

抗癌药物敏感试验近展

浙江医科大学肿瘤研究所 鱼 达 综述 郑 树 审校

近年来，以抗癌药物治疗个体化为目的的抗癌药物敏感试验受到重视。各种肿瘤活细胞定量方法逐步形成抗癌药物评价系统，用于药敏试验，亦用于药物筛选。药敏试验总的趋势是从动物体内转向体外，从昂贵、费时转向简易、快速，研究方法趋于多样化。这些研究揭示了肿瘤细胞增殖分化的一些特征及其与药物的关系。目前，该领域正面临着进一步深入反映肿瘤与药效，面临着临床验证的新挑战，并有待于抗癌药物本身的发展。本文将该领

域的近况和动向作一介绍。

(一) 裸鼠人癌模型药敏试验

几乎所有人类肿瘤均能在裸鼠皮下移植成功。原代裸鼠模型不宜用于药敏试验，因肿瘤潜伏期自数天至2月以上不等。原代瘤经三次传代后生长稳定，瘤体倍增期1至2周，可用于药敏试验。表1概括了一些研究工作结果。裸鼠模型药敏试验结果优于临床实际效果，可能是瘤体环境的差异。人实体肿瘤倍增期较长为3周至3月。

表 1 抗癌药物对各种人肿瘤裸鼠模型的药敏试验结果

肿瘤类型	评价率%	用药种数	相对有效药物	无效药物
小细胞肺癌	64 (16/25)	9	DDP, CTX, CCNU	MTX
乳 癌	54 (34/63)	12	L-PAM, ADM, 5-FU	MTX
卵 巢 癌	43 (19/46)	10	DDP	CTX
脑 癌	38 (23/60)	14	DCNU, PCB	DDP
黑色素瘤	34 (30/89)	11	MCCNU, MMC	VLB, RCN
胃 癌	25 (52/204)	12	MMC, ACNU, VBL	VCR, VP16
肺非小细胞癌	16 (15/93)	11	CIX	5-FU
结直肠癌	13 (24/185)	14	BCNU	ADM

表 2 克隆分析药敏试验与临床相关结果

病例数	分析数	用药方式	体外, 临床 均敏感	体外敏感 临床耐药	体外耐药 临床敏感	体外, 临床 均耐药
63	82	单药	3	6	0	73
38	41	联合用药	12	0	2	27
合计	101		15	6	2	100

张素胤报告用裸鼠传代模型对多种抗癌药物作快速疗效评价。国内尚未见裸鼠人癌模型用于治疗个体化药敏试验的报道。

该法缺点为试验流程长，且价格昂贵。

(二) 免疫功能正常小鼠肾包膜下肿瘤移植药敏试验

1979年 Bogden 将人原代肿瘤移植于免疫功能正常小鼠肾包膜下，次日起对荷瘤鼠进行为期5天的抗癌治疗，第6天处死动物比较用药与对照组植入块的体积变化，根据统计数据评价抗癌药物的敏感性(Subrenal Capsule Assay, SRCA)。

近来，SRCA治疗个体化的可行性受到了质疑和否定。否定的主要理由是用于反映肿瘤细胞生长状态的植入瘤块体积变化与组织病理学研究结果不符。Cunnigham对胃癌，Tueni对非小细胞肺癌。我所对大肠癌和乳癌SRCA作组织病理研究，植入块含肿瘤细胞分别占6% (26/418)，14% (41/298)和22% (43/200)。对SRCA的应用结果可概括为：(1)大多数人原代肿瘤细胞在免疫正常小鼠肾包膜下迅速坏死；(2)含有数量不等的肿瘤细胞团块，以致正常组织均能在小鼠肾包膜下出现类似的体积变化；(3)宿主细胞浸润和纤维形成是

植入块体积增大的主要原因。许多抗癌药的抗炎作用与对机体的影响,可能是用药组植入块体积变化小于对照组的缘故。

国外有近百篇文献,试图对SRCA进行改进,均未能改变组织病理缺陷。国内近期有一些同6—7年前国外水平的研究报道,这些工作同样缺少组织病理学的充分依据而有待探讨。

(三) 肿瘤干细胞培养及药敏试验

人肿瘤细胞在半固体凝胶中的集落形成培养技术展示了肿瘤细胞研究的广阔前景。1977年Hamburgr和salman建立了适于人肿瘤原代细胞生长的双层软琼脂培养系统,为肿瘤干细胞克隆分析(Human Tumor Cloning Assay, HTCA)和抗癌药物敏感试验(Human Tumor Drug Sensitivity, HTDST)打下了基础,其论著成为经典文献。表2显示了其药敏与临床的相关结果。

浙江中医学院附属医院对26例急性白血病患者作肿瘤细胞集落形成药敏试验,并采取对集落高、中和低生长型有区别的三尖杉酯碱和阿糖胞苷用药措施。国内这方面的研究尚属起步。

HTCA 有一些实际问题亟需解决: (1) 只有小部份肿瘤细胞可形成集落,集落形成率仅为0.001—0.1%,在用于药敏试验时难于反映群体细胞; (2) 需要有肿瘤标本用量小,肿瘤单细胞制备效率高并能更有效地鉴别成团细胞、破碎组织残骸和肿瘤细胞集落的方法。

一系列改进研究的主要目的是提高人肿瘤细胞的集落形成能力,但至今尚未获得经改进后的比较公认的适宜方法。

克隆形成药敏试验为药物筛选价值是不言而喻的,并为放射增敏剂的研究提供了手段,但其用于临床药敏试验为期尚早。

(四) 四唑兰显色反应药敏试验

自1983年Mosmann报道用MTT研究肿瘤细胞生长与生存状况以来,该法得到迅速发展。试验利用活细胞内线粒体脱氢酶将四唑染料MTT转化为有色产物的原理,将一系列不同种类不同浓度的药敏试验设置在96孔板上半自动进行。该法每实验单位仅需1—2×10⁴肿瘤细胞,数据处理可计算机化,能获得各种药物较满意的剂量效应曲线,根据肿瘤细胞的ID₅₀判断肿瘤细胞对抗癌药的敏感程度。

美国国立癌研所已将MTT法纳入抗癌药物筛

选程序。其近期进展是用于白血病药敏试验,显色反应的灵敏度也获得进一步提高。

MTT 法药敏试验方法简便,能反映肿瘤群体细胞与药物的关系,酶活力能反映肿瘤细胞的生存状态,是比较有前景的方法。

(五) 其它药敏试验方法

1. ³H—胸腺嘧啶渗入试验(³H—TdR incorporation Assay)。Friedman 报道将双层软琼脂培养的上层改为液层,肿瘤细胞暴露于含抗癌药的上液层中,培养4天后加入定量³H—TdR,继续培养18至24小时后计算放射性渗入量(Cpm)*。用药组Cpm 比对照组减少40%定义为抗癌药物敏感。该法优点为测量易标准化,缺点为需要同位素防护设施。

万景华 报道 对52例急非淋白血病患者作³H—TdR,³H—UdR等综合药敏试验,综合符合率为90.4%。因根据经验性化疗方案治疗各种初发白血病的临床缓解率在80—90%左右。预计今后白血病药敏试验的重点是复发,难治病例。

许德凤报道对40例人胃癌和20例人肺癌原代细胞作了3小时微量培养³H—TdR 渗入药敏试验,并对其中20例进行临床疗效对照研究认为,应用体外试验敏感药物治疗的效果高于一般经验治疗。

2. 染料排斥法药敏试验(noval Dye exclusion Assay, NDEA)。本法采用肿瘤细胞悬液培养,药敏试验持续3—4天。肿瘤活细胞有拒染料作用,在培养液内加入考马氏兰和苯胺黑后用离心涂片机制备肿瘤细胞涂片,按一定方法在光镜下计数肿瘤活细胞,获药物对肿瘤细胞的ID₅₀。

该法细胞计数任务繁重,似无更大前景。

3. 酯酶活性荧光法药敏试验。采用肿瘤细胞悬液培养,试验持续1—3天,加入荧光试剂后,荧光素将活细胞染成亮绿色,溴乙锭将死细胞核染成红色,用流式细胞仪计数活细胞。肿瘤细胞抑制90%定义为药物敏感。该法尚未见于个体化药敏试验的报告。

4. 三磷酸腺苷法(ATP Assay)。采用肿瘤细胞悬液培养,在ATP释放试剂,反应启动试剂和荧光素及荧光素酶作用下,反映肿瘤细胞活性状态的肿瘤细胞ATP含量由荧光光度计测定。本法优点为实验单位仅需1×10³肿瘤细胞,肿瘤活细胞ATP含量比死细胞高1至2个数量级。该法用于个体化药敏试验的价值有待研究。

5. 肿瘤细胞半透膜包裹法药敏试验 (Microencapsulated Tumor Assay, META)。以半透膜将肿瘤细胞和琼脂包裹成微球,并注入裸鼠和免疫正常小鼠的腹腔。由于半透膜的保护,肿瘤细胞在两种小鼠腹腔内生长速度基本一致。本法在比较各种抗癌药物的抗癌作用方面已显示一定价值,深入研究有待开展。

6. 原代肿瘤组织培养同位素渗入药敏试验。Schroy II 报道将大肠癌原代组织块培养24小时后除去未贴皿块,再暴露于抗癌药内培养3天,加入定量 ^3H -TdR 继续培养3天后随机取12个组织培养块计数cpm。该法的组织培养技术经病理研究证实较为成熟。

郑树报道了类似的大肠癌组织块原代培养药敏试验。初步观察到5-Fu 对同人大肠癌在培养条件下药物敏感性的差异。

7. 鸡胚绒毛膜囊药敏试验。将肿瘤细胞注入经孵育10至11天鸡胚的血管内,3天后给予抗癌药,7天从鸡胚上取下肿瘤称重,计算抑瘤率。该法用于抗癌药物评价,尚未见治疗个体化药敏试验的报道。

8. 雌激素受体状态与药物敏感性。郑树报道乳腺癌5-Fu化疗前后雌激素受体(ER)阴性者对5-Fu化疗较敏感,提示雌激素状态在一定程度上可反映个体乳腺癌病例对化疗药物的敏感程度。在目前仍不失为个体化化疗选择与否的一种方法。

目前,不少学者热衷于临床个体化抗癌药物敏感性研究。主要以肿瘤传代细胞为对象的药效评价或药物筛选,可对细胞的倍增期,适宜的试验单位细胞数、合适的试验中止时间、何种细胞适于何类药物研究,以及怎样使试验系统规范化便于应用等

加以充分考虑和研究。原代肿瘤细胞药敏试验比用传代细胞复杂得多,原因是无法对原代细胞的生物学特性进行必要的考虑。肿瘤异质性,肿瘤细胞悬液制备,肿瘤细胞对新环境不易适应等均是难点。由于现有各种实验研究资料不充分,方法间的比较亦较困难。一些研究所获抗癌药物耐药方面资料的相互符合率较高,敏感性结果差异较大。

在药敏试验的评价方法上,大致有两种:

(1) 根据各自方法学特点先确定实验可评价标准,对实验结果进行数学处理后得出抗癌药敏感与不敏感的结论;(2) 获得抗癌药的剂量效应曲线,求得 ID_{50} ,根据临床可达到的药液,提出临床可能相对敏感的药物。在抗癌药物临床应用时关于实体肿瘤抗癌药物体内实际暴露问题的研究很少,与经制备的肿瘤细胞相比,实体肿瘤存在各种药物屏障。用细胞研究仅反映孤立条件下肿瘤细胞的药物敏感性。又因肿瘤细胞容易产生耐药、交叉与多种耐药,使药敏试验结果的具体应用更为复杂。因此,抗癌药物相对敏感性的提法更适于化疗现状,更易为临床所接受。

抗癌药物敏感试验面临的问题不仅是各实验测试系统均有一定的复杂性和能力限度,更困难的是临床疗效评价涉及大量病例的随机试验。现有抗癌药对大多数肿瘤临床缓解期很短,临床评价必需要有严格的标准和质控。

Tueni 认为目前拥有的某些药敏试验方法是可靠的,关键问题是迄今缺乏有效的抗癌药物。对目前化疗缓解和治愈率较高的肿瘤,体外药敏试验所提供的耐药报告有参考价值。对大部分临床难治肿瘤,以临床应用为目的的抗癌药物敏感试验必将随着抗癌药物本身的进展获得较大的突破。

(本文参考文献39篇从略)