

体外药物敏感实验为依据的恶性脑胶质瘤个体化化疗初步研究*

倪 炜¹ 罗 林^{1△} 左 频¹ 袁红平¹ 李 佳² 范耀东¹

(1 昆明医学院第三附属医院神经外科 云南 昆明 650118 2 昆明医学院第三附属医院肿瘤研究所 云南 昆明 650118)

摘要 目的:建立胶质瘤细胞体外原代培养模型,利用 MTT 法进行体外药物敏感实验,为临床化疗方案的设计提供理论指导,实施个体化化疗。方法:32 例术后病理证实为胶质瘤(WHO Ⅲ级)的新鲜标本,制备肿瘤单细胞悬液进行体外原代培养,与 7 种抗肿瘤药物在临床血浆峰值浓度(PPC)条件下作用 72 小时,MTT 法标记存活的肿瘤细胞,用酶标仪检测光密度值(OD),计算出抑制率(IR),检测不同肿瘤个体对化疗药物的敏感和耐药情况,从而指导临床个体化化疗方案的制定。另选取同期符合上述入选标准的 20 例间变型星形细胞瘤患者作为对照组,按照 VM-26 加 DDP 方案经验化疗,化疗 4 个疗程结束后,复查影像学,按照 WHO 肿瘤疗效评价标准评价治疗效果,分为稳定(SD),进展(PD),缓解(PR)。结果:32 例临床标本的原代培养及药敏试验,其 PPC 下的抑制率(IR%)>50%者,DDP 有 20 例,VCr 有 9 例,VM-26 有 12 例,VP-16 有 17 例,Procarbazine 有 7 例,BCNU 有 6 例,Taxol 有 3 例,其敏感性依次为:DDP>VP-16>VM-26>VCr>Procarbazine>BCNU>Taxol。根据体外药物敏感实验结果制定个体化化疗方案治疗 29 例,肿瘤缓解率为 47.2%,对照组为 29.4%,2 组 χ^2 检验统计 $P<0.05$ 。结论:7 种常用的抗肿瘤药物均有耐药的情况,进行化疗药物的敏感测定可以避免耐药药物的使用。根据体外药物敏感实验结果制定个体化化疗方案化疗与对照组相比近期疗效较满意。

关键词 脑胶质瘤;药物敏感耐药性;化学药物治疗

中图分类号 R739.4 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)06-1075-03

Preliminary Study on Individualized Chemotherapy Based on Drug Sensitivity and Resistance Assay in Patients with Malignant Glioma*

NI Hui¹, LUO Lin^{1△}, ZUO Pin¹, YUANG Hong-ping¹, LI Jia², FANG Yao-dong¹

(1 The third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan, Kunming, 650118, China;

2 The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University Institute of cancer research, Yunnan, Kunming, 650118, China)

ABSTRACT Objective: To establish neurogliocytoma cells ex-vitro primary culture model and carry out chemosensitivity experiment by the MTT assay. To provide theory guidance for designing and optimizing clinical chemotherapy regimen, to practice individualization chemotherapy. **Methods:** Using 32 fresh specimen which were proved to be neurogliocytoma (WHO grade 3) to produce monoplast suspension and carry out vitro primary culture, add 7 antineoplastic drugs with peak plasma concentration to primary culture glioma cells, after 72 hours measure the survival tumor cell with the MTT colorimetric assay, get the optical density and the inhibition ratio, then judge the sensitiveness and drug fast of every drugs to every tumors, to guide the clinical individual Chemotherapy. Another 20 patients with anaplastic glioma received VM-26 and DDP regimen chemotherapy. Radiology evaluation of 2 groups is done in the light of WHO malignant tumor treatment effect assessment following 4 periodic of chemotherapy. **Results:** 32 clinical gliomas specimen were subject to primary culture and susceptibility test. The rank of sensitivity from high to low is: DDP> VP-16> VM-26>VCr >procarbazine>BCNU> paclitaxel. Based on the ex-vivo chemotherapy sensitivity and resistance assay, individualized chemotherapy is implemented in 29 patients. Glioma remission ratio in individualized chemotherapy is 47.2%, in comparison with control group the difference is significant. **Conclusion:** MTT colorimetric assay is convenient, objective and simple method with good repeatability. Every one of 7 drugs commonly used has the situation of drug resistance. Chemosensitivity assay can avoid using the resistant drugs and provide guidance to improve the clinical chemotherapy effect. Individualized chemotherapy on the basis of vitro sensitivity and resistance assay for patients with malignant glioma could improved treatment efficacy.

Key word: Glioma; Drug sensitivity and resistance; Chemotherapy

Chinese Library Classification(CLC): R739.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)06-1075-03

* 基金项目:云南省教育厅基金资助(06y132C)

作者简介:倪炜(1978-)男,博士研究生,主治医师,研究方向:脑肿瘤手术及化疗。

Tel: 13708873667, E-mail: neewei@live.cn

△通讯作者:罗林 教授, Tel: 0871-8185656-2091, E-mail: sunny.95@163.com

(收稿日期:2011-06-15 接受日期:2011-07-11)

前言

化疗是恶性脑胶质瘤的重要辅助治疗手段,可以进一步杀灭残存的肿瘤细胞降低肿瘤负荷^[1],但目前胶质瘤化疗效果并不理想,究其原因除了血脑屏障限制药物进入中枢神经系统外,与胶质瘤对化疗药物耐药密切相关,因此,进行化疗药物敏感试验指导临床个体化化疗,对于延长患者生存期,提高胶质瘤综合治疗水平具有一定的理论及现实意义。本研究对恶性胶质瘤患者手术切除的肿瘤组织进行体外原代细胞培养,应用四甲基偶氮唑盐(MTT)法对7种常用化疗药物进行敏感实验作为选择化疗药物的参考,以提高恶性脑胶质瘤化疗效果。

1 材料和方法

1.1 临床资料

随机选取2006年6月至2008年6月本院神经外科手术切除冰冻切片证实为WHO中枢神经系统肿瘤分类标准间变型星形细胞瘤(WHO 3级)的新鲜肿瘤标本共32例,患者年龄为20岁~65岁之间,性别不限,且不合并其他系统肿瘤的患者为试验组。

1.2 方法

将胶质瘤标本制备肿瘤单细胞悬液进行体外原代培养,与7种抗肿瘤药 DDP, VM-26, VP-16, BCNU, VCR, PCZ, Taxol 的临床血浆峰值浓度(PPC)作用72小时 MTT 法标记存活的肿瘤细胞,测出不同肿瘤个体对不同化疗药物的敏感和耐药情况,用 M490 酶标仪测量吸光值(OD)。按下列公式计算抑制率:抑制率(IR)=(空白组 OD 值-实验组 OD 值)/空白组 OD 值×100%。血药峰浓度下的抑制率大于50%,认为该药物敏感。从而指导临床个体化化疗方案的制定;另选取同期符合上述入选标准的21例间变型星形细胞瘤(WHO 3级)患者作为对照组,按照 VM-26 加 DDP 方案经验化疗,化疗4个疗程结束后,复查影像学,按照 WHO 肿瘤疗效评价标准评价治疗效果,进行2组间化疗总有效率比较。

2 结果

2.1 原代培养胶质瘤细胞药敏实验结果

本实验共测定了32例临床标本加入7种抗肿瘤药物在血浆峰浓度(PPC)下的抑制率。具体结果如表1所示。

表1 胶质瘤细胞对7种药物的抑制率比较
Table 1 Comparison of Inhibiting Rate of glioma cells to 7 agents

Inhibiting Rate	DDP	VCR	VM-26	PCZ	VP-16	BCNU	Taxol
IR>50%	16	8	9	6	12	5	2
30%<IR<50%	6	13	10	6	12	4	2
IR<30%	10	11	13	20	8	23	28

以 IR>50% 为敏感,32 例标本中 DDP 敏感程度最高,有16例敏感。按照敏感程度从高到低排列依次 DDP>VP-16>VM-26>VCR>PCZ>BCNU>Taxol。

2.2 体外药物敏感试验为依据的化疗情况

个体化化疗的有效率为41.2%,而对照组的有效率为29.4%。2组化疗总有效率(CR plus PR)比较差异有统计学意义。个体化化疗方案及反应情况详见表2。

表2 体外敏感实验为依据的化疗方案及疗效
Table 2 Efficacy of chemotherapy regimens based on drug sensibility and resistance assay

Regimen	Cases	Response			
		CR	PR	SD	PD
VM-26 plus DDP	5	0	1	3	1
BCNU plus DDP	3	0	0	3	0
VP-16 plus DDP	4	1	0	1	2
VP-16 plus PCZ	5	0	2	1	2
VM-26 alone	4	0	0	3	1
VCR plus DDP	4	0	1	2	1
VP-16 plus VCR	3	1	1	1	0
BCNU alone	2	0	1	1	0
Taxol alone	2	0	0	2	0

Note: VM-26, teniposide; BCNU, carmustine; DDP, cisplatin; PCZ, procarbazine; VCR, vincristine; VP-16, etoposide; CR, complete remission; PR, partial remission; SD, stable disease; PD, progressive disease; Taxol, paclitaxel

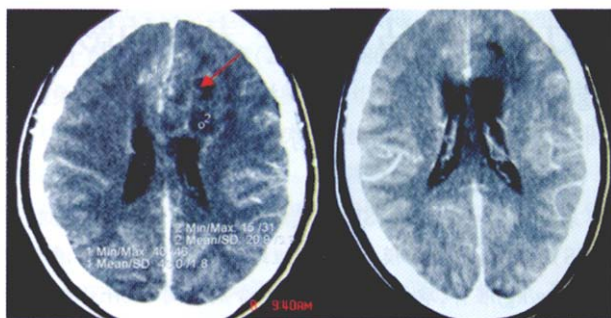


图1 间变性星形细胞瘤个体化疗前后CT对比

Figure 1 CT images of anaplastic astrocytoma before (A) and after chemotherapy (B)

A 34-year-old woman with anaplastic astrocytoma achieved complete remission after 2 cycles of chemotherapy

3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,大约占每年新诊断的原发恶性脑肿瘤的70%^[2],尽管目前对胶质瘤发病相关的一些分子机制的认识日益深入,但总体来说脑胶质瘤的治疗效果并不令人满意,胶质母细胞瘤的中位生存期仅12~15个月,间变性胶质瘤仅2~5年。近年来的Stewart LA等人Meta分析研究指出胶质瘤辅助化疗可以使1年生存率提高6~10%^[3],由于胶质瘤的异质性,即使病理级别不同的不同个体对同一种化疗药物的敏感性差异较大,例如临床上对恶性胶质瘤的常规化疗药卡莫司汀(BCNU)的有效率只有20%^[4]。因此个体化化疗在临床肿瘤化疗中显得尤为重要,肿瘤药敏试验是实现肿瘤个体化化疗的基础。

MTT法是评价细胞增殖和存活情况的一种体外药敏实验方法,国内外学者纷纷将其应用于临床部分肿瘤(白血病、胃癌、肺癌、卵巢癌)的化疗药敏检测^[5,6],已被美国NCI选作为体外抗肿瘤药物筛选的常规方法。体外肿瘤药敏试验MTT法测定结果与临床总符合率达到74%~90%^[7]。但目前用MTT法进行神经胶质瘤化疗药物敏感性试验的系统报道较少,本研究建立胶质瘤细胞原代的模型,并采用MTT法检测7种抗肿瘤药物的细胞毒性作用,为临床筛选敏感的抗肿瘤药物实施个体化化疗提供参考^[8,12]。

若以抑制率>50%作为敏感与否的判断标准,则7种药物对神经胶质瘤的敏感程度从高到低排列依次为DDP>VP-16>VM-26>VCR>PBC>BCNU>Taxol,对神经胶质瘤比较敏感的化疗药物如DDP,也存在对其不敏感的个体(10例/32例的抑制率<50%),而对神经胶质瘤不敏感的药物如Taxol亦存在对其敏感的个体(2例/32例的抑制率>50%),提示由于胶质瘤的异质性表现为病理类型不同的不同个体对同一种化疗药物的反应均有比较大的差异^[9],我们的研究显示经验用药常使用的亚硝脲类药物BCNU的敏感率仅达到15.6%,尽管体外药敏试验难以模拟复杂的体内环境,药物在体内的代谢与排泄以及体内由于血脑屏障限制,使药物到达胶质瘤组织的浓度下降,与体外药敏试验的条件有较大差异,但有研究表明

体外药物敏感而在体内有效的为71.4%,有较高的阳性符合率,体外耐药且体内也耐药的符合率达到93.3%^[10,11]。本研究结果显示,应用体外药物敏感实验为依据的化疗的有效率为41.2%,而对照组为27.4%,2组比较 $P<0.05$,采用体外药敏试验指导的个体化化疗结果初步显示有较好的近期疗效,国内张俊平等研究认为体外药物敏感实验与临床疗效的相关性,发现体外耐药且在体内耐药的符合率达到93.3%,体外敏感而在体内有效的为71.4%,体外药敏试验可以为临床化疗用药起到筛选作用,至少可以避免使用体外实验耐药的药物^[8,13]。

目前,MTT法尚无一个国际统一的技术标准,不利于资料积累和比较。各医院及研究所所做的脑胶质瘤药敏试验少的只有十几例,多则几十例,尚需大样本多中心研究以提高临床化疗药物筛选和预测的准确性。

参考文献(References)

- [1] Stéphane Pédeboscq, Béatrice L'Azou, Dominique Liguoro, et al. Interindividual differences in anticancer drug cytotoxicity in primary human glioblastoma cells[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2007 (58): 248
- [2] Patric Y Wen, Santosh Kesari. Malignant gliomas in adult[J]. N ENGL J MED, 339(5):492-505
- [3] Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade gliomas: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials[J]. Lancet, 2002(359): 1011-1018
- [4] Westphal KA, Wright CD, Loehrer PJ Sr. Thymoma: current medical and surgical management [J]. Semin Neurol, 2004, 24(1): 63
- [5] 辛华雯. 40例胃癌乳腺癌化疗药物敏感性MTT法研究[J]. 中国肿瘤临床, 1994, 21(9): 699
- [6] 贾正平, 谢景文, 谢廷泉. MTT快速比色法在肺癌化疗药物敏感性试验的研究[J]. 肿瘤防治研究, 1993, 20(4): 243
- [7] 张银霞, 于兰, 吕同德. 肿瘤药敏试验方法及临床应用[J]. 医学综述, 2003, 9(1): 34-35
- [8] Zhang Jun-ping, Shi Hong-liu, Sai Ke. Individualized chemotherapy based on drug sensitivity and resistance assay and MGMT protein expression for patient with malignant glioma [J]. Chinese Journal of Cancer, 2006, 25(12): 1533-1537
- [9] Lewandowicz GM, Harding B, Harkness W. Chemosensitivity in childhood brain tumours in vitro: evidence of differential sensitivity to lomustine(CCNU) and vincristine[J]. European Journal of Cancer, 2000, (36): 1955-1964
- [10] Cheng Jian-wen, Zhang Jun-ping, Cheng Jing-jian, et al. Chemotherapy for malignant glioma patients based on in vitro chemosensitivity assay [J]. Canton Medical, 2005, 26(9): 1183-1185
- [11] Yu Chao-chun, Zhou Fan-min, Wang Yu-qian. Research on the chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas [J]. Chin J Neuro-med, 2005, 4 (7): 686-690
- [12] Fu Jun, Cheng Zhong-Ping. Laboratory techniques for predicting chemosensitivity in malignant glioma and their clinical application[J]. Chin J of Neuro-Onco, 2007, (1): 72-76
- [13] Fang Chuan, Tan Yan-li, Wang Jia-liang, et al. Primary culture and drug sensitivity of human glioma cells [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2010, 37(12): 1380-1382