

放射导致的组织乏氧对正常组织损伤影响的研究进展

刘琦¹ 孙勇¹ 邢星^{1,2} 刘勇^{1,2}

1. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032 ;
2. 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] 肿瘤放疗的同时常常不同程度地引起肿瘤周围正常组织的损伤, 其表现为炎症反应、纤维化形成、组织坏死等病理改变。组织乏氧是正常组织受照后发生的重要变化之一。研究发现, 组织乏氧后会引起多种与放射损伤相关的细胞因子, 如乏氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等的改变。另外, 通过HIF-1 α 信号传导通路、氧化应激反应、巨噬细胞活化增殖、微小RNA(microRNA, miRNA)表达改变等多种途径影响放射损伤的发生发展。现就受照射后乏氧微环境的形成及其对正常组织损伤的影响机制进行综述。

[关键词] 放射; 正常组织损伤; 乏氧

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.12.013

中图分类号: R730.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)12-0956-05

Recent advances of radiation-induced hypoxia on radiation-induced normal tissue injury LIU Qi¹, SUN Yong¹, XING Xing^{1,2}, LIU Yong^{1,2} (1.Cancer Research Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2.Department of Radiation Oncology, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: LIU Yong E-mail: drliuyong@hotmail.com

[Abstract] The dose-limiting factor of radiotherapy is injury found in normal surrounding tumor tissues. It is characterized by inflammation, fibrotic changes, necrosis and other pathological changes. Hypoxic microenvironment is induced in normal tissues received radiation exposure. Previous studies demonstrated radiation-induced hypoxia increased hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor- β (TGF- β) and other cytokines. They promoted radiation-induced normal tissues injury by HIF-1 α signaling pathways, oxidative stress reaction, macrophages and miRNAs. In this study, we reviewed the effect of radiation-induced hypoxic microenvironment on normal tissues injury after radiation exposure.

[Key words] Radiation; Normal tissue injury; Hypoxia

放射治疗是实体肿瘤治疗的有效手段之一。其中肿瘤周围正常组织受照射后引起的放射损伤是影响肿瘤放疗疗效的主要因素之一。放射导致的正常组织早期损伤主要表现为血管内皮细胞损伤、组织局部缺血缺氧及炎症反应等, 晚期损伤主要表现为组织坏死及纤维化改变等。Westbury等^[1]的研究显示, 受照后的乳腺组织与皮肤组

织发生纤维化等形态学改变时, 可以被乏氧标志物哌嗪硝唑盐酸盐染色。Vujaskovic等^[2]亦发现放射治疗后的组织乏氧可通过激活促纤维化形成相关细胞因子转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等, 以促进和维持放射性肺损伤的发展进程。Liu等^[3]在受照射后的直肠组织病理损伤过程中发现, 多种乏氧相关细胞因子, 如乏氧诱导因子

-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、VEGF等表达增高,分别应用HIF-1 α 抑制剂YC-1、VEGF抗体等抑制其作用,放射导致的直肠损伤程度减轻^[4]。由此可见,组织受照射后引起的乏氧可能是导致放射损伤形成的原因之一。进一步研究显示,组织乏氧后可通过提高胶原蛋白-I(collagen-I)mRNA的表达水平直接引起细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中胶原沉积^[5],亦可通过促进成纤维细胞、血管内皮细胞及巨噬细胞等分泌细胞因子导致放射损伤^[6]。

1 放射后组织乏氧的产生原因

正常组织受照射后早期血管损伤导致的组织局部缺血是组织乏氧的主要因素之一。Vujaskovic等^[7]的研究显示,接受放射治疗后肺组织血管内皮细胞损伤,细胞间质水肿及微脉管系统紊乱导致乏氧微环境的形成。组织受照射后血管内皮细胞黏附分子如选择素家族、整合素家族表达的增加及血管平滑肌细胞增生的抑制是射线引起血管损伤的主要机制^[8]。此外,Vujaskovic等^[7]的研究还发现,组织受照射后6周巨噬细胞开始激活,6个月时增殖明显增多。因巨噬细胞具有较高的代谢率和增殖速率,且增殖期细胞耗氧量是G₀期细胞的3~5倍,推测巨噬细胞的高耗氧量及降低肺血管对肺组织释放氧的作用是导致放射早期组织乏氧产生的另一因素。

放射损伤晚期,由于血管壁结构发生损伤后,血管外膜成纤维细胞迅速增殖与分化,超过内皮细胞与血管平滑肌细胞,同时,这些改变使得促纤维化形成的肌成纤维细胞数量增多,进而ECM大量合成,组织发生重建,由此导致组织乏氧加重^[9]。

2 组织乏氧影响放射损伤相关细胞因子表达

2.1 HIF-1

HIF-1是一种普遍存在于哺乳动物细胞内的缺氧应答调控因子,HIF-1主要以异源二聚体形式存在,由 α 亚基(HIF-1 α)和 β 亚基(HIF-1 β)组成。HIF-1 β 表达稳定,而HIF-1 α 活性受氧浓度调节,其C-末端是缺氧信号的活性调控区域。

常氧浓度下,HIF-1 α 极不稳定,很快被泛素蛋白酶系统所降解,而乏氧情况下HIF-1 α 与HIF-1 β 亚单位结合形成具有活性的HIF-1蛋白,结合到乏氧反应元件(hypoxia response elements, HREs)的基因启动子上靶点,调控一系列下游基因的转录与翻译过程^[10]。Rabbani等^[11]研究发现,受分割照射后的肺组织乏氧形成与氧化应激过程激活HIF-1 α 的表达相关,其表达水平与炎症反应、促纤维化因子激活、血管生成通路的激活及巨噬细胞生成与浸润有关。Helton等^[12]通过验证乏氧条件下HIF-1 α 在脑神经元损伤方面的作用,发现经过乏氧处理后行HIF-1 α 基因敲除的小鼠脑神经元死亡的数量比对照组明显减少($P < 0.0001$),表明HIF-1 α 的减少可以保护乏氧导致的小鼠脑部损伤。

2.2 VEGF

VEGF是一种选择性糖基化多肽分泌因子,具有较强的促血管生成作用,其生物活性主要是通过结合蛋白受体(VEGF R1、VEGF R2、VEGF R3、Neuropilin-1和Neuropilin-2)而表现出来。HIF-1结合位点位于VEGF上游作为增强子,乏氧时可通过HIF-1激活VEGF mRNA转录、增强其稳定性从而促进VEGF的表达^[13]。章文成等^[14]通过对放射性皮肤烧伤愈合机制的研究,认为 γ 射线通过损伤DNA和细胞染色体抑制人脐静脉内皮细胞系ECV-304增殖,同时VEGF在内皮细胞受辐射后表达升高,认为其对细胞具有辐射防护作用。

Nordal等^[15]通过对HIF-1 α 、VEGF及其他乏氧反应基因的研究,发现组织乏氧后引起的VEGF可以增加血管通透性加重炎症反应,进而促进中枢神经系统放射性损伤。中枢神经系统接受电离辐射后血管内皮细胞破坏和死亡,造成血脑屏障(blood brain barrier, BBB)或血脊髓屏障(blood spinal cord barrier, BSCB)破坏,液体渗漏造成组织灌注压降低、血管源性水肿和组织间隙液体压力上升,导致局部缺氧,胶质细胞对缺氧反应产生转录因子HIF-1 α ,HIF-1 α 导致其靶基因VEGF上调,而VEGF又造成血管通透性进一步升高,BBB或BSCB进一步破坏,

造成内皮细胞永久性破坏。在放射性直肠损伤的研究中也发现, 应用VEGF抗体抑制其作用后, 可以减轻放射性直肠纤维化的程度^[4]。

2.3 TGF- β

TGF- β 是一种多肽, 具有多种生物学作用, 包括促进成纤维细胞、成骨细胞和雪旺氏细胞的生长; 促进ECM如胶原蛋白、纤粘连蛋白的表达和抑制ECM的降解; 促进伤口愈合和典型肉芽组织形成等。Falanga等^[16]将人类皮肤成纤维细胞暴露于乏氧环境下24~72 h, 发现与标准氧分压环境下相比, TGF- β 的mRNA水平及多肽合成增多。Rabbani等^[11]在受照射4周后的肺组织中发现TGF- β 表达持续增高, 且与组织乏氧表达模式相同。

TGF- β 亦是一种公认的放射损伤相关因子。Gallet等^[17]研究发现, 接受放射治疗6周后的皮肤TGF- β 的表达比未接受放射治疗高2.2倍($P=0.001$), 并在6个月之后达到2.7倍($P=0.013$), 且TGF- β 水平越高, 纤维化程度越高。

2.4 核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)

NF- κ B是一类具有启动基因转录功能的蛋白质。NF- κ B的主要功能是调控多种基因, 包括免疫炎症反应相关基因、病毒相关基因和原癌基因的转录表达, 另外也是调节炎症因子基因表达的关键转录因子之一。NF- κ B是一种组织乏氧相关因子。早期的研究显示, 组织乏氧可通过Ras和Raf-1酶激活NF- κ B, 同时乏氧条件下, *Src*原癌基因的激活亦可通过促进Ras激活的进程, 导致NF- κ B亚单位抑制剂I- κ B α 的降解^[18]。

NF- κ B同时又是一种放射损伤相关因子。Rabbani等^[11]发现NF- κ B作为一种氧化还原敏感性转录因子, 在分割放射治疗后的乏氧肺组织中显著升高。Zhou等^[19]发现在放疗过程中, 射线直接作用后可通过产生炎症细胞因子或通过活性氧作用激活NF- κ B, 从而启动和调控一系列参与炎症反应的炎症因子的基因表达, 进而产生炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素

-1(interleukin-1, IL-1)等, 加速放射性肺炎与纤维化的发生。

3 乏氧对放射损伤途径的影响

3.1 HIF-1 α 途径

正常组织受照射后, 多种乏氧相关细胞因子之间的相互作用, 是促进放射损伤途径的途径之一。Jubb等^[20]研究发现乏氧诱导HIF-1 α 活性增加, 随后激活VEGF、血管内皮生长因子受体-1(vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1)基因转录, 进而VEGFR-2基因也被相继激活, VEGF/VEGFR系统的激活引起了脑组织血管内皮细胞增殖和新生血管的形成, 以适应缺血反应。Nordal等^[15]在对放射引起的中枢神经系统损伤的研究中亦发现, 缺氧条件下, HIF-1 α 表达上调并介导其下游靶基因VEGF高表达, 产生信号级联反应, 该信号通路是调控BSCB通透性变化引起放射损伤的分子基础。

乏氧诱导HIF-1 α 的生成亦可通过调节TGF- β 信号通路, 促进TGF- β 表达水平升高, 同时TGF- β 增高可以在翻译水平上促进HIF-1 α 的表达, 进而促进乏氧后组织损伤的形成。Basu等^[21]研究发现, 应用HIF-1 α 转录水平抑制剂或HIF-1 α 基因敲除后, TGF- β 结合蛋白Smad结合元件的启动子活性降低, 且TGF- β 刺激胶原蛋白I表达减少, 而HIF-1 α 过度表达时两者皆增加。乏氧亦可促进Smad3 mRNA表达水平升高, 促进血小板反应蛋白释放潜在TGF β -2, 从而调节TGF信号通路^[21]。

3.2 巨噬细胞的活化与增殖

巨噬细胞作为一种免疫细胞, 能够吞噬、破坏受损组织, 促进组织修复, 但若其持续存在, 并不利于组织修复。同时, 巨噬细胞具有高代谢率与高耗氧量的特点, 可促进组织乏氧^[7]。Rabbani等^[22]在放射性肺损伤的研究中发现, 受分割照射26周后的肺组织中巨噬细胞激活数量明显增多。Fleckenstein等^[23]通过研究发现, 乏氧条件下的巨噬细胞增多, 可通过其调节炎症反应对组织造成的损伤。巨噬细胞亦可通过刺激促纤维化与促血管形成细胞因子

的表达, 维持慢性放射损伤的进程。

3.3 氧化应激反应

射线对细胞的损伤作用很大程度上是由于辐射对水分子的作用形成羟自由基(HO·)、超氧阴离子(O₂⁻)等活性氧簇(reactive oxygen species, ROS), 进而对DNA造成损伤, 即涉及物理-化学-生物体的连锁反应。研究发现, 受照射后的乏氧组织中, 乏氧诱导因子HIF-1 α 表达升高, 氧化应激反应可以通过稳定HIF-1 α , 提高HIF-1 α 的表达而导致放射性肺损伤^[24]。分割放射治疗后的肺组织通过锰卟啉催化的抗氧化剂治疗后, 降低氧化应激反应水平的同时可以降低HIF-1 α 以及HIF-1 α 调节蛋白水平, 这可能是抗氧化剂转移反应活性物质或直接作用于相关的信号蛋白引起的^[22]。ROS在乏氧时亦可通过线粒体复合体III促进HIF-1 α 表达。通过RNA干扰技术敲除复合体III活性, 可以降低该复合体中某一种蛋白亚基, 减少了ROS的生成, 并减弱其对HIF-1 α 的稳定与促表达作用^[25]。

3.4 微小RNA(microRNA, miRNA)的表达

目前研究发现, 多种miRNA在乏氧条件下表达发生改变。Bruning等^[26]报道, 结肠癌患者经过放疗后的乏氧组织中miR-155的表达水平增高。而miR-155可通过作用于靶基因血管紧张素II的I型受体促进成纤维细胞分化为肌成纤维细胞, 促进胶原合成^[27]。肾小管上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的发生, 是促进肾纤维化形成的原因之一^[28]。Du等^[29]的研究发现, 乏氧环境下, 肾小管上皮细胞表达miR-34a降低, 而miR-34a敲除后可促进肾小管EMT的发生, miR-34a的过度表达则避免EMT的发生。由此可见, miR-34a对乏氧环境下组织损伤具有保护作用, 此调节过程通过miR-34a靶向作用于Notch信号通路进行。

4 小结

综上所述, 放射所致的组织乏氧是影响正常组织损伤的重要因素之一, 该因素已经受到临床关注, 并且开展了相关的临床研究, 如有临床试验表明, 抗VEGF抗体贝伐单抗可以有

效治疗放射导致的中枢神经系统损伤(如放射性脑坏死), 合并使用可以降低头颈部肿瘤或脑瘤, 特别是儿童脑瘤放疗后中枢神经系统损伤^[30-31]。另外, Citrin等^[32]研究证实, 阿米福汀及抗氧化的 β -胡萝卜素、维生素E可作为自由基清除剂, 减轻氧化应激反应, 从而减轻放射引起的氧化损伤。虽然放射导致的组织乏氧对正常组织损伤的影响已经受到关注, 但其机制尚未完全清楚。从放射生物学着手, 进一步探讨放射后组织乏氧微环境的产生及其对正常组织损伤的影响机制, 对于提高临床放疗疗效、减少放疗并发症具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] WESTBURY C B, PEARSON A, NERURKAR A, et al. Hypoxia can be detected in irradiated normal human tissue: a study using the hypoxic marker pimonidazole hydrochloride [J]. Br J Radiol, 2007, 80(959): 934-938.
- [2] VUJASKOVIC Z, ANSCHER M S, FENG Q F, et al. Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 50(4): 851-855.
- [3] LIU Y, KUDO K, ABE Y, et al. Hypoxia expression in radiation-induced late rectal injury [J]. J Radiat Res, 2008, 49(3): 261-268.
- [4] LIU Y, KUDO K, ABE Y, et al. Inhibition of transforming growth factor- β , hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor reduced late rectal injury induced by irradiation [J]. J Radiat Res, 2009, 50(3): 233-239.
- [5] NORMAN J T, CLARK I M, GARCIA P L. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts [J]. Kidney Int, 2000, 58(6): 2351-2366.
- [6] HOPEWELL J W, CALVO W, JAENKE R, et al. Microvasculature and radiation damage [J]. Recent Results Cancer Res, 1993, 130: 1-16.
- [7] VUJASKOVIC Z, DOWN J D, VAN T' VELD AA, et al. Radiological and functional assessment of radiation-induced lung injury in the rat [J]. Exp Lung Res, 1998, 24(2): 137-148.
- [8] 杨冬, 刘伟. 电离辐射引起血管损伤的研究 [J]. 中国肿瘤防治杂志, 2007, 14(8): 638-641.
- [9] STENMARK K R, GERASIMOVSKAYA E, NEMENOFF R A, et al. Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role of vascular remodeling [J]. Chest, 2002, 122(6): 326-334.
- [10] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. Cell, 2012, 148(3): 399-408.
- [11] RABBANI Z N, MI J, ZHANG Y, et al. Hypoxia inducible factor-1 α signaling in fractionated radiation-induced lung

- injury: role of oxidative stress and tissue hypoxia [J]. *Radiat Res*, 2010, 173(2): 165-174.
- [12] HELTON R, CUI J, SCHEEL J R, et al. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 α reduces rather than increase hypoxic-ischemic damage [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(16): 4099-4107.
- [13] 隋文文, 张维东. 缺氧诱导因子促进肿瘤血管生成的研究 [J]. *国际肿瘤杂志*, 2013, 40(6): 416-418.
- [14] 章文成, 杨占山, 杨淑琴, 等. 辐射对血管内皮细胞生物学特性的影响 [J]. *苏州大学学报*, 2005, 25(2): 193-199.
- [15] NORDAL R A, NAGY A, PINTILIE M, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor1 target genes in central nervous system radiation injury: a role for vascular endothelial growth factor [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(10): 3342-3353.
- [16] FALANGA V, ZHOU L, YUFIT T. Low oxygen tension stimulate collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF- β 1 [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 191(1): 42-50.
- [17] GALLET P, PHULPIN B, MERLIN J L, et al. Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissues and relation with histological severity scoring [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29399.
- [18] KOONG A C, CHEN E Y, MIVECHI N F, et al. Hypoxia activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2) [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(20): 5273-5279.
- [19] ZHOU D, BROWN S A, YU T, et al. A high dose of ionizing radiation induces tissue-specific activation of nuclear factor-kappa B in vivo [J]. *Radiat Res*, 1999, 51(6): 703-709.
- [20] JUBB A M, PHAM T Q, HANBY A M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor1 α , and carbonic anhydrase IX in human tumors [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57: 504-512.
- [21] BASU R K, HUBCHAK S, HAYASHIDA T, et al. Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(4): 898-905.
- [22] RABBANI Z N, SALAHUDDIN F K, YARMOLENKO P, et al. Low molecular weight catalytic metalloporphyrin antioxidant AEOL 10150 protects lungs from fractionated radiation [J]. *Free Radic Res*, 2007, 41(11): 1273-1282.
- [23] FLECKENSTEIN K, ZGONJANIN L, CHEN L, et al. Temporal onset of hypoxia and oxidative stress after pulmonary irradiation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 68(1): 196-204.
- [24] LI F, SONVEAUX P, RABBANI Z N, et al. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation [J]. *Mol Cell*, 2007, 26(1): 63-74.
- [25] DEWHIRST M W, CAO Y, MOELLER B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(6): 425-437.
- [26] BRUNING U, CERONE L, NEUFELD Z, et al. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1 α activity during prolonged hypoxia [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(19): 4087-4096.
- [27] JOSHI S R, COMER B S, MCLENDON J M, et al. MicroRNA regulation of smooth muscle phenotype [J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2012, 4(1): 1-16.
- [28] IWANO M. EMT and TGF-beta in renal fibrosis [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2010, 1(2): 229-238.
- [29] DU R, SUN W, XIA L, et al. Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-34a promotes EMT by targeting the Notch signaling pathway in tubular epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30771.
- [30] LIU A K, MACY M E, FOREMAN N K. Bevacizumab as therapy for radiation necrosis in four children with pontine gliomas [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 75(4): 1148-1154.
- [31] LEVIN V A, BIDAUT L, HOU P, et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of bevacizumab therapy for radiation necrosis of the central nervous system [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 79(5): 1487-149.
- [32] CITRIN D, COTRIM A P, HYODO F, et al. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury [J]. *Oncologist*, 2010, 15(4): 360-371.

(收稿日期: 2014-02-18 修回日期: 2014-04-23)