

## 普纳替尼对人血管内皮细胞功能的影响

张亚楠<sup>1</sup>, 孙继红<sup>1</sup>, 黄新益<sup>2</sup>, 项仪宾<sup>2</sup>, 余伯阳<sup>1\*</sup>

1. 中国药科大学, 江苏 南京 211198

2. 南京圣和药业股份有限公司, 江苏 南京 210038

**摘要:** 目的 观察普纳替尼 (Ponatinib) 对人血管内皮细胞的增殖、迁移、血管形成及 NO 合成释放的影响, 从细胞水平评价 Ponatinib 血栓不良反应形成机制。方法 采用 CCK-8 法、体外划痕法、Matrigel 基底膜成管法及 NO 检测试剂盒分别考察 Ponatinib 对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的细胞毒作用、迁移能力、血管形成能力及细胞 NO 释放水平的影响。结果 研究表明 Ponatinib 对 HUVECs 细胞半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 (0.69±0.05) μmol/L。非毒性剂量的 Ponatinib 能够不同程度抑制 HUVECs 细胞的迁移、血管形成及 NO 的释放 (P<0.05)。结论 Ponatinib 通过影响人血管内皮细胞增殖、迁移、血管形成等正常功能而造成血管内皮损伤, 可能为其诱发血栓的原因之一。

**关键词:** Ponatinib; 血栓; 人脐静脉内皮细胞; 机制

中图分类号: R961 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)02-0156-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.008

## Effects of Ponatinib on human umbilical vein endothelial cell function *in vitro*

ZHANG Ya-nan<sup>1</sup>, SUN Ji-hong<sup>1</sup>, HUANG Xin-yi<sup>2</sup>, XIANG Yi-bin<sup>2</sup>, YU Bo-yang<sup>1</sup>

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Nanjing Sanhome Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210038, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Ponatinib on human vascular endothelial cell proliferation, migration, angiogenesis and the synthesis and release of NO and to evaluate the mechanisms of thrombotic adverse reaction of Ponatinib *in vitro*. **Methods** CCK-8 assay, wound healing test, tube formation assay, and NO detection Kit were used to investigate the cytotoxicity, migration, angiogenesis, and NO release of Ponatinib on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Results** It was found that the IC<sub>50</sub> value of Ponatinib on HUVECs was (0.69 ± 0.05) μmol/L. Non-toxic concentration of Ponatinib was able to inhibit the proliferation, migration, angiogenesis, and NO release (P < 0.05). **Conclusion** Ponatinib may injure the vascular endothelial cells by inhibiting the proliferation, migration, angiogenesis, and other functions of human vascular endothelial cells, which might be one of the main mechanisms of thrombotic adverse reaction, so as to provide the references for future research on the thrombosis mechanisms of Ponatinib.

**Key words:** Ponatinib; thrombosis; human umbilical vein endothelial cells; mechanism

普纳替尼 (Ponatinib) 是由 Ariad 制药公司开发的第三代多激酶酪氨酸激酶抑制剂, 于 2012 年获 FDA 批准上市, 用于治疗对其他酪氨酸激酶抑制剂不耐受或治疗无效的人慢性粒细胞白血病 (CML) 及“费城染色体阳性” (Ph+) 急性淋巴细胞白血病 (ALL) [1]。FDA 相关报道显示 [2-3], Ponatinib 临床使用后出现严重的血栓及血管狭窄等不良反应。目前对于 Ponatinib 血栓体外评价及机制方面的研究

报道较少。本实验研究了 Ponatinib 对正常人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 增殖、迁移及血管形成等功能影响, 从细胞水平初步探索 Ponatinib 血栓形成机制, 为后期深入研究提供适当参考。

### 1 仪器与材料

SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司), OLYMPUS-CKX41 型倒置显微镜 (日本

收稿日期: 2014-12-04

作者简介: 张亚楠 (1989—), 女, 药理学硕士, 从事药理、药代动力学研究。E-mail: yananzhang729@126.com

\*通信作者 余伯阳, 教授, 博士生导师, 从事中药复方现代化研究。Tel: (025)86185158 E-mail: boyangyu59@163.com

网络出版时间: 2015-03-09 15:23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1409.R.20150309.1523.003.html>

Olympus 公司), Eppendorf-5804 型离心机 (Eppendorf 中国有限公司), SpectraMAX-M3 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司), 超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher 公司)。NO 检测试剂盒 (南京建成科技有限公司), Matrigel 基底膜基质 (美国 BD 公司), DMSO (Sigma 公司)。DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、PBS 及 CCK-8 检测试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司。HUVECs 细胞株由中国药科大学新药筛选中心馈赠, Ponatinib (AP24534) 购自上海赛鑫生物科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 Ponatinib 细胞毒活性测定

采用 CCK-8 法<sup>[4]</sup>检测 Ponatinib 对正常 HUVECs 的细胞毒作用。用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 HUVECs 细胞, 收集 5~8 代处于对数生长期的细胞消化、重悬、计数, 以 5×10<sup>4</sup>/mL 密度每孔 100 μL 接种细胞至 96 孔板。待细胞贴壁后, 去除培养液, 对照孔加入不含药物的新鲜培养液 100 μL, 给药组每孔加入不同浓度的含药培养液 100 μL, 设 3 个复孔, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 48 h, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL, 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h 后, 用酶标仪于 450 nm 波长下测定吸光度 (A) 值。使用 GraphPad prism 5.0 软件拟合非线性曲线, 并计算 Ponatinib 对 HUVECs 细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{阴性}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{阴性}}$$

### 2.2 Ponatinib 对细胞迁移能力影响

采用体外划痕试验<sup>[5]</sup>观察 Ponatinib 对 HUVECs 细胞迁移能力的影响。将 5×10<sup>4</sup>/mL 的 HUVECs 细胞接种至 24 孔板, 每孔 500 μL, 24 h 后, 用灭菌的 10 μL 枪头在单层细胞上呈“一”字划痕, 吸掉培养液, 用 PBS 清洗 3 遍, 去除划掉的细胞, 每孔加入药物浓度依次为 0.01、0.05、0.10 μmol/L 的含药培养液 500 μL, 每个浓度设置 3 个复孔, 以不含药物的孔作为阴性对照, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养, 直至阴性对照组划痕两侧的细胞布满划痕后拍照观察, 并对各组迁移至划痕中央的细胞进行计数, 计算迁移率。

$$\text{迁移率} = \text{药物组划痕区域细胞数} / \text{对照组划痕区域细胞数}$$

### 2.3 Ponatinib 对细胞成管能力影响

采用体外血管形成试验<sup>[6]</sup>考察 Ponatinib 对 HUVECs 细胞成管能力的影响。将 100 μL 枪头、96

孔板、Matrigel 基质胶置于 4 °C 冰箱过夜预冷。于 96 孔板加入 Matrigel 基质胶 50 μL/孔, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中温孵 0.5~1 h。取融合 80%~90% HUVECs 细胞以 3.0×10<sup>4</sup>/孔的密度接种到 96 孔板, 分别加入 10μL 的含药培养液使 Ponatinib 终浓度依次为 0.01、0.05、0.10 μmol/L, 每组设 3 个复孔。温孵 10 h 后于倒置显微镜低倍镜下观察拍照, 记录各组细胞成管情况, 根据管型情况进行评分: 细胞形成闭合的多边形评 4 分, 细胞排列呈多边形但未闭合评 3 分, 细胞排列呈线性结构评 2 分, 细胞未成管散在或聚集成簇评 1 分<sup>[7]</sup>。

### 2.4 Ponatinib 对细胞 NO 释放的影响

将 HUVECs 细胞以 1×10<sup>6</sup>/孔的密度接种至 6 孔板, 24 h 后, 每孔加入浓度依次为 0.01、0.05、0.10 μmol/L 的含药培养液 2 mL, 每个浓度设置 3 个复孔, 以不含药物的孔作为阴性对照, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24~48 h, 取细胞上清液 100 μL, 按照 NO 硝酸还原法试剂盒说明书的方法进行检测。

### 2.5 统计学分析

采用 GraphPad prism 5.0 软件进行 One-way ANOVA 分析<sup>[8]</sup>。数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

### 3.1 HUVECs 细胞毒作用

结果表明 Ponatinib 对 HUVECs 细胞株增殖显示出较强的抑制作用。随着药物浓度的升高, 抑制率也升高, 在 0.1~10 μmol/L 呈现出典型的浓度相关性 (图 1)。使用 GraphPad prism 5.0 软件计算得到 Ponatinib 对 HUVECs 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 (0.69±0.05) μmol/L。

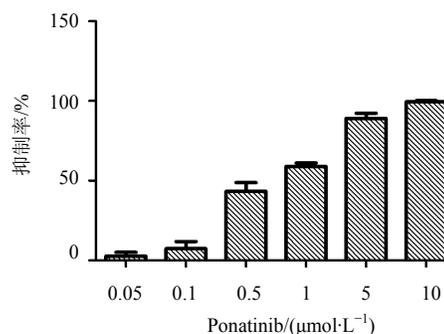


图 1 Ponatinib 对 HUVECs 细胞毒作用  
Fig. 1 Cytotoxic effect of Ponatinib on HUVECs

另外, 0.01、0.05、0.10 μmol/L 浓度的 Ponatinib 对 HUVECs 细胞的抑制率小于 10%, 对细胞的增殖

影响较小,可作为 Ponatinib 的非毒性剂量用于考察该药物对细胞迁移、成管及 NO 水平的影响。

### 3.2 细胞迁移能力影响

相同作用时间下,给药组的细胞向划痕中央迁移的数量明显少于对照组,说明经药物处理后的

HUVECs 细胞的划痕愈合能力与对照组相比较差,且随着 Ponatinib 浓度的增加,差异越显著 ( $P < 0.05$ ) (图 2 和表 1),即 Ponatinib 对血管内皮细胞迁移能力的影响呈剂量相关性,药物浓度为  $0.01 \mu\text{mol/L}$  时已经达到半数抑制率。

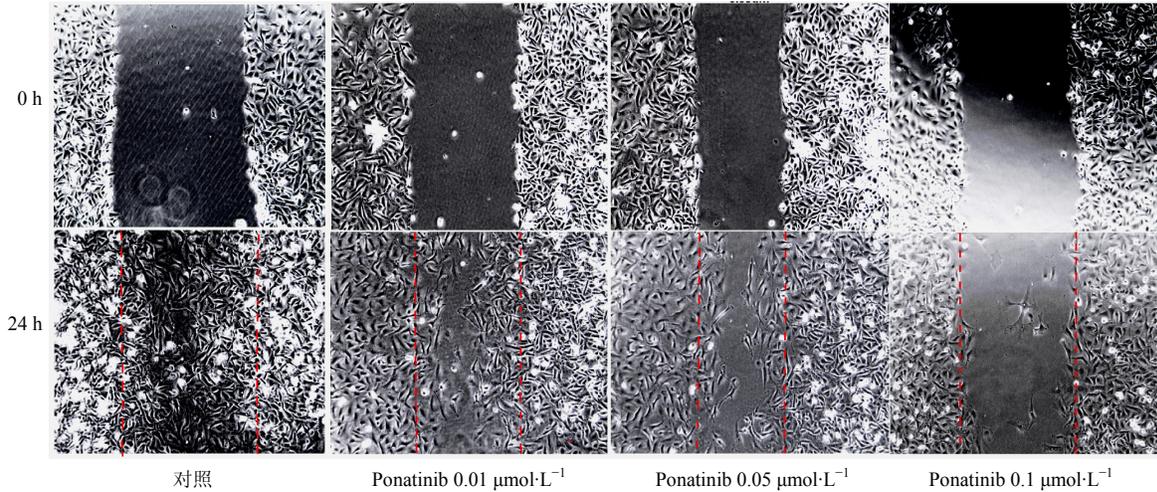


图 2 Ponatinib 对 HUVECs 细胞迁移能力的影响

Fig. 2 Effect of Ponatinib on migration ability in HUVECs

表 1 Ponatinib 对 HUVECs 细胞迁移能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of Ponatinib on migration ability in HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞迁移率/%
对照	—	$100.00 \pm 3.86$
Ponatinib	0.01	$51.77 \pm 3.34^{***}$
	0.05	$27.52 \pm 1.05^{***}$
	0.10	$14.19 \pm 1.50^{***}$

与对照组比较:  $^{***}P < 0.001$

$^{***}P < 0.001$  vs control group

### 3.3 细胞成管能力的影响

由 HUVECs 细胞成管图像可得,不同浓度 Ponatinib 作用下, HUVECs 细胞在 Matrigel 基质胶上血管形成情况存在显著差异 (图 3)。成管评分结果显示,  $0.05$ 、 $0.10 \mu\text{mol/L}$  的 Ponatinib 组评分均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 4),说明非毒性剂量的 Ponatinib 能剂量相关地抑制 HUVECs 细胞的血管形成能力。

### 3.4 细胞 NO 释放水平影响

不同浓度 Ponatinib 处理 HUVECs 细胞 24 h 和 48 h 后,采用硝酸还原法间接检测细胞上清液的 NO 浓度,结果显示,相同作用时间下,给药组的细胞培养液中的 NO 浓度明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 2),表明 Ponatinib 抑制 HUVECs 细胞 NO 的合成

与释放,且作用时间越长,NO 浓度降低越显著。

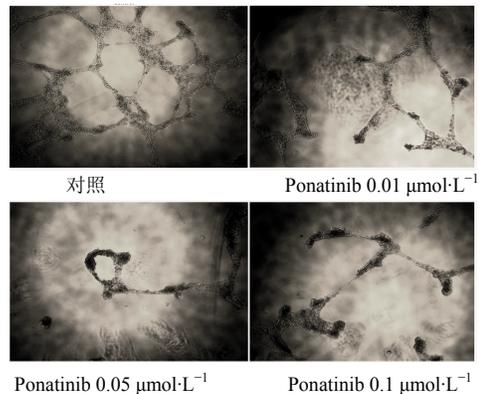
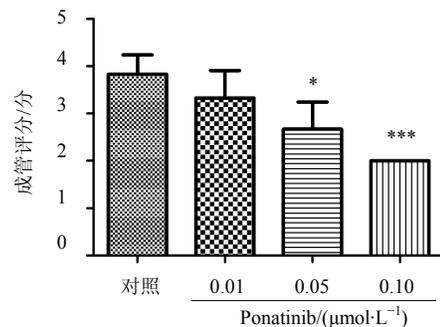


图 3 HUVECs 细胞成管图像

Fig. 3 Tube formation images of HUVECs



与对照组比较:  $^*P < 0.05$   $^{***}P < 0.001$

$^*P < 0.05$   $^{***}P < 0.001$  vs control group

图 4 HUVECs 细胞成管评分

Fig. 4 Matrigel scores of HUVECs

表2 Ponatinib对HUVECs细胞培养液中NO含量影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 2 Effect of Ponatinib on NO concentration  
in HUVECs culture medium ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	NO/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
		24 h	48 h
对照	—	41.73 $\pm$ 1.75	40.65 $\pm$ 3.27
Ponatinib	0.01	33.24 $\pm$ 2.99*	25.42 $\pm$ 2.10*
	0.05	29.85 $\pm$ 1.07*	17.37 $\pm$ 2.38*
	0.10	26.09 $\pm$ 1.24*	13.19 $\pm$ 2.94*

与对照组比较: \* $P < 0.05$ \* $P < 0.05$  vs control group

#### 4 讨论

Ponatinib 为典型的靶向抗癌药物, 为小分子多激酶抑制剂, 主要作用于 BCR-ABL、血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 等多种激酶。FDA 相关资料报道, Ponatinib 诱发血栓及其他血管毒性与 Ponatinib 对 VEGFR 的抑制作用有关, 并预测可能与索拉菲尼 (Sorafenib)、帕唑替尼 (Pazopanib)、舒尼替尼 (Sunitinib) 及贝伐单抗 (Bevacizumab) 等 VEGF 信号通路 (VSP) 抑制剂血管不良反应机制密切相关<sup>[9]</sup>。

近年来, VSP 抑制剂如索拉菲尼等引发的血管毒性不良反应频繁报道<sup>[10]</sup>。VSP 抑制剂通过阻断 VEGF-VEGFR 相互作用, 阻断其下游信号 PI3K/AKT/eNOS 等通路的传递, 进而影响血管内皮细胞的增殖、迁移及血管形成等正常生理功能, 导致血管内皮损伤<sup>[11]</sup>; 另外, 当血管内皮细胞功能受损时, 其凝血与抗凝血、纤溶与抗纤溶的平衡会失调<sup>[12]</sup>。而凝血系统激活、纤溶系统失活及血小板黏附聚集是血栓形成的重要环节。NO 是由血管内皮细胞产生的一种气体信号分子, 通过促进血管舒张、抑制血小板聚集和白细胞黏附调节血管的功能<sup>[13]</sup>。正常生理状态下, 机体主要通过 AKT/eNOS 通路调节 p-eNOS 的表达, 进而调控血管内皮细胞对 NO 的合成释放来实现对血管收缩和舒张功能的调节<sup>[14]</sup>。NO 活性降低会诱发多种病理变化, 包括改变内皮的抗凝功能, 干扰内皮的生长和再生功能<sup>[15]</sup>。

本文以此为研究依据, 从 Ponatinib 对正常血管内皮细胞的功能影响方面初步考察 Ponatinib 致血栓的相关机制。研究发现, Ponatinib 对 HUVECs 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 (0.69 $\pm$ 0.05)  $\mu\text{mol/L}$ , 而 45 mg 单次口服剂量的 Ponatinib 在恶性血液病患者体内的血药浓度峰值 ( $C_{\text{max}}$ ) 为 (0.161 $\pm$ 0.098)  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[16]</sup>, 即  $C_{\text{max}}$  范围为 0.063~0.25  $\mu\text{mol/L}$ , 结合细胞毒性

实验数据分析, 在此浓度范围内的 Ponatinib 对血管内皮细胞有不同程度的毒性作用; 另外, 本研究还发现低于人体内  $C_{\text{max}}$  的 Ponatinib (0.01~0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 能够显著抑制 HUVECs 细胞的迁移、血管形成及 NO 的释放 ( $P < 0.05$ )。提示 Ponatinib 可能通过抑制内皮细胞增殖、迁移、血管形成, 影响 NO 合成导致内皮细胞功能障碍, 从而改变血管内皮的抗凝、生长及再生功能, 最终诱发动静脉血管狭窄、血栓等病理变化。对 PI3K/AKT/eNOS 等信号通路相关机制有待进一步研究。目前, Ponatinib 在临床治疗中具有不可替代性, 因心血管毒性影响其使用, 期待该药全面评估安全性并通过改造恢复其临床广泛应用。

#### 参考文献

- [1] 邹彬, 石庆之. 第三代 BCR-ABL 酪氨酸激酶抑制剂 普纳替尼 [J]. 中国新药与临床杂志, 2014, 5(33): 329-333.
- [2] 江苏省药品不良反应监中心. 2013年10月美国FDA安全信息摘选 [J]. 药学与临床研究, 2013, 21(6): 650.
- [3] FDA. Drug Safety and Availability [EB/OL]. (2013-10-31) [2013-11-15]. <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm373040.html>.
- [4] Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay [J]. *Anal Commun*, 1999, 36: 47-50.
- [5] 唐杰, 陈龙菊, 王军, 等. Transwell 和 Wound healing 在细胞迁移中的应用比较 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2007, 25(6): 687-689.
- [6] Arnaoutova I, Kleinman H K. *In vitro* angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract [J]. *Nat Prot*, 2010, 4: 628-635.
- [7] Brown A C, Shah C, Liu J, et al. Ginger'S inhibition of rat colonic adenocarcinoma cells proliferation and angiogenesis *in vitro* [J]. *Phytother Res*, 2009, 23: 640-645.
- [8] 于童, 白喜云, 解晓晶, 等. 应用 GraphPad Prism 5.0 软件计算药物的 EC<sub>50</sub> [J]. 药学进展, 2012, 36(4): 180-183.
- [9] FDA. Drug Safety and Availability [EB/OL]. (2012-12-21) [2014-04-19]. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2012/203469Orig1s000PharmR.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/203469Orig1s000PharmR.pdf).
- [10] Keefe D, Bowen J, Gibson R, et al. Noncardiac vascular toxicities of vascular endothelial growth factor inhibitors in advanced cancer: A review [J]. *Oncologist*, 2011, 16:

432-444.

[11] Bair S M, Choueiri T K, Moslehi J. Cardiovascular complications associated with novel angiogenesis inhibitors: Emerging evidence and evolving perspectives [J]. *Trends In Cardiovasc Med*, 2013, 23: 104-113.

[12] Conti E, Romiti A, Musumeci M B, *et al.* Arterial thrombotic events and acute coronary syndromes with cancer drugs: Are growth factors the missed link ? What both cardiologist and oncologist should know about novel angiogenesis inhibitors [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167: 2421-2429.

[13] Knowles R G, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals [J]. *Biochem J*, 1994, 298: 249-258.

[14] Fulton D, Gratton J P, Timothy J, *et al.* Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt [J]. *Nature*, 1999, 399: 597-601.

[15] Lefroy D C, Crake T Uren N G, Davies GJ, *et al.* Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans [J]. *Circulation*, 1993, 88: 43-54.

[16] Iclusig [package insert]. Cambridge, MA: Ariad Pharmaceuticals; 2012.

• 新药快讯 •

### FDA 批准 Ibrance 用于治疗绝经后妇女晚期乳腺癌

董江萍

国家食品药品监督管理总局药品审评中心, 北京 100038

美国 FDA 2015 年 2 月 3 日以加速审批程序批准 Ibrance (Palbociclib) 用于治疗晚期 (转移性) 乳腺癌。在美国, 乳腺癌是第二常见的女性恶性肿瘤, 其主要成形于乳腺组织, 发展至肿瘤晚期会扩散至周围正常组织中。据美国国家癌症研究所估算, 2014 年有 232 670 例美国妇女被诊断为乳腺癌, 死亡 40 000 例。

Ibrance 通过抑制可促进肿瘤细胞生长的细胞周期依赖性激酶 (CDK) 4 和 6 发挥作用, 用于治疗既往未接受过内分泌治疗的雌激素受体 (ER) 阳性、人表皮生长因子受体 2 (HER2) 阴性的绝经后女性转移性乳腺癌, 临床上和来曲唑联合使用。

FDA 药品评价与研究血液及肿瘤产品办公室主任 Richard Pazdur 博士称: “FDA 始终致力于通过加速审批法规加快抗肿瘤药物的批准上市, Palbociclib 和来曲唑的联合治疗为那些被诊断为转移性乳腺癌的妇女提供了一个全新的治疗选择。”

申请人提供的初步临床证据表明, Ibrance 相比现有治疗手段具有重大医学进步, 据此 FDA 核准其为突破性新药, 并给予优先审评。FDA 计划完成上市申请审批的处方药付费目标批准时间是 2015 年 4 月 13 日, 而 Ibrance 提前 2 个多月获得了批准。

在 165 例既往未经治疗的 ER 阳性、HER2 阴性绝经后女性晚期乳腺癌患者中证实了 Ibrance 的有效性。参加临床研究的患者随机分配接受 Ibrance 和来曲唑联合治疗或来曲唑单药治疗, 联合治疗组患者的无进展生存期 (PFS) 达到 20.2 个月, 而来曲唑单药治疗组患者的 PFS 仅为 10.2 个月。截至目前尚未获得总生存的数据分析。

与本品相关的最常见的药物相关不良反应为嗜中性粒细胞减少 (中性粒细胞减少症)、白细胞减少、疲乏、贫血、上呼吸道感染、恶心、口腔炎、脱发、腹泻、血小板计数较低 (血小板减少症)、食欲下降、呕吐、乏力、外周神经损伤以及鼻出血。医疗专业人士应将以上风险告知患者。

本品的临床推荐剂量为初始 125 mg, 服用 21 d, 停药 7 d。建议医疗专业人士在患者开始治疗前、每个治疗周期开始时、最初两个治疗周期的第 14 天及有临床指征时监测患者的全血细胞计数。

Ibrance 由位于纽约的辉瑞公司销售。