

外周血淋巴细胞放射敏感性检测在预测肿瘤放疗导致的正常组织损伤中的应用

牛小爽 综述 刘勇 孔琳 审核

复旦大学附属肿瘤医院放疗科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 正常组织的放射损伤存在个体差异, 对于放射敏感性高的患者, 标准剂量的放疗便可能引起严重的放射损伤, 而对于正常组织耐受性较好的患者, 还有提高放疗剂量的空间, 如果能提高对这部分患者的放疗剂量, 则可以进一步提高肿瘤控制率。因此, 如何在治疗前用简便、准确的方法预测正常组织放射敏感性以及放疗出现的放射损伤风险实现个体化放疗有着重要的临床意义。通过检测射线导致的淋巴细胞中DNA或染色体损伤程度、凋亡情况、遗传变异来分析放射敏感性以及正常组织放射损伤有其自身的优势。现就外周血淋巴细胞放射敏感性检测在预测肿瘤放疗导致的正常组织损伤中的研究进展作一综述。

[关键词] 外周血淋巴细胞; 正常组织损伤; 放射敏感性; 放疗

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.01.010

中图分类号: R730.55 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)01-0057-05

Prediction of peripheral blood lymphocytes radiosensitivity in normal tissue radiation damage in oncology patients with radiotherapy NIU Xiao-shuang, LIU Yong, KONG Lin (Department of Radiation Oncology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: KONG Lin E-mail: konglinj@gmail.com

[Abstract] Patients treated with radiotherapy (RT) might experience a large variation in normal tissues. Severe radiation damage in a minority of patients limits the doses that might be safe given to the majority. The possibility of predicting such radiation-induced damage would provide a better treatment schedule for the patients. Several predictive tests in peripheral blood lymphocytes such as initial DNA damage, radiation-induced apoptosis and genetic variation have been proposed to know the individual sensitivity of patients to the radiotherapy schedules. This study aimed to summarize the main studies regarding to this field.

[Key words] Peripheral blood lymphocytes; Normal tissue damage; Radiosensitivity; Radiotherapy

放疗是肿瘤治疗的主要手段之一。多项临床研究证实, 提高肿瘤放疗剂量可改善肿瘤控制率, 然而肿瘤周围正常组织损伤限制了处方剂量给予。正常组织放射损伤存在个体差异, 个体正常组织耐受剂量往往不同, 对于放射敏感性高的患者, 标准剂量的放疗便可能引起严重的放射损伤, 影响患者的生活质量, 甚至危及患者生命。而对于正常组织耐受性较好的患者, 还有提高放疗剂量的空间, 如果能提高这部分患者的放疗剂量, 则可以进一步提高肿瘤控制率。因此, 根据个体不同的正常组织放射敏感性制定相对应的放

疗计划具有重要的临床意义^[1-2]。如何在治疗前用简便、准确的方法预测正常组织放射敏感性以及放疗出现的放射损伤风险, 对实现个体化放疗有着重要的参考价值。通过检测射线导致的淋巴细胞中DNA或染色体损伤程度、凋亡情况、遗传变异来分析放射敏感性以及正常组织放射损伤有其自身的优势并已日益受到重视。

1 正常组织放射损伤预测方法研究现状

放疗引起的正常组织损伤是一个动态的、渐进的过程, 这其中基因参与的DNA或染色体损伤、信号传导、细胞凋亡及炎症反应过程等在正常组织损伤过程中起到关键作用^[2-3]。正常组

织放射损伤的影响因素很多, 包括放疗方式(如放疗剂量、分割剂量、总治疗时间等), 其他治疗方式的影响(如化疗、手术等), 个体差异(如年龄、生活方式、是否有基础疾病等)和遗传因素^[4-5]。这其中70%~80%取决于遗传因素^[6-7], 从而为其预测正常组织放射损伤奠定基础。染色体是遗传物质的载体并含有生物体全部的遗传信息, 染色体遗传信息不同可不同程度地影响生物体的放射敏感性。成纤维细胞曾是预测放射敏感性与放射损伤的研究热点, 但由于大量验证试验结果为阴性, 加上培养周期长、培养难度大等缺点, 导致该类研究已逐渐减少^[8]。通过检测放射损伤相关基因的表达也可预测放射损伤, 但由于基因的组织取样存在不便性, 且基因的表达随时间变化明显, 因此作为预测指标, 其稳定性和可靠性较差^[9]。

淋巴细胞具有高度的放射敏感性, 并在放射损伤检测中有着自身的优点, 例如体外试验放射反应效应与体内试验高度一致、持续的全身循环可以反应全身射线的吸收剂量、易于获取和处理等^[5,10-11], 可以作为载体观察射线对于染色体的影响。因此, 通过检测射线导致的淋巴细胞中DNA或染色体损伤程度、凋亡情况、遗传变异来分析放射敏感性以及正常组织放射损伤已日益受到重视。一项前瞻性研究显示, 淋巴细胞的放射敏感性是预测宫颈癌放疗时正常组织放射损伤的独立因素, 并且佐证了遗传因素是正常组织放射损伤的决定因素^[7]。

2 外周血淋巴细胞研究在预测正常组织放射损伤中的应用

2.1 外周血淋巴细胞DNA或染色体损伤在预测正常组织放射损伤中的应用

放射线主要作用于靶细胞的DNA, 引起DNA单链或双链断裂, 使细胞分裂受到阻碍, 引起损伤修复、染色体断裂或缺失、细胞凋亡等。相同照射剂量下, 射线引起的DNA双链断裂越多, 染色体损伤越严重, 则DNA受损的细胞凋亡越多, 细胞存活率越低, 放疗反应就越强, 放射敏感性也就越高。因此, 射线造成靶

细胞DNA或染色体损伤程度与其放射敏感性一致^[12-14]。通过检测射线导致的DNA或染色体损伤程度来分析细胞放射敏感性以及正常组织放射损伤已日益受到重视, 目前应用较多的检测方法有克隆形成法、松胞素阻滞微核法、彗星法、染色体畸变法等。克隆形成法是检测放射敏感性的“金标准”, 它是研究不同剂量的射线在照射细胞时出现的增殖性死亡后形成的有效克隆数^[15]。但由于克隆形成法有操作复杂、时间长、易污染、原代细胞培养不易成功、失败率高等缺点, 限制临床的推广。在其他几种检测方法中, Cao等^[16]在9例单纯放疗的鼻咽癌患者外周血检测中, 发现松胞素阻滞微核法(cytokinesis-block micronucleus assay, CBMNA)是最敏感检测方法, 优于彗星法及染色体畸变法, 推荐外周血淋巴细胞CBMNA为检测放射后染色体损伤的首选方法。

微核是异常有丝分裂的产物, 它是由细胞有丝分裂时未进入主核的染色体断片或整条染色体形成; CBMNA是在体外培养淋巴细胞后加入松胞素B, 通过抑制胞浆运动而不影响细胞核的分裂出现双核淋巴细胞, 进而检测靶细胞受射线照射或化学物损伤后第一次核分裂出现双核淋巴细胞时染色体损伤的程度。CBMNA具有操作简便、快速、灵敏度极高、可观察细胞形态等优点, 已成功用于正常组织辐射损伤、肿瘤组织放疗反应等检测^[11-12,17]。Widel等^[18]在放疗前对55例单纯放疗的宫颈癌患者外周血照射0、2、4 Gy时行CBMNA检测, 随访37(4~77)个月, 发现4 Gy时微核率与严重的早期和晚期正常组织放射损伤分别呈线性相关($r=0.681$, $P<0.000$; $r=0.701$, $P<0.000$)。Lee等^[19]在放疗前检测38例前列腺癌患者外周血照射1~4 Gy的CBMNA微核率, 随访(32.8±4.6)个月, 比较直肠反应I级及以下者与II级及以上者发现, 微核率在照射2 Gy以上时差异有统计学意义, 提示放疗前CBMNA微核率可预测前列腺癌患者正常组织放射损伤。

虽然外周血淋巴细胞松胞素阻滞微核法在预测正常组织放射损伤中有很多阳性结果, 但

由于微核率在轻、重度正常组织放射损伤之间有重叠,无法根据制定微核率标准来划分正常组织放射损伤的程度;以往的研究多在单一肿瘤上,CBMNA在未观察的肿瘤中是否有预测价值还无从得知;同时由于试验的样本量较小,使得试验结果存在偏倚,从而使外周血淋巴细胞CBMNA预测正常组织放射损伤没有常规应用于临床。

2.2 外周血淋巴细胞中放射诱导凋亡在预测正常组织放射损伤中的应用

放射诱导细胞凋亡是一个极其复杂的过程,在正常组织放射损伤中起到重要作用。在一定的照射剂量范围内,凋亡是射线诱导细胞死亡的主要途径,它涉及细胞内信号传递、基因表达、酶活化以及蛋白质合成等一系列细胞代谢的主动过程^[20-21]。正常组织的放射损伤与放射诱导凋亡存在密切相关性,采用流式细胞仪检测外周血淋巴细胞放射诱导凋亡来评估正常组织放射损伤已取得了一定的认可。Ozsahin等^[22]对399例不同肿瘤患者放疗前抽取的外周血进行0、8 Gy照射,分别分析CD4+、CD8+T淋巴细胞凋亡与正常组织放射损伤的相关性,发现放射诱导淋巴细胞凋亡与2、3级晚期正常组织放射损伤呈负相关($P<0.000$),并且CD8+T淋巴细胞比CD4+T淋巴细胞具有更好的敏感性和特异性。Bordón等^[23-25]进行一系列针对放射诱导淋巴细胞凋亡与正常组织放射损伤关系的研究。作者对94例宫颈癌患者放疗前外周血淋巴细胞照射1、2、8 Gy,分别在培养24、48、72 h后进行凋亡检测,所得到的结果与放射诱导细胞凋亡的数学模型(RIA)= $\beta\ln(\text{Gy})+\alpha$ 相吻合,其中 α 为Y轴的截距并表示自发性细胞凋亡的百分数, β 为曲线的斜率并表示特定照射剂量下的细胞凋亡百分数($\beta = \Delta\text{RIA}/\Delta\ln(\text{Gy})$)。 β 值越高(即特定照射剂量下的放射诱导凋亡率越高),正常组织晚期放射损伤发生率越低^[23]。作者又分别对不同淋巴细胞亚群即CD4+、CD8+T细胞、B细胞、NK细胞进行分析,发现CD8+T细胞和B细胞的 β 值与正常组织晚期放射损伤发生率呈负相关,并提出B淋巴细胞凋亡对正常组织

晚期放射损伤的预测作用^[24]。另外,在头颈部肿瘤中,作者也得到了类似的结果,即 β 值与口干的发生率呈负相关^[25]。虽然作者的数学模型在不同的肿瘤中得到了证实,但该模型能否在临床上推广,还需要大规模随机临床研究进行验证。

2.3 外周血淋巴细胞遗传变异在预测正常组织放射损伤中的应用

如前所述,正常组织放射损伤取决于遗传因素。其有力的证据来源于对一些少见的基因综合征患者的研究,如Bloom's综合征、共济失调性毛细血管扩张症(ataxia telangiectasia, AT)等,这部分患者都表现出放射敏感性增加,且都有与DNA损伤或修复相关的基因突变。而类似的DNA损伤或修复相关的基因突变也见于对放疗极敏感但并未患基因综合征的患者^[26-28]。多项研究希望通过对DNA损伤、修复基因的多态性与放射性损伤之间的关系来了解放射性损伤的分子机制并建立可靠的放射损伤预测模型。在淋巴细胞中,Mayer等^[29]对有严重急性放射损伤的4例头颈部肿瘤和8例乳腺癌患者与匹配的12例正常反应患者进行了双盲研究,发现67个辐射诱导基因可以区分严重急性放射损伤与正常反应的患者;Svensson等^[30]在头颈部肿瘤中对有严重晚期放射损伤的21例和正常反应的17例患者进行研究,发现了14个与放疗后正常组织损伤最相关的通路。但由于这方面的研究相对较少,受到细胞类型、基因芯片分析方法、放疗方案、试验设计等的影响,结果也有很大差异,还需要大量的研究来补充和验证。

个体间基因水平相差不大,遗传差异主要体现在DNA序列上核苷酸残基种类和数目,其中最主要的类型是单核苷酸多态(single nucleotide polymorphisms, SNP)。SNP既可以通过改变氨基酸组成影响所编码蛋白质的结构和功能,也可以改变顺式作用元件序列使基因在转录和翻译水平发生变化,同时由于SNP广泛存在于整个基因组,满足理想分子标

志物的要求, 逐渐成为预测疗效和毒性的遗传标志以实现个体化治疗的研究热点^[31-32]。ATM、XRCC1、TGF- β 1、BRCA1/2、GSTP1、ERCC2、SOD2和DNA ligaseIV等基因的SNPs与正常组织的放射损伤相关, 是目前有关放射性损伤研究的活跃领域。但是受到样本量等的限制, 目前的数据并不具备普遍的代表性, 有些研究的结果甚至是矛盾的。到目前为止, 还不能确定一个具有显著临床应用价值的预测正常组织放射损伤的标志物。随着全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)、国际放射基因组学联盟等的出现, 大样本量的研究、标准化的分析和统计方法的应用, 将会有更多更确定的标志物被发现, 为寻找具有良好临床利用价值的正常组织放射损伤的标志物提供理论基础。

2.4 外周血淋巴细胞联合预测模型的应用

外周血淋巴细胞放射诱导凋亡与DNA或染色体损伤在预测正常组织放射损伤中都得到阳性了结果, 那么这两种检测方法是否相关, 联合应用能否更好地服务于临床呢? 这种猜测在以下的试验中得到证实。Pinar等^[33]在对26例乳腺癌患者外周血淋巴细胞照射1、2、8 Gy后分别进行DNA损伤和放射诱导凋亡检测时发现, 3种照射剂量的两种检测方法呈显著的负相关。Henríquez-Hernández等^[34]对这些患者进行了长期随访(平均197个月), 发现DNA损伤低于2/3检测值并且放射诱导凋亡高于1/3检测值的患者, 可以定义为放射抵抗患者, 他们在高剂量照射时表现出低的晚期正常组织放射损伤。该研究提出了两种检测方法的相关性, 并为两种方法联合预测正常组织放射损伤提供依据。

3 小结

正常组织敏感性评估对实现个体化放疗有着重要的参考价值。在治疗前用简便、准确的方法预测放射敏感性以及放疗出现的放射损伤, 对减少无效和过度治疗具有重要临床意义。通过检测射线导致的淋巴细胞中DNA或染色体损伤程度、凋亡情况、遗传变异来分析放射敏感性以及正常组织放射损伤已取得了一定

的认可。但受到样本量等的限制, 目前的数据并不具备普遍的代表性, 研究的检测方法还不能应用于临床。尽管如此, 现有的研究结果可以为今后的工作方向起到提示作用。未来在正常组织放射损伤相关性的研究中, 需要进一步扩大样本量、进行严格的随机对照研究验证外周淋巴细胞预测正常组织放射敏感性, 以指导临床的可行性。

[参 考 文 献]

- [1] GREGOIRE V, JERAJ R, LEE J A, et al. Radiotherapy for head and neck tumours in 2012 and beyond: conformal, tailored, and adaptive? [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13: e292-e300.
- [2] BARNETT G C, WEST C M, DUNNING A M, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 134-142.
- [3] GHAZALI N, SHAW R J, ROGERS S N, et al. Genomic determinants of normal tissue toxicity after radiotherapy for head and neck malignancy: a systematic review [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48: 1090-1100.
- [4] AZRIA D, BETZ M, BOURGIER C, et al. Identifying patients at risk for late radiation-induced toxicity [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012, 84 Suppl 1: e35-e41.
- [5] HENRIQUEZ-HERNANDEZ L A, BORDON E, PINAR B, et al. Prediction of normal tissue toxicity as part of the individualized treatment with radiotherapy in oncology patients [J]. *Surg Oncol*, 2012, 21: 201-206.
- [6] PEACOCK J, ASHTON A, BLISS J, et al. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy [J]. *Radiother Oncol*, 2000, 55: 173-178.
- [7] WEST C M, DAVIDSON S E, ELYAN S A, et al. Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 51: 10-15.
- [8] BENTZEN S M. From cellular to high-throughput predictive assays in radiation oncology: challenges and opportunities [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2008, 18: 75-88.
- [9] POPANDA O, MARQUARDT J U, CHANG-CLAUDE J, et al. Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation [J]. *Mutat Res*, 2009, 667: 58-69.
- [10] FENECH M, CHANG W P, KIRSCH-VOLDERS M, et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures [J]. *Mutat Res*, 2003, 534: 65-75.
- [11] LEE T K, ALLISON R R, O' BRIEN K F, et al. Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation [J]. *Mutat Res*, 2004, 557: 75-84.
- [12] HOELLER U, BORGMANN K, BONACKER M, et al.

- Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer [J]. *Radiother Oncol*, 2003, 69: 137-44.
- [13] HENRIQUEZ-HERNANDEZ L A, PINAR B, CARMONA-VIGO R, et al. Common genomic signaling among initial DNA damage and radiation-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes from locally advanced breast cancer patients [J]. *Breast*, 2013, 22: 28-33.
- [14] WEST C M, DUNNING A M, ROSENSTEIN B S. Genome-wide association studies and prediction of normal tissue toxicity [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2012, 22: 91-99.
- [15] BJORK-ERIKSSON T, WEST C, KARLSSON E, et al. Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 46: 13-19.
- [16] CAO J, LIU Y, SUN H, et al. Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy [J]. *Mutat Res*, 2002, 504: 85-90.
- [17] BONASSI S, EL-ZEIN R, BOLOGNESI C, et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies [J]. *Mutagenesis*, 2011, 26: 93-100.
- [18] WIDEL M, JEDRUS S, LUKASZCZYK B, et al. Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy [J]. *Radiat Res*, 2003, 159: 713-721.
- [19] LEE T K, ALLISON R R, O' BRIEN K F, et al. Lymphocyte radiosensitivity correlated with pelvic radiotherapy morbidity [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 57: 222-229.
- [20] BARBER J B, WEST C M, KILTIE A E, et al. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy [J]. *Radiat Res*, 2000, 153: 570-578.
- [21] 钟军, 熊戴群, 罗辉, 等. 肿瘤细胞放射敏感性与放射诱导凋亡关系的研究 [J]. *实用癌症杂志*, 2007, 22: 560-564, 568.
- [22] OZSAHIN M, CROMPTON N E, GOURGOU S, et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 7426-7433.
- [23] BORDÓN E, HENRIQUEZ H L, LARA P C, et al. Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs) [J]. *Radiat Oncol*, 2009, 4: 58.
- [24] BORDON E, HENRIQUEZ-HERNANDEZ L A, LARA P C, et al. Role of CD4 and CD8 T-lymphocytes, B-lymphocytes and natural killer cells in the prediction of radiation-induced late toxicity in cervical cancer patients [J]. *Int J Radiat Biol*, 2011, 87: 424-431.
- [25] BORDON E, HENRIQUEZ-HERNANDEZ L A, LARA P C, et al. Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs) [J]. *Radiat Oncol*, 2010, 5: 4.
- [26] ALTER B P. Radiosensitivity in Fanconi's anemia patients [J]. *Radiother Oncol*, 2002, 62: 345-347.
- [27] ROGERS P B, PLOWMAN P N, HARRIS S J, et al. Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy [J]. *Radiother Oncol*, 2000, 57: 143-154.
- [28] GATTI R A. The inherited basis of human radiosensitivity [J]. *Acta Oncol*, 2001, 40: 702-711.
- [29] MAYER C, POPANDA O, GREVE B, et al. A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects [J]. *Cancer Lett*, 2011, 302: 20-28.
- [30] SVENSSON J P, STALPERS L J A, LANGEREE V, et al. Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(10): e422.
- [31] WEST C M, DUNNING A M, ROSENSTEIN B S. Genome-wide association studies and prediction of normal tissue toxicity [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2012, 22: 91-99.
- [32] POPANDA O, MARQUARDT J U, CHANG-CLAUDE J, et al. Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation [J]. *Mutat Res*, 2009, 667: 58-69.
- [33] PINAR B, HENRIQUEZ-HERNANDEZ L A, LARA P C, et al. Radiation induced apoptosis and initial DNA damage are inversely related in locally advanced breast cancer patients [J]. *Radiat Oncol*, 2010, 5: 85.
- [34] HENRIQUEZ-HERNANDEZ L A, CARMONA-VIGO R, PINAR B, et al. Combined low initial DNA damage and high radiation-induced apoptosis confers clinical resistance to long-term toxicity in breast cancer patients treated with high-dose radiotherapy [J]. *Radiat Oncol*, 2011, 6: 60.

(收稿日期: 2013-04-18 修回日期: 2013-12-05)