

兰州大学

研究生学位论文

论文题目（中文） 1. 洁悠神对部分癌细胞体内外作用

2. 前列腺电切术前短期应用非那雄胺的系统评价

论文题目（外文） 1. Effect of Jieyoushen on some cancer cells in vitro and in vivo

2. A systematic review of short-term finasteride

pretreatment in patients treated with transurethral

resection of prostate for benign prostatic hyperplasia

研究生姓名 张 竣

学 科、专 业 外科学（泌尿外科）

研 究 方 向 泌尿系肿瘤

学 位 级 别 博 士

导师姓名、职称 王志平 教授

论 文 工 作

起 止 年 月 2007 年 9 月至 2010 年 4 月

论文提交日期 2010 年 4 月

论文答辩日期 2010 年 5 月

学位授予日期 _____

校址：甘肃省兰州市

原创性声明

本人郑重声明：本人所呈交的学位论文，是在导师的指导下独立进行研究所取得的成果。学位论文中凡引用他人已经发表或未发表的成果、数据、观点等，均已明确注明出处。除文中已经注明引用的内容外，不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究成果做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名： 张 日期： 2010.5.30

关于学位论文使用授权的声明

本人在导师指导下完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属兰州大学。本人完全了解兰州大学有关保存、使用学位论文的规定，同意学校保存或向国家有关部门或机构送交论文的纸制版和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权兰州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，可以采用任何复制手段保存和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文成果时，第一署名单位仍然为兰州大学。

保密论文解密后应遵守此规定。

论文作者签名：张欣 导师签名：张欣 日期 2011.5.30

目 录

缩略语·····	2
第一部分·····	4
前言·····	7
材料和方法·····	13
结果·····	37
讨论·····	45
结论·····	48
参考文献·····	49
第二部分·····	53
背景·····	55
方法·····	56
结果·····	58
讨论·····	67
参考文献·····	69
综述·····	73
攻读学位期间发表论文目录·····	83
致谢·····	84

3

缩略语	英文全称	中文全称
FCM	Flow Cytometry	流式细胞术
CKI	cyclin dependent kinase inhibitor	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂
Caspase	cysteiny l aspartate specific protease	天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶
MDR	multidrug resistance gene	多药耐药基因
SDS	dodecyl sulfate, sodium salt	十二烷基硫酸钠
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
Tris	Tris(Hydroxymethyl) aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
AP	ammonium persulfate	过硫酸铵
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine	N, N, N', N'-四甲基二乙胺
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
PS	phosphatidylserine	磷脂酰丝氨酸
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑盐
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
TURP	transurethral resection of prostate	经尿道前列腺切除术

10

缩略语	英文全称	中文全称
IPSS	International Prostatic Symptom Scores	国际前列腺症状评分
PVR	Postvoid residual	残余尿量
MVD	microvessel density	微血管密度
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子

第一部分

洁悠神对部分肿瘤细胞的体内外作用

中文摘要

目的 本研究试图用体内大鼠种植性转移模型实验以及体外肿瘤细胞药物实验的方法,探讨洁悠神对肿瘤细胞的体内外作用机制,为临床肿瘤治疗及预防提供新的药物及思路。

方法 体外培养膀胱肿瘤细胞 T24 和 EJ,给予不同浓度洁悠神处理后,应用细胞形态观察、MTT 比色法、平板克隆形成实验、流式细胞术(Flow Cytometer, FCM)和 Western 免疫印迹(Western blotting)等方法,研究洁悠神在体外对肿瘤细胞的作用;通过建立大鼠肿瘤种植性转移模型,研究洁悠神体内抗肿瘤作用。

结果 以不同浓度比例的药物处理肿瘤细胞不同时间,形态学观察肿瘤细胞表现为脱壁、变小和皱缩等凋亡表现;MTT 比色试验和克隆形成试验结果显示洁悠神对 T24、EJ 细胞的增殖活性有明显的抑制;FCM 结果显示 T24、EJ 细胞在药物处理后凋亡细胞明显增加,并且对癌细胞增殖的抑制和诱导癌细胞凋亡的作用随着作用时间和药物浓度的增加而增加;Western blotting 结果表明 p53 蛋白表达增加,而 Bcl-2 蛋白表达降低。大鼠种植性转移癌模型实验中,实验组和对照组的发生率分别是 29.4%和 66.7%,实验组和对照组肿瘤的发生率在统计学上有统计学差异(Fisher's Exact Test, $p < 0.05$)。

结论 体内体外实验表明洁悠神可能成为一个有效的抗肿瘤药物。

【关键词】 洁悠神、抗肿瘤；凋亡；种植性转移

Effect of Jieyoushen on some cancer cells in vitro and in vivo

Abstract

Purpose: The purpose of this study is to confirm the anticancer activity of Jieyoushen (JUC) against carcinoma cell lines in vitro and in vivo, and to elucidate the mechanism of its activity.

Methods: Human bladder cancer cell lines T24 and EJ were tested in vitro for cell proliferation and induction of apoptosis after treatment with JUC. Furthermore, the anticancer activity of JUC in vivo was tested in a rat intra-abdominal tumor model.

Results: Exposure of human bladder cancer cells T24 and EJ to JUC resulted in a dose- and time-dependent inhibitory effect on cancer cell proliferation, and also induced dose- and time-dependent apoptosis of T24 and EJ cells. The anti-apoptotic Bcl-2 protein was downregulated by the JUC treatment together with enhancement of the p53 expression. JUC can also prevent intra-abdominal tumor spreading in rats.

Conclusions: Considering anticancer activities in vitro and in vivo, JUC may be a promising anticancer drug.

Keywords: JUC; anticancer; apoptosis; implantation metastasis

前言

恶性肿瘤对人类健康和生命的威胁很大，它和心血管疾患已成为医学上的两大难关，是疾病导致死亡原因的前两位，是人类健康的主要杀手。世界上每年死于恶性肿瘤的人数呈逐年上升趋势。全世界每年死于恶性肿瘤的人数约 700 万，在我国城市居民疾病死因第一位的便是恶性肿瘤，2005 年我国城市居民的恶性肿瘤的死亡率 124.86/10 万，在农村地区，恶性肿瘤也居疾病死因的第三位，死亡率约 105.99/10 万。1995 年欧洲大约有 260 万新发癌症病例，死于癌症的人数为 160 万[1]，到 2006 年癌症新发病例数约为 320 万，死于癌症的人数为 170 万[2]。据报道约 1/3 的人在一生中会被诊断患有肿瘤并有 1/4 的人会死于肿瘤，开发新的抗肿瘤药物已经成为人类战胜恶性肿瘤的重要手段之一。

肿瘤是机体细胞异常增殖形成的新生物，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新生物。肿瘤的发生不只是单个基因突变的结果，而是一个长期的、多阶段的、多种基因突变积累的过程。原癌基因的激活和（或）肿瘤抑制基因的失活可导致细胞的恶性转化。原癌基因并不导致肿瘤，它所编码的产物是对细胞增殖和生长十分重要的蛋白质，具有调节细胞的生长和增殖、调节细胞发育和分化的作用。当原癌基因发生异常变化时，原癌基因激活，能使细胞发生恶性改变，此时的癌基因也就变成了细胞癌基因。插入诱变、点突变、基因扩增和染色体转位都可以使原癌基因激活，使之成为癌基因，编码癌蛋白，从而是细胞发生恶性改变，无限增殖。近代分子肿瘤学研究表明，已发现的 70 多种不同的癌基因以不同的方式和途径引起细胞癌变，在癌变的不同阶段同时或者相继有不同的原癌基因被激活，一种肿瘤可能有很多种原癌基因被激活，而一种癌基因可能参与多种肿瘤的发生。肿瘤抑制基因也在细胞的生长和增殖中起着非常重要的作用，它们的产物限制细胞的生长。当肿瘤抑制基因的基因结构发生改变或者启动子过甲基化时，导致肿瘤抑制基因的表达障碍，功能丧失，抑癌基因失活（突变或缺失），

它们所编码的蛋白就不能再调节DNA的修复及细胞的生长、凋亡，从而使有DNA异常的细胞可无节制地复制和增殖，导致细胞发生恶性变化。目前人们所了解的肿瘤抑制基因有Rb基因、p53基因、NF1基因、APC基因等。p53基因的表达产物p53蛋白在维持细胞正常生长和抑制细胞恶性增殖中起着十分重要的作用，因而被称为“基因卫士”。它在细胞周期调控、DNA损伤修复、细胞凋亡及抑制肿瘤血管生成方面发挥着重要的作用[2-4]。p53基因在人类、猴、鸡和鼠等动物中相继发现后，对其进行了基因定位，人类 p53基因定位于17P13.1。p53基因编码的p53蛋白，由393个氨基酸组成，分子量53 kD，具有特异的转录作用。当DNA损伤后，细胞的主要反应就是p53蛋白增加，它诱导对细胞周期有负调控作用的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子（CKI）P21^{WAF-1/CIP1}的转录，使细胞停留在G₁期，阻止DNA的合成，同时诱导DNA修复基因GADD45的转录，使得DNA的损伤能够及时修复。p53基因突变后，由于其空间构象发生改变，失去了对细胞生长、凋亡和DNA 修复的调控作用。p53基因突变或者缺失后DNA修复失败，不能通过p53DNA突变介导停滞在G₁期进行修复，细胞继续增殖，DNA的异常改变传递给子代细胞，这些异常的积累，最终可能使细胞发生肿瘤性转化。在人类50%以上的肿瘤组织中均发现了p53基因的突变，如恶性血液病、肝癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、肾癌、卵巢癌、子宫内膜癌等的发生都与p53基因的突变有关。p53在DNA损伤时也参与了细胞的凋亡，即程序性死亡[5]。目前的研究表明，许多抗癌药物的抗癌效果都与p53基因介导的细胞凋亡有关。抗癌药的应用，可以使p53基因的产物p53蛋白的表达增加，抑制了细胞的异常增殖和促进了肿瘤细胞的凋亡。p53基因的突变，也可以使肿瘤细胞对抗癌药的敏感性下降[6]。肿瘤的发生除了与原癌基因和肿瘤抑制基因有关外，凋亡调节基因也在肿瘤的发生中起着非常重要的作用。促进异常增生的细胞的凋亡可以降低肿瘤的发生，反之亦然。细胞凋亡是指为维持机体内环境稳定，由基因控制的细胞程序性死亡。凋亡进程可分为三个时相：诱导期，效应期和降解期。在诱导期，细胞接受各种信号从而引发各种不同的效应：进入效应期后，经过一些决定细胞命运（存活/死亡）的分子调控点，细胞进入不可

逆的程序化死亡，这些调控分子包括一系列原癌基因、抑制癌基因的产物和凋亡抑制基因等。细胞凋亡的调控涉及许多基因，上述p53基因也参与了凋亡的调控。Bcl-2是目前研究最广泛、最系统的抑制凋亡基因之一，其家族成员包括Bcl-x1、Bcl-xs、Bad, Bax基因等。最初在血液淋巴细胞中发现Bcl-2能抑制细胞死亡，随后陆续在其它一些细胞中也发现Bcl-2的这种作用。Bcl-2原癌基因由于染色体易位使得该基因与免疫球蛋白重链位点并列，导致Bcl-2基因过度表达，抑制了细胞的凋亡，延迟了细胞的寿命，导致肿瘤发生的机会增加[7]。Bcl-2可以增强细胞对DNA损伤因子的抵抗性，抑制大多数化疗药物所引起的靶细胞凋亡，但其本身并不能抑制这些因素对细胞的损伤。研究证实Bcl-2能抑制p53介导的凋亡，抑制Bcl-2基因表达可以促进多种刺激诱导的凋亡。Bcl-2抗凋亡的机制可以概括为：抑制线粒体释放促凋亡蛋白；直接抗氧化；抑制凋亡蛋白的细胞毒作用；维持细胞的钙稳定。目前的研究表明，许多抗癌药物都有抑制Bcl-2基因的表达，从而促进肿瘤细胞凋亡的作用[8]。与凋亡有关的p53和Bcl-2基因在本研究中用来研究药物诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制。

细胞凋亡后，会发生形态学变化和生物化学变化。形态学的变化是多阶段的：首先出现的是细胞体积缩小，连接消失，与周围细胞脱离，细胞光镜下表现为变小、皱缩和脱壁等，然后是细胞质密度增加，线粒体膜电位消失，细胞色素C释放到胞浆中，细胞核的核膜和核仁破碎，DNA降解成小片段，片段的大小约为180-200bp。胞膜有小泡形成，膜内侧的磷脂酰丝氨酸从内侧翻转到外侧，但特点是膜的结构完整，最终将细胞残骸分割包裹成几个凋亡小体。因为膜的完整，所以没有内容物外溢，因此机体没有炎症反应。通过姬姆萨染色，就可以看到凋亡小体。细胞凋亡的生物化学变化表现为：细胞浆内Ca²⁺浓度增加；细胞内活性氧增加；质膜通透性变大；DNA内切酶活性升高，DNA被切割成有序DNA片段等，在细胞凋亡的检测中，DNA Ladder测定中就是利用细胞凋亡时形成的50-300kb或者180-200kb整倍数的寡核苷酸片段，在凝胶电泳上表现出梯形电泳图谱。而流式细胞术就是利用磷脂酰丝氨酸外翻的特征，将荧光标记的Ca²⁺依赖性磷脂结

合蛋白 Annexin-V与磷脂酰丝氨酸高亲和力的结合，流式细胞仪检测。同时流式细胞仪也利用碘化丙啶（PI）透过完整的细胞膜，可以与凋亡中晚期的细胞和死亡细胞结合，排除坏死细胞的特征。p53蛋白和Bcl-2蛋白的表达发生变化，促进了细胞凋亡，因此我们可以用Western blotting技术来检测p53蛋白和Bcl-2蛋白表达的改变以反映药物对细胞凋亡的影响。

目前肿瘤的治疗有抗癌药物（化疗）、手术、放射治疗、生物疗法及物理治疗等治疗方法。目前最为成熟和有效的治疗方法是化疗和手术治疗。药物对肿瘤细胞的作用可以使肿瘤细胞坏死或者凋亡，目前的研究表明化疗药物治疗肿瘤可能通过上述介绍的p53基因、Bcl-2基因等的途径来实现诱导肿瘤细胞的凋亡。Konstantakou EG等的研究表明，化疗药物顺铂可以促进p53蛋白的表达从而导致癌细胞凋亡[9]。p53基因的表达减少可能导致肿瘤细胞对顺铂的敏感性下降，从而可能致使临床治疗失败[10]。研究也发现，肿瘤凋亡抑制基因Bcl-2的表达也可以影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性[11]。

肿瘤细胞常常会出现耐药性，多药耐药基因（multidrug resistance gene, MDR gene）、microRNA等参与了肿瘤细胞实现耐药的过程[12, 13]。在临床治疗中，许多恶性肿瘤在治疗初期或者首次治疗时，都对化学药物表现出良好的治疗效果，然而，在治疗后期这些肿瘤往往表现出抗药性，从而使治疗效果下降或者失败[14]。化疗药物对正常的细胞也有一定的作用，所以化疗后常常出现如白细胞减少、消化道反应、血尿、免疫功能下降等副反应，所以寻找新的抗肿瘤药物成为肿瘤的治疗中人们关注的重点之一。手术治疗恶性肿瘤，仍然是目前最有效的治疗方法之一。近年来手术切除肿瘤时可能形成体腔或者切口的医源的种植性转移，越来越引起广大医务工作者、患者及家属的关注。有研究统计表明胃癌术后腹腔种植癌种植性转移高达50%[15]。体腔内器官的肿瘤累及到器官的表面时，瘤细胞可脱落并种植到体腔各器官的表面，形成种植性转移瘤，腹腔、胸腔最常受累。手术引起的种植性转移主要是开放手术引起的，如胃癌、肝癌的根治手术引起的癌的转移，腹腔镜手术如胃癌的根治等都可以引起癌的种植转移，前颅骨

钻孔处的硬脑脊膜肉瘤。近年来微创手术如腹腔镜肿瘤切除术腹腔镜穿刺针眼处的种植转移等也引起了注意[16, 17]。所以如何预防肿瘤的种植转移,特别是医源性转移研究逐渐引起大家的关注。目前预防医源性种植转移的方法有减少手术时间、术中热化疗、蒸馏水冲洗切口、化疗药物冲洗暴露的组织 and 缝合切口前切除切口暴露组织等。但是这些措施的实施还是有一定的难度或者效果有待提高。如术中热化疗持续时间长、需要专门的仪器,难以普遍开展;减短手术时间与术者的手术技能及熟练程度有关,所以寻求一种方便、可靠的预防肿瘤种植转移的方法是十分必要的。对于肿瘤手术切口及暴露组织的种植性转移,如有一种药物或者材料在刚切开组织还未到达肿瘤组织时为切口处覆盖一层无形保护膜或类似物,那么必将有效预防肿瘤的切口种植转移。如果这个药物对癌细胞还有直接的作用,那么对于手术引起的种植转移必定有很好的预防作用。

洁悠神是一种临床广泛应用的长效抗菌药物,兼有“物理抗菌”和“隐形纱布”双重功效的高分子活性剂,利用物理抗菌原理,经喷洒在创面形成一层稳定的抗菌网膜,吸附病原微生物,使其赖以生存的呼吸酶失去作用而窒息死亡,起到杀菌和抗菌作用,临床中广泛应用于预防手术创面感染。它从抗菌和保持创面清洁等方面给创面提供了一个良好的修复环境,从而防止细菌感染,促使创面愈合。实验证明:洁悠神用于激光术后,创面感染几率较使用其他材料明显降低,从而促进了创面的愈合[18, 19];对照实验研究证明,对照组给予正常换药,治疗组创面给予洁悠神,治疗组总有效率(用药后15 d内疼痛减轻,创面出现新鲜肉芽组织、创伤范围明显缩小患者所占比例)为100.0%,对照组为86.0%,治疗组疗效明显高于对照组[19]。还有实验证明用于宫颈病变术后、放射性皮炎、留置导尿伴随尿路感染等应用洁悠神都有很好的疗效[20-23]。洁悠神可以在创面形成分子级保护膜,那么我们推测,在实验中它可能阻止肿瘤细胞种植于手术中暴露的组织,但是目前并没有实验就洁悠神的预防肿瘤种植转移方面即洁悠神体外对肿瘤细胞的作用做出研究和探讨,本实验首先研究洁悠神体外对肿瘤细胞的作用,然后研究洁悠神在大鼠种植性转移癌的形成过程中的作用,并探讨体内

体外对癌细胞的作用机制,为临床手术中预防肿瘤种植转移及治疗肿瘤提供新的药物及思路。

材料及方法

2.1 材料

药物洁悠神系南京神奇科技开发有限公司免费提供。MTT、台盼兰从Sigma公司购买。BCA蛋白定量试剂盒、及蛋白marker DM121、超敏发光液购自于北京普利莱基因技术有限责任公司, 蛋白提取试剂盒购自于南京凯基生物科技发展有限公司, β -actin单克隆抗体、Bcl-2单克隆抗体、p53单克隆抗体及二抗等购自于北京博奥森生物技术有限公司。RPMI(Roswell Park Memorial Institute)1640培养基、DMEM高糖培养基购自GIBCO公司(Invitrogen Corporation)。胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程公司(中国杭州)。R15大鼠肝癌细胞株购自上海拜力生物科技有限公司。T24、EJ细胞株及其他实验常用材料及试剂来自兰州大学第二医院泌尿研究所。本实验所用Wistar大鼠购自于兰州大学动物实验中心。

2.2 试剂及配制、仪器

2.2.1 试剂及配制

1) 细胞培养基: 先将培养基粉剂加入终体积的 2/3 双蒸水中, 并用双蒸水冲洗包装袋 2-3 次(冲洗液一并加入培养基中), 每小包培养基加入 2.0g 碳酸氢钠(DMEM 培养基为加入 3.7g NaHCO_3), 充分搅拌至粉剂全部溶解, 加入 10 万单位的链霉素和青霉素, 调节 pH 至 7.2 左右, 加双蒸水至终体积, 滤器(0.22 μm 滤芯)过滤除菌, 用前每 90ml 加入 10ml 经 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 分钟水浴灭活的胎牛血清。

2) 青霉素储存液: 每西林瓶青霉素(80 万 U)中加入去离子水 4ml, 充分溶解后分装, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3) 链霉素储存液: 每西林瓶链霉素(100 万 U)中加入去离子水 5ml, 充

分溶解后分装，于-20℃保存。

4) 10%十二烷基硫酸钠(SDS): 称取 10gSDS 加入 90ml 的去离子水中，充分搅拌使其完全溶解，补加水至 100ml，常温保存。

5) 0.5mol / L EDTA(pH8.0): 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶于 700ml 去离子水中，加入约 50ml 10mol/L NaOH 溶液，调 pH 值至 8.0，补水至 1000ml，常温保存。

6) 1.0mol/L 的 Tris · HCl 溶液(Tris:三羟甲基氨基甲烷):取 Tris 试剂 30.29g, 加入蒸馏水 200ml, 充分溶解后用浓盐酸调节 PH 值至所需点, 而后蒸馏水定容至 250ml, 高温灭菌后室温下保存。调节 PH 值所需浓盐酸量大约为: pH7.4, 浓盐酸 17ml; pH7.5, 浓盐酸 16ml; pH7.6, 浓盐酸 15ml; PH8.0, 浓盐酸 10ml。1.5mol/L (pH 值 8.8)、0.5 mol/L (pH 值 6.8) 的 Tris · HCl 方法同上。

7) 10%过硫酸铵 (AP): AP 0.1g 加入超纯水 1.0ml, 振荡溶解后 4℃保存, 保存时间为 1 周。

8) 30%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (Acr/Bic): 将 Acr 29g 和 Bic 1g 加入 100ml 的超纯水中, 37℃下搅拌溶解, 4℃保存, 使用时恢复至室温且无沉淀。

9) 20%吐温 20 (Tween 20): Tween 20 20ml 加蒸馏水至 100ml, 混匀后 4℃保存。

10) 考马斯亮蓝 G250 溶液 (测蛋白含量): 考马斯亮蓝 G250 100mg 加入 50ml 95%乙醇, 溶解后加入磷酸 100ml, 加水至 1000ml, 混匀后滤纸过滤, 4℃保存。

11) SDS-PAGE 分离胶配方 (12%):

H ₂ O	8.2ml
30% Acr/Bic	10.0ml
1.5M Tris-HCl (PH 8.8)	6.3ml
10%SDS	0.25ml
10%AP	0.25ml

N, N, N', N'-四甲基二乙胺 (TEMED) 0.01ml

加入 TEMED 混匀后, 应立即灌胶。

12) SDS-PAGE 浓缩胶配方 (5%):

H ₂ O	5.5ml
30% Acr/Bic	1.3 ml
1.5M Tris-HCl (PH 8.8)	1.0ml
10%SDS	0.08ml
10%AP	0.08ml
N, N, N', N'-四甲基二乙胺 (TEMED)	0.008ml

加入 TEMED 混匀后, 应立即灌胶。

13) 转膜缓冲液配方:

Tris	3.0g
甘氨酸 (Glycine)	14.0g
SDS	1.0g

上述试剂溶于 600ml 蒸馏水中, 搅拌溶解后, 加 200ml 甲醇, 加蒸馏水至 1000ml 混匀, 4℃ 保存。

14) 电泳缓冲液: 称取 Tris 3.03g、Glycine 18.77g、SDS 1g 加蒸馏水至 1000ml, 搅拌溶解后室温保存, 此溶液可以重复使用 3 次。

15) 10×浓度丽春红染液: 称取丽春红 S 2g、三氯乙酸 30g 和磺基水杨酸 30g 加蒸馏水至 100ml, 溶解后常温保存, 使用时稀释 10 倍。

16) Tris 缓冲盐溶液(TBS): 取 NaCl 8.8g, 1mol/L Tris-HCl (pH7.5), 蒸馏水溶解并加至终体积为 1000ml。室温保存。

17) TBS tween20 缓冲液 (TBST): 20%Tween20 1.65ml 加入到 700mlTBS 中, 混匀后即可, 注意此液体应现配现用。

18) 封闭液(含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液): 取脱脂奶粉 5g 加入 100mlTBST, 溶解后 4℃ 保存, 使用时恢复至室温。注意此液体最好现配现用。

19) 显影液配方:

温水 (50°C-60°C)	750ml
米吐尔	2g
无水亚硫酸钠	100g
对苯二酚	5g
四硼酸钠	1g
溴化钾	5ml
加冷水至	1000ml

上述试剂逐一加入温水中, 待上一成分溶解后加入下一个成分, 最后冷水定容至 1000ml。

19) 定影液:

温水 (50°C-60°C)	700ml
无水硫代硫酸钠	240g
冰乙酸	100g
硼酸	7.5g
钾明矾	15g

溶解后加水定容至 1000ml, 室温保存。

20) D-Hanks 液:

NaCl	8.00g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O/ Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.06g/0.134g

将上述试剂溶于蒸馏水中, 定容至 1000ml, 用 0.1% 的 HCl 调 pH 至 7.2, 高压蒸汽灭菌 20-30min, 4°C 保存。

21) PBS 液:

NaCl	8.00g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O/ Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.56g/3.49g
KH ₂ PO ₄	0.20g

去离子水溶解并定容至 1000ml, 盐水瓶分装, 必要时高压蒸气灭菌, 4℃保存。

22) 胰蛋白酶消化液: 称取所需胰蛋白酶 0.25, 加 D-Hanks 至 100ml, 磁力搅拌混匀, 配成 0.25%浓度, 使其完全溶解, 过滤除菌、分装保存于 4℃冰箱, 使用前可将 pH 值调到 7.2 左右。

23) 细胞冻存液: 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 1ml与灭活小牛血清9ml混合配制, 4℃保存备用。

24) 6×浓度上样缓冲液: 取溴酚兰20mg, 甘油12ml, 加去离子水溶解至终体积为4ml, EP管分装, 4℃保存。

25) 2%MTT溶液: 取0.1g MTT, 放入烧杯中, 加50mlPBS(0.01mol/L, Ph7.4), 在电磁力搅拌机上搅拌使其充分溶解, 用0.22um的微孔滤膜除菌, 分装, 4℃保存。最长保存时间为2周。

26) 姬姆萨染液: 姬姆萨粉0.8g, 甘油50ml和甲醇50ml。先将姬姆萨粉溶于甲醇中, 在研钵中研磨, 待充分研磨溶解后再加入甘油, 混匀, 置于37℃恒温水浴8-12h, 用棕色瓶室温保存备用。

27) 台盼兰母液: 称取0.4g台盼兰, 加少量蒸馏水充分研磨, 加蒸馏水至 10ml, 滤纸过滤, 4℃保存备用。

2.2.2 试验仪器

1) 细胞冻存液氮罐: CRYO Thermolyne 型, 美国 Locator 公司产品。

- 2) 倒置相差显微镜: Canon, Tokyo, Japan.
- 3) 倒置显微镜: 中国北京
- 3) 电子天平: GM1302 型, Mettler Toledo 公司产品。
- 4) 恒温水浴箱: DZ-84 型, 上海跃进医疗器械一厂产品。
- 5) 离心机: J_T6M 型, 德国 Beckman 公司产品。
- 6) CW-CJ-18 标准超净工作台: 苏州净化设备厂。
- 7) 台式低温离心机: RS-20I11 型(日本)。
- 8) 2400 型 PCR 扩增仪: 美国。
- 9) 流式细胞仪: Becton Dickson 公司。
- 10) 细胞培养箱: Heraeus GBB16 中国北京。
- 11) 荧光显微镜: Olympus BH 日本。
- 12) 紫外分光光度仪: UV-9100, 中国北京。
- 13) 酶标仪: Elx800, 美国。
- 14) 精密 pH 计。
- 15) TG328B 电光分析天平: 中国上海。
- 16) 平板电泳仪: 中国北京。
- 17) 磁力搅拌器: 武汉科尔仪器设备有限公司。
- 18) 手提式高压蒸汽锅: 中国上海
- 19) WP800S 微波炉: 中国北京。
- 20) MF400 超低温冰箱: 青岛海尔集团
- 21) 低温冰箱: 青岛海尔集团
- 22) 微量移液器: 200ul、100ul、50ul、10ul(法国 France Gilson)。
- 23) 图象分析系统: 美国 Image—pro plus。
- 24) 数码相机: 日本佳能 G2。
- 25) 半干转膜仪: 美国。

2.3 细胞培养及处理

T24 和 EJ 细胞均来自兰州大学第二医院泌尿研究所。复苏后培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中并添加 10 万 U/L 的青霉素和 10 万 U/L 的链霉素（完全培养基），37℃饱和湿度 95%空气 5%CO₂的培养箱中。大鼠肝癌 R15 细胞购自于上海拜力生物科技有限公司，培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液并添加 10 万 U/L 的青霉素和 10 万 U/L 的链霉素（完全培养基），37℃饱和湿度 95%空气 5%CO₂的培养箱中。每次处理前培养 24 小时以使细胞贴壁。药物处理细胞前，用培养基稀释药物成不同浓度（体积比，本研究中浓度均采用体积比）。

2.3.1 细胞复苏、培养、消化和冻存。

1) 细胞复苏和培养

1. 细胞实验室进行常规紫外线照射 30 min 以上，超净台紫外线消毒 30 min 后开启通风 10 min，并用酒精纱布擦拭超净台台面。
2. 将装有新鲜培养基的容器置于 37℃恒温水浴锅中，回温后喷以 70% 酒精并擦拭，移入无菌操作台内。将 10 ml 左右新鲜培养基移入无菌细胞培养瓶中，备用。准备 40℃的温水待用。
3. 从液氮罐中取出细胞冻存管，立即投入到 40℃的温水中并摇晃，使其在一分钟内融化。以 70% 酒精擦拭冻存管外部，移入无菌操作台内。
4. 用火烧灭菌处理过的止血钳打开冻存管，用灭菌吸管吸出全部冻存液到含有 6ml 上述已备的培养基的离心管中，800g 室温离心 3min。
5. 将离心后的上清弃去，重新加入 6ml 上述已备的培养基的离心管中，重悬细胞，800g 室温离心 3min，此步可以重复 1 次。

6. 弃去上清，重新加入 6ml 上述已备的培养基的离心管中，重悬细胞，加入到底面积为 25cm^2 的经高压蒸汽灭菌的培养瓶中。
7. 加入适量的上述培养基后，拧紧瓶盖后倒回半圈，放入细胞培养箱中（ 37°C 、湿度 95%、 CO_2 浓度 5%）培养，每天观察细胞状态，视培养液颜色换培养液和细胞密度适时传代处理。

2) 细胞消化

1. 将培养液、胰酶液（含 0.25% 胰酶的 D-Hanks 液）及 D-Hanks 或者 PBS 放入 37°C 水中水浴。
2. 倒去待消化的细胞瓶内培养基，加入适量 D-Hanks/PBS 液洗涤一次，倒掉 D-Hanks/PBS，必要时重复一次。
3. 每瓶加入 10 滴左右细胞消化液，轻轻晃动使培养液均匀作用于细胞，放入细胞培养箱。
4. 显微镜下观察，细胞逐渐回缩伪足、变圆、并脱离瓶壁，乃至悬浮，立即加入培养基，用 10ml 吸管稍加吹打，吸出转移到灭菌细胞培养瓶中后加入适量培养基后培养，或者做后续处理。

3) 冻存

1. 选择处于对数生长期的细胞，在冻存前一天最好换液。将多个培养瓶中的细胞培养液去掉，用含 0.25% 胰蛋白酶消化液消化。倒置显微镜下观察细胞有 80% 以上变圆后，加入少量新鲜培养液。用吸管吸取培养液反复吹打瓶壁上的细胞，使其成为均匀分散的细胞悬液。然后将细胞收集于离心管中离心（ $1000\text{r}/\text{min}$ ， 10min ）。
2. 去上清液，加入含 20% 小牛血清的完全培养基，于 4°C 预冷 15 分钟后，逐滴加入已无菌的二甲亚砷（DMSO）或甘油，用吸管轻轻吹打使细胞均匀。细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{L}$ 以上，但密度不能太高，不能超过 $1 \times 10^7/\text{L}$ 。

口。

4. 将装好细胞的冻存管装入小布袋内（标记：日期、细胞种类及代次、冻存支数及操作者姓名）；采用下列步骤：先将冷冻管置入 4℃ 冰箱中 2~3 小时，再移至冰箱冷冻室内 3~4 小时，再放入 -70℃ 冰箱保存 24-48 小时，最后放入液氮中，可以长期保存。

2.3.2 细胞形态观察

本实验中采用倒置相差显微镜观察细胞形态。倒置相差显微镜，是相差显微镜和倒置显微镜的结合，既具有倒置显微镜的倒置观察方式，同时，成像原理则与相差显微镜成像原理相一致。倒置相差显微镜，其照明系统位于镜体上方，与一般光学显微镜不同，物镜和目镜则位于下部，这样在集光器和载物台之间有较大的工作距离，可以放置培养皿、细胞培养瓶和血细胞计数板等容器，辅助以相差的光学系统，可以很方便地对培养中的细胞进行观察，且相差系统的观察效果远好于一般光学观察系统。当同一种光通过细胞时，由于细胞不同部分对光的折射率不同，因此，通过细胞的光线和未通过细胞的光线便可以产生相位差。再通过特定的相差板使之发生干涉，如果衍射光线和 0-级光线相位相反，则合光的振幅减小，物体图像变暗；如果相位相同，则合光的振幅增大，图像变亮，则可以产生明暗不同的图像。因此，无色透明的样品在显微镜下表现出明暗的对比从而可以被识别。采用倒置相差显微镜，可以较清楚观察到细胞的轮廓和内部结构，可以对培养瓶或者培养皿中的细胞进行长期的观察、拍照、录像等以方便记录生活细胞。

在实验中，我们给细胞加药不同浓度，药物作用时间为 24h、48h 和 72h 后，用倒置相差显微镜观察细胞形态变化。

2.4 MTT 比色试验

MTT 全称为 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-dimethylphenyltetrazolium bromide, 汉语化学名为 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, 商品名为噻唑蓝, 是一种黄色的染料。MTT 比色法, 是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚 (Formazan) 并沉积在细胞中, 而死细胞因为线粒体已经无功能无法还原 MTT。二甲基亚砷 (DMSO) 能溶解细胞中的甲瓚, 用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。它的特点是灵敏度高、经济、重复性好、操作简便、快速、无放射性污染, 与其他检测细胞活力的方法 (如细胞计数法、软琼脂克隆形成试验和 H-TdR 掺入试验等) 有良好的相关性。MTT 比色试验的缺点是: 由于 MTT 经还原所产生的甲瓚产物不溶于水, 需被溶解后才能检测。这会对实验结果的准确性产生影响, 而且实验者也可能受到溶解甲瓚的有机溶剂的损害。

2.4.1 试验用品

- 1) MTT 溶液 (配置方法见上)
- 2) 含 10%胎牛血清 PRMI1640 培养液, 0.25%胰蛋白酶消化液、DMSO。(配置方法见上)
- 3) 96 孔培养板 (平底型, 不能重复使用, 以免影响吸光值), 可调移液器、吸管、离心管、计数板。
- 4) 细胞培养箱, 倒置显微镜, 振荡仪、酶联免疫检测仪。

2.4.2 试验步骤

- 1) 收集 T24、EJ 细胞, 调整细胞悬液浓度, 每孔加入 100 μ l, 约 1×10^4 细胞, 铺板使待测细胞调密度 10000/孔, (边缘孔用无菌 PBS 填充)。
- 2) 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 至细胞单层铺满孔底 (96 孔培养板), 加入浓度梯度的洁悠神, 一般 6 个梯度 (分别药物比例是 1/10000、5/10000、1/1000、1.5/1000、2/1000 和 3/1000。前期预试验测得最低作用浓度比例是 1/10000) 每孔 100 μ l, 设 7 个复孔, 以减少试验操作误差。
- 3) 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24-72 小时, 倒置显微镜下观察。
- 4) 分别于 24 小时、48 小时和 72 小时时间点取出一 96 孔培养板, 每孔加入 20 μ l MTT 溶液 (5mg/ml, 即 0.5%MTT), 继续培养 4 小时。
- 5) 终止培养, 打开 96 板盖子, 翻转 96 孔板, 右手持 96 孔板, 左手拍击右手腕, 倒去 96 孔板内培养液。
- 6) 每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 490nm 处测量各孔的吸光值。
- 7) 同时设置调零孔 (培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质—本实验中为细胞培养液、MTT、二甲基亚砜, 对照组的存活率看作 100%)。打印结果, 做好记录。

2.5 台盼兰排斥实验

台盼兰排斥实验是细胞活力的检测方法之一, 细胞死亡后台盼兰可以穿透变性的细胞膜, 与解体的 DNA 结合。而活细胞膜是完整的, 台盼兰是无法进入到细胞内, 就不能与细胞核内的 DNA 结合, 表现为台盼兰排斥。是检测细胞生长繁

殖密度之定量信息的权威而经典的技术方法。本研究中用台盼兰排斥实验检测动物造模前，R15 肝癌细胞的密度及存活率。

2.5.1 实验用品

- 1) 2%台盼兰母液（配置方法见上），使用时，用 1.7%的盐水等体积混合，即浓度为 1%。
- 2) 吸管、血细胞计数板、倒置显微镜、离心管等。

2.5.2 实验步骤

- 1) 消化细胞成单细胞悬液，适当调节细胞浓度。细胞浓度应达到 10^6 。
- 2) 取 2%的台盼兰母液加等量的 1.7%的盐水，混匀，最好使用前配制。
- 3) 取刚配制的台盼兰溶液 0.5ml 与 0.5ml 的细胞悬液混合。
- 3) 在短时间内（3min 内）用血细胞计数板快速计数。活细胞无色透亮，死细胞核呈蓝色。计数死细胞和活细胞。
- 4) 细胞存活率=活细胞数/（死细胞数+活细胞数）。

2.6 平板克隆形成试验

克隆形成试验是反映单个细胞增殖能力的有效方法之一。形成克隆的细胞必为贴壁和有增殖活力的细胞。克隆形成率反映细胞群体依赖性和增殖能力两个重要性状。其基本原理是单个细胞在体外持续增殖 6 代以上，其后代所组成的细胞群体，称之为克隆或集落。每个克隆可含有 50 个以上的细胞，大小在 $0.3-1.0 \text{ mm}^3$ 之间。通过计数克隆形成率，可对单个细胞的增殖潜能作定量分析，了解细胞的

增殖能力和对生存环境的适应性，克隆形成率高者其独立生存能力强。这种方法常用于抗癌药物敏感性试验，肿瘤放射生物学实验等。平板克隆形成试验适用于贴壁生长的细胞，其方法简单，不需要制备琼脂培养基，细胞可在培养皿底壁形成克隆。

2.6.1 试验用品

- 1) 含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液，0.25%胰蛋白酶消化液（配制方法见上）。
- 2) 姬姆萨染液：配置方法见上。取姬姆萨原液一份，加入 9 份 PBS（0.67mol/L, pH 6.4）即为应用液。
- 3) 6 孔细胞培养板，巴氏吸管，血细胞计数板、无水乙醇等。
- 4) 细胞培养箱，倒置显微镜。

2.6.2 实验步骤

- 1) 制备细胞悬液：取对数生长期的 T24、EJ 单层培养细胞，弃去培养液，用 37℃预热的 0.25%胰蛋白酶消化液消化使其成单个细胞悬液，把细胞悬浮在 RPIM1640 培养液中待用。
- 2) 接种细胞：用血细胞计数板计数细胞，加 200 个/孔于含 37℃预温细胞培养液 10ml /孔的 6 孔板中，十字晃动培养板，使细胞均匀分布。在细胞培养箱中培 24 小时以供细胞贴壁（贴壁培养期间最好不要晃动）。
- 3) 弃去培养液，用含 5/10000、1/1000、1.5/1000 洁悠神的培养液分别作用不同孔内细胞 1h，未作用孔作为对照。
- 4) 弃去含洁悠神的培养液，用 RPIM 1640 培养液轻轻洗 3 遍，以便彻底除去洁悠神。每孔加入 10ml RPIM1640 培养液，放入细胞培养箱中培

养 2 周，并定期取出观察，待克隆形成肉眼可见后停止培养。

5) 先加入无水乙醇 5ml 固定（覆盖培养板底部即可）15min，弃去固定液，再加入姬姆萨染液适量染色（上述原液稀释 10 倍），倒掉并用流水缓慢洗去多余的染料，空气中干燥，计克隆数。

6) 计数克隆形成率：克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%

2.7 流式细胞术定量检测凋亡

流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)是 20 世纪 70 年代发展起来的一种在功能水平上对单细胞或其他生物粒子的理化及生物学特性(细胞大小、DNA / RNA 含量、细胞表面抗原表达等)进行定量分析和分选的检测分析新技术。它可以高速分析上万个细胞，并能同时从一个细胞中测得多个参数，与传统的荧光镜检查相比，具有速度快、精度高、准确性好等优点，成为当代最先进的细胞定量分析技术。特点：测量速度快；可进行多参数测量；FCM 是一门综合性的高科技方法（FCM 综合了光学，电子学，流体力学，细胞化学，免疫学，激光和计算机等多门学科和技术）；既是细胞分析技术，又是精确的分选技术。在细胞生物学、肿瘤学、免疫学、血液学、药物学中都有广泛的应用。

流式细胞仪(flow cytometer)又名荧光激活细胞分类仪(fluorescence activated cell sorter, FACS)。主要由液流系统、光学系统、电子系统、分析系统和细胞分选系统五个部分组成。将待测细胞制成单细胞悬液，经荧光染料染色后加入样品管，待测样品被压入流动室。待测细胞在鞘液的包裹下单行排列，依次快速通过检测区，被荧光染料染色的细胞受到强烈的激光照射后，产生散射光和荧光信号。通过接受装置后转为电信号，再经数/模转换器转换为可被计算机识别的数学信号，以一维直方图或二维点阵图及数据表或三维图形显示出来。

膜联蛋白 V (Annexin-V) 是一种分子量为 35-36KD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合

蛋白，能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）高亲和力特异性结合。以荧光素 FITC 标记了的 Annexin-V 作为探针，与翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸特异性结合后通过流式细胞仪检测。碘化丙啶（propidium iodide, PI）是一种核染料，将 Annexin-V 和 PI 联合使用，可以将凋亡早期的细胞和凋亡晚期的细胞区分开来。细胞发生凋亡时，膜上的 PS 外露早于 DNA 断裂发生，因此 Annexin V 联合 PI 染色法检测早期细胞凋亡较 TUNEL 法更为灵敏。又 Annexin V 联合 PI 染色不需固定细胞，可避免 PI 染色因固定造成的细胞碎片过多及 TUNEL 法因固定出现的 DNA 片段丢失。因此，Annexin V 联合 PI 法更加省时，结果更为可靠，是目前最为理想的检测细胞凋亡的方法。

2.7.1 试验用品

- 1) 流式细胞仪（FCM）。
- 2) Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒：包括 Annexin-V-FITC，结合缓冲液，碘化丙啶。
- 3) PBS PH7.4，细胞消化液（视细胞状态使用）。
- 4) 冰乙醇 4℃70%的乙醇。
- 4) 离心机等。

2.7.2 试验步骤

- 1) EJ 细胞采用单标法
 1. EJ 细胞达到 80%融合后，弃去培养液，加入含洁悠神比例为 0、1/10000、1/1000 和 1.5/1000 的培养液处理 24 小时。
 2. 加入细胞消化液（加入消化液的量视细胞状态而定）消化收集细胞（ 1×10^6 ），离心后 PBS 洗涤两次，4℃70%乙醇固定，若不能立即检测，放

入 4℃ 冰箱。

3. 离心后用 PI 染色。
4. 后样本通过流式细胞仪计数 1×10^4 细胞进行 DNA 含量分析, PI 用氩离子激发荧光, 激发光波波长为 488nm, 发射光波波长大于 630nm, 产生红色荧光, 可分析前散射光对侧散射光的散点图及 PI 荧光的直方图。分析软件为 muticycle (Phoenix 公司)。

2) T24 细胞采用双标法

1. T24 细胞达到 80% 融合后, 弃去培养液加入含药物比例为 0、1/1000 的培养液, 每个浓度的分别处理 24 小时、48 小时和 72 小时。
2. 加入细胞消化液 (加入消化液的量视细胞状态而定) 消化收集细胞 (1×10^6), 离心后 PBS 洗涤两次, 加入结合缓冲液。
3. 离心后用 Annexin-V 和 PI 联合避光室温反应 15min。加入结合缓冲液。
4. 流式细胞仪检测。用流式细胞仪检测, 激发波长 Ex=488 nm; 发射波长 Em=530 nm。Annexin V-EGFP 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测; PI 红色荧光通过 PI 通道 (FL2 或 FL3) 检测。检测结果软件分析。

2.8 Western blot 检测 p53、Bcl-2 蛋白的表达

Western Blotting 是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。Western Blot 原理是将待检测样品转移到固相载体上, 而后利用相应的探针来检测样品。它所使用的探针是抗体, 它与附着于固相支持体的靶蛋白所呈现的抗原表位发生特异性反应。这种技术的作用是对非放射性标记蛋白组成的复杂混合物中的某些特异蛋白进行鉴定和鉴别。它具有分析容量大、灵敏度高、特异性强等优点, 缺点是试验过程复杂繁琐, 容易出现误差。它是检测蛋白质特性、表达与分布的一种最常用的方法,

如组织抗原的定性定量检测、多肽分子的质量测定及病毒的抗体或抗原检测等。

2.8.1 试验用品

- 1) 高压锅、玻璃匀浆器、高速离心机、酶标仪、-20℃低温冰箱及-80℃超低温冰箱、垂直板电泳转移装置、杂交炉和半干转膜仪。
- 2) 单去污剂裂解液、0.01mol/L PBS (PH 3.0)、12%分离胶、4%浓缩胶、G250 考马斯亮蓝溶液、0.15mol/L NaCl 溶液、2× (5×) SDS 上样缓冲液、电泳缓冲液、转移缓冲液、10×丽春红染液、封闭液 (含5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液)、TBST、TBS、洗脱抗体缓冲液、显影液、定影液、抗体、超敏化学发光试剂, 总蛋白提取试剂盒, 蛋白质定量试剂盒 (BCA 法), 蛋白 Marker。试剂配制方法见前文。
- 3) 杂品与耗材: 各种规格的吸头、离心管和加样器, 各种规格的烧杯、量筒和平皿等玻璃器材, 硝酸纤维素膜, 乳胶手套, 保鲜膜, Western blotting 专用滤纸, 搪瓷盘 (大于 20×20cm), X-光片夹, X-光片, 玻璃棒, 计时器, 吸水纸, 96 孔细胞培养板。

2.8.2 试验步骤

- 1) 蛋白样品的制备
 1. EJ 细胞株达到 80%融合后, 弃去培养液加入含洁悠神比例为 1/1000 的培养液处理 0、24、48 和 72 小时。
 2. 用细胞刮刮取贴壁细胞, 用吸管将细胞瓶内培养液移入离心管内, 于 1000rpm 离心 5min, 收集细胞并用 PBS 洗涤两遍。
 3. 每 $5-10 \times 10^6$ 细胞加入 0.5ml 裂解液, 震荡重悬, 4℃静置 2min。

4. 按比例每 0.5ml 裂解液加入 1ml 抽提试剂，振荡混匀。4℃ 静置 10min。
5. 10000g (1.2 万转/分，实验室小型离心机) 4℃ 离心 10min，溶液分为两相，两相中间为蛋白膜。小心吸除上层相和大部分下层相 (慢慢倾斜一下离心管吸管吸出液体)，保留两相中间的蛋白絮状物。如果不能分相，可再加入 50ul 蒸馏水混匀离心。
6. 加入 1ml 纯乙醇洗涤沉淀。10000g 4℃ 离心 3min，去除杂质，蛋白沉淀在管底。
7. 去除管中所有液体，敞开口，室温空气干燥沉淀 (室温打开离心管盖子过夜即可)。
8. 每 1×10^6 细胞可加入 100ul 的蛋白溶解缓冲液 (5%SDS)，95℃ 煮 10min，室温放置 20-60min 溶解沉淀，离心除去不溶物。注：干燥蛋白沉淀可 4 度或 -20℃ 长期保存。

2) 蛋白质定量

Bicinchoninic acid (BCA) 法是近来广为应用的蛋白定量方法。

其原理是在碱性环境下蛋白质与 Cu^{2+} 络合并将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{1+} 。BCA 与 Cu^{1+} 结合形成稳定的紫蓝色复合物，在 562nm 处有高的光吸收值并与蛋白质浓度成正比，据此可测定蛋白质浓度。BCA 法蛋白质定量的特点是试剂及其形成的复合物颜色稳定，灵敏度高，操作简单，受外界干扰较小。

1. 将 25 μl 标准品与 250 μl 工作液混合。加于 96 孔细胞培养板中，可以设复孔以减少误差。
2. 将 96 孔细胞培养板放入恒温箱内，37℃ 反应 30min。
3. 将反应 96 孔细胞培养板冷却至室温，将 96 孔细胞培养板置入酶标仪中，测定 562nm 光密度值，绘制标准曲线图。
4. 测定待测样品的蛋白含量。本实验样品的蛋白浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 到

2. $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之间。

3) SDS-PAGE 电泳

1. 清洗玻璃板：一只手紧扣玻璃板，一只手蘸取去污粉轻轻擦洗，注意两面都要用去污粉洗，洗后用流水冲洗干净（先用自来水，后用蒸馏水），立玻璃板于箩筐内，晾干备用。
2. 把两玻璃板对齐，底边和两侧边夹上橡胶条绳，再用夹子夹紧两玻璃板。垂直卡在架子上准备灌胶。
3. 将 12%分离胶（配制方法见上文）在加入 TEMED 摇匀后即可紧贴玻璃板灌入，可以用烧杯，在快到达所需高度是放慢灌胶速度，否则会有气泡产生。到达所需高度后，用注射器吸取蒸馏水，针头紧贴玻璃板缓慢加入。室温放置 30min 左右使分离胶成型。注意蒸馏水的速度不能太快，否则会冲入刚灌入的分离胶内，致使分离胶不能成型或变型。
4. 观察玻璃板，如果板内出现一条折射线是，说明分离胶已经成型，倒掉上方的水，并用滤纸吸干残余水。
5. 按前述方法配制 5%浓缩胶，在加入 TEMED 摇匀后立即紧贴玻璃板灌入，将剩余空间灌满后，将梳子插入浓缩胶中，注意插入梳子时使梳子斜行插入，以免产生气泡。由于胶凝固时体积会收缩减小，从而使加样孔的上样体积减小，所以在浓缩胶凝固的过程中要经常从两边补胶。约 20-30min 后浓缩胶凝固，两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出。注意水平拔出，否则会使上样孔变形。
6. 用水或者电泳缓冲液冲洗一下浓缩胶，将其放入电泳槽中，大玻璃板在外，小玻璃板在内，夹子固定。
7. 将测完含量的蛋白 95°C 计算出 $50\mu\text{g}$ 测完含量的蛋白，加入 $5\times$ 上样缓冲液 $4\mu\text{l}$ ，体积若不足用蒸馏水补足 $20\mu\text{l}$ 。用微量加样器缓慢加入（微量加样器吸入蛋白样品时应缓慢移入，以免吸入空气，加样

是产生气泡，影响加样。加样太快可使样品冲出加样孔，若有气泡也可能使样品溢出。加入下一个样品时，进样器需在外槽电泳缓冲液中洗涤 3 次，以免交叉污染)。最边的加样孔加入蛋白 marker DM-121 10 μ l。

8. 电泳：加入足够的电泳缓冲液，电泳缓冲液最少应没过内侧小玻璃板。正确接入电极，电压浓缩胶 80V 左右，电泳约 30min，在溴酚蓝跑入分离胶后调至 100V 左右，电泳 4-5 小时，以溴酚蓝刚刚跑出分离胶即可终止电泳，准备转膜。

4) 转膜

1. 准备 3mm 厚滤纸一张，裁成为 5 \times 3cm 大小，每次转膜需要 6 张，准备 PVDF 膜一张，裁成 5.2 \times 3.2cm 大小。滤纸用转移液浸透。以蛋白 marker 为标记，裁取目的蛋白所在区域的分离胶。分离胶裁取大小为 5 \times 3cm。注意 PVDF 膜应比分离胶和滤纸的面积稍大。
2. 将滤纸、分离胶和 PVDF 膜放入半干转膜仪内，本实验室滤纸、分离胶和 PVDF 膜的放置顺序由下到上以此为：3 张滤纸、PVDF 膜、分离胶、3 张滤纸。每放一张物品后都应用玻璃棒驱走中间气体。PVDF 膜放置前应放在甲醛中处理 10 秒左右，不得超过 15 秒，甲醇浸完后应用半干转移液浸一下。视滤纸湿度加入转膜缓冲液。
3. 盖上半干转膜仪盖子，调电流至 18mA，电转 1 小时。电转时注意膜的湿度，如果太干半干转膜仪会报警，适时加入转膜缓冲液。半干转膜仪每次用完后用自来水冲洗干净晾干后备用。
4. 转膜完成后，将膜置于 1 \times 丽春红染液中摇床上摇 5min，然后用自来水轻轻冲洗掉染液，可以看到蛋白染成红色，将膜晾干备用。若看不到染色，说明膜上没有蛋白，即可终止后续步骤。

5) 免疫反应

1. 用 TBS 从下向上浸湿 PVDF 膜，置于含有封闭液大培养皿(含 10%脱脂

奶粉的 TBST 缓冲液)中, 将其置于湿盒中 4℃ 过夜。

2. 将一抗用 TBST 稀释到适当浓度, 本实验中 β -actin 一抗稀释比例为 1:500, p53 及 Bcl-2 稀释比例为一抗 1:1000, 二抗 1:2000。撕下适当大小的一块儿保鲜膜铺于实验台面上, 四角用水浸湿以使保鲜膜保持平整; 将抗体溶液加到保鲜膜上; 从封闭液中取出膜, 用滤纸吸去残留液后, 将膜蛋白面朝下放于抗液体面上, 掀动膜四角以赶出残留气泡; 室温下孵育 1-2h 后 (可以在 37℃ 半小时), 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 2 次, 每次 10min; 再用 TBS 洗 1 次, 10min。
3. 同上方法准备二抗稀释液并与膜接触, 室温下孵育 1-2h 后 (可以在 37℃ 半小时), 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 2 次, 每次 10min; 再用 TBS 洗 1 次, 10min, 进行化学发光反应。

6) 化学发光、显影和定影

1. 将 A 和 B 两种试剂在保鲜膜上等体积混合; 1min 后, 将膜蛋白面朝下与此混合液充分接触; 1min 后, 将膜移至另一保鲜膜上, 去尽残液, 包好, 放入 X-光片夹中, 用透明胶固定。
2. 暗室操作: 放 3 个塑料托盘, 分别将显影液、自来水和定影液分别倒入塑料盘, 中将 X-光片裁成膜大小或者稍大于膜面积, 放于膜上, 一旦放上, 便不能移动, 关上 X-光片夹, 开始计时。根据信号强度调整曝光时间, 也可选择不用时间多次压片以达最佳效果, 本实验中曝光 10min 左右, 打开 X-光片夹, 取出 X-光片置于显影液中, 待出现明显条带后, 即可终止显影, 显影时间在温度高时可以适当缩短显影时间, 温度低时, 可以适当延长显影时间。本实验中多采用显影液中放置 5min 后, 取出 X-光片迅速在自来水中蘸两下, 然后立即将 X-光片置于定影液中以胶片透明为止, 本实验中 X-光片在定影液中 10min 左右。用自来水冲去残留的定影液后, 室温下晾干。应注意的是: 显影和定影需移动胶片时, 尽量拿胶片一角, 手指甲不要划伤胶片, 否则会对

结果产生影响。每次新配显影液和定影液，应用荧光标签检查显影液和定影液是否合格。

3. X-光片晾干后，将胶片进行扫描或拍照。

2.9 大鼠肿瘤种植转移模型发生实验

2.9.1 试验用品

- 1) 试验所需 Wistar 雄性大鼠 40 只（体重 150g 左右）。
- 2) 鼠笼，手术器械，10%水合氯醛（0.35ml / 100g 体重）。
- 3) R15 大鼠肝癌细胞株、DMEM 高糖培养基、胎牛血清等（见前）。

2.9.2 试验步骤

1) 将 40 只 Wistar 雄性大鼠随机分为 2 组，对照组和实验组。

分组方法：随机数字法。将 40 只 Wistar 雄性大鼠按照体重大小编号，1-40 号，然后从随机数字表（医学统计学，附表 15，人民卫生出版社）中任意一个随机数字开始，向任一方向（左、右、上、下）连续抄下 40 个数字，令随机数字中的单数为甲组，双数为乙组。如果出现某组多时，需要调整 n 只大鼠到另外一组，继续取 n 个数字，取到的数字除以数量多的这组的实际数量，得到的一个余数，就将这组序号与余数相同的这个大鼠调到另外一组。调整完成后，所有大鼠被随机分为两组即实验组和对照组。

2) R15 细胞培养至约 80%融合后，消化收集细胞，台盼兰染色测定细胞活力大于 95%后（台盼兰染色方法见上），用生理盐水调节细胞浓度至 6×10^6 /ml 备用[23]。

3) 用 10%水合氯醛麻醉大鼠，固定后，取剑突至耻骨联合的腹部正中切口，

长约 3cm，腹膜用一牵引器分离，并被固定在手术台上，手术持续 2h，双层关腹。对照组直接吸取 1ml 细胞悬液用注射器撒于腹腔内；实验组开腹后先用喷洁悠神制剂 2 喷（170ul），然后吸取 1ml 细胞悬液撒于腹腔内。

4) 5 周后麻醉过量处死大鼠，原伤口旁切开，观察种植转移瘤的形成情况，记录实验组和对照组形成转移瘤的大鼠只数，并记录肿瘤的生长情况（通过测量肿瘤的重量来估计）。

5) 两组肿瘤组织 HE 染色，病理形态学观察。

1 石蜡切片放于 80℃ 烤箱，烤至溶蜡（约 20min）；

2 放入二甲苯（I）中脱蜡 5 分钟，用吸水纸吸干液体；

3 放入二甲苯（II）中脱蜡 10 分钟（切片透明），用吸水纸吸干液体；

4 放入无水乙醇（I）5 分钟，用吸水纸吸干液体；

5 放入无水乙醇（II）5 分钟，用吸水纸吸干液体；

6 放入 95%乙醇 3 分钟；

7 流水 2 分钟，用吸水纸吸干水分；

8 Harris 苏木素 染色 4-8 分钟；

9 自来水稍洗；

10 1%盐酸水溶液分化 5-10 秒（切片由蓝变红）；

11 自来水洗返蓝 15-30 分钟；

12 0.5%伊红染色 30 秒-1 分

13 95%乙醇（I）脱水 5 分钟，用吸水纸吸干液体；

14 95%乙醇（II）5 分钟，用吸水纸吸干液体；

15 放入 100%乙醇（I）5 分钟，用吸水纸吸干液体；

16 放入 100%乙醇（II）2 分钟，用吸水纸吸干液体；

17 放入二甲苯（I）中透明 2-3 分钟，用吸水纸吸干液体；

18 放入二甲苯（II）中透明 5 分钟；

19 中性树胶封片；

20 镜下观察结果。

2.10 统计处理

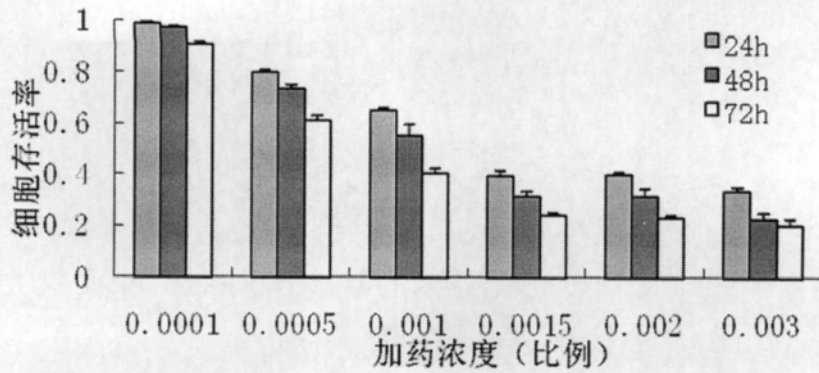
本试验数据均采用平均数±标准差表示,全部数据分析采用 SPSS16.0 处理,细胞存活率、克隆形成率等组间比较采用 Student's t test, Fisher's Exact Test 用来检查动物实验中肿瘤的发生率的差异, $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有显著的统计学差异。

试验结果

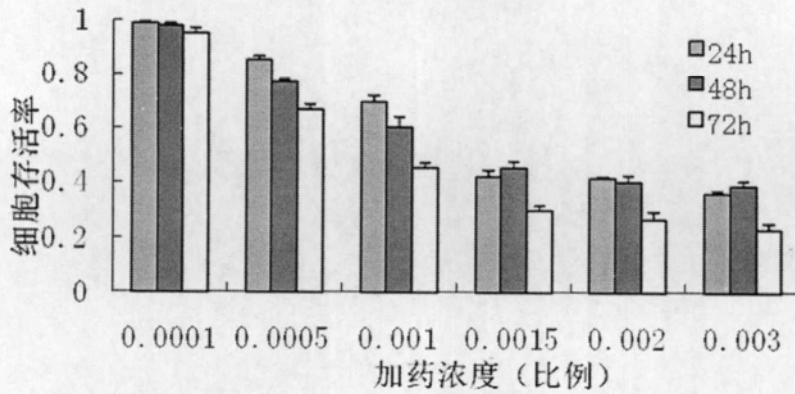
3.1 药物对肿瘤细胞存活率影响。

图 1 药物洁悠神对细胞存活率的影响。图 A 给予 T24 细胞不同浓度的药物 MTT 结果（细胞存活率，计算方法见材料与方法），每个药物浓度设 7 个复孔。可以看到细胞的存活率随着药物浓度增加和时间延长逐渐降低。不同浓度组和同一浓度不同时间组之间有显著性差异（Student's t test, $p < 0.05$ ）。图 B 给予 EJ 细胞不同浓度的药物 MTT 结果（细胞存活率，计算方法见材料与方法），可以看到细胞的存活率随着药物浓度增加和时间延长逐渐降低。不同浓度组和同一浓度不同时间组之间有显著性差异（Student's t test, $p < 0.05$ ）。图 C 给予 T24、EJ 细胞不同浓度比例的药物（0.0005、0.001、0.002）处理，克隆形成数结果柱状图。

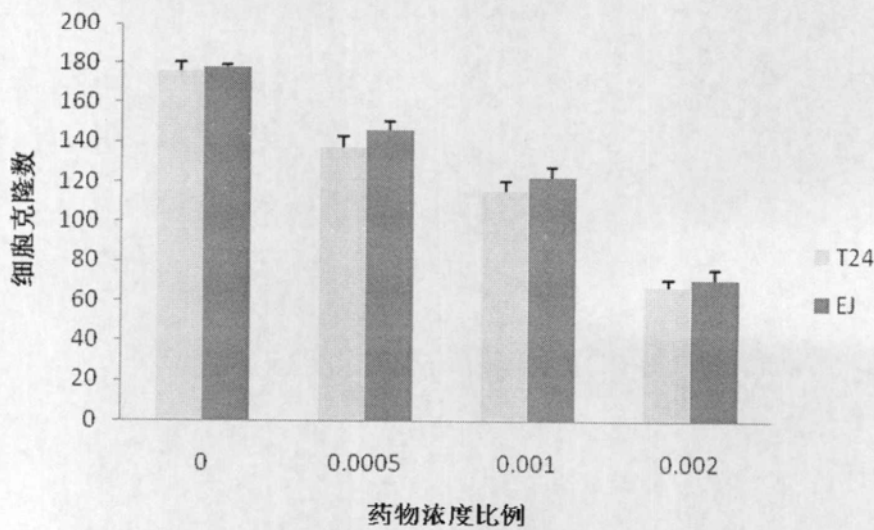
A T24 细胞 MTT 比色试验



B EJ 细胞 MTT 比色试验



C 克隆形成试验



3.2 平板克隆形成试验

如图 1C 所示，细胞用不同浓度处理 1 小时后，然后培养 2 周，平板克隆实验表明，洁悠神可以抑制细胞克隆的形成，并且随着药物浓度的增加，克隆形成数下降。

3.3 细胞形态观察

我们观察了药物对肿瘤细胞的形态影响。给予 EJ 细胞加药浓度为 5/10000、1/1000、2/1000，分别于 24 小时、48 小时和 72 小时时间点观察细胞的形态。随着药物浓度的增加和时间延长，对细胞的损害逐渐加重（见图 2）。

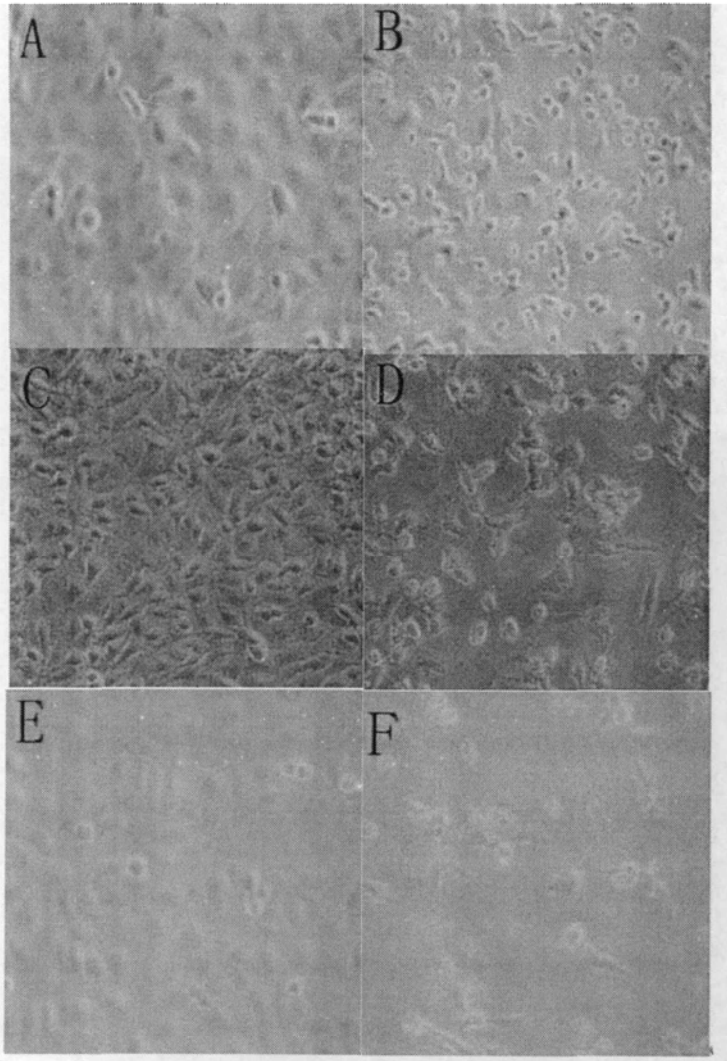
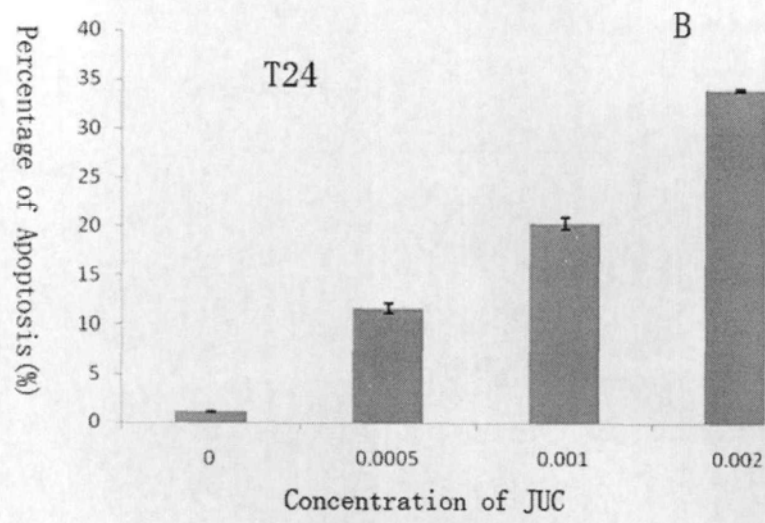
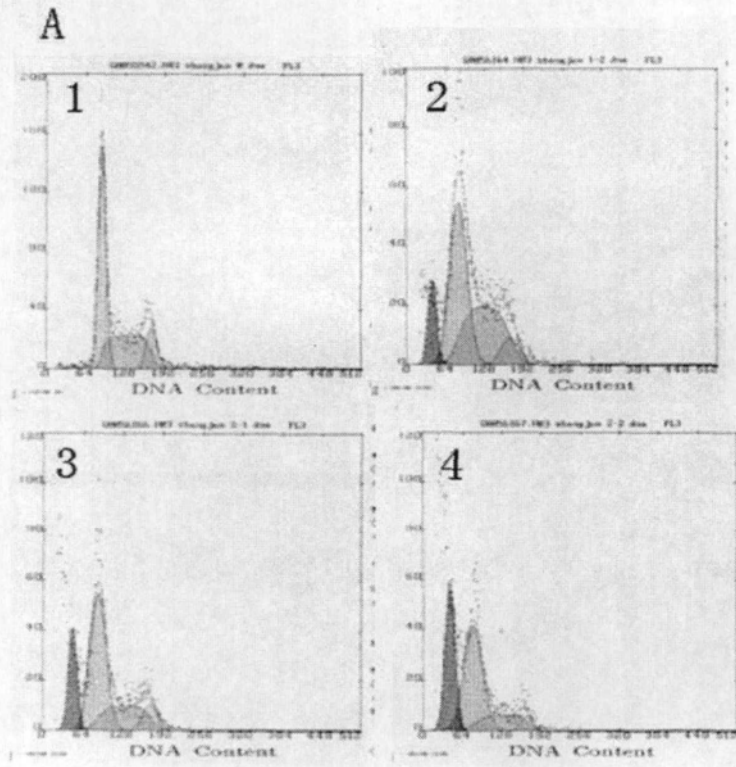


图 2. 洁悠神处理细胞 24 小时、48 小时和 72 小时形态与未处理组对照观察。蓝色图片为

加蓝色滤光片观察，放大倍数均为 20×10 ，24 小时，加药组（图 2B）同未加药组比较（图 2A），细胞形态发生变化，加药组出现细胞变圆，皱缩、脱壁漂浮现象。48 小时，加药组（图 2C）同未加药组（图 2D）比较，细胞形态发生更大变化，贴壁的细胞形态也发生变化，不规则，细胞脱壁现象更加严重。72 小时，加药组（图 2E）同未加药组（图 2F）比较，贴壁细胞仅占 10%左右，部分细胞已经发生崩解，细胞数量明显减少，可见细胞脱壁漂浮现象。

3.4 洁悠神诱导 T24 和 EJ 细胞凋亡

我们用流式细胞术检测了 T24 细胞在不同洁悠神浓度（比例）诱导 24 小时的凋亡情况如图 3A，我们发现随着药物浓度（比例）的增加，凋亡增加。我们检测了 EJ 细胞在同一浓度不同时间点的凋亡情况，实验结果表明如图 3A 和 B，随着药物处理时间延长，凋亡增加，同时也表明随着药物处理时间的延长，细胞坏死也逐渐增多，这个与药物处理后形态观察结果相似。



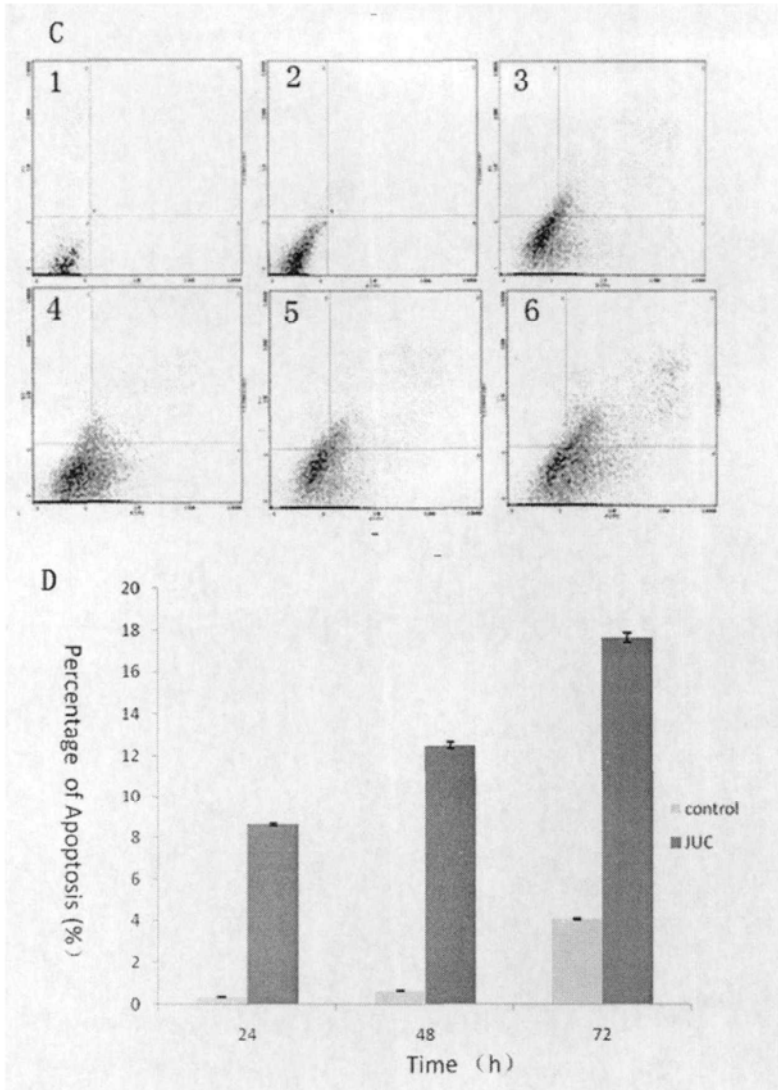


图 3. T24、EJ 细胞在药物处理后凋亡的流式细胞术检测。图 3A: T24 细胞在 5/10000, 1/1000, 2/1000 洁悠神处理 24 小时的流式细胞术检测结果 (PI 单染色), 其中第 1 图凋亡未检出, 第 2 图凋亡率为 11.1%, 第 3 图凋亡率为 19.8%, 第 4 图凋亡率为 33.9%。图 3B, 上述结果柱状图。图 3C, EJ 细胞在 1/1000 洁悠神处理 24 小时、48 小时和 72 小时后流式细胞术检测结果 (AnnexinV-FITC 和 PI 双染色)。图 3C 第 1 图为未加药 24 小时, 凋亡率 0.35%。图 3C 第 2 图为未药物处理 48 小时, 凋亡率 0.65%, 图 3C 第 3 图为未药物处理 72 小时, 凋亡率为 4.05%。图 3C 第 4 图为药物处理 24 小时, 凋亡率 8.61%。图 3C 第 5 图为药物处理 48 小时, 凋亡率 12.5%, 图 3C 第 6 图为药物处理 72 小时, 凋亡率 17.7%。图 D, 双标结果柱状图。

3.5 洁悠神调节 p53、Bcl-2 蛋白的表达

通过流式细胞术检测明确了洁悠神可以引起 T24 和 EJ 细胞的凋亡, 为了进一步了解洁悠神引起细胞凋亡的通路, 我们利用 Western bolt 法检测了凋亡抑制基因 p53 基因和促凋亡基因 Bcl-2 的表达, 即 p53 蛋白和 Bcl-2 蛋白。Western blot 结果显示, 药物处理 EJ 细胞后 p53 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低, 并且随着药物作用时间的增加, p53 蛋白表达逐渐增加, Bcl-2 蛋白表达逐渐降低。

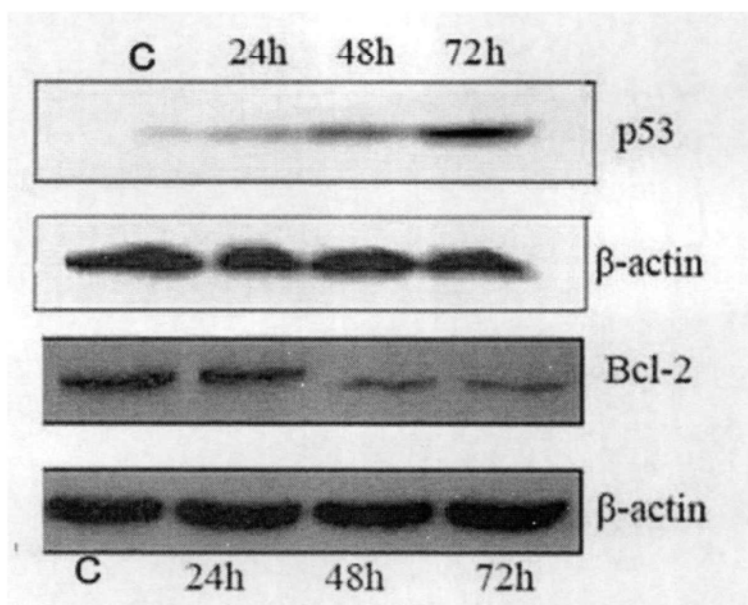


图 4. 洁悠神处理 EJ 细胞 24、48 和 72 小时后, 收集细胞, 提取总蛋白, 蛋白定量后, 采用 5%浓缩胶、12%分离胶, 采用 p53、bcl-2 一抗、二抗, 化学发光检测法 (具体 western blotting 操作步骤见试验材料与与方法)。药物处理 24、48 和 72 小时后 p53 蛋白、Bcl-2 蛋白表达, 参照为 β -actin 蛋白, 可以看出 p53 蛋白的是随着药物作用时间的延长而表达量增加, Bcl-2 蛋白则是随着药物作用时间的延长而减少。

3.6 洁悠神对大鼠种植转移瘤形成的影响。

通过上述体外试验, 证实洁悠神对细胞增殖有抑制作用, 可以诱导细胞凋

亡。为了了解洁悠神在体内对肿瘤细胞的作用，我们研究了洁悠神对大鼠种植转移模型形成的影响（具体方法见材料与方法）。在试验组中 3 只和对照组中 2 只大鼠死于手术损伤及术后感染，约占大鼠总数 12.5%死于手术损伤及术后感染。在 5 周后处死大鼠，观察腹腔种植转移瘤的形成情况，发现对照组中有 12 只大鼠腹腔内有肿瘤形成，肿瘤发生率约为 66.7%，实验组中有 5 只腹腔内有肿瘤形成，肿瘤发生率约为 29.4%。实验组和对照组肿瘤的发生率在统计学上有显著性差异（Fisher's Exact Test, $p < 0.05$ ）。同时病理形态学检查实验组和对照组形成的肿瘤无差异如图 5。

表 1. 洁悠神对大鼠种植转移瘤形成的影响

	对照组	洁悠神组
大鼠数量	18	17
肿瘤大鼠	12 (66.7)	5 (29.4)

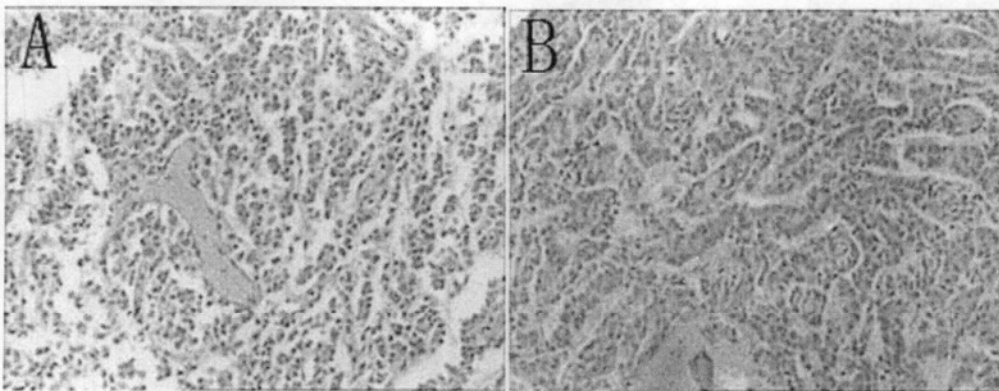


图 5. 取对照组（图 5A）和实验组（图 5B）腹腔内形成的肿瘤，切片并 HE 染色，显微镜（10×10）观察，两组肿瘤无病理形态学差异。

讨论

恶性肿瘤是一种严重威胁人类健康和生命的疾病，目前发病率有增无减，成为继心血管疾病之后，引起人类死亡的第二大病因。因此肿瘤的预防和治疗对人类是至关重要的。肿瘤的治疗包括化学药物治疗、免疫治疗和手术治疗等。化学药物治疗是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一。临床研究者也发现越来越多的肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤和肺癌等都出现了多药耐药现象，并且正在努力研究其机制并寻找解决这种现象的方法[24-27]。抗药性已经成为癌症治疗和延长癌症患者寿命的主要障碍，目前对肿瘤抗药性并没有有效的应对措施[28]。恶性肿瘤的另外一个重要的治疗手段是手术治疗。手术治疗可以彻底去除恶性肿瘤的原发灶，必要时可以切除周围可疑的组织和区域淋巴结。但是手术治疗引起的医源性的肿瘤种植性转移越来越受到人们的关注，为了防止医源性的种植性转移，术中往往采用纱布阻隔、术中热化学疗法、蒸馏水冲洗切口、化疗药物冲洗暴露的组织和缝合切口前切除切口暴露组织等，但是这些预防医源性的种植性转移的效果还不明确[29-31]。鉴于以上原因，寻找新的有效治疗肿瘤的药物成为肿瘤治疗的重要工作之一。

洁悠神是一种新的抗菌药物，已经广泛应用于预防术后切口和伤口感染。尚没有关于洁悠神与肿瘤的研究，在本研究中，我们通过细胞实验和动物模型实验证实了洁悠神具有抗肿瘤作用，并且初步探讨了其抗肿瘤的作用机制。

在体外实验中，我们通过 MTT、平板克隆形成试验来研究洁悠神对肿瘤细胞增殖活力的影响。试验结果表明：洁悠神可以有效的抑制 T24 和 EJ 细胞的增殖，并且随着药物浓度和药物作用时间的延长，这种抑制细胞增殖的作用逐渐增加。同时我们通过流式细胞术检测洁悠神是否具有诱导细胞凋亡的作用。在药物处理细胞后不同时间我们观察了细胞形态的改变，发现药物处理后细胞出现皱缩、脱壁、变小等类似凋亡的形态学改变，并且随着时间的延长，这种改变越来越明显。这个现象和流式细胞术及 western blotting 检测基本吻合。流式细胞术检测结

果表明, 洁悠神能够诱导肿瘤细胞凋亡, 并且这种诱导凋亡的作用随着药物浓度和药物作用时间的增加而增强。

肿瘤细胞常常过表达 Bcl-2、NF- κ B、Survivin 等抗凋亡蛋白以逃避凋亡, 这些蛋白有助于肿瘤细胞的存活。而 p53 蛋白则是肿瘤抑制蛋白, 在肿瘤细胞中, 野生型 p53 蛋白表达降低而突变型 p53 蛋白表达增加。p53 蛋白可以通过外源性凋亡途径和内源性凋亡途径来调节细胞凋亡。在 p53 依赖的外源性凋亡途径中, p53 可以激活位于细胞上的死亡受体如 Fas、DR4、DR5, 从而引起凋亡。在 p53 依赖的内源性凋亡途径, 主要受线粒体调控。Bcl-2 蛋白和线粒体腺苷酸三磷酸

表达, 而 p53 蛋白表达增加和 Bcl-2 的表达减少都可以促进肿瘤细胞的凋亡。为了明确洁悠神诱导细胞凋亡的具体机制, 在药物处理细胞后, 我们用 Western blot 技术检测了抗凋亡基因 Bcl-2 及促凋亡基因 p53 的表达产物——Bcl-2 蛋白和 p53 蛋白。检测表明, 洁悠神处理细胞后, Bcl-2 蛋白的表达减少而 p53 蛋白表达增加, 而且这个效应是随着药物作用于肿瘤细胞的时间延长而增强的。Bcl-2 蛋白的表达减少和 p53 蛋白表达增加, 这个和我们检测 EJ、T24 细胞洁悠神处理后的凋亡结果是一致的。因此, 我们认为洁悠神诱导细胞凋亡可能是通过 p53 依赖的信号通路的。

由于洁悠神是一个长效抗菌药物, 兼有“物理抗菌”和“隐形纱布”双重功效的高分子活性剂, 利用物理抗菌原理, 经喷洒在创面形成一层稳定网膜, 吸附病原微生物, 使其赖以生存的呼吸酶失去作用而窒息死亡, 起到杀菌和抗菌作用, 临床中广泛应用于预防手术创面感染。上述作用结合洁悠神体外细胞试验具有促进细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞的增殖能力, 我们假设如果洁悠神喷洒于肿瘤手术的暴露组织的表面, 形成的“隐形的保护膜”可以阻隔脱离的肿瘤细胞粘附在暴露的组织表明, 同时药物还有抑制这些肿瘤细胞的增殖和促使其凋亡的作用,

因此我们试图通过洁悠神对在 Wistar 大鼠建立肿瘤种植性转移模型的影响来验证这个假设。实验结果表明，洁悠神可以阻止腹腔种植性转移瘤的形成，在实验组 17 只大鼠中只有 5 只大鼠形成了种植性转移瘤，肿瘤发生率约为 29.4%，而在对照组 18 只大鼠中有 12 只大鼠形成了种植性转移瘤，肿瘤发生率约为 66.7%，有统计学差异 ($p < 0.05$)。一般的抗肿瘤药物，如丝裂霉素、顺铂等，预防肿瘤细胞种植并生长于手术暴露的组织的机制是化学药物的直接的抗肿瘤作用，而本研究中，洁悠神不仅可以起化学药物的作用，而且它可以组织表面可以形成一层保护膜，阻止肿瘤细胞种植与组织上，所以洁悠神具有其他抗肿瘤药物所不具有的优势。

在本研究中，我们在洁悠神诱导细胞凋亡的机制研究中，仅仅对 Bcl-2 和 p53 蛋白表达进行了检测，而这对阐明药物诱导细胞凋亡的机制来说是不足的，下一步我们的工作室检测与凋亡有关的 Bax、survivin、Caspase 等蛋白的表达，以便了解洁悠神诱导细胞凋亡的具体机制。在本研究中，由于我们是探索性的研究洁悠神有无抗肿瘤作用，所以没有设立阳性对照，在进一步的研究中，我们会把洁悠神同目前公认的抗肿瘤药物如顺铂、丝裂霉素等药物的抗肿瘤药物进行对比研究，以便更加明确其抗肿瘤效果。在本实验中，我们没有研究洁悠神体内应用的毒性实验，这也是我们下一步研究中的工作。在以前的研究中，我们发现了抗肿瘤药物不但可以阻止肿瘤的形成，而且实验组的肿瘤组织中细胞凋亡是增加的，本实验中我们没有检测实验组的肿瘤组织中细胞凋亡情况，这也会是我们的下一步工作。

结论

- 1) 在体外实验中, 洁悠神对 T24 和 EJ 细胞具有抑制其增殖作用, 并且这种作用有剂量和时间依赖关系, 即随着洁悠神对 T24 和 EJ 细胞的作用时间延长和洁悠神浓度的增加, 对 T24 和 EJ 的抑制增殖作用逐渐增强。
- 2) 洁悠神可以诱导细胞凋亡, 并且诱导细胞凋亡的作用也是时间和剂量依赖性的, 即随着洁悠神对 T24 和 EJ 细胞的作用时间延长和洁悠神浓度的增加, 诱导细胞凋亡的作用逐渐增强。
- 3) 洁悠神诱导 EJ 细胞凋亡的机制可能与下调 Bcl-2 和上调 p53 的表达有关, 这一结果提示洁悠神诱导凋亡可能是通过 p53 依赖的信号通路的。
- 4) 通过肝癌细胞 R15 建立腹腔种植性转移瘤模型中, 洁悠神具有防止肝癌种植性转移瘤形成的作用, 未见明显的副作用。
- 5) 综上所述, 洁悠神在体内外具有抗癌作用, 尤其是在动物实验中可以预防手术时形成的种植性转移瘤, 因此, 洁悠神可能是预防及治疗肿瘤的有效药物。

参考文献

1. Bray, F, Sankila, R., Ferlay, J., et al., *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995*. Eur J Cancer, 2002. **38**(1): p. 99-166.
2. Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., et al., *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Ann Oncol, 2007. **18**(3): p. 581-92.
3. Amaral, J.D., Xavier, J. M., Steer, C. J. et al., *The role of p53 in apoptosis*. Discov Med. **9**(45): p. 145-52.
4. May, P. and May E., *Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein*. Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7621-36.
5. Shtilbans, V., M. Wu, and D.E. Burstein, *Evaluation of apoptosis in cytologic specimens*. Diagn Cytopathol.
6. Portugal, J., M. Bataller, and S. Mansilla, *Cell death pathways in response to antitumor therapy*. Tumori, 2009. **95**(4): p. 409-21.
7. Korsmeyer, S.J., *Bcl-2: an antidote to programmed cell death*. Cancer Surv, 1992. **15**: p. 105-18.
8. Aouacheria, A., *Novel genetic and peptide-based strategies targeting the Bcl-2 family, an update*. Recent Pat DNA Gene Seq, 2009. **3**(2): p. 123-9.
9. Konstantakou, E.G., Voutsinas, G. E., Karkoulis, P. K., et al., *Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses*. Int J Oncol, 2009. **35**(2): p. 401-16.
10. Duarte, M.L., de Moraes, E., Pontes, E., et al., *Role of p53 in the induction of cyclooxygenase-2 by cisplatin or paclitaxel in non-small cell lung cancer cell lines*. Cancer Lett, 2009. **279**(1): p. 57-64.
11. Karnak, D. and L. Xu, *Chemosensitization of Prostate Cancer by Modulating*

Bcl-2 Family Proteins. *Curr Drug Targets*.

12. Zheng, T., Wang, J., Chen, X., et al., *Role of microRNA in anticancer drug resistance*. *Int J Cancer*. **126**(1): p. 2-10.
13. Liu, F.S., *Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy--a quick review*. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2009. **48**(3): p. 239-44.
14. Coley, H.M., *Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2008. **34**(4): p. 378-90.
15. 吴功佩, 赵荣宇. *提高可切除进展期胃癌疗效的策略与措施*[J]. *中国实用外科杂志*. 1998. **18**(8): 451~453.
16. Castillo, O.A., Vitagliano, G., Diaz, M., et al., *Port-site metastasis after laparoscopic partial nephrectomy: Case report and literature review*. *J Endourol*, 2007. **21**(4): p. 404-7.
17. Herawi, M., Leppert, J. T., Thomas, G. V., et al., *Implants of noninvasive papillary urothelial carcinoma in peritoneum and ileocolonic neobladder: support for "seed and soil" hypothesis of bladder recurrence*. *Urology*, 2006. **67**(4): p. 746-50.
18. 卢镜洪, 何柳仙, 邓桂新, et al., *“洁悠神”预防尖锐湿疣激光术后复发临床观察*. *中华临床医学研究杂志*, 2006. **12**(007): p. 890-890.
19. 朱菁, 张美珏, *洁悠神长效抗菌剂用于激光术后创面的观察*. *应用激光*, 2002. **22**(004): p. 443-446.
20. 周艳琼, 李惠玲, *抗菌材料“洁悠神”对留置尿管病人预防尿路感染的临床观察*. *四川省卫生管理干部学院学报*, 2007. **26**(004): p. 289-290.
21. 刘淮, *“洁悠神”在预防 STD 继发感染中的作用*. *皮肤病与性病*, 2001. **22**(001): p. 57-59.

- 误诊学杂志, 2006. **6**(015): p. 2969-2970.
23. 李永青, 林贵山, 程惠华, et al., *洁悠神防治急性放射性皮炎 29 例效果观察*. 中国皮肤性病学杂志, 2006. **20**(005): p. 285-286.
24. 孟宪瑛, 王广义, *二氧化碳气腹对径路口及腹腔内肿瘤细胞转移的影响*. 中华实验外科杂志, 2003. **20**(004): p. 362-363.
25. Germano, S. and O'Driscoll, L., *Breast cancer: understanding sensitivity and resistance to chemotherapy and targeted therapies to aid in personalised medicine*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**(3): p. 398-418.
26. La Porta, C.A., *Mechanism of drug sensitivity and resistance in melanoma*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**(3): p. 391-7.
27. Saad, M., Garbuzenko, O.B. and Minko, T., *Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrug-resistant cancer*. *Nanomedicine (Lond)*, 2008. **3**(6): p. 761-76.
28. Pesic, M., Andjelkovic, T., Bankovic, J., et al., *Sulfinosine enhances doxorubicin efficacy through synergism and by reversing multidrug resistance in the human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R)*. *Invest New Drugs*, 2009. **27**(2): p. 99-110.
29. Lippert, T., Ruoff, H. and Volm, M. *Resistance in malignant tumors: can resistance assays optimize cytostatic chemotherapy?* *PHARMACOLOGY-BASEL-*, 2008. **81**(3): p. 196.
30. Oosterling, S.J., van der Bij, G. J., van Egmond, M., et al., *Surgical trauma and peritoneal recurrence of colorectal carcinoma*. *Eur J Surg Oncol*, 2005. **31**(1): p. 29-37.
31. Maccabee, D. and Sheppard, B.C. *Prevention of percutaneous endoscopic gastrostomy stoma metastases in patients with active oropharyngeal malignancy*. *Surg Endosc*, 2003. **17**(10): p. 1678.

32. Steinert, R., Lippert, H. and Reymond, M.A. *Tumor cell dissemination during laparoscopy: prevention and therapeutic opportunities*. Dig Surg, 2002. **19**(6): p. 464-72.
33. Ma, L., et al., *Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 2275-85.
34. Tian, B., et al., *Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model*. Cancer Lett, 2008. **264**(2): p. 299-308.