

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520141153560

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

GSNO 对子宫内膜癌的抑制作用及其机制初步研究

The Inhibitory Effect of GSNO to Endometrial Cancer and Preliminary Study of the Mechanisms

李清

指导教师姓名: 温兰玲 副教授

专业名称: 妇产科学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 近年来子宫内膜癌发病率不断上升,严重影响女性健康,目前子宫内膜癌治疗手段仍以传统的手术治疗为主,辅以放疗、化疗、内分泌治疗等,毒副作用大,对患者的生活质量及恢复造成不良影响。分子靶向治疗药物具有特异性强,毒副作用小等优势,成为目前肿瘤治疗界的研究热点。S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)已被证实对多种恶性肿瘤有治疗作用。本课题拟通过体内外实验,探究 GSNO 对子宫内膜癌细胞生长的抑制作用,并对其可能的作用机制进行初步探讨,为子宫内膜癌的分子靶向治疗提供新的思路。

方法: 采用 CCK8 法检测 GSNO 对子宫内膜癌细胞 HEC-1-A 以及 ishikawa 的生长抑制作用,通过 HE 染色法观察 GSNO 对细胞形态学的改变,利用流式细胞周期检测法、Western Blot法等对其作用机制进行初步探讨,并通过裸鼠皮下成瘤法进一步验证 GSNO 在体内的作用效果。

结果: (1) GSNO 对子宫内膜癌细胞具有明显的生长抑制作用,并且其抑制效率随着浓度的增加和作用时间的延长而增加,在浓度为2.0mmol/L及作用24小时后,抑制效率明显提高,同时其对子宫内膜癌细胞的抑制效果明显强于正常二倍体细胞,差异具有统计学意义($P<0.05$)。(2) HE 染色结果显示:GSNO 使子宫内膜癌细胞呈现出凋亡形态,细胞贴壁不良,胞质皱缩,细胞核固缩、碎裂。

(3) GSNO 明显降低子宫内膜癌细胞内 STAT3 的磷酸化水平,并通过抑制细胞周期关键蛋白 CDK2、CDK4、cyclinA2 以及 cyclinD 的表达,促进细胞周期抑制蛋白 p21 的表达,使肿瘤细胞发生 G₁/S 期停滞。而对 NF- κ B 通路 p65、I κ B α 的高磷酸化以及 IKK- α 的高表达无明显效果。(4) 裸鼠皮下成瘤实验结果显示:相比于生理盐水对照组,接受 GSNO 治疗的裸鼠,皮下瘤体大小明显小于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),且治疗过程中裸鼠各项生理机能完好,未出现明显异常。

结论: (1) GSNO 对子宫内膜癌细胞具有生长抑制作用,这一作用效果呈剂量-时间依赖性,且对正常二倍体细胞的抑制作用明显弱于子宫内膜癌细胞,表现出很大程度的特异性。(2) GSNO 通过调节细胞周期关键蛋白的表达,使子

子宫内膜癌细胞发生 G1/S 期阻滞,从而使肿瘤细胞生长受到抑制。(3) GSNO 能够降低子宫内膜癌细胞内 STAT3 的磷酸化水平,进而逆转 JAK-STAT 通路的异常激活,抑制肿瘤细胞的增殖失控。(4) GSNO 对 NF- κ B 通路的异常激活无明显作用,不是其抑制子宫内膜癌细胞生长的机制。(5) GSNO 在体内同样具有抑制子宫内膜癌细胞生长的作用,且不对正常细胞、组织、器官产生损害,毒副作用小,是理想的分子靶向治疗药物。

关键字: GSNO; 子宫内膜癌; STAT3; 细胞周期

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

OBJECTIVE: The incidence of endometrial cancer is continually rising in recent years, seriously impact women's health. The treatment of endometrial cancer remains given to surgery, supplemented with radiotherapy, chemotherapy, endocrinotherapy and so on. All of these make serious toxic and side effects, badly impact on the patient's quality of life and recovery. Molecular targeted therapy is one kind of therapies with specificity and hypotoxicity, has been a new hotspot in anti-tumor field. S-nitroso glutathione (GSNO) has been confirmed that has a therapeutic effect on a variety of malignant tumors, and the mechanism of action has been carried out preliminarily. Our topic means to explore the inhibitory effect of GSNO to endometrial cancer cell growth are by both *in vivo* and *in vitro* experiments, and do a preliminary study on the mechanism, provide a new thought to endometrial cancer molecular targeted therapy.

METHODS: CCK8 is used to detect the inhibitory effect of GSNO to endometrial cancer cells, HEC-1-A and ishikawa. We use HE staining to observe the changes in cell morphology after treatment with GSNO. We employ flow cytometry cycle test, Western Blot etc. to make a preliminary study on the mechanism and then further verify the effect of GSNO to endometrial cancer *in vivo* by nude mice subcutaneous tumor formation experiment.

RESULTS: 1. GSNO has an obvious inhibitory effect to endometrial cancer, the inhibitory effect increased with the concentration and the time of therapy. When the concentration increased to 2.0 mmol/L, or the time of therapy reached 24h, the inhibitory efficiency increased significantly. At the same time, the inhibitory effect of GSNO to endometrial cancer is much more obvious than normal diploid cells, and the difference has statistical significance ($P < 0.05$). 2. HE staining results showed that the treatment of GSNO brought out the changes of apoptosis morphology of endometrial cancer cells. And the cell could not adhere to cell plate well, the cytoplasm shrank, the cell nucleus fractured and pyknosis occurred. 3. GSNO can significantly reduce the level of phosphorylation of STAT3 in endometrial cancer cells, and makes tumor

cell cycle arrest at G1 / S phase by inhibiting the expression of CD2, CDK4, cyclinA₂, cyclinD and prompting the expression of p12. Though it has no effect to the high phosphorylation levels of p65, I κ B α or high expression rate of IKK- α in NF- κ B pathway. 4. The nude mice subcutaneous tumor formation experiment shows that the size of subcutaneous tumors of the nude mice treated with GSNO are significantly smaller compared with normal saline control group, the difference has statistical significance (P<0.05).

CONCLUSION: 1. GSNO has an obvious inhibitory effect to endometrial cancer, the effect is dose-time dependent, and the inhibitory effect on normal diploid cells is much weaker than that on endometrial cancer cells, which shows that GSNO has a great specificity. 2. GSNO makes tumor cells cycle arrest at G1 / S phase by regulating the expression of cell cycle key proteins, therefore the tumor cell growth is restrained. 3. GSNO can reduce the level of phosphorylation of STAT3 in endometrial cancer cells, and reverse the abnormal activation of JAK-STAT pathways, consequently inhibit the proliferation of tumor cells out of control. 4. However, GSNO has no effect to the abnormal activation of the NF- κ B pathway, which might not be the mechanism of the inhibitory effect. 5. GSNO also has an inhibitory effect to the endometrial cancer cells, and do not damage normal cells, tissues or organs, the side effects is weak, might be an molecular targeted therapy drugs.

Keywords: GSNO Endometrial cancer STAT3 Cyclins

英文缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
GSNO	S-nitroso glutathione	S-亚硝基谷胱甘肽
GSH	glutathione	谷胱甘肽
EC	Endometrial cancer	子宫内膜癌
SCC	Squamous Cell Carcinoma	鳞状细胞癌
NO	Nitric Oxide	一氧化氮
CCK	Cell Counting Kit	细胞计数试剂盒
WST	water-soluble tetrazolium	水溶性四唑盐
CDK	cyclin-dependent kinases	周期蛋白依赖性激酶
JAK	Janus Kinase	两面神激酶
STAT	signal transduction and activators of transcription	信号传导与转录激活因子
NF- κ B	nuclear factor kappa-B	核因子 κ B
I κ B	inhibitor of nuclear factor kappa-B	核因子 κ B 抑制蛋白
IKK	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase	核因子 κ B 抑制蛋白激酶
IL	interleukin	白细胞介素
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮细胞生长因子
TAM	Tamoxifen	三苯氧胺
BMI	Body Mass Index	体质指数
SHBG	sex hormone-binding globulin	性激素结合球蛋白
IORT	Intraoperative radiation therapy	术中放疗
EBRT	External beam radiation therapy	体外放射治疗
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲亚砜

英文缩略词表

DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
kD	kilo Daltons	千道尔顿
PCR:	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
EM	electronic microscope	电子显微镜
PH	hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数
Luc	luciferase	荧光素酶
WB	westen blot	蛋白免疫印迹
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
SPF	Specific pathogen Free	无特定病原体
SPSS	statistical program for social science	社会科学统计程序
P	Probability	概率
PFS	Progression-free survival	无进展生存期
OS	Overall survival	总生存率
NIDVD	National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases	国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
英文缩略词表.....	V
第一章 前言.....	1
一 子宫内膜癌.....	1
1.1 子宫内膜癌发病的流行病学及危险因素.....	1
1.2 子宫内膜癌的治疗进展.....	3
二 GSNO.....	6
2.1 GSNO 在体内的生理作用.....	6
2.2 GSNO 对恶性肿瘤的作用.....	6
第二章 材料与方法.....	9
一 材料.....	9
1.1 主要仪器.....	9
1.2 主要耗材.....	10
1.3 菌株、质粒、细胞株和实验动物.....	10
1.4 常用试剂.....	11
1.5 常用溶液及培养基配制.....	12
二 方法.....	15
2.1 哺乳动物细胞培养.....	15
2.2 GSNO 制备.....	16
2.3 CCK8 法检测 GSNO 对子宫内膜癌细胞增殖的抑制作用.....	16
2.4 HE 染色观察 GSNO 对子宫内膜癌细胞 ishikawa 形态的影响.....	17
2.5 应用流式细胞仪检测 GSNO 对子宫内膜癌细胞周期的影响.....	17
2.6 蛋白质分析 (Western Blot).....	18
2.7 构建 pLV-luc 真核表达质粒.....	19
2.8 慢病毒法构建稳定表达荧光素酶的子宫内膜癌细胞株 ishikawa-luc.....	23
2.9 裸鼠皮下成瘤实验.....	23

第三章 结果	25
一 GSNO 对子宫内膜癌细胞具有明显的生长抑制作用	25
1.1 不同浓度的 GSNO 对子宫内膜癌细胞的影响	25
1.2 GSNO 作用不同时长对子宫内膜癌细胞的影响	26
二 GSNO 使子宫内膜癌细胞发生明显的形态改变	27
三 GSNO 可导致子宫内膜癌细胞发生 G1/S 期阻滞	27
四 Western Blot 检测细胞内蛋白质表达情况	28
4.1 GSNO 显著降低子宫内膜癌细胞内 STAT3 磷酸化水平	29
4.2 GSNO 对 NF- κ B 通路无明显影响	29
4.3 GSNO 调节细胞周期蛋白表达	30
五 裸鼠皮下成瘤实验	30
5.1 pLV-luc 真核表达质粒的构建	30
5.2 构建稳定表达荧光素酶的子宫内膜癌细胞株 ishikawa-luc	32
5.3 转染 pLV-puro-luc 质粒不影响 ishikawa 细胞生长	32
5.4 GSNO 在体内同样具有抑制子宫内膜癌细胞生长的作用	33
第四章 讨论	35
第五章 结论与展望	39
参考文献	40
致谢	43

CONTENTS

ABSTRACT IN CHINESE	I
ABSTRACT IN ENGLISH.....	III
ABBREVIATION	V
Chapter 1 INTRUCTION	1
— Endometrial cancer.....	1
1.1 The epidemiology and hazards of morbidity of endometrial cancer	1
2.1 The progress on treatment of endometrial cancer	3
二 GSNO	6
2.1 The physiological function of GSNO in vivo	6
2.2 The effect of GSNO to malignant tumor	6
Chapter 2 MATERIALS AND METHODS.....	9
— Materials	9
1.1 Instrument	9
1.2 Consumable.....	10
1.3 Strain, plasmid, cell line and experimental animal	10
1.4 Reagent	11
1.5 Preparation of solution and medium	12
二 Methods.....	15
2.1 Mammalian cell culture	15
2.2 Preparation of GSNO	16
2.3 The measure of inhibitory effection of GSNO to endometrial cancer by CCK8	16
2.4 The observation of the change of apoptosis morphology of endometrial cancer cell brought by GSNO through HE stain.....	17
2.5 The measure of effection og GSNO on cell cycle to endometrial cancer by flow cytometry cycle detection	17
2.6 Western Blot.....	18
2.7 Build pLV - luc eukaryotic expression plasmid.....	19
2.8 Build the endometrial cancer cell line ishiskawa-luc that stably expressed	

luciferase by lentivirus	23
2.9 Nude mice subcutaneously into tumor experiment.....	23
Chapter 3 RESULT.....	25
一 GSNO has an obvious inhibitory effect to endometrial cancer	25
1.1 The effecton of different concentrations of GSNO to endometrial cancer cell.....	25
1.2 The effecton of different action time of GSNO to endometrial cancer cell	26
二 GSNO brought an obvious change of apoptosis morphology on endometrial cancer cell	27
三 GSNO make tumor cell cycle stasis at G1 / S phase	27
四 The result of Western Blot	28
4.1 GSNO can reduce the level of phosphorylation of STAT3 in endometrial cancer cells.....	29
4.2 GSNO has no effect on NF-κB pathway.....	29
4.3 GSNO can regulate the expression of cell cycle key protein.....	30
五 Nude mice subcutaneously into tumor experiment	30
5.1 Build pLV - luc eukaryotic expression plasmid.....	30
5.2 Build the endometrial cancer cell line ishiskawa-luc that stably expressed luciferase	32
5.3 transfection pLV – luc plasmid dose not effet the growth of endometrial cancer cell ishiskawa	32
5.4 GSNO can inhibit the growth of endometrial cancer cell in vito	33
Chapter 4 DISCUSSION.....	35
Chapter 5 CONCLUSION AND PROSPECT.....	39
REFERENCE.....	40
ACKNOWLEDGE.....	43

第一章 前言

一 子宫内膜癌

1.1 子宫内膜癌发病的流行病学及危险因素

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)是一组发生于子宫内膜的上皮性恶性肿瘤,以来源于子宫内膜腺体的腺癌最为多见,是女性生殖系统的三大恶性肿瘤之一。分为I型子宫内膜癌(即雌激素依赖型)和II型子宫内膜癌(即非雌激素依赖型)。I型子宫内膜癌可能是在无孕激素拮抗的雌激素长期作用下,发生子宫内膜增生症,从而继发的癌变,均为腺癌,占子宫内膜癌的大多数,但预后较好,据统计,早期子宫内膜癌(I期或II期)五年无进展生存期(PFS)和总生存率(OS)为90%-95%和80%-85%^[1],五年复发率为20%;II型子宫内膜癌的发病与雌激素没有明确关系,病理形态多样,属于少见类型,多见于老年体弱者,多数分化差,预后不良。子宫内膜癌好发于中老年女性,其典型临床表现为绝经后阴道流血,未绝经者可表现为月经紊乱,此外部分患者还会出现下腹部疼痛、阴道异常排液、消瘦、贫血、恶病质等其他症状。

近年来,随着人们生活水平的提高,子宫内膜癌的发病率在全球范围内呈上升趋势,且发病年龄呈年轻化趋势,每年全球约有20万新发病例,在许多发达国家,其发病率已经超过宫颈癌位居女性生殖系统恶性肿瘤的第一位^[2]。据统计,2010年美国新发子宫内膜癌病例达43470例,约8000人死于该疾病^[3]。多数病例可在早期得到诊断和治疗,预后较好,5年生存率可达75%-83%,但也有部分患者,就诊时已到晚期,或属于特殊类型的肿瘤,或存在其他合并症等,预后较差,复发率高^[4]。子宫内膜癌的病因及发病机制尚不明确,研究表明,多种危险因素与子宫内膜癌的发生相关,包括:无孕激素拮抗的内外源性雌激素的过度刺激、肥胖、异常月经婚育史、家族遗传、不良生活方式等。

1.1.1 内源性及外源性雌激素

目前普遍观点认为,子宫内膜癌的发生与过度的内源性及外源性雌激素刺激相关。早在1996年,人们就通过雌孕激素干预实验证实了雌激素对子宫内膜的刺激是导致子宫内膜癌的重要危险因素^[5]。导致内源性雌激素增多的因素主要有排卵障碍、卵巢功能性肿瘤、神经内分泌系统疾病等,同时还包括雌激素转化障碍及肝功能障碍等。外源性雌激素则是指环境中存在的具有雌激素样活性的一大类物质,其可模拟雌激素的生理作用,包括天然或合成的雌激素、环境化学污染物中的雌激素等。激素替代疗法、乳腺癌的内分泌治疗药物三苯氧胺(Tamoxifen, TAM)^[6]的临床应用增加都是导致外源性雌激素增加的因素,而口服避孕药因含有孕激素而对子宫内膜具有一定的保护作用^[7]。雌激素增多而孕酮缺乏或者相对不足,使得子宫内膜不断增生,而无法成熟并发生周期性内膜脱落,导致子宫内膜癌发生的危险性明显升高。

1.1.2 EC三联征

EC三联征是指肥胖、高血压以及糖尿病。研究认为肥胖,特别是向心性肥胖、成年后或绝经后肥胖、体质指数(body mass index, BMI)过高等都是增加子宫内膜癌的患病风险的重要因素。患有2型糖尿病的妇女,其发生子宫内膜癌的概率大约是普通妇女的1.7-3.0倍,患有高血压的妇女,其危险性则是普通妇女的2倍左右^[8]。脂肪组织中含有芳香化酶,可将雄烯二酮转变为雌酮,肥胖者体内脂肪组织含量大,因而其转化能力也高于普通人,同时肥胖者体内的游离脂肪酸可竞争性抑制性激素结合球蛋白(sex hormone-binding globulin, SHBG)与性激素结合,导致游离雌激素水平升高。在多种因素的共同作用下,体内雌激素水平升高,使子宫内膜暴露于高雌激素环境中,增加了子宫内膜癌的发生危险。

1.1.3 异常月经婚育史

研究显示月经周期紊乱、绝经延迟、未孕未产都是子宫内膜癌的高危因素。绝经愈晚,子宫内膜受到雌激素影响的时间也愈长,因此患病风险也就愈高。正常妊娠期间,子宫内膜所受到的雌激素刺激明显低于未妊娠时,因此妊娠在一定程度上具有保护子宫内膜癌的效应,这一效应随着妊娠及分娩次数的增加而增加。

1.1.4 家族遗传

与众多恶性肿瘤相似，子宫内膜癌的发生与遗传因素明显相关，据统计，约10%的子宫内膜癌有相关家族史^[9]。

1.1.5 生活方式

除上述的因素外，不良的生活习惯，如长期高碳水化合物或高糖饮食^[10]、酗酒、吸烟、作息不规律都是导致子宫内膜癌发生的危险因素，而适度的运动以及母乳喂养^[11]可降低患病风险。

1.2 子宫内膜癌的治疗进展

目前，子宫内膜癌的治疗手段仍是以手术治疗为主，辅以放疗、化疗、激素治疗以及分子靶向药物治疗。下面对各种治疗方式进行概述：

1.2.1 手术治疗

手术治疗是目前子宫内膜癌的首选治疗方式，对手术方式的选择以及是否进行淋巴结清扫仍存在争议。2010年《妇科常见肿瘤诊治指南》中提出，子宫内膜癌手术应当包括盆腹腔冲洗液的脱落细胞学检查，筋膜外全子宫、双附件切除术，盆腔及腹主动脉旁淋巴结切除术。对于临床分期为 IA/IB期，或分化较高(G1/G2)的子宫内膜癌患者，可行筋膜外全子宫、双侧附件切除术以及选择性盆腹腔淋巴结清扫术；对于 II期、分化较低(G3)或组织类型为非内膜样腺癌的患者，需行筋膜外全子宫、双侧附件切除术以及盆腹腔淋巴结清扫术，研究表明，相比于单纯盆腔淋巴结清扫，盆腹腔淋巴结清扫能明显延长患者总体生存率^[12]；而对于III期、IV期或存在远处转移的患者，应行肿瘤减灭术，包括盆腹腔探查术、腹水及冲洗液脱落细胞学检测、大网膜及阑尾切除术、腹膜活检等。对病变局限于子宫的早期EC患者而言，手术不仅可以切除病灶，还可以进行手术病理分期，明确是否存在转移及复发的高危因素，以便指导后续治疗。对晚期或复发的患者而言，手术治疗的目的是尽可能切除或缩小病灶，为进一步的放疗或化疗创造条件。具体手术方式的选择需综合患者的临床分期及具体情况而定。手术治疗是目前较为有效的治疗手段，但是对晚期患者意义有限，且本身存在诸多并发症、后遗症，对患者自身机体也是一种打击。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库