

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.11.014

· 综述 ·

活性氧在非小细胞肺癌肿瘤免疫中的作用

Role of reactive oxygen species in tumor immunity of non-small cell lung cancer

李喜存 综述; 赵家义 审阅(海军军医大学附属长海医院 全科医学科, 上海 200433)

[摘要] 活性氧(reactive oxygen species, ROS)是癌症细胞信号转导机制中不可或缺的一环。ROS含量的多少将决定它所产生的生物学效应。高含量的ROS可能会引起组织损坏和细胞死亡,低水平的ROS可能具有增殖作用。ROS不仅能够在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的肿瘤细胞内产生,也是肿瘤生长环境的重要组成部分。本文从ROS的生物学特性及其细胞免疫机制角度出发,阐述不同含量的ROS通过参与多种的信号通路改变肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME),从而发挥调节PD-1/PD-L1免疫抑制作用,对Treg、MDSC以及TAM生物活性的影响等,对ROS在NSCLC肿瘤免疫的研究进展进行综述。

[关键词] 活性氧; 非小细胞肺癌; 肿瘤免疫

[中图分类号] R734.2; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)11-1295-04

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一类化学性质活泼,具有较高氧化活性的分子或粒子的总称。主要包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(HO^\cdot)、一氧化氮(NO)等。线粒体是ROS的主要产生部位。大多数内源性ROS是由线粒体或过氧化物酶体参与的代谢反应产生的,少数ROS是通过NAPDH氧化酶产生。该酶能够转运电子通过细胞膜并且催化氧气转变成过氧化物,后者进一步被过氧化物歧化酶还原成过氧化氢。肺癌是当今世界最常见的人类恶性肿瘤之一,发病率与病死率居癌症之首。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的80%~85%^[1]。研究^[2]发现,机体免疫功能与肺癌细胞中ROS水平具有明显浓度依赖性。本文从ROS参与的细胞免疫机制角度出发,对NSCLC免疫治疗的进展作一综述。

1 ROS的生物学特征

1969年,科学家发现,在机体细胞内生化反应过程中 O_2 能够获得一个电子还原生成超氧自由基,通过体外模拟该反应过程后,分离精制可以获得超氧自由基的清除灭活酶,并命名为超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)。随后,由超氧自由基衍生出来的 O_2^- 、 H_2O_2 、 HO^\cdot 和NO等ROS也越来越受到重视。

细胞中过量的ROS会对蛋白质、核酸和脂质等生物大分子造成损伤,从而影响其正常的生理生化功能。细胞内存在清除ROS的体系包括SOD酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和抗坏血酸等使体内ROS保持稳态平衡。ROS及其氧化损伤与神经退行性疾病、糖尿病、癌症和早衰老等多种疾病相关。生理条件下的低水平ROS是信号分子,而ROS的过

度生成会诱导生物分子的氧化损伤,进而导致包括NSCLC在内的许多疾病发生。故阐明ROS在NSCLC内的作用以及与肿瘤免疫之间的关系是非常重要的。

2 ROS与NSCLC的发生发展

ROS在NSCLC肿瘤细胞的线粒体中产生,参与了NSCLC发生发展中的多种生物学过程,如细胞增殖、基因突变、炎症反应、组织细胞凋亡以及代谢重构。肿瘤细胞中的ROS是主要由其线粒体产生,其机制为单电子通过线粒体的电子传输链(electron transport chain, ETC)还原氧气,从而在线粒体中产生过氧化物^[3]。ROS可在线粒体的不同位置产生,部分过氧化物是由复合物I和II主要在线粒体基质中生成,而复合物III能够在线粒体基质和膜间隙中产生过氧化物^[4-5]。后者在线粒体基质中被过氧化物歧化酶蛋白2(superoxide dismutase protein 2, SOD2)转化为 H_2O_2 ^[6]。在膜间隙由复合物III产生的过氧化物可以至线粒体外膜进入胞质溶胶,并被过氧化物歧化酶蛋白1(superoxide dismutase protein 1, SOD1)转化为 H_2O_2 ^[7]。细胞质中的过氧化物能够影响细胞信号传导^[8]。

线粒体ROS可以激活包括稳定缺氧诱导的转录

[基金项目] 海军军医大学第一附属医院“234学科攀峰计划”(No. 2019YBZ003)。Project supported by the “234 Subject Peak Climbing Plan” from the First Affiliated Hospital of Naval Medical University (No.2019YBZ003)

[作者简介] 李喜存(1989-),男,本科,住院医师,主要从事非小细胞肺癌发生发展的机制及治疗研究, E-mail: 813423065@qq.com

[通信作者] 赵家义(ZHAO Jiayi, corresponding author), 硕士,主治医师,主要从事肺癌的发病机制及治疗研究, E-mail: rayzhaojiayi@163.com

因子(hypoxia-inducible transcription factor, HIF)在内的多种信号通路^[9-11]。稳定HIF会引导大量转录程序的启动以调节血管生成基因^[12],上调VEGF的表达,后者可结合VEGF受体激活内皮细胞增殖的信号通路^[13]。线粒体ROS在T细胞活化中亦很关键,研究^[14]证实,当小鼠体内由复合物III生成的线粒体ROS含量降低时,即使受到CD3或CD28的刺激,也无法持续引起T细胞活化。此外,有研究^[15]表明线粒体ROS可移位至T细胞的免疫突触,当受到抗原刺激后,线粒体中的H₂O₂可增强T细胞受体(T-cell receptor, TCR)的MAPK信号途径,引起T细胞的激活和增殖。可见,线粒体ROS在刺激细胞增殖中有重要作用,影响NSCLC的发生发展。

KIM等^[16]的研究也证实抗氧化调节能够诱导肿瘤细胞凋亡。长期的ROS暴露可促进NSCLC的细胞有丝分裂、细胞存活、细胞生长、细胞增殖和血管生成^[17]。在多种肿瘤细胞中线粒体DNA突变不仅影响细胞中的氧化还原反应,而且还可能导致线粒体ROS含量明显升高^[18-21]。WEINBERG等^[22]研究发现,在敲除线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)的肺癌小鼠模型中,其肿瘤的生长速度显著下降,这表明TFAM在线粒体DNA复制过程中起着至关重要的作用。当TFAM缺乏时,细胞氧化磷酸化功能受损进而线粒体ROS的水平降低,导致肿瘤的生长受到影响,表明线粒体ROS是非依赖性软琼脂生长所必需的。上述研究表明,ROS对NSCLC的发生发展有正向调节作用。

3 ROS参与NSCLC的肿瘤免疫

ROS与NSCLC的肿瘤免疫主要指ROS与肿瘤浸润性T淋巴细胞的关系。在免疫功能受抑制的情况下,肿瘤更易对机体侵犯、转移,甚至出现对相关药物耐药^[23]。ROS参与了肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中T细胞的活化和调节。TME中高含量的ROS可抑制T细胞活化增殖和抗肿瘤等功能。T细胞的活化需要通过诱导信号转导通路和转录因子刺激T细胞受体(T-cell receptor, TCR)。Ca²⁺通过依赖性TCR流入CD4⁺T细胞后,会导致线粒体ROS的生成,抑制了CD4⁺T细胞活化^[14,24]。

3.1 ROS与PD-1/PD-L1

PD-1主要在活化的T细胞上表达,与其两个配体之一(PD-L1或PD-L2)结合,使受体磷酸化和Src同源区2重新结合磷酸酶2(srhomology region 2 domain-containing phosphatase-2, SHP-2),进而导致TCR活化分子去磷酸化^[25-26],这导致NSCLC细胞的“暴露”和针对该细胞的肿瘤浸润性T淋巴细胞

(tumor-reactive cytotoxic T-lymphocytes, T-CTL)的激活。当PD-L1与PD-1结合后可产生负性刺激信号,抑制T淋巴细胞的活化和功能,使T细胞无法吞噬肿瘤细胞,肿瘤细胞发生免疫逃逸导致NSCLC的发生发展^[27-28]。目前仍未完全阐明PD-1阻断机制是如何导致肿瘤免疫耐受性消失的。然而,有学者研究^[29]发现,ROS和线粒体的活化能够在PD-1阻断机制诱导的T细胞免疫过程中发挥重要作用:在使用PD-1抑制剂的小鼠T-CTL中发现其线粒体、膜电位、超氧化物和细胞ROS的含量都明显增加。同时,当使用ROS产生剂或线粒体呼吸链解耦联剂后,T-CTL可进一步协同阻断PD-1/PD-L1,从而增强了对肿瘤生长的抑制作用^[29]。上述研究表明,调节免疫细胞(例如T-CTL)中的线粒体活性和线粒体ROS含量可能会对抑制PD-1/PD-L1产生重要影响。

3.2 ROS与调节性T细胞

肿瘤中Treg的细胞数量的增加归因于Treg的活化和扩增,Treg在糖酵解和脂肪酸合成与氧化相结合的基础上对其能量需求具有代谢优势,因此优先在恶性肿瘤微环境中增殖^[30]。研究^[31]表明在NSCLC细胞环境中通过释放大量的具有免疫抑制作用的ATP和腺苷能够增加ROS含量和氧化应激能力,从而提高Treg的免疫抑制能力。因此,降低肿瘤微环境中的ROS含量能够抑制Treg的生物活性。而KUNISADA等^[32]通过使用二甲双胍或特异性线粒体抗氧化剂使Treg保持更高的糖酵解状态,降低线粒体ROS的水平,使Treg免疫抑制活性降低,进而增强了T细胞的免疫功能。故在特定细胞类型内ROS的水平对该细胞的功能具有重要影响,高水平的ROS可增强CTL的抗肿瘤作用,而低水平的ROS能够改善Treg免疫抑制。研究^[33]证明,NSCLC患者肿瘤组织中,Treg占总T细胞比率显著高于癌旁组织,其参与肿瘤的发生发展,并促进肿瘤的侵袭与转移。这表明调节细胞中ROS含量水平可以达到抑制或治疗NSCLC细胞的作用。

3.3 ROS与其他肿瘤浸润淋巴细胞

以MDSC和TAM为代表的其他TIL同样受到ROS的调节。MDSC代表未成熟的骨髓细胞,是由骨髓干细胞、巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞的前体组成^[34]。是免疫微环境的主要组成部分,其通过多种机制抑制机体对肿瘤细胞产生免疫应答^[35]。其通过抑制T细胞来诱导免疫抑制。研究^[36]发现高密度MDSC与NSCLC患者的TNM分期、不良预后及复发转移呈正相关。MDSC生成的活性氧(ROS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)使T细胞永久地失去活性,破坏T细胞的应答能力^[37]。当抑制MDSC中ROS表

达时,能够解除免疫抑制,产生明显的抑瘤效应^[38]。TAM是存在于肿瘤微环境中的另一类免疫细胞,其被认为是炎症和肿瘤发生的关键介质。而ROS与巨噬细胞激活和信号传导有关。SAMMARCO等^[39]通过检测胃癌组织标本中TAM与微血管密度(microvessel density, MVD),发现MVD与TAM呈显著正相关。而WANG等^[40]的研究揭示利用二甲双胍改变TAM的状态,能够抑制肿瘤细胞的增殖。另一项研究^[41]表明,巨噬细胞源性ROS诱导Treg生成,这表明源自巨噬细胞的ROS可以具有免疫抑制作用。因此,在NSCLC微环境中ROS不仅充当氧化应激的诱导物,而且是免疫调节的媒介,对促进癌细胞的形成具有重要作用。

4 小 结

无论是NSCLC细胞还是非NSCLC细胞产生的ROS均可促进NSCLC的发生发展,高水平的ROS通过激活特定信号传导通路,促进NSCLC细胞增殖,同时可以通过抑制T细胞内的诱导信号转导通路和转录因子从而达到抑制T细胞免疫功能的作用。ROS能够阻断PD-1/PD-L1信号通路,可上调T细胞免疫功能,影像其他的TIL。近年来,NSCLC的免疫治疗研究不断取得重大突破,但仍有很多难点需要去解决。例如:是否能够以调控ROS的方式控制Treg从而达到治疗NSCLC的目的,是否能够以ROS为切入点解决PD-1/PD-L1抑制剂耐药的问题。总之,以ROS为切入点为研究更多治疗NSCLC的方法前景广阔。

[参考文献]

- [1] HEIST R S, MINO-KENUDSON M, SEQUIST L V, et al. FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(12): 1775-1780. DOI:10.1097/jto.0b013e31826aed28.
- [2] DI S Y, FAN C X, MA Z Q, et al. PERK/eIF-2 α /CHOP pathway dependent ROS generation mediates butein-induced non-small-cell lung cancer apoptosis and G2/M phase arrest[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(8): 1637-1653. DOI:10.7150/ijbs.33790.
- [3] MURPHY M P. How mitochondria produce reactive oxygen species [J]. *Biochem J*, 2009, 417(1): 1-13. DOI:10.1042/bj20081386.
- [4] TURRENS J F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species [J]. *J Physiol*, 2003, 552(2): 335-344. DOI: 10.1111/j. 1469-7793. 2003.00335.x.
- [5] MULLER F L, LIU Y H, VAN REMMEN H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 49064-49073. DOI:10.1074/jbc.m407715200.
- [6] FRIDOVICH I. Superoxide anion radical (O⁻²), superoxide dismutases, and related matters[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(30): 18515-18517. DOI:10.1074/jbc.272.30.18515.
- [7] HAN D, ANTUNES F, CANALI R, et al. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 5557-5563. DOI:10.1074/jbc.m210269200.
- [8] ORR A L, VARGAS L, TURK C N, et al. Suppressors of superoxide production from mitochondrial complex III [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(11): 834-836. DOI:10.1038/nchembio.1910.
- [9] LIAO Z, CHUA D, TAN N S. Reactive oxygen species: a volatile driver of field cancerization and metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 65. DOI:10.1186/s12943-019-0961-y.
- [10] DRUCK T, CHEUNG D G, PARK D, et al. Fhit-Fdxr interaction in the mitochondria: modulation of reactive oxygen species generation and apoptosis in cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 147. DOI:10.1038/s41419-019-1414-7.
- [11] WENG M S, CHANG J H, HUNG W Y, et al. The interplay of reactive oxygen species and the epidermal growth factor receptor in tumor progression and drug resistance[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 61. DOI:10.1186/s13046-018-0728-0.
- [12] RATTNER A, WILLIAMS J, NATHANS J. Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3807-3820. DOI:10.1172/jci126655.
- [13] FERRARA N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2009, 20(4): 158-163. DOI: 10.1684/ecn. 2009.0170.
- [14] SENA L A, LI S, JAIRAMAN A, et al. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling[J]. *Immunity*, 2013, 38(2): 225-236. DOI:10.1016/j.immuni.2012.10.020.
- [15] LI Y, LIANG R, ZHANG X, et al. Copper chaperone for superoxide dismutase promotes breast cancer cell proliferation and migration via ROS-mediated MAPK/ERK signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 356. DOI:10.3389/fphar.2019.00356.
- [16] KIM Y, KIM Y S, KIM M, et al. Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) mediates thioredoxin-dependent antioxidant mechanism in endometrial cancer cells treated with 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(9): 4795-4803. DOI: 10.21873/ anticancer.13664.
- [17] SOHONI S, GHOSH P, WANG T Y, et al. Elevated heme synthesis and uptake underpin intensified oxidative metabolism and tumorigenic functions in non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(10): 2511-2525. DOI: 10.1158/0008-5472. can-18- 2156.
- [18] TRIPATHI S K, RENGASAMY K R R, BISWAL B K. Plumbagin engenders apoptosis in lung cancer cells via caspase-9 activation and targeting mitochondrial-mediated ROS induction[J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43(2): 242-256. DOI:10.1007/s12272-020-01221-6.
- [19] DONG L F, KOVAROVA J, BAJZIKOVA M, et al. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells[J]. *Elife*, 2017, 6: e22187. DOI:10.7554/elife.22187.
- [20] MA L, FU Q Z, XU B, et al. Breast cancer-associated mitochondrial DNA haplogroup promotes neoplastic growth via ROS-mediated AKT activation[J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(9): 1786-1796. DOI: 10.1002/ijc.31207.
- [21] WOO D K, GREEN P D, SANTOS J H, et al. Mitochondrial genome instability and ROS enhance intestinal tumorigenesis in

- APCMin/+ mice[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(1): 24-31. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.10.003.
- [22] WEINBERG F, CHANDEL N S. Mitochondrial metabolism and cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1177: 66-73. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05039.x.
- [23] VASIEVICH E A, HUANG L. The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy[J]. *Mol Pharmaceutics*, 2011, 8(3): 635-641. DOI:10.1021/mp1004228.
- [24] KAMIŃSKI M M, SAUER S W, KAMIŃSKI M, et al. T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation[J]. *Cell Rep*, 2012, 2(5): 1300-1315. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.10.009.
- [25] OKAZAKI T, MAEDA A, NISHIMURA H, et al. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13866-13871. DOI: 10.1073/pnas.231486598.
- [26] MIYAJIMA M, ZHANG B, SUGIURA Y, et al. Metabolic shift induced by systemic activation of T cells in PD-1-deficient mice perturbs brain monoamines and emotional behavior[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(12): 1342-1352. DOI:10.1038/ni.3867.
- [27] BARCLAY J, CRESWELL J, LEÓN J. Cancer immunotherapy and the PD-1/PD-L1 checkpoint pathway[J]. *Arch Esp Urol*, 2018, 71(4): 393-399.
- [28] MUNHOZ R R, POSTOW M A. Clinical development of PD-1 in advanced melanoma[J]. *Cancer J*, 2018, 24(1): 7-14. DOI:10.1097/ppo.000000000000299.
- [29] CHAMOTO K, CHOWDHURY P S, KUMAR A, et al. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(5): E761-E770. DOI:10.1073/pnas.1620433114.
- [30] DENG G. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features [J]. *Am J Clin Exp Immunol*, 2018, 7(5): 81-87.
- [31] MAJ T, WANG W, CRESPO J, et al. Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(12): 1332-1341. DOI:10.1038/ni.3868.
- [32] KUNISADA Y, EIKAWA S, TOMONOBU N, et al. Attenuation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the tumor microenvironment by metformin, a type 2 diabetes drug[J]. *E Bio Medicine*, 2017, 25: 154-164. DOI:10.1016/j.ebiom.2017.10.009.
- [33] 王新乐, 袁飞, 吴显宁, 等. 非小细胞肺癌肿瘤微环境中免疫细胞特征及临床意义[J]. *临床肺科杂志*, 2020, 25(7): 1021-1026, 1036. DOI:10.3969/j.issn.1009-6663.2020.07.011.
- [34] GROTH C, HU X Y, WEBER R, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression[J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(1): 16-25. DOI: 10.1038/s41416-018-0333-1.
- [35] YIN Z N, LI C X, WANG J J, et al. Myeloid-derived suppressor cells: Roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(5): 933-946. DOI:10.1002/ijc.31744.
- [36] BARRERA L, MONTES-SERVÍN E, HERNANDEZ-MARTINEZ J M, et al. Levels of peripheral blood polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and selected cytokines are potentially prognostic of disease progression for patients with non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(9): 1393-1406. DOI:10.1007/s00262-018-2196-y.
- [37] PARK M J, LEE S H, KIM E K, et al. Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3753. DOI:10.1038/s41598-018-21856-2.
- [38] 徐伟立, 时保军, 李索林, 等. 靶向抑制髓系抑制性细胞调控肿瘤微环境对神经母细胞瘤荷瘤小鼠免疫疗效的影响[J]. *中华小儿外科杂志*, 2020, 41(9): 846-854. DOI: 10.3760/cma.j.cn421158-20200404-00232.
- [39] SAMMARCO G, GADALETA C D, ZUCALÀ V, et al. Tumor-associated macrophages and mast cells positive to tryptase are correlated with angiogenesis in surgically-treated gastric cancer patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1176. DOI: 10.3390/ijms19041176.
- [40] WANG J C, SUN X, MA Q, et al. Metformin's antitumor and anti-angiogenic activities are mediated by skewing macrophage polarization[J]. *J Cell Mol Med*, 2018,???. DOI: 10.1111/jcmm.13655. DOI:10.1111/jcmm.13655.
- [41] KRAAIJ M D, SAVAGE N D L, VAN DER KOOIJ S W, et al. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species[J]. *PNAS*, 2010, 107(41): 17686-17691. DOI:10.1073/pnas.1012016107.

[收稿日期] 2020-04-08

[修回日期] 2020-11-11

[本文编辑] 黄静怡