

安罗替尼对人肝内胆管细胞癌细胞系 HCCC-9810 作用研究

杨斌, 谢辉, 王春平, 孔惠芳, 张伟, 毛薇
(解放军第 302 医院, 北京 100039)

[摘要] 目的: 检测安罗替尼(Anlotinib) 对人肝内胆管细胞癌(ICC) 细胞系 HCCC-9810 的杀伤作用。方法: 使用系列浓度的 Anlotinib 以及作为对照的索拉非尼(Sorafenib) 和舒尼替尼(Sunitinib) 处理 HCCC-9810 细胞后, 进行 MTT 实验, 利用 MTT 数据计算药物作用的抑制率与半数作用浓度(IC_{50})。在此基础上检测药物对 HCCC-9810 细胞转移与侵袭的影响。结果: Anlotinib、Sorafenib 和 Sunitinib 等作用于 HCCC-9810 细胞的 IC_{50} 值分别为 (0.97 ± 0.14) 、 (8.27 ± 1.17) 和 $(8.18 \pm 0.82) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。相同浓度下($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) , Anlotinib 能显著抑制 HCCC-9810 细胞的转移与侵袭, Sorafenib 和 Sunitinib 抑制作用不明显。结论: Anlotinib 能够杀伤肝内胆管上皮肿瘤细胞, 是肝胆管细胞癌诊疗新的希望。

[关键词] 胆管细胞癌; 安罗替尼; 细胞存活抑制实验; 转移与侵袭

[中图分类号] R735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-0959(2017)12-1389-03

Study on Inhibition of Arotinib on Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cell Line HCCC-9810

YANG Bin, XIE Hui, WANG Chunping, KONG Huifang, ZHANG Wei, MAO Wei
(The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the potential application of anlotinib on human intrahepatic cholangiocarcinoma(ICC) cell line HCCC-9810. **Methods:** After treatment of HCCC-9810 cells with serial concentrations of anlotinib, sorafenib and sunitinib as controls, MTT experiments were performed. Inhibition rate and IC_{50} were analyzed by MTT-assays. The invasion or migration of HCCC-9810 cells was identified by tranwell assays. **Results:** The IC_{50} value of anlotinib, sorafenib and sunitinib on HCCC-9810 cells was (0.97 ± 0.14) , (8.27 ± 1.17) , and $(8.18 \pm 0.82) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. At the same concentration ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), anlotinib could significantly inhibit the metastasis and invasion of HCCC-9810 cells. The inhibitory effects of sorafenib and sunitinib were not obvious. **Conclusion:** Anlotinib can kill intrahepatic bile duct epithelial tumor cells, and may be a hopeful strategy for intrahepatic cholangiocarcinoma treatment.

[Key Words] Intrahepatic cholangiocarcinoma; Anlotinib; Cell survival inhibition test; Invasion and migration

肝脏肿瘤(liver cancer)主要分为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)。HCC 占病例总数的 90% 以上^[1]。尽管 ICC 比例较低,但目前临床诊疗没有十分有效的药物治疗策略,面临巨大挑战^[2,3]。安罗替尼(Anlotinib)是一种新型多靶标小分子蛋白激酶抑制剂,是多种恶性肿瘤寄予希望的新的治疗策略^[4]。本研究利用肝内 ICC 细胞系

HCCC-9810 作为研究模型,使用 HCC 以及胃肠道间质肿瘤的靶向治疗药物索拉非尼(Sorafenib)与舒尼替尼(Sunitinib)作为对照,作用于 HCCC-9810 细胞。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

抗肿瘤药物: 安罗替尼(Anlotinib; 生产批号: HY-19716; 生产企业: 美国 MCE 公司); 索拉非尼(Sorafenib; 生产批号 S7397; 生产企业: 美国 Selleck 公司)、舒尼替尼(Sunitinib, 生产批号: S7781; 生产企业: 美国 Selleck 公司); HCCC-9810 细胞为本实验室保存; 细胞培养相关试剂与耗材为分别购买自美国

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(项目编号: 81271848; 项目名称: 慢性丙肝患者体内髓源性抑制细胞抑制 T 细胞的作用及其临床意义)

[作者简介] 杨斌,男,博士,副主任医师,研究方向: 肝脏肿瘤。

E-mail: biny91@sina.com

Hyclone 和 Corning 公司; MTT 试剂盒为美国 Amerres-co 公司产品; 多功能酶标仪为美国 BD 公司产品; 倒置相差显微镜为日本 Nikon 公司产品。

1.2 细胞培养与药物作用的抑制率实验

HCCC-9810 细胞接种于 96 孔细胞培养板(8000 细胞每孔)中,使用抗肿瘤药物处理细胞,药物浓度设置为 10、3、1、0.3、0.1、0.03 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 7 个浓度。使用 MTT 法检测药物对细胞的杀伤作用并计算抑制率。抑制率的计算公式为抑制率(%) = (对照组 O. D. 490 nm - 药物处理组 O. D. 490nm) / (对照组 O. D. 490nm - 溶剂对照组 O. D. 490nm) $\times 100\%$ [5]。

1.3 细胞侵袭与转移实验

HCCC-9810 细胞使用抗肿瘤药物处理后,使用 Transwell 实验检测 HCCC-9810 细胞的转移与侵袭,按照 Xu 等学者的研究方法进行实验 [6,7]。使用倒置显微镜进行拍照,选取代表性图片。同时使用冰醋酸溶解染色所得结晶紫,在 547nm 波长处测定吸光度值。相对转移(relative migration cell number) / 侵袭细胞数(relative invasion cell number) 的

计算公式为药物处理组 O. D. 546nm / 对照组 O. D. 546nm。

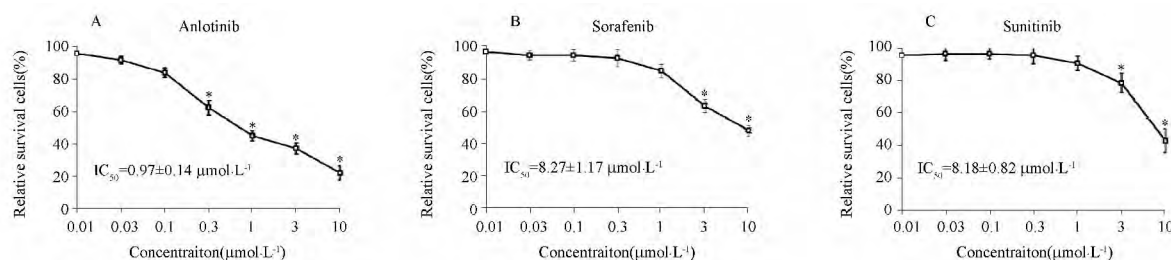
1.4 统计学分析

数据使用 SPSS 19.0 统计软件 Bonferroni's correction with or without two-way ANOVA 方法计算 P 值和判别差异是否有统计学意义。应用数据统计软件 Origin 6.1 中的 Sigmoidal Fit 模块拟合药物作用的量效关系并计算抑制率与半数作用浓度(IC_{50}) 值。

2 结果

2.1 Anlotinib 对 HCCC-9810 细胞的杀伤作用

Anlotinib 能够抑制 HCCC-9810 细胞存活(见图 1A), 作用于 HCCC-9810 细胞的 IC_{50} 值为 $(0.97 \pm 0.14) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Sorafenib(见图 1B) 与 Sunitinib(见图 1C) 对 HCCC-9810 的抑制作用较弱。作用于 HCCC-9810 细胞的 IC_{50} 值分别为 (0.97 ± 0.14) 、 (8.27 ± 1.17) 和 $(8.18 \pm 0.82) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这表明,Anlotinib 能够有效抑制 HCCC-9810 细胞的存活,而 Sorafenib 与 Sunitinib 的活性较弱。



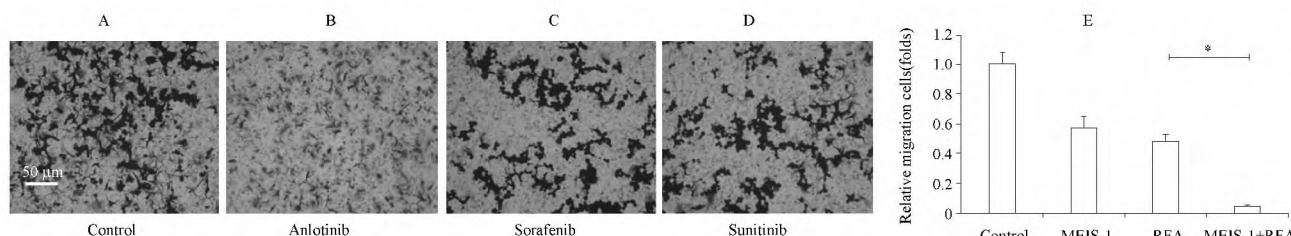
A: Anlotinib; B: Sorafenib; C: Sunitinib; * $P < 0.05$

图1 药物作用于 HCCC-9810 细胞的量效关系曲线

2.2 Anlotinib 抑制 HCCC-9810 细胞的转移与侵袭

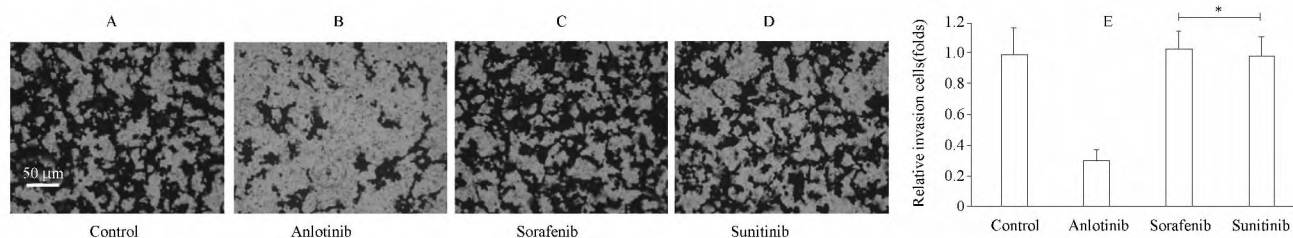
结果显示, IC_{50} ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 Anlotinib 能够显著抑制 HCCC-9810 细胞的转移(见图 2) 与侵袭(见图 3) 作用。而相同浓度的 Sorafenib(见图 2, 3)

与 Sunitinib(见图 2, 3) 对 HCCC-9810 细胞的转移与侵袭作用无明显抑制作用。这表明, Anlotinib 能够有效抑制 HCCC-9810 细胞的转移与侵袭作用, 而 Sorafenib 与 Sunitinib 的活性较弱。



A: Control B: Anlotinib; C: Sorafenib; D: Sunitinib; E: 相对侵袭细胞数; * $P < 0.05$

图2 药物对 HCCC-9810 细胞转移的影响



A: Control B: Anlotinib; C: Sorafenib; D: Sunitinib; E: 相对侵袭细胞数; * $P < 0.05$

图3 药物对 HCCC-9810 细胞侵袭的影响

3 讨论

ICC 临床诊疗面临巨大挑战, 尽管目前肝脏肿瘤中以 HCC 为主^[8], 但随着乙型肝炎病毒 (HBV) 对症治疗策略的进展, 以及各种对 HBV 阻断策略, 未来 HBV 感染率会逐渐下降, 各种 HBV 相关慢性肝病及 HCC 发病亦会趋缓^[9]。这些都使得未来 ICC 的挑战更为艰巨。ICC 治疗选择较少, 本研究发现 Anlotinib 能够抑制 ICC 细胞 HCCC-9810 的存活、转移与侵袭, 这一结果不仅拓展了我们对 Anlotinib 的认识, 也为 ICC 临床诊疗带来新的启示^[10]。作为对照, Sorafenib 为 HCC 一线治疗药物^[11], Sunitinib 为胃肠间质肿瘤一线治疗药物^[12], 二者对 HCCC-9810 的抑制作用较弱。作为新型多靶标小分子蛋白激酶抑制剂, Anlotinib 化学性质更好, 其与作用靶标的亲和力也远高于 Sorafenib 与 Sunitinib 等, 这表明 Anlotinib 可能具有更为广阔的临床应用前景。

参考文献

[1] Jia H, Yang Q, Wang T, et al. Rhamnetin induces sensitization of hepatocellular carcinoma cells to a small molecular kinase inhibitor or chemotherapeutic agents[J]. *Biochimica Biophysica Acta* 2016, 1860(7): 1417-1430.

[2] Ali AH, Tabibian JH, Naser-Ghods N, et al. Surveillance for Hepatobiliary Cancers in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis[J]. *Hepatology*, 2017.

[3] Xie N, Cai JB, Zhang L, et al. Upregulation of B7-H4 promotes tumor progression of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(12): 3205.

[4] Taurin S, Yang CH, Reyes M, et al. Endometrial Cancers Harboring Mutated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Protein Are Successfully Treated With a New Small Tyrosine Kinase Inhibitor in an Orthotopic Mouse Model[J]. *International Journal of Gynecological Cancer Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 2017, 28(1): 152-160.

[5] Feng F, Lu YY, Zhang F, et al. Long interspersed nuclear element ORF-1 protein promotes proliferation and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol* 2013, 19(7): 1068-1078.

[6] Xu X, Fan Z, Liang C, et al. A signature motif in LIM proteins mediates binding to checkpoint proteins and increases tumour radiosensitivity[J]. *Nature Communications* 2017, 17(8): 14059.

[7] Xu X, Fan Z, Kang L, et al. Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis[J]. *J Clin Invest* 2013, 123(2): 630-645.

[8] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology* 2014, 60(6): 2099-2108.

[9] Zhang S, Wang F, Zhang Z. Current advances in the elimination of hepatitis B in China by 2030[J]. *Front Med*, 2017, 11(4): 490-501.

[10] Sun Y, Niu W, Du F, et al. Safety, pharmacokinetics, and antitumor properties of anlotinib, an oral multi-target tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced refractory solid tumors[J]. *Journal of Hematology & Oncology* 2016, 9(1): 105.

[11] Petrou P. Value-Based pricing and the end of pharmaceutical pricing as we know it? A case study on sorafenib and axitinib[J]. *Pharmacol Res* 2017, 124(10): 160-163.

(收稿日期: 2017-12-01)