

TRAIL 联合舒尼替尼对 EGFR-TKIs 抵抗的 A549 细胞株的抗肿瘤作用

邓立力¹, 邓洪滨², 王文秀¹, 韩红霞¹, 李逸文¹, 路丹¹, 黄雪香¹, 高迪¹, 王迪¹

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: [目的] 探讨 TRAIL 与舒尼替尼(sunitinib) 体外不同用药方式下对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI) 抵抗的 NSCLC A549 细胞的抗肿瘤活性及其机制。[方法] 实验分为对照组、TRAIL 组、舒尼替尼组、TRAIL 联合舒尼替尼组(T+S)、TRAIL 序贯舒尼替尼组(T→S) 和舒尼替尼序贯 TRAIL 组(S→T)。CCK8 法检测 TRAIL 和舒尼替尼对 A549 细胞的生长抑制作用; 流式细胞术检测 TRAIL 和舒尼替尼作用后细胞周期变化及诱导的细胞凋亡; Western blot 检测 TRAIL 和舒尼替尼作用后 Akt, p-Akt 蛋白表达的变化。[结果] T+S 组及 T→S 组的抗增殖作用及诱导细胞凋亡的能力明显优于 TRAIL 组、舒尼替尼组及 S→T 组(P 均 <0.05)。细胞周期显示, TRAIL 和舒尼替尼均能使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, T+S 组、T→S 组对 G_0/G_1 期的阻滞作用明显增强。Western blot 结果显示, TRAIL 单独作用于 A549 细胞能明显上调 p-Akt 的表达, 而舒尼替尼能下调 p-Akt 的表达; T+S 组、T→S 组、S→T 组 p-Akt 的表达明显减少。[结论] 舒尼替尼通过抑制 TRAIL 诱导的 PI3K/Akt 通路活化, 增加 TRAIL 诱导的 A549 细胞凋亡。此外, 两药物对 A549 细胞周期的特异性阻滞作用, 也是诱导凋亡增加的原因之一。

关键词: 非小细胞肺癌; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 舒尼替尼; 凋亡

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2015)02-0142-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.02.A014

Effect of TRAIL Combined with Sunitinib on EGFR-TKIs-resistant Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line A549

Deng Li-Li¹, DENG Hong-bin², WANG Wen-xiu¹, et al.

(1. The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

2. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the efficacy of TRAIL in combination with sunitinib under three different sequence-dependent schedules on epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs)-resistant human NSCLC A549 cells, and to reveal the responsible mechanisms. [Methods] Threats were divided into 6 groups: control group, TRAIL group, sunitinib group, TRAIL+sunitinib group, TRAIL sequential sunitinib group (T→S) and S→T group. The drug sensitivity was estimated by CCK8 method. the alteration of cell cycle and apoptosis in A549 cells treated with TRAIL and sunitinib by different administration programs were analyzed by the flow cytometry (FCM). The protein expression of Akt and p-Akt under different sequence-schedules was measured by Western blotting. [Results] Antiproliferative effects and induced apoptosis in the group of T+S and T→S were significantly better than those in the TRAIL group, sunitinib group and S→T group (P all <0.05). FCM analysis showed that TRAIL and sunitinib resulted in cell cycle arrest at G_0/G_1 phase, while the G_0/G_1 phase arrest was more happen in the group of T+S group and T→S group induced by two drugs. Western blot showed that TRAIL could induce the expression of p-Akt, and sunitinib could down regulate the expression of p-Akt; the expression of p-Akt in T+S group, T→S group and S→T group was significantly reduced. [Conclusion] Sunitinib enhances TRAIL-induced apoptosis by blocking the activation of PI3K/Akt signaling pathway in human NSCLC A549 cells. In addition, the two drugs resulted in cell cycle arrest at G_0/G_1 and can induce more cells apoptosis.

Key words: Non-small cell lung cancer; Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; sunitinib; apoptosis

收稿日期: 2014-03-07; 修回日期: 2014-07-16

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(H201311); 黑龙江省博士后资助金(LBH-Z12159)

E-mail: dengdoctor@126.com

近年来,非小细胞肺癌(NSCLC)的分子靶向治疗备受关注,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)19 外显子缺失或 21 外显子 L858R 突变的 NSCLC 患者能够从小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor,TKI)治疗中明显获益,通过筛选的患者其 TKI 治疗的有效率可以达到 40%以上^[1],但是耐药问题成为 TKI 治疗的瓶颈。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand,TRAIL)是肿瘤坏死因子超家族中的一员,可诱导多种肿瘤细胞凋亡,而对正常细胞毒性很小^[2],是很有潜力的新型抗肿瘤药物。然而,一些肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的凋亡存在耐药^[3]。研究显示,TRAIL 与多种化疗药物或化合物联合应用,能够增强 TRAIL 诱导的肿瘤细胞凋亡,甚至能够逆转该肿瘤细胞对 TRAIL 的原发耐受性^[3]。

舒尼替尼(sunitinib)是一种多靶点的小分子酪氨酸激酶抑制剂,能同时抑制多条信号传导通路,具有抗肿瘤和抗血管生成的双重作用,美国 FDA 批准其用于肾癌和对伊马替尼抵抗的胃肠道间质瘤的治疗,其抗肿瘤活性已在多种肿瘤得到证实^[4]。

本研究中,我们采用 TRAIL 联合舒尼替尼作用于 EGFR-TKIs 抵抗的 A549 细胞株,观察体外两药不同用药方式下的抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

重组人可溶性 TRAIL 蛋白购自 Abcam 公司。舒尼替尼购自美国 Sigma 公司。鼠抗人单克隆抗体 anti-DR4、anti-DR5 和作为对照的 anti-GAPDH 购自 Santa Cruz 公司;鼠抗人单克隆抗体 anti-Akt、兔抗人单克隆抗体 anti-p-Akt 购自 Cell Signaling Technology (CST)公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠或羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司。胎牛血清、RPMI-1640 购自 Invitrogen 公司。CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司。ECL 试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 细胞培养

人 NSCLC 细胞株 A549 购自中国科学院上海

细胞研究所,细胞培养于 RPMI-1640 培养液,内含 10%小牛血清,青霉素(100U/ml)、链霉素(100μg/ml)。培养条件为 37℃、5%CO₂,饱和湿度。

1.3 CCK-8 法检测细胞活性

1.3.1 实验分组

实验分为对照(C)组、TRAIL(T)组、舒尼替尼(S)组、TRAIL 联合舒尼替尼(T+S)组、TRAIL 序贯舒尼替尼(T→S)组和舒尼替尼序贯 TRAIL(S→T)组。

1.3.2 给药方式

1.3.2.1 浓度梯度

TRAIL 和舒尼替尼单药处理的浓度分别为 0、1、10、100、500ng/ml 和 0、5、50、500、1000ng/ml,药物处理 24h 后,检测细胞活性,并得出 24h 药物处理使细胞活性和对照组有显著差异的最小药物浓度,作为后续实验的最佳药物使用浓度。

1.3.2.2 时间梯度

TRAIL 和舒尼替尼单药处理的浓度为 1.3.2.1 中所得浓度,分别设置 24、48 和 72h 3 个时间点,检测细胞活性,并求出各处理组细胞与未处理组活性出现差异的最短药物作用时间。

1.3.2.3 药物处理

根据 1.3.2.1 得出的最佳药物浓度为 TRAIL=100ng/ml,舒尼替尼=500ng/ml。TRAIL 和舒尼替尼单药处理 48h;T+S 组则同时用 TRAIL 和舒尼替尼作用 48h;T→S 组先用 TRAIL 作用 24 h,然后加入舒尼替尼继续作用 24h;S→T 组先用舒尼替尼作用 24h,然后加入 TRAIL 继续作用 24h;分别检测细胞活性。

1.3.3 CCK-8 检测细胞活性

每孔加入 10μl 的 CCK-8 溶液;将培养板在培养箱内(37℃和 5% CO₂ 浓度)孵育 4h;然后将 96 孔培养板中液体转移至另一个 96 孔板;上机,使用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。绘制生长曲线,细胞抑制率=(对照组 A450-给药组 A450)/对照组 A450×100%。不同处理方式的联用指数(combination index,CI) 值=CA,x/ICx,A+CB,x/ICx,B;其中 CA,x 和 CB,x 是指 A、B 两种药物联用达到 x% 有效时的药物浓度;ICx,A 和 ICx,B 是指单用一种药物达到 x% 有效时的药物浓度。结果分析:CI<1,说明两药联用具有协同效应;CI>1,说明具有拮抗效应;CI=1,

则认为相加效应。

1.4 流式细胞术检测不同用药方式对细胞周期的影响

细胞分组和药物处理方式如 1.3 所述。TRAIL 和舒尼替尼的处理浓度分别为 100ng/ml 和 500ng/ml。取药物处理后的细胞,使用胰酶(不含 EDTA)消化的方法收集细胞,用预冷 PBS(pH=7.4)冲洗细胞 2 次,离心收集细胞沉淀,加入预冷的 70%乙醇,于 4℃放置过夜。检测前离心收集细胞,以 1ml 的 PBS 洗细胞两次,1000×g 离心 5min 收集细胞沉淀,加入 100μl PBS(含 50μg/ml PI、100μg/ml RNase A),4℃避光常温孵育 30min,流式细胞仪上机(FACS Calibur, BD 公司)检测,用 Modifit 软件分析细胞周期分布。

1.5 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡

实验采用 Annexin V-FITC 凋亡检测双染试剂盒。细胞分组和药物处理方式如 1.3 所述。TRAIL 和舒尼替尼的处理浓度分别为 100ng/ml 和 500ng/ml。取药物处理后的细胞,使用胰酶(不含 EDTA)消化的方法收集细胞,用 dPBS 洗涤细胞 2 次,2000×g 离心 5min,收集细胞沉淀,加入 500μl 的 Binding Buffer 重悬细胞沉淀,加入 5μl Annexin V-FITC 混匀后,混匀室温、避光、反应 10min,加入 5μl 的 PI,混匀室温、避光、反应 5min,用流式细胞仪检测,激发波长 Ex=488 nm, BD CFlow Plus 软件进行分析。

1.6 Western blot 检测蛋白表达的变化

取生长状态良好的细胞,将细胞裂解后提取细胞总蛋白,经 BCA 法蛋白定量,调整蛋白浓度至 10μg/μl, -20℃保存。取出 100μg 样品,变性 5min, 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜,用溶解有 5%脱脂奶粉的 TBST [10mmol/L Tris(pH7.4), 150mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20] 常温封闭 2h,加入一抗,4℃摇床孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1h,充分洗涤后,ECL 法显色,定影,使用灰度分析软件(TotalLab V1.10, Nonlinear Dynamics Ltd),进行胶片灰度扫描,分析结果。

1.7 统计学处理

所有试验均重复 3 次,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学处理采用 SPSS10.0 软件。组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRAIL 和舒尼替尼不同用药方式对 A549 细胞体外增殖的影响

不同浓度、不同作用时间的 TRAIL 和舒尼替尼分别作用于 A549 细胞,随着药物浓度的增加, TRAIL 和舒尼替尼对细胞的抑制率增加(见 Figure 1A, B)。当 TRAIL 和舒尼替尼的浓度分别 ≥ 100ng/ml 及 ≥ 500ng/ml 时,细胞抑制率明显高于对照组 (*t* = 6.965, *P* = 0.020; *t* = 5.127, *P* = 0.036)。随着药物作用时间的增加, TRAIL 组的细胞抑制率增加,当 TRAIL 作用时间 ≥ 24h,细胞抑制率即明显高于对照组 (*t* = 14.089, *P* = 0.005);而在舒尼替尼组,药物作用 ≥ 48h 的细胞抑制率明显高于对照组 (*t* = 11.113, *P* = 0.008)(Figure 1C)。

CCK8 法检测不同用药方式作用细胞 48h 后的抑制率,结果显示在抗增殖效果方面, T+S 组优于 TRAIL 组 (*t* = 14.089, *P* = 0.005)、舒尼替尼组 (*t* = 9.456, *P* = 0.011)和 S→T 组 (*t* = 10.470, *P* = 0.009); T→S 组优于 TRAIL 组 (*t* = 11.113, *P* = 0.008)、舒尼替尼组 (*t* = 9.046, *P* = 0.012)和 S→T 组 (*t* = 10.470, *P* = 0.009)(Figure 1D)。通过计算各组 CI 值发现: T+S 组和 T→S 组 CI 值均 < 1,具有协同效应;而 S→T 组 CI 值 > 1,具有拮抗效应。

2.2 TRAIL 和舒尼替尼不同用药方式对 A549 细胞周期的影响

TRAIL (100ng/ml) 和舒尼替尼 (500ng/ml) 以不同处理方式作用于 A549 细胞 48h,细胞周期的变化如 Figure 2 及 Table 1 所示。与对照组相比, TRAIL 组和舒尼替尼组 G₀/G₁ 期细胞比例增加 (*t* = 11.113, *P* = 0.008; *t* = 5.204, *P* = 0.035); T+S 组 G₀/G₁ 期细胞比

Table 1 The changes of cell cycle of A549 cells treated with TRAIL or sunitinib alone as well as the combination in different drug-administration sequences (n=3)

Group	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)
Control	39.11±5.94	50.90±10.27	11.99±3.41
TRAIL	57.05±0.61 [*]	35.11±0.94	7.84±1.49
Sunitinib	51.78±3.74 [*]	36.92±1.47	11.30±2.29
T+S	62.26±3.07 [*]	26.73±0.96 [*]	11.01±2.50
T→S	73.60±3.43 [*]	17.38±2.39 [*]	9.02±1.80
S→T	41.17±4.53	46.13±3.48	12.70±1.63 [#]

Compared with control group, ^{*}: *P* < 0.05; compared with TRAIL group, [#]: *P* < 0.05.

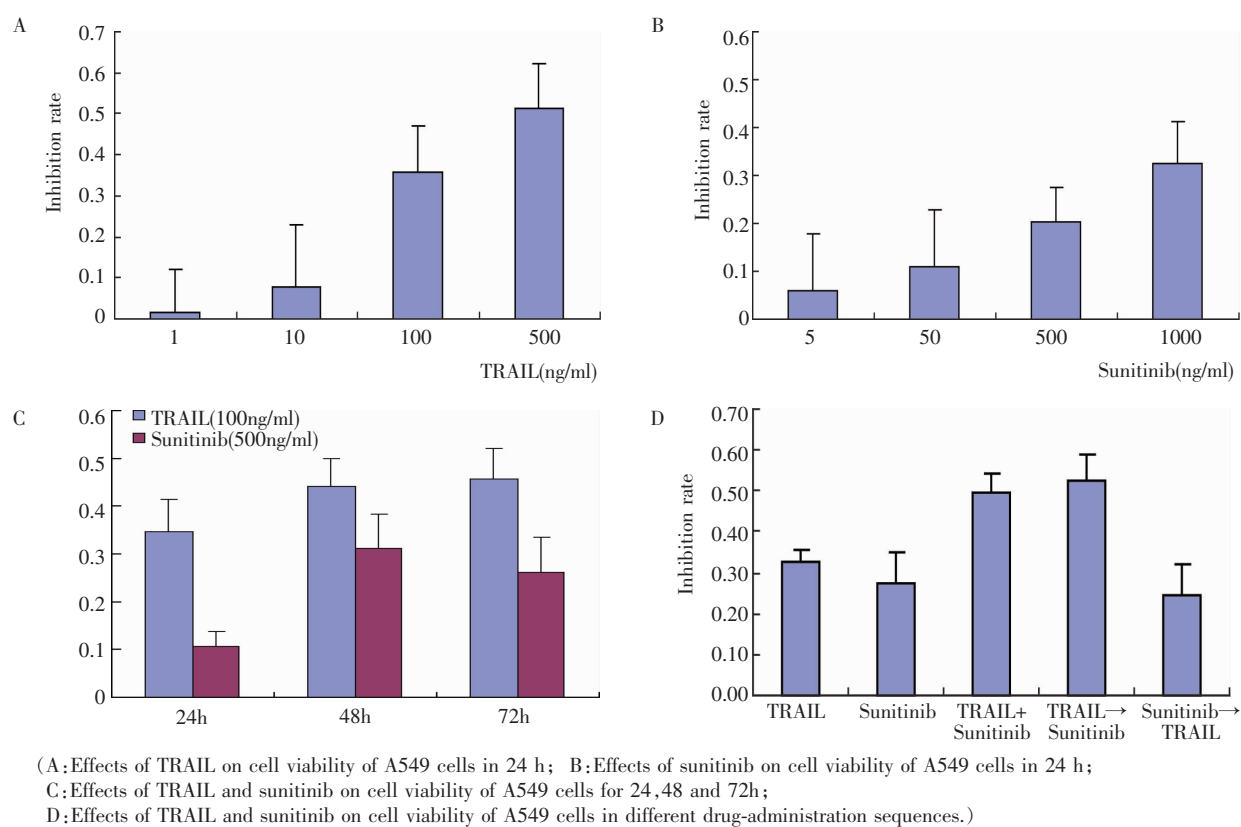


Figure 1 Effects of TRAIL and sunitinib on cell viability of A549 cells

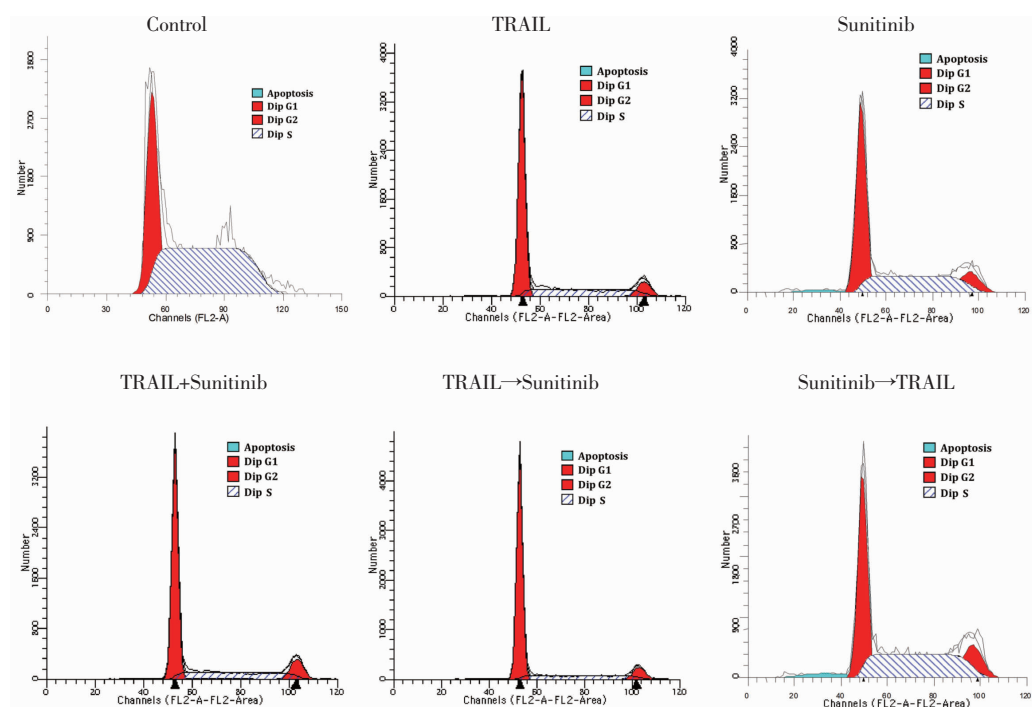


Figure 2 Cell cycle of A549 cells treated with TRAIL (100ng/ml) or sunitinib (500ng/ml) alone as well as the combination in different drug-administration sequences

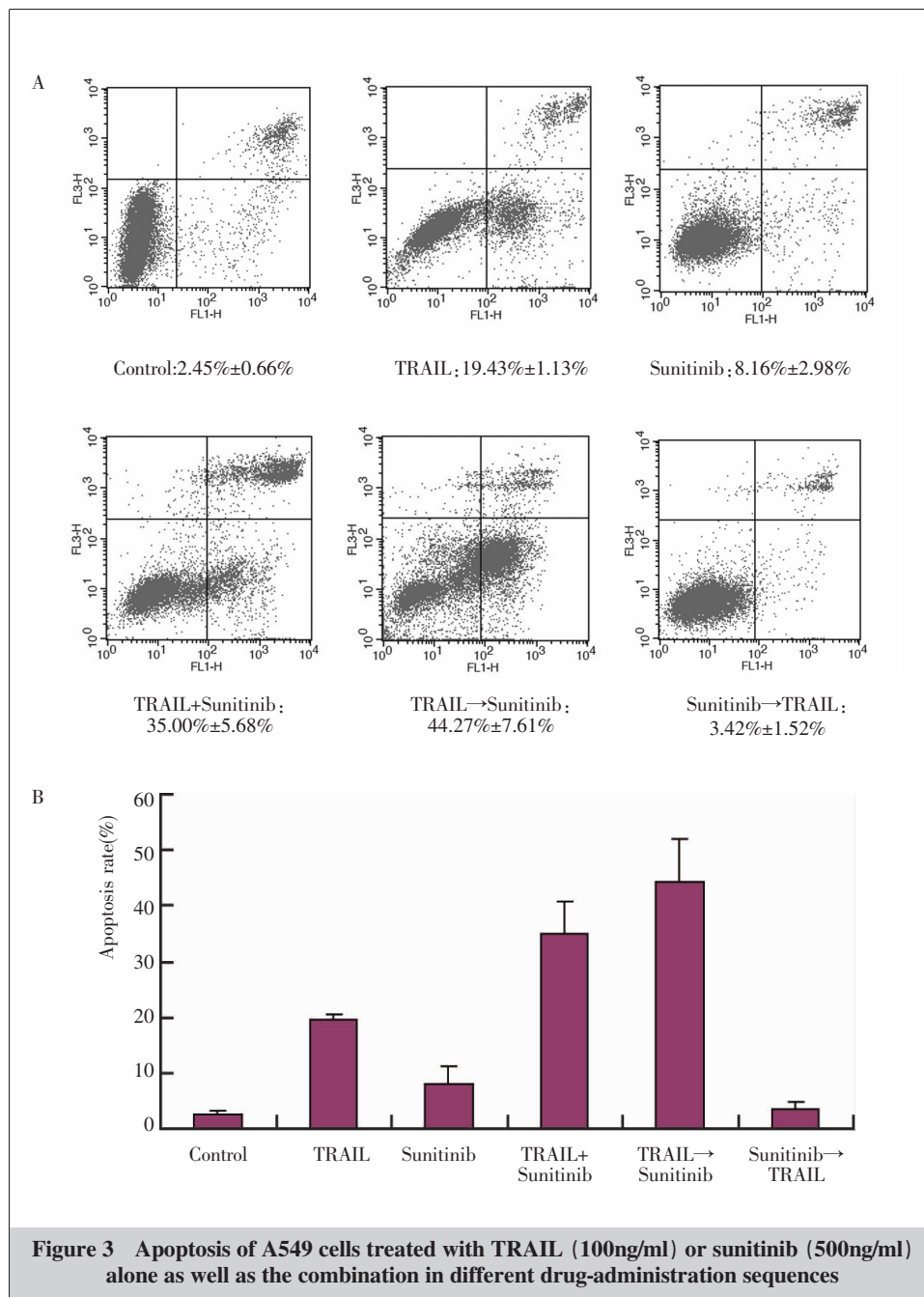
例增加($t=15.764, P=0.004$), S 期细胞比例降低($t=8.073, P=0.015$); T→S 组 G₀/G₁ 期细胞比例明显增加 ($t=31.599, P=0.001$), S 期细胞比例明显降低 ($t=14.089, P=0.005$)。而在 S→T 组, 无论 G₀/G₁ 期、G₂/M 期及 S 期细胞比例均较对照组无明显差异 (t 值分别为 0.514, 0.345, 0.841; P 分别为 0.658, 0.763, 0.489)。

T+S 组 G₀/G₁ 期细胞比例高于 TRAIL 组($t=5.455, P=0.032$)和舒尼替尼组($t=6.945, P=0.020$), S 期细胞比例低于 TRAIL 组($t=18.216, P=0.003$)和舒尼替尼组 ($t=31.600, P=0.001$); T→S 组 G₀/G₁ 期细胞比例高于 TRAIL 组 ($t=31.534, P=0.001$)、舒尼替尼组 ($t=22.327, P=0.002$) 以及 T+S 组 ($t=8.685, P=0.013$), S 期细胞比例低于 TRAIL 组 ($t=31.765, P=0.001$)、舒尼替尼组 ($t=158.109, P<0.001$) 以及 T+S 组 ($t=18.216, P=0.003$); S→T 组 G₀/G₁ 期细胞比例低于 TRAIL 组($t=14.089, P=0.005$)、舒尼替尼组 ($t=5.204, P=0.035$)、T+S 组 ($t=18.216, P=0.003$) 以及 T→S 组 ($t=31.599, P=0.001$), S 期细胞比例高于 TRAIL 组($t=8.684, P=0.013$)、舒尼替尼组 ($t=8.684, P=0.013$)、T+S 组($t=31.542, P=0.001$) 以及 T→S 组 ($t=81.697, P<0.001$)。且 S→T 组 G₂/M 期细胞比例高于 TRAIL 组 ($t=7.151, P=0.019$)。

2.3 TRAIL 和舒尼替尼不同用药方式对 A549 细胞凋亡的影响

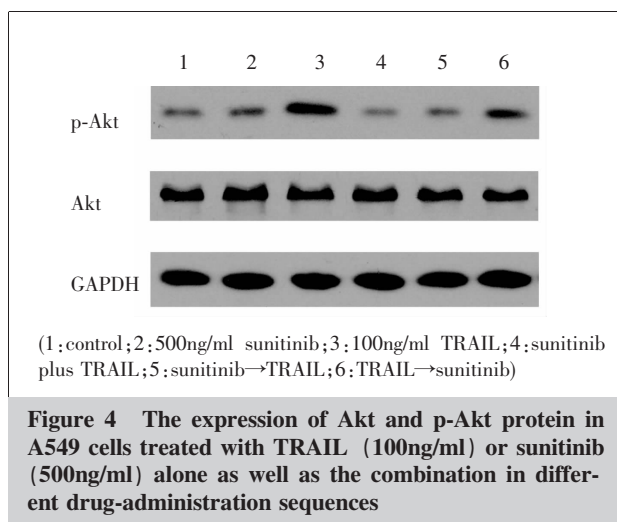
TRAIL (100ng/ml) 和舒尼替尼 (500ng/ml) 单药作用于 A549 细胞 48h, 细胞凋亡率分别为 19.43%±

1.13% 和 8.16%±2.98%, 差异有统计学意义 ($t=15.764, P=0.004$)。当 TRAIL 与舒尼替尼联合作用于 A549 细胞 48h, 细胞凋亡率升至 35.00%±5.68%, 明显高于 TRAIL 组($t=9.925, P=0.010$)、舒尼替尼组($t=22.327, P=0.002$)。T→S 组细胞凋亡率明显高于 TRAIL 组 ($t=14.089, P=0.005$) 和舒尼替尼组 ($t=22.327, P=0.002$); 而在 S→T 组, 细胞凋亡率明显低于 TRAIL 组 ($t=33.311, P=0.000$)、T+S 组 ($t=31.598, P=0.001$) 和 T→S 组 ($t=31.598, P=0.001$) (Figure 3)。



2.4 TRAIL 和舒尼替尼不同用药方式对 A549 细胞 PI3K/Akt 通路活性的影响

Western blot 结果显示,100ng/ml 的 TRAIL 单药作用于 A549 细胞后能明显上调 p-Akt 的表达,而 500ng/ml 的舒尼替尼能下调 p-Akt 的表达。TRAIL 与舒尼替尼联合应用,p-Akt 的表达明显下调。用 TRAIL 预处理细胞 24h 再予舒尼替尼作用 24h 后,仅能部分逆转 TRAIL 上调 p-Akt 表达的作用;而先用舒尼替尼预处理细胞 24h,再予 TRAIL 处理细胞 24h,能够逆转 TRAIL 上调的 p-Akt 表达 (Figure 4)。



3 讨论

目前,在晚期 NSCLC 中需要常规进行分子诊断,包括 *EGFR*、*KRAS*、*ALK* 等基因变异的检测,以指导临床治疗。对于 *EGFR* 敏感突变的特定人群,*EGFR*-TKI 如吉非替尼 (gefitinib) 和厄罗替尼 (erlotinib) 能够明显延长晚期 NSCLC 患者的无复发生存期^[5]。然而,NSCLC *EGFR* 敏感突变的发生率仅为 10%~30%^[6],即使是 *EGFR* 敏感突变的患者也会产生继发 TKI 耐药。*KRAS* 突变和 *EGFR* 野生型患者并不能从 *EGFR*-TKIs 中获益,对 *EGFR*-TKIs 表现出原发耐药。最近研究表明,在转移性 NSCLC 患者中,*KRAS* 突变已被证实是厄罗替尼或吉非替尼治疗预后的负相关因素^[7]。因此,在 NSCLC 患者中,迫切需要针对 *EGFR* 野生型、*KRAS* 突变的治疗方案。

研究发现,与肿瘤坏死因子家族其他成员不同,

不含有外来序列的非标记型 TRAIL 在诱导多种肿瘤细胞凋亡的同时,对大多数正常细胞无作用。本实验中我们选用了非标记型的全序列重组 TRAIL 蛋白,与多靶点 TKI 以不同联用方式作用于 *EGFR* 野生型并携带有 *KRAS* 突变的 NSCLC 细胞 A549,体外观察药物的抗肿瘤活性。NSCLC 是一种具有高度异质性的恶性肿瘤,其活化的肿瘤信号通路纷繁复杂,且纵横交错。单靶点药物在封闭肿瘤关键驱动信号通路的同时也激活了肿瘤的逃逸机制,使肿瘤细胞能够通过其它旁路再次激活其增殖。因而,在确保安全、低毒的前提下,尽可能多地抑制肿瘤信号通路是可行的。以舒尼替尼 (sunitinib) 为代表的多靶点药物同时具有抗血管生成和抗细胞增殖的双重作用。多项研究显示舒尼替尼在乳腺癌、神经内分泌肿瘤、NSCLC 等肿瘤中均具有抗肿瘤效应,其与多种化疗药物合用后能够产生更好的抗肿瘤作用^[8]。有研究通过不同的药物处理方式,寻找多靶点药物与 TRAIL 的优化联合用药方案。目前,联合治疗与序贯治疗作为有效的给药方式,不仅在肺癌领域,还在其他肿瘤治疗中得到了应用与研究,然而有关舒尼替尼联合或序贯 TRAIL 的研究在国内外尚少见报道。

本实验中,我们观察到 TRAIL 与舒尼替尼联合应用的抗增殖效应优于两药单独应用。此外,不同的序贯用药方式其抗肿瘤作用也存在明显不同,先用 TRAIL 预处理细胞再用舒尼替尼处理,其抗增殖效应明显高于先用舒尼替尼预处理后再用 TRAIL 处理细胞的结果。此外,CI 值分析显示:T+S 组和 T→S 组 CI 值均<1,而 S→T 组 CI 值>1,说明 TRAIL 与舒尼替尼联合应用或先用 TRAIL 处理细胞再用舒尼替尼处理,两者之间具有明显的协同效应,而先用舒尼替尼处理细胞再用 TRAIL 处理,两者之间具有拮抗效应。结果显示,舒尼替尼作为多靶点的 *EGFR*-TKIs 药物,与 TRAIL 以不同方式应用时,存在因给药顺序不同而引起的抗增殖效应的差异。我们的研究还发现,TRAIL 与舒尼替尼联合作用于 A549 细胞 48h,细胞凋亡率明显高于 TRAIL 及舒尼替尼单药处理组。先用 TRAIL 预处理细胞再用舒尼替尼处理,细胞凋亡率亦明显高于先用舒尼替尼预处理后再用 TRAIL 处理细胞的凋亡率,以上结果显示 TRAIL 与舒尼替尼联合应用的抗肿瘤细胞增殖效应与其联用诱导细胞凋亡增加有关,且诱导细胞

凋亡的差异与两药物的给药次序相关。

通过流式细胞周期检测,我们发现 TRAIL 和舒尼替尼均是细胞周期特异性药物,能够诱导细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,当 TRAIL 与舒尼替尼联合应用以及 T→S 序贯应用时,有更多的细胞被阻滞在 G₀/G₁ 期。药物通过阻止细胞进入 S 期,抑制细胞的生长增殖,继而诱发凋亡,这可能是药物诱导细胞凋亡的又一机制。而当先用舒尼替尼处理细胞再用 TRAIL 处理时,有更多的细胞通过 G₀/G₁ 期,进入 S 期,细胞生长增殖活跃,凋亡减少,推测这可能是 S→T 组序贯给药产生拮抗效应的机制之一。

研究表明,TRAIL 可激活生存通路,拮抗其诱导凋亡作用。在众多生存通路中,近年来已经有大量文献报道磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt) 信号通路的异常与肿瘤生长、维持和化疗耐药等有关^[9]。Akt 是 PI3K/Akt 信号通路的关键分子,活化的 Akt 能够拮抗多种肿瘤细胞的凋亡。有报道静息状态下,Akt 过度活化的肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的凋亡耐药,而且 TRAIL 可通过诱导 Akt 磷酸化,进一步增加肿瘤细胞对 TRAIL 的耐药性^[10]。我们的研究显示,TRAIL 单独作用时,仅能引起低于 20% 的细胞发生凋亡,同时可以检测到 Akt 磷酸化表达的明显增加,提示 Akt 通路的活化可能是 A549 细胞对 TRAIL 诱导的凋亡不敏感的原因之一。有文献显示,舒尼替尼可能通过靶向 PDGFR α ,进而抑制 Akt Ser473 的磷酸化,改变细胞内 PI3K/Akt 通路活性^[11]。本研究发现,A549 细胞中,舒尼替尼能够有效阻止 TRAIL 诱导的 Akt 磷酸化,无论是两药联合应用还是 TRAIL→舒尼替尼序贯应用,均观察到此效应,这也部分解释了上述用药方式下,A549 细胞凋亡明显增加的原因。以上结果提示舒尼替尼逆转 A549 细胞对 TRAIL 诱导凋亡的耐药部分是通过抑制了 TRAIL 诱导的 PI3K/Akt 通路活化,进而抑制了生存通路。值得一提的是,先用舒尼替尼处理细胞再给予 TRAIL 处理,也观察到 Akt 磷酸化的减少,而此时检测到的细胞凋亡并没有增加,提示舒尼替尼通过抑制 TRAIL 诱导的 PI3K/Akt 通路活化,进而逆转 A549 细胞对 TRAIL 诱导凋亡的耐药仅是两药联合或序贯应用诱导细胞凋亡的机制之一,更多的机制还需要深入的实验研究。

总之,我们的研究证实了 TRAIL 与舒尼替尼联

用以及 TRAIL→舒尼替尼序贯应用模式对于携带有 EGFR 野生型、KRAS 突变这一分子类型 NSCLC 是可行的。其诱导细胞凋亡增加的机制可能与舒尼替尼抑制 TRAIL 诱导的 PI3K/Akt 通路活化有关。此外,两药物对 A549 细胞周期的特异性阻滞作用,也是诱导凋亡增加的原因之一。

参考文献:

- [1] Song T, Yu W, Wu SX. Subsequent treatment choices for patients with acquired resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer: restore after a drug holiday or Switch to another EGFR-TKI? [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(1):205-213.
- [2] Mitchell MJ, Wayne E, Rana K, et al. TRAIL-coated leukocytes that kill cancer cells in the circulation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(3):930-935.
- [3] Qiu F, Hu M, Tang B, et al. Annexin V-TRAIL fusion protein is a more sensitive and potent apoptotic inducer for cancer therapy [J]. Sci Rep, 2013, 3:3565.
- [4] Choi BS. Risks associated with sunitinib use and monitoring to improve patient outcomes [J]. Korean J Intern Med, 2014, 29(1):23-26.
- [5] Fukihara J, Watanabe N, Taniguchi H, et al. Clinical predictors of response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutant non-small cell lung cancer [J]. Oncology, 2014, 86(2):86-93.
- [6] Usuda K, Sagawa M, Motono N, et al. Relationships between EGFR mutation status of lung cancer and preoperative factors- are they predictive? [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(2):657-662.
- [7] Fiala O, Pesek M, Finek J, et al. Gene mutations in squamous cell NSCLC: insignificance of EGFR, KRAS and PIK3CA mutations in prediction of EGFR-TKI treatment efficacy [J]. Anticancer Res, 2013, 33(4):1705-1711.
- [8] Schem C, Bauerschlag D, Bender S, et al. Preclinical evaluation of sunitinib as a single agent in the prophylactic setting in a mouse model of bone metastases [J]. BMC Cancer, 2013, 13:32.
- [9] Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging [J]. Aging (Albany NY), 2011, 3(3):192-222.
- [10] Yuan BZ, Chapman J, Ding M, et al. TRAIL and proteasome inhibitors combination induces a robust apoptosis in human malignant pleural mesothelioma cells through Mcl-1 and Akt protein cleavages [J]. BMC Cancer, 2013, 13(1):140.
- [11] Yang F, Jove V, Xin H, et al. Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways [J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(1):35-45.