

• 实验研究 Experimental research •

索拉非尼联合奥沙利铂对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用

储玉山, 朱小庆, 张玉宇, 陆小华, 曹建民

【摘要】目的 探讨索拉非尼联合奥沙利铂(L-OHP)对肝癌细胞 HepG2 的抑制作用及其可能的分子机制。方法 索拉非尼和 L-OHP 单独及联合给药后以 CCK8 法测定 HepG2 细胞的增殖,用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡,用 Western blot 观察 ERK 及 pERK 蛋白的表达。结果 索拉非尼及 L-OHP 单药对 HepG2 均有抑制作用,两药联合具有协同或相加作用($P < 0.05$)。索拉非尼及 L-OHP 分别主要使细胞阻滞于 G1 及 S 期。两药联用后同时阻滞于 G1 及 S 期。联合组细胞凋亡率明显比各单药组高($P < 0.05$)。单用及联合用药对 HepG2 细胞 ERK 表达无明显影响,索拉非尼及联合用药减少 pERK 的表达。结论 索拉非尼和 L-OHP 对肝癌 HepG2 细胞有增殖抑制及促凋亡作用,两药联合表现为协同或相加作用,其机制可能与细胞周期的双重阻滞及细胞增殖通路 Raf/MEK/ERK 的抑制有关。

【关键词】肝癌;索拉非尼;奥沙利铂;联合用药;协同作用

中图分类号:R735.7 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2011)-10-0810-05

The inhibitory effect of sorafenib together with oxaliplatin on the growth of human hepatic carcinoma cell line HepG2 in vitro CHU Yu-shan, ZHU Xiao-qing, ZHANG Yu-yu, LU Xiao-hua, CAO Jian-min. Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu Province 226001, China

Corresponding author: CHU Yu-shan

【Abstract】Objective To investigate the inhibitory effect of sorafenib in combination use with oxaliplatin (L-OHP) on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells and to explore the possible molecular mechanism. Methods The inhibitory effect of sorafenib together with L-OHP on the growth of human hepatic carcinoma cell line HepG2 in vitro was evaluated by CCK8 assay. The cell cycle changes and the apoptotic rate of the treated cells were determined by flow cytometry, and the expressions of ERK and pERK were observed by using Western blott. Results Both sorafenib and L-OHP when used alone could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells, and a synergistic or adding effect could be achieved when both sorafenib and L-OHP were used together ($P < 0.05$). Sorafenib and L-OHP could cause cell cycle to stagnate at G1 phase and S phase, respectively. Combined use of the two drugs resulted in cell cycle arresting at G1 phase and S phase. The combination use of the drugs significantly increased the apoptosis rate of the cells as compared with that when only sorafenib or L-OHP was used ($P < 0.05$). Sorafenib and L-OHP, whether used alone or in combination, did not produce obvious effect on ERK expression. However, pERK expression in the HepG2 cells was significantly lowered after the treatment with sorafenib alone or in combination with L-OHP, especially in the combination use group. Conclusion The combination use of sorafenib and L-OHP shows a synergistic or adding effect in inhibiting the proliferation and inducing apoptosis of HepG2 cells. The mechanism of this synergistic effect may be closely related to the double blockage of the cell cycle as well as to the inhibition of Raf/MEK/ERK pathway. (J Intervent Radiol, 2011, 20: 810-814)

【Key words】hepatocellular carcinoma; sorafenib; oxaliplatin; combined medication; synergistic effect

索拉非尼是首个口服的小分子多靶点抗肿瘤药,靶向作用于肿瘤细胞和肿瘤血管上的丝氨酸/

苏氨酸激酶和受体酪氨酸激酶,具有同时抑制肿瘤细胞增殖和血管生成的双重作用。有关肝癌的大型、多中心、随机、安慰剂对照Ⅲ的临床研究显示,索拉非尼组的总生存率比安慰剂组提高了 44%,两

组中位总生存期分别是 10.7 和 7.9 个月^[1]。奥沙利铂(L-OHP)是第三代铂类抗癌化合物,临床资料表明,奥沙利铂治疗多种类型肿瘤时无论单用或联合应用都有较好的疗效,不良反应小,化疗指数高,安全范围广。靶向治疗与化疗联合是否能达到协同或相加的作用,其联合的机制及最适宜的方案,需要在临床试验前进行系统的研究。因此我们选用索拉非尼联合 L-OHP 化疗探索治疗肝癌的新思路,为进一步的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2 引自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。培养传代于含 10%新生牛血清的 DMEM 培养液中,选择对数生长期细胞进行实验。

1.1.2 药物及试剂 索拉非尼由南京安格医药公司提供,用 10%DMSO 溶解,于-20℃保存,实验用时稀释,DMSO 终浓度 < 0.5%,不影响细胞生长。L-OHP 由连云港恒瑞制药生产,DMEM 及小牛血清由 Gibco 公司生产,DMSO 由 Sigma 公司生产;CCK-8 由海门碧云天公司生产,AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒由上海明睿生物技术有限公司提供;ERK1/2、p-ERK 由美国 Cell Signaling Technology 生产;FACS 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 CCK8 法检测药物对肿瘤细胞增殖的抑制

取对数生长期 HepG2 细胞,以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板,培养 24 h 后加入药物。索拉非尼药物剂量分别为 1.4、2.8、5.6、和 11.2 mg/L,L-OHP 药物剂量分别为 2.5、5.0、10.0 和 20.0 mg/L。实验分为空白对照组、索拉非尼单药组、L-OHP 单药组、索拉非尼联合 L-OHP 组。每个剂量设 3 个复孔,加药后分别培养 72 h,每孔加 CCK8 10 μ l,37℃孵育 3 h,用酶标仪(波长 450 nm)测定各孔的 A 值,计算细胞增殖抑制率。抑制率(%)=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值 \times 100%。采用 q 值判断索拉非尼和奥沙利铂联用的性质。q 值的计算参照金氏公式: $q = E_{AB}/(E_A + E_B - E_A \times E_B)$ 。式中 E_A 和 E_B 为各药单用抑制率, E_{AB} 为两药合用抑制率。 $q > 1.15$ 为协同作用,0.85 ~ 1.15 为相加作用,< 0.85 为拮抗作用。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 将处于对数生长期的细胞接种于 24 孔培养板,经给药处理后,用 0.25%胰酶消化细胞,收集各组细胞后,调

整细胞浓度为 5×10^5 /ml,分别行细胞周期及凋亡检测。①周期检测:75%乙醇-20℃固定过夜,洗涤离心后加入含有 0.1%RnaseA 的 PBS 液和 10 μ g/ml PI 500 μ l,室温避光染色 30 min 后上流式细胞仪进行细胞周期测定。②凋亡检测:用冰冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,吸取 100 μ l 含细胞的平衡液到 5 ml 离心管,加入 5 μ l AnnexinV-FITC 和 5 μ l 的 PI,避光室温反应 15 min,每管加入 400 μ l 平衡液终止反应,上机检测。细胞周期数据由 ModFit2.0 软件系统分析,凋亡检测采用 Cell Quest 分析。

1.2.3 Western-blot 检测 ERK 及 pERK 蛋白的表达

收集各组细胞,加入细胞裂解液,冰上放置 15 min,然后在 4℃,10 000 g,离心 10 min,上清液用 Bradford 法测蛋白含量,然后加入 2 \times SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min,离心,取 20 μ g 蛋白上样到 10%SDS-PAGE 进行电泳,电转 90 min 把蛋白转到 PVDF 膜,将 PVDF 膜放入含有 5%脱脂奶粉的 TBS/T 中,4℃包被过夜。然后膜与一抗(1:1 000)在摇床上室温摇 2 h,4℃孵育过夜,相应二抗(1:7 000)室温孵育 1.5 h。实验中设不加一抗的空白对照组。ECL 化学发光显色后,Odyssey 进行灰度扫描,PDQuest 7.2.0 软件分析结果。

1.3 数据分析

实验数据采用 SPSS11.5 统计软件分析,各组间细胞抑制率比较采用完全随机设计的方差分析;细胞周期、细胞凋亡率采用单向方差分析;多重比较均采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 索拉非尼、L-OHP 单药及联合用药对 HepG2 的抑制作用

CCK8 结果显示,人肝癌 HepG2 细胞经索拉非尼、L-OHP 单药处理及两者联合处理后,在不同时间、不同浓度均能出现细胞生长抑制作用(表 1、2),L-OHP 的抑制作用呈剂量-时间依赖效应,索拉非尼单药组及联合用药组细胞抑制率在 72 h 达峰值,至 96 h 下降。与单药组相比,联合组对细胞的抑制率明显增高(表 1、2,图 1),表现为协同或相加作用。索拉非尼 2.8 mg/L + L-OHP 5.0 mg/L 组 24、48、72 及 96 h 时 q 值分别为 1.30、1.23、1.37 和 1.29,表现为协同作用,其余为相加作用(表 3)。因此,选取索拉非尼 2.8 mg/L + L-OHP 5.0 mg/L 为最佳联合剂量。

2.2 索拉非尼、L-OHP 单药及联合用药对 HepG2 细胞周期的影响

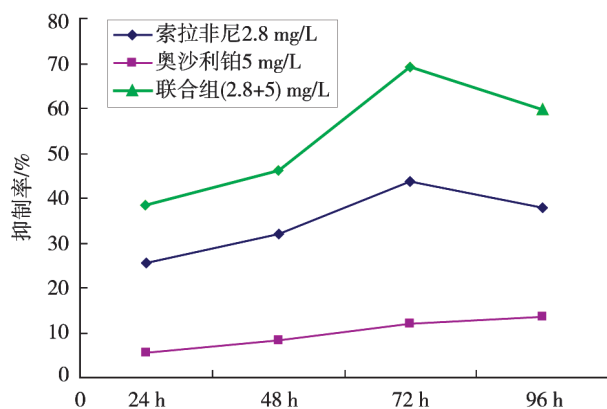


图 1 索拉非尼和 L-OHP 单独及联合用药对 HepG2 细胞的抑制作用

表 1 索拉非尼和 L-OHP 单用对 HepG2 的抑制作用

药物浓度/(mg/L)	抑制率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
索拉非尼				
1.4	12.36	21.33	28.57	13.47
2.8	25.55	31.99	43.71	37.75
5.6	33.24	59.81	62.86	52.32
11.2	45.88	75.58	86.57	59.82
L-OHP				
2.5	2.79	5.16	7.20	9.85
5.0	5.58	8.26	12.10	13.60
10	13.96	16.52	20.53	24.05
20	21.32	26.84	31.87	38.14

表 2 索拉非尼联合 L-OHP 对 HepG2 的抑制作用

分组	抑制率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
L-OHP + 索拉非尼				
2.5 mg/L + 1.4 mg/L	16.09	27.25	38.48	22.38
5.0 mg/L + 2.8 mg/L	38.52	46.26	69.10	59.57
10 mg/L + 5.6 mg/L	50.13	68.91	87.86	68.22
20 mg/L + 11.2 mg/L	63.32	92.00	95.31	88.97

表 3 索拉非尼和 L-OHP 对 HepG2 协同抑制作用的 q 值

分组	处理时间/h			
	24 h	48 h	72 h	96 h
L-OHP + 索拉非尼				
2.5 mg/L + 1.4 mg/L	1.09	1.07	1.13	1.02
5.0 mg/L + 2.8 mg/L	1.30	1.23	1.37	1.29
10 mg/L + 5.6 mg/L	1.11	1.03	1.12	1.07
20 mg/L + 11.2 mg/L	1.10	1.12	1.05	1.14

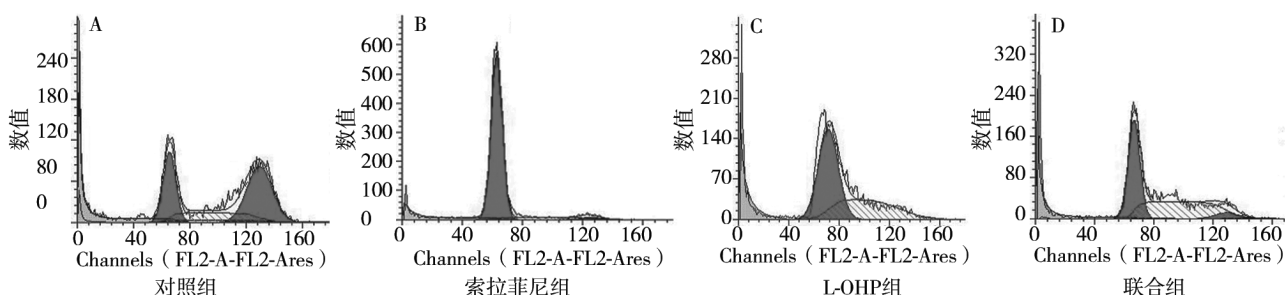


图 2 索拉非尼和 L-OHP 单独及联合用药对 HepG2 细胞周期的影响

索拉非尼可使细胞周期阻滞于 G0/G1 期,本研究中,索拉非尼 48 h 组细胞阻滞于 G1 期高达 90.27%,与对照组相比增加了 57.56%。而 L-OHP 主要使细胞阻滞于 S 期(39.12%,对照组 22.01%)。联合用药后,G2 期明显下降至 6.16%(对照组 45.28%),细胞主要阻滞于 G1(45.46%)及 S 期(48.38%) (表 4、图 2)。

表 4 L-OHP 及索拉非尼对 HepG2 细胞周期及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期			细胞凋亡率
	G0/G1	S	G2/M	
对照组	32.71 ± 2.23	22.01 ± 1.96	45.28 ± 2.76	5.29 ± 0.75
L-OHP	58.15 ± 2.96	39.12 ± 2.08	2.73 ± 0.45	18.14 ± 1.43 ^a
索拉非尼	90.27 ± 3.79	6.54 ± 1.65	3.19 ± 0.98	41.86 ± 2.94 ^{ab}
联合组	45.46 ± 3.17	48.38 ± 3.93	6.16 ± 1.21	52.46 ± 3.46 ^{abc}

与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 L-OHP 组相比,^b $P < 0.05$;与索拉非尼组相比,^c $P < 0.05$

2.3 索拉非尼、L-OHP 单药及联合用药对 HepG2 细胞凋亡的作用

经索拉非尼或 L-OHP 单药作用后,细胞凋亡率均较空白对照组升高。两药单药的凋亡率分别为索拉非尼 41.86%和 L-OHP 18.14%,而对照组为 5.29%。联合用药组凋亡率升高更为明显,达 52.46%,与单药组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 4、图 3)。

2.4 索拉非尼、L-OHP 单药及联合用药对 ERK 及 pERK 表达的影响

Western-blot 检测结果显示,与对照组相比,单药组及联合用药组 ERK 蛋白表达均无明显改变,而索拉非尼及联合用药组 pERK 的表达下降,在联合用药组下降更加明显(图 4)。

3 讨论

肝癌的发病机制十分复杂,其发生、发展和转移与多种基因的突变、细胞信号传导通路和新生血管增生异常等密切相关^[2]。研究发现,Raf 激酶在大部分肝细胞癌(HCC)中过度表达,刺激细胞信号传导通路,导致细胞增殖^[3],并且 HCC 的重要致病因

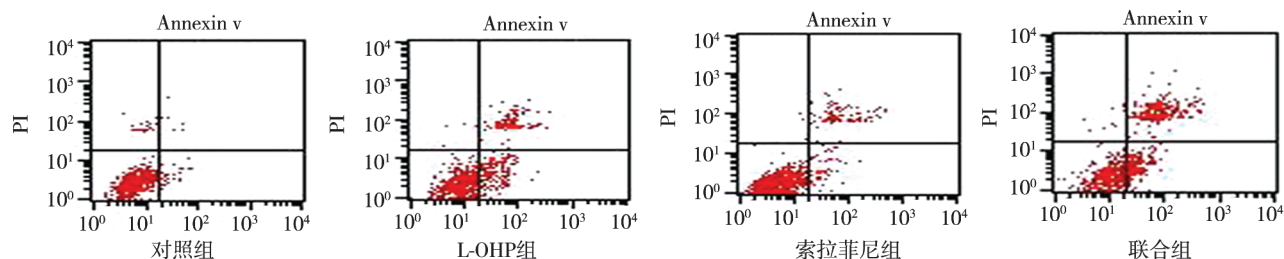
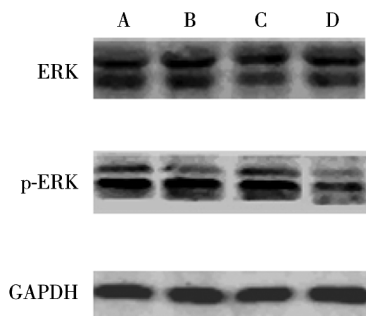


图 3 索拉非尼和 L-OHP 单独及联合用药对 HepG2 细胞凋亡的影响



注:A:对照组,B:索拉非尼组,C:L-OHP 组,D:联合组

图 4 索拉非尼和 L-OHP 单独及联合用药 ERK 及 pERK 表达

素如 HBV 和 HCV 感染以及有丝分裂生长因子均能激活 Raf/MEK/ERK 途径^[4,5]。这些都是肝癌靶向治疗的理论基础。

索拉非尼可抑制受体酪氨酸激酶 KIT 和 FLT3 以及 Raf/MEK/ERK 途径中丝氨酸/苏氨酸激酶,明显抑制肿瘤细胞增生;还可通过抑制受体酪氨酸激酶 VEGFR 和 PDGFR 及 Raf/MEK/ERK 途径中丝氨酸/苏氨酸激酶,明显抑制肿瘤血管生成,同时发挥抗血管生成和抗肿瘤细胞增殖的双重作用^[6,7]。体外细胞和动物实验显示,索拉非尼对体外多种肿瘤细胞有抑制或杀伤作用。2 个大型的 III 期临床研究(全球开展的 SHARP 研究^[1]及亚太地区的 Oriental 研究^[8])取得了突破性进展,证实索拉非尼能够有效阻止肝癌病情的恶化,显著延长患者的生存时间。

与其他铂类药物相似,L-OHP 作用机制主要是使肿瘤细胞内 DNA 形成链间和链内交联,中断 DNA 合成,从而最终产生细胞毒和抗肿瘤活性。由于 L-OHP 用 1,2-二氨基环己烷(DACH)基团取代了 CDDP 的氨基,故其阻断 DNA 的复制和转录的作用更强烈,疗效优于其他铂类药物而无交叉耐药。对部分原发性或获得性顺铂或卡铂耐药的细胞株也有效^[9]。在 2010 年 CSCO 大会上秦淑逵公布了亚洲晚期肝癌患者接受 FOLFOX 方案对比多柔比星系统化疗 III 期临床研究(EACH 研究)结果,FOLFOX4 组和多柔比星组患者的中位 OS 分别为

6.4 个月和 4.9 个月,首次证明含 L-OHP 方案的系统化疗能为晚期肝癌患者带来生存获益。

本研究结果显示,索拉非尼及 L-OHP 单药及联合用药对人肝癌 HepG2 的增殖均有抑制作用,联合用药的抑制作用强于单药,具有协同或相加作用。在索拉非尼 + L-OHP $(2.8 + 5.0 \text{ mg/L})$ 组,联合效果最佳,均表现为协同作用。研究还发现,L-OHP 的抑制作用呈剂量-时间依赖效应,索拉非尼单药组及联合用药组细胞抑制率在 72 h 达峰值,至 96 h 下降。原因可能为索拉非尼只要穿过细胞膜与受体酪氨酸激酶等结合就能起效,而 L-OHP 需进入细胞核内产生作用,且主要作用于 S 期,所以起效较索拉非尼慢。流式细胞仪检测细胞周期及凋亡显示,联合用药组细胞凋亡率明显强于各单药组。索拉非尼抑制细胞周期蛋白及细胞周期相关蛋白,使增殖期细胞不能通过“G1-S”调节点,阻滞在 G1 期,从而阻断细胞周期的进展,进而影响细胞生长促进凋亡^[10]。L-OHP 使细胞阻滞于 S 期,在合用药组,细胞主要阻滞于 G1 期及 S 期,G2 期比率明显降低,从而进一步阻断细胞周期的进展,促进细胞凋亡。因此,联合用药组细胞凋亡率增加,可能是由于细胞的 G1 期及 S 期同时被阻滞,使 DNA 复制、修复和细胞分裂受到双重抑制,促进了细胞凋亡,增强了抗肿瘤效果,在药效上表现为协同作用。

Raf/MEK/ERK 级联的信号传导在 HCC 进展中发挥重要作用^[2]。Raf/MEK/ERK 信号通路被激活后,ERK 被磷酸化而活化,转位至细胞核,作用于转录因子(如 NF- κ B, c-myc 等),刺激转录启动和转译激活途径,导致细胞增殖^[3]。本研究 Western blot 结果显示,索拉非尼和 L-OHP 单药及联合用药对 ERK 表达均无明显影响,但索拉非尼及联合用药组 pERK 的表达下降,联合用药组下降更加明显。提示联合用药组进一步抑制 ERK 磷酸化。阻断 Raf/MEK/ERK 信号转导通路,是两药联合对 HepG2 细胞增殖协同抑制的机制之一。另有报道,Raf/MEK/ERK 通路与化疗药耐药有关^[11],细胞信号传导通路

抑制剂能够逆转肿瘤多药耐药性^[12-13]。索拉非尼通过抑制这一通路,使耐药细胞恢复对 L-OHP 的敏感性,加强了 L-OHP 的促凋亡作用。

随着分子靶向治疗研究的不断深入,全新的肿瘤治疗模式越来越受到人们的关注,索拉非尼在单 L-OHP 药治疗肝癌取得肯定疗效后,有研究表明索拉非尼联合 TACE 治疗原发性肝癌安全、有效^[14-15]。本实验通过索拉非尼联用 L-OHP 的体外实验证明了对肝癌有良好的协同增效作用,表明分子靶向治疗与化疗药物联合应用能提高治疗肝癌的疗效,为临床上肝癌治疗模式提供了参考,但是仍有很多问题有待解决,值得我们进一步研究与探讨。

[参考文献]

- [1] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359: 378 - 390.
- [2] Villanueva A, Newell P, Chiang DY, et al. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma[J]. Semin Liver Dis, 2007, 27: 55 - 76.
- [3] Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Regulation of c-Raf-1: therapeutic implications[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2003, 1: 476 - 481.
- [4] Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma[J]. Gut, 2003, 52: 706 - 712.
- [5] Hwang YH, Choi JY, Kim S, et al. Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2004, 29: 113 - 121.
- [6] 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, 2004, 64: 7099 - 7109.
- [7] Chang YS, Adnane J, Trail PA, et al. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 59: 561 - 574.
- [8] Cheng AL, Kang Y, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2009, 10: 25 - 34.
- [9] Lian M, Liu Y, Yu SZ, et al. Hepatitis B virus x gene and cyanobacterial toxins promote aflatoxin B1-induced hepatotumorigenesis in mice[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 3065 - 3072.
- [10] Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5 [J]. Cancer Res, 2006, 66: 11851 - 11858.
- [11] Lee S, Yoon S, Kim DH. A high nuclear basal level of ERK2 phosphorylation contributes to the resistance of cisplatin-resistant human ovarian Cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2007, 104: 338 - 344.
- [12] Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S, et al. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6: 2092 - 2102.
- [13] 丁晓蕾, 张阳, 吴涛. 索拉非尼逆转肝癌细胞株 HepG2/GEM 耐药作用的实验研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17: 1160 - 1163.
- [14] 闫东, 刘德忠, 曾辉英, 等. TACE 联合索拉非尼治疗肝细胞癌的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15: 359 - 361.
- [15] 黄振, 毕新宇, 赵建军, 等. 索拉非尼联合经导管肝动脉化疗栓塞治疗无远处转移的晚期肝细胞癌 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15: 355 - 358.

(收稿日期:2011-06-04)