肿瘤放、化疗引发造血干细胞衰老的机制

张 宇 王文娟

摘 要 放、化疗治疗恶性肿瘤存在许多不良反应,其中骨髓损伤最为常见。急性骨髓损伤通过治疗可以恢复;潜在骨髓损伤随着时间或治疗的逐渐加重可导致严重的血液疾病。造血干细胞衰老是放、化疗诱导的潜在骨髓损伤的机制,本文将对放、化疗造成造血干细胞衰老的机制做一综述,着重探讨 ROS 的介导作用,以及信号通路如 p38 MAPK、p53 - 21 等的作用,为临床治疗提供可能的靶点或思路。

关键词 肿瘤放化疗 造血干细胞衰老 活性氧 p38 途径 p53 途径

中图分类号 R552 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.003

放、化疗是临床治疗恶性肿瘤的常用方法,然而其不良反应很多,其中对骨髓的损伤是最常见的不良反应。放、化疗容易损伤骨髓造血细胞及造血微环境,造成骨髓抑制。骨髓抑制包括急性骨髓损伤和潜在骨髓损伤两方面。造血干细胞(hematopoietic stem cells,HSCs)是最原始的造血细胞,具有高度的自我更新能力并分化为各系造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells,HPCs),HPCs 的增殖分化满足机体造血需求。急性骨髓损伤在放、化疗后短时间内发生,主要表现为 HPCs 受损,外周血中血细胞数量明显减少。但由于 HSCs 大部分处于静止期,对于 DNA 损伤具有较强的抵抗和修复能力,放、化疗造成其直接凋亡较少,故通过造血生长因子的应用可恢复骨髓造血[1]。目前临床常采用粒细胞集落刺激因子(G - CSF)等造血生长因子来治疗急性骨髓损伤,取得了较好的疗效。而在使用一些对 HSCs 具有高选择性毒性的药物或大剂量放疗时,一些急性骨髓损伤可发展成为潜在骨髓损伤,造成 HSC 衰老而表现为 HSCs 储备减少、自我更新能力受损及造血重建功能缺陷。由于造血生长因子等的应用,潜在骨髓损伤患者在 HSCs 储备减少的情况下在短期内仍具有正常的血细胞计数,从而使潜在骨髓损伤进一步被遮蔽,因此在临床上很容易被忽视。还有研究发现,G - CSF 的应用会促使 HSC 衰老而加重放射诱导的潜在骨髓损伤[2]。可见对于潜在骨髓损伤,目前临床上的认识及预防、治疗尚十分不足。由于 HSC 衰老是肿瘤放、化疗引发潜在骨髓损伤的主要原因,因此本文将对放、化疗造成 HSC 衰老的机制做一综述。

基金项目:首都中医药研究专项课题(16ZY02);北京市中医管理局中医药薪火传承“3 + 3”工程项目(No. 2012 - SZ - B - 27);首都医科大学科研基金资助项目(自然类)(2015ZR27)

作者单位:100069 北京,首都医科大学

通讯作者:王文娟,副教授,硕士生导师,电子信箱:ruyue999@sina.com

一、活性氧与 HSC 衰老

活性氧(reactive oxygen species,ROS)是外源性氧化剂或细胞内有氧代谢过程中产生的、具有很高生物活性的含氧化合物,包括 O_2^-、OH、HO_2、RO_2、H_2O_2 等。ROS 在细胞信号转导方面起重要作用,可维持正常细胞功能。但由于 ROS 含有未配对的自由基,因此其性质非常活跃,可损害细胞内大分子,从而与细胞衰老和疾病发生密切相关[3]。因此细胞内 ROS 含量的调节对于细胞的功能和存活具有重要意义。当这种调控失衡时,ROS 积聚可导致脂类、蛋白质和核酸受损,这种情况称为氧化应激[4]。

ROS 对 HSCs 自我更新、细胞迁移和发育,以及骨髓造血微环境的调控都具有重要作用[5]。ROS 积聚导致 HSC 衰老被认为是潜在骨髓损伤的主要机制。HSC 衰老主要表现为细胞生长停滞、细胞形态改变、自我更新和多向分化能力降低等。现已明确放射或化疗药可导致细胞内 ROS 生成快速增加,这个初始的氧化应激不仅造成直接和急性的细胞损伤,更重要的是扰乱了细胞的代谢功能,造成细胞内氧化和去氧化反应调节失衡,从而使 ROS 持续生成。ROS 对 HSCs 功能的调控具有浓度依赖性。HSCs 的增殖分化需要低水平的 ROS,有实验发现 AKT1/2 双敲除鼠的 HSCs 表现出长期功能缺陷,这是由 ROS 生成减少造成的[6,7]。而过多 ROS 的产生将损伤 HSCs,有研究对鼠进行半数致死全身性射线照射(TBI),发现 HSCs 中 ROS 持续增加,并伴有持续的 DNA 损伤增

加和 HSC 多向分化能力减弱,更多实验证实放、化疗通过使细胞内 ROS 增加损伤了 HSCs 增殖分化和自我更新的能力,导致 HSC 衰老和储备减少[11]。ROS 通过蛋白质、转录因子及基因结构修饰等可参与多种信号转导通路。当 HSCs 内 ROS 含量增加时,可通过激活 p38 MAPK、p53 - p21、p16 - Rb 等通路导致造血系统应激能力下降而造成 HSC 衰老。

目前研究发现,多种信号分子如 ATM、FoxOs、Bmi1、TSC1、mTOR、AKT 和 NADPH 氧化酶(NOXs)等,在 ROS 生成的调节中扮演了重要的角色。ATM 激酶在调节基因组稳定性上起关键作用,是调控 DNA 损伤中应激反应的关键酶,对 HSCs 内 ROS 的生成起负性调控作用。研究发现,ATM -/- 鼠的 HSCs 中 ROS 升高,ROS 通过激活 p38 MAPK 导致肿瘤抑制因子 $p16^{Ink4a}$ 和 $p19^{Arf}$ 升高而抑制 HSCs 增殖,进而抑制了 HSCs 的自我更新,导致细胞周期停滞和 HSCs 早熟性衰竭[11]。FoxOs 转录因子是 HSCs 内抗氧化应激反应的关键调控因子[12]。研究发现 FoxO1、FoxO3、FoxO4 3 个基因敲除鼠表现出造血功能损伤,基因敲除后 HSCs 的数量和长期再生能力显著降低,并且与 HSCs 内 ROS 的升高密切相关,用抗氧化剂 NAC 治疗能改善 HSCs 损伤和造血功能异常。而 FoxO3 在此调控中发挥重要作用,与同时敲除 FoxO1、FoxO3、FoxO4 3 个基因一样,单独敲除 FoxO3 也会导致 ROS 聚集,使静止期 HSCs 减少,进而使 HSCs 停滞在 G_2/M 期,表现出骨髓增殖样症状。目前已知 FoxOs 对 HSCs 内 ROS 的调控主要是通过调节一些抗氧化酶的转录来实现的。有实验发现 FoxO3 对 ATM 基因的表达有重要作用,可见 FoxO3 对 HSCs 内 ROS 的负性调控至少部分是通过调节 ATM 的表达实现的,这两者对 ROS 的生成存在一定的联系机制,并且对 HSCs 池的维持有重要作用[13]。

ROS 是线粒体呼吸的副产物,线粒体被认为是大多数细胞内 ROS 生成的主要来源。Bmi1 -/- 和 TSC -/- 鼠线粒体功能损伤导致 ROS 生成增加。研究表明,TSC -/- 鼠 mTOR 过度激活,引起 HSCs 内线粒体活动增强和 ROS 聚集,促使 HSCs 由静止期进入细胞周期,造成 HSCs 早熟性衰竭和骨髓造血功能减退。使用抗氧化剂 NAC 或 mTOR 抑制剂雷帕霉素等处理敲除 TSC1 的 HSCs 移植小鼠,能显著恢复其 HSCs 数量和活性[14]。但是与 HSCs 分化而来的下级造血细胞和其他体细胞相比,HSCs 只有少量线粒体,主要依靠糖酵解提供 ATP。因此,HSCs 中 ROS 生成的增加只是小部分源于线粒体。ROS 也可由 NADPH 氧化酶家族(NOXs)产生。人类的 HSCs 表达 NOX1、NOX2、NOX4 3 种基因及其他调节亚单位,NOXs 消耗线粒体外的氧气大约占 HSCs 的呼吸的一半,这些都提示 NOXs 可能是 HSCs 内 ROS 的主要来源,放射诱导的人造血细胞中 ROS 升高并非是线粒体来源的[15]。

与 HSCs 不同的是,HPCs 以及单核细胞表达 NOX1、NOX2,而不表达 NOX4,提示 HSCs 分化后 NOX4 表达下调,其在 HSCs 功能中有重要作用。更重要的发现是,在全身放射治疗后 HSCs 中 NOX4 的表达上调,NOX1、NOX2 的表达不变,因此 NOX4 很可能是放疗诱导 HSCs 中 ROS 升高的首要因素。二苯碘(DPI)治疗可以抑制放射后 HSCs 中 ROS 的升高,而夹竹桃麻素却不能,NOX4 对夹竹桃麻素的抑制作用不敏感,而其他 NOXs 成员对其敏感。除此之外,白藜芦醇被发现可通过下调 NOX4 的表达来抑制射线照射造成的 HSCs 氧化应激和衰老[16]。这些发现更加证实了 NOX4 是 TBI 后 HSCs 中 ROS 的主要来源。还有研究发现,mTOR 可能通过 HIF1 上调 NOX4 的表达,因为 mTOR 可以激活 HIF1,而 NOX4 被发现是 HIF1 的靶基因[17]。但是放、化疗是否会造成 mTOR 激活再引发 NOX4 表达上调,仍需要得到进一步的证实。对这个机制的研究,将会为放、化疗造成的 HSC 衰老和潜在骨髓损伤的治疗揭示新的分子靶点。然而除 NOX4 外,其他酶是否在放化疗后对 HSCs 中 ROS 的升高有重要作用,仍有待进于一步发现。

此外,与 ROS 增多相关的 HSC 衰老和功能缺陷可能还存在其他机制,如 Mdm2 -/- 鼠诱导 ROS 水平升高,激活 p53 途径,影响 HSCs 的生存[18]。总之,在放、化疗后,多种信号分子介导 HSCs 内 ROS 水平升高,导致 HSCs 数量减少、活性降低、自我更新能力减弱、细胞周期变化而引发 HSC 衰老。

二、p38 途径与 HSC 衰老

p38 MAPK 是丝裂原活化蛋白酶(MAPK)超家族成员,研究发现其在造血细胞功能调节过程中有重要作用,通过抑制 p38 MAPK 通路可以在一定程度上缓解疾病引发的造血细胞功能损伤或衰老。p38 MAPK 通路是一种级联式的应激反应通路,在不同的外界或细胞内刺激条件下,通过 MAPKKK 活化,激活 MAPK,后者再通过双位点磷酸化调控 p38 MAPK 的活性。p38 MAPK 通路对其下游的激活,会引发细胞

产生炎症或免疫反应,或者导致细胞周期停滞、衰老、凋亡等。目前许多研究证明,p38 通过上调 p16 的表达对细胞衰老起重要作用,而阻止 p38 激活或下调 p38 的表达可以缓解 p16 的诱导和基因毒作用、氧化应激和端粒缩短导致的细胞衰老[19]。

目前的研究认为,ROS 对 HSCs 造成的损伤不是通过非特异的细胞毒作用,而是通过细胞内信号转导途径实现的,其中至少包含 p38 途径。对 ATM 基因突变鼠和 FoxO3 基因敲除鼠的研究发现,其 HSCs 出现早衰和衰竭,并且与 ROS 的生成增多相关,更重要的是选择性地在 HSCs 中出现 p38 激活和 p16 基因的上调[11]。因此 p38 可能对 HSCs 自我更新的调节有重要作用,并且在氧化应激条件下激活后通过调节 p16 诱导 HSC 衰老。那么放化疗造成的骨髓损伤是否是通过 p38 - p16 途径? 使用 p38 阻断剂又是否可以缓解放化疗造成的骨髓损伤? 研究发现,p38 选择性地在射线照射过的 HSCs 中激活,并且在骨髓细胞培养鉴定中维持了 5 周,使用 p38 的特异性阻断剂(SB203580)缓解了放射诱导的骨髓造血细胞功能抑制且 p16 的表达下降。更值得一提的是,研究还发现在体使用 p38 阻断剂可缓解放射造成的骨髓损伤[20, 21]。上述结果提示 p38 途径在射线诱导的 HSC 衰老和骨髓损伤中发挥重要作用,并且对该途径的特异性阻断可以缓解放射诱导的骨髓损伤,为放化疗造成长期骨髓损伤的预治提供了有效干预靶点。

三、p53 途径与 HSC 衰老

p53 基因是一种抑癌基因,随着研究的深入,其在放、化疗中的作用也逐渐被发现并受到重视。p53 基因是细胞生长周期中的负调节因子,可以调节大量靶基因,与细胞周期的调控、DNA 修复、细胞分化、细胞凋亡等重要的生物学功能有关,在抑制癌细胞生长过程起到了重要的作用。p53 在细胞内受到严密调控。研究发现,p53 对 HSCs 的静止状态起维持作用,对 HSCs 自我更新起负性调控作用,p53 基因缺陷鼠表现出 HSCs 自我更新的增强和扩增的造血干细胞池[22]。野生型 p53 蛋白可使细胞周期停滞在 G_1 期而不进入分裂期,为细胞内 DNA 损伤提供修复的时间,如果 DNA 损伤严重而无法修复,p53 可通过触发凋亡系统使细胞凋亡。当 ROS 异常升高时,可导致 DNA 双链断裂,激活 ATM /Chk2 - p53 - p21 途径启动细胞周期检定点后,通过一系列反应磷酸化 p53,进而诱导 p21 表达,导致细胞周期阻滞而发生细胞衰老。

p16 - Rb 通路可能是多种途径诱导细胞衰老的最终通路,其上游转导信号包括 p38 途径和 p53 - p21 途径[23]。在细胞衰老的起始阶段 p53 激活和 p21 上调,在 p16 开始上调后 p53 和 p21 开始减少,并且当 p16 高表达时,即使阻断 p53 - p21 途径也无法逆转细胞周期。p53 - p21 途径在细胞衰老起始阶段发挥作用,而 p16 对维持细胞衰老发挥作用。辐射诱导 HSCs 中 p53 激活和 p21 表达之后再有 p16 表达,射线照射几周后,p53 和 p21 表达开始下降,而 p16 持续升高[23]。总之,p53 途径是放、化疗导致 HSC 衰老的重要信号途径,在衰老的起始阶段发挥重要作用。

四、造血微环境损伤与 HSC 衰老

造血微环境由内皮细胞、成骨细胞、脂肪细胞等组成,是 HSCs 赖以生存的场所,调节 HSCs 的静息、增殖和分化。造血微环境主要分为两种。成骨微环境和血管微环境。血管微环境中氧浓度较高,在 ROS 的作用下,主要参与短期 HSCs 的增殖和分化。成骨微环境指骨腔内表面的区域,氧浓度极低,包含丰富的成骨细胞,HSCs 通过与成骨细胞相互作用维持静息状态。正常情况下,HSCs 代谢活动较低,胞内代谢产生 ROS 较少及相应抗氧化能力的保护作用,使 HSCs 维持静息状态。当损伤发生时,ROS 过度聚集,可使 HSCs 进入细胞周期,促使 HSCs 增殖分化。放化疗导致造血微环境损伤及其与 HSC 衰老的具体关联机制仍有待于进一步研究。N - 钙黏素是一种细胞黏附分子,在 HSCs 和成骨细胞上共同表达,可能介导 HSCs 在造血微环境中的黏附。有研究发现,化疗药物 5 - FU 诱导 HSCs 中 ROS 升高,抑制 N - 钙黏素的表达,导致 HSCs 从造血微环境中脱离[24]。研究提示,放、化疗使 ROS 积聚导致 HSCs 从造血微环境中脱离,失去调控,进入细胞周期并发生衰老。成骨细胞对射线抵抗较强,而内皮细胞对放射极其敏感,致死量全身射线照射会导致内皮细胞严重损伤,而移植内皮细胞后会促进 HSCs 增殖恢复而提高存活率[23,25,26]。至于放、化疗后成骨细胞和内皮细胞在 HSC 衰老中发挥的作用,放、化疗对造血微环境中其他细胞造成影响及其与 HSC 衰老的关联,都还需进一步研究。

HSC 衰老是放、化疗造成潜在骨髓损伤的主要机制。生理浓度的 ROS 通过调控 HSCs 功能对维持造血平衡起重要作用,放、化疗使 ROS 积聚,导致

HSCs 发生氧化应激反应,从而影响 HSCs 的数量与活性,使其自我更新能力受损和细胞周期变化,最终导致 HSC 衰老和 HSCs 池的衰竭。多种信号分子如 ATM、FoxO3 以及 NADPH 氧化酶 NOX4 等,在 ROS 介导的 HSC 衰老过程中发挥着重要的作用,最终通过 p38 MAPK、p53 -21、p16 - Rb 等通路导致 HSC 衰老。深入研究放、化疗引发 HSC 衰老的机制,对于在肿瘤治疗中适当应用抗氧化剂、通路阻断剂预防 HSC 衰老,以减轻或防治因肿瘤放、化疗引发的潜在骨髓损伤具有重要的指导意义。

参考文献

1 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

2 Li C, Lu L, Zhang J, *et al*. Granulocyte colony - stimulating factor exacerbates hematopoietic stem cell injury after irradiation[J]. Cell Biosci, 2015, (5): 65

3 Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health[J]. Crit Rev Toxicol, 2015, 45(9):765 - 798

4 Richardson C, Yan S, Vestal CG. Oxidative stress, bone marrow failure, and genome instability in hematopoietic stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2):2366 - 2385

5 Ludin A, Gur - Cohen S, Golan K, *et al*. Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self - renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(11): 1605 - 1619

6 Lewandowski D, Barroca V, Ducongé 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

7 Juntilla MM, Patil VD, Calamito M, *et al*. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species [J]. Blood, 2010, 115(20): 4030 - 4038

8 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

9 Fleenor CJ, Marusyk A, DeGregori J. Ionizing radiation and hematopoietic malignancies: altering the adaptive landscape[J]. Cell Cycle, 2010, 9(15): 3005 - 3011

10 Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, *et al*. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self - renewal capacity of human hematopoietic stem cells[J]. Blood, 2011, 118(11):2941 - 2950

11 Shao L, Li H, Pazhanisamy SK, *et al*. Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence[J]. Int J Hematol, 2011, 94 (1): 24 - 32

12 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

13 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

14 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

15 Yamaguchi M, Kashiwakura I. Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells[J]. PLoS One, 2013, 8(7):e70503

16 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

17 Diebold I, Petry A, Hess J, *et al*. The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia - inducible factor - 1[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(12): 2087 - 2096

18 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

19 Geest CR, Coffer PJ. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis[J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(2): 237 - 250

20 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

21 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

22 Liu Y, Elf SE, Miyata Y, *et al*. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(1): 37 - 48

23 Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(9): 1447 - 1462

24 Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, *et al*. Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell - niche interaction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(3): 578 - 583

25 Hooper AT, Butler JM, Nolan DJ, *et al*. Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2 - mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(3): 263 - 274

26 Li B, Bailey AS, Jiang S, *et al*. Endothelial cells mediate the regeneration of hematopoietic stem cells[J]. Stem Cell Res, 2010, 4(1): 17 - 24

(收稿日期:2016 - 04 - 06)
(修回日期:2016 - 04 - 06)