

PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 体内外对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响

杨 芬^{1,2*}, 唐晓燕³, 吴 鹏⁴, 谭运新⁵

(¹南京医科大学基础医学院生物化学及分子生物学系, 江苏 南京 210029; ²蚌埠医学院第一附属医院肿瘤放疗科, 安徽 蚌埠 233004; ³南京市胸科医院检验科, 江苏 南京 210029; ⁴南京医科大学附属南京医院肿瘤内科, 江苏 南京 210006; ⁵南京市浦口医院内分泌科, 江苏 南京 210031)

[摘要] 目的: 探讨 PI3K/mTOR 双重抑制剂 NVP-BEZ235 在体内外对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响。方法: MTT 法检测 NVP-BEZ235 对细胞增殖的影响; Western blot 检测 NVP-BEZ235 对 PI3K/mTOR 下游信号蛋白的影响; 碘化丙啶染色检测细胞周期和细胞凋亡; DAPI 染色从细胞形态上检测细胞凋亡; 构建 CNE1 异种移植肿瘤模型, NVP-BEZ235 口服给药, 测量肿瘤体积大小和剥除的肿瘤重量计算抑制率, TUNEL 法检测组织细胞凋亡。结果: ① 与人鼻咽上皮细胞 NP69 比较, NVP-BEZ235 选择性抑制鼻咽癌细胞增殖; ② NVP-BEZ235 在体外特异性抑制 PI3K/mTOR 下游信号通路; ③ NVP-BEZ235 通过阻滞 G1 期抑制细胞周期, 在体外诱导细胞凋亡; ④ NVP-BEZ235 抑制裸鼠移植肿瘤的生长, 在体内通过抑制 PI3K/mTOR 下游信号通路的磷酸化诱导细胞凋亡。结论: PI3K/mTOR 双重抑制剂 NVP-BEZ235 在体内外选择性抑制鼻咽癌细胞增殖, 抑制细胞周期进程, 诱导鼻咽癌细胞凋亡。

[关键词] PI3K/mTOR 信号通路; NVP-BEZ235; 鼻咽癌; 细胞凋亡

[中图分类号] R739.63

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)05-569-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20160512

Effects of PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 on proliferation and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma in vivo and in vitro

Yang Fen^{1,2*}, Tang Xiaoyan³, Wu Peng⁴, Tan Yunxin⁵

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Tumor Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004; ³Department of Clinical Laboratory, Nanjing Chest Hospital, Nanjing 210029; ⁴Department of Oncology, the Affiliated Nanjing Hospital of NJMU, Nanjing 210006; ⁵Department of Endocrinology, Nanjing Pukou Hospital, Nanjing 210031, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 on proliferation and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods:** We treated NPC cells CNE1 and SUNE1 with NVP-BEZ235 in different concentrations, MTT assay was used to detect inhibition of cell proliferation by NVP-BEZ235. Inhibitors-induced apoptosis in NPC cells was evaluated by propidium iodide (PI) staining assay, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and Transferase-mediated FITC-12-dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. Western blot analysis was used to detect the proteins of PI3K/mTOR pathway. Tumor xenografts were established by injection of CNE1 cells into nude mice to observe the growth inhibitory effect by NVP-BEZ235 and effects of the inhibitor on PI3K/mTOR pathway and apoptosis in vivo. **Results:** ① NVP-BEZ235 selectively inhibited proliferation of NPC cells rather than normal nasopharyngeal cells. ② NVP-BEZ235 selectively inhibited the phosphorylation of PI3K/mTOR downstream signal molecules. ③ Exposure of NPC cells to NVP-BEZ235 resulted in G1 growth arrest and significant apoptosis. ④ In CNE1 nude mice xenograft models, orally NVP-BEZ235 efficiently attenuated tumor growth and shrunk tumor volumes, and induced

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(31401094); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(12JC011)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yangfen@njmu.edu.cn

apoptosis through blocking phosphorylation of PI3K/mTOR downstream molecules in vivo. **Conclusion:** NVP-BEZ235 selectively inhibited proliferation of NPC cells and induced apoptosis through G1 growth arrest and inhibiting the phosphorylation of PI3K/mTOR downstream signal molecules both in vivo and in vitro.

[Key words] PI3K/mTOR pathway; NVP-BEZ235; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05):569-576]

磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)是磷脂酰肌醇(PTDIns)依赖激酶家族成员,主要接受来自上游受体酪氨酸蛋白激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)的信号,参与一系列细胞功能的调节^[1-2]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶(phosphoinositide 3-kinase related kinase, PIKK)家族成员,它的催化结构域的氨基酸序列与 PI3K 具有显著同源性^[3]。PI3K 家族成员主要磷酸化脂质,而 PIKK 家族成员主要作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶发挥作用,两者在细胞生长、发育、增殖等方面都发挥重要作用,但是在肿瘤中的过度激活往往促进肿瘤的侵袭和转移。

近年来,针对过度激活的生存信号通路的靶向治疗发展迅速,包括抑制 PI3K 和 mTOR 信号通路的小分子抑制剂,但是两者之间经常存在串扰,研究显示 mTOR 抑制可以反馈激活 PI3K^[4],因此,开发双重抑制 PI3K 和 mTOR 的抑制剂很有必要。咪唑喹啉(imidazoquinazoline)类化合物 NVP-BEZ235 (Novartis)通过分别结合 PI3K 和 mTOR 的 ATP 结合裂隙而抑制它们的激酶活性,从而导致 G1 期阻滞。NVP-BEZ235 在多种肿瘤细胞系和移植肿瘤(包括 PTEN 缺失的胶质瘤和前列腺癌)中具有良好的抗肿瘤活性。体内实验显示 NVP-BEZ235 口服给药具有良好的耐受性,和其他抗肿瘤药物合用可以增强其他药物的抗肿瘤效应^[5-6]。本实验以鼻咽癌细胞 CNE1 和 SUNE1 及裸鼠移植模型为研究对象,检测 PI3K/mTOR 双重抑制剂 NVP-BEZ235 对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响,探讨 NVP-BEZ235 对鼻咽癌的治疗潜力,扩大该药的抗肿瘤谱,同时为鼻咽癌的治疗提供新手段和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

鼻咽癌细胞株 CNE1、SUNE1 及人正常鼻咽上皮细胞 NP69(南京医科大学生物化学及分子生物学系实验室肿瘤研究组冻存培养)。培养条件:应用含

5%胎牛血清、100 U/mL 青霉素 G 和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基,培养在 5%CO₂、37℃ 温湿环境中。

DMEM 培养基(Gibco 公司,美国)。NVP-BEZ235 (Selleck Chemical 公司,美国),溶于 100%DMSO, -20℃ 保存。胰蛋白酶、碘化丙啶(PI)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵(APS)、二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、Tris·HCl、Tris·Base、甘氨酸、氯化钠、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(Sigma 公司,美国)。PVDF 膜(Millipore 公司,美国)。新生牛血清(FBS, Invitrogen 公司,美国),分装后 -20℃ 保存。

AKT1、Phospho-AKT1 (Ser473)、GSK3α/β 和 HRP 标记的二抗(Santa Cruz Biotechnology 公司,美国)。4E-BP1、P70S6K、PRAS40、Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)、Phospho-P70S6K (Thr389)、Phospho-PRAS40 (Thr246) 和 Phospho-GSK3β (Ser9)、化学发光试剂盒(Cell Signaling Technology 公司,美国)。Transferase-mediated FITC-12-dUTP nick-end labeling (TUNEL) 检测试剂盒(Roche 公司,美国)。GAPDH(上海康成技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法

取对数生长期的细胞消化离心后制成细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 195 μL,含 8 000~10 000 个细胞。12~24 h 后加入药物,每组设 4 个复孔,置 CO₂ 培养箱培养 72 h,实验中止前 4 h 加入 10 μL 5 mg/mL MTT 液,再培养 4 h,弃去培养液,加入 100 μL DMSO,震荡 10 min,待结晶溶解后在酶联检测仪上检测 570 nm 波长的吸光值(OD 值)。按下列公式求出生长抑制率,生长抑制率(%) = (1 - 用药组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值) × 100%。

1.2.2 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色检测细胞周期和细胞凋亡

PI 染色可以将细胞周期各时相区分为 G1/G0 期、S 期和 G2/M 期,可以通过软件计算细胞周期各时相的百分率。如果细胞发生凋亡,细胞内核酸酶

释放,降解 DNA,将其分解成小的片段,在 PI 染色处理时,细胞膜的完整性被破坏,使细胞内降解的 DNA 片段从细胞内流出,造成总体 DNA 含量减少,成为亚 2 倍体(亚 G1 期)。PI 染色检测到具有亚 G1 期 DNA 含量的细胞代表凋亡细胞。

PI 染色的步骤:①将对数生长期细胞制成单细胞悬液接种于 24 孔细胞培养板,每孔 $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 个细胞;②培养 12~24 h 后按实验设计处理细胞;③处理结束后,收集各孔培养液至对应流式管中,用预冷 PBS 500 μ L 清洗培养孔;④收集清洗液至对应培养液中,1 200 r/min,离心 10 min,弃上清;⑤培养板中加入 PI 缓冲液 750 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min;⑥吹打收集细胞至对应流式管中,轻轻摇动混匀。4 $^{\circ}$ C 避光保存,过夜(最长保存 1 周),流式细胞仪检测。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达

收集细胞用细胞裂解液(总体积 200 mL,100 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 20 mL,1 mol/L NaCl 28 mL,100 mmol/L CaCl₂ 1 mL,100 mmol/L MgCl₂ 21 mL,15 mmol/L NaN₃ 40 mL,Triton X-100 2 mL;用前加入蛋白酶抑制剂 12 μ mol/L Leupeptin,1 mmol/L PMSF 各 2 mL/L)冰上裂解 30 min,提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定量法(参照试剂盒说明书操作)测各组蛋白浓度,用细胞裂解液将各组蛋白稀释至等浓度,与 2 \times 上样缓冲液 1:1 混合,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 蛋白变性。取总蛋白 20~40 μ g/组,6%~15% SDS-PAGE 凝胶电泳(80 V 30 min,120 V 60 min),湿转(110 mA,2~3 h)至 PVDF 膜;5%脱脂奶粉室温封闭 2 h(或 4 $^{\circ}$ C 过夜);一抗 1:(500~1 000),室温孵育 2 h(或 4 $^{\circ}$ C 过夜);TPBS 洗涤 3 次,PBS 洗涤 1 次;二抗 1:(3 000~5 000),室温孵育 2 h;TPBS 洗涤 3 次,PBS 洗涤 1 次;ECL 发光试剂盒暗室发光、显影、定影或 Bio-Rad 凝胶成像系统直接获取图像,测量灰度值除以各组 GAPDH 灰度值代表蛋白的相对表达水平。

1.2.4 动物实验

扩大培养鼻咽癌细胞 CNE1,消化对数生长期细胞,计数,用 PBS 重悬细胞,调整其终浓度为 2×10^6 个/mL,无菌环境下充分重悬混匀细胞,1 mL 注射器吸取 0.2 mL 细胞液,皮下注射接种于裸鼠腋下,每组 6 只裸鼠($n=6$)。接种后第 5~7 天摸到裸鼠腋下有肿瘤形成(体积约 50 mm³),开始用药处理。隔日测量肿瘤体积大小、裸鼠体重,观察裸鼠有无恶液质出现;瘤体积计算公式为:瘤体积= $0.5 \times a \times b^2$

(a:肿瘤的长径;b:肿瘤的宽径)。用药 21 d,停药的第 2 天,颈椎断颈法处死所有裸鼠,完整分离每只裸鼠的肿瘤,称取肿瘤重量并记录。用尖锐的刀片将瘤组织切成小块状,放入冻存管中,置于液氮中保存备用。抑瘤率的计算公式为:肿瘤抑瘤率(%)= $(C-T)/C \times 100\%$,公式中 T 为给药组平均瘤重,C 为对照组平均瘤重^[7]。瘤组织蛋白的提取:从液氮中取出瘤组织,加入裂解液直接研磨后,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,收集上清液后用同样方法再离心 1 次,收集上清。用 BCA 法测蛋白浓度,将样品置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.5 DAPI 染色法

胰酶消化细胞,用 PBS(含 0.1% Triton X-100)洗 2 次后,行细胞甩片;0.1%多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 5 min;将以上制备好的细胞爬片,浸泡在装有 DAPI 染液(DAPI 染料 100 μ g,溶于 100 mL 含 0.1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液中)的染色缸中,避光作用 10 min,用盖玻片封片;共聚焦显微镜下(Olympus 公司,日本)观察细胞核的形态并拍照。

1.2.6 TUNEL 染色检测组织细胞凋亡

根据 Roche 公司的原位凋亡检测试剂盒操作说明进行:①制作冰冻切片,丙酮浸泡 20 min 后取出晾干,-80 $^{\circ}$ C 保存备用;②从-80 $^{\circ}$ C 冰箱取出冰冻切片,浸入固定液(用 PBS 配制的 4%多聚甲醛)中,室温固定 20 min 后,PBS 浸洗 30 min;③将冰冻切片浸入封闭液(30% H₂O₂:甲醇=1:9)中,室温封闭 10 min 后,PBS 漂洗 2 次,每次 5 min;④冰冻切片浸入通透液(0.1% Triton X-100 溶于 0.1% 柠檬酸钠)中,冰上促渗 2 min 后,PBS 漂洗 2 次,样本周围用吸水纸吸干;⑤每个样本滴加 50 μ L TUNEL 反应混合液,置于带盖湿盒中,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,PBS 漂洗 2 次,每次 5 min;⑥DAPI(1 μ g/mL)染核 5 min,PBS 漂洗 2 次;⑦滴加抗荧光淬灭封片剂,封片,激光共聚焦显微镜下观察结果并拍照,激发波长 450~500 nm,检测波长 515~565 nm,TUNEL 阳性细胞核呈绿色,阴性细胞核呈蓝色,绿色代表凋亡细胞。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行方差分析及 Student's *t*-Test, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NVP-BEZ235 在体外抑制鼻咽癌细胞增殖

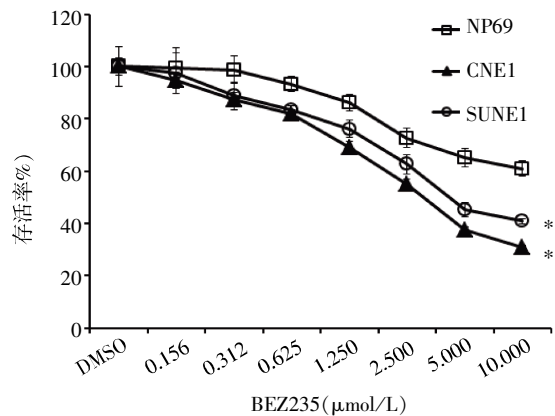
为了研究 NVP-BE235 对鼻咽癌细胞增殖的影响, 选用鼻咽癌 CNE1、SUNE1 及人鼻咽上皮细胞 NP69, 应用不同浓度 NVP-BE235 处理以上细胞, 作用 72 h, 与 NP69 比较, NVP-BE235 选择性抑制鼻咽癌细胞的增殖(图 1)。

2.2 NVP-BE235 抑制 PI3K/AKT 和 mTORC1 下游信号通路

已有报道 NVP-BE235 在 nmol 水平双重抑制 PI3K 和 mTOR 激酶^[6], 抑制肿瘤生长所必需的多个自分泌和旁分泌生长因子, 从而发挥广泛的抗癌活性。我们在鼻咽癌 CNE1、SUNE1 细胞中, 应用不同浓度 NVP-BE235 不同时间处理细胞, 发现 NVP-BE235 能够时间和浓度依赖地抑制 AKT 和 mTOR 及其下游信号分子的磷酸化(图 2)。

2.3 NVP-BE235 通过阻滞 G1 期抑制细胞周期进程

在鼻咽癌 CNE1 和 SUNE1 细胞中, 应用 NVP-BE235 0.5 μmol/L 处理细胞不同时间, 如图 3 所示, 随着时间的延长, G1 期细胞逐渐增加, CNE1 细胞中, 药物处理 24 h 后 G1 期细胞的比例从对照组的 43.1% 上升到 70.9%(图 3A、B); SUNE1 细胞中, 相应的处理, G1 期细胞比例从 44.4% 上升到 68.9%



CNE1、SUNE1 组细胞存活率分别与 NP69 比较, * $P < 0.05$, $n=4$ 。

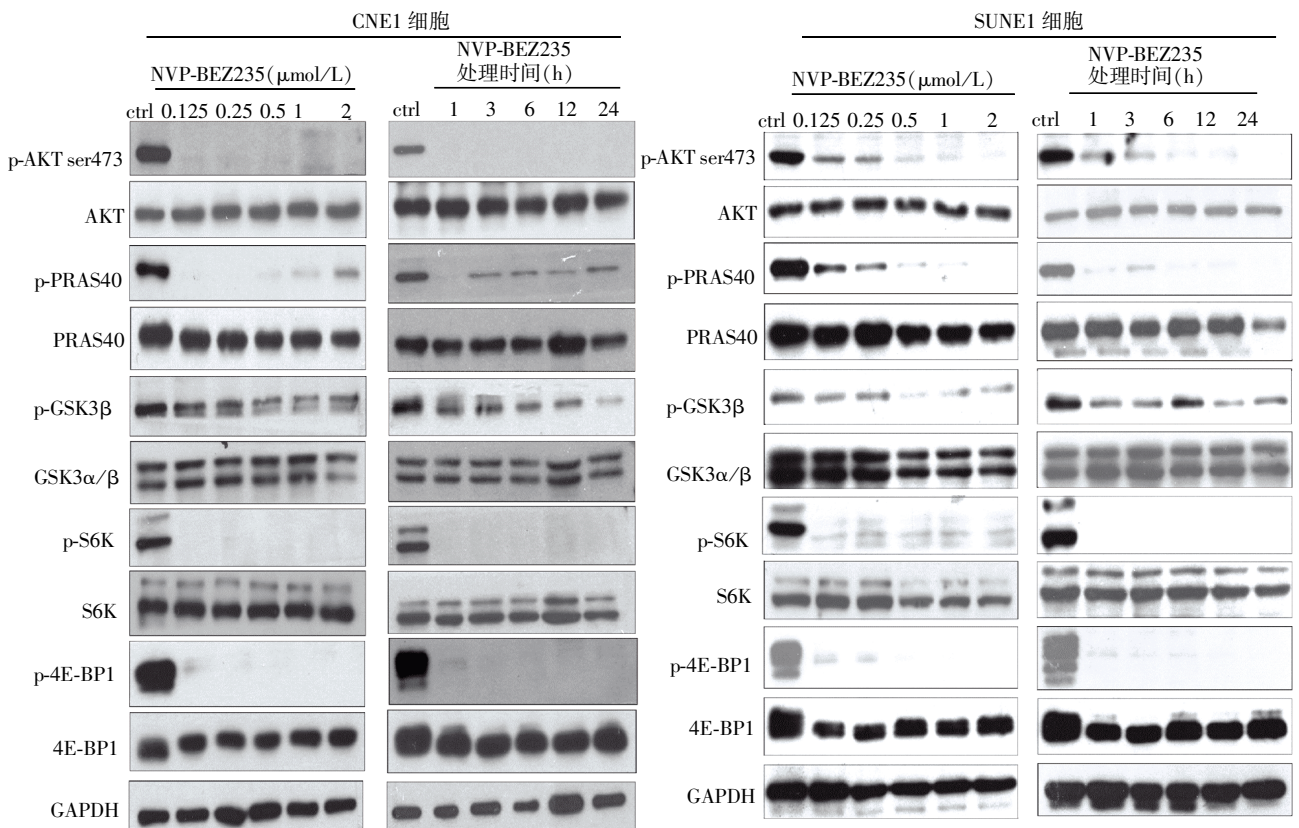
图 1 NVP-BE235 对鼻咽癌细胞 CNE1、SUNE1 及鼻咽上皮细胞 NP69 的影响

Figure 1 Effects of NVP-BE235 on nasopharyngeal carcinoma cells CNE1, SUNE1 and normal nasopharyngeal cells NP69

(图 3C、D), 表明 NVP-BE235 通过阻滞 G1 期抑制细胞周期进程。

2.4 NVP-BE235 诱导鼻咽癌细胞凋亡

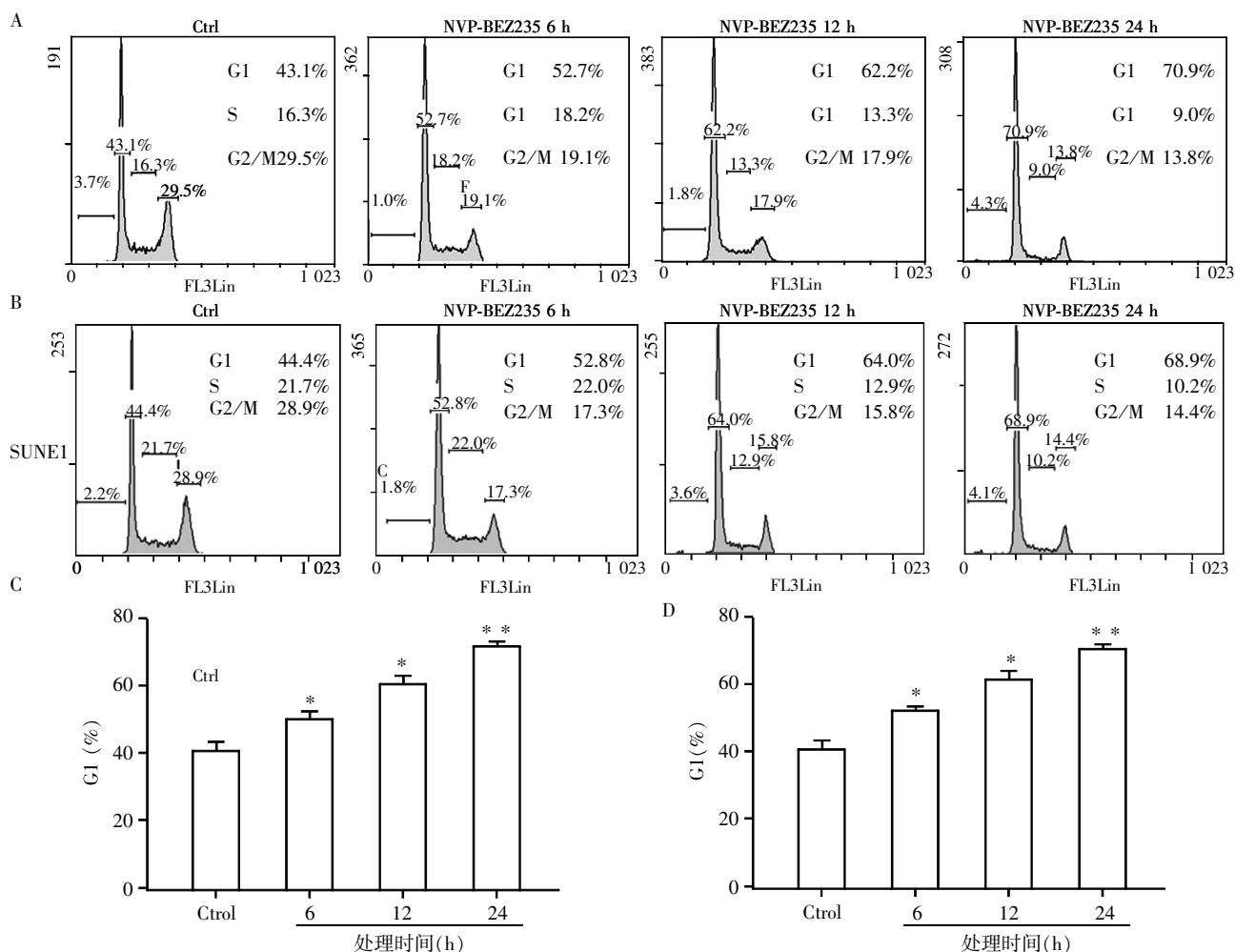
在鼻咽癌 CNE1 和 SUNE1 细胞中, 5 μmol/L NVP-BE235 作用 24 h 和 48 h, CNE1 细胞中, 代表



3 次结果相似, 图示为其中 1 次结果($n=3$)。

图 2 NVP-BE235 抑制 PI3K/mTOR 信号通路下游靶分子的磷酸化

Figure 2 NVP-BE235 inhibited the phosphorylation of PI3K/mTOR pathway downstream molecules in NPC cells



A: NVP-BE2235 处理 CNE1 细胞 6~24 h 细胞周期各期比例, 3 次重复实验的代表图片; B: NVP-BE2235 处理 SUNE1 细胞 6~24 h 细胞周期各期比例, 3 次重复实验的代表图片; C: NVP-BE2235 处理 CNE1 细胞 3 次实验 G1 期变化统计图, 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$); D: NVP-BE2235 处理 SUNE1 细胞 3 次实验 G1 期变化统计图, 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 3 NVP-BE2235 诱导 G1 期细胞周期阻滞

Figure 3 NVP-BE2235 induced cell cycle arrest in G1 phase

细胞凋亡的亚 G1 期细胞从 2.3% 上升到 35.1%, 在 SUNE1 细胞中, 细胞凋亡率从 2.2% 上升到 39.9%。共聚焦显微镜 DAPI 染色 24 h 和 48 h, 细胞呈蓝白色荧光, 随着时间延长, 可见细胞核出现大量的核浓缩, 染色加深, 或核染色质呈新月形聚集于核膜一边, 或核破碎成大小不等的核小体, 并被细胞膜所包绕 (图 4)。

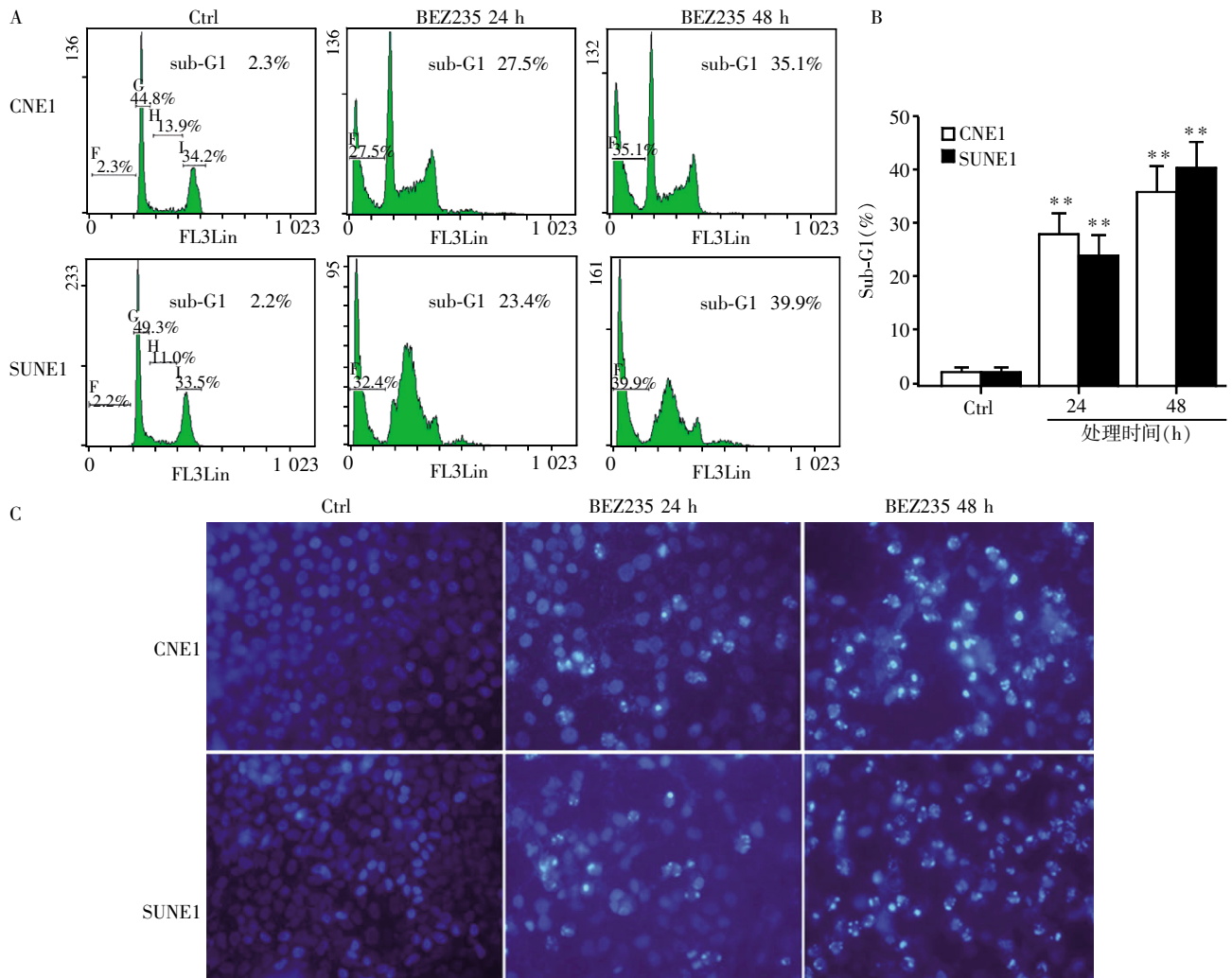
2.5 NVP-BE2235 抑制 CNE1 裸鼠移植肿瘤的生长

将体外培养的人鼻咽癌 CNE1 细胞种植到裸鼠体内形成异种移植肿瘤, 然后给予 NVP-BE2235 灌胃处理, 结果显示, NVP-BE2235 能够显著抑制肿瘤的生长, 根据测量所得肿瘤体积计算的抑制率: NVP-BE2235 25 mg/kg 组肿瘤生长抑制率为 38.5%, NVP-BE2235 50 mg/kg 组肿瘤生长抑制率为 65.1%, 两个剂量处理组与溶剂对照组相比具有显

著差异 (图 5A)。根据所称肿瘤重量计算的抑制率: NVP-BE2235 25 mg/kg 组肿瘤生长抑制率为 29.0%, NVP-BE2235 50 mg/kg 组肿瘤生长抑制率为 61.3%, 两个剂量处理组与溶剂对照组肿瘤重量比较有显著差异 (图 5B)。

2.6 NVP-BE2235 在体内抑制 PI3K/mTOR 信号通路

留取各组肿瘤组织冻于液氮备用, 择日取出 NVP-BE2235 25 mg/kg 及 50 mg/kg 组的肿瘤组织, 每组随机抽取 2 个不同裸鼠来源的肿瘤, 利用研磨法提取组织蛋白进行 Western blot 检测。结果显示, 与对照组比较, NVP-BE2235 处理的肿瘤组织, PI3K 下游 AKT、GSK3 β 及 mTOR 下游 P70S6K、4E-BP1 的磷酸化均显著降低 (图 5C), 表明 NVP-BE2235 在体内双重抑制 PI3K/mTOR 信号通路。



A: 流式细胞仪检测 sub-G1 期细胞比例代表细胞凋亡, 实验重复 3 次 (n=3); B: NVP-BE235 诱导鼻咽癌 CNE1 和 SUNE1 细胞凋亡统计图, 与对照组比较, **P < 0.01 (n=3); C: DAPI 染色检测细胞凋亡。

图 4 NVP-BE235 诱导鼻咽癌 CNE1 和 SUNE1 细胞凋亡
Figure 4 NVP-BE235 induced apoptosis in CNE1 and SUNE1 cells

2.7 NVP-BE235 在体内诱导细胞凋亡

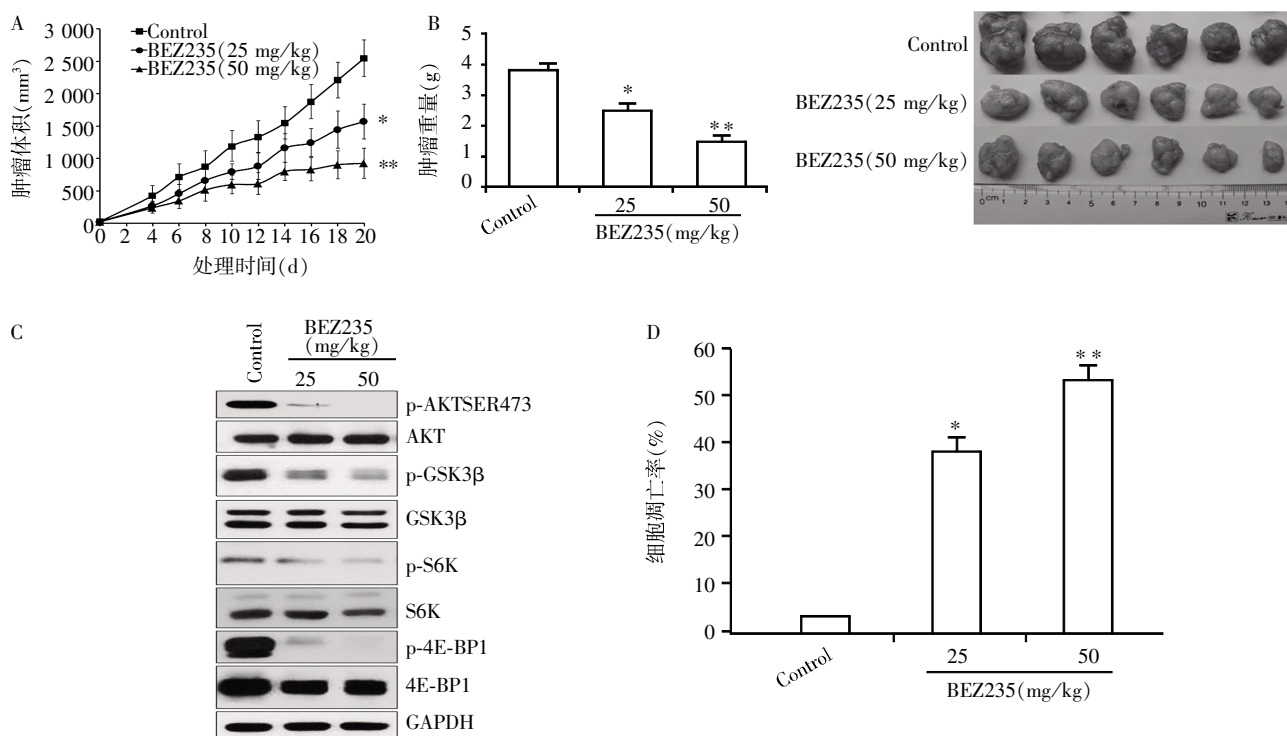
各实验组随机取 3 块肿瘤组织进行 TUNEL 实验, 胞核绿色代表细胞凋亡, 统计凋亡细胞如图 5D 所示, NVP-BE235 25 mg/kg 和 50 mg/kg 均明显诱导细胞凋亡, 平均细胞凋亡率分别为 38.2% 和 52.9%, 与对照组比较, 具有显著差异。

3 讨论

鼻咽癌是我国常见的头颈部恶性肿瘤, 多数患者发现时已进入晚期, III、IV 期患者占总数 85% 左右。放疗一直是治疗的主要手段, 但 III~IV 期患者的 5 年生存率仅 30% 左右。放射治疗失败的主要原因是局部复发和远处转移, 同时大多数鼻咽癌属低分化鳞癌, 对化疗有一定敏感性, 故近年来多用化疗联合放疗治疗晚期鼻咽癌, 多数化疗以 CDDP 为主

要化疗药物, 但数据显示 CDDP 耐药问题越来越突出^[8]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路在鼻咽癌中通常是过度激活的^[9-10], 因此是有潜力的治疗靶点。我们应用新型的 PI3K/mTOR 双重抑制剂 NVP-BE235 处理鼻咽癌细胞及裸鼠移植模型, 发现 NVP-BE235 不仅在体内外抑制鼻咽癌细胞增殖及 PI3K/AKT/mTOR 下游信号通路(图 1、5A~C), 而且能够引起鼻咽癌细胞 G1 期阻滞(图 3), 同时, NVP-BE235 还可以在体内外诱导鼻咽癌细胞凋亡(图 4、5D)。鉴于此, 我们认为 NVP-BE235 具有潜在的治疗鼻咽癌的应用价值。

靶向 PI3K/Akt/mTOR 的抗凋亡信号通路以提高癌症防治效果一直是竞争激烈的和有前途的研究领域, 然而, 针对这条途径的第一代抑制剂, 如渥曼青霉素、LY294002 或雷帕霉素及其衍生物, 表现



A: 根据肿瘤体积计算的抑制剂,和对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=6$);B: 根据肿瘤重量计算的抑制率,和对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=6$);C: NVP-BE235 在体内抑制 PI3K/mTOR 下游分子的磷酸化($n=3$);D: TUNEL 法检测原位细胞凋亡统计图,和对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 5 NVP-BE235 在裸鼠移植肿瘤中的抗肿瘤活性

Figure 5 Antitumor activity of NVP-BE235 in nude mice xenografts

出不期望的不良反应和低特异性^[4,11-12]。因此,具有更高特异性和药理特性的第二代抑制剂迅速发展并有多种处于临床试验阶段,其中新型的可口服 PI3K/mTOR 双重抑制剂 NVP-BE235 在体内外均表现抗增殖和放射增敏活性^[13-14]。早期研究显示 NVP-BE235 对神经胶质瘤具有明显作用,可拮抗 PI3K/mTOR 信号通路诱导细胞周期阻滞和细胞自噬,并通过下调血管内皮生长因子抑制神经胶质瘤细胞^[15]。NVP-BE235 抑制 ATM 和 DNA-PK 的催化亚基(DNAPKcs),阻滞细胞周期,并诱导细胞凋亡^[16]。此外,干细胞样细胞系 A172 皮下或颅内注射时,给予 NVP-BE235 预处理能够明显抑制肿瘤形成^[17-18]。近来报道 NVP-BE235 对骨肉瘤、默克尔细胞癌亦有抗肿瘤作用^[19-20]。

PI3K/mTOR 信号通路主要影响不同的细胞功能,包括细胞增殖,生长、分化和存活,这一途径还促进辐射诱导的 DNA 损伤后肿瘤存活^[21]。PI3K/mTOR 信号通路功能失调经常有多种原因,包括上游细胞因子和酪氨酸激酶受体的过度激活及癌基因的突变等,其中最多见的是 PIK3CA 基因突变、PTEN 突变^[3]。在我们以前的研究中,发现 NVP-BE235 对

存在 PIK3CA 基因突变的细胞更加敏感,仅需较小的浓度^[22],但是在当前研究中,发现在没有 PIK3CA 基因突变的细胞中,只要增加给药浓度,同样可以抑制鼻咽癌细胞增殖和细胞周期,诱导细胞凋亡。因此,本研究认为,在鼻咽癌细胞中,无论是否存在 PIK3CA 突变,只要存在 PI3K/mTOR 信号通路过度激活,NVP-BE235 均具有较强的抗鼻咽癌作用。

虽然 NVP-BE235 目前正处在临床 II 期试验阶段,并取得了很好的结果,但是任何一个小分子抑制剂单独作用都难以彻底杀灭肿瘤,长时间作用会引起其他生存通路的激活。在鼻咽癌细胞中,NVP-BE235 处理细胞后,PI3K/AKT/mTOR 信号通路被抑制效果非常明显,但是也发现 MAPK 信号通路被明显激活(数据未显示)。可见,小分子抑制剂合用传统化疗药物、其他小分子抑制剂或其他治疗手段是最大化杀灭肿瘤所必需的。

[参考文献]

[1] Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67:481-507
[2] Hong SY, Yu FX, Luo Y, et al. Oncogenic activation of

- the PI3K/Akt pathway promotes cellular glucose uptake by downregulating the expression of thioredoxin-interacting protein[J]. *Cell Signall*,2016,28(5):377-383
- [3] Bhaskar PT,Hay N. The two TORCs and Akt[J]. *Dev Cell*,2007,12(4):487-502
- [4] Markman B,Dienstmann R,Taberero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway-beyond rapalogs[J]. *Oncotarget*,2010,1(7):530-543
- [5] Stauffer F,Maira SM,Furet P,et al. Imidazo [4,5-c] quinolines as inhibitors of the PI3K/PKB-pathway [J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2008,18(3):1027-1030
- [6] Maira SM,Stauffer F,Brueggen J,et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235,a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity [J]. *Mol Cancer Ther*,2008,7(7):1851-1863
- [7] 黄河,谢冰芬,朱孝峰. 等紫草素衍生物 SYUNZ-7 的抗肿瘤作用及其机制的初步研究[J]. *癌症*,2005,24(12):1453-1458
- [8] Xie SM,Fang WY,Liu TF,et al. Association of ABCC2 and CDDP-Resistance in two sublines resistant to CDDP derived from a human nasopharyngeal carcinoma cell line [J]. *J Oncol*,2010,2010:915046
- [9] Liu Y,Chen LH,Yuan YW,et al. Activation of AKT is associated with metastasis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Tumour Biol*,2012,33(1):241-245
- [10] Yip WK,Leong VC,Abdullah MA,et al. Overexpression of phospho-Akt correlates with phosphorylation of EGF receptor,FKHR and BAD in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncol Rep*,2008,19(2):319-328
- [11] Prevo R,Deutsch E,Sampson O,et al. Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity[J]. *Cancer Res*,2008,68(14):5915-5923
- [12] Wan X,Harkavy B,Shen N,et al. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism[J]. *Oncogene*,2007,26(13):1932-1940
- [13] Zhu W,Fu W,Hu L. NVP-BEZ235,dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor,prominently enhances radiosensitivity of prostate cancer cell line PC-3[J]. *Cancer Biother Radiopharm*,2013,28(9):665-673
- [14] Manara MC,Nicoletti G,Zambelli D,et al. NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas[J]. *Clin Cancer Res*,2010,16(2):530-540
- [15] Liu TJ,Koul D,LaFortune T,et al. NVP-BEZ235,a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor,elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas[J]. *Mol Cancer Ther*,2009,8(8):2204-2210
- [16] Mukherjee B,Tomimatsu N,Amancerla K,et al. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM-and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses[J]. *Neoplasia*,2012,14(1):34-43
- [17] Sunayama J,Sato A,Matsuda K,et al. Dual blocking of mTor and PI3K elicits a prodifferentiation effect on glioblastoma stem-like cells [J]. *Neuro Oncol*,2010,12(12):1205-1219
- [18] Sunayama J,Matsuda K,Sato A,et al. Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells[J]. *Stem Cells*,2010,28(11):1930-1939
- [19] Zhu YR,Min H,Fang JF,et al. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against osteosarcoma[J]. *Cancer Biol Ther*,2015,16(4):602-609
- [20] Lin Z,Mei H,Fan J,et al. Effect of the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against human Merkel cell carcinoma MKL-1 cells[J]. *Oncol Lett* 2015,10 (6):3663-3667
- [21] Hennessy BT,Smith DL,Ram PT,et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2005,4(12):988-1004
- [22] Yang F,Qian XJ,Qin W,et al. Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 has a therapeutic potential and sensitizes cisplatin in nasopharyngeal carcinoma[J]. *PLoS One*,2013,8(3):e59879

[收稿日期] 2015-11-13