

索拉非尼联合奥沙利铂对人肝癌 BEL-7402 细胞抑制作用的实验研究

116024 辽宁大连 大连医科大学第二附属医院肿瘤内科 武燕¹, 张阳², 吴涛

【摘要】 目的 探讨索拉非尼联合奥沙利铂对人肝癌 BEL-7402 细胞的抑制作用。方法 选取人肝癌细胞株 BEL-7402, 用奥沙利铂和索拉非尼单药或联合(含不同给药顺序)作用于细胞, 观察最佳抑制效果。MTT 法检测奥沙利铂和索拉非尼分别对肝癌 BEL-7402 细胞的抑制作用并计算半数抑制浓度(IC₅₀); 电镜下观察细胞形态和超微结构的改变; 流式细胞仪检测细胞周期分布及细胞凋亡的变化。**结果** 奥沙利铂单药及联合索拉非尼组 BEL-7402 细胞出现 S 期、G₂/M 期阻滞, 索拉非尼单药组仅出现 S 期阻滞。先用奥沙利铂联合组的 BEL-7402 细胞凋亡率最高, 为(40.94 ± 4.62)%, 其次为先用索拉非尼联合组的凋亡率(30.02 ± 4.15)%, 联合组的 BEL-7402 细胞凋亡率均高于索拉非尼单药组(P < 0.05)。**结论** 人肝癌 BEL-7402 细胞体外对索拉非尼和奥沙利铂均高度敏感, 两药联合应用对肝癌细胞有协同抑制作用, 且先用奥沙利铂联合给药的效果更好。

【关键词】 肝细胞癌; BEL-7402 细胞株; 索拉非尼; 奥沙利铂; 凋亡

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2011)09-0780-05

The effect of sorafenib in combination with oxaliplatin on hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402

WU Yan, ZHANG Yang, WU Tao. Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116024, China

Corresponding author: ZHANG Yang, E-mail: zydl@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To observe effects of sorafenib combined with oxaliplatin(OXA) on human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. **Methods** In order to find the best effect, human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 was treated with sorafenib and OXA alone or in combination according to different sequences. Median inhibition concentration (IC₅₀) was calculated by MTT assay for OXA and sorafenib in BEL-7402. Altered cellular morphism and ultrastructure of the treated cells were observed under transmission electron microscope, and cell cycle distribution and altered apoptosis were analyzed by flow cytometry. **Results** S and G₂/M phase arrest was observed in the three regimens containing OXA (OXA alone and two dosing sequences of combination), while S phase arrest was found in the regimen containing sorafenib alone. The highest apoptosis rate was (40.94 ± 4.62)% in OXA and sorafenib combination(OXA prior used), dwarfing (30.02 ± 4.15)% of sorafenib and OXA combination(sorafenib prior used), while it of either combination were superior to that of sorafenib alone(P < 0.05). **Conclusion** Human hepatocellular carcinoma cell BEL-7402 is highly sensitive to both sorafenib and OXA, which may cooperate in combination for synergistic inhibition on hepatocellular carcinoma cells with better effect in the dosing sequence of OXA followed by sorafenib.

【Key Words】 Hepatocellular carcinoma; BEL-7402 cell line; Sorafenib; Oxaliplatin; Apoptosis

肝癌是我国常见的消化道恶性肿瘤, 以多学科综合治疗和靶向治疗为代表的新治疗方法, 为肝癌的治疗开启了一扇希望之窗。索拉非尼是一种双芳基尿素类口服多激酶抑制剂, 它具有双重抗肿瘤作用, 一方面抑制 Raf/MEK/ERK 信号传导通路^[1]直

接抑制肿瘤生长, 另一方面抑制与血管生成和肿瘤发展有关的酪氨酸激酶^[2-4]。索拉非尼作为一种新型多靶点药物, 其不良反应较传统药物轻。目前, 靶向治疗联合化疗治疗肝癌还处于研究探索阶段。本研究通过观察化疗药物奥沙利铂和靶向药物索拉非

1 034000 现工作单位山西省忻州市人民医院放疗科

2 通讯作者, E-mail: zydl@medmail.com.cn

尼对人肝癌 BEL-7402 细胞株体外增殖和凋亡的影响,为奥沙利铂和索拉非尼联合应用于肝细胞瘤的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人肝癌 BEL-7402 细胞系购自中国科学院上海细胞库,由大连医科大学附属第二医院中心实验室传代保存。

1.1.2 主要试剂 细胞培养试剂:PRMI-1640 干粉培养基、新生牛血清、胰蛋白酶、EDTA、四甲基偶氮唑蓝、二甲基亚砷、青霉素、链霉素等。实验药物:索拉非尼购自拜耳公司,奥沙利铂购自江苏恒瑞医药公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 0.25% 胰酶分别消化处于对数生长期的 BEL-7402 单层培养细胞,PRMI 完全培养基调整细胞浓度至 3×10^5 /ml。取相应的细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24h,设置实验组、对照组和空白组。实验组用 PRMI-1640 培养液分别倍比稀释索拉非尼和奥沙利铂,稀释浓度为 1:10、1:100、1:1000、1:10 000;对照组加入不含药物的 PRMI-1640 培养液 100 μl ;空白组仅加入 PRMI-1640 培养液 200 μl ,无 BEL-7402 细胞。各组均设 3 复孔。培养 48h 后每孔加入 MTT (5mg/ml) 20 μl ,继续培养 4h,弃上清,每孔加入二甲基亚砷 200 μl ,充分振荡 5min。于 Model 550 型酶标仪 540nm 测量每孔吸光值(A),并计算细胞抑制率(IC), $\text{IC} = 1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值} \times 100\%$ 。 IC_{50} 即抑制率为 50% 的药物浓度,取 3 次重复实验的均值作图。根据实验结果用 Excel 软件绘制细胞对药物的浓度反应曲线,并计算 IC_{50} 。

1.2.2 透射电镜观察 设未加药培养 48h 的对数生长期 BEL-7402 细胞作为对照组,分别用索拉非尼($1/5 \text{IC}_{50}$:2.7ng/ml)和奥沙利铂($1/5 \text{IC}_{50}$:5ng/ml)作用 BEL-7402 细胞 48h 后,弃去培养液,将细胞刮下后用低浓度胰酶消化,2000r/min 离心 15~20min,4 $^\circ\text{C}$ 固定 30min~2h;用探针拨离细胞团,移入小瓶,4 $^\circ\text{C}$ PBS 漂洗 3 次,每次 10min,1% 四氧化钼 4 $^\circ\text{C}$ 固定 15~30min,用 PBS 漂洗 3 次;分别收集细胞,电镜下观察两组细胞形态变化。

1.2.3 流式细胞仪检测 实验设 5 组:不加任何药物的对照组;索拉非尼单药作用 48h 组;奥沙利铂单

药作用 48h 组;先加索拉非尼,24h 后用 PBS 清洗加奥沙利铂 24h 组;先加奥沙利铂,24h 后用 PBS 清洗加索拉非尼 24h 组。实验用药分别为 $1/5 \text{IC}_{50}$ 浓度索拉非尼和奥沙利铂(2.7ng/ml 和 5ng/ml)。实验各组索拉非尼终浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,奥沙利铂终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将样品放入流式细胞仪的样品室,以激发波长 488nm 测定,所得数据输入 MACINTISH650 型计算机,并用 Modifit1.0 软件分析细胞周期分布及细胞凋亡状况。重复 3 次。 IC_{50} 根据药物效应中效方程式 $f_a/f_u = (D/D_m)^m$ 计算。 f_a 为抑制率, $f_u = 1 - f_a$,D 为药物浓度, D_m 为中效浓度,即 50% 效应时的药物浓度,m 为斜率。在本研究中 IC_{50} 等同于中效方程式中 D_m 。

1.3 统计学分析 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件行 *t* 检验和方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 索拉非尼和奥沙利铂单药对 BEL-7402 细胞增殖的抑制作用 MTT 法检测不同浓度的索拉非尼和奥沙利铂单药作用人肝癌细胞株不同时间对细胞增殖的抑制作用。索拉非尼和奥沙利铂对肝癌细胞株 BEL-7402 的增殖有明显的抑制作用。抑制率随着药物浓度的增加而增加,有剂量依赖关系,到一定程度后,随着索拉非尼和奥沙利铂浓度的增加,抑制率增加不再明显,呈现平台效应。在相同浓度下,索拉非尼对 BEL-7402 细胞增殖的抑制率高于奥沙利铂。根据 MTT 结果及中效方程式分别计算索拉非尼和奥沙利铂的 IC_{50} ,作用 BEL-7402 细胞 48h 索拉非尼的中效浓度为 2.17~8 $\mu\text{g}/\text{ml}$,作用 BEL-7402 细胞 48h 奥沙利铂的中效浓度为 5~15.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。见图 1。

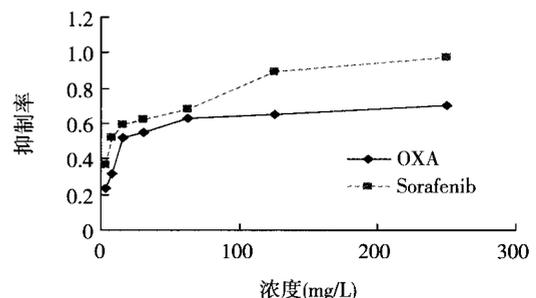
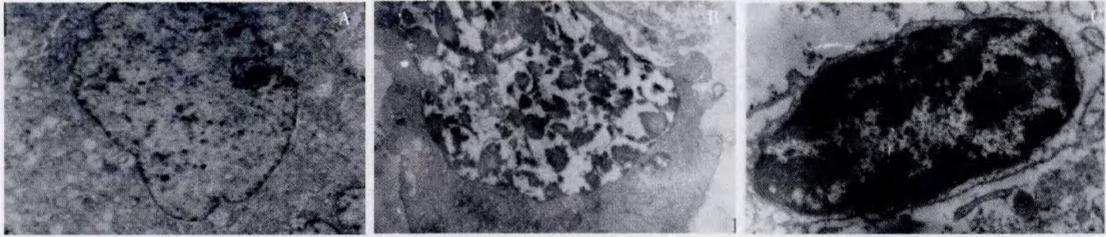


图 1 索拉非尼和奥沙利铂单药分别对 BEL-7402 的抑制率

2.2 索拉非尼和奥沙利铂作用 BEL-7402 细胞超微结构的改变 透射电镜观察对照组 BEL-7402 细胞的胞膜完整,细胞体积大,胞核大,表面畸形,核仁明显,可见有多个核仁,常染色质均匀。索拉非尼处理

BEL-7402 细胞后,观察到核碎裂细胞以及即将形成包裹有细胞器的凋亡小体,细胞呈凋亡形态的改变。奥沙利铂处理 BEL-7402 细胞后,染色质呈高度凝集和边缘化,细胞呈早期凋亡形态的改变。



A:对照组;B:索拉非尼组;C:奥沙利铂组

图 2 透射电镜观察索拉非尼和奥沙利铂作用 48h 的 BEL-7402 细胞(×10 000)

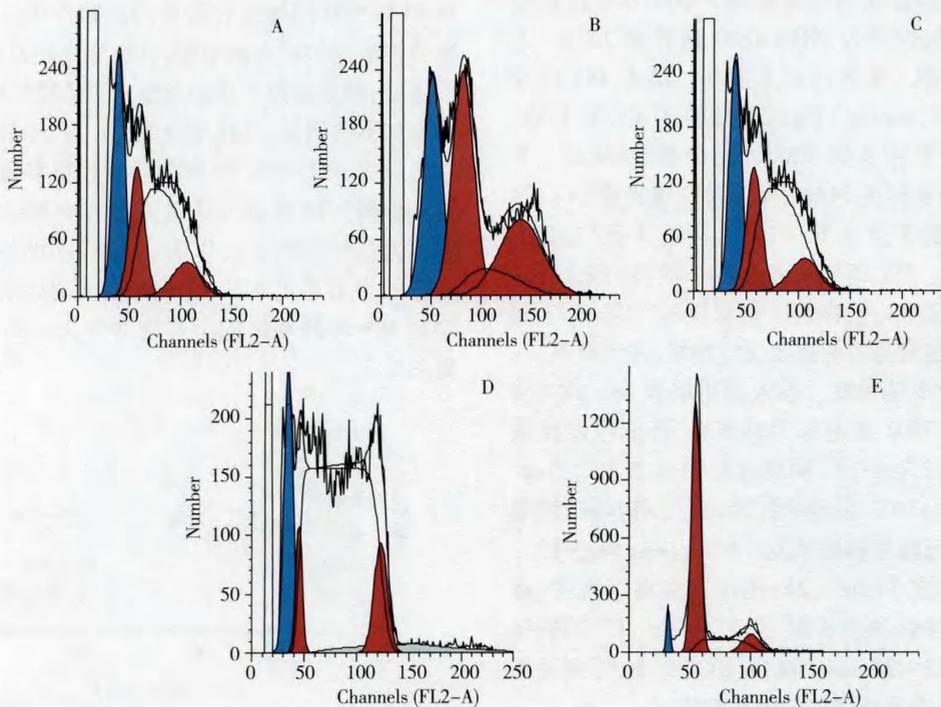
2.3 流式细胞仪检测药物对 BEL-7402 细胞周期分布的影响 两种药物作用于肝癌 BEL-7402 细胞呈凋亡、坏死及凋亡继发性坏死,各组细胞周期分布不一致。见表 2、图 3。

表 2 流式细胞术检测各组对 BEL-7402 细胞周期和凋亡率的影响(%)

| 组别 | G ₀ ~ G ₁ | S | G ₂ ~ M | 凋亡率 |
|-----------|---------------------------------|-------|--------------------|--------------|
| 索拉非尼单药组 | 63.08 | 30.49 | 6.43 | 25.66 ± 4.02 |
| 奥沙利铂单药组 | 60.36 | 15.44 | 24.20 | 19.39 ± 3.25 |
| 先用索拉非尼联合组 | 45.02 | 22.43 | 32.55 | 30.02 ± 4.15 |
| 先用奥沙利铂联合组 | 46.63 | 35.00 | 18.37 | 40.94 ± 4.62 |
| 对照组 | 70.40 | 19.19 | 10.41 | 2.15 |

3 讨论

肝癌的发生发展不仅与肝癌细胞的异常分化及过度增殖有关,而且与肝癌细胞凋亡的减少关系密



A:索拉非尼单药组;B:奥沙利铂单药组;C:先用索拉非尼联合组;D:先用奥沙利铂联合组;E:对照组

图 3 索拉非尼和奥沙利铂对 BEL-7402 细胞周期分布的影响

切。因此,诱导肿瘤细胞凋亡已成为现代肿瘤药物治疗的新策略^[6-7]。

索拉非尼是第一个口服的多激酶抑制剂,主要作用于肿瘤细胞和肿瘤内脉管系统中的丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸激酶受体^[8-9]。在基础研究模型中,索拉非尼主要作用于两种激酶家族的成员,包括 RAF 激酶^[10]、VEGFR-2(血管内皮生长因子受体)^[11]、VEGFR-3^[12]、PDGFR-B(血小板衍生生长因子)^[13]、KIT 和 FLT3^[14]。已知这些激酶与肿瘤细胞的增殖及肿瘤血管的生成有关。索拉非尼主要通过 CYP3A4 和 UGT1A9 酶途径代谢,但国外试验证明,CYP3A4 抑制剂和诱导剂并不影响其在体内的药动学参数。另外,索拉非尼在体外抑制动力学参数 K_i 值为 6 和浓度为 1 ~ 2 nmol/L 时能显著抑制 CYP2B6 和 CYP2C8 酶^[15],因此这两种酶的底物在与索拉非尼合用时的总暴露量增加,合用时应注意。

奥沙利铂作为第 3 代铂类化疗药物,广泛应用于胃肠道肿瘤的化疗,但实验研究证明,该药对人类多种肿瘤细胞株均有抑制作用,且对其他铂类耐药的肿瘤细胞株无交叉耐药,已与其他抗癌药物联合应用于肝癌的治疗^[16]。与其他铂类药物相似,奥沙利铂是细胞周期非特异性药物,其作用机制主要是使肿瘤细胞内 DNA 形成链间和链内交联,从而阻断 DNA 合成,最终产生细胞毒和抗肿瘤活性^[17]。国外研究证明,索拉非尼和奥沙利铂在体内无药动学的相互作用,这两者合用耐受性良好^[18]。对于索拉非尼是否能诱导人肝癌细胞的凋亡,以及传统化疗药物奥沙利铂是否能够联合新一代靶向药物索拉非尼达到进一步的促凋亡作用,国内外少见报道。

本实验采用 MTT 法观察索拉非尼和奥沙利铂分别对 BEL-7402 细胞体外增殖的影响,发现不同浓度的索拉非尼和奥沙利铂对 BEL-7402 细胞均有明显的抑制作用,呈剂量依赖性,并且在同等浓度下索拉非尼对人肝癌细胞 BEL-7402 的抑制作用要高于奥沙利铂。透射电镜下发现凋亡小体,证明一定浓度的单药索拉非尼和单药奥沙利铂均可以分别诱导 BEL-7402 细胞产生凋亡。流式细胞术显示,先加奥沙利铂后用索拉非尼组肝癌细胞的凋亡率最高,为 $(40.94 \pm 4.62)\%$,S 期细胞比例为 35.00%,提示该模式对癌细胞 S 期阻滞作用更为强烈;先加索拉非尼后用奥沙利铂组肝癌细胞的凋亡率为 $(30.02 \pm 4.15)\%$,S 期细胞比例 22.43%, $G_2 \sim M$ 期细胞比例 32.55%,提示该模式对癌细胞 $G_2 \sim M$

期阻滞较明显;单药索拉非尼或奥沙利铂对肝癌细胞的凋亡率均较联合组低。上述结果可能的机制为:(1)索拉非尼治疗前先予化疗可以诱导肿瘤 EGFR 过表达,增强信号转导,使后续靶向治疗的靶向性更强,抑制效果更好。(2)奥沙利铂非特异性阻滞 DNA 的 S 期和 $G_2 \sim M$ 期,偏向于后者;索拉非尼可强化 S 期阻滞,上述双重作用对癌细胞有明显促凋亡作用。单药索拉非尼作用 BEL-7402 后凋亡率较单药奥沙利铂作用 BEL-7402 细胞的凋亡率高,这可能与 S 期受阻滞较多有关。本实验的结果与国内外文献报道的一致,即先用化疗药物联合靶向药物较先用靶向药物联合化疗药物的效果较好^[19-20]。

综上所述,体外肝癌 BEL-7402 细胞对索拉非尼和奥沙利铂均高度敏感,先用奥沙利铂再联合索拉非尼的促凋亡作用最明显。

参考文献

- [1] Lasithiotakis KG, Sinnberg TW, Schitteck B, et al. Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 28(8): 2013 - 2023.
- [2] Panka DJ, Wang W, Atins MB, et al. The Raf inhibitor BAY 43-9006 (sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 1611 - 1619.
- [3] 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(24): 11851 - 11858.
- [4] Chen T, Chu ZH, Liu JP, et al. Application of adenosine triphosphate tumor chemosensitive assay system to individual chemotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Ai Zheng*, 2005, 24(8): 1018 - 1122.
- [5] Panka DJ, Cho DC, Atkins MB, et al. GSK-3beta inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in melanoma cell lines[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(2): 726 - 732.
- [6] Zhang W, Konopleva M, Ruvolo VR, et al. Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway[J]. *Leukemia*, 2008, 22(4): 808 - 818.
- [7] Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer[J]. *Liver Int*, 2007, 27(2): 155 - 162.
- [8] Giuseppe P, Elena V, Arpine G, et al. Safety and activity of sorafenib in different histotypes of advanced renal cell carcinoma[J]. *Oncology*, 2007, 73(3-4): 204 - 209.
- [9] Richly H, Henning BF, Kupsch P, et al. Results of a phase II trial of sorafenib in combination with doxorubicin in patients with refractory solid tumor[J]. *Ann Oncol*, 2006, 17(5): 866 - 873.
- [10] Ambrosini G, Cheema HS, Seelman S, et al. Sorafenib inhibits

- growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(4): 890-896.
- [11] Zhang Y, Zuo GQ, Tang WX. Study on apoptosis of human hepatoma cell line HepG2 induced by oxaliplatin[J]. *Chin J Hepatol*, 2004, 12(6): 374-375.
- [12] Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment[J]. *Drugs Today (Barc)*, 2005, 41(12): 773-784.
- [13] Lathia C, Lettieri J, Cihon F, et al. Lack of effect of ketoconazole-mediated CYP3A inhibition on sorafenib clinical pharmacokinetics[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57(5): 685-692.
- [14] Ratain MG, Eisen T, Stadler WM, et al. Phase II placebo controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(16): 2505-2512.
- [15] 葛涛, 范鸣. 抗癌药 Sorafenib[J]. *药学进展*, 2005, 27(7): 2-3.
- [16] 华海清, 姜子瑜, 杨爱珍, 等. 复方苦参注射液联合奥沙利铂对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖与凋亡的影响[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(1): 10-15.
- [17] Larkin JM, Eisen T. Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma[J]. *Crit Rev in Oncol Hematol*, 2006, 60(3): 216-226.
- [18] Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in advanced clear cell renal cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(2): 125-134.
- [19] Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a phase III trial—INTACT1[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(5): 777-784.
- [20] Ryan CW, Goldman BH, Lara PN, et al. Sorafenib plus interferon- α 2b (IFN) as first-line therapy for advanced renal cell carcinoma (RCC): SWOG 0412[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: a4525.

收稿日期: 2011-04-05; 修回日期: 2011-05-16