

学术学位硕士学位论文

分类号: R965.1

单位代码: 10678

密 级:

学 号: 20160106

昆明医科大学

硕 士 学 位 论 文



基于 NF- κ B 信号通路研究化合物 GA13316 对结肠癌的抑制作用

院(系)、所	药学院
研究生姓名	武娅曦
学 科 专 业	药理学
学 位 类 型	学术学位
指 导 教 师	丁健 院士
	卿晨 教授

二〇一九年五月

昆明医科大学

硕士学位论文

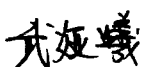
基于 NF- κ B 信号通路研究化合物 GA13316 对结肠癌的抑制作用

院 (系)、所	药学院
研究生姓名	武娅曦
学 科 专 业	药理学
学 位 类 型	学术学位
指 导 教 师	丁健 院士
	卿晨 教授
指导小组成员	陈亚娟 高级实验师

完 成 日 期 二 〇 一 九 年 五 月

昆明医科大学研究生学位论文研究撰写声明

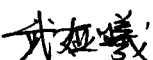
本人郑重声明：本学位论文是我本人在导师指导下，独立进行学位课题研究所取得的研究成果。论文中除特别加以标注和致谢的地方外，不包含他人或其他机构已经发表或撰写过的研究成果。对本研究和论文做过贡献的同道我均在论文中作了明确的说明并表明谢意。该学位论文资料若有不实之处，本人愿承担一切相关责任。

论文作者（签名）：

2019年6月1日

昆明医科大学研究生学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解昆明医科大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。学校可公布论文的全部或部分内容（确属保密内容已注明，并在解密后遵守此规定）；学校可采用影印、缩印或其他手段保存本学位论文。

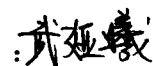
学位论文作者（签名）：

2019年6月1日

指导教师（签名）：

2019年6月1日

本人及导师同意将学位论文提交至清华大学“中国学术期刊（光盘版）电子杂志社”进行电子和网络出版，并编入 CNKI 系列数据库，传播本学位论文的全部或部分内容，同意按《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定享受相关权益。

学位论文作者（签名）：

2019年6月1日

指导教师（签名）：

2019年6月1日

目 录

缩略词表	1
中文摘要	3
英文摘要	5
正 文	7
前 言.....	7
材料与方法.....	10
结 果.....	25
讨 论.....	41
参考文献.....	46
综 述	49
攻读学位期间获得的学术成果.....	60
致 谢	61

缩 略 词 表

缩略词	英文全称	中文全称
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸缓冲溶液
OD	Optical Density	光密度
IC ₅₀	50% Inhibitory Concentration	半数抑制浓度
SD	Standard Deviation	标准偏差
MTT	3-[4,5-dimehyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide)	3-(4, 5-二甲基-2-噻唑)-2, 5- 二苯基溴化四唑
CMC-Na	Sodium Carboxymethyl Cellulose	羧甲基纤维素钠
TV	Tumor Volume	肿瘤体积
RTV	Relative Tumor Volume	相对肿瘤体积
NF-κB	Nuclear Factor kappa B	核因子 kappa B
I-κB	Inhibitor of NF-κB	核因子κB 的抑制子
IKK	Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase	I-κB 激酶
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	细胞外信号调节激酶

I κ BKE (IKKE)	Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon	I- κ B 激酶 Epsilon
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
MAPK1 (ERK)	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	促分裂原活化蛋白激酶 1
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
rpm	Revolutions per minute	转/分
Tris	Trihydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TBS	Triethanolamine buffered saline solution	三乙醇胺缓冲盐水溶液
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
ECL	Electro-Chemi-Luminescence	电化学发光
cIAP 2	Cellular inhibitor of apoptosis 2	细胞凋亡抑制蛋白 2
Bcl-2	B cell lymphoma/leukemia-2	B 细胞淋巴瘤/白血病-2
MMP 9	Matrix Metalloproteinase-9	基质金属蛋白酶 9
PPM1D (WIP1)	Wild-type p53-inducible phosphatase-1	野生型 p53 诱导型磷酸酶-1

基于 NF- κ B 信号通路研究化合物 GA13316 对结肠癌的抑制作用

研究生：武娅曦

导师：丁健 院士

卿晨 教授

(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室，云南昆明，650500)

中文摘要

【目的】基于 NF- κ B 信号通路研究化合物 GA13316 对结肠癌的抑制作用。

【方法】1、以人结肠癌细胞 Caco2、HT29、HCT-116 为模型，采用 MTT 法检测化合物 GA13316 对细胞增殖的影响；2、采用敏感株人结肠癌 HCT-116 的裸小鼠异种移植瘤模型，评估化合物 GA13316 的体内抗肿瘤活性；3、以 HCT-116 细胞为模型，采用 Western Blot 检测化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 NF- κ B 信号通路蛋白 p65、I κ B α 表达的影响；4、采用免疫组织化学技术，检测化合物 GA13316 对 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织 NF- κ B 信号通路蛋白 p65、I κ B α 、磷酸化 I κ B α 以及相关信号通路蛋白 ERK 表达的影响；5、采用 Western Blot 检测化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 NF- κ B 信号通路下游靶基因 cIAP2、MMP9、Bcl2 及关联信号通路蛋白 PPM1D、p53 表达的影响。

【结果】1、MTT 检测结果显示，化合物 GA13316 对人结肠癌细胞 Caco2、HT29、HCT-116 的生长增殖均表现出抑制作用，具有浓度依赖性，作用 48h 的半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 31.68 $\pm$ 1.40 μ M、11.41 $\pm$ 0.81 μ M、4.15 $\pm$ 0.07 μ M，其中化合物 GA13316 对 HCT-116 抑制作用较为明显。

2、体内结果显示，在剂量为 2、4、8mg/kg 灌胃给药 21 天，化合物 GA13316 对人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤的生长具有显著的抑制作用，瘤重分别为 1.84 $\pm$ 0.73g、1.38 $\pm$ 0.59g、0.92 $\pm$ 0.49g，与溶媒对照组相比，差异具有高度显著性；肿瘤的相对增殖率 (T/C) 分别为 84%、79%、49%，且对荷瘤裸小鼠的体重及重要免疫器官-脾脏无明显影响，提示其治疗效果较好、毒副作用较小。

3、Western Blot 结果显示, 化合物 GA13316 明显下调 HCT-116 细胞 NF- κ B 通路主要蛋白 p65 的表达, 明显上调 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B α 的表达。

4、免疫组织化学结果显示, 化合物 GA13316 明显上调 HCT-116 细胞 NF- κ B 信号通路中 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B α 的表达, 下调磷酸化 I κ B α 、p65、ERK 的蛋白表达。

5、Western Blot 结果显示, 化合物 GA13316 明显下调 HCT-116 细胞 NF- κ B 信号通路下游蛋白 cIAP2、MMP9、Bcl2 以及相关信号通路蛋白 PPM1D 的表达, 上调 p53 的蛋白表达。

【结 论】 化合物 GA13316 抑制结肠癌细胞 HCT-116 的作用, 与抑制 NF- κ B 信号转导通路的经典途径 (即抑制 I κ B α 的磷酸化从而抑制 p65 的入核), 进而抑制其下游靶基因 cIAP2 (细胞凋亡抑制因子 2)、Bcl2 (B 淋巴细胞瘤-2)、MMP9 (基质金属蛋白酶 9) 有关。同时, 也与影响 MAPK 信号通路以及 p53 和 NF- κ B 之间的交叉对话有关。

【关键词】 化合物 GA13316; 结肠癌; NF- κ B; p53

Study on the inhibitory effect of compound GA13316 on colon cancer based on NF- κ B signaling pathway

Postgraduate: WuYaxi

Supervisor: Academician Ding Jian

Prof. Qing Chen

(The School of Pharmaceutical Sciences & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Yunnan, Kunming 650500)

ABSTRACT

Objective: Study on the inhibitory effect of compound GA13316 on colon cancer based on NF- κ B signaling pathway

Methods: 1. Human colon cancer cells Caco2, HT29 and HCT-116 were used as models to detect the effect of compound GA13316 on cell proliferation by MTT assay. 2. The in vivo antitumor activity of compound GA13316 was evaluated by human colon cancer cell HCT-116 nude mouse xenograft model. 3. Using HCT-116 cell as a model, the effect of compound GA13316 on HCT-116 NF- κ B signaling pathway proteins p65 and I κ B α was detected by Western Blot. 4. Immunohistochemistry was used to detect the effect of compound GA13316 on NF- κ B signaling pathway proteins p65, I κ B α , phosphorylated I κ B α and related signaling pathway protein ERK in HCT-116 nude mice xenograft tumor tissues. 5. Western Blot was used to detect the effect of compound GA13316 on the downstream target genes cIAP2, MMP9, Bcl2 and correlated signal transduction pathway proteins PPM1D, p53 in HCT-116 NF- κ B signaling pathway.

Results: 1、The results of MTT assay showed that compound GA13316 inhibited the growth and proliferation of human colon cancer cells Caco2, HT29 and HCT-116 in a concentration-dependent manner. The IC₅₀ of the inhibitory concentration of 48h was $31.68 \pm 1.40 \mu\text{M}$, $11.41 \pm 0.81 \mu\text{M}$, $4.15 \pm 0.07 \mu\text{M}$, respectively, wherein the inhibition of HCT-116 is most obvious.

2、The in vivo results showed that compound GA13316 significantly inhibited the growth of human colon cancer HCT-116 nude mouse xenograft tumors at a dose of 2, 4, 8

mg/kg for 21 days. The tumor weight was 1.84 ± 0.73 g, 1.38 ± 0.59 g, 0.92 ± 0.49 g, compared with the solvent control group, the difference was highly significant, and the relative proliferation rate (T/C) of the tumor was 84%, 79%, 49%, respectively. Moreover, it has no significant effect on the body weight of the tumor-bearing animal and the important immune organ-spleen, suggesting that the therapeutic effect is good and the side effects are small.

3、Western Blot results showed that the compound GA13316 significantly down-regulated the protein expression of p65 in the NF- κ B signaling pathway and up-regulated the expression of NF- κ B inhibitor I κ B α of HCT-116 cells.

4、Immunohistochemistry results showed that the compound GA13316 significantly up-regulated the expression of NF- κ B inhibitor I κ B α and down-regulated the protein expression of phosphorylated I κ B α , p65 and ERK in the NF- κ B signaling pathway of HCT-116 cells.

5、Western Blot results showed that compound GA13316 significantly down-regulated the expression of cIAP2, MMP9, Bcl2 in the downstream of NF- κ B signaling pathway and correlated signal transduction pathway protein PPM1D in HCT-116 cells, but up-regulated the protein expression of p53.

Conclusions: In summary, the inhibitory effect of compound GA13316 on colon cancer cell line HCT-116 is related to the inhibition of the classical pathway of NF- κ B signal transduction pathway(which inhibits phosphorylation of I κ B α and inhibits the entry of p65 into the nucleus), thereby inhibiting its downstream target gene cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis) , Bcl2 (B lymphoma-2), and MMP9 (matrix metalloproteinase 9) are involved. At the same time, it is also involved in the cross-talk between the MAPK signaling pathway and p53 and NF- κ B.

Key words: Compound GA13316; colon cancer; NF- κ B; p53

前言

恶性肿瘤是威胁人类健康和生命的重大疾病，其中结直肠癌（colorectal cancer, CRC）是最常见的恶性肿瘤之一，其发病率及死亡率均位于前列^[1,2]。外科手术是结肠癌治疗的主要手段，对早期患者可取得良好效果，但多数结肠癌在早期症状隐匿，大多数患者诊断时已是中晚期，此类患者术后复发率和转移率高，均需配合化疗、靶向治疗、基因治疗、免疫治疗等术后辅助治疗。

化疗是结肠癌术后辅助治疗的最重要手段，但目前使用的化疗药物多存在选择性低、毒副作用大及产生耐药性等缺点，成为临床治疗的难题^[3]。如结肠癌化疗基础用药 5-氟尿嘧啶、伊立替康、奥沙利铂等易产生恶心、呕吐、腹泻等严重消化道反应，亦有骨髓抑制的发生^[4]。

近年来，结肠癌的治疗尤其是分子靶向治疗取得了显著发展，使患者在近期内明显受益，但靶向治疗几乎无法避免耐药性的发生，使得远期治疗效果难以保障，结肠癌患者的相对存活率也尚未明显改善^[5]。因此，研究和发现新的临床治疗药物是结肠癌治疗的重要任务。

从天然产物中筛选和发现活性先导化合物，以此为基础对其结构进行修饰和改造，是新药研发的重要途径。萜类化合物广泛分布于植物、动物和大型真菌中，结构多样，目前已报道的萜类化合物结构大约有 50000 种^[6]，绝大多数具有抗炎、抗肿瘤、抑菌和抗氧化等多种生物活性。如我国中药丹参的主要有效成分丹参酮（二萜类），具有抗炎、抗肿瘤、抑菌、抗氧化等多种活性^[7]；灵芝中分离出来的灵芝酸 C1（三萜类）通过抑制肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）的产生发挥抗炎活性^[8]；来源于植物黄花蒿、具有显著抗疟原虫活性的青蒿素（倍半萜类），在一定程度上还可用于改善多种临床耐药肿瘤病人的药物敏感性^[9,10]；食用菌中含有多种萜类具有抑菌作用，如茯苓皮三萜对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌有较好的抑制作用；类胡萝卜素类化合物（四萜类）具有抗氧化活性。因此，萜类物质是一类重要的天然产物。

赤霉素（gibberellins, GA）是一类广泛存在于植物和微生物体内、具有多种生物活性的天然二萜类化合物。化合物 GA13316（13-氯-3, 15-二氧-赤霉酸对甲氧基苄基酯，结构见图 1）是以赤霉素为原料合成的新四环二萜类化合物。由于 GA13316

合成原料易得、合成工艺较为稳定成熟，故具有进一步研究的价值。

我们前期的研究结果显示，化合物 GA13316 对不同肿瘤细胞的增殖具有较明显的抑制作用，其中对结肠癌细胞的作用更为显著。于是，我们进一步采用药物芯片（Drug Array）对其抑制结肠癌细胞可能的作用靶点进行了筛选。Drug Array 含有针对 66 个特定作用靶点的药物/工具药，干预特定的信号通路，可快速筛选和预测受试化合物可能涉及的靶点或信号通路。

我们筛选的结果显示，化合物 GA13316 抑制结肠癌细胞 HCT116 增殖的作用与 NF- κ B1（Nuclear Factor kappa B1）及 IKKE（Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon）有关，之后采用 RQ-PCR 及 Western Blot 进行验证，结果显示化合物 GA13316 可下调 NF- κ B1、IKKE 基因的表达，而 IKKE 及 NF- κ B1 是 NF- κ B 信号通路的重要组成部分，此结果提示化合物 GA13316 抑制结肠癌 HCT-116 细胞的作用机制可能与 NF- κ B 信号通路有关。

NF- κ B 信号通路由 NF- κ B 家族、NF- κ B 抑制子（inhibitor-kappa Bs, I κ Bs）和 I κ B 激酶（inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKKs）组成。NF- κ B 是 1986 年由 Sen 和 Baltimore 等发现的核转录因子，其家族包括 5 名成员：RelA(p65, NF κ B3)，RelB，Rel(cRel)，p105/p50(NF- κ B1) 和 p100/p52(NF- κ B2)^[11]。在这些成员中，除 RelB 只能与 p50 或 p52 形成二聚体外，其它成员均可形成同源或异源二聚体。其中，p65/RelA(即通常所指的 NF- κ B) 是发现最早、最常见，也是分布最广、发挥主要生理作用的 NF- κ B。I κ B 是一种能特异性结合并抑制 NF- κ B 的蛋白，在未被刺激的细胞中，它与 NF- κ B 二聚体结合形成三聚体、以非活性状态存在，其中以 I κ B α 为主要形式。IKK 是 I κ B 激酶，是 I κ B 的上游调节机构^[12]。

目前，NF- κ B 信号通路的激活方式可分为经典途径和非经典途径，大部分 NF- κ B 的激活是通过经典途径。经典途径是指在肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)、细菌和病毒抗原等诱导因子的刺激下，上游激酶 IKK 复合体通过磷酸化而活化，活化后的 IKK 进而磷酸化 I κ B 蛋白，磷酸化后的 I κ B 经泛素化降解、释放出 NF- κ B，释放出的游离的 NF- κ B 入核结合靶基因、以启动相应基因的转录而发挥作用^[13, 14]。非经典途径则是指由不同于经典途径的刺激引起的使 p100 加工为 p52 的信号途径的激活。

细胞信号转导通路的异常调节和交叉对话在恶性肿瘤的发生发展中发挥关键作

用,可导致细胞异常增殖、血管生成、侵袭和转移,从而促进肿瘤的进展^[15]。NF- κ B 是一种重要的信号转导通路,在结直肠癌中常可观察到 NF- κ B 的组成型活化,其活化通常与较高的肿瘤分期、治疗抗性和不良的预后有关,因此, NF- κ B 信号途径的成员有可能成为 CRC 的预后标志物或治疗靶点^[11]。

活化的 NF- κ B 参与细胞的多种生理和病理反应过程,涉及细胞增殖、炎症、细胞转化、血管增生、细胞侵袭转移等^[16, 17],还参与多种靶基因的转录,如①抗细胞凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl 2)蛋白,参与细胞凋亡调节,其中细胞凋亡抑制因子 2(cIAP2)是最具代表的 IAP;②基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),MMP 与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关^[18, 19],其中 MMP9 是常见的基质金属蛋白酶。NF- κ B 促进肿瘤的发生发展还与其它信号转导途径,如丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、p53 等的相互作用有关。MAPK 信号通路与 NF- κ B 相互作用,参与肿瘤发生发展,ERK(Extracellular Signal-Regulated Kinase)是 MAPK 信号转导系统的主要通路,包括 ERK1 和 ERK2。p53 和 NF- κ B 是发现较早的两条信号转导途径,研究发现, p53 可以抑制 NF- κ B 的信号途径^[20]。PPM1D(Wild-type p53-inducible phosphatase-1, WIP1/PPM1D)是野生型 p53 诱导型磷酸酶-1,在多种肿瘤中高表达,可负反馈抑制 p53 的抑癌活性,也可以与 NF- κ B 相互作用促进肿瘤细胞增殖。

本课题拟在前期工作的基础上,①以人结肠癌细胞 HCT-116 为模型,从细胞和整体动物水平研究 GA13316 对结肠癌的抑制作用;②选择 NF- κ B 信号转导通路中的几个重要蛋白 I κ B α 、磷酸化 I κ B α 、p65、ERK 为指标,检测其在人结肠癌裸小鼠移植瘤组织中的表达水平;③检测 I κ B α 、p65、cIAP2、MMP9、Bcl 2、p53 以及 PPM1D 在人结肠癌细胞中的表达水平,以探讨化合物 GA13316 抑制结肠癌的作用及机制。

材料与方法

一、实验材料

（一）受试样品：化合物 GA13316，化学名：13-氯-3,15-二氧-赤霉酸对甲氧基苄基酯，分子量为 496.94，是从合成的一系列赤霉素衍生物中筛选出的新四环二萜类化合物，云南大学提供。

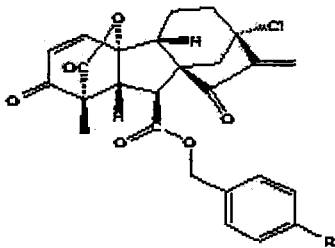


图 1 化合物 GA13316

(二) 细胞株

细胞名称	细胞的组织来源	生长方式
Caco 2	人结肠癌细胞株	贴壁生长
HT 29	人结肠癌细胞株	贴壁生长
HCT-116	人结肠癌细胞株	贴壁生长

注：购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库，并在我室传代培养

（三）主要试剂和仪器设备

1. 主要试剂

试剂名称	生产厂家	批号
McCoy's 5A Medium	美国 GIBCO 公司	16600082
MEM	美国 GIBCO 公司	1967520
胎牛血清(FBS)	美国 GIBCO 公司	1244840
二甲基亚砷(DMSO)	Amresco 公司	201508
0.25%EDTA-胰蛋白酶	美国 GIBCO 公司	1316929
MTT	BioFroxx	E23413A112
PBS 磷酸盐缓冲溶液	福州迈新生物技术开发有限公司	13062503
总蛋白定量测试盒（BCA 法）	康维世纪生物科技有限公司	60345

过硫酸铵(AP)	上海生物工程股份有限公司	0777A55
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)	biosharp	681163a
Tris	Solarbio	803X071
甘氨酸	Solarbio	1010M06
甲醇(分析纯)	西陇化工股份有限公司	130505
Skim milk powder	BD 公司	3107094
Tween-20	西陇化工股份有限公司	110408
PMSF	北京康为世纪生物科技有限公司	3A04010350
RIPA 裂解液(中)	碧云天生物有限公司	P0013C
高灵敏度化学发光检测试剂盒	康为世纪生物科技有限公司	00171507
PVDF 膜 (size:0.45 μ m)	Millipore	K2MA8350E
甲醛溶液	成都金山化学试剂有限公司	20160908
羧甲基纤维素钠 300-800	Solarbio	428A0210
显微镜盖玻片	CITOGLAS 世泰	80340-3610
柠檬酸组织抗原修复液 (100X)	福州迈新生物技术开发有限公司	171031432J
粘附载玻片	福州迈新生物技术开发有限公司	170719
即用型快捷免疫组化 MaxVision	福州迈新生物技术开发有限公司	171116407T
动物非免疫血清	福州迈新生物技术开发有限公司	180105392A
内源性过氧化物酶阻断剂	北京博奥龙免疫技术有限公司	KLA7124168
增强型 DAB 显色试剂盒 (20X)	Solarbio	20171017
Antibody		
Phospho-I-Kappa-B-alpha	Invitrogen	RB215829
p44/42 MAPK(Erk 1/2)	Cell Signaling Technology	4695
Beta-Tubulin Mouse Monoclonal Ab	Affinity Biosciences	65y9255

Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP	Affinity Biosciences	11W8627
Bcl 2	Santa Cruz Biotechnology	E0112
p53 (FL-393)	Santa Cruz Biotechnology	B2511
Rb mAb to NF-κB p65	abcam	GR200963-9
Rb pAb to PPM1D	abcam	GR3228201-1
Rb mAb to Mutant p53	abcam	GR136120-36
Anti-MMP 9 Antibody	Sigma	QC49618
Anti-IκB-α, N-Terminal, antibody	Sigma	217116
GAPDH Antibody	SAB	8715
Goat anti-Rabbit IgG Secondary	SAB	8715
β-actin Antibody	SAB	8803

2、主要仪器设备

仪器	生产厂商	型号、规格
超纯水系统	力康公司	NW 基础型
CO ₂ 细胞培养箱	美国 SHELLAB 公司	2406 型
医用净化工作台	珠海再鑫仪器有限公司	EVL-53
电热恒温水槽	上海一恒科技有限公司	HWS12 型
医用冰箱	合肥美菱公司	YCD-EL259 型
超低温冰箱	美国 Thermo 公司	REVCO 型
倒置显微镜	日本 Olympus 公司	CKX31 型
电子天平	德国 Sartorius 公司	CPA224S 型
全波长酶标仪	美国 Molecular Devices 公司	Plus 384 型
普通低速离心机	上海菲恰尔公司	TDL-4A 型
摇床	宁波其林贝尔公司	TS-8 型
Hoefer 水平电泳槽	美国 Protein simple 公司	MAX FULL 型
漩涡混匀器	北京大龙兴传公司	MX-F 型
电泳仪电源	美国 Biorad 公司	Powerpac 基础型
小型垂直电泳槽	美国 Biorad 公司	Mini-PROTEAN Tean 型
湿转系统	美国 Biorad 公司	Mini Trans-bolt 型
凝胶化学发光成像仪	美国 Proteinsimple 公司	FCE 型
台式高速离心机	美国 Sigma 公司	1-14 型
高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司	5417R 型号

二、实验方法

(一) 受试药物配制

1、化合物 GA13316 的配制

称取 7.5mg, 加入 0.75ml DMSO, 混匀, 配制成 20mM 的储备液, 分装, -20℃ 保存。

(二) 试剂配制

1、10%胎牛血清完全培养基

基础培养基 (McCoy's 5A、MEM) 中加入 10%胎牛血清、青霉素(100μg/ml) 和链霉素(100μg/ml), pH 7.4。

2、0.1mol PBS 平衡盐溶液

NaCl 8.00g、KCl 0.20g、Na₂HPO₄·H₂O 2.89g、KH₂PO₄ 0.20g, 用 1L 三蒸水溶解后调 pH 至 7.2 左右。

3、细胞冻存液

50% McCoy's 5A、40% FBS、10% DMSO, 加入离心管中混匀, 4℃ 保存备用, 冻存肿瘤细胞株。

4、0.5%羧甲基纤维素钠

称取羧甲基纤维素钠 0.5g 于三蒸水中溶解, 混匀, 定容至 100ml。

5、4%中性甲醛溶液

甲醛 5ml, PB 定容至 50ml。

6、70%, 80%, 90%, 95%乙醇

由无水乙醇梯度稀释配制而得。

7、1%柠檬酸抗原修复液

5ml 柠檬酸抗原修复液加入三蒸水定容至 500ml 配成 1%柠檬酸抗原修复液。

8、增强型 DAB 显色试剂盒 (20X)

配制方法: 将 A、B、C 三种液体各 50ul 按顺序加入至 850ul 三蒸水中即可, 避光。

9、PMSF 溶液

称取 0.1741g 粉末, 加入 10ml 异丙醇, 即为 100mM 储备液, 分装 100μL/管, -20℃ 保存。

10、RIPA 裂解液的配制

取 990 μ L 裂解液加入 10 μ L PMSF 溶液、10 μ L 磷酸酶抑制剂（100: 1: 1），现配现用。

11、10%过硫酸铵溶液（APS）

1g 过硫酸铵，三蒸水溶解并定容至 10ml，-20℃保存。

12、10×Tris-甘氨酸电泳缓冲液

30.3gTris，188g 甘氨酸，10gSDS，三蒸水定容至 1L，临用前稀释 10 倍。

13、膜转移缓冲液

14.26g 甘氨酸，3.03gTris，200ml 甲醇（20%），pH 8.3，定容至 1L，现配现用。（可先配制成 10X 不加甲醇保存，电泳时加入预冷的甲醇。如目的蛋白分子量大于 80kDa，则加入终浓度为 0.1%的 SDS）

14、10×TBS

NaCl 80g，KCl 2g，Tris 30g，加 800ml 三蒸水，pH 7.4，定容到 1L，4℃保存。

15、TBST

10×TBS 稀释 10 倍，按照 0.1%(v/v)的量加入吐温-20，充分溶解即为 TBST 缓冲液，现用现配，预冷备用。

16、封闭液

10%(w/v)脱脂奶粉的 TBST。

17、一抗稀释液

根据不同抗体稀释浓度比例使用 TBST 稀释（1: 1000）。

18、二抗稀释液

5%(w/v)脱脂奶粉的 TBST（1: 10000）。

19、ECL 发光显影液的配制

ECL-A: ECL-B 为 1: 1 进行配制。

（三）肿瘤细胞的培养

1、细胞培养

将 Caco 2、HT 29、HCT-116 细胞置于培养瓶，加入配制好的含 10%血清的完全培养基，置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。细胞呈贴壁生长，适时换液

，取对数生长期细胞进行后续试验。

细胞名称	培养基
Caco 2	MEM+10%FBS
HT 29	McCoy's 5A+10%FBS
HCT-116	McCoy's 5A+10%FBS

2、细胞传代

待细胞生长到一定程度后(约 70%~80%融合)，即可进行传代培养。用 0.25% Trypsin-EDTA 消化液消化细胞，收集于离心管中，以 800-1000 rpm 离心 5min。倒去上清液，加入适量完全培养基后吹打混匀，制备单细胞悬液计算数量及活率。以适宜密度接种于培养瓶后，置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养，适时换液。

3、细胞冻存与复苏

3.1 细胞冻存：取对数生长期且状态良好的细胞(活率>98%)，用 0.25%Trypsin-EDTA 消化收集细胞，以 800rpm 离心 5min。加入适量配制好的冻存液混悬细胞，计数。以 5-10×10⁶ 个/ml 浓度将细胞移入已消毒冻存管，放入程序降温盒，置于-80℃冰箱过夜，次日将冻存管转移至液氮内保存。

3.2 细胞复苏：于液氮内快速取出冻存管，置于 37℃温水中迅速解冻。将解冻后的细胞悬液快速转移至离心管，加入 9 倍体积的完全培养基，以 800 rpm 离心 5min。倒去上清液，以适量完全培养基重新混悬，接种于培养瓶，并置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养，适时换液。

(四) 化合物 GA13316 对 Caco 2、HT 29、HCT-116 细胞增殖的影响—MTT 法

1、受试物配制

1.1 化合物 GA13316

化合物 GA13316 设 1、2、4、8、16μM 共 5 个受试浓度(此浓度根据预试验结果设定)。具体配制如下：称取一定量化合物 GA13316 加入一定量的 DMSO 溶解后，再加入一定量的完全培养基配制成高浓度溶液，其余各浓度按比例稀释配制而成。

1.2 溶媒对照

取高浓度化合物 GA13316(16μM)所含 DMSO 的量，用完全培养基配制相应的溶媒对照，此时 DMSO 的浓度为 0.08%。

2、实验原理

MTT 化学名为 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐, 商品名: 噻唑蓝, 是一种黄颜色的染料。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶-甲臞 (Formazan) 并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲基亚砷 (DMSO) 能溶解细胞中的甲臞, 用酶标仪在 570nm 和 630nm 波长处测定其光吸收值, 在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。根据测得的吸光度值 (OD 值), 来判断活细胞数量, OD 值越大, 细胞数量越多, 细胞活性越强 (如果是测药物毒性, 则表示药物毒性越小)。

3、实验方法

取对数生长期的 HCT-116 细胞, 调整细胞浓度为 6×10^4 个/mL, 90 μ L/孔加入 96 孔培养板, 每个给药浓度设 6 个复孔, 接种细胞之后静置 1h 再放入细胞培养箱 (避免 96 孔板的边缘效应)。24h 细胞贴壁之后再加 GA13316 使其终浓度为 1, 2, 4, 8, 16 μ M, 每个浓度设 5 个平行孔, 并设阴性对照 (培养基) 及溶媒对照, 在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中孵育 48h 后加入 MTT 20 μ L, 继续孵育 4h 后, 以 570nm 和 630nm 波长检测 OD 值, 实验重复 3 次。

4、结果计算及分析

计算不同浓度的 OD 值均数及标准差, 按下列公式计算细胞增殖抑制率:

$$OD_{\text{给药孔}} = OD_{570} - OD_{630}$$

$$\text{抑制率 (\%)} = (OD_{\text{阴性对照孔}} - OD_{\text{给药孔}}) / OD_{\text{阴性对照孔}} \times 100\%。$$

采用 Microsoft Excel 2007 软件计算增殖抑制率, 运用 SPSS 软件计算药物的半数抑制浓度 IC₅₀。

(五) 化合物 GA13316 对人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤生长的影响

1、受试物配制

受试前用 0.5%羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 配制成相应剂量的所需浓度。由于药物稳定性不好, 于每次给药前配制, 给药体积均为 0.2ml/10g。

具体配制如下:

高剂量: 8mg/kg, 配制溶液浓度: 0.4mg/ml

中剂量: 4mg/kg, 配制溶液浓度: 0.2mg/ml

低剂量: 2mg/kg, 配制溶液浓度: 0.1mg/ml

2、实验方法

2.1 人结肠癌 HCT-116 裸小鼠移植瘤模型的建立

取生长旺盛期的 HCT-116 瘤组织，剪切成约 1.5 mm^3 大小的组织块，在无菌条件下，接种于裸小鼠右侧腋窝皮下。在接种后第 14 天，去除移植瘤未生长或移植瘤生长过缓、过速的裸小鼠，选择已形成 $100\text{-}300\text{ mm}^3$ 大小移植瘤组织的裸小鼠，按实验方案随机分组及给药。

2.2 实验方案

- (1) 阴性对照组：0.9%NaCl，灌胃给药；
- (2) 溶媒对照组：0.5%CMC-Na，灌胃给药；
- (3) 化合物 GA13316 低剂量组：2mg/kg，灌胃给药；
- (4) 化合物 GA13316 中剂量组：4mg/kg，灌胃给药；
- (5) 化合物 GA13316 高剂量组：8mg/kg，灌胃给药；

各剂量组按 0.2ml/10g 的给药体积灌胃给药，每周连续给药 6 天，停药 1 天，共 21 天。

3、结果计算及分析

实验期间每周测量瘤径和体重 2 次，实验结束后处死动物，并测量瘤径和称量体重。每次测量瘤径后计算肿瘤体积 (TV)、相对肿瘤体积 (RTV) 和相对肿瘤增殖率 (T/C)，计算公式如下：

- (1) $TV\text{ (tumor volume)} = 1/2 \times a \times b^2$ ，其中 a、b 分别表示肿瘤的长和宽；
- (2) $RTV\text{ (relative tumor volume)} = V_t/V_0$ ，其中 V_0 为分组给药时(即 d_0)所测得的肿瘤体积， V_t 为每一次测量时的肿瘤体积；
- (3) $T/C\text{ (\%)} = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ ，其中 T_{RTV} 为治疗组的 RTV， C_{RTV} 为溶媒对照组的 RTV。

实验结束后，称取裸小鼠肿瘤重量以及计算去瘤体重。

(六) 化合物 GA13316 对人结肠癌细胞 HCT-116 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响—Western Blot 法

1、实验原理

Western Blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)，被检测物是蛋白质，探针是抗体，显色用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品，转移到固相载体 (

例如硝酸纤维素薄膜)上,固相载体以非共价键形式吸附蛋白质,且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原,与对应的抗体起免疫反应,再与酶或同位素标记的第二抗体起反应,经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。

2、受试物配制

2.1 化合物 GA13316

化合物 GA13316 设 1、2、4 μ M 共 3 个受试浓度(此浓度根据预试验结果设定)。具体配制如下:称取一定量化合物 GA13316 加入一定量的 DMSO 溶解后,再加入一定量的完全培养基配制成高浓度溶液,其余各浓度按比例稀释配制而成。

2.2 溶媒对照

取高浓度化合物 GA13316(4 μ M)所含 DMSO 的量,用完全培养基配制相应的溶媒对照,此时 DMSO 的浓度为 0.02%。

3、实验方法

3.1 取对数生长期 HCT-116 细胞,常规消化制成单细胞悬液并计数,以 1×10^6 个接种于培养皿中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24h,细胞贴壁后更换新鲜完全培养基,同时给予 1、2、4 μ M 3 个不同浓度的化合物 GA13316,777 μ L/皿,阴性对照组加完全培养基 777 μ L/皿,溶媒对照组加药物高浓度对应的溶媒稀释液 777 μ L/皿,将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中作用 48h 后,用无 EDTA 的胰酶消化收集细胞。

3.2 细胞总蛋白提取(均在冰上操作)

收集细胞,先用预冷 PBS 洗涤细胞,重复 2 次,离心转速为 800 转/min,将细胞置于冰上;加入提前配好的 RIPA 裂解液(RIPA:PMSF:磷酸酶抑制剂=100:1:1)550 μ L/管,用移液枪吹打贴壁细胞,震荡器震荡 20s,冰上静置 10min,重复 4 次,使细胞充分裂解。于 4 $^{\circ}$ C,14000 $\times$ g 离心 17min 收集细胞裂解液上清,分装于 eppendorf 管, -80 $^{\circ}$ C 保存。

3.3 总蛋白浓度测定(BCA 法)

3.3.1 测定原理

碱性条件下,蛋白质分子中的肽链结构能与 Cu²⁺络合生成络合物,同时将 Cu²⁺还原为 Cu⁺。BCA 试剂可敏感特异地与 Cu⁺结合,形成稳定的紫色络合物。在 562nm

处有高的光吸收值，颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，可根据吸收值大小来测定蛋白质的含量。

3.3.2 操作步骤

3.3.2.1 稀释 BSA 标准品：用与待测蛋白样品相一致的稀释液按下表稀释 BSA 标准品

管号	稀释液用量（μL）	BSA 标准品用量（μL）	BSA 标准品最终浓度（μg/μL）
A	0	100	2
B	200	200	1
C	200	200（从 B 管中取）	0.5
D	200	200（从 C 管中取）	0.25
E	200	200（从 D 管中取）	0.125
F	200	200（从 E 管中取）	0.0625
G	200	0	0（空白）

3.3.2.2 配置 BCA 工作液

（1）计算 BCA 工作液总量：BCA 工作液总量=(BSA 标准品样本个数+未知样本个数)×复孔数×每个样本 BCA 工作液体积

（2）根据计算出的 BCA 工作液需要总量，将 BCA-A 和 BCA-B 按照 50：1 的体积比配制 BCA 工作液，充分混匀。

注意：由于加样可能存在误差，建议配制 BCA 工作液时，多配制 1-2 个孔；新配制的 BCA 工作液室温密封条件下可稳定保存 24h。

3.3.2.3 定量检测—微孔检测法(蛋白浓度检测范围 20-2000μg/ml)

（1）将稀释好的标准品和待测蛋白样品(原液或稀释液)各 25ul 分别加到作好标记的 96 孔板微孔中，每个测定的样本做 3 个平行反应；

（2）每孔加入 200ul BCA 工作液，充分混匀，盖上 96 孔板盖，37℃ 孵育 30min；冷却至室温，须在 3-5min 内完成检测；

（3）用酶标仪在 562nm 处测定每个样品及 BSA 标准品的吸光值，同时做好记录。

（4）绘制标准曲线，计算样品中的蛋白浓度。

3.4 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析

（1）用 95%乙醇将洗好的胶模长短各一的玻璃板、上样梳擦拭干净，空气中自然

晾干待用。

(2) 配制 EZ protein any KD PAGE 压缩胶及分离胶。

(3) 取 2 支小烧杯（小试管亦可），在第一个小烧杯中加入试剂盒 EZ Protein any KD PAGE 浓缩胶 A 液 1.0ml + EZ Protein any KD PAGE 浓缩胶 B 液 1.0ml；在另一个小烧杯中加入 EZ Protein any KD PAGE 分离胶 A 液 2.5ml+ EZ Protein any KD PAGE 分离胶 B 液 2.5ml。

(4) 在 5ml 的分离胶溶液中加入 10%APS 50 μ l，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。

(5) 在凝胶模具中灌入适量混匀的分离胶(对于 mini-gel，凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5cm 或距梳齿约 0.5cm 即可)。

(6) 在 2ml 的浓缩胶液中加入 10%APS 20 μ l，轻轻搅拌使其混匀后直接灌入凝胶模具中分离胶的上层(无需等待分离胶液凝固)。

(7) 将梳子插入凝胶内，静置 10-15min，等待浓缩胶聚合。

(8) 取蛋白样品，所取量使得各组含相同的蛋白总量，并与 5x loading buffer 上样缓冲液按 1:4 配比，另将 5x loading buffer 用 ddH₂O 稀释成 1x loading buffer 待用，置于 100℃，变性 15min。

(9) 将现配的电泳液 1000 ml 倒入电泳槽中，并小心拔出浓缩胶里的梳子，以免破坏加样孔。

(10) 向上样孔中依次加入各组样品和 3 μ l 的预染蛋白 Marker。

(11) 调整电泳仪为恒压 300V，进行电泳操作，直至溴酚蓝到达分离胶底部，终止电泳，约 40min 完成蛋白电泳实验。(300V 为绝大多数电泳仪设计可承受电压，正常使用不会损坏仪器。如有担心可以适当降低电压至 250v，对电泳速度不会有明显影响。)

(12) 电泳快结束时准备 PVDF 膜(5.5cmx7cm)，将 PVDF 膜用甲醇浸泡活化约 3min 后，放入预冷的转膜液中浸泡 15min。

(13) 电泳结束后，将胶梳孔以上和溴酚蓝以下部分切除。

(14) 转模（湿转法）：剪 2 张与胶相同大小的滤纸，放入转膜液浸泡后，按转移装置负极(黑色)板—海绵垫—滤纸 3 张—胶—PVDF 膜—滤纸 3 张—海绵垫—转移装置正极板(透明)的顺序放好各层，并用玻璃棒赶走气泡，将此装置放入转移槽里

，让负极板靠近黑色槽边，正极板靠近红色槽边，4℃350mA 恒流下电泳 120min。

(15) 转膜结束后，预染 Marker 条带已转染到 PVDF 膜上。

(16) 使用 10%脱脂奶粉封闭，室温中摇床振摇 2h。

(17) 倾去封闭液，TBST 洗膜 3 次，10min/次。

(18) 结合一抗，摇床振摇，4℃过夜。

(19) 回收一抗，TBST 洗膜 3 次，10min/次。

(20) 结合二抗，室温摇床振荡 2h。

(21) 倾去二抗，TBST 洗膜 3 次，10min/次。

(22) 将 ECL 发光液 A 液和 B 液按 1: 1 的比例配制，充分混合，将 PVDF 膜放入其中，转入 FCE 化学发光成像系统中进行曝光处理，并观察拍照，使用软件 Image J 对结果进行灰度分析。

(七) 化合物 GA13316 对人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织中 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响 — 免疫组织化学技术

1、实验原理

免疫组化，是应用免疫学基本原理—抗原抗体反应，即抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的显色剂（荧光素、酶、金属离子、同位素）显色来确定组织细胞内抗原（多肽和蛋白质），对其进行定位、定性及相对定量的研究，称为免疫组织化学技术 (Immunohistochemistry) 或免疫细胞化学技术 (Immunocytochemistry)。

2、实验方法

2.1 切片前处理：

- (1) 固定：将肿瘤组织进行固定（4%中性甲醛固定一天）；
- (2) 冲洗：对已固定的肿瘤组织流水冲洗 2h；
- (3) 梯度乙醇脱水：70%乙醇 3h→80%乙醇过夜→90%乙醇 1.5h→95%乙醇 1.5h→无水乙醇 I 40min→无水乙醇 II 40min；
- (4) 透明：二甲苯透明 I 15min→二甲苯透明 II 15min；
- (5) 脱蜡：石蜡 I 1h→石蜡 II 1h→石蜡 III 1h；
- (6) 包埋：将组织块置于包埋机包埋；
- (7) 切片：将包埋好的蜡块固定于切片机上，切成薄片（3 μ m）；

- (8) 摊片：切下的薄片易折叠，故置于热水中铺展；
- (9) 捞片：待蜡片铺展后，捞片于洁净防脱载玻片上；
- (10) 烘片：将带有组织的载玻片置于 37℃ 恒温箱中烤干。

2.2 切片的免疫组织化学染色

- (1) 将带有组织的载玻片置于 60℃ 烤箱中烤片 2 h；
 - (2) 脱蜡：烤片趁热放入二甲苯中脱蜡 20 min/次×2 次；
 - (3) 复水：100%、100%、95%、90%、80%、70% 乙醇各 1 次，5 min/次→蒸馏水 5 min；
 - (4) 高温高压抗原修复：用 1% 柠檬酸抗原修复液高温高压修复 90 秒，冷却至室温；
 - (5) 漂洗：冷却后取出载玻片于组织周围用免疫组化笔画圈以限定范围，PBS 漂洗，5min/次×3 次；
 - (6) 阻断内源性过氧化物酶活性：甩干片子，内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10min；
 - (7) 漂洗：PBS 漂洗，5min/次×3 次；
 - (8) 封闭：滴加动物非免疫血清（即用型），室温封闭 30min；
 - (9) 加一抗：倾去血清，勿洗，滴加一抗工作液，4℃ 孵育过夜；
 - (10) 漂洗：PBS 漂洗，5min/次×3 次；
 - (11) 加二抗：滴加二抗，37℃ 温箱孵育 20min；
 - (12) 漂洗：PBS 漂洗，5min/次×3 次；
 - (13) 显色：DAB 显色 3-10min；
 - (14) 漂洗：自来水充分冲洗；
 - (15) 复染：苏木素复染 2min；
 - (16) 分化：盐酸分化 10s；
 - (17) 自来水充分洗涤 10min；
 - (18) 梯度酒精快速脱水，二甲苯透明；
 - (19) 中性树脂封片，观察；
 - (20) 采用 Image-Pro Plus 6.0 分析结果。
- (八) 统计学处理

所有数据用均数±标准差 (Mean±SD) 表示, 对实验结果的统计, 采用 SPSS17.0 统计学软件处理分析, 各组间结果的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计, 方差不齐时采用秩和检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

结果

一、化合物 GA13316 对结肠癌 Caco2、HT 29、HCT-116 细胞增殖的影响

结果显示，化合物 GA13316 对 Caco2、HT 29、HCT-116 三株人结肠癌细胞均显示出不同浓度的抑制作用，且呈浓度依赖性，作用 48h 的半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 31.68±1.40μM、11.41±0.81μM、4.15±0.07μM，其中化合物 GA13316 对 HCT-116 的抑制作用最为明显。见表 1、图 2。

表 1 化合物 GA13316 对 Caco2、HT 29、HCT-116 细胞增殖的影响 (Mean±SD, n=3)

细胞株	Caco2	HT 29	HCT-116
IC ₅₀ (μM)	31.68±1.4	11.41±0.81	4.15±0.07

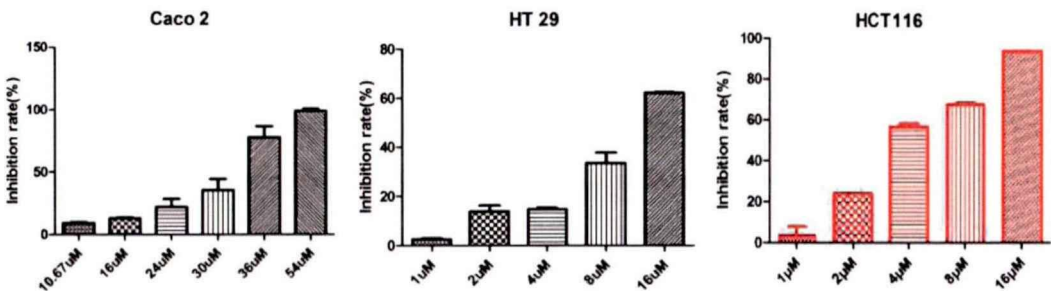


图 2 化合物 GA13316 对 Caco2、HT 29、HCT-116 细胞增殖的影响

二、化合物 GA13316 对人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤生长的影响

采用人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤模型，评估化合物 GA13316 的体内抗肿瘤活性。实验结果显示，在剂量为 2、4、8mg/kg 灌胃给药 21 天，化合物 GA13316 对人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤的生长具有显著的抑制作用，瘤重分别为 1.84±0.73g、1.38±0.59g、0.92±0.49g，与溶媒对照组相比，差异具有高度显著性，肿瘤的相对增殖率 (T/C) 分别为 84%、79%、49%，且对荷瘤动物的体重及重要免疫器官-脾脏无明显影响，提示其治疗效果好、毒副作用小。见表 2、图 3。

表 2 化合物 GAI3316 对人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤生长的影响

组 别	剂量 (mg/kg)		动物数		体 重 (g)		TV(mm ³)		RTV	T/C(%)	瘤 重 (g)	抑瘤率 (%)
	给药方式		d ₀	d ₂₁	d ₀	d ₂₁	d ₀	d ₂₁				
	d ₀	d ₂₁										
阴性对照组 (0.9%NaCl)	ig	6	6	18.9	18.9	354.16±129.34	2561.88±773.74	8.28±4.88	98	2.36±0.26	-	
溶媒对照组 (0.5%CMC-Na)	ig	6	6	18.3	18.3	399.04±228.55	2311.08±737.76	8.43±3.89	100	2.27±0.65	-	
GAI3316												
低剂量	2	ig	6	6	18.8	18.7	343.85±269.78	2608.74±1425.39	7.05±2.03	84	1.84±0.73	19
中剂量	4	ig	6	6	18.3	18.7	288.31±140.10	1694.88±974.85	6.63±3.28	79	1.38±0.59*	39
高剂量	8	ig	6	6	18.5	18.3	349.92±194.04	1475.35±776.73	4.11±0.96	49	0.92±0.49**	59

注：ig 为灌胃给药，d₀：分组开始给药时间； d₂₁：实际治疗疗效最佳时间点。与溶媒对照组相比，*：P<0.05，**：P<0.01

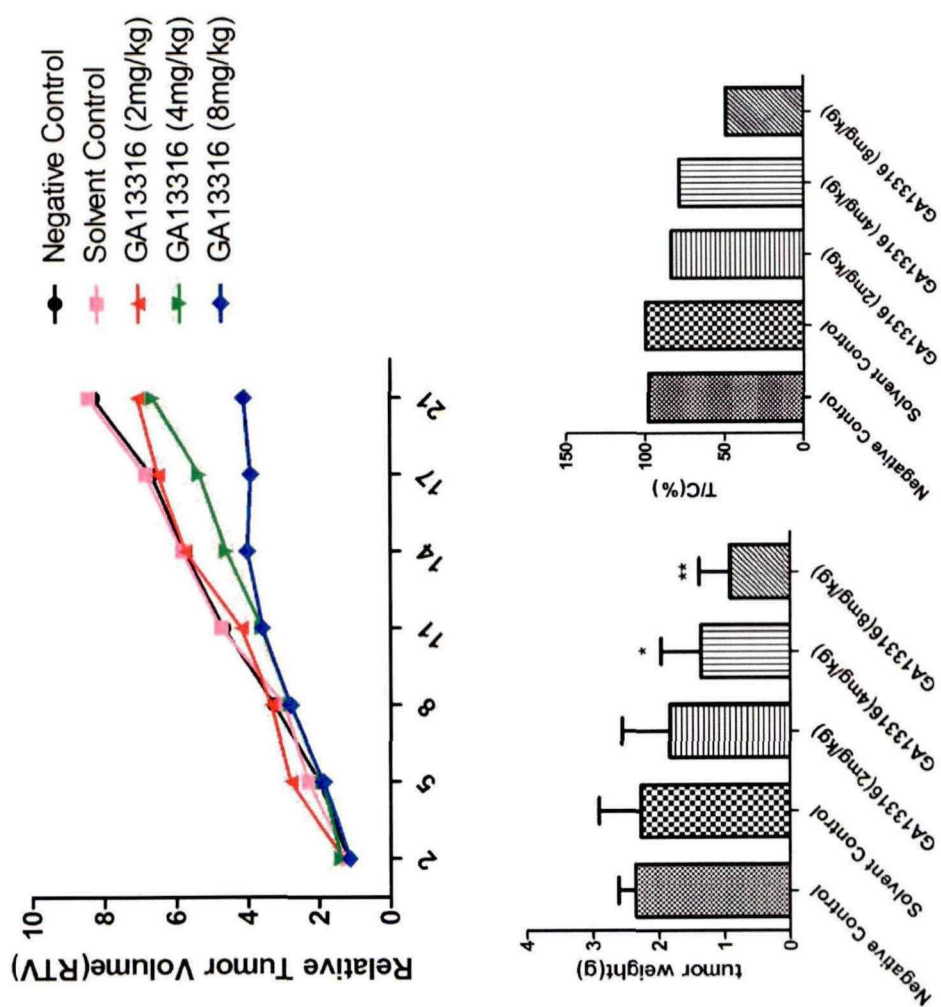
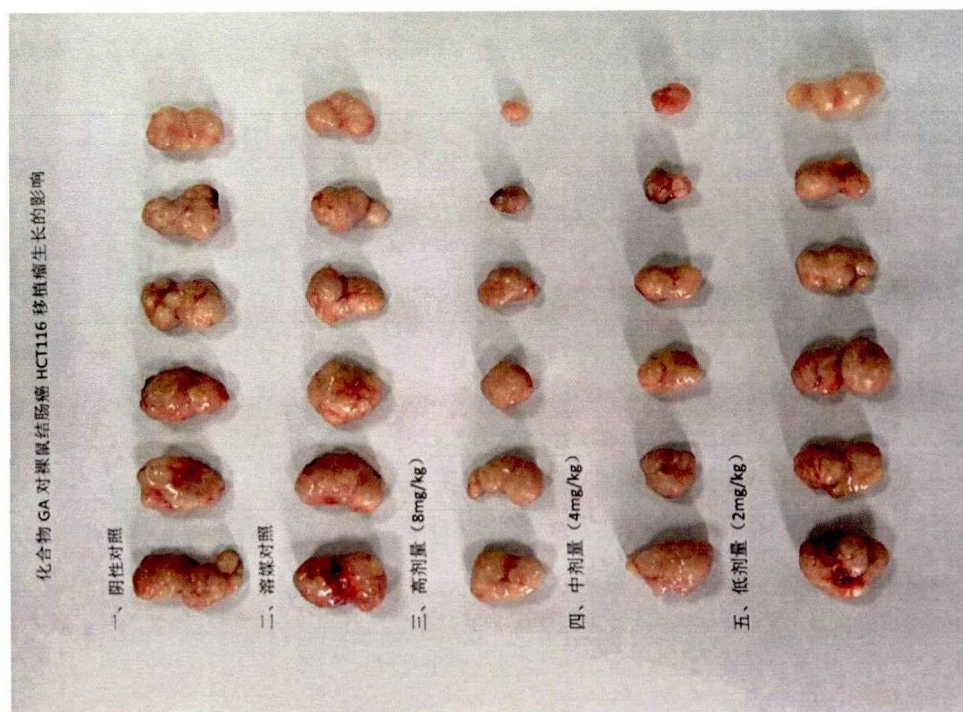


图 3 化合物 GA13316 对人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤生长的影响

三、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 NF-κB 信号通路蛋白表达的影响

1、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 NF-κB p65 蛋白表达的影响

结果显示，与阴性对照组相比，溶媒对 HCT-116 细胞 NF-κB p65 蛋白的表达无明显影响，差异无统计学意义；化合物 GA13316 在 1、2、4μM 浓度作用 HCT116 细胞 48h，p65 蛋白的表达分别下调了 20.11 %、26.94%、30.29%，与溶媒对照组相比，差异具有统计学意义。见表 3，图 4、5。

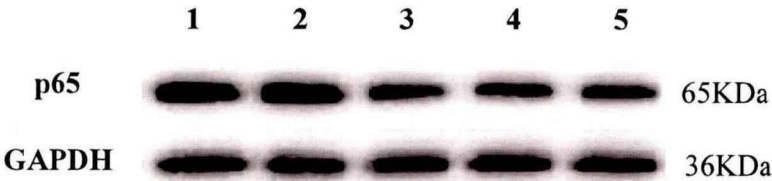


图 4 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 p65 蛋白表达的影响

Lane 1: Negative Control
Lane 2: Solvent Control
Lane 3: GA13316 1μM
Lane 4: GA13316 2μM
Lane 5: GA13316 4μM

表 3 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 p65 蛋白表达的影响(mean±SD, n=3)

Groups	p65/GAPDH
Negative control	0.97 ±0.11
Solvent control	1.05 ±0.15
GA13316 1μM	0.84± 0.05***
2μM	0.76±0.03***
4μM	0.73±0.04***

注：与溶媒对照组比较：*：P<0.5，**：P<0.01，***：P<0.001

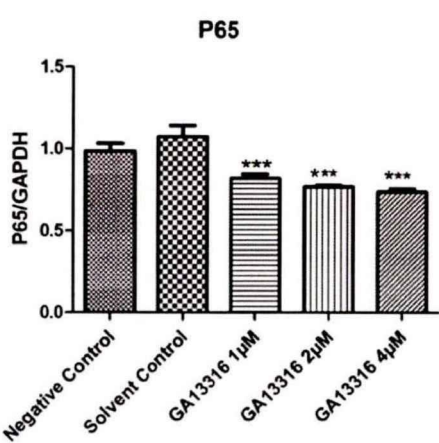


图 5 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 p65 蛋白表达的影响

2、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 IκB α蛋白表达的影响

结果显示，与阴性对照组相比，溶媒对 HCT-116 细胞 IκB α 蛋白的表达无明显影响，差异无统计学意义；化合物 GA13316 在 1、2、4μM 浓度作用 HCT-116 细胞 48h，IκB α 蛋白的表达分别上调了 7.03 %、10.59 %、42.20%，与溶媒对照组相比，4μM 浓度作用下差异具有统计学意义。见表 4，图 6、7。

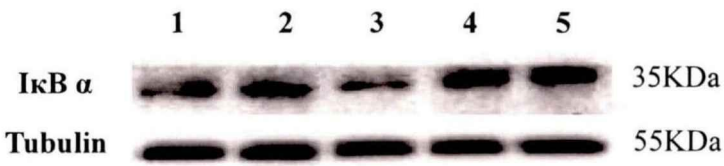


图 6 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 IκB α蛋白表达的影响

Lane 1: Negative Control
Lane 2: Solvent Control
Lane 3: GA13316 1μM
Lane 4: GA13316 2μM
Lane 5: GA13316 4μM

表 4 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 IκB α蛋白表达的影响(mean±SD, n=3)

Groups	IκB α/Tubulin
Negative control	0.65±0.09
Solvent control	0.75±0.03
GA13316 1μM	0.80 ±0.22
2μM	0.82 ±0.17
4μM	1.06 ±0.02 ***

注：与溶媒对照组比较：*： P<0.5， **： P<0.01， ***： P<0.001

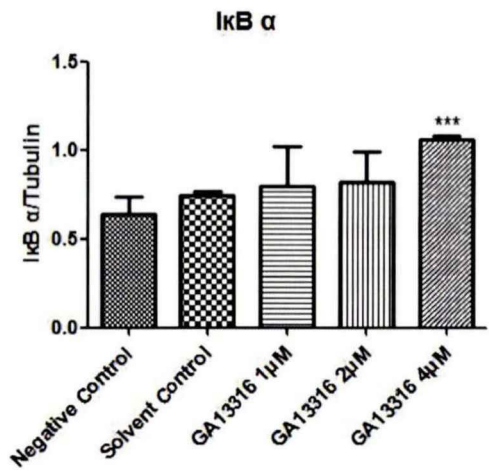


图 7 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 IκB α蛋白表达的影响

四、化合物 GA13316 对 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织中 NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响

采用免疫组织化学技术进行检测，组织中目标蛋白呈现棕黄色，颜色变浅则表达量减少，颜色变深则表达量增加，以颜色深浅为依据，用软件进行定量分析。在化合物 GA13316 剂量为 2、4、8mg/kg 灌胃给药 21 天，HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织中 NF-κB p65、IκB α、磷酸化 IκB α（P-IκB α）、ERK 蛋白表达量见表 5，图 8（8-1、8-2、8-3、8-4）。其中，NF-κB p65：溶媒对 NF-κB p65 的表达无影响，与溶媒对照组相比，GA13316 下调其表达；IκB α：溶媒对 IκB α 的表达无影响，与溶媒对照组相比，GA13316 上调其表达；P-IκB α：溶媒对 P-IκB α 的表达无影响，与溶媒对照组相比，GA13316 下调其表达；ERK：溶媒对 ERK 的表达无影响，与溶媒对照组相比，GA13316 下调其表达。

表 5 化合物 GA13316 对人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织中 NF-κB p65、IκB α、P-IκB α、ERK 蛋白表达的影响(mean±SD, n=3)

	IOD/Area				
	阴性对照 (0.9%NaCl)	溶媒对照 (0.5%CMC-Na)	GA13316		
			2mg/kg	4mg/kg	8mg/kg
NF-κB p65	0.0720±0.0101	0.0734±0.0019	0.0309±0.0057	0.0133±0.0026	0.0059±0.0037
IκB α	0.0034±0.0005	0.0056±0.0000	0.0082±0.0012	0.0113±0.0021	0.0198±0.0018
P-IκB α	0.0372±0.0037	0.0351±0.0082	0.0144±0.0033	0.0038±0.0027	0.0021±0.0005
ERK	0.0138±0.0020	0.0172±0.0028	0.0123±0.0014	0.0078±0.0035	0.0005±0.0002

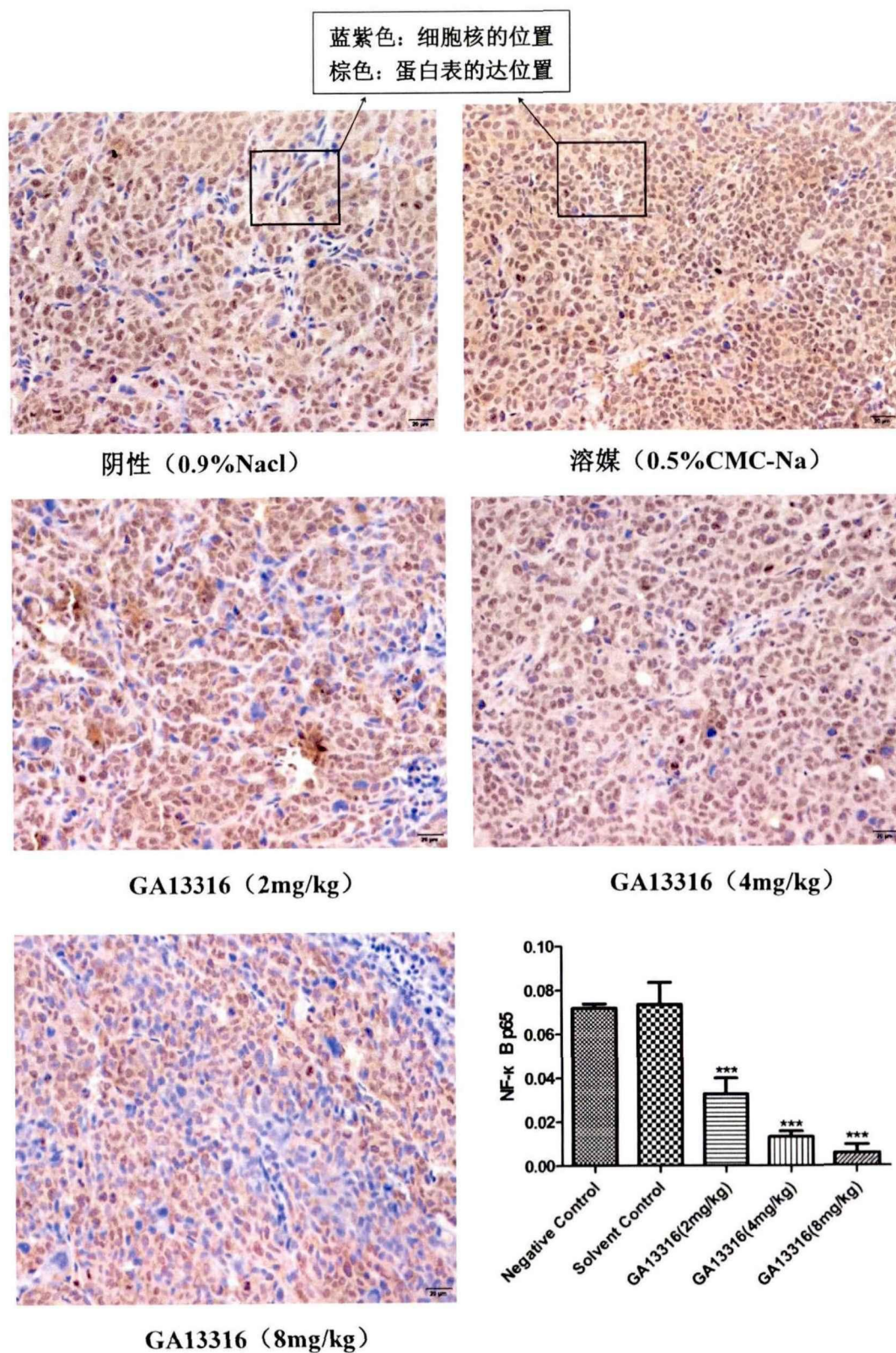


图 8-1 人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织 NF-κB p65 的表达 (400X)

注：蓝紫色：细胞核的位置；棕色：蛋白表达的位置

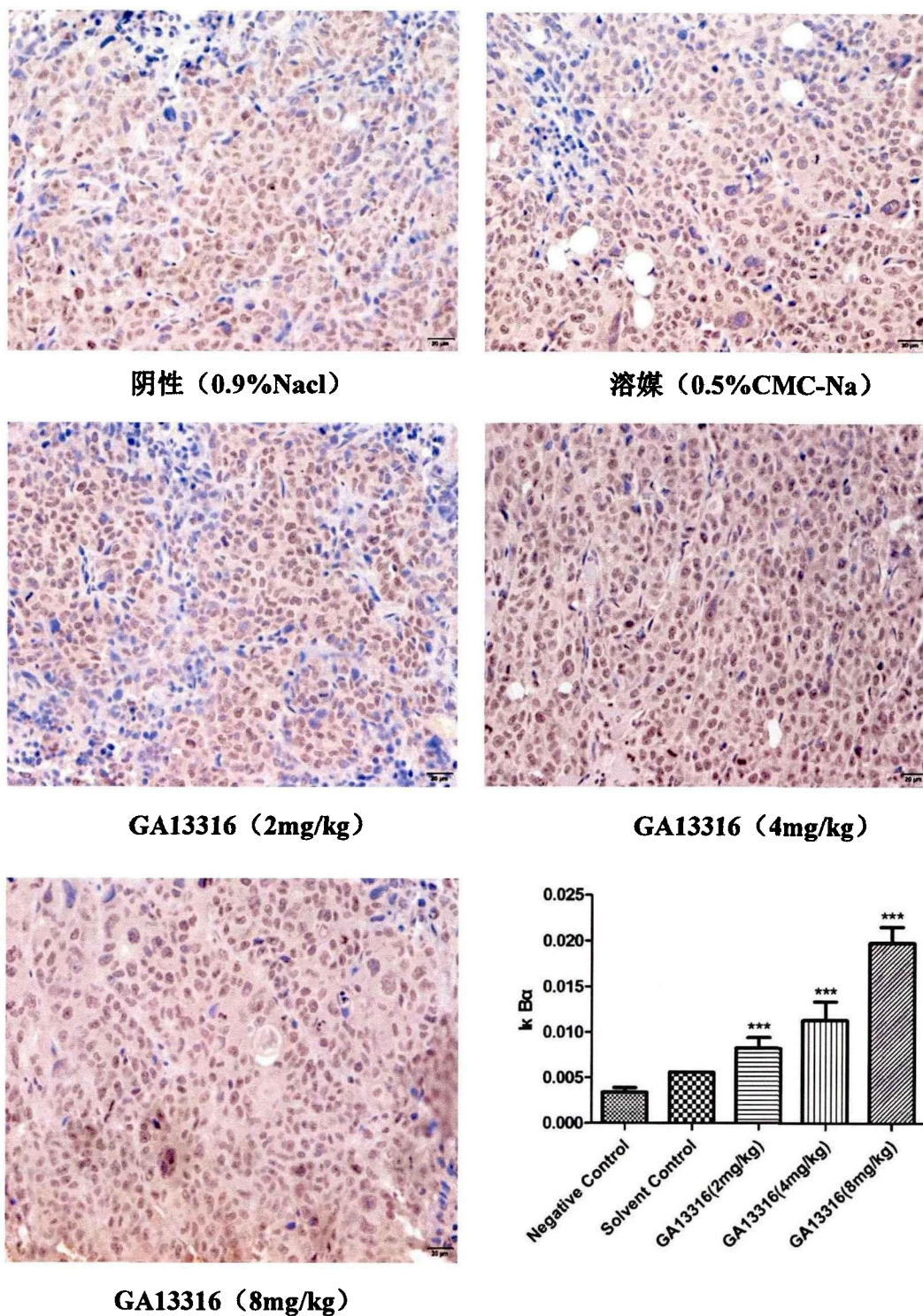


图 8-2 人结肠癌细胞 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织 IκB α 的表达 (400X)
 注：蓝紫色：细胞核的位置；棕色：蛋白表达的位置

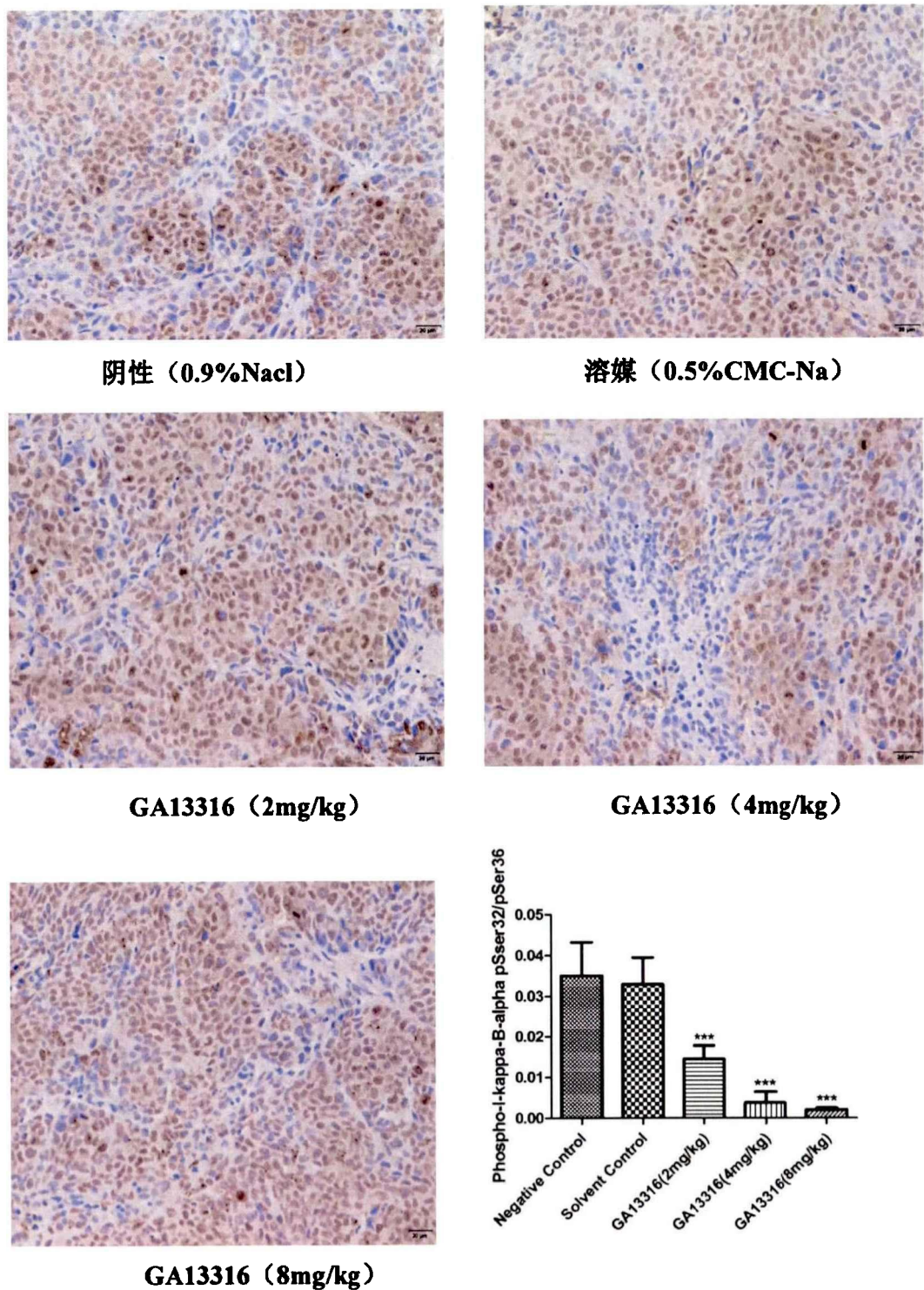


图 8-3 人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织 Phospho-I-kappa-B-alpha pSer32/pSer36 的表达 (400X)

注：蓝紫色：细胞核的位置；棕色：蛋白表达的位置

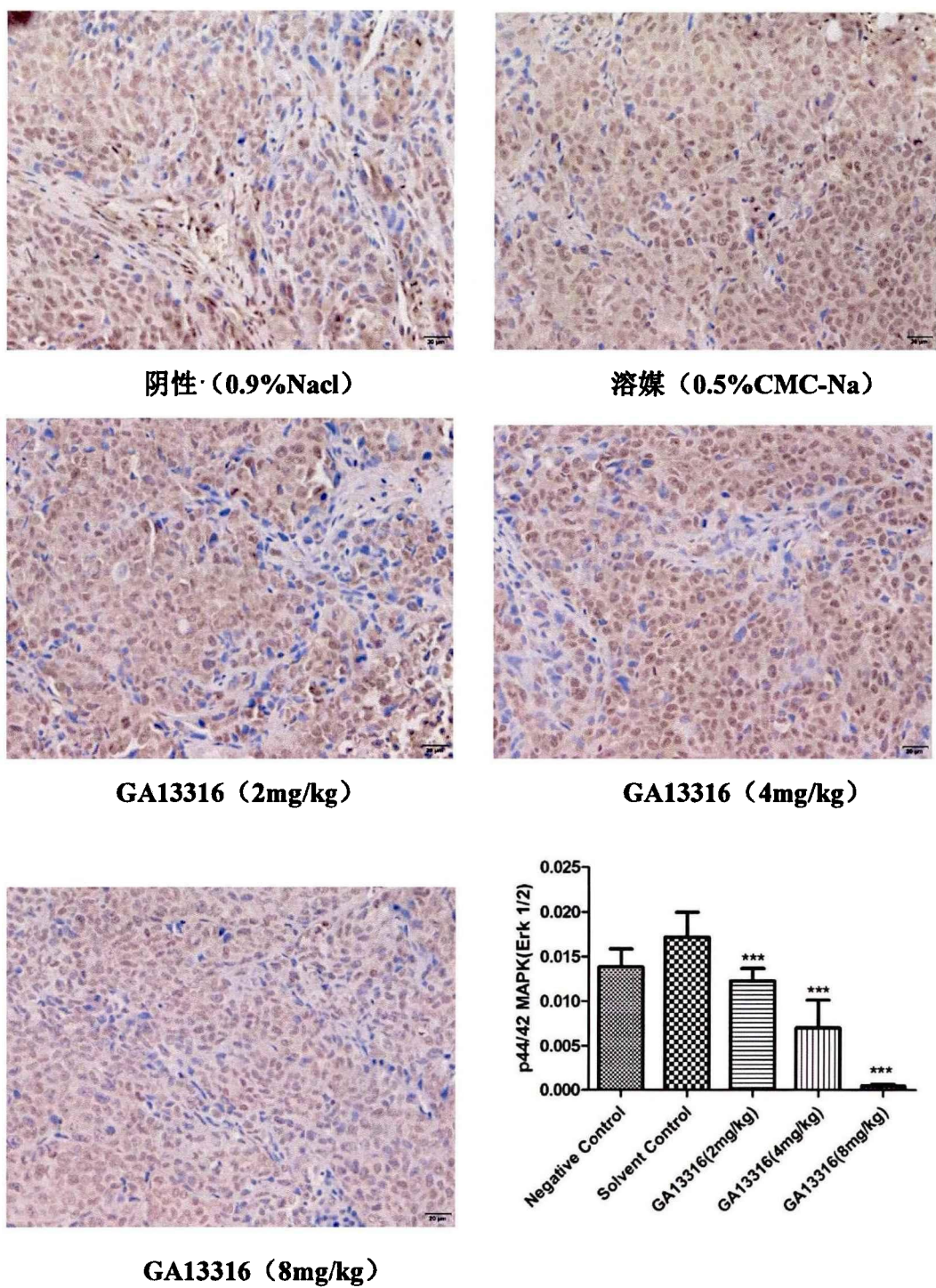


图 8-4 人结肠癌 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤组织 p44/42 MAPK(Erk 1/2)的表达
(400X)

注：蓝紫色：细胞核的位置；棕色：蛋白表达的位置

五、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 NF-κB 信号通路下游蛋白表达的影响

1、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 cIAP2 蛋白表达的影响

结果显示，与阴性对照组相比，溶媒对 HCT-116 细胞 cIAP2 蛋白表达无明显影响，差异无统计学意义；化合物 GA13316 在 1、2、4μM 浓度作用 HCT-116 细胞 48h，cIAP2 蛋白的表达分别下调了 14.72 %、51.27%、52.21%，与溶媒对照组相比，2、 4μM 浓度作用下的差异具有统计学意义。见表 6，图 9、10。

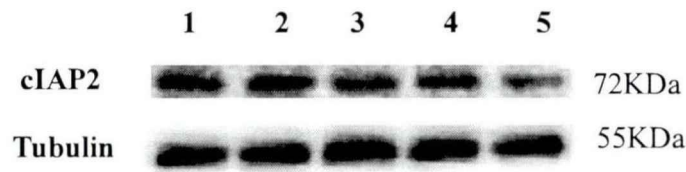


图 9 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 cIAP2 蛋白表达的影响

Lane 1: Negative Control
Lane 2: Solvent Control
Lane 3: GA13316 1μM
Lane 4: GA13316 2μM
Lane 5: GA13316 4μM

表 6 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 cIAP2 蛋白表达的影响(mean±SD, n=3)

Groups	cIAP2/Tubulin
Negative Control	1.31±0.58
Solvent Control	1.31±0.71
GA13316 1μM	1.12±0.44
2μM	0.64±0.14***
4μM	0.63±0.09***

注：与溶媒对照组比较：*：P<0.5，**：P<0.01，***：P<0.001

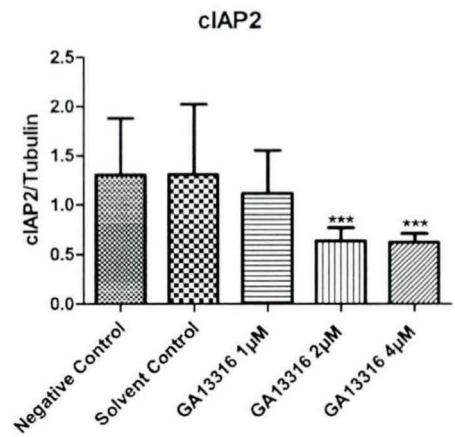


图 10 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 cIAP2 蛋白表达的影响

2、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 Bcl 2 蛋白表达的影响

结果显示，与阴性对照组相比，溶媒对 HCT-116 细胞 Bcl 2 蛋白表达有下调作用；化合物 GA13316 1、2、4 μ M 作用 HCT-116 细胞下，Bcl 2 蛋白表达分别下调了 23.57%、47.59%、50.19%，与溶媒对照组相比，差异具有统计学意义。见表 7，图 11、12。

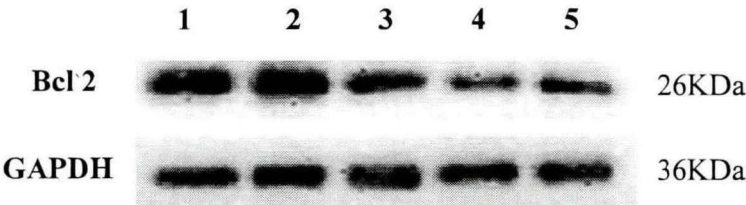


图 11 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 Bcl 2 蛋白表达的影响

Lane 1: Negative Control
Lane 2: Solvent Control
Lane 3: GA13316 1 μ M
Lane 4: GA13316 2 μ M
Lane 5: GA13316 4 μ M

表 7 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 Bcl 2 蛋白表达的影响(mean $\pm$ SD, n=3)

Groups	Bcl 2/GAPDH
Negative Control	1.25 $\pm$ 0.11*
Solvent Control	0.98 $\pm$ 0.09
GA13316 1 μ M	0.75 $\pm$ 0.05 ***
2 μ M	0.52 $\pm$ 0.06***
4 μ M	0.49 $\pm$ 0.04***

注：与溶媒对照组比较：*：P<0.5，**：P<0.01，***：P<0.001

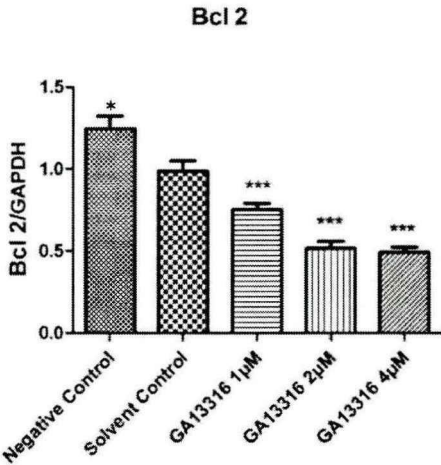


图 12 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 Bcl 2 蛋白表达的影响

3、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 MMP 9 蛋白表达的影响

结果显示，与阴性对照组相比，溶媒对 HCT-116 细胞 MMP 9 蛋白表达有下调作用；化合物 GA13316 在 1、2、4 μ M 浓度作用 HCT116 细胞 48h，MMP 9 蛋白表达分别下调了 19.46%、20.49%、31.97%，与溶媒对照组相比，差异均具有统计学意义。见表 8，图 13、14。

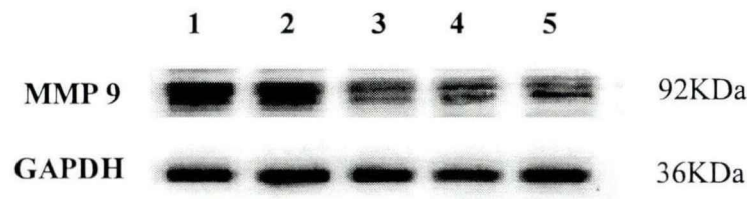


图 13 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 MMP 9 蛋白表达的影响

Lane 1: Negative Control
Lane 2: Solvent Control
Lane 3: GA13316 1 μ M
Lane 4: GA13316 2 μ M
Lane 5: GA13316 4 μ M

表 8 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 MMP 9 蛋白表达的影响(mean $\pm$ SD, n=3)

Groups	MMP 9/GAPDH
Negative Control	2.39 $\pm$ 0.08***
Solvent Control	2.01 $\pm$ 0.17
GA13316 1 μ M	1.62 $\pm$ 0.13***
2 μ M	1.60 $\pm$ 0.19***
4 μ M	1.37 $\pm$ 0.13***

注：与溶媒对照组比较：*：P<0.5，**：P<0.01，***：P<0.001

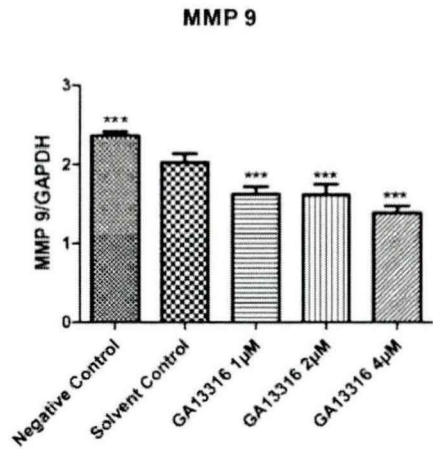


图 14 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 MMP 9 蛋白表达的影响

4、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 p53 蛋白表达的影响

结果显示，与阴性对照组相比，溶媒对 HCT-116 细胞 p53 蛋白表达无明显影响，差异无统计学意义；化合物 GA13316 在 1、2、4 μ M 浓度作用 HCT-116 细胞 48h，p53 蛋白表达分别上调了 12.70%、22.22%、36.51%，与溶媒对照组相比，2、4 μ M 浓度作用下差异具有统计学意义。见表 9，图 15、16。

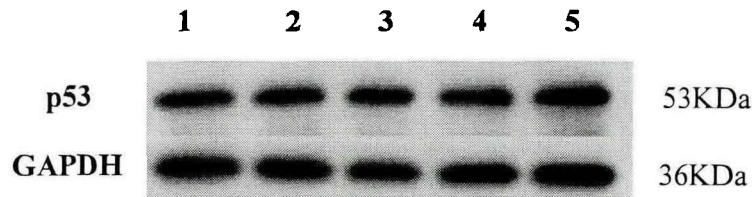


图 15 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 p53 蛋白表达的影响

Lane 1: Negative Control
Lane 2: Solvent Control
Lane 3: GA13316 1 μ M
Lane 4: GA13316 2 μ M
Lane 5: GA13316 4 μ M

表 9 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 p53 蛋白表达的影响(mean $\pm$ SD, n=3)

Groups	p53/GAPDH
Negative Control	0.63 $\pm$ 0.02
Solvent Control	0.63 $\pm$ 0.06
GA13316 1 μ M	0.71 $\pm$ 0.05
2 μ M	0.77 $\pm$ 0.10*
4 μ M	0.86 $\pm$ 0.11***

注：与溶媒对照组比较：*：P<0.5，**：P<0.01，***：P<0.001

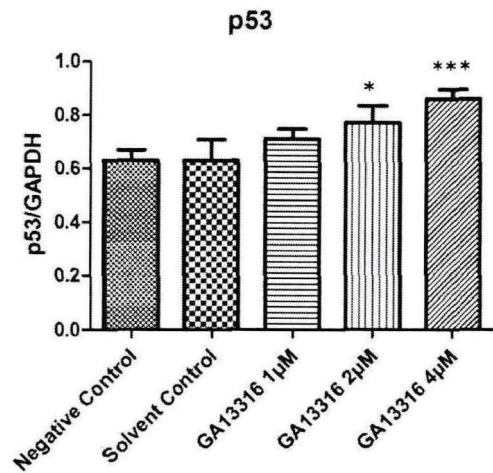


图 16 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 p53 蛋白表达的影响

5、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 PPM1D 蛋白表达的影响

结果显示，与阴性对照组相比，溶媒对 HCT-116 细胞 PPM1D 蛋白有轻度上调作用；化合物 GA13316 在 1、2、4 μ M 浓度作用 HCT-116 细胞 48h，PPM1D 蛋白表达分别下调了 40.45%、49.49%、53.27%，与溶媒对照组相比，差异均具有统计学意义。见表 10，图 17、18。

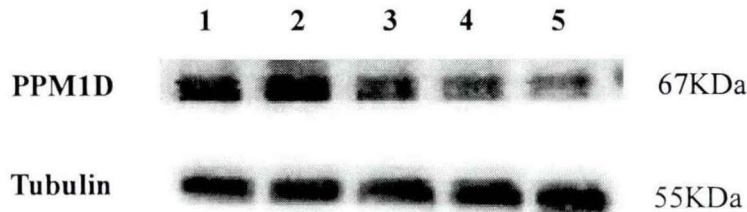


图 17 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 PPM1D 蛋白表达的影响

Lane 1: Negative Control
Lane 2: Solvent Control
Lane 3: GA13316 1 μ M
Lane 4: GA13316 2 μ M
Lane 5: GA13316 4 μ M

表 10 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 PPM1D 蛋白表达的影响(mean $\pm$ SD, n=3)

Groups	PPM1D/Tubulin
Negative Control	1.19 $\pm$ 0.20
Solvent Control	1.29 $\pm$ 0.37
GA13316 1 μ M	0.77 $\pm$ 0.11**
2 μ M	0.65 $\pm$ 0.09***
4 μ M	0.60 $\pm$ 0.11 ***

注：与溶媒对照组比较：*：P<0.5，**：P<0.01，***：P<0.001

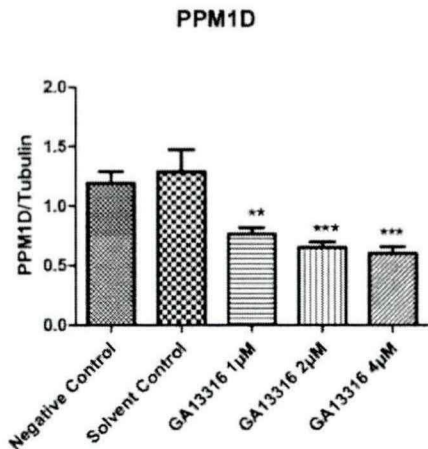


图 18 化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞 PPM1D 蛋白表达的影响

6、化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞突变型 p53 蛋白表达的影响

结果显示，化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞突变型 p53 蛋白不表达，说明对该蛋白不影响，且 HCT-116 为 p53 野生型。

讨 论

结肠癌是常见的消化道肿瘤，其发病率及死亡率均位于前列^[1,2]。外科手术是其主要治疗手段，对早期患者可取得良好效果。但结肠癌在早期的症状表现隐匿，多数患者诊断时已是中晚期，此类患者术后复发率和转移率高，术后需要配合以化疗为主的多种辅助治疗。

目前常用的化疗药物包括氟尿嘧啶类的 5-氟尿嘧啶、卡培他滨，铂类的奥沙利铂和喜树碱类的伊立替康，但这些药物均存在选择性低、毒副作用大及产生耐药性等缺点，成为临床治疗的难题^[3]。因此，继续发现和研究新的临床治疗药物，是改善结肠癌预后的重要课题。

化合物 GA13316 是从一系列赤霉素衍生物中筛选出的、具有体内外抗肿瘤活性的新四环二萜类化合物。我们前期的研究结果显示，化合物 GA13316 对不同肿瘤细胞的增殖均具有较明显的抑制作用，其中对结肠癌的作用更为显著。本研究在前期基础上，选择 Caco2、HT29、HCT-116 三株人结肠（腺）癌细胞，对化合物 GA13316 的细胞毒活性再次进行了验证。结果显示，化合物 GA13316 对以上三株结肠癌细胞作用 48h 后，其半数抑制浓度（IC₅₀）分别为 31.68±1.40μM、11.41±0.81μM、4.15±0.07μM，其中对 HCT-116 细胞的抑制作用最为显著，故后续的体内实验及作用机制研究均采用敏感的人结肠癌 HCT-116 细胞为模型进行。

我们采用 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤模型，检测了化合物 GA13316 对结肠癌生长的影响。结果显示，化合物 GA13316 对 HCT-116 裸小鼠异种移植瘤的生长具有明显的抑制作用，在剂量为 2、4、8mg/kg 灌胃给药 21 天，肿瘤的重量和体积均明显降低，抑瘤率分别为 19%、39%、59%，肿瘤的相对增殖率（T/C）分别为 84%、79%、49%，并呈现出剂量依赖性。

以上结果显示，化合物 GA13316 对结肠癌 HCT-116 具有良好的体内外抑制活性。

我们前期还采用药物芯片（Drug Array）对化合物 GA13316 抑制结肠癌细胞可能的作用靶点进行了筛选。Drug Array 含有针对 66 个特定作用靶点的药物/工具药，干预特定的信号通路，可快速筛选和预测受试化合物可能涉及的靶点或信号通路。筛选的结果显示，化合物 GA13316 抑制 HCT-116 细胞增殖的作用与

IKKE 及 NF- κ B1 有关, 之后采用 RQ-PCR 及 Western Blot 进行了初步验证, 结果显示, 化合物 GA13316 可下调 NF- κ B1 和 IKKE 基因的表达, 而二者是 NF- κ B 信号通路的重要组成部分, 提示化合物 GA13316 抑制结肠癌 HCT-116 细胞的作用机制可能与 NF- κ B 信号通路有关。

NF- κ B 信号转导通路主要由 NF- κ B 家族、NF- κ B 抑制子 (I κ Bs) 和 I κ Bs 激酶 (IKKs) 组成。NF- κ B 是 1986 年发现的核转录因子, 包括 RelA (p65, NF κ B3), RelB, Rel (cRel), p105/p50 (NF- κ B1) 和 p100/p52 (NF- κ B2) 5 名成员。其中 p65/RelA (通常所指的 NF- κ B) 是发现最早、最常见、发挥主要作用的 NF- κ B。I κ B (主要形式是 I κ B α) 以特异性结合 NF- κ B 的方式抑制其活性。IKK 是 I κ B 激酶, 是 I κ B 的上游因子^[12]。

目前, NF- κ B 信号通路的激活方式可分为经典途径和非经典途径, 大部分 NF- κ B 通路以经典途径激活, 即在肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)、细菌和病毒抗原等因子刺激下, 上游激酶 IKK 经磷酸化活化, 进而磷酸化下游的 I κ B 蛋白, 后者经泛素化降解、释放出 NF- κ B, 游离的 NF- κ B 入核、启动一系列靶基因的活化^[13, 14]。

NF- κ B 是一种重要的信号转导通路, 在结肠癌中常可观察到它的组成型活化, 在细胞异常增殖、凋亡、血管新生、肿瘤侵袭和转移中起关键作用, 广泛参与结肠癌的发生发展, 通常与较高的肿瘤分期、治疗抗性和不良预后有关, 因此, NF- κ B 信号途径的成员可成为结肠癌的干预靶点和预后标志物^[21, 22]。

本研究以 HCT-116 细胞为模型, 采用 Western Blot 技术检测了 NF- κ B 信号通路经典途径中 NF- κ B 蛋白的主要形式 p65, 以及 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B α 的表达。结果显示, 化合物 GA13316 在 1、2、4 μ M 浓度作用 HCT-116 细胞 48h, p65 蛋白的表达分别下调了 20.11 %、26.94 %、30.29 %, 与溶媒对照组相比差异具有显著性; 化合物 GA13316 在 4 μ M 浓度作用 HCT-116 细胞 48h, I κ B α 蛋白的表达上调了 42.20 %, 与溶媒对照组相比差异具有显著性, 此效应均呈现出浓度依赖性。根据已知的 NF- κ B 信号转导经典活化途径, p65 蛋白表达的下调和 I κ B α 蛋白表达的上调, 都将抑制 NF- κ B 信号转导途径的活化, 进而影响对下游靶基因的激活。

细胞的生命活动极其复杂, 必须受到严格调控。作为一个开放系统, 它不仅

与外界环境进行信息交流，还要在细胞间进行信息传递。在长期进化发展过程中逐步建立起复杂的信号转导网络，由不同的信号转导途径相互联系和作用形成，即不同信号转导途径间的“cross-talking”。

在信号网络中，MAPK信号途径起着极为重要的作用，控制着细胞多种生理过程，如细胞生长、发育、分裂、死亡等。ERK是MAPK家族的一员，其介导的信号途径是调节细胞生长、发育及分裂的信号网络核心。NF- κ B 可调控MAPK信号通路，二者相互作用促进肿瘤的发生发展^[23, 24]。ERK与结肠癌细胞增殖密切相关，参与肿瘤细胞增殖、侵袭、分化、衰老和凋亡的调控^[25, 26]。研究显示，多种恶性肿瘤可检测到 ERK的过表达及活化，已成为相关肿瘤发展变化的标志物^[27, 28]。

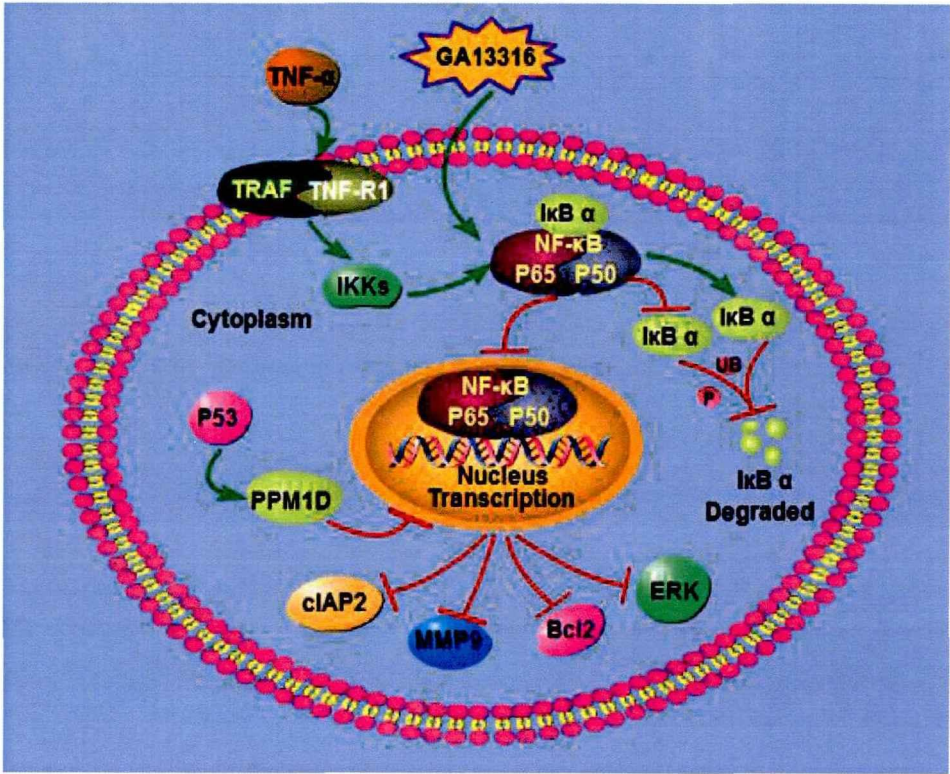
本研究采用免疫组化技术，检测了HCT-116裸小鼠异种移植瘤组织中 NF- κ B p65、磷酸化I κ B α (P-I κ B α)、ERK蛋白的表达，结果显示，化合物GA13316剂量为2、4、8mg/kg灌胃给药21天，HCT-116移植瘤组织中NF- κ B p65的表达量较溶媒对照组下调；I κ B α 的表达量较溶媒对照组上调；磷酸化I κ B α (P-I κ B α)的表达量较溶媒对照组下调；ERK蛋白的表达量较溶媒对照组下调（前期结果显示，化合物GA13316可抑制HCT-116细胞ERK蛋白的表达）。以上作用均具有剂量依赖性。表明化合物GA13316可不同程度地抑制NF- κ B信号通路经典途径以及与其相互作用的MAPK信号通路。

以上结果提示，化合物GA13316可以抑制I κ B α 的磷酸化，增加I κ B α 的表达从而抑制p65，使p65无法解离入核，致使NF- κ B经典信号通路失活，从而发挥抗肿瘤作用。

NF- κ B信号通路在自身激活的基础上，通过对一系列下游靶基因的激活，从而在肿瘤的发生发展中发挥作用^[18, 19]。这些靶基因涉及抗凋亡、细胞周期进程、细胞侵袭、血管生成等，从而参与炎症、细胞转化、细胞增殖、血管增生、细胞侵袭/转移、化疗抵抗和抗辐射等生物学过程^[16, 17]。

为验证化合物GA13316是否通过抑制HCT-116细胞NF- κ B信号通路，影响其下游靶蛋白表达、进而影响细胞增殖，本研究进一步采用Western Blot技术，检测了GA13316在HCT-116细胞对NF- κ B信号通路下游蛋白cIAP2、MMP9、Bcl2表达的影响。

cIAP2 是最具代表性的细胞凋亡抑制因子，Bcl 2 也是一种重要的抗凋亡蛋白，均与肿瘤的发生、发展密切相关；MMPs 是基质金属蛋白酶，具有降解细胞外基质（ECM）的功能，在包括结肠癌在内的多种肿瘤组织中均呈阳性表达，也是肿瘤侵袭、转移的重要影响因子^[29, 30]，其中 MMP9 是常见的基质金属蛋白酶。研究发现，血浆中 MMP9 含量的增加可提高结肠癌的血管生成及细胞发生肺转移的能力^[31, 32]。



结果显示，化合物 GA13316 在 2、4 μ M 浓度作用 48h，HCT-116 细胞中 cIAP2 蛋白的表达分别下调了 51.27%、52.21%，与溶媒对照组相比，差异具有统计学意义。GA13316 在 1、2、4 μ M 浓度作用 48h，HCT-116 细胞中 Bcl 2 蛋白的表达分别下调了 23.57%、47.59%、50.19%，与溶媒对照组相比，差异具有统计学意义。化合物 GA13316 在 1、2、4 μ M 浓度作用 48h，HCT-116 细胞中 MMP 9 蛋白的表达分别下调了 19.46%、20.49%、31.97%，与溶媒对照组相比，差异具有统计学意义。

以上结果表明，化合物 GA13316 在抑制结肠癌 HCT-116 细胞 NF- κ B 信号通路的同时，亦抑制了与肿瘤进展、转移密切相关的 NF- κ B 信号通路下游蛋白

cIAP2、Bcl-2 和 MMP9 的表达。

p53 是细胞死亡的关键调节因子，是经典的抑癌蛋白，其在 50%以上的恶性肿瘤中发生突变^[33]，野生型 p53 可以抑制 NF- κ B 信号转导通路，p53 功能的丧失（如 p53 突变蛋白）可增强 NF- κ B 的 DNA 结合和转录活性^[31]。就其生物学背景，结肠癌 HCT-116 细胞表达野生型 p53 蛋白，因此，我们检测/验证了化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞野生型和突变型 p53 蛋白表达/含量的影响。结果显示，化合物 GA13316 在 2、4 μ M 浓度作用下，HCT-116 细胞野生型 p53 蛋白的表达分别上调了 22.22%、36.51%，与溶媒对照组相比，差异具有统计学意义，但未检测到突变型的 p53 蛋白。

PPM1D (Wild-type p53-inducible phosphatase-1, WIP1/PPM1D) 是野生型 p53 (p53) 蛋白诱导型磷酸酶，是野生型 p53 的下游分子，激活后可负反馈地使野生型 p53 蛋白分子丝/苏氨酸位点去磷酸化，抑制 p53 功能，参与细胞应激后 p53 功能的稳态调节^[34, 35]。PPM1D 是致癌基因，可增强 NF- κ B 的信号转导^[36, 37]。NF- κ B 可通过直接结合 PPM1D 的启动子区域激活其表达、并促进 CRC 细胞增殖^[38]。故本研究还检测了化合物 GA13316 对 HCT-116 细胞中 PPM1D 基因表达的影响。结果显示，GA13316 在 1、2、4 μ M 浓度作用 48h，HCT-116 细胞 PPM1D 蛋白的表达分别下调了 40.45%、49.49%、53.27%，与溶媒对照组相比，差异具有显著性。

综上所述，化合物 GA13316 抑制结肠癌细胞 HCT-116 的作用，与抑制 NF- κ B 信号转导通路的经典途径（即抑制 I κ B α 的磷酸化从而抑制 p65 的入核），进而抑制其下游靶基因 cIAP2（细胞凋亡抑制因子 2）、Bcl2（B 淋巴细胞瘤-2）、MMP9（基质金属蛋白酶 9）有关。同时，也与影响 MAPK 信号通路以及 p53 和 NF- κ B 之间的交叉对话有关。

参考文献

- [1]. Li S, Martin A. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends in Molecular Medicine*. 2016;22(4):274.
- [2]. Wanqing, Chen, Rongshou, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2014;26(1):48-58.
- [3]. Baron DM, Kaindl U, Haudek-Prinz VJ, et al. Autonomous inhibition of apoptosis correlates with responsiveness of colon carcinoma cell lines to ciglitazone. *Plos One*. 2014;9(12):e114158.
- [4]. Kosugi C, Koda K, Ishibashi K, et al. Safety of mFOLFOX6/XELOX as adjuvant chemotherapy after curative resection of stage III colon cancer: phase II clinical study (The FACOS study). *International Journal of Colorectal Disease*. 2018;33(6):809-817.
- [5]. Verma M, Kumar V. Epigenetic Biomarkers in Colorectal Cancer. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2017;21(2):1-13.
- [6]. 孙丽超, 李淑英, 王凤忠, et al. 萜类化合物的合成生物学研究进展. *生物技术通报*. 2017;33(1):64-75.
- [7]. 植物天然产物合成生物学研究. *中国科学院院刊*. 2018;33(11):106-116.
- [8]. Liu C, Yang N, Song Y, et al. Ganoderic acid C1 isolated from the anti-asthma formula, ASHMI™ suppresses TNF- α production by mouse macrophages and peripheral blood mononuclear cells from asthma patients. *International Immunopharmacology*. 2015;27(2):224-231.
- [9]. Lin R, Zhang Z, Chen L, et al. Dihydroartemisinin (DHA) induces ferroptosis and causes cell cycle arrest in head and neck carcinoma cells. *Cancer Letters*. 2016;381(1):S0304383516304529.
- [10]. Ooko E, Saeed ME, Kadioglu O, et al. Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells. *Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*. 2015;22(11):1045-1054.
- [11]. Hoesel, Bastian, Schmid, et al. The complexity of NF-kappa B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12, 1(2013-08-02). 2013;12(1):86.
- [12]. Ekblom A. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression.
- [13]. Schneider AT, Gautheron J, Feoktistova M, et al. RIPK1 Suppresses a TRAF2-Dependent Pathway to Liver Cancer. *Cancer Cell*. 2017;31(1):94-109.

- [14].S R, A R, AS L-H, et al. Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1 β production. *Nature Immunology*. 2014;15(6):538-545.
- [15].Chen H, Huang Q, Dong J. Cancer Initiating Cell Theory: Popularity and Controversies. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*. 2006;25(6):779.
- [16].Patel M, Horgan PG, Mcmillan DC, et al. NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research*. 2018;197:43.
- [17].Basseres D, Baldwin A. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*. 2006;25(51):6817-6830.
- [18].Xie TX, Xia Z, Zhang N, et al. Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncology Reports*. 2010;23(3):725-732.
- [19].Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2008;18(1):19-26.
- [20].Salminen A, Kai K. Control of p53 and NF- κ B signaling by WIP1 and MIF: Role in cellular senescence and organismal aging. *Cellular Signalling*. 2011;23(5):747-752.
- [21].Moorchung N, Kunwar S, Ahmed KW. An evaluation of nuclear factor kappa B expression in colorectal carcinoma: an analysis of 50 cases. *Journal of Cancer Research & Therapeutics*. 2014;10(3):631-635.
- [22].Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, et al. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Critical Reviews in Oncology/hematology*. 2017;120:141.
- [23].Koichi S, Hideyuki T, Kyoichi K, et al. Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Science*. 2015;106(1):1-8.
- [24].Bao-Song, Chun-Gen, Xing, et al. Blocking NF-kB nuclear translocation leads to p53-related autophagy activation and cell apoptosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2011;17(4):478-487.
- [25].Rauch J, MoranJones K, Albrecht V, et al. c-Myc regulates RNA splicing of the A-Raf kinase and its activation of the ERK pathway. *Cancer Research*. 2011;71(13):4664.
- [26].Duhamel S, Hä©Bert J, Gaboury L, et al. Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation. *Cancer Research*. 2012;72(3):626-635.

- [27].Zassadowski F, Rochette-Egly C, Chomienne C, et al. Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cellular Signalling*. 2012;24(12):2369-2377.
- [28].Jean-Claude M, Joshua C, Natascia M, et al. The Nm23-H1 metastasis suppressor as a translational target. *European Journal of Cancer*. 2010;46(7):1278-1282.
- [29].Westermarck J, ., K?H?Ri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(8):781-792.
- [30].Lujan B, ., Hakim S, ., Moyano S, ., et al. Activation of the EGFR/ERK pathway in high-grade mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *British Journal of Cancer*. 2010;103(4):510-516.
- [31].Xiwu C, Yan S, Barbara F, et al. Increased plasma MMP9 in integrin alpha1-null mice enhances lung metastasis of colon carcinoma cells. *International Journal of Cancer*. 2005;116(1):52-61.
- [32].Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, et al. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Molecular Carcinogenesis*. 2010;10(4):199-206.
- [33].Dalil H, Shunsuke K, Chikashi I, et al. The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Human Mutation*. 2010;27(1):14-20.
- [34].Lowe J, Cha H, Lee MO, et al. Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response. *Front Biosci*. 2012;17(1):1480-1498.
- [35].Gilmartin AG, Faitg TH, Mark R, et al. Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nature Chemical Biology*. 2014;10(3):181-187.
- [36].Liwei Z, Chen LH, Hong W, et al. Exome sequencing identifies somatic gain-of-function PPM1D mutations in brainstem gliomas. *Nature Genetics*. 2014;46(7):726-730.
- [37].Elise R, Katie S, Peter H, et al. Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature*. 2013;493(7432):406-U152.
- [38].Bai F, Zhou H, Fu Z, et al. NF- κ B-induced WIP1 expression promotes colorectal cancer cell proliferation through mTOR signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;99:402-410.

NF- κ B 信号转导通路恶性肿瘤关系的研究进展

武娅曦(综述) 卿晨(审校)

(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明, 650500)

摘要: 癌症是世界公共卫生问题, 其复发率及死亡率高, 威胁着人类健康。癌症的发生发展机制十分复杂, 信号转导通路的异常激活参与肿瘤发病机制, 并在癌症的发生发展和复发中起关键作用。NF- κ B (nuclear factor kappa B) 是参与癌症发病机制和治疗的重要信号转导通路, 在各种肿瘤组织中发现了 NF- κ B 信号转导通路的过度激活, 并且针对靶向癌症治疗的该信号转导通路的研究已成为热门话题。本文就 NF- κ B 信号转导通路及其与恶性肿瘤的关系作一综述。

关键词: NF- κ B ; 宫颈癌; 结直肠癌; 血液系统恶性肿瘤; 乳腺癌

Research progress in the relationship between NF- κ B signal transduction pathway and malignant tumors

WuYaxi,QingChen

(The School of Pharmaceutical Sciences & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Yunnan, Kunming, 650500)

Abstract: Cancer is a public health problem in the world with high recurrence rates and mortality rates that threaten human health. The mechanism of cancer development and development is very complicated. Abnormal activation of signal transduction pathway is involved in tumor pathogenesis and plays a key role in the development and recurrence of cancer. NF- κ B (nuclear factor kappa B) is an important signal transduction pathway involved in cancer pathogenesis and treatment, and overactivation of NF- κ B signal transduction pathway is found in various tumor tissues, And research on this signal transduction pathway targeting cancer therapy has become a hot topic. This article reviews the relationship between NF- κ B signal transduction pathway and malignant tumors.

Keywords: NF- κ B; cervical cancer; colorectal cancer; hematological malignancy; breast cancer

细胞信号转导通路是指细胞通过胞膜或胞内受体,感受胞外信号分子的刺激,通过一系列信号转导蛋白的酶促反应,将生物学信息传递到细胞核内,诱导相应的基因表达,从而引起相关生物学效应及细胞应答的过程。细胞信号转导通路的异常调节和相互作用在癌症中发挥关键作用,其异常可能导致细胞过度增殖,分化,细胞凋亡,血管生成,侵袭和转移,最终导致癌症的发展和进展^[1]。NF- κ B 是一种重要的信号转导通路,广泛参与癌症的发展和进展。目前,随着癌症免疫疗法的兴起,免疫细胞,炎症和癌症之间的联系成为主要焦点,而 NF- κ B 是三者之间的重要调节因子^[2],在控制细胞增长、分化、凋亡、介导免疫及炎症反应、应激反应和癌症的进展过程中起着重要的作用。

NF- κ B 信号转导通路参与细胞免疫,炎症和应激,以及细胞分化,增殖和凋亡的调节^[3,4],经典和替代的 NF- κ B 途径在不同程度上于许多类型的癌症中被激活,如在宫颈癌、结直肠癌、血液系统恶性肿瘤以及乳腺癌等诸多肿瘤中,NF- κ B 组成型激活,与肿瘤的发生发展密切相关。现将 NF- κ B 信号转导通路及其与各种肿瘤的关系综述如下:

1 NF- κ B 信号转导通路的组成

NF- κ B 信号转导通路是由 NF- κ B 家族、I κ B(inhibitor-kappa B , I κ B)家族以及 IKK (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) 家族三部分组成。

1.1 NF- κ B 及家族成员 (NF- κ Bs)

NF- κ B 是 1986 年由 Sen 和 Baltimore 等在研究电离辐射诱导的一种早期反应中发现的核转录因子^[5],因能够与 B 细胞免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κ B 序列 (GGGACTTTCCC) 发生特异性结合而得名。NF- κ B 广泛表达于哺乳动物细胞中,参与细胞生长、凋亡、炎症反应以及肿瘤发生发展中多种相关基因的转录调控。

NF- κ B 家族包括 5 名成员: NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52)、RelA (p65, NF- κ B3)、RelB 以及 Rel (cRel), 根据 C 末端不同分为两类^[6,7]。其中 I 类为 NF- κ B1、NF- κ B2, p50 和 p52 分别由前体蛋白 p105 和 p100 水解加工成 p50 和 p52, 变成成熟形式^[8,9], 其 C 末端仅含有 Rel 同源结构域 (Rel homology domain, RHD), 不含反式激活结构域 (Transactivation domain, TAD) ^[10,11]; II 类为 RelA、RelB 及 Rel, 其 C 末端含有 RHD 和 TAD, 合成时就是

成熟形式^[12]；RHD 包括核定位序列和 I κ B 结合区，参与 NF- κ B 因子的核定向、易位及与 I κ B 的结合^[13]，负责不同或相同家族成员之间的 DNA 结合和二聚化，导致亚基的同聚或异聚体结合，而 TAD 仅与转录激活有关^[14,15]。在这些成员中，除 RelB 只能与 p50 或 p52 形成二聚体外，其他成员均可形成同源或异源二聚体。其中，p50/RelA (即通常所指的 NF- κ B) 是发现最早、最常见的，也是分布最广泛、主要发挥生理作用的 NF- κ B。这些同源和/或异源二聚体可以结合靶基因的特定序列（即 NF- κ B 位点）以调节基因转录。因此，NF- κ B 可以通过调控 NF- κ B 二聚体与靶序列结合的差异来调节细胞的活性。

1.2 I κ B 及家族成员 (I κ Bs)

I κ Bs 和 IKKs 是 NF- κ B 信号转导通路的上游调节因子^[16]，与 NF- κ B 共同构成 NF- κ B 信号转导通路。I κ B 是一种能特异性结合并抑制 NF- κ B 的蛋白，在未被刺激的细胞中，它与 NF- κ B 二聚体结合形成三聚体并以非活性状态存在于胞浆，阻止 NF- κ B 易位入核发挥作用^[17,18]。哺乳动物的 I κ B 蛋白家族包括 I κ B α 、I κ B β 、I κ B γ /p105、I κ B ϵ 、I κ B δ 、p100 和 Bcl-3 七个成员。该家族成员在分子中部均含有 5~7 个约 30 个氨基酸残基保守序列，称之为锚蛋白重复序列，可与 NF- κ B 的 RHD 相互作用，将 NF- κ B 隔离在细胞浆内。

1.3 IKK 及家族成员 (IKKs)

IKK 是 I κ B 激酶，一种分子量在 $(700\sim900)\times10^3$ 的蛋白激酶复合体，是 I κ B 的上游监管机构^[19]。目前发现并克隆出它的四个组分：IKK α 、IKK β 、IKK γ 和 IKAP (IKK-complex-associated-protein)。IKK 复合物由催化亚基 IKK α 和 IKK β 以及调节亚基 IKK γ 组成^[17]。NF- κ B 由两类亚基形成同/异源二聚体，NF- κ B 未被激活时和 I κ B 形成复合物分布在细胞浆中，炎症、生长或趋化因子等可启动 NF- κ B 的活化^[20,21]。IKK 复合体参与了此过程，IKK 的激活使 I κ B 被磷酸化，随后 I κ B 从 NF- κ B 上脱落并被泛素化降解，使得 NF- κ B 由抑制状态被激活，解离的 NF- κ B 转位入核并激发一系列反应^[22,23]。

2 NF- κ B 信号转导通路的激活

在细胞静息状态下，由 NF- κ B 二聚体与 I κ B 形成的复合物存在于细胞质中^[24]。当细胞被细胞外信号刺激时，NF- κ B 被激活并进入细胞核结合靶基因发挥作用。在激活途径上被分为经典途径和非经典途径，两者都需要 IKK 参与^[25]。

2.1 经典激活途径

大部分 NF- κ B 的激活是通过经典途径,如在肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)、细菌和病毒抗原等的刺激下,上游激酶 IKK 复合体通过磷酸化而活化,进而活化后的 IKK 磷酸化 I κ B 蛋白,磷酸化后的 I κ B 泛素化降解, NF- κ B 释放后入核结合靶基因以启动相应基因转录发挥作用^[26,27]

2.2 非经典(替代)激活途径

非经典激活途径是由不同于经典途径的刺激引起的, p100 转化为 p52 的过程即属于非经典激活途径。正常静息状态下, NF- κ B 诱导激酶(NIK)泛素化而被蛋白酶体降解,不能诱导活化 NF- κ B 产生 p100 以无活性状态存在于细胞浆中。当细胞受到淋巴细胞毒素 β 受体、B 细胞激活因子、CD40 配体刺激后, NIK 泛素化受到阻碍导致 NIK 自磷酸化积累并激活,从而磷酸化 IKK α 。IKK α 活化后使 p100 发生磷酸化依赖性剪切,生成有活性的 p52-RelB 复合物并进入细胞核与靶基因结合。

3 NF- κ B 信号转导通路 with 恶性肿瘤

目前,在许多研究中发现 NF- κ B 信号转导通路在生理和病理过程中具有重要作用,与多种恶性肿瘤发生发展密切相关,是癌症研究的热点^[28,29]。

3.1 NF- κ B 信号转导通路 with 宫颈癌

宫颈癌(Cervical Cancer)是常见的妇科恶性肿瘤, NF- κ B 信号转导通路是宫颈癌发生发展的重要参与者。NF- κ B 信号转导通路的功能性突变在实体瘤中是罕见事件,但几项研究表明, NF- κ B 组成型在宫颈癌进展过程中被激活^[30]。在肿瘤发生的早期阶段, NF- κ B 与 HPV (Human Papillomavirus) 密切相关,使其产生慢性炎症状态。由于持续的 HPV 感染, NF- κ B 介导的生长抑制信号逐渐丧失,发生肿瘤^[31]。在正常宫颈组织和低度鳞状上皮内病变(LSIL)中, p50/p65 和 I κ B α 定位于细胞质中,在 SIL 高度病变和鳞状细胞癌(SCC)中 NF- κ B 易位至细胞核。在癌症发展过程中,细胞质中的 I κ B α 降低,表明 I κ B α 在宫颈癌晚期发生降解,随着疾病从正常到癌前的发展,核 NF- κ B 表达逐渐增加^[32]。宫颈原位癌等级的增加与 NF- κ B 表达的强度之间存在线性关系,这表明肿瘤 NF- κ B 在宫颈癌的进展过程中发挥肿瘤促进作用^[31]。

3.2 NF- κ B 信号转导通路 with 结直肠癌

结直肠癌 (Colorectal cancer, CRC) 是胃肠道最常见的恶性肿瘤^[33]，是全球癌症相关死亡的第三大常见原因。NF- κ B 信号转导通路与 CRC 的发生发展密切联系，在癌症相关过程如细胞增殖，细胞凋亡，血管生成和转移中起关键作用^[34]。NF- κ B 在 CRC 中的作用是复杂的，涉及结肠炎相关癌症中的腺瘤形成的早期阶段^[35]，且在结肠炎相关癌症中直接促进肿瘤发生中起作用。NF- κ B 活化通过增强细胞增殖和影响血管生成调节因子（如血管内皮生长因子，白介素 1，白介素 8 和环氧合酶-2 等）来抑制细胞凋亡和促进细胞侵袭和转移从而支持肿瘤发生^[36,37]。除此之外，参与上皮细胞向间充质细胞转变 (EMT) 以及调节基质金属蛋白酶 (MMP) ^[34]。因此，NF- κ B 对促进结直肠癌转移具有重要意义。在 CRC 中观察到 NF- κ B 的组成型活化，并且与较高的肿瘤分期^[38,39]，治疗抗性和较差的生存结果相关^[40]，激活与预后不良有关，因此，NF- κ B 途径的成员可能可用作 CRC 的预后标志物或新的治疗靶点^[31]。

3.3 NF- κ B 信号转导通路与血液系统恶性肿瘤

NF- κ B 在各种类型的血液癌症中发挥重要作用^[41]，特别是在急性髓性白血病 (AML) 以及慢性粒细胞白血病 (CML) 中发挥重要作用^[42]。NF- κ B 在原发性急性髓细胞白血病细胞以及白血病干细胞中过表达，但在正常的造血细胞中不表达。在 CML 中，NF- κ B 是活跃的，但活跃程度低于 AML，但在 CML 急变期 NF- κ B 表达增加^[43]，IKK α 在 CML 发病机制中必不可少，说明 NF- κ B 对 CML 以及 AML 的发生发展有重要作用。淋巴瘤和白血病的显著特征是 NF- κ B 的组成型表达，NF- κ B 的组成型表达抑制霍奇金淋巴瘤细胞 HRS 细胞系中的细胞凋亡，刺激细胞增殖^[42]。综上所述，NF- κ B 与各种血液系统恶性肿瘤的发生发展密切相关。

3.4 NF- κ B 信号转导通路与乳腺癌

NF- κ B 在乳腺生物学的各个发育阶段都发挥着重要作用^[42]。在正常生理条件下，NF- κ B 是导管发育和调节乳腺上皮分支和增殖所必需的^[44]。怀孕期间乳腺干细胞扩张是通过激活 NF- κ B 途径的受体激活剂来激活，其正向调节肺泡发育^[45]。关于乳腺癌，NF- κ B 的组成型活化有助于细胞增殖，血管生成，细胞凋亡的逃避^[42]。刘等人报道 NF- κ B 是启动 Her2 阳性小鼠乳腺肿瘤生长所必需的^[46]。NF- κ B 控制 Her2 肿瘤的起始，其抑制作用足以降低 CD44 阳性细胞群并降低模型中的

肿瘤微血管密度。此外，NF- κ B 对于 EMT 以及转移很重要^[47, 48]。NF- κ B 显示出对乳腺癌发展和维持的显著支持，其激活是乳腺癌预后不良的主要标志。

4 NF- κ B 信号转导通路恶性肿瘤治疗

目前已经开发出数百种 NF- κ B 抑制剂，许多 NF- κ B 抑制剂在临床前方法中表现出明显的抗癌活性^[16, 49]。这些抑制剂主要设计用于靶向 NF- κ B 途径中的四个关键点：IKK，NF- κ B 亚基二聚体，蛋白酶体抑制剂以及泛素化阻断剂^[49]。例如，BAY11-7082 可以特异性地消除 p65 与靶 DNA 的结合并下调肿瘤坏死因子 TNF α 的表达^[50]。EF24 作为 IKK β 抑制剂可通过抑制 IKK β 磷酸化来阻断 NF- κ B 信号转导通路，导致 G2/M 期细胞周期停滞和细胞凋亡^[51]。蛋白酶体抑制剂 MG132 通过下调 NF- κ B 信号转导通路抑制肿瘤生长^[52, 53]。虽然许多 NF- κ B 抑制剂已被开发用于在从淋巴瘤到实体瘤的各种实验性癌症模型中并发挥抗肿瘤作用，但其抗肿瘤作用的机制尚不完全清楚^[54]，因此临床尚未批准此类药物^[55, 56]。

NF- κ B 抑制剂目前被认为是单一抗癌药物最有希望的替代品^[57]。NF- κ B 抑制剂作为新型抗癌药物候选物应用于临床的挑战在于这些 NF- κ B 抑制剂是否具有更好的药物治疗作用和安全性^[16]。因此，还需要一些改进和更广泛的研究，以确保和优化未来的预期治疗效益^[58]。

5 结论

NF- κ B 信号转导通路与各种肿瘤关系密切，在宫颈癌、结直肠癌、各种血液系统恶性肿瘤、乳腺癌等多种肿瘤中发现 NF- κ B 组成型激活，且广泛参与各种癌症的发生发展过程，并可以作为预后标志物或新的治疗靶点。尽管靶向 NF- κ B 信号转导通路用于癌症治疗取得了很大进展，但 NF- κ B 抑制剂尚未投入临床应用，需要探索更有效和特异性的 NF- κ B 靶向抗癌策略。随着技术的发展，各种抑制剂对 NF- κ B 的抑制可能为未来的个性化治疗策略奠定基础。

【参考文献】

- [1]. Chen H, Huang Q, Dong J. Cancer Initiating Cell Theory: Popularity and Controversies. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*. 2006;25(6):779.
- [2]. Pires BRB, Silva RCMC, Ferreira GM, et al. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes*. 2018;9(1):24-.
- [3]. Song W, Mazziere R, Yang T, et al. Translational Significance for Tumor Metastasis of Tumor-Associated Macrophages and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1106.
- [4]. Kwon HJ, Choi GE, Ryu S, et al. Stepwise phosphorylation of p65 promotes NF- κ B activation and NK cell responses during target cell recognition. *Nature Communications*. 2016;7(1):57-71.
- [5]. Sen R, Baltimore D. Sen R, Baltimore D Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46: 705-716. *Cell*. 1986;46(5):705-716.
- [6]. JS K, EJ K, HS K, et al. MKK4 activates non-canonical NF κ B signaling by promoting NF κ B2-p100 processing. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2017;491(2).
- [7]. Yan X, Xiaodan W, C JS, et al. Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF- κ B and tonic type I interferon signaling. *Nature immunology*. 2016;17(5):565-573.
- [8]. Hoesel, Bastian, Schmid, et al. The complexity of NF-kappa B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*,12,1(2013-08-02). 2013;12(1):86.
- [9]. 周峰, 刘子杰, 段勇. 炎症在肿瘤发生过程中所起作用研究进展. *世界最新医学信息文摘*. 2018(9).
- [10]. Merchant M, Morkotinis V, Hale A, et al. Crocodylian Nuclear Factor Kappa B. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*. 2017;213:28-34.
- [11]. CE K, CC S, J R, et al. Carbon dioxide-dependent regulation of NF- κ B family members RelB and p100 gives molecular insight into CO₂-dependent immune regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292:jbc.M116.755090.
- [12]. LQ S, X X, HP L, et al. [Screening of polypeptides interacting with Rel homology domain of NF-kappaB p50 subunit]. *Chinese Journal of Cellular & Molecular Immunology*. 2006;23(23):804-806.
- [13]. 王宁, 陈海滨. NF- κ B 及其在肿瘤发生发展中的作用. *解剖学研究*. 2008;30(2):141-144.

- [14]. Tong L, Ye Y, Wu S. Therapeutic microRNAs targeting the NF-kappa B Signaling Circuits of Cancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;81:1-15.
- [15]. Isoda K, Roth S, Nüsslein-Volhard C. The functional domains of the Drosophila morphogen dorsal: evidence from the analysis of mutants. *Genes & Development.* 1992;6(4):619.
- [16]. Xia L, Tan S, Zhou Y, et al. Role of the NFkB-signaling pathway in cancer. *Oncotargets & Therapy.* 2018;Volume 11:2063-2073.
- [17]. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Encyclopedia of Stress.* 2007;62(10):45-48.
- [18]. Espinosa L, Bigas A, Mulero MC. Novel functions of chromatin-bound I[[kappa]]B[[alpha]] in oncogenic transformation. *British Journal of Cancer.* 2014;111:1688-1692.
- [19]. Ekblom A. Nuclear factor-kB in cancer development and progression.
- [20]. Benneriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-[kappa]B as the matchmaker. *Nature Immunology.* 2011;12(8):715-723.
- [21]. G H, M K. NF-kB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research.* 2011;21(1):159-168.
- [22]. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology.* 2002;2(10):725.
- [23]. PN M. The NF-kappaB pathway. 2005;118(20):4589.
- [24]. Annemann M, Plazasirvent C, Schuster M, et al. Atypical Ikb proteins in immune cell differentiation and function. *Immunology Letters.* 2016;171(11):26-35.
- [25]. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology.* 2004;25(6):280-288.
- [26]. Schneider AT, Gautheron J, Feoktistova M, et al. RIPK1 Suppresses a TRAF2-Dependent Pathway to Liver Cancer. *Cancer Cell.* 2017;31(1):94-109.
- [27]. S R, A R, AS L-H, et al. Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1 β production. *Nature Immunology.* 2014;15(6):538-545.
- [28]. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-kB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(9):823-830.
- [29]. JW B, AS B. IKK/nuclear factor-kappaB and oncogenesis: roles in tumor-initiating cells and in the tumor microenvironment. *Advances in Cancer Research.* 2014;121(121):125-145.
- [30]. Costa RM DA, Bastos MM, Medeiros R, et al. The NFkB Signaling Pathway in

- Papillomavirus-induced Lesions: Friend or Foe? *Anticancer Research*. 2016;36(5):2073.
- [31]. Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, et al. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Critical Reviews in Oncology/hematology*. 2017;120:141.
- [32]. Asha N, Manickam V, Maliekal TT, et al. NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene*. 2003;22(1):50.
- [33]. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. WHO classification of tumours of the digestive system: *International Agency for Research on Cancer*; 2010. 1089 p.
- [34]. Patel M, Horgan PG, Mcmillan DC, et al. NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research*. 2018;197:43.
- [35]. Vogelstein B, , Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-532.
- [36]. Basseres D, Baldwin A. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*. 2006;25(51):6817-6830.
- [37]. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2008;18(1):19-26.
- [38]. Moorchung N, Kunwar S, Ahmed KW. An evaluation of nuclear factor kappa B expression in colorectal carcinoma: an analysis of 50 cases. *Journal of Cancer Research & Therapeutics*. 2014;10(3):631-635.
- [39]. Sandur SK, Amit D, Pandey MK, et al. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF-kappaB activity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;75(2):534-542.
- [40]. Kei S, Shin M, Yohko H, et al. Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(7):2248.
- [41]. Gasparini C, Celeghini C, Monasta L, et al. NF- κ B pathways in hematological malignancies. *Cellular & Molecular Life Sciences*. 2014;71(11):2083-2102.
- [42]. Pires BRB, Silva RCMC, Ferreira GM, et al. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes*. 2018;9(1):24.
- [43]. Carrà G, Torti D, Crivellaro S, et al. The BCR-ABL/NF- κ B signal transduction network: a

long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias. *Oncotarget*. 2016;7(40):66287-66298.

[44].Cao Y, Karin M. NF- κ B in Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia*. 2003;8(2):215-223.

[45].Tiede B, Kang Y. From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. *Cell Research*. 2011;21(2):245-257.

[46].Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, et al. The Canonical NF- κ B Pathway Governs Mammary Tumorigenesis in Transgenic Mice and Tumor Stem Cell Expansion. 2010.

[47].Huber MA, Ninel A, Bernd B, et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(4):569-581.

[48].Neil JR, Schiemann WP. Altered TAB1:I κ B Kinase Interaction Promotes Transforming Growth Factor β -Mediated Nuclear Factor- κ B Activation during Breast Cancer Progression. *Cancer Research*. 2008;68(5):1462-1470.

[49].Erstad DJ, Jr CJ. Targeting the NF- κ B pathway in cancer therapy. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2013;22(4):705-746.

[50].Wu CY, Ke Y, Zeng YF, et al. Anticancer activity of Astragalus polysaccharide in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Cell International*. 2017;17(1):115.

[51].Rong J, Chen Q, Song Y, et al. The synthesis and anti-tumor activity of EF24 analogues as IKK β inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;144:218.

[52].Zhang Y, Yang B, Zhao J, et al. Proteasome Inhibitor Carbobenzoxyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal (MG132) Enhances Therapeutic Effect of Paclitaxel on Breast Cancer by Inhibiting Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling. *Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research*. 2018;24:294-304.

[53].Sun F, Zhang Y, Xu L, et al. Proteasome inhibitor MG132 enhances cisplatin-induced apoptosis in osteosarcoma cells and inhibits tumor growth. *Oncology Research*. 2017;26(4).

[54].Oida K, Matsuda A, Jung K, et al. Nuclear factor- κ B plays a critical role in both intrinsic and acquired resistance against endocrine therapy in human breast cancer cells. *Scientific Reports*. 2014;4:4057.

[55].Vu KT, Zhang F, Hulleman JD. Conditional, Genetically Encoded, Small

Molecule-Regulated Inhibition of NF κ B Signaling in RPE Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(10):4126-4137.

[56].Pollock N, Taylor G, Jobe F, et al. Modulation of the transcription factor NF- κ B in antigen-presenting cells by bovine respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of General Virology*. 2017;98(7):1587-1599.

[57].Chen F, Castranova V, Shi X, et al. New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B, a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases. *Clinical Chemistry*. 1999;45(1):7-17.

[58].Mi DCB, Da CR, Fraga AG, et al. NF- κ B Signaling Pathway Inhibitors as Anticancer Drug Candidates. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents)*. 2016;17(4).

攻读学位期间获得的学术成果

武娅曦, 卿晨.NF- κ B 信号转导通路与恶性肿瘤关系的研究进展[J].昆明医科大学学报(稿件已录用, 待发表)

致 谢

时光飞逝，三年的研究生涯悄然逝去，这三年里有过迷茫，有过焦虑，但更多的是喜悦和收获，从科研思维到实验技能，从为人处事到统筹能力我都得到了很大的提升，这得益于所有老师同学以及朋友家人的关心和帮助。

感谢我的导师卿晨教授，她严谨的科学态度，精益求精的工作作风，严以律己、平易近人的人格魅力深深地感染和激励着我，是我学习的榜样。在学习上，从课题的选取到项目的最终完成，卿老师都始终给予我细心的指导和不懈的支持；在生活中，卿老师亲切的关心，耐心的开导，让我的研究生生活多了一份幸福。在此谨向卿老师致以诚挚的谢意。

感谢我的指导老师陈亚娟高级实验师，谢谢陈老师在我实验上的细心指导，生活上的关心。在实验中遇到问题时，陈老师总是耐心地帮我分析，与我一起寻找解决方案，指导我前进。如果没有陈老师的督促、指导和帮助，我的课题一定不会顺利完成。

感谢课题组张玲老师及其他老师的指导和帮助；感谢课题组师兄叶峻贤、汤庭荣，师姐马媛、杨彩虹、龚虹宇，同门朱绍艳、程显亮、李浩，师弟王国徽、万少翔、徐焦，师妹冯钊慧、贾梦、刘琼艳、廖媛、罗开丽在实验和生活中给予我的帮助和关心。正是因为有你们的陪伴，让我三年研究生活不孤单。

感谢我的家人、朋友，如果没有你们的含辛茹苦及支持，我想我可能坚持下去，让我拥有前进的动力。

感谢昆明医科大学，让我有科研学习的平台，感谢药学院这个大家庭的关心与帮助，能进入昆明医科大学药学院“肿瘤药理课题组”继续学习，还得益于卿晨老师负责的“云南省丁健院士工作站”支持。因为在“院士工作站”的建设过程中，学校给予了大力支持，包括在研究生培养方面增加了招生的名额。我们被录取，直接受益于“院士工作站”提供的条件，在此特别致谢。

这三年中还得到众多老师的关心支持和帮忙。在此，谨向老师们致以衷心的感谢和崇高的敬意。最后，我要向百忙之中抽时间对本文进行审阅，评议和参与本人论文答辩的各位老师表示感谢。