

• 临床研究 •

乳腺癌的 TECIA 法药敏试验及其临床应用价值

姚清深 秦军 陈春媚 覃运荣 周林荣 覃欣 周腾贤

【摘要】 目的 探讨组织培养-终点染色-计算机图像分析(TECIA)法体外肿瘤药敏试验对乳腺癌化疗的临床应用价值。**方法** 选取 2005 年 9 月至 2008 年 9 月本院手术的 46 例乳腺癌标本,采用 TECIA 法进行化疗药物敏感性的体外检测。所测药物为乳腺癌常用化疗药物紫杉醇(PTX)、诺维本(NVB)、多柔比星(ADM)、氨甲喋呤(MTX)、5-氟脲嘧啶(5-FU)、顺铂(DDP)及联合化疗 TA(PTX+ADM)、NP(NVB+DDP)、CAF(CTX+ADM+5-FU)、CMF(CTX+MTX+5-FU) 方案。化疗药物敏感性差异的比较,采用多个样本率的 χ^2 检验。**结果** 46 例乳腺癌对化疗药物的敏感性为:PTX 60.9%(28/46)、NVB 58.7%(27/46)、ADM 56.5%(27/46)、MTX 37.0%(17/46)、5-FU 34.8%(16/46)、DDP 26.1%(12/46);PTX、NVB、ADM、MTX 之间及 5-FU 和 DDP 之间比较,敏感率差异均无统计学意义($\chi^2=6.724, P=0.081; \chi^2=0.821, P=0.365$),PTX、NVB 比 5-FU、DDP 的敏感率高,其差异有统计学意义($P<0.003$);TA、NP、CAF 和 CMF 方案的敏感率分别为 71.7%(33/46)、67.4%(31/46)、45.7%(21/46)、39.1%(18/46),但 TA 与 NP 方案、CAF 与 CMF 方案比较,差异无统计学意义($P>0.007$);TA 和 NP 方案比 CAF 和 CMF 方案的敏感率高,其差异有统计学意义($P<0.007$)。PTX、NVB 及含有此类药物的联合化疗方案的敏感性较高,化疗药物敏感性存在个体差异。**结论** TECIA 法体外肿瘤药敏试验在乳腺癌的化疗用药方面具有指导意义。

【关键词】 乳腺肿瘤; 药物筛选试验; 组织培养-终点染色-计算机图像分析法; 个体化化疗

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Study on drug sensitivity test in breast cancer and its clinical value YAO Qing-shen, QIN Jun, CHEN Chun-mei, QIN Yun-rong, ZHOU Lin-rong, QIN Xin, ZHOU Teng-xian. Department 2 of General Surgery, Guangxi Yulin Red Cross Hospital, Yulin 537000, China

【Abstract】 Objective To explore *in vitro* chemosensitivity of breast cancer with TECIA (tissue culture-end point staining-computer image analysis) and its clinic value in chemotherapy of breast cancer. **Methods** Forty-six specimens of breast cancer were selected from the patients who underwent breast cancer surgery from September 2005 to September 2008 in our hospital and were used for evaluating the chemosensitivity of breast cancer cells with TECIA. The drugs tested were the drugs commonly used for breast cancer including paclitaxol (PTX), navelbine (NVB), (adriamycin)ADM, methotrexate (MTX), (5-fluorouracil)5-FU, (cisplatin)DDP, and combined regimens as TA (PTX+ADM), NP(NVB+DDP), CAF(CTX+ADM+5-FU) and CMF(CTX+MTX+5-FU). The drug sensitivity difference was compared using Chi

square test. **Results** In the 46 specimens of breast cancer, the sensitivity to PTX was 60.9% (28/46), to NVB 58.7% (27/46), to ADM 56.5% (27/46), to MTX 37.0% (17/46), to 5-FU 34.8% (16/46) and to DDP 26.1% (12/46). There was no difference in PTX, NVB, ADM and MTX. Also, there was no difference in 5-FU and DDP ($\chi^2=6.724, P=0.081; \chi^2=0.821, P=0.365$). The sensitivity of PTX and NVB was higher than that of MTX, 5-FU and DDP ($P<0.003$). The sensitivity to TA, NP, CAF and CMF was 71.7% (33/46), 67.4% (31/46), 45.7% (21/46) and 39.1% (18/46), respectively. There was no difference between TA and NP and between CAF and CMF ($P>0.007$). The sensitivity of TA and NP was higher than that of CAF and CMF, with statistical difference ($P<0.007$). The sensitivity of PTX and NVB or chemotherapy regimens with PTX and NVB was higher. There was individual difference in the sensitivity of chemotherapy drugs. **Conclusion** *In vitro* chemosensitivity of breast cancer with TECIA is of guiding significance in clinics.

【Key words】 Breast neoplasms; Drug screening test; Tissue culture-end point staining-computer image analysis; Individual chemotherapy

乳腺癌已成为世界范围内最常见的女性恶性肿瘤,并且居女性癌症死亡病因的第 2 位。乳腺癌的治疗以手术切除为主,术后仍需配合化学治疗,而临床使用的化疗药物种类繁多,实施化疗前了解患者对不同化疗药物的敏感性和耐受性,预先筛选临床化疗药物,对指导临床个体化治疗具有重要意义^[1]。本文采用组织培养-终点染色-计算机图像分析法进行了乳腺癌的体外药物敏感性试验,以便为临床选择药物提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

46 例乳腺癌新鲜标本取自本院 2005 年 9 月至 2008 年 9 月的手术标本。患者均为女性,年龄 16~71 岁,平均年龄 46.4 岁。所有病例均为首次治疗,术前均未化疗,标本于无菌条件下快速送实验室检查。

1.2 药品与试剂

实验采用的化疗药物均为临床注射液,按照常规化疗剂量的峰值浓度配成试验浓度^[2],过滤除菌,避光冷藏。RPMT-1640 培养液(GIBCO 公司产品)含 20% 小牛血清, -20℃ 冻存。100 级净化工作台购自吴江市伟峰净化设备厂;二氧化碳培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司;图像分析仪由江苏先声药业公司提供。

1.3 标本处理

依据梁永钜等^[3]报道的方法并加以改进,具体过程如下:活组织标本为手术当日切除的新鲜无污染标本,约 1 mm×1 mm×1 mm 大小,放入培养液中并送实验室,4 h 内在超净工作台进行实验。准备灭菌的 24 孔培养板,每孔放入一张灭菌滤纸,加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 300 μ l。用 D-hanks 反复清洗标本 3 次,洗去组织表面的血液,将标本切割成 1 cm×1 cm×

1 cm大小的组织块后,放入上述的 24 孔培养板中,每组设 4 孔,每孔放 1 块。培养板放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后取出,用 TECIA 图像分析系统测定组织块面积,即初始面积 (area, A)。然后每孔加入化疗药物 1×血浆峰值浓度(PPC,对照孔除外)。46 例标本均选择 6 种单药[紫杉醇(PTX)、诺维本(NVB)、多柔比星(ADM)、氨甲喋呤(MTX)、5-氟脲嘧啶(5-FU)、顺铂(DDP)]及 4 组联合用药方案[TA(PTX+ADM)、NP(NVB+DDP)、CAF(CTX+ADM+5-FU)、CMF(CTX+MTX+5-FU)]。化疗药物与培养液充分混匀,放入培养箱继续培养 4 d 后,加入四氮唑染料再培养。4 h 后用 TECIA 图像分析系统测定组织蓝染面积 (blue area, BA),计算化疗药物抑制率 (IR)。IR = (1-BA 处理 × A 对照/A 处理 × BA 对照) × 100%。

1.4 评价指标和标准

化疗药物敏感性以 IR 作为评价标准,参照 Singh 等^[4]的研究,抑制率在 30%以上为敏感,低于 30%为耐药。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件包进行分析。多个样本率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义;两两比较采用 χ^2 分割法,检验水准 α 在表 1 为 0.003,表 2 为 0.007。

2 结果

2.1 46 例乳腺癌体外单种药物敏感性试验结果

单药的敏感率为 PTX > NVB > ADM > MTX > 5-FU > DDP; PTX、NVB、ADM 和 MTX 之间及 5-FU 和 DDP 之间比较,差异无统计学意义($P > 0.003$); PTX、NVB 比 5-FU、DDP 的敏感率高,差异有统计学意义($P < 0.003$,表 1)。

表 1 46 例乳腺癌体外单种药物敏感性试验结果

受检药物	敏感例数	耐药例数	敏感率 ^a	χ^2 值	P 值
①PTX ^b	28	18	0.609	20.328	0.001
②NVB ^c	27	19	0.587		
③ADM	26	20	0.565		
④MTX	17	29	0.370		
⑤5-FU	16	30	0.348		
⑥DDP	12	34	0.261		

a: $P > 0.003$ ①、②、③、④之间比较($\chi^2 = 6.724$ $P = 0.081$),

⑤、⑥之间比较($\chi^2 = 0.821$, $P = 0.365$); b, c: $P < 0.003$, ①

与⑤+⑥比较,②与⑤+⑥比较; PTX: 紫杉醇; NVB: 诺维本;

ADM: 多柔比星; MTX: 氨甲喋呤; 5-FU: 5-氟脲嘧啶; DDP: 顺铂

2.2 46 例乳腺癌不同化疗方案的体外药物敏感性试验结果

联合用药的敏感率为 TA 方案 > NP 方案 > CAF 方案 > CMF 方案; TA 与 NP 方案之间及 CAF 与 CMF 方案之间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.007$); TA 和 NP 方案比 CAF 和 CMF 方案的敏感率高 ($P < 0.007$, 表 2)。PTX、NVB 及含有此类药物的联合化疗方案的敏感性较高。

表 2 46 例乳腺癌体外联合化疗方案药物敏感性试验结果

受检药物	敏感例数	耐药例数	敏感率	χ^2 值	P 值
①TA 方案 ^a	33	13	0.7174	14.357	0.002
②NP 方案 ^b	31	15	0.6739		
③CAF 方案	21	25	0.457		
④CMF 方案	18	28	0.391		

a, b: $P < 0.007$, ①与③+④比较, ②与③+④比较; TA: 紫杉醇+多柔比星; NP: 诺维本+顺铂; CAF: 环磷酰胺+多柔比星+5-氟脲嘧啶; CMF: 环磷酰胺+氨甲喋呤+5-氟脲嘧啶

3 讨论

乳腺癌为化疗中度敏感的恶性肿瘤, 化疗方案的选择是治疗的关键。由于恶性肿瘤存在较强的异质性^[5], 肿瘤对各种化疗药物有着明显的个体差异, 忽视个体差异仅凭经验用药, 存在着盲目性, 使得总体疗效不佳。个体化治疗一直是恶性肿瘤治疗的难题, 为此, 研究者们尝试多种肿瘤药敏检测方式, 建立了可靠的肿瘤药敏检测方法, 可以帮助临床医师了解不同患者对不同化疗药物的敏感和耐受情况, 设计合理的治疗方案, 避免无效药物所致的不良反应, 从而实现个体化治疗。

目前抗肿瘤药物的药敏试验方法多为体外检测法, 常用的有四氮唑衍生物比色法 (MTT 法)、ATP 生物荧光肿瘤体外药敏检测技术 (ATP-TCA)、组织块培养-终点染色-计算机图像分析法 (TECIA 法) 等。MTT 法及 ATP-TCA 法采用新鲜实体瘤标本洗净后制成单细胞悬液, 然后放入培养板中加药培养, 最后计算肿瘤细胞的存活率以预测肿瘤对药物的敏感性。MTT 法具有快速、简便、半自动操作及成本低等优点, 但因是肿瘤活细胞的培养, 有时不能区分正常细胞与肿瘤细胞, 所需细胞数较多, 数据差异较大, 结果不稳定, 还存在筛选周期长 (约 1 周) 等不足。ATP-TCA 法的优点是细胞需要量少, 可测到少至 20 个细胞的 ATP 含量, 敏感度高, 干扰因素少, 结果稳定, 对于复发癌和癌灶体积小者尤其适合, 且试验周期较短 (约 30~60 min), 方法简便, 但荧光检测方法也存在测定仪器昂贵、无法排除非癌细胞干扰等缺点。由于单细胞的体外生存环境与体内实体瘤中的环境差别很大, 模拟实体瘤的体内生长环境尚有不足^[5-6]。组织块培养 TECIA 法与传统的单细胞培养 MTT 等方

法相比,能够保持实体瘤在体内的三维生长方式、组织立体结构、细胞异质性和致瘤性等多种特性,并能模拟体内实体瘤细胞的环境,提高药敏检测的准确性,且该法操作步骤少、简便易行、需标本量小、成功率高、重复性好,试验周期短(5 d),是一种较实用的微量体外药敏检测方法^[7]。在各种实体瘤中,乳腺癌的标本较硬,内有大量的纤维,获得单细胞悬液难以保证,更适合组织培养 TECIA 法。陈国际等^[8]报道,化疗药物敏感率的大小依次为: PTX、NVB、表柔比星(EPI)、ADM、DDP、5-FU、CTX、羟基喜树碱。本研究结果与之相似,并显示 PTX、NVB 及含有此类药物的联合化疗方案的敏感性较高。PTX、NVB 及含有此类药物的联合化疗方案正是临床上比较有效的药物,但不同乳腺癌患者对同一种化疗药物的敏感度也有差异。临床上进行的多种乳腺癌体外药敏检测结果显示,80%的敏感化疗药为临床经验化疗中单药和联合用药有效的药物,与临床上观察的有效率基本一致,提示体外药敏结果可以反映体内药物敏感性^[2,5,8-10]。TECIA 法为乳腺癌患者筛选相对敏感的药物,从而实现乳腺癌的个体化化疗。Kabeshima 等^[11]的研究显示,在恶性肿瘤药物敏感组的远期存活率明显高于耐药组和单纯手术组。黄剑飞等^[12]根据乳腺癌药敏检测结果,指导乳腺癌个体化化疗,经 3 年随访,治疗组复发转移率低于对照组,差异也有统计学意义($P < 0.050$)。

体外药敏检测结果可以反映体内药物敏感性,但这一点不足以证明体外环境等同于体内环境。体外试验还有局限性,如标本内肿瘤细胞数量、标本新鲜度、实验技术及条件等;但在未开发出更好的检测技术之前,乳腺癌的 TECIA 法体外药敏检测技术对于评估、组合和筛选化疗方案、实施个体化化疗具有指导意义,对乳腺癌的临床治疗药物选择具有重要参考价值。随着分子生物与技术的发展,肿瘤药敏试验正步入分子基因水平,肿瘤药敏试验方法的也不断改进与完善。这必将大大提高肿瘤药敏试验的实用性和准确性,肿瘤药敏试验在指导临床用药及个体化疗方面发挥着越来越重要的作用。

参考文献

- [1] 左文述,王磊. 乳腺癌外科临床实践的点滴思考:外科医师的使命感与乳腺癌的个体化理念. 中华乳腺病杂志:电子版,2007,1:193-196.
- [2] 秦海明,宋福林,匡丽. 体外药敏试验在乳腺癌中的应用. 实用诊断与治疗杂志,2007,21:299-300.
- [3] 梁永钜,周昕熙,潘启超,等. 肝癌体外药物敏感性试验. 肿瘤,2001,21:17-19.
- [4] Singh B, Li R, Xu L, *et al.* Prediction of survival in patients with head and neck cancer using the histoculture drug response assay. Head Neck, 2002, 24: 437-442.
- [5] 李艳芬,田海梅,陈国际,等. 人乳腺癌细胞原代培养体外药敏试验研究. 临床肿瘤学杂志,2006,11:768-771.
- [6] 赵国刚,骆云鹏,王崇树,等. MTT 比色法在临床抗癌药物感性实验中的应用及进展. 川北医学院报, 2001, 16:108-109.
- [7] 王玉栋,刘巍. 肿瘤化疗药敏试验研究进展. 肿瘤研究与临床,2007,4:141-144.
- [8] 陈国际,傅军,田海梅,等. ATP 生物荧光肿瘤药敏检测技术在乳腺癌化疗中的应用研究. 癌症进展,2003,

1;215—218.

- [9] 吕青,袁淑兰,程南生,等. 化疗药物敏感试验与乳腺癌经验化疗. 华西医学,2000,15:409—410.
- [10] 孙燕. 内科肿瘤学. 北京:人民卫生出版社,2005:375—454.
- [11] Kabeshima Y, Kubota T, Watanabe M, *et al.* Clinical usefulness of chemosensitivity test for advanced colorectal cancer. *Anticancer Res*,2002,22:3033—3037.
- [12] 黄剑飞,惠君,倪启超. 三磷酸腺苷法肿瘤药敏试验在乳腺癌中的临床应用. 南京医科大学学报(自然科学版), 2008,28:1606—1609.

(收稿日期:2008-07-04)

(本文编辑:罗承丽)

姚清深,秦军,陈春媚,等. 乳腺癌的 TECIA 法药敏试验及其临床应用价值[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2009,3(3):288-293.