

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: B200426018

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

人参皂甙肠道代谢物 IH-901 抗肝癌分子靶点研究

Anti-tumor molecular targets of intestinal metabolite IH-901 of
Ginseng saponin in human hepatocellular carcinoma cells

明艳林

指导教师姓名: 陈清西 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007 年 10 月 18 日

论文答辩时间: 2007 年 11 月 24 日

学位授予单位: 厦 门 大 学

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2007 年 10 月

**Anti-tumor molecular targets of intestinal metabolite
IH-901 of Ginseng saponin in human hepatocellular
carcinoma cells**

Dissertation Submitted to

Xiamen University

in Partial Fulfilment of the Requirement

for the Degree of

Doctor of Philosophy

By

Yanlin Ming

(Cell Biology)

Dissertation Supervisors: Prof. Qingxi Chen

Oct, 2007

Xiamen, China

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

目 录

英文缩略语对照表.....	IX
中文摘要.....	XI
英文摘要.....	XIII
第一章 前言	1
1.1 肝癌分子遗传学研究现状	1
1.1.1 癌基因、抑癌基因与肝癌.....	1
1.1.2 细胞凋亡与肝癌.....	5
1.1.3 侵袭转移与肝癌.....	12
1.2 抗肿瘤分子靶点及相关药物	21
1.2.1 细胞信号转导相关靶点.....	22
1.2.2 细胞凋亡相关的靶点.....	23
1.2.3 细胞持续增殖相关的靶点.....	24
1.2.4 细胞周期调控相关靶点.....	26
1.2.5 侵袭转移相关靶点.....	27
1.2.6 血管生成相关靶点.....	28
1.2.7 基因治疗相关靶点.....	29
1.2.8 抗肿瘤药物研究存在的问题及对策.....	30
1.3 人参皂甙肠道代谢物与肿瘤	32
1.3.1 人参皂甙及其抗肿瘤活性概述.....	33
1.3.2 人参皂甙肠道代谢途径及其产物概述.....	36
1.4 人参皂甙肠道代谢物 IH-901 活性概述	45
1.4.1 抗肿瘤活性.....	45
1.4.2 其它药理学活性.....	48
1.5 本课题研究的目標、内容和意义	51
1.5.1 研究目标和内容.....	51
1.5.2 研究意义.....	51

第二章 实验材料与amp;方法	52
2.1 实验材料	52
2.1.1 细胞株、裸鼠.....	52
2.1.2 工具酶、抗体.....	52
2.1.3 主要化学试剂和耗材.....	53
2.1.4 哺乳动物细胞培养试剂.....	54
2.1.5 主要仪器.....	55
2.1.6 主要溶液配置.....	56
2.2 实验方法	59
2.2.1 人参皂甙标准曲线的制备.....	59
2.2.2 皂甙的薄层层析.....	59
2.2.3 超声波提取法.....	60
2.2.4 硅胶柱层析.....	60
2.2.5 酶法转化二醇组皂甙制备体系的建立.....	61
2.2.6 酶法转化二醇组皂甙反应的工艺优化.....	61
2.2.7 柱层析分离纯化酶转化产物及其 HPLC 纯度测定.....	63
2.2.8 化合物结构鉴定.....	64
2.2.9 细胞培养.....	64
2.2.10 细胞的存活率测定 (MTT 法).....	64
2.2.11 Hoechst 33258 和 AO/EB 染色.....	65
2.2.12 DNA ladder 分析.....	65
2.2.13 细胞周期变化及其凋亡细胞的检测.....	65
2.2.14 线粒体跨膜电位测定.....	66
2.2.15 细胞裂解及蛋白质浓度测定.....	66
2.2.16 Western blot.....	66
2.2.17 细胞黏附能力分析.....	67
2.2.18 细胞迁移能力分析—划痕实验.....	67

2.2.19	细胞侵袭能力分析-Transwell®细胞侵袭实验.....	68
2.2.20	ELISA 检测 VEGF 和 bFGF 的表达.....	68
2.2.21	RT-PCR 检测 VEGF 和 bFGF 的表达.....	69
2.2.22	MMP-2 和 MMP-9 活性分析.....	70
2.2.23	裸鼠皮下成瘤和转移实验.....	71
2.2.24	肿瘤微血管密度测定.....	71
2.2.25	石蜡切片与免疫组织化学染色.....	72
2.2.26	数据处理.....	73
第三章	酶法转化制备稀有人参皂甙 IH-901 的研究.....	74
3.1	结果.....	75
3.1.1	标准曲线.....	75
3.1.2	超声波法提取三七总皂甙正交优化的条件.....	75
3.1.3	三七总皂甙的 TLC 图谱.....	77
3.1.4	柱层析分离纯化三醇组皂甙和二醇组皂甙.....	78
3.1.5	酶法转化制备体系及其产物分析.....	80
3.1.6	酶解转化反应的工艺优化结果.....	81
3.1.7	硅胶柱层析分离纯化酶解产物的 TLC 鉴定和 HPLC 分析.....	86
3.1.8	化合物结构鉴定结果.....	88
3.2	讨论.....	91
3.3	小结.....	93
第四章	IH-901 诱导人肝癌细胞凋亡及其凋亡信号通路.....	95
4.1	结果.....	96
4.1.1	IH-901 对体外培养的肝癌细胞增殖活性的影响.....	96
4.1.2	IH-901 诱导肝癌细胞凋亡的形态学观察.....	98
4.1.3	IH-901 诱发肝癌细胞染色体 DNA 片段化.....	101
4.1.4	IH-901 对肝癌细胞周期分布的影响.....	101
4.1.5	IH-901 对肝癌细胞与正常肝细胞体外作用效果的比较.....	105

4.1.6	IH-901 诱导肝癌细胞线粒体跨膜电位下降.....	108
4.1.7	IH-901 诱导细胞色素 <i>c</i> 从线粒体释放.....	109
4.1.8	IH-901 激活 Caspase-9/Caspase-3.....	109
4.1.9	IH-901 激活 Fas/FasL.....	110
4.1.10	凋亡相关蛋白对 IH-901 诱导肝癌细胞凋亡的调控.....	111
4.2	讨论.....	113
4.3	小结.....	117
第五章	IH-901 抑制人肝癌细胞侵袭转移及血管生成	119
5.1	结果.....	120
5.1.1	IH-901 对脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖的影响.....	120
5.1.2	IH-901 诱导脐静脉内皮细胞 ECV304 凋亡形态学观察.....	121
5.1.3	IH-901 对脐静脉内皮细胞 ECV304 细胞周期相分布的影响.....	123
5.1.4	IH-901 对肝癌细胞 MHCC97-H 和内皮细胞 ECV304 黏附能力的影响....	124
5.1.5	IH-901 对肝癌细胞 MHCC97-H 和内皮细胞 ECV304 迁移能力的影响....	125
5.1.6	IH-901 对肝癌细胞 MHCC97-H 侵袭能力的影响.....	126
5.1.7	IH-901 对 VEGF 和 bFGF 在肝癌细胞 MHCC97-H 中表达影响.....	127
5.1.8	IH-901 对 MMP-2 和 MMP-9 在肝癌细胞 MHCC97-H 中表达的影响.....	129
5.1.9	IH-901 对肝癌细胞 MHCC97-H 裸鼠体内致瘤能力的影响.....	130
5.1.10	IH-901 对肝癌细胞 MHCC97-H 裸鼠体内转移能力的影响.....	131
5.1.11	IH-901 对 CD34 在裸鼠荷肝癌组织中表达的影响.....	133
5.1.12	IH-901 对 MMP-9 在裸鼠荷肝癌组织中表达的影响.....	134
5.1.13	IH-901 对 VEGF 在裸鼠荷肝癌组织中表达的影响.....	135
5.2	讨论.....	136
5.3	小结.....	139
	结论.....	141
	参考文献.....	142
	致谢.....	164

Catalogue

Abbreviation	IX
Abstract in Chinese	XI
Abstract in English	XIII
Chapter I Forewords	1
1.1 Ginsenoside and tumor	1
1.1.1 Oncogene, anti-oncogene and hepatoma.....	1
1.1.2 Apoptosis and hepatoma.....	5
1.1.3 Invasion, metastasis and hepatoma.....	12
1.2 Anti-tumor molecular targets and related agents	21
1.2.1 Molecular targets on cell signal transtruction.....	22
1.2.2 Molecular targets on apoptosis.....	23
1.2.3 Molecular targets on cell proliferation.....	24
1.2.4 Molecular targets on cell cycle regulation.....	26
1.2.5 Molecular targets on invasion, metastasis.....	27
1.2.6 Molecular targets on angiogenesis.....	28
1.2.7 Molecular targets on gene therapy.....	29
1.2.8 Problem and strategy on anti-tumor drugs research.....	30
1.3 Intestinal metabolin of ginseniside and hepatoma	32
1.3.1 Review of ginseniside and anti-tumor activity.....	33
1.3.2 Metabolic pathway of ginseniside in intestine and its product.....	36
1.4 Bioactivity of IH-901	45
1.4.1 Anti-tumor activity.....	45
1.4.2 Other activity on pharmacology.....	48
1.5 Aims, contents and significance of the projects	51
1.5.1 Aims and contents.....	51

1.5.2	Significance.....	51
Chapter II Materials and methods.....		52
2.1	Materials.....	52
2.1.1	Cell line and Nude mice.....	52
2.1.2	Enzyme and Antibodies.....	52
2.1.3	Major chemical reagent.....	53
2.1.4	Reagent for mammal cell culture.....	54
2.1.5	Major equipment.....	55
2.1.6	Major buffer.....	56
2.2	Methods.....	59
2.2.1	Factor standard curve.....	59
2.2.2	TLC of ginsenoside.....	59
2.2.3	Ultrasonic Extraction Technology.....	60
2.2.4	Silica gel column chromatogram.....	60
2.2.5	Enzymatic transformation of protopanaxadiol saponins	61
2.2.6	The optimize of enzymatic transformation of protopanaxadiol saponins.....	61
2.2.7	Hydrolyase separation by column chromatogram and purity test by HPLC.....	63
2.2.8	Structure identification of compound.....	64
2.2.9	Cell culture.....	64
2.2.10	Cell survival rate assay (MTT assay)	64
2.2.11	Hoechst 33258 and AO/EB stain.....	65
2.2.12	DNA ladder analysis.....	65
2.2.13	Cell cycle and cell apoptosis assay.....	65
2.2.14	Chondriosome transmembrane potential assay.....	66
2.2.15	Cell lysis and protein assay.....	66
2.2.16	Western blot.....	66
2.2.17	Zymography analysis.....	67
2.2.18	Cell migration assay.....	67
2.2.19	Transwell [®] cell invasion.....	68

2.2.20	ELISA.....	68
2.2.21	RT-PCR.....	69
2.2.22	Zymography analysis.....	70
2.2.23	Xenograft assays in nude mice.....	71
2.2.24	MVD assay.....	71
2.2.25	Immunohistochemistry analysis.....	72
2.2.26	Data processing.....	73
Chapter III Preparation of the metabolites ginsenoside IH-901.....		74
3.1	Results.....	75
3.1.1	Standard curve.....	75
3.1.2	The optimum condition of ultrasonic extraction technology of panax notoginsenosides by Orthogonal Test.....	75
3.1.3	TLC of Panax notoginsenosides.....	77
3.1.4	Separated Ptotopanaxatriol and Protopanaxadiol saponins by chromatogram...78	
3.1.5	Test of Crude hydrolysate by TLC and assay by HPLC.....	80
3.1.6	The optimum condition of enzymatic transformation.....	81
3.1.7	Test of purified hydrolysate by TLC and assay by HPLC.....	86
3.1.8	Result of Structure identification of compound.....	88
3.2	Discussion.....	91
3.3	Conclusion.....	93
Chapter IV IH-901 induces hepatoma carcinoma cell (HCC) apoptosis and signal transduction pathways.....		95
4.1	Results and analysis.....	96
4.1.1	Antiproliferative activity of IH-901 against different HCC cell lines.....	96
4.1.2	Cell morphology of HCC after IH-901 exposure.....	98
4.1.3	DNA fragmentation assay.....	101
4.1.4	Cell cycle and cell apoptosis assay analysis of HCC.....	101
4.1.5	Compare on apoptosis of HCC and Chang-liver induced by IH-901.....	105
4.1.6	Mitochondrial transmembrane potential breakdown by IH-901.....	108

4.1.7	IH-901 induces HCC to release Cyt <i>c</i> from mitochondrial.....	109
4.1.8	Cyt <i>c</i> /Caspase-3 is activated by IH-901.....	109
4.1.9	Fas/FasL is activated by IH-901.....	110
4.1.10	Apoptosis is controlled by apoptosis related proteins.....	111
4.2	Discussion	113
4.3	Conclusion	117
Chapter V Molecular targets of inhibiting HCC Angiogenesis and metastasis by IH-901		119
5.1	Results and analysis	120
5.1.1	Effect of anti-proliferation on ECV304 by IH-901.....	120
5.1.2	Cell morphology of ECV304 after IH-901 exposure.....	121
5.1.3	Cell cycle and cell apoptosis assay on ECV304 induced by IH-901.....	123
5.1.4	Effect of IH-901 on the adhesion ability of ECV304 and MHCC97-H.....	124
5.1.5	Effect of IH-901 on cell migration assay of ECV304.....	125
5.1.6	Effect of IH-901 on cell invasion assay of ECV304.....	126
5.1.7	Effect of IH-901 on mRNA expression of VEGF and bFGF in MHCC97-H....	127
5.1.8	Effect of IH-901 on expression of MMP-2 and MMP-9 in MHCC97-H.....	129
5.1.9	Effect of IH-901 in MHCC97-H cells promote the growth of subcutaneous tumors and tumor metastasis in nude mice.....	130
5.1.10	Effect of IH-901 in MHCC97-H cells promote tumor metastasis in nude mice.....	131
5.1.11	Effect of CD34 expression in the HCC tissues of nude mice.....	133
5.1.12	Effect of MMP-9 expression in the HCC tissues of nude mice.....	134
5.1.13	Effect of VEGF expression in the HCC tissues of nude mice.....	135
5.2	Discussion	136
5.3	Conclusion	139
Conclusion		141
References		142
Acknowledgement		164

英文缩略语对照表

中文名称	Full Name	Abbreviation
吖啶橙	acridine orange	AO
凋亡诱导因子	apoptosis inducing factor	AIF
碱性成纤维细胞生长因子	basic fibroblast growth factor	bFGF
细胞色素 <i>c</i>	cytochrome <i>c</i>	Cyt <i>c</i>
脱氧核糖核酸	deoxyribonucleic acid	DNA
二氨基联苯	diaminobenzidin	DAB
二甲亚砜	dimethyl sulfoxide	DMSO
二硫苏糖醇	dithiothreitol	DTT
改良 Eagle 培养基	dulbecco's modified Eagle's medium	DMEM
增强化学发光	enhanced chemiluminescence	ECL
表皮生长因子	epidermal growth factor	EGF
溴化乙锭	ethidium bromide	EB
细胞外基质	extracellular matrix	ECM
乙二胺四乙酸	ethylene diaminetetraacetic acid	EDTA
胎牛血清	fetal bovine serum	FBS
流式细胞计量术	flow cytometry	FCM
纤维粘连蛋白	fibronectin	FN
肝癌	hepatocellular carcinoma	HCC
肝癌相关基因 1	HCC-associated gene 1	HCCA1
苏木精	hematoxylin & eosin	H & E
高效液相色谱	high performance liquid chromatography	HPLC
辣根过氧化物酶	horseradish peroxidase	HRP
半抑制率浓度	the inhibitor concentrations leading to 50% activity lost	IC_{50}

英文缩略语对照表

免疫组织化学	immunohistochemistry	IHC
20-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 -20 (S) -原人参二醇	20-O-beta-D-glucopyranosyl-20(S) -protopanaxadiol	IH-901、M1、 Compound K
层粘连蛋白	laminin	LN
基质金属蛋白酶	matrix metalloproteinase	MMP
线粒体膜通透性转换孔	mitochondrial permeability transition pore	MPTP
四甲基偶氮唑蓝	3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5- diphenyltetrazolium bromide	MTT
微血管密度	microvessel density	MVD
新生牛血清	new born calf serum	NCS
核磁共振	nuclear magnetic resonance	NMR
聚丙烯酰胺凝胶电泳	polyacrylamide gel electrophoresis	PAGE
磷酸盐缓冲液	phosphate-buffer saline	PBS
聚合酶链反应	polymerase chain reaction	PCR
碘化丙啶	propidium iodide	PI
张力蛋白基因	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten	PTEN
聚偏二氟乙烯	polyvinylidene difluoride	PVDF
核糖核酸酶 A	ribonuclease A	RNase A
十二烷基硫酸钠	sodium dodecyl sulfate	SDS
转化生长因子 α	transforming growth factor-α	TGF-α
Tat 相互作用的辅助因子	Tat-interacting protein 30	TIP30
薄层层析	thin-layer chromatography	TLC
肿瘤坏死因子相关凋亡 诱导配体	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand	TRAIL
血管内皮生长因子	vascular endothelial growth factor	VEGF

摘要

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种恶性程度高、浸润和转移性强, 治疗难度大的恶性肿瘤, 至今仍无有效抗肝癌药物。人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 是我国传统名贵中药, 具有明显抗肿瘤效果, 其主要活性成分为人参皂甙。最新药理学研究表明, 人参发挥抗肿瘤作用的最终活性物质不是天然人参皂甙, 而是其一系列肠道菌代谢产物。其中, 人参皂甙肠道菌代谢物 20-O- β -D-吡喃葡萄糖苷-20(S)-原人参二醇 (简称 IH-901, M1 或 Compound K) 为天然二醇组人参皂甙肠道细菌最终代谢产物, 是人参皂甙抗肿瘤作用的最终主要活性形式之一。然而, 迄今为止, 有关 IH-901 抗肿瘤的分子机制及其作用的分子靶点仍知之甚少。

本论文首先采用植物化学方法, 选用五加科人参属植物三七块根为原料, 分离获得天然二醇组人参皂甙, 然后参照人参皂甙肠内菌代谢机理, 借助酶工程技术, 首次分析比较了六种酶在体外酶法转化二醇组人参皂甙制备 IH-901 的效果, 筛选最佳转化酶。结果表明, 其中蜗牛酶转化能力最强, 正交实验优化酶解反应, 其最佳转化条件为: 物料比为 6/1、反应时间 9 h、反应温度为 45 °C、pH 值为 3.0, 酶解得率达到 54.24%。为进一步得到高纯度 IH-901, 采用硅胶柱层析技术进行分离纯化, 纯化产物通过 TLC、HPLC、UV、IR 和 NMR 波谱进行结构和纯度鉴定。结果表明, 纯化产物即为 IH-901, 其纯度大于 98%。

为研究 IH-901 抗肝癌的药效学功能效应, 我们通过 MTT 法检测显示 IH-901 对三种普通肝癌细胞株 SMMC7721、Bel7402、HepG2 和一种高转移肝癌细胞株 MHCC97-H 均有明显的浓度和时间依赖的细胞增殖抑制效果。进一步通过细胞形态学观察, 琼脂糖凝胶电泳 DNA 片段化分析, Hoechst 33258 和 AO/EB 细胞核染色及流式细胞仪细胞周期分析等方法观察到 IH-901 能明显诱导肝癌 SMMC7721 和 MHCC97-H 细胞凋亡, 且二者细胞周期均阻滞于 G0/G1 期。通过比较研究表明, IH-901 对肝癌细胞株的体外细胞毒性和凋亡率均明显高于正常人肝癌细胞株 Chang-liver。

为了阐明 IH-901 诱导肝细胞 SMMC7721 凋亡的分子机制和药物作用靶点, 我们首先研究了 IH-901 对线粒体凋亡信号通路的激活情况。研究显示, 在

IH-901 的作用下, 线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 明显下降, Cyt *c* 从线粒体释放到细胞质中, 同时发生了 Caspase-3 和 Caspase-9 的激活。Fas/FasL 是另一种很重要的介导细胞凋亡的信号通路, 我们发现 IH-901 也能上调 FasL 和 Fas 的表达。上述结果表明, IH-901 能激活线粒体信号通路诱导 SMMC7721 凋亡, 和 Fas/FasL 信号通路也密切相关, 推测该二条信号通路在 IH-901 诱导的细胞凋亡中可能存在着相互交叉放大作用, 共同执行着细胞凋亡信号转导通路的网络式调控。另外, 通过对凋亡相关蛋白研究表明, IH-901 能上调促凋亡蛋白 Bax 和 P53 蛋白的表达, 而对抑凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-X_L 没有影响。推测在凋亡网络通路中, 下游 Caspase 活化的一个可能的机制是通过 P53 促进产生细胞周期阻滞, 使细胞发生 DNA 修复或凋亡。P53 是促凋亡蛋白 Bax 转录因子, P53 表达的增加导致促凋亡蛋白 Bax 的表达, Bax 通过调节线粒体膜的通透性, 促进 Cyt *c* 的释放, 从而促进细胞的凋亡进程。

为进一步探讨 IH-901 对肝癌细胞侵袭转移及血管生成的抑制效果及其作用的分子靶点。首先, 体外研究表明, IH-901 能有效的抑制人脐静脉内皮细胞 ECV304 的增殖, 使其细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 诱导其凋亡。进一步研究发现, IH-901 对 ECV304 的黏附和迁移能力也有明显的抑制作用。其次, 通过一系列细胞侵袭转移的细胞学实验表明, IH-901 体外可明显抑制肝癌高转移 MHCC97-H 细胞的黏附、迁移和侵袭。在分子水平上, IH-901 可抑制肝癌细胞 MMP-9 和 VEGF 的表达。进一步裸鼠体内实验, IH-901 能明显抑制高转移肝癌 MHCC97-H 细胞向肝和肺部转移, 免疫组化染色显示 IH-901 能抑制 MMP-9 和 VEGF 在裸鼠荷肝癌组织中的表达, 且与 MVD 密切相关。以上结果表明, IH-901 不仅具有抑制肝癌细胞侵袭转移的功能, 而且在抑制血管形成方面发挥重要作用, MMP-9 和 VEGF 为其重要作用分子靶点。

关键词: 人参皂甙 IH-901; 肝癌; 细胞凋亡; 肿瘤转移; 分子靶点

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