

Combretastatin A-4 氨基糖类衍生物 CPU-XT-008 抑制血管内皮细胞增殖的分子机制

何书英^{1*}, 熊蕊¹, 刘坤², 徐云根²

(中国药科大学¹生命科学与技术学院;²药物化学教研室, 南京 210009)

摘要 以人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为模拟肿瘤血管内皮细胞的实验模型, 研究 combretastatin A-4(CA-4)的氨基糖类衍生物 CPU-XT-008 对 HUVEC 的增殖、周期分布、微管蛋白聚合以及关键周期调控蛋白表达的影响。采用 MTT 法检测 CPU-XT-008 对 HUVEC 增殖的影响; 采用流式细胞仪检测 CPU-XT-008 对 HUVEC 周期分布的影响; 采用免疫荧光染色检测 CPU-XT-008 对 HUVEC 凋亡及 β -tubulin 微管蛋白的聚合变化; 采用 Western blot 检测 CPU-XT-008 对周期蛋白 Cyclin B1, Cdc2 和微管蛋白 β -tubulin 的影响。结果表明, CPU-XT-008 能以微管蛋白为靶点抑制 β -tubulin 微管蛋白聚合, 通过上调 HUVEC 的细胞周期蛋白 Cyclin B1 水平表达, 下调细胞周期依赖性激酶 Cdc2 蛋白水平的表达从而引发细胞 G₂/M 期阻滞, 抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡。

关键词 combretastatin A-4; CPU-XT-008; 氨基糖类衍生物; 人脐静脉内皮细胞; 微管蛋白; 细胞周期

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)05-0594-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150513

Molecular mechanisms of combretastatin A-4 amino sugar derivative CPU-XT-008 on inhibiting proliferation of vascular endothelial cells

HE Shuying^{1*}, XIONG Rui¹, LIU Kun², XU Yungen²

¹School of Life Science and Technology; ²Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Taking human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as experimental model which can simulate tumor-derived vascular endothelial cells, the effects of CPU-XT-008, an amino sugar derivative of combretastatin A-4 (CA-4), on HUVEC proliferation, cell cycle distribution, tubulin polymerization and the key regulatory protein of cell cycle were studied. The effect of CPU-XT-008 on the proliferation of HUVEC was determined by MTT assay. The cell cycle distribution caused by CPU-XT-008 was detected by flow cytometry. Immunofluorescence was used to detect apoptosis and tubulin polymerization. The expressions of Cyclin B1, Cdc2 and β -tubulin were detected by Western blotting. Results demonstrated that CPU-XT-008 could target tubulin and inhibit the polymerization of β -tubulin, and it could lead to G₂/M cell cycle arrest in HUVEC by up-regulating Cyclin B1 expression and down-regulating Cdc2 and p-Cdc2 expression, which resulted in inhibiting the proliferation of HUVEC and inducing its apoptosis.

Key words combretastatin A-4; CPU-XT-008; amino sugar derivative; human umbilical vein endothelial cells; tubulin; cell cycle

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2010436)

Combretastatin A-4(CA-4)是从南非灌木柳树皮 *Combretum caffrum* 树干中提取分离得到的顺式二苯乙烯类化合物, 是目前已知微管蛋白抑制剂中

活性最强的化合物之一, 但也存在着众多缺陷, 如水溶性差、难以保持顺式构型等, 因此 CA-4 衍生物的研究成为近几年热点^[1]。通过偶联 CA-4 与

1-氨基葡萄糖得到一种 CA-4 衍生物 CPU-XT-008, 其具有的氨基糖结构可以模拟肝素的功能, 因此提高分子靶向性和生物相容性。

微管由微管蛋白聚合而成, 在有丝分裂、信号传导、细胞骨架及细胞迁移等多种细胞功能中发挥重要作用^[2]。CA-4 具有抗肿瘤血管生成和抑制微管蛋白聚合的作用, 主要通过和微管蛋白的秋水仙碱位点结合, 抑制微管的聚合, 影响了有丝分裂中纺锤体的形成从而中断有丝分裂进程, 引起细胞凋亡, 抑制肿瘤血管内皮细胞增殖^[3]。研究发现, CA-4 类药物的一个显著的特点是引起细胞的 G₂/M 期阻滞, 而这一过程受到多种蛋白的调节, 其中, 细胞周期依赖性激酶 Cdc2 与细胞周期蛋白 Cyclin B1 形成的复合物在调控细胞从 G₂ 期进入 M 期中发挥重要作用^[4]。因此, 本研究从微管蛋白和细胞周期两个方面入手, 开展 CPU-XT-008 对 HUVEC 作用机制的研究。

1 材料

1.1 试剂

化合物 CPU-XT-008 (纯度大于 95%, 中国药科大学药物化学实验室合成); DMEM 培养基、新生牛血清和胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 和二甲基亚砜 (DMSO) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 兔抗人 Cdc2、Cyclin B1 和 β -tubulin 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司); 兔抗人 β -actin 抗体、羊抗兔 IgG HRP、FITC 荧光标记的二抗 (美国 Bio-world 公司); 碘化丙啶 (PI)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) (美国 Thermo 公司)。

1.2 仪器

FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 Beckton-Dickinson 公司); 荧光倒置显微镜 (厦门 Motic 公司); 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司)。

1.3 细胞株

人脐静脉内皮细胞株 (HUVECs) 由中国药科大学生命科学与技术学院徐寒梅教授提供。

2 方法

2.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 用含 10% 的新生牛血清的 DMEM 培养液培养, 培养条件为

37 °C、饱和湿度、5% CO₂, 当细胞长至 90% ~ 95% 时即可进行传代。

2.2 MTT 法检测 CPU-XT-008 对 HUVEC 增殖的影响

将生长近融合的 HUVEC 用 0.25% 胰酶消化后接种于 96 孔培养板。培养 24 h 待细胞贴壁后, 将细胞分为对照组 (含 DMSO 的培养基, DMSO 浓度小于 0.1%) 和加药组 (分别含 0.01, 0.1, 1, 10 μ mol/L CPU-XT-008 的培养基), 继续孵育 24 h。然后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 37 °C 孵育 4 h。小心吸出培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解结晶, 振荡混匀后于 570 nm 处测定各孔的吸收度。

2.3 流式细胞仪检测 CPU-XT-008 对 HUVEC 细胞周期分布的影响

将每毫升含 1×10^5 个细胞的细胞悬液种植细胞于六孔板中, 每孔 2 mL, 贴壁后用 0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ mol/L 的 CPU-XT-008 处理细胞, 继续培养 18 h。收集细胞培养液到一离心管内备用, 胰酶消化细胞, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并吹散收集至离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤, 加入预冷的 70% 乙醇 1 mL 中, 轻轻吹打混匀, 4 °C 固定过夜, 1 000 r/min 离心 5 min, 预冷 PBS 洗涤, 每管加入配制好的碘化丙啶染色液 0.5 mL, 重悬细胞, 37 °C 避光温育 30 min, 流式细胞仪上测定细胞周期分布。

2.4 免疫荧光染色检测人脐静脉内皮细胞凋亡及微管蛋白的聚合变化

将每毫升含 1×10^5 个细胞的细胞悬液种植细胞于六孔板中, 每孔 2 mL, 贴壁后用 0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ mol/L 浓度的 CPU-XT-008 处理细胞, 继续培养 24 h。室温下 PBS 洗 3 次, 每孔加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.3% Triton X-100 处理 20 min, 5% BSA 湿盒内封闭 30 min, 滴加 β -tubulin 一抗稀释液, 湿盒内 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 3 次, 滴加 FITC 标记的二抗, 室温避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 滴加 DAPI 染色 2 min, 50% 甘油封片, 用荧光显微镜进行观察。

2.5 Western blot 法检测周期蛋白 Cyclin B1, Cdc2 和微管蛋白 β -tubulin 的变化

将生长近融合的 HUVEC 分为对照组和加药组 (0.01, 0.1, 1, 10 μ mol/L), 分别用不同浓度

CPU-XT-008 处理 24 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 清洗两遍,加入细胞裂解液 300 μ L(同时加入蛋白酶抑制剂 PMSF),提取总蛋白,Bradford 法测定总蛋白的浓度并定量,经 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿转法恒流 250 mA,90 min 将蛋白转移到 PVDF 膜上。10% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,Cdc2、p-Cdc2、Cyclin B1 和 β -tubulin 一抗(1:500)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 室温洗(10 min \times 3)。辣根过氧化物酶标记二抗(1:5 000)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST 室温洗(10 min \times 3)。ECL 化学发光法显影,Bio-Rad 成像系统拍照,结果分析采用吸收度表示,以目标条带与内参的比值来表示。

3 结果

3.1 CPU-XT-008 对 HUVEC 增殖的影响

采用 MTT 法检测 CPU-XT-008 对 HUVEC 增殖的影响,结果如图 1 所示,与空白组相比,CPU-XT-008 能明显抑制 HUVEC 细胞的增殖($P < 0.01$),并且随药物浓度的增加,抑制作用逐渐增强。

3.2 CPU-XT-008 对 HUVEC 细胞周期分布的影响

采用流式细胞仪检测 CPU-XT-008 对 HUVEC 细胞周期分布的影响。结果如图 2、表 1 所示,CPU-XT-008 作用于 HUVEC 细胞 18 h 后,处于 G_2/M 期细胞所占比率均随着药物浓度的递增而

逐渐增加,处于 G_1 期细胞所占比率随着药物浓度递增而递减,并有统计学差异,同时出现部分细胞的凋亡,结果表明,CPU-XT-008 能明显引发细胞周期阻滞于 G_2/M 期。

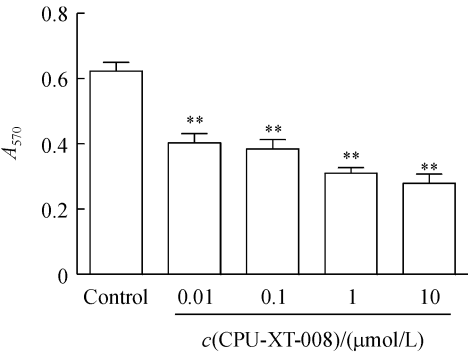


Figure 1 Inhibition of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) proliferation by combretastatin A-4 amino sugar derivative CPU-XT-008 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
** $P < 0.01$ vs control group

Table 1 Effect of CPU-XT-008 on the cell cycle distribution of HUVECs after 18 h incubation($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$c/(\mu\text{mol/L})$	$G_1/\%$	$S/\%$	$G_2/\%$
Control	78.53 ± 2.5	18.87 ± 1.7	2.6 ± 2.2
0.01	46.84 ± 1.6	35.89 ± 1.3	$17.26 \pm 1.6^{**}$
0.1	24.53 ± 1.8	45.31 ± 2.5	$30.16 \pm 1.9^{**}$
1.0	6.65 ± 3.7	46.22 ± 2.3	$47.13 \pm 2.1^{**}$
10.0	3.04 ± 1.2	38.33 ± 2.0	$58.63 \pm 1.7^{**}$

** $P < 0.01$ vs control group

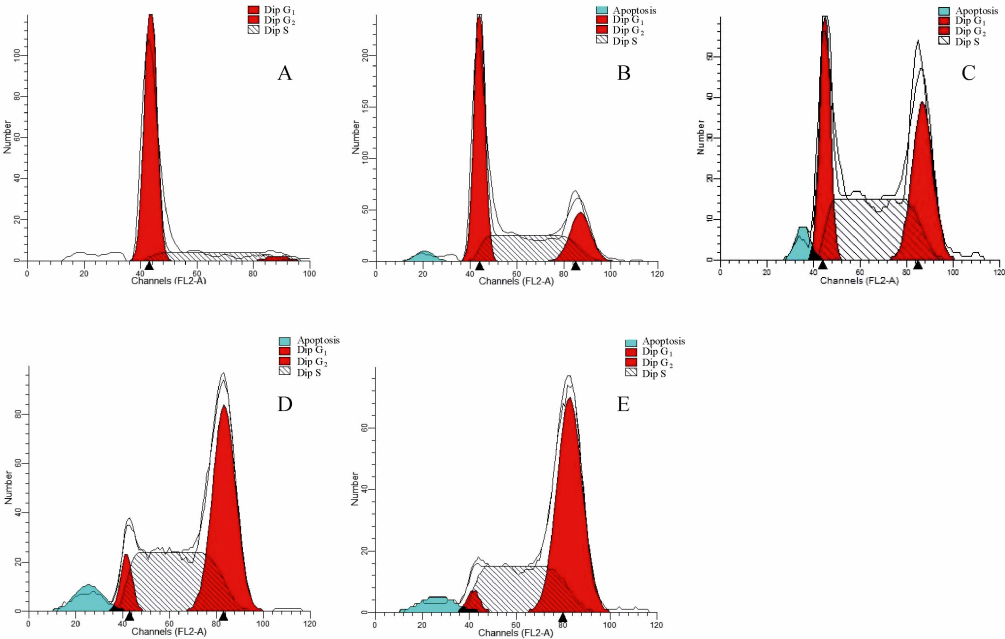


Figure 2 Effect of CPU-XT-008 on the cell cycle distribution of HUVECs after 18 h incubation
A: Control; B: CPU-XT-008 (0.01 μ mol/L); C: CPU-XT-008 (0.1 μ mol/L); D: CPU-XT-008 (1 μ mol/L); E: CPU-XT-008 (10 μ mol/L)

3.3 免疫荧光检测人脐静脉内皮细胞凋亡及微管蛋白聚合变化

3.3.1 DAPI 核染色观察 CPU-XT-008 对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ CPU-XT-008 分别作用于 HUVEC 细胞 24 h 后,

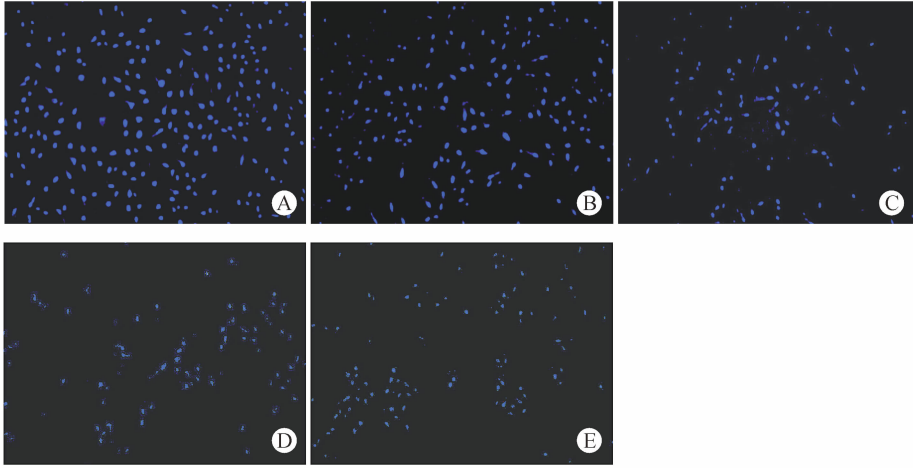


Figure 3 Effect of CPU-XT-008 on the apoptosis of HUVECs by DAPI staining.

A: Control; B: CPU-XT-008 (0.01 $\mu\text{mol/L}$); C: CPU-XT-008 (0.1 $\mu\text{mol/L}$); D: CPU-XT-008 (1 $\mu\text{mol/L}$); E: CPU-XT-008 (10 $\mu\text{mol/L}$)

3.3.2 免疫荧光检测 CPU-XT-008 对 HUVEC 微管蛋白聚合的影响 FITC 在 495 nm 激发,在 525 nm 发射荧光,呈绿色荧光。羊抗兔 IgG-FITC 检测 β -tubulin 在细胞核区和细胞质区的分布情况。如图 4 所示,以空白组作为对照,观察到 HUVEC 细胞核内微管呈致密的网状分布,荧光染色清晰,荧光强度高,细胞立体感强。经过 CPU-XT-008 (0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 HUVEC 细胞 24 h 后,随浓度的增加细胞核区微管明显解聚,呈弥散状分布,荧光强度明显减弱,细胞核周围细胞质区域荧光强度相对增强,且具有一定的浓度依赖性,此结果表明 CPU-XT-008 能影响 β -tubulin 在细胞核区和细胞质区的分布。

3.4 Western blot 检测 CPU-XT-008 对人脐静脉内皮细胞 Cyclin B1, Cdc2 和 β -tubulin 蛋白表达的影响

0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ CPU-XT-008 分别作用于 HUVEC 细胞 24 h 后,分析 Cyclin B1, Cdc2, p-Cdc2 和 β -tubulin 蛋白表达变化,如图 5 所示,CPU-XT-008 呈浓度依赖性上调 HUVEC 细胞 Cyclin B1 蛋白水平表达,下调 Cdc2 蛋白水平的表达,具有统计学差异 ($P < 0.05$)。CPU-XT-008 对 β -tubulin 蛋白水平表达无影响。此结果表明,CPU-XT-008 通过

DAPI 核染色结果如图 3 所示空白对照组细胞核呈均匀分布,核大且核膜清晰可辨,加药组 DNA 核形状变得不规则,甚至裂解为碎片,荧光强度减弱,且随药物浓度增大而愈发明显,此结果表明 CPU-XT-008 可呈浓度依赖性诱导 HUVEC 细胞凋亡。

上调细胞周期 G_2/M 期的关键调节蛋白 Cyclin B1, 下调 Cdc2, p-Cdc2 蛋白表达,阻滞细胞周期于 G_2/M 期。而 CPU-XT-008 作为微管蛋白抑制剂,并不影响微管蛋白 β -tubulin 总蛋白水平的表达。

4 讨论

CA-4 是针对肿瘤血管而发展的新一代抗肿瘤药,能特异性靶向肿瘤血管,破坏已生成的肿瘤血管,同时,CA-4 具有与秋水仙碱相似的化学结构,可以通过和内皮细胞微管蛋白- β 亚单位结合,导致微管解聚、破坏内皮细胞骨架,从而降低血流,达到血管阻断的目的。故 CA-4 作为微管蛋白抑制剂可以选择性地阻断肿瘤血管,达到靶向治疗的目的^[5]。本课题组前期研究表明,CPU-XT-008 同类衍生物 CPU-XT-006 的抗血管活性主要是通过抑制 HUVEC 的增殖、迁移,促进细胞凋亡,减少有关促血管生长因子 VEGF、FGF-2 等蛋白的表达^[6]。本实验进一步探讨了 CPU-XT-008 的作用机制。首先运用流式细胞仪检测 CPU-XT-008 在不同浓度对 HUVEC 细胞周期分布影响,检测结果表明 CPU-XT-008 引发 HUVEC 细胞 G_2/M 期阻滞。采用免疫荧光法检测 CPU-XT-008 对细胞内微管蛋白 β -tubulin 分布的影响,结果显示与对照组比较,

CPU-XT-008 使细胞核荧光减弱,细胞质区荧光强度增加,而 Western blot 结果显示细胞内总 β -tubulin 蛋白表达水平无变化,这表明 CPU-XT-008 能阻滞微管蛋白 β -tubulin 从细胞质入细胞核区组装成纺锤体或者促进细胞核内纺锤体解聚成微管蛋白而出核。

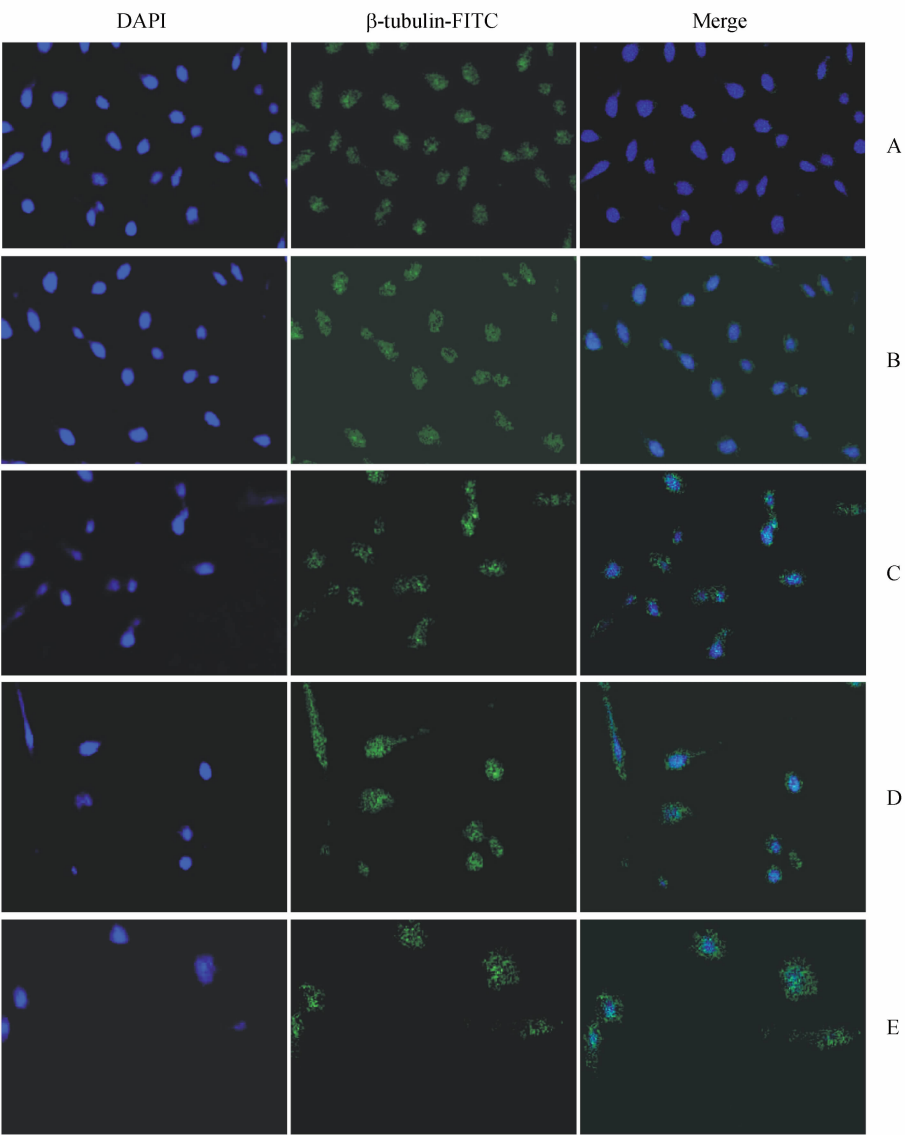


Figure 4 CPU-XT-008 changes the distribution of β -tubulin in the nucleus and cytoplasm
A: Control; B: CPU-XT-008 (0.01 $\mu\text{mol/L}$); C: CPU-XT-008 (0.1 $\mu\text{mol/L}$); D: CPU-XT-008 (1 $\mu\text{mol/L}$); E: CPU-XT-008 (10 $\mu\text{mol/L}$)

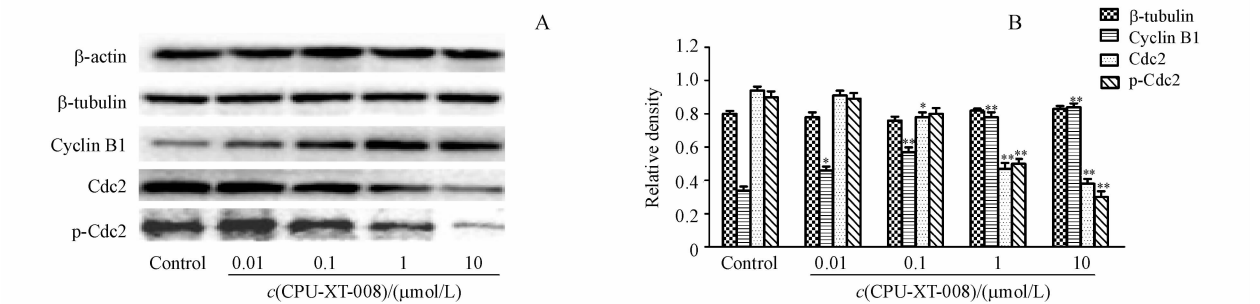


Figure 5 Effect of CPU-XT-006 on Cyclin B1, Cdc2, p-Cdc2 and β -tubulin proteins in HUVEC analyzed by Western blot ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A: Western blot assay; B: Densitometric analysis of the relative proteins taking β -actin as reference
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

真核细胞从 G₂ 期向 M 期推进的过程中受到多种蛋白的调节,其中最重要的是细胞周期依赖性激酶 Cdc2 与细胞周期蛋白 Cyclin B1^[7]。Cyclin B1 与 Cdc2 形成复合物,即细胞促分裂因子(MPF),促使细胞 G₂/M 期转变。

Western blot 结果表明,CPU-XT-008 作用 24 h 后,HUVEC 细胞中 Cdc2 的表达显著降低,这直接导致 Cyclin B1-Cdc2 复合物的形成显著减少,进而导致具有蛋白激酶活性的 MPF 减少,从而诱导细胞停滞于 G₂/M 期。而 Cdc2 的活性受抑制时,Cyclin B1 蛋白降解受阻,从而使 Cyclin B1 积累而蛋白水平升高。另外,纺锤体形成受阻时,纺锤体形成检测点通过识别未结合的染色单体而活化抑制 APC 介导的泛素化而抑制 Cyclin B1 降解,也会造成 Cyclin B1 表达上调。

综上所述,CPU-XT-008 作为微管蛋白抑制剂抗肿瘤可能的机制是通过与微管蛋白 β -tubulin 结合,影响 β -tubulin 在胞质和胞核区域的分布,阻止微管蛋白 β -tubulin 入胞核而抑制纺锤体的形成,或者促进细胞核内纺锤体的解聚,造成细胞分裂中断,导致 Cdc2, p-Cdc2 蛋白表达下调,MPF 活性下降,进而导致 Cyclin B1 蛋白降解受阻,细胞周期阻滞于 G₂/M 期,并诱导细胞凋亡。

参考文献

- [1] Kretschmann VK, Furst R. Plant-derived vascular disrupting agents: compounds, actions, and clinical trials [J]. *Phytochem Rev*, 2014, **13**(1): 191 – 206.
- [2] Schwartz EL. Antivascular actions of microtubule-binding drugs [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, **15**(8): 2594 – 2601.
- [3] Wang XF, Wang SB, Ohkoshi E, et al. N-Aryl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: a novel class of antitumor agents targeting the colchicine site on tubulin [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, **9**(67): 196 – 207.
- [4] Magalhães HI, Wilke DV, Bezerra DP, et al. (4-Methoxyphenyl) (3,4,5-trimethoxyphenyl) methanone inhibits tubulin polymerization, induces G₂/M arrest, and triggers apoptosis in human leukemia HL-60 cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, **272**(1): 117 – 126.
- [5] Tripathi A, Fornabai M, Kellogg GE, et al. Docking and hydrophobic scoring of polysubstituted pyrrole compounds with antitubulin activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, **16**(5): 2235 – 2242.
- [6] He SY, Sun J, Liu K, et al. Effect of combretastatin A-4 derivative CPU-XT-006 on proliferation, apoptosis and expression of VEGF and bFGF of HUVEC *in vitro* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(5): 451 – 454.
- [7] Kanthou C, Greco O, Stratford A, et al. The tubulin-binding agent combretastatin A-4-phosphate arrests endothelial cells in mitosis and induces mitotic cell death [J]. *Am J Pathol*, 2004, **165**(4): 1401 – 1411.