



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.07.008
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.07.008
China Journal of General Surgery, 2024, 33(7):1091-1099.

· 基础研究 ·

瑞戈非尼联合PD-L1单抗对小鼠肝癌移植瘤的作用及机制

倪明立, 潘威, 徐倩

(郑州大学附属洛阳中心医院 肿瘤二科, 河南 洛阳 471000)

摘要

背景与目的: 瑞戈非尼治疗肝癌不可避免的存在毒副作用, 而且治疗有效率有限。细胞程序性死亡-配体1 (PD-L1) 单抗可有效阻断“肿瘤免疫逃逸机制”, 发挥显著抗肿瘤作用。因此, 本研究探讨瑞戈非尼联合PD-L1单抗对肝癌移植瘤小鼠的抗癌作用。

方法: 将Balb/C裸小鼠建立肝癌移植瘤模型后, 分别给予瑞戈非尼(瑞戈非尼组)、阿替利珠单抗(PD-L1单抗组)、瑞戈非尼+阿替利珠单抗(联合组)、生理盐水(模型组)处理, 连续4周, 期间动态测量各组肿瘤体积。4周后, 剥离各组小鼠移植瘤, 分别用流式细胞术、TUNEL法、HE染色检测肿瘤组织CD4⁺和CD8⁺细胞浸润情况、细胞凋亡率及形态特征, 并用qRT-PCR和Western blot检测肿瘤组织CD31、血管内皮生长因子(VEGF)、增殖细胞核抗原(Ki-67)、B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、Bax表达。

结果: 给药前4组小鼠肿瘤体积差异无统计学意义($P>0.05$), 给药1、2、3、4周时, 各给药组小鼠肿瘤体积均明显小于模型组, 且联合组的肿瘤体积明显小于两个单药组(均 $P<0.05$), 但两个单药组间肿瘤体积无明显差异(均 $P>0.05$)。各给药组肿瘤组织中CD4⁺与CD8⁺细胞比例均较模型组明显升高, 且升高程度依次为瑞戈非尼组<PD-L1单抗组<联合组(均 $P<0.05$)。各给药组肿瘤组织细胞凋亡率均较模型组明显升高, 且升高程度依次为瑞戈非尼组<PD-L1单抗组<联合组(均 $P<0.05$)。HE染色显示, 模型组肿瘤细胞核大、深染、排列密集, 各给药组肿瘤细胞均出现不同程度的核皱缩、细胞数量减少, 片状坏死等改变, 联合组改变最为明显。与模型组比较, 各给药组肿瘤组织CD31、VEGF、Ki-67和Bcl-2 mRNA与蛋白表达水平明显降低, Bax mRNA与蛋白表达水平明显升高, 且联合组的以上指标变化程度明显大于两个单药组, 但两个单药组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

结论: 瑞戈非尼联合PD-L1单抗可有效抑制肝癌生长, 且强度大于两者单独作用, 这可能由两者不同的作用机制的协同效应实现的。

关键词

肝肿瘤; 肿瘤移植; 小鼠; 瑞戈非尼; 阿替利珠单抗

中图分类号: R735.7

Effects and mechanisms of regorafenib combined with PD-L1 antibody on liver cancer xenograft in mice

NI Mingli, PAN Wei, XU Qian

(The Second Department of Oncology, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang, Henan 471000, China)

基金项目: 河南省科学技术厅科技发展计划基金资助项目(202102310048)。

收稿日期: 2023-12-13; **修订日期:** 2024-07-16。

作者简介: 倪明立, 郑州大学附属洛阳中心医院副主任医师, 主要从事肿瘤靶向及免疫治疗方面的研究。

通信作者: 倪明立, Email: hua3800887@163.com

Abstract

Background and Aims: Regorafenib treatment for liver cancer inevitably presents side effects and limited efficacy. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) monoclonal antibody can effectively block the "tumor immune escape mechanism" and exert significant anti-tumor effects. Therefore, this study was conducted to explore the anti-cancer effect of regorafenib combined with PD-L1 monoclonal antibody in a mouse model of transplanted liver cancer.

Methods: After establishing a liver cancer transplant model in Balb/C nude mice, the mice were treated with regorafenib (regorafenib group), atezolizumab (PD-L1 antibody group), regorafenib + atezolizumab (combination group), or saline (model group) for 4 weeks. Tumor volumes were dynamically measured in each group during the treatment period. After 4 weeks, the transplanted tumors were excised from the mice, and flow cytometry, TUNEL assay, and HE staining were used to detect CD4⁺ and CD8⁺ cell infiltration, apoptosis rate, and morphological characteristics of the tumor tissues. Additionally, qRT-PCR and Western blot were employed to detect the expression of CD31, vascular endothelial growth factor (VEGF), proliferating cell nuclear antigen (Ki-67), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and Bax in the tumor tissues.

Results: There was no statistically significant difference in tumor volumes among the four groups of mice before treatment ($P>0.05$). At weeks 1, 2, 3, and 4 of treatment, the tumor volumes in each treated group were significantly smaller than those in the model group, and the tumor volume in the combination group was significantly smaller than those in the two monotherapy groups (all $P<0.05$). However, there was no significant difference in tumor volume between the two monotherapy groups (all $P>0.05$). The proportion of CD4⁺ and CD8⁺ cells in tumor tissues was significantly higher in each treated group than those in the model group, with the increase being in the order of regorafenib group < PD-L1 antibody group < combination group (all $P<0.05$). The apoptosis rate of tumor cells was significantly higher in each treated group compared to the model group, with the increase being in the order of regorafenib group < PD-L1 antibody group < combination group (all $P<0.05$). HE staining showed large, deeply stained, densely arranged nuclei in tumor cells of the model group, while various degrees of nuclear shrinkage, reduced cell numbers, and patchy necrosis were observed in the treated groups, with the most pronounced changes in the combination group. Compared to the model group, the expression levels of CD31, VEGF, Ki-67, and Bcl-2 mRNA and protein in tumor tissues were significantly lower in the treated groups. In contrast, the expression levels of Bax mRNA and protein were significantly higher. The extent of these changes was more pronounced in the combination group than in the two monotherapy groups, with no significant difference between the two monotherapy groups (all $P>0.05$).

Conclusion: Regorafenib combined with PD-L1 monoclonal antibody can effectively inhibit the growth of liver cancer, and the intensity is greater than that of either treatment alone. This effect may be achieved through the synergistic interaction of their different mechanisms of action.

Key words

Liver Neoplasms; Neoplasm Transplantation; Mice; Regofenil; Atezolizumab

CLC number: R735.7

肝癌是全球范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一，严重威胁着人类的生命健康，给全球带来沉重的社会压力和经济负担^[1-2]。瑞戈非尼是已经获得美国食品药品监督管理局批准的小分子靶向药物，作为二线药物用于治疗肝癌，但是

以分子靶向的药物很少能完全抑制肿瘤，而且高剂量瑞戈非尼可能引起肝胆系统以及消化系统损伤^[3-4]。因此，联合用药不失为一种治疗恶性肿瘤的有效策略，临床研究^[5]表明，瑞戈非尼联合卡瑞利珠单抗对难治性肝复发癌具有一定疗效。瑞戈

非尼和贝伐珠单抗联合治疗转移性结直肠肿瘤的效果优于单独一种靶向药物^[6]。细胞程序性死亡-配体1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 与免疫系统的抑制密切相关,广泛表达于恶性肿瘤细胞表面,PD-L1分子通过与T细胞表面的细胞程序性死亡受体1 (PD-1) 结合可使肿瘤细胞成功逃避免疫系统的识别和攻击,从而使肿瘤细胞发生增殖和转移^[7-8],而PD-L1单抗可有效阻断这种“肿瘤免疫逃逸机制”,恢复患者自身免疫系统抗癌功能^[9-10]。PD-L1单抗和抗肿瘤药物联合使用不仅可提高肿瘤治疗有效率,而且可降低抗肿瘤药物的剂量,减轻药物对重要器官的毒副作用。因此本研究通过建立肝癌移植瘤小鼠模型,探讨瑞戈非尼联合PD-L1单抗的抗肝癌作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40只雄性Balb/C裸小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,6周龄,体质量(20±2)g,许可证号:SYXK(沪)2022-0013;人肝癌HepG2细胞株购自美国ATCC公司。

1.2 试剂和仪器

瑞戈非尼购自拜耳公司;阿替利珠单抗注射液购自德国Roche Diagnostics GmbH;胎牛血清和培养基购自美国Gibco公司;抗人CD4⁺APC和CD8⁺PE抗体购自美国eBioscience公司;苏木素伊红(HE)染色试剂盒和末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP原位切口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)染色试剂盒购自中国上海碧云天生物科技有限公司;抗人CD31、Ki-67、B-细胞淋巴瘤因子(B-cell lymphoma factor, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-Associated X protein, Bax)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体购自美国Abcam公司;恒温培养箱购自德国Thermo Fisher Scientific;光学显微镜购自日本Olympus;流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肝癌移植瘤模型制备与分组给药 模型制作参照文献^[11]方法,HepG2细胞常规培养,收集对数期细胞调整密度为 2×10^7 个/mL,无菌注射器取0.5 mL细胞悬液注入小鼠右侧背部皮下,4 d后接

种部位可见直径为3~4 mm的肿瘤结节,当肿瘤直径>1 cm时将小鼠分为模型组、瑞戈非尼组、PD-L1单抗组和联合组,每组10只。瑞戈非尼组小鼠灌胃瑞戈非尼20 mg/kg,1次/d,连续4周;PD-L1组小鼠腹腔注射阿替利珠单抗注射液0.2 mL/只,1次/4 d,共注射7次,连续4周;联合组小鼠灌胃瑞戈非尼20 mg/kg后,1次/d,连续4周,腹腔注射阿替利珠单抗注射液0.2 mL/只,1次/4 d,共注射7次,连续4周;模型组小鼠给予等体积生理盐水^[12-13]。

1.3.2 肿瘤体积测定 在注射药物前和注射药物后,用游标卡尺测量肿瘤长径(a)和短径(b),根据公式 $V=1/2 ab^2$ 计算肿瘤体积。

1.3.3 流式细胞仪检测肿瘤组织中免疫细胞浸润情况 肿瘤直径测量完成后,处死小鼠,快速剥离肿瘤组织。取部分肿瘤组织置于EP管中,剪碎,加入0.1 μg/L IV型胶原酶,置于37℃摇床上孵育1 h,含1%胎牛血清的磷酸盐缓冲液终止反应,2 000 r/min离心10 min(离心半径8 cm),去除上清液,加入2 mL红细胞裂解液,冰上静置10 min,2 000 r/min离心10 min(离心半径8 cm),磷酸盐缓冲液清洗2次,将细胞制成悬液分装成两管,一管加入anti-CD4⁺-APC,另一管加入anti-CD8⁺-PE,冰上避光染色30 min,磷酸盐缓冲液终止反应,1 500 r/min离心5 min(离心半径8 cm),弃掉上清液,加入300 μL磷酸盐缓冲液将细胞重悬,流式细胞仪进行检测。

1.3.4 TUNEL染色计算肿瘤细胞凋亡率 取部分肿瘤组织,制成4 μm厚的石蜡切片,二甲苯透明2次,梯度乙醇脱水,滴加过氧化氢阻断剂孵育10 min,组织上滴加Proteinase K工作液20 μL,湿盒中避光孵育30 min,磷酸盐缓冲液清洗2次。TUNEL反应液37℃孵育60 min,磷酸盐缓冲液清洗2次,滴加辣根过氧化物酶标记的抗体,37℃湿盒中孵育30 min,磷酸盐缓冲液冲洗3次,苏木精复染,中性树胶封片。显微镜下观察,呈棕黄色着色的颗粒即为阳性细胞。细胞凋亡率=阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.3.5 HE染色观察肿瘤组织病理形态 取石蜡切片组织,根据HE试剂盒说明书进行染色,显微镜下观察细胞形态。

1.3.6 qRT-PCR法检测CD31、VEGF、Ki-67、Bax和Bcl-2 mRNA表达 TRIzol试剂提取肿瘤组织中总

RNA, 将RNA逆转录成cDNA, 以cDNA为模板进行扩增, 反应体系设置为: 8 μL cDNA, 10 μL SYBR Green mix、上下游引物各1 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min, 进行40个循环。 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行计算CD31、VEGF、Ki-67、Bax和Bcl-2水平, 引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	引物序列
CD31	F:5'-ACG CTG GTG CTC TAT GCA AG-3' R:5'-TCA GTT GCT GCC CAT TCA TCA-3'
VEGF	F:5'-CTG CCG TCC GAT TGA GAC C-3' R:5'-CCC CTC CTT GTA CCA CTG TC-3'
Ki-67	F:5'-ATC ATT GAC CGC TCC TTT AGG T-3' R:5'-GGG CGT GGG CGA TAC TAA A-3'
Bax	F:5'-GCT CGC CTT GAT GGT TCC T-3' F:5'-AAT TCG CCG GAG ACA CTC G-3'
Bcl-2	F:5'-GCT ACC GTC GTG ACT TCG C-3' F:5'-CCC CAC CGA ACT CAA AGA AGG-3'
GAPDH	F:5'-ACA ACT TTG GTA TCG TGG AAG G-3' R:5'-GCC ATC ACG CCA CAG TTT C-3'

1.3.7 Western blot 检测 CD31、VEGF、Ki-67、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 取部分肿瘤组织, 剪碎, 匀浆, 加入裂解液裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min (离心半径 8 cm), 吸取上清液, 测定蛋白浓度。120 V 恒压电泳 1.5 h, 0.3 A 恒流湿转 2 h, 5% 脱脂奶粉

封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗孵育 1 h, 显影, Image J 分析条带灰度值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤体积和肿瘤抑制率测定结果

给药前 4 组小鼠肿瘤体积比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药 1、2、3、4 周时, 瑞戈非尼组、PD-L1 单抗组和联合组小鼠肿瘤体积均明显小于模型组, 且联合组小鼠肿瘤体积明显小于瑞戈非尼组和 PD-L1 单抗组 (均 $P < 0.05$), 瑞戈非尼组和 PD-L1 单抗组小鼠肿瘤体积差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 2)。

2.2 肿瘤组织中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞浸润情况

与模型组比较, 瑞戈非尼组、PD-L1 单抗组和联合组 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞比例均明显升高 (均 $P < 0.05$); 与瑞戈非尼组比较, PD-L1 单抗组 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞比例升高 ($P < 0.05$); 与瑞戈非尼组和 PD-L1 单抗组比较, 联合组 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞比例均升高 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

表2 各组小鼠不同时间点肿瘤体积比较 ($n=10, \text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Table 2 Comparison of tumor volumes at different time points in each group of mice ($n=10, \text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

组别	给药前	给药1周	给药2周	给药3周	给药4周
模型组	0.53 \pm 0.04	0.44 \pm 0.06	0.73 \pm 0.08	1.02 \pm 0.11	1.31 \pm 0.14
瑞戈非尼组	0.57 \pm 0.09	0.35 \pm 0.06 ^(1,2)	0.62 \pm 0.07 ^(1,2)	0.91 \pm 0.08 ^(1,2)	1.06 \pm 0.11 ^(1,2)
PD-L1 单抗组	0.55 \pm 0.08	0.36 \pm 0.05 ^(1,2)	0.60 \pm 0.07 ^(1,2)	0.89 \pm 0.09 ^(1,2)	1.04 \pm 0.12 ^(1,2)
联合组	0.56 \pm 0.05	0.29 \pm 0.05 ⁽¹⁾	0.56 \pm 0.06 ⁽¹⁾	0.74 \pm 0.08 ⁽¹⁾	0.88 \pm 0.07 ⁽¹⁾

注: 1) 与模型组比较, $P < 0.05$; 2) 与联合组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. model group; 2) $P < 0.05$ vs. combination group

表3 各组小鼠肿瘤组织中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞比例比较 ($n=10, \%, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of CD4⁺ and CD8⁺ cell proportions in tumor tissues of each group of mice ($n=10, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺	CD8 ⁺
模型组	5.60 \pm 1.22	4.95 \pm 1.05
瑞戈非尼组	20.48 \pm 5.73 ^(1,3)	18.37 \pm 6.14 ^(1,3)
PD-L1 单抗组	28.89 \pm 5.30 ^(1,2),3)	25.38 \pm 7.64 ^(1,2),3)
联合组	58.76 \pm 11.49 ⁽¹⁾	44.75 \pm 12.69 ⁽¹⁾

注: 1) 与模型组比较, $P < 0.05$; 2) 与瑞戈非尼组比较, $P < 0.05$; 3) 与联合组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. model group; 2) $P < 0.05$ vs. regorafenib group; 3) $P < 0.05$ vs. combination group

2.3 肿瘤组织中细胞凋亡率比较

模型组几乎没有呈棕黄色阳染细胞,瑞戈非尼组、PD-L1单抗组和联合组肿瘤组织中可见明显呈棕黄色阳染的细胞(图1)。与模型组比较,瑞戈非尼组、PD-L1单抗组和联合组细胞凋亡率均明

显升高(均 $P<0.05$);与瑞戈非尼组比较,PD-L1单抗组细胞凋亡率升高($P<0.05$);与瑞戈非尼组和PD-L1单抗组比较,联合组细胞凋亡率升高(均 $P<0.05$)(表4)。

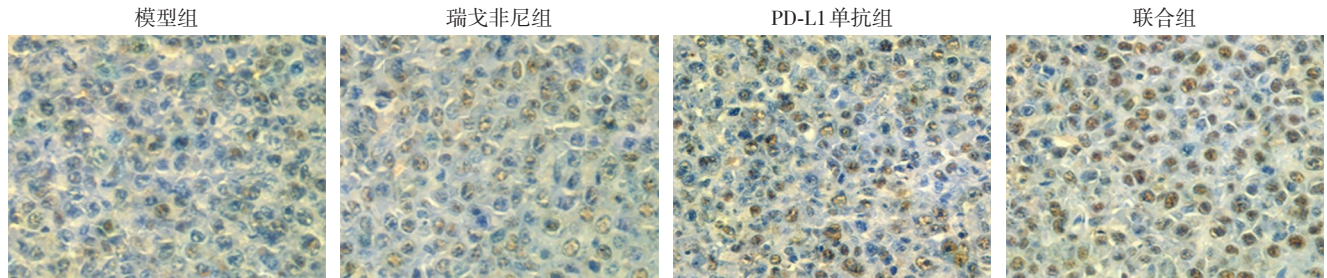


图1 TUNEL染色检测肿瘤细胞凋亡情况(x400)

Figure 1 TUNEL staining for detection of tumor cell apoptosis (x400)

表4 各组小鼠肿瘤组织中细胞凋亡率比较(n=10, %, $\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of apoptosis rates in tumor tissues of each group of mice (n=10, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率
模型组	14.59±2.40
瑞戈非尼组	31.48±7.31 ^{1),3)}
PD-L1单抗组	42.96±8.70 ^{1),2),3)}
联合组	68.33±9.27 ¹⁾

注:1)与模型组比较, $P<0.05$;2)与瑞戈非尼组比较, $P<0.05$;3)与联合组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. model group; 2) $P<0.05$ vs. regorafenib group; 3) $P<0.05$ vs. combination group

2.4 肿瘤组织形态结构变化

模型组肿瘤细胞核大、深染、排列密集;瑞

戈非尼组、PD-L1单抗组和联合组肿瘤细胞出现不同程度的核皱缩、细胞数量减少,片状坏死等改变,联合组此种改变最明显(图2)。

2.5 肿瘤组织中mRNA表达情况

与模型组比较,瑞戈非尼组、PD-L1单抗组和联合组CD31、VEGF、Ki-67和Bcl-2 mRNA表达水平降低,Bax mRNA表达水平升高($P<0.05$);与瑞戈非尼组和PD-L1单抗组比较,联合组CD31、VEGF、Ki-67和Bcl-2 mRNA表达水平降低,Bax mRNA表达水平升高($P<0.05$);瑞戈非尼组和PD-L1单抗组CD31、VEGF、Ki-67、Bcl-2和Bax mRNA表达水平比较,差异无统计学意义(均 $P>0.05$)(表5)。

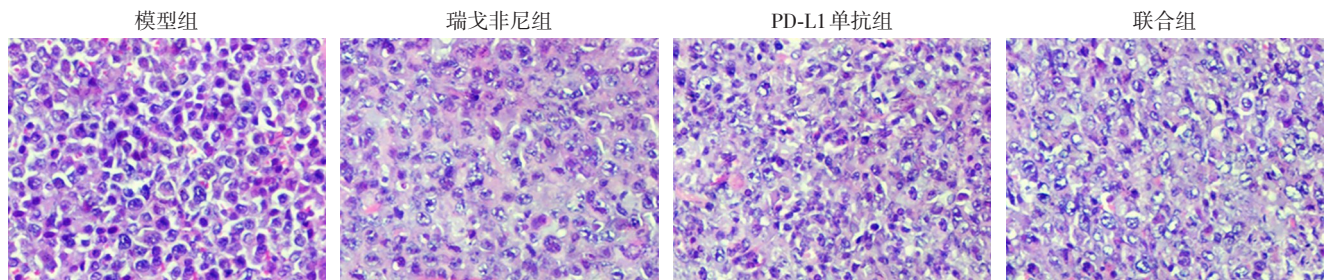


图2 肿瘤组织HE染色(x400)

Figure 2 HE staining of tumor tissues (x400)

表5 各组小鼠肿瘤组织中CD31、VEGF、Ki-67、Bcl-2和Bax mRNA水平比较(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the mRNA expression levels of CD31, VEGF, Ki-67, Bcl-2 and Bax in each group of mice (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	CD31	VEGF	Ki-67	Bcl-2	Bax
模型组	1.00±0.03	1.00±0.05	1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.04
瑞戈非尼组	0.64±0.06 ^{1),2)}	0.63±0.09 ^{1),2)}	0.52±0.07 ^{1),2)}	0.68±0.06 ^{1),2)}	0.59±0.08 ^{1),2)}
PD-L1单抗组	0.61±0.06 ^{1),2)}	0.57±0.08 ^{1),2)}	0.55±0.08 ^{1),2)}	0.73±0.06 ^{1),2)}	0.55±0.06 ^{1),2)}
联合组	0.37±0.07 ¹⁾	0.44±0.09 ¹⁾	0.46±0.05 ¹⁾	0.52±0.07 ¹⁾	0.41±0.05 ¹⁾

注:1)与模型组比较, $P<0.05$;2)与联合组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. model group; 2) $P<0.05$ vs. combination group

2.6 肿瘤组织中蛋白表达情况

与模型组比较, 瑞戈非尼组、PD-L1 单抗组和联合组 CD31、VEGF、Ki-67 和 Bcl-2 蛋白表达降低, Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与瑞戈非尼组和 PD-L1 单抗组比较, 联合组 CD31、VEGF、Ki-67 和 Bcl-2 蛋白表达降低, Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 瑞戈非尼组和 PD-L1 单抗组 CD31、VEGF、Ki-67、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比较, 差异无统计学意义 (均 $P>0.05$) (图 3) (表 6)。

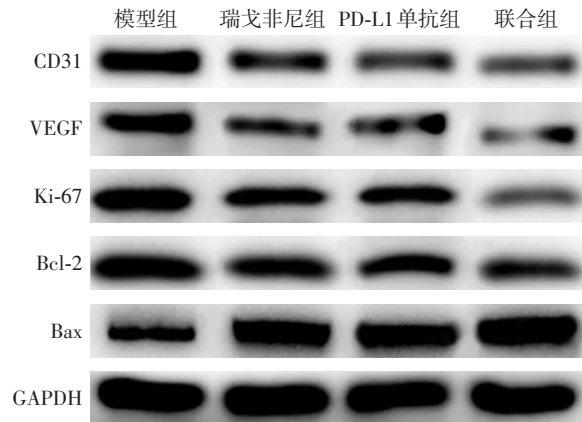


图 3 Western blot 检测肿瘤组织中 CD31、VEGF、Ki-67、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

Figure 3 Western blot analysis for protein expressions of CD31, VEGF, Ki-67, Bcl-2 and Bax in the tumor tissues

表 6 各组小鼠肿瘤组织中 CD31、VEGF、Ki-67、Bcl-2 和 Bax 蛋白水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of the protein expression levels of CD31, VEGF, Ki-67, Bcl-2 and Bax in each group of mice ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	CD31	VEGF	Ki-67	Bcl-2	Bax
模型组	0.81±0.08	0.57±0.06	0.85±0.09	0.91±0.09	0.35±0.06
瑞戈非尼组	0.34±0.06 ^(1),2)	0.22±0.05 ^(1),2)	0.56±0.06 ^(1),2)	0.48±0.08 ^(1),2)	0.78±0.08 ^(1),2)
PD-L1 单抗组	0.31±0.07 ^(1),2)	0.25±0.06 ^(1),2)	0.57±0.08 ^(1),2)	0.51±0.06 ^(1),2)	0.79±0.08 ^(1),2)
联合组	0.12±0.04 ⁽¹⁾	0.14±0.05 ⁽¹⁾	0.09±0.02 ⁽¹⁾	0.37±0.06 ⁽¹⁾	0.96±0.09 ⁽¹⁾

注: 1) 与模型组比较, $P<0.05$; 2) 与联合组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. model group; 2) $P<0.05$ vs. combination group

3 讨论

目前, 临床上对肝癌的治疗多是手术切除, 但是部分患者就诊时已处于中晚期, 错失了根治性手术的机会, 且早期切除患者易复发, 5 年术后复发率高达 70%^[14]。瑞戈非尼是中晚期患者经索拉菲尼治疗失败后的二线治疗药物, 但是存在肝脏毒副作用^[15]。瑞戈非尼可通过靶向 VEGFR1~3、TIE-2、FGFR 等多靶点发挥抗肿瘤作用^[16-18]。近些年, PD-1/PD-L1 抑制剂给恶性肿瘤患者的治疗带来了新希望, 通过抑制肿瘤细胞免疫逃逸, 增加 T 细胞免疫应答以达到消除肿瘤的目的^[19-20]。阿替利珠单抗是 PD-L1 抑制剂, 新辅助化疗联合阿替利珠单抗对乳腺癌具有良好临床疗效^[21]。本研究通过建立肝癌移植瘤小鼠模型, 探讨瑞戈非尼联合 PD-L1 单抗的抗癌作用。

本研究通过测量小鼠肿瘤体积发现, 瑞戈非尼组、PD-L1 单抗组和联合组小鼠肿瘤体积在给药 1、2、3、4 周时与模型组比较均减小, 且联合组

肿瘤体积减小最多。由此可见瑞戈非尼联合 PD-L1 单抗可发挥抗肝癌作用, 且治疗效果优于单一用药。从肿瘤组织病理学染色结果: 模型组肿瘤细胞核大、深染、排列密集; 瑞戈非尼组、PD-L1 单抗组和联合组肿瘤细胞出现不同程度的核皱缩、细胞数量减少、片状坏死等改变, 联合组此种改变最明显。TUENL 染色结果显示, 瑞戈非尼组、PD-L1 单抗组和联合组小鼠肿瘤细胞凋亡率较模型组明显升高, 且联合组细胞凋亡率最高, 说明瑞戈非尼联合 PD-L1 单抗可诱导肿瘤细胞凋亡。综合以上结果可知, 瑞戈非尼联合 PD-L1 单抗可有效发挥抗肝癌作用, 诱导肿瘤细胞凋亡和坏死, 且联合用药效果优于单一用药。

前人的研究^[22-23]结果多表明小分子靶向药物联合免疫检查点抑制剂治疗恶性肿瘤多是通过调节免疫微环境中的免疫细胞而发挥协同抗肿瘤作用。基于这一思路, 本研究检测了肿瘤组织中免疫细胞的浸润情况, 结果发现, 与模型组比较, 瑞戈非尼组、PD-L1 单抗组和联合组 CD4⁺ 和 CD8⁺ T

细胞比例显著升高,且联合组升高最显著,说明瑞戈非尼联合PD-L1单抗可提高肝癌微环境中免疫细胞活化,抑制肿瘤细胞免疫逃逸。这可能是由于瑞戈非尼具有抗血管生成作用,而有研究^[24]认为,肿瘤组织异常的血管网络不仅为肿瘤组织提供充足的养分,而且还可作为第一道免疫屏障使免疫细胞被阻止在肿瘤细胞外,使得肿瘤组织处于免疫抑制状态;此外,PD-1/PD-L1之间的相互作用是介导肿瘤微环境免疫抑制状态的主要机制,二者结合将下调T细胞杀伤裂解肿瘤细胞的能力,从而导致免疫耐受发生,而PD-L1单抗通过阻止PD-1和PD-L1的结合可使T细胞处于活化状态,监测并杀伤肿瘤细胞。因此瑞戈非尼联合PD-L1单抗具有更显著的改善肿瘤微环境,抑制肿瘤细胞免疫逃逸的作用。

血管生成成为肿瘤细胞的快速增殖提供足够的氧气和养分,是肿瘤细胞发生恶性增殖、转移的基础,而VEGF和CD31是血管生成的重要标志物^[25-26]。一项基础研究^[27]表明,VEGF蛋白过表达可显著降低瑞戈非尼对肝癌细胞活力的抑制作用。Ki-67是细胞增殖的重要标志蛋白,Bax和Bcl-2是细胞凋亡相关蛋白^[28-29],因此本研究检测了Ki-67、Bax和Bcl-2蛋白表达情况。结果显示,与模型组比较,瑞戈非尼组、PD-L1单抗组和联合组肿瘤组织中VEGF、CD31、Ki-67、Bcl-2蛋白和mRNA表达降低,Bax蛋白和mRNA表达升高,且联合组各指标变化最显著,说明瑞戈非尼联合PD-L1单抗可抑制细胞增殖、血管生成,同时调节促凋亡蛋白表达,降低抗凋亡蛋白表达。瑞戈非尼阻断肿瘤组织中异常血管生成,降低VEGF表达,而研究^[30]表明VEGF与PD-L1具有正相关性。此外,PD-L1单抗可能通过抑制VEGF受体表达同样发挥抑制血管生成作用^[31]。因此瑞戈非尼联合PD-L1单抗具有显著的抑制血管生成作用。

综上所述,瑞戈非尼联合PD-L1单抗显著发挥抗肝癌作用,其可能是通过调节肿瘤微环境中的免疫细胞活化,抑制血管生成、调节凋亡相关蛋白表达发挥作用,为临床治疗中晚期肝癌患者提供理论依据。但是,本研究存在不足之处,首先本研究猜测瑞戈非尼联合PD-L1单抗发挥抗肝癌作用的途径之一是抑制血管生成,但是对血管的研究甚少,下一步将针对血管生成做进一步的研究。其次,本研究仅停留在动物水平,下一步将从细

胞水平探讨瑞戈非尼联合PD-L1对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:倪明立提供实验方案;潘威负责实验操作;徐倩负责数据统计分析和文章撰写。

参考文献

- [1] Qi J, Li M, Wang L, et al. National and subnational trends in cancer burden in China, 2005–20: an analysis of national mortality surveillance data[J]. *Lancet Public Health*, 2023, 8(12):e943–e955. doi:10.1016/S2468-2667(23)00211-6.
- [2] Runggay H, Arnold M, Ferlay J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6):1598–1606. doi:10.1016/j.jhep.2022.08.021.
- [3] 龙霞,曾晓欢,干小红.基于美国FDA不良事件报告系统数据库的瑞戈非尼肝胆系统损伤风险分析[J]. *药物不良反应杂志*, 2020, 22(4):227–232. doi:10.3760/cma.j.cn114015-20190615-00491.
- [4] Long X, Zeng XH, Gan XH. Risk analysis of regorafenib related hepatobiliary system injury based on the US Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System[J]. *Adverse Drug Reactions Journal*, 2020, 22(4):227–232. doi:10.3760/cma.j.cn114015-20190615-00491.
- [5] 裴育莹,高宇,姜彦妮.瑞戈非尼致不良反应的文献回顾性分析[J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(6):616–619. doi:10.13286/j.cnki.chinhosp-pharm.2019.06.16.
- [6] Pei YY, Gao Y, Lou YN. Literature review analysis of adverse drug reactions induced by regorafenib[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2019, 39(6):616–619. doi:10.13286/j.cnki.chinhosp-pharm.2019.06.16.
- [7] 蒋经柱,李浩权,王在国,等.瑞戈非尼联合卡瑞利珠单抗治疗难治性肝复发癌获得完全缓解病例的临床经验[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2022, 29(9):1149–1153. doi:10.7507/1007-9424.202207040.
- [8] Jiang JZ, Li HQ, Wang ZG, et al. Clinical experience of regorafenib combined with camrelizumab in the treatment of refractory recurrent liver cancer with complete remission[J]. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2022, 29(9):1149–1153. doi:10.7507/1007-9424.202207040.
- [9] 杨媛,郑涛,左强,等.瑞戈非尼与贝伐珠单抗联合化疗对转移性结肠直肠癌的临床效果[J]. *西南国防医药*, 2020, 30(6):565–568. doi:10.3969/j.issn.1004-0188.2020.06.025.
- [10] Yang Y, Zheng T, Zuo Q, et al. Clinical efficacy of regorafenib plus

- bevacizumab combined with chemotherapy in treatment of metastatic colorectal tumors[J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China*, 2020, 30(6):565-568. doi: 10.3969/j.issn.1004-0188.2020.06.025.
- [7] 肖国辉, 陈浪, 余武汉, 等. PD-1/PD-L1 与肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤发生中的相互作用研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(4):615-621. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.016.
- Xiao GH, Chen L, Yu WH, et al. Research progress on the interaction between PD-1/PD-L1 and tumor-associated macrophages in carcinogenesis[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(4): 615-621. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.016.
- [8] 杜晓宇, 范瑞芳, 许淑梅, 等. 免疫检查点抑制剂在胃肠道恶性肿瘤新辅助治疗中的应用研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(10):1588-1598. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.018.
- Du XY, Fan RF, Xu SM, et al. Advances in application of immune checkpoint inhibitors in neoadjuvant therapy for gastrointestinal malignancies[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(10): 1588-1598. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.018.
- [9] Peng L, Pan B, Zhang X, et al. Lipopolysaccharide facilitates immune escape of hepatocellular carcinoma cells via m6A modification of lncRNAMIR155HG to upregulate PD-L1 expression[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2022, 38(6): 1159-1173. doi: 10.1007/s10565-022-09718-0.
- [10] 刘凤英, 张文东, 刘方. 二线单药化疗联合PD-1/PD-L1抑制剂对晚期非小细胞肺癌的临床疗效[J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(2):169-172. doi:10.3969/j.issn.1671-4695.2021.02.016.
- Liu FY, Zhang WD, Liu F. Clinical efficacy of second-line single drug chemotherapy combined with PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2021, 20(2): 169-172. doi: 10.3969/j.issn.1671-4695.2021.02.016.
- [11] 雷艺, 程旸, 林鑫盛, 等. 仑伐替尼联合氟伐他汀对小鼠肝癌移植瘤的抑制作用及其机制[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(10):1511-1516. doi:10.12360/CPB202201067.
- Lei Y, Cheng Y, Lin XS, et al. The inhibitory effect of lenvatinib plus fluvastatin on liver transplantation tumor in mice and corresponding mechanism[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2022, 38(10):1511-1516. doi:10.12360/CPB202201067.
- [12] 陈建南, 吴进盛, 于莉, 等. 瑞戈非尼通过抑制Wnt信号通路调控肝癌进展的分子机制[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(7):1722-1726. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2022.07.054.
- Chen JN, Wu JS, Yu L, et al. Molecular mechanism of regofibril regulating the progress of hepatocellular carcinoma by inhibiting Wnt signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2022, 42(7):1722-1726. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2022.07.054.
- [13] 程建猛. PD-L1抑制剂对非小细胞肺癌小鼠血清IL-4、IFN- γ 及生存率的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(15):2574-2578. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2020.15.006.
- Cheng JM. Effects of PD-L1 inhibitors on serum IL-4, IFN- γ and survival of mice with non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2020, 28(15): 2574-2578. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2020.15.006.
- [14] Zeng ZM, Mo N, Zeng J, et al. Advances in postoperative adjuvant therapy for primary liver cancer[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2022, 14(9):1604-1621. doi:10.4251/wjgo.v14.i9.1604.
- [15] Yan H, Wu W, Hu Y, et al. Regorafenib inhibits EphA2 phosphorylation and leads to liver damage via the ERK/MDM2/p53 axis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):2756. doi:10.1038/s41467-023-38430-8.
- [16] Sharma D, Rasool F, Bharti M, et al. Regorafenib and ruthenium complex combination inhibit cancer cell growth by targeting PI3K/AKT/ERK signalling in colorectal cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1):686. doi:10.3390/ijms24010686.
- [17] Bajbouj K, Qaisar R, Alshura MA, et al. Synergistic anti-angiogenic effect of combined VEGFR kinase inhibitors, lenvatinib, and regorafenib: a therapeutic potential for breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4408. doi: 10.3390/ijms23084408.
- [18] Zhao J, Guo Y, Feng T, et al. Efficacy and safety of regorafenib in combination with immune checkpoint inhibitor therapy as second-line and third-line regimen for patients with advanced hepatocellular carcinoma: a retrospective study[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2023, 14(6):2549-2558. doi:10.21037/jgo-23-590.
- [19] Yamaguchi H, Hsu JM, Yang WH, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression in cancers and associated opportunities for novel small-molecule therapeutics[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(5): 287-305. doi:10.1038/s41571-022-00601-9.
- [20] Wu M, Huang Q, Xie Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1):24. doi: 10.1186/s13045-022-01242-2.
- [21] 刘树雨, 王丽霞, 姚秀玲, 等. 阿替利珠单抗联合化疗治疗卵巢癌的效果及对肿瘤标志物、短期预后的影响[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2024, 25(1): 28-30. doi: 10.13390/j.issn.1672-1861.2024.01.008.
- Liu SY, Wang LX, Yao XL, et al. Effect of atezolizumab combined with chemotherapy on ovarian cancer and its influence on tumor markers and short-term prognosis[J]. *Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2024, 25(1): 28-30. doi: 10.13390/j.issn.1672-1861.2024.01.008.
- [22] 祝保艳, 李婧婧, 李丹丹, 等. 卡博替尼联合PD-L1单抗对黑色素

- 瘤小鼠移植瘤的抑制作用机制[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2019, 40(2):172-178. doi:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2019.0025.
- Zhu BY, Li JJ, Li DD, et al. Cabozantinib combined with anti-PD-L1 antibody produced antitumor effect on mice melanoma xenograft and its mechanism[J]. Journal of Sun Yat-sen University: Medical Sciences, 2019, 40(2):172-178. doi:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2019.0025.
- [23] 彭雨, 李海涛, 杨文丽, 等. PD-1 抑制剂联合仑伐替尼治疗老年中晚期原发性肝癌患者临床疗效研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2023, 26(1):112-115. doi:10.3969/j.issn.1672-5069.2023.01.029.
- Peng Y, Li HT, Yang WL, et al. Clinical efficacy of PD-1 inhibitor and lenvatinib in the treatment of elderly patients with advanced primary liver cancer[J]. Journal of Practical Hepatology, 2023, 26(1):112-115. doi:10.3969/j.issn.1672-5069.2023.01.029.
- [24] Mo DC, Huang JF, Luo PH, et al. PD-1/PD-L1 inhibitor plus chemotherapy versus standard of care in the first-line treatment for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2023, 280(1):1-9. doi:10.1007/s00405-022-07571-9.
- [25] Li X, Li Y, Wang Y, et al. Sinensetin suppresses angiogenesis in liver cancer by targeting the VEGF/VEGFR2/AKT signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(5): 360. doi: 10.3892/etm.2022.11287.
- [26] Wu S, Su Y, Wang L, et al. The effects of photobiomodulation therapy on inflammatory mediators, immune infiltration, and angiogenesis in a mouse model of rosacea[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(15):831. doi:10.21037/atm-22-3204.
- [27] Segura IG, Secchi DG, Galíndez MF, et al. Connexin 43, Bcl-2, Bax, Ki67, and E-cadherin patterns in oral squamous cell carcinoma and its relationship with GJA1 rs12197797 C/G[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2022, 27(4): e366-e374. doi: 10.4317/medoral.25298.
- [28] Chen CH, Hsu FT, Chen WL, et al. Induction of apoptosis, inhibition of MCL-1, and VEGF-A expression are associated with the anti-cancer efficacy of magnolol combined with regorafenib in hepatocellular carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(9): 2066. doi:10.3390/cancers13092066.
- [29] Wang J, Zhang M, Huang X, et al. Multiproperty polyethylenimine-caged platinum nanoclusters promote apoptosis of osteosarcoma cells via regulating the BAX-bcl-2/caspase-3/PARP axis[J]. Mol Pharm, 2023, 20(11):5607-5615. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.3c00501.
- [30] Kuo CL, Chou HY, Lien HW, et al. A Fc-VEGF chimeric fusion enhances PD-L1 immunotherapy via inducing immune reprogramming and infiltration in the immunosuppressive tumor microenvironment[J]. Cancer Immunol Immunother, 2023, 72(2): 351-369. doi:10.1007/s00262-022-03255-9.
- [31] Wen J, Xue L, Wei Y, et al. YTHDF2 is a therapeutic target for HCC by suppressing immune evasion and angiogenesis through ETV5/PD-L1/VEGFA axis[J]. Adv Sci, 2024, 11(13): e2307242. doi:10.1002/advs.202307242.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式:倪明立,潘威,徐倩.瑞戈非尼联合PD-L1单抗对小鼠肝癌移植瘤的作用及机制[J].中国普通外科杂志,2024,33(7):1091-1099. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.07.008

Cite this article as: Ni ML, Pan W, Xu Q. Effects and mechanisms of regorafenib combined with PD-L1 antibody on liver cancer xenograft in mice[J]. Chin J Gen Surg, 2024, 33(7):1091-1099. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2024.07.008