

综述



张志刚, 研究员, 博士生导师。上海交通大学医学院附属仁济医院上海市肿瘤研究所肿瘤系统医学全国重点实验室, 神经递质与肿瘤微环境研究团队负责人。中国生理学会基质生物专业委员会前任主任委员。获国家自然科学基金委重点项目、国家自然科学基金重大研究计划、国家科技重大专项、国家自然科学基金面上项目、国家高技术研究发展计划(863计划)等课题资助。担任*Frontiers Cell and Developmental Biology*的Signaling Section主编。以通讯作者在消化系统主流期刊*Gastroenterology*、*Gut*、*Nature Communications*、*Hepatology*、*Journal of Hepatology*、*American Journal of Gastroenterology*、*Genome Biology*、*Molecular Therapy*、*Clinical Cancer Research*、*Cancer Research*、*Oncogene*等发表多篇论文。上海市领军人才, 上海市优秀学科带头人, 上海市卫生系统优秀学科带头人, 入选上海交通大学医学院“高原高峰”计划。申请国家发明专利9项, 获国家专利授权6项, 获国际PCT专利授权1项, 参与编写中英文专著2本。获上海医学科技二等奖(第一完成人)。

细胞外基质与肿瘤休眠

戴大有^{1#}, 木司塔巴·木台力甫^{1#}, 张一宁^{2#}, 李冬雪^{1*}, 张志刚^{1*}

(¹上海交通大学医学院附属仁济医院上海市肿瘤研究所, 肿瘤系统医学全国重点实验室, 上海 200032;

²吉林大学附属白求恩第一医院小儿内分泌遗传代谢科, 长春 130012)

摘要: 肿瘤休眠是目前肿瘤研究和治疗的难点之一, 治疗后的肿瘤常因肿瘤休眠而发生晚期复发。虽然目前针对肿瘤休眠已有大量的研究, 但是肿瘤发生休眠的原因、肿瘤休眠的位置, 以及让肿瘤进入休眠的方法等仍是未解之谜。本文介绍了肿瘤休眠研究的历史, 以及目前研究者针对肿瘤休眠提出的两种学说, 即肿瘤细胞和肿瘤块休眠学说, 简述了目前一些肿瘤休眠的研究方法和模型; 还总结了目前治疗肿瘤休眠的方案, 并分析了肿瘤休眠与细胞外基质的关系, 指出通过靶向细胞外基质内容治疗肿瘤休眠的可行性, 以期为肿瘤休眠的研究和治疗提供新的思路。

关键词: 肿瘤休眠; 细胞外基质; 胶原蛋白; 靶向治疗

Extracellular matrix and tumor dormancy

DAI Dayou^{1#}, MUSITABA Mutailifu^{1#}, ZHANG Yining^{2#}, LI Dongxue^{1*}, ZHANG Zhigang^{1*}

(¹State Key Laboratory of Systems Medicine for Cancer, Shanghai Cancer Institute, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200032, China; ²Department of Pediatric Endocrinology, and Genetic/Metabolic Disorders, Bathune First Hospital of Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: Tumor dormancy presents a significant challenge in both tumor research and treatment, as late recurrence frequently occurs following treatment. Despite extensive research on the topic, the underlying

收稿日期: 20230511

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(82230087)

*共同第一作者: 戴大有, E-mail: ddy990119@sjtu.edu.cn; 木司塔巴·木台力甫, E-mail: 18139363645@sjtu.edu.cn; 张一宁, E-mail: yining@jlu.edu.cn

*通信作者: 张志刚, E-mail: zzhang@shsci.org; 李冬雪, E-mail: dxli@shsci.org

causes, specific locations, and effective methods for inducing tumor dormancy remain unresolved. In this review, we present an overview of the research history of tumor dormancy, including the two theories proposed by researchers, namely the tumor cell and tumor mass dormancy theories. Additionally, current research methods and models of tumor dormancy are briefly discussed. Subsequently, we introduced the current treatment plans for tumor dormancy here, analyzed the relationship between tumor dormancy and extracellular matrix, and pointed out the feasibility of targeting extracellular matrix content to treat tumor dormancy, in order to provide new ideas for the research and treatment of tumor dormancy.

Key Words: tumor dormancy; extracellular matrix; collagen; targeting treatment

对于肿瘤休眠的研究可以追溯到公元47年, 当时古罗马的Celsus就在其著作的百科全书中提出了“组织切除后, 已经形成疤痕, 但是这种疾病还是复发了, 并且导致了死亡”。约100年前, Rupert Willis等通过分析晚期患者的资料, 提出了肿瘤休眠细胞的概念, 开创了肿瘤休眠这一研究领域。随后又有研究者提出了肿瘤块休眠的概念, 为肿瘤休眠进行了其他视角的阐释^[1,2]。

临床上, 有证据提示, 肿瘤休眠现象的存在, 如雌激素阳性(ER-positive)乳腺癌在完成辅助内分泌治疗后的第五至第二十年, 其复发的概率逐年增加^[2]。2022年的一项研究发现, 乳腺癌在手术后10年至32年内都有复发现象存在。发表在《美国外科医师学会杂志》上的一项研究提示, 黑色素瘤存在十年或以上的复发期^[3]。

肿瘤休眠细胞具有很强的适应性, 因其不复制的特性, 细胞周期毒性药物对其无效, 故肿瘤休眠细胞可以耐受大部分传统化疗方案。同时, 肿瘤休眠细胞具有更强的免疫逃避能力, 机体的免疫细胞和免疫分子也难以对其起效。因此, 在长期综合治疗后, 肿瘤休眠细胞仍能存在于患者体内, 是肿瘤复发的“种子”。所以, 识别这些潜在的复发的“种子”, 具有重要的治疗意义。然而, 目前尚未找到肿瘤休眠细胞区别于非休眠细胞的特异性标记物, 现存标记方式都存在特异性差或灵敏性差的缺陷, 很难区分肿瘤休眠细胞与其他慢循环肿瘤细胞(如肿瘤干细胞)。尽管许多研究者提出了多种手段来标记肿瘤休眠细胞^[4,5], 但目前仍没有公认的合理的肿瘤休眠模型, 这也是肿瘤休眠研究的最主要瓶颈。

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)包括细

胞间质和基底膜, 它的组成成分主要包括以下两大类: 经典ECM和非经典ECM。经典ECM主要起支持作用, 其中主要包括胶原蛋白(collagens)、层黏连蛋白(laminins)、纤维蛋白(fibronectin)、弹性蛋白(elastins)、蛋白聚糖以及硫酸乙酰肝素蛋白聚糖等; 非经典ECM包括骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨结合蛋白(osteonectin, SPARC)以及一些小分子的分泌蛋白。有证据显示, ECM影响肿瘤休眠^[6], 如肿瘤细胞可通过整合素系统感知ECM硬度并产生休眠现象。胶原蛋白、黏附蛋白家族中的层黏连蛋白也和肿瘤休眠高度相关。有研究表明, 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)在肿瘤休眠中发挥重要作用^[4,7]。另外, ECM在肿瘤休眠生态位的形成中至关重要。

目前, 主要有两种针对肿瘤休眠细胞的治疗策略, 一是寻找肿瘤休眠细胞的代谢缺陷, 或者使其失去免疫逃避能力, 以杀死肿瘤休眠细胞; 二是厘清肿瘤细胞休眠的机制, 利用该机制让肿瘤长期地处于休眠状态。肿瘤休眠与ECM息息相关, 因此针对ECM的治疗能够改变肿瘤休眠状态, 也是预防肿瘤复发的策略之一。

1 肿瘤休眠概述

虽然目前对肿瘤休眠的了解仍然有限, 但是通过前人的不断努力, 已经为肿瘤休眠的研究奠定了坚实的基础。

1.1 肿瘤休眠概念完善的历史

如前文所述, 很久以前临床医生就注意到肿瘤存在复发的现象, 但是直到1934年, 学者等才提出了肿瘤在一定的条件下会发生休眠的学说(图1), 为肿瘤复发现象提供了一种可能的解释^[8]。然

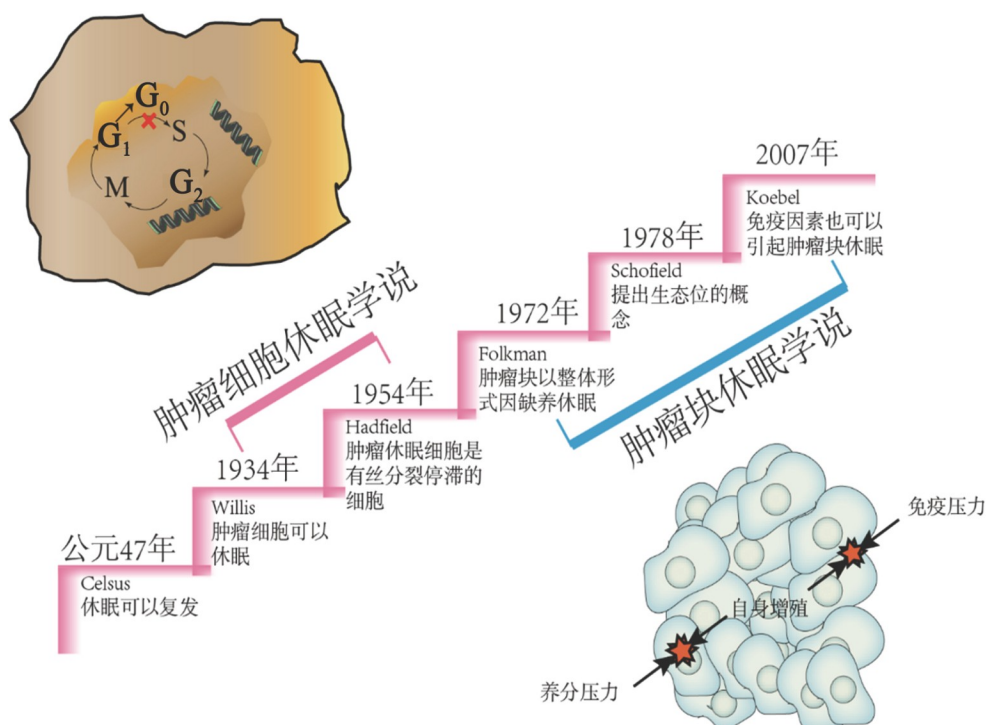


图1 肿瘤休眠的研究历史

而，他的学说并没有区分肿瘤休眠细胞与肿瘤干细胞。随后，Hadfield^[9]进一步明确了肿瘤休眠细胞的定义，即肿瘤细胞进入有丝分裂的停滞阶段。在1972年，Gimbrone等^[10]提出了肿瘤块休眠学说，即肿瘤休眠是整个肿瘤块内肿瘤细胞的增殖和死亡的平衡状态，该学说源自肿瘤的土壤-种子学说，认为肿瘤休眠状态和肿瘤的血液供应、机体的免疫系统功能相关。有学者开展了生态位研究，他们的研究成果为ECM影响休眠提供了理论支持^[4]。

Phan等^[2]概括了肿瘤休眠细胞研究的模型，并详细区分了肿瘤休眠细胞和肿瘤干细胞。首先，两者具有不同的生长状态。尽管肿瘤干细胞也是一类生长缓慢的细胞，但是肿瘤干细胞并没有进入生长停滞的状态^[11,12]，所以只能被划分为慢循环肿瘤细胞(slow cycling cancer cell, SCCC)；而肿瘤休眠细胞的细胞周期是完全停滞的。其次，两者的分子标记不同，目前已发现肿瘤的干细胞特异性的分子标记有CD34、NANOG、POU结构域(POU5F1)、class 5、转录因子1(nucleolar transcription factor 1, NTF1)和SOX2(SRY-box 2)等^[13-15]；而至今为止，尚没有发现肿瘤休眠细胞的

特异性分子标记。最后，肿瘤干细胞和肿瘤休眠细胞处于不同的分化阶段。肿瘤细胞是肿瘤干细胞分化的结果。而肿瘤休眠细胞是处于G₀期有丝分裂停止的肿瘤细胞，和肿瘤细胞处于同一分化阶段^[16,17]。这些研究为完善肿瘤休眠的概念做出了巨大的贡献。

尽管在学者们的不断推进下，肿瘤休眠已有较为成熟的概念，但目前有关肿瘤细胞休眠的相关研究仍受限于技术难题，即尚无标记肿瘤休眠细胞的技术。目前标记肿瘤休眠细胞的方法，大多难以精准地标记出肿瘤休眠细胞，假阴性和假阳性率高。后文会详细介绍这些方法及其局限性。

1.2 肿瘤休眠的学说

肿瘤是以什么形式休眠的？这是关于肿瘤休眠的重要问题之一，目前存在肿瘤细胞休眠和肿瘤块休眠两个概念，分别从肿瘤细胞本身和外部作用角度解释了肿瘤休眠现象。

1.2.1 细胞休眠

细胞休眠学说由Hadfield^[9]提出，认为肿瘤休眠的本质是肿瘤细胞进入G₀期，即“退出有丝分裂的肿瘤细胞”。

与其他几种学说相比, 细胞休眠学说主要围绕肿瘤细胞的周期展开。细胞有丝分裂周期分为G₁期(DNA合成前期)、S期(DNA合成期)、G₂期(DNA合成后期)和M期(有丝分裂期), 其中G₁-G₂期被称为有丝分裂间期。多数学者认为, 在G₁期存在一个特定的节点, 细胞能在这个节点前进入G₀期, 停止有丝分裂, 肿瘤休眠细胞即处于这样的一个阶段。而一旦细胞突破这个节点, 则无法停止本次细胞有丝分裂周期。基于该学说, 有团队利用细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)抑制因子P27^[18]和P21标记肿瘤休眠细胞^[19]。以往还有其他基于细胞周期标记肿瘤休眠细胞的研究方案, 但是都有明显的缺点^[5]。后文我们列举了这些观点及其存在的缺陷。

1.2.2 肿瘤块休眠(tumor mass dormancy)

肿瘤块休眠学说由Gimbrone等^[10]提出。认为肿瘤休眠是肿瘤细胞增殖和死亡的平衡状态^[20]。这种平衡状态主要通过两个方式来达成: 血管新生不良引起的休眠和免疫清除引起的休眠^[21]。肿瘤细胞长成较大的肿瘤块之后, 需要通过新生血管为其提供养分^[22]。血管生成需要经历血管新生(angiogenesis)的过程, 目前有关于肿瘤血管新生的研究认为, 血管新生不良同样是肿瘤休眠的原因^[21]。值得一提的是, 免疫因素也可以引起肿瘤块休眠, Teng等^[23]和Koebel等^[24]证明, 免疫系统杀伤也可以使肿瘤休眠。如效应T细胞通过穿孔素-颗粒酶机制利用INF γ 和TNF α 等细胞因子杀伤肿瘤细胞, 而同时肿瘤细胞仍在不停地复制、增殖, 因而肿瘤块进入增殖-死亡平衡的状态^[25]。除此之外, CD4⁺和CD8⁺的T细胞通过释放抗血管生成趋化因子CXCL9/10, 抑制血管新生, 导致肿瘤血管新生不良, 间接引发肿瘤块休眠^[26]。

1.3 目前研究肿瘤休眠的方法

肿瘤休眠研究面临着巨大的挑战。首先, 肿瘤休眠和肿瘤微环境息息相关, 但是在体外实验中, 很难模拟出真正的体内休眠微环境。为了解决这一问题, 有研究利用3D生物打印技术和海藻泥等生物材料打印ECM成分^[27], 模拟肿瘤细胞在体内的微环境, 为体外实验模型提供了更真实的微环境。

在体内实验中, 由于肿瘤休眠细胞的分子标

记尚不明确, 尚无公认的标记肿瘤休眠细胞的方法。即便是注射外源性肿瘤细胞进行动物体内造模, 也缺乏让肿瘤进入休眠状态的方法。

因为肿瘤块休眠学说的研究模型设计更为困难, 所以大多数研究着眼于肿瘤细胞休眠学说。

1.3.1 核苷酸脉冲追踪

BrdU和EdU是两种核苷酸放射性标记物, 利用他们对DNA进行标记, 根据DNA的半保留复制机制, 每次经历有丝分裂的肿瘤细胞的放射性会稀释为原来的1/2, 所以用X光观察核素强度的衰减, 即可捕获慢复制的肿瘤细胞。

但是这种标记方法的缺点很明显, 首先它识别的是慢循环细胞, 并不能准确识别G₀期细胞, 假阳性率高。其次, 需要固定细胞后才能用X光观察核素, 因此该方法只能用于死细胞, 导致其适用性大大受限^[28]。

1.3.2 质膜和蛋白质染色追踪

一些膜蛋白(如CFSE和CellTrace)和膜脂质(如PKH和DiD)在细胞复制时也会被一分为二。因此, 对这些膜蛋白和膜脂质的染色同样可以标记出慢复制的肿瘤细胞。有人开发出了基于PKH的染色系统, 现今常用PKH26进行染色^[29]。这种标记方法不需要固定细胞就可以观察, 甚至可以通过流式细胞仪分选出慢循环细胞。

质膜染色标记的缺点依然是假阳性率高。另外, 质膜染色标记不能区分细胞或者外泌体, 分泌外泌体多的慢循环细胞的荧光同样会稀释, 因而存在假阴性的可能。

1.3.3 组蛋白追踪

组蛋白追踪也是一种基于稀释原理寻找慢循环细胞的手段, 通过给组蛋白H2标记eGFP来观察细胞增殖。虽然需要多西环素诱导eGFP的荧光, 但是与前两种标记方法相比, 组蛋白追踪对细胞的伤害更小^[30]。

然而, 组蛋白追踪能标记慢循环细胞, 却不能标记真正休眠的G₀期细胞。组蛋白追踪需要利用慢病毒转染肿瘤细胞, 而慢病毒转染G₀期细胞的效率非常低。因此, 用组蛋白追踪研究肿瘤休眠的灵敏度很差。

1.3.4 荧光泛素化细胞周期指示系统

上述方法通过稀释原理来标记慢循环肿瘤细

胞,相比之下,标记细胞周期及其相关蛋白的方法能更准确地指示肿瘤细胞的复制状态。FUCCI (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) 标记系统利用了两种细胞周期限制性周期蛋白: Cdt1和Gemini蛋白^[31]。其中,Cdt1在细胞周期的G₁期积累,在G₁期后被泛素化降解;Gemini在细胞周期的S、G₂、M期积累,在G₁期被泛素化降解。Sawano分别用红色和绿色标记了这两个蛋白质,因此在细胞周期的不同阶段,细胞中两个蛋白质表达和降解的水平不同,使细胞颜色发生红-黄-绿的变化,从而便于观察细胞的有丝分裂阶段。

这种方式可以准确地反映细胞在细胞周期中的状态,但是Cdt1的降解是缓慢的,在G₁和S期都会有Cdt1存在;Gemini也不会G₁期迅速降解,换言之,两个蛋白质的表达和降解水平与细胞周期并不完全同步,因而无法十分精准地标记细胞周期。

1.3.5 CDK相关因子及CDK抑制因子追踪

理论上来说,直接标记CDK蛋白似乎是最好的方式,但是直接标记CDK或者cyclin的方法并不可行^[2]。近年来,许多研究者提出通过干预细胞周期因子来研究肿瘤休眠。P21和P27^[32]是细胞周期相关蛋白,他们都属于细胞周期激酶CDK抑制剂(cyclin-dependent kinases inhibitor, CKI),目前最新的研究聚焦于用P27标记休眠细胞^[33,34]。

这种追踪方法虽然仍不能标记真正处于G₀期的细胞,但是相比其他方法来说,其筛选细胞的特异性更高。

目前为止,基于稀释原理的标记方法都存在假阳性率高的问题,无法从慢循环细胞中区分出真正的休眠肿瘤细胞。基于CDK相关因子的追踪方法能更准确地标记肿瘤休眠细胞,但是也不具有特异性。未来肿瘤休眠研究亟需找到好的方法来寻找和标记休眠细胞。

2 ECM与休眠

大量证据表明,肿瘤微环境和肿瘤休眠现象密切相关^[4,35,36]。休眠现象常见于乳腺导管癌和前列腺癌的骨转移,以及黑色素瘤的肺转移。为什么肿瘤休眠更容易发生于这些转移性肿瘤中,我们尚未可知,但这些现象提示我们,肿瘤微环境

中的ECM组分不同会影响转移性肿瘤的休眠。

2.1 胶原蛋白对肿瘤休眠的影响

胶原蛋白是动物结缔组织的主要成分,常见的有I、II、III、V、XI型胶原等。I型胶原纤维和III型胶原纤维能支撑器官和保持机体活性,在正常组织中的比例约为4:1^[37],二者比例的变化可以改变组织的物理性质^[38]。I型胶原纤维决定了间质硬度,III型胶原纤维决定了间质弹性。有研究表明,I型和III型胶原纤维以及COLXV II型胶原可以影响肿瘤的休眠^[35]。

有研究表明,I型胶原通过整合素 β 1传导信号,经过MLCK诱导MLC磷酸化,触发休眠细胞的觉醒^[39]。

在ER阳性乳腺癌的早期播散细胞(disseminated tumor cells, DTCs)附近会富集III型胶原,Aouad等^[35]认为,III型胶原可作为ER阳性乳腺癌休眠的标记。Di Martino等^[39]用头颈部鳞癌和乳腺癌建立了一个富含III型胶原蛋白的生态位,发现III型胶原蛋白通过激活DDR1/Stat1信号通路来维持休眠状态,他们利用多光子二次谐波成像(second harmonic generation, SHG),分析增殖型(T-HEp3)和休眠型(D-HEp3)头颈部鳞癌的肿瘤模型,发现与增殖型相比,休眠型头颈部鳞癌模型中III型胶原的排列更为整齐,呈现波浪形结构。Montagner等^[36]发现,肺部AT1细胞参与维持弥散性乳腺癌细胞的休眠,与AT1的相互作用触发了乳腺癌细胞中COL3A1的表达。

XV II型胶原蛋白由COL17A1基因编码,是一种促进干细胞成熟的蛋白质。Ohta等^[40]在结肠癌中找到了一类LRG5⁺癌症干细胞,这些细胞在化疗期间进入休眠状态,并在化疗后持续休眠。但LGR5是结肠干细胞标记物,并不是公认的肿瘤干细胞标记物。通过敲低COL17A1可消除LRG5⁺休眠细胞,使肿瘤对化疗敏感。化疗期间破坏COL17A1可激活FAK/YAP来打破LRG5⁺细胞的休眠。

2.2 层黏连蛋白对肿瘤休眠的影响

层黏连蛋白是胚胎发育中最早出现的ECM成分,它与胶原蛋白IV的产生相关,参与了多种生理功能。

炎症反应中,死亡的中性粒细胞可以形成中性粒细胞杀菌网(neutrophil extracellular traps,

NETs)。NETs可以重塑肺ECM并且激活MMP9, 打破休眠细胞的维持状态。Albregues等^[41]研究表明, MMP9剪切层黏连蛋白111使其活化, 通过 $\alpha 3 \beta 1$ 信号通路激活肿瘤休眠细胞。另一项关于脑肿瘤休眠的研究表明, 星形胶质细胞分泌的层黏连蛋白211促进了乳腺癌细胞在脑组织中的休眠^[42]。这些研究强调了层黏连蛋白对维持肿瘤休眠状态的必要性。

2.3 生长因子对肿瘤休眠的影响

生长因子是一类正常细胞分泌的多肽类物质, 对生物的生长、发育具有广泛调节作用, 参与人体的免疫、造血调控、肿瘤发生、炎症与感染和胚胎形成等过程, 属于广义的ECM组分。

转化生长因子- β 超家族包括: 骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、生长分化因子(growth differentiation factor, GDF)、抗缪勒式管激素(anti-Mullerian hormone, AMH)、激活素(Activin)、Nodal及TGF- β , 这些分子和肿瘤休眠密切相关^[43]。

TGF- $\beta 1$ ^[44]和TGF- $\beta 2$ 在休眠中扮演了不同的角色^[45]。学者发现, 骨髓中高水平的TGF- $\beta 2$ 通过TGF β 3激活p38-MAPK通路^[7,45], 诱导肿瘤细胞休眠。相反, 肺中低水平的TGF- $\beta 2$ 促使转移性肿瘤细胞生长。休眠细胞通过血小板反应蛋白1和内皮细胞相互作用, 在血管周围生态位中活动。新生血管通过产生骨形成蛋白和TGF- $\beta 1$ 刺激休眠细胞的再激活和肿瘤生长。研究发现, BMP家族也在前列腺癌骨转移休眠中发挥了巨大的作用, BMP-7信号通过其受体BMP2维持肿瘤休眠, 骨髓中表达的BMP-7促进了前列腺癌骨转移的休眠^[43]。

2.4 肿瘤休眠与ECM硬度

ECM的硬度主要与其成分和内部结构有关, 因此改变细胞基质成分可以改变基质硬度。肿瘤细胞可以通过机械感知和生物化学感知的方式感受ECM硬度并产生应答^[38], 而目前相关研究主要聚焦于肿瘤细胞对ECM硬度的机械感知^[46]。

细胞机械感知ECM硬度主要依赖三种受体, 即整合素受体、Piezo1受体和Piezo2受体。整合素受体跨膜通过黏着斑与细胞骨架连接并传递信息, 由Rho通路传递下游信息, RhoA通过Rho激酶(Rho kinases, ROCK)磷酸化肌球蛋白轻链, 并通

过抑制肌动蛋白切断蛋白维持肌动蛋白的稳定性^[47]。LINK复合体是核骨架和细胞骨架的连接物, 整合素受体源信号通过LINK复合体进入细胞核。这一信号可以影响细胞核形状和染色质的表观遗传学修饰等, 促进了肿瘤休眠^[46]。

Piezo蛋白是一类感受机械力的受体, 其中Piezo1主要在非神经元中表达, Piezo2在神经元细胞表达^[37]。Piezo和肿瘤休眠的关系尚待探索。

值得一提的是, 尿激酶(urokinase plasminogen activator, uPA)也参与了肿瘤休眠的过程。Ossowski等^[48]在头颈部鳞癌模型中发现, uPA和uPA受体(urokinase plasminogen activator receptor, uPAR)的过度表达与患者不良预后相关。uPAR通过与纤维蛋白结合激活ERK通路, 促进细胞的增殖, 而uPAR水平低的细胞不易受ECM硬度的影响, 发生细胞周期阻滞, 易进入休眠状态。

上文中已经介绍过, I型和III型胶原蛋白比例会影响ECM硬度, 其中I型胶原蛋白越多时, ECM的硬度越强, 而III型胶原蛋白越多时, ECM的弹性越强, 肿瘤细胞也会因为III型胶原蛋白表达量上升、ECM硬度下降而进入休眠状态^[38]。

2.5 肿瘤休眠与生态位

在1978年, Schofield等根据土壤种子学说提出了生态位的概念, 生态位包括ECM和周围的细胞。生态位给细胞提供了不同的生存环境, 肿瘤根据不同环境表现出不同表型。对休眠细胞来说, 休眠生态位即休眠细胞所在的空间位置, 休眠生态位促进休眠的维持。

许多肿瘤在骨转移后进入休眠状态。在研究乳腺癌和前列腺癌骨转移休眠中发现^[34,49], 骨转移的肿瘤休眠细胞所处的生态位和造血干细胞生态位类似^[50,51], 其中骨骼的MAF癌基因表达上升, 为肿瘤细胞提供了更适合的生态位^[52]。生态位给肿瘤细胞提供养分支持, 同时产生免疫因子杀死肿瘤细胞。有研究发现, 乳腺癌细胞在缺氧生态位会进入G₀-G₁期休眠状态^[53], 提示肿瘤细胞休眠与生态位的供氧不足相关。而生态位上的免疫状态也影响DTC的定植和定植后状态^[54]。除此之外, 生态位中的神经信号也被证明与肿瘤休眠相关, 去甲肾上腺素信号可以通过 $\beta 2$ 肾上腺素能受体(adrenergic beta-2-receptor, ADRB2)直接刺激前列

腺癌休眠细胞激活^[55]。

总而言之,生态位研究在宏观角度厘清了肿瘤休眠原因,提示我们可以靶向生态位的免疫功能和基因表达,从而干预肿瘤休眠状态,减少肿瘤复发。

3 靶向细胞外基质干预肿瘤休眠的手段

针对肿瘤休眠细胞有两种治疗策略,即杀死肿瘤休眠细胞或者使肿瘤细胞永远维持在休眠状态。

要杀死肿瘤休眠细胞,必须找到合适的标记手段或治疗靶点,以求精准切除或直接杀死肿瘤细胞,或者找到方法使肿瘤休眠细胞失去免疫逃避和耐药能力。然而,迄今为止,无论是寻找休眠细胞的特异性治疗靶点,还是抑制休眠细胞的耐药性和免疫逃避能力,都鲜有收获。有研究表明, NR2F1 可以促使肿瘤休眠^[14],而靶向干扰 NR2F1 可促使肿瘤休眠细胞复苏,使其免疫逃避和耐药的能力减弱。但是,本质上讲,肿瘤休眠本身对人体有益,打破肿瘤原有的休眠状态很大程度上提高了它的危险性。因此我们需要找到更理想的方法,在削弱休眠细胞的耐药性和免疫逃避

能力的同时,维持其肿瘤休眠状态。

让活动的肿瘤细胞进入休眠状态也可以延长晚期患者的生存时间。有多种方式可以诱导肿瘤休眠。首先,可以通过靶向细胞周期来诱导肿瘤休眠,如通过细胞周期蛋白抑制剂和mTOR抑制剂阻断细胞周期^[2],促进肿瘤细胞进入休眠状态;其次,可以靶向肿瘤细胞表面的某些受体来诱导休眠,如5-氮杂胞苷与视黄酸受体(retinoic acid receptor, RARs)泛激动剂联合使用时,全反式视黄酸可以恢复NR2F1诱导的休眠^[14]。

C26是利用计算机模拟筛选出的一种化合物,美国西奈山伊坎医学院和爱因斯坦医学院研究者的共同研究发现,C26可以激动NR2F1,诱导肿瘤细胞进入休眠状态^[56]。

ECM参与肿瘤休眠,因此靶向ECM的治疗手段也可以影响肿瘤休眠状态(图2)。目前已经有学者通过靶向整合素受体改变肿瘤休眠状态,通过抗体阻断 $\alpha 4$ 整合素和VCAM1可抑制骨转移的形成^[57]。

硬化蛋白(Sclerostin,一种由骨细胞分泌的糖蛋白)是一种Wnt拮抗物质,靶向抑制硬化蛋白可以增加多发性骨髓瘤的5TGM1小鼠模型和免疫缺

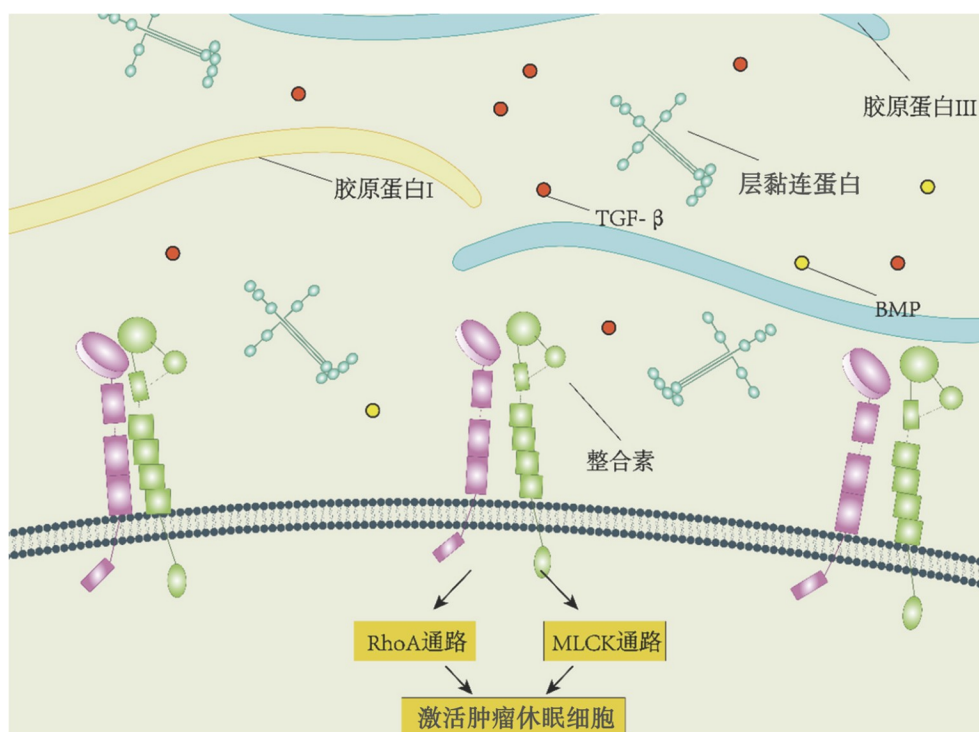


图2 肿瘤休眠细胞生态位ECM相关的潜在治疗靶点

陷小鼠的人类多发性骨髓瘤异种移植瘤中成骨细胞的数量和骨形成的速度, 并减少溶骨损伤^[17]。在乳腺癌转移模型中, 抗硬化蛋白治疗可以降低转移灶的大小和数目。靶向 $\beta 1$ 和 $\alpha V\beta 3$ 整合素可以恢复乳腺癌休眠细胞对化疗药物的敏感性^[57]。

值得一提的是, 研究者们也通过重塑生态位治疗肿瘤休眠——通过重塑细胞外基质组分, 加入PAD4抑制剂或DNase I 抑制剂抑制NETs, 维持肿瘤休眠^[41]。研究表明, 成骨细胞有助于构成休眠生态位, 而破骨细胞可以破坏休眠生态位^[2]。抑制破骨细胞可以减少肿瘤细胞的骨吸收, 从而维持休眠状态, 这种治疗策略在乳腺癌和前列腺癌模型中均降低了肿瘤的转移, 提高了患者的生存率^[58,59]。

4 结论与展望

肿瘤休眠是导致肿瘤手术后患者远期复发的重要原因。我们目前对肿瘤休眠的了解非常有限, 尚不能解释休眠是如何发生的、肿瘤休眠细胞在哪里? 但通过结合临床数据和实验研究, 我们已经有针对肿瘤休眠细胞进行治疗的初步构想。但是, 由于目前尚无公认的肿瘤休眠细胞的特异性标记物, 研究者们各自建立了许多不同的模型来研究肿瘤休眠细胞。靶向杀伤肿瘤休眠细胞的治疗策略同样受限于此。

肿瘤的化学药物治疗和外科手术切除常引起肿瘤细胞休眠状态改变, 进入休眠状态提高了肿瘤细胞对环境的适应能力。激活肿瘤休眠细胞可使其对药物再次敏感, 但是这一方式存在风险, 并且不能保证所有肿瘤休眠细胞都被激活。相比之下, 维持肿瘤休眠状态或诱导活动期肿瘤进入休眠状态具有更大的研究意义。靶向胶原纤维和层黏连蛋白治疗、维持细胞外基质硬度, 以及重塑肿瘤细胞生态位, 是未来维持肿瘤的休眠状态、预防肿瘤晚期复发的重要策略。

在后续的研究中, 一方面应该重点寻找肿瘤休眠细胞的标志物, 或利用新型技术和尖端检测手段建立更好的肿瘤休眠模型, 以求进一步了解肿瘤休眠细胞; 另一方面可以从ECM入手, 靶向细胞外基质促进休眠维持或抑制肿瘤的耐药性。根据目前的研究, 我们认为胶原蛋白或整合素受体有很大的潜力成为未来的治疗靶点。而对于不

能手术的晚期活动性肿瘤, 也可以考虑支持治疗配合休眠疗法, 以延长患者的生存期。

参考文献

- [1] Pan H, Gray R, Braybrooke J, et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med*, 2017, 377(19): 1836-1846
- [2] Phan TG, Croucher PI. The dormant cancer cell life cycle. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(7): 398-411
- [3] Faries MB, Leung A, Morton DL, et al. A 20-year experience of hepatic resection for melanoma: is there an expanding role? *J Am Coll Surgeons*, 2014, 219(1): 62-68
- [4] Cackowski FC, Heath EI. Prostate cancer dormancy and recurrence. *Cancer Lett*, 2022, 524: 103-108
- [5] Basu S, Dong Y, Kumar R, et al. Slow-cycling (dormant) cancer cells in therapy resistance, cancer relapse and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2022, 78: 90-103
- [6] Kai FB, Drain AP, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the metastatic journey. *Dev Cell*, 2019, 49(3): 332-346
- [7] Yumoto K, Eber MR, Wang J, et al. Axl is required for TGF- $\beta 2$ -induced dormancy of prostate cancer cells in the bone marrow. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 36520
- [8] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111
- [9] Hadfield G. The dormant cancer cell. *Br Med J*, 1954, 2 (4888): 607-610
- [10] Gimbrone Jr. MA, Leapman SB, Cotran RS, et al. Tumor dormancy *in vivo* by prevention of neovascularization. *J Exp Med*, 1972, 136(2): 261-276
- [11] Collier H. The essence of quiescence. *Science*, 2011, 334 (6059): 1074-1075
- [12] Collier H, Sang L, Roberts J. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol*, 2006, 4(3): e83
- [13] Clever H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, 2011, 17(3): 313-319
- [14] Sosa MS, Parikh F, Maia AG, et al. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 6170
- [15] Khoo WH, Ledergor G, Weiner A, et al. A niche-dependent myeloid transcriptome signature defines dormant myeloma cells. *Blood*, 2019, 134(1): 30-43
- [16] Kleinsmith L, Pierce G. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res*, 1964, 24: 1544-1551
- [17] Lawson MA, McDonald MM, Kovacic N, et al. Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 8983

- [18] Oki T, Nishimura K, Kitaura J, et al. A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K, identifies quiescent cells and visualizes G₀-G₁ transition. *Sci Rep*, 2014, 4(1): 4012
- [19] Carlson P, Dasgupta A, Grzelak CA, et al. Targeting the perivascular niche sensitizes disseminated tumour cells to chemotherapy. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(2): 238-250
- [20] Townson JL, Chambers AF. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle*, 2006, 5(16): 1744-1750
- [21] Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1995, 1(2): 149-153
- [22] Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*, 2006, 5(16): 1779-1787
- [23] Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, et al. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukocyte Biol*, 2008, 84(4): 988-993
- [24] Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 2007, 450(7171): 903-907
- [25] Ghajar CM. Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(4): 238-247
- [26] Wang H, Wang S, Huang M, et al. Targeting immune-mediated dormancy: a promising treatment of cancer. *Front Oncol*, 2019, 9: 498
- [27] Shboul SA, DeLuca VJ, Dweiri YA, et al. Can 3D bioprinting solve the mystery of senescence in cancer therapy? *Ageing Res Rev*, 2022, 81: 101732
- [28] Potten CS, Kellett M, Roberts SA, et al. Measurement of *in vivo* proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut*, 1992, 33(1): 71-78
- [29] Ford JW, Welling III TH, Stanley JC, et al. PKH26 and 125I-PKH95: characterization and efficacy as labels for *in vitro* and *in vivo* endothelial cell localization and tracking. *J Surg Res*, 1996, 62(1): 23-28
- [30] Zhang D, Jeter C, Gong S, et al. Histone 2B-GFP label-retaining prostate luminal cells possess progenitor cell properties and are intrinsically resistant to castration. *Stem Cell Rep*, 2018, 10(1): 228-242
- [31] Yan C, Brunson DC, Tang Q, et al. Visualizing engrafted human cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish. *Cell*, 2019, 177(7): 1903-1914.e14
- [32] Narkhede AA, Crenshaw JH, Crossman DK, et al. An *in vitro* hyaluronic acid hydrogel based platform to model dormancy in brain metastatic breast cancer cells. *Acta BioMater*, 2020, 107: 65-77
- [33] La T, Chen S, Guo T, et al. Visualization of endogenous p27 and Ki67 reveals the importance of a c-Myc-driven metabolic switch in promoting survival of quiescent cancer cells. *Theranostics*, 2021, 11(19): 9605-9622
- [34] Correia AL, Guimaraes JC, Auf der Maur P, et al. Hepatic stellate cells suppress NK cell-sustained breast cancer dormancy. *Nature*, 2021, 594(7864): 566-571
- [35] Aouad P, Zhang Y, De Martino F, et al. Epithelial-mesenchymal plasticity determines estrogen receptor positive breast cancer dormancy and epithelial reversion drives recurrence. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4975
- [36] Montagner M, Bhome R, Hooper S, et al. Crosstalk with lung epithelial cells regulates Sfrp2-mediated latency in breast cancer dissemination. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(3): 289-296
- [37] Mukherjee A, Bravo-Cordero JJ. Regulation of dormancy during tumor dissemination: the role of the ECM. *Cancer Metastasis Rev*, 2023, 42(1): 99-112
- [38] Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J*, 2021, 288(24): 6850-6912
- [39] Di Martino JS, Nobre AR, Mondal C, et al. A tumor-derived type III collagen-rich ECM niche regulates tumor cell dormancy. *Nat Cancer*, 2022, 3(1): 90-107
- [40] Ohta Y, Fujii M, Takahashi S, et al. Cell-matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells. *Nature*, 2022, 608(7924): 784-794
- [41] Albregues J, Shields MA, Ng D, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*, 2018, 361(6409): ea004227
- [42] Dai J, Cimino PJ, Gouin Iii KH, et al. Astrocytic laminin-211 drives disseminated breast tumor cell dormancy in brain. *Nat Cancer*, 2022, 3(1): 25-42
- [43] Kobayashi A, Okuda H, Xing F, et al. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med*, 2011, 208(13): 2641-2655
- [44] Adam AP, George A, Schewe D, et al. Computational Identification of a p38SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5664-5672
- [45] Bragado P, Estrada Y, Parikh F, et al. TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α/β signalling. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(11): 1351-1361
- [46] Sun Z, Guo SS, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol*, 2016, 215(4): 445-456
- [47] Burridge K, Monaghan-Benson E, Graham DM. Mechanotransduction: from the cell surface to the nucleus via RhoA. *Phil Trans R Soc B*, 2019, 374(1779): 20180229
- [48] Ossowski L, Reich E. Changes in malignant phenotype of a human carcinoma conditioned by growth environment.

- [Cell](#), 1983, 33(2): 323-333
- [49] Singh DK, Patel VG, Oh WK, et al. Prostate cancer dormancy and reactivation in bone marrow. [J Clin Med](#), 2021, 10(12): 2648
- [50] Vora AJ, Toh CH, Peel J, et al. Use of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for mobilizing peripheral blood stem cells: risk of mobilizing clonal myeloma cells in patients with bone marrow infiltration. [Br J Haematol](#), 1994, 86(1): 180-182
- [51] Vogel W, Kopp HG, Kanz L, et al. Myeloma cell contamination of peripheral blood stem-cell grafts can predict the outcome in multiple myeloma patients after high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. [J Cancer Res Clin Oncol](#), 2005, 131(4): 214-218
- [52] Pavlovic M, Arnal-Estapé A, Rojo F, et al. Enhanced MAF oncogene expression and breast cancer bone metastasis. [J Natl Cancer Inst](#), 2015, 107(12): djv256
- [53] Carcereri de Prati A, Butturini E, Rigo A, et al. Metastatic breast cancer cells enter into dormant state and express cancer stem cells phenotype under chronic hypoxia. [J Cell Biochem](#), 2017, 118(10): 3237-3248
- [54] Goddard ET, Bozic I, Riddell SR, et al. Dormant tumour cells, their niches and the influence of immunity. [Nat Cell Biol](#), 2018, 20(11): 1240-1249
- [55] Decker AM, Jung Y, Cackowski FC, et al. Sympathetic signaling reactivates quiescent disseminated prostate cancer cells in the bone marrow. [Mol Cancer Res](#), 2017, 15(12): 1644-1655
- [56] Khalil BD, Sanchez R, Rahman T, et al. An NR2F1-specific agonist suppresses metastasis by inducing cancer cell dormancy. [J Exp Med](#), 2022, 219(1):
- [57] Lu X, Mu E, Wei Y, et al. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging $\alpha 4\beta 1$ -positive osteoclast progenitors. [Cancer Cell](#), 2011, 20(6): 701-714
- [58] McDonald MM, Reagan MR, Youtlen SE, et al. Inhibiting the osteocyte-specific protein sclerostin increases bone mass and fracture resistance in multiple myeloma. [Blood](#), 2017, 129(26): 3452-3464
- [59] Eda H, Santo L, Wein MN, et al. Regulation of sclerostin expression in multiple myeloma by Dkk-1: a potential therapeutic strategy for myeloma bone disease. [J Bone Miner Res](#), 2016, 31(6): 1225-1234