DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.015


# 纤支镜活检组织肺癌细胞原代培养药敏检测意义的初步探讨

熊 玮 沈寒放 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科)重庆, 630038

提 要 目的: 探索经纤支镜活检肺癌组织进行原代癌细胞培养、体外药敏试验的可行性,试图减少临床肺癌化疗的盲目性。方法: 对 46例经纤支镜活检肺癌组织进行原代细胞培养,并用 MTT法首次对培养成功者行长春新碱(VCR)、足叶乙甙(VP16)、顺铂(DDP)三种药药敏检测;临床应用 COEP或 COFP基本方案化疗一疗程, 2月~ 3月后复查并与体外药敏结果相比较。结果: 10例培养成功者药敏检测均获满意结果。7例体外药物敏感者, 6例临床化疗有效, 1例表现为临床耐药; 3例体外耐药者,临床化疗均无效。MTT法药敏结果预测临床肺癌化疗近期疗效的总符合率为 9/10(90%),阳性符合率为 6/7(85.7%),阴性符合率 3/3(100%)。结论: 经纤支镜活检组织可行原代肺癌细胞培养及 MTT法药敏检测,其结果代表性强、针对性好,与临床肺癌化疗近期疗效间有良好的一致性。此研究有可能加速不能手术肺癌患者化疗的个体化进程。

关键词 肺肿瘤;肿瘤细胞,培养的;药敏试验
中图法分类号 R73-351

肺癌化疗的最佳措施是抗癌治疗的个体化。80%肺癌病例确诊时已失去手术时机,其化疗均带有盲目性,严重地影响着肺癌化疗的个体化进程。体外药敏检测对临床化疗用药有较好的指导意义,在诸多方法中,以 MTT法最受人青睐。目前国内外肺癌体外药敏试验的研究取材为细胞株、手术切除癌块及转移癌灶[1,2]。本文应用经纤支镜活检肺癌组织进行原代细胞培养,利用 MTT法测试各个体肿瘤对三种临床常用肺癌化疗药物的敏感性,并观察其近期疗效;试图探讨其可行性及临床应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织细胞来源

本实验对 46例经纤支镜活检肺癌组织进行原代细胞培养,其中男性 38例,女性 8例,年龄 26~ 74岁。组织细胞类型:鳞癌 28例,腺癌 10例,小细胞肺癌 8例。并对培养成功的 10例行药敏检测。

### 1.2 药物设置

选用足叶乙甙(VP16)、长春新碱(VCR)、顺铂(DDP)三药物,分别用三蒸水或 20%酒精配成母液保存于 -25℃冰箱中,工作液随配随用。每种药物设置血峰值一个浓度点(VP16: 2 cg/L, VCR: $5\times10^{-1}$ mg/L, DDP: 2 cg/L)。对照组为对照I 与对照II,对照I 为细胞悬液加 PBS,对照II 为培养液加抗癌药物;设双复管。

### 1.3 原代肺癌细胞培养

经纤支镜在支气管腔内无菌取出肺癌组织约 50mg,立即浸入含青霉素、链霉素各 500 U/ml的 4℃ Hanks液中,随后漂洗数次、离心。将组织剪碎至 0.5 $mm^3$ 大小,序贯经胰蛋白酶、II 型胶原酶和 DNA酶消化。离心、弃去上清液,加 Hank's液吹打、铜网过滤;去红细胞、细胞沉淀加入 RPMI-1640完全培养液中。台盼兰染色、活细胞计数并调整细胞浓度,制成 $6\times10^{3}$~ $8\times10^{5}$个活细胞/ml的细胞悬液。置于 5% $CO_2$、95%空气、100%饱和水蒸汽的 37℃二氧化碳培养箱中培养。

### 1.4 培养细胞的鉴定

取培养 3 d的细胞离心、沉淀涂片、吹干,分别行角蛋白 ABC法组化染色和 HE染色。

### 1.5 MTT法

参照文献报道方法[1]并加改进,实验中离心后采用快速翻转法弃除上清液。

### 1.6 体外药敏结果与临床反应关系观察

小细胞肺癌采用 COEP基本方案,非小细胞肺癌采用 COFP基本方案。具体为: COEP方案: 第 1天, VCR 2 mg静脉推注;第 2, 4天, DDP 40 mg/d静滴;第 5、7、9天, VP16 100 mg/d静滴;环已亚硝脲(CCNU)100 mg于疗程的最后一天服用,每两周为一周期,两周期为一疗程。COFP方案: 第 1天, VCR 2 mg静推;第 2至 4天, DDP 40 mg/d静滴;第 8~10天, 5-氟脲嘧啶(5-Fu)500 mg/天静滴;环已亚硝脲于疗程的最后一天服用;每三周一次,两次为一疗程。按照国家恶性肿瘤疗效判断标准,观察治疗后 2~ 3个月内的情况,并与体外药敏结果相比较。

## 2 结果

### 2.1 各类型肺癌细胞培养结果见表 1

本实验中若生长良好的癌细胞数达到药敏试验要求数,才列为培养成功。46例标本中 10例培养成功,失败 36例,其中 33例因细胞数太少, 3例因微生物污染。

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

表 1　三种类型肺癌培养结果

**Tab 1　The culture results of three types of lung cancers**

| Types | *n* | Results of culture | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Success | Non-success | Successive rate(%) |
| Squamous cancer | 28 | 5 | 23 | 17.86 |
| Adenocarcinoma | 10 | 2 | 8 | 20.00 |
| Small cell cancer | 8 | 3 | 5 | 37.50 |
| Total | 46 | 10 | 36 | 21.74 |

### 2.2　培养细胞角蛋白免疫组化分析

10例培养成功的细胞,培养 3 d后涂片角蛋白 ABC法组化分析,10例培养细胞之细胞浆均染成棕褐色,计为强阳性,表明所培养细胞来源于上皮组织。HE染色确定为各类型肺癌细胞。

### 2.3　MTT法药敏试验结果

本研究中用于药敏试验的 10例肺癌细胞均获成功,其中 5例鳞癌,3例小细胞癌,2例腺癌。以用药组活性抑制率> 50%为药物敏感的标准,结果显示,10例肺癌细胞中 7例对药物有不同程度的敏感,3例表现为完全耐药。三药对不同类型肺癌细胞有效强度不一,鳞癌 $VP_{16}$(3/5)> DDP(2/5)> VCR(1/5);腺癌 VCR(1/2)、DDP(1/2);小细胞癌 $VP_{16}$(3/3)> DDP(2/3)及 VCR(2/3)。敏感性程度亦不同,三药敏感(2/10),两药敏感(4/10),单药敏感(1/10),均耐药(3/10)。

### 2.4　MTT法药敏结果与近期临床疗效间的关系

本组 10例肺癌病人分别用 COEP或 COFP方案进行正规化疗一疗程。在治疗后 2~ 3月复查症状、体征、胸片及其它辅助检查,结果见表 2

表 2　药敏结果与临床疗效关系

**Tab 2　The relationship of drug test and clinical response**

| | Drug test (*n*) | Clinical response | Corrective rate | *P* value |
|---|---|---|---|---|
| Effective | 7 | 6 | 85.71 | |
| | | | | 0.999996 |
| No-effective | 3 | 3 | 100.00 | |
| Total | 10 | 9 | 90.00 | |

初步显示:药敏试验中有效的 7例,临床化疗一疗程后复查,6例症状明显改善,胸部 X线片示病灶明显缩小(> 50%),1例无效。3例体外药敏试验示耐药的病例,临床用药后复查患者病情加重,X线检查见肺部病灶较前增大。

## 3　讨论

多年来学者们试图用纤支镜活检组织行肺癌细胞培养研究,结果颇令人失望。收集国外文献迄今仅 7例培养建系成功,且都为小细胞肺癌[3]。本实验选用 46例经纤支镜活检的肺癌标本行原代细胞培养,10例取得成功(21.74%)。同时取 28例手术切除肺癌组织标本(其中鳞癌 20例,腺癌 7例,小细胞癌 1例)行癌细胞培养,均获成功(100%),成功率明显高于经纤支镜活检标本。培养成功者均经活细胞观察,涂片角蛋白组化及 HE染色证实为癌细胞。结果显示小细胞肺癌较易培养成活(3/8),鳞癌及腺癌成功率低(5/28,2/10)。此结果与各类型肺癌生长方式有关:小细胞肺癌多为管壁浸润,呈粘膜上型生长,故活检效率高,培养成功率高;鳞癌多为腔内菜花样肿物,表面有较多坏死组织及脓性分泌物,活检时不易取到足够的活癌细胞;腺癌多呈粘膜下生长,活检时易出血,故培养成功率低。影响培养成功的最主要因素是活检组织所含活细胞太少和伴随的微生物污染。

对失去手术时机的肺癌患者,化疗乃是治疗的重要措施。而肺癌的耐药性和肺癌组织类型的多样混合性及异质性,常致化疗失败。部分不能手术患者不可能行体外药敏预测试验,盲目化疗影响疗效。纤支镜活检组织肺癌细胞培养的成功,获得了原发灶中各类型癌细胞的群体细胞,为保证药敏检测的准确性奠定了基础,有希望减少不能手术治疗患者化疗的盲目性,提高化疗有效率。Saimon[4]证实,取自不同病人而组织类型相同的癌细胞对同一药物的反应性不同;同一病人原发灶与转移灶之间,不同转移灶之间,对同一药物也呈现出不同的敏感性。实施化疗主要强调治疗原发病灶(有重要脏器转移者例外),故对不适合手术的肺癌病人,经纤支镜行原发癌灶活检,并进行原代细胞培养及药敏试验,可使药敏试验更具代表性,使化疗更有针对性。

本研究首次使用经纤支镜原代培养肺癌细胞用 MTT法进行药敏试验,10例获得成功。表明用 MTT法检测这类细胞的药物反应性是可行的。因经纤支镜活检所获得的组织较少,经处理后仅能得到 3.5 ml~ 5.5 ml单细胞悬液,故本实验只选用三种药物,取一个有效浓度点进行试验。初步结果显示,本组 10例肺癌细胞对 $VP_{16}$、DDP、VCR三药的敏感性相近,以 $VP_{16}$略强,VCR稍差。因实验例数较少,仅有 10例,尚难以代表肺癌的总体反应情况。纤支镜活检组织所能培养的细胞数量较少,不能进行大量化疗药物的敏感性检测。纤支镜活检时如何取材,培养时如何提高存活率、减少细胞丢失,扩大药敏检测的范围是今后尚需探索的研究课题。

不少研究表明,MTT法药敏结果与临床治疗反应性间存在着良好的一致性。本组 10例体外 MTT法

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

药敏试验表明显示,7例敏感。3例耐药。正规化疗一疗程后复查,7例体外药物敏感者 6例治疗后缓解,患者自觉症状明显缓解,胸部 X线片示肺部病灶明显缩小(> 50%);仅 1例治疗后病情恶化。3例体外耐药者联合化疗后复查,症状加重,X线检查见肺部病灶明显增大。本组体外药敏结果与临床治疗反应性间相比较,P值为 0.999996,提示无明显差异;体外药敏预测符合率为 90%,阳性符合率为 85.7%,阴性符合率为 100%。预测准确率与文献报道一致[5]。进一步证实 MTT法能较好地预测临床化疗的反应性。

## 参考文献

1 田 坤,沈寒放.肺癌细胞 MTT法药敏试验的研究.中国肿瘤临床,1995;22(11):829

2 廖美琳,王恩忠,薄维娜.药敏试验在肺癌化疗中的指导意义.中华结核和呼吸杂志,1993;16(6):345

3 Tanio Y, Watanabe M, Inoue T *et al*. Chemo-radioresistance of small cell lung cancer cell lines derived from untreated primary tumours obtained by diagnostic bronchofiberscopy. Jpn J Cancer Res, 1990;81(3):289

4 Saimon S E. Human tumour clonogenic assay: Growth condition and applications. Cancer Genet Cytogenet, 1986;19(1):21

5 Brown E, Markman M. Tumor chemosensitivity and chemoresistance assays. Cancer, 1996;77(6):1020

(收稿:1996-09-02;修回:1997-01-06)

(编辑 冯崇英)

# Clinical significance of bronchofibroscopic biopsy to test drug sensitivity of lung cancer cells

Xiong Wei, Shen Hanfang (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing, 630038)

**Abstract** Objective: To investigate the possibility of collecting the lung cancer cells with bronchofibroscopic biopsy for primary culture for the test of drug sensitivity to reduce the blindness of the clinical management of lung cancer. Methods: Forty six lung cancer specimens obtained with bronchofiroscopic biopsy for primary culture and the test of sensitivity of the cancer cells to three drugs of VCR, DDP and $VP_{16}$ was conducted with MTT assay. Then the result of the test was compared with the clinical response. Results: Among the 10 successfully cultured cases 6 out of the 7 cases being sensitive to the three drugs *in vitro* exhibited good clinical response and other 3 cases resistant to the drugs *in vitro* had no clinical response. Conclusion: The primary culture of lung cancer cells obtained with bronchofibroscopic biopsy is useful to select the best anticancer drug and to design an individual anticancer chemotherapy regimen and thus the efficient rate of chemotherapy for lung cancer can be increased.

**Key words** bronchofibroscopic biopsy; lung cancer; primary culture; MTT assay; anticancer drug

# 细胞凋亡和细胞增殖抑制在射线损伤造血功能中的作用

# The role of apoptosis and cell proliferation suppression in radio-induced hematopoietic dysfunction

邹仲敏 罗成基 (第三军医大学预防医学系防原教研室)重庆,630038

射线对造血组织的损伤机理是放射病的研究重点。凋亡概念的提出为揭示损伤的分子机理开辟了一条新途径。放射损伤作为一个确定的诱发凋亡的方法,它的效应是肯定的。射线诱导的凋亡是受基因调控的一个主动过程,涉及诸多基因。本实

(下转 141页)

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