

[文章编号] 1671-587X(2024)04-1009-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.202404015

甲磺酸阿帕替尼联合放疗对肝癌 HepG2 细胞的体外协同增敏作用

杨永净, 柯天洋, 刘士新, 王 雪, 许德权, 刘婷婷, 赵 玲
(吉林省肿瘤医院放疗一科, 吉林 长春 130012)

[摘要] **目的:** 探讨甲磺酸阿帕替尼(阿帕替尼)联合放射治疗(放疗)对肝癌 HepG2 细胞的体外协同抑制作用, 阐明其相关抗肿瘤机制。**方法:** 体外培养肝癌 HepG2 细胞, 以不同浓度阿帕替尼和(或)不同剂量 X 射线处理后, 采用 MTT 法检测各组细胞活性, 计算各组细胞增殖抑制率和阿帕替尼 20% 抑制浓度 (IC₂₀), 并确定后续实验的 X 射线照射剂量。HepG2 细胞分为阿帕替尼组、放疗组和阿帕替尼+放疗组(联合组), 流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 细胞划痕实验检测各组细胞迁移率, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组细胞培养上清中血管内皮生长因子 (VEGF) 水平。**结果:** MTT 法检测, 阿帕替尼的 IC₂₀ 为 1.32 μmol·L⁻¹, 以此作为后续实验阿帕替尼作用浓度, 确定 2 Gy 为后续实验 X 射线照射剂量。与对照组比较, 阿帕替尼组和放疗组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P>0.05$), 联合组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)。与对照组比较, 阿帕替尼组、放疗组和联合组细胞迁移率降低 ($P<0.05$); 与阿帕替尼组和放疗组比较, 联合组细胞迁移率降低 ($P<0.05$)。与对照组比较, 阿帕替尼组和联合组细胞培养上清中 VEGF 水平降低 ($P<0.05$); 与阿帕替尼和放疗组比较, 联合组细胞培养上清中 VEGF 水平降低 ($P<0.05$)。**结论:** 阿帕替尼联合放疗在体外可明显抑制肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移, 并诱导细胞凋亡, 其作用可能与抑制细胞 VEGF 分泌有关。

[关键词] 肝细胞癌; 甲磺酸阿帕替尼; 放射治疗; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞迁移; 血管内皮细胞生长因子

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

Synergistic sensitization of apatinib mesylate and radiotherapy on hepatocarcinoma cells *in vitro*

YANG Yongjing, KE Tianyang, LIU Shixin, WANG Xue, XU Dequan, LIU Tingting, ZHAO Ling
(Department of Radiation Oncology, Tumor Hospital, Jilin Province, Changchun 130012, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the synergistic inhibitory effect of apatinib mesylate (apatinib) combined with radiotherapy (RT) on the hepatocellular carcinoma (HepG2) cells *in vitro*, and to clarify its related antitumor mechanism. **Methods:** The HepG2 cells were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of apatinib and/or varying doses of X-rays. MTT method was used to detect the survival rates of the cells in various groups; the inhibitory rates of cell proliferation and the 20% inhibitory concentration (IC₂₀) of apatinib were calculated; the X-ray irradiation dose for subsequent experiments was detected. The HepG2 cells were divided into apatinib group, RT group, and apatinib+RT group (combined group). Flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups;

[收稿日期] 2023-07-15

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目 (20160101163JC); 北京市希思科临床肿瘤学研究基金项目 (201611234)

[作者简介] 杨永净 (1975-), 女, 吉林省榆树市人, 副主任医师, 医学硕士, 主要从事恶性肿瘤精准放疗方面的研究。

[通信作者] 赵 玲, 主任医师 (E-mail: 2267398336@qq.com)

wound healing assay was used to detect the migration rates of the cells in various groups; ELISA method was used to detect the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the cell culture supernatant in various groups. **Results:** The MTT results showed that the IC_{20} of apatinib was $1.32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and this concentration was used for subsequent experiments, and the X-ray irradiation dose for the follow-up experiments was 2 Gy. Compared with control group, the apoptotic rates of the cells in apatinib group and RT group had no significant differences ($P>0.05$), while the apoptotic rate of the cells in combined group was increased ($P<0.05$). Compared with control group, the migration rates of the cells in apatinib group, RT group, and combined group were decreased ($P<0.05$); compared with apatinib group and RT group, the migration rate of the cells in combined group was decreased ($P<0.05$). Compared with control group, the levels of VEGF in the cell culture supernatant in apatinib group and combined group were decreased ($P<0.05$); compared with apatinib and RT group, the level of VEGF in the cell culture supernatant in combined group was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Apatinib combined with radiotherapy significantly inhibits the proliferation and migration of the HepG2 cells *in vitro* and induces the apoptosis; its effect may be related to the inhibition of VEGF secretion by cells.

KEYWORDS Hepatocellular carcinoma; Apatinib mesylate; Radiotherapy; Cell proliferation; Apoptosis; Cell migration; Vascular endothelial growth factor

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是癌症相关死亡最常见的原因之一, 已位居世界恶性肿瘤发病的第2位。由于HCC起病隐匿, 多数HCC患者在发现时已失去手术机会, 且治疗方法有限, 近年来HCC治疗领域中并未出现明显的疗效提升^[1]。放射治疗(放疗)是治疗HCC的有效手段之一, 提高HCC对放疗的敏感性成为临床中亟待解决的问题之一。目前小样本I期及探索性临床试验^[2-4]证实: 放疗联合甲磺酸阿帕替尼(阿帕替尼)可用于不可切除HCC患者的治疗, 但两者联合应用的效果和作用机制尚需进一步研究。本研究通过体外实验, 探索并验证阿帕替尼联合放疗对肝癌HepG2细胞的增效作用, 为HCC的精准治疗提供可行性方案。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人肝癌HepG2细胞购自中科院上海细胞库。阿帕替尼原料粉末由江苏恒瑞医药股份有限公司提供。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国Gibco公司, DMEM高糖培养基、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS)、青霉素-链霉素和0.25%胰蛋白酶均购自美国Hyclone公司, 噻唑蓝 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 和二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自北京鼎国公司, Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自美国BD公司, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth

factor, VEGF) 检测试剂盒购自美国R&D公司。CO₂孵育箱购自日本Thermo公司, Wellscan Mk3酶标仪购自美国Thermo公司, Calibur流式细胞仪购自美国BD公司, DMI3000荧光显微镜购自德国莱卡公司。

1.2 细胞培养 HepG2细胞采用DMEM高糖培养基 (含10%灭活胎牛血清和1%青霉素-链霉素) 置于37℃、5% CO₂孵箱中培养, 待细胞达到90%覆盖率时进行传代培养。

1.3 MTT法检测不同剂量阿帕替尼处理和不同剂量X射线照射后各组细胞增殖抑制率 收集对数生长期细胞并调整为 $5\times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ 密度的单细胞悬液, 接种于96孔培养板中。待细胞贴壁后加入DMEM培养基配制的阿帕替尼, 使其终浓度分别为0、1、2、4、8、16和32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 照射条件: 使用直线加速器照射, 放射源为6MV-X射线, 源皮距100 cm, 照射剂量分别为0、1、2、4和8 Gy。采用MTT法检测490 nm波长处各组细胞吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率= (对照组A值-实验组A值)/对照组A值 $\times 100\%$, 并计算20%抑制浓度 (20% inhibitory concentration, IC_{20}), 并以 IC_{20} 作为阿帕替尼浓度进行后续试验。HepG2细胞分为对照组、阿帕替尼组、不同剂量(1、2和4 Gy)放疗组和联合组(阿帕替尼+1、2和4 Gy放疗组), 计算各组细胞增殖抑制率, 确定后续实验放疗剂量。

1.4 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 HepG2细

胞分为对照组、阿帕替尼组、放疗组和联合组, 培养48 h后收集各组对数生长期细胞, PBS缓冲液洗涤2次后, 加入Annexin V-FITC和PI各5 μL , 室温避光孵育15 min, 上机前加入1 \times Binding Buffer 400 μL , 1 h内采用流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 收集20 000个细胞进行分析。根据检测结果将染色细胞定义为早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)和晚期凋亡细胞(Annexin V+/PI+), 计算各组细胞凋亡率。细胞凋亡率=早期细胞凋亡率+晚期细胞凋亡率。

1.5 细胞划痕试验检测各组细胞迁移率 细胞分组见“1.4”。采用含0.5%血清培养基培养各组细胞, 在6孔细胞培养板中采用10 μL 吸头划1条垂直线, PBS缓冲液清洗未贴壁细胞。在倒置显微镜下分别记录0和24 h的细胞迁移距离, 计算各组细胞迁移率。细胞迁移率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 \times 100%。实验重复3次。

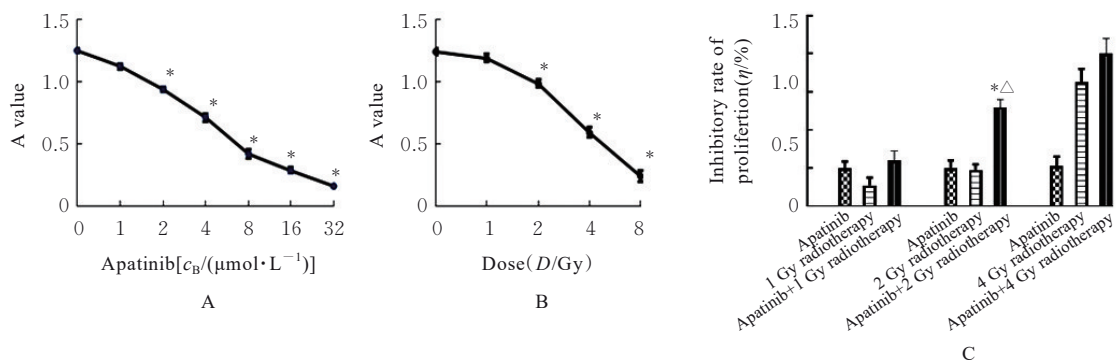
1.6 酶联免疫吸附试验(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)法检测各组细胞培养上清中VEGF水平 细胞分组见“1.4”。在已包被的反应孔中加入稀释后待检样品及标准品各50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。采用洗涤液清洗2次。在各反应孔中分别加入新配制的酶标抗体100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 50 μL 底物液显色, 孵育20 min后加入终

止液, 立即在酶标仪中检测450 nm波长处A值, 并绘制标准曲线, 计算VEGF水平。

1.7 统计学分析 采用SPSS17.0统计软件进行统计学分析, 采Graph Prism 5.0软件根据数据制图。各组细胞增殖抑制率、细胞凋亡率、细胞迁移率和细胞培养上清中VEGF水平经正态性检验均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖抑制率 不同浓度(0、1、2、4、8、16和32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)阿帕替尼作用HepG2细胞48 h后, 与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿帕替尼组比较, 2、4、8、16和32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿帕替尼组细胞活性呈剂量依赖性降低($P<0.01$) (图1A)。为了确定放疗对HepG2细胞最佳抑制剂量, 分别给予0、1、2、4和8 Gy X射线单次照射, 与0 Gy放疗组比较, 2、4和8 Gy放疗组细胞活性呈剂量依赖性降低($P<0.01$) (图1B)。48 h时阿帕替尼的 IC_{20} 值为1.32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 以该浓度联合不同剂量(1、2和4 Gy)放疗进行联合处理, 结果显示: 阿帕替尼联合2 Gy放疗组细胞增殖抑制率明显高于阿帕替尼组和2 Gy放疗组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 故以2 Gy为后续实验的放疗剂量(图1C)。



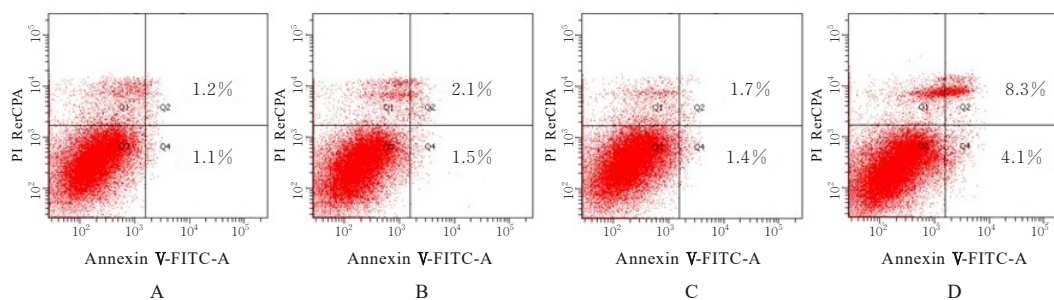
A: Effects of different concentrations of apatinib on HepG2 cell proliferation ($*P<0.01$ vs 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ apatinib group); B: Inhibitory effects of X-ray with different doses on HepG2 cells ($*P<0.01$ vs 0 Gy radiotherapy group); C: Inhibitory effects of apatinib combined with X-ray with different doses on HepG2 cell proliferation ($*P<0.01$ vs apatinib group; $\Delta P<0.05$ vs 2 Gy radiotherapy group).

图1 阿帕替尼和放疗对HepG2细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of apatinib and radiotherapy on proliferation of HepG2 cells

2.2 各组细胞凋亡率 处理HepG2细胞48 h后, 对照组、阿帕替尼组、放疗组和联合组细胞凋亡率分别为(2.54 \pm 0.62)%、(3.78 \pm 0.91)%、(3.12 \pm 0.55)%和(12.51 \pm 3.74)%, 各组间细胞

凋亡率比较差异有统计学意义($F=16.64$, $P<0.05$)。与对照组比较, 阿帕替尼组和放疗组细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$), 联合组细胞凋亡率升高($P<0.05$)。见图2。



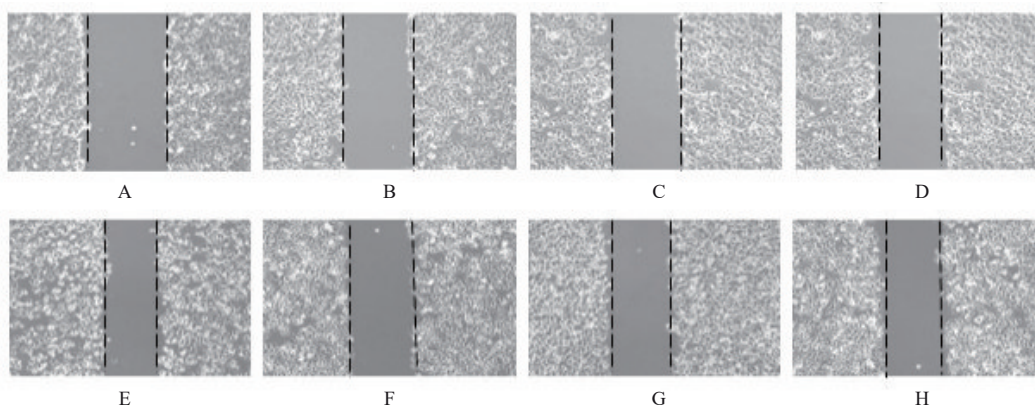
A: Control group; B: Apatinib group; C: Radiotherapy group; D: Combination group.

图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Fig. 2 Apoptotic rates of cells in various groups detected by flow cytometry

2.3 各组细胞迁移率 细胞划痕实验结果显示：各组细胞迁移率比较差异有统计学意义 ($F=29.10$, $P<0.05$)。与对照组 ($59.33\% \pm 6.02\%$) 比较，阿帕替尼组、放疗组和联合组细胞迁移率

($35.67\% \pm 4.51\%$ 、 $36.33\% \pm 4.04\%$ 和 $22.33\% \pm 4.93\%$) 降低 ($P<0.05$)；与阿帕替尼和放疗组比较，联合组细胞迁移率降低 ($P<0.05$)。见图3。



A-D: 0 h; E-H: 24 h; A, E: Control group; B, F: Apatinib group; C, G: Radiotherapy group; D, H: Combination group.

图3 细胞划痕实验检测各组细胞迁移情况($\times 200$)

Fig. 3 Migration of cells in various groups detected by cell wound assay ($\times 200$)

2.4 各组细胞培养上清中 VEGF 水平 各组细胞培养上清中 VEGF 水平比较差异有统计学意义 ($F=17.78$, $P<0.01$)。与对照组比较，阿帕替尼组和联合组细胞培养上清中 VEGF 水平降低 ($P<0.05$)，放疗组细胞培养上清中 VEGF 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与阿帕替尼和放疗组比较，联合组细胞培养上清中 VEGF 水平降低 ($P<0.05$)。见表1。

3 讨论

放疗作为 HCC 重要的局部治疗手段之一，与靶向治疗和免疫治疗等多种治疗方法联合，可改善 HCC 患者的预后。目前获批一线治疗 HCC 的靶向药物仅有索拉非尼和仑伐替尼，且临床疗效受限于

表1 各组细胞培养上清中 VEGF 水平

Tab. 1 Levels of VEGF in cell supernatant in various groups

[$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	VEGF
Control	643.667 \pm 90.666
Apatinib	416.666 \pm 61.592*
Radiotherapy	617.666 \pm 70.946
Combination	287.667 \pm 48.439 $^{\Delta\#}$

* $P<0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P<0.05$ compared apatinib group; $^{\#}P<0.05$ compared with radiotherapy group.

多种因素。阿帕替尼作为我国自主研发的新型小分子抗血管生成的酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKI)，可高度选择性结合并抑制

血管内皮细胞生长因子受体2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2), 进而抑制肿瘤血管生成和肿瘤细胞生长^[5]。近年来研究^[6-7]显示: 放疗与抗血管生成药物具有协同作用, 能够提高抗肿瘤效果, 抗血管生成药物可抑制肿瘤血管生成, 促进肿瘤血管正常化, 改善肿瘤缺氧, 而缺氧是放疗抵抗最重要的因素, 因此推测两者之间可能存在协同效应。研究^[8-10]显示: 阿帕替尼可延长晚期胃癌和肝癌患者的总生存期, 且能增强食管癌和宫颈癌的放疗敏感性。LIANG等^[11]研究显示: 立体定向消融放疗 (stereotactic ablative radiotherapy, SABR) 联合阿帕替尼可通过逆转肺癌免疫抑制, 改善肿瘤微环境, 有效引发SABR诱导的远隔效应。因此抗血管药物与放疗联合可能成为肝癌治疗的新方案之一, 但联合作用的机制复杂, 涉及肿瘤细胞本身及氧供状态、基质和血管等肿瘤微环境。

一项Ⅲ期临床试验研究^[12]显示: 阿帕替尼可明显改善接受过治疗的晚期HCC患者的总生存期, 且安全性可控。阿帕替尼联合放疗在肝癌治疗中可能具有协同增敏作用。研究^[2-4]显示: 阿帕替尼联合调强放疗治疗不可切除/经肝动脉化疗栓塞 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE) 疗效不佳的HCC患者具有明显效果。在阿帕替尼联合调强放疗治疗不可切除HCC患者的I期临床试验^[2]中采用3+3剂量递增设计, 推荐采用阿帕替尼250 mg联合调强适形放疗 (intensity-modulated radiation therapy, IMRT) 治疗不可切除HCC。在阿帕替尼联合IMRT治疗不可切除HCC的探索性临床试验^[3]中, 评价了联合治疗方案的临床疗效和安全性, HCC患者6和12个月的总生存率分别为96.7%和66.2%, 客观缓解率 (objective response rate, ORR) 和疾病控制率 (disease control rate, DCR) 分别为15.1%和81.8%, 3~4级肝脏不良反应发生率为12.1%, 无放射性肝病和5级毒性, 表明阿帕替尼联合IMRT可改善HCC患者的无进展生存 (progression free survival, PFS) 率和DCR, 安全性可接受。QIN等^[12]研究证实: IMRT联合阿帕替尼具有良好的疗效和耐受安全性, 是TACE疗效不佳的不可切除HCC患者的潜在治疗选择。目前也有学者开始关注放疗和阿帕替尼联合免疫治疗对HCC并发门静脉癌栓患者的有效性和安全性^[13]。一项前瞻性多中心研究正在进行中^[14], 该研究将首次评估SABR和阿帕替尼联

合卡瑞利珠单抗治疗HCC的有效性和安全性, 其结果可能为肝癌建立一个新的标准一线治疗方案。

本研究结果显示: 阿帕替尼可呈剂量依赖性抑制肝癌HepG2细胞增殖, 与姜增凯等^[15]研究结论一致, 其研究证实阿帕替尼可通过多种信号通路抑制肝癌细胞的增殖, 本研究证实阿帕替尼联合放疗对HepG2细胞增殖的抑制作用更明显。

抗血管生成药物已被证明与放疗有协同作用, 其作用机制为: 抗血管生成药物可能抑制放疗引起的新血管形成; 血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 抑制剂可抑制VEGF, 通过增强树突状细胞程序性死亡1的表达, 减弱放疗引起的热沉效应^[16]。阿帕替尼主要通过阻断VEGF和磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B (phosphatidylinositide 3-kinases/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路抑制肝癌细胞的迁移、侵袭和血管生成^[17]。本研究结果表明: 阿帕替尼 ($1.32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 或放疗 (2 Gy) 对HepG2细胞凋亡无明显影响, 但联合作用后细胞凋亡率升高, 与殷亮等^[18]对结肠癌细胞的研究结论部分一致, 同时阿帕替尼联合放疗可明显降低细胞迁移能力, 与HSU等^[19]和MEIJER等^[20]在头颈部肿瘤中的研究结果一致。研究^[21]显示: 阿帕替尼对肝癌细胞的抑制作用与VEGF表达有关。HCC是一种典型的VEGFR高表达的高血管性肿瘤, 肿瘤血管生成提供了肿瘤发生、发展和转移所需的营养和氧气^[22], VEGF和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 表达可促进肿瘤血管生成、生长和转移^[23], 既往研究^[24]表明: VEGF信号通路促进内皮细胞中MMPs激活。因此推测阿帕替尼联合放疗对肝癌HepG2细胞的体外协同增敏作用可能与VEGF分泌被抑制有关。CHEN等^[25]研究表明: 阿帕替尼对上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和肿瘤发生的抑制作用可能与细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)-VEGF/基质金属蛋白酶9 (matrix metalloproteinases 9, MMP9) 信号通路有关。目前已有研究^[26]证实了上述观点。此外, 有研究^[27-28]显示: 阿帕替尼在HCC中具有放疗增敏剂的作用, 而PI3K/AKT信号通路在介导阿帕替尼的放疗增敏中起关键作用。

综上所述, 阿帕替尼联合放疗在体外可明显抑制肝癌HepG2细胞增殖和迁移, 并诱导细胞凋亡,

其作用机制可能与抑制细胞 VEGF 分泌有关。

作者贡献声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

杨永净参与研究设计、实验质量控制和论文撰写,柯天洋参与实验操作、数据收集和统计学分析,刘士新参与研究设计和实验质量控制,王雪参与实验数据收集和参考文献整理,许德权和刘婷婷参与实验操作和数据收集整理,赵玲参与研究设计、实验质量控制和论文审校。

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *Ca A Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [2] WANG H, ZHU X, ZHAO Y, et al. Phase 1 trial of apatinib combined with intensity-modulated radiotherapy in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1):771.
- [3] QIU H, KE S, CAI G, et al. An exploratory clinical trial of apatinib combined with intensity-modulated radiation therapy for patients with unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(1): 213-222.
- [4] LIU X, LUO J, ZHANG L, et al. SIB-IMRT combined with apatinib for unresectable hepatocellular carcinoma in patients with poor response to transarterial chemoembolization[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2022, 46(6):101897.
- [5] DVORAK H F. Tumor stroma, tumor blood vessels, and antiangiogenesis therapy[J]. *Cancer J*, 2015, 21(4): 237-243.
- [6] RIM C H, SEONG J. Application of radiotherapy for hepatocellular carcinoma in current clinical practice guidelines[J]. *Radiat Oncol J*, 2016 Sep; 34(3): 160-167.
- [7] JIANG S, ZHOU Y, ZOU L, et al. Low-dose Apatinib promotes vascular normalization and hypoxia reduction and sensitizes radiotherapy in lung cancer[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(4): 4434-4445.
- [8] 冯久桓,秦叔逵,王琳.甲磺酸阿帕替尼的研究现状与进展[J].*临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(4): 345-356.
- [9] 孙菲,孙志强,汪建林,等.阿帕替尼对食管癌 Kyse150 细胞放射敏感性影响的实验研究[J].*中华放射医学与防护杂志*, 2017, 37(11): 805-809.
- [10] 刘伟,张建文.阿帕替尼联合放疗对 HeLa 细胞周期和凋亡影响的体外研究[J].*安徽医科大学学报*, 2018, 53(1): 55-58.
- [11] LIANG L J, HU C X, WEN Y X, et al. Apatinib combined with local irradiation leads to systemic tumor control via reversal of immunosuppressive tumor microenvironment in lung cancer[J]. *Cancer Res Treat*, 2020, 52(2):406-418.
- [12] QIN S, LI Q, GU S, et al. Apatinib as second-line or later therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma (AHELP): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2021, 6(7):559-568.
- [13] 张延藏,王满周,韩新巍,等.载药栓塞微球经肝动脉化疗栓塞术联合阿帕替尼治疗不可切除肝癌后二线追加卡瑞利珠单抗的安全性和有效性分析[J].*临床肝胆病杂志*, 2023, 39(4): 834-842.
- [14] HU Y, QIN T, LI S, et al. Efficacy and safety of SBRT combined with Camrelizumab and Apatinib in HCC patients with PVTT: Study protocol of a randomized controlled trial[J]. *Front Oncol*, 2020, 26(10):1589.
- [15] 姜增凯,叶晓歌,陈琴华.阿帕替尼对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响研究[J].*中国临床药理学杂志*, 2016, 32(15):1422-1424.
- [16] QI X, YANG M, MA L, et al. Synergizing sunitinib and radiofrequency ablation to treat hepatocellular cancer by triggering the antitumor immune response[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2):e001038.
- [17] SONG J, GUAN Z, SONG C, et al. Apatinib suppresses the migration, invasion and angiogenesis of hepatocellular carcinoma cells by blocking VEGF and PI3K/AKT signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6):429.
- [18] 殷亮,王苾,黄凤昌,等.甲磺酸阿帕替尼对结肠癌 HCT-116 细胞增殖的抑制作用及其机制[J].*南方医科大学学报*, 2017, 3: 367-372.
- [19] HSU H W, GRIDLEY D S, KIM P D, et al. Linifanib (ABT-869) enhance radiosensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. *Oral Oncol*, 2013, 49(6): 591-597.
- [20] MEIJER T W, KAANDERS J H, SPAN P N, et al. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20): 5585-5594.
- [21] 王一,李锦毅.索拉非尼与阿帕替尼对人肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制作用比较[J].*中华灾害救援医学*, 2017, 5(12): 681-684.
- [22] LIN D, WU J. Hypoxia inducible factor in hepatocellular carcinoma: A therapeutic target [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(42): 12171-12178.

- [23] NG E W, SHIMA D T, CALIAS P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(2): 123-132.
- [24] BROWN DM, REGILLO CD. Anti-VEGF agents in the treatment of neovascular age-related macular degeneration: applying clinical trial results to the treatment of everyday patients [J]. *Am J Ophthalmol*, 2007, 144(4):627-37.
- [25] CHEN Y, CHEN X, DING X, et al. Afatinib, an EGFR inhibitor, decreases EMT and tumorigenesis of Huh-7 cells by regulating the ERK-VEGF/MMP9 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3317-3325.
- [26] ZHANG H H, ZHANG Y, CHENG Y N, et al. Metformin in combination with curcumin inhibits the growth, metastasis, and angiogenesis of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(1):44-56.
- [27] LIAO J, JIN H, LI S, et al. Apatinib potentiates irradiation effect via suppressing PI3K/AKT signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):454.
- [28] 朱丽珍, 许晓磊, 阿卜杜萨拉木·艾尼, 等. 肝细胞癌免疫治疗研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(5): 1197-1203.