

ATP 生物荧光体外药敏检测在中晚期 结直肠癌化疗药物筛选中的应用

226361 江苏南通 南通市肿瘤医院普外科

蒋松琪, 何松, 江晓晖, 陈志刚, 郭燕¹

【摘要】目的 探讨 ATP 生物荧光体外药敏检测法(ATP-TCA)的特点及其在中晚期结直肠癌患者化疗方案中的指导价值。**方法** 应用 ATP-TCA 体外检测 59 例结直肠癌细胞对常用抗癌药物的敏感性。**结果** ATP-TCA 法对结直肠癌标本的可评估率为 96.61%。57 例结直肠癌细胞对 4 组联合化疗药物氟尿嘧啶 + 丝裂霉素、氟尿嘧啶 + 奥沙利铂、氟尿嘧啶 + 伊立替康、氟尿嘧啶 + 奥沙利铂 + 伊立替康相比氟尿嘧啶、丝裂霉素、伊立替康、奥沙利铂 4 种单药的敏感度有高度显著性差异($P=0.0006$)。应用 ATP-TCA 检测结果指导中晚期结直肠癌患者化疗,临床近期有效率为 59.65% (34/57),总预测准确率为 63.16% (36/57),阳性符合率为 61.82% (34/55),阴性符合率为 100% (2/2)。**结论** ATP-TCA 能有效检测化疗药物的敏感性,对指导中晚期结直肠癌患者化疗有重要的临床意义。

【关键词】 ATP-TCA; 结直肠癌; 抗癌药物; 细胞培养

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2011)06-0538-04

Application of ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA) in the screening of chemotherapeutic agents for advanced colorectal cancer

JIANG Song-qi, HE Song, JIANG Xiao-hui, CHEN Zhi-gang, GUO Yan. Department of General Surgery, Nantong Tumour Hospital, Nantong 226361, China

【Abstract】 Objective To explore the experimental characteristics of adenosine triphosphate based tumour chemosensitivity assay(ATP-TCA) and its guiding value in the screening of chemotherapeutic agents for advanced colorectal cancer. **Methods** The sensitivity of 8 groups of common chemotherapeutic drugs in 59 patients with advanced colorectal cancer was tested by ATP-TCA *in vitro*. **Results** The evaluable rate in the specimens of colorectal cancer was 96.61% by ATP-TCA. There was significant difference($P=0.0006$) in the sensitivity between the 4 groups of combination regimens (fluorouracil + mitomycin, fluorouracil + oxaliplatin, fluorouracil + irinotecan and fluorouracil + oxaliplatin + irinotecan) and 4 single drugs (fluorouracil, mitomycin, oxaliplatin and irinotecan) in 57 cases of colorectal cancer. The recent effective rate was 59.65% (34/57) according to the results of ATP-TCA in directing chemotherapy for advanced colorectal cancer, the total predicting accuracy rate was 63.16% (36/57), the positive coincidence rate was 61.82% (34/55) and the negative coincidence rate was 100% (2/2). **Conclusion** ATP-TCA technique is an effective method in detecting chemosensitivity, and has important clinical value to guide postoperative chemotherapy for advanced colorectal cancer.

【Key Words】 ATP-TCA; Colorectal cancer; Anti-cancer drugs; Cell culture

结直肠癌的治疗一直是一个具有挑战性的临床问题,全世界统计显示结直肠癌在男性癌症发病率排第 4 位,女性第 3 位^[1]。手术后化疗可提高中晚期结直肠癌患者的生活质量,延长生存期,本研究采用 ATP 生物荧光体外药敏检测(ATP-TCA)^[2]对 59 例中晚期结直肠癌患者标本进行体外药敏试验,根据

检测结果指导患者化疗并观察临床效果。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集我院 2009 年 6 月至 2010 年 5 月 59 例中晚期结直肠癌患者术后新鲜组织标本,患者均经电子结肠镜和病理诊断后行手术治疗。男性

35 例,女性 24 例。年龄 62 ~ 75 岁,中位年龄 67.3 岁。直肠癌 43 例,结肠癌 16 例。病理类型:低分化腺癌 24 例,中分化腺癌 9 例,高分化腺癌 7 例,未分化癌 6 例,黏液腺癌 10 例,管状腺癌 3 例。所有患者 Karnofsky 评分 ≥ 70 , 预计生存期 > 3 个月;无肠梗阻;白细胞 $> 4.0 \times 10^9/L$, 血小板 $> 100 \times 10^9/L$;无严重心、肝、肾功能不全。

1.2 药敏试验的抗癌药物 化疗药物均在本院临床使用,包括氟尿嘧啶(5-FU,天津金耀集团)、丝裂霉素(MMC,浙江海正药业股份有限公司)、奥沙利铂(L-OHP,江苏恒瑞医药股份有限公司)、伊立替康(CPT-11,用活性代谢物 SN-38 代替,上海龙翔生物医药开发有限公司)。上述化疗药物均以生理盐水溶解并稀释,置 -20°C 保存备用,药敏试验用药浓度参考说明书的血浆峰值浓度(plasma peak concentration, PPC)。见表 1。

表 1 药敏试验中化疗药物浓度

抗癌药物	100% PPC ($\mu\text{g/ml}$)
5-FU	25
MMC	0.5
L-OHP	4.5
SN-38	4.7
5-FU + MMC	25 + 0.5
5-FU + L-OHP	25 + 4.5
5-FU + SN-38	25 + 4.7
5-FU + L-OHP + SN-38	4.5 + 4.7

1.3 主要仪器和试剂 ATP-TCA 试剂盒包括消化酶、ATP 提取液、96 孔培养板、荧光酶-荧光素、完全培养基、ATP 生成抑制剂、红细胞裂解液、ATP 标准品等,均为德国 DCS 公司产品。微孔板式化学发光检测仪 Orion II 为德国 Berthold Detection Systems 公司产品,其它仪器包括 CO_2 培养箱、倒置显微镜、无菌操作台、离心机等。

1.4 ATP-TCA 操作步骤 取新鲜肿瘤组织后立即浸入装有 RPMI-1640 培养液的无菌瓶中浸泡 15min,剪成 0.5 ~ 1mm 大小 3 个碎块,转移到含组织消化液的离心管中,于 37°C 孵育箱中孵育 1.5 ~ 3h,待其充分消化后用 200 目筛网滤得单细胞悬液,400g 离心 10min,去上清,用培养基洗涤 1 次,若有明显红细胞沉淀则需要去除红细胞的步骤,最后调整细胞浓度为 $2 \sim 4 \times 10^5$ 个/ml。取单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μl 加入抗癌药物,

工作液药物设定为 6 个浓度即 200%、100%、50%、25%、12.5%、6.25% 的药物测试浓度,每个浓度作 2 个平行孔,同时设定无药对照孔和最大抑制孔(加入 ATP 抑制剂)。

将培养板置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱内培养 4 ~ 5 天,每孔加入 50 μl ATP 提取液,室温静置后吸出 50 μl 上清液置于检测板中,每孔加入 50 μl ATP 荧光素-荧光酶,振荡 10s,将检测板置于板式化学发光检测,DCS 软件系统进行数据分析,计算出各测试浓度抑制率及各种药物 IC_{50} 和 IC_{90} 。 IC_{50} 指抑制 50% 肿瘤细胞生长药物浓度, IC_{90} 是指抑制 90% 肿瘤细胞生长药物浓度。

1.5 ATP-TCA 评价 参考 Blumenthal 2005 年最新标准^[2],将药物对肿瘤细胞抑制率分为 4 个等级,高度敏感: $\text{IC}_{50} < 25\%$ PPC 及 $\text{IC}_{90} < 100\%$ PPC,中度敏感: $\text{IC}_{50} < 25\%$ PPC 及 $\text{IC}_{90} > 100\%$ PPC,低度敏感: $\text{IC}_{50} > 25\%$ PPC 及 $\text{IC}_{90} < 100\%$ PPC,耐药: $\text{IC}_{50} > 25\%$ PPC 及 $\text{IC}_{90} > 100\%$ PPC。参照 WHO 实体瘤客观评价标准,以 CR + PR 计算有效率(RR)。敏感度 = (高敏 + 中敏) / (高敏 + 中敏 + 低敏 + 耐药) $\times 100\%$

1.6 统计学分析 应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计,用 χ^2 检验比较组间差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATP-TCA 结直肠癌标本评价 59 例结直肠癌标本有 57 例完成 ATP-TCA 检测,2 例标本因细胞数量太少放弃,ATP-TCA 法对结直肠癌标本的可评估率为 96.61% (57/59)。

2.2 剂量-效应关系 对 1 例直肠癌标本用 ATP-TCA 法生成抗癌药物的剂量-效应曲线(图 1),结果显示不同药物及同种药物不同浓度对癌细胞的抑制率有差异,单药和联合药物方案对癌细胞抑制率亦有差异,均符合药物的体内药代动力学。

2.3 结直肠癌细胞对各种抗癌药物的敏感度 57 例结直肠癌细胞对 5-FU、MMC、SN-38、L-OHP 等 4 种单药的敏感度差异无显著性($\chi^2 = 9.263, P = 0.4134$),结直肠癌细胞对 4 组联合药物方案(5-FU + MMC、5-FU + L-OHP、5-FU + SN-38、5-FU + L-OHP + SN-38)的敏感度差异无显著性($\chi^2 = 11.93, P = 0.2175$),结直肠癌细胞对 4 组联合药物的敏感度与 4 组单药相比差异有高度显著性($P = 0.0006$)。见表 2。

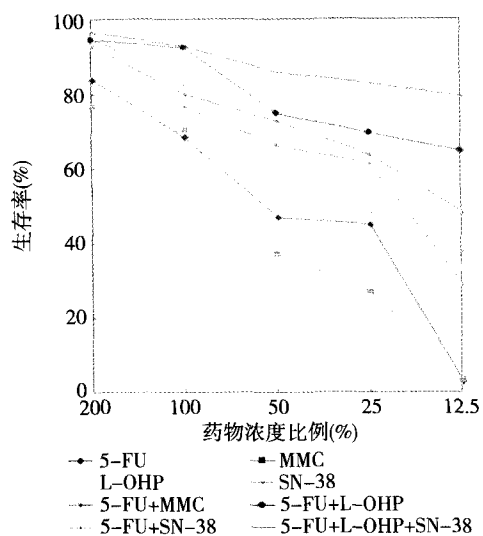


图 1 8 组抗癌药物不同药物浓度比例对 1 例直肠癌细胞抑制率的剂量-效应曲线

表 2 57 例结直肠癌患者体外抗癌药物敏感度

抗癌药物	n	高敏	中敏	低敏	耐药	敏感度 (%)
5-FU	57	2	10	27	18	21.82
MMC	57	1	9	24	23	17.54
L-OHP	57	4	12	30	11	28.07
SN-38	57	1	13	29	14	24.56
5-FU + MMC	57	10	16	21	10	45.61
5-FU + L-OHP	57	19	14	22	2	57.89
5-FU + SN-38	57	9	18	20	10	47.36
5-FU + L-OHP + SN-38	57	12	19	18	8	54.38

2.4 ATP-TCA 检测结果与临床疗效的关系 57 例可评估的结直肠癌标本中有 2 例对 8 组抗癌药物均表现出耐药,故临床治疗中对该患者经验性使用了 5-FU + L-OHP 联合化疗方案,其余 55 例标本均对联合药物方案敏感,根据 ATP-TCA 结果,10 例患者应用 5-FU + MMC 方案,29 例应用 5-FU + L-OHP 方案,5 例应用 5-FU + CPT-11 方案,11 例应用 5-FU + L-OHP + CPT-11 方案进行化疗。结果显示,有效率为 59.65% (34/57),ATP-TCA 的总预测准确率为 63.16% (36/57),阳性符合率为 61.82% (34/55),阴性符合率为 100% (2/2)。见表 3。

3 讨论

ATP 生物荧光法是近年发展起来的肿瘤化疗药物敏感性检测法^[3-4],其原理是当细胞受损时,ATP 合成下降,细胞死亡时,ATP 迅速水解消失,因此通

表 3 57 例结直肠癌患者根据 ATP-TCA 结果化疗与近期临床疗效的关系

临床疗效	敏感	不敏感	合计
有效	34	0	34
无效	21	2	23
合计	55	2	57

过测定细胞内源性 ATP 的含量,即可反映细胞活性和活细胞的数量。国内外学者应用 ATP-TCA 法做了多方面的研究,并表明其在一定程度上可提高临床治疗的有效性^[5-7]。在结直肠癌方面,郭洪斌等^[8]认为 ATP 体外药敏实验对结肠癌患者化疗药物及化疗方案筛选,实现化疗个体化有重要的价值。Cho 等^[9]认为因肿瘤的异质性而应该对结直肠癌患者进行 ATP 肿瘤化疗药物敏感性分析实验,并发现患者能从中受益。

本次研究中联合药物方案是依据 2010 年中国结直肠癌肝转移指南制定,但我们还特别加入了已经退出一线治疗的 5-FU 联合 MMC 方案^[10-11],药敏试验结果显示,结直肠癌细胞对 4 组联合化疗药物方案的敏感度并没有显著性差异($\chi^2 = 11.93, P = 0.2175$)。5-FU 联合 MMC 方案具有价格低廉和使用简便的特点。韩俊毅等^[12]在 2009 年应用 MMT 法研究该化疗方案及临床效果后,发现患者 3 年总生存率达到 70% 以上,因此如果能够合理地评估患者受益的可能性,目前该方案还是一种不错的选择。

5-FU 与 L-OHP 联合化疗组成了 FOLFOX 系列方案。NCCTG 协调并联合多个协作组织进行的大型随机 III 期临床试验一线治疗结果表明,FOLFOX 方案是目前晚期结直肠癌的一线治疗方案^[13],在本研究中 FOLFOX 方案的敏感度最高(57.89%),与临床应用情况相符。

CPT-11 是喜树碱类的衍生物,作用于拓扑异构酶 I,CPT-11 的活性代谢物 SN-38 可与拓扑异构酶 I DNA 稳固结合,特异性抑制拓扑异构酶 I 对断裂 DNA 链的修复,阻止 DNA 的复制和转录,最终导致肿瘤细胞的死亡^[14]。虽然研究及应用证实含 CPT-11 的联合化疗在临床上可以作为中晚期结直肠癌的一线治疗方案,但患者易发生不同程度的毒副反应如腹泻、中性粒细胞减少等,限制了进一步应用。近年来研究发现应用半合成的喜树碱类药物羟基喜树碱(HCPT)联合铂类药物方案,患者更容易耐受^[14-15],我们计划下一步应用肿瘤药敏试验对

CPT-11 和 HCPT 联合铂类化疗药物体外敏感率差异及临床效果、毒副作用等方面进行比较。

本研究选取结直肠癌细胞对 4 组联合方案敏感性与 4 种单药相比差异有高度显著性 ($P = 0.0006$), 这一结果表明联合化疗具有较好的协同作用。与此同时, 当药敏检测结果提示癌细胞对多种化疗药物敏感时, 应该综合考虑药物的毒副作用并评估患者付出的费用和获益可能性。

由于肿瘤的异质性特点导致不同肿瘤患者对同一种化疗药物的敏感性不同, 表明建立个性化治疗可避免无效药物导致的不良反应及耐药性。我们认为, ATP-TCA 法可以对常用化疗药物可能耐药患者提前预测。本次研究中未对病情进展患者进行多次体外药敏试验以期修正化疗药物方案, 这一点有待于进一步研究改进。

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74 - 108.
- [2] Kurbacher CM, Cree IA. Chemosensitivity testing using microplate adenosine triphosphate-based luminescence measurements [M]//Blumenthal RD. Method in molecular medicine. Chemosensitivity volume 1; in vitro assays. New York: Human Press Inc, 2005: 101 - 120.
- [3] 陈 莉, 程 纯. 现代病理学临床研究的基本问题[M]. 北京: 中国科学出版社, 2007: 536 - 540.
- [4] Kangas L, Grönroos M, Nieminen AL. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro[J]. Med BioL, 1984, 62(6): 338 - 342.
- [5] Cree IA, Kurbacher CM, Lamont A, et al. A prospective randomized controlled trial of tumour chemosensitivity assay directed chemotherapy versus physician's choice in patients with recurrent platinum-resistant ovarian cancer[J]. Anticancer Drugs, 2007, 18(9): 1093 - 1101.
- [6] Qi CJ, Zhu YL, Qian KQ, et al. In vitro chemosensitivity in breast cancer using ATP-tumor chemosensitivity assay[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(12): 1737 - 1742.
- [7] 成海燕, 祝秀丹, 王焕民. 恶性实体瘤化疗患儿 ATP 生物荧光肿瘤体外药敏检测研究[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(8): 598 - 601.
- [8] 郭洪斌, 刘 意, 郭春芳, 等. ATP-生物荧光法体外药敏试验在结肠癌化疗中的临床应用[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(1): 41 - 43.
- [9] Cho YB, Lee WY, Song SY, et al. In vitro chemosensitivity based on depth of invasion in advanced colorectal cancer using ATP-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) [J]. Eur J Surg Oncol, 2009, 35(9): 951 - 956.
- [10] Engstrom PF, National Comprehensive Cancer Network. Systemic therapy for advanced or metastatic colorectal cancer; national comprehensive cancer network guide-lines for combining anti-vascular endothelial growth factor and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies with chemotherapy [J]. Pharmacotherapy, 2008, 28(11): 18 - 22.
- [11] 朱 旭, 杨仁杰, 沈 琳. 结直肠癌肝转移 105 例姑息性治疗的回顾性分析[J]. 肿瘤, 2009, 29(1): 87 - 90.
- [12] 韩俊毅, 卢爱国, 翟晓波, 等. 中晚期结直肠癌体外丝裂霉素联合 5-氟尿嘧啶抗肿瘤药敏相关因素分析[J]. 肿瘤, 2009, 29(5): 479 - 482.
- [13] 郑 树. 结直肠肿瘤基础研究与临床实践[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 511.
- [14] 骆卉妍, 李宇红, 张 力, 等. CPT-11 联合 5FU/CF (FOLFIRI) 化疗方治疗方案治疗晚期结直肠癌[J]. 癌症, 2007, 26(8): 905 - 908.
- [15] 刘 祺, 龚凡杰, 李永国, 等. 羟基喜树碱治疗胃肠道肿瘤近期疗效及安全性的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2006, 6(2): 124 - 127.
- [16] 宁四海, 陈绍俊, 黄海欣, 等. 奥沙利铂联合羟基喜树碱与氟尿嘧啶治疗转移性结直肠癌的随机对照临床研究[J]. 中国癌症杂志, 2009, 19(4): 284 - 287.

收稿日期: 2010 - 11 - 01; 修回日期: 2011 - 01 - 08