

# 双链 RNA 依赖的蛋白激酶在非小细胞肺癌预后预测及靶向治疗中的作用

郭铮铮, 黄河, 梁超勇, 田莹, 刘婷智, 李学莹, 洪焯明, 林桐榆\*

(中山大学肿瘤防治中心肿瘤内科//华南肿瘤学国家重点实验室, 广东广州 510060)

**摘要:**【目的】探索双链 RNA 依赖的蛋白激酶(PKR)联合其他肿瘤代谢相关蛋白能否作为非小细胞肺癌(NSCLC)的更有效的预测因子;同时拟研究部分肿瘤代谢相关化合物,如胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)抑制剂、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制剂等与 PKR 表达的关系,拟求达到更好的靶向治疗及个体化治疗的目的。【方法】免疫组化检测 212 例 NSCLC 中 PKR、IGF-1R 表达情况,并用于 Kaplan-Meier 生存分析。Western Blotting 检测 13 种肺癌细胞株 PKR、p-PKR 表达;磺基罗丹明 B 法(SRB)检测 PPP、Rapamycin 等药物作用后对高表达及低表达 p-PKR 细胞的抑制率。【结果】全组 NSCLC 患者中,PKR<sup>low</sup>/IGF-1R<sup>high</sup> 患者的 5 年总生存率(21.6%)明显低于 PKR<sup>high</sup>/IGF-1R<sup>low</sup> 患者(74.6%)及其他患者(58.2%) ( $P < 0.0001$ ),单、多因素分析提示 PKR/IGF-1R 联合标记物为 NSCLC 患者总生存率的独立预后因素。SRB 结果提示,第 1~3 天,IGF-1R 抑制剂 PPP 3  $\mu\text{mol/L}$  在 6 个肺癌细胞株中均能显著抑制细胞生长,在 0.3  $\mu\text{mol/L}$  剂量低表达 PKR 和/或 p-PKR 的 H1792 和 H292 细胞株中,较其他细胞株更能抑制细胞生长。而 mTOR 抑制剂 Rapamycin 采用 1、0.1 及 0.01  $\mu\text{mol/L}$  3 个剂量级在各细胞株均未见明显抑制细胞生长的区别。【结论】PKR 联合 IGF-1R 可预测 NSCLC 的预后,PKR 低表达的 H1792、H292 细胞株中,IGF-1R 抑制剂 PPP 具有显著抑制作用,但对于 mTOR 抑制剂 Rapamycin,未见明显作用,提示可通过检测 PKR 的表达来选择适合 IGF-1R 抑制剂 PPP 的病人。

**关键词:** 双链 RNA 依赖的蛋白激酶(PKR); IGF-1R, mTOR; 靶向治疗; 预后

**中图分类号:** R73      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2012)06-0781-06

## Value of Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase on Prognosis Prediction and Screening Target Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer

GUO Cheng-cheng, HUANG He, LIANG Chao-yong, TIAN Ying, LIU Ting-zhi, LI Xue-ying,

HONG Huang-ming, LIN Tong-yu\*

(State Key Laboratory of Oncology in South China//Cancer Center Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】 Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is a hot pot in cancer research. However, it should be confirmed that whether PKR is an independent prognostic variable in the patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). In the present study, we investigated the correlation between PKR and metabolism related biomarkers for NSCLC, identified the markers that could further improve the prognostic significance of PKR. On the other hand, we planned to study the relationship between PKR and some tumor metabolism related products, such as IGF-1R inhibitors and mTOR inhibitors, so as to improve the outcome of individualized target treatment. 【Methods】 Tissue samples obtained from 212 lung cancer patients were stained with an anti-PKR and anti-IGF-1R. Immunohistochemical expression was scored and used for Kaplan-Meier survival analysis. Western blotting was used to analysis PKR and p-PKR expression in 13 lung cancer cell lines, and Sulforhodamine B method (SRB) was used to detect drug inducing Cell inhibitory rate. 【Results】 The 5-year overall survival rate in PKR<sup>low</sup>/IGF-1R<sup>high</sup> patients (21.6%) was significantly lower than that of PKR<sup>high</sup>/IGF-1R<sup>low</sup> patients (74.6%) and others patients (58.2%) ( $P < 0.0001$ ). Univariate and multivariate Cox analyses revealed that this PKR/IGF-1R combination was an independent predictor of overall survival. SRB suggested that IGF-1R

收稿日期: 2012-08-20

基金项目: 广州市科技计划项目(2006Z3-E0021)

作者简介: 郭铮铮, 住院医师, 肿瘤内科博士, 研究方向: 肿瘤治疗的个体化及靶向治疗, E-mail: guochch@sysucc.org.cn; \* 通信作者: 林桐榆, 教授、主任医师、博士生导师, 研究方向: 肿瘤的内科治疗, E-mail: Linty@sysucc.org.cn

inhibitor PPP can significantly inhibit cell growth in all of the six cell lines in 3  $\mu\text{mol/L}$  dose in d1-3. In 0.3  $\mu\text{mol/L}$  doses, PPP can inhibit the cell growth in H1792 and H292 cells, which weakly expressed PKR and/or p-PKR. There were no significant difference when treated in mTOR inhibitor Rapamycin in 3 dose levels (1, 0.1 and 0.01  $\mu\text{mol/L}$ ) in 6 cell lines. 【Conclusion】PKR/IGF1-R is a significant predictor of prognosis for NSCLC. PKR/IGF1-R may be a promising approach to improving screening efficiency and predicting prognosis in NSCLC patients. H292, H1792, which are low expression of PKR, are sensitive to IGF-1R inhibitor PPP, but not to mTOR inhibitor Rapamycin. What's more, it's valuable to select the NSCLC patients who are sensitive to the IGF-1R inhibitor with the detection of PKR expression.

**Key words:** double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR); IGF-1R; mTOR; target therapy; prognosis]

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2012, 33(6): 781-786]

目前在手术、化疗或放射的综合治疗手段下,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 5 年生存率仍小于 10%<sup>[1]</sup>。双链 RNA 依赖的蛋白激酶(dsRNA-dependent protein kinase, PKR)作为先天免疫抗病毒蛋白而被认识后,在生长调节、细胞凋亡、增殖、信号转导、分化、炎症、细胞因子等都被认为有重要作用<sup>[2]</sup>。前期研究中发现,PKR 是 NSCLC 的潜在肿瘤标志物,高表达的 PKR 预示 NSCLC 预后良好<sup>[3]</sup>,联合其他肿瘤代谢相关蛋白有可能作为 NSCLC 的更有效的预测因子。同时 PKR 与代谢内稳态密切相关,可调节胰岛素/胰岛素样生长因子通路,这在肿瘤代谢这一热议领域有举足轻重的地位<sup>[4]</sup>。目前,有多种肿瘤代谢相关的化合物作为抗肿瘤热门靶点,如胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor I receptor, IGF-1R) 抑制剂和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抑制剂,但其在肺癌中的价值仍有争议。因此,寻找能区分敏感的病人接受这两种抑制剂的治疗,将有非常重要的意义。本研究拟通过对检测 PKR 联合 IGF-1R 作为联合肿瘤标记物在肺癌患者中的预测预后价值,并比较 IGF-1R 抑制剂和下游的 mTOR 抑制剂在不同表达水平的 PKR 细胞株的作用情况,以寻找 PKR 作为药物筛选靶点的价值,探索 PKR 在 IGF-1R 抑制剂和 mTOR 抑制剂的靶向治疗中的指示性意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病例资料

选取 2004-2007 年 NSCLC 组织标本共 212 例(119 腺癌和 93 鳞状细胞癌),均为 I~IV 期未接受新辅助或辅助治疗的非小细胞肺癌患者入组本研究。患者的分期按照 2009 年修订的肺癌国际

分期,均为外科-病理分期,记录所有患者的详细的临床和病理资料,包括流行病学资料、吸烟史(从未和曾经吸烟者)、病理分期(TNM)、整体存活率数据。

### 1.2 免疫组化

免疫组化采用 EnVision 两步法进行,按说明书步骤进行。确定阳性标准:在高倍镜下( $\times 400$ )对每张切片随机选择 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,共计 500 个。着色强度:无色为 0 分,淡棕色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分;计算每张切片阳性细胞百分率,阳性细胞分级 < 25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分;51%~75% 为 3 分,> 75% 为 4 分。两项得分相乘,并取 5 个高倍视野的平均值,得到范围在 0~12 分的分数,由此分为 4 个等级:阴性(0~1)、弱阳性(2~4)、阳性(5~8)、强阳性(9~12),大于 2 分视为阳性结果。

### 1.3 细胞培养

文献报道 H1299、H460、H226 为 IGF-1R 抑制剂(R1507, PQIP)及 mTOR 抑制剂(RAD001, Rapamycin)耐药的细胞株, H292, H322, A549 为上述两种抑制剂敏感的细胞株<sup>[5-8]</sup>。我们选择的 A549, H1299, H1792, H226, H322, CALU-3, H1347, H1650, H460, H661, CALU-1, H292, 838A 肺癌细胞株均来自美国菌种收藏中心(ATCC, Manassas, VA)。所有细胞株均保持在 RPMI 1640 培养基中培养,其中含体积分数 10% 小牛血清, 10 mmol/L 谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。所有实验均在细胞对数生长期进行。

### 1.4 Western blotting 检测 PKR、p-PKR 等蛋白的表达情况

检测蛋白表达收集各肺癌细胞,分别裂解细胞提取其总蛋白,50  $\mu\text{g}$  蛋白经 6% 或 10% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离后转移至硝酸纤

纤维素膜,室温封闭 1 h,一抗: $\beta$ -catin(1:10 000, Sigma)、PKR(1:1 000, Santa Cruz Biotechnology 公司)、p-PKR(1:1 000, Cell Signaling 公司)4℃孵育过夜,用含 0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液(TBST)漂洗 3 次,每次 10 min;二抗以 5%脱脂牛奶按 1:10 000 浓度稀释,与膜一起密封后置室温 1 h。用 TBST 溶液洗涤 3 次,每次 10 min。LINCOR 公司 Odyssey 计算机扫描仪 CLx ODY0518 扫描 PVDF 膜,应用 Odyssey software 记录各条带。 $\beta$ -actin 作为内参。每个样本重复 3 次。

### 1.5 磺基罗丹明 B 法 (sulforhodamine B, SRB) 测定细胞生长情况

1.5.1 细胞系细胞密度梯度配置 取对数生长期的 6 种细胞系 H1299, H226, H322, H1792, H292, H460, 用含体积分数 10%的新生小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液调整细胞密度为 3 000 个/孔,分别加入 PPP(IGF-1R 抑制剂 Picropodophyllotoxin, 美国 tocris 公司)3、0.3、0.03  $\mu\text{mol/L}$ , Rapamycin(mTOR 抑制剂 Rapamycin, 美国 Sigma 公司)1、0.1、0.01  $\mu\text{mol/L}$ , 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  的条件下孵育 24、48、72 h, 每种处理药品设置 3 个复孔。

1.5.2 SRB 法测定 96 孔板细胞培养孔的贴壁细胞, 每孔轻柔加入 70  $\mu\text{L}$  经 4℃预冷的 10%的三氯醋酸(TCA), 于 4℃1 h 放置后, 自来水清洗 5 次除去三氯醋酸、培养液、低分子量代谢物、血清蛋白, 空气干燥后存放于室温中。干燥后, 每孔加入以 0.4%体积比溶于 1%冰醋酸的 SRB 70  $\mu\text{L}$ , 37℃放置 30 min 后用 1%冰醋酸漂洗 5 次, 自然晾干加入 10 mmol/L pH 10.5 Tris 液 100  $\mu\text{L}$  溶解, 漩涡振荡器振摇 5 min 后于波长 570 nm 处测定其吸光度(D)值。

1.5.3 数据分析 计算平均值, 画出生长曲线。

### 1.6 统计分析

肿瘤标志物以中位数得分为界, 分为低表达组和高表达组。在单因素分析, 连续和分类变量分别采用独立样本  $t$  检验和  $\chi^2$  检验。对生存概率的估计采用 Kaplan-Meier 法, 并用 Log-Rank 法对结果间的差异进行显著性检验采用 Cox 比例风险模型进行多因素分析, 调整临床和病理参数(年龄, 性别, 吸烟状况, 肿瘤组织学)的生物标志物的表达对生存时间的影响。双侧检验,  $P < 0.05$  认为有统计学意义。统计分析软件采用 SPSS13.0。

## 2 结果

### 2.1 PKR 和 IGF-1R 联合作为肿瘤标志物对 NSCLC 的预后价值

表 1 为 212 例 NSCLC 患者的临床特征。其中患者接受的化疗方案包括: 紫杉类+顺铂/卡铂(79 例), 吉西他滨+顺铂/卡铂(66 例), 长春瑞滨+顺铂/卡铂(38 例), 吉非替尼(10 例), 其他非铂类的方案(12 例)。我们将 PKR 阴性或弱阳性表达归为 PKR<sup>low</sup>, 阳性或强阳性表达归为 PKR<sup>high</sup>, 同理分类 IGF-1R<sup>low</sup> 及 IGF-1R<sup>high</sup>。进而统计分析不同表达强度的 PKR 联合 IGF-1R 对患者生存的影响。结果发现, 如图 1 所示, 全组 NSCLC 患者中, PKR<sup>high</sup>/IGF-1R<sup>low</sup>, 双高及双低, PKR<sup>low</sup>/IGF-1R<sup>high</sup> 5 年总生存(OS)分别为 74.6%, 58.2%, 21.6%, 呈逐渐下降的趋势( $P < 0.0001$ )。单因素

表 1 212 例 NSCLC 患者的临床特征

Table 1 The characteristic of 212 NSCLC patients (cases)

Characteristic	Total	PKR <sup>high</sup> /IGF-1R <sup>low</sup>	PKR <sup>low</sup> /IGF-1R <sup>high</sup>	Others
Age	212	54	61	97
Gender				
Female	110	26	32	52
Male	102	28	27	47
Histology				
denocarcinoma	119	29	31	59
SCC	93	24	26	42
Tabacco History				
No	28	7	9	12
Yes	184	56	46	82
Pathological Stage				
IA/IB	6	3	1	2
IIA/IIIB	30	8	9	13
IIIA/IIIB	91	22	31	38
IV	85	21	20	44
Treatment				
O	7	2	3	2
O+C	82	22	21	39
O+C+R	3	1	2	0
C	83	17	26	40
C+R	37	12	9	16

SCC: squamous cell carcinoma; O: operation; R: radiotherapy; C: chemotherapy

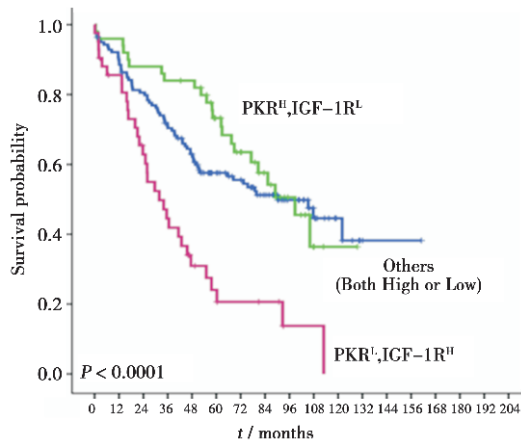


图 1 PKR/IGF1-R 联合标记物对 NSCLC 患者总生存率的预后预测价值

Fig.1 Prognostic significance of markers as assessed using Kaplan-Meier survival estimates and the log-rank test

分析提示,组织病理类型(HR:1.50,95%CI:0.91-2.25,  $P = 0.03$ )、分期(HR:1.97,95%CI:1.10~3.37,  $P = 0.01$ )、PKR/IGF-1R(HR:5.5,95%CI:2.29~12.53,  $P < 0.0001$ )、年龄(HR:1.04,95%CI:1.01~1.07,  $P = 0.04$ )为总生存的独立预后因素。多因素分析显示,分期(HR:1.84,95%CI:1.01~3.16,  $P = 0.01$ )、PKR/IGF-1R(HR:5.1,95%CI:2.19~12.16,  $P < 0.0001$ )均为总生存的独立预后因素。

2.2 PKR 表达与 IGF-1R 及 mTOR 抑制剂表达之间的关系

13 种肺癌细胞株中 PKR、p-PKR 蛋白表达情况详见图 2。在对上述两类抑制剂耐药的细胞株 H1299、H460、H226 为 PKR 和/或 p-PKR 高表达,

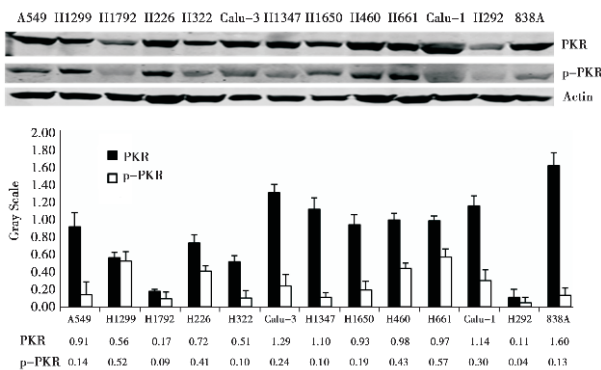


图 2 13 种 NSCLC 细胞株中 PKR、p-PKR 的表达情况  
Fig.2 The PKR, p-PKR expressions in 13 NSCLC cell lines

表 3 IGF-1R 抑制剂(PPP)不同剂量在各肺癌细胞株中培养 1~3 d 后的生长情况

Table 3 The OD value of different doses of IGF-1R inhibitor (PPP) in lung cancer cells in day 1-3

( $D(570\text{ nm}), \bar{x} \pm s$ )

	Control	PPP/( $\mu\text{mol/L}$ )		
		0.03	0.3	3
<b>H1792</b>				
d0	0.21 ± 0.06	0.21 ± 0.06	0.21 ± 0.06	0.21 ± 0.06
d1	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.11	0.33 ± 0.12
d2	0.62 ± 0.04	0.62 ± 0.16	0.54 ± 0.08	0.26 ± 0.07
d3	1.16 ± 0.08	1.05 ± 0.11	0.55 ± 0.19	0.24 ± 0.05
<b>H292</b>				
d0	0.14 ± 0.07	0.14 ± 0.07	0.14 ± 0.07	0.14 ± 0.07
d1	0.30 ± 0.16	0.33 ± 0.11	0.29 ± 0.11	0.21 ± 0.09
d2	0.45 ± 0.17	0.50 ± 0.12	0.43 ± 0.12	0.22 ± 0.13
d3	0.69 ± 0.15	0.71 ± 0.13	0.50 ± 0.13	0.22 ± 0.11
<b>H322</b>				
d0	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.06
d1	0.39 ± 0.04	0.54 ± 0.01	0.36 ± 0.06	0.24 ± 0.06
d2	0.63 ± 0.09	0.68 ± 0.17	0.6 ± 0.04	0.25 ± 0.08
d3	1.16 ± 0.07	1.17 ± 0.02	1.12 ± 0.09	0.23 ± 0.06
<b>H226</b>				
d0	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.06
d1	0.40 ± 0.17	0.43 ± 0.03	0.43 ± 0.12	0.32 ± 0.13
d2	0.80 ± 0.23	0.80 ± 0.14	0.75 ± 0.14	0.28 ± 0.19
d3	1.30 ± 0.16	1.44 ± 0.13	1.45 ± 0.12	0.39 ± 0.12
<b>H1299</b>				
d0	0.12 ± 0.11	0.12 ± 0.11	0.12 ± 0.11	0.12 ± 0.11
d1	0.53 ± 0.06	0.55 ± 0.02	0.52 ± 0.13	0.51 ± 0.19
d2	1.13 ± 0.39	1.11 ± 0.35	0.79 ± 0.19	0.48 ± 0.14
d3	1.78 ± 0.08	1.73 ± 0.04	1.75 ± 0.12	0.46 ± 0.13
<b>H460</b>				
d0	0.20 ± 0.08	0.20 ± 0.08	0.20 ± 0.08	0.20 ± 0.08
d1	0.58 ± 0.03	0.42 ± 0.16	0.41 ± 0.12	0.34 ± 0.08
d2	1.12 ± 0.13	0.96 ± 0.12	0.91 ± 0.27	0.25 ± 0.19
d3	1.85 ± 0.12	1.82 ± 0.04	1.79 ± 0.02	0.33 ± 0.10

而对其敏感的细胞株 H292、H322、A549 为 PKR 和/或 p-PKR 弱表达。选取 PKR、p-PKR 均低表达(H1792, H292, H322)和均高表达(H226、H1299、H460)的细胞株,作为靶点细胞株进行 IGF-1R 抑制剂、mTOR 抑制剂的药物敏感性检测。

2.3 细胞生长抑制率检测

2.3.1 IGF1-R 抑制剂 PPP 对 NSCLC 细胞株的抑制率检测 SRB 法显示,第 1~3 天(d1-3),IGF-

表4 mTOR 抑制剂(雷帕霉素)不同剂量在肺癌细胞株中培养 1~3 d 后的生长情况

Table 4 The OD value of different doses of mTOR inhibitor(Rapamycin) in lung cancer cells in day 1-3 (D(570 nm),  $\bar{x} \pm s$ )

	Control	Rapamycin/( $\mu\text{mol/L}$ )		
		0.01	0.1	1
<b>H1792</b>				
d0	0.35 ± 0.06	0.35 ± 0.06	0.35 ± 0.06	0.35 ± 0.06
d1	0.40 ± 0.07	0.52 ± 0.10	0.75 ± 0.33	0.66 ± 0.36
d2	1.17 ± 0.20	1.28 ± 0.19	1.10 ± 0.08	1.01 ± 0.21
d3	1.00 ± 0.29	1.99 ± 0.13	1.41 ± 0.08	1.16 ± 0.09
<b>H292</b>				
d0	0.28 ± 0.09	0.28 ± 0.09	0.28 ± 0.09	0.28 ± 0.09
d1	0.42 ± 0.02	0.45 ± 0.15	0.70 ± 0.07	0.68 ± 0.23
d2	1.17 ± 0.11	0.97 ± 0.11	0.75 ± 0.24	0.84 ± 0.09
d3	1.86 ± 0.21	2.33 ± 0.15	2.01 ± 0.10	1.88 ± 0.04
<b>H322</b>				
d0	0.42 ± 0.14	0.42 ± 0.14	0.42 ± 0.14	0.42 ± 0.14
d1	0.50 ± 0.27	0.81 ± 0.08	0.91 ± 0.19	0.86 ± 0.21
d2	1.15 ± 0.22	1.37 ± 0.20	1.02 ± 0.12	1.42 ± 0.16
d3	1.38 ± 0.21	2.51 ± 0.33	2.17 ± 0.19	1.88 ± 0.24
<b>H226</b>				
d0	0.53 ± 0.14	0.53 ± 0.14	0.53 ± 0.14	0.53 ± 0.14
d1	1.30 ± 0.11	1.15 ± 0.25	1.37 ± 0.16	1.40 ± 0.14
d2	2.52 ± 0.16	2.15 ± 0.34	1.75 ± 0.08	1.85 ± 0.12
d3	2.61 ± 0.19	2.6 ± 0.11	2.67 ± 0.15	2.41 ± 0.16
<b>H1299</b>				
d0	0.48 ± 0.12	0.48 ± 0.12	0.48 ± 0.12	0.48 ± 0.12
d1	0.80 ± 0.13	1.28 ± 0.13	1.39 ± 0.04	1.47 ± 0.21
d2	2.10 ± 0.05	2.23 ± 0.16	1.88 ± 0.18	2.62 ± 0.19
d3	2.84 ± 0.31	2.96 ± 0.19	3.03 ± 0.09	3.49 ± 0.17
<b>H460</b>				
d0	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04
d1	0.71 ± 0.28	0.92 ± 0.09	0.85 ± 0.13	0.83 ± 0.07
d2	2.37 ± 0.31	1.78 ± 0.09	2.35 ± 0.26	2.47 ± 0.13
d3	2.59 ± 0.41	2.97 ± 0.28	2.86 ± 0.14	2.88 ± 0.11

1R 抑制剂 PPP 3  $\mu\text{mol/L}$  在 H1792、H292、H322、H226、H1299、H460 等 6 个细胞株中均能显著抑制细胞生长,在 0.3  $\mu\text{mol/L}$  剂量时,在 H1792 和 H292(弱表达 PKR 和/或 p-PKR)细胞株中,d3 的光吸光度值分别为  $0.55 \pm 0.19$  及  $0.5 \pm 0.13$ , 较其他细胞株更能抑制细胞生长(表 3)。

2.3.2 mTOR 抑制剂 Rapamycin 对 NSCLC 细胞株的抑制率检测 SRB 法显示,d1-3,mTOR 抑制剂

Rapamycin 在 1、0.1、0.01  $\mu\text{mol/L}$  这 3 个剂量级上对以上 6 个细胞株中未见明显区别(表 4)。

### 3 讨论

#### 3.1 PKR 在 NSCLC 中作为肿瘤标记物价值

PKR 可使下游 eIF2a 蛋白磷酸化,从而抑制 NSCLC 中蛋白质的合成,进而导致细胞凋亡<sup>[9-11]</sup>,且 PKR 或 p-PKR 高表达,预示 NSCLC 的患者生存期较长,预后良好;而腺病毒转染的野生型 PKR 更能促进肺癌细胞的凋亡<sup>[3]</sup>。高表达的 PKR 更能促进肺癌细胞的凋亡,故高表达的患者预后较低表达的患者预后更佳。因此,PKR 表达不同,可作为筛选不同预后患者的指标。

#### 3.2 PKR 联合 IGF-1R 作为联合肿瘤代谢相关的标记物更能区分 NSCLC 的预后

作为能量代谢的重要一员,IGF 通路的分子在促进机体生长发育、组织修复、营养代谢及细胞分化等方面,都有重要的生物学作用。而 IGF-1R 为 IGF 的跨膜受体,与肿瘤的发生密切相关<sup>[12-13]</sup>。绝大部分肺癌细胞株表达 IGF-1R 的 mRNA 和蛋白,并有一定生物学功能<sup>[14]</sup>。Favoni 等<sup>[15]</sup>研究发现 NSCLC 中 IGF-1 的表达增高,功能增强;当上调 IGF-1R 后,肿瘤细胞的增殖及 DNA 合成都有所增加。因此,IGF-1R 表达升高预示着肿瘤细胞高增殖。另一方面,PKR 在能量代谢方面也有重要的作用,PKR 可直接与胰岛素受体底物(IRS)结合,从而影响营养通路与胰岛素活性<sup>[4]</sup>。结合 3.1 讨论,高表达 PKR 预示肿瘤预后良好,而低表达 IGF-1R 则预示肿瘤低增殖,因此 PKR 联合 IGF-1R 作为联合肿瘤标记物,可将 NSCLC 患者分为不同的预后组,为目前尚未有明确有意义肿瘤标记物的 NSCLC 的带来曙光。

#### 3.3 PKR 在筛选 IGF-1R 抑制剂及 mTOR 抑制剂敏感性中的价值及其机理

机制上,如前所述,由于 PKR 在肿瘤代谢方面有重要的作用,PKR 可通过 IRS 而间接影响 IGF 活性,当 IGF 与 IGF-1R 结合后可激活 IGF-1R,从而激活下游丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt/mTOR)信号通路,与细胞分化、生长、增殖、浸润、转移均有密切关系<sup>[16-20]</sup>。而 IGF-1R 对细胞凋亡的调控主要通过 PI3K/AKT/mTOR 信号

通路起作用。另一方面,当受上游 IGF-1R 等酪氨酸激酶受体激活时,处于最下游的 mTOR 表达缺失,从而负反馈抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路。与正常细胞不同的是,肿瘤细胞存在 PI3K/Akt/mTOR 的持续激活,故可反馈性影响上游 IGF-1/胰岛素信号。人们利用这种反馈性抑制的特性,尝试探索 mTOR 在抗肿瘤中的治疗价值,而且推断 mTOR 抑制剂结合 IGF-1R 抑制剂,有可能比单药使用更有效。首先,肿瘤细胞在上游信号通路被抑制后,对 mTOR 抑制剂的敏感性则明显提高,而且还抑制其他信号通路的激活;其次当各种信号抑制 mTOR 后,则可进而抑制 mTOR 对其他通道蛋白的负反馈性抑制;再次,IGF-1 可拮抗 mTOR 抑制剂雷帕霉素的抗肿瘤增殖作用,而 IGF-1R 抑制剂可增强肿瘤细胞对雷帕霉素抗增殖作用的敏感性。

针对该两种抑制剂的临床应用方面,经过多年研究,IGF-1R 已逐渐进入临床试验阶段。然而,目前仅在尤文肉瘤等少数肿瘤中获得客观有效率的报道,未见在肺癌中有阳性结果的报道。因此,联合用药或寻找敏感的 IGF-1R 抑制剂的群体就显得非常重要。另一方面,mTOR 抑制剂近年来已在各肿瘤中不断推向临床试验,如肾癌、淋巴瘤等。在肺癌中,mTOR 抑制剂雷帕霉素可有效抑制 NSCLC 细胞的生长。体内实验显示,雷帕霉素可通过诱导 *Ras* 基因表达从而抑制 NSCLC 肿瘤及肺泡上皮肿瘤的生长。另外,雷帕霉素联合多西紫杉醇在抑制肺癌细胞的生长中有协同作用。因此,我们推断,mTOR 抑制剂联合其他药物,尤其是上游通路蛋白 IGF-1R 有增强抗肿瘤疗效的可能。但筛选敏感的肿瘤细胞或特定人群对于单药或联合治疗则尤为重要。

我们尝试寻找 PKR 作为靶向药物预测方面的指示性意义。经文献查找发现 PKR 低表达的 NSCLC 细胞株,对 IGF-1R 抑制剂及 mTOR 抑制剂较敏感,反之,则耐药。实验结果提示,PKR 低表达的 H292、H1792 细胞株中,IGF-1R 抑制剂 PPP 敏感性较高,但对于 mTOR 抑制剂,未见以上的规律。其原因有可能是,mTOR 相对于 IGF-1R 来说,在信号通路的下游,故 PKR 的作用相对不明显。由此推理,PKR 有可能作为 IGF-1R 抑制剂筛选的靶点,而 PKR 作为 mTOR 抑制剂的筛选靶点,则有待进一步商榷。

### 3.4 结论及未来研究方向

本文已证实 PKR 联合 IGF-1R 作为联合标记

物,可作为预测 NSCLC 预后的良好指标,PKR<sup>high</sup>/IGF-1R<sup>low</sup> 的患者预后最好,反之则预后最差,机理可能是 PKR<sup>high</sup>/IGF-1R<sup>low</sup> 亚型更能促进细胞凋亡,抑制细胞增殖。不仅如此通过对比较 IGF-1R 抑制剂在不同表达水平的 PKR 细胞株的作用水平,我们发现 PKR 低表达的 H292、H1792 细胞株中,IGF-1R 抑制剂 PPP 敏感性较高,但对于 mTOR 抑制剂,未见以上的规律。因此,PKR 有可能作为 IGF-1R 抑制剂筛选的靶点。未来我们将进一步应用免疫组化,对 IGF-1R 抑制剂应用的病人进行 PKR 表达的测定,拟前瞻性测定 PKR 对筛选靶向药物 IGF-1R 抑制剂 PPP 的价值。

### 参考文献:

- [1] Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, et al. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(2): 254-266.
- [2] Garcia MA, Gil J, Ventoso I, et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(4): 1032-1060.
- [3] Pataer A, Raso MG, Correa AM, et al. Prognostic significance of RNA-dependent protein kinase on non-small cell lung cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(22): 5522 - 5528.
- [4] Nakamura T, Furuhashi M, Li P, et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis[J]. *Cell*, 2010, 140(3): 338-348.
- [5] Gong Y, Yao E, Shen R, et al. High expression levels of Total IGF-1R and sensitivity of NSCLC cells in vitro to an anti-IGF-1R antibody (R1507)[J]. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7273.
- [6] Hewish M, Chau I, Cunningham D. Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2009, 4(1): 54-72.
- [7] Roudier E, Mistafa O, Stenius U. Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p53-deficient cells to cytostatic drugs[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(11): 2706-2715.