

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620100153915

UDC _____

厦门大学

博士学位论文

DAM 的发酵放大及其诱导 HeLa 细胞 凋亡机制的初步研究

The scale-up fermentation of DAM and preliminary study of
DAM-induced apoptosis in HeLa cells

林 鹏

指导教师姓名: 苏 文 金 教授

张 连 茹 教授

黄 耀 坚 教授

专业名称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2015 年 11 月

论文答辩日期: 2015 年 12 月

学位授予日期: 2015 年 12 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 12 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.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1 海洋天然产物研究概况.....	1
1.2 红树植物内生真菌天然产物研究进展.....	4
1.3 微生物液体发酵研究概况.....	9
1.3.1 发酵研究概述.....	9
1.3.2 补料分批发酵.....	10
1.3.3 发酵过程中的溶氧控制.....	12
1.3.4 发酵产物的提取与精制.....	13
1.4 细胞凋亡.....	15
1.4.1 细胞凋亡简介.....	15
1.4.2 细胞凋亡的基本特征.....	16
1.4.3 细胞凋亡的信号途径.....	17
1.4.3.1 膜死亡受体介导的凋亡途径（外源途径）.....	17
1.4.3.2 线粒体介导的凋亡途径（内源途径）.....	18
1.4.3.3 caspase 级联反应.....	19
1.4.4 细胞凋亡的基因调控.....	20
1.4.4.1 Bcl-2 基因家族.....	20
1.4.4.2 p53 引导细胞凋亡.....	20
1.4.5 细胞周期调控.....	21
1.4.5.1 Cyclin/CDK 和 CKI.....	21
1.4.5.2 细胞周期检查点调控.....	21
1.5 Hsp90 简介.....	23
1.5.1 Hsp90 种类与结构.....	24
1.5.2 Hsp90 作用机理.....	25
1.5.3 Hsp90 客户蛋白及相关信号通路.....	26
1.5.3.1 Akt 及相关信号通路.....	27
1.5.3.2 IKK 相关信号通路.....	28
1.5.3.3 Raf/MEK/ERK 信号通路与细胞凋亡.....	30
1.5.4 常见 Hsp90 抑制物.....	32
1.6 本课题研究的背景、目的及意义.....	33

第二章 材料与amp;方法	35
2.1 实验材料	35
2.1.1 菌株来源	35
2.1.2 化合物来源	35
2.1.3 细胞株来源	35
2.1.4 主要试剂和试剂盒	35
2.1.5 主要耗材和仪器	38
2.1.6 主要试剂的配置	40
2.2 实验方法	44
2.2.1 主要技术路线	44
2.2.2 液体发酵放大	44
2.2.3 发酵参数的测定与 DAM 定性定量分析	47
2.2.4 DAM 规模制备	49
2.2.5 细胞复苏、传代与冻存	51
2.2.6 抗肿瘤活性测定 (MTT 法测定细胞增殖抑制)	52
2.2.7 细胞存活率测定	52
2.2.8 细胞周期分布测定	52
2.2.10 免疫荧光观察	53
2.2.11 Western-Blotting 检测	54
2.2.12 免疫共沉淀	55
2.2.13 裸鼠移植瘤	55
2.2.14 免疫组织化学 (石蜡切片)	56
第三章 结果与分析	59
3.1 DAM 的发酵放大及其参数的控制	59
3.1.1 10L 罐上高产菌株的筛选	59
3.1.2 10 L 发酵罐中发酵基质的调整	61
3.1.3 临界氧浓度和 K_{La} 的测定及发酵过程的溶氧控制策略	63
3.1.4 剪切力对 DAM 发酵的影响	64
3.1.5 接种量对 DAM 发酵的影响	66
3.1.6 发酵后期的残糖控制	67
3.1.7 50 L 发酵罐的放大及其过程控制	68
3.1.8 200 L 的中试放大及其过程控制	69
3.2 DAM 的分离纯化与规模制备	72
3.2.1 粗提物预处理	72
3.2.2 DAM 的规模制备	72
3.3 DAM 抗肿瘤活性机制研究	76
3.3.1 DAM 抑制肿瘤细胞的生长与增殖	76
3.3.2 DAM 引起 HeLa 细胞凋亡	80
3.3.2.1 DAM 对 HeLa 细胞存活率的影响	80
3.3.2.2 DAM 对 HeLa 细胞核形态的影响	80

3.3.2.3 Annexin V/PI 双染色检测 DAM 引起的 HeLa 细胞凋亡	81
3.3.2.4 DAM 对 HeLa 细胞内凋亡相关蛋白的影响	83
3.3.2.5 DAM 对 HeLa 细胞周期的影响	87
3.3.2.6 DAM 对 HeLa 细胞内活性氧的影响	89
3.3.3 DAM 对 Hsp90 客户蛋白的影响	94
3.3.3.1 DAM 对不同细胞株 Hsp90 客户蛋白的影响	94
3.3.3.2 DAM 持续性激活 MEK/ERK 通路	97
3.4 DAM 对裸鼠移植瘤的影响	99
3.4.1 DAM 抑制 HeLa 系宫颈癌移植瘤的生长	99
3.4.2 移植瘤内 Hsp90 相关蛋白的免疫组化分析	101
第四章 讨论与结论	104
4.1 DAM 发酵放大的条件优化与探索	104
4.1.1 发酵过程溶氧控制工艺的探索	104
4.1.2 培养基质的优化	104
4.1.3 补料方式与补料浓度的确定	106
4.2 DAM 的纯化与制备	106
4.3 DAM 诱导 HeLa 细胞凋亡的机制探索	107
4.4 进展与展望	110
参考文献	113
常用英文缩写词	129
致谢	132

Catalogue

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 The summary of marine natural products.....	1
1.2 Mangrove fungi and their secondary metabolites	4
1.3 Microbial liquid fermentation	9
1.3.1 The summary of liquid fermentation	9
1.3.2 Fed-batch fermentation	10
1.3.3 Control of fermentation conditions.....	12
1.3.4 Purification and preparation of microbial natural products	13
1.4 Apoptosis	15
1.4.1 General introduction of apoptosis.....	15
1.4.2 Morphological changes of apoptosis	16
1.4.3 The apoptosis pathways	17
1.4.3.1 Death receptors signaling pathway.....	17
1.4.3.2 Mitochondrial pathway.....	18
1.4.3.3 Caspase activation	19
1.4.4 Regulated genes of apoptosis.....	20
1.4.4.1 Bcl-2 family.....	20
1.4.4.2 p53	20
1.4.5 The regulation of cell cycle and cancer	21
1.4.5.1 Cyclin/CDK and CKI	21
1.4.5.2 Cell cycle checkpoints.....	21
1.5 Hsp90 Review.....	23
1.5.1 Classification and Structure of Hsp90	24
1.5.2 Mechanism of Hsp90	25
1.5.3 Hsp90 client proteins and related pathways.....	26
1.5.3.1 Akt signal pathway	27
1.5.3.2 IKK/I κ B/NF- κ B signal pathway	28
1.5.3.3 Raf/MEK/ERK signal pathway	30
1.5.4 Study on Hsp90 inhibitors	32
1.6 Background, Purpose and Significance of this study	33

Chapter 2 Materials and Methods	35
2.1 Materials.....	35
2.1.1 Strain	35
2.1.2 Compounds	35
2.1.3 Cell lines	35
2.1.4 Reagent and Kits	35
2.1.5 Instruments.....	38
2.1.6 Preparing of major solution	40
2.2 Methods	44
2.2.1 Technological process	44
2.2.2 Scale-up fermentation	44
2.2.3 Determination of fermentation parameters and qualitative and quantitative analysis of DAM	47
2.2.4 Large-scale preparation of DAM	49
2.2.5 Cell thawing, Passage and Cryopreservation.....	51
2.2.6 MTT	52
2.2.7 Measurement of cell death	52
2.2.8 Cell cycle analysi	52
2.2.10 Immunofluorescence.....	53
2.2.11 Western-Blotting	54
2.2.12 Co-Immunoprecipitation.....	55
2.2.13 Xenograft in nude mice.....	55
2.2.14 Immunohistochemistry(Paraffin section).....	56
Chapter 3 Results and Analysis	59
3.1 Scale-up fermentation of DAM and its parameters control	59
3.1.1 Screening of high yield strain in 10 L fermentations.....	59
3.1.2 The adjustment of the fermentation substrate in 10 L fermentations.....	61
3.1.3 The determination of critical oxygen concentration and K_{La} and dissolved oxygen control strategies of the fermentation process.....	63
3.1.4 The influence of the shear stress of DAM fermentation.....	64
3.1.5 The influence of inoculation quantity of DAM fermentation	66
3.1.6 Residual sugar control in late fermentation	67
3.1.7 Process control in 50 L fermentation	68
3.1.8 Process control in 200 L fermentation	69
3.2 Purification and Large-scale preparation of DAM	72
3.2.1 Pretreatment of fermentation broth.....	72
3.2.2 Large-scale preparation of DAM	72
3.3 The mechanism research on anti-ancer activities of DAM.....	76
3.3.1 DAM inhibits Viability and Proliferation of tumor cells.....	76
3.3.2 DAM induced HeLa cell apoptosis.....	80

3.3.2.1 The influence of DAM on HeLa survival rate.....	80
3.3.2.2 The influence of DAM on HeLa nuclear shape.....	80
3.3.2.3 Detection of DAM induce HeLa apoptosis by Annexin V/PI.....	81
3.3.2.4 The influence of apoptosis-related proteins in DAM induce HeLa apoptosis.....	83
3.3.2.5 The influence of DAM on the cell cycle.....	87
3.3.2.6 The effects of ROS in DAM induce HeLa apoptosis.....	89
3.3.3 Impact of DAM on Hsp90 client proteins.....	94
3.3.3.1 Impact of MED on Hsp90 client proteins.....	94
3.3.3.2 DAM constitutively activates MEK/ERK pathway in HeLa.....	97
3.4 The influence of DAM of xenograft tumor in nude mice.....	99
3.4.1 DAM inhibit the growth of cervical cancer HeLa department in nude mice	99
3.4.2 The impact of DAM on Hsp90 associated proteins in the transplanted tumor by immunohistochemical analysis.....	101
Chapter 4 Discussion and Conclusion.....	104
4.1 Optimization and scale-up in submerged fermentation of DAM.....	104
4.1.1 The effects of DO on DAM fermentation.....	104
4.1.2 The optimization of fermentation culture substrate.....	104
4.1.3 Feding in the process of DAM fermentation.....	106
4.2 Purification and preparation of DAM.....	106
4.3 The mechanism research of DAM induce HeLa apoptosis.....	107
4.4 Progress and Prospects.....	110
References.....	113
Abbreviations.....	129
Acknowledgements.....	132

摘要

丰富的海洋生物资源为天然产物提供了重要来源,红树内生真菌由于独特的生理和代谢系统,产生了一些新颖独特的次级代谢产物。去乙酰真菌环氧二烯(Deacetylmycopoxydiene, DAM)是本课题组杨丽珊同学从红树植物秋茄内生拟茎点霉属真菌 A-1-2-3 次级代谢产物中分离得到,具有新颖的含氧桥结构骨架,前期实验表明,该化合物具有较强的抗肿瘤活性。

本论文通过对菌株发酵技术参数的优化,确立了 DAM 液体发酵放大的工艺控制流程并进行了规模制备,初步阐明了 DAM 的抗肿瘤作用及其诱导 HeLa 细胞凋亡的作用机制,并通过裸鼠移植瘤模型验证其体内抗肿瘤作用。主要研究结果包括以下几个方面:

1) 在 10 L 罐水平筛选确定 P2-139 菌株作为后续发酵菌株,并对 P2-139 发酵培养基中的葡萄糖浓度和马铃薯汁浓度、接种量及发酵转速进行调整优化,最终确定 P2-139 的发酵培养基组成:马铃薯 200 g/L、葡萄糖 65 g/L、陈海水 20% (V/V);接种量为 5-7%之间;10 L 罐转速控制在 400 r/min 以内,200 L 罐 300 r/min 以内。

2) 10 L 罐水平上,以发酵不同阶段的临界氧浓度和 K_La 为依据,并考虑生物量的影响,我们提出了通过对转速和通气量的调节,使 DO 在发酵前期维持在 20%~30%,发酵中期在 28%以上,发酵后期在 30%~60%的分阶段溶氧控制发酵工艺,并取得了良好的效果,DAM 产量稳定可达 100 mg/L 以上。

3) 通过对发酵过程残糖浓度的测定,结合 DAM 产生特点,提出发酵后期流加补料策略,对比了不同的补料形式与浓度,最终确定葡萄糖+马铃薯汁复合补料流加的方式,并将残糖浓度控制在 10 g/L 的方案。

4) 利用上述优化后的发酵条件,以 DO 控制为准则在 200L 罐上进行中试放大,DAM 产量达到 123.1 mg/L,发酵数次,并规模制备,共制备 20 g 以上的 DAM。

5) 通过 MTT 实验发现,DAM 可有效抑制多种肿瘤细胞的生长增殖,其中 HeLa 细胞对 DAM 作用最敏感。

6) DAM 可诱导 HeLa 细胞出现 caspase 依赖性的凋亡,凋亡过程出现 Bax

向线粒体聚集，Cyto C 从线粒体释放，抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 表达量下降，而促凋亡蛋白 Bax 等上调。DAM 可诱导 HeLa 细胞出现 G2/M 期周期阻滞，多个与周期相关蛋白含量出现变化，p21、CyclinB1、GADD45 α 上调，Cdc25c、Wee1 等下降。

7) DAM 诱导的 HeLa 细胞凋亡与 ROS 含量的上升相关，DAM 可引起 Trx-ASK1 复合物的分离，并进而激活相关信号通路。DAM 可抑制 HeLa 细胞内与细胞存活相关的多个 Hsp90 客户蛋白的表达，并可持续性激活 MEK/ERK 信号通路。

8) 通过 HeLa 细胞裸鼠移植瘤实验发现，DAM 能有效抑制移植瘤的生长，抑制率达 64.8%，通过对移植瘤的免疫组化分析，发现 DAM 可引起移植瘤内多种 Hsp90 相关蛋白改变，AKT 蛋白表达量在给药组明显下降，MEK 和 ERK 的磷酸化水平明显上升。

以上研究结果为具有自主知识产权的 DAM 的工业化规模发酵制备，并将其作为抗肿瘤药物的开发研究奠定了基础。

关键词：去乙酰真菌环氧乙酯；液体发酵放大；细胞凋亡；Hsp90；裸鼠移植瘤

Abstract

Marine biological resources provides an important source for natural products, mangrove endophytic fungi produce some novel secondary metabolites because of its unique physiological and metabolic system. DAM, a second metabolic product of endophytic fungi *Phomopsis sp.* A-1-2-3, first separated by Lishan Yang, which contains an oxygen-bridged cyclooctadiene, is novel and represents a new class of fungal metabolites. It have stronger antitumor activity, and is worth further research. In this paper, we established the process-control of DAM liquid amplifying fermentation and the scale-up preparation process. we studied the anti-tumor function of DAM and its mechanism that induce HeLa to apoptosis. The main research and results are as follows.

1) P2-139 was determined as the subsequent fermentation strain by screening in 10 L fermentation. Also The glucose concentration and the potato juice concentration in fermentation medium was optimized in 10 L fermentation, ultimately the optimal fermentation medium component as followed : 200 g/L potato, 65 g/L glucose, 20% seawater (V/V); the amount of inoculum determined between 5% to 7.5%; the speed that control within 400 r/mim in 10 L fermentation and within 300 r/mim in 200 L fermentation.

2) Limited DO concentration and K_{La} measurements showed that, Dissolved oxygen concentration (DO) must maintain at 20% to 30% or more in order to ensure the normal growth and metabolism of the P2-139 strain. In 10 L fermentation, the DO was controlled as followed: more than 20% in the initial (0~96 h); more than 28% in the metaphase(96~218 h) and 30%~60% in the later stage, Under these conditions, the yield of DAM would reach 100mg/L or more.

3) Through measuring the concentration of residual sugar in fermentation process and comparing the different forms and concentrations of feeding, glucose concentration was controlled at 10% by method of fed-batched with glucose + potato juice compound.

4) According to the above study, the yield of DAM would reach 120mg/L or more in 200 L scale-up fermentation. Fermented 3 times, and the preparation of the scale, a total of more than prepared DAM 20 g.

5) DAM demonstrates a concentration-dependent inhibitory effect on the proliferation of various tumor cells by MTT. It has different effects on different types of cancer cell, among which HeLa is most sensitive to the inhibition of DAM

6) DAM induces typically intrinsic, caspase-dependent apoptosis in HeLa cells during which Bcl-2, Bcl-xL down-regulated, Bax up-regulated, Bax processed cytosol to mitochondria traslocation and Cyto C released from mitochondria. It exposure to HeLa cells resulted in a cell cycle arrest at G2/M phase and, ultimately, the induction of apoptosis. MED-induced G2/M arrest was accompanied by the upregulation of cyclin B1 and p21 and the downregulation of cdc25c, wee1.

7) DAM induced apoptosis through the generation of ROS in HeLa cells. DAM can cause Trx - ASK1 complex separation, and then activate the related apoptosis signaling pathways. It caused a great degradation of Hsp90 client proteins in the sensitive tumor cell (such as HeLa), MED inhibits the proliferation of HeLa cells but persistently activates MEK/ERK signaling pathway.

8) DAM can effectively inhibit the growth of HeLa xenograft in nude mice. The tumor inhibition rate reached 64.8%. Through immunohistochemical analysis of the transplanted tumor, we found that DAM can cause a variety of Hsp90 associated proteins in the transplanted tumor changes, AKT protein expression was significantly decreased, MEK and ERK phosphorylation levels increased significantly in the treatment group.

The study has paved the way for the DAM on industrial scale fermentation and preparation. It laid the foundation for the further study for the development of DAM as a anti-tumor drug.

Key words: Deacetylmycoepoxydiene; scale-up fermentation; apoptosis; Hsp90; xenograft in nude mice

第一章 前言

肿瘤严重威胁着人类的生命与健康，我国是癌症高发区，随着癌症发病率的不断提高，抗肿瘤药物的研发已日益成为药物研究的重中之重。

从自然界中得到结构新颖、高活性的抗肿瘤药物已成为了该领域的研究重点。微生物药物研究从 20 世纪开始，已日益成为现代药物开发的一个重要方面，已知的具有生物活性的化合物中，有 10% 来源于微生物。传统微生物代谢产物研究主要集中于陆生微生物，然而研究效率低下，成本提高已成为不容忽视的问题，近年来，人们开始把目光转向生态与物种多样性更为丰富的海洋，海洋占据着地球约 71% 的面积，拥有独特的生境和自然资源，有望成为天然抗肿瘤药物的重要来源。

1.1 海洋天然产物研究概况

从自然资源中寻找具有显著生物活性的天然产物作为先导化合物并由此得到的天然产物衍生物是新药开发的主要途径^[1]。海洋由于其独特的环境和生物多样性，已成为许多天然产物的重要来源^[2]。根据*Nat. Prod. Rep.*统计，2008至2012年之间，每年发现新的海洋天然产物数量为1065^[3]、1011^[4]、1003^[5]、1151^[6]和1035^[7]，平均每年发现新的海洋来源天然产物在1000个左右。

海洋微生物物种丰富，独特的生境造就了其独特的生理与代谢途径，也因此产生了一些化学结构独特的次级代谢产物。近年来，海洋微生物越来越引起研究者的广泛关注，成为具生物活性天然产物的重要来源^[8]。据*Nat. Prod. Rep.*统计，1/3的海洋天然产物来自于海洋微生物^[7]。

从海洋天然产物来源微生物的组成来看（图 1-1），真菌来源的海洋天然产物是海洋天然产物的主要组成部分，约占总体的 64%，其中又以青霉和曲霉为主，放线菌来源的海洋天然产物约占到总产物的 29%，其中以链霉菌为主，细菌来源的海洋天然产物约占总数的 7%，其中以芽苞杆菌为主。

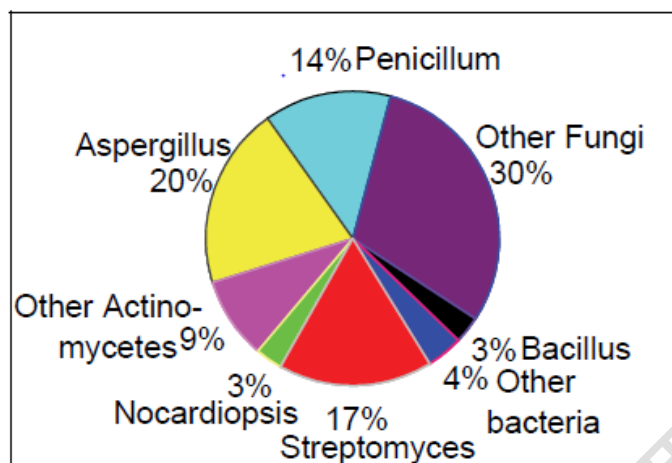


图 1-1 产海洋天然产物的微生物种类^[8]

Fig.1-1 Microbial species of Marine natural products

从海洋天然产物来源的环境来看(图 1-2), 产天然产物的海洋微生物主要生境或宿主是海洋沉积物和红树林, 分别产生 39%和 18%的海洋天然产物, 而海绵、藻类和珊瑚也是海洋天然产物产生菌的重要来源。

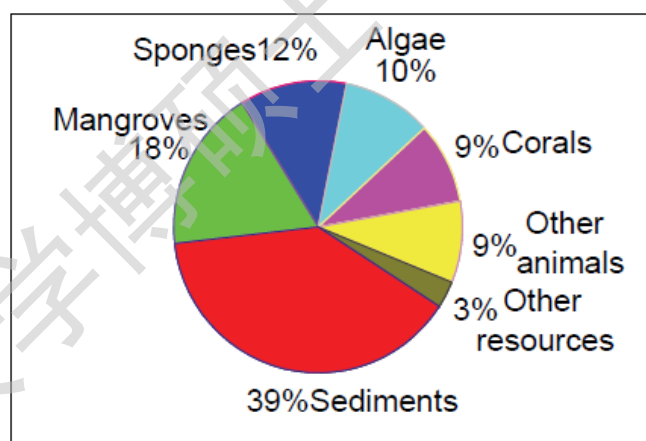


图 1-2 产海洋天然产物的微生物生境分类^[8]

Fig.1-2 Microbial habitat classification of Marine natural products

海洋微生物产生的天然产物结构种类多样, 其中以聚酮类化合物和含氮类化合物为主要类型, 分别占总数的 40%和 37% (图 1-3), 别外还有萜类、甾体及卤代类等化合物。其中含氮类化合物主要来自海底沉积物微生物 (46%), 聚酮类化合物主要来自红树林微生物 (28%) (图 1-4)。抗肿瘤活性和抗菌活性是已知海洋来源天然产物的主要生物活性。

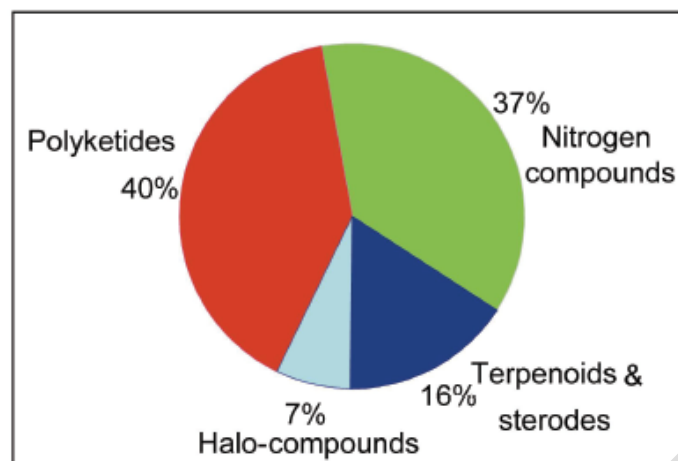


图 1-3 海洋天然产物的主要结构分类^[8]

Fig.1-3 The main structure classification of Marine natural products

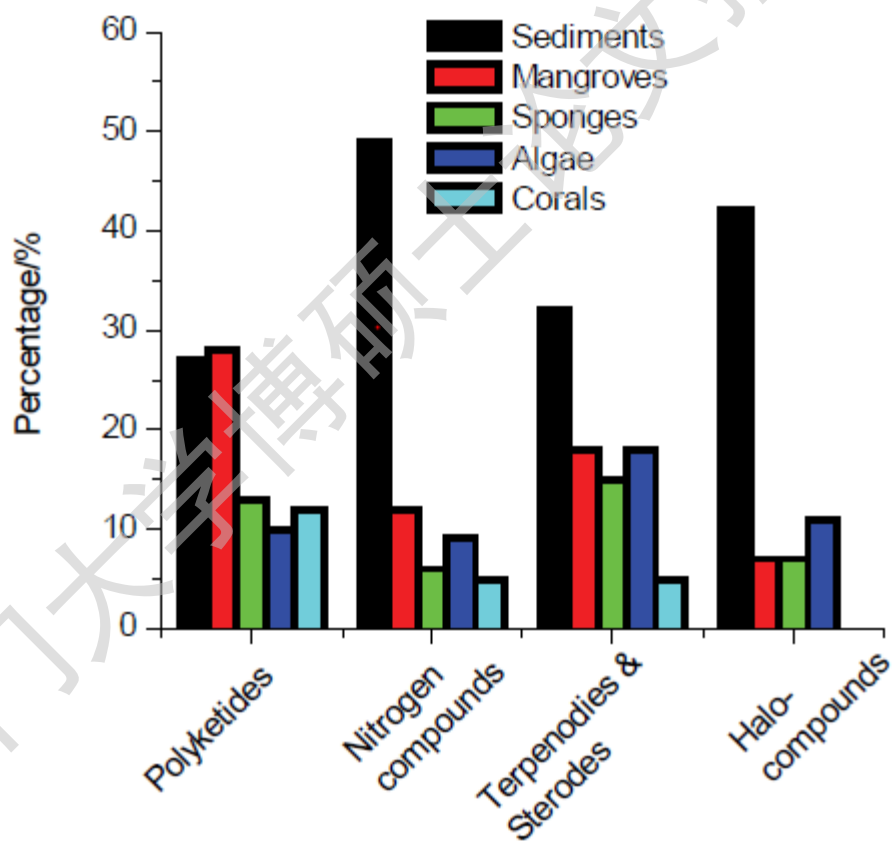


图 1-4 海洋天然产物结构与产生菌生境关系^[8]

Fig.1-4 The relationship between Microbial habitat classification and Marine natural products

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.