

MTT 法测定异搏定联合化疗药物对胶质瘤细胞 U251 化疗敏感性评估

何国龙 金许洪 尹 剑 马跃辉 秦福创 叶 欣

摘 要 **目的** 探讨应用四甲基偶氮唑盐(MTT)检测胶质瘤细胞 U251 对异搏定联合化疗药物的化疗敏感性。**方法** 利用 MTT 法检测异搏定分别联合化疗药物(阿霉素、长春新碱、足叶乙甙)在不同作用时间点和不同剂量的作用下胶质瘤细胞 U251 的存活率。**结果** 异搏定联合化疗药物具有一定的协同作用。随着化疗药物作用时间的延长,细胞存活度在每组中均有减少。72h 时间点,阿霉素组细胞存活率为 34.57%,联合长春新碱组细胞存活率为 13.44%,足叶乙甙组细胞存活率为 62.71%,组间比较有统计学差异。**结论** 异搏定联合化疗药物与化疗敏感性存在一定关系,为临床化疗选择合适的化疗剂量和化疗周期提供了实验依据。

关键词 联合化疗 MTT 法 胶质瘤 化疗敏感性

Effect of Verapamil Combined with Chemotherapy Drugs on Sensitivity of U251 Glioma Cell Line by the MTT Assay. He Guolong, Jin Xuhong, Yin Jian, Ma Yuehui, Qin Fuchuang, Ye Xin. Hangzhou Red Cross Hospital, Zhejiang 310003, China

Abstract Objective To study the effect of verapamil combined with chemotherapy drugs on sensitivity of U251 glioma cell line by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. **Methods** The cell survival rate of the U251 glioma cell line under the effect of different chemotherapeutic agents (doxorubicin, vincristine, etoposide) and at different time points of a series of doses were detected by MTT assay. **Results** The combination of chemotherapeutic agents and verapamil showed synergistic effect. With the action of the chemotherapeutic drugs, cell survival rate decreased in each group. In the time point of 72 hours, cell viability of doxorubicin group was 35.72%, vincristine group was 16.37%, etoposide group was 61.72%, and there was significant difference between groups. **Conclusion** The relationship between the doses of chemotherapeutic agents with verapamil and sensitivity of chemotherapy gives a basis for choosing appropriate clinical chemotherapy doses.

Key words Chemotherapy; MTT test; Glioma; Chemosensitivity

脑胶质瘤起源于神经外胚层,是颅内发病率最高、最难治愈的恶性肿瘤,约占所有颅内肿瘤的 35%~61%^[1]。尽管有手术、化疗和 γ 刀、X 刀等治疗方法,但预后依然不佳。从临床治疗效果看,术后辅助化疗在胶质瘤的综合治疗中的作用越来越受到重视。本实验通过 MTT 法检测不同时间和剂量的化疗药物对脑胶质瘤细胞 U125 存活度的变化,来探讨异搏定分别联合化疗药物(阿霉素、长春新碱、足叶乙甙)在不同作用时间点和不同剂量的作用下对胶质瘤化疗敏感性的影响,进一步明确化疗敏感性的差异。

材料与方法

1. 主要材料、试剂与仪器:U251 细胞株购于中国科学院细胞研究所,DMEM 培养基购于美国 Invitrogen 公司,阿霉素、

长春新碱、足叶乙甙、异搏定购于美国 Sigma 公司;主要仪器包括:上海精密科学仪器有限公司紫外分光光度仪 MC-756,美国 SHELDON 公司二氧化碳恒温培养箱 TC2323 等。

2. 组别设置:一共 4 个组,第 1~3 组为实验组和第 4 组为对照组,具体见表 1。

3. 细胞培养:将 U251 细胞置于 pH 7.2~7.4 的 DME 培养基(含 10% 胎牛血清,青霉素 100U/ml,链霉素 100U/ml)中,待细胞状态良好后进行铺板(96well);铺板,调整细胞浓度为 5×10^4 /ml,每孔加 100 μ l 细胞悬液。在 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养。培养 24h,上药,弃去原培养液,用培养基稀释药物,配制成不同浓度的药物培养液,每孔 100 μ l 上药;倒置显微镜下观察细胞呈贴壁生长,形态良好无退化,待其铺满瓶壁 70%~80% 时,以 0.25% 胰蛋白酶消化,隔夜换液。对照孔直接换培养基。分别在各时间点(6、12、24、36、48、72h)检测。

4. MTT 法检测:取对数生长期细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,接种,CO₂ 恒温培养箱中培养 24h 后吸出培养液,弃去上清液。设置对照组及异搏定联合化疗组(阿霉素、长春新

表 1 不同剂量对化疗敏感性影响的组别设置

组别		剂量 (μg/ml)									
1 组	异搏定 (verapamil) + 阿霉素 (DOX)	0.1	0.3	0.6	3	6	15	30	60	90	120
2 组	异搏定 (verapamil) + 长春新碱 (VCR)	0.1	0.5	1	5	10	25	50	100	150	200
3 组	异搏定 (verapamil) + 足叶乙甙 (VP-16)	0.1	0.5	1	5	10	25	50	100	150	200
4 组	对照组	0.1	0.5	1	5	10	25	50	100	150	200

每组 10 个浓度,每个浓度设 3 复孔,对照组:不加药,设 3 复孔

碱、足叶乙甙)时设置不同时间组(6、12、24、36、48、72h)观察时效关系。孵育 4h 每孔加入 10μl 5mg/ml 的 MTT 液;37℃ 恒温下孵育 4h;弃去培养液,每孔加入 150μl DMSO,37℃ 振荡 10min,使结晶充分溶解;待结晶充分溶解后置于酶标仪上,测量各孔的光密度值 D 值;测量波长 570nm,参考波长为 630nm。计算不同药物浓度的细胞存活度:细胞存活度(%) = 实验组 OD 平均值/对照组 OD 平均值 × 100%。检测异搏定对细胞存活率的影响。分析比较加异搏定前后,异搏定对细胞存活率的影响。

5. 统计学方法:用 SPSS13.0 统计学软件进行数据处理,以百分数(%)来表示。组间存活率的比较用χ² 检验。

结 果

用 MTT 法检测异搏定联合化疗药物对胶质瘤细胞 U251 化疗敏感性。根据 OD 值计算细胞存活率,用细胞存活率及不同药物浓度的对数值制作图(表 2)。

实验结果表明,在体外,长春新碱低浓度区域,加入异搏定后,细胞存活率也有下降,但不明显。随着化疗时间的增加,细胞存活度在各组中均有减少,但在长春新碱组减少的幅度最大,阿霉素组次之,而足叶乙甙组最少。异搏定联合阿霉素组的浓度在 0.3 ~ 60.0μg/ml,细胞存活度减少的幅度明显大于其他浓度;异搏定联合长春新碱组、异搏定联合足叶乙甙组在 0.5 ~ 200.0μg/ml 这段浓度时,存活度明显减少,以长春新碱组减少最为明显。72h 时间点,阿霉素组细胞存活率为 35.72%,长春新碱组细胞存活率为 16.37%,足叶乙甙组细胞存活率为 61.72%,组间比较有统计学差异,*P* < 0.05(表 3)。不同时间点,细胞存活率在各组中均有减少,但在长春新碱组减少的幅度最大,阿霉素组次之,而足叶乙甙组最少。

表 2 各化疗组不同药物浓度时细胞存活率的比较

组别 浓度 (μg/ml)	阿霉素组		长春新碱组		足叶乙甙组	
	OD 平均值	细胞存活率 (%)	OD 平均值	细胞存活率 (%)	OD 平均值	细胞存活率 (%)
100	1.425	111.331	1.171	91.508	1.367	106.851
500	0.742	58.010	1.033	80.724	1.216	95.051
1000	0.528	41.287	1.204	94.113	1.251	97.786
5000	0.558	43.579	1.118	87.393	0.934	72.961
10000	0.552	43.136	1.049	81.974	0.863	67.413
25000	0.563	43.970	1.392	108.804	0.863	67.413
50000	0.184	14.379	1.037	81.037	0.760	59.390
100000	0.207	16.150	0.474	37.067	0.832	64.991
150000	0.247	19.302	0.304	23.730	0.624	48.763
200000	0.294	22.975	0.169	13.233	0.457	35.738

每组 10 个浓度(μg/ml),每个浓度设 3 复孔

表 3 各化疗组不同时间点细胞存活率的比较

组别 时间 (h)	阿霉素组		长春新碱组		足叶乙甙组	
	OD 平均值	细胞存活率 (%)	OD 平均值	细胞存活率 (%)	OD 平均值	细胞存活率 (%)
6	1.147	84.933	1.678	124.318	1.353	100.191
12	1.128	83.508	1.630	120.763	1.307	98.303
24	0.945	69.973	1.586	117.504	1.247	92.377
36	0.892	66.066	1.416	104.913	1.186	87.804
48	0.801	59.307	1.008	74.657	1.189	88.082
72	0.467	34.570	0.181	13.443	0.847	62.714

阿霉素浓度为 4.46μg/ml,长春新碱浓度为 95.36μg/ml,足叶乙甙浓度为 59μg/ml

讨 论

体外化疗药物敏感试验方法颇多,常用的有集落形成分析法、集落形成效率法、放射核素标记前体物抑制试验,多细胞肿瘤球体形成试验及 MTT 法,而 MTT 法已应用于各种肿瘤细胞系所代表的化疗药物的药物敏感性的筛选。有报道体外 MTT 与患者自体内的敏感性具有高度相关性^[2]。对于脑胶质瘤术后化疗敏感性差的原因,除了化疗药物的血脑屏障通透性和多重耐药基因的诱导表达所引起外,未能针对肿瘤类型及个体选择敏感性药物进行化疗也是一个重要原因^[3]。因此,针对胶质瘤对不同化疗药物的敏感性,为每个患者制定个体化的化疗方案,避免无效化疗,减少不必要的不良反应,提高化疗效果十分必要^[4]。

研究表明单一用药疗效差的原因是多方面的。联合用药时,尤其是异搏定联合化疗药物对肿瘤细胞的打击面增宽,可应付多种不同的肿瘤细胞,并且还减少了耐药性的发生率。更为重要的是,异搏定联合化疗药物的剂量强度超过单一用药。对化疗具有一定敏感性的肿瘤来说,有利于总疗效的提高。国内有研究发现脑胶质瘤细胞化疗敏感性与化疗浓度及时间存在一定的关系,并且联合化疗的效果比单独化疗好^[5]。于朝春等^[6]根据化疗药物敏感性对肿瘤患者进行个体化化疗,认为应用药敏试验指导化疗有助于改善患者的生存状态,降低复发率和病死率,提高生存率。张伟等^[7]利用 MTT 法对 69 例人脑胶质瘤标本进行化疗药物敏感性测定,认为同一药物及同一个体的胶质瘤标本对不同药物的敏感性差异很大。我们通过异搏定分别联合化疗药物(阿霉素、长春新碱、足叶乙甙)在不同作用时间点和不同剂量的作用下对胶质瘤化疗敏感性的研究,结果发现,随着联合化疗药物剂量的增加,化疗时间的延长,72h 时间点,DOX 组细胞存活率为 34.57%,VCR 组细胞存活率为 13.44%,VP-16 组细胞存活率为 62.71%,长春新碱组对胶质瘤细胞 U251 的存活率影响最明显。同时,有研究表明,没有一种药物能够抑制所有肿瘤细胞系的生长^[8,9]。我们的试验也证实了这一点。DOX、VCR、VP-16 等药物为临床抗胶质瘤化疗常用药,但只有 VP-16 具有较高的敏感率(约 62.71%),

而其他两种药物的敏感性均较低。说明 VP-16 对胶质瘤细胞作用较好。

此外,本实验还发现化疗药物作用时间与化疗敏感性也存在着一定的联系,但其内在机制尚不明确,需要进一步实验加以证实。体外实验结果与临床疗效相关性的资料表明,化疗药物体外敏感、体内敏感有效的符合率为 50%~70%^[6]。而体外药物敏感性试验,作为临床病人临床试验的前期研究或敏感度的预测,并制定个性化化疗方案具有重要价值^[10]。

参考文献

- 1 Hargrave DR, Zacharoulis S. Pediatric CNS tumors: current treatment and future directions [J]. *Expert Rev Neurother*, 2007, 7(8): 1029-1042
- 2 Hand CM, Vender JR, Black P. Chemotherapy in experimental brain tumor, part I: invitro colorimetric MTT assay [J]. *J Neurooncol*, 1998, 36(1): 1-6
- 3 Demeule M, Shedid D, Beaulieu E. Expression of multidrug-resistance P glycoprotein (p-gp) in human brain tumors [J]. *Int J Cancer*, 2001, 93: 62-66
- 4 Vanden Bent MJ, Hegi ME, Stupp R. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(5): 582-588
- 5 祁红, 陈红专, 冯菊妹, 等. 地昔帕明单用和合用替尼泊苷对大鼠脑交织瘤 C6 细胞增殖的调控作用 [J]. *中国癌症杂志*, 2000, 10(1): 62-64
- 6 Nikkiah G, Tonn JC, Hoffmann O, et al. The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system, part II: evaluation of patient and drug-specific variable [J]. *J Neuro Oncol*, 1992, 13(1): 13-24
- 7 张伟, 江涛, 袁芳, 等. 脑胶质瘤组织培养化疗药物敏感性的研究 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2007, 12(4): 163-166
- 8 Rampling R, James A, Papanastassiou V. The present and future management of malignant brain tumours: surgery, radiotherapy, chemotherapy [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75 Suppl 2: 1124-30
- 9 Grundy RG, Wilne SH, Robinson KJ. Primary postoperative chemotherapy without radiotherapy for treatment of brain tumours other than ependymoma in children under 3 years: results of the first UKCCSG/SIOP CNS 9204 trial [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(1): 120-133
- 10 Van den Bent MJ, Hegi ME, Stupp R. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(5): 582-588

(收稿: 2012-02-17)

(修回: 2012-02-28)