

三维组织培养药物敏感性检测技术在胃癌术后个体化化疗中的应用研究

张现伟 刘湘花 李富林 王仰坤 赵文召 郑国宝

作者单位: 471031 洛阳市, 解放军第 150 中心医院病理科, 济南军区医学病理中心(张现伟 李富林 王仰坤)

471031 洛阳市, 河南中医学院科研处病理实验中心(刘湘花)

471031 洛阳市, 解放军第 150 中心医院胃肠外科(赵文召), 肿瘤医院(郑国宝)

通讯作者: 王仰坤, E-mail: dr.wyk@163.com

【摘要】 目的 研究三维组织培养药物敏感性检测 (three-dimensional histoculture drug response assay, TDHDRA) 技术在指导胃癌术后个体化化疗中的临床价值。方法 将 147 例胃癌患者随机分为肿瘤药敏组和经验化疗组。肿瘤药敏组应用 TDHDRA 技术, 检测 5-氟尿嘧啶(5-FU)、多西他赛(DTX)、顺铂(DDP)、紫杉醇(TXT)、奥沙利铂(OXA)、表阿霉素(EADM)、伊立替康(CPT-11)这 7 种单药和 DTX+DDP+(5-FU)、EADM+DDP+(5-FU)、DDP+(5-FU)、OXA+(5-FU)、CPT-11+(5-FU) 这 5 组联合用药对胃癌组织的抑制率, 计算胃癌组织对药物的敏感率, 并通过随访, 记录两组的无进展生存期 (progression free survival, PFS) 和总生存期 (overall survival, OS), 比较两组的化疗效果。结果 单药中 5-FU 对胃癌组织的抑制率和敏感率最高, 分别为 (44.8±12.1)% 和 57.9%; 联合用药中 DTX+DDP+(5-FU) 组合对胃癌组织的抑制率、敏感率最高, 分别为 (64.3±15.6)%、75.4%。经验化疗组与肿瘤药敏组分别有 16 例、7 例出现复发转移; 肿瘤药敏组中位 PFS (162 d) 显著高于经验化疗组 (84 d), 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 肿瘤药敏组 OS (476 d) 虽高于经验化疗组 (392 d), 但两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 TDHDRA 技术检测结果符合临床实际, 在指导胃癌术后个体化化疗中有很好的临床价值。

【关键词】 胃肿瘤; 三维组织培养; 药敏实验; 个体化治疗

The application research of three-dimensional histoculture drug response assay in individualization chemotherapy of gastric carcinoma postoperative

ZHANG Xian-wei¹, LIU Xiang-hua², LI Fu-lin¹, et al. ¹Department of Pathology, 150 Hospital of PLA, Luoyang 471031, China ²Department of Pathology Experiment Center, the College of Chinese Medicine of Henan, Luoyang 471031, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the clinical value of three-dimensional histoculture drug response assay (TDHDRA) in guiding individual chemotherapy of gastric cancer patients. **Methods** The 147 cases patients with gastric cancer were randomly divided into tumor chemosensitivity group and empirically chemotherapy group. The inhibition rate of 5-fluorouracil(5-FU), cisplatin(DDP), oxaliplatin(OXA), docetaxel(DTX), paclitaxel(TXT), irinotecan(CPT-11), epirubicin(EADM) and DTX + DDP + (5-FU), EADM + DDP + (5-FU), DDP + (5-FU), OXA + (5-FU), CPT-11 + (5-FU) to gastric cancer, and the sensitivity of gastric cancer to the drugs were detected by TDHDRA. Those patients were follow-up and recorded their progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). The effect of chemotherapy between two groups were compared. **Results** The inhibition rate [(44.8±12.1)%] and sensitivity (57.9%) of 5-FU were the highest among single agents. The inhibition rate [(64.3±15.6)%] and sensitivity (75.4%) of DTX + DDP + (5-FU) to gastric cancer were the highest among combined regimens. The recurrence patients in tumor chemosensitivity group and empirically chemotherapy group were respectively 16 cases and 7 cases. The PFS of tumor chemosensitivity group (162 d) was significantly higher than the empirically chemotherapy group (84 d), and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The OS of tumor chemosensitivity group (476 d) was higher than that of the empirically chemotherapy group (392 d), but there was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The results of TDHDRA are coincidence with clinical practice and have good clinical value in guiding individual chemotherapy of gastric cancer.

【Key words】 Stomach neoplasms; Three-dimensional culture; Drug sensitive test; Individualized treatment

胃癌严重影响人类健康和生命, 中国人胃癌粗死亡率男性、女性分别为 52.24/10 万、29.26/10 万, 分居恶性肿瘤的第二、三位。化疗能缓解胃癌症状并获得生存益处, 但目前疗效肯定的几种药物的总有效率仅为 10%~20%, 联合化疗的有效率也仅为 50% 左右^[1,2]。由于胃癌患者遗传背景的差异、胃癌的异质性及肿瘤多重耐药现象的普遍存在, 致使胃癌患者对化疗的反应各不相同, 这就决定了化疗必须实施个体化方案。因此, 如何预测个体肿瘤对化疗药物的敏感性, 筛选敏感性高的抗癌药, 指导临床化疗以提高疗效, 已成为临床亟需解决的现实问题。为此, 许多研究者开发出了多种体外肿瘤化疗敏感性检测方法, 如: 四氮唑盐法 (methylthiazolyltetrazolium, MTT)、ATP 生物荧光法 (ATP-tumor chemosensitivity assay, ATP-TCA)、组织培养药物敏感性法 (histoculture drug response assay, HDRA) 等。其中, HDRA 使肿瘤组织在体外不仅呈现类似体内的三维立体结构生长, 保持其各种体内特性如增殖、浸润、异源性和肿

瘤相关基因或抗原的表达, 并对抗癌药物具有类似体内的反应^[3], 这些特点相对于单层培养法 (如 MTT、ATP-TCA 等) 有较大的优势。本文通过观察三维组织培养药物敏感性检测技术 (three-dimensional histoculture drug response assay, TDHDRA) 测定胃癌的药物敏感性, 为胃癌的个体化化疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2008 年 3 月至 2009 年 4 月在我院手术治疗的 147 例胃癌患者, 随机分为接受 TDHDRA 检测患者 69 例, 归入肿瘤药敏组 (所有患者在手术前均经病理学检查确诊), 其余 78 例归入经验化疗组, 两组间性别、年龄经平衡检验, 差异均无统计学意义, 具有可比性 ($\chi^2=0.210, P=0.714, \chi^2=0.174, P=0.725$)。两组患者的临床病理资料比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

1.2 TDHDRA 检测实验 参考相关文献^[3-6]并作修改, 新鲜肿瘤标本离体后, 立即在靠近胃浆膜面取材, 取肿瘤组织约 1 cm³, 置于 4 ℃ 的 Hanks 液中, 送

表 1 147 例胃癌患者临床病理资料的比较

项目	基本病理资料	经验化疗组 (n)	肿瘤药敏组 (n)	χ^2 值	P 值
组织病理学类型 ^a	乳头状腺癌	8	6	5.520	0.597
	管状腺癌	18	20		
	黏液腺癌	11	10		
	低黏附性癌 (包括印戒细胞癌和其他亚型)	10	9		
	混合性腺癌	5	8		
	未分化癌	10	6		
	神经内分泌肿瘤	14	6		
	混合性腺神经内分泌癌	2	4		
	T1a	3	2		
TNM 分期 ^b T(肿瘤)	T1b	7	4	1.000	0.963
	T2	11	9		
	T3	28	29		
	T4a	24	21		
	T4b	5	4		
	N0	3	2		
N(淋巴结)	N1	7	4	0.287	0.991
	N2	11	9		
	N3a	28	29		
	N3b	24	21		
M(远处转移)	M0	72	65	0.207	0.750
	M1	6	4		
	G1	18	14		
G(分化程度)	G2	31	30	0.237	0.971
	G3	21	19		
	G4	8	6		

注: 采用 2010 年 WHO 消化系统肿瘤组织学分类 (第四版)、2010 年 AJCC 癌症分期手册 (第七版) 对所有研究对象进行重新分类分期

实验室进一步处理。肿瘤组织用除菌洗涤液(400 u/mL 庆大霉素, 500 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素, 3 $\mu\text{g/mL}$ 两性霉素 B, 125 $\mu\text{g/mL}$ 制霉菌素, 溶解于 RPMI-1640 培养液)洗标本 10 min \times 3 次, 冲去残留血液; 低倍显微镜下相对无菌环境剔除纤维、脂肪、血管以及坏死组织后, 将肿瘤组织切成重量为 10~15 mg 小组织块, 用天平(上天平 FA1104, 分度值: 0.1 mg)称取每块肿瘤组织的准确重量。将 3 块小组织块放置于约 1 cm^3 的猪皮制海绵样胶原凝胶(Gelfoam, Pharmacia&Upjohn 公司产品)表面, 置于 24 孔培养板中, 加 RPMI-1640 培养液(含 20% 小牛血清, 100 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)至其液面正好达到 Gelfoam 表面但不没过。放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。药物处理孔每孔加药物 10 μl , 每种处理 4 孔, 对照组每孔加 PBS 液 10 μl 。实验所选化疗药物参照 2009 年 NCCN 胃癌临床实践指南(中国版)的相关要求, 化疗药物浓度参照人体内有效血药浓度峰值配置, 5-氟尿嘧啶(5-FU)60 $\mu\text{g/mL}$, 顺铂(DDP)2.5 $\mu\text{g/mL}$, 奥沙利铂(OXA)5 $\mu\text{g/mL}$, 多西他赛(DTX)20 $\mu\text{g/mL}$, 紫杉醇(TXT)4.9 $\mu\text{g/mL}$, 伊立替康(CPT-11)10 $\mu\text{g/mL}$, 表阿霉素(EADM)2.3 $\mu\text{g/mL}$ 。实验组为以上单药组和 DDP+(5-FU)、OXA+(5-FU)、CPT-11+(5-FU)、DTX+DDP+(5-FU)、EADM+DDP+(5-FU)5 组联合用药组。培养 72 h 后, 每孔加 100 μl PBS 液(含 0.6 mg/mL I 型胶原酶, 5 mg/mL MTT, 50 mM 琥珀酸钠)孵育 4 h, 用移液器完全吸净每个培养孔内的液体, 然后每孔加入 1 ml 二甲基亚砜提取还原的 MTT, 2 h 后将液体转移至 96 孔培养板(每孔 100 μl), 用酶标仪(Thermo MK3 型)测定 540 nm 的光密度值(optical density, OD)。将实验组和对照组进行比较, 计算药物对肿瘤组织的抑制率: 抑制率(I)=[1-(实验组平均 OD 值/实验组肿瘤组织重量 g)/(对照组平均 OD 值/对照组肿瘤组织重量 g)] \times 100%, 抑制率 \geq 30%为对药物敏感。抑制率越高表示培养的胃癌组织对对应药物越敏感。

1.3 随访 采用回院复查、电话、信函、走访的方式进行, 随访时间截至 2011 年 3 月, 中位随访时间为 44 w, 随访率为 88.3%。

1.4 疗效评价 根据随访反馈信息, 详细记录无进展生存期(progression-free survival, PFS)即自患者术后化疗首日起至疾病复发或进展或因任何原因死亡的时间间隔和总生存期(overall survival, OS)即自患者术后化疗首日起至因任何原因死亡日。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学

分析。药物对胃癌的抑制率采用 $\bar{x}\pm s$ 描述, 组间比较采用多个独立样本非参数检验; 胃癌组织对药物敏感率采用百分比描述, 组间比较采用 χ^2 检验; 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, 采用 Log rank 检验比较各组患者生存率的差异。均为双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TDHDRA 检测的药物对胃癌组织的抑制率和胃癌组织对药物敏感率 不同药物及药物组合对胃癌组织的抑制率及胃癌组织对不同药物及药物组合敏感率差异均有统计学意义(P 均 < 0.05), 抑制率由高到低依次是 DTX+DDP+(5-FU)、EADM+DDP+(5-FU)、DDP+(5-FU)、OXA+(5-FU)、CPT-11+(5-FU)、5-FU、DTX、DDP、TXT、OXA、EADM、CPT-11; 敏感率由高到低依次是: DTX+DDP+(5-FU)、EADM+DDP+(5-FU)、DDP+(5-FU)、OXA+(5-FU)、CPT-11+(5-FU)、5-FU、DTX、DDP、TXT、OXA、EADM、CPT-11。药物及药物组合的药物敏感率和抑制率之间有较好的一致性。见表 2。

2.2 经验化疗组与肿瘤药敏组疗效比较 经验化疗组与肿瘤药敏组分别有 16 例、7 例出现复发转移, 两组的中位 PFS 分别为 84 d、162 d, 肿瘤药敏组 PFS 显著高于经验化疗组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); OS 分别为 392 d、476 d, 肿瘤药敏组 OS 虽高于经验化疗组, 但两组差异无统计学意义($P > 0.05$) (见图 1, 2)。

3 讨论

胃癌术后化疗对于胃癌患者十分重要, 临床医生在多种规范、指南的指导下选择化疗方案, 尽管这种标准化治疗取得了一些疗效, 但是, 不可回避的现实却是相当部分患者在坚持接受这些标准化治疗后病情仍然恶化。由于胃癌患者遗传背景的差异和胃癌的异质性, 决定了化疗必须个体化。显然通过肿瘤体外药敏实验, 筛选敏感化疗药物, 实施个体化的化疗, 可提高化疗有效率和患者生存率。

肿瘤体外药敏实验始于上世纪 70 年代 Salmon 等^[7]创制的人肿瘤细胞集落法。此后, 一些研究者陆续推出了多种肿瘤药敏实验方法, 如: MTT、ATP-TCA、HDRA、胶滴肿瘤药敏检测技术等。MTT、ATP-TCA 都是将新鲜肿瘤组织制成肿瘤细胞悬液进行单层培养, 在人工培养条件下肿瘤细胞活性过早减退, 忽视了细胞连接的作用, 实验结果易受间质纤维细胞影响, 导致实验结果与临床应用效果符合率较低, 从而限制了上述方法的进一步推广应用。由

表 2 各药物对胃癌组织的抑制率和胃癌组织对药物敏感率比较(%)

药物	抑制率	χ^2 值	P 值	敏感率	χ^2 值	P 值
5-FU	44.8±12.1			57.9		
DDP	41.7±12.7			49.3		
OXA	35.1±10.4			36.2		
DTX	43.5±10.4			52.2		
TXT	41.2±11.9			44.9		
CPT-11	28.8±14.6	72.703	0.023	20.3	92.786	0.001
EADM	33.2±13.6			24.6		
DDP+(5-FU)	51.0±16.4			66.7		
OXA+(5-FU)	46.8±17.2			60.7		
CPT-11+(5-FU)	45.3±14.3			59.4		
DTX+DDP+(5-FU)	64.3±15.6			75.4		
EADM+DDP+(5-FU)	59.2±15.8			71.0		

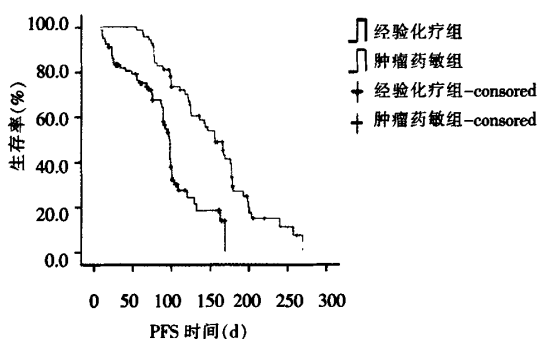


图 1 两组 PFS 时间的比较

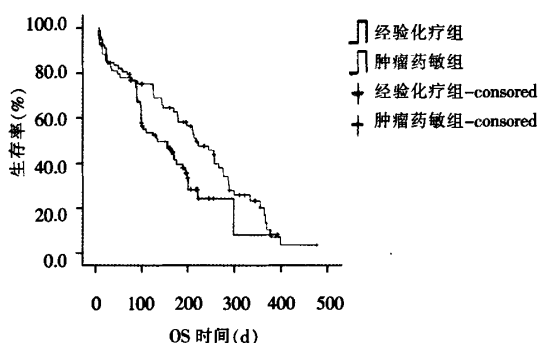


图 2 两组 OS 时间的比较

Robert 等^[3]提出的 TDHORA 技术作为近年来兴起的技术,直接对手术切除的多种人体恶性肿瘤的小组织块进行原代组织培养,获得了很高的成功率,可达 72%。该技术采用猪皮制成的海绵样胶原凝胶作为培养底物,该底物具备基底膜的功能,能够抑制纤维组织增生,有助于维持肿瘤细胞在生长和分化过程中的特殊形态,从而使肿瘤组织在体外不仅呈现类似体内的三维立体结构生长,保持其各种体内特性如增殖、浸润、异源性和肿瘤相关基因或抗原的表达,并对抗癌药物具有类似体内的反应,这些特点相对于单层培养法有较大优势^[6]。Lawler^[9]和 Miller^[10]等比较了三维组织培养和单层培养的实验结果,发现单层培养方法证明敏感的药物而在三维组织培养中却显示高度耐药,认为肿瘤组织结构本身是影响肿瘤药敏的重要因素。Furukawa 等^[11]研究认为该方法敏感性达到 90%以上,特异性达 70%~90%,临床符合率 80%~90%。研究数据^[4,5,11]显示乳腺癌、卵巢癌、胃肠道癌患者已从该方法中获得了生存收益。

本文研究结果表明,5-FU、DTX 单药对胃癌组织的抑制率和敏感率都较高;而以 5-FU、DTX 为基

础的联合用药组对胃癌组织的抑制率和敏感率较单药组明显升高,实验结果与临床报道及 Yuan 等^[5]的研究结果一致,提示在制定胃癌化疗方案时,可以选择 5-FU、DTX 为基础的药物,结合其他敏感药物进行联合化疗。经验化疗组与肿瘤药敏组分别有 16 例、7 例出现复发转移,两组的中位 PFS 分别为 84 d、162 d,肿瘤药敏组复发率低于经验化疗组,PFS、OS 高于经验化疗组,说明肿瘤药敏指导下的化疗效果优于经验化疗组。

本文研究在肿瘤标本前期处理,检测时间等方面都做了改进,既保证了结果的准确性,又缩短了实验时间,切合临床实际,可以为临床个体化治疗提供实验依据。下一步应延长随访时间以更科学的验证本实验结果的临床指导价值。

4 参考文献

- 1 Wu Chun-xiao, Zheng Ying, Bao Ping-ping. Pattern of change incidence of gastric cancer and its time trend in Shanghai. J sur Concepts Prat, 2008, 13: 24-29.
- 2 Kentaro Maejima, Akira Tokunaga, Teruo Kiyama, et al. Chemosensitivity test for 5-fluorouracil and 5-chloro-2, 4-dihydropyridine

- predicts outcome of gastric cancer patients receiving S-1 postoperatively. *Gastric Cancer*, 2010, 13: 231.
- 3 Robert M. Hoffman: Three-dimensional sponge-gel matrix histoculture of human tumors: methods and applications. *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, 1994, 2: 367-389.
- 4 Shin wha lee, Yong-man kim, Moon-bo kim, et al. Chemosensitivity of uterine cervical cancer demonstrated by the histoculture drug response assay. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 219: 277-282.
- 5 Yuan Shu-Qiang, Zhou Zhi-wei, Liang Yong-Ju, et al. Correlation of chemosensitivity measured by histoculture drug response assay to expression of multidrug resistance genes and proteins in gastric cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 2009, 28: 337-343.
- 6 高春芳, 主编. 实验室诊断新技术与临床. 北京: 人民军医出版社, 2010: 117-118.
- 7 Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, et al. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J MED*, 1978, 298: 1321-1327.
- 8 鄂征, 主编. 组织培养和分子细胞学技术. 第 2 版. 北京: 北京出版社, 1994, 135.
- 9 Lawler EM, Miller FR, Heppner GH. Significance of three-dimensional growth patterns of mammary tissues in collagen gels. *In Vitro*, 1983, 19: 600-610.
- 10 Miller BE, Miller FR, Heppner GH. Assessing tumor drug sensitivity by a new in vitro assay which preserves tumour heterogeneity and subpopulation interactions. *J Cell Physiol Suppl*, 1984, 3: 105-116.
- 11 Furukawa T, Kubota T, Hoffman RM. Clinical applications of histoculture response assay. *Clin Cancer Res*, 1997, 1: 305-311.

(收稿日期: 2011-04-15)

(本文编辑: 杨军)

(上接第 93 页)

阳性患者的病历进行分析, 结果显示当涂片查见真菌孢子及菌丝时, 结合患者相关临床资料提示超过 70% 患者为真菌感染。由于查见真菌孢子及菌丝时, 往往提示真菌在机体内生长繁殖较快, 病原体在体内大量生长繁殖是其致病性的一个重要原因, 当消化道内出现较多真菌孢子及菌丝时可致消化功能紊乱并出现相关临床体征, 因此大便涂片真菌镜检有助于协助临床诊断真菌感染。涂片仅查见真菌孢子未查见菌丝的患者, 通常为真菌定植, 定植真菌往往生长繁殖较慢、数量有限并较少出现菌丝, 患者通常不表现出真菌感染相关的临床体征。

本文研究中真菌培养及鉴定结果显示白色念珠菌占培养阳性的比例为最高, 超过 70%, 表明白色念珠菌是目前真菌定植最常见、数量最多的菌种, 其次是光滑念珠菌、热带念珠菌及克柔念珠菌。曲霉菌作为广泛分布于环境中的一种真菌, 对正常人体不致病, 但对部分特殊人群可作为条件致病菌并导致严重后果^[4]。本文研究中曲霉菌阳性的 1 例是来自于血液科的慢性粒细胞白血病患者, 由于患者长期大量使用广谱抗生素和细胞毒性药物, 致机体免疫力明显降低而容易受到曲霉菌侵袭, 随着这部分特殊人群的逐渐增多, 可能导致曲霉菌所致感染呈上升趋势。

消化道真菌感染主要因为定植真菌在机体抵抗力下降或在基础性疾病作用下促使真菌大量增殖而导致肠道功能紊乱, 随着医疗水平的提高, 一些慢性

病生存时间延长以及器官移植治疗的开展, 皮质激素和免疫抑制剂的长期应用, 使肠道真菌感染的发病率不断增加。真菌涂片镜检操作简便、快速, 检测结果与临床符合率较高, 直接涂片检查对于肠道真菌感染的诊断具有重要意义。真菌培养及鉴定可确定真菌的种属, 对致病性真菌来说, 培养阳性就可确诊, 但条件致病性真菌则不同, 因正常人体内可有部分真菌的存在, 因此, 一般的粪便培养对真菌诊断作用有限。其次真菌培养及鉴定操作繁琐、耗时长, 真菌培养阳性也不能确定是真菌定植或感染。因此, 真菌涂片镜检与培养鉴定各有其优缺点, 但涂片镜检对临床上快速确定真菌感染具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Grossman RF, Rotschafer JC, Tan JS. Antimicrobial treatment of lower respiratory tract infections in the hospital setting. *Am J Med*, 2005, 118: 29S-38S.
- 2 MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, et al. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*, 1999, 45: 223-228.
- 3 房芳, 梁冰. 老年人抗生素相关性肠道菌群失调. *中华医院感染学杂志*, 1998, 3: 185-186.
- 4 唐晓丹, 吴菊芳. 器官移植受者曲霉菌感染诊治进展. *中国感染与化疗杂志*, 2007, 7: 63-67.

(收稿日期: 2011-03-12)

(本文编辑: 李霏)