Linifanib 和 Tivozanib 对肺癌细胞增殖的影响

沈金花,陈剑霖
(中南民族大学 生命科学学院,
医学生物研究所 & 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室,武汉 430074)

摘 要 为探讨小分子化合物 Linifanib 和 Tivozanib 对肺癌细胞 A549 和 H358 增殖的影响,以不同浓度 Linifanib 和 Tivozanib 预处理细胞 48 h,用 MTT 法检测了细胞存活率,并通过流式细胞仪检测了细胞周期和凋亡情况,用 RT-PCR 检测了肿瘤抑制因子 P21 的 mRNA 表达量. 结果表明: Linfanib 和 Tivozanib 能抑制肺癌细胞的增殖,呈现剂量依赖性. Linifanib 能诱导细胞凋亡,同时引起细胞周期在 G2/M 期阻滞. Tivozanib 主要引起细胞周期在 G2/M 期阻滞. Linifanib 和 Tivozanib 均能引起 A549 和 H358 细胞中 P21 的 mRNA 表达量显著升高,说明 Linifanib 和 Tivozanib 能抑制肺癌细胞 A549 和 H358 的增殖.

关键词 小分子化合物; 肺癌细胞; 增殖
中图分类号 Q291 **文献标识码** A **文章编号** 1672-4321(2017)04-0036-04

Effect of Linifanib and Tivozanib on Proliferation of Lung Cancer Cells

Shen Jinhua, *Chen Jianlin*
(Institute for Medical Biology & Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and
Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China,
College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract To investigate the effect of Linifanib and Tivozanib on the proliferation of lung cancer cell, A549 and H358 cells were treated with different concentrations of these compounds for 48 h and MTT assay was used to detect cell viability. Cell cycle and cell apoptosis were detected by flow cytometry analysis, and the mRNA expression of tumor-inhibiting factor P21 was tested by RT-PCR. The results showed that Linifanib and Tivozanib could inhibit the proliferation of lung cancer cells in a dose-dependent manner. Linifanib could induce cell apoptosis and arrest cell cycle in G2/M phase. Tivozanib could arrest cell cycle in G2/M phase. Meanwhile P21 mRNA expression in A549 and H358 cells increased after the Linifanib and Tivozanib treatment. It was concluded that Linifanib and Tivozaninb could inhibit the proliferation of lung cancer cell A549 and H358.

Keywords small molecule compounds; lung cancer cell; proliferation

肺癌是全球范围内发病率和死亡率最高的疾病,每年约有 156 万人因肺癌死亡,其中 85% 均是非小细胞肺癌. 早期患者可以通过手术进行治疗,但由于很多患者确诊时已是晚期,癌细胞已转移,有近 40% 的患者已无法用手术治疗. 因此化疗是目前治疗非小细胞肺癌的主要手段. 但化疗毒副作用大,化疗的肺癌患者 5 年存活率较低. 因此,积极探索新的治疗肺癌的思路对临床医疗具有重要的意义. 在肿瘤的生长过程中,血管起到了为癌细胞提供营养,促进肿瘤生长和增殖的功能. 血管的生长与血管表皮生长因子受体(VEGFR)的激活密切相关. 因此,抑制 VEGFR 的激活逐渐成为治疗肺癌的新思路.

Linifanib 和 Tivozanib 均为新型的 VEGFR 的酪氨酸激酶抑制剂,其中 Linifanib 是氨基吲唑类尿素衍生物,对肝癌、乳腺癌、直肠癌等有明显的治疗效果[1]. Tivozanib 是 Aveo 公司和安斯泰来公司合作开发的高效抑制剂,目前主要用于肾癌的治疗[2].

Linifanib 和 Tivozanib 是高效的 VEFGR 抑制剂,该药物已用于其他癌症的治疗. 但是在肺癌上的应用鲜有报道. 有研究表明 VEGFR 在肺癌细胞上高表达[3]. 故理论上 VEGFR 抑制剂对肺癌的增殖有一定的影响. 期望本文通过研究 Linifanib 和 Tivozanib 对非小细胞肺癌细胞增殖和凋亡的影响,期望为肺癌的治疗提供新的思路.

收稿日期 2016-04-14
作者简介 沈金花(1975-),女,教授,博士,研究方向: 疾病相关基因的功能研究,E-mail: shenjinhua2013@163.com
基金项目 国家自然科学基金面上资助项目(31771274);湖北省自然科学基金重点资助项目(2012FFA028)

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　试剂及样品

Linifanib 和 Tivozanib 购自 Selleckchem 公司; MTT 试剂购自 Promega 公司; 碘化丙啶(PI)购自 Biosharp 公司; 胎牛血清、RPMI-1640 以及双抗均购自 Hyclone 公司. H358 细胞株由武汉大学张晓东教授赠予,A549 细胞株购自 Procell 公司.

1.2　实验仪器

酶标仪(Infinite200 型, TECAN 公司),流式细胞仪(Aria Ⅲ 型, BD 公司),Real-Time PCR System (7500fast 型, Applied Biosystems),核酸定量仪(Nanodrop 2000 型, Thermo fisher Scientific 公司),核酸凝胶成像系统(Gel Doc XR + 型, BIO-RAD 公司)

1.3　细胞培养

H358 和 A549 细胞株均用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 培养液,于 37℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养[4].

1.4　实验分组

实验分为 7 组: 对照组,Linifanib 低、中、高剂量组(2,5,10 μM),Tivozanib 低、中、高剂量组(2,10,20 μM).

1.5　MTT 实验

分别接种 3000 个生长状态良好的 H358 和 A549 细胞于 96 孔板中,细胞贴壁后按照实验分组加入不同浓度药物,在培养箱中培养 48 h 后向每个孔加入 10 μL MTT 试剂,3 h 后用酶标仪在 490 nm 波长下检测吸光值. 取各平行孔吸光值的平均值,根据下列公式计算细胞存活率: 存活率(%) = (实验组吸光度值/对照组吸光度值) ×100 %(以不含细胞的培养液为空白组调零).

1.6　流式细胞术

分别接种 6×10^5 个生长状态良好的 H358 和 A549 细胞于 60 mm 培养皿中. 细胞贴壁后按照实验分组加入不同浓度药物. 在培养箱中培养 48 h 后收集细胞,PBS 洗 2 次后加入 70 % 乙醇, -20 ℃下固定过夜后,用 PI 染色 30 min. 用流式细胞仪检测细胞周期.

1.7　逆转录-链式聚合酶反应(RT-PCR)

接种 6×10^5 个生长状态良好的 H358 和 A549 细胞于 60 mm 培养皿中,细胞贴壁后按照实验分组加入不同浓度药物,在培养箱中培养 48 h 后用 Trizol 法提取 RNA,按 RT-PCR 试剂盒方法进行逆转录,反应结束后取 4 μL 的逆转录产物进行 RT-PCR 反应[5].

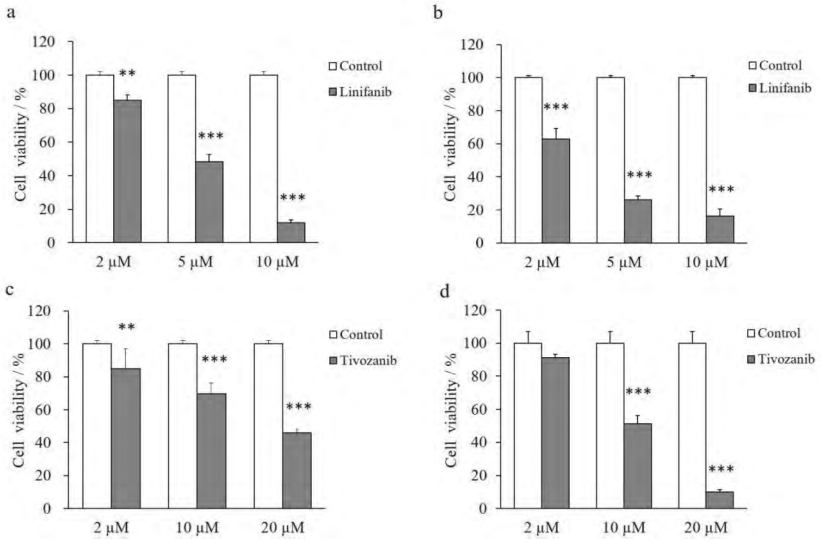
1.8　统计分析

采用 Excel、CorelDRAW X4 和 Power Point 2013 软件绘图,用 t-检验法(student's t-test)对实验数据进行显著性差异比较,$P < 0.05$,具有统计学意义.

2　结果与分析

2.1　Linifanib 和 Tivozanib 对肺癌细胞增殖的影响

Linifanib 和 Tivozanib 对肺癌细胞增殖的影响结果见图 1.



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

a) Linifanib 处理 A549 细胞; b) Linifanib 处理 H358 细胞; c) Tivozanib 处理 A549 细胞; d) Tivozanib 处理 H358 细胞

图 1　Linifanib 和 Tivozanib 对 A549 和 H358 细胞增殖的影响

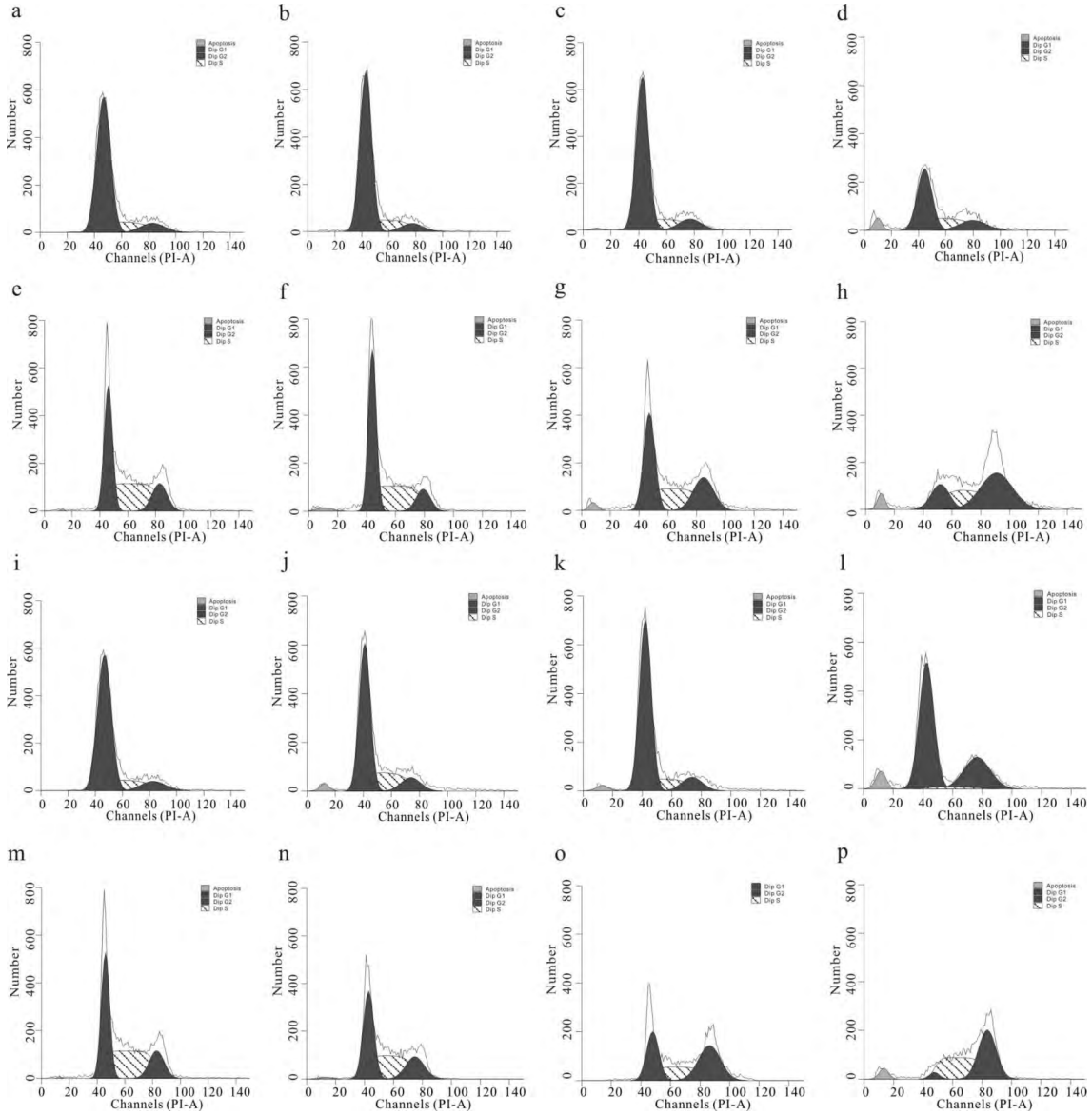
Fig. 1　Effect of Linifanib and Tivozanib on proliferation of A549 and H358 cells

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由图1可见:2~10 μM Linifanib或2~20 μM Tivozanib处理细胞后,A549和H358细胞的增殖均受到抑制,细胞存活率随着药物浓度的升高而降低,且呈现剂量依赖性,具有统计学意义($P<0.05$),说明Linifanib和Tivozanib可以抑制A549和H358细胞的增殖.

2.2 Linifanib和Tivozanib对肺癌细胞周期的影响

用不同浓度Linifanib或Tivozanib分别处理A549或H358细胞后,通过流式细胞仪检测细胞周期和凋亡的情况,结果见图2.由图2可见:在一定浓度范围内,随着Linifanib浓度升高,凋亡细胞和G2/M期细胞的比例逐渐升高.随着Tivozanib浓度升高,G2/M期细胞的比例逐渐升高.说明Linifanib对肺癌细胞增殖的影响是通过诱导细胞凋亡和细胞G2/M期阻滞共同引起的.Tivozanib可以通过引起细胞G2/M期阻滞进而影响细胞增殖.



a~d) 2,5,10 μM Linifanib处理A549细胞,a为对照; e~h) 2,5,10 μM Linifanib处理H358细胞,e为对照; i~l) 2,10,20 μM Tivozanib处理A549细胞,i为对照; m~p) 2,10,20 μM Tivozanib处理H358细胞,m为对照

图2 A549和H358细胞的流式细胞分析

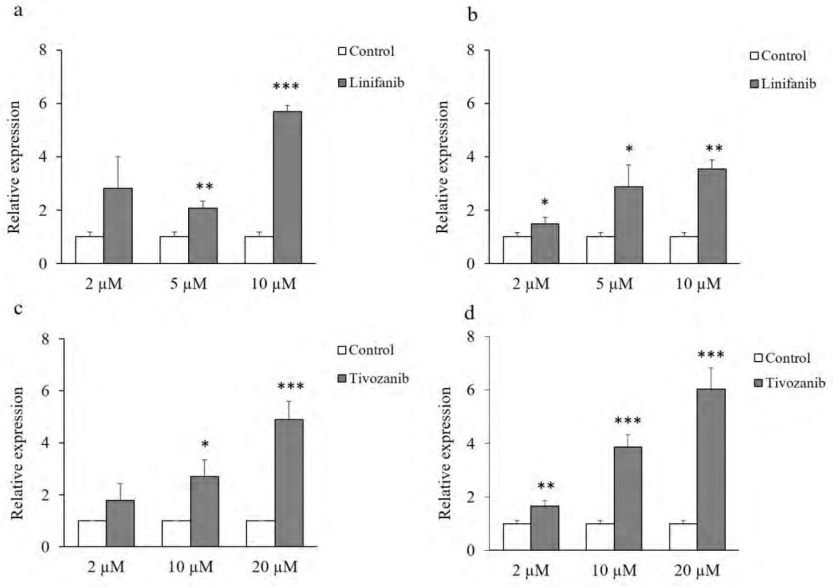
Fig.2 Flow oytometric canalysis of A549 and H358 cells

2.3 Linifanib和Tivozanib对肺癌细胞中P21 mRNA的影响

通过对调控细胞周期相关蛋白的mRNA表达量进行检测,发现用不同浓度Linifanib或Tivozanib分别处理A549和H358细胞后,在一定浓度范围内,随着药物浓度升高,实验组中P21的mRNA水平逐渐升高.而药物对Cyclin D1的mRNA表达没有显著影响.结果提示Linifanib和Tivozanib引起肺癌细胞的G2/

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

M 期阻滞是因为 P21 表达量升高，进而抑制与 G2/M 期相关的周期蛋白激活.



$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

a) Linifanib 处理 A549 细胞; b) Linifanib 处理 H358 细胞; c) Tivozanib 处理 A549 细胞; d) Tivozanib 处理 H358 细胞

图 3　Linifanib 和 Tivozanib 对 A549 和 H358 细胞中 P21 的 mRNA 表达量的影响

Fig. 3　Effect of Linifanib and Tivozanib on the mRNA expression of P21 in A549 and H358 cells

3　讨论

目前对抗癌药物的开发集中在靶向药物方面. EGFR 是目前广泛研究的靶点之一. 它是肺癌细胞膜表面高表达的蛋白，通过与外界配体结合，引发一系列生物学效应，如增殖、凋亡、分化和迁移等[6]. 因此可能通过抑制该蛋白的激活可以抑制细胞生长. 现在最常见的治疗肺癌的靶向药物是 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂. 该类抑制剂在肺癌的治疗上取得了不错的临床效果[7]. 但是，单一的 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂对肺癌的治疗效果有限，故本研究的靶点是另一个肺癌细胞膜表面高表达的蛋白 VEGFR. VEGFR 在肝癌、胃癌和结肠癌等癌症的治疗中已经得到普遍关注，针对该靶点设计的小分子化合物很多，其中如 Sorafenib、Bevacizumab 和 Sunitinib 等在癌症的治疗中取得了很好的效果[8,9]. 鉴于在肺癌细胞中也存在 VEGFR 高表达的现象，推测相关的小分子化合物对治疗肺癌也有一定的作用. 实验以肺癌细胞系 H358 和 A549 细胞为对象，初步探讨了 Linifanib 和 Tivozanib 对肺癌细胞增殖和凋亡的影响.

研究分别从细胞水平和分子水平探究了小分子化合物对肺癌细胞 A549 和 H358 的影响. 通过 MTT 实验发现 Linifanib 和 Tivozanib 能降低 A549 和 H358 细胞存活率. 流式细胞术分析证明 Linifanib 能诱导细胞凋亡，同时引起细胞周期在 G2/M 期阻滞，Tivozanib 主要引起细胞周期在 G2/M 期阻滞. RT-PCR 检测发现 Linifanib 和 Tivozanib 均可以引起 A549 和 H358 细胞中 P21 的 mRNA 表达量显著升高. 以上结果说明了 Linifanib 和 Tivozanib 可以影响肺癌细胞 A549 和 H358 的增殖.

参 考 文 献

[1] Jasinghe V J, Xie Z, Zhou J, et al. ABT-869, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, in combination with rapamycin is effective for subcutaneous hepatocellular carcinoma xenograft [J]. J Hepatol, 2008, 49(6): 985-997.

[2] Fishman M N, Srinivas S, Hauke R J, et al. Phase Ib study of tivozanib (AV-951) in combination with temsirolimus in patients with renal cell carcinoma [J]. Eu J Cancer, 2013, 49(13): 2841-2850.

[3] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications [J]. S Oncology, 2002, 29(6 Suppl 16): 10-14.

(下转第 83 页)

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

4　结语

本文设计的 DNA 合成仪控制系统可同时实现 96 个独立通道的寡核苷酸长链的合成. 基于 LabVIEW 开发的上位机软件功能齐备,操作界面美观友好,数据处理和转换方便. 基于 STM32 开发的下位机高效可靠,对上位机指令处理迅速准确,控制电机和捕获光电开关触发信号及时稳定. 由于 DNA 合成仪的重复工作量大,长时间运行后定位系统的精确度和每次打开电磁阀组排出液体的均一性还需要不断完善.

参 考 文 献

[1] 邢玉华,谭俊杰,李玉霞,等. 合成生物学的关键技术及应用进展[J]. 中国医药生物技术, 2012,7(5):357-363.

[2] 熊　燕,陈大明,杨　琛,等. 合成生物学发展现状与前景[J]. 生命科学,2011, 23(9):826-837.

[3] 冯　淼,王　璐,田　敬. 基因合成技术研究进展[J]. 生物工程学报,2013,29(8):1075-1085.

[4] 王　霞,赵　鹃,李炳志,等. DNA 合成技术及应用[J]. 生命科学,2013,25(10):993-999.

[5] 高朝辉. 基因合成方法的改进与验证[D]. 长春: 吉林大学,2008.

[6] 梁晓会,黄传伟,郭　剑. 多通道高通量 DNA 合成仪控制系统设计与实现[J]. 军事医学, 2015,39(8):571-576.

[7] 万　娟,张　莉,张冰洋. 基于 TMCM-6110 和 LabVIEW 的全自动酶联免疫前处理仪的设计[J]. 制造业自动化, 2016, 38(10):1-6.

(上接第 39 页)

[4] 王朝元, 刘亮亮. bHGA 对体外培养成骨细胞活性的影响[J]. 中南民族大学学报(自然科学版),2016,35(2):31-35.

[5] 陈思礼,吴汇兰,陈　洁. 鱼腥藻 PCC7120 质粒上毒素-抗毒素基因对 *alr9029/asr9028* 的初步研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版),2016,35(2):26-30.

[6] Hynes N E, Lane H A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(5): 341-354.

[7] Yang J C, Srimuninnimit V, Ahn M J, et al. First-line pemetrexed plus cisplatin followed by gefitinib maintenance therapy versus gefitinib monotherapy in East Asian never-smoker patients with locally advanced or metastatic nonsquamous non-small cell lung cancer: final overall survival results from a randomized phase 3 study[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(3): 370-379.

[8] Bellmunt J, Eisen T, Fishman M, et al. Experience with sorafenib and adverse event management[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2011, 78(1): 24-32.

[9] Boehm S, Rothermundt C, Hess D, et al. Antiangiogenic drugs in oncology: a focus on drug safety and the elderly – a mini-review[J]. Gerontology, 2010, 56(3): 303-309.

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net