

致突变剂敏感性与头颈肿瘤患者放化疗后 第二原发性肿瘤发生风险的研究

秦俭¹, 王仁生², 莫耀喜³, 滕家安⁴, 杨慧华⁵, 李婷婷⁶

1. 广西壮族自治区人民医院临床肿瘤中心放疗病区 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院放疗科;
3. 广西壮族自治区人民医院生殖中心实验室; 4. 广西壮族自治区人民医院内分泌代谢干部病区;
5. 北海市人民医院血液科; 6. 柳州市工人医院妇产科

摘要: 目的 探讨基因稳定性与头颈肿瘤患者放化疗后发生第二原发性肿瘤(secondary primary tumor, SPT)的关系。方法 SPT 组和无 SPT 组病例分别为 67、47 例,正常对照组 40 例。以博来霉素作为致突变剂,分析既往有头颈肿瘤放疗±化疗史、发生和未发生 SPT 者,分析外周血淋巴细胞平均染色单体断裂数。结果 从初诊头颈肿瘤的年龄开始,SPT 组至发生 SPT 的时间、无 SPT 组至最后随访时间分别为 16.73 ± 6.31 (95% CI, 15.19 ~ 18.27) 和 18.51 ± 8.51 (95% CI, 16.01 ~ 21.01) 年 ($F = 1.643$, $P = 0.203$)。发生 SPT 的部位主要是头颈部,病理类型以鳞癌居多。SPT 组、无 SPT 组和对照组外周血淋巴细胞平均染色单体断裂数分别为 0.88 ± 0.29 (95% CI, 0.81 ~ 0.95)、 0.56 ± 0.19 (95% CI, 0.50 ~ 0.61) 和 0.52 ± 0.18 (95% CI, 0.46 ~ 0.58) 个,差异有统计学意义 ($F = 6.519$, $P = 0.002$)。以 ≥ 0.5 个断裂数/细胞作为博来霉素敏感性高低的分界点,3 组对博来霉素敏感的百分比分别为 85.07%、65.96%、52.50%,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.611$, $P = 0.000$)。将 SPT 组设置为病例组,余为对照组,外周血淋巴细胞平均染色单体断裂数的 ROC 曲线下面积为 0.829,标准误是 0.037 ($P = 0.000$),该值为 0.69 时特异性和敏感性均较高。结论 头颈肿瘤患者潜在的基因不稳定性与 SPT 密切相关;发生 SPT 的潜伏期较长,超过 10 年;外周血淋巴细胞平均染色单体断裂数判断该患者人群发生 SPT 的风险有价值, ≥ 0.69 可以作为高危 SPT 的最佳阈值,但需要进一步验证。

关键词: 头颈肿瘤;第二原发性肿瘤;博来霉素;基因稳定性

DOI:10.13491/j.cnki.issn.1004-714x.2014.04.004

Study of Mutagen Sensitivity and the Risk of Developing Secondary Primary Tumors after Radiotherapy and/or Chemotherapy in Patients with Head and Neck Cancers. QIN Jian, WANG Ren-sheng, MO Yao-xi, TENG Jia-an, YANG Hui-hua, LI Ting-ting. Department of Radiation Oncology, Clinical Cancer Center, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021 China.

Abstract: **Objective** To discuss the relationship between genetic stability and secondary primary tumor (SPT) after radiotherapy and/or chemotherapy in patients with head-and-neck cancers. **Methods** Compared bleomycin-induced chromatid breaks in peripheral blood lymphocyte cultures (as an indicator of latent genetic instability) between 67 cases (patients with SPT) and 47 controls (head-and-neck cancer patients without SPT). **Results** The time from the age of new diagnosis of head-and-neck cancer to SPT in SPT group was 16.73 ± 6.31 (95% CI, 15.19 ~ 18.27) years, and to the last follow-up time in no-SPT group was 18.51 ± 8.51 (95% CI, 16.01 ~ 21.01) years, respectively. The major tumor site and pathologic type of SPT was head-and-neck squamous carcinoma. The mean number of chromatid breaks per cell was significantly higher in SPT group 0.88 ± 0.29 (95% CI, 0.81 ~ 0.95) than in no-SPT 0.56 ± 0.19 (95% CI, 0.50 ~ 0.61) and the controls 0.52 ± 0.18 (95% CI, 0.46 ~ 0.58) ($F = 6.519$, $P = 0.002$). Low and high bleomycin sensitivity was determined by using 0.5 breaks/cell as a cutoff point. The high sensitivity ratio in SPT, no-SPT and control group were 85.07%, 65.96% and 52.50%, respectively ($\chi^2 = 13.611$, $P = 0.000$). SPT as cases and others as controls, the area under ROC curve of the mean number of chromatid breaks per cell was 0.829, the standard error was 0.037 ($P = 0.000$). The best cutoff point was 0.69. **Conclusion** The latent genetic instability is closely related with SPT in patients with head and neck cancers after radiotherapy and/or chemotherapy. The incubation period of SPT is as long as more than a decade. The mean number of chromatid breaks per cell is worth to estimate high risk of developing SPT in these patients. The optimal threshold value is 0.69, further verifications need be proceeding.

Key words: Head-and-Neck Cancer; Secondary Primary Tumor; Bleomycin; Genetic Stability

中图分类号: R815.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2014)04-0299-04

以获得长期生存,但在随访的第 1 个 5 年期,每年仍有 (3~6)% 的患者发生第二原发肿瘤(secondary primary tumor, SPT), SPT 是该患者人群患病和主要死亡原因^[1-3]。遗传基因的稳定性被认为是 SPT 的重要原因之一^[4]。本研究拟通过分析既往有头颈肿瘤放化疗病史、现已发生以及未发生 SPT 患者的外周血淋巴细胞对致突变剂博来霉素的敏感性,探讨基因的稳定性与 SPT 的发生风险。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2008 年 6 月~2013 年 6 月经组织学证实为 SPT、既往有头颈部恶性肿瘤病史、曾采用根治性放疗±化疗治疗的患者,设为 SPT 组。成功随访的、既往有头颈肿瘤放疗±化疗病史、现已治愈而至随访之日尚未发生 SPT 的患者,设为非 SPT 组。病例来源于广西壮族自治区人民医院、广西医科大学第一附属医院、北海市人民医院、柳州市工人医院等多家三甲医院。所有病例均除外高血压、2 型糖尿病、慢性肝病、慢性肾病、免疫系统疾病、慢性阻塞性肺病、哮喘等合并症以及既往有头颈部良性肿瘤病史者。

1.2 SPT 的定义以 Warren 和 Gates 建立的标准^[5]

①新的肿瘤的组织学类型与原发肿瘤不相同;②相同组织学类型的出现须为原发肿瘤治疗后>3 年;③距离原发肿瘤、有正常上皮细胞间隔>2 cm。

1.3 致突变剂博来霉素敏感性分析 ①清晨、空腹和清醒的状态下采集入组病例和健康对照者外周静脉血 2 mL, 500 U/μmol 肝素抗凝。严格无菌操作,按 1:9 的比例将采集的外周静脉血加入外周血淋巴细胞培养基中(湖南湘雅基因技术有限公司提供,批号:200902140202),置于循环消毒 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 电子公司,型号:HEPA CLASS 100)中 37℃ 培养 72 h。0.03 U/mL 博来霉素(日本化药公司提供)干预 5 h。40 μg/mL 秋水仙碱 0.08 mL 阻断 2 h。低速离心 7 min, 20 r/min。去上清液,加入 0.075 mmol/L 的 KCL 溶液 5 mL,混匀。后置 37℃ 电热三用水浴箱(Q/ZYS 002-91 型号 BS60)中 15 min。乙酸:甲醇(成都市科龙化工试剂厂提供)按 1:3 的比例配成固定液。第一次加入 1 mL 进行预固定,吹打、混匀后低速离心,条件 20 r/min, 7 min。去上清液后再加入 5 mL 固定液固定、吹打、离心。如此重复 1 次。去上清液,滴管取少量含有淋巴细胞的混悬液滴于冰片上,酒精灯烤片,玻片标记编号。每一样本制片 4 张。将制好的玻片置于电热鼓风箱(湖北黄石市医疗器械厂,型号 DFG801)

中 3 h。胰酶消化 5~7 min, Giemsa 染色。②已标记编号的玻片由 2 名以上专门的技术人员进行读片。计算每个样本 50 个有丝分裂中期的染色单体断裂的数目,并以 $\bar{x} \pm s$ 表达为每个细胞染色单体的平均断裂数。选择有完整 46 条染色体,形态相对较好于辨认的染色体进行观察、计数。

1.4 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本的差异比较采用 *t* 检验,多个样本的差异比较采用方差分析和秩和检验。应用 SPSS 13.0 软件包,所有检验水准均为 0.05。

2 结果

2.1 入组病例及 确诊为 SPT 并成功采集外周血进行致突变剂敏感性分析的患者有 67 例,非 SPT 组患者 47 例,既往均有头颈部放疗病史,选择年龄相似的正常人 40 例作为对照组。SPT 组患者从初诊断头颈肿瘤到发生 SPT 的时间为 (16.73 ± 6.31) 年, 95% CI: 15.19~18.27 年,而无 SPT 组最后随访之日距初诊断头颈肿瘤的时间为 (18.51 ± 8.51) 年, 95% CI: 16.01~21.01 年,差异无统计学意义($F = 1.643$, $P = 0.203$)。发生 SPT 的部位主要是头颈(20/67)、肺(18/67)、前列腺(9/67)、结直肠(7/67)和膀胱(3/67),病理类型以鳞癌居多(36/67),也有腺癌、肉瘤、腺样囊性癌、肌上皮癌等。SPT 组和无 SPT 组初治肿瘤部位主要是鼻咽部(58/114)、喉(24/114)、下咽(13/114)、舌(10/114),病理类型也以鼻咽未分化非角化性癌(53/114)和鳞癌(38/114)为主。入组病例及对照组的病例资料见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	初治年龄	随访时年龄	性别		化疗史	
		(95% CI)	(95% CI)	男	女	有	无
SPT 组	67	47.51 ± 7.65 (45.64 ~ 49.37)	64.24 ± 7.80 (62.34 ~ 66.14)	56	11	53	14
无 SPT 组	47	46.49 ± 7.87 (44.18 ~ 48.80)	65.00 ± 6.41 (63.12 ~ 66.88)	37	10	36	11
对照组	40	45.95 ± 8.70 (43.17 ~ 48.73)		32	8		
<i>F</i> 值/ <i>t</i> 值	-	0.523	0.304	0.234		0.100	
<i>P</i> 值	-	0.594	0.583	0.792		0.753	

2.2 三组患者的染色单体断裂情况 SPT 组、无 SPT 组和对照组的外周血淋巴细胞平均染色单体断裂数差异有统计学意义, SPT 组显著高于无 SPT 组和对照组,但是无 SPT 组和对照组差异无统计学意义($t = 0.975$, $P = 0.332$)。以 ≥ 0.5 个断裂数/细胞作为博来霉素敏

感性高低的分界点^[6], 3 组对博莱霉素敏感的百分比分别为 85.07% (57/67)、65.96% (31/47)、52.50% (21/40), 差异有统计学意义。见表 2。

表 2 两组患者对致突变剂博莱霉素的敏感性分析($\bar{x} \pm s$)

组别	敏感性(例)		淋巴细胞染色体断裂数(个) (95% CI)
	高	低	
SPT 组	57	10	0.88 ± 0.29 (0.81 ~ 0.95)
无 SPT 组	31	16	0.56 ± 0.19 (0.50 ~ 0.61)
对照组	21	19	0.52 ± 0.18 (0.46 ~ 0.58)
χ^2 值/F 值	13.611		6.519
P 值	0.001		0.002

2.3 ROC 曲线下面积 将 SPT 组设置为病例组, 另两组设定为对照组对外周血淋巴细胞平均染色单体断裂数进行 ROC 曲线分析, 见图 1。ROC 曲线下面积为 0.829, 面积的标准误是 0.037, 外周血淋巴细胞平均染色单体断裂数用于判断发生 SPT 的风险有统计学意义 ($P=0.000$)。从 ROC 的移动诊断界点, 选取 ROC 曲线上距离左上角最近的点作为诊断界点, 参考 Youden 指数^[7]: (灵敏度 + 特异度 - 1), 0.69 是特异性和敏感性最佳的点, 灵敏度为 0.806, 特异度为 0.782。

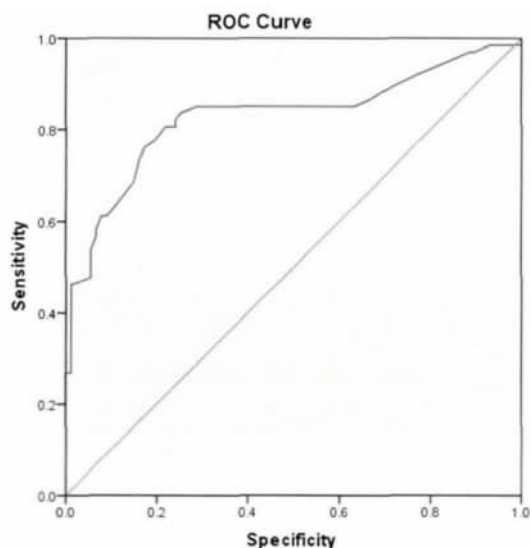


图 1 ROC 曲线图

3 讨论

尽管宿主患癌易感性与致癌物的环境暴露之间的相互作用已经明确, 但是环境诱变剂的个体反应性有很大差别。可能的原因有: ①致癌物代谢的个体间差异; ②诱变剂或致癌物导致的染色体损伤的易感性; ③不同的 DNA 修复能力^[8-13]。化疗药物和放射线治疗都可以诱发 SPT。研究表明辐射至少可以通过 3 个机

制导致癌症的发生: ①与可导致 DNA 损伤和突变的遗传毒性药物的机制相似; ②在中等或高剂量, 辐射细胞杀伤作用破坏组织和约束控制变异细胞增殖的效能减低; ③通过诱导慢性放射损伤(组织凋亡或无序的高增殖)^[14]。SPT 的原因至今仍不完全清楚, 可能的原因有: 遗传易感性, DNA 修复能力的降低和基因不稳定性的增加将导致患癌风险增加。其次为环境因素、生活方式和治疗相关因素等导致。然而长期以来, 我们都低估了 SPT 事件发生的时间。大多数癌症患者的随访期是 5 ~ 10 年, 而 SPT 却很少在这个期间内发生。治疗诱导性 SPT 已成为早期头颈癌患者死亡的主要原因^[15]。

本研究采用博莱霉素作为致突变剂分析既往有头颈肿瘤病史患者的基因稳定性与接受物理和/或化学治疗后是否发生 SPT 做了一个回顾性分析。由于国内大多数医疗单位或院所的病例资源无法共享, 因此本研究最大的困难在于获取病例, 尤其是治愈多年而未发生 SPT 的患者。本研究 SPT 组患者从初诊断头颈肿瘤经放疗 ± 化疗治疗后到发生 SPT 的时间为 (16.73 ± 6.31) 年, 选取随访时间相仿而未发生 SPT、既往有头颈肿瘤病史、并经过放疗 ± 化疗治疗的患者作为病例对照组, 同时设置正常对照组, 使结果更具有说服力。研究发现, SPT 组对致突变剂敏感性显著高于无 SPT 组和对照组, 提示宿主基因稳定性与发生 SPT 密切相关。外周血淋巴细胞平均染色单体断裂数判断该患者人群发生 SPT 的风险有价值, ≥ 0.69 可以作为高危 SPT 患者的临界参考值。本研究是一个横断面调查, 入组病例较少, 生存分析、多因素分析等均存在较大的统计学偏倚, 能否将该值作为预判初治头颈肿瘤患者放化疗后发生 SPT 的风险有待进一步验证。

中国南方是头颈肿瘤高发的区域, 尤其是鼻咽癌, 治愈率高, 生存期长, 尤其要重视 SPT 的发生。对于高危 SPT 的患者在初始治疗制定治疗计划时是否应该把放疗的剂量、靶区、时间和化疗等各种因素都考虑进去进行个体化治疗, 避免或降低过度治疗导致的 SPT, 我们还有更多的工作需要去做。因此在本地区开展大型多中心前瞻性研究意义重大而深远。采用博莱霉素作为致突变剂检测基因的稳定性, 灵敏度和特异性均较好, 技术成熟稳定, 成本低, 效价值高, 易于在基层医院推广, 同时又具有较好的经济前景。

参考文献

- [1] Khuri FR, Kim ES, Lee JJ, et al. The impact of smoking status,

- disease stage , and index tumor site on second primary tumor incidence and tumor recurrence in the head and neck retinoid chemoprevention trial [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev , 2001 , 10 (8) : 823 - 829.
- [2] Haughey BH , Gates GA , Arfken CL , et al. Meta analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol , 1992 , 101 (2 Pt 1) : 105 - 112.
- [3] Gluckman JL , Crissman JD. Survival rates in 548 patients with multiple neoplasms of the upper aerodigestive tract[J]. Laryngoscope , 1983 , 93 (1) : 71 - 74.
- [4] Li X , Hemminki K. Familial upper aerodigestive tract cancers: incidence trends , familial clustering and subsequent cancers [J]. Oral Oncol , 2003 , 39 (3) : 232 - 239.
- [5] Warren S , Gates O. Multiple primary malignant tumors. A survey of the literature and a statistical study [J]. Am J Cancer , 1932 , 16 : 1358 - 1414.
- [6] Wu X , Gu J , Dong Q , et al. Joint effect of mutagen sensitivity and insulin - like growth factors in predicting the risk of developing secondary primary tumors and tumor recurrence in patients with head and neck cancer [J]. Clin Cancer Res , 2006 , 12 (23) : 7194 - 7201.
- [7] Hilden J , Glasziou P. Regret graphs , diagnostic uncertainty and Youden's Index [J]. Stat Med , 1996 , 15 (10) : 969 - 986.
- [8] Wu X , Shi H , Jiang H , et al. Associations between cytochrome P4502E1 genotype , mutagen sensitivity , cigarette smoking and susceptibility to lung cancer [J]. Carcinogenesis , 1997 , 18 (5) : 967 - 973.
- [9] Kawajiri K , Watanabe J , Eguchi H , et al. Genetic polymorphisms of drug - metabolizing enzymes and lung cancer susceptibility [J]. Pharmacogenetics , 1995 , 5 Spec No: S70 - 73.
- [10] Nakachi K , Imai K , Hayashi S , et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S - transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population [J]. Cancer Res , 1993 , 53 (13) : 2994 - 2999.
- [11] Setlow RB. Repair deficient human disorders and cancer [J]. Nature , 1978 , 271 (5647) : 713 - 717.
- [12] Bohr VA , Phillips DH , Hanawalt PC. Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome [J]. Cancer Res , 1987 , 47 (24 Pt 1) : 6426 - 6436.
- [13] Hsu TC. Genetic instability in the human population: a working hypothesis [J]. Hereditas , 1983 , 98 (1) : 1 - 9.
- [14] Welte B , Suhr P , Bottke D , et al. Second malignancies in high dose areas of previous tumor radiotherapy [J]. Strahlenther Onkol , 2010 , 186 (3) : 174 - 179.
- [15] Larson JT , Adams GL , Fattah HA. Survival statistics for multiple primaries in head and neck cancer [J]. Otolaryngol Head Neck Surg , 1990 , 103 : 14 - 24.

收稿日期: 2014 - 03 - 15 修回日期: 2014 - 06 - 27

(上接第 298 页)

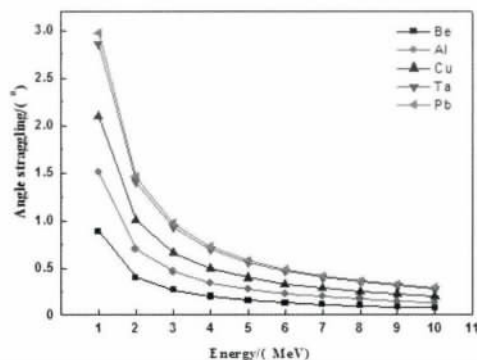


图 4 角度歧离与入射质子能量关系

3 结论

综上所述 , 能量歧离主要发生在入射质子 100 keV ~ 200 keV 能量范围内 , 能量歧离和角度歧离与入射质子能量和面电子密度相关 , 而面电子密度又与靶材料原子序数和靶材料厚度相关。入射质子能量相同时 , 靶材料厚度和原子序数越大 , 能量歧离和角度歧离越大 ; 靶材料厚度相同时 , 入射质子能量越大 , 能量歧离和角度歧离越小。此外 , Geant 4 程序能很好地

描述质子透射谱的能量歧离和角度歧离 , 为背散射分析技术、离子注入、高能质子照相和重离子肿瘤治疗等方面提供定量信息。

参考文献

- [1] 吴治华 , 赵国庆 , 路福全 , 等. 原子核物理实验方法 [M]. 北京: 原子能出版社 , 1997.
- [2] 朱唯干. 散射分析技术 [M]. 北京: 原子能出版社 , 1986.
- [3] 复旦大学 , 清华大学 , 北京大学. 原子核物理实验方法 [M]. 2 版(修订本). 北京: 原子能出版社 , 1985: 59 - 60.
- [4] Frühwirth R , Liendl M. Mixture Models of Multiple Scattering: Computation and Simulation [J]. Computer Physics Communications. 2001 , 141: 230 - 246.
- [5] Highland VL. Some Practical Remarks on Multiple Scattering [J]. Nucl. Instr. and Meth. 1975 , 129: 497 - 499. Erratum [R]. Nucl. Instr. and Meth. 1979 , 161: 171.
- [6] Tsai Yung - Su. Pair Production and Bremsstrahlung of Charged Leptons [J]. Re v. Mod. Phys. 1974 , 46: 815.
- [7] 易海云 , 赵广义. 减能片对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束流影响 Geant4 模拟 [J]. 吉大学学报(理学版) 2014 , 40 (26) : .

收稿日期: 2014 - 06 - 18 修回日期: 2014 - 07 - 05