

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

海洋天然产物 lagunamide A 的抗肿瘤活性研究

黄 伟

工作完成日期 2016 年 6 月

报告提交日期 2016 年 10 月

厦门大学

2016 年 10 月

海洋天然产物 lagunamide A 的抗肿瘤机理研究

Anti-tumor activities of marine natural product lagunamide A: a
mechanism study

博 士 后 姓 名 黄 伟

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称 生物化学与生物技术

研究工作起始时间 2013 年 12 月

研究工作期满时间 2016 年 10 月

厦 门 大 学

2016 年 10 月

厦门大学博士后研究工作报告 著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（）， 2、不保密（）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（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

摘要	i
ABSTRACT	ii
第一章 引言	1
第二章 材料与方法	4
2.1 细胞培养	4
2.2 化合物与抗体	4
2.3 细胞存活率测定	4
2.4 DAPI 染色	4
2.5 透射电镜扫描	4
2.6 细胞周期检测	5
2.7 Annexin V、PI 双染实验	5
2.8 Caspase 3 活性实验	5
2.9 线粒体膜电位 ($\Delta\psi_m$) 的测定	5
2.10 活性氧 (ROS) 的测定	5
2.11 线粒体的分离	5
2.12 western blot 实验	5
2.13 外源性 Mcl-1 的表达	6
2.14 瞬转实验	6
第三章 结果与讨论	7
3.1 Lagunamide A 类化合物的构效关系研究。	7
3.2 Lagunamide A 可诱导多种人源癌细胞的凋亡。	8
3.3 Lagunamide A 诱导了 caspase 依赖的细胞凋亡	10
3.4 Lagunamide A 诱导了线粒体介导的细胞凋亡	11
3.5 Bcl-2 蛋白家族参与了 lagunamide A 诱导的细胞凋亡	13
3.6 小结	14
参考文献	15
论文与专利	17
致谢	18

摘要

本研究以海洋天然产物为对象，系统地分析了 lagunamide A 及其 5 个类似物抑制多种肿瘤细胞（A549、HeLa、U2OS、HepG2、BEL-7404、BGC-823、HCT116、MCR-7、HL-60 与 A375）生长的构效关系，结果表明，C-39 位的 *R* 构型对活性的保持具有至关重要的作用。在 A549 细胞中进行的进一步机理研究表明，lagunamide A 诱导了 caspase 依赖性的细胞凋亡。它通过降低膜电位 ($\Delta\psi_m$)，产生大量活性氧 (ROS)，引起线粒体功能障碍，最终导致细胞死亡。Bcl2 蛋白家族中的促凋亡蛋白与抑凋亡蛋白均参与了此过程，特别是 Mcl-1。在 A549 细胞中过表达 Mcl-1 蛋白可在一定程度上抑制 lagunamide A 诱导的凋亡。这些研究结果为基于 lagunamide A 开发抗肿瘤药物提供了理论依据。

关键词：海洋天然产物，lagunamide A，细胞凋亡，线粒体，Bcl-2 蛋白家族。

ABSTRACT

In this study, we have systematically investigated the structure-activity relationships (SAR) of lagunamide A and its 5 analogs against a broad panel of cancer, including A549, HeLa, U2OS, HepG2, BEL-7404, BGC-823, HCT116, MCR-7, HL-60, and A375. The *R* configuration of lagunamide A at C-39 position was found to be critical for anticancer activity. Further molecular mechanism study in A549 cells revealed that lagunamide A induced caspase-mediated mitochondrial apoptosis. Accompanied with the dissipation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and overproduction of reactive oxygen species (ROS), lagunamide A led to mitochondrial dysfunction and finally caused cell death. Moreover, both anti- and pro-apoptotic B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins participated in lagunamide A-induced mitochondrial apoptosis, especially myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1). Over-expression of Mcl-1 partly rescued A549 cells from lagunamide A-induced apoptosis. This study suggests that lagunamide A may exert anticancer property through mitochondrial apoptosis. Together, our findings would provide insightful information for the design of new anticancer drugs derived from lagunamides.

Keywords: marine natural products; lagunamide A; apoptosis; mitochondria; Bcl-2 family.

第一章 引言

癌症是人类面临的重大难题。近年来，虽然在人们在肿瘤治疗领域取得了一系列进展，临床上仍急需新的治疗方法与药物，以进一步提高病人的生存率与生存质量。一直以来，天然产物因种类繁多，结构多样，是发现新药的重要源泉^[1-2]。据统计^[2]，1981-2014 年美国食品药品监督管理局（FDA）批准的新药中 26%直接与天然产物相关，而小分子药物中这一比例达 33%（图 1.1）。而海洋由于环境特殊，容易蕴育出结构新颖，性质独特的小分子化合物，这些化合物往往具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎症等药理性质，多个已被成功地开发为药物^[3]。至今，FDA 与欧洲药品管理局（EMA）共批准了 8 个来源于海洋的药物，其中 4 个是抗肿瘤药物，说明海洋天然产物对于抗癌药物开发具有重要的意义。

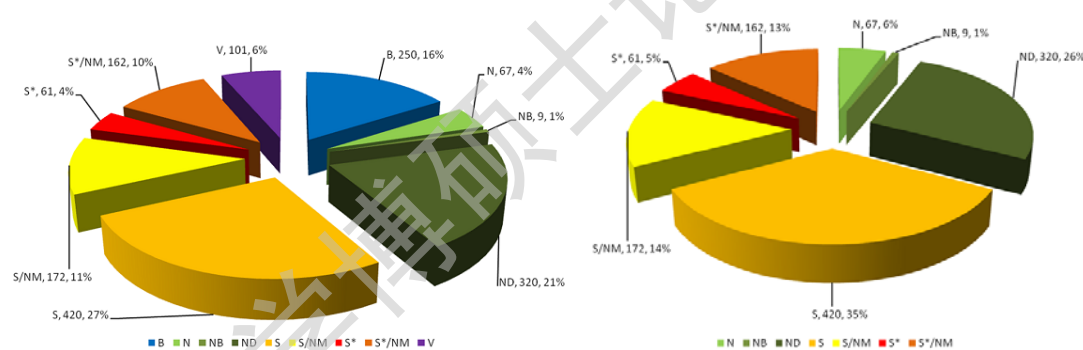


图 1.1 1981-2014 年间 FDA 批准新药（左：全部新药；右：小分子新药）分布情况（引自^[2]，B: 生物合成; N: 天然产物; ND: 天然产物衍生物; S: 化学合成; S*: 化学合成, 但药效基团来自天然产物; V: 疫苗; NM: 天然产物模拟物。）

天然产物或者其衍生物要应用于临床，其确切的作用机理是研究者首先要深入探讨的课题。然而天然产物往往具有多靶点，作用机理复杂等特点，因此，以天然产物或其衍生物为探针，系统地研究该类化合物在细胞中的分子作用机理，是基于此类化合物进行抗肿瘤药物开发的必经阶段。细胞程序性死亡的主要模式——细胞凋亡，是最为常见的药物引起肿瘤细胞死亡的方法之一。在细胞凋亡过程中，胞内的信号会导致线粒体膜通透性发生改变，进而引起线粒体膜电位降低^[4]，活性氧的产生增加，以及细胞色素 C 的释放^[5]（图 1.2）。细胞色素 C 进入到细胞质后会活化

caspace，形成凋亡小体，切割一系列的底物如聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARP）^[6-8]，最终导致凋亡的发生。Bcl-2 蛋白家族可在细胞凋亡过程中定位到线粒体，通过调节膜通透性及 caspace 的活化进而调节凋亡过程^[9-14]。Bcl-2 蛋白的功能紊乱与多种疾病相关，如该家族的促凋亡蛋白在多种癌症中有高表达。因此，寻找可调节 Bcl-2 蛋白家族活性的化合物是一种有效的开发抗癌药物的方法。

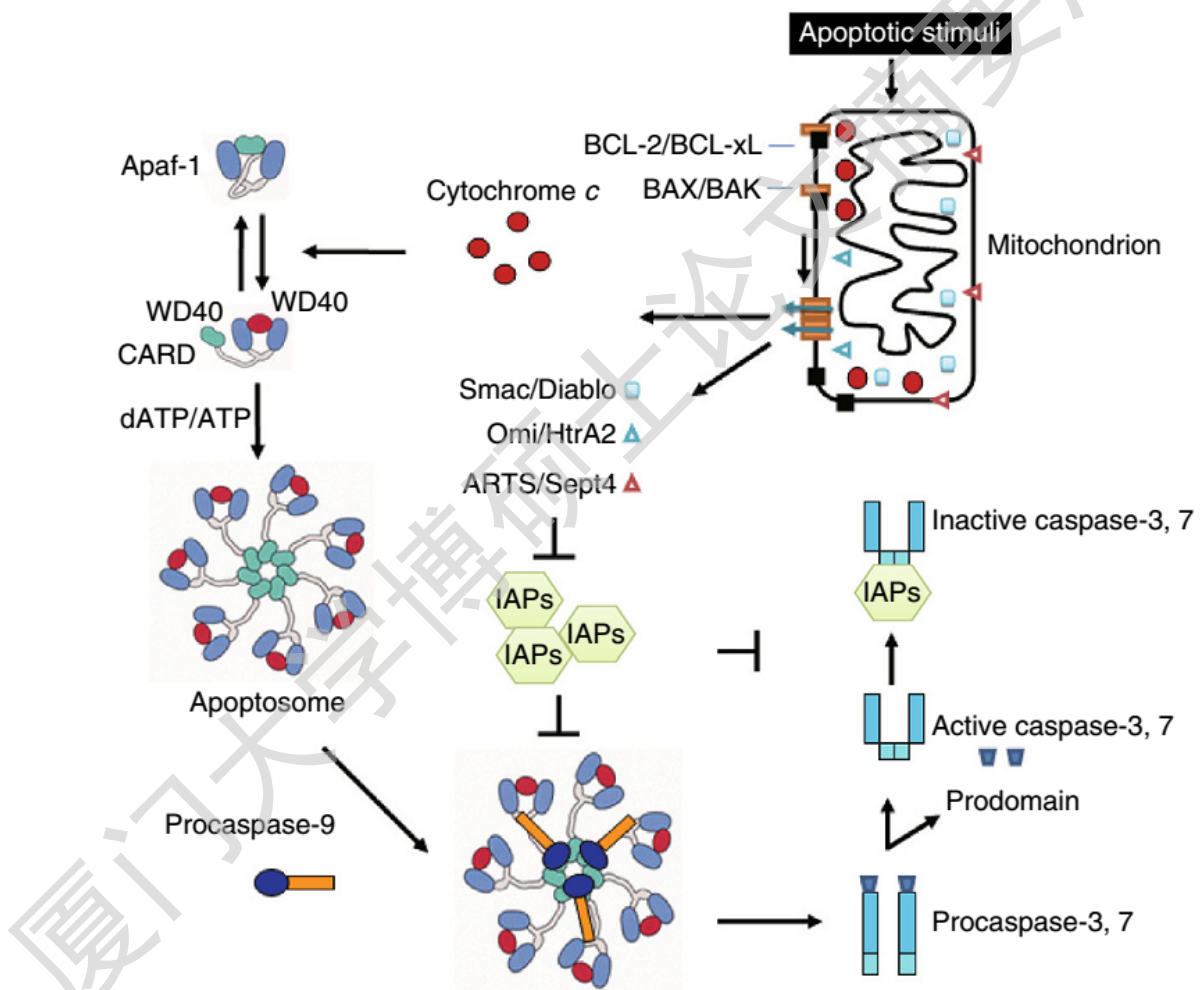


图 1.2 线粒体介导的细胞凋亡图解（引自^[4]）

基于细胞凋亡信号通路的筛选模型，人们发现了众多有抗肿瘤活性的细胞毒化合物^[15]。Lagunamides A-C^[16-17]是从海洋蓝藻菌 *Lyngbya majuscula* 中分离得到的环肽酯类化合物（图 1.3），初步的细胞毒性试验表明，该类化合物对多种癌细胞具有

很强的抑制作用。为进一步研究该类化合物确切的作用机理，本人博士期间发展了一条高立体选择性、高效率的 lagunamide A 的全合成路线，获得了一定量的天然产物及其 5 个类似物^[18]。本研究中，我们分析了该类化合物的构效关系，找到了抗肿瘤活性的关键结构因素——C-39 位的 *R* 构型。在 A549 细胞中进一步的机理研究表明，lagunamide A 是通过诱导线粒体介导的细胞凋亡从而产生抗肿瘤活性的，主要表现在导致线粒体膜电位 ($\Delta\psi_m$) 降低，活性氧 (ROS) 增加。并且，lagunamide A 降低了 Bcl-2 家族的抑凋亡蛋白的表达，增加了促凋亡蛋白的表达，从而加速了细胞死亡。这些研究结果对于从 lagunamide A 类化合物开发新的抗癌药物具有指导意义。

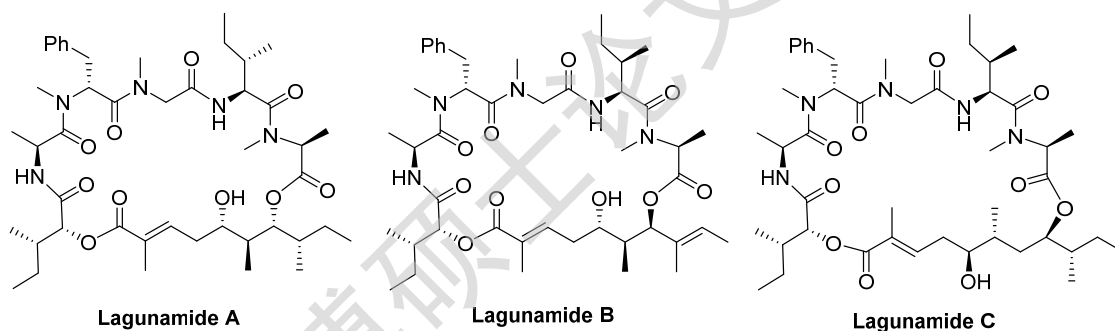


图 1.3 Lagunamides A-C 的化学结构

第二章 材料与方法

2.1 细胞培养

人非小细胞肺癌细胞 A549、人宫颈癌细胞 HeLa、人肝癌细胞 HepG2、BEL-7404、人直肠癌细胞 HCT116、人骨肉瘤细胞 U2OS、胃腺癌细胞 BGC-823、人急性早幼粒白血病细胞 HL-60、人乳腺癌细胞 MCF-7 以及恶性黑色素瘤细胞 A375 培养在 DMEM 或 RPMI1640 培养液中，其中含 10%胎牛血清（FBS）、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素及 100 U/mL 青霉素。

2.2 化合物与抗体

化合物溶解在 DMSO 中， β -actin, Flag, HSP60 与 α -tubulin 抗体购自 Sigma-Aldrich 公司，PARP 与 Bad 抗体购自 Santa Cruz 生物技术公司，Mcl-1 抗体购自 AbCam 公司，其他抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司。

2.3 细胞存活率测定

细胞存活率通过商业化方法 CellTiter 96[®]测定：将细胞以适当的密度种在 96 孔板中过夜后，加入空白对照（0.1% DMSO）或特定浓度的 lagunamide A 类化合物，作用一定时间后，加入 20 μL MTS 溶液，1-4 小时后在 490 nm 波长下测定吸收值。生存率计算公式为： $(\text{加药组吸收值} - \text{空白吸收值}) \div (\text{对照组吸收值} - \text{空白吸收值})$ 。IC₅₀ 值通过 GraphPad Prism 获得。

2.4 DAPI 染色

A549 细胞种至含有盖玻片的 6 孔板中，加入 DMSO 或 lagunamide A 类化合物作用一定时间后，以 PBS 缓冲液洗 2 次，再以 4%甲醛在室温下固定 20 分钟。然后加入 DAPI 染色室温下染色 15 分钟。洗去未结合的 DAPI 后封片，在共焦激光扫描显微镜下观察（LSM 780，德国 Carl Zeiss 公司）。

2.5 透射电镜扫描

细胞经 DMSO 或化合物处理、收集后，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 2.5%戊二醛，2%甲醛，2.5%戊二醛，0.05%氯化钙，1%锇酸固定，再以乙醇与丙酮脱水后嵌入到载体，切割为 60-80 纳米厚度，选中的区域以醋酸双氧铀/柠檬酸铅着色后以透射电镜观察（JEM-2100, JEOL 公司）。

2.6 细胞周期检测

细胞经 DMSO 或化合物处理、收集后，以 70%乙醇（体积比）在-20℃固定过夜，再以含 0.1%柠檬酸钠、0.3%NP-40 与 100 U/mL 核糖核酸酶的 PI 液（50 μg/mL）作用 30 分钟。DNA 含量通过流式细胞仪进行测定（EPICS XL，美国 Beckma 公司）。

2.7 Annexin V、PI 双染实验

细胞经 DMSO 或化合物处理、收集后，以商品化试剂盒（Annexin-V-Fluors，瑞士 Roche 公司）进行处理，再经流式细胞仪进行 FACScan 分析（LSRFortessa，美国新泽西州 BD 公司）。

2.8 Caspase 3 活性实验

细胞经 DMSO 或化合物处理后裂解，总蛋白以 BCA 定量，caspase 3 的活性以试剂盒（中国 Beyotime 公司）测定，即在 405 纳米下测定其对底物 DEVD 的活力。

2.9 线粒体膜电位 ($\Delta\psi_m$) 的测定

细胞经 DMSO 或化合物处理、收集后，与 JC-1（中国 Beyotime 公司）作用，再以光学显微镜（AX20 OBSERVER A1，德国 Zeiss 公司）与流式细胞仪观察、检测具有荧光活性的细胞。

2.10 活性氧 (ROS) 的测定

以 30%过氧化氢为阳性对照，ROS 的产生由 FACScan 流式细胞仪测定（中国 Beyotime 公司试剂盒）。

2.11 线粒体的分离

线粒体的分离由商品化试剂盒（美国 Thermo 公司）完成，提取的蛋白由 BCA 定量，以便后续的 western blot 实验。

2.12 western blot 实验

细胞经 DMSO 或化合物处理、收集后，以裂解液进行裂解（包含 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% (v/v) Triton X-100, 5% 甘油、5 μg/mL 亮抑酶肽、1 mM 原钒酸钠、50 mM 氟化钠、1 mM PMSF），总蛋白以 BCA 定量，等量的蛋白用于 SDS-PAGE 电泳分离，再转移至 PVDF 膜。蛋白与特异性的一抗、二抗免疫反应，

以化学发光成像系统进行检测、显色（CHEMIDOC，美国 Bio-rad 公司）。

2.13 外源性 Mcl-1 的表达

全长的人 Mcl-1 cDNA 以 PrimerSTAR DNA 扩增酶（中国 TAKARA 公司）进行 PCR 扩增，正向与反向引物分别为 5'-AAAAGAATTCGGTTTGGCCTCAAAGAAACG-3'，5'-AAAAGATCTCTATCTTATTAGATATGCCAAACC-3。扩增产物以 *EcoR* I、*Bgl* II 限制性内切酶酶切后克隆到 pCMV5-FLAG 表达质粒中。

2.14 瞬转实验

当 A549 的细胞密度达到 70%时，将 Mcl-1 质粒或空载体以 Lipofectamine 试剂（Lipofectamine[®] 3000，美国 Invitrogen 公司）进行转染，48 小时后用于后续实验。

第三章 结果与讨论

3.1 Lagunamide A 类化合物的构效关系研究。

Lagunamide A 是一种分离自海洋蓝藻细菌 *Lyngbya majuscula* 的环肽酯，具有抗疟原虫 *Plasmodium falciparum* 及抗小鼠白血病细胞株 P388 生长活性^[17]。为获得足量的化合物以进一步深入研究 lagunamide A 的生物活性及构效关系，我们发展了一条高选择性、高效率的多样性合成路线，合成了 lagunamide A 及其 5 个类似物^[18]（图 3.1），并评价了这 6 个化合物对一系列癌细胞的生长抑制作用进行了系统的评价，包括肺癌细胞 A549、宫颈癌细胞 HeLa、人骨肉瘤细胞 U2OS、肝癌细胞 HepG2、BEL-7404、胃癌细胞 BGC-823、结肠癌细胞 HCT116、乳腺癌细胞 MCF-7、白血病细胞 HL-60 以及黑色素瘤细胞 A375（表 3.1）。

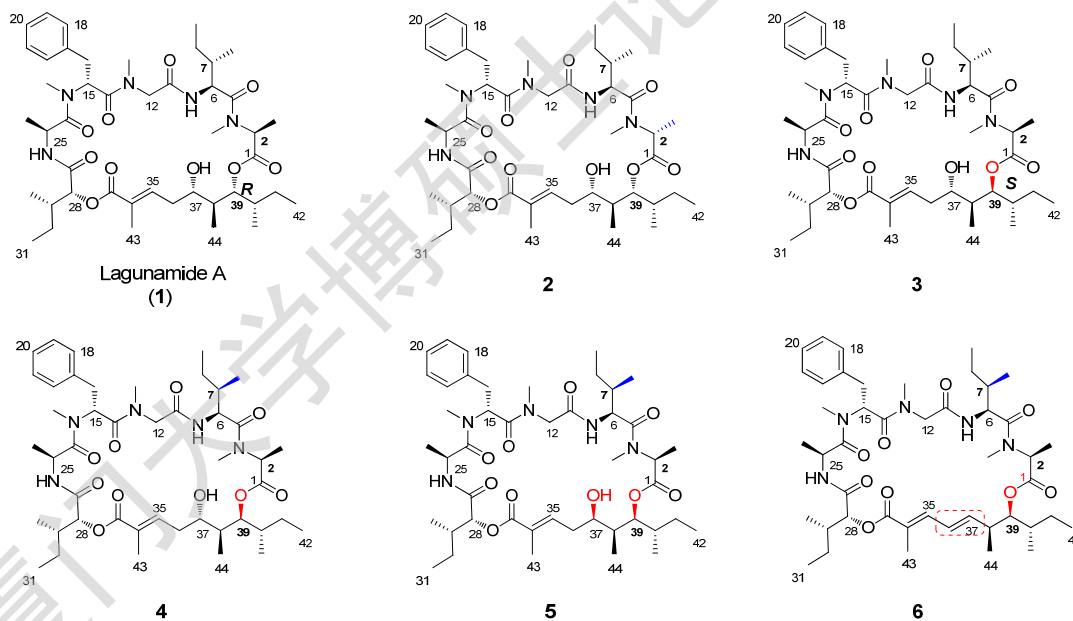


图 3.1 Lagunamide A 及其类似物的化学结构

从表 3.1 可以看出，天然产物 lagunamide (1) 具有最强的细胞毒性，其对所有测试的癌细胞的半数有效抑制浓度 (IC_{50}) 均小于 20 nM；仅有 C-2 位手性不同的化合物 2，细胞毒性相比于化合物 1 下降了 3 倍多，其 IC_{50} 值在 40 到 150 nM 之间；化合物 3 的 C-39 位手性相较于 1 由 R 变为 S，但其细胞毒性下降了 20 多倍；

具有更多手性发生改变的化合物 **4** 与 **5**，细胞毒性进一步有所降低；脱水产物 **6** 几乎失去了细胞毒性，其 IC₅₀ 值大于 10 μM。因此，lagunamide A 类化合物要保持良好的细胞毒性，C-39 位的 *R* 构型是一个关键因素，这为进一步的结构改造提供了重要的信息。

表 3.1. lagunamide A 类化合物抑制人源癌细胞生长的 IC₅₀ 值^a

IC ₅₀ (nM)	Lagunamide A (1)	2	3	4	5	6
A549	8.7±0.3	62.3±11.5	273.9±38.3	3400.3±567.3	>10000	>10000
HeLa	17.0±1.7	67.3±20.3	191.6±63.7	1377.7±313.5	>10000	>10000
U2OS	8.6±1.0	59.3±9.8	437.9±58.0	4036.7±400.7	>10000	>10000
HepG2	11.4±1.9	67.4±1.2	246.6±9.7	2537.3±486.3	>10000	>10000
BEL-7404	11.0±0.7	59.9±8.3	725.0±153.5	5859.3±384.4	>10000	>10000
BGC-823	4.7±0.4	42.5±1.8	231.7±25.3	3430.3±577.1	>10000	>10000
HCT116	8.2±1.2	52.4±5.1	200.0±19.5	3799.7±332.7	>10000	>10000
MCF-7	18.7±2.2	145.8±21.1	946.4±206.8	839.8±407.8	>10000	>10000
HL-60	19.8±0.9	92.6±1.9	713.9±97.6	8630.3±515.1	>10000	>10000
A375	8.3±1.8	56.3±6.6	212.6±42.8	970.2±178.7	>10000	>10000

^a 细胞生存率在加药后 48 小时通过 MTS 方法测定，IC₅₀ 值由 GraphPad Prism 5 计算而得

3.2 Lagunamide A 可诱导多种人源癌细胞的凋亡。

在确认 Lagunamide A 在多种癌细胞上表现出了很强的细胞毒性后，我们着手对其确切的作用机理进行了研究。我们首先观察了 lagunamide A 处理下细胞形态学变化。在 A549 细胞中以 10 nM lagunamide A 处理 24 小时后，可以观察到伪足撤回、收缩，染色质收缩，细胞核固缩（图 3.2 A），在透射电镜（TEM）下可以观察到 DNA 释放到细胞质，溶酶体包裹损伤的细胞器等典型的细胞凋亡现象（图 3.2 B）。为进一步确认，我们进行了 Annexin V-Fluors/PI 双染实验，以检测细胞膜上凋亡早期的标志物磷脂酰丝氨酸（PS）^[15]，结果表明，在 A549 细胞中以 10 nM lagunamide A 处理 48 小时后，高达 80% 的细胞呈 Annexin-V 阳性（图 3.2 C），说明 lagunamide A 导致了绝大部分细胞凋亡。以 20 nM 或 40 nM lagunamide A 处理 Hela, HepG2 或 HCT116 细胞后凋亡比例分别为 81%、50%、40%。

以上结果表明，lagunamide A 可通过诱导凋亡对多种癌细胞产生杀伤作用。

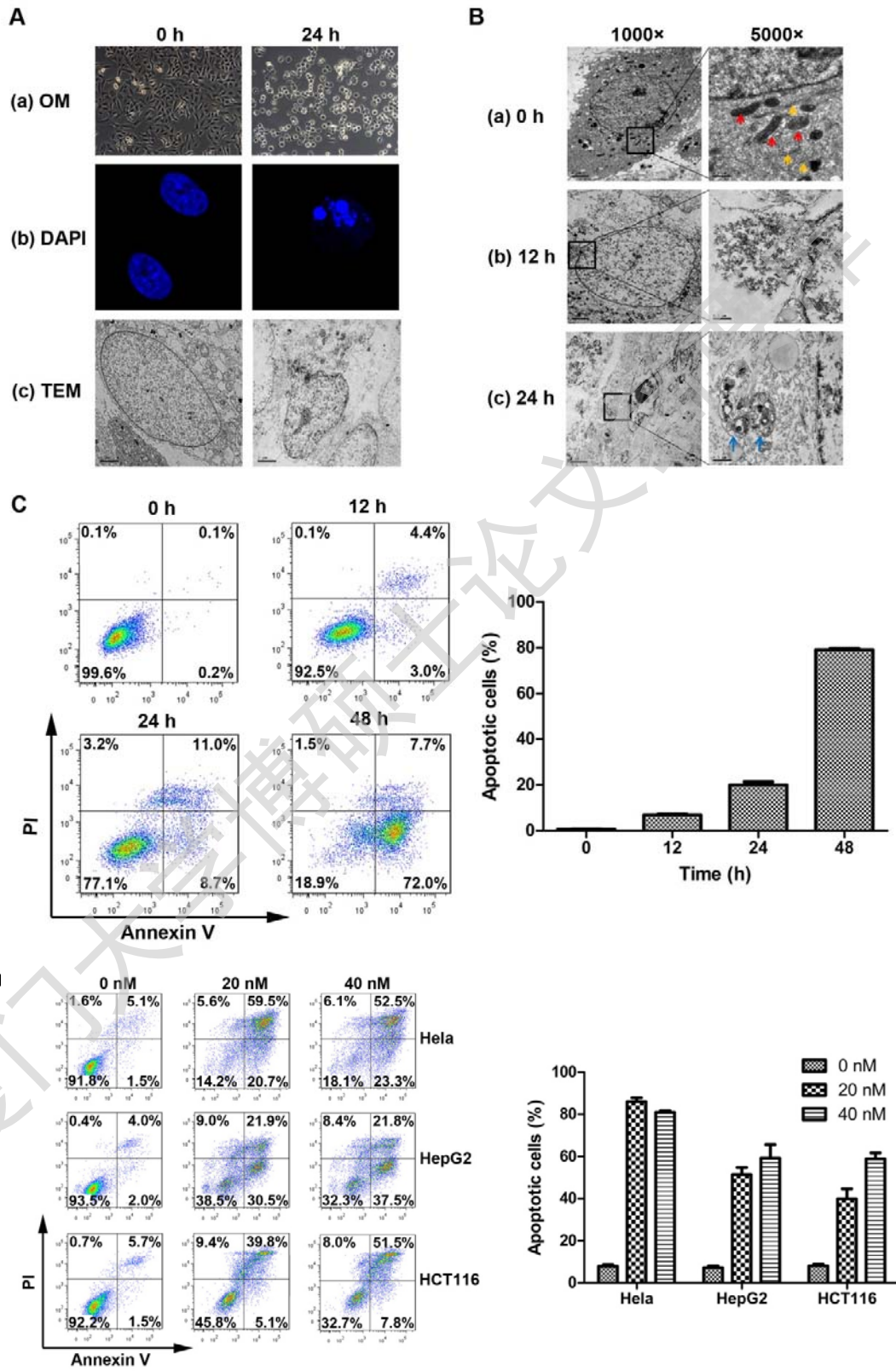
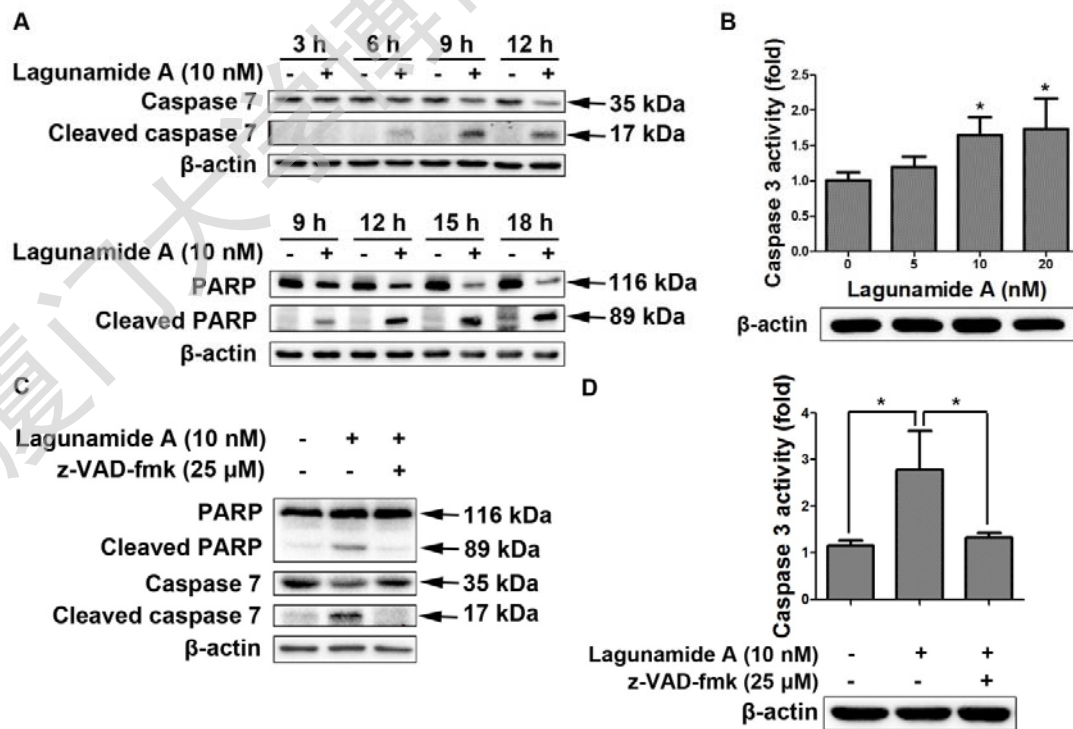


图 3.2 lagunamide A 诱导 A549 细胞凋亡。(A) 光学显微镜观察到的 lagunamide A 作用下 A549 细胞形态变化, 染色质以 DAPI 染色后以共聚焦激光扫描显微镜观察, 细胞核以 TEM 观察, 图中标尺为 2 微米。(B) TEM 下观察到的细胞核及细胞器形态, 左图标尺为 2 微米, 右图标尺为 0.5 微米, 数字为放大倍数, 红色、橙色与蓝色分别代表线粒体、内质网及自溶酶体。(C)、(D) lagunamide A 作用后 A549、HeLa、HepG 及 HCT116 细胞 PI/ Annexin V 双染的 FCAScan 流式细胞仪结果。

3.3 Lagunamide A 诱导了 caspase 依赖的细胞凋亡

在细胞凋亡过程中, caspase 将被激活, 进而水解一些关键的底物如 PARP, 再介导一系列凋亡事件^[19-22]。我们采用免疫印迹法检测了 A549 细胞内与凋亡相关的蛋白, 结果与预期一致, 切割的半胱天冬酶 caspase 7 与 PARP 均呈时间依赖性地增加 (图 3.3 A), caspase 3 的活性呈浓度依赖性地增强 (图 3.3 B)。若提前加入 caspase 广谱抑制剂 z-VAD-fmk 后, 切割的 caspase 7 与 PARP 几乎消失了 (图 3.3 C), caspase 3 的活性也降低至了正常水平 (图 3.3 D)。这些结果表明, lagunamide A 介导了 caspase 3 依赖性的细胞凋亡。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.