

# 安罗替尼通过调控NF- $\kappa$ B信号通路对脑胶质瘤细胞恶性表型的影响<sup>Δ</sup>

柳新<sup>1\*</sup>, 李青山<sup>1</sup>, 谢云鹏<sup>2#</sup>, 张圣林<sup>1</sup>, 董怡<sup>1</sup>(1. 承德医学院附属医院肿瘤科, 河北承德 067000; 2. 承德医学院附属医院神经外科, 河北承德 067000)

中图分类号 R965;R739.41 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)02-0192-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.02.12



**摘要** 目的 探究安罗替尼通过调控核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路对脑胶质瘤细胞恶性表型的影响。方法 体外培养人脑胶质瘤T98G细胞,以5-氟尿嘧啶为阳性对照药物,考察不同浓度(5、10、20  $\mu$ mol/L)安罗替尼对该细胞增殖、黏附、迁移、侵袭能力和上皮间质转化(EMT)相关蛋白[上皮钙黏着蛋白(E-cadherin)、神经钙黏着蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、纤维连接蛋白(FN)]表达的影响,并通过加入NF- $\kappa$ B信号通路抑制剂(BAY 11-7082)和激活剂(prostratin)来验证安罗替尼上述作用的可能机制。结果 5、10、20  $\mu$ mol/L的安罗替尼均可显著降低细胞的增殖活力(5  $\mu$ mol/L安罗替尼组除外)和迁移率,显著减少黏附细胞数和侵袭细胞数,显著上调E-cadherin蛋白的表达并下调N-cadherin、vimentin、FN蛋白的表达( $P<0.05$ ),且20  $\mu$ mol/L安罗替尼的作用与阳性对照药物相当( $P>0.05$ );与10  $\mu$ mol/L安罗替尼比较,通路抑制剂可使细胞增殖、黏附、迁移、侵袭能力以及N-cadherin、vimentin、FN、磷酸化NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达显著降低,E-cadherin蛋白的表达显著上调( $P<0.05$ ),而通路激活剂则可使上述指标显著逆转( $P<0.05$ )。结论 安罗替尼可抑制人脑胶质瘤T98G细胞的增殖、黏附、迁移和侵袭,上述作用可能与通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路进而抑制细胞EMT样进程有关。

**关键词** 脑胶质瘤;安罗替尼;核因子 $\kappa$ B信号通路;上皮间质转化

## Effects of anlotinib on the malignant phenotype of glioma cells by mediating NF- $\kappa$ B signaling pathway

LIU Xin<sup>1</sup>, LI Qingshan<sup>1</sup>, XIE Yunpeng<sup>2</sup>, ZHANG Shenglin<sup>1</sup>, DONG Yi<sup>1</sup> (1. Dept. of Oncology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Hebei Chengde 067000, China; 2. Dept. of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Hebei Chengde 067000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the effects of anlotinib on the malignant phenotype of glioma cells by regulating the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. **METHODS** Human glioma T98G cells were cultured *in vitro*, and 5-fluorouracil was used as positive control to investigate the effects of different concentrations of anlotinib (5, 10, 20  $\mu$ mol/L) on the ability of proliferation, adhesion, migration and invasion, the expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins [E-cadherin, N-cadherin, vimentin and fibronectin (FN)]. NF- $\kappa$ B signaling pathway inhibitor (BAY 11-7082) and activator (prostratin) were additionally used to verify the possible mechanism of the above effects of anlotinib. **RESULTS** Anlotinib with 5, 10, 20  $\mu$ mol/L could significantly decrease the activity of cell proliferation (except for 5  $\mu$ mol/L anlotinib group), migration rate, and the number of adherent cells and invasive cells, could significantly up-regulate the expression of E-cadherin protein while down-regulate the expressions of N-cadherin, vimentin and FN protein ( $P<0.05$ ); the effect of 20  $\mu$ mol/L anlotinib was similar to that of positive control ( $P>0.05$ ). Compared with 10  $\mu$ mol/L anlotinib, pathway inhibitor could significantly decrease the ability of proliferation, adhesion, migration and invasion, and the expressions of N-cadherin, vimentin, FN and phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 protein, while could significantly up-regulate the expression of E-cadherin protein ( $P<0.05$ ); above indexes were reversed significantly by pathway activator ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Anlotinib may inhibit the proliferation, adhesion, migration and invasion of human glioma T98G cells, which may be associated with the inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway, thus inhibiting cell EMT-like processes.

**KEYWORDS** glioma; anlotinib; nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway; epithelial-mesenchymal transition

脑胶质瘤恶性程度高、发展速度快,为临床常见颅内恶性肿瘤,具有高复发率和高病死率的特点。由于脑胶质瘤的位置特殊,早期症状不明显,故大多数患者在

确诊时已处于中晚期,错过了最佳手术治疗时机,加之手术后复发率和转移率较高,放化疗毒副作用极大,严重影响了患者的生存质量<sup>[1]</sup>。可见,探究有效且安全的药物对于脑胶质瘤患者的临床治疗十分必要。

安罗替尼作为一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂,对多种生长因子受体激酶具有抑制作用,且能通过抑制相关转移信号通路来发挥抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>。研究指出,肿瘤细胞的迁移、侵袭与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal

<sup>Δ</sup>基金项目 河北省医学科学研究课题(No.20231363)

\* 第一作者 主治医师,硕士。研究方向:肿瘤学相关疾病的诊疗。

E-mail: liuxin662023@163.com

# 通信作者 副主任医师,硕士。研究方向:颅内肿瘤、脑血管病等的诊疗。E-mail: xyp830422@163.com

transition, EMT)关系密切,当EMT发生后,肿瘤细胞更具侵袭力,可进一步入侵周围组织、血管及淋巴管等,从而发生远处转移<sup>[9]</sup>。核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路是经典的信号转导通路,能参与调控肿瘤细胞迁移、侵袭、EMT、血管生成等过程<sup>[4-5]</sup>。可见,阻断NF- $\kappa$ B信号通路可作为改善肿瘤细胞恶性表型的重要途径。基于此,本研究拟探讨安罗替尼调控NF- $\kappa$ B信号通路对人脑胶质瘤细胞T98G黏附、迁移、侵袭及EMT样进程的影响,旨在为该药治疗脑胶质瘤提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括MCO18AIC型CO<sub>2</sub>培养箱(日本SANYO公司)、Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、WMS-1033型倒置荧光显微镜(上海无陌光学仪器有限公司)、FluorChem HD2型凝胶成像系统(美国ProteinSimple公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

安罗替尼对照品(货号S8726,纯度 $\geq$ 98%)购自美国Selleck Chemicals公司;5-氟尿嘧啶对照品(阳性对照,货号S17073-5g,纯度 $\geq$ 98%)、NF- $\kappa$ B通路抑制剂BAY 11-7082对照品(批号J07HS173399,纯度 $\geq$ 98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;NF- $\kappa$ B通路激活剂prostratin对照品(批号0000112801,纯度 $\geq$ 98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;DMEM-H培养基购自北京索莱宝科技有限公司;RIPA裂解液、CCK-8试剂盒均购自日本Dojindo公司;重组人纤维连接蛋白(recombinant human fibronectin, rFN)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;鼠源NF- $\kappa$ B p65、磷酸化NF- $\kappa$ B p65(phosphorylated NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65)、上皮钙黏着蛋白(E-cadherin)、神经钙黏着蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG二抗(批号分别为10021394、10021309、20000374、10010628、10017978、10016772、20000374、20000425)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

### 1.3 细胞

人脑胶质瘤细胞T98G(编号338721)购自商城北纳创联生物科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 人脑胶质瘤T98G细胞培养

取T98G细胞,复苏后接种于DMEM-H培养基(含10%胎牛血清、1%青-链霉素)中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养(培养条件下同),当细胞贴壁至80%~90%时进行传代,取第3代对数生长期细胞用于后续实验。

### 2.2 安罗替尼对T98G细胞恶性表型影响的考察

#### 2.2.1 细胞增殖活力

取对数生长期细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种至96孔板中,每孔100  $\mu$ L。将细胞分为对照组、安罗替尼不同浓度、阳性对照组,每组设置3个复孔。对照组细胞不进行干预;安罗替尼不同浓度组细胞分别用5、10、20  $\mu$ mol/L的安罗替尼<sup>[9]</sup>进行干预;阳性对照组细胞用50 mg/L的5-氟尿嘧啶<sup>[7]</sup>进行干预;同时,设置不加细胞的调零孔作为空白组。培养24 h后,每孔加入CCK-8溶液10  $\mu$ L,孵育2 h后,使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,并按下式计算细胞增殖活力:细胞增殖活力=(OD<sub>实验组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)/(OD<sub>对照组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)。

#### 2.2.2 细胞黏附能力

将20  $\mu$ g/mL的rFN(以不含胎牛血清的DMEM-H培养基稀释)铺于96孔板中,风干后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤20 min $\times$ 3次,备用。取对数生长期细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种至6孔板中,每孔50  $\mu$ L。按“2.2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后,收集各组细胞,用胰蛋白酶消化并制成单细胞悬液( $1 \times 10^4$ 个/mL)。取上述单细胞悬液100  $\mu$ L,接种至上述铺有rFN的96孔板中,于37℃培养1 h;以PBS洗涤3次,以甲醇固定10 min后,用结晶紫染液染色15 min;再以PBS洗涤3次,于显微镜下观察细胞黏附情况并记录黏附细胞(呈紫色)数。

#### 2.2.3 细胞迁移和侵袭能力

取对数生长期细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种至6孔板中,每孔300  $\mu$ L。按“2.2.1”项下方法分组、处理。待细胞融合至90%时,用200  $\mu$ L移液器枪头在每孔底部中央划一直线。分别于培养0、24 h时用显微镜观察并拍照,记录对应的划痕面积( $S_{0h}$ 、 $S_{24h}$ ),并按下式计算细胞迁移率:细胞迁移率=( $S_{0h}$ - $S_{24h}$ )/ $S_{0h} \times 100\%$ 。

取对数生长期细胞,以不含胎牛血清的DMEM-H培养基制成单细胞悬液( $1 \times 10^5$ 个/mL),取上述单细胞悬液0.25 mL,置于Transwell小室(需用基质胶处理5 h)上层;取含10%胎牛血清的DMEM-H培养基0.45 mL,置于Transwell小室下层。上室细胞按“2.2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后,弃去上清液,穿膜细胞用PBS清洗3次,以4%甲醇固定30 min后晾干;用0.1%结晶紫染液染色10 min,用PBS清洗3次,晾干。使用显微镜观察、拍照(每孔随机选择5个不同区域),并使用Image J图像分析软件记录侵袭细胞(呈紫色)数。

#### 2.2.4 细胞EMT相关蛋白的表达情况

取对数生长期细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种至6孔板中,每孔300  $\mu$ L。按“2.2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后,收集各组细胞,提取其蛋白后,进行定量、变性处理。取变性蛋白适量,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转膜,封闭2 h;以TBST缓冲液洗膜,加入E-cadherin、N-cadherin、vimentin、FN、 $\beta$ -actin一抗(稀释比例分别为1:2 000、1:10 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000),4℃下孵育过夜;以TBST缓冲液洗膜,加入

相应IgG二抗(稀释比例为1:2 000),室温下孵育2 h;以TBST缓冲液洗膜,加入显影液,使用凝胶成像系统成像并采用Image J软件进行分析,以目的蛋白与内参蛋白( $\beta$ -actin)的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

## 2.3 安罗替尼对T98G细胞恶性表型影响机制的验证

### 2.3.1 细胞增殖活力

取对数生长期细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种至96孔板中,每孔100  $\mu$ L。将细胞分为对照组、安罗替尼组、抑制剂组和激活剂组,每组设置3个复孔。对照组细胞不进行干预;安罗替尼组细胞分别用10  $\mu$ mol/L的安罗替尼(浓度参考“2.2”项下各实验结果设置)进行干预;抑制剂组细胞用10  $\mu$ mol/L的安罗替尼+5  $\mu$ mol/L的NF- $\kappa$ B通路抑制剂BAY 11-7082<sup>[8]</sup>进行干预;激活剂组细胞用10  $\mu$ mol/L的安罗替尼+1  $\mu$ mol/L的NF- $\kappa$ B通路激活剂prostratin<sup>[9]</sup>进行干预;同时,设置不加细胞的调零孔作为空白组。培养24 h后,按“2.2.1”项下方法检测各组细胞的增殖活力。

### 2.3.2 细胞黏附能力

取对数生长期细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种至6孔板中,每孔50  $\mu$ L。按“2.3.1”项下方法分组、处理,再按“2.2.2”项下方法检测各组黏附细胞数。

### 2.3.3 细胞迁移和侵袭能力

取对数生长期细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种至6孔板中,每孔300  $\mu$ L。按“2.3.1”项下方法分组、处理,再按“2.2.3”项下方法检测各组细胞迁移率和侵袭细胞数。

### 2.3.4 细胞EMT及NF- $\kappa$ B通路相关蛋白表达情况

取对数生长期细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种至6孔板中,每孔300  $\mu$ L。按“2.3.1”项下方法分组、处理,再按“2.2.4”项下方法检测各组细胞中E-cadherin、N-cadherin、vimentin、FN、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65蛋白(NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65的稀释比例分别为1:5 000、1:2 000)的相对表达量。

## 2.4 统计学方法

采用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用Tukey检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 安罗替尼对T98G细胞恶性表型的影响

#### 3.1.1 细胞增殖活力

与对照组( $1.00 \pm 0.07$ )比较,10、20  $\mu$ mol/L安罗替

尼组和阳性对照组细胞的增殖活力( $0.76 \pm 0.08$ 、 $0.53 \pm 0.05$ 、 $0.51 \pm 0.03$ )均显著降低( $P < 0.05$ );与阳性对照组( $0.51 \pm 0.03$ )比较,5、10  $\mu$ mol/L安罗替尼组细胞的增殖活力( $0.90 \pm 0.04$ 、 $0.76 \pm 0.08$ )均显著升高( $P < 0.05$ ),而20  $\mu$ mol/L安罗替尼组细胞的增殖活力( $0.53 \pm 0.05$ )则与阳性对照组相当( $P > 0.05$ )。

#### 3.1.2 细胞黏附能力

与对照组( $239.67 \pm 10.26$ )比较,5、10、20  $\mu$ mol/L安罗替尼组和阳性对照组的黏附细胞数( $179.67 \pm 15.31$ 、 $143.67 \pm 10.02$ 、 $96.00 \pm 5.29$ 、 $94.00 \pm 4.58$ )均显著减少( $P < 0.05$ ),且有浓度依赖趋势;与阳性对照组比较,5、10  $\mu$ mol/L安罗替尼组的黏附细胞数均显著增加( $P < 0.05$ ),而20  $\mu$ mol/L安罗替尼组的黏附细胞数则与阳性对照组相当( $P > 0.05$ )。结果见图1。

#### 3.1.3 细胞迁移和侵袭能力

与对照组[细胞迁移率为( $43.67 \pm 2.08$ )%、侵袭细胞数为( $42.67 \pm 3.79$ )]比较,5、10、20  $\mu$ mol/L安罗替尼组和阳性对照组的细胞迁移率[( $35.33 \pm 2.08$ )%、( $26.33 \pm 2.08$ )%、( $19.00 \pm 2.00$ )%、( $18.33 \pm 1.53$ )%]和侵袭细胞数( $32.00 \pm 2.65$ 、 $27.67 \pm 1.53$ 、 $15.67 \pm 1.53$ 、 $15.67 \pm 2.08$ )均显著降低( $P < 0.05$ ),且有浓度依赖趋势;与阳性对照组比较,5、10  $\mu$ mol/L安罗替尼组的细胞迁移率和侵袭细胞数均显著升高( $P < 0.05$ ),而20  $\mu$ mol/L安罗替尼组的上述指标则与阳性对照组相当( $P > 0.05$ )。结果见图2、图3。

#### 3.1.4 细胞EMT相关蛋白的表达情况

与对照组比较,各药物组细胞中E-cadherin蛋白的表达均显著上调,N-cadherin、vimentin、FN蛋白的表达均显著下调( $P < 0.05$ ),且有浓度依赖趋势;与阳性对照组比较,5、10  $\mu$ mol/L安罗替尼组细胞中E-cadherin蛋白的表达均显著下调( $P < 0.05$ ),N-cadherin、vimentin、FN蛋白的表达均显著上调( $P < 0.05$ );而20  $\mu$ mol/L安罗替尼组的上述蛋白表达则与阳性对照组相当( $P > 0.05$ )。结果见图4、表1。

## 3.2 安罗替尼对T98G细胞恶性表型影响的机制

### 3.2.1 细胞增殖活力

与对照组( $1.00 \pm 0.08$ )比较,安罗替尼组细胞的增殖活力( $0.76 \pm 0.07$ )显著降低( $P < 0.05$ );与安罗替尼组比较,抑制剂组细胞的增殖活力( $0.48 \pm 0.02$ )显著降低( $P < 0.05$ ),而激活剂组细胞的增殖活力( $1.01 \pm 0.08$ )则显著升高( $P < 0.05$ )。

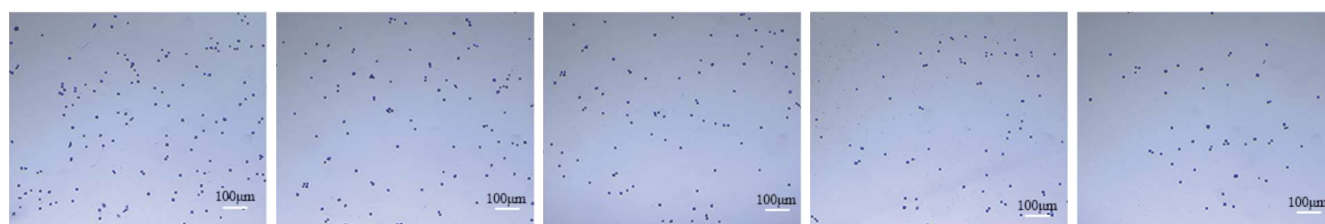


图1 不同浓度安罗替尼对细胞黏附能力的影响

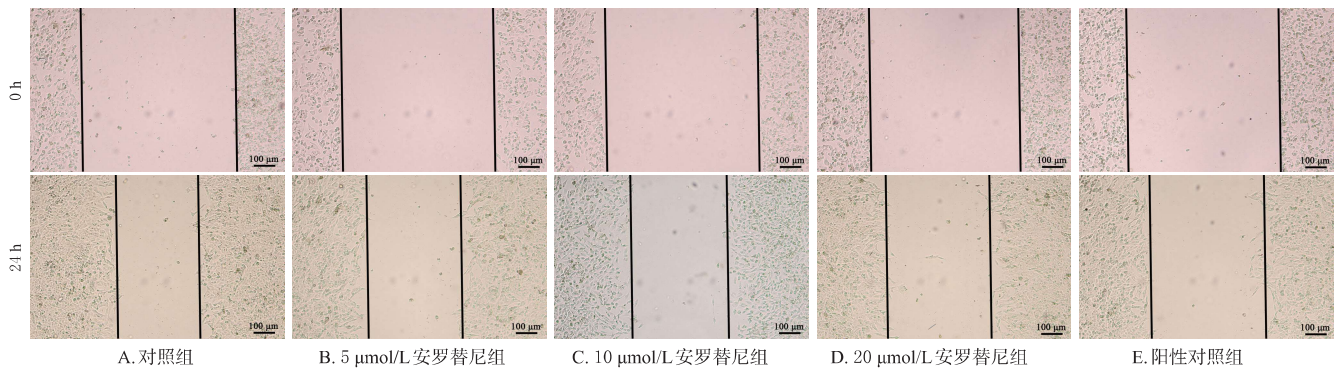


图2 不同浓度安罗替尼对细胞迁移能力的影响

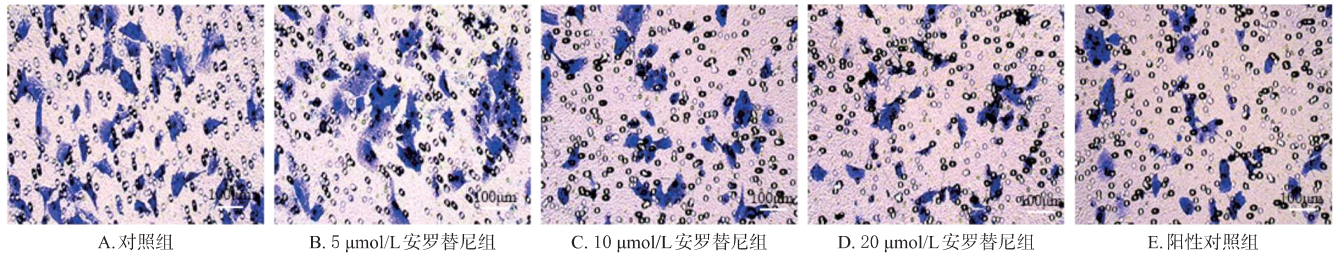


图3 不同浓度安罗替尼对细胞侵袭能力的影响

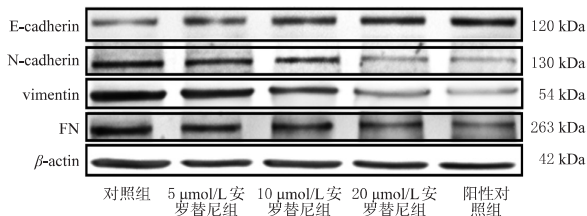


图4 不同浓度安罗替尼对细胞EMT相关蛋白表达影响的电泳图

表1 不同浓度安罗替尼对细胞EMT相关蛋白相对表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	E-cadherin	N-cadherin	vimentin	FN
对照组	0.25 ± 0.02	0.95 ± 0.02	2.02 ± 0.06	1.41 ± 0.03
5 μmol/L安罗替尼组	0.40 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.70 ± 0.01 <sup>ab</sup>	1.90 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.11 ± 0.06 <sup>ab</sup>
10 μmol/L安罗替尼组	0.70 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.40 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.91 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.84 ± 0.04 <sup>ab</sup>
20 μmol/L安罗替尼组	0.95 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>a</sup>
阳性对照组	1.00 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>a</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与阳性对照组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.2.2 细胞黏附能力

与对照组(243.00 ± 7.21)比较,安罗替尼组的黏附细胞数(143.67 ± 11.59)显著降低( $P < 0.05$ );与安罗替尼组比较,抑制剂组的黏附细胞数(73.67 ± 10.50)显著降低( $P < 0.05$ ),而激活剂组的黏附细胞数(228.67 ± 13.65)则显著升高( $P < 0.05$ )。结果见图5。

### 3.2.3 细胞迁移和侵袭能力

与对照组[细胞迁移率为(43.67 ± 2.08)%、侵袭细胞数为41.33 ± 3.51]比较,安罗替尼组的细胞迁移率[(24.00 ± 1.00)%]和侵袭细胞数(26.67 ± 1.53)均显著降低( $P < 0.05$ );与安罗替尼组比较,抑制剂组的细胞迁移率[(15.67 ± 1.15)%]和侵袭细胞数(13.33 ± 2.52)均显著降低( $P < 0.05$ ),而激活剂组的细胞迁移率[(45.33 ± 1.53)%]和侵袭细胞数(40.00 ± 2.65)则显著升高( $P < 0.05$ )。结果见图6、图7。

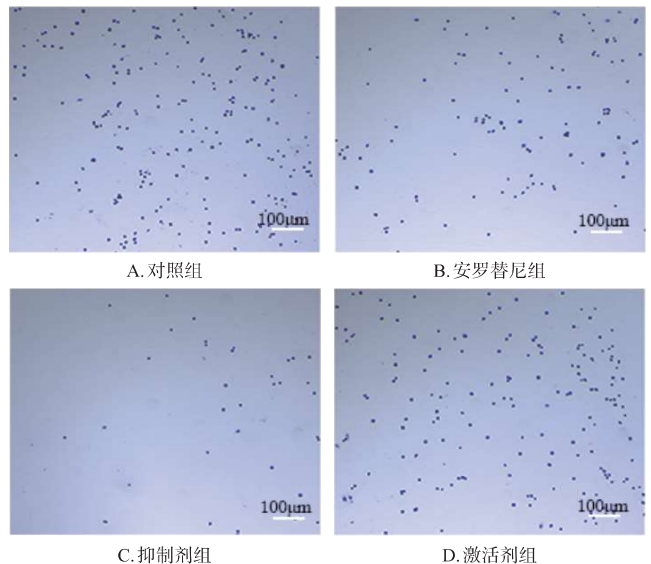


图5 机制验证中各组细胞的黏附能力比较

### 3.2.4 细胞EMT和NF-κB通路相关蛋白的表达情况

与对照组比较,安罗替尼组细胞中E-cadherin蛋白的表达显著上调,N-cadherin、vimentin、FN、p-NF-κB p65蛋白的表达均显著下调( $P < 0.05$ );与安罗替尼组比较,抑制剂组细胞中E-cadherin蛋白的表达显著上调( $P < 0.05$ ),N-cadherin、vimentin、FN、p-NF-κB p65蛋白的表达均显著下调,而激活剂组细胞中上述蛋白的变化则相反( $P < 0.05$ )。结果见图8、表2。

## 4 讨论

脑胶质瘤属于临床常见的具有高死亡率、高发病率特点的中枢神经系统肿瘤。虽然医学治疗水平在不断提高,但脑胶质瘤病灶很难通过手术彻底清除,患者极易复发,且一旦出现转移则难以进行有效治疗。脑胶质瘤细胞有丰富的新生血管,在其侵袭、转移过程中,肿瘤

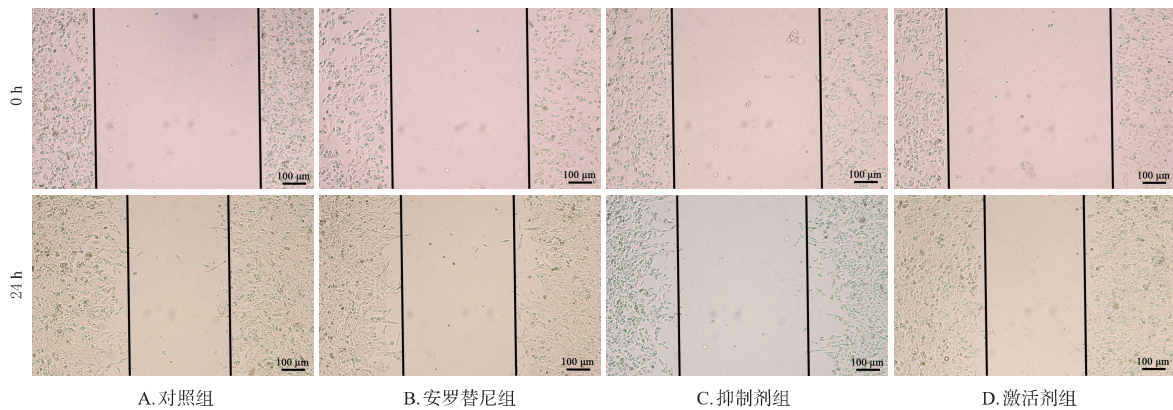


图6 机制验证中各组细胞的迁移能力比较

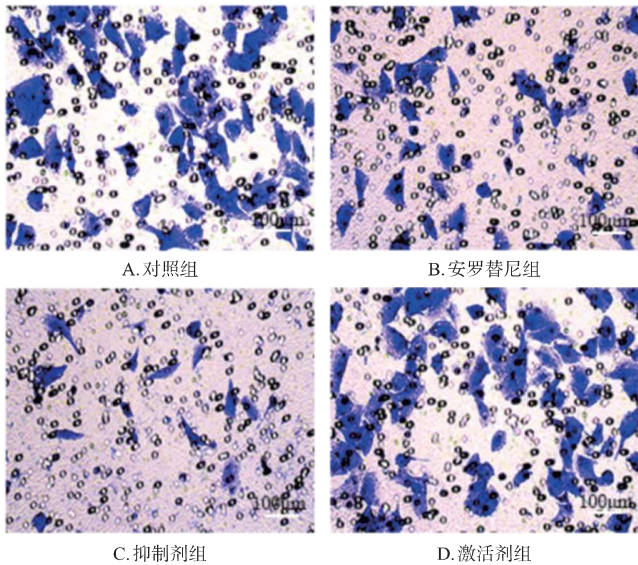


图7 机制验证中各组细胞的侵袭能力比较

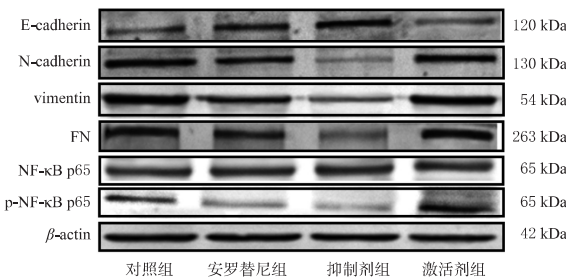


图8 机制验证中各组细胞中EMT和NF-κB通路相关蛋白表达的电泳图

表2 机制验证中各组细胞中EMT和NF-κB通路相关蛋白相对表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	E-cadherin	N-cadherin	vimentin	FN	NF-κB p65	p-NF-κB p65
对照组	0.40±0.03	1.41±0.04	2.30±0.11	0.95±0.02	0.96±0.04	0.36±0.03
安罗替尼组	0.60±0.02 <sup>a</sup>	0.95±0.02 <sup>a</sup>	1.01±0.07 <sup>b</sup>	0.77±0.08 <sup>a</sup>	0.96±0.04	0.27±0.03 <sup>a</sup>
抑制剂组	0.95±0.02 <sup>a</sup>	0.20±0.01 <sup>b</sup>	0.40±0.03 <sup>b</sup>	0.25±0.03 <sup>b</sup>	0.96±0.05	0.19±0.01 <sup>b</sup>
激活剂组	0.40±0.03 <sup>b</sup>	1.20±0.02 <sup>b</sup>	2.30±0.06 <sup>b</sup>	1.15±0.03 <sup>b</sup>	0.95±0.04	0.43±0.02 <sup>b</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与10 μmol/L安罗替尼组比较,  $P < 0.05$ 。

细胞可从原发病灶脱离、降解,随即入侵淋巴管或血管,并经淋巴或血液循环转移至远端形成新的病灶,呈现出高度侵袭性<sup>[1]</sup>,因此探寻有效抑制脑胶质瘤细胞转移及

侵袭的药物具有重要意义。

作为新型口服酪氨酸酶抑制剂,安罗替尼可通过抑制肿瘤血管形成而发挥抗肿瘤作用,现已获批用于肺癌、软组织肉瘤、甲状腺髓样癌等多种适应证,并可使晚期或转移性肝细胞癌、食管鳞癌患者在治疗中获益。研究表明,安罗替尼能抑制肺癌细胞生长和瘤体血管生成,且对人肝内胆管上皮肿瘤细胞 HCCC-9810 具有杀伤作用<sup>[10]</sup>;另有研究指出,安罗替尼联合替莫唑胺化疗可延缓脑胶质瘤患者的疾病进展<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,10、20 μmol/L安罗替尼组和阳性对照组细胞的增殖活力均显著低于对照组,提示其可抑制脑胶质瘤细胞的增殖;同时,20 μmol/L安罗替尼组细胞的增殖活力与阳性对照组比较差异无统计学意义,提示此剂量的安罗替尼对脑胶质瘤细胞增殖活力的抑制作用与50 mg/L的5-氟尿嘧啶相当,与陈彦民等<sup>[12]</sup>的研究结果基本一致。

肿瘤细胞的迁移、侵袭与EMT关系密切,其可借助EMT样进程形成有迁移能力的间充质细胞,从而诱导细胞向其他组织和器官转移<sup>[13]</sup>。有研究证实,EMT在肾癌、肺癌、乳腺癌细胞原位侵袭和远端转移中发挥了重要作用<sup>[14]</sup>。作为具有高度侵袭性的恶性肿瘤,脑胶质瘤的发生与细胞间质性改变关系密切<sup>[3]</sup>。由于EMT的影响,纤维细胞快速增多,其所含的细胞外基质也不断增多,从而导致了脑胶质瘤的持续恶化发展<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,不同浓度安罗替尼组和阳性对照组细胞黏附、迁移、侵袭能力均较对照组显著增强,且N-cadherin、vimentin、FN蛋白的表达均较对照组显著上调,E-cadherin蛋白的表达均较对照组显著上调;5、10 μmol/L安罗替尼组的上述指标改善程度均不及阳性对照组,而20 μmol/L安罗替尼组与阳性对照组比较差异均无统计学意义,表明20 μmol/L安罗替尼对脑胶质瘤细胞迁移、侵袭的抑制作用与阳性对照药相当。研究指出,发生EMT样进程后,肿瘤细胞的迁移和侵袭能力增强,主要表现为E-cadherin、N-cadherin、vimentin等细胞上皮间质分化标志蛋白表达的显著变化<sup>[16]</sup>。本研究结果提示,安罗替尼具有抑制脑胶质瘤细胞EMT样进程的能力,并可抑制其黏附、迁移和侵袭,与Nan等<sup>[17]</sup>的研究结果基本一致。

近年研究表明,多种肿瘤的发生发展和NF-κB信号

通路的异常激活有关<sup>[18]</sup>。NF- $\kappa$ B作为信号通路的中枢,在多种肿瘤细胞EMT样进程中发挥了重要作用,且抑制肿瘤细胞EMT样进程能够明显抑制其侵袭、转移<sup>[18]</sup>。为验证NF- $\kappa$ B信号通路的作用,本研究在10  $\mu$ mol/L安罗替尼的基础上分别联用通路抑制剂BAY 11-7082和激活剂prostratin进行验证,结果显示,与安罗替尼组比较,抑制剂组细胞的增殖活力,黏附、迁移、侵袭能力及N-cadherin、vimentin、FN、p-NF- $\kappa$ B p65蛋白的相对表达量均显著降低,E-cadherin蛋白的相对表达量显著升高,而激活剂组上述指标的变化趋势则相反。以上结果提示,安罗替尼可通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路来抑制细胞的EMT样进程,进而抑制脑胶质瘤细胞的增殖、黏附、迁移和侵袭,说明安罗替尼的抗胶质瘤作用与抑制NF- $\kappa$ B信号通路有关。

综上所述,安罗替尼可抑制人脑胶质瘤T98G细胞的增殖、黏附、迁移和侵袭,上述作用可能与抑制NF- $\kappa$ B信号通路进而抑制细胞EMT样进程有关。但本研究只针对NF- $\kappa$ B信号通路进行了研究,该药能否通过其他信号通路发挥抗胶质瘤作用尚需进一步探讨。

### 参考文献

[1] HUANG W, SHI Y, HAN B, et al. LncRNA GAS5-AS1 inhibits glioma proliferation, migration, and invasion via miR-106b-5p/TUSC2 axis[J]. *Hum Cell*, 2020, 33 (2): 416-426.

[2] SYED Y Y. Anlotinib: first global approval[J]. *Drugs*, 2018, 78(10):1057-1062.

[3] JIA Z X, ZHANG Z, LI Z, et al. Anlotinib inhibits the progress of colorectal cancer cells by antagonizing VEGFR/JAK2/STAT3 axis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(5):2331-2343.

[4] TANIGUCHI K, KARIN M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(5):309-324.

[5] 晋涛,陶胜忠,范鲁鼎,等.白藜芦醇基于NF- $\kappa$ B p65通路对脑胶质瘤细胞的作用[J]. *西北药学杂志*, 2023, 38(1):55-60.

JIN T, TAO S Z, FAN L D, et al. Effect of resveratrol on glioma cell through NF- $\kappa$ B p65 pathway[J]. *Northwest Pharm J*, 2023, 38(1):55-60.

[6] HU H Y, LIU Y Y, TAN S T, et al. Anlotinib exerts anti-cancer effects on KRAS-mutated lung cancer cell through suppressing the MEK/ERK pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:3579-3587.

[7] ALKİŞ M E, TURAN N, ALAN Y, et al. Effects of electroporation on anticancer activity of 5-FU and newly synthesized zinc (II) complex in chemotherapy-resistance human brain tumor cells[J]. *Med Oncol*, 2021, 38(11):129.

[8] 张静,周永刚,舒俊斌,等. miR-130b在胶质瘤对替莫唑胺耐药中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(4): 597-605.

ZHANG J, ZHOU Y G, SHU J B, et al. miR-130b

reverses temozolomide resistance in glioma[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2019, 35(4):597-605.

[9] 张晶,苏畅,孔凡铭,等.基于IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B通路探究香菇多糖联合顺铂对乳腺癌的干预作用[J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(9):1932-1937.

ZHANG J, SU C, KONG F M, et al. Explore the intervention effect of lentinan combined with cisplatin on breast cancer based on IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Drugs Clin*, 2022, 37(9):1932-1937.

[10] RUAN X H, SHI X L, DONG Q M, et al. Antitumor effects of anlotinib in thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2019, 26(1):153-164.

[11] 许礼平,李玉蓉,唐心宇,等.安罗替尼联合替莫唑胺治疗复发性高级别脑胶质瘤患者的临床研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(4):464-468.

XU L P, LI Y R, TANG X Y, et al. Clinical study of anlotinib in combination with temozolomide in patients with recurrent high-grade glioma[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39(4):464-468.

[12] 陈彦民,邹明雷,李丽,等.安罗替尼通过上调miR-33b抑制PI3K/AKT信号通路来抑制HeLa增殖、迁移侵袭的作用机制[J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(5):706-711.

CHEN Y M, ZOU M L, LI L, et al. Amrotinib inhibited HeLa proliferation and migration invasion by upregulating miR-33b and inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Pract J Cancer*, 2022, 37(5):706-711.

[13] XU B, LI J, LIU X X, et al. TXNDC5 is a cervical tumor susceptibility gene that stimulates cell migration, vasculogenic mimicry and angiogenesis by down-regulating SERPINF<sub>1</sub> and TRAF<sub>1</sub> expression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(53):91009-91024.

[14] KIM B N, AHN D H, KANG N, et al. TGF- $\beta$  induced EMT and stemness characteristics are associated with epigenetic regulation in lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):10597.

[15] 曾英,肖华亮,郭乔楠.胶质母细胞瘤上皮间叶转化机制研究进展[J]. *诊断病理学杂志*, 2019, 26(8):533-538.

ZENG Y, XIAO H L, GUO Q N. Advances in epithelial-mesenchymal transition of glioblastoma[J]. *Chin J Diagn Pathol*, 2019, 26(8):533-538.

[16] SHASH L S, IBRAHIM R A, ELGOHARY S A. E-cadherin and N-cadherin immunohistochemical expression in proliferating urothelial lesions: potential novel cancer predictive EMT profiles[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2021, 29(9):657-666.

[17] NAN Y, GUO L Y, LU Y L, et al. MiR-451 suppresses EMT and metastasis in glioma cells[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(13):1270-1278.

[18] MULERO M C, WANG V Y, HUXFORD T, et al. Genome reading by the NF- $\kappa$ B transcription factors[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(19):9967-9989.

(收稿日期:2023-07-11 修回日期:2023-11-01)

(编辑:张元媛)