

- 学杂志, 2011, 20(10): 894-897.
- [10] Diaz-Lopez R, Tsapis N, Santin M, et al. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(5): 1723-1731.
- [11] 王平, 尹庭辉, 郑荣琴. 新型纳米微泡超声造影剂的制备及超声显像研究[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2011, 32(3): 327-330.
- [12] Aaron FHL, Mark AB, Paul AD, et al. Ultrasound radiation force enables targeted deposition of model drug carriers loaded on microbubbles[J]. *J Control Release*, 2006, 11(1/2): 128-134.
- [13] Wilson SR, Burns PN. Microbubble-enhanced US in body imaging: what role[J]. *Radiology*, 2010, 257(1): 24-39.
- [14] Danila M, Popescu A, Sirlu R, et al. Contrast enhanced ultrasound (CEUS) in the evaluation of liver metastases[J]. *Med Ultrason*, 2010, 12(3): 233-237.
- [15] Deshpande N, Needles A, Willmann JK. Molecular ultrasound imaging: current status and future directions[J]. *Clin Radiol*, 2010, 65(7): 567-581.
- [16] Willmann JK, Lutz AM, Paulmurugan R, et al. Dual targeted contrast agent for US assessment of tumor angiogenesis in vivo[J]. *Radiology*, 2008, 248(3): 936-944.
- [17] 劳翼. 超声微泡造影剂携带基因和药物靶向治疗的研究进展[J]. *医学影像学杂志*, 2007, 17(12): 1359-1361.
- [18] Dai J, Zou S, Pei Y, et al. Polyethylenimine-grafted copolymer of poly(L-lysine) and poly(ethylene glycol) for gene delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1694-1705.
- [19] Yang X, Zhu B, Dong T, et al. Interactions between an anticancer drug and polymeric micelles based on biodegradable polyesters[J]. *Macromol Biosci*, 2008, 8(12): 1116-1125.
- [20] Aoia X, Watanabe Y, Mori S, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase mediated suicide gene therapy using nanomicrobubbles and ultrasound[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(3): 425-434.
- [21] Emoto M, Tachibana K, Iwasak H, et al. Antitumor effect of TNP 470, an angiogenesis inhibitor, combined with ultrasound irradiation for human uterine sarcoma xenografts evaluated using contrast color doppler ultrasound[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(6): 929-935.
- [22] Duvshani M, Machluf M. Efficient transfection of tumors facilitated by long term therapeutic ultrasound in combination with contrast agent: from in vitro to in vivo setting[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(3): 306-315.
- [23] Tinkov S, Coester C, Serba S, et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: in vitro characterization[J]. *J Control Release*, 2010, 148(3): 368-372.
- [24] Thomas J, Jeffrey N. Current management of advanced resectable oral cavity squamous cell carcinoma[J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2011, 4(1): 1-10.
- [25] Hernot S, Klivanov AL. Microbubbles in ultrasound triggered drug and gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10): 1153-1166.

(收稿日期: 2012-09-25 修回日期: 2012-10-15)

循环肿瘤细胞 γ -H2AX 检测评估化疗疗效研究进展*

寿涛¹, 汪晓洁¹, 平竹仙², 李丽华¹, 曾蓉¹综述, 严新民¹审校
(昆明理工大学附属昆华医院: 1. 肿瘤内科; 2. 检验科, 昆明 650032)

关键词: 循环肿瘤细胞; H2AX; 肿瘤

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.045

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)04-0468-03

作为目前肿瘤治疗主要手段之一的化疗应用广泛, 对其疗效的评价依据基于影像学肿瘤缩小而设计的 RECIST 标准, 一般在 2~4 个周期化疗后进行评估。姑且不论在影像学图像如 CT 片上进行测量, 容易产生对可评价病灶毫米级的测量出入, 以及存在于测量者与测量者之间的差异; 这样的以“周期”为测量单位跨度占据患者 28~84 d 的时间, 有的患者可能在第 1 周期就耐药, 有的患者转移可能已经发生, 有的患者可能错过最佳治疗时机等。由于有诸多的“可能”会发生, 因此, 需要更敏感、即时且更早期的评价指标以监测化疗患者的疗效。药物基因组学已经关注到个体药物代谢过程差异的多个环节, 并在 mRNA 或蛋白表达水平有了很多富有吸引力的研究结果预测疗效^[1-2], 评估指标多数都要求组织标本。而晚期或多程

化疗的患者, 要重复取材, 并以化疗“周期”为测量单位进行影像学检查, 不容易满足早期评估要求, 临床可操作性低, 实用价值有限。在这样的背景下, 探索外周血化疗疗效敏感指标, 在化疗单次给药后以“d”为测量单位, 调整下一周期的治疗方案, 抑或即时手术, 这样的指标将极具实际应用价值, 成为目前肿瘤治疗学中的一个研究热点。

1 组蛋白 H2AX 和循环肿瘤细胞

DNA 损伤修复在肿瘤耐药中起着重要作用, 如果因个体代谢差异导致肿瘤细胞对 DNA 损伤药物敏感程度不同, 或存在 DNA 修复差异, 那么敏感或修复能力弱的肿瘤细胞将会更多地被杀死。基于这样的共识, 参与 DNA 损伤早期反应的 H2AX, 即组蛋白 H2A 变体, 成为候选评估 DNA 损伤修复的

指标。它是核心组蛋白的一个亚型,其多肽链包含一个 139 位为丝氨酸的丝氨酸-谷氨酰胺-谷氨酸结构域,可被激活发生磷酸化,此 139 位丝氨酸磷酸化的 H2AX 被称为 γ -H2AX^[3]。毛细血管共济失调突变基因(ataxiatangiectasis, ATM),磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K),DNA-依赖激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)等均可与之结合使其磷酸化,尤其 ATM 与此位点的结合是 DNA 双链断裂(DNA double strand break, DSBs)及修复的早期反应^[4]。DNA 损伤时 γ -H2AX 能够快速募集一系列 DNA 损伤修复相关蛋白和信号分子,如 BRCA1、Nbs1、53BP1、Rad50 和 Rad51,在识别损伤信号的传导及 DNA 修复过程中发挥关键性作用^[5-6]。无论是在高等哺乳动物,还是低等的爪蟾、果蝇和酵母中,当电离辐射和其他因素使 DNA 发生双链断裂时,H2AX 磷酸化在 DSBs 产生后 1 min 就开始出现。一个 DSB 就可以激活 ATM,使大量的 H2AX 发生磷酸化,约涉及 2M 碱基的染色质区域,形成荧光下可以分辨的焦点, γ -H2AX 焦点与发生 DSBs 数量存在对应关系,一旦 DNA 损伤消除或被修复该结合位点就消失,焦点随之消失。如果持续暴露于 DNA 损伤物质,DSBs 持续增加,最终整个核呈现 γ -H2AX 荧光阳性,且阳性细胞数目增加^[7]。在辐射和放疗领域的研究已经证实, γ -H2AX 可以作为肿瘤细胞 DNA 损伤的一个灵敏和特异的生物指标,判断放疗敏感或是抵抗^[8-10]。

取材较为方便且可以频繁获得的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)为探索外周血化疗疗效敏感指标这样的思路提供了达成的基石。国内外多项研究已经在多种转移或未转移的实体瘤中检测到 CTC,尽管有的肿瘤是以低水平数量被检测到,仍对其表面标志、与肿瘤分期和预后等的相关性进行了研究,成为疗效和预后判定的候选指标之一^[11-12]。以 Cristofanilli 等^[13]的研究为例,他们发现每 7.5 mL 外周血中 CTC>5 个的进展期乳腺癌患者治疗后缓解期小于 3 个月,总生存期约 10 个月,而 CTC<5 个的患者缓解期可达 7 个月,总生存期超过 18 个月。提示在转移性乳腺癌患者中,治疗之前 CTC 的数量是一个独立的预后指标。将 CTC 与其 DNA 损伤指标 γ -H2AX 检测相结合,有希望使用外周血样本检测化疗疗效,即时的监测为实施个体化治疗创造条件。

2 以 γ -H2AX 观察化疗药物作用的体外研究

有了电离辐射研究的基础,多项体外实验以 γ -H2AX 为 DNA 损伤指标,观察了经多种化疗药物处理后细胞的反应。Banath 等^[14]将中国仓鼠 V79 细胞系分别暴露于平阳霉素、多柔比星、依托泊苷 30 min 后,孵育 1 h,然后观察细胞杀伤力和 γ -H2AX 抗体染色的关系。所有实验组 γ -H2AX 的水平随着药物剂量的增高而增加,是未受药物处理对照组的 5 倍,与 50%~90% 的细胞死亡率一致。用依托泊苷和替拉扎明处理 V79 和 SiHa 细胞后 1 h,同样观察到 γ -H2AX 水平低者细胞存活, γ -H2AX 水平高于未处理组的则细胞死亡^[15]。环磷酰胺、替莫唑胺、米托蒽醌、羟基脲等都可以观察到类似结果^[16-17]。因此, γ -H2AX 很可能成为 DNA 损伤药物疗效观察的早期指标,虽然没有细胞特异性,但与 DNA 损伤、药物剂量及其后的细胞死亡呈正相关。这样的结果在肿瘤细胞系和更多的化疗药物中得到证实。我国学者于琳等^[18]用 γ -H2AX 来预测 4 种处理药物:依托泊苷、多柔比星、丝裂霉素和顺铂对肝癌细胞 HepG2.215 的敏感性。结果显示,经流式细胞仪检测到的肝癌细胞 γ -H2AX 阳性百分数,与 MTT 比色法检测的经上述药物处理后肝癌细胞增殖抑制率呈正相关,并且荧光阳性

细胞数目与化疗药物呈剂量依赖型增加,提示 γ -H2AX 在细胞水平预测癌细胞对 DNA 损伤药物敏感性的可行性。由于观察 γ -H2AX 需要活的单个细胞,模拟以 CTC 为载体的环境将有可能使上述研究结果真正转化为临床诊治手段。近来的 1 项研究的确又更深入了一步^[19]。此项研究采用人乳腺癌细胞系 MCF7、人结肠腺癌细胞系 HT-29 和人卵巢腺癌细胞系 SKOV3,经托泊替康处理后 2 h,分别取各瘤系细胞 600 ± 50 个加入 7.5 mL 的健康对照全血中,经免疫磁性富集,流式细胞仪分选和免疫荧光染色,观察到 γ -H2AX 阳性细胞比例的变化在上述各系均增加。处理前 γ -H2AX 阳性细胞比例为 1%~4%,处理后 MCF7 为 31.4%,HT-29 为 44.3%,SKOV3 为 19.6%,阳性细胞比例随处理剂量增加而增加。对照组没有观察到这样的变化。这些研究提示 γ -H2AX 很可能成为 DNA 损伤化疗药物疗效的早期生物标志。

3 以 CTC γ -H2AX 监测化疗疗效的体内研究

体内实验虽然目前仅有小样本研究,同样得到了令人鼓舞的结果。Wang 等^[19]对 15 例 IV 期实体瘤患者进行了研究,其中乳腺癌 2 例、结肠癌 6 例、肝细胞癌 1 例、小细胞肺癌 1 例、神经内分泌前列腺癌 1 例、食管癌 1 例、胰腺癌 2 例和阑尾癌 1 例,都是多种化疗耐药的晚期患者。他们接受不同的治疗方案:托泊替康,托泊替康联合多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂,环磷酰胺联合 PARP 抑制剂。抽取患者 7.5 mL 全血用免疫磁性富集,流式细胞仪分选和免疫荧光染色,15 例患者给药前 CTC 的检出由(0~84)个/7.5 mL 全血不等, γ -H2AX 阳性细胞比例 0%~31%不等。给药第 2 天、第 5 天观察到了 γ -H2AX 阳性细胞比例较给药前呈上升趋势。以此研究中的乳腺癌患者为例,2 例都接受环磷酰胺联合 PARP 抑制剂。给药前 CTC 检出分别为 6 个/7.5 mL 和 0 个/7.5 mL, γ -H2AX 阳性细胞比例均为 0。前者给药第 2 天和第 5 天 γ -H2AX 阳性细胞比例上升至 33.3%和 12.5%,后者给药第 2 天和第 5 天 H2AX 阳性细胞比例上升至 63.6%和 62.5%。其他两种治疗方案也观察到类似变化。研究结果显示与体外研究的一致性,提示除了实验方法的可行性外,CTC 中检测 γ -H2AX 有可能早期监测 DNA 损伤药物的疗效。这项研究中有几个现象值得注意:(1)CTC 细胞数似乎与 γ -H2AX 阳性细胞比例变化不呈对应关系,即给药后有的患者 CTC 检出增加,有的患者下降,这或许可以解释为 CTC 有其寿命,再或是实验差异。作者认为还可能有其他解释。自发和(或)由外科操作进入血循环的 CTC 多以休眠状态存在,可能是由于血管形成缺如和机体正常的免疫功能状态所致,休眠细胞增殖和凋亡率很低,对 DNA 损伤药物的敏感性比增殖期肿瘤细胞低。此项研究中给药后 γ -H2AX 阳性细胞比例较给药前总是增加,提示药物作用导致肿瘤细胞脱落引起 CTC 增加的可能性, γ -H2AX 阳性细胞比例增加可能较 CTC 更直接地与药物 DNA 损伤对应。这需要更多的研究加以证实。(2)CTC γ -H2AX 阳性细胞比例变化在个体间差异比较大,个体中也因药物作用时间点不同而 CTC γ -H2AX 阳性细胞比例不同,故需要深入研究进一步回答: γ -H2AX 阳性细胞百分值或是上升幅度值与疗效的关系,即此数值的疗效预测最终须与由 RECIST 标准或 PET-CT 代谢改变一致;CTC 数目对 γ -H2AX 的灵敏度的影响如何;给药与采血时间点对检测结果的影响,免疫荧光强度是否也能提示 DNA 损伤等等。(3)CTC γ -H2AX 免疫荧光形成是否受到 H2AX 功能缺陷或个体差异的影响。因为 H2AX 磷酸化对基因组的稳定很重要^[20],其功能缺

陷有可能不能有效形成焦点而免疫荧光减弱。不同个体间给药前 γ -H2AX 阳性细胞比例的差异可能还与前一周期化疗有关。

4 展 望

基于外周血 CTC 检测化疗疗效, γ -H2AX 有望成为敏感性判定指标之一, 但尚有诸多问题亟待解决。首先需要增加对 CTC 的认识, 分析 CTC 的生物学特征, 不断提高 CTC 检测方法的敏感性和特异性, 将免疫磁性富集、依据细胞大小收集技术等结合应用将有助于早期准确检测 CTC^[21]。在解决这些问题的过程中, CTC 与生物标志相结合的思路可能还会带来新生物标志的发现和应^[22-23]。随着对 CTC 基因组谱不断揭示, 对诸如 CTC 中 CEA mRNA 表达与疾病关系这类指标的探索^[24-25], 外周血 CTC 检测有着良好的应用前景, 这一研究领域的不断发展, 必将产生新的诊疗手段。

参考文献:

- [1] Fareed KR, Kaye P, Soomro IN, et al. Biomarkers of response to therapy in oesophago-gastric cancer[J]. *GUT*, 2009, 58(1):127-143.
- [2] Gossage L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group1 (ERCC1) in cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(6):565-577.
- [3] Redon C, Pilch D, Rogakou E, et al. Histone H2A variants H2AX and H2AZ[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(2):162-169.
- [4] Lavin MF, Birrell G, Chen P, et al. ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage[J]. *Mutat Res*, 2005, 569(1/2):123-132.
- [5] Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage[J]. *Curr Biol*, 2000, 10(15):886-895.
- [6] Clingen PH, Wu JY, Miller J, et al. Histone H2AX phosphorylation as a molecular pharmacological marker for DNA interstrand crosslink cancer chemotherapy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(1):19-27.
- [7] Dmitry K, Susan MM, Judit PB, et al. Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of x-rays[J]. *Radiother Oncol*, 2006, 80(2):223-229.
- [8] Kao J, Milano MT, Javaheri S, et al. γ -H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006, 6(3):197-205.
- [9] Olive PL, Banath JP. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 58(2):331-335.
- [10] Taneja N, Davis M, Choy JS, et al. Histone H2AX Phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3):2273-2280.
- [11] Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(19):3213-3221.
- [12] Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4):366-377.
- [13] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8):781-791.
- [14] Banath JP, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15):4347-4350.
- [15] Olive PL, Banath JP, Sinnott LT. Phosphorylated histone H2AX in spheroids, tumors, and tissues of mice exposed to etoposide and 3-anilino-1,2,4-benzotriazine-1,3-dioxide[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15):5363-5369.
- [16] Huang X, Okafuji M, Traganos F, et al. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin[J]. *Cytometry A*, 2004, 58(2):99-110.
- [17] Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15):5843-5849.
- [18] 于琳, 孙青. 磷酸化组蛋白预测肝癌细胞对某些化疗药物的敏感性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(1):60-65.
- [19] Wang LH, Pfister TD, Parchment RE, et al. Monitoring drug-induced γ -H2AX as a pharmacodynamic biomarker in individual circulating tumor cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3):1073-1084.
- [20] Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX[J]. *Science*, 2002, 296(5569):922-927.
- [21] De Giorgi V, Pinzani P, Salvianti F, et al. Application of a filtration- and isolation-by-size technique for the detection of circulating tumor cells in cutaneous melanoma[J]. *J Invest Dermatol*, 2010, 130(10):2440-2447.
- [22] 刘芊, 江泽飞. 循环肿瘤细胞人表皮生长因子受体 2 的检测对乳腺癌诊治意义的研究进展[J/OL]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2012, 6(2):190-194.
- [23] 刘文静, 刘毅, 刘晓晴. CellSearch 系统检测循环肿瘤细胞及其分子标记的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(2):182-186.
- [24] Sieuwerts AM, Mostert B, de Bolt VJ, et al. mRNA and microRNA expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(11):3600-3618.
- [25] 李世超, 姜军, 杨新华, 等. 乳腺癌分子分型与外周血循环肿瘤细胞相关性探讨[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(10):1006-1010.