DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.017

肺癌细胞原代培养MTT法药敏试验研究

田 坤* 沈寒放 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科)重庆,630038

提 要 采用MTT法对肺癌细胞药物敏感性进行研究。先以MTT与^{3}H-TdR掺入法分别测试8例肺癌原代细胞对4种抗癌药的反应并将两者加以比较,结果显示:两法有较好的相关性。后用MTT法测试6种常用抗癌药对20例原代肺癌细胞的作用,发现6种药物均有一定的抗癌作用,其中以卡铂(CBDCA)作用最强。实验证实:MTT法有较多优点,有一定临床实用价值。

关键词 抗癌药;肺癌细胞;药敏试验;肺肿瘤
中图法分类号 R734.2

临床治疗研究中,建立肿瘤药敏检测系统,使肿瘤化疗个体化是十分必要的。近几年,此类方法学的研究十分活跃,迄今有:裸鼠移植瘤法,集落形成法,拒染法,结晶紫法,氚标胸腺嘧啶掺入法(^{3}H-TdR)[1]等,上述各法在有关实验室与临床研究中各有所长,但用于临床推广尚存在一定困难。自1983年Mosmann建立噻唑蓝(MTT)法[2]测定细胞活度以来,为肿瘤耐药性检测的研究开辟了新的途径。本实验用MTT疗法测试各个体肺癌原代培养细胞对6种抗癌药的反应性并与^{3}H-TdR掺入法作比较。

1 材料与方法

本实验采用20例手术所得肺癌组织进行原代细胞培养[3],其中男性17例,女性3例。年龄37～68岁。组织类型:鳞癌15例,腺癌5例。药物:环磷酰胺(CTX)、5-氟脲嘧啶(5-FU)、阿霉素(ADR)、长春新碱(VCR),足叶乙甙(VP16)、卡铂(CBDCA)6种抗癌药。每种药物设6个浓度点,其范围由血峰值$\times10^{-1}$～$\times10^{1}$。设对照组Ⅰ即细胞悬液加PBS与对照组Ⅱ即培养液加抗癌药,以上均用双复管测试。试剂:噻唑兰(MTT),二甲基亚砜(DMSO)。仪器:DG3022酶联免疫测试仪。多头细胞收集器。

MTT测试法[2]:细胞悬液加入96孔培养板每孔200 μl,培养12 h,加入不同浓度各种抗癌药20 μl于相应孔内,培养48 h,离心,弃上清液180 μl,即加0.2%MTT液50 μl,又培养5 h,后加入DMSO 150 μl轻摇5～10 min,在570 nm波长以酶联免疫仪测试光密度(A)值。

^{3}H-TdR掺入法[1]:如上法细胞悬液加抗癌药培养48 h,加^{3}H-TdR液20 μl培养24h,用多头细胞收集器将细胞收集于玻璃纤维滤膜,凉干,将膜片置于闪烁瓶内加PPO、POPOP闪烁液5 ml于β计数仪测试min^{-1}值。

活度抑制率计算:$S=\frac{Ac-Ad}{Ac}\times100\%$

S:活度抑制率;Ac:对照组A值;Ad:加药组A值。

数据处理:相关分析,方差分析,四格表确切概率法。

2 结 果

2.1 细胞浓度与A值的关系(表1)

将标本Ⅰ与标本Ⅱ的细胞浓度作梯度稀释后分别测其A值,经相关分析,标本Ⅰ $r=0.998$, $P<0.001$;标本Ⅱ $r=0.989$, $P<0.001$。

2.2 MTT与^{3}H-TdR掺入法相关性比较

8例不同个体的肺癌细胞分别用两法测试4种药物6个浓度及对照组的min^{-1}值(^{3}H-TdR法)与A值(MTT法)经相关分析得相关系数(表2)。

2.3 药物对原代肺癌细胞的作用

2.3.1 6种药物对肺癌细胞的作用(表3)

2.3.2 6种药物作用比较(表4)

表1 细胞浓度与A值关系

Tab 1 The relationship between concentration of cell and A value

Sample Ⅰ		Sample Ⅱ	
Cell number/well	A value	Cell number/well	A value
0.148×10^5	0.28	0.268×10^5	1.05
0.296×10^5	0.36	0.536×10^5	1.08
0.440×10^5	0.41	0.840×10^5	1.23
0.596×10^5	0.48	1.072×10^5	1.35
0.740×10^5	0.54	1.342×10^5	1.46
		1.680×10^5	1.54

The results in Tab 1 shawed that absorbunce was directly proportonal to the number of cells, which is in agreement on Tim's.

* 研究生,现在成都军区总医院呼吸内科 成都,610038

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

表2 ^{3}H-TdR 掺入法与 MTT 法的相关系数(r)值

Tab 2 coefficient correlation to two assays of MTT and ^{3}H-TdR

Drugs	Control	Drug concentrations					
		1	2	3	4	5	6
ADR	0.8233*	0.8222*	0.8781**	0.8942**	0.8972**	0.7729*	0.4802
VGR	0.9417**	0.9342**	0.8815**	0.8394**	0.7841*	0.4918	0.4818
VP16	0.8744**	0.9638**	0.7654*	0.6258	0.5548	0.4418	0.2744
CBDCA	0.9739**	0.9795**	0.9679**	0.963**	0.9684**	0.9382**	0.6292

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$. The MTT and ^{3}H-TdR assays showed excellent agreement.

表3 6种药物对20例肺癌细胞的作用 A 值($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of 6 anticancer drugs on 20 cases of lung cancer cells

Drugs	Control	Drug concentrations					
		1	2	3	4	5	6
CTX	0.45±0.25	0.37±0.22	0.354±0.23	0.35±0.22	0.32±0.22	0.29±0.20	0.24±0.19
5-Fu	0.45±0.25	0.37±0.23	0.340±0.22	0.31±0.21	0.28±0.19	0.26±0.17	0.23±0.16
ADR	0.45±0.25	0.36±0.22	0.330±0.20	0.28±0.20	0.28±0.19	0.28±0.19	0.24±0.15
VCR	0.45±0.25	0.36±0.21	0.330±0.20	0.28±0.20	0.28±0.17	0.24±0.16	0.21±0.16
VP16	0.45±0.25	0.33±0.21	0.310±0.20	0.29±0.19	0.25±0.19	0.20±0.18	0.17±0.17
CBDCA	0.45±0.25	0.35±0.22	0.320±0.22	0.27±0.19	0.24±0.18	0.21±0.15	0.15±0.13

There was nover signifcance cieffcrence among the various eoncertrations of 6 drugs, which was calculated with analysis of voriance.

表4 各药物对20例肺癌细胞效应

Tal 4 Effect of each anticaner drug on 20 cases of lung cancer cells

Drugs	No. of efficacy	No. of no efficacy	Tolal	Rate of efficacy (%)
5-Fu	4	16	20	20
ADR	5	15	20	25
VCR	6	14	20	30
VP16	8	12	20	40
CTX	2	14	16	12.5
CBDCA	6	5	11	54

The results showed there was a significance difference in effect of anticancer drugs between CTX and CBDCA to lung cancer cells ($P<0.05$), which was calculated with the method of accurate probability fourfold table.

3 讨论

由于肿瘤耐药的多样性与多变性[3]，抗癌药治疗的个体化显得更为必要，故摸索、选择一种适用于临床的抗癌药的筛选方法已是当务之急。

MTT 是一种黄色细粒状四氮唑化合物，其分子中的四唑环在活的真核细胞线粒体内琥珀酸脱氢酶作用下发生断裂，形成蓝色沉淀物甲臜。其形成量与活细胞内酶的活性及活细胞量密切相关，该物质溶解后可被分光光度仪测试，量化指标为 A 值。利用这一生物特性 Mosmann 建立 MTT 法进行细胞活度的测试。后被引入肿瘤细胞抗癌药物敏感性测试[4,5]。本实验以二例原代培养肺癌细胞进行细胞浓度梯度稀释，得出细胞浓度、A 值的关系见表1，经相关分析，$P<0.001$，提示细胞量的增加与 A 值存在明显的线性依存关系，Masmann 报道一致。

蓝色甲臜的形成与活细胞量之间存在着一种线性正相关的关系，利用其特性可以进行药物对肿瘤细胞抑制的评价，但由此所得的结果与临床疗效是否一致呢？许德风[6]、KssT 等将^{3}H-TdR 掺入法药敏试验测试的药物评价与临床治疗的效果进行比较，结果表明：两者有较好的一致性。因此，我们选用^{3}H-TdR 法与本法进行对照、以两法同时测试8例肺癌细胞对不同浓度的4种抗癌药的反应并对所测结果作相关分析，发现28个测试点的相关系数中有20个所对应的 $P<0.01$（表2）表现出明显的一致性相关。说明用 MTT 法作为临床肿瘤药敏的评价，具有良好应用价值。

本实验选用临床治疗中常用6种抗癌药物对20例非小细胞肺癌的原代培养细胞进行药敏测试，此6种药分别作用于细胞增殖周期的不同时相，在彼此组合时具有协同作用，各药物对肿瘤细胞的抑制能力（见表3，

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

4)CBDCA＞VP16＞VCR＞ADR＞5-Fu＞CTX，其结果得出印象是，在6种药物中 CBDCA 对肺癌抑制力最强，CTX 最弱，CBDCA 作用明显强于 CTX。显然对 CTX 的评价与通常报道的临床疗效不符[7]。这可能与 CTX 未被活化有关，因为 CTX 需在肝脏微粒体内转化成4-羟化环磷酰胺时才对肿瘤有较强的杀伤作用。体外培养所用者是原型，故抑癌率低。若欲确切反映 CTX 的抑癌作用，可采用静脉注射后，取患者血清或其他代谢产物来测试其抑癌能力，可供临床用药参考。

MTT 测试法有众多优点，与拒染法相比操作较简单、实验误差减少、利于临床应用，但尚存一些不足有待克服[8]。为了客观地反映出各个体肿瘤对药物的反应，在临床药敏试验中多采用短期的原代肿瘤细胞作为实验对象，由于肿瘤细胞有锚地不依赖性生长的特点[9]，相当一部分肿瘤细胞在体外培养中呈悬浮生长，尤其在原代培养中是如此，即使在传代培养中贴壁生长良好的细胞也呈现贴壁不牢的现象。因而 MTT 测试中弃去上清培养液时，不免带出部分细胞，尽管有人统计其带出细胞所造成的误差仅为4%[10]，但仍对结果的准确性一定影响。为此，Willson JK 等[11]提出快速翻板法可减少细胞的丢失，但快速翻板难以确保每孔倒出等量液体，而培养液存留不均匀[9]同样影响测试结果。Fraser L[12]提出以细胞基质包被培养板可使细胞贴壁。今后能否采用此法减少细胞丢失，值得进一步摸索。此外，原代培养细胞群是一种混合体，其中掺有少量正常细胞即外周淋巴细胞与微量成纤维细胞。前者还原 MTT 能力极低；后者在48 h 培养中未见明显增殖[9]。虽然原代肿瘤细胞培养中存在的上述正常细胞对 MTT 测试结果影响极小。若能将其分离、去除可使该法所测结果更为精确。

参考文献

1 Twnetyman PR, Walls GA, Wzight KA. The response of tunour cells to radiation and cytotoxic drug- A comparison of clonogenic and isotope uptake assays. Br J Cancer, 1984; 50: 625

2 Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth, 1983; 65: 55

3 Grant CE, Valdimarsson G. Ouerexpresson of multidrug resistance-associated protein (MRP) increase resistance to natural product durgs. Cancer Res, 1994; 54: 357

4 Kasper GTL. On vitro drug sensitivity of normal periphexal blood lymphooytes and childhood leukemic cells from mollow and peripheral blood. Br J Cancer, 1991; 64: 469

5 Pieters R, Hongo T. Different types of non-p-glycoprotein mediated multiple drug ressitance in chidren with relapsed acute lymphoblastic leukaemia. Br J Cancer, 1992; 62: 691

6 许德风. 人癌细胞短期培养——抗癌药物敏感试验及临床应用. 肿瘤, 1988; 8: 241

7 赵　芳，孟祥顺，高建国等. 甲硝唑氨酸钠对化疗药物培敏作用的实验动物研究. 肿瘤防治研究, 1994; 21(2): 70

8 周建军，乐秀芳，韩家娴等. 影响 MTT 法测定结果的一些因素. 肿瘤, 1994; 14(2): 93

9 何　申，刘　裕，苏树芸等译. 培养中的肿瘤与正常细胞. 北京：人民卫生出版社, 1985: 49～50

10 Campling BG. Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. Br J Cancer, 1991; 63: 75

11 Willson JK, Sargent JK, Elgie AW. A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. Br J Cancer, 1990; 62: 189

12 Fraser L. Drug and radiation sensi-tivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor cells using cell-adhesive matrix and supplernented medium. Cancer Rer, 1986; 46: 1263

（收稿：1995-09-17；修回：1996-02-29）

（编辑　刘　鹏）

Study of drug sensitivity of lung cancer cells with MTT

Tian Kun, Shen Hanfang (Department of Respiratory Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The resistance of cancer cells to anti-cancer drugs is characterized by its complexity and changeability. The best way to design a chametheray for a cancer patient is to individualize the therapeutic scheme. The cell suspension of non-small cell lung cancer was cultured and the effects of 4 anti-cancer agents on the primary passage of 8 specimens of non-small cell lung cancer were correlated to those obtained with MTT. It was found that the results obtained with MTT were correlated to those obtained with ^{3}H-TdR in-

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



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