

新型蛋白酶体抑制剂 YSY-01A 对肿瘤细胞 促血管生成作用的抑制及其机制初探*

刘敬弢 袁霞 徐波 冉福香 楚明明 贾璇 陈溢欣
王哲 李润涛 崔景荣**

(北京大学药学院, 天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

摘要 YSY-01A 是一种新型蛋白酶体抑制剂, 前期研究已经证实其对肿瘤细胞的增殖有抑制作用. 但是它对肿瘤血管生成是否有影响尚不明确. 本研究旨在探明 YSY-01A 阻碍肿瘤细胞促进血管生成的作用及机制. 我们首先将磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB) 法与细胞共培养(Transwell)模型相结合, 探讨 YSY-01A 抑制人结肠癌细胞(HT-29 cells)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的增殖促进作用; 运用高内涵筛选(high content screening, HCS)法研究 YSY-01A 对 HT-29 细胞中 NF- κ B 核转位的影响; 利用 Western blot 法检测 YSY-01A 对 HT-29 细胞中缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达调控. 为了观察 YSY-01A 对 HUVEC 增殖和运动有无直接抑制作用, 我们采用 SRB 法观察 YSY-01A 对 HUVEC 的增殖抑制作用; 运用 HCS 法分别考察 YSY-01A 对 HUVEC 的运动抑制和细胞毒作用. 结果证实, YSY-01A 可以阻碍 HT-29 细胞对 HUVEC 的增殖促进作用并具有浓度依赖性. YSY-01A 还可抑制 HT-29 细胞中 NF- κ B 的核转位, 下调 HIF-1 α 及 VEGF 的表达. 进一步研究证实, YSY-01A 能够浓度依赖地抑制 HUVECs 的增殖和运动, 而不伴有明显的细胞毒作用. 上述结果表明, YSY-01A 可以通过抑制蛋白酶体活性下调肿瘤细胞中促血管生成因子的表达, 进而在血管内皮细胞中发挥抗血管生成作用.

关键词 蛋白酶体抑制剂, 血管生成, 人脐静脉内皮细胞, HT-29 细胞, 高内涵筛选, YSY-01A

学科分类号 R979.1, R965.11

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00398

结直肠癌是目前发病率较高的癌症之一, 经典的放化疗法效果并不理想, 临床治疗中毒副反应和耐药现象都较为普遍^[1]. 因此, 针对肿瘤组织特异性的靶向治疗显得尤为重要. 研究表明, 大多数肿瘤的生长和转移都是血管依赖性的^[2]. 新生血管网可以为肿瘤组织输送养料、排除废物并提供转移途径, 同时肿瘤细胞也能分泌相关因子促进血管生成^[3]. 目前, 以肿瘤新生血管为靶点的抗血管生成治疗已经应用于临床, 但有效的血管生成抑制剂仍不多见.

NF- κ B 是转录因子家族的一个重要成员, 与肿瘤的发生发展密切相关. 前期研究表明, NF- κ B 的活性受泛素-蛋白酶体系统调节, 与肿瘤血管生成均密切相关^[4]. 报道显示, 蛋白酶体抑制剂(如 Bortezomib/PS-341、MG-132)不仅抑制肿瘤生长, 还可通过降低 NF- κ B 的活性抑制血管生成^[2, 4]. 然

而由于 PS-341 存在心脏和免疫毒性^[5], 近来人们对 PS-341 进行结构改造, 得到了新型硼酸肽类蛋白酶体抑制剂 YSY-01A. 前期实验证实, YSY-01A 可以抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导细胞周期阻滞于 G2/M 期, 并调节周期相关蛋白的表达^[6]. 但关于 YSY-01A 对血管生成是否有抑制作用尚未见报道. 血管生成受多种相关蛋白质的调控, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其上游的缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)等, 这些因子可由血管内皮细胞

* 国家“十一五”科技重大专项: 北京大学综合性创新药物研究开发技术大平台(2009ZX09301-010).

** 通讯联系人.

Tel: 010-82802467, E-mail: jrcui@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2012-11-21, 接受日期: 2013-02-20

自行表达, 但更多来源于肿瘤组织的释放^[7-9]. 因此, 本实验首先运用细胞共培养(Transwell)、高内涵筛选(high content screening, HCS)以及 Western blot 等方法探讨 YSY-01A 对肿瘤细胞释放血管生成相关因子的影响, 继而观察 YSY-01A 对血管内皮细胞的直接作用.

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

M199 细胞培养基(CM10061)、McCoy's 5A 细胞培养基(CM10051)、内皮细胞生长促进剂(endothelial cell growth supplement, ECGS, CC019)、青链霉素混合液(双抗, penicillin and streptomycin, 100 $\times$, CC004)购于北京迈晨科技有限责任公司; 特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 16000-044), 由 Gibco Invitrogen Corporation(Grand Island, NY, USA)公司生产; 磺酰罗丹明 B(Sulforhodamine B, SRB, S9012-25G)购于北京鼎国生物技术有限责任公司; 高内涵筛选试剂盒 Cell Motility Evaluation Hitkit (K0800011)、Multiparameter Cytotoxicity 2 Multiplex Kit (8400002)、NF- κ B Activation Hitkit (p65 亚基, K0100011)以及考马斯亮蓝检测试剂盒(Coomassie blue plus assay kit, 23236)由 Thermo Fisher Scientific Cellomics 公司生产; 兔一抗 VEGF (Sc-152)、鼠一抗 HIF-1 α (Sc-53546)由 Santa Cruz 公司生产; 鼠一抗 β -actin(A5441)由 Sigma 公司生产.

化合物 YSY-01A 及硼替佐米(PS-341)由北京大学药学院李润涛教授课题组制备, 溶于生理盐水, -20 $^{\circ}$ C 保存.

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为自行分离所得, 经形态学观察和免疫学检测(VIII因子抗原标记)验证(图片未显示); 人结肠癌细胞(HT-29)由我室提供. HUVEC 以含 10%FBS、1%青链霉素混合液、1% ECGS 的 M199 培养基培养; HT-29 以含 10%FBS、1%青链霉素混合液的 McCoy's 5A 培养基培养. 两种细胞均培养于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 的恒温恒湿培养箱中.

1.3 细胞共培养实验

取对数生长期的 HT-29 和 HUVEC, 用 M199 培养液配成浓度为 1.0×10^5 个/ml 的细胞悬液铺板: 各孔下室中加入 HUVEC 悬液, 630 μ l/孔, 再加

入上室并将各孔随机分为对照组和实验组, 对照组上室加入 HUVEC, 实验组上室加入 HT-29, 300 μ l/孔. 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 24 h 后加药(浓度同前), 70 μ l/孔. 温箱中继续培养 48 h 后弃去培养液及上室, 下室每孔加入 10%三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA), 200 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 固定 1 h 后用自来水清洗, 室温加入 0.4%磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)染色 10 min, 400 μ l/孔. 用 1%乙酸冲洗, 室温隔夜晾干, 翌日加入 10 mmol/L Tris 溶解 SRB, 800 μ l/孔, 用酶标仪在激发光波长 540 nm 下测定各孔吸光度值(A), 按下列公式分别计算内皮细胞在两种培养条件下增殖的差异率以及待测化合物对细胞增殖的抑制率: 增殖差异率 = (共培养组平均 A 值 - 单独培养组平均 A 值) / 单独培养组平均 A 值 $\times 100\%$; 抑制率 = (PBS 组平均 A 值 - 给药组平均 A 值) / PBS 组平均 A 值 $\times 100\%$.

1.4 细胞核转位实验

取对数生长期的 HT-29 细胞, 用 MC 培养液配成浓度为 2.0×10^4 个/ml 的细胞悬液, 铺入 96 孔板中, 90 μ l/孔. 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养 24 h 后加入 PBS 或 $10 \times$ 浓度的药液(PS-341 及不同浓度的 YSY-01A), 10 μ l/孔. 温箱中继续培养 24 h 后, 向各组加入细胞因子孵育(模型对照组除外); 30 min 后吸出培养液, 加入预热的 3.7%甲醛, 100 μ l/孔, 室温固定 15 min. 用 $1 \times$ 缓冲液(wash buffer)洗涤 2 次后加入 $1 \times$ 打孔液(permeabilization buffer), 100 μ l/孔, 室温打孔 15 min. 用 $1 \times$ 洗涤缓冲液润洗 2 次后加入一抗, 50 μ l/孔(按 1:100 稀释), 室温孵育 1 h. 洗涤 3 次后加入二抗染液(Hoechst Dye 按 1:1000 稀释、Dylight 488 anti-rabbit 按 1:200 稀释), 50 μ l/孔, 室温避光孵育 1 h. 再次洗涤 2 次后加入 $1 \times$ 洗涤缓冲液, 200 μ l/孔; 用 Cellomics HCS Readers 采集图像, BioApplication 软件分析图像并得出量化结果.

1.5 Western blot 实验

将对数生长期的 HT-29 细胞制成 1×10^5 个/ml 的细胞悬液, 接种于细胞培养瓶中, 9 ml/瓶. 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养 24 h 后分别加入 PBS(阴性对照)或 $10 \times$ 浓度的药液(PS-341 及不同浓度的 YSY-01A), 1 ml/瓶. 温箱中继续培养 24 h, 消化后离心收集细胞, 1000 r/min $\times$ 5 min, PBS 润洗 2 次, 离心弃上清后得到细胞团块. 加入与细胞团块等体积的全蛋白裂解液(含蛋白酶抑制剂), 充分混匀冰浴并超声破碎. 细胞裂解 30 min 后 4 $^{\circ}$ C 离心,

14 000 r/min × 30 min, 吸取上层蛋白质溶液, 按考马斯亮蓝检测试剂盒说明书进行定量, 加入 5×洗脱缓冲液及双蒸水, 使各组蛋白质终浓度相同. 蛋白质样品加热变性, 65℃ × 10 min, 冷却至 4℃ 后上样电泳 20~40 mA, 1~1.5 h 后转至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜 150 mA × 2 h. NC 膜经丽春红预染后加入 3%BSA 或 1.5%脱脂奶粉封闭 3 h; 一抗孵育 NC 膜, 4℃ 过夜(VEGF, 1:2 000; HIF-1 α , 1:1 000; β -actin, 1:1 000); 用 TBST 润洗后室温孵育二抗 3 h, 加入 TBST 再次润洗后滴加 ECL, 将 NC 膜置于凝胶成像仪中显色曝光, 并运用相关软件定量分析条带强弱.

1.6 细胞增殖实验

取对数生长期的 HUVEC, 用 M199 培养液配成浓度为 1.0×10^5 个/ml 的细胞悬液铺板, 180 μ l/孔于 37℃ 温箱中培养 24 h 后, 向每孔加入 PBS 或 10×浓度的药液(阳性药 PS-341 或不同浓度的 YSY-01A, 20 μ l/孔). 温箱中继续培养 48 h 后弃去培养液, 每孔加入 10%三氯乙酸(200 μ l/孔), 4℃ 固定 1 h 后用自来水清洗, 室温加入 0.4%SRB (100 μ l/孔)染色 10 min. 用 1%乙酸冲洗, 室温隔夜晾干, 翌日加入 10 mmol/L Tris 溶解 SRB, 200 μ l/孔, 用酶标仪测定各孔吸光度值(A 值, 激发光波长 540 nm), 按如下公式计算待测化合物对细胞增殖的抑制率: 抑制率=(PBS 组平均 A 值 - 给药组平均 A 值)/PBS 组平均 A 值 × 100%.

1.7 细胞运动实验

按 HCS cell motility 试剂盒说明书将蓝色荧光珠铺于事先胶原包被的 96 孔板, 37℃ 温箱内孵育过夜后用 1×洗涤缓冲液润洗, 铺入对数生长期的 HUVEC 悬液, 1.0×10^4 个/ml, 50 μ l/孔. 温箱中继续培养 24 h 后加药: 模型对照组每孔加入 50 μ l 无血清 M199 培养液; 阴性对照组每孔加入 50 μ l 含 10%血清的 M199 培养液; 给药组加入 40 μ l 含 10%血清的 M199 培养液和 10 μ l 的 10×浓度的药液. 温箱中培养 18 h 后加入 37℃ 预热的 5.5%甲醛溶液, 200 μ l/孔, 室温固定 1 h; 用 1×洗涤缓冲液清洗 3 次后加入 1×透析缓冲液室温打孔 15 min; 继而加入 Rhodamine 染液, 100 μ l/孔, 室温染色 30 min. 用 1×洗涤缓冲液清洗 3 次后吸干液体, 加入 1×洗涤缓冲液, 200 μ l/孔, 用 Cellomics HCS Readers 采集图像, BioApplication 软件分析图像并得出量化结果. 输出参数 Mean Motion Track Area Per Cell 代表各组运动面积, 按如下公式计算待测

化合物对细胞运动的抑制率: 运动抑制率=(阴性对照组运动面积 - 给药组运动面积)/阴性对照组运动面积 × 100%.

1.8 细胞毒实验

向 96 孔板中铺入对数生长期的 HUVEC 悬液, 3.0×10^4 个/ml. 37℃ 温箱中培养 24 h 后加入 PBS 或 10×药液(PS-341 及不同浓度的 YSY-01A), 10 μ l/孔. 温箱中继续培养 23.5 h 后向各孔加入活细胞染液(50 μ l/孔), 温箱中染色 0.5 h. 吸出培养液后加入 37℃ 预热的 3.7%甲醛溶液(100 μ l/孔), 室温固定 20 min. 用 1×洗涤缓冲液洗涤后加入核染液(100 μ l/孔), 室温避光染色 10 min. 用 1×洗涤缓冲液洗涤后吸干液体, 加入 1×洗涤缓冲液(200 μ l/孔), 用 Cellomics HCS Readers 采集图像, BioApplication 软件分析图像并得出量化结果.

1.9 统计学分析

上述实验均平行重复 3 或 4 次, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示. 各给药组与对照组间采用 *t* 检验通过 Excel 软件作统计学比较, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学显著性.

2 结 果

2.1 YSY-01A 抑制肿瘤细胞对内皮细胞的增殖促进作用

如前所述, 肿瘤细胞会分泌相关因子促进内皮细胞的增殖. 因此本实验首先采用 Transwell 共培养模型在体外模拟肿瘤与内皮细胞相伴生的体内微环境, 观察肿瘤细胞对内皮细胞的促进, 并评价化合物 YSY-01A 对该促进作用的影响. 实验结果显示, 与两种细胞共培养相比, 单独培养时的 A 值均明显降低; 与 PBS 对照组相比, 两种培养条件下给药组的 A 值均浓度依赖地下降, 单独培养时抑制率最高可达 35%, 共培养时也可接近 30% (图 1). 该结果表明, 肿瘤细胞可以促进内皮细胞

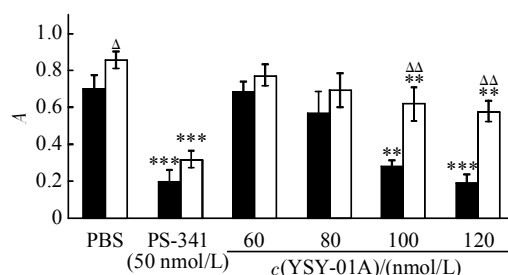


Fig. 1 Effects of YSY-01A on HUVEC proliferation with or without tumor cells ($n=3$)

*** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. PBS control, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs. HUVEC without HT-29 group. ■: Single culture; □: Co-culture.

的增殖, 而 YSY-01A 能够对抗这种促进作用。

2.2 YSY-01A 抑制 HT-29 细胞中 NF- κ B 的核转位

共培养实验得到的结果应与 YSY-01A 调节肿瘤细胞内相关分子的水平有关。由于 YSY-01A 属于蛋白酶体抑制剂 PS-341 的衍生物, 故它很可能抑制了 NF- κ B 的活性, 后者可参与 HIF-1 α 的转录, 进而调节 VEGF 的表达。为了验证以上推论, 本实验继续运用 HCS 模型探讨 YSY-01A 对肿瘤细胞内 NF- κ B 核转位的影响。结果如图 2 所示,

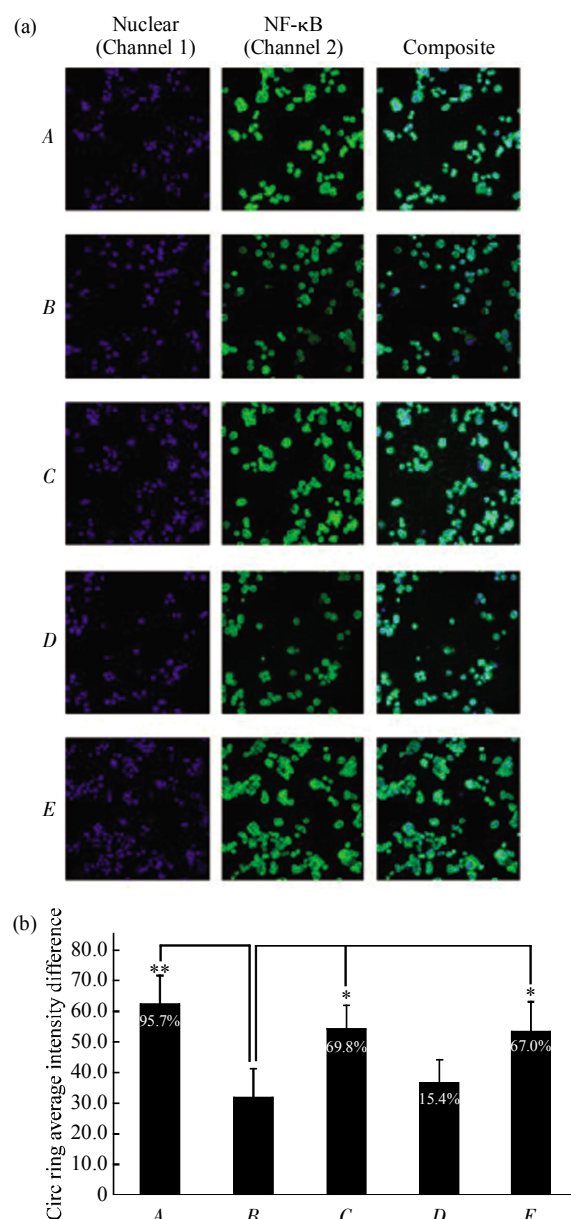


Fig. 2 YSY-01A inhibited NF- κ B nuclear translocation in HT-29 cells

(a) Channel 1 indicated nucleus (blue) and channel 2 indicated NF- κ B (p65subunit) labelled by green fluorescence. (b) Quantitative results, * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. PBS+CM group. A: PBS; B: PBS+CM; C: PS-341(50 nmol/L)+CM; D: YSY-01A(80 nmol/L)+CM; E: YSY-01A (100 nmol/L)+CM. $n=4$.

HT-29 细胞经细胞因子刺激后细胞浆与细胞核中的荧光差值明显降低, 表明 NF- κ B 发生了核转位, 而给药组的荧光差值可浓度依赖性地升高, 说明 YSY-01A 可以阻碍 NF- κ B 核转位, 降低其活性, 该抑制作用与同等剂量的 PS-341 水平相当。

2.3 YSY-01A 抑制肿瘤细胞内血管生成相关蛋白的表达

结果已证实, YSY-01A 阻碍 NF- κ B 的核转位, 本实验进一步观察了 YSY-01A 对 NF- κ B 下游因子 VEGF 及 HIF-1 α 的影响。图 3 显示, YSY-01A 可以降低肿瘤细胞(HT-29)中 VEGF 及 HIF-1 α 的表达量, 降幅分别可达 35%和 25%, 与 PS-341 接近; 说明 YSY-01A 通过降低 NF- κ B 的活性下调了下游血管生成因子的表达。

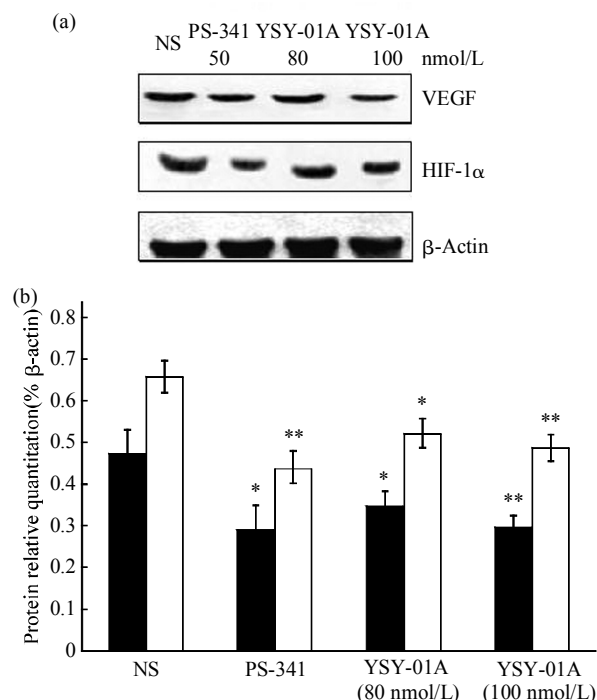


Fig. 3 YSY-01A reduced expression of angiogenesis related protein in tumor cells

(a) Whole cell extracts were prepared and analyzed by Western blot. (b) Quantification of the related protein expression from HT-29 cells. β -Actin was examined as loading control. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. PBS control. ■: VEGF; □: HIF-1 α . $n=3$.

2.4 YSY-01A 对内皮细胞的增殖抑制作用

上述结果表明, YSY-01A 通过调节肿瘤细胞中相关因子的活性及表达可以间接抑制血管生成。为了继续探讨 YSY-01A 对血管内皮细胞有无直接作用, 本实验观察了它对细胞增殖的影响。实验结果如表 1 所示, 给药 48 h 后 YSY-01A 低浓度给药组(60、80 nmol/L)的吸光度值(A)略低于 PBS 对照

组, 随 YSY-01A 浓度的增加, 抑制率显著升高, 高浓度组(100、120 nmol/L)的抑制率已经接近 90%; 而图 4 显示, YSY-01A 给药组(100 nmol/L)的 A 值随给药时间的缩短而逐渐上升, 说明 YSY-01A 对 HUVEC 的增殖抑制作用具有浓度和时间依赖性。

Table 1 YSY-01A inhibited HUVEC proliferation

Agent	$c/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	A ($\bar{x} \pm s$)	Inhibition ratio/%
PBS	0	0.574 ± 0.020	-
PS-341	50	$0.137 \pm 0.012^{***}$	76.2
YSY-01A	60	0.556 ± 0.035	3.1
	80	0.498 ± 0.054	13.3
	100	$0.103 \pm 0.041^{***}$	82.0
	120	$0.069 \pm 0.020^{***}$	87.9

*** $P < 0.001$ vs. PBS control. $n=3$.

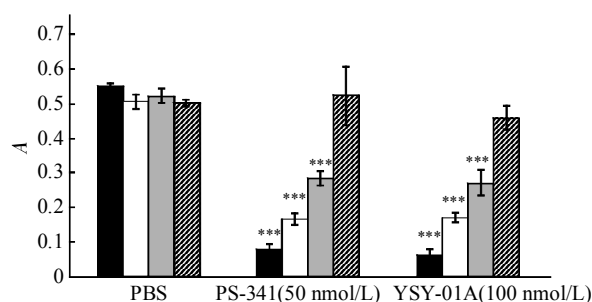


Fig. 4 YSY-01A (100 nmol/L) inhibited HUVEC proliferation in different time ($n=3$)

*** $P < 0.001$ vs. PBS control. ■: 48 h; □: 36 h; ▒: 24 h; ▨: 12 h. $n=3$.

2.5 YSY-01A 对内皮细胞运动的抑制作用

内皮细胞运动是肿瘤转移和血管生成的重要步骤, 故本实验继续观察 YSY-01A 对细胞运动的影响。结果如图 5a 所示: 阴性对照组的黑色轨迹面积明显大于模型对照组, 说明血清可以刺激内皮细胞运动。低浓度组的轨迹面积略小于阴性对照组, 随着药物浓度的增加轨迹面积不断减小, 表明 YSY-01A 可以浓度依赖地抑制内皮细胞运动。图 5b 结果显示, 模型组和给药组的轨迹面积均小于阴性对照组, 并且给药组随着药物浓度的增加, 抑制率逐渐增大, 高浓度组可达 60%以上。

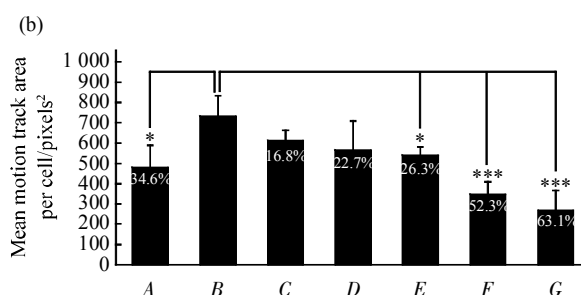
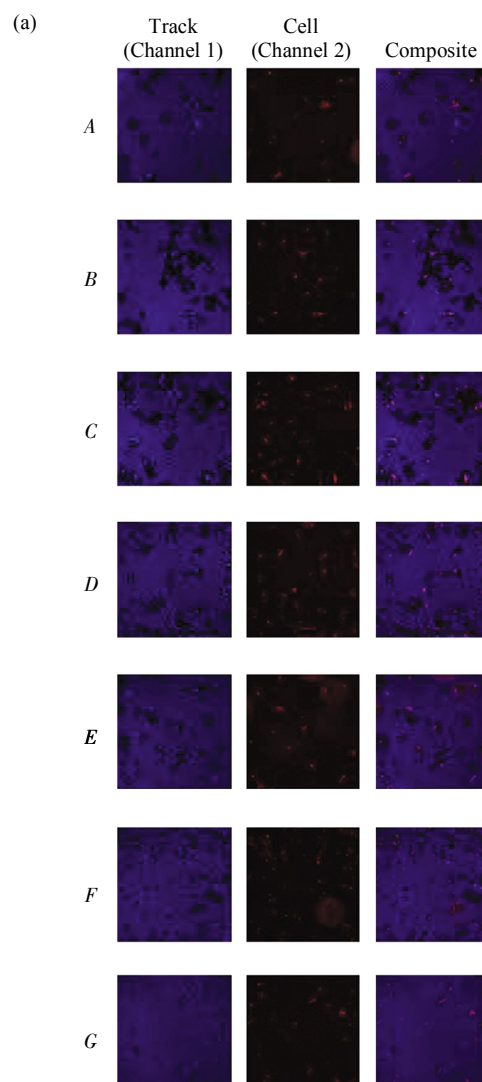


Fig. 5 YSY-01A inhibited HUVEC motility

(a) The blue background indicated the fluorescent beads, red or purple points were the cells, and the black tails indicated cell movement. (b) The track area for each cell was measured, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. PBS+10% FBS group. A: PBS without FBS; B: PBS + 10% FBS; C: PS-341(50 nmol/L) + 10% FBS; D: YSY-01A(60 nmol/L) + 10% FBS; E: YSY-01A(80 nmol/L) + 10% FBS; F: YSY-01A(100 nmol/L) + 10% FBS; G: YSY-01A(120 nmol/L) + 10% FBS. $n=4$.

2.6 YSY-01A 对内皮细胞的细胞毒作用

为了排除上述抑制作用是由细胞毒引起, 本实验检测了相同浓度下 YSY-01A 的细胞毒作用. 实验结果如图 6 所示: 阴性对照组(PBS)细胞的蓝色胞核明显, 红色荧光强于绿色荧光; YSY-01A 各给药组的蓝、红色荧光与阴性对照组比几乎无变化, 而 YSY-01A 高浓度组绿色荧光有所增强;

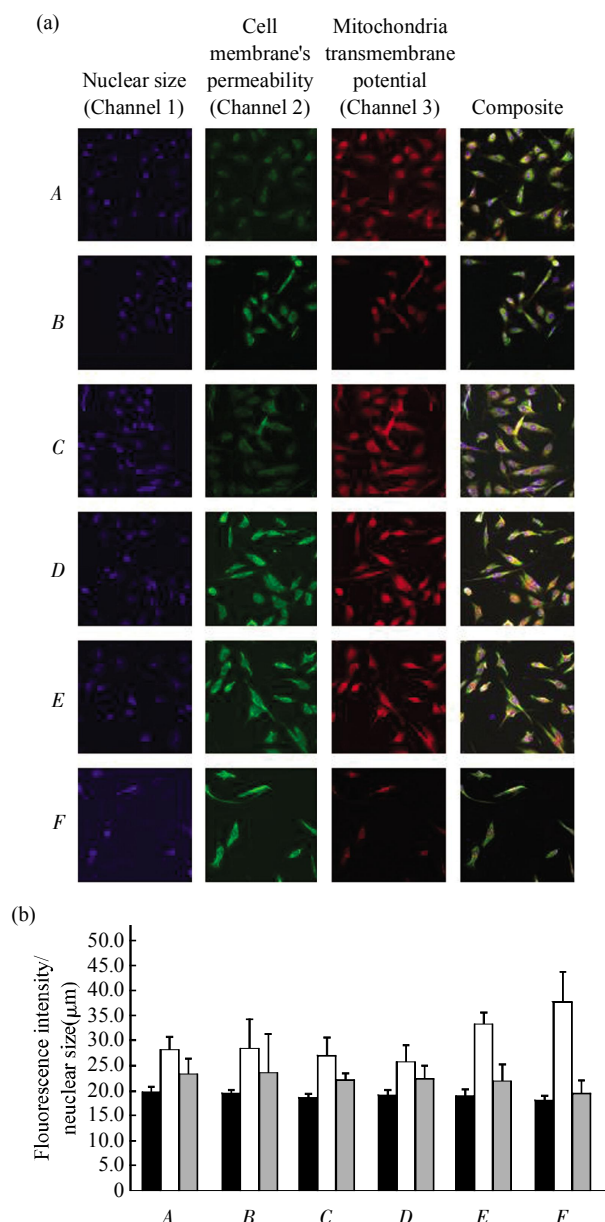


Fig. 6 Cytotoxicity of YSY-01A on HUVEC

(a) Channel 1 indicated nucleus (blue), channel 2 indicated nuclear membrane (green), and channel 3 indicated mitochondrial membrane (red). (b) Quantitative results, data in channel 2 and 3 were reduced to 1/20 and 1/40 respectively. A: PBS; B: PS-341(50 nmol/L); C: YSY-01A (60 nmol/L); D: YSY-01A(80 nmol/L); E: YSY-01A(100 nmol/L); F: YSY-01A(120 nmol/L). ■: MEAN_Nucsize Ch1; □: MEAN_CircAvg IntenCh2/20; ▤: MEAN_SpotAvg IntenCh3/40. n=4.

YSY-01A 中高剂量组的二通道绿色荧光强度与对照组有显著性差异, 而其他各组均无明显变化. 结果表明, 较高浓度的 YSY-01A 具有轻微毒副作用, 而低浓度的 YSY-01A 无明显细胞毒作用.

3 讨 论

血管生成与肿瘤的发生、转移息息相关, 报道显示众多癌症预后不良均与肿瘤微血管密度的显著升高有关^[10], 同时肿瘤组织也会通过内源性因子的调控促进周围血管的生长^[18-21]. 血管内皮细胞的增殖和运动是血管生成的关键步骤, 增殖产生大量内皮细胞后才能形成血管网, 运动则是血管网不断向肿瘤组织延伸的重要途径. 因此, 抗血管生成已成为肿瘤靶向治疗的重要手段之一, 而寻找血管生成抑制剂的主要评价指标包括抑制内皮细胞的增殖和运动.

泛素-蛋白酶体系统参与细胞增殖、分化、凋亡及血管新生等多个过程的调控^[11], 因此蛋白酶体作为癌症治疗的新靶点, 颇具研究意义. 蛋白酶体抑制剂是一类新型的靶向抗肿瘤药物, 通过阻碍蛋白酶体降解肿瘤抑制因子发挥抗肿瘤作用. PS-341 是第一个批准上市的蛋白酶体抑制剂, 报道显示它不仅抗癌谱较广, 可有效治疗难治性多发性骨髓瘤, 对血管生成同样具有抑制作用^[4]. 然而实验证实, PS-341 的毒副作用也较明显, 特别是对心脏和免疫系统^[9]. YSY-01A 是 PS-341 的结构衍生物, 前期的体内研究表明 YSY-01A 对小鼠抑瘤效果明显, 其 LD_{50} 值高于 PS-341 4 倍(数据未显示). 内皮细胞在血管生成的各个方面都发挥了重要作用^[12], 而肿瘤细胞可分泌大量因子影响内皮细胞的增殖^[7-9]. 为了更好地在体外模拟体内血管的生长环境并观察内皮细胞与肿瘤细胞的相互影响, 本实验以 HUVEC 和 HT-29 细胞为对象, 评价 YSY-01A 的抗血管生成作用并寻找作用靶点.

如本文前言所述, 血管内皮细胞的增殖是肿瘤血管新生的前提, 本研究首先将 Transwell 共培养模型与 SRB 法相结合, 证实了 HT-29 细胞可以促进 HUVEC 的增殖, 而 YSY-01A 可以对抗肿瘤细胞的增殖促进作用, 间接降低 HUVEC 的增殖速率.

由上述实验结果不难推测, YSY-01A 可能会影响肿瘤细胞中血管生成相关因子的释放, 继而抑制内皮细胞的增殖. 目前已知的血管生成调控因子种类众多, 其中以血管内皮生长因子家族最为重要. 报道显示, VEGF 可直接与内皮细胞表面受体

结合, 激活下游的 MAPK/ERK 和 PI3K/Akt 通路, 增加血管通透性, 诱导内皮细胞分泌蛋白溶解酶, 降解毛细血管基底膜, 从周围基质中释放更多促血管生成因子(如 MMP 等), 从而促进内皮细胞的增殖和运动^[13-14]; 瘤组织中 VEGF 的表达水平与 MVD 及肿瘤恶性程度成正相关, 并且明显高于非肿瘤组织^[15]. 而有关 VEGF 上游因子的研究表明, HIF-1 α 可促进 VEGF 的表达. HIF-1 α 的表达受 NF- κ B 的调控, 后者的激活是通过二聚体化以及从细胞浆到细胞核的转位实现的. 转入细胞核的 NF- κ B 可以启动众多基因的转录, 其中就包括 HIF-1 α ^[16]. 在文献报道中, 有关蛋白酶体抑制剂的机制研究显示, PS-341 可以阻碍蛋白酶体降解核转录因子 NF- κ B 的抑制因子 I- κ B, 后者与 NF- κ B 结合后, 能降低其转录活性, 继而抑制血管生成^[4-5].

共培养实验已证明, 内皮细胞的增殖会受到肿瘤细胞的促进, 而肿瘤细胞中 NF- κ B 的活性与其在细胞核与细胞浆的量有关. 故本研究以肿瘤细胞为研究对象, 首先运用高内涵模型探讨 YSY-01A 对 NF- κ B 在细胞内分布的影响, 再用 Western blot 法观察其下游分子的表达. 高内涵实验证实, YSY-01A 可以抑制 HT-29 细胞中 NF- κ B 的核转位, 给药后 NF- κ B 的浆核差显著升高; Western blot 结果显示, YSY-01A 可下调 HT-29 细胞中 HIF-1 α 及 VEGF 的表达. 这说明 YSY-01A 能够降低肿瘤细胞中 NF- κ B 的转录活性, 进而降低 NF- κ B 下游的促血管生成因子的表达. 肿瘤细胞中 VEGF 的表达量降低, 内皮细胞的增殖速率也相应下降, 这也与共培养实验结果相吻合. 由以上结果可以推断, NF- κ B 是 YSY-01A 发挥抗血管生成作用的重要作用靶点之一.

上述结果表明, YSY-01A 可以通过肿瘤细胞间接影响血管生成. 本研究又进一步考察了 YSY-01A 对血管内皮细胞有无直接作用. 细胞增殖实验结果显示, YSY-01A 可以浓度和时间依赖地抑制 HUVEC 的增殖, 抑制率与相同剂量水平的 PS-341 相当.

细胞运动是血管网扩展蔓延并到达肿瘤组织实现养料供应和肿瘤转移的关键步骤. 报道显示, 内皮细胞的运动能力与肿瘤的生长、转移呈正相关^[17-18]. 然而既往研究往往难以排除药物的细胞毒

作用对细胞运动的影响^[19]. 为了研究 YSY-01A 能否抑制内皮细胞的运动同时与细胞毒作用相区分, 本实验采用高内涵细胞筛选模型进行观察. 该模型可以通过荧光显微成像技术, 定量分析单个细胞的生理功能、运动状态以及分子表达. 高内涵细胞运动模型(HCS-Motility)实验结果显示, YSY-01A 能浓度依赖地抑制 HUVEC 的运动, 并在中高剂量组具有显著性差异. 高内涵细胞毒性(HCS-Cytotoxicity)实验则表明, YSY-01A 对 HUVEC 的细胞毒作用并不明显. 这说明适宜浓度的 YSY-01A 可以不通过细胞毒作用抑制内皮细胞的运动.

综上所述, 本研究证实 YSY-01A 能够对抗肿瘤细胞对内皮细胞的增殖促进作用, 该抑制作用与其降低肿瘤细胞体内 NF- κ B 的转录活性, 继而降低 HIF-1 α 及 VEGF 的表达量有关. 同时, YSY-01A 还可直接抑制 HUVEC 的增殖和运动, 且该抑制作用不同于传统化疗药物的细胞毒作用. YSY-01A 作为经典蛋白酶体抑制剂的衍生物, 与 PS-341 的抗血管生成作用及机制相似, 且前期已证明 YSY-01A 的体内毒性更低, 因而开发前景较好. 关于 YSY-01A 在体内的确切药效、毒性及作用机制, 仍需作进一步研究.

参 考 文 献

- [1] Bschof M, Abdollahi A, Gong P, *et al.* Triple combination of irradiation, chemotherapy (pemetrexed), and VEGF inhibition (SU5416) in human endothelial and tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, **60**(4): 1220-1232
- [2] Matsuo Y, Sawai H, Ochi N, *et al.* Proteasome inhibitor MG132 inhibits angiogenesis in pancreatic cancer by blocking NF- κ B activity. *Dig Dis Sci*, 2010, **55**(4): 1167-1176
- [3] Liu J T, Guo W, Xu B, *et al.* Angiogenesis inhibition and cell cycle arrest induced by treatment with Pseudolarix acid B alone and in combination with 5-fluorouracil. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, **44**(6): 490-502
- [4] Francesca B, Riccardo T, Paolo A, *et al.* Bortezomib-mediated proteasome inhibition as a potential strategy for the treatment of rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*, 2008, **44**(6): 876-884
- [5] Graham J, Hermann E, Phillippe M. Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Treat Rev*, 2005, **31**(8): 591-602
- [6] Tong K, Liu J T, Yuan X, *et al.* Cell cycle arrest of compound YSY-01A, a new proteasome inhibitor on HT-29 cells *in vitro*. *J Chin Pharmaceu Sci*, 2012, **21**(5): 448-458
- [7] Jensen R L. Growth factor-mediated angiogenesis in the malignant

- progression of glial tumors: a review. *Surg Neurol*, 1998, **49**(2): 189-195
- [8] 刘敬弢, 郭 维, 徐 波, 等. DADAG 对小鼠移植性肝癌 H22 肿瘤生长和血管生成的抑制作用. *中国新药杂志*, 2011, **20**(2): 115-119
- Liu J T, Guo W, Xu B, *et al.* *Chin J New Drugs*, 2011, **20**(2): 115-119
- [9] Senger D R, Galli S J, Dvorak A M, *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983, **219**(4587): 983-985
- [10] Al-Najar A, Al-Sanabani S, Korda J B. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol*, 2012, **30**(3): 325-329
- [11] Williams S, Pettaway C, Song R, *et al.* Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*, 2003, **2**(9): 835-843
- [12] Tandle A T, Calvani M, Uranchimeg B, *et al.* Endothelial monocyte activating polypeptide-II modulates endothelial cell responses by degrading hypoxia-inducible factor-1 α through interaction with PSMA7, a component of the proteasome. *Exp Cell Res*, 2009, **315**(11): 1850-1859
- [13] Tan W F, Zhang X W, Li M H, *et al.* Pseudolarix acid B inhibits angiogenesis by antagonizing the vascular endothelial growth factor-mediated anti-apoptotic effect. *Eur J Pharmacol*, 2004, **499**(3): 219-228
- [14] Cornali E, Zietz C, Benelli R, *et al.* Vascular growth factor regulate angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol*, 1996, **149**(6): 1851-1869
- [15] Mise M, Arai S, Higashitani H, *et al.* Clinical significance of vascular endothelial growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology*, 1996, **23**(3): 455-464
- [16] Sarah F S, Bhaumik S R. The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1825**(1): 64-76
- [17] Kornberg L J, Grant M B. Adenoviruses increase endothelial cell proliferation, migration, and tube formation: partial reversal by the focal adhesion kinase inhibitor, FRNK. *Microvasc Res*, 2007, **73**(3): 157-162
- [18] Lund N, Henrion D, Tiede P, *et al.* Vimentin regulates endothelial cell migration, proliferation and VASP phosphorylation and regulates cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **395**(3): 401-406
- [19] Wang X H, Xu B, Liu J T, *et al.* Effect of β -escin sodium on endothelial cells proliferation, migration and apoptosis. *Vasc Pharmacol*, 2008, **49**(4-6): 158-165

Inhibition Effect and Mechanism of YSY-01A, a Novel Proteasome Inhibitor, on Tumor-induced Angiogenesis*

LIU Jing-Tao, YUAN Xia, XU Bo, RAN Fu-Xiang, CHU Ming-Ming, JIA Xuan,
CHEN Yi-Xin, WANG Zhe, LI Run-Tao, CUI Jing-Rong**

(State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Compound YSY-01A is a recently synthesized proteasome inhibitor. It has been proved for potent growth-inhibitory effect on tumor cells in previous studies. However, the effect of YSY-01A on tumor angiogenesis remains unclear. Our research aims to reveal the inhibition effect and mechanism of YSY-01A on tumor-induced angiogenesis. Firstly, we combined the Sulforhodamine B (SRB) assay and Transwell co-culture model to observe the inhibition of YSY-01A on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) proliferation induced by tumor cells (HT-29 cells). In succession, high content screening (HCS) assay was used to investigate effect of YSY-01A on NF- κ B nuclear translocation in HT-29 cells. Finally, Western blot was used to measure the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in HT-29 cells inhibited by YSY-01A. To further determine mechanism of inhibition, SRB and HCS methods were used to investigate the effect of YSY-01A against HUVECs proliferation and motility, respectively. The results showed that YSY-01A could prohibit HUVECs proliferation induced by HT-29 cells in a concentration-dependent manner. Furthermore, YSY-01A significantly inhibited NF- κ B nuclear translocation and reduced the expression of HIF-1 α and VEGF in HT-29 cells. Further investigation revealed concentration-dependent suppress of YSY-01A on HUVECs proliferation and motility without obvious cytotoxic effect. In conclusion, through proteasome inhibition, YSY-01A could down-regulate pro-angiogenesis factors expression in tumor cells and exhibit remarkable anti-angiogenesis activity on vascular endothelial cells.

Key words proteasome inhibitor, angiogenesis, human umbilical vein endothelial cells, HT-29 cells, high content screening, YSY-01A

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00398

*This work was supported by a grant from The 12th Five Years Key Program—the Comprehensive Center for Drug Discovery and Development, Peking University (2009ZX09301-010).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-82802467, E-mail: jrcui@bjmu.edu.cn

Received: November 21, 2012 Accepted: February 20, 2013