

. 论 著 .

# 替莫唑胺联合放疗对体外原代培养的胶质瘤细胞 Ki-67 表达的影响

吴 科 唐树军 魏剑波 黄志刚 王代文

**【摘要】目的** 探讨替莫唑胺同步放化疗对脑神经胶质瘤病人生存质量的影响以及放疗联合替莫唑胺处理对体外原代培养胶质瘤细胞 Ki-67 表达的影响。**方法** 2013 年 10 月至 2016 年 8 月收治恶性脑神经胶质瘤 114 例,分为对照组(n=57)与观察组(n=57)。所有病人都接受手术治疗。对照组术后 4 周接受安慰剂+放疗;观察组在放疗基础上采用替莫唑胺同步化疗。对照组和观察组术中各留取两份肿瘤组织,一份 4 h 后直接测定 Ki-67 表达情况。对照组另一份经放疗处理后测定 Ki-67 表达情况。观察组另一份经过替莫唑胺放、化疗处理后测定 Ki-67 表达。**结果** 治疗前,观察组和对照组生存质量评分分别为(32.67±3.32)分、(32.69±3.29)分,两组无统计学差异(P>0.05)。治疗后,观察组和对照组生存质量评分分别为(43.40±3.26)分、(38.37±5.99)分,较治疗前均明显增高(P<0.05),而且,观察组增加更明显(P<0.05)。两组不良反应总发生率无统计学差异(P>0.05)。放、化疗两处理前,观察组和对照组 Ki-67 阳性表达率分别为 71.93(41/57)、73.68(42/57),两组无统计学差异(P>0.05)。放、化疗两处理前,观察组 Ki-67 阳性表达率(24.56%, 14/57)明显低于对照组(43.68%, 25/57;P<0.05)。**结论** 替莫唑胺同步放化疗可显著改善脑神经胶质瘤病人生存质量,可能与降低 Ki-67 表达水平有关。

**【关键词】** 脑神经胶质瘤;同步放化疗;替莫唑胺;生存质量;Ki-67

**【文章编号】** 1009-153X(2017)05-0322-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

## Effect of radiotherapy combined with temozolomide on Ki-67 expression levels in primary cultured malignant glioma cells

WU Ke, TANG Shu-jun, Wei Jian-bo, HUANG Zhi-gang, WANG Dai-wen. Department of Neurosurgery, the Central Hospital of Panzihua City, Panzihua 617000, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of postoperative radiotherapy and simultaneous temozolomide on the survival quality in the patients with gliomas and treatment of radiotherapy combined with temozolomide on Ki-67 expression levels in primary cultured malignant glioma cells. **Methods** One hundred and fourteen patients with malignant cerebral gliomas were randomly divided into two groups, i.e. control group (n=57), in which the patients received radiotherapy and observed group (n=57), in which the patients received chemotherapy with temozolomide on the basis of radiotherapy after the surgery for the gliomas. The gliomas tissues derived from the patients of each group were divided into two equal parts, of which, one as used for determination of Ki-67 expression and the other for the tissues culture. The cultured glioma tissues were derived into two groups, i.e. radiotherapy group, in which Ki-67 expression was determined in the cultured tissues after the radiotherapy and radiochemotherapy group in which Ki-67 expression was determined in the cultured tissues after the radiotherapy and chemotherapy with temozolomide. The survival quality was assessed by survival quality score before and after the treatment in all the patients. **Results** The survival quality scores [(43.40±3.26) points] were significantly higher in the observed group than that [(38.37±5.99) points] in control group after the treatment (P<0.05). The positive rate of Ki-67 expression (24.6%) was significantly lower in the radiochemotherapy group than that (43.86%) in the radiotherapy group (P<0.05). There was insignificant difference in the incidences of adverse reactions between the observed group and control groups (P>0.05). **Conclusions** It is suggested that the radiotherapy combined with chemotherapy with temozolomide may increase the survival quality in the patients with malignant gliomas and decrease Ki-67 positive expression in the gliomas tissues.

**【Key words】** Malignant cerebral glioma; Temozolomide; Radiochemotherapy; Survival quality; Ki-67; Expression

脑神经胶质瘤具有较高的发病率,严重威胁人类健康。目前,临床常采用手术治疗,但效果不佳<sup>[1]</sup>;

术后辅助替莫唑胺同步放化疗,可有效提高临床疗效,降低复发率<sup>[2]</sup>。本文探讨替莫唑胺联合放疗对体外原代培养的胶质瘤细胞 Ki-67 表达的影响。

## 1 资料与方法

1.1 病人与分组 2013 年 10 月至 2016 年 8 月收治恶性脑神经胶质瘤 114 例,分为对照组(n=57)与观察

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.05.013

基金项目:四川省卫生厅科研基金项目(110503)

作者单位:617000 四川,攀枝花市中心医院神经外科(吴科、唐树军、魏剑波、黄志刚、王代文)

组( $n=57$ )。对照组男 28 例,女 29 例;年龄 32~65 岁,平均( $45.38\pm 3.55$ )岁;WHO 分级Ⅲ级 30 例(间变少突胶质细胞瘤 17 例,间变星形细胞瘤 13 例),Ⅳ级 27 例(胶质母细胞瘤 23 例,髓母细胞瘤 4 例)。观察组男 32 例,女 25 例;年龄 24~67 岁,平均( $35.74\pm 3.49$ )岁;WHO 分级Ⅲ级 31 例(间变少突胶质细胞瘤 19 例,间变星形细胞瘤 12 例),Ⅳ级 26 例(胶质母细胞瘤 21 例,髓母细胞瘤 5 例)。本研究通过我院伦理委员会的批准。两组一般资料差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 1.2 病例入选标准

1.2.1 纳入标准 ①组织病理学证实为脑神经胶质瘤;②临床资料完整;③年龄为 30~68 岁;④KPS 评分  $>60$  分;⑤近期无放疗或立体定向干预;⑥未接受其他靶向药物治疗及化疗;⑦骨髓功能良好;⑧对本研究知情,并签署知情同意书。

1.2.2 排除标准 ①复发多形性脑胶质瘤;②患有严重精神疾病;③放疗前白细胞计数  $<4\times 10^9/L$ ,血红蛋白  $<100\text{ g/L}$ ,血小板计数  $<100\times 10^9/L$ ;④妊娠及哺乳期妇女;⑤合并有严重肝、肾及血液系统原发性疾病。

## 1.3 治疗方法

1.3.1 手术治疗 所有病人均接受手术治疗。根据 MRI 影像确定肿瘤位置并开颅入路。

1.3.2 对照组 术后 4 周左右接受安慰剂+放疗,应用调强放疗及三维适形放疗技术,采用 6MV-X 线加速器实施射线照射,放疗剂量为 2 Gy/d,每周 5 次;安慰剂(成都大西南制药股份有限公司,批号 061001)外观与替莫唑胺一致,1 粒/次,1 次/d,用药方法、疗程与观察组一致。

1.3.3 观察组 在放疗基础上采用替莫唑胺同步化疗,口服,75 mg/( $\text{m}^2\cdot\text{d}$ ),从放疗第一天连续应用至放疗结束。放疗结束 4 周后开始辅助化疗,第 1 周期剂量为 150 mg/( $\text{m}^2\cdot\text{d}$ ),28 d 为 1 个疗程(连续使用 5 d 停药 23 d)。辅助化疗 6 个疗程,对于疗效较好者可适当增加 1~2 个疗程。治疗期间,根据病人血小板及中性粒细胞数量的变化调整替莫唑胺剂量。

1.4 标本处理 术中留取对照组和观察组各两份同样的病理组织,将手术切除的新鲜肿瘤标本放入生理盐水中清洗,在显微镜下剔除坏死及电凝组织。同一病人的两份标本中取一份浸泡在 10% 福尔马林中固定,保存在液氮中,4 h 后直测定 Ki-67 表达情况。对照组另一份经放疗处理后测定 Ki-67 表达情况。观察组另一份经过替莫唑胺放、化疗处理,具体

方法如下<sup>[3]</sup>:采用含链霉素、青霉素的无血清 RPMI-1640 培养液清洗标本 3~5 遍,应用无菌眼科剪将肿瘤剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 左右。吸管反复吹打后应用不锈钢网研磨过滤,将单个细胞悬液收集至离心管,以 1 000 转/min 离心 5~10 min,弃去上清,加入含有 10% 血清的 RPMI-1640 培养液混匀后再离心 5~10 min,重复操作 3 次。加入含有 20% 血清的 RPMI-1640 培养液进行活细胞计数,配制成细胞悬液( $1\times 10^5$  个/ml)。按每孔 190  $\mu\text{l}$  接种于 96 孔培养板中,观察组加入浓度为 18  $\mu\text{g/ml}$  的替莫唑胺,放置于 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 24 h。从培养箱中取出 96 孔培养板进行放疗,根据放射等效剂量计算得出计划靶区 1 放疗剂量为 9 Gy,计划靶区 2 放疗剂量为 6 Gy,共放疗 3 d。对照组接受单纯放疗处理,放疗方法、剂量、时间与观察组一致。

1.5 观察指标 ①生存质量。参考癌症病人生命质量测定量表,结合恶性脑神经胶质瘤相关症状及放化疗不良反应制定生存质量调查问卷,包括躯体活动、社会关系、情感认知、总体健康及症状 5 个方面,总分 0~50 分,得分越高表明生存质量越好<sup>[4]</sup>。② Ki-67 表达。采用 S-P 免疫组化法测定,操作步骤严格按照试剂盒说明进行,阳性对照用已知阳性片,阴性对照省略一抗,以 PBS 代替。Ki-67 的阳性着色主要位于细胞核,呈棕黄色或棕褐色染色为阳性<sup>[5]</sup>。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行处理,计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示,采用  $t$  检验;计数资料采用  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 生存质量评分 治疗前,观察组和对照组生存质量评分分别为 ( $32.67\pm 3.32$ ) 分、( $32.69\pm 3.29$ ) 分,两组无统计学差异( $P>0.05$ )。治疗后,观察组和对照组生存质量评分分别为 ( $43.40\pm 3.26$ ) 分、( $38.37\pm 5.99$ ) 分,较治疗前均明显增高( $P<0.05$ ),而且,观察组增加更明显( $P<0.05$ )。

2.2 不良反应 观察组发生腹泻 2 例,恶性、呕吐 7 例,头晕 2 例,肝肾功能异常 1 例,骨髓抑制 14 例,疲乏 11 例;对照组发生腹泻 3 例,恶性、呕吐 5 例,头晕 5 例,肝肾功能异常 1 例,骨髓抑制 12 例,疲乏 9 例;两组不良反应总发生率无统计学差异( $P>0.05$ )。

2.3 Ki-67 表达 放、化疗两处理前,观察组和对照组 Ki-67 阳性表达率分别为 71.93 (41/57)、73.68 (42/57),两组无统计学差异( $P>0.05$ )。放、化疗两处理前,观察组 Ki-67 阳性表达率 (24.56%, 14/57) 明显低

于对照组(43.68%, 25/57;  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

因脑神经胶质瘤的占位效应会对病人脑区功能产生巨大影响,产生视物模糊、运动功能障碍等临床表现,妨碍病人正常生活及工作。由于浸润性生长是脑神经胶质瘤的生长特点,与正常脑组织的界限不明显,故手术完全切除困难。随着临床对肿瘤机制及生物学认识的不断加深,免疫治疗、化疗及基因治疗等成为研究的热点及重点<sup>[6]</sup>。

近年来,化疗被广泛应用于脑神经胶质瘤的临床治疗中,理想的化疗药物应具备以下几个特点,如能在肿瘤部位特异性分布、毒副作用小、广谱高效等。替莫唑胺是一种新型烷化剂,具有可透过血脑屏障、特异性高、针对性强、服药方法简便、生物利用度高及毒副作用小等优点,可作为中枢神经系统肿瘤化疗首选药物<sup>[7]</sup>。替莫唑胺通过碱催化作用,代谢 5-(3-甲基三氮烯-1-基)咪唑-4-酰胺,形成甲基重氮阳离子,使腺嘌呤 N3 及鸟嘌呤 O6、N7 出现甲基化,从而促使细胞毒性作用的产生;同时替莫唑胺能快速通过血脑屏障,进入脑脊液<sup>[8]</sup>。替莫唑胺毒性作用发生部位与传统烷化剂极为相似,主要发生于肠胃道、骨髓、睾丸及淋巴系统,包括中性粒细胞减少、血小板减少症等,但替莫唑胺安全性更高,骨髓抑制、恶心呕吐主要为轻、中度,大部分在对症治疗后 2 周内即可恢复。替莫唑胺可显著增加病人对放疗敏感性,肿瘤细胞对放疗最敏感为 G<sub>2</sub>~M 期,而其可以诱导肿瘤细胞停留于 G<sub>2</sub>~M 期,从而导致肿瘤细胞不断凋亡。Ki-67 是一种核蛋白质,在正常脑组织中 Ki-67 无表达,主要分布于增殖周期的细胞核中,是一种细胞增殖标记物<sup>[9,10]</sup>。Ki-67 蛋白标记指数可反映肿瘤细胞的增殖活性,有效评价肿瘤生物学行为。本研究表明术后辅助替莫唑胺同步放化疗,明显提高疗效;而且,替莫唑胺联合放疗明显增高体外原代培养的脑神经胶质瘤细胞 Ki-67 阳性表达率。与单纯放疗、化疗相比,同步放化疗往往可取得更好疗效,分析原因为同步放化疗可缩短疗程,在一定程度上减少肿瘤细胞的再增殖,且部分化疗药物具有放射增敏作用;放疗后肿瘤体积缩小,化疗药物更易于释放进入肿瘤中,对化疗具有一定程度增敏作用,同时当放疗达到一定剂量时,会损伤血脑屏障,而化疗药物可通过血脑屏障进行脑内,从而提高疗效;放疗、化疗可作用于细胞的不同时相,具有协同作用,且采用替莫唑胺同步放化疗后继续辅助化疗,可巩

固疗效,进一步杀灭体内残留的肿瘤细胞,降低复发率。

总之,本研究发现替莫唑胺联合放疗可有效降低体外原代培养的胶质瘤细胞 Ki-67 阳性表达水平,为临床更好的治疗脑神经胶质瘤提供依据。由于本研究样本数量较少、观察时间有限,未对不同级别脑神经胶质瘤 Ki-67 表达情况及远期生存率进行研究,临床需加大样本数量、延长观察时间继续深入探讨。

### 【参考文献】

- [1] 薛贵生,扈玉华,吴建梁,等. 不同级别恶性脑胶质瘤中胰岛素样生长因子结合蛋白-3 的表达差异[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(5): 1069-1071.
- [2] 伍碧武,张义,汪洋,等. 显微外科手术治疗丘脑胶质瘤及预后分析[J]. 中华神经外科杂志, 2015, 31(12): 1201-1205.
- [3] 张惊宇,张力娜,郑永慧,等. 体外原代培养脑胶质瘤细胞对化疗药物敏感性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(21): 6023-6024.
- [4] 尹琴,李琼颖,毛洁敏,等. 自我管理教育对胶质瘤术后化疗患者生活质量的影响[J]. 上海护理, 2014, 14(3): 9-12.
- [5] 张文学,孙健,曹永珍,等. 采用不同边界适形调强放疗结合替莫唑胺化疗治疗恶性胶质瘤的近期疗效观察[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(31): 2522-2525.
- [6] 毛彦彬,曹玮,张志辉,等. 神经胶质瘤中 PTEN、Ki-67 和 HIF-1 $\alpha$  的表达及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(10): 1907-1910, 1870.
- [7] 郭旗,田野. 放疗对低级别脑胶质瘤患者认知功能的影响及防治方法[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2015, 35(5): 397-400.
- [8] 高乃康,呼格吉乐,韩艳秋. 新靶点细胞周期蛋白 E 干扰 RNA 对人脑胶质瘤细胞增殖及侵袭的影响[J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2014, 7(3): 161-165.
- [9] 李根华,冯嵩,刘阳,等. 替莫唑胺对胶质瘤干细胞抗凋亡与多重耐药基因及细胞周期的影响[J]. 中华神经外科杂志, 2015, 31(7): 3212.
- [10] 赵亚群,王永,杨辉,等. 垂体腺瘤侵袭性与 galectin-3 蛋白表达及 Ki-67 标记指数的关系[J]. 中国临床神经外科杂志, 2009, 14(7): 415-417, 421.

(2016-12-08 收稿, 2017-03-17 修回)