

MG132 联合 X 射线对非小细胞肺癌生长转移和凋亡的影响

刘 静 唐益庭 王 骁 申文豪 许 雯 朱 巍 张舒羽 曹建平

(苏州大学医学部放射医学与防护学院 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 探讨蛋白酶体抑制剂 MG132 联合 X 射线对非小细胞肺癌 H1299 细胞生长、转移侵袭和细胞凋亡的影响及机制。采用 MTT 法检测不同 MG132 浓度不同时间处理后肺癌 H1299 细胞的增殖; Transwell 小室实验测定肺癌细胞的迁移和侵袭能力; 流式细胞术测定肺癌细胞的凋亡; Western-blot 法测定蛋白表达水平。结果表明, MG132 能明显抑制 H1299 细胞的生长, 并呈现剂量-效应和处理时间-效应关系; MG132 在无毒性剂量下联合 X 射线可显著抑制 H1299 细胞的迁移及侵袭能力, 并明显诱导细胞凋亡; MG132 能明显降低 H1299 细胞的基质金属蛋白酶-2、-9 的表达水平, 降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平, 同时增加凋亡蛋白 Bax 的表达水平。提示 MG132 可以显著抑制人非小细胞肺癌 H1299 细胞的生长, 且在无毒性剂量下联合 X 射线可以明显降低癌细胞转移和侵袭能力, 能显著加强 X 射线诱导的细胞凋亡作用。

关键词 蛋白酶体抑制剂, MG132, X 射线辐照, 非小细胞肺癌, 生长转移, 凋亡

中图分类号 R811.5

在人类群体中, 非小细胞肺癌(NSCLC)成为癌症相关死亡的首要原因。放射治疗几乎是各型肺癌的常规疗法, 但受限于肿瘤周围正常组织的耐受力 and 存在于固体肿瘤的缺氧区, 使得放疗疗效大打折扣, 一直以来肺癌的总体治愈率和生存率都持续在低水平上^[1-3]。目前临床上通常将抗肿瘤药物与电离辐射联合使用以弥补上述的负面影响, 特别是对于 NSCLC 患者, 放化疗有利于提高生存率, 减少病人的治疗剂量和毒副作用, 故筛选和发展一系列可以加强放疗疗效的辐射增敏剂逐渐受到人们的重视^[4-6]。

蛋白酶体对于调控细胞周期, 细胞增殖和转移, 细胞凋亡, 血管生成, 以及放化疗抵抗等发挥着核心作用, 而蛋白酶体的抑制剂, 如硼替佐米(硼酸二肽衍生物)和 MG132(苯酯基 1-亮氨酸 1-亮氨酸 1-亮氨酸 1-H), 具有显著的抗肿瘤活性^[7-11]。有研究表明^[12]: 蛋白酶体抑制剂可以作为 DNA 损伤剂、电离辐射和 DNA 交联剂的增敏剂而发挥抗肿瘤作用。还有报道称^[13-16]: 硼替佐米与电离辐射联合使用能够显著抑制肿瘤细胞中 NF- κ B 的表达, 诱导肿瘤细胞凋亡增加, 增强电离辐射的敏感性, 改

善肿瘤放疗疗效。

然而, 前人在蛋白酶体抑制剂发挥抗肿瘤作用的相关研究中使用的剂量较高($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 并不适用于人类癌症的临床治疗, 且关于蛋白酶体抑制剂联合 X 射线对肿瘤细胞的生长转移作用及相关机制的研究甚少。因此本研究将在一个无毒剂量($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)下探讨 MG132 联合 X 射线对人非小细胞肺癌 H1299 细胞生长转移和凋亡的影响及可能的机制如何, 为 MG132 应用于肺癌放射治疗提供临床依据。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

MG132 购于美国 Sigma 公司, 白色粉末状晶体。二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司)溶解配成 $2000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的原液, 超滤除菌备用; 胎牛血清、RPMI-1640 培养基(HyClone 公司, 美国); 噻唑蓝(MTT), 碘化丙啶(PI)(碧云天公司); Bcl-2、Bax 抗体(Santa Cruz 公司, 美国); MMP-2、MMP-9 抗体(Epitomics 公司, 美国)。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81172597、81102078)、江苏省高校重大科研项目(11KJA310001)、苏州大学“大学生创新性实验计划”资助

第一作者: 刘静, 女, 1984 年 11 月出生, 2009 年毕业于河北医科大学, 现为苏州大学医学部放射医学与防护学院在读硕士研究生

通讯作者: 曹建平, Email: jpcap@suda.edu.cn; 张舒羽, Email: mathhavs@hotmail.com

收稿日期: 初稿 2013-03-19, 修回 2013-04-17

1.2 细胞培养和照射条件

H1299 细胞(购于中国科学院上海细胞库)培养于 37℃、5% CO₂ 孵箱中。用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 1640 培养基培养,每 3-4 d 传代一次。采用医用直线加速器照射,剂量率为 200cGy/min,源皮距(Source skin distance, SSD) = 100 cm,照射野 10 cm×10 cm,细胞表面覆有约 1.5 cm 厚的补偿膜。

1.3 MTT 法细胞存活试验

取对数生长期的 H1299 细胞(浓度 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)接种于 96 孔板上,200 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,贴壁后加 MG132 (浓度梯度为 0、0.1、0.5、1.0、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每种浓度平行 5 孔,设立空白对照,实验重复 3 次。各实验组分别在加药 24 h 和 48 h 后加入 20 μg MTT ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),继续孵育 4 h,弃上清加入 100 μL 的 DMSO,振荡混匀后置于酶标仪上测定吸光度(A)值(570 nm,参考波长 630 nm)。肿瘤细胞存活率(%) = 实验组 A 值/对照组 A 值×100%。

1.4 Transwell 细胞迁移实验

选取 8.0 μm 膜的 24 孔 Transwell 小室(Coming 公司,美国)备用,实验分为 4 组:对照组、MG132 组(0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、照射组(4Gy)、照射+MG132 组(0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MG132 作用 6 h 后 4Gy 照射)。照后 24 h 将各组细胞用不含血清的培养基重悬,计数 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 后分别加入上室,每室 100 μL ,下室加入 500 μL 含 10%胎牛血清的培养基,每组设 3 个复孔。培养 24 h 后取出上室,下室加入 50 μg 新配制浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT,37℃,4 h 后取出,弃上清加入 500 μL 的 DMSO,振荡混匀后置于酶标仪上选取波长为 570 nm,以 630 nm 为参考波长测定吸光度(A)值。细胞迁移率(%) = 实验组 A 值/对照组 A 值×100%。实验重复 3 次。

1.5 Transwell 细胞侵袭实验

在 24 孔 Transwell 小室(Coming 公司,美国)滤膜上方涂敷人工基膜(Matrigel) 50 μL ,放置于 37℃ 培养箱孵育 5 h,使其形成凝胶状。实验方法同 1.4。培养 24 h 后取出滤膜,小心用棉球棒擦掉小室内表面未穿过膜的细胞,甲醛固定后结晶紫染色,至倒置显微镜下计数膜背面的细胞数,随机计数 10 个视野,取平均值。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞仪测定细胞凋亡

将对数生长期的 H1299 细胞制成细胞悬液,取 10^5 个细胞接种于 25 mL 培养瓶中,实验分为 4 组:对照组、MG132 组(0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、照射组(4 Gy)、照射+MG132 组(0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MG132 作用 6 h 后 4 Gy 照射),每组设 3 个平行样。照后立即换液,继续培养 48 h 后胰酶消化收集细胞,制备单细胞悬液,计数并调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,用预冷的 PBS 洗两遍,悬浮细胞,AnnexinV 和 PI 染色室温避光作用 15 min 后流式细胞仪检测凋亡(美国 BD 公司)。实验重复 3 次。

1.7 Western blotting 检测蛋白水平变化

将对数生长期的 H1299 细胞制成细胞悬液接种于细胞瓶中,于含 10%胎牛血清的 1640 培养基中培养过夜。实验分对照组、MG132 组(0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、照射组(8 Gy)和照射+MG132 组(0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MG132 作用 6 h 后 8 Gy 照射)。辐照后立即换液,48 h 后消化收集细胞,裂解细胞并提取全蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,与 SDS 蛋白上样缓冲液混匀,100℃变性 5 min,然后进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭后孵育抗体、化学发光,显影,定影。

1.8 统计学处理

所有统计学处理均在 SAS8.0 软件包中进行,各组数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较用 t 检验,多组均数比较用方差分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MG132 对人非小细胞肺癌 H1299 细胞的生长抑制作用

不同浓度的 MG132 分别孵育 24 h 和 48 h 后对 H1299 细胞的生长抑制作用结果见表 1。单因素方差分析结果表明,细胞存活率与 MG132 浓度及作用时间相关,呈现明显的剂量-效应和处理时间-效应关系,即随作用时间的延长和药物浓度的增大,细胞抑制作用越明显。差异具有统计学意义($^a p < 0.01$, $^b p < 0.01$)。

表 1 MG132 显著抑制体外肺癌细胞的存活率
Table 1 MG132 significantly inhibits growth of lung tumor cells *in vitro*.

MG132 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率 / %	Cell viability rate
	24 h	48 h
0	100.00	100.00
0.1	94.57 ± 1.8771^a	$68.72 \pm 2.1347^{a,b}$
0.5	68.68 ± 1.9666^a	$29.71 \pm 2.0888^{a,b}$
1	36.48 ± 4.7620^a	$11.73 \pm 1.2757^{a,b}$
5	21.73 ± 3.1638^a	$5.97 \pm 1.6426^{a,b}$
10	14.09 ± 3.1105^a	$2.61 \pm 0.7069^{a,b}$

注: 肺癌 H1299 细胞经不同浓度 MG132 ($0\sim 10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 24 和 48 h 后, 细胞存活率经 MTT 实验检测($^ap<0.01$, $^bp<0.01$)。实验结果表明 MG132 可明显抑制 H1299 细胞增殖能力

Note: Lung tumor cells (H1299) were treated with MG132 at the indicated concentrations (0 to $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 and 48 h and cell viability was measured with the MTT assay ($^ap<0.01$, $^bp<0.01$). The results show that MG132 leads to the suppression of cellular proliferation in H1299 cells

2.2 MG132 联合 X 射线对人非小细胞肺癌 H1299 细胞迁移的抑制作用

MG132 能显著抑制 H1299 细胞迁移, 各处理组肺癌细胞相对迁移率如图 1 所示。MG132 组、照射组和 MG132+照射组细胞相对迁移率具体数值分别为($84.00\pm 8.0785\%$)、($74.04\pm 3.7707\%$)和($44.24\pm 4.4868\%$); 与对照组比较, 细胞经 $0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的

MG132 预处理 6 h 后联合 4 Gy X 射线照射组的细胞迁移率下降最明显 ($^*p<0.05$)。

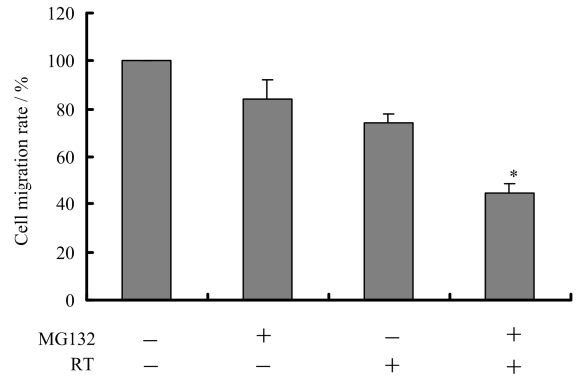


图 1 照射和/或蛋白酶抑制剂处理后细胞迁移力的影响。与对照组相比, $0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MG132 预处理细胞 6 h 后再联合 4 Gy X 射线照射组的细胞迁移力下降显著

Fig.1 Cell migration after radiation and/or proteasome inhibition. There was a significant difference between the control group and the group pretreated with $0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MG132 and then exposed to 4 Gy radiation ($^*p<0.05$, $n=3$)

2.3 MG132 联合 X 射线对人非小细胞肺癌 H1299 细胞侵袭的抑制作用

MG132 能显著抑制 H1299 细胞侵袭, 各处理组肺癌细胞相对侵袭率如图 2 所示。

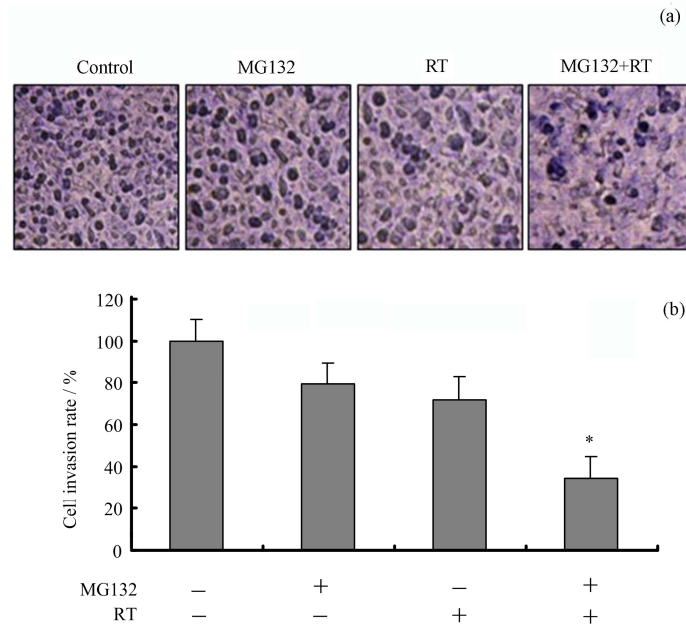


图 2 照射和/或蛋白酶抑制剂处理后细胞侵袭力的影响: (a) 穿过基质胶的 H1299 细胞经结晶紫液染色($\times 400$); (b) 与对照组相比, $0.1\ \mu\text{mol/L}$ 的 MG132 预处理细胞 6 h 后再联合 4 Gy X 射线照射组的细胞侵袭力下降显著

Fig.2 Cell invasion after radiation and/or proteasome inhibition: (a) H1299 cells through the matrigel were stained by Crystal Violet Solution ($\times 400$); (b) There was a significant difference between the control group and the group pretreated with $0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MG132 and then exposed to 4 Gy radiation ($^*p<0.05$, $n=3$)

MG132 组、照射组和 MG132+照射组细胞相对侵袭率分别为 $(79.51 \pm 10.1462)\%$ 、 $(71.73 \pm 10.9489)\%$ 和 $(34.63 \pm 9.9577)\%$ ；与对照组相比，细胞经过 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MG132 预处理 6 h 后联合 4 Gy X 射线照射组的细胞侵袭率下降最明显 ($*p < 0.05$)。

2.4 流式细胞仪检测 MG132 对 X 射线诱导人非小细胞肺癌 H1299 细胞凋亡的影响

各组细胞经 AnnexinV/PI 双染后经流式细胞仪检测细胞凋亡率，结果如图 3 所示。单纯 MG132 组与对照组比较凋亡率差异不明显；但随着照射剂量的增加，加药组和不加药组的细胞凋亡率均明显增加 ($*p < 0.05$)，且 MG132 与射线联合作用组增加最为明显，达到了 $(11.44 \pm 0.90)\%$ ，对比对照组为 $(2.20 \pm 0.18)\%$ ($\#p < 0.05$)。结果表明：MG132 可对 X 射线诱导非小细胞肺癌 H1299 细胞凋亡有显著加强的作用。

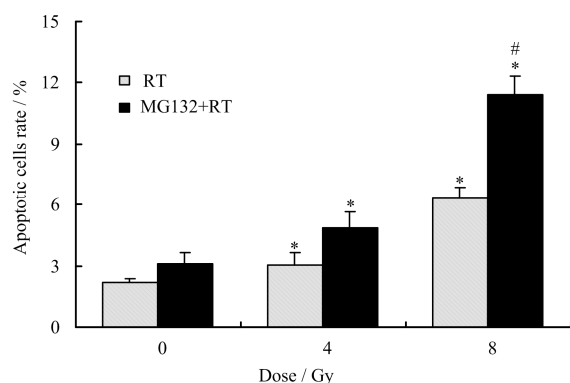


图3 照射和/或蛋白酶体抑制剂处理后 H1299 的凋亡细胞经流式细胞术检测结果 (*与对照组比较, $p < 0.05$; #与 4 Gy 照射组, MG132+4 Gy 照射组以及 8 Gy 照射组比较, $p < 0.05$, $n = 3$)

Fig.3 Apoptosis after radiation and/or MG132 of H1299 cells analyzed by flow cytometry. (*compared with control group, $p < 0.05$; # compared with 4 Gy RT group, MG132+4Gy group, and 8 Gy RT group. $p < 0.05$, $n = 3$)

2.5 MG132 联合 X 射线对人非小细胞肺癌 H1299 细胞中基质金属蛋白酶-2, -9 (MMP-2, -9), 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2, 以及凋亡蛋白 Bax 表达水平的影响

为了进一步了解 MG132 联合 X 射线发挥抗肿瘤作用的机制如何，我们选择了两种细胞侵袭蛋白 MMP-2, -9 和凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2, 来研究 MG132 联合 X 射线对肿瘤细胞中上述蛋白表达的影响。如图 4 所示，与对照组比较，经 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MG132 预处理细胞 6 h 后联合 8Gy X 射线照射，

照射后 48 h 细胞中凋亡蛋白 Bax 表达明显增高，而 MMP-2、-9 蛋白和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达则明显降低。

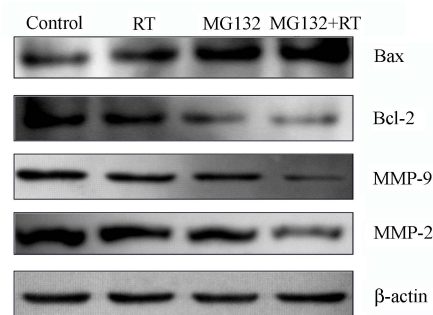


图4 MG132 加强照射诱导的 H1299 细胞中凋亡和侵袭相关基因表达水平的变化。Western blot 实验结果表明 MG132 联合 X 射线照射后能显著抑制侵袭相关基因(MMP-2 和 MMP-9)和抗凋亡基因 Bcl-2 的表达，同时增强促凋亡基因 Bax 的表达

Fig.4 MG132 enhances radiation to inhibit the expression of apoptosis and invasion genes in H1299 cells. Western blot shows that MG132 in combination with RT inhibits the gene expression that regulates invasion (MMP-2 and MMP-9), anti-apoptosis (Bcl-2), and pro-apoptosis (Bax)

3 讨论

非小细胞肺癌占肺癌总数的 80%，是最为常见的肺癌，主要包括腺癌、鳞状细胞癌、大细胞未分化癌三类，其对于传统放化疗敏感性较差，故一直以来肺癌总体治愈率和生存率都持续在低水平上，IV 期患者 1 年生存率约 40%，一般 5 年生存率仅为 1%—2%^[1-3]。为延长肺癌患者生存期，减少治疗剂量和毒副作用，提高病人生存质量，临床上一般将抗肿瘤药物与电离辐射联合使用。因此，不断筛选和发展一系列可以加强放疗疗效的辐射增敏剂，逐渐受到人们的重视^[4-6]。

近年来，泛素-蛋白酶体系统 (UPS) 逐渐成为肿瘤治疗研究的新目标。有研究表明^[7-9]：调节泛素-蛋白酶体系统能够在蛋白水平上调节有关细胞凋亡，细胞周期进程，以及基因转录相关重要蛋白质的表达，包括 Caspase 家族、Bcl-2 家族、细胞周期蛋白依赖性激酶以及核转录因子 κB (NF- κB) 等。由于蛋白酶体负责降解细胞内 80% 的蛋白质，应用蛋白酶抑制剂能够同时触发细胞内肿瘤抑制和促存活相关的信号通路^[10,11]。干扰细胞内促凋亡和抗凋亡信号之间的平衡，促进多种肿瘤细胞系发生周期阻滞和细胞凋亡，从而使得肿瘤向着生长抑制和转移减少的方向发展。MG132 (苄酯基 1-亮氨酸 1-亮氨酸 1-亮氨酸 1-H) 是一种强效的可逆的，具有

细胞通透性的蛋白酶体抑制剂,可与 20S 和 26S 蛋白酶体结合并使其失活。研究表明^[12]:蛋白酶体抑制剂,包括硼替佐米和 MG132,具有显著的抗肿瘤活性,其能够对广泛范围的肿瘤细胞系造成独特而强有力的细胞毒性作用,其中包括有非小细胞肺癌,结肠癌,中枢神经系统肿瘤,黑色素瘤,卵巢癌,肾癌,前列腺癌,以及乳腺癌等。在肿瘤治疗中,蛋白酶体抑制剂被称为是 DNA 损伤剂、电离辐射以及 DNA 交联剂的强效增敏剂。再如在雄激素非依赖性人前列腺癌细胞以及头颈部和结直肠癌模型中,硼替佐米和电离辐射的联合使用能显著抑制与肿瘤生长相关的 NF- κ B 表达,诱导增加肿瘤细胞凋亡^[13-16]。还有报道称^[17-19]:MG132 能够通过抑制 NF- κ B 的表达,增强 PC-3 前列腺癌细胞对电离辐射的敏感性,同时,改善 NSCLC 的放疗疗效。然而,前人在蛋白酶体抑制剂发挥抗肿瘤作用的相关研究中使用的剂量较高 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),并不适用于人类癌症的临床治疗,且关于蛋白酶体抑制剂联合 X 射线对肿瘤细胞的生长转移作用及相关机制的研究甚少。因此在本研究中,我们将主要通过体外试验,在一个无毒剂量 ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下探讨蛋白酶体抑制剂 MG132 联合 X 射线对非小细胞肺癌 H1299 细胞生长、转移侵袭、细胞凋亡的影响及机制如何,为 MG132 应用于肺癌放射治疗提供临床依据。

在本实验中发现:MG132 可以显著抑制肺癌 H1299 细胞的生长,且在无毒性剂量 ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下联合 X 射线可以明显降低肺癌细胞转移和侵袭能力,显著加强 X 射线诱导的肺癌 H1299 细胞凋亡作用。在人类肺腺癌 H1299 细胞中,MG132 在无明显细胞损伤的药物浓度 ($<10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下,其自身就能够导致显著的细胞毒性作用,并呈现明显的剂量-效应关系和处理时间-效应关系。然而, H1299 细胞经 MG132 ($0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和射线联合作用后其细胞迁移率、细胞侵袭率和细胞凋亡率均增加明显,与其它各组相比,差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。需要强调的是,我们的研究优势在于 MG132 的使用浓度维持在无毒水平上,即 $0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MG132 作用肺癌 H1299 细胞 24 h 后细胞存活率达 90% 以上。我们用上述剂量的 MG132 联合射线多次重复各项试验,有效地修正了 MG132 本身活性对实验的影响。实验结果证明:与先前专家们所建议使用高剂量 MG132 联合射线不同,使用小于临床使用量的 MG132 是具有一定可行性的^[19]。因此,

我们的研究结果或许能够为日后改善人类肺癌放疗疗效而提供临床依据。

其次还发现,由 MG132 联合 X 射线后所导致的肺癌 H1299 细胞侵袭率减低和细胞凋亡增加的机制是通过下调基质金属蛋白酶-2、-9 和细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,同时上调凋亡蛋白 Bax 的表达而实现的。然而上述基因表达改变的具体机制又是怎样的呢?有研究称:肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤经 MG132 和射线处理后,组织中 c-Myc 的表达水平显著下调,而凋亡显著增强。而 c-Myc 表达改变可强有力的调控细胞生长增殖,分化以及凋亡^[20,21]。尽管 MG132 联合射线作用后介导下调 c-Myc 蛋白表达的机制尚未明确,但是根据最近的报道表明 β -catenin 可能参与其中^[22],即 MG132 能够导致 β -catenin 裂解,进而导致 c-Myc 的信使 RNA 表达降低。除此之外,我们知道 NF- κ B 能够调控各种基因的表达,包括参与细胞增殖的基因(COX-2, cyclin D1),细胞侵袭基因(MMP-2, -9),细胞凋亡相关基因(Survivin, bcl-2, bax),血管生成基因(VEGF)等。且在研究姜黄素增加人结直肠癌对希罗达的化疗敏感性的机制是发现:NF- κ B 通路起到至关重要的作用,抑制 NF- κ B 的激活将降低化疗抵抗性^[23]。这些都将为下一步研究细胞内可能的信号通路指明了方向。

参考文献

- 1 Jemal A, Thun M J, Ries L A, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control [J]. J Natl Cancer Inst, 2008, **100**(23): 1672-1694
- 2 O'Rourke N, Roque I F M, Farre Bernado N, *et al.* Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2010(6): CD002140
- 3 Overgaard J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored [J]. J Clin Oncol, 2007, **25**: 4066-4074
- 4 Sandler A. State-of-the-art treatment for advanced non-small-cell lung cancer [J]. Oncology, 2003, **17**: 15-22
- 5 Choi E K, Terai K, Ji I M, *et al.* Upregulation of NAD (P) H: quinone oxidoreductase by radiation potentiates the

- effect of bioreductive beta-lapachone on cancer cells [J]. Neoplasia, 2007, **9**: 634–642
- 6 Jeong S Y, Park S J, Yoon S M, *et al.* Systemic delivery and preclinical evaluation of Au nanoparticle containing beta-lapachone for radiosensitization [J]. J Control Release, 2009, **139**: 239–245
- 7 Sorokin A V, Kim E R, Ovchinnikov L P. Proteasome system of protein degradation and processing [J]. Biochemistry (Moscow), 2009, **74**(13): 1411–1442
- 8 Wu W K K, Cho C H, Lee C W, *et al.* Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment [J]. Cancer letters, 2010, **293**(1): 15–22
- 9 Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs [J]. Cancer cell, 2004, **5**: 417–421
- 10 Goktas S, Baran Y, Ural A U, *et al.* Proteasome inhibitor bortezomib increases radiation sensitivity in androgen independent human prostate cancer cells [J]. Urology, 2010, **75**: 793–798
- 11 Han Y H, Moon H J, You B R, *et al.* The attenuation of MG132, a proteasome inhibitor, induced A549 lung cancer cell death by p38 inhibitor in ROS-independent manner [J]. Oncol Res, 2010, **18**: 315–322
- 12 Orlowski R Z, Kuhn D J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade [J]. Clin Cancer Res, 2008, **14**: 1649–1657
- 13 Van Waes C, Chang A A, Lebowitz P F, *et al.* Inhibition of nuclear factor-kappaB and target genes during combined therapy with proteasome inhibitor bortezomib and reirradiation in patients with recurrent head-and-neck squamous cell carcinoma [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, **63**: 1400–1412
- 14 Shah S, Potter M, Callery M. Ubiquitin proteasome pathway: Implications and advances in cancer therapy [J]. Surg Oncol, 2001, **10**: 43–52
- 15 Adams J. Proteasome inhibitors as new anticancer drugs [J]. Curr Opin Oncol, 2002, **14**: 628–634
- 16 Adams J. The proteasome: A suitable antineoplastic target [J]. Nat Rev Cancer, 2004, **4**: 349–360
- 17 Pajonk F, van Ophoven A, Weissenberger C, *et al.* The proteasome inhibitor MG-132 sensitizes PC-3 prostate cancer cells to ionizing radiation by a DNA-PK-independent mechanism [J]. BMC Cancer, 2005, **5**: 76
- 18 Warren G, Grimes K, Xu Y, *et al.* Selectively enhanced radiation sensitivity in prostate cancer cells associated with proteasome inhibition [J]. Oncol Rep, 2006, **15**: 1287–1291
- 19 Grimes K R, Daosukho C, Zhao Y, *et al.* Proteasome inhibition improves fractionated radiation treatment against non-small cell lung cancer: an antioxidant connection [J]. Int J Oncol, 2005, **27**: 1047–1052
- 20 Meyer N, Penn L Z. Reflecting on 25 years with MYC [J]. Nat Rev Cancer, 2008, **8**: 976–990
- 21 Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death [J]. Nat Rev Cancer, 2002, **2**: 764–776
- 22 Cervello M, Giannitrapani L, La Rosa M, *et al.* Induction of apoptosis by the proteasome inhibitor MG132 in human HCC cells: Possible correlation with specific caspase-dependent cleavage of beta-catenin and inhibition of beta-catenin-mediated transactivation [J]. Int J Mol Med, 2004, **13**: 741–748
- 23 Kunnumakkara A B, Diagaradjane P, Anand P, *et al.* Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model [J]. Int J Cancer, 2009, **125**: 2187–2197

Effects of proteasome inhibition on growth, metastasis, and apoptosis of non-small cell lung cancer induced by X-rays irradiation

LIU Jing TANG Yiting WANG Xiao SHEN Wenhao

XU Wen ZHU Wei ZHANG Shuyu CAO Jianping

(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, School of Radiation Medicine and Protection,
Medical College of Soochow University, Suzhou, 215123, China)

ABSTRACT After H1299 cells were treated with MG132, the cellular proliferation was detected by MTT assay; Transwell migration assay was used to determine the migration and invasion ability of H1299 cells *in vitro*.; changes of cell apoptosis were analyzed by flow cytometry assay; Western blot assay was employed to measure the protein expression. The results show that MG132 alone inhibits cell growth in H1299 cells, in a dose- and time-dependent manner; MG132 in combination with radiation significantly suppresses the migration and invasion of H1299 cells; MG132 enhances radiation-induced apoptosis in H1299 cells. The apoptosis rate of MG132+RT group is up to (11.44±0.90)%; the expression of MMP-2, -9, Bcl-2 is significantly suppressed by MG132 in combination with radiation, while the expression of Bax is up-regulated relatively. The present findings demonstrate that MG132 inhibits the cell growth in lung cancer, the migration and invasion ability of H1299 cells treated by MG132 in combination with radiation is significantly suppressed, while the apoptosis rate increases relatively. The mechanism may be associated with MMPs and Bcl-2 down-regulation, as well as Bax up-regulation.

KEYWORDS Proteasome inhibition, MG132, X-rays irradiation, Non-small cell lung cancer, Cell growth and metastasis, Apoptosis

CLC R811.5