

学校编码: 10384
学 号: 24520121153170

分类号密级
UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**AMP 类似物 AICAR 抑制高脂饮食诱导的肝脏
脂肪变性和肝癌的发生发展**

**The AMP-mimetic AICAR prevents HFD-promoted
hepatosteatosis and inhibits liver tumorigenesis**

高建龙

指导教师姓名: 尹震宇 教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 年 月

论文答辩时间: 年 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席:

教授

评阅人:

2015 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

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma) 是最常见的肝脏原位肿瘤。肝癌的危险因素包括酒精性肝疾病、非酒精性肝炎、肝炎病毒感染等。这些因素都和肝癌形成中炎症有重要关系。肥胖人群中, 肝脏脂质积累造成的非酒精性脂肪肝炎, 肥胖已成为肝癌形成的潜在危险因素。流行病学研究表明, 超重和肥胖增加了癌症发生的风险。在升高体重指数超标的肝癌患者中, 由于肝癌死亡的风险是正常人的 4.5 倍。文献报道, 肥胖通过增加白介素 6 和肿瘤坏死因子的表达促进肝脏炎性过程, 激活促癌因子 STAT3 的转录活性促进肝癌的发生。

AMPK 是细胞内重要的能量感受器, 它的激活可以关闭合成代谢促进分解代谢。同时在脂质代谢调节中起着重要的作用, 它在肿瘤的发生发展中的机制还不明了, 它一方面可以促进肿瘤细胞存活, 另一方面又可以通过多种机制抑制肿瘤的发生发展。它在肿瘤中的作用值得我们研究。我们通过建立 DEN 小鼠肝癌原位模型, 给予小鼠高脂饮食, 腹腔注射 AICAR (AMPK 激活剂), 发现 AICAR 可以显著抑制小鼠肝癌的进展, 他一方面减轻高脂造成的肝脏脂肪性病变, 另一方面降低了小鼠血清和肝脏中的白介素 6 的水平, 对白介素 6 下游通路 STAT3 有明显的抑制作用。我们阐明了激活 AMPK 可能抑制肝癌的进展, AMPK 激活剂 AICAR 可能是未来肝癌治疗的潜在药物。

关键字: 肝癌 肥胖 AICAR AMPK

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC), the most common primary liver cancer, is closely linked to risk factors such as preexisting alcoholic liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and infection with hepatitis B and C viruses. These factors are all associated with inflammation, which plays a critical role in tumorigenesis. In nonalcoholic steatohepatitis, a condition in which fat accumulates in the liver, the common underlying factor is obesity, rather than alcohol abuse. Obesity has been examined as a potential risk factor for HCC. Indeed, epidemiological studies indicate that excess body weight and obesity may increase cancer risk. In men who were free of cancer at enrollment, individuals with high body mass index experience a large, 4.5-fold increase in risk of death from liver cancer during 16 years of follow-up. Obesity promotes HCC development by enhancing production of the cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α), which cause hepatic inflammation, activate the oncogenic transcription factor STAT3 and trigger tumorigenesis (Park et al., 2010). Thus, there has long been a view that prevention of obesity and associated metabolic diseases may also decrease the risk of liver cancer.

In eukaryotic cells, AMP-activated protein kinase (AMPK) is a sensor of energy and nutrient status, and is a master regulator of metabolic homeostasis by switching off anabolic pathways, including synthesis of fatty acids, triglycerides, cholesterol, and proteins. Therefore, AMPK is a good pharmacological target to treat metabolic diseases such as obesity, type 2 diabetes and cardiovascular disease. At the same time, AMPK is also a potential cancer therapeutic, because its activation causes cell cycle arrest, presumably by suppressing most of the metabolic changes that occur in rapidly proliferating cells. However, whether AMPK should be activated or inhibited during cancer therapy remains an open question, and requires further investigation. On the one hand, AMPK activation during energy stress has been shown to enhance survival of cancer cells. On the other, AMPK has been found to negatively regulate aerobic

glycolysis in cancer cells, and to suppress tumor growth *in vivo*.

AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside) is a membrane-permeable prodrug that activates AMPK. In cells, AICAR is metabolized to the nucleotide ZMP, an AMP analog with similar effects on the AMPK complex, including allosteric activation, T172 phosphorylation, and protection from dephosphorylation. Here, we chemically triggered HCC in diet-induced obese mice, and treated them with AICAR. We found that long-term AICAR treatment prevented hepatic steatosis, decreased IL-6 production, and inhibited HCC development. Further, AICAR suppressed phosphorylation of the oncogenic transcription factor STAT3. These results suggest that AMPK is a promising target to treat HCC, and that long-term AICAR administration prevents obesity-related liver cancer.

Key words: HCC; Obesity; AMPK; AICAR

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前沿.....	1
1 肝细胞癌.....	1
1.1 肝细胞癌的流行病学.....	1
1.1.1 全球分布.....	1
1.1.2 种族.....	2
1.1.3 性别.....	2
1.1.4 年龄.....	3
1.1.5 危险因素的分佈.....	3
1.2 肝癌的危险因素.....	4
1.2.1 乙型肝炎病毒.....	4
1.2.2 丙型肝炎病毒.....	4
1.2.3 酒精.....	5
1.2.4 黄曲霉素.....	5
1.2.5 非酒精性肝脏疾病.....	6
1.2.6 肥胖.....	6
1.2.7 糖尿病.....	7
1.2.8 烟草.....	7
1.3 肝癌发病的机理与分子机制.....	7
1.3.1 细胞周期检测点丢失.....	9
1.3.2 抗凋亡.....	10
1.3.3 促癌信号通路的激活.....	10
1.4 肝癌的诊断和治疗.....	10
2 能量感应器 AMPK.....	12
2.1 AMPK 简介.....	12
2.2 AMPK 的结构.....	13

2.3 AMPK 的功能	16
2.3.1 AMPK 对代谢的调节	16
2.3.2 AMPK 对细胞生长和凋亡的调节	17
2.4 AMPK 调控及相关药物	18
2.4.1 AICAR.....	18
2.4.2 治疗糖尿病药物	19
2.4.3 2-脱氧葡萄糖、A-769662 和水杨酸类.....	20
2.4.4 苯巴比妥.....	20
2.4.5 中药或天然提取物.....	20
2.4.6 AMP 代谢抑制剂.....	20
2.5 AMPK 与肿瘤	20
3 肥胖和肝癌	22
3.1 脂肪细胞重编程和炎症细胞的分泌	23
3.2 异常的脂质积累和脂毒性.....	26
3.3 胰岛素和胰岛素样生长因子受体	27
3.4 miRNA 介导的基因表达调节的改变.....	28
3.5 改变胃肠道菌群	28
第二章 材料和方法	29
2.1 常用药品、试剂和仪器	29
2.2 小鼠原位肝癌模型的建立	31
2.3 免疫组织化学染色.....	31
2.4 小鼠 MRI 检测	31
2.5 Masson 染色	32
2.6 油红染色	32
2.7 苏木精—伊红染色法 (HE 染色)	32
2.8 实时定量 PCR.....	33
2.9 蛋白质的提取	33
2.10 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与 western blot 分析.....	34
2.11 TUNEL 凋亡检测.....	34
第三章 结果和讨论	35
3.1 结果.....	35

3.1.1 AICAR 可以抑制 DEN 诱导的小鼠原位肝癌的形成.....	35
3.1.2 AICAR 在 DEN 诱导小鼠原位肝癌晚期没有明显作用	37
3.1.3 AICAR 有效抑制高脂饮食诱导的小鼠肝脏脂肪性变	39
3.1.4 AICAR 抑制 DEN 及高脂饮食对肝脏的损伤及代偿性增生	42
3.1.5 AICAR 抑制 IL-6 的生成	44
3.1.6 AICAR 抑制 STAT3 的磷酸化.....	46
3.1.7 AICAR 抑制肝脏脂肪积累和 IL-6 的水平是一个慢性的过程.....	47
3.2 讨论.....	49
参考文献.....	51
致谢.....	66

TABLE OF CONTENT

ABSTRACT	I
Abstract.....	II
CHAPTER 1 INTRODUCTION.....	1
1Hepatocellular carcinoma.....	1
1.1 Epidemiology	1
1.1.1 Distribution.....	1
1.1.2 Race.....	2
1.1.3 Sex.....	2
1.1.4 Age	3
1.1.5 Distribution of Risk Factors	3
1.2 Risk Factors of HCC.....	4
1.2.1 HBV	4
1.2.2 HCV	4
1.2.3 Alcohol.....	5
1.2.4 Aflatoxin.....	5
1.2.5 NAFLD.....	6
1.2.6 Obesity.....	6
1.2.7 Diabetes	7
1.2.8 Tobacco	7
1.3 Molecular Mechanisms ofHepatocarcinogenesis	7
1.3.1 Loss of Cell-Cycle Checkpoints	9
1.3.2 Resistance to Apoptosis.....	10
1.3.3 Activation of Oncogenic Pathways.....	10
1.4 Diagnosis and Treatment	10
2 Energy Sensor-AMPK	12
2.1 Introduction.....	12
2.2 Structure.....	13

TABLE OF CONTENT

2.3 Function	16
2.3.1 AMPK Regulation of Metabolism	16
2.3.2 AMPK Regulation of Growth and Apoptosis.....	17
2.4 The Drugs Regulation of AMPK.....	18
2.4.1 AICAR.....	18
2.4.2 Biguanides and Thiazolidinediones.....	19
2.4.3 2-DG、A-769662 和 Salicylate	20
2.4.4 Phenobarbital	20
2.4.5 Nutraceuticals and Traditional Medicines	20
2.4.6 Inhibitor of AMP	20
2.5 AMPK and Cancer	20
3. Obesity and HCC	22
3.1 Adipose tissue remodeling and pro-inflammatory adipokine secretion	23
3.2 Ectopic lipid accumulation and lipotoxicity	26
3.3 Insulin and IGF.....	27
3.4 Changes in miRNA-mediated gene expression.....	28
3.5 Altered composition of gut microbiota.....	28
CHAPTER 2. MATERIALS AND METHODS	29
2.1 Chemicals, reagents and instruments.....	29
2.2 The model of HCC	31
2.3 IHC	31
2.4 MRI.....	31
2.5 Masson staining.....	32
2.6 Oil Red staining.....	32
2.7 HE staining.....	32
2.8 RT-PCR.....	33
2.9 Protein extract.....	33
2.10 SDS-PAGE and western blot	34
2.11 TUNEL apoptosis detection.....	34
CHAPTER 3 RESULTS AND DISCUSSION	35
3.1 Results.....	35

TABLE OF CONTENT

3.1.1 AICAR inhibits DEN-induced liver tumorigenesis.....	35
3.1.2 Short-term AICAR treatment exhibits no significant effect in advanced HCC.....	37
3.1.3 AICAR prevents HFD-induced hepatosteatosis.....	39
3.1.4 AICAR administration prevents liver damage and inhibits compensatory proliferation	42
3.1.5 AICAR inhibits production of IL-6.....	44
3.1.6 AICAR inhibits STAT3 phosphorylation	46
3. 1.7 AICAR reduced lipid accumulation in liver via a chronic process that ultimately results in suppressed IL-6 production.....	47
3.2 Discussion	49
REFERENCE.....	51
Thanks	66

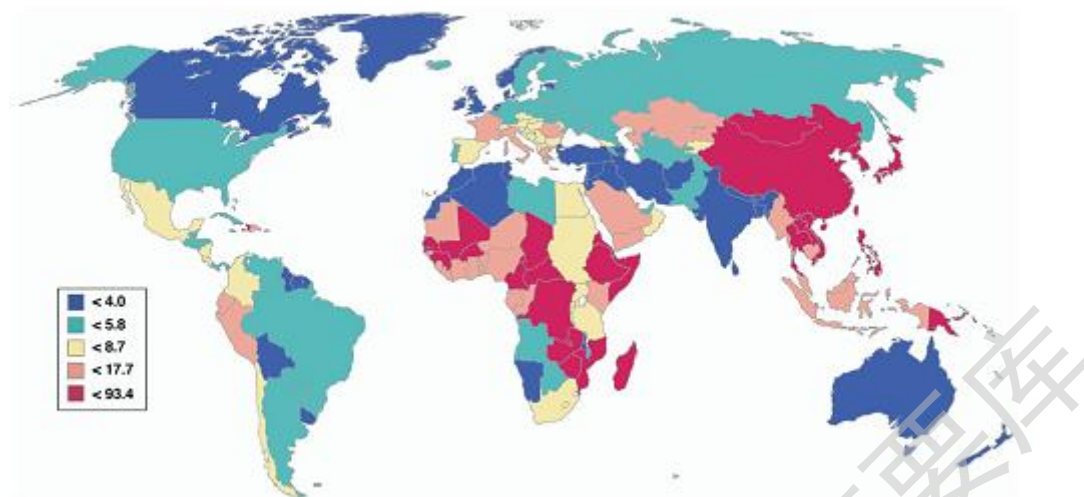
第一章 前沿

1 肝细胞癌

1.1 肝细胞癌的流行病学

1.1.1 全球分布

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma) 是肝细胞癌变发展的恶性肿瘤。是我国常见的恶性肿瘤之一。2014 年的世界癌症报告显示, 肝细胞癌 (HCC) 是已成为男性第五大癌症 (每年新发病例约 55.4 万), 女性的第九大癌症 (每年新发病例约 22.8 万)。HCC 的高患病率及高病死率 (总体病死率 0.95), 肝细胞癌发病率在所有癌症中排名第五同时它也是癌症造成的死亡的最重要病因, 使其成为当前社会主要的健康负担。在美国肝癌患者尽管采取了激进的治疗但是它的 5 年生存率是 8.9%, 它是致死率第二高的肿瘤仅次于胰腺导管细胞癌。在肝脏原发性肿瘤 (肝细胞癌, 肝内胆管细胞癌, 肝母细胞癌, 胆管囊腺癌, 血管瘤, 上皮样血管内皮瘤, 纤维板层癌) 中肝细胞癌占 90% 以上, 它是一个全球性的问题, 每年有超过一百万的新发患者, 这其中 80% 患者位于非洲和东亚 (在南非和东南亚人群中没十万人就有一百人患有肝癌)。中国患者占世界一半以上 (男性为 28.47/100 000, 女性为 12.2/100000), 其他高发地有塞内加尔 (男性为 35.2/100 000, 女性为 13.3/100000), 朝鲜 (男性为 48.8/100 000, 女性为 14.6./100000), 赞比亚 (男性为 36.67/100 000, 女性为 14.6/100000)。美洲、北欧和大洋洲的肝癌发生率较低 (5.0/100 000)。世界上肝癌发生率最高的地方在泰国 (男性为 88.0/100 000, 女性为 35.4/100000), 但是在这一地区的肝癌大多数是肝内胆管细胞癌。



Parkin DM. Cancer Incidence in five continents. IARC scientific publications volume VIII[No. 155]. 2002.

现在采取一些有效措施，一些肝癌高发地肝癌发生率降低。在亚洲许多高发地区，新生儿会接种乙型肝炎病毒疫苗，肝癌的发生率有所降低，在中国江苏省政府通过改变食物类型来防止黄曲霉素造成的肝癌也取得成效。相反，在一些肝癌发生率较低的地方现在正慢慢增多，包括美国，英国和澳大利亚，这其中涉及许多因素，在西方国家发病率的上升主要是由于丙肝的流行和慢性酒精性肝脏疾病的增多。肝癌的发病年龄通常在 50 岁左右，但在非洲更早，大约 30 岁左右，这大概是因为他们更早暴露在乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒的环境中，男性发展为肝细胞癌的危险度是女性的 3-8 倍。

1.1.2 种族

在一些地方肝癌的发生率在不同的人群中不一样，例如在新加坡中国男性肝癌发生率为 21.21/100 000，印度男性肝癌发生率则为 7.86/100 000。新加坡的中国女性肝癌发病率为 5.13/100 000，印度女性肝癌发病率为 1.77/100 000。另一个例子就是，在美国无论年龄和性别，亚洲人群的肝癌发病率是美洲人群的 2 倍，也就是比白人的发病率高 2 倍。肝癌发生的种族差异主要是不同的流行因素和肝脏疾病造成的。

1.1.3 性别

在所有的人群中男性肝癌的发生率通常是女性的 2-4 倍，到目前为止，这种差异性最明显的是欧洲地区。目前报道的比较典型的地区瑞典为 4.1 倍，意大利

为 5.1 倍，在一些肝癌高发地，中国启动男女比例为 3.1:1，日本 3.7:1，赞比亚 2.8:1，在中南美洲这种差异性最小，最典型的哥伦比亚，男女比例为 1.2:1。这种差异性的最主要原因最可能是男女暴露在肝癌危险因素的不同，男性更容易感染乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒，饮酒，抽烟和铁的累计较多，但是，在小鼠实验中发现，雄性小鼠肝癌发生率是雌性小鼠的 2-8 倍，这些数据表明这种差异主要是由雄性激素造成的而不仅仅是暴露的危险因素不同，排除环境的内在性因素更可能造成男性更高的肝癌发生率。台湾一项研究表明：男性更容易感染乙型肝炎病毒并发展成为肝癌。

1.1.4 年龄

在全球肝癌的年龄分布因地区，发生率和性别而不一样。在大多数地区，女性的发病年龄比男性晚 5 年。在一些低发区，如美国、英国、加拿大，人群发病率最多的在 75 岁，这和亚洲的一些高发地类似如香港和上海，相反在非洲发病率最高的是男性 60-65 岁，女性 65-70 岁，这些年龄差异性可能和不同地区人群感染肝炎病毒的差异，不同的年龄感染肝炎病毒以及暴露在不同的危险因素中，很明显，丙型肝炎病毒感染的大多数是成人阶段而乙型肝炎病毒主要是年轻人感染²。

1.1.5 危险因素分布

肝癌的主要危险因素因地区不同而有明显的差异，在大多数肝癌高发地，最主要的危险因素是慢性乙型肝炎病毒的感染，在亚洲，乙型肝炎病毒主要通过母婴传播，但是在非洲主要是在儿童期通过兄弟姐妹传染。在许多肝癌高发地的另外一个重要危险因素是食用了黄曲霉毒素污染的食物。和亚洲其他地区不一样，在日本最主要的肝炎病毒是丙型肝炎病毒，第二次世界大战后期丙型肝炎病毒在日本广泛流行。因此造成丙型肝炎病毒感染造成的肝癌预计在 2015 年达到一个顶峰，尽管目前一些数据表明可能已经达到了峰值。在一些肝癌低发区，肝硬化患者的增多可能是造成肝癌增多的一个重要原因，这是一些联合的因素造成的，包括丙型肝炎病毒感染，乙型肝炎病毒感染。估计由于毒品静脉注射，在北美和欧洲中南部，肝炎病毒感染了许多成年人，这造成了肝癌的发生率发生增长。

1.2 肝癌的危险因素

肝癌大部分是发生在慢性肝脏疾病和肝硬化的基础上。肝癌患者肝硬化的主要原因是乙型肝炎病毒，丙型肝炎病毒，酒精性肝疾病和非酒精性脂肪肝炎。其他原因包括自身免疫学肝炎，抗胶原酶缺乏，嘌呤代谢紊乱等。

1.2.1 乙型肝炎病毒

在全球范围，乙型肝炎病毒是引起肝癌的最重要的原因，大概有 3 亿人感染乙型肝炎病毒。病例对照研究表明和正常人相比，慢性乙型肝炎病毒携带者的肝癌发生率升高 5 到 15 倍，乙型肝炎病毒感染者大部分发展为肝硬化和肝癌，大概有 70%到 90%。尽管在没有肝硬化的患者中乙型肝炎病毒是最重要的原因。乙型肝炎病毒相关肝癌主要是地区分布的，在这些地区，通常是通过母婴传播，大概 90%发展为慢性携带者。在肝癌低发区的传播方式是不一样的，通常是通过性传播和血液传播感染成人，但通常会被消除。还有一些其他的原因会影响乙型肝炎病毒携带者发展为肝癌，例如性别，年龄，种族，肝硬化，家族肝癌史，暴露在黄曲霉素，酒精，烟草环境中，混合感染丙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒。肝癌的发生率在乙型肝炎病毒高复制的病人中会提高，在亚洲的一项研究表明，丙型肝炎病毒造成的肝脏疾病会比乙型肝炎病毒更加严重。在慢性乙型肝炎病毒感染自然疾病史中，自发或经过治疗产生抗体预后会更加好，一项病例对照研究表明使用干扰素治疗后的患者预后比未治疗的患者更好，但是并没有统计学意义。已经产生乙型肝炎病毒抗体的病人发生肝癌的比比较低，许多研究表明，感染乙型肝炎病毒但产生抗体的比乙型肝炎病毒 DNA 长期复制的病人预后好，肝癌的发生率也明显低 5:495/100000。乙型肝炎疫苗被认为是抵抗乙型肝炎病毒感染的最好的方法，它被证实可以有效的阻止乙型肝炎病毒的复制和肝癌的发生，在成年人也许要数十年的时间。在台湾一项回顾性研究表明，注射乙型肝炎疫苗可以有效降低肝癌的发病率，通过注射疫苗后的十年时间里，台湾的肝癌发病率显著下降，在 1982 到 1986 年间，儿童的肝癌发病率从 0.7/100000 降到 0.36/100000，肝癌的致死率也发生了同样水平的下降。有研究通过数学模型发现有 620000 人因为乙型肝炎病毒感染造成死亡，580000 是因为乙型肝炎相关肝硬化和肝癌。

1.2.2 丙型肝炎病毒

慢性丙型肝炎病毒是肝癌发展的一个关键危险因素。丙型肝炎病毒感染在不

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.