

# 八种常用化疗药物组合对人类宫颈癌细胞体外药物敏感试验研究

周影, 胡建铭

(苏州大学附属第一医院 妇产科, 苏州 215006)

**[摘要]** **目的** 探讨临床宫颈癌原代肿瘤细胞对 8 种常用化疗药物组合方案的敏感性。**方法** 2013 年 6 月~2014 年 10 月苏州大学附属第一医院收治的 41 例宫颈癌术中切下肿瘤组织标本进行体外细胞培养, 再将紫杉醇, 紫杉醇+顺铂, 紫杉醇+卡铂, 托泊替康+顺铂, 吉西他滨+顺铂, 多西他赛, 吉西他滨以及顺铂+环磷酰胺+多柔比星分别设定不同药物浓度梯度[200%, 100%, 50.0%, 25.0%, 12.5% 血浆峰值浓度(plasma peak concentration, PPC)], 采用 ATP 生物荧光法进行药敏试验。**结果** 8 组化疗药物方案血浆峰值浓度下对宫颈癌的敏感性依次为: 紫杉醇+顺铂>紫杉醇+卡铂>紫杉醇>吉西他滨+顺铂>顺铂+环磷酰胺+多柔比星>托泊替康+顺铂>多西他赛>吉西他滨。**结论** 宫颈癌患者进行化疗药物敏感试验具有可行性, 对临床个体化化疗具有现实指导作用。

**[关键词]** 宫颈癌; 原代肿瘤细胞; 化疗药物; 敏感性; 体外培养

**[中图分类号]** R737.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-1678(2015)01-0057-03

## Study on susceptibility of eight common chemotherapy drug combinations in human cervical carcinoma cell in vitro

ZHOU Ying, HU Jian-ming

(Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate chemosensitivity of cervical pro-generation tumor cells to eight common chemotherapy drug combinations. **Methods** 41 fresh specimens of human cervical tumors were selected in the first affiliated hospital of Soochow university from June 2013 to October 2014, then the cells were cultured. The sensitivity of combinations were tested using ATP-bioluminescence method: taxol (TAX), TAX + cisplatin (DDP), TAX + carboplatin (CBP), topotecan + DDP, gemcitabine (GEM) + DDP, docetaxel, GEM and DDP + cyclophosphamide (CTX) + doxorubicin (ADM) in different concentrations [200%, 100%, 50.0%, 25.0%, 12.5% plasma peak concentration (PPC)]. **Results** The chemosensitivities priority of cervical carcinoma to eight anticancer drugs in plasma peak concentration: TAX + DDP > TAX + CBP > TAX > GEM + DDP > DDP + CTX + ADM > Topotecan + DDP > Docetaxel > GEM. **Conclusion** The ATP-bioluminescence assay in vitro can predict chemotherapy for cervical carcinoma, which has practical guidance for individual chemotherapy.

**[Keywords]** cervical carcinoma; pro-generation tumor cells; chemotherapy drugs; susceptibility; cultivation in vitro

宫颈癌是女性生殖系统 3 大恶性肿瘤之一, 其发病率居妇科恶性肿瘤之首。近年来发病率呈上升和年轻化趋势。宫颈癌的治疗模式为手术及放疗, 化疗仅仅用于不能手术的晚期患者的姑息治疗或手术前新辅助化疗<sup>[1]</sup>。随着医疗技术的不断发展, 临床治疗的不断深入, 医疗工作者发现手术和放疗不能控制和消除亚临床病灶和微小转移病灶。随着化疗药物的更新换代、里程碑式的跨越, 给药方法和给药途径的不断改善。选择针对个体有效的药物进行化疗是治疗妇科恶性肿瘤的重要手段之一。本研究通过参考近年来国内外有关文献<sup>[2-3]</sup>选择 8 种一线及二线宫颈癌化疗药物方案, 化疗前对个体宫颈癌细胞进行药物体外敏感试验, 对其细胞毒性进行比较, 挑选出有效的单药或

有效(或敏感)联合药物组成的化疗方案, 为临床个体化化疗提供依据。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 6 月~2014 年 10 月年在苏州大学附属第一医院手术治疗的宫颈癌(经病理确诊为宫颈原发恶性肿瘤)患者 41 例标本, 年龄 24~68 岁, 平均(43.7 ± 11.2)岁。其中鳞癌 32 例; 腺癌 8 例; 宫颈腺泡状横纹肌肉瘤 1 例。

1.2 材料 生物荧光抗癌药物敏感性检测试剂盒(ATP-chemiluminescence method, 简称 ATP-TCA<sup>[11]</sup>试剂盒), 由湖州海创生物科技有限公司提供。化疗药物: 紫杉醇(taxol, TAX, 百时美施贵宝公司, H20130281), 顺铂<sup>[4]</sup>(cisplatin, DDP, 江苏豪森药业, H20040813), 卡铂<sup>[5]</sup>(carboplatin, CBP, 齐鲁制药, H20020180), 托泊替康<sup>[6]</sup>(topotecan, 葛兰素史克, H20130424), 吉西他滨<sup>[7]</sup>(gemcitabine, GEM, ELI LILLY AND COMPANY,

作者简介: 周影, 女, 硕士, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: snow.zy131@163.com; 胡建铭, 通讯作者, 女, 学士, 主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: hu\_jm2001@163.com。

H20110535),多西他赛<sup>[8]</sup>(docetaxel,江苏恒瑞医药,H20031243);环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX,Toronto Research Chemicals Inc.,H20110407),多柔比星<sup>[9]</sup>(doxorubicin,ADM,深圳万乐药业,H44024359)。均为一般临床制剂。其试验浓度依据药物的血浆峰值浓度(plasma peak concentration,PPC)确定,以上8种化疗药物的具体血浆峰值浓度见表1。

表1 8种化疗药物的血浆峰值浓度(μg/mL)

Tab.1 Plasma peak concentration of eight anticancer drugs(μg/mL)

药物	TAX	DDP	CBP	Topotecan	GEM	Docetaxel	CTX	ADM
血浆峰值浓度	13.8	6.3	25	0.75	25	10	3	3

1.3 方法 ATP-TCA 操作步骤:取手术切除的新鲜肿瘤组织标本,去除其表面的凝血块及坏死组织等,剪碎、离心,加入组织消化酶溶液,充分消化后离心,去上清,收集细胞悬液,调整细胞浓度至(1~3)×10<sup>5</sup>/mL,加入96孔细胞培养板中,置37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养4h后,加入化疗药物,每个药物设5个浓度(200%,100%,50.0%,25.0%,12.5%PPC),同时设空白对照孔(不含肿瘤细胞)及对照孔(含肿瘤细胞但不加化疗药物),于5%CO<sub>2</sub>、37℃、95%湿度下孵育5~7d。加入肿瘤细胞ATP提取

液,混匀后室温下15min,取0.05mL混合液置微板荧光分析仪检测<sup>[11]</sup>。按下式计算各个化疗药物的抑制率:

$$\text{抑制率} = (1 - \text{试验组 ATP 量} / \text{对照组 ATP 量}) \times 100\%$$

抑制率≥70%为高度敏感;50%~70%为敏感;30%~50%为低度敏感;<30%为耐药;当抑制率≥50%时可以推荐临床使用。

1.4 统计学方法 本试验所有数据采用SPSS 13.0软件进行方差分析,正态计量数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多样本均数比较采用方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 ATP标准曲线<sup>[10]</sup>(用于质控,用于每次使用系统时的发光测试及实验结果异常时的校验)。取各浓度测得的发光均值,以稀释浓度的LG对数值为自变量,以测定结果均值的LG对数值为因变量绘制标准曲线确定线性度,在ATP标准品浓度10<sup>-11</sup>~10<sup>-6</sup>mol/mL范围内,2者呈良好的直线相关关系(r≥0.975,P<0.001)。

2.2 ATP生物发光法检测结果 在总共收集的41例患者中,41例均具有可评估性。总可评估率约为:100%。在血浆峰值浓度下药物对宫颈鳞癌与腺癌的抑制率见表2。

表2 血浆峰值浓度下药物对鳞癌与腺癌的抑制率均值( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab.2 The tumor growth inhibition of squamous carcinoma and adenocarcinoma( $\bar{x} \pm s, \%$ )

病理类型	TAX	TC	TP	Docetaxel	GEM + DDP	DDP + CTX + ADM	GEM	Topotecan + DDP
鳞癌	89.71 ± 9.39	93.89 ± 7.95	98.07 ± 1.62	65.17 ± 27	75.28 ± 20.99	70.62 ± 27.01	46.60 ± 25.89	71.56 ± 24.46
腺癌	87.98 ± 14.74	97.29 ± 1.76	92.62 ± 12.67	65.58 ± 28.9	96.60 ± 1.98	89.70 ± 18.41	39.70 ± 31.79	70.13 ± 41.42

另外,宫颈腺泡状横纹肌肉瘤1例的癌细胞药物的敏感性:TAX单药为高度敏感,TAX+CBP方案为敏感,DDP+CTX+ADM方案为低度敏感,其余均为耐药。

宫颈癌不同病理类型药物敏感性的差异根据SPSS软件统

计P=0.3360,差异无统计学意义。

资料收集的41例宫颈癌细胞在不同浓度梯度下8组药物的肿瘤生长抑制率见表3,8组化疗药物对宫颈癌细胞体外敏感试验结果对照见图1。

表3 不同浓度梯度下8组药物的肿瘤生长抑制率均值( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab.3 Tumor growth inhibition of eight anticancer drugs in different concentrations( $\bar{x} \pm s, \%$ )

药物浓度	TAX	TC	TP	Docetaxel	GEM + DDP	DDP + CTX + ADM	GEM	Topotecan + DDP
200% PPC	96.98 ± 4.71	97.95 ± 3.99	99.31 ± 0.94	81.94 ± 21.62	81.57 ± 18.67	80.64 ± 20.17	50.57 ± 25.51	76.08 ± 24.11
100% PPC	89.31 ± 10.66	94.49 ± 7.35	96.71 ± 6.45	65.30 ± 26.63	77.94 ± 20.86	75.11 ± 26.08	44.63 ± 26.61	71.41 ± 25.67
50% PPC	71.44 ± 20.61	79.05 ± 16.52	86.14 ± 15.86	49.74 ± 27.81	69.76 ± 22.03	66.72 ± 27.6	38.18 ± 26.51	59.70 ± 29.94
25% PPC	54.43 ± 26.66	59.07 ± 24.58	68.37 ± 23.72	40.19 ± 27.11	58.02 ± 24.05	48.37 ± 27.2	31.36 ± 26.62	45.52 ± 33.88
12.5% PPC	42.12 ± 26.02	46.35 ± 26.31	48.93 ± 26.8	34.24 ± 25.33	44.62 ± 24.06	32.09 ± 25.56	26.10 ± 24.42	36.42 ± 35.07

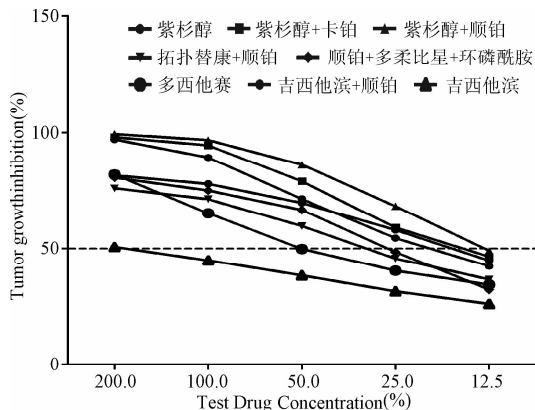


图1 8组化疗药物对宫颈癌细胞体外敏感试验结果

Fig.1 Chemosensitivities of cervical carcinoma to eight anticancer drugs

试验结果显示:本试验的8组化疗药物随着浓度增加,对肿瘤细胞敏感率也逐渐增加。分别在5个药物浓度下,对各组药物作用下肿瘤细胞生长的抑制作用之间两两比较,进行单因素方差分析,统计结果显示均P<0.01,从而得出结论:8组化疗药物对个体宫颈癌细胞的抑制作用具有显著性差异,血浆峰值浓度下肿瘤生长抑制率依次为:紫杉醇+顺铂>紫杉醇+卡铂>紫杉醇>吉西他滨+顺铂>顺铂+环磷酰胺+多柔比星>拓扑替康+顺铂>多西他赛>吉西他滨。

## 3 讨论

经典的宫颈癌化疗方案一般选择:BVP(博来霉素、长春新碱与顺铂)、BP(博来霉素与顺铂)、FP(氟尿嘧啶与顺铂)或者TP(紫杉醇与顺铂)。经验性选择化疗方案对宫颈癌细胞几乎没有选择特异性,因而疗效低,同时易产生严重不良反应<sup>[12]</sup>;但是

临床上大多凭经验用药,同一化疗方案固定不变应用于许多患者而忽视了个体差异,总体疗效不佳。本研究采用 ATP 生物荧光法<sup>[6]</sup>对 41 例宫颈癌患者的肿瘤细胞进行药敏试验,结果显示随着药物浓度的增大,肿瘤细胞对各抗癌药物的敏感性增加,呈剂量依赖性。在患者可耐受的前提下可优先选择 TAX + DDP 方案,其次为 TAX + CBP 和单药 TAX 方案。有些患者的肿瘤细胞对某些药物非常敏感,在浓度为 50% PPC 时就表现为高度敏感;而有些细胞则表现出耐药,但随着检测药物浓度的增加,当在浓度达 200% PPC 甚至更高时,细胞则表现出敏感。表明增加药物剂量可以提高疗效,这对于能够耐受大剂量化疗的患者有较好的指导意义。参与本试验的 41 例宫颈癌患者,其肿瘤细胞对于各组化疗药物的敏感性均不完全相同。Ling ZQ 等<sup>[13]</sup>报道对食管癌患者进行体外药敏试验为临床治疗提供合理的抗癌方案。O' Toole SA 等<sup>[14]</sup>采用 MTS 法检测子宫内内膜癌以及宫颈癌患者对化疗药物的敏感性,并对比药敏试验结果与临床疗效,发现 2 者具有较好的相关性。因此,在临床选择化疗方案前进行体外药物敏感试验,检测患者肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,根据药敏试验结果选择合适化疗方案,可以显著提高治疗疗效,减少不良反应及预防多重耐药发生,从而延长患者生存期。

本研究也存在一些不足之处,抗癌药物的疗效是许多作用的综合结果,受体内诸多因素的调控和制约,体外细胞生长环境无法完全模拟肿瘤体内环境,药敏试验只是药物和细胞的直接作用,仅反映了肿瘤一个阶段,一部分细胞的情况,无法完全体现肿瘤的异质性;临床效果受用药方法、剂量影响很大,体内的药物浓度及持续时间受给药途径、肝肾功能等各种因素影响,而试验条件则无法选择合适的浓度和作用时间以达到与临床完全一致;某些药物需经代谢转化或免疫系统介导发挥作用,如环磷酰胺<sup>[15]</sup>需经过肝脏代谢转化为有效物质发挥作用,而体外药敏试验无法很好体现这些药物功效。另外,据本研究结果显示宫颈癌不同组织病理学间的药物敏感性差异不具有统计学意义,可能与宫颈腺癌的样本量少有关,有待后期继续收集样本资料,完善实验结果。□

## 参考文献

- [1] 王平,彭芝兰,张家文,等. 子宫颈癌新辅助化疗中不同化疗途径的疗效比较[J]. 中华妇产科杂志,2005,40(4):227-230.
- [2] 王立峰,刘宝瑞. 铂类、紫杉类药物个体化治疗研究进展[J]. 癌症进展,2011,9(5):533.
- [3] 沈晓燕,崔恒. 复发性和转移性子宫颈癌化疗的研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2013,48(10):788-791.
- [4] Leath CA, Straughn JM. Chemotherapy for advanced and recurrent cervical carcinoma: results from cooperative group trials [J]. Gynecologic oncology,2013,129(1):251-257.
- [5] 安云婷,李隆玉,邓克华,等. 紫杉醇联合顺铂/卡铂在宫颈癌新辅助化疗中的作用[J]. 实用癌症杂志,2007,21(5):499-501.
- [6] Kurtz JE, Freyer G, Joly F, et al. Combined Oral Topotecan plus Carboplatin in Relapsed or Advanced Cervical Cancer: A GINECO Phase I-II Trial[J]. Anticancer research,2012,32(3):1045-1049.
- [7] 沈连强,张国玲. 吉西他滨介入治疗晚期和中晚期宫颈癌 58 例临床观察[J]. 苏州大学学报(医学版),2003(6):800-801.
- [8] 李学真,邹文,李敏,等. 多西他赛联合卡铂同步放化疗门诊治疗

中晚期宫颈癌的近期疗效观察[J]. 中国全科医学,2012,15(30):3523-3525.

- [9] 肖军霞. 多柔比星对人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的形态学观察[J]. 中华肿瘤防治杂志,2009,16(22):1749-1752.
- [10] 陈历排. 用微量板 ATP 生物发光法检测肿瘤细胞对化疗药物的敏感性[J]. 肿瘤,2000,20(2):103-105.
- [11] Sevin BU, Peng ZL, Perras JP, et al, Averette HE. Application of an ATP -bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing[J]. Gynecol Oncol,1988,31:191-204.
- [12] Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview[J]. Mini Rev Med Chem,2011,11(1):1-17.
- [13] Ling ZQ, Qi CJ, Lu XX, et al. Heterogeneity of chemosensitivity in esophageal cancer using ATP-tumor chemosensitivity assay [J]. Acta Pharmacol Sin,2012,33(3):401-406.
- [14] O' Toole SA, Sheppard BL, McGuinness EP, et al. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumors[J]. Cancer Detect Prev,2003,27(1):47-54.
- [15] Xiao Y, Li JD, Shi HL, et al. Predictive value of in vitro MTT assay chemosensitivity test of cytotoxic drug activity in cervical cancer[J]. chin J cancer,2007,26(4):386-389.

(编校:谭玲,王伊伊)