



华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

Targeting a cell state common to triple-negative breast cancer

靶向三阴性乳腺癌细胞状态治疗

信息学院：刘梦苑

2015317110008

30th Dec 2015



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

目录

实验背景

实验过程与结果

总结



華中農業大學

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

实验背景



华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

基于基因表达谱将乳腺癌的亚型划分为:

luminal A

luminal B

HER2 enriched

normal like

basal like

claudin low



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

三阴性乳腺癌是什么样的？

三阴性乳腺癌是指癌组织免疫组织化学检查结果为**雌激素受体（ER）**、**孕激素受体（PR）**和**原癌基因Her-2**均为阴性的乳腺癌。这类乳腺癌占有所有乳腺癌病理类型的**10.0%~20.8%**。

特点：高侵袭性、预后差、发病年龄较早、早期发生局部复发和远处转移等

TNBC的治疗进展

■ 化疗

- 蒽环类与紫杉类
- 健择联合紫杉醇
- 卡培他滨联合伊沙匹隆

■ 化疗联合EGFR抗体

- 伊立替康联合西妥昔单抗
- 卡铂联合西妥昔单抗

■ 化疗联合PARP1制剂

■ 化疗联合抗血管生成剂

- 紫杉醇联合贝伐单抗
- 多西他赛联合贝伐单抗
- 化疗联合贝伐单抗



存在的问题:

TNBC不表达雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）和原癌基因Her-2这三种biomarkers,特异的靶向治疗太缺乏，给治疗带来困难。

TNBCs的一些细胞呈现出这样的特征：细胞会经历从上皮组织分离并迁移到其它位置,此时细胞呈现一种特殊状态，称为EMT。在乳腺癌中，这个过程与肿瘤的起始能力、治疗抗性、浸染力和难预后有关。而basal like和claudin low这两种亚型的EMT特征更为显著。



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

实验过程与结果



華中農業大學

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

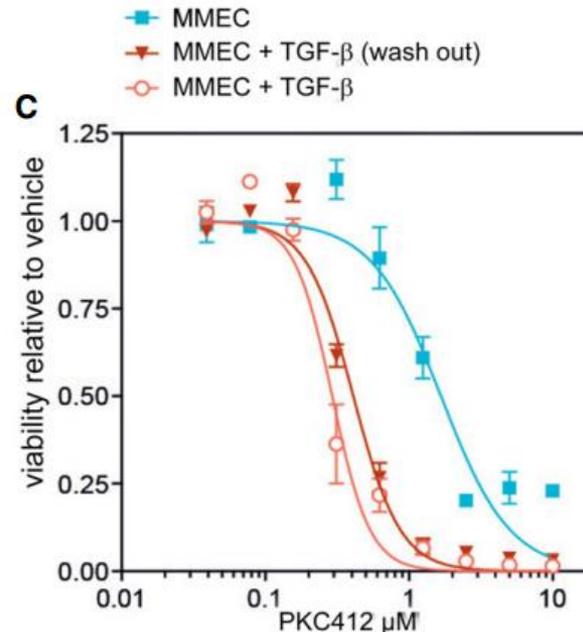
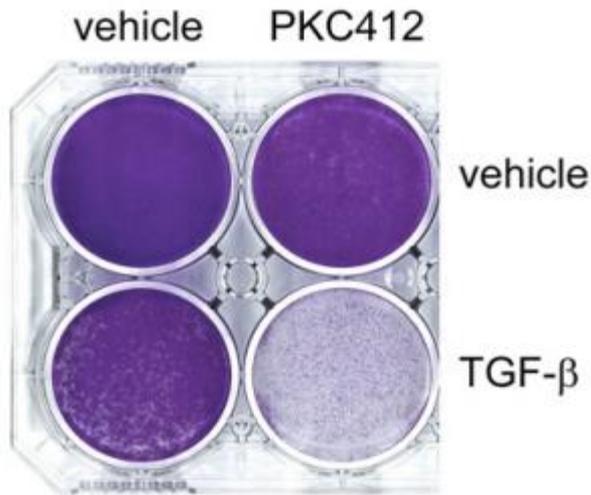
寻找选择性作用药物以及探讨药物作用方式



1、筛选靶向MCF10A-Twist1的小分子

用 Tanimoto/Jaccard 系数进行结构相似聚类，一组化合物与自然界植物碱——十字孢碱的结构相似。PKC412

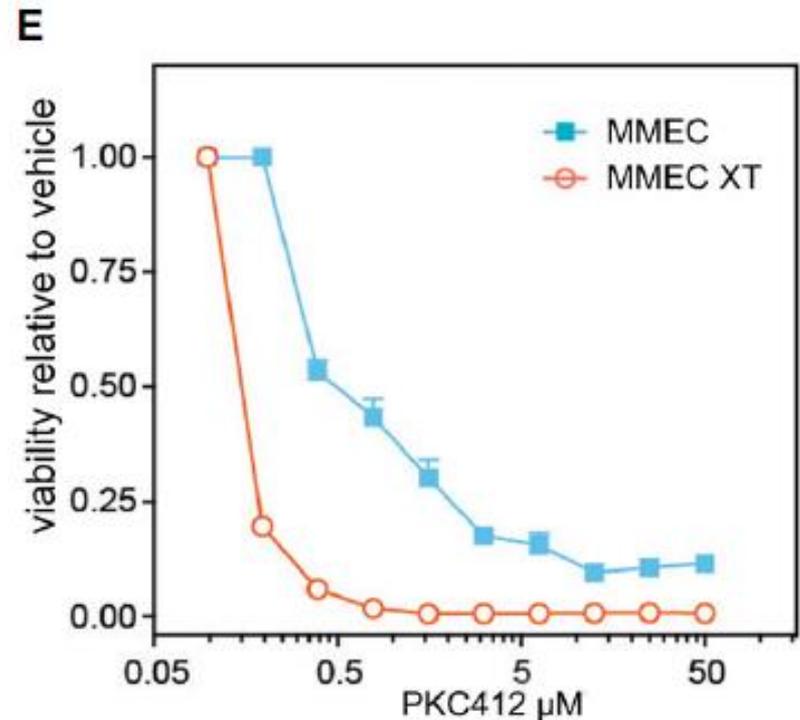
2、长期 TGF- β 治疗和体内 EMT 诱发 MMECs-HRASV12G 细胞对 PKC412 的敏感性





3、**MMECs XT**也会出现**EMT**，而且这种状态会稳定存在。所以将这种细胞作为生理肿瘤环境中**EMT**模型，发现这类细胞对**PKC412**敏感性是普通同类细胞的**5-10**倍。

结论：**Twist1**的过表达，**TGF- β** 的慢性刺激以及体内的**EMT**结果都是增加了细胞对于**PKC412**的敏感性。所以，**PKC412**不是靶向体内的突变而是靶向细胞的**EMT**状态。

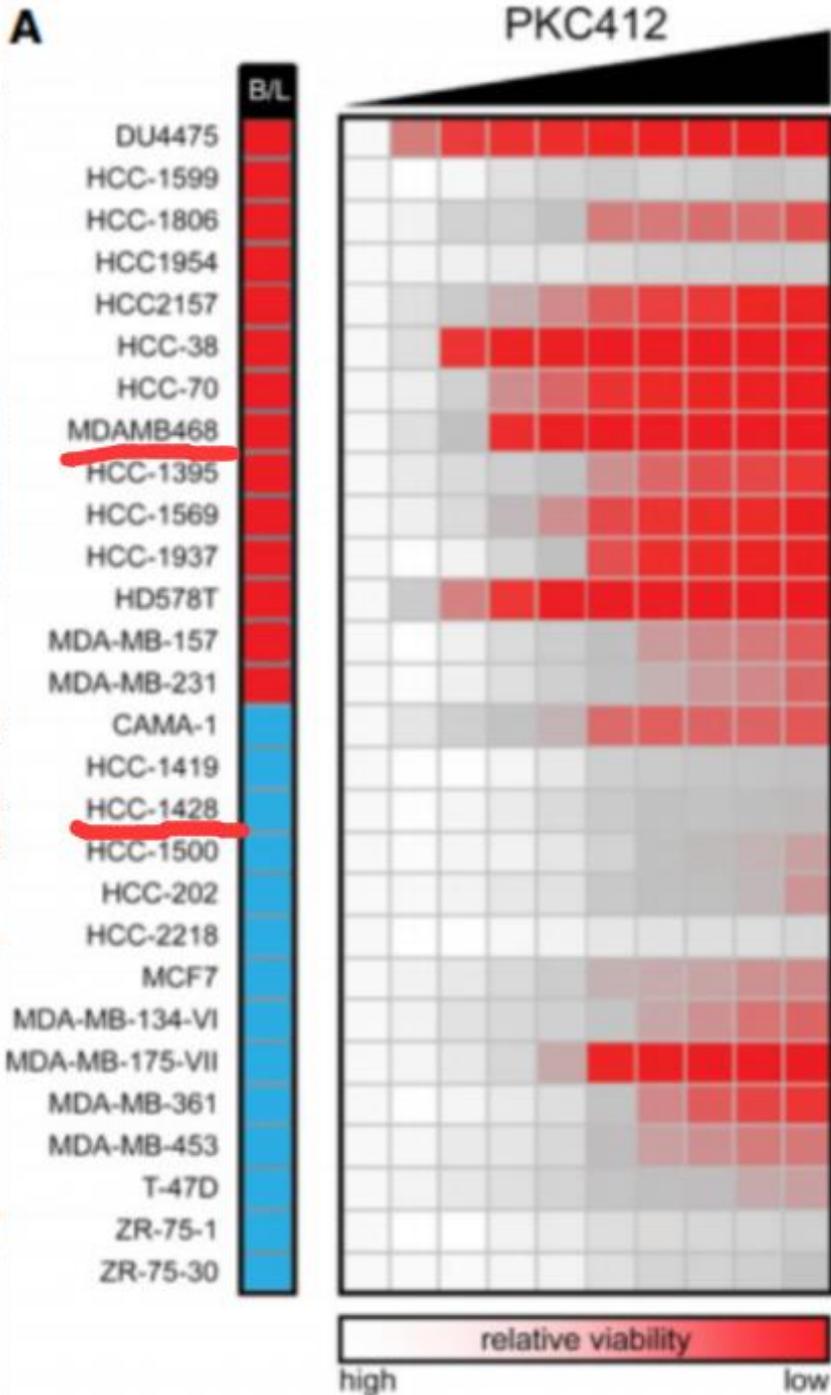




華中農業大學

HUZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

探究 **Basal-like** 亚型对于 **PKC412** 的敏感性



结论：**Basal-like** 亚型可能有与**EMT**相似的特征，使得其对**PKC412**的敏感性更强。



華中農業大學
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

新的问题：仍然有**Basal-like**亚型的细胞对**PKC412**具有抗性，**luminal** 亚型也有**PKC412**敏感的细胞，是否有额外的因素决定其敏感性？

PKC412是多激酶抑制剂，所以**PKC412**靶标的可能发现新的治疗乳腺癌的方法



华中农业大学

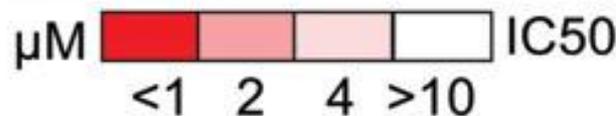
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

材料：具有与PKC412相同的靶标六种结构不相关的小分子抑制剂

basal-like cells

luminal cells

inhibitor	main target	BASAL				LUMINAL		
		DU4475	HCC38	HS578T	MDA-MB-468	ZR-75-1	HCC1419	HCC2218
PKC412	PKC, FLT3, cKIT	■	■	■	■			
Go 6976	PKC, JAK2	■	■	■	■			
Masitinib	FLT3	■			■		■	■
LY333531	PKC	x	■			■		■
OSI930	cKIT, VEGFR	x	■		■			■
Sunitinib	cKIT, FLT3, VEGFR	x	■	■				■
Tandutinib	FLT3, cKIT	x	■	■				■

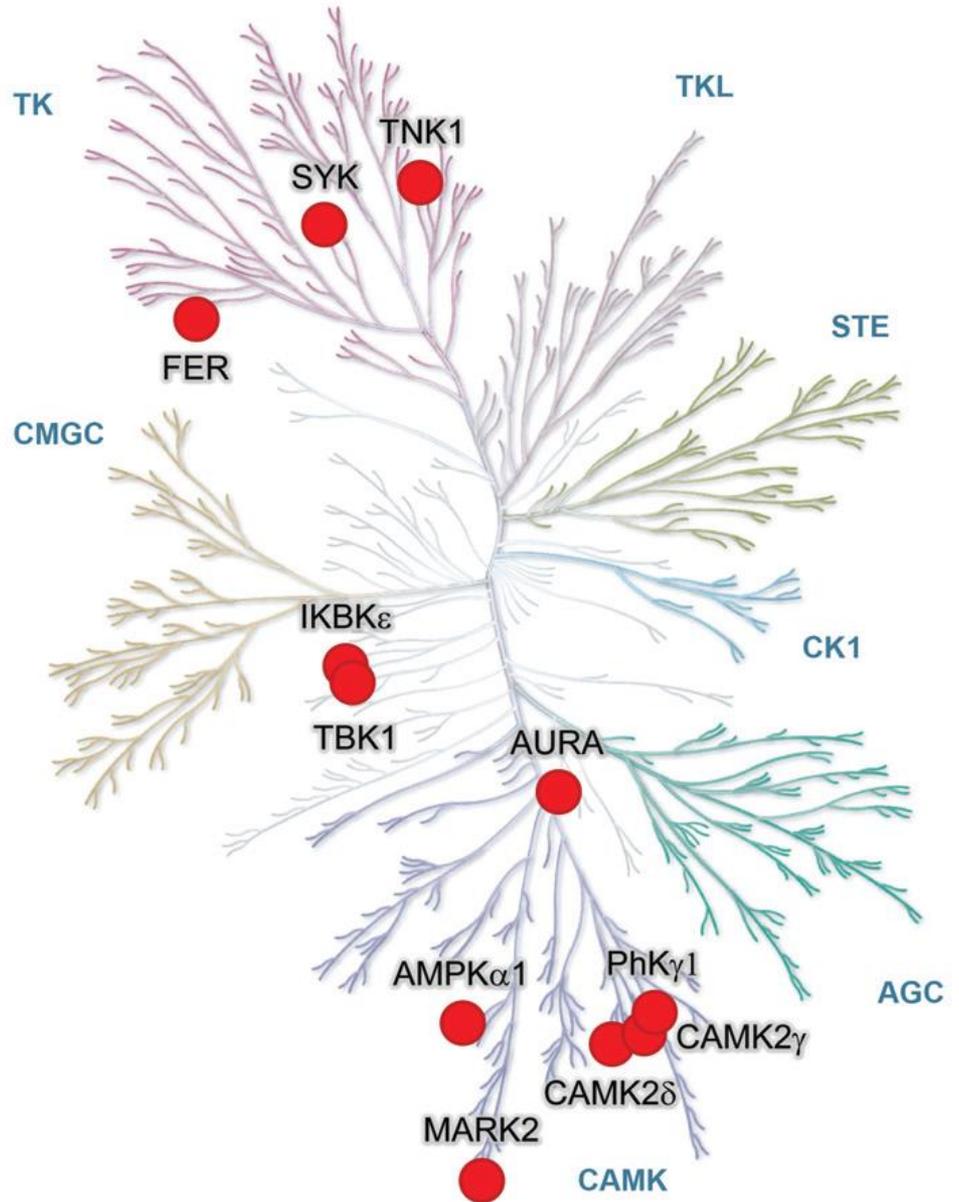




华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

用**药物的亲和纯化**来进行筛选PKC412关键的靶标，固定的PKC412与MDA-MB-468细胞裂解液一起孵育，将与PKC412结合的蛋白用质谱法进行鉴定。通过和未结合药物的竞争程度来确定PKC—matrix的特异相互作用。如果是同源的药（LY333531除外，它没有选择性），说明该物质是PKC412特异作用的靶标。基于这个标准，我们鉴定了11种候选靶标



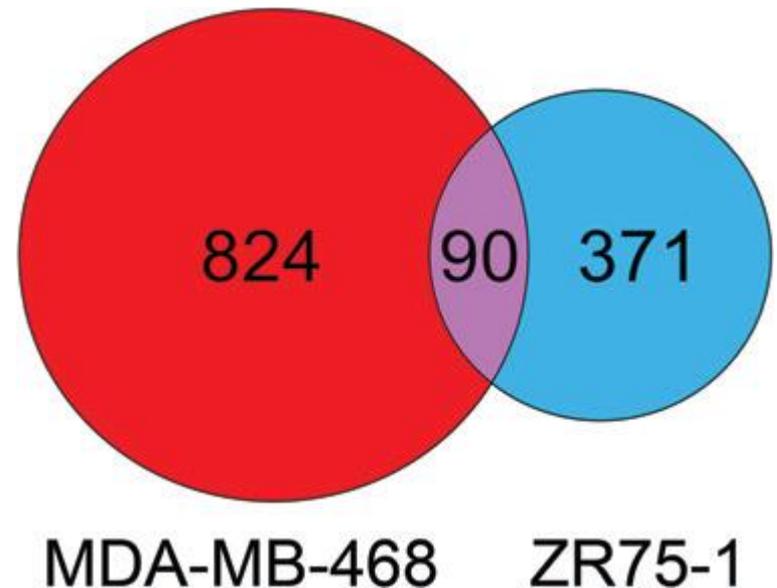


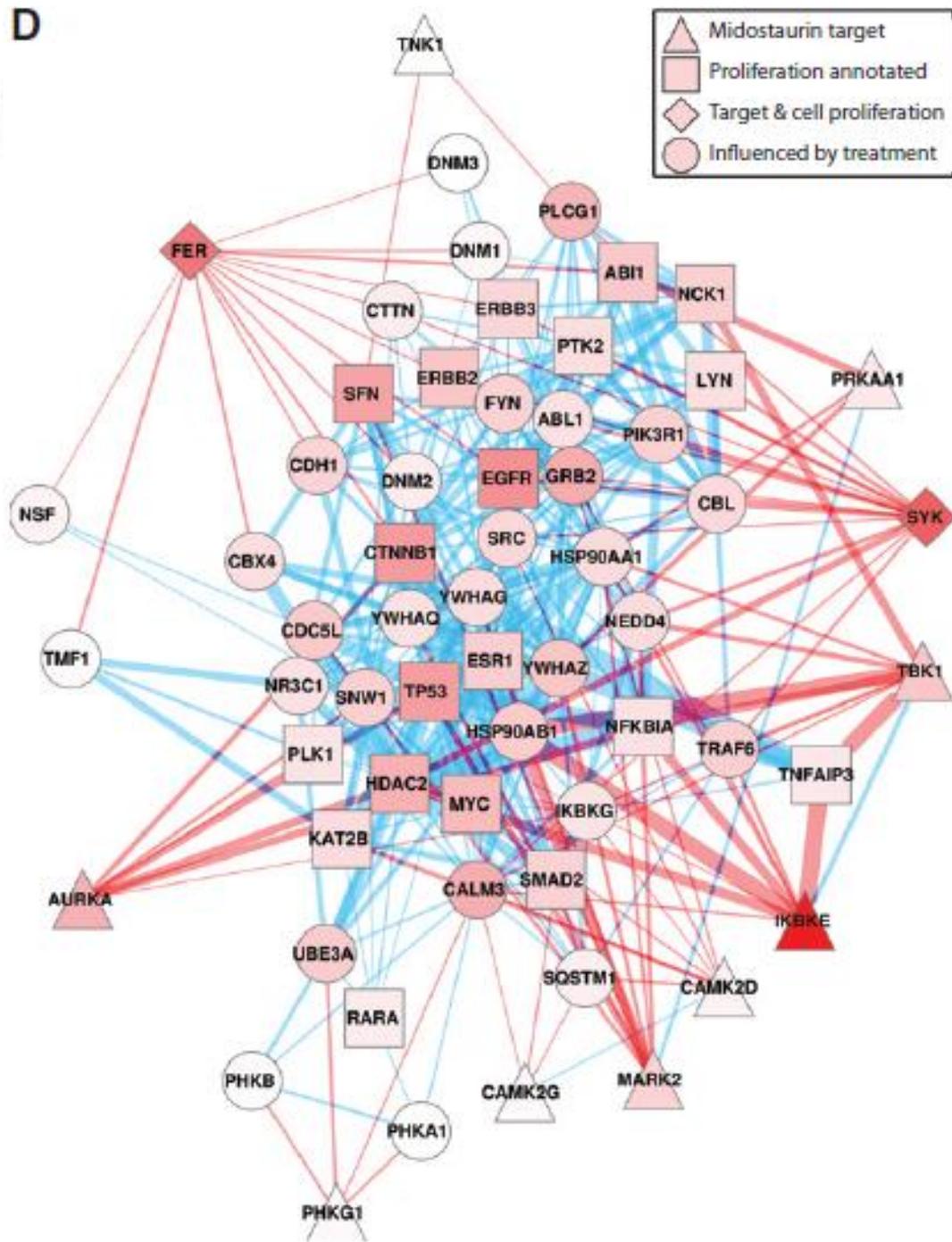
华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

用计算机模拟的方法来寻找PKC412一个关键的候选靶标

MDA-MB-468、ZR75-1经6小时PKC412治疗后，对RNA测序进行转录组分析，有超过800个基因出现至少三倍的上调或下调。和预期一样，这些基因都具有调节细胞凋亡的作用。



D

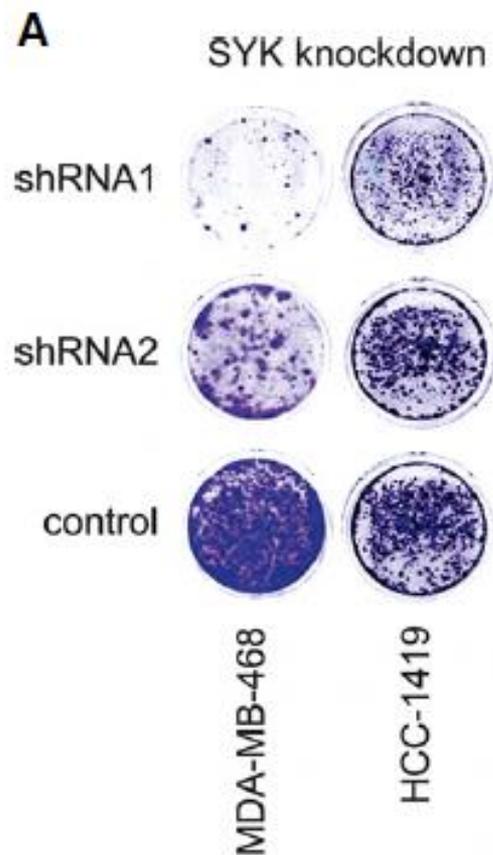
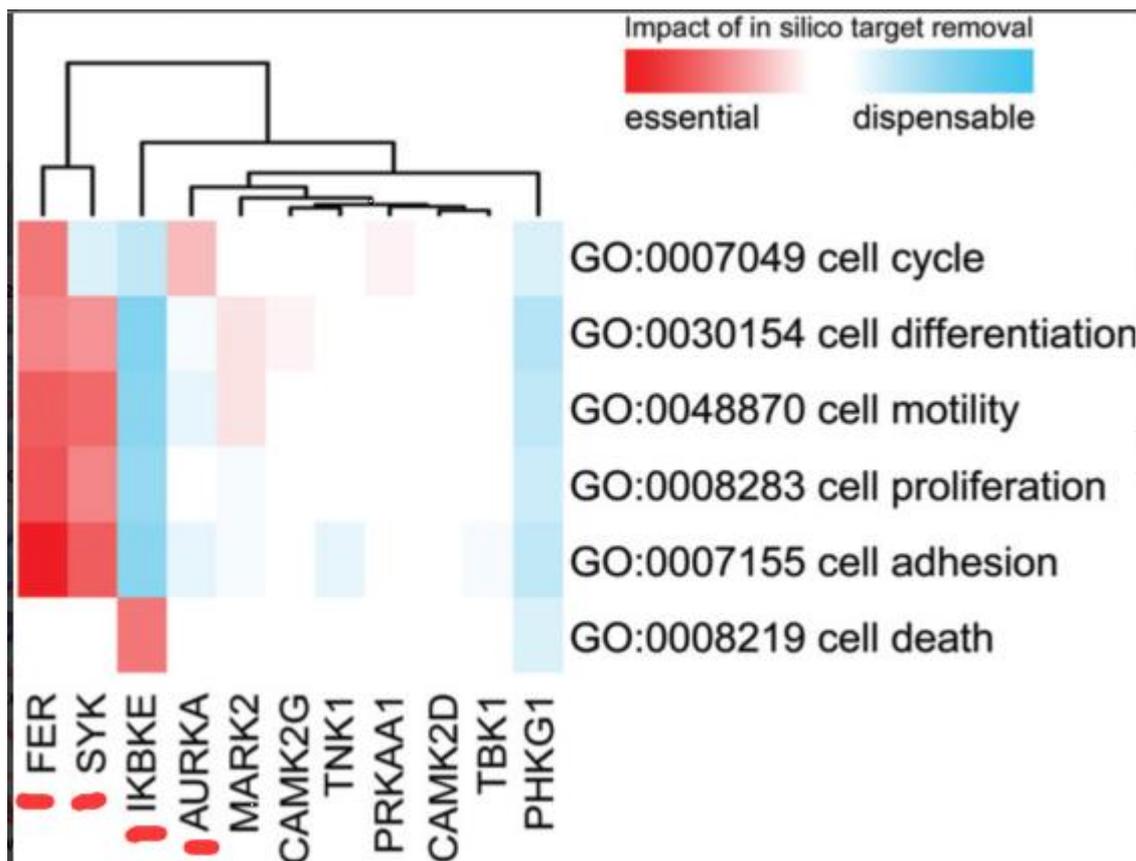
用计算机程序模拟从用亲和层析鉴定的相互作用蛋白质开始到计算机预测整个网络的各个节点，在PKC412治疗时会受到影响的可能性。发现MDA-MB-468网络的节点变化得最明显，而且据GO terms发现受PKC412影响最大的一些生理过程都是一些复杂多功能的与癌症相关的通路。



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

为确定每个候选靶标的影响，我们对每一个候选靶标进行了重新计算打分

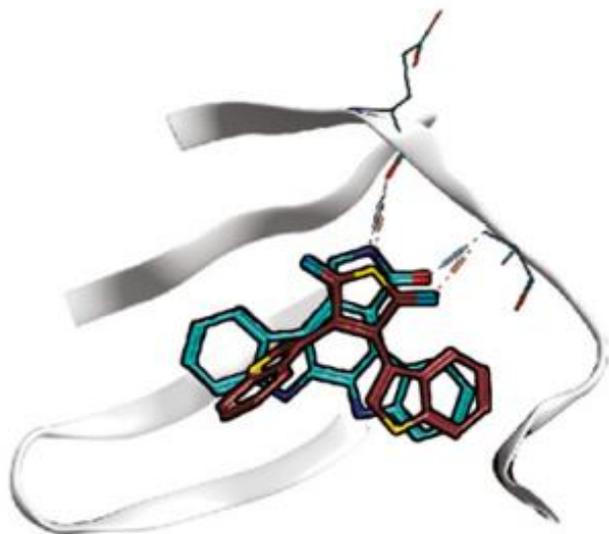




华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

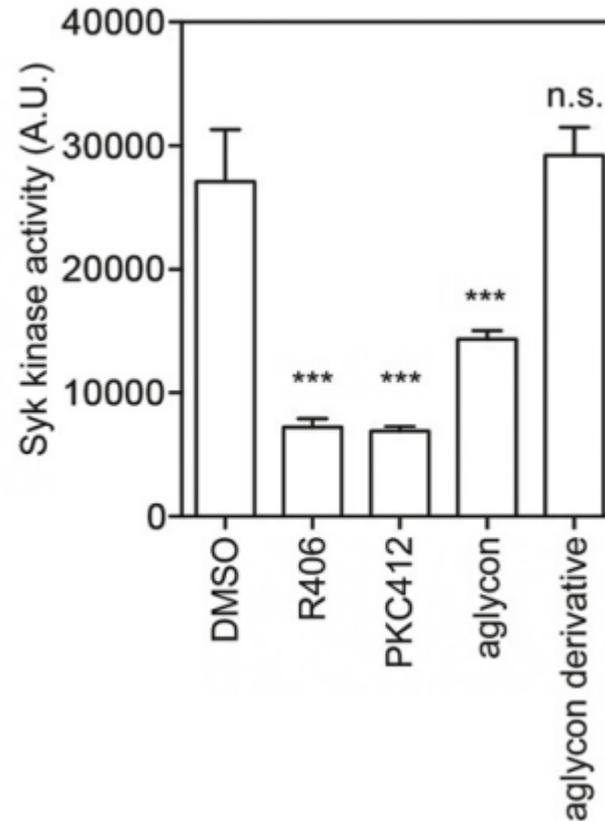
构效关系分析

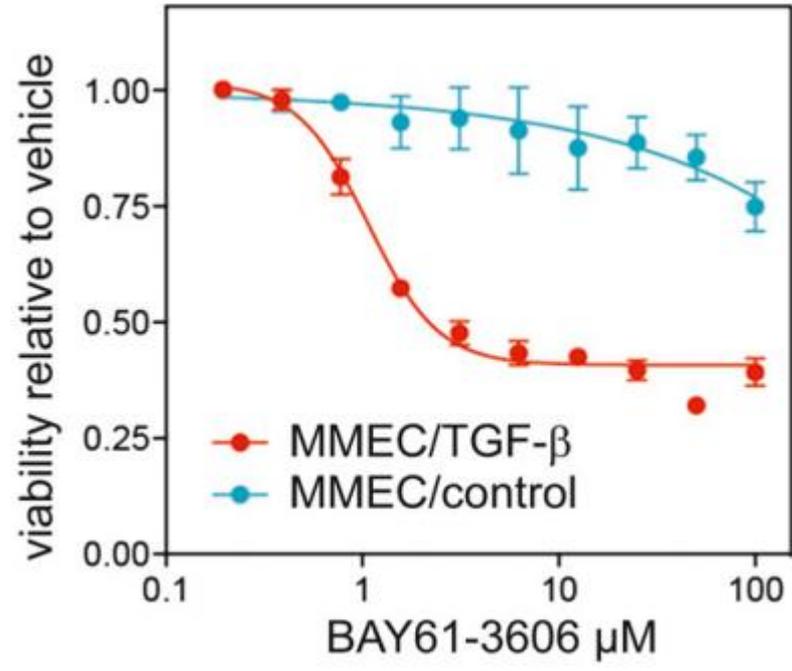
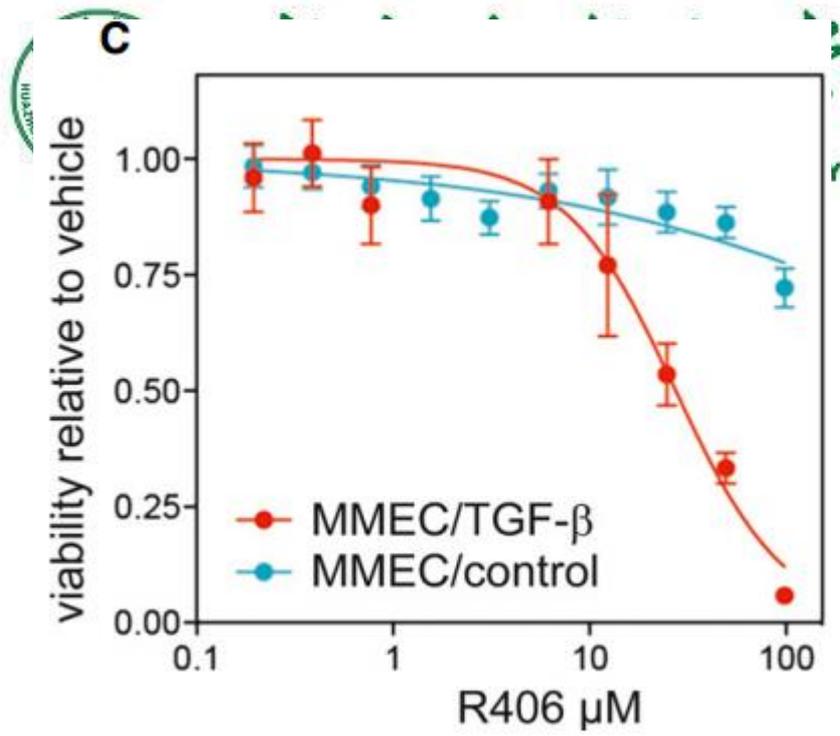


将PKC412的中心支架和SYK的催化腔进行对接显示：固定结构苯环对配基的结合起着重要的作用。——没有该类苯环的PCK412类似物不会对SYK有抑制作用，也不会对basal-like cells具有选择性。



合成3,4-Bis(3-indolyl)-1H-pyrrole-2,5-dion





R406 和 BAY61-3606是两种结构不相关的选择性SYK抑制剂，也对BLBCs有特异的毒性



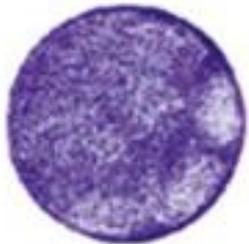
华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY



DMSO
+GFP cDNA



BAY61-3606
+GFP cDNA



BAY61-3606
+SYK cDNA

SYK过表达会缓解毒性，表明该化合物杀死细胞是通过抑制SYK的活性。

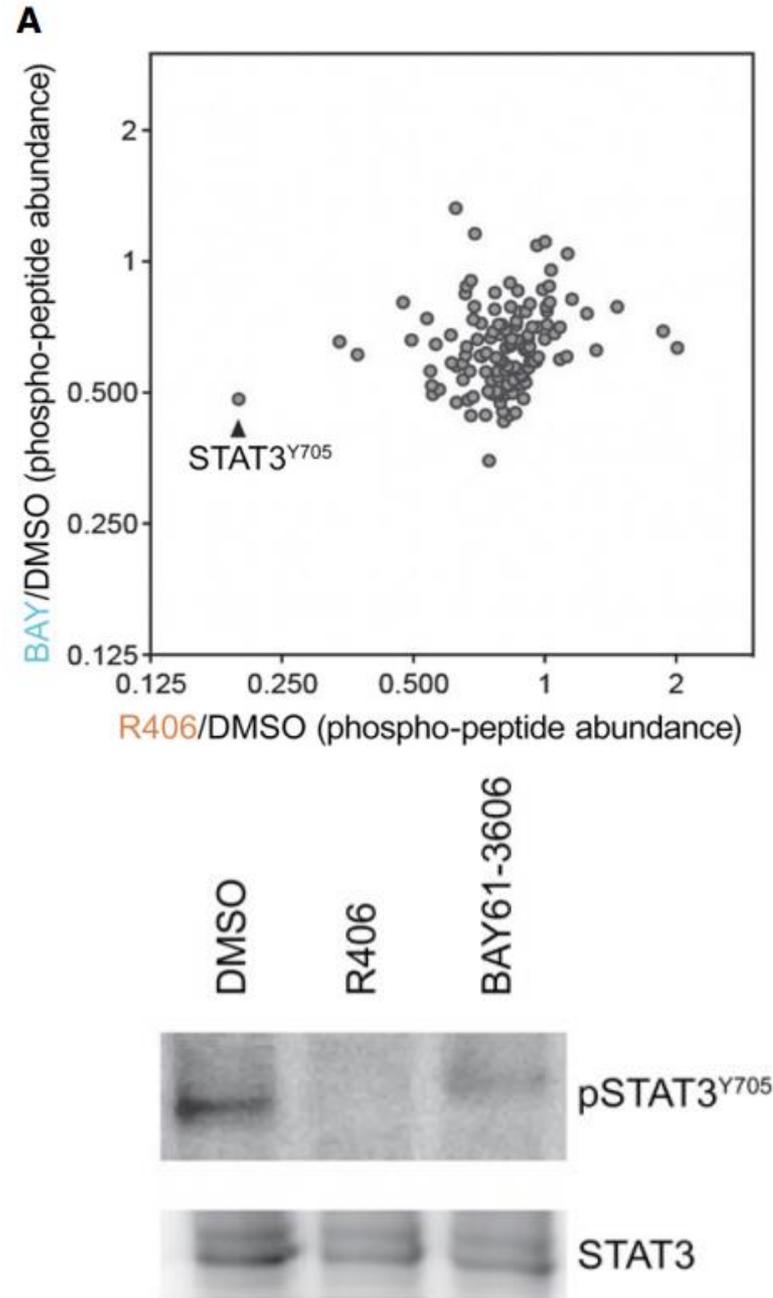
实验证明：**SYK**是一个新的
basal-like cells 的靶标



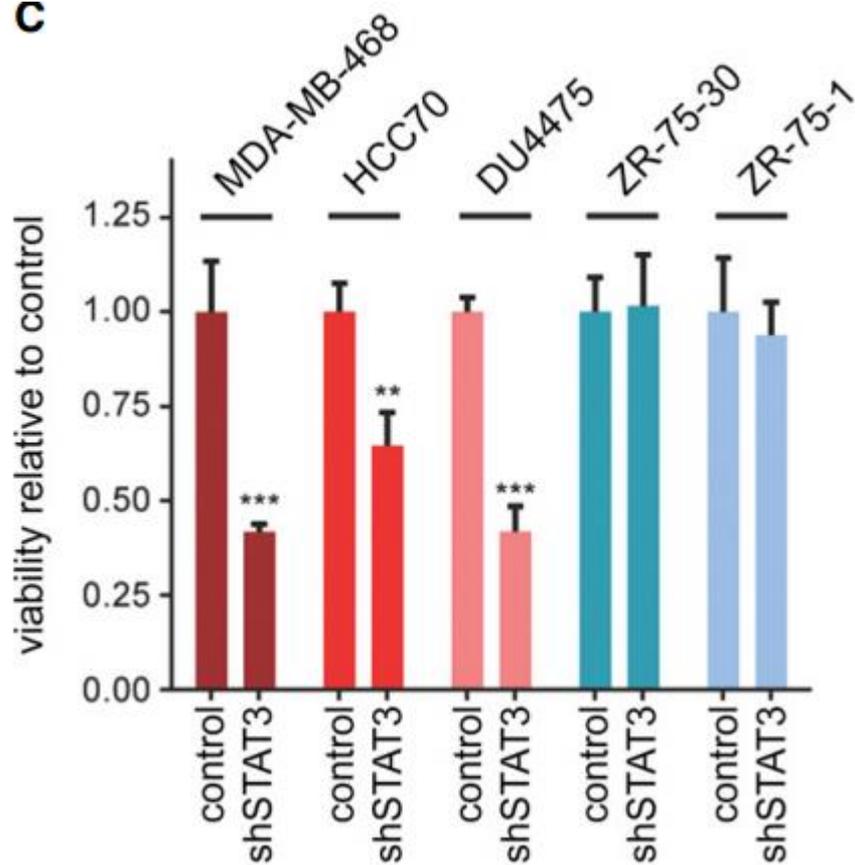
华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

将MDA-MB-468 细胞分别与对照 (DMSO)、R406 和BAY61-3606一起孵育6h。再将磷酸化的酪氨酸富集，用TMT标记，最后用液相色谱-质谱法分析。结果显示：转录因子STAT3的一个肽段705位上的磷酸化的酪氨酸残基急剧减少

western blot



C



STATs的下调能充分抑制
basal-like cells。

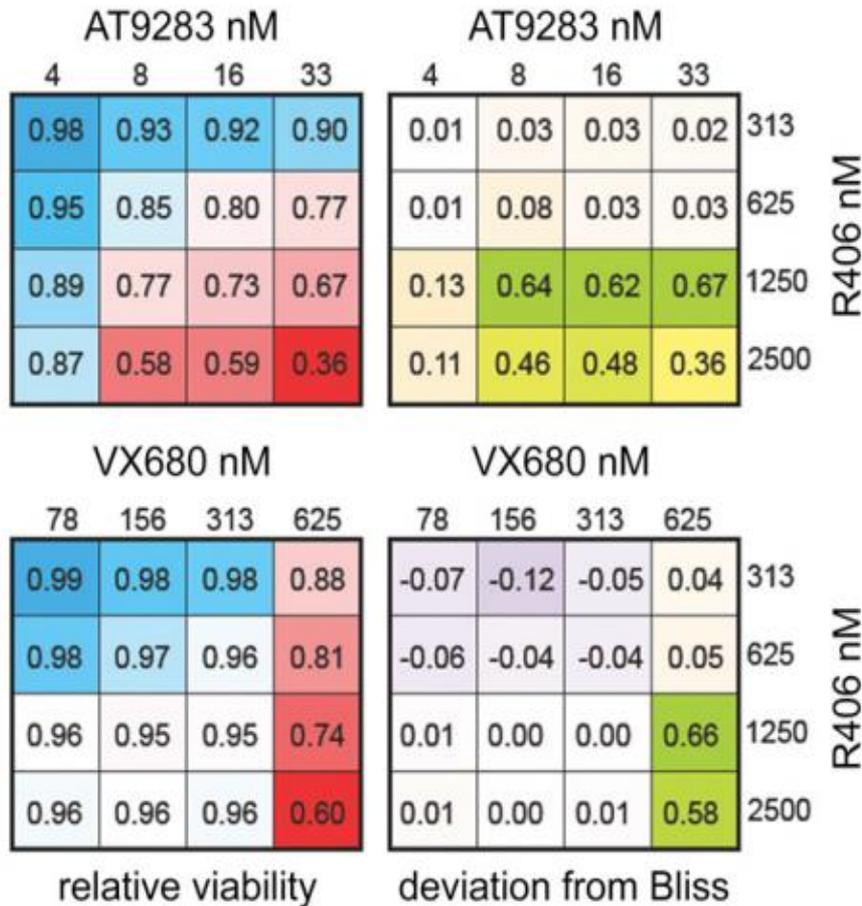
结论：酪氨酸激酶**SYK**在维持**BLBCs**的**STAT3**的磷酸化具有重要作用





探究SYK和AURKA激酶协同抑制能否起到更好的抑制效果

D



三阴性乳腺癌病人的这两种激酶普遍存在，而且是高表达，表明这两种靶标是共表达的。这些数据可以得出：PKC412的各种靶标可能协同作用，特异地作用于乳腺癌细胞，并且使得BLBCs出现EMT状态。



华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

总结

创新点：

- 1.细胞经历**EMT**后的特殊状态使其成为小分子的靶标。
- 2.**SYK**是小分子抑制剂的关键靶标，**SYK**依赖的**STAT3**的活性是**basal-like cells**的至关重要的弱点。
- 3.**PKC412** 同时抑制**AURKA**和**SYK**可以起到协同致死作用。

不足：筛选靶向**MCF10A-Twist1**的小分子费时废材，应该考虑更简单的方法。

启发：

- 1.生物信息技术和实践实验验证相结合更有说服力。
- 2.常规方法行不通，就要另辟蹊径。