

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.13.005

阿帕替尼对人肝癌细胞增殖及凋亡的作用机制研究*

张琼 余智操 博伦 张红梅[△]

(空军军医大学西京医院肿瘤科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨阿帕替尼抑制肝癌细胞增殖促进凋亡的作用机制。**方法:**选取肝癌细胞系 SNU739、HepG2,以 CCK-8 细胞增殖实验、平板克隆实验测定阿帕替尼对肝癌细胞增殖及克隆形成能力的影响;流式细胞术检测阿帕替尼对肝癌细胞凋亡的影响;蛋白免疫印迹法检测阿帕替尼影响肝癌细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 及 Caspase3 的表达情况。**结果:**与对照组相比,阿帕替尼可显著抑制肝癌细胞增殖($P<0.05$)。平板克隆实验提示与对照组相比,10 μM 和 20 μM 阿帕替尼组肝癌细胞克隆数明显减少($P<0.05$)。流式细胞术结果提示 10 μM 和 20 μM 阿帕替尼处理组细胞凋亡率明显增加($P<0.05$)。蛋白免疫印迹法结果显示经阿帕替尼处理的肝癌细胞,促凋亡蛋白 Bax 及 Caspase3 的活性片段 Cleaved-caspase3 表达水平显著上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著下调($P<0.01$)。**结论:**阿帕替尼通过调节肝癌细胞凋亡相关蛋白从而抑制肝癌细胞增殖、促进其凋亡。

关键词:肝癌;阿帕替尼;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)13-2424-05

The Effect of Apatinib on The Proliferation and Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells*

ZHANG Qiong, YU Zhi-cao, BO Lun, ZHANG Hong-mei[△]

(Department of Oncology, Xijing Hospital, The Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: The present study aimed to investigate the effects of Apatinib on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** The proliferation and apoptosis of these hepatocellular carcinoma cells were assessed by CCK-8, plate cloning assay and flow cytometry, respectively. Finally, the levels of the apoptosis-associated proteins Bax, Bcl-2 and Caspase3 were detected by western blotting. **Results:** The proliferation of SNU739 and HepG2 cells were significantly inhibited by Apatinib, compared with the control group ($P<0.05$). The inhibitory effect of the Apatinib group was markedly stronger than that of the control group. Compared to the control group, the colony forming efficiency of hepatocellular carcinoma cells treated by 10 μM and 20 μM Apatinib were significantly lower ($P<0.05$), the rates of apoptosis were obviously higher ($P<0.05$). The expression levels of Bcl-2 was further inhibited in the Apatinib group, and the expression level of Bax and Cleaved-caspase3 were also significantly increased in the Apatinib group by western blotting ($P<0.01$). **Conclusions:** Apatinib significantly inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating the expression of Bax and Cleaved-caspase3, and downregulating the expression of Bcl-2.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Apatinib; Cell proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)13-2424-05

前言

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一,具有发病率高、进展迅速、死亡率高等特点。治疗方式主要有手术、局部消融、介入、放疗、分子靶向治疗、免疫治疗及中医药治疗等^[1]。早期 HCC 以手术治疗为主,然而,由于 HCC 的早期临床症状并不明显,大多数 HCC 患者在初诊时即处于晚期。临床上仅有约 20% 的患者有手术治疗的机会^[2]。晚期 HCC 首选分子靶向药物治疗,常用多靶点抗血管生成药物,如一线索拉非尼、仑伐替尼和二线瑞戈非尼。索拉非尼是最

早获批用于晚期 HCC 一线治疗的靶向药物,然而索拉非尼中位生存期也仅为 10.7 个月^[3]。另外一个 2018 年在我国上市的多靶点药物仑伐替尼,其对比索拉非尼的非劣效研究显示总生存期并无统计学差异^[4]。因此,针对晚期 HCC 探索新的治疗策略至关重要。阿帕替尼是我国自主研发的一种小分子酪氨酸激酶抑制剂,可以特异性地结合细胞内 VEGFR-2 的 ATP 结合位点,阻断下游信号转导,从而抑制肿瘤新生血管生成^[5]。一系列的临床研究证实了阿帕替尼在多种实体瘤中的抗肿瘤作用,包括乳腺癌^[6,7]、肺癌^[8-10]、肉瘤^[11]和 HCC^[12]。在我国进行的阿帕替尼治疗晚期 HCC 的 II 期临床研究^[13]结果显示,阿帕替尼单药治

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81572699);陕西省重点产业创新链课题(2016KTZDSF-01-05)

作者简介:张琼(1988-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:消化道肿瘤的内科治疗, E-mail: cddsys1125@163.com

[△] 通讯作者:张红梅(1978-),硕士生导师,副教授,主要研究方向:肿瘤内科基础与临床研究, E-mail: zhm@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2019-02-23 接受日期:2019-03-15)

疗晚期 HCC 安全而有效。提示阿帕替尼有可能成为晚期 HCC 患者的另一种治疗选择。然而,阿帕替尼对 HCC 的潜在抗肿瘤机制尚不清楚。因此,本研究旨在阐明阿帕替尼对 HCC 细胞的抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

SNU739、HepG2 细胞系我校生化教研室留存;甲磺酸阿帕替尼(后简称阿帕替尼)购自江苏恒瑞医药公司;RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒购自上海尚宝生物科技有限公司;兔抗人 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Cleaved-caspase3 抗体,鼠抗人 β -actin 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司;化学发光试剂盒购自 zeta 公司;DMSO(二甲基亚砜)购自 MP Biomedicals 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SNU739、HepG2 细胞分别培养于含 10 % 胎牛血清(FBS)及 1 % 双抗(100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素)的 RPMI-1640 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C,5 %CO₂ 的培养箱中常规培养。收集传代第 3 代对数生长期细胞,用 0.25 %胰蛋白酶消化成单细胞悬液,根据实验设计对细胞进行相应处理。称取 50 mg 阿帕替尼溶于 1 mL DMSO 后放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存,使用时用 RPMI-1640 培养基稀释至所需浓度。

1.2.2 CCK-8 细胞增殖实验 将细胞接种密度设定为 5000 个/孔,均匀接种于 96 孔板中,分别设调零、对照及加药组,每组设五个复孔。在 37 $^{\circ}$ C,5 %CO₂ 的孵箱中培养 24 h 后,用不同浓度的阿帕替尼(20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M)或(10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M)分别处理 SNU739 或 HepG2 细胞 48 h 后,向每个孔中迅速加入 10 μ L CCK-8,然后 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后使用多功能酶标仪测量吸光度。

1.2.3 平板克隆形成实验 取对数生长期细胞常规离心收集,以 500 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板,设对照及加药组,37 $^{\circ}$ C,5 %CO₂ 的孵箱中培养 24 h 后,对照组给予 1 %DMSO,加药组分别用不同浓度的阿帕替尼(10 μ M, 20 μ M)处理后于 37 $^{\circ}$ C,5 %CO₂ 培养 2 周。预冷 PBS 洗两次,甲醇固定 30 min,结晶紫染色 1 h 后,洗去染液拍照,使用 Odyssey 扫描拍照,利用 ImageJ 软件计数,计算对照组及加药组形成的克隆数。

1.2.4 流式细胞术凋亡检测 收集对数生长期细胞,用 0.25 %胰蛋白酶消化后,将细胞均匀接种于 6 cm 平皿中,随机分为对照组和阿帕替尼处理组(10 μ M 和 20 μ M),对照组给予 1 %DMSO,处理 48 h 后,用 0.25 %胰蛋白酶消化细胞,然后以 800 r/min 离心 5 min 收集细胞,用 4 $^{\circ}$ C 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,弃上清,PBS 重悬细胞。取 100 μ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中,加 10 μ g/mL 的 PI,混匀后避光孵育 15 min,在反应管中加入 400 μ L 稀释好的结合缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 蛋白免疫印迹 分别用 10 μ M 的阿帕替尼处理 SNU739 及 HepG2 各 48 h,对照组给予 1 %DMSO 后将细胞样品收集于 1.5 ml EP 管中,PBS 重悬,5000 r/min 离心 5 min,两次,弃上清,在各管中加入 80 μ L 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,收集裂解液上清。BCA 定量法测定蛋白浓度后,加入 1/4 体积的 5 $\times$ loading buffer,100 $^{\circ}$ C 煮沸

10 min 后保存样品。配置聚丙烯酰胺凝胶,对蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳,于各加样孔中加 2 μ L 蛋白 marker 及相应蛋白样品 20 μ g,连接电极,设置电泳电压 120 V,2 h,300 mA 恒流冰水转膜 60 min。根据目的蛋白分子量的大小将 NC 膜裁至适宜大小,用 5 %脱脂奶粉室温封闭 1 h,TBST 洗涤 30 min 后放入预先配好的 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 β -Actin (1:1000)的一抗缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗涤 30 min 后室温孵育二抗(1:500)1 h,TBST 洗涤 30 min,待发光检测。

1.3 统计学分析

每组实验重复 3 次。采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,用 GraphPad Prism7 作图。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行独立样本 t 检验, $P<0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 阿帕替尼可直接抑制肝癌细胞 SNU739 及 HepG2 增殖

不同浓度阿帕替尼(20 μ M,40 μ M,60 μ M,80 μ M,100 μ M)或(10 μ M,20 μ M,30 μ M,40 μ M,50 μ M,60 μ M)分别处理 SNU739 及 HepG2 细胞 48 h,其细胞存活率(%)分别为: SNU739: 对照组:92.17 $\pm$ 1.11; 加药组为 56 $\pm$ 1.68、35.15 $\pm$ 1.09、17.37 $\pm$ 1.04、15.83 $\pm$ 1.44、14.12 $\pm$ 1.18。HepG2: 对照组: 98 $\pm$ 0.71; 加药组为:86.78 $\pm$ 3.44、68.58 $\pm$ 2.76、54.22 $\pm$ 1.04、40.81 $\pm$ 3.49、32.72 $\pm$ 2.21、26.96 $\pm$ 1.98。分析细胞增殖实验结果如图所示(图 1a),随着阿帕替尼浓度增大,对肝癌细胞的抑制作用越明显($P<0.05$; $P<0.0001$)。根据 48 h 的 IC₅₀ 值(图 1b, SNU739:24.67 $\pm$ 1.25;HepG2: 31.55 $\pm$ 0.98)选用 10 μ M 和 20 μ M 的阿帕替尼进行后续实验。

2.2 阿帕替尼可抑制肝癌细胞 SNU739 及 HepG2 细胞的克隆形成能力

用不同浓度的阿帕替尼(10 μ M 和 20 μ M)处理 SNU739 及 HepG2 细胞后,与对照组相比加药组形成的克隆数明显减少(图 2)。且随着阿帕替尼浓度的增加,形成的克隆数逐渐下降。结果显示: 对照组形成的克隆数分别为(56.00 $\pm$ 4.01)及(45.00 $\pm$ 1.76),阿帕替尼 10 μ M 组分别为(40.40 $\pm$ 2.87)、(23.00 $\pm$ 1.46),阿帕替尼 20 μ M 组分别为(13.60 $\pm$ 1.17)、(2.71 $\pm$ 0.64)。组间差异有统计学意义(SNU739: $P<0.01$; HepG2: $P<0.001$)。

2.3 阿帕替尼可诱导肝癌细胞 SNU739 及 HepG2 细胞凋亡

流式细胞术检测结果如图 3 所示,阿帕替尼 10 μ M 及 20 μ M 的作用下,SNU739 细胞凋亡率分别为(20.83 $\pm$ 1.53)%和(56.95 $\pm$ 0.78)%,HepG2 细胞凋亡率分别为(8.86 $\pm$ 0.14)%和(42.02 $\pm$ 6.50)%,与对照组相比,加药组细胞凋亡率显著增加(SNU739: $P<0.01$;HepG2: $P<0.05$, $P<0.001$),表明阿帕替尼可诱导 SNU739 及 HepG2 细胞凋亡。

2.4 阿帕替尼对肝癌细胞 SNU739 及 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示(图 4),阿帕替尼处理组的细胞中促凋亡蛋白 Bax 表达水平显著升高,Caspase3 的活性片段 Cleaved-caspase3 表达水平升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。

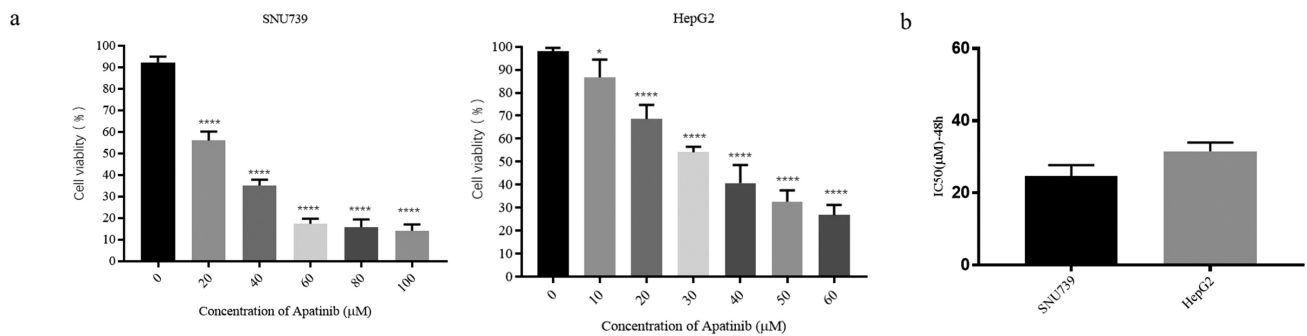


图1 阿帕替尼抑制 SNU739 及 HepG2 细胞增殖(* $P<0.05$ **** $P<0.001$)。a.以不同浓度阿帕替尼分别处理肝癌细胞 48 h。

细胞活力通过 CCK-8 测定评估。b.阿帕替尼处理 SNU739 和 HepG2 48 h 的 IC_{50} 值。

Fig.1 Apatinib inhibits proliferation of SNU739 and HepG2 cells. a. Hepatocellular carcinoma cells were cultured in a series of concentration of apatinib for 48 h. Cell viability was assessed by CCK-8 assay. b. The IC_{50} of apatinib treated in SNU739 and HepG2 for 48 h.

(* $P<0.05$ **** $P<0.001$ vs control group).

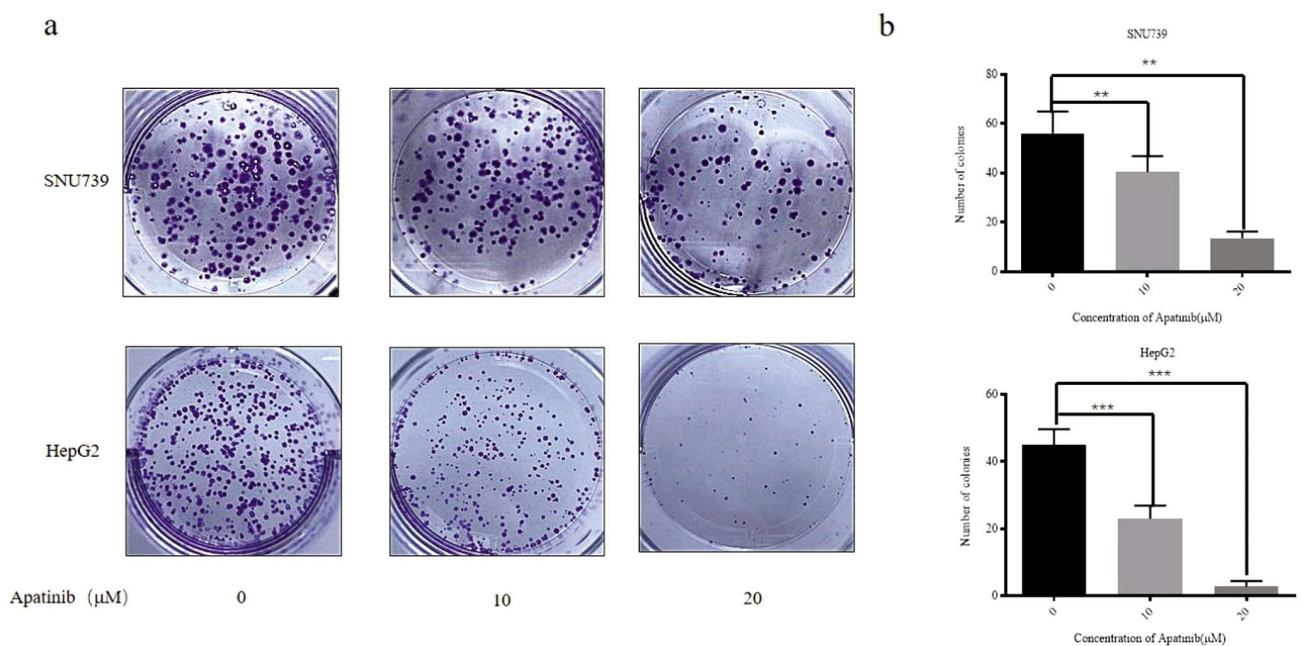


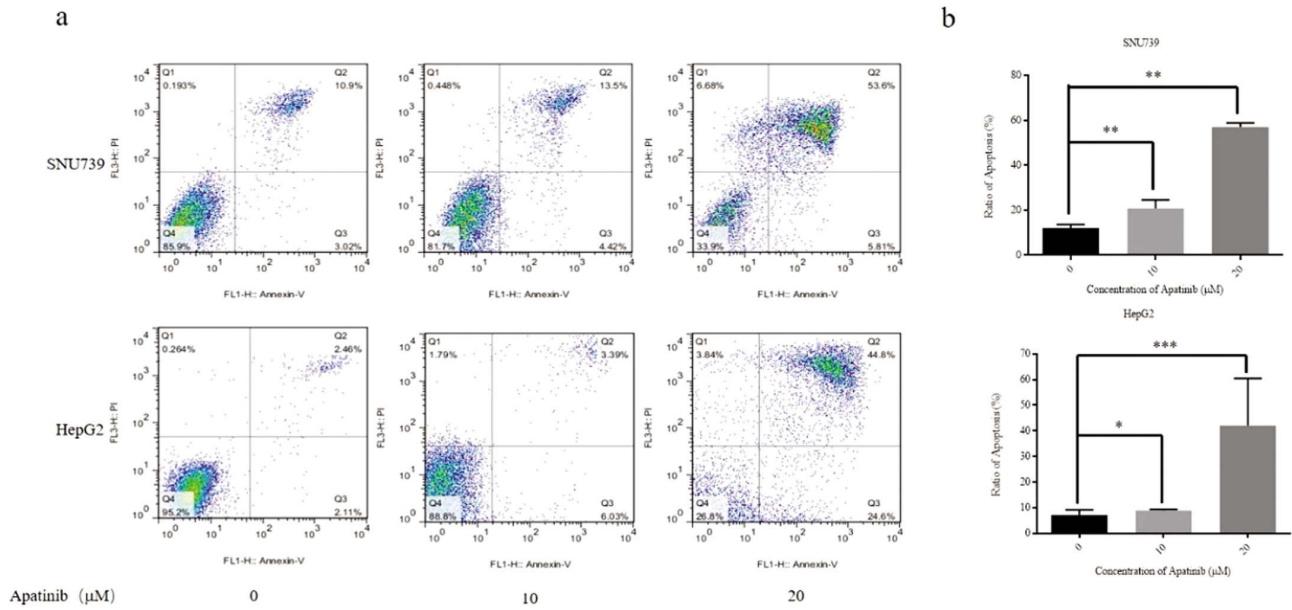
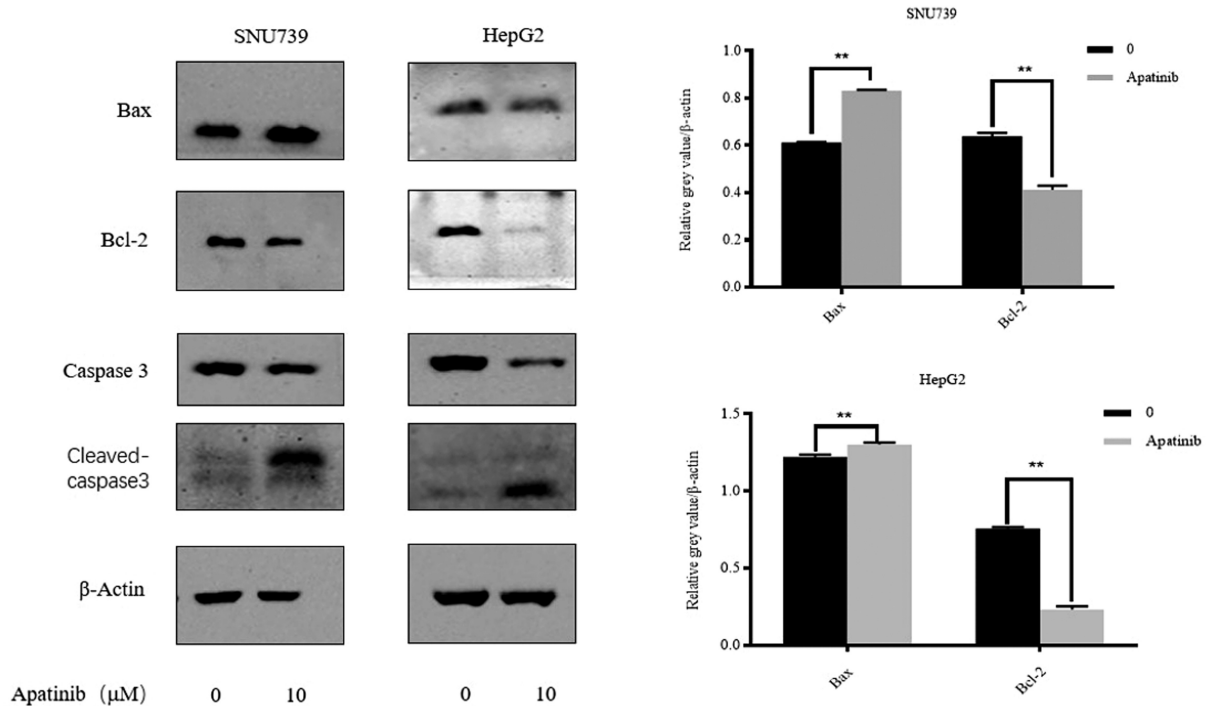
图2 阿帕替尼抑制 SNU739 和 HepG2 细胞形成克隆的能力(** $P<0.01$ *** $P<0.001$)

Fig.2 Effect of apatinib on colony formation of SNU739 and HepG2 cells(** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group)

3 讨论

HCC 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一，全世界每年报道的 HCC 病例中约有 75%-80% 发生在亚洲国家，仅中国就占全球 HCC 病例和死亡人数的 50% 以上^[14,15]。晚期 HCC 预后很差，生存期仅为 3-6 个月^[16]。由于多药耐药性和传统化疗药物的不良反应，针对晚期 HCC 全身化疗的有效率仅为 10-15%^[17]。目前晚期 HCC 主要以分子靶向治疗为主，但仍因存在进展迅速、预后差等问题而成为临床治疗的难题。阿帕替尼为小分子酪氨酸激酶抑制剂，2014 年 10 月获国家食品药品监督管理局 (CFDA) 批准用于治疗既往至少接受过两种系统化疗后进展或复发的晚期胃腺癌或胃-食管结合部腺癌患者^[18]。其在 HCC 中的临床研究^[13]显示阿帕替尼有望成为 HCC 治疗的新选择，但目前作用机制尚不明确。细胞凋亡是机体内细胞死亡的重要途径，目前发现真核细胞主要经死亡受体介导的外部凋亡途径、内部线粒体途径、B 粒酶介导的细胞凋亡途径、内质网应激

途径等发生凋亡^[19]。内部线粒体途径的关键环节为线粒体外膜透化 (MOMP) 引起细胞色素 C 向胞质释放，此环节主要受 Bcl-2 家族蛋白分子的调控^[20]。Bax 和 Bcl-2 同属 Bcl-2 家族，其中抗凋亡蛋白 Bcl-2 在凋亡信号传导中发挥关键作用，通过抑制促凋亡蛋白 Bax、Bak 对线粒体膜的透化作用来抑制细胞凋亡^[21]。促凋亡蛋白 Bax，可拮抗 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用，亦可直接促进肿瘤细胞凋亡^[22]。Caspase3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶，在细胞凋亡的内部线粒体途径中，促凋亡蛋白首先被激活，进一步激活凋亡起始蛋白酶 Caspase9，进而 Caspase3 裂解、活化而发生细胞凋亡^[23]。多数研究表明阿帕替尼可直接诱导肿瘤细胞发生凋亡：阿帕替尼通过内质网应激诱导结肠癌细胞凋亡^[24]，阿帕替尼可通过 VEGFR2/STAT3/BCL-2 信号诱导骨肉瘤细胞凋亡^[25]，阿帕替尼通过 AKT/mTOR 通路促进未分化型甲状腺癌细胞凋亡^[26]。阿帕替尼通过 PI3K/Akt 通路促进肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡^[27]。阿帕替尼通过 VEGFR2/STAT3 通路促进肝癌细胞凋亡^[28]。

图3 阿帕替尼诱导 SNU739 及 HepG2 细胞凋亡(* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$)Fig.3 Effect of apatinib on apoptosis of SNU739 and HepG2 cells (* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs. control group)图4 阿帕替尼对 SNU739 及 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响(** $P<0.01$)Fig.4 Effect of apatinib on the expression of apoptosis-related proteins in SNU739 and HepG2 cells (** $P<0.01$ vs control group)

Wu 等研究^[29]表明,阿帕替尼以浓度依赖的方式抑制结肠癌细胞增殖,且随着浓度的增加细胞的凋亡率增加。Li 等研究^[30]表明,阿帕替尼以浓度依赖的方式抑制肝癌细胞增殖及克隆形成,促进其凋亡。在本研究中不同浓度的阿帕替尼分别作用于 SNU739 及 HepG2 细胞 48 h, CCK-8 细胞增殖实验表明,阿帕替尼可显著抑制 SNU739 及 HepG2 细胞增殖,差异有统计学意义($P<0.05$; $P<0.0001$);平板克隆形成实验提示经阿帕替尼处理细胞后, SNU739 及 HepG2 细胞克隆形成数明显低于未处理组,表明阿帕替尼可抑制 SNU739 及 HepG2 细胞克隆形成能力。AV/PI 双染色结果显示,阿帕替尼能够以浓度依赖的方式

诱导 SNU739 及 HepG2 细胞凋亡。这与上述研究结果相一致。Western blotting 进一步印证, SNU739 及 HepG2 细胞经阿帕替尼处理后, 促凋亡蛋白 Bax 及 Caspase3 的活性片段 Cleaved-caspase3 表达明显上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 明显下调, 表明阿帕替尼可诱导肿瘤细胞凋亡。在 Zhang 等人进行的一项研究^[27]中发现了类似的结果, 即阿帕替尼可以通过诱导 Bax 和 Caspase-9 的表达, 抑制 Bcl-2 的表达诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡。与 Feng 等研究^[26]结果亦类似, 即阿帕替尼通过上调 Bax、Cleaved-caspase3、Cleaved-PARP, 下调 Bcl-2、Caspase3、PARP 的表达促进未分化型甲状腺癌细胞凋亡。

本研究显示阿帕替尼直接抑制 SNU739 及 HepG2 细胞增殖能力,此作用与药物浓度呈正相关,通过上调促凋亡蛋白 Bax/Cleaved-caspase3、下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 从而抑制肝癌细胞增殖、促进肝癌细胞凋亡。这些结果提示阿帕替尼有望成为晚期 HCC 治疗的新策略。然而,由于本研究仅选用了人 HCC 细胞株 SNU739 及 HepG2 为研究对象,研究局限于凋亡相关蛋白的表达,鉴于不同细胞株间存在差异,因此需进一步验证并进行更为深入的机制研究,并且还需要探索关注阿帕替尼联合化疗药物的实验及临床研究。

参考文献(References)

- [1] 吴孟超, 汤钊猷, 刘允怡, 等. 原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)[J]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2017, 9(04): 213-228
- [2] Azumi M, Suda T, Terai S, et al. Prognostic Impact of Indocyanine Green Plasma Disappearance Rate in Hepatocellular Carcinoma Patients after Radiofrequency Ablation: A Prognostic Nomogram Study[J]. Intern Med, 2017, 56(9): 1001-1007
- [3] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 378-390
- [4] Kudo M, Finn RS, Qin S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. Lancet, 2018, 391(10126): 1163-1173
- [5] Roviello G, Ravelli A, Polom K, et al. Apatinib: A novel receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 372(2): 187-191
- [6] Hu X, Cao J, Hu W, et al. Multicenter phase II study of apatinib in non-triple-negative metastatic breast cancer [J]. BMC Cancer, 2014, 14(820)
- [7] 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
- [8] Song Z, Yu X, Lou G, et al. Salvage treatment with apatinib for advanced non-small-cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 1821-1825
- [9] Wu D, Liang L, Nie L, et al. Efficacy, safety and predictive indicators of apatinib after multilines treatment in advanced nonsquamous nonsmall cell lung cancer: Apatinib treatment in nonsquamous NSCLC[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2018, 14(6): 446-452
- [10] Yan X, Wang Q, Wang H, et al. Apatinib as maintenance therapy in extensive-stage small-cell lung cancer: results from a single-center retrospective study[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(1): 235-240
- [11] Li F, Liao Z, Zhao J, et al. Efficacy and safety of Apatinib in stage IV sarcomas: experience of a major sarcoma center in China [J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 64471-64480
- [12] Zhang H. Apatinib for molecular targeted therapy in tumor [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 6075-6081
- [13] 秦叔逵, 白玉贤, 欧阳学农, 等. 阿帕替尼一线治疗晚期肝细胞癌的前瞻性、随机、开放、全国多中心 II 期临床试验[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22(12): 1057-1065
- [14] Asia-Pacific Working Party on Prevention of Hepatocellular Carcinoma. Prevention of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region: consensus statements [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(4): 657-663
- [15] Amarapurkar D, Han KH, Chan HL, et al. Application of surveillance programs for hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific Region[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(6): 955-961
- [16] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30
- [17] Lin J, Shen A, Chen H, et al. Nitidine chloride inhibits hepatic cancer growth via modulation of multiple signaling pathways [J]. BMC Cancer, 2014, 14(729)
- [18] 秦叔逵, 李进. 阿帕替尼治疗胃癌的临床应用专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志, 2015, 20(09): 841-847
- [19] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 41(02): 103-107
- [20] Munoz-Pinedo C, Guio-Carrion A, Goldstein JC, et al. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(31): 11573-11578
- [21] Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family[J]. Curr Opin Genet Dev, 2011, 21(1): 12-20
- [22] Brady HJ, Gil-Gomez G, Bax B. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(6): 647-650
- [23] Communal C, Sumandea M, de Tombe P, et al. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(9): 6252-6256
- [24] Cheng X, Feng H, Wu H, et al. Targeting autophagy enhances apatinib-induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress for human colorectal cancer[J]. Cancer Lett, 2018, 431: 105-114
- [25] Liu K, Ren T, Huang Y, et al. Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e3015
- [26] Feng H, Cheng X, Kuang J, et al. Apatinib-induced protective autophagy and apoptosis through the AKT-mTOR pathway in anaplastic thyroid cancer[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 1030
- [27] Zhang H, Cao Y, Chen Y, et al. Apatinib promotes apoptosis of the SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cell line via the PI3K/Akt pathway[J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 5739-5743
- [28] Wen S, Shao G, Zheng J, et al. Apatinib regulates the cell proliferation and apoptosis of liver cancer by regulation of VEGFR2/STAT3 signaling[J]. Pathol Res Pract, 2019, S0344-0338(18): 31438-31439
- [29] Lu W, Ke H, Qianshan D, et al. Apatinib has anti-tumor effects and induces autophagy in colon cancer cells [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(9): 990-995
- [30] 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 [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(5 Pt A): 1693-1701