

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.21.042

光动力学疗法辅助治疗黑色素瘤的研究进展*

小普布卓玛 综述, 贡桑多吉 审校
(西藏大学理学院, 拉萨 850000)

[关键词] 黑色素瘤; 光动力学疗法; 作用机制

[中图分类号] R739

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)21-2994-03

恶性黑色素瘤是一种恶性程度高的皮肤肿瘤,是由位于表皮基底部的黑色素细胞恶变形成的。80%的皮肤癌死亡率直接源于只占皮肤癌5%的黑色素瘤。黑色素瘤在欧美国家是发生率排在第5位的恶性肿瘤。美国每年新诊断病例数近30年来翻了一番,英国近5年来男性发病率增加了28%,女性增加了12%。黑色素瘤在我国也呈快速上升趋势,根据北京市8城区流行病学统计,近5年来发病率提高了5倍。我国每年新发恶性黑色素瘤超10 000例。因此黑色素瘤的控制是世界各国政府的卫生战略重点,黑色素瘤的综合治疗成为世界所关注的研究课题^[1]。

虽然进行着大量的研究和临床试验,黑色素瘤的预后差和死亡率高仍是这一领域的主要问题。黑色素瘤早期患者可通过手术获得治愈的机会,但手术后的复发率高。而进展期患者,则预后差,死亡率高。其主要原因包括细胞的异常增殖和细胞凋亡受抑。因此肿瘤的治疗要从抑制肿瘤细胞分裂、增殖和启动或增强凋亡机制入手。本文将从光动力学疗法(photo-dynamic therapy, PDT)对以上因素可能的靶向作用机制及对PDT治疗黑色素瘤的相关报道入手,探讨PDT成为治疗黑色素瘤的辅助疗法的可能性。

1 PDT 基本原理

PDT是一种微创疗法,已证实对非黑素性皮肤癌及其他肿瘤有很好的治疗效果^[2-3]。PDT作用过程中,光敏剂特异性地聚集在肿瘤细胞或组织中,在适当波长的光照下,光敏剂吸收特定波长的光后激发氧分子产生氧化能力极强的活性单线态氧。单态氧作为一种高反应性物质,能与脂肪酸、蛋白质及核酸等物质反应而导致细胞凋亡^[4]。

2 光动力学疗法对黑色素瘤的靶向作用机制

2.1 细胞的增殖和生存通路与PDT的关系 众所周知,细胞的增殖作用是细胞癌变的主要因素。Ras/Raf/MEK/ERK信号传导通路是调控细胞生长、分化和增殖最重要的通路之一,而Ras家族是这些信号传导过程中的重要组成部分。大量研究报告Ras基因家族成员(如H-Ras、K-Ras和N-Ras)和Raf是人类肿瘤中最常见的癌基因,68%~90%的黑素瘤患者存在Raf或n-Ras基因突变^[5],所以Raf和n-Ras的突变被认为在黑素瘤的发展过程中起着重要的驱动作用。Ras基因的激活正向调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,与GTP结合的活化的Ras激活Raf,激活的Raf可以促使MAPK的两个丝氨酸残基磷酸化,而MAPK又可导致ERK的磷酸化从而使其激活,最终活化的ERK形成二聚体,转入细胞核,促使有关细胞增殖信号的传导,而这种信号的传导已成为包括黑素瘤在

内的许多恶性肿瘤的形成机制之一^[6]。这一通路在表皮生长因子(EGF)受体的协助下成为了光动力学疗法的作用靶^[7]。

核因子对细胞增殖、转移和存活起着重要的调控作用,也成为了光动力学疗法阻止异常细胞增殖的重要作用靶。已有研究证明激活或失活的抑制剂可通过PDT诱导的氧化应激来实现^[8]。有研究指出TMPyP4-PDT可通过抑制核因子的信号通路,促进肿瘤细胞凋亡^[9],从而控制细胞的癌变。

2.2 程序性细胞死亡与PDT的关系 程序性细胞死亡通路的获得性缺陷是大多数肿瘤细胞的共性,即癌细胞的凋亡和自吞噬机制均存在缺陷。很多学者将细胞的死亡形式分为凋亡性程序性细胞死亡和自吞噬性细胞死亡。而大量研究表明恶性黑色素瘤细胞的程序性死亡水平低于其他恶性肿瘤,对这一机制的调控也就成为了治疗恶性黑色素瘤的重中之重。

2.2.1 凋亡性程序性细胞死亡与PDT的关系 细胞凋亡是有机体为调控自身的生长发育、维持内环境稳定,由基因调控的一种细胞主动死亡过程。细胞凋亡过程伴随着细胞缩小, DNA被核酸内切酶降解成片段,染色体凝聚,膜皱缩和胱蛋白酶(Caspase)的激活等现象^[10]。细胞凋亡作为一种基本生物学现象,在多细胞生物去除不需要的或异常的细胞中起着必要的作用。此过程受到Caspase的严格调控,在正常细胞中Caspase处于非活化的酶原状态。凋亡程序一旦开始,Caspase被激活随后发生凋亡蛋白酶的层叠级联反应,发生不可逆的凋亡。而Caspase的激活又是通过死亡受体(外源性)或通过溶酶体-线粒体途径释放凋亡酶激活因子从而激活Caspase(内源性)两种途径来实现的。大量研究表明死亡受体Fas/FasL途径在PDT诱导肿瘤细胞凋亡中有重要作用^[11-13]。此外,Zhuang等^[14]的研究表明光敏剂能对Fas受体的激活有直接影响。一些光敏剂主要定位于线粒体,而线粒体在细胞凋亡中起着重要作用^[15]。就恶性黑色素瘤而言,Barge等^[10]在研究新型光敏剂硅酞菁在人恶性黑素瘤中的光杀伤作用时认为硅酞菁胆固醇衍生物能增加细胞线粒体膜的通透性,产生的类似半胱天冬酶的底物抑制半胱天冬酶活性,导致细胞凋亡。郑微等^[16]在MB-PDT治疗黑色素瘤实验研究中也得到了通过线粒体途径诱导细胞凋亡的结论。黑色素瘤细胞在接受PDT后出现凋亡的现象也发现于两性光敏剂ATX-S10(Na)对人恶性黑色素瘤细胞(G361)的光动力学治疗过程中^[17],并进一步指出高浓度光敏剂和高剂量光照射导致高细胞毒性。当PDT诱导的细胞死亡少于70%时,大部分死亡细胞的死亡模式为凋亡。洪洁等^[18]的研究中也发现了相似的结果,Nagata等^[17]推测光动力学作用对溶酶体的损伤导致线粒体膜电位失稳而

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(11364040)。 作者简介:小普布卓玛(1974—),硕士,教授,主要从事光动力学疗法治疗皮肤癌的研究。

激发的细胞凋亡。由此可知,死亡受体 Fas/FasL 和线粒体都可成为 PDT 的作用靶。

2.2.2 自体吞噬程序性细胞死亡与 PDT 的关系 自体吞噬作用是普遍存在于大部分真核细胞中的一种降解和再利用机制,受细胞内一些基因和信号机制的严格调控。此过程主要清除降解细胞内受损伤的细胞结构、衰老的细胞器官,以及不再需要的生物大分子等,对肿瘤的发生、发展、治疗有着重要的影响。最近有报道指出光动力学疗法诱导的氧化应激反应能引起黑素瘤细胞的自体吞噬作用^[19]。其他研究也指出一旦器官内的溶酶体系统在光动力学治疗过程中受到破坏,细胞内的自体吞噬作用就会被激活^[20]。线粒体作为另一个目标,当光动力学治疗导致线粒体内抗凋亡蛋白受损时,自体吞噬作用就会被激活。PDT 可以通过溶酶体和线粒体对细胞的自体吞噬作用进行调节。

3 目前 PDT 治疗黑色素瘤的研究概况

PDT 对恶性黑色素瘤的作用,在细胞水平、实验动物水平上和临床上都有相关的报道。在细胞实验中,Urbanska 等^[21]用黑素瘤细胞株生长证实了 PDT 能使黑素瘤细胞减少 5~10 倍。应用血卟啉单甲醚(HMME)行 PDT 对鼠皮肤黑色素瘤细胞具有明显的杀伤效应^[16]。在实验动物体内,Haddad 等^[22]通过系统给药的方式评价 5-ALA-PDT 对黑素瘤的作用,体内试验证实了 PDT 可诱导黑素瘤细胞的死亡。在内消旋四苯基脂质体对荷恶性黑素瘤裸鼠的 PDT 研究中证实了 PDT 可使绝大部分的肿瘤消失^[23]。光敏剂 A1^[24]及 CASPs^[25]介导的光动力学疗法对黑色素瘤细胞及移植瘤的生长抑制作用明显。而在临床上,Sheleg 等^[26]对 14 例恶性黑素瘤转移患者(女 10 例,男 4 例,平均年龄为 49.6 岁)进行了二氢卟吩 e6 静脉给药(5 mg/kg)的光动力学治疗,分别在静脉给药后 1 h 和 6 h 进行 PDT 治疗,疗效令人满意。8 例在接受了 1 次 PDT 后完全治愈,其他的 6 例患者在经过多次 PDT 后也获得完全治愈。这种治疗不良反应小,血细胞计数也没发现二氢卟吩 e6 的系统毒性,血生化和尿分析也显示无肝脏和肾脏损害。研究也进一步证明了光动力学疗法 PDT 治疗黑色素瘤的有效性。刘慧龙等^[27]利用血卟琳衍生物(HPD)静脉给药对 6 例恶性黑素瘤患者进行光动力学治疗,发现完全有效 4 例,部分有效 2 例,总有效率达 100%。

由于黑色素瘤对传统治疗方法的抑制作用导致肿瘤学家寻找新的治疗手段,随着对 PDT 作用机制特别是 PDT 诱导黑色素瘤细胞凋亡和抑制细胞增殖机制的深入了解,PDT 必将成为治疗黑色素瘤的一种新的辅助疗法。

参考文献

[1] 沈彬,刘樑,赵承梅,等.肿瘤光动力学疗法研究进展[J].继续医学教育,2005,19(6):42-48.

[2] Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776(1): 86-107.

[3] Babilas P, Schreml S, Landthaler M, et al. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art[J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2010, 26(3): 118-132.

[4] Niedre M, Patterson MS, Wilson BC. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo

[J]. *Photochem Photobiol*, 2002, 75(4): 382-391.

[5] Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(12): 3728-3733.

[6] 练炼,马德亮,陶敏.恶性黑色素瘤的分子靶向治疗进展[J].实用肿瘤杂志,2010,25(2):109-112.

[7] Tong Z, Singh G, Rainbow AJ. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway protects cells from photofrin-mediated photodynamic therapy[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(19): 5528-5535.

[8] Mercurio F, Manning AM. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response[J]. *Oncogene*, 1999, 18(45): 6163-6171.

[9] 吕昌帅.阳离子卟啉对人宫颈癌 Caski 细胞光动力学杀伤效应的研究[D].济南:山东大学,2013.

[10] Barge J, Decréau R, Julliard M, et al. Killing efficacy of a new Silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis[J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13(1): 33-44.

[11] Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, et al. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(6): 1041-1046.

[12] Yokota T, Ikeda H, Inokuchi T, et al. Enhanced cell death in NR-S1 tumor by photodynamic therapy: possible involvement of Fas and Fas ligand system[J]. *Lasers Surg Med*, 2000, 26(5): 449-460.

[13] Ali SM, Chee SK, Yuen GY, et al. Photodynamic therapy induced Fas-mediated apoptosis in human carcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(3): 257-270.

[14] Zhuang S, Kochevar IE. Ultraviolet a radiation induces rapid apoptosis of human leukemia cells by Fas ligand-independent activation of the Fas death pathways[J]. *Photochem Photobiol*, 2003, 78(1): 61-67.

[15] Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death[J]. *Cell*, 2003, 112(4): 481-490.

[16] 郑薇,陈勇军,李颖倩,等.亚甲基蓝联合光动力学疗法治疗黑色素瘤的机理研究[J].中国药理通讯,2010,27(4):33-34.

[17] Nagata S, Obana A, Gohto Y, et al. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na)[J]. *Lasers Surg Med*, 2003, 33(1): 64-70.

[18] 洪洁,张风,杨庆松,等.应用血卟啉甲醚对体外培养鼠皮肤黑色素瘤细胞 PDT 治疗的实验研究[J].眼科,2005,14(6):405-408.

[19] Davids LM, Kleemann B, Cooper S, et al. Melanomas display increased cytoprotection to hypericin-mediated cytotoxicity through the induction of autophagy[J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(10): 1065-1072.

- [20] Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence[J]. EMBO J, 2005, 24(7): 1311-1317.
- [21] Urbanska K, Romanowska-Dixon B, Matuszak Z, et al. Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas[J]. Acta Biochim Pol, 2002, 49(2): 387-391.
- [22] Haddad R, Kaplan O, Greenberg R, et al. Photodynamic therapy of murine colon cancer and melanoma using systemic aminolevulinic acid as a photosensitizer[J]. Int J Surg Investig, 2000, 2(3): 171-178.
- [23] Jezek P, Nekvasil M, Skobisová E, et al. Experimental photodynamic therapy with MESO-tetrakisphenylporphyrin (TPP) in liposomes leads to disintegration of human amelanotic melanoma implanted to nude mice[J]. Int J Cancer, 2003, 103(5): 693-702.
- [24] 曹波, 刘天军, 牛聪. 新型水溶性卟啉类光敏剂 A1 光动力治疗黑色素瘤的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 170-174.
- [25] 胡立宽, 李桂云, 李贞, 等. 兔眼脉络膜黑色素瘤的第二代光敏剂光动力治疗[J]. 中华眼底病杂志, 2004, 20(2): 108-110.
- [26] Sheleg SV, Zhavrid EA, Khodina TV, et al. Photodynamic therapy with chlorin e(6) for skin metastases of melanoma[J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2004, 20(1): 21-26.
- [27] 刘慧龙, 刘端祺, 介雅慧, 等. 激光光动力学治疗恶性黑色素瘤 6 例[J]. 中国激光医学杂志, 2008, 17(4): 248-250, 303.

(收稿日期: 2015-02-25 修回日期: 2015-03-20)

• 综述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.21.043

试验序贯性分析在随机对照试验 Meta 分析中的运用*

王欢综述, 胡厚祥[△]审校

(川北医学院附属医院心内科, 四川南充 637000)

[关键词] 随机对照试验; Meta 分析; 试验序贯分析

[中图分类号] R-3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)21-2996-04

Meta 分析是将两个或者多个相似的研究结果进行定量综合分析的一种方法学。随机对照试验(random control trial, RCT)的 Meta 分析能够增加干预效果评估的力度和精确度^[1-4]。当任何可利用的研究被一一纳入后, Meta 分析被认为目前最佳的方法学。但是“最佳方法学”被广泛运用不代表它就是“证据确凿”或者“证据有力”^[5-6]。传统 Meta 分析方法, 比如在 Review Manager V. 5.1 并没有考虑到纳入研究的数量是否足够^[7], 而干预组显著性差异的广泛运用, 忽略了研究样本的数目对结果的影响。如果得到的结果不具备统计学意义, 就简单考虑是“样本量不足”的问题^[8-10]。建立在有限的样本量基础上进行干预疗效的评估是不可靠的, 大约有 25% 传统的系统评价纳入了小样本的研究而得出了错误的阳性结果^[11]。样本量过小会影响 Meta 分析的结果, 于是新的研究发表后, Meta 分析就需要及时更新, 在 Cochrane 网上的 Meta 分析需每隔 2 年要更新 1 次^[12]。但是 Meta 分析反复更新, 却可能使 I 型错误(type I error)——假阳性增加^[5, 11, 13-14]; 其次, Meta 分析也没有太多关注“检验效能”(发现两个总体参数间差异的能力), 记为(1-β), 因此, 通过现有样本量计算得到的最后结果也可能不是真实的。故采用序贯 Meta 分析(sequential analysis)方法, 通过引进成组序贯原理来克服 Meta 分析的样本量。

1 试验序贯性分析概念

目前序贯 Meta 分析包括试验序贯分析(trail sequential analysis, TSA)^[15]和 whitehea 三角检验序贯 Meta 分析(sequential Meta-analysis, SMA)。SMA 方法学在评估随机对照实验

的 Meta 分析中也是有用的一个工具, 和 TSA 比较具备不需要提前估算总体样本量等优点^[16], 但是由于方法学尚不成熟, 实践运用受限, 故目前运用最为广泛的是 TSA。试验序贯性分析指每纳入一个研究后, 都进行一次期中分析(interim analysis), 校正 α 值, 目的是控制 I 类错误稳定在 0.05 的水平^[12, 17]。TSA 能够在传统 Meta 分析的基础上关注“校正后的信息量”(heterogeneity-adjusted information size, HIS), 采用随机对照实验中累积数据重复性显著性检验的方法学, 校正显著性检验和无效检验的阈值, 运用软件绘制出序贯 Meta 分析的界值图(trail sequential monitoring boundary, TSMB)。运用校正后的信息量来计算显著性检验 α 值和传统的 Meta 分析比较能有效地减少 I 类错误的发生, 得到的结果也更有信服力^[6]。

2 试验序贯性分析的重点步骤

TSA 重点在于根据 HIS 的数据, 计算并绘制 TSMB 曲线。

第一步: 明确未有校正的信息量(informaztion size, IS)、HIS 和 I^2 的关系^[3], 见公式(1)。

$$HIS = \frac{IS}{1 - I^2} \quad (1)$$

I^2 为通过传统 Meta 分析得到的异质性检验值^[13]。当纳入的各研究之间的异质性增加, I^2 增加, HIS 也会增加。

第二步: 计算 IS。

(1) 当效应量是连续性变量, 见公式(2)。