**分 类 号**   **学号** D201078136

**学校代码**  10487  **密级**



博士学位论文

**RY10-4 的抗肿瘤血管Th成和侵袭研究**

**学位申请人：** **刘子维 学 科 专 业 ：** **药理学**

**指 导 教 师 ：** 阮金兰教授答 辩 日 **期 ：** **2013.05**

**A dissertation submitted to Huazhong University of Science and Technology for the Degree of Doctor**

**The anti-tumor angiogenesis and invasion research of RY10-4**

**D.Candidate** : **Liu ziwei Major** : **Pharmacology**

**Supervisor** : Professor Ruan **jinlan**

**Huazhong University of Science & Technology Wuhan 430074, P. R. China**

**May, 2013**

**本课题由如下基金资助**

武汉科学技术发展基金：项目编号：201260523182

中国教育部博士学科点科研基金，项目编号：20090142110021

**独创性声明**

本人郑重声明，本学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果的总结。尽我所知，除文中已经标明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本人将承担本声明引起的一切法律后果。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

**学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权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。本人授权华中科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本论文属于

保密□ ，在 年解密后适用本授权书。

不保密□。

（请在以上方框内打“√” ）

学位论文作者签名： 指导教师签名：

日期： 年 月 日 日期： 年 月 日

目 录

[目录](#_Toc686825964) 3

[英文缩略词汇表](#_Toc686825965) 4

[摘 要](#_Toc686825966) 6

[ABSTRAT](#_Toc686825967) 6

[引 言](#_Toc686825968) 7

[第一部分 RY10-4的在肿瘤细胞中的抗血管Th成作用](#_Toc686825969) 7

[1. 实验材料及仪器：](#_Toc686825970) 7

[1.1 试药的准备](#_Toc686825971) 7

[1.2 实验材料](#_Toc686825972) 7

[1.3 主要设备与仪器](#_Toc686825973) 8

[2. 细胞的准备及增殖抑制实验](#_Toc686825974) 8

[2.1 细胞培养及缺氧诱导](#_Toc686825975) 8

[2.2 MTT细胞增殖实验](#_Toc686825976) 8

[2.3 实验结果](#_Toc686825977) 8

[2.4 结果讨论](#_Toc686825978) 8

[3. 细胞迁移和小管形成实验](#_Toc686825979) 8

[3.1 实验步骤](#_Toc686825980) 8

[3.2 实验结果](#_Toc686825981) 9

[3.3 结果讨论](#_Toc686825982) 9

[4. RY10-4对斑马鱼血管Th成的影响](#_Toc686825983) 9

[4.1 斑马鱼的来源](#_Toc686825984) 9

[4.2 实验原理及步骤](#_Toc686825985) 9

[4.3 实验结果](#_Toc686825986) 10

[4.4 结果讨论](#_Toc686825987) 10

[5. 免疫印迹法分析RY10-4对血管Th成相关的信号通路蛋白的作用](#_Toc686825988) 10

[5.1 溶液配制及方法](#_Toc686825989) 10

[5.2 实验方法](#_Toc686825990) 12

[5.3 实验结果](#_Toc686825991) 14

[5.4 讨论](#_Toc686825992) 14

[6. 统计学分析](#_Toc686825993) 15

[第二部分 RY10-4对于肿瘤细胞的侵袭抑制作用](#_Toc686825994) 15

[1. 实验材料及仪器：](#_Toc686825995) 15

[1.1 试药的准备](#_Toc686825996) 15

[1.2 实验试剂](#_Toc686825997) 15

[1.3 主要仪器与设备](#_Toc686825998) 15

[2. 细胞培养以及核质分离](#_Toc686825999) 15

[2.1 细胞培养](#_Toc686826000) 15

[2.2 细胞核质分离](#_Toc686826001) 15

[3. 细胞粘附实验](#_Toc686826002) 16

[3.1 实验方法](#_Toc686826003) 16

[3.2 实验结果](#_Toc686826004) 16

[3.3 实验讨论](#_Toc686826005) 16

[4. 体外迁移与侵袭实验](#_Toc686826006) 16

[4.1 实验方法](#_Toc686826007) 16

[4.2 实验结果](#_Toc686826008) 16

[4.3 实验讨论](#_Toc686826009) 17

[5. E-Cadherin和β-catenin的免疫荧光分析](#_Toc686826010) 17

[5.1 实验方法](#_Toc686826011) 17

[5.2 实验结果](#_Toc686826012) 17

[5.3 结果讨论](#_Toc686826013) 17

[6. RY10-4对Wnt及MAPK信号通路相关蛋白的免疫印迹分析](#_Toc686826014) 17

[6.1 实验方法](#_Toc686826015) 17

[6.2 实验结果](#_Toc686826016) 18

[6.3 结果讨论](#_Toc686826017) 18

[7. 统计性分析](#_Toc686826018) 18

[第三部分 RY10-4的检测方法学和初步药代研究](#_Toc686826019) 18

[1. 仪器与试剂](#_Toc686826020) 18

[1.1 实验试剂](#_Toc686826021) 18

[1.2 实验仪器](#_Toc686826022) 19

[2. UV检测波长的确定](#_Toc686826023) 19

[3. HPLC-UV检测条件的确定及方法学](#_Toc686826024) 19

[3.1 HPLC-UV的检测条件确定](#_Toc686826025) 19

[3.2 专属性实验](#_Toc686826026) 19

[3.3 线性关系试验](#_Toc686826027) 19

[3.4 精密度试验](#_Toc686826028) 20

[3.5 稳定性试验](#_Toc686826029) 20

[3.6 最低检测限和最低检测量](#_Toc686826030) 21

[3.7 结果与讨论](#_Toc686826031) 21

[4. RY10-4的在大鼠体内药物代谢学初步研究](#_Toc686826032) 21

[4.1 药品与试剂](#_Toc686826033) 21

[4.2 动物](#_Toc686826034) 21

[4.3 生物样品处理](#_Toc686826035) 21

[4.4 方法学考察](#_Toc686826036) 22

[4.5 RY10-4在大鼠体内的组织分布](#_Toc686826037) 22

[5. 实验结果](#_Toc686826038) 22

[5.1 专属性实验](#_Toc686826039) 22

[5.2 线性范围](#_Toc686826040) 23

[5.3 回收率实验](#_Toc686826041) 24

[5.4 精密度实验](#_Toc686826042) 27

[5.5 最低检测限](#_Toc686826043) 29

[5.6 稳定性实验](#_Toc686826044) 29

[5.7 体内分布实验](#_Toc686826045) 31

[6. 统计性分析](#_Toc686826046) 44

[参考文献](#_Toc686826047) 44

[综述](#_Toc686826048) 47

[攻读博士学位期间的研究成果](#_Toc686826049) 52

# 英文缩略词汇表

(List of Abbreviation)

ANOVA Analysis of variance 单因素方差分析

Dll4 Delta like ligand 4 类Delta4配体

RY10-4 2-(1-hydroxy-4-oxo-2,5-cyclohexadien

-1-yl) -4H-Pyran-4-one

DEDC 2-(cis-1,2-dihydroxy-4-oxo-cyclohex-5

-enyl) -5,7-dihydroxy-chromone

2-(1-羟基-4-酮-2,5-环己二烯) -吡喃-4-酮

2-（顺-1,2-二羟基-4-酮-环己

-5-烯）-5, 7-二羟基-色原酮

PI3K Phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase 磷脂酰 3-羟基激酶 DMEM Dulbcco's Modifed Eagle Medium 改良的 Eagle 培养基 DMSO Dimethyl sulfoxide 二甲基亚砜

UV UltraViolet 紫外线

EB Ethidium bromide 溴化乙锭

ECL Enhanced chemiluminescence 增强型化学发光

EDTA Ethylene diamine tetraacetic acid 乙二胺四乙酸

HPLC High Performance Liquid Chromatography

高效液相色谱

ERK Extracellular signal-regulated kinase 细胞外信号调节蛋白激酶

FCS Fetal calf serum 小牛血清

JNK C-Jun N-terminal kinase c-Jun 氨基末端激酶

MAPK Mitogen activated protein kinase 丝裂原活化蛋白激酶

MTT 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -3,5-diph- enylformazan

四甲基偶氮唑盐

p38 p38 protein p38 蛋白

NF-κB Nuclear factor Kappa B 核转录因子 κB

OD Optical density 光密度值

PBS Phosphate buffer saline 磷酸盐缓冲液

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| AKT | Protein Kinase B | 细胞激酶 B |
| PI | Propidium Iodide | 碘化丙啶 |
| PMSF | Phenylmethanesulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| HIF | Hypoxia-inducible factor | 缺氧诱导因子 |
| PVDF | Polyvinyldifluoride | 聚偏氟乙烯 |

mTOR Mamalian target of rapamycin 哺乳动物雷帕霉素靶点

VEGF Vascular endothelial growth factor 血管内皮生长因子

SU5416 (3Z) -3-[(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl) methylidene] -1,3-dihydro-2H-indol-2- one

3-[(3,5-二甲基-1H-吡咯-2-

基）亚甲基] -1,3-二氢-2H-吲哚-2-酮

SD Standard deviation 标准差

MMPs Matrix metalloproteinase 基质金属蛋白酶

HUVECs Human Umbilical Vein Endothelial Cells

STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3

人脐静脉内皮细胞

转录信号传导子与激活子 3

Tris Trihydroxymethyl aminomethane 三羟甲基氨基甲烷

摘 要

黄酮(flavonoids)作为一种在植物中广泛存在的化合物，也大量的存在于人们的日常饮食中，其集多种优良的生理、药理，保健活性于一身，默默的维系着人类的身体健康。黄酮类化合物从日常的身体状态的调节到肿瘤以及心血管等重大疾病的预防都发挥着不可忽视的作用。随着研究的深入，在治疗疾病的层面上，近年来，某些黄酮因其低毒、高效、天然的特点而倍受关注。

普通针毛蕨Macrothelypteris torresiana(Gaud.) Ching，为金星蕨科针毛蕨属的植物，在我国长江以南的各省均存在大量分布。民间普遍认为该植物具有清热解毒，软坚散结的功效，因此在传统中医中其常被用于止血及治疗水肿。通过近几年的深入研究发现，世界上多个实验室均发现，普通针毛蕨中所含的特殊黄酮成分原芹菜素（Protoapigenone）在体内和体外的抗肿瘤活性筛选中均有良好的表现。更加令人惊喜的是，原芹菜素抗肿瘤谱较广，对不同来源的肿瘤细胞都表现出明显的细胞毒作用。通过进一步研究发现，以Protoapigenone为代表的一系列的B环为非芳香环的黄酮类化合物，在体内和体外筛选实验中均表现出良好的抗肿瘤活性；而结构相似的传统黄酮的抗肿瘤作用却很微弱。

在前人的研究基础上，本课题以Protoapigenone为先导化合物，采用化学全合成的方法开发出了新化合物 RY10-4 ，其具体命名为2-(1-hydroxy-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-yl) -4H-pyran-4-one，其中包括核心基团1-hydroxycyclohexa-2, 5-dien-4-one。在初步的体外筛选中采用肝肿瘤细胞，肺肿瘤细胞，乳腺肿瘤细胞，前列腺肿瘤细胞等对RY10-4进行全面抗肿瘤的体外评价，结果显示人源乳腺肿瘤细胞为该化合物最佳的靶向肿瘤细胞。同时在实验中也观察到，该化合物不但展现出了良好的抗肿瘤作用，且其副作用也比较微弱。这种初步的筛选结果为后续的深入研究提供了基础并指明了研究的方向。通过后续研究发现该化合物可以作用于肿瘤细胞中的多条通路，包括经典的PI3K-AKT和MAPK通路。

在本课题中，针对RY10-4的毒副作用小的特点，采用了抗血管生成和抗细胞迁移两个途径来评价其抗肿瘤的具体作用机制。在抗血管生成的实验中，本实验采用人脐静脉内皮细胞（HUVECs）建立体外模型以模拟RY10-4对血管生长

的抑制作用，体外小管形成抑制作用，以及细胞运动能力抑制作用。同时用斑马鱼来模拟细胞的整体的血管生成。通过上述模型，从表观学来评价了RY10-4的抗血管生成的能力。为了探讨具体的药物分子作用机制，实验通过模拟缺氧环境建立AKT-mTOR-HIF-1-VEGF通路评价系统。通过免疫印迹方法在MDA-MB-231和MCF-7两种人源肿瘤细胞中评估RY10-4对该通路的作用。结果发现肿瘤细胞中该通路上关键蛋白磷酸化激活在RY10-4共培养后被弱化，进而使得这条通路被抑制。

由于肿瘤细胞周边的血管生成行为和肿瘤细胞的侵袭与迁移密切相关，实验中采用人源性乳腺癌肿瘤细胞MDA-MB-231，一种易于迁移的乳腺肿瘤细胞作为细胞实验模型。首先通过细胞粘附，和transwell法在体外模拟肿瘤细胞侵袭和迁徙三个过程：肿瘤细胞粘附于相邻组织上，降解细胞外基质，发生迁徙。然后针对细胞的主要结构支撑蛋白即钙粘蛋白环粘蛋白复合体和细胞外基质采用免疫荧光和免疫印迹的方法来检测其表达和分布。结果显示钙粘蛋白以及在胞内与其构成细胞骨架的环粘蛋白在RY10-4作用以后表达量和表达的位置都发生了明显的变化，主要表现在环粘蛋白在胞内的表达增加，而在核内的表达则减少，钙粘蛋白的表达范围更大而且表达量也增加。MMP-2/9作为主要的细胞外基质降解酶，其表达量的多少与细胞外基质的数量息息相关。因此采用免疫印迹的方法对MMP-2/9以及其上游通路的相关蛋白的表达量来进行评价。结果显示MAPK可能是RY10-4作用于肿瘤细胞的另一条通路，MAPK与PI3K-AKT共同影响着MMP-2/9的表达，而这种通路的激活可以被RY10-4通过降低其上关键蛋白的磷酸化的来阻断。

作为一个有开发前景的化合物，本课题建立了RY10-4的HPLC-UV分析方法。并采用该方法建立了大鼠体内的分析模型并初步进行了RY10-4在大鼠体内的药物分布研究。结果显示RY10-4无论是在空白样中还是在动物组织内均可以在HPLC-UV下采用常规的流动相进行高灵敏度的检出。组织分布的初步结果显示RY10-4的在组织中的分布和血液量有正相关，该化合物在血流充盈的器官中的分布情况差别不大，在血液中可以较长时间保持一个相对高的浓度，这对于该化合物的后续的药物开发工作是十分有利的。

关键词：RY10-4； 抗肿瘤； 血管生成； 侵袭与迁移； 药代动力学

# ABSTRAT

Flavones are a series of compounds that widely distributed in plants, and existed in our daily diet in a large amount. They rolled physiological, pharmacological and health activities into a one, nourished our body silently. They play an essential role from the daily regulation of the body to the prevention of major diseases such as tumors and cardiovascular disease. With further research, flavones have attracted more and more attention in the aspect of disease treatment due to their characteristics of natural, high efficiency and low toxicity.

Macrothelypteris torresiana (Gaud.) Ching, widely distributed in the provinces in southwestern China, is a member of genus Mcrothelypteris in family Thelypteridaceae. The plant has the functions of clearing heat and removing toxicity and softening and resolving hard mass. It was often used in traditional Chinese medicine to stop the bleeding and the treatment of edema.

In the recent years, several laboratories in the world have found that a particular flavonoid, protoapigenone, which detected in the Macrothelypteris torresiana (Gaud.) Ching have exhibited fine activities both in vivo and in vitro anti-tumor screen. What is more commendable to statement is that it has a wide spectrum of anti-tumor significant cytotoxicity to several tumor cells from different sources. Protoapigenone represent a series of flavonoids with a non aromatic B ring, which can exhibit a good anti-tumor activity in vivo and in vitro screening experiments are found through further researchs. Meanwhile the traditional flavones with similar structure have little anti-tumor effects.

Based on the previous studies, used protoapigenone as a model, we adopted chemical synthesis methods to develop the new compounds RY10-4. It was specifically named as 2-(1-hydroxy-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-yl) -4H-pyran-4-one, including a core group: 1-hydroxycyclohexa-2,5-dien-4-one. In preliminary in vitro screening, we adopted a liver tumor cells, lung tumor cells, breast tumor cells, prostate tumor cells as target tumor cells, among which breast were most sensitive to

RY10-4. Besides the fine anti-tumor activities, no obvious side effects were observed. The results provided the basis for subsequent in-depth study and indicated the direction of further research. Through a follow-up study we found that the compounds can act on multiple pathways of tumor cells, such as the classic PI3K-AKT and MAPK pathways.

In the task, taken the characteristics of small side effect of RY10-4 into account, anti-angiogenic and anti-cell migration are two promising pathway to evaluate the specific anti-tumor mechanism. In anti-angiogenesis experimental, firstly human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), which were essential cells in tube formation, were co-cultured with RY10-4, secondly tube formation inhibition and inhibition of cell motility also accomplished using HUVECs, finally transgenic zebrafish was used as a whole angiogenesis model to assess RY10-4. Through the above model, we evaluate the ability to anti-angiogenic of RY10-4 by superficial test, which gave us a direction for further study. In order to explore the specific mechanism and behavior of RY10-4, we simulated hypoxic environment and established an AKT-mTOR-HIF-1-VEGF pathway evaluation system. We evaluated the role of RY10-4 in the signal pathway in two human source tumor cells lines MDA-MB-231 and MCF-7 by immunoblotting. The results shows that the phosphorylation of key protein of the tumor cells in the pathways was inactivated after the tumor cells co-cultured with RY10-4, which may be the cause of inhibition of the pathway.

As known that the invasion and migration of tumor cells are closely related to the behavior of angiogenesis around the tumor cells, so the human resource breast tumor cells MDA-MB-231, which were regarded to prone to migrate were used as cell models. Firstly, cell adhesion assay, tumor cell invasion and migration assay by in vitro transwell system were used to imitate the three processes of tumorigenesis: adhering to the adjacent tissue, degradation of extracellular matrix, migration. Then expression and distribution of the main structural support protein for cells: E-cadherin/β-catenin complex and extracellular matrix were detected by both

Immunofluorescence and immunoblotting. The results showed expression levels and distribution of E-cadherin and its correspondingβ-catenin that constitute cytoskeleton in intracellular significantly changed after RY10-4 treatment. The outcome exhibited as follows: β-catenin up-regulated in the cytoplasm, while down-regulated in the nucleus. E-cadherin increased in both expression levels and range. MMP-2/9 acted as a major extracellular matrix degrading enzyme, their quantity was closely bound up of the amount of extracellular matrix. Therefore, we have adopted the Western blot method to evaluate MMP-2/9 and its related proteins in the upstream pathway. The result shows the MAPK may be the other signal pathway RY10-4 acts on the tumor cells. MAPK and PI3K-AKT signal pathway contribute to the expression of MMP-2/9, and the activation of the signal pathway can be blocked by reducing the phosphorylation levels of key proteins.

As a compound with the prospects for the development, the subject established a HPLC-UV analysis method for RY10-4. Then we adopted SD rats to analysis the preliminary pharmacokinetic in vitro of RY10-4. The results show that whether it is in the blank or the animal tissues, RY10-4 can be detected by HPLC-UV using a conventional mobile phase to get a high sensitivity. The tentative results show that there is a positive correlation between the tissue distribution and the amount of blood of RY10-4. The distribution of the compound exhibited only a little differences among the organs with plentiful bloods meanwhile it can sustain a relatively high concentration in the blood in a longer time. This is very beneficial for us to follow-up drug development work.

KEY WORDS: RY10-4; Anti-tumor; Angiogenesis; Invasion and migration; Pharmacokinetic

引 言

癌症（Cancer）也叫做恶性肿瘤，普遍认为是由控制细胞正常生长增殖与程序化死亡的机制失常而引起的恶性疾病。除了生长失控外，癌细胞会局部侵入周遭正常组织释放内毒素，甚至侵袭进入体内循环系统或淋巴系统，从而转移到身体的其他部位。且由于在疾病发生初期，由于恶性肿瘤症状不明显，且到临床发现是一般为肿瘤发生后期，恶性肿瘤一般存在着易复发、易转移的特点，因而成为了医学界的难以攻克的重大难题之一，也使得无数病人及其家庭陷入了痛苦之中。当多种致癌因子的交互作用与机体，并在体内不断的恶化，累积到了一定程度后，则会使得局部组织的基因或者蛋白异常沉默或者异常激活，这些异常事件直接导致了正常细胞分化、生长、死亡等过程的紊乱，最终使得正常细胞在机体内变异超脱的机体的控制，产生永生化的特点而形成肿瘤。临床上目前常用的抗肿瘤药物通常以细胞毒作用为作用方式，该类型药物存在着毒副作用强的主要缺点。由于肿瘤细胞本源于正常细胞的突变，因此大多数抗肿瘤的细胞毒药物在杀伤肿瘤细胞的同时对于正常的细胞和组织也有很大的危害[1]。为此人们广泛的寻找一类毒副作用相对较小的抗肿瘤化合物，来源于植物的天然化合物被首先列为筛选对象。

黄酮(flavonoids)作为一种在植物中广泛存在的化合物，同时也大量的存在于人们的日常饮食中，黄酮集多种优良的生理、药理，保健活性于一身，润物细无声的维系着人类的身体健康。从日常的身体状态的调节到肿瘤以及心血管等重大疾病的预防都发挥着不可忽视的作用，随着研究的深入，而在治疗疾病的层面上，近年来，某些黄酮因其低毒、高效、天然的特点倍受关注[2, 3]。

普通针毛蕨Macrothelypteris torresiana (Gaud.) Ching，作为金星蕨科针毛蕨属的植物，在我国长江以南的各省均存在大量的分布。民间普遍认为该植物具有软坚散结，亲热解毒的功效，因此在传统中医中常被用于止血以及治疗水肿

[4, 5,6]. 通过近几年的研究发现，世界上若干个实验室均发现，普通针毛蕨中所含

的特殊黄酮成分[7, 8]：原芹菜素（Protoapigenone）在体内和体外的抗肿瘤活性筛 选中均有良好的表现[9]，且更加令人惊喜的是，其抗肿瘤谱较广，对不同来源的

肿瘤细胞都表现出明显的细胞毒作用。通过进一步的研究发现以Protoapigenone为代表的一系列的B环为非芳香环的黄酮类化合物，其在体内和体外筛选实验中均可以表现出良好的抗肿瘤活性。而结构相似的传统黄酮的抗肿瘤作用却很微弱[10, 11]。

从分子生物学层面的药理而言抗肿瘤药物的靶点确定并对其进行针对性的筛选是抗肿瘤药物研究过程中重要的一环，以往应用的筛选只是简单的体内瘤体抑制实验或者是体外的肿瘤细胞增殖的抑制实验，但是现在人们已经认识到比较理想的筛选系统是正对肿瘤与正常细胞中相异的基因或者蛋白为筛选对象进行筛选[12]。为此人们已经开始广泛的寻找非细胞毒类的化合物来治疗肿瘤，在这些寻找中，最值得人们关注的有如下几个方向：肿瘤的免疫治疗，肿瘤的抗血管生成治疗，血管的抗迁移治疗，肿瘤细胞的去分化治疗。上述的作用途径中的一个共同点就是特异性的抑制了肿瘤的非正常生长过程，而不是以大规模的细胞毒性杀伤为作用基础[13,14]。近些年来随着生命科学技术不断的进步，诞生了许多新的分析研究方法，也使得科学研究者可以更准确的去针对肿瘤的特殊靶点设计新的药物。同时越来越多的相关通路得到阐明是的药物开发工作者的理论依据不断的充实，使得所开发的药物远远的超过了传统的以环磷酰胺和氮芥为代表的细胞核酸毒性化合物。主要有肿瘤化学预防剂，肿瘤细胞诱导分化剂，细胞信号传导阻断剂，血管生成抑制剂等。其中以信号传导阻断剂最受人们的关注，细胞信号通路可从根本上影响细胞的宏观生物学行为，在肿瘤的形成的过程需要多个正常基因的失活或者异常活化并累计到一定程度才会发生[15]。这些异常事件所导致的下游反应就是：与正常细胞相比，往往一些通路处于异常激活，一些通路却传导受阻，同时细胞内的蛋白的时间和空间表达也发生了错乱。主要表现为以下几类（1）。增殖失控：如生长因子c-Sis和生长因子受体HER-2等均处于异常的活化状态。（2）。凋亡受阻：正常的机体清除衰老的细胞的重要机制是诱导细胞凋亡，而肿瘤细胞中多种凋亡途径受阻主要有：TNF家族，Bcl2/Bax。（3）. 老化逃遁：细胞老化是在生物体抵抗细胞永生化的重要一道屏障，细胞老化主要依靠Rb, p53这两个途径。（4）。侵袭和转移：肿瘤细胞的侵袭和转移是肿瘤细胞危害生命的关键和重要特性，在这个过程中伴生这血管新生以维持侵袭和转移所需的能

量，主要包括以下几个靶蛋白的异常表达：VEGF（血管内皮细胞生长因子）,

MMPs(基质金属蛋白酶)[16, 17]。

在这些异常活化或者抑制生长和永生化需要大量的养分来供应，因此近些年来饿死肿瘤细胞的药物开发途径要比直接大规模杀伤细胞更加受到欢迎。而且肿瘤的血管生长和肿瘤的侵袭迁的通路中，近些年来尤以血管生成和迁移方向研究最为热门[18, 19]，由于肿瘤细胞的疯狂移行为往往与其相伴相生，因此针对这两种行为的有抑制作用的药物被寄予多效应作用的希望，针对这种被视为临床治疗的难点的行为进行的药物开发广受研究者的热捧也就十分自然了[20]。

B环为非芳香环的一系列黄酮类化合物通过以往的实验已经表现出了相当好的抗肿瘤活性，如：原芹菜素，DEDC等。在本研究中针对原芹菜素为蓝本的黄酮而新开发的化合物RY10-4进行了一系列的抗肿瘤药理和药物代谢学研究[21]。由于黄酮在人们的日常饮食中广泛的存在，因此黄酮类化合物常常被认为是具有低毒性的保健类化合物。RY10-4在体外的细胞初筛中也继承了这个优点，在已有的实验中发现其对正常的造血细胞和免疫细胞的毒副作用很弱，因此可以认为其的作用机理不应该是传统的DNA，蛋白质破坏等传统细胞毒作用，而应该为一种针对性更强的作用机制[22]。为此，本实验通过评价RY10-4对于肿瘤细胞的血管生成和侵袭迁移这两种行为的影响来探究其具体抗肿瘤机制。在两个研究方向上都采用了如下的研究思路，首先，依然重复进行了MTT的细胞存活率测试，而后主要通过Transwells系统，纤粘蛋白细胞粘附系统，Matrigel体外血管模拟生成系统和斑马鱼整体模型来评价了RY10-4对血管生成和肿瘤侵袭的抑制作用。而后本实验主要采用免疫印迹和免疫荧光的方法去检测了RY10-4作用以后蛋白层面上的变化。结果显示RY10-4可以通过影响使蛋白质磷酸化失活的方式来作用于PI3K-AKT，和MAPK等多种通路，以产生抗血管生成和抗迁移的作用。遗憾的是：本课题的研究仅仅停留在蛋白水平，这种蛋白层面的变化是发生于翻译，转录亦或是翻译阶段就不得而知，同时RY10-4的多靶点的网络作用效应是通过作用于不同靶点来实现的还是通过细胞网络的交互会话来实现的并没有得到很好的阐述，留下的疑问也为下一步的实验指明了方向。

# 第一部分 RY10-4的在肿瘤细胞中的抗血管Th成作用

已有的实验结果表明，RY10-4是一种网络多靶点，且毒副作用较小的具有开发前景的抗肿瘤化合物。RY10-4与其先导化合物原芹菜素的结构类似，其区别仅在于A环的有无，针对RY10-4的弱毒性的特点，实验中采用抗血管生成途径作为其抗肿瘤药理学研究的突破口[23]，通过最初的细胞筛选发现RY10-4对乳腺癌细胞的作用最好，因此首先通过MTT法评价了RY10-4对两种人源乳腺癌细胞：MDA-MB-231, MCF-7以及人脐静脉内皮细胞的生长增殖活性。而后采用了血管生成研究中比较有代表性的3种实验方法从体内和体外两个方面考察了，三个实验分别是：人脐静脉内皮细胞的迁移与侵袭，斑马鱼血管模型整体实验。有了以上基础，最后落脚于分子生物学层面，并研究RY10-4对血管生成的核心蛋白VEGF，以及VEGF上游的通路蛋白AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR, HIF-1α的影响。

## 1. 实验材料及仪器：

### 1.1 试药的准备

RY10-3, RY10-4均由本实验室合成，其结构经由MS, 13C-NMR, 1H-NMR的确认，纯度由HPLC-UV测定大于90%，溶解于DMSO中制成浓度为1 mM的储备液，置于冰箱冷冻室中储存待用。

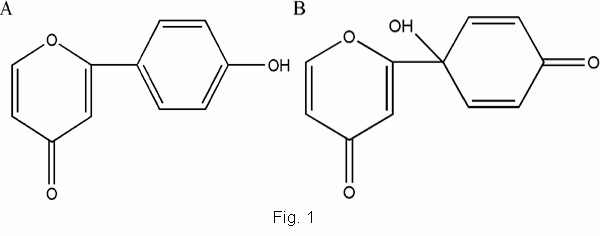


图1.1：RY10-4和RY10-3的结构图(A): RY10-3, (B): RY10-4.

### 1.2 实验材料

二甲基亚砜(DMSO)，噻唑蓝(MTT)，SU5416（血管内皮细胞生长因子抑制剂）

为Sigma公司产品。人源性乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞株由华中科技大学同济医院提供；胰蛋白酶：美国Gibco公司干粉国内分装；新生小牛血清：杭州四季青公司；DMEM培养基，M199培养基，1640培养基：美国Hyclone公司；transwell小室：美国COSTAR公司；Matrigel胶: BD science technology (USA); HIF-1a, VEGF, AKT, phosphor-AKT, mTOR, phosphor-mTOR和β-actin：均来自美国Santa Cruz公司；甲叉双丙烯酰胺，丙烯酰胺：上海化学试剂有限公司，进口分装；甘氨酸，十二烷基磺酸钠(SDS)：华美生物工程有限公司；ECL发光试剂盒：江苏碧云天生物技术研究所；聚偏氟乙烯膜(PVDF): Millipore公司(USA)；相应的二抗：KPL公司(USA)；磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾、氯化钠（分析纯）：天津科密欧化学试剂有限公司；其他试剂：均为分析纯。

### 1.3 主要设备与仪器

NMR: Bruker AV 400型核磁共振仪，TMS为内标；电子分析天平：Mettler Toledo AL104；电热恒温干燥箱(DHG-923A)：上海柏欣仪器设备厂；三用紫外分析仪(FHW-2038)：上海精科实业有限公司；旋转蒸发仪(SENCO, R系列)：上海申科科技有限公司；循环水真空泵(SHZ-D)：河南巩义英峪予华仪器厂；超声波清洗仪(SG5201HE)：昆ft超声仪器设备厂；超净工作台：苏州净化仪器设备有限公司；上海冠特超声仪器公司；电热恒温鼓风干燥箱：上海精密试验设备有限公司；CO2恒温细胞培养箱：美国Thermo Forma公司；低温冰箱：中ft美的电器有限公司，电泳及转膜装置：美国Bio-Rad公司；电蒸汽压力灭菌锅：上海三申医疗器械有限公司；低速离心机DL-5：上海金鹏分析仪器有限公司；流式细胞仪：美国Beckman公司；荧光显微镜：ECLIPSE Ti-s, Nikon, Japan；恒温水浴箱：北京恒奥德仪器有限公司；全自动X光洗片机和X光片；美国Kodak公司；移液器：丹麦KHB公司；膜针头式过滤器(millex GP, 0.22/0.45μm): Millipore公司(USA)；6孔及96孔细胞培养板：Costar公司(USA)。

## 2. 细胞的准备及增殖抑制实验

### 2.1 细胞培养及缺氧诱导

人源性乳腺癌细胞株(MCF-7)以及(MDA-MB-231)，人脐静脉内皮细胞

（HUVECs）分别培养于添加了10%胎牛血清以及100 U/ml 青霉素-链霉素的

DMEM高糖培养基，1640培养基，M199培养基中；培养条件为37°C，5% CO2，相对饱和湿度，每隔2-3天传代一次，使细胞数目保持在1×105-1×106 cells/ml左右，生长代数在30代以前，且存活率大于95%的细胞方可用于试验。缺氧培养条件为37°C, 1% O2, 5% CO2, 95% N2相对饱和湿度。

### 2.2 MTT细胞增殖实验

体外抑制肿瘤增殖实验采用四氮唑盐(MTT)还原法：待乳腺癌细胞和人脐静脉内皮细胞生长至70-80%融合度时，将其接种至96孔板内，接种密度为1105

cells/ml细胞，培养18个小时，以不同浓度(0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0µM)的RY10-4分别作用于MCF-7, MDA-MB-231和HUVECs 24小时，以不同浓度(0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0µM)的SU5416作用于HUVECs 24小时，以不同浓度(0.1,

0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0µM)的RY10-3作用于MCF-7和MDA-MB-231人源

乳腺癌细胞24小时。采用MTT细胞增殖检测法测定供试化合物对肿瘤细胞株的抑制作用。用酶标仪检测，检测波长570 nm。无药物作用的细胞组认为存活率100%。存活率=(加药组OD值/对照组OD值)100%。每组实验重复3次。

### 2.3 实验结果

从图1.2中可以看出，RY10-4对人源乳腺肿瘤细胞MCF-7和MDA-MB-231

有着明显的抑制作用，其对MCF-7和MDA-MB-231的IC50分别为0.54µM 和

0.92µM，且对HUVECs的抑制作用与一种已经进入临床研究阶段的通过抑制血管生成的抗肿瘤化合物SU5416相仿。于此同时RY10-3对于肿瘤细胞和人脐静脉内皮细胞基本没有抑制作用，从图中可以看出RY10-3对两种人源性的乳腺癌细胞和人脐静脉内皮细胞的IC50基本都大于50µM。



图1.2 RY10-3和RY10-4对MCF-7，MDA-MB-231以及HUVECs的抑制作用

（A）：梯度浓度的RY10-4对MCF-7和MDA-MB-231的抑制作用，（B）：梯度浓度的RY10-4和SU5416对HUVECs细胞的抑制作用，（C）：梯度浓度的RY10-3对MCF-7, MDA-MB-231以及HUVECs的抑制作用。以上每个实验都重复三次，以SD法算出平均值，增殖抑制百分率以空白组(0.1% DMSO)作为100%。

### 2.4 结果讨论

MTT是一种非常成熟并且十分简便的评价细胞增殖的方法，它属于光学法。其原理为在一定条件下，通过测量吸光度的数值来定量反映细胞的增殖和存活情况，MTT法是测量细胞的酶活性来定量计算细胞的数量，这种酶广泛存在于线粒体中，其活性只有当细胞处于存活状态的时候才会表现出来[24]，它可以将MTT中的tetrazolium转化为可溶性的formazon, formazon溶解于DMSO中在570 nm处有特征吸收。血管生成血管内皮细胞的持续性增殖是肿瘤血管生成的重要基础及特征，这种过程受到多种因素调控，正常组织中的血管内皮细胞的数目长期处于一个较稳定的状态，而在血管新生过程中，由于外界因子的刺激，其分裂速率和增殖速度都会大大提高，高效率的血管内皮细胞增殖是构成血管新生的重要事件之一，因此可以认为，一般具有抑制血管内皮细胞增殖作用的药物，即具有抗新生血管的生成的可能，而且很容易理解新生血管对于肿瘤组织而言是必不可少的，肿瘤组织需要从新生的血管中得到氧气，能量与养分[25, 26]。从结果中可以看出RY10-4不仅仅具有抑制人源肿瘤细胞增殖的作用，同样可以抑制人脐静脉内皮细胞的增殖，MTT的结果作为一个初步的药理筛选实验依然可以提示从抗血

管生成方面去研究该化合物抗肿瘤作用机理。

同时从图1.2中可以看到RY10-3的抗肿瘤作用十分有限，RY10-3对MDA-MB-231, MCF-7和HUVECs的IC50基本都在50µM以上，其IC50几乎十倍于RY10-4，从RY10-3和RY10-4的结构上看来，它们仅仅是B环上的结构不同，非芳香化的烯酮样的B环和芳香化的酚样B环的结构差异最先在原芹菜素和芹菜素中发现，而且原芹菜素和芹菜素的抗肿瘤活性上所表现出来的差异也证实了烯酮化的B环可以显著的增加该类化合物的抗肿瘤活性，这个结论在的实验中进一步得到了证实。酮基作为一个强烈的供电子基团，可以进行亲核攻击，因此它可以与蛋白得到更加紧密的结合，而酚羟基的亲核能力却要弱许多，而且烯酮化的B环相对于苯环而言可以进行一定程度的折叠，因此空间构象更为丰富，被认为更加的利于嵌入目标蛋白的结构结合区域内。

## 3. 细胞迁移和小管形成实验

### 3.1 实验步骤

#### 3.1.1 内皮细胞迁移实验

本实验采用transwells法来评价RY10-4和SU5416对HUVECs细胞迁移能力的影响。当HUVECs细胞长至70-80%融合度时，将其与以不同浓度0.1µM, 0.5

µM, 2.5µM的RY10-4和1µM的SU5416共培养24小时后。取200μl不同剂量组细胞移至装有8µm孔径的聚碳酸酯膜，直径为13 mm的transwell小室上室

（不含FBS, 1105 cells/室），下室加入含10% FBS的DMEM高糖培养基，作用

24 h后结晶紫染色，并对每一个剂量组取3个不同的视野拍照。

#### 3.1.2 HUVECs小管生成实验

本实验采用Matrigel基质胶模拟体外血管生成，并通过该模型来评价RY10-4和SU5416对细胞小管血管形成能力的影响。将Matrigel基质胶从冷冻室拿出于4°C下过夜，次日将Matrigel基质胶以150μL/well的量加入24孔板中，温和震荡培养板使Matrigel基质胶均匀的平铺在24孔板的底部，将其放在37°C恒温培养箱中45 min使Matrigel胶凝固，再将处于80%融合度左右的的HUVECs 细

胞悬液注入24孔板中，同时加入RY10-4和SU5416使细胞中的药液浓度分别为

0.1µM, 0.5µM, 2.5µM和1µM并设0.1% DMSO为空白对照组，在37°C, 5% CO2

的环境下培养18 h，于倒置显微镜下观察管腔生成情况，同时测量管腔长度。以形成的管腔长度来评估RY10-4和SU5416干预下HUVECs细胞的体外血管形成能力。

### 3.2 实验结果

结果显示RY10-4 对HUVECs 迁移能力的抑制为一种剂量依赖关系，当

SU5416的浓度为1µM时的抑制迁移的比率为32%，当RY10-4的浓度到达2.5

µM时，其抑制能力超过了1µM时的SU5416。

在基质胶模拟的体外血管生长中，与阴性对照相比SU5416和RY10-4都可以显著的抑制小管的生成。当RY10-4和SU5416的浓度分别到达2.5µM和1µM时，凝胶基质很难看到成规模的新生血管。结果显示RY10-4的抗血管作用虽然不及SU5416，但是依然有良好的表现。



图1.3 RY10-4和SU5416对HUVECs的迁移能力的影响，在RY10-4和SU5416

与HUVECs共培养24小时后，于显微镜下随机选取6个视野，并计数。(A): a: 空

白对照组，b: 浓度为0.1µM的RY10-4, c: 浓度为0.5µM的RY10-4, d: 浓度为5µM的RY10-4, e: 浓度为1µM的SU5416. (B): 以空白组(0.1% DMSO)为100%，计算RY10-4和SU5416对HUVECs迁移作用的抑制率。以上计数重复三次，并以SD法作出平均值(\* *P* <0.01)。



图1.4 RY10-4和SU5416对HUVECs的小管形成能力的影响，在RY10-4 和

SU5416与HUVECs共培养24小时后，于显微镜下随机选取6个视野，并对生成的小管计数。(A): a: 空白对照组，b: 浓度为0.1µM的RY10-4, c: 浓度为0.5µM的RY10-4, d: 浓度为5µM的RY10-4, e: 浓度为1µM的SU5416, (B): 以空白组(0.1% DMSO)为100%，计算RY10-4和SU5416对HUVECs小管生成作用的抑制率。以上计数重复三次，并以SD法作出平均值(\* *P* <0.01)。

### 3.3 结果讨论

经典的评价细胞迁移能力的方法为Transwell法，其外形为一个可放置在24孔板里的小杯子，杯子底部有一层膜，根据膜上面的孔径的不同3µM-12µM可以用做细胞之间物质相互影响，细胞运动，迁移，侵袭等实验，本实验中采用的是膜孔径为8µM的transwell小室来评价RY10-4和SU5416对HUVECs细胞迁移能力的影响。内皮细胞的离开原发灶，并发生迁移随血流，淋巴或其他体液向其他的地方流动并重新组成新的小血管，一直被视为肿瘤发生中血管生成的重要环节，结果显示，该化合物可以在相对低的浓度内抑制内皮细胞的迁移，至此进一步的证实了RY10-4具有抗血管生成的能力。

在进一步的实验中采用了HUVECs在BD公司的Matrigel基质胶中的生长来模拟体外血管生成的过程。当血管内皮细胞与纤维蛋白、胶原蛋白等支持物接触并作用时，血管内皮细胞才会被诱导进行分化并成熟，形成小血管，本实验所用细胞外基质(matrigel)是从EHS小鼠肉瘤中抽提得到，并可溶的基底膜抽提物，其中富含多种生长因子，细胞外基质蛋白、层黏连蛋白、胶原IV、副层连蛋白、硫酸肝素糖蛋白、TGF-β、FGF、组织纤溶酶原激活物(tPA)等，用来模拟细胞外的基质环境，发现HUVECs细胞在martrigel中培养时能够发生自由迁移并融合生成类似血管的管状结构，因此被作为检测药物抑制血管生成的常用方法之一

[27]，在培养液中加入受试药物后，可根据形成管腔的长度来反应所加药物对血

管生成的影响。HUVECs细胞经过16 h与Matrigel胶共培养后，HUVECs细胞会由其原来的多角形变为梭形，并在凝胶基质中向四周伸出触角并延伸，互相纠缠而形成管状结构，多个小管相互交错成三维空间网状结构。而当HUVECs与RY10-4和SU5416[28]共培养后由于药物对HUVECs的增殖抑制作用使得，小管形成受阻，从而导致了整体的血管形成被遏制，因此可以认为该模型可以模拟体内的血管生成过程，从而可以认定能够阻止这种体外血管生成的药物也可以在体内发挥相应的效用[29, 30]。

## 4. RY10-4对斑马鱼血管Th成的影响

### 4.1 斑马鱼的来源

野生型斑马鱼，血管荧光(VEGFR2: GFP)转基因型斑马鱼以及斑马鱼胚胎培养用水均由ft东省科学院生物研究所提供。

### 4.2 实验原理及步骤

本实验使用转基因血管荧光斑马鱼胚胎(VEGFR2: GFP)作为动物模型来评估RY10-4和SU5416对整体动物模型血管生成的抑制作用，其具体步骤如下：

#### 4.2.1 斑马鱼模型准备：

随机挑选性成熟AB品系健康的雌雄斑马鱼，将其以雄雌比为1: 1的比例用野生型和转基因型杂交混合放入产卵缸内中进行配对并产卵，然后将受精卵，用一定浓度的次氯酸钠消毒，放入培养用水中，于28°C，控光条件培养24 h，在

显微镜下仔细挑选出正常的胚胎，采用蛋白酶溶液处理2-5 min，除去外膜，用

培养水清洗胚胎清洗2-3遍后，即得实验动物模型。

#### 4.2.2 斑马鱼给药：

设定浓度为0.1µM, 0.5µM, 2.5µM的RY10-4和1µM的SU5416为给药组，

（0.1% DMSO）为对照组。随机选取上述处理好的斑马鱼胚胎实验模型，将其置入

96孔板孔细胞培养板中，每孔放入1个胚胎，加入上述浓度的待检样品溶液，

每个浓度组设5个胚胎重复，加盖封闭，于光照培养箱中恒温28°C条件下孵育

24 h，在荧光显微镜下仔细观察斑马鱼胚胎体节间血管(ISV)的生成情况同时拍照，且对ISV人工计数。

### 4.3 实验结果

结果显示，RY10-4能够抑制斑马鱼胚胎体节间血管生成。在本实验中，0.1%的DMSO和空白组无区别，可以认为0.1% DMSO的浓度对实验结果没有影响，空白组的斑马鱼血管在显微镜下清晰而明亮，正常的斑马鱼约有26根血管。当RY10-4的浓度为1µM，5µM，10µM，从图片和图表中都容易看出，斑马鱼的体间血管数目有着明显的减少，并且在高浓度中特别明显，呈一种剂量依赖关系，当RY10-4的浓度到达5µM的时候，斑马鱼的血管数目已经显著的减少，同时血管的形状也呈现出不连续的线性，由此可见血管的基本的运输血液的功能已经

基本丧失，而当SU5416和RY10-4的浓度为10µM的时候，体间的血管几乎完全被抑制，成型的血管在显微镜下已经很难被观察到。



图1.5：RY10-4和SU5416对转基因斑马鱼血管生成的影响，在RY10-4和SU5416与作用转基因斑马鱼后，于显微镜下拍照，并对体节间血管计数。(A): a：空白对照组，a`：空白对照的局部放大图，b：浓度为1µM的RY10-4, b`:1µM的RY10-4的局部放大图，c：浓度为5µM的RY10-4, c`:5µM的RY10-4的局部放大图，d：浓度为10µM的RY10-4, d`:10µM的RY10-4的局部放大图，e：浓度为10µM的SU5416 e`:10µM的SU5416d的局部放大图，（B）：以空白组（0.1%

DMSO）为100%，计算RY10-4和SU5416对斑马鱼体节间血管数的抑制率。以上计数重复三次，并以SD法作出平均值(\* *P* <0.01)。

### 4.4 结果讨论

自从1994年冷泉港的报告，以及Nature和Science等顶级杂志相继发表文章，到2009年斑马鱼的全基因组测序工作完成，斑马鱼作为一种的新型的成熟模式生物已被广泛公认并接受，与线虫、果蝇等传统模式生物相比，斑马鱼作为一种脊椎动物，其器官与人的器官在结构、生理、分子层面上都十分相似，基因组保守性与人相比很高，而在蛋白质表达水平上，关键蛋白的同源性几乎是100%。在探究生命的多种器官和系统的发育、功能和疾病的研究中都可以发现其价值。国内外采用斑马鱼以及其转基因的衍生物建立了一系列人类疾病模型，如抗新生

血管形成、血液疾病、肿瘤、细胞凋亡以及增殖、炎症等[31, 32]。

胚胎发育透明，血管发育形式较简单明朗是斑马鱼最大的特点，血管主要发生区域集中在头部和躯干部体节间，体节间的血管起源于背部的动脉萌发，而后在体节间形成，因此在显微镜下容易被观察到，被视为理想的活体血管生成模型。本实验采用了血管荧光(VEGFR2: GFP)表达的转基因斑马鱼为抗血管生成的模型，以评价RY10-4对新生血管生成的影响，结果也证实了RY10-4对于血管新生的抑制作用，同时根据文献，可以抑制血管生成的抗肿瘤药物如：SU5416亦能够显著抑制血管生成，并作为一种值得期待的化合物已经进入了临床研究阶段，所以在本实验中，SU5416被选择作为RY10-4的阳性对照药物，实验中也同时验证了它的抗血管生成作用。

通过人脐静脉内皮细胞的体外迁移实验，增殖抑制实验，小管生成实验和斑马鱼血管形成抑制实验，从各种层面评价了SU5416和RY10-4的抑制血管生成的作用，该系列实验完整的模拟了血管生成的各个过程，从血管内皮细胞的激活增殖，到血管内皮细胞发生活化并迁移，最后再体外类细胞基质中重构形成新的血管组织，这个一系列过程皆可以被RY10-4抑制，而最后的斑马鱼整体模型也验证了RY10-4的抗血管生成的能力，这些体外初步的筛选实验为后面进一步深入的机制探讨实验打下了良好的基础，也指明了下一步的研究方向。

## 5. 免疫印迹法分析RY10-4对血管Th成相关的信号通路蛋白的作用

### 5.1 溶液配制及方法

#### 5.1.1 溶液配制

##### （A) pH=7.2的PBS缓冲液：

精密称取0.2 g KCl, 0.24 g KH2PO4, 7.9 g NaCl，及1.9 g K2HPO4，溶于900 ml双蒸水中，用0.1 M的HCl调pH至7.4，用双蒸水定容至1 L. 高压灭菌后，于4°C下保存。

##### （B) 0.25%胰蛋白酶消化液：

使胰蛋白酶液浓度为0.25％，准确称取胰蛋白酶粉剂溶入灭菌好的PBS（pH=7.2）液中，混匀，于低于4°C以下过夜。次日待用时将配好的胰酶溶液在超净台内用注射滤器（0.22µM微孔滤膜）除菌过滤。而后分装成小份，于-20°C保存备用。

##### （C) 10%（W/V）过硫酸铵：

过硫酸铵提供了丙烯酰胺和亚甲丙烯酰胺聚合所必需的自由基。精密称取1 g过硫酸铵溶入10 ml的去离子水后，存于4°C。特别注意：在4°C下，10%过硫酸

胺溶液只有约2周左右的保质期，超过期限最好重新配置。

##### （D) 0.8% N, N’-亚甲丙烯酰胺溶液-30%丙烯酰胺：

将0.8克N，N'-亚甲丙烯酰胺和30克丙烯酰胺混合并溶于总体积为70 ml的水中，加热使之溶解，不要超过37°C，而后用水定容至终体积为100 ml。0.22µm微孔滤膜过滤以除菌，该溶液pH应保持在7.0以下，存于棕色瓶。注意：丙烯酰胺具有神经毒性并为疑似致癌物。

##### （E) 4×SDS电泳缓冲液：

如表1-1的方案进行配制，向其中加去离子水定容成500 ml的母液。使用前，将其稀释为1×SDS电泳缓冲液（0.38 mol/L Glycerin; 0.05 mol/L Tris base; 0.1%

SDS）。于-20°C可保存数月之久。

表 1.1 4×SDS电泳缓冲液的配制组分用 量

Tris base 12.1 g

Glycerin 57.65 g

20% SDS 10 ml

##### （F) 考马斯亮蓝G250贮备液：

精密称取考马斯亮蓝G250 50 g并稀释于25 ml 95%乙醇中，而后加50 ml 85%磷酸使之混匀，作为母液保存。

##### （G) 4×Tris·Cl/SDS（pH=6.8）溶液：

在50 ml H2O中加入6.15 g Tris碱使浓度为0.5 mol/L，同时用1 M的HCL调pH至6.8，补加H2O至终体积100 ml.0.45 um滤膜过滤，而后加入0.4 g的SDS，于4°C下可保存1月。

##### （H) 4×Tris·HCl/SDS (pH=8.8)溶液：

在40 ml H2O中加入6.05 g Tris碱(0.5 mol/L)，用1M的HCL调节pH至8.8，补加H2O至终体积为100 ml. 用0.45 um微孔滤膜过滤，再加入0.4 g SDS，于4°C可存放1月。

##### （I) 10×洗脱缓冲液（TBS）：

精密称取24.3 g Tris碱、80g NaCl溶于800 ml的去离子水中，1 M的HCL调pH

值为7.6，定容为1 L，临用前加水稀释成10倍。

##### （J) 1×转膜缓冲液（pH=8.3）：

如表2的方案配制，用去离子水定容至500 ml。

表1.2 1×转膜缓冲液的配制

组分用 量

Tris base 1.5 g

Glycin 7.2 g

Methanol 100 ml

##### （K) 封闭液（5%脱脂牛奶溶液）：

仔细称取5 g脱脂奶粉，溶于配置好的100 ml PBS缓冲液中，即配即用。

##### （L) 10×丽春红染液：

将3.0 g三氯乙酸、0.2 g丽春红、3.0 g磺基水杨酸一起溶入10×洗脱缓冲液（TBS）中，待用前用去离子水稀释10倍。

##### （M) 聚丙烯酰胺积层胶（3.9%）：

取Acry: Bis(30:0.8) 1.30 ml, 6.1 ml三蒸水、TEMED 0.01 ml, 4×TrisCl/SDS (pH=6.8) 2.5 ml, 10%过硫酸胺溶液0.05 ml，均匀混合，即配即用。

(N)细胞裂解液：

50 mM Tris/Cl(pH 6.8), 0.5% NP-40, 15 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 即配

即用。

(O)分离胶：

如表3的方案，即配即用。

丙烯酰胺百分比浓度按分离的目的蛋白质的分子量大小多少来确定，通常采用

15%浓度的凝胶分离12-45 kDa的SDS变性蛋白质分子；10%的凝胶分离16-70 kDa的SDS变性蛋白质分子；5%的凝胶则被用来分离60-200 kDa的SDS变性蛋白质分子。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂组分 |  | | | | |
|  | 5% | 8% | 10% | 12% | 15% |
| Acry:Bis (30:0.8) | 2.50 | 4.00 | 5.00 | 6.00 | 7.50 |
| 4×Tris·HCl/SDS, pH8.8 | 3.75 | 3.75 | 3.75 | 3.75 | 3.75 |
| 四蒸水 | 8.75 | 7.25 | 6.25 | 5.25 | 3.75 |
| 10%过硫酸铵 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| TEMED | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

表1.3. 聚丙烯酰胺分离胶配制

配制不同浓度分离胶所需试剂（ml）

(P) 2×SDS加样缓冲液的配制：

即配即用，按表4的方案进行，加去离子水定容至50 ml。表1.4. 2×SDS加样缓冲液的配制

组分体积（ml）

0.5M Tris·Cl (pH6.8) 12.5

20%SDS 11.5

Glycerin 10

2% Blue-Bromo-phenol 2.5

β-mercaptoethanol 5.0

### 5.2 实验方法

按文献报道Western blot方法检测VEGF, HIF-1α, AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR

蛋白表达，步骤如下：

Ⅰ细胞处理

取处于对数生长期的MDA-MB-231和MCF-7人源乳腺癌细胞，按具体实验方案做分组如下处理，实验分两组：（A） 将RY10-4在常氧状态下用下列浓度0.1µM,

0.5µM, 2.5µM作用MDA-MB-231和MCF-7细胞24小时。(B)将RY10-4在缺氧状态下用下列浓度0.1µM, 0.5µM, 2.5µM作用MDA-MB-231和MCF-7细胞

24小时。

ⅠⅠ总蛋白和亚细胞部分收集制备

收集浓度为1×106的细胞离心后弃上清，用冷的PBS洗一次，而后将细胞倒入于细胞裂解液中，冰上静置20 min，4°C条件下离心，上清液即为总蛋白。

ⅠⅠⅠ蛋白质定量

蛋白浓度测定严格按BCA试剂盒说明书所述步骤进行。

##### （A) 将其中试剂A与试剂B混匀配制成BCA工作液。

##### （B) 将BCA试剂盒中的蛋白标准品（5 mg/ml）用配置好的PBS缓冲液稀释，使

其终浓度为0.5 mg/ml。

(C)向96孔板中加入稀释后的蛋白标准品溶液，体积依次为0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20μl，而后用PBS缓冲液注入各孔，使各孔溶液最终体积达到20μl。

(D)在处理好的96孔板的孔中加入待测样品1μl，同样采用PBS缓冲液补足样品孔至终体积为20μl。

(E)向样品孔和标准品孔中加入200 μl 工作液，孵育45 min. （F）采用酶标仪在540-595 nm波长范围下检测小孔中溶液的吸光度。

（G）绘制标准曲线，根据曲线计算出各样品的蛋白浓度，用去离子水调整样品，使各个孔的蛋白浓度保持一致。

ⅠⅤ蛋白变性

将加样缓冲液与所提的蛋白质溶液涡旋，在100°C条件下变性10 min，室温冷却后，放在冰箱冷冻室中。

Ⅴ电泳

##### （A) 将两块干净的平板玻璃固定于电泳槽上，同时配制分离胶。

##### （B) 将分离胶快速注入平板玻璃的夹层中，使胶最高点距电泳槽玻璃上缘约2 cm。

##### （C) 而后从玻璃夹层中加入去离子水，静置15 min，在室温下使凝胶聚合。

##### （D) 吸去夹层中的水，凝胶残余的水分用滤纸尽量吸干。

##### （E) 将聚丙烯酰胺的积层胶从夹层上缓慢加入，使积层胶的顶部与玻璃夹层顶部等高。

##### （F) 向积层胶中插入样品梳，室温下静置30 min。

(G)两端平均用力小心的拔出梳子，采用SDS电泳缓冲液冲洗加样孔至平整。于每个孔中先加入处理好的蛋白标准品，依次向各孔中加入蛋白样品。

(H)接通电源，先将电压设置为60V，待溴酚蓝标志物泳入分离胶后，再升高电压至120V，至溴酚蓝泳动到凝胶底部后断电。

##### （I) 将凝胶夹层取出并冲洗，小心取出凝胶。

ⅤⅠ转膜（过程需低温进行以避免气泡）

1）准备工作

将PVDF膜裁剪为与所得凝胶面积相似的大小，将其浸没于去离子水中，以除去气泡，将待用的海绵及滤纸浸泡于转膜缓冲液中。

2）安装转膜装置

制备“三明治”样的转膜夹心结构（在电极板上依次放置浸泡过的海绵垫片、滤纸、凝胶、PVDF膜、滤纸及海绵垫片），用玻璃棒滚动挤压以除去其中的气泡；而后将阳性电极板连接夹心结构上，开通电源，升高电压120V，最佳转膜时间根据蛋白分子量大小来确定。

ⅤⅠⅠ染色

1）将PVDF膜小心放丽春红染色液中，可见待检的蛋白条带。

2）以去离子水冲洗PVDF膜，使得膜上的染液尽量除去，置于摇床上进行摇动洗脱。

3）依据参照蛋白以确定目的蛋白的位置。

ⅤⅠⅠⅠ封闭蛋白

PVDF膜被浸泡于封闭液中（即配即用），平置于摇床上，于4°C下过夜。

ⅠⅩ孵育一抗

把PVDF膜置于有一抗封闭液中（一抗采用封闭液进行稀释），于4°C环境下过夜。结束后采用PBS缓冲液冲洗滤膜数次。

Ⅹ孵育二抗

将PVDF膜浸没在有二抗（辣根过氧化物标记的酶联试剂）的封闭液中（二抗同样采用5%脱脂奶稀释），放在摇床上，37 °C下孵育2 h。孵育结束后，同样采用PBS缓冲液清洗滤膜数次。

ⅩⅠ显影

在暗室中将清洗后的PVDF膜放入一平皿里，将适量的ECL发光剂涂在PVDF

膜上。室温反应后（曝光情况依据实际情况调整），曝光、洗片、出片。

XI定量分析

采用AlphaEaseFC软件处理目的蛋白，蛋白条带的相对表达强度以积分光密度值

（IOD）来判断。结果以目的蛋白对比对照蛋白β-actin的积分光密度值的数值来确定。

### 5.3 实验结果



图1.6：不同浓度RY10-4(0µM, 0.1µM, 0.5µM, 2.5µM)在缺氧和常氧状态下对MCF-7 和MDA-MB-231 中(A): VEGF, HIF-1, (B): AKT, p-AKT, mTOR,

p-mTOR蛋白的抑制作用。



图1.7：不同浓度RY10-4(0µM, 0.1µM, 0.5µM, 2.5µM)在缺氧和常氧状态下对MCF-7和MDA-MB-231中VEGF蛋白表达量的影响(\* *P* <0.01)。

### 5.4 讨论

肿瘤是机体在各种致癌因素作用下，局部组织的某一个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控，导致其克隆性异常增生而形成的异常病变。由于肿瘤生长不受控制，且呈一种永生化趋势，因此其较正常细胞相比会消耗掉更多的养分，大量研究表明瘤生长及其转移灶形成必须依赖于血管发生、新血管的形成。这些血管可以为其提供了足够的养分和氧气[33]。1990年，美国哈佛大学Folkman博士提出著名的Folkman理论，即肿瘤组织生长，必须依靠新生血管生成来提供足够的氧气和营养物质来维持。被认为是通过抑制血管生成来进行抗肿瘤治疗的临床基础。目前，以VEGF为靶点，医学应用已经有了重大突破，2004年美国罗氏生产的通过抑制VEGF作用机制的肿瘤治疗药物阿瓦斯汀获得FDA的批准，该类化合物由于不以细胞毒作用为抗肿瘤治疗的基础，而是通过抑制血管特异性的血管生成过程通过体外养分供给以达到饿死肿瘤细胞的目的，因此被广泛的认为是一种弱毒性的抗肿瘤药物[34, 35]。

基于一系列的B环为非芳香环的黄酮类化合物：DEDC，原芹菜素的药理作用研究[36, 37, 38]，本实验首先考察的RY10-4对血管生成的影响，从图表均可以看出无论是在常氧或是在缺氧条件下，MCF-7和MDA-MB-231中的VEGF表达水

平在RY10-4的浓度分别为0.1µM，0.5µM，2.5µM的时候得到了一种剂量依赖关系的抑制。从表中可以看到，当RY10-4的浓度到达2.5µM时，VEGF在细胞中的表达量相对于阳线对照而言有显著的下降，平均只有空白对照的30%左右，

VEGF作为血管生长因子在血管生成中发挥着决定性的作用，该结果充分的解释了上述的表观血管抑制实验的结果[39]。

由于肿瘤细胞生长迅速且会形成致密的组织，因此肿瘤细胞内会长期处于一种低氧气浓度的状态，但是肿瘤细胞并没有因此而受到损害，其中一个原因是HIF-1生长因子的存在，HIF-1在低氧应答过程中起重要作用可以被认为是对细胞的一种保护，该因子可以诱导血管生成，并激活糖酵解，为细胞在缺氧状态下提供更多的营养和氧气。HIF-1是一种DNA结合蛋白，主要以异源二聚体的形式存在，由一个α亚基(HIF-1α)和一个β亚基(HIF-1β)组成，而HIF-1α的表达在常氧的情况下可以通过其上氨基酸氧依赖的结构域可以被控制并导致其进入降解途径[40]。现在认为其降解途径主要有两条（一）氧依赖降解结构域(ODD)的多肽片段结构中的脯氨酸残基经脯氨酸羟化酶的作用发生羟基化及由此导致的赖氨酸乙酰化，使得HIF-1泛素化并经泛素-蛋白酶途径被降解，（二）为天冬氨酸羟化酶(FIH-1)可将羧基末端转录活性区(CAD)内的天冬氨酸残基羟化，阻断转录辅助因子(p300)与CAD的结合，抑制HIF-1的转录活性。当环境中的氧含量较少时，

PHD和FIH-1的活性被抑制，从而使HIF-1降解受阻，在胞浆开始稳定，并积聚，活化，最后转移至核内，与HIF-1β结合形成稳定的HIF-1聚合分子从而使得转录活性及稳定性增强，从而促进靶基因的转录尤其是涉及血管生成，葡萄糖，铁代谢等的基因[41, 42]，从图1.6中看到当细胞处于常氧状态下时，由于HIF-1α基础表达量比较少，RY10-4对其的抑制作用很不明显，而但MCF-7和MDA-MB-231细胞处于缺氧状况下的时候，外界环境诱导使得HIF-1α降解过程受到抑制，从而导致了细胞内的HIF-1α的稳定积累，这个时候RY10-4对HIF-1的抑制作用显现的十分明显，从图1.6可以看出在高浓度下当RY10-4的浓度达到2.5µM，HIF-1α的表达量显著减少，由于HIF-1对血管生成基因转录有很大的影响，与此相呼应的是VEGF的表达量也急剧下降。可以认为RY10-4对HIF-1α和VEGF抑制作用的结果互相支持。

后续的实验考察了更上游的细胞通路，去解释RY10-4对VEGF和HIF-1的抑制作用[43]，在常氧和缺氧状态下，采用了高中低三个给药浓度（0.1µM, 0.5µM,

2.5µM），在两种细胞中分别评价了如下蛋白的表达情况：mTOR, p-mTOR, AKT, p-AKT。这两种蛋白以及其磷酸化形式对PI3K-AKT通路的激活与静默起着重要的作用[44]，磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide3-kinase, PI3K)是细胞内重要的信号传导分子，参与调节细胞的增殖、凋亡与分化等生理过程，可特异地使磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)环上的3位羟基磷酸化。Akt作为一种丝氨酸/苏氨酸激酶是PI3K-AKT下游主要的效应物，约由480个氨基酸残基组成，与蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)高度同源。而在血管生成途径中AKT的下游蛋白石mTOR。雷帕霉素哺乳动物靶点(mTOR)是一种细胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶位于多种细胞信号级联反应中的中央点。在人体内，mTOR 是一种可以帮助细胞对有利或者不利环境做出应答的分子传感器

[45,46]. 在一般情况下，mTOR充当的是诱导细胞生长和分裂的基因的主要调控因子。当机体处于饥饿状态是，mTOR会关闭合成蛋白质的大部分分子机器，以确保生物体能偶维持正常生理所需的能量，而在肿瘤组织中，这一精细平衡被打破。

mTOR蛋白出现了异常的激活，不断的发出信号促使肿瘤细胞增长，分裂及转移到新的健康组织，并诱导产生了更多的血管来为肿瘤组织提供养分[47, 48]。

从结果中可以看出，两种人源乳腺癌细胞与RY10-4给药共培养以后，尽管磷酸化mTOR和AKT与非磷酸化的mTOR和AKT下降趋势都和给药浓度密切相关，但是很容易发现，无论是在什么情况下，磷酸化的mTOR和AKT被抑制的程度都要远远大于非磷酸化的mTOR和AKT，从结果中可以看出，当RY10-4的浓度达到了2.5µM后，无论是在常氧还是在缺氧状态下，磷酸化的mTOR 和

AKT相对于空白组而言含量几乎都可以忽略不计，这点和HIF-1所表现出来的不一样，HIF-1在缺氧状况下大量表达，但是在常氧状况下却少量表达，磷酸化的mTOR和AKT在常氧和缺氧状态下都得到了充分的表达，而且都可以被RY10-4充分抑制。而这点提示了RY10-4的作用靶点不仅仅是在HIF-1而是在HIF-1上游的PI3K通路。而非磷酸化的mTOR和AKT在RY10-4给药以后下降趋势不明显，可以进一步看出RY10-4的主要抑制作用为磷酸化的mTOR和AKT。

当RY10-4的浓度到达2.5µM后，非磷酸化的mTOR和AKT的表达量相对于空白组而言仅仅有轻微的表达减少，但是正常的mTOR和AKT的下降是否是因为RY10-4的直接抑制，还是由于抑制了磷酸化的mTOR和AKT以后，非磷酸化的mTOR和AKT想起补充转化所导致。这个一点还需进一步的证明。

## 6. 统计学分析

实验均最少重复3次以上。所测定的指标采用均值加上标准差（*x*±s）的方式来表示，用SPSS14.0统计软件包进行分析。组内比较采用LSD（最小显著差法）一维单因素方差分析（one-way ANOVA），组间比较用Dunnett't检验

# 第二部分 RY10-4对于肿瘤细胞的侵袭抑制作用

肿瘤侵袭与血管生成在肿瘤发生，生长和迁移过程中都息息相关，新生血管为肿瘤的侵袭及运动提供足够的能量和养分，同时也提供了一种长距离转移的方式[49]。细胞侵袭的过程中不断的降解正常组织的细胞外基质成分，也为新生血管提供了生长空间。而在分子水平上，已有的研究表明血管生成中的关键蛋白

VEGF和肿瘤侵袭中的关键蛋白MMPs家族可以直接诱导互相促进合成，同时血管生成中的信号通路和肿瘤细胞侵袭中的信号通路可以发生大量的交互会话，互相影响[50, 51]。因此广泛的认为肿瘤细胞侵袭和血管生成是一个相辅相成的过程。在本章中同样采用人源性的易迁移的乳腺癌细胞作为细胞模型[52]，通过细胞粘附，侵袭，迁移这三个实验从宏观层面证明了RY10-4对于易转移乳腺癌侵袭过程的抑制作用，更进一步的实验采用了分子生物学手段评价了细胞外基质的和钙粘蛋白的降解过程。以及相应通路对这两种细胞外骨架的主要物质的影响。

## 1. 实验材料及仪器：

### 1.1 试药的准备

RY10-4由本实验室合成，其结构经由MS, 13C-NMR, 1H-NMR的确认，纯度由HPLC测定大于90%，配制成浓度为1 mM的储备液放在冰箱的冷冻室备用。



图2.1 RY10-4的结构图

### 1.2 实验试剂

二甲基亚砜(DMSO)，噻唑蓝(MTT)，纤维结合蛋白(fibronectin)均为Sigma

公司产品；MDA-MB-231细胞株：由华中科技大学同济医院提供；胰蛋白酶：

美国Gibco公司干粉国内分装；1640培养基：美国Hyclone公司；新生小牛血清：杭州四季青生物科技公司；NE-PER试剂盒：美国THERMO pierce公司；transwell小室：美国COSTAR公司；Matrigel胶: BD science technology(USA); p38, phosphor-p38, ERK1/2, phosphor-ERK1/2, MMP-2/9, LaminB, tublin和β-actin: 美国Santa Cruz公司；丙烯酰胺，甲叉双丙烯酰胺：上海化学试剂有限公司，进口分装；十二烷基磺酸钠(SDS): 华美生物工程有限公司；聚氟乙烯膜(PVDF)：

Millipore公司(USA)；相应二抗：KPL公司(USA)；磷酸二氢钾、氯化钠、磷酸氢二钠、氯化钾、碳酸氢钠（分析纯）：天津科密欧化学试剂有限公司；其他试剂：非特殊声明均为分析纯。

### 1.3 主要仪器与设备

NMR: Bruker AV 400型核磁共振仪，TMS为内标；电子分析天平：Mettler Toledo: AL104；紫外分析仪（ZF6）：河南巩义市英峪予华仪器厂；旋转蒸发仪

（RE-5288）：上海亚荣仪器厂；电热恒温干燥箱(DHG-912)：上海柏欣仪器设备有限公司；循环水真空泵(SHZ)：河南巩义市予华仪器厂；电热蒸汽压力锅：上海三申医疗器械公司；超声波清洗器(SG520)：昆ft超声仪器公司；超净工作台：苏州净化设备有限公司；CO2恒温细胞培养箱：美国Thermo Forma公司；大容量离心机DL系列：上海金鹏仪器有限公司；电泳装置和转膜装置：美国Bio-Rad公司；流式细胞仪：Beckman公司(USA)；荧光显微镜：ECLIPSE Ti-s, Nikon, Japan；

6孔和96孔细胞培养板：Costar公司(USA)；自动X光洗片机：美国Kodak公司；移液器：丹麦KHB公司；针头式过滤器(millex GP, 0.22/0.45μm): Millipore公司(USA)；细胞培养瓶：美国Costar公司；

## 2. 细胞培养以及核质分离

### 2.1 细胞培养

人源性乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)，培养于添加了10%胎牛血清以及100

U/ml青霉素-链霉素的1640培养基；培养条件为37°C，5% CO2，相对饱和湿度。

### 2.2 细胞核质分离

采用NE-PER试剂盒进行核质分离，按照说明书操作，取高浓度的对数期生长的细胞，胰酶消化后，收集细胞，用PBS清洗2遍，而后加入相当于所收集细胞10倍体积的细胞质蛋白抽提试剂A，涡旋仪涡旋5 s，使得细胞沉淀完全在

溶液中悬浮并分散开，而后冰上静置10-15 min，加入约细胞总体积一半的细胞质蛋白抽提试剂B，涡旋5s，于冰上静置5 min，涡旋仪涡旋5s，在40°C环境下12000 g/min离心5 min，立即小心吸取上清，抽提得到的即为细胞质蛋白，待所需上清完全收集后，尽量吸尽残余上清，细胞核蛋白抽提试剂B向向残余的细胞沉淀以2.5倍体积的量加入，涡旋15-30 s，把细胞沉淀完全悬浮并分散开，

然后放回冰浴中，每隔1-2 min高速剧烈涡旋15-30 s，共30 min，而后在40°C

环境以15000 g/min的转速离心10 min，立即吸取上清，抽提得到的即为细胞核蛋白。

## 3. 细胞粘附实验

### 3.1 实验方法

本细胞粘附实验采用纤维连接蛋白作为肿瘤细胞的粘附诱导剂，在96孔板的小孔底部铺上一层fibronectin 过夜。然后用含0.5%血清的PBS 封闭

fibronectin30分钟。MDA-MB-231细胞被消化并制成细胞浓度为5\*105 cells/ml的无血清的细胞悬液。并用不同浓度的RY10-4 (0、0.1、0.5、2.5µM)共培养24 h。而后吸取100µL细胞悬液加入fibronectin处理好的96孔板中，并在37°C下培养40分钟。而后小心的吸出培养基，每一个孔用PBS清洗三次，粘附在fibronectin的细胞采用MTT法计数。

### 3.2 实验结果

如图2.2，从结果中可以发现，RY10-4可以有效的抑制MDA-MB-231向纤粘蛋白的粘附作用。当RY10-4的浓度达到0.5和2.5µM时，相对于空白组而言，其对应的MDA-MB-231的粘附抑制率为75%和32%。由于迁移，侵袭，再粘附为一个有机的整体过程，在后续的实验中进一步考察了肿瘤侵袭中的运动能力和对细胞外基质的降解能力。



图2.2 RY10-4对有纤粘蛋白所致的细胞粘附的影响(\* *P* <0.01)

### 3.3 实验讨论

纤维连接蛋白（fibronectin缩写FN）是一种高分子糖蛋白，具有多种生物学功能。FN广泛存在于动物组织和组织液中，是一种大分子糖蛋白，分子量约为

450KD，具有广泛的生物学活性。很多研究结果表明，FN分子在进化过程中保守性很强，各种动物体液中的FN具有非常相近的结构、性质和生物学功能，因而不同来源的FN可以相互替代使用。在FN的众多功能中，最基本最重要的一项是促进细胞的黏连生长，而细胞的黏连是机体结构得以维持、细胞生长完成的必要条件[53]，因此在本实验中采用fibronectin作为MDA-MB-231的粘附趋化因子。

肿瘤细胞对于新组织的亲和能力在肿瘤转移中是一个重大事件，这种粘附过程从肿瘤发生开始一直持续到肿瘤最后再转移灶的再粘附，肿瘤细胞从原发灶脱落后必须通过粘附的过程粘附与淋巴组织或者血管上，并侵袭穿透血管发生再迁移[54, 55]。从结果中可以发现：当RY10-4和MDA-MB-231共培养后，从结果中可以发现，RY10-4可以有效的抑制MDA-MB-231向纤粘蛋白的粘附作用。因此通过以上实验可以认为：在肿瘤侵袭中的起始阶段的粘附和最终在粘附与转移灶上的行为均可以被RY10-4所抑制，这种粘附作用的削弱最终导致的结果即：使得肿瘤的整个转移过程被抑制。

## 4. 体外迁移与侵袭实验

### 4.1 实验方法

本实验采用transwells法来评价RY10-4对MDA-MB-231细胞迁移与侵袭能力的影响。将matrigel胶从-20°C拿到4°C过夜使其溶解，而后在transwell板的每孔上室中加入100µL的matrigel，并与37°C中固化作侵袭实验用，当MDA-MB-231细胞长至70-80%融合度时，将其与以不同浓度0.1µM, 0.5µM, 2.5

µM的RY10-4共培养24小时后。取200μl不同剂量组细胞移至装有8µm孔径的聚碳酸酯膜，直径为13 mm的transwell小室上室（不含FBS，1105/室），下室加入含10% FBS的DMEM高糖培养基，在transwell小室中有无matrigel胶的存在作为区分迁移与侵袭实验的标志，作用24 h后用浓度为0.5%结晶紫染色，并对每一个剂量组随即取3个不同的视野拍照并计数。

### 4.2 实验结果

RY10-4对于MDA-MB-231细胞的迁徙和侵袭的抑制作用如图2.3, 2.4所示，不论是从图片还是柱状图都可以容易发现当MDA-MB-231细胞与RY10-4共培养后，穿过聚碳酸酯膜的细胞数量都急剧减少，尤其是在迁移实验中，RY10-4的高浓度组的迁徙抑制作用超过了60%，且从图片中可以很容易的看出高浓度组的细胞数量明显减少。同样的情况也发生在侵袭实验中，由于Matrigel胶的存在，因此穿过聚碳酸酯膜的细胞并没有迁移组中那么多，但是当RY10-4采用高浓度给药时穿过聚碳酸酯膜的细胞也明显减少，从图表中可以得出RY10-4对该细胞的侵袭行为可以抑制的结论，由此我们可以断定RY10-4同样也可以作用于人源肿瘤细胞MDA-MB-231的迁移与侵袭环节。



图2.3 RY10-4对于MDA-MB-231的迁移抑制作用。（A）：a, RY10-4 0µM(0.1% DMSO) b, RY10-4 0.1µM c, RY10-4 0.5µM d, RY10-40 2.5µM（B）：以空白对照

为100%，计算出不同浓度的RY10-4作用后对于MDA-MB-231的迁移抑制百分比(\* *P* <0.01)。



图2.4 RY10-4 对于MDA-MB-231 细胞的侵袭抑制作用。（A）：a, RY10-4 0

µM(0.1% DMSO) b, RY10-4 0.1µM c, RY10-4 0.5µM d, RY10-40 2.5µM（B）：以

空白对照为100%，计算出不同浓度的RY10-4作用后对于MDA-MB-231的侵袭抑制百分比(\* *P* <0.01)。

### 4.3 实验讨论

实验采用了孔径为8µm transwells系统来评价RY10-4对MDA-MB-231细胞的的迁移以及侵袭能力的影响，本实验中采用孔径为8µm的聚碳酸酯膜来进行迁徙能力的评价，不同孔径的聚碳酸酯膜可以用来做不同的实验，本实验中采用较普通细胞尺寸较大的孔径的碳酸酯膜，使得肿瘤细胞在上层的饥饿条件以及下层的血清诱导的情况下穿过碳酸酯膜并发生迁移。同时也可以采用这个系统通过在transwells的上室铺上matrigel胶来模拟细胞外基质以达到评价肿瘤细胞侵袭的能力。Matrigel是从EHS（Engelbreth-Holm-Swarm）小鼠肉瘤得到的可溶性的基底膜类似物，此种肉瘤富含细胞外基质蛋白，主要由层粘连蛋白，Ⅳ型胶原，巢蛋白，硫酸肝素糖蛋白等组成，还包含生长因子和基质金属蛋白酶等，在室温下，此Matrigel Matrix可聚合成一种具有生物活性的三维基质材料，作用与哺乳动物细胞基底膜类似。可以用来模拟体内细胞基底膜的结构、组成、物理特性和功能，有利于体外细胞的培养和分化，以及对细胞形态、生化功能、迁移、侵染和基因表达的研究[56]。在本实验中Matrigel主要被用来模拟肿瘤细胞侵袭的过程。

结果显示，相较于空白对照组(0.1% DMSO)在低浓度下RY10-4对MDA-MB-231的迁移和侵袭的抑制作用并不明显，但是高浓度的RY10-4可以有效的抑制这种转移性乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。结果如图2.4所示，RY10-4不仅仅可以抑制肿瘤细胞的运动能力，更可以抑制MDA-MB-231对细胞外基质的降解，细胞外基质是由胶原，层粘蛋白和纤粘蛋白组成，从这种表观实验的结果可以产生如下推断：RY10-4必定阻断了MDA-MB-231产生的某些可以降解细胞外基质的物质，这也为下一步的实验指明了方向。

最初评价肿瘤转移采用的划痕法，即在种满细胞的培养皿上面画一道痕迹，完全除去其中的细胞，使其成为培养皿中的一个无细胞的空白地带，而后通过观察划痕周边的细胞向划痕中转移的个数来评价细胞迁移的能力，该方法不能够有效的判断划痕中的细胞是由于细胞迁移所致还是由于细胞生长所致，后来改进的划痕法，将丝裂霉素于划痕前一小时添加于所培养的细胞中，以抑制细胞的增殖，但是丝裂霉素本身的价格较昂贵，使得划痕法的实验成本低的优势不复存在。而且该实验需要细胞对无血清有较强的忍受力（至少24小时），因此很多肿瘤细胞

系是不适合做划痕的，很多肿瘤细胞系在无血清培养下，12小时细胞凋亡率迅速上升。因此该方法在肿瘤细胞迁移研究就进一步得到了限制，因此后来研究并诞生了transwells法，该方法通过一层8µM的聚碳酸脂的阻隔可以有效的减少细胞正常增殖所带来的误判，而且该方法更加的适合肿瘤细胞。在该实验中可以认为穿过碳酸脂膜的细胞皆为细胞的迁移活动所致[57, 58]。

## 5. E-Cadherin和β-catenin的免疫荧光分析

### 5.1 实验方法

在于不同浓度的RY10-4(0、0.1、0.5、2.5µM)共培养24 h后，到掉细胞培养液，PBS冲洗三次；用2-4%甲醛固定15分钟；然后1×PBS缓冲液（0.01 M，

pH=7.4）洗涤3次，每次5分钟；滴加非免疫ft羊血清（内含0.3% Triton X-100）

封闭液，覆盖液面2-3 mm,室温放置60 min，甩去多余液体。滴加不同种属的一抗ant-E-cadherin和β-catenin各50μL(1:200)，4°C过夜。PBS洗3次，每次5分钟；滴加荧光标记的上述二抗donkey anti-rabbit-FITC和donkey anti-rat-Tex-Red各50μL（1:200），室温60分钟；PBS洗3次各5 min；荧光显微镜下观察，拍

照，每指标照相5张左右。

### 5.2 实验结果

如图2.5所示，RY10-4可以显著的增加E-cadherin的表达，同时β-catenin在细胞内的表达量总量并没有太大的变化，而后对这两种蛋白进行了免疫印迹的实验实验结果进一步的解释了β-catenin的表达变化情况，具体表现为核内的β-catenin减少，而细胞质的β-catenin含量增加，同时E-cadherin的表达量也增加这与免疫印迹的结果十分吻合，当RY10-4的浓度到达高浓度状态的时候，从免疫荧光和免疫印迹的结果都可以很容易的看出，E-cadherin的表达量显著增高。同时β-catenin重新分布的趋势也更加明显。



图2.5 RY10-4对E-钙粘着蛋白和环粘蛋白的影响，：a, RY10-4 0µM(0.1% DMSO), b, RY10-4 0.1µM, c, RY10-4 0.5µM, d, RY10-40 2.5µM.

### 5.3 结果讨论

E-cadherin和β-catenin所致细胞间粘附

钙粘着蛋白家族作为一类钙离子依赖的粘附因子，主要为单链跨膜糖蛋白，主要参与并介导特定组织或器官的同型细胞间粘附。根据其在不同组织分布的位置分布，通常将其分为如下四个大类：（1）。E-钙粘着蛋白(E-Cadherin, E-CD)：主要分布于内皮细胞上。（2）。P-钙粘着蛋白：主要存在于胎盘组织。（3）。L-钙粘着蛋白：主要分布于肝脏。（4）。N-钙粘着蛋白：主要分布于神经组织[59, 60]。

E-钙粘着蛋白的表达主要产生以下两方面的作用，（1）：其表达可以增强细胞的极性，有利于维持细胞形态。（2）：其更主要的作用表现在可以减少细胞发生上皮-间充质转移(EMT)，加强与细胞内的β-catenin的连接，从而阻止肿瘤转移

[61]. 在本实验中，E-钙粘着蛋白的范围和数量上的表达增加可以从免疫荧光和免

疫印迹的结果得出。从图2.5中可以看出，在空白对照组中(0.1% DMSO)基本上很难看到E-钙粘着蛋白细胞内的表达，但当MDA-MB-231在高浓度的RY10-4的刺激以后，可以看出E-钙粘着蛋白的表达量显著的增加了。这可以解释为该

化合物的一种抑制肿瘤生长的途径。

此外由于β-catenin和E-钙粘着蛋白常常作为一个细胞间连接的整体存在[62]，随后考察了β-catenin的数量和空间的表达，通过采用核质分离试剂盒，分别提取了细胞核和细胞质中的β-catenin并进行了免疫印迹分析以及免疫荧光的实验。实验结果显示：β-catenin在细胞质中的表达增加，而在细胞核中的表达量减少，而总β-catenin的表达量并没有明显的变化，由此可以得出在RY10-4的影响下，β-catenin多表达于细胞质，而少表达于细胞核[63]，但是β-catenin本身是可以通过磷酸化而导致泛素化降解的，RY10-4是阻断了β-catenin的表达亦或是导致了β-catenin在不同细胞器中的选择性降解，仍有待于进一步的研究。

此外β-catenin的表达量和表达范围的变化不仅仅局限于对细胞间粘附的稳固，还会影响到Wnt通路。Wnt得名于Wg(wingless)与Int. wingless基因最早被发现与果蝇中并作用于其胚胎发育，而int基因则最早在脊椎动物中发现，尽管发生效应的强度以及Wnt的配体因机体自身而异，但是信号通路许多组分，从线虫到人类都具有很高的同源性。通过蛋白质的同源性提示，可以认为多种各异的Wnt配体源自于各种生物的同一祖先[64]。

一般经典的Wnt信号传导途径及其配体如下所示：Wnt蛋白通过旁分泌或自分泌的方式与细胞膜表面特异性受体卷曲蛋白(frizzled, Fz)结合，通过其下游一系列作用元件产生级联效应[65]，这些作用元件包括散乱蛋白（Dishevelled, Dsh 或

Dvl），糖原合成酶激酶3(glycogen synthase kinase 3, GSK3)，大肠腺瘤样息肉蛋白(adenoatous polyposis coli, APC)、轴蛋白(Axin)等，最终使β-catenin蛋白游离，并进入细胞核中与TCF/LEF(T cell factor/lymphoid enhancer factor)转录因子家族成员结合以促进相应靶基因的转录，来完成整个Wnt信号的传递。因此广泛认为：该途径的关键调控点是β-catenin蛋白在该信号传导途径中从胞内传递到核内的过程[66, 67]。

在已知的许多人源恶性肿瘤中，都发现参与调节β-catenin转化过程中各种因子的异常以及β-catenin自身N末端的突变，而这些都会影响β-catenin的降解过程和细胞内的分布，导致了β-catenin 在细胞中的非正常累积[68, 69]。最终导致

β-catenin在细胞核内的聚集，引起目的基因如LEF/TCF家族异常的持续激活[70]。在RY10-4的作用下，通过免疫荧光和免疫印迹的结果都可以发现β-catenin总体含量虽然没有发生什么变化，但是核内的β-catenin含量明显的减少，而胞内的β-catenin则增加了，总而言之，这些表达量和表达位置的发生了有利于机体的变化，而这些变化导致的Wnt通路产生的效应可以为该化合物的抗肿瘤机理做出一个新解释[71, 72]。

## 6. RY10-4对Wnt及MAPK信号通路相关蛋白的免疫印迹分析

### 6.1 实验方法

不同浓度的RY10-4(0、0.1、0.5、2.5µM)与MDA-MB-231细胞共培养24 h后，收集细胞。提取细胞总蛋白，进行SDS-PAGE电泳。考马斯亮蓝染胶均参照第一部分中6.1方法部分。而后将凝胶上的蛋白质转至PVDF膜上。而后丽春红s染膜、5%脱脂奶粉封闭l h，一抗37°C孵育l.5 h, TBST洗膜，辣根过氧化物酶标记的二抗37°C孵育1.5 h, TBST洗膜至干净，ECL显色。Wnt通路相关蛋白采用E-cadherin和β-catenin为探针，同时在进行胞内与核内蛋白分析的时候分别采用LaminB和tublin为相应的内参；而在考察MAPK通路的时候采用如下一抗：MMP2, MMP9, P38, p-P38, ERK1/2, p-ERK1/2。β-actin为内参，二抗为抗兔的相应二抗，稀释比例为1: 3000。

### 6.2 实验结果

如图2.6所示，当不同浓度(0, 0.1, 0.5, 2.5µM)的RY10-4作用于MDA-MB-231后，环粘蛋白的表达总量基本保持不变，但是通过核质分离后评价细胞不同部位的蛋白表达可以发现环粘蛋白在细胞质中的表达量显著上升，而在细胞核中的表达量却显著下降。同时E-cadherin的表达量却随药物作用的浓度上升明显。同时发现MMP-2/9的表达量也减少，并呈明显的药物剂量依赖关系。同时影响MMP-2/9表达的上游通路MAPK上的关键蛋白的磷酸化激活也被抑制。



图2.6. 不同浓度(0、0.1、0.5、2.5µM) RY10-4对MDA-MB-231细胞中的E-cadherin和β-catenin的表达量以及分布表达的影响，并用不同浓度下E-cadherin和β-catenin的最大表达量作为100%，考察RY10-4作用后对于不同蛋白的抑制百分率。采用β-actin为内参(\* *P* <0.01)。



图2.7。 不同浓度(0、0.1、0.5、2.5

µM）RY10-4对MDA-MB-231细胞

中的MMP-2/9以及MAPK通路上的关键蛋白以及其磷酸化形式的的影响，采用β-actin为内参。

### 6.3 结果讨论

RY10-4对MMP-2/9及其MAPK通路的影响

细胞外基质(ECM)作为一种维持细胞正常形态，保持细胞间的正常接触的重要物质广泛分布于细胞中。在大多数细胞中的ECM组成主要包括了以下几个大类1：蛋白聚糖(proteoglycan)和糖胺聚糖(glycosaminoglycans)，它们可以互相交错并形成水样的胶状物，其中可包埋其它的基质成分；2：结构蛋白，如胶原和弹性蛋白，他们共同维持着细胞外基质一定的强度和韧性；3：粘着蛋白(adhesive)，又称之为纤维连接蛋白、纤粘蛋白。就整体而言，胶原和蛋白聚糖在细胞表面形成纤维网状结构的基本骨架，复合物通过层粘连蛋白或纤粘连蛋白与细胞表面相应的受体附着并连接。由于大多数受体是跨膜整合蛋白，并在细胞内与细胞骨架蛋白相连，这样一来就使得连续的组合使细胞外基质和细胞内骨架形成一个有机的整体[73]。目前恶性肿瘤的侵蚀和转移广泛被认为是一个动态、连续的过程。如果肿瘤丧失转移的能力，其将被迅速的治愈。首先肿瘤细胞从原发部位脱落，侵入到细胞外基质，和基底膜(basement membrane)与细胞间质中一些分子粘附，诱导激活细胞合成并分泌各种降解酶类，使得肿瘤细胞穿过细胞外基质所构成的屏障并进入血管，然后在不同因素的诱导下，穿越血管壁并渗到其他部位，继而发生增殖、并形成转移灶，使人体进入一个恶性循环，总之，脱落、粘附、移动，在粘附和增生持续存在于恶性肿瘤侵蚀和转移的全过程。降解细胞外基质作为些过程的起始阶段在肿瘤转移中扮演者决定性的角色，对人类的生命构成了巨大的威胁[74]。

一般认为恶性程度高的肿瘤细胞与其细胞外基质破坏促进转移的能力密切相关。目前认为比较重要的酶主要为以下几种：丝氨酸蛋白酶类，如基质金属蛋白酶(metalproteinase, MMP)类和纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)，透明质酸酶、胶原酶IV、基质降解酶。基质金属蛋白酶(MMPs)对细胞外基质的降解可以认为是肿瘤细胞侵袭和转移的关键因素，在多种恶性肿瘤均可见MMPs表达水平的增高[75]。

从免疫印迹的结果可以看出当MDA-MB-231与RY10-4共培养后，MMP-2/9

的表达量显著下降，MMP-2/9作为一种细胞外基质蛋白的主要降解酶，其表达量的减少会导致细胞对基质的降解能力减弱[76]，这个结果和transwells的结果十分吻合，尤其是在高浓度组中可以看到MMP-2/9下降的趋势十分明显，相对于空白对照组而言表达量可以下降90%左右。后续的实验的目标为MMP的上游信号通路：MAPK.

细胞外信号调节激酶ERK/丝裂原活化蛋白激酶MAPK和在真核生物中高度保守的激酶家族p38丝裂原蛋白激酶家族在细胞应激反应中起着极其重要的作用[77]。几乎所有不良的的外部刺激和内部变化均可以激活所有类型细胞中的p38信号通路，而是ERK/MAPK超家族中最早鉴定出的亚通路，他们通过瀑布样磷酸化级联反应将细胞外刺激转导至细胞内相应调节靶蛋白，参与调节细胞的存活，增殖，组织侵袭与肿瘤的发生，发展，转移[78]。

磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)通路常被发现在肿瘤患者中被异常激活[79, 80]，它在肿瘤的发展和对抗肿瘤药物（主要为细胞毒类化疗药）耐药方面发挥了重要的作用。该通路的主要分子畸变有以下几种，其中包括基因异常的突变和扩增如AKT的激活，以及负调控因素功能丧失：如PTEN基因的失活[79]。Akt可以通过磷酸化而激活从而激活或抑制其下游靶蛋白如Bad、Caspase9、NF-κB、mTOR、Par-4、

P21等，而激活胰岛素和多种生长因子以促使细胞生长，通过多种途径促进细胞存活，是重要的抗凋亡调节因子。PI3K通路抑制剂仍处于临床研发早期阶段，它们包括：（a）单纯PI3K抑制剂；（b）双靶点PI3K/mTOR抑制剂；(c) AKT抑制剂；

（d）mTOR复合物抑制剂；(e) PI3K亚型特异性抑制剂[81, 82]。

由于MAPK这个通路对MMPs有着重要的作用[83, 84]，因此本实验对MAPK

这个通路上的相关蛋白进行了分析，结果显示以上两个通路的关键蛋白P38，

ERK1/2的含量基本没有什么变化，而他们的磷酸化形式p-P38, p-ERK1/2的表达量却呈现出了不同形式下降趋势。由于通过蛋白质激酶催化的把ATP或GTPγ位的磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基（丝氨酸、苏氨酸）上的是生物体内一种普通的调节方式，因此有理由相应RY10-4作用以后蛋白磷酸化水平降低，PI3K-AKT以及MAPK通路的活性下降，从图2.7可以看出在中低浓度的作用下

磷酸化的和非磷酸化的蛋白表达量下降都不明显，当RY10-4的浓度达到2.5µM，所检测蛋白的磷酸化形式的表达量都明显下降，尤其是p-ERK1/2的表达量下降最为明显，这提示该化合物可能是通过抑制以上蛋白的磷酸化激活来影响整个通路，进而调节MMP-2/9的表达，发挥抗肿瘤细胞侵袭的作用。结合RY10-4对肿瘤细胞血管生成抑制作用的研究，现在可以基本确定该化合可以作用于肿瘤细胞的MAPK和P13K-AKT两条通路来发挥抑制肿瘤生长的作用。

## 7. 统计性分析

实验均重复3次以上。所有的测定指标采用均值加减标准差（*x*±s）的方式表示，用SPSS 13.0统计软件包进行分析。组内比较采用LSD（最小显著差法）一维单因素方差分析（one-way ANOVA），组间比较用Dunnett't检验

# 第三部分 RY10-4的检测方法学和初步药代研究

## 1. 仪器与试剂

### 1.1 实验试剂

RY10-4(纯度> 90%)，为本实验室自制，分析纯甲醇（国药化学试剂有限公司）被用于样品溶液的制备；乙腈（天津市科密欧化学试剂有限公司）和甲醇（天津市科密欧化学试剂有限公司）为色谱纯；磷酸（上海试剂有限公司）为分析纯；双蒸水用于整个实验。其他试剂除特殊说明皆为国药化学试剂有限公司生产的分析纯。

### 1.2 实验仪器

HITACHI高效液相色谱仪(Hitachi, Hitachi High-Technological Corporation, Tokyo, Japan)配备有UV detector L-2400, Pump L-2130, 20µL进样环，TO-2A型柱温箱（日本岛津）和T2000P色谱工作站。TU-1900紫外可见分光广度计（北京普析通用仪器有限责任公司）用于分析对象最大吸收波长的扫描。Delta 320酸度计(Mettler Toledo Instruments Co. Ltd., Shanghai, China)用于流动相酸度的控制。

## 2. UV检测波长的确定

取少许RY10-4用适量的甲醇溶解定量稀释制成15.0μg・mL-1的对照品溶液。以甲醇为空白对照溶剂，将对照品溶液在200~600 nm波长范围内进行扫描。可以看出RY10-4在200-600 nm间有2个最大吸收峰，分别为242 nm和365 nm。



图3.1 RY10-4 200-400nm波长紫外扫描图。

## 3. HPLC-UV检测条件的确定及方法学

### 3.1 HPLC-UV的检测条件确定

色谱柱：Hypersil ODS-C18(4.6 mm×250 mm, 5μm)

流动相：甲醇：0.2%磷酸水＝60: 40检测波长：242 nm

柱温：30°C

流速：1.0 mL·min-1

理论塔板数按图计算，n=5.54×(tR/W1/2) 2。规定RY10-4的理论塔板数不得低于

2000.

### 3.2 专属性实验

分别精密吸取供试品溶液20μL，按“3.1”项下色谱条件进样分析，保留时间

为17.2 min左右，RY10-4理论塔板数计算为> 3000，分离度大于1.6，对称性良好，基线平稳，无其它干扰物质存在。因此可以认为该条件可以作为RY10-4的HPLC-UV检测方法。如图3.2所示。



图3.2. RY10-4的专属性结果

### 3.3 线性关系试验

精密称取RY10-4 10.00 mg，加流动相溶解于10 ml的容量瓶中为1 mg·mL-1

母液。精密量取贮备液适量，以流动相分别稀释至浓度为0.1, 0.5, 1, 5, 8, 10.00,

20.00μg・mL-1的溶液，各进样20μL，记录峰面积，线性关系试验结果见表3.1。表3.1. RY10-4含量测定线性关系试验结果

|  |  |
| --- | --- |
| 浓度 C（μg·mL-1） | 峰面积（A） |
| 0.1 | 6607 |
| 0.5 | 34249 |
| 1 | 61276 |
| 5 | 332992 |
| 8 | 549976 |
| 10.00 | 686824 |
| 20.00 | 1342912 |

以浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，求得回归方程为：A=67500C+616.78，

r＝0.9998。结果表明，在0.1-20.00μg・mL-1浓度范围内RY10-4的含量与峰面积呈良好的线性关系。

### 3.4 精密度试验

取上述25.00μg・mL-1的RY10-4标准溶液，按照上述色谱条件连续进样6次，每次20μL，记录峰面积，作为日内精密度，并于一周内隔日进样每次20μL，记录峰面积，作为日间精密度，其结果分别见表3.2，表3.3。

表3.2. 日内精密度试验结果(n＝6)

No. 1 2 3 4 5 6 平均值 RSD(%)

峰面积1473416 1425352 1431436 1425369 1454587 1424568 1439121 1.41

表3.3. 日间精密度试验结果(n=6)

No. 1 2 3 4 平均值 RSD(%)

峰面积1458944 1528625 1425687 1415965 1457305 3.49

结果表明该方法下的日间和日内精密度均小于5%，说明该方法有着良好的重现性。

### 3.5 稳定性试验

将前述浓度为25.00μg·mL-1的RY10-4标准溶液于室温下放置，分别在以下时间点进样0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h。

表3.4. RY10-4稳定性考察试验结果(n＝6)

时间点0 h 2 h 4 h 8 h 12 h 24 h 平均值 RSD(%)

峰面积1423416 1425352 1431436 1425369 1424587 1424568 1442163 1.67

由表3.4可知，所配制的RY10-4溶液在24 h内峰面积平均值为1442163，

RSD为1.67%。结果表明，RY10-4在溶液稳定性良好。

### 3.6 最低检测限和最低检测量

将25.00μg・mL-1的RY10-4标准溶液按照一定的倍比关系稀释，认为当目标峰与基线的信噪比S/N=3时的浓度为RY10-4的最低检测限，认为当目标峰与基线的信噪比S/N=10时的浓度为RY10-4的最低检测限[85]。结果显示RY10-4的最低检测限LOD<10 ng，而最低检测量LOQ<50 ng，因此可以认为RY10-4在该条件下容易被检出，该方法的灵敏度良好，最低检测限和最低检测量均符合进一步实验的要求。

### 3.7 结果与讨论

本实验建立了一种甲醇：0.2%磷酸水=60: 40，检测波长为280 nm的HPLC-UV方法来检测RY10-4，结果显示该方法有很强的专属性，峰型良好，无前沿或拖尾，对称性良好。且该检测方法精密度良好，在0μg・mL-1-20.00μg・mL-1线性关系良好，且最低检测限和最低检测量均达到标准。

#### 3.7.1 流动相组成对RY10-4检测的影响

首先考察了不同流动相组成对于RY10-4保留时间的影响，实验首先采用了最基本的甲醇-水和乙腈-水体系，这个两种体系均可以将RY10-4与其他物质分别出来，但是在这两种体系中的RY10-4的峰型不好，具体表现为RY10-4的主峰对称性不好，有拖尾现象的存在，并且重现性不好，为此首先调节了流动相的

PH值，采用0.1%磷酸-水和0.1%乙酸铵-水分别进行酸碱的调节。在加入了0.1%乙酸铵-水后发现RY10-4的峰型不好情况进一步的加重，而且在RY10-4出峰点附近的基线变得不稳。这个可能和RY10-4中的酚羟基在碱性溶液中更加的溶液解离，形成了其他的副产物所导致。当加入0.1%磷酸-水后，由于溶液中的氢离子的浓度增加，抑制的RY10-4的酚羟基的解离，使得RY10-4在溶液中的解离状态减少。在通常情况下，甲醇-水溶液体系构成的流动相即可满足多数样品的分离要求，且甲醇-水体系粘度小，成本低。总所周知，流动相组成对RY10-4的决定着保留时，随着流动相中有机相含量的增加，RY10-4的保留时间缩短。为此，分别考察了不同比例的（55:45,60:40,70:30,75:25）甲醇-0.2%磷酸水，乙腈-0.2%磷酸水时的RY10-4的保留时间，其结果表明：当甲醇-0.2%磷酸水=60: 40

时，保留时间适中(16 min左右)，且可以达到基线分离[86]。

#### 3.7.2 柱温对RY10-4检测的影响

色谱柱温度在色谱分析中起了一个不可忽视的作用，通常而言，温度升高有利于低流动相粘度的降低，减小系统负荷，降低柱压，提高分离效率。一般而言大家倾向于较高的色谱柱温度，实验初步采用了15°C, 20°C, 30°C不同温度，实验结果表明，温度对RY10-4分离的影响显著，保留时间影响较大。低温时色谱峰较宽，随着柱温的升高，色谱峰逐渐变窄，峰型变尖锐，柱效增强。但由于过高的柱温会减少色谱柱的使用寿命，在满足色谱系统适用性实验条件的情况下，实验选择25°C作为分析时的温度条件。

## 4. RY10-4的在大鼠体内药物代谢学初步研究

### 4.1 药品与试剂

#### 4.1.1 实验试剂见第三部分1.1

#### 4.1.2 对照品溶液的制备

精密称取10 mg的RY10-4，先用少量的DMSO溶解后再用纯净水配制成1 mg·mL-1的母液。置于-20°C环境下，备用。

### 4.2 动物

SD大鼠，体重200±10g，雌雄各半，由华中科技大学同济医学院实验动物学中心提供。

### 4.3 生物样品处理

#### 4.3.1 色谱条件

色谱柱：Lichrospher C18 (5μm, 4.6×250 mm)；流动相为甲醇:0.2%磷酸水溶液=60:40 (v/v)；流速：1.0 ml·min-1；柱温：25°C；测定波长：248 nm；进样量：20μL。

#### 4.3.2 对照品生物样品的制备

取一定量均匀混合后的空白血浆和组织匀浆液，向其中加入不同体积的RY10-4储备液，配制成RY10-4的终浓度为0、0.25、0.5、2.5、5.0、10.0、20.0μg・mL-1 的对照品生物样品，待检。

#### 4.3.3 血浆样品的处理

精密吸取血浆100μL于1 mL的EP管中，加入200μL 50%磷酸和300μL

乙酸乙酯，涡旋2分钟后静置5分钟，取上清液200μL，继续加入乙酸乙酯200

μL，涡旋2分钟，静置5分钟，取上层清液200μL，再重复该操作1次，将总共收集到的600μL乙酸乙酯上清液置于EP管内，在60°C水浴锅中蒸干，而后向该EP管中加入100μL甲醇，涡旋2分钟，12000 rpm离心20分钟，取上清液备用于HPLC分析。

取同样量血浆定量加入不同体积的RY10-4对照品溶液制成对照品生物样品系列，按上述方法制成血浆样品。

#### 4.3.4 组织样品的处理

取一定重量大鼠的心、肝、脾、肺、肾的组织样品，按1: 10(g: mL)的比例向各组织中加入一定体积的生理盐水，然后使用匀浆机匀浆使组织样品溶液中无明显固体物质后，4000 rpm离心10 分钟，精密吸取组织匀浆液100μL于1 mL 的

EP管中，加入200μL 50%磷酸和300μL乙酸乙酯，涡旋2分钟后静置5分钟，

取上清液200μL，继续加入乙酸乙酯200μL，涡旋2分钟，静置5分钟，取上

层清液200μL，再重复该操作1次，将总共收集到的600μL乙酸乙酯上清液置于EP管内，在60°C水浴锅中蒸干，而后向该EP管中加入100μL甲醇，涡旋

2分钟，12000 rpm离心20分钟，取上清液备用于HPLC分析。

取同样量血浆定量加入不同体积的RY10-4对照品溶液制成对照品生物样品系列，按上述方法制成组织匀浆样品。

### 4.4 方法学考察

#### 4.4.1 专属性实验

分别取大鼠空白血浆以及心，肝，脾，肺，肾的空白样品，给药后样品，以及加入RY10-4的空白样品，按“第三部分4.3项下的生物样品的处理”项下方法处理，用HPLC-UV分析。其结果见图2-7。

#### 4.4.2 标准曲线的绘制

精密吸取不同量的RY10-4标准溶液，用大鼠空白血浆及各个组织匀浆配制成RY10-4浓度为0.1、0.5、1、5、8、10.0、20.0μg・mL-1的标准生物样品。按“第三部分4.3项下生物样品的处理”项下处理，用HPLC-UV进行分析。

#### 4.4.3 回收率实验

取空白血浆及组织匀浆液，分别加入不同体积的RY10-4标准溶液，配成高(20μg·mL-1)、中(10μg·mL-1)、低(0.5μg·mL-1) 3种不同浓度的生物样品，按“第三部分4.3项下生物样品的处理”项下方法处理，用HPLC-UV进行分析，计算回收率。

#### 4.4.4 精密度实验

取空白血浆及组织匀浆液，向其中分别加入一定量RY10-4 标准溶液制成

RY10-4生物样品，按“第三部分4.3项下生物样品的处理”项下方法处理，分别于

1日内多次和7日内隔日用HPLC-UV对样品进行测定分析，根据结果日内和日间精密度。

#### 4.4.5 最低检测限

精密配制一定浓度的血浆和组织匀浆样品溶液，按倍比关系稀释，按照“第三部分4.3项下生物样品的处理”项下处理，用HPLC-UV分析，采用RY10-4峰与基线的信噪比S/N=3时的浓度为其的最低检测限，采用RY10-4峰与基线的信噪比S/N=10时的浓度为其的最低检测限。

#### 4.4.6 稳定性实验

取空白血浆、组织匀浆液及排泄物，分别加入一定量RY10-4标准溶液配成配制高(20μg·mL-1)、中(10μg·mL-1)、低(0.5μg·mL-1) 3种不同浓度的生物样品，

按“第三部分4.3项下生物样品的处理”项下方法处理，血液及组织样品于-20°C冰箱中放置7日后在进行测定，采用测定RY10-4含量的方法来分析样品的稳定性，

### 4.5 RY10-4在大鼠体内的组织分布

#### 4.5.1 实验方法

给药浓度的确定，RY10-4与原芹菜素都属于一类结构相似的B环非芳香环的类黄酮化合物，但是从体外筛选的结果可以看出，RY10-4的IC50相较于原芹菜素而言要低得多，结合前期原芹菜素的药代实验内容，本实验采用100 mg·kg-1的计量给药。

将SD大鼠随机分组，每个采血时间点用6只老鼠，实验过程中自由饮水，采血过程中适量补充生理盐水。按体重分别给予100 mg·kg-1的RY10-4，腹部皮下给药，各组分别于给前、药后0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 6 h后，将动物摘取眼球将血液充分流净，然后迅速解剖取出心、肝、脾、肺、肾等组织，用生理盐水漂洗，滤纸吸干，置-20°C冷冻，备用。采用第四部分3.1项下建立的HPLC-UV法测定组织匀浆液中RY10-4的含量。

## 5. 实验结果

### 5.1 专属性实验

图3.3-3.8分别列出了在本实验所建立的HPLC-UV分析方法下血浆、心脏、肝、肾、肺、脾组织中RY10-4的测定结果。从图中看出，RY10-4的保留时间基本稳定在17.2 min左右，在不同的组织中RY10-4的出峰时间基本上保持一致，并且在RY10-4的出峰点附近均没有发现相关物质的干扰，峰型基本良好，以血浆样本为例，按RY10-4的峰面积来计算色谱柱的理论塔板数> 2000。所有生物样品中的内源性物质与RY10-4的分离度均大于2，对RY10-4的检测不产生干扰，因此，可以认为所建立的HPLC-UV法具有良好的专属性，可以被用来检测血液和以上组织中RY10-4的含量，结果可信度高。



图3.3 RY10-4在大鼠血液中的HPLC图：从上到下依次为空白血浆，空白血

浆+RY10-4，给药后血浆



图3.4 RY10-4在大鼠肝脏中的HPLC图：从上到下依次为空白肝脏，空白肝

脏+RY10-4，给药后肝脏



图3.5 RY10-4在大鼠心脏中的HPLC图：从上到下依次为空白心脏，空白心

脏+RY10-4，给药后心脏



图3.6 RY10-4在大鼠脾脏中的HPLC图：从上到下依次为空白脾脏，空白脾

脏+RY10-4，给药后脾脏



图3.7 RY10-4在大鼠肺中的HPLC图：从上到下依次为空白肺，空白肺

+RY10-4，给药后肺



图3.8 RY10-4在大鼠肾脏中的HPLC图：从上到下依次为空白肾脏，空白肾

脏+RY10-4，给药后肾脏

### 5.2 线性范围

将血浆及组织匀浆液的RY10-4的浓度X(μg・mL-1)作为横坐标，HPLC-UV检测所得的峰面积Y为纵坐标，做线性回归分析，计算出各样品中RY10-4的标准曲线，实验数据显示，本方法检测的RY10-4在0.5~20μg・mL-1范围内线性关系良好。具体实验结果见表3.5

表3.5. RY10-4在不同器官中的线性回归分析

| 序号 | 样品 | 浓度范围 | 标准曲线方程 R2 | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 对照品 | 0.1-20μg·mL-1 | Y=55674X-1118 | 0.9999 |
| 2 | 心脏 | 0.1-20μg·mL-1 | Y=47786X+223 | 0.9999 |
| 3 | 肝脏 | 0.1-20μg·mL-1 | Y=41667X+542 | 0.9995 |
| 4 | 脾脏 | 0.1-20μg·mL-1 | Y=29678X-197 | 0.9996 |
| 5 | 肺脏 | 0.1-20μg·mL-1 | Y=38792X+587 | 0.9996 |
| 6 | 肾脏 | 0.1-20μg·mL-1 | Y=31159X+986 | 0.9993 |

### 5.3 回收率实验

将RY10-4按不同高、中、低浓度(20.0, 10.0, 0.5μg·mL-1)的要求投入标准血浆及组织匀浆液中，RY10-4含量的测定结果见表3.6。从数据可以看出，RY10-4在生物样品中的回收率符合含量分析的要求，在80~120%的范围内，且相对标准偏差均<6%，说明该方法的准确度良好，数据可信率高。

表3.6. 高，中，低浓度RY10-4的回收率实验。

| 样品 | 浓度(μg mL-1) | 回收率(%) | 均值(%) | 误差(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0.50 | 96.24 |  |  |
| 血浆 | 10.00 | 97.36 | 94.93 | 2.7 |
|  | 20.00 | 92.34 |  |  |
|  | 0.50 | 91.88 |  |  |
| 心脏 | 10.00 | 93.16 | 93.08 | 2.2 |
|  | 20.00 | 96.02 |  |  |
|  | 0.50 | 96.08 |  |  |
| 肝脏 | 10.00 | 98.02 | 94.92 | 3.0 |
|  | 20.00 | 92.34 |  |  |
|  | 0.50 | 91.55 |  |  |
| 脾脏 | 10.00 | 96.76 | 95.12 | 2.8 |
|  | 20.00 | 94.36 |  |  |
|  | 0.50 | 96.84 |  |  |
| 肺脏 | 10.00 | 90.81 | 91.94 | 3.6 |
|  | 20.00 | 91.24 |  |  |
|  | 0.50 | 92.52 |  |  |
| 肾脏 | 10.00 | 95.16 | 94.62 | 2.0 |
|  | 20.00 | 96.18 |  |  |

### 5.4 精密度实验

在1日内多次和7日内隔日测定高、中、低浓度(20.0, 10.0, 0.5μg·mL-1)的标准血浆及组织匀浆液中RY10-4的含量，所得的日内和日间精密度结果见表3.7。结果表明此方法所得的精密度符合分析的要求。

表3.7. 高，中，低浓度RY10-4的精密度实验。

| 样品 | 浓度(μg·mL-1) | 日内精密度(%) | 日间精密度(%) |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 0.50 | 5.16 | 7.67 |
| 血浆 | 10.00 | 3.22 | 6.47 |
|  | 20.00 | 3.29 | 7.47 |
|  | 0.50 | 3.43 | 6.11 |
| 心脏 | 10.00 | 7.65 | 6.40 |
|  | 20.00 | 4.84 | 3.97 |
|  | 0.50 | 8.90 | 9.31 |
| 肝脏 | 10.00 | 4.31 | 3.09 |
|  | 20.00 | 4.73 | 7.49 |
|  | 0.50 | 3.06 | 5.06 |
| 脾脏 | 10.00 | 4.55 | 2.09 |
|  | 20.00 | 1.22 | 7.01 |
|  | 0.50 | 9.01 | 6.93 |
| 肺脏 | 10.00 | 9.84 | 2.58 |
|  | 20.00 | 7.94 | 9.89 |
|  | 0.50 | 8.88 | 4.64 |
| 肾脏 | 10.00 | 7.97 | 5.72 |
|  | 20.00 | 1.26 | 1.45 |

### 5.5 最低检测限

将25.00μg・mL-1的RY10-4标准溶液配制成一定浓度的血浆、组织溶液并按照一定的倍比关系稀释，按照“4.1.2.4生物样品的处理”项下处理，用HPLC-UV分析，当目标峰与基线的信噪比S/N=3时的浓度为RY10-4的最低检测限，当目标峰与基线的信噪比S/N=10时的浓度为RY10-4的最低检测限。结果显示RY10-4的最低检测限<10 ng，而最低检测量<50 ng，因此可以认为RY10-4的组织样本在该条件下容易被检出，并可以被定量，说明该方法对组织样本中的RY10-4的检测灵敏度良好。

### 5.6 稳定性实验

将高、中、低浓度(20.0, 10.0, 0.5μg·mL-1)的标准血浆及组织匀浆液样品置于-20°C

冰箱中放置7日后进行测定，结果表明，生物样品稳定性良好，在实验所需的时间中所得的结果知道相信，具体结果见表3.8，

表3.8. 高，中，低浓度RY10-4的稳定性实验。

| 样品 | 浓度(μg·mL-1) | 回收率(%) | 均值(%) | 误差(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0.50 | 95.21 |  |  |
| 血浆 | 10.00 | 98.35 | 94.94 | 3.7 |
|  | 20.00 | 91.26 |  |  |
|  | 0.50 | 91.12 |  |  |
| 心脏 | 10.00 | 92.26 | 93.08 | 2.7 |
|  | 20.00 | 95.87 |  |  |
|  | 0.50 | 96.32 |  |  |
| 肝脏 | 10.00 | 97.21 | 94.92 | 3.4 |
|  | 20.00 | 91.23 |  |  |
|  | 0.50 | 92.23 |  |  |
| 脾脏 | 10.00 | 95.88 | 95.12 | 2.7 |
|  | 20.00 | 97.24 |  |  |
|  | 0.50 | 95.36 |  |  |
| 肺脏 | 10.00 | 89.23 | 91.94 | 3.4 |
|  | 20.00 | 91.23 |  |  |
|  | 0.50 | 94.24 |  |  |
| 肾脏 | 10.00 | 92.56 | 94.34 | 1.9 |
|  | 20.00 | 96.21 |  |  |

### 5.7 体内分布实验

待给药后取不同时间点0.5 h, 0.75 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h分别

将老鼠拉扯尾部处死眼部取血，待给药后取不同时间点0.5 h, 0.75 h, 1 h, 2 h, 3 h,

6 h小心分离各个脏器，取出心脏，肝脏，脾脏，肺，肾脏。采用第三部分3.1所建立的HPLC-UV方法检测其中的RY10-4的含量，结果见表3.9-3.14和图3.9, 3.10.

表3.9 RY10-4在大鼠血液中不同时间的含量(μg·mL-1)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间(h) |  |  |  | 大鼠编号 |  |  | 均值 | 标准差 |  |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |  |  |  |
| 0.25 | 0.064 | 0.059 | 0.061 | 0.049 | 0.068 | 0.052 | 0.059 | 0.007 |  |
| 0.5 | 0.095 | 0.099 | 0.101 | 0.106 | 0.089 | 0.087 | 0.096 | 0.007 |  |
| 0.75 | 0.161 | 0.159 | 0.173 | 0.165 | 0.149 | 0.159 | 0.161 | 0.008 |  |
| 1 | 0.258 | 0.272 | 0.280 | 0.259 | 0.268 | 0.251 | 0.265 | 0.011 |  |
| 2 | 0.221 | 0.197 | 0.211 | 0.211 | 0.185 | 0.198 | 0.203 | 0.013 |  |
| 3 | 0.158 | 0.135 | 0.152 | 0.122 | 0.148 | 0.144 | 0.143 | 0.013 |  |
| 6 | 0.097 | 0.091 | 0.101 | 0.095 | 0.109 | 0.111 | 0.101 | 0.008 |  |
| 8 | 0.089 | 0.075 | 0.066 | 0.055 | 0.091 | 0.093 | 0.078 | 0.015 |  |
| 10 | 0.061 | 0.055 | 0.054 | 0.068 | 0.058 | 0.061 | 0.060 | 0.005 |  |
| 12 | 0.028 | 0.02 | 0.011 | 0.016 | 0.021 | 0.011 | 0.017 | 0.007 |  |
| 24 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |  |  |  |
| 表 3.10 RY10-4 在大鼠心脏中不同时间的含量(μg·mL-1) | | | | | | | | |  |
| 时间(h) |  |  |  | 大鼠编号 |  |  | 均值 | 标准差 | |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |  |  | |
| 0.25 | 0.059 | 0.064 | 0.055 | 0.051 | 0.053 | 0.044 | 0.054 | 0.07 | |
| 0.5 | 0.101 | 0.103 | 0.092 | 0.099 | 0.109 | 0.099 | 0.101 | 0.005 | |
| 0.75 | 0.142 | 0.153 | 0.168 | 0.178 | 0.142 | 0.155 | 0.156 | 0.014 | |
| 1 | 0.259 | 0.268 | 0.257 | 0.269 | 0.245 | 0.249 | 0.257 | 0.010 | |
| 2 | 0.213 | 0.224 | 0.232 | 0.222 | 0.229 | 0.211 | 0.221 | 0.008 | |
| 3 | 0.205 | 0.186 | 0.168 | 0.168 | 0.177 | 0.161 | 0.178 | 0.016 | |
| 6 | 0.111 | 0.108 | 0.089 | 0.097 | 0.105 | 0.118 | 0.105 | 0.011 | |

表 3.11 RY10-4 在大鼠肝脏中不同时间的含量(μg·mL-1)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间(h) |  |  |  | 大鼠编号 |  |  | 均值 | 标准差 |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |  |  |
| 0.25 | 0.065 | 0.079 | 0.059 | 0.050 | 0.076 | 0.066 | 0.065 | 0.011 |
| 0.5 | 0.085 | 0.099 | 0.103 | 0.101 | 0.106 | 0.110 | 0.101 | 0.008 |
| 0.75 | 0.175 | 0.161 | 0.155 | 0.165 | 0.164 | 0.134 | 0.159 | 0.014 |
| 1 | 0.264 | 0.268 | 0.236 | 0.287 | 0.301 | 0.277 | 0.272 | 0.022 |
| 2 | 0.245 | 0.265 | 0.247 | 0.241 | 0.239 | 0.254 | 0.249 | 0.009 |
| 3 | 0.211 | 0.200 | 0.184 | 0.203 | 0.196 | 0.182 | 0.196 | 0.013 |
| 6 | 0.160 | 0.142 | 0.100 | 0.118 | 0.122 | 0.109 | 0.124 | 0.020 |

表 3.12 RY10-4 在大鼠脾脏中不同时间的含量(μg·mL-1)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间(h) |  |  |  | 大鼠编号 |  |  | 均值 | 标准差 |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |  |  |
| 0.25 | 0.045 | 0.053 | 0.041 | 0.049 | 0.061 | 0.048 | 0.049 | 0.007 |
| 0.5 | 0.084 | 0.093 | 0.099 | 0.101 | 0.089 | 0.093 | 0.089 | 0.006 |
| 0.75 | 0.153 | 0.178 | 0.157 | 0.157 | 0.149 | 0.122 | 0.166 | 0.018 |
| 1 | 0.261 | 0.248 | 0.251 | 0.246 | 0.255 | 0.239 | 0.255 | 0.008 |
| 2 | 0.221 | 0.213 | 0.209 | 0.208 | 0.222 | 0.218 | 0.217 | 0.006 |
| 3 | 0.175 | 0.151 | 0.143 | 0.169 | 0.161 | 0.155 | 0.163 | 0.012 |
| 6 | 0.132 | 0.151 | 0.121 | 0.129 | 0.132 | 0.095 | 0.142 | 0.018 |

表 3.13 RY10-4 在大鼠肺中不同时间的含量(μg·mL-1)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间(h) |  |  |  | 大鼠编号 |  |  | 均值 | 标准差 |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |  |  |
| 0.25 | 0.053 | 0.057 | 0.048 | 0.03 | 0.047 | 0.051 | 0.048 | 0.009 |
| 0.5 | 0.107 | 0.098 | 0.088 | 0.101 | 0.086 | 0.087 | 0.095 | 0.009 |
| 0.75 | 0.156 | 0.159 | 0.149 | 0.159 | 0.164 | 0.146 | 0.156 | 0.007 |
| 1 | 0.273 | 0.247 | 0.258 | 0.264 | 0.224 | 0.258 | 0.254 | 0.017 |
| 2 | 0.199 | 0.226 | 0.231 | 0.223 | 0.210 | 0.232 | 0.220 | 0.013 |
| 3 | 0.142 | 0.149 | 0.150 | 0.151 | 0.159 | 0.161 | 0.152 | 0.007 |
| 6 | 0.105 | 0.086 | 0.098 | 0.079 | 0.058 | 0.088 | 0.086 | 0.016 |

表 3.14 RY10-4 在大鼠肾脏中不同时间的含量(μg·mL-1)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间(h) |  |  |  | 大鼠编号 |  |  | 均值 | 标准差 |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |  |  |
| 0.25 | 0.047 | 0.033 | 0.049 | 0.044 | 0.041 | 0.032 | 0.041 | 0.007 |
| 0.5 | 0.087 | 0.098 | 0.091 | 0.081 | 0.0816 | 0.077 | 0.085 | 0.008 |
| 0.75 | 0.148 | 0.173 | 0.155 | 0.159 | 0.144 | 0.122 | 0.150 | 0.017 |
| 1 | 0.277 | 0.249 | 0.230 | 0.267 | 0.251 | 0.249 | 0.254 | 0.016 |
| 2 | 0.222 | 0.236 | 0.241 | 0.239 | 0.242 | 0.222 | 0.234 | 0.009 |
| 3 | 0.135 | 0.156 | 0.121 | 0.099 | 0.124 | 0.120 | 0.126 | 0.019 |
| 6 | 0.074 | 0.069 | 0.08 | 0.076 | 0.053 | 0.071 | 0.071 | 0.009 |





图3.9 RY10-4在血液中分布的浓度-时间图

图3.10 RY10-4在不同组织中分别的浓度-时间图

讨论

在给药1h后，可以看到在所有器官中RY10-4的分布都达到了顶峰，而后随着时间的推移，药物浓度在各个器官中都逐步下降，而且可以看到这下降趋势在2-3小时之间较为明显，而在3小时以后则趋缓，这说明RY10-4在生物体内与血浆蛋白结合率较高，不易被代谢掉，这个特性对以后针对其的药物开发十分有利，表明该药物的半衰期较长，可以在体内以一定浓度的量存在，使得药物在可以长时间的保持在有效浓度，但是从结果中看出，RY10-4的组织分布没有靶向性，在所有检测组织中的分布情况都十分相似，总体而言RY10-4在心，肝，脾，肺，肾这个5个血液比较充盈的组织中的分布情况基本相似和血液中的分布较吻合。

## 6. 统计性分析

实验均重复3次以上。所有的测定指标采用均值加减标准差（*x*±s）的方式表示，用SPSS 16.0统计软件包进行分析。组内比较采用LSD（最小显著差法）一维单因素方差分析（one-way ANOVA），组间比较用Dunnett't检验

参考文献

[1]. 郭青龙. 肿瘤药理学[M]. 南京, 化学工业出版社, 2008.

[2]. 中国植物志编委会. 中国植物志(第4卷第1分册). 北京, 科学出版社, 1999: 79-82.

[3]. 黄华艺, 锡良. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展. 中国新药与临床杂志, 2002, 21: 428-433.

[4]. 周铜水. 蕨类植物的黄酮类成分及其系统学意义. 武汉植物学研究, 1989, 4: 377-389.

[5]. 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M], 第2卷, 科学出版社, 1959: 78-79.

[6]. 中华本草编委会. 中华本草[M], 第2卷, 上海科技出版社, 1999: 162.

[7]. Ding HS. Chinese Medicinal spore bearing plants. Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1982, China.

[8]. Lin AS, Chang FR, Wu CC, et al. New cytotoxic flavonoid from Thelypteris torresiana. Planta Medical, 2005, 71: 867-870.

[9]. Huang XH, Xiong PC, Ruan JL, et al. In vitro and in vivo antitumor activity of Macrothelypteris torresiana and its acute/subacute oral toxicity. Phytomedicine, 2010, 17: 930-934.

[10]. Chen WY, Hsieh YA, Wu CC, et al. Protoapigenone, a natural derivative of apigenin, induces mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in human breast cancer cells associated with induction of oxidative stress and inhibition of glutathione S-transferaseπ. Invest New Drug, 2011, 29: 1347-1359

[11]. Chang HL, Wu YC, Yuan SF. Protoapigenone, a novel flavonoid, induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-Terminal kinase 1/2. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 325: 841-849

[12]. Folkman J． Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186．

[13]. Du, W, Hattori, Y, Yamada, T, et al. Tumor angiogenesis in the bone marrow of

Multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment. Pathol. Int, 2004, 54(5): 285-294.

[14]. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastasis and survival in breast cancer. Lancet, 1992, 340: 1120-1124.

[15]. Mohammad AR, Masakazu T. Anti-angiogenic therapy in breast cancer. Biomed Pharmacother, 2003, 57: 463-470.

[16]. Senn HJ. Current status and indications for adjuvant therapy in breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol, 1982, 8: 139-150.

[17]. Susumu S, Hiromi J, Kenichi W, Masato T. Does primary tumor resection improve outcomes for patients with incurable advanced breast cancerBreast2011, 20: 543-547.

[18]. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Medicine, 1995, 1: 27-31.

[19]. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. Cell, 1998, 93: 661-664.

[20]. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependentJNatlCancerInst1990, 82: 4-6.

[21]. Yuan QY, Cai SX, Ruan JL et al. A new protoapigenone analog RY10-4 induces apoptosis and suppresses invasion through the PI3K/Akt pathway in human breast cancer. Cancer Letters 2012, 324: 210-220.

[22]. Yuan QY, Liu ZW, Ruan JL et al. A novel, broad-spectrum antitumor compound containing the 1-hydroxycyclohexa-2, 5-dien-4-one group: The disclosure of a new antitumor pharmacophore in protoapigenone 1. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21: 3427-3430.

[23]. Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, et al. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor-growth. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93: 2002-2007.

[24]. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983, 65: 55-63.

[25]. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. Lancet, 1997, 349 (suppl II): 13-15.

[26]. Claffey KP, Robinson GS. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: Consequences for tumor-growth and metastasis. Cancer Metast Rev, 1996, 15: 165-176.

[27]. Longo R, Gasparini G. Challenges for patient selection with VEGF inhibitors. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 60: 151-170.

[28]. Pandit B, Sun YJ, Chen P, et al. Structure-activity-relationship studies of conformationally restricted analogs of combretastatin A-4 derived from SU5416. Bioorgan Med Chem, 2006, 14: 6492-6501.

[29]. Xu G, Zhang WH, McLeod H et al. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-Akt-mTOR pathway in common human tumors. Int J Oncol, 2004, 24: 893-900.

[30]. Datta NS, Long MW. Modulation of MDM2/p53 and cyclin-activating kinase during the megakaryocyte differentiation of human erythroleukemia cells. Exp Hematol, 2002, 30: 158-165.

[31]. Kimmel CB, Ullmann B, Schilling TF, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish, Dev Dyn, 1995, 203: 253-310.

[32]. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, et al. The syntenic relation ship of the zebrafish and human genomes, Genome Res, 2000, 10: 1351-1358.

[33]. Taraboletti G, Giavazzi, R. Modelling approaches for angiogenesis. Eur J Cancer 2004, 40: 881-889.

[34]. Shin DH, Kim JH, Park JW et al. Preclinical evaluation of YC-1, a HIF inhibitor, for the prevention of tumor spreading. Cancer Lett, 2007, 255: 107-116.

[35]. Chuang TC, Hsu SC, Wang V et al. Magnolol down-regulates HER2 gene

Expression, leading to inhibition of HER2-mediated metastatic potential in ovarian cancer cells. Cancer Lett, 2011, 311: 11-19.

[36]. Lin AS, Yu DL, Lee KH et al. First total synthesis of protoapigenone and its analogues as potent cytotoxic agents. J Med Chem, 2007, 50: 3921-3927.

[37]. Wei AH, Zhou DN, Ruan JL et al. A novel non-aromatic B-ring flavonoid: Isolation, structure elucidation and its induction of apoptosis in human colon HT-29 tumor cell via the reactive oxygen species-mitochondrial dysfunction and MAPK activation. Food Chem Toxicol, 2011, 49: 2445-2452.

[38]. Liu HB, Xiao YL, Ruan JL et al. Apoptosis induced by a new flavonoid in human hepatoma HepG2 cells involves reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK activation. Eur J Pharmacol, 2008, 654: 209-216.

[39]. Bradshaw TD, Matthews CS, Cookson J, et al. Elucidation of thioredoxin as a molecular target for antitumor quinols. Cancer Res, 2005, 65: 3911-3919.

[40]. Mayumi O, Hiroto I, Michihiko K et al. Angiogenesis as a new target for cancer treatment. Cancer Chemother Pharmacol, 1996, 38(Suppl): S78-S82.

[41]. Zhong XS, Zheng JZ, Jiang BH. SU5416 inhibited VEGF and HIF-1a expression through the PI3K/AKT/p70S6K1 signaling pathway. Biochem Bioph Res Co, 2004, 324: 471-480.

[42]. Comito G, Calvani M, Giannoni E, et al. HIF-1αstabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. Free Radical Bio Med, 2011, 51: 893-904.

[43]. Manolescu B, Oprea E, Busu C, Cercasov C. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway. Biochimie, 2009, 91: 1347-1358

[44]. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. Crit Rev Biochem Mol, 2000, 35(2): 71-103.

[45]. Neshat MS, Thomas G, Sawyers CL et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98:

10314-10319.

[46]. Chiang CT, Way TD, Lin JK et al. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. FEBS Lett, 2007, 581: 5735-5742.

[47]. Liu D, Xu YJ, Chen ZC. Preparation of anti-HER2 monoclonal antibody-paclitaxel immunoconjugate and its biological evaluation. J Huazhong Univ Sci Technol, [Med Sci] 2011, 31(6): 735-740.

[48]. Chen HJ, Xiong T, Mu D et al. mTOR activates hypoxia-inducible factor-1αand inhibits neuronal apoptosis in the developing rat brain during the early phase after hypoxia-ischemia. Neurosci Lett, 2012, 507: 118-123.

[49]. Susumu S, Hiromi J, Masato Ti. Does primary tumor resection improve outcomes for patients with incurable advanced breast cancerTheBreast, 2011, 20: 543-547.

[50]. Yilmaz M, Christofori G, Lehembre G. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. Trends Mol. Med, 2007, 13 (12): 535-541.

[51]. Nguyen DX. Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat. Rev. Cancer, 2009, 9: 274-284.

[52]. Chen JQ, Russo J. ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. Biochim. Biophys. Acta, 2009, 1796: 162-175.

[53]. Chen, Y, Yang, L, Lee, TJ. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. Biochem Pharmacol, 2000, 59: 1445-1457.

[54]. Deryugina EI, Quigley JP, Matrix metalloproteinases and tumor metastasis, Cancer Metastasis Rev. 2006, 25: 29-34.

[55]. Pierre YS, Themsche CV, Esteve PO. Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and

Therapeutic strategies. Curr. Drug Targets, 2003, 2: 206-215.

[56]. Egeblad M, Werb Z, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer, 2002, 2: 161-174.

[57]. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: Role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim Biophys Acta, 1994, 1198: 11-26.

[58]. Jiang WG, Robert E. Mansel E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer. Surgical Oncology, 2000, 9: 151-171.

[59]. Blaschuk OW, Emmanuelle BD. Cadherins as novel targets for anti-cancer therapy. European Journal of Pharmacology 2009, 625: 195-198.

[60]. Chen HJ, Hsu LS, Shia YT. Theβ-catenin/TCF complex as a novel target of resveratrol in the Wnt/β-catenin signaling pathway. Biochemi Pharmacolo, 2012, 84: 1143-1153.

[61]. Fu DY, Wang ZM, Shao ZM. Sox17, the canonical Wnt antagonist, is epigenetically inactivated by promoter methylation in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 2010 119: 601-612.

[62]. Serafino A, Moroni N, Pierimarchi P. Anti-proliferative effect of atrial natriuretic peptide on colorectal cancer cells: Evidence for an Akt-mediated cross-talk between NHE-1 activity and Wnt/β-catenin signaling. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1822: 1004-1018.

[63]. Gong YD, Dong MS, Kang NS. A novel 3-arylethynyl-substituted pyrido[2, 3, -b] pyrazine derivatives and pharmacophore model as Wnt2/β-catenin pathway inhibitors in non-small-cell lung cancer cell lines. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011, 19: 5639-5647.

[64]. Chen HJ, Hsu LS, Lin CM Theβ-catenin/TCF complex as a novel target of resveratrol in the Wnt/β-catenin signaling pathway. Biochemical Pharmacology, 2012, 84: 1143-1153.

[65]. Comito G, Calvani M, Chiarugi P, et al. HIF-1αstabilization by mitochondrial

ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. Free Radical Biology & Medicine, 2011, 51: 893-904.

[66]. Hart, IR, Saini A. Biology of tumour metastasis. Lancet, 1992, 339: 1453-1457.

[67]. Laezza C, D'Alessandro A, Bifulco M. Anandamide inhibits the Wnt/β-catenin signalling pathway in human breast cancer MDA-MB-231 cells. European Journal of Cancer, 2012, 48: 3112-3122.

[68]. Jamieson C, Sharma M, Beric R. Henderson Wnt signaling from membrane to nucleus: β-catenin caught in a loop. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2012, 44: 847-850.

[69]. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature Reviews Cancer, 2002, 2: 442-454.

[70]. Jiang WG, Mansel RE. E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer Surgical. Oncology, 2000, 9: 151-171.

[71]. Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ. E-cadherin's dark side: Possible role in tumor progression. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1826: 23-31.

[72]. Torregrosa A, Munoz J, Germa JR. Prognostic value of the expression of E-cadherin andβ-catenin in bladder cancer. European Journal of Cancer, 2000, 36: 357-362.

[73]. 于建渤, 殷平, 李志强. 结肠癌MMP-9、VEGF的表达和微血管密度的相关研究. 肿瘤防治研究. 2005, 32(1): 30-33.

[74]. 詹平, 毛熙光, 董述全, 等. 基质金属蛋白酶-2的表达及微血管密度与宫颈癌侵袭性的相关性. 妇科肿瘤, 2008, 16(2): 262-265.

[75]. Berry JM, Bradshaw TD, Westwell AD, et al. Quinols as Novel Therapeutic Agents 4-(1-Arylsulfonylindol-2-yl) -4-hydroxycyclohexa-2, 5-dien-1-ones and Related Agents as Potent and Selective Antitumor Agents. J Med Chem, 2005, 48: 639-644

[76]. Lee KH, Hyun MS, Kim JR. Growth factor-dependent activation of the MAPK pathway in human pancreatic cancer: MEK/ERK and p38 MAP kinase interaction

In uPA synthesis. Clin. Exp. Metastasis, 2003, 20: 499-505.

[77]. Ahn GO, and Brown, JM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: Role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. Cancer Cell, 2008, 13: 193-205.

[78]. Virtanen SS, Vaananen HK, Harkonen PL, Lakkakorpi PT. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting themevalonate pathway. Cancer Res, 2002, 62: 2708-2714.

[79]. Liabakk NB, Talbot I, Smith BF. Matrixmetallo-protease 2 (MMP-2) andmatrixmetalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. Cancer Res, 1996, 56: 190-196.

[80]. Chang HL, Wu YC, Yuan SS. Protoapigenone, a novel flavonoid, induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun NH2-terminal kinase1/2. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, 325: 841-849.

[81]. Augustin HG. Translating angiogenesis research into the clinic: the challenges ahead. The British Journal of Radiology, 2003, 76: 3-10.

[82]. Xu G, Zhang WH, McLeod H et al. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-Akt-mTOR pathway in common human tumors. Int J Oncol, 2004, 24: 893-900.

[83]. Garcia MG, Alaniz LD, Hajos SE et al. PI3K/Akt inhibition modulatesmultidrug resistance and activates NF-kB inmurine lymphoma cell lines. Leukemia Res, 2009, 33: 288-296.

[84]. Hartmann W, Digon-sontgerath B, Koch A, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN. Clin Cancer Res, 2006, 12: 3019-3027.

[85]. 裴利霞, 杜冠华. 药物代谢动力学研究进展. 中国医药导刊, 2006, 8(5): 328-329.

[86]. 曾苏. 药物代谢学. 杭州: 浙江大学出版社, 2004. 178-180.

# 综述

抗血管生成及迁移在肿瘤治疗中的研究进展

肿瘤作为一种危险人类生命健康的重大疾病[1]，主要因其易复发，易转移而难以治愈[2]。在肿瘤发生，生长，转移这个三个核心过程中。肿瘤组织周边的血管生长以及肿瘤自身的侵袭并迁移都发挥了重大的作用。肿瘤侵袭多发于恶性肿瘤细胞，一般是指肿瘤细胞从其起源部位沿着组织间隙，或突破血管壁沿血管向身体其他部分流动，一般的标志值肿瘤细胞突破基底膜[3, 4]。在这个过程总肿瘤周边的血管生成扮演者双重角色，首先由于肿瘤细胞的永生性使得其生长速度较正常组织而言更快，所以肿瘤组织周边的血管密度相较于正常组织而言要大许多才能满足肿瘤细胞对氧气和营养物质的需求，所以肿瘤组织总是可以激发其周围生长出更多的血管[5]。其次，肿瘤细胞的侵袭和转移有很大一部分是通过血管来完成的，肿瘤细胞可从原发地脱落，穿透基底膜和肿瘤组织周边的毛细血管壁，而后进入主要血管，随着血液循环到达靶向器官形成新的转移灶[6, 7]。因此肿瘤血管的生长和肿瘤侵袭转移这两个过程是相辅相成的，并且较正常细胞而言，血管的非正常生长和侵袭转移是肿瘤的一个特异的行为，尤其在恶性肿瘤中这两种行为都十分活跃，因此研究者相信作用与这两种行为的药物对正常的机体生长的影响会较传统的细胞毒类药物要低很多，因此现在血管生成和肿瘤侵袭成为了肿瘤研究中的新热点[8, 9]。

一血管生成在肿瘤

1背景

在上世纪70年代，波士顿儿童医院和哈佛大学医学院的外科医师兼科学家Judah Folkman[10]提出血管生成与肿瘤的生长与转移有着密切的关系，肿瘤的生长依赖于新生血管。外行提出的非主流学说，即使已经发表在知名的《新英格兰医学杂志》上，自然也是一直得不到主流学派认同的，然而得益于他的执着，他发现了血管生成抑素(angiostatin)和内皮抑素(endostatin)，在有同行评议的期刊上发表了389篇论著，获得荣誉和奖项无数；得益于他的执着，血管生成抑制剂成为炙手

可热的抗肿瘤药物，新产品不断问世；得益于他的执着，全球120多万肿瘤患者正享受着抗血管生成治疗的所带来的好处。

2理论基础及优点

生命体的任何组织和细胞的正常生存以及增值都需要外界提供氧气和营养物质，在人和高等生物体内这一功能主要是由血管来实现[11,12]。血管新生是由一系列多基因，正负因子调控的复杂过程。在成熟的组织器官中内皮细胞的状态基本静止，而在特定情况下如外伤，血管生成也是受到精确调节的，血管发生的基本的发生过程由以下几个阶段组成：首先促血管新生因子的大量产生，与此同时抑制血管生长的因子下降，从而导致的失衡使得内皮细胞被激活[11,12]，就外部环境而言，血管部位细胞外基质（extracellular matrix ECM）改变，细胞外基低膜降解，内皮细胞芽生、增殖和转移。新生内皮细胞聚集形成管状毛细血管血管及管腔，细胞条索发生分化，从而形成中空的管腔，而后在三维空间上，多个管腔彼此交错并融合成新的管腔，新生管腔得以贯通[13]。

由于生物体内长期处于一种动态平衡过程，因此血管生成也不例外，按作用来分类，血管形成因子分为血管抑制因子和血管形成促进因子2大部分，他们共同维系着血管形成这一微妙的动态平衡，使得血管在生命体有需要的地方发生并成为有一定形态和功能的空间网络结构[14]。

目前已发现有大约十几种血管生长因子和血管抑生成制剂。主要的血管生长因子有如下几类：组织细胞旁分泌或自分泌的VEGF（血管内皮细胞生长因子）、血管生成素( angiopoietin, Ang)、碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等，其中血管内皮细胞生长因子（VEGF）以及血管生成素（Ang）最为重要。等可诱导内皮细胞扩增并促使血管形成[15, 16]。

VEGF，其最初被称为血管渗透因子，从患肝细胞癌的豚鼠腹水中分离并纯化得到。后来，在卵巢滤泡星形细胞癌分离纯化中鉴定出其内皮细胞丝裂原活性而被称为VEGF。目前发现的VEGF同源体主要有五个分别是：VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E及胎盘生长因子（Placenta growth factor, PlGF），他们共同构成

VEGF家族。VEGF是分子量为3.4-4.5KD同源二聚体糖化蛋白，对内皮细胞有较特异的促增殖和趋化作用，对内皮细胞作用灵敏度高且呈剂量依赖性，体内体外的实验均已证实增加VEGF的表达或者外源VEGF均可增加血管密度[17, 18]。

VEGF主要通过以下途径来诱导血管生成，通过一氧化氮合酶来刺激NO的合成并使其激活其相关的促血管生成因子，还可以诱导内皮细胞合成并释放细胞外基质蛋白酶，降解细胞外基质以便于内皮细胞和周细胞的迁徙运动；维持内皮细胞的存活率、增加单核细胞及中性粒细胞向血管外迁移[19, 20]。

常见的血管生成素（angiogenin, Ang）有四个主要构型，分别是Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4, Ang-1和Ang-2最为常见，他们常常与Tie-2受体（内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体）结合从而发挥效用。在肿瘤血管新生中Ang具有显著的作用，在多种癌组织如星型细胞瘤、甲状腺癌等均有报道称Ang及其受体表达增加或活化，特别是处于在肿瘤边缘的新生血管区。Ang自身能够溶解细胞间基质并可以活化溶解基质的蛋白酶类，活化内皮细胞之间的连接蛋白；诱导细胞增殖。同时，Ang-1可以与TEK受体结合，诱导其磷酸化，吸引血管周细胞和平滑肌细胞聚集并相互作用，增强血管内皮细胞间连接从而有利于维持血管壁完整，促进血管重构、成熟并在血管生成过程中促进出芽及分支形成。还有研究发现在Ang家族的作用过程中，与VEGF具有协同效应[21, 22]。

正如前面所诉，生物体长期处于一种动态的平衡过程中，因此许多细胞因子也具有抑制血管生成的作用，如激活的血小板、内皮细胞、纤维细胞分泌的血栓素-1和-2，血小板聚集产生的血小板因子-4均有抑制血管生成的功能，可以认为血小板可能对血管生成有非常重要的作用[23]。同时一些内皮细胞抑制因子是某些蛋白因子的水解片段，血管他丁是纤溶酶原氨基端水解片段，内皮他丁是胶原

XVIII的羧基端片段；TNFα及干扰素α有抑制血管生成的作用；如软骨、玻璃体等一些无血管的组织也含有抑制血管生成的成分。

4 血管生成与肿瘤发生

肿瘤的血管生成过程根据肿瘤的大小分为无血管期和血管期，在前血管期，当肿瘤组织比较小，通常是小于1 mm3时，肿瘤主要通过周围组织的弥散扩散的

方式来获取营养，当肿瘤体积到达2-3 mm3。肿瘤的发生和转移与肿瘤细胞所处的内外环境有着密切关系[24, 25]。新生血管可以不断的为肿瘤组织提供更多的养分，从而使得肿瘤细胞的微环境不断的改善并更加的适应肿瘤的生长。同时血管生成也是肿瘤细胞转移过程所必须的[26]。从体内试验的结果可以看出，在原发肿瘤血管化之前，整个循环系统中肿瘤细胞极少，仅仅当肿瘤组织血管化后，肿瘤细胞才持续出现在循环中，有实验表明从原发灶进入的细胞数与肿瘤血管密度及所观察到的肺转移的数目相关。大量的血管不仅增加了肿瘤细胞进入循环的几率；同时，由于新生血管的基度膜普遍呈碎片状，更加易于肿瘤细胞从其中渗漏，因此新生血管较成熟血管更易被肿瘤细胞穿透而发生转移[27]。

为了更加方便的研究药物对肿瘤血管生成作用的影响，在实验中开发了一系列稳定的实验模型。主要分为细胞水平和组织水平两大类：

细胞水平上主要有以下4个模型：

1．血管内皮细胞增殖实验(cell proliferation assay)：内皮细胞作为构成血管的主要成分，其活化增殖是血管发生的首要阶段，决定了血管生成的开始。目前应用广泛的两种细胞增殖测定方法分别为：细胞凋亡分析法和活细胞计数法。

2. 内皮细胞迁移实验(cell migration assay)：在这个实验中主要采用如下两种实验方法1。细胞划痕法：即在布满细胞的6孔板上用枪头在其中画出一道无细胞生长的空白区域，在给药后观察向这个空白区域迁移的细胞的数量。2.

Transwells室模型，Transwells室由两层组成，就是上层的底部有的一张有通透性的膜，这层膜带有微孔，根据不同需要可用不同种类的膜，其孔径大小有从0.1-12.0μM不等，常用的材料是聚碳酸酯膜，加入待测药物，与细胞共同培养后，除去上层的细胞，用甲醇固定下层细胞，光镜下清点下层的血管内皮细胞数[28]。

3. 小管形成实验(tube formation assay)：体外小管形成实验能模拟内毛细血管生成的整个过程，其整体过程接近人体内血管生成的实际过程。主要步骤是将

Matrigel胶铺在24孔板的底部，并将人的血管内皮细胞接种于其中进行培养，在Matrigel胶形成的三维空间中，人血管内皮细胞可以发生空间上的各个方向的生长，在加入了不同浓度的药物后，可以在显微镜下评价其生长状态[29]。

4. 大鼠动脉环实验(rat aortic ring assay): 1990年此模型被首次应用于血管生成的研究中。取出大鼠主动脉后，将其水平剪切成为直径为1 mm的血管环，再用胶原蛋白或纤维蛋白胶包埋，而后采用无血清的培养基进行培养。在整个培养过程中，每天定时计算主动脉环产生的新生血管数。后来人们采用更薄的胶层去包埋动脉环，从而使得染色新生成血管更方便；同时应用共聚焦显微镜和双重染色法使可以在同一层面上同时观察到内皮细胞和平滑肌细胞，并由此证明新生血管主要由内皮细胞所构成。本实验材料来源范围广，观察方法相对简单，被认为是一个较理想的体外血管生成活体模型。但它还是不能很好的反映血管生长在肿瘤发生中的过程，主要是由于：动脉环血管在不同种属或者不同大小的动物中，其生成数差别很大[30]。

由于体内模型的和体外模型可以互为支撑，因此研究者也针对血管生成开发了一系列的体内模型，如下[31]：

1. 兔角膜微囊实验(cornealm icropocket assay)：该模型首次被Folkman等用于肿瘤血管生成的研究。正常角膜本无血管，因此很容易避免干扰，因此角膜血管生成诱导可以相对真实地反映出血管生成的过程。考虑到动物眼球大小，一般实验中采用兔眼角膜，于角膜边缘处采用植入载体，待新生毛细血管萌生进入载体后，通过评估载体内新生毛细血管数和生长率等指标，即可评价药物对血管新生的影响。但非特异性炎症反应容易产生于实验中，肿瘤新血管生成与因子刺激诱导的血管生成难以区别。

2. 基质胶实验(matrigel plus assay): 基质胶主要由细胞外基质上的膜蛋白类似物构成。基质胶在4°C时的为液态，将bFGF与胶混匀，注射于小鼠皮下，由于外部温度的作用胶形成胶栓，基质胶以及与其相应的内皮细胞等迁移入胶栓内，并形成血管结构。1-2周后取出胶栓及其附件的肉芽组织，定量计数。

3. 海绵植入实验(sponge implant assay): 一般先将待测药物埋入无菌聚酯海绵中，再将海绵植入大鼠的皮下。而后可以测定其中的血流，待海绵血管化后可以客观的、重复的去评价新血管生成行为，也可以通过向局部注射目标药物，收集渗出液用来做生化分析。海绵植入后，内部较致密，肿瘤缺氧微环境可以采用

海绵植入实验来模仿。

4. 海绵-基质胶实验(the sponge/matrigel assay): 此后在基质胶栓实验和海绵植入实验的基础上，人们建立海绵-基质胶(sponge/matrigel)模型。该实验结合了海绵植入法和基质胶植入法的优点，将Matrigel注射到小鼠皮下，待基质胶凝固后，直接在胶栓上开口，植入含有待检药物的无菌海绵，将海绵推至胶栓的中央，待实验结束后，取出胶栓并计算清点新生血管数。此模型的优点是，血管能定向生长，更重要的是，该实验的灵敏度比单独的基质胶栓和海绵实验都高，不过也更加的耗时[32]。

此外最近开发出的一系列整体模型引起了人们极大的关注，主要有以下两类：斑马鱼模型（zebrafish model）和爪蟾蝌蚪模型（xenopus laevis tadpole mode），在这其中尤以斑马鱼模型引起了大家最广泛的关注，斑马鱼相较于传统模式生物而言有如下的优势[33]：

1. 斑马鱼是脊椎动物，有独立的组织器官，由于进化的保守性，其器官与人器官在分子水平层面上方面十分相似，且斑马鱼的全基因组已经完成测序，遗传背景清晰，可做大规模的遗传背景筛选。2. 斑马鱼个体小，使用常规的细胞培养的容器和设备即可喂养，费用低廉，所需空间场地不大，且斑马鱼的繁殖能力强大，一对斑马鱼通常可以产下200左右的胚胎，而且胚胎间的个体差异小，可以做大量的药物平行筛选，并且结果可信度高，3. 相较于传统模式生物如：小鼠，比格犬而言，其最大也最为明显的优势是其胚胎透明，斑马鱼体内所有的器官和结构在活体的状态即可观察到，避免杀死动物，从而可多角度，动态，持续的观察活体行为。在评价血管生成的实验中，一般将待检药物加入斑马鱼的培养液中，共培养后无需解剖，即可从体外看到斑马鱼的体节间血管，直接计数即可。

总上所述，目前已经积累了相当多的血管生成评价模型，但是由于生物体的复杂性，且血管生成过程的正负调节因子众多，因此单独一种模型不可能很好的模拟体内的血管生成状态[34, 35]。在所建立的已有体内和体外血管生成模型中，体外模型能较好地控制，并持续监测整个实验过程，相对而言费用较低，操作相对简单，但由于体外实验本身的局限性，实验结果不能完全反映体内情况，在很多

情况下需要体内实验来辅助证实。体内模型实验更加的接近体内真实环境，但操作普遍繁琐耗时、费用高、结果不稳定。总而言之，斑马鱼模型成为在一种值得信赖的血管生成评价模型。

通过抑制血管生长而遏制肿瘤之所以值得人们去建立如此多的体内体外模型是因为，抗血管生长针对的是肿瘤生长特异性的治疗，而且通过抑制血管生成可以遏制肿瘤组织的迁移和侵袭使得肿瘤最难治愈的特性被抑制，因此抗血管生成治疗有这如下的优势[36]：1.高效性，破坏少量的附着在肿瘤附件的血管，便可使血管周边大量的肿瘤细胞由于缺乏必要的营养物质而发生坏死；2.广谱性，生物体内的血管内皮细胞和诱导血管生长的物质高度保守，不同肿瘤的血管内皮细胞往往表达相同的促血管生成的蛋白分子，针对这种蛋白分子的一种疗法就可能可以治愈多种肿瘤；3.易起效，血管内皮细胞直接暴露于血液中，药物能直接发挥作用；4.无明显的毒副作用，抑制血管治疗只针对增殖中的血管内皮细胞，对静止的血管内皮细胞无明显作用。对正常的组织细胞的毒副作用更小；5.内皮细胞是非转化的二倍体细胞，在通常情况下其遗传信息是高度静止的，而肿瘤细胞，因其多由正常细胞突变而成，因此在遗传上极不稳定，包括获得药物抗性的能力和异常的增殖和生存能力，因为内皮细胞在遗传上是稳定的，因此它们更易受到药物作用而且这种作用可以持续，同肿瘤细胞相比，它们不易产生抗药性。但是抗血管生成在实际应用中依然有不少问题：1. 目前抗肿瘤血管生成尚处于起步阶段，多数实验结果来自于体内或者体外的实验，临床参考价值不大。2. 由于抗血管生成不直接杀伤细胞因此其见效比较慢。3. 由于抗血管生成的主要用途与抗肿瘤侵袭结合在一起，因此在临床上需要长期应用，这样就不得不考虑该治疗手法的长期副作用，如内出血，高血压，肠胃耐受性等等。4. 最新的研究表明低分化的肿瘤细胞可以在某种环境下丧失原有的组织特性，直接形成不需要内皮细胞参与的血管网络。5. 由于大多数实验来源于动物典型且快速生长的血管模型，而起对于缓慢生长的人类肿瘤的疗效需要进一步的证实[37, 38]。

如前面所诉，VEGF在血管生成中扮演着重要的作用，而VEGF作为一个下游的效应蛋白收到很多上游信号通路的调节，其中研究的比较透彻的信号通路有如下两条：

Notch Dll4信号通路[39]：近年来发现Notch Dll4信号通路是的与肿瘤血管生成相关的通路。Notch受体广泛表达于多种细胞表面，主要为以下4种：Notch1, Notch2, Notch3和Notch4，一旦这些受体与其对应的跨膜配体结合，即可行使细胞凋亡、分化和增殖的调节功能。相应的跨膜配体主要有Dll1, Dll3和Dll4。而血管内皮细胞主要表达Notch1和Notch4受体以及Dll1和Dll4配体。在肿瘤组织的血管生成过程中，表达与内皮细胞表明的Dll4, VEGF的活化可使其表达显著增加。通过测定发现肿瘤细胞中Dll4表达水平相当高，但对肿瘤细胞应用抗

Dll4信号通路的靶向药物后，可以观察到肿瘤的血管数量提高，但是这种新生成的血管在结构和功能上都是不完备的，因而缺乏实际作用的，这就使得肿瘤的血流量大大降低，从而可以抑制肿瘤生长[40, 41]。

另外一条为经典的PI3K-AKT-mTOR信号通路[42]。PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶，与src和ras等癌基因的产物相关，且PI3K本身具有丝氨酸/苏氨酸

（Ser/Thr）激酶的活性，具有磷脂酰肌醇激酶的活性。由调节亚基p85和催化亚基

p110构成。PI3K的活化可使Akt从细胞质转移到细胞膜上．并在磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDKI)的辅助下，磷酸化Akt蛋白上的苏氨酸磷酸化位点(Thr308)和丝氨酸磷酸化位点(Ser473)而使其激活，激活后的Akt通过直接或者间接两种途径激活其底物雷帕霉素的靶向蛋白(mTOR)[43-45]。活化的mTOR可以使得更下游的HIF-1a的降解停止，并在细胞中累积与HIF-1b结合形成完整的HIF-1蛋白，HIF-1作为肿瘤细胞在缺氧状态下产生的应急蛋白，在外面条件不利的情况下，可以发挥一系列促进肿瘤细胞存活的功能，其中就包括可以激活VEGF，使得致密的肿瘤组织中的养分得以持续的供应[46, 47]。其具体的细胞信号通路图如下：



6 已有的药物发现

在研制通过抗血管生长治疗肿瘤的过程中，主要依靠Miller[48]等于于2001年所提出的4条准则：1. 细胞毒差异作用(differential cytotoxicity)：即抗血管生成药物杀伤内皮细胞的作用剂量应低于对肿瘤细胞的作用剂量；2. 扰乱内皮细胞正常功能(alter endothelial cell function)：即药物在不杀死内皮细胞的情况下，实现干扰内皮细胞功能；3。明确的作用机制(critical mechanistic effects)：能够阐明药物抑制血管形成的关键环节；4. 体内抑制血管生成(inhibit angiogenesis in vivo)：所筛选的化疗药物在体内活性实验中具有明确的证据。

具有抗肿瘤前景的治疗药物主要有以下三个大类：

1单克隆抗体：现有的VEGF 单克隆抗体以贝伐单抗和兰尼单抗这两种药

物为代表， 均属于人源性单抗。贝伐单抗商业名为阿瓦斯汀[49]（Bevacizumab，

Avastin）是重组的人源化单克隆抗体，为美国罗氏公司生产，2004年获得FDA的批准，是美国第一个获得批准上市的抑制肿瘤血管生成的药。通过体内和体外两套独立的检测系统，均证实IgG1抗体可以与人血管内皮生长因子（VEGF）结合，从而导致其生物活性丧失。阿瓦斯汀的主要功能域为：可结合VEGF的鼠源单抗的互补决定区和人源抗体的结构区。阿瓦斯汀由中国仓鼠卵巢细胞表达系统所生产，其分子量约为140, 000 KD. VEGF与其内皮细胞表面的受体（Flt-1和KDR）结合被阿瓦斯汀可的竞争性结合所阻断。在血管体外生成模型上，在接种了结肠癌的裸（无胸腺）鼠模型上，VEGF与其相应的受体结合可诱发内皮细胞持续增殖进而形成新生血管。当使用阿瓦斯汀后微血管生成可显著减少，同时抑制了转移病灶。主要用于结肠癌、肺癌、肾癌和脑癌的治疗[50, 51]。兰尼单抗也是一种重组人源化单克隆抗体，由肠道杆菌(E. coli)在含四环素的培养液中产生

[52]. 其受体结合部位是血管内皮生长因子A(VEGF-A)，其相对分子质量为48000，其中具有生物活性的裂解片段是VEGF110. VEGF-A可促进新生血管生成和渗漏，被认为是导致湿性老年黄斑病变的原因。该药物的传统治疗范围为老年性的黄斑病变，但是现在也在尝试其在抗肿瘤血管生成方面的作用，这种结合防止并阻碍了血管受体(VEGFR1和VEGFR2)在血管内皮细胞表面的的相互作用，阻止血管内皮增生。

2小分子化合物：在临床上应用的小分子受体酪氨酸激酶抑制剂主要有舒尼替尼和索拉非尼，舒尼替尼是一种可以口服的酪氨酸激酶抑制剂，作用分子靶点包括VEGFR和PDGFR，通过特异性抑制来达到对肿瘤血管生长的抑制。索拉非尼具有抗血管生成和促肿瘤细胞凋亡的双重作用：既可通过阻断由

RAF/MEK/ERK介导的细胞信号传导通路而直接抑制肿瘤细胞的增殖，还可通过作用于VEGFR，抑制新生血管的形成，从而切断肿瘤细胞的营养供应达到阻止肿瘤生长的目的[53]。

舒尼替尼比较成熟的商品为美国辉瑞公司生成的苹果酸舒尼替尼[54]，商品名为索坦。舒尼替尼能够大大延长已对伊马替尼治疗耐药或不能耐受的胃肠道基质肿瘤患者的肿瘤进展时间，并显著性降低他们50%的死亡风险。舒尼替尼也已在

用于治疗转移性乳腺癌和神经内分泌肿瘤等的Ⅱ期临床试验中显现出令人鼓舞的结果。

索拉非尼的成熟商品由德国拜耳药业开发商品名为Nexavar[55]，用于治疗对标准疗法没有响应或不能耐受之胃肠道基质肿瘤和转移性肾细胞癌。能选择性地靶向某些蛋白的受体，后者被认为在肿瘤生长过程中起着一种分子开关样的作用。它的上述适应证已在美国获得了FDA授予的“快通道”审批地位。

3中药类

依据《皇帝内经》，《景岳全书》等传统经典报道中医对肿瘤的认识，多因正气虚弱，脏腑功能失调，复因邪毒内侵、情志抑郁、体内病理产物积聚等多种因素所致，使得阴阳逆乱，气血亏虚，五脏六腑不调，癌瘤邪毒蕴结，终致病患瘤深。故因采用调理气机、活血化癖的方法。

王思峰[56]等人发现从大青叶中得到靛玉红是一种抗肿瘤活性成分，通过抑制周期素依赖性蛋白激酶阻止细胞增殖，在体外斑马鱼胚胎血管生成筛选实验中，靛玉红表现出了明显的剂量效应关系。徐中平等则研究了昆布多糖硫酸醋的抑制血管生成和抗肿瘤作用，认为昆布多糖硫酸醋是碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)附着和b-FGF依赖性细胞增殖的抑制剂，能够抑制内皮细胞形成管状结构，抑制鸡绒毛膜尿囊膜的形成，并具有抗鼠肿瘤生长的活性[57, 58]。颜大海[59]等对个传统抗癌方剂中出现频率最高的11味中药进行了体内和体外的抗血管生成初筛，结果发现羲术、郁金均有抗血管生成作用。王志玲[60]等人发现茶叶中的多酚内物质也能抑制肿瘤的血管生成。

肿瘤侵袭与肿瘤发生

癌细胞从原发肿瘤转移扩散到远处器官，是癌症病人死亡最常见的原因，也是肿瘤难以治愈的关键，而肿瘤的侵袭对肿瘤本身而言，可以使得肿瘤组织在生物体内不断的扩散并增殖，从而逃避各个免疫系统的监管[61]。因此肿瘤的血管生长和迁移对于肿瘤组织而言至关重要。早在1889年，Paget即提出，器官微环境（“土壤”）可影响特定肿瘤细胞（“种子”）的种植、侵袭、存活、生长。肿瘤

转移早期常呈现特异脏器亲合性，如结肠癌易转移到肝脏，肺癌易转移到骨、肾上腺和脑，前列腺癌易转移到骨[62]。肿瘤细胞主要通过以下三个途径进行转移[63]

1淋巴系统转移

淋巴道是肿瘤细胞转移的重要途径，肿瘤细胞在淋巴道里面的运动轨迹基本和淋巴液的流动方向一致，但是在少数情况下也可发生跳跃转移或者逆行转移。肿瘤细胞侵入淋巴管，首先流向局部淋巴结，先聚集在淋巴结的边缘，而后渐渐侵占整个淋巴结，并可以通过引流来到下一个淋巴结，最后通过胸导管进入体循环，收到攻击的淋巴结会发生肿大，变硬等情况，在组织学层面上，显微镜下的淋巴结结构被破坏。

2血液系统转移

血液系统转移和前面所述的血管生成的关系密切，血液系统转移的靶向性很强，肝脏和肺是血道转移的重要靶器官

3种植性转移

当体内的正常器官和肿瘤组织表面接触的时候，肿瘤组织可以从原发灶脱落并种植到新的体腔各器官的表面，形成种植性的转移瘤。胸腔和腹腔最易受累。心包腔，蛛网膜下也容易遭受这种转移的侵袭。这种转移很难侵入器官的深层，并常伴有积液。

Liotta：等提出癌细胞侵袭三步学说：首先癌细胞黏附于细胞基底膜，而后分泌蛋白水解酶降解基底膜和分并使得细胞向外移动。很容易理解细胞外基质作为细胞与细胞之间的分隔组织，其在阻止肿瘤细胞侵袭的过程中是一道首要的屏障，细胞外基质除了发挥支持、连接、抗压等维持正常细胞形态的物理层面的作用之外，还在细胞的基本生命活动中发挥广泛的生理作用，其主要的生物学活性有如下四种。

1．决定细胞的生存

正常细胞在真核生物中，除了成熟的血细胞之外，大多细胞须粘附于特定的

细胞外基质上，从而抑制凋亡并存活，这称之为接触依赖性（anchorage

dependence）。最明显的是：内皮细胞和上皮细胞一旦脱离了其依赖的细胞外基质，则会进入程序性死亡。

更重要的是，不同的细胞外基质对细胞生理行为亦有着不同的影响，这种影响控制这生物体的自我生长，这种影响广泛认为是有细胞外基质上的某些信号分子所导致的。如，在纤粘连蛋白基质上成纤维细胞增殖较快，而在层粘连蛋白基质上则增殖放缓，但是肿瘤细胞丧失了定着依赖性，可处于半悬浮状态来增殖，因此人们认为肿瘤细胞缺失了这种接触抑制。

2．决定细胞的形态

细胞学观察证明，在没有细胞基质的情况下，细胞多为游离状态。即使是同一种细胞，当其附于不同的细胞外基质时有着完全不同的形状。这一作用的实现被认为是通过包膜上的受体影响细胞骨架而实现的。不同细胞匹配着不同的细胞外基质，因而介导的细胞骨架组装的状况也不同，从而是细胞表现出不同的宏观形状。

3．参与决定细胞的分化

细胞外基质中的特殊成分可使得细胞发生不同方向的分化。例如，成肌细胞在纤粘连蛋白持续增殖并同时保持未分化状态；而其在层粘连蛋白上则增殖放缓，发生分化。

4．控制细胞的迁移

控制细胞迁移的方向与速度是细胞外基质的重要功能，相当于可以为细胞提供一种迁移的指引。如：当肿瘤细胞遇上层粘连蛋白时可促进其迁移。细胞外基质决定了细胞的趋化性与趋触性。这种行为在创伤愈合和胚胎发育中均有积极意义。细胞的迁移行为依靠着细胞的粘附以及细胞骨架的再组装。细胞粘附于一定的细胞外基质时开始诱导粘着斑产生，粘着斑可以理解为联系细胞外基质与细胞骨架“铆钉”[64, 65]，从而可以开始新位置的固定。

由于细胞外基质在细胞的物理结构和生理功能上均提供了支持，因而无论是

在胚胎发育，组织形态发生和器官形成的过程中，亦或是维持机体结构与功能完善（如创伤修复和免疫应答等）的一切生理活动中均具有不可替代的作用。而细胞外基质在肿瘤组织中的往往最先遭受肿瘤细胞的破坏。目前研究表明，能有效降解细胞外基质成分的酶类包括MMP、丝氨酸蛋白酶及胱氨酸蛋白酶在破坏细胞外基质的酶类中，其中最重要的是MMPs家族[66]：基质金属蛋白酶(MMPs)是一类结构相似，基因水平高度同源的内肽酶的总称，其基因位于人类16号染色体长臂，因其中富含锌，钙等金属离子而得名为金属蛋白酶，其主要的作用是降解基膜糖蛋白及细胞外基质的所有成分，其最主要的功能是降解和破坏细胞外基质中的V型胶原和明胶，而在MMPs家族中研究的最透彻的是MMP-2/9两种蛋白酶。生物体内MMPs活性受到多种因素的调节，其中包括转录水平的调节、正负反馈调节等。此外酶原的激活及其与特异组织抑制因子(TIMPs)的相互作用决定了酶的活力。首先大量的实验结果揭示了，MMPs的正负表达是长期处于一个动态平衡中，受到了广泛的细胞信号通路的调控，最主要的有如下两条[67]。

1. ERK/MAPK信号通路：胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase, ERK）是MAPK家族的一员，细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)主要包括两种蛋白，分别是ERKl和ERK2，他们是将信号从表面受体传导至细胞核的关键环节，其中ERK1 和ERK2 的分子量分别为

44KDa和42KDa。磷酸化的ERKl/2由胞质进入到细胞核内，它的信号级联传递并激活是细胞生长、发育及分裂的核心，通过长期的研究，其基本的信号传递步骤已经研究清楚，ERK作为MAPK家族的一员也遵循MAPKs的三级酶促级联反应，其基本流程如下：即上游激活蛋白→MAPK激酶的激酶(MAP-KKK) -MAPK激酶(MAP-KK)→MAPK. Ras作为ERKs的传递途径上游激活蛋白，Raf相当于

MAPKKK, MAPK/ERK激酶（MEK）发挥MAPKK这一级的作用，ERK即MAPK，具体到ERK通路为：Ras-Raf-MEK-ERK。通过下调ERK/MAPK信号通路抑制肿瘤的侵袭与迁移已经被多种抗癌化合物的所证实，当这些抗肿瘤化合物肿瘤细胞共培养后，使得ERK/MAPK通路的激活被抑制，从而降低了MMPs表达量，

Endo等运用凝胶迁移或电泳迁移率实验EMSAs发现，人源胰腺癌细胞上的两个

MMP启动子区均存在较强的AP-1转录活性，而在加入MEK特异性抑制剂后，

MMP 的合成被阻断，含量减少，并可阻断AP-1 活性，这些结果提示我们

ERK/AP-1通路的激活在胰腺癌细胞MMP的上调表达过程中至关重要[68, 69]。

2．JAK-STAT信号通路：JAK全名为Janus Kinase（Janus为罗马神话中前后各有一张脸的门神）两面神激酶，属于一种非受体型酪氨酸蛋白激酶（PTK）。之所以被如此命名，与其双重功能有关，JAK既能催化与之相连的细胞因子受体发生酪氨酸磷酸化，又能磷酸化多种含特定SH2区的信号分子从而使其激活。

STAT全名为Signal transducers and activators of transcription（信号传导及转录激活因子）,含有SH3和SH2的结构域，可与特定的含磷酸化活性的氨基酸的肽段结合。当STAT被磷酸化后，成为活化的转录激活因子形式，进入细胞核内与靶基因结合，促进靶基因的转录，产生更加广泛的效应。进一步的实验证明在乳腺癌易转移的细胞系MDA-MB-231中，JAK激酶可以使STAT3的羧基端的酪氨酸磷酸化，从而使得STAT3被激活，活化后的STAT3可以作为转录因子进入细胞核，促进ERK1/2转录和表达，而传统认为ERK1/2激活是通过其上的氨基酸残基磷酸化完成的。目前，普遍认为JAK激酶可能也直接参与了ERK1/2残基的磷酸化，促进了ERK1/2的活化，总而言之JAK酶对JAK/STAT3与MAPK/ERKl/2信号通路都可以有着广泛的影响，JAK/STAT3 和MAPK/ERKl/2的交错对话中

JAK可能发挥了关键的作用，因此科研人员相信JAK酶的抑制剂在肿瘤治疗中肯能存在着相当广泛的应用以及前景[70, 71]。

随着研究的深入MMPs在临床上也表现出了更多的意义。现在普遍认为MMP-2与TIMP-2是2个与肿瘤侵袭性有密切相关的指标，MMP-2与TIMP-2的含量的此消彼长决定了细胞外基质合成及降解代谢平衡[72]。广泛的病理学研究发现，胃癌组织TIMP-2的阳性率明显低于MMP-2，两者表达呈负相关，说明胃癌组织TIMP-2对MMP-2的分泌及活性的抑制作用较弱，这其中可能是由于某种因素的存在，使胃癌组织中MMP-2表达量总要高于TIMP-2。正是由于这两者之间的平衡被打破才导致MMPs的异常积累，并引起了肿瘤的侵袭与转移[73, 74]。

在宫颈癌研究得到的结果显示，MMP家族不仅仅在促侵袭方面发挥了作用，

同时也参与了血管生成。临床研究表明MMP-2的阳性表达率在浸润癌中明显高于正常宫颈组织，同时常常伴淋巴结转移和血管发生，结果提示MMP-2蛋白酶广泛的参与了宫颈癌的进展，参与肿瘤的侵袭转移并使得肿瘤组织周围的血管发生，其他肿瘤中MMP-2蛋白的研究结果也基本一致。

肿瘤侵袭与肿瘤血管生成的因子在某种程度上面相辅相成，一些促血管生成的因子如：VEGF，FGF等，可诱导肿瘤细胞生成MMPs，与此相应的是MMP家族也可以促进VEGF的产生并释放[75, 76]。MMP-2的上调表达将使基底膜和细胞外基质被降解，很容易理解这种上调表达使得肿瘤细胞在侵袭及转移过程中，穿透内皮细胞的细胞外基底膜以及血管基底膜等各种屏障的能力增强，于此同时，内皮细胞的迁移能力也更强，进一步促进肿瘤血管的生成。Partridge等报道指出，MMPs还能诱导释放出可与基质结合的生长因子，使细胞外基质的胶原成分被降解，裂解原有的肽链，同时形成新生血管所需要的肽链，肿瘤细胞除了自分泌MMPs家族之外，还能通过促进促血管生成因子的，促使血管内皮细胞生成MMPs，进一步降解细胞外基质，这些行为互相支持互相诱导，使得新生血管和肿瘤侵袭更易发生[77]。

综上所述，可以容易理解，肿瘤组织的侵袭与迁移与肿瘤周边的血管生成从来就不是两个独立事件，这两个事件在肿瘤发生中密切相关，相辅相成，共同促使着肿瘤自身的生长已经在生物体中的扩散。在正常细胞血管生成和迁移都是在一系列的正负调控因子的作用下发生的，因此肿瘤的侵袭和血管生成作为一种明显有别于正常细胞的行为渐渐的在肿瘤研究中得到了广泛的关注。

1. 汤钊猷，现代肿瘤学[M]。2011，上海，复旦大学出版社。

2. 高杰，章静波。癌的侵袭与转移[M]。2003，北京，科学出版社。

3. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997, 386: 671-674.

4. Partridge CR, Hawker JR, Forough R. Overexpression of a secretory form of FGF-1 promotes MMP-1-mediated endothelial cell migration. J Cell Biochem, 2000, 78(3): 487-499．

5. 屠哲玮，陶一飞，董缙，徐云根。细胞毒药物与肿瘤血管生成。中国现代应用药学，2011, 7(28)：7-12.

6. Lai KC, Huang AC, Hsu SC, et al. Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human coloncancer HT29 cells by inhibiting matrix metalloproteinase2/9 and urokinase plasminogen (uPA) through PKC and MAPK signaling pathway. J Agric Food Chem, 2010, 58(5): 2935-2942.

7. Weng CJ, Chau CF, Hsieh YS, et al. Lucidenic acid inhibits PMA induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF kappaB and AP-1. Carcinogenesis, 2008, 29 (1): 147-156.

8. Endo H, Watanabe T, Sugioka Y, et al. Activation of two distinct MAPK pathways governs constitutive expression of matrix metalloproteinase 1 in human pancreatic cancer cell lines. Int J Oncol, 2009, 35 (6): 1237-1245.

9. 戴婷婷，华海清。中药抗肿瘤侵袭转移的分子机制研究进展。肿瘤防治研究

2010, 37(3): 37-39.

10. FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.

11. Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, et al. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammat ory breast cancer xenograft. Cancer Res, 2002, 62 (2): 560-566.

12. Ruf W, Seftor EA, Petrovan RJ, et al. Differential role of tissue factor pathway

Inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. Cancer Res, 2003, 63(17):

5381-5389.

13. ClementeM, PérezM, Illera J, et al. Histological, immunohist ological and ultrastructural description of vascul ogenic mimicry in canine mammary cancer. Vet Pathol, 2009, 7: 1131-1142

14. Sigstedt SC, Hooten CJ, Callewaert MC, et al. Evaluation of aqueous extracts of Taraxacum officinale on growth and invasion of breast and prostate cancer cells. Int J Oncology, 2008, 32(5): 1085-1090.

15. Claffey KP, Robinson GS. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor-cells-consequences for tumor-growth and metastasis. Cancer Metastasis Rev 1996; (15): 165-166.

16. Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, et al. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. Cancer Metastasis Rev, 2000, 19(1-2): 167-172.

17. Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. Microvasc Res, 2007, 74(2-3): 72-84．

18. Jain RK, Finn AV, Kolodgie FD, et al. Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque stabilization. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007, 4(9): 491-502.

19. Sathornsumetee S, Rich JN. Antiangiogenic therapy in malignant glioma: promise and challenge. Curr Pharm Des, 2007, 13(35): 3545-3558．

20. Bischof M, Abdollahi A, Gong P, et al. Triple combination of irradiation, chemotherapy (pemetrexed), and VEGFR inhibition (SU5416) in human endothelial and tumor cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 60(4): 1220-1232.

21. Fukumura D, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. Microcirculation, 2010, 17(3): 206-225.

22. 龙淼云，郑启昌，宋自芳，等.血管生成抑制因子arresten抑制huvec细胞增殖和

迁移的实验研究。中国药理学通报, 2007, 23(1)：64-66.

23. Frenkel S, Barzel I, Levy J, et al. Demonstrating circulation in vasculogenic mimicry patterns of uvealmelanoma by confocal indocyanine green angiography. Eye, 2008, 22 (7): 948-952.

24. 霍介格，顾勤。周仲瑛治疗肿瘤的临证思路探析。上海中医药杂志2007, 41（1）

5-6.

25. 邱建武，郭薇，申丽娟。P38 MAPK在肝细胞癌中的研究进展。世界华人消化杂志，2009, 16 (5)：503-509.

26. Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. FASEB J, 2008, 22(4): 954-965.

27. Yang XC, Luo PH, Yang B. Anti-angiogenesis response of endothelial cells to the anti-tumour drug 10-methoxy-9-nitrocamptothecin. Pharmacological Research 2006, 54: 334-340.

28. Harris AL. Angiogenesis as a new target for cancer control. Eur J Cancer 2003, 1:1-2.

29. Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Comparison of the three in vitrohuman'angiogenesis'assayswith capillaries formed in vivo. Angiogenesis, 2001,4(2): 113-121.

30. Auerbach R, Lewis R, Shinners B, et al. Angiogenesis assays: a critical overview. Clin Chem, 2003, 49(1): 32-40.

31. Wang YK, Huang ZQ. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H2O2 in vitro. Pharm Res 2005;52:174-182.

32. Ucuzian AA, Greisler HP. In vitro models of angiogenesis. World J Surg, 2007, 31(4): 654-663.

33. Annelii NY, Monica A, Peter C. Zebrafish and Xenopus tadpoles: Small animal

Models to study angiogenesis and lymphangiogenesis. Experimental Cell Research, 2006, 312: 684-693.

34. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn, 1995, 203: 253-310.

35. 王思锋，刘可春，王希敏等。抗血管生成药物筛选及其新模型-斑马鱼。ft东科学, 2007, 20(4)：12-15.

36. Auerbach R, Lewis R, Shinners B, et al. Angiogenesis assays: a critical overview. Clin Chem, 2003, 49(1): 32-40.

37. Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, LewisCE. Comparison of the three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. Angiogenesis, 2001, 4(2): 113-121.

38. Sanz L, Pascual M, Munoz A, et al. Development of a computer-assisted high-throughput screening platform for anti-angiogenic testing. Microvasc Res, 2002, 63(3): 335-339.

39. Chen Y, Li D, Liu H, et al. Notch-1 signaling facilitates survivin expression in human non-small cell lung cancercells. Cancer Biol Ther, 2011, 111: 14-21.

40. Bao B, Wang Z, Ali S, et al. Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition coteansistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. Cancer Lett, 2011, 307(1): 26-36.

41. Wang Z, Banerjee S, Ahmad A, et al. Activated K-ras and INK4a/Arf deficiency cooperate during the development of pancreatic cancer by activation of Notch and NF-kappB signaling pathways. PLoS One, 2011, 6, 6: e20537.

42. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. Mammalian target of rapamycin: a newmolecular target for breast cancer. Clin Breast Cancer, 2003, 4: 126-137.

43. Roforth MM, Tan C. Combination of rapamycin and 17-allylamino- 17-demethoxygeldanamycin abrogates Akt activation and potentiates mTOR blockade in breast cancer cells. Anti cancer Drugs, 2008, 19: 681-688.

44. Zhu WH, Nicosia RF. The thin prep rataortic ring assay: Amodified method for

The characterization of angiogenesis in whole mounts. Angiogenesis, 2002, 5(1-2): 81-86.

45. Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, et al. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. J Immunol Methods, 2003, 273(1-2): 83-101.

46. Baker JH, Huxham LA, Kyle AH, et al. Vascular-specific quantification in anin vivoMatrigel chamber angiogenesis assay. Microvasc Res, 2006,71(2): 69-75.

47. Brooks PC. Cell-adhesion molecules in angiogenesis. Cancer Metastasis Rev 1996; 15: 187-194.

48. Ademuyiwa FO, Miller KD. Incorporation of antiangiogenic therapies in the treatment of metastatic breast cancer. Clin Breast Cancer 2008, 8(Suppl 4):S151-156.

49. Moreno SF, Paloma JB. Therapeutic anti-VEGF in age related macular degeneration: Ranibizumab and Bevacizumab controversy. Br J Ophthalmol, 2008, 92(6): 866-867.

50. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a

Humanized anti-VEGF antibody in vitro. Angiogenesis, 2004, 7(14): 335-345.

51. Staton CA, Brown NJ, Rodgers GR, et al. Alphastatin a 24 amino-acid fragment ofhuman fibrinogen, is a potentnew inhibitor of activated endothelial cells in vitro and in vivo. Blood, 2004, 103(2): 601-606.

52. Brown NJ, Staton CA, Rodgers GR, et al. Fibrinogen efragment selectively disrupts the vasculature and inhibits the growth of tumors in a syngeneic murine model. Br J Cancer, 2002, 86(11): 1813-1816

53. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. Cancer Res, 2005, 65 (3): 671-680.

54. Bellmunt JN, Escudier B, et al. The medical treatment of metastatic renal cell cancer in the elderly: position paper of a SIOG Task force. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 69(1): 64-72.

55. Zhang Y, Jiang X, Qin X, et al. RKTG inhibits angiogenesis by suppressing

MAPKµ

Mediated autocrine VEGF signaling and is downregulated in clearµ

cell

Renal cell carcinoma. Oncogene, 2010, 29(39): 5404-5415.

56. 陈锡强，刘可春，王思锋，何秋霞。天然产物抗血管生成的研究进展。ft东科学，2010, 23(6)：33-38.

57. 陈世壮，计磊，王玉萍，等。红素对大鼠肝脏内皮细胞的体外杀伤作用。前卫医药杂志，1999, 16(6)：337-339.

58. 卢锦娥，梁立治，瘳灿，等。MMP2及其抑制物TIMP2在宫颈癌发展中的作用。现代医院, 2008, 7(8)：31-33.

59. 颜大海，朱树林，宝忠。鸡胚法筛选具有血管生成抑制作用中药.黑龙江医药，

1998, 11(2):94-98.

60. 王志玲。饮茶抑制血管生成。国外医学卫生学分册，2000, 27(3)：190-192.

61. 张明林，许建明，梅俏。结肠癌中MMP-2和MMP-9蛋白表达与微血管计数的关系。安徽医药，2007, 11(2)：146-148.

62. 刘韬， 马岩，张锐。基质金属蛋白酶与恶性肿瘤侵袭和转移关系的研究进展。

2004, 30(4): 662-664.

63. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow oxygen and nutrient supply and metabolic microenvironment of human tumors a review. Cancer Res 1989, 49(23): 6449-6465.

64. Zuo S, Ji Y, Wang J, et al. pression and clinical implication of HIF-1alpha and VEGF-C in non-small cell lung cancer, J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(6): 674-676.

65. Katayama A, Bandoh N, Kishibe K, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. Clin Cancer Res, 2004, 10(2):

634-640．

66. Tanioka Y, Yoshida T, Yagawa T, et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavorable prognosis in superficial

Oesophageal cancer. Br J Cancer, 2003, 89(11): 2116-2121.

67. Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, et al. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion tumor growth and angiogenesis. Oncogene, 2004, 23(27): 4681-4689.

68. Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. Cancer Res, 2005, 65(8):

3193-3199．

69. Hendrix MJ, Seftor EA, Kirschmann DA, et al. Molecular biology of breast cancermetastasis. Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. Breast Cancer Res, 2000, 2(6): 417-422.

70. Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, et al. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type2 matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. Cancer Res, 2001, 61(17): 6322-6327.

71. Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, et al. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. Cancer Res, 2003, 63(16): 4757-4762.

72. Incorvaia, L, Badalamenti, G, Rini, G, Arcara, C, Fricano, S, Sferrazza, C, Di Trapani, D, Gebbia, N, Leto, G, 2007. MMP-2, MMP-9 and activin A blood levels in patients with breast cancer or prostate cancer metastatic to the bone. Anticancer Res 2002, 27: 1519-1525.

73. Delassus GS, Cho H, Park J, Eliceiri GL. New pathway links from cancer progression determinants to gene expression of matrix metalloproteinases in breast cancer cells. J Cell Physiol, 2008, 217: 739-744.

74. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer, 2002 2: 161-174.

75. Ogura S, Ohdaira T, Hozumi Y, Omoto Y, Nagai H. Metastasis-related factors

Expressed in pT1 pN0 breast cancer: assessment of recurrence risk. J Surg Oncol, 2007, 96: 46-53.

76. Vincenti MP. The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. Methods Mol. Biol 2001, 151: 121-148.

77. 张志超，孙亚欣，贾明库。基质金属蛋白酶含量及表达与肝细胞癌浸袭转移

的关系吉林大学学报（医学版），2006, 32(1): 116-118.

# 攻读博士学位期间的研究成果

Ziwei Liu, Qianying Yuan, Xuenong Zhang, Chaomei Xiong, Pingping Xue, Jinlan Ruan. RY10-4, a novel anti-tumor compound, exhibited its anti-angiogenesis activity by down-regulation the HIF-1αand inhibition phosphorylation of AKT and mTOR. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2012, 69(6), 1633-1640

(SCI, IF: 2.759)

Qianying Yuan, Ziwei Liu, Chaomei Xiong, Liqian Wu, Jianping Wang, Jinlan Ruan. A novel, broad-spectrum antitumor compound containing the 1-hydroxycyclohexa-2,5-dien-4-one group: the disclosure of a new antitumor pharmacophore in protoapigenone 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011, 21(11), 3427-3430. (SCI, IF: 2.661)

阮金兰；袁倩颖；熊朝梅；刘子维。一种抗肿瘤化合物及其制备方法和应用. 受理号：201110081818.7/2011.4.1

刘子维，薛聘聘，石犊，赵洋，阮金兰。普通针毛蕨的化学成分和药理学活性研究进展[OL]。科技论文在线. 2013

致 谢

值此学业完成之际，谨向所有给予我指导、关心、帮助的老师和朋友表示衷心的感谢！

在此首先要感谢我的导师阮金兰教授给了我宝贵的学习机会，从课题的选定，到实验的细节问题直至最后定稿，无不倾注了导师大量的心血。在三年的博士研究期间，我都深深受益于导师多方面的关心、指导和教诲。阮老师渊博的知识和严谨的学风将使我终生受益，同时生活中，他那平易近人的态度更是让人如沐春风，能够有幸师从阮金兰老师，我感到十分庆幸。

同时也要感谢实验室张长弓老师，熊朝梅老师，汪建平老师在实验过程中所给予的大力支持和理论指导。

感谢实验室袁倩颖师姐在实验过程中所给予我的巨大帮助，感谢实验室雷永芳、魏安华、陈静楼、张学农、陈静、魏涵、吴光华、宋珊珊、石犊、薛萍萍、杨娴、韩盼等兄弟姐妹们在工作与生活上对我的帮助和关心。感谢所有在研究生期间给予我支持和帮助的同学和朋友。

感谢药学院的熊自萍和汪继红老师支持和鼓励。

最后，感谢我的父母，感谢他们一直以来对我生活上无微不至的关怀，精神与经济上的大力支持，使我得以顺利完成自己的学业。

所有的支持与帮助，我将铭刻在心，这是我一生永恒的回忆和财富。