

放射性纤维化发病机制的研究现状与进展

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 放射治疗是实体肿瘤治疗的有效手段之一,其原理是通过射线造成肿瘤细胞 DNA 损伤而达到治疗目的。然而射线本身不具有靶向性,对肿瘤细胞进行杀伤的同时亦会对受照区域内的正常组织造成不同程度的损伤。早期损伤多表现为急性炎症反应,晚期损伤以纤维化为主要病理改变,常导致受照器官结构和功能的改变,严重影响患者的生存质量。研究表明,放射性纤维化的形成涉及多种细胞因子,多个反应及组织微环境的变化等过程。本文将对放射性纤维化的发病机制的研究现状与进展进行综述。

关键词 放射, 正常组织, 晚期损伤, 纤维化

中图分类号 R730.55, TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.010101

放射治疗是实体肿瘤的有效治疗手段之一,50%~60%的肿瘤患者在治疗过程中需要进行放射治疗。然而,放射导致的正常组织损伤也是临床放疗面临的重要问题,特别是以纤维化为主要病理改变的晚期损伤,常导致器官结构和功能发生变化。尤其是发生在重要脏器的晚期损伤,如放射性肺纤维化、放射性直肠纤维化、放射性脑损伤等,严重影响患者的生存质量,甚至危及生命。

放射纤维化是在正常组织受辐射发生损伤以后,细胞外基质(ECM)合成与降解失衡导致胶原和其他 ECM 成分过度积累的过程。接受照射后的组织中细胞因子 TGF- β 1、基质金属蛋白酶(MMPs)等表达发生改变进而诱导组织中纤维化形成相关蛋白如胶原蛋白、纤维连接蛋白及其他糖蛋白等表达增加,从而导致 ECM 合成与降解失衡^[1]。ECM 重建将会导致血管内膜、中层的纤维化、动脉血管狭窄、器官发生缺血性缺氧进而萎缩、中空器官狭窄和器官功能下降等病理改变^[2]。

1 肌成纤维细胞形成

正常组织受照射后,发生氧化应激,急性炎症反应等过程,成纤维细胞、上皮细胞、血管内皮细

胞、血管平滑肌细胞和骨髓来源的间充质细胞等皆可分化为肌成纤维细胞,进而分泌胶原蛋白等 ECM 成分,促进纤维化的形成^[2]。Hinz 等^[3]研究发现,组织损伤后成纤维细胞转变为肌成纤维细胞, α -平滑肌肌动蛋白(α -SAM)的出现导致细胞-细胞间连接与细胞-基质间连接,后者使得肌成纤维细胞纤维坚硬且具有收缩性,产生大量胶原蛋白(尤其是 I 型和 III 型胶原)、纤连蛋白和其他 ECM 蛋白。

2 细胞因子

2.1 转化生长因子 β (TGF- β)

TGF- β 超家族,包括多功能细胞因子如骨形态发生蛋白、激活剂和抑制剂。其中, TGF- β 1 的主要生物学功能是调节细胞的增殖和结缔组织的合成,对细胞外基质基因表达、基质降解、细胞凋亡等起着重要的调节作用。Gallet 等^[4]的研究发现,接受放射治疗 6 周后的皮肤 TGF- β 1 的表达,比未接受治疗组升高 2.2 倍($p=0.001$),并且在 6 个月之后达到 2.7 倍($p=0.013$),且 TGF- β 1 水平越高,纤维化程度越高。

TGF- β 1 主要通过 TGF- β /Smad 信号途径、MAPK 及 PKC 信号途径等多条通路诱导 CTGF 的

基金项目: 国家自然科学基金(81202148)、教育部留学回国人员科研启动基金(N130204)和 2013 年上海市浦江人才计划(13PJ1401600)资助

第一作者: 刘琦,女,1989 年 8 月出生,2013 年毕业于泰山医学院,现就读于复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, E-mail: liuqiqi36@163.com

通讯作者: 刘勇,博士,副研究员, E-mail: drliuyong@hotmail.com

收稿日期: 初稿 2014-07-21; 修回 2014-11-03

产生^[5]。TGF- β 1 信号通路亦可与血小板源生长因子受体- β (PDGFR- β)信号通路相互作用, PDGFR- β 的自身免疫可诱导 TGF- β 的产生, 进而加重纤维化的形成^[2]。Wang 等^[6]通过研究发现, TGF- β 1 促进 miR-192 的生成, miR-192 与锌指增强结合蛋白(ZEB)的 3'UTR 结合, 导致 ZEB 对转录调控元件(E-box)的抑制, 使得细胞黏附分子 E-钙黏素的表达减少, 促进纤维化形成。E-box 的抑制亦可降低磷酸酶张力蛋白同系物(PTEN), 进而活化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt), 导致 ECM 沉积^[7]。

然而最新研究发现, TGF- β 家族分子之一 TGF- β 3 对纤维化形成起到缓解作用。Xu 等^[8]通过减少放射后肺纤维化进程中成纤维细胞募集及调节 IFN- γ /IL-4 平衡, 提高肺纤维化组织中 Tregs 细胞比例, 进而减轻肺纤维化。

2.2 结缔组织生长因子 CTGF

CTGF 是 TGF- β 信号通路的下游信号分子, 主要介导 TGF- β 的促纤维化作用, 局限于促结缔组织中 ECM 的生成, 与体内多种器官纤维化相关。CTGF 细胞因子的自分泌使纤维化过程得以持续。在 TGF- β 等一系列刺激因子的作用下, CTGF 结合到非特征性的细胞膜受体, 激活下游纤维化信号级联反应, 进而激活成纤维细胞迁移和增殖等^[2]。CTGF 亦与其他生长因子如碱性成纤维细胞因子(β -FGF)、血小板源生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子 TNF- α 等共同作用维持纤维化进程^[9]。Haydont 等^[9]在分离的放射性直肠炎的肌成纤维细胞中发现, CTGF 也可不依赖于经典 TGF- β /Smad 通路, 而是依赖于 rho/ROCK 通路。

2.3 肿瘤坏死因子 TNF- α

TNF 是一种促使肿瘤出血坏死的物质, 可分为 TNF- α 和 TNF- β , 其中 TNF- α 主要由活化的单核巨噬细胞产生, 为体内启动炎症反应的关键细胞因子。研究显示, 在放射性肺损伤的发生过程中, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎因子表达增加^[10]。Przybyzewska 等^[11]通过转染 TNF- α 溶解型受体基因抑制小鼠中 TNF- α 活性, 对其进行照射后与对照组比较, 发现其晚期纤维化症状减轻, 且比对照组小鼠平均晚 8 周死亡, 进而提出设想转染 TNF 受体抑制基因为简单安全的防护放射性肺纤维化发生的方法。

3 多个反应共同作用

3.1 氧化应激反应

真核生物组织受照射后, 由于水分子的电离导致活性氧簇大量产生, 产生的自由基和活性氧簇(ROS)包括 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 及 $HO_2^{\cdot}$ 、 $\cdot OH$ 等, 对生物大分子及其细胞造成机体在分子水平和细胞水平的损伤。低浓度 ROS 可作为第二信使, 活化信号通路如 NF- κ B 通路、ERK/MAPK 通路、PI3K/AKT 通路等, 调节细胞的增殖与存活^[12]。

TGF- β 1 是放射诱导纤维化形成的主要调节因子, 亦是上皮-间质转化(EMT)的潜在引发因子, 可使肿瘤细胞获得更多转移表型^[13]。ROS 激活前体相关蛋白, 导致蛋白蛋氨酸残基被氧化, 通过 TGF- β 1 依赖的信号通路如促肌成纤维细胞生成、促 CTGF 生成等途径诱导细胞外基质合成增多^[14]。Tobar 等^[15]的研究显示, TGF- β 1 可显著提高细胞 ROS 水平, 且 TGF- β 1 加入后细胞内 ROS 比基础水平增加两倍, 该反应可被氧化应激清除剂 N-乙酰半胱氨酸所抑制。另有报道显示, ROS 在缺氧时对 HIF-1 α 生成和维持中具有重要作用, 在此过程中线粒体复合体 III 起到重要作用。通过 RNA 干扰技术敲除复合体 III 活性从而降低该复合体中其中一种蛋白亚基, 减少了 ROS 的生成和其对 HIF-1 α 的稳定与促表达作用。若在敲除细胞中加入 H_2O_2 , 则缺氧时细胞恢复稳定生成 HIF-1 α 的能力^[16]。

Edvardsen 等^[17]在 18 个与纤维化相关基因的 mRNA 水平上分析单核苷酸多态性对后放射治疗后 ROS 相关基因的影响, 发现在许多 ROS 相关基因中基因变异与皮下组织纤维化相关基因 miRNA 表达有关。Sunday 等^[18]通过对氧敏感性的肺神经内分泌细胞(PNECs)和 PNEC 来源的胃泌素释放肽(GRP)的研究总结出, 在放射线、臭氧等环境作用下, ROS 产生增多, 进而促进 PNECs 分泌 GRP, 后者可直接作用于其靶细胞同源受体诱导其分化, 如平滑肌细胞、巨噬细胞、CD4⁺T 细胞、内皮细胞及肺成纤维细胞; 同时促巨噬细胞和 T 细胞分泌细胞因子, 最终诱导肌成纤维细胞及纤维化的形成。

3.2 炎症反应

组织受照射早期血管舒张、血管通透性增高, 内皮细胞发生急性炎症反应是放射性纤维化形成的关键因素。Cho 等^[19]发现服用姜黄素的小鼠照射后

可减轻炎性水肿和巨噬细胞积累,降低炎症反应,同时降低受照肺组织中 TGF- β 1 和 CTGF 的表达水平,提高肿瘤坏死因子 TNF- α 和其受体 TNFR-1 的表达水平,这表明降低炎症反应水平可以降低放射性纤维化的发生。Ma 等^[20]发现,运用脂多糖诱导小鼠肺损伤后抑制 TGF- β /Smad 通路可促进炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 大量产生,同时 MMP-9 活性增加,这表明在放射性肺损伤形成过程中,炎症因子及 MMPs 或 TIMPs 等通路可互相影响促进纤维化的形成。

Horton 等^[21]对受照射 14 d 的小鼠皮肤进行骨髓来源的间充质干细胞(BMSC)治疗,发现可以抑制纤维化炎症因子 IL-10 表达增加,可以促纤维化形成的炎症因子 IL-1 β 表达降低,表明抑制慢性炎症反应可以逆转放射导致的皮肤纤维化形成。

3.3 血管反应

放射后导致血管损伤是哺乳动物受照射后正常组织损伤的突出特征。直肠癌患者术后进行 1.8 或 2 Gy 分割放射治疗后数周,大血管形态发生改变,主要表现为血管周围和血管内纤维化、血管内膜增生、血管腔狭窄^[22]。Wang 等^[23]通过研究发现,直肠癌患者术前放射治疗后,血管内皮细胞血栓调节蛋白(TM)减少,纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)增多。TM 的降低促进凝血酶增高进而促进血液凝集、血小板释放纤维化因子 TGF- β 1 增多。潜在的促纤维化蛋白 PAI-1 可以通过 TGF- β 1/Smad 通路,也可以通过 P53 通路等非 Smad 途径产生,与 TGF- β 1、CTGF 共作用抑制 ECM 降解,促进产生胶原蛋白-I 的肺巨噬细胞生成^[24]。

4 组织微环境变化

组织受照射以后,微血管萎缩,大血管腔狭窄导致组织局部缺血和乏氧。乏氧状态下, HIF 的两个亚单位 HIF- α 与 HIF- β 形成异质二聚体,结合到乏氧反应元件(HREs)的基因启动子上靶点,激活大量基因表达以促进纤维化形成等过程^[25]。放疗后组织乏氧诱导 HIF-1 α 的生成可调节 TGF- β 信号通路,其促进 TGF- β 表达水平的提高与 HIF-1 α 和 Smad 结合特定乏氧相关基因的 DNA 序列调节密切相关,其调节血管内皮生长因子(VEGF)的表达,进而影响血管新生及组织炎性状态。乏氧同样促进 Smad3 mRNA 的表达水平,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^[26]。

Higgins 等^[27]通过研究发现,乏氧亦可以通过 HIF-1 α 作用上调 CTGF 和 ECM 调节因子如 TIMP-1 和 PAI-1,同时下调 MMP-2 的表达。他们通过灭活肾上皮细胞中 HIF-1 α 和单侧输尿管堵塞相连的肾小管中的 HIF-1 α 进行研究,发现 HIF-1 α 亦可提高肾 EMT 的作用,通过调节赖氨酸氧化酶基因,导致上皮细胞迁移。HIF-1 α 基因切除后则抑制间质胶原沉积,抑制炎症反应,降低成纤维细胞特定蛋白-1(FSP-1)的表达^[28]。

Vujaskovic 等^[29]的研究发现,受照后 6 个月重度乏氧模型的鼠肺中胶原沉积和纤维化程度高于轻度乏氧模型,同时巨噬细胞数量、体积、活性等增强。免疫组化结果表明,TGF- β 、VEGF 和血小板-内皮细胞粘附分子(CD31)内皮细胞标记增加,提示乏氧激活纤维化形成。乏氧亦可以通过调节 miRNA 水平的表达调节纤维化进程。Bruning 等^[30]发现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(AT1R)促进成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,增强其胶原蛋白合成能力^[31]。

5 总结

随着对放射性纤维化形成机制的深入研究,人们期待通过开发一些药物,阻断相关的信号传导通路,进而预防与治疗放射导致的纤维化。目前临床上已对此做出了些尝试:例如发现重建免疫平衡如糖皮质激素的应用,对许多放射性器官和组织的纤维化具有改善作用,预示其可作为放射后肺纤维化形成预防和治疗的干预措施^[32];另外发现,中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)抑制因子西维来司钠在受照后的肺实质中能显著降低中性粒细胞聚集与胶原蛋白的合成,提高肺组织顺应性^[33]等。

放射性纤维化的形成与发展是一个复杂的动态变化的过程,其发病及影响因素尚未完全阐明,其预防和治疗靶点的深入研究将有助于改善临床放疗疗效。

参考文献

- 1 Jean C, Gravelle P, Fournie J J, *et al*. Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology [J]. *Oncogene*, 2011, 30(24): 2697-2706.
- 2 Yarnold J, Brotons M C. Pathogenetic mechanisms in

- radiation fibrosis [J]. *Radiotherapy and Oncology*, 2010, **97**(1): 149-161.
- 3 Hinz B, Phan S H, Thannickal V J, *et al.* The myofibroblast: one function, multiple origins [J]. *American Journal of Pathology*, 2007, **170**(6): 1807-1816.
- 4 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.
- 5 Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and Fibrosis [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, **13**: 3056-3062.
- 6 Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P, *et al.* E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor-beta [J]. *Diabetes*, 2010, **59**(7): 1794-1802.
- 7 Kato M, Putta S, Wang M, *et al.* TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN [J]. *Nature Cell Biology*, 2009, **11**(7): 881-889.
- 8 Xu L, Xiong S, Guo R, *et al.* Transforming growth factor β 3 attenuates the development of radiation-induced pulmonary fibrosis in mice by decreasing fibrocyte recruitment and regulating IFN- γ /IL-4 balance [J]. *Immunology Letters*, 2014, **162**(1): 27-33.
- 9 Haydont V, Riser B L, Aigueperse J, *et al.* Specific signals involved in the long-term maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation: a role for CCN2 and low concentration of TGF-beta1 [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2008, **294**: 1332-1341.
- 10 Liu G D, Xia L, Zhu J W, *et al.* Genistein alleviates radiation-induced pneumonitis by depressing Ape1/Ref-1 expression to down-regulate inflammatory cytokines [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, **69**(3): 725-733.
- 11 Przybyszewska M, Miloszevska J, Rzonca S, *et al.* Soluble TNF- α receptor I encoded on plasmid vector and its application in experimental gene therapy of radiation-induced lung fibrosis [J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2011, **59**(4): 315-326.
- 12 Reuter S, Gupta S C, Chaturvedi M M, *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, **49**(11): 1603-1616.
- 13 Iwano M. EMT and TGF-beta in renal fibrosis [J]. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2010, **2**: 229-238.
- 14 Jobling M F, Mott J D, Finnegan M T, *et al.* Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species [J]. *Radiation Research*, 2006, **166**(6): 839-848.
- 15 Tobar N, Villar V, Santibanez J F. ROS-NFkappaB mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010, **340**(1-2): 195-202.
- 16 Dewhirst M W, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response [J]. *Nature Reviews Cancer* 2008, **8**(6): 425-437.
- 17 Edvardsen H, Reinertsen K V, Zhao X, *et al.* SNP in TXNRD2 associated with radiation-induced fibrosis: a study of genetic variation in reactive oxygen species metabolism and signaling [J]. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2013, **86**(4): 791-799.
- 18 Sunday M E. Oxygen, gastrin-releasing Peptide, and pediatric lung disease: life in the balance [J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2014, **2**: 72.
- 19 Cho Y J, Yi C O, Jeon B T, *et al.* Curcumin attenuates radiation-induced inflammation and fibrosis in rat lungs [J]. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2013, **17**(4): 267-274.
- 20 Ma B, Zhou P Y, Ni W, *et al.* Inhibition of activin in receptor-like kinase 5 induce matrix metalloproteinase 9 expression and aggravates lipopolysaccharide-induced pulmonary injury in mice [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2013, **17**(8): 1051-1059.
- 21 Horton J A, Hudak K E, Chung E J, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation [J]. *Stem Cells*, 2013, **31**(10): 2231-2241.
- 22 Milliat F, Francois A, Isoir M, *et al.* Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages [J]. *American Journal of Pathology*, 2006, **169**(4): 1484-1495.
- 23 Wang J, Zheng H, Ou X, *et al.* Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic

- radiation fibrosis [J]. American Journal of Pathology, 2002, **160**(6): 2063-2072.
- 24 Samarakoon R, Overstreet J M, Higgins P J, *et al.* TGF- β signaling in tissue fibrosis: Redox controls, target genes and therapeutic opportunities [J]. Cellular Signalling, 2013, **25**: 264-268.
- 25 Semenza G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. Cell, 2012, **148**(3): 399-408.
- 26 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]. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2011, **300**: 898-905.
- 27 Higgins D F, Kimura K, Iwano M, *et al.* Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis [J]. Cell Cycle, 2008, **7**(9): 1128-1132.
- 28 Higgins D F, Kimura K, Bernhardt W M, *et al.* Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Journal of Clinical Investigation, 2007, **117**(12): 3810-3820.
- 29 Vujaskovic Z. Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury [J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2001, **50**(4): 851-855.
- 30 Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, *et al.* MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1 α activity during prolonged hypoxia [J]. Molecular and Cellular Biology, 2011, **31**(19): 4087-4096.
- 31 Joshi S R, Comer B S, McLendon J M, *et al.* MicroRNA regulation of smooth muscle phenotype [J]. Molecular and Cellular Pharmacology, 2012, **4**(1): 1-16.
- 32 Sekine I, Sumi M, Ito Y, *et al.* Retrospective analysis of steroid therapy for radiation-induced lung injury in lung cancer patients [J]. Radiotherapy and Oncology, 2006, **80**: 93-97.
- 33 Fujino N, Kubo H, Suzuki T, *et al.* Administration of a specific inhibitor of neutrophil elastase attenuates pulmonary fibrosis after acute lung injury in mice [J]. Experimental Lung Research, 2012, **38**: 28-36.

Recent advances in mechanisms of radiation-induced fibrosis

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)

ABSTRACT Radiation therapy is an effective treatment for solid tumors. Its effectiveness results from DNA damage of tumor cells induced by ionizing radiation (IR). However, IR can also destroy normal tissues surrounding tumors in treatment of cancer. Early damages are featured with acute inflammatory response. Late damages are characterized by fibrosis, which would affect the structure and function of the targeting organs, even threaten the quality of patients' life. Previous studies suggested that radiation fibrosis process involves multiple cytokines, multiplex reactions and changes in the microenvironment. Here we review the current progress of molecular mechanisms on radiation-induced fibrosis.

KEYWORDS Radiation, Normal tissue, Late damage, Fibrosis

CLC R730.55, TL71