

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.016

ATP 生物荧光技术指导大肠癌患者腹腔化疗的研究

周 莉,侯安继

ATP Bioluminescence Technical Guides Intra-peritoneal Chemotherapy in Patients with Colorectal Cancer

ZHOU Li, HOU An-ji

Department of Oncology, Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai 200137, China

Corresponding Author: HOU An-ji, E-mail: houanji@sina.com

Abstract: Objective To evaluate the feasibility and efficacy of the intra-peritoneal chemotherapy guided by ATP bioluminescence tumor chemo-sensitivity assay for human colorectal cancer. **Methods** Thirty-two cases with the colorectal cancer malignant ascites were collected for ATP-TCA to determine the chemo-sensitivity. The drug with the highest inhibition rate was selected for intra-peritoneal chemotherapy. The results of ATP-TCA and the response of malignant ascites, the clinical features and Karnofsky performance score(KPS) were analyzed. **Results** There were considerable differences in chemo-sensitivity between individuals. Hydroxycamptothecin(HCPT) was the most effective to the colorectal cancer malignant ascites. Fifteen patients showed response by intra-peritoneal chemotherapy (complete response: 1, partial response: 14). The KPS of the responders was improved significantly. **Conclusion** *In vitro* chemo-sensitivity ATP bioluminescence tumor assay was safe and effective to guide intra-peritoneal chemotherapy for colorectal cancer malignant ascites, through improvement of the KPS.

Key words: ATP-TCA; Human colorectal cancer; Malignant ascites

摘要:目的 观察 ATP 生物荧光技术指导大肠癌患者腹腔化疗的疗效及安全性。**方法** 选择 32 例腹水癌细胞阳性的晚期大肠癌患者,ATP-TCA 法检测腹水癌细胞对 5-氟尿嘧啶、顺铂、羟基喜树碱、丝裂霉素、卡铂、多西他赛和吡柔比星的敏感度,选择敏感药物对患者进行腹腔内化疗,观察治疗后腹水缓解率、生活质量评分及化疗不良反应等。**结果** 大肠癌腹水标本的药物敏感度存在较大的个体差异,敏感率最高的化疗药物为羟基喜树碱,腹水治疗有效病例 15 例,其中完全缓解 1 例,部分缓解 14 例,总有效率 46.9%,不良反应以骨髓抑制为主,有 12 例(37.5%),腹腔化疗有效者治疗后 KPS 较治疗前显著升高,差异有统计学意义。**结论** ATP-TCA 法指导大肠癌患者腹腔化疗安全有效,腹水治疗有效者可提高生活质量。

关键词: ATP-TCA; 大肠癌; 腹水

中图分类号:R735.3⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)11-1280-03

0 引言

恶性腹水是晚期恶性肿瘤的常见并发症,其恰当治疗对提高患者的生存质量有重要意义。目前临床上对大肠癌腹膜转移引起腹水者常采用抽放腹水、腹腔内注入化疗药物或免疫及生物制剂等,腹腔内化疗无标准方案,且因肿瘤有异质性和多药耐药现象,治疗效果不佳。本研究选择 32 例大肠癌合并

腹水患者,采用 ATP-TCA 法检测腹水中癌细胞对多种化疗药物的敏感度,选择敏感药物进行腹腔内化疗,观察其疗效。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择

选取我院 2009 年 1 月—2010 年 4 月住院结肠癌患者 32 例。入选标准如下:(1)本科收治的经病理学确诊的大肠癌合并腹水患者;(2)PS(Performance Status)评分≤2 分;(3)无重要脏器严重疾患;(4)腹水细胞学检查癌细胞阳性;(5)能耐受并愿意接受放腹水和腹腔内化学药物治疗者。

1.2 患者情况

收稿日期:2011-01-30;修回日期:2011-07-07

基金项目:上海市浦东新区社发局优秀青年医学人才基金资助项目(PWRg2008-9)

作者单位:200137 上海,上海市第七人民医院肿瘤科

通信作者:侯安继,E-mail:houanji@sina.com

作者简介:周莉(1978-),女,博士,主治医师,主要从事肿瘤内科学临床及基础研究

共 32 例,年龄 43~69 岁,其中男 18 例,女 14 例,直肠癌 4 例,乙状结肠癌 14 例,升结肠癌 8 例,横结肠癌 6 例,组织学类型:乳头状腺癌 11 例,管状腺癌 13 例,黏液腺癌 5 例,印戒细胞癌 2 例,未分化癌 1 例。

1.3 化疗药物

所用化疗药物及 100%测试药物浓度如下:5-氟尿嘧啶(5-Fu) 25.00 μg/ml(上海旭东海普药业有限公司)、顺铂(DDP) 2.00 μg/ml(齐鲁制药有限公司)、羟基喜树碱(HCPT) 0.50 μg/ml(武汉李时珍药业有限公司)、丝裂霉素(MTX) 0.40 μg/ml(浙江海正药业有限公司)、卡铂(CBP) 15.00 μg/ml(齐鲁制药有限公司)、多西他赛(Tax) 4.00 μg/ml(江苏恒瑞医药有限公司)、吡柔比星(THP) 0.80 μg/ml(江苏恒瑞医药有限公司)。体外试验药物浓度(μg/ml) = 50 × 临床每日用药剂量/10⁶,以 0.9%氯化钠溶液配成所需溶液于 -20℃ 保存备用。

1.4 试剂和主要仪器

胎牛血清(杭州四季青),RPMI1640 培养液(Gibco),荧光色素-荧光色素酶试剂盒(EG&G 公司),ATP-TCA 试剂盒(北京金紫晶),倒置相差显微镜(Nikon),荧光测定仪(德国 Berthold 公司)等。

1.5 腹水肿瘤细胞的培养及 ATP-TCA 药敏试验

无菌条件下收集癌细胞阳性的腹水 500 ml,离心收集细胞,采用不连续密度梯度离心法收集肿瘤细胞,将沉淀细胞用 RPMI1640 培养液悬浮细胞后备用。将所培养细胞配成单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,按浓度梯度加入下列药物:5-氟尿嘧啶、顺铂、羟基喜树碱、丝裂霉素、卡铂、多西他赛和吡柔比星,每种药物设 100%、50%、25%、12.5%、6.25% 五个浓度梯度,每组 3 个平行孔,阴性对照只加细胞悬液,空白对照只加培养液。将培养板置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 3~5 d 后,各孔加 ATP 提取液 50 μl,混匀后取 50 μl 混合液于检测板,加入 50 μl 荧光酶-荧光素工作液,送检测板入荧光测定仪内进行检测,测定荧光值,结果经计算机软件分析药物各浓度抑制率,绘制抑制曲线,计算药物半数抑制浓度 IC₅₀ 和 90%抑制浓度 IC₉₀,判断敏感程度。

1.6 药敏检测判定标准

高度敏感(+++): IC₉₀ < 100% 测试药物浓度, IC₅₀ < 25%; 部分敏感(++): IC₉₀ > 100% 测试药物浓度, IC₅₀ < 25%; 低度敏感(+): IC₉₀ < 100% 测试药物浓度, IC₅₀ > 25%; 不敏感(-): IC₉₀ > 100% 测试药物浓度, IC₅₀ > 25%。

1.7 腹腔内化疗

选择对腹水肿瘤细胞抑制率最高的一种化疗药物进行腹腔化疗,将化疗药物稀释后沿导管缓慢注入患者腹腔,同时加强护胃保肝止呕等处理,腹腔化疗每周 1 次,共 4 次,于第 4 次腔内化疗后复查 B 型

超声,腹水疗效的判定参照 WHO 标准,完全缓解(CR):腹水完全消失,腹水癌细胞阴性,持续时间 ≥ 4 周;部分缓解(PR):腹水消退率 ≥ 50%,腹水癌细胞阴性,持续时间 ≥ 4 周;无效(NC):腹水消退率 < 50%;进展(PD):腹水增多。由专业人员用 B 型超声检查腹水,同时观察患者化疗不良反应及治疗前后生活质量评分变化。

1.8 统计学方法

运用 SPSS15.0 统计软件,腹水疗效与药敏结果的一致差异性分析及与临床病理特征的比较采用 Kappa 检验及 Fisher 精确检验,生活质量比较采用方差分析。

2 结果

2.1 大肠癌腹水肿瘤细胞的药敏检测结果

32 例腹水标本均进行药敏检测,其中 30 例(93.75%)对一种及一种以上化疗药物敏感,2 例(6.25%)对所有化疗药物均不敏感,提示大肠癌腹水标本的药物敏感度存在较大的个体差异。腹水标本的敏感率最高的药物依次为:羟基喜树碱、吡柔比星、丝裂霉素、多西他赛、5-氟尿嘧啶及顺铂,而卡铂的高度敏感率为 0。按高度敏感与中度敏感之和计算敏感率,各种化疗药物对腹水肿瘤细胞的敏感率由高至低依次为:羟基喜树碱、顺铂、吡柔比星、丝裂霉素、5-氟尿嘧啶、多西他赛、卡铂,见表 1。

表 1 大肠癌腹水对化疗药物的敏感谱(n,%)

Table 1 Drug spectrum with different sensitivities to colorectal cancer ascites(n,%)

Chemotherapy drugs	Highly sensitivity	Moderately sensitivity	Low sensitivity
5-Fu	1(3.1)	6(18.8)	25(78.1)
DDP	1(3.1)	21(65.6)	10(31.3)
HCPT	14(43.8)	10(31.3)	8(25)
MTX	5(15.6)	7(21.9)	10(31.3)
CBP	0(0)	3(9.4)	29(90.6)
Tax	2(6.25)	4(12.5)	26(81.25)
THP	11(34.4)	2(6.25)	19(59.4)

2.2 临床疗效

根据药敏结果选择敏感度最高化疗药物腹腔化疗,32 例患者中 21 例完成 4 次腹腔化疗,7 例完成 3 次腹腔化疗,4 例完成 2 次腹腔化疗。32 例患者中 13 例患者在腹腔化疗的同时行 mFOLFOX 方案静脉化疗。腹水治疗有效病例 15 例,其中完全缓解 1 例,部分缓解 14 例,总有效率 46.9%,腹水疗效及药敏结果与患者年龄、性别、部位、病理类型、既往有无化疗及是否同时进行静脉化疗等均无明显相关性,不良反应以骨髓抑制为主,有 12 例(37.5%),其他不良反应包括腹痛腹泻、恶心呕吐等,经对症处理后均缓解。腹腔化疗有效者治疗后 KPS 较治疗前显著升高,差异

有统计学意义。患者临床资料及疗效,见表 2。

表 2 患者临床资料及疗效

Table 2 Clinical data and efficacy

Clinical data	Cases	Effective cases(%)	Sensitive cases(%)
Age(years)			
<60	19	9(47.4)	18(94.7)
≥60	13	6(46.2)	12(92.3)
Gender			
Male	21	9(42.9)	19(90.4)
Female	11	6(54.5)	11(100)
Position			
Colon	28	13(46.4)	26(92.9)
Rectum	4	2(50)	4(100)
Pathology type			
High and middle grade	24	12(50)	24(100)
Low grade	7	3(42.9)	6(85.7)
Undifferentiated	1	0	0
Previous chemotherapy			
With	27	13(48.1)	25(92.6)
Without	5	2(40)	5(100)
Concomitant chemotherapy			
Yes	13	7(53.8)	13(100)
No	19	8(42.1)	17(89.5)

3 讨论

约 50% 的转移性恶性肿瘤患者会在疾病进展过程中出现恶性体腔积液,体腔转移的肿瘤细胞因缺少与基质细胞和内皮细胞的相互作用,且氧气和营养供应较少,其生存模式较原发灶肿瘤细胞有所不同^[1-2],因此恶性体腔积液的临床治疗与实体肿瘤的治疗也应有所不同,提高腹水治疗的疗效对提高患者的生存质量有重要意义。目前腹腔内化疗属经验性化疗,疗效不确切,存在一定的盲目性,化疗前对药物的敏感度进行预测和评估有助于提高疗效和减少不必要的不良反应^[3]。

国内外大量临床研究表明,肿瘤体外药敏检测与临床疗效存在一定的相关性,能较好的指导临床用药、提高疗效及延长患者的生存期。ATP 生物荧光肿瘤体外药敏检测技术(ATP-TCA)以细胞内源性 ATP 含量作为细胞活性度测定终点,所需细胞数量小且敏感、定量,对标本的可评价率较其他方法高,适宜于药敏检测。大量研究表明 ATP-TCA 法较集落形成抑制法及四唑蓝比色法在评估细胞活力方面具有更高的敏感度和特异性^[4-5]。

近年来,药物敏感试验指导肿瘤的个体化化疗逐渐受到重视,并已先后应用于多种实体肿瘤的治疗^[6-8],但在恶性体腔积液中应用研究不多。临床上,恶性腹腔积液是一种易于获取的标本,且对患者的创伤较小,可重复操作性也很强,将恶性腹腔积液作为一种特殊的肿瘤转移灶,在个体化化疗研究领域具有独特的优势^[9-10]。本研究发现对腹水肿瘤细胞

的敏感率最高的化疗药物为羟基喜树碱,同时发现患者年龄、性别、原发肿瘤部位、病理类型、既往有无化疗及是否同时进行静脉化疗等与患者药敏结果及腹腔化疗疗效均无关。羟基喜树碱系 S 期细胞周期特异性药物,可与拓扑异构酶(TOPO)I-DNA 复合物结合,促进 TOPO 介导的 DNA 单链断裂,阻碍 TOPO 修复 DNA 链,导致复制停止,细胞不能分裂和增殖,也可干扰微管蛋白聚合使肿瘤细胞阻滞在 G₂ 期,发挥其抗肿瘤作用。

大肠癌患者出现恶性腹水多提示预后不佳,腹水治疗的效果与患者症状的控制直接相关,是治疗有效的直接依据。本研究的不良反应经对症处理后均缓解,无严重不良反应及化疗相关性死亡,安全性及患者依从性均满意。

综上,ATP-TCA 法指导大肠癌患者腹腔化疗安全有效,腹水治疗有效者可提高生活质量。羟基喜树碱与临床常用大肠癌静脉化疗方案 FOLFOX、FOLFIRI 等联合使用有可能增加化疗疗效,对于体力状况不支持全身化疗的晚期患者也可考虑羟基喜树碱单药腹腔化疗,以达到减轻症状、延长生存目的。

参考文献:

- Neragi-Miandoab S. Malignant pleural effusion, current and evolving approaches for its diagnosis and management[J]. Lung Cancer, 2006, 54(1): 1-9.
- Konstantinovskiy S, Nielsen S, Vyberg M, et al. Angiogenic molecule expression is downregulated in effusions from breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 94(1): 71-80.
- 任习芳,陈岳祥,谢渭芬. 恶性腹水治疗现状及对策[J]. 中华消化杂志,2006,28(8):573-576.
- 田海梅,石小燕,张伟,等. 三磷酸腺苷生物荧光法卵巢肿瘤组织标本体外药敏试验[J]. 中华肿瘤杂志,2005,27(5):296-298.
- 高国兰,万红英,邹学森,等. 子宫颈癌组织三磷酸腺苷肿瘤体外药物敏感试验及其与耐药蛋白表达的关系[J]. 中华妇产科杂志,2007,42(3):201-205.
- Kurbacher CM, Grecu OM, Stier U, et al. ATP chemosensitivity testing in ovarian and breast cancer: early clinical trials[J]. Recent Results Cancer Res, 2003, 161:221-230.
- Doerler M, Hyun J, Venten I, et al. Does chemosensitivity-assay-directed therapy have an influence on the prognosis of patients with malignant melanoma stage IV? A retrospective study of 14 patients with malignant melanoma stage IV[J]. Eur J Med Res, 2007, 12(10): 497-502.
- 田海梅,李艳芬,吴健雄,等. 应用 ATP 生物荧光肿瘤体外药敏检测技术(ATP-TCA)研究大肠癌药敏的异质性[J]. 癌症进展,2005,8(5):102-105.
- 周旻,杨冬华,汤绍辉,等. 药物敏感试验指导胃癌合并恶性腹水的腹腔内化疗[J]. 中华消化杂志,2005,25(5):274-276.
- 王立峰,殷海涛,钱晓萍,等. 恶性胸腔和腹腔积液中 ERCC1 和 BRCA1 mRNA 的表达水平与顺铂敏感度的关系[J]. 肿瘤, 2010,30(3):226-231.

[编辑:周永红;校对:黄园玲]