

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.008

· 基础研究 ·

沉默 *ERK* 增强 A375 黑素瘤细胞对 TRAIL 诱导细胞凋亡的敏感性

李红霞, 张帆, 李坤, 刘庆平, 秦建中(大连大学生命科学与技术学院 辽宁省糖脂代谢重点实验室, 辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:** 探讨直接抑制细胞外信号调节激酶(extra cellular signal-regulated kinase, ERK)表达后,对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)对黑素瘤细胞杀伤作用的影响及其作用机制。 **方法:** 用携带 *ERK* 特异或对照 shRNA 的慢病毒感染 A375 黑素瘤细胞,48 h 后加入终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 基因重组 TRAIL 蛋白继续培养 6 h,收获细胞,碘化丙啶染色,用流式细胞术检测细胞周期、细胞凋亡和 TRAIL 受体的表达;Western blotting 检测相关蛋白的表达水平。 **结果:** 亚型特异的 ERK shRNA 分别沉默 *ERK1* 或 *ERK2*,导致 A375 细胞出现 G_1 期阻滞(对照 shRNA 组的 G_1 期细胞比例为 71%,*ERK1*、*ERK2*、*ERK1* + 2 shRNA 组分别增加到 85%、90% 和 81%, $P < 0.01$);S 期细胞从对照组的 11% 减少到 2% 左右($P < 0.001$)、 G_2/M 期细胞也从对照组的 17% 减少到 3%($P < 0.01$)。细胞周期改变伴有 P21、P27 蛋白上调和 Cyclin D1 蛋白降低,但未见明显的细胞凋亡。经对照 shRNA 和 TRAIL 处理的细胞,仅有 15% 的凋亡率,而 ERK shRNA 和 TRAIL 联合处理则使凋亡率达到 40% ~ 60%($P < 0.01$)。抑制 ERK 蛋白表达能显著上调细胞表面 TRAIL 受体 DR4 的表达(从对照组 32% 增加到 75% ~ 80%, $P < 0.01$),但 DR5 变化不明显。ERK 抑制还明显降低 A375 细胞的葡萄糖转运受体 1(Glut 1)和己糖激酶 II(HK-II)的蛋白表达水平。 **结论:** 直接抑制 ERK 不仅可以抑制肿瘤细胞周期的进展,而且可以增强 TRAIL 对 A375 黑素瘤细胞的杀伤作用,其机制与上调细胞表面 DR4 的表达和干扰肿瘤细胞糖代谢有关。

[关键词] 黑素瘤;A375 细胞;细胞外信号调节激酶;TRAIL;细胞凋亡;糖代谢

[中图分类号] R739.5; R730.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)03-0343-07

Silencing *ERK* enhances susceptibility of A375 melanoma cells to cell apoptosis induced by TRAIL

LI Hongxia, ZHANG Fan, LI Kun, LIU Qingping, QIN Jianzhong (School of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Key Laboratory of Carbohydrate and Lipid Metabolism Research in Liaoning Province, Dalian 116600, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of extra cellular signal-regulated kinase (*ERK*) knockdown on melanoma cell apoptosis mediated by TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and the underlying mechanisms. **Methods:** A375 cells were infected with lentivirus carrying either scramble shRNA (SC shRNA) or ERK (shRNA) for 48 hours and then treated with recombinant TRAIL protein (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for another 6 hours. Cells were harvested and stained with PI; Flow cytometry was used to detect cell cycle, apoptosis, and the expression of TRAIL receptor; Western blotting was used to measure the expression level of relevant proteins. **Results:** Knockdown of either *ERK1* or *ERK2* by isotype specific shRNA resulted in G_1 -phase growth arrest of A375 cells(cell percentage at G_1 -phase in control group was 71% , compared to 85% , 90% , 81% respectively in ERK1 , ERK2 and ERK1 + 2 shRNA groups , $P < 0.01$). Accordingly, the A375 cell percentage at S-phase was 11% in control group, compared to around 2% in various ERK shRNA groups ($P < 0.001$); the G_2/M cell percentage was 17% in control group, compared to the around 3% in various ERK shRNA groups ($P < 0.01$). The change of cell cycle was accompanied by up-regulation of P21 and P27 proteins, and down-regulation of cyclin D1 level, however no obvious cell apoptosis was observed. Treatment of scramble shRNA together

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81241148)。Project supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81241148)

[作者简介] 李红霞(1990 -),女,内蒙古乌兰察布市人,硕士生,主要从事小分子化合物抗肿瘤机制研究,E-mail: 15661251922@163.com

[通信作者] 秦建中(QIN Jianzhong, corresponding author),E-mail: jzqin68@hotmail.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160527.1640.008.html>

er with TRAIL caused about 15% of cell apoptosis, in contrast, the combined treatment of ERK shRNA and TRAIL increased cell apoptosis rate up to 40% ~ 60% ($P < 0.01$). Silencing of ERK enhanced DR4 expression on TRAIL receptor (from 32% to 75% ~ 80%, $P < 0.01$), but not DR5 expression. Furthermore, directly silencing ERK resulted in inhibited expression of Glut 1 and hexokinase II, which are involved in the unique glucose metabolism of tumor cells. **Conclusion:** Directly silencing ERK with specific shRNA inhibited tumor cell growth and enhanced tumor cell apoptosis mediated by TRAIL. A combination of increased DR4 expression and impaired glucose metabolism is likely to contribute to the synergistic effect seen with TRAIL and ERK shRNA treatment in melanoma cells.

[**Key words**] melanoma; A375 cell; extra cellular signal-regulated kinase (ERK); TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL); apoptosis; glucose metabolism

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 343-349. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.008]

细胞外信号调节激酶(extra cellular signal-regulated kinase, ERK)是治疗恶性黑素瘤的重要靶标。目前, ERK 信号通路的靶向药物, 如 vemurafenib、abrafenib、cobimetinib 等主要抑制其上游成分 B-RAF 和 MEK, 单独使用时仅抑制肿瘤细胞增生, 停用后肿瘤复发率较高^[1]。因此研究 ERK 信号靶向药物和其他药物联合应用, 对于提高黑素瘤的远期疗效十分重要。肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)能够相对特异地诱导肿瘤细胞凋亡, 其与细胞膜表面死亡受体 4(death receptors, DR4)和 DR5 结合, 促进死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC)的形成, 启动细胞凋亡程序^[2]。然而, 许多肿瘤细胞, 包括恶性黑素瘤, 对 TRAIL 诱导的细胞毒作用并不敏感^[3]。已有研究^[4,5]报道用 B-RAF 和 MEK 抑制剂能增强黑素瘤细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性, 但直接抑制 ERK 表达对 TRAIL 抗肿瘤作用的影响目前尚未见报道。ERK 是 RAF/MEK/ERK 信号通路的功能执行者, 包括 ERK1 (P44) 和 ERK2 (P42) 两个亚型。本研究用特异的小发夹 RNA (shRNA) 分别或联合沉默 ERK 不同亚型, 旨在探讨直接抑制 ERK 蛋白表达对人黑素瘤细胞周期和 TRAIL 诱导细胞凋亡的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人恶性 A375 黑素瘤细胞系购自南京凯基生物有限公司, 含有靶向人 ERK1 (NM_002746) 和 ERK2 (NM_138957) 的 shRNA 质粒的大肠杆菌菌株由 Sigma 公司提供, Scramble 对照 shRNA 质粒、ps-PAX2、pMD2 包装质粒均由 Addgene 提供。基因重组人 TRAIL 蛋白和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒均为 Biovision Research Products 公司产品。ERK 与 pERK 抗体购自 Cell Signaling Technology 公

司, DR4 和 DR5 特异抗体购自 Immunex 公司, 同型对照抗体(小鼠 IgG $\gamma 1$) 购自 eBioscience 公司, Alexa-Fluor 488-标记的羊抗鼠 IgG 购自 Invitrogen 公司, 葡萄糖转运受体 1 (Glut1)、II 型己糖激酶(HK-II)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)、乳酸脱氢酶 A (LDH-A) 和 β -actin 抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司、碘化丙啶(propidium iodide, PI) 购自 Sigma 公司。

1.2 shRNA 慢病毒上清的制备

将 2.5×10^6 个 293FT 细胞接种于 10 cm 塑料培养皿中, 每皿含 2.5×10^6 个细胞, 在完全 DMEM 培养基中培养过夜。次日, 用 FuGen 6 试剂进行共转染, 每个培养皿含 pLKO.1 靶基因或对照 shRNA 质粒(3 μg)、PAX2(2.25 μg) 和 pMD2(0.75 μg) 包装质粒, 转染步骤按试剂说明书操作。转染 24 h 后, 每天换新鲜培养液并继续培养 2 d。分别收集转染后 48、72 h 培养上清液, 离心、分装并储存于 -80°C 低温冰箱备用。

1.3 细胞感染与处理

将 A375 黑素瘤细胞接种于 6 孔板中(30×10^4 / 孔), 培养过夜。次日, 去除培养液, 加入 PBS, 洗细胞一次。在各种 shRNA 病毒上清中加入溴化乙二胺(8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 然后以每孔 1 ml 的量加入对应孔。对 ERK1 和 ERK2 shRNA 病毒双感染的孔, 加入两种病毒上清各 1 ml。细胞感染 6 h 后, 弃掉病毒上清, 更换新鲜培养液, 继续培养 48 h 后收获细胞, 检测细胞周期。部分感染细胞在加入基因重组人 TRAIL(100 ng/ml) 继续培养 6 h, 收集贴壁与悬浮细胞。

1.4 流式细胞术检测细胞周期、细胞凋亡和细胞膜 TRAIL 受体表达

收获对照及 ERK shRNA 处理的细胞, 冷 PBS 洗一次, 缓慢加入 1 ml 预冷的 70% 乙醇, 在 4°C 固定细胞 1 h。离心弃掉乙醇, 用 PBS 洗细胞一次, 加

入 0.5 ml RNase A (DNase free, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 以去除 RNA, 然后加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的碘化丙啶染细胞 10 min, 流式细胞仪检测细胞 DNA 含量, 用 FlowJo 软件分析细胞周期。

收集 A375 细胞悬液经离心去上清后, 用 PBS 洗一次。在 500 μl Annexin-V 结合缓冲液中加入 1 μl Annexin V-FITC 和 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PI, 重悬细胞, 冰上避光孵育细胞 10 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡, 结果用 FlowJo 软件进行分析, 早期、晚期凋亡与坏死细胞计为细胞的总死亡数。

A375 细胞感染对照或 ERK1 或 ERK2 shRNA 48 h 后, 短暂胰酶消化, 并用 FACS 缓冲液 (PBS 含有 2% 胎牛血清、0.02% 叠氮钠) 洗细胞一次。然后将细胞与 TRAIL 受体 1 (DR4) 或受体 2 (DR5) 的特异抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 或同型对照抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗细胞后, 将细胞与 Alexa-Fluor 488-标记的羊抗鼠 IgG (1:400 稀释) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用 FACS 缓冲液洗细胞 2 次, 然后用流式细胞仪检测细胞表面 TRAIL 受体表达, 其表达量用平均荧光强度 (MFI) 表示。

1.5 Western blotting 检测蛋白表达

用细胞刮板收获细胞, 加入适量含有复合蛋白酶抑制剂 (Roche 公司) 与复合磷酸酶抑制剂 (Calbiochem 公司) 的 M-PER 哺乳动物蛋白提取缓冲液 (Thermo Scientific 公司), 冰浴孵育 30 min, 加以间断性涡流震荡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心后, 吸取上清为细胞总蛋白提取物。Bradford 法定量蛋白, 每个样品取 30 μg 蛋白行 SDS-PAGE。电泳结束后, 经电转膜将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上, 并用 5% 脱脂奶粉 (TBS-T 稀释) 在室温阻断膜 1 h。然后将膜与 TBS-T 适当稀释的靶蛋白特异性抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜, 并将膜与 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的相应二抗室温孵育 1 h。用 ECL 试剂和化学发光凝胶成像系统 (SYGN2/7503, 英国 Gene 公司) 显影和检测蛋白质表达信号。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件, 定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用独立样本 t 检验, 多样本均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 ERK 基因抑制人黑素瘤细胞周期的进展

用携带 ERK1 或 ERK2 亚型特异 shRNA 的慢病毒颗粒分别或联合感染 A375 黑素瘤细胞, 在感染 48 h 后检测不同亚型 ERK 总蛋白和磷酸化 ERK 蛋

白的表达水平。结果如图 1A 所示, 与对照 shRNA (SC shRNA) 相比, ERK1 和 ERK2 shRNA 处理都能特异地抑制相应亚型的 ERK 总蛋白表达水平, ERK1 的沉默效率达到 80%, ERK2 的沉默效率略低, 可能与 ERK2 在细胞内表达量高于 ERK1 有关。两种亚型 ERK shRNA 联合感染细胞则导致 ERK1 和 ERK2 的共同抑制。ERK shRNA 也显著地抑制不同亚型对应的磷酸化 ERK 的表达水平, 这提示其激酶功能也被抑制。

细胞周期分析显示, 分别沉默 ERK1 或 ERK2 均能显著抑制 A375 细胞从 G_1 进入 DNA 合成期, 表现为 85% 以上的细胞被阻滞在 G_1 期, 而 S 期和 G_2/M 期的细胞比例明显降低, 这表明 ERK1 和 ERK2 对细胞周期的作用是同样重要的。联合沉默 ERK1/2, 除表现为 G_1 周期阻滞外, G_2/M 期的细胞略多于单独沉默组, 提示联合抑制还有 G_2/M 期阻滞效应 (图 1A、1B)。检测细胞周期相关蛋白变化发现, 直接抑制 ERK 表达, 将增加细胞周期抑制蛋白 P21 和 P27 的表达, 并下调 Cyclin D1 蛋白, 而后者是促进细胞进入 S 期的关键调节因子 (图 1C)。

2.2 直接抑制 ERK 表达增强肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性

A375 细胞对 ERK shRNA 处理的早期 (48 h) 反应仅有细胞周期抑制, 并无明显的细胞死亡。正常情况下 A375 黑素瘤细胞对 TRAIL 仅有低敏感性, 对照 shRNA 处理的细胞加入 TRAIL 后仅有约 15% 的细胞发生凋亡。然而, 在分别用 ERK 亚型特异的 shRNA 处理后, 再加入 TRAIL 重组蛋白则导致 40% 以上的 A375 细胞发生早期或晚期细胞凋亡。联合沉默 ERK1 和 ERK2 再加 TRAIL 能诱导大于 60% 的肿瘤细胞发生凋亡 (图 2A、2B)。这些结果表明, 直接抑制 ERK 单一亚型即可显著提高 A375 细胞对 TRAIL 的敏感性, 而联合抑制 ERK1/2 能促进 TRAIL 发挥更强的肿瘤细胞杀伤作用。

2.3 沉默 ERK 基因增强 A375 细胞 DR4 的表达

以 ERK shRNA 处理的 A375 细胞, 不经固定和通透处理, 用死亡受体的特异抗体进行染色, 检测细胞膜表面 DR4 与 DR5 的表达水平。结果显示, 虽然 A375 细胞同时表达 DR4 和 DR5, 但 DR5 的表达量高于 DR4。基因沉默 ERK1 和 ERK2 均可显著增强 DR4 在细胞膜表面的表达水平, 而 DR5 的表达变化不明显 (图 3A、3B)。检测细胞内 DR4 的蛋白水平显示, ERK1 shRNA 上调 DR4 蛋白表达的作用最强, 而 ERK2 shRNA 对细胞内 DR4 蛋白表达的影响不明显 (图 3C), 提示 ERK1 shRNA 对 DR4 表达

的促进作用至少部分是由于 DR4 蛋白合成增加所 转移发挥作用。
引起的, 而 ERK2 shRNA 主要通过诱导 DR4 细胞膜

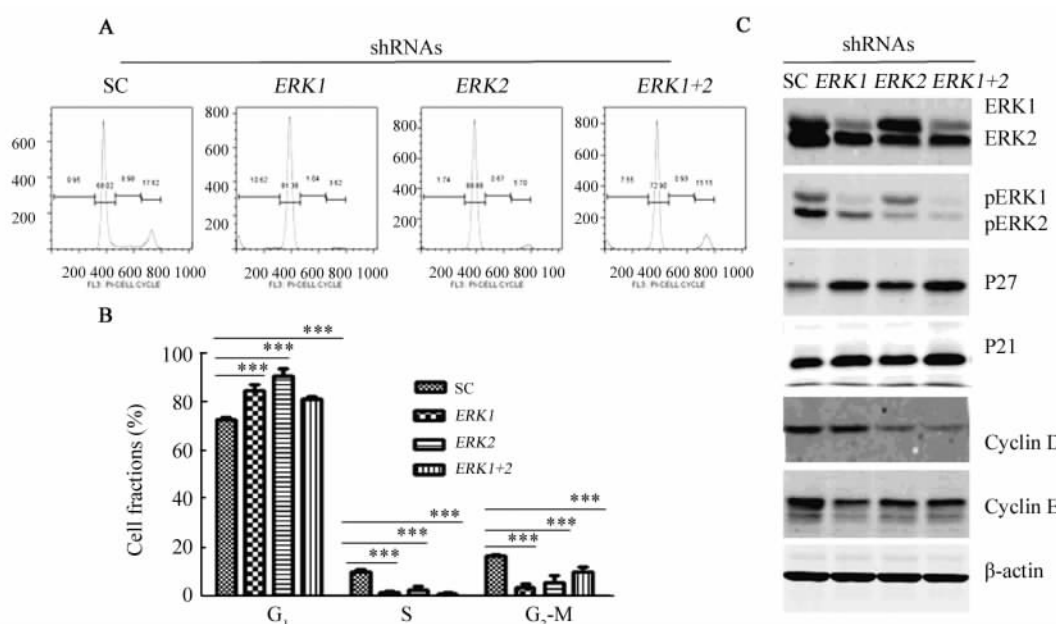


图1 直接抑制 ERK 亚型诱导 A375 细胞周期阻止而不引起细胞凋亡

Fig. 1 Directly silencing ERK isoforms induces A375 cell growth arrest but not apoptosis

A: FACS profiles of cell cycle; B: Quantitation of cell cycle; C: Proteins expression by Westen blotting
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs SC shRNA (control) group

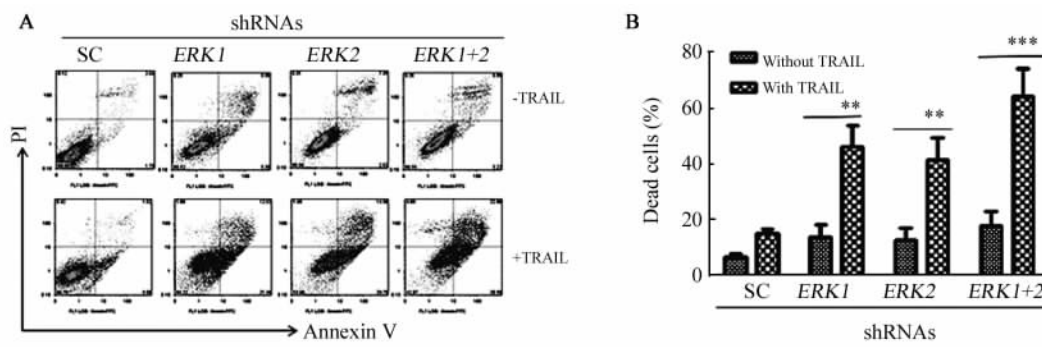


图2 基因沉默 ERK 亚型提高 TRAIL 诱导 A375 细胞死亡的敏感性

Fig. 2 Silencing ERK isoform sensitizes A375 cells to TRAIL induced cell death

A: FACS profiles of apoptosis; B: Quantitation of apoptosis
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs group without TRAL treatment

2.4 ERK shRNA 处理抑制 A375 黑素瘤细胞糖代谢中关键酶的表达

检测基因沉默 ERK 后对几种葡萄糖代谢关键酶表达的影响, 结果如图 4 所示。沉默 ERK 单一亚型或两个亚型均明显下调葡萄糖转运受体 1 (Glut 1) 和葡萄糖酵解途径的限速酶己糖激酶 II 型 (HK-II) 的表达水平。ERK shRNA 似乎不影响乳酸脱氢酶 A (LDH-A) 的表达水平, 联合抑制 ERK1/2 对戊

糖旁途径的关键酶 6-磷酸葡萄糖脱氢酶有微弱上调作用。结果提示, 抑制 ERK 表达可能降低肿瘤细胞对葡萄糖的摄入与利用。

3 讨论

尽管近年研究报道充分肯定了 RAF/MEK/ERK 信号通路在黑素瘤的病理作用, 但绝大多数实验研究主要通过靶向 B-RAF 和 MEK 等上游成分间

接抑制 ERK 功能^[6]。本研究的最大特点是用基因沉默技术直接抑制该信号通路的末端激酶 ERK, 为探讨 ERK 对肿瘤细胞增殖与凋亡的调控作用提供更准确和特异的实验证据, 有助于比较和发现抑制

ERK 通路不同环节对细胞影响的相似点与差异性; 此外, 极少有研究关注肿瘤细胞不同 ERK 亚型的功能是否完全一致, 本研究也为回答这一问题提供了新的证据。

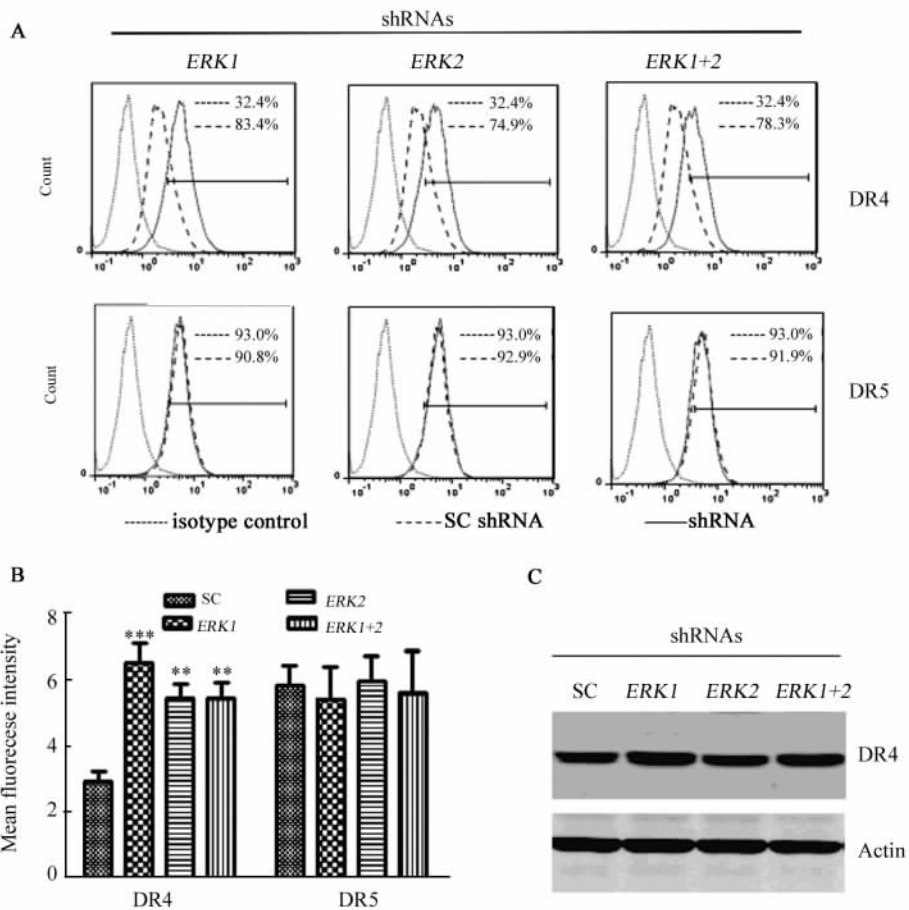


图 3 沉默 ERK 亚型增强 A375 细胞表面死亡受体 4 的表达

Fig. 3 Silencing ERK isoforms up-regulates the expression of TRAIL receptor1(DR4)

A: FACS profiles of DR expression; B: Quantitation of DRs; C: DR protein expression; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs SC shRNA (control) group

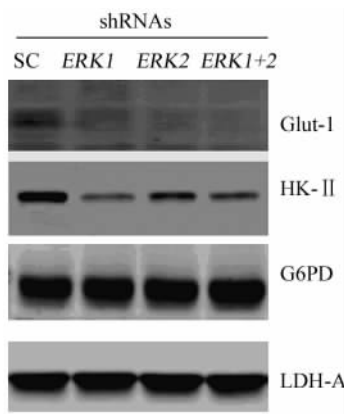


图 4 沉默 ERK 亚型影响葡萄糖代谢关键酶的表达
Fig. 4 Silencing ERK isoforms alter expressions of key enzymes involved in glucose metabolism

ERK 信号通路接收和传递促进细胞生长信号, 启动细胞周期变化, 由静止的 G_1 期相继进入活跃的 DNA 合成和有丝分裂期^[7]。本实验结果表明, 在细胞周期调控方面, 直接抑制 ERK 与抑制其上游激酶具有几乎同样的作用, 表现为典型的 G_1 期阻滞和 S 期抑制。这些改变的生化基础是 CDK 抑制蛋白 P21 和 P27 的上调和 Cyclin D1 表达的减少。本研究还证明 ERK1 和 ERK2 亚型对细胞周期调控同等重要, 抑制任何单一亚型即可阻断细胞周期进展。值得注意的是, 本实验观察的细胞周期改变只是 A375 黑素瘤细胞对 ERK shRNA 的早期反应。笔者在以前的研究中曾观察到, 延长 ERK 基因沉默时间

至4或6 d,大部分细胞发生凋亡,而ERK上游成分抑制剂依然只导致细胞周期阻滞^[8]。所以,本实验结果不能排除在改变实验条件后,直接抑制ERK会产生与靶向上游成分不同的效应。目前临床观察和实验研究^[9]都表明,靶向ERK信号通路主要抑制肿瘤细胞增殖而非导致肿瘤细胞死亡,因此疗效不能持久。此外,由于ERK信号通路上下游成分之间存在反馈调节,上游激酶抑制剂,如B-RAF抑制剂,导致ERK激酶反馈性活化,肿瘤细胞产生药物耐受^[10]。本研究直接抑制ERK蛋白表达和功能活性,这样有可能避免上游成分抑制剂反馈激活ERK的可能性,因此有理由预期ERK特异抑制剂的抗肿瘤效果将优于该信号通路上游成分的抑制剂。

本研究证实特异靶向ERK蛋白能够显著增强TRAIL诱导肿瘤细胞凋亡的能力,这与已发表的关于RAF、MEK抑制剂能增强肿瘤细胞TRAIL敏感性的报道一致^[3,4]。研究者^[11]认为,抑制ERK通路增强TRAIL抗肿瘤活性的机制是多方面的,包括上调死亡受体表达,改变Bcl-2家族蛋白成分,抑制NF κ B活性,促进细胞凋亡程序启动等。笔者观察到分别或联合沉默*ERK1*、*ERK2*亚型均可增强TRAIL受体DR4在肿瘤细胞表面的表达;DR5的表达改变不明显可能与该受体在A375细胞表达量较高,已经处于饱和状态有关。虽然DR4和DR5都能介导TRAIL诱导的细胞毒作用,但有研究^[12]表明黑素瘤细胞主要通过DR4介导TRAIL的细胞毒作用。笔者认为,上调DR4至少是抑制ERK表达,增强肿瘤细胞TRAIL敏感性的主要机制之一。

本研究尚未探讨ERK调节DR4表达的分子机制。文献^[13]报道,DR4和DR5在转录水平受细胞应激(包括DNA损伤、内质网应激)相关的转录因子P53、CHOP和NF κ B等的调节,同时也受到糖基化、蛋白质转运、细胞内吞和溶酶体降解等多种转录后调节的影响。研究^[14]表明,在黑素瘤细胞,B-raf突变抑制一种控制P53转录活性的去泛素化酶Usp5,B-raf抑制剂可以解除对Usp5的抑制,从而恢复和增强P53功能,提示靶向ERK通路可能通过P53上调DR4表达。此外,用B-raf抑制剂阻断ERK活化,能够诱导肿瘤细胞发生内质网应激^[15],而新近研究^[16]报道,内质网应激反应能够上调TRAIL受体,诱导骨髓来源的抑制细胞(MDSC)发生凋亡。直接抑制ERK表达调控TRAIL受体表达的详细机制仍有待进一步研究。

近年研究^[17]发现,肿瘤细胞能量代谢与TRAIL敏感性有密切关系。肿瘤细胞具有依赖葡萄糖有氧

糖酵解的代谢特征,即所谓的“Warburg作用”^[18]。大多数具有癌基因功能的信号分子,如AKT/mTOR、cMYC等对肿瘤细胞代谢特征有促进作用^[19]。有学者^[20]报道,降低培养液葡萄糖浓度能显著提高肿瘤细胞对TRAIL的敏感性。笔者已发表的研究^[21]证明,用己糖激酶竞争抑制剂(2-脱氧葡萄糖)预处理A375细胞,能够促进TRAIL对肿瘤细胞的杀伤作用,同时上调死亡受体在细胞膜的表达。本研究发现,抑制ERK蛋白能显著下调葡萄糖转运受体和II型己糖激酶蛋白质的表达,这将抑制肿瘤细胞对葡萄糖的摄取和利用,提示ERK信号对维持葡萄糖上游代谢,即糖酵解过程也有重要作用。因此,笔者认为抑制ERK表达,从而干扰肿瘤细胞糖代谢,是增强TRAIL抗肿瘤作用机制的新解释。

本研究证实直接抑制ERK蛋白表达能够抑制肿瘤细胞DNA合成与有丝分裂,增强肿瘤细胞对TRAIL的敏感性,其机制与上调DR4表达和抑制肿瘤细胞糖代谢有关。

[参考文献]

- [1] SULLIVAN R J, FLAHERTY K T. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(6): 1297-1304. DOI:10.1016/j.ejca.2012.11.019.
- [2] FULDA S. Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J/OL]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 818: 167-180 [2015-11-20]. <http://link.springer.com/bookseries/5584>. DOI:10.1007/978-1-4471-6458-6_8.
- [3] NEWSOM D T, PRIESKE S, WALCZAK H. Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(4): 607-623. DOI:10.1007/s10495-009-0321-2.
- [4] ZHANG X D, BORROW J M, ZHANG X Y, et al. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria [J]. *Oncogene*, 2003, 22(19): 2869-2881. DOI:10.1038/sj.onc.1206427.
- [5] BERGER A, QUAIST S A, PLOTZ M, et al. RAF inhibition overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in melanoma cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(2): 430-440. DOI:10.1038/jid.2013.347.
- [6] HERTZMAN JOHANSSON C, EGYHAZI BRAGE S. BRAF inhibitors in cancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(2): 176-182. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.11.011.
- [7] CHAMBARD J C, LEFLOCH R, POUYSSEUR J, et al. ERK implication in cell cycle regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1299-1310. DOI:10.1016/j.bbamer.2006.11.010.
- [8] QIN J, XIN H, NICKOLOFF B J. Specifically targeting ERK1 or ERK2 kills Melanoma cells [J/OL]. *J Transl Med*, 2012, 25: 10-15 [2015-11-20]. <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-10-15>. DOI: 10.1186/

- 1479-5876-10-15.
- [9] BUCHEIT A D, DAVIES M A. Emerging insights into resistance to BRAF inhibitors in melanoma [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87 (3): 381-389. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.11.013.
- [10] SULLIVAN R J, FLAHERTY K T. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49 (6): 1297-1304. DOI:10.1016/j.ejca.2012.11.019.
- [11] ZHANG L, FANG B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12 (3): 228-237. DOI:10.1038/sj.cgt.7700792.
- [12] KURBANOV B M, GEILEN C C, FECKER L F, et al. Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 125 (5): 1010-1019. DOI:10.1111/j.0022-202x.2005.23900.x.
- [13] TWOMEY J D, KIM S R, ZHAO L, et al. Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells [J/OL]. *Drug Resist Updat*, 2015, 19: 13-21 [2015-11-20]. [http://www.drugjournal.com/article/S1368-7646\(15\)00011-4/pdf](http://www.drugjournal.com/article/S1368-7646(15)00011-4/pdf). DOI: 10.1016/j.drug.2015.02.001.
- [14] POTU H, PETERSON L F, PAL A, et al. Usp5 links suppression of p53 and FAS levels in melanoma to the BRAF pathway [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (14): 5559-5569. DOI:10.18632/oncotarget.2140.
- [15] BECK D, NIESSNER H, SMALLEY K S, et al. Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells [J]. *Sci Signal*, 2013, 6 (260): ra7. DOI:10.1126/scisignal.2003057.
- [16] CONDAMINE T, KUMAR V, RAMACHANDRAN I R, et al. ER stress regulates myeloid-derived suppressor cell fate through TRAIL-R-mediated apoptosis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (6): 2626-2639. DOI:10.1172/JCI74056.
- [17] ZHAO Y, BUTLER E B, TAN M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e532. DOI:10.1038/cddis.2013.60.
- [18] ELF S E, CHEN J. Targeting glucose metabolism in patients with cancer [J]. *Cancer*, 2013, 120 (6): 774-780. DOI:10.1002/ncr.28501.
- [19] ROBEY R B, Hay N. Is Akt the “Warburg kinase”? -Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19 (1): 25-31. DOI:10.1016/j.semcancer.2008.11.010.
- [20] NAM S Y, AMOSCATO A A, LEE Y J. Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (3): 337-346. DOI:10.1038/sj.onc.1205068.
- [21] QIN J Z, XIN H, NICKOLOFF B J. 2-deoxyglucose sensitizes melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis which is reduced by mannose [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 401 (2): 293-299. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.09.054.
- [收稿日期] 2016 - 02 - 22 [修回日期] 2016 - 04 - 24
[本文编辑] 党瑞山

· 科技动态 ·

热烈祝贺本刊主编曹雪涛院士免疫细胞治疗研究项目荣获 2016 年度陈嘉庚生命科学奖

在 2016 年 6 月 1 日召开的中国科学院第十八次院士大会上,中国工程院院士、中国医学科学院院长《中国肿瘤生物治疗杂志》主编曹雪涛教授主持的“树突状细胞与免疫调控、免疫治疗的研究”荣获陈嘉庚生命科学奖,该成果发现了树突状细胞中激活免疫功能的新分子及其调控机制,并显示出良好的应用前景。免疫学根本的科学问题是有效识别和清除病原体并保护自身稳定,树突状细胞是机体行使免疫基本功能即免疫识别与免疫应答的重要免疫细胞,曹雪涛院士研究团队与合作者对于树突状细胞的生物学特性、免疫学功能及其作用机制进行了系统和深入研究,从中发现了具有自主知识产权的免疫新分子,研究了免疫应答新途径和新机制;发现了新型树突状细胞亚群及其功能;系统分析了树突状细胞和单核巨噬细胞如何选择性地识别病原体并激发天然免疫应答机制。基于理论研究成果,经国家食品药品监督总局(CFDA)批准将树突状细胞疫苗应用于Ⅱ期临床试治晚期转移性肿瘤患者,取得了令人振奋的临床疗效。近年来,以树突状细胞、巨噬细胞为细胞模型,研究了表观遗传修饰在免疫与炎症发生与消退中的作用及相关机制,提出了新的抗炎治疗靶点与策略。

陈嘉庚科学奖和陈嘉庚青年科学奖是以对我国科教事业发展做出杰出贡献的著名爱国侨领陈嘉庚先生命名的科技奖项。从 2003 年设立以来,已有 28 位杰出科学家获得陈嘉庚科学奖,14 位青年科学家获得陈嘉庚青年科学奖。

(本刊编辑部)