

Apatinib 对急性髓系白血病干祖细胞样细胞株 kg1 α 的杀伤作用及其分子机制

李志峰, 邓漫漫, 查洁, 周勇, 方志鸿, 徐兵* (厦门大学附属第一医院血液科, 福建 厦门 361003)

摘要: 目的 研究新型小分子酪氨酸激酶抑制剂 Apatinib 对急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)干祖细胞增殖和凋亡的影响及其相关分子机制。方法 CCK8 法检测不同浓度 Apatinib 对 kg1 α 细胞的增殖抑制作用, Annexin V/PI 法检测不同浓度 Apatinib 诱导 kg1 α 细胞和原代 CD34⁺AML 干细胞的凋亡情况, Western blot 法检测 Apatinib 处理 kg1 α 细胞后 PI3K/AKT 通路相关蛋白(AKT、Raf 和 PTEN)的表达变化。结果 不同浓度的 Apatinib(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 48 h 和 72 h 后对 kg1 α 细胞均具有显著的增殖抑制作用, 呈浓度和时间依赖性, 与对照组相比差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Annexin V/PI 检测细胞凋亡的结果显示, 不同浓度 apatinib 对 kg1 α 具有显著的诱导凋亡作用, 作用 48 h 和 72 h 后的凋亡率和对照组相比差异均有统计学意义($P<0.01$)。不同浓度 Apatinib 作用 48 h 后对 7 例原代 AML 干细胞均具有显著的杀伤作用, 与对照组相比差异具有显著的统计学意义($P<0.01$); Western blot 结果显示, Apatinib 处理 kg1 α 细胞 48 h 后 AKT/p-AKT、p-Raf 表达降低, 而 p-PTEN 表达增加。结论 Apatinib 可抑制 AML 干祖细胞样细胞 kg1 α 细胞的增殖, 且可诱导 kg1 α 细胞和原代 CD34⁺AML 干祖细胞的凋亡, 均呈浓度和时间依赖性, 其作用机制可能是通过干扰 PI3K/AKT 通路实现的。

关键词: Apatinib; AML 干祖细胞样细胞株(kg1 α); PI3K/AKT pathway

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)02-0204-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.012

Apatinib Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Stem/progenitor Like Cell Line (kg1 α cells) and Its Mechanism

LI Zhifeng, DENG Manman, ZHA Jie, ZHOU Yong, FANG Zhihong, XU Bing* (Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of Apatinib, a small-molecule vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor, on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia(AML) stem/progenitor cells and its molecule mechanism. **METHODS** The kg1 α cells and primary CD34⁺ AML stem cells were treated with a serial of concentrations of Apatinib for 48 h and 72 h, the inhibitory ratio was measured by CCK8 assay, the apoptosis percent was measured by flow cytometry. Western bolt was used to analyzed AKT/p-AKT, p-Raf and p-PTEN expression after treatment with 0, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Apatinib in kg1 α cells. **RESULTS** After treatment with a serial of Apatinib (2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on AML stem-like cell line(kg1 α) for 48 h and 72 h, the cell proliferation were significantly inhibited in a dose- and time-dependent mode. All the differences had statistical significance compared with control group. The results of Annexin V/PI showed that various concentration of Apatinib induced significantly apoptosis on kg1 α cells. After 48 h and 72 h, all the apoptosis percentage were significantly higher than control group($P<0.01$); Apatinib significantly induced apoptosis of 7 cases primary AML stem cell, the difference has statistical significance; Western blot results indicated decrease the expression of AKT/p-AKT and p-Raf, however, upregulated the level of p-PTEN. **CONCLUSION** Apatinib can inhibit the proliferation of AML stem/progenitor like cell line(kg1 α cells) and also induce the apoptosis of kg1 α and primary CD34⁺ AML stem cells. Its mechanism may be related with the PI3K/AKT signal pathway.

KEY WORDS: Apatinib; acute myeloid leukemia stem/progenitor like cell (kg1 α); PI3K/AKT pathway

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人急性白血病最常见的类型, 难治、复发是目前导致 AML 治疗失败的最根本原因, 临床中可分为 M0~M7 共 8 种。研究表明, 白血病干细

胞(leukemia stem cell, LSC)具有自我更新、无限增殖的潜能, 多处于细胞静止期(G0 期), 对传统的化疗药物不敏感, 是导致白血病复发及难治的根本原因^[1]。因此对 LSC 的靶向治疗是 AML 最根

作者简介: 李志峰, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: (0592)2137255
Tel: (0592)2137254 E-mail: xubingzhangjian@126.com

E-mail: lzf_xm@163.com *通信作者: 徐兵, 男, 博士, 主任医师

本的治疗策略。

目前很难获得足够研究的 LSC, 常规的方法是从白血病患者体内提取 LSC。有研究表明^[2-3], 男性急性微分化型粒细胞白血病(AML-M0)病人来源的 Kgl α 细胞系, 其高表达 CD34(98%)、CD123(90%), 多数不表达 CD38, 与目前公认 LSC 的免疫表型特征相一致, 且其高表达 P 糖蛋白对常规 AML 化疗药物耐药。可作为比较理想的 AML 干祖细胞样细胞进行相应的研究。

大量研究发现, 多种恶性血液病(白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤等)的发生发展同样与新生血管生成密不可分^[4-5]。新生血管形成有赖于促血管生成因子和抑血管生成因子的精密调控, 其中最重要的促血管生成因子是血管内皮生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 其主要通过与细胞膜表面的血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)结合而促进血管生成^[6]。自从 1971 年 Folkman 首次提出肿瘤的生长依赖于新生血管形成, 抗血管生成药逐步发展成为一种有效的抗肿瘤治疗手段, 且为当今肿瘤研究的主要热点之一。

Apatinib(YN968D1)是我国自主研发的一种选择性抑制 VEGFR2 的小分子化合物, 其亦可抑制 RET、c-KIT 及 c-Src 等^[7-8]。目前 II/III 临床试验结果显示, Apatinib 对多种实体瘤如胃癌、肝癌及乳腺癌等有显著杀伤作用^[9-12], 而关于其在 AML 干祖细胞中的作用尚不明确, 本实验探讨 Apatinib 对 AML 干祖细胞样细胞株 kg1 α 的杀伤作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂

甲磺酸阿帕替尼(江苏恒瑞医药股份有限公司); IMDM 培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(Hyclone 公司); CCK8(日本同仁化工 Dojindo 公司, 批号: JQ701); Annexin-V/APC 凋亡检测试剂盒(批号: 4283875)、抗人 CD34(批号: E10158-1635)及 CD38 抗体(批号: E11027-1634)均购于 eBioscience 公司; CD34 MicroBead Kit, human(德国 Miltenyi Biotec 公司, 货号: 130-046-703、130-092-263); RIPA 裂解液(碧云天公司); 兔抗 Akt、兔抗 p-Akt473 及兔抗 β -actin 单抗购于 Cell Signaling Technology (CST)公司。BD 公司的 FACS Aria 用

于 kg1 α 细胞的分选及周期检测, 而 BD AccuriC6 用于细胞凋亡的检测, Bio Tek 公司的 Synergy H1 多功能酶标仪用于检测 CCK8 实验的 OD 值。

1.2 仪器

CO₂ 培养箱(美国 Thermo scientific 公司); CX4 光学显微镜(日本 Olympus); 5804 离心机(德国 Eppendorf); Model 550 酶标仪(美国 Bio-Rad); FACSC6 和 FACS Aria 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 细胞株及其培养条件

在 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中, kg1 α 细胞置于含 10%胎牛血清的 IMDM 培养基中生长, 取对数生长期细胞离心, 台盼蓝染色并计数, 拒染率>98%者适用于实验。

1.4 细胞增殖和毒理试验

取对数生长期细胞悬液以每孔 5×10^4 接种于 96 孔板中, 分别设置 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 每孔 100 μL 细胞悬液, 并加入含 10%新生小牛血清的 IMDM 培养基 100 μL 作为空白对照组, 每个浓度均设 3 个复孔, 培养 24 h 后再加入 CCK8 工作液, 每孔 10 μL , 继续在培养箱中培养 2~4 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值(OD)。细胞抑制率(%)=(1-药物组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。

1.5 Annexin V-APC/PI 双染法流式细胞仪检测 Apatinib 处理后 kg1 α 细胞的凋亡

取对数生长期细胞悬液以每孔 2×10^5 接种于 24 孔板中, 共设置 0, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组, 作用 24 h 后离心收集细胞, 采用 PBS 洗涤 1 次, 弃上清, 加入 50 μL binding buffer 重新悬浮细胞, 再加入 0.5 μL Annexin V-APC 冰上避光染色 30 min, 后再用 binding buffer 洗涤 1 次, 弃上清, 再次加入 200 μL binding buffer 重新悬浮细胞后加入 1 μL PI, 5 min 后上机检测细胞凋亡状态。

1.6 Ficoll 淋巴细胞分离液密度梯度分离原代 AML 单个核细胞及免疫磁珠(Magnetic activated cell sorting, MACS)分选原代 CD34⁺AML 干细胞

将 AML 患者骨髓液和等体积的 PBS 充分混匀后, 沿着 50 mL 离心管管壁小心加至含有等体积的 Ficoll 淋巴细胞分离液中, 800×g 离心 30 min, 然后小心吸出中间白色薄膜层, 并重悬于等体积 PBS 中充分混匀, 用 600×g 离心 15 min, 弃上清, PBS 洗涤 1 次, 加入 PBS 混匀后计数;

每 1×10^7 个细胞加入 100 μL PBS 和 10 μL 的 CD34-APC 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 加 1 mL 的 PBS 洗涤 1 次, 弃上清, 加入 100 μL 的 PBS 和 10 μL 抗体 APC 的免疫磁珠, 混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15~20 min, 再用 PBS 洗涤 1 次, 弃上清, 重悬于 500 μL 分选液, 加到磁场 LD 柱中, 收集流出的细胞并计数。

1.7 Annexin V-APC/PI 双染法流式细胞仪检测 Apatinib 处理后原代 CD34⁺AML 干细胞的凋亡

取“1.6”项下分选后原代 CD34⁺AML 干细胞悬液以 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 24 孔板内, 设置 0, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组, 处理 48 h 后离心收集细胞, 然后进行凋亡检测, 具体步骤同“1.5”项下方法。

1.8 蛋白质印迹法检测 PI3K/AKT 通路蛋白的变化

设置 Apatinib(0, 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 48 h 后, 收集各个不同处理组的细胞, 用含有 1% 苯甲基磺酸 (phenyl methanesulfonyl fluoride, PMSF) 的 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解液, 于冰上裂解细胞 15 min, $12\,000 \times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取出上清, 根据 BCA 试剂盒说明书测蛋白浓度, 沸水浴变性 5 min 后, 取同等量蛋白样品用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 电泳完毕转至 PVDF 膜。转膜完成后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中室温封闭 1 h, 然后分别加入兔抗 p-Akt(1:1 000 稀释)、兔抗 Akt(1:1 000 稀释)、兔抗 β -actin (1:1 000 稀释), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上孵育过夜; TBST 洗涤 3 次(每次 5 min), 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:10 000 稀释)室温孵育 1 h, TBST 重新洗涤 3 次, 膜与化学发光底物反应 3~5 min 后, 暗室中 ECL 显色, X 射线片压片曝光。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 多组间均数比较使用多个独立样本的非参数检验或单因素方差法进行统计(方差不齐时考虑 Welch 校正), 方差齐时考虑使用 LSD(方差齐性)进行多重比较, 不齐时采用 Dunnett's T3 方法进行多重比较; 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准为 $\alpha=0.05$, 所有检验均为双侧检验。因样本量较小, 当出现参数检验与非参数检验结果不同时, 以非参数检验的结果为准, 并用 Bonferroni 法校正检验水准进行多重比较; 2 种方法结果相同时, 采用参数

方法的结论。

2 结果

2.1 CCK8 法检测 Apatinib 对 AML 干祖细胞样细胞株 kg1 α 细胞增殖的影响

结果显示, Apatinib 能明显抑制 kg1 α 细胞增殖, 呈剂量依赖性, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apatinib 分别作用于 kg1 α 细胞 48 h 后, 各组细胞活性为 $(92.32 \pm 0.82)\%$ 、 $(80.59 \pm 4.95)\%$ 、 $(61.75 \pm 0.47)\%$ 、 $(51.51 \pm 4.10)\%$ 和 $(26.42 \pm 4.20)\%$, 方差分析结果显示, 与对照组相比差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 48 h 的 IC_{50} 浓度为 $(16.98 \pm 0.08) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述浓度 Apatinib 分别作用于 kg1 α 细胞 72 h 后, 各组细胞活性为 $(88.42 \pm 2.91)\%$ 、 $(70.83 \pm 4.45)\%$ 、 $(47.87 \pm 1.59)\%$ 、 $(31.41 \pm 3.57)\%$ 、 $(13.26 \pm 1.96)\%$, 方差分析结果显示, 与对照组相比差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 72 h 的 IC_{50} 浓度为 $(10.05 \pm 0.08) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。独立样本 t 检验分析表明 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 72 h 细胞活性显著低于 48 h, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 Apatinib 抑制 kg1 α 细胞增殖呈时间依赖性。结果见图 1。

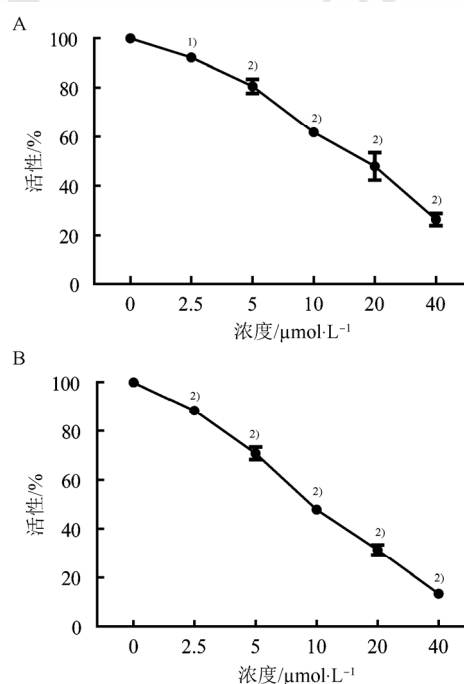


图 1 Apatinib 作用 48, 72 h 后明显抑制 AML 干祖细胞样细胞株 kg1 α 细胞的增殖

A-48 h; B-72 h; 与对照组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Apatinib significantly inhibited AML stem-like cells kg1 α proliferation after treating with 48, 72 h

A-48 h; B-72 h; compared with control group(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

2.2 流式细胞术检测 Apatinib 处理 AML 干祖细胞样细胞株 kg1α 细胞后的凋亡情况

Annexin V-APC/PI 双染法流式细胞术比较不同浓度的 Apatinib 作用于 kg1α 细胞 48 h 和 72 h 后诱导凋亡的情况。10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Apatinib 作用 kg1α 细胞 48 h 后, 各组凋亡率分别为 $(6.58\pm 0.45)\%$ 、 $(12.6\pm 2.34)\%$ 、 $(16.37\pm 4.38)\%$ 和 $(19.77\pm 2.55)\%$, 随浓度增加, 凋亡细胞比例逐渐增加, 呈剂量依赖性。方差分析表明, 不同浓度 Apatinib 能诱导 kg1α 细胞凋亡, 与对照组 $(4.57\pm 1.16)\%$ 比较差异有统计学意义 ($F=18.85$, $P<0.01$)。用 LSD 方法比较不同浓度 Apatinib 处理的 kg1α 细胞两两组间的细胞凋亡的差异, 结果表明, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比均具有明显的统计学差异 ($P<0.05$), 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比有明显的统计学差异 ($P<0.01$), 其余各组间差异无统计学

意义。

上述浓度 Apatinib 作用 kg1α 细胞 72 h 后各组凋亡比例为 $(10.83\pm 2.96)\%$ 、 $(15.38\pm 2.78)\%$ 、 $(24.95\pm 2.70)\%$ 和 $(35.17\pm 1.36)\%$, 凋亡比例随浓度增加而增加, 方差分析表明, 不同浓度 Apatinib 能诱导 kg1α 细胞凋亡, 与对照组 $(5.03\pm 1.11)\%$ 比较差异有统计学意义 ($F=79.425$, $P<0.01$)。用 LSD 方法比较不同浓度 Apatinib 处理的 kg1α 细胞两两组间的细胞凋亡比较的差异结果表明, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 20, 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 比较均具有统计学意义 ($P<0.05$), 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 比较均具有统计学意义 ($P<0.01$), 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 比较也具有统计学意义 ($P<0.01$)。30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Apatinib 处理 72 h 后凋亡比例显著高于 48 h, 差异具有统计学意义 (分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$)。显示 Apatinib 对 kg1α 细胞的杀伤作用还具有时间依赖性。结果见图 2。

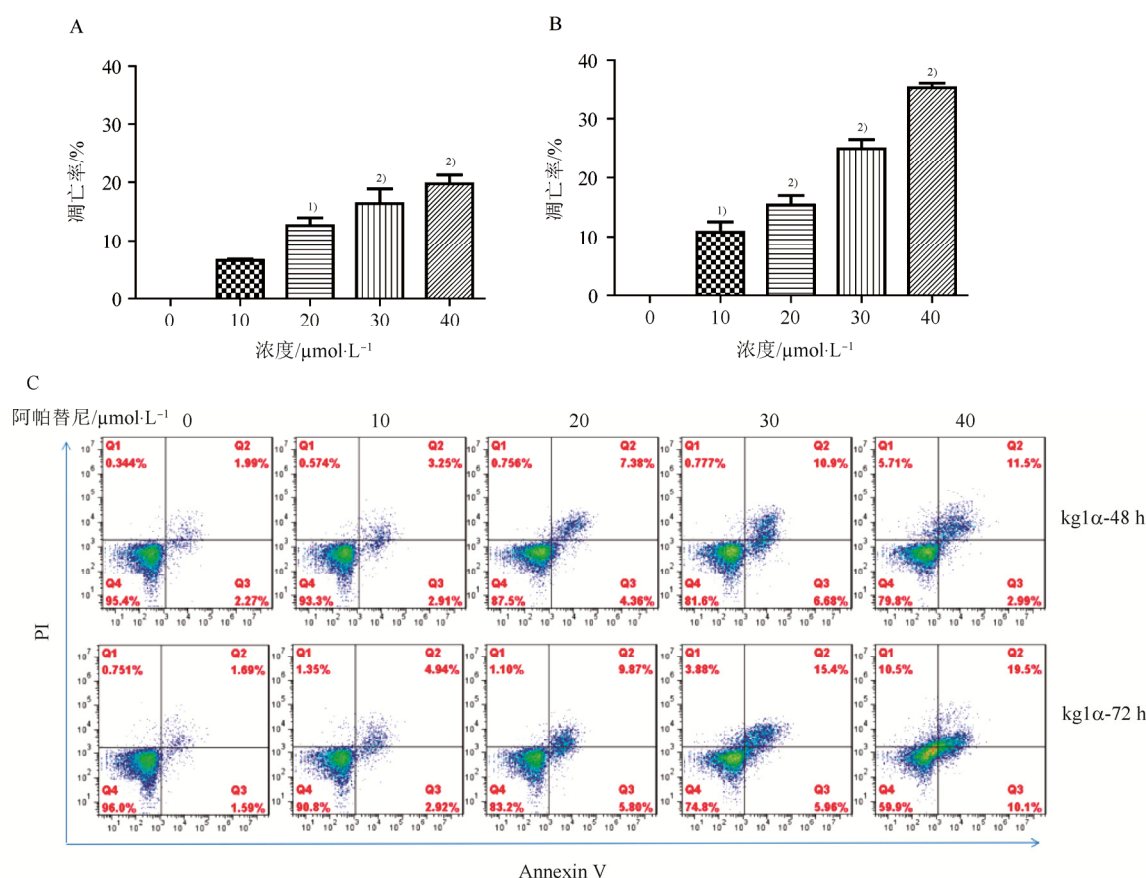


图 2 Apatinib 诱导 kg1α 细胞凋亡

A-48 h 后 kg1α 细胞的凋亡比例; B-72 h 后 kg1α 细胞的凋亡比例; C-典型的凋亡散点图; 与对照组 ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Apatinib induced kg1α cells apoptosis

A-The apoptotic percentage of kg1α after dealing with apatinib for 48 h; B-the apoptotic percentage of kg1α after dealing with apatinib for 72 h; C-flow cytometric analysis; compared with control group ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.3 Apatinib 诱导原代 CD34⁺AML 干细胞的凋亡情况

Annexin V-APC/PI 双染法流式细胞术检测 Apatinib 对不同患者来源的 CD34⁺ AML 干细胞的凋亡比例。研究结果显示, 不同浓度 Apatinib(10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 48 h, 对 7 例不同患者来源的 CD34⁺ AML 干细胞均有杀伤作用, 呈剂量依赖性, 凋亡比例分别为(32.83 $\pm$ 16.72)%, (41.91 $\pm$ 16.36)%, (51.48 $\pm$ 14.99)%, (53.50 $\pm$ 15.91)%, 与对照组(18.70 $\pm$ 11.48)%相比, 差异具有显著的统计学意义($F=6.219$, $P<0.01$)。结果见表 1 和图 3。

表 1 7 例 AML 患者的临床生物学特征

Tab. 1 Clinical biological characteristics of 7 patients

No	性别	年龄/岁	AML 分型	WBC/ $\times 10^9$	HGB/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	PLT/ $\times 10^9$
1	男	50	M5	113.57	72	82
2	男	81	M5b	217.53	91	27
3	女	53	M2	47.39	58	24
4	女	31	M2	60.38	61	55
5	男	56	M2b	49.52	59	46
6	男	67	M5	233.19	85	91
7	女	38	M5b	2.43	111	49

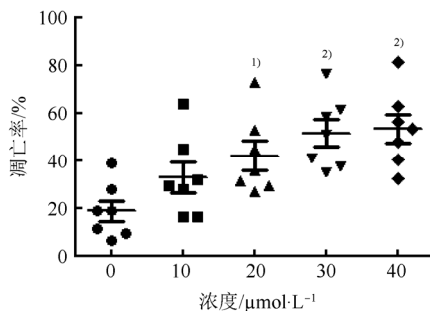


图 3 Apatinib 对不同来源 AML 干细胞的杀伤作用与对照组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 The apoptosis effect of Apatinib on AML stem cells derived from different sources

Compared with control group(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$.

2.4 Western blot 检测 Apatinib 作用于 kg1 α 细胞后 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达水平的变化

为了阐明 Apatinib 抑制 kg1 α 细胞的增殖及诱导凋亡的分子机制, Western blot 检测不同浓度 Apatinib 处理 kg1 α 细胞 48 h 后 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达变化。数据显示, 随着 Apatinib 浓度的增加, AKT/p-AKT 及 p-raf 表达降低, 而 PI3K/AKT 通路的负调控因子 PTEN 表达升高。据此推测, Apatinib 可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路从而抑制 kg1 α 细胞增殖和诱导其凋亡。结果见图 4。

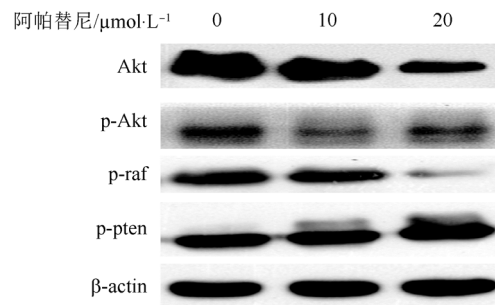


图 4 Apatinib 作用于 kg1 α 细胞 48 h 后 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达变化

Fig. 4 Western blot showed that Apatinib could modulate the PI3K/AKT signaling pathway-related proteins expression after treating with 48 h

3 讨论

急性髓系白血病是一组起源于造血干/祖细胞的恶性血液病, 在临床特性、细胞遗传学及分子生物学等方面具有高度异质性^[13]。随着高剂量联合化疗和造血干细胞移植的应用, AML 预后有所改善, 但难治复发仍是临床面临的一大难题。有研究表明 LSC 是导致白血病复发及难治的根本原因, 而目前治疗模式包括大剂量化疗、甚至造血干细胞移植仍无法完全消灭 LSC, 因此急需寻求一种杀伤和消灭 LSC 的新策略。

分子靶向治疗是目前恶性血液病研究领域的热点, 是指针对细胞受体、基因、调控分子等信号传导作为靶点的治疗, 研究最为广泛的靶向治疗药物主要有 EGFR 家族抑制剂、血管生成抑制剂、信号传导抑制剂和凋亡诱导剂等^[14-16], 其中最成功的典范是酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼(Imatinib)治疗慢性髓系白血病, 70%~80%患者可获长期生存。相对于传统的化疗药物, 分子靶向药物具有作用疗效好, 不良反应小等特性, 因此, 越来越多的学者专注于分子靶向药物的研究。

Apatinib(YN968D1)作为一种新型的小分子酪氨酸激酶抑制剂, 是 Valatinib 的类似物, 通过选择性抑制 VEGFR-2 活化从而发挥抗肿瘤血管新生。Tian 等^[8]证实 Apatinib 在体外和小鼠肿瘤移植模型中对多种实体瘤(如肺癌、结肠癌、胃癌及肝癌等)具有显著的杀伤作用。同时, Yan 等研究发现^[17], Apatinib 可逆转 P-gp 和 BCRP 等介导的多药耐药作用。目前 Apatinib 的 II/III 临床试验结果显示对胃癌、非小细胞肺癌、乳腺癌等具有一定的临床有效性^[9-12]。关于 Apatinib 对血液肿瘤的作用尚不明确, 本研究探讨 Apatinib 对 AML 干祖细

胞样细胞 kg1 α 的杀伤作用及其分子机制。研究发现 Apatinib 具有明显的抑制 kg1 α 细胞增殖, 呈剂量和时间依赖性, 48 h 和 72 h 的 IC₅₀ 浓度分别为 (16.98 $\pm$ 0.08) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 (10.05 $\pm$ 0.08) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究还表明 Apatinib 能诱导 kg1 α 细胞的凋亡, 也表现为浓度和时间依赖性。

受体型酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)广泛存在于体内多种生理过程中, 主要通过其下游的多条信号通路(如 PI3K/AKT、Src/STAT 及 RAS/Raf/MEK 等)调节细胞的增殖、分化、生存及凋亡等^[18]。大量研究表明, RTKs 及其下游通路的激活或发生突变常与肿瘤的发生发展相关, 抑制酪氨酸激酶的活性能有效控制肿瘤的生长。本研究显示小分子酪氨酸激酶抑制剂 Apatinib 作用于 kg1 α 细胞 48 h 能显著抑制 RTKs 下游的 PI3K/AKT 通路蛋白的表达, 如 AKT/p-AKT, 而上调此通路天然负调控因子 PTEN 的表达。

综上, 本研究结果显示在体外 Apatinib 能抑制 kg1 α 细胞增殖并诱导其凋亡, 其作用机制可能是通过抑制酪氨酸激酶活性, 进而阻断其下游 PI3K/AKT 通路的信号传导而发挥杀伤作用。

REFERENCES

- [1] GROVE C S, VASSILIOU G S. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(8): 941-951.
- [2] DE LEEUW D C, DENKERS F, OLTROF MC, et al. Attenuation of microRNA-126 expression that drives CD34+38-stem/progenitor cells in acute myeloid leukemia leads to tumor eradication [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(7): 2094-2105.
- [3] LI Y, CHEN K, ZHOU Y, et al. A New strategy to target acute myeloid leukemia stem and progenitor cells using chidamide, a histone deacetylase inhibitor [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015, 15(6): 493-503.
- [4] CHAND R, CHANDRA H, CHANDRA S, et al. Role of microvessel density and vascular endothelial growth factor in angiogenesis of hematological malignancies [J]. *Bone Marrow Res*, 2016(2016): 5043483. doi: 10.1155/2016/5043483.
- [5] IMAI N, SHIKAMI M, MIWA H, et al. t(8;21) acute myeloid leukaemia cells are dependent on vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor type2 pathway and Phosphorylation of Akt [J]. *Br J Haematol*, 2006, 135(5): 673-682.
- [6] ELLIS L M, HICKLIN D J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(8): 579-591.
- [7] PENG H, ZHANG Q, LI J, et al. Apatinib inhibits VEGF signaling and promotes apoptosis in intrahepatic Cholangiocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 17220-17229.
- [8] 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* [J]. *Cancer sci*, 2011, 102(7): 1374-1380.
- [9] AOYAMA T, YOSHIKAWA T. Targeted therapy: Apatinib-New third-line option for refractory gastric or GEJ cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(5): 268-270.
- [10] LI J, QIN S, XU J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase iii trial of apatinib in patients with chemo-therapy refractory advanced or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction [J]. *Am J Clin Oncol*, 2016, 34(13): 1448-1454.
- [11] GENG R, LI J. Apatinib for the treatment of gastric cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16(1): 117-122.
- [12] 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 [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(8): 1961-1969.
- [13] ESTEY E, DOHNER H. Acute myeloid leukaemia [J]. *Lancet*, 2006, 368(9550): 1894-907.
- [14] ZANIBONI A, FORMICA V. The best first anti-EGFR before anti-VEGF, in the first-line treatment of RAS wild-type Meta-Static colorectal cancer: from bench to bedside [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 78(2): 233-244.
- [15] LI K, LI J. Current molecular targeted therapy in advanced gastric cancer: a comprehensive review of therapeutic mechanism, clinical trials, and practical application [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016(2016): 4105615. doi: 10.1155/2016/4105615.
- [16] EMOLE J, TALABI T, PINILLA-IBARZ J. Update on the management of philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia: role of nilotinib [J]. *Biologics*, 2016(10): 23-31.
- [17] MI Y J, LIANG Y J, HUANG H B, et al. Apatinib (YN968D1) reverses multidrug resistance by inhibiting the efflux function of multiple ATP-binding cassette transporters [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 7981-7991.
- [18] REGAD T. Targeting RTK Signaling Pathways in cancer [J]. *Cancers(Basel)*, 2015, 7(3): 1758-1784.

收稿日期: 2016-07-11