**分类号：**

**UDC:**

**密级:**

Hsp90 抑制剂体内抗乳腺癌作用及其机制研究Studies on the Anti-angiogenesis Mechanism of Hsp90 Inhibitor in Breast Cancer *in vivo*

姓 名： 田旭岩

学 号： 2111243005

院 系 ： 基 础 学 院 专 业 ： 免 疫 学研究方向：抗肿瘤免疫药理及

分子机制研究 导师姓名：陈宏远（副教授） 论文提交日期：2015 年 3 月 19 日

论文答辩日期：2015 年 5 月 18 日

学位授予单位： 广东药学院

二〇一五年三月

I

# 中文摘要

Hsp90抑制剂体内抗乳腺癌作用及其机制研究

硕士生：田旭岩专业：免疫学

指导老师：陈宏远（副教授）

乳腺癌是女性最常见的癌症之一。目前，在乳腺癌的治疗方案中，药物疗法（化疗）仍是最主要的治疗手段。而由于常规化疗方法的局限性，往往无法达不到理想的治疗目的。通过抑制肿瘤血管新生来治疗肿瘤的方案，由于具有可特异性作用于肿瘤组织，对正常组织损伤较小的特点，已成为当今抗肿瘤药物研究领域的热点之一。目的：

研究四氢吲哚酮类Hsp90抑制剂在体内对乳腺癌的抑制作用，并探讨其在体内发挥作用的机制，初步评价其治疗效果。

方法：

1、通过Western Blot的方法检测缺氧时在AT533体外对MDA-MB-231和MCF-7细胞株作用；

2、通过构建BABL/c裸鼠的MDA-MB-231细胞的乳腺癌移植瘤模型，分别研究AT533和BJ-B11对乳腺癌的抑制作用；

3、通过HE染色对AT533和BJ-B11治疗后的裸鼠肿瘤进行组织学观察，研究Hsp90

抑制剂对乳腺癌组织学的改变；

4、通过免疫组化和Western Blot的方法检测AT533和BJ-B11治疗后的裸鼠肿瘤组织中HIF-1α/VEGF信号通路的改变；

5、通过免疫组化方法检测AT533对肿瘤细胞凋亡的作用。

结果：

1、AT533在体外可使MDA-MB-231的Hsp90发生断裂，使MCF-7的Hsp90发生下调。MDA-MB-231和MCF-7的HIF-1α/VEGF信号通路都受到抑制，细胞内蛋白泛素化降解增加。

2、AT533和BJ-B11在体内对乳腺癌都有抑制作用。

3、AT533和BJ-B11能明显抑制乳腺癌的血管新生，造成组织缺血。

4、AT533和BJ-B11在体内也能使HIF-1α/VEGF信号通路受到抑制。

5、AT533可以在体内诱导肿瘤细胞发生凋亡。

结论：

AT533可以在体外抑制MDA-MB-231和MCF-7细胞因缺氧引起的HIF-1α/VEGF信号通路的激活，同时促进细胞蛋白内泛素化降解。它在体内具有良好的抗乳腺癌活性，其作用机制可能是通过抑制Hsp90活性使HIF-1α/VEGF信号通路受到抑制，从而抑制肿瘤内的血管新生，同时诱导肿瘤细胞发生凋亡。BJ-B11作为AT533的前药，在体内具有和AT533类似的作用。

关键词：Hsp90 抑制剂； AT533；血管新生；乳腺癌

# 英文摘要

Studies on the Anti-angiogenesis Mechanism of Hsp90 Inhibitor in Breast Cancer *in vivo*

Xuyan Tian

Major: Immunology Supervisor: Hongyuan Chen

Breast cancer is a melignant cancer for women. Chemotherapy method has been still the mained so far. However, for the localization, conventional chemotherapy cannot reach certain curative effects. The programs of inhibiting the tumor angiogenesis, which specific to act on tumor cell and tissues with less side-effect on normal tissue, have already become a hot issue of Anti-tumor drugs research.

**Objective**

To investigate the effects of Hsp90 inhibitor *in vivo* and explore the mechanism of anti-angiogenesis.

**Methods**

1. Western Blot was performed to detect the active of AT533 on MDA-MB-231 and MCF-7 *in vitro* under hypoxia conditions.

2. AT533 and BJ-B11 were exerted on breast cancer *in vivo* with the xenografted model of MDA-MB-231 cell line on BABL/c nude mice.

3. HE was used for staining section of breast cancer which cured by AT533 or BJ-B11.

4. Immunohistochemical and Western Blot were used to detect the changes of HIF-1α/VEGF signaling pathway on tumor tissue which cured by AT533 or BJ-B11

5. Immunohistochemical was used to research the effect of AT533 on apoptosis for breast cancer xenograft.

**Result**

1. Hsp90 was broke in MDA-MB-231 treatment with AT533 and down-regulated in MCF-7 *in vitro*. AT533 couldalso inhibit the HIF-1α/VEGF signaling pathway and

Promote the protein ubiquitination *in vitro*.

2. Breast cancer animal model was inhibited by AT533 or BJ-B11 *in vivo*.

3. The angiogenesis in breast cancer was inhibited by AT533 or BJ-B11, which contribute to tissue ischemia *in vivo*.

4. The HIF-1α/VEGF signaling pathway was suppressed by AT533 or BJ-B11 *in vivo*.

5. AT533 was contributed to the apoptosis for breast cancer xenograft *in vivo*.

**Conclusion**

AT533 regulate the HIF-1α/VEGF signaling pathway with which activated by hypoxia and the promoting ubiquitination. The mechanism is involved in the suppression of Hsp90 so that the HIF-1α/VEGF signaling pathway downregulation,, angiogenesis suppression and apoptosis of tumour cells. BJ-B11, the prodrug of AT533, has the similar effect with AT533 *in vivo*.

**Keywords:** Hsp90 Inhibitor; AT533; Angiogenesis; Breast Cancer

# 第一章 引言

乳腺癌是女性最常见的癌症之一，它是发生在乳房腺上皮组织的恶性肿瘤。据世界卫生组织国际癌症研究中心的估计，每年全球有超过100万的病例，约占全球女性恶性肿瘤发病率的23%，每年死亡人数超过40万，严重威胁着女性的健康[1]。中国是乳腺癌发病率增长最快的国家之一。我国乳腺癌的总体发病率迅速上升，成为城市中死亡率增长最快的癌症之一，乳腺癌已经成为城市女性的第一杀手[2, 3]。

目前，在乳腺癌的治疗方案中，药物疗法（化疗）仍是最主要的治疗手段。而由于常规化疗方法的选择性差，毒副作用大，在抑制肿瘤细胞的同时对正常细胞和组织也造成较大的损伤，严重影响了乳腺癌患者的生活质量。此外，在化疗过程中出现的肿瘤多药耐药以及转移等问题也常常导致化疗的失败。近年来，随着分子生物学技术的发展，人类从细胞分子水平对肿瘤的发病机制产生了许多新的认识，对抗肿瘤药物的研发也从传统的细胞毒药物转向瞄准肿瘤发生、发展机制中多个关键环节的特异性靶标或通路，这也是当前抗肿瘤药物研发的主导方向和新型创新药物的重要来源。

## 1.1 血管新Th可促进肿瘤Th长

血管新生（Angiogenesis）与许多生理学和病理学过程相关[4]。一方面，过度的血管新生会导致大量异常且无序的血管产生，这是血管瘤、过敏性水肿、肿瘤、风湿性关节炎和视网膜病变等疾病的重要原因。另一方面，血管新生不足或血管异常改变同样也会引起疾病发生。

血管新生是肿瘤的一种恶性表型，在肿瘤发展、转移和侵润过程中起到了至关重要的作用。肿瘤细胞转变为肿瘤组织的过程中需要新生成的血管[5]。Folkman于1971年首次提出肿瘤的生长和转移依赖于血管新生的观点。当肿瘤的体积达到一定体积时，需要大量的氧气、养分以及生长因子维持肿瘤的生长，而被动的扩散不能满足生长所需，持续的缺氧和营养不足会上调一系列促血管新生因子的表达进而激活内皮细胞增殖、迁移、管腔化形成新的血管，维持供给营养成分、氧气以及排泄代谢产物[6] 。与此同时，肿瘤组织也通过新生的血管向宿主输送肿瘤细胞，增强肿瘤灶的远处转移能力，使得肿瘤快速转移和侵润，否则肿瘤将进入休眠期或者退化。

由于抑制血管新生可特异性作用于肿瘤组织，对正常组织损伤较小，因此通过抑制肿瘤血管新生来治疗肿瘤的方案（tumor antiangiogenic strategy）已成为当今抗肿瘤药物研究领域的热点之一。

肿瘤的血管新生主要由出芽或从其他血管生长的形式出现。从血管内壁脱落的或通过骨髓动员的血管内皮前体细胞对于肿瘤血管新生有促进作用[7, 8]。肿瘤细胞同样也可以生长在原本的血管周围[9]。在此过程中，血管内皮生长因子（VEGF）和血管生成素（Ang）家族发挥着关键作用[10, 11]。而血管内皮生长因子受到基因拷贝数的调控。

VEGF在正常生理状态下呈低表达，但在大多数实体瘤组织中却呈高水平表达，特异性较强。在肿瘤组织中，VEGF具较明确的扩张血管、增加肿瘤血供及促进血管生成的作用，对肿瘤的生长、转移意义重大。因此，抑制VEGF的释放并干扰其信号转导通路已成为血管新生抑制剂类抗肿瘤药物研发的重要方向。因此，目前有很多化合物都能通过抑制VEGF来发挥抗肿瘤作用的。VEGF靶向抑制剂Bevacizumab的上市进一步确证了抑制VEGF的释放为抗血管新生的关键途径[12]。

肿瘤血管缺乏像正常血管那样的保护机制，例如缺乏功能性血管周细胞，来维护血管的避免氧或激素平衡改变，提供必要的血管活性物质以适应新陈代谢需要。肿瘤血管壁并不是都由相同的内皮细胞组成，而是排列镶嵌着许多肿瘤细胞[13]。据此，肿瘤血管主要有以下特点[4]：

1、体系混乱和血流无序与正常组织相比，肿瘤组织的脉管系统高度紊乱，血管扭曲膨大，同时管径不均匀，过多分支和分流。这是由于生成血管的调控因子失衡，如VEGF和血管生成素。因此，肿瘤的血流表现出混乱多变，容易导致局部缺氧和产酸[14]。

2、血管高通透性观察肿瘤血管的超微结构，血管壁上有许多开口。内皮细胞外形不规则，常生长在其他内皮细胞上或深入管腔。这些缺陷造成肿瘤血管存在着漏洞[15-17]。这些漏洞可以作为肿瘤治疗的切入点[18]。

3、表面标记物不均一肿瘤细胞和免疫细胞分泌的细胞因子和生血管物质可调控肿瘤内皮的细胞粘附分子和其他表面标志物。肿瘤血管表面蛋白缺失或在成熟的血管中勉强能检测到、混乱的血液供给加上黏附分子不均衡表达可能导致了在肿瘤中白细胞和内皮细胞相互作用较弱和淋巴细胞在血管内皮粘附不均匀[19, 20]。

## 1.2 缺氧在肿瘤Th长中有重要意义

缺氧在发育、生理和某些疾病过程中具有重要意义[21]。组织的缺氧状态受到缺氧诱导因子（HIF）的调节[22]。HIF是一种核表达的[23]异源二聚体蛋白，由三种氧调节α亚基（HIF-1α、HIF-2α、HIF-3α）中的一种[24]和三种组成行表达的芳香烃基核转录蛋白（ARNT1、ARNT2、ARNT3）中的一种组成。HIF-1β为HIF-1的组成性表达，是几种转录因子的共同亚基，不受氧浓度的调节[24]。HIF-1α和HIF-2α可以入核与ARNT1（HIF-1β）结合成二聚体[25]，作为VEGF的核转录因子[26, 27]。

肿瘤细胞HIF-1的表达和活性主要通过HIF-1α亚基进行调节，而HIF1α的表达则依赖于细胞内的氧水平。在正常组织氧浓度下，包含4-脯氨酰羟化酶结构域的酶

（PHD1、PHD2、PHD3）和HIF-1抑制因子（FIH-1）[28]可能使HIF-1α减少。HIF-1α位于氧依赖降解结构域（ODDD）的脯氨酸残基（Pro402、Pro564）是PHD的羟基化位点[29]。发生羟基化之后的HIF-1α被E3泛素化连接酶复合体识别[30]，HIF-1α发生泛素化，进而被蛋白酶体降解。相反，低氧时PHD和FIH-1活性受到抑制，HIF-1α变得稳定并且转移入核内与HIF-1β结合形成异二聚物，与缺氧效应元件共有序列5'(A/G) CGTG-3'结合[31]。随后可引起靶基因转录[32]。

HIF-1α通过对血管新生相关基因的调控而直接参与对血管新生的调节，从而在肿瘤生长、浸润和转移中起重要作用[33]。1）在血管生成启动阶段：通过合成NO使血管扩张、VEGF及VEGFR1表达的增强来增加血管通透性。2）在进展阶段：通过上调基质金属蛋白酶（MMPs）降解细胞外基质、上调VEGF诱导血管内皮细胞增殖和迁移，同时在血管生成素（angiogenin, Ang）-2的参与下，形成结节状血管芽。3）在血管形成阶段：在VEGF、Ang-1及整合素的作用下，单个血管芽形成血管腔，并与临近的血管相互吻合成血管网。4）在重塑和改建阶段：通过血小板生长因子

（platelet-derived growth factor, PDGF）、Ang-1等使血管平滑肌或其他细胞迁移包绕新生血管，产生细胞外基质，进而形成完整的血管壁结构。HIF-1α在肿瘤血管新生中的重要作用已在多个动物模型中得到验证[34-36]，因此，通过阻断HIF-1α介导的血管新生相关的信号通路而抑制肿瘤血管新生，被认为是一种具有很好前景的实体瘤靶向治疗手段。

## 1.3 Hsp90在肿瘤血管新Th过程中起着重要的作用

Hsp90与血管新生密切相关，能调控参与血管新生的多种蛋白，包括VEGFR2、

Akt、eNOS、Raf、MEK、Stat3）等。体外实验[37, 38]和临床前模型[39]均已表明Hsp90

抑制剂能够抑制VEGF的表达以及NO的释放。

Hsp90包括三个功能域，即N-末端，中间结构和C-末端结构域的二聚化形成。中间结构域参与水解ATP或者客户蛋白及其他共同的分子伴侣结合，其中C-末端的结构域是Hsp90二聚化必不可少的[40,41]。在肿瘤的发生过程中，Hsp90的伴侣活性可能被肿瘤细胞颠覆，反过来赋予其异常的增殖和存活能力，血管发生或转移的潜能

[42,43]. 通过抑制Hsp90的活性可以促进其客户蛋白的降解或失活，从而阻断多个与肿瘤生长密切相关的信号通路。同时，Hsp90的阻断可以克服多种癌症中[44, 45]冗余的信号和耐药机制，并且还可能会导致肿瘤细胞易受其他靶向或化疗剂[46]的影响。重要的是，Hsp90的多个客户蛋白都是致癌基因，其中包含了多种调控血管新生的蛋白，如HIF-1α、VEGFR-2、EGFR、Akt和eNOS等。

此外，缺氧是诱发细胞内Hsp90表达加强的刺激因素之一，HIF-1α作为Hsp90

的客户蛋白，Hsp90对于维持HIF-1α结构的稳定性发挥着重要的作用[40]。Katschinski

DM等在缺氧环境中处理小鼠和HepG2细胞系[47]，检测到HIF-1α、Hsp90上调和核聚集，还发现在热应激时，出现了Hsp90和非磷酸化形式的HIF-1α，二者可直接结合成复合体，提示HIF-1α和Hsp90存在一定关联性。HIF-1α可以对Hsp90产生影响，而且对HSP进行调控。研究显示，一些Hsp90抑制剂的抗血管新生作用，可能是由于其下调HIF-1α活性所导致[48]。

## 1.4 Hsp90抑制剂可以抑制肿瘤组织血管新Th

由于Hsp90的客户蛋白包括凋亡蛋白、蛋白激酶、转录因子和信号蛋白等，其中有许多蛋白和肿瘤密切相关。因此Hsp90抑制剂作为一种新型抗肿瘤靶向药物，近年来引起学者们的关注。许多Hsp90抑制剂被用于治疗肿瘤。

目前已研发的Hsp90抑制剂的抗肿瘤药物主要有[49]：格尔德霉素衍生物（17-AAG、

17-DMAG、IPI-504、IPI493），嘌呤和嘌呤类似物（CNF2024/BIIB021、MPC-3100、

Debio 0932、PU-H71），间苯二酚衍生物（STA-9090、NVP-AUY922/VER52296、

KW-2478、AT-13387），二氢吲哚衍生物（SNX-5422、SNX-2112）等。

格尔德霉素（GA）可通过直接与Hsp90的N-末端ATP结合口袋结构域结合，阻断其分子伴侣的功能[50]。在缺氧条件（1% O2）下，能呈时间依赖地使HIF-1α和VEGF在mRNA和蛋白水平都发生下调[51]。此外，格尔德霉素还可以可减弱视网膜色素上皮细胞中低氧诱导的VEGF表达，成为治疗眼内血管化疾病的潜在药物[52]。

间苯二酚可以通过抑制HIF-1α的表达，从而逆转因HIF-1α过表达导致的VEGF表达上调[53]。在SCID小鼠的MDA-MB-231乳腺癌移植瘤中，ganetespib可明显抑制肿瘤的生长，肿瘤中肿瘤干细胞的数目降低，使HIF-1α蛋白及其靶基因的mRNA编码的蛋白发生下调，从而使使血管新生受到抑制[54]。

以6, 7-二氢吲哚-4-酮为基础的一类小分子二氢吲哚酮类化合物是一种新型Hsp90抑制剂。SNX-2112能导致头颈鳞癌细胞G2/M其阻滞，调节多个关键的细胞信号通路，增加细胞对于药物和辐射的敏感性[55]。其前药SNX-5422已经进入临床一期用于治疗恶性肿瘤。但因在动物实验中发现SNX-5422具有眼毒性，目前已停止临床研究

[56]。

此外，一些中药提取物中也发现具有抑制Hsp90的活性的物质。如南蛇藤醇（三萜烯甲基醌化合物）能在多个水平调节HIF-1α，从而通过抑制缺氧诱导的血管新生和转移，发挥抗肿瘤作用[57]。

## 1.5 前期研究工作

本课题组根据Hsp90空间结构设计并合成了一系列四氢吲唑酮类化合物（AT533和BJ-B11）。其中BJ-B11是AT533的前药。它们经过体内代谢可转换成为AT533。

AT533是本课题组原创性合成并纯化的一种四氢吲哚酮类化合物，不同于其他的

Hsp90抑制剂，前期的活性评价筛选发现AT533能竞争性地与Hsp90的ATP-结合活性口袋结合，具有很好的Hsp90抑制活性，其效果比目前已进入III期临床实验的化合物17-AAG高出10倍以上，由此开展了AT533抗肿瘤作用及其相关机制的研究，发现AT533可通过线粒体途径诱导乳腺癌MCF-7细胞、黑素瘤A375细胞和白血病

K562细胞凋亡。本课题组曾经对AT533抗肝癌的活性及其作用机制进行了系统的研究。结果发现，AT533在体内和体外均能抑制肝癌细胞的增殖，其作用机制与其诱导的细胞内ROS的产生相关，下调MAPK和转录因子NF-κB p50和p65表达水平有关

[58]. 此外，AT533还能抑制人肝癌HepG2细胞的侵袭、转移和粘附行为[59]。而本课题前期的研究也表明[60]，AT533对人脐带静脉内皮的体外成管行为及体内血管新生的抑制作用明显。同时，在缺氧条件下，AT533可以抑制乳腺癌细胞的VEGF的合成和分泌。也就是说AT533能对HIF-1α/VEGF信号通路产生抑制作用。

前期研究[60]中发现，AT-533可以逆转VEGF对体外培养的HUVEC细胞成管促进作用，对HUVEC细胞的成管行为及体内正常血管新生具有很好的抑制作用。还可以抑制乳腺癌细胞的增殖。AT-533能够通过HIF-1α/VEGF信号通路来抑制缺氧诱导细胞中的VEGF的表达，抑制VEGF分泌到胞外。总之，AT533作为一种新型Hsp90抑制剂在体外可以很好地通过HIF-1α/VEGF信号通路抑制缺氧诱导的乳腺癌细胞内及分泌到胞外的VEGF，据此可初步论证其对血管新生的抑制作用以及对乳腺癌的抑制作用。

为了进一步确定AT533的抗血管新生以及抗乳腺癌活性，这个研究将针对AT533对细胞内蛋白泛素化降解途经影响进行分析，构建裸鼠乳腺癌移植瘤模型进行体内的药理药效研究，并初步分析评价其前药BJ-B11的抗血管新生以及抗乳腺癌活性。为后期Hsp90抑制剂的开发利用提供充分的科学依据。

# 第二章 AT533对乳腺癌的抑制作用

## **2.1** 实验设备和试剂

### 2.1.1 实验仪器和材料

#### 2.1.1.1 实验仪器

|  |  |
| --- | --- |
| **实验仪器** | **生产厂家** |
| SDS-PAGE 垂直电泳槽 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 湿式转膜槽 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 直流电源 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 生物净化工作台 | 常州诺基仪器厂 |
| 恒温 CO2 培养箱 | 德国 Heraeus 公司 |
| 倒置显微镜 | 日本 OLYMPUS 公司 |
| -80℃超低温冰箱 | 日本 SANYO 公司 |
| 普通冰箱 | 中国青岛海尔电器有限公司 |
| 碎冰机 | 德国 Scotsmra 公司 |
| 万分之一/十万分之一电子分析天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| 高压蒸汽灭菌锅 | 日本 SANYO 公司 |
| 680 型酶标仪 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 自动双纯水蒸馏器 | 中国上海申力玻璃仪器公司 |
| 磁力搅拌器 | 中国其林贝尔公司 |
| 漩涡振荡器 | 中国其林贝尔公司 |
| 恒速摇床 | 中国其林贝尔公司 |
| 低温台式冷冻低速离心机 | 美国 Beckman 公司 |
| 低温台式冷冻高速离心机 | 美国 Sigma 公司 |
| 电子恒温水浴锅 | 森信仪器（上海）公司 |
| pH 计 | MettlerToledo 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 手术器械 | 广州医药公司 |
| 低氧操作台 | 美国 BioSpherix 公司 |

#### 2.1.1.2 主要耗材

|  |  |
| --- | --- |
| **主要耗材** | **生产厂家** |
| T25/T75 细胞培养瓶 | 美国 CORNING 公司 |
| 96 孔细胞培养板 | 美国 CORNING 公司 |
| 100mm 培养皿 | 美国 CORNING 公司 |
| 15mL/50mL 离心管 | 美国 CORNING 公司 |
| 1.5mL 离心管 | 美国 Axygen 公司 |
| 1mL/5mL/10mL 注射器 | 海门玻璃塑料公司 |
| PVDF 膜 | 美国 Milipore 公司 |
| 0.22μm 滤器 | 美国 Milipore 公司 |
| 医用感光胶片 | 日本富士胶片株式会社 |

#### 2.1.1.3 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| **主要耗材** | **生产厂家** |
| AT-533 | 本实验室合成 |
| DMEM 培养基 | 美国 GIBCO 公司 |
| 胎牛血清（FBS） | 浙江天杭生物科技有限公司 |
| 青霉素、链霉素 | 华北制药股份有限公司 |
| 胰蛋白酶 | 美国 AMRESCO 公司 |
| NaCl | 广州化学试剂厂 |
| KCl | 广州化学试剂厂 |
| KH2PO4 | 广州化学试剂厂 |
| Na2HPO4 | 广州化学试剂厂 |
| BSA（牛血清白蛋白） | 广州斯佳生物科技有限公司 |
| 高纯氮气 | 佛ft市华特气体有限公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| RIPA 强裂解液 | 北京百泰克生物技术有限公司 |
| SDS 裂解液 | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| PMSF | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| Tween-20 | 广州斯佳生物科技有限公司 |
| 显影液 | 中国柯达股份有限公司 |
| 定影液 | 中国柯达股份有限公司 |
| BCA 蛋白浓度测定试剂盒 | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| EDTA | 广州博理生物公司 |
| Tris-base | 广州博理生物公司 |
| DMSO | 美国 SIGMA-ALDRICH 公司 |
| 无水乙醇 | 广州化学试剂厂 |
| 甲醇 | 广州化学试剂厂 |
| N,N,N’N’-四甲基乙二胺 | 美国 Sigma 公司 |
| 兔抗人 HIF-1α 抗体 | 美国 ABGENT 公司 |
| 兔抗人 VEGF 抗体 | 美国 CST 公司 |
| 鼠抗人 Hsp90 抗体 | 美国 CST 公司 |
| 鼠抗人 Trx 抗体 | 美国 CST 公司 |
| 兔抗人 PARP 抗体 | 美国 CST 公司 |
| β-actin 单克隆抗体 | 美国 CST 公司 |
| GAPDH 单克隆抗体 | 美国 CST 公司 |
| 羊抗兔 lgG-HRP | 美国 Milipore 公司 |
| 羊抗小鼠 lgG-HRP | 美国 Milipore 公司 |
| 化学发光液 | 美国 Milipore 公司 |
| 高浓度基质胶 | 美国 CORNING 公司 |
| 4%多聚甲醇 | 北京鼎国生物科技有限公司 |

#### 2.1.1.4 实验动物

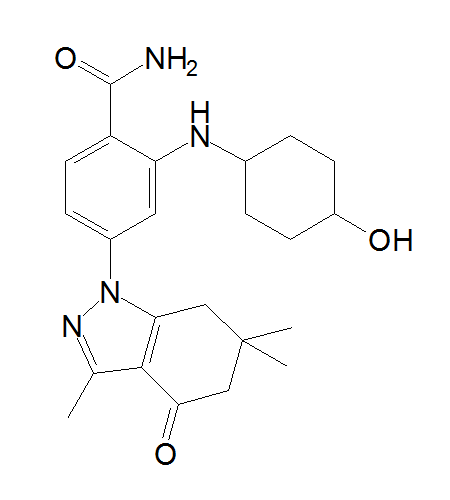
选取4～5周龄的雌性SDF级BABL/c裸小鼠，购自中ft大学实验动物中心，饲养于

暨南大学医学院实验动物中心。使用棕色的独立通风换气笼具进行饲养，5～6只/笼。

### 2.1.2 常用试剂配制

#### 2.1.2.1 细胞实验相关试剂

**AT-533：**化学分子式为C23H30N4O3，相对分子质量为410.5，纯度≥98% (HPLC)。单体粉末，由本课题组合成、纯化所得，其结构经光谱方法鉴定。化学结构式如下：



**图 1 AT-533化学结构式**

**Figure** **1** **Chemical structure of AT-533**

**AT-533母液（10 mmol/L）：**分析天平称取少量AT533粉末于洁净的1.5mL离心管中，在超净工作台中加入适量体积DMSO，吹打充分使之充分溶解，得到10mmol/L的溶液，封口膜密封管口，-20℃保存。

**PBS缓冲液：**称取8.0 g NaCl、0.2 g KCl、2.9 g Na2HPO4·12H 2O和0.2 g K2HPO4 于

1000 mL干净烧杯中，加入800 mL三蒸水，在磁力搅拌器上使其充分溶解，定容至

1000 mL，分装后高压蒸汽灭菌，室温储存备用。

**DMEM基础培养基：**将1包DMEM粉末加入800mL三蒸水中，分别称取NaHCO3 3.7g和HEPES 4.76g，磁力搅拌器搅拌30min使之充分溶解，定容至1000 mL。0.22μm滤器虑菌，分装后于4 ℃冰箱储存。

**双抗：**将1瓶青霉素钠（160万单位）和1瓶硫酸链霉素（120万单位）完全溶解于

40mL DMEM基础培养基中，分装后于-20℃冰箱储存.

**细胞消化液：**分析天平称取1.25g胰酶和0.1g EDTA·Na 2加入500mL PBS中，4℃冰箱溶解过夜，0.22μm滤器虑菌，分装后于4℃冰箱储存。

**DMEM完全培养基：**取一瓶分装好的基础培养基，根据体积加入已灭活补体的FBS

（体积比为9: 1）和双抗（体积比为100: 1），充分混匀即可。4 ℃冰箱储存。

**DMEM 无血清培养基：**取一瓶分装好的基础培养基，根据体积加入双抗（体积比为

100: 1），充分混匀即可。4 ℃冰箱储存。

**75%乙醇：**375mL无水乙醇中加入蒸馏水定容至500mL，室温保存。

#### 2.1.2.2 Western Blot相关试剂

**SDS-PAGE配胶试剂**

1）40%丙烯酰胺混合液：分析天平称取38g丙烯酰胺（Acr）和2g N，N'-亚甲叉双丙烯酰胺（Bis）充分溶解于60ml蒸馏水中，定容至100ml。0.45μm滤器虑菌，置于棕色瓶中，于4 ℃冰箱中避光储存。

2）下层缓冲液（1.5mol/L Tris-HCl PH=8.8）分析天平称取18.15g Tris溶解于60ml

蒸馏水中，浓盐酸调节PH至8.8，定容至100ml，于4 ℃冰箱中储存。

目 录

[中文摘要](#_Toc686144930) 2

[结论：](#_Toc686144931) 2

[英文摘要](#_Toc686144932) 2

[第一章 引言](#_Toc686144933) 4

[1.1 血管新Th可促进肿瘤Th长](#_Toc686144934) 4

[1.2 缺氧在肿瘤Th长中有重要意义](#_Toc686144935) 4

[1.3 Hsp90在肿瘤血管新Th过程中起着重要的作用](#_Toc686144936) 4

[1.4 Hsp90抑制剂可以抑制肿瘤组织血管新Th](#_Toc686144937) 5

[1.5 前期研究工作](#_Toc686144938) 5

[第二章 AT533对乳腺癌的抑制作用](#_Toc686144939) 5

**[2.1](#_Toc686144940)** [实验设备和试剂](#_Toc686144940) 5

[2.1.1 实验仪器和材料](#_Toc686144941) 5

[2.1.1.1 实验仪器](#_Toc686144942) 5

[2.1.1.2 主要耗材](#_Toc686144943) 7

[2.1.1.3 主要试剂](#_Toc686144944) 7

[2.1.1.4 实验动物](#_Toc686144945) 10

[2.1.2 常用试剂配制](#_Toc686144946) 10

[2.1.2.1 细胞实验相关试剂](#_Toc686144947) 10

[2.1.2.2 Western Blot相关试剂](#_Toc686144948) 10

[2.1.2.3 动物实验注射药物](#_Toc686144949) 13

**[2.2](#_Toc686144950)** [实验方法和步骤](#_Toc686144950) 13

[2.2.1 细胞培养](#_Toc686144951) 13

[2.2.2 缺氧和AT533对MDA-MB-231和MCF-7细胞株体外作用研究](#_Toc686144952) 13

[2.2.2.1 细胞处理](#_Toc686144953) 13

[1）消化收集对数生长期的MDA-MB-231 或MCF-7 细胞，调整细胞悬液浓度为](#_Toc686144954) 13

[2）取 6个100mm培养皿，每个培养皿中加入10mL上述细胞悬液，置于饱和湿度、](#_Toc686144955) 13

[3）待细胞24h贴壁后弃去培养基，取其中5个培养皿加入10mL DMEM无血清培养基，余下1个培养皿加入10mL DMEM完全培养基作为空白对照组，置于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中培养12h；](#_Toc686144956) 13

[4）实验组5个培养皿弃去培养基，分别加入含AT533浓度为0μmol/L、0μmol/L、](#_Toc686144957) 13

[5）取上述其中1个不含AT533的培养皿与对照组一同置于饱和湿度、37℃、5% CO2](#_Toc686144958) 13

[2.2.2.2 细胞总蛋白提取](#_Toc686144959) 13

[1）缺氧工作站中（充入高纯氮气，O2浓度为0.5%）取出缺氧处理的4个培养皿，和另外2个正常状态培养的培养皿一同处理；](#_Toc686144960) 13

[2）转移培养基至15mL离心管中，使用5mL预冷的PBS缓冲液清洗细胞表面，加入](#_Toc686144961) 13

[3）导入上述转移的培养基终止消化，将细胞悬液转移入15mL 离心管中，4℃、](#_Toc686144962) 13

[2.2.3 蛋白浓度的测定及上样样品的制备](#_Toc686144963) 13

[2.2.3.1 BCA法检测蛋白浓度](#_Toc686144964) 13

[2.2.3.2 上样样品制备](#_Toc686144965) 14

[2.2.4 Western Blot检测](#_Toc686144966) 14

[2.2.4.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳](#_Toc686144967) 14

[2.2.4.2 转膜](#_Toc686144968) 14

[2.2.4.3 孵育抗体](#_Toc686144969) 14

[2.2.4.4 化学发光、显影](#_Toc686144970) 14

[2.2.5 AT533对裸鼠移植瘤抑制实验](#_Toc686144971) 15

[2.2.5.1 BABL/c裸鼠（4～5周龄）乳腺癌移植瘤模型的构建](#_Toc686144972) 15

[1） 将MDA-MB-231细胞扩大培养至100mm培养皿中（培养皿数目为实验裸鼠数目的1/2），于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中培养2～3天；](#_Toc686144973) 15

[2） 待细胞完全长满后，按照1传2比例对细胞进行消化传代（培养皿数目与实验裸鼠数目的相等），于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中继续培养24h。](#_Toc686144974) 15

**[3](#_Toc686144975)**[）](#_Toc686144975)[使用预冷的PBS缓冲液重悬细胞，离心收集沉淀接种裸鼠（冰上操作）](#_Toc686144975) 15

[1)冰上按照1：2比例将高浓度基质胶和PBS缓冲液混匀](#_Toc686144976) 15

[2） 根据实验裸鼠数量用混好的基质胶充分重悬细胞，以220μL/管分装至无菌1.5mL](#_Toc686144977) 15

[3) 1mL注射器吸取0.2mL含细胞的基质胶注射入裸鼠颈背部皮肤下，调整所形成的包块形态，待凝固后松手；](#_Toc686144978) 15

[4） 正常饲养1周，待瘤块大小达到(长×宽2)/2>100mm3时开始动物实验](#_Toc686144979) 15

[2.2.5.2 动物给药](#_Toc686144980) 15

[2.2.5.3 处死动物和取材](#_Toc686144981) 15

[2.2.5.4 肿瘤组织蛋白提取](#_Toc686144982) 15

[2.2.6 统计学分析](#_Toc686144983) 15

**[2.3](#_Toc686144984)** [实验结果和分析](#_Toc686144984) 15

[2.3.1 AT533在体内对乳腺癌的抑制作用](#_Toc686144985) 15

[2.3.1.1 AT533对乳腺癌移植瘤Th长的抑制作用](#_Toc686144986) 15

[2.3.1.2 AT533对BABL/c裸小鼠体重的影响](#_Toc686144987) 16

[2.3.1.3 AT533对乳腺癌移植瘤的组织学改变](#_Toc686144988) 16

[2.3.1.4 AT533对乳腺癌移植瘤的HIF-1α/VEGF信号通路相关蛋白表达的作用](#_Toc686144989) 16

[2.3.1.5 AT533对乳腺癌移植瘤细胞凋亡的影响](#_Toc686144990) 17

[2.3.2 缺氧时AT533在外对乳腺癌细胞体外作用研究](#_Toc686144991) 17

[2.3.2.1 AT533在缺氧条件下对乳腺癌细胞中Hsp90、VEGF表达的影响](#_Toc686144992) 17

[2.3.2.2 AT533在缺氧条件下对乳腺癌细胞中蛋白泛素化降解的影响](#_Toc686144993) 18

[第三章 BJ-B11对乳腺癌的抑制作用](#_Toc686144994) 18

**[3.1](#_Toc686144995)** [实验设备和试剂](#_Toc686144995) 18

[3.1.1 实验仪器和材料](#_Toc686144996) 18

[3.1.1.1 实验仪器](#_Toc686144997) 18

[3.1.1.2 主要耗材](#_Toc686144998) 19

[3.1.1.3 主要试剂](#_Toc686144999) 20

[3.1.1.4 实验动物](#_Toc686145000) 22

[3.1.2 常用试剂配制](#_Toc686145001) 22

[3.1.2.1 细胞培养相关试剂](#_Toc686145002) 22

[3.1.2.2 Western Blot相关试剂](#_Toc686145003) 23

[1）40%丙烯酰胺混合液：分析天平称取38g丙烯酰胺（Acr）和2g N, N’-亚甲叉双丙烯酰胺（Bis）充分溶解于60ml蒸馏水中，定容至100ml。0.45μm滤器虑菌，置于棕色瓶中，于4 ℃冰箱中避光储存。](#_Toc686145004) 23

[2）下层缓冲液（1.5mol/L Tris-HCl PH=8.8）分析天平称取18.15g Tris溶解于60ml](#_Toc686145005) 23

[3）上层缓冲液（1.0mol/L Tris-HCl PH=6.8）分析天平称取12.1g Tris溶解于60ml蒸馏水中，浓盐酸调节PH至6.8，定容至100ml，于4 ℃冰箱中储存。](#_Toc686145006) 23

[4）10% 过硫酸铵：分析天平称取1g过硫酸铵充分溶解于8mL蒸馏水中，定容至](#_Toc686145007) 23

[5）10%十二烷基磺酸钠：分析天平称取1g过硫酸铵充分溶解于8mL蒸馏水中，定容至10mL，室温保存。](#_Toc686145008) 23

[3.1.2.3 动物实验注射药物](#_Toc686145009) 25

**[3.2](#_Toc686145010)** [实验方法和步骤](#_Toc686145010) 25

[3.2.1 细胞培养](#_Toc686145011) 26

[3.2.2 蛋白浓度的测定及上样样品的制备](#_Toc686145012) 26

[3.2.2.1 BCA法检测蛋白浓度](#_Toc686145013) 26

[3.2.2.2 上样样品制备](#_Toc686145014) 26

[3.2.3 Western Blot检测](#_Toc686145015) 26

[3.2.3.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳](#_Toc686145016) 26

[3.2.3.2 转膜](#_Toc686145017) 26

[3.2.3.3 孵育抗体](#_Toc686145018) 27

[3.2.3.4 化学发光、显影](#_Toc686145019) 27

[3.2.4 BJ-B11对裸鼠移植瘤抑制实验](#_Toc686145020) 27

[3.2.4.1 BABL/c裸鼠（4～5周龄）乳腺癌移植瘤模型的构建](#_Toc686145021) 27

[3.2.4.2 动物给药](#_Toc686145022) 27

[3.2.4.3 处死动物和取材](#_Toc686145023) 27

[3.2.4.4 肿瘤组织蛋白提取](#_Toc686145024) 27

[3.2.5 统计学分析](#_Toc686145025) 28

**[3.3](#_Toc686145026)** [实验结果和分析](#_Toc686145026) 28

[3.3.1 BJ-B11对乳腺癌移植瘤Th长的抑制作用](#_Toc686145027) 28

[3.3.2 BJ-B11对BABL/c裸小鼠体重的影响](#_Toc686145028) 28

[3.3.3 BJ-B11对乳腺癌移植瘤的组织学改变](#_Toc686145029) 28

[3.3.3 BJ-B11对乳腺癌移植瘤的HIF-1α/VEGF信号通路相关蛋白表达的作用](#_Toc686145030) 28

[第四章 讨论](#_Toc686145031) 29

[第五章 结论](#_Toc686145032) 29

[参考文献](#_Toc686145033) 29

[附 录](#_Toc686145034) 31

蒸馏水中，定容至1000mL，4℃冰箱中储存。使用时取100mL和200mL甲醇混合，加入蒸馏水定容至1000mL。

**BSA标准品：**分析天平称取10mg BSA，充分溶解于8mL PBS缓冲液中，定容至10mL。取少量BSA溶液稀释为0.8mg/mL的BSA标准溶液，通过倍比稀释法配得0.4mg/mL、

0.2mg/mL、0.1mg/mL和0.05mg/mL的BSA标准溶液，-20℃冰箱中储存。

**10×TBS缓冲液（PH=7.6）：**分析天平分别称取24.2g Tris-base和80g NaCl，充分溶解于800mL蒸馏水中，浓盐酸调节PH至7.6，蒸馏水定容至1000mL，室温保存。使用时稀释至1×浓度。

**TBST：**量取1000mL TBS，小心加入1mL Tween-20，上下颠倒充分混合均匀，室温保存。

**封闭液：**分析天平称取2.5g脱脂奶粉，充分溶解于50mL TBST中。现配现用。

**一抗稀释液：**称取5g BSA，充分溶解于100mL TBST中，加入200μL叠氮钠，混匀后4℃冰箱中储存。

**显影液：**按照说明书配制。先将小包粉末溶于800mL蒸馏水中，加热至约50℃，充分溶解后加入大包粉末，充分溶解后定容至1000mL，室温避光保存。

**定影液：**按照说明书配制。将定影粉充分溶解于800mL蒸馏水中，充分溶解后定容至1000mL，室温避光保存。

**SDS-PAGE胶配制：**

按照表1根据目的蛋白分子量选择需要所需凝胶浓度，根据表2所示的各成分比例进行配置

**表 1 各浓度 SDS-PAGE分离胶最佳分离范围**

Table 1 The Best Separation Range of Different Concentrations SDS-PAGE Separating Gel

| 分离胶浓度 | 最佳分离范围 |
| --- | --- |
| 6% | 50～150 KD |
| 8% | 30~90 KD |
| 10% | 20~80 KD |
| 12% | 12~60 KD |
| 15% | 10~40 KD |

**表 2** **分离胶和浓缩胶的配方**

**Table** **2** Formulations of Separating Gel and Stacking **Gel**

| 5mL 分离胶 | | | | | 3mL 浓缩胶 | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 6% | 8% | 10% | 12% | 15% | 5% |
| H2O(mL) | 2.9 | 2.65 | 2.4 | 2.15 | 1.775 | 2.19 |
| 40%丙烯酰胺混合液（mL） | 0.75 | 1 | 1.25 | 1.5 | 1.875 | 0.375 |
| 下层缓冲液（mL） | 1.25 | 1.25 | 1.25 | 1.25 | 1.25 | - |
| 上层缓冲液（mL） | - | - | - | - | - | 0.375 |
| 10% SDS(mL) | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.03 |
| 10% 过硫酸铵（mL） | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.03 |
| TEMED(mL) | 0.004 | 0.003 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.003 |

#### 2.1.2.3 动物实验注射药物

1）PBS对照组：无菌PBS缓冲液；

2）溶剂对照组：药物溶剂，10% DMSO与PBS缓冲液混合；

3）阳性药物（顺铂）对照组：顺铂浓度为1mg/mL, 5mg/mL顺铂注射液（针剂）与

4倍体积的无菌PBS缓冲液混匀；

4）给药组：分析天平称取适量AT533粉末于洁净的1.5mL离心管中，在超净工作台中加入适量体积DMSO，吹打充分使之充分溶解，得到6.67mg/mL的溶液，用无菌PBS缓冲液稀释10倍。

## **2.2** 实验方法和步骤

### 2.2.1 细胞培养

MDA-MB-231和MCF-7细胞株使用无菌DMEM完全培养基进行培养，培养于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中。每隔2～3天使用细胞消化液进行消化传代。传代比例为1: 3。

### 2.2.2 缺氧和AT533对MDA-MB-231和MCF-7细胞株体外作用研究

#### 2.2.2.1 细胞处理

##### 1）消化收集对数生长期的MDA-MB-231 或MCF-7 细胞，调整细胞悬液浓度为

2.0×10 5个/mL；

##### 2）取 6个100mm培养皿，每个培养皿中加入10mL上述细胞悬液，置于饱和湿度、

37℃、5% CO2的细胞培养箱中培养；

##### 3）待细胞24h贴壁后弃去培养基，取其中5个培养皿加入10mL DMEM无血清培养基，余下1个培养皿加入10mL DMEM完全培养基作为空白对照组，置于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中培养12h；

##### 4）实验组5个培养皿弃去培养基，分别加入含AT533浓度为0μmol/L、0μmol/L、

0.1μmol/L、0.4μmol/L和2.0μmol/L的DMEM无血清培养基；

##### 5）取上述其中1个不含AT533的培养皿与对照组一同置于饱和湿度、37℃、5% CO2

的细胞培养箱中培养24h，其余4个培养皿置于缺氧工作站中（充入高纯氮气，

O2浓度为0.5%）中放置片刻，用密封塑料盒装好放入37℃细胞培养箱中培养24h。

#### 2.2.2.2 细胞总蛋白提取

##### 1）缺氧工作站中（充入高纯氮气，O2浓度为0.5%）取出缺氧处理的4个培养皿，和另外2个正常状态培养的培养皿一同处理；

##### 2）转移培养基至15mL离心管中，使用5mL预冷的PBS缓冲液清洗细胞表面，加入

2mL细胞消化液室温消化3min；

##### 3）导入上述转移的培养基终止消化，将细胞悬液转移入15mL 离心管中，4℃、

3000rpm离心5min；

4）弃上清，加入5mL PBS缓冲液重悬细胞，4℃、3000rpm离心5min；

5）重复上述操作；

6）加入500μL RIPA强裂解液和10μL PMSF，冰上裂解40min，至细胞完全裂解；

7）离心，收集上清，-20℃保存备用。

### 2.2.3 蛋白浓度的测定及上样样品的制备

#### 2.2.3.1 BCA法检测蛋白浓度

1）取2μL蛋白样品和50μL PBS缓冲液混匀，取10μL加入96孔板中，每个样品设置3个复孔，设置PBS缓冲液调零孔；

2）分别取10μL浓度为0.8mg/mL、0.4mg/mL、0.2mg/mL、0.1mg/mL和0.05mg/mL

的BSA标准品加入96孔板中，每个浓度的标准品设置3个复孔；

3）配置BCA工作液：按照50: 1比例将A液和B液充分混匀

4）每孔加入100μL BCA工作液，37℃孵育30min；

5）酶标仪检测各孔的OD值（波长λ=450nm）；

6）根据标准品分析出标准曲线和线性回归方程，并根据三个复孔的均值按照线性回归方程计算出每个样品的浓度。

#### 2.2.3.2 上样样品制备

1）根据蛋白浓度测定结果，计算出各样品的稀释比例；

2）使用PBS缓冲液按照上述结果对各样品进行稀释，使各样品蛋白浓度一致；

3）按照1: 4比例加入5×上样缓冲液，100℃加热变性10min，-20℃保存备用。

### 2.2.4 Western Blot检测

#### 2.2.4.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

**配胶（厚度：1.0mm）**

1）将2块玻璃板洗净，对齐插入夹子中夹好，固定在配胶架上；

2）在玻璃板中灌满蒸馏水，静置20min，观察漏水情况，20min后若无明显漏水，小心弃净玻璃板中的蒸馏水；

3）根据目的蛋白大小按照配胶比例配制下层分离胶（详见2.2.2.13），加入TEMED

后立刻充分混匀，迅速灌入玻璃板中，4mL/板，用75%乙醇压线；

4）静置20min，等待胶凝固；

5）小心弃净压线的75%乙醇，配制上层浓缩胶，加入TEMED后立刻充分混匀，迅速灌入玻璃板中，灌满玻璃板，插入梳子；

**6）**静置20min，等待胶凝固，4℃保存备用。**电泳**

1）将上述配好的SDS-PAGE胶固定在电泳槽上，加入电泳液；

2）依次上样和Marker，空白孔用等体积的1×上样缓冲液填补；

3）接通电源，浓缩时80V恒压电泳，分离时120V恒压电泳。

#### 2.2.4.2 转膜

**组装**

1）根据电泳情况裁剪相应大小的PVDF膜，做好标记，甲醇活化5min，放入转膜液中浸泡备用；

2）待溴酚蓝条带泳动至距离SDS-PAGE胶底部1cm时，关闭电源，取出并撬开玻璃板，切除上层浓缩胶和多余的下层分离胶，蒸馏水冲洗干净；

3）按照下列方式进行组装：

夹子黑面**|**海绵垫**|**3层3M滤纸**|**SDS-PAGE胶**|**PVDF膜**|**3层3M滤纸**|**海绵垫**|**夹子透明面

**4）**赶净气泡，插入转膜槽中，加入转膜液使胶和PVDF膜完全浸泡在转膜液中；**电转：**

将转膜槽放入碎冰中，倒入少量清水，接通电源，200mA横流电转120min～150min。

#### 2.2.4.3 孵育抗体

1）封闭：转膜完成后取出PVDF膜，TBST漂洗3×5min，放入封闭液中，置于摇床上摇晃（40rpm）封闭90min；

2）孵育一抗：取出PVDF膜，用保鲜膜包好，根据Marker将不同的目的条带剪下，放入杂交带中，加入相应一抗工作液，4℃孵育过夜；

3）回收一抗工作液，取出PVDF膜，TBST漂洗3×15min；

4）根据一抗种属加入相应二抗（用封闭液配制），置于摇床上摇晃（40rpm）封闭60min；

5）弃净二抗，取出PVDF膜，TBST漂洗2×15min；

#### 2.2.4.4 化学发光、显影

1）化学发光：暗房中按照1: 1比例配制好化学发光液工作液，PVDF膜蘸取化学发光液工作液，用保鲜膜包好，放在压片盒中；

2）显影：黑暗中观察化学发光亮度，放入感光胶片，根据光亮度化学发光亮度决定曝光时间，单张浸泡于显影液中反应2min，待感光胶片上有条带显出来，立即用自来水冲洗1min，定影液中定影2min，再用自来水冲洗干净。烘干胶片，扫描保存。

### 2.2.5 AT533对裸鼠移植瘤抑制实验

#### 2.2.5.1 BABL/c裸鼠（4～5周龄）乳腺癌移植瘤模型的构建

**细胞传代扩大培养**

##### 1） 将MDA-MB-231细胞扩大培养至100mm培养皿中（培养皿数目为实验裸鼠数目的1/2），于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中培养2～3天；

##### 2） 待细胞完全长满后，按照1传2比例对细胞进行消化传代（培养皿数目与实验裸鼠数目的相等），于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中继续培养24h。

**收集细胞**

1）取出所有100mm培养皿，消化收集所有细胞；

2）用DMEM完全培养基将细胞悬液稀释1000倍后进行细胞计数，根据实验对注射细胞数目（每只约3.5×106个/只）需要吸取足够的细胞悬液，离心，收集沉淀；

##### **3**）使用预冷的PBS缓冲液重悬细胞，离心收集沉淀接种裸鼠（冰上操作）

##### 1)冰上按照1：2比例将高浓度基质胶和PBS缓冲液混匀

##### 2） 根据实验裸鼠数量用混好的基质胶充分重悬细胞，以220μL/管分装至无菌1.5mL

离心管中；

##### 3) 1mL注射器吸取0.2mL含细胞的基质胶注射入裸鼠颈背部皮肤下，调整所形成的包块形态，待凝固后松手；

##### 4） 正常饲养1周，待瘤块大小达到(长×宽2) /2> 100mm3时开始动物实验

#### 2.2.5.2 动物给药

**配药：**

分为生理盐水/PBS组、溶剂组、阳性药物（顺铂）对照组和给药组。顺铂用生理盐水或PBS缓冲液稀释；溶剂组根据药物溶解需要进行配置；给药组根据实验需要可分别设置不同给药浓度。

**动物给药：**

腹腔注射按照15mL/kg体重给药，每2天1次给药（每组给药剂量见2.1.2.3）。根据实验需要，给药时间为12天。每次给药前测量肿瘤体积和裸鼠体重，并据此及时调整给药方案。

#### 2.2.5.3 处死动物和取材

**处死动物：**

颈椎脱臼法处死动物。每组动物分别进行拍照记录。**取材**

1）肿瘤组织：小心将肿瘤组织从裸鼠体内剥离，并去除肿瘤组织边缘的正常组织。称重和拍照后，将肿瘤组织分为2块，一块置于冰上，-80℃保存，用于提取蛋白，另

一块立即放入4%多聚甲醛中固定，石蜡包埋后用于HE染色（华侨医院病理科完成）和免疫组化分析（广州尚博生物完成）。 2）内脏：打开荷瘤裸鼠的胸腔和腹腔，摘除心脏、肺、脾脏、肝脏和肾脏，分别放入4%多聚甲醛中固定，保存于4℃冰箱中。

#### 2.2.5.4 肿瘤组织蛋白提取

手术刀切下约1mm厚的肿瘤组织薄片（约50mg），放入玻璃匀浆器中，加入500μL SDS裂解液，冰上匀浆15min，直至见不到明显组织形态。吸管小心将匀浆也吸出，转移至1.5mL离心管中。另取500μL SDS裂解液冲洗玻璃匀浆器，并将洗涤液体一同转移入上述1.5mL离心管中。匀浆液100℃加热裂解20min，离心吸上清，-20℃保存。经过BCA蛋白检测并做好蛋白定量后用于Western Blot检测（详见2.2.4）。

### 2.2.6 统计学分析

所有实验结果的数据用Mean±S. D.表示，使用Origin 9.0软件统计建模，使用ANOVA

检验和Student's t检验的方法进行统计学处理，当P <0.05时有统计学意义。

## **2.3** 实验结果和分析

为研究Hsp90抑制在裸鼠体内的对乳腺癌生长的抑制作用，选取了4～5周龄的雌性BABL/c裸鼠构建了MDA-MB-231细胞移植瘤模型，通过腹腔注射注射AT533和BJ-B11进行给药，观察Hsp90抑制剂对乳腺癌的作用。同时观察了AT533在缺氧条件下在体外细胞内相关信号通路以及细胞内蛋白泛素化降解的影响。

### 2.3.1 AT533在体内对乳腺癌的抑制作用

#### 2.3.1.1 AT533对乳腺癌移植瘤Th长的抑制作用

选取4～5周龄的雌性BABL/c裸鼠，每只在颈背部皮下注射200μL包含3.5×106

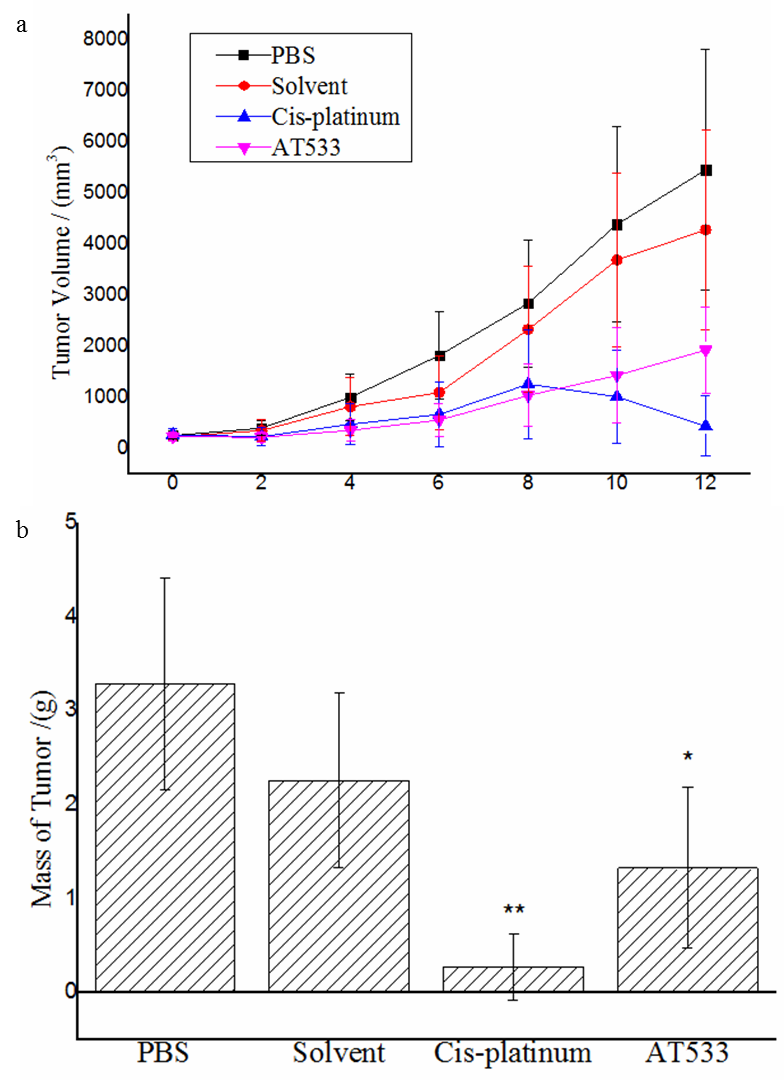
个MDA-MB-231细胞的基质胶，成瘤8天后测量肿瘤大小（所有裸鼠肿瘤体积大于

100mm3）。根据肿瘤大小将所有裸鼠分为4组，每组10只（肿瘤体积均值接近，差异无统计学意义，*P<0.05*）：PBS 对照组、溶剂对照组、阳性药物（顺铂）对照组和给药组。

采取腹腔注射给药的方法给药，给药体积为15mL/kg体重，给药剂量为：PBS对照组——PBS缓冲液15mL/kg体重；溶剂对照组——药物溶剂15mL/kg；阳性药物（顺铂）对照组——顺铂15mg/kg体重；给药组——AT533 10mg/kg体重。每2天给药1次，并测量肿瘤体积。给药后第12天处死动物。

从实验结果可见，对比溶剂组和PBS组，给药组和顺铂组都明显使肿瘤的生长速度减缓（图2a），给药组从开始给药开始，肿瘤生长速度明显比溶剂组要低，直到大约一周后肿瘤生长速度才逐渐开始增加。在给药第12天后处死动物，通过手术方式剥离肿瘤组织进行称重（图2b），可以看出，给药组和顺铂组裸鼠肿瘤的质量明前小于溶剂组和PBS组，即裸鼠肿瘤的生长速度明显受到AT533的抑制。

对处死裸鼠后的拍照分析（图3a）表面，顺铂组和给药组皮下隆起的肿瘤组织明显比溶剂组和PBS组的要小很多。PBS组甚至出现明显的表皮溃疡的现象，推测可能是肿瘤组织生长过快将皮肤撑破造成溃疡。手术剥离肿瘤后进行拍照同样得到印证：给药组和顺铂组裸鼠肿瘤的体积（图3b）明显小于溶剂组和PBS组。



**图 2** **AT533对乳腺癌移植瘤生长的抑制作用（a：乳腺癌移植瘤生长的体积变化曲线；b：肿瘤质量比较）**

**Figure** **2** Suppression of in vivo breast cancer growth by **AT533**

因此，可以得出AT533在雌性BABL/c裸鼠体内能够明显抑制MDA-MB-231乳腺癌移植瘤的生长。



**图 3** **AT533对乳腺癌移植瘤生长的抑制作用（a：：荷瘤裸鼠拍照；b：分离肿瘤组织拍照）**

**Figure** **3** Suppression of ***in vivo* breast cancer growth by AT533**

#### 2.3.1.2 AT533对BABL/c裸小鼠体重的影响

为了解AT533对机体的毒副作用，对实验过程中BABL/c裸小鼠体重变化进行分析。如图4所示，从给药开始后，给药组裸鼠体重并没有像溶剂组那样逐渐增加，整

个实验周期体重变化不大，甚至在给药后期出现轻微下降。在给药第10天时甚至出现动物死亡的现象。这说明AT533对裸鼠机体同样具有一定毒性作用。



**图 4** **AT533对BABL/c裸小鼠体重的影响**

**Figure** **4** Influences of **AT533 on the weight of BABL/c nude mices**

#### 2.3.1.3 AT533对乳腺癌移植瘤的组织学改变

为进一步研究AT533对乳腺癌移植瘤的作用，对实验中剥离下来的肿瘤组织进行

HE染色观察其组织形态的改变。

从显微拍照的结果（图5）来看，相比较PBS组和溶剂组，给药组（AT533）中的管腔样结构明显减少，即血管新生明显少于溶剂组。而顺铂组虽然能明显抑制肿瘤的生长，但对于血管新生方面的抑制作用并不明显。另一方面，比较管腔内的红细胞

数目，给药组的红细胞数目也明显少于溶剂组，这表明给药组很可能发生供血不足，从而导致缺氧等一系列病理改变。



**图 5** **AT533对乳腺癌移植瘤的组织学改变**

**Figure** **5** The histologic changes of breast cancer xenografted tumor by **AT533**

此外，给药组个别肿瘤组织和大部分顺铂组肿瘤组织在镜下还可见局部均匀红染

的区域，而溶剂组和PBS组并没有出现这种现象。这可能是因为肿瘤组织在药物作用下（也可能是缺氧导致的），内部一些区域出现较严重的细胞死亡并出现组织纤维化



**图 6** **AT533对乳腺癌移植瘤血管新生的作用**

**Figure** **6** The **Angiogenesis of breast cancer xenografted tumor by AT533**

等现象。

以上结果表明AT533能明显抑制肿瘤组织的血管新生，进而造成组织供血量下降，组织缺氧，从而对肿瘤的生长发挥抑制作用。

为确定AT533在体内对乳腺癌血管新生的抑制作用，通过免疫组化检测了血管内皮细胞标志物CD31的表达（图6），PBS组、溶剂组和顺铂组都观察到大量管腔状黄褐色阳性标记，即组织中存在着大量的血管。而给药组中管腔状黄褐色阳性标记明显减少了，即组织中的血管明显减少。这证明了AT533能明显抑制了乳腺癌的血管新生，这与HE染色的结果（图7）相一致。

#### 2.3.1.4 AT533对乳腺癌移植瘤的HIF-1α/VEGF信号通路相关蛋白表达的作用

前面研究结果已表明AT533能通过抑制血管生成抑制肿瘤生长。同时，体外细胞实验研究也发现AT533这一作用与HIF-1α/VEGF信号通路有关。为进一步确定体外研究的结论，对肿瘤组织中HIF-1α/VEGF信号通路的相关蛋白的表达进行分析。



**图7 AT533对乳腺癌移植瘤的HIF-1α/VEGF信号通路相关蛋白表达的作用Figure 7** Influences of **AT533 on HIF-1α/VEGF signaling pathways related proteins *in vivo***

将肿瘤组织匀浆提取蛋白，通过Western Blot检测（图7）（以GAPDH作为内参），

Hsp90蛋白的表达没有明显改变，这与细胞实验的结果不相符。这可能在体内条件下，

AT533仅仅是抑制率Hsp90的功能，对于Hsp90本身的断裂并没有明显的作用。对比

PBS组、溶剂组，给药组的HIF-1α表达明显下调。这表明Hsp90受到抑制后，HIF-1α蛋白发生降解。此外，Trx的表达也发生了明显的下调，这表明AT533同时使肿瘤细胞内的氧化应激受到抑制。



**图 8** **AT533对乳腺癌移植瘤的Hsp90蛋白表达的作用**

**Figure** **8** Effects of **AT533 on Hsp90 proteins for breast cancer *in vivo***

肿瘤组织石蜡切片免疫组化分析发现，各组中Hsp90蛋白（图8）表达改变不大。对比PBS组和溶剂组，给药组的VEGF蛋白（图9）的表达发生明显下调，顺铂组的

VEGF蛋白（图9）也发生了下调。



**图 9** **AT533对乳腺癌移植瘤的VEGF蛋白表达的抑制作用**

**Figure** **9** Influences **of AT533 on VEGF proteins for breast cancer *in vivo***

从免疫荧光的结果（图10）可以看出，对比溶剂组，给药组的HIF-1α蛋白的表达量下降。从表达的位置来看，溶剂组和阳性对照组中同时在胞浆和核内发现HIF-1α，而

AT533作用后，核内表达的HIF-1α消失。虽然顺铂对于肿瘤有的生长有明显的抑制作用，但本身却对于HIF-1α的表达没有影响。



**图 10** **AT533对乳腺癌移植瘤的HIF-1α蛋白表达的抑制作用**

**Figure** **10** Influences of **AT533 on HIF-1αproteins for breast cancer *in vivo***

以上结果说明，AT533在裸鼠体内可以通过抑制HIF-1α/VEGF信号通路对乳腺癌的生长发挥抑制作用。

#### 2.3.1.5 AT533对乳腺癌移植瘤细胞凋亡的影响



**图 11** **AT533对乳腺癌移植瘤细胞中caspase-3表达的影响**

**Figure** **11** **Influences of AT533 on caspase-3 proteins for breast cancer *in vivo***

为研究AT533对乳腺癌移植瘤细胞凋亡的影响，通过免疫组化分析了凋亡相关蛋白caspase-3和caspase-9的表达。结果表明，相比PBS组，给药组的裸鼠肿瘤组织中发生caspase-3（图11）和caspase-9（图12）的表达都明显上调。这表明AT533在体内能明显促进乳腺癌乳腺癌细胞发生凋亡。



**图 12** **AT533对乳腺癌移植瘤细胞中caspase-9表达的影响**

**Figure** **12** Influences of **AT533 on caspase-9 proteins for breast cancer *in vivo***

此外，为深入探讨AT533诱导乳腺癌移植瘤细胞的凋亡，通过Western Blot对肿瘤组织匀浆液进行检测PARP蛋白的表达（图13）。有趣的是，PBS组和溶剂组中，与顺铂组情况类似，PARP都有一定水平的表达，并且发生了切割。相反，给药组中

PARP表达量却明显下调，推断这可能和肿瘤组织中DNA修复机制有关。



**图 13** **AT533对乳腺癌移植瘤细胞中PARP表达的影响**

**Figure** **13** Influences of **AT533 on PARP proteins for breast cancer *in vivo***

### 2.3.2 缺氧时AT533在外对乳腺癌细胞体外作用研究

为研究AT533在缺氧条件下在体外对MDA-MB-231和MCF-7细胞株的相关蛋白的作用，使用Western Blot进行研究。

#### 2.3.2.1 AT533在缺氧条件下对乳腺癌细胞中Hsp90、VEGF表达的影响

课题组前期研究已经表明，在缺氧条件下可以促进Hsp90和VEGF的表达。为了确定AT533对HIF-1α/VEGF信号通路的在缺氧条件下的抑制作用，分别检测了MDA-MB-231和MCF-7细胞株在正常培养、饥饿培养和缺氧条件下不同药物浓度作用Hsp90、VEGF表达量的改变。

实验一共分为三组：正常培养的细胞、饥饿培养的细胞、缺氧和饥饿培养的细胞。取出在对数生长期的MDA-MB-231和MCF-7细胞株分别扩大培养至6个100mm培养皿，当细胞覆盖底部80%面积时开始实验。各留1个培养皿作为正常培养对照，其余弃净培养基，更换为DMEM无血清培养基，饥饿处理12h。每种细胞取4个分别加入含AT533浓度为0μmol/L、0.1μmol/L、0.4μmol/L和2.0μmol/L的DMEM无血清培养基，在缺氧工作站（充入高纯氮气，O2浓度为0.5%）中放置约20min，用密封塑料盒装好放入37℃细胞培养箱中培养24h。所有样品在缺氧工作站中收集蛋白，

Western Blot检测Hsp90和VEGF蛋白水平的改变，GAPDH作为内参。

结果如图16所示，正常培养的MDA-MB-231和MCF-7细胞株几乎不表达VEGF。当细胞受到饥饿和缺氧的刺激后VEGF表达明显上调，而AT533可以使VEGF的42KD和21KD的表达都受到抑制。而且随着AT533浓度的升高，抑制效果增加。在MDA-MB-231细胞株中，Hsp90表达量改变不明显，但在受到缺氧刺激后出现一条约

70KD的条带，而且随着AT533浓度的增加表达量也增加，推断可能是Hsp90在应激状态下发生断裂，而AT533可以促进这一过程；在MCF-7细胞株中，饥饿刺激使Hsp90表达量发生下调，但AT533却使其表达发生上调。



**图16 AT533在缺氧条件下对乳腺癌细胞中Hsp90和VEGF表达的影响Figure 16** Influences of **AT533 on the expression of Hsp90 and VEGF protein in breast cancer cells on hypoxia condition**

#### 2.3.2.2 AT533在缺氧条件下对乳腺癌细胞中蛋白泛素化降解的影响

为进一步研究AT533对MDA-MB-231和MCF-7细胞株的影响，研究了其细胞内蛋白泛素化降解的变化。实验一共分为二组：饥饿培养的细胞、缺氧和饥饿培养的细胞。实验方法和4.1.1相同。通过Western Blot检测（图17）发现，相比较于单纯饥饿刺激的细胞，缺氧刺激对于MDA-MB-231和MCF-7细胞株的泛素化降解的影响不明显，而AT533能明显增加蛋白泛素化降解。



**图 17** **AT533在缺氧条件下对乳腺癌细胞中蛋白泛素化降解的影响**

**Figure** **17** Influences of **AT533 on the protein ubiquitination in breast cancer cells on hypoxia condition**

# 第三章 BJ-B11对乳腺癌的抑制作用

## **3.1** 实验设备和试剂

### 3.1.1 实验仪器和材料

#### 3.1.1.1 实验仪器

|  |  |
| --- | --- |
| **实验仪器** | **生产厂家** |
| SDS-PAGE 垂直电泳槽 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 湿式转膜槽 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 直流电源 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 生物净化工作台 | 常州诺基仪器厂 |
| 恒温 CO2 培养箱 | 德国 Heraeus 公司 |
| 倒置显微镜 | 日本 OLYMPUS 公司 |
| -80℃超低温冰箱 | 日本 SANYO 公司 |
| 普通冰箱 | 中国青岛海尔电器有限公司 |
| 碎冰机 | 德国 Scotsmra 公司 |
| 万分之一/十万分之一电子分析天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| 高压蒸汽灭菌锅 | 日本 SANYO 公司 |
| 680 型酶标仪 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 自动双纯水蒸馏器 | 中国上海申力玻璃仪器公司 |
| 磁力搅拌器 | 中国其林贝尔公司 |
| 漩涡振荡器 | 中国其林贝尔公司 |
| 恒速摇床 | 中国其林贝尔公司 |
| 低温台式冷冻低速离心机 | 美国 Beckman 公司 |
| 低温台式冷冻高速离心机 | 美国 Sigma 公司 |
| 电子恒温水浴锅 | 森信仪器（上海）公司 |
| pH 计 | MettlerToledo 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 手术器械 | 广州医药公司 |

#### 3.1.1.2 主要耗材

|  |  |
| --- | --- |
| **主要耗材** | **生产厂家** |
| T25/T75 细胞培养瓶 | 美国 CORNING 公司 |
| 100mm 培养皿 | 美国 CORNING 公司 |
| 15mL/50mL 离心管 | 美国 CORNING 公司 |
| 1.5mL 离心管 | 美国 Axygen 公司 |
| 1mL/5mL/10mL 注射器 | 海门玻璃塑料公司 |
| PVDF 膜 | 美国 Milipore 公司 |
| 0.22μm 滤器 | 美国 Milipore 公司 |
| 医用感光胶片 | 日本富士胶片株式会社 |

#### 3.1.1.3 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| **主要耗材** | **生产厂家** |
| BJ-B11 | 本实验室合成 |
| DMEM 培养基 | 美国 GIBCO 公司 |
| 胎牛血清（FBS） | 浙江天杭生物科技有限公司 |
| 青霉素、链霉素 | 华北制药股份有限公司 |
| 胰蛋白酶 | 美国 AMRESCO 公司 |
| NaCl | 广州化学试剂厂 |
| KCl | 广州化学试剂厂 |
| KH2PO4 | 广州化学试剂厂 |
| Na2HPO4 | 广州化学试剂厂 |
| BSA（牛血清白蛋白） | 广州斯佳生物科技有限公司 |
| SDS 裂解液 | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| PMSF | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| Tween-20 | 广州斯佳生物科技有限公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 显影液 | 中国柯达股份有限公司 |
| 定影液 | 中国柯达股份有限公司 |
| BCA 蛋白浓度测定试剂盒 | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| EDTA | 广州博理生物公司 |
| Tris-base | 广州博理生物公司 |
| DMSO | 美国 SIGMA-ALDRICH 公司 |
| 无水乙醇 | 广州化学试剂厂 |
| 甲醇 | 广州化学试剂厂 |
| N,N,N’N’-四甲基乙二胺 | 美国 Sigma 公司 |
| 兔抗人 HIF-1α 抗体 | 美国 ABGENT 公司 |
| 兔抗人 VEGF 抗体 | 美国 CST 公司 |
| 鼠抗人 Hsp90 抗体 | 美国 CST 公司 |
| 兔抗人 PARP 抗体 | 美国 CST 公司 |
| β-actin 单克隆抗体 | 美国 CST 公司 |
| GAPDH 单克隆抗体 | 美国 CST 公司 |
| 羊抗兔 lgG-HRP | 美国 Milipore 公司 |
| 化学发光液 | 美国 Milipore 公司 |
| 高浓度基质胶 | 美国 CORNING 公司 |
| PEG-400 | 阿拉丁试剂（上海）有限公司 |
| 4%多聚甲醇 | 北京鼎国生物科技有限公司 |

#### 3.1.1.4 实验动物

选取4～5周龄的雌性SDF级BABL/c裸小鼠，购自广东省实验动物中心，饲养于暨南大学医学院实验动物中心。使用棕色的独立通风换气笼具进行饲养，5～6只/笼。

### 3.1.2 常用试剂配制

#### 3.1.2.1 细胞培养相关试剂

**PBS缓冲液：**称取8.0 g NaCl、0.2 g KCl、2.9 g Na2HPO4·12H 2O和0.2 g K2HPO4 于

1000 mL干净烧杯中，加入800 mL三蒸水，在磁力搅拌器上使其充分溶解，定容至

1000 mL，分装后高压蒸汽灭菌，室温储存备用。

**生理盐水：**称取9.0 g NaCl于1000 mL干净烧杯中，加入800 mL三蒸水，在磁力搅拌器上使其充分溶解，定容至1000 mL，分装后高压蒸汽灭菌，室温储存备用。

**DMEM基础培养基：**将1包DMEM粉末加入800mL三蒸水中，分别称取NaHCO3 3.7g和HEPES 4.76g，磁力搅拌器搅拌30min使之充分溶解，定容至1000 mL。0.22μm滤器虑菌，分装后于4 ℃冰箱储存。

**双抗：**将1瓶青霉素钠（160万单位）和1瓶硫酸链霉素（120万单位）完全溶解于

40mL DMEM基础培养基中，分装后于-20℃冰箱储存.

**细胞消化液：**分析天平称取1.25g胰酶和0.1g EDTA·Na 2加入500mL PBS中，4℃冰箱溶解过夜，0.22μm滤器虑菌，分装后于4℃冰箱储存。

**DMEM完全培养基：**取一瓶分装好的基础培养基，根据体积加入已灭活补体的FBS

（体积比为9: 1）和双抗（体积比为100: 1），充分混匀即可。4 ℃冰箱储存。

**DMEM 无血清培养基：**取一瓶分装好的基础培养基，根据体积加入双抗（体积比为

100: 1），充分混匀即可。4 ℃冰箱储存。

**75%乙醇：**375mL无水乙醇中加入蒸馏水定容至500mL，室温保存。

#### 3.1.2.2 Western Blot相关试剂

**SDS-PAGE配胶试剂**

##### 1）40%丙烯酰胺混合液：分析天平称取38g丙烯酰胺（Acr）和2g N, N’-亚甲叉双丙烯酰胺（Bis）充分溶解于60ml蒸馏水中，定容至100ml。0.45μm滤器虑菌，置于棕色瓶中，于4 ℃冰箱中避光储存。

##### 2）下层缓冲液（1.5mol/L Tris-HCl PH=8.8）分析天平称取18.15g Tris溶解于60ml

蒸馏水中，浓盐酸调节PH至8.8，定容至100ml，于4 ℃冰箱中储存。

##### 3）上层缓冲液（1.0mol/L Tris-HCl PH=6.8）分析天平称取12.1g Tris溶解于60ml蒸馏水中，浓盐酸调节PH至6.8，定容至100ml，于4 ℃冰箱中储存。

##### 4）10% 过硫酸铵：分析天平称取1g过硫酸铵充分溶解于8mL蒸馏水中，定容至

10mL。分装成小份，-20℃冰箱储存，避免反复冻融。

##### 5）10%十二烷基磺酸钠：分析天平称取1g过硫酸铵充分溶解于8mL蒸馏水中，定容至10mL，室温保存。

**5×蛋白SDS-PAGE上样缓冲液：**分析天平分别称取1.2g SDS和0.3855g DTT，分别加入6mL甘油和3.75mL Tris-HCl（1mol/L PH=6.8），充分溶解后加入蒸馏水定容至

10mL。加入10mg溴酚蓝，充分溶解，分装为1mL小管，-20℃冰箱储存。

**5×Tris甘氨酸缓冲液：**分析天平分别称取15.1 g Tris-base、94.0 g甘氨酸和5.0 g SDS，充分溶解于800mL蒸馏水中，定容至1000mL，4℃冰箱中储存，使用时稀释至1×浓度。

**10×转膜缓冲液：**分析天平分别称取30.3g Tris-base和144g甘氨酸，充分溶解于800mL蒸馏水中，定容至1000mL，4℃冰箱中储存。使用时取100mL和200mL甲醇混合，加入蒸馏水定容至1000mL。

**BSA标准品：**分析天平称取10mg BSA，充分溶解于8mL PBS缓冲液中，定容至10mL。取少量BSA溶液稀释为0.8mg/mL的BSA标准溶液，通过倍比稀释法配得0.4mg/mL、

0.2mg/mL、0.1mg/mL和0.05mg/mL的BSA标准溶液，-20℃冰箱中储存。

**10×TBS缓冲液（PH=7.6）：**分析天平分别称取24.2g Tris-base和80g NaCl，充分溶解于800mL蒸馏水中，浓盐酸调节PH至7.6，蒸馏水定容至1000mL，室温保存。使用时稀释至1×浓度。

**TBST：**量取1000mL TBS，小心加入1mL Tween-20，上下颠倒充分混合均匀，室温保存。

**封闭液：**分析天平称取2.5g脱脂奶粉，充分溶解于50mL TBST中。现配现用。

**一抗稀释液：**称取5g BSA，充分溶解于100mL TBST中，加入200μL叠氮钠，混匀后4℃冰箱中储存。

**显影液：**按照说明书配制。先将小包粉末溶于800mL蒸馏水中，加热至约50℃，充分溶解后加入大包粉末，充分溶解后定容至1000mL，室温避光保存。

**定影液：**按照说明书配制。将定影粉充分溶解于800mL蒸馏水中，充分溶解后定容

至1000mL，室温避光保存。

**SDS-PAGE胶配制：**

按照表1根据目的蛋白分子量选择需要所需凝胶浓度，根据表2所示的各成分比例进行配置

**表 1 各浓度 SDS-PAGE分离胶最佳分离范围**

Table 1 The Best Separation Range of Different Concentrations SDS-PAGE Separating Gel

| 分离胶浓度 | 最佳分离范围 |
| --- | --- |
| 6% | 50～150 KD |
| 8% | 30~90 KD |
| 10% | 20~80 KD |
| 12% | 12~60 KD |
| 15% | 10~40 KD |

**表 2** **分离胶和浓缩胶的配方**

**Table** **2** Formulations of Separating Gel and Stacking **Gel**

| 5mL 分离胶 | | | | | 3mL 浓缩胶 | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 6% | 8% | 10% | 12% | 15% | 5% |
| H2O(mL) | 2.9 | 2.65 | 2.4 | 2.15 | 1.775 | 2.19 |
| 40%丙烯酰胺混合液（mL） | 0.75 | 1 | 1.25 | 1.5 | 1.875 | 0.375 |
| 下层缓冲液（mL） | 1.25 | 1.25 | 1.25 | 1.25 | 1.25 | - |
| 上层缓冲液（mL） | - | - | - | - | - | 0.375 |
| 10% SDS(mL) | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.03 |
| 10% 过硫酸铵（mL） | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.03 |
| TEMED(mL) | 0.004 | 0.003 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.003 |

#### 3.1.2.3 动物实验注射药物

**BJ-B11:** 化学分子式为C25H32N4O4，相对分子质量为452.5，纯度≥98% (HPLC). 单

体粉末，由本课题组合成、纯化所得，其结构经光谱方法鉴定。化学结构式如下：



**BJ-B11动物实验**

**图18** **BJ-B11化学结构式**

**Figure** **18** Chemical structure of **BJ-B11**

1）生理盐水对照组：无菌生理盐水；

2)溶剂对照组：药物溶剂，20% DMSO, 40% PEG-400, 40% PBS缓冲液；

3）阳性药物（顺铂）对照组：顺铂浓度为1mg/mL, 5mg/mL顺铂注射液（针剂）与

4倍体积的无菌PBS缓冲液混匀；

4）低剂量组（10mg/kg体重）：分析天平称取适量BJ-B11粉末于洁净的1.5mL离心管中，在超净工作台中加入适量体积DMSO，吹打充分使之充分溶解，得到6.67mg/mL的溶液，依次加入二倍体及的PEG-400和无菌PBS缓冲液，充分混匀；

5）中剂量组（20mg/kg体重）：分析天平称取适量BJ-B11粉末于洁净的1.5mL离心管中，在超净工作台中加入适量体积DMSO，吹打充分使之充分溶解，得到

13.3mg/mL的溶液，依次加入二倍体及的PEG-400和无菌PBS缓冲液，充分混匀；

6）高剂量组（30mg/kg体重）：分析天平称取适量BJ-B11粉末于洁净的1.5mL离心管中，在超净工作台中加入适量体积DMSO，吹打充分使之充分溶解，得到20.0mg/mL的溶液，依次加入二倍体及的PEG-400和无菌PBS缓冲液，充分混匀；

## **3.2** 实验方法和步骤

### 3.2.1 细胞培养

MDA-MB-231细胞株使用无菌DMEM完全培养基进行培养，培养于饱和湿度、37℃、

5% CO2的细胞培养箱中。每隔2～3天使用细胞消化液进行消化传代。传代比例为1：

3。

### 3.2.2 蛋白浓度的测定及上样样品的制备

#### 3.2.2.1 BCA法检测蛋白浓度

1）取2μL蛋白样品和50μL PBS缓冲液混匀，取10μL加入96孔板中，每个样品设置3个复孔，设置PBS缓冲液调零孔；

2）分别取10μL浓度为0.8mg/mL、0.4mg/mL、0.2mg/mL、0.1mg/mL和0.05mg/mL

的BSA标准品加入96孔板中，每个浓度的标准品设置3个复孔；

3）配置BCA工作液：按照50: 1比例将A液和B液充分混匀

4）每孔加入100μL BCA工作液，37℃孵育30min；

5）酶标仪检测各孔的OD值（波长λ=450nm）；

6）根据标准品分析出标准曲线和线性回归方程，并根据三个复孔的均值按照线性回归方程计算出每个样品的浓度。

#### 3.2.2.2 上样样品制备

1）根据蛋白浓度测定结果，计算出各样品的稀释比例；

2）使用PBS缓冲液按照上述结果对各样品进行稀释，使各样品蛋白浓度一致；

3）按照1: 4比例加入5×上样缓冲液，100℃加热变性10min，-20℃保存备用。

### 3.2.3 Western Blot检测

#### 3.2.3.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

**配胶（厚度：1.0mm）**

1）将2块玻璃板洗净，对齐插入夹子中夹好，固定在配胶架上；

2）在玻璃板中灌满蒸馏水，静置20min，观察漏水情况，20min后若无明显漏水，小心弃净玻璃板中的蒸馏水；

3）根据目的蛋白大小按照配胶比例配制下层分离胶（详见2.2.2.13），加入TEMED

后立刻充分混匀，迅速灌入玻璃板中，4mL/板，用75%乙醇压线；5）静置20min，等待胶凝固；

5）小心弃净压线的75%乙醇，配制上层浓缩胶，加入TEMED后立刻充分混匀，迅速灌入玻璃板中，灌满玻璃板，插入梳子；

**6）**静置20min，等待胶凝固，4℃保存备用。**电泳**

1）将上述配好的SDS-PAGE胶固定在电泳槽上，加入电泳液；

2）依次上样和Marker，空白孔用等体积的1×上样缓冲液填补；

5）接通电源，浓缩时80V恒压电泳，分离时120V恒压电泳。

#### 3.2.3.2 转膜

**组装**

1）根据电泳情况裁剪相应大小的PVDF膜，做好标记，甲醇活化5min，放入转膜液中浸泡备用；

2）待溴酚蓝条带泳动至距离SDS-PAGE胶底部1cm时，关闭电源，取出并撬开玻璃板，切除上层浓缩胶和多余的下层分离胶，蒸馏水冲洗干净；

3）按照下列方式进行组装：

夹子黑面**|**海绵垫**|**3层3M滤纸**|**SDS-PAGE胶**|**PVDF膜**|**3层3M滤纸**|**海绵垫**|**夹子透明面

6）赶净气泡，插入转膜槽中，加入转膜液使胶和PVDF膜完全浸泡在转膜液中；**电转：**

将转膜槽放入碎冰中，倒入少量清水，接通电源，200mA横流电转120min～150min。

#### 3.2.3.3 孵育抗体

1）封闭：转膜完成后取出PVDF膜，TBST漂洗3×5min，放入封闭液中，置于摇床上摇晃（40rpm）封闭90min；

2）孵育一抗：取出PVDF膜，用保鲜膜包好，根据Marker将不同的目的条带剪下，放入杂交带中，加入相应一抗工作液，4℃孵育过夜；

3）回收一抗工作液，取出PVDF膜，TBST漂洗3×15min；

4）根据一抗种属加入相应二抗（用封闭液配制），置于摇床上摇晃（40rpm）封闭60min；

5）弃净二抗，取出PVDF膜，TBST漂洗2×15min；

#### 3.2.3.4 化学发光、显影

1）化学发光：暗房中按照1: 1比例配制好化学发光液工作液，PVDF膜蘸取化学发光液工作液，用保鲜膜包好，放在压片盒中；

2）显影：黑暗中观察化学发光亮度，放入感光胶片，根据光亮度化学发光亮度决定曝光时间，单张浸泡于显影液中反应2min，待感光胶片上有条带显出来，立即用自来水冲洗1min，定影液中定影2min，再用自来水冲洗干净。烘干胶片，扫描保存。

### 3.2.4 BJ-B11对裸鼠移植瘤抑制实验

#### 3.2.4.1 BABL/c裸鼠（4～5周龄）乳腺癌移植瘤模型的构建

**细胞传代扩大培养**

3）将MDA-MB-231细胞扩大培养至100mm培养皿中（培养皿数目为实验裸鼠数目的1/2），于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中培养2～3天；

4）待细胞完全长满后，按照1传2比例对细胞进行消化传代（培养皿数目与实验裸鼠数目的相等），于饱和湿度、37℃、5% CO2的细胞培养箱中继续培养24h。

**收集细胞**

4）取出所有100mm培养皿，消化收集所有细胞；

5）将细胞悬液稀释1000倍后进行细胞计数，根据实验对注射细胞数目（每只约3.5～

5.0×106个/只）需要吸取足够的细胞悬液，离心，收集沉淀；

**6）**使用预冷的PBS缓冲液重悬细胞，离心收集沉淀**接种裸鼠（冰上操作）**

5）冰上按照1: 2比例将高浓度基质胶和PBS缓冲液混匀

6）根据实验裸鼠数量用混好的基质胶充分重悬细胞，以220μL/管分装至无菌1.5mL

离心管中；

7）1mL注射器吸取0.2mL含细胞的基质胶注射入裸鼠颈背部皮肤下，调整所形成的包块形态，待凝固后松手；

8）正常饲养1周，待瘤块大小达到(长×宽2) /2> 100mm3时开始动物实验

#### 3.2.4.2 动物给药

**配药：**

分为生理盐水/PBS组、溶剂组、阳性药物（顺铂）对照组和给药组。顺铂用生理盐水或PBS缓冲液稀释；溶剂组根据药物溶解需要进行配置；给药组根据实验需要可分别设置不同给药浓度。

**动物给药：**

腹腔注射按照15mL/kg体重给药，每2天1次给药（每组给药剂量见3.1.2.3）；根据实验需要，给药时间为2～3周。每次给药前测量肿瘤体积和裸鼠体重，并据此及时调整给药方案。

#### 3.2.4.3 处死动物和取材

**处死动物：**

颈椎脱臼法处死动物。每组动物进行拍照记录。**取材**

肿瘤组织：小心将肿瘤组织从裸鼠体内剥离，并去除肿瘤组织边缘的正常组织。称重和拍照后，将肿瘤组织分为2块，一块置于冰上，-80℃保存，用于提取蛋白，另一块

立即固定，石蜡包埋用于HE染色（华侨医院病理科完成）和免疫组化分析（广州尚博生物完成）。

#### 3.2.4.4 肿瘤组织蛋白提取

手术刀切下约1mm厚的肿瘤组织薄片（约50mg），放入玻璃匀浆器中，加入500μL SDS裂解液，冰上匀浆15min，直至见不到明显组织形态。吸管小心将匀浆也吸出，转移至1.5mL离心管中。另取500μL SDS裂解液冲洗玻璃匀浆器，并将洗涤液体一同转移入上述1.5mL离心管中。匀浆液100℃加热裂解20min，离心吸上清，-20℃保存。经过BCA蛋白检测并做好蛋白定量后用于Western Blot检测（详见3.2.3）。

### 3.2.5 统计学分析

所有实验结果的数据用Mean±S. D.表示，使用Origin 9.0软件统计建模，使用ANOVA

检验和Student's t检验的方法进行统计学处理，当P <0.05时有统计学意义。

## **3.3** 实验结果和分析

### 3.3.1 BJ-B11对乳腺癌移植瘤Th长的抑制作用



**图19 BJ-B11对乳腺癌移植瘤生长的抑制作用（a：乳腺癌移植瘤生长的体积变化曲线；b：肿瘤质量比较；）**

**Figure** **19** Suppression of in vivo breast cancer growth by **BJ-B11**

选取4～5周龄的雌性BABL/c裸鼠，每只在颈背部皮下注射200μL包含4.5×106个MDA-MB-231细胞的基质胶，成瘤8天后测量肿瘤大小（所有裸鼠肿瘤体积大于100mm3）。

根据肿瘤大小将所有裸鼠分为6组，每组10只（肿瘤体积均值接近，差异无统计学意义，*P<0.05*）：PBS对照组、溶剂对照组、阳性药物（顺铂）对照组和低、中、高三个不同给药剂量的给药组。



**图 20** **BJ-B11对乳腺癌移植瘤生长的抑制作用（a：拍照；b：和分离肿瘤组织拍照）**

**Figure** **20** Suppression of in vivo breast cancer growth by **BJ-B11**

采取腹腔注射给药的方法给药，给药体积为15mL/kg体重，给药剂量为：PBS对照组——PBS缓冲液15mL/kg体重；溶剂对照组——药物溶剂15mL/kg；阳性药物（顺铂）对照组——顺铂10mg/kg体重；低剂量组——BJ-B11 10mg/kg体重；中剂量组

——BJ-B11 20mg/kg体重；高剂量组——BJ-B11 30mg/kg体重。每2天给药1次，并测量肿瘤体积。给药后第20天处死动物。

从实验结果来看，与溶剂组相比，给药组中的低剂量组和中剂量组，BJ-B11对肿瘤生长速度的抑制作用不明显。而高剂量组和顺铂组与溶剂组和生理盐水组相比，肿瘤生长速度明显降低（图19a），一直保持着较低的生长速度。处死裸鼠后，将瘤块通过手术方式小心剥离下来并称重（图19b），给药组中的高剂量组和顺铂组的肿瘤组织的质量明显降低。但给药组中低剂量组和中剂量组肿瘤质量和溶剂组相比差异不明显。

处死荷瘤裸鼠后，拍照（图20a）可以看出，与溶剂组和生理盐水组相比，给药组中的高剂量组和顺铂组的瘤块隆起明显较小，而低剂量组和中剂量组与溶剂组没有明显差异。剥离肿瘤后拍照（图20b），也可见类似的趋势。

因此，以上结果表明BJ-B11只有在较高剂量（30mg/kg体重）时才对乳腺癌有一定的治疗作用。

### 3.3.2 BJ-B11对BABL/c裸小鼠体重的影响



**图 21** **BJ-B11对BABL/c裸小鼠体重的影响**

**Figure** **21** Influences of **BJ-B11 on the weight of BABL/c nude mices**

为进一步确定BJ-B11对机体的毒副作用，对实验过程中BABL/c裸小鼠体重变化进行分析。如图21所示，从给药开始后，低剂量组、溶剂组和生理盐水组裸鼠体重逐渐增加，中剂量组在整个给药周期内没有明显变化，甚至在给药后期出现轻微下降。高剂量组和顺铂组在随着时间体重逐渐下降。

以上结果表明，对比AT533, BJ-B11的毒性虽然有所下降，但在药效比较明显的剂量下药物毒性仍然比较明显，其对机体的损害不容忽视。

### 3.3.3 BJ-B11对乳腺癌移植瘤的组织学改变



**图 22** BJ-B11**对乳腺癌移植瘤的组织学改变**

**Figure 22 The histologic changes of breast cancer xenografted tumor by BJ-B11**

为进一步研究BJ-B11对乳腺癌移植瘤的作用，对实验中剥离下来的肿瘤组织进行HE染色观察其组织形态的改变。

从实验结果（图22）可以看出，相比较溶剂组，三种给药浓度的管腔结构都明显减少，而且随着BJ-B11给药浓度的增加而减少。顺铂组和生理盐水组相比，都有大量管腔结构出现。另一方面，在管腔内，三个BJ-B11给药组管腔内红细胞数也明显较溶剂组减少。这说明BJ-B11和AT533一样同样具有抑制肿瘤内血管新生的作用，BJ-B11作用后，肿瘤组织内血管新生明显减少，供血量明显下降。

此外，值得注意的是，与另外三组组织切片相比较，BJ-B11作用后，在低倍镜下可见肿瘤组织中出现大量大小不等的空泡状空腔，和血管腔形态有很大差异，而且空泡状空腔随着BJ-B11剂量的增加而增多增大。高倍镜下可见零星分布这一些印戒状的细胞分布。这可能是BJ-B11会导致肿瘤细胞内发生能量代谢紊乱，出现轻度的脂肪变性。

### 3.3.3 BJ-B11对乳腺癌移植瘤的HIF-1α/VEGF信号通路相关蛋白表达的作用

前面研究已经确定了BJ-B11可以抑制乳腺癌中的血管新生，为确定其作用机制，通过Western Blot检测了HIF-1α和Hsp90的表达。以GAPDH作为内参。

从结果（图23）可见，BJ-B11处理组，尤其是高剂量组，HIF-1α的表达量明显下降，而Hsp90表达量没有明显变化。这说明BJ-B11可通过HIF-1α/VEGF信号通路对乳腺癌的生长发挥抑制作用。此外，检测PARP的表达也发现了类似AT533的改变，给药组的PARP表达都发生了明显下调。



**图23 BJ-B11对乳腺癌移植瘤的HIF-1α/VEGF信号通路相关蛋白表达的作用Figure 23** Influences of **BJ-B11 on HIF-1α/VEGF signaling pathways related proteins *in vivo***

# 第四章 讨论

本研究本课题组前期研究[60]的基础上，主要通过研究3种Hsp90抑制剂在BABL/c

裸鼠体内对MDA-MB-231乳腺癌细胞移植瘤生长的抑制作用。

其中AT533可以对肿瘤生长具有明显的抑制作用。一方面，经注射AT533之后的裸鼠肿瘤生长速度明显降低，处死后分离出来的肿瘤质量也明显低于对照组。另一方面，镜下观察发现，给药组的裸鼠肿瘤组织中，血管数量明显下降，血管内的红细胞数目也明显下降，管腔横截面积减小。同时，经Western Blot检测还发现，AT533通过对HIF-1α/VEGF信号通路的进行抑制，从而对肿瘤细胞的增殖以及肿瘤内血管新生发挥了抑制作用。活性评价筛选也发现化合物AT533能与Hsp90的ATP-结合活性口袋结合，具有很好的Hsp90抑制活性。

作为细胞中重要的分子伴侣，Hsp90可以促进蛋白质分解、重折叠以及复性错误折叠，从而达到促使新生的多肽折叠成天然结构的作用。缺氧是诱发细胞内Hsp90表达加强的刺激因素之一，HIF-1α可作为Hsp90的底物，在Hsp90作用下稳定性增加[40]，从而促进血管新生并诱导对缺氧的适应。值得注意的是，HIF的活性还受到其他非氧依赖的调控[61]。对于肿瘤内缺氧，HIF-1过表达可以是由于遗传学改变引起的上游信号通路的改变[62]。如磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3K）[63]、促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）

[64]通路、哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白（mTOR）通路。它们激活mTOR受体复合物，磷酸化4E结合蛋白-1（4EBP1）和核糖体p70 S6激酶（S6K），使HIF-1转录[65]。小分子泛素样模体（SUMO）的加入在HIF-1α上的酪氨酸残基SUMO脱羟基化过程中降低了HIF-1α的转录活性[66]。HIF-1α上的Cys800的S-亚硝基化能通过刺激共激活剂的募集到HIF-1α来增加HIF-1α的转录活性[67]。HIF-1α受到热休克蛋白（Hsp90）和在PAS-A结构域活化的C激酶受体（RACK1）的竞争调控。Hsp90增加HIF-1α的稳定性[68]，RACK1在缺乏Hsp90的时候可以结合到PAS-A结构域上导致HIF-1α泛素化并蛋白酶体降解[69]。活性氧（ROS）通过氧化辅因子Fe2+使PHD和FIH-1活性受到抑制，增加了缺氧对HIF-1α的稳定性[70]。因此，在使用Hsp90抑制剂治疗肿瘤的时候，还应该考虑HIF-1α还存在其他因素。

从AT533对裸鼠机体的毒性而言，AT533的毒性比较大。在实验结果中可观察到，注射了AT533的裸鼠，体重增加明显比溶剂组要慢。而在动物饲养过程中也观察到，

裸鼠在注射AT533后，食欲明显下降，精神萎靡，普遍存在腹泻的现象。处死时也可观察到给药组的裸鼠肠道发黑，这表明AT533对肠道毒性很大。观察其它脏器，均有不同程度的病理改变。预实验中还观察到，当给药剂量为实验剂量的2倍（20mg/kg体重）时，虽然能观察到肿瘤开始变小甚至消失，但裸鼠体重开始急剧下降，3次给药之后已经十分消瘦，体重降至15g以下，而且陆续开始出现死亡的现象。这说明在使用AT533治疗乳腺癌的时候，除了AT533对肿瘤细胞具有明显的抑制作用之外，对于正常组织细胞的毒性也不可忽视！

为降低药物的毒性，本实验室还设计合成了另外两种前药——BJ-B11. BJ-B11主要是在AT533的4-羟基环己烷氨基上的羟基乙酰化进行改构，引入新的基团构成前药。在本实验室有其他课题组通过大鼠代谢实验证实，BJ-B11可通过体内代谢将上述位置的乙酰基水解掉，转化为AT533，进而发挥抗肿瘤作用。在本研究的实验中可以观察到，BJ-B11在相同剂量（10mg/kg体重）下，毒性都明显下降。但经过改构之后，BJ-B11对肿瘤的抑制作用明显低于AT533，在相同剂量（10mg/kg体重）时，BJ-B11并没有表现出明显的抑制肿瘤作用。在给药剂量达到AT533实验的3倍时（30mg/kg体重）才表现出一定的抗肿瘤作用。但在此剂量下，BJ-B11的毒性也很明显。

和其他Hsp90抑制剂的研究相同[71]，AT533和BJ-B11都在体外[58]和体内实验中诱导肿瘤细胞发生凋亡。但在AT533和BJ-B11的体内实验中发现，PARP无论是在剪切条带和表达量上，给药后都发生了下降，这与细胞凋亡蛋白caspase-3和caspase-9的变化趋势不一致。推断可能是AT533本身并不会导致细胞内DNA发生损伤。在体内实验中，由于肿瘤的生长过大本身就会导致肿瘤内部细胞因缺氧等因素发生凋亡。同时，由于时间原因，处死动物时的细胞凋亡的时间较长，可能很难检测到细胞凋亡早期发生的一些现象。

在本研究推进的同时，本实验室还进行了石墨烯纳米材料包裹药物通过尾静脉注射给药的裸鼠移植瘤实验。从实验结果上看，石墨烯纳米材料在对机体具有低毒的特性的同时，对于药物效果的提升有很大帮助（1mg/kg 体重给药剂量的药效甚至比

10mg/kg体重给药剂量的药效还好，对机体毒性却很低）。因此，与石墨烯纳米材料的结合可能对于提升AT533药效有促进作用，可避免因给药剂量过大对于机体毒副作用。

此外，在实验中还发现，BJ-B11作用下肿瘤组织中镜下观察出现了大小不等的空泡状空腔和少量印戒状细胞，且空泡状空腔随着BJ-B11剂量的增加而增多增大。这

种现象和轻度的肝脏脂肪变性相似。本实验室其他研究发现，BJ-B11还可导致K562细胞线粒体内膜电位降低，线粒体功能出现障碍，进而导致细胞发生凋亡[72]。从细胞脂类代谢角度来分析，线粒体功能障碍本身会导致细胞内能量代谢出现紊乱。脂肪酸代谢的中间产物脂酰CoA无法正常地在线粒体中发生β氧化进行分解代谢，从而造成甘油三酯的堆积[73]。

# 第五章 结论

1、AT533可以在体外抑制MDA-MB-231和MCF-7细胞因缺氧引起的HIF-1α/VEGF

信号通路的激活，同时促进细胞蛋白内泛素化降解。

2、AT533在体内具有良好的抗乳腺癌活性，其作用机制可能是通过抑制Hsp90活性使HIF-1α/VEGF信号通路受到抑制。

3、AT533在体内可以有效诱导肿瘤细胞发生凋亡。

4、BJ-B11作为AT533的前药，在体内具有和AT533类似的抗肿瘤作用。

5、AT533和BJ-B11可以有效抑制肿瘤内的血管新生，造成组织缺血。

参考文献

[1] M, M., Chair, P., Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC, WCRF/AICR Report, 2007: 277-280.

[2] Goldhirsch A1, Ingle JN, Gelber RD, *et al*. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. Ann Oncol. 2009; 20(8): 1319-29

[3] Long N, Moore MA, *et al*. Chen W Cancer epidemiology and control in north-East Asia - past, present and future. Asian Pac J Cancer Prev. 2010; 11 Suppl 2: 107-48.

[4] Peter Carmeliet, Rakesh K. Jain. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407 (6801): 249-57.

[5] Gullino, P. M. Angiogenesis and oncogenesis. J. Natl Cancer Inst. 1978; 61, 639–643.

[6] Folkman, J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med, 1971, 285: 1182-1186.

[7] Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. Gene Ther. 2000; 7(6): 451-7.

[8] Rafii, S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J Clin Invest. 2000; 105(1): 17-9.

[[9] Yancopoulos GD,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yancopoulos%20GD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11001067) [Davis S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Davis%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11001067), [Gale NW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gale%20NW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11001067), *et al*. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature. 2000; 407(6801): 242-8.

[10] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vascular endothelial growth factor allele. Nature. 1996; 380(6573): 435-9.

[11] Ferrara N1, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. Nat Med. 1999; 5(12): 1359-64.

[12] Herbert Hurwitz, Louis Fehrenbacher, William Novotny, *et al*. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med, 2004, 350(23): 2335-2342.

[13] Jain RK. Determinants of tumor blood flow: a review. Cancer Res. 1988;

48(10):2641-58.

[14] Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, *et al.* Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. Nat Med. 1997; 3(2): 177-82.

[15] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(8): 4607-12.

[16] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, *et al.* Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am J Pathol. 2000; 156(4): 1363-80.

[17] Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. Curr Top Microbiol Immunol. 1999; 237: 97-132.

[18] Jain RK, Safabakhsh N, Sckell A, Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(18): 10820-5.

[19] Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. J Clin Invest. 1999; 103(9): 1227-30.

[20] Huang X1, Molema G, King S, *et al.* Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. Science. 1997 Jan 24; 275(5299): 547-50.

[21] Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. Am J Pathol 2004; 164(6): 1875-82.

[22] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 2012; 148(3): 399-408.

[23] Manolescu B1, Oprea E, Busu C, *et al.* Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway. Biochimie. 2009; 91(11-12): 1347-58.

[24] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jun 6; 92(12): 5510-4.

[25] Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. Cell Death Differ. 2008; 15(4): 642-9.

[26] Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, *et al.* Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1alpha, HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. J Biol Chem. 2004 Oct 29; 279(44): 45643-51.

[27] Nilsson I, Shibuya M, Wennström S. Differential activation of vascular genes by hypoxia in primary endothelial cells. Exp Cell Res. 2004; 299(2): 476-85.

[28] Stiehl DP, Wirthner R, Koditz J, *et al*. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. J Biol Chem 2006; 281(33): 23482-91.

[29] Walmsley SR, McGovern NN, Whyte MK, *et al*. The HIF/VHL pathway: from oxygen sensing to innate immunity. Am J Respir Cell Mol Biol 2008; 38(3): 251-5.

[30] Spratt DE, Wu K, Kovacev J, *et al*. Selective recruitment of an E2～ubiquitin complexby an E3 ubiquitin ligase. J Biol Chem 2012; 287: 17374-85.

[31] Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, *et al*. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1996; 271(51): 32529–37.

[32] Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, *et al*. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxiainducible factor-1 alpha. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(8): 5367-72.

[33] Rezvani HR1, Ali N, Nissen LJ, *et al*. HIF-1alpha in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders. J Invest Dermatol. 2011; 131(9): 1793-805

[34] Pratheeshkumar, P., Kuttan, G., Vernolide-A inhibits radiation-induced hypoxia-mediated tumor angiogenesis by regulating HIF-1 alpha, MMP-2, MMP-9, and VEGF. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2011; 30(2): 139-51.

[35] Song EL, Hou YP, Yu SP, *et al*. EFEMP1 expression promotes angiogenesis and accelerates the growth of cervical cancer in vivo. Gynecol Oncol, 2011, 121(1): 174-180.

[36] Shiau AL, Shen YT, Hsieh JL, *et al*. Scutellaria barbata inhibits angiogenesis through downregulation of HIF-1 alpha in lung tumor. Environ Toxicol. 2014; 29(4): 363-70.

[37] Pritchard KA Jr, Ackerman AW, Gross ER, *et al*. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem. 2001; 276(21): 17621-4.

[38] García -Cardeña G1, Fan R, *et al*. Shah V Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. Nature. 1998; 392(6678): 821-4.

[39] Sun J, Liao JK. Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24(12): 2238-44.

[40] Ali MM1, Roe SM, Vaughan CK, *et al*. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. Nature. 2006; 440(7087): 1013-7.

[41] Mayer MP, Gymnastics of molecular chaperones. Mol Cell. 2010; 39(3): 321-31.

[42] Whitesell L, Lindquist SL, Hsp90 and the chaperoning of cancer. Nat Rev Cancer. 2005; 5(10): 761-72.

[43] Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, *et al*. Targeting the dynamic Hsp90 complex in cancer. Nat Rev Cancer. 2010; 10(8): 537-49.

[44] Xu Wl, Neckers L. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. Clin Cancer Res. 2007; 13(6): 1625-9.

[45] Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. Clin Cancer Res. 2009; 15(1): 9-14.

[46] Cheung CH, Chen HH, Cheng LT, *et al*. Targeting Hsp90 with small molecule inhibitors induces the over-expression of the anti-apoptotic molecule, survivin, in human A549, HONE-1 and HT-29 cancer cells. Mol Cancer. 2010; 9: 77.

[47] Katschinski DM, Le L, Heinrich D, *et al*. Heat Induction of the Unphosphorylated Form of Hypoxia-inducible Factor-1alpha Is Dependent on Heat Shock Protein-90 Activity. J Biol Chem. 2002; 277(11): 9262-7.

[48] Baird NA, Turnbull DW, Johnson EA. Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. J Biol Chem. 2006; 281(50): 38675-81.

[49] Komal Jhaveri, Tony Taldone, Shanu Modi, *et al*. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. Biochim Biophys Acta. 2012; 1823(3): 742-55

[50] Zagouri F, Bournakis E, Koutsoukos K, *et al*. Heat shock protein 90 (Hsp90) expression and breast cancer. Pharmaceuticals (Basel). 2012; 5(9): 1008-20.

[51] O Alqawi, M Moghaddas, G Singh. Effects of geldanamycin on HIF-1a mediated angiogenesis and invasion in prostate cancer cells. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2006; 9(2): 126-35.

[52] Wu WC, Kao YH, Hu PS, *et al*. Geldanamycin, a Hsp90 inhibitor, attenuates the hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in retinal pigment epithelium cells in vitro. Exp Eye Res. 2007; 85(5): 721-31.

[53] Purnachandra Nagaraju Ganji, Wungki Park, Jing Wen, *et al*. Antiangiogenic effects of ganetespib in colorectal cancer mediated through inhibition of HIF-1a and STAT-3. Angiogenesis. 2013; 16(4): 903-17.

[54] Xiang L, Gilkes DM, Chaturvedi P, *et al*. Ganetespib blocks HIF-1 activity and inhibits tumor growth, vascularization, stem cell maintenance, invasion, and metastasis in orthotopic mouse models of triple-negative breast cancer. J Mol Med (Berl). 2014; 92(2): 151-64.

[55] Friedman JA, Wise SC, Hu M, *et al*. Hsp90 Inhibitor SNX5422/2112 Targets the Dysregulated Signal and Transcription Factor Network and Malignant Phenotype of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Transl Oncol. 2013; 6(4): 429-41.

[56] Hall, S. E. Discovery and pre-clinical profile of SNX-5422: An orally active Hsp90 inhibitor in phase 1 trials for solid and hematological tumors. In Proceedings of the 99th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, CA, USA, 11–15 April 2008; Abstract 2449.

[57] Huang L, Zhang Z, Zhang S, *et al*. Inhibitory action of Celastrol on hypoxia-mediated

Angiogenesis and metastasis via the HIF-1αpathway. Int J Mol Med. 2011 Mar;27(3):407-15.

[58] 曹惠慧, 沙蟾毒精抗肝癌作用及其机制研究, 广州: 暨南大学硕士毕业论文, 2011.

[59] 曹惠慧, 张冬梅, 刘俊珊, 侯春英, 栗原博, 叶文才, 沙蟾毒精抑制肝癌HepG2细胞黏附、迁移和侵袭的作用[J], 中国药理学报, 2011, 27.19-23.

[60] 刘晓, Hsp90抑制剂通过HIF-1α/VEGF信号通路抑制乳腺癌血管新生的机制研究, 广州: 广东药学院硕士毕业论文, 2014.

[61] Sandeep Unwith, Hailin Zhao, Lindsay Hennah, *et al*. The potential role of HIF on tumour progression and dissemination. Int J Cancer. 2015; 136(11): 2491-503.

[62] Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. Cell Growth Differ 2001; 12(7): 363-9.

[63] Gort EH, Groot AJ, Derks van de Ven TL, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression requires PI 3-kinase activity and correlates with Akt1 phosphorylation in invasive breast carcinomas. Oncogene 2006; 25(45): 6123-7.

[64] Richard DE, Berra E, Gothie E, *et al*. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem 1999; 274(46): 32631-7.

[65] Salmond RJ, Emery J, Okkenhaug K, *et al*. MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase, and mammalian target of rapamycin pathways converge at the level of ribosomal protein S6 phosphorylation to control metabolic signaling in CD8 T cells. J Immunol 2009; 183(11): 7388-97.

[66] Berta MA, Mazure N, Hattab M, *et al*. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. Biochem Biophys Res Commun 2007; 360(3): 646-52.

[67] Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. FEBS Lett 2003; 549(1-3): 105-9.

[68] Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, *et al*. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hyposxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. J Biol

Chem 2002; 277(33): 29936-44.

[69] Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. Hsp90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. Cell Cycle 2007; 6(6): 656-9.

[70] Manolescu B, Oprea E, Busu C, *et al*. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway. Biochimie 2009; 91(11-12): 1347-58.

[71] Wang R, Shao F, Liu Z, *et al*. The Hsp90 inhibitor SNX-2112, induces apoptosis in multidrug resistant K562/ADR cells through suppression of Akt/NF-κB and disruption of mitochondria-dependent pathways. Chem Biol Interact. 2013 5; 205(1): 1-10.

[72] 鞠怀强, 沙蟾毒精抗肝癌作用及其机制研究, 广州: 暨南大学硕士毕业论文, 2011.

[73] 查锡良, 药立波. 生物化学与分子生物学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 149-159.

攻读学位期间发表的论文

1、**田旭岩**，应鹏，陆家政，陈宏远，芮雯. 三种新型氧钒配合物的抗肿瘤活性作用评价[J]. 广东药学院学报. 2015, 31(2)：109-114.

2、Ying P, **Tian X**, Zeng P, Lu J, Chen H, *et al.* (2014) Synthesis, DNA-binding, Photocleavage and in vitro Cytotoxicity of Novel Imidazole[4,5-f][1,10] phenanthroline-based Oxovanadium Complexes. Med chem 4: 549-557.

3、Chen H, Liu X, Clayman ES, Shao F, Xiao M, **Tian X**, Fu W, Zhang C, Ruan B, Zhou P,

Liu Z, Wang Y, Rui W. Synthesis and Evaluation of a CBZ-AAN-Dox Prodrug and its in vitro Effects on SiHa Cervical Cancer Cells Under Hypoxic Conditions. Chem Biol Drug Des. 2015.

4、刘晓， 邵方元， **田旭岩**， 肖满珊， 陈宏远. 一种阿霉素新型前体药物的抗肿瘤活性作

用研究[J]. 广东药学院学报. 2014, 30(1): 1-4.

附 录

缩写词及中英文对照

（按照写词首字母排序）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| BSA | Bovine Serum Albumin | 牛血清白蛋白 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eargle Medium | DMEM |
| DTT | Dithiothreitol | 二硫苏糖醇 |
| ECL | Enhanced chemiluminescene | 化学发光自显影 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| GAPDH | Glyceraldehydes-3-phosphate | 三磷酸甘油醛脱氢酶 |
| h | Hour | 小时 |
| HIF | Hypoxia-inducible factor | 缺氧诱导因子 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| Hsp90 | Heat shock protein 90 | 热休克蛋白 90 |
| HUVEC | Human umbilical vein endothelial cell | 人脐带静脉内皮细胞 |
| IC50 | Half maximal (50%) inhibitory  Concentration (IC) of a substance | 半数抑制浓度 |
| min | Minute | 分钟 |
| mL | Milliliter | 毫升 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrohoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinase | 磷脂酰肌醇-3-激酶 |
| PMSF | PhenylmethanesμLfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧基团或分子 |
| rpm | Rotator per minute | 每分钟转数 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| SD | Standard deviation | 标准偏差 |
| SDS | Sodium dodecylsufonte | 十二烷基硫酸钠 |
| SPSS | Statistical Package for the Social Sciences | 社会科学统计学软件包 |
| Tris | Tris hydroxymethyl a minomethane | 三羟甲基氨基甲烷 |
| Trx | Thioredoxin | 硫氧还蛋白 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | 血管内皮生长因子 |
| WB | Western-blot | 蛋白印迹 |

致 谢

流光易逝，日月如梭。转眼间，三年的研究生生活将画上一个句号。这三年里，我收获的不仅仅是我的专业知识和实验技能，更多的是对我性格的历练，视野的开拓以及人生的充实。

首先，衷心感谢我的导师陈宏远副教授、刘忠副研究员和王一飞教授，谢谢三位老师在学业、生活和工作上对我的悉心指导和照顾！陈宏远老师治学严谨、待人真诚、随和热情，感谢您平时对我的理解、支持以及包容！刘忠老师文思敏捷、幽默风趣、谦和宽厚，感谢您在我学习和生活上给予的指导与照顾！王一飞老师知识渊博、对科研工作孜孜不倦，感谢您一直以来对我的谆谆教诲！

衷心感谢芮雯、熊盛老师，任哲、刘秋英、钱垂文博士，黄立、王晓燕、王颖、王巧丽师姐在文章的写作及实验过程中给予的帮助和建设性意见。

衷心感谢张毅博士、徐单单博士、王晓博士在课题开展，实验技术指导以及论文的撰写等方面所给予的指导性意见和帮助。衷心感谢暨南大学生物医药基地所有的老师和同学，一如既往地在我学业上和生活上给予的帮助。

特别感谢马冬磊、汪圣师弟，杜若兰、符吴萸、阮碧波师妹在实验过程及后期写作过程中给予的意见和帮助；衷心感谢刘晓师姐、邵方元师兄，谢谢你们在工作和生活中给予我的帮助。感谢一路上所有曾经在我最困难的时候给予我帮助的人，是你们的慷慨相助，我才有勇气走完这一路。

衷心感谢在我的学生生涯中教导过我的所有老师，是你们为我指明方向。

特别感谢我的家人以及关心照顾我的朋友，你们是我奋斗路上的支撑与后盾，谢谢你们对我无微不至的关心与呵护。最后衷心祝愿所有关心和帮助过我的人，让我们继续共勉共进，开创更美好的明天。