

肿瘤体外三磷酸腺苷药敏试验

刘珊玲,彭芝兰,楼江燕,王 和,唐茜萍,何 斌

摘 要:目的 评价肿瘤细胞经药物处理后的生存情况,探讨将该方法用于卵巢癌药敏试验的可行性。方法 采用生物荧光法检测三磷酸腺苷(ATP),对小鼠纤维瘤细胞株 L929、人卵巢癌组织和腹水细胞进行抗癌药物处理后的细胞活性测定。结果 该法能测出不同浓度药物对细胞作用的剂量—效应关系,以及不同个体对不同浓度药物反应的差异,实验变异系数 CV 值为 1.2 ~ 15.8%。结论 ATP 生物荧光法有稳定、重复性好、特别敏感的特点,用于卵巢癌体外药敏试验可行。

关键词:药物敏感性试验;卵巢癌;三磷酸腺苷-生物荧光法

中图分类号:R730.264 文献标识码:A 文章编号:1000-8578 (2000)06-0429-04

以抗癌药物治疗个体化为目的的药物敏感性试验是当今癌症研究的主要课题之一^[1]。至今,学者们建立了多种肿瘤体外药敏试验,并在临床上取得一定效果,寻找一种敏感性、特异性高,简便易行,与临床相关好的方法仍在进行^[2]。本文采用生物荧光液闪测定法检测三磷酸腺苷(ATP),评价肿瘤细胞经药物处理后的生存情况,探讨将该方法用于卵巢癌药敏试验的可行性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 小鼠纤维瘤细胞株 L929 (American Type Culture Collection);卵巢癌实体瘤标本 5 例,腹水标本 1 例,均为本科手术病人的新鲜标本。

1.2 试剂及仪器 试剂:ATP 标准品;RPMI1640、McCoy's 5A 培养基 (Gibco);琼脂糖 (Serva);荧光素、荧光素酶 (Boehringer Mannheim);4% 三氯醋酸溶液 (TCA)、ATP 检测中和液、反应液等由本实验室配制;抗癌药物顺铂 (CDDP)、足叶乙甙 (VP-16)、阿霉素 (ADR)、5-氟尿嘧啶 (5-FU) 按血浆最高浓度 (PPC) 的 50 倍配制储备液^[3]。仪器:液闪计数仪等。

1.3 ATP 生物荧光液闪测定法^[4,5] 将待测液 100ul、中和液 200ul、含荧光素、荧光素酶的反应混合液 300ul 和反应缓冲液 4ml 加入闪烁瓶中,于液闪计数仪中检测 1 分钟计数值。

1.4 ATP 标准品的检测 ATP 标准品系列浓度 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/ml,与等量 4%TCA 溶液混匀,取 100ul 进行测定。作出标准曲线 (图 1)。

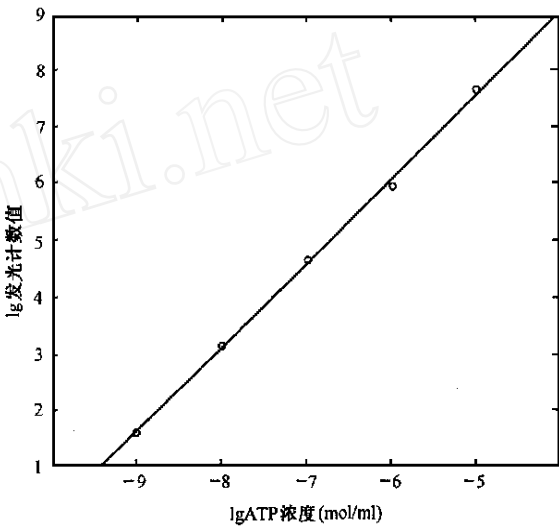


图 1 ATP 标准曲线

1.5 L929 细胞培养及检测 取生长旺盛的 L929 细胞用 2% 台盘兰染色计活细胞数,分别稀释成 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 个细胞/ml,提取 ATP 进行测定,分析活细胞数与 ATP 量及荧光计数值的关系^[4] (图 2)。

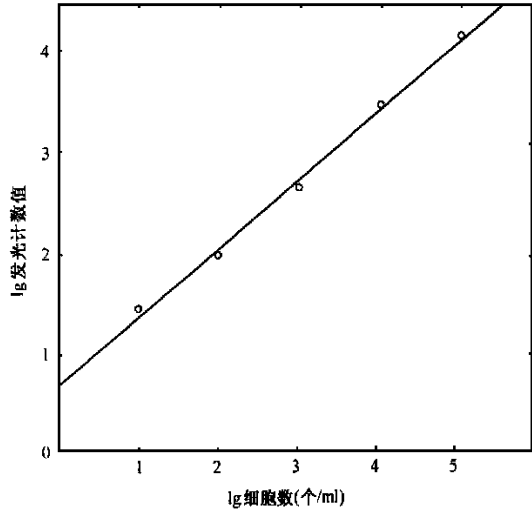


图 2 细胞数与 ATP 量的关系

收稿日期:1999-09-08; 修回日期:1999-11-24

基金项目:高校博士点基金课题资助项目 (卫科技发 (91) 第 101 号,校内编号 91014)

作者单位:610041 成都,华西医科大学附二院妇产科教研室

1.6 卵巢癌细胞的培养及检测^[6] (1)取腹水,离心、破红细胞,细胞悬液加入带凝胶的 24 孔培养板中培养。(2)新鲜瘤组织剪碎,经混合酶液分解后,去除细胞碎片及大细胞团,将含有少量 <30 个细胞团块的单细胞悬液接种于上述培养板培养。(3)分别加入终浓度为 1x 和 0.2xPPC 的抗癌药物 ADR、5-FU、VP-16 和 CDDP。培养结束测定 ATP。对照组于第 1~7 天取样,分析其生长情况(图 3)及剂量效应曲线(图 4)。

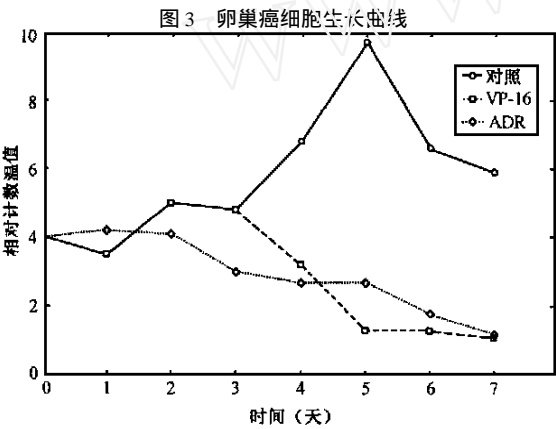
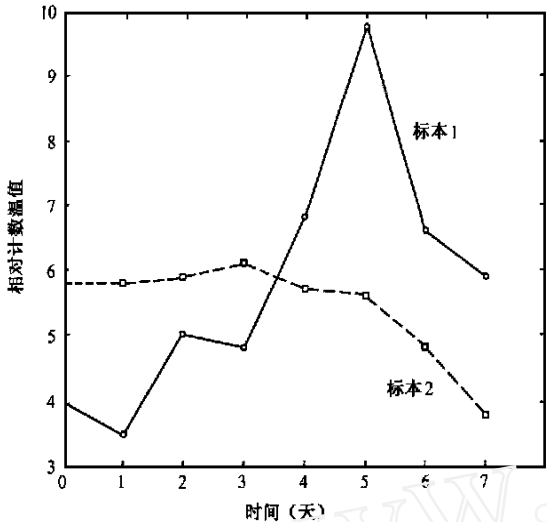


图 4 抗癌药物对卵巢癌细胞的影响

表 1 抗癌药物作用后,卵巢癌细胞 ATP 下降率($\bar{x} \pm s$) %

| 药物 | 0.2xPPC | | 1xPPC | |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 第 3 天 | 第 5 天 | 第 3 天 | 第 5 天 |
| DDP | 10.1 \pm 0.3 | 8.9 \pm 1.1 | 23.0 \pm 2.0 | 51.1 \pm 3.1 |
| VP-16 | 75.6 \pm 2.0 | 82.7 \pm 8.1 | 62.2 \pm 4.2 | 94 \pm 11.3 |
| 5-Fu | 11.2 \pm 1.2 | 14.3 \pm 2.3 | 8.2 \pm 1.2 | 40.3 \pm 3.5 |
| Adr | 20.0 \pm 3.2 | 69.1 \pm 2.7 | 27.8 \pm 1.6 | 83.2 \pm 2.6 |
| 0.01 < P < 0.05 | | | P < 0.001 | |

同一浓度作用下,第 5 天的下降率均大于第 3 天,而同一时间条件下,高浓度作用后的下降率大于低浓度,因而在培养的第 5 天检测更易测出药物作用结果。图 5 即显示卵巢癌细胞经抗癌药物处理

1.7 细胞学分析 对照组瘤细胞在加药前(0 天,即细胞培养当天)和培养结束时(第 5 天)作细胞涂片,HE 染色,计癌细胞比例。

1.8 统计学分析 各项检测平行作三管,计算变异系数,以评价方法的稳定性。

2 结果

2.1 ATP 标准曲线 以 ATP 浓度(mol/ml)的对数为横坐标,计数值的对数为纵坐标,绘制直线如图 1。

直线方程: $Y=1.48X+15.03$

相关系数: $r=0.9963$, ($P<0.001$)

平均变异系数 $CV=1.3\%$ (1.0% ~ 2.1%)

2.2 活细胞数与 ATP 量的关系 以 L929 细胞数的对数为横坐标,计数值的对数为纵坐标,细胞数在 $3 \times 10^2 \sim 10^6$ 个/ml 时,绘制一直线,直线相关系数 $r=0.9922$ ($P<0.001$),平均变异系数 $CV=1.4\%$ 。通过计数值可反应活细胞的数目。(图 2)

2.3 细胞的生长曲线 卵巢癌实体瘤(标本 1)及腹水标本(标本 2)在培养第 2~5 天中,癌细胞的生长相对稳定,第 7 天后大量死亡。图中取点为平行三管均值, CV 值 1.2% ~ 15.8%。(图 3)

2.4 抗癌药物对卵巢癌细胞的影响

2.4.1 最初 3 天,药物处理组与对照组无明显区别,第 4 天开始,药物处理组 ATP 量(以相对计数值表示)持续下降,与对照组的差别越来越明显,第 6 天后,对照组 ATP 值亦开始下降。(图 4)

2.4.2 不同浓度抗癌药物在不同培养时间对卵巢癌细胞的影响列于表 1 中。

ATP 值下降率 = $\left[1 - \frac{\text{药物处理组 ATP 值}}{\text{对照组 ATP 值}} \right] \times 100\%$

后的剂量-效应曲线,图中各组数据 CV 值 5.0% ~ 14.3%。

2.5 不同个体肿瘤细胞对抗癌药物的反应 6 例卵巢癌细胞用 0.2x 和 1xPPC 的四种抗癌药物作用

后，第 5 天进行检测，与对照组相比，ATP 下降率 >70% 为敏感（S），下降率 50% ~ 70% 为中度敏感（PS），下降率 <50% 为耐药（R），结果见表 2。不同个体对各种药物的反应性有差别。

表 2 卵巢癌细胞对化疗药物的反应

| | Adr | | VP-16 | | 5-Fu | | DDP | |
|----|-------|----|-------|----|-------|----|-------|----|
| | 0. 2x | 1x | 0. 2x | 1x | 0. 2x | 1x | 0. 2x | 1x |
| S | 1 | 2 | 2 | 3 | 0 | 1 | 1 | 4 |
| PS | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| R | 3 | 2 | 2 | 1 | 4 | 3 | 2 | 0 |

2.6 细胞学检查结果 制备的细胞悬液，台盘兰染色计活细胞数可达 90% 以上；涂片经 HE 染色观察癌细胞含量达 90%。对照组培养 5 天后，HE 染色观察癌细胞含量为 95% 以上。

3 讨论

3.1 ATPCVA的原理和可行性 在生理条件下，细胞内 ATP 含量相对稳定，当细胞的代谢受损时，ATP 合成下降，细胞死亡，则 ATP 迅速消失。因而对 ATP 进行测量，不仅能检测细胞的死亡，也能评价细胞的活性^[7]。Kangas^[8]等提出的 ATP 生物荧光法（Bioluminescence Assay 或 ATP-Cell Viability Assay, ATP-CVA）的新药敏试验方法是测定已加入各种化疗药物的癌细胞中的 ATP 与对照组相比较，通过 ATP 下降的百分率了解细胞被药物杀灭的程度来评价药物的敏感性。据报道敏感性可达 90% ~ 92%，特异性 86% ~ 100%。由于实体瘤细胞培养的困难及检测生物荧光的荧光光谱仪价格昂贵，国内仅有关于卵巢癌细胞株和白血病的初步研究报告^[9]。本文采用液闪法检测生物荧光，该法可用 ATP 的测量来作为检测活细胞数的指标^[10]。具有特别敏感、稳定、重复性好的特点，所获结果与 Kuzmits、Peng 等的报道完全一致。并因此使药敏试验需要细胞量大大减少，检测一次仅需细胞 1 × 10⁴，可使标本较少或细胞分离较困难的复发癌、转移癌成功率大大提高，具有极大的优越性^[6,11]。本文对 ATP 生物荧光法用于卵巢癌腹水和实体瘤的药敏试验的可行性研究表明 ATP 法尚可测出不同的肿瘤细胞对不同浓度的各种抗癌药所表现出的不同反应性，将 ATP 法用于药敏试验是可行的。此外，ATP 法检测的是肿瘤细胞的总体杀伤情况（total tumor cell kill），包括正在分裂增殖和未分裂增殖的细胞，克服了克隆形成法、放射性标记核酸前体掺入法中只能检测处于分裂增殖期细胞的弱点，理论上对各种不同作用机制的药物（包括抗生素、抗代谢药、生物碱、烷化剂等等），都能进行测定^[1,12]。

3.2 检测时间 由于对照组细胞在第 3 ~ 6 天生长旺盛或保持相对稳定，第 7 天以后由于养料的消耗，生长下降。而药物处理组前 2 天与对照组差别不大，第 3 ~ 5 天中方显示下降趋势，以后基本处于最低点。考虑到：（1）半固体培养基对非肿瘤细胞的抑制在短时间内效果不明显，第 6 天后最好；（2）某些抗癌药物为细胞周期特异性（如 5-Fu），在短时间内细胞可能尚未进入一个新的周期，因而应适当延长培养时间，使结果更准确；（3）应用于临床的敏感试验应尽可能在短时间内出报告。综合这几点因素，本研究选择了在第 5 天时进行检测，此结果与文献报道的第 5 天或第 6 天检测也基本一致^[6,10,12]。

另外，本方法与 HTCA 不同，并不需要制备困难的绝对单细胞悬液。而采用混合酶液分解就能获得供实验用的 90% 以上的活细胞，简单可行。由于采用琼脂糖半固体培养基，有效地防止了非肿瘤细胞生长，培养第 5 天癌细胞比例在 95% 以上，提高了实验的可信度。

本研究认为 ATP 法灵敏度高、重复性好，能够检测出卵巢癌不同个体对抗癌药物的不同反应性，且实验周期较短，需要细胞量小，故用于卵巢癌体外药敏试验可行，实验结果与临床疗效的相关性，值得进一步研究。

参考文献：

[1] KochliOR,SevinBU,HallerU,etal.Chemosensitivitytestingin gynecologicmalignanciesandbreastcancer[J].ContribGynecol Obstet.Basel,Karger,1994,19.

[2] 刘叙仪. 人新鲜癌组织药敏试验及其方法. 见韩锐主编：肿瘤化学预防及药物治疗 [M]. 北京医科大学，中国协和医科大学联合出版社，1991.

[3] DorrRT,FritzWL.CancerChemotherapyHandBook[M]. NewYork:Elsevier,1980.

[4] 三磷酸腺苷（ATP）生物荧光液闪测定法检测活细胞计数（待发表）

[5] 胡天喜主编：发光分析与医学 [M]. 华东师范大学出版社. 1990.

[6] SevinBU,PengZL,PerrasJP,etal.ApplicationofanATP bioluminescenceassayinhumantumorchemosensitivitytesting[J]. GynecolOncol,1988,31:191.

[7] MayerJD,HendersonJF.Ulttrasensitivityassayforribonucleoside triphosphatein50 ~ 1000cells[J].BiochemPharmacol,1983, 32:3831.

[8] KangasL,etal.BioluminescenceofcellularATP:Anewmethod forevaluatingcytotoxicagentsinvitro[J].MedBiol,1984,62: 338.

[9] KochliOR,AvnerBP,etal.ApplicationoftheATPcellviability assayinhumanbreastcancerchemosensitivitytesting.Areporton thefirstresults[J].JsurgOncol,1993,54:119.

- [10] 施维, 顾美皎, 等. 检测三磷酸腺苷预测卵巢癌细胞株对化疗药物的敏感性 [J]. 中华妇产科杂志, 1996, 31 (2): 79.

[11] Kuzmits R, Rumpold H, Muller MM, Schopt G: The use of bioluminescence to evaluate the influence of chemotherapeutic drugs on ATP levels of malignant cell lines [J]. J Clin Chem Clin Biochem, 1986, 24: 293.
- [12] Wiber DW, Camacho ES, et al. Chemotherapy of non-small cell lung carcinoma guided by an in vitro drug resistance assay measuring total tumor cell kill. Br J J. Cancer, 1992, 65: 27.

The Evaluation of Adenosine Triphosphate Bioluminescence Assay for Tumor in Vitro Chemosensitivity Test

LIU Shan -lin, PENG Zhi -lan, LOU Jiang -yan, et al

The second Affiliated Hospital of Huaxi Medical university, Chendu 610041, China

Abstract: Adenosine triphosphate (ATP) is the basic energy source for living cells. It rapidly disappears when cells die. Some measuring the ATP levels may estimate the viability of cells exposed to drugs. Dose response curves can be determined in mouse fibroblast cell line: L929 treated with chemotherapeutic agents by the ATP-bioluminescence assay and the different in vitro response of 6 ovarian carcinoma (5 from fresh tumor tissues, 1 from ascites) treated with topotecan, cisplatin, 5-fluorouracil and adriamycin can be investigated. The coefficient of variation for triplicate assays ranges from 1.2 to 15.8%. It means high reproducibility of the assay. This presentation also reported that single cell suspension (include <30 cells clusters) can be separated from tissue fragments by means of the enzyme cocktail (collagenase, Dnase, pronase). The viable cells were over 90%. 0.5% Argarose /McCoy underlayer can prevent the growth of anchorage-dependent non-malignant cells. This study demonstrates that ATP bioluminescence assay is a sensitive, efficient method for tumor chemosensitivity test. Correlation of in vitro drug sensitivity and in vivo patient response worth further studying.

Keywords: Adenosine triphosphate; Bioluminescence assay; Chemosensitivity test; ovarian cancer

儿童脑膜瘤 10 例

费舟, 章翔, 王占祥

关键词: 儿童; 脑膜瘤

中图分类号: R739.45

文献标识码: D

文章编号: 1000-8578 (2000) 06-0432-01

儿童期脑膜瘤极少见。我科 10 年仅收治此类肿瘤 10 例, 本文重点探讨有关的临床病理特点及治疗。

1 临床资料

1.1 一般资料 10 例中, 男 4 例、女 6 例。年龄 7~16 岁。病程 1 月~2 年, 平均 11.16 月。

1.2 临床表现 主要为颅内压增高及神经局灶症状。首先症状以眼球突出及视神经损害最多见, 占 50%, 其次为颅内压增高症状, 占 40%。

1.3 肿瘤位置、病理及预后情况 肿瘤位于眶内 2 例, 位于前颅底 3 例, 其

中 1 例侵及额窦, 颞顶凸面 2 例, 桥小脑角、额窦及脊髓各 1 例。3 例直径在 6cm 或以上, 4 例直径在 4cm 或以上。病理检查示上皮细胞型脑膜瘤 6 例, 沙粒体型脑膜瘤 3 例, 纤维细胞型脑膜瘤 1 例。10 例中, 1 例因手术后严重脑水肿致中枢衰竭死亡。余 9 例术后 0.5~7 年随访, 除 1 例左眶内脑膜瘤有 3 次复发史外, 余均恢复良好, 无复发。

2 讨论

小儿脑膜瘤发病率很低, 生长速度快, 易恶变, 又因小儿颅骨的可塑性, 至发现时体积较大, 易延误

治疗。本组 10 例脑膜瘤中有 7 例直径在 4cm 或以上, 3 例直径甚至在 6cm 或以上。因此, 掌握小儿脑膜瘤的临床特点, 尤为重要。

小儿脑膜瘤以颅内压增高及视力减退为首发症状者多见, 但其好发部位与成年者不同, 多见于前后颅底、侧脑室及眶内。本组 2 例位于眶内, 4 例位于前后颅底。本组另一特点是, 脑瘤发生在颅外者即异位脑膜瘤较多, 其中眶内 2 例, 额窦及脊髓各 1 例, 占 40%, 而脊髓脑膜瘤极为罕见, 本组出现 1 例。

Starshak 等的研究提示, 成人脑膜瘤发生囊变机会较低 (2%~4.6%), 而小儿脑膜瘤发生囊变机会高 (13%~50%), 本组有 2 例瘤内有囊变 (20%)。这种瘤内有囊的脑膜瘤在阅读 CT 片时易被误诊为恶性胶质瘤或转移瘤, 在临床诊治中应提高警惕。

病人预后与复发, 主要取决于首次手术切除程度、肿瘤部位及肿瘤浸润性。部分肿瘤尚需放射治疗。本组 1 例复发 3 次, 均行手术切除, 2 例附加了放疗。

收稿日期: 1998-12-24; 修回日期: 2000-05-31

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院神经外科

性, 至发现时体积较大, 易延误