

原代胶质瘤细胞化疗药物敏感性研究

王宁 王伟 杨日晓 王茂德 王拓 陈伟 李奇

【摘要】 目的 观察不同抗肿瘤药物在体外对原代人胶质瘤细胞的敏感性,为临床筛选化疗药物、制订个体化方案提供指导。方法 46 例经手术后病理证实的胶质瘤新鲜组织标本进行体外原代培养,流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染法检测替尼泊苷、尼莫司汀、甲氨蝶呤和替莫唑胺在体外对原代胶质瘤细胞的敏感性;分析不同化疗药物敏感性与患者性别、年龄和肿瘤病理分级之间的关系。结果 人胶质瘤细胞对 4 种化疗药物敏感性的强弱程度依次为替尼泊苷(39.13%)、替莫唑胺(34.78%)、尼莫司汀(26.09%)和甲氨蝶呤(6.52%),组间差异具有统计学意义($\chi^2=14.770, P=0.002$);甲氨蝶呤组患者对化疗药物敏感性最低,与其他各组比较差异具有统计学意义($\chi^2=13.883, 11.210, 6.452$; 均 $P<0.05$)。亚组分析提示,性别和年龄对化疗药物敏感性无显著影响(均 $P>0.05$),但不同 WHO 病理分级对替莫唑胺化疗敏感性存在差异并具有统计学意义($\chi^2=4.305, P=0.038$)。结论 不同胶质瘤个体对化疗药物的敏感性不同,以替尼泊苷抗胶质瘤作用较强,替莫唑胺对高级别胶质瘤药物化疗效果更佳。流式细胞术可作为快速化疗药物敏感性检测方法,为胶质瘤筛选化疗药物并制订个体化方案。

【关键词】 神经胶质瘤; 抗肿瘤联合化疗方案; 药物筛选试验,抗肿瘤; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2010.05.008

Study on the sensitivity of primary glioma cell to chemotherapeutic agents in vitro WANG Ning, WANG Wei, YANG Ri-xiao, WANG Mao-de, WANG Tuo, CHEN Wei, LI Qi. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shanxi, China
Corresponding author: WANG Mao-de (Email: maodewang@163.com)

【Abstract】 Objective To study the sensitivity of primary human glioma cell to chemotherapeutic agents in vitro in order to provide an experimental basis for clinical chemotherapy of glioma. **Methods** The glioma cells derived from 46 cases of fresh brain glioma specimens were cultured in vitro. The sensitivity of primary cultured brain glioma cell to 4 chemotherapeutic agents which were teniposide (VM26), nimustine (ACNU), methotrexate (MTX) and temozolomide (TMZ) was determined by flow cytometry assay. **Results** The sensitivity sequence in 46 cases of 4 chemotherapeutic agents from high to low was VM26 (39.13%), TMZ (34.78%), ACNU (26.09%) and MTX (6.52%), there was no significant difference in the chemosensitivity in the groups of VM26, ACNU and TMZ. The chemosensitivity in MTX group was significant lower than the other groups ($\chi^2=13.883, 11.210, 6.452; P<0.05$, for all). There was no significant influence of patients' sex and age on chemosensitivity ($P>0.05$, for all). Except TMZ group, the other chemotherapeutic agents showed no significant correlation of chemosensitivity with the pathological grade of the tumor. **Conclusion** Glioma sensitivity to chemotherapeutic drugs in vitro is different. VM26 anti-glioma effect is stronger than the other 3 drugs; TMZ shows a better effect in high grade gliomas. Flow cytometry assay is a rapid drug sensitivity detecting method for screening chemotherapy drugs.

【Key words】 Glioma; Antineoplastic combined chemotherapy protocols; Drug screening assays, antitumor; Flow cytometry

胶质瘤是临床最为常见的颅内原发性肿瘤,约占所有颅内原发性肿瘤的 50% 以上,其侵袭性强、

生长迅速、病死率高,手术后易复发。据资料显示,胶质瘤在所有新发肿瘤中约占 1.40%,因胶质瘤死亡的病例约占所有肿瘤死亡人数的 2.40%^[1]。药物化疗是胶质瘤的重要治疗措施之一,然而,目前胶质瘤的药物化疗效果欠佳,临床上常发现不同胶质瘤个体对同一种化疗药物的疗效会有所不同,甚至

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30772226)

作者单位:710061 西安交通大学医学院第一附属医院神经外科

通信作者:王茂德(Email:maodewang@163.com)

存在显著差异。因此,针对不同病理级别的肿瘤制订个体化药物化疗方案对胶质瘤患者的治疗有着重要意义。在本研究中,我们利用原代培养的人胶质瘤细胞,采用流式细胞术检测 4 种化疗药物在体外的抗肿瘤效应,拟为临床筛选化疗药物及制订药物化疗方案提供实验性参考依据,以提高胶质瘤的临床疗效。

材料与方法

一、材料

1. 标本来源 46 例活肿瘤组织标本随机取自 2008 年 1 月-2009 年 1 月在西安交通大学医学院第一附属医院神经外科住院行手术治疗并经病理证实的胶质瘤患者,男 28 例,女 18 例;年龄 24~70 岁,平均 (44.98 ± 19.44) 岁,其中 <40 岁 21 例, ≥ 40 岁 25 例。按照 2000 年 WHO 神经上皮组织肿瘤分类与分级标准^[2],WHO II 级者 24 例(弥漫性星形细胞瘤 19 例、少突胶质细胞瘤 2 例、室管膜瘤 3 例),WHO III 级者 18 例(间变性星形细胞瘤 17 例、间变性少突-星形细胞瘤 1 例),WHO IV 级者 4 例(胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤各 2 例)。

2. 试剂与仪器 (1)试剂:DMEM 培养液和胎牛血清均购于美国 HyClone 公司。本研究所用 4 种化疗药物替尼泊昔(VM26)购自美国 Bristol-Myers Squibb 公司,尼莫司汀(ACNU)、甲氨蝶呤(MTX)和替莫唑胺(TMZ)均为美国 Sigma 公司产品,并按照如下公式配制血浆峰浓度(PPC)备用:血浆峰浓度($\mu\text{g/ml}$) = $50 \times D \times 2 \times 10^3 / 500$ {D 为临床用药剂量 [$\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]}^[3],配药所用溶剂为灭菌注射用水。(2)仪器:流式细胞仪由美国 Beckman Coulter 公司提供。超净工作台为天津市泰斯特仪器有限公司产品。Thermo HEPA Class 100 二氧化碳培养箱购自美国 Thermo 公司。Motic-AE31 型倒置生物显微镜为加拿大 Motic 公司产品。

二、研究方法

1. 原代细胞培养 选择肿瘤边缘组织较多的部分采集活组织标本,取材时避免电凝。无菌条件下生理盐水清洗组织标本后置无菌瓶中,注射器加注适量无血清 DMEM 培养液即刻送实验室备测。采用 pH 值为 7.40 的磷酸盐缓冲液清洗组织标本,剔除血管和坏死组织,眼科镊和剪刀尽可能分离为 $<1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 组织块,小吸管或眼科镊小心

移至 10 ml 无菌离心管。加入质量分数为 0.25% 胰蛋白酶 6 ml,室温下轻振荡 15 min,离心半径 16 cm、1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液约 10 ml,吸管吹打、静置 5 min;上层细胞悬液移至培养瓶中,再加入适量含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,37 ℃、体积分数为 5% 二氧化碳培养箱中培养 72 h,然后进行流式细胞术检测。

2. 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 细胞密度调整至 $400 \times 10^3/\text{ml}$ 即接种于 6 孔板中继续培养,待细胞贴壁后,分为对照组和实验组,光学显微镜下观察细胞形态无异常,分别将实验组 DMEM 培养液换成含血浆峰浓度的 4 种化疗药物的培养液,每组浓度设 3 个重复孔,继续培养 48 h 收集细胞,4 ℃ 预冷磷酸盐缓冲液洗涤 5 min($\times 2$ 次),弃上清后重悬细胞于 250 μl 结合缓冲液中(4 ℃),滴加 5 μl Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC)和 10 μl 碘化丙啶(PI)溶液,摇匀,室温下避光染色 15 min,滴加 400 μl 磷酸盐缓冲液后立即进行流式细胞术检测,测定细胞凋亡率,以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的试管作为阴性对照。细胞凋亡率 $>30\%$ 为对化疗药物敏感, $\leq 30\%$ 为耐药。化疗药物敏感率(%) = 敏感例数 / 总例数 $\times 100\%$ 。

3. 统计分析方法 采用 SPSS 13.0 统计软件对所得数据进行分析。本实验计数资料以率(%)或相对数构成比(%)表示,采用 χ^2 检验。统计推断的检验水准均为 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、化疗药物体外敏感性观察

46 例胶质瘤组织标本经流式细胞术检测,替尼泊昔、尼莫司汀、甲氨蝶呤和替莫唑胺的化疗敏感率分别为 39.13%(18/46)、26.09%(12/46)、6.52%(3/46)和 34.78%(16/46),4 种化疗药物敏感性比较,差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.770, P = 0.002$; 表 1);不同化疗药物之间敏感性比较,替尼泊昔、尼莫司汀和替莫唑胺 3 组之间药物敏感率差异均无统计学意义($P > 0.05$),而甲氨蝶呤组药物敏感率低于其他抗肿瘤药物组,而且差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$, 表 2)。

二、性别和年龄对化疗药物敏感性的影响

按照患者性别和年龄进行亚组分析,其结果显

表1 4种化疗药物敏感性的比较 例(%)				表2 4种化疗药物敏感性的两两比较		
化疗药物	样本例数	敏感	耐药	组间两两比	χ^2 值	P值
VM26(1)	46	18(39.13)	28(60.87)	(1):(2)	1.781	0.182
ACNU(2)	46	12(26.09)	34(73.91)	(1):(3)	13.883	0.000
MTX(3)	46	3(6.52)	43(93.48)	(1):(4)	0.187	0.666
TMZ(4)	46	16(34.78)	30(65.22)	(2):(3)	6.452	0.011
				(2):(4)	0.821	0.365
				(3):(4)	11.210	0.001

注:4种化疗药物敏感性比较的 χ^2 检验, $\chi^2=14.770,P=0.002$ 。
VM26,替尼泊苷;ACNU,尼莫司汀;MTX,甲氨蝶呤;TMZ,替莫唑胺

表3 不同性别组患者对4种化疗药物敏感性的比较 例(%)									
组别	样本例数	VM26		ACNU		MTX		TMZ	
		敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药
男性组	28	12(42.86)	16(57.14)	8(28.57)	20(71.43)	2(7.14)	26(92.86)	10(35.71)	18(64.29)
女性组	18	6(33.33)	12(66.67)	4(22.22)	14(77.78)	1(5.56)	17(94.44)	6(33.33)	12(66.67)
χ^2 值		0.420		0.018		0.000		0.027	
P值		0.520		0.893		1.000		0.869	

注:VM26,替尼泊苷;ACNU,尼莫司汀;MTX,甲氨蝶呤;TMZ,替莫唑胺。下表同

表4 不同年龄组患者对4种化疗药物敏感性的比较 例(%)									
组别	样本例数	VM26		ACNU		MTX		TMZ	
		敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药
≥40岁组	25	10(40.00)	15(60.00)	6(24.00)	19(76.00)	1(4.00)	24(96.00)	11(44.00)	14(56.00)
<40岁组	21	8(38.10)	13(61.90)	6(28.57)	15(71.43)	2(9.52)	19(90.48)	5(23.81)	16(76.19)
χ^2 值		0.017		0.124		0.024		2.051	
P值		0.895		0.725		0.876		0.152	

表5 不同WHO分级组患者对4种化疗药物敏感性的比较 例(%)									
组别	样本例数	VM26		ACNU		MTX		TMZ	
		敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药
WHO II级组	24	11(45.83)	13(54.17)	7(29.17)	17(70.83)	2(8.33)	22(91.67)	5(20.83)	19(79.17)
WHO III~IV级组	22	7(31.82)	15(68.18)	5(22.73)	17(77.27)	1(4.55)	21(95.45)	11(50.00)	11(50.00)
χ^2 值		0.947		0.247		0.000		4.305	
P值		0.331		0.619		1.000		0.038	

示性别和年龄对化疗药物的敏感性均无明显影响 ($P>0.05$;表3,4)。

三、肿瘤病理分级与化疗药物敏感性之间关系的观察

不同WHO分级胶质瘤对4种化疗药物敏感性的比较结果显示,WHO II级组和III~IV级组对替尼泊苷、尼莫司汀和甲氨蝶呤化疗敏感性差异无统计学意义(均 $P>0.05$);而两组标本对替莫唑胺化疗敏感性差异有统计学意义($\chi^2=4.305,P=0.038$;表5),其列联系数为0.293。

讨 论

药物化疗是胶质瘤治疗的重要手段之一,但是由于胶质瘤的耐药性、异质性以及血-脑屏障存在等因素,从而导致胶质瘤对同样的化疗药物表现出不同的敏感性。临床上的经验用药已经无法保证胶质瘤的疗效,而且在一定程度上增加了药物的毒性反应,如何针对不同患者的具体情况,筛选敏感的化疗药物,制订更为合理的个体化药物化疗方案,已成为亟待解决的问题。研究表明,经体外培养的

肿瘤细胞对化疗药物的敏感性和体内治疗效果有着良好的相关性^[4,5],这意味着体外化疗药物敏感性试验对胶质瘤的治疗有着重要的指导意义。

诱导肿瘤细胞凋亡是化疗药物发挥其抗肿瘤作用的重要途径,在很大程度上决定了化疗药物的临床疗效^[6]。目前,流式细胞术是最精确、可靠的肿瘤细胞凋亡率检测方法,姚静等^[7]的研究结果显示,流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染法在体外化疗药物敏感性试验中比经典的噻唑蓝(MTT)比色法具有更敏感、快速、简洁、可靠等优点,具有临床应用价值。在本研究中,我们采用流式细胞术进行体外药物敏感性试验,结果显示,替尼泊苷的体外敏感性最高,其次为替莫唑胺、尼莫司汀,但替尼泊苷、尼莫司汀和替莫唑胺之间敏感性差异无统计学意义。国内一些学者采用其他方法检测的胶质瘤体外药物敏感性结果^[8,9]与本研究相似。肿瘤的细胞动力学及分子病理学特征目前被认为是影响药物化疗疗效的主要因素,2002年,一项纳入3000例胶质瘤患者的临床分析显示,药物化疗可使原发性胶质瘤患者的一年生存率提高6%,以亚硝基脲类药物为基础的化疗方案可将胶质瘤患者的两年生存率由15%提高至20%,从而肯定了药物化疗的临床效果,同时亦发现药物化疗效果与患者年龄、性别、病理分级等因素无相关性^[10]。我们对本组患者的性别、年龄和病理分级进行分析,发现4种化疗药物敏感性与患者性别和年龄均无相关性,在病理分级上,除替莫唑胺外,其他3种化疗药物敏感性与患者病理分级亦无关联性。因此,性别、年龄、病理分级等因素不能作为制订胶质瘤药物化疗方案的主要参考指标。近20年来,胶质瘤的药物化疗逐步走向规范,新的化疗药物不断应用于临床。替莫唑胺属于第2代烷化剂,可通过血-脑屏障,是一种抗胶质瘤的新型抗肿瘤药物,与传统的化疗药物相比,具有不良反应小、易吸收等特点,临床疗效较好。Dinnes等^[11]的研究表明,替莫唑胺对于复发性间变性星形细胞瘤和多形性胶质母细胞瘤治疗效果更佳。我们将替莫唑胺列入本研究,发现其药物敏感率为34.78%(16/46),对高级别胶质瘤敏感性更好,但列联系数仅为0.293,其药物化疗效果与胶质瘤病理级别之间的关联程度并不密切。

尽管体外药物敏感性测定结果与患者体内药

物化疗效果存在较好的相关性,但是在体内与体外环境不同,二者效果不可能完全一致。据Nikkhah等^[12]报告,治疗胶质瘤的化疗药物体外药物敏感性实验与体内同时耐药的符合率接近95%,二者之间具有较高的相关性;体外敏感而在患者体内同样有效者仅约65%。因此,在临床制订药物化疗方案时,还需考虑患者的个体差异性和药代动力学特点等因素,同时注意避免使用在体外耐药的化疗药物。目前,胶质瘤化疗耐药的研究已经进入分子病理学水平^[13],耐药相关基因的发现为胶质瘤药物化疗方案的选择提供了新的思路,随着研究的不断深入,基于胶质瘤的分子病理学特征和体外药物敏感性试验结果所制订个体化化疗方案将成为胶质瘤药物化疗新的趋势。

参 考 文 献

- [1] Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, et al. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, 2001, 51:15-36.
- [2] 只达石, 于士柱. 中枢神经系统肿瘤1993年和2000年两次WHO分类的比较. *现代神经疾病杂志*, 2003, 3:7-12.
- [3] Limburg H. Individual chemotherapy of ovarian cancer by means of tissue and culture method//Dendy PP. *Human tumors in short term culture: techniques and clinical application*. London: Academic Press, 1972: 29-38.
- [4] Dow LW, Dahl GV, Kalwinsky DK, et al. Correlation of drug sensitivity in vitro with clinical responses in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*, 1986, 68:400-405.
- [5] Furukawa T, Kubota T, Watanabe M, et al. High in vitro-in vivo correlation of drug response using sponge-gel-supported three-dimensional histoculture and the MTT end point. *Int J Cancer*, 1992, 51:489-498.
- [6] Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53:153-159.
- [7] 姚静, 李小兰, 李伟华, 等. 抗肿瘤药物敏感性实验方法的比较. *中华实验外科杂志*, 2005, 22:792-793.
- [8] 张伟, 江涛, 袁芳, 等. 脑胶质瘤组织培养化疗药物敏感性的研究. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2007, 12:163-166.
- [9] 卢俊章, 杨正明. 脑胶质瘤化疗敏感性实验研究. *中国临床神经外科杂志*, 2007, 12:267-269.
- [10] Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*, 2002, 359:1011-1018.
- [11] Dinnes J, Cave C, Huang S, et al. A rapid and systematic review of the effectiveness of temozolomide for the treatment of recurrent malignant glioma. *Br J Cancer*, 2002, 86:501-505.
- [12] Nikkhah G, Tonn JC, Hoffmann O, et al. The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. Part II: evaluation of patient- and drug-specific variables. *J Neurooncol*, 1992, 13:13-24.
- [13] Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci*, 2009, 10:184-212.

(收稿日期:2010-08-17)