

杨润泽,胡耀华,秦靖,等. LRRC8A/VRAC 离子通道抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 91-99.
Yang RZ, Hu YH, Qin J, et al. Research progress on anti-tumor effects of LRRC8A volume-regulated anion channels [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 91-99.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.012

LRRC8A/VRAC 离子通道抗肿瘤作用的研究进展

杨润泽¹, 胡耀华², 秦靖³, 汪永锋^{1*}, 师长宏^{3*}

(1.甘肃中医药大学基础医学院,兰州 730000;2.延安大学医学院,延安 716000;3.空军军医大学实验动物中心,西安 710000)

【摘要】 体积调节阴离子通道(volume-regulated anion channels,VRAC)在脊椎动物细胞和各类型的肿瘤细胞中普遍表达。其由富含亮氨酸重复序列8A(leucine-rich repeat containing 8A,LRRC8A)及其4个同源家族成员(LRRC8B-E)组成,其中LRRC8A为必需亚基。已证实LRRC8A/VRAC通过各种信号途径参与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及多药耐药,并调控免疫细胞功能。该离子转运蛋白在杀伤肿瘤细胞及预防肿瘤中显示出良好的应用潜力,可作为肿瘤治疗的新靶点。本文综述了LRRC8A/VRAC参与肿瘤发生发展的最新研究,包括LRRC8A/VRAC的分子结构、功能及其在肿瘤中的调控作用,重点总结了LRRC8A/VRAC在肿瘤诊断和免疫治疗中的应用,以期探索LRRC8A/VRAC成为肿瘤治疗的新靶点提供借鉴。

【关键词】 体积调节阴离子通道;富含亮氨酸重复序列8A;增殖;迁移;侵袭;多药耐药;肿瘤免疫
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)11-0091-09

Research progress on anti-tumor effects of LRRC8A volume-regulated anion channels

YANG Runze¹, HU Yaohua², QIN Jing³, WANG Yongfeng^{1*}, SHI Changhong^{3*}

(1. Basic Medical College of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China.

2. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000. 3. Experimental Animal Center of Air Force Military Medical University, Xi'an 710000)

【Abstract】 Volume-regulated anion channels (VRACs) are present in vertebrate cells and a variety of tumor cells. VRACs include leucine-rich-repeat-containing 8A (LRRC8A) and its four homologous family members (LRRC8B-E), of which LRRC8A is an essential subunit. It has been confirmed that the VRAC LRRC8A is involved in the proliferation, migration, invasion, and multi-drug resistance of tumor cells through various signaling pathways. This ion transporter has shown good potential for use in strategies to kill tumor cells and prevent the development of tumors and can be used as a new target for tumor therapy. Therefore, this paper reviews the latest research on the involvement of LRRC8A in tumorigenesis and development. The molecular structure, function, and regulation of LRRC8A in tumor and immune cells, with emphasis on targeting LRRC8A in tumor diagnosis and immunotherapy, are discussed, providing a reference for studies exploring LRRC8A as a new tumor therapy target.

【Keywords】 volume-regulated anion channels; leucine-rich repeat containing 8A; proliferation; migration; invasion; multidrug resistance; tumor immunity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】国家自然科学基金(82160871);甘肃省自然科学基金资助项目(22JR5RA591);甘肃省中医药管理局项目(GZKZ-2021-10)。

【作者简介】杨润泽(1997—),男,硕士研究生,研究方向:中西医肿瘤防治。E-mail:1377623986@qq.com

【通信作者】汪永锋(1967—),男,教授,硕士生导师,研究方向:中西医结合治疗胰腺病研究。E-mail:wyf@gszy.edu.cn

师长宏(1973—),男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病的动物模型。E-mail:changhong@fmmu.edu.cn *共同通信作者

肿瘤是全球公共卫生的主要威胁之一,其发病率持续增加,每年新增病例超过 1000 万例^[1]。到目前为止,包括化疗、放射治疗和手术等方式的综合治疗方案有了一定的发展,但其疗效往往受到肿瘤的扩散和侵袭的限制,肿瘤患者生存预后较差,当前治疗方案的效果远不能让人满意^[2]。因此,肿瘤的治疗仍然是一个巨大的医学挑战,需要新的潜在靶点。离子通道在人体内参与多项生理病理过程,受到了科研人员广泛关注。在肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及多药耐药中,已被证实存在许多离子通道的异常表达,如电压门控通道和瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)通道^[3]。因此有研究者提出离子通道可能成为肿瘤诊断、治疗和预后的潜在靶点。

LRRC8(leucine-rich repeat containing 8)家族被确定为体积调控性阴离子通道(volume-regulated anion channels, VRAC)的重要组成部分,由 LRRC8A-E 5 个亚单位组成,其中 LRRC8A 为必需亚基^[4]。研究发现,在许多肿瘤中 LRRC8A 均高表达,并促进肿瘤细胞的增殖和迁移。而 LRRC8A 的敲除则显著抑制了肿瘤细胞的增殖和迁移,并诱导了肿瘤细胞凋亡^[5]。LRRC8A/VRAC 离子通道抗肿瘤作用的分子机制见图 1。本文从 LRRC8A/VRAC 离子通道对肿瘤细胞的增殖、迁移侵袭和耐药的影响,及对免疫细胞的调控作用展开综述,并对 LRRC8A/VRAC 离子通道调节肿瘤进展的潜在机制及在肿瘤免疫治疗中的应用总结,以期 LRRC8A 作为潜在靶点治疗肿瘤提供参考和借鉴。

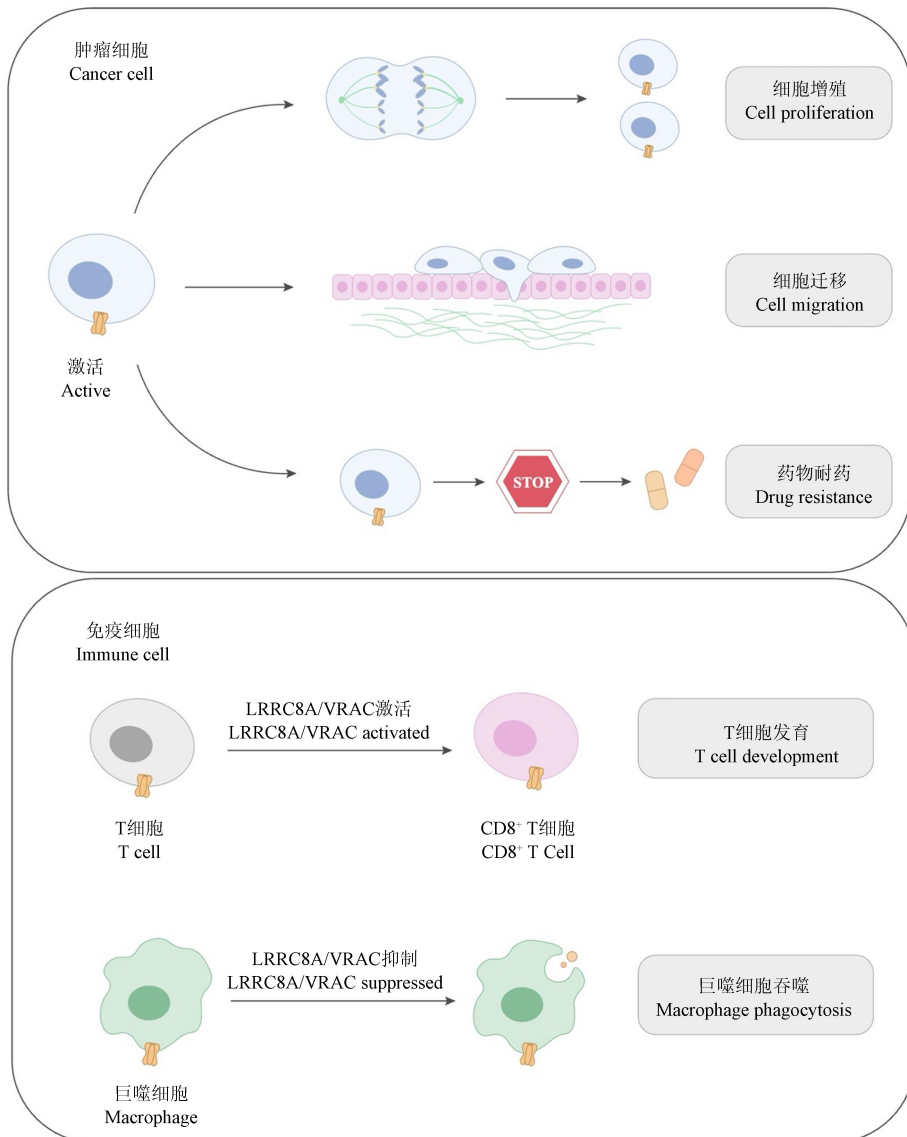


图 1 LRRC8A/VRAC 离子通道抗肿瘤作用的分子机制

Figure 1 Molecular mechanism of anti-tumor effect of LRRC8A/VRAC ion channel

1 LRRC8A/VRAC 离子通道的分子表征

1.1 阴离子通道 VRAC 通过调节细胞体积维持细胞稳态

细胞体积的动态稳定是细胞正常功能发挥的前提条件。参与细胞肿胀或细胞收缩激活的各种膜通道和转运体与这一过程有关。其中,VRAC 是一种特殊类型的阴离子通道,其在包括肿瘤细胞在内的各种类型的细胞中普遍表达^[6]。1988 年 Hazama 等^[7]首次在人淋巴细胞中对 VRAC 进行了功能性的描述,VRAC 活化是由细胞肿胀或其他介导 Cl⁻ 外排的刺激引起的离子强度降低所致。其主要特征是激发典型外向整流电流以及广泛阴离子渗透。因此,VRAC 又被称为体积敏感的外向整流阴离子通道 (volume-sensitive outwardly rectifying anion channel, VSOR) 或体积敏感有机渗透压阴离子通道 (volume-sensitive organic osmolyte anion channel, VSOAC)^[8]。VRAC 可通过介导离子转运导致细胞内液外流,从而使细胞体积恢复正常,这一过程被称为调节性体积减少 (regulatory volume decrease, RVD)^[9]。此外,VRAC 已被证明可以调节细胞容积动态平衡、细胞电生理、细胞自身内环境稳态,还与细胞的增殖与分化、迁移与凋亡等一系列生理过程密切相关^[10]。然而,尽管在过去的几十年里进行了广泛的研究,但 VRAC 的分子结构直到近年才被揭示,这主要是因为其复杂的电生理特性。

1.2 LRRC8A 是 VRAC 阴离子通道的核心成分

随着对 VRAC 研究的不断深入,其电生理特性被揭示,2014 年两个研究小组通过膜片钳电生理技术和细胞层面的荧光检测技术,发现富含亮氨酸的蛋白 LRRC8A,也称为 SWELL1,是 VRAC 的核心成分^[11]。LRRC8A 是 LRRC8 蛋白家族的一员,LRRC8A 和其他四个同源家族成员 (LRRC8B-E) 组装成 VRAC 复合物^[12]。随后的研究表明 LRRC8A 与其同源物的不同组合生成不同的通道特性,包括通道开放概率、门控动力学和底物特异性等。敲除 LRRC8A 将显著抑制细胞中的内源性 VRAC,使 VRAC 功能严重受损甚至完全丧失,揭示 LRRC8A 在 VRAC 中的重要作用^[13]。

1.3 LRRC8A/VRAC 参与细胞体积调节并影响肿瘤细胞

LRRC8A/VRAC 的经典作用为参与细胞体积调

节。细胞在面对细胞外液渗透压不断变动引起的刺激或损伤时,调节细胞体积和保持稳定状态的能力对于维持细胞稳态和许多生理功能至关重要。在此过程中,LRRC8A/VRAC 可调节离子和水跨膜运输,以保护细胞免受过度的细胞肿胀或收缩。这些结果有力地表明,LRRC8A/VRAC 在调节细胞体积和维持相对恒定的细胞体积方面中发挥重要作用^[14]。除此之外,最近的研究证实,LRRC8A/VRAC 可通过不同信号通路影响肿瘤细胞的增殖、侵袭迁移和多药耐药,并且可能成为肿瘤诊断、预后和治疗的潜在靶点^[15]。

2 LRRC8A/VRAC 在肿瘤发生、发展中的作用

已证实 LRRC8A 作为 VRAC 的必需蛋白可以通过各种信号途径参与肿瘤细胞的增殖、侵袭迁移及多药耐药。表 1 总结了 LRRC8A/VRAC 在肿瘤发生、发展中的多种作用。

2.1 LRRC8A/VRAC 参与调节肿瘤细胞的增殖

肿瘤细胞的肿胀在细胞增殖早期扮演着重要的角色。研究发现在肿瘤细胞中 LRRC8A/VRAC 的表达显著上调,并与不良预后有关^[26]。已有研究表明,LRRC8A/VRAC 在调节细胞周期转换发挥着重要作用。Lu 等^[22]通过流式分析对肿瘤细胞进行了检测,结果显示,LRRC8A/VRAC 的高表达使细胞周期中的 S 峰细胞数增加,G₁/G₀ 期细胞数减少。LRRC8A/VRAC 基因表达增强后,细胞周期调控蛋白 Cyclin D1 和 CDK2 在 RNA 和蛋白质水平的表达均显著增加,而 Cyclin E 和 CDK4 的表达不随 LRRC8A/VRAC 的表达而改变。这些结果表明 LRRC8A/VRAC 促进了肝癌细胞的 G₁/S 转变。Konishi 等^[17]通过基因敲除实验发现,细胞周期 G₁/S 检查点调节通路是 LRRC8A/VRAC 基因被敲除后影响最显著的信号通路。进一步分析表明,在肿瘤发生中发挥重要作用的 CDK 抑制因子 p21 和 p27 途径相关基因在 LRRC8A/VRAC 基因敲除后强烈上调,从而抑制 CDK-cyclin 复合物,阻碍细胞周期转换。此外,先前的一项研究发现,PI3K/AKT 是 LRRC8A/VRAC 调控肿瘤细胞增殖和细胞周期转换的下游信号。LRRC8A/VRAC 的缺失降低了肿瘤细胞中 PI3K/AKT 的磷酸化水平,抑制了肿瘤细胞增殖^[27]。综上可知 LRRC8A/VRAC 在调节肿瘤细胞增殖中发挥重要作用。

表 1 LRRC8A/VRAC 在肿瘤进展中的作用
Table 1 Role of LRRC8A/VRAC in tumor progression

肿瘤类型 Tumor type	作用 Effect	物种 Species
胶质母细胞瘤 ^[16] Glioblastoma	增殖、迁移、侵袭 Proliferation, migration and invasion	人 Human
鼻咽癌 ^[17] Nasopharyngeal carcinoma	细胞周期进展、迁移、凋亡 Cell cycle progression, migration and apoptosis	人 Human
卵巢癌 ^[18] Ovarian cancer	增殖、细胞周期进展、耐药性 Proliferation, cell cycle progression and drug resistance	人 Human
宫颈癌 ^[19] Cervical cancer	细胞周期进展 Cell cycle progression	人 Human
小细胞肺癌 ^[20] Small cell lung cancer	细胞周期进展 Cell cycle progression	人 Human
神经胶质瘤 ^[21] Glioma	增殖、耐药性 Proliferation and drug resistance	大鼠 Rats
肝细胞癌 ^[22] Hepatocellular carcinoma	增殖、迁移、侵袭 Proliferation, migration and invasion	人、小鼠 Human, mice
骨肉瘤 ^[23] Osteosarcoma	耐药性 Drug resistance	人 Human
肺泡癌 ^[24] Alveolar carcinoma	耐药性 Drug resistance	人 Human
结直肠癌 ^[25] Colorectal cancer	增殖、迁移 Proliferation and migration	人、小鼠 Human, mice

同时, LRRC8A/VRAC 也可影响肿瘤细胞线粒体功能。研究表明, LRRC8A/VRAC 高表达的肿瘤细胞 ROS 产生减少^[28]。ROS 的产生与线粒体功能密切相关。同时, 过度表达 LRRC8A/VRAC 的细胞有更高的 ATP 水平。因此, 这些结果表明 LRRC8A/VRAC 通过抑制线粒体功能障碍来保护肿瘤细胞免受凋亡的影响, 促进肿瘤细胞增殖。

广泛的研究已经证实, 细胞内稳态在肿瘤进展中起着至关重要的作用^[29]。LRRC8A 作为一种参与细胞内稳态的容量调节的阴离子通道蛋白, 其可通过改变细胞大小和细胞变形性以调节肿瘤细胞的增殖。Chen 等^[30]检测了 LRRC8A/VRAC 在低渗条件下是否参与维持肿瘤细胞的细胞内环境平衡。研究表明 LRRC8A/VRAC 基因敲除加速了低渗液处理下肿瘤细胞的肿胀和破裂。用 CCK-8 比色法测定低渗液处理后不同时间点的细胞存活率。结果表明, 与对照组相比, LRRC8A/VRAC 过表达促进了低渗液处理后肿瘤细胞的存活, 而 LRRC8A/VRAC 的缺失显著降低了肿瘤细胞的存活率, 导致肿瘤细胞的凋亡增加, 表明 LRRC8A/VRAC 过表达可能通过抑制凋亡而促进肿瘤细胞的存活与增殖。

此外, LRRC8A/VRAC 基因下调可抑制裸鼠体内肿瘤细胞的成瘤效果。Lu 等^[22]建立了人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型。结果发现 LRRC8A 敲除组的

小鼠肿瘤体积明显小于对照组, 且敲除组 Ki67 和 CD31 的表达明显下调。说明敲除 LRRC8A/VRAC 有效抑制肿瘤生长, 提示 LRRC8A/VRAC 下调可抑制肿瘤细胞的增殖。Zhang 等^[26]将 LRRC8A-shRNA (LRRC8A 敲除组) 慢病毒感染的肿瘤细胞及对照慢病毒分别皮下注射于裸鼠腋窝, 2 周后, 腋窝产生肿瘤结节。解剖后发现慢病毒对照组的肿瘤体积与重量均大于 LRRC8A 敲除组, 表明 LRRC8A/VRAC 蛋白的下调使肿瘤生长变慢, 提示 LRRC8A/VRAC 下调可能抑制裸鼠体内肿瘤细胞增殖。

外泌体是肿瘤微环境中细胞间通讯的重要媒介, 已有研究表明, 外泌体通过调节肿瘤微环境的成分并影响肿瘤细胞的增殖和迁移率, 可加速肿瘤的进展。Zhang 等^[31]对 Vesiclepedia 数据库中的外泌体蛋白质组图谱进行了筛选, 发现 LRRC8A 蛋白存在于不同肿瘤细胞的胞外小泡中, 并且 LRRC8A mRNA 包装在肿瘤细胞的胞外体中。尽管过表达 LRRC8A 蛋白的细胞生长较慢, 但这些细胞增加了外泌体的分泌数量。这些证据支持过表达 LRRC8A/VRAC 可以促进肿瘤细胞外泌体的生物合成和释放。重要的是, LRRC8A/VRAC 是维持外泌体体积稳定的调节器之一, 以响应细胞外渗透压的变化。胞膜和胞外 LRRC8A 蛋白与肿瘤细胞存活和细胞间通讯密切相关, 因此 LRRC8A 可作为一种

有前途的预后生物标志物和潜在的治疗靶点。

2.2 LRRC8A/VRAC 参与调节肿瘤细胞的侵袭和迁移

研究发现 LRRC8A/VRAC 可调节细胞骨架重排,是细胞迁移中不可或缺的组成部分,而调节细胞骨架中肌动蛋白的快速聚合和解聚被认为是调节细胞迁移的主要分子机制^[32]。

Chen 等^[30]为了探索 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞中的作用,在 HeLa 细胞中过表达 LRRC8A/VRAC。Transwell 分析表明,LRRC8A/VRAC 过表达显著增加了肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。为了进一步证实 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞中的促转移作用,其通过慢病毒感染构建敲低 LRRC8A 的 HeLa 细胞。正如预期的那样,LRRC8A/VRAC 表达的减少抑制了 HeLa 细胞的迁移和侵袭。Xu 等^[14]发现敲低 LRRC8A 对肿瘤细胞迁移和侵袭具有显著的抑制作用。Lu 等^[22]的实验也证实,上调 LRRC8A/VRAC 显著增强了细胞的迁移距离,且 LRRC8A/VRAC 过表达时迁移细胞的数量明显更高。LRRC8A/VRAC 在调控肿瘤细胞迁移中发挥重要作用,敲低 LRRC8A 的表达可使肿瘤细胞中整合素表达降低,从而调节生长因子信号传导,如成纤维细胞生长因子等,最终影响肿瘤细胞增殖、迁移和血管生成^[33]。为了确定 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞体内模型中的作用,研究者通过尾静脉注射建立了裸鼠肿瘤转移模型^[34]。通过裸鼠的肝及肺部的大体观察和病理检查来评估 LRRC8A/VRAC 在肿瘤转移中的作用。结果表明,注射 shRNA LRRC8A 细胞的小鼠转移瘤显著减少。相关机制研究发现在 LRRC8A/VRAC 过表达的情况下,Jun 氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)的表达增加,而抑制 LRRC8A/VRAC 可显著降低 JNK 水平。Transwell 结果表明,LRRC8A/VRAC 对细胞迁移的刺激作用被 JNK 抑制剂 SP600125 显著抑制^[22]。上述结果提示 LRRC8A/VRAC 可能通过 JNK 途径促进肿瘤细胞的迁移。

此外,细胞黏附在肿瘤转移中有重要地位,细胞黏附能力的丧失被认为是一个显著的致癌特征^[35]。已有实验表明上调 LRRC8A/VRAC 表达可抑制肿瘤细胞黏附并促进其迁移。进一步实验发现,LRRC8A/VRAC 敲低可导致肿瘤细胞系中上皮-间质转移(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物(如基质金属蛋白酶)表达降低^[36]。综上所

述,这些结果表明 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞的迁移与侵袭中起着重要作用。

2.3 LRRC8A/VRAC 参与肿瘤细胞的多药耐药

化疗依然是目前肿瘤治疗的主要手段之一,但是化疗出现的多药耐药性严重阻碍了肿瘤治疗。铂类药物被广泛应用于肿瘤治疗^[37],LRRC8A/VRAC 可抑制铂类药物摄取。研究发现,肿瘤细胞内铂(platinum, Pt)的积累与 LRRC8A/VRAC 蛋白表达和通道活性有关,即当 LRRC8A/VRAC 被质膜去极化或低渗细胞肿胀激活时,细胞 Pt 含量降低,而当通道活性降低或 LRRC8A/VRAC 表达受到抑制时,细胞 Pt 含量较高^[38]。在人类卵巢癌细胞中敲低 LRRC8A/VRAC 可使顺铂摄取增加,提高了药物的敏感性。已有许多研究表明,细胞凋亡的一个显著特征是细胞体积的减小,这一过程被称为凋亡体积减少(apoptotic volume decrease AVD)。Sørensen 等^[24]证实,LRRC8A/VRAC 抑制剂可促进顺铂诱导的 AVD 以及 caspase-3 激活,降低肿瘤细胞耐药性,从而提高其对顺铂的敏感度。亦有研究表明,在药物敏感的肿瘤细胞中,顺铂可诱导 LRRC8A/VRAC 的表达下调且肿瘤细胞的凋亡增加,而在存在顺铂耐药性的肿瘤细胞中 LRRC8A/VRAC 表达显著上调。

Zhang 等^[39]在其他铂类药物抗肿瘤应用中也发现了相似的现象。奥沙利铂是第三代铂类药物,用于肿瘤的一线化疗。然而,肿瘤患者常对奥沙利铂出现耐药性,严重影响了治疗效果,导致化疗失败。其建立了对奥沙利铂具有稳定耐药性的 R-Oxa 细胞,并观察到 LRRC8A/VRAC 在 R-Oxa 细胞中的表达显著高于在天然肿瘤细胞中的表达,提示 LRRC8A/VRAC 上调可能是肿瘤细胞获得奥沙利铂耐药的一个重要因素。该研究证实 LRRC8A/VRAC 可促进奥沙利铂耐药的发生,但 LRRC8A/VRAC 协助肿瘤细胞获得耐药的机制尚不清楚,仍需进一步研究。

此外, Rubino 等^[40]研究发现,LRRC8A/VRAC 下调可增加胶质母细胞瘤对替莫唑胺(temozolomide, TMZ)的敏感性。其中 LRRC8A/VRAC 下调促进 TMZ 诱导的线粒体依赖性凋亡,包括 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)表达增加, Bcl-2 相关 x 蛋白(Bcl-2 associated x, Bax)表达减少,细胞色素 c 释放, caspase-9 和 caspase-3 激活。LRRC8A/VRAC 上调则抑制了胶

质瘤细胞线粒体依赖性凋亡通路的激活。同时将 LRRC8A siRNA 与化疗药物相结合时,治疗效果远优于单药,且联合治疗促进了肿瘤细胞的 G2/M 阻滞,并增加凋亡细胞数量。因此,下调 LRRC8A/VRAC 降低了肿瘤细胞的增殖,并增加了肿瘤细胞对临床 TMZ 的敏感性。

综上所述,在抗肿瘤药物治疗中 LRRC8A/VRAC 可能是解决药物耐药,增强疗效的潜在靶点,同时 LRRC8A/VRAC 的靶向抑制与化疗药物的联合使用可相互促进。因此,进一步开展针对 LRRC8A/VRAC 特异性抑制剂的研究是解决药物在肿瘤治疗中出现耐药问题的关键,对于开发临床抗癌疗法和优化应用具有重要意义。

3 LRRC8A/VRAC 作为肿瘤潜在治疗靶点的应用进展

越来越多的研究证实,LRRC8A/VRAC 在肿瘤微环境中发挥重要的调控作用。其可通过直接或间接作用于免疫细胞,引发抗肿瘤免疫及促进肿瘤基质纤维化,在肿瘤治疗中发挥重要作用。此外 LRRC8A/VRAC 还可作为一种肿瘤预后生物标志物,以判断肿瘤的预后,反映肿瘤的治疗情况,有望提高肿瘤的诊断效率和患者的生存预后^[41]。

3.1 LRRC8A/VRAC 作用于免疫细胞

已有研究表明,LRRC8A/VRAC 在免疫调节中发挥作用^[42-43],研究者使用肿瘤免疫评估资源(tumor immune estimation resource, TIMER)研究其表达是否与免疫浸润水平相关。结果显示,LRRC8A/VRAC 的表达与 CD8⁺T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞显著相关。Kumar 等^[44]发现 LRRC8A/VRAC 在 T 淋巴细胞的发育和功能中发挥着重要作用。LRRC8A/VRAC 全身性敲除小鼠死亡率增加,生长迟缓并且多种组织发育异常。该品系小鼠在胸腺发育早期就表现出严重的细胞内源性障碍,胸腺细胞增殖减少和凋亡增加,外周 T 细胞功能受损。这是由于胸腺上皮细胞表达一种 LRRC8A/VRAC 配体,该配体对胸腺细胞的分化和存活至关重要。这些发现揭示了 LRRC8A/VRAC 在 T 细胞发育、存活和功能中的重要作用。通过使用肿瘤免疫分析数据库(tumor-immune system interactions database management, TISDB)对肿瘤样本中 LRRC8A/VRAC 和 CD8⁺T 细胞进行的相关性分析也表明两者显著相关。这些发现证实了

LRRC8A/VRAC 通过与免疫浸润,特别是肿瘤中的 CD8⁺T 细胞相互作用,影响患者的临床结果^[45]。以上结果证明 LRRC8A/VRAC 对 T 细胞发育至关重要,可能在肿瘤免疫治疗中发挥着不可或缺的作用。

此外,LRRC8A/VRAC 的抑制可促进巨噬细胞的吞噬作用,而肿瘤相关巨噬细胞是肿瘤微环境的重要组成部分,在血管生成、细胞外基质重塑、肿瘤细胞增殖、转移中发挥作用。适当激活巨噬细胞可以介导肿瘤细胞的吞噬和细胞毒性肿瘤杀伤,并与先天性和适应性免疫系统的组成部分进行有效的双向相互作用以抑制肿瘤进展。研究表明,抑制巨噬细胞中的 LRRC8A/VRAC 可以显著激活巨噬细胞,促进其吞噬作用。从机制上讲,消除或阻断 LRRC8A/VRAC 通道可能促进腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)激活和核因子红细胞 2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, Nrf2)核转位,上调 CD36 表达,增强巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用^[46]。这些发现不仅揭示了 LRRC8A/VRAC 在巨噬细胞吞噬功能中的作用,还为肿瘤治疗和与巨噬细胞吞噬功能障碍相关的疾病提供了潜在的治疗靶点。

3.2 LRRC8A/VRAC 引发抗肿瘤免疫

环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)负责感知肿瘤细胞的胞浆脱氧核糖核酸,催化形成 20~30 个环鸟苷-磷酸腺苷-磷酸(cGMP-AMP, cGAMP),cGAMP 通过 STING 途径产生干扰素。肿瘤来源的 cGAMP 可以转运到宿主细胞中,并引起干扰素反应,以增强自然杀伤细胞的激活^[47]。而与肿瘤密切相关的炎症因子可激活 LRRC8A/VRAC,其作为 cGAMP 外流和内流的通道,将 cGAMP 转移至旁细胞中增强 STING 介导的干扰素反应,因此,可以推测 LRRC8A/VRAC 介导的 cGAMP 外流和/或内流在宿主对肿瘤防御中发挥关键作用^[48]。研究表明,LRRC8A/VRAC 介导的 cGAMP 传输促进 cGAS-cGAMP-STING 通路激活。虽然缝隙连接只允许 cGAMP 在物理连接的细胞之间传输,但 LRRC8A/VRAC 可以促进 cGAMP 转移至远处细胞。这一过程有助于抗肿瘤免疫,阻止恶性肿瘤的发生。这一结果表明 LRRC8A/VRAC 高表达的患者可能受益于 cGAS-cGAMP-STING 途径抗肿瘤治疗^[43]。综上所述,LRRC8A/VRAC 在疫苗接种中的作用值得进一步研究,并应探索将

LRRC8A/VRAC 激动剂用作肿瘤疫苗中 cGAMP 的辅助佐剂的可能性。

LRRC8A/VRAC 在肿瘤样本中的共表达分析显示,肾上腺素 A 受体 (ephrin-A receptor 2, EPHA2) 在大多数肿瘤数据库中与 LRRC8A/VRAC 呈正相关^[49]。据报道, EPHA2 参与肿瘤的多种免疫调节途径,是肿瘤产生免疫治疗耐药性的内在驱动因子。 EPHA2 缺失可逆转肿瘤 T 细胞抵抗性并增强肿瘤免疫治疗敏感性。当 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞中被敲低时, EPHA2 的 mRNA 表达水平显著降低。因此,通过调节 LRRC8A/VRAC 以降低肿瘤细胞中 EPHA2 的表达可能是一种潜在的肿瘤免疫治疗途径。

LRRC8A/VRAC 还在肿瘤相关纤维化中发挥调节作用。已有研究表明,肿瘤微环境中的纤维化基质会产生细胞外基质蛋白 (extra cellular matrix, ECM),促进肿瘤细胞逃避免疫治疗的攻击,从而使一些实体瘤,例如胰腺导管腺癌,对免疫疗法反应不佳^[50]。因此抑制 LRRC8A/VRAC 可能是治疗肿瘤的一种有前途的策略。研究显示 LRRC8A/VRAC 在肿瘤纤维化组织中的表达显著升高。其通过激活非受体型蛋白酪氨酸激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) - 信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription3, STAT3) 信号通路参与转化生长因子- β 诱导的肿瘤基质纤维化。此外, LRRC8A/VRAC 通过其 C 末端富含亮氨酸的重复结构域激活 JAK2-STAT3 途径,直接与生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) 相互作用。因此, LRRC8A/VRAC、JAK2 和 Grb2 组成了一个蛋白质复合物,促进 JAK2-STAT3 通路的激活,以促进肿瘤基质纤维化,为 LRRC8A/VRAC 在调节肿瘤相关纤维化中作用提供了新的见解^[51]。

3.3 LRRC8A/VRAC 是一种有前景的肿瘤预后生物标志物

ONCOMINE 数据库检索和基因表达谱交互分析 (gene expression profiling interactive analysis, GEPIA),均发现肿瘤样本中 LRRC8A/VRAC 的表达显著高于正常样本^[30]。进一步分析显示, LRRC8A/VRAC 的表达与肿瘤患者的病理分期之间存在显著相关性。相较于低表达组,高 LRRC8A/VRAC 的 5 年生存率明显低于低 LRRC8A/VRAC 组。进一步研究 9 个变量 (性别、年龄、肿瘤长度、

组织学分化、淋巴浸润、静脉浸润、pT 类别、pN 类别和 LRRC8A/VRAC 表达)对接受肿瘤根治性切除的患者预后的影响发现,预后与静脉侵犯、pN 类别和 LRRC8A/VRAC 表达显著相关。上述 3 个因素的多变量分析证实静脉浸润和 LRRC8A/VRAC 表达是独立的预后指标。因此, LRRC8A/VRAC 的高表达可能是肿瘤的不良预后因素。这些结果表明, LRRC8A/VRAC 是一种有前景的肿瘤预后生物标志物。

同时体外细胞实验也获得了相似的结论^[14]。通过肿瘤患者病理切片的免疫组织化学分析发现, LRRC8A/VRAC 的高表达与较高肿瘤级别有关。此外,根据 GEPIA 和 Kaplan-Meier 绘图仪获得的结果,肿瘤患者中 LRRC8A/VRAC 的高表达与较差的临床结果显著相关。尽管如此, LRRC8A/VRAC 在肿瘤中的生物学功能和预后价值尚并未得到全面的表征,其在肿瘤治疗中的关键作用和分子机制仍需要进一步阐明^[52]。

4 总结与展望

LRRC8A 作为 VRAC 的必需组成单位,与肿瘤的发生发展表现出极高的相关性,尤其是在肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及多药耐药中通过介导上下游信号通路发挥重要作用,同时,由于其在肿瘤免疫中的调控作用,从而使 LRRC8A/VRAC 可能成为肿瘤的潜在治疗靶点。但值得注意的是,现在对 LRRC8A/VRAC 的研究主要是以 VRAC 为主,但有关 LRRC8A 自身的研究相对较少,后续对 LRRC8A 自身的研究可能为肿瘤治疗提供新的思路。此外免疫组化显示 LRRC8A/VRAC 不仅位于细胞膜上,而且位于细胞质中。先前的研究表明,一些膜蛋白细胞内定位的变化会影响肿瘤的进展。这种定位变化的详细机制尚不清楚,仍需进一步研究来阐明 LRRC8A/VRAC 在细胞质中是否具有不同的作用。

参考文献:

- [1] DEO S V S, SHARMA J, KUMAR S. GLOBOCAN 2020 report on global cancer burden; challenges and opportunities for surgical oncologists [J]. *Ann Surg Oncol*, 2022, 29(11): 6497-6500.
- [2] PAPIEŻ M A, KRZYŚCIAK W. Biological therapies in the treatment of cancer-update and new directions [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11694.
- [3] ANDERSON K J, CORMIER R T, SCOTT P M. Role of ion channels in gastrointestinal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(38): 5732-5772.

- [4] LÜCK J C, PUCHKOV D, ULLRICH F, et al. LRRC8/VRAC anion channels are required for late stages of spermatid development in mice [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(30): 11796–11808.
- [5] KURASHIMA K, SHIOZAKI A, KUDOU M, et al. LRRC8A influences the growth of gastric cancer cells via the p53 signaling pathway [J]. *Gastric Cancer*, 2021, 24(5): 1063–1075.
- [6] OSEI-OWUSU J, YANG J, VITERY M D C, et al. Molecular biology and physiology of volume-regulated anion channel (VRAC) [J]. *Curr Top Membr*, 2018, 81: 177–203.
- [7] HAZAMA A, OKADA Y. Ca^{2+} sensitivity of volume-regulatory K^+ and Cl^- channels in cultured human epithelial cells [J]. *J Physiol*, 1988, 402: 687–702.
- [8] KITTL M, WINKLMAYR M, PREISHUBER-PFLÜGL J, et al. Low pH attenuates apoptosis by suppressing the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) chloride current in chondrocytes [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 804105.
- [9] FORMAGGIO F, SARACINO E, MOLA M G, et al. LRRC8A is essential for swelling-activated chloride current and for regulatory volume decrease in astrocytes [J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 101–113.
- [10] FIGUEROA E E, DENTON J S. A SWELL time to develop the molecular pharmacology of the volume-regulated anion channel (VRAC) [J]. *Channels*, 2022, 16(1): 27–36.
- [11] VOSS F K, ULLRICH F, MÜNCH J, et al. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC [J]. *Science*, 2014, 344(6184): 634–638.
- [12] FRIARD J, LAURAIN A, RUBERA I, et al. LRRC8/VRAC channels and the redox balance: a complex relationship [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2021, 55(S1): 106–118.
- [13] GHOULI M R, FIACCO T A, BINDER D K. Structure-function relationships of the LRRC8 subunits and subdomains of the volume-regulated anion channel (VRAC) [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 962714.
- [14] XU R, WANG X, SHI C. Volume-regulated anion channel as a novel cancer therapeutic target [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 159: 570–576.
- [15] YOSHIMOTO S, MATSUDA M, KATO K, et al. Volume-regulated chloride channel regulates cell proliferation and is involved in the possible interaction between TMEM16A and LRRC8A in human metastatic oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 895: 173881.
- [16] WONG R, CHEN W, ZHONG X, et al. Swelling-induced chloride current in glioblastoma proliferation, migration, and invasion [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 363–370.
- [17] KONISHI T, SHIOZAKI A, KOSUGA T, et al. LRRC8A expression influences growth of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(10): 1973–1985.
- [18] PLANELLS-CASES R, LUTTER D, GUYADER C, et al. Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs [J]. *EMBO J*, 2015, 34(24): 2993–3008.
- [19] SHEN M R, DROOGMANS G, EGGERMONT J, et al. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells [J]. *J Physiol*, 2000, 529(Pt 2): 385–394.
- [20] LIU T, STAUBER T. The volume-regulated anion channel LRRC8/VRAC is dispensable for cell proliferation and migration [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2663.
- [21] YANG C, HE L, CHEN G, et al. LRRC8A potentiates temozolomide sensitivity in glioma cells via activating mitochondria-dependent apoptotic pathway [J]. *Hum Cell*, 2019, 32(1): 41–50.
- [22] LU P, DING Q, LI X, et al. SWELL1 promotes cell growth and metastasis of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *EBioMedicine*, 2019, 48: 100–116.
- [23] CAI S, ZHANG T, ZHANG D, et al. Volume-sensitive chloride channels are involved in cisplatin treatment of osteosarcoma [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2465–2470.
- [24] SØRENSEN B H, NIELSEN D, THORSTEINSDOTTIR U A, et al. Downregulation of LRRC8A protects human ovarian and alveolar carcinoma cells against Cisplatin-induced expression of p53, MDM2, p21Waf1/Cip1, and Caspase-9/-3 activation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(11): C857–C873.
- [25] FUJII T, SHIMIZU T, YAMAMOTO S, et al. Crosstalk between Na^+ , K^+ -ATPase and a volume-regulated anion channel in membrane microdomains of human cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(11): 3792–3804.
- [26] ZHANG H, DENG Z, ZHANG D, et al. High expression of leucine-rich repeat-containing8A is indicative of a worse outcome of colon cancer patients by enhancing cancer cell growth and metastasis [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(3): 1275–1286.
- [27] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120–128.
- [28] CHOI H, ETTINGER N, ROHRBOUGH J, et al. LRRC8A channels support TNF α -induced superoxide production by Nox1 which is required for receptor endocytosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 101: 413–423.
- [29] 刘张驰, 王娟, 陈旭. 人源肿瘤异种移植小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(3): 374–381.
- LIU Z C, WANG J, CHEN X. Establishment and application of human tumor xenograft models in cancer research [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(3): 374–381.
- [30] CHEN Y, ZUO X, WEI Q, et al. Upregulation of LRRC8A by m^5C modification-mediated mRNA stability suppresses apoptosis and facilitates tumorigenesis in cervical cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(2): 691–704.
- [31] ZHANG H, CUI S, JING Z, et al. LRRC8A is responsible for exosome biogenesis and volume regulation in colon cancer cells [J]. *Biochem J*, 2023, 480(9): 701–713.
- [32] HOFFMANN E K, SØRENSEN B H, SAUTER D P, et al. Role of volume-regulated and calcium-activated anion channels in cell

- volume homeostasis, cancer and drug resistance [J]. *Channels*, 2015, 9(6): 380–396.
- [33] SLACK R J, MACDONALD S J F, ROPER J A, et al. Emerging therapeutic opportunities for integrin inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(1): 60–78.
- [34] PATTEN L W, BLATCHFORD P, STRAND M, et al. Assessing the performance of different outcomes for tumor growth studies with animal models [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(3): 248–257.
- [35] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212–226.
- [36] FRIARD J, CORINUS A, COUGNON M, et al. LRRC8/VRAC channels exhibit a noncanonical permeability to glutathione, which modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 925.
- [37] 李惠, 郭文文, 王荟荟, 等. 抗 PD-1 单抗联合顺铂的新辅助治疗策略对 NSCLC 人源化小鼠模型肿瘤复发与转移的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(6): 751–758.
- LI H, GUO W W, WANG H H, et al. Neoadjuvant treatment strategy by anti-PD-1 immunotherapy combined with cisplatin inhibits recurrence and metastasis of NSCLC in a humanized mouse model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(6): 751–758.
- [38] SØRENSEN B H, DAM C S, STÜRUP S, et al. Dual role of LRRC8A-containing transporters on cisplatin resistance in human ovarian cancer cells [J]. *J Inorg Biochem*, 2016, 160: 287–295.
- [39] ZHANG H, JING Z, LIU R, et al. LRRC8A promotes the initial development of oxaliplatin resistance in colon cancer cells [J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e16872.
- [40] RUBINO S, BACH M D, SCHÖBER A L, et al. Downregulation of leucine-rich repeat-containing 8A limits proliferation and increases sensitivity of glioblastoma to temozolomide and carmustine [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 142.
- [41] XU R, HU Y, XIE Q, et al. LRRC8A is a promising prognostic biomarker and therapeutic target for pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancers*, 2022, 14(22): 5526.
- [42] CONEJO-GARCIA J R. Breaking barriers for T cells by targeting the EPHA2/TGF- β /COX-2 axis in pancreatic cancer [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3521–3523.
- [43] ZHOU C, CHEN X, PLANELLAS-CASES R, et al. Transfer of cGAMP into bystander cells via LRRC8 volume-regulated anion channels augments STING-Mediated interferon responses and Anti-viral immunity [J]. *Immunity*, 2020, 52(5): 767–781.
- [44] KUMAR L, CHOU J, YEE C S, et al. Leucine-rich repeat containing 8A (LRRC8A) is essential for T lymphocyte development and function [J]. *J Exp Med*, 2014, 211(5): 929–942.
- [45] CONCEPCION A R, WAGNER L E, ZHU J, et al. The volume-regulated anion channel LRRC8C suppresses T cell function by regulating cyclic dinucleotide transport and STING-p53 signaling [J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(2): 287–302.
- [46] LIU J, SHEN D, WEI C, et al. Inhibition of the LRRC8A channel promotes microglia/macrophage phagocytosis and improves outcomes after intracerebral hemorrhagic stroke [J]. *iScience*, 2022, 25(12): 105527.
- [47] 王赛飞, 荀敬, 武雪亮, 等. NK 细胞及其免疫疗法在肿瘤免疫治疗中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(11): 1479–1484.
- WANG S F, XUN J, WU X L, et al. Application of NK cells and their immunotherapy in tumor immunotherapy [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(11): 1479–1484.
- [48] LI T, CHEN Z J. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(5): 1287–1299.
- [49] MARKOSYAN N, LI J, SUN Y H, et al. Tumor cell-intrinsic EPHA2 suppresses anti-tumor immunity by regulating PTGS2 (COX-2) [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3594–3609.
- [50] NAIK A, LEASK A. Tumor-associated fibrosis impairs the response to immunotherapy [J]. *Matrix Biol*, 2023, 119: 125–140.
- [51] CHEN X, ZHANG F, HU G, et al. LRRC8A critically regulates myofibroblast phenotypes and fibrotic remodeling following myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2022, 12(13): 5824–5835.
- [52] ZHANG H, LIU R, JING Z, et al. LRRC8A as a central mediator promotes colon cancer metastasis by regulating PIP5K1B/PIP2 pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(4): 167066.

[收稿日期]2024-02-01