

88例卵巢上皮性癌行ATP-TCA 体外药敏试验结果分析

崔颖* 周丹 李叶 申桂华 张斯由
(北京医院妇产科, 北京 100730)

摘要 该研究是探讨三磷酸腺苷生物荧光肿瘤抗癌药物药敏性分析实验(ATP-TCA)在卵巢癌患者化疗中的应用。研究选取88例卵巢上皮性癌新鲜组织行ATP-TCA体外药敏试验, 分析结果、计算各种化疗药物敏感性, 并与48例对照组患者进行临床近期有效率的比较。结果显示, 在体外药敏试验敏感性最强的单药为紫杉醇(51.9%), 敏感性强弱依次为: 紫杉醇>卡铂>顺铂>吉西他滨>拓泊替康>多西他赛>依托泊苷>环磷酰胺>博来霉素, 联合用药方案敏感性较单药增加。药敏组患者临床近期有效率(85.23%)高于对照(68.75%)。ATP-TCA是一种有效的抗癌药物敏感性分析实验, 可为卵巢癌患者临床化疗提供个体化的指导方案。

关键词 原发卵巢上皮性癌; ATP-TCA; 个体化治疗

Analysis Results of ATP-Tumor Chemosensitivity Assay In Vitro of 88 Cases of Epithelial Ovarian Cancer

Cui Ying*, Zhou Dan, Li Ye, Shen Guihua, Zhang Siyou

(Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract In this research, we demonstrated the feasibility of ovarian cancer patients in clinical individualized chemotherapy using ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA) *in vitro*. We examined the heterogeneity of chemosensitivity in ovarian cancer specimens ($n=88$) using an *ex vivo* ATP-TCA. The short-term effectiveness of chemotherapy was compared between ATP group and control group. We found that the most active single agent tested was paclitaxel, to which 51.9% of samples were sensitive. The order of the sensitivity is paclitaxel > carboplatin > cisplatin > gemcitabine > topotecan > docetaxel > etoposide > cyclophosphamide > bleomycin. Combinations of agents showed more strong sensitivity cases. The short-term effectiveness rates in ATP group (85.23%) and control group (68.75%) were significantly different. Chemosensitivity testing may provide a practical method of testing new regimens before clinical trials in ovarian cancer patients.

Key words primary epithelial ovarian cancer; ATP-tumor chemosensitivity assay; individual chemotherapy

卵巢上皮性癌的特点是起病隐匿, 发现时大多为晚期、易盆腔内种植转移、手术难以根治, 因而化疗在卵巢癌的综合治疗中占有相当重要的地位。对化疗药物的敏感程度直接影响到患者的生存率、

复发率。但由于肿瘤本身存在异质性, 不同的个体, 即使组织来源与分期相同, 对化疗药物的敏感谱亦会不同, 而原发耐药与复发耐药又是制约卵巢癌临床疗效的关键因素^[1]。如果仅依照临床固定的方案进行化疗, 一部分患者不但对化疗药物无效, 而且会产生副反应及耐药性。因此, 近年来许多学者致力于探讨化疗药物敏感性测定, 对卵巢癌患者进行个体化治疗, 目的是提高疗效、减少毒副反应、防止

收稿日期: 2014-04-10 接受日期: 2014-06-11

*通讯作者。Tel: 010-85136112, E-mail: cuiy9906@163.com

Received: April 10, 2014 Accepted: June 11, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-10-85136112, E-mail: cuiy9906@163.com

网络出版时间: 2014-07-02 10:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0124.html>

多重耐药性的诱导。三磷酸腺苷法肿瘤化学敏感检测(ATP-tumor chemosensitivity assay, ATP-TCA)法是目前技术较为稳定、结果相对可靠、操作简便的药敏测定法。本文对近一年多来我院88例卵巢上皮性癌用ATP-TCA技术行化疗药物敏感性检测的结果进行分析,探讨了卵巢肿瘤患者的临床个体化化疗的可行性,以期提高疗效,降低毒副作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

研究对象为北京医院2013年1月~2014年2月收治并行手术治疗的卵巢上皮性癌患者,根据患者意愿将患者随机分为药敏组(88例)及对照组(48例)(表1)。药敏组88例,术中留取新鲜肿瘤组织采用ATP-TCA技术行化疗药物敏感性检测;对照组48例,

表1 患者资料

Table 1 The basic information of the patients

分组 Groups	例数 Number of cases	平均年龄(岁) Average age (years)	分期 Stage grouping			
			Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
ATP group	88	49.6	6	16	48	18
Control group	48	50.3	4	9	21	14

未行药物敏感性检测。所有患者均经病理证实为卵巢上皮性癌。

1.2 试剂与仪器

ATP生物荧光肿瘤药物敏感性检测试剂盒购自湖州海创生物科技有限公司。

1.3 化疗药物

紫杉醇(PTX, 意大利百时美施贵宝公司, 批号: G00084)、顺铂(DDP, 江苏豪森药业股份有限公司, 批号: 111103)、卡铂(CBP, 意大利百时美施贵宝公司, 批号: 2G01278)、拓泊替康(TPT, 大连美仑生物技术有限公司, 批号: 20111001)、吉西他滨(GEM, 法国礼来公司, 批号: A812353C)、依托泊苷(VP-16, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 12010331)、多西他赛(TXT, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: H20020543)、博来霉素(BLM, 日本化药株式会社, 批号: Y20262)、环磷酰胺体内活化物(4-HC, 加拿大TORONTO公司, 批号: 3-JBZ-104-1)。

1.4 试验流程

全过程需在无菌操作条件下进行。

1.4.1 标本制备 将新鲜卵巢肿瘤组织样本剪碎, 经抗生素浸泡、消化酶消化、37℃孵育2 h, 消化完毕后, 混合液离心5~8 min, 用200目细胞筛过滤未分解的肿瘤组织, 得到细胞悬液, 进行细胞分离、计数。

1.4.2 准备待测化疗药物 参照制药商的说明书或药典中的化疗药物血浆峰值浓度(peak plasma concentration, PPC), 设定5个药物测试浓度(test drug

concentration, TDC): 0%, 100%, 50.0%, 25.0%, 12.5% PPC。每个TDC做2个平行对照孔, 重复3次。培养板上剩下的孔可以用于MO(未加化疗药的细胞)和空白孔(未加细胞)对照测试。100%实验药物测试浓度配置见表2。

1.4.3 肿瘤细胞和药物共培养 计数后, 确定接种细胞量, 将培养板置于37℃、5% CO₂、湿度>95%的培养箱培养, 培养至第5 d时即可进行ATP检测。

1.4.4 数据分析 ATP的提取后进行荧光检测, 绘制ATP标准曲线, 完成数据自动传输和分析。

1.5 药敏检测结果判定

体外药物敏感度根据以下四种进行分类。强敏感: IC₉₀≤100% TDC和IC₅₀≤25% TDC; 中度敏感: IC₉₀>100% TDC和IC₅₀≤25% TDC; 轻度敏感:

表2 各种药物100% TDC配置表

Table 2 The 100% TDC of the drugs

抗癌药物 Anticancer drugs	100% TDC (μg/mL)
PTX	13.8
DDP	6.3
CBP	25
TPT	0.14
GEM	25
VP-16	20
TXT	10
BLM	0.6
4-HC	1

$IC_{90} \leq 100\%$ TDC和 $IC_{50} > 25\%$ TDC; 耐药: $IC_{90} > 100\%$ TDC和 $IC_{50} > 25\%$ TDC。其中, IC_{90} 为抑制90%肿瘤细胞生长时的血浆峰值浓度(PPC), 即本实验中的测试药物浓度(TDC), IC_{50} 为抑制50%肿瘤细胞生长时的血浆峰值浓度。

1.6 临床近期疗效评价

临床近期疗效主要参考Rustin等^[2]的评价标准: 治疗前1周内血清CA125异常升高的患者, 术后CA125转阴为完全缓解(CR); 降低 $>50\%$ 为部分缓解(PR); 降低 $<50\%$ 或增高 $<25\%$ 为稳定(SD); 增高 $>25\%$ 为进展(PD)。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行卡方分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ATP-TCA法卵巢癌标本评价

88例卵巢肿瘤组织标本中, 5例因消化后细胞数量过少无法检测, 3例因标本污染无法检测, 其余80例均顺利完成ATP-TCA药敏检测, 可评价率为90.91%(80/88)。

2.2 剂量-效应关系

通过1例卵巢癌标本ATP-TCA结果得出抗癌药物的剂量-效应曲线(图1), 可以看出, 不同药物及同种药物不同浓度对卵巢癌细胞的抑制率不同; 也可以看出单药和联合药物对卵巢癌细胞抑制率的差异符合药物的体内药代动力学。

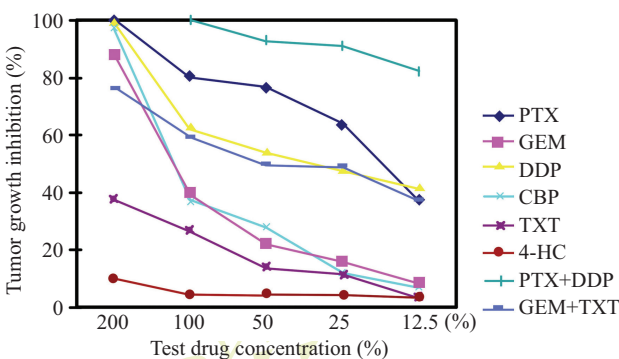


图1 抗癌药物不同药物浓度下对1例卵巢癌细胞抑制率的剂量-效应曲线

Fig.1 The dose-effect curve of the inhibition of the anticancer drugs to the cancer cells of one case

2.3 卵巢癌细胞对各种抗癌药物的敏感度

癌细胞对各种抗癌药物的敏感度各有不同, 单药在体外药物敏感性强弱依次为: 紫杉醇 $>$ 卡铂 $>$ 顺铂 $>$ 吉西他滨 $>$ 拓泊替康 $>$ 多西他赛 $>$ 依托泊苷 $>$ 环磷酰胺 $>$ 博来霉素, 联合用药方案敏感性较单药增加(表3)。卵巢癌细胞对目前临床上常用的紫杉醇联合顺铂(PTX+DDP)方案敏感度更高, 与PTX、DDP单药的敏感度相比具有显著性差异($\chi^2=17.72$, $P < 0.01$), 显示出联合用药良好的药物协同效应。

2.4 临床近期疗效评价

88例药敏组患者术后根据药敏试验结果选择化疗药物, 48例对照组患者根据临床经验用药, 治疗后均评价疗效(表4)。完全及部分缓解(CR+PR)为临床治疗有效, 计算两组患者临床治疗有效率。药敏组

表3 12种(组)抗癌药物对80例卵巢癌患者体外药敏情况

Table 3 The chemosensitivity of the ovarian cancer of 80 cases to 12 groups of anti-cancer drugs *in vitro*

药物 Drugs	例数 Number of cases	敏感 Sensitive cases	轻度敏感 Lightly sensitive cases	耐药 Resistant cases
PTX	79	41(51.90%)	34(43.04%)	4(5.06%)
DDP	16	4(25.00%)	5(31.25%)	7(43.75%)
CBP	62	17(27.42%)	29(46.77%)	16(25.81%)
TPT	78	14(17.95%)	31(39.74%)	33(42.31%)
GEM	79	15(18.99%)	24(30.38%)	40(50.63%)
VP-16	72	5(6.94%)	8(11.11%)	59(81.94%)
TXT	69	10(14.49%)	26(37.68%)	33(47.83%)
4-HC	57	2(3.51%)	22(38.60%)	33(57.89%)
BLM	52	0(0%)	3(5.77%)	49(94.23%)
PTX+DDP	41	30(73.17%)	5(12.19%)	6(14.63%)
GEM+TXT	39	13(33.33%)	18(46.15%)	8(20.51%)
TPT+VP-16	39	13(33.33%)	26(66.67%)	0(0%)

表4 临床治疗效果

Table 4 The clinical efficacy of the treatment

分组 Groups	完全缓解 CR	部分缓解 PR	稳定 SD	进展 PD
ATP group (cases)	61	14	10	3
Control group (cases)	23	10	11	4

临床治疗有效率为85.23%, 对照组有效率为68.75%, 差异有统计学意义($\chi^2=5.158$, $P<0.05$), 说明根据药敏试验选择治疗方案可提高临床治疗有效率。

3 讨论

ATP-TCA肿瘤体外药敏检测技术诞生于20世纪70年代中后期。1983年, Moyer等^[3]提出通过检测三磷酸腺苷(ATP)的数量可以反映相应细胞的活性度。1988年, Sevin等^[3]将ATP生物的荧光检测技术应用于卵巢癌, 进行体外卵巢癌的药物敏感性检测实验。ATP-TCA肿瘤体外药敏检测技术的检测原理是: 内源性ATP是活体的细胞能量来源的基本途径, 在细胞死亡、细胞膜破裂时, ATP迅速地水解。因此, 我们可以通过检测细胞内源性ATP的含量来反映活细胞数量和细胞的活性。ATP在相关酶的作用下, 可以和相关的荧光素结合, 并释放出波长为562 nm的荧光。检测荧光强度, 由此测出ATP含量, 进而反应活细胞数。肿瘤细胞通过在体外给药培养一段时间后, 测定其ATP的含量, 并与未加药对照组加以比较, 并计算出化疗药物的各个系列浓度对培养细胞不同的抑制率, 并参照相应的判断指标评估该化学治疗药物对肿瘤细胞的杀伤程度^[4]。这项技术高度敏感, 只需50个细胞就能测出有荧光强度的改变, 进而测出ATP的量^[5]。而且, 当ATP含量为 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ mol/L时, 活细胞的对数值与ATP发光值的对数值之间存在极好的线性关系, 从而达到精确定量^[6]。ATP-TCA法可评价率高, 本研究可评价率为90.91%, 与既往研究相比, 高于MTT法(四唑蓝显色反应法)。在评估细胞活力方面, ATP-TCA检测法比软琼脂集落形成实验和MTT法具有更高的敏感性和特异度^[7]。

上世纪80年代, 随着紫杉碱类药物的发现, 紫杉醇进入了卵巢上皮性癌的一线化疗。目前, 国际妇产科联盟(FIGO)和美国国家综合癌症网(NCCN)等国际权威机构及多数妇科肿瘤中心制定的临床癌症诊治指南中, 一致推荐紫杉醇和铂类(TP)联合方案为卵巢上皮性癌的标准一线化疗方案。本研究中,

单药中敏感性最高为紫杉醇, 其次为铂类, 且二者联合应用时敏感性增加。从体外药敏实验角度证实, 紫杉醇联合铂类为原发性卵巢癌的一线化疗方案。目前, 紫杉醇和铂类联合化疗治疗卵巢癌是首选方案, 并已广泛应用^[8]。卵巢癌经过肿瘤细胞减灭术联合紫杉醇、铂类辅助化疗, 虽然治疗后有60%~70%的患者获得临床完全缓解, 但其余30%~40%的患者仍有肿瘤残存甚至肿瘤进展, 预后很差^[9]。原因是其中一部分患者为紫杉醇、铂类耐药患者。本研究中, 紫杉醇联合铂类耐药率为18.18%。不同个体的体内代谢环境在现有的体外实验技术下尚无法建模。Fruehauf等^[10]认为, 在体外给予最适宜的药物及作用环境, 肿瘤标本如果已经是完全耐药的话, 那么体内因为肿瘤血供不良和(或)快速的药物失活, 更有可能导致治疗失败, 即通过体外药敏试验预测治疗失败的准确性更高。如果能够预测卵巢癌患者对紫杉醇、铂类化疗的敏感性, 则可使那些耐药患者免于不必要的化疗及由此带来的化疗副反应及经济浪费, 争取宝贵的治疗时间, 使患者从中获益。赵丹等^[11]通过对59例原发性卵巢癌患者的无瘤生存时间和总生存时间的分析显示, 体外药敏试验紫杉醇、铂类敏感组患者的中位无瘤生存时间和总生存时间分别为26个月和39个月, 均较体外药敏试验紫杉醇、铂类耐药组患者的无进展生存时间(10个月)和总生存时间(25个月)显著延长($P<0.01$)。这说明, ATP-TCA检测不仅可以预测多种化疗方案的敏感性, 同时可以与手术病理分期、病理分化程度等经典的预后因素一样, 是有效的预测卵巢癌患者复发及预后的影响因素。本研究中, 药敏组患者术后根据药敏试验结果选择化疗药物, 避免应用体外试验耐药药物, 临床上取得了较好的近期疗效, 与根据经验用药的对照组比较临床有效率差异明显, 说明体外药敏试验对临床治疗方案的选择有良好的指导作用。

对于复发及难治性卵巢上皮性癌, 二线化疗疗效低, 且无标准治疗方案供临床参考, 探索有效的、有针对性的二线化疗方案成为当务之急。本研究中, 作为二线化疗药物的吉西他滨、拓泊替康、多西他赛体外药物试验敏感性接近20%, 个体差异较大。若仅凭经验用药, 可能出现化疗无效, 而且会产生化疗副反应、降低生活质量、增加治疗费用等问题。本研究中, 依托泊苷、环磷酰胺、博来霉素体外药敏试验敏感性均低于10%, 且博来霉素耐药率达

到94.23%, 临床不适合单独应用。但体外药敏试验为轻度敏感的药物联合用药可增加敏感性。高克非等^[12]观察发现, 卵巢癌满意减灭术后应用TP(紫杉醇、卡铂/顺铂)方案和CBP(环磷酰胺、博来霉素、卡铂/顺铂)方案为一线化疗的两组患者, 其3年生存率、3年无瘤生存率、3年内复发病例的无进展生存期、3年生存分析和无瘤生存分析, 两组间比较均无显著性差异, 说明虽然单独用药敏感性低, 但联合用药可提高有效率。联合用药在提高有效率的同时, 也会增加药物的毒副作用, 所以临床仍应选择针对不同患者敏感性高的药物。因本研究中病例观察时间较短, 未对两组患者生存期及无瘤生存期进行比较, 有待进一步观察复发患者根据药敏结果选择化疗药物治疗的有效率。

化疗在卵巢上皮性癌的综合治疗中占有相当重要的地位, 在接受相同化疗方案治疗的个体中, 仍有相当一部分患者经过标准方案治疗并未从中获益。源于患者体内药物代谢酶的遗传性和肿瘤的异质性导致了肿瘤对多种抗肿瘤药物敏感性的差异。当某种抗肿瘤药物根据临床经验估计或盲目应用于临床治疗时, 化疗表现出明显的疗效差异。有时, 正在治疗中的肿瘤仍进展较快, 并发生严重的毒副反应而未收到预期的疗效。针对临床这种状况, 采用ATP-TCA法进行体外药物敏感性试验, 实行化疗药物筛选, 进行个体化治疗是可行而且必要的。

参考文献 (References)

- 1 Liu J, Matulonis UA. New advances in ovarian cancer. *Oncology* 2010; 24(8): 721-8.
- 2 Rustin GJ, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Pujade-Lauraine E, Jakobsen A, *et al.* Re: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (ovarian cancer). *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(6): 487-8.
- 3 Sevin BU, Peng ZL, Perras JP, Ganjei P, Penalver M, Averette HE. Application of an ATP bioluminescence assay in human chemosensitivity testing. *Gynecol Oncol* 1988; 31(1): 191-204.
- 4 Fu Jun, Zhang Wei. Progression of tumor chemosensitivity assay with ATP bioluminescence in clinical application. *Chin J Clin Oncol Rehabil* 2004; 11(3): 274-7.
- 5 傅 军, 张 伟. ATP生物荧光肿瘤体外药敏检测技术及其临床应用研究进展. *中国肿瘤临床与康复*(Fu Jun, Zhang Wei. *Chin J Clin Oncol Rehabil*) 2004; 11(3): 274-7.
- 6 Sevin BU, Perras JP, Averette HE, Donato DM, Penalver M. Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer* 1993; 71(4 Suppl): 1613-20.
- 7 O'Meara AT, Sevin BU. Predictive value of the ATP chemosensitivity assay in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001; 83(2): 334-42.
- 8 Tian Haimei, Shi Xiaoyan, Fu Jun, Cao Dongyan, Zhan Kai, Wu Lingying, *et al.* Correlation between ATP bioluminescence tumor chemosensitivity assay and clinical response in ovarian cancer. *Chin J Oncol* 2005; 27(5): 296-8.
- 9 田海梅, 石晓燕, 傅 军, 曹冬艳, 张 凯, 吴令英, 等. ATP抗肿瘤药物敏感性检测技术与卵巢癌临床治疗的相关性研究. *中华肿瘤杂志*(Tian Haimei, Shi Xiaoyan, Fu Jun, Cao Dongyan, Zhang Kai, Wu Lingying, *et al.* Correlation between ATP bioluminescence tumor chemosensitivity assay and clinical response in ovarian cancer. *Chin J Oncol*) 2005; 27(5): 296-8.
- 10 Teo MY, Power DG, Tew WP, Lichtman SM. Doublet chemotherapy in the elderly patient with ovarian cancer. *Oncologist* 2012; 17(11): 1450-60.
- 11 Daly MB, Ozols RF. Symptoms of ovarian cancer—where to see the bar? *JAMA* 2004; 291(22): 2755-6.
- 12 Fruehauf JP, Alberts DS. Assay-assisted treatment selection for women with breast or ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; 161: 126-45.
- 13 赵 丹, 吴令英, 王小兵, 李晓光, 李 莱, 李艳芬, 等. 三磷酸腺苷-肿瘤体外药敏试验在预测原发性卵巢上皮癌化疗敏感度中的应用价值. *中华肿瘤杂志*(Zhao Dan, Wu Lingying, Wang Xiaobing, Li Xiaoguang, Li Mo, Li Yanfen, *et al.* Application of ATP-tumor chemosensitivity assay in primary epithelial ovarian cancer. *Chin J Oncol*) 2010; 32(5): 368-72.
- 14 高克非, 刘富元, 陈福进, 冯艳玲. 上皮性卵巢癌满意减灭术后TP、CBP方案化疗的疗效比较. *癌症*(Gao Kefei, Liu Fuyuan, Chen Fujin, Feng Yanling. Comparison of therapeutic efficacy between TP regimen and CBP regimen on epithelial ovarian cancer after optimal cytoreductive operation. *Chinese Journal of Cancer*) 2007; 26(4): 431-4.