

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.02.010
文章编号: 1005-8982 (2021) 02-0048-08

基础研究·论著

TW-37对肺癌细胞和血管生成的影响及其机制研究

谢丹, 李漪, 查银莲, 何樱

(惠州市中心人民医院 肿瘤内科, 广东 惠州 516001)

摘要: **目的** 研究TW-37对肺癌细胞生长和血管生成的影响及其机制。**方法** 使用不同浓度的TW-37处理人微血管内皮细胞(HMEC-1)。采用qRT-PCR和蛋白免疫印迹法检测细胞内血管内皮生长因子(VEGF)及其转录因子的转录和表达,通过血管生成与鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)试验检测HMEC-1细胞的血管生成能力,通过MTT与流式细胞术分析细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡情况。建立异种移植模型,检测TW-37对肿瘤进展的影响。处死小鼠并收集肿瘤,采用免疫组织化学法分析VEGF和血管密度标志蛋白的表达。**结果** TW-37可以抑制CAM上生成新的血管,并且呈剂量依赖性。TW-37可抑制HMEC-1细胞的迁移和侵袭($P < 0.05$),并诱导细胞凋亡($P < 0.05$)。TW-37可抑制VEGF、ERK及HIF-1 α 的表达($P < 0.05$)。体内实验表明,TW-37可以抑制肿瘤生长和血管生成。**结论** TW-37通过ERK/VEGF抑制血管生成和肺癌的体内外进展。

关键词: 肺肿瘤; 细胞增殖; 血管生成; 血管内皮生长因子; HMEC-1细胞; 小鼠

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

TW-37 inhibits angiogenesis and lung cancer cell growth by targeting ERK/VEGF

Dan Xie, Yi Li, Yin-lian Zha, Ying He

(Department of Oncology, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou, Guangdong 516001, China)

Abstract: **Objective** To study the effect and mechanism of TW-37 on lung cancer cell growth and angiogenesis. **Methods** After treatment of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) with different concentrations of TW-37, the transcription and expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its transcription factors in the cells were detected by polymerase chain reaction (PCR) and immunoblotting. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay was performed to detect the angiogenic ability of HMEC-1 cells. The cell proliferation, cell cycle and apoptosis were analyzed by MTT assay and flow cytometry. The xenograft model was established and the effect of TW-37 on tumor progression was detected. Then the mice were sacrificed and tumor tissues were collected, where the expression of VEGF and marker proteins of vascular density was analyzed by immunohistochemistry. **Results** TW-37 significantly inhibited the formation of new blood vessels on CAM in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). TW-37 also suppressed the migration and invasion of HMEC-1 cells ($P < 0.05$), and induced apoptosis through cell cycle arrest ($P < 0.05$). TW-37 could inhibit the expression of VEGF, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) ($P < 0.05$). Besides, in vivo experiments showed that TW-37 could inhibit tumor growth and angiogenesis. **Conclusions** TW-37 inhibits angiogenesis and lung cancer progression in vivo and in vitro through ERK/VEGF.

Keywords: lung cancer; cell proliferation; angiogenesis; vascular endothelial growth factor

收稿日期: 2020-08-17

[通信作者] 何樱, E-mail: han51791167@163.com

肺癌是最常见的癌症死亡原因,占癌症相关死亡的24%,诊断后5年生存率仅为15%。约85%肺癌患者为非小细胞肺癌^[1]。诊断时,大多数肺癌患者都存在一定程度的肺癌转移,导致预后恶化,而血管生成是肺癌进展和转移的关键步骤^[1]。新生血管在癌组织中发挥营养和分解代谢物的作用,并促使肿瘤的转移,因此血管生成抑制剂被广泛用于治疗肺癌^[2-4]。近年来文献报道,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管生成的有效诱导剂,通过激活其下游信号分子,可影响血管内皮细胞的增殖、迁移、侵袭,从而促进血管生成,促进肿瘤进展^[5]。

有文献指出,B淋巴细胞瘤2(B cell lymphoma 2, Bcl-2)小分子抑制剂TW-37具有抗血管生成活性,其可通过与Bcl-2结合,从而抑制Bcl-2和Bcl-2家族促凋亡成员的异源二聚化,进而促进线粒体孔形成并诱导释放细胞色素c和启动细胞凋亡,最终在体内外抑制肿瘤的生长^[6-7]。此外,Bcl-2可以调节癌细胞中酸酐酶IX、VEGF和p-Akt的表达,其可通过信号传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)诱导新生血管内皮细胞中VEGF的表达,促进血管生成^[8-9],但是其靶分子和抗血管生成的确切机制尚未完全阐明。本研究旨在探讨TW-37对肺癌细胞生长和血管生成的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

21只BALB/cAnu/nu小鼠(6~8周)购自上海华源生物公司。人微血管内皮细胞(HMEC-1)和A549肺癌细胞购自美国典型收藏物保藏中心。HMEC-1细胞在含2 mmol/L谷氨酰胺、10 ng/ml表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、15% FBS和抗生素(100 u/ml青霉素,100 μg/ml链霉素)的DEME培养基中培养,A549肺癌细胞在含10% FBS和抗生素(100 u/ml青霉素,100 μg/ml链霉素)的RIPM 1640培养基中培养。所有细胞在5% CO₂潮湿环境中培养。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 胎牛血清购自浙江擎科生物技术公司,DEME培养基、RIPM1640培养基、青霉素

和链霉素购自美国Invitrogen公司,TW-37购自上海百奥莱博生物技术公司,血管生成检测试剂盒、Transwell小室和MTT检测试剂盒购自泉州市睿信生物科技有限公司,Caspase-3/7检测试剂盒购自美国Millipore公司,Trizol试剂购自美国Invitrogen公司,M-MLV逆转录酶和SYBR Green Premix Ex Taq II试剂盒购自日本TaKaRa公司,EGF和VEGF一抗购自上海Prime Gene公司,VEGFR2一抗购自上海百奥莱博生物科技有限公司,HIF-1α和ERK一抗购自美国Invitrogen公司,CD31抗体购自英国Abcam公司,Ki67抗体购自美国Abcam公司,VEGF抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2.2 主要仪器 BX51型显微镜购自日本Olympus公司,FACSCalibur™型流式细胞仪购自美国BD公司,Applied Biosystems ViiA™ 7型实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪购自美国ABI公司。

1.3 方法

1.3.1 鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)测定 将受精卵在37℃、45%湿度下孵育。第7天缓慢、轻轻地用砂轮磨除顶部蛋壳,并将该区域剥落,暴露出绒毛尿囊膜。分别用含0 μg/卵、50 μg/卵、100 μg/卵和150 μg/卵的TW-37盐水浸泡滤纸(0.5 cm × 0.5 cm),然后放在CAM上,用无菌透明胶带封闭后孵育3 d。每组10个卵,使用甲醇和丙酮(1:1)固定后通过显微镜拍摄CAM。

1.3.2 血管生成试验 将冷的基质胶按50 μl/孔涂在96孔板上,并在37℃条件下孵育以固化基质胶。将HMEC-1细胞按5 × 10⁴个/孔的密度接种到基质胶上,使用不同剂量(0 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L)TW-37处理2 h后在37℃条件下孵育过夜。将HMEC-1细胞接种在含或不含VEGF(100 ng/ml)和TW-37(8 μmol/L)的生长因子还原基质胶上,孵育12 h。用显微镜拍摄并记录毛细管生成情况。

1.3.3 细胞迁移和侵袭测定 ①细胞迁移测定:将HMEC-1细胞按1.5 × 10⁵个/孔接种在含不同剂量TW-37(0 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L)的100 μl无血清培养基中。下腔室包含相同的培养基,含15% FBS。温育8 h后,将迁移的细胞用0.1%结晶紫染色,并用棉签清洁膜的上表面以除去未迁移的细胞,拍照并记录迁移的细胞。②细

胞侵袭测定：将基质胶解冻并在无血清冷培养基中稀释至 5 mg/ml，将 80 μ l 稀释的基质胶添加到上腔室中。在 37℃ 条件下孵育 5 h，将凝胶状的 Matrigel 用温和的无血清培养基轻轻洗涤。后续步骤与细胞迁移测定相同。孵育 24 h 后进行固定和染色，拍照并记录侵袭细胞。

1.3.4 MTT 增殖测定 用 8 μ mol/L TW-37 (TW-37 组) 或二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (对照组) 处理 HMEC-1 细胞 4 h。将细胞按 1×10^4 个/孔的密度接种在 96 孔培养板上，室温孵育 24 h，每孔添加 50 μ l MTT 测试溶液，使用酶标仪在 490 nm 波长处测量并记录吸光度值，拍照并记录增殖细胞。

1.3.5 流式细胞术 用胰蛋白酶消化 TW-37 组和对照组 HMEC-1 细胞。按照试剂盒说明书，使用 Muse®Annexin V、Cell Cycle 和 Caspase-3/7 试剂盒制备样品，采用流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.6 免疫荧光染色 将 TW-37 组和对照组 HMEC-1 细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min，0.3% Triton X-100 渗透并用 5% BSA 在 PBS 中封闭 1 h，用鬼笔环肽染色以可视化 F-肌动蛋白丝，细胞室温孵育 1h，用 DAPI 复染色 30 h，在荧光显微镜下分析显微照片。

1.3.7 qRT-PCR TW-37 组、对照组 HMEC-1 细胞培养 6 h、12 h 和 24h。采用 Trizol 试剂提取培养细胞的总 RNA。使用 M-MLV 逆转录酶从 2 μ g 总 RNA 中合成互补 DNA。使用 SYBR Green Premix Ex Taq II 试剂盒进行 qRT-PCR 反应，qRT-PCR 反应条件：95℃ 变性 30 s，然后进行 40 个循环，95℃ 变性 3 s，57℃ 退火和延伸 30 s。实验重复 3 次，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
ERK	正向:GGTCTCACAGCGCATCCT	23
	反向:CGCCCATACTTTAGGCCGATC	
AP-1	正向:GTAATACGACTCACTATAGGGC	20
	反向:GGTAGCATCGATGGGATTCCAT	
AP-2	正向:ACTATAGGGCAGCAGTGCT	20
	反向:GTTACGTAGCTATATCATC	
HIF-1 α	正向:GAACCCATTTTCTACTCAGGACACAG	21
	反向:CCACTTTCATCCATTGATTGCCCTAG	
18sRNA	正向:GTAACCCGTTGAACCCCAT	22
	反向:CCATCCATCGGTAGTAGCG	

1.3.8 蛋白免疫印迹法 用裂解缓冲液溶解 HMEC-1 细胞。蛋白样品通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，并转移到 PVDF 膜上。将印迹与 EGF 一抗 (1:500)、VEGF 一抗 (1:500)、HIF-1 α 一抗 (1:500)、ERK 一抗 (1:500) 在 4℃ 孵育过夜。与辣根过氧化物酶标记的小鼠二抗 (1:100) 室温孵育 2 h 后，使用增强的化学发光试剂进行信号检测，以 GAPDH 为内参，使用 Image J 软件对数据进行量化和归一化。

1.3.9 异种移植模型与免疫组织化学染色 皮下注射 A549 癌细胞 (5×10^6 个/只) 到 BALB/cAnu/nu 小鼠中，异种移植动物分别经尾静脉注射盐水或不同剂量的 TW-37 (0.5 mg/kg 和 10.0 mg/kg)，1 次/d，每组 7 只。治疗第 27 天，处死小鼠，称重并拍照。收集并切除肿瘤，4% 中性多聚甲醛固定，对羟基苯甲酸酯包埋，切片并进行免疫组织化学染色。采用 CD31 抗体免疫染色鉴定内皮细胞，Ki67 抗体染色确定细胞增殖，VEGF 抗体染色显示 VEGF 表达。使用 Image Pro Plus 软件对切片进行半定量图像分析。

1.4 统计学方法

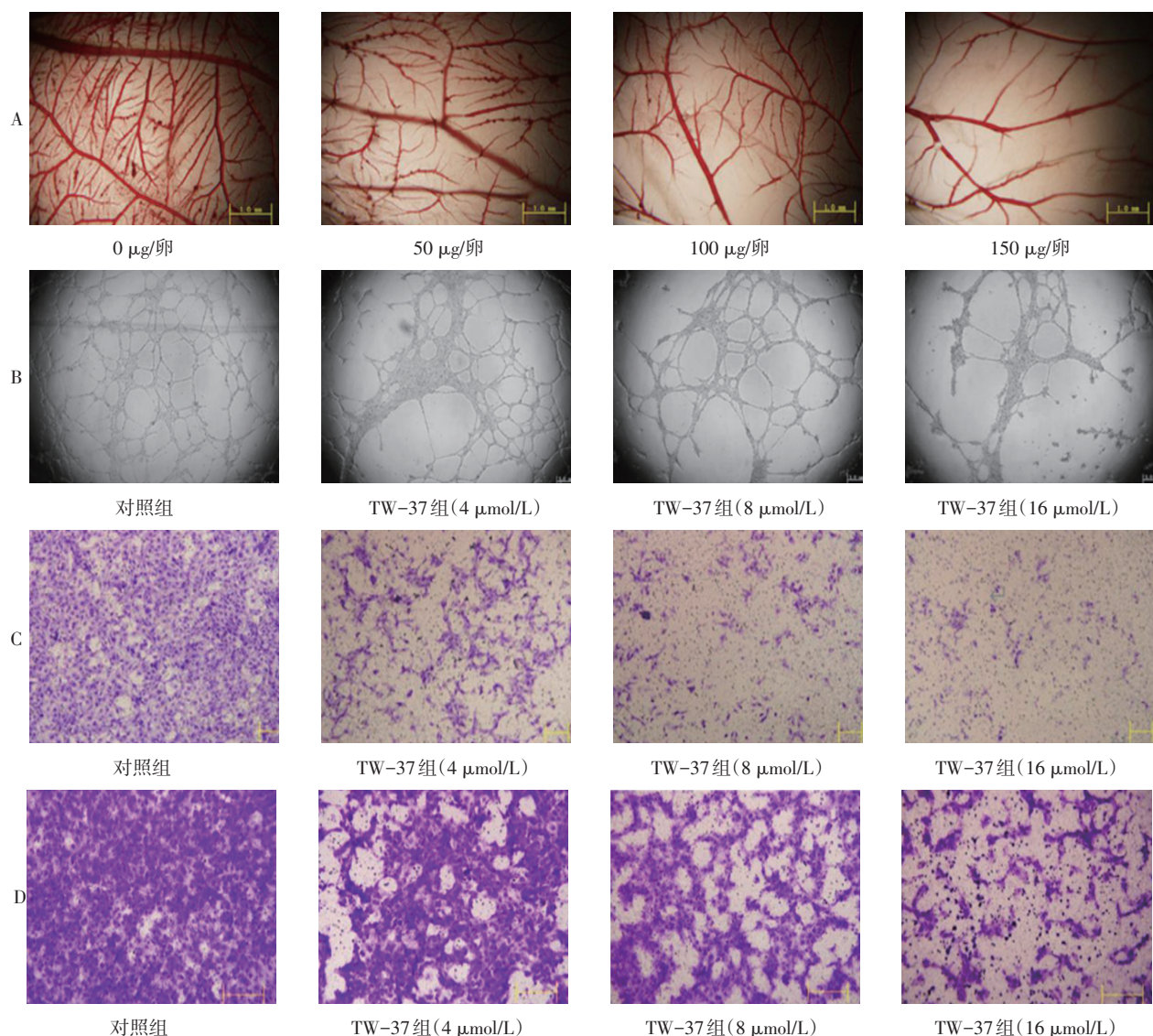
数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较用 t 检验或方差分析，方差分析的两两比较用 LSD- t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TW-37 抑制血管新生及 HMEC-1 细胞的迁移和侵袭

与对照组相比，TW-37 组以剂量依赖的方式降低微血管密度 (见图 1A)，削弱 HMEC-1 细胞生成毛细血管的能力 (见图 1B)，同时以剂量依赖的方式抑制 HMEC-1 细胞的迁移 (见图 1C) 和侵袭 (见图 1D)。

免疫组织化学染色结果，对照组细胞中 F-肌动蛋白以线性模式规则组装，并基本上以平行的方式穿过；而 TW-37 组细胞中 F-肌动蛋白变为分散型，应力纤维处于混乱状态或部分消失，表明 TW-37 可引起 HMEC-1 细胞中 F-肌动蛋白解聚。见图 2。



A: TW-37处理48 h后CAM上的新生血管($\times 40$); B: 基质胶上HMEC-1细胞生成的毛细血管($\times 40$); C: HMEC-1细胞的迁移能力($\times 100$); D: HMEC-1细胞的侵袭能力($\times 100$)。

图1 TW-37在体内外抑制血管生成及HMEC-1细胞的迁移和侵袭

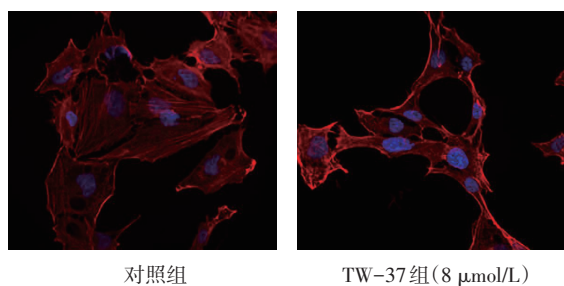


图2 TW-37对F-肌动蛋白分布的影响($\times 200$)

2.2 TW-37抑制VEGF诱导的体外血管生成

与对照组相比, 100 ng/ml VEGF可诱导HMEC-1细胞生成毛细血管。而再加入TW-37后, 可明显抑制VEGF诱导的毛细血管生成。见图3。

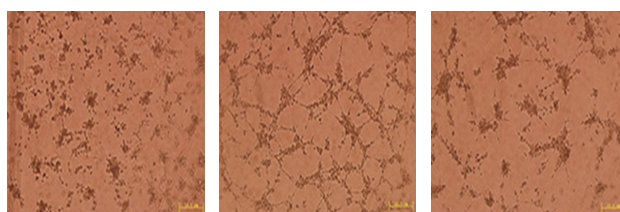


图3 TW-37抑制VEGF诱导的血管生成($\times 40$)

2.3 TW-37抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡

TW-37组与对照组细胞凋亡率、增殖率、侵袭情况比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组与TW-37组 G_1 期、S期细胞数比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2和图4~6。

表 2 两组细胞增殖、凋亡、侵袭及细胞周期分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖率/%	凋亡率/%	侵袭细胞/(个/Hp)	细胞周期/(个/Hp)	
				G ₁ 期	S期
对照组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.08
TW-37组	0.32 ± 0.01	2.09 ± 0.26	0.49 ± 0.03	2.56 ± 0.28	0.65 ± 0.09
t值	12.198	9.385	8.926	8.391	9.103
P值	0.001	0.013	0.024	0.028	0.016

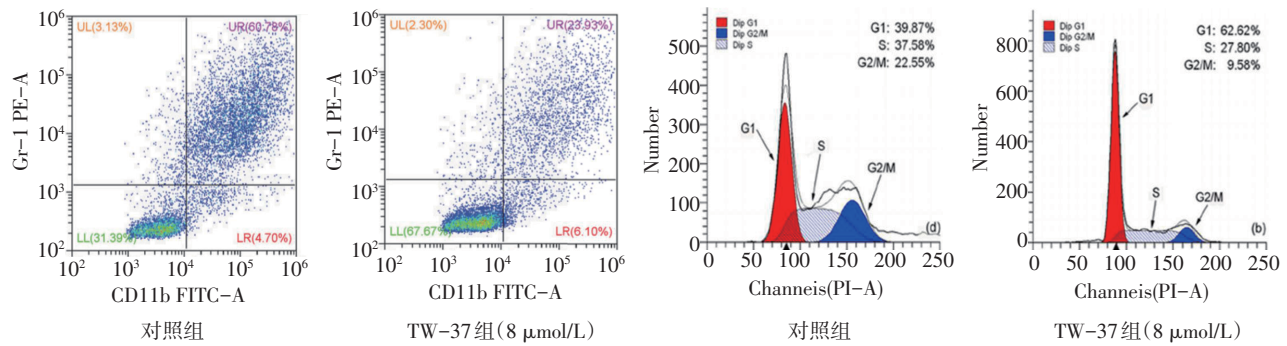


图 4 各组流式细胞图

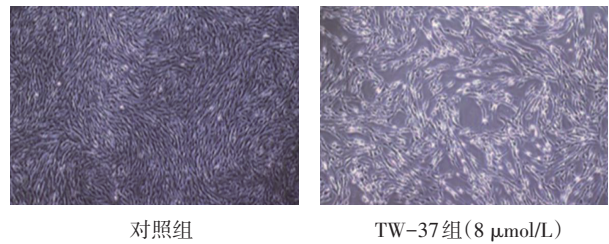


图 5 TW-37抑制细胞增殖 (×100)

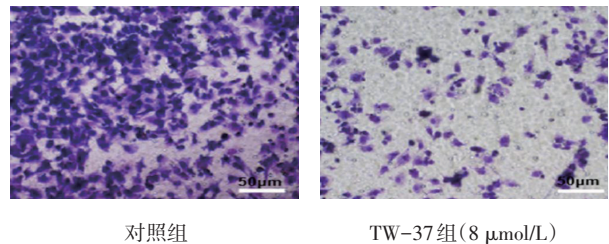


图 6 TW-37抑制细胞迁移 (×100)

2.4 TW-37抑制VEGF和ERK的激活

对照组与不同时间点TW-37组的VEGF、ERK蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组和不同时间点TW-37组的p-VEGF、p-ERK蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,不同时间点TW-37组的p-VEGF、p-ERK蛋白相对表达量较低($P<0.05$)。见表3和图7。

对照组与不同质量浓度TW-37组的VEGF、ERK蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组与不同质量浓度TW-37组的p-VEGF、p-ERK蛋白相对表达量比较,经方差

分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,不同质量浓度TW-37组的p-VEGF、p-ERK蛋白相对表达量较低($P<0.05$)。见表4和图8。

表 3 对照组与8 μmol/L TW-37组处理不同时间后细胞中蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-VEGF	VEGF	p-ERK	ERK
对照组	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09
TW-37组				
6 h	0.63 ± 0.08 [†]	0.93 ± 0.12	0.61 ± 0.07 [†]	0.99 ± 0.11
12 h	0.54 ± 0.06 [†]	1.09 ± 0.08	0.47 ± 0.07 [†]	0.91 ± 0.08
24 h	0.39 ± 0.01 [†]	1.12 ± 0.17	0.45 ± 0.03 [†]	0.86 ± 0.11
F值	29.229	2.519	45.717	1.097
P值	0.000	0.135	0.000	0.374

注:†与对照组比较, $P<0.05$ 。

表 4 对照组与不同质量浓度TW-37组处理12 h后细胞中蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-VEGF	VEGF	p-ERK	ERK
对照组	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.09
TW-37组				
4 μmol/L	0.62 ± 0.04 [†]	1.11 ± 0.09	0.53 ± 0.02 [†]	0.82 ± 0.03
6 μmol/L	0.52 ± 0.01 [†]	0.99 ± 0.11	0.47 ± 0.01 [†]	0.92 ± 0.07
8 μmol/L	0.41 ± 0.03 [†]	1.26 ± 0.13	0.39 ± 0.03 [†]	0.79 ± 0.08
F值	31.802	1.879	80.222	4.558
P值	0.000	0.208	0.000	0.053

注:†与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.5 TW-37 下调 VEGF 及其转录因子的表达

对照组与 TW-37 组 HIF-1α、AP-1 及 AP-2 的 mRNA 相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), TW-37 组低于对照组。见表 5 和图 9。

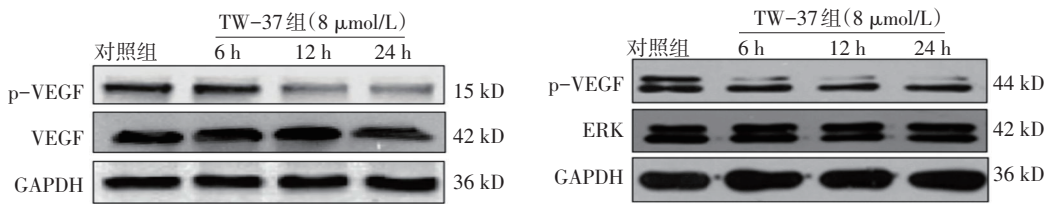


图 7 对照组与 TW-37 组 (8 μmol/L) 处理不同时间后细胞中蛋白的表达

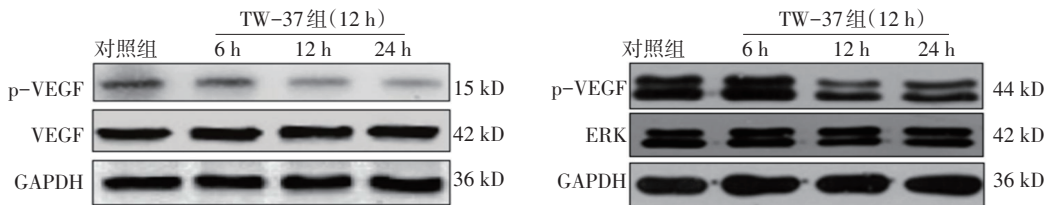


图 8 对照组与不同质量浓度 TW-37 组处理 12 h 后细胞中蛋白的表达

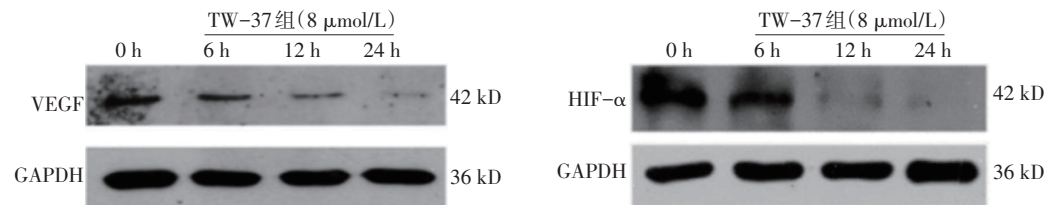


图 9 TW-37 下调 HMEC-1 细胞中 VEGF 及其转录因子的表达

表 5 各组 HIF-1α、AP-1 及 AP-2 的 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1α	AP-1	AP-2
对照组	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.11
TW-37 组	0.37 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.61 ± 0.02
<i>t</i> 值	12.970	11.081	8.991
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.009

表 6 对照组与不同质量分数 TW-37 组小鼠的肿瘤体积、Ki67、CD31、VEGF 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤体积/mm ³	Ki67	CD31	VEGF
对照组	600 ± 132	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.18
TW-37 组				
0.5 mg/kg	387 ± 72 [†]	0.66 ± 0.03 [†]	0.69 ± 0.05 [†]	0.92 ± 0.08
10.0 mg/kg	326 ± 43 [†]	0.24 ± 0.01 [†]	0.37 ± 0.01 [†]	0.98 ± 0.23
<i>F</i> 值	53.307	51.897	184.002	1.191
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.311

注: [†]与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.6 TW-37 在体内阻碍肿瘤生长和血管生成

对照组与 TW-37 组 (0.5 mg/kg 和 10.0 mg/kg) 小鼠的肿瘤体积、增殖标志物 Ki67 和微血管密度标志物 CD31 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与对照组比较, TW-37 组 (0.5 mg/kg 和 10.0 mg/kg) 肿瘤体积、Ki67 和 CD31 均较低 ($P<0.05$); 与 TW-37 组 (0.5 mg/kg) 比较, TW-37 组 (10.0 mg/kg) 肿瘤体积、Ki67 和 CD31 均较低 ($P<0.05$)。3 组小鼠的 VEGF 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 6 和图 10 ~ 12。

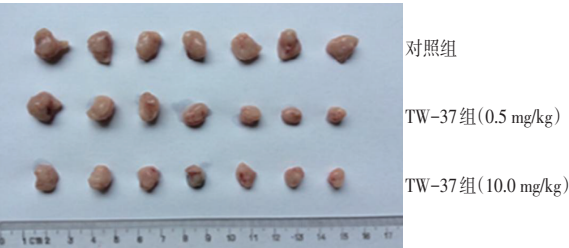


图 10 各组小鼠背侧接种 A549 细胞 27 d 后的肿瘤

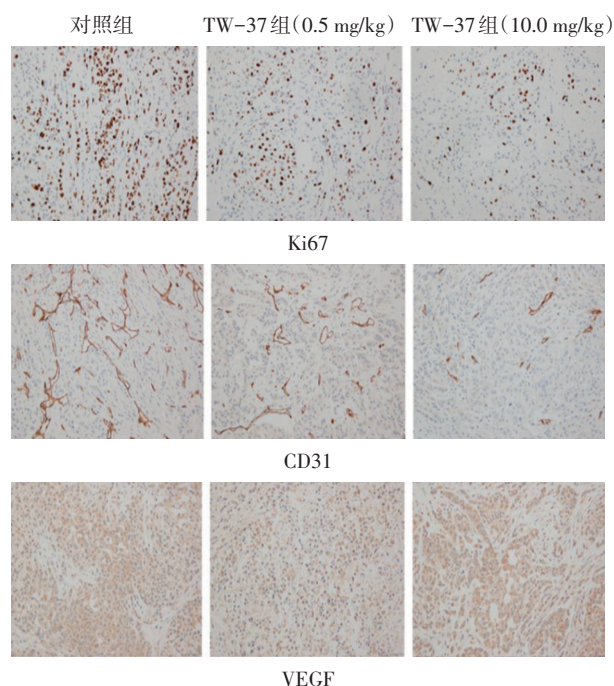


图 11 TW-37在体内阻碍肿瘤的生长和血管生成
(免疫组织化学染色 × 200)

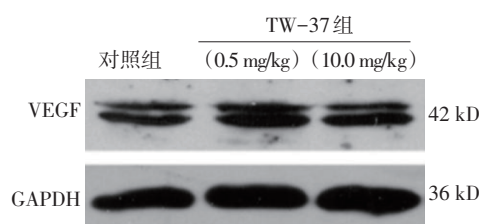


图 12 小鼠肿瘤组织中 VEGF 的表达

3 讨论

肺癌是最具侵袭性的癌症之一，预后很差。流行病学统计显示，在中国每年有 33 000 例患者死于肺癌^[10]。绝大多数患者出现大转移或微小转移，需要有效的药物治疗。然而，现有的常规化学治疗与手术切除难以满足临床需求，迫切需要新的治疗方法^[11-12]。在肺癌转移过程中血管的新生至关重要，新生血管通过为肿瘤组织供血、供氧及传输营养物质而在肿瘤发展中发挥重要作用，而干扰血管生成成为一种有效的抗肿瘤治疗策略^[13]。

在肿瘤诱导的血管生成早期，大量的 VEGF 从癌细胞中释放出来，然后与内皮细胞中的 VEGF 2 型受体 (VEGFR2) 结合，从而激活下游效应因子，促进血管新生。研究指出，生长因子通过与 VEGFR2 受体结合，诱导其磷酸化和二聚化，从而导致下游信号通路激活，促进血管生成^[14]。而

VEGFR2 的负调节对于抑制血管生成，包括肿瘤新血管生成具有重要意义，被认为是限制血管内皮细胞增殖的重要靶点，在血管生成中起关键作用^[15]。因此，靶向 VEGF 及其受体是一种有效的抗肿瘤治疗策略。而本研究结果表明，VEGF 可以促进 HMEC-1 细胞生成毛细血管，而 TW-37 能够抑制 VEGF 诱导的毛细血管生成。

VEGF 的表达受多种转录因子的调控，包括 HIF-1 α 、AP-1、AP-2、SP-1 和 STAT3^[16]。HIF-1 α 是一种异型二聚体反式激活因子，是控制 VEGF 表达和分泌的主要转录因子，可调节涉及血管生成、肿瘤生长和转移的基因表达^[17-18]。HIF-1 由 α 和 β 亚基组成，HIF-1 α 是在常氧条件下限制 VEGF 基因转录速率的限制性亚基^[19-22]。此外，有研究指出，Bcl-2 通过 Raf-1/MEKK-1 介导的 IKK β 活化的信号传导机制激活核转录因子- κ B，从而诱导肿瘤细胞的增殖和侵袭^[22-25]。本研究中蛋白免疫印迹法和 qRT-PCR 反应结果显示，TW-37 能够通过抑制 VEGFR2 和 ERK 的磷酸化激活，下调 VEGF 转录因子 HIF-1 α 、AP-1 和 AP-2 的转录水平，抑制 HIF-1 α 蛋白的表达，进而抑制 VEGF 诱导的毛细血管生成。此外，本研究结果显示，TW-37 通过靶向 ERK 抑制 HIF-1 α 的表达，从而下调 VEGF 水平，抑制 HMEC-1 细胞的侵袭和转移，发挥其对血管生成的抑制作用，提示 ERK/MAPK 信号通路对毛细血管生成具有重要意义。而细胞增殖实验显示，TW-37 可以显著诱导细胞凋亡并抑制细胞的克隆形成能力；其次，体内实验结果进一步表明 TW-37 可以抑制肿瘤进展，并抑制血管生成，表现为微血管密度标志物 CD31 的表达下调；最后，对照组与 TW-37 组大鼠的 VEGF 蛋白相对表达量无差异，可能是因为 TW-37 在体内多为抑制内皮细胞的功能，而未影响肿瘤细胞的功能。

综上所述，TW-37 可以通过靶向 ERK，抑制包括 HIF-1 α 在内的 VEGF 转录因子的表达，从而下调 VEGF 水平，抑制 HMEC-1 细胞的侵袭和转移，发挥其对血管生成的抑制作用，并诱导肺癌细胞的凋亡，抑制肺癌细胞的增殖，发挥抗肿瘤作用。

参 考 文 献：

- [1] CUI P, ZHANG P, ZHANG Y M, et al. HIF-1 α /Actl6a/H3K9ac

- axis is critical for pluripotency and lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells[J]. *The FASEB Journal*, 2020, 34(4): 72-81.
- [2] 宋慧华, 付秀华. 非小细胞肺癌常见驱动基因及相应靶向药物的研究进展[J]. *医学综述*, 2020(8): 1531-1536.
- [3] ROMANELLI-CREDREZ L, DOITSIDOU M, ALKEMA M J, et al. HIF-1 has a central role in caenorhabditis elegans organismal response to selenium[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11(8): 129-135.
- [4] JIANG N, ZOU C, ZHU Y, et al. HIF-1 α -regulated miR-1275 maintains stem cell-like phenotypes and promotes the progression of LUAD by simultaneously activating Wnt/ β -catenin and Notch signaling[J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 56-62.
- [5] 刘慧, 孟庆威, 耿健雄, 等. 非小细胞肺癌脑转移的治疗进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(10): 1790-1793.
- [6] 马永超, 杜晓鹃, 李海龙, 等. 白细胞介素-6对胰腺癌荷瘤小鼠移植瘤生长及 Caspase-3/Bax/Bcl-2 信号通路的影响[J]. *解剖学报*, 2020, 51(2): 216-219.
- [7] SHUKLA N A, YAN M N, HANNA N. The story of angiogenesis inhibitors in non-small-cell lung cancer: the past, present, and future[J]. *Clinical Lung Cancer*, 2020, 7(92): 17-25.
- [8] 李立佳, 符梅竹, 黄惠敏, 等. 柠檬苦素调控 Tiam1 基因表达影响人体血管瘤内皮细胞 VEGF/VEGFR2 通路及诱导其凋亡的机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(6): 723-728.
- [9] ZHANG J, WANG Q, WANG Q, et al. Chrysophanol exhibits anti-cancer activities in lung cancer cell through regulating ROS/HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2020, 393(3): 49-56.
- [10] 刘怡辰, 向卉楠, 方志红. 多原发肺癌的诊断与治疗研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(9): 1013-1017.
- [11] 卢子龙, 耿庆. 免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌治疗中的研究进展[J]. *疑难病杂志*, 2020, 19(3): 311-316.
- [12] DU Q Q, WANG W, LIU T Y, et al. High expression of integrin α 3 predicts poor prognosis and promotes tumor metastasis and angiogenesis by activating the c-Src/extracellular signal-regulated protein kinase/focal adhesion kinase signaling pathway in cervical cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10(82): 9-18.
- [13] LI X M, YU M, YANG C Y. YY1-mediated overexpression of long noncoding RNA MCM3AP-AS1 accelerates angiogenesis and progression in lung cancer by targeting miR-340-5p/KPNA4 axis[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2020, 121(3): 37-45.
- [14] 温培楠, 林明恕, 金冕, 等. 二氢杨梅素通过 ERK/VEGFA/VEGFR2 通路对体内外胃癌血管生成的影响[J]. *中国癌症杂志*, 2020, 30(2): 113-121.
- [15] WEI H, HARPER M T. Comparison of putative BH3 mimetics AT-101, HA14-1, sabutoclax and TW-37 with ABT-737 in platelets [J]. *Platelets*, 2020, 39(41): 87-96.
- [16] 郭超, 丁涛, 党文呈, 等. 黄芪注射液对小鼠 4T1 乳腺癌细胞移植瘤 CyclinD1、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(1): 104-108.
- [17] 刘王波, 彭禹, 马瑞, 等. 地黄饮子汤对 rt-PA 溶栓后急性脑梗死大鼠神经细胞凋亡及 Bcl-2、Caspase-3 表达的影响[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(8): 1366-1369.
- [18] 沈俊逸, 赵智明, 刘春丽, 等. 人参皂苷对大鼠脑血管内皮细胞 MEG3 表达的干预作用及促进血管新生的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3418-3421.
- [19] 史敏, 杨佳慧, 李永军. Bcl-2 抑制剂 BH3 模拟物在血液系统恶性肿瘤治疗中的研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2019, 38(7): 385-390.
- [20] HAJIZADEH F, ARDEBILI S M, MAHDI B M, et al. Silencing of HIF-1 α /CD73 axis by siRNA-loaded TAT-chitosan-spion nanoparticles robustly blocks cancer cell progression[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 882(3): 99-112.
- [21] SUN Y, ZHAO J T, CHI B J, et al. Long noncoding RNA SNHG12 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration via regulating miR-199a-5p/HIF-1 α [J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(8): 201-213.
- [22] CUI K X, LIU J, HUANG L L, et al. Andrographolide attenuates choroidal neovascularization by inhibiting the HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 530(1): 178-189.
- [23] KOZIEL K, SMIGELSKAITE J, DRASCHE A, et al. RAF and antioxidants prevent cell death induction after growth factor abrogation through regulation of Bcl-2 proteins[J]. *Experimental Cell Research*, 2013, 319(17): 257-263.
- [24] 陈涛, 杜维. 非小细胞肺癌患者热休克蛋白 90 α 、凋亡促进因子 Bax、凋亡抑制因子 Bcl-2 表达水平变化及与病理学特征的相关性[J]. *中国医学工程*, 2019, 27(8): 9-13.
- [25] Gary-Gouy H, Sainz-Perez A, Bismuth G, et al. Cyclosporin-A inhibits ERK phosphorylation in B cells by modulating the binding of Raf protein to Bcl2[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 344(1): 55-63.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 谢丹, 李旖, 查银莲, 等. TW-37 对肺癌细胞和血管生成的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(2): 48-55.

Cite this article as: XIE D, LI Y, ZHA Y L, et al. TW-37 inhibits angiogenesis and lung cancer cell growth by targeting ERK/VEGF[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(2): 48-55.