

阿帕替尼联合CCI-779体外抑制小细胞肺癌细胞株NCI-H446的增殖和迁移

刘超 张洪兵 李永文 张子禾 施睿峰 徐松林 朱光胜 王攀 刘红雨 陈军

【摘要】背景与目的 肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤，其中小细胞肺癌是恶性程度最高的亚型，具有生长迅速、早期转移和高度血管化等特点。阿帕替尼（Apatinib）是我国自主研发的血管内皮生长因子受体2抑制剂，在多种实体瘤中疗效显著。本研究旨在探讨Apatinib对小细胞肺癌细胞株NCI-H446的体外作用以及联合哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）抑制剂CCI-779对小细胞肺癌的体外作用。**方法** 体外培养小细胞肺癌细胞株NCI-H446，CCK8法、细胞凋亡实验、细胞周期实验及Transwell实验检测Apatinib及联合mTOR抑制剂CCI-779对NCI-H446细胞增殖、凋亡、周期及迁移的影响；Western blot实验检测血管内皮生长因子受体和细胞周期相关蛋白的表达。**结果** CCK8实验结果显示高浓度Apatinib能抑制NCI-H446细胞增殖；细胞凋亡实验结果显示高浓度Apatinib诱导NCI-H446细胞凋亡；Transwell实验结果显示高浓度Apatinib抑制NCI-H446细胞迁移；联合mTOR抑制剂CCI-779后，低浓度Apatinib便能抑制NCI-H446细胞增殖和迁移，诱导细胞凋亡。**结论** Apatinib对小细胞肺癌细胞株NCI-H446的作用具有浓度依赖性特征，高浓度Apatinib能够抑制NCI-H446细胞增殖和迁移，诱导细胞凋亡，与mTOR抑制剂CCI-779联用能增加NCI-H446细胞对Apatinib的敏感性。

【关键词】 肺肿瘤；阿帕替尼；mTOR抑制剂；CCI-779；细胞周期；凋亡；细胞迁移

Apatinib Combined with CCI-779 Inhibits the Proliferation and Migration of Small Cell Lung Cancer NCI-H446 Cells *In Vitro*

Chao LIU¹, Hongbing ZHANG¹, Yongwen LI², Zihe ZHANG¹, Ruifeng SHI¹, Songlin XU¹, Guangsheng ZHU¹, Pan WANG¹, Hongyu LIU², Jun CHEN^{1,2}

¹Department of Lung Cancer Surgery; ²Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Hongyu LIU, E-mail: liuhongyu123@hotmail.com;

Jun CHEN, E-mail: huntercj2004@yahoo.com

【Abstract】Background and objective Lung cancer is the most common malignancy world-wide. Small cell lung cancer is the deadliest subtype of lung cancer, which features such as rapid growth, early metastasis, and high vascularization. Apatinib is a vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor independently developed in China, which has a significant inhibition in a variety of solid tumors. The purpose of this study is to investigate the effects of Apatinib alone or Apatinib combined with mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, CCI-779, on small cell lung cancer cell line NCI-H446 *in vitro*. **Methods** The small cell lung cancer cell line NCI-H446 was grown *in vitro*. The effects of Apatinib alone or Apatinib combined with CCI-779 on proliferation, apoptosis, cell cycle and migration of NCI-H446 small cell lung cancer cells were detected by CCK8; FACS and transwell assays were also carried out; Western blot assays were used to detect vascular endothelial growth factor and cell cycle related protein expression. **Results** CCK8 assays showed that high concentration of Apatinib could inhibit the proliferation of NCI-H446 cells. Apoptosis assays showed that high concentration of Apatinib could induce NCI-H446 cell apoptosis. Transwell assays showed that high concentration of Apatinib could inhibit NCI-H446 cell migration. After combined with mTOR inhibitor CCI-779, low concentration of Apatinib could inhibit the proliferation and migration of NCI-H446 small cell lung cancer cells and induce apoptosis. **Conclusion** Apatinib has a concentration-dependent effect

本研究受国家自然科学基金（No.81773207）、天津市科技支撑计划重点项目（No.19YFZCSY00040）、天津市拔尖创新团队基金（No.TJZJH-GCCCXYTD-2-6）及天津市自然科学基金（No.19JYBJC27000）资助

作者单位：300052 天津，天津医科大学总医院肺部肿瘤外科（刘超，张洪兵，张子禾，施睿峰，徐松林，朱光胜，王攀，陈军）；天津市肺癌研究所，天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室（李永文，刘红雨，陈军）（通讯作者：刘红雨，E-mail: liuhongyu123@hotmail.com；陈军，E-mail: huntercj2004@yahoo.com）

on the small cell lung cancer cell line NCI-H446. High concentration of Apatinib can inhibit the proliferation and migration of NCI-H446 small cell lung cancer cells, induce apoptosis. Apatinib combined with the mTOR inhibitor CCI-779 can sensitize the NCI-H446 cells to Apatinib.

【Key words】 Lung neoplasms; Apatinib; mTOR inhibitor; CCI-779; Cell cycle; Apoptosis; Cell migration

【Competing interests】 The authors declare that they have no competing interests.

This study was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (to Jun CHEN, No. 81773207), the Key Support Projects of Tianjin Science and Technology (to Jun CHEN, No.19YFZCSY00040), Special Support Program for High Tech Leader & Team of Tianjin (to Jun CHEN, No.TJTZJH-GCCCXYTD-2-6) and Tianjin Natural Science Foundation (to Yongwen LI, No.19JCYBJC27000).

肺癌是最常见的癌症以及癌症相关死亡的主要原因,可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)。其中SCLC约占所有肺癌的10%-15%^[1],是一种高侵袭、高致死率、易广泛转移的肺癌类型,早期即可出现血行转移,约60%患者确诊时已有远处转移^[2],5年生存率仅为7%^[3,4]。SCLC具有生长迅速、高度血管化的特点。血管生成是恶性肿瘤进展过程中最关键的过程之一,其为肿瘤的生长提供营养物质,促进肿瘤的生长,与肿瘤的发生、增殖和转移密切相关^[5]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管生成的重要调控分子,能够与血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)结合形成正反馈,调控血管内皮细胞的增殖、分化和迁移,促进新生血管形成。阻断VEGFR2可抑制肿瘤诱导的血管生成^[6]。此外,几乎所有SCLC患者都存在TP53和RB基因失活或突变^[7,8]。TP53和RB基因是重要的抑癌基因,其突变会导致细胞周期调控异常,细胞持续增殖,促进肿瘤的发生及发展。

阿帕替尼(Apatinib)是一种小分子酪氨酸激酶抑制剂,能够选择性抑制VEGFR2的活性,从而抑制VEGF介导的细胞增殖、肿瘤微血管密度^[9]。Apatinib已被证实多种类型肿瘤中发挥作用,如胃癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌以及NSCLC^[10-12],但是Apatinib对SCLC细胞的作用尚需探索。CCI-779是一种哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抑制剂,能够抑制肿瘤细胞增殖及VEGF产生,诱导细胞周期停滞在G₁期,由于SCLC均存在细胞增殖异常及VEGF调控异常,mTOR抑制剂有望抑制其增殖。此外,联合mTOR周期抑制剂有可能增加SCLC对Apatinib的敏感性。本研究通过体外实验探讨Apatinib对SCLC细胞株的作用以及联合CCI-779能否增加SCLC细胞株对Apatinib敏感性。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂 人SCLC细胞NCI-H446(TP53突变、RB突变)购自中国科学院细胞库(中国上海),阿帕替尼(Apatinib mesylate, S2221)、CCI-779(NSC683864, S1044)均购自Selleck公司。抗体:VEGFR2抗体购自Abcam公司,CDK4、CDK6、GAPDH抗体均购自Cell Signaling Technology公司。RPMI-1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum)、胰蛋白酶均购自GIBCO公司。CCK-8细胞增殖试剂盒、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购自碧云天公司。PI/RNase染色液、细胞凋亡试剂盒均购自BD公司。Transwell购自美国Corning公司。

1.2 细胞培养 将细胞从-80℃冰箱中取出,在37℃水浴锅中快速复温,1,000 rpm离心3 min,弃掉上清液,用新鲜培养基重悬细胞沉淀,培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,置于37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中。待细胞生长至90%左右融合度时,弃掉培养基,用PBS清洗1遍-2遍,0.25%胰酶-EDTA消化传代。所有实验均采用对数生长期细胞。

1.3 CCK8法测定细胞活力 收集呈对数期稳定生长的NCI-H446细胞,细胞计数板计数,调整细胞悬液浓度至 2.5×10^4 /mL,向96孔板中每孔加入200 μL悬液,37℃、5%CO₂培养过夜,待细胞贴壁后,设置Apatinib浓度梯度为0 μmol/L、1 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L、32 μmol/L、64 μmol/L、128 μmol/L,每个浓度设4个复孔,每个复孔加入200 μL不同浓度的Apatinib。37℃、5%CO₂孵育24 h后,弃掉培养基,每孔加入100 μL含10% CCK-8的完全培养基,避光,37℃培养箱中孵育1 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度,药物抑制率计算公式:(对照组OD值-实验组OD值)/对照组OD值×100%,计算出药物的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)。以同样的方法测定CCI-779对NCI-H446细胞的抑制

率及 IC_{50} 。

1.4 细胞周期实验 将NCI-H446细胞接种至6孔板中,加入完全培养基,待细胞汇合率达到70%-80%时,吸去孔内培养基,将各孔分为对照组、CCI-779处理组、低浓度Apatinib处理组、高浓度Apatinib处理组、低浓度Apatinib联合CCI-779处理组、高浓度Apatinib联合CCI-779处理组,各组分别加入不同浓度药物2 mL, 37 °C、5%CO₂孵育24 h。收集 1×10^6 个细胞于流式管中,用预冷的PBS清洗细胞,1,000 rpm离心3 min,弃上清,逐滴加入1 mL-2 mL预冷的75%乙醇,涡旋混匀细胞,4 °C避光过夜,2,000 rpm离心细胞10 min,弃上清, PBS清洗细胞2次以去除乙醇,将细胞重悬于0.5 mL PI/RNase染色液,室温避光孵育15 min, 1 h之内上流式细胞仪进行检测。

1.5 细胞凋亡实验 将NCI-H446细胞接种至6孔板中,加入完全培养基,待细胞汇合率达到70%-80%时,吸去孔内培养基,将各孔分为对照组、CCI-779处理组、低浓度Apatinib处理组、高浓度Apatinib处理组、低浓度Apatinib联合CCI-779处理组、高浓度Apatinib联合CCI-779处理组,各组分别加入不同浓度药物2 mL, 37 °C、5%CO₂孵育24 h。收集 5×10^5 个细胞于流式管中,用预冷的PBS清洗细胞,1,000 rpm离心3 min,弃上清,加入100 μ L 1×Binding Buffer重悬细胞,加入5 μ L Annexin V-FITC, 37 °C培养箱中孵育10 min;加入5 μ L PI Staining Solution,轻轻混匀,避光、室温反应10 min;加入400 μ L 1×Binding Buffer,混匀,样品在1 h内用流式细胞仪检测。

1.6 Transwell迁移实验 将NCI-H446细胞接种至6孔板中,加入完全培养基,待细胞汇合率达到70%-80%时,吸去孔内培养基,将各孔分为对照组、CCI-779处理组、低浓度Apatinib处理组、高浓度Apatinib处理组、低浓度Apatinib联合CCI-779处理组、高浓度Apatinib联合CCI-779处理

组,各组分别加入不同浓度药物2 mL, 37 °C、5%CO₂孵育24 h。使用无血清RPMI-1640培养基调整各组细胞浓度为 1×10^5 /mL,分别取200 μ L加入上室,于下室加入600 μ L含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,置于37 °C、5%CO₂培养箱,培养24 h。取出小室后,用棉签轻柔拭去上室细胞,4%多聚甲醛固定15 min,结晶紫室温染色25 min,并用PBS将多余染色液洗净,显微镜下观察穿过的细胞,每个样本随机选取5个视野进行拍照计数,计算平均值。

1.7 蛋白免疫印迹实验 将NCI-H446细胞接种至6孔板中,当细胞融合度达到70%-80%时,加入不同浓度药物处理,24 h后提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度。加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,充分混匀,100 °C金属浴加热15 min。每种样品取30 μ g上样电泳,湿转法电转移至PVDF膜,含5%脱脂牛奶的TBST摇床上室温封闭2 h。按照不同分子量剪切PVDF膜,加入对应的抗体,4 °C摇床孵育过夜。次日用TBST室温清洗3次,每次5 min,加HRP标记的二抗,室温孵育1 h,显色曝光,分析条带灰度值。

1.8 统计学方法 应用Graphpad Prism 8.0软件对数据进行统计学分析并作图,组间数据比较采用单因素 t 检验, P 值取双侧检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 高浓度Apatinib抑制NCI-H446细胞增殖 Apatinib按照0 μ mol/L、1 μ mol/L、2 μ mol/L、4 μ mol/L、8 μ mol/L、16 μ mol/L、32 μ mol/L、64 μ mol/L、128 μ mol/L的浓度梯度处理NCI-H446细胞24 h后, CCK8法计算出其 IC_{50} 为30.44 μ mol/L。如图1所示,当药物浓度 < 10 μ mol/L时, Apatinib对NCI-H446细胞活力几乎没有影响;当药物浓度 > 10 μ mol/L时, Apatinib开始逐渐抑制NCI-H446细胞增殖,药物浓度

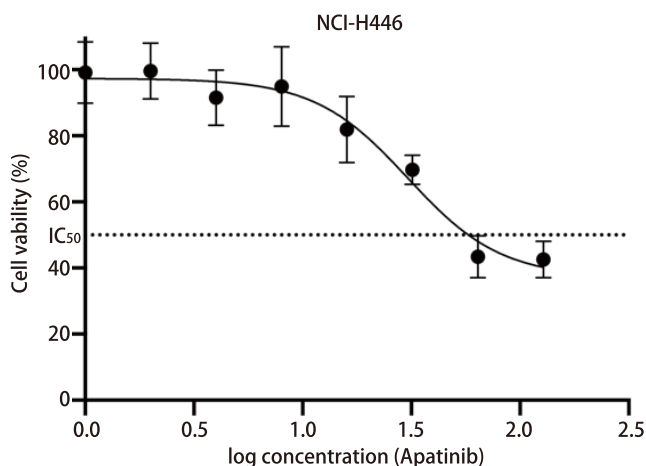


图1 高浓度Apatinib抑制NCI-H446细胞增殖。不同浓度的Apatinib处理NCI-H446细胞24 h后, CCK8法计算出其 IC_{50} 为30.44 μ mol/L。当药物浓度 > 10 μ mol/L时, Apatinib开始逐渐抑制NCI-H446细胞增殖,药物浓度 > 30.44 μ mol/L后才能将NCI-H446细胞活力抑制在50%以下。

Fig 1 High concentration of Apatinib inhibits NCI-H446 small cell lung cancer cells proliferation. After the NCI-H446 small cell lung cancer cells were treated with Apatinib at different concentrations for 24 h, the IC_{50} calculated by the CCK8 was 30.44 μ mol/L. When the drug concentration > 10 μ mol/L, Apatinib gradually inhibits the proliferation of NCI-H446 small cell lung cancer cells, and the NCI-H446 small cell lung cancer cells viability can be suppressed below 50% when concentration > 30.44 μ mol/L. IC_{50} : half inhibitory concentration.

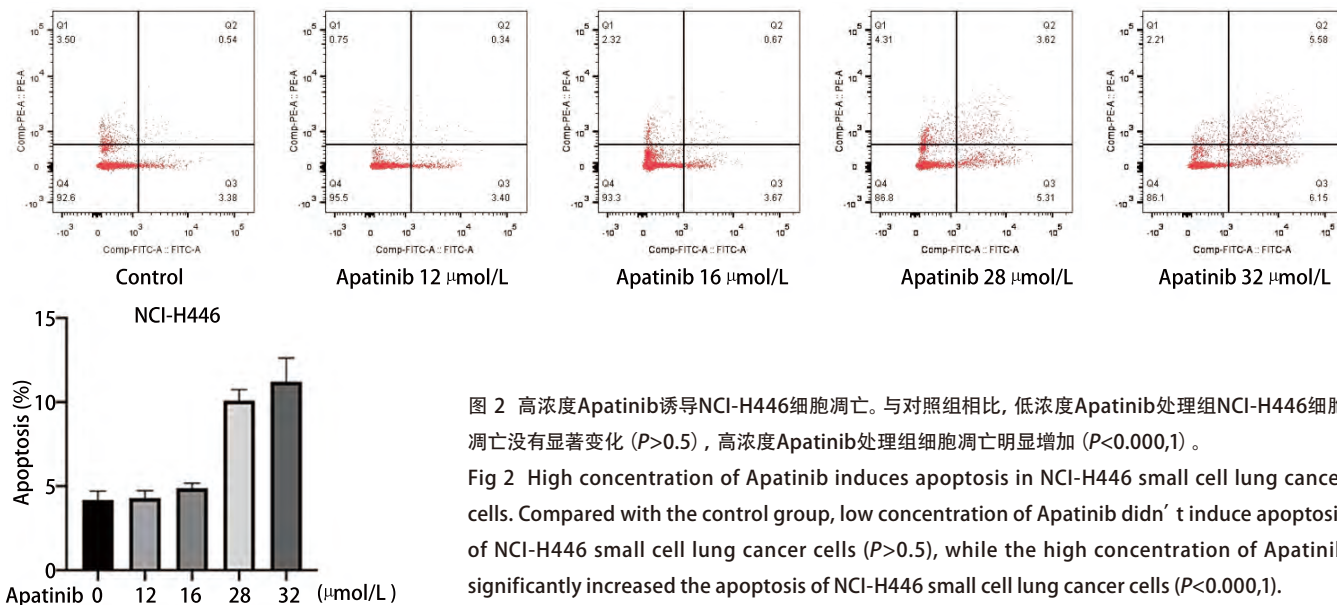


图2 高浓度Apatinib诱导NCI-H446细胞凋亡。与对照组相比,低浓度Apatinib处理组NCI-H446细胞凋亡没有显著变化 ($P>0.5$),高浓度Apatinib处理组细胞凋亡明显增加 ($P<0.000,1$)。

Fig 2 High concentration of Apatinib induces apoptosis in NCI-H446 small cell lung cancer cells. Compared with the control group, low concentration of Apatinib didn't induce apoptosis of NCI-H446 small cell lung cancer cells ($P>0.5$), while the high concentration of Apatinib significantly increased the apoptosis of NCI-H446 small cell lung cancer cells ($P<0.000,1$).

$>30.44 \mu\text{mol/L}$ 后能将NCI-H446细胞活力抑制在50%以下,提示Apatinib对NCI-H446的作用具有浓度依赖性,高浓度Apatinib才能明显抑制NCI-H446细胞增殖。

2.2 高浓度Apatinib诱导NCI-H446细胞凋亡 为了研究Apatinib对NCI-H446细胞凋亡的影响,我们分别用低浓度 ($12 \mu\text{mol/L}$ 、 $16 \mu\text{mol/L}$) 和高浓度 ($28 \mu\text{mol/L}$ 、 $32 \mu\text{mol/L}$) Apatinib处理NCI-H446细胞24 h,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。如图2所示,对照组凋亡细胞占总细胞的比例为 $4.18\% \pm 0.30\%$,低浓度Apatinib处理组分别为 $4.29\% \pm 0.25\%$ 、 $4.88\% \pm 0.17\%$,高浓度Apatinib处理组分别为 $10.09\% \pm 0.37\%$ 、 $11.22\% \pm 0.81\%$ 。与对照组相比,低浓度Apatinib处理组NCI-H446细胞凋亡没有显著变化 ($P>0.5$),高浓度Apatinib处理组NCI-H446细胞凋亡明显增加 ($P<0.001$),提示高浓度Apatinib能诱导NCI-H446细胞凋亡。

2.3 高浓度Apatinib抑制NCI-H446细胞迁移 为了研究Apatinib对NCI-H446细胞迁移的影响,我们分别用低浓度 ($12 \mu\text{mol/L}$ 、 $16 \mu\text{mol/L}$) 和高浓度 ($28 \mu\text{mol/L}$ 、 $32 \mu\text{mol/L}$) Apatinib处理NCI-H446细胞24 h,将细胞加入Transwell小室中,24 h后观察细胞迁移数目。如图3所示,对照组细胞迁移数目为 (271.60 ± 9.60) 个,低浓度Apatinib处理组分别为 (285.60 ± 7.61) 个、(255.80 ± 3.60) 个,高浓度Apatinib处理组分别为 (78.20 ± 10.30) 个、(11.80 ± 2.60) 个。与对照组相比,低浓度Apatinib处理组NCI-H446细胞迁移无显著变化 ($P>0.5$),高浓度Apatinib处理组显著抑制NCI-H446细胞迁移 ($P<0.000,1$),提示高浓度Apatinib显著抑制NCI-H446细胞迁移。

2.4 Apatinib联合CCI-779增加NCI-H446细胞对Apatinib的

敏感性 如图4A所示,CCI-779按照 $0 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $2 \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \mu\text{mol/L}$ 、 $8 \mu\text{mol/L}$ 、 $16 \mu\text{mol/L}$ 、 $32 \mu\text{mol/L}$ 、 $64 \mu\text{mol/L}$ 、 $128 \mu\text{mol/L}$ 的浓度梯度处理NCI-H446细胞24 h后,CCK8法计算出其 IC_{50} 为 $13.59 \mu\text{mol/L}$,提示CCI-779能抑制NCI-H446活性。

首先,选取药物浓度为 $6 \mu\text{mol/L}$ ($1/2 \text{IC}_{50}$) 的CCI-779与Apatinib联用。在Apatinib $0 \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \mu\text{mol/L}$ 、 $8 \mu\text{mol/L}$ 、 $12 \mu\text{mol/L}$ 、 $16 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 、 $24 \mu\text{mol/L}$ 、 $28 \mu\text{mol/L}$ 、 $32 \mu\text{mol/L}$ 浓度梯度下,应用蛋白免疫印迹实验,观察单药Apatinib和Apatinib联合CCI-779时细胞周期蛋白的变化。如图4B-4C所示,单药Apatinib处理NCI-H446细胞时,Apatinib浓度 $>24 \mu\text{mol/L}$,细胞周期蛋白CDK4、CDK6蛋白表达才出现明显降低,VEGFR2才被明显抑制,进一步提示Apatinib的作用具有浓度依赖性,较高浓度才能抑制VEGFR2的表达;Apatinib联合CCI-779处理NCI-H446细胞时,Apatinib在较低浓度就能降低CDK4、CDK6蛋白表达,明显抑制VEGFR2,提示CCI-779联合Apatinib能够降低细胞周期蛋白的表达,增加Apatinib对VEGFR2的抑制作用。

为了进一步研究Apatinib联合CCI-779对NCI-H446细胞的作用,我们将实验分为对照组、CCI-779处理组、低浓度Apatinib ($12 \mu\text{mol/L}$ 、 $16 \mu\text{mol/L}$) 联合CCI-779处理组、高浓度Apatinib ($28 \mu\text{mol/L}$ 、 $32 \mu\text{mol/L}$) 联合CCI-779处理组,分别进行细胞周期实验、细胞凋亡实验以及细胞迁移实验。如图4D所示,与对照组相比,CCI-779处理组、低浓度Apatinib联合CCI-779处理组、高浓度Apatinib联合CCI-779处理组均出现明显的 G_1 期阻滞

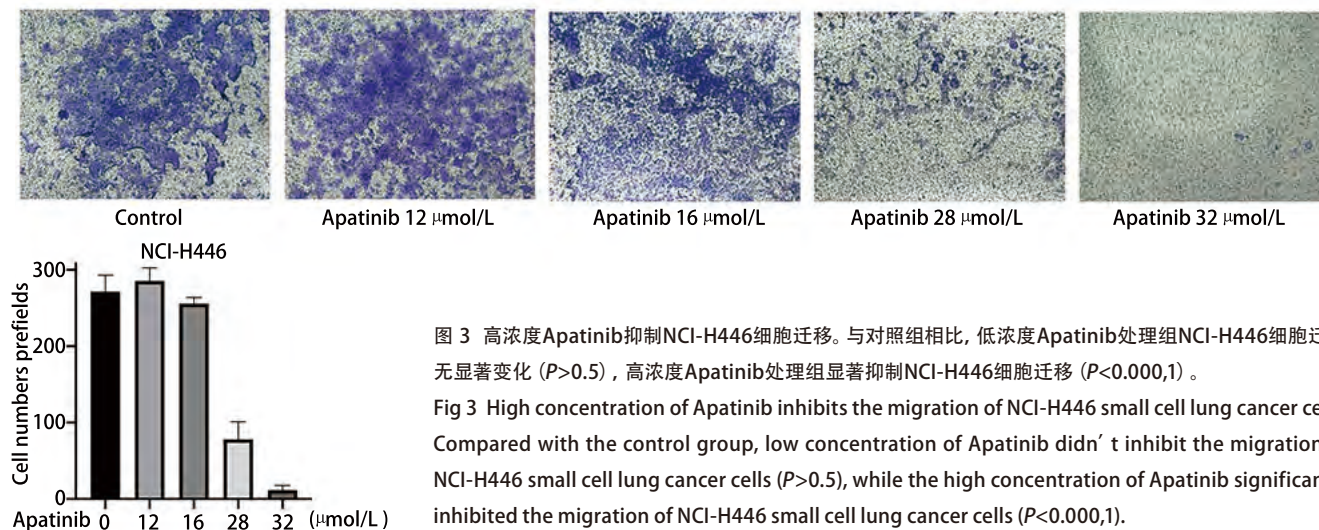


图3 高浓度Apatinib抑制NCI-H446细胞迁移。与对照组相比,低浓度Apatinib处理组NCI-H446细胞迁移无显著变化($P>0.5$),高浓度Apatinib处理组显著抑制NCI-H446细胞迁移($P<0.000,1$)。

Fig 3 High concentration of Apatinib inhibits the migration of NCI-H446 small cell lung cancer cells. Compared with the control group, low concentration of Apatinib didn't inhibit the migration of NCI-H446 small cell lung cancer cells ($P>0.5$), while the high concentration of Apatinib significantly inhibited the migration of NCI-H446 small cell lung cancer cells ($P<0.000,1$).

($P<0.05$)。如图4E所示,对照组凋亡细胞占总细胞的比例为 $5.20\% \pm 0.65\%$, CCI-779处理组为 $4.26\% \pm 0.08\%$,低浓度Apatinib联合CCI-779处理组分别为 $8.41\% \pm 0.43\%$ 、 $13.76\% \pm 0.26\%$,高浓度Apatinib联合CCI-779处理组分别为 $29.96\% \pm 0.56\%$ 、 $38.34\% \pm 0.31\%$ 。与对照组相比,CCI-779处理组NCI-H446细胞凋亡无显著变化($P>0.5$),低浓度和高浓度Apatinib联合CCI-779处理组NCI-H446细胞凋亡明显增加($P<0.000,1$)。如图4F所示,对照组细胞迁移个数为(275.60±9.72)个,CCI-779处理组为(108.40±7.83)个,低浓度Apatinib联合CCI-779处理组分别为(71.30±5.33)个和0个,高浓度Apatinib联合CCI-779处理组迁移到室细胞数为0。与对照组相比,CCI-779处理组、低浓度Apatinib联合CCI-779处理组和高浓度Apatinib联合CCI-779处理组显著抑制NCI-H446细胞迁移($P<0.000,1$)。上述结果表明,Apatinib联合CCI-779能够增加NCI-H446细胞对Apatinib的敏感性,抑制NCI-H446细胞的增殖和迁移,导致细胞周期G₁期阻滞,并诱导细胞凋亡。

3 讨论

SCLC是一种高侵袭、高致死率、易广泛转移的肺癌类型,大部分患者确诊时即已发生转移,可进行手术切除的SCLC患者比例低,仅有约5%的患者能够早期发现并完成手术治疗,而且手术治疗仅适用于临床分期I期(T1-2N0),并且纵隔淋巴结未被侵犯的局限期SCLC患者^[13]。大部分患者需接受药物治疗,SCLC患者对化疗和放疗敏感,但易于复发并且出现耐药性,局限期患者化疗联合放疗后,5年生存率不到15%,而广泛期患者的2年生存率不

到5%^[14],探索新的抗肿瘤药物成为提高SCLC疗效的重要途径之一。精准医学的发展促进了对肿瘤发生发展机制和分子生物学的理解,靶向治疗为NSCLC的治疗策略带来了翻天覆地的变化^[15],与此同时,对SCLC基因组学的研究也成为了当下的热点。VEGF信号通路中关键因子如VEGF、低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)、VEGFR等在SCLC中均呈过表达状态,与肿瘤细胞的增殖、转移、侵袭以及预后不良密切相关^[16,17]。研究^[18]表明,VEGF相关信号通路能够促进SCLC的生长及转移,且SCLC具有高度血管化的特点,提示靶向VEGF信号通路的药物可能改善SCLC的疗效。血管生成能够促进新生异常血管网的产生,改变肿瘤微环境,在肿瘤细胞的转移和生长过程中发挥着重要作用^[19]。VEGF信号通路是血管生成的重要组成部分,靶向VEGF信号通路的抗血管生成药物可以抑制肿瘤新生血管生成,使现有的肿瘤血管退化,阻止肿瘤细胞摄取营养物质,从而持续抑制肿瘤细胞的生长和转移,最终达到抑制肿瘤生长的作用。

Apatinib是一种选择性抑制VEGFR-2的小分子酪氨酸激酶抑制剂,Apatinib在多种恶性肿瘤中疗效显著,但在SCLC中研究较少。Apatinib在三线及三线以上的SCLC治疗中有一定的效果。本研究通过体外试验进一步证实,Apatinib对SCLC细胞株NCI-H446的作用具有浓度依赖性特征,高浓度Apatinib能够抑制NCI-H446细胞增殖和迁移,诱导细胞凋亡,且与mTOR抑制剂CCI-779联用能够提高NCI-H446细胞对Apatinib的敏感性,在较低浓度时便能抑制NCI-H446细胞增殖和迁移,导致细胞周期G₁期阻滞,并诱导细胞凋亡。

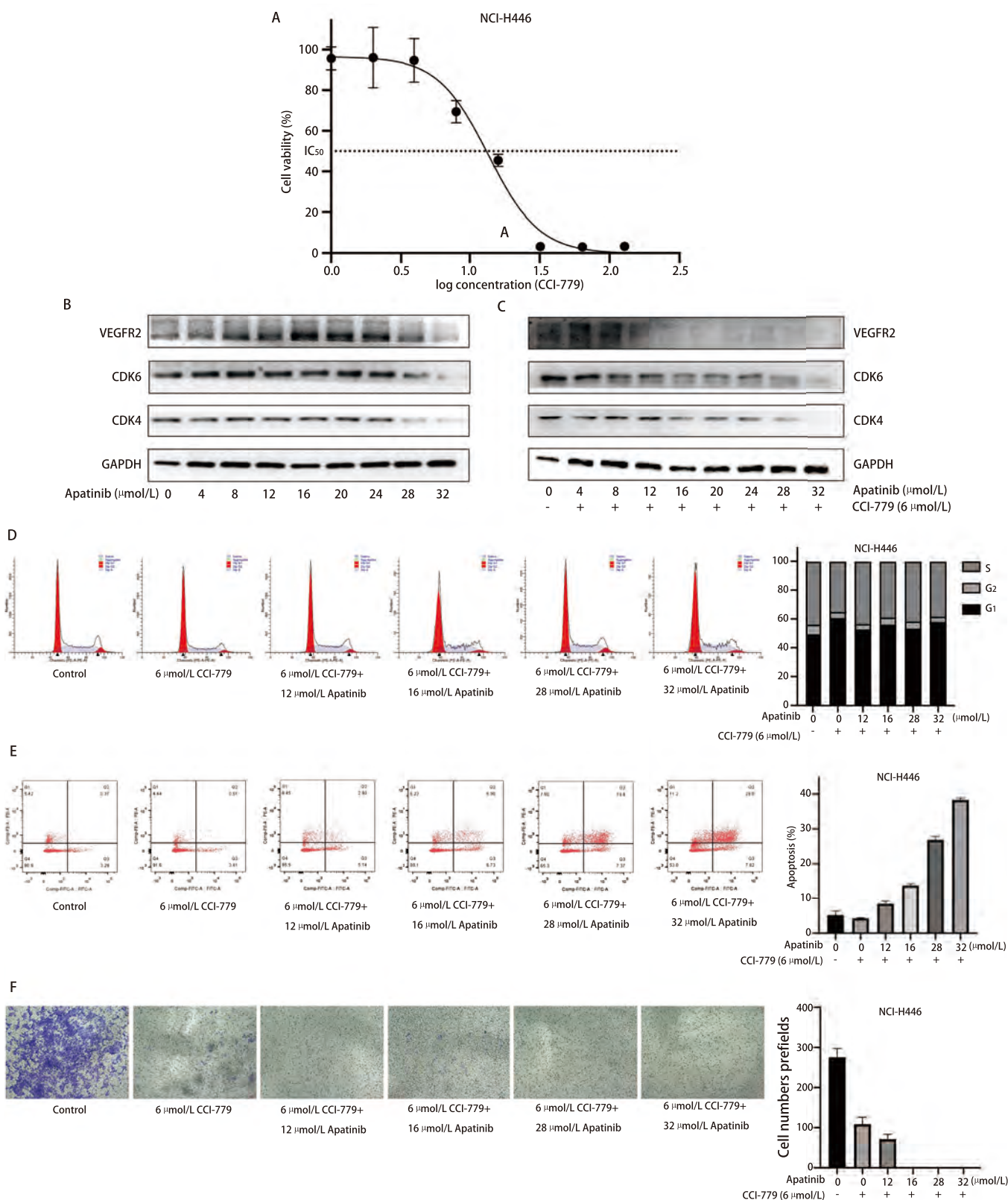


图4 Apatinib联合CCI-779抑制NCI-H446细胞细胞周期进展及细胞迁移

Fig 4 Effect of Apatinib combined with CCI-779 inhibits cell cycle and migration of NCI-H446 small cell lung cancer cells

Author contributions

Liu C, Zhang HB, and Liu HY conceived and designed the study. Liu C, Zhang ZH, and Shi RF performed the experiments. Zhu GS, Xu SL analyzed the data. Wang P contributed analysis tools. Liu HY, Chen J and Li YW provided critical inputs on design, analysis, and interpretation of the study. All the authors had access to the data. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30. doi: 10.3322/caac.21387
- 2 Kong FM, Lally BE, Chang JY, *et al.* ACR appropriateness criteria radiation therapy for small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol*, 2013, 36(2): 206-213. doi: 10.1097/COC.0b013e31827e5523
- 3 Hoseini S, Davoodi J, Habibi M, *et al.* American Cancer Society. *J Gen Intern Med*, 2015, 38(12): 30-31. doi: 10.1080/00185868.1960.9953744
- 4 Rudin CM, Poirier JT. Small-cell lung cancer in 2016: Shining light on novel targets and therapies. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(2): 75-76. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.203
- 5 Hall RD, Le TM, Haggstrom DE, *et al.* Angiogenesis inhibition as a therapeutic strategy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(5): 515-523. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.06.09
- 6 Zhang H. Apatinib for molecular targeted therapy in tumor. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 6075-6081. doi: 10.2147/DDDT.S97235
- 7 George J, Lim JS, Jang SJ, *et al.* Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 2015, 524(7563): 47-53. doi: 10.1038/nature14664.
- 8 Bunn PA Jr, Minna JD, Augustyn A, *et al.* Small cell lung cancer: can recent advances in biology and molecular biology be translated into improved outcomes? *J Thorac Oncol*, 2016, 11(4): 453-474. doi: 10.1016/j.jtho.2016.01.012
- 9 Tian S, Quan H, Xie C, *et al.* YN968D1 is a novel and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase with potent activity *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci*, 2011, 102(7): 1374-1380. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01939.x
- 10 Li X, Xu A, Li H, *et al.* Novel role of apatinib as a multi-target RTK inhibitor in the direct suppression of hepatocellular carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(5 Pt A): 1693-1701. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.02.014
- 11 Hu X, Zhang J, Xu B, *et al.* Multicenter phase II study of apatinib, a novel VEGFR inhibitor in heavily pretreated patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Int J Cancer*, 2014, 135(8): 1961-1969. doi: 10.1002/ijc.28829
- 12 Hu X, Cao J, Hu W, *et al.* Multicenter phase II study of apatinib in non-triple-negative metastatic breast cancer. *BMC Cancer*, 2014, 14: 820. doi: 10.1186/1471-2407-14-820
- 13 Schneider BJ, Saxena A, Downey RJ. Surgery for early-stage small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 2011, 9(10): 1132-1139. doi: 10.6004/jnccn.2011.0094
- 14 Lally BE, Urbanic JJ, Blackstock AW, *et al.* Small cell lung cancer: have we made any progress over the last 25 years? *Oncologist*, 2007, 12(9): 1096-1104. doi: 10.1634/theoncologist.12-9-1096
- 15 Minguet J, Smith KH, Bramlage P. Targeted therapies for treatment of non-small cell lung cancer-Recent advances and future perspectives. *Int J Cancer*, 2016, 138(11): 2549-2561. doi: 10.1002/ijc.29915
- 16 Mamdani H, Induru R, Jalal SI. Novel therapies in small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(5): 533-544. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.07.20
- 17 Lin Q, Xue L, Tian T, *et al.* Prognostic value of serum IL-17 and VEGF levels in small cell lung cancer. *Int J Biol Markers*, 2015, 30(4): e359-e363. doi: 10.5301/jbm.5000148
- 18 Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, *et al.* Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3. *Lung Cancer*, 2004, 46(1): 11-19. doi: 10.1016/j.lungcan.2004.03.006
- 19 Beck A, Lambert J, Sun M, *et al.* Fourth world antibody-drug conjugate. *MAbs*, 2012, 4(6): 637-647. doi: 10.4161/mabs.21697

(收稿: 2020-02-18 修回: 2020-03-02 接受: 2020-03-04)

(本文编辑 丁燕)



Cite this article as: Liu C, Zhang HB, Li YW, *et al.* Apatinib Combined with CCI-779 Inhibits the Proliferation and Migration of Small Cell Lung Cancer NCI-H446 Cells *In Vitro*. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2020, 23(4): 216-222. [刘超, 张洪兵, 李永文, 等. 阿帕替尼联合 CCI-779 体外抑制小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 的增殖和迁移. *中国肺癌杂志*, 2020, 23(4): 216-222.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.104.08