

# 肿瘤细胞死亡受体的调控

郝花花 孔庆宏 王冠林\* 张宽仁

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

**摘要** 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)只有与细胞膜上死亡受体结合才能促使癌细胞凋亡,一旦细胞膜上的死亡受体发生缺失或失去活性,将使癌细胞对TRAIL极为耐受。近年来,对死亡受体的研究发现,死亡受体异常表达可能是死亡受体在细胞膜上发生功能性缺失的最主要原因。该文主要探究肿瘤细胞中死亡受体在转录调控、翻译后修饰、转运和内化过程中的异常情况,期望为今后研发克服TRAIL耐受的联合药物及癌症治疗提供参考。

**关键词** 死亡受体; 转录; 翻译后修饰; 转运; 内化; 凋亡因子耐受; 癌症治疗

## The Regulation of Death Receptors in Tumor Cells

Hao Huahua, Kong Qinghong, Wang Guanlin\*, Chang Kwenjen

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract** Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) can induce tumor apoptosis only after binding to its cognate death receptors (DRs) on the plasma membrane. The loss of DRs on the surface of cancer cells will result in tumor resistance to TRAIL-induced apoptosis and cell death. Recent studies have demonstrated that abnormal expression of death receptors may be the primary cause of the loss of cell surface death receptors. This review highlights the abnormal situation of death receptors in tumor cells, including the regulatory roles of transcription, post-translation modifications, trafficking and internalization, are possible mechanisms for the loss of death receptors in cell surface. This review provides a further reference theoretical basis for the development of multiple drugs combination therapy to overcome TRAIL resistance and to improve cancer therapy.

**Keywords** death receptors; transcription; post-translation modifications; trafficking; internalization; TRAIL resistance; cancer therapy

恶性肿瘤是全球死亡率最高的疾病,然而药物耐受是目前治疗肿瘤失败最主要的原因之一,因此在肿瘤治疗方面需要探索新的治疗方法及药物。随着对肿瘤发病机制的不断深入研究,发现了许多诱导细胞凋亡的配体及受体,肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是近年发现的一种高效低毒

的新型抗肿瘤蛋白质药物,因其具有选择性诱导肿瘤细胞凋亡的特点而备受关注<sup>[1]</sup>。

然而,有一半以上的肿瘤细胞对TRAIL受体介导的凋亡产生耐受,从而限制了它们在肿瘤治疗中的应用。究其原因,一是在TRAIL信号通路中存在多种异常表达的调控因子,如凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis, IAP)、Bcl-2(B-cell lymphoma-2)、细胞型

收稿日期: 2016-04-06 接受日期: 2016-05-03

国家自然科学基金(批准号: 81260351、81360162)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0871-65920747, E-mail: glwang83@gmail.com

Received: April 6, 2016 Accepted: May 3, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81260351, 81360162)

\*Corresponding author. Tel: +86-871-65920747, E-mail: glwang83@gmail.com

网络出版时间: 2016-07-25 15:30:39 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160725.1530.004.html>

Fas相关死亡域样白介素-1 $\beta$ 转换酶抑制蛋白(cellular FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein, c-FLIP)等<sup>[2]</sup>; 二是与肿瘤细胞膜表面缺乏功能性死亡受体(death receptors, DRs)<sup>[3-4]</sup>有关。值得注意的是, 由于DRs处于凋亡通路的最上游位置, 无论肿瘤细胞的下游信号通路正常与否, 只要细胞膜表面缺乏功能性DRs就可以导致信号通路中断, 从而引起肿瘤细胞对TRAIL耐受。本综述主要针对肿瘤细胞膜表面缺乏功能性死亡受体的相关机制作一阐述, 为药物研发及临床治疗提供可能的新思路。

## 1 TRAIL受体

到目前为止已发现, TRAIL受体有五个成员<sup>[5]</sup>, 两个死亡受体(death receptor 4/5, DR4/5)、两个诱骗受体(decoy receptor 1/2, DcR1/2)和一个可溶性受体(osteoprotegerin, OPG)。两个死亡受体结构相似[包括胞外N-端的一个信号肽、两个半胱氨酸富集区-CRD; 一个跨膜域; 胞内C-端传递凋亡信号的死亡结构域(death domain, DD)], 氨基酸残基分别为468个和411个, 都可以被TRAIL结合传递凋亡信号, 又称为TRAIL的功能型受体。两个诱骗受体在结构上有所不同: DcR1没有胞内区, DcR2的胞内区不完整, 可溶性受体OPG由401个氨基酸组成, 是调节破骨有关的TNF(tumor necrosis factor)受体分泌型糖蛋白, 它们虽能与TRAIL结合, 但不能传递凋亡信号。

## 2 TRAIL凋亡通路

由于DRs是TRAIL功能性死亡受体, TRAIL只有与表达在细胞膜表面的DRs结合才会活化形成三聚体, 募集Fas相关死亡结构域(Fas associated death domain, FADD)连接蛋白, 随后无活性的前胱冬肽酶(procaspase-8/-10)被募集到FADD的死亡效应结构域(death effector domain, DED)上形成死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex, DISC), 激活为胱冬肽酶-8(caspase-8), 然后通过两条途径传递死亡信号: (1)外源性凋亡途径, 活化的胱冬肽酶-8可以直接激活下游胱冬肽酶-3/-6/-7, 诱发细胞凋亡; (2)内源性凋亡途径, 又称线粒体依赖型通路, 活化的胱冬肽酶-8不足的情况下, 会切割Bcl-2家族中的Bid(Bcl-2 inhibitory BH3-domain)蛋白, 形成tBid后与Bax(Bcl-2 associated X protein)、Bak(Bcl-2 associated k protein)共同作用于线粒体膜上促进线

粒体释放细胞色素c(cytochrome c, cyt-c)及第二线粒体来源的胱冬肽酶激活剂(second mitochondria-derived activator of caspases, Smac)到细胞质中, 其中细胞色素c与凋亡酶激活因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)结合, 形成凋亡酶体激活胱冬肽酶-9或者激活胱冬肽酶-3/-6/-7, 最终诱导细胞凋亡(图1)。

## 3 DRs在肿瘤细胞膜表面的表达缺失对TRAIL敏感性的影响

许多肿瘤细胞对TRAIL诱导的凋亡是敏感的, 但也有耐药的。目前研究表明, 影响TRAIL敏感性的因素有很多, 其中就包括细胞膜表面缺失TRAIL死亡受体<sup>[6]</sup>。Zhang等<sup>[7]</sup>用TRAIL处理6种人乳腺癌细胞株后发现, 对TRAIL产生耐受的原因与细胞膜表面DR4和DR5任意一个缺失或者两者都缺失有关, 恢复它们的表达可恢复这些细胞株对TRAIL的敏感性。Jin等<sup>[8]</sup>在研究人类结肠癌SW480细胞为什么会产生TRAIL耐受时, 发现DR4 mRNA和蛋白质水平在对TRAIL敏感的亲代细胞和对TRAIL耐受的克隆细胞中完全相同, 但是在对TRAIL耐受的克隆细胞膜表面的DR4蛋白质呈阴性。随后用衣霉素(tunicamycin)预先处理耐受的细胞后发现, 细胞膜表面DRs表达有所增加并且重新获得对TRAIL的敏感性。

因此, 细胞膜上缺失DRs或在细胞错误位置产生DRs都不能诱导细胞凋亡。根据目前的相关研究发现产生这些现象的原因主要与DRs相关调控、转运、内化过程中可能参与的各种因子有关。

## 4 DRs的调控

大量研究表明, TRAIL的促凋亡作用只有通过与肿瘤细胞表面高表达的DRs结合才能实现, 对TRAIL诱导凋亡敏感的细胞株通常表现为DRs的过表达; 反之, DRs功能性缺失的细胞株均表现为对TRAIL的耐受<sup>[8]</sup>。因此, 了解DRs的基因表达调控、蛋白质修饰过程有助于阐明肿瘤细胞对TRAIL耐受的一些潜在的原因。

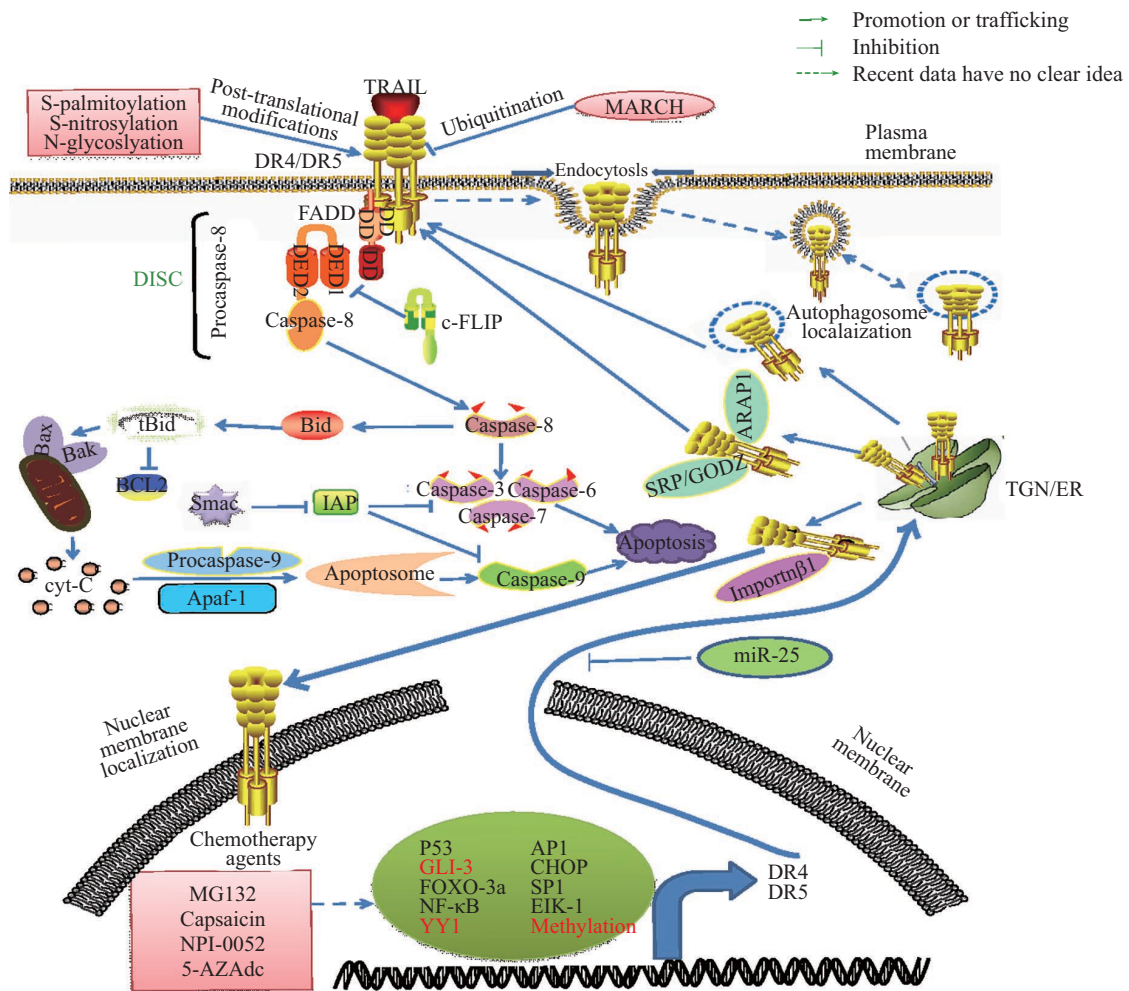
### 4.1 DR4、DR5的转录调控

相关研究表明, DRs启动子高甲基化能在很大程度上影响DRs的转录活化进而降低TRAIL诱导肿瘤细胞的凋亡; 反之, 去甲基化后可以使肿瘤细胞重新获得对TRAIL的敏感性<sup>[9]</sup>。Hopkins-Donaldson

等<sup>[10]</sup>通过甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MS-PCR)技术检测小细胞肺癌中基因甲基化状态,结果在小细胞肺癌细胞系(N417和NCI-H69、SW2、OH-1、OH-3)等细胞株中发现DR4和胱冬肽酶-8基因的CpG岛甲基化;随后用去甲基化试剂5'-氮杂-2'-脱氧胞苷(5'-Aza-2'-deoxy cytidine, 5-AZAdC)和IFN- $\gamma$ (interferon-gamma)处理后部分(如N417)细胞株恢复了DR4、胱冬肽酶-8的表达并增加了对TRAIL诱导的细胞死亡敏感性。

DRs的转录除了受甲基化的影响之外,还受多种应激诱导转录因子的调控(图1)。其一,包括对死亡受体都能起到调控作用的因子,如AP1(ancillary protein 1)<sup>[11]</sup>、NF- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B)<sup>[12]</sup>、FoXo3a(Forkhead box o3a)<sup>[13]</sup>、p53、CHOP(CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein)<sup>[14]</sup>。过

去研究发现,表达突变型p53的肿瘤细胞在DRs激动剂型抗体诱导下能发生凋亡,然而,现在有报道证实p53是DRs的转录因子<sup>[15-16]</sup>,还有一些化疗药物主要依赖p53调控DR5的表达最终改善TRAIL诱导凋亡的能力<sup>[17]</sup>。CHOP不仅靶向结合DR5启动子区域-289~-253<sup>[18]</sup>,还能与EIK1(member of ETS oncogene family)联合调控DR5的表达<sup>[19]</sup>。其二,包括只能选择调控一种死亡受体的因子,如YY1(Yin Yang 1)和Sp1(specificity protein 1)只能选择性调控DR5的转录,GLI-3(GLI family zinger 3)只能选择性调控DR4转录。其中,YY1是DR5的一个转录抑制因子,不仅靶向结合DR5启动子区域-804~-794<sup>[20]</sup>,而且会受到NF- $\kappa$ B传递的信号的影响<sup>[21]</sup>。Sp1不仅靶向结合DR5启动子区域-198~-116<sup>[20]</sup>,还以Notch1(Notch homology 1, translocation-associated)依赖的方式调



SRP: 信号识别颗粒; TGN: 反面高尔基体管网状结构; ER: 内质网。

SRP: signal recognition particle; TGN: trans Golgi network; ER: endoplasmic reticulum.

图1 TRAIL诱导的凋亡途径及死亡受体的调控(根据参考文献[4]修改)

Fig.1 TRAIL-induced apoptosis signal pathway and the regulation of death receptors (modified from reference [4])

控DR5的表达, Fassl等<sup>[22]</sup>用染色质免疫沉淀法发现, 抑制Notch1后, Sp1显著地聚集在DR5启动子区域, 用报告基因实验发现只有离DR5转录起始位置较远的Sp1结合位点才会对Notch1介导的DR5转录活性有影响。Kurita等<sup>[23]</sup>用荧光素酶、染色质免疫沉淀及表达分析实验表明, 转录因子GLI-3与DR4的启动子区域相结合, 进一步用小干扰RNA的方法敲除GLI-3后, 发现DR4在胆管癌细胞中的表达及其对TRAIL诱导凋亡的敏感性都有所恢复而对DR5的表达却没有影响。

除此之外, 还有一些微小RNA分子(microRNA, miRNA), 如miR-25抑制DR4的表达(图1), miR-135a-3p<sup>[24]</sup>促进DR5的表达。其中, Razumilava等<sup>[25]</sup>发现, 在胆管癌细胞系和患者组织样本中一个抗凋亡microRNA, miR-25表达增加, 用荧光素酶报告基因实验及免疫荧光技术发现, miR-25靶向DR4 3'UTR抑制DR4的表达, 促进胆管癌细胞系对TRAIL诱导凋亡的耐受, 之后在细胞培养中, 又用环巴胺(cyclopamine)抑制Hedgehog(Hh)信号通路后, 发现不仅miR-25的表达随之降低, 而且增加了胆管癌细胞系对TRAIL诱导凋亡的敏感性。

## 4.2 DR4、DR5的翻译后修饰

DRs的表达存在复杂的翻译后修饰过程, 包括蛋白质的糖基化、棕榈酰化(palmitoylation)及亚硝基化(nitrosylation)修饰(图1)。因此, 在这些翻译后修饰过程中发生任何异常情况都能引起大多数肿瘤细胞对TRAIL产生耐受。

4.2.1 TRAL受体的糖基化修饰 有相关报道, DRs O-糖基化能够增加它们的膜稳定性, 从而阻碍内吞作用, 最终增强肿瘤细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感性<sup>[26]</sup>。DR5的糖基化修饰属于O-糖基化, 在N-乙酰半乳糖转移酶3/14(N-acetylgalactosaminyltransferase 3/14, GALNT3、GALNT14)、 $\alpha$ -(1,3)-岩藻糖转移酶 $[\alpha$ -(1,3)-fucosyltransferase, FUT]的作用下, 使N-乙酰半乳糖(N-acetyl-galactosamine, GalNAC)与DR5胞外多肽的Ser/Thr残基相连接, 增加DR4和DR5糖基化水平, 从而增强结肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、黑色素瘤细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感性<sup>[27]</sup>。Wagner等<sup>[27]</sup>发现, 大部分对TRAIL敏感的肿瘤细胞系都高表达O-糖基转移酶, 反之, 敲除GALWT14后, 再用TRAIL处理PSN-1细胞, 结果显示, DR4/DR5的转运减少, 异位增加, 细胞膜上的数量也随之减

少, DISC的募集及胱冬肽酶-8的活化都受到了抑制, PSN-1细胞对TRAIL诱导凋亡敏感性也降低了, 进一步说明蛋白质糖基化修饰能够影响肿瘤细胞对TRAIL的敏感性。

4.2.2 TRAL受体的棕榈酰化及亚硝基化修饰 在调节死亡受体蛋白质水平上, 棕榈酰化及亚硝基化同样扮演重要角色。Rossin等<sup>[28]</sup>研究发现, DR4在靠近跨膜域的胞内段上有三个特有的半胱氨酸残基cys261-263, 其中至少两个半胱氨酸残基会被棕榈酰化修饰从而使DR4定位在脂筏中, 而脂筏是富含胆固醇和鞘磷脂的一种特殊膜结构, 它能够促进DR4的同源寡聚化及随后TRAIL介导的凋亡信号转导。Tang等<sup>[29]</sup>用NO-cb1处理人皮肤黑色素瘤、肾癌细胞及卵巢癌细胞系后, 发现NO-Cb1能与DR4C336的巯基共价连接从而使DR4受到s-亚硝基修饰, 随后激活胱冬肽酶-8, 最终促进肿瘤细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感性。最新研究还发现, 在肝癌细胞HepG2中, 索拉菲尼(Sorafenib)能够减少NO供体(NO donors)对死亡受体s-亚硝基修饰及增加死亡受体表达的作用<sup>[30]</sup>。

## 4.3 TRAIL受体的转运

DRs在一些转运蛋白(如Arf和RhoGAP适配蛋白1(Arf and Rho GAP adapter protein, ARAP1)、核输入蛋白 $\beta$ 1(import  $\beta$ 1)、信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)、DHHC型锌指蛋白[Golgi-specific Asp-His-His-Cys (DHHC) zinc finger protein, GODZ]的调控下从转运高尔基体易位到细胞膜上, 其中任何一个相关蛋白质生物功能失活都会使死亡受体滞留在细胞核、细胞质、高尔基体中, 反而使细胞膜上缺乏DRs最终引起TRAIL耐受(图1)。相关研究发现, ARAP1的C-端突变体, 即从1 190~1 450位且缺乏外显子30, ARAP1-C $\Delta$ exon30, 通过其C-末端的RA部分区域及PH5区域段靶向DR4的DD保守残基区域段将DR4从内质网或高尔基体转运到细胞膜, 促进TRAIL诱导的凋亡<sup>[31]</sup>。其中, SRP是一个核糖核蛋白复合体(ribonucleo protein, RNP), 能够靶向分泌型和膜型蛋白到内质网从而激活蛋白的分选过程; SRP72和SRP54是SRP复合体的两个亚基, 它们能够调控DR4在细胞膜上的定位及TRAIL诱导的凋亡<sup>[32]</sup>。GODZ是一个整合膜蛋白, 有四个跨膜域, 一个DHHC-CRD(半胱氨酸残基聚集域)区域, 其通过DHHC结构域靶向DR4运输到细胞膜从

而促进TRAIL诱导的凋亡<sup>[33]</sup>。Kojima等<sup>[34]</sup>用共聚焦显微技术(confocal microscop)发现,大部分DR5定位在对TRAIL耐受的宫颈癌HeLa、肝癌细胞HepG-2细胞的细胞核内,反而在对TRAIL敏感的人前列腺癌细胞系DU145的细胞核内却没有发现DR5的存在。用免疫沉淀(immunoprecipitation)及蛋白质印记(Western blot)技术进一步研究发现,是因为DR5中有两个核定位信号,核输入蛋白 $\beta$ 1能与其共定位并将它输送到细胞核,使细胞膜上的DR5数量减少。Haselmann等<sup>[35]</sup>也发现,相对于正常细胞,DR5在胰腺癌细胞核中有更多的表达。同时还发现,DR5在细胞核内与细胞膜上的功能不同,在细胞核内它能影响抑癌基因let-7前体成熟过程,增加高迁移率族蛋白A2(high mobility group A2, HMG A2)及RNA结合蛋白Lin28B的表达,促进癌细胞的增殖,起着致癌基因的作用,但是其具体机制还需进一步研究。

#### 4.4 TRAIL受体的内化

TRAIL与TNF $\alpha$ 、FasL不同,不需要内化就能传递凋亡信号,然而它与DRs结合后,DRs会发生内吞并且会对传递的凋亡信号造成巨大的影响。研究发现,在许多肿瘤细胞系中包括胸腺癌细胞,TRAIL能够加速DRs的内化,随之会上调凋亡抑制蛋白的表达、阻碍胱冬肽酶级联活化反应<sup>[36]</sup>并且抑制线粒体反应<sup>[37]</sup>,最终形成获得性TRAIL耐受。

有许多内化的机制能够导致细胞膜上缺乏TRAIL死亡受体,引起TRAIL的耐受,这些机制包括:快速网格蛋白依赖的内吞作用(rapid clathrin-dependent endocytosis, CDE)<sup>[38]</sup>、非网格蛋白依赖的内吞作用(clathrin-independent endocytosis, CIE)<sup>[39]</sup>、溶酶体的降解<sup>[40]</sup>或自噬体的共定位<sup>[41]</sup>等(图1)。

有些癌细胞可能是依赖网格蛋白的内吞作用使DRs内化并且这种内吞作用还会受到相关激酶的调控。在人类胸腺癌细胞系MDA-MB-231中,Zhang等<sup>[36]</sup>发现,在TRAIL传递凋亡信号过程中虽然不需要TRAIL及死亡受体的内化,但是他们用CDE的抑制剂氯丙嗪(chlorpromazine, cpz),处理MDA-MB-231后会使细胞膜上DRs减少的数量有所下降,随后分别用CIE的抑制剂filipinIII、cpz与TRAIL联合处理此细胞后发现,只有cpz能增强TRAIL诱导凋亡的能力,而filipinIII没有此作用,由此进一步说明人类胸腺癌细胞系MDA-MB-231是利用网格蛋白依赖的途径使TRAIL及受体内化成为TRAIL耐受的机制

之一。So等<sup>[42]</sup>发现,AP2相关激酶1(AP2-associated kinase 1, AAK1)通过对接头蛋白2(adaptor protein 2, AP2)复合体的接头相关蛋白复合物2M1(adaptor-related protein complex 2 M 1, AP2M1)组件的磷酸化能够促进网格蛋白的组装从而以网格蛋白依赖的方式促进TRAIL及受体的内吞,并且相对于转染空质粒载体的细胞,在稳定表达AAK1、包含PX域的丝氨酸/苏氨酸激酶(PX domain-containing serine/threonine kinase, PXX)的结肠直肠癌细胞系DLD-1中能够检测到更多带有FLAG标签的TRAIL。

在人类B细胞淋巴瘤细胞系BJAB中,Kohlhaas等<sup>[39]</sup>发现,TRAIL及死亡受体是以非网格蛋白依赖的方式发生内吞。这种内化还有可能受H-Ras的调控<sup>[43]</sup>。

在胸腺癌细胞系MDA-MB-231中,Zhang等<sup>[36]</sup>发现,TRAIL在诱导胱冬肽酶活化的同时还能使死亡受体内化,关键是DR4内化后还会被切割,反之,用靶向胱冬肽酶的抑制剂Z-VAD-fmk处理该细胞后,DR4就不被切割,由此说明DR4内吞后会成为胱冬肽酶的底物从而被降解。

TRAIL及受体内吞之后,c-cbl1、MARCH、Rab7会将死亡受体运送至溶酶体将其降解,同时还会阻碍死亡受体重新返回细胞膜与TRAIL结合。

Song等<sup>[44]</sup>研究发现,c-cbl1中Try371磷酸化后可以作为E3泛素连接酶对TRAIL死亡受体进行泛素化,之后被溶酶体降解。除此之外,Yan等<sup>[45]</sup>发现,c-cbl1还可以通过JNK/MAPK信号通路来调控细胞膜上TRAIL死亡受体的数量。所以,c-cbl1也可以成为一个新的治疗靶点,调控细胞膜上的死亡受体,恢复肿瘤细胞对TRAIL的敏感性。

一些膜相关的RING-CH(MARCH)连接酶[membrane-associated RING-CH (MARCH-8) ligase]也能靶向膜分子使其泛素化(图1)。其中,MARCH-1和MARCH-8就能够泛素化DR4Lys-273,溶酶体会以此为靶点将其降解从而下调细胞膜表面DR4的表达,进一步用小干扰RNA方法发现内源性的MARCH-8也能靶向DR4泛素化及减弱其在细胞膜上的稳定表达<sup>[46]</sup>。

Rab7能将膜受体从早期的内吞体运送到溶酶体。Akazawa等<sup>[40]</sup>用免疫印迹法及共聚焦显微技术共同证明了用TRAIL处理表达DR5-EGFP的肝癌细胞系Huh-7细胞后,DR5与溶酶体共定位。随后用干

表1 死亡受体靶向药物及其作用原理  
Table 1 Medicine targets DRs and its mechanism

作用靶点 Target	研究药物 Agent	作用原理 Mechanism	参考文献 Reference
YY1	NPI-0052	Inhibition of the transcription repressor YY1, increasing in both surface and total DR5 protein expression	[48]
CHOP	Carnosic acid	CHOP-dependent up-regulation of DR5 at the post translational levels	[49]
Sp1	Capsaicin	Sp1-mediated up-regulation of DR5 surface expression	[50]
p53	Trifluorothymidine	Increased the expression of p53 and p53-dependent DR5 expression	[51]
ROS-JNK-CHOP	Tanshinone II a	Up-regulation of DR5 expression	[52]
Unknown	FTY720	Up-regulation of DR5 at the post translational levels	[53]
UPS	b-AP15	Inhibition of proteasome deubiquitinase activity and up-regulation of DR5 surface expression	[54]
Histone deacetylase	MS-275	Up-regulation of DR4 surface expression	[55]
CIE	Pitstop2	Inhibition of clathrin-independent endocytosis	[56]
Dynein	Dyngo4a <sup>m</sup>	Inhibition of clathrin-mediated endocytosis	[57]
PI3K	SF126	Inhibition of autophagy	[58]

UPS: 泛素化蛋白酶体系统; CIE: 非网格蛋白介导的内吞。

UPS: Ubiquitin-proteasome system; CIE: clathrin-independent endocytosis.

扰RNA方法敲低Rab7后表明, 在Huh-7细胞中是依赖Rab7将DR5运输到溶酶体。

最近有研究表明, 化疗药物耐受与自噬也存在相互联系, 在自噬过程中会受到复杂的信号网络的调控, 包括Beclin-1、微管相关蛋白1A/1B-轻链3(LC3)及ATG7等<sup>[47]</sup>。Di等<sup>[41]</sup>用LC3免疫印迹法(LC3 immunoblotting)、RFP-LC3荧光显微法(RFP-LC3 fluorescence microscopy)、电子显微法在TRAIL耐受的胸腺癌细胞系(BT474和AU565)及小鼠BT474移植瘤模型中都检测到了高水平自噬体的存在, 并发现DRs与LC3共同定位在BT474细胞的自噬体中, 随后用自噬抑制剂3-MA、siATG7抑制自噬后能够恢复细胞表面DR4/DR5的表达同时还能增强BT474和AU565对TRAIL的敏感性; 但是他们还发现, 在对TRAIL敏感胸腺癌细胞系MDA-MB-231中抑制溶酶体活性后不仅会阻碍自噬而且还会降低此细胞对TRAIL的敏感性。除此之外, Han等<sup>[47]</sup>在对TRAIL耐受的一些细胞中(如过表达c-FLIP的Hct116、没有Bax表达的Hct116)发现了一些自噬相关蛋白, 进一步用干扰RAN的方法敲低自噬基因*beclin-1*会激活依赖胱冬肽酶-8的线粒体凋亡途径。这些结果表明, 靶向自噬不同的阶段可能会对TRAIL诱导的凋亡产生不同的效应, 这可能取决于细胞类型、肿瘤细胞

发展的阶段及基础自噬体的状态。

如上所述, 细胞膜上的TRAIL及其受体会依赖不同形式发生内吞, 随之又会被分选循环到细胞膜上或是经历依赖胱冬肽酶活化的降解、溶酶体的降解及与自噬体共定位, 使细胞膜上的死亡受体数量减少从而产生TRAIL耐受。

## 5 结语

近十年来, 众多研究者们一直在寻找新颖的癌症治疗方法并且目标主要集中在具有特异性、靶向性、毒副作用较少的药物方面。诱导肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的方法之一, 也是现今肿瘤学研究的一个热点方向。TRAIL具有特异性、靶向性、毒副作用较少等特点, 具有良好的应用前景, 但许多肿瘤细胞对TRAIL具有耐受性。根据TRAIL诱导肿瘤细胞凋亡通路及机制, 导致耐受的原因有很多, c-FLIP在很多肿瘤细胞中过表达, DRs在很多肿瘤细胞膜表面缺失, 这些都是导致TRAIL耐受的重要原因。

然而, 目前还没有发现针对c-FLIP的专一性抑制剂, 还有许多能使细胞膜缺失DRs的相关机制尚未阐明。一些可能引起细胞膜表面缺失DRs的靶点及相应的一些治疗药物都集中在(表1)中, 但是这些药物大部分都还处于临床前研究, 并且在寻找

提高DRs表达的药物过程中,发现很多药物或化合物能够提高DRs表达的却不能被广泛应用。比如FTY720虽能在翻译后水平调整DR5蛋白质的稳定,然而具体的作用靶点还不明确。还有一些营养制品(nutraceuticals)在提高DRs的表达的同时还能激活存活通路,增加肿瘤细胞对TRAIL的耐受性。

DRs及c-FLIP是凋亡信号启动的起始及关键环节。基于其重要性,我们在抗凋亡蛋白c-FLIPs为靶向的肿瘤特异性药物筛选细胞系的构建中发现,在常温下,用一定浓度TRAIL处理稳定表达绿色荧光标记的c-FLIPs细胞时,发现绿色荧光没有发生聚集。我们推测有两种原因可能会产生这种结果:(1)该细胞膜上的DRs表达较低;(2)在常温下,细胞膜上的DRs发生了内吞。其中,绿色荧光不发生聚集的具体机制还有待作进一步研究。希望以后能将重点主要集中在能使细胞表面缺失DRs的可能作用靶点上并以细胞存亡调控蛋白c-FLIP为靶点筛选出它的专一性抑制剂。如果能解决上游凋亡通路中这两大障碍,不仅能激活外源性凋亡通路,还能为进一步TRAIL耐受药物联合治疗的研发中提供一些潜在的治疗靶点。

### 参考文献 (References)

- Kim Y, Seol DW. TRAIL, a mighty apoptosis inducer. *Mol Cell* 2003; 15(3): 283-93.
- 施鹏飞, 王冠林, 张宽仁. 死亡受体信号通路耐受机制及肿瘤治疗. 生命的化学(Shi Pengfei, Wang Guanlin, Chang Kwenjen. Resistance mechanism in the death receptors mediated apoptosis signaling pathways and cancer therapy. *Chemistry of Life*) 2015; 35(5): 615-21.
- Snow AL, Vaysberg M, Krams SM, Martinez OM. EBV+ B lymphoma cell lines from patients with post-transplant lymphoproliferative disease are resistant to TRAIL-induced apoptosis. *Am J Transplantat* 2006; 6(5): 976-85.
- Twomey JD, Kim SR, Zhao L, Bozza WP, Zhang B. Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells. *Drug Resist Updat* 2015; 19: 13-21.
- Humphreys RC, Halpern W. Trail receptors: Targets for cancer therapy. *Adv Exp Med Biol* 2008; 615: 127-58.
- Chen JJ, Shen HC, Rivera Rosado LA, Zhang Y, Di X, Zhang B. Mislocalization of death receptors correlates with cellular resistance to their cognate ligands in human breast cancer cells. *Oncotarget* 2012; 3(8): 833-42.
- Zhang Y, Zhang B. TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res* 2008; 6(12): 1861-71.
- Jin Z, McDonald ER 3rd, Dicker DT, El-Deiry WS. Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(34): 35829-39.
- Bae SI, Cheriya V, Jacobs BS, Reu FJ, Borden EC. Reversal of methylation silencing of Apo2L/TRAIL receptor 1 (DR4) expression overcomes resistance of SK-MEL-3 and SK-MEL-28 melanoma cells to interferons (IFNs) or Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 2008; 27(4): 490-8.
- Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandioler D, Ludwig C, *et al.* Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ* 2003; 10(3): 356-64.
- Portanova P, Notaro A, Pellerito O, Sabella S, Giuliano M, Calvaruso G. Notch inhibition restores TRAIL-mediated apoptosis via AP1-dependent upregulation of DR4 and DR5 TRAIL receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Oncol* 2013; 43(1): 121-30.
- Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gelinis C, *et al.* Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4): 409-16.
- Shoeb M, Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase inhibition enhances TRAIL-induced human colon cancer cell apoptosis through AKT/FOXO3a-dependent upregulation of death receptors. *Free Radic Biol Med* 2013; 63: 280-90.
- Jin HO, Lee YH, Park JA, Kim JH, Hong SE, Kim HA, *et al.* Blockage of Stat3 enhances the sensitivity of NSCLC cells to PI3K/mTOR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444(4): 502-8.
- Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* 2000; 19(14): 1735-43.
- Guan B, Yue P, Clayman GL, Sun SY. Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *J Cell Physiol* 2001; 188(1): 98-105.
- Mahalingam D, Mita A, Sankhala K, Swords R, Kelly K, Giles F, *et al.* Targeting sarcomas: novel biological agents and future perspectives. *Curr Drug Targets* 2009; 10(10): 937-49.
- Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Horinaka M, Wakada M, Mizutani Y, *et al.* Proteasome inhibitor MG132 induces death receptor 5 through CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein. *Cancer Res* 2005; 65(13): 5662-7.
- Oh YT, Liu X, Yue P, Kang S, Chen J, Taunton J, *et al.* ERK/ribosomal S6 kinase (RSK) signaling positively regulates death receptor 5 expression through co-activation of CHOP and Elk1. *J Biol Chem* 2010; 285(53): 41310-9.
- Yoshida T, Maeda A, Tani N, Sakai T. Promoter structure and transcription initiation sites of the human death receptor 5/TRAIL-R2 gene. *FEBS Lett* 2001; 507(3): 381-5.
- Baritaki S, Huerta-Yepez S, Sakai T, Spandidos DA, Bonavida B. Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis: Up-regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(4): 1387-99.
- Fassl A, Tagscherer KE, Richter J, de-Castro Arce J, Savini C, Rosl F, *et al.* Inhibition of Notch1 signaling overcomes resistance to the death ligand Trail by specificity protein 1-dependent upregulation of death receptor 5. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1921.

- 23 Kurita S, Mott JL, Almada LL, Bronk SF, Werneburg NW, Sun SY, *et al.* GLI3-dependent repression of DR4 mediates hedgehog antagonism of TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 2010; 29(34): 4848-58.
- 24 Shin EA, Sohn EJ, Won G, Choi JU, Jeong M, Kim B, *et al.* Upregulation of microRNA135a-3p and death receptor 5 plays a critical role in Tanshinone I sensitized prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis. *Oncotarget* 2014; 5(14): 5624-36.
- 25 Razumilava N, Bronk SF, Smoot RL, Fingas CD, Werneburg NW, Roberts LR, *et al.* miR-25 targets TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) death receptor-4 and promotes apoptosis resistance in cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2012; 55(2): 465-75.
- 26 Wu YH, Yang CY, Chien WL, Lin KI, Lai MZ. Removal of syndecan-1 promotes TRAIL-induced apoptosis in myeloma cells. *J Immunol* 2012; 188(6): 2914-21.
- 27 Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, *et al.* Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* 2007; 13(9): 1070-7.
- 28 Rossin A, Derouet M, Abdel-Sater F, Hueber AO. Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *Biochem J* 2009; 419(1): 185-92, 2 p following 92.
- 29 Tang Z, Bauer JA, Morrison B, Lindner DJ. Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4. *Mol Cell Biol* 2006; 26(15): 5588-94.
- 30 Rodriguez-Hernandez A, Navarro-Villaran E, Gonzalez R, Pereira S, Soriano-De Castro LB, Sarrias-Gimenez A, *et al.* Regulation of cell death receptor S-nitrosylation and apoptotic signaling by Sorafenib in hepatoblastoma cells. *Redox Biol* 2015; 6: 174-82.
- 31 Simova S, Klima M, Cermak L, Sourkova V, Andera L. Arf and Rho GAP adapter protein ARAP1 participates in the mobilization of TRAIL-R1/DR4 to the plasma membrane. *Apoptosis* 2008; 13(3): 423-36.
- 32 Ren YG, Wagner KW, Knee DA, Aza-Blanc P, Nasoff M, Deveraux QL. Differential regulation of the TRAIL death receptors DR4 and DR5 by the signal recognition particle. *Mol Biol Cell* 2004; 15(11): 5064-74.
- 33 Oh Y, Jeon YJ, Hong GS, Kim I, Woo HN, Jung YK. Regulation in the targeting of TRAIL receptor 1 to cell surface via GODZ for TRAIL sensitivity in tumor cells. *Cell Death Differ* 2012; 19(7): 1196-207.
- 34 Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, Nakano H, Koyanagi M, Takeda K, *et al.* Importin beta1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *J Biol Chem* 2011; 286(50): 43383-93.
- 35 Haselmann V, Kurz A, Bertsch U, Hubner S, Olempska-Muller M, Fritsch J, *et al.* Nuclear death receptor TRAIL-R2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells. *Gastroenterology* 2014; 146(1): 278-90.
- 36 Zhang Y, Yoshida T, Zhang B. TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(10): 917-22.
- 37 Yoshida T, Zhang Y, Rivera Rosado LA, Zhang B. Repeated treatment with subtoxic doses of TRAIL induces resistance to apoptosis through its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; 7(11): 1835-44.
- 38 Austin CD, Lawrence DA, Peden AA, Varfolomeev EE, Totpal K, De Maziere AM, *et al.* Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(27): 10283-8.
- 39 Kohlhaas SL, Craxton A, Sun XM, Pinkoski MJ, Cohen GM. Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282(17): 12831-41.
- 40 Akazawa Y, Mott JL, Bronk SF, Werneburg NW, Kahraman A, Guicciardi ME, *et al.* Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines. *Gastroenterology* 2009; 136(7): 2365-76 e1-7.
- 41 Di X, Zhang G, Zhang Y, Takeda K, Rivera Rosado LA, Zhang B. Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5. *Oncotarget* 2013; 4(9): 1349-64.
- 42 So J, Pasculescu A, Dai AY, Williton K, James A, Nguyen V, *et al.* Integrative analysis of kinase networks in TRAIL-induced apoptosis provides a source of potential targets for combination therapy. *Sci Signal* 2015; 8(371): rs3.
- 43 Chen JJ, Bozza WP, Di X, Zhang Y, Hallett W, Zhang B. H-Ras regulation of TRAIL death receptor mediated apoptosis. *Oncotarget* 2014; 5(13): 5125-37.
- 44 Song JJ, Szczepanski MJ, Kim SY, Kim JH, An JY, Kwon YT, *et al.* c-Cbl-mediated degradation of TRAIL receptors is responsible for the development of the early phase of TRAIL resistance. *Cell Signal* 2010; 22(3): 553-63.
- 45 Yan S, Qu X, Xu C, Zhu Z, Zhang L, Xu L, *et al.* Down-regulation of Cbl-b by bufalin results in up-regulation of DR4/DR5 and sensitization of TRAIL-induced apoptosis in breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138(8): 1279-89.
- 46 van de Kooij B, Verbrugge I, de Vries E, Gijzen M, Montserrat V, Maas C, *et al.* Ubiquitination by the membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) ligase controls steady-state cell surface expression of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor 1. *J Biol Chem* 2013; 288(9): 6617-28.
- 47 Han J, Hou W, Goldstein LA, Lu C, Stolz DB, Yin XM, *et al.* Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *J Biol Chem* 2008; 283(28): 19665-77.
- 48 Baritaki S, Suzuki E, Umezawa K, Spandidos DA, Berenson J, Daniels TR, *et al.* Inhibition of Yin Yang 1-dependent repressor activity of DR5 transcription and expression by the novel proteasome inhibitor NPI-0052 contributes to its TRAIL-enhanced apoptosis in cancer cells. *J Immunol* 2008; 180(9): 6199-210.
- 49 Jung KJ, Min KJ, Bae JH, Kwon TK. Carnosic acid sensitized TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of c-FLIP and Bcl-2 expression at the post translational levels and CHOP-dependent up-regulation of DR5, Bim, and PUMA expression in human carcinoma caki cells. *Oncotarget* 2015; 6(3): 1556-68.
- 50 Moon DO, Kang CH, Kang SH, Choi YH, Hyun JW, Chang WY,



- et al.* Capsaicin sensitizes TRAIL-induced apoptosis through Sp1-mediated DR5 up-regulation: involvement of Ca<sup>2+</sup> influx. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 259(1): 87-95.
- 51 Azijli K, van Roosmalen IA, Smit J, Pillai S, Fukushima M, de Jong S, *et al.* The novel thymidylate synthase inhibitor trifluorothymidine (TFT) and TRAIL synergistically eradicate non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73(6): 1273-83.
- 52 Chang CC, Kuan CP, Lin JY, Lai JS, Ho TF. Tanshinone IIA facilitates TRAIL sensitization by up-regulating DR5 through the ROS-JNK-CHOP signaling axis in human ovarian carcinoma cell lines. *Chem Res Toxicol* 2015; 28(8): 1574-83.
- 53 Woo SM, Seo BR, Min KJ, Kwon TK. FTY720 enhances TRAIL-mediated apoptosis by up-regulating DR5 and down-regulating Mcl-1 in cancer cells. *Oncotarget* 2015; 6(13): 11614-26.
- 54 Sarhan D, D'Arcy P, Lundqvist A. Regulation of TRAIL-receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *Int J Mol Sci* 2014; 15(10): 18557-73.
- 55 Aguilera DG, Das CM, Sinnappah-Kang ND, Joyce C, Taylor PH, Wen S, *et al.* Reactivation of death receptor 4 (DR4) expression sensitizes medulloblastoma cell lines to TRAIL. *J Neurooncol* 2009; 93(3): 303-18.
- 56 Dutta D, Williamson CD, Cole NB, Donaldson JG. Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. *PLoS One* 2012; 7(9): e45799.
- 57 McCluskey A, Daniel JA, Hadzic G, Chau N, Clayton EL, Mariana A, *et al.* Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic* 2013; 14(12): 1272-89.
- 58 Deng M, Wang J, Chen Y, Zhang L, Liu D. Combination of SF1126 and gefitinib induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells through the PI3K/AKT-mTOR pathway. *Anticancer Drugs* 2015; 26(4): 422-7.