



· 论 著 ·

# Regorafenib联合TAS102新策略治疗肝细胞癌的研究

章俊<sup>1,2</sup>, 董宇华<sup>3</sup>, 杨叶<sup>1</sup>, 张梦琪<sup>1</sup>, 何常<sup>1,2</sup>

1. 贵州医科大学病理学教研室, 贵州 贵阳 550004;
2. 贵州医科大学附属医院病理科, 贵州 贵阳 550004;
3. 贵州医科大学生理学教研室, 贵州 贵阳 550004

**[摘要]** 背景与目的: 瑞格菲尼 (regorafenib, REG) 和TAS102是治疗消化道肿瘤的新型药物。嘧啶类药物5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 联合REG可抑制多药耐药转移性结肠癌的进展。肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 决定肿瘤的自我更新, 异质性及治疗耐受等, 靶向CSC为治愈肿瘤提供了可能途径。探讨REG联合TAS102治疗肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的联合效应及潜在机制。方法: 以人HepG2、Huh7和SK-Hep1肝癌细胞系为实验对象。REG和TAS102单药或联合处理肝癌细胞及荷瘤动物。采用细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测肝癌细胞活力; 流式细胞术分析肝癌细胞中CD133阳性细胞亚群比例; 采用蛋白质印迹法 (Western blot) 分析不同药物处理后肝癌细胞中蛋白表达差异; 含不同药物的干细胞培养基培养肝癌干细胞球 (HCC sphere); 荷瘤动物实验评估药物联合治疗效果。结果: REG及TAS102单药显著抑制肝癌细胞活力。TAS102联合使用减低REG单药时诱导增加的CD133阳性细胞亚群比例及干细胞标志分子SRY相关的高迁移率族盒蛋白-2 (SRY-related high mobility group box protein-2, SOX2) 和乙醛脱氢酶1A (aldehyde dehydrogenase 1A, ALDH1A) 的蛋白水平。同时REG的联合使用下调TAS102单药处理时诱导活化的抗凋亡蛋白髓细胞白血病-1蛋白 (myeloid cell leukemia-1, MCL1) 信号。REG联合TAS102显著抑制了HCC sphere的形成。动物实验证实REG联合TAS102显著抑制肝癌瘤体的生长。结论: REG联合TAS102通过调控肝癌细胞的干细胞性及抗凋亡信号, 发挥联合用药增强抗HCC的活性, 为临床治疗难治性HCC提供了一种新的治疗策略。

**[关键词]** 瑞格菲尼; TAS102; 肿瘤干细胞; 联合治疗; 肝细胞癌

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.04.008

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)04-0294-08

**A novel strategy of regorafenib in combination with TAS102 against hepatocellular carcinoma** ZHANG Jun<sup>1,2</sup>, DONG Yuhua<sup>3</sup>, YANG Ye<sup>1</sup>, ZHANG Mengqi<sup>1</sup>, HE Chang<sup>1,2</sup> (1. Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; 2. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; 3. Department of Physiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China)

Correspondence to: HE Chang E-mail: hechang\_66@163.com;

**[Abstract]** **Background and purpose:** Both regorafenib (REG) and TAS102 are novel anti-tumor drugs in the treatment of the digestive cancers. REG in combination with 5-fluorouracil (5-FU), a pyrimidine analogue, could inhibit the progression of multi-drug resistant metastatic colorectal cancer. Cancer stem cells (CSCs) determine tumor self-renewal, heterogeneity and therapeutic resistance, and targeting CSCs provides a curable approach to multiple malignancies. This study aimed to investigate the therapeutic effect and potential mechanism of REG in combination with TAS102 against hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** A panel of human liver cancer cell lines HepG2, Huh7 and SK-Hep1 were used in this study. Liver cancer cells and xenograft tumor animals were treated with REG and TAS102 monotherapy or combining regimen. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to assess HCC cell viability. The subpopulations of CD133 positive cells were detected and analyzed using flow cytometry. Western blot was used to evaluate these protein contents in HCC cells with diverse drug treatments. HCC spheres were cultured in growing sphere medium with diverse drugs. Xenograft tumor animals were used to assess the therapeutic effect *in vivo*. **Results:** REG or TAS102 monotherapy significantly inhibited HCC cell viability. TAS102 in combination therapy reduced the increase of CD133<sup>+</sup> cell subpopulation, SRY-related high mobility group box protein-2 (SOX2) and aldehyde dehydrogenase 1A (ALDH1A) expressions

通信作者: 何常 E-mail: hechang\_66@163.com;

induced by REG alone. Moreover, REG attenuated TAS102-induced myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) expression. REG in combination with TAS102 ameliorated the formation of HCC sphere. Animal experiment demonstrated that REG in combination with TAS102 significantly eliminated HCC tumor growth in xenograft animals. **Conclusion:** REG in combination with TAS102 regulates HCC stemness and MCL-1 signaling and improves the therapeutic effect against HCC. The combination therapy may provide a novel strategy for refractory HCC patients.

[Key words] Regorafenib; TAS102; Cancer stem cell; Combination therapy; Hepatocellular carcinoma

瑞格菲尼 (regorafenib, REG) 是一种新型多靶点酪氨酸激酶抑制剂, 是治疗原发性肝癌的规范用药之一<sup>[1]</sup>。临床试验证实其能改善 sorafenib 治疗耐受晚期肝癌患者的生存时间<sup>[2]</sup>。TAS102 是由曲氟尿苷 (trifluridine, FTD) 及胸苷磷酸化酶抑制剂 (tipiracil hydrochloride, TPI) 按摩尔浓度 2:1 比例制成的一种新型口服配方化疗药物, 临床试验<sup>[3-4]</sup>证实 TAS102 可显著改善多耐药性消化道肿瘤的疗效, 延长患者的生存时间。多项研究<sup>[5-9]</sup>报道 REG 或 TAS102 分别联合其他化疗药物或靶向药物能够有效控制消化道肿瘤的进展。

肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 决定肿瘤的自我更新及异质性, 促进肿瘤的生长、复发、转移及药物耐受等, 靶向肿瘤干细胞对拮抗肿瘤的演进及治疗耐受提供了一条重要途径<sup>[10]</sup>。大量研究<sup>[11-12]</sup>证实靶向肿瘤干细胞能够改善肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性, 抑制肿瘤生长、复发及转移。我们报道了靶向氧化应激信号能够下调肝癌细胞的干细胞性并抑制肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞的增殖<sup>[13]</sup>。

研究<sup>[5]</sup>证实序贯给予 REG 和 TAS102 能够有效控制晚期结肠癌的进展。我们报道了 FTD 类似物 5-FU 联合 REG 显著改善多耐药性转移性结肠癌患者的预后<sup>[14]</sup>。因此, 本研究拟探讨 REG 联合 TAS102 靶向 CSC 治疗 HCC 的疗效及潜在机制, 以期为临床治疗难治性肝癌提供新的可供选择的联合治疗策略。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验试剂

生化试剂 TAS102 (货号 S81525, 纯度 98%) 和 REG (货号 R843747, 纯度 98%) 均购自美国

MedKoo Biosciences 公司, 干细胞培养基购自加拿大 Stemcell Technologies 公司, CD133-conjugated PE 荧光抗体购自英国 Abcam 公司, 乙醛脱氢酶 1A (aldehyde dehydrogenase 1A, ALDH1A) 及髓细胞白血病-1 蛋白 (myeloid cell leukemia-1, MCL1) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, GAPDH 和干细胞标志分子 SRY 相关的高迁移率族盒蛋白-2 (SRY-related high mobility group box protein-2, SOX2) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 胎牛血清、青链霉素双抗、DMEM 及 PRMI-1640 培养基均购自美国 Invitrogen 公司。

#### 1.1.2 实验细胞

本研究使用的 3 种人肝癌细胞系 HepG2、Huh7 及 SK-Hep1 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。HepG2 及 Huh7 均是人 HCC 细胞株, HepG2 来源于儿童肝母细胞瘤, Huh7 来源于高分化 HCC。二者均表达甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP)、未检出乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV)。SK-Hep1 来源于胰腺癌患者腹水中的上皮细胞。按照细胞库推荐的培养基, HepG2、Huh7 及 SK-Hep1 分别培养于含 10% 胎牛血清及 100 单位/100 mL 青链霉素的 DMEM 或 RPMI-1640 培养基, 并放置于含 CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%、湿度 95% 的 37 °C 培养箱, 细胞丰度达 80%~90%, 进行传代。

#### 1.1.3 实验动物

BALB/c 雌性 4~6 周龄裸小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 荷瘤成功后饲养于贵州医科大学实验动物中心, 生产许可证为 SYXK (黔) 2018-0001。

## 1.2 方法

### 1.2.1 实验分组

分组分为对照 (control) 组、REG 组、TAS102 组和 REG+TAS102 组。实验细胞分组见表 1。实验动物分组见表 2。

表1 不同药物处理的细胞实验分组

Drug treatment	Control	REG	TAS102	REG+TAS102
Repetition	2-3	2-3	2-3	2-3

表2 不同药物处理的动物实验分组

Drug treatment	Control	REG	TAS102	REG+TAS102
Mouse	4	6	6	5

### 1.2.2 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞活力

将4 000个HCC细胞接种到96孔板中, 过夜贴壁后加入2 mol/L TAS102及5 mol/L REG分别或联合使用处理48 h。加入10  $\mu$ L CCK-8试剂温育2 h, 使用酶标仪检测每孔溶液450 nm处的吸光度 ( $D$ ) 值。通过CCK-8 [化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐] 检测细胞线粒体脱氢酶活性, 定量评估细胞活力。

### 1.2.3 CD133阳性干细胞亚群比例的检测

不同药物处理48 h后的HCC细胞, 使用偶联荧光素藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 的CD133荧光抗体温育30 min后, 采用流式细胞仪 (美国BD公司) 检测CD133阳性细胞的百分比; 结果用二维图示。

### 1.2.4 肝癌干细胞球 (HCC sphere) 的培养

按每孔20 000个HCC细胞接种到24孔的低黏附性培养板, 使用含不同药物的肿瘤干细胞培养基体外培养肝癌细胞8 d, 观察孔内HCC sphere的形成及生长, 倒置显微镜 (购自日本Olympus公司) 观察及测量细胞球并对直径 $>60 \mu\text{m}$ 细胞球计数。

### 1.2.5 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞内蛋白水平

收集不同药物处理后的细胞, 使用RIPA缓冲液裂解收集总蛋白, BCA法定量后, 按每孔等量12~20  $\mu\text{g}$ 蛋白上样于10%~12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

胶中, 置于恒定电压缓冲系统 (XCell system, 美国Invitrogen公司) 中分离不同相对分子质量蛋白电泳条带。分离胶中不同相对分子质量蛋白在恒定电压缓冲系统 (Bio-Rad, 美国Invitrogen公司) 转移到PVDF膜上, 使用10%脱脂牛奶封闭后, 与一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜温育、相应偶联辣根过氧化物酶二抗温育, 全自动凝胶成像仪显示蛋白条带。Image J软件测量蛋白条带的平均光密度值 (average optical intensity, AOI) 蛋白条带灰度, 与内参蛋白GAPDH AOI比较, 计算各种蛋白的相对含量。

### 1.2.6 动物实验

本课题设计已通过贵州医科大学伦理委员会认证, 所涉及实验动物的使用及操作, 均严格遵循“减少、替代、优化”的3Rs原则。BALB/c裸小鼠皮下每部位接种 $2 \times 10^6$ 个细胞, 荷瘤成功后使用游标卡尺间隔2~3 d测量瘤体长径和短径, 按照公式 $0.5 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ 计算瘤体体积并绘制生长曲线, 约4周麻醉处死动物, 剥离瘤体并称重。

### 1.2.7 药物处理

细胞实验使用2 mol/L TAS102及5 mol/L REG分别或联合使用处理3种HCC细胞; 动物实验TAS102溶解于5%羟丙基甲基纤维素配制成终浓度20 mg/mL溶液, 4  $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。REG溶解于体积比为42.5% : 42.5% : 15.0%的聚丙二醇/聚乙二醇/聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物188溶液中, 配制成终浓度为1 mg/mL溶液, 4  $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。TAS102按每日100 mg/kg每日2次灌胃给药, REG按每日50 mg/kg每日1次灌胃给药。连续给药3周。

## 1.3 统计学处理

计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 $t$ 检验 (Student's  $t$  test, 双尾); 多组间比较采用单因素方差ANOVA分析。所有统计使用SPSS 17.0统计学软件进行分析;  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 REG和TAS102单药及联合使用降低肝癌细胞活力

CCK-8检测结果发现, REG及TAS102单药或

联合处理, 较对照组均显著减低了3种肝癌细胞活力 (HepG2: Control组为 $0.491 \pm 0.023$ , TAS102组为 $0.388 \pm 0.013$ , REG组为 $0.380 \pm 0.022$ , REG+TAS102组为 $0.379 \pm 0.014$ ; Huh7: Control组为 $0.738 \pm 0.018$ , TAS102组为 $0.571 \pm 0.011$ , REG组为 $0.534 \pm 0.015$ , REG+TAS102组为 $0.564 \pm 0.011$ ; SK-Hep1: Control组为 $0.696 \pm 0.014$ , TAS102组为 $0.493 \pm 0.034$ , REG组为 $0.465 \pm 0.047$ , REG+TAS102组为 $0.388 \pm 0.007$ ) (图1,  $P < 0.05$ )。其中SK-Hep1细胞中联合用药较2种单药处理显示了增强的细胞活力抑制作用, 而在HepG2及Huh7细胞中, 联合用药没有显示显著增强的联合抑制效应。

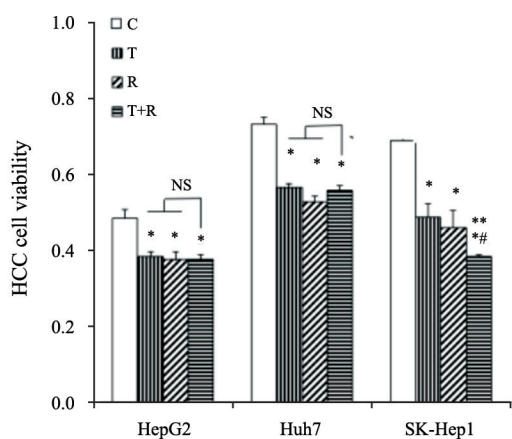


图1 REG联合TAS102处理对HCC细胞活力的影响

Fig. 1 The effect of REG in combination with TAS102 on liver cancer cell viability

T: TAS102; R: REG; T+R: Combination. \*:  $P < 0.05$ , compared with control group; #:  $P < 0.05$ , compared with REG monotherapy; \*\*:  $P < 0.05$ , compared with TAS102 monotherapy; NS:  $P > 0.05$

## 2.2 TAS102下调REG诱导增加的CD133阳性 (+) 细胞亚群比例

CD133是肝癌干细胞 (liver cancer stem cell, LCSC) 表面重要的标志分子。流式细胞术检测结果发现, TAS102单药显著降低了3种细胞中CD133<sup>+</sup>细胞亚群比例 (HepG2: Control组为 $53.33\% \pm 3.22\%$ , TAS102组为 $13.11\% \pm 2.76\%$ ; Huh7: Control组为 $49.14\% \pm 3.32\%$ , TAS102组为 $18.28\% \pm 2.56\%$ ; SK-Hep1: Control组为 $58.73\% \pm 4.22\%$ , TAS102组为 $15.37\% \pm 2.76\%$ ) (图2A、B,  $P < 0.05$ )。在HepG2及Huh7细胞中,

5 mol/L REG单药处理显著提高了CD133<sup>+</sup>细胞亚群比例 (HepG2 REG组为 $78.19\% \pm 4.93\%$ ; Huh7 REG组为 $82.46\% \pm 2.28\%$ ) (图2A、B,  $P < 0.05$ )。较REG单药处理, 联合用药显著减低了CD133<sup>+</sup>细胞亚群比例 (HepG2 REG+TAS102组为 $56.32\% \pm 2.00\%$ ; Huh7 REG+TAS102组为 $33.28\% \pm 2.90\%$ ) (图2A、B,  $P < 0.05$ )。在SK-Hep1细胞中, 不同用药组均显著下调了CD133<sup>+</sup>细胞亚群比例 (SK-Hep1: Control组为 $58.73\% \pm 4.22\%$ , REG组为 $29.29\% \pm 4.28\%$ , TAS102组为 $15.37\% \pm 2.76\%$ , REG+TAS102组为 $18.48\% \pm 3.00\%$ ) (图2A、B,  $P < 0.05$ )。

## 2.3 REG联合TAS102调控SOX2、ALDH1A及MCL1的表达

本研究结果发现, TAS102单药处理3株细胞时, 与对照组 (SOX2: Huh7为 $1.00 \pm 0.03$ , HepG2为 $0.70 \pm 0.05$ , SK-Hep1为 $1.71 \pm 0.15$ ; ALDH1A: Huh7为 $1.62 \pm 0.03$ , HepG2为 $1.40 \pm 0.07$ , SK-Hep1为 $1.59 \pm 0.02$ ) 相比, SOX2 (Huh7为 $0.50 \pm 0.09$ , HepG2为 $0.42 \pm 0.11$ , SK-Hep1为 $1.15 \pm 0.03$ ) 及ALDH1A (Huh7为 $0.72 \pm 0.01$ , HepG2为 $1.10 \pm 0.01$ , SK-Hep1为 $0.88 \pm 0.02$ ) 的蛋白相对表达水平显著减低 (图3A~C,  $P < 0.05$ )。HepG2及Huh7细胞中, REG单药处理 (SOX2: Huh7为 $1.19 \pm 0.04$ , HepG2为 $0.78 \pm 0.02$ ; ALDH1A: Huh7为 $1.48 \pm 0.03$ , HepG2为 $1.62 \pm 0.02$ ) 与control组相比, 对SOX2及ALDH1A的蛋白水平调控作用不明显或轻度升高 (图3A~C)。联合用药较REG单药处理 (SOX2: Huh7为 $0.54 \pm 0.05$ , HepG2为 $0.60 \pm 0.06$ ; ALDH1A: Huh7为 $0.60 \pm 0.04$ , HepG2为 $1.28 \pm 0.03$ ) 显著下调了SOX2及ALDH1A的蛋白水平 (图3A~C,  $P < 0.05$ )。在SK-Hep1中, 不同给药组均显著下调SOX2 (control组为 $1.71 \pm 0.15$ , TAS102组为 $1.15 \pm 0.03$ , REG组为 $1.25 \pm 0.03$ , REG+TAS102组为 $0.51 \pm 0.02$ ) 及ALDH1A (control组为 $1.59 \pm 0.02$ , TAS102组为 $0.88 \pm 0.02$ , REG组为 $1.08 \pm 0.02$ , REG+TAS102组为 $0.86 \pm 0.02$ ) 的蛋白水平 (图3A~C,  $P < 0.05$ )。此外, 3种细胞中REG单药处理

(Huh7为 $0.17 \pm 0.03$ , HepG2为 $0.13 \pm 0.00$ , SK-Hep1为 $0.35 \pm 0.06$ ) 较对照 (Huh7为 $0.40 \pm 0.02$ , HepG2为 $0.35 \pm 0.01$ , SK-Hep1为 $1.14 \pm 0.11$ ) 显著下调了MCL-1水平 (图3A、D,  $P < 0.05$ )。在HepG1及Huh7细胞中, TAS102单药处理较对照组显著提高了MCL-1水平 (图3A、D,  $P < 0.05$ ); 而联

合用药处理 (Huh7为 $0.97 \pm 0.05$ , HepG2为 $0.47 \pm 0.00$ ) 较TAS102单药处理显著减低了MCL-1的蛋白水平 (图3A、D,  $P < 0.05$ )。在SK-Hep1中, TAS102对MCL-1的调控不明显 (control组为 $1.14 \pm 0.11$ , TAS102组为 $1.24 \pm 0.04$ ) (图3A、D,  $P > 0.05$ )。

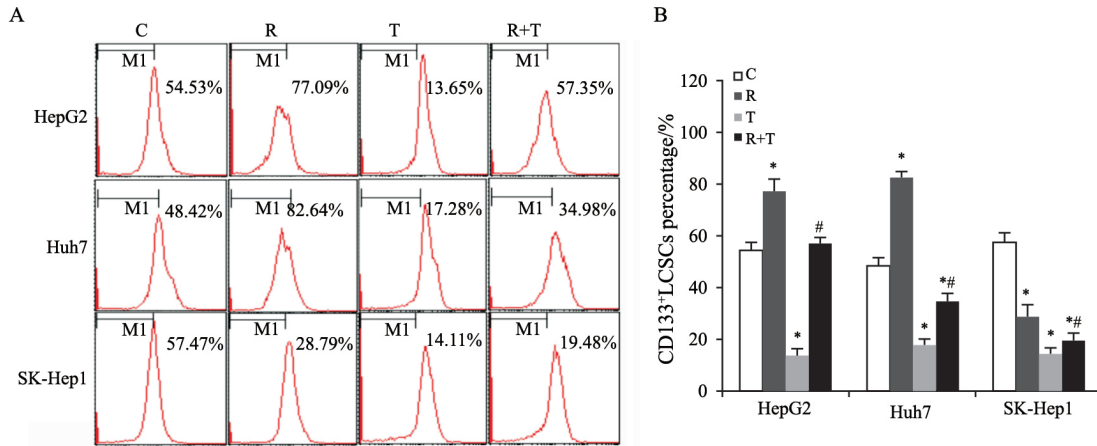


图2 REG联合TAS102处理对CD133<sup>+</sup>细胞亚群分布的影响

Fig. 2 The effect of REG in combination with TAS102 on the subpopulation of CD133 positive cells

A: The representative flow cytometry results of the subpopulation of CD133 positive cells were shown; B: The diagram of CD133 positive cells percentage; R: REG; T: TAS102; R+T: Combination; \*:  $P < 0.05$ , compared with control group; #:  $P < 0.05$ , compared with REG monotherapy

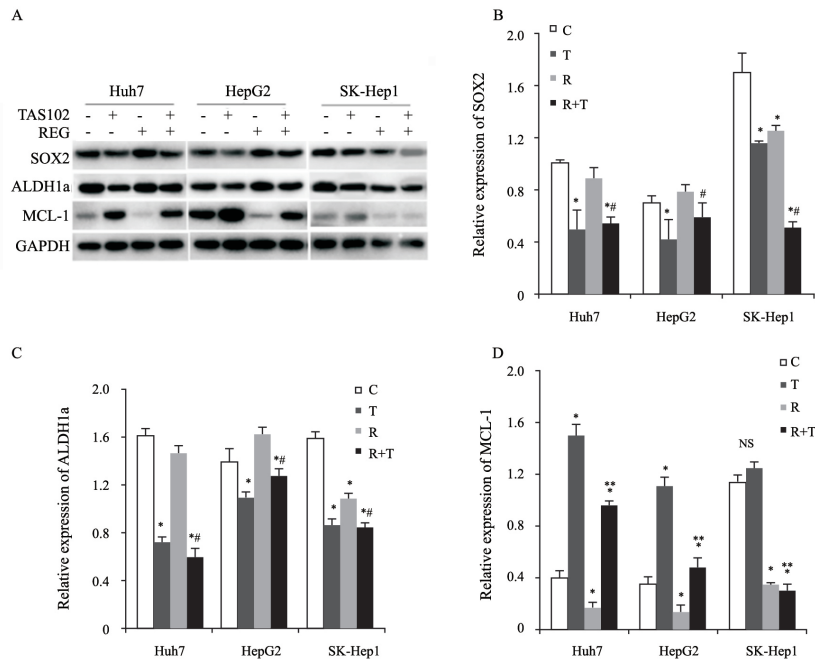


图3 REG联合TAS102处理对HCC细胞SOX2、ALDH1A和MCL-1蛋白水平的影响

Fig. 3 The effect of REG in combination with TAS102 on the expression of SOX2, ALDH1A and MCL-1

A: The expressions of SOX2, ALDH1A and MCL-1 were shown. B-D: The protein expression diagram of SOX2, ALDH1A and MCL-1; T: TAS102; R: REG; R+T: Combination. \*:  $P < 0.05$ , compared with control group; #:  $P < 0.05$ , compared with REG monotherapy; \*\*:  $P < 0.05$ , compared with TAS102 monotherapy

### 2.4 REG及TAS102单药及联合使用抑制HCC sphere的形成

进一步我们观察了二者联合处理8 d对干细胞培养基中生长HCC sphere形成的影响。结果发现,不同用药组较对照组均显著抑制了HCC sphere的形成(图4A、B)。TAS102处理对HCC sphere形成的体积大小影响不大(图4A),但显著减少了形成的数量(图4B,  $P<0.05$ )。REG单药较TAS102单药显著抑制了HCC sphere形成的体积大小及数量(图4A、B,  $P<0.05$ )。Huh7细胞中,联合用药组与两个单给药组HCC sphere形成的数量减少,而HepG2及SK-Hep1中,联合抑制

效应不明显(图4A、B)。

### 2.5 REG联合TAS102抑制动物体内HCC移植瘤的生长

将SK-Hep1及HepG2分别接种在裸小鼠两侧,荷瘤成功后按照不同药物分别治疗动物3周。结果发现,不同药物处理组较对照组均能显著降低动物体内瘤体的生长;REG单药较TAS102单药抑瘤生长显著;二者的联合使用较单药处理进一步抑制了瘤体生长(图5A、B,  $P<0.05$ )。体内实验提示TAS102联合REG较二者单药治疗进一步抑制了动物体内移植瘤的生长。

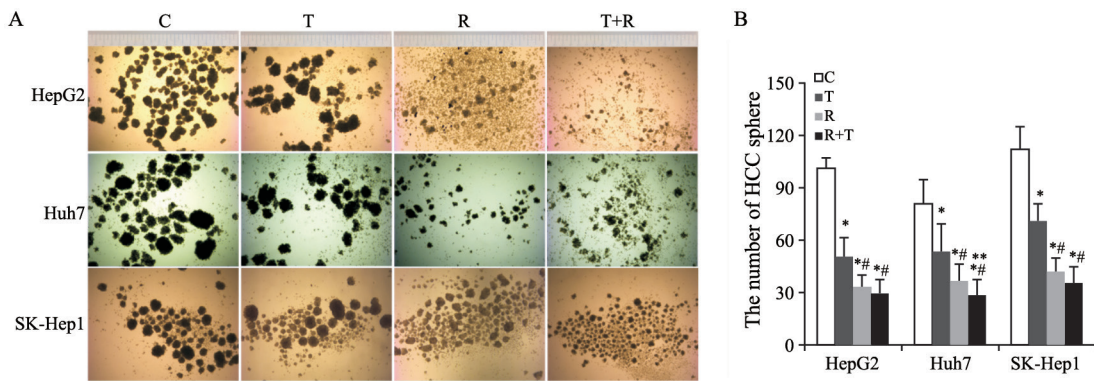


图4 REG联合TAS102对HCC sphere形成的影响

Fig. 4 The effect of REG in combination with TAS102 on the formation of HCC sphere

A: The representative images of HCC sphere in the growing medium; B: The diagram of HCC sphere number; T: TAS102; R: REG; R+T: Combination; \*:  $P<0.05$ , compared with control group; #:  $P<0.05$ , compared with TAS102 monotherapy; \*\*:  $P<0.05$ , compared with REG monotherapy

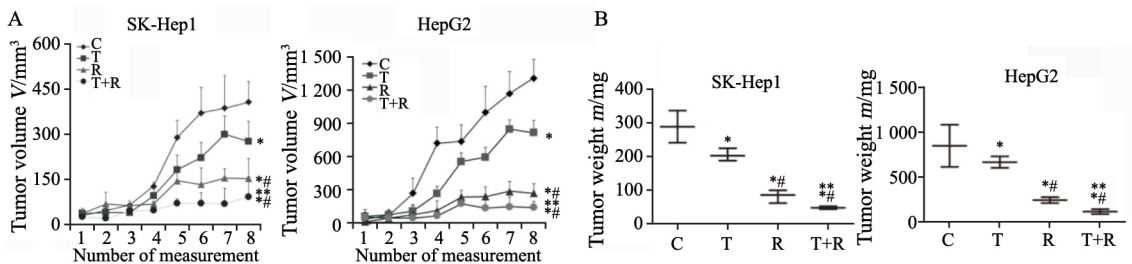


图5 REG联合TAS102对动物体内瘤体生长的影响

Fig. 5 The effect of REG in combination with TAS102 on tumor growth

A: The curves of tumor growth were plotted; B: Xenografted tumors were excised and weighed; T: TAS102; R: REG; R+T: Combination; \*:  $P<0.05$ , compared with control group; #:  $P<0.05$ , compared with TAS102 monotherapy; \*\*:  $P<0.05$ , compared with REG monotherapy

## 3 讨论

REG是一种靶向VEGFR2、VEGFR3、Ret、KIT、PDGFR及RAF等分子的多靶点酪氨酸激酶抑制剂,能够抑制肿瘤新生血管的生成及细胞增殖。TAS102是治疗消化道恶性肿瘤的新型抗癌

药物。两者分别协同其他化疗药物及靶向药物,为临床治疗晚期肿瘤提供了多种有效的联合新策略。研究<sup>[6]</sup>发现VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3抑制剂nintedanib联合TAS102,促进FTD整合入肿瘤DNA分子,贝伐珠单抗靶向抑制肿瘤血管的生成,联合TAS102显著改善多耐药转移性结肠

癌患者的生存率<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[14]</sup>表明,FTD类似物5-FU联合REG能有效控制多耐药转移性结肠癌的进展。本研究发现,TAS102及REG单药或联合处理能够下调肝癌细胞活力。二者的联合使用亦显著抑制了HCC sphere的形成。体内实验进一步证实二者联合使用能够显著抑制动物瘤体的生长,提示REG及TAS102的联合使用能够增强抗肝癌治疗作用。

CSC是肿瘤细胞的重要亚群。靶向CSC为治愈肿瘤提供了可能的研究途径。LCSC在无血清悬浮培养的体系中成球生长,较非干性肿瘤细胞,成球细胞的干性标志物的表达显著升高<sup>[15]</sup>。研究<sup>[12]</sup>发现FTD显著抑制了肿瘤干细胞球的生长,且较肿瘤细胞更为高效地整合入CD44/CD133阳性细胞的DNA分子,抑制了CSC的自我更新及生长。TAS102能够抑制肿瘤细胞的克隆性生长,并提高了肿瘤细胞对放疗的敏感性<sup>[11]</sup>。而REG或sorafenib处理原代软组织肉瘤细胞,诱导了ALDH阳性细胞比例升高<sup>[16]</sup>。本研究发现REG单药处理显著上调了CD133<sup>+</sup>细胞亚群比例及干细胞标志物SOX2和ALDH1A的蛋白水平,联合使用TAS102较REG单药处理显著降低了CD133<sup>+</sup>细胞比例及干细胞标志物SOX2及ALDH1A的蛋白水平。提示TAS102的联合使用可能下调了REG单药治疗诱导增强的肝癌干细胞性,从而降低或延缓肝癌细胞对REG单药治疗的耐受。

Sorafenib与REG相似,是一种靶向VEGFR、PDGFR和RAF/MEK/ERK级联的多靶点酪氨酸激酶抑制剂<sup>[17]</sup>。研究<sup>[18]</sup>发现sorafenib能够下调抗凋亡蛋白MCL-1水平促进HCC细胞的凋亡。细胞内MCL-1蛋白水平决定HCC细胞对sorafenib治疗的敏感性,高水平的MCL-1诱导HCC细胞对sorafenib治疗的耐受,靶向下调ERK1/2-MCL-1信号促进HCC细胞的凋亡并提高HCC细胞对sorafenib的敏感性<sup>[19-20]</sup>。我们报道了结肠癌细胞中REG单药能够下调FTD类似物5-FU诱导活化的ERK1/2-MCL-1信号,提高药物的联合效应及肿瘤细胞对药物治疗的敏感性<sup>[14]</sup>。本研究发现TAS102上调了细胞内MCL-1的蛋白水平,联合使用REG能够下调TAS102诱导升高的MCL-1蛋

白水平,提示二者的联合机制亦涉及HCC细胞中MCL-1信号的调控。

有研究<sup>[21]</sup>表明,REG能够抑制肿瘤生长及间质反应,阻断肿瘤细胞与间质干细胞间的相互促进作用,抑制肿瘤的生长和转移。之前的研究<sup>[22]</sup>证实SK-Hep1细胞系具有类似肝血窦内皮的细胞形态及免疫表型。提示药物治疗在肿瘤实质细胞及间质细胞中的作用及机制不同,体内实验综合评估药物作用是必要的。此外,REG处理48 h及8 d后对CD133阳性细胞亚群比例及肝癌干细胞球的生长调控变化不同,提示药物治疗对肿瘤干细胞性的作用是动态变化的。

本研究证实,REG联合TAS102能够提高抗肝癌的疗效,其协同作用机制涉及对肿瘤干细胞性及抗凋亡信号的调控。二者的联合使用为临床治疗难治性HCC提供了一种新的治疗策略。

#### [参 考 文 献]

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版) [J]. 中国实用外科杂志, 2020, 40(2): 121-138.  
Bureau of Medical Administration, National Health Commission of the People's Republic of China. Standardization for diagnosis and treatment of primary hepatic carcinoma (2019 edition) [J]. China J Practical Surg, 2020, 40(2): 121-138.
- [2] TEUFEL M, SEIDEL H, KÖCHERT K, et al. Biomarkers associated with response to regorafenib in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2019, 156(6): 1731-1741.
- [3] SHITARA K, DOI T, DVORKIN M, et al. Trifluridine/tipiracil versus placebo in patients with heavily pretreated metastatic gastric cancer (TAGS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2018, 19(11): 1437-1448.
- [4] ILSON D H, TABERNERO J, PROKHARAU A, et al. Efficacy and safety of trifluridine/tipiracil treatment in patients with metastatic gastric cancer who had undergone gastrectomy: subgroup analyses of a randomized clinical trial [J]. JAMA Oncol, 2019, 6(1): e193531.
- [5] CIOMBOR K K, BEKAIH-SAAB T. A comprehensive review of sequencing and combination strategies of targeted agents in metastatic colorectal cancer [J]. Oncologist, 2018, 23(1): 25-34.
- [6] SUZUKI N, NAKAGAWA F, MATSUOKA K, et al. Effect of a novel oral chemotherapeutic agent containing a combination of trifluridine, tipiracil and the novel triple angiokinase inhibitor nintedanib, on human colorectal cancer xenografts [J]. Oncol Rep, 2016, 36(6): 3123-3130.

- [ 7 ] PFEIFFER P, YILMAZ M, MÖLLER S, et al. TAS-102 with or without bevacizumab in patients with chemorefractory metastatic colorectal cancer: an investigator-initiated, open-label, randomised, phase 2 trial [ J ] . Lancet Oncol, 2020, 21(3): 412-420.
- [ 8 ] MOY R H, DOS SANTOS FERNANDES G, JONSSON P, et al. Regorafenib in combination with first-line chemotherapy for metastatic esophagogastric cancer [ J ] . Oncologist, 2020, 25(1): e68-e74.
- [ 9 ] PATEL A K, BARGHOUT V, YENIKOMSHIAN M A, et al. Real-world adherence in patients with metastatic colorectal cancer treated with trifluridine plus tipiracil or regorafenib [ J ] . Oncologist, 2020, 25(1): e75-e84.
- [ 10 ] LYTLE N K, BARBER A G, REYA T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance [ J ] . Nat Rev Cancer, 2018, 18(11): 669-680.
- [ 11 ] MATSUOKA K, KOBUNAI T, NUKATSUKA M, et al. Improved chemoradiation treatment using trifluridine in human colorectal cancer cells *in vitro* [ J ] . Biochem Biophys Res Commun, 2017, 494(1-2): 249-255.
- [ 12 ] TSUNEKUNI K, KONNO M, HARAGUCHI N, et al. CD44/CD133-positive colorectal cancer stem cells are sensitive to trifluridine exposure [ J ] . Sci Rep, 2019, 9(1): 14861.
- [ 13 ] ZHANG J, PEI Y, YANG W, et al. Cytoglobin ameliorates the stemness of hepatocellular carcinoma via coupling oxidative-nitrosative stress signals [ J ] . Mol Carcinog, 2019, 58(3): 334-343.
- [ 14 ] MARKS E I, TAN C, ZHANG J, et al. Regorafenib with a fluoropyrimidine for metastatic colorectal cancer after progression on multiple 5-FU-containing combination therapies and regorafenib monotherapy [ J ] . Cancer Biol Ther, 2015, 16(12): 1710-1719.
- [ 15 ] 李懿峰, 戴 谦, 王蓓丽, 等. 肝肿瘤细胞干性与糖代谢特点的相关性研究 [ J ] . 中国癌症杂志, 2019, 29(10): 773-779.
- LI Y H, DAI Q, WANG B L, et al. Correlation between cancer cell stemness and glucose metabolism characteristics in hepatocellular carcinoma [ J ] . China Oncol, 2019, 29(10): 773-779.
- [ 16 ] CANTER R J, AMES E, MAC S, et al. Anti-proliferative but not anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors enrich for cancer stem cells in soft tissue sarcoma [ J ] . BMC Cancer, 2014, 14: 756.
- [ 17 ] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [ J ] . Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [ 18 ] RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ M A, GONZÁLEZ R, DE LA ROSA Á J, et al. Molecular characterization of autophagic and apoptotic signaling induced by sorafenib in liver cancer cells [ J ] . J Cell Physiol, 2018, 234(1): 692-708.
- [ 19 ] HSU C, LIN LI, CHENG Y C, et al. Cyclin E1 inhibition can overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma cells through Mcl-1 suppression [ J ] . Clin Cancer Res, 2016, 22(10): 2555-2564.
- [ 20 ] SONG P, YANG S, HUA H, et al. The regulatory protein GADD34 inhibits TRAIL-induced apoptosis via TRAF6/ERK-dependent stabilization of myeloid cell leukemia 1 in liver cancer cells [ J ] . J Biol Chem, 2019, 294(15): 5945-5955.
- [ 21 ] TAKIGAWA H, KITADAI Y, SHINAGAWA K, et al. Multikinase inhibitor regorafenib inhibits the growth and metastasis of colon cancer with abundant stroma [ J ] . Cancer Sci, 2016, 107(5): 601-608.
- [ 22 ] TAI Y, GAO J H, ZHAO C, et al. SK-Hep1: not hepatocellular carcinoma cells but a cell model for liver sinusoidal endothelial cells [ J ] . Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(5): 2931-2938.

(收稿日期: 2020-12-02 修回日期: 2021-03-01)

## 《抗癌》杂志征稿启事

《抗癌》杂志于1988年创刊, 主管单位为上海市科学技术协会, 主办单位为上海市抗癌协会, 杂志刊号: CN 31-1664/R ISSN 1008-3065。征稿栏目及内容如下。

### 一、《生活篇》栏目

记录癌症患者自强不息、热爱生活、勇敢面对病痛和生活压力的故事, 能够启发其他患者自信和勇敢的精神, 帮助他们建立积极、知足、感恩和达观的生活态度。可以是你的亲身经历, 也可以是医生治疗患者时的所见所闻, 或是你身边发生的故事。

### 二、《正谊明道、大医精诚》栏目

真实记录医生对患者的关怀; 或是爱岗敬业、精益求精富有专业精神的事迹, 能让更多医道同仁敬重和学习。可以讲述患者眼里的医生, 也可以记录你的同事。

以上稿件《抗癌》编辑部在发表时有修改的权力, 如果不同意修改请注明, 谢谢! 欢迎大家踊跃投稿。

通信地址: 上海市东安路270号10号楼4楼《抗癌》编辑部 邮 编: 200032

电 话: 021-64042258; E-mail: anti-cancer@163.com

《抗癌》编辑部