

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.002

## 舒尼替尼促进人肝癌细胞 HepG2 的凋亡及其分子机制

黄宇贤<sup>1</sup>, 陈心彤<sup>2</sup>, 蔡宋浩<sup>3</sup>, 李玉华<sup>1</sup>, 吴秉毅<sup>1</sup>, 宋朝阳<sup>1</sup>, 贺艳杰<sup>1</sup>, 郭坤元<sup>1</sup>(1. 南方医科大学珠江医院血液科, 广东广州 510282; 2. 纽约州立大学西奈山医学院伊坎基因组学与高维生物学研究所, 美国纽约 10029; 3. 中山大学附属汕头医院血液科, 广东汕头 525031)

**[摘要]** **目的:** 探讨苹果酸舒尼替尼对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用及其机制。**方法:** 常规体外培养 HepG2 细胞, 利用 MTT 法检测舒尼替尼杀伤 HepG2 细胞的 IC<sub>50</sub>, Western blotting 检测药物处理前后 HepG2 细胞分子靶点蛋白表达, 膜联蛋白 (Annexin-V)/碘化丙啶 (PI) 双标法和 TUNEL 染色法检测舒尼替尼处理前后 HepG2 细胞凋亡情况, 实时荧光定量 PCR 检测药物处理前后 HepG2 细胞凋亡基因 mRNA 的表达情况。**结果:** 舒尼替尼杀伤 HepG2 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 (3.22 ± 0.50) μmol/L。以对 HepG2 细胞无明显抑制作用的剂量 1 μmol/L 舒尼替尼处理 HepG2 细胞后, 细胞内 VEGFR1、VEGFR2、PDGFRα、Kit、FLT3 蛋白表达均有不同水平下降 (均  $P < 0.05$ ), HepG2 细胞的凋亡率 [(15.18 ± 1.28)% vs (5.90 ± 0.45)%],  $P < 0.05$ 、凋亡指数 (AI) [(23.54 ± 4.73) vs (4.17 ± 0.64)],  $P < 0.05$  均显著升高。舒尼替尼处理 HepG2 细胞后, 上调促凋亡基因 *Bax*、*NOXA*、*PUMA*、*P53* mRNA 表达水平 (均  $P < 0.05$ ), 降低抑凋亡基因 *Bcl-2*、*X-IAP* mRNA 表达水平 (均  $P < 0.05$ )。 **结论:** 舒尼替尼能够诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡, 其机制可能是通过上调促凋亡基因的表达及降低抑凋亡基因表达水平来实现的。

**[关键词]** 舒尼替尼; 肝细胞癌; HepG2 细胞; 细胞凋亡; 凋亡基因

**[中图分类号]** R735.7; R730.54

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)06-0684-06

## The apoptotic effect of sunitinib on human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and its mechanism

Huang Yuxian<sup>1</sup>, Chen Xintong<sup>2</sup>, Cai Songhao<sup>3</sup>, Li Yuhua<sup>1</sup>, Wu Bingyi<sup>1</sup>, Song Chaoyang<sup>1</sup>, He Yanjie<sup>1</sup>, Guo Kunyuan<sup>1</sup> (1. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Icahn Institute for Genomics and Multiscale Biology, Mount Sinai School of Medicine Levy Place New York, NY 10029, USA; 3. Department of Hematology, Shantou Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Shantou 525031, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the apoptotic effect of sunitinib on human hepatocellular carcinoma cell HepG2 and explore the underlying molecular mechanism. **Methods:** The HepG2 cells were cultivated by routine method. The effect of sunitinib on the growth of HepG2 cells was assessed by MTT assay. Molecular targets in the hepatocellular carcinoma HepG2 cells were examined by immunoblotting. Apoptotic cell death was detected using Annexin-V/PI double labeled flow cytometry and TUNEL assay. The expressions of mRNA were quantitated by RT-qPCR. **Results:** The IC<sub>50</sub> of sunitinib for inhibiting HepG2 cell growth was (3.22 ± 0.50) μmol/L. After exposed to sunitinib, the expression of VEGFR1, VEGFR2, PDGFRα, Kit, FLT3 were decreased in HepG2 cells. Apoptosis rates of HepG2 cells were (5.90 ± 0.45)% vs (15.18 ± 1.28)% in the absence or presence of sunitinib respectively, and corresponding apoptosis index (AI) were (4.17 ± 0.64) vs (23.54 ± 4.73). After treated with sunitinib, the expressions of pro-apoptotic genes *Bax*,

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金资助项目 (No. 81302372, 81300431); 南方医科大学珠江医院优秀中青年人才项目资助 (No. 201207008)。Project supported by the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81302372, 81300431), and the Excellent Middle and Young Aged Experts Project of Zhujiang Hospital Southern Medical University (No. 201207008)

**[作者简介]** 黄宇贤 (1980 -), 男, 广东省揭阳市人, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤生物治疗相关研究, E-mail: hyx6610@163.com

**[通信作者]** 郭坤元 (Guo Kunyuan, corresponding author), E-mail: wodeyoujian@foxmail.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151216.1236.004.html>

*NOXA*, *PUMA* and *P53* were increased in the cells, whereas that of apoptosis-inhibiting genes *Bcl-2* and *X-IAP* were significantly decreased. **Conclusion:** Increased expression of pro-apoptotic genes and decreased apoptosis-inhibiting genes are likely responsible for sunitinib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells.

[ **Key words** ] sunitinib; hepatocellular carcinoma; HepG2 cell line; cell apoptosis; apoptosis gene

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22( 6 ): 684-689 ]

原发性肝细胞癌是我国常见恶性肿瘤之一,高发于东南沿海地区,肿瘤恶性程度极高,常规化放疗治疗效果差,病死率高,占我国肿瘤病死率的第二位<sup>[1]</sup>。早期肝细胞癌症状不明显,晚期肝癌主要以乏力、消瘦、食欲减退、腹胀及肝区疼痛为主。多数患者出现症状时已处于癌症晚期,失去手术切除机会,并且对化放疗不敏感,预后不良,中位生存期少于1年<sup>[2]</sup>。随着对肝癌发病和浸润、转移分子机制的深入研究,越来越多的肿瘤增殖信号分子和靶点被发现,分子靶向治疗作用于肿瘤细胞特异性靶点,为肝癌患者的治疗带来新希望。苹果酸舒尼替尼(sunitinib)是一种多靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂,2006年被美国FDA批准用于治疗晚期肾癌和依马替尼耐药的胃肠道间质瘤。其主要是通过抑制肿瘤血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)1-3、血小板源生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)、干细胞生长因子受体(stem cell factor receptor, SCFR;如C-Kit)、胶质细胞源性神经营养因子受体(glial cell-line derived neurotrophic factor receptor, GDNFR;如RET)和人FMS样酪氨酸激酶3(human FMS-like tyrosine kinase 3, FLT3)等酪氨酸激酶而阻断Ras/Raf/MEK/ERK、PI3K-AKT-mTOR信号通路,从而抑制肿瘤细胞的生长、增殖和转移<sup>[3]</sup>。近年来多项临床试验结果提示,舒尼替尼对肝细胞癌有一定治疗作用,能够延长晚期肝癌患者总生存期和无疾病进展生存期,虽然比索拉非尼疗效差,但仍有一定受益<sup>[4]</sup>。推测舒尼替尼对肝细胞癌有治疗作用的可能机制之一是促进肝癌细胞的凋亡,但相关研究甚少。本研究利用舒尼替尼作用于肝癌细胞株HepG2,检测细胞凋亡变化及相关凋亡基因表达情况,旨在探讨舒尼替尼对HepG2细胞的作用机制,为肝癌分子靶向治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

人肝癌细胞株HepG2由本实验室保存,用含有双抗(青霉素+链霉素)及胎牛血清的RPMI 1640培养基培养。苹果酸舒尼替尼购自美国辉瑞公司,抗VEGFR1单抗、抗VEGFR2单抗、抗PDGF $\alpha$ 单抗、抗Kit单抗、抗FLT3单抗均购自Med Chem Express公司,HRP标记的GAPDH内参单抗购自上海康成生物,羊抗兔IgG(H+L链特异)购自Southern Biotech,Immobilon western chemilum HRP substrat和Immobilon-P transfer membrane均购自Millipore公司,医用X射线胶片购自Eastman Kodak公司,Gibco胎牛血清购自上海玉博生物科技有限公司,RPMI 1640购自上海生博生物医药科技有限公司,cDNA合成和PCR试剂购自立陶宛Fermentas(MBI)公司,引物由上海英骏生物公司合成。流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司,Biophotometer生物分光光度计购自美国Eppendorf公司,PE9700 PCR仪购自美国PE公司,水平核酸电泳仪购自美国One Lambda公司,垂直电泳槽和转移电泳槽购自上海天能科技有限公司,倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司。

### 1.2 MTT检测舒尼替尼杀伤HepG2细胞的IC<sub>50</sub>

MTT法测定HepG2细胞对舒尼替尼的药物敏感性。收取对数生长期的HepG2细胞,消化计数后调整细胞密度,接种于96孔培养板,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养过夜。光镜观察细胞生长状态并拍照,细胞贴壁后吸去培养液,分别加入0、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8  $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度的舒尼替尼,每种浓度梯度设3个复孔,实验重复3次;并设不含药物的对照组。培养48 h后,每孔加入20  $\mu\text{l}$  MTT溶液,继续培养4 h,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu\text{l}$ ,充分混匀,于自动酶标仪490 nm波长下测定光密度(D)值,计算50%细胞生长抑制所需的药物浓度(IC<sub>50</sub>)及不同浓度的舒尼替尼对细胞增殖的抑制效应。

### 1.3 Western blotting检测舒尼替尼处理对HepG2细胞分子靶点蛋白表达的影响

收集1  $\mu\text{mol/L}$ 舒尼替尼处理前后的HepG2细胞,分2组:细胞未处理组、药物处理组。用细胞裂解液处理后,加入适量SDS-PAGE上样缓冲液,沸水

中加热 5 min,在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,用湿转法转膜至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上;以 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 2 h, TBST 洗 10 min, 重复 3 次,加入 VEGFR1、VEGFR2、PDGF $\alpha$ 、Kit、FLT3、GAPDH 单抗(均 1:200),室温孵育 1 h;TBST 洗 10 min,重复 3 次,加羊抗鼠二抗(1:10 000),室温孵育 1 h;TBST 洗 10 min,重复 3 次;暗室曝光拍照。检测 VEGFR1、VEGFR2、PDGF $\alpha$ 、c-Kit、Flt3 条带灰度,以上述蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值比值确定蛋白相对表达量。

#### 1.4 流式细胞术检测舒尼替尼对 HepG2 细胞凋亡的影响

收集 1  $\mu\text{mol/L}$  舒尼替尼孵育 24 h 前后的 HepG2 细胞,分 2 组:细胞未处理组、药物处理组。用 PBS 洗涤 2 次,重悬细胞,加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC,混匀后,加入 5  $\mu\text{l}$  PI,混匀,室温下避光作用 15 min,EPICS AITRA 型流式细胞仪检测凋亡细胞荧光强度,用 Modfit LT 软件分析结果。

#### 1.5 TUNEL 法检测药物处理前后靶细胞凋亡指数

收集 1  $\mu\text{mol/L}$  舒尼替尼处孵育 24 h 前后的 HepG2 细胞,分为 4 组:阴性对照组、阳性对照组、HepG2 细胞未处理组、HepG2 细胞药物处理组。制备细胞爬片,4% 多聚甲醛 (pH7.4) 室温 (15 ~ 25 °C) 固定 1 h, PBS 充分冲洗;3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (甲醇) 封闭 10 min, PBS 冲洗 3 次;用 0.1% TritonX-100 (0.1% 柠檬酸钠新鲜配制) 冰上 (2 ~ 8 °C) 孵育 2 min, PBS 洗涤 2 次;滴加 TUNEL 反应液于样本上。作阳性对照的切片,经预处理用 PBS 洗涤后,滴加 Dnase I 反应液,在 15 ~ 25 °C, 孵育 10 min;作阴性对照的切片滴加 Label solution 代替,放进暗盒,37 °C,避光孵育 60 min;用 PBS 洗涤 3 次;滴加 converter-POD 于样本上,放进暗盒,37 °C 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次;加入 DAB 显色液,在 15 ~ 25 °C, 孵育 2 ~ 10 min,用 PBS 洗涤 3 次;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,荧光显微镜下观察结果。阴性细胞着色为蓝色,阳性着色为棕色。计算细胞凋亡指数 (AI):  $\text{AI}(\%) = \frac{\text{阳性细胞核数}}{\text{总细胞核数}} \times 100\%$ , 结果用每视野细胞凋亡指数表示。

#### 1.6 实时荧光定量 PCR 检测药物处理前后肝癌细胞凋亡基因的 mRNA 的表达情况

收集 1  $\mu\text{mol/L}$  舒尼替尼处孵育 24 h 前后的 HepG2 细胞,分为 2 组: HepG2 细胞未处理组、HepG2 细胞药物处理组。用 RNA 试剂盒提取细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 纯度,反转录合成 cDNA。

实时荧光定量 PCR 反应 (SYBR 反应) 体系总体积为 100  $\mu\text{l}$ , 反应条件如下: 94 °C、5 min, 94 °C、45 s, 60 °C、1 min, 30 个循环, 同时设空白对照。PCR 反应前 3 ~ 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 调节基线至适宜处, 各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据公式  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}}$  和  $\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$ , 计算检测基因的 mRNA 相对表达量, 每组重复 3 次并取平均值。所检测的凋亡基因 PCR 引物序列见表 1。

表 1 肝癌细胞 HepG2 凋亡基因引物序列

Tab.1 Primers of apoptosis genes in hepatocellular carcinoma HepG2 cell

Gene	Primer	Sequence	Size (bp)
P53	Sense	5'-TTCTACAGTTGGCAGCT-3'	295
	Antisense	5'-GCAGTAAGCCAAGATCAC-3'	
Bcl-2	Sense	5'-CTGGTGTACAACATCGC-3'	135
	Antisense	5'-GGAGAAATCAAACAGAGGC-3'	
Bax	Sense	5'-CCAGCTGCCTTGGACTGT-3'	135
	Antisense	5'-ACCCCCTCAAGACCACTCTT-3'	
NOXA	Sense	5'-ATTACCGCTGGCCTACTGTG-3'	127
	Antisense	5'-ATGTGCTGAGTTGGCACTGA-3'	
PUMA	Sense	5'-GGGCCAGACTGTGAATCC-3'	88
	Antisense	5'-TCACACGTGCTCTCTCTAAACC-3'	
XIAP	Sense	5'-CAATGTGAATTTCTTCTCAGC-3'	210
	Antisense	5'-TCAAGAAAGGTAGCTTGGTGA-3'	

#### 1.7 统计学处理

采用 SPSS15.0 软件进行统计学处理, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 不同处理组肿瘤细胞分子靶点蛋白表达和凋亡率检测采用配对  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 药物敏感性分析

HepG2 细胞贴壁生长, 生长状态良好, 传代周期约为 36 h, 见图 1。舒尼替尼按照不同浓度梯度处理细胞后, HepG2 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为 (3.22  $\pm$  0.50)  $\mu\text{mol/L}$ , 药物在 1  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对靶细胞无明显抑制作用, 可用于后续实验, 见图 2。

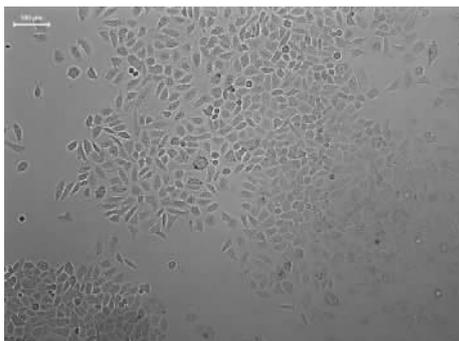


图1 HepG2 细胞形态学( ×100 )

Fig.1 Morphology of HepG2 cells ( ×100 )

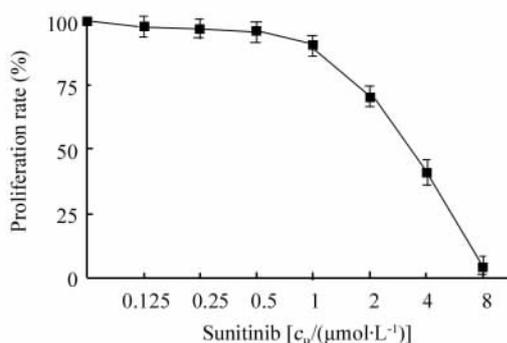


图2 不同浓度舒尼替尼抑制 HeG2 细胞增殖

Fig.2 Inhibition of HepG2 cell proliferation after treatment with various concentrations of sunitinib

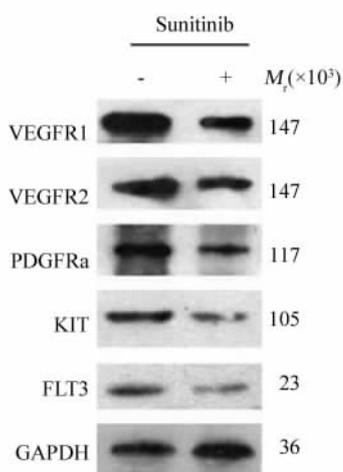


图3 舒尼替尼处理降低 HepG2 细胞分子靶点蛋白表达水平

Fig.3 Decrease of the expression of molecular targets in HepG2 cell treated with sunitinib

\*  $P < 0.05$  vs HepG2 cells untreated

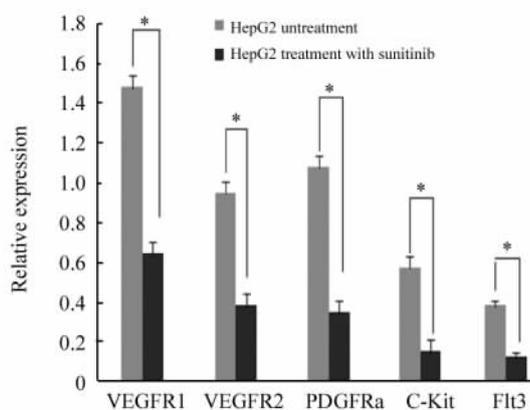
## 2.2 舒尼替尼处理降低 HepG2 细胞分子靶点蛋白表达水平

Western blotting 检测结果(图3)显示,靶细胞药物处理前均表达 VEGFR1、VEGFR2、PDGFR $\alpha$ 、Kit、FLT3 等分子靶点蛋白,经舒尼替尼处理后,上述蛋白表达均有不同水平下降,靶细胞被药物处理前后蛋白表达水平差异有统计学意义(配对  $t$  检验,均  $P < 0.05$ )。

## 2.3 舒尼替尼处理增加 HepG2 细胞凋亡率

2.3.1 流式细胞术检测 流式细胞术检测结果(图4)显示,HepG2 细胞被舒尼替尼处理前后的凋亡率分别为(5.90 ± 0.45)% 和(15.18 ± 1.28)% ,HepG2 细胞被药物处理后坏死细胞较多,药物处理前后凋亡率差异有统计学意义( $t = 25.317$ ,  $P = 0.000$ )。

2.3.2 TUNEL 法检测 TUNEL 染色法结果(图4)显示,在荧光显微镜下观察,未经舒尼替尼药物处理肿瘤细胞呈蓝色,经舒尼替尼处理后肿瘤细胞呈现棕色,并且阳性细胞核固缩或碎裂,呈典型的凋亡细胞表现;阴性对照细胞完全显蓝色,阳性对照细胞完全显棕色,其 AI 分别为(1.05 ± 0.12)% 和(98.85 ± 0.19)% ;HepG2 细胞未处理组 AI 为(4.17 ± 0.64)%、HepG2 细胞药物处理组 AI 为(23.54 ± 4.73)% ;靶细胞被药物处理前后凋亡率差异有明显统计学意义( $t = 38.846$ ,  $P = 0.001$ )。



## 2.4 实时荧光定量 PCR 检测药物处理前后肝癌细胞凋亡基因 mRNA 的表达情况

在凋亡基因 mRNA 组中,未经舒尼替尼处理的 HepG2 细胞凋亡基因 *Bax*、*NOXA*、*PUMA*、*P53*、*Bcl-*

2、*X-IAP* mRNA 表达水平分别为( 1.00 ± 0.09 )、( 1.00 ± 0.09 )、( 1.00 ± 0.19 )、( 1.00 ± 0.16 )、( 1.00 ± 0.13 )、( 1.00 ± 0.12 )。经舒尼替尼处理后, 主要是促凋亡基因 *Bax*、*NOXA*、*PUMA*、*P53* mRNA 表达水平明显升高, 分别为( 2.06 ± 0.19 )、( 1.35 ± 0.17 )、( 1.56 ± 0.20 )、( 1.49 ± 0.32 ); 而抑凋亡基因 *Bcl-2*、*X-IAP* mRNA 表达水平明显降低, 分别为( 0.68 ± 0.08 )、( 0.74 ± 0.05 ), 不同处理组间凋亡基因 mRNA 表达差异有明显统计学意义 (ANOVA for factorial analysis  $F = 33.721, P = 0.000$ ), 见表 2。

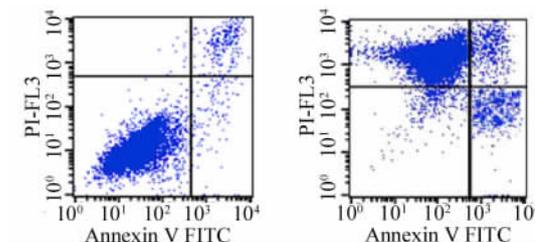


图 4 Annexin-V/PI 双标记流式细胞术检测舒尼替尼处理前后靶细胞凋亡情况  
Fig. 4 Apoptosis of tumor cells before and after treatment with sunitinib detected by Annexin-V/PI double labeled flow cytometry

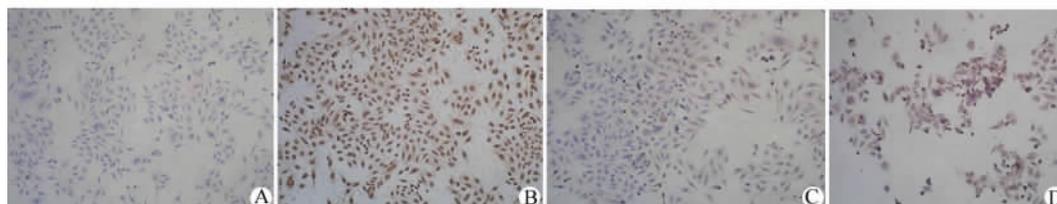


图 5 TUNEL 法检测舒尼替尼处理前后靶细胞凋亡水平( ×10 )  
Fig. 5 Apoptosis of tumor cells before and after treatment with sunitinib detected by TUNEL( ×10 )  
A: Negative control ; B: Positive control; C: HepG2 untreated; D: HepG2 treated

表 2 舒尼替尼处理前后 HepG2 细胞凋亡基因 mRNA 表达水平(  $\bar{x} \pm s$  )

Tab. 2 Expressions of apoptotic gene mRNA on HepG2 cells before and after incubation with sunitinib (  $\bar{x} \pm s$  )

Group	<i>Bax</i>	<i>NOXA</i>	<i>PUMA</i>	<i>P53</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>X-IAP</i>
Untreatment	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.12
Sunitinib	2.06 ± 0.19*	1.35 ± 0.17*	1.56 ± 0.20*	1.49 ± 0.32*	0.68 ± 0.08*	0.74 ± 0.05*

\*  $P < 0.05$  vs HepG2 untreated group

### 3 讨论

苹果酸舒尼替尼通过抑制受体酪氨酸激酶( receptor tyrosine kinases RTK ), 如 VEGFR1-3、PDGFR、C-Kit、FLT3 和 RET 等激酶, 从而阻断 Ras/Raf/MEK/ERK、PI3K-AKT-mTOR 肿瘤增殖信号通路和血管生成通路, 抑制肿瘤细胞增殖和新生血管形成, 最终通过细胞凋亡的形式清除肿瘤<sup>[5-6]</sup>。因此, 细胞凋亡在肿瘤的发生发展机制上起重要作用。分子靶向药物对肿瘤的治疗效果与肿瘤细胞凋亡息息相关, 诱导肿瘤细胞凋亡成为肿瘤治疗领域研究的热点。本研究中, 舒尼替尼的 IC<sub>50</sub> 为 3.22 μmol/L, 此浓度时 HepG2 细胞有明显抑制作用。在此浓度下孵育 HepG2 细胞 24 h, Western blotting 检测结果提示对肝癌细胞靶点蛋白 VEGFR、PDGFR、C-Kit 和

FLT3 表达具有明显抑制作用。

细胞凋亡( apoptosis ), 又称细胞程序性死亡( programmed cell death, PCD ), 是指细胞在一定的生理或病理条件下, 遵循自身的程序, 自己结束其生命的过程。它是一个主动的、高度有序的、基因控制的一系列酶参与的过程<sup>[7]</sup>。细胞凋亡与肿瘤的清除和发展密切相关, 大多数药物是通过诱导细胞凋亡达到清除肿瘤的目的, 包括分子靶向药物在内<sup>[8]</sup>。检测药物对肿瘤细胞凋亡作用的方法很多, 需要根据不同的组织类型和用途选择检测凋亡的方法。细胞发生早期凋亡时, 磷脂酰丝氨酸( PS )从膜内迁移至细胞膜外, 细胞膜外的 PS 外露早于 DNA 断裂发生, 因此, 膜联蛋白( Annexin-V )/碘化丙啶( PI )双标法检测早期细胞凋亡灵敏度高, 是目前最为理想的检测细胞凋亡的方法<sup>[9]</sup>。而 TUNEL 实际

上是分子生物学与形态学相结合的研究方法,对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征,可用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养的细胞和从组织中分离细胞的形态测定,并可检测出极少量的凋亡细胞,因而在细胞凋亡的研究中被广泛采用<sup>[10]</sup>。因此,本实验选择膜联蛋白(Annexin-V)/碘化丙啶(PI)双标法和 TUNEL 染色法检测舒尼替尼处理肝癌细胞前后凋亡情况变化,结果提示舒尼替尼对 HepG2 细胞具有明显促凋亡作用。

细胞凋亡受多种信号通路和凋亡基因的调控,使它有别于细胞坏死。文献报道 Ras/Raf/MEK/ERK 和 PI3K-AKT 信号通路可通过多种途径抑制凋亡,促进肿瘤细胞存活<sup>[11-12]</sup>。Ras/Raf/MEK/ERK 信号增殖通路可被 EGF、PDGF 和 IL-1 等细胞因子激活,被活化的 MEK/ERK 激酶通过抑凋亡基因 Bcl-2 家族而抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>。PI3K-AKT 信号通路主要通过直接调节作用和间接调节作用调节细胞凋亡,直接作用表现为阻断促凋亡分子 BAD 与 Bcl-2 或 Bcl-xl 形成复合物,抑制线粒体通路凋亡途径;间接调节作用主要表现为 PI3K-AKT 信号通路活化后抑制转录因子家族如 Forkhead、NK- $\kappa$ B 和 P53 等,使转录因子不能与促凋亡配体或促凋亡分子( FasL TRAIL TRADD/Bim Bcl-6 等)结合,从而起到间接抑制凋亡作用<sup>[15-16]</sup>。舒尼替尼作用于 HepG2 细胞后,抑制肿瘤细胞 Ras/Raf/MEK/ERK 和 PI3K-AKT 信号通路,诱导促凋亡基因( Bax、NOXA、PUMA、P53 )表达及降低抑凋亡基因( Bcl-2、X-IAP )表达水平,达到促进肿瘤细胞凋亡的目的。但舒尼替尼抑制 VEGFR1-3、PDGFR、C-Kit、FLT3 和 RET 等激酶,阻断 Ras/Raf/MEK/ERK 和 PI3K-AKT 信号通路后,如何与凋亡信号通路相互作用、哪些关键信号分子和基因参与凋亡通路、启动哪些凋亡途径( 死亡受体凋亡途径、线粒体凋亡途径、内质网凋亡途径及旁路凋亡途径 )仍未清楚,有待深入研究。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Attwa MH, El-Etreby SA. Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [ J ]. *World J Hepatol*, 2015, 7( 12 ): 1632-1651.
- [ 2 ] Deng GL, Zeng S, Shen H. Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: new advances and challenges [ J ].

- World J Hepatol*, 2015, 7( 5 ): 787-798.
- [ 3 ] Lee CH, Motzer RJ. Sunitinib as a paradigm for tyrosine kinase inhibitor development for renal cell carcinoma [ J ]. *Urol Oncol*, 2015, 33( 6 ): 275-279.
- [ 4 ] Cheng AL, Kang YK, Lin DY, et al. Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial [ J ]. *J Clin Oncol*, 2013, 31( 32 ): 4067-4075.
- [ 5 ] Joosten SC, Hamming L, Soetekouw PM, et al. Resistance to sunitinib in renal cell carcinoma: from molecular mechanisms to predictive markers and future perspectives [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1855( 1 ): 1-16.
- [ 6 ] Nishida T, Doi T, Naito Y. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors [ J ]. *Expert Opin Pharmacother*, 2014, 15( 14 ): 1979-1989.
- [ 7 ] Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development [ J ]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17( 1 ): 12-29.
- [ 8 ] Anreddy N, Gupta P, Kathawala RJ, et al. Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance [ J ]. *Molecules*, 2014, 19( 9 ): 13848-13877.
- [ 9 ] Sarvothaman S, Undi RB, Pasupuleti SR, et al. Apoptosis: role in myeloid cell development [ J ]. *Blood Res*, 2015, 50( 2 ): 73-79.
- [ 10 ] Archana M, Bastian, Yogesh TL, et al. Various methods available for detection of apoptotic cell--a review [ J ]. *Indian Cancer*, 2013, 50( 3 ): 274-283.
- [ 11 ] McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy [ J ]. *Leukemia*, 2008, 22( 4 ): 708-722.
- [ 12 ] Vachhani P, Bose P, Rahmani M, et al. Rational combination of dual PI3K/mTOR blockade and Bcl-2/-xL inhibition in AML [ J ]. *Physiol Genomics*, 2014, 46( 13 ): 448-456.
- [ 13 ] Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, et al. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy [ J ]. *Leukemia*, 2011, 25( 7 ): 1080-1094.
- [ 14 ] Chung E, Kondo M. Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development [ J ]. *Immunol Res*, 2011, 49( 1/3 ): 248-268.
- [ 15 ] Danielsen SA, Eide PW, Nesbakken A, et al. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1855( 1 ): 104-121.
- [ 16 ] Szydłowski M, Jabłońska E, Juszczynski P. FOXO1 transcription factor: a critical effector of the PI3K-AKT axis in B-cell development [ J ]. *Int Rev Immunol*, 2014, 33( 2 ): 146-157.

[ 收稿日期 ] 2015 - 09 - 06

[ 修回日期 ] 2015 - 11 - 04

[ 本文编辑 ] 黄静怡