DOI:10.16016/j.2097-0927.202206093

# 不同剂量分割放射治疗对直肠癌细胞促血管生成作用的比较研究

童潮旭,张 涛,龚惠英,毛伟灵,李龙浩 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肿瘤科

[**摘要**] **目的** 探讨不同剂量分割放射治疗对直肠癌肿瘤内血管生成的影响及其潜在机制。**方法** 收集2017-2020年重庆医科大学附属第一医院肿瘤科收治的56例直肠癌患者病理学资料进行统计学分析,采用免疫组化检测大分割放疗(5 Gy×5次,1周内完成)和常规分割放疗(2 Gy×25次,5周内完成)后直肠癌患者癌组织中微血管密度,并使用Western blot检测癌组织中的低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor 1-alpha,HIF-1α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)蛋白表达水平。将培养的直肠癌细胞及人脐静脉内皮细胞分为0、4、12、24 Gy剂量辐照组,采用CCK-8法检测两种细胞各剂量辐照组的增殖情况,Western blot检测各剂量辐照组直肠癌细胞中VEGF和HIF-1α蛋白表达水平,ELISA检测直肠癌细胞上清液中VEGF的浓度。收集各剂量辐照组的直肠癌细胞条件培养基,干预培养并用CCK-8法和克隆形成实验观测人脐静脉内皮细胞的增殖情况。**结果** 常规分割放疗组和大分割放疗组在病理肿瘤退缩分级(tumor regression grade,TRG)上差异无统计学意义,直肠癌患者术后癌组织免疫组化显示,大分割放疗组微血管密度计数(microvessel density,MVD,32.00±3.61)显著高于常规分割放疗组(22.33±3.06,$P<0.05$);Western blot结果显示,大分割放疗组癌组织内HIF-1α和VEGF蛋白表达水平显著高于常规分割放疗组($P<0.01$)。细胞实验结果显示,不同剂量放射照射后,呈剂量依赖性降低直肠癌细胞和血管内皮细胞的增殖能力($P<0.05$)。直肠癌细胞中VEGF和HIF-1α的蛋白表达水平和直肠癌细胞上清液中VEGF的蛋白浓度随着辐照剂量的增加逐渐升高($P<0.01$)。大剂量辐照后直肠癌细胞培养基干预人脐静脉内皮细胞能显著提高其增殖能力($P<0.01$)。**结论** 大剂量放疗能抑制血管内皮细胞增殖,同时可能通过促进直肠癌细胞HIF-1α和VEGF高表达,导致肿瘤血管代偿性生成增加。

[**关键词**] 直肠癌;血管内皮细胞;放射治疗;HIF-1α;VEGF

[**中图法分类号**] R730.23; R730.55; R735.37 [**文献标志码**] A

# Comparison of angiogenetic effects of different dose fractionated radiotherapy on rectal cancer cells

TONG Chaoxu, ZHANG Tao, GONG Huiying, MAO Weiling, LI Longhao Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of different dose fractionated radiotherapy on angiogenesis in rectal cancer and its potential mechanism. **Methods** The pathological data of 56 rectal cancer patients admitted to our hospital from 2017 to 2020 were collected for statistical analysis. The microvessel density (MVD) in the rectal cancer tissues under hypofractionated radiotherapy (HFR) and conventional fractionated radiotherapy (CFR) were respectively detected by immunohistochemistry. The expression levels of hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1α) and vascular endothelial growth factor

[**基金项目**] 重庆市科卫联合医学科研项目(2021MSXM318)

[**通信作者**] 李龙浩,E-mail:149276764@qq.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

(VEGF) in the rectal cancer tissues were determined by Western blotting. Then the cultured rectal cancer SW1463 cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were irradiated at doses of 0, 4, 12 and 24 Gy, respectively. CCK-8 assay was subsequently used to test the proliferation of both cells in each group, Western blotting was performed to measure the levels of VEGF and HIF-1α in SW1463 cells, and ELISA assay was adopted to detect the concentration of VEGF in the supernatant of rectal cancer cells. In addition, CCK-8 assay and colony formation assay were carried out to observe the proliferation of HUVECs after intervened with different doses of irradiated cultured medium. **Results** *Chi*-square test showed no significant difference in pathological tumor regression grade (TRG) between the HFR and CFR groups. The results of immunohistochemistry indicated that the MVD in the HFR group (32.00±3.61) was significantly higher than that in the CFR group (22.33±3.06, $P<0.05$). Western blotting also revealed the protein levels of HIF-1α and VEGF were remarkably up-regulated in the HFR group ($P<0.01$). In *in vitro* study, high-dose radiation dose-dependently reduced the proliferation of SW1463 cells and HUVECs ($P<0.05$). However, the expression levels of VEGF and HIF-1α in rectal cancer cells and the content of VEGF in the supernatant were increased gradually with the rise of irradiation dose ($P<0.01$). Correspondingly, the proliferation of HUVEC cells was prominently enhanced by the cultured medium of rectal cancer cells after high-dose radiation ($P<0.01$). **Conclusion** High-dose radiotherapy inhibits the proliferation of vascular endothelial cells, while may simultaneously increase the compensatory angiogenesis of tumor vessels by promoting the expression of HIF-1α and VEGF in rectal cancer cells.

[**Key words**] rectal cancer; vascular endothelial cells; radiotherapy; HIF-1α; VEGF

Supported by the Joint Medical Scientific Research Project of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2021MSXM318). Corresponding author: LI Longhao, E-mail: 149276764@qq.com

大肠癌(colorectal cancer,CRC)是世界上常见的恶性肿瘤之一,按部位可分为结肠癌和直肠癌,其中直肠癌约占60%以上[1]。临床实践中,直肠癌患者就诊时往往已属中晚期[2],而放射治疗在中晚期直肠癌的治疗中有着重要地位。术前放疗能缩小肿瘤的体积,降低其临床分期,为患者争取根治性切除的机会,并降低术后局部复发率;同时对于低位直肠癌,术前放疗可能通过提高保肛率来使患者的生活质量得到提高[3-4]。目前局部晚期直肠癌的术前放疗主要有长程放疗(1.8~2.0 Gy×25次,5~5.5周完成)和短程放疗(5 Gy×5次,1周完成)两种模式[5]。两种模式的主要区别为单次剂量的照射强度和照射次数,即前者为常规分割多分次照射,而后者为大分割少分次照射。

肿瘤生长依赖于肿瘤血管的生成[6]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)拥有维持血管内皮细胞活性和诱导其增殖等多种功能,并在大多数癌细胞中过度表达,是肿瘤血管生成最重要的刺激因子[7-8]。缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor 1-alpha,HIF-1α)是VEGF的重要调控因子,HIF-1α/VEGF轴是低氧激活肿瘤血管生成的主要机制[9-10]。研究发现,放射辐照同样能诱导肿瘤细胞HIF-1α的表达,激活HIF-1α/VEGF通路[11],但目前关于不同剂量放射辐照对直肠癌肿瘤血管生成影响的研究较少。本研究在临床样本中发现,不同剂量分割模式的放疗对直肠癌肿瘤血管生成的影响可能存在差异,并通过体外细胞实验探讨不同剂量分割放射治疗对直肠癌血管生成的影响,以期为直肠癌放疗方案的优化提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病例和组织标本 收集2017-2020年重庆医科大学附属第一医院肿瘤科经病理确诊为直肠癌的患者56例,其中男性32例,女性24例,年龄44~74(61.00±9.90)岁。患者均进行术前新辅助放疗,在放疗结束后6~8周内完成手术治疗,且在术后由病理科进行病理的肿瘤退缩评级(tumor regression grade,TRG)。根据术前放疗方案分为两组:常规分割放疗组(总剂量50 Gy,单次剂量2 Gy,共进行25次,每周5次,5周内完成)42例,大分割放疗组(总剂量为25 Gy,单

次剂量 5 Gy,共进行 5 次,1 周内完成)14 例。根据 AJCC 肿瘤退缩分级(tumor regression grade, TRG)系统对放疗效果进行分级:TRG0,无活的癌细胞残留;TRG1,单个或小簇癌细胞残留;TRG2,残留癌灶,间质纤维化;TRG3,仅少数或未见癌细胞消退。直肠腺癌组织样本来源于 2021 年 1-12 月在重庆医科大学附属第一医院胃肠外科病理确诊、并经术前局部放疗的直肠腺癌患者手术切除的肿瘤组织。其中术前行常规分割、大分割放射治疗各 5 例,男性 3 例,女性 2 例,年龄 47~71(55.79±9.22)岁。从同一患者手术切除的肿瘤组织中取 2 份样本,一份多聚甲醛固定用于包埋切片,另一份超低温冰箱保存。本研究经本院伦理委员会审批通过(2022-57)。

1.1.2 细胞、试剂与仪器 人脐静脉内皮细胞 HUVEC 由重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学重庆市重点实验室提供;人直肠腺癌细胞 SW1463 购自美国 ATCC 公司。胎牛血清和 1640 培养基分别购自 BI 公司和 Gibco 公司;HIF-1α 和 VEGF 的兔抗人多克隆抗体均购自博士德公司;β-actin 的鼠抗人单克隆抗体购自碧云天公司;HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗购自碧云天公司;PVDF 膜、胰蛋白酶、RIPA 裂解液和蛋白上样缓冲液均购自碧云天公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 电泳配胶试剂盒、ECL 发光试剂盒、DAB 显色试剂盒、CCK-8 试剂盒和 ELISA 试剂盒等购自碧云天公司。直线加速器购自 VARIAN Medical Systems 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 组织标本处理及免疫组化 收集两组患者的术后直肠腺癌组织,多聚甲醛固定、石蜡包埋后切片。用内皮细胞标记物 CD34 抗体孵育,然后用 DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒按说明书步骤对癌组织切片进行 DAB 染色。显微镜下观察不同放疗方案癌组织中的 CD34 阳性表达情况,拍照记录,参照 Weidner 校正方法[12]计算微血管密度(microvessel density, MVD)。

1.2.2 细胞培养 人直肠腺癌细胞株 SW1463 和人脐静脉内皮细胞株 HUVEC 在 37 ℃、5% $CO_2$ 的细胞孵箱环境中用 1640 培养基(含 10%胎牛血清)单独培养。每 2 天进行细胞换液,当细胞处于生长对数期、融合度达 80%左右可进行细胞传代或冻存。传代时用 0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)在 PBS 清洗细胞后进行消化,冻存时采用无血清冻存液在-80 ℃超低温冰箱内保存细胞。

1.2.3 不同剂量照射肿瘤细胞及条件培养基制备

采用放射线照射细胞以模拟体内放疗情况。将培养的 SW1463 细胞以 $5\times10^7$/皿接种于直径 10 cm 的细胞培养皿中,置于 37 ℃、5% $CO_2$ 细胞孵箱中培养。当细胞融合度达 70%时分成 4 组,根据前期实验结果和文献[13],分别给予 0、4、12、24 Gy 单次放射线照射。以细胞培养皿表面为入射中心,SSD 设置为 100 cm,射野大小为 10 cm×10 cm,输出辐射能量为 6 MV。细胞辐照结束后立即进行细胞换液,用新鲜培养基继续培养细胞 48 h。收集上述不同分组肿瘤细胞照射后培养基,1 000×*g* 离心 10 min。取离心后的上清并用 0.45 μm 无菌过滤器过滤即得到照射后条件培养基。

1.2.4 Western blot 分别检测 HIF-1α 和 VEGF 在组织和细胞中的表达 将收集的经常规分割放射治疗和经大分割放射治疗的直肠腺癌组织剪成合适大小,加入适量液氮冰冻后再加入 100 μL 裂解液长程研磨,再用匀浆器进一步研磨。研磨结束后移入 1.5 mL EP 管,用 4 ℃离心机 12 000 r/min 离心 10 min,离心后吸取上清移至新 1.5 mL EP 管得到组织总蛋白。

将不同剂量照射后的 SW143 细胞用 PBS 清洗 3 遍,每皿加入 100 μL RIPA 裂解液(含 1%PMSF)后于摇床上反应 25 min。用细胞刮刮取细胞,超声裂解,4 ℃离心机 12 000 r/min 离心 10 min,吸取离心后的上清移至 1.5 mL EP 管得到细胞总蛋白。

总蛋白提取后用 BCA 试剂盒按说明书测蛋白浓度,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后 100 ℃加热变性蛋白 5 min。用 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒按说明书配制浓缩胶和分离胶进行 SDS-PAGE 电泳(每孔蛋白上样量为 40 μg),冰上 250 mA 转膜,配制脱脂奶粉(5%浓度)封闭 1 h,TBST 清洗 PVDF 膜 3×10 min 后孵育一抗(稀释比例 1∶1 000),4 ℃摇床过夜。次日同样步骤清洗 PVDF 膜 3×10 min,孵育二抗 2 h(稀释比例 1∶3 000),再次清洗 PVDF 膜后用 ECL 试剂盒进行曝光显影并保存结果。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清液中 HIF-1α 和 VEGF 的浓度 收集不同剂量照射后的 SW1463 细胞培养基,离心后收集上清液,使用 ELISA 试剂盒检测 VEGF 在各组细胞上清液中的浓度水平。

1.2.6 CCK-8 检测细胞增殖 将培养的 SW1463 细胞和 HUVEC 细胞以 2 000/孔接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后分成 4 组,分别给予 0、4、12、24 Gy 单次

放射线辐照。照射后更换新鲜培养基,并于照射后的0、24、48、72 h加入10 μL/孔的CCK-8试剂。用酶标仪在避光孵育2 h后检测波长为450 nm时的光密度值[$D$(450)]。

将培养的HUVEC细胞以2 000/孔接种于96孔板中,并分成4组,分别加入收集的SW1463细胞不同剂量(0、4、12、24 Gy)照射后条件培养基100 μL/孔。于接种后的0、24、48、72 h加入10 μL/孔的CCK-8试剂。用酶标仪在避光孵育2 h后检测波长为450 nm时的光密度值[$D$(450)]。

1.2.7　克隆形成实验　　将HUVEC细胞以500/孔接种于6孔板中,加入收集的SW1463细胞照射后条件培养基,于37 ℃、5% $CO_2$孵箱中培养7 d。当肉眼可观察到细胞集落形成后终止培养,弃掉培养液,PBS清洗后加入4%多聚甲醛(1 mL/孔)固定30 min。结晶紫(1 mL/孔)染色15 min,PBS清洗、干燥后拍照,并计算克隆数。

1.3　统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件进行分析。计数资料采用$\chi^2$检验;计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用$t$检验,多组间比较采用单因素方差分析,并采用LSD或Tamhane's T2法进行两两比较。检验水准为0.05。

## 2　结果

2.1　肿瘤退缩评级情况

常规分割放疗组42例患者术后病理标本中TRG0共8例,TRG1共7例,TRG2共11例,TRG3共16例;大分割放疗组14例患者术后病理标本中TRG0共1例,TRG1共2例,TRG2共8例,TRG3共3例。经$\chi^2$检验,两组放疗方案效果差异无统计学意义(表1)。

**表1　不同分割放疗组直肠癌患者病理TRG评级**

| 组别 | $n$ | 病理TRG评级 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | TRG0 | TRG1 | TRG2 | TRG3 |
| 常规分割放疗组 | 42 | 8 | 7 | 11 | 16 |
| 大分割放疗组 | 14 | 1 | 2 | 8 | 3 |
| 合计 | 56 | 9 | 9 | 19 | 19 |

2.2　免疫组化检测直肠癌样本内CD34阳性表达并进行MVD计数

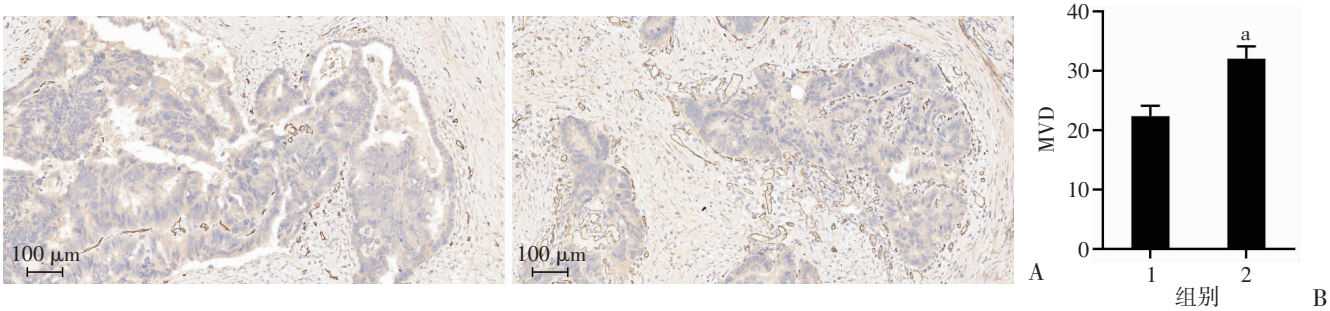
为了比较常规分割、大分割放射治疗后直肠癌患者癌组织内血管密度情况,采用DAB染色,血管内皮细胞用CD34标记,血管内皮细胞胞浆或胞膜呈现棕色或棕黄色染色颗粒为阳性表现。结果显示,大分割放疗组CD34阳性染色情况及MVD计数显著高于常规分割放疗组($P$<0.05,图1)。

2.3　Western blot检测直肠癌组织中VEGF和HIF-1α蛋白的表达

为了检测不同放射治疗模式下直肠癌组织中促血管生成因子的表达情况,采用Western blot检测直肠癌样本中促血管生成相关蛋白VEGF和HIF-1α的表达,并用Image J软件定量分析各蛋白条带的灰度值(蛋白相对表达量=目的/内参蛋白灰度值)。结果显示,大分割放疗组直肠癌组织中VEGF和HIF-1α蛋白表达水平显著高于常规分割放疗组($P$<0.01,图2)。

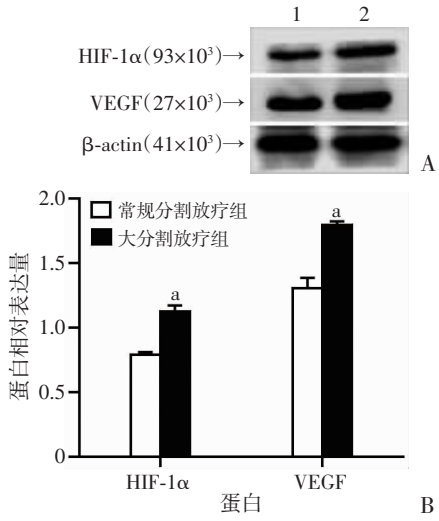
2.4　CCK-8检测直肠癌细胞和血管内皮细胞的增殖情况

采用细胞实验来模拟人体放疗情况,并使用CCK-8检测两种细胞受不同剂量辐照后的增殖情况。结果显示,72 h后SW1453细胞($P$<0.05)和HUVEC细胞($P$<0.05)的增殖能力均随所受照射剂量的加大而降低,且4、12、24 Gy组均显著低于0 Gy组($P$<0.05,图3)。



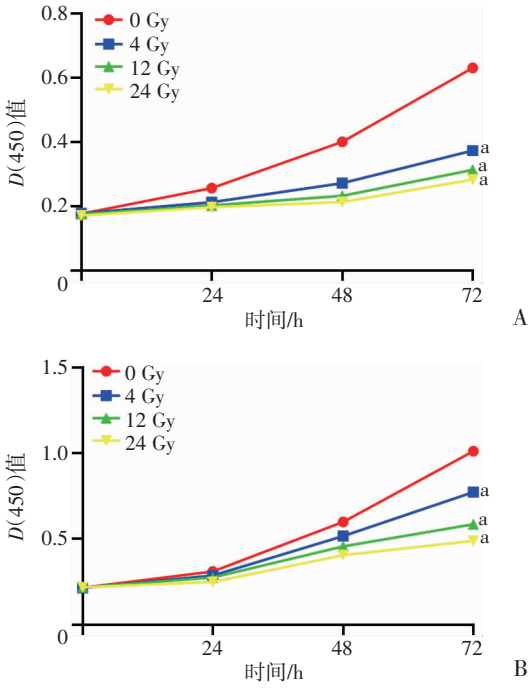

A:免疫组化检测常规分割放疗组(左)、大分割放疗组(右)术后直肠腺癌组织标本CD34阳性表达;B:两组患者直肠癌组织MVD计数($n$=5)　1:常规分割放疗组;2:大分割放疗组;a:$P$<0.05,与常规分割放疗组比较

**图1　血管内皮细胞在肿瘤组织中CD34染色情况及MVD计数**　(S-P)




A:Western blot 检测结果　1:常规分割放疗组;2:大分割放疗组;B:蛋白相对表达量　a:$P<0.01$,与常规分割放疗组比较

**图 2　Western blot 检测各组直肠癌组织中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的表达**

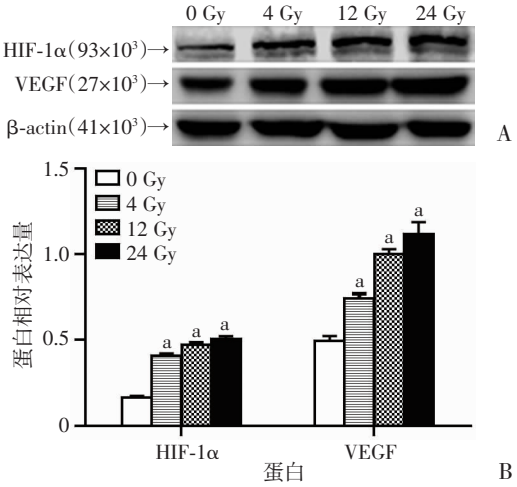



A:SW1453 细胞;B:HUVEC 细胞; a:$P<0.05$,与 0 Gy 比较

**图 3　CCK-8 检测不同剂量照射后 SW1463 细胞和 HUVEC 细胞增殖情况**

## 2.5　Western blot 检测直肠癌细胞中 VEGF 和 HIF-1α 表达

采用 Western blot 检测放疗后 SW1463 细胞中促血管生成因子的蛋白表达水平。结果显示,未经放射处理的 SW1463 细胞中 VEGF 和 HIF-1α 的蛋白表达水平较低,随着所受放射剂量的加大,SW1463 细胞中 VEGF($P<0.01$)和 HIF-1α($P<0.01$)蛋白的表达水平均逐渐提高,且 4、12、24 Gy 均显著高于 0 Gy($P<0.01$,图 4)。

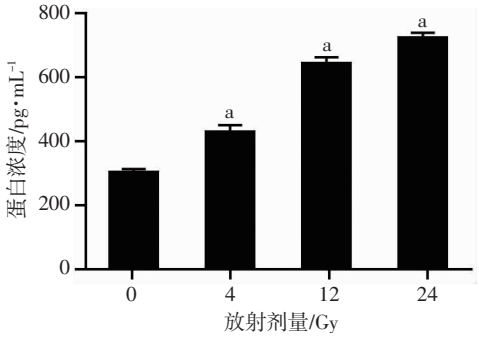



A:Western blot 检测结果;B:蛋白相对表达量　a:$P<0.01$,与 0 Gy 比较

**图 4　Western blot 检测 SW1463 细胞中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的表达水平**

## 2.6　ELISA 检测直肠癌细胞上清液中 VEGF 的浓度

为了检测不同剂量射线照射后 SW1463 细胞促血管生成因子 VEGF 的分泌情况,收集 SW1463 细胞上清并采用 ELISA 检测其中 VEGF 的蛋白浓度水平。结果显示,SW1463 细胞上清中 VEGF 含量与所受放射的剂量大小呈正相关,未经放射处理的 SW1463 细胞上清中的 VEGF 含量较低,随着放射剂量的增加,细胞上清中 VEGF 的含量逐渐升高,且 4、12、24 Gy 均显著高于 0 Gy($P<0.01$,图 5)。

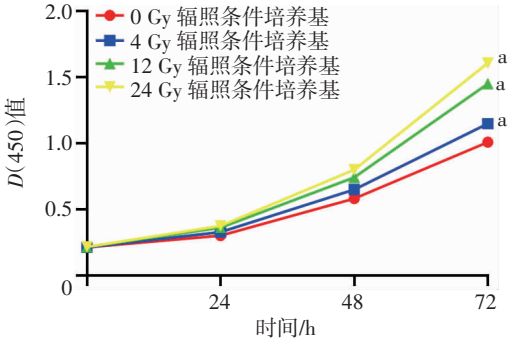



a:$P<0.01$,与 0 Gy 比较

**图 5　ELISA 法测定 VEGF 蛋白在 SW1463 细胞上清液中的含量**

### 2.7　CCK-8检测血管内皮细胞在条件培养基影响下的增殖情况

通过CCK-8实验检测HUVEC细胞在不同剂量辐照条件培养基干预下的增殖情况。结果显示,与未放射条件培养基组相比,大剂量放射处理的直肠癌细胞培养基干预显著提高了HUVEC细胞的增殖能力($P<0.01$),且4、12、24 Gy均显著高于0 Gy($P<0.01$);随条件培养基所受放射剂量的加大,其干预提高HUVEC细胞增殖能力的作用越明显($P<0.01$,图6)。




a:$P<0.01$,与0 Gy辐照条件培养基比较

**图6　CCK-8检测HUVEC细胞在不同剂量辐照后条件培养基中的增殖**

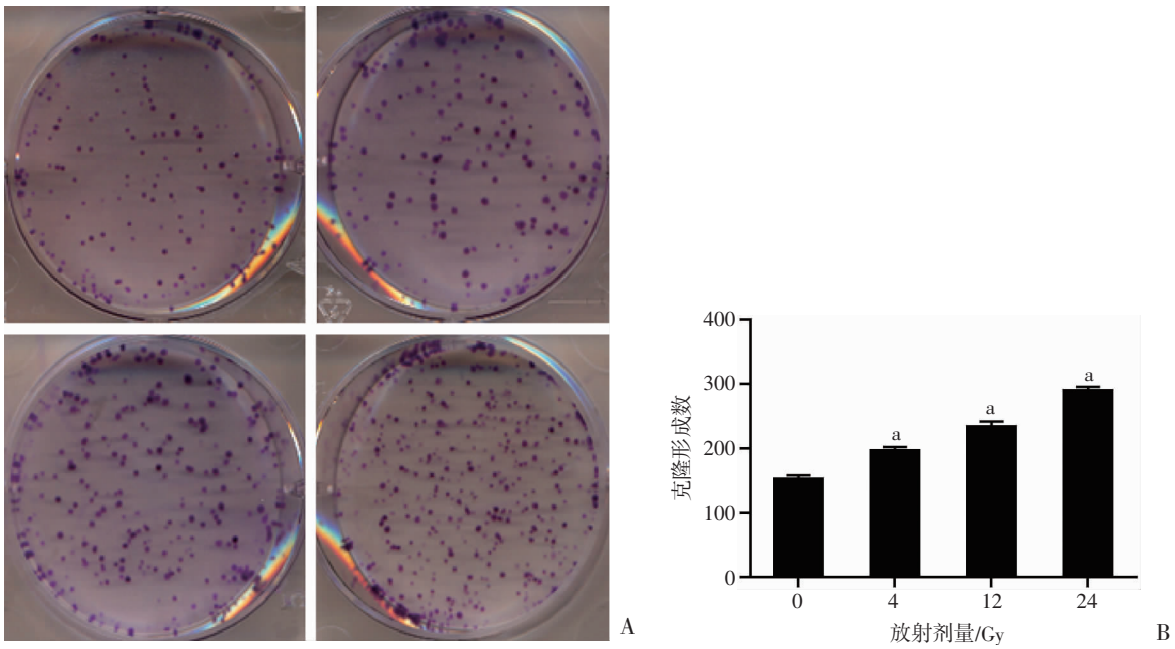
### 2.8　克隆形成实验检测细胞条件培养基对血管内皮细胞增殖的影响

为了进一步验证血管内皮细胞在SW1463细胞辐照后条件培养基干预下的增殖情况,采用克隆形成实验并计数了各组条件培养基干预培养后HUVEC细胞形成克隆的情况。结果表明,大剂量辐照处理的直肠癌细胞培养基相比于未经辐照的条件培养基,能显著提高人脐静脉内皮细胞HUVEC的增殖能力($P<0.01$),且4、12、24 Gy均显著高于0 Gy($P<0.01$,图7)。

## 3　讨论

随着人们生活水平的提升,随之而来的是生活习惯和饮食结构的改变,我国结直肠癌的发病率呈现上升态势[14]。放射治疗作为直肠癌治疗的重要组成方式之一,其时机和剂量的把控显得尤为关键。长久以来,临床上采用先手术再放疗来降低肿瘤复发率,延长患者生存期。但近年来研究表明,术前放疗不仅具有传统术后放疗模式的优点,还具有缩小瘤体体积、降低肿瘤分期、增加部分患者进行根治性切除手术的机会和提高保肛率等多种优势[15-16]。因此,直肠癌的术前放疗得到了临床医师的广泛认可和运用。

过去,研究者对直肠癌的术前放疗模式进行了多种剂量组合的探索,包括长程的常规分割放疗模式:每次剂量1.8~2.0 Gy,进行25~28次;短程的大分割放疗模式:每次剂量5 Gy,进行5次;综合的新型放疗模式:每次剂量3 Gy,进行10次。遗憾的是,在局部复发、远处转移和总生存率方面各放疗模式并未发现显著差异。但在患者依从性和医疗资源占用方面,长程




A:分别为0、4、12、24 Gy条件培养基;B:克隆形成数计数　a:$P<0.01$,与0 Gy条件培养基比较

**图7　克隆形成实验检测HUVEC细胞在不同剂量辐照条件培养基中的增殖**

常规分割放疗存在一定的劣势,且一般认为长程常规分割放疗后患者更易发生辐射毒副反应[5,17-18]。本研究通过术后病理 TRG 分级对常规分割放疗模式和大分割放疗模式进行比较,结果显示两种放疗分割模式在术后病理的 TRG 分级上无显著差异。但是本研究在不同剂量分割方式放疗后的直肠癌患者术后样本中发现,大分割放疗组直肠癌组织内 CD34 阳性染色和 MVD 计数均高于常规分割放疗组,推测可能与短程放疗采用的单次大剂量分割方式促进直肠癌组织内肿瘤血管的生成有关。为此,本研究检测了各组样本中 HIF-1α 和 VEGF 的蛋白表达水平,发现大分割放疗组直肠癌样本中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的表达水平显著高于常规分割放疗组。于是在体外细胞实验中,本研究使用不同放射剂量处理直肠癌细胞及血管内皮细胞以模拟体内情况。结果显示,虽然大剂量的辐照直接降低了血管内皮细胞和直肠癌细胞的增殖能力,但是通过检测直肠癌细胞内 HIF-1α、VEGF 的水平及上清液中 VEGF 的蛋白浓度,证明了射线辐照的确能促进这些因子在肿瘤细胞中的高表达。VEGF 可直接作用于血管内皮细胞,诱导其增殖并促进血管的构建,还能通过旁分泌途径间接促进肿瘤的进展,是目前已发现的促肿瘤血管生成因子中作用效果最强的刺激因子[19-20]。而 HIF-1α 是 VEGF 表达的主要调控因子,能增强 VEGF 的转录活性和增加 VEGF mRNA 稳定性。在缺氧或受辐照的条件下,肿瘤细胞通过增强 HIF-1α 转录活性,上调 VEGF 表达来促进肿瘤新生血管形成[11,21-22]。

为了证实 VEGF 对血管内皮细胞的影响,实验收集了照射后癌细胞的培养基以干预血管内皮细胞,发现这些条件培养基的确能呈放射剂量依赖性地促进血管内皮细胞的增殖。推测直肠细胞受到大剂量辐照后,细胞内 HIF-1α、VEGF 的表达增加,释放到胞外的 VEGF 蛋白也随之增多,VEGF 作为强力的促血管生成因子,可直接作用于血管内皮细胞,促进血管内皮细胞的增殖。

另外,在实验中观察到随着放射剂量的增大,直肠癌细胞和血管内皮细胞的增殖能力虽然逐渐下降,但下降率明显放缓。推测这与细胞受到放射后 DNA 的损伤再修复有关,即小剂量照射后,细胞中亚致死性损伤的细胞占比例大。发生亚致死性损伤的细胞其 DNA 可在辐照停止后完成一定自我修复,从而逐渐恢复增殖能力。当辐照达到一定剂量时,大多数细胞将发生不可修复的致死性损伤。综上,研究者推测大剂量的照射虽然直接降低了直肠癌细胞和血管内皮细胞的增殖能力,但同时也促进了促血管生成因子 HIF-1α、VEGF 的表达升高,由于受到放射损伤的细胞存在再修复的机制,使得血管内皮细胞在肿瘤中增殖的总体水平呈上升表现。

如今,放疗技术水平的提升使大剂量照射得到进一步运用。由于增加了照射时的生物等效剂量,大剂量分割放疗在多种肿瘤的治疗中取得了良好的临床效果[23]。研究表明,相比于常规分割照射,大剂量分割照射在联合免疫治疗方面有明显的理论优势:大剂量分割照射后能产生更多的肿瘤抗原,且可诱导免疫细胞及时浸润[24]。此外,大剂量分割照射还能通过促进树突状细胞成熟、细胞因子分泌及激活 T 细胞特异性杀伤能力来加强免疫应答反应[25]。然而,肿瘤新生血管的增加会形成物理屏障,使免疫细胞到达肿瘤部位变得困难,限制免疫治疗的有效性[10]。异常管脉系统还会形成缺氧和酸性微环境,使 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞等抗肿瘤免疫细胞变成无反应状态,随后发生凋亡,加剧免疫抑制[26]。另一方面,VEGF 除了刺激肿瘤血管生成,还作为趋化因子对免疫细胞产生不同程度影响[27-28],如使树突状细胞和淋巴细胞等抗肿瘤免疫细胞相对缺乏,髓源性抑制细胞和肿瘤相关巨噬细胞等免疫抑制细胞积累,诱导免疫失衡。因此,如何优化组合使大分割放疗与免疫联合达到最优协同作用是值得进一步探索的问题。现在在肝癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤领域运用抗血管生成靶向药物联合免疫药物的治疗模式有了非常好的疗效。在晚期结直肠癌领域,REGONIVO 研究也证实了抗血管生成靶向药物联合免疫检查点抑制剂的抗肿瘤效应[29]。在大剂量放疗的同时应用抗血管生成的靶向药物,而后与免疫治疗联合可能是本研究下一步的研究方向。

本研究仍存在局限,本研究虽然探讨了不同剂量分割放射治疗对直肠癌细胞增殖及血管生成的影响,但未进一步探讨放射次数带来的影响。此外,细胞实验难以完全模拟临床放疗,研究者正在进行动物实验进一步验证研究结果。

综上所述,本研究证实了单次大剂量的放射促进直肠癌细胞中 HIF-1α 和 VEGF 的表达,促进血管内皮细胞的增殖,进而促进了肿瘤血管的生成,为探索肿瘤大剂量放疗联合免疫治疗的优化提供了一定参考。

**参考文献:**

[1] 苏文雨, 房静远. 2020 年结直肠癌的研究新进展[J]. 中华医学信息导报, 2021, 36(3): 12-13. DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-8039.2021.03.107.

SU W Y, FANG J Y. New progress in colorectal cancer research in 2020 [J]. Chin Med Information Guide, 2021, 36(3): 12-13. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-8039.2021.03.107.

[2] WU S G, ZHANG W W, SUN J Y, *et al*. Preoperative radiotherapy improves survival in rectal signet-ring cell carcinoma-a population-based study [J]. Radiat Oncol, 2017, 12(1): 141. DOI:10.1186/s13014-017-0874-0.

[3] GOLLINS S, WEST N, SEBAG-MONTEFIORE D, *et al*. Preoperative chemoradiation with capecitabine, irinotecan and cetuximab in rectal cancer: significance of pre-treatment and post-resection RAS mutations[J]. Br J Cancer, 2017, 117(9): 1286-1294. DOI:10.1038/bjc.2017.294.

[4] 彭俊杰, 朱骥, 刘方奇, 等. 中国局部进展期直肠癌诊疗专家共识[J]. 中国癌症杂志, 2017, 27(1): 41-80. DOI:10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.01.008.
PENG J J, ZHU J, LIU F Q, *et al*. Expert consensus on diagnosis and treatment of locally advanced rectal cancer in China [J]. China Oncol, 2017, 27(1): 41-80. DOI:10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.01.008.

[5] ERLANDSSON J, HOLM T, PETTERSSON D, *et al*. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm Ⅲ): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, non-inferiority trial[J]. Lancet Oncol, 2017, 18(3): 336-346. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30086-4.

[6] ZHANG Y Y, CHEN B, DING Y Q. Metastasis-associated factors facilitating the progression of colorectal cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6): 2437-2444. DOI: 10.7314/apjcp.2012.13.6.2437.

[7] SUN W, WANG X J, LI J L, *et al*. microRNA-181a promotes angiogenesis in colorectal cancer by targeting $SRCIN_1$ to promote the SRC/VEGF signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(4): 438. DOI:10.1038/s41419-018-0490-4.

[8] KIM S, LEE M, CHOI Y K. The role of a neurovascular signaling pathway involving hypoxia-inducible factor and Notch in the function of the central nervous system[J]. Biomol Ther (Seoul), 2020, 28(1): 45-57. DOI: 10.4062/biomolther.2019.119.

[9] TIRPE A A, GULEI D A, CIORTEA S M, *et al*. Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of HIF genes[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6140. DOI:10.3390/ijms20246140.

[10] VIALLARD C, LARRIVÉE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets[J]. Angiogenesis, 2017, 20(4): 409-426. DOI: 10.1007/s10456-017-9562-9.

[11] ZHU H J, ZHANG S L. Hypoxia inducible factor-1α/vascular endothelial growth factor signaling activation correlates with response to radiotherapy and its inhibition reduces hypoxia-induced angiogenesis in lung cancer[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(9): 7707-7718. DOI: 10.1002/jcb.27120.

[12] CHABOWSKI M, NOWAK A, GRZEGRZOLKA J, *et al*. Comparison of microvessel density using nestin and CD34 in colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2018, 38(7): 3889-3895. DOI:10.21873/anticanres.12673.

[13] MAEDA A, CHEN Y H, BU J C, *et al*. *In vivo* imaging reveals significant tumor vascular dysfunction and increased tumor hypoxia-inducible factor-1α expression induced by high single-dose irradiation in a pancreatic tumor model[J]. Int J Radiat Oncol, 2017, 97(1): 184-194. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2016.09.005.

[14] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[15] 常娜, 钱立庭, 赵于飞, 等. 放疗技术在直肠癌术前治疗中的应用与研究进展[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(11): 861-868. DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.11.A009.
CHANG N, QIAN L T, ZHAO Y F, *et al*. Application of radiotherapy in preoperative treatment of rectal cancer[J]. China Cancer, 2019, 28(11): 861-868. DOI:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.11.A009.

[16] 万觉锋, 章真. 直肠癌术前放疗进展[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2016, 5(2): 127-132. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2016.02.04.
WAN J F, ZHANG Z. Advances in preoperative radiation of locally advanced rectal cancer[J]. Chin J Colorectal Dis Electron Ed, 2016, 5(2): 127-132. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2016.02.04.

[17] ANSARI N, SOLOMON M J, FISHER R J, *et al*. Acute adverse events and postoperative complications in a randomized trial of preoperative short-course radiotherapy versus long-course chemoradiotherapy for T3 adenocarcinoma of the rectum: trans-Tasman radiation oncology group trial (TROG 01.04)[J]. Ann Surg, 2017, 265(5): 882-888. DOI:10.1097/SLA.0000000000001987.

[18] ZHAN T C, GU J, LI M, *et al*. Intermediate-fraction neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 2013, 56(4): 422-432. DOI: 10.1097/DCR.0b013e31828576c6.

[19] TSAI H C, TZENG H E, HUANG C Y, *et al*. WISP-1

positively regulates angiogenesis by controlling VEGF-A expression in human osteosarcoma[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(4): e2750. DOI:10.1038/cddis.2016.421.

[20] YANG J G, WANG L L, MA D C. Effects of vascular endothelial growth factors and their receptors on megakaryocytes and platelets and related diseases[J]. Br J Haematol, 2018, 180(3): 321-334. DOI:10.1111/bjh.15000.

[21] LUDWIG N, WHITESIDE T L. Potential roles of tumor-derived exosomes in angiogenesis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(5): 409-417. DOI:10.1080/14728222.2018.1464141.

[22] 郭靖, 尚杨杨, 汪荣泉. 结直肠癌及缺氧的结直肠癌细胞中 HIF-1α 与 miRNA-200b 表达的相关性[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(6): 545-549. DOI:10.16016/j.1000-5404.201510122.
GUO J, SHANG Y Y, WANG R Q. Correlation of HIF-1α and miRNA-200b expression in human colorectal cancer tissues and hypoxia-induced colorectal cancer cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(6): 545-549. DOI:10.16016/j.1000-5404.201510122.

[23] 胥芸芸, 洪梅, 李桂香. 放疗对机体抗肿瘤免疫效应机制的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(24): 4023-4025. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2016.24.040.
XU Y Y, HONG M, LI G X. New progress on the effect of radiotherapy on the anti-tumor immune response[J]. J Mod Oncol, 2016, 24(24): 4023-4025. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2016.24.040.

[24] FREY B, RÜCKERT M, WEBER J, *et al*. Hypofractionated irradiation has immune stimulatory potential and induces a timely restricted infiltration of immune cells in colon cancer tumors[J]. Front Immunol, 2017, 8: 231. DOI:10.3389/fimmu.2017.00231.

[25] 郑声琴, 范璟, 郑勤, 等. 单次大分割放疗在体外对树突状细胞激活 T 细胞的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2021, 40(1): 46-52. DOI:10.3969/j.issn.1671-6264.2021.01.009.
ZHENG S Q, FAN J, ZHENG Q, *et al*. Effects of single fractionation radiotherapy on dendritic cells activation to T cell *in vitro*[J]. J Southeast Univ Med Sci Ed, 2021, 40(1): 46-52. DOI:10.3969/j.issn.1671-6264.2021.01.009.

[26] PILON-THOMAS S, KODUMUDI K N, EL-KENAWI A E, *et al*. Neutralization of tumor acidity improves antitumor responses to immunotherapy[J]. Cancer Res, 2016, 76(6): 1381-1390. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-1743.

[27] SIA D, ALSINET C, NEWELL P, *et al*. VEGF signaling in cancer treatment[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(17): 2834-2842. DOI:10.2174/13816128113199990590.

[28] FERRARA N, ADAMIS A P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(6): 385-403. DOI:10.1038/nrd.2015.17.

[29] FUKUOKA S, HARA H, TAKAHASHI N, *et al*. Regorafenib plus nivolumab in patients with advanced gastric or colorectal cancer: an open-label, dose-escalation, and dose-expansion phase Ib trial (REGONIVO, EPOC1603)[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(18): 2053-2061. DOI:10.1200/JCO.19.03296.

(**收稿**:2022-06-15;**修回**:2022-08-13)
(编辑 汪勤俭)