

索拉非尼对人肺癌细胞株 A549 增殖的影响及其机制的研究

司新鹏

(山东省泰安市中心医院呼吸内科, 山东 泰安 271000)

摘要:目的 以人肺癌细胞株 A549 为研究对象, 观察不同浓度/时间下索拉非尼对人肺癌细胞 A549 的增殖及其对 VEGFR-2、VEGFR-3、P-VEGFR-2 及 P-VEGFR-3 表达的影响。方法 不同浓度的索拉非尼 (1.5 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 、6 $\mu\text{mol/L}$ 、12 $\mu\text{mol/L}$) 分别与 A549 细胞体外培养 24 h、48 h、72 h 后采用四甲基偶氮唑蓝比色法测定细胞生长抑制率。采用 RT-PCR 法测定不同药物浓度/时间下肺癌细胞株 A549 中 VEGFR-2mRNA、VEGFR-3mRNA 的表达变化, 用 Western Blot 法测定 P-VEGFR-2 及 P-VEGFR-3 的表达。结果 在外源性药物索拉非尼的刺激下, 肺癌细胞 A549 的生长受到抑制, 索拉非尼的浓度越高, 作用时间越长, 抑制率越大, 提示呈现时间和浓度依赖性 ($P<0.05$)。以终浓度为 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 、6 $\mu\text{mol/L}$ 、12 $\mu\text{mol/L}$ 的索拉非尼加入实验组, 在不同的作用时间 (24 h、48 h、72 h) 下, 实验组与对照组比较 VEGFR-2mRNA 及 VEGFR-3mRNA 的表达无明显变化 ($P>0.05$)。P-VEGFR-2 及 P-VEGFR-3 的表达与对照组比较呈现下降趋势 ($P<0.05$), 呈浓度依赖性。结论 索拉非尼能抑制 A549 肺癌细胞的生长, 呈现时间和浓度依赖性。索拉非尼能抑制 A549 肺癌细胞的生长, 其机制之一可能与其抑制 P-VEGFR-2 及 P-VEGFR-3 的表达有关。

关键词: 索拉非尼; A549 肺癌细胞; VEGFR-2; VEGFR-3; P-VEGFR-2; P-VEGFR-3

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2018.17.003

文章编号: 1006-1959(2018)17-0008-06

Effect of Sorafenib on Proliferation of Human Lung Cancer Cell Line A549 and its Mechanism

SI Xin-peng

(Department of Respiratory Medicine, Tai'an Central Hospital, Tai'an 271000, Shandong, China)

Abstract: Objective The proliferation of human lung cancer cell line A549 and its effects on the expression of VEGFR-2, VEGFR-3, P-VEGFR-2 and P-VEGFR-3 were observed at different concentrations/time. Methods Different concentrations of sorafenib (1.5 $\mu\text{mol/L}$, 3 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$, 12 $\mu\text{mol/L}$) were cultured with A549 cells for 24, 48 and 72h respectively. The inhibition rate of cell growth was determined by tetramethylazo blue colorimetry. The expression of VEGFR-2 mRNA and VEGFR-3 mRNA in lung cancer cell line A549 was detected by RT-PCR and the expression of P-VEGFR-2 and P-VEGFR-3 was detected by Western Blot. Results Under the stimulation of the exogenous drug sorafenib, the growth of lung cancer cell A549 was inhibited. The higher the concentration of sorafenib, the longer the duration of action, the greater the inhibition rate, suggesting time- and concentration-dependent ($P<0.05$). Sorafenib at a final concentration of 1.5 $\mu\text{mol/L}$, 3 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$, and 12 $\mu\text{mol/L}$ was added to the experimental group at different time (24h, 48h, 72h), there was no significant difference in the expression of VEGFR-2 mRNA and VEGFR-3 mRNA between the experimental group and the control group ($P>0.05$). The expression of P-VEGFR-2 and P-VEGFR-3 decreased in a concentration-dependent manner compared with the control group ($P<0.05$). Conclusion Sorafenib can inhibit the growth of A549 lung cancer cells in a time- and concentration-dependent manner. Sorafenib can inhibit the growth of A549 lung cancer cells, and one of its mechanisms may be related to its inhibition of P-VEGFR-2 and P-VEGFR-3 expression.

Key words: Sorafenib; A549 lung cancer cells; VEGFR-2; VEGFR-3; P-VEGFR-2; P-VEGFR-3

随着肿瘤分子生物学的研究进展, 肿瘤分子靶向治疗已成为肿瘤研究的热点, 在多种肿瘤的治疗中发挥了重要作用。分子靶向治疗已使众多肿瘤患者受益, 目前已有多种靶向治疗药物上市并在某些肿瘤的临床试验中证实有效^[1]。然而, 大部分肿瘤的生物行为并非由单一信号传导通路所支配, 而是多个信号传导通路共同起作用的, 因此, 针对多靶点进行靶向治疗可能会取得更好的疗效^[2]。索拉非尼

是一种小分子多靶点的生物靶向治疗新药, 是首个口服多激酶抑制剂, 目前已成为肿瘤学界倍受关注的抗肿瘤药物之一^[3]。大量的体外肿瘤细胞和实验动物模型以及临床研究都已证实, 索拉非尼的疗效是可喜的, 使抗肿瘤从化疗和免疫治疗阶段迈入了靶向治疗的年代^[4]。拜耳和 Onyx 药业公司从肿瘤的发生机理和肿瘤生长需要新生血管提供营养入手, 联合研制了索拉非尼 (sorafenib)。索拉非尼能作用于多个靶点, 对多种肿瘤细胞有抑制作用。索拉非尼既能直接抑制肿瘤细胞的增殖, 又能通过抑制血管

作者简介: 司新鹏 (1982.1-), 男, 山东莱芜人, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 肺癌的基础和临床

新生,达到肿瘤饥饿疗法的目的^[9]。2005 年 12 月 20 日获美国 FDA 快速批准了其作为晚期肾细胞癌的一线治疗药物,是美国 FDA10 年来批准的第一个治疗肾癌的药物。目前研究表明,索拉非尼对肝癌、非小细胞肺癌以及黑色素瘤等也有疗效^[9]。本研究以人肺癌细胞株 A549 为研究对象,观察不同浓度/时间下索拉非尼对人肺癌细胞 A549 的增殖及其对 VEGFR-2、VEGFR-3、P-VEGFR-2 及 P-VEGFR-3 表达的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 肺腺癌细胞 A549,泰安市中心医院;小牛血清;RPMI1640 粉剂;胰蛋白酶;索拉非尼;P-VEGFR-2 多克隆抗体(兔抗人);P-VEGFR-3 多克隆抗体(兔抗人);碱性磷酸酶标记的二抗(抗兔)。

1.2 主要设备 倒置显微镜 IX70,Olympus;细胞培养箱(311 型);电子天平;超净工作台 SW-CJ-1F;60 mm 培养皿;低温超速离心机;立时压力蒸汽灭菌器;紫外分光光度计;垂直平板;电泳槽、转移电泳槽、稳压稳流电泳仪、半干电转移仪;GDS 8000 型凝胶成像分析系统;气浴恒温振荡器;DDY-2C 型电泳仪;电热恒温水浴箱;加样枪(1000 μ l、100 μ l 和 0.5~10 μ l)Eppendorf,德国;烘干箱。

1.3 细胞培养 将取出的冻存管直接投入 37 $^{\circ}$ C 温水中,并轻轻摇动令其尽量融化。从 37 $^{\circ}$ C 水浴中取出冻存管,用酒精消毒后开启,用吸管吸出细胞悬液,注入离心管并滴加 10 倍以上体积的培养液,混合后低速离心 800 rpm,5 min。除去上清液,再重复用培养液洗一次。用培养液适当稀释后,接种培养瓶,放入 CO₂ 培养箱静置培养,次日更换一次培养液,继续培养。

1.4 细胞给药 取第 4 代肺癌细胞,待细胞生长覆盖瓶底 80%,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,用含 10%胎

牛血清的 RPMI1640 培养液制成单细胞悬液,接种于 96、6 孔无菌培养板,置于 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 饱和湿度下。至细胞单层铺满孔底,按下述分组给药:①正常对照组,不加任何药物。②以终浓度为 1.5 μ mol/L、3 μ mol/L、6 μ mol/L、12 μ mol/L 的浓度梯度加入各组。四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测细胞的增殖抑制率,用 RT-PCR 检测 VEGFR-2mRNA、VEGFR-3mRNA 的表达,用 Western blot 检测 P-VEGFR-2、P-VEGFR-3 的表达。

1.5 输入计算机系统对蛋白质条带进行密度分析 将 Western Blot 曝光胶片进行图像扫描,用 GIS1000 分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化,目的蛋白的灰度值除以内参的灰度值以校正误差,所得结果代表某样品的目的蛋白相对含量。为消除扫描和分析中的误差,重复三次该过程,并取均值作统计学分析。

1.6 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件分析结果,所有实验数据均重复 3 次,结果以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数比较采用方差分析,多组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 索拉非尼抑制细胞增殖试验 索拉非尼作用于 A549 肺癌细胞的抑制率在同一时间点、不同浓度组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),同一浓度组不同时间点比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。MTT 结果显示:随着药物浓度的增大,药物作用时间的延长,索拉非尼对肺癌细胞 A549 生长的抑制率越大。说明索拉非尼能抑制肺癌细胞 A549 的生长,呈现一定的剂量-时间依赖关系($P < 0.05$)。

2.2 索拉非尼对 P-VEGFR-2、P-VEGFR-3 的表达的影响

2.2.1 索拉非尼对 P-VEGFR-2 表达的影响 采用半定量 Western Blot 方法,应用 Quantity one v4.6.2 生

表 1 不同浓度、不同时间索拉非尼作用于 A549 肺癌细胞的抑制率($\bar{x} \pm s$,%)

索拉非尼浓度(μ mol/L)	药物作用时间			F	P
	24 h	48 h	72 h		
0	0 [▲]	0 [▲]	0 [▲]	/	/
1.5	15.70 \pm 0.53 [▲]	18.20 \pm 0.66 [▲]	35.42 \pm 0.41 [▲]	11.637	0.009
3	22.20 \pm 1.80 [▲]	28.97 \pm 0.95 [▲]	42.40 \pm 1.50 [▲]	22.647	0.002
6	35.10 \pm 1.85 [▲]	44.42 \pm 2.90 [▲]	64.07 \pm 1.89 [▲]	29.511	0.001
12	44.27 \pm 1.51 [▲]	58.47 \pm 1.48 [▲]	81.35 \pm 0.79 [▲]	11.801	0.008
F	5.988	15.192	25.917	/	/
P	0.019	0.001	0.000	/	/

注:同一时间不同浓度比较,[▲] $P < 0.05$;同一浓度不同时间比较,^{*} $P < 0.05$

物图像处理软件测定对 Western-Bolt 图片进行分析,结果与 β -action 的相对光密度比值表示。结果显示:索拉非尼作用于肺癌细胞 A549 24 h、48 h、72 h 后,P-VEGFR-2 的表达水平与对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。同一时间点组间比较,差

异具有统计学意义($P<0.05$);同一浓度不同时间点比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。说明不同浓度的索拉非尼对 A549 肺癌细胞 P-VEGFR-2 的表达有抑制作用:索拉非尼浓度越高,抑制作用越强,提示呈浓度依赖性。

表 2 半定量 Western Blot 检测索拉非尼作用于 A549 细胞 P-VEGFR-2 的表达($\bar{x}\pm s$)

药物浓度($\mu\text{mmol/L}$)	药物作用时间			F	P
	24 h	48 h	72 h		
0	0.99 \pm 0.04 [*]	0.86 \pm 0.10 [*]	0.91 \pm 0.04 [*]	/	/
1.5	0.73 \pm 0.05 ^{*▲}	0.68 \pm 0.03 ^{*▲}	0.66 \pm 0.01 ^{*▲}	2.802	0.138
3	0.52 \pm 0.04 ^{*▲}	0.50 \pm 0.02 ^{*▲}	0.48 \pm 0.06 ^{*▲}	0.485	0.638
6	0.39 \pm 0.02 ^{*▲}	0.36 \pm 0.05 ^{*▲}	0.34 \pm 0.03 ^{*▲}	1.007	0.420
12	0.28 \pm 0.04 ^{*▲}	0.25 \pm 0.07 ^{*▲}	0.23 \pm 0.02 ^{*▲}	0.859	0.470
F	129.819	45.952	140.536	/	/
P	0.000	0.000	0.000	/	/

注:同一时间不同浓度组比较,^{*} $P<0.05$;同一浓度不同时间比较,[▲] $P>0.05$

2.2.2 索拉非尼对 P-VEGFR-3 表达的影响 采用半定量 Western Blot 方法,应用 Quantity one v4.62 生物图像处理软件测定对 Western-Bolt 图片进行分析,结果与 β -action 的相对光密度比值表示。结果显示:索拉非尼作用于肺癌细胞 A549 24 h、48 h、72 h 后,P-VEGFR-3 的表达水平与对照组相比,差异

具有统计学意义($P<0.05$)。同一时间点组间比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);同一浓度不同时间段比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。说明不同浓度的索拉非尼对 A549 肺癌细胞 P-VEGFR-3 的表达有抑制作用:索拉非尼浓度越高,抑制作用越强,提示呈浓度依赖性。

表 3 半定量 Western Blot 检测索拉非尼作用于 A549 细胞 P-VEGFR-3 的表达($\bar{x}\pm s$)

药物浓度($\mu\text{mmol/L}$)	药物作用时间			F	P
	24 h	48 h	72 h		
0	0.95 \pm 0.10 [*]	0.83 \pm 0.10 [*]	0.88 \pm 0.03 [*]	/	/
1.5	0.72 \pm 0.06 ^{*▲}	0.69 \pm 0.07 ^{*▲}	0.65 \pm 0.02 ^{*▲}	0.900	0.455
3	0.50 \pm 0.04 ^{*▲}	0.49 \pm 0.02 ^{*▲}	0.47 \pm 0.06 ^{*▲}	0.412	0.679
6	0.39 \pm 0.03 ^{*▲}	0.40 \pm 0.02 ^{*▲}	0.34 \pm 0.03 ^{*▲}	3.610	0.093
12	0.27 \pm 0.25 ^{*▲}	0.24 \pm 0.05 ^{*▲}	0.21 \pm 0.02 ^{*▲}	1.120	0.386
F	54.029	40.474	163.654	/	/
P	0.000	0.001	0.000	/	/

注:同一时间不同浓度组比较,^{*} $P<0.05$;同一浓度不同时间比较,[▲] $P>0.05$

2.3 索拉非尼对 VEGFR-2mRNA、VEGFR-3mRNA 表达的影响

2.3.1 索拉非尼对 VEGFR-2mRNA 表达的影响 加入药物索拉非尼作用 24 h、48 h、72 h 后,肺癌细胞 A549 VEGFR-2mRNA/GAPDH PCR 扩增产物的相对比值,同一时间不同浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$),同一浓度不同时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

2.3.2 索拉非尼对 VEGFR-3mRNA 表达的影响 加入药物索拉非尼 24 h、48 h、72 h 后,肺癌细胞 A549 VEGFR-3mRNA/GAPDH PCR 扩增产物的相对比值,同一时间不同浓度比较,差异无统计学意义($P>$

0.05),同一浓度不同时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 5。

3 讨论

索拉非尼是拜耳和 ONYX 公司共同研制的一种多靶点的生物靶向新药,目前索拉非尼用于肝癌治疗的 3 期临床试验已完成患者入组,正在进行中。此外,2006 年 11 月 30 日索拉非尼在中国上市。索拉非尼对黑色素瘤、非小细胞肺癌等实体瘤亦有潜在的抗肿瘤效应,其用于转移性黑色素瘤、皮肤癌、非小细胞肺癌的临床试验亦在进行中。目前对于索拉非尼的研究尚处于起步阶段。

为了准确的检测不同浓度/时间下索拉非尼对

表 4 半定量 RT-PCR 检测索拉非尼作用于 A549 细胞 VEGFR-2mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

药物浓度($\mu\text{mmol/L}$)	药物作用时间			F	P
	24 h	48 h	72 h		
0	0.47 \pm 0.03	0.48 \pm 0.02	0.49 \pm 0.05	/	/
1.5	0.46 \pm 0.06	0.43 \pm 0.16	0.48 \pm 0.03	0.094	0.911
3	0.47 \pm 0.10	0.43 \pm 0.16	0.44 \pm 0.03	0.065	0.937
6	0.39 \pm 0.09	0.42 \pm 0.03	0.44 \pm 0.04	0.419	0.675
12	0.47 \pm 0.07	0.48 \pm 0.19	0.43 \pm 0.02	0.158	0.857
F	0.532	0.157	1.407	/	/
P	0.715	0.956	0.300	/	/

表 5 定量 RT-PCR 检测索拉非尼作用于 A549 细胞 VEGFR-3mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

药物浓度($\mu\text{mmol/L}$)	药物作用时间			F	P
	24 h	48 h	72 h		
0	0.79 \pm 0.13	0.72 \pm 0.02	0.75 \pm 0.26	/	/
1.5	0.77 \pm 0.06	0.69 \pm 0.07	0.77 \pm 0.03	1.463	0.304
3	0.69 \pm 0.03	0.75 \pm 0.05	0.75 \pm 0.05	1.289	0.342
6	0.66 \pm 0.15	0.69 \pm 0.06	0.78 \pm 0.04	1.291	0.342
12	0.79 \pm 0.08	0.69 \pm 0.05	0.74 \pm 0.11	0.979	0.429
F	1.009	0.653	0.047	/	/
P	0.448	0.638	0.995	/	/

人肺癌细胞 A549 的体外抑制作用, 本实验采用 MTT 比色法对加入药物后的肺癌细胞 A549 活性进行检测。MTT 比色法的特点是简单、快捷、准确, 广泛用于细胞毒性试验、肿瘤放射敏感性实验等^[6]。

本实验结果显示: 不同浓度/时间下索拉非尼对人肺癌细胞 A549 的抑制率不同。在同一时间点, 各浓度组细胞抑制率较阴性对照组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并随着药物浓度的增加, 其抑制效果越明显, 各浓度组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示当作用时间相同时, 索拉非尼的浓度越大, 对肺癌细胞 A549 的抑制率就越大。同一浓度组不同时间点进行比较, 抑制率较阴性对照组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。并随着药物作用时间的延长, 其抑制效果越明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示药物浓度相同时, 作用时间越长, 抑制率就越大。索拉非尼能够抑制肺癌细胞 A549 的生长; 随着索拉非尼浓度越大, 作用时间越长, 抑制率就越大, 呈现时间和浓度依赖性。

索拉非尼具有双重抗肿瘤作用, 它可以通过抑制上述 RAF/MEK/ERK 信号传导通路直接抑制肿瘤生长。RAS/RAF/MEK/ERK 信号传导通路是细胞周期调控、基因表达、细胞增殖和分化过程中的主要途径, 而 RAF 为该通路中的关键激酶, 它有 3 个同工酶, 分别为 A-RAF、B-RAF 与 C-RAF, 它们均与细胞增殖、分化及血管生成的调节密切相关。大部分

刺激细胞生长的因子, 包括 EGF、PDGF、VEGF 和 c-KIT, 与细胞表面的受体结合后, 即可通过受体酪氨酸激酶自体磷酸化的方式首先激活 RAS, RAS 又进一步激活 RAF/MEK/ERK 信号传导通路, 将生长因子的信号带入细胞核, 从而发挥调节基因转录和促进细胞增殖的作用。生长因子受体酪氨酸激酶活性的增加、RAS 基因突变和过度表达以及 RAF 基因突变都可导致信号传导通路的过度激活, 从而引起细胞的过度增殖。已知在人类肿瘤细胞中 A-RAF 和 C-RAF 突变非常少见, B-RAF 突变占 7%, RAS 基因突变占 15%~30%。30% 卵巢癌、35%~53% 甲状腺癌、30% 结肠癌以及 50%~70% 恶性黑色素瘤中有 B-RAF 基因突变。索拉非尼正是通过抑制 RAF 活性从而阻断了 RAF/MEK/ERK 信号传导通路, 抑制肿瘤细胞的增殖, 直接抑制肿瘤生长。

索拉非尼还可以通过抑制几种与血管生成和肿瘤发展有关的酪氨酸激酶受体的活性, 包括血管内皮生长因子受体-2 (VEGFR-2), VEGFR-3, 血小板衍生的生长因子受体- β (PDGFR- β) 和 c-KIT 原癌基因, 阻断肿瘤新生血管生成, 间接抑制肿瘤细胞的生长, 从而起到抗肿瘤作用。VEGF 刺激 VEGFR-2、VEGFR-3, 介导肿瘤血管内皮细胞 DNA 合成和增殖。其信号转导主要是通过 ERK 通路, 使 VEGFR-2 及 VEGFR-3 酪氨酸磷酸化, 通过中间一些未知机制激活 ERK 级联反应, 进而引起血管内皮细胞增

殖,为肿瘤细胞提供营养引起肿瘤生长。

通过目前对 VEGF/VEGFR 信号通路作用机制的了解,可以得到以下几种可能的抑制剂研究方向:

①利用单克隆抗体抑制 VEGF 或 VEGFR,使其不能特异性结合,阻断信号传导,也可以利用基因技术抑制它们的表达,减弱其活性。②设计特定的小分子抑制剂,结合到 VEGFR 胞外 VEGF 结合区域,竞争性拮抗 VEGF,同理,也可以是结合到 VEGF 上 VEGFR 的特定结合域,竞争性拮抗 VEGFR。③抑制 VEGFR 的胞内激酶域,主要是 ATP 的结合位点,竞争性地拮抗 ATP,使其无法提供 γ 磷酸基。④抑制胞内的 VEGFR 下游信号的关键性蛋白。

本实验采用 RT-PCR 检测 VEGFR-2mRNA、VEGFR-3mRNA 的表达。它是聚合酶链式反应(PCR)的一种广泛应用的变形。在 RT-PCR 中,一条 RNA 链被逆转录成为互补 DNA,再以此为模板通过 PCR 进行 DNA 扩增。RT-PCR 的指数扩增是一种很灵敏的技术,可以检测很低拷贝数的 RNA。RT-PCR 广泛应用于遗传病的诊断,并且可以用于定量监测某种 RNA 的含量。

本实验结果显示:当药物作用 24、48、72 h 后,同一浓度不同时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),同一时间不同浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。提示当用索拉非尼处理后,总的 VEGFR-2mRNA、VEGFR-3mRNA 的表达并没有发生变化。说明索拉非尼的多靶点抗肿瘤作用并不是直接通过 VEGFR-2、VEGFR-3 起作用。国内在这方面的报道甚少。国外学者采用 Western Blot 检测索拉非尼对 VEGFR-2mRNA 的表达影响,结果显示,总的 VEGFR-2mRNA 的表达没有发生变化。本实验研究结果和国外文献结果一致^[7]。另外,本实验研究了索拉非尼对 VEGFR-3mRNA 表达的影响,结果显示,总的 VEGFR-3mRNA 的表达也没有发生变化。

国外学者研究索拉非尼抑制 VEGFR-2 的自身磷酸化在两种细胞系中被观察到,分别是 HUVECs 和 NIH 3T3 细胞系,在 HUVECs 的实验中,血管内皮生长因子强烈诱导着受体 VEGFR-2 自身磷酸化,但是这一点被索拉非尼阻滞。在 100 nmol/L 的索拉非尼时,50%的受体 VEGFR-2 被抑制。同样的在 NIH 3T3 的试验中,观察到同样的现象^[8,9]。这些研究结果表明,索拉非尼是一种 VEGFR-2 在细胞内的信号传导的抑制剂。

Western Blot 中文一般称为蛋白质印迹,它是分

子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。其基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色。通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达情况的信息。

本实验显示:当同一时间点不同浓度比较时,各浓度组细胞 P-VEGFR-2、P-VEGFR-3 的表达有明显的差异,差异有统计学意义($P<0.05$)。索拉非尼的浓度越大,P-VEGFR-2、P-VEGFR-3 的表达越少,提示呈现浓度依赖性。提示索拉非尼能够抑制 P-VEGFR-2、P-VEGFR-3 的表达。关于索拉非尼对肺癌细胞株 A549 中 P-VEGFR-2、P-VEGFR-3 的表达的影响,国外有文献报道:在同一时间点不同浓度组索拉非尼能够抑制肺癌细胞株 A549 中 P-VEGFR-2 的表达,并呈浓度依赖性^[7]。与本实验观察到的结果一致。同时,本实验结果还发现索拉非尼能够抑制人肺癌细胞株 A549 中 P-VEGFR-3 的表达,同样呈浓度依赖性。

另外本实验显示:在同一浓度组不同时间点比较,差异无统计学意义($P>0.05$),这与 MTT 的结果(索拉非尼能够抑制人肺癌细胞 A549 的生长,呈现一定的时间和浓度依赖性)不一致。说明索拉非尼对于人肺癌细胞 A549 可能还存在着其它的靶点。

总之,索拉非尼能够抑制人肺癌细胞 A549 的生长,其机制并不是通过直接抑制 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的表达,而是可能通过抑制信号转导通路上游分子 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的磷酸化水平,以阻止肿瘤血管生成,从而起到抗肿瘤作用,这就为索拉非尼用于肺癌提供了理论依据。

本实验是体外实验,肿瘤细胞脱离体内生长内环境会受外界多种因素影响;药物在体内作用比在体外实验中要复杂,索拉非尼在不同药物浓度/时间下对体外细胞毒作用只是体内杀伤作用的相对反映,而且受实验条件限制,结果有一定局限性;另外本实验选取单一肺癌细胞、单一药物索拉非尼,对于此实验还有继续探讨的空间。因此,关于索拉非尼对肺癌的作用机制,我们还要大量体内外实验继续深入的研究以便为临床应用提供充足的理论依据。

参考文献:

- [1]Strumberg D.Preclinical and clinical development of the oral multikase inhibitor sorafenib in cancer treatment[J].Drugs Today (Barc),2012,41(12):773-784.
- [2]Beeram M,Patnaik A,Rowinsky EK.Regulation of c-Raf-1:

therapeutic implications [J].Clin Adv Hematol Oncol,2014,1(8):476-481.

[3]Bos JL.Ras oncogenes in human cancer:a review [J].Cancer Res,2009,49(17):4682-4689.

[4]Garnett MJ,Marais R.Guilty as charged:B-RF is a human oncogene[J].Cancer Cell,2004,6(4):313-319.

[5]Beeram M,Patnaik A,Rowinsky EK.Raf:a strategic target for therapeutic development against cancer [J].J Clin Oncol,2012,23(27):6771-6790.

[6]Mosmann T.Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assay[J].J Immunol Methods,2005(1-2):55-63.

[7]Mendel DB,Laird AD,Xin X,et al.In vivo antitumor activity

of SU11248,a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and plateletdrived growth factor receptors:determination of a pharmacokinetic pharmacodynamic relationship[J].Clin Cancer Res,2013(1):327-337.

[8]Wilhelm SM,Carter C,Tang L,et al.BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF MEK ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis [J].Cancer Res,2014,65(19):7099-7109.

[9]Lyons JF,Wilhelm S,Hibner B,et al.Discovery of a novel Raf kinase inhibitor[J].Endocr Relat Cancer,2013,8(3):219-225.

收稿日期:2018-6-7;修回日期:2018-6-22

编辑/杨倩