

基于 TRAIL 联合治疗的信号通路及协同作用机制研究进展

Research Advance in Signaling Pathway and Synergistic Mechanisms of TRAIL-Based Combination Therapy // CHEN Juan, OUYANG Xue-nong, YU Zong-yang

陈娟¹, 欧阳学农², 余宗阳²

(1. 福建医科大学福总临床医学院, 福建 福州 350025; 2. 南京军区福州总医院, 福建 福州 350025)

摘要: 肿瘤坏死因子相关凋亡配体(TRAIL), 属于肿瘤坏死因子超家族成员, 因其能特异性结合受体诱导肿瘤细胞凋亡, 且对正常细胞没有明显损伤, 使其成为一种极具发展潜能的抗肿瘤治疗药物。文献报道称以 TRAIL 为基础的多药联合治疗具有协同作用, 可增强 TRAIL 受体靶向治疗的疗效。文章就以 TRAIL 为基础多药联合治疗的信号通路及协同作用机制作一综述。

关键词: 肿瘤坏死因子相关凋亡配体; 细胞凋亡; 协同作用; 信号通路

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A **文献编号:** 1671-170X(2012)12-0954-04

肿瘤坏死因子相关凋亡配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), 又称凋亡素 2 配体(APO2L), 是肿瘤坏死因子(TNF)超家族的新成员。与家族其他成员不同的是 TRAIL 对肿瘤细胞具有较高选择性, 能特异性地诱导多种肿瘤细胞凋亡, 对正常组织却无明显凋亡诱导作用^[1], 相关研究表明 TNF 家族其他成员如 TNF α 、FasL 等无明显特异地诱导肿瘤细胞凋亡作用, 且对肝细胞和其他非转化细胞具有较强的细胞毒性作用^[2]。TRAIL 的抗肿瘤作用为 p53 非依赖型, 其对 p53 变异或缺失的肿瘤细胞亦有较强的杀伤作用^[3]。因此, TRAIL 在抗肿瘤领域中展现出较为广阔的应用前景。该综述简要地描述 TRAIL 诱导凋亡的信号途径及以 TRAIL 为基础联合治疗的临床试验, 并阐述联合治疗的协同作用机制。

1 TRAIL

TRAIL 表达 281 个氨基酸, 属 II 型跨膜蛋白, 锚定在质膜上并呈递到细胞表面。TRAIL 的第 230 位的半胱氨酸(cysteine-230)对其活性起关键作用, 将 cysteine-230 突变为丝氨酸或氨基乙酸后, 其结构改

变, 形成无功能的二聚体, 无诱导凋亡作用。此外, 3 个 TRAIL 单体螯合一个 Zn^{2+} 离子可形成 TRAIL 的同源三聚体, Zn^{2+} 离子对保持 TRAIL 的原始结构、稳定性和生物学活性十分重要, 去除 Zn^{2+} 的螯合作用后, 三聚体转换为二聚体, 削弱了 TRAIL 的促凋亡活性。TRAIL 在序列上跟其他死亡配体具有相似性, 特别是与 Fas 配体具有高度同源性。在生理学上, TRAIL 对免疫系统的形成、免疫监视作用及抑制自发性肿瘤形成是必不可少的^[4]。

2 TRAIL 受体

目前已确定 TRAIL 有 5 种受体, 根据其不同作用可分为: ①死亡受体: TRAIL-R1(DR4)、TRAIL-R2(DR5), DR4、DR5 是激动型受体, 在肿瘤细胞和组织中高表达, 含有胞质内死亡结构域(death domain, DD), 与 TRAIL 结合后能将 TRAIL 的死亡信息传递至胞质, 激活胱天蛋白酶系统, 最终诱导细胞凋亡。②诱捕受体: TRAIL-R3(DcR1)、TRAIL-R4(DcR2), DcR1 和 DcR2 的胞外区均有两个与死亡受体高度同源富含半胱氨酸的重复序列, DcR1 缺少含有死亡结构域的胞质区, 故虽能与 TRAIL 结合却不能诱导细胞凋亡; DcR2 细胞内的死亡结构域不完整, 缺少氨基端部分, 因而也丧失诱导凋亡的能力。高表达的诱骗受体是否是肿瘤细胞对 TRAIL 产生耐药的原

通讯作者: 欧阳学农, 主任医师, 硕士生导师, 博士; 南京军区福州总医院肿瘤科, 福建省福州市西二环北路 156 号(350025); E-mail: oyxnong@163.com。

收稿日期: 2012-06-25; **修回日期:** 2012-08-28

因目前还存在着很大的争议,因为在分离出来的癌细胞株中,很少发现诱骗受体的表达水平升高。此外,两个诱骗受体抑制 TRAIL 诱导细胞凋亡的分子机制也不尽相同,曾有报道称 DcR1 与 TRAIL 结合仅形成同源三聚体,而 DcR2 却可与活化的 DR4 或 DR5 聚合成异源三聚体,这种异源三聚体不能形成功能性死亡信号诱导复合体(death-inducing signaling complex,DISC),无法诱导细胞凋亡^[5]。③ 护骨素(OPG),OPG 为一种可溶性分泌型糖蛋白,具有竞争性结合 TRAIL 的作用,同样也因缺乏 DD 而不能启动凋亡通路^[6]。

3 TRAIL 诱导细胞凋亡的信号通路

3.1 细胞外途径

TRAIL 与其靶细胞表面受体 DR4 和/或 DR5 特异性结合后,激活 DR4、DR5 分子中的死亡结构域,DD 相互聚集并募集特异接头蛋白 FADD (Fas-associated death domain)。FADD 包含两个相互作用的结构域蛋白,即 DD 和死亡效应器(death effector domain,DED)。FADD 通过两个 DD 之间的相互作用来结合受体,并同时通过与 DED 之间的相互作用募集凋亡信号的起始因子胱冬酶原(procaspase-8),最后形成 DISC。在 DISC 内 caspase-8 前体被激活,caspase-8 因含两个 DED 具备强大的死亡效应启动和传递功能,成为死亡受体凋亡诱导途径的关键分子。caspase-8 活化后能够引发 caspase 蛋白酶级联反应,并进一步链式水解激活下游的同源酶 caspase-6 和 caspase-7 等,最后激活其效应 caspase-3 发挥生物学功能,诱发细胞凋亡。

3.2 细胞内途径

在细胞内途径中,caspase-8 活化后将胞浆中 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白 Bid 剪切成有活性的 tBid 并迁移至线粒体,结合线粒体膜上电压依赖性阴离子通道蛋白 Bax、Bak,改变线粒体膜通透性,使线粒体释放出细胞色素 C(cytC)、凋亡蛋白激活因子-1(Apaf-1)、细胞凋亡诱导因子(AIF)等促凋亡因子和 Smac/DIABLO。释放的 cytC 与 Apaf-1、procaspase-9 及 dATP 形成凋亡小体(apoptosome),凋亡小体二聚化后激活 caspase-9,进而激活蛋白水解酶 caspase-3、caspase-6 和 caspase-7 诱导肿瘤细胞凋亡。Smac/

DIABLO 通过解除凋亡抑制蛋白(IAPs)对 caspase-3 前体的抑制作用,从而激活 caspase-3 前体,诱发细胞凋亡。

3.3 旁路途径

TRAIL 与受体结合后,除激活上述凋亡诱导信号途径外,还能激活 NF- κ B、JNK 通路、PI3K/Akt 途径、蛋白激酶 C(PKC)以及促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员等旁路途径,TRAIL 的旁路激活作用在 TRAIL 耐受中起重要作用。

4 TRAIL 临床试验

4.1 单药治疗

在国外,可溶性 rhTRAIL(又称杜拉乐明)、DR4 靶向单克隆竞争性抗体 mapatumumab,DR5 靶向单克隆竞争性抗体 lexatumumab、conatumumab、tigatuzumab 及 DAB4 已进入临床研究,这些临床试验的药物广泛用于实体或非实体恶性肿瘤中。

rhTRAIL 临床前研究具有很好的抗肿瘤活性,I 期临床试验中,rhTRAIL 毒性部分的研究结果让人鼓舞,其在单药治疗进展期癌症患者的研究中,随着剂量的逐渐上升血清药物浓度具有很好的耐受性^[7]。类似的,mapatumumab 也具有很好的耐受性,在 II 期临床试验中,约有三分之一的复发或难治性非霍奇金淋巴瘤患者对 mapatumumab 的治疗敏感^[8];此外,mapatumumab 对结直肠癌患者也具有很好的耐受性^[9]。DR5 靶向性抗体也进入了 I 期和 II 期临床试验^[10]。和 DR4 竞争性抗体相似,这些抗体仅导致小部分患者出现低到中度的副反应。给予 DR5 靶向性抗体治疗后,一些患者产生部分缓解或可减缓疾病进展^[11]。总之,TRAIL 和 TRAIL 受体结合性抗体具有很好的耐受性,并且在治疗进展期及难治性恶性肿瘤方面具有很好的前景。然而,TRAIL 死亡受体也可产生抗凋亡及促活化信号。这些反应是通过活化激酶,如 RIP1、IKK、c-jun-NH2^[12],这些激酶被激活后可诱导转录依赖的促活化反应。曾有报道^[13]称在急性白血病的儿童体内分离出来的癌细胞亚群经 TRAIL 治疗后可促进癌细胞的增殖。这些促增殖反应一定程度上限制了 TRAIL 单药治疗的可行性。

4.2 联合治疗

临床前的药物研究数据表明,多种肿瘤细胞对

TRAIL 的治疗敏感。然而,也经常发现肿瘤细胞对 TRAIL 的治疗产生耐药,这可能跟抗凋亡蛋白的过表达及 TRAIL 死亡受体的低表达有关。可喜的是在临床前 TRAIL 联合治疗的研究中发现,联合治疗可提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性或可逆转肿瘤细胞对 TRAIL 的耐受性。尽管联合治疗存在一定的风险,因为非转化细胞可能对这种治疗产生敏感,但是初步结果显示这样做是安全的。在 Ib 期临床研究中, rhTRAIL 联合紫杉醇、卡铂和贝伐单抗治疗 NSCLC 患者,发现并没有剂量限制性毒性反应且治疗具有很好的耐受性,其中有 1 例患者完全缓解及较高比例的患者获得部分缓解^[14]。其他较早的 Ib 期临床试验中,进展期实体瘤的患者给予 mapatumumab 联合紫杉醇/卡铂治疗,或联合吉西他滨/顺铂治疗的研究中发现肿瘤对 mapatumumab 具有很好的耐受性^[15]。

5 基于 TRAIL 联合治疗药物之间的协同作用机制

5.1 TRAIL 与细胞毒药物的联合作用机制

不同细胞毒药物可增强 TRAIL 信号途径和它的抗肿瘤作用,其中 5-Fu 和顺铂是最常被研究的两种药物。单用细胞毒药物可转录诱导 BH3-only 蛋白的活化。BH3-only 蛋白是 Bcl-2 蛋白家族中启动和调节细胞凋亡的重要成员,能识别不同的细胞刺激形式并被活化,其活性受转录和/或转录后修饰的调节。BH3-only 成员包括 Bim、Bad、Bid、Bik、Bmf、Puma、Noxa 和 Hrk。其中 Bid 的裂解和活化可上调 TRAIL 诱导的凋亡;Puma 也可通过线粒体途径有效地诱导肿瘤细胞凋亡,这在一定程度上可协同补充 Bid 的促凋亡作用^[16]。此外,TRAIL 与细胞毒药物的协同作用也可通过对 TRAIL 上游信号进行调节。例如,5-Fu 可通过下调 c-FLIP 及上调死亡受体 DR5 的表达从而促进 TRAIL 耐药的肝癌细胞凋亡,并且联合干预对正常细胞并没有明显的不良反应^[17]。Koehler 等^[18]研究表明 TRAIL 分别联合 5-Fu、多西他赛干预肝细胞癌可上调 DR4、DR5 的表达。在 TRAIL 诱导的细胞凋亡中,随着 DR5 启动子的活化,DR5 的表达可能因转录因子 Yin Yang1 (YY1) 结合到 DR5 启动子结合位点而被抑制。Baritaki 等^[19]

研究指出顺铂、依托泊苷、阿霉素或长春新碱干预前列腺癌 PC-3 细胞,可增加 DR5 的表达,下调 YY1 的表达并增加细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性。

5.2 TRAIL 与蛋白酶体抑制剂联合作用机制

蛋白酶体是溶解蛋白的大分子复合物,通过泛素——蛋白酶体途径参与多种蛋白的降解过程,从而参与血管生成、细胞粘附、细胞因子生成等多种细胞生物过程。选择性抑制蛋白酶体可稳定细胞周期的调节蛋白、干扰细胞增殖、诱导细胞凋亡及抗血管生成等。蛋白酶体抑制剂与 TRAIL 联合使用具有协同抗肿瘤作用。在刘静等^[20]的研究中,人胃癌细胞株 MGC803 经 TRAIL 单独处理后未能产生明显活化的 caspase-8,用硼替佐米预处理细胞再给予 TRAIL 干预后,可见到明显活化的 caspase-8,该研究结果提示硼替佐米联合 TRAIL 可促进 caspase 无活性前体裂解成活性片段,进而增强细胞 TRAIL 诱导凋亡的敏感性。另外,有研究报道^[21]称在人软组织肉瘤细胞系中, MG132 可通过促进死亡受体和 Bcl-2 家族促凋亡蛋白 BAX 的表达,来上调 TRAIL 对肿瘤细胞诱导凋亡的敏感性。总之,蛋白酶体抑制剂联合 TRAIL 在多种肿瘤细胞可通过上调死亡受体及凋亡通路中促凋亡蛋白的表达来促进细胞的凋亡。

5.3 TRAIL 与凋亡抑制蛋白拮抗剂联合作用机制

凋亡抑制蛋白拮抗剂,如 Smac 肽类合成物和 Smac 类似物可增强 TRAIL 诱导的各种肿瘤细胞凋亡。特别是 XIAP 竞争性抗体,它可以通过 caspase-8 直接促进 caspase-3 的活化导致死亡效应的有效执行^[22]。此外,Smac 类似物可结合到 cIAP-1 和 cIAP-2 上,引起 cIAPs 减少,使得细胞对分泌性 TNF α 产生应答^[23]。TNF α 可通过活化胞外凋亡通路导致 caspase-8 的活化来促进细胞的凋亡。IAP 抑制剂与 DR4 靶向抗体 mapatumumab 联合使用时可协同促进胰腺癌细胞的凋亡,而与 DR5 特异性抗体 lexatumumab 联合治疗时其对肿瘤细胞的杀伤效应降低。这表明特定受体的不同,其协同作用及对某些癌细胞的敏感性也是存在差异的^[24]。

TRAIL 与药物的协同作用机制除了转录活化及 p53 非依赖途径外,还可通过转录后蛋白修饰作用来发挥协同作用,如磷酸化作用。抑制蛋白激酶 CK2 可减少 Bid 的磷酸化并通过 caspase-8 的作用上调 Bid 的裂解^[25]。caspase-8 前体蛋白可被 Src 激酶磷酸

化,从而减少其与 DISC 的结合,并影响 DISC 的活化^[26]。激酶抑制也可以直接或间接诱导转录反应,如 PI3K/AKT 靶向抑制剂哌立福新可通过 p53 非依赖途径上调死亡受体 DR5 的表达并下调 cFlip 和 XIAP 来恢复急性粒细胞白血病对 TRAIL 的敏感性^[27]。因此,多靶点激酶抑制剂,如目前正在进行的索拉菲尼与 TRAIL 联合治疗的 I 期临床试验中,索拉菲尼在增强癌细胞反应性方面将有可能发挥巨大的潜能^[11]。

TRAIL 作为肿瘤生物治疗的新型药物自发现以来就备受关注。目前对 TRAIL 单药及以 TRAIL 为基础的多药联合治疗的作用机制及在肿瘤治疗方面的研究已经取得较大进展。临床前研究及临床试验均已证实 TRAIL 是极具潜能的新型抗肿瘤药物。但因肿瘤细胞类型不同,TRAIL 与不同治疗手段联合具有不同的抑瘤效果,需考虑个体化治疗。相信随着 TRAIL 临床试验的开展及相关临床数据的统计,结合各种肿瘤细胞的生物学行为特点,TRAIL 联合治疗将有可能为肿瘤治疗开辟崭新的途径。

参考文献:

- [1] Bellail AC, Qi L, Mulligan P, et al. TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges[J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2009, 4(1):34-41.
- [2] Nesterov A, Nikrad M, Johnson T, et al. Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11):3922-3927.
- [3] Galligan L, Longley DB, McEwan M, et al. Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(12):2026-2036.
- [4] Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death[J]. *Nature*, 2005, 434(7029):88-93.
- [5] Merino D, Lalaoui N, Morizot A, et al. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(19):7046-7055.
- [6] O'Kane HF, Watson CJ, Johnston SR, et al. Targeting death receptors in bladder, prostate and renal cancer[J]. *J Urol*, 2006, 175(2):432-438.
- [7] Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, et al. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(17):2839-2846.
- [8] Younes A, Vose JM, Zelenetz AD, et al. A phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(12):1783-1787.
- [9] Trarbach T, Moehler M, Heinemann V, et al. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(3):506-512.
- [10] Camidge DR, Herbst RS, Gordon MS, et al. A phase I safety and pharmacokinetic study of the death receptor 5 agonistic antibody PRO95780 in patients with advanced malignancies[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4):1256-1263.
- [11] Abdulghani J, El-Deiry WS. TRAIL receptor signaling and therapeutics[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(10):1091-1108.
- [12] Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, et al. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(49):40599-40608.
- [13] Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, et al. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB[J]. *Oncogene*, 2003, 22(25):3842-3852.
- [14] Soria JC, Smit E, Khayat D, et al. Phase 1b study of dulacemir (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(9):1527-1533.
- [15] Mom CH, Verweij J, Oldenhuis CN, et al. Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17):5584-5590.
- [16] Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53[J]. *Oncogene*, 2008, 27(Suppl 1):S71-S83.
- [17] Ganten TM, Haas TL, Sykora J, et al. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitization of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(Suppl 1):S86-S96.
- [18] Koehler BC, Urbanik T, Vick B, et al. TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells is augmented by targeted therapies[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(47):5924-5935.
- [19] Baritaki S, Huerta-Yepez S, Sakai T, et al. Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis: up-regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4):1387-1399.
- [20] 刘静, 徐玲, 刘云鹏, 等. 硼替佐米抑制 PI3K/Akt 通路增强胃癌细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(18):1854-1859.
- [21] Cheong HJ, Lee KS, Woo IS, et al. Up-regulation of the DR5 expression by proteasome inhibitor MG132 augments TRAIL-induced apoptosis in soft tissue sarcoma cell lines[J]. *Cancer Res Treat*, 2011, 43(2):124-130.
- [22] Jost PJ, Grabow S, Gray D, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis[J]. *Nature*, 2009, 460(7258):1035-1039.
- [23] Vince JE, Wong WW, Khan N, et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis[J]. *Cell*, 2007, 131(4):682-693.
- [24] Stadel D, Mohr A, Ref C, et al. TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(23):5734-5749.
- [25] Hellwig CT, Ludwig-Galezowska AH, Concannon CG, et al. Activity of protein kinase CK2 uncouples Bid cleavage from caspase-8 activation[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 9):1401-1406.
- [26] Cursi S, Rufini A, Stagni V, et al. Src kinase phosphorylates caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression[J]. *EMBO J*, 2006, 25(9):1895-1905.
- [27] Tazzari PL, Tabellini G, Ricci F, et al. Synergistic proapoptotic activity of recombinant TRAIL plus the Akt inhibitor Perifosine in acute myelogenous leukemia cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22):9394-9403.