

辐射导致长期骨髓抑制的研究进展

李德冠 樊赛军 孟爱民

【摘要】 随着接受放疗患者生存期的延长,患者发生长期骨髓抑制的概率也大幅提高。长期骨髓抑制在临床中常被忽略,随着时间延长患者病情会逐渐加重,生活质量降低。许多长期骨髓抑制患者会形成再生障碍性贫血或者骨髓增生异常综合征,严重者可引发死亡。研究资料表明,活性氧和丝裂原活化蛋白激酶 p38(P38MAPK)通路在辐射诱导长期骨髓抑制中占主要作用。笔者总结了辐射导致的长期骨髓抑制的相关研究,指出了今后的研究方向。

【关键词】 造血干细胞;骨髓抑制;活性氧;丝裂原活化蛋白激酶 p38

Long-term myelosuppression induced by irradiation Li Deguan, Fan Saijun, Meng Aimin. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Meng Aimin, Email: ai_min_meng@126.com

【Abstract】 The incidence of long-term myelosuppression increased with the increasing numbers of cancer patients treated with radiation, Because long-term myelosuppression can deteriorate over time and be overlooked in clinic, the survival quality of cancer survivors are affected. Many of them may develop hypoplastic anemia or myelodysplastic syndrome, even death. The role of reactive oxygen species and p38 MAPK in regulating long-term myelosuppression induced by irradiation has been proved in the recent years. In this review, the advancement of long-term myelosuppression induced by irradiation and the further works need to be done are summarized.

【Key words】 Hematopoietic stem cell; Myelosuppression; Reactive oxygen species; p38 Mitogen-activated protein kinase

随着肿瘤患者的逐年增加,接受放疗的患者也在不断增加。2012年,全球新增癌症病例1400多万例,中国每年新增肿瘤患者300多万例,而肿瘤患者中约有70%接受放射治疗,这些患者接受治疗的远期效应会影响患者的生活质量^[1]。造血系统对辐射高度敏感,在接受照射后造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)会出现凋亡、衰老或者分化等损伤性改变,引起造血系统应激能力下降,导致肿瘤患者长期骨髓抑制^[2]。现将辐射诱导长期骨髓抑制的有关研究综述如下。

1 辐射对造血系统的损伤

造血系统对辐射高度敏感,辐射后造血系统

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.04.011

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2011CB964800-G); 国家自然科学基金(81372928, 81102873); 天津自然科学基金(12JCQNJC09100, 15JCZDJC35200)

作者单位: 300192 天津,中国医学科学院放射医学研究所,天津市放射医学和分子核医学重点实验室

通信作者: 孟爱民(Email: ai_min_meng@126.com)

损伤是限制临床放疗照射剂量的最常见毒副作用。造血细胞在受照后会大量凋亡,引起造血功能低下,进而诱发的感染、出血和严重贫血是急性放射病致死的重要原因^[3]。由于大部分的HSC处于静止期,并且更易于修复DNA损伤,因此在受照后增殖的多能造血祖细胞(multipotent progenitors, MPP)和造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPC)比HSC更易凋亡^[4]。而MPP和HPC大量减少也是导致急性骨髓抑制的主要原因。HSC在这种情况下会进行自我更新增殖和分化再生,形成新的MPP和HPC,从而产生成熟的血细胞,恢复造血系统动态平衡。在这个过程中,各类造血细胞因子如粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF),粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte/macrophage-colony stimulating factor)或促红细胞生成素(erythropoietin)等可起到刺激增殖作用。因此,这些生长因子在临床被广泛应用于治疗放疗后急性骨髓抑制,以快速恢复成熟造血

细胞数量。大部分患者会在放疗后接受造血因子治疗康复或者自我康复。

但是,有些患者在接受放疗后会形成长期骨髓抑制。长期骨髓抑制不同于急性骨髓抑制,它是潜在的。形成长期骨髓抑制的患者或者动物通常具有正常的血细胞计数、骨髓有核细胞计数和正常的克隆形成能力,但是HSC储备量以及自我更新能力发生下降,因此长期骨髓抑制在临床上常常被忽略。临床上使用造血因子促进急性骨髓抑制尽快恢复。但事实上,应用造血因子动员HSC增殖形成MPP和HPC,会进一步损伤HSC的自我更新能力,最终长期骨髓抑制患者会发展成再生不良性贫血或者骨髓增生异常综合征。

2 HSC衰老——辐射诱导长期骨髓抑制的主要机制

研究证实,HSC在受到照射后会根据损伤不同而启动不同应激通路,主要包括HSC凋亡、HSC分化以及HSC衰老^[5-7]。而由于HSC凋亡或者分化主要发生在急性辐射损伤并能够被具有自我更新能力的HSC所补充,所以其在长期骨髓抑制的发生中作用较小。因此,辐射诱导长期骨髓抑制的主要原因是HSC自我更新能力下降,这也是HSC衰老的主要表现。

HSC衰老最早在Bmi1^{-/-}小鼠中得到证实^[8]。Bmi1基因是多梳基因(polycomb group genes)家族中的一种转录抑制基因,是一种广泛表达的核蛋白。在小鼠Bmi1基因敲除后,小鼠骨髓会逐渐发育不良并在两个月内死亡。尽管Bmi1^{-/-}小鼠具有正常的胎肝HSC,但是移植实验发现其仅有短期的造血重建能力。这说明Bmi1^{-/-}小鼠的胎肝HSC仅具有形成和分化成造血祖细胞的功能,但不具备自我更新和形成HSC功能。同样类似的结果在神经和白血病干细胞中得到证实^[9-10]。这些结果都提示Bmi1基因与干细胞的自我更新能力密切相关,敲除Bmi1基因会导致包括HSC在内的多种干细胞衰老。

多项研究报道证实,HSC衰老会引起HSC自我更新能力降低,导致正常HSC数量下降,诱发长期骨髓抑制^[11-13]。受照小鼠的HSC会形成较少的脾结节,并且之后再生能力下降。在临床接受全身照射后进行自体移植的患者中也得到类似的结果。2003年,Meng等^[12-13]从体内和体外实验发现,在辐射引起的长期骨髓抑制模型中存在HSC衰老

现象;进一步研究发现衰老的HSC克隆能力下降,与衰老相关的 β -半乳糖苷酶(senescence associated β -galactosidase, SA- β -gal)、p16和Arf表达升高,这是首次得到的辐射诱导HSC衰老的直接证据。此外,辐射诱导HSC衰老在HSC衰竭前并未引起HSC自我更新能力下降、分化能力丧失,分化形成的成熟细胞功能也未见改变,提示辐射可选择性地诱导HSC衰老,进而诱导长期骨髓抑制发生^[14]。

3 活性氧与HSC衰老

活性氧在干细胞稳态调节中占据重要地位^[15]。共济失调毛细血管扩张症突变基因(ataxia telangiectasia mutated, ATM)敲除小鼠中HSC活性氧水平升高,从而使静止期的HSC数量减少,进入增殖的HSC数量增加,最终损伤HSC的自我更新能力,并发生骨髓衰竭。给予ATM^{-/-}小鼠N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-cysteine, NAC)可有效修复HSC功能并阻止骨髓衰竭进度^[16-17]。丁硫氨酸亚砷胺(L-buthionine-S-R-sulfoximine, BSO)为谷胱甘肽合成抑制剂,可减少细胞中活性氧的清除。向HSC加入低剂量的BSO,可诱导HSC活性氧水平升高,进而导致HSC的克隆形成能力下降^[18]。此外,在Forkhead转录因子1、3、4、小鼠双微体2(mouse double minute2 homolog gene, MDM2)、结节性硬化症1(the tuberous sclerosis 1 gene, TSC1)等基因敲除小鼠模型以及范可尼贫血等疾病中,均发现HSC活性氧水平升高,自我更新能力下降^[19-22]。这些研究结果均表明HSC中活性氧水平升高会导致HSC衰老。

辐射通过直接作用和间接作用对机体产生损伤。直接作用是射线直接照射在生物大分子或者细胞上,导致分子或者细胞损伤;而间接作用则是射线产生大量的活性氧自由基,自由基进一步损伤细胞和蛋白。而辐射对机体或者细胞的远期效应则主要体现在引起细胞衰老、基因不稳定增加、炎症反应以及纤维化。辐射作用于HSC可引起HSC中活性氧升高,会损伤HSC进而诱导HSC衰老,引起HSC自我更新能力和分化能力下降,形成长期骨髓抑制。Shao等^[22]的研究证实,亚致死剂量的照射仅能引起HSC中活性氧的持续升高,而对于子代成熟细胞则无显著影响。这种辐射引起的HSC中活性氧长期升高会使HSC中DNA损伤持续增加,从而引起HSC衰老,具体表现为HSC的克隆形成

和长期植入能力降低以及引起髓系分化偏移。

有研究表明,给予接受亚致死剂量照射小鼠 NAC、白藜芦醇或者超氧化物歧化酶模拟物等均可有效降低 HSC 中的活性氧水平,提高 HSC 克隆形成和长期植入能力,缓解辐射引起的长期骨髓抑制^[23-25]。另有研究表明,抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路也可提高 HSC 的长期植入能力^[26]。此外,中药血必净注射液对辐射诱导的 HSC 活性氧升高也有一定的抑制作用^[27]。这些研究进一步证实辐射引起的活性氧升高是引起 HSC 衰老的重要原因。

4 丝裂原活化蛋白激酶 p38(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)通路与 HSC 衰老

p38MAPK 通路是一种介导细胞应激反应的重要信号通路,它可被不同的外部与细胞内刺激所激活,这些应激刺激包括辐射、活性氧和细胞因子等。细胞受到刺激后,通过某种中间环节使 MAPK 激酶活化,其转而激活 MAPK 激酶,后者通过双位点磷酸化调控 p38MAPK 的活性^[28]。p38MAPK 具有多种底物,通过对下游通路的激活,会引发细胞产生炎症或者免疫反应,进而导致细胞周期阻滞、衰老和凋亡等。

近年来,研究发现 p38MAPK 通路在骨髓抑制中也起到一定作用^[29]。在再生障碍性贫血和骨髓增生异常综合征患者中,骨髓细胞的 p38 表达显著升高^[30-31]。在 ATM 突变或者 FoxO3 基因敲除后,小鼠的 HSC 发生衰老,形成骨髓抑制,而抑制 p38 表达升高可部分逆转骨髓抑制的发生^[32]。Wang 等^[33]进一步研究证实,辐射通过 p38 通路诱导 HSC 衰老,引发骨髓抑制,观察接受亚致死剂量照射小鼠的 HSC,结果发现受照射后 HSC 中的 p38 在第 5 周时仍显著升高,利用 p38MAPK 抑制剂 SB203580 可有效抑制 HSC 的衰老,降低 p16 和 SA- β -gal 的表达。Li 等^[34-35]对接受 4 Gy 或 6 Gy 全身照射小鼠进行 p38 抑制剂联合 G-CSF 治疗,结果发现,联合给药可有效抑制辐射引起的 HSC 衰老,对免疫系统也有保护作用,p38MAPK 有可能作为长期骨髓抑制治疗的靶点^[36]。Bmi1 调控的下游基因包括 p16、Arf 等。Bmi1^{-/-}小鼠的 HSC p16 和 Arf 高表达分别导致 HSC 周期阻滞和凋亡。在 Bmi1^{-/-}小鼠基础上进一步敲除 p16,可有效缓解 HSC 衰老;而敲除 Arf,则未发现对 HSC 衰老有逆转作用。Shao 等^[37]

利用 p16 和 Arf 基因敲除小鼠,接受全身照射后与正常小鼠相比发现,基因敲除小鼠的 HSC 衰老比例并未显著降低。该研究表明辐射诱导的骨髓长期抑制并未经过 p16-Arf 通路。此项研究被认为是辐射诱导 HSC 衰老研究的重要突破,表明辐射诱导 HSC 衰老机制有待深入研究^[38]。

5 结语

长期骨髓抑制是放射治疗常见的不良反应之一。尽管长期骨髓抑制是潜在的,但是它会长期持续存在,并且很难恢复,最终会导致贫血、骨髓发育不良甚至会引发骨髓异常增生或者急性髓系白血病。本文总结了辐射诱导 HSC 衰老引发长期骨髓抑制的机制以及治疗的研究进展。但截至到目前为止,对辐射导致的长期骨髓抑制的发病机制仍未阐明,且临床也没有有效的治疗方案。未来随着衰老或者活性氧调控机制的研究进展可能会获得突破。总之,辐射导致长期骨髓抑制机制的深入研究将会促进临床长期骨髓抑制新策略的开发。

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(9): 1447-1462.
- [3] Shao L, Sun Y, Zhang Z, et al. Deletion of proapoptotic Puma selectively protects hematopoietic stem and progenitor cells against high-dose radiation[J]. Blood, 2010, 115(23): 4707-4714.
- [4] Mohrin M, Bourke E, Alexander D, et al. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(2): 174-185.
- [5] Yu H, Shen H, Yuan Y, et al. Deletion of Puma protects hematopoietic stem cells and confers long-term survival in response to high-dose gamma-irradiation[J]. Blood, 2010, 115(17): 3472-3480.
- [6] Carbonneau CL, Despars G, Rojas-Sutterlin S, et al. Ionizing radiation-induced expression of INK4a/ARF in murine bone marrow-derived stromal cell populations interferes with bone marrow homeostasis[J]. Blood, 2012, 119(3): 717-726.
- [7] Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, et al. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence[J]. Blood, 2006, 107(1): 358-366.
- [8] Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2003, 423(6937): 302-305.
- [9] Molofsky AV, He S, Bydon M, et al. Bmi-1 promotes neural stem

- cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(12): 1432-1437.
- [10] Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 255-260.
- [11] Spangrude GJ, Brooks DM, Tumas DB. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells; in vivo expansion of stem cell phenotype but not function[J]. *Blood*, 1995, 85(4): 1006-1016.
- [12] Meng A, Wang Y, Brown SA, et al. Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms[J]. *Exp Hematol*, 2003, 31(12): 1348-1356.
- [13] Meng A, Wang Y, Van Zant G, et al. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5414-5419.
- [14] Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(2): 348-356.
- [15] Bigarella CL, Liang R, Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling[J]. *Development*, 2014, 141(22): 4206-4218.
- [16] Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2004, 431(7011): 997-1002.
- [17] Ito K, Takubo K, Arai F, et al. Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes[J]. *J Immunol*, 2007, 178(1): 103-110.
- [18] Lewandowski D, Barroca V, Duconge F, et al. In vivo cellular imaging pinpoints the role of reactive oxygen species in the early steps of adult hematopoietic reconstitution[J]. *Blood*, 2010, 115(3): 443-452.
- [19] Abbas HA, Maccio DR, Coskun S, et al. Mdm2 is required for survival of hematopoietic stem cells/progenitors via dampening of ROS-induced p53 activity[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 606-617.
- [20] Miyamoto K, Araki KY, Naka K, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 101-112.
- [21] Chen C, Liu Y, Liu R, et al. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(10): 2397-2408.
- [22] Shao L, Wang Y, Chang J, et al. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury[J]. *Transl Cancer Res*, 2013, 2(5): 397-411.
- [23] Zhang H, Zhai Z, Wang Y, et al. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 54: 40-50.
- [24] Li H, Wang Y, Pazhanisamy SK, et al. Mn (III) meso-tetrakis-(N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin mitigates total body irradiation-induced long-term bone marrow suppression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 30-37.
- [25] Wang H, Yang YL, Zhang H, et al. Administration of the resveratrol analogues isorhapontigenin and heyneanol-A protects mice hematopoietic cells against irradiation injuries[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 282657[2015-03-01]. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/282657/>.
- [26] Luo Y, Li L, Zou P, et al. Rapamycin enhances long-term hematopoietic reconstitution of ex vivo expanded mouse hematopoietic stem cells by inhibiting senescence [J]. *Transplantation*, 2014, 97(1): 20-29.
- [27] Li D, Lu L, Zhang J, et al. Mitigating the effects of Xuebijing injection on hematopoietic cell injury induced by total body irradiation with gamma rays by decreasing reactive oxygen species levels[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 10541-10553.
- [28] 李德冠 樊飞跃, 孟爱民. p38 MAPK 通路在造血系统调节中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(1): 4-6.
- [29] Geest CR, Coffey PJ. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(2): 237-250.
- [30] Navas TA, Mohindru M, Estes M, et al. Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors[J]. *Blood*, 2006, 108(13): 4170-4177.
- [31] Zhou L, Opalinska J, Verma A. p38 MAP kinase regulates stem cell apoptosis in human hematopoietic failure[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(5): 534-537.
- [32] Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress[J]. *Cell*, 2007, 128(2): 325-339.
- [33] Wang Y, Liu L, Zhou D. Inhibition of p38 MAPK attenuates ionizing radiation-induced hematopoietic cell senescence and residual bone marrow injury[J]. *Radiat Res*, 2011, 176(6): 743-752.
- [34] Li D, Wang Y, Wu H, et al. Mitigation of ionizing radiation-induced bone marrow suppression by p38 inhibition and G-CSF administration[J]. *J Radiat Res*, 2011, 52(6): 712-716.
- [35] Li D, Wang Y, Wu H, et al. The effects of p38 MAPK inhibition combined with G-CSF administration on the hematoimmune system in mice with irradiation injury[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62921[2015-03-01]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062921>.
- [36] 李德冠, 路璐, 吴红英, 等. G-CSF 联合 SB203580 对 4 Gy 照射小鼠免疫系统的作用[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2014, 38(4): 216-218.
- [37] Shao L, Feng W, Li H, et al. Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an Ink4a- and Arf-independent manner[J]. *Blood*, 2014, 123(20): 3105-3115.
- [38] Geiger H. HSC senescence upon irradiation[J]. *Blood*, 2014, 123(20): 3060-3061.

(收稿日期: 2015-03-03)