非细胞机制介导的肿瘤微环境与肿瘤多药耐药

唐雪瑶　邱艳艳　殷佩浩

摘　要　肿瘤微环境已经成为肿瘤发生、发展不可缺少的重要环节,肿瘤的耐药不仅是肿瘤细胞遗传物质的改变,也与肿瘤所处的微环境相关联。而肿瘤微环境是一个复杂的体系,它即由各种细胞介导产生的微环境,同时也包括各种生理因素而造成的微环境,如缺氧、微酸、较高的肿瘤组织间隙液压(IFP)。在肿瘤耐药的发生过程中他们相互交叉地共同改变着肿瘤内环境而最终导致肿瘤耐药的形成。本文将从非细胞机制介导的肿瘤微环境所致的肿瘤耐药做一综述。

关键词　肿瘤　微环境　耐药　微酸　缺氧

中图分类号　R73　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.002

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)已经成为近几年来研究肿瘤耐药的热点。而肿瘤微环境是一个复杂的体系,它包含着各种除肿瘤细胞以外的其他细胞,例如:成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞、脂肪细胞,还有各类生物因子、微血管和细胞外基质。如果解释肿瘤与肿瘤微环境的关系,那莫过于"种子与土壤"的经典观点,这一观点恰当的说明了肿瘤的生长、发展是离不开肿瘤微环境的。虽然医学的发展使得肿瘤的治疗手段更加的多元化,但是现代医学在治疗肿瘤时面临着一个巨大的阻碍,肿瘤多药耐药(multi-drug resistance)。肿瘤耐药的机制复杂多样,大体可分为细胞机制和非细胞机制两种,细胞机制即肿瘤微环境中的各种细胞所介导的耐药性,非细胞机制即生理性耐药(physiological drug resistance),如缺氧、酸化、肿瘤组织间隙液压升高等[1]。

一、肿瘤缺氧微环境与肿瘤耐药机制

1. 缺氧的产生:肿瘤缺氧主要是因为局部供氧不足,而并非是氧气使用障碍。肿瘤生长迅速,这不仅会导致氧的消耗及弥散距离增加,还同时由于肿瘤血管结构的异常增生、管壁萎缩塌陷、血流淤滞、血供不足,而使得肿瘤区域氧的供求平衡打破导致,出现环境中的相对缺氧。除此之外,在肿瘤发展过程中,各种转录因子、生长因子、细胞因子和脂质介质的过度表达也在缺氧微环境中扮演重要的角色。这些分子和特定于低氧细胞中的关键转录因子之间的相互作用在缺氧区域肿瘤细胞的成功存活率和实体瘤的进展上有决定性的作用,而对其中缺氧诱导的转录因子 HIF-1 的作用当下已经有了比较深入的研究。HIF-1 是由两个亚基,HIF-1β 和缺氧调节亚基 HIF-1α 构成的异二聚体转录因子。在缺氧应答的全局性调控中其扮演着重要的角色,同时也是调节能量代谢、肿瘤新生血管生成、细胞增殖、浸润和转移等相关基因的上游转录调节蛋白。而 HIF-1 又调控肿瘤的生存和发展之中缺氧恶劣条件下的几个重要的下游靶点,包括生长因子和其他信号分子,例如,促血管生成因子,如血管内皮生长因子(VEGF)和葡萄糖转运蛋白-1(GLUT-1)[2]。

2. 缺氧对于肿瘤的耐药机制:缺氧造成肿瘤耐药的机制暂时可分为两种:直接抑制和间接抑制。所谓直接抑制是指一些化疗药物具有氧依赖性。目前更为全面和深入的研究方向是间接抑制,主要体现在 3 个方面:其一,缺氧通过激活的 HIF-1 家族启动 MDR1/P-gp,通过外排药物使浓度降低而避免肿瘤细胞受到杀伤。有研究证明,MDR1 基因启动子可以被激活的 HIF-1α 绑定,从而直接诱导 MDR1/P-gp 在缺氧微环境中的表达,然后导致 MDR;同时,通过芯片测定缺氧环境,发现 HIF 途径可以上调 miR-21、miR-27a、miR-210 和 miR-181b,并证实HIF-1α 可以直接结合并促进 miR27a 转录,调节胃癌的 MDR[3]。其二,缺氧促进上皮-间质转化(EMT);在缺氧状态下 TGF-β、IL-6、TNF-α 分泌增多,通过体外研究证实缺氧增加 HIF-1α 表达而直接上调 Snail,促进钙黏素转换(E-cadherin 的表达减少而

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81473482,81603464);上海市科委医学引导类项目(16411972600);上海中医药大学中西医结合高原学科面上项目(16-DX-08)

作者单位:200062　上海中医药大学附属普陀医院(唐雪瑶、邱艳艳);200062　上海中医药大学附属普陀医院普外科(殷佩浩)

通讯作者:殷佩浩,副教授,硕士生导师,电子信箱:yinpeihao1975@hotmail.com

N－cadherin 的表达增加），而诱发 EMT[4]。其三，缺氧还有一定程度上即表明远离血管，没有血管的分布则药物难以到达。由于低血管密度和血流波动引起的低灌注区域已知会干扰血源性药物的递送，由于药物获取的减少，远离血管的肿瘤细胞因此暴露于低浓度的药物环境中而导致耐药的发生[5]。

3. 靶向缺氧的抗肿瘤耐药的策略：因为缺氧基本上是肿瘤所独有的，故通过使用缺氧细胞细胞毒素选择性地杀死对常规抗癌治疗有抗性的缺氧癌细胞，同时保存需氧正常组织则可成为一种利用缺氧解决耐药的方法[6]。生物还原或缺氧激活的前药通常是被缺氧肿瘤细胞中的酶还原的无毒化合物。还原酶（例如硝基还原酶）在实体瘤的缺氧区域中活性的增强为前药的位点特异性转化提供了产生细胞毒性产物的途径[7]。目前为止，已经开发了 5 种不同类别的生物反应性前药来靶向实体瘤中的缺氧细胞。这些缺氧激活的前药，包括硝基化合物、N－氧化物、醌等具有共同的激活机制，由此它们通过细胞内氧化还原酶以氧敏感的方式被还原而形成细胞毒素[8]。另一种策略则是使 HIF－1α 成为治疗实体瘤的主要药物靶标，通过对 HIF－1α 的调节来克服缺氧带来的耐药。抑制 HIF 对缺氧应答的方法包括 siRNA 处理，阻断 HIF－1α 和 β 亚基的二聚化以及使用已知抑制 PI_3K/AKT/HIF－1α 通路的抗癌剂直接抑制 HIF－1α[9,10]。在缺氧肿瘤中，使用触发 HIF－1α 降解途径活化的药物具有清除过表达的 HIF－1α 的潜力。例如，用雷帕霉素处理缺氧细胞导致 HIF－1α 降解，促使肺癌细胞中存活蛋白表达的抑制和凋亡增加[11]。其他的途径如伐他拉尼用于联合化疗使用，以消除缺氧条件下耐药肿瘤细胞，其机制为抑制 ABCG2 和 ABCB1 流出活性并干扰 ATP 酶活性[12]。

二、肿瘤微酸环境与肿瘤耐药机制

1. 肿瘤微酸环境的产生：与正常组织相比，肿瘤细胞具有消耗多达 12 倍的葡萄糖并同时增加有氧糖酵解的能力，即使当氧气水平是正常水平时也只有较小部分葡萄糖被线粒体氧化磷酸化，因此将产生更多的乳酸和更少的 ATP。这种现象在 20 世纪 30 年代首次被 Warburg 观察到，被称为 Warburg 效应[13]。缺氧和（或）各种信号转导途径的交互作用在肿瘤进展过程中经常促进这种糖酵解的发生。在缺氧时，HIF－1α 免于蛋白酶体的降解，致使它与 HIF－1β 可相互作用。然后将完整的 HIF－1 蛋白转位到细胞核，激活响应缺氧的下游基因表达。致癌信号转导途径，如 PI_3K/Akt 信号，MAPK/ERK 和 STAT3 信号转导途径的活化，同时也在转录和翻译水平促进 HIF－1α 的表达，以增加即使在充足的氧含量下葡萄糖在肿瘤中的利用速度[14]。GLUT1 的表达在低氧条件下增加，其诱导葡萄糖代谢向糖酵解转移，而 GLUT－1 的表达由 HIF－1 依赖性缺氧调节[15]。除了乳酸生成的增加，另一个肿瘤细胞外酸度的主要来源是肿瘤细胞通过氧化代谢产生的大量 CO_2[16]。而 CA9（carbonic anhydrase IX），一种跨膜锌金属酶，其作为二氧化碳可逆水合碳酸氢离子和质子的催化剂，在 pH 值的调节中发挥作用。CA9 以其独特的启动子结构成为 HIF－1 活性的最敏感的内源性传感器之一，HIF－1α 可大幅上调 CA9，从而使更多的二氧化碳转变为酸[17]。同时肿瘤组织中组织液淋巴引流不畅和肿瘤升高的组织间隙压力，导致代谢酸（乳酸和 CO_2）不能被迅速导出到血液中。除此之外，在细胞内存在的酸性细胞器溶酶体和内涵体，它们在细胞内吞途径中发挥重要作用，并且其内环境 pH 值分别保持在 4～5 和 5～6，对于采取内吞作用的药物和药物载体被困在内涵体和溶酶体中，也会导致耐药[18]。

2. 肿瘤细胞适应酸环境的机制：耐药性可能是侵袭性癌症由于长期暴露于酸性微环境中而出现的适应性改变。自噬是一种细胞分解代谢途径，可使溶酶体、蛋白质及细胞器降解再循环利用，目前被认为是肿瘤细胞代谢应激或化疗下的一个重要的生存机制。有研究表明，在酸性条件下培养的人黑色素瘤细胞，与正常 pH 值环境下的细胞相比，$LC3^+$ 自噬小泡迅速积累，这表明酸性作用增强的细胞内自噬通量变得更加活跃，而在敲除自噬基因 ATG5 后通过抑制自噬的作用，黑色素瘤细胞在低 pH 值条件下生存率持续减少。这些观察都表明癌细胞可能是通过诱导自噬来适应酸性环境[19]。除此之外，GSH，一种分布非常广泛的抗氧化物，对于维持体内 ROS 水平非常重要，而 ROS 对肿瘤细胞的增殖、转移和侵袭等都有影响。有研究报道称，在短期酸性培养基处理后，细胞内 ROS 的水平明显增高。虽然 ROS 水平短暂性增高，但长期酸性条件处理后 ROS 水平反而下降；并发现在适应了酸性微环境的结肠癌细胞中产生和维持 GSH 的通路上调，GSH 含量和 GSH/GSSG 比例增高，结肠癌细胞依赖 GSH 适应酸性微环境，且参与维持细胞中 ROS 的低水平[20]。

3. 微酸环境导致多药耐药的机制：（1）“离子捕获”导致的药物浓度降低：由于不带电荷的小分子在

穿过细胞膜的磷脂部分时容易扩散,而带电物质则不容易渗透的这个特点,为实体瘤的酸性胞外环境形成一道弱碱性细胞摄取生理屏障提供了条件。这种现象被称为"离子捕获"。而目前临床上使用的一些化疗药物在细胞内的靶点是具有 pH 值依赖性的,细胞内 pH 梯度的改变会造成药物在细胞内的积蓄量减少,从而大大降低了化疗药物的疗效最终导致耐药的发生。有研究表明在葡萄糖大剂量注射性酸中毒体内实验中弱酸性的苯丁酸氮芥的功效是弱碱性阿霉素的 2.3 倍。而用碳酸氢钠对瘤内环境碱化后无论是体外还是体内研究氮芥的功效都表现出明显的降低[21]。美法仑(Melphalan),一种临床批准用于治疗多发性骨髓瘤和卵巢癌的弱酸性化疗药物,也同样出现与此现象一致的结果,在治疗黑色素瘤的临床前和临床试验中局部缺氧和微酸环境使得疗效有所增强。然而,目前临床应用中弱碱性化疗药物的占比相较于弱酸性化疗药物多得多,并且美法仑和苯丁酸氮芥已很少应用于实体肿瘤的治疗。(2)低 pH 值激发 P-糖蛋白(P-gp)的上调:耐药性的一大中药机制就是多药转运 P-gp 的表达。P-gp 由 MDR1 基因编码,并具有泵出细胞毒素如阿霉素和紫杉醇的作用,虽然酸环境中它的 mRNA 水平没有改变,但 P-gp 的活性却增加,并且这种效果在低氧环境中得以加倍。有研究表明,对 A549 细胞进行酸性培养基处理后发现 P-gp 的表达水平差异无统计学意义,但 P-gp 的活性却显著增强并且峰值出现在 6h 后,而显著降低的柔红霉素的细胞毒性在维拉帕米的协同作用下出现反转效果。

4. 靶向肿瘤酸性微环境抗肿瘤耐药的策略:因为肿瘤组织的 pH 值比正常组织低,这种特点可用于酸引发的肿瘤靶向。把 pH 值响应能力与肿瘤靶向性相结合可以提高肿瘤治疗的特异性。通过酸性的 pH 靶向肿瘤的方法包括修改 pH 值敏感的肽,利用 pH 值引发电离材料,并且由屏蔽/去屏蔽机制暴露配位体[22]。近年来对酸环境的治疗途径比较热门的还有质子泵抑制剂(PPI)的运用,研究表明 PPI 能够以酸性依赖的方式增加顺铂的细胞摄取,在化疗耐药的上皮性卵巢癌(EOC)中增加细胞毒性剂的作用[23,24]。除了直接抑制酸的产生,还有一些通过药物递送系统克服酸性对化疗药物影响的尝试。利用肿瘤组织与正常组织生理 pH 值的差异,将化疗药物靶向递送或定位释放于肿瘤靶组织,不仅避免了酸环境的影响更提高了药物的靶向性;该体系主要类型包括:pH 敏感脂质体、聚合物纳米粒、胶束及树枝状聚合物等[25]。

三、展 望

肿瘤的多药耐药现象成为抗肿瘤治疗的一大阻碍,肿瘤微环境影响着肿瘤的发生、发展,本文借对肿瘤微环境研究的部分总结,探讨可以从肿瘤非细胞机制下逆转肿瘤多药耐药的可能机制。在综上所述的研究探索下,肿瘤微环境中缺氧、微酸相辅相成为肿瘤提供了促力,但同时也阐明了肿瘤多药耐药的机制,为寻找新的治疗靶点,研发有效化疗药物提供了帮助。针对调节人体内环境克服肿瘤多药耐药将是一个值得结合和开拓的领域。除此之外,造成肿瘤特有的微环境的因素并非是独立的,他们之间互为因果,有着千丝万缕的联系,不仅牵一发而动全身,更使得肿瘤在治疗时难度大大增加,但目前的研究大多关注于其中的一各方面或者一点,而对于这些因素作用的共同作用点却鲜少深入,且缺少能够同时克服肿瘤微环境中缺氧与酸环境的治疗手段,而这些因素的共同作用点可能正是肿瘤微环境形成的枢纽所在,对于此把控点,将成为破坏或逆转肿瘤的微环境从而达到逆转多药耐药,甚至治愈肿瘤的关键。

参考文献

1 Raghunand N, He X, Van SR, *et al*. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH [J]. Br J Cancer, 1999, 80(7): 1005-1011

2 Wojtkowiak JW, Verduzco D, Karla JS, *et al*. Gillies Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment [J]. Mol Pharm, 2011, 8(6): 2032-2038

3 Zhao Q, Li Y, Tan B, *et al*. HIF-1α Induces Multidrug Resistance in Gastric Cancer Cells by Inducing MiR-27a [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0132746

4 Zhang L, Huang G, Li X, *et al*. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 108

5 王时光,单远洲,周联明, 等. 缺氧微环境下 HIF-1α 对胰腺癌细胞上皮间质转化及侵袭迁移的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(11): 1705-1709

6 Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration insolid tumours [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6: 583-592

7 Siemanna DW, Michael RH. Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy [J]. Pharmacol Therapeut, 2015, 9(153): 107-124

8 Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11: 393-410

9 Guise CP, Mowday AM, Ashoorzadeh A, *et al*. Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia [J]. Chinese J Cancer, 2014, 33(2): 80-86

(转第 2 页)

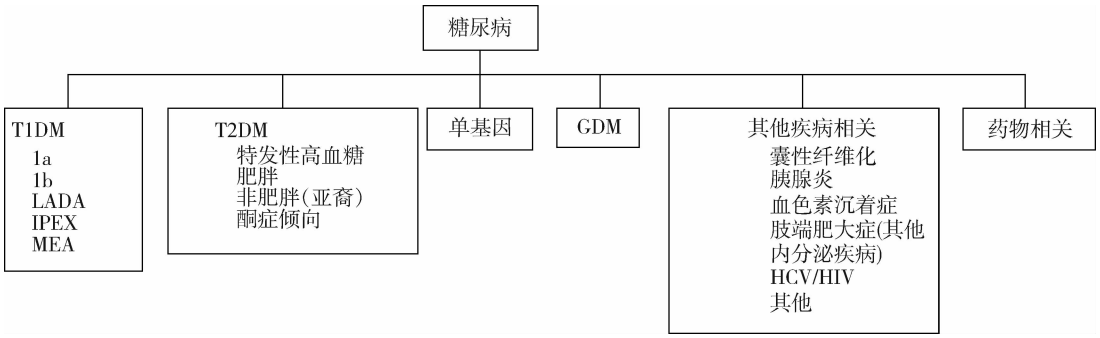

图 1　糖尿病初步分型框架

(HOMA2 - β)、胰岛素敏感指数(HOMA2 - IR)和谷氨酸脱羧酶(GAD)抗体,对糖尿病患者进行分组后,发现"严重胰岛素缺乏的糖尿病"组患者更易发生糖尿病视网膜病变;"严重胰岛素抵抗的糖尿病"组患者更易发生终末期肾病;"轻度肥胖的糖尿病"组和"轻度年龄相关的糖尿病"组仅表现出轻度的代谢紊乱,而某些 2 型糖尿病(T2DM)的高危 SNP 位点也仅与其中的个别亚组具有相关性。这正是通过上述综合性视角试图对 2 型糖尿病进行精准分型的一次积极有益的探索和思考。

总之,做好糖尿病分型是精准医学的前提。正如 Leif Groop 教授在 2017 年欧洲糖尿病研究学会上所说:"我们相信将来可以通过遗传、表观、基因等方法对糖尿病进行明确分型,进而为糖尿病的精准诊疗提供科学依据"。深入研究如何实现糖尿病的精细化分型,旨在为大家提供一个更加有效的方向和手段,真正实现糖尿病的精确诊断和个体化治疗。我们的临床医生也可以开展适合广大中国糖尿病人群的糖尿病精准分型研究。

(本文转载自《国际糖尿病》杂志)

(接第 5 页)

10 Welsh SJ, Dale AG, Lombardo CM, *et al*. Inhibition of the hypoxia - inducible factor pathway by a G - quadruplex binding small molecule [J]. Sci Rep, 2013, 3: 2799

11 Zhang D, Shi Z, Li M, *et al*. Hypoxia - induced miR - 424 decreases tumor sensitivity to chemotherapy by inhibiting apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1301

12 Chen B, Yuping S, Ni J. Rapamycin decreases survivin expression to induce NSCLC cell apoptosis under hypoxia through inhibiting HIF - 1αinduction [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39: 185 - 191

13 To KK, Poon DC, Wei Y, *et al*. Vatalanib sensitizes ABCB1 and ABCG2 - overexpressing multidrug resistant colon cancer cells to chemotherapy under hypoxia [J]. Biochem Pharmacol, 2015, 97 (1): 27 - 37

14 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. Science, 2009, 324(5930): 1029 - 1033

15 Du J, Xu R, Hu Z, *et al*. PI_3K and ERK - induced Rac1 activation mediates hypoxia - induced HIF - 1alpha expression in MCF - 7 breast cancer cells [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25213

16 Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, *et al*. Acid production in glycolysis - impaired tumors provides new insights into tumor metabolism [J]. Clin. Cancer Res, 2002, 8(4): 1284 - 1291

17 Li M, Song J, Pytel P. Expression of HIF - 1 regulated proteins vascular endothelial growth factor, carbonic anhydrase IX and hypoxia inducible gene 2 in hemangioblastomas [J]. Folia Neuropathol, 2014, 52 (3): 234 - 242

18 He X, Li J F, An S, *et al*. pH - sensitive drug - delivery systems for tumor targeting [J]. Future Sci Ltd, 2013, 4(12): 1499 - 1510

19 Marino ML, Pellegrini P, Di Lernia G, *et al*. Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress [J]. J Biol Chem, 2012, 287(36): 30664 - 30676

20 赵敏楠. 结肠癌细胞对酸性微环境的适应及其机制研究 [D]. 山东: 山东大学医学院, 2016

21 Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, *et al*. Gillies drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment [J]. Mol Pharm, 2011, 8(6): 2032 - 2038

22 Felber AE, Dufresne MH, Leroux JC. pH - sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates [J]. Adv Drug Deliv Rev. 2012, 64(11): 979 - 992

23 Federici C, Petrucci F, Caimi S, *et al*. Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin [J]. PLoS One 2014, 9 (2): e88193

24 Lee YY, Jeon HK, Hong JE, *et al*. Proton pump inhibitors enhance the effects of cytotoxic agents in chemoresistant epithelial ovarian carcinoma [J]. Oncotarget, 2015, 6 (33): 35040 - 35050

25 刘艳红, 周建平, 霍美蓉. 肿瘤微环境响应型智能纳米药物载体的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(2): 125 - 133

(收稿日期: 2017 - 09 - 12)
(修回日期: 2017 - 09 - 28)