

# 胶质瘤对亲细胞非均质分子脂质和 几种药物敏感性的比较

顾宇翔 陈衍城 王宇倩

(复旦大学附属华山医院神经外科 上海 200040)

**【摘要】** 目的 应用药物敏感试验(MTT比色法)比较亲细胞非均质分子脂质(CHML)和几种常用化疗药对脑胶质瘤细胞的抑制作用。方法 取90例手术切除的脑胶质瘤新鲜标本,处理后接种于96孔培养板中,加入不同浓度的CHML、VM-26、VP-16、CBP、DDP和福莫司汀(fotemustine),孵育后进行MTT反应,于波长570 nm处测定A值。结果 胶质瘤细胞对CHML 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的敏感率(63/90),200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的敏感率(58/90),显著高于10 PPC(血浆峰浓度)VP-16、CBP、福莫司汀组,与1 PPC VM-26、10 PPC DDP敏感率相似。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组CHML的敏感率要高于0.1 PPC组的所有5种药物。在耐药率方面,500、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的CHML耐药率只高于10 PPC VM-26,低于或相等于其余任何实验浓度药物。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的CHML耐药率低于0.1 PPC组的所有5种药物。500与200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组CHML的敏感率和耐药率差异无显著意义,两者与100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组差异有显著意义。结论 CHML对体外原代培养的胶质瘤细胞有较强的抑制作用。

**【关键词】** 亲细胞非均质分子脂质; 胶质瘤; 药物敏感试验; 化疗

**【中国图书馆分类法分类号】** R 730.269

## Contrast of the Sensitivity of Cytotropic Heterogeneous Molecular Lipids and Conventional Chemotherapy Drugs in Gliocytoma Cell

GU Yu-xiang, CHEN Xian-cheng, WANG Yu-qian

(Department of Neurosurgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

**【Abstract】 Purpose** To contrast the inhibition of cytotropic heterogeneous molecular lipid(CHML) and conventional chemotherapy drugs in gliocytoma by drug sensitivity testing(MTT assay). **Methods** Ninety tumor specimens were obtained and planted into 96 well plates immediately after operation. Incubated with CHML, VM-26, VP-16, CBP and DDP at different concentrations, MTT assay were taken. A values were detected at the wave of 570 nm length. **Results** The sensitive rate of CHML at 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (63/90) and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (58/90) were similar to 1 PPC VM-26 and 10 PPC DDP and higher than VP-16, CBP, fotemustine at 10 PPC. The sensitive rate of CHML at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was higher than any other chemotherapy drugs at 0.1 PPC. The resistant rate of gliocytoma to CHML at 500 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were only higher than 10 PPC VM-26 but similar or lower than other chemotherapy drugs at different densities. The resistant rate of CHML at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was lower than any other five drugs at 0.1 PPC. The sensitive and resistant rates of CHML at 500 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  have no statistical differences, but significantly higher than that at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **Conclusions** CHML is a effective agent to inhibitate vitro-incubated primitive gliocytoma.

**【Key words】** cytotropic heterogenous molecular lipid; gliocytoma; drug-sensitivity-test; chemotherapy

化学疗法是治疗恶性脑胶质瘤的手段之一,正确地选用有效的化学药物及其剂量,是减少化疗不良反应及降低肿瘤细胞耐药的关键<sup>[1]</sup>。近年来,有通过恶性肿瘤原代培养细胞来筛选敏感的抗肿瘤药物,以利

于临床上实施个体化治疗。一般化疗药物治疗胶质瘤的体外敏感、体内有效的符合率为65%~75%,体外耐药、体内无效的符合率为90%左右<sup>[3]</sup>。体外试验作为体内和临床试验的前期研究,对药物进行初步筛

选和敏感度的预测是很有价值的。其方法主要有形态学损伤的检测、代谢抑制试验(MTT比色法)、膜完整性检测、同位素标记物掺入抑制试验检测等。其中MTT比色法具有快速、简便、无放射性、临床疗效相关性好等优点,最为常用<sup>[1-6]</sup>。

亲细胞非均质分子脂质(cytotropic heterogenous molecular lipid, CHML)是一类具有抗癌作用的脂质类物质,本研究将手术切除的脑胶质瘤细胞经原代培养后,用MTT法检测肿瘤对CHML及几个临床上常用的化疗药物的敏感性,来比较其对肿瘤的抑制作用。

## 材料和方法

**肿瘤细胞来源** 自2000年4月至2001年2月,收取手术切除并经病理证实的脑胶质瘤新鲜肿瘤标本90份,其中星形细胞瘤Ⅱ~Ⅲ级24例,少枝胶质瘤Ⅱ~Ⅲ级34例,室管膜瘤Ⅰ~Ⅲ级5例,毛细胞星形细胞瘤Ⅰ级4例,胶质母细胞瘤23例。标本离体后置于RPMI1460培养液内,2 h内开始试验。

**试剂和药品** RPMI1460培养液(美国Gibco公司产品),胎牛血清(四季青公司产品),MTT(四氮甲基唑蓝,MTT Sigma)用pH 7.2的磷酸缓冲液(PBS)配成4 mg/mL的溶液,过滤除菌,于4℃避光保存;甲腈溶解液为含0.01 mol/L盐酸的10% SDS(Serva);CHML由美国高立食品药品有限公司提供,分别为CHML-6.0和CHML-6.1两种型号。该两种型号需配制成复合液同时使用,以加强药效和减少抗药性。用5%葡萄糖生理盐水配制成各种浓度的CHML-6.0和CHML-6.1的复合液。两者的浓度比恒定,所以实验所采用的复合液的浓度以CHML-6.0的浓度来表示。本实验所用化疗药物为替尼泊苷(teniposide, VM-26)、依托泊苷(etoposide, VP-16)、卡铂(carboplatin, CBP)、顺铂(cisplatin, DDP)、福莫司汀(fotemustine)。

**仪器** 5% CO<sub>2</sub> 贺利氏BB<sub>16</sub>气体培养箱, BIO-RAD 318 MC型酶标仪, 96孔无菌培养板。

**细胞培养** 将取得的新鲜无污染的胶质瘤细胞标本立即置于RPMI1640培养液, 2 h内于无菌室的超净工作台中进行机械分离、胰酶消化、纯化胶质瘤细胞后进行活细胞计数, 将其配制成10<sup>5</sup>/mL的细胞

悬液,按每孔100 μL接种于96孔培养板中,每种药品3个浓度,每个浓度3孔,共9孔,置于37℃的5% CO<sub>2</sub> 贺利氏BB<sub>16</sub>气体培养箱孵育24 h,使肿瘤细胞贴壁生长。

**加药** CHML复合液以CHML-6.0浓度500、200、100 μg/mL分为3组;VM-26、VP-16、CBP、DDP、福莫司汀的浓度根据每个药物的血浆峰浓度(PPC)分别用了1、0.1、10 PPC 3种浓度,共15组,每组各有3孔,另取6孔作为对照组加入100 μL培养液,继续培养48 h。VM-26、VP-16、CBP、DDP、福莫司汀的PPC分别为30、80、10、20、80 μg/mL。

**MTT法检测** 弃去各培养孔中的上清液,加入20 μL MTT,再培养4 h,各加入100 μL甲腈溶解液,在37℃恒温下震荡5 min,待结晶充分溶解后置于BIO-RAD 318MC型酶标仪上,测定各孔在570 nm波长处吸光度A值。

计算抑制率  $IR = [1 - (\text{药物孔 } A \text{ 平均值} / \text{对照孔 } A \text{ 平均值})] \times 100\%$

**试验药敏评价标准** 参照Yamaue等<sup>[7]</sup>的药敏试验评价标准进行评价:抑制率在50%以上为敏感,30%~50%为中度敏感,低于30%归入耐药。

**统计方法** 将各种药物、各浓度组之间的敏感率与耐药率差异应用SPSS统计软件进行卡方检验统计学分析。

## 结 果

6种药物对90例胶质瘤细胞的抑制结果如表1。实验结果显示,脑胶质瘤细胞对500 μg/mL浓度组CHML的敏感率显著高于10 PPC VP-16、CBP、福莫司汀组( $\chi^2 = 11.14, 16.50, 27.31, v = 2, P < 0.05$ ),与1 PPC VM-26、10 PPC DDP敏感率相似( $\chi^2 = 1.5, 0.48, v = 2, P > 0.05$ ),200 μg/mL浓度组CHML与其余5种化疗药物敏感率比较结果与500 μg/mL浓度组一致。100 μg/mL浓度组CHML的敏感率要高于0.1 PPC组的所有5种药物( $\chi^2 = 17.21, 45.57, 47.63, 45.92, 47.63, v = 2, P < 0.05$ ),与10 PPC VP-16、CBP敏感率相似( $\chi^2 = 2.04, 1.43, v = 2, P > 0.05$ )且高于10 PPC福莫司汀1 PPC DDP( $\chi^2 = 4.82, 7.87, v = 2, P < 0.05$ )。

表 1 6 种药物对 90 例胶质瘤细胞的抑制作用

Tab 1 Inhibition of six drugs in ninety gliocytoma

( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Inhibition	VM-26			VP-16			CBP			DDP			Fotemustin			CHML		
	300	30	3	800	80	8	100	10	1	200	20	2	800	80	8	500	200	100
Sensitive	76	57	16	42	10	4	37	9	3	63	26	3	29	14	3	64	58	42
Middle	11	20	30	27	32	22	27	27	24	17	35	29	31	25	24	14	23	20
Resistant	3	13	44	21	48	64	26	54	63	10	29	58	30	51	63	12	9	28

在耐药率方面,500、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组的 CHML 耐药率只高于 10 PPC VM-26 ( $\chi^2 = 5.90, v = 1, P < 0.05$ ), 低于或相近于其余任何实验浓度药物。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的 CHML 耐药率低于 0.1 PPC 组的所有 5 种药物 ( $\chi^2 = 5.93, 28.81, 27.23, 20.04, 27.23, v = 1, P < 0.05$ ), 但高于 1 PPC VM-26、10 PPC DDP ( $\chi^2 = 7.76, 12.97, v = 1, P < 0.05$ )。

CHML 随药物浓度的提高,肿瘤对 CHML 的敏感率也上升,其中 500 与 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的差异无显著意义 ( $\chi^2 = 2.91, v = 2, P > 0.05$ ), 两者与 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组差异有显著意义 ( $\chi^2 = 12.03, 12.53, v = 2, P < 0.05$ )。耐药性相比,500 与 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的比例要低于 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组 ( $\chi^2 = 8.23, 12.28, v = 1, P < 0.05$ )。

## 讨 论

恶性胶质瘤属预后最差的颅内肿瘤之一,一旦复发,数月后的病死率近 100%。胶质瘤的化疗作为综合治疗中的重要环节,其疗效在近 20 年来均未能令人满意,原因在于血脑屏障影响着化疗药物在脑组织内的分布,只有相对小分子质量、高脂溶性的药物易通过血脑屏障。有动物实验证实亚硝脲类药物静脉用药后,约有 7%~10% 进入脑脊液 (CSF), VP-16 中的 CSF 浓度为血浓度的 2%~10%, VM-26、DDP、CBP 的脑脊液浓度均很低,虽可在肿瘤中有较高浓度,但几乎难以达到 PPC<sup>[6]</sup>。

尽管脑胶质瘤的中心部位血脑屏障已被破坏,允许化疗药物进入,但其周边仍有不同程度的屏障作用。某些药物静脉给药时,药物在瘤内可达有效的治疗浓度,但其边缘区药物浓度低于瘤内浓度或难以检测。然而,在恶性胶质瘤的化疗中最关键的因素是药物能否通过正常脑组织-肿瘤交界区,因为该处的肿瘤细胞属增殖期,生长极其活跃,往往是肿瘤复发的根源<sup>[8,9]</sup>。因此,脑胶质瘤化疗较全身其他脏器肿瘤的化疗有其特殊性,对 MTT 比色法的结果也应作具体分析。本实验中常用化疗药物浓度由 1 PPC 提高至 10 PPC 时,肿瘤对药物的敏感率也提高,其中以 DDP 变化最为明显。这可提示提高药

物浓度,可增强其抗肿瘤的效果,以往的实验和临床上 DDP 的大剂量疗法证实了这一点。但是,加大给药量会加重全身毒副作用的增加,可能导致骨髓抑制、感染或出血等严重并发症<sup>[6,10]</sup>,因此,临床应用中常受到限制。在接近药物脑内浓度的 0.1 PPC 浓度中以 VM-26 的作用最为显著,这与临床上的实际疗效相符,但远低于 CHML 的抑瘤效果。实验结果表明,500、200、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的 CHML 对脑胶质瘤细胞抑制高度有效,其中 500、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组的疗效可达到 VM-26、DDP 在 1 PPC 或 10 PPC 浓度的水平。

恶性胶质瘤化疗效果不佳的一个主要原因就是其耐药性的产生<sup>[11]</sup>。本实验中脑胶质瘤对 500、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的 CHML 敏感率可以达到或接近常规药物的 10 PPC 浓度组水平,其抑制胶质瘤的效果是常规临床药物所难以达到的,这可能为难治性恶性胶质瘤的化学治疗提供一条新的途径。

在 CHML 的 3 种药物浓度作用比较中,200 与 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的肿瘤抑制率相近,差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ),而显著高于 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的抑制率。这与细胞株的离体实验结果相一致<sup>[12]</sup>,进一步证实 CHML-6.0 浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CHML 复合液可能是临床治疗胶质瘤细胞的理想浓度。

Qimin 等<sup>[13]</sup>研究证实,CHML 作为非均质分子脂质,其毒副作用小,肿瘤细胞对它的敏感性远胜于正常组织细胞,在用药上 CHML 有其独特的优越性。已有的实验表明,500、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  甚至更高浓度的 CHML 复合液脑内局部注射时,大鼠脑组织无器质性损害,实验观察无特殊的不良反应<sup>[14]</sup>。由于临床上尚未有 CHML 治疗胶质瘤的研究,因此,在实际临床中多少药物的用量使脑胶质瘤局部可达到这样的浓度,对全身及脑组织有无毒性作用,或者 500、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  经颅直接瘤内用药,正常脑组织能否耐受等问题均需进一步研究解决。

## 参 考 文 献

- 1 邢同海,彭志海,袁国强.细胞凋亡检测用于肿瘤细胞株对化疗敏感性的研究.肿瘤,2001,21(1):20

- 2 黄强,陈忠平,兰青.胶质瘤.北京:中国科技出版社,2000:470
- 3 蒋芹,匡久树,黄小明,等.MTT法体外检测癌细胞药敏试验及临床相关性研究.实用癌症杂志,2001,16(1):57
- 4 姜圣亮,朱上林,王天翔,等.MTT法应用于肝癌化学免疫治疗敏感性研究.肿瘤,2001,21(1):23
- 5 Salminen E, Nuutinen JM, Huhtala S. Multivariate analysis of prognostic factors in 106 patients with malignant glioma. *Eur J Cancer*, 1996, 32A: 1918
- 6 周际昌.实用肿瘤内科学.北京:人民卫生出版社,1998:217
- 7 Yamaue H, Tanimura H, Tsunoda T, et al. Chemoresponsiveness testing with highly purified fresh human tumor cells with the MTT colorimetric assay. *Eur J Cancer*, 1991, 27: 1258
- 8 Yamashita T, Yamashita J, Shoin K. Neurotoxicity of local administration of two nitrosoureas in malignant gliomas. *Neurosurgery*, 1990, 26: 794
- 9 周良辅.现代神经外科学.上海:复旦大学出版社,2001:696
- 10 顾宇翔,陈衍城,王宇倩,等.C<sub>6</sub>胶质瘤体外药物敏感试验.中华临床医药杂志,2001,13(12):1802
- 11 Davis FG, Freels S, Grutsch J, et al. Survival rates in patient with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on surveillance epidemiology and end results (SEER) data, 1973-1991. *J Neurosurg*, 1998, 88: 1
- 12 陈衍城,顾宇翔,王宇倩.亲细胞非均质分子脂质对人脑胶质瘤细胞系的抑制作用.中国癌症杂志,2002,12(12):57
- 13 Qimin Z, Zheng X. ChML suppresses cell growth and induces apoptosis in multiple human tumor lines. *Anticancer Research*, 1999, 19: 2893
- 14 顾宇翔,陈衍城,王宇倩.CHML脑内局部给药对大鼠脑组织的影响.中华临床医药杂志,2002,13(47):7743

(收稿日期:2002-05-30 编辑:张秀峰)

## 女性处女膜伞伴尿道内翻性乳头状瘤 1 例

赵 鸿 金建军 瞿连喜 丁 强 张元芳

(复旦大学附属华山医院泌尿科 上海 200040)

泌尿系内翻性乳头状瘤为临床罕见的良性肿瘤。1963年由 Potts 首先报道并命名。我院最近收治一例尿道内翻性乳头状瘤,现报告如下。

患者女,38岁。因进行性排尿困难,伴尿频、尿急、尿痛3年至我院就诊。近来每日小便十数次,每次尿量约50~70 mL,尿不成线,间歇性尿道外口灼痛。查体发现耻骨上膀胱区充盈,尿道外口黏膜红肿,下唇处女膜伞覆盖,约0.5 cm × 0.5 cm大小。B超发现膀胱内壁增厚,残余尿量350 mL。尿流动力学示排尿时间78 s,最大尿流率仅为1.3 mL/s。余各项检查未见明显异常。初步诊断为下尿路梗阻伴慢性尿潴留。入院后在腰麻下取截石位行处女膜伞切除术。术中常规膀胱镜检查发现尿道黏膜充血、水肿,后尿道近膀胱颈处局部乳头状凸起,表面光滑。取部分凸起组织送活检,电刀汽化患处至黏膜固有层。膀胱内可见小梁增生,同时咬取膀胱黏膜送活检。病理证实为尿道内翻性乳头状瘤(腺体型),膀胱黏膜正常。术后一周拔除导尿管,小便通畅,最大尿流率18.5 mL/s。术后6个月、12个月随访尿常规、脱落细胞及尿道镜未见肿瘤复发。

讨论 尿路内翻性乳头状瘤在临床发病率很低,而发生在尿道部位尤为罕见<sup>[1]</sup>。近二十年国内各级医院共计报道30余例,多见于膀胱及输尿管。该肿瘤为良性病变。病因可能与致癌因素长期作用或慢性炎症刺激有关。其临床症状以血尿和尿路梗阻为主。病理与息肉和移行细胞癌区别

不明显,因此易被误诊为息肉、血管瘤或恶性肿瘤。其组织发生学与增生性膀胱炎、囊性膀胱炎和腺性膀胱炎相似,含有 Brunn 芽和 Brunn 巢,因此认为该病与腺性膀胱炎关系密切<sup>[2]</sup>。本例患者因尿道外口处女膜伞覆盖导致慢性尿路感染,可能诱导尿道内翻性乳头状瘤的发生。治疗以原位切除为主,无须进行彻底或扩大手术。术后应每6个月进行一次细胞学或内镜检查<sup>[3]</sup>。值得临床泌尿科医生注意的是内翻性乳头状瘤患者有并发其他尿路上皮性肿瘤的倾向,因此在尿路的任何部位出现内翻性乳头状瘤,都提示应该对整个泌尿道进行检查,包括影像学、细胞学或内镜检查<sup>[4]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Anderstrom C, Johansson S. Inverted papilloma of the urinary tract. *J Urol* 1982, 127: 1132
- 2 Kunze E, Schauer A, Schmitt M, et al. Histology and histogenesis of two different types of inverted Uerthelial papilloma. *Cancer* 1983, 51: 348
- 3 吴阶平,顾方六,梅骅,等.膀胱肿瘤.见:泌尿外科(主编:吴阶平).济南:山东科学技术出版社,1993:446
- 4 Kyriakos M, Royce RK. Multiple simultaneous inverted papillomas of the urinary tract. *Cancer*, 1989: 368

(收稿日期:2002-10-17 编辑:沈玲)