

本文引文格式:吴飞,程洁,胡韵,等.阿帕替尼诱导肝癌细胞凋亡的作用研究[J].
右江民族医学院学报,2021,43(1):33-36.

【论著与临床报道】

阿帕替尼诱导肝癌细胞凋亡的作用研究

吴飞^{1,2},程洁^{1,2},胡韵^{1,2},陆军¹,王章桂^{1,2}

1. 安徽理工大学医学院,安徽 淮南 232001;
2. 安徽省第二人民医院,安徽 合肥 230001)

摘要:目的 探讨阿帕替尼诱导 HepG2 细胞凋亡的作用。方法 细胞生长采用 MTS 法;凋亡率检测采用 FCM 法;激活半胱天冬酶-3(Cleaved-Caspase-3)、血管内皮生长因子受体-2(Vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)以及凋亡蛋白家族成员 Bcl-2 和 Bax 的表达采用 WB 法。结果 人肝癌细胞 HepG2 在系列浓度阿帕替尼给药时增长受到抑制;在 0 $\mu\text{mol/L}$ 、1.25 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时的抑制率依次为:0%、(17.25 \pm 0.34)%、(32.42 \pm 5.25)%、(52.13 \pm 7.31)%、(65.48 \pm 9.02)%;流式细胞仪检测凋亡率在高浓度组(10 $\mu\text{mol/L}$)达到(44.37 \pm 3.48)%,免疫印迹分析表明高浓度时 Caspase-3 的活化增加;进一步研究发现,VEGFR-2 和 Bcl-2 的在高浓度时表达最低,而 Bax 在高浓度时的表达最为显著。结论 肝癌细胞在阿帕替尼处理后增长受到抑制,凋亡细胞增多,其作用机制可能与抑制 VEGFR-2、Bcl-2 的表达,上调 Bax 表达进而导致活化的 Caspase-3 增多有关。

关键词:阿帕替尼;癌,肝细胞;细胞凋亡;VEGFR-2

中图分类号:R730.261 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2021)01-0033-04
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.01.007

Effect of Apatinib on inducing the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

Wu Fei^{1,2}, Cheng Jie^{1,2}, Hu Yun^{1,2}, Lu Jun¹, Wang Zhanggui^{1,2}

1. Medical School, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui, China;
2. Anhui No. 2 Provincial People's Hospital, Hefei 230001, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Apatinib on apoptosis of HepG2 cells. **Methods** Cell proliferation was detected by MTS. The apoptosis rate was detected by FCM. Western blotting (WB) was used to detect the expressions of Cleaved-Caspase-3, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2), and Bcl-2 and Bax of apoptotic protein family members. **Results** The proliferation of HepG2 was inhibited by Apatinib at serial concentrations. The inhibitory rates of Apatinib at 0 $\mu\text{mol/L}$, 1.25 $\mu\text{mol/L}$, 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ were 0%, (17.25 \pm 0.34)%, (32.42 \pm 5.25)%, (52.13 \pm 7.31)% and (65.48 \pm 9.02)%, respectively. The apoptosis rate was (44.37 \pm 3.48)% in the high concentration group (10 $\mu\text{mol/L}$) detected by flow cytometry. WB analysis showed that the activation of Caspase-3 increased when Apatinib was at high concentrations. Further studies showed that the expressions of VEGFR-2 and Bcl-2 were the lowest when Apatinib was at high concentrations, while the expression of Bax was the most significant when Apatinib was at high concentrations. **Conclusion** After treatment with Apatinib, the proliferation of HCC cells is inhibited and the apoptotic cells increase. The mechanism may be related to the inhibition of the expressions of VEGFR-2 and Bcl-2, up-regulation of Bax expression and the increase of activated Caspase-3.

Key words: Apatinib; carcinoma, hepatocyte; apoptosis; VEGFR-2

基金项目:安徽省教育厅高校自然科学基金重点项目(KJ2016A379)

第一作者简介:吴飞(1995-),男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤分子生物学,E-mail:313503139@qq.com

通讯作者简介:王章桂(1979-),男,医学博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:恶性肿瘤综合治疗,E-mail:wzg79@

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是东亚地区的常见肿瘤,从全世界范围来看其发病率和死亡率居高不下(分别排第四位和第三位)^[1]。由于肝癌自身的病因学发展影响因素众多,因此 HCC 是目前医学上治疗的难点,也是研究的重点领域^[2]。小分子药物索拉非尼、乐伐替尼均获批于晚期肝癌的一线治疗,但是其有效时间短(中位无进展生存时间分别为 2.7 个月和 7.4 个月)、价格昂贵、可及性、不良反应等问题阻碍了其临床应用^[3-4]。阿帕替尼是一种口服的靶向药物,主要的作用靶点是血管内皮生长因子受体 2。根据 III 期研究结果,国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准阿帕替尼用于接受过两种化疗方案后的晚期胃癌患者的治疗,在一项针对进展期胃癌的研究中也已经观察到显著的临床疗效^[5-6]。临床研究表明,阿帕替尼二线治疗晚期肝癌表现出一定的临床疗效^[7]。本研究试图探讨阿帕替尼体外对人肝癌细胞株 HepG2 的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 主要材料包括:HepG2 细胞、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、MTS、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天 C1062M)、Bax(CST, 14796S)、Bcl-2 (CST, 3498S)、Cleaved-Caspase-3 (CST, 9661s)、VEGFR-2 (CST, 9698s)、GAPDH (CST, 2118S)和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(CST, A0208)、ECL 发光试剂盒分别来源于中科院上海细胞库、杭州四季青、上海碧云天和 Cell Signal Technology 等公司;阿帕替尼(Apatinib)由恒瑞医药公司生产。

1.2 方法

1.2.1 阿帕替尼溶液配制及分组 阿帕替尼分子量为 639。将阿帕替尼 10 mg 溶于 1 ml 二甲基亚砜(DMSO)中,配制浓度为 20 mmol/L 的母液,储存于-80℃冰箱。使用时,用 1%的 FBS 进行梯度稀释至指定浓度(0 μmol/L、1.25 μmol/L、2.5 μmol/L、5 μmol/L 和 10 μmol/L)。分组:0 μmol/L 浓度组、1.25 μmol/L 浓度组、2.5 μmol/L 浓度组、5 μmol/L 浓度组、10 μmol/L 浓度组、空白对照组(只含有培养基而无细胞)、阴性对照组(加入 0.4%的 DMSO)。

1.2.2 细胞培养 肝癌细胞 HepG2 常规培养。将肝癌细胞置于含有 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中。然后置于 CO₂ 浓度为 5%,温度为 37℃的培养箱中。

1.2.3 细胞增殖检测^[8] 同我们前期检测方法类似,采用 MTS 法。实验步骤概述如下:①选择处于对数生长期的细胞于 96 孔板中,使得细胞数约为 1×10⁴ 个/毫升;②给予一定浓度的阿帕替尼处理后过夜;③

处理指定时间(24 h、48 h 和 72 h)后,根据实验说明书加入 MTS 检测试剂;④将分光光度计波长设为 490 nm,上机检测 OD 值,每隔 15 min 再测 1 次,反复 3 次。抑制率(inhibitor rate, IR)=(1-实验组 A 值/细胞组 A 值)×100%。数据结果导入 GraphPad,制作增殖曲线,计算抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将 HepG2 细胞接种于 6 孔板,使得每孔细胞数约为 3×10⁵ 个细胞。培养 24 h 后,加入 10 μmol/L 浓度的阿帕替尼培养液培养 72 h 后,按照说明提前配制试剂,然后采用漂洗、消化、离心等步骤,将细胞收集至 15 ml 离心管,分别加入指定试剂后避光保存,流式细胞仪检测。每次实验设 3 个复孔,重复 3 次。

1.2.5 免疫印迹分析 将细胞移植至 6 孔板中,过夜后加入阿帕替尼,浓度为 0 μmol/L、1.25 μmol/L、2.5 μmol/L、5 μmol/L 和 10 μmol/L。48 h 后按操作说明收集蛋白。蛋白定量采用 BCA 法;后续步骤按 SDS PAGE 电泳说明进行电泳、转膜、脱脂奶粉封闭;前述步骤完成后分别将目标抗体 Caspase-3(1:400)、VEGFR(1:200)、Bcl-2(1:200)、Bax(1:200)、GAPDH(1:1000)加入。过夜后再加入 HRP 标记的二抗(1:1000),采用 ECL 发光试剂上机显像,保存文件。

1.3 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 16.0 软件处理,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿帕替尼抑制肝癌细胞增殖 MTS 实验结果表明 HepG2 细胞在阿帕替尼处理后的增殖受到明显的抑制。HepG2 细胞在多种阿帕替尼浓度(0 μmol/L、1.25 μmol/L、2.5 μmol/L、5 μmol/L 和 10 μmol/L)下均表现出一定的被抑制作用;阿帕替尼处理 72 h 后的抑制率分别为:0%、(17.25±0.34)%、(32.42±5.25)%、(52.13±7.31)%、(65.48±9.02)%,同不加阿帕替尼药物的阴性对照组(不含药物,仅给予 0.4% DMSO)相比差异有统计学意义(*P* < 0.05)。半数抑制浓度为(5.36±0.27) μmol/L。这表明阿帕替尼具有抑制肝癌细胞增殖作用,这种抑制作用与浓度和时间呈剂量依赖性,见图 1。

2.2 阿帕替尼诱导肝癌细胞凋亡 为了检测阿帕替尼抑制肝癌细胞增殖是否与凋亡相关,分别采用流式细胞仪检测凋亡率,Western blot 检测天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)表达情况。实验结果表现为:阿帕替尼在 10 μmol/L 时, HepG2 细胞的凋亡率为(44.37±3.48)%,而对照组为(8.42

±0.31)%。Western blot 结果表明阿帕替尼作用于 HepG2 细胞 48 h 后,Cleaved-Caspase-3 表达上调,这些结果表明阿帕替尼诱导肝癌细胞凋亡,见图 2。

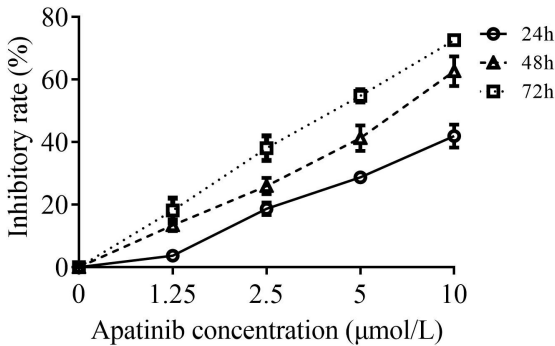
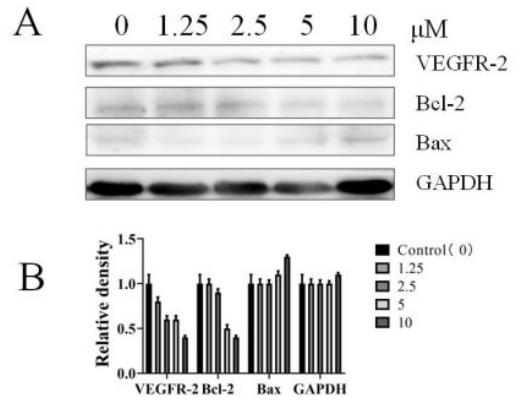
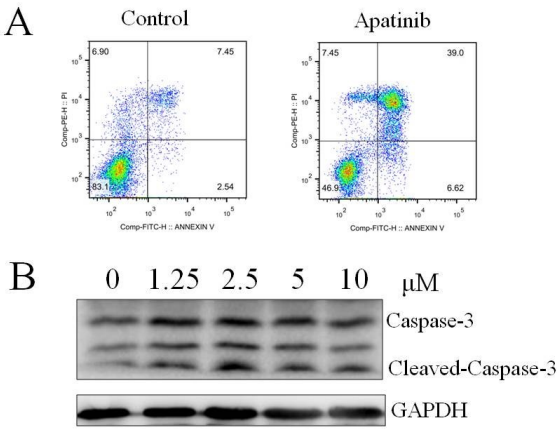


图 1 不同浓度阿帕替尼对 HepG2 细胞增殖的影响



注:A 为 Western blot 检测相关蛋白表达; B 为 Image J 软件浓度分析。

图 3 不同浓度阿帕替尼对 HepG2 细胞株 VEGFR-2、Bcl-2、Bax 表达的影响



注:A 为 FCM 检测凋亡率;B 为 Western blot 检测 Caspase-3 表达。

图 2 阿帕替尼诱导 HepG2 细胞凋亡

2.3 阿帕替尼诱导凋亡的作用机制 Western blot 结果表明阿帕替尼给药 48 h 后,HepG2 细胞中 VEGFR、Bcl-2 的表达在高剂量时下降最为明显;相反,Bax 的表达在高剂量时最为明显,随着阿帕替尼的药物浓度的升高其表达逐步增加(见图 3A);蛋白定量表明在 GAPDH 表达稳定的情况下,VEGFR-2、Bcl-2 表现出逐步的降低,而 Bax 表现出逐步的升高(见图 3B)。

3 讨论

晚期肝癌目前的主要治疗策略是经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)联合索拉非尼或索拉非尼或乐伐替尼单药口服。Atezolizumab 是一种以 PD-L1 为靶点的免疫检查点抑制剂,联合抗血管生成药物贝伐单抗已经被批准用于晚期肝癌的一线治疗^[9]。其作用机制可能在于抗血管生成从而改善了肿瘤微环境,使得免疫治疗药

物更容易进入肝癌细胞而发挥作用。阿帕替尼主要作用靶点是 VEGFR-2 胞内段的酪氨酸激酶区域,除了批准用于胃癌治疗外,目前已经获批用于一线治疗后进展的晚期肝癌的二线治疗。临床前研究表明阿帕替尼在包括肝癌在内的多种实体瘤中表现出显著的抗肿瘤活性和可耐受的毒性反应^[10-11],但是其具体作用机制还不清楚。传统观点认为靶向药物主要是通过调节细胞生长过程中的信号通路,从而抑制细胞增殖作用。本研究发现阿帕替尼可以显著地抑制肝癌细胞的增殖,这种增殖抑制作用在高剂量时最为明显。这与临床上观察到的现象相一致,也就是患者在接受阿帕替尼治疗后表现为肿块快速退缩,并且疗效与剂量相关^[12]。

恶性肿瘤的死亡方式包括凋亡、自噬、铁死亡等。诱导凋亡是传统中药、分子靶向治疗药物、microRNA 等作用于肝癌细胞的方式之一^[13-14]。细胞凋亡可以分为受体依赖性凋亡和非受体依赖性凋亡,其中 Caspase 活性是检测细胞凋亡的重要手段,Caspase-3 活化后导致线粒体细胞色素 C 释放。在本研究中观察到阿帕替尼高剂量组凋亡率达到了(44.37 ± 3.48)%,进一步采用免疫印迹也证实了这一结果,免疫印迹表明活化的 Caspase-3 表达在高剂量组表达最为显著,这些结果表明阿帕替尼诱导凋亡。本课题组一直从事凋亡、自噬、铁死亡研究,虽然阿帕替尼诱导凋亡,但是自噬、铁死亡等死亡方式是否参与了这一过程以及在这一过程中的具体作用还有待进一步观察。

Liao JB 等^[15]报道在肝癌的基础实验中阿帕替尼通过抑制 PI3K/Akt 通路而发挥放疗增敏作用。本研究中发现,阿帕替尼可以抑制 VEGFR-2 的表达,其抑

制作用在高剂量时最为显著;与 VEGFR-2 表达相一致的是凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达降低,在高剂量组最为明显;而 Bax 的表达随着阿帕替尼浓度的增加而升高;这些结果表明与 Cleaved-caspase-3 表达相一致;尽管临床前研究表明^[16]阿帕替尼主要的作用靶点是 VEGFR-2,本研究也证实阿帕替尼抑制 VEGFR-2 的表达,但是阿帕替尼是否通过抑制下游 PI3K/Akt、Mek/Erk 等信号通路而抑制 Bcl-2 和促进 Bax 表达进而诱导凋亡还并不清楚。在后续研究中,我们需要通过上调或下调 VEGFR-2 的表达后再观察凋亡相关分子的表达情况。

阿帕替尼是一种新的分子靶向治疗药物,其作用机制目前还不清楚,深入理解其作用机制有助于临床选择优势人群,并为可能的耐药寻找新的治疗策略。总之,本研究表明抗血管生成药物阿帕替尼在体外可以诱导肝癌细胞凋亡,这种作用与剂量浓度有关,其作用机制可能与调节 VEGFR-2、Bcl-2、Bax 表达有关。进一步的功能分析和联合免疫治疗药物的作用及机制正在研究中。

参考文献:

- [1] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1):22.
- [2] 梁寻杰,覃小珊,黄赞松. 肝癌预后影响因素研究进展 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(5):642-645.
- [3] Rimassa L, Santoro A. Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9(6):739-745.
- [4] Yamashita T, Kudo M, Ikeda K, et al. REFLECT-a phase 3 trial comparing efficacy and safety of lenvatinib to sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: an analysis of Japanese subset [J]. *J Gastroenterol*, 2020, 55(1):113-122.
- [5] Li J, Qin SK, Xu JM, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Apatinib in Patients With Chemotherapy-Refractory Advanced or Metastatic Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(13):1448-1454.
- [6] Du YY, Cao QS, Jiang CQ, et al. Effectiveness and safety

of low-dose apatinib in advanced gastric cancer: A real-world study [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(14):5008-5014.

- [7] Zhang YQ, Huang GH, Miao HF, et al. Apatinib treatment may improve survival outcomes of patients with hepatitis B virus-related sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 23:12.
- [8] 韩新华,王章桂. Brivanib 对 HepG2 细胞的抑制作用及机制 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(3):355-357.
- [9] Lee MS, Ryoo BY, Hsu CH, et al. Atezolizumab with or without bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma (GO30140): an open-label, multicentre, phase 1b study [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(6):808-820.
- [10] Li J, Qin SK, Xu JM, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Apatinib in Patients With Chemotherapy-Refractory Advanced or Metastatic Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(13):1448-1454.
- [11] Xu JM, Zhang Y, Jia R, et al. Anti-PD-1 Antibody SHR-1210 Combined with Apatinib for Advanced Hepatocellular Carcinoma, Gastric, or Esophagogastric Junction Cancer: An Open-label, Dose Escalation and Expansion Study [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(2):515-523.
- [12] Wu XY, Wang HW, Wu Y, et al. Efficacy of apatinib on multiple advanced-stage nongastric cancers [J]. *J Cancer Res Ther*, 2019, 15(4):836-841.
- [13] 廖俊,张彩灵,黄赞松,等. 苦参素及 Mir-181a 对人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM 裸鼠移植瘤中耐药蛋白 P-gp 的影响 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(1):1-6.
- [14] 黎梨,邓凤莲,黄赞松,等. 长链非编码 RNA-H19 调控人肝癌 HepG2 细胞增殖与凋亡 [J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(1):15-19, 25.
- [15] Liao JB, Jin HL, Li SQ, et al. Apatinib potentiates irradiation effect via suppressing PI3K/AKT signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):454.
- [16] Tian S, Quan HQ, Xie CY, et al. YN968D1 is a novel and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase with potent activity in vitro and in vivo [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(7):1374-1380.

收稿日期:2020-11-18;修回日期:2020-11-27