

肿瘤微环境中一种新型促侵袭因子的发现

——细胞外 ATP 功能及机制的研究进展

方伟岗[△], 田新霞

(北京大学基础医学院病理学系, 北京 100191)

[关键词] 三磷酸腺苷; 肿瘤微环境; 肿瘤浸润; 肿瘤转移

[中图分类号] R730.2 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2017)02-0188-08

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2017.02.002

根据世界卫生组织的最新统计数据,全球癌症每年新发病例约 1 400 多万人,同时约有 820 万人因癌症死亡,其中 90% 是因肿瘤的复发转移导致。恶性肿瘤给患者造成的危害关键就在于它能够转移,因此肿瘤转移始终是肿瘤防治的重大课题及研究难点。如果能够精准了解并掌握肿瘤转移的规律和机制,控制转移发生、发展的关键环节,肿瘤问题就能够得到根本的解决。

我们团队在过去近 20 年的研究工作中发现肿瘤微环境中存在的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)具有明显促进肿瘤细胞侵袭的作用,针对 ATP 的促侵袭机制进行了系统深入的研究,并在国际上首次提出肿瘤微环境中的 ATP 是一种重要的促侵袭因子的观点,为肿瘤侵袭发生的机制及调控提供了新的科学依据。本文将结合我们的工作对这一领域的研究进展给予论述。

1 肿瘤微环境对肿瘤发生和发展的重要作用

过去几十年的研究证实,肿瘤细胞的转移不仅与肿瘤细胞本身的特性有关,还与多个其他环节包括肿瘤细胞所处的局部环境(称之为肿瘤微环境, tumor microenvironment)有关。肿瘤细胞通过与各种宿主因素发生互动,适应或改变周围环境以满足自身生存、生长及迁移的需要,从而完成侵袭、转移过程。肿瘤细胞的转移过程大致如下:肿瘤细胞从原发瘤脱离,突破基底膜侵袭周围组织,进入血液/淋巴系统播散到靶器官,穿出血管/淋巴管进入周围组织,增殖形成转移灶^[1]。

从肿瘤细胞完成转移过程的一系列步骤来看,

肿瘤细胞面临多种不同微环境的考验。除了原发瘤部位是肿瘤细胞熟悉的“家乡”以外,血液/淋巴系统及转移靶器官的微环境对肿瘤细胞来说均是非常恶劣的环境,生存是头等重要的问题,而要最终完成转移则更需要一系列的技能并精确调控才有可能实现^[2]。肿瘤细胞如何克服各种不利因素的影响,并充分利用各种宿主细胞和因子为己所用,最终完成这一目的,至今还是一个迷。经过多年的研究,部分机制已经得以揭示,相信最终谜底的揭开为时不会太久。

1.1 原发瘤部位的微环境与肿瘤侵袭的始动

肿瘤的发生和发展是一个动态的连续过程,肿瘤细胞会随着环境的变化而不断出现基因和表型的改变,如上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而使自身更好地适应和利用周围环境,不断演进并完成侵袭、转移过程。肿瘤细胞可以和周围微环境中各种宿主因素发生互动,适应或改变周围环境以满足自身发展的需要。

原发瘤部位微环境是肿瘤发生的最初部位,最适合肿瘤细胞的生存和生长,但与正常器官组织的微环境相比,一旦发生肿瘤,该部位的微环境仍然会发生变化,最明显的是原发瘤内部及周边的组织中出现不同程度的炎症反应。目前的研究已经明确慢性炎症与肿瘤的发生及发展关系密切,许多炎性介质,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)及各种白细胞介素(interleukin, IL)等,均在肿瘤演进及侵袭中发挥不同作用^[3]。

基金项目: 国家自然科学基金(30070293、30270518、30471936、30971152)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2010CB529402)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070293, 30270518, 30471936, 30971152) and the National Basic Research Program of China (973 Program) (2010CB529402)

[△] Corresponding author's e-mail, wfgang@bjmu.edu.cn

网络出版时间:2017-3-28 8:54:23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20170328.0854.008.html>

原发瘤微环境中存在着多种宿主细胞,包括肿瘤相关纤维母细胞(tumor-associated fibroblasts)、浸润的免疫/淋巴细胞、骨髓来源的间充质干细胞、血管/淋巴管内皮细胞及由这些细胞产生的各种生长因子/生长抑制因子、炎症介质、细胞因子、趋化因子、血管生成促进/抑制因子、促侵袭因子等,还有非细胞形态物质,如细胞外基质的各种成分及其降解产物,这些成分会通过各种机制直接或间接影响肿瘤细胞生长、新生血管生成、免疫逃逸以及侵袭和转移。有研究提示,这些成分的组成及时间和空间分布的变化也会影响临床治疗效果,与患者预后有着密切关系,比如人们发现肿瘤细胞自身分泌或诱导周围炎症细胞分泌多种炎症性细胞因子(如 IL-1、IL-6、TNF- α)以及多种趋化因子及其受体[如趋化因子受体 4(chemokine receptor 4, CXCR4)、C-C 趋化因子受体 7(C-C chemokine receptor 7, CCR7)等],从而促进肿瘤的侵袭、转移^[4]。不同的 M1 或 M2 表型的巨噬细胞在调节肿瘤局部免疫反应中发挥不同作用,进而影响肿瘤侵袭和转移的不同结局,说明免疫调节网络的精确性及复杂性。

即使在肿瘤组织内部,不同部位的微环境也有明显差异。恶性肿瘤由于生长迅速,靠近中心部位经常会处于缺血缺氧状态甚至发生出血坏死。在缺氧状态下,肿瘤细胞可以通过不同信号通路的激活促进一些转录因子[如低氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)等]的活化来增加许多促血管生成因子[如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等]的合成和分泌,增加肿瘤的血供以及转移的风险。此外,缺氧与肿瘤干细胞的产生有密切关系,缺氧状态下 Notch 的配体 Jagged2 表达增高,进而引起 EMT 并促进乳腺癌干细胞生长。与之相对应, Jagged2 表达增高及 Notch 通路的激活已被证实与乳腺癌患者肿瘤转移及不良预后相关。我们的早期研究发现,在正常氧状态下, bFGF 可诱导缺氧诱导因子 HIF-1 α 的表达,进而促进 VEGF 的分泌;而在缺氧状态下, bFGF 在 HIF-1 α 的协同作用下,其促血管生成作用进一步加强,其中 PI-3K/Akt 信号通路可能起重要作用^[5-6]。

在肿瘤的周边部位,尤其是肿瘤侵袭的前缘,是肿瘤细胞与宿主细胞及细胞外间质相互作用最激烈的部位,也是 EMT 表现最明显的地方。多种宿主细胞,如肿瘤相关纤维母细胞、浸润的免疫/淋巴细胞、肿瘤相关巨噬细胞/树突状细胞等,与肿瘤细胞及脱

离原发瘤的肿瘤细胞直接接触并活化产生各种因子,引起肿瘤细胞发生一系列变化。细胞的破坏使许多细胞内的酶或因子释放出来,而细胞外基质的降解破坏导致许多原来结合于细胞外基质的生长因子[如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等]被游离出来发挥作用。EMT 使得肿瘤细胞更具有运动及侵袭能力,这里也是肿瘤干细胞产生和聚集的场所。具有移动能力的肿瘤干细胞被认为是转移细胞的重要起始细胞,而 EMT 也被认为与肿瘤干细胞产生有密切关系^[7]。

1.2 转移靶器官部位的微环境与转移瘤的形成

转移靶器官部位的微环境完全不同于肿瘤的原发生长环境。正常情况下,细胞很难在另一个器官组织中生存,更不用说生长了。肿瘤细胞在靶器官中之所以能够生存并生长形成转移瘤,其机制仍不清楚,一方面不同肿瘤对不同器官组织的亲和力有明显差异,如乳腺癌最容易转移至肺、骨、脑,肺癌容易转移至肝、脑,大肠癌转移的靶器官是肝,前列腺癌转移的靶器官是骨,另一方面,即使这种亲和力存在,肿瘤细胞仍然需要克服多种障碍才能形成转移瘤。目前已发现几种决定肿瘤细胞亲和力的因素,其中转移瘤细胞与靶器官微循环血管内皮细胞之间黏附分子的识别及相互作用是重要因素之一。这种识别使瘤细胞停着于靶器官毛细血管床,进一步的相互作用使瘤细胞穿过内皮细胞屏障进入组织。例如肿瘤细胞表达的整合素 $\alpha_6\beta_4$ 可与肺部血管内皮细胞上的钙激活氯通道(calcium-activated chloride channel, CLCA)结合,使肿瘤细胞在肺部停留,并形成转移灶^[8]。破骨细胞的激活对肿瘤的骨转移至关重要,肿瘤特异性的 $\alpha_v\beta_3$ 可通过募集激活的破骨细胞以及增强趋化性和趋触性迁移来促进乳腺癌细胞的自发骨转移^[9]。

近年来有一种新的理论——“转移前壁龛”(pre-metastatic niche)可以部分解释转移瘤是如何在靶器官形成的^[10]。肿瘤细胞在到达靶器官之前可以分泌某些因子,如 VEGF、胎盘生长因子(placental growth factor, PlGF)、FGF 等,这些因子以分泌小体(exosome)的形式先于肿瘤细胞到达靶器官,并对靶器官微环境进行改造,使之变得适合于后来的肿瘤细胞的生存。肿瘤细胞也可通过分泌小体动员骨髓中的一些细胞,如骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow derived cells, BMDC, 通常表达 VEGF 受体)先于肿瘤细胞到达靶器官,并对靶器官微环境进行改造,经过这些改造,肿瘤细胞在靶器官的生存及成瘤能力大大提高。因此,如何阻断“转移前

壁龛”的形成,有可能成为抑制转移瘤形成的有效策略。

1.3 血管/淋巴管系统中肿瘤细胞的转运及生存

由于血管/淋巴管系统中免疫细胞及抗体的存在,再加上液体剪切力的作用,使得绝大部分进入血管/淋巴管系统的肿瘤细胞被破坏或清除。肿瘤细胞可以通过自身形成细胞团或与血小板形成小血栓的形式抵抗这种破坏,有实验数据表明,形成血栓或细胞团的肿瘤更容易形成转移灶。

肿瘤患者外周血及骨髓中存在的肿瘤细胞分别被称为循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)或播撒肿瘤细胞(disseminated tumor cells, DTC),现在已经可以通过多种方法检测,正在成为临床判断肿瘤患者复发/转移、临床疗效及预后的重要指标^[11]。CTC/DTC 往往 EMT 更明显,同时带有肿瘤干细胞样标记的细胞比例也更高。

2 ATP 作为新型促侵袭因子的发现

除上述被人们逐渐认识和接受的炎症性细胞因子及生长因子外,相信还有很多尚未被人们意识到或正在深入研究的分子存在于肿瘤微环境中(包括原发瘤及转移灶部位),影响着肿瘤的进展。例如,以 ATP 为代表的核苷/核苷酸类物质在肿瘤微环境中的作用就很值得关注。笔者实验室的研究发现,ATP 除具有一定的抑制肿瘤细胞增殖作用外^[12-13],还可以明显促进肿瘤细胞的侵袭能力^[14-15],很可能是肿瘤微环境中另一种重要的促侵袭因子。

2.1 对 ATP 生理功能的认识

ATP 究竟在体内具有哪些功能?自 1929 年 Lohmann 发现 ATP 分子以来,ATP 及其相关的核苷酸在调节酶活性、离子通道功能、能量代谢及核酸合成中的重要作用不断被揭示。随着研究的深入,人们发现释放到细胞外的 ATP 还具有多种重要生理/病理功能。ATP 是重要的信号分子,在各种外周组织和中枢神经系统产生不同的效应,包括参与快速激动型神经传导及发育,参与伤害感受、听觉、视觉、味觉功能,参与凋亡级联反应、骨关节病的发生、血小板凝集、平滑肌收缩/舒张及免疫反应,调节肺及心血管功能,调节星形细胞等^[16]。近年来还发现,ATP 也参与长效的生物学行为调节,如细胞增殖、分化、迁移以及死亡。

2.2 细胞外 ATP 的来源及代谢

正常情况下细胞外 ATP 浓度($\mu\text{mol/L}$)要远小于细胞内($3 \sim 5 \text{ mmol/L}$),并维持一种平衡状态。在某些病理情况下,如炎症、缺氧或组织重塑等造成

细胞损伤破坏,细胞内 ATP 会大量释放到细胞外,引起细胞外微环境中 ATP 浓度短暂迅速增加。此外,许多细胞在缺氧、机械/化学刺激时可通过胞吐、小泡转运的方式释放 ATP。最近还有 P2X7 受体可直接参与介导 ATP 释放的报道^[17]。释放到细胞外的 ATP 存在时间较短,通常会在外核苷酸酶(ectonucleotidase)的作用下迅速降解为二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、一磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)及腺苷(adenosine)。外核苷酸酶中的外三磷酸核苷二磷酸水解酶(ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases, 主要是 CD39)、外核苷焦磷酸酶(ecto-nucleotide pyrophosphatase)和磷酸二酯酶水解 ATP 为 ADP 和 AMP,后者被 CD73 进一步水解为腺苷。肿瘤微环境中,由于炎症反应、缺氧造成细胞损伤以及肿瘤侵袭造成组织破坏,使 ATP 大量出现在细胞外间隙中,其浓度(约 $100 \mu\text{mol/L}$)要高于正常细胞外 ATP 浓度^[18],如此高浓度的 ATP 对肿瘤微环境的影响值得被关注。

2.3 ATP 受体

细胞外 ATP 主要通过细胞膜上相应的受体发挥作用,这些受体被称之为嘌呤受体(purinergic receptor 或 purinoceptor)。Burnstock^[16]首次系统描述了嘌呤受体并将其分为 P1 和 P2 受体两大类。

P1 受体:其主要的天然配体是腺苷,又称腺苷受体,分为 A1、A2A、A2B 和 A3 四个亚型,均与 G 蛋白偶联。

P2 受体:主要是 ATP 受体,可进一步分为 P2X 和 P2Y 两大类。(1)P2X 受体为配体门控型离子通道(ligand-gated ion channel, LGIC)受体,已有 7 种亚型被克隆(P2X1 ~ P2X7),P2X 受体对 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 通透,一旦被激活,即引起细胞的去极化及兴奋。P2X 受体主要对 ATP 起反应。(2)P2Y 受体属于 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR),以具有典型的 7 次跨膜结构为特征,迄今已有 8 种有功能的哺乳动物 P2Y 受体(P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2Y11、P2Y12、P2Y13、P2Y14)被克隆。P2Y 受体可被多种核苷/核苷酸激活,包括 ATP、ADP、二磷酸尿苷(uridinediphosphate, UDP)及 UDP 葡萄糖。从药理学特性方面看,P2Y 受体可被进一步区分为:腺嘌呤核苷酸受体 P2Y1、P2Y11、P2Y12、P2Y13,主要由 ATP 激活;尿嘧啶核苷酸受体 P2Y4、P2Y6、P2Y14,主要由三磷酸尿苷(uridine triphosphate, UTP)、UDP 或者 UDP 葡萄糖激活。另外,P2Y2 受体等同地被 ATP、UTP 激活。从系统分

类以及结构、信号通路方面看,P2Y受体分为两个亚家族:①P2Y1家族,包括P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2Y11,其同源率为35%~52%,其中P2Y11与其他4种受体的同源性仅为28%~30%,它们共同偶联于G_q,参与激活磷脂酶C(phospholipase C,PLC)。②P2Y12家族,包括P2Y12、P2Y13、P2Y14,其基因共同定位于染色体3上的一个基因群,其同源率为45%~55%,偶联于G_{i/o},参与抑制腺苷酸环化酶的活性。

2.4 P2Y受体激活的信号传导通路

P2Y受体具有GPCR的共性,即受体活性与所偶联的G蛋白类型密切相关。当P2Y受体与细胞外激动剂结合后,通过与G蛋白偶联激活一系列信号通路。通常根据与不同的G蛋白偶联而分成两组:P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6和P2Y11受体与G_q偶联,激活PLC β ;而P2Y12、P2Y13和P2Y14受体与G_i偶联,抑制腺苷酸环化酶。

2.4.1 与1,4,5-三磷酸肌醇通路相偶联,激活PLC

通过对百日咳毒素不敏感的G蛋白G_{q/11}激活PLC β ,使磷脂酰4,5-二磷酸肌醇(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate,PIP2)分解为1,4,5-三磷酸肌醇(inositol-1,4,5-trisphosphate,IP3)和二酰基甘油(diacyl glycerol,DAG)。IP3促使内质网钙库释放Ca²⁺,使细胞内Ca²⁺浓度升高,进而激活蛋白激酶C(protein kinase C,PKC);DAG也可以激活PKC。

2.4.2 腺苷酸环化酶的抑制和/或激活

通过对百日咳毒素敏感的G蛋白G_{i/o}参与对腺苷酸环化酶的抑制和激活,从而调节环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate,cAMP)的水平,引起蛋白激酶A(protein kinase A,PKA)的抑制和激活。

2.4.3 激活丝裂原活化蛋白激酶

通过激活非受体酪氨酸蛋白激酶(如Src)、受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine protein kinase,RTK),以及通过Ras依赖的、Ras不依赖的而Raf依赖的PKA、PKC等途径激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)通路。

2.4.4 通过第二信使调节其他酶的活性

P2Y受体通过第二信使还可以调节其他一些酶的活性,如磷脂酶A₂、一氧化氮合酶等,也会通过影响多种信号分子的产生,如前列环素(prostaglandin I₂,PGI₂)、内皮源性舒张因子(endothelium derived relaxing factor,EDRF)以及NO等,调节多种生理功能。

2.4.5 参与对多种离子通道的调节

P2Y受体参与了N型Ca²⁺通道、M型K⁺通道、Ca²⁺依赖的Cl⁻通道和Ca²⁺依赖的K⁺通道的调节,但其对离子通

道的调节机制尚不清楚。某些离子通道是通过细胞内Ca²⁺调节的,因此,当细胞内的Ca²⁺升高时,就会将受体介导的IP3信号通路与离子通道的激活联系起来,但在许多神经细胞和非神经细胞,P2Y受体对K⁺通道的调节又是直接进行的,其中可能包括了G蛋白的 β 和 γ 亚单位。P2Y受体所激活的下游信号通路不仅依赖于P2Y受体亚型,也因细胞类型的不同而异。通过这些信号参与多种功能的调节,如血小板聚集、上皮细胞离子通道的激活、粒细胞的分化、调节血管张力等。

2.5 ATP与肿瘤

2.5.1 实验动物体内的抗肿瘤研究

关于ATP对肿瘤作用的研究始于上世纪80年代。Rapaport^[19]首先在体内实验中发现ATP可以抑制动物肿瘤细胞的生长,小鼠接种肿瘤细胞后,每日给予腹腔注射ATP,结果发现ATP具有抑制肿瘤生长、抑制带瘤动物体重下降并延长动物生存期的效果。此后多项研究在不同类型肿瘤模型上得出了类似的结果。随后的裸鼠体内实验也证实ATP能抑制人肿瘤细胞的生长,与经典化学药物治疗和放射治疗相结合用于肿瘤治疗具有协同效应,其抗肿瘤作用已得到广泛证实。

2.5.2 抗肿瘤效应的体外实验

ATP及其类似物在几乎所有主要类型人类肿瘤细胞系(如大肠、肺、食道、脑、头颈、宫颈、乳腺、卵巢、黑色素瘤等)体外实验中都表现出明显地抑制肿瘤细胞生长的效应。更为重要的是,ATP仅对晚期恶性肿瘤细胞具有很强的抑制作用,但其对正常细胞几乎没有毒性。例如,我们研究组曾报告ATP能够明显抑制雄激素非依赖性人前列腺癌细胞系(PC-3、DU145、PC-3M)的生长,但对雄激素依赖性人前列腺癌细胞系(LN-CaP)却没有明显影响^[12]。

2.5.3 人体临床试验

由于ATP表现出良好的抗肿瘤活性而进入临床试验,经I、II、III期主要针对非小细胞肺癌的临床试验发现,单独给予ATP并未导致明显肿瘤消退,但确实可以通过减少体重下降而延长部分肺癌患者(主要是III B期)的生存期。到目前为止,临床试验的总体结论是:全身使用ATP是安全的,与其他抗肿瘤治疗方法联合使用具有一定前景^[20]。

2.6 ATP具有促肿瘤侵袭的作用

本研究组曾报道,ATP可以促进前列腺癌细胞的体外侵袭能力^[14-15]。ATP处理前列腺癌细胞(PC-3、DU145、PC-3-1E8、PC-3-2B4)后短时间内就可出现以下变化:微丝染色免疫荧光实验显示在几

分钟内细胞伪足明显增多,6 h 内就有明显的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)表达改变;Matrigel 体外侵袭实验显示,数小时内细胞侵袭能力明显增强,实验结果经多次重复予以确认。对其他类型肿瘤,如 A549(肺癌)、LoVo(大肠癌)、WM983a(黑色素瘤)、Hela(宫颈癌)、MCF-7(乳腺癌)等,ATP 均表现出明显地刺激侵袭的能力,说明 ATP 促侵袭作用具有普遍性。考虑到 ATP 在肿瘤局部微环境中大量存在,因此,该结果提示 ATP 在肿瘤微环境中可能是一个尚未被重视,但很可能具有重要作用的促侵袭因子。

3 ATP 促侵袭作用机制的研究

肿瘤细胞间黏附力的进一步下降、运动能力的增加以及细胞降解胞外基质能力的增强都提示着其侵袭能力的增强,其中任何一种情况的发生都增加了肿瘤细胞侵袭和转移的可能。我们的实验结果显示,ATP 至少可以通过后两种方式促进肿瘤细胞的侵袭乃至转移,即促进细胞的运动并通过增加细胞 MMP 的合成来增强其降解胞外基质的能力^[15]。

3.1 ATP 影响细胞运动能力

细胞伪足长短数量的变化往往是细胞运动状态的写照,伪足数量的增多、长度的增加反映出细胞运动能力的增强。丝状伪足被认为是细胞的触手,可以感知外界信号,确定运动方向;片状伪足是细胞运动的先驱,带动细胞运动。据文献报道,Cdc42 和 Rac1 的激活分别与细胞的丝状伪足和片状伪足形成有关^[21]。

Rac1 和 Cdc42 是很重要的两个 Rho G 蛋白家族成员,与这个家族其他成员一样,其蛋白存在着两种形式,一种是与三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)结合的激活形式,另一种是与二磷酸鸟苷(guanosinediphosphate, GDP)结合的失活形式。现今被人们认识的 Rho 蛋白家族成员有 20 多个,可以分为 6 类,它们的激活状态被至少 3 类调控蛋白所调节,即 Rho 鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)、RhoGTP 酶激活蛋白(GTPase-activating protein, GAP)和 Rho 鸟苷酸分离抑制因子(guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDI),其中 GEF 促进 Rho 蛋白激活,而后两种则起抑制作用。这个家族中很多成员都参与对微丝和微管的组装以及细胞运动的调节。

Rac1 和 Cdc42 是 Rho 蛋白家族中被研究得比较深入的分子,它们通过对细胞微丝骨架的调节直接影响着细胞的运动、极性、黏附等重要活动。文献

报道,Cdc42 主要参与调节细胞的极性(包括上皮的极性、运动的极性和细胞分裂的极性),调节细胞微丝骨架的组装、丝状伪足和轴突髓鞘的形成等,而 Rac1 的主要功能是调节片状伪足的伸展、微丝骨架的组装及细胞黏附、吞噬等过程^[21]。

从我们的实验结果可以看到,ATP 刺激使得前列腺癌细胞片状和丝状伪足的数量以及长度都明显增加^[15]。然而 ATP 所激活的 Rho G 蛋白分子却不相同,这也再次验证了肿瘤细胞遗传背景的复杂与多样性。不同的细胞表型(基因背景以及细胞内信号网络环境)决定着细胞对刺激的不同反应方式,即使由同一刺激引起的相似效果所经由的信号途径也是千差万别。在 DU-145 细胞,没有检测到与 2B4 相同的 Rac1 和 Cdc42 蛋白的激活,但其明显的伪足形态和数量的改变提示可能有其他类型的 Rho 蛋白家族分子(如 Rif、RhoD 等)参与这一过程。

3.2 ATP 调节部分 MMP 活性表达

众所周知,肿瘤细胞在转移过程中需要降解细胞外基质,这一过程依赖于多种肽链内切酶的参与,而 MMP 就是其中被研究得最多的一种。有研究报道,ATP 可以引起子宫内膜间质细胞 MMP 表达的增加,还可以促使动脉平滑肌细胞和单核细胞释放 MMP。笔者曾研究 ATP 对前列腺癌细胞 MMP 活性的影响,发现 ATP 不影响最常见的 MMP-2 和 MMP-9 的活性,但可以增强 MMP-3 和 MMP-13 的表达;在 2B4 和 1E8 细胞,ATP 主要是引起 MMP-3 表达的上调,而在 DU-145 细胞,则对 MMP-3 和 MMP-13 的表达均有促进作用^[15]。这一差异可以解释为,由于不同肿瘤细胞之间细胞内微环境的不同决定了传导相同刺激的途径不同,从而最终导致不同的结果。

进一步研究 ATP 在调节 MMP 表达中涉及的信号传导通路,发现 PI3K/AKT 和细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)通路在不同前列腺癌细胞中的作用存在差异^[14]。在 2B4 和 1E8 细胞,ATP 促侵袭作用主要由 PI3K/AKT 通路介导,而在 DU-145 细胞,此作用由 PI3K/AKT 和 ERK1/2 通路所共同参与。我们还发现,在不同前列腺癌细胞中这两条通路对 ATP 促前列腺癌细胞 MMP 表达的影响也有差异:对 DU-145 细胞而言,MMP-3 的表达上调是 PI3K/AKT 和 ERK1/2 通路共同作用的结果,而 MMP-13 的上调主要由 PI3K/AKT 通路参与。PI3K/AKT 通路参与 1E8 细胞 ATP 促 MMP-3 的表达,对 2B4 细胞中 ATP 上调 MMP-3 却没有明显影响。总而言之,我们的研究发

现 PI3K 通路的激活在 ATP 促前列腺癌细胞侵袭过程中的作用十分显著,而 ERK1/2 通路的作用在不同细胞却不尽相同。

3.3 ATP 受体亚型的鉴定

正常情况下,细胞表面会表达多种 ATP 受体。我们在前列腺癌细胞表面发现各种受体亚型的表达呈现明显异质性,其中表达最普遍且表达水平较高的是 P2Y1、P2Y2、P2Y11 和 P2X7 受体。根据相关功能实验结果,我们首先选择 P2Y2 作为主要对象进行相关机制研究,P2Y2 受体的主要激动剂是 ATP 和 UTP,100 $\mu\text{mol/L}$ UTP 与同剂量 ATP 一样,能够促进前列腺癌细胞的体外侵袭和迁移。应用 RNA 干扰技术将 P2Y2 受体敲低,ATP 和 UTP 的促侵袭/促迁移的作用被明显抑制^[22],说明 P2Y2 受体是 ATP 促侵袭作用的主要介导受体。

3.4 ATP 刺激前后肿瘤细胞差异表达转移相关基因

应用基因表达芯片筛选技术,我们得到多组 ATP 作用后肿瘤细胞差异表达的基因,对其中 32 个可能与肿瘤侵袭和转移密切相关的基因进行 real-time PCR 及 Western blot 验证,结果发现,ATP 刺激可以明显上调 IL-8 和 Snail 的表达,下调上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)和紧密连接蛋白(claudin-1)的表达^[22]。

3.5 ATP 诱导肿瘤细胞 EMT,与 P2Y2 受体密切相关

ATP 刺激肿瘤细胞后,EMT 相关基因的表达出现明显变化,表现为 Snail 的表达上调,E-cadherin 和 claudin-1 的表达下调,同时肿瘤细胞侵袭能力明显增强。应用 RNA 干扰技术将 P2Y2 受体敲低,ATP 促 EMT 的作用被明显抑制,肿瘤细胞的侵袭能力也明显下降,说明 ATP 的促侵袭作用主要通过诱导 EMT 实现。

3.6 P2Y2 受体协同表皮生长因子受体共同介导 ATP 的促侵袭作用

P2Y2 受体属于 GPCR,可通过反式激活(trans-activation)的方式激活受体酪氨酸蛋白激酶受体表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)^[23]。已有实验证实,GPCR 引发的细胞迁移需要 EGFR 的参与,其机制可能为:GPCR 通过激活 MMP,使原本结合于细胞表面或细胞外基质的肝素结合表皮生长因子(heparin binding epidermal-like growth factor, HB-EGF)释放出来,与 EGFR 相互作用。P2Y 受体激活后,通过吸引非受体酪氨酸蛋白激酶 Src 磷酸化 EGFR 使之激活。

我们的研究发现,ATP 和 UTP 均能激活前列腺癌细胞中 EGFR 以及 ERK1/2 激酶。敲低 P2Y2 受体或用 EGFR 的特异性抑制剂 AG1478 处理细胞,可明显抑制 ATP 对 ERK1/2 激酶的活化,同时 ATP 的促侵袭作用也被明显抑制^[24],说明 P2Y2 受体除了自身介导的信号传导通路外,与 EGFR 的相互作用也是一条重要的通路。由于 EGFR 在多种肿瘤中均有表达增强的情况,这种相互作用也为进一步认识 P2Y2 受体在肿瘤中的作用提供了线索。

3.7 体内研究进一步证实 ATP 的促侵袭转移作用

体外实验已经提供了充足的证据证实 ATP 的促侵袭作用,为了验证其在体内的作用,我们采用裸鼠移植瘤模型进行体内观察^[22]。结果显示,皮下接种肿瘤细胞后,对照组肿瘤与周围的肌肉和脂肪组织界限不清,侵袭明显,50% 发生了肝转移;但在敲低 P2Y2 的两组动物中,移植瘤与周围组织界限清楚,且所有裸鼠均未发生肝转移。同时,实验组肿瘤中 Snail 的表达量下降,E-cadherin 和 claudin-1 的表达量上升,说明阻断 P2Y2 受体可以明显抑制前列腺癌体内侵袭和转移过程,也为 ATP 的促侵袭转移作用提供了最直接的证据。

此外,不仅在前列腺癌模型中,对乳腺癌的研究也同样揭示了 ATP 诱导 EMT,具有促进肿瘤细胞迁移及侵袭的作用(结果待发表)。

3.8 P2X7 受体也能介导 ATP 的促侵袭作用

前面曾提到,ATP 受体的另一个亚型——离子通道型 P2X7 受体也在前列腺癌细胞中高表达。采用同样的研究方法,我们发现 ATP 刺激可显著促进前列腺癌细胞的体外迁移和侵袭,并调节 Snail、E-cadherin 和 claudin-1 的表达^[25]。敲低 P2X7 受体后,ATP 介导的体外迁移、侵袭以及对 EMT 相关基因表达的调节作用均被显著抑制。在 P2X7 受体低表达的 22RV1 前列腺癌细胞中过表达 P2X7 受体,ATP 的促迁移、侵袭及其对 Snail 和 E-cadherin 表达的调节作用明显增强。使用 LY294002 和 U0126 分别抑制前列腺癌细胞中 PI3K/AKT 和 ERK1/2 信号通路的激活,ATP 介导的体外迁移、侵袭以及对 EMT 相关基因表达的调节作用被显著抑制。敲低 P2X7 受体后,ATP 对 PI3K/AKT 和 ERK1/2 信号通路的激活作用减弱。裸鼠体内实验的结果表明,敲低 P2X7 受体能够明显抑制前列腺癌移植瘤的局部侵袭以及向肾、淋巴结的远处转移。此外,敲低 P2X7 受体导致移植瘤组织中 E-cadherin 和 claudin-1 的表达上调、Snail 的表达下调以及 PI3K/AKT 和 ERK1/2 信号通路的激活水平下降,与体外实验结

果相一致。以上结果表明,P2X7 受体也是介导 ATP 促侵袭作用的重要受体。

4 ATP 作为新型促侵袭因子的意义及展望

在肿瘤微环境中存在众多的分子,作用于肿瘤生长、侵袭、转移的不同环节。ATP 分子虽然简单,但其作用正在得到越来越多的重视。在肿瘤微环境中,ATP 浓度高,虽然存在时间短暂,但可以通过细胞内的不断释放而得到持续的补充,因此其作用不容忽视。我们的研究表明,ATP 对多种类型的肿瘤均具有促侵袭作用,说明不是偶然现象,而是具有普遍意义。P2Y2 受体与 EGFR 相互作用,说明 ATP 可通过多种通路对肿瘤细胞发挥作用。此外,已证实 ATP 受体与包括间充质干细胞在内的干细胞代谢及生长分化有关,再加上 EMT 与肿瘤干细胞的关系,使我们不由得将 ATP 的作用与肿瘤干细胞联系起来。我们假设,ATP 通过诱导 EMT,产生具有迁移能力的肿瘤干细胞,进而促进肿瘤的侵袭和转移,但这一假设尚需要进一步的实验予以证实。

ATP 的生理/病理作用经几十年的研究仍未被彻底揭示,作为一种新型的促肿瘤侵袭因子,其在肿瘤侵袭过程中的作用及临床意义还有待更多的研究结果予以揭示。

参考文献

- [1] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 275 - 292.
- [2] Quail D, Joyce J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423 - 1437.
- [3] Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, et al. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(2): 243 - 248.
- [4] Fang H, DeClerck YA. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(16): 4965 - 4977.
- [5] Shi YH, Wang YX, Bingle L, et al. *In vitro* study of HIF-1 activation and VEGF release by bFGF in T47D breast cancer under normoxia: involvement of PI-3K/Akt and MEK1/ERK pathways [J]. *J Pathol*, 2005, 205(4): 530 - 536.
- [6] Shi YH, Bingle L, Gong LH, et al. Basic FGF augments hypoxia-induced HIF-1 expression and VEGF release by T47D breast cancer cells [J]. *Pathology*, 2007, 39(4): 396 - 400.
- [7] Wang S, Jiang J, Liang X, et al. Links between cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Onco Targets Ther*, 2015(8): 2973 - 2980.
- [8] Abdel-Ghany M, Cheng H, Elble CR, et al. The interacting binding domains of the β_4 integrin and calcium-activated chloride channels (CLCAs) in metastasis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278

(49): 49406 - 49416.

- [9] Sloan EK, Pouliot N, Stanley KL, et al. Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone [J]. *Breast Cancer Res*, 2006, 8(2): R20.
- [10] Isola AL, Chen S. Exosomes: the link between GPCR activation and metastatic potential? [J]. *Front Genet*, 2016(7): 56.
- [11] Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(6): 228.
- [12] Fang WG, Pirmia F, Bang YJ, et al. P2-purinergic receptor agonists inhibit the growth of androgen-independent prostate carcinoma cells [J]. *J Clin Invest*, 1992, 89(1): 191 - 196.
- [13] Fang WG, Wu BQ. Differential growth regulation of a metastatic human lung carcinoma cell line through activation of phosphatidylinositol turnover signal transduction pathway [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1993, 11(4): 330 - 336.
- [14] Chen L, He HY, Li HM, et al. ERK1/2 and p38 pathways are required for P2Y receptor-mediated prostate cancer invasion [J]. *Cancer Lett*, 2004, 215(2): 239 - 247.
- [15] Zhang Y, Gong LH, Zhang HQ, et al. Extracellular ATP enhances *in vitro* invasion of prostate cancer cells by activating Rho GTPase and upregulating MMPs expression [J]. *Cancer Lett*, 2010, 293(2): 189 - 197.
- [16] Burnstock G. Purinergic signalling: from discovery to current developments [J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(1): 16 - 34.
- [17] Wanke D, Mauch-Mücke K, Holler E, et al. Human beta-defensin-2 and -3 enhance pro-inflammatory cytokine expression induced by TLR ligands *via* ATP-release in a P2X7R dependent manner [J]. *Immunobiology*, 2016, 221(11): 1259 - 1265.
- [18] Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, et al. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: *in vivo* imaging with plasma membrane luciferase [J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2599.
- [19] Rapaport E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle [J]. *J Cell Physiol*, 1983, 114(3): 279 - 283.
- [20] Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer [J]. *Purinergic Signal*, 2013, 9(4): 491 - 540.
- [21] Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(9): 690 - 701.
- [22] Li WH, Qiu Y, Zhang HQ, et al. P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells [J]. *Bri J Cancer*, 2013, 109(6): 1666 - 1675.
- [23] Norambuena A, Palma F, Poblete MI, et al. UTP controls cell surface distribution and vasomotor activity of the human P2Y2 receptor through an epidermal growth factor receptor-transregulated mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(5): 2940 - 2950.
- [24] Li WH, Qiu Y, Zhang HQ, et al. P2Y2 receptor and EGFR cooperate to promote prostate cancer cell invasion *via* ERK1/2 pathway [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133165.
- [25] Qiu Y, Li WH, Zhang HQ, et al. P2X7 mediates ATP-driven invasiveness in prostate cancer cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114371.

(2016-12-21 收稿)
(本 文 编 辑 : 赵 波)

Identification of a new pro-invasion factor in tumor microenvironment: progress in function and mechanism of extracellular ATP

FANG Wei-gang[△], TIAN Xin-xia

(Department of Pathology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100191, China)

SUMMARY Up to 90% of all cancer related morbidity and mortality can be attributed to metastasis. In recent years the study of tumor microenvironment, its cellular and molecular components, and how they can affect neoplastic progression toward metastasis, has become a hot focus in cancer research. Accumulated evidence shows that the formation of metastasis is a multi-step sequential process, in which, the tumor cells continuously interact with the host microenvironment. Host derived factors, *i.e.* growth factors/inhibitors, angiogenic factors, chemokines, *etc.* together with different types of host cells, play important roles in the tumor progression towards metastasis. The interaction between the tumor cells and host microenvironment determines the fate of metastasis. The reveal of this interaction mechanism provides us an opportunity to find effective mode of interference and develop novel anti-metastasis drugs. In this review, we have summarized our work on a new pro-invasion factor identified in tumor microenvironment and how it affects tumor invasion and metastasis. Adenosine triphosphate (ATP), the key intracellular energy currency, accumulates within the tumor microenvironment and is closely involved in cancer cell metabolism and in antitumor immunity. The established role of ATP as a growth modulator and a pro-inflammatory mediator endues ATP and other purines with potential players in host-tumor interaction. Our study demonstrated that extracellular ATP stimulated human cancer invasion in *in vitro* tests. Increased migration and invasive ability across Matrigel was observed in some human carcinoma cell lines, including the prostate, breast, colon, melanoma and lung, when stimulated with ATP or its analogues. ATP enhanced the motility of cancer cells *via* increasing the amount and length of lamellipodia and filopodia, which were necessary for the cell motility. Significant increase in Rac1 and Cdc42 activities was observed. Using cDNA microarray we found that the expression of a panel of invasion/metastasis-related genes was significantly changed, including the increased expression of interleukin (IL)-8 and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) after ATP treatment. Changes of some epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related factors were also observed, including the increase of snail, decrease of E-cadherin and claudin-1. Multiple P2Y receptors subtypes were expressed on tumor cells, but P2Y2 and P2X7 receptors were found to be mainly responsible for the pro-invasive effect of ATP. Down-regulation of either P2Y2 or P2X7 abolished ATP effect on cancer invasion and expression of EMT/invasion-related genes. Further, we found that P2Y2 receptor trans-activated with epidermal growth factor receptor (EGFR) and co-activated extracellular regulated protein kinases (ERK1/2) signaling pathway, which was involved in regulating expression of EMT and other related genes. In nude mice experiment, the pro-invasive effect of ATP was further confirmed. In summary, our results reveal that ATP is a potential pro-invasive factor in tumor microenvironment. P2Y2/P2X7 receptors act as a mediator in the regulation of ATP-induced EMT and invasion of cancer cells. Given that tumor microenvironment is rich in ATP and other purines, we hypothesize that ATP might be a potential invasion stimulator in tumor microenvironment. Blocking ATP receptor might be a therapeutic target on cancer.

KEY WORDS Adenosine triphosphate; Tumor microenvironment; Neoplasm invasiveness; Neoplasm metastasis