引文格式:孙浩,李姣,毕宏生,王兴荣. 阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞的作用及其机制研究[J]. 眼科新进展,2022,42(4):284-288. doi:10.13389/j.cnki.rao.2022.0057

【实验研究】

阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞的作用及其机制研究△

孙 浩 李 姣 毕宏生 王兴荣

作者简介:孙浩(ORCID:0000-0002-2014-7697),男,1992年6月出生,山东临沂人,在读硕士研究生。研究方向:玻璃体视网膜疾病、眼视光学。E-mail:gongsunhaoqi@163.com
通信作者:王兴荣(ORCID:0000-0002-7561-3296),女,教授,山东中医药大学附属眼科医院副院长。E-mail:semxrw@163.com

收稿日期:2021-12-18
修回日期:2022-02-08
本文编辑:方红玲
△**基金项目**:山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2018ws194);山东省自然科学基金面上项目(编号:ZR2020MH393)
作者单位:250002 山东省济南市,山东中医药大学(孙浩);276000 山东省临沂市,兰陵县人民医院(孙浩);250002 山东省济南市,山东中医药大学附属眼科医院、山东省眼病防治研究院(李姣,毕宏生,王兴荣)

【摘要】 **目的** 探索阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞的作用及其机制。**方法** 将B16F10细胞(葡萄膜黑色素瘤细胞)分为实验组和对照组,对照组不使用药物处理,实验组分别用0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1}阿柏西普进行干预。通过实时细胞电子分析系统(RT-CES)、CCK-8法探讨不同剂量的阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞生长过程的影响;ELISA分析阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞中VEGF-A含量的影响;RT-PCR检测不同剂量阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞VEGF-A mRNA表达的影响;流式细胞仪分析不同剂量阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞周期和凋亡的影响。**结果** 0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1}的阿柏西普作用B16F10细胞24 h后,细胞存活率分别下降至(95.10±1.76)%、(87.33±2.20)%和(74.36±1.67)%。RT-PCR检测结果显示:阿柏西普能够下调细胞中VEGF-A mRNA的表达;ELISA检测结果表明,阿柏西普可抑制细胞中VEGF-A的水平,其中4.0 g·L^{-1}阿柏西普抑制作用最为明显。此外,与对照组[细胞凋亡率0%,G1期细胞比例为(27.60±0.36)%]相比,0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1}阿柏西普干预24 h后,B16F10细胞凋亡率分别升高为3.51%、11.10%和14.77%,G1期细胞比例分别升高至(64.09±0.34)%、(66.02±0.65)%、(67.49±0.33)%,差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。**结论** 阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞有显著抑制作用,其作用机制为抑制细胞中VEGF-A水平,从而诱导细胞发生凋亡和S期阻滞,其作用具有浓度依赖性。

【关键词】 阿柏西普;葡萄膜黑色素瘤;VEGF;作用机制
【中图分类号】 R773.9

恶性黑色素瘤是人类致死率很高的肿瘤之一,最早由希波克拉底提出[1]。葡萄膜黑色素瘤是成人最常见的原发性眼内恶性肿瘤,占眼内黑色素瘤的83.0%,极易发生转移,常见的为肝转移,其次是肺转移和骨转移,如果在肿瘤发生全身转移前进行诊断和治疗,患者存活率可提高到90.0%[2]。众所周知,人血管内皮生长因子(VEGF)是影响血管生成的主要因子之一,异常的血管生成与肿瘤的生长、转移密切相关[3]。研究发现,阻断VEGF的产生并抑制肿瘤新生血管形成被认为是一种有效的抗肿瘤治疗方法[4]。阿柏西普是一种抗VEGF的眼内注射药物,是由VEGF的受体1、受体2与人免疫球蛋白Fc片段重组形成的融合蛋白,可通过特异性地结合VEGF-A所有亚型和胎盘生长因子(PLGF)等VEGF家族成员及促血管生成细胞因子,从而抑制VEGF家族成员与天然VEGF受体的结合与激活,减少血管内皮细胞分裂、增殖,降低血管通透性,进一步抑制新生血管的生成[5]。在转移性结肠癌患者肿瘤模型中,阿柏西普可以使肿瘤的脉管系统及体积减小,抑制腹水生成[6]。因此我们推测,阿柏西普可以通过拮抗VEGF的某个受体,从而抑制葡萄膜黑色素瘤的生长。本实验主要研究抗VEGF药物阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤B16F10细胞生长的影响和靶向机制,揭示阿柏西普在UM治疗过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 葡萄膜黑色素瘤细胞株B16F10(中国科学院细胞库);阿柏西普(美国拜耳公司);胎牛血清(FBS;澳大利亚GICO公司);高糖-DMEM培养液(美国Hyclone公司);PBS试剂、CCK-8试剂盒和PCR试剂盒均购自山东思科捷生物科技有限公司;PCR引物由上海生工生物有限公司合成;ELISA试剂盒购自上海将来实业股份有限公司;流式细胞仪试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。裂隙灯显微镜(德国Zeiss);高倍显微镜(美国Leica-M841型);高速冷冻离心机(美国Heal Force);流式细胞仪(美国BD FACSVerse);快速温度梯度PCR仪(美国Bio-RAD);荧光定量PCR反应机(德国罗氏480);酶联免疫仪(美国BioTek);细胞培养箱(上海新苗)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将购买的葡萄膜黑色素瘤B16F10细胞用含体积分数10% FBS、100 mg·L^{-1}链霉素、100×10^3 U·L^{-1}青霉素的高糖-DMEM培养基进行培养,置于37 ℃、含体积分数5% CO_2细胞培

养箱中培养。当培养瓶中细胞占据90% ~100%时，用0.5 g·L^{-1}胰蛋白酶进行消化、传代，本实验所用的细胞为第3-6代。

1.2.2 RT-CES动态监测各组细胞生长状态 将10×10^3个B16F10细胞分别种植于16孔板中，在37 ℃、含体积分数5% CO_2细胞培养箱中培养20 h，去除培养液，实验组按加入药物浓度不同设为0.2 g·L^{-1}阿柏西普组、2.0 g·L^{-1}阿柏西普组、4.0 g·L^{-1}阿柏西普组，各实验组细胞加入不同浓度阿柏西普与DMEM混合的培养液继续培养，对照组细胞加入等量DMEM培养液继续培养。利用RT-CES分析器记录并分析各组细胞经不同浓度阿柏西普干预90 h内的生长趋势。

1.2.3 CCK-8法检测各组细胞生存率 将B16F10细胞按每孔10×10^3个接种于96孔板内，置于37 ℃、含体积分数5% CO_2细胞培养箱中培养24 h，实验组细胞用含不同浓度(0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1})的阿柏西普与DMEM混合的培养液继续培养，对照组细胞加入等量DMEM培养液继续培养，每组设置3个复孔。继续培养24 h后，每孔加入200 μL CCK-8检测试剂，培养4 h后检测各组细胞在490 nm波长下的吸光度(D)，计算细胞生存率。细胞生存率(%)=($D_{实验组}/D_{对照组}$)×100%。

1.2.4 RT-PCR检测各组细胞中VEGF-A mRNA的相对表达量 利用RT-PCR检测B16F10细胞经阿柏西普干预后VEGF-A mRNA的表达。提取总RNA后采用Takara逆转录试剂盒逆转录合成cDNA，VEGF-A的引物序列如下：上游引物为5'-GCCCTTGCCTTGCTGCTCTACC-3'，下游引物为5'-GTGATGATTCTGCCTCCTCCTTC-3'。以β-actin作为内参照行PCR扩增。反应条件为：95 ℃ 3 min预变性；95 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，共40个循环，然后95 ℃ 60 s，60 ℃ 60 s。按$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算各组细胞中VEGF-A mRNA的相对表达水平。

1.2.5 ELISA检测各组细胞中VEGF-A含量 将实验组B16F10细胞分别用0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1}阿柏西普与DMEM的混合培养液进行处理，对照组细胞加入等量DMEM培养液培养。24 h后收集每孔上清液200 μL，利用VEGF-A ELISA试剂盒进行分析，具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.6 各组细胞周期检测 将B16F10细胞培养至对数生长期，在生长状态良好的情况下进行实验。细胞经PBS清洗、胰蛋白酶消化计数后稀释至60×10^3个·mL^{-1}，然后将其吹打混匀，取5 mL按每瓶300×10^3个细胞接种于6孔板上，置于37 ℃、含体积分数5% CO_2饱和湿度细胞培养箱内培养24 h。0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1}阿柏西普分别加入实验组对应培养板内，对照组加入等量DMEM培养液，置于细胞培养箱继续培养48 h。连同培养上清液一起收集阿柏西普作用48 h后的细胞，1000 r·min^{-1}离心5 min，用PBS清洗一遍，再用体积分数70%冰乙醇4 ℃固定12 h以上。将固定好的细胞离心去除乙醇，预冷PBS清洗2遍后，0.5 mL预冷的PBS重悬细胞。分别加入5 μL的10 g·L^{-1} RNaseA，对不同浓度阿柏西普作用后的细胞于37 ℃避光处理30 min。再用0.05 g·L^{-1}碘化丙啶于4 ℃避光处理30 min。利用流式细胞仪对处理好的各组细胞进行细胞周期检测。

1.2.7 细胞凋亡检测 将B16F10细胞培养至对数生长期，细胞经PBS清洗、胰蛋白酶消化计数后稀释至30×10^3个·mL^{-1}，然后将其吹打混匀，取5 mL以每孔150×10^3个接种于6孔板中，于37 ℃、含体积分数5% CO_2饱和湿度细胞培养箱内培养24 h。分别取0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1}阿柏西普加入对应实验组孔内，对照组加入等量DMEM培养液，将孔板置于37 ℃、含体积分数5% CO_2饱和湿度细胞培养箱培养48 h。连同培养上清液一起收集，1000 r·min^{-1}离心5 min，PBS清洗。先用500 μL AnnexinV/FITC binding buffer重悬细胞，再分别依次加入AnnexinV-FITC和碘化丙啶，避光处理15 min。将处理好的细胞用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析，实验结果用$\bar{x}\pm s$表示，实验组与对照组比较采用独立样本t检验，不同实验组间比较采用单因素方差分析。检验水准：$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 各组细胞生长状态 RT-CES连续监测阿柏西普作用B16F10细胞90 h的生长状态曲线显示：与对照组相比，4.0 g·L^{-1}阿柏西普组细胞的生长受抑制作用最明显，2.0 g·L^{-1}阿柏西普组与对照组相比细胞生长受抑制较明显，0.2 g·L^{-1}阿柏西普组与对照组相比细胞生长受抑制作用不明显(图1)。

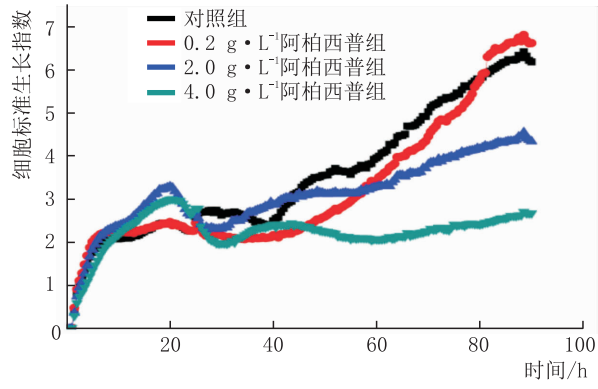


图1 RT-CES连续监测各组细胞生长状态

2.2 各组细胞的生存率 随着时间的推移，B16F10细胞经过不同浓度阿柏西普处理后发现，实验组细胞相较于对照组具有明显的抗细胞增殖活性，其中48 h检测结果提示细胞生存率下降最为明显，0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1}阿柏西普组细胞生存率分别为(95.10±1.76)%、(87.33±2.20)%和(74.36±1.67)%，且表现出浓度和时间依赖性。

2.3 各组细胞中 VEGF-A mRNA 的相对表达量 RT-PCR检测结果显示，对照组细胞中VEGF-A mRNA的相对表达量为1.00±0.03，4.0 g·L^{-1}阿柏西普组细胞中VEGF-A mRNA相对表达量(0.70±0.05)较对照组下调，0.2 g·L^{-1}阿柏西普组、2.0 g·L^{-1}阿柏西普组细胞中VEGF-A mRNA表达较对照组均下调，相对表达量分别为0.73±0.03、0.82±0.01，差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。

2.4 各组细胞中 VEGF-A 含量 ELISA检测结果表明，阿柏西普干预B16F10细胞24 h后，对照组细胞中VEGF-A含量为(97.84±0.76) ng·L^{-1}；0.2 g·L^{-1}阿柏西普组、2.0 g·L^{-1}阿柏西普组、4.0 g·L^{-1}阿柏西普组作用24 h后，B16F10细胞VEGF-A含量分别下降为(85.50±0.88) ng·L^{-1}、(62.70±0.19) ng·L^{-1}、(43.11±0.17) ng·L^{-1}，与对照组相比，差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。

2.5 各组细胞周期结果 阿柏西普对B16F10细胞作用24 h后，对照组与0.2 g·L^{-1}阿柏西普组、2.0 g·L^{-1}阿柏西普组、4.0 g·L^{-1}阿柏西普组G1期和G2期的细胞比例比较，差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)；各组间S期细胞比例比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。结果提示，阿柏西普可以引起B16F10细胞S期阻滞，从而抑制细胞周期性增殖(表1)。

表1 流式细胞仪检测各组细胞周期结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	G1期/%	G2期/%	S期/%
对照组	27.60±0.36	57.81±0.34	10.54±0.37
0.2 g·L^{-1}阿柏西普组	64.09±0.34*	14.04±0.10*	16.83±0.39
2.0 g·L^{-1}阿柏西普组	66.02±0.65*	13.83±0.04*	16.33±0.05
4.0 g·L^{-1}阿柏西普组	67.49±0.33*	13.45±0.01*	15.85±0.32

注：与对照组相比，*$P<0.05$。

2.6 流式细胞仪检测各组细胞凋亡结果 对照组培养24 h后正常细胞比例为96.34%，破碎、坏死细胞的比例为2.51%，凋亡细胞的比例为0.00%。0.2 g·L^{-1}、2.0 g·L^{-1}、4.0 g·L^{-1}阿柏西普组处理细胞24 h后，正常细胞比例显著下降，分别为90.53%、72.36%、67.40%，凋亡细胞的比例明显上升，分别为3.51%、11.10%、14.77%。结果表明，阿柏西普可以促进B16F10细胞的凋亡，并呈浓度依赖性(图2)。

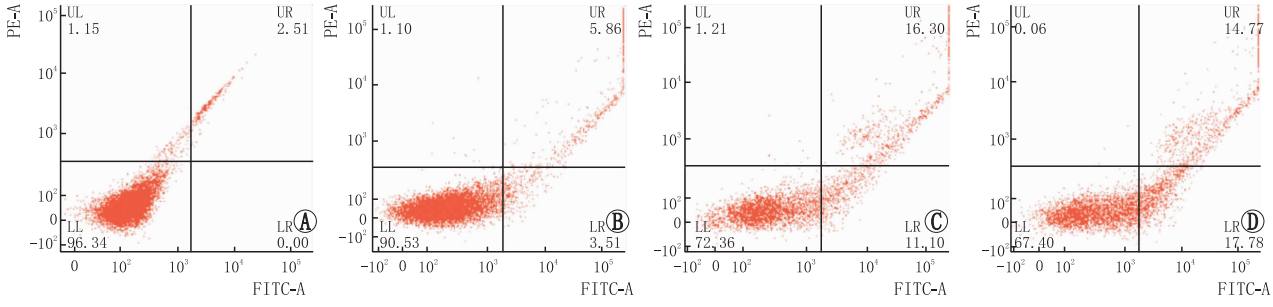


图2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况 A：对照组；B为0.2 g·L^{-1}阿柏西普组；C：2.0 g·L^{-1}阿柏西普组；D：4.0 g·L^{-1}阿柏西普组。

3 讨论

葡萄膜黑色素瘤是成人常见的眼内恶性肿瘤，早期无明显症状，容易漏诊和误诊，且恶性程度高，易侵袭转移，一旦转移预后极差[7]。目前，葡萄膜黑色素瘤的治疗主要包括眼球摘除术、局部肿瘤切除术、局部放射治疗(巩膜外敷贴放射治疗、立体放射治疗、质子束治疗)和激光光凝治疗(经瞳孔温热疗法、光动力疗法)[8]。虽然治疗方法有所改善，但疗效各异。迄今为止，还没有一种较为理想的治疗方法。众所周知，葡萄膜黑色素瘤细胞的高增殖活性和极易发生眼外转移是导致该肿瘤诊疗困难及死亡率高的主要原因[9]。肿瘤的生长、发育及转移均依赖血管提供必需的营养物质，运走代谢废物。肿瘤新生血管不仅能为组织提供日常代谢的营养，并且为肿瘤细胞进入循环系统向远处转移提供了途径[10]。基于此，如果能成功阻断或抑制肿瘤血管的新生，切断其营养通路，肿瘤细胞最终将停止增殖而死亡，以此来达到治疗肿瘤的目的，这也正是享有盛誉的抗肿瘤血管生成疗法[11]。

迄今研究认为，抗VEGF药物也是抑制肿瘤的药物，目前阿柏西普作为一种抗VEGF的眼内注射药物，广泛应用于湿性黄斑变性、黄斑水肿等眼病的治疗，并取得了良好的疗效，但其对于治疗葡萄膜黑色素瘤是否依然有效目前尚不明确，并且国内的相关研究报道也不多。葡萄膜黑色素瘤细胞发育过程

可以表达更多的 VEGF，而肿瘤细胞的生长也依赖 VEGF[12]。VEGF 家族成员包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和 PLGF，在新生血管形成过程中是不可或缺的关键因子，通过刺激血管内皮细胞的有丝分裂和迁移诱导血管形成[13]。阿柏西普是由 VEGF 受体（VEGFR）胞外结构域（VEGFR1-Ig2 区和 VEGFR2 Ig3 区）与人免疫球蛋白 G1 的 Fc 片段相结合的一种重组蛋白，具有半衰期长、与 VEGF-A 受体亲和性高及抑制新生血管形成等特征[14-15]。阿柏西普作为 VEGF 的可溶性诱饵受体，可与 VEGF-A 的所有亚型、VEGF-B 及 PLGF 结合，阻断肿瘤组织中新生血管形成，从而间接达到抗肿瘤的目的[16]。研究表明，阿柏西普与所有 VEGF-A 亚型的亲和力大于 VEGF-A 与其自身受体的亲和力，可有效防止 VEGF 结合并激活其受体[17]。

本研究采用几种细胞生物学技术探究了阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖和凋亡的影响。实时细胞检测系统 RT-CES 可以连续记录分析葡萄膜黑色素瘤细胞生长的全过程，描绘阿柏西普干预后 90 h 内的细胞生长曲线，提供了大量的动态反应信息，结果显示，4.0 g·L^{-1}阿柏西普干预 B16F10 细胞效果最为明显。CCK-8 法检测结果发现，阿柏西普可显著抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的活力，且呈剂量和时间依赖性。ELISA 检测结果提示，阿柏西普干预葡萄膜黑色素瘤细胞 24 h 后，能够呈浓度依赖性地抑制细胞中 VEGF-A 的表达。RT-PCR 检测结果发现，高浓度剂量组的阿柏西普可以明显下调细胞中 VEGF-A mRNA 的表达，并且流式细胞仪检测结果显示，阿柏西普呈剂量依赖性地诱导葡萄膜黑色素瘤细胞发生凋亡和 S 期阻滞。因此可以推断，阿柏西普可能是通过下调 B16F10 细胞中 VEGF-A mRNA 的表达来抑制 VEGF-A 的分泌，然后通过 VEGF-A 来拮抗 VEGF，从而达到抑制葡萄膜黑色素瘤细胞生长并且诱导其发生凋亡的目的。

综上所述，阿柏西普可诱导葡萄膜黑色素瘤细胞发生凋亡和 S 期阻滞，这可能与其抑制 VEGF-A 的分泌和 VEGF-A mRNA 的表达有关。本研究为进一步开发阿柏西普的抗肿瘤作用提供了新的证据支持，但不同剂量的阿柏西普对葡萄膜黑色素瘤细胞的安全性研究有待进一步开展。

参考文献

[1] RUSŇÁK Š, HECOVÁ L, KASL Z, SOBOTOVÁ M, HAUER L. Therapy of uveal melanoma: a review[J]. *Cesk Slov Oftalmol*, 2020, 77(1): 1-13.
[2] WU M Y, LAI T T, LIAO W T, LI C J. Clinic opathological and prognostic significance and molecular mechanisms governing uveal melanoma[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1-12.
[3] FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18.
[4] FERRARA N, HILLAN K J, GERBER H P, NOVOTNY W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(5): 391-400.
[5] SARWAR S, CLEARFIELD E, SOLIMAN M K, SADIQ M A, BALDWIN A J, HANOUT M, *et al*. Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 12(8): 2.
[6] GONZALEZ N S, SALVÁ F, ROS J, BARAIBAR I, MARMOLEJO D, VALDIVIA A, *et al*. Up-to-date role of aflibercept in the treatment of colorectal cancer[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2021, 21(10): 1315-1324.
[7] BURR J M, MITRY E, RACHET B, COLEMAN M P. Survival from uveal melanoma in England and Wales 1986 to 2001[J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2007, 14(1): 3-8.
[8] CARVAJAL R D, SCHWARTZ G K, TEZEL T, MARR B, FRANCIS J H, NATHAN P D. Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects[J]. *Br J Ophthalmol*, 2017, 101(1): 38-44.
[9] XU L T, FUNCHAIN P F, BENA J F, LI M, TARHINI A, BERBER E, *et al*. Uveal melanoma metastatic to the liver: treatment trends and outcome[J]. *Ocul Oncol Pathol*, 2019, 5(5): 323-332.
[10] MITTAL K, EBOS J, RINI B. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond[J]. *Semin Oncol*, 2014, 41(2): 235-251.
[11] FAKHREJAHANI E, TOI M. Antiangiogenesis therapy for breast cancer: an update and perspectives from clinical trials[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2014, 44(3): 197-207.
[12] 李自显，徐刚，王亚楠，杨文义. VEGF 基因沉默联合唑来膦酸抑制胃癌细胞增殖和迁移的机制[J]. 现代肿瘤医学，2019，27(20)：3597-3601.
LI Z X, XU G, WANG Y N, YANG W Y. Mechanisms of targeting VEGF gene combined with zoledronic acid on proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Modern Oncol*, 2019, 27(20): 3597-3601.
[13] CHEKHONIN V P, SHEIN S A, KORCHAGINA A A, GURINA O I. VEGF in tumor progression and targeted therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(4): 423-443.
[14] PAPADOPOULOS Z. Aflibercept: a review of its effect on the treatment of exudative age-related macular degeneration[J]. *Eur J Ophthalmol*, 2019, 29(4): 368-378.
[15] AVERY R L, CASTELLARIN A A, STEINLE N C, DHOOT D S, PIERAMICI D J, SEE R, *et al*. Systemic pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravitreal aflibercept, bevacizumab and ranibizumab[J]. *Retina*, 2017, 37(10): 1847-1858.
[16] CHU Q S. Aflibercept (AVE0005): an alternative strategy for inhibiting tumour angiogenesis by vascular endothelial growth factors[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(2): 263-271.
[17] GIORDANO G, FEBBRARO A, VENDITTI M, CAMPIDOGLIO S, OLIVIERI N, RAIET A K, *et al*. Targeting angiogenesis and tumor microenvironment in metastatic colorectal cancer: role of aflibercept[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 7(21): 1-13.

Effect and mechanism of aflibercept on uveal melanoma cells

SUN Hao[1,2], LI Jiao[3], BI Hongsheng[3], WANG Xingrong[3]

1. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250002, *Shandong Province, China*
2. *Lanling County People's Hospital of Linyi City, Linyi* 276000, *Shandong Province, China*
3. *Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong Institute of Eye Disease Control, Jinan* 250002, *Shandong Province, China*

Corresponding author: WANG Xingrong, E-mail: semxrw@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect and mechanism of aflibercept on uveal melanoma cells. **Methods** B16F10 cells (uveal melanoma cells) were divided into the experimental group and control group. Cells in the control group were not treated with drugs, while cells in the experimental group were intervened with 0.2 g·L^{-1}, 2.0 g·L^{-1}, and 4.0 g·L^{-1} aflibercept. Real-time cell electronic sensing (RT-CES) and CCK-8 assays were used to explore the effect of different doses of aflibercept on the growth process of uveal melanoma cells. ELISA assay was performed to investigate the effect of aflibercept on the content of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in uveal melanoma cells, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was performed to investigate the effects of different doses of aflibercept on the mRNA expression of VEGF-A in uveal melanoma cells, and flow cytometry was performed to investigate the effects of different doses of aflibercept on cycle and apoptosis of uveal melanoma cells. **Results** It was found that the survival rates of B16F10 cells treated by 0.2 g·L^{-1}, 2.0 g·L^{-1} and 4.0 g·L^{-1} of aflibercept for 24 h fell to (95.10±1.76)%, (87.33±2.20)% and (74.36±1.67)%, respectively. RT-PCR assay results showed that aflibercept down-regulated the mRNA expression of VEGF-A in cells. ELISA assay results showed that aflibercept inhibited VEGF-A levels in cells, with 4.0 g·L^{-1} aflibercept having the most significant inhibitory effect. In addition, compared with the control group [apoptosis rate: 0%, proportion of cells in G1 phase: (27.60±0.36)%], the apoptosis rates of B16F10 cells in the experimental group increased to 3.51%, 11.10% and 14.77% after being intervened by 0.2 g·L^{-1}, 2.0 g·L^{-1} and 4.0 g·L^{-1} aflibercept for 24 h, respectively, and the proportion of cells in G1 phase increased to (64.09±0.34)%, (66.02±0.65)% and (67.49±0.33)%, with statistically significant differences (all $P<0.05$). **Conclusion** Aflibercept shows significant inhibitory effects on uveal melanoma cells by inhibiting the VEGF-A levels and inducing apoptosis and S-phase arrest in a concentration-dependent manner.

【Key words】 aflibercept; uveal melanoma; vascular endothelial growth factor; mechanism of action