

目录列表可在[科学直通车](#)

## 生化和生物物理研究通讯

期刊主页: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Anlotinib通过Erk和Akt途径诱导肝细胞癌凋亡并抑制增殖

超何<sup>a</sup>吴婷婷<sup>b, c, \*</sup>, 郝永强<sup>a, \*\*</sup><sup>a</sup>上海市第九人民医院上海市第九人民医院整形外科上海市骨科植入重点实验室, 上海<sup>b</sup>上海市第九人民医院口腔正畸科上海市第九人民医院口腔医学重点实验室  
医学, 上海, 中国<sup>c</sup>安徽医科大学口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 安徽

## 文章信息

## 文章历史:

2018年8月3日收到

2018年8月13日接受

2018年8月23日在线提供

## 关键词:

安洛替尼

肝细胞癌细胞凋亡

扩散Erk

Akt

## 摘要

虽然已报道多种靶向受体酪氨酸激酶抑制剂anlotinib在许多临床前和临床试验中具有抗肿瘤作用, 但对其对肝细胞癌(HCC)的作用知之甚少。在这里, 我们已经显示了anlotinib对HCC的抗肿瘤作用。数据表明, anlotinib应用显著抑制HCC细胞活力, 增殖, 集落形成, 并促进体外凋亡。此外, 动物实验还说明了anlotinib减轻了HCC进展。在机械上, 我们证明了anlotinib治疗下调抗凋亡蛋白Bcl-2和Survivin, 但上调促凋亡分子Bax, 这是其对HCC的治疗作用的原因。途径分析显示Erk和Akt的磷酸化水平降低。总之, 该研究表明, 通过抑制Bcl-2和存活蛋白表达, 通过灭活Erk和Akt途径促进Bax表达, anlotinib可能对HCC具有直接的抗肿瘤进展作用, 并且可能是治疗HCC的有希望的药物。

©2018 Elsevier Inc. 保留所有权利。

## 1. 介绍

肝细胞癌(HCC)是一个高度恶性的肿瘤, 它也是第五大流行的癌症, 构成肿瘤相关死亡率的第二大部分, 也是全球发展最快的癌症[1]. 与其他癌症不同, 有一些报道HCC发病的危险因素, 如慢性肝炎病毒(HBV和HCV)感染, 酒精, 肝脏脂肪浸润, 肝炎, 自身免疫或慢性胆汁淤积疾病[2]. 目前, HCC的治疗策略是手术切除, 常规化疗, 放疗或肝移植[3]. 尽管HCC的治疗方案取得了很大进展, 但长期来看

HCC患者的总生存时间仍然不变[4], 这主要是因为晚期诊断和任何其他非手术治疗的不足。在这方面, 迫切需要更好地理解HCC进展的潜在机制以寻找针对HCC的新的有效药剂。

Anlotinib是一种新型口服多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂, 合成主要抑制一组新鉴定的激酶, 如VEGFR2 / 3, FGFR1-4, PDGFR α / β, c-Kit, Ret, Aurora-B, c-FMS和盘基蛋白结构域受体1 (DDR1), 在肿瘤进展, 凋亡, 增殖和血管生成中起重要作用[5e8]. 由于VEGFR2被认为是VEGF诱导的抗血管生成和抗肿瘤信号传导的主要介质[9e11]在测定针对一组酪氨酸激酶(包括VEGFR1, VEGFR3, PDGFRβ, c-Kit等)的安非他替后, anlotinib对VEGFR2的IC<sub>50</sub>最低[12]. 此外, 据报道, anlotinib高度选择性地抑制VEGFR2 [12], 我们合理地假设, anlotinib可能主要通过抑制VEGFR2对HCC发挥作用。受VEGF分子刺激后, VEGFR2的细胞内TK结构域二聚化并自身磷酸化, 导致下游信号通路同时激活, 包括Raf / Mek / Erk1 / 2和PI3K / Akt / mTOR通路[13e15].

\*通讯作者。上海市第九人民医院上海市第九人民医院整形外科上海市骨科植入重点实验室, 上海

\*\*通讯作者。上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔正畸科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海

电子邮件地址: [wutingting\\_focus@163.com](mailto:wutingting_focus@163.com) (T. 吴), [haoyq1664@sh9hospital.org](mailto:haoyq1664@sh9hospital.org) (Y. Hao)

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.098>

0006-291X / ©2018 Elsevier Inc. 保留所有权利。

尽管在一些临床前和临床试验中, anlotinib已显示出对抗多种恶性肿瘤类型的有希望的抗肿瘤活性[16e21], 没有研究估计其在HCC中的潜在机制。在这里, 我们首先尝试探讨anlotinib对HCC的治疗作用及其可能的机制。我们的工作将为安非他酮在人类HCC治疗中的临床治疗应用提供有希望的证据和理论依据。

## 2. 结果

### 2.1. VEGFA的高表达与HCC和较差的存活时间有关

如上所述, anlotinib可能通过阻断VEGFR的活化发挥其功效, 因为VEGFA是VEGF家族的主要和最重要的成分, 通常称为VEGF [22], 我们评估了HCC和正常组织中的VEGFA表达水平, 以及公共数据库KM Plotter中HCC不同阶段的表达谱[23]和UALCAN [24]. 数据表明, 与正常组织相比, VEGFA在HCC中表达更高 (图. 1A), 值得强调的是, 随着HCC等级的进展, VEGFA表达更高 (图. 1B). 此外, 我们进一步分析了VEGFA表达与患者生存时间之间的相关性, 结果表明较高的VEGFA表达预示着较差的预后和较短的生存时间 (图. 1C, 1D和1E)。总之, 这些发现表明, 与正常组织相比, VEGFA在HCC中表达更高, 并且随着HCC等级的进展, VEGFA表达更高, 另外, 更高的VEGFA预测更差的预后和更短的存活时间。

### 2.2. Anlotinib在体外和离体时抑制HCC进展

为了测试anlotinib对HCC的功效, 我们在体外共培养不同浓度的anlotinib和HCC细胞, 并离体建立异种移植小鼠模型。表明anlotinib通过CCK-8以浓度依赖性方式降低HCC细胞的活力 (图2A) 和集落形成试验 (图2b), 在图2C, 通过相差显微镜拍摄的图像也显示当用安非他替治疗时HCC细胞的活力差。此外, 我们还生成异种移植小鼠模型以确认体内阿洛替尼的疗效。两组6e8周龄无胸腺裸鼠皮下注射  $2 \times 10^6$  Huh7细胞。形成皮下肿瘤块一周后, 每天通过口服管饲法给予实验组 (n = 6) 和对照组 (n = 6) anlotinib (5mg / kg) 和1% DMSO。如图所示图2D, 与对照组相比, 在实验组中观察到显著的肿瘤生长抑制。与小鼠处死后测量的对照组相比, anlotinib组肿瘤重量较低, 肿瘤体积较小, 这些观察结果也得到了加强 (图2E)。简而言之, 我们的结果表明, anlotinib在体外和体内抑制HCC进展。

### 2.3. Anlotinib促进细胞凋亡并抑制HCC的增殖

然后我们使用流式细胞术进一步测试了anlotinib对细胞凋亡和增殖的影响。膜联蛋白V / 7-AAD双染色显示, anlotinib大大增加了HCC细胞的凋亡百分比 (图3A). 此外, anlotinib治疗还可能导致HCC细胞的细胞周期停滞 (图3B). 总之, 这些数据表明, anlotinib以浓度依赖性方式促进细胞凋亡并抑制HCC的增殖。

### 2.4. Anlotinib通过下调Bcl-2和Survivin发挥其功效, 并通过抑制Erk和Akt通路上调Bax

由于anlotinib在体外和体内显示出显著的治疗功效, 我们进一步试图找出潜在的机制。PCR和Western blot分析显示抗凋亡蛋白 (包括Bcl-2和Survivin) 的表达下降, 而促凋亡蛋白Bax的表达增加, 从而导致Bcl-2 / Bax比例降低 (图4A和4B)。同时, 由于Ras / Erk和PI3K / Akt途径是VEGF信号传导的主要下游途径, 我们首先检测到这两种途径的主要蛋白质。结果表明, anlotinib下调了Erk和Akt的磷酸化, 但Erk和Akt的总蛋白水平没有显著变化 (图4B). 总之, 这些观察结果表明, anlotinib可能通过抑制Bcl-2和Survivin的表达抑制HCC进展, 通过抑制Erk和Akt通路上调Bax (图4C)。

## 3. 讨论

HCC是死亡率最高的三大癌症之一, 由于诊断延迟和缺乏有效的治疗策略, HCC患者的生存和预后保持中等。不用说, 迫切的临床需求是低毒性的有效治疗以延长HCC患者的总体存活时间。

众所周知, HCC对大多数化疗药物的敏感性低于任何其他癌症[25]. 此外, 大多数患者在确诊为HCC时已处于晚期[26], [27]. 这些晚期HCC患者的预后有限。在这种情况下, 靶向治疗在HCC治疗方案中显示出有吸引力的前景。2007年, 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 索拉非尼被FDA批准用于晚期HCC作为一线治疗[11] [28], 这意味着anlotinib在HCC治疗中具有相同的潜力, 而且, anlotinib对VEGFR1 / 2 / b和FGFR1的IC<sub>50</sub> 远低于索拉非尼 (约1 / 4e1 / 25) [20], 表明anlotinib在某种程度上可能有更好的效果。

作为多激酶抑制剂的Anlotinib已显示出对VEGFR2的高效和特异性抑制作用, 导致对HCC的显著的促凋亡和抗增殖活性。此外, II期临床试验表明, 与安慰剂相比, anlotinib作为三线治疗为难治性晚期非小细胞肺癌患者提供了显著的无进展生存益处, 且毒性特征显示出良好的耐受性[24]. 此外, 在中国已经完成了anlotinib的III期临床试验, 目前正在美国进行针对各种恶性肿瘤的II期临床试验[20].

作为一种多药剂, 安非他尼可以通过任何其他途径或分子发挥其作用, 这仍然是进一步的研究。虽然anlotinib是一种很有前途的药物, 但在临床上应用于HCC患者之前, 仍需要进行更多的体内研究以验证其副作用和不良事件, 只有这些才能安全和广泛地使用anlotinib。

总之, 我们证实了anlotinib可能通过抑制VEGFR2的活化和Bcl-2和Survivin的表达抑制HCC细胞的增殖并诱导其凋亡, 并通过抑制Erk和Akt信号转导途径上调Bax表达。总之, 这些研究表明, anlotinib是治疗HCC的有希望的药物, 并为正在进行的安非他酮作为一种新型抗肿瘤药物的临床研究提供了机制证据。

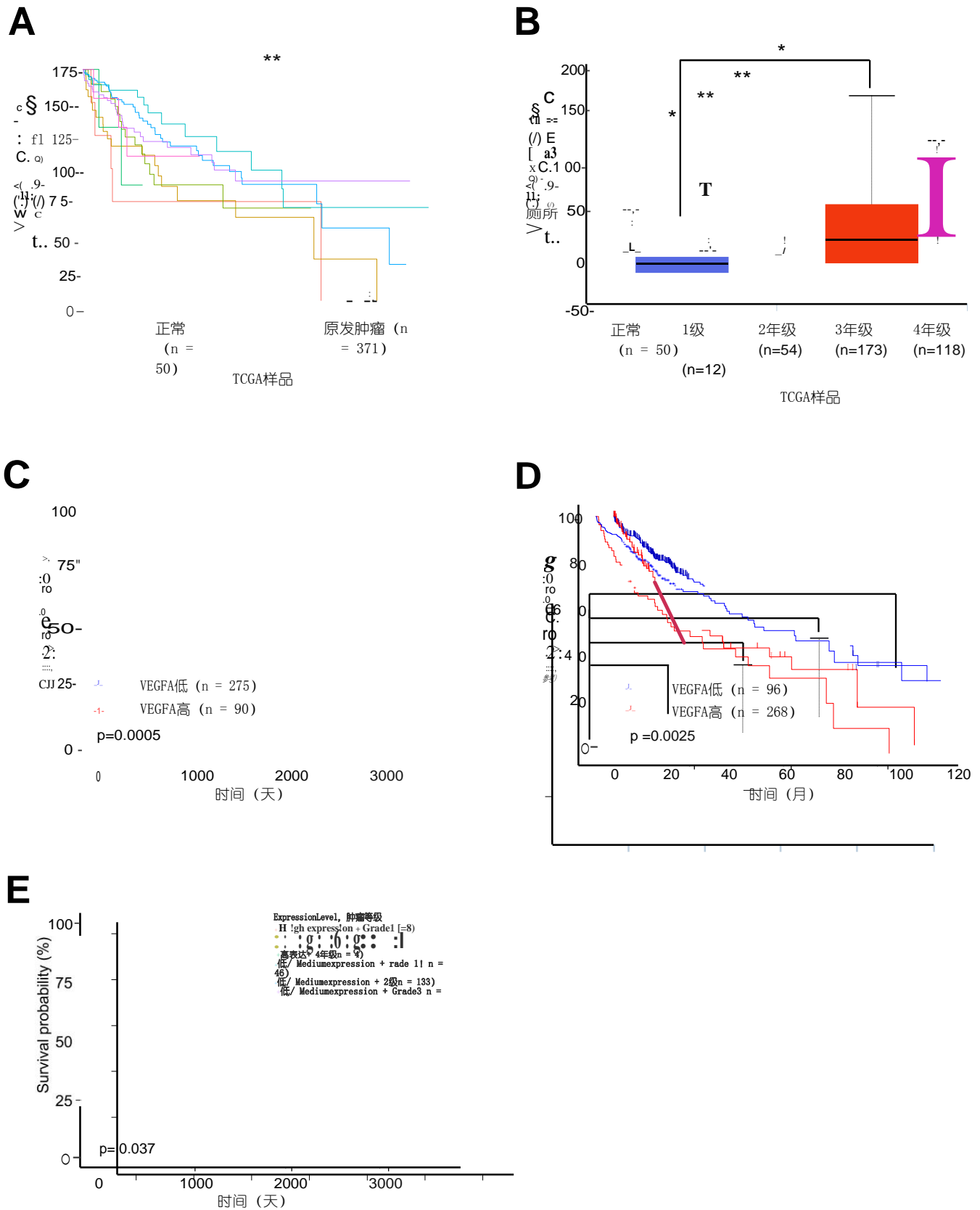


图1. VEGFA的高表达与HCC和较差的存活时间有关。(A) 基于UALCAN的HCC和正常组织中的VEGFA表达。(B) 基于UALCAN的不同等级的HCC和正常组织中的VEGFA表达。基于数据库KM绘图仪(D) 和UALCAN (C, E) 的VEGFA高和低患者的存活时间的Kaplan-Meier图。\* P < 0.05, \*\* P < 0.01。

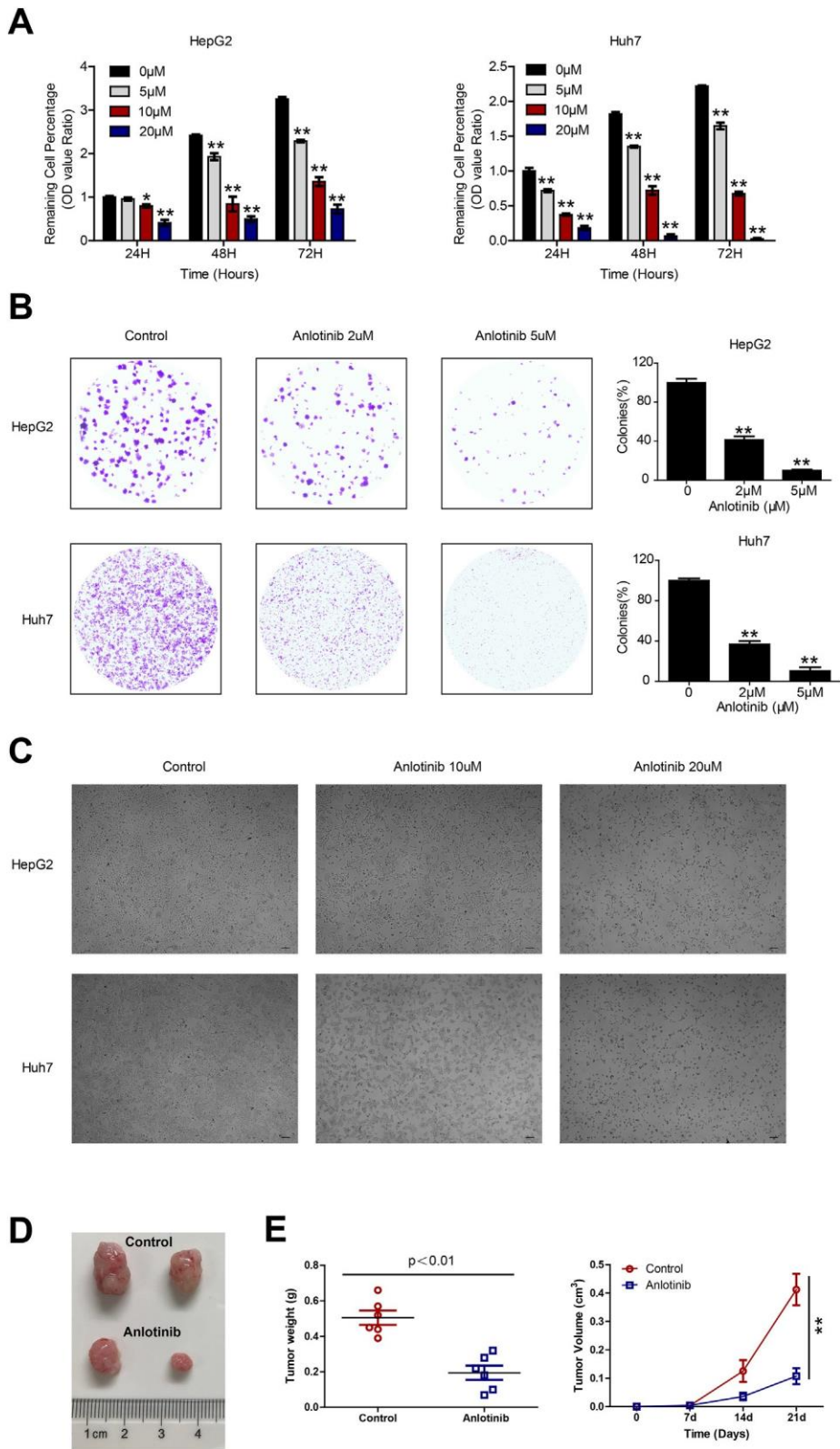


图2. Anlotinib在体外和离体时抑制HCC进展。通过CCK-8 (A) 和集落形成测定 (B) 测量有或没有anlotinib处理的细胞活力。(C) 具有或不具有anlotinib的HCC细胞的相差显微照片图像48小时。(D) 处死小鼠后切除的代表性肿瘤的总图像。(E) 在指定时间测量肿瘤重量和体积。\* P < 0.05, \*\* P < 0.01。比例尺100μm。

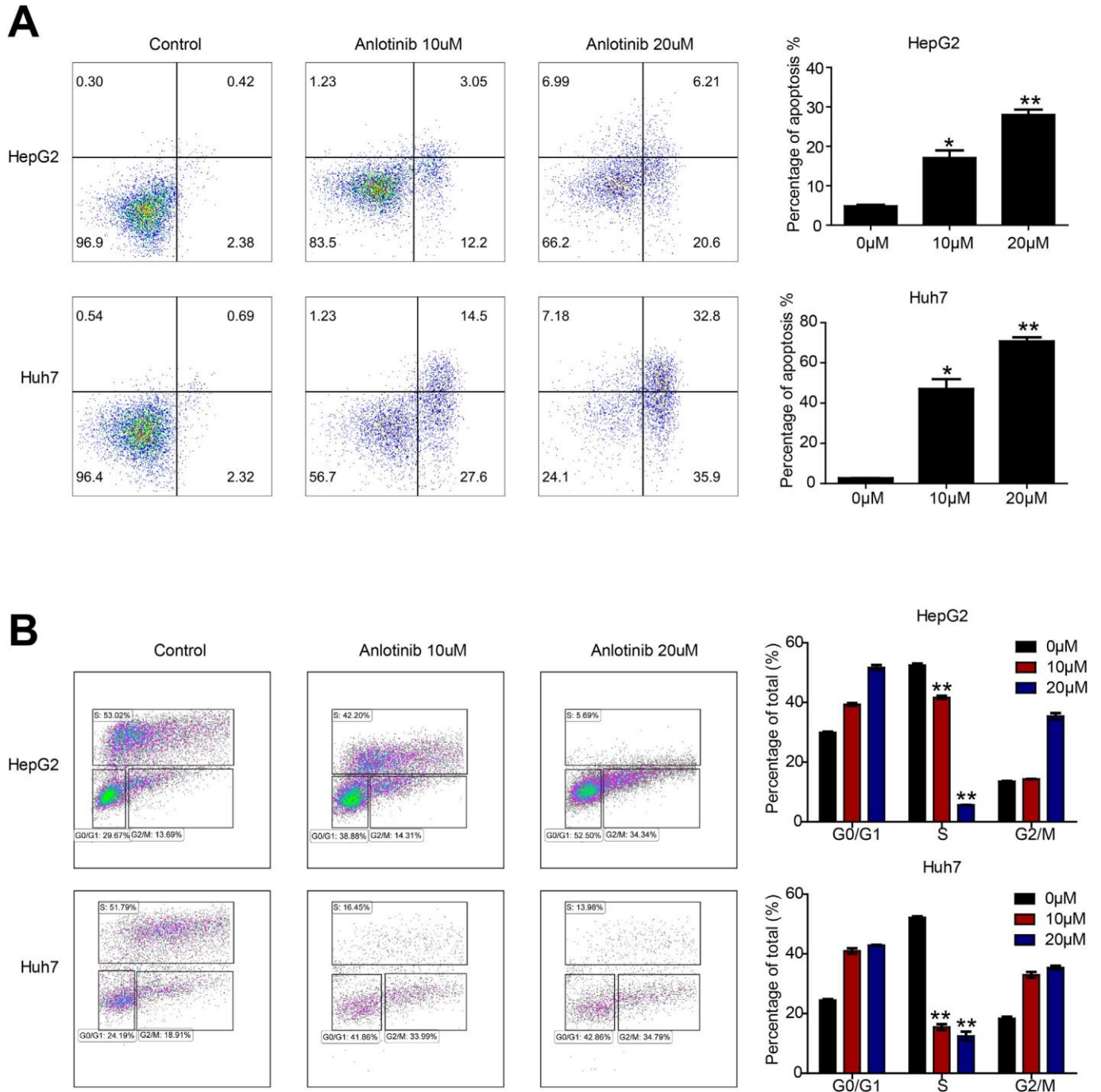


图3. Anlotinib促进细胞凋亡并抑制HCC的增殖。通过流式细胞术测量具有或不具有anlotinib的细胞凋亡 (A) 和增殖 (B)。\*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

#### 4. 方法

##### 4.1. 物料

Anlotinib是由Chia Tai Tianqing Co., Ltd (中国南京) 赠送的。针对存活蛋白, Bax, Bcl-2, Erk, p-Erk, Akt, p-Akt和GAPDH的抗体购自CST (Beverly, MA, USA)。

##### 4.2. 数据库

揭示VEGFA表达与... 之间的相关性

患者生存, 我们搜索了公共数据库KM Plotter [23]和UALCAN [24].

##### 4.3. 细胞培养

人肝细胞癌细胞HepG2和Huh7购自ATCC。使细胞在含有10% FBS (Gibco) 和抗生素 (青霉素100U / ml, 链霉素100mg / ml) 的DMEM (HyClone) 中在含有5% CO<sub>2</sub>的37 °C湿润气氛中生长。



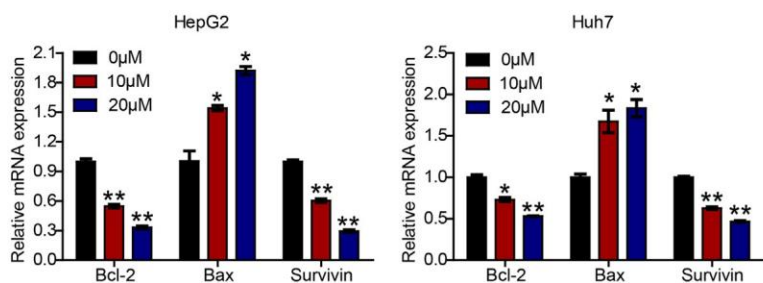
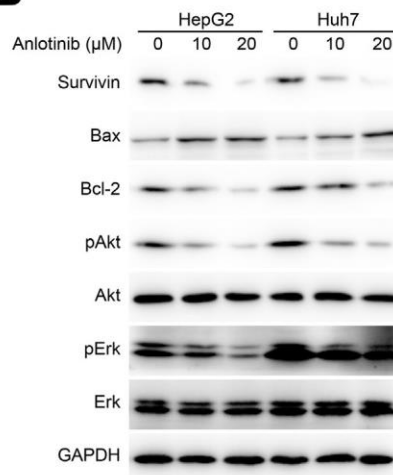
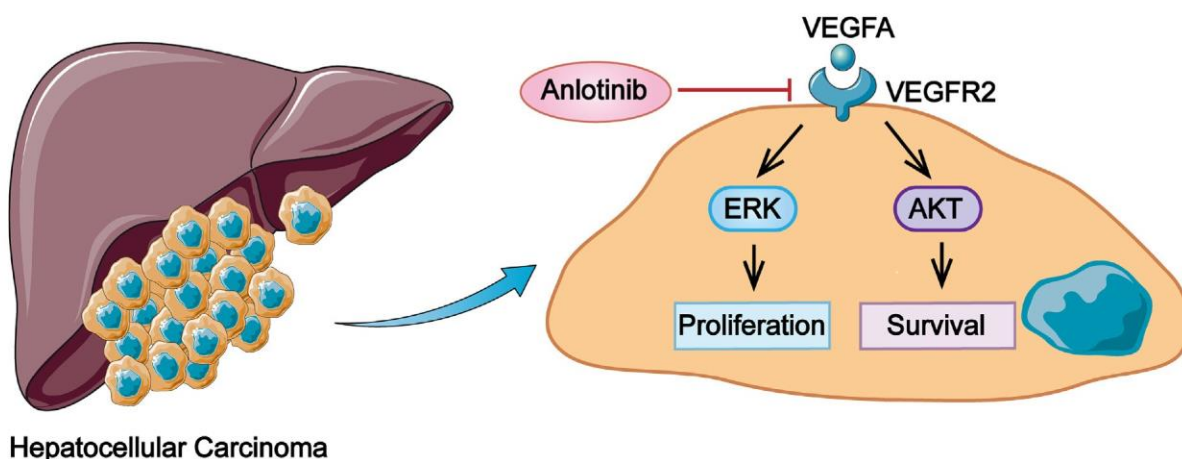
**A****B****C**

图4. Anlotinib通过下调Bcl-2和Survivin并通过抑制Erk和Akt途径上调Bax来发挥其功效。(A) 通过RT-qPCR测量的Bcl-2, Bax, 存活蛋白的表达。(B) 通过Western印迹分析存活蛋白, Bax, Bcl-2, Erk, pErk, Akt, pAkt在具有或不具有anlotinib的HCC细胞中24小时的表达 (GAPDH用作上样对照)。(C) anlotinib的机制在HCC中发挥作用。

#### 44. 细胞活力测定

如图所示进行测定[23]. 简而言之, 将每孔5000个细胞加入6孔板中并与或不与试剂一起温育72小时, 然后以1:10稀释加入CCK-8并培养2小时。测量并记录OD450。

#### 45. PCR

如所报道的那样进行测定[23]. 使用TaKaRa RT-PCR试剂盒 (日本) 根据制造商的方案进行RT-PCR。相对量化 (RQ) 计算 - 由等式  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  得出。引物的序列是列于表S1中。

#### 46. 蛋白质印迹

如所报道的那样进行测定[23]. 简言之, 通过10%SDS-PAGE电泳分离蛋白质裂解物, 然后转移至PVDF膜, 接着孵育具有特异性一抗和二抗的膜。

#### 47. 菌落形成测定

6孔板每孔含有1000个细胞, 用指定的处理进行孵育。7天后, 固定菌落并用0.1%结晶紫染色, 手动计数菌落。

#### 48. 流式细胞术分析

对于细胞凋亡分析, 将含有或不含有anlotinib的细胞培养48小时, 然后收获细胞并用7-AAD (BD Biosciences) 和 Annexin-V (BD Biosciences) 染色。至于增殖测定, 在用或不用anlotinib处理细胞24小时后, 按照说明使用EdU Cell Proliferation Kit (Beyotime) 进行以下测定。简而言之, 用10mM EdU孵育细胞2小时, 然后在洗涤, 固定和透化后, 用Click Additive Solution处理细胞30分钟并用7-AAD染色。

#### 49. 异种移植小鼠模型

小鼠在上海市第九人民医院动物实验中心保持SPF状态。所有动物实验均经道德委员会批准。对于HCC异种移植模型,

向12只BALB / c无胸腺裸鼠 (6e8周龄) 皮下注射 $2 \times 10^5$  Huh7细胞。形成皮下肿瘤块一周后, 每天通过口服管饲法给予实验组 (n = 6) 和对照组 (n = 6) anlotinib (5mg / kg) 和1%DMSO。每7天用卡尺测量肿瘤, 并使用该公式计算为 $0.5 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ 。在第21天处死小鼠后测量肿瘤重量。

#### 4.10. 统计分析

如所示, 所有实验重复3次。通过Excel (Microsoft) 计算平均值, 标准平均误差 (SEM) 和基于t检验的P值。差异被认为是显著的,  $P < 0.05$ 。

#### 作者贡献

郝永强, 吴婷婷和赵鹤构思了这个项目并设计了实验; 赵和吴婷婷进行了实验; Yongqiang Hao修改了稿件并提交了最终版本。

#### 利益冲突

作者宣称没有利益冲突。

#### 致谢

本研究得到了中国国家重点研究发展计划 (2016YFC1100600) 的资助; 上海市第九人民医院林项目 (JYLJ012); 国家自然科学基金 (81600845); 安徽省教育厅自然科学基金 (KJ2016A347), 北京市牙齿再生与功能重建重点实验室 (KFKT2017007)。

#### 附录A. 补充数据

可以在以下位置找到与本文相关的补充数据 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.098>.

#### 参考

- [1] HB El-Serag, F. Kanwal, 肝细胞癌的流行病学 美国: 我们在哪里? 我们去哪里? 肝脏病学60 (5) (2014) 1767e1775.
- [2] A. Forner, JM Llovet, J. Bruix, Hepatocellular carcinoma, Lancet 379 (9822) (2012) 1245e1255.
- [3] P. Ferenci等, 肝细胞癌 (HCC): 全球视角, J.Clin. Gastroenterol. 44 (4) (2010) 239e245.
- [4]

- SD Ryder, 肝细胞癌诊断和治疗指南 成人中的cinoma (HCC), Gut 52 (SUPPL.3) (2003) .
- [5] C. Wang, J. Chen, W. Cao, L. Sun, H. Sun, Y. Liu, Aurora-B和HDAC syner- 通过AKT, mTOR, 可以调节淋巴瘤细胞的存活和增殖 和Notch途径, Eur. J. Pharmacol. 779 (2016) 1e7.
- [6] C. Ambrogio等人, DDR1和Notch信号传导的组合抑制是一种 KRAS驱动的肺腺癌的治疗策略, Nat. 医学. 22 (3) (2016) 270e277.
- [7] S. Ashton等人, 极光激酶抑制剂纳米粒子靶向肿瘤 有利的体内治疗指数, Sci. 译. 医学. 8 (325) (2016) .
- [8] S. Kakiuchi-Kiyota, et al., 原癌基因cFMS蛋白在肺中的表达, 乳腺癌和卵巢癌, Appl. 免疫组. 摩尔. 吗琳. 22 (3) (2014) 188e199.
- [9] A.-K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh, VEGF receptor signalling - 控制血管功能, Nat. 牧师莫尔. 细胞生物学. 7 (5) (2006) 359e371.
- [10] M. Shibuya, 血管内皮生长因子受体-1 (VEGFR-1 / Flt-1): a 用于血管生成的双重调节因子, 血管生成9 (4) (2006) .
- [11] C. Fontanella, E. Ongaro, S. Bolzonello, M. Guardascione, G. Fasola, G. Aprile, 新型VEGFR2抑制剂的开发临床进展, Ann. 译. 医学. 2 (12) (2014) .
- [12] C. Xie, et al., anlotinib的临床前特征, 一种非常有效的和 选择性血管内皮生长因子受体-2抑制剂, Canc. 科学. 109 (4) (2018) 1207e1219.
- [13] C.-H. Heldin, B. Westermark, 血小板的作用机制和体内作用 - 衍生生长因子, Physiol. Rev. 79 (4) (1999年1月) 1283e1316.
- [14] K. Holmes, OL Roberts, AM Thomas, MJ Cross, 血管内皮生长 因子受体-2: 结构, 功能, 细胞内信号传导和治疗 抑制, 细胞. 信号. 19 (10) (2007年10月) 2003e2012.
- [15] DJ Hicklin, LM Ellis, 血管内皮生长因子途径的作用 在肿瘤生长和血管生成中, J.Clin. ONCOL. 23 (5) (2005) 1011e1027.
- [16] J. Zhao, H. Zhao, Y. Chi, Safety and efficacy of S-1 / 替莫唑胺方案的治疗方法 在转移性神经内分泌肿瘤患者中, 神经内分泌学106 (4) (2018) 318e323.
- [17] Y. Sun, et al., 安非他酮的安全性, 药代动力学和抗肿瘤特性, 口服多靶酪氨酸激酶抑制剂, 用于晚期患者 断层实体瘤, J. Hematol. ONCOL. 9 (1) (2016年12月) 105.
- [18] YY Syed, Anlotinib: 第一次全球批准, 药物78 (10) (2018) 1057e1062.
- [19] Y. Su, et al., 一例携带KRAS的晚期肺腺癌病例报告 用anlotinib治疗突变, Chin. J. Lung Canc. 21 (5) (2018) 428e430.
- [20] B. Lin, X. Song, D. Yang, D. Bai, Y. Yao, N. Lu, Anlotinib通过抑制血管生成抑制VEGFR2, PDGFRb和FGFR1的激活, 基因654 (2018) 77e86.
- [21] B. Han, et al., Anlotinib作为难治性患者的三线治疗 晚期非小细胞肺癌: 一项多中心随机II期临床试验 (ALTER0302), Br. J. Canc. 118 (5) (2018) 654e661.
- [22] W. Li, X.-Y. 男, J.-Q. Chen, J. Zhou, S.-Q. Cai, M. Zheng, 靶向VEGF / VEGFR 在治疗牛皮癣, Discov. 医学. 18 (98) (2014) 97e104.
- [23] A. Lănczky, et al., miRpower: 一个验证生存相关的网络工具 利用来自2178名乳腺癌患者乳腺癌的表达数据的miRNA CANC. RES. 对待. 160 (3) (2016年12月) 439e446.
- [24] B. Han, et al., Anlotinib作为难治性患者的三线治疗 晚期非小细胞肺癌: 一项多中心随机II期临床试验 (ALTER0302), Br. J. Canc. 118 (5) (2018年3月) 654e661.
- [25] MB Thomas, 肝细胞癌全身治疗, Canc. J. 14 (2) (2008) 123e127.
- [26] JK Lee, GK Abou-Alfa, 关于治疗癌症的临床试验的最新进展 晚期肝细胞癌, J.Clin. Gastroenterol. 47 (供应 1) (2013).
- [27] A. Schlachterman, WW Craft, E. Hilgenfeldt, A. Mitra, R. Cabrera, Current and 未来的肝细胞癌治疗, World J. Gastroenterol. 21 (28) (2015) 8478e8491.
- [28] AM Crissien, C. Frenette, 目前肝细胞癌的管理, Gastroenterol. 肝脏病. 10 (3) (2014) 153e161.