

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520141153470

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

黄连素通过 RXR α 抑制人结肠癌生长机制
的结构基础初探及相关药物的初步改造

The structural filed study of berberine inhibiting human
colon cancer growth via retinoid X receptor alpha and
the identification of derivatives preliminarily

田媛

指导教师姓名: 胡天惠 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2017 年 04 月

论文答辩时间: 2017 年 05 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 05 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 前言	1
1.1 结肠癌简介	1
1.1.1 结肠癌的发展现状.....	1
1.1.2 结肠癌的诱因.....	1
1.1.3 结肠癌的发病机制.....	2
1.2 Wnt/ β -catenin 信号通路.....	3
1.2.1 Wnt 基因.....	3
1.2.2 β -catenin 简述.....	3
1.2.3 Wnt/ β -catenin 信号通路对结直肠癌发生的影响.....	4
1.3 核受体 RXR α 与结肠癌.....	5
1.3.1 核受体.....	5
1.3.2 RXR α 与结肠癌的关系	6
1.3.3 靶向 RXR α 的抗肿瘤药物的研究现状	8
1.4 黄连素.....	8
1.4.1 黄连素简介.....	8
1.4.2 黄连素的抗癌机制.....	9
1.4.3 黄连素的改造现状.....	13
1.5 本课题研究的内容、目标及意义.....	14
第二章 材料与方法	17
2.1 实验材料和仪器	17
2.1.1 实验细胞系.....	17
2.1.2 工具酶和抗体.....	17
2.1.3 主要化学试剂和耗材.....	17
2.1.4 细胞培养试剂和双抗.....	19

2.1.5 仪器设备.....	19
2.1.6 主要溶液配方.....	20
2.2 实验方法	24
2.2.1 细胞培养.....	24
2.2.2 药物处理.....	25
2.2.3 质粒构建及检测.....	25
2.2.4 细胞转染.....	29
2.2.5 双荧光素酶报告基因测定实验.....	30
2.2.6 MTT 比色法测定细胞生长状况	31
2.2.7 细胞全蛋白提取及 Western Blot 检测	32
2.2.8 总 RNA 的提取	35
2.2.9 双链 cDNA 合成——反转录反应	35
2.2.10 实时定量 PCR.....	36
2.2.11 稳转细胞系的建立.....	38
2.2.12 EdU 细胞增殖检测实验	38
2.2.13 HPLC 分析结合实验	40
2.2.14 数据处理.....	41
第三章 实验结果	42
3.1 黄连素通过 RXRα 抑制人结肠癌增殖的初步结构学研究结果.....	42
3.1.1 黄连素与 RXR α -LBD 结合方式的点突变分析.....	42
3.1.2 黄连素通过依赖 RXR α 影响结肠癌细胞增殖及 Wnt 通路活性	48
3.2 黄连素及其改造衍生物的鉴定.....	52
3.2.1 黄连素衍生物的改造.....	52
3.2.2 第一批黄连素衍生物的鉴定.....	56
3.2.3 第二批黄连素衍生物的鉴定.....	58
3.2.4 第三批黄连素衍生物的鉴定.....	60
3.2.5 第四批黄连素衍生物的鉴定.....	62
3.2.6 第五批黄连素衍生物的鉴定.....	64
3.2.7 黄连素及高效衍生物的效果比较.....	65
3.2.8 黄连素衍生物的初步构效分析.....	68
3.3 结论.....	69
第四章 讨论	70

致 谢.....73

参 考 文 献74

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Colorectal cancer	1
1.1.1 Status of colorectal cancer	1
1.1.2 Inducement of colorectal cancer	1
1.1.3 Pathogenesis of colorectal cancer	2
1.2 Wnt/β-catenin signaling pathway	3
1.2.1 Wnt	3
1.2.2 β -catenin	3
1.2.3 The influence of Wnt/ β -catenin on colon cancer	4
1.3 Nuclear Receptor RXR and colon cancer	5
1.3.1 Nuclear Receptor	5
1.3.2 The relationship between RXR α and colon cancer	6
1.3.3 Research for RXR α targeted drugs	8
1.4 Berberine	8
1.4.1 Berberine	8
1.4.2 Antitumor mechanism of berberine	9
1.4.3 Transformation status of berberine	13
1.5 Contents, aims and significances of our project	14
Chapter 2 Materials and Methods	18
2.1 Experimental Materials	17
2.1.1 Cell lines	17
2.1.2 Enzymes and antibodies	17
2.1.3 Chemical reagents and consumables	17
2.1.4 Cell culture related reagents and antibiotics	19

2.1.5 Common instruments	19
2.1.6 Solution compositions.....	20
2.2 Experimental Methods.....	24
2.2.1 Cell culture.....	24
2.2.2 Medicament treatment	25
2.2.3 Plasmid construction.....	25
2.2.4 Cell transfection.....	29
2.2.5 Dual-luciferase reporter Assay	30
2.2.6 MTT assay	31
2.2.7 Protein extraction and Western Blot.....	32
2.2.8 Total RNA extraction.....	35
2.2.9 Reverse transcription PCR.....	35
2.2.10 Real-time PCR	36
2.2.11 Stably transfected cell line.....	38
2.2.12 EdU assay.....	35
2.2.13 HPLC analysis	40
2.2.14 Data analysis.....	41
Chapter 3 Results.....	42
3.1 The structural analysis of Ber inhibiting colon cancer growth via RXRα ..	42
3.1.1 Mutational analysis of RXR α for berberine binding	42
3.1.2 RXR α mediates the effect of berberine on Wnt and cell growth.....	48
3.2 Identification of berberine and its derivatives.....	52
3.2.1 The design for berberine	52
3.2.2 The first round identification of berberine derivatives	56
3.2.3 The second round identification of berberine derivatives.....	58
3.2.4 The third round identification of berberine derivatives	60
3.2.5 The fourth round identification of berberine derivatives.....	62
3.2.6 The fifth round identification of berberine derivatives.....	64
3.2.7 Comparison between berberine derivatives	65
3.2.8 Primary structure analysis.....	68
3.3 Conclusions	69
Chapter 4 Discussion	70

Acknowledgements73

References74

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

视黄醇 X 受体 (RXR α) 作为核受体家族的成员之一, 参与了细胞增殖、分化、代谢和胚胎发育等重要生理学环节的调控, 是治疗代谢性疾病和癌症等的重要靶点。

黄连素 (berberine, Ber), 又名小檗碱, 是一种从黄连、黄柏等药用植物中提取出的异喹啉生物碱, 临床上主要用于胃肠炎和细菌性痢疾等的治疗。近年来很多药理学和临床研究中还发现黄连素具有抗癌的功效, 引起了广泛关注, 但其发挥抗癌作用的靶标并不清楚。本课题组的前期研究表明, 黄连素能够作为一种新型的激动剂靶向 RXR α , 通过调控 RXR α 的转录激活活性以及降解核内的 β -catenin, 抑制结肠癌细胞增殖。

我们通过实验发现, 黄连素可以和 RXR α 的天然配体 9-顺式视黄酸 (9-cis-RA, 9cRA), 在 RXR α 的转录激活水平及结肠癌细胞增殖的抑制等方面发挥协同的作用。Real-time PCR 实验表明, 黄连素和 9-cis-RA 能在提高 RXR α 的下游靶基因肿瘤抑制因子 FOXO3A 的 mRNA 水平表达上发挥协同效应。这些协同作用暗示了黄连素是通过不同于 9-cis-RA 的独特的方式结合到 RXR α 配体结合区域来发挥功效。哺乳动物单杂交和 HPLC 等实验的点突变分析, 证明黄连素通过直接与核受体 RXR α 上 275 位的谷氨酰胺、316 位的精氨酸残基结合, 增强 RXR α 的转录激活水平。哺乳双杂交实验证明黄连素可以促进 RXR α 和 β -catenin 的相互作用, 并且呈浓度依赖性。而黄连素对 RXR α 的靶定, 对促进 RXR α 和 β -catenin 的结合, 抑制 Wnt 通路活性和肿瘤细胞的生长都具有重要意义。

黄连素能显著激活 RXR α 的转录活性, 并通过靶向 RXR α 抑制结肠癌细胞增殖, 这都为我们设计以 RXR α 为靶点的抗癌药物提供了依据。通过黄连素和 RXR α 的结合模式等方面的分析, 我们期待设计出以黄连素为基础, 不仅保留其本身低毒性、高选择性的优点, 并且溶解度和抗肿瘤特性都更好的化合物。

我们设计并合成出 21 种黄连素的衍生物, 通过双荧光素酶报告基因检测和 MTT 实验, 检测这些类似物在对 RXR α 转录激活活性、RXR α 和 β -catenin

结合及人结肠癌细胞生长抑制方面的生物学特性。同时，采用“改造-评价-再改造-再评价”的循环模式，对高通量筛选后的类似物进行初步构效分析，并将这些不同衍生物间的功能学差异及官能团改变，反馈到下一代改造。至此，我们已经挑选出了两个，与黄连素相比溶解性更好以及对 RXR α 转录激活能力更强和抗癌效果更显著的黄连素衍生物 Ber-122、Ber-125，为后续的药物分析及下一步的深入改造打下了基础。

关键词：黄连素；人结肠癌；RXR α ；9-cis-RA；黄连素衍生物

Abstract

Retinoid X receptor (RXR α) is a member of nuclear receptor superfamily and involved in cell proliferation, differentiation, metabolism, embryonic development and other physiological processes, especially in carcinogenesis. Its ligands are expected to be antitumor agents.

Berberine, an isoquinoline alkaloid, is a traditional oriental medicine which is extracted from *Coptis chinensis* and used to treat diarrhea and gastroenteritis. Recently, it's a popular trend to study the antitumor activity of berberine. However, the intracellular target mediating the effects of berberine remains elusive. Our previous experiments identified berberine as a novel RXR α ligand. And berberine could increase transcriptional activity of RXR α , as well as degradation of intranuclear β -catenin, to inhibit the growth of colon cancer cells by physically binding to RXR α .

Here, we provide evidence that berberine directly binds to a unique region comprising residues Gln275 and Arg316 in nuclear receptor RXR α , where berberine concomitantly binds to and synergistically activates RXR α with 9-cis-retinoic acid (9-cis-RA, 9cRA), a natural RXR α ligand binding to the classical ligand binding pocket. And there is also a synergistic inhibitory effect of berberine and 9-cis-RA on colon cancer cell growth which is subjected to EdU assays. Real-time PCR analysis of FOXO3A, a target gene of RXR α and a tumor repressor, shows a significant increasing of mRNA expression when berberine and 9-cis-RA added together in colon cancer cells. The synergistic rather than competitive effect between berberine and 9-cis-RA exhibits that they might bind to different regions in RXR α . Berberine promotes RXR α interaction with nuclear β -catenin which is analyzed by mammalian two-hybrid assay and this effect is enhanced by berberine dose-dependently. These results thus suggest that binding to RXR α is required for berberine to promote RXR α - β -catenin interaction and inhibit Wnt activity and colon cancer cell growth.

Berberine elevates the transcriptional activity of RXR α to inhibit the colon cancer cell growth by binding to RXR α . We preliminary understand how berberine binds to RXR α -LBD with the structural mode analysis of berberine and RXR α , which supports a new sight to design the superior RXR α -targeted antitumor medicine. Based on these researches, we try to keep the advantages of berberine's low toxicity and high selectivity and develop the analogs with the better solubility and anti-cancer effect.

We have designed and synthesized 21 kinds of berberine derivatives and identified these compounds by dual luciferase reporter gene assays and MTT tests to see their transcriptional activity and other biological abilities. We choose a special cyclical pattern combined transformation and identification to analyze the structure-activity relationship. Now, there are two berberine derivatives 122 and 125, which have a better solubility, activation of RXR α transcription and stronger inhibition in human colon cancer compared with berberine and other derivatives for further drug metabolic analysis and transformation.

Key words: berberine; human colon cancer; RXR α ; 9-cis-RA; berberine derivatives

第一章 前言

1.1 结肠癌简介

1.1.1 结肠癌的发展现状

结肠癌 (colorectal carcinoma, CRC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 在消化道肿瘤中发病率位居第三, 仅次于胃癌和食管癌。全世界每年有高达 94 万例的结直肠癌新发病例数, 而每年有近 50 万例的患者死于该病, 病死率居癌症死因的第三位。

在我国, 近几年的结肠癌发病情况呈现出迅猛地上升势头。20 世纪 90 年代与 70 年代对比发现, 我国结肠癌的发病率在城市中升高了 32.0%, 农村中升高了 8.5%。这些数据都显示, 结肠癌已然成为影响我国人民健康的常见恶性肿瘤。但至今, 该病症的总体治疗效果仍不如人意, 5 年的患者生存率仅在 60% 左右。

结肠癌作为全球都常见的恶性肿瘤, 病死率在 2010 年前位居恶性肿瘤死因第二位, 主要原因是进展后的结肠癌预后很差^[1]。II 期结肠癌患者中, 通过手术可以治愈 60%~70%, 而其中 15%~20% 的病人, 手术后即使经受化疗, 仍会出现复发。III 期结肠癌患者中, 40%~50% 可以通过手术治愈, 但仍有 35% 的病人, 手术后接受化疗依然出现复发。

结肠癌的防治研究越来越引起人们的广泛重视, 它的发生与诸多因素息息相关, 包括饮食、环境、遗传等, 是个多基因共同作用的结果。通过与结肠癌相关联的基因检测, 对临床上预测结肠癌的发生、发展、治疗及预后判断等, 具有重要意义。

1.1.2 结肠癌的诱因

结肠癌的发病原因和机制是一个十分复杂的过程, 其发生的主要诱因有以下几个方面的特点: ①生活方式和精神心理因素, 情绪自我调节能力差, 精神创伤史的合并 OR 值是 1.72, 2.61; ②饮食相关因素, 作为今天肠癌高发的主要原因, 包括动物脂肪摄入过量, 蛋白质尤其是红肉的食用过量, 以及膳食纤维的纳入不足等; ③肠道疾病史和家族史, 肠息肉与结肠癌关联强度最大 OR 值高达 8.73,

其次是一些长期慢性结肠病，而有肿瘤家族史的患者患结肠癌的机率是平常人的 1.97 倍。

研究表明，结肠组织癌变的主要分子机制包括：①微卫星的不稳定性；②与 DNA 损伤、修复相关的基因功能丧失；③癌基因的激活和过度表达；④抑癌基因的突变、丢失；⑤端粒酶的过度表达；⑥细胞信号转导途径的调控出现紊乱；⑦凋亡机制发生障碍等。

结肠癌的发生，涉及了多种类型的癌基因和抑癌基因，是它们协同作用的结果。通过对癌基因及抑癌基因的发现和细胞信号传导通路的深入研究，极大地增加了我们对细胞癌变机制方面的了解。当癌基因与抑癌基因间的相对平衡被破坏，参与调控细胞增殖的癌基因出现持续性高表达，而抑癌基因失活或不表达，就会导致癌变细胞逃避机体免疫系统的控制，形成肿瘤^[2]，并进一步引发细胞的恶化、转移等。细胞中转移基因的激活或转移抑制基因的失活与结肠癌的转移相关，并且是许多转移相关基因及转移抑制相关基因共同作用的结果。所以，在结肠癌发生发展机制的研究中：APC、MCC、K-ras 基因的突变、MMR 基因失活、DCC、p53 抑癌基因的突变或缺失等导致的分子遗传学模式上发生的改变，是经典的结肠癌发生发展模式。

1.1.3 结肠癌的发病机制

大多数结肠癌是由结肠内的一个乃至多个正常细胞发生恶性转化形成的，其中涉及了多个癌基因、抑癌基因、癌变发生相关基因（如血管生成相关基因）等的突变和异常表达。目前公认的肠癌发病分子模式认为，肠癌发病的遗传突变顺序可能是：正常细胞（APC 突变）→早期腺瘤（K-ras 等突变）→中期腺瘤（DCC 突变）→晚期腺瘤（p53 突变）→癌。正是这些逐步性、阶段性的基因突变，使得正常的肠上皮细胞过度增生，发展成良性息肉，并进一步转变成恶性肿瘤。

研究发现，多条的细胞信号转导通路都参与了结肠的癌变过程，其中，起到关键调控作用的是 Wnt/ β -catenin 信号转导通路和 PI3K/Akt 信号途径。也因此，这两条信号途径的抑制剂被认为是治疗结肠癌的潜在药物，而该领域也已成为近年肿瘤药物研发的前沿热点。

综上，结肠癌的发生发展是多个基因参与的多因素间的互作，通过一个个阶段形成精密且复杂的生物学过程。尽管今天在结直肠癌的诊疗上已经获得较大的

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.

厦门大学博硕士论文摘要库