

·讲座·

# 恶性脑胶质瘤个体化化疗实验室技术及其临床应用

傅 军, 陈忠平

(中山大学肿瘤防治中心神经外科/神经肿瘤科, 广东 广州 510060)

【摘要】胶质瘤是神经系统最常见的原发性肿瘤。化疗是胶质瘤综合治疗的重要手段之一,但其疗效仍不理想,原因主要是胶质瘤本身对现有化疗药物不敏感且具有较强的个体化疗敏感性差异。化疗前了解具体肿瘤对化疗的敏感性,从而制定出合理的个体化治疗方案成为合理的个体化治疗的关键。一些实验室技术如肿瘤体外培养药敏检测与临床疗效存在一定的相关性,能够较好的指导临床用药、提高临床疗效。随着对胶质细胞瘤分子特征的深入了解,与药物敏感性相关分子遗传学标记物的筛选和临床应用,个体化化疗在胶质瘤综合治疗中将发挥更积极的作用。

关键词: 胶质瘤; 药敏; 化学治疗

中图分类号:739.41

文献标识码:A

文章编号:1726-8192(2007)01-0072-05

## Laboratory Techniques for Predicting Chemosensitivity in Malignant Glioma and Their Clinical Application

Jun Fu, Zhong-ping Chen

*Department of Neurosurgery/Neuro-oncology, Cancer center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, P.R.China*

【ABSTRACT】Glioma is the commonest primary tumor in central nervous system(CNS). Chemotherapy is an indispensable approach in combined modality therapy for patients with glioma. However, the effect of chemotherapy varies and is only modest. The possible reasons for lack of effective in chemotherapy are drug resistance and variable chemosensitivity in glioma. Rational personalised chemotherapy is up-coming as understanding in chemosensitivity and tumor molecular alternations increases. In vitro chemosensitivity assays can predict in vivo response of the drugs. Understanding in molecular profiles of glioma would predict treatment response and prognosis. Personalised chemotherapy directed by molecular markers will play a promising role in clinical management of malignant gliomas.

**KEY WORDS:** Glioma; Chemosensitivity; Chemotherapy

脑胶质瘤是起源于神经外胚层的肿瘤,约占成人颅内肿瘤的30%~50%。由于胶质瘤呈浸润性生长,与正常脑组织分界不清,手术不可能将其彻

底切除,术后常有复发。近年来,大量临床研究结果表明,术后化疗具有一定的疗效,能在一定程度上延长患者的生存时间。然而,由于脑胶质瘤属于化疗不敏感性肿瘤,传统的经验化疗难以获得满意的临床疗效,常规化疗药物如顺铂、VM-26和CCNU等,客观有效率均不超过20%。新药替莫唑胺(temozolomide, TMZ)虽然获得了相对较好的临床反应,但不加选择的用药总有效率也只有50%

收稿日期:2006-11-28

通讯作者:陈忠平

Correspondence to: Zhong-ping Chen

Tel: 86-20-87343310

E-mail:chenzp57@mail.sysu.edu.cn

左右<sup>[1]</sup>。大量研究证实,脑胶质瘤具有较大的化疗敏感性差异,从而导致肿瘤对同样的化疗方案出现不同的疗效。因此,如何在化疗前了解具体肿瘤对化疗的敏感性,从而制定出合理的个体化治疗方案已经成为临床医生极为关注的问题。

## 1 药敏预测技术的发展和趋势

目前,体外预测胶质瘤对化疗药物敏感性的方法主要有:(1)体外培养药敏试验,如软琼脂克隆形成实验(Colony formation assay, CFA)和四唑蓝比色法(MTT)等;(2)基于细胞遗传学的检测方法,如荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH),检测染色体/基因的异常改变如扩增,缺失;(3)免疫组织化学方法(immunohistochemistry, IHC),检测耐药相关基因蛋白产物表达。

传统的应用新鲜肿瘤组织进行体外培养的药敏试验研究已经有数十年的历史,相关的技术研究和临床应用较为成熟,至2006年与临床有关的类似报道已逾5 000篇。大量国外临床研究表明案肿瘤体外培养药敏检测与临床疗效存在一定的相关性,能够较好的指导临床用药、提高临床疗效。

近年来,大量研究表明,肿瘤的发生是一个多阶段的过程,由于肿瘤发生过程中各种因素的种类、数量和时机组合不同,存在多种肿瘤遗传学途径,这就使同一病理类型的肿瘤可能具有个体独特的遗传学途径<sup>[2]</sup>。以胶质瘤分子遗传学标志物为指导而进行的个体化化疗是近年来国际神经肿瘤学界提出的先进理念,对脑胶质瘤的治疗具有深远意义<sup>[3]</sup>。国外大量研究表明,应用FISH技术分析恶性胶质瘤的分子遗传学特征可以用于指导胶质瘤用药方案的制定。目前研究最为确切的是少枝胶质瘤1p和19q染色体缺失是少枝胶质瘤对PCV化疗方案敏感性的特征性标志,与其良好预后相关;9p和10q染色体缺失的胶质母细胞瘤患者替莫唑胺化疗的疗效较好。

另外,组成性耐药基因表达而引起的耐药机制也是造成脑胶质瘤疗效不理想的一个重要因素<sup>[4]</sup>。临床相关性分析表明,这些基因能够很大程度上影响化疗药物的效果。研究表明,约一半以上的脑胶质瘤为六氧甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)阳性,能够对亚硝脲类药物如BCNU、CCNU以及替

莫唑胺产生耐受;P-gp和DNA拓补异构酶(Topo II)阳性的脑胶质瘤则会对VCR和VM-26治疗不敏感;顺铂对GST- $\pi$ 和肺抗拒相关蛋白(lung resistance-related protein,LRP)过表达的肿瘤疗效较差。因此,制定化疗方案前应用免疫组化技术进行检测可以了解这些耐药基因的表达情况,从而避免使用无效药物化疗。

## 2 现有的药敏检测技术及临床应用

理想的肿瘤体外药敏预测体系的目标是筛选对肿瘤患者敏感的高疗效药物,避免传统化疗方案设计的盲目性,从而降低无效药物对患者身体损害的风险,提高药物治疗指数,降低医疗花费。具体在技术层面上应该满足如下条件:(1)需要的肿瘤组织较少,不影响其他病理检查对肿瘤标本的需求;(2)技术简便,具有可推广性。(3)试验成功评价率高于90%;(4)具有较好的结果重复性;(5)体外实验结果与药物体内疗效有较好的符合率。为了建立上述理想的药敏检测体系,人们对此进行了长期的实验探讨。

### 2.1 脑胶质瘤体外药敏实验的常用方法

2.2.1 克隆形成实验(CFA) CFA法是最为经典的体外培养药敏检测方法,Mcallister等较早开展了这方面的研究,Hamburger等将该技术运用于肿瘤体外药敏检测。1980年,Rosenblum等报道该技术在脑肿瘤中的应用研究,结果表明,BCNU体外药敏检测结果和临床疗效具有相关性。随后,欧洲、美国和日本进行了大量的临床相关性研究,Yung等研究表明,该方法的评价成功率为45%~64%,实验指导化疗方案治疗转移癌的有效率为25%,而同期经验选择方案的有效率为14%。此种方法由于需要活细胞的数量较大、培养要求高、克隆形成率较低,难以获得理想的单细胞悬液,现已很少使用。

CFA的技术原理为:肿瘤组织中存在3种具有不同生物学特征的细胞群:①肿瘤干细胞群,含量为1%以下,该细胞群具有无限的自我更新能力,经过培养能够形成细胞集落;②过渡细胞群,具有分裂能力,但分裂次数有限,对肿瘤的长期存活不如干细胞重要;③终末细胞,为高度分化细胞,已失去自我更新潜力。将肿瘤单细胞悬液接种到含软琼脂的培养基中,培养一段时间以后一部分肿瘤细胞能够形成集落,正常细胞则不能。

Giemsa染色以后通过显微镜计数集落数,并将药物处理组和对照组进行比较。处理药物浓度一般用药物人体内血浆峰值浓度的1/10,常以该浓度下肿瘤细胞生长低于50%或30%作为体外敏感标准。

2.1.2 甲基噻唑基四唑 (MTT) 药敏实验 1983年Mosmann等将MTT比色法用于检测IL-2对小鼠T细胞的生长促进作用以来,国内外学者尝试将该技术应用于肿瘤体外药敏检测,并对其可行性进行了深入的探讨。1990年,Nikkah等报道该技术在恶性胶质瘤体外药敏检测中的应用,并和CFA法进行比较,结果表明,两种技术的检测结果具有良好的一致性。我国学者徐建明较早进行了该方面的研究,非随机的结果显示该方法评价成功率为88%。我们的体外药敏试验结果与临床治疗效果的总符合率为82.8%,阳性符合率为71.4%,阴性符合率为93.3%。体外药敏试验预示的敏感性为90.9%,特异性为77.8%。根据药敏试验结果进行化疗的临床客观有效率(CR+PR)为28.6%,疾病控制率(CR+PR+SD)为71.4%<sup>[5]</sup>。尽管该实验方法已引起人们较大的关注,但也同样存在着肿瘤原代细胞培养困难,间质细胞干扰较大等缺点。实验结果的重复性和稳定性还需要进一步探讨。该方法由于需要细胞数量较大,实验结果受酶标仪检测条件、肿瘤细胞的代谢和PH值的影响,检测结果与临床疗效符合率不高,不少学者在探讨对此技术的改良。

MTT的技术原理为:MTT方法是利用细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可以将MTT分子还原成蓝紫色的Formazan,通过体外细胞培养中的线粒体琥珀酸脱氢酶的活力测定,来判断肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。该技术在96孔板上完成检测。在药物处理组内,设定6个不同浓度的药物进行处理,另设不加药对照和无细胞空白对照。细胞经药物处理72h以后,加入MTT,然后继续培养2~4小时,最后用DMSO溶解还原的Formazan,利用酶标仪在570nm波长测定每孔吸光值(A),然后计算药物浓度对应的抑制率和药物半数抑制浓度IC<sub>50</sub>,一般以IC<sub>50</sub><25%PPC作为体外药物敏感标准。

2.2 荧光原位杂交技术(FISH)检测染色体/基因的异常改变

随着分子生物学技术的发展和人类基因组计划的实施,从分子遗传学和基因水平上阐述药物

敏感性及其机制成为未来药敏检测技术发展的方向。FISH是一种先进的分子生物学检测技术,能够在染色体/基因水平上检测异常遗传学改变如扩增、缺失等。胶质瘤分子遗传学标志物为指导而进行的个体化化疗是近年来国际神经肿瘤学界提出的先进理念,对脑胶质瘤的治疗具有深远意义。国外大量研究表明,恶性胶质瘤的分子遗传学特征可以用于指导胶质瘤用药方案的制定<sup>[3]</sup>。1998年,Cairncross等研究表明,少枝胶质瘤的一些分子遗传学特征如染色体1p和19q缺失和PCV方案敏感性相关,1p和19q合并缺失的患者生存期较长。该研究首次证实个体肿瘤分子遗传学标记能够预测疗效,指导化疗方案的制定。Fortin等人的研究证实了上述结论<sup>[6,7]</sup>。由于高级别星形胶质瘤和少枝胶质瘤生物学行为类似,因此Kraus、Ino等推测1p的缺失亦能作为星形胶质瘤PCV方案的分子遗传学特征<sup>[8]</sup>。Perry等收集287例少枝胶质瘤进行回顾性分析表明,1p/19q缺失是具有较好生存预后的遗传学标志。2006年Walker等研究显示,1p/19q缺失是PCV方案预后的独立预测标志<sup>[3]</sup>。2005年,Silke等报道染色体9p和10q缺失的患者能从替莫唑胺的治疗中获益,生存期较同期患者能够显著延长( $P=0.00063$ ),该研究结果强烈推荐个体肿瘤分子遗传学标志物作为肿瘤化疗的评价模型,筛选和指导临床治疗方案的依据<sup>[9,10]</sup>。目前,美国NCCN肿瘤学临床实践指南亦推荐化疗前检测少枝胶质瘤1p/19q是否缺失作为PCV方案应用的依据。

FISH的技术原理为:FISH是将荧光化学与分子生物学技术相结合来检测和定位核酸的技术。它是用已知碱基顺序并带有荧光标记的核酸片段作为探针(probe),与组织细胞中待检测的基因组DNA按碱基配对的原则进行特异性结合,形成杂交体,然后再应用与标记物相应的检测系统,通过显微镜荧光成像技术,在核酸原有位置把它显示出来。FISH能够检测一些药敏相关的分子遗传标记染色体/基因的异常改变如扩增,缺失,从而确定肿瘤对化疗方案的个体敏感性。

FISH的主要步骤包括:组织样本的制备→杂交前样本的预处理→杂交→杂交后洗涤→显微镜荧光成像。

2.3 免疫组织化学技术(IHC)检测耐药基因表达

胶质瘤化疗效果不佳,除了血-脑屏障对药物

进入脑组织的阻止作用外,肿瘤细胞本身对抗癌药物的耐药性也是化疗失败的重要原因。体内外研究发现肿瘤耐药的分子机制很复杂,包括靶基因突变、靶基因扩增、DNA 损伤修复能力差异、药物进入肿瘤细胞内浓度减少等。近年来,分子生物学研究发现,肿瘤细胞内某些基因如:MDR、MGMT、核苷酸切除修复(NER)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、蛋白激酶 C(PKC)、错配修复(MMR)等的表达与否跟耐药密切相关。临床相关性分析表明,肿瘤组织中耐药基因高表达在很大程度上能影响化疗药物的效果。MGMT 与肿瘤对甲基化类药物耐药是目前研究发现较为肯定的,MGMT 是分子量为 22Ku 的酶蛋白,能与 DNA 鸟嘌呤六号氧上的烷基化合物结合,将烷基转移到 MGMT 的第 145 号半胱氨酸活性位上,使 DNA 上烷基化的鸟嘌呤被还原,而 MGMT 则成为失活的烷基化 MGMT。所以,MGMT 阳性的肿瘤细胞将表现为对亚硝胺类和 TMZ 耐药<sup>[11]</sup>。有研究表明 67.2%~76% 的胶质瘤 MGMT 表达阳性<sup>[12,13]</sup>,提示至少半数以上胶质瘤对亚硝胺类和 TMZ 耐药,这也解释了临床上如果不加选择的使用这些药物有效率甚至无效的原因。我们采用免疫组织化学方法检测患者肿瘤组织 MGMT 蛋白表达,据 MGMT 测定结果选择化疗方案,对 MGMT 表达阳性者采用不含亚硝胺类和替莫唑胺的方案进行化疗,MGMT 表达阴性者可以用也可不用含亚硝胺类和替莫唑胺的方案进行化疗。结果客观有效率(CR+PR)为 35%,疾病控制率(CR+PR+SD)达到 73%。Levin 等<sup>[14]</sup>研究表明,MGMT 低表达少枝胶质瘤患者疗效较好,有效率为 61%,中位 TTP 为 31 个月。

IHC 的技术原理为:IHC 是将组织化学与免疫学技术相结合来检测和定位目的蛋白的技术。它是用特异性抗体作为探针与组织细胞中待检测的蛋白进行特异性结合,然后再应用与标记物相应的检测系统,通过组织化学方法,在组织切片原位显示出来。

IHC 的主要步骤包括:组织切片的制备→脱蜡和抗原修复→一抗孵育→酶标二抗孵育→组织化学显色→复染封片→镜检。

### 3 结语

对胶质瘤进行体外化疗药物敏感性预测的各项检查,指导恶性脑肿瘤的临床化疗方案的个体

化设计,对临床化疗效果的提高具有重要意义。通过神经肿瘤学工作者的共同努力,随着对胶质瘤分子特征的深入了解,特别是与药物敏感性相关基因的充分认识,以及有效新药的研究开发和临床应用,对具体患者进行系统的优化组合的个体化治疗,胶质瘤患者的化疗必定会取得令人满意的效果,在胶质瘤综合治疗中发挥积极作用。

#### [参考文献]

- [1] 陈忠平.重视胶质瘤的化学治疗[J].中国神经肿瘤杂志,2003,1(2):65-68.
- [2] Michotte A, Neyns B, Chaskis C, et al. Neuropathological and molecular aspects of low-grade and high-grade gliomas [J]. Acta Neurol Belg. 2004,104(4):148-153.
- [3] Walker C, Haylock B, Husband D, et al. Clinical use of genotype to predict chemosensitivity in oligodendroglial tumors [J]. Neurology, 2006, 66 (11): 1661-1667.
- [4] 邵翠杰,史泓浏,陈忠平.胶质瘤耐药分子机制 [J]. 中国肿瘤,2006,15(3):163-167.
- [5] 陈建文,张俊平,程金建,等.体外药敏试验指导的恶性脑胶质瘤预见性化疗 [J]. 广东医学,2005,26(9): 1183-1185.
- [6] Fortin D, Cairncross G J, Hammond R R. Oligodendroglioma: an appraisal of recent data pertaining to diagnosis and treatment [J]. Neurosurgery, 1999,45(6): 1279-1291.
- [7] Jeuken J W, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors[J].J Neurooncol, 2004, 70(2):161-181.
- [8] Ino Y, Zlatescu M C, Sasaki H, et al. Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss[J].J Neurosurg,2000,92(6):983-990.
- [9] Wemert S, Ketter R, Rahnenfuhrer J, et al. Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment [J]. Neoplasia,2005,7(10):883-893.
- [10] Leuraud P, Taillandier L, Medioni J, et al. Distinct responses of xenografted gliomas to different alkylating agents are related to histology and genetic alterations[J]. Cancer Res, 2004,64(13):4648-4653.
- [11] Chen Z P, Malapetsa A, McQuillan A, et al. Evidence for nucleotide excision repair as a modifying factor of MGMT mediated innate chloroethylnitrosourea resistance in human tumor cell lines [J]. Mol Pharmacol, 1997, 52: 815-820.

- [12] 胡 苹,左焕琮,马雄君,等. O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤 DNA 转移酶在神经胶质瘤中的表达及其与亚硝脲耐药的关系[J].中日友好医院学报,2003,17:216-218.
- [13] Silber J R, Bobola M S, Ghatan S, et al. O<sup>6</sup>-methylguanine -DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics [J]. Cancer Res, 1998, 58: 1068-1073.
- [14] Levin N, Lavon I, Zelikovitch B, et al. Progressive low-grade oligodendrogliomas: response to temozolomide and correlation between genetic profile and O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase protein expression[J]. Cancer,2006,106(8):1759-1765.

## 关于举办“2007 年神经肿瘤化学治疗培训班”的通知

为使临床医师更好的掌握神经肿瘤化学治疗规范,进一步提高临床诊治水平,由中山大学肿瘤防治中心神经肿瘤科主办的"神经肿瘤化学治疗培训班"(2007 年经卫生部获批国家级继续医学教育项目:神经肿瘤化学治疗培训班,编号:2007-04-04-030)拟于 2007/05/11~05/25 及 2007/06/15~06/29 在广州举办两期培训班。

现通知有关注意事项:

1. 办班目的:通过本继续教育项目,可以使神经肿瘤相关专业人员及时了解国内外本领域新进展,提高相关领域医师对中枢神经系统肿瘤(包括胶质瘤、生殖细胞瘤、淋巴瘤、转移瘤等)化疗的认识。在培训结束时,能够掌握中枢神经系统肿瘤个体化化疗的原则,熟悉中枢神经系统肿瘤常用化疗方案的适应症、禁忌症、并发症的处理及疗效的评价,以利于指导日常临床工作,提高中枢神经系统肿瘤的治疗效果。

2. 培训内容:开展中枢神经系统肿瘤化疗相关课程的理论学习及临床实践。包括神经系统常见肿瘤治疗原则,神经肿瘤化疗基础知识,神经肿瘤特殊化疗,神经肿瘤个体化化疗实验室技术(如神经肿瘤体外药敏试验),组织学员见习、观摩/讨论临床化疗病例。由中山大学肿瘤防治中心神经外科/神经肿瘤科、化疗科多位教授授课、带教。

3. 项目负责人:中山大学肿瘤防治中心神经外科/神经肿瘤科 陈忠平教授

4. 参加人员:医疗卫生单位从事或有志从事神经肿瘤化疗相关人员(含神经外科、肿瘤内科、神经内科等主治医师或高年资住院医师)。每期办班规模为 10 人左右,学习时间 2 周,授予国家级继续医学教育 I 类学分 25 分。

5. 报名要求:请参训人员认真填写报名表并加盖公章后寄回。报名截止日期 4 月 15 日。我们将根据报名先后安排具体培训时间,以正式报到通知为准。

6. 培训费用:报到时每人交纳培训费 2000 元。我们热诚欢迎各位,并协助学员联系食宿,费用自理。

7. 联系人:

赵劲梅:中山大学肿瘤防治中心教务科,电话:(020)87343136

李 刚:中山大学肿瘤防治中心神经肿瘤科,电话:(020)87343309

传 真:020-87343310, 手 机:13632243910(李刚)

8. 联系地址:广州市东风东路 651 号, 邮编:510060

E-mail: liliangxbyt@yahoo.com.cn