

PI3K/Akt 通路在 EGFR/KRAS 不同遗传背景 NSCLC 细胞对 TRAIL 敏感性中的作用

邓立力¹, 邓洪滨², 韩红霞¹, 李逸文¹

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: [目的] 探讨 PI3K/Akt 通路在肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 诱导携带 EGFR/KRAS 不同基因表型的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 细胞凋亡中的作用。[方法] CCK8 法检测 TRAIL 对 A549 和 PC9 细胞活性的影响; Western blot 检测 TRAIL 作用后 Akt、p-Akt 蛋白表达的变化。使用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 处理细胞, CCK8 法检测对 TRAIL 抗细胞增殖活力的影响; 流式细胞术检测对 TRAIL 诱导细胞凋亡和细胞周期影响。[结果] 当 TRAIL 浓度 < 100 ng/ml 时, A549 和 PC9 细胞的存活率与对照组无明显差异。当 TRAIL 浓度分别为 100 ng/ml [(64.29±11.39)% vs (100±12.07)%, $t=6.900$, $P=0.020$]、[(74.57±9.70)% vs (100±11.20)%, $t=4.786$, $P=0.041$] 和 500 ng/ml [(48.85±10.92)% vs (100±12.07)%, $t=13.390$, $P=0.006$] [(46.34±8.99)% vs (100±11.20)%, $t=18.419$, $P=0.003$] 时, A549 和 PC9 细胞存活率明显低于对照组。TRAIL 以时间依赖的方式上调 A549 和 PC9 细胞内的 p-Akt 的水平。使用 LY294002 抑制 PI3K/Akt 通路活性能够明显增加 TRAIL 抑制 A549 细胞 [(40.74±2.53)% vs (64.29±9.30)%, $t=6.092$, $P=0.026$] 和 PC9 细胞 [(42.38±3.40)% vs (74.57±7.92)%, $t=12.689$, $P=0.006$] 增殖的能力, 诱导更多的 A549 细胞 [(44.98±8.99)% vs (23.07±2.92)%, $t=7.836$, $P=0.016$] 和 PC9 细胞 [(46.32±7.42)% vs (3.44±1.46)%, $t=40.727$, $P=0.001$] 凋亡, 并使细胞周期更多地阻滞在 G₀/G₁ 期 [(73.60±3.43)% vs (60.20±5.48)%; (70.51±3.86)% vs (42.37±4.55)%) (P 均 < 0.05)。[结论] TRAIL 引起的 PI3K/Akt 通路活化, 可拮抗 TRAIL 的诱导凋亡作用。抑制 PI3K/Akt 活性可明显增强 EGFR-TKI 敏感的和 EGFR-TKI 不敏感的 NSCLC 细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性。

关键词: PI3K/Akt; 非小细胞肺癌; TRAIL; 细胞凋亡

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)01-0070-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.01.A013

Effect of PI3K/Akt Pathway Inhibition on TRAIL-Induced Apoptosis in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells With EGFR Mutation and KRAS Mutation

DENG Li-li¹, DENG Hong-bin², HAN Hong-xia¹, et al.

(1. The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

2. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: [Purpose] To explore the effect of PI3K/Akt pathway inhibition on TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells with EGFR mutation and KRAS mutation. [Methods] A549 and PC9 cells were treated with TRAIL under different concentrations. The drug sensitivity was estimated by CCK8 method. The expression of Akt phosphorylation was measured by Western blot. Then cells were treated with LY294002, an inhibitor of PI3K/Akt pathway, the flow cytometry (FCM) was used to analyze the alteration of cell cycle and apoptosis. The alteration of cell viability was measured by CCK8 method. [Results] No significant differences between A549, PC9 and the control were found when cells were treated with TRAIL of lower than 100 ng/ml used CCK8 method. The cell viability of A549 and PC9 cells was significantly lower than the control when cells were treated with TRAIL (100 ng/ml) [(64.29±11.39)% vs (100±12.07)%, $t=6.900$, $P=0.020$] [(74.57±9.70)% vs (100±11.20)%, $t=4.786$, $P=0.041$]. Similar results were observed when cells were treated with TRAIL (500 ng/ml) [(48.85±10.92)% vs (100±12.07)%, $t=13.390$, $P=0.006$] [(46.34±8.99)% vs (100±11.20)%, $t=18.419$, $P=0.003$]. A549 and PC9 cells showed the increased level of Akt phosphorylation activated by TRAIL in a time-dependent manner. Treatment with LY294002 before TRAIL resulted in less cell viability [(40.74±2.53)% vs (64.29±9.30)%, $t=6.092$, $P=0.026$] [(42.38±3.40)% vs (74.57±7.92)%, $t=12.689$, $P=0.006$], more apoptosis [(44.98±8.99)%

收稿日期: 2015-06-28; 修回日期: 2015-09-27

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目资助 (12541270)

E-mail: dengdoctor@126.com

vs (23.07±2.92)%, $t=7.836$, $P=0.016$] [(46.32±7.42)% vs (3.44±1.46)%, $t=40.727$, $P=0.001$] and more cell cycle arrest at G₀/G₁ phase [(73.60±3.43)% vs (60.20±5.48)%; (70.51±3.86)% vs (42.37±4.55)%], $t=6.487$, $P=0.023$; $t=14.702$, $P=0.005$) than TRAIL-single treatment. [Conclusion] PI3K/Akt activity promotes A549 and PC9 cells survival against TRAIL-induced apoptosis. The cytotoxic effect of TRAIL can be enhanced by inhibiting the Akt phosphorylation in TKI-sensitive and TKI-insensitive human non-small cell lung cancer cells.

Key words: PI3K/Akt; non-small cell lung cancer; TRAIL; apoptosis

以表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 为靶点的小分子酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 对于 EGFR 具有 TKI 敏感突变 (19 外显子缺失和 21 外显子 L858R 点突变) 的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者的客观缓解率可达 70% 以上, 明显高于传统化疗^[1]。然而, TKI 治疗 6~12 个月后, 多数患者不可避免地会发生耐药。如何延迟耐药时间、减少耐药机会成为当前该领域关注的焦点。除获得性耐药外, KRAS 突变型 NSCLC 患者预后和疗效不佳, 对多种 TKI 表现原发耐药^[2]。此外, EGFR/KRAS 均为野生型的患者也不能从 TKI 治疗中获益^[3]。因而, 急需寻找新的、更加有效且毒性小的治疗手段来提高 TKI 耐药 NSCLC 的治愈率。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 应运而生。TRAIL 能够选择性诱导肿瘤细胞凋亡而赦免正常细胞, 并可逆转化疗药物的耐药。然而, 多种肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的凋亡耐药, 其机制可能与 TRAIL 启动凋亡信号的同时激活 Akt 等生存通路相关。使用特异性抑制剂阻断 PI3K/Akt 通路可逆转结肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、恶性淋巴瘤细胞对 TRAIL 的原发耐药^[4-7]。这些结果提示 PI3K/Akt 通路的激活可能是 NSCLC 对 TRAIL 不敏感的原因之一。本实验以携带 EGFR/KRAS 不同基因表型的 A549 和 PC9 肺癌细胞为模型, 研究 TRAIL 作用后不同细胞内 PI3K/Akt 通路活性的改变。采用 PI3K/Akt 特异性抑制剂与 TRAIL 联合应用, 初步探讨了 PI3K/Akt 通路在 TRAIL 诱导 NSCLC 细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

重组人可溶性 TRAIL 蛋白购自 Abcam 公司

(Cambridge, MA, USA)。LY294002(2-(4-morpholinyl)-8-phenylbenzopyran-4-one hydrochloride) 购自 Sigma 公司。鼠抗人单克隆抗体 anti-Akt、兔抗人单克隆抗体 anti-p-Akt 购自 Cell signaling Technology (CST) 公司; 作为对照的 Anti-GAPDH 购自 Santa cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司。胎牛血清、RPMI-1640 购自 Invitrogen 公司。CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司。ECL 试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 细胞培养

人 NSCLC 细胞株 A549 (wild-type EGFR/ exon 2 G12S KRAS) 和 PC9 (exon19delE746-A750 EGFR / wild-type KRAS) 购自中国科学院上海细胞研究所, 细胞培养于 RPMI-1640 培养液, 内含 10% 小牛血清, 青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100μg/ml)。培养条件为 37℃、5%CO₂, 饱和湿度。

1.3 CCK-8 法检测细胞活性

TRAIL 单药处理的浓度分别为 0、1、10、100、500ng/ml, 药物处理 24h 后, 检测细胞活性, 并求出 24h 药物处理使细胞活性和对照组有显著性差异的最小药物浓度, 作为后续实验的最佳药物使用浓度。将细胞分为空白对照组、TRAIL 组 (100ng/ml)、LY294002 组 (25μmol/L) 和联合用药组 (LY294002 预处理细胞 1h, 再给予 TRAIL 作用 24h)。96 孔板每孔加入 10μl 的 CCK-8 溶液; 将培养板在培养箱内 (37℃和 5% CO₂ 浓度) 孵育 4h; 然后将 96 孔培养板中液体转移至另一个 96 孔板; 上机, 使用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。绘制生长曲线, 细胞存活率=(给药组 A450/对照组 A450)×100%。

1.4 流式细胞术检测细胞周期

TRAIL 和 LY294002 处理浓度分别为 100ng/ml 和 25μmol/L。取药物处理后细胞, 使用胰酶 (不含 EDTA) 消化的方法收集细胞, 用预冷 PBS (pH=7.4)

冲洗细胞 2 次,离心收集细胞沉淀,加入预冷 70% 乙醇,于 4℃ 放置过夜。检测前离心收集细胞,以 1ml 的 PBS 洗细胞 2 次,1000g 离心 5min 收集细胞沉淀,加入 100μl PBS (含 50μg/ml PI、100μg/ml RNase A),4℃ 避光常温孵育 30min,流式细胞仪上机(FACS Calibur,BD 公司)检测,用 Modifit 软件分析细胞周期。

1.5 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡

实验采用 Annexin V-FITC 凋亡检测双染试剂盒。TRAIL 和 LY294002 处理浓度分别为 100ng/ml 和 25μmol/L。取药物处理后细胞,使用胰酶(不含 EDTA)消化的方法收集细胞,用 dPBS 洗涤细胞 2 次,2000g 离心 5min,收集细胞沉淀,加入 500μl 的 Binding Buffer 重悬细胞沉淀,加入 5μl Annexin V-FITC 混匀后,混匀室温、避光、反应 10min,加入 5 μl PI,混匀室温、避光、反应 5min,用流式细胞仪检测,激发波长 $E_x=488\text{ nm}$,BD CFlow Plus 软件进行分析。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

取生长状态良好的细胞,将细胞裂解后提取细胞总蛋白,经 BCA 法蛋白定量,调整蛋白浓度至 10μg/ul,-20℃ 保存。取出 100μg 样品,变性 5min,15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜,用溶解有 5%脱脂奶粉的 TBST [10mmol/L Tris(pH7.4),150 mmol/L NaCl,0.1%Tween 20]常温封闭 2h,加入一抗,4℃ 摇床孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1h,充分洗涤后,ECL 法显色,定影,使用灰度分析软件(TotalLab V1.10,Nonlinear Dynamics Ltd),进行胶片灰度扫描,分析结果。

1.7 统计学处理

所有实验均重复 3 次。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计学处理采用 SPSS10.0 软件。两组间差异采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRAIL 对 EGFR/KRAS 不同遗传背景 NSCLC 细胞活性的影响

1、10、100 和 500ng/ml 的 TRAIL 作用于 A549 和 PC9 细胞 24h,当 TRAIL 浓度 $<100\text{ ng/ml}$ 时,各组细胞的存活率与对照组无明显差异。当 TRAIL 浓度分别为 100ng/ml [(64.29±11.39)% vs

(100±12.07)%, $t=6.900$, $P=0.020$] [(74.57±9.70)% vs (100±11.20)%, $t=4.786$, $P=0.041$] 和 500ng/ml [(48.85±10.92)% vs (100±12.07)%, $t=13.390$, $P=0.006$] [(46.34±8.99)% vs (100±11.20)%, $t=18.419$, $P=0.003$]时,各组细胞存活率明显低于对照组(Figure 1)。

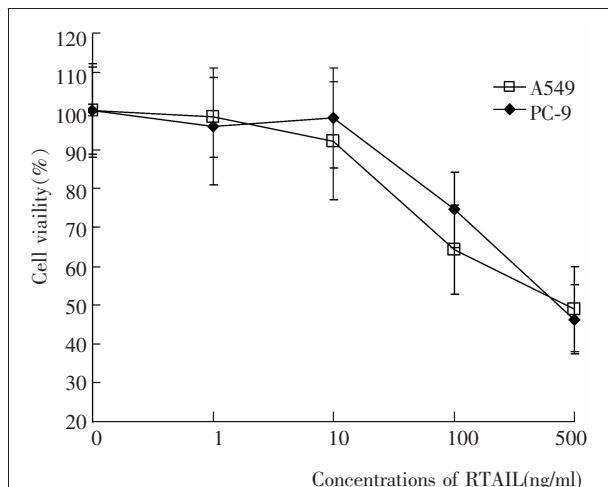


Figure 1 Effect of TRAIL on cell viability of A549 and PC9 cells by CCK-8 method

2.2 TRAIL 对 EGFR/KRAS 不同遗传背景 NSCLC 细胞 PI3K/Akt 通路活性的影响

100ng/ml TRAIL 作用各组细胞 1、4、8、16、24 h,蛋白质印迹法显示 A549 细胞内 p-Akt 表达水平于 TRAIL 作用 4h 后开始升高,16h 达高峰,24h 下降,但仍高于基线水平;而 PC9 细胞内 p-Akt 表达水平于 TRAIL 作用 1h 后开始升高,8h 达高峰,24h 下降,但仍明显高于基线水平(Figure 2)。

2.3 抑制 PI3K/Akt 通路对 TRAIL 体外抗肿瘤活性的影响

2.3.1 对 EGFR/KRAS 不同遗传背景 NSCLC 细胞增殖的影响

将 A549 和 PC9 细胞分为空白对照组、TRAIL 组(100 ng/ml)、LY294002 组(25μmol/L)和联合用药组 (LY294002 预处理细胞 1h,再给予 TRAIL 作用 24h)。CCK8 检测结果显示,TRAIL 组细胞存活率分别为 (64.29±9.30) %和 (74.57±7.92)%;LY294002 组细胞存活率分别为 (79.80±6.02)%和 (71.45±10.74)%;而联合用药组细胞存活率分别为 (40.74±2.53)%和 (42.38±3.40)%,明显低于 TRAIL 单独治疗组($t=6.092$, $P=0.026$)($t=12.689$, $P=0.006$)(Figure 3)。

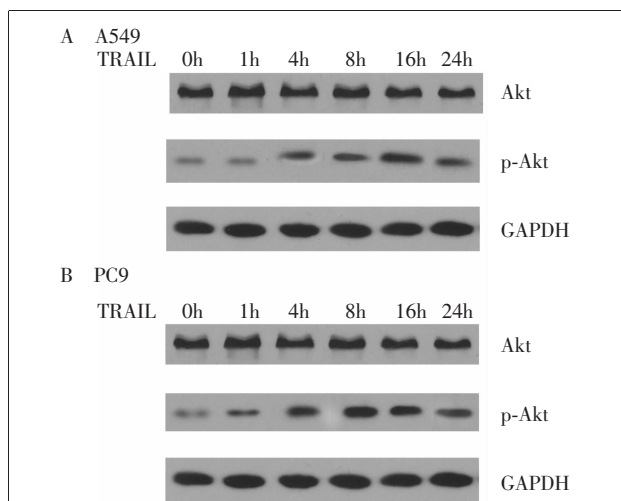


Figure 2 The expression of Akt and p-Akt protein in A549 (A) and PC9 (B) cells treated with TRAIL (100ng/ml) by Western blot

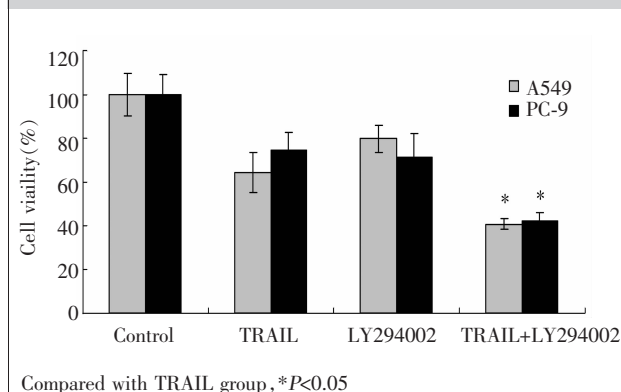


Figure 3 Effect of TRAIL and LY294002 on the cell viability of A549 and PC9 cells by CCK8 method

2.3.2 对 EGFR/KRAS 不同遗传背景 NSCLC 细胞凋亡和细胞周期的影响

用 100ng/ml TRAIL 处理细胞, A549 和 PC9 细胞凋亡率分别为 $(23.07 \pm 2.92)\%$ 和 $(3.44 \pm 1.46)\%$ 。单独用 $25 \mu\text{mol/L}$ LY294002 处理细胞, 细胞凋亡率分别为 $(10.19 \pm 4.77)\%$ 和 $(10.73 \pm 3.30)\%$ 。LY294002 预处理细胞 1h, 再给予 TRAIL 作用 24h, 各组细胞凋亡率均明显增加, 分别为 $(44.98 \pm 8.99)\%$ 和 $(46.32 \pm 7.42)\%$, 明显高于 TRAIL 单药组 ($t=7.836, P=0.016$; $t=40.727, P=0.001$) (Figure 4)。

单独用 TRAIL 处理细胞后, A549 细胞 G_0/G_1 期细胞比例增加高于对照组 $[(60.20 \pm 5.48)\% \text{ vs } (39.11 \pm 5.94)\%]$ ($t=9.624, P=0.011$), 而 PC9 细胞周期分布较对照组无明显变化 $[(46.80 \pm 6.04)\% \text{ vs } (41.31 \pm 8.08)\%]$ ($t=1.061, P=0.400$)。单独 LY294002

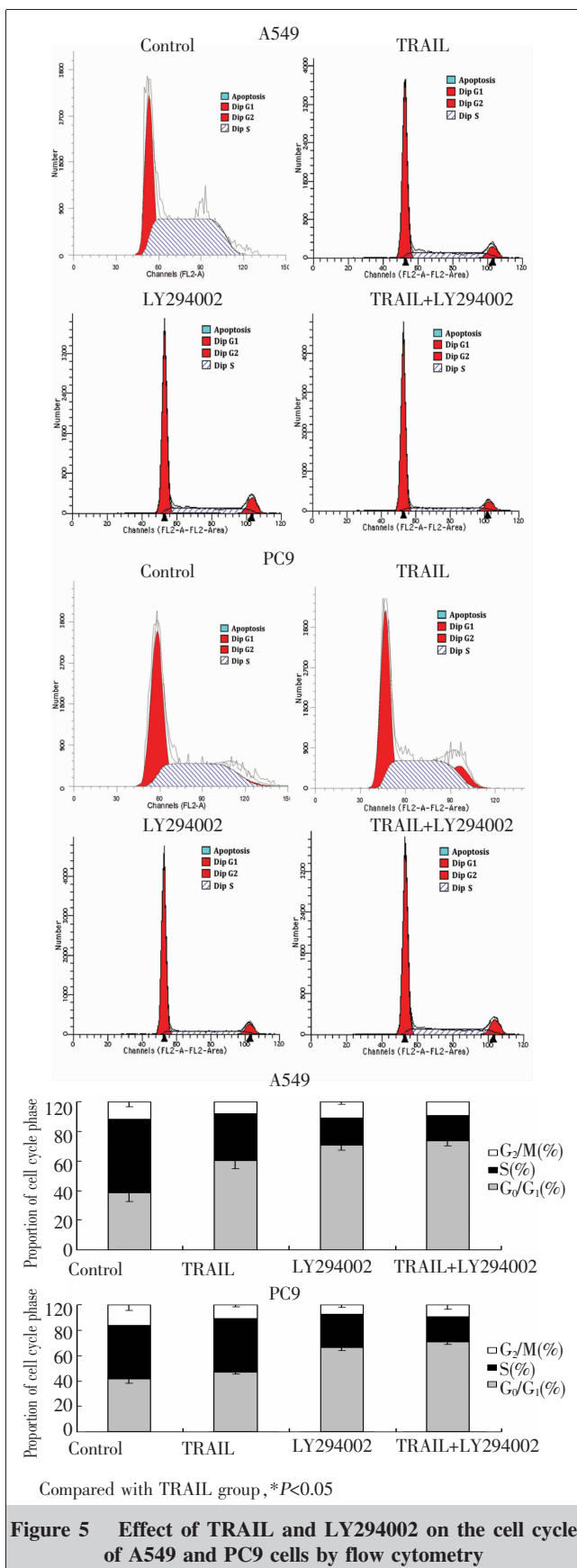
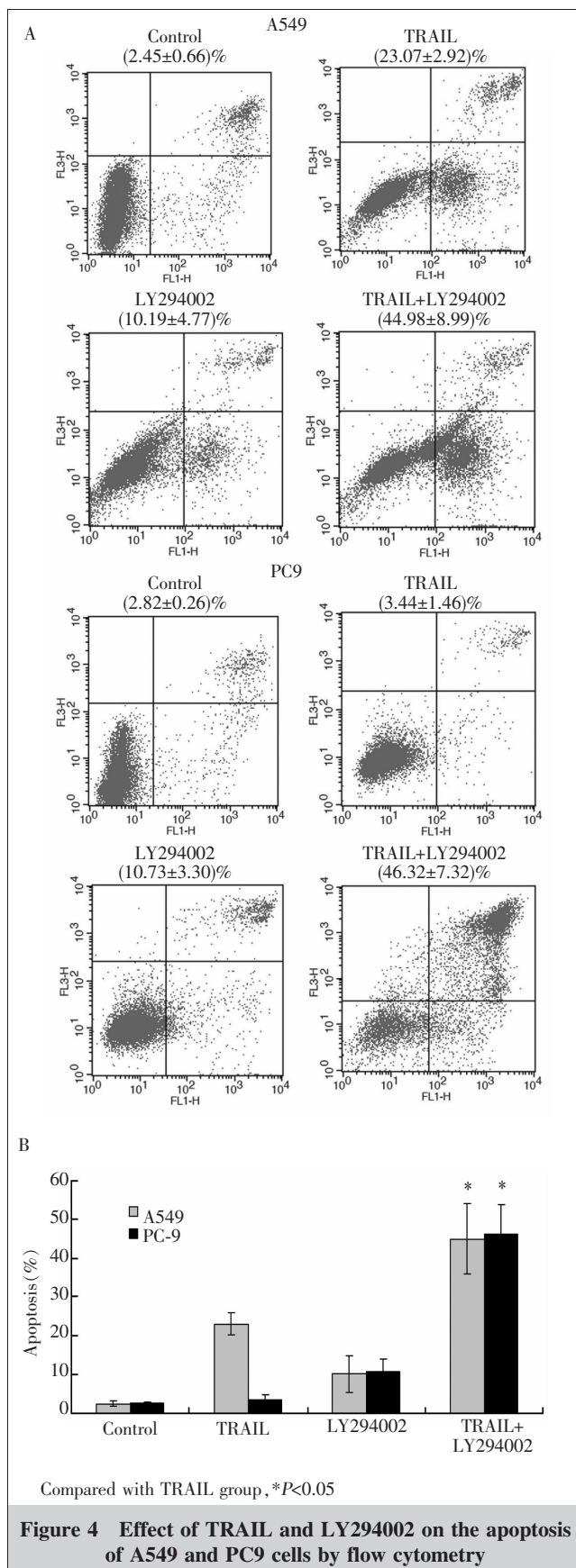
治疗组, A549 细胞 G_0/G_1 期细胞比例 $[(70.59 \pm 3.12)\% \text{ vs } (39.11 \pm 5.94)\%]$ ($t=28.320, P=0.001$) 和 PC9 细胞 G_0/G_1 期细胞比例 $[(66.29 \pm 3.06)\% \text{ vs } (41.31 \pm 8.08)\%]$ ($t=11.519, P=0.007$) 均明显高于对照组。而两药联合应用时, 两株细胞 G_0/G_1 期细胞的比例均进一步增加, 明显高于 TRAIL 单药组 $[(73.60 \pm 3.43)\% \text{ vs } (60.20 \pm 5.48)\%; (70.51 \pm 3.86)\% \text{ vs } (42.37 \pm 4.55)\%]$ ($t=6.487, P=0.023$; $t=14.702, P=0.005$) (Figure 5)。

3 讨论

临床上同一分期、同一病理类型、采用同一治疗方案的 NSCLC 患者, 其疗效及预后常常明显不同。其疗效及预后的差异可归因于遗传异质性的存在, 如 *EGFR* 和 *KRAS* 基因的不同突变状态。研究显示, 携带有 *EGFR* 19 外显子缺失和 21 外显子 L858R 点突变的 NSCLC 患者, 经过以吉非替尼和厄洛替尼为代表的 TKI 治疗后, 其缓解率明显高于 *EGFR* 野生型的患者。然而, 与化疗相似, TKI 治疗也不可避免地面临耐药问题。此外, 携带有 *KRAS* 突变的 NSCLC 患者往往预示着较差的疗效与预后, 对多种 TKI 耐药。本研究选择 *EGFR/KRAS* 基因表型不同的 A549 (wild-type *EGFR*/exon 2 G12S *KRAS*) 和 PC9 (exon19delE746-A750 *EGFR*/wild-type *KRAS*) NSCLC 细胞, 寻找进一步改善 NSCLC 疗效和预后的契机。

TRAIL 可与死亡受体 DR4 或 DR5 结合, 通过募集一系列蛋白, 形成死亡诱导信号复合物 (death-inducing signal complex, DISC), 诱导细胞凋亡^[8]。然而 TRAIL 诱导凋亡的同时, 也可活化生存信号通路, 促进细胞存活, 拮抗其诱导凋亡作用^[9], 这可能是许多肿瘤细胞, 包括肺癌细胞对 TRAIL 相对不敏感的原因之一。在我们的研究中, 当用 100ng/ml TRAIL 处理携带 *KRAS* 突变的 A549 细胞, 其凋亡率不超过 25%, 而对携带有 *EGFR* 19 外显子缺失的 PC9 细胞, 其凋亡率仅为不足 5%。结果显示, NSCLC 细胞 A549 和 PC9 均对 TRAIL 不敏感, 而且 *EGFR/KRAS* 突变状态不同的 NSCLC 细胞对 TRAIL 的敏感性不同。

PI3K /Akt 通路广泛存在细胞中, 参与细胞生长、细胞增殖、细胞分化的调节。有研究发现 PI3K/



Akt 通路各成分的过度活化是多种肿瘤预后不良的因素,PI3K/Akt 通路可以导致治疗耐药,抑制该通路可以逆转耐药,提高在体内外化疗、放疗的效果。PI3K 下游信号因子 Akt 在绝大多数肺癌中呈现活化状态,其活化机制可能与上游因子的扩增或是变异有关^[10]。有资料显示,突变型 EGFR 比野生型 EGFR 能更高地激活 PI3K 表达水平,从而进一步诱导 Akt 更高水平的活化^[11]。本文中,我们的研究也发现,TRAIL 能够以时间依赖的方式上调 A549 和 PC9 细胞内磷酸化 Akt 的表达,且携带有 EGFR 敏感突变的 PC9 细胞内磷酸化 Akt 表达上调早于 A549 细胞,且持续高水平表达时间更长,而此时并未见肿瘤细胞表现出明显的凋亡现象,提示 Akt 磷酸化激活可能参与了 NSCLC 细胞,尤其是 EGFR 突变的 PC9 细胞对 TRAIL 诱导凋亡的抵抗作用。

在 NSCLC 细胞系的研究中,PI3K 依赖的 Akt 活化与化疗的耐药有关,使用特异性抑制剂阻断 PI3K/Akt 通路可逆转一些细胞对 TRAIL 的原发耐药。LY294002 是一种广泛应用的 PI3K 抑制剂,能够特异性抑制 PI3Kp110 亚单位的催化活性,阻断 PI3K/Akt 通路的活化。研究显示,将 LY294002 单独或者与化疗药联合应用,可以诱导具有高度活化状态 Akt 的 NSCLC 细胞系的凋亡和抑制其生长^[12]。本研究使用 LY294002 与 TRAIL 联合应用,可明显增强 TRAIL 的抗肿瘤活性,在携带 KRAS 突变的 A549 细胞和携带 EGFR 突变的 PC9 细胞均表现为凋亡细胞百分比明显升高,且凋亡率的升高与 EGFR/KRAS 的突变状态无关。进一步细胞周期分析结果表明,使用 LY294002 特异性地抑制 PI3K/Akt 的活性,能够使更多的细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,从而阻止细胞进入 G₂/M 期而启动有丝分裂进程,这可能也是抑制 PI3K/Akt 的活性能够更多地诱导细胞凋亡的机制之一。本研究结果表明,在肺癌细胞中,TRAIL 引起的 PI3K/Akt 通路活化,可拮抗 TRAIL 的诱导凋亡作用。抑制 PI3K/Akt 活性可明显增强肺癌细胞,包括 EGFR 突变和 KRAS 突变的细胞,对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性。

近些年以吉非替尼和厄洛替尼为代表的抑制 EGFR 的靶向治疗已经获得了很大的成功,但是患者从 EGFR 的抑制剂中获益程度并不如最开始预期的那样好。原发性与获得性耐药的存在影响了 EGFR

靶向药物治疗的应用。PI3K/Akt 可以作为 NSCLC 细胞抵抗 TRAIL 诱导细胞凋亡研究的新靶点。

参考文献:

- [1] Ribeiro Gomes J, Cruz MR. Combination of afatinib with cetuximab in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer resistant to EGFR inhibitors [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 1137-1142.
- [2] Sarosi V, Losonczy G, Francovszky E, et al. Effectiveness of erlotinib treatment in advanced KRAS mutation-negative lung adenocarcinoma patients: results of a multicenter observational cohort study (MOTIVATE) [J]. *Lung Cancer*, 2014, 86(1): 54-58.
- [3] Ulivi P, Delmonte A, Chiadini E, et al. Gene mutation analysis in EGFR wild type NSCLC responsive to erlotinib: are there features to guide patient selection? [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 16(1): 747-757.
- [4] Shueb M, Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase inhibition enhances TRAIL-induced human colon cancer cell apoptosis through AKT/FOXO3a-dependent upregulation of death receptors [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 63: 280-290.
- [5] Dao P, Smith N, Scott-Algara D, et al. Restoration of TRAIL-induced apoptosis in resistant human pancreatic cancer cells by a novel FAK inhibitor, PH11 [J]. *Cancer Lett*, 2015, 360(1): 48-59.
- [6] Cao W, Li X, Zheng S, et al. Selenocysteine derivative overcomes TRAIL resistance in melanoma cells: evidence for ROS-dependent synergism and signaling crosstalk [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(17): 7431-7445.
- [7] Elia A, Powley IR, MacFarlane M, et al. Modulation of the sensitivity of Jurkat T-cells to inhibition of protein synthesis by tumor necrosis factor α -related apoptosis-inducing ligand [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(10): 769-777.
- [8] He W, Wang Q, Xu J, et al. Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation [J]. *Autophagy*, 2012, 8(12): 1811-1821.
- [9] Prabhu VV, Allen JE, Dicker DT, et al. Small-molecule onc201/tic10 targets chemotherapy-resistant colorectal cancer stem-like cells in an Akt/Foxo3a/TRAIL-dependent manner [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(7): 1423-1432.
- [10] Zhao R, Chen M, Jiang Z, et al. Platycodin-d induced autophagy in non-small cell lung cancer cells via PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways [J]. *J Cancer*, 2015, 6(7): 623-631.
- [11] Akca H, Tani M, Hishida T, et al. Activation of the AKT and STAT3 pathways and prolonged survival by a mutant EGFR in human lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*, 2006, 54(1): 25-33.
- [12] Li B, Li J, Xu WW, et al. Suppression of esophageal tumor growth and chemoresistance by directly targeting the PI3K/AKT pathway [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 11576-11587.