

374 例恶性肿瘤患者化疗药物敏感性研究

喻卫红¹, 孙涛², 刘文中², 李英辉¹, 逯晓波³, 陆垚³

(1.辽宁省肿瘤研究所, 辽宁 沈阳 110042; 2.辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042;

3.中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110005)

摘要: [目的] 研究临床常用的抗肿瘤化疗药物对不同恶性肿瘤的抑制率, 为临床个体化治疗提供参考。[方法] 采用 MTT 法测定了化疗药物对 374 例恶性肿瘤患者原代肿瘤细胞的抑制率, 比较不同药物在不同肿瘤中抑制率的差异, 分析药物抑制率与年龄、性别的关系, 观察药物对肿瘤细胞的抑制而产生的形态变化。[结果] 不同药物对同一肿瘤的抑制率不同, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中, 肺癌对紫杉醇、洛铂、吉西他滨较敏感; 乳腺癌对卡培他滨、顺铂、表阿霉素、奥沙利铂较敏感; 头颈部癌对 5 氟尿嘧啶、博来霉素、异环磷酰胺较敏感; 神经胶质瘤对卡莫司汀、顺铂、替尼泊苷较敏感; 卵巢癌对奥沙利铂、阿霉素、表阿霉素较敏感。对男性肺癌的平均抑制率 (30.71%) 高于女性患者 (29.38%), 差异有统计学意义 ($t = 2.188, P = 0.029$)。在乳腺癌、卵巢癌患者中, 年龄与抑制率呈负相关。同类或不同药物作用下, 瘤细胞均发生形态学改变, 对瘤细胞产生程度不同的抑制作用, 表现为明显的个体差异性。[结论] 不同个体对抗肿瘤药物的敏感性具有明显差异, 药物敏感性试验对临床选择化疗药物具有参考价值。

主题词: 药物敏感性; 化疗药物; 个体化治疗; 肿瘤细胞

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)05-0393-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.05.B009

Study on Sensitivity of Chemotherapeutic Agents in 374 Cases with Malignancy

YU Wei-hong¹, SUN Tao², LIU Wen-zhong², et al.

(1. The Tumor Research Institute of Liaoning Province, Shenyang 110042, China;

2. The Tumor Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110042, China)

Abstract: [Purpose] To investigate inhibition rate of the clinical commonly used antineoplastic chemotherapeutic agents on various malignant tumor, to provide reference for individualized treatment. [Methods] Inhibition rate of chemotherapeutic agents on primary tumor cells of 374 cases with malignant tumor were determined by MTT method. The association of inhibition rate with age and gender was analyzed, and morphological changes of tumor cells inhibited by chemotherapeutic agents were observed. [Results] The inhibition of different drugs on the same tumor cells were different, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Lung cancer cells were sensitive to paclitaxel, lobaplatin and gemcitabine; Breast cancer cells were sensitive to capecitabine, cisplatin, epirubicin and oxaliplatin; Head and neck cancer cells were sensitive to fluorouracil, bleomycin and ifosfamide; Glioma cells were sensitive to carmustine, cisplatin and teniposide; Ovarian cancer cells were sensitive to oxaliplatin, adriamycin, epirubicin. The average inhibition rate of male patients with lung cancer (30.71%) was higher than that of female lung cancer patients (29.38%), with significant difference ($P = 0.029$). In breast cancer or ovarian cancer patients, negative correlation was found between age and inhibition. Under the action of the same kind or different drugs, inhibition of tumor cells were different, characterized by obvious individual differences. [Conclusion] Different individual susceptibilities to chemotherapeutic agents are different, drug sensitive test provides reference value for clinical application of chemotherapy agents.

Subject words: drug sensitivity; chemotherapy agent; individualized treatment; tumor cells

在肿瘤临床化疗中发现, 即使同一肿瘤的不同

个体对同一种化疗药物敏感性也可能不同。这与肿瘤生物学特性 (病理分型、肿瘤异质性和细胞动力学)、病人个体差异 (病人对化疗药物敏感程度以及对药物的耐受程度)、药物本身的不良反应等有关。

基金项目: 辽宁省科技厅科研事业发展专项 (辽财指预 201001)

通讯作者: 喻卫红, 研究员; 辽宁省肿瘤研究所, 辽宁省沈阳市大东区小河沿路 44 号 (110042); E-mail: weihongyu55@163.com

收稿日期: 2013-11-04; **修回日期:** 2013-12-13

如何选择切实可行的化疗药物,优化组合,确定个体化治疗方案,仍是当今肿瘤化疗的热点和难点。而化疗药物敏感试验为临床筛选化疗药物、制定个性化治疗方案提供了有效手段,一定程度上避免了经验性用药,尽可能排除或防止无效药物对机体的不良反应、减少多药耐药性的产生,可提高综合治疗效果。本文收集 374 例肺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈部癌和神经胶质瘤患者的肿瘤组织,采用 MTT 比色法检测抗肿瘤药物敏感性并进行对比分析,探讨了抗肿瘤药物与肿瘤类别、患者年龄及性别的关联,以期筛选个体化治疗药物,为临床用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

本文中的 374 例恶性肿瘤样本均取自辽宁省肿瘤医院 2009~2012 年度的就诊病人。所有病例均经病理诊断证实为肺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤及头颈部癌等恶性肿瘤(Table 1)。

Table 1 General information of patients

Diseases	N	Gender		Patients' age (years old)	
		Male	Female	Average age	Range
Lung cancer	113	68	45	58.81	37~84
Breast cancer	78	27	65	52.81	32~80
Ovarian cancer	55	0	55	56.78	37~76
Glioma	57	35	22	49.66	10~82
Head and neck cancer	71	64	7	57.94	42~79
Total	374	169	205	55.67	10~84

1.2 仪器设备及试剂、药物

Esco-1500TE 生物安全柜(新加坡 Esco);HF-90 二氧化碳培养箱(上海力康公司);DTX 880 型多功能分析仪及 Allegra-X-15R 低温低速离心机(BECKMAN-COULTER);艾柯超纯水仪(重庆);Leica DM IL LED 生物倒置显微镜(德国莱卡);-80℃低温冰箱(海尔)。

1640 细胞培养基和细胞培养板(GIBCO 公司);新生牛血清(杭州四季青公司);人淋巴细胞分离液、四噻唑蓝(MTT, SIGMA 公司);DMSO 分析纯(上海)。

抗肿瘤药物:紫杉醇(TAX)、多西他赛(TXT)、吉西他滨(GEM)、长春瑞滨(NVB)、长春新碱(VCR)、卡铂(CBP)、顺铂(DDP)、洛铂(LBP)、奥沙

利铂(L-OHP)、奈达铂、环磷酰胺(CTX)、异环磷酰胺(IFO)、伊立替康(CPT-11)、托泊替康(TPT)、卡培他滨、5-氟尿嘧啶(5-Fu)、阿霉素(ADM)、表阿霉素(EADM)、脂质体阿霉素、卡莫司汀(BCNU)、替尼泊苷(VM-26)、替莫唑胺(TMZ)、依托泊苷(Vp-16)、博来霉素(BLM)、平阳霉素(PYM)共 25 种,购自辽宁省肿瘤医院药学部。

1.3 实验方法

样品采集及处理:以无菌手续采取手术切除的新鲜、无坏死的癌组织约 1cm³,置于含双抗生索的 Hank's 液的无菌容器中立即送检,如不能及时送检则暂于 4℃保存,应尽早处理。

癌细胞与化疗药物共培养:将癌组织用含双抗的培养液冲洗后置于无菌平皿内剪碎,经无菌筛网过滤,收集滤液,离心后弃上清。用完全培养液悬浮细胞,调整细胞悬液的浓度为 3.0×10⁵/ml~4.0×10⁵/ml。将此细胞悬液以 100μl/孔分别加入 96 孔细胞培养板。实验分组:设空白组(完全培养液)、对照组(仅加细胞悬液),实验组分别加入不同受试药液 10μl,每种化疗药物的试验浓度为 1.0PPC(1.0 个血浆高峰浓度),每个浓度平行 2 孔。将制备的细胞培养板轻轻混匀,置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱,孵育 24~48h。

MTT 显色及检测:肿瘤细胞与药物共培养 24~48h 后加入 5mg/ml MTT 溶液 20μl,培养 4 h 后加入 DMSO 100μl,置微量振荡器上混合 10min,用多功能分析仪(λ=490 nm)测量吸光度值(A 值)。按下列公式分别计算

各药物的肿瘤细胞抑制率:抑制率(%)=(对照组平均 A 值-实验组平均 A 值)/对照组平均 A 值×100%

结果判定:抑制率<30%为耐药,≥30%为敏感。各药物的敏感率=敏感例数/试验总例数×100%。

1.4 观察药物对肿瘤细胞作用的形态变化

于加药 24~48h 之间,在倒置生物显微镜下观察肿瘤细胞的形态,并用图像记录细胞形态的动态变化。

1.5 统计学处理

全部资料采用 SPSS19.0 进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组定量资料比较,采用单因素方差分析的检验方法,两两比较采用 LSD 法;两组定量资料比较,采用 *t* 检验的方法;两组定量资料的关联,采用简单线性相关分析。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 常用化疗药物对肿瘤细胞的抑制率比较

肺癌敏感的药物依次为:紫杉醇、洛铂、吉西他滨、奥沙利铂、长春瑞滨、异环磷酰胺、卡铂、顺铂、伊立替康、多西他赛等。经方差分析比较各组药物敏感性,发现差异具有统计学意义($F=7.439, P<0.001$)。乳腺癌敏感的药物依次为:卡培他滨、顺铂、表阿霉素、奥沙利铂、吉西他滨、洛铂、长春瑞滨、多西他赛、异环磷酰胺、氟尿嘧啶、卡铂,经方差分析比较各组药物敏感性,发现差异具有统计学意义($F=4.629, P<0.001$)。卵巢癌敏感的药物依次为:奥沙利铂、阿霉素、表阿霉素、奈达铂、洛铂、环磷酰胺、紫杉醇、托泊替康、脂质体阿霉素等,经方差分析比较各组药物敏感性,发现差异具有统计学意义($F=3.368, P<0.001$)。神经胶质瘤敏感的药物依次为:卡莫司汀、顺铂、替尼泊苷、替莫唑胺、卡铂、依托泊苷、长春新碱等,经方差分析比较各组药物敏感性,发现差异具有统计学意义($F=8.979, P<0.001$)。头颈部癌敏感的药物依次为:5-氟尿嘧啶、博来霉素、异环磷酰胺、平阳霉素、依托泊苷、环磷酰胺、紫杉醇、长春新碱、多西他赛、顺铂等,经方差分析比较各组药物敏感性,发现差异具有统计学意义($F=6.783, P<0.001$)。另外,根据临床用药情况,比较了顺铂、依托泊苷、多西他赛、紫杉醇、卡铂、吉西他滨、长春新碱等7种常用药物在不同肿瘤中的抑制率差异。发现各药物在不同肿瘤中的抑制率差异均无统计学意义($P>0.05$) (Table 2)。

2.2 不同性别患者的肿瘤细胞抑制率比较

各药物对男性肺癌患者的平均抑制率(30.71%)高于女性患者(29.38%),两者差异有统计学意义($t=2.188, P=0.029$)。不同性别的头颈部癌患者药物

抑制率差异无统计学意义($t=-1.869, P=0.062$)。不同性别的神经胶质瘤患者药物抑制率差异无统计学意义($t=-1.592, P=0.112$)。

2.3 不同年龄患者的肿瘤细胞抑制率比较

在所有肺癌患者中,年龄与抑制率未呈线性相关($r=-0.014, P=0.607$)。但按性别分层后,男性肺癌患者的年龄与抑制率呈线性相关($r=-0.151, P<0.001$),女性肺癌患者也呈线性相关($r=0.191, P<0.001$)。乳腺癌患者的年龄与抑制率呈线性相关($r=-0.086, P=0.005$)。卵巢癌患者的年龄与抑制率呈线性相关($r=-0.152, P<0.001$)。头颈部癌患者的年龄与抑制率无关($r=0.067, P=0.135$)。神经胶质瘤患者的年龄与抑制率无关($r=-0.052, P=0.201$)。

2.4 化疗药物作用下的肿瘤细胞形态变化

倒置生物显微镜下观察来自不同个体的肿瘤细胞经过不同药物处理后的形态变化情况。发现同一类型肿瘤细胞经不同类型药物作用后的形态变化存在明显差别,如紫杉醇类药物对肺癌细胞的抑制作用表现为细胞不伸展,呈粗糙的黑颗粒样变化,整个细胞变成扁平状、大小不等的盘状或碎片、细胞质浓缩后其结构完全消失。紫杉醇不仅抑制敏感的肿瘤细胞,对淋巴细胞及红细胞也有很强的抑制和杀伤

Table 2 Comparison of drug inhibition rate in different tumors (%)

Drugs		Lung cancer	Breast cancer	Ovarian cancer	Glioma	Head and neck cancer
DDP	N	98	42	41	56	62
	IR	27.24	28.34	26.27	29.11	25.53
	95%CI	25.13~29.36	25.45~31.23	23.47~29.06	26.98~31.23	22.84~28.22
VP16	N	51	25	17	57	16
	IR	24.05	24.39	27.06	24.76	28.51
	95%CI	21.00~27.09	21.33~27.45	23.59~30.53	22.40~27.13	22.65~34.37
TXT	N	94	46	41	—	29
	IR	25.52	25.63	26.03	—	25.55
	95%CI	23.78~27.25	23.14~28.12	23.10~28.97	—	21.77~29.33
TAX	N	70	37	41	—	29
	IR	30.43	24.65	28.72	—	27.13
	95%CI	27.82~33.05	21.48~27.82	25.55~31.90	—	23.57~30.70
CBP	N	45	13	35	56	—
	IR	27.33	24.80	23.45	27.26	—
	95%CI	24.07~30.59	19.94~29.67	20.57~26.32	24.85~29.68	—
GEM	N	95	46	42	—	—
	IR	29.13	27.74	26.22	—	—
	95%CI	27.00~31.26	25.53~29.94	23.33~29.11	—	—
VCR	N	—	—	—	57	59
	IR	—	—	—	24.34	25.65
	95%CI	—	—	—	21.98~26.70	23.08~28.22

Note:IR:inhibition rate.

作用。不同患者的血细胞可有不同程度变化,体积缩小或呈碎片、细胞数量急剧减少或血细胞消失殆尽,表现出明显的个体差异(Figure 1)。阿霉素类对乳腺癌细胞轻微损伤时,细胞体变为扁平及细胞质大部分消失,留下细胞残骸(Figure 2)。阿霉素类作用强时可使细胞内容完全消失,仅存细胞轮廓似空环状或半月状致细胞膜大部分缺如。对抑制其它类型肿瘤细胞的形态变化基本相同。阿霉素对淋巴细胞有轻微损伤,而红细胞几乎没有变化。奥沙利铂的作用主要使瘤细胞体积迅速缩小成小球体,细胞结构完全消失。对顺铂敏感的肿瘤细胞,失去折光性,细胞膜表面粗糙、细胞大小不等,形态各异。敏感的药物作用表现为细胞膜表面粗糙或缺如,细胞成灰黑色并,细胞质显著减少、细胞核消失,细胞活性受到明显抑制。其它常用抗肿瘤药物如吉西他滨、长春瑞滨,对各种瘤细胞抑制时使细胞缩小或大小不等、畸

形或多边形,再如替尼泊苷与神经胶质瘤细胞共培养,可使正在增殖的致密瘤细胞团解体,分散为单个细胞或致使单个细胞自溶。

3 讨 论

化疗对多数复发转移的晚期肿瘤患者在二、三线治疗中疗效并不理想。本文 374 例恶性肿瘤病例经药物敏感性筛选结果显示,肺癌细胞对化疗药物的敏感性较低,结果近似文献报道^[2]。多西他赛作为紫杉醇类药物对治疗后复发或晚期乳腺癌的敏感性明显降低。有文献报道^[3],以卡培他滨为主的一线化疗安全有效,尤其适用于既往用过蒽环类和紫杉醇类的转移性乳腺癌治疗。研究结果中提示该药有较高的敏感性,与临床应用的治疗原则相符合。3 种铂类顺铂、奥沙利铂、洛铂也显示了相对较高的敏感

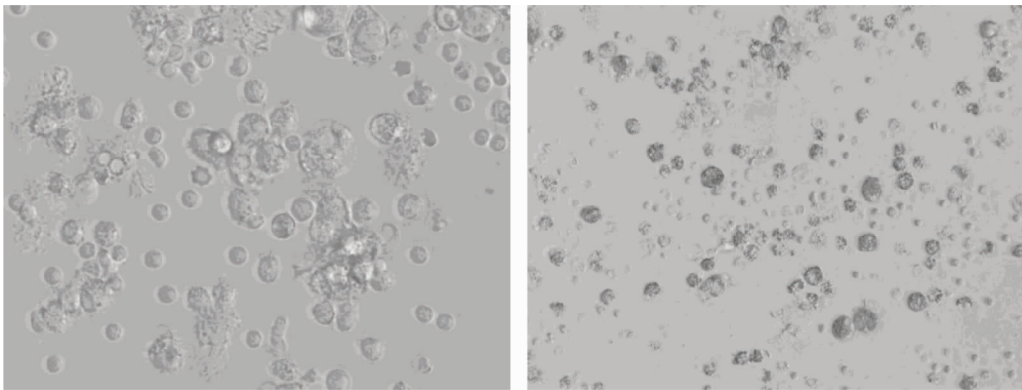


Figure 1 Dynamic change of lung adenocarcinoma stage IV pleural effusion cells after 48h incubation with paclitaxel 1.0 PPC (200×)

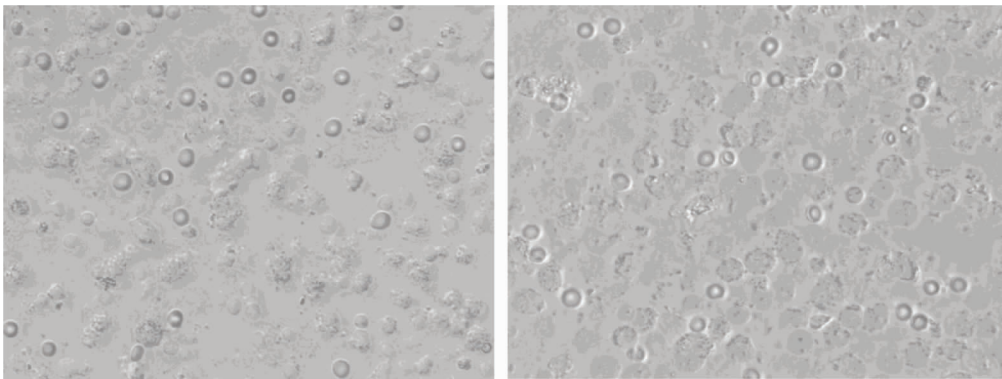


Figure 2 Dynamic change of metastasis lymph nodes of breast carcinoma cells after 48h incubation with adriamycin 1.0 PPC (200×)

性,结果与文献报道相似^[4]。临床应用表阿霉素治疗晚期或复发乳腺癌的疗效个体差异较大,研究结果也提示其敏感性降低而退居第3位,可能与其病例中多数患者曾经化疗,耐药性明显增加有关。

对于晚期、复发的卵巢癌患者,紫杉醇药物敏感性排名明显降次,以往较多文献^[5]对卵巢癌耐药的治疗失败均视为铂类耐药所致,而本次药敏结果提示较多卵巢癌病例不仅存在铂类耐药,还有紫杉醇类药物的原发或继发耐药。在选择化疗方案时应予以重视。本文还比较了同一药物对不同肿瘤的肿瘤细胞抑制率,未见明显差异,提示肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性并不像抗生素杀伤细菌那样达到完全或较高的抑制作用,加之恶性肿瘤的异质性,即在相同作用时间里所有接触抗肿瘤药物、受到同一药物或不同药物作用的肿瘤细胞并未完全产生应答。在镜下也观察到这种现象,对某种药物相对敏感的细胞,表现为数量减少、细胞膜破损或缺如、细胞质皱缩,不同程度的细胞破碎崩解等受到抑制或被杀灭。而不敏感的细胞未见形态变化,可能存在原发耐药或形成继发耐药,致使耐药细胞逐渐增加,是导致临床疗效较差的原因之一。头颈部癌对化疗药物敏感性较低,术后化疗或晚期化疗效果较差,本次研究结果与文献报道近似,对临床常用药物氟尿嘧啶、博来霉素、异环磷酰胺、平阳霉素比较敏感^[6]。神经胶质瘤也是易于复发的恶性肿瘤,化疗方案虽有固定模式,但药敏结果显示,卡莫司汀、顺铂、替尼泊苷相对敏感,与临床总的疗效较一致^[7]。替莫唑胺为口服化疗药物,多用于术后辅助化疗,其治疗胶质瘤效果较显著^[8],但是本文研究结果与文献报道不同,敏感性不及卡莫司汀、顺铂、替尼泊苷。

本文还探讨了不同肿瘤患者的年龄与肿瘤细胞抑制率的相关关系。性别差异对于药物敏感性的影响未见明显相关,有待收集更多病例深入研究。由于收集的病例大多为晚期、复发者,经过多次化疗后易产生耐药性,比较的顺铂等7种药物的敏感性均较低。不同药物在同一肿瘤中的抑制率差异有统计学意义。各药物在不同肿瘤中的抑制率差异均无统计学意义,同一药物在不同肿瘤中的抑制率也未见明显差异。但是,在倒置显微镜下,药物对肿瘤细胞的抑制或破坏的结局呈现了药物类型的差别,以致不同肿瘤细胞对药物的同一类型、同一浓度作用显示

了不同的形态变化,反映了肿瘤细胞的个体差异性 & 异质性,提示抗肿瘤药物的作用方式不同,在选择化疗药物种类及联合方案时应慎重。另外,由于MTT方法所限,在分离不同瘤细胞时附带了数量不等的血细胞,所以也观察到血细胞对不同药物的作用表现出不同形态变化,提示化疗毒性也存在个体差异和药物种类的差异。因此,进行药物敏感性筛选,对于化疗方案的选择,避免无效化疗及试验性治疗,减少不良反应及患者经济负担,节省医疗资源是有益的。

参考文献:

- [1] Yan KL,Tang DP,Zhang CM,et al.Relationship between tumor chemotherapy drug sensitive test and clinical pathological and efficacy [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment,2011,3(1):23-27. [颜克兰,唐东平,张传珉,等.肿瘤药敏试验与临床病理及疗效的关系 [J].中国癌症防治杂志,2011,3(1):23-27.]
- [2] Fu JD,Yuan J,Huang XW,et al.Research progress of paclitaxelin plant anti-tumor drug[J].Journal of Modern Chinese Medicine Reseach and Practice,2006,20(3):58-61. [傅结敏,袁杰,黄雄伟,等.植物抗癌药紫杉醇的研究进展 [J].现代中药研究与实践,2006,20(3):58-61.]
- [3] Kameshima H,Ohmura T,Kutomi G,et al. 254 oral combination chemotherapy with capecitabine and cyclophosphamide showed good efficacy and quality of life for metastatic breast cancer patient[J].Eur J Cancer,2012,48 (Suppl 1):S116-S117.
- [4] Lekakis L,Tryfonopoulos D,Pistamatzi N,et al. Salvage cheotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil in metastatic breast cancer. Particular activity against liver metastases [J].Anticancer Res,2012,32(5):1833-1837.
- [5] Chen WY,Liu J,Mao SB,et al.Application of docetaxel+ adriamycin in neoadjuvant chemotherapy of breast cancer [J]. Shanxi Medical Journal,2013,42 (7):745-746.[陈文有,刘静,毛顺宝,等.多西他赛+表阿霉素方案在乳腺癌新辅助化疗中的应用 [J]. 山西医药杂志,2013,42(7): 745-746.]
- [6] Rauh-hain JA,Nitschmann CC,Worley MJ Jr,et,al. Platinum resistance after neoadjuvant chemotherapy compared to primary surgery in patients with advanced epithelial ovarian carcinoma[J]. Gynecol Oncol,2013,129(1):63-68.
- [7] Singh B,Li R,Xu L,et al. Prediction of survival in patients with head and neck cancer using the histoculture drug response assay [J]. Head Neck,2002,24:437-442.
- [8] Wick W,Platten M,Meisner C,et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol,2012,13(7):707-715.