



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.06

文章编号: 2095-1264(2022)01-0036-10

阿帕替尼联合阿霉素对外周 T 细胞淋巴瘤的抑制作用及机制研究[★]

左轶朗¹, 欧阳周^{2*}, 周 辉^{2*}

(¹南华大学衡阳医学院, 湖南省肿瘤医院研究生协作培养基地, 湖南 衡阳, 421001;

²湖南省肿瘤医院/中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院, 湖南 长沙, 410013)

摘要: **目的** 探讨抗血管生成药物阿帕替尼与常用化疗药物阿霉素联合应用对外周 T 细胞淋巴瘤 Hut78 细胞株的抑制作用以及相关分子作用机制, 为开发外周 T 细胞淋巴瘤治疗新方法提供实验依据。 **方法** 将 Hut78 细胞分为不同浓度药物处理组: 阿帕替尼单药 (10、20、40、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素单药 (1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿帕替尼+阿霉素 [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(60+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(60+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], 分别作用 72 h, 采用 CCK-8 法检测药物对细胞的增殖抑制作用。采用流式细胞术检测不同浓度药物处理组阿帕替尼单药 (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素单药 (1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿帕替尼+阿霉素 [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] 作用 24 h 后对 Hut78 细胞凋亡的影响。采用流式细胞术检测不同浓度阿帕替尼 (10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 24 h 后对 Hut78 细胞周期的影响。采用蛋白印迹法检测不同浓度药物处理组阿帕替尼单药 (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素单药 (1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿帕替尼+阿霉素 [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] 作用 24 h 后, Hut78 细胞中 PI3K/Akt 信号转导通路相关蛋白 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Caspase-3、Bax 的表达变化。 **结果** 不同浓度 (10、20、40、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的阿帕替尼作用 72 h 后, 细胞抑制率分别为 (13.42 $\pm$ 2.19)%、(19.52 $\pm$ 4.16)%、(31.49 $\pm$ 3.16)%、(52.88 $\pm$ 3.37)%, 72 h 的 IC_{50} 值为 (59.34 $\pm$ 0.31) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 各药物处理组与对照组两两比较, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=10.116$, $P=0.018$); 不同浓度 (1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的阿霉素分别作用 72 h 后, 细胞抑制率分别为 (15.82 $\pm$ 3.23)%、(31.70 $\pm$ 4.79)%、(42.34 $\pm$ 5.23)%, 72 h 的 IC_{50} 值为 (5.52 $\pm$ 0.18) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 各药物处理组与对照组两两比较, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=10.532$, $P=0.015$); 阿帕替尼+阿霉素 [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(60+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(60+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] 作用 72 h 的细胞抑制率分别为 (51.70 $\pm$ 2.09)%、(56.62 $\pm$ 4.83)%、(61.35 $\pm$ 1.79)%、(65.13 $\pm$ 3.88)%。两药的联合指数 (CI) <1 , 说明二者具有药物协同作用。阿帕替尼单药 (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素单药 (1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 24 h 的细胞凋亡率分别为 (15.65 $\pm$ 0.75)%、(13.85 $\pm$ 2.15)%、(23.60 $\pm$ 1.30)%, 阿帕替尼+阿霉素 [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] 作用 24 h 的细胞凋亡率分别为 (27.00 $\pm$ 1.90)%、(33.20 $\pm$ 2.30)%, 各药物处理组与对照组 [(6.10 $\pm$ 0.90)%] 比较, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=16.251$, $P=0.006$)。不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的阿帕替尼作用 24 h 后, G_0/G_1 期细胞比例随浓度升高而升高 [(49.27 $\pm$ 0.45)%、(50.34 $\pm$ 1.24)%、(59.16 $\pm$ 1.23)%], S 期细胞比例随浓度升高而降低 [(42.81 $\pm$ 2.22)%、(39.19 $\pm$ 2.71)%、(34.08 $\pm$ 1.01)%], 各药物处理组与空白对照组 [G_0/G_1 期 (39.26 $\pm$ 0.65)%, S 期 (49.40 $\pm$ 2.52)%] 比较, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。阿帕替尼单药 (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素单药 (1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及阿帕替尼+阿霉素 [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] 作用 24 h 后, PI3K/Akt 信号通路相关蛋白 PI3K、p-PI3K、p-Akt 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平呈下降趋势, 促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 的表达水平呈上升趋势, Akt 蛋白的表达水平无明显变化, 各药物处理组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2、Caspase-3 及 Bax 蛋白表达水平与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。 **结论** 阿帕替尼可抑制外周 T 细胞淋巴瘤细胞的增殖并诱导其凋亡, 同时具有细胞周期阻滞作用, 其作用可能是通过抑制 PI3K/Akt 信号通路激活实现的。阿帕替尼联合阿霉素对外周 T 细胞淋巴瘤细胞具有协同抑制作用。

[★]基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (2018JJ6024)。

作者简介: 左轶朗, 男, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤内科。

*通信作者: 周辉, 男, 硕士生导师, 主任医师, 研究方向: 肿瘤内科; 欧阳周, 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 肿瘤内科。

关键词: 阿帕替尼; 阿霉素; 外周 T 细胞淋巴瘤; 血管内皮生长因子

中图分类号: R733.4 文献标识码: A

Inhibitory effects of apatinib combined with adriamycin on peripheral T-cell lymphoma cells and its mechanism[★]

ZUO Yilang¹, OUYANG Zhou^{2*}, ZHOU Hui^{2*}

(¹Graduate Collaborative Training Base of Hunan Cancer Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China; ²Hunan Cancer Hospital / the Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effects of the anti-angiogenic drug apatinib and the commonly used chemotherapy drug adriamycin on the peripheral T-cell lymphoma (PTCL) cell line Hut78 and the related molecular mechanisms, in order to provide relevant experimental basis for the development of new treatment methods for PTCL. **Methods** Hut78 cells were divided into several groups with drug treatment of different concentrations: apatinib single agent (10, 20, 40, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); adriamycin single agent (1, 2, 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); apatinib + adriamycin [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (60+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (60+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]. After treatment for 72 h, CCK-8 method was used to detect the inhibitory effects of drugs on the cell proliferation. Flow cytometry was used to detect the effects of drugs on the apoptosis of Hut78 cells in different concentrations treatment groups [apatinib single agent (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), adriamycin single agent (1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), apatinib + adriamycin [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] after 24 h, as well as the effects on the cell cycle of Hut78 cells in groups with different concentrations of apatinib (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) after 24 h. Western blotting was used to detect the expressions of PI3K/Akt signal pathway-related proteins (PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt) and apoptosis-related proteins (Bcl-2, Caspase-3 and Bax) in Hut78 cells in groups with different concentrations of drugs [apatinib single agent (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), adriamycin single agent (1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), apatinib + adriamycin [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] after 24 h. **Results** After treated with different concentrations (10, 20, 40, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of apatinib for 72 h, the inhibition rates of Hut78 cells were (13.42 $\pm$ 2.19)%, (19.52 $\pm$ 4.16)%, (31.49 $\pm$ 3.16)%, (52.88 $\pm$ 3.37)%, respectively. The IC_{50} value at 72 h was (59.34 $\pm$ 0.31) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the differences were statistically significant between each treatment group and the control group ($\chi^2=10.116$, $P=0.018$). After treated with different concentrations (1, 2, 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of adriamycin for 72 h, the inhibition rates of Hut78 cells were (15.82 $\pm$ 3.23)%, (31.70 $\pm$ 4.79)%, (42.34 $\pm$ 5.23)%, respectively. And the IC_{50} value at 72 h was (5.52 $\pm$ 0.18) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the differences were statistically significant between each treatment group and the control group ($\chi^2=10.532$, $P=0.015$). After treated with apatinib + adriamycin [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (60+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (60+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] for 72 h, the inhibition rates of Hut78 cells were (51.70 $\pm$ 2.09)%, (56.62 $\pm$ 4.83)%, (61.35 $\pm$ 1.79)%, (65.13 $\pm$ 3.88)%, respectively. The combination index (CI) value of the two drugs was < 1, suggesting a synergistic effect of the two drugs. Moreover, the apoptosis rate of Hut78 cells in groups of apatinib single agent (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and adriamycin single agent (1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) after 24 h was respectively (15.65 $\pm$ 0.75)%, (13.85 $\pm$ 2.15)%, (23.60 $\pm$ 1.30)%; while that was respectively (27.00 $\pm$ 1.90)%, (33.20 $\pm$ 2.30)% in the apatinib + adriamycin groups [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]. The differences between each treatment group and the control group [(6.10 $\pm$ 0.90)%] was statistically significant ($\chi^2=16.251$, $P=0.006$). In addition, after treated with different concentrations of apatinib (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, the ratio of G₀/G₁ phase cells gradually increased [respectively (49.27 $\pm$ 0.45)%, (50.34 $\pm$ 1.24)%, (59.16 $\pm$ 1.23)%], while the proportion of S phase cells gradually decreased [respectively (42.81 $\pm$ 2.22)%, (39.19 $\pm$ 2.71)%, (34.08 $\pm$ 1.01)%]. The differences were statistically significant between each drug treatment group and the blank control group [G₀/G₁ phase ratio (39.26 $\pm$ 0.65)%, S phase ratio (49.40 $\pm$ 2.52)%] ($P<0.05$). Besides, after treatment with apatinib single agent (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), adriamycin single agent (1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), apatinib + adriamycin [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] for 24 h, the expression levels of PI3K/Akt signaling pathway-related proteins (PI3K, p-PI3K, p-Akt) and anti-apoptotic protein (Bcl-2) showed a downward trend, while the expression levels of the apoptotic proteins (Caspase-3 and Bax) showed an upward trend, and the expression level of Akt protein did not show a significant change. The protein expression levels of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, Bcl-2, Caspase-3, and Bax in each drug treatment group were statistically different from those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Apatinib can inhibit the proliferation of PTCL cells, induce their apoptosis, and have a cell cycle arrest effect. Apatinib may inhibit the activation of PI3K/Akt signaling pathway and play a role in killing PTCL cells. Apatinib combined with adriamycin can exert a synergistic inhibitory effect on peripheral T-cell lymphoma cells.

Keywords: Apatinib; Adriamycin; Peripheral T-cell lymphoma; Vascular endothelial growth factor

前言

外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T-cell lymphoma, PTCL)是一组起源于胸腺后成熟 T 细胞的恶性疾病。中国的 PTCL 发病率约占非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)的 25%~30%,显著高于欧美国家的 10%~15%^[1-2]。PTCL 的传统治疗方法为 CHOP 方案(环磷酰胺、长春新碱、阿霉素、泼尼松)或者 CHOP 样方案(依托泊苷、环磷酰胺、长春地辛、阿霉素、泼尼松)化疗。PTCL 对一线化疗方案的总应答率为 50%~70%^[3],中位无进展生存期(median progression-free survival, mPFS)为 12~14 个月,治疗后 5 年无进展生存率(progression-free survival, PFS)约为 30%。国际 T 细胞淋巴瘤组发现,除间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)阳性的间变性大细胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphoma, ALCL)外,其余类型 PTCL 的 5 年总生存率均低于 50%^[4],长期生存率<30%^[5]。尽管近年来有临床研究证实,抗 CD30 单抗联合 CHOP 方案能有效改善部分 CD30⁺ PTCL 患者的生存,但临床上仍有相当数量的复发/难治性外周 T 细胞淋巴瘤(re-lapsed/refractory peripheral T-cell lymphoma, r/r PTCL)难以治愈,这些患者通常预后不良,中位总生存期(overall survival, OS)≤6 个月^[6]。因此,探索 PTCL 治疗的新靶点及联合用药,提高患者生存率,改善其预后,是临床亟需解决的难题。

恶性肿瘤的血管生成与其生长及转移密切相关。在已有的毛细血管网基础上形成新的血管即称作新生血管生成,其过程主要是内皮细胞的大量增殖、迁移及胞外基质降解,形成新血管等多个步骤^[7]。在血管堵塞、外伤等特殊情况下,新生血管生成可对血供的恢复及伤口的加速愈合起到积极作用。而对于恶性肿瘤,新生血管生成主要的作用是促进其生长和转移,因为肿瘤的生长过程需要足够的营养物质并排泄代谢产物,而这些正是新生血管的重要作用^[8]。有研究表明,对肿瘤血管生成具有重要调节作用的主要是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)/血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)信号通路。当前,VEGF/VEGFR 信号通路为众多学者所关注和研究,其主要研究内容为其作

用机制与相关抗肿瘤药物的研发。

阿帕替尼(apatinib)是新一代小分子 VEGFR2 抑制剂,可通过高选择性竞争 VEGFR2 的 ATP 结合位点,阻断其与 VEGF 结合,高效抑制血管生成并减少下游信号的转导,切断肿瘤组织的营养供给并诱导肿瘤细胞凋亡^[9]。2014 年 12 月,国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)正式批准阿帕替尼用于胃癌三线及以上治疗^[10]。阿帕替尼在肺癌、肝癌、乳腺癌等实体瘤中的抗肿瘤作用也均有文献报道^[11-13]。另有多项研究显示,化疗药物如阿霉素(adriamycin)、顺铂(cisplatin)、紫杉醇(paclitaxel)等细胞毒药物可使肿瘤负荷降低,肿瘤细胞反馈性地使 VEGF 表达上调,此时序贯联用 VEGFR2 抑制剂阻断配体与受体结合,使 VEGF 无法发挥作用,减少肿瘤血管生成,促进肿瘤细胞凋亡,从而达到更好的抗肿瘤疗效^[14-17]。一项 II 期临床试验^[18]评估了贝伐单抗(抗 VEGF 单克隆抗体)联合 CHOP 方案在 PTCL 中的疗效,结果显示有 49%(19/39)的患者达到完全缓解(complete remission, CR),41%(16/39)的患者达到部分缓解(partial response, PR),中位无进展生存期(progress free survival, PFS)和 OS 分别为 7.7 个月和 22 个月。另有研究报道,使用恩度(重组人血管内皮抑制素)联合 CHOP 方案治疗 PTCL,在 73.3%(11/15)的 VEGFR2 高表达患者中,5 年 PFS 率和 OS 率分别为 71% 和 86%,疗效显著优于低表达患者(5 年 PFS 率和 OS 率均为 25%)^[19]。目前,阿帕替尼在 PTCL 中的研究报道较少,其具体作用机制尚不明确。因此,本研究结合 PTCL 独特的疾病病程以及临床预后特点,着力探讨阿帕替尼与常规化疗药物阿霉素联合应用对 PTCL 细胞株的抑制作用以及相关分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞处理 外周 T 细胞淋巴瘤 Hut78 细胞株购自中国科学院上海细胞库,用 RPMI 1640 普通培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验,台盼蓝染色,活性率>95%。

1.2 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率 取对数生长期 Hut78 细胞,1000 r·min⁻¹ 离心 5 min,去除上层液体,再加入培养基缓慢重悬细胞,进行细胞计数。

于 96 孔细胞培养板中每孔缓慢加入 100 μL 细胞液,并于细胞孔周围加入无菌 PBS,每孔 100 μL 。细胞种板完成后设置空白组(完全培养基)、对照组(细胞液)、不同浓度的药物处理组{阿帕替尼单药(10、20、40、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素单药(1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿帕替尼+阿霉素[(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(60+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(60+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]},每组 3 个复孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中继续培养 72 h,用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度(optical density, OD)。细胞增殖抑制率=[1-(OD_{药物组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组})] $\times$ 100%;IC₅₀ 定义为生长抑制率达到 50% 时的药物浓度,使用 SPSS 软件计算。

1.3 Annexin V-APC/PI 双染法检测细胞凋亡 取对数生长期 Hut78 细胞,于 24 孔细胞培养板中每孔加入 1 mL 细胞液。细胞种板后设置空白对照组(细胞液)、不同浓度的药物处理组{阿帕替尼单药(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素单药(1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿帕替尼+阿霉素[(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]},每组 3 个复孔,置于恒温培养箱中继续培养 24 h。将 Annexin V-APC/PI 凋亡试剂盒中的 10 $\times$ Binding Buffer 稀释至 1 $\times$ 。收集细胞,加入适量 PBS,1000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 次,去除剩余培养基,加入 100 μL 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞,再加入 5 μL Annexin V-APC 室温避光孵育 10~15 min,最后加入 5 μL Propidium Iodide 轻轻混匀。使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.4 PI 染色法检测细胞周期 取对数生长期 Hut78 细胞,于 6 孔细胞培养板中每孔加入 2.4 mL 细胞液。细胞种板后设置对照组(细胞液)、不同浓度阿帕替尼组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、置于恒温培养箱继续培养 24 h。收集细胞,1000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去除上层液体,加入预冷的 PBS 重悬细胞,1000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 继续离心 5 min。加入预冷的 PBS,缓慢吹打细胞使其分布均匀,于 2 min 内加入适量预冷的无水乙醇,边加边混匀,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日吸取细胞液于离心管中,1000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,小心去除上清后用 PBS 洗涤,再次离心。加入 150 μL PI 工作液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min。将细胞液经筛网过滤为单个细胞状态,转至流式检测管,上机检测。

1.5 Western blotting 检测蛋白表达 在 12 孔板中接种适量 Hut78 细胞[(1~2) $\times$ 10⁵ 个/孔],分别设置空白对照组、药物处理组{阿帕替尼单药(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素单药(1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿帕替尼+

阿霉素[(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]},每组设 3 个复孔,处理 24 h。收集细胞,PBS 洗涤 2 次。加入适量蛋白裂解液充分混匀,置于冰上裂解 20~30 min。使用 BCA 法检测蛋白浓度。配置分离胶和积层胶,将蛋白样品上样电泳,取出电泳后的夹子,根据目标蛋白相对分子量大小将胶裁剪好,盖上有滤纸和海绵垫的转模板。转膜结束后,取出 PVDF 膜,加入封闭液摇床孵育 1 h,TBST 反复漂洗。将 PVDF 膜加入含目标蛋白一抗的离心管中,使之完全浸没,摇床孵育 1 h。将蛋白条带小心取出,于摇床上用 TBST 反复漂洗 15 min。加入稀释的相应二抗,摇床孵育 1~2 h。用 TBST 将蛋白条带反复漂洗约 15 min。在暗室中倒入适量定影液、显影液、清水。打开胶片匣子,取出胶片做好标记后铺于蛋白条带上,关闭胶片匣子,调至合适的曝光时间。取出胶片,轻柔放入显影液中缓慢摇晃直至显影,再放入定影液中小心摇晃。扫描晾干后的胶片,用凝胶图像处理系统分析蛋白条带分子量,Image J 软件检测条带灰度值。相对灰度值=目的蛋白灰度值/内参灰度值。

1.6 统计学分析 研究数据使用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。两组间独立样本的均数比较采用独立 t 检验,两组间均数比较采用单因素方差分析,多组间均数比较使用 Kruskal-Wallis H 非参数检验,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 药物作用 72 h 后对 Hut78 细胞增殖的作用

2.1.1 阿帕替尼对 Hut78 细胞增殖的作用 不同浓度(10、20、40、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的阿帕替尼分别作用 72 h 后,细胞抑制率分别为(13.42 $\pm$ 2.19)%、(19.52 $\pm$ 4.16)%、(31.49 $\pm$ 3.16)%、(52.88 $\pm$ 3.37)%,72 h 的 IC₅₀ 值为(59.34 $\pm$ 0.31) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,与对照组比较,差异具有统计学意义($\chi^2=10.116$, $P=0.018$)(图 1)。

2.1.2 阿霉素对 Hut78 细胞增殖的抑制作用 不同浓度(1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的阿霉素分别作用 72 h 后,细胞抑制率分别为(15.82 $\pm$ 3.23)%、(31.70 $\pm$ 4.79)%、(42.34 $\pm$ 5.23)%,72 h 的 IC₅₀ 值为(5.52 $\pm$ 0.18) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,与对照组比较,差异具有统计学意义($\chi^2=10.532$, $P=0.015$)(图 2)。

2.1.3 阿帕替尼联合阿霉素对 Hut78 细胞增殖的抑制作用增强 阿帕替尼联合阿霉素作用 72 h 后,细

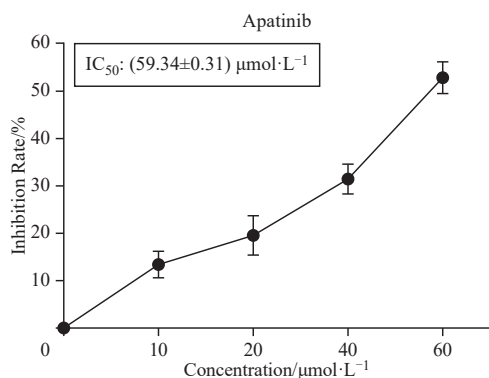


图 1 不同浓度阿帕替尼作用 72 h 对 Hut78 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of apatinib on the proliferation of Hut78 cells after 72 h

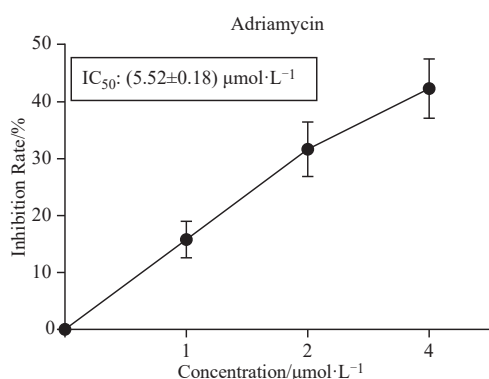


图 2 不同浓度阿霉素作用 72 h 对 Hut78 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of adriamycin on the proliferation of Hut78 cells after 72 h

胞抑制率均高于单药组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。根据前期预实验结果,阿帕替尼单药(40、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 Hut78 细胞的增殖抑制率分别为 31.49% 和 52.88%,阿霉素单药(1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 Hut78 细胞的增殖抑制率分别为 15.82% 和 31.70%。本研究使用 Compusyn 软件进一步对阿帕替尼与阿

霉素的联合指数(combination index, CI)进行分析,其中,CI<1 表示两药呈协同作用,CI=1 表示两药呈简单相加作用,CI>1 表示两药呈拮抗作用。阿帕替尼+阿霉素[(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(60+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(60+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]处理 72 h 后,CI<1,即阿帕替尼与阿霉素对 Hut78 细胞具有协同抑制作用(表 1)。

表 1 阿帕替尼联合阿霉素对 Hut78 细胞增殖的影响

Tab. 1 The effects of apatinib combined with adriamycin on the proliferation of Hut78 cells

组别	细胞增殖抑制率/%	CI
阿帕替尼单药(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	31.49±3.16	—
阿帕替尼单药(60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	52.88±3.37	—
阿霉素单药(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	15.82±3.23	—
阿霉素单药(2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	31.70±4.79	—
阿帕替尼+阿霉素[(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	51.70±2.09	0.85
阿帕替尼+阿霉素[(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	56.62±4.83	0.89
阿帕替尼+阿霉素[(60+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	61.35±1.79	0.96
阿帕替尼+阿霉素[(60+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	65.13±3.88	0.97

2.2 药物作用 24 h 后可诱导 Hut78 细胞凋亡

阿帕替尼单药(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、阿霉素单药(1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组的细胞凋亡率分别为(15.65±0.75)%、(13.85±2.15)%、(23.60±1.30)%,阿帕替尼+阿霉素[(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]组的细胞凋亡率分别为(27.00±1.90)%、(33.20±2.30)%,凋亡比例逐渐上升,表明不同浓度的阿帕替尼、阿霉素及两药联合均能诱导 Hut78 细胞凋亡,与对照组[(6.10±0.90)%]比较,差异具有统计学意义($\chi^2=16.251$, $P=0.006$)(图 3、表 2)。

表 2 不同药物作用 24 h 后 Hut78 细胞凋亡率比较

Tab. 2 Comparison of apoptosis rate of Hut78 cells after treatment with different drugs for 24 h

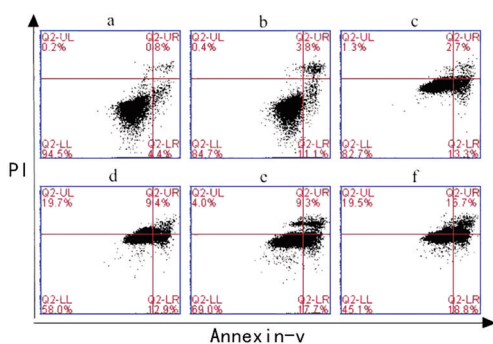
组别	细胞凋亡率/%	χ^2	P
对照组	6.10±0.90		
阿帕替尼单药(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	15.65±0.75		
阿霉素单药(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	13.85±2.15		
阿霉素单药(2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	23.60±1.30	16.251	0.006
阿帕替尼+阿霉素[(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	27.00±1.90		
阿帕替尼+阿霉素[(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	33.20±2.30		

2.3 药物作用 24 h 对 Hut78 细胞周期的影响

随着阿帕替尼(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度的增

加,Hut78 细胞 G₁期比例逐渐升高,S 期和 G₂/M 期比例逐渐降低,与空白对照组比较,差异具有统计学

意义($P<0.05$),说明不同浓度的阿帕替尼可不同程度地将 Hut78 细胞阻滞于 G_0/G_1 期(图 4、表 3)。

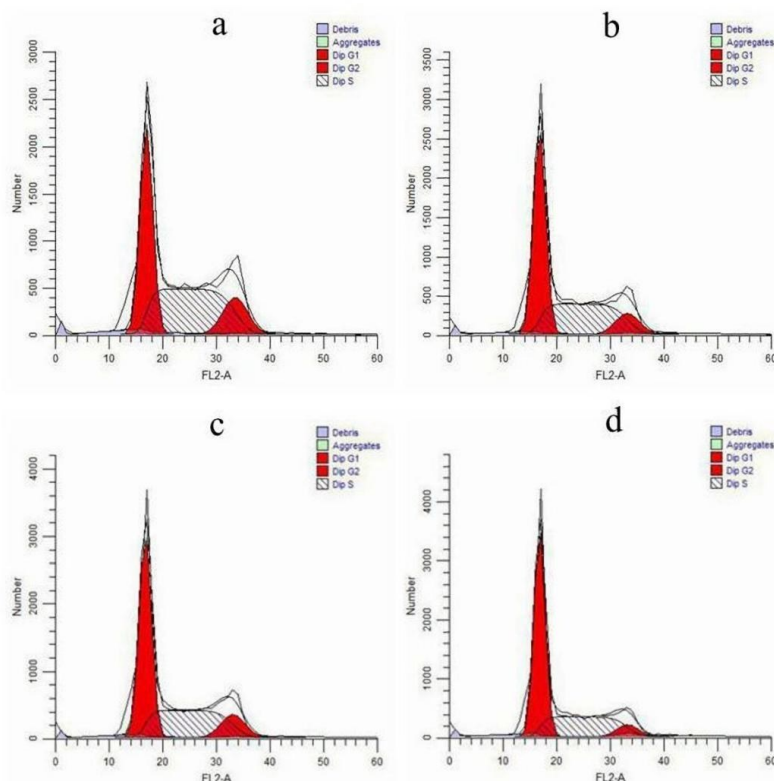


注:(a)空白对照;(b)阿帕替尼单药($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);(c)阿霉素单药($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);(d)阿霉素单药($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);(e)阿帕替尼+阿霉素[($40+1$) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$];(f)阿帕替尼+阿霉素[($40+2$) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]。

Note: (a) Blank control; (b) Apatinib single drug ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (c) Adriamycin single drug ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (d) Adriamycin single drug ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (e) Apatinib + adriamycin [($40+1$) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]; (f) Apatinib + adriamycin [($40+2$) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$].

图 3 不同药物诱导 Hut78 细胞凋亡的散点图

Fig. 3 Scatter plot of Hut78 cell apoptosis induced by treatment of different drugs



注:(a)空白对照;(b)阿帕替尼单药($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);(c)阿帕替尼单药($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);(d)阿帕替尼单药($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

Note: (a) Blank control; (b) Apatinib single drug ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (c) Apatinib single drug ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (d) Apatinib single drug ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

图 4 不同浓度阿帕替尼对 Hut78 细胞周期的影响

Fig. 4 Effects of apatinib of different concentrations on the cell cycle of Hut78

表 3 不同浓度阿帕替尼对 Hut78 细胞周期的影响

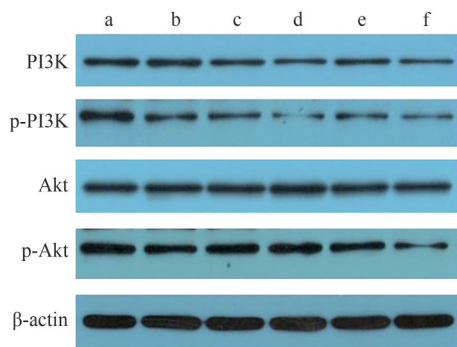
Tab. 3 Effects of apatinib of different concentrations on the cell cycle of Hut78

阿帕替尼	细胞周期比例/%		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	39.26±0.65	49.40±2.52	11.34±3.18
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	49.27±0.45	42.81±2.22	7.92±1.89
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50.34±1.24	39.19±2.71	10.47±1.47
40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	59.16±1.23	34.08±1.01	6.76±0.22

2.4 药物对 Hut78 细胞相关蛋白表达水平的影响

2.4.1 药物处理 24 h 后 Hut78 细胞中相关蛋白的表达变化 不同药物处理组的 PI3K/Akt 通路蛋白 PI3K、p-PI3K、p-Akt 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平有所下降,促凋亡蛋白 Caspase-3、Bax 的表达水平升高,而 Akt 的表达水平无明显变化(图 5-6)。

2.4.2 不同蛋白表达量的灰度分析 各药物处理组 PI3K、p-PI3K、p-Akt 及 Bcl-2 蛋白的表达水平均低于对照组, Caspase-3、Bax 蛋白的表达水平均高

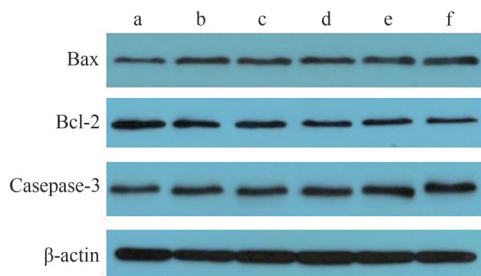


注: (a) 空白对照; (b) 阿帕替尼单药 (40 μmol·L⁻¹); (c) 阿霉素单药 (1 μmol·L⁻¹); (d) 阿霉素单药 (2 μmol·L⁻¹); (e) 阿帕替尼+阿霉素 [(40+1) μmol·L⁻¹]; (f) 阿帕替尼+阿霉素 [(40+2) μmol·L⁻¹].

Note: (a) Blank control; (b) Apatinib single agent (40 μmol·L⁻¹); (c) Adriamycin single agent (1 μmol·L⁻¹); (d) Adriamycin single agent (2 μmol·L⁻¹); (e) Apatinib + Adriamycin [(40+1) μmol·L⁻¹]; (f) Apatinib + Adriamycin [(40+2) μmol·L⁻¹].

图 5 不同药物处理后 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达情况

Fig. 5 Expressions of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt proteins after treatment with different drugs



注: (a) 空白对照; (b) 阿帕替尼单药 (40 μmol·L⁻¹); (c) 阿霉素单药 (1 μmol·L⁻¹); (d) 阿霉素单药 (2 μmol·L⁻¹); (e) 阿帕替尼联合阿霉素 [(40+1) μmol·L⁻¹]; (f) 阿帕替尼联合阿霉素 [(40+2) μmol·L⁻¹].

Note: (a) Blank control; (b) Apatinib single agent (40 μmol·L⁻¹); (c) Adriamycin single agent (1 μmol·L⁻¹); (d) Adriamycin single agent (2 μmol·L⁻¹); (e) Apatinib + Adriamycin [(40+1) μmol·L⁻¹]; (f) Apatinib + Adriamycin [(40+2) μmol·L⁻¹].

图 6 不同药物处理后 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达情况

Fig. 6 Expressions of Bax, Bcl-2, Caspase-3 proteins after treatment with different drugs

于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 7)。

3 讨论

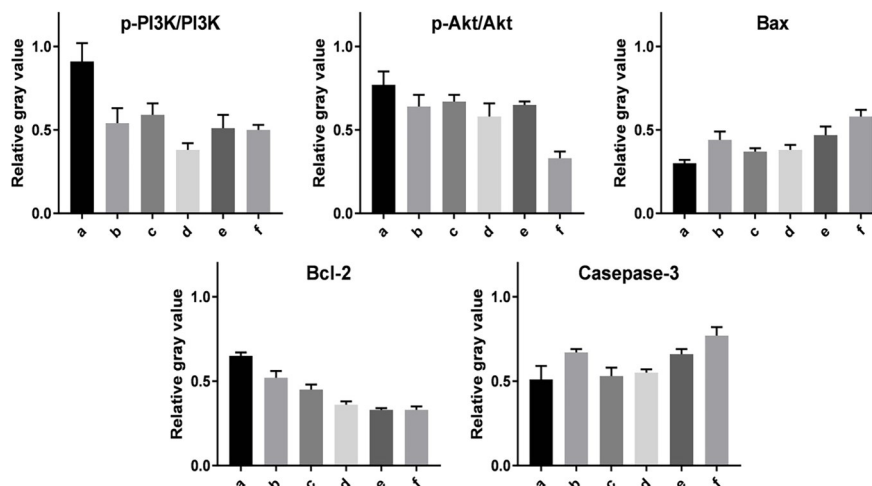
PTCL 是我国最常见的 T 细胞淋巴瘤之一,起源于胸腺后成熟 T 细胞,具有明显的临床和分子生物学异质性^[3, 20]。目前,化疗仍是 PTCL 的主要治疗方式,含蒽环类药物的化疗如 CHOP 方案和 CHOP 样方案是常用的一线治疗方案,但反应率普遍较低,预后较差^[4, 21-22]。阿帕替尼作为我国研发的新一代

小分子 VEGFR2 抑制剂,可特异性结合 VEGFR2 的 ATP 位点,抑制 VEGFR2 酪氨酸激酶活性,高效抑制肿瘤血管生成。但有研究报道,长期单独用药会使机体产生一定的耐药性,从而削弱其疗效,而合理的联合用药可以减轻药物的毒副作用,甚至提高疗效^[23-24]。以肿瘤药物的作用机制及肿瘤细胞的增殖动力学为依据联合用药,是近年来抗肿瘤治疗的新趋势。阿霉素是临床常用的蒽环类抗肿瘤药物,是 PTCL 的一线化疗药物,具有疗效好、抗瘤谱广的特点^[25],可通过干扰核酸代谢或有丝分裂,达到阻止肿瘤细胞持续生长的目的。进入肿瘤细胞内部的化疗药物被细胞膜上的 ABC 转运蛋白排出,是肿瘤耐药的主要原因之一^[24]。有研究证明,阿帕替尼与化疗药物联用可有效抑制细胞膜转运蛋白的外排功能,甚至逆转耐药^[26]。

结合 PTCL 独特的疾病病程以及临床预后特点,本研究采用阿帕替尼联合常规化疗药物阿霉素,探索其对 PTCL 细胞株 Hut78 的抑制作用以及相关分子作用机制。CCK8 结果显示,阿帕替尼可在体外抑制 Hut78 细胞的增殖,且与阿霉素联用后,细胞增殖抑制作用显著增强。既往研究报道,阿帕替尼在伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤以及弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞株中的 IC₅₀ 值分别为 (19.26±0.10) μmol·L⁻¹、(20.07±0.22) μmol·L⁻¹ 和 (15.29±0.13) μmol·L⁻¹^[27],而本研究中阿帕替尼的 IC₅₀ 值为 (59.34±0.31) μmol·L⁻¹。分析其原因,首先,本研究使用的是 PTCL 细胞株,与 B 细胞淋巴瘤相比,恶性程度可能更高,导致药物作用剂量相应增大;其次,阿帕替尼对不同类型淋巴瘤的具体作用机制可能不同,以至于不同实验结果显示的药物剂量差距较大。

相关研究表明^[28-30],抗 VEGFR 靶向药物作用于 VEGF/VEGFR 轴后,其主要杀伤作用是通过诱导细胞凋亡的方式实现的。因此,根据细胞增殖抑制实验结果,本研究选择了特定浓度的阿帕替尼、阿霉素及两药联合处理 Hut78 细胞 24 h,发现凋亡实验结果与增殖抑制实验结果具有一致性,提示阿帕替尼可诱导 PTCL 细胞凋亡,且联合阿霉素后作用进一步增强。

既往文献报道,不同血管生成抑制剂对细胞周期的阻滞不尽相同^[31]。研究显示,索拉菲尼 (sorafenib)、BD0801 在胃肠道肿瘤以及肝癌中具有促进 G₀/G₁ 期阻滞的作用^[32-33],而在卵巢癌中以 G₂/M



注:(a)空白对照;(b)阿帕替尼单药($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);(c)阿霉素单药($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);(d)阿霉素单药($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);(e)阿帕替尼+阿霉素[(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$];(f)阿帕替尼+阿霉素[(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$].

Note: (a) Blank control; (b) Apatinib single agent ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (c) Adriamycin single agent ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (d) Adriamycin single agent ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (e) Apatinib + adriamycin [(40+1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]; (f) Apatinib + adriamycin [(40+2) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$].

图7 不同蛋白条带的灰度分析结果

Fig. 7 Histogram of gray analysis results

期阻滞为主^[34]。为探索阿帕替尼在PTCL中的细胞周期阻滞作用,本研究通过流式细胞仪检测了不同浓度阿帕替尼作用于Hut78细胞24 h后对细胞周期的影响,结果显示,随着阿帕替尼浓度的增加,Hut78细胞G₀/G₁期比例逐渐升高,S期比例逐渐降低,提示阿帕替尼对PTCL细胞有较强的G₀/G₁期阻滞作用,并呈剂量依赖性。

VEGF/VEGFR 信号通路的激活与恶性肿瘤的发生、发展密切相关,而其下游的PI3K/Akt 信号通路被认为是肿瘤细胞抗凋亡的重要途径。本研究结果显示,阿帕替尼单药、阿霉素单药以及阿帕替尼联合阿霉素处理Hut78细胞24 h后,PI3K、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平呈不同程度的下降,提示阿帕替尼和阿霉素可抑制PI3K/Akt 信号通路。同时,各药物处理组抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平呈不同程度的下降,促凋亡蛋白Caspase-3、Bax的表达水平呈不同程度的上升,而Akt蛋白的表达水平无明显变化。因此,我们认为阿帕替尼竞争性抑制VEGFR2后,可导致VEGF/VEGFR 信号通路受到抑制,从而抑制其下游PI3K/Akt 信号通路,最终抑制PTCL细胞增殖,并在一定程度上诱导其凋亡,发挥抗肿瘤作用。

靶向治疗是抗肿瘤研究的热点及重点。靶向VEGF/VEGFR 信号通路的药物包括以VEGF为靶点的单克隆抗体以及VEGFR2小分子抑制剂等,因其

强大的抗肿瘤作用在临床上的应用愈发广泛^[35-36]。本研究的主要目的是检测阿帕替尼单药以及阿帕替尼联合常规化疗药物阿霉素对PTCL细胞的杀伤作用,为PTCL的治疗提供新的选择,对NHL的其他亚型也有一定程度上的参考意义。可以期待未来阿帕替尼能逐步应用于血液肿瘤患者,改善其预后并提高长期生存率。

本研究也存在以下不足:首先,本实验结果未在体内进行验证;其次,增殖抑制实验结果显示阿帕替尼的IC₅₀值较高,可能在一定程度上提示其发生毒副作用的风险也较大。后续我们将通过动物模型在体内验证这些结果,并观察其毒副作用。

参考文献

- [1] 李小秋,李甘地,高子芬,等. 中国淋巴瘤亚型分布:国内多中心性病例10002例分析[J]. 诊断学理论与实践, 2012, 11(2): 111-115. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2870.2012.02.006.
- [2] VOSE J, ARMITAGE J, WEISENBURGER D, et al. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(25): 4124-4130. DOI: 10.1200/jco.2008.16.4558.
- [3] HORWITZ S M, ANSELL S, AI W Z, et al. NCCN GUIDELINES® INSIGHTS - T-CELL LYMPHOMAS, VERSION 1.2021 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2020, 18(11): 1460-1467. DOI: 10.6004/jnccn.2020.0053.
- [4] XIE C Q, LI X, ZENG H, et al. Molecular insights into pathogenesis and targeted therapy of peripheral T cell lymphoma [J]. Exp Hematol Oncol, 2020, 9(1): 30. DOI: 10.1186/s40164-020-00188-w.

- [5] NG S Y, JACOBSEN E D. Peripheral T-cell lymphoma: moving toward targeted therapies [J]. *Hematol Clin N Am*, 2019, 33(4): 657–668. DOI: 10.1016/j.hoc.2019.04.002.
- [6] ABOUYABIS A N, SHENOY P J, LECHOWICZ M J, et al. Incidence and outcomes of the peripheral T-cell lymphoma subtypes in the United States [J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(11): 2099–2107. DOI: 10.1080/10428190802455867.
- [7] MCCORMICK F. New-age drug meets resistance [J]. *Nature*, 2001, 412(6844): 281–282. DOI: 10.1038/35085665.
- [8] SHIBUYA M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis [J]. *BMB Rep*, 2008, 41(4): 278–286. DOI: 10.5483/bmbrep.2008.41.4.278.
- [9] SAMSON P, LOCKHART A C. Biologic therapy in esophageal and gastric malignancies: current therapies and future directions [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2017, 8(3): 418–429. DOI: 10.21037/jgo.2016.11.13.
- [10] 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. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.53.
- [11] XU J, LIU X, YANG S, et al. Clinical response to apatinib monotherapy in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2018, 14(3): 264–269. DOI: 10.1111/ajco.12834.
- [12] KOU P, ZHANG Y, SHAO W, et al. Significant efficacy and well safety of apatinib in an advanced liver cancer patient: a case report and literature review [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 20510–20515. DOI: 10.18632/oncotarget.14724.
- [13] LIN Y, WU Z, ZHANG J, et al. Apatinib for metastatic breast cancer in non-clinical trial setting: Satisfying efficacy regardless of previous anti-angiogenic treatment [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317711033. DOI: 10.1177/1010428317711033.
- [14] PENG X C, QIU M, WEI M, et al. Different combination schedules of gemcitabine with endostar affect antitumor efficacy [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(1): 239–246. DOI: 10.1007/s00280-011-1695-8.
- [15] DE MELLO R A, COSTA B M, REIS R M, et al. Insights into angiogenesis in non-small cell lung cancer: molecular mechanisms, polymorphic genes, and targeted therapies [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2012, 7(1): 118–131. DOI: 10.2174/157489212798357994.
- [16] YOSHIKAWA A, SAURA R, MATSUBARA T, et al. A mechanism of cisplatin action: antineoplastic effect through inhibition of neovascularization [J]. *Kobe J Med Sci*, 1997, 43(3/4): 109–120.
- [17] MIYAHARA Y, YOSHIDA S, MOTOYAMA S, et al. Effect of *Cis*-diammine dichloroplatinum on vascular endothelial growth factor expression in uterine cervical carcinoma [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2004, 25(1): 33–39.
- [18] GANJOO K, HONG F X, HORNING S J, et al. Bevacizumab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone in combination for patients with peripheral T-cell or natural killer cell neoplasms: an Eastern Cooperative Oncology Group study (E2404) [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(4): 768–772. DOI: 10.3109/10428194.2013.816700.
- [19] ZHANG Q, CAO J, XUE K, et al. Recombinant human endostatin in combination with CHOP regimen for peripheral T cell lymphoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 145–151. DOI: 10.2147/ott.s117007.
- [20] CAO C, FENG J, GU H, et al. Distribution of lymphoid neoplasms in Northwest China: Analysis of 3244 cases according to WHO classification in a single institution [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2018, 34: 60–65. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2017.05.005.
- [21] ZAIN J M. Aggressive T-cell lymphomas: 2019 updates on diagnosis, risk stratification, and management [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(8): 929–946. DOI: 10.1002/ajh.25513.
- [22] MARCHI E, O'CONNOR O A. The rapidly changing landscape in mature T-cell lymphoma (MTCL) biology and management [J]. *CA A Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 47–70. DOI: 10.3322/caac.21589.
- [23] BOSANQUET A G, RICHARDS S M, WADE R, et al. Drug cross-resistance and therapy-induced resistance in chronic lymphocytic leukaemia by an enhanced method of individualised tumour response testing [J]. *Br J Haematol*, 2009, 146(4): 384–395. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07741.x.
- [24] PÉREZ-TOMÁS R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(16): 1859–1876. DOI: 10.2174/092986706777585077.
- [25] JONES S E, GROZEA P N, METZ E N, et al. Superiority of adriamycin-containing combination chemotherapy in the treatment of diffuse lymphoma: a Southwest Oncology Group study [J]. *Cancer*, 1979, 43(2): 417–425. DOI: 10.1002/1097-0142(197902)43:2<417::aid-cnrcr2820430203>3.0.co;2-i.
- [26] DEAN M, HAMON Y, CHIMINI G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily [J]. *J Lipid Res*, 2001, 42(7): 1007–1017.
- [27] WANG Y, DENG M, CHEN Q, et al. Apatinib exerts anti-tumor activity to non-Hodgkin lymphoma by inhibition of the Ras pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 843: 145–153. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.11.012.
- [28] LU B, LIU G L, YU F, et al. MicroRNA-16/VEGFR2/p38/NF- κ B signaling pathway regulates cell growth of human pituitary neoplasms [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(3): 1235–1244. DOI: 10.3892/or.2018.6227.
- [29] DONG J, SAUNDERS D, SILASI-MANSAT R, et al. Therapeutic efficacy of a synthetic epsin mimetic peptide in glioma tumor model: uncovering multiple mechanisms beyond the VEGF-Associated tumor angiogenesis [J]. *J Neurooncol*, 2018, 138(1): 17–27. DOI: 10.1007/s11060-018-2766-z.
- [30] MIRZAEI A, MOHAMMADI S, GHAFARI S H, et al. Osteopontin b and c splice isoforms in leukemias and SolidTumors: angiogenesis alongside chemoresistance [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(3): 615–623. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.3.615.
- [31] ZHAO C, SU Y, ZHANG J, et al. Fibrinogen-derived fibrinostatin inhibits tumor growth through anti-angiogenesis [J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(11): 1596–1606. DOI: 10.1111/cas.12797.
- [32] PLASTARAS J P, KIM S H, LIU Y Y, et al. Cell cycle dependent and schedule-dependent antitumor effects of sorafenib combined with radiation [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 9443–9454. DOI: 10.1158/0008-5472.can-07-1473.
- [33] LIU L, QIN S, ZHENG Y, et al. Molecular targeting of VEGF/

- VEGFR signaling by the anti-VEGF monoclonal antibody BD0801 inhibits the growth and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(3): 166–176. DOI: 10.1080/15384047.2017.1282019.
- [34] MOMENY M, SABOURINEJAD Z, ZARRINRAD G, et al. Anti-tumour activity of tivozanib, a *Pan*-inhibitor of VEGF receptors, in therapy-resistant ovarian carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45954. DOI: 10.1038/srep45954.
- [35] TOUYZ R M, HERRMANN S M S, HERRMANN J. Vascular toxicities with VEGF inhibitor therapies—focus on hypertension and arterial thrombotic events [J]. *J Am Soc Hypertens*, 2018, 12(6): 409–425. DOI: 10.1016/j.jash.2018.03.008.
- [36] SUBRAMANIAN P, HAAS N B. Recent advances in localized RCC: a focus on VEGF and immuno-oncology therapies [J]. *Urol Oncol*, 2018, 36(1): 23–30. DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.09.008.
- 收稿日期: 2021-06-11 校稿: 李征 于静

本文引用格式: 左铁朗, 欧阳周, 周辉. 阿帕替尼联合阿霉素对外周T细胞淋巴瘤的抑制作用及机制研究[J]. 肿瘤药理学, 2022, 12(1): 36–45. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.06.

Cite this article as: ZUO Yilang, OUYANG Zhou, ZHOU Hui. Inhibitory effects of apatinib combined with adriamycin on peripheral T-cell lymphoma cells and its mechanism[J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2022, 12(1): 36–45. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.06.