

肿瘤治疗中的多细胞耐受性与三维细胞培养

贾 茜^{1,2} 薛绍白¹ 丰美福^{2*}¹北京师范大学生命科学学院细胞生物学研究所细胞增殖与调控教育部重点实验室, 北京 100875;²中国科学院动物研究所生殖生物学中心, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 肿瘤治疗中的多细胞耐受性是由于体内肿瘤具有三维结构而产生的对药物、射线等作用的耐受性。近年来人们利用体外三维细胞培养技术研究多细胞耐受性, 发现其机制主要为三维结构相关的耐受性和接触性耐受性, 并发现一些逆转或减弱多细胞耐受性的方法, 显示了其作为临床肿瘤单独治疗或联合治疗的应用前景。

关键词 多细胞耐受性; 多细胞耐受性的机制; 多药耐受性; 三维细胞培养

20世纪80年代以来对于肿瘤治疗中耐受性的研究主要集中在多药耐受性(multidrug resistance, MDR), 阐明了其机制并且发现了一些逆转MDR的方法。但临床上还没有得到抑制肿瘤细胞耐受性的理想效果。原因之一是进行体外药物敏感实验时一般使用传统的单层细胞培养系统, 而体内药物的作用靶靶通常是具有一定组织结构的实体瘤, 这两种细胞的状态存在差异。肿瘤细胞进行体外三维培养可得到近似于体内肿瘤的组织结构, 这种新型的药物检测模型越来越受重视。人们发现具有三维结构的体外肿瘤细胞培养物表现出一种类似于体内肿瘤的治疗耐受性: 多细胞耐受性(multicellular resistance, MCR)。本文就近年来通过体外三维细胞培养进行的MCR机制和逆转MCR的实验研究及临床应用作一综述。

1 MCR的产生和特点

1.1 MCR的产生

MCR是指当细胞生长在三维的环境中, 在细胞-细胞和/或细胞-胞外基质之间的联系建立后表现出的对药物敏感性降低的现象。因此, 要在体内获得与体外培养的细胞所受的相同程度的生长抑制, 需要更高的药物浓度。Desoize等^[1]将人肺癌细胞系A594三维培养得到的IC₅₀值与单层培养得到的IC₅₀值的比率作为MCR指数, 将耐药细胞的IC₅₀与敏感细胞的IC₅₀的比率作为MDR指数, 实验结果表明两者之间有很大的差异, 且不同药物的MCR和MDR指数不相同(表1)。

目前三维培养已有多种技术, 如搅拌瓶培养技术、旋转瓶技术、液体叠盖技术、中空纤维培养技术、放射流生物反应器技术、三维胶原培养技术、旋转壁生物反应器技术等。应用这些培养技术, 可将单层扁平生长的细胞培养成具有三维结构的聚集体或球聚体。这些方法的共同原理是提供一个使细胞间黏附力大于细胞与贴附界面间黏附力的条件, 或为细胞提供类似体内生长环境的支架或基质。培养一段时间后细胞将形成一定的三维结构, 建立细胞-细胞之间或细胞-胞外基质间不同程度的联系, 细胞通过膜的突起、胞外基质及桥粒、紧密连接和缝隙连接等连接方式而聚集。

1.2 MCR的特点

肿瘤细胞在体外三维培养的过程中, 一旦与周围同类或异类细胞或细胞外基质建立联系, MCR就出现了。三维培养技术可在体外培养具有一定三维结构的多细胞培养物, 如聚集体和球聚体。随着培养物的生长, 细胞间将建立更多的连接且分泌更多的胞外基质。由此推测, MCR的出现需要一个过程。实验表明^[2], 球聚体培养时一般MCR在24小时内开始出现, 3~5天后有一个平台期, 可见耐受性是逐渐出现的, 且依赖于细胞建立的日益增多的与其微环境的联系。

MCR具有广谱性, 几乎所有的癌细胞在三维培养时都能获得MCR。而且当MCR存在时, 细胞能对几乎所有的药物显示耐受性, 甚至放疗、光

收稿日期: 2004-01-19 接受日期: 2004-02-24

*通讯作者。Tel: 010-62628740, E-mail: Fengmf@panda.ioz.ac.cn

Table 1 IC₅₀ (μmol/L) of four anticancer drugs (etoposide, doxorubicin, cisplatin and vinblastine) and of a new compound (KP46) on A549 cells (human lung cell line) cultured *in vitro* as monolayer and as spheroid^[1]

	Cisplatin	Doxorubicin	Etoposide	Vinblastine	KP46 Tris (8-quinolinolato) gallium III
Monolayer	3.0±0.5	0.2±0.1	3.2±0.3	0.008±0.001	19.5±0.5
Spheroids	81±15	7±1	521±80	53±6	23.5±1.5
MCR indexes	27	35	163	6625	1.2
MDR indexes	2.9	14.5	21.5	3.6	-

疗、免疫疗法等也是 MCR 的目标。MCR 依赖三维结构, 当细胞间联系被破坏时这种接触依赖的耐受性就会被逆转或消失。

2 MCR 的机制

到目前为止, 对 MCR 的机制还不能很清楚地解释。已知药物的渗透效率、三维培养环境、三维培养中细胞接触增加等都是其中的重要因素。根据目前积累的资料, MCR 的机制可被分为两类: 三维结构相关的耐受性和接触性耐受性。

2.1 三维结构相关的耐受性

2.1.1 三维结构对药物渗透的影响 各种药物渗透细胞的能力与其分子量和溶解性有关。目前主要的抗癌药物中, 卡氯芥、顺铂, 卡铂、争光霉素、氟尿嘧啶、苯丁酸氮芥(即瘤可宁)、丝裂霉素、罗氮芥等渗透较快, 如氟尿嘧啶只要几分钟就可均匀分布于球聚体中; 长春碱可能由于其高分子量而较慢, 需 2 h。阿霉素的渗透是另一种情形。阿霉素是一种蒽环类抗肿瘤抗生素, 在多细胞聚集体中, 它对生物分子的高亲和性阻碍它越过第一层细胞继续渗透, 需要超过作用量的药物来饱和所有的结合位点才能使药物渗透至球聚体的中央。所以想要得到与单层培养相同程度的药效, 三维培养的细胞要求更多的阿霉素。但有些数据表明, 对阿霉素的 MCR 不只是渗透效率的问题, 如研究阿霉素对球聚体中细胞的杀伤作用时发现药物似乎最先是在最大的球聚体中作用, 这可能由于阿霉素对生物分子的高亲和力使大量的阿霉素储存在细胞内, 当外层细胞死去后药物释放出来, 继续对其他细胞发挥作用^[3]。

2.1.2 三维培养物的异质性 三维培养物中的细胞不处于相同状态, 或者说具有异质性。例如球聚体就表现出高度的异质性: 外围的细胞通常处于增殖期, 中心是或大或小的坏死区, 两者之间是静息期细胞。氚标记核苷酸示踪试验显示从外到内放射强度迅速降低, 在人黑色素瘤细胞球聚体的 175 μm 处^[4], 放射强度几乎为零。这种细胞的异质性导致

了它们对药物作用的不同反应。例如靶细胞为增殖期细胞的细胞毒性药物阿霉素、长春新碱和氟尿嘧啶等, 对进入平台期的细胞较增殖期细胞的活性明显降低。三维培养的细胞由于这种异质性而增加对药物的耐受性。体内实体瘤也存在这种异质性的影响。

三维培养物随着生长, 和体内肿瘤一样也建立了氧浓度、葡萄糖浓度和细胞间 pH 值的梯度。低营养成分、低氧浓度及 pH 水平的改变可导致细胞生长的明显改变。这些变化对许多药物和辐射的作用发生很大影响。三维培养物内部葡萄糖、氧气可能还有其他的营养物的缺乏, 还可引起一些基因表达和蛋白质活性的变化。有资料报道球聚体中心的氧不足会诱导 NAD(P)H- 醌受体氧化还原酶、胸苷酸合成酶、谷胱甘肽 S 转移酶 -p 和金属硫因 IIA (metallothionein IIA) 等的合成。这些蛋白质在对某些抗癌药物和辐射治疗的耐受性中起重要作用^[5]。

实验所观察到的对抗癌药物和电离辐射的抗性还可能是由于肿瘤细胞迅速的重新繁殖。这个现象被称为“再生性耐受性(regrowth resistance)”, 已在临床病例中得到证实, 且存在于球聚体模型中^[6,7]。放疗和化疗后, 外层有充足氧气供应的增殖期细胞大部分死去。随后, 原本位于内层的静息期细胞转而位于外围, 得到较好的营养供应, 重新回到细胞周期, 恢复生长和对化疗、放疗的敏感性。但新的细胞占据空出的空间, 又由于所处的三维环境发生一系列变化而产生耐受性。因此, 耐受性是动态的变化过程。这些在体外三维培养物中观察到的治疗效应, 可能与临床肿瘤治疗的不确定性有关。

2.2 接触性耐受性

三维培养的细胞由于细胞间接触增加形成一种对药物的特殊耐受性: “接触性耐受性(regrowth resistance)”, 表现为细胞对药物所诱导的凋亡、增殖降低、周期阻滞等效应的耐受。这种耐受性与接触程度正相关。单层培养的细胞生长至汇合状态时也能表现出此耐受性。

2.2.1 接触引起对凋亡的抑制 诱导凋亡是抗癌

的一条重要途径,而三维培养时细胞间接触和/或细胞与胞外基质的接触能够抑制凋亡发生。有很多实验结果显示细胞间接触与细胞凋亡的联系:例如抗 αv 或 $\beta 1$ 或 $\alpha v\beta 3$ 整合素(integrin)的抗体抑制细胞黏附且能很快诱导凋亡;而 $\alpha 5\beta$ 整合素可能通过 bcl-2 通路抑制凋亡^[8]。也有报道表明表达 E-钙黏素(E-cadherin, E-cd)的细胞在三维培养时可保持生长而避免凋亡,原因可能是 E-cd 参与的细胞间黏附产生了某种促进锚定依赖性生长和抑制凋亡的代偿机制^[9],并与细胞表现的耐受性有关。另外,CD44 家族的黏附分子也显示了与凋亡的相关性。例如,在 T-细胞中 CD44v7 通过干扰药物诱导的凋亡来增加细胞的存活^[10]。研究发现 CD44 抑制凋亡的信号通路包括诱导酪氨酸磷酸化和 FAK 的激活,后者又与 PI3K 和下游的 MAPK 的激活相关联^[11]。事实上, E-cd、整合素以及 CD44 等细胞黏附分子(CAM)在肿瘤细胞体外形成三维结构时起着至关重要的作用^[12]。已确定这些细胞间黏附分子与 MCR 十分相关,但确切作用机制有待进一步研究。

另一方面,细胞与胞外基质的接触也与凋亡有关。Frish 等^[13]证明破坏正常上皮细胞与胞外基质间的相互联系可诱导凋亡,并称此现象为“anoikis”。细胞通过 bcl-2 的过表达避免 anoikis,但 bcl-2 过表达是由整合素与胞外基质(ECM)相互作用诱导的。越来越多的工作显示磷酸肌醇丙酮酸(PI)循环也可能与整合素介导的通过 FAK 的存活相关:细胞通过整合素与纤黏蛋白(fibronectin)的黏附促进 FAK 与 p85 相关的 3-磷酸肌醇丙酮酸(PI-3)激酶的相互作用,导致磷酸肌醇丙酮酸 3,4 双磷酸盐和磷酸肌醇丙酮酸 3,4,5 三磷酸盐的积聚。这种 PI 周期对锚定依赖性的存活和生长的作用已在小细胞肺癌细胞(SCLC)中证实^[14]。

2.2.2 接触引起耐受性相关蛋白质的表达变化 有关接触对耐受性相关蛋白质表达影响的资料有些来自单层生长到汇合状态的细胞。例如拓扑异构酶 II (TopII)在复制变慢的汇合细胞中的水平降低^[15],这时药物诱导的 DNA 突变比高表达 TopII 的细胞少。热休克蛋白 27(HSP27)可阻抑细胞坏死和凋亡,它在汇合的人直肠癌细胞中的过表达增加了细胞的耐受性并抑制药物诱导的凋亡,而转染 HSP27 的未生长至汇合状态的细胞也能表现相似的耐受性^[16]。在汇合细胞和球聚体中的细胞还观察到 NAD(P)H: 苯醌受体氧化还原酶表达和活性的增加,这种酶也在药

物敏感性中起作用,且可能与 MCR 有关。

当 HT-29 细胞生长至汇合时,细胞接触依赖的细胞周期依赖性激酶抑制子 p27Kip1 表达增加,可使细胞周期停滞在 G_0/G_1 期,降低抗癌药物的细胞毒作用和引发凋亡的能力,增加药物耐受性^[17]。后来发现三维培养的细胞中 p27Kip1 的表达与单层相比上升了 15 倍多。p27Kip1 的上调使细胞停滞在 G_0/G_1 期,这可能是三维培养物内部细胞进入静息期而对药物敏感性降低的原因。

Poland 等^[18]用蛋白质组学方法分析单层和球聚体生长的人结肠癌细胞 HT-29 的蛋白质表达,借助计算机辅助图像分析,发现了一些蛋白质,包括细胞角蛋白 18(cytokeratin 18, CK18)的 3 种不同片段、一种 rho GDP 分裂抑制物的变体:钙网蛋白前体(calreticulin precursor)及其他几种 CK 分子和 peroxiredoxin 4 的高表达。这三种 CK18 片段的过表达也发生在体内的肿瘤中。CK18 已知是凋亡过程中 caspase 作用的目标, caspase 可使之断裂。其他的蛋白质也与化疗耐受性或凋亡有关。目前,对于接触引起这些相关蛋白质的表达或活性变化的信号通路还不清楚。

2.2.3 接触引起细胞修复能力的增加 细胞间接触引起 MCR 的另一个可能原因是接触引起细胞修复能力的增加。三维培养时细胞具有更强的 DNA 损伤修复能力,细胞间接触引起的胞外-膜-细胞骨架-染色体的信号影响 DNA 的折叠方式,以及 DNA 与修复酶的相互作用,从而促进 DNA 损伤的修复^[9]。另外,三维培养的细胞中 DNA 与某些蛋白质的作用也可能保护 DNA 不受到严重损伤。这些变化使细胞对药物引起的损伤获得一定的耐受性。三维培养的细胞中 DNA 结构完整性的增加可能与核中的一个 55~60 kDa 的蛋白质有关,这个蛋白质在单层培养的细胞中不表达^[20]。

2.3 MCR 与 MDR

虽然 MCR 与 MDR 的基本机制不同,但二者之间仍有一定联系。例如与单层培养的细胞相比,在球聚体培养的细胞中由 *mdr-1* 引起的耐受性更加有效^[21];表达 P-糖蛋白的细胞进行球聚体培养时,需要更高浓度的阿霉素才能达到与单层培养时相同的作用效果。有实验表明细胞和细胞外基质间的联系影响多药耐受性:在 I 型胶原上培养的肝实质细胞过表达 *mdr-1*,但是层黏蛋白(laminin)或培养基中的可溶性 IV 型胶原则抑制 *mdr-1* 基因的表达^[22]。另

外, MCR 也可能影响拓扑异构酶相关的 MDR。例如三维培养的细胞对拓扑异构酶抑制剂足叶乙甙 (Etoposide) 会产生耐受性^[23]。其原因是三维培养时 α II 型拓扑异构酶 (topII α) 不再位于核内而移到胞浆, 细胞则表现出对足叶乙甙的耐受性。若恢复平面培养, 敏感性也恢复。这种分布变化可能与静息态细胞的存在有关, 但具体机制不确定。

3 逆转 MCR 的基础研究与临床实验

有些药物在单层培养的细胞和三维培养物中作用效果差别不大, 如 PS-341 是一种蛋白酶抑制剂, 它对 60 多种单层生长的肿瘤细胞系有广谱的细胞毒作用, 对三维生长的细胞也有相似药效。因此, 可推测它对体内生长不活跃、对传统药物有固有耐受性的实体瘤也有一定作用。实验显示 PS-341 能够抑制 SCID 鼠中骨肉瘤细胞的生长, 且临床实验也观察到明显的疗效, 并证明其作用机制是诱导 p53 和 MDM2 蛋白表达, 诱导 p53 蛋白的磷酸化, 进而激活 c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK), caspase-8 和 caspase-3; 且切断 DNA 蛋白激酶作用的亚单位 ATM 而诱导细胞凋亡^[24]。临床实验也表明 PS-341 对病人毒副作用较小。已启动进一步研究, 希望得到有关蛋白酶抑制剂作为单独治疗方式或参与联合治疗的依据^[25]。

MCR 可被破坏细胞间联系的蛋白酶完全而快速地逆转, 例如用胰酶解聚球聚体后肿瘤细胞的耐受性消失。但这种方法很明显不适合在体内应用。不过, 有一种可以逆转 MCR 的水解酶透明质酸酶已作为化疗致敏剂应用于临床, 在对黑色素瘤、恶性肉瘤、转移性肝癌的化疗中起作用。透明质酸酶可以水解胞外基质, 降低细胞与胞外基质的黏附。这种水解作用可恢复细胞对抗癌药物正常的敏感性但不影响三维结构的形成。它的体内作用机制目前不明, 可能通过解聚细胞促进抗癌药在肿瘤细胞间的渗透来调节与细胞黏附有关的耐受性^[26]。应用透明质酸酶治疗的长期效果还不确定, 因为其降解产物可诱导血管发生, 这可能促进药物运输, 也可能促进肿瘤生长和转移。但也有一些研究没有观察到类似的结果^[27]。

此外还有一些分子, 如直接作用于黏附相关分子的单克隆抗体、合成多肽或非肽类似物, 它们结合或者模拟黏附分子或其受体的识别序列, 从而抑制细胞黏附和调节凋亡。还有陆续发现的一些物

质, 如名为 *Bacillus polymyxa* 的细菌中有一种蛋白酶 Dispase 可以通过促进顺铂向球聚体的中心渗透来提高顺铂的作用^[28]。还有一类如 DNA 依赖性的蛋白激酶抑制剂渥曼青霉素 (Wortmanin), 通过抑制 DNA 损伤修复提高放疗、化疗敏感性^[29]。另外还有 SDZ PSC833 是一种多药耐受性调节物, 它可以逆转对阿霉素的 MCR, 临床试验已在进行中^[30]。

化疗是治疗肿瘤的重要手段。目前肿瘤化疗的最大障碍主要是剂量限制性毒性和肿瘤细胞产生药物耐受性。肿瘤细胞产生的耐受性, 不仅存在于化疗, 且在放疗和免疫治疗时都会出现, 使原本有效的治疗方案变为无效。对肿瘤治疗中多细胞耐受性进行研究, 揭示其机制, 探索逆转方法, 可为临床提出新的治疗方案提供依据。临床采用降低细胞间连接的辅助治疗, 可减少细胞毒性药物的用量, 增强药物疗效, 降低对机体的损伤。另外, 在进行药物测试或治疗方案的临床前实验时, 应更多考虑使用与体内目标相似的实验模型。

参考文献 (References)

- [1] Desoize B et al. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000, **36**: 193
- [2] Olive PL et al. *Br J Cancer*, 1993, **67**: 522
- [3] Wartenberg M et al. *Anticancer Res*, 1996, **16**: 573
- [4] Pettersson OA et al. *Melanoma Res*, 1993, **3**: 369
- [5] Mattern J et al. *Int J Cancer*, 1996, **67**: 20
- [6] Durand RE. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997, **39**: 803
- [7] Olive PL et al. *Cancer Metastasis Rev*, 1994, **13**: 121
- [8] Zhang Z et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 6161
- [9] Kantak SS et al. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 16953
- [10] Marhaba R et al. *J Leukoc Biol*, 2003, **74**: 135
- [11] Fujita Y et al. *FEBS Lett*, 2002, **528**: 101
- [12] Mayer B et al. *Gastroenterology*, 2001, **121**: 839
- [13] Frisch SM et al. *J Cell Biol*, 1994, **124**: 619
- [14] Moore SM et al. *Cancer Res*, 1998, **58**: 5239
- [15] Garrido C et al. *Int J Cancer*, 1995, **61**: 873
- [16] Garrido C et al. *Cancer Res*, 1997, **57**: 2661
- [17] Dimanche-Boitrel MT et al. *Int J Cancer*, 1998, **77**: 796
- [18] Poland J et al. *Electrophoresis*, 2002, **23**: 1174
- [19] Dimanche-Boitrel MT et al. *Cytotechnology*, 1993, **12**: 347
- [20] Gordon DJ et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1990, **19**: 1199
- [21] Kolchinsky A et al. *Anticancer Res*, 1997, **17**: 3321
- [22] Schuetz JD et al. *Cell Growth Differ*, 1993, **4**: 31
- [23] Oloumi A et al. *Cancer Res*, 2000, **60**: 5747
- [24] Hideshima T et al. *Blood*, 2003, **101**: 1530
- [25] Adams J. *Curr Opin Oncol*, 2002, **14**: 628
- [26] Baumgartner G et al. *Cancer Lett*, 1998, **131**: 85
- [27] Spruss T et al. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1995, **121**: 193
- [28] Matsuoka H et al. *J Pharm Pharmacol*, 1998, **50**: 285
- [29] Hall TJ et al. *Calcif Tissue Int*, 1995, **56**: 336
- [30] Kusunoki N et al. *Jpn J Cancer Res*, 1998, **89**: 1220

Multicellular Resistance in Cancer Therapy and Three-dimensional Cell Culture

Qian Jia^{1,2}, Shao-Bai Xue¹, Mei-Fu Feng^{2*}

(¹Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation of Ministry of Education, Institute of Cell Biology, College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; ²State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Multicellular resistance (MCR) phenomenon in cancer treatment is due to there is the three-dimensional structure for tumor inside the body. In recent years, MCR phenomenon has been studied by using three-dimensional cell culture technology *in vitro*. It was found that the mechanism of MCR is mainly related to three-dimensional structure itself, i.e. intrinsic resistance and contact resistance. In addition, some methods were found to be able to reverse or decrease MCR, which might be used in cancer treatment by oneself or united with others in the future.

Key words multicellular resistance; multicellular resistance mechanism; multidrug resistance; three-dimensional cell culture

Received: January 19, 2004

Accepted: February 24, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-10-62628740, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn