

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号:

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

博士学位论文

一种具有高效低毒抗肝癌效应的熊去氧胆酸  
衍生物的筛选及初步机制探讨

U12, a UDCA derivative, screened as a lead in anti-hepatoma effects  
and detected its preliminary mechanism

指导教师: 张晓坤教授

协助指导教师: 陈海峰副教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2013 年 月

论文答辩时间: 2013 年 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2013 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

英文缩略词 .....	I
摘 要 .....	III
英文摘要 .....	V
前 言 .....	1
材料和方法 .....	7
一、实验材料 .....	7
1.1 主要实验仪器 .....	7
1.2 主要实验试剂 .....	8
1.3 细胞株 .....	9
1.4 主要溶液 .....	9
二、实验方法 .....	14
2.1 UDCA 衍生物的合成（详见结果部分） .....	14
2.2 细胞的培养和冻存 .....	14
2.3 细胞毒性实验 .....	15
2.4 克隆形成实验 .....	15
2.5 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染法 .....	16
2.6 caspase 酶活力检测 .....	17
2.7 Western Blotting .....	18
2.8 Metadrug 软件预测靶点及相应通路 .....	19
2.9 比较蛋白质组学检测蛋白质组的变化 .....	20
2.10 流式细胞术 PI 染色法 .....	22
2.11 昆明小鼠急性毒性实验 .....	23
2.12 裸鼠移植瘤实验 .....	23
实验结果 .....	25
一、熊去氧胆酸衍生物的合成 .....	25
二、UDCA 衍生物对正常肝细胞和肝癌细胞的细胞毒性研究 .....	35
2.1 MTT 法检测 UDCA 衍生物的细胞毒性活性 .....	35
2.2 U12 对 DCA 诱导的细胞损伤具有保护作用 .....	38
2.3 U12 诱导 QSG-7701 细胞的克隆形成 .....	39

三、U12 激活外源性凋亡信号通路 .....	39
3.1 U12 诱导肝癌细胞凋亡 .....	39
3.2 U12 激活 caspase-8 依赖的外源性凋亡通路 .....	41
四、U12 抗肿瘤作用机制预测 .....	44
五、蛋白质组学研究 U12 诱导肝癌细胞蛋白质谱的变化 .....	46
六、U12 对细胞周期的调控 .....	49
6.1 U12 对细胞周期分布的影响 .....	49
6.2 U12 对细胞周期相关蛋白的影响 .....	50
七、动物实验 .....	52
7.1 急性毒性实验 .....	52
7.2 U12 抑制人裸鼠移植瘤细胞生长 .....	53
<b>讨 论 .....</b>	<b>57</b>
<b>结论与展望 .....</b>	<b>63</b>
一、结论 .....	63
二、创新点 .....	63
三、展望 .....	63
<b>参考文献 .....</b>	<b>64</b>
<b>附 录 .....</b>	<b>75</b>
<b>博士期间发表成果及奖励情况 .....</b>	<b>95</b>
一、发表成果 .....	95
二、奖励情况 .....	96
<b>致 谢 .....</b>	<b>97</b>

## Contents

<b>Abbreviation in English</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>III</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>V</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Materials and Methods</b> .....	<b>7</b>
1. Materials.....	7
2. Experimental methods .....	14
<b>Results</b> .....	<b>25</b>
1. The synthesis of UDCA derivatives .....	25
2. Cytotoxicity effects of UDCA derivatives on normal and cancer liver cells .....	35
2.1 Cytotoxicity effects of UDCA derivatives by MTT .....	35
2.2 U12 inhibits DCA-induced cellular damage.....	38
2.3 U12 improves clonogenic survival of QSG-7701 cells.....	39
3. U12 induces extrinsic apoptosis pathway .....	39
3.1 U12 induces apoptosis of liver cancer cells.....	39
3.2 U12 activates the extrinsic apoptosis through caspase-8-associated pathway .....	41
4. Prediction of the mechanism of U12 anticancer action .....	44
5. Cellular proteins alteration in response to U12 administration .....	46
6. U12 regulates cell cycle in SMMC-7721 cells.....	49
6.1 U12 arrests cell cycle G1-phase in SMMC-7721 cells .....	49
6.2 U12 regulates the expression of cell cycle-associated proteins .....	50
7. Animal testing .....	52
7.1 Acute toxicity testing.....	52
7.2 U12 inhibits the growth of liver cancer xenografts in nude mice.....	53
<b>Discussion</b> .....	<b>57</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>63</b>
<b>Reference</b> .....	<b>64</b>
<b>Appendix</b> .....	<b>75</b>
<b>Publications and Awards for the doctoral study</b> .....	<b>95</b>

1.Publications .....	95
2.Awards. ....	96
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>97</b>

厦门大学博硕士论文摘要库



## 英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
AML	Acute Myelocytic Leukemia	急性髓细胞性白血病
BCA	Bicinchoninic Acid	二喹啉甲酸
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
CDK	Cyclin-dependent kinase	周期蛋白依赖性激酶
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethyl-ammonio] propanesulfonic acid	
CKI	Cyclin-dependent kinase Inhibitor	周期蛋白依赖性激酶抑制因子
DCA	Deoxycholic Acid	去氧胆酸
2DE	Two Dimensional Electrophoresis	二维凝胶电泳
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dulbecco 的改良 Eagle 培养基
DMF	Dimethyl Formamide	二甲基甲酰胺
EF	Elongation Factor	延长因子
FAS	Factor Associated Suicide	
FBP	Far Up Stream Element-Binding Protein	远端上游元件结合蛋白
FDA	Food and Drug Administration	美国食品药品监督管理局
5-Fu	5-Fluoro-2,4(1h, 3h)pyrimidinedione	5-氟尿嘧啶
FUSE	Far Up Stream Element	远端上游元件
H	Hour	小时
HBV	hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HCC	Hepatocellular Carcinoma	肝细胞肝癌
HCV	hepatitisC virus	丙型肝炎病毒
IEF	Isoelectric focusing	等电聚焦电泳
mg	milligram	毫克
mL	Millilitre	毫升
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-6-yl] -6,5-diphenyltetrazolium bromide	噻唑蓝

---

PARP	Poly ADP-ribose Polymerase	聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCC	Pyridinium chlorochromate	氯铬酸吡啶
PE	Petroleum Ether	石油醚
PFA	Paraformaldehyde	多聚甲醛
PI	Isoelectric Point	等电点
PI	Propidium Iodide	溴化丙锭
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PIKK	Phosphatidylinositol 3-Kinase related Kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶
PS	Phosphatidylserine	磷脂酰丝氨酸
Rb	Retinoblastoma protein	成视网膜母细胞瘤蛋白
RT	Room Temperature	室温
UDCA	Ursodeoxycholic Acid	熊去氧胆酸
$\mu\text{M}$	Micromole per Litre	微摩尔每升
TLC	Thin Layer Chromatography	薄层层析色谱

---

## 摘 要

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一，占癌症致死原因的第3位，其5年的自然死亡率超过95%。熊去氧胆酸（UDCA）是我国传统名贵中药熊胆的主要化学成分牛磺熊去氧胆酸的降解产物，在临床上广泛应用于肝胆疾病的治疗，1999年被美国FDA批准为治疗原发性胆汁性肝硬化的唯一药物。鉴于UDCA在肝胆疾病方面的应用以及其毒副作用小的特点，以对UDCA进行结构修饰寻找新型高效低毒的治疗肝癌药物成为一条可能的途径。

本文利用酯化、醚化、乙酰化以及氧化等方法对UDCA进行结构修饰，合成了20个UDCA衍生物。细胞毒性试验研究显示，在这合成的20个衍生物中，U12对两种肝癌细胞HepG2和SMMC-7721表现出良好的杀伤作用，而对QSG-7701正常肝细胞有一定的促增殖功能，且能够显著抑制DCA对QSG-7701肝细胞的损伤。构效关系分析表明7-OH乙酰化对于U12发挥抗肿瘤活性至关重要。鉴于此，我们对U12抗肿瘤作用机制进行探讨。

分子作用机制研究表明U12能够通过caspase-8诱导人肝癌细胞的外源性凋亡通路。流式细胞术Annexin V-FITC/PI双染法证实了U12的凋亡效应。体外实验研究表明，U12能够激活caspase-8酶，诱导PARP蛋白切割以及FAS蛋白过表达；caspase-8抑制剂Z-IETD-fmk预处理可抑制U12对SMMC-7721人肝癌细胞的凋亡效应。

Metadrug软件预测并结合蛋白质组学研究显示U12还可调控细胞周期的相关通路尤其是细胞周期G1期相关因子的表达。流式细胞术PI染色法验证了U12对人肝癌细胞SMMC-7721细胞周期G1期分布的影响。Western Blotting结果显示U12抑制了人肝癌细胞mTOR，S6K1以及Rb等蛋白的磷酸化，同时下调cyclin D1，CDK4/6以及cdc25A蛋白的表达量，促进CDK抑制蛋白p27的表达。总之，U12抑制了mTOR/S6K1/cyclin&CDK复合物信号通路。

肝癌细胞的裸鼠移植瘤实验研究显示U12在250 mg/kg浓度条件下可有效地抑制肿瘤的增殖，且与阳性对照组比较，体重没有明显下降，体内心、肝、脾、肺、肾等脏器未发现外观改变。

总之，U12和UDCA及其他衍生物不同，具有潜在的高效低毒治疗肝癌活性，且能够激活caspase-8依赖的外源性凋亡通路，抑制了mTOR/S6K1/cyclin&CDK复合物信号通路，有望成为新的治疗肝癌的先导化合物。

关键词： UDCA； U12； 肝癌； mTOR/S6K1 信号通路； 细胞周期

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstracts in English

Liver cancer is one of the most common cancers and a leading cause of cancer deaths all over the world. It ranks third amongst the organ-specific causes of cancer-related deaths. UDCA, as the main degradation product of TUDCA, has a wide range of clinical applications in treating hepatic diseases. To date, UDCA is utilized for the treatment of primary biliary cirrhosis (PBC) for which it is the only drug approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 1999. Given the applications of UDCA in treating hepatic diseases and lower side effects, structure modification of UDCA may lead to the development of new anti-hepatoma drug with reduced side effects.

This study reported the synthesis of 20 UDCA derivatives through esterification, etherification and oxidation reactions. These derivatives were initially evaluated by the MTT assay and our results identified the UDCA derivative U12 as a potent inhibitor of the growth of HepG2 and SMMC-7721 liver cancer cells but not QSG-7701 normal liver cells. Moreover, it could prevent DCA-induced damages on QSG-7701 cells. Structure-activity relationship analysis showed that the existence of acetyl at 7-OH of U12 improved its anti-tumor activity.

In studying the mechanism by which U12 inhibited the growth of liver cancer cells, we found that it could induce apoptosis of SMMC-7721 cells through the caspase-8-dependent extrinsic apoptotic pathway. The apoptotic effect of U12 was revealed by double staining of liver cancer cells by Annexin V-FITC/PI approach. In vitro experiments showed that U12 activation of caspase-8 was accompanied with induction of PARP cleavage and FAS expression, which was alleviated by the pretreatment of SMMC-7721 cells with Z-IETD-fmk, a specific inhibitor of caspase-8.

Combination of Metadrug™ with comparative proteomic approach suggested that the anti-cancer effect of U12 might also involve its regulation of cell cycle progression. Flow cytometry analysis revealed that treatment of SMMC-7721 cells with U12 resulted in G1-phase arrest. Western blotting experiments demonstrated that U12 could inhibit the activation of mTOR, S6K1 and Rb, while down-regulating the expression of cyclin D1, CDK4/6 and cdc25A and up-regulating the expression of CDK inhibitor p27. Thus, U12

could inhibit the mTOR/S6K1/cyclin&CDK signaling pathway.

The anti-cancer effect of U12 was also evaluated in liver cancer xenograft animal model. Our results showed that U12 could effectively inhibit the growth of liver cancer cells in animals, while it had little side effects evidenced by no reduction of body weight and no obvious organs damage during the treatment period.

In summary, our results demonstrated that U12 is promising UDCA derivative with potent anti-liver cancer effects through its activation of the caspase-8-dependent extrinsic apoptosis and inhibition of mTOR/S6K1/cyclin&CDK signaling pathway.

**Key words:** UDCA; U12; liver cancer; mTOR/S6k1 pathway; cell cycle

## 前 言

作为一类以细胞异常增殖和转移为特点的疾病，癌症是当前严重影响人类健康、威胁人类生命的主要疾病之一<sup>[1]</sup>。目前，癌症已经成为继心血管疾病之后人类的第二大杀手，并且全球病例呈现增加趋势<sup>[2-6]</sup>。受到全球人口日益增加和老龄化的影响，世界卫生组织预计从 2007 年到 2030 年，全球癌症死亡人数将增加 45%。此外，在这一时期新增癌症病例将增加至 1550 万例<sup>[1,2]</sup>。目前在中国，21% 农村死亡病例和 25% 城市死亡病例与癌症有关，而且在过去三十年中，癌症死亡率正呈现持续快速增加趋势<sup>[7-9]</sup>。

肝癌是指发生于肝脏的恶性肿瘤，包括原发性肝癌和转移性肝癌两种，人们日常说的肝癌指的多是原发性肝癌，原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一。肝癌占癌症致死原因的第 3 位，其 5 年的自然死亡率超过 95%。全球每年有超过 50 万人患有肝癌，新增肝癌病例占到所有增加癌症患者的 6%<sup>[2, 10, 11]</sup>，其中一半以上在中国<sup>[11]</sup>。据世界卫生组织 2008 年癌症统计显示，我国肝癌发病率占到全球 55%<sup>[2]</sup>，是肝癌发病率最高的国家。据 2010 年我国癌症死亡率统计显示（图 1），在 1973 年到 2005 年的三十几年里，我国肝癌死亡率保持快速增长的趋势，已跃升为仅次于肺癌的第二大癌症死亡病因<sup>[12, 13]</sup>，据估计我国每年新增 28 万男性和 11 万女性原发性肝癌患者，肝癌死亡人数 32.5 万<sup>[5]</sup>，占全世界肝癌死亡人数的 45%。我国肝癌死亡率有着明显的区域和性别差异<sup>[4]</sup>。表 1 显示，我国 2004-2005 年间城市肝癌死亡率占到癌症死亡率的 16.6%，仅次于肺癌的 27.29%，而在农村这一比例高达 20.94%，已经成为癌症的第一杀手，且还在呈逐渐增长趋势。图 2, 3 显示，我国 2009 年肝癌发病率和死亡率与我国区域，年龄，性别有着密切关系：1、农村肝癌发病率和死亡率高于城市，2、男性肝癌发病率和死亡率明显高于女性，3、随着年龄增长，肝癌发病率和死亡率呈显著递增趋势。我国是人口老年化问题较为严重的国家<sup>[5]</sup>，肝癌发病率和死亡率也将随之进一步加剧，直接影响我国人民的健康和生存安全，因此，研究治疗肝癌的药物及其作用机制具有重要的现实意义。

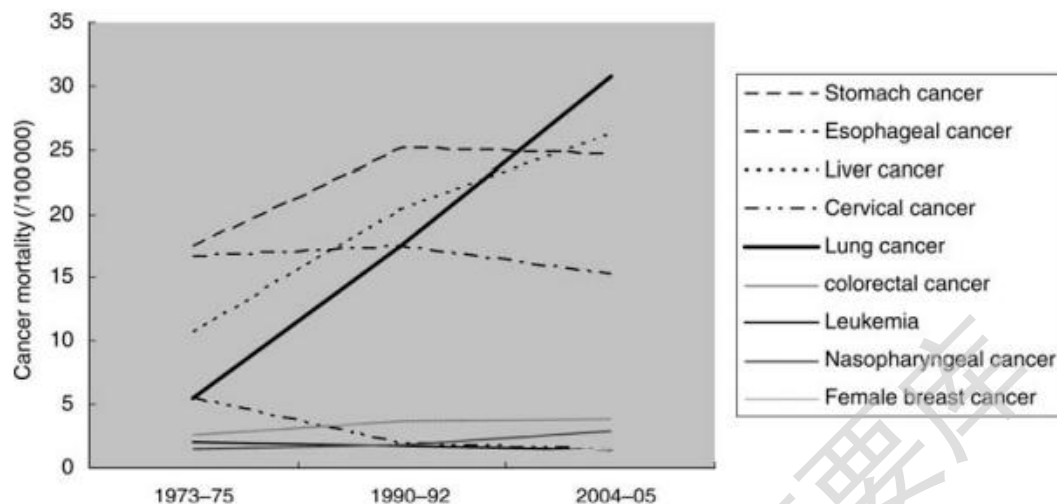


图 1. 我国 1973-2005 年间排名前 10 位的癌症死亡率变化趋势

Figure1. Changes of cancer mortality rate for top 10 cancers in China, 1973-2005

表 1. 我国城市和农村地区排名前十癌症死亡率统计

Table1. Top 10 cancers among urban and rural areas in China, 2004-05

		Urban areas		Rural areas		
		Mortality (/100 000)	Proportion (%)	Mortality (/100 000)	Proportion (%)	
1	Lung cancer	40.98	27.29	Liver cancer	26.93	20.94
2	Liver cancer	24.93	16.6	Lung cancer	25.71	19.99
3	Gastric cancer	22.97	15.3	Gastric cancer	25.58	19.89
4	Esophageal cancer	10.97	7.31	Esophageal cancer	17.34	13.48
5	Colorectal cancer	9.78	6.51	Colorectal cancer	5.96	4.64
6	Pancreas cancer	4.44	2.96	Leukemia	3.68	2.86
7	Leukemia	4.17	2.78	Brain tumor	2.8	2.18
8	Female breast cancer	3.98	2.65	Female breast cancer	2.35	1.83
9	Brain tumor	3.77	2.51	Pancreas cancer	1.7	1.32
10	Gallbladder cancer	2.13	1.42	Bone cancer	1.61	1.25



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库