

# 体外视网膜母细胞瘤细胞对不同化疗药物的敏感性分析

刘万丽, 吴中耀, 杨华胜, 李永平, 黄祥坤, 颜建华

(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】研究视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)细胞对化疗药物的体外敏感性,以制定合理的RB临床个体化疗方案。【方法】应用3-(4,5)-双甲基-2-噻唑-(2,5)-二甲基溴化四氮唑蓝(MTT)体外药敏法,测定35例RB患儿瘤细胞对常用的阿霉素、长春新碱、鬼臼乙叉苷、卡铂、甲氨喋呤、放线菌素D和噻替哌共7种化疗药物的敏感性。【结果】RB的药敏可评价率是86.7%。同一种药物对不同的肿瘤细胞有不同的抑制率,7种药物的最高抑制率是卡铂(91.8%)、噻替哌(90.7%)、放线菌素D(89.7%)、鬼臼乙叉苷(88.4%)、阿霉素(86.61%)、甲氨喋呤(58.66%)、长春新碱(54.95%);最低的直接抑制率均是0。【结论】不同RB个体的瘤细胞对不同的化疗药物有不同的敏感性,体外药敏试验筛选敏感化疗药物对临床RB个体化治疗有应用价值。

**关键词:**视网膜母细胞瘤/药物治疗; MTT 药物敏感试验; 抗肿瘤药物

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0428-0431

## Analysis of Drug Sensitivity of Variant Antineoplastic Drugs on Retinoblastoma Cells *In Vitro*

LIU Wan-li, WU Zhong-yao, YANG Hua-sheng, LI Yong-ping, HUANG Xiang-kun, YAN Jian-hua  
(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the chemosensitivity of retinoblastoma (RB) cells *in vitro* in order to set reasonable and individual chemotherapy project. 【Methods】 Using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay to detect the chemosensitivity of 7 ordinary antineoplastic drugs, doxorubicin, vincristine, etoposide, carboplatin, methotrexate, actinomycin and thiotepa acting on retinoblastoma cells. 【Results】 The MTT assay was successful in 86.7% of the retinoblastoma samples. The same drug has different inhibiting rate to different retinoblastoma cells. The maximum of inhibiting rate was 91.8% of carboplatin, 90.7% of thiotepa, 89.7% of actinomycin, 88.4% of etoposide, 86.61% of doxorubicin, 58.66% of methotrexate, 54.95% of vincristine and the minimum of inhibiting rate was 0 of all the 7 antineoplastic drugs. 【Conclusion】 The different RB samples have different drug sensitivity to variant antineoplastic drugs. The drug sensitive test has certain applying value in individual treatment to select sensitive drugs for patients with RB.

**Key words:** retinoblastoma/drug therapy; MTT assay; antineoplastic drugs.

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(4):428-431]

目前化学药物治疗在视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)眼内期病例的保守治疗、眼外期病例的辅助治疗、晚期病例的姑息治疗等方案中起到非常重要的作用<sup>[1,2]</sup>。3-(4,5)-双甲基-2-噻唑-(2,5)-二甲基溴化四氮唑蓝(MTT)法已作为美国国立肿瘤研究中心所采用的抗癌药物筛选方法<sup>[3]</sup>。我们应用常用的与临床相关性较高的 MTT 药敏检测方法<sup>[4-6]</sup>,进行了原代 RB 瘤细胞对 7 种常用化疗药物的敏感性研究,为探讨 RB 瘤细胞的化疗药物敏

感性及实现 RB 个体化用药提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

2004 年 3 月至 2004 年 12 月在中山大学中山眼科中心就诊的 RB 患儿,共 35 例。行眼球摘除术时取新鲜的肿瘤组织,置于无菌 RPMI1640 (Gibco)双抗培养液中,立即送实验室。

收稿日期:2004-12-30

基金项目:广东省科技计划重点项目(A052001127)

作者简介:刘万丽(1973-),女,贵州贵阳人,博士生;吴中耀,教授,导师, E-mail: lightwanli@yahoo.com.cn

1.2 单细胞悬液的配制

用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 双抗培养液反复冲洗肿瘤组织,使其成为小块状的悬液,将大的癌组织块用显微剪剪成糊状,然后用 200 目铜网过滤成瘤细胞悬液,加入 100 mL/L RPMI1640 双抗培养液,置于体积分数 5%CO<sub>2</sub>37℃ 培养箱中培养 24 h。

1.3 MTT 溶液和药物工作液的配制

MTT(Sigma)溶于RPMI1640液中,终浓度为5 mg/mL,过滤除菌,置于-20℃冰箱保存。MTT法参见文献 [7,8]。选用常用的化疗药物:阿霉素(doxorubicin,ADM,汕头明治医药有限公司)、长春新碱(vincristine,VCR,广州明兴制药有限公司)、鬼臼乙叉苷(etoposide,VP-16,江苏恒瑞医药股份有限公司)、卡铂(carboplatin,CBP,齐鲁制药厂)、甲氨喋呤(methotrexate,MTX,上海华联药业有限公司)、放线菌素D(actinomycin,ACTD,上海新亚药业股份有限公司)、噻替哌(thiotepa,TSPA,上海旭东海普药业有限公司)。研究的7种化疗药均用注射用生理盐水配成母液,再用培养液配制成工作液,均设三种浓度,使每种药物加入96孔板后,每孔的药物浓度与化疗时病人的血浆药物浓度(plasma concentration,ppc)相似(1 ppc)或0.1倍血药浓度(0.1 ppc)或10倍血药浓度(10 ppc)。置于4℃冰箱保存。血药浓度计算根据公式<sup>[8]</sup>:每mL血浆中药物(μg)=成人平均体重(60 kg)×D(临床用药剂量g)÷5000(平均成人血容量mL)÷50%×10<sup>3</sup>。7种药物的血药浓度分别是:ADM:2.3 μg/mL,VCR:0.37 μg/mL,VP-16:3.4 μg/mL,CBP:15 μg/mL,MTX:8 μg/mL,ACTD:0.16 μg/mL,TSPA:5 μg/mL。

1.4 肿瘤细胞培养

将培养的肿瘤细胞吹打成悬液,调整细胞密度达到 2×10<sup>6</sup>~3×10<sup>6</sup>/mL,在 96 孔培养板中每孔加

入 180 μL 的细胞悬液。加入药物工作液 20 μL,每种浓度 3 孔。同时每块培养板设 3 孔对照孔,对照孔加入 200 μL 细胞悬液;设 3 孔零孔,加入 200 μL 培养液。放入 5% CO<sub>2</sub>37℃ 培养箱中培养 48 h 后,取出每孔加入 20 μL MTT 液,继续培养 4 h。

1.5 肿瘤细胞药物敏感性测定

培养结束后离心(2 000×g,10 min),甩板,然后每孔加入 200 μL 二甲基亚砷(DMSO,广州新成精细化工厂),振荡 10 min,使甲臞颗粒充分溶解。以零孔校正零点,用 Sigma Σ 960 型酶标仪测定 570 nm 波长下各孔的吸光度值(A<sub>570</sub>),取每种药物每种浓度三孔 A 的平均值,按下列公式计算单个药物的肿瘤细胞生长抑制率。药物敏感性分级:抑制率<30%为不敏感,≤30%~<50%为敏感,≤50%~<70%为中度敏感,≥70%为高度敏感。

$$\text{抑制率} = (1 - \frac{\text{处理孔 } A_{570}}{\text{对照孔 } A_{570}}) \times 100\%$$

1.6 统计方法

采用 SPSS10.0 软件,应用单因素方差分析进行各药物不同浓度组的均数比较,两两比较采用 SNK-q 检验,取 α=0.05。

2 结 果

2.1 药敏测定结果的可评价率

本组进行 35 例 RB 的测试,其中 5 例细胞由于瘤体钙化多,细胞活性差,不能进行评价,可评价率是 85.7%。进行每种药物 3 种浓度作用下各组抑制率均数方差分析,结果见表 1,其中甲氨喋呤和放线菌素 D 两药的 3 种浓度组间均数差别均无统计学意义。

2.2 RB 瘤细胞对 7 种化疗药物的敏感率

表 1 7 种药物 3 种浓度间平均抑制率的比较

Group	CBP <sup>1)</sup>	TSPA <sup>2)</sup>	VP16 <sup>2)</sup>	ACTD	ADM <sup>3)</sup>	VCR <sup>4)</sup>	MTX
10 ppc	53±31	53±29	51±25	47±25	43±25	33±16	24±18
1.0 ppc	33±23	24±19	34±21	31±15	39±20	25±17	24±17
0.1 ppc	17±14	15±17	23±16	29±21	20±14	23±13	22±16
F	17.16	23.01	13.82	0	10.28	3.55	0.24
P	0.00	0.00	0.00	1.0	0.00	0.03	0.79

1)10, 1.0, 0.1 ppc group vs each other, P< 0.05; 2)10 ppc vs 1.0 or 0.1 ppc, P< 0.05; 3)10 or 1.0 ppc vs 0.1 ppc, P< 0.05; 4)10 ppc vs 0.1 ppc, P< 0.05

30例RB瘤细胞对7种化疗药物的敏感率见表 2。在 10 ppc 下,RB 瘤细胞对 7 种化疗药物敏感率的顺序依次是:VP-16>TSPA,ACTD,ADM>CBP>

VCR>MTX。其中只有 MTX 的平均抑制率<30%,其余各药的 平均抑制率均>30%。进行各药物组间敏感率均数的方差分析,其中 MTX 与 ADM (P=

表 2 7 种化疗药对 30 例 RB 药敏结果

ppc	%	VP16	TSPA	ACTD	ADM	CBP	VCR	MTX
10	>30	24(80)	23(76.7)	23(76.7)	23(76.7)	22(73.3)	19(63.3)	11(36.7)
	>50	14(46.7)	17(56.7)	12(40)	10(33.3)	19(63.3)	5(16.7)	2(6.7)
1	>30	16(53.3)	9(30)	16(53.3)	20(66.7)	16(53.3)	13(43.3)	11(36.7)
	>50	5(16.7)	3(10)	5(16.7)	9(30)	10(33.3)	1(3.3)	2(6.7)
0.1	>30	10(33.3)	4(13.3)	14(46.7)	6(20)	5(16.7)	10(33.3)	10(33.3)
	>50	2(0)	1(3.3)	2(6.7)	2(6.7)	0(0)	0(0)	3(10)

0.007)、VP-16 ( $P=0.000$ )、CBP ( $P=0.000$ )、TSPA ( $P=0.000$ ) 4 药均数差别有统计学意义; ACTD 与 ADM ( $P=0.038$ )、VP-16 ( $P=0.000$ )、CBP ( $P=0.001$ )、TSPA ( $P=0.001$ ) 4 药均数差别有统计学意义; VCR 与 VP-16 ( $P=0.007$ )、TSPA ( $P=0.007$ ) 两药的均数差别有统计学意义; 其余各药均数间差别均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

在 1 ppc 的药物浓度下, RB 瘤细胞对 7 种化疗药的敏感度的顺序是: ADM>VP-16, CBP, ACTD>VCR>MTX>TSPA。其中 ADM, VP-16, CBP, ACTD 的平均抑制率>30%, 其余各药的平均抑制率<30%。进行各组间敏感率均数的方差分析, 各药物组间

均数差别无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

在 0.1 ppc 的药物浓度下, RB 瘤细胞对 7 种化疗药的敏感度的顺序是: ACTD>VCR, VP-16, MTX>ADM>CBP>TSPA。但各药的平均抑制率均<30%。进行各组间敏感率均数的方差分析, 各药物组间均数差别无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

### 2.3 化疗药物对 RB 瘤细胞的抑制率范围

化疗药物对不同的 RB 瘤细胞的直接最高抑制率分别是: 卡铂(91.8%)、噻替哌(90.7%)、放线菌素 D(89.7%)、鬼臼乙叉苷(88.4%)、阿霉素(86.61%)、甲氨喋呤(58.66%)、长春新碱(54.95%); 最低的直接抑制率均是 0(或接近 0), 见表 3。

表 3 不同化疗药物的抑制率范围 (%)

ppc	CBP	TSPA	ACTD	VP16	ADM	MTX	VCR
10	0~91.8	0~90.7	0~89.7	0~88.4	0~86.6	0~58.6	1.1~54.9
1	0~73.5	0~73.1	0~70.5	0~77.6	0~77.1	0~56.9	0~54.1
0.1	0~46.2	0~65.7	0~70.1	0~55.8	0~53.9	0~57.6	0~46.8

### 2.4 30 例 RB 病理结果

30 例患儿年龄为 2~75 月, 经病理检查其中有脉络膜侵犯 15 例(50%), 筛板前侵犯有 23 例(76.7%), 筛板侵犯有 14 例(46.7), 筛板后侵犯有 12 例(40%), 视神经切面断端侵犯有 5 例(16.7%), 眶组织侵犯的病例有 3 例(10%)。其中需要进行化疗的病例有 16 例(53.3%), 包括筛板后侵犯、视神经断端切面侵犯和/或眶组织侵犯的病例 13 例; 3 例需进行预防化疗, 病理示大部分脉络膜受侵合并瘤细胞穿破视乳头, 但未穿破巩膜筛板。RB 眼内期病例有 14 例(46.7%), 病理示筛板或视乳头侵犯, 和/或小部分脉络膜侵犯。

## 3 讨论

目前 RB 常用的化疗药物有: 长春新碱、鬼臼乙叉苷、卡铂、环磷酰胺和阿霉素<sup>[9-11]</sup>。在本研究

中, 中、高剂量组敏感的药物(平均抑制率均>30%)的有阿霉素、鬼臼乙叉苷、卡铂和放线菌素 D; 只在高剂量组敏感的药物有噻替哌和长春新碱。我们的结果与经验性化疗用药中相同的药物是阿霉素、鬼臼乙叉苷和卡铂, 由于环磷酰胺需要在肝脏代谢后才起到杀死肿瘤细胞的作用, 这类药物就不能进行体外 MTT 试验, 因此不能通过 MTT 法评价此类药物的体外 RB 细胞抑制率。从本研究中, 推荐可以选择阿霉素、鬼臼乙叉苷、卡铂和放线菌素 D 这几种药物进行常规联合化疗方案的制定。同时在高剂量组有 50% 以上个体均敏感(抑制率>30%)的药物是鬼臼乙叉苷、阿霉素、放线菌素 D、噻替哌、卡铂和长春新碱; 在中等剂量组有 50% 以上个体均敏感的药物是鬼臼乙叉苷、阿霉素、放线菌素 D 和卡铂; 低剂量组 7 种药物均未达到 50% 以上个体均敏感。说明随着药物浓度的降低, 敏感的个体也逐渐减少。而甲氨喋呤

高、中、低剂量组中敏感的个体都较少,只有约 1/3 的个体敏感。

由于 RB 个体的肿瘤异质性,化疗的敏感性存在很大的差异。本研究发现不同的肿瘤标本对不同的药物有不同的敏感性,同一种化疗药物对不同的 RB 细胞的体外直接抑制率差别也很大,敏感的个体即使在 0.1 ppc 的浓度下有的药物抑制率也能 >50%。比如虽然对 MTX 敏感的个体少,但少部分个体只表现对其和少数化疗药敏感,说明了化疗前开展体外药敏试验的必要性,也说明进行肿瘤个体化治疗的优势,有利于选择敏感的化疗药,避免了应用无效化疗方案所产生的副作用和治疗关键时期的拖延。

MTT 方法客观,测定周期短,经济,准确率高。RB 实体瘤中的瘤细胞无结缔组织,组织软而容易分离得到单细胞,能够快速获得较高存活率且纯度高的单细胞悬液。35 例标本的可评价率是 85.7%,说明 RB 体外药敏试验是可行的。我们实验中发现,RB 瘤细胞在细胞浓度较高时才有较高的吸光度值,我们推荐 MTT 法中 RB 瘤细胞的密度为  $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ ,因为 RB 的瘤细胞较其他肿瘤或组织的细胞小。虽然 MTT 法建议使用血药浓度进行试验,但我们设定 10、1、0.1 ppc 3 种药物浓度,有利于进行不同药物浓度下敏感度的比较。发现敏感的肿瘤细胞药敏都呈剂量依赖性,药物浓度越高,细胞生长抑制率越高。而耐药的肿瘤细胞,药物浓度的改变对细胞生长抑制率的影响差别不大。观察 35 例中 5 例 MTT 失败病例的手术标本,同 30 例 MTT 成功病例的标本比较,提示对于大体观察中肿瘤钙化多,伴明显的出血和机化,显微镜下观察发现瘤细胞肿大,成团少的标本,体外药敏的失败率高。

本研究中发现约有 53.3% 的病例需要进行术后的化疗,与发达国家相比比例高<sup>[11-13]</sup>,分析这与我国属发展中国家,RB 患儿就诊晚,病情较重有关。因此,对 RB 手术摘除眼球标本进行常规体外药敏试验,以能预测敏感的化疗药物,合理制定化疗方案,实施个体化化疗,避免无效化疗药的副作用和提高患儿的生存质量都有重要意义。

#### 参考文献

- [1] William JH. What is the best treatment for retinoblastoma? [J]. *Am J Ophthalmol*,2004,138(3):471-3.
- [2] Deegan, WF. Emerging strategies for the treatment of retinoblastoma[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2003,14(5): 291-5.
- [3] 田雪梅,张展霞. 白藜芦醇抗肿瘤作用的体外实验研究[J].*中山大学学报(自然科学版)*,2000,39(6):64-7.
- [4] Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, *et al*. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(11):1957-62.
- [5] Xu JM, Song ST, Tang ZM, *et al*. Neoadjuvant chemotherapy in inoperable, locally advanced, and inflammatory breast carcinoma: a pilot study of MTT assay *in vitro* and outcome analysis of 10 patients [J]. *Am J Clin Oncol*, 2001, 24(3):259-63.
- [6] 唐亚辉,马葵,韩居然,等.MTT 药物敏感试验在指导胃癌及原发肝癌化疗中的作用 [J]. *肿瘤防治研究*, 2001,28(1):37-8.
- [7] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M].西安:世界图书出版西安公司,2004.199-200,250-2.
- [8] 谢晓东,蒋芹,李小民,等.MTT 法癌细胞体外药敏试验的改良及其指导下胃、肠癌的预见性化疗[J].*淮海医药*,2003,21(1):1-3.
- [9] Doz F, Khelifaoui F, Mosseri V, *et al*. The role of chemotherapy in orbital involvement of retinoblastoma. The experience of a single institution with 33 patients [J]. *Cancer*, 1994,74(2):722-32.
- [10] Bornfeld N, Schuler A, Bechrakis N, *et al*. Preliminary results of primary chemotherapy in retinoblastoma [J]. *Klin Padiatr*, 1997, 209(4):216-21.
- [11] Shields CL, Shields JA, Baez KA, *et al*. Choroidal invasion of retinoblastoma: metastatic potential and clinical risk factors[J]. *Br J Ophthalmol*, 1993, 77(9): 544-8.
- [12] Messmer EP, Heinrich T, Hopping W, *et al*. Risk factors for metastases in patients with retinoblastoma[J]. *Ophthalmology*, 1991,98(2):136-41.
- [13] Shields CL, Shields JA, Baez KA, *et al*. Optic nerve invasion of retinoblastoma[J]. *Cancer*, 1994, 73(3):692-8.

(编辑 刘清海)