

# 阿昔替尼对肾上腺皮质癌 SW-13 细胞生物学行为的影响\*

杨涛玮<sup>1,2</sup>, 汪帮琦<sup>2</sup>, 胡卫列<sup>1,2△</sup>

(<sup>1</sup>南方医科大学, 广东 广州 510515; <sup>2</sup>中国解放军南部战区总医院泌尿外科, 广东 广州 510010)

**[摘要]** 目的: 探究阿昔替尼(axitinib)对人肾上腺皮质癌 SW-13 细胞生物学行为的影响。方法: CCK-8 法检测不同浓度 axitinib 对 SW-13 细胞活力的影响; 流式细胞术检测细胞周期分布; Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率; 划痕愈合实验及 Transwell 侵袭实验观察细胞迁移及侵袭的情况; Western blot 实验检测细胞中血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)、细胞外信号调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2) 和 p-ERK1/2 的蛋白水平。结果: Axitinib 能抑制 SW-13 细胞活力, 阻滞细胞于 G<sub>2</sub>/M 期, 促进细胞凋亡, 并抑制 SW-13 细胞的迁移及侵袭能力 ( $P < 0.05$ ); axitinib 可下调 SW-13 细胞 VEGFR2 和 p-ERK1/2 的蛋白水平 ( $P < 0.05$ )。结论: Axitinib 可以抑制 SW-13 细胞生长、阻滞细胞周期、促进细胞凋亡并抑制其迁移和侵袭, 其作用机制可能与抑制 VEGFR2 的表达和减少 ERK1/2 的磷酸化有关。

**[关键词]** 阿昔替尼; 肾上腺皮质癌; 血管内皮生长因子受体 2; 细胞外信号调节蛋白激酶 1/2

**[中图分类号]** R736.6; R730.23 **[文献标志码]** A doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2019.05.008

## Effects of axitinib on biological behavior of adrenocortical carcinoma cell line SW-13

YANG Tao-wei<sup>1,2</sup>, WANG Bang-qi<sup>2</sup>, HU Wei-lie<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Department of Urology, General Hospital of Southern Theater Command, PLA, Guangzhou 510010, China. E-mail: huwl-mr@vip.sina.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effects of axitinib on the biological behavior of adrenocortical carcinoma cell line SW-13. **METHODS:** CCK-8 assay was used to measure the viability of SW-13 cells treated with axitinib at different concentrations. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. The apoptotic rate was also analyzed by flow cytometry with Annexin V/PI double staining. Wound healing experiment and Transwell invasion assay were used to observe cell migration and invasion abilities, respectively. The protein levels of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), extracellular regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) and p-ERK1/2 were determined by Western blot. **RESULTS:** After treated with axitinib, the viability of SW-13 cells was significantly inhibited, the cell cycle was blocked in G<sub>2</sub>/M phase, and the apoptosis rate was increased. The migration and invasion abilities of SW-13 cells were markedly inhibited by axitinib ( $P < 0.01$ ). The protein levels of VEGFR2 and p-ERK1/2 in the SW-13 cells were significantly decreased with axitinib treatment ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION:** Axitinib inhibits the viability, blocks the cell cycle, promotes cell apoptosis, and inhibits the migration and invasion abilities of SW-13 cells. The mechanism may be related to inhibition of VEGFR2 expression and reduction of ERK1/2 phosphorylation.

**[KEY WORDS]** Axitinib; Adrenal cortical carcinoma; Vascular endothelial growth factor receptor 2; Extracellular regulated protein kinases 1/2

肾上腺皮质癌(adrenal cortical carcinoma, ACC)是一种起源于肾上腺皮质的恶性肿瘤, 每年发病率约为 0.5 ~ 2.0/100 万人, 该病起病隐匿, 恶性程度

高, 侵袭力强, 容易向肝脏、肺、后腹膜及淋巴转移<sup>[1-3]</sup>。完全性手术切除是早期 ACC 治疗的重要手段, 但术后复发率高, 即使完全切除肿瘤, 患者 5 年

[收稿日期] 2018-07-09 [修回日期] 2018-10-10

\* [基金项目] 广东省医学科研项目(No. A2017442)

△通讯作者 Tel: 020-61778478; E-mail: huwl-mr@vip.sina.com

生存率仅为 30%。ACC 缺乏有效的药物治疗,目前国内外推荐最有效的药物米托坦,其有效率仅为 35%,且仅能短暂减缓肿瘤进展速度<sup>[4]</sup>。

阿昔替尼(axitinib)为小分子多靶点酪氨酸激酶抑制剂,可靶向作用于血管内皮细胞生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR),具有抑制肿瘤血管生成和抗肿瘤细胞生长的作用<sup>[5-6]</sup>。目前临床上阿昔替尼主要用于肾癌的治疗,少有在 ACC 治疗中应用。本文研究阿昔替尼是否可抑制人肾上腺皮质癌 SW-13 细胞的生长,并探究其作用机理,为阿昔替尼临床用于 ACC 治疗提供科学依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 细胞株

人肾上腺皮质癌 SW-13 细胞购自上海中科院细胞库。

### 2 主要试剂

阿昔替尼购自 MedChemExpress; L-15 培养基(杭州吉诺公司);胎牛血清、胰蛋白酶、二甲基亚砜、青霉素和链霉素(Gibco);CCK-8 细胞活力检测试剂盒和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(Dojindo);细胞周期检测试剂盒(武汉碧云天公司);兔抗人  $\beta$ -actin、兔抗人 VEGFR 2、p-ERK 1/2 和 ERK1/2 抗体(Abcam)。

### 3 主要方法

**3.1 细胞培养** 人肾上腺皮质癌 SW-13 细胞用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 L-15 培养基、接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶,在 37 °C、无 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养。待细胞密度处于 70% ~ 80% 时进行传代;用对数生长期的细胞进行实验。一般 2 d 换液,4 d 细胞传代。

**3.2 CCK-8 法检测细胞存活率** 将对数生长期的 SW-13 细胞以  $2.5 \times 10^7$ /L 密度接种于 96 孔板中,每孔含培养液 100  $\mu$ L,设置 5 个药物实验组(阿昔替尼浓度分别为 0.1、1、2.5、5、10 和 20  $\mu$ mol/L)、1 个正常对照组和 1 个空白组,每组 4 个复孔。在受试物处理 24 h、48 h 和 72 h 后,每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ L,避光反应 4 h,用酶标仪检测各孔在 450 nm 波长的吸光度(A)值,以空白对照孔调零,计算细胞存活率。细胞存活率(%) =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{正常对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。实验独立重复 3 次。

**3.3 流式细胞术检测细胞周期** 将细胞接种传代于 6 孔板中,每孔细胞接种约  $5 \times 10^4$  个,待细胞铺满板底约 60% 时弃原培养基, PBS 冲洗孔板 2 次,分组并更换含受试物的培养基,再培养细胞 48 h。按细

胞周期检测试剂盒标准操作流程,消化收集并固定细胞,染色后上 BD 流式细胞仪检测。实验独立重复 3 次。

**3.4 Annexin V/PI 双染法检测 SW-13 细胞凋亡** 取处于对数生长期 SW-13 细胞接种于 6 孔板(每孔  $5 \times 10^4$  细胞),待细胞铺满板底约 60% 时弃原培养基, PBS 冲洗孔板 2 次,分别换相应受试物培养基培养细胞 48 h。加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI 染液,室温下避光染色 15 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

**3.5 划痕愈合实验检测细胞迁移能力** 将 24 孔板背面横向画线,每孔 3 条。对数生长期细胞消化并均匀接种于孔板内,培养细胞密度为细胞间无空隙。用直尺比划,以 100  $\mu$ L 枪头沿直尺固定,垂直于孔板背后画线,对孔板细胞笔直划痕。用 PBS 沿孔板边轻冲洗细胞 3 次,吸去划下的细胞,对照组加入无血清 L-15 培养基,药物组分别加入无血清含有 4、8 和 16  $\mu$ mol/L 药物的培养基。放入上述培养条件培养,分别于 18 h 和 36 h 在相差显微镜下选定同一位置拍照,计算细胞迁移率。

**3.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力** 将对数生长期细胞撤血清饥饿培养过夜。消化细胞、离心,并分别用无血清培养基及含 4、8 和 16  $\mu$ mol/L 阿昔替尼药物的无血清培养基重悬细胞。调整细胞浓度至  $1 \times 10^8$ /L。分别取细胞悬液 200  $\mu$ L 加入 Transwell 小室,小室下孔板内加入 500  $\mu$ L 含 30% FBS 的培养基。细胞培养 36 h 后,弃去培养液,将 Transwell 小室取出,用棉签擦去小室内侧细胞及基质胶,无水甲醛固定小室外侧细胞 20 min,再用 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min, PBS 冲洗小室内外侧 3 次。在倒置相差显微镜,计数 5 个随机视野的细胞数量。

**3.7 Western blot 检测相关蛋白表达** 收集阿昔替尼处理 48 h 的 SW-13 细胞至离心管中,充分裂解细胞,利用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,进行 12% SDS-PAGE 分离,使用半干转膜法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,脱脂乳室温封闭 1 h,加入 I 抗兔抗人  $\beta$ -actin 抗体、兔抗人 VEGFR2 抗体、兔抗人 p-ERK 1/2 抗体及兔抗人 ERK1/2 抗体,置于 4 °C 摇床过夜孵育。用 TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,加入 II 抗(HRP 标记山羊抗兔 IgG),室温孵育 1 h, ECL 发光试剂显色,利用化学发光型凝胶成像系统检测目的条带,内参照采用  $\beta$ -actin,利用 ImageJ 软件进行灰度分析。

### 4 统计学处理

各组实验独立重复 3 次。实验数据用均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。细胞活力和划痕愈合实验结果采用两因素方差分析(two-way ANOVA),两两比较采用 Bonferro-

ni 检验;细胞周期、细胞侵袭实验、细胞凋亡率和 Western blot 结果分析采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 Tukey 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 CCK-8 法检测阿昔替尼对 SW-13 细胞生长的抑制作用

以  $0 \mu\text{mol/L}$  阿昔替尼作为对照组, 结果显示, 同一时间点, 随阿昔替尼浓度增加, 细胞存活率明显降低 ( $P < 0.05$ ); 同一药物浓度, 随作用时间延长, 细胞存活率也显著降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 1, 即阿昔替尼抑制 SW-13 细胞增殖呈浓度-时间相关性。计算出

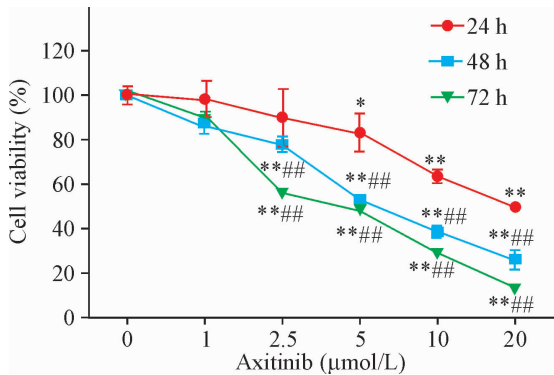


Figure 1. The effect of axitinib on the viability of SW-13 cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs  $0 \mu\text{mol/L}$  group; ###  $P < 0.01$  vs 24 h group.

图 1 阿昔替尼对 SW-13 细胞活力的影响

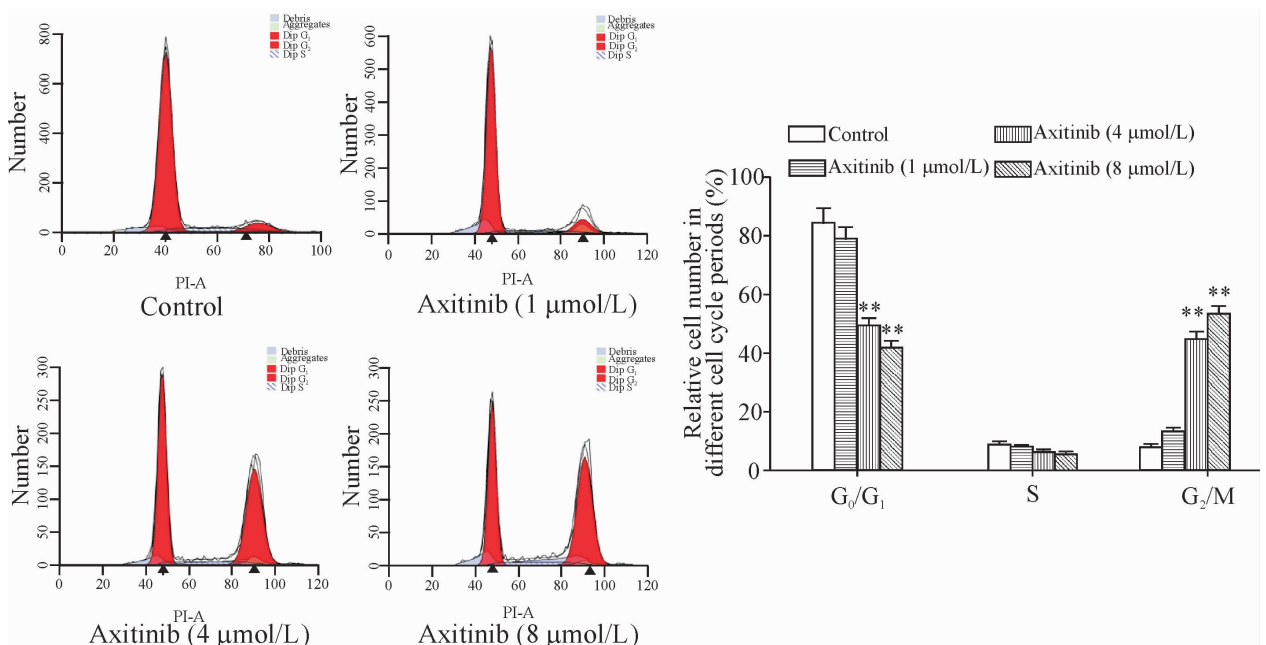


Figure 2. The effect of axitinib on the cell cycle distribution of SW-13 cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

图 2 阿昔替尼对 SW-13 细胞周期的影响

阿昔替尼作用 24 h、48 h 和 72 h 的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 ( $19.06 \pm 1.09$ )  $\mu\text{mol/L}$ 、( $6.49 \pm 0.03$ )  $\mu\text{mol/L}$  和 ( $4.13 \pm 0.04$ )  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 2 阿昔替尼阻滞 SW-13 细胞周期

流式细胞术结果显示, 与对照组相比,  $4 \mu\text{mol/L}$  和  $8 \mu\text{mol/L}$  阿昔替尼组 S 期无明显变化, 处于  $G_0/G_1$  期细胞的比例减少 ( $P < 0.01$ ), 而  $G_2/M$  细胞的比例明显升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。表明阿昔替尼对细胞周期有抑制作用, 可将 SW-13 阻滞在  $G_2/M$  期。

### 3 阿昔替尼促进 SW-13 细胞凋亡

Annexin V/PI 双染色流式细胞检测结果显示, 对照组细胞凋亡率为 ( $3.50 \pm 0.42$ )%,  $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \mu\text{mol/L}$  和  $8 \mu\text{mol/L}$  阿昔替尼组细胞凋亡率分别为 ( $3.80 \pm 0.60$ )%、( $9.80 \pm 1.08$ )% 和 ( $17.90 \pm 2.17$ )%。与对照组比较,  $4 \mu\text{mol/L}$  和  $8 \mu\text{mol/L}$  阿昔替尼组细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 3。

### 4 阿昔替尼减弱 SW-13 细胞迁移能力

对照组在 18 h 和 36 h 后, 细胞已明显向划痕区迁移并覆盖划痕空白条带, 而阿昔替尼干预后, 能够显著抑制 SW-13 细胞向划痕区的迁移。Two-way ANOVA 分析, 除  $4 \mu\text{mol/L}$  组在 18 h 迁移率与对照组相比差异无统计学显著性外, 其余各阿昔替尼组迁移率和对照组相比均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 4。提示阿昔替尼可减弱 SW-13 细胞迁移能力, 且阿昔替尼抑制细胞弱迁移的能力和其作用时间和药物浓度呈正比关系。

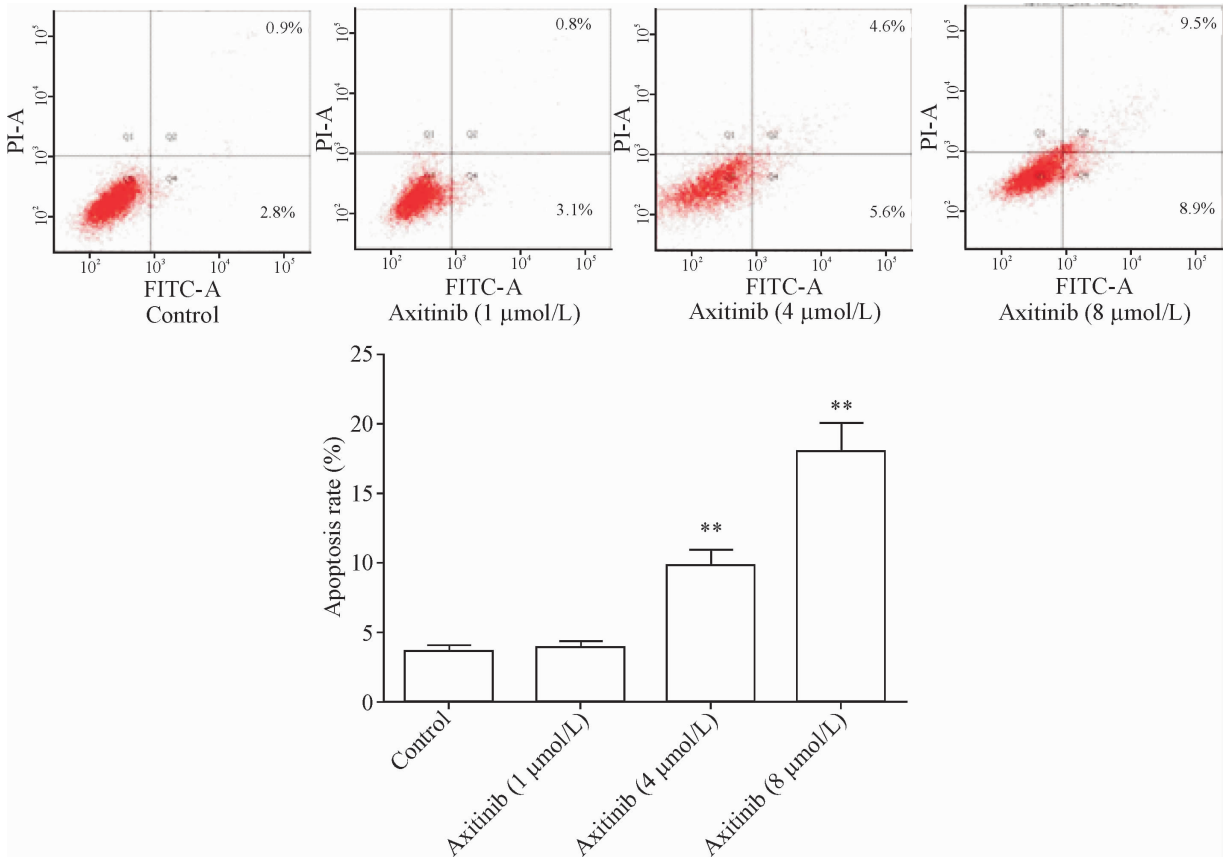


Figure 3. Axitinib induced apoptosis in the SW-13 cells. The SW-13 cells treated with Axitinib were stained with annexin V-PI and subjected to flow cytometry analysis. Mean ± SD.  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

图3 阿昔替尼对 SW-13 细胞凋亡的影响

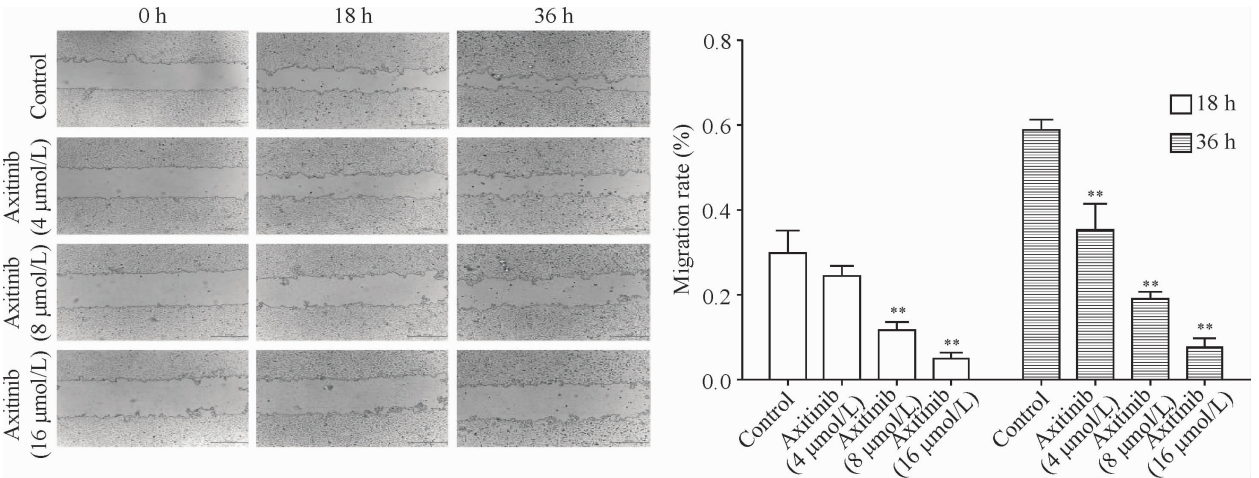


Figure 4. The effect of axitinib on migration ability of SW-13 cells ( $\times 200$ ). Mean ± SD.  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

图4 划痕愈合实验检测阿昔替尼对细胞迁移能力的影响

### 5 阿昔替尼抑制 SW-13 细胞侵袭能力

Transwell 小室外侧的 SW-13 细胞数量, 8 和 16  $\mu\text{mol/L}$  阿昔替尼组较对照组明显减少 ( $P < 0.01$ ), 见图 5。结果表明阿昔替尼可以抑制 SW-13 细胞对组织基质的侵袭能力。

### 6 阿昔替尼抑制 VEGFR2 介导的 ERK1/2 磷酸化

Western blot 结果示, 与对照组相比, 阿昔替尼呈剂量依赖性地抑制 VEGFR2 的表达; p-ERK1/2 在用药后的蛋白水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), 而 ERK1/2 的表达无明显差异, 见图 6。提示阿昔替尼抑制前列腺癌细胞的活力和迁移可能与调控 VEGFR2 和 ERK1/2 磷酸化水平相关。



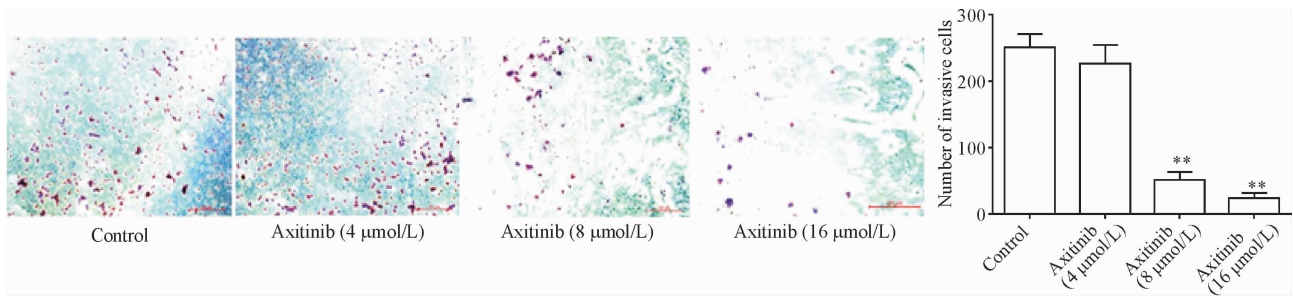


Figure 5. The effect of axitinib on the invasion ability of SW-13 cells ( $\times 100$ ). Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

图5 阿昔替尼对细胞侵袭能力的影响

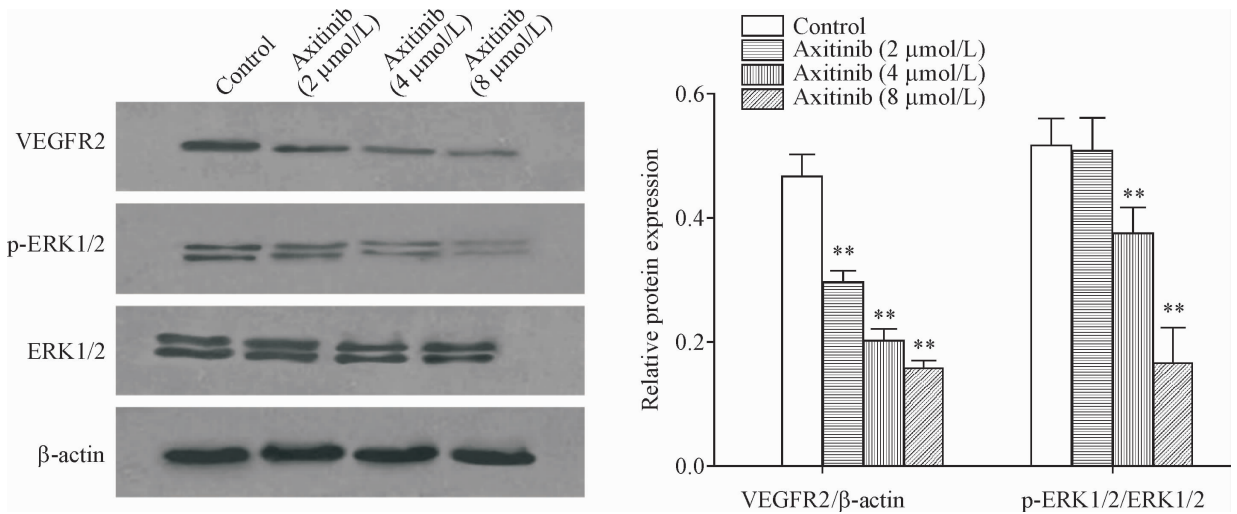


Figure 6. The effects of axitinib on the protein levels of VEGFR2 and p-ERK1/2 in SW-13 cells was determined by Western blot. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

图6 阿昔替尼对 SW-13 细胞 VEGFR2 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平的影响

## 讨 论

肾上腺皮质癌是原发于肾上腺皮质的恶性肿瘤。据研究报道 ACC 年发病率为 0.02%<sup>[1-3]</sup>。ACC 起病隐匿,肾上腺皮质癌组织形态在影像学上和正常肾上腺组织相似,影像学诊断困难。有功能 ACC 肿瘤其临床表现与肾上腺良性肿瘤表现相似,容易误诊漏诊;而无功能型 ACC 更难以被发觉;多数 ACC 患者被诊断时已有远处转移。失去手术机会的 ACC 患者,需要使用化疗、放疗、肿瘤栓塞等姑息治疗方法,然而这些治疗效果都不理想。即使是早期 ACC 患者施行根治性切除术,也需要术后服用药物来防止肿瘤复发<sup>[7]</sup>。

米托坦作为 FDA 唯一批准使用的 ACC 治疗药物,其有效率仅为 35%<sup>[4]</sup>,且米托坦并不能使 ACC 患者远期生存率显著提高。寻找耐受好、疗效佳的治疗 ACC 的药物已成为人们关注的焦点。近年来酪氨酸酶抑制剂相关靶向药物,如 VEGFR 抑制剂等,成为了抗肿瘤靶点研究热点,但 VEGFR 是否也可能是 ACC 理想的治疗靶点,目前文献很少。阿昔

替尼作为多靶点酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI),其主要作用的受体为 VEGFR、PDGFR 和 c-KIT,可通过酪氨酸激酶受体抑制作用,阻断受体型酪氨酸激酶相关信号通路,使肿瘤细胞失去继续分裂和生长的能力<sup>[5-6]</sup>。Kroiss 等<sup>[8]</sup>在 157 例肾上腺皮质癌和 9 例正常肾上腺组织样品中利用免疫组织化学检测了 VEGF 和 VEGFR 的表达发现,VEGFR2 在 ACC 组织中表达量较正常肾上腺组织显著增高,同时发现舒尼替尼可以抑制 ACC 细胞系的增殖,并通过下调 HSD3B2 表达来抑制肾上腺皮质癌细胞皮质醇的分泌。文献报道索拉菲尼 (sorafenib),另一种 TKI,可通过有效抑制 VEGFR1、VEGFR2 和 PDGFR,显著抑制肾上腺皮质癌细胞的生长,表明其在肾上腺皮质癌细胞中具有抗血管生成和抗肿瘤作用<sup>[9]</sup>,以上研究表明酪氨酸酶抑制剂类可能通过抑制 VEGFR,继而抑制肿瘤增殖及血管生成,达到治疗 ACC 的目的。本研究中,我们通过 CCK-8 法来检测阿昔替尼对 SW-13 细胞活力的抑制作用。结果表明,随着药物浓度的升高或药物作用时间的增长,SW-13 细胞存活率降低,药物抑制 SW-13 细胞活力

呈浓度和时间双重依赖性。值得注意的是,阿昔替尼 24 h 的半抑制浓度( $IC_{50}$ )为 19.06  $\mu\text{mol/L}$ ,在 24 h ~ 48 h 期间  $IC_{50}$  有显著下降,而 48 h 和 72 h 的  $IC_{50}$  较为稳定,分别为 6.491  $\mu\text{mol/L}$  和 4.125  $\mu\text{mol/L}$ ,推测可能由于 24 h 时细胞尚处于第一个分裂周期,此后细胞分裂受到抑制,故 48 h 后的  $IC_{50}$  变小,即很低浓度的药物即可抑制细胞的活力。可以推测,阿昔替尼对肿瘤细胞的作用主要是通过抑制其生长,而可能并不主要是通过杀伤细胞导致的。以上推测在分析细胞周期和细胞凋亡的实验中得到了进一步的证实。本研究中流式细胞术检测结果显示,阿昔替尼可剂量依赖地将 SW-13 细胞阻滞于  $G_2/M$  期,使得细胞不能进入 M 期,导致分裂指数下降,细胞增殖被抑制;而  $G_2/M$  期阻滞可能也是 DNA 的修复期,损伤的 DNA 在染色体分离前可能得到修复,而不能修复者则退出增殖周期,进入凋亡途径<sup>[10]</sup>。本研究结果,阿昔替尼用药 48 h 后,SW-13 细胞的凋亡率明显升高,也证明了这一点。但其促凋亡作用似没有周期阻滞作用明显,是否阿昔替尼在抑制 SW-13 细胞活力的过程中,相对促进其细胞凋亡而言,药物对细胞周期生长的阻滞更加重要,还需进一步证明。

恶性肿瘤除了增殖、细胞周期和细胞凋亡等基本生长繁殖特征外,其生物学特征还包括转移特性。本研究划痕愈合实验显示,阿昔替尼可减弱 SW-13 细胞迁移能力,并且随作用时间延长或药物浓度增高,减弱迁移能力的效果越明显。Transwell 实验也证实阿昔替尼抑制了 SW-13 细胞的侵袭能力。这两个实验互相佐证,证明了阿昔替尼可以降低 SW-13 细胞的迁移、侵袭能力,这是抗肿瘤转移的重要药物特征。

如前所述,酪氨酸激酶抑制剂是 ACC 治疗的潜在重要靶点。其中 VEGFR 相关通路可能通过影响肿瘤增殖、血管生成等达到治疗肿瘤的目的。VEGF 配体通过结合到 VEGFR2 上,催化 ATP 上的磷酸基转移到 Ras 蛋白酪氨酸残基上,激活 Ras,然后进一步激活 PARK 级联反应:  $Raf1 \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2$ <sup>[11]</sup>。MAPK/ERK 信号通路,不仅在细胞增殖、细胞凋亡、迁移等过程中起到重要作用,也处于血管生成信号通路的调节中心,决定肿瘤血管生成的最终状态<sup>[12]</sup>。ERK 分为 ERK1 和 ERK2,主要通过磷酸化而激活为有活性的 p-ERK1/2,参与肿瘤细胞的增殖、迁移和血管形成过程,并在肿瘤侵袭和转移过程中起重要作用。Sun 等<sup>[12]</sup>研究表明,一种抗血管生成化合物 EPOX 可以通过抑制 ERK 磷酸化,从而具

有抗肿瘤血管形成的作用。本实验 Western blot 结果显示,阿昔替尼减少了 VEGFR2 和 p-ERK1/2 的蛋白水平。可以推测,阿昔替尼下调 VEGFR2 表达,导致级联反应  $Raf1 \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2$  抑制,从而抑制 ERK 的磷酸化这一机制可能与阿昔替尼体外抑制 SW-13 细胞活力有关。

#### [参 考 文 献]

- [1] Fassnacht M, Libé R, Kroiss M, et al. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update[J]. Nat Rev Endocrinol, 2011, 7(6):323-335.
- [2] Else T, Kim AC, Sabolch A, et al. Adrenocortical carcinoma[J]. Endocr Rev, 2014, 35(2):282-326.
- [3] Kebebew E, Reiff E, Duh QY, et al. Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress? [J]. World J Surg, 2006, 30(5):872-878.
- [4] Veytsman I, Nieman L, Fojo T. Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(27):4619-4629.
- [5] Escudier B, Gore M. Axitinib for the management of metastatic renal cell carcinoma[J]. Drugs R D, 2011, 11(2):113-126.
- [6] Gross-Goupil M, François L, Quivy A, et al. Axitinib: a review of its safety and efficacy in the treatment of adults with advanced renal cell carcinoma[J]. Clin Med Insights Oncol, 2013, 7:269-277.
- [7] Lebastchi AH, Kunstman JW, Carling T. Adrenocortical carcinoma: current therapeutic state-of-the-art[J]. J Oncol, 2012, 2012: 234726.
- [8] Kroiss M, Reuss M, Kühner D, et al. Sunitinib inhibits cell proliferation and alters steroidogenesis by down-regulation of HSD3B2 in adrenocortical carcinoma cells [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2011, 2:27.
- [9] Libé R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment[J]. Front Cell Dev Biol, 2015, 3:45.
- [10] Palayoor ST, Macklis RM, Bump EA, et al. Modulation of radiation-induced apoptosis and  $G_2/M$  block in murine T-lymphoma cells[J]. Radiat Res, 1995, 141(3):235-243.
- [11] Chang F, Steelman LS, Shelton JG, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway[J]. Int J Oncol, 2003, 22(3):469-480.
- [12] Sun HL, Tsai AC, Pan SL, et al. EPOX inhibits angiogenesis by degradation of Mcl-1 through ERK inactivation [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(15):4904-4914.