

类泛素化激活酶抑制剂PEV通过细胞衰老提高结肠癌细胞对5-氟尿嘧啶的敏感性

花雨昕^{1,2} 倪梦珍² 孙晴晴² 翟潇晴² 潘巍巍^{2*}

(¹浙江中医药大学, 基础医学院, 杭州 310000; ²嘉兴大学医学院, 细胞生物学教研室, 嘉兴 314001)

摘要 细胞衰老与肿瘤细胞增殖减缓密切相关, 细胞衰老抑制了许多癌基因的激活, 因此诱导细胞衰老是现阶段一种干扰肿瘤细胞增殖过程的潜在策略, 或许可以成为治疗肿瘤的有效途径。PEV(Pevonedistat)又称MLN4924, 是NEDD8激活酶(NAE)抑制剂, 可以通过阻断Cullin类泛素化使Cullin-RING E3泛素连接酶(CRL)失活。PEV可以抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡、细胞衰老。5-氟尿嘧啶(5-FU)是结肠癌治疗中的一线化疗药物。PEV是否可以通过促进细胞衰老增强化疗药物5-FU的敏感性, 提高结肠癌的治疗效果尚未可知。该研究对结肠癌细胞HCT116、HT29分别进行PEV单药处理、5-FU单药处理以及PEV与5-FU联合处理, 通过 β -半乳糖苷酶染色、Western blot、细胞3天连续计数、CCK-8实验、裸鼠皮下成瘤实验、免疫组化等实验对结肠癌细胞的衰老与增殖情况进行探究。结果提示, 与溶媒组相比, PEV处理组与PEV、5-FU联合处理组半乳糖苷酶活性增加, P21、P27、PAI-1、P62等衰老相关蛋白表达水平增加以及细胞核形态标志物LaminB1缺失。同时与PEV单药处理组相比, PEV、5-FU联合处理组细胞衰老程度增加, 对细胞增殖的抑制效果更为显著。该研究揭示类泛素化激活酶抑制剂PEV促进细胞衰老提高结肠癌对5-FU的敏感性, 从而加剧细胞衰老、抑制细胞增殖。

关键词 类泛素化; 细胞衰老; 结肠癌; 化疗药物敏感性

Neddylation Activating Enzyme Inhibitor PEV Enhances the Sensitivity of Colorectal Cancer Cells to 5-Fluorouracil through Cell Senescence

HUA Yuxin^{1,2}, NI Mengzhen², SUN Qingqing², ZHAI Xiaoqing², PAN Weiwei^{2*}

(¹School of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China;

²Department of Cell Biology, College of Medicine, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China)

Abstract Cell senescence is closely related to the slowing down of tumor cell proliferation, and cell senescence inhibits the activation of many oncogenes. Therefore, inducing cell senescence is a potential strategy to interfere with the important process of tumor cells proliferation at this stage, and may be an effective way to treat tumors. PEV (Pevonedistat), also known as MLN4924, is a NAE (NEDD8-activating enzyme) inhibitor that can inactivate CRL by blocking Cullin neddylation. PEV can inhibit the proliferation of tumor cells, promote cell apoptosis and senescence. 5-FU (5-fluorouracil) is a first-line chemotherapy agent in the treatment of colorectal

收稿日期: 2024-03-10 接受日期: 2024-04-28

国家自然科学基金(批准号: 31871402)、浙江省自然科学基金(批准号: LY21H160047、LGD21H160003、LQ23C070001)和“创新嘉兴·优才支持计划”先锋型创新团队资助的课题

*通信作者。Tel: 0573-83623150, E-mail: wwpan@mail.zjxu.edu.cn

Received: March 10, 2024

Accepted: April 28, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31871402), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY21H160047, LGD21H160003, LQ23C070001) and the Jiaxing Talent Pioneer Innovation Team

*Corresponding author. Tel: +86-573-83623150, E-mail: wwpan@mail.zjxu.edu.cn

cancer. However, it is not known whether PEV can enhance the sensitivity of chemotherapy drug 5-FU and improve the therapeutic effect of colorectal cancer by promoting cell senescence. In this study, colorectal cancer cells HCT116 and HT29 were treated with PEV alone, 5-FU alone and PEV combined with 5-FU respectively. Through β -galactosidase staining, Western blot, cell count for three days, CCK-8 test, mice and xenograft models, immunohistochemistry and other experiments, it was proved that PEV promoted cell senescence, the combination of PEV and 5-FU accelerated cell senescence and increased the sensitivity of colorectal cancer to 5-FU. The inhibitory effect on cell proliferation was more significant. The results showed that compared with the solvent group, the galactosidase activity, the expression of senescence-related proteins such as P21, P27, PAI-1, P62 and the loss of nuclear morphological marker LaminB1 were increased in PEV plus PEV and 5-FU groups. At the same time, compared with PEV single drug treatment group, PEV and 5-FU combined treatment group increased cell senescence and inhibited cell proliferation more significantly. This study revealed that NEDD8-activating enzyme inhibitor PEV promotes cell senescence and increases the sensitivity of colorectal cancer to 5-FU, which aggravates cell senescence and inhibits cell proliferation.

Keywords neddylation; cellular senescence; colorectal cancer; chemotherapy drug sensitivity

根据中国国家癌症中心(NNC)数据最新统计表明, 2022年我国结直肠癌新发病例数位居所有癌症发病率的第2位。其中, 结直肠癌位居男性恶性肿瘤发病率第二位, 位居女性恶性肿瘤发病率第四位^[1]。在我国结肠癌仍旧是最常见的恶性肿瘤之一, 氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是现阶段结肠癌的一线化疗药物。尽管结肠癌在化疗方法、治疗手段上已有显著进展, 但结肠癌易发生转移, 且患者生存期仅有24个月^[2]。因此, 找到新的更有效的治疗方法很有必要。

细胞衰老是一种由遗传损伤、端粒磨损等压力引起的永久性细胞周期停滞状态, 伴有炎症因子、生长因子等组成的衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)^[3]。细胞衰老通过影响细胞增殖, 抑制潜在癌变细胞生长, 构成了对肿瘤发生的一种自然防御机制^[4]。衰老细胞存在于肿瘤微环境中, 与多种癌症(如乳腺癌、甲状腺癌)的进展和转移有关, 尤其是在抗肿瘤治疗后^[5]。有研究表明在结肠癌的诱导过程中发现结肠上皮细胞衰老相关的诱导因子表达水平增加^[6], 并且结肠癌细胞的衰老与结肠癌细胞增殖减缓密切相关。现阶段有很多药物以及分子靶点可以通过促进或诱导结肠癌细胞衰老来阻止肿瘤生长^[7-9]。

NEDD8激活酶(NEDD8-activating enzyme, NAE)抑制剂PEV(Pevonedistat)阻断Cullin类泛素化(neddylation)并使Cullin-RING E3泛素连接酶(Cullin-RING E3 ligases, CRLs)失活, 从而诱导细胞凋亡

和抑制肿瘤增殖^[10]。PEV又称MLN4924, 是一种一流的NAE抑制剂^[11], 目前已在白血病、淋巴瘤、黑色素瘤和几种晚期实体瘤患者的许多I~III期临床试验中运用^[12]。总结近10年的研究, 在许多人类癌症中, 类泛素化途径通过NEDD8、UBE2F、UBE2M、SAG/RBX2的过表达过度激活, 从而导致癌症患者生存率低^[13-16]。现阶段已有研究报道PEV作为一种新型的放射增敏剂, 可以增强结直肠癌对放射治疗的敏感性^[17-18], 与此同时PEV与许多化疗药物在治疗癌症上存在协同作用^[19]。5-FU是最早被公认为治疗结肠癌有效的药物^[20]。为了进一步提高5-FU对结肠癌的治疗效果, 我们将PEV与5-FU在结肠癌中联合用药。

因此, 我们通过培养细胞和建立异种移植小鼠模型, 探究类泛素化激活酶抑制剂PEV是否可以通过促进细胞衰老来提高5-FU的抗肿瘤作用同时抑制细胞增殖。我们的研究结果提出了结肠癌治疗的潜在干预策略, 旨在为后续提高化疗药物的治疗效果提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞株 人结肠癌细胞系HCT116、人结肠癌细胞系HT29购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 实验动物 SPF级雄性6~8周龄BALB/c-裸鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司, 本研究所涉及的所有动物实验均按照嘉兴大学实验动物伦理委员

会批准的《国家卫生研究院实验动物关爱与使用指南》进行(批准号: JUMC2021-151)。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清、McCoy's 5A培养基、胰蛋白酶、PBS等购自美国Gibco公司。Western IP裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、 β -半乳糖苷酶细胞衰老检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。PEV以及5-FU购自MedChemExpress公司。实验中所使用的抗体见表1。PVDF膜、ECL发光液购自美国Millipore公司。山羊血清购自北京索莱宝科技有限公司。DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒购自Vector Laboratories公司。皮下成瘤实验所需基质胶购自美国Corning公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结肠癌细胞系HCT116、人结肠癌细胞系HT29在含有10%牛血清(ThermoFisher Scientific)和1%青霉素-链霉素(ThermoFisher Scientific)的McCoy's 5A(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)中于37 °C、5% CO₂(标准培养条件)培养。肿瘤细胞系购自中国科学院上海细胞库。

1.2.2 细胞分组与药物处理 将PEV(HY-10484 MedChemExpress)和5-FU(HY-90006 MedChemExpress)溶解在DMSO中制成原液,再用完全培养液稀释至相应浓度。最终DMSO浓度小于0.01%(v/v)。单独使用PEV(0.2 μ mol/L)和5-FU(20 μ mol/L)以及PEV(0.2 μ mol/L)与5-FU(20 μ mol/L)联合使用处理细胞48 h后,分别用处理后的细胞进行相应的实验。

1.2.3 CCK-8实验 分别取HCT116、HT29结肠癌细胞,接种于96孔板中,每孔接种5 000个细胞,细胞贴壁后分别加入相应浓度的PEV与5-FU,分别培养

48 h后,吸取上清液,然后在每孔内加入CCK-8溶液,继续在37 °C培养箱中孵育1~2 h,孵育结束后使用酶标仪在450 nm波长处检测细胞的吸光度(D)值。

1.2.4 细胞3天连续计数实验 取PEV、5-FU单独处理以及联合处理24 h后的HCT116、HT29细胞,以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种在6孔板中,分别在24、48、72 h计算每孔的细胞总数(在细胞贴壁后分别对48 h、72 h所对应的孔中细胞再进行1次药物处理),并绘制细胞的生长曲线。

1.2.5 克隆形成实验 将HCT116和HT29细胞在完全培养液中培养,接种于6孔培养板(含600个细胞),用PEV(0.2 μ mol/L)、5-FU(20 μ mol/L)处理后培养14天。实验结束后使用甲醇溶液室温固定细胞15 min, PBS清洗后用0.1%结晶紫染色细胞,通过ImageJ软件计算细胞克隆数。

1.2.6 Western blot分析衰老相关蛋白变化 从细胞提取物中分离总蛋白,采用10%或12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离30 μ g蛋白。将蛋白质转移到PVDF膜上,用5%(w/v)脱脂牛奶在18 °C下封闭1 h。一抗(稀释比例1:1 000)孵育后,用含有0.05%(w/v) Tween-20的Tris缓冲盐水(TBST)洗涤膜,并与抗兔IgG或者抗鼠IgG辣根过氧化物酶联二抗(稀释比例1:5 000)孵育。最后,使用增强型化学发光检测试剂盒(Millipore)检测得到的条带。使用Imager 680进行条带曝光显影。

1.2.7 细胞衰老染色 计数、收集溶媒组细胞和实验组细胞各 1×10^5 个,在12孔板中培养过夜。使用PBS洗涤后,加入固定液,室温固定细胞15 min,用PBS洗涤,使用衰老检测试剂盒进行染色。染色的细胞在37 °C下孵育过夜,孵育结束后用PBS洗涤,光

表1 实验中所使用的抗体清单
Table 1 List of antibodies used in the experiment

抗体 Antibody	稀释比例 Dilution rate	货号 Art.No	厂家 Manufacturer
Anti-rabbit LaminB1	WB 1:1 000	#12987	Proteintech
Anti-mouse PAI-1	WB 1:1 000	#66261	Proteintech
Anti-rabbit GAPDH	WB 1:1 000	#BK7021	Bioker
Anti-rabbit P21	WB 1:1000; IHC 1:200	#2947	Cell Signaling Technology
Anti-rabbit P27	WB 1:1 000	#3686	Cell Signaling Technology
Anti-rabbit P62	WB 1:1 000; IHC 1:200	#AF5384	Affinity Biosciences LTD
HRP anti-rabbit IgG	WB 1:5 000; IHC 1:400	#7074	Cell Signaling Technology
HRP anti-mouse IgG	WB 1:5 000; IHC 1:400	#7076	Cell Signaling Technology

镜下成像。

1.2.8 免疫组化实验 石蜡切片脱蜡, 再水化, 3% H_2O_2 处理。10 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬酸钠溶液(pH6.0)修复抗原。山羊血清室温孵育1 h后, 一抗在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。一抗孵育结束后, 用PBS洗涤切片(3次, 每次5 min), 再进行二抗孵育, 室温孵育30 min。二抗孵育结束后, 使用DAB试剂盒染色, 随后使用苏木精对细胞核进行染色, 染色结束后脱色封片, 光镜下拍照。蛋白表达水平通过细胞阳性率与阳性强度来确定, 免疫组化定量分析结果使用ImageJ免疫组化模块进行测定。

1.2.9 动物实验 体内研究。选取6~8周龄SPF雄性裸鼠28只, 将其随机分为4组, 每组7只。1组为对照溶媒组, 1组皮下注射PEV(10 mg/kg), 1组腹腔注射5-FU(20 mg/kg), 1组皮下注射PEV(10 mg/kg)和腹腔注射5-FU(20 mg/kg)同时进行。实验组与溶媒组在无菌条件下皮下注射 5×10^6 个HT29细胞, 每只接种体积为100 μL 。7天后, 开始使用游标卡尺测量肿瘤大小, 一周测量3次。同时开始按分组注射不同的药物, 每周注射3次, 每种药物每次注射体积均为100 μL 。当肿瘤直径 ≥ 15 mm时, 处死动物。切除皮下肿瘤进行测量。

1.2.10 统计学处理 各实验均独立重复3次、使用Prism GraphPad软件对实验数据进行统计分析。定量资料结果数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间数据比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。显著性水平表示为: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$ 。

2 结果

2.1 PEV阻断结肠癌类泛素化

结肠癌中类泛素化处于过度活化状态, 与肿瘤

发生发展有密切关系。PEV作为类泛素化激活酶抑制剂, 可以在结肠癌中阻断类泛素化^[21-22]。在结肠癌细胞HCT116、HT29(图1A和图1B)中PEV阻断了Cullin类泛素化。

2.2 PEV、5-FU单独处理以及两种药物联合处理对细胞衰老的影响

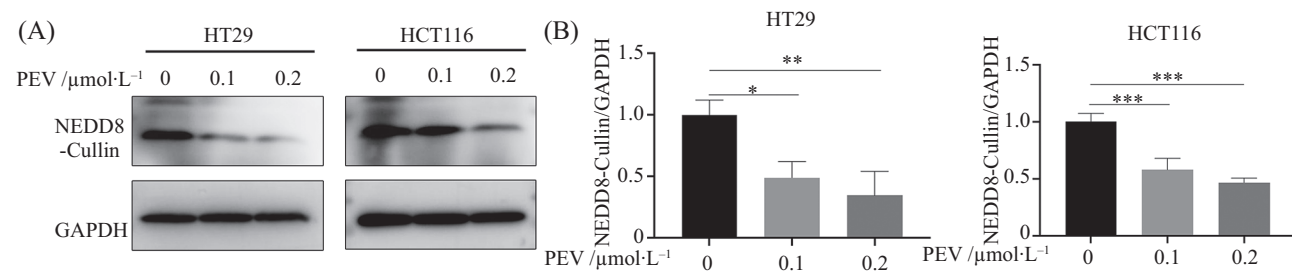
在结肠癌HCT116、HT29(图2A)细胞系中, PEV、5-FU单药使用以及PEV、5-FU联合用药后, β -半乳糖苷酶染色发现PEV单药处理组衰老细胞数量明显增多, 5-FU单药处理组细胞未出现明显衰老, 与此同时PEV与5-FU联合使用后发现衰老细胞数量明显增多, 且衰老细胞数量占比高于PEV与5-FU单药处理(图2B)。

2.3 PEV、5-FU单独处理以及两种药物联合处理对衰老相关蛋白表达的影响

在结肠癌HT29(图3A)、HCT116(图4A)细胞系中, PEV、5-FU单药使用以及PEV、5-FU联合用药后, Western blot检测衰老相关蛋白表达的变化。我们发现了与 β -半乳糖苷酶染色相一致的情况。PEV单药处理后, 出现了纤溶酶原激活物抑制物1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)、P21、P62、P27等衰老相关标志物的聚集, 以及细胞核形态标志物LaminB1的缺失, 在5-FU单药处理的细胞中衰老相关蛋白表达变化较小, 但在PEV与5-FU联合用药的细胞中衰老相关蛋白变化明显高于两种药物单独使用, 细胞衰老加剧(图3B和图4B)。

2.4 PEV与5-FU联合处理对HCT116、HT29细胞活力的影响

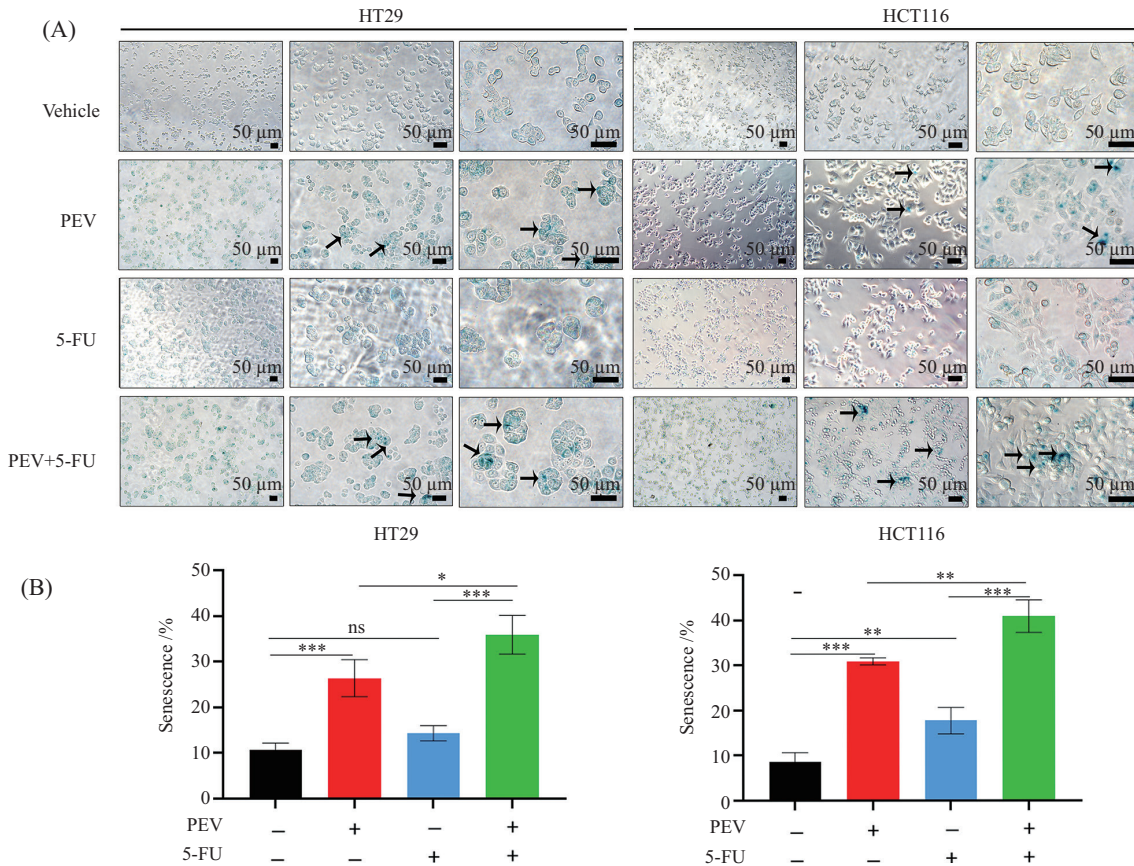
我们通过CCK-8实验发现, PEV与5-FU联合处理对细胞增殖的抑制作用最佳, 并且5-FU对细胞增



A: Western blot检测PEV阻断结肠癌细胞HT29、HCT116类泛素化; B: NEDD8-Cullin表达量统计分析。n=3。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
A: Western blot assay was performed to detect PEV blocking the neddylation of colorectal cancer cells HT29 and HCT116; B: statistical analysis of NEDD8-Cullin expression level. n=3. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图1 PEV阻断结肠癌细胞HT29、HCT116类泛素化

Fig.1 PEV blocks neddylation of colorectal cancer cells HT29 and HCT116



A: 结肠癌细胞HT29、HCT116 β半乳糖苷酶染色, 图中箭头代表细胞出现衰老; B: PEV单药处理、5-FU单药处理、PEV与5-FU联合处理以及溶媒组HT29、HCT116细胞衰老率的统计分析。ns: $P>0.05$, $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: senescent β-galactosidase staining of colorectal cancer cells HT29 and HCT116, the arrows represent cells that are senescent; B: statistical analysis of the aging rate of HT29 and HCT116 cells in the PEV monotherapy, 5-FU monotherapy, PEV combined with 5-FU treatment and solvent group. ns: $P>0.05$, $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图2 PEV单药处理以及PEV与5-FU联合用药处理促进结肠癌细胞HCT116、HT29衰老

Fig.2 The senescence of HCT116 and HT29 colorectal cancer cells was promoted by PEV alone and PEV combined with 5-FU

殖的抑制随着浓度的增加出现剂量依赖性。与此同时我们也发现在PEV与5-FU联合处理后,降低5-FU或者PEV药物的浓度均可达到高浓度单药处理相同的效果(图5A和图5B)。

2.5 PEV与5-FU联合使用对HCT116、HT29增殖抑制效果最佳

我们分别对溶媒组和PEV单药使用组、5-FU单药使用组以及PEV与5-FU联合使用组的细胞进行3天连续计数,分别绘制溶媒组与实验组的细胞生长曲线。通过细胞生长曲线我们发现PEV与5-FU联合使用对细胞增殖的抑制效果明显优于PEV与5-FU单药使用(图6A和图6B)。与此同时我们通过克隆形成实验分别对PEV、5-FU以及PEV、5-FU联合处理的细胞克隆形成能力进行检测(图7A)。通过统计形成克隆的数量证明PEV与5-FU

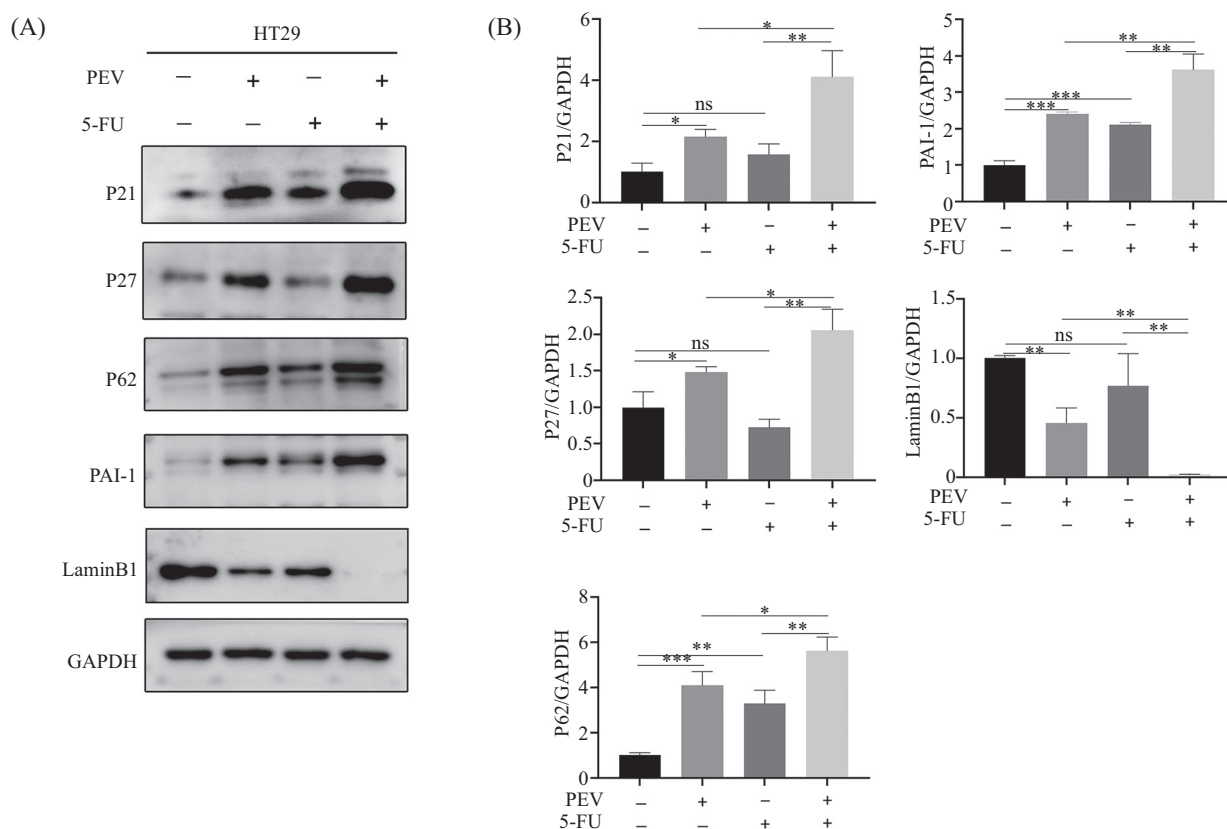
联合处理对细胞的增殖能力抑制效果最佳(图7B)。

2.6 皮下成瘤实验验证PEV联合5-FU抑制肿瘤增殖的效果

为了进一步验证PEV促进结肠癌细胞衰老提高细胞对5-FU的敏感性,我们将HT29细胞与基质胶混合后注射到裸鼠皮下,定期测量肿瘤大小,当肿瘤直径 ≥ 15 mm时,处死动物,取出皮下肿瘤(图8A)。称量肿瘤并绘制质量曲线(图8B),同时绘制肿瘤的生长曲线(图8C),结果发现PEV、5-FU单药使用都对肿瘤增殖有一定的抑制作用,但PEV与5-FU联合使用对肿瘤增殖的抑制作用最为明显。

2.7 皮下肿瘤组织衰老相关蛋白表达情况

我们取溶媒组、PEV单药注射组、5-FU单药注射组以及PEV、5-FU联合注射组的肿瘤组织进行组织蛋白的提取,Western blot检测发现PEV、5-FU



A: Western blot检测衰老相关蛋白PAI-1、LaminB1、P21、P62、P27的变化; B: P21、P27、P62、PAI-1、LaminB1表达量的定量统计分析。 $n=3$, ns: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: Western blot was used to detect the changes of senescence-related proteins PAI-1, LaminB1, P21, P62 and P27; B: quantitative statistical analysis of P21, P27, P62, PAI-1, LaminB1 expression. $n=3$, ns: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图3 Western blot检测PEV单药处理、5-FU单药处理以及PEV与5-FU联合处理后HT29细胞衰老相关蛋白变化

Fig.3 Western blot analysis of senescence related protein changes in HT29 cells after PEV monotherapy, 5-FU monotherapy and PEV combined with 5-FU treatment

联合注射组的组织中P21、P62、P27蛋白的聚集(图9A和图9B),与细胞水平结果相对应。

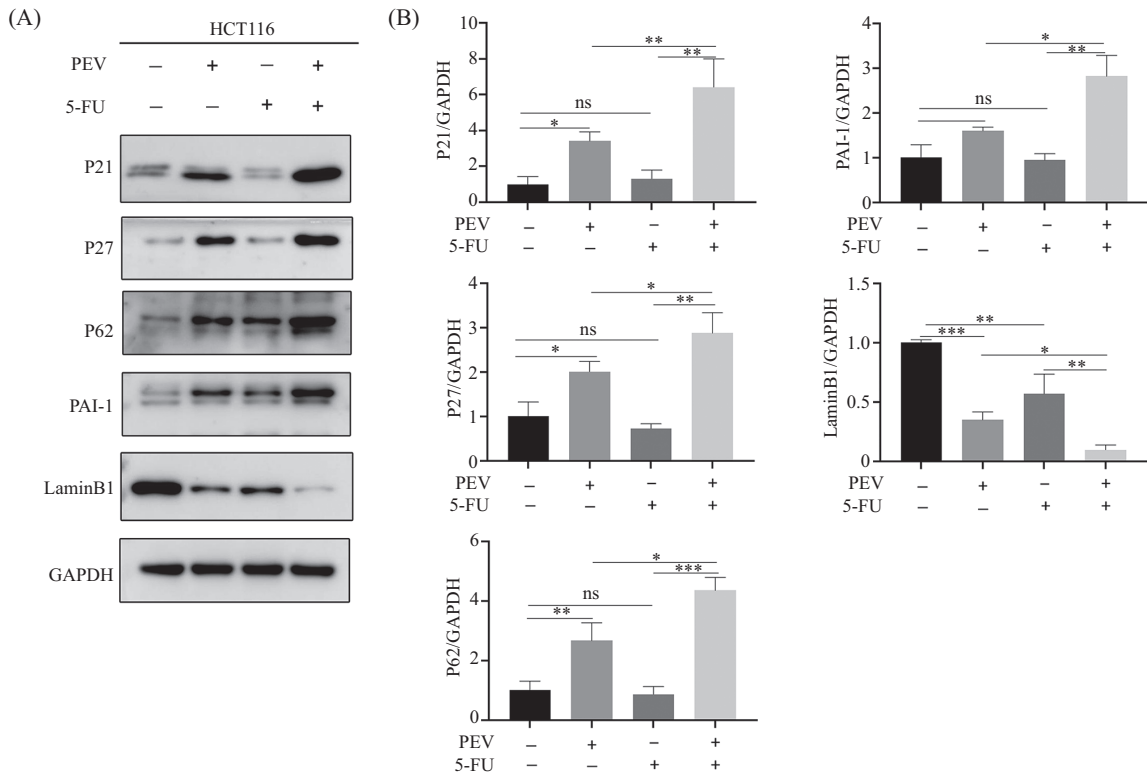
2.8 皮下肿瘤组织石蜡切片检测衰老相关蛋白的表达情况

我们通过免疫组化实验分别对溶媒组、PEV单药注射组、5-FU单药注射组以及PEV、5-FU联合注射组的肿瘤组织切片进行衰老相关蛋白P62(图10A)、P21(图10B)的测定。通过细胞的阳性率我们发现,PEV与5-FU联合处理组的P62蛋白(图10C)、P21蛋白(图10D)变化最为明显,与细胞水平实验结果相一致。

3 讨论

结肠癌是全球癌症相关死亡的第三大原因^[23]。衰老是DNA损伤细胞分裂过程中常见的应激反应^[24]。诱导肿瘤细胞衰老是一种可以有效应对肿瘤发生的方法,可以阻止细胞增殖并激活抗肿瘤免疫反应^[25-26]。衰老相关增殖停滞的主要介导体是细胞周期蛋白

依赖性激酶抑制因子1和1B等,它们阻止细胞周期检查点细胞周期蛋白复合体的形成,参与细胞周期G₁~S的相变^[27]。衰老细胞的特征是半乳糖苷酶活性增加,细胞周期停滞。我们的研究表明,HT29、HCT116细胞在PEV单药处理后,细胞衰老特征明显。PEV诱导细胞衰老是不可逆的,并伴有P21的持续积累和DNA损伤反应的持续激活^[28]。与此同时与PEV单药处理组相比,PEV与5-FU联合用药处理组半乳糖苷酶活性增加,P21、P27等细胞周期相关蛋白变化明显,提示PEV与5-FU联合处理后细胞衰老加剧。有研究表明,联合检测衰老生物标志物和细胞增殖可提高组织切片衰老细胞预测的可靠性^[29]。我们通过平板克隆实验对药物处理组的增殖能力进行检测,发现结肠癌细胞发生衰老抑制了细胞增殖,且PEV与5-FU联合处理的细胞与单药处理细胞相比细胞增殖受到了抑制。与此同时CCK-8实验还提示我们PEV与5-FU联合处理后,结肠癌细胞对5-FU的

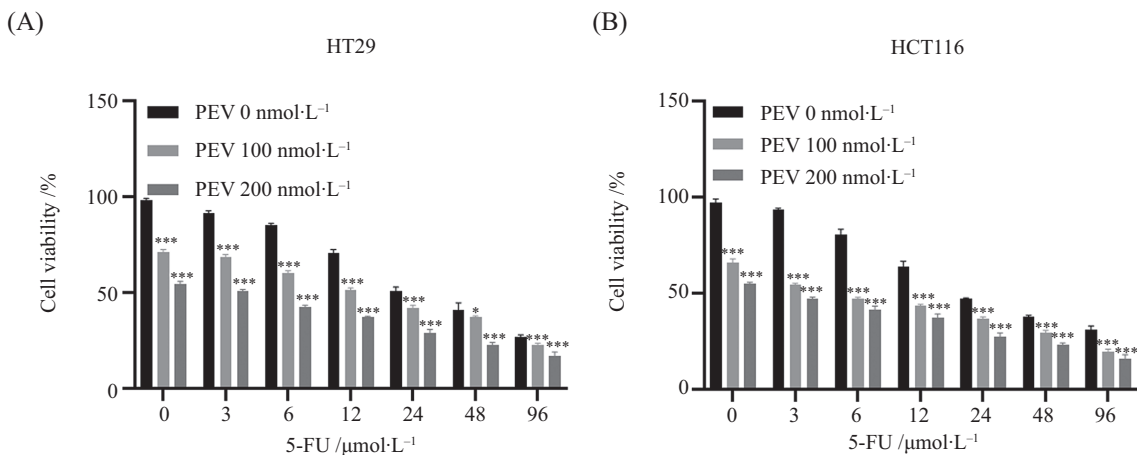


A: Western blot检测衰老相关蛋白PAI-1、LaminB1、P21、P62、P27的变化; B: P21、P27、P62、PAI-1、LaminB1表达量的定量统计分析。 $n=3$, ns: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: Western blot analysis was performed to detect the changes of age-related proteins PAI-1, LaminB1, P21, P62 and P27. B: quantitative statistical analysis of P21, P27, P62, PAI-1, LaminB1 expression. $n=3$, ns: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 Western blot检测PEV单药处理、5-FU单药处理以及PEV与5-FU联合处理后HCT116细胞衰老相关蛋白变化

Fig.4 Western blot analysis of senescence related protein changes in HCT116 cells after PEV monotherapy, 5-FU monotherapy and PEV combined with 5-FU treatment



A: CCK8实验检测PEV与5-FU联合使用在不同浓度下对HT29细胞活力的影响; B: CCK8实验检测PEV与5-FU联合使用在不同浓度下对HCT116细胞活力的影响。 $n=5$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

A: CCK8 assay was used to detect the effects of PEV combined with 5-FU on the viability of HT29 cells at different concentrations; B: CCK8 assay was used to detect the effects of PEV combined with 5-FU on the viability of HCT116 cells at different concentrations. $n=5$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

图5 CCK-8检测PEV与5-FU在不同浓度下联合处理HCT116、HT29细胞的存活率

Fig.5 CCK-8 assay to detect the viability of HCT116 and HT29 cells treated with PEV combined with 5-FU at different concentrations

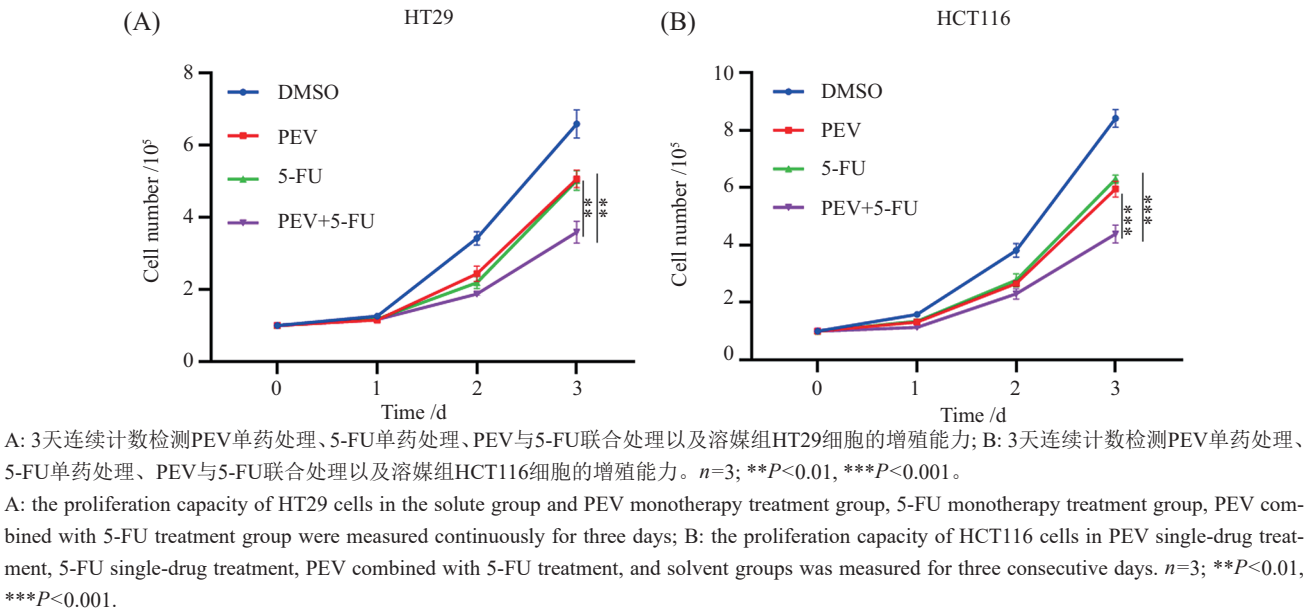


图6 3天连续计数检测溶媒组与药物处理组的HT29细胞与HCT116细胞的增殖能力

Fig.6 The proliferation capacity of HT29 cells and HCT116 cells in the solvent group and the drug treatment groups was measured for three consecutive days

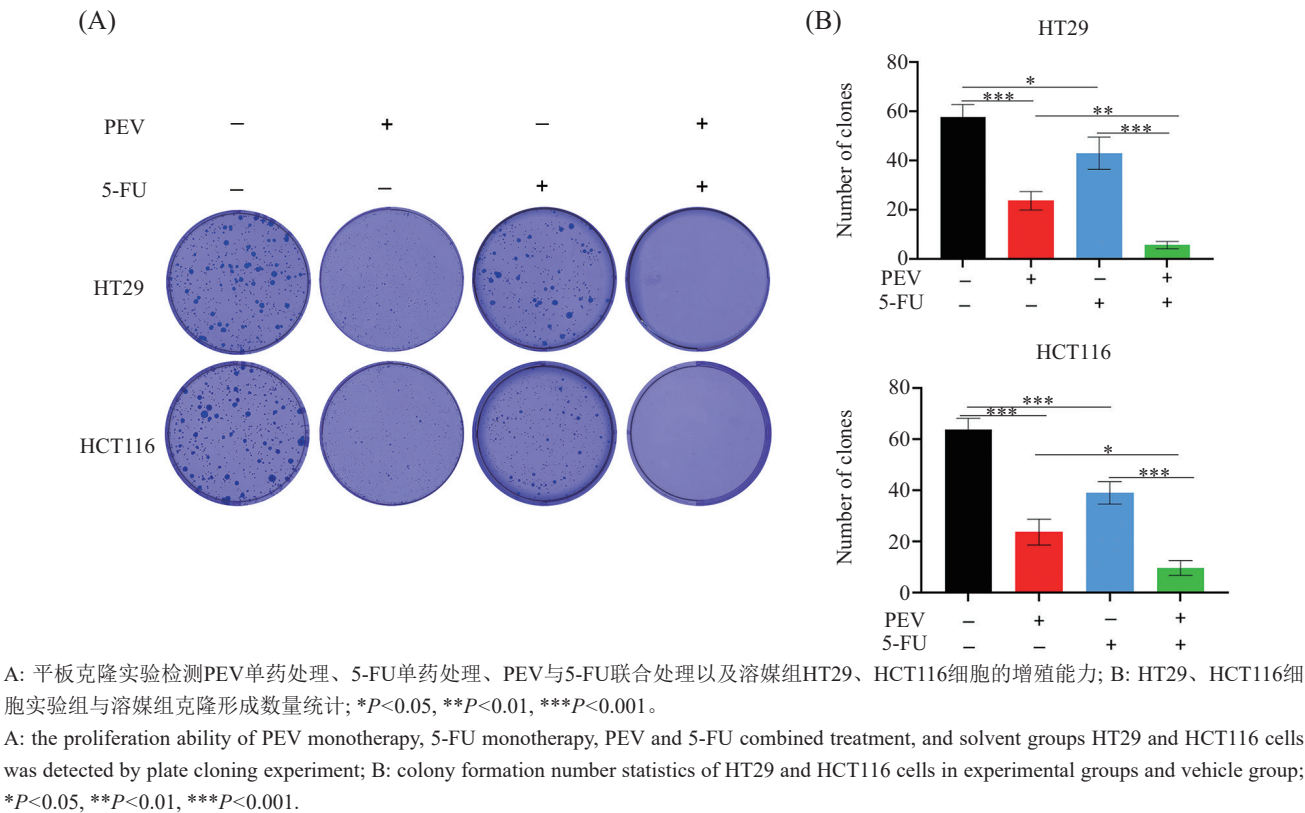


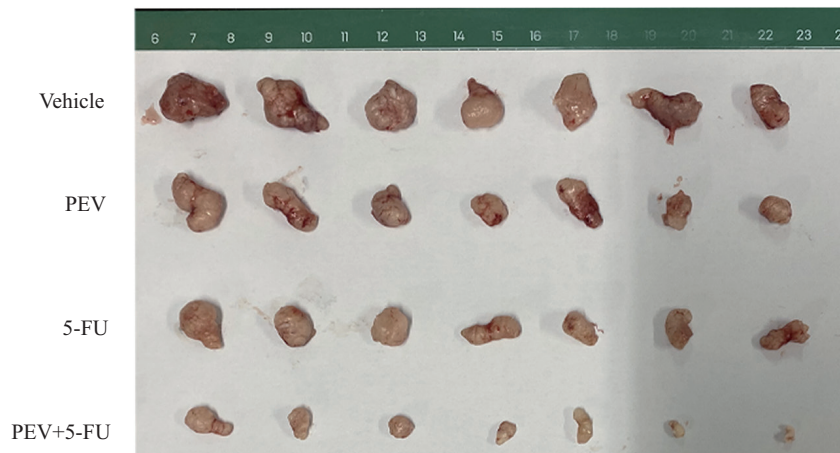
图7 平板克隆实验检测HCT116、HT29细胞药物处理后的增殖能力

Fig.7 The proliferation ability of HCT116 and HT29 cells after drug treatment was detected by plate cloning experiment

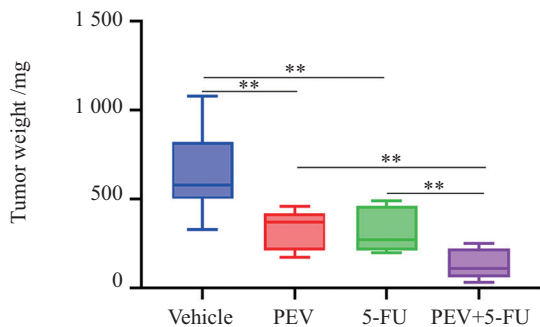
敏感性提高, 对细胞增殖的抑制效果最佳, 同时降低5-FU或者PEV药物的浓度均可达到高浓度单药处理相同的效果。

PEV是一种有效的NEDD8激活酶抑制剂^[11]。NEDD8与包括结肠癌在内的许多癌症的病程有紧密的联系, 并且其表达水平的变化与肿瘤细胞的增

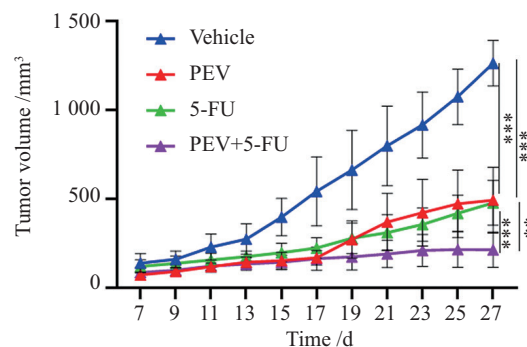
(A)



(B)



(C)



A: 裸鼠皮下成瘤实验检测PEV给药组、5-FU给药组、PEV与5-FU联合给药组以及溶媒组的肿瘤生长情况; B: PEV给药组、5-FU给药组、PEV与5-FU联合给药组以及溶媒组的肿瘤质量统计; C: PEV给药组、5-FU给药组、PEV与5-FU联合给药组以及溶媒组肿瘤生长曲线。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

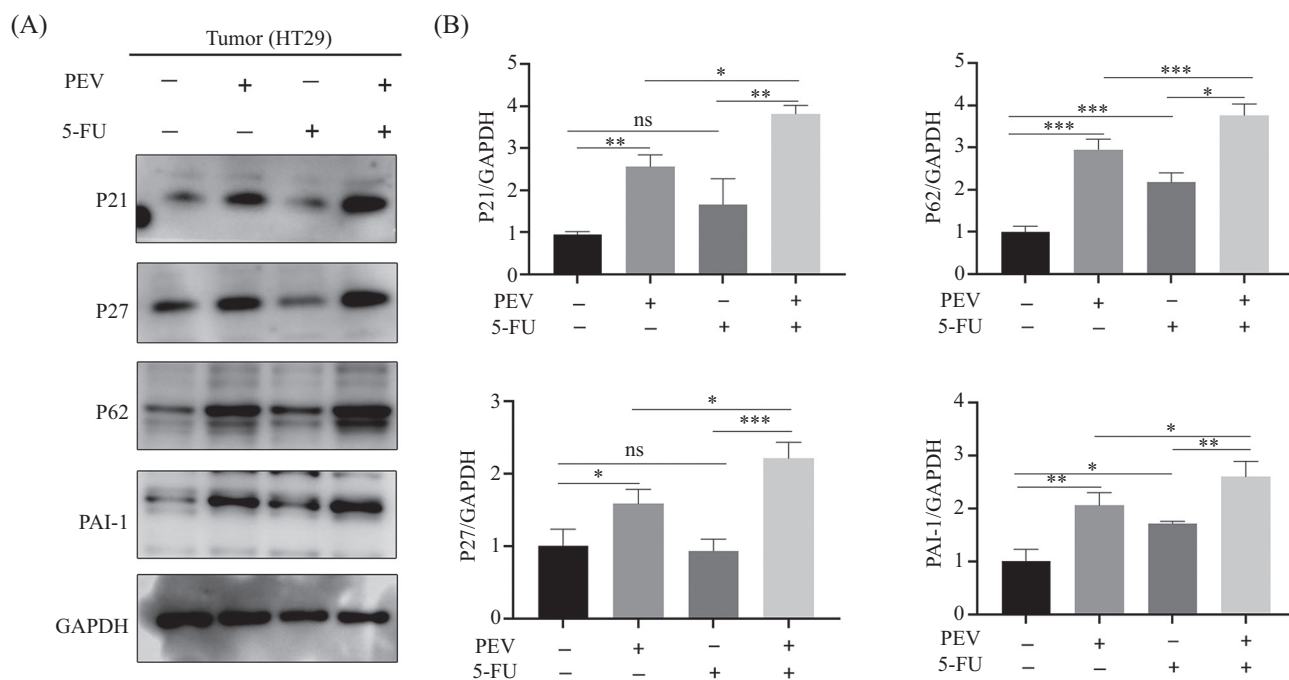
A: the tumor growth in the PEV administration group, 5-FU administration group, PEV combined with 5-FU administration group, and solvent group was detected by subcutaneous tumor formation experiment in nude mice; B: the tumor weight statistics of PEV administration group, 5-FU administration group, PEV combined with 5-FU administration group, and solvent group. C: tumor growth curves of PEV administration group, 5-FU administration group, PEV combined with 5-FU administration group, and solvent group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图8 在动物水平检测溶媒组与给药组肿瘤的生长情况

Fig.8 Tumor growth of the vehicle group and the administration groups was measured at animal level

殖和克隆能力有关^[30]。PEV选择性地抑制NEDD8激活酶,可以干扰许多类型的癌症^[31-33],特别是结肠癌的代谢^[34],可以导致细胞周期停滞或细胞死亡。与此同时现阶段的结肠癌常见化疗药物和PEV联合使用,已发现具有良好的抗肿瘤作用^[19]。5-FU是结肠癌治疗中广泛使用的抗肿瘤药物,通过靶向胸苷酸合酶抑制肿瘤细胞增殖,影响肿瘤细胞的分裂^[35]。目前5-FU是结肠癌的治疗的一线化疗药物,找寻新的药物与5-FU联合用药提高结肠癌治疗效果很有必要。本研究中发现结肠癌细胞中PEV与5-FU联合用药治疗效果优于5-FU单独使用,在药物处理组中最大程度地抑制细胞增殖、促进细胞衰老,所以我们推测细胞衰老或许可以增加结肠癌对5-FU等化疗药物的抗肿瘤作用,同时进一步加剧细胞的衰老。

P21、P27、P53和P62参与细胞衰老^[36-38]。细胞在衰老过程中会生成复杂的分泌体,包括IL-8、IL-6、PAI-1和胰岛素样生长因子结合蛋白7(insulin like growth factor binding protein 7, IGFBP7),促进细胞衰老、生长停滞^[39]。衰老细胞表现出特定的表型,包括核形态改变和转录组学的变化^[40],其中LaminB1(核层的主要成分)的显著丢失是细胞发生衰老的标志^[41]。我们通过细胞实验发现PEV单药处理以及PEV与5-FU联合处理的结肠癌细胞P62、PAI-1表达水平增加及LaminB1缺失。这提示我们结肠癌细胞在PEV单药处理以及PEV与5-FU联合处理后细胞出现明显衰老。与此同时我们也发现在5-FU单药处理后,半乳糖苷酶的活性以及衰老相关蛋白并未发生明显改变,但PEV与5-FU联合处



A: PEV给药组、5-FU给药组、PEV与5-FU联合给药组以及溶剂组HT29源性的肿瘤组织蛋白衰老相关蛋白表达情况; B: P21、P27、P62、PAI-1表达量的定量统计分析; ns: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: expression of HT29-derived tumor tissue protein senescence related proteins in PEV administration group, 5-FU administration group, PEV combined with 5-FU administration group, and solvent group; B: quantitative statistical analysis of P21, P27, P62, PAI-1 expression; ns: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图9 Western blot检测皮下肿瘤组织衰老相关蛋白表达情况

Fig.9 Western blot analysis of age-related protein expression in subcutaneous tumor tissue

理, 较PEV单药处理, P62、PAI-1、LaminB1变化更为明显。同时我们也在动物水平通过裸鼠皮下成瘤实验验证PEV促进细胞衰老, 提高结肠癌细胞对5-FU的敏感性的结论。我们从肿瘤的生长速度、肿瘤的质量以及肿瘤组织免疫组化染色阳性率等多个维度进行分析, 结果提示PEV单药处理与5-FU单药处理对肿瘤体积大小和质量的抑制情况没有较大差异, 均可以起到抑制肿瘤增殖的效果, 但PEV与5-FU联合使用对肿瘤增殖的抑制作用最为明显, 并且我们通过免疫组化染色也发现PEV、5-FU联合处理组P62、P21衰老相关蛋白也发生明显变化。

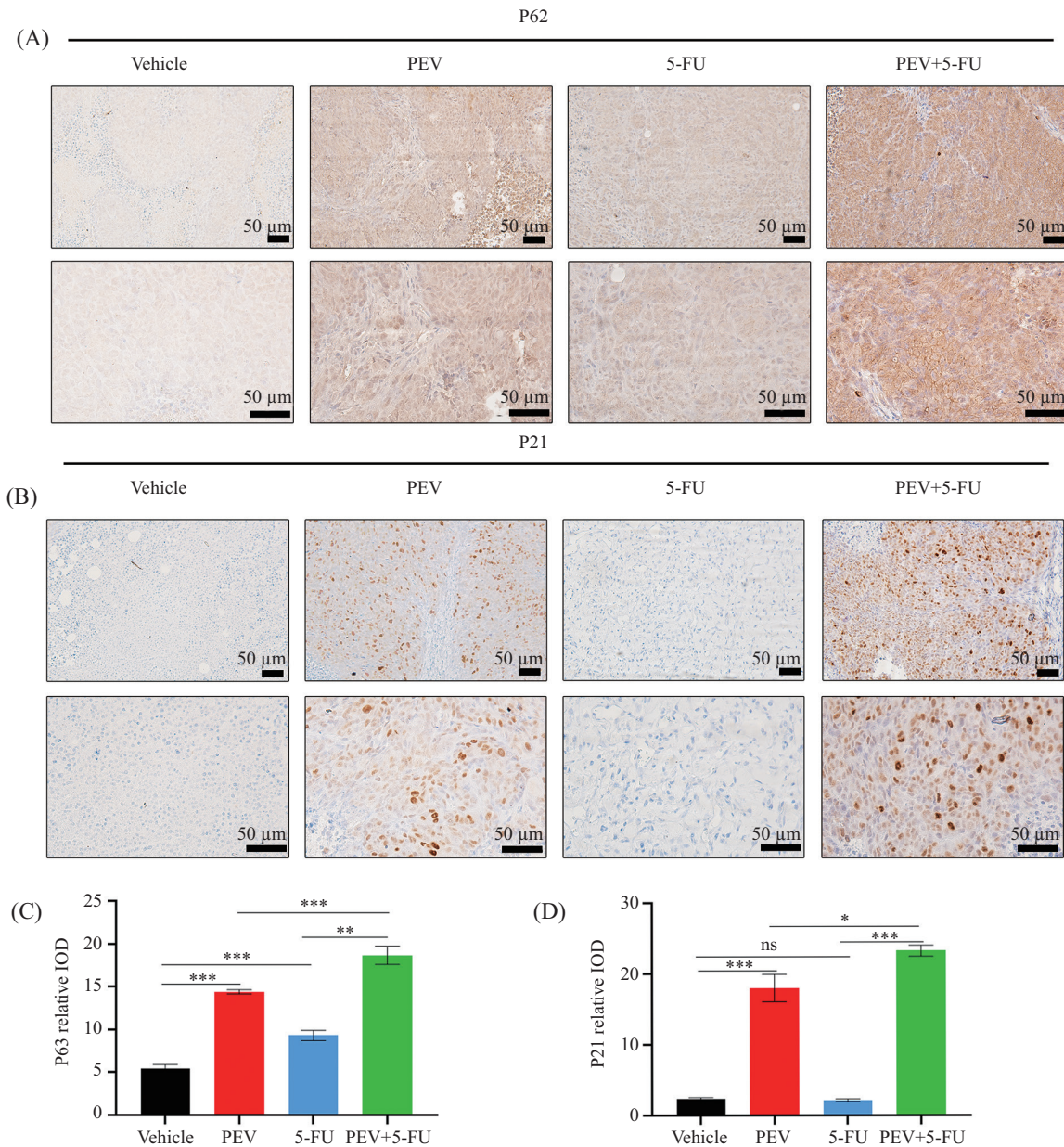
目前, 在很多肿瘤中都发现了细胞衰老与化疗药物的疗效密切相关。诱导卵巢癌细胞衰老可以降低化疗剂量和肿瘤的抗凋亡能力^[26,42]。卵巢癌细胞中可以通过抑制细胞衰老而增强细胞对化疗药物的耐药性^[43]。与此同时还有研究报道可以通过细胞衰老来治疗癌症并且规避基因毒性化疗药物的耐药性^[44]。我们的研究从体内外共同验证了PEV促进了结肠癌细胞衰老, 提高了5-FU对结肠癌的治疗效果, 从而抑

制了细胞的增殖, 加剧了细胞衰老的猜想。

综上所述, 我们实验证明PEV促进结肠癌细胞衰老, 导致衰老相关蛋白P21、P27、P62、PAI-1等蛋白表达水平升高及LaminB1表达水平降低, 同时衰老细胞对5-FU的敏感性增加, 抑制了结肠癌细胞的增殖。本研究从细胞衰老层面阐述肿瘤治疗的新方向, 但PEV具体是通过作用于什么分子靶点导致细胞衰老提高5-FU抗肿瘤作用的还有待更深一步的研究。

参考文献 (Reference)

- [1] ZHENG R S, CHEN R, HAN B F, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. JNCC, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] HEERVÄ E, LAVONIUS M, JAAKKOLA P, et al. Overall survival and metastasis resections in patients with metastatic colorectal cancer using electronic medical records [J]. J Gastrointest Cancer, 2018, 49(3): 245-51.
- [3] ZENG Q, GONG Y, ZHU N, et al. Lipids and lipid metabolism in cellular senescence: emerging targets for age-related diseases [J]. Ageing Res Rev, 2024, 97: 102294.
- [4] SCHMITT C A, WANG B, DEMARIA M. Senescence and cancer-role and therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(10): 619-36.



A: 代表性HT29源性肿瘤组织中P62蛋白免疫组化染色; B: 代表性HT29源性肿瘤组织中P21蛋白免疫组化染色; C: P62蛋白免疫组化阳性强度统计; D: P21蛋白免疫组化阳性强度统计。ns: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: immunohistochemical staining of P62 protein in representative HT29-derived tumor tissues; B: immunohistochemical staining of P21 protein in representative HT29-derived tumor tissues; C: P62 protein immunohistochemical positive intensity statistics; D: P21 protein immunohistochemical positive intensity statistics. ns: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图10 免疫组化实验检测裸鼠皮下成瘤组织切片中衰老相关蛋白的表达情况

Fig.10 Expression of senescence-related proteins in subcutaneous tumor tissue of nude mice detected by immunohistochemistry

- [5] ZENG Q, GONG Y, ZHU N, et al. Lipids and lipid metabolism in cellular senescence: emerging targets for age-related diseases [J]. Ageing Res Rev, 2024: 102294.
- [6] SAUL D, KOSINSKY R L. Single-cell transcriptomics reveals the expression of aging- and senescence-associated genes in distinct cancer cell populations [J]. Cells, 2021, 10(11): 3126.
- [7] HUANG Z, GAN S, ZHUANG X, et al. Artesunate inhibits the cell growth in colorectal cancer by promoting ROS-dependent cell senescence and autophagy [J]. Cells, 2022, 11(16): 2472.
- [8] BAELL J B, LEAVER D J, HERMANS S J, et al. Inhibitors of histone acetyltransferases KAT6A/B induce senescence and arrest tumour growth [J]. Nature, 2018, 560(7717): 253-7.
- [9] CHOU J, KALLER M, JAECKEL S, et al. AP4 suppresses DNA damage, chromosomal instability and senescence via inducing MDC1/Mediator of DNA damage checkpoint 1 and repressing MIR22HG/miR-22-3p [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 120.
- [10] PAN W W, ZHOU J J, YU C, et al. Ubiquitin E3 ligase CRL4 (CDT2/DCAF2) as a potential chemotherapeutic target for ovar-

- ian surface epithelial cancer [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(41): 29680-91.
- [11] SOUCY T A, SMITH P G, MILHOLLEN M A, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer [J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 732-6.
- [12] XU T, MA Q, LI Y, et al. A small molecule inhibitor of the UBE2F-CRL5 axis induces apoptosis and radiosensitization in lung cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 354.
- [13] LI L, KANG J, ZHANG W, et al. Validation of NEDD8-conjugating enzyme UBC12 as a new therapeutic target in lung cancer [J]. *EBioMedicine*, 2019, 45: 81-91.
- [14] WANG S, XIAN J, LI L, et al. NEDD8-conjugating enzyme UBC12 as a novel therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 123.
- [15] ZHOU W, XU J, LI H, et al. Neddylation E2 UBE2F promotes the survival of lung cancer cells by activating CRL5 to degrade NOXA via the K11 linkage [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(4): 1104-16.
- [16] ZHOU L, ZHANG W, SUN Y, et al. Protein neddylation and its alterations in human cancers for targeted therapy [J]. *Cell Signal*, 2018, 44: 92-102.
- [17] WAN J, ZHU J, LI G, et al. Radiosensitization of human colorectal cancer cells by MLN4924: an inhibitor of NEDD8-activating enzyme [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2016, 15(4): 527-34.
- [18] SHAO Y, LIU Z, SONG X, et al. ALKBH5/YTHDF2-mediated m6A modification of circAFF2 enhances radiosensitivity of colorectal cancer by inhibiting Cullin neddylation [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(7): e1318.
- [19] WANG T, LI X, MA R, et al. Advancements in colorectal cancer research: unveiling the cellular and molecular mechanisms of neddylation [J]. *Int J Oncol*, 2024, 64(4): 39.
- [20] HEIDELBERGER C, CHAUDHURI N K, DANNEBERG P, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds [J]. *Nature*, 1957, 179(4561): 663-6.
- [21] LV Y, LI B, HAN K, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 suppresses colon cancer cell growth via triggering autophagy [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(6): 617-25.
- [22] SUN Y, BAECHLER S A, ZHANG X, et al. Targeting neddylation sensitizes colorectal cancer to topoisomerase I inhibitors by inactivating the DCAF13-CRL4 ubiquitin ligase complex [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3762.
- [23] CHEN M C, DEVI H S, PIEN H F, et al. Novel chromium (III)-based compound for inhibition of oxaliplatin-resistant colorectal cancer progression [J]. *Am J Cancer Res*, 2024, 14(3): 979-95.
- [24] TAO Y P, ZHU H Y, SHI Q Y, et al. S1PR1 regulates ovarian cancer cell senescence through the PDK1-LATS1/2-YAP pathway [J]. *Oncogene*, 2023, 42(47): 3491-502.
- [25] SERRANO M. Shifting senescence into quiescence by turning up p53 [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(21): 4256-7.
- [26] CALCINOTTO A, KOHLI J, ZAGATO E, et al. Cellular senescence: aging, cancer, and injury [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1047-78.
- [27] HERNANDEZ-SEGURA A, NEHME J, DEMARIA M. Hallmarks of cellular senescence [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(6): 436-53.
- [28] JIA L, LI H, SUN Y. Induction of p21-dependent senescence by an NAE inhibitor, MLN4924, as a mechanism of growth suppression [J]. *Neoplasia*, 2011, 13(6): 561-9.
- [29] FLORES J M, MARTÍN-CABALLERO J, GARCÍA-FERNÁNDEZ R A. p21 and p27 a shared senescence history [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(11): 1655-6.
- [30] XIE P, ZHANG M, HE S, et al. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3733.
- [31] KITTAI A S, DANILOVA O V, LAM V, et al. NEDD8-activating enzyme inhibition induces cell cycle arrest and anaphase catastrophe in malignant T-cells [J]. *Oncotarget*, 2021, 12(20): 2068-74.
- [32] LIU H, BEI Q, LUO X. MLN4924 inhibits cell proliferation by targeting the activated neddylation pathway in endometrial carcinoma [J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(6): 3000605211018592.
- [33] ZHANG Y, SHI C C, ZHANG H P, et al. MLN4924 suppresses neddylation and induces cell cycle arrest, senescence, and apoptosis in human osteosarcoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 45263-74.
- [34] PICCO G, PETTI C, SASSI F, et al. Efficacy of NEDD8 pathway inhibition in preclinical models of poorly differentiated, clinically aggressive colorectal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(2): djw209.
- [35] MISHRA J, DRUMMOND J, QUAZI S H, et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013, 86(3): 232-50.
- [36] SHUAI T, KHAN M R, ZHANG X D, et al. lncRNA TRMP-S directs dual mechanisms to regulate p27-mediated cellular senescence [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 24: 971-85.
- [37] ALZA L, NÀGER M, VISA A, et al. FAK inhibition induces glioblastoma cell senescence-like state through p62 and p27 [J]. *Cancers*, 2020, 12(5): 1086.
- [38] RUFINI A, TUCCI P, CELARDO I, et al. Senescence and aging: the critical roles of p53 [J]. *Oncogene*, 2013, 32(43): 5129-43.
- [39] BIRCH J, GIL J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues [J]. *Genes Dev*, 2020, 34(23/24): 1565-76.
- [40] SHIMOYAMA Y, YAMADA K, YOSHIDA S, et al. Inhibition of protein kinase C delta leads to cellular senescence to induce anti-tumor effects in colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(6): 2471-84.
- [41] MATIAS I, DINIZ L P, DAMICO I V, et al. Loss of lamin-B1 and defective nuclear morphology are hallmarks of astrocyte senescence *in vitro* and in the aging human hippocampus [J]. *Aging Cell*, 2022, 21(1): e13521.
- [42] WANG Z, LIU H, XU C. Cellular senescence in the treatment of ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28(5): 895-902.
- [43] SUN H, WANG H, WANG X, et al. Aurora-A/SOX8/FOXK1 signaling axis promotes chemoresistance via suppression of cell senescence and induction of glucose metabolism in ovarian cancer organoids and cells [J]. *Theranostics*, 2020, 10(15): 6928-45.
- [44] YAN Q, WAJAPPEYEE N. Exploiting cellular senescence to treat cancer and circumvent drug resistance [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(3): 166-75.