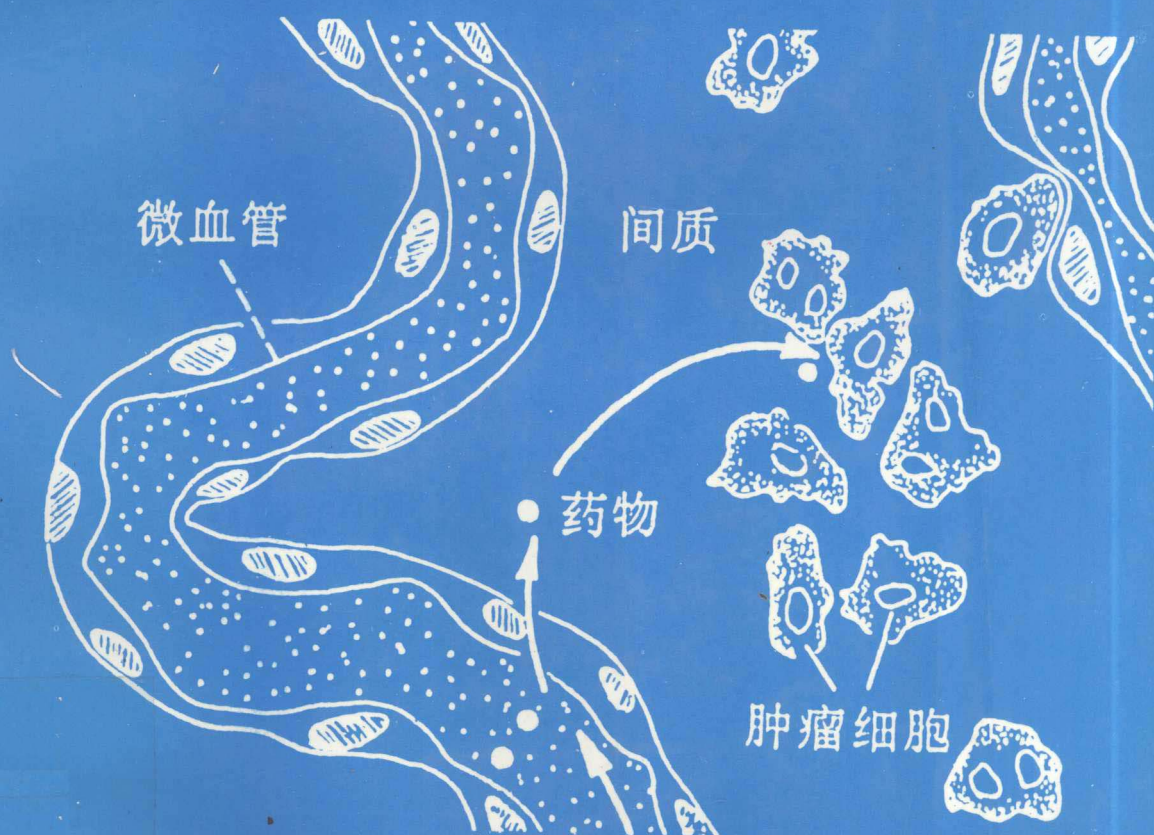


肿瘤化学治疗

敏感性与抗药性

Zhongliu Huaxuezhiliao Minganxing Yu Kangyaoxing

张胜本 张连阳 主编



四川科学技术出版社

第2版

敏感性与耐药性

Sensitivity and Resistance to Antibiotics

李伯良 李伯明 主编



中国医药出版社出版

肿瘤化学治疗敏感性与抗药性

Sensitivity and Resistance in Chemotherapy of Tumor

主编 张胜本 张连阳

四川科学技术出版社

1995年·成都

(川)新登字 004 号

责任编辑: 康利华

特约编辑: 沈锡庚

封面设计: 韦 农

版面设计: 王 红

责任校对: 汪勤俭 张大春 冷怀明 王 红

肿瘤化学治疗敏感性与抗药性

主编 张胜本 张连阳

四川科学技术出版社出版、发行 (成都市盐道街三号)

新华书店重庆发行所经销

达川新华印刷厂印刷

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 16 插页 6 字数 420 千字
1995 年 9 月成都第一版 1995 年 9 月第一次印刷 印数 1—2000

ISBN 7-5364-3174-0/R·694 定价: 18.50 元

主 编 张胜本 张连阳

副主编 郭先健 饶本强 黄 刚

参加编写人员(按姓氏笔画为序):

王严庆	王祥卫	刘松青	李 义
汤为学	冷建军	陈意生	张胜本
张连阳	杨唐俊	杨清浩	饶本强
胡义德	高 峰	黄 刚	黄显凯
郭先健	谢兆霞	谢尚奎	魏 泓

序

恶性肿瘤已成为威胁人们健康、生命的严重疾病。全世界每年发病人数达 700 万人以上，而死亡者约 500 万人。在我国，城市居民因恶性肿瘤死亡者，占总死亡数 21.88%，位居人口死亡原因的第一位，在农村也是死亡原因的第二位。

对于恶性肿瘤的研究，全世界医药卫生和科学技术工作者做出了巨大的努力。就恶性肿瘤的治疗而言，外科手术、放射治疗、化学药物治疗是人们熟悉的几种基本方法。随着现代科学技术的发展，高温、冷冻、激光、微波等治疗方法也进入临床，生物治疗、生物导弹、基因治疗等又相继问世，人们对这些新的手段寄予了极大的希望。尽管如此，手术治疗、放射治疗和化学药物治疗仍然是肿瘤最常用、最重要的治疗方法。

化学药物治疗，作为恶性肿瘤重要的治疗手段之一，是手术治疗和放射治疗以及其它治疗无法取代的。不断开发新的抗肿瘤化学药物；深入揭示化学治疗的有关规律；改进化学治疗的用药途径和方法，使化学药物治疗肿瘤的效果有所提高是肿瘤学家们的期望。但化学治疗的实际疗效与人们期望的仍相差很大，其原因是多方面的，抗药性的产生，对正常组织细胞的伤害引起的一系列副作用等，给化学治疗带来了诸多的困难，也影响了治疗的效果。因而对抗肿瘤药物敏感性的研究，对提高化学药物治疗的效果极其重要。临床上往往凭经验进行化学治疗，但即使是相同组织类型的肿瘤，就不同的个体而言，对同一种抗肿瘤药物的反应也是不一致的，理论上有效而实际并不敏感的药物的盲目应用，其后果是可想而知的。反之，如果能用科学的方法，在用药前准确地得知肿瘤对化学药物的敏感性，那么化学治疗的效果一定会大大提高。本书作者就是抓住了这个关键点，精心编写了《肿瘤化学治疗敏感性与抗药性》这本书，书中介绍了肿瘤对化学治疗敏感性、抗药性的国内外研究进展，详细叙述了化学治疗敏感性检测的各种方法，分析了恶性肿瘤抗药性产生的机理和有关临床应用等方面的知识。我相信，这部著作的出版在肿瘤的化学治疗领域将产生积极的作用。

中国人民解放军第三军医大学校长 李荟元 教授

1995 年 3 月于重庆

前 言

化学治疗已成为恶性肿瘤极为重要的治疗手段,但效果并不理想。其中肿瘤对化疗药物的抗药性是主要障碍;而未能针对不同的肿瘤类型、不同的肿瘤个体选择敏感的药物也是重要原因。因而进行肿瘤化学治疗敏感性、抗药性的检测和研究可以指导临床实行“个体化”、“预见性”化疗,并最终克服肿瘤化疗的抗药性,为肿瘤的治疗开创新纪元。

目前,在这方面的研究极其活跃。然而迄今为止,尚无系统的、专门的介绍肿瘤化学治疗敏感性、抗药性的专著。为此,组织了第三军医大学、重庆医科大学 10 多位长期从事肿瘤化学治疗研究的专家、学者编著本书,并特邀国内最早开展抗药性研究的湖南医科大学谢兆霞教授参加了本书的编写。期望本书的出版对提高肿瘤化学治疗的效果有所帮助。

全书 40 余万字,共分 16 章及附录,图表 50 余幅。介绍恶性肿瘤化学治疗敏感性、抗药性的国内外研究概况、发展趋势和应用前景;详细叙述恶性肿瘤化疗敏感性检测的各种方法、试验设计、数据处理和最新研究进展;分析恶性肿瘤抗药性产生的机理与药物化学结构的关系、抗药性肿瘤细胞病理学,抗药性检测、逆转及临床应用等。

本书的主要特点如下:(1)以自己多年的研究工作为基础,结合国内外文献,反映当前肿瘤化疗敏感性、抗药性检测和研究的最新成就、新进展。(2)内容丰富,阐述详尽,对肿瘤化疗敏感性检测的各种方法从原理、材料和试剂、操作步骤、影响因素、注意事项、评价及其临床应用等多个层次进行了叙述,而抗药性部分则偏重于理论研究,所以本书既是一本理论专著,又是一本肿瘤化疗敏感性、抗药性检测的技术操作手册,具有较强的实用性、科学性。(3)人肿瘤细胞培养、肿瘤异种移植既是肿瘤化疗敏感性、抗药性检测的基础,对肿瘤的其它研究也具有帮助,本书给予详尽的介绍,使本书更为全面。(4)针对抗药性产生机理的复杂性,综合了国内外大量文献,提出了抗药性产生和逆转的主线,为抗药性的进一步研究提供指导。

本书可供从事肿瘤防治研究的工作人员、临床医师、检验医师、药理学和药学研究工作者以及医学院校师生参考。

在本书的编写过程中,由于水平和经验不足,加以时间仓促,疏忽及错误在所难免,希望得到读者的指正及帮助。

本文的编写得到第三军医大学黄松生教授、孔祥英教授的大力支持和帮助,第三军医大学学报编辑部各位教授及编辑对本书的出版作了大量的工作,特别感谢第三军医大学校长李荟元教授为本书作序,并衷心感谢李卿广先生大力支持本书的出版。

张胜本 张连阳

1995 年 4 月

目 录

序	(I)
前言	(I)
第一章 概论	(1)
第一节 肿瘤化学治疗现状	(1)
第二节 药物敏感性与抗药性检测和研究在肿瘤化学治疗中的意义	(2)
第三节 肿瘤化学治疗敏感性与抗药性研究的发展简史	(3)
第二章 人肿瘤细胞培养	(6)
第一节 肿瘤细胞培养的实验条件和准备工作	(6)
第二节 肿瘤细胞培养方法	(12)
第三节 肿瘤细胞培养在药物敏感性和抗药性研究中的应用	(17)
第三章 人体肿瘤免疫缺陷动物体内移植模型	(18)
第一节 免疫缺陷动物的分类及其特点	(18)
第二节 人体肿瘤裸鼠移植瘤模型概述	(21)
第三节 人体肿瘤裸鼠移植瘤模型的建立方法	(26)
第四节 人体肿瘤裸鼠移植瘤模型在抗肿瘤药物研究中的应用	(32)
第五节 人体肿瘤免疫缺陷动物体内转移模型的建立及其在抗转移药物研究中的应用	(37)
第四章 体外药物敏感性检测	(44)
第一节 集落法(HTCA)	(45)
第二节 同位素掺入法	(51)
第三节 四唑蓝快速比色法(MTT 法)	(55)
第四节 染料排除法	(57)
第五节 三磷酸腺苷生物发光分析法	(59)
第六节 琥珀酸脱氢酶抑制法	(61)
第五章 体内化疗药敏检测	(65)
第一节 体内药敏检测观测指标	(66)
第二节 早期体内药敏检测法	(68)
第三节 肿瘤移植于免疫缺陷动物的药物敏感性检测法	(69)
第四节 正常免疫小鼠 SRCA 药物敏感性检测法	(73)

第六章 模拟体内环境的药物敏感性测定法	(78)
第一节 三维组织培养法	(78)
第二节 类器官培养法	(83)
第三节 微胶囊法	(86)
第七章 流式细胞仪在化学治疗敏感性检测中的应用	(89)
第一节 流式细胞仪单色荧光标记药敏测试	(89)
第二节 流式细胞仪 BrdU/DNA 二重染色分析法	(92)
第三节 流式细胞仪 FDA/PI 二重染色法	(96)
第八章 化学治疗敏感性检测试验设计和多药效应的定量分析	(100)
第一节 正交设计	(100)
第二节 正交设计在肿瘤药敏检测中的应用举例	(105)
第三节 肿瘤联合化学治疗相互作用的定量分析	(107)
第九章 常见肿瘤化学治疗药物敏感性检测	(113)
第一节 白血病	(113)
第二节 肺癌	(119)
第三节 消化系统恶性肿瘤	(121)
第四节 卵巢癌	(128)
第五节 膀胱癌	(130)
第十章 肿瘤化学治疗抗药性	(132)
第一节 概述	(132)
第二节 内在抗药性与获得性抗药性	(134)
第三节 药物传递障碍与抗药性	(135)
第四节 免疫与抗药性	(139)
第五节 代谢与抗药性	(140)
第六节 细胞增殖动力学与抗药性	(142)
第十一章 多重抗药性产生机理	(145)
第一节 P-糖蛋白及 <i>mdr</i> 基因	(145)
第二节 谷胱甘肽过氧化物酶与多重抗药性	(152)
第三节 谷胱甘肽 S-转移酶与多重抗药性	(153)
第四节 拓扑酶 I 与多重抗药性	(158)
第五节 蛋白激酶 C 与多重抗药性	(164)
第十二章 多重抗药性肿瘤细胞的病理学	(167)
第一节 恶性肿瘤化疗后的组织学变化	(167)

第二节	多重抗药性肿瘤细胞的表型变化·····	(168)
第三节	多重抗药性肿瘤细胞 P-糖蛋白的过度产生与超微结构定位 ·····	(169)
第十三章	多重抗药性与药物化学结构的关系·····	(171)
第一节	概述·····	(171)
第二节	多重抗药性与抗肿瘤药物化学结构的关系·····	(172)
第十四章	抗药性的检测·····	(177)
第一节	多重抗药性细胞的鉴别、分离和细胞内药物浓度的变化 ·····	(177)
第二节	P-糖蛋白(P-gp) ·····	(179)
第三节	多重抗药基因 mRNA 的检测 ·····	(183)
第四节	抗药标记酶检测·····	(186)
第十五章	抗药性的纠正·····	(191)
第一节	找寻新药·····	(191)
第二节	改进用药方案·····	(192)
第三节	抗药调节剂·····	(195)
第四节	传递障碍引起抗药性的克服·····	(205)
第五节	代谢机理引起抗药性的克服·····	(207)
第六节	免疫治疗与抗 P-gp 抗体的应用 ·····	(210)
第七节	基因治疗·····	(213)
第八节	中医药克服肿瘤化疗的抗药性·····	(215)
第十六章	各系统肿瘤的抗药性·····	(219)
第一节	血液系统恶性肿瘤·····	(219)
第二节	肺癌·····	(225)
第三节	消化系统肿瘤·····	(231)
附录	·····	(1)

第一章 概 论

第一节 肿瘤化学治疗现状

化学治疗作为全身性治疗的手段,在恶性肿瘤的治疗中具有手术和放射治疗不能替代的地位。自 1946 年 Gillman 和 Phillips 报道氮芥类药物造血系统肿瘤以来,化学治疗已取得很大的进步。首先是不断地开发新的抗肿瘤药物,如 50 年代氟脲嘧啶和环磷酰胺,70 年代顺铂的开发都成为化学治疗史上的里程碑,目前临床应用的抗肿瘤药物已达 60 余种。其次是通过不懈的基础研究与临床研究,揭示了化学治疗的部分规律,形成了现行的联合用药、大剂量间断给药、多途径多方式给药、双途径化疗(如氨甲蝶呤+叶酸)等有助于提高疗效的治疗策略。目前化学治疗已使绒毛膜上皮癌、恶性葡萄胎、急性淋巴细胞性白血病、何杰金病、睾丸精原细胞瘤、小细胞肺癌、Wilms 瘤等 10 多种恶性肿瘤获得治愈的机会,使乳腺癌、儿童淋巴瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤等 20 多种恶性肿瘤得以缓解,存活期得到延长,从而成为恶性肿瘤治疗的三大主要手段之一。

但临床抗肿瘤药物治疗的总有效率仅 14%,阻碍化学治疗取得更好疗效的原因众多,主要包括:

1. 现行化学治疗的盲目性 抗肿瘤药物敏感性研究表明,即使是相同组织学类型的肿瘤,对同一抗肿瘤药物的反应也不尽一致;对不同脏器或不同组织学类型的肿瘤采用相同的用药方案,效果更是千差万别。仅凭经验对病人进行盲目性化疗,对部分病人可能是有益的,但对相当一部分病人是有害的。依据药敏试验结果指导应用抗生素,在治疗感染性疾病中取得显著疗效;这启发了人们通过检测病人肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性,合理联合用药,以“个体化”化疗取代盲目性化疗,许多资料显示可使化疗有效率提高 1 倍以上。

2. 化学治疗的抗药性 多数实体瘤如胃癌、大肠癌对化疗低敏感或不敏感。有些肿瘤经化疗缓解,一段时间后复发再化疗无效等提示肿瘤细胞对抗肿瘤药物也存在抗药性。研究表明,抗药性的原因包括药物传递障碍、细胞增殖动力学差异、免疫及代谢等多方面。深入研究探讨抗药性的本质,准确诊断某一个体病人产生的抗药性类型(抗药性的检测),并设法防治(减少化疗中获得性抗药性的产生,逆转抗药性)将大大提高化学治疗的水平。

3. 抗肿瘤药物的选择性与毒性 所有抗肿瘤药物在杀伤肿瘤细胞的同时,也杀伤正常的组织细胞,尤其是增殖旺盛的骨髓造血细胞和胃肠道细胞。由于盲目性化疗和化疗的抗药性导致的低疗效,如果期望通过增大剂量、增加用药品种、缩短间隔时间等方法来改善,则将进一步加重毒性作用,故肿瘤的化学治疗在半个世纪以来,虽然取得显著进展,但仍令人很不满意。通过检测化疗药物的敏感性和抗药性,并努力揭示其本质,将开创化学治疗的新纪元。

第二节 药物敏感性与抗药性检测和研究 在肿瘤化学治疗中的意义

肿瘤化学治疗敏感性与抗药性是既有区别又紧密联系的两个概念。敏感性研究的是肿瘤对化疗药物的最终反应,通过各种方法检测肿瘤对化疗药物的反应性,得到敏感或不敏感的判断;而抗药性研究则是从不同的角度揭示肿瘤对化疗药物不敏感的本质,因而其内涵很广,几乎涉及到肿瘤化学治疗的各个方面,因而“抗药”并不等同于“不敏感”。但是,二者又紧密联系,抗药性需要敏感性的检测才能表现出来,而敏感性的检测又常是抗药性研究的基础。另一方面,只有揭示不敏感的本质,才能发掘出肿瘤对其真正敏感的药物或能增强肿瘤细胞对化疗药物敏感性的药物和方法。因此,二者相辅相承,辩证统一。

药物敏感性与抗药性的检测和研究在肿瘤化学治疗中占有重要的地位,主要表现在以下几个方面。

1. 肿瘤化疗敏感性与抗药性的检测是实现“个体化”化疗的基础 迄今,肿瘤的化疗已开始迈入“个体化”化疗阶段。以往不同的肿瘤患者常常使用固定的化疗模式(方案),不可避免地带来盲目性。研究表明,即使相同组织类型的同种肿瘤,甚至同一肿瘤的不同阶段对化疗药物的敏感性也不尽一致。因此,有必要对肿瘤患者个体的药物敏感性进行测试,选用其中敏感的药物,特别是在目前抗肿瘤药物日趋增多的形势下,就显得更为急迫。肿瘤化疗的临床经验已经证明,单凭经验用药有效率很低(14%),倘若能根据现有的药敏测试方法所测结果指导选药,有效率可提高至 28%~35%左右,这已是一个不小的成就。

肿瘤化疗敏感性和抗药性的检测为预见性化疗提供了重要的依据。近年来,随着抗药机理的逐渐揭示,使人们有可能在肿瘤化疗之前,通过生化、免疫及分子生物学手段,估测肿瘤抗药性产生的原因,据此开发和使用合理的抗肿瘤药物,减少盲目性,提高针对性,从而开创肿瘤预见性化疗的新途径,这无疑将会大大提高肿瘤的治疗水平。例如 O^6 -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶(O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase, O^6 -AGT)、DNA 拓扑异构酶(DNA topoisomerase)和 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)就已证明与肿瘤细胞对某些化疗药物的敏感性密切相关,这可以作为是否使用这些化疗药物的预见性指标。

肿瘤化疗敏感性和抗药性的检测还为选择合理的联合化疗方案提供了依据,以寻找更有效的细胞毒药物,选择更为合理的联合用药方案,达到明显提高疗效的目的。根据敏感性和抗药性检测的结果,在联合方案中尽量选用敏感的药物,避免有交叉抗药的药物混用或联合应用抗药调节剂。

2. 用于发掘新的抗肿瘤药物,提出新的抗肿瘤策略 发掘和筛选新型的抗肿瘤药物,往往要以药物敏感性、抗药性的各种检测方法作为研究手段。在新药的开发过程中,不管是体外试验还是体内试验,检测药物敏感性的各种方法如集落法、同位素掺入法、流式细胞仪法及裸鼠肾包膜下肿瘤移植等都已得到广泛应用。研究抗药性产生的各种机理,为寻找新的抗肿瘤药物提供了多方面的线索。谷胱甘肽合成抑制剂丁硫氨酸亚砷(Buthionine sulfoximine, BSO)以

及避开 P-gp 的药物聚烷基氰丙烯酸酯得以在肿瘤化疗中应用,就是因为它们能纠正抗肿瘤药物的抗药性。

通过对药物敏感性和抗药性的研究,还能提出治疗肿瘤的新策略。实体瘤的化疗效果远不如血液系统恶性肿瘤好,Rakesh K 等根据这两类肿瘤化疗过程中的差异,指出实体瘤瘤组织内药物传递障碍是实体瘤抗药的最主要因素。Rakesh K 的这一理论引起了世界各国的广泛关注。针对引起瘤内药物传递障碍的机理,目前已分别提出了降低肿瘤间质压力,提高肿瘤氧含量,增加缺少血管化区域的血管分布,以及增加药物在瘤组织内滞留的二步法和三步法等,这些方法均是具有战略意义的治疗方法。若能解决实体瘤瘤内药物的传递障碍,使实体瘤的化疗取得有如白血病等血液系统肿瘤化疗一样的疗效,将是实体瘤治疗的突破性进展。

3. 监测化疗疗效,指导及时更换化疗药物并预测预后 动态检测肿瘤患者对化疗药物的敏感性和各种抗药因素如多重抗药基因及其翻译产物 P-gp 的表达,谷胱甘肽-S 转移酶、谷胱甘肽过氧化酶、蛋白激酶 C、拓扑异构酶等抗药标志物的活性,以及通过流式细胞仪动态观察化疗前后肿瘤组织中 DNA 含量,倍体和各时相细胞的比例,对监测化疗效果、指导及时更换化疗药物具有重要意义,而且还能据此预测患者的预后等。

4. 是研究肿瘤其它生物学行为的基础 肿瘤转移模型的建立和抗转移药物的筛选,细胞周期动力学分析,肿瘤的生物化学、遗传学研究,化学致癌、物理因素的致癌作用以及肿瘤的放射治疗等多方面的研究常常与肿瘤化疗敏感性与抗药性的检测和研究有密切联系,有的研究还是以直接提高肿瘤对化疗药物敏感性,克服抗药性为最终目的。可以说,肿瘤化疗敏感性和抗药性的检测与研究已渗透到肿瘤学的各个方面,在肿瘤的发生、发展、治疗的研究中均有重要意义。

第三节 肿瘤化学治疗敏感性与抗药性研究的发展简史

恶性肿瘤对化学治疗敏感性的检测用于指导临床研究的研究先于肿瘤抗药性的研究。从其历史来划分可分为黎明期、发展期、从体外试验转向体内试验的变改期以及综合多种方法进行测试的趋向期,直到现在深入到分子水平的检测,有近 60 年的历史。

肿瘤化疗敏感性检测作为肿瘤患者临床用药的依据是从 Timofeyresky(1947 年)开始的。但这以前,就有人抽取白血病患者外周血细胞和化疗药物短期培养后,在光学显微镜下观察药物对细胞形态的影响,并根据形态变化判断白血病细胞对化疗药物的反应情况(Gey,1938)。鉴于这样的事实,在 Timofeyresky 之前,通过药敏试验选择出对该原代培养细胞最有效的抗肿瘤药物给予患者治疗的设想,就已经奠定了相当的基础。

在此后的 20 年中,直接指导临床选药的药敏试验一直处于停滞或者说很少在临床实际应用的阶段。部分原因是当时可供临床医生选择的药物有限,但最主要的还是人们把注意力集中于寻找更为有效的细胞毒性药物;另外,技术上的限制尤其肿瘤细胞培养技术尚不成熟也大大地阻碍了这方面的研究。

以 Wright(1957)、DiPaolo 和 Dowd(1961)创造的单层培养(试管法、微孔板法)及器官组织培养的药敏检测方法标志着个体肿瘤患者药敏检测的重新兴起。这一时期,由于新的抗肿瘤药物的不断涌现、肿瘤细胞培养技术的初步成熟和受抗生素药敏试验的启示,专门研究药敏试验的报道不断增多。但是这些方法有一个共同的特点,即观察指标多处于光学显微镜观察的范围,只能根据形态分级判断药物是否敏感、所以事与愿违,根据检测结果指导用药的疗效与凭经验用药的疗效大多无显著差异。但是这段时间内,却初步确立了药敏试验在肿瘤化学治疗和研究中的地位,以染料排除法(Dye-exclusion Assay, DEA)为代表,在肿瘤的研究中,现在仍常应用肿瘤细胞计数,而且 DEA 还是其它许多药敏检测法的基础。

在随后的 15~20 年中,个体肿瘤化疗药物敏感性检测迎来了迅速发展的时期,并和肿瘤细胞培养、肿瘤生物化学研究、同位素技术、免疫组织化学技术的发展史紧密联系在一起。药敏试验进入飞跃发展时期的标志是 Park1971 年创造的人肿瘤细胞集落形成药敏测试法(Human Tumor cell colonizing Assay, HTCA)。以此为开端,先后建立了同位素掺入法(^3H -TdR 法, Mattern, 1976)、四唑蓝快速比色法(MTT 法, Mosmann, 1983)、区别染色细胞毒法(Disc 法, Weisenthal, 1983)、三磷酸腺苷生物发光法(ATP-CSA, Perra, 1987)和琥珀酸脱氢酶抑制试验(SDI-T, Maehara, 1987)等。这些药敏测试方法所测结果与临床化疗的结果有密切的相关性,被誉为肿瘤化疗药物敏感性测试的五大基本方法,在临床和研究中都得到广泛应用。

随着流式细胞仪技术、计算机技术、荧光化学和单克隆抗体技术的发展和完善,人们又将流式细胞仪引进肿瘤化疗敏感性测试中,通过测定 DNA 含量,倍体分析及各时相细胞数量的分析,测定肿瘤细胞对药物的敏感性。采用流式细胞仪检测肿瘤的药敏情况,利于动态观察。

上述各种体外药物敏感性检测方法,均有某些限制因素,且离开了肿瘤生长的体内环境,客观上并不能完全反映肿瘤—药物—人体之间复杂的情况。为了弥补这一缺陷,在对外体药敏研究的同时,人们建立了各种体内药敏测试法:由最初的利用免疫障碍区组织的方法(Huntald, 1954)到利用人肿瘤裸鼠异种移植模型进行药敏检测的“标准动物检测法”(Rygaard, 1969),直至正常免疫小鼠 SRCA 药敏测试(Bogden, 1979),虽然后者颇有争议,但大大推动了体内药敏测试的发展。

近年来,肿瘤化疗药敏检测的研究更有遍地开花之势,适用于药敏测试的各种肿瘤细胞培养技术、模拟体内环境的体外药敏检测、综合多种方法或指标的药敏检测、针对某类药物或肿瘤的检测方法竞相报道,但这些方法历史短,尚待时间检验。

肿瘤化疗药物敏感性的检测,促使人们去探索抗药的原因。40 多年的研究中,在两个方面取得了重要进展:①多重抗药性的发现和研究;②实体瘤内药物传递障碍引起的抗药性。

1970 年, Biedler 和 Riehm 等发现,在逐步提高化疗药物浓度孵育的 P-388 白血病细胞系和中华地鼠肺细胞对一些结构、作用机理完全不同的化疗药物具有交叉抗药性。随后, Ling、Juliao、Kartner 等相继对这种现象进行了深入研究,发现这种抗药性与肿瘤细胞过度表达的一种基因及其翻译产物有关。由于这种抗药性的肿瘤细胞能对抗多种药物,因而叫多重抗药性(Multide drug resistance, MDR)。MDR 的发现为抗药性的研究开创了新纪元,在此后相当长

的时间内,MDR 在抗药性的研究中一直占据主要地位。

实体瘤内药物传递障碍引起的抗药性首先由 Rakesh K 等提出,经过了近 20 年的艰苦研究,逐步阐明了实体瘤结构与抗药性的关系。他们的论文一发表,引起了各国学者的广泛关注,由此而提出的种种克服这种抗药性的研究也正在进行之中。

(张胜本 张连阳)

参考文献

1. 陈建敏 等. 肿瘤治疗的新途径——预见性化疗的可行性探讨. 中国肿瘤临床,1994;21(4):299
2. Rakesh, et al. (赵裕卿 译) 固态肿瘤内药物传递的障碍. 科学,1994;11:25
3. Dolan ME, et al. Depletion of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase activity in mammalian tissues and human tumor xenografts in nude mice by treatment with O⁶-methylguanine. Cancer Chemother Pharmacol, 1989;25:103
4. Puchalski RB, et al. Expression of recombinant glutathione S-transferase π , γ or γ , Confers resistance to alkylating agents. Proc Natl Acad Sci USA,1990;87:2443
5. Biedler JL, et al. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro; cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. Cancer Res,1970;30:1174
6. Ling V, et al. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster orary cell multidrug-resistance. Biochem Biophys Acta,1978;455:152
7. Wright JC, et al. Investigation of the relation between clinical and tissue-culture reponse in chemotherapeutic agents on human cancer. New Engl J Med,1957;257:1207
8. Di Paolo, et al. Evaluation of inhibition of human tumor tissue by cancer chemotherapeutic drugs with an in vitro test. J Nat Cancer Inst,1961;27:807
9. Park CH, et al. Mouse myeloma tumor stem cells; a primary cell culture assay. J Nat Cancer Inst,1971;46:411
10. Weisenthul LM, et al. A novel dye exclusion method for testing in vitro chmosensitivity of Human tumor. Cancer Res,1983;43:749

第二章 人肿瘤细胞培养

肿瘤细胞培养是研究和检测肿瘤化学治疗敏感性、抗药性的基础。临床上检测某个体肿瘤对化疗药物敏感或抗药通常先进行人肿瘤细胞培养,再投予药物,孵育一定时间后观察肿瘤细胞反应,此即为“体外药物敏感性检测”。将个体人肿瘤移植于动物体内,行药物敏感性检测称为“体内药物敏感性检测”。无论“体外”、“体内”仍需要熟练掌握肿瘤细胞培养知识和操作。本章主要介绍肿瘤细胞培养所需的设备、材料、药品及培养方法、技术操作等。

第一节 肿瘤细胞培养的实验条件和准备工作

一、实验设备及器材

(一)培养室的设备

在肿瘤细胞培养时,需要避免杂菌、霉菌污染,实行无菌操作,因此,细胞培养室应严格隔离,还应附设准备室、培养前室二部分。准备室多单独成间,培养室及培养前室相邻并设小门相通。进行肿瘤细胞培养时,三室应具有以下设备:

1. 超净工作台(或无菌操作箱) 为细胞培养提供一个无菌的工作环境,带有紫外线杀菌灯(消毒空气)及过滤空气装置,被过滤的空气可以保证没有或很少有空气污染。
2. 恒温培养箱 用于密闭系统的培养。
3. 二氧化碳培养箱 通入 5%CO₂ 及 95%空气,有调温装置及恒温功能,用于开放系统的培养。无二氧化碳培养箱,也可用一密闭容器,通入一定量二氧化碳,置恒温培养箱中即可。
4. 倒置显微镜 用于观察平皿、玻璃或塑料培养瓶底的细胞。如载物台上带有恒温操作室及连续摄影装置或录相系统的相差倒置显微镜则更为理想。
5. 实体显微镜 在原代培养时用来准确地挑选用于培养的组织。
6. 离心机 以能够获得稳定转速的低速离心机(800~1500r/min)为宜,如需进一步开展分子生物学研究,则需备有超速离心机。
7. 蒸馏器 双蒸水或三蒸水是制备各种培养液必需的溶剂,即要求水中的离子量减少到最低限度(电阻测量值大于 300 欧姆)。
8. 冰箱 平衡盐溶液及培养液保存于 4℃ 中,胰蛋白酶及小牛血清、L-谷酰胺等保存于 -20℃ 中。
9. 高压蒸汽消毒器及电热鼓风干燥箱 供消毒和干燥器材时用。

10. 恒温水浴箱 培养液等在使用前应加温到 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ ，水浴箱应定期清洗。如不经常换水，则容易成为杂菌和霉菌孳生的温床。

11. 液氮容器 用于冻存肿瘤组织或培养的细胞。若有天平、pH 测定仪等则更为方便，后者主要用于监测培养基，各种溶液及试剂的 pH 值。

注意：(1)培养室不要有窗户或密封窗户，避免阳光照射使室温升高，或看不清酒精灯火焰，同时可制止外面空气流入。

(2)减少引起室内空气流动的因素，如入口应做成拉门；培养时关闭空气净化装置；设立相对无菌的准备室等。

(3)房间内应避免灰尘堆积，尽可能减少凹凸不平的部分，地板以能够洗刷的瓷砖或铺以地板胶，墙壁可用除菌剂(五氯苯酚)与油漆混合涂抹，以预防霉菌生长。

(4)必需设置紫外线杀菌灯，使房间的每个角落都能受到紫外线灯的直接照射。由于不能期望反射光有什么效果，所以安装灯管时不宜让灯管转向天花板。准备室亦安装杀菌灯。

(5)由于使用酒精灯可造成高温、高湿状态，培养室最好设置封闭式除湿空气调节器。但只应在培养操作的空隙时间运转。

最近，从空间和无菌管理方面的考虑出发，我国已生产轻便的培养净化台，使用者逐渐增多。净化台与实验者之间有气流常隔开，操作时两手伸入其中，一切操作均在净化台内完成。

(二)培养器材

1. 培养瓶或培养皿 两者均普遍使用。目前市面上供应的 Eerle 氏瓶，Carrel 氏瓶均很适应于肿瘤细胞培养。一般认为，硼硅玻璃及钠玻璃比较满意，而含铅、砷等有毒物质的玻璃瓶因这些有毒物能缓慢渗入培养液导致细胞中毒，应避免使用。培养皿一般用玻璃培养皿，近年来由于塑料工业的发展，采用聚苯乙烯类物质制成的塑料平皿，透明度好，无毒，肿瘤细胞能贴壁生长而得到广泛应用。

2. 滤菌器 玻璃滤菌器、Seitz 氏滤菌器、微孔滤菌膜、Beikefled 氏滤菌器或 gamberland 氏滤菌器均可应用，以前三者最为常用。滤除细菌时，必须选用孔径合适的滤菌器。如 G_3 号玻璃滤菌器孔径 $60\sim 80\mu\text{m}$ ，过滤澄清用； G_4 号孔径 $25\sim 30\mu\text{m}$ ，过滤澄清用； G_5 号孔径 $2\sim 5\mu\text{m}$ ，滤除一般较大细菌； G_6 号孔径小于 $2\mu\text{m}$ ，滤除较小细菌。其它几种滤菌器也有相似功能。

3. 抽滤瓶 准备 250、500、1000ml 三种。

4. 三角烧瓶 准备 25、50、100、250ml 四种，用于消化分离肿瘤细胞。

5. 吸管 常用 1ml 及 10ml 刻度移液管及 3ml 橡皮吸管三种。吸管种类越少，对培养操作、洗涤、灭菌越方便。备齐用一类型的吸管，注意随时补充。吸管必须塞以棉花，故应选择末端口径较大的吸管。

6. 离心管 用于离心操作，原代培养所需处理容量大，以 10ml 大型尖底离心管为宜。

7. 胶塞 硅胶加工的胶塞或木制塞。

8. 电磁搅拌器及带玻璃外衣的搅棒 消化分离细胞用。