DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.025
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
712 2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)08-0712-03

人肺癌细胞原代培养药敏检测及4种耐药相关蛋白表达的研究

刘凌志,周向东,黄桂君,钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 采用MTT法对人肺癌细胞药物敏感性进行研究。方法 对26例外科手术标本进行原代细胞培养,用MTT法对培养成功者进行阿霉素(ADM)、顺铂(DDP)、长春新碱(VCR)和足叶乙甙(VP16)4种化疗药的药敏实验,并应用免疫组化法检测其中10例肺癌组织TOPOⅡ、p53、bcl-2和GST-π的表达。结果 21例培养成功者药敏检测表明ADM、DDP、VCR和VP16 4种化疗药的有效率分别为19.0%、38.1%、23.8%和23.8%。10例对上述4种化疗药有不同程度耐药的肺癌组织有不同程度TOPOⅡ、p53、bcl-2和GST-π的表达。结论 用手术切除的肺癌组织进行肿瘤细胞原代培养和MTT法检测细胞对化疗药物的反应性是可行的,药敏实验的结果对临床用药具有提示作用。检测手术肺癌组织的TOPOⅡ、p53、bcl-2和GST-π表达,对判定耐药具有一定的提示意义。

关键词:肺肿瘤;药敏实验;抗癌药;免疫组织化学
中图法分类号:R730.23;R734;R969.3 文献标识码:A

Study of the drug sensitivity of primary cultured lung cancer cells and the expressions of four drug resistance related proteins

LIU Ling-zhi, ZHOU Xiang-dong, HUANG Gui-jun, QIAN Gui-sheng (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the drug sensitivity of chemotherapeutic drugs by MTT method. Methods Twenty five lung cancer specimens obtained by operation were used for primary culture and the sensitivity of the cancer cells to four drugs, adriamycin (ADM), cis-dichlorodiamine platinum (DDP), vincristine (VCR) and etoposide (VP16), was tested by MTT assay. TOPOⅡ, p53, bcl-2 and GST-π proteins in 10 cases of lung cancer tissue were determined by immunohistochemistry. Results The successfully obtained results in 21 cases showed that the effective rate of ADM, DDP, VCR and VP16 was 19.0%, 38.1%, 23.8% and 23.8% respectively. Positive expressions of TOPOⅡ, p53, bcl-2 and GST-π proteins were found in lung cancer tissue in the 10 cases which had different multi-drug resistance (MDR) to the four drugs. Conclusion It is possible to test the drug sensitivity of the primary cultured lung cancer cells obtained from operation by MTT method and the results are useful for the selection of anticancer drugs. The expressions of TOPOⅡ, p53, bcl-2 and GST-π are factors to determine MDR for lung cancer cells.

Key words: lung cancer; drug sensitivity assay; anticancer drug; immunohistochemistry

肺癌是严重危害人类健康的疾病,约80%病例确诊时已失去手术时机,化疗是主要的治疗手段之一。肿瘤细胞产生耐药性是化疗失败的主要原因,因此,肺癌化疗的最佳措施是治疗的个体化。临床研究中,体外药敏检测对用药具有较好的指导意义,在诸多方法中,MTT法因其敏感性和简便性而被普遍采用。随着对肿瘤细胞耐药机制的了解,目前认为拓扑异构酶(Topoisomerase, TOPO)Ⅱ、p53、bcl-2和谷胱甘肽-S-转移酶(Glutathione-S-transferase, GST)-π在肿瘤耐药发生中起一定作用。本实验应用外科手术切除的肺癌组织进行原代细胞培养,采用MTT法检测4种临床常用肺癌化疗药物的敏感性,免疫组化法检测TOPOⅡ、p53、bcl-2和GST-π的表达,探讨肺癌细胞原代培养药敏检测的可行性及药敏结果与上述几种蛋白表达的关系。

基金项目:重庆市卫生局医学科研资助项目(00-2001);第三军医大学疾病基因资助项目(2001)

作者简介:刘凌志(1972-),女,辽宁省沈阳市人,博士,主治医师、讲师,主要从事肺癌方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68755320

收稿日期:2001-11-22;修回日期:2002-10-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　标本来源

26 例手术标本来自新桥医院和西南医院胸外科。其中男性患者 18 例, 女性 8 例, 年龄 34～77 岁。病理类型: 鳞癌 7 例, 腺癌 12 例, 细支气管肺泡癌 4 例, 大细胞癌 1 例, 小细胞肺癌混合腺癌 1 例, 肉瘤 1 例。

1.2　选用药物

选用盐酸阿霉素(Adriamycin, ADM, 深圳万东药业有限公司)、长春新碱(Vincristine, VCR, 广州明兴制药厂)、顺铂(Cisplatin, DDP, 昆明三戊贵金属药业有限公司)和足叶乙甙(Etoposide, VP16, 江苏恒瑞医药股份公司)4 种药物, 分别用无菌三蒸水配成母液保存于－20 ℃, 工作液随配随用。每种药物设置 5 个浓度点, 其范围为血峰值× 10^{-1} ～血峰值× 10^{1}。

1.3　原代肺癌细胞培养

手术切除的肺癌组织标本立即浸入含青、链霉素各 500 U/ml 的 4 ℃预冷的 Hanks 液中, 1 h 内用 D-Hanks 漂洗数次、离心。将适量癌组织剪碎, 序贯经胰蛋白酶、胶原酶和 RNA 酶消化。1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 加入 Hanks 液吹打, 200 目筛网过滤。低渗法去除红细胞后, 将所得细胞悬液 1 000 r/min离心 5 min, 沉淀加入 RPMI1640 培养液(含青、链霉素各 500 U/ml 和二性霉素 B 2.5 μg/ml)。台盼蓝染色计数活细胞数＞90%, 调细胞数至约 10^{4}～5× 10^{5} 个/ml, 加入 96 孔板, 每孔 200 μl, 置于含 5% CO_2 的培养箱中培养。

1.4　MTT 法药敏试验

细胞培养 12 h 后, 向相应孔内加入不同浓度的 4 种化疗药物, 阴性对照为细胞悬液中不加化疗药物, 空白对照为 RPMI 1640 加血峰浓度的化疗药物, 设双复孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl, 继续培养 4 h。离心, 小心吸去各孔中上清液, 每孔加入二甲基亚砜 200 μl, 混匀, 振荡培养板 10 min, 使孔中沉淀完全溶解。在 DG3022A 型酶联免疫检测仪(华东电子管厂)上, 以 490 nm 波长测定 *A* 值。

活性抑制率=(阴性对照组 *A* 值－加药组 *A* 值)/阴性对照组 *A* 值× 100%。

当加药组血峰浓度水平时的抑制率大于 50%时, 即为药物有效。

1.5　TOPO Ⅱ、p53、bcl-2 和 GST-π 的表达

应用免疫组化方法检测上述四种蛋白的表达, 由新桥医院病理科常规检查。TOPO Ⅱ、p53、bcl-2 和 GST-π 即用型抗体均为来自于小鼠的单克隆抗体(Santa Cruz 公司产品, 购于北京中山生物技术有限公司)。

1.6　统计学方法

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　肺癌细胞原代培养结果

原代培养生长良好、细胞数达到药敏实验要求则视为成功。26 例标本中成功 21 例, 其中男性患者 15 例, 女性 6 例。病理类型: 鳞癌 6 例, 腺癌 10 例, 细支气管肺泡癌 4 例, 大细胞癌 1 例。失败 4 例, 3 例因取材标本太小, 1 例为污染, 1 例为肉瘤而未计入统计资料。

2.2　MTT 法药敏试验结果

21 例肺癌细胞中 9 例表现为完全耐药(9/21), 12 例对 4 种药物有不同程度的敏感性, 其中四药敏感 2 例(2/21), 三药敏感 2 例(2/21), 两药敏感 2 例(2/21), 单药敏感 6 例(6/21)。6 例鳞癌中, 2 例完全耐药, 2 例完全敏感; 10 例腺癌中 4 例完全耐药; 4 例细支气管肺泡癌中 2 例完全耐药; 1 例大细胞癌完全耐药。各药对不同类型肺癌有效强度不一, 鳞癌 DDP(4/6)＞ VCR(3/6)＞VP16(2/6)和 ADM(2/6); 腺癌 DDP(4/10)＞ VCR(2/10)和 VP16(2/10)＞ ADM(1/10); 细支气管肺泡癌 VP16(1/4)、ADM(1/4)。4 种药物作用的比较见表 1。

表 1　4 种化疗药物对 21 例肺癌细胞的作用

Tab 1　Effect of 4 anticancer drugs on 21 cases of lung cancer cells

Drug	No. of efficacy	No. of non-efficacy	Rate of efficacy
ADM	4	17	4/21 *
DDP	8	13	8/21 *
VCR	5	16	5/21 *
VP16	5	16	5/21 *

*: $P<0.05$ *vs* DDP

2.3　TOPO Ⅱ、p53、bcl-2 和 GST-π 的表达

检测 10 例对 4 种化疗药物有不同程度耐药标本的 TOPO Ⅱ、p53、bcl-2 和 GST-π 表达结果提示, 对化疗药物耐药的肺癌组织上述 4 种蛋白有不同程度的表达, 见表 2。

表 2　10 例肺癌组织 4 种蛋白的表达

Tab 2　Expression of 4 types of proteins in lung cancer tissue in 10 cases

Pathological type	*n*	Number of positive expression			
		TOPO Ⅱ	p53	bcl-2	GST-π
Squamous carcinoma	1	0	1	0	0
Adenocarcinoma	7	3	5	2	4
Big cell lung carcinoma	1	1	1	0	0
Bronchiolalveolar carcinoma	1	0	0	1	1

3　讨论

由于肿瘤耐药的多样性和多变性, 临床治疗中, 建立肿瘤药敏检测系统, 使肿瘤化疗个体化是十分必要的。已用于药敏实验的方法有裸鼠移植法、拒染法、结晶紫法、集落形成法和氚标胸腺嘧啶掺入法等。MTT 是一种四氮唑化合物, 其分子中的四唑环只在活细胞线粒体内琥珀酸脱氢酶作用下发生断裂, 形成蓝色沉淀物甲月赞, 溶解后可被分光光度仪检测, 光吸收值能表示存活细胞的量。自 20 世纪 80 年代 Mosmann[1] 建立噻唑蓝(MTT)法测定细胞活度以来, 用该方法进行

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

体外药敏检测因其简便易行和高敏感性而备受青睐。

在肿瘤多学科综合治疗中，化疗起着十分重要的作用，其效果影响患者的预后。应用临床手术标本在体外进行原代细胞培养并行药敏检测，可望为术后病人的化疗提供用药依据。我们进行26例组织标本的原代细胞培养，成功21例，其余1例病理检查为肉瘤，1例为微生物污染，3例因取材过小，达不到细胞培养和药敏实验的要求。污染的1例标本为鳞癌，有空洞和液化、坏死，故标本本身已有污染，虽经含高浓度抗生素的平衡盐溶液漂洗，培养仍很难成功。我们的经验是，标本足够大、取材时避免污染、培养过程中注意严格无菌操作，可获得很高的培养成功率。ADM、DDP、VCR和VP16是临床常用的肺癌化疗药物，我们的结果初步显示，21例肺癌细胞对DDP的敏感性最高，而对其它3种药物敏感性相近，这与国外的研究结果一致[2]，提示DDP仍是肺癌化疗中疗效较高的药物之一。

目前认为肿瘤的多数耐药性(MDR)系多种因素所致，包括p170糖蛋白、多药耐药相关蛋白和肺耐药蛋白的高表达，谷胱甘肽S转移酶和谷胱甘肽的改变，拓扑异构酶活力降低，凋亡抑制，DNA损伤修复能力增强，蛋白激酶C的变化等。已有的研究发现，TOPOⅡ基因表达对小细胞肺癌(Small cell lung cancer，SCLC)患者对化疗药物的反应和预后具有指导意义[3]。GST-π的高表达则可能是抗药性的标志之一，Arai等[4]应用免疫组织化学法检测了89例非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer，NSCLC)患者肺癌组织GST-π的表达，认为GST-π在肿瘤细胞对包括铂类在内的烷化剂产生耐药的过程中起着重要作用，可用来预测化疗的反应性。应用bcl-2反义寡核苷酸可促进SCLC细胞的凋亡，且该反义寡核苷酸协同VP16、ADM和DDP的细胞毒作用[5]。p53基因在肺癌的异常改变主要是第5至8外显子的突变，见于56%～100%的SCLC和25%～75%的NSCLC，该基因有突变的肺癌患者生存期或生存率明显低于阴性者。Kawasaki等[6]发现NSCLC患者化疗前p53高表达预示抗顺铂等化疗药物治疗及预后不佳。我们发现10例对化疗药物耐药的肺组织TOPOⅡ、突变型p53、bcl-2和GST-π 4种蛋白表达的阳性率分别为40%、70%、30%和50%，表明上述4种物质与肺癌细胞多MDR密切相关。TOPOⅡ、p53、bcl-2和GST-π异常导致MDR的机制如下：①TOPOⅡ基因的点突变可改变其特定的氨基酸序列，使TOPOⅡ发生质或量的改变，直接影响TOPOⅡ与DNA结合，导致裂解复合物减少、DNA裂解抑制而产生耐药。②GST能催化亲电物质与其结合，并可与亲脂性细胞毒药物结合增强其水溶性，促进药物排泄而降低抗癌药物的作用。③bcl-2是最重要的抑制细胞凋亡的基因，其过度表达可以促进细胞的生存，它同时也抑制射线、化疗药物诱导的细胞凋亡，该基因的高水平表达与多种化疗药物诱导的细胞凋亡抑制显著相关而导致耐药。④野生型p53可诱导DNA受损伤的细胞进入G_1/G_0静止期，抑制细胞增殖，直到损伤DNA得到修复，若修复失败，则诱导细胞凋亡。当p53基因发生缺失、突变等致表达异常时，其对凋亡过程的调控也会发生异常，化疗药物所诱发的细胞凋亡受到抑制，导致肺癌细胞对化疗药物的耐受显著增强[7]。同时p53基因的突变也可能特异性地激活MDR-1/P-gp启动子，使肿瘤细胞产生MDR。

综上所述，用手术切除的肺癌组织进行肿瘤细胞原代培养和MTT法检测细胞对化疗药物的反应性是可行的，药敏实验的结果对临床用药具有提示作用。检测手术肺癌组织的TOPOⅡ、p53、bcl-2和GST-π表达，对判定耐药具有一定的提示意义。

参考文献：

[1] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1—2): 55—63.

[2] Ettinger D S. Is there a prefered combination chemotherapy regimen for metastastic nonsmall cell lung cancer[J]. Oncologist, 2002, 7(3): 226—233.

[3] Dingemans A M, Witlox M A, Stallaert R A, *et al*. Expression of DNA topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(8): 2048—2058.

[4] Arai T, Yasuda Y, Takaya T, *et al*. Immunohistochemical expression of glutathione transferase-pi in untreated primary non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Detect Prev, 2000, 24(3): 252—257.

[5] Zangemeister W U, Schenker T, Luedke G H, *et al*. Synergistic cytotoxicity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 1998, 78(8): 1035—1042.

[6] Kawasaki M, Nakanishi Y, Kuwano K, *et al*. The utility of p53 immunostaining of transbronchial biopsy specimens of lung cancer: p53 overexpression predicts poor prognosis and chemoresistance in advance non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(7): 1195—2000.

[7] Tanaka F, Takata T, Yamada T, *et al*. Apoptotic tumor-cell death in response to cell proliferation is influenced by p53 status in resected non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2002, 36(1): 27—32.

（编辑 冯崇英）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net