维普资讯 http://www.cqvip.com

103~108

人实体瘤抗癌药物敏感试验MTT法的建立△

病理生理教研室 汤为学 骆云鹏 王瑞雪

R979.1

提 要 本文探讨用MTT法进行人实体瘤抗癌药敏试验的条件和影响因素，结果表明该法之最适肿瘤细胞浓度为0.5—1×10⁵个/孔，最适培养时间为三天。167例实体瘤的八种抗癌药物敏感试验结果说明其与肿瘤细胞生长特性、病理类型和肿瘤标本取材部位等因素有关。MTT法有操作简单、重复性好、成功率较高、便于推广等优点

关键词 MTT法；肿瘤；抗癌药物敏感试验

中图分类号 R979.1

肿瘤化疗研究在近40年来取得巨大进步，挽救或延长了不少肿瘤患者生命。但迄今恶性肿瘤化疗仍停留于按文献资料及临床传统经验给药，疗效常不尽满意。实践提示，不同肿瘤虽病理诊断属同一类型，但其对抗癌药物的敏感性却有明显差异。因之，如何选择对某一具体肿瘤有效的抗癌药物引起人们普遍关注。目前，抗癌药物敏感试验国内外已有不少报道[1-5]。1983年Mosmann用MTT（四甲基偶氮唑盐）显色法测定细胞生长；1987年Carmicheal等成功地将MTT法用于细胞株进行药物筛选[6]；1988年Pieters等又应用于急性白血病细胞的抗癌药物筛选[7]；1990年Wilson、Sargent用于卵巢恶性肿瘤的药物敏感试验[8]。但国内用MTT法进行人实体瘤抗癌药物敏感试验尚无报道。本文研究MTT法[9,10]用于167例人实体瘤抗癌药物敏感性测定，并探讨其最适条件及影响因素。

材料和方法

1. 材料

（1） 人实体瘤标本来源：重庆医科大学附一院、二院、儿科医院等手术切除新鲜肿瘤组织，包括卵巢粘液性囊腺癌1例、卵巢浆液性囊腺癌9例、子宫内膜癌4例、输卵管腺癌2例、内胚窦瘤2例、克洛根勃氏瘤2例、卵巢低分化癌1例、腹膜恶性间皮瘤1例、腹膜乳头状腺癌1例、卵巢含睾丸母细胞癌1例、肺腺癌19例、肺鳞癌5例、食道鳞癌5例、胃腺癌20例、直肠腺癌39例、结肠腺癌12例、盲肠腺癌1例、肛管腺癌2例、乳腺癌腹壁转移性结节1例、肾癌腹壁转移性结节1例、膀胱腺癌9例、小脑胶质细胞瘤1例、神经母细胞瘤1例、卵黄囊瘤2例、肝细胞癌4例、视网膜母细胞瘤3例、肾胚胎瘤1例、脑膜瘤1例、胰腺癌淋巴结转移1例、鞘膜瘤1例、恶性混合生殖细胞瘤1例，淋巴肉瘤3例，共167例。

（2） 培养液：RPMI—1640（美国，GIBCO），新生牛血清（本校微生物教研室提供），青霉素10万u/L，链霉素0.1g/L。

（3） 四甲基偶氮唑盐（MTT）、胶原酶、DNA酶（美国，Sigma）。

（4） 二甲亚砜（DMSO，北京化工厂）。

（5） 96孔培养板（美国，Corning）。

（6） 抗癌药物：丝裂霉素C（MMC，日本协和发酵工业株式会社）、柔红霉素（DNR，意大利，Farmitalia）、氨甲喋呤（MTX，上海第十二制药厂）、长春新碱（VCR，上海第十一制药厂）、顺

△ 卫生部资助科研课题

维普资讯 http://www.cqvip.com

铂（CDDP，云南个旧市生物化学制药厂）、卡铂（Carboplatin，济南齐鲁制药厂）、足叶乙甙（VP_{16-213}，江苏连云港制药厂）、5-氟尿嘧啶（5-Fu，天津市人民制药厂）等。

2.方法 将手术切除的新鲜肿瘤组织（约1cm³大小），在超净台上清除脂肪、纤维组织、血块和坏死组织。Hanks液洗净，经机械及酶（0.2%胶原酶和0.002% DNA酶）处理，制成肿瘤单细胞悬液[11-14]。如混有较多红细胞，应低渗去除。洗涤二次，台盼兰染色，计算活细胞数。调整活细胞浓度至5×10^3—5×10^6个/ml，将细胞悬液接种于96孔培养板内，每孔200μl。实验包括试剂对照组、肿瘤细胞阴性对照组、肿瘤细胞阳性对照组（内加lectin）及加不同抗癌药物的实验组。各种抗癌药物按规定稀释成三种不同浓度，每种浓度作三个平行孔，每孔加抗癌药物20μl，置37℃、7%CO_2湿性孵育箱内培养24—96h后，500×g离心10min，弃上清，每孔加200μl1640培养液及20μl MTT（5mg/ml），再培养4h后，离心、弃上清，每孔加DMSO 200μl。用微量振荡器（wz-2A型，北京海淀电子医疗仪器厂）摇振5min，在自动酶标读数仪（Bio-Rad E2550型）上比色，波长600nm[15]，测出每孔光密度值。

计算：肿瘤细胞存活率＝

$$\frac{\text{实验组光密度值}}{\text{肿瘤细胞阴性对照组光密度值}}\times100\%$$

结果判定[16]：

肿瘤细胞存活率＜30%，则该药为高度敏感

肿瘤细胞存活率30—50%，则该药为中度敏感

肿瘤细胞存活率＞50%，则该药为不敏感

结　果

1.每孔最适肿瘤细胞接种数 将肿瘤单细胞悬液分别配制成1×10^6、5×10^5、1×10^5、5×10^4、1×10^4、5×10^3、1×10^3、5×10^2及1×10^2个/孔等系列稀释度，分别接种于96孔培养板，每孔200μl，不加抗癌药，按前述方法操作，培养72h，并测定光密度值（图1）。图1显示随细胞数增加，所测光密度值增大。当细胞浓度≥5×10^5个/孔时光密度值接近或等于2.5，细胞浓度＜1×10^3个/孔时光密度值＜0.2。细胞浓度为0.5—1×10^5个/孔时，则可获得理想的光密度值。

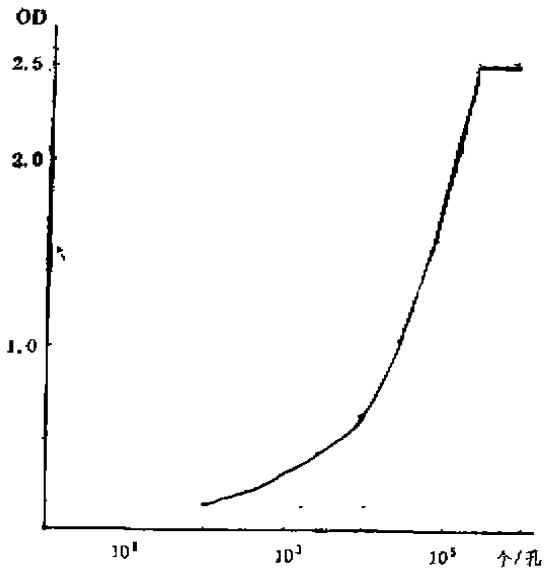


图1 肿瘤细胞数与光密度值的关系（卵巢浆液性囊腺癌DP.9032）

2. 肿瘤细胞培养时间选择 接种瘤细胞（肺腺癌，按1×10^5、0.5×10^5、1×10^4个/孔三种浓度）于板孔，置37℃、7%CO_2湿性孵育箱，分别培养24、48、72和96h，测得不同瘤细胞浓度在不同时间内的光密度值。结果见培养96h后细胞活力降低，培养72h前细胞活力仍较好（图2）。用5-Fu、

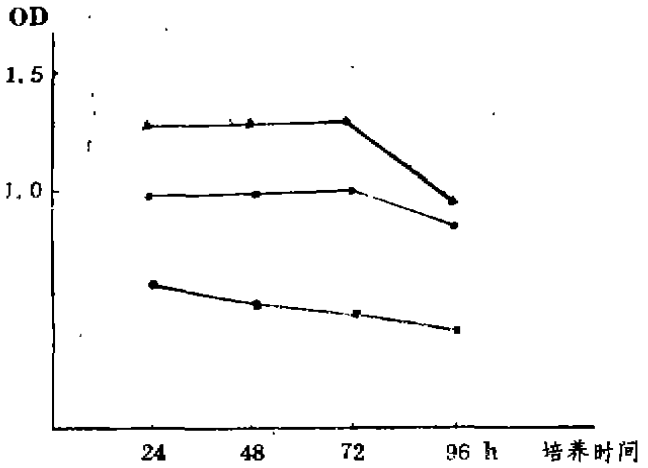


图2 肿瘤细胞培养时间与光密度值的关系（肺腺癌，DP.9023）

▲—1×10^5个细胞/孔，●—0.5×10^5个细胞/孔，●—1×10^4个细胞/孔

维普资讯 http://www.cqvip.com

MMC、VCR、MTX、CDDP分别作用24、48、72和96h(肺腺癌，细胞浓度1×10^5个/孔)，测其肿瘤细胞存活率变化（图3)。

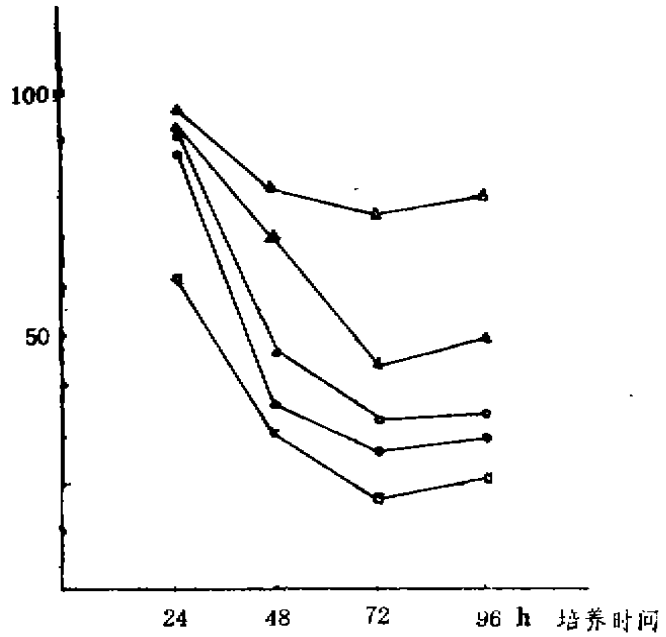


图3 五种抗癌药物作用时间与肿瘤细胞存活率关系（肺腺癌，DP.9023)

△—MTX(10μgml^{-1}) ▲—VCR(1μgml^{-1}) ○—MMC(1μgml^{-1})
●—5-Fu(100μgml^{-1}) □—CDDP(10μgml^{-1})

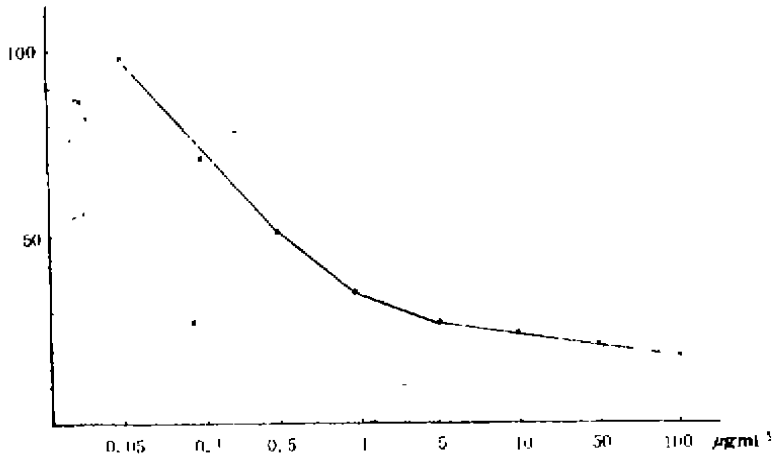


图4 CDDP浓度与肿瘤细胞存活率关系（卵巢粘液性囊腺癌，DP.9006)

需要采用灭菌生理盐水或注射用水稀释CDDP、MMC和VCR成100、50、10、5、1、0.5、0.1和0.05μgml^{-1}等浓度，分别加入96孔板，作用于癌细胞(卵巢粘液性囊腺癌，细胞浓度1×10^6个/孔)，培养72h，测得不同剂量药物作用下肿瘤细胞存活率变化（图4.5.6)。可见随药物浓度增加，肿瘤细胞存活率减少。

4.重复性试验 以输卵管腺癌、子宫内膜癌、卵巢粘液性囊腺癌、肺腺癌、直肠腺

维普资讯 http://www.cqvip.com

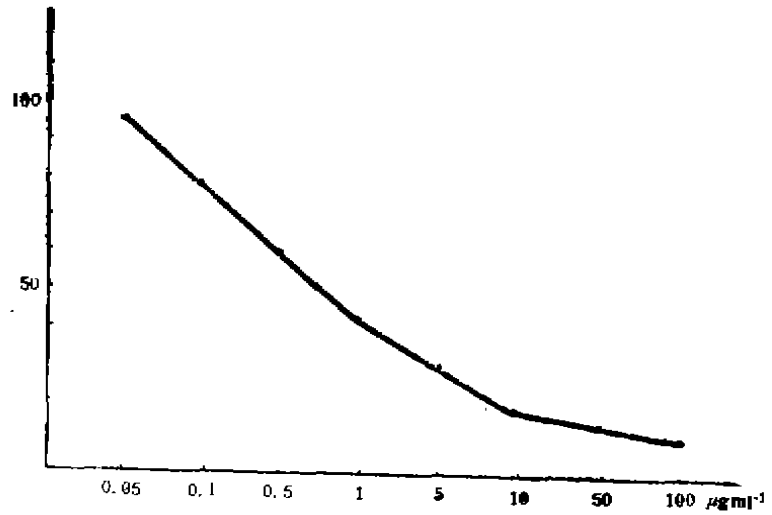


图5 MMC浓度与肿瘤细胞存活率关系（卵巢粘液性囊腺癌，DP.9006）

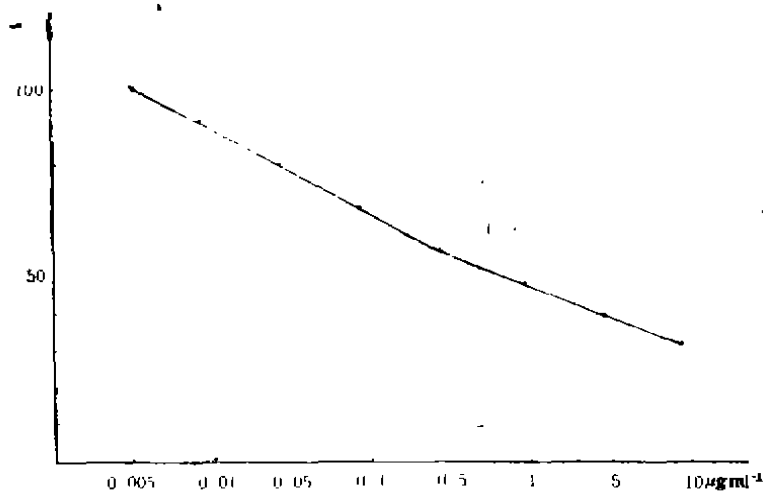


图6 VCR浓度与肿瘤细胞存活率关系（卵巢粘液性囊腺癌，DP.9006）

表1 MTT法用于人实体瘤抗癌药物敏感试验的组内重复性实验

标本名称	n	OD ±SD	CV%
输卵管腺癌	4	1.3493±0.0522	10.3
子宫内膜癌	4	0.9660±0.0247	9.0
卵巢粘液性囊腺癌	4	1.1370±0.0317	12.2
肺腺癌	4	0.5245±0.0152	9.9
直肠腺癌	4	0.8638±0.0184	6.2
卵巢低分化癌	4	1.1510±0.0399	9.2
腹膜乳头状腺癌	4	0.9960±0.0262	9.0

癌、卵巢低分化癌、腹膜乳头状腺癌7例标本分析MTT法用在人实体瘤抗癌药物敏感性测定时的重复性（表1）。结果表明重复性较好，CV为10%左右。

5.实验成功率 通过167例实体瘤药敏试验检测，我们认为MTT法药敏试验成功

维普资讯 http://www.cqvip.com

必须符合(1)测试系统中无污染；(2)培养瘤细胞分散良好，以使结果符合统计要求；(3)培养瘤细胞生长良好，光密度值须达到0.5以上（图1)。我们所做167例实体瘤标本，136例成功，成功率81.4%（表2)。

表2 各种类型肿瘤MTT法抗癌药敏试验成功数

肿瘤类型	例数	实验成功例数
腺癌	135	114
鳞癌	10	6
皮下转移性癌结节	2	0
其他肿瘤	20	16
合计	167	136

讨论

1977年Salmon[1]建立人类肿瘤原代细胞生长的双层琼脂培养，为肿瘤干细胞克隆分析和体外抗癌药物筛选打下基础，嗣后，Friedman建立^{3}H-TdR掺入人类肿瘤细胞克隆药物敏感试验。以上二种方法技术设备要求较高。MTT法于1983年由Mosmann提出，该法利用活细胞内线粒体脱氢酶能将MTT转化为兰紫色衍生物甲臜（formazam）的原理来检测活细胞数目。因为产物甲臜颜色深浅（可以OD值表示）与活细胞数成正比，而且OD值可以在自动酶标读数仪上连续记数。故本组利用此原理测定抗癌药物作用后OD值变化，并计算出肿瘤细胞存活率，从而预测患者体内肿瘤细胞对某抗癌药物敏感程度，据此建立MTT法用于人实体瘤抗癌药物敏感性检测。

实验成功率 我们的研究显示抗癌药物敏感试验与(1)恶性肿瘤的病理类型和肿瘤细胞生长情况有关，如肿瘤类型为腺癌，肿瘤细胞生长良好，试验成功数较高（表2)。(2)肿瘤标本取材部位有关，如所取肿瘤标本靠近肿瘤边缘，则内含活细胞较多，药敏成功率较高。如取于较大肿瘤的中心部位，则内含坏死组织较多，药敏成功率较低。本组共有31例失败，其中4例腺癌因坏死组织较多；13例消化道肿瘤因污染；其余14例(5例腺癌、3例鳞癌、2例皮下转移性癌结节、4例其他肿瘤)因肿瘤细胞太少或生长不良而未获成功。肿瘤单细胞悬液常混有非恶性细胞如白细胞及成纤维细胞，但量极少，又白细胞代谢活性低[17]，成纤维细胞在短期培养时增殖少，而肿瘤细胞占有极高百分率，故我们认为非恶性细胞对MTT法药敏试验结果影响较少。

随药物浓度增加，肿瘤细胞存活率下降（图4.5.6)。根据Alberts研究，抗癌药物敏感试验药物浓度为血峰$\frac{1}{10}$能正确反映该药对某一肿瘤细胞的敏感性。本组药敏试验所用各种药物浓度都按此给予。

根据Salman[18]、富田[3]等报道，某抗癌药物的药敏试验结果与临床疗效一样敏感，即真阳性率为60—70%，某一药物的药敏试验结果与临床疗效一样均不敏感，即真阴性率为90%左右。本组MTT法用于临床时间尚不够长，但抗癌药敏检测应用于晚期卵巢恶性肿瘤患者，近期效果满意（如××女42岁复发性转移性卵巢腺癌（DP.9184)，再次手术，属残瘤者，术后根据药敏结果进行三个月化疗，结果癌块由10cm缩小至6cm，腹水消失。）远期疗效正在观察之中。因此抗癌药物敏感试验能较好反映个体药物敏感性，有助于临床医师正确部署化疗方案，并减少药物对患者的毒副作用，因而肿瘤患者在化疗前作抗癌药物敏感试验十分必要。

MTT法抗癌药物敏感试验操作简单、重复性好、成功率较高、易于推广。此外我们应用本法于血液恶性肿瘤的骨髓血和癌性胸腹水药敏检查，亦收到理想效果（将另文报道)。

（本研究承范维珂教授支持并审阅全文；叶之美副教授提供临床资料；重医大附一院妇产科、普外科、胸外科、泌尿外科、脑外科、血液科，附二院

维普资讯 http://www.cqvip.com

妇产科、胸外科，儿科医院外科，重庆长航医院内科、市第三人民医院眼科等提供肿瘤标本；重医大病理生理教研室、病理解剖教研室同志的支持，在此一并致谢！）

参 考 文 献

[1] Hamburger AW and Salmon SE. Science, 1977; 197:461

[2] Tomita K, Yokoyawa S. Cancer, Chemother, Pharmacol. 1986; 18:133

[3] 富田勝郎. 日本癌治会誌. 1989; 24(1):83

[4] 许德凤，等.《肿瘤防治》全国肿瘤防治学术讨论会论文集. 1989; pp. 1009

[5] 陈建超，等.《肿瘤防治》全国肿瘤防治学术讨论会论文集. 1989; pp. 1007

[6] Carmicheal J, et al. Cancer Res. 1987; 47:936

[7] Pieters R, et al. Cancer Cell. 1988; 41:323

[8] Wilson JK, Sargent JM, et al. The British Journal of Cancer. 1990; 62(2):189

[9] Mosman T, et al. J Immuno Methods. 1983; 65:55

[10] 薛彬，等. 北京医科大学学报. 1987; 19:125

[11] Leibovitz A, Liu. R, et al. Int. J. Cell Cloning. 1983; 1, 478

[12] Hamburger AW, et al. Cancer Res. 1978; 38:3438

[13] Pavelie ZP, et al. Cancer Res. 1980; 40:2160

[14] Cin PD, et al. 国外医学《遗传学分册》. 1986; 4:189

[15] 王瑞雪，等. 重庆医科大学学报. 1991; 16(4):330

[16] Salmon SE. Cancer Treat. Rep. 1984; 68(1):117

[17] Hongo T, et al. Jpn J. Cancer Chemother. 1987; 14:472

[18] Salmon SE, et al. Alan R, Liss, Inc. 1980; 223

（收稿日期：1991-08-22）

DETERMINATION OF ANTICANCER DRUG SENSITIVITY TEST BY THE MTT COLORIMETRIC ASSAY FOR HUMAN SOLID TUMORS

Tang Weixue, et al

Department of Pathophysiology

We studied the methodology of 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) colorimetric assay for anticancer drug sensitivity test of human solid tumors. Results showed that the optimal cell concentration per well is $0.5\text{-}1\times10^5$, the optimal incubation period for the action of anticancer drugs on tumor cells is three days. The concentration of anticancer drugs used should be varied with different drugs. We observed 167 samples of human solid tumors. The applicability of this test is concerned with the growth characteristics of tumor cells, histological types of malignancy, and the resected portion of the tumor specimen. The MTT colorimetric assay is a simple, rapid and reliable method for anticancer drug sensitivity test of human solid tumors

KEY WORDS MTT colorimetric assay; Tumor; Anticancer drug sensitivity