四川大学学报（医学版）
J Sichuan Univ（Med Sci Edi） 2014；45(3)：355－361

·论著·

# MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路抑制剂在诱导恶性黑色素瘤细胞凋亡中的协同作用*

王馨苑[1]，承　尧[1]，杜吉佩[2]，陈德高[1]，杨雪杉[1]，杨志梅[1]，黄　宁[1△]

1.四川大学华西基础医学与法医学院 病理生理学教研室（成都 610041）；
2.四川大学华西基础医学与法医学院 法医物证学教研室（成都 610041）

**【摘要】 目的** 通过联合抑制 MEK 和 AKT 信号通路关键靶点分子，探讨克服细胞耐药性的靶向治疗方法。**方法** 体外培养和新鲜分离恶性黑色素瘤细胞株，分别在 0.5%和 5%血清浓度下单独或同时抑制靶点 MEK（U0126，20 μmol/L）和 AKT（LY294002，20 μmol/L），MTT 法检测细胞增殖，PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡情况。**结果** 当培养液血清浓度从 0.5%提高到 5%时，U0126 和 LY294002 对肿瘤细胞增殖的抑制效应明显降低。LY294002 以抑制细胞增殖为主，U0126 主要诱导细胞凋亡，二者作用效果与细胞是否具备该通路关键靶点活化变异无关。联合用药时诱导细胞凋亡普遍增强，LY294002 和 U0126 具有协同效应。**结论** 联合抑制 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路可较好地克服恶性黑色素瘤细胞的耐药性。

**【关键词】** 恶性黑色素细胞瘤　协同效应　MEK/ERK　PI3K/AKT

**Synergistic Effect of Targeted Inhibition of MEK/ERK and PI3K/AKT Survival Signaling Pathways on Induction of Apoptosis in Melanoma**

*WANG Xin-yuan*[1], *CHENG Yao*[1], *DU Ji-pei*[2], *CHEN De-gao*[1], *YANG Xue-shan*[1], *YANG Zhi-mei*[1], *HUANG Ning*[1△]. 1. *Department of Pathophysiology*, *West China School of Preclinical and Forensic Medicine*, *Sichuan University*, Chengdu 610041, China; 2. *Department of Forensic Genetics*, *West China School of Preclinical and Forensic Medicine*, *Sichuan University*, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: huangpanxiao@sina.com

**【Abstract】 Objective** The treatment of metastatic melanoma by conventional chemotherapeutic agents remains unsatisfactory. The present study was undertaken to reveal the role of co-inhibition of survival signaling pathways in apoptosis of melanoma cells. **Methods** A panel of human melanoma cell lines and fresh melanoma isolates was assessed for their sensitivity to the MEK inhibitor U0126 and/or AKT inhibitor LY294002. The proliferation and apoptosis of the cells were examined after treatment with the inhibitors. **Results** Constitutive activation of ERK1/2 and AKT was closely related to concentrations of serum in the culture medium (extracellular signals). The sensitivity of melanoma cells to apoptosis induced by inhibition of MEK/ERK was not correlated with the active BRAF mutation ($BRAF^{V600E}$). Inhibition of MEK/ERK predominantly induced apoptosis; whereas inhibition of PI3K/AKT primarily inhibited proliferation. Co-inhibition of MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT synergistically induced apoptosis. **Conclusion** Co-targeting MEK/ERK and PI3K/AKT pathways may further improve treatment for melanoma.

**【Key words】** Melanoma　Synergistic effect　MEK/ERK　PI3K/AKT

恶性黑色素瘤是一种高度侵袭性肿瘤，恶性度高，转移发生早，死亡率高，在我国和西方国家发病率逐年上升。恶性黑色素瘤对目前临床普遍采用的各种抗肿瘤治疗方法极不敏感[1]，化疗的金标准药物达卡巴嗪的有效率也仅为 8%～12%，晚期和有远处转移患者平均生存期限仅为 6～10 个月[2]。

目前晚期黑色素瘤治疗的一个主要的研究方向是个体化分子靶向治疗，即针对不同患者的基因突变类型，特异性地选定参与细胞癌变信号通路中的关键酶进行靶向抑制[3]。目前已经有多种针对不同信号通路的靶向抑制剂进入临床前期实验[4]。其中研究得较多的是 RAS/MAPK 和 PI3K/AKT 两条生存信号通路[5－7]。因此针对这 2 条通路开发靶向药物有广泛的临床应用前景。如已经在临床上应用的 BRAF 抑制剂 RG7204 有效率达 52.3%，肿瘤缩小的患者占 81.8%[8]。虽然 RG7204 有效率非常

* 国家理科人才培养基金——能力提高项目（No. J1103604）资助

△ 通讯作者，E-mail：huangpanxiao@sina.com

高,但维持时间较短,有些患者一两个月就出现耐药情况。因此关于此类药物的耐药机制,以及如何逆转耐药仍需深入研究,而联合用药以达到逆转耐药将是一个有前景的研究方向。本研究拟通过在恶性黑色素瘤细胞中分别抑制MEK和AKT通路,并与同时抑制这两条生存通路相比较,观察其对细胞增殖和凋亡的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

AKT抑制剂LY294002(Cat. No. 9901)购自Cell Signaling(Danvers,US),MEK抑制剂U0126(Cat. No. 662005)购自Merck公司(New Jersey,US)。抗体pAKT、AKT、pERK1/2和ERK1/2购自Cell Signaling(Danvers,US),β-actin及二抗购自Santa Cruze公司(Texas,US)。Propidium Iodide(Cat. No. P4170)及其它化学试剂均购自Sigma。

### 1.2 实验方法

**1.2.1** *细胞培养* 人恶性黑色素瘤细胞株(共9株)MM200、Sk-Mel-28、Mel-RMu、Mel-RM、Me4405、Mel-AT、IgR3、Mel-CV、Sk-Mel-110获赠于澳大利亚纽卡索大学Peter Hersey实验室,其中MM200、Sk-Mel-28、Mel-RMu为BRAF突变株($BRAF^{V600E}$),其余6株为野生型;Sk-Mel-110为PTEN突变株,其余8株为PTEN野生株。常规培养于DMEM培养基〔含5%或0.5%胎牛血清(FBS),2 mol/L谷氨酰胺〕,置于37 ℃,5%$CO_2$培养箱中培养。

从2例患者的恶性黑色素瘤组织中新鲜分离恶性黑色素瘤细胞,参照Peter Hersey实验室分离方法[9]。将新鲜组织用含抗生素的PBS冲洗4次,在无菌条件下将组织切成小于1 mm×1 mm×1 mm的组织块,加入胶原酶Ⅳ消化组织,4 ℃低速震荡过夜。第2 d取出后,室温静置5 min,收集上清(内中含单个细胞),离心获得细胞沉淀,PBS洗2遍后计数,培养于DMEM培养基(含10%FBS,2 mol/L谷氨酰胺),置于37 ℃,5% $CO_2$培养箱中培养。待细胞达到80%~90%融合后传代,第2~3代用于实验。

**1.2.2** *实验设计* 体外培养人恶性黑色素瘤细胞株,根据不同细胞外信号强度分为0.5%和5%血清组,检测细胞生存信号通路中ERK1/2和AKT的活化以及对靶向抑制剂U0126(20 μmol/L)、LY294002(20 μmol/L)的敏感度,以及联合用药的协同抑制效应。以细胞Mel-RM和MM200为例,明确U0126(20 μmol/L)和LY294002(20 μmol/L)对细胞生长的抑制机制。

**1.2.3** *蛋白质免疫印迹分析* 采用不同血清浓度(5%或0.5%)的培养液培养9株细胞24 h后,收集实验各组细胞($1\times10^7$/样本)沉淀,RIPE裂解液裂解获得全细胞蛋白,加入SDS凝胶加样缓冲液后煮沸5 min。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后,采用电转移将蛋白质转移至PVDF膜上,0.05 g/mL脱脂奶粉封闭,加入检测蛋白特异抗体p-ERK1/2(#9106),ERK(#9102),p-AKT(#4051),AKT(#9272)。4 ℃摇床过夜。TBS洗去未结合的抗体,加入相应HRP标记第二抗体(0.05 μg/mL),室温孵育2 h后,采用化学发光检测试剂盒显色,GE图像分析仪成像。以β-actin为内参照进行半定量分析,目标蛋白和β-actin条带灰度的比值作为目标蛋白相对表达量。磷酸化蛋白的表达量代表其活化程度。

**1.2.4** *细胞增殖活力检测* 将细胞制成悬液,每孔$1\times10^4$细胞接种于96孔板,每孔体积为200 μL,置于细胞培养箱中培养。待细胞贴壁后,按实验设计给予药物,以U0126和LY294002(均为20 μmol/L)作用于Mel-RM和MM200细胞,以未加药物处理的细胞为对照组,分别在24 h、48 h、72 h进行MTT测定。每孔加入5 mg/mL MTT溶液200 μL,37 ℃孵育4 h,终止培养,弃去孔内培养上清,每孔加入50 μL DMSO,振荡溶解后,在Bio-Rad 550型酶联免疫检测仪上测定在570 nm波长处的吸光度($A_{570}$)值。细胞存活率(%)=药物处理组$A_{570}$值/对照组$A_{570}$值×100%。

**1.2.5** *细胞凋亡检测* 以每孔$8\times10^4$细胞接种于24孔板中培养24 h后,按照实验设计更换不同血清浓度培养液或给予药物刺激。实验结束后进行PI染色,通过流式细胞仪检测细胞亚二倍体峰(Sub-G1峰)荧光强度,作为细胞凋亡的指标。每孔收集上清液,8 000 r/min离心留沉淀。每孔加入750 μL低渗PI缓冲液(PI 50 μg/mL,柠檬酸钠10 mg/mL,Triton×100 0.1%),37 ℃孵育20 min,用枪尖反复吹打后收集细胞悬液,与先前上清液离心获得的细胞沉淀置于同一管中。4 ℃染色过夜,流式细胞仪检测Sub-G1期荧光强度,以PI荧光所占面积与整体面积比例代表细胞凋亡率(%)。

### 1.3 统计学方法

组间比较用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。药物协同作用分析使用 Calcusyn 软件(Biosoft，Cambridge，UK；www. biosoft. com)计算联合指数(combination index，CI)，CI 大于 1 为两药物无相互作用，等于 1 为相加作用，小于 1 为协同作用，小于 0.3 为强协同作用。协同作用半数有效量(50% effective dose，ED50)计算采用相同的软件构建 ED50 等效应图，ED50 值以附加线下的点表示，代表协同作用，越靠近纵坐标轴提示协同效应越强。

## 2　结果

### 2.1　不同 FBS 浓度对恶性黑色素瘤细胞株中 ERK1/2 和 AKT 活化的影响

9 株恶性黑色素瘤细胞系中 ERK1/2 活化水平并不相同(图 1A)。在 FBS 浓度为 5%的条件下，ERK1/2 磷酸化水平为 FBS 浓度为 0.5%的培养液的 1.9 倍($P<0.05$)。

在培养的恶性黑色素瘤细胞中，IgR3 细胞系是野生型的 BRAF，却具有高水平的 ERK1/2 活化，甚至在不含血清的培养液中培养 24 h 也能检测到较强的 ERK1/2 的活化(结果未显示)；但同样为 BRAF 野生型细胞的 Sk-Mel-110 和 Mel-CV 在 5% FBS 的培养液中 ERK1/2 活化程度却很低。$BRAF^{V600E}$细胞株 MM200 也没有明显 ERK1/2 的活化。因此，ERK1/2 活化与是否存在 BRAF 变异并不相关。

如图 1B 所示，细胞培养在含不同浓度 FBS 的培养液中，AKT 活化的水平也不一致。与 ERK1/2 活化相似，AKT 在恶性黑色素瘤细胞中的活化水平在 5%FBS 浓度培养液中高于 0.5%FBS 浓度培养液，但与细胞是否有PTEN突变无关，含有变异的 PTEN 的 Sk-Mel-110 细胞在 0.5%FBS 浓度培养液中并没有检测到 AKT 的活化。

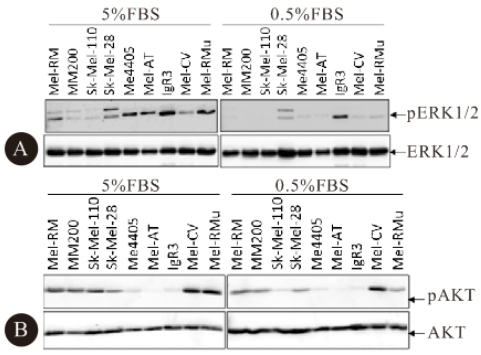


**图 1　恶性黑色素瘤细胞在 0.5%和 5%FBS 浓度培养基中 ERK1/2(A)和 AKT(B)持续活化状态**

**Fig 1　Condition of constitutive activation of ERK1/2 (A) and AKT (B) in melonoma cells with 5% and 0.5% concentrations of fetal bovine serum (FBS) in the culture medium**

### 2.2　在恶性黑色素瘤细胞中抑制 MEK 通路和 AKT 通路对细胞增殖和凋亡的影响

图 2 显示，与对照组相比，用 U0126 作用于 5%血清培养的细胞 72 h 后，Mel-RM 细胞变成长梭形，部分细胞变圆浮起；而 MM200 细胞并没有明显的形态学变化。而用 LY294002 作用于这两株细胞后，仅有少量细胞变圆浮起，大部分细胞并没有发生形态学变化。

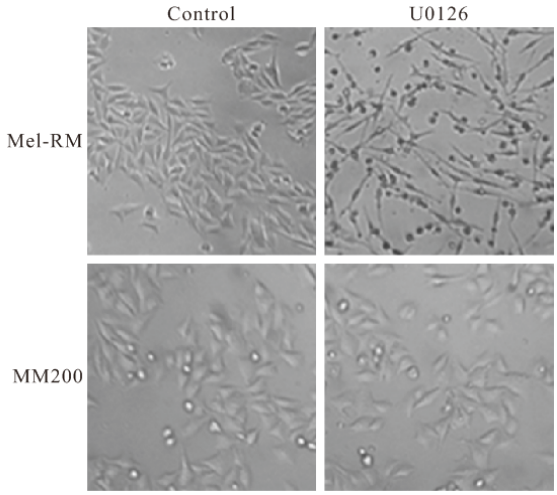


**图 2　U0126 作用 72 h 后 Mel-RM 和 MM200 的形态学变化。×100**

**Fig 2　Change of Mel-RM and MM200 morphology after U0126 treatment. ×100**

由图 3 可见，U0126 作用 Mel-RM 细胞株 72 h 后仅有 10%的细胞生存。但 U0126 对 MM200 细胞株的增殖活力并没有明显的抑制作用，作用 72 h 后仍有 90%细胞存活。LY294002 可以抑制 Mel-RM 和 MM200 的增殖活性，作用于细胞 72 h 后，Mel-RM 细胞仅有 42%存活，而 MM200 细胞有 60%存活。

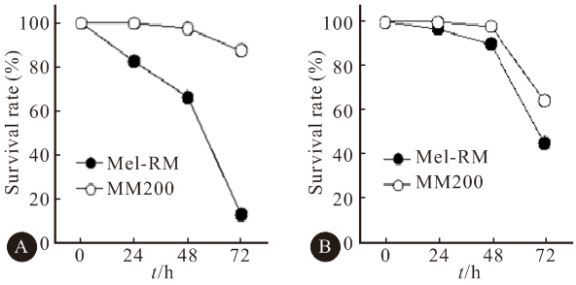


**图 3　U0126 (A)和 LY294002 (B)对 Mel-RM 和 MM200 细胞存活率影响**

**Fig 3　U0126 (A) and LY294002 (B) induced growth inhibition in Mel-RM and MM200 cells**

由图 4 可见,U0126 诱导 Mel-RM 和 MM200 细胞凋亡,其时间-凋亡百分率曲线和 MTT 方法检测到的细胞增殖抑制曲线趋势基本一致。U0126 作用 72 h 后,70% Mel-RM 细胞发生凋亡,但是在 MM200 只检测到 5% 细胞发生凋亡。当使用 LY294002 作用 Mel-RM 和 MM200 细胞时,只有很少量的细胞发生凋亡,LY294002 作用 72 h 后在 Mel-RM 检测到少量细胞发生凋亡,而 MM200 仅有 5%。说明在恶性黑色素瘤细胞中 AKT 抑制剂 LY294002 主要抑制细胞增殖而 MEK 抑制剂 U0126 主要诱导细胞凋亡。

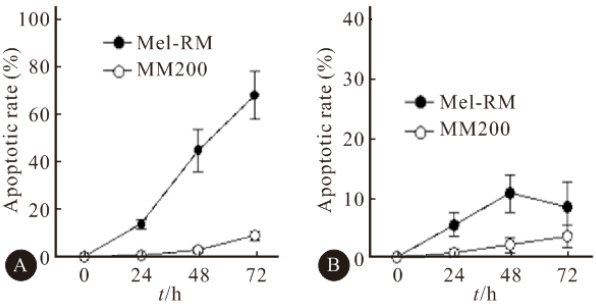


**图 4 U0126 (A)和 LY294002 (B)对 Mel-RM 和 MM200 细胞凋亡率的影响**

**Fig 4 U0126 (A) and LY294002 (B) induced apoptosis in Mel-RM and MM200 cells**

## 2.3 FBS 浓度及 BRAF 活化变异对 U0126 诱导恶性黑色素瘤细胞凋亡的影响

图 5A 显示 U0126 诱导后,5%FBS 中的细胞比 0.5%FBS 中的细胞凋亡率更低,抗凋亡作用更强($P<0.05$),说明培养液中的血清浓度影响了 U0126 促细胞凋亡的作用。

我们用含 0.5%FBS 的培养液培养 9 株恶性黑色素瘤细胞,进一步检测不同细胞株中对 U0126 诱导细胞凋亡的敏感性。在细胞系 Mel-RM、Mel-AT 和 Sk-Mel-28 超过 40% 的细胞发生凋亡,而在 MM200、Sk-Mel-110 和 Mel-CV 细胞系少于 20% 的细胞发生凋亡(图 5B)。如前所述,细胞株 MM200、SK-Mel-28 和 Mel-RMu 具有 $BRAF^{V600E}$ 活化变异,由此推测,$BRAF^{V600E}$ 活化变异与细胞对 U0126 诱导凋亡的敏感性并没有关系。

## 2.4 联合应用 U0126 和 LY295002 对诱导恶性黑色素瘤细胞凋亡的影响

虽然单独使用20 μmol/L U0126或20 μmol/L LY294002作用于MM200的细胞时诱导凋亡效果

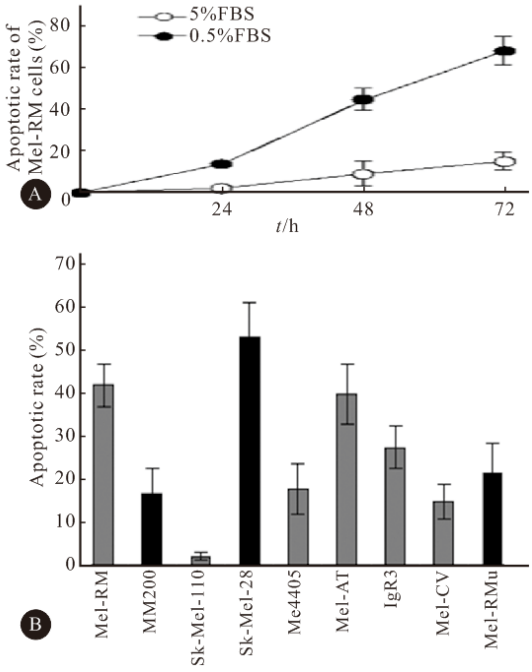


**图 5 20 μmol/L U0126 在不同 FBS 浓度培养液中对 Mel-RM 细胞(A)及在 0.5%FBS 培养液中对 9 株恶性黑色素细胞(B)凋亡的影响**

**Fig 5 20 μmol/L U0126 induced apoptosis in different concentrations of FBS (A) and different melonoma cells (B)**

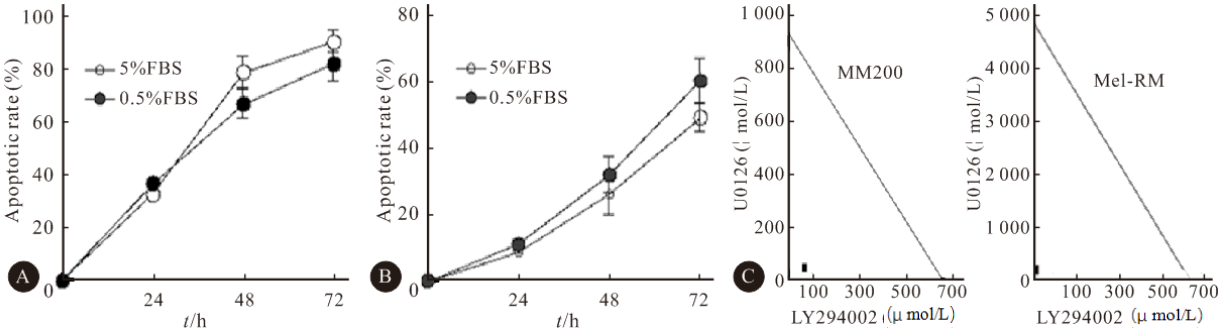


**图 6 20 μmol/L U0126 和 20 μmol/L LY294002 联合作用对 Mel-RM(A)和 MM200(B)细胞凋亡的影响及协同效应 ED50 等效应图(C)**

**Fig 6 20 μmol/L U0126 and 20 μmol/L LY294002 induced apoptosis in Mel-RM (A) and MM200 (B) cells and their synergies effect detected by Calcusyn software (C)**

差，但是联合用药 48 h 细胞凋亡百分率超过 25%，在 72 h 超过 50%（图 6），说明联合使用 U0126 和 LY294002 可以提高 Mel-RM 和 MM200 细胞的凋亡率。我们又检测了同时抑制 MEK 和 AKT 能否促进在相对较高血清浓度下培养的细胞发生凋亡，结果表明，同时使用 U0126 和 LY294002 也可以促进培养在 5%FBS 的培养液中 Mel-RM 和 MM200 发生凋亡，凋亡百分率与 0.5%FBS 培养的细胞基本一致。在其余恶性黑色素瘤细胞株中，联合应用抑制 MEK 和 AKT 抑制剂也可以提高多数细胞的凋亡率（图 7）。

如附表所示，除了 U0126 和 LY294002 作用于 MM200 细胞 24 h 的 CI>1 外，其余各组的 CI 均<1，提示 U0126 和 LY294002 在诱导细胞凋亡方面具有协同效应，其中，用 20 μmol/L U0126 和 20 μmol/L LY294002 作用于 Mel-RM 24 h 可以观察到很强的协同效应（CI<0.3），MM200 细胞系在联合用药 48 h 和 72 h 有强协同效应（CI<0.3）。

## 2.5　在新鲜分离的恶性黑色素瘤细胞中 U0126 和 LY294002 协同诱导细胞凋亡的结果

由图 8 可见，新鲜分离的恶性黑色素瘤细胞对 20 μmol/L LY294002 或 20 μmol/L U0126 单独诱导的凋亡相对抵抗，但在 U0126 和 LY294002 联合作用后，细胞凋亡的百分率高于单独用药（$P<0.001$）。

20 μmol/L U0126 和 20 μmol/L LY294002 同时作用于新鲜分离细胞 48 h 后，ED50 等效应图结果提示 U0126 和 LY294002 具有协同效应（图 9）。

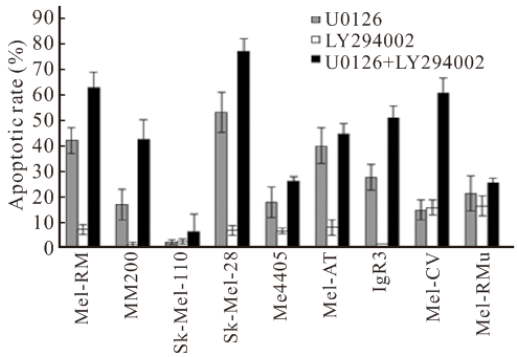


**图 7　U0126 和 LY294002 分别及联合作用对恶性黑色素瘤细胞凋亡影响**

**Fig 7　U0126 and LY294002 induced apoptosis in melonoma cells**

**附表　联合抑制 MEK/ERK1/2 和 PI3K/AKT 信号通路可协同抑制细胞凋亡**

**Table　Synergistic effect of co-Inhibition of MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT on cell apoptosis**

| | U0126 (μmol/L) | LY294002 (μmol/L) | Mel-RM | | MM200 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $Fa^2$ | CI | $Fa^2$ | CI |
| 24 h | 5 | 5 | 0.089 | 0.560 | 0.033 | >1 |
| | 10 | 10 | 0.150 | 0.408 | 0.038 | >1 |
| | 20 | 20 | 0.367 | 0.118 | 0.045 | >1 |
| 48 h | 5 | 5 | 0.340 | 0.528 | 0.04 | 0.193 |
| | 10 | 10 | 0.570 | 0.453 | 0.078 | 0.120 |
| | 20 | 20 | 0.668 | 0.623 | 0.266 | 0.022 |
| 72 h | 5 | 5 | 0.341 | 0.884 | 0.120 | 0.175 |
| | 10 | 10 | 0.642 | 0.731 | 0.163 | 0.237 |
| | 20 | 20 | 0.821 | 0.755 | 0.531 | 0.072 |

CI：Combination index

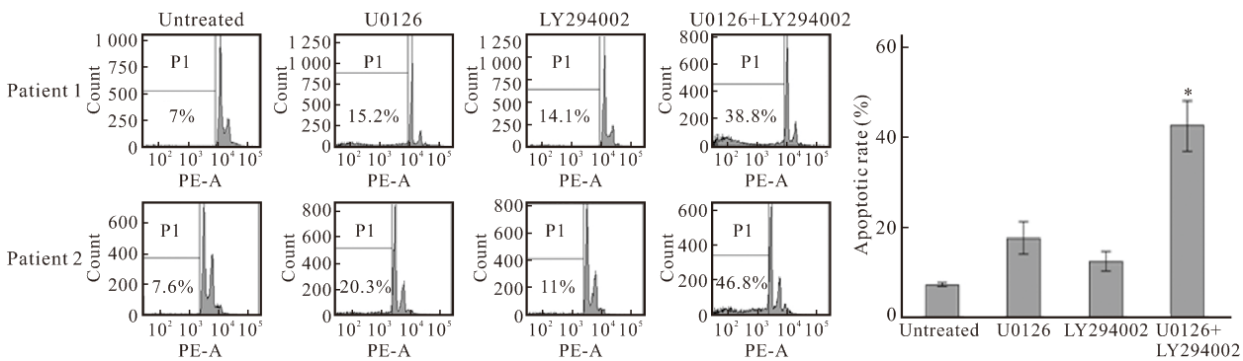


**图 8　20 μmol/L U0126 和 20 μmol/L LY294002 作用 48 h 对新鲜分离的的恶性黑色素瘤细胞凋亡率影响**

**Fig 8　20 μmol/L U0126 and 20 μmol/L LY294002 induced apoptosis in fresh isolated melonoma cells on 48 h**

* $P<0.001$, vs. other groups

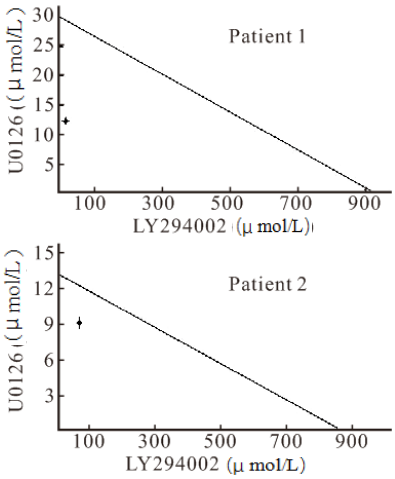


**图 9 20 μmol/L U0126 和 20 μmol/L LY294002 对新鲜分离黑色素瘤细胞协同效应的 ED50 等效应图**

**Fig 9 Synergies effect of 20 μmol/L U0126 and 20 μmol/L LY294002 indued apoptosis in fresh isolated melonoma cells detected by Calcusyn software**

## 3 讨论

凋亡是保持生命稳态的一个重要生理过程,也是多种治疗手段杀伤肿瘤细胞的主要机制。肿瘤细胞的一个基本特征就是能够在各种诱导凋亡的因子作用下生存,肿瘤细胞通过激活某些促进生存和增殖的信号传导通路获得强大的生存能力。RAS 和 RAF 家族成员活化变异普遍存在于恶性黑色素瘤中,而抑制 AKT 活化的调节因子 PTEN 的变异也出现在一些恶性黑色素瘤中[10, 11]。

研究证实 ERK1/2 在多种恶性黑色素瘤细胞系和体内的肿瘤中持续活化。BRAF 活化变异存在于近 70%的恶性黑色素瘤中[12],这可能是在大多数恶性黑色素瘤细胞中存在持续的 ERK1/2 活化的原因,也为靶向抑制 RAF-MEK-ERK 信号通路提供了依据。虽然有研究结果报道,恶性黑色素瘤对抑制 MEK/ERK 信号通路的敏感性与是否存在 BRAF 活化变异高度相关[13],BRAF 变异可以作为恶性黑色素瘤对抑制 MEK 敏感程度的指标。然而在前期临床试验中,单独使用 RAF 激酶抑制剂 BAY43-9006 并没用达到预期的治疗效果,只有联合使用其它化疗药物如 Taxol 才有确定的疗效[3]。而且对 BAY43-9006 有临床反应的恶性黑色素瘤病例与 BRAF 变异并没有相关性[14]。本研究中检测了 9 株体外培养的恶性黑色素瘤细胞株,ERK1/2 有不同程度的活化,但与是否具有 BRAF 变异没有关系。而且细胞对 MEK 抑制剂的敏感性与是否具有 BRAF 变异也不相关。因此 $BRAF^{V600E}$ 不能作为临床上使用 MEK/ERK 信号通路抑制剂的治疗方案确定的依据。

除了 BRAF 变异,还有一小部分恶性黑色素瘤存在 N-RAS 活化变异[15],可能是这部分肿瘤中 ERK1/2 持续活化的原因。然而,RAS-RAF-MEK-ERK 信号传导通路也能够被许多其它的细胞外信号因子活化,如整合素 β3/粘附作用因子[16],通过酪氨酸激酶受体发挥作用的 autocrine 生长因子[17],如 IL-6、胰岛素生长因子、成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)。因此 ERK 的活化受多条信号通路活化的影响。在本研究中,改变培养液的血清浓度后,ERK1/2 活化水平与血清浓度正相关。而且降低培养液血清浓度,可以显著提高细胞对 ERK1/2 信号通路抑制剂的敏感性,说明 RAS-RAF-MEK-ERK 信号传导通路受胞外信号调节多于信号通路内靶点分子的变异。

PI3K-AKT 细胞生存信号通路在维持恶性黑色素瘤细胞生存优势同样具有重要地位[6]。AKT 家族包括 3 个家族成员,AKT1、AKT2 和 AKT3。在恶性黑色素瘤中 AKT3 存在广泛上调[18]。AKT 在大部分恶性黑色素瘤细胞系中持续活化,但是活化的机制不明。RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路也可导致 PI3K-AKT 通路的活化[7]。尽管大多数研究着重于 PTEN 在恶性黑色素瘤中的表达情况,但是 PTEN 的变异在恶性黑色素瘤中频率很低[19],因此并不能解释 PI3K-AKT 通路在大部分恶性黑色素瘤中活化的原因。在我们培养的恶性黑色素瘤细胞中,AKT 活化情况与 PTEN 变异并不一致,而是培养液中血清浓度成正相关。

不论是临床病人还是体外培养恶性黑色素瘤细胞对 ERK 和 AKT 抑制剂的敏感性个体差异都很大[20,21]。基于 ERK 和 AKT 的活化以及抑制剂的效果与 BRAF、NRAS 以及 PTEN 都没有显著相关性[22,23],所以目前还没有一个可以作为临床个性化用药的分子标准。当我们同时抑制 MEK/ERK (U0126)和 AKT(LY294002)通路后,在 9 株细胞中检测到不同程度的凋亡,而且联合用药的细胞凋亡率明显高于单独用药。联合用药诱导的细胞凋亡与培养液中血清的浓度并没有相关性,这一结果提示,联合用药有效抑制了细胞外信号对这两个生存通路的激活作用。当联合使用不同浓度 U0126 和 LY294002(5、10 和 20 μmol/L)分别作用细胞不同时间后,使用 Calcusyn 软件分析细胞凋亡率,分析

结果提示联合用药 48 h 甚至更长时间后，无论在敏感细胞株（Mel-RM）还是抵抗细胞株（MM200），U0126 和 LY294002 可以协同诱导细胞凋亡。这一结果提示，MEK/ERK 和 AKT 这两条生存通路同时在恶性黑色素瘤细胞中活化，并介导了恶性黑色素瘤耐受化学药物诱导的细胞凋亡，两条通路相对独立。这可能是临床治疗中患者针对单一通路靶点治疗效果差的原因。因此我们的结果提示同时抑制 MEK-ERK 信号通路和 PI3K-AKT 通路在治疗恶性黑色素瘤中可能更有效，并且有可能提高恶性黑色素细胞对其它化疗药物的敏感性。

## 参　考　文　献


1 Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, *et al*. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. Oncologist, 2011;16(1):5-24.

2 Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al*. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin, 2010;60(5):277-300.

3 Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, *et al*. Results of a Phase Ⅲ, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage Ⅲ or stage Ⅳ melanoma. J Clin Oncol, 2009;27(17):2823-2830.

4 Bollag G, Hirth P, Tsai J, *et al*. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. Nature, 2010;467(7315):596-599.

5 Nazarian R, Shi HB, Wang Q, *et al*. Melanomas acquire resistance to B-RAF (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. Nature, 2010;468(7326):973-977.

6 Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. Cancer J, 2012;18(2):142-147.

7 Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, *et al*. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy. Dermatol Res Pract, 2012; 2012:354191. doi:10.1155/2012/354191.

8 Yang H, Higgins B, Kolinsky K, *et al*. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. Cancer Res, 2010; 70(13):5518-5527.

9 Nguyen D, Zhang X, Hersey P. Regulation of TRAIL induced apoptosis of fresh melanoma isolates. Clin Cancer Res, 2001; 7(3):966s-973s.

10 Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, *et al*. A landscape of driver mutations in melanoma. Cell, 2012;150(2):251-263.

11 Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, *et al*. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. Cancer Res, 2011;71(7):2750-2760.

12 Colombino M, Capone M, Lissia A, *et al*. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. J Clin Oncol, 2012;30(20):2522-2529.

13 Flaherty KT, Infante JR, Daud A, *et al*. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. N Engl J Med, 2012; 367(18):1694-1703.

14 Ott PA, Hamilton A, Min C, *et al*. A phase Ⅱ trial of sorafenib in metastatic melanoma with tissue correlates. PLoS One, 2010; 5(12):e15588.

15 Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, *et al*. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. Melanoma Res, 2006;16(4):267-273.

16 Abdala-Valencia H, Berdnikovs S, Cook-Mills JM. Mechanisms for vascular cell adhesion molecule-1 activation of ERK1/2 during leukocyte transendothelial migration. PLoS One, 2011;6(10):e26706.

17 Pratsinis H, Constantinou V, Pavlakis K, *et al*. Exogenous and autocrine growth factors stimulate human intervertebral disc cell proliferation via the ERK and Akt pathways. J Orthop Res, 2012;30(6):958-964.

18 Shao Y, Aplin AE. Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF - targeted melanoma cells. Cancer Res, 2010;70(16):6670-6681.

19 Aguissa-Touré A-H, Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. Cell Mol Life Sci, 2012;69(9):1475-1491.

20 Mitsiades N, Chew SA, He B, *et al*. Genotype-dependent sensitivity of uveal melanoma cell lines to inhibition of B-Raf, MEK, and Akt kinases: rationale for personalized therapy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011;52(10):7248-7255.

21 Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, *et al*. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. Cancer Discov, 2014;4(1):94-109.

22 Davies MA, Stemke-Hale K, Lin E, *et al*. Integrated molecular and clinical analysis of AKT activation in metastatic melanoma. Clin Cancer Res, 2009;15(24):7538-7546.

23 Li Y, Takahashi M, Stork PJ. Ras-mutant cancer cells display B-Raf binding to Ras that activates extracellular signal-regulated kinase and is inhibited by protein kinase a phosphorylation. J Biol Chem, 2013;288(38):27646-27657.


（2013－10－09 收稿，2013－12－28 修回）

编辑　汤　洁