

氟尿嘧啶和丝裂霉素联合用药体外药敏试验在大肠癌中的应用

翟晓波¹, 卢爱国² (1. 上海市同济大学附属东方医院药剂科, 上海 200120; 2. 东方医院普外科, 上海 200120)

摘要:目的 在大肠癌中尝试体外抗癌药联合药敏试验的可行性。方法 用 MTT法测定 5-Fu、MMC 单药和联合用药对 32 例大肠癌患者的体外敏感性, 分别以金氏公式法和 Isobologram 分析法统计其体外拮抗、相加、协同作用的发生率。结果 合并用药后抗癌药抑制率大于单药, 有部分联合用药组与单药组比较存在显著差异。按金氏公式法统计结果, 其拮抗、相加、协同作用的发生率分别为 22%、50%、28%; 而按 Isobologram 分析法的统计结果, 其拮抗、相加、协同作用发生率分别为 22%、44%、34%。结论 5-Fu、MMC 联合用药大肠癌体外药敏试验中, 金氏公式法可替代烦琐的 Isobologram 分析法, 体外联合药敏试验的结果与临床化疗疗效的相关性有待实践检验。

关键词:联合药敏; MTT; 大肠癌; Isobologram 分析法; 金氏公式

中图分类号: R979.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)05-0409-03

The applying of in vitro chemosensitivity of 5-Fu plus MMC in colorectal cancers

ZHAI Xiao-bo¹, LU Ai-guo² (1. The Pharmaceutical Department of Dongfang Hospital Affiliated to Shanghai Tongji University, Shanghai 200120, China; 2. The General Surgery Department of Dongfang Hospital, Shanghai 200120, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the method of combined chemosensitivity test in colorectal cancers in vitro. **METHODS** To test the chemosensitivity of 5-Fu, MMC lonely and their combining in 32 colorectal cancers with MTT method in vitro, then calculate the incidence of synergism, additivity, antagonism with Jin's formula and Isobologram method. **RESULTS** The inhibition rates of combined chemotherapy regimes were higher than that of single agents, and some combined chemotherapy groups had significant difference comparing with single agent groups. The incidence of antagonism, additivity, synergism were 22%, 50%, 28% according to the results of Jin's formula, and the incidence of antagonism, additivity, synergism were 22%, 44%, 34% according to the results of Isobologram method. **CONCLUSION** Among the chemosensitivity test of 5-Fu plus MMC in colorectal cancers in vitro, Jin's formula can substitute for complicated Isobologram method. The relationship of the results of chemosensitivity in vitro with clinical results is to be evaluated.

KEY WORDS: combined chemosensitivity test; MTT; colorectal cancer; Isobologram method; Jin's formula

常用体外药敏研究一般以单药实验, 难以反映联合化疗药物间的协同、相加、拮抗作用。此外单药药敏以联合化疗方案中的一种(或一种以上)药物敏感即判断为体外敏感, 这种标准也不够客观。从理论上说联合药敏试验能更直接、客观地确定临床所用联合方案的体外敏感性, 预示临床联合化疗的疗效。在统计方法中, 金氏公式法相对 Isobologram 分析法简明。5-Fu + MMC 为我院大肠癌常用化疗方法, 为此, 我们用 MTT 法测定其在 36 例大肠癌患者中的体外敏感性, 并对这两种统计方法的结果进行比较。

1 材料和方法

1.1 病例

36 例大肠癌均为我院住院病例, 其中直肠癌 16 例, 结肠癌 20 例。病理学检查结果都是腺癌, 包括 29 例中分化腺癌, 5 例中低分化腺癌, 2 例低分化腺癌。男 17 例, 女 19 例,

年龄 35 ~ 81 岁, 平均 (64.4 ± 12.8) 岁。

1.2 方法

将手术取下的大肠癌标本立即用手术剪剪碎, 若瘤块较硬较小, 则用一定浓度的胶原酶和脱氧核糖核酸酶消化, 过筛网, 用 RPMI 1640 培养液 (20% 小牛血清和青霉素 100 u/mL, 链霉素 100 μg/mL) 制成一定浓度的癌细胞悬液, 加入 96 孔培养板中, 具体操作步骤见文献^[1]。设空白组, 对照组, 用药组。用药组加入抗癌药, 使单药和联合用药都达终浓度, 对照组不加抗癌药, 空白组只加培养液, 37℃ 5% CO₂ 培养 72 h。每孔加 20 μL 用生理盐水配成的 5 mg/mL MTT 溶液, 4 ~ 8 h 后每孔加 100 μL 10% 十二烷基硫酸钠, 第 2 天用微量盘读数仪 570 nm 波长处读出各孔吸光度 (A) 值, 抗癌药存活率 = (A 用药组 / A 对照组) × 100%, 抗癌药抑制率 = (1 - A 用药组 / A 对照组) × 100%。

基金项目: 2003 年浦东新区社会发展局青年医学科研基金资助项目 (编号: pw2003 - B10)

1.3 判断体外拮抗、相加或协同效应

金氏公式法:抗癌药物用生理盐水配置, -20℃保存。药物终浓度分别为氟尿嘧啶(5-Fu) 100mg/L;丝裂霉素(MMC)10mg/L^[1],联合药敏试验药物终浓度与单药相同,测得抑制率,用金氏公式求 q 值^[2]。 $q = E_{A+B} / E_A + E_B - E_A \times E_B$ 。式中 E_{A+B} 为两药合用的抑制率; E_A 和 E_B 为各药单用时的抑制率; $q < 0.85$ 表示两药合用有拮抗作用; $q > 1.15$ 表示两药合用有协同作用; $0.85 \leq q \leq 1.15$ 表示两药合用有相加作用。

Isobologram 分析法^[3]:将 5-Fu 制备成 100, 50, 25, 12.5, 6.25mg/L 5 种终浓度; MMC 制备成 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/L 5 种终浓度, 然后进行交叉排列组合, 共有 25 种组合, 如表 1 所示。按上述药物终浓度测得存活率, 在 excel 上绘出 5-Fu、MMC 单药以及各个药物组合的剂量-反应曲线^[4], 如图 1、图 2、图 3 所示。

绘 Isobologram 图的过程:如图 1 所示, 当 5-Fu 剂量为 A_1 时, 其细胞抑制率为 $F_a(A_1)$, 为获得 80% 细胞抑制率, 要由 MMC 产生一个增量 x , 如图 2 所示, 要求 MMC 的剂量分别为 B_1 和 B_2 。由 A_1 和 B_1 产生模型线 I, A_1 和 B_2 产生模型线 II a。当 MMC 剂量为 B 时, 其细胞抑制率为 $F_b(B)$, 为获得 80% 抑制率, 要由 5-Fu 产生一个增量 y , 同理可得出 5-Fu 的剂量为 A , 由此产生模型线 II b^[3]。

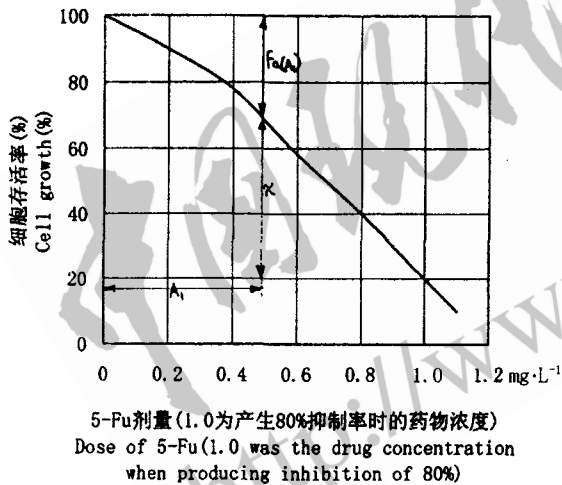


图 1 5-Fu 剂量-反应曲线
Fig 1 Dose-response curves of 5-Fu

各个药物组合 (MMC 剂量固定) 的剂量-反应曲线如图 3 所示, 为产生 80% 的细胞抑制率, 要求 5-Fu 的剂量分别为 A_a, A_b, A_c, A_d, A_e 。将这 5 个点绘入 Isobologram 图中, 如图 4 所示, 三条模型线 I, II a, II b 围成一个区域, 当 P_a 落在此区域的左边时, 则存在协同作用; 当 P_b, P_c 落在此区域中时, 则存在相加作用; 当 P_d, P_e 落在此区域右边时, 则存在拮抗作用。在此需要指出的是, 图 3、图 4 只是为阐明 Isobologram 统计方法而做的说明, 在大多数情况下, 上述 5 个点都同时落在三条模型线 I, II a, II b 围成的区域的左边或区域内或区域的右边。少数情况下如果这 5 个点不是落在同一个区域内, 则用 Wilcoxon 符号秩和检验进行统计, 以判断协同、相

加、拮抗作用^[5]。

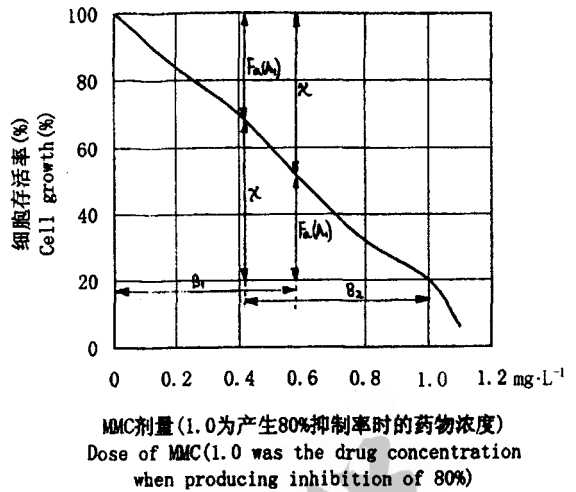


图 2 MMC 剂量-反应曲线
Fig 2 Dose-response curves of MMC

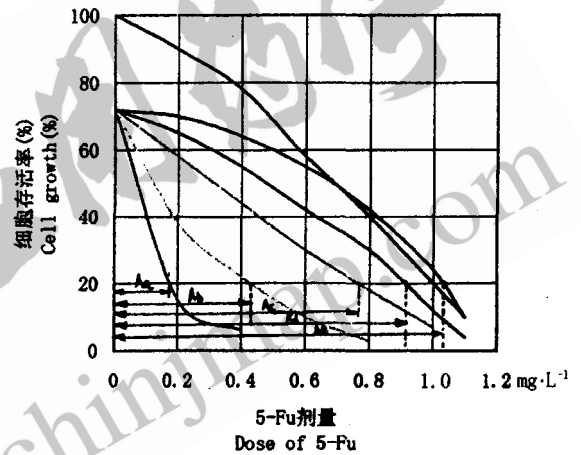


图 3 5-Fu、MMC 联合用药剂量-反应曲线
Fig 3 Dose-response curves of combination of 5-Fu and MMC

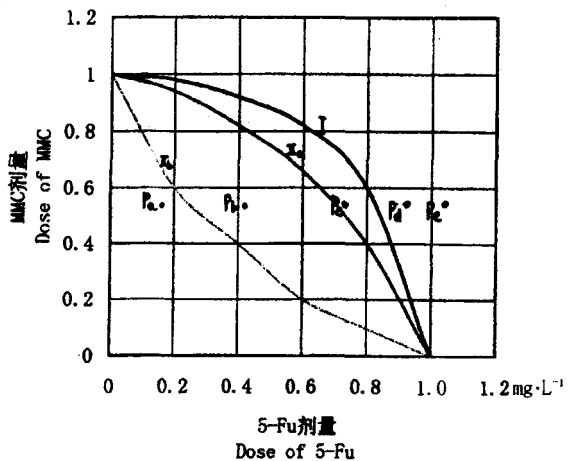


图 4 5-Fu、MMC 联合用药 ID80 isobologram 图
Fig 4 ID80 isobologram chart of combination of 5-Fu and MMC

2 实验结果

36 例大肠癌中, 有 4 例对照组 A 值 < 0.1 , 因计算其抑制率误差较大, 故不计入统计。32 例大肠癌合并用药抗癌药抑

制率大于单用药,其中有 9 个合并用药组与单药组比较统计结果有显著差异,见表 1。在 32 例大肠癌中,按金氏公式的判断标准,得出 5-Fu+MMC 合并用药后有 7 例拮抗、16 例相

表 1 5-Fu, MMC 单药以及联合用药对 32 例大肠癌抑制率 (%)

MMC 浓度 (μg/mL)	5-Fu 浓度 (μg/mL)				
	100	50	25	12.5	6.25
10.0 (52.8 ± 28.2)	(50.8 ± 34.4)	(45.6 ± 30.6)	(41.8 ± 29.3)	(38.5 ± 28.7)	(36.4 ± 24.6)
5.0 (49.6 ± 26.4)	62.4 ± 31.2	59.6 ± 30.5*	56.2 ± 29.4*	53.8 ± 30.3*	53.0 ± 30.2**
2.5 (45.7 ± 26.2)	59.5 ± 30.2	56.2 ± 30.4	54.6 ± 29.4*	50.6 ± 31.8	48.2 ± 29.6*
1.25 (42.5 ± 24.6)	58.8 ± 29.7*	55.8 ± 29.8	49.6 ± 28.2	46.2 ± 27.3	45.8 ± 28.4
0.62 (37.6 ± 24.5)	54.6 ± 29.1*	52.2 ± 28.6	47.3 ± 23.7	44.7 ± 25.3	42.6 ± 26.6
	51.4 ± 29.3*	47.7 ± 29.4	44.5 ± 28.2	40.4 ± 25.7	38.5 ± 23.2

注: t 检验, ** 表示 $P < 0.01$, * 表示 $P < 0.05$

括号内数据为 5-Fu, MMC 单药抑制率 (%), 表中数据为各种浓度联合用药抑制率 (%)

Note: t test, ** means $P < 0.01$, * means $P < 0.05$

The data in brackets were the inhibitions (%) of 5-Fu, MMC lonely, the data in the table were the inhibitions (%) of their combination

表 2 金氏公式法和 Isobologram 分析法在 32 例大肠癌中统计 5-Fu, MMC 联合用药的结果比较

Tab 2 The comparison of the statistic results of combination with 5-Fu plus MMC in 32 colorectal cancers between Jin's formula and Isobologram method

方法	拮抗 (例)	相加 (例)	协同 (例)
金氏公式法	7	16	9
Isobologram 分析法	7	14	11

3 讨论

金氏公式法和 Isobologram 分析法都是判定联合用药体外发生协同、相加、拮抗作用的标准统计方法,而金氏公式法相对比较简明,便于推广,通常被运用于对临床病例的统计^[6]。从剂量-反应曲线的检测结果来看,5-Fu, MMC 的浓度与细胞抑制率或存活率之间存在一定的线性关系,因此从理论上说,金氏公式法虽只判定一种浓度,其结果与统计多种浓度的 Isobologram 分析法应有较大的相关性。将这两种方法在完全相同条件下同时对 32 例大肠癌进行统计,结果完全证实了我们的推测,两种统计方法对 5-Fu, MMC 联合用药拮抗作用发生率的判断完全一致,对相加、协同作用发生率的判断接近一致。因此,金氏公式法可以代替烦琐的 Isobologram 分析法运用于对大肠癌体外联合药敏的判断。

5-Fu 主要使 DNA 合成受阻, MMC 破坏 DNA 的结构与功能,两药之间存在互补性,从理论上说应有协同作用,因而合用后其临床疗效大于 5-Fu 单用。但有人考察晚期大肠癌可估价患者的化疗疗效,综合各家报道,5-Fu 单药有效率为 21%; 5-Fu+MMC 为 17%~33%^[7]。可见多数情况下联合化疗疗效比使用单药高,但也有疗效不增加的报道。虽然这与各家使用化疗药的剂量差异、判断疗效的标准不完全一致等因素有关,然而也在一定程度上说明了联合化疗在临床实践中虽能获协同或相加作用,但未必总能达到这种效果,也有可能发生拮抗作用。我们的体外测定结果也证实了这一点,32 例大肠癌中,5-Fu, MMC 联合用药有 22% 存在拮抗作用。最近日本学者利用基因芯片技术比较圆满地解释了

加、9 例协同作用;而按 Isobologram 分析法,则有 7 例拮抗、14 例相加、11 例协同作用。两种统计方法的结果基本一致,见表 2。

由于恶性肿瘤基因的异质性,导致同种肿瘤对同一种联合化疗方案可以存在个体差异^[8],从而在理论上支持了我们的实验结果。

因此我们有理由推测大肠癌体外联合药敏可能与临床化疗疗效有较大的相关性,可以帮助临床选择具有协同作用、筛选具拮抗作用的化疗方案,但这有待实践检验。

参考文献

- [1] ZHAI X B, LI B S, ZHANG Y, *et al.* Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT method and double-layer agarose MTT method [J]. *Chin J of Clin Pharm* 1996, 5 (3): 102-107.
- [2] HOU H X, LI D R, QIN Q, *et al.* Flavone A from skullcap inhibited human hepatocellular carcinoma cell (BEL-7402) and enhanced cytotoxicity of anti-cancer drugs in vitro [J]. *Chin J of Clin Pharm* 2000, 9 (3): 166-168.
- [3] Kano Y, Suzuki K, Akutsu M, *et al.* Effects of CPT-11 in combination with other anti-cancer agents in culture [J]. *Int J Cancer*, 1992, 50, 604-610.
- [4] Rosee PL, Johnson K, Odwyer ME, *et al.* In vitro studies of the combination of imatinib mesylate and arsenic trioxide in chronic myelogenous leukemia [J]. *Experimental Hematology*, 2002, 30, 729-737.
- [5] Kano Y, Akutsu M, Suzuki K, *et al.* Schedule-dependent interactions between Raltitrexed and Cisplatin in human carcinoma cell lines in vitro [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91, 424-432.
- [6] Tsunoda T, Tanimura H, Hotta T, *et al.* In vitro augmentation of antitumor effect in combination with CPT-11 and CDDP for human colorectal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2000, 73, 6-11.
- [7] PAN Q C, TENG B. *Cancer Pharmacology And Chemotherapy* [M]. Vol 2. Henan: Henan Medical University Press, 2000: 627-637.
- [8] Moriyama M, Hoshida Y, Kato M, *et al.* Genes associated with human hepatocellular carcinoma cell chemosensitivity to 5-fluorouracil plus interferon-alpha combination chemotherapy [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25 (5): 1279-1287.

收稿日期: 2005-08-25