

替尼泊苷和卡莫司汀对脑胶质瘤的治疗作用及耐药的研究

包自由

湖南省长沙市第一医院药剂科 410005

【摘要】目的 探讨替尼泊苷和卡莫司汀对脑胶质瘤的治疗作用和耐药性。**方法** 选取25例胶质瘤细胞,分别单一、联合使用替尼泊苷和卡莫司汀,测定体外敏感性以及标本中的多药耐药基因(mdr-1)的表达。联合用药的敏感度是52.00%,显著高于使用替尼泊苷24.00%以及单一使用卡莫司汀20.00%。联合替尼泊苷和卡莫司汀的耐药性和mdr-1基因表达具有良好的符合性,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 临床治疗脑胶质瘤,联合替尼泊苷与卡莫司汀的治疗效果较好;联合用药的耐药情况和mdr-1表达有密切关联。

【关键词】 脑胶质瘤;替尼泊苷;卡莫司汀;治疗效果;耐药性

【中图分类号】 R739.41

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-0415 (2019) 04-031-02

数据显示^[1]:脑胶质瘤每年的发病人数约有5~8万例,这是一种发病率较高的神经系统恶性肿瘤,手术切除与放疗是主要的治疗方法。尽管化疗治疗脑胶质瘤已经经过了数十年的研究和发展,但始终无法达到理想的治疗效果,患者的存活时间只有短短的36~48周;2年内的生存率约为8%~12%^[2]。目前有关替尼泊苷、卡莫司汀联合治疗脑胶质瘤的研究较少,本研究通过体外药敏试验对联合用药的临床疗效进行评估,且采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测mdr-1的表达,现将研究结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 脑胶质瘤体外药敏试验

①抗肿瘤药物和试剂:化疗药物为替尼泊苷(VM26)与卡莫司汀(BCNU)。药物浓度的计算公式是: $C(\mu\text{g/mL}) = 20D$,“D”表示化疗的计量单位($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);实验用药的浓度是 $0.1 \times \text{PPC}$ (血浆峰值)与 $1 \times \text{PPC}$ 、 $10 \times \text{PPC}$ 。联合用药的浓度是单一用药相加之和,替尼泊苷和卡莫司汀都是单一用药的一半。②胶质瘤标本的收集:本研究25例标本都是从手术切除的肿瘤组织中提取,其中12例间变型星形细胞瘤和多形胶质细胞瘤;8例星形细胞瘤和少突胶质瘤;5例是星形胶质细胞瘤术后复发。③采用MTT比色法检测细胞毒性:将细胞悬液加入96孔板中,每孔100 μL 。单一用药组(对照组)、联合用药组(观察组)都加入3种PBS或者药液,要求浓度不同,最终的体积是200 μL 。实验的浓度设置3个复孔,再设置2个对照组,一个是不加药物的肿瘤细胞6孔;另一个是没有细胞的空白6孔。培养板的温度设置37℃,在5%CO₂的孵箱内培养72h,然后以5mg/mL的剂量在孔内加入MTT,每孔20 μL ,再培养4h,去掉培养液,然后加入200 μL 的DMSO。振荡培养板,约5min,然后在BIO-RAD酶标仪上获得吸光度(A596/630, OD值)。根据以下公式计算出细胞毒性: $1 - (\text{对照孔OD值} - \text{加药孔OD值}) \times \text{对照孔OD值} \times 100\%$ 。替尼泊苷和卡莫司汀在 $10 \times \text{PPC}$ 的治疗浓度下,细胞毒性 $\geq 80\%$ 判定为敏感; $< 30\%$ 判定为耐药^[3]。

1.2 通过PT-PCR检测mdr-1基因的表达

①提取DNA:采用氯仿超速离心法、异硫氰酸胍和酚等方法提取肿瘤细胞的DNA。②设计引物:采用亚磷酸酯法合成寡核苷酸的引物。mdr-1特异引物:上游引物\下游引物分别为 residues2593-2612 5' GTACCATCATGTGCAATAGC3'; residues2730-27495 'CAACTTCTGCTCCTGAGTC3';扩增片段为157bp,由美国Biolab公司合成。③对照系统:美国国立研究所提供,阳性耐药对照是MCF-7adr细胞系;阴性敏感对照是MCF-7WT细胞系。④分析RT-PCR与PCR产物:PCR扩增完成后,取20%的琼脂糖凝胶和15 μL 的样品,电泳半小时,5V/cm;EB染色,0.08 $\mu\text{L/mL}$;在投射式的紫外灯下查看扩增的区带。

1.3 统计学方法

本研究应用SPSS19.0统计学软件进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验,计数资料以率(%)表示

,组间比较进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑胶质瘤细胞的体外药敏试验比较

以联合用药有效浓度组所对应的A值,得出各种药物的体外敏感值,最终明确患者的体外药敏情况,如表1所示。单一用药和联合用药的体外敏感性比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表1:脑胶质瘤细胞的体外药敏试验比较($\bar{x} \pm s$)

药物	n	耐药		敏感		敏感率
		n	细胞毒性	n	细胞毒性	
替尼泊苷	25	9	20.95 $\pm$ 11.48	6	78.12 $\pm$ 13.46	24.00%
卡莫司汀	25	8	8.87 $\pm$ 6.52	5	80.53 $\pm$ 20.64	20.00%
联合用药组	25	9	31.15 $\pm$ 10.24	13	84.67 $\pm$ 14.21	52.00% [#]

注:与单一用药相比, $P < 0.05$

2.2 mdr-1 mRNA表达和体外药敏试验的关系

25例脑胶质瘤患者,其中肿瘤mdr-1 mRNA阳性表达有9例,阳性率36.00%;mdr-1基因的表达阳性与体外培养耐药的符合率是76.00%(19/25)。通过确切概率法进行处理,敏感组、耐药组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);提示mdr-1 mRNA的表达和体外药敏实验的耐药性有直接关系,如表2所示。

表2:体外药物的敏感性和多药耐药基因

组别	mdr(-)	mdr(+)	合计
敏感组	12	2	14
耐药组	4	7	11
合计	16	9	25

注:体外药敏和mdr-1表达的符合性良好($P < 0.05$)

3 讨论

脑胶质瘤对神经系统的危害极大,而且是浸润性的生长^[4],很难通过手术根治。目前的主流观点认为,应以手术治疗为主,辅以放疗,通过综合治疗提高临床疗效,改善患者的预后。VM26和BCNU都属于低分子、脂溶性的药物,联合用药成分近年来治疗脑胶质瘤的热点研究。有学者对28例脑胶质瘤患者采用足叶己甙与ACNU两种药物进行3个疗程的治疗^[5],所有患者之前已经接受了手术与放射治疗,结果显示,治疗有效率为28.60%,其中2例全部缓解、6例部分缓解,由此认为,联合化疗治疗脑胶质瘤是可行的。

本研究通过MTT比色法对替尼泊苷和卡莫司汀这两种药物对胶质瘤细胞的体外杀伤力进行了测定和评估,接种细胞时,配置了 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,以保证实验条件一致。为了提高光密度值的准确性,在甲瓖颗粒溶解的15min以内完成了MTT比色检测,从而排除因时间不一致而导致的系统误差。

本研究的意义在于:采用体外肿瘤原代细胞培养技术,明确了替尼泊苷和卡莫司汀联合用药对胶质瘤细胞更具有杀伤力,治疗效果比单一用药更好。通过RT-PCR技术,证明了联合用药的耐

(下转第33页)

下床活动时间及住院时间等均较对照组短 ($P<0.05$), 两组比较 差异有统计学意义, 见表 1:

表 1: 观察组与对照组患者手术相关指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	手术时间 (min)	术中出血量 (ml)	术后排气时间 (h)	下床活动时间 (h)	住院时间 (d)
观察组	30	129.26 $\pm$ 13.47	91.69 $\pm$ 12.42	25.37 $\pm$ 4.43	25.42 $\pm$ 3.74	11.27 $\pm$ 1.74
对照组	30	113.63 $\pm$ 12.52	155.26 $\pm$ 11.36	49.42 $\pm$ 6.62	36.48 $\pm$ 4.82	19.38 $\pm$ 3.35
t	/	1.214	11.336	8.026	9.346	10.971
p	/	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 观察组与对照组患者术后并发症发生情况比较

术后随访观察结果显示, 观察组患者中有 1 例出现切口感染, 1 例为肠梗阻, 并发症率为 6.7% (2/30), 与对照组的 23.3% (7/30) 比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2:

表 2: 观察组与对照组患者术后并发症发生情况比较 (%)

组别	例数	切口感染	排尿困难	肠梗阻	并发症发生率 (%)
观察组	95	1 (3.3)	0 (0.0)	1 (3.3)	2 (6.7)
对照组	95	2 (6.7)	2 (6.7)	3 (10.0)	7 (23.3)
χ^2	/	/	/	/	10.831
p	/	/	/	/	<0.05

3 讨论

低位直肠癌是人类常见恶性肿瘤, 具有较高的发病率与死亡率, 且呈现出逐年增高的趋势, 低位直肠癌早期无症状, 或症状不明显, 随着癌肿发展, 症状逐渐出现, 发部位不同其表现出不同的临床症状及体征^[5]。近年来, 腹腔镜技术不断发展, 腹腔镜在结直肠癌手术中也得到了广泛地应用, 其安全性高, 能够达到与传统开腹相同的根治效果, 降低对患者的创伤, 有利于术后恢复^[6]。与传统开腹手术相比, 腹腔镜 Miles 术式尽管手术时间较开腹 Miles 术略长, 但随着腹腔镜手术经验的积累以及临床医师操作配合, 其手术时间也在不断缩短^[7]。与此同时, 腹腔镜手术较开腹手术安全性更高, 其不仅能够减轻患者的手术痛苦, 而且能够减少术后并发症的发生。此次研究观察组患者手术时间与对照组差异无统计学意义, 术后并发症率显著低于对照组 ($P<0.05$), 体现了腹腔镜 Miles 术式治疗的安全性。传统开腹手术会对患者免疫系统功能起到抑制作用, 降低患者机体对肿瘤细胞的免疫力及抵抗力, 增加了肿瘤复发及转移扩散的风险。腹腔镜 Miles 术减少了腹部手术切口, 能够在降低手术创伤的同时避免脏器长时间暴露, 防止腹腔水分流失, 有利于患者术后康复^[8]。在腹腔镜技术支持下, 临床手术操作医师能够获得清晰的手

术视野, 确保了手术的精准操作, 有利于淋巴结的彻底清扫, 提升手术效果。在选择入路方式时能够更加精准, 防止对盆腔神经丛的损伤。术中采用线型切割器对乙状结肠肠管进行离断, 能够防止腹腔感染的发生。综上所述, 对低位直肠癌患者给予腹腔镜 Miles 手术治疗, 创伤小、术后恢复快, 能够减少术后并发症的发生, 疗效确切, 可广泛应用于临床。

参考文献

- [1] 陈振伟, 黄卫华, 徐勇, et al. 腹腔镜和开腹手术方式治疗低位直肠癌的疗效对比及对血浆 miR-21 表达水平的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 24(06):64-67.
- [2] 孙涛, 周鑫, 傅卫, et al. 新辅助放化疗对腹腔镜中低位直肠癌根治术围术期结果的影响 [J]. 中国微创外科杂志, 2017, 15(3):172-173.
- [3] 蒋光富, 陈尚武, 姜明. 腹腔镜辅助 Dixon 手术治疗高龄患者低位直肠癌的临床应用价值 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 12(18):349-350.
- [4] 韩寅, 何勇, 黄进. 腹腔镜全直肠系膜切除术治疗老年中低位直肠癌的近期疗效及安全性评价 [J]. 海南医学, 2017, 26(5):273-274.
- [5] 陈伟平, 李其肯, 范永田, et al. 中低位直肠癌腹腔镜与开放全系膜切除合并侧方淋巴结清扫围术期临床分析 [J]. 肿瘤防治研究, 2017, 15(6):182-183.
- [6] 蔡鹏, 刘浩, 王凯, et al. 折刀位腹腔镜 Miles 术与截石位腹腔镜 Miles 术治疗低位直肠癌效果比较 [J]. 山东医药, 2018, 58(9):61-63.
- [7] 张宜江. 经肛拖出式全腹腔镜直肠前切除术在中低位直肠癌中的应用体会 [J]. 结直肠肛门外科, 2017, 26(02):52-55.
- [8] 李叶骋, 张德保, 邢春根. 两种腹腔镜手术在低位直肠癌前切除术中的应用 [J]. 医学临床研究, 2017, 34(12):173-174.

(上接第 30 页)

^[5]。从本次研究结果看, 观察组患者手术效果优于对照组, 安全性更高, 且新生儿 Apgar 评分优于对照组, 并发症率低于对照组, 说明围术期护理能够确保手术安全性, 减少手术创伤, 降低并发症率。综上所述, 对凶险性前置胎盘患者给予围术期护理, 有利于手术的顺利进行, 减少出血量, 促进术后恢复, 且并发症少, 可予以推广应用。

参考文献

- [1] 姚红爱, 王波, 马世颖, 等. 目标导向性液体治疗对凶险性前置胎盘患者围术期容量及凝血功能的影响 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(3):446-449.

(上接第 31 页)

药机制或许是多药耐药基因表达, 为联合化疗治疗提供了实验依据。

参考文献

- [1] 徐立新, 张伟, 师忠芳, 等. 人脑胶质瘤培养组织对化疗药物的敏感性 [J]. 武警医学, 2018, 29(7):660-662, 666.
- [2] 颜建辉, 梁永, 王家祺, 等. 替莫唑胺联合替尼泊苷治疗恶性胶质细胞瘤的临床疗效分析 [J]. 肿瘤药学, 2014, (3):207-210.
- [3] 李刚, 王樑, 贺世明, 等. 基于分子检测的奥沙利铂与替

- [2] 杨凌艳, 傅玲. 凶险性前置胎盘行双侧髂内动脉球囊预置剖宫产术患者的护理 [J]. 护理学杂志, 2017, 32(18):52-54.
- [3] 张素萍, 张洪莉, 张雅娟, 等. 多学科合作在凶险性前置胎盘孕产妇围术期管理的效果分析 [J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(8):979-982.
- [4] 蒋玉蓉, 唐雅兵, 游一平, 等. 凶险型前置胎盘合并胎盘植入 64 例围手术期综合治疗疗效分析 [J]. 实用妇产科杂志, 2018, 34(3):227-230.
- [5] 李娟, 付金红, 张慧娟, 等. 凶险性前置胎盘发生率及对妊娠结局影响的回顾性研究 [J]. 河北医药, 2017, 39(20):3078-3081.

尼泊苷联合治疗脑胶质瘤近期疗效分析 [C].// 中华医学会神经外科学分会第九次学术会议论文集. 2010:139-139.

- [4] 刘岱, 吉华平. 肿瘤切除术联合卡莫司汀缓释植入剂治疗高级别脑胶质瘤的临床研究 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2017, 25(7):429-433.
- [5] 林小祥, 李剑侠, 郭晓远. 白介素 13 介导的卡莫司汀聚合物胶束靶向性治疗脑胶质瘤研究 [J]. 药学与临床研究, 2016, 24(4):273-277.