

分类号:

密级:

兰州大学

研究生学位论文

有机硅季铵盐联合 5-FU 对肝癌细胞

论文题目 (中文)

增殖及凋亡的影响

The synergistic effect of Organic Silicone

论文题目 (外文)

Quaternary Ammonium Salt and 5-FU on

hepatocellular carcinoma in vitro

研究生姓名

王娟霞

学科、专业

外科学

研究方向

消化系肿瘤

学位级别

博士

导师姓名、职称

王志平 教授

论文工作

2010 年 9 月至 2013 年 9 月

起止年月

论文提交日期

2013 年 10 月

论文答辩日期

2013 年 12 月

学位授予日期

校址: 甘肃省兰州市

分类号:

密级:

兰州大学

研究生学位论文

有机硅季铵盐联合 5-FU 对肝癌细胞

论文题目 (中文) 增殖及凋亡的影响

论文题目 (外文) **The synergistic effect of Organic Silicone
Quaternary Ammonium Salt and 5-FU on
hepatocellular carcinoma in vitro**

研究生姓名 王娟霞

学科、专业 外科学

研究方向 消化系肿瘤

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 2010 年 9 月至 2013 年 9 月

论文提交日期 2013 年 10 月

论文答辩日期 2013 年 12 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： 王娟霞 日期： 2013.12.2

关于学位论文使用授权的声明

本人在导师指导下所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质版和电子版，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或成果时，第一署名单位仍然为兰州大学。

本学位论文研究内容：

可以公开

不宜公开，已在学位办公室办理保密申请，解密后适用本授权书。

(请在以上选项内选择其中一项打“√”)

论文作者签名： 王娟霞

导师签名： 王娟霞

日期： 2013.12.2

日期： 2013.12.2

目 录

中文摘要	I
Abstract	II
第一章 引 言	1
1.1 原发性肝癌的分子生物学研究进展	1
1.2 原发性肝癌与凋亡相关基因的关系	7
1.3 肝癌化疗的研究进展	11
1.4 本论文选题的依据和思路	12
第二章 有机硅季铵盐联合5-FU对肝癌细胞增殖及凋亡的影响	14
2.1 材料和方法	14
2.2 结果	31
2.3 讨论	47
2.4 结论	52
参考文献	53
个人简介	64
攻读博士期间发表论文目录	65
致谢	66
附一 综述	67
附二 缩略语	77

有机硅季铵盐联合 5-FU 对肝癌细胞增殖及凋亡的影响

中文摘要

目的：原发性肝癌的治疗目前仍然存在一些困难，手术切除过程中种植转移难免发生，解决手术中种植转移问题势在必行，本研究使用有机硅季铵盐、5-FU 及两药联合作用于体外肝癌细胞（SMMC-7721 人肝癌细胞，R15 大鼠肝癌细胞）的实验方法，探讨有机硅季铵盐（洁悠神）单独及联合 5-FU 对肝癌细胞的作用及机制，为临床肝癌的治疗及预防术中转移提供新的药物及思路。

方法：在本研究中，体外培养 SMMC-7721 人肝癌细胞，R15 大鼠肝癌细胞，使用不同浓度的有机硅季铵盐、不同浓度的 5-FU 及两药联合处理细胞，应用细胞形态观察、MTT 比色法、Hochest 染色、透射电镜、细胞周期、流式细胞术（Flow CytoMeter, FCM）和 Western 免疫印迹（Western blotting）等方法，研究洁悠神、5-FU 及两药联合对肝癌细胞的作用。

结果：用不同浓度的药物处理两种肝癌细胞不同时间，细胞形态学观察肿瘤细胞表现为脱壁、变小和皱缩等凋亡现象；透射电镜观察发现细胞出现凋亡小体，MTT 比色试验结果表明有机硅季铵盐对 SMMC-7721 人肝癌细胞，R15 大鼠肝癌细胞的增殖活性有明显的抑制作用；FCM 结果显示 SMMC-7721 人肝癌细胞，R15 大鼠肝癌细胞在药物处理后凋亡细胞数明显增加，并且对抑制肿瘤细胞增殖作用及诱导肿瘤细胞凋亡作用随着药物作用时间和药物浓度的增加随之增加；Western blotting 结果表明 Bax、Caspase3、Caspase8 蛋白表达增加，而 Bcl-2 蛋白表达降低。

结论：有机硅季铵盐可能是一个有效的抗肿瘤药物；有机硅季铵盐联合 5-FU 表现出协同抑制效果；联合用药的作用机制为抑制细胞周期，诱导细胞凋亡，激活凋亡蛋白 caspases-3、caspases-8 和 caspases-9，并下调 bcl-2 的表达，通过影响线粒体凋亡途径的基因表达，促进肿瘤细胞凋亡以达到抗肿瘤的效果；本研究将为抗肿瘤药物的研发提供新思路。

【关键词】 有机硅季铵盐、5-FU、凋亡、肝细胞癌

The synergistic effect of Organic Silicone Quaternary Ammonium Salt and 5-FU on hepatocellular carcinoma in vitro

Abstract

Purpose: There are still some difficulties we faced in the clinical treatment of HCC. The implantation metastasis in liver cancer operation is an urgent problem needed to be solved. In this study, we have investigated the effects of individual and joint action of organic silicone quaternary ammonium salt (Jieyoushen) and 5-fluorouracil (5-FU) in human hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells lines and R15 cell lines of rat in vitro. Here we assessed the characteristics of the drugs to explore the effects of individual and joint action of Jieyoushen and 5-FU.

Methods: MTT assay was used to investigate the inhibitory effects of these agents. Electron microscopy and Hoechst 33342 staining were used to observe the morphological changes of liver cell lines treated with Jieyoushen and 5-FU. Flow cytometry were performed to detect the cycle and apoptosis of liver cell lines with Jieyoushen and 5-FU. The expression of caspases-3 and 8, bax, bcl-2, and survivin protein in these cells were determined by western blotting.

Results: The results of MTT assays showed that single and joint action Jieyoushen and 5-FU inhibited the proliferation of liver carcinoma cell lines in a dose-and time-dependent manner respectively. And electron microscopy and Hoechst 33342 staining showed that characteristic apoptotic bodies were visible in apoptotic cell treated with Jieyoushen and 5-FU. Flow cytometry results indicated that the percentages of cells at G0/G1 phase gradually increased, while gradually decreased during S phase after the treatment. The medication leads to the changes on expression of proteins caspases-3, -8, bax, bcl-2 and survivin. Compared with the control group, the expression levels of bax, caspase-8 and caspase-3 protein increased significantly in the SMMC7721 and R15 cells after 24 hours treatment, meanwhile, the bcl-2 protein expression decreased significantly.

Conclusions: It can be concluded that the combination of Jieyoushen with 5-FU showed a better inhibitory effect than either agent alone. The mechanism of action could be the synergistic arrest of the cell cycle, induction of apoptosis, activation of caspases-3, 8 and 9,

and down-regulation bcl-2 expression. So, it can be indicated that the combination of Jieyoushen with 5-FU exerted a synergistic anti-cancer effect on HCC growth, via the impact on the proteins of mitochondrial signaling pathway and the positive film, produced by Jieyoushen, which had a mechanical shielding effect on tumor cell membrane. So Jieyoushen will be a useful ancillary drug to improve the effectiveness of chemotherapeutic agents in the treatment of live cancer, which might be useful for the further development of anticancer drugs.

Keywords: JUC; 5-FU; HCC; anticancer; apoptosis; implantation metastasis

第一章 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,严重危害人类健康。美国癌症协会2011年发布的一项研究结果显示:肝癌在全球恶性肿瘤发病率排名中位居第五位,在癌症致死率排名中高居第二位^[1]。在中国肝癌的发病率居恶性肿瘤发病率排名的第三位,致死率居癌症致死率排名的第二位^[2]。随着手术和微创治疗等技术的发展,治疗有效率和生存率有了一定提高,但由于肝癌易复发转移,恶性程度高、进展快、侵袭性强、对化疗、放疗不敏感,故死亡率仍居高不下,是世界范围内肿瘤死亡的重要原因。大量的流行病学研究发现,病毒和化学致癌因子均参与了肝癌的形成过程。人体细胞内即存在抑癌基因,也存在原癌基因。肿瘤的发生不仅与细胞增殖有关,亦与细胞凋亡有关。原癌基因、癌基因和抑癌基因的表达、过表达、激活以及突变失活都可能会是引起肿瘤发生的启动因素。在外界环境因素的作用下,原癌基因可能被激活为癌基因,抑癌基因可能失活,并丧失了抑癌作用,从而导致正常细胞增值及分化的调节机制失控,导致细胞内正常信号转导通路紊乱,细胞发生异常增殖及分化,最终导致肿瘤的发生^[3]。原发性肝癌目前的治疗手段主要有手术、放化疗、介入等,化疗目前仍为肝癌治疗的主要手段^[4-8]。因此想提高肝癌患者的治疗效果,必须进一步明确肝癌发生、发展和化疗药物耐药产生的各种机制。随着分子生物学技术的发展,目前科学家在分子水平对肝癌的病因、病理、基因表达和突变等方面进行了一系列的研究,并取得了很多有价值的成果。并且针对肿瘤细胞特有的特征,研究抗肿瘤的新药物,成为肿瘤治疗研究的新方向。

1.1 原发性肝癌的分子生物学研究进展

肿瘤的发生是多步骤,多阶段的复杂过程,原癌基因和抑癌基因的互相制约,导致细胞正常增殖、分化,是组织再生和个体发育所须的。由于病毒或化学致癌物的作用使原癌基因激活成为癌基因,以及抗癌基因失活,引起细胞生长失控而形成。癌基因与抑癌基因并非一成不变,在一定条件下,癌基因可起抑癌基因的作用,而抑癌基因亦可起癌基因的作用。肝癌的分子生物学研究是近年迅速发展起来的一个崭新领域,它对肝癌的发生、发展及其与乙型肝炎病毒的关系等提供了新的材料,随着分子技术的不断发展,基因治疗已逐步成为肿瘤治疗的手段,肝癌的基因治疗也将可能有广阔的前景,根据原

发性肝癌形成的分子生物学特点,可以选择基因转移等技术以达到治疗的目的^[9]。目前研究较多的为肝癌的癌基因、抑癌基因以及与 HBV 的关系方面^[10]。近年来一些研究表明,各种胞外致病因素通过细胞信号转导通路引起癌基因的激活和抑癌基因的失活,从而调控细胞周期,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,细胞遗传学及表观遗传学的改变逐渐累积导致肝癌的发生和发展^[11-15],因此,深入研究肝癌发生发展过程中的分子生物学机制将为探索肝癌新的治疗策略提供坚实的理论基础和治疗靶点。近年来,肝癌的分子生物学机制研究取得了显著进步,尤以细胞信号传导通路研究为代表,现将就细胞信号传导通路在肝癌中的机制研究进展做简要综述。

1.1.1 MAPK信号转导通路

促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAP 激酶,MAPK)链是真核生物信号传递网络中的重要途径之一,MAPK 将细胞外刺激信号传递到细胞核,介导细胞产生反应的信号转导通路中最为重要的一条。在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用。肿瘤的发生与细胞内信息传递异常密切相关,而肝癌细胞的增殖受多条信号转导通路影响,MAPK 信号传导通路的异常将导致细胞增殖与凋亡之间的失衡,可能在肝癌发病过程起重要作用^[16-18]。MAPK 链由 3 类蛋白激酶 MAP3K-MAP2K-MAPK 组成,通过依次磷酸化将上游信号传递至下游应答分子。MAPK 信号通路主要包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、应激激活蛋白激酶(stress-activated protein kinase SAPK), c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,c-JNK)和 p38^[19]。ERK 主要参与细胞的生长、增殖与分化, SAPK/JNK 和 p38 主要参与炎症反应与凋亡^[19,20]。Cai 等人^[21]研究发现,中药可逆转肝纤维化,减少 α -平滑肌肌动蛋白的表达,降低血清中 TNF- α 和 IL-13 的水平,并且 p38 和 ERK 的表达下调, c- JNK 的表达没有发现明显变化。此外,近年来 Caspases (cysteine aspartic acid specific protease)以执行细胞凋亡而受到广泛关注^[22,23]。

1.1.2 PI3K/Akt, PKB/Akt信号转导通路

Akt 是细胞增殖和生存的一个关键调节因子,是细胞质中的一种信号转导蛋白,三个研究组于 1991 年先后克隆出的一种基因,与病毒癌基因 v-Akt 高度同源,所以被命名为 Akt^[24]。Akt 在细胞存活途径中起重要作用,在肿瘤中经常表达失调,活化的 Akt 可通过多种机制抑制肿瘤细胞凋亡,促进细胞周期进展^[25]。PI3K/Akt, PKB/Akt 信号转导通路在恶性肿瘤的发生、发展及转归中发挥着重要作用。它作为体内重要的信号通路,

能够调控众多信号转导途径、参与细胞的生长与存活、细胞间信息传递等。异常的 Akt 信号通路参与肿瘤的形成与转移, 具有促增殖抗凋亡等作用^[26-27]。殷鹏等人研究发现, 在人肝癌细胞中, PI3K/Akt 信号通路通过转录因子 Sp1 在转录水平上调控 CSE 基因的表达, 并且 CSE 及其催化产物内源性 H₂S 通过对细胞周期的调节促进肝癌细胞增殖^[28]。多种研究证实在肝癌细胞组织中, Akt 和 pAkt 表达增高, 而 PI3K/Akt 信号通路负调控因子 PTEN 基因突变或缺失, 前两者增高及后者功能的障碍有助于肿瘤血道、淋巴转移, 并影响治疗和预后。多项发现 PI3K/Akt/mTOR 通路过度激活与多种肿瘤的发生发展密切相关, 调节该通路的活性对肿瘤的预防及治疗有重要意义^[29-31]。

1.1.3 Janus 蛋白酪氨酸激酶(Janus protein tyrosine kinase,JAK) 信号通路

Janus 蛋白酪氨酸激酶(Janusproteintyrosinekinase, JAK) 及信号转导活化蛋白(signal transducer and activator of transcription, STAT) 信号通路是近年来在肿瘤研究方面较多的一条通路。此通路包括众多的胞外信号, 如 G 蛋白偶联受体、IFN 家族、CC 家族、受体酪氨酸激酶、gp130 家族和单链家族都通过该通路进行转导^[32]。并且此信号转导通路在正常细胞的增值、分化、造血及免疫功能等多种生理过程中起重要作用^[33]。STAT1、STAT3 和 STAT5 是此通路中重要的 3 个信号分子。STAT 在多种恶性肿瘤中异常表达, 在正常组织中几乎不表达或不存在其活化形式。目前 STAT 可能被认为是一种癌基因, 一旦被激活, 可能作用于细胞核内特异的 DNA, 最终调控靶基因的表达, 促进肿瘤的血管生成及侵袭转移, 并导致肿瘤细胞的增殖、分化。诸多肿瘤细胞系及人的癌变组织中存在 STAT3 的持续激活, STAT3 的持续被激活能促进细胞的恶性转化并阻断凋亡^[34]。张斌等人^[35]研究了 JAK/STAT 信号通路与肝细胞性肝癌的肿瘤进展和预后的相关性, 发现肝癌临床 III~IV 期组织中 JAK-1 蛋白和 STAT-3 蛋白的表达明显高于临床 I~II 期的组织, 可用于评价肝癌的恶性程度, 分期, 分级及预后。Aggarwal 等研究表明 STAT3 的激活与肿瘤细胞对化疗药物的耐药性及对放射线的不敏感性有关。目前已有许多小分子被鉴定为 STAT3 的激活阻断剂, 其中包括一些人工合成的分子和一些多酚类^[36]。将来进一步的研究可能找出其它被 STAT3 调节的基因, 以便进一步揭示 STAT3 在肿瘤形成过程中的作用, 为进一步寻找阻断 STAT3 作用提供新的分子靶点^[37]。

1.1.4 HGF /c-Met 信号通路

肝细胞生长因子(HGF) 在 80 年代被发现, 因它对肝细胞具有强的丝裂原作用而命名为肝细胞生长因子。它是一种多效生长因子, 具有促进多种细胞分裂、生长、运动及

促血管生成等作用^[38]。c-Met 是一种原癌基因,编码 HGF 的受体,为 45ku 的 α 链和 145ku 的跨膜 β 链组成的糖蛋白,属于酪氨酸激酶蛋白家族,在上皮类细胞表面有丰富的表达,在人肝脏、胃肠道和大脑组织中表达水平较高。c-Met 参与正常生理发育,诱导肿瘤细胞侵袭、转移。c-Met 过度表达与肝癌转移、复发密切相关^[39,40]。Battaro 等^[41]首次报道了 HGF 和 c-Met 的关系,间质细胞产生的 HGF 作用于 c-Met 受体,形成 HGF/c-Met 系统。HGF 通过激活 c-Met 受体调节细胞的增殖、分化、形态改变和侵袭运动,c-Met 的激活与多种人类肿瘤的发生、发展有关。近来大量研究表明,HGF-c-met 与多种肿瘤的发生、发展、侵袭、转移密切相关。吴福生等^[42]研究了 25 例原发性肝癌患者血清 HGF 的水平变化,并检测了癌组织中 mRNA 的表达水平及 c-met 蛋白的表达水平,结果表明:肝细胞癌患者血清 HGF 水平高于健康对照组,且差异有统计学意义,表明在原发性肝癌患者中,c-Met 基因可能是被激活的;肝癌组织中 c-met 蛋白的表达与 mRNA 的表达均高于癌旁组织,差异有统计学意义。Vejchapipat 等^[43]检测了 55 例不宜进行手术的原发性肝癌患者的血清 HGF,结果表明原发性肝癌患者血清 HGF 水平高于正常对照组,差异有统计学意义,且肝癌患者的生存期与血清 HGF 表达水平呈负相关,血清 HGF 水平高于 1.0ng/ml 的患者较其他患者预后差。C-Met 在肝癌组织中的表达显著高于癌旁组织,肝细胞癌中 c-Met 有过度表达,高表达的 c-Met 蛋白使得肿瘤细胞对 HGF 的刺激反应更强烈、敏感。HGF 具有促进癌细胞运动、离散、侵袭等作用,异常的 HGF/c-Met 系统可能在肿瘤的侵袭转移种扮演重要角色。

1.1.5 Wnt 信号转导通路

Wnt 信号转导通路是指由 Wnt 基因调控的信号转导系统,是近年来肿瘤病因学研究的一个新热点。Wnt 信号途径在正常的细胞中发挥着重要的调控作用,调控着多种生命过程,包括生物体正常状态下的生长发育、疾病的发生及转归、机体的衰老及死亡等;也包括正常细胞形态及功能的维持,还包括细胞的分化、细胞癌变、细胞免疫、细胞凋亡、应激等。 β -catenin 最早是作为黏合连接(adhesion junction)的成员被发现的,但后来发现它是果蝇 armadillo 蛋白的同源物,并且是 Wnt 信号途径中具转录调控活性的关键成员,能在细胞核内与 Wnt 途径的另一类成员 LEF1/TCFs 结合从而激活靶基因的转录。 β -catenin 在这条信号通路中扮演着极其重要的角色,是整条通路的关键枢纽分子,B-catenin 作为一种多功能蛋白,能与 20 多种蛋白结合发挥双重调节功能^[44]。60%-70%的肝癌中发现有异常的 Wnt 信号,Wnt 信号通路通过激活其下游靶基因而影

响肝癌的发生发展^[45]。Bengochea 等^[46]发现 FZD3、FZD6、FZD7 在 HCC 中呈高表达, 而 FZD7 的高表达与 HCC 中 Wnt/ β -catenin 通路的激活有关, Wnt-3 正是通过与该受体的相互作用来激活 HCC 中的 Wnt/ β -catenin 信号通路^[47]。Yoshikawa 等^[48]研究发现 46% 的 HCC 中 Wnt-10B 启动子区域异常甲基化, 并以 β -catenin 依赖的方式抑制细胞生长, 表达水平与 β -catenin/TCF 活性密切相关, 在 Wnt-10B 基因敲除的细胞中 β -catenin 及下游靶基因如 c-myc、CyclinD1 的表达下调。随着经典 Wnt/ β -catenin 信号通路在肿瘤发生发展中作用机制研究的不断深入, 为抗肿瘤药物的研发和肿瘤治疗提供了新靶点。已发现非类固醇类抗炎药以及丙戊酸可以有效抑制 Wnt 通路信号转导^[49]。

1.1.6 线粒体通路

线粒体是细胞能量代谢的中心, 细胞凋亡过程中对线粒体损伤的最直接结果是其正常功能的丧失。线粒体功能障碍除了会导致自由基产生增加、兴奋性氨基酸释放增多、钙离子超载而引起细胞凋亡外, 还能直接诱导细胞凋亡^[50]。线粒体通路是线粒体凋亡途径之一, 当含 Bcl-2 家族的成员在接受细胞内的死亡信号后被激活, 含 BH3 结构域的 Bcl-2 家族成员与其它不含 BH3 结构域的 Bcl-2 家族成员作用, 如 Bax, Bak 等, 主要存在细胞浆或线粒体外膜面, 导致不含 BH3 结构域的寡聚并插入线粒体内膜, 引起线粒体膜通透性明显升高, 跨膜电位出现不可逆的降低, 导致细胞色素 C (Cytc) 释放^[51], 从而引起线粒体的功能发生紊乱, 导致细胞出现早期凋亡现象。Cytc 的释放是线粒体凋亡途径的主要步骤, Cytc 与凋亡活化因子-1 (Apaf-1)、ATP/dATP 结合并发生多聚化从而形成凋亡体, 后可进一步启动 caspase 级联反应, 激活线粒体通路下游的 caspase-3 和 caspase-7, 引起细胞的凋亡^[52]。研究表明: 线粒体在细胞凋亡中起着十分重要的作用, 线粒体膜通透性转运孔的开放在线粒体通路诱导的细胞凋亡过程中其主要作用, 各种促凋亡因素均可引起线粒体膜通透性转运孔的结构发生改变, 从而引起而线粒体膜的通透性增加^[53], 如细胞毒性药物刺激、氧化作用、电离辐射、热刺激等, 最终导致凋亡诱导因子及细胞色素等蛋白从线粒体内释放到胞质中^[54]。亚细胞定位研究表明: Bcl-2 和 Bcl-x1 定位于线粒体外膜, 而 Bcl-2 家族促凋亡成员存在于细胞质或线粒体内膜。在细胞凋亡过程中, BCL-2 家族促凋亡成员 (Bak、Bax、Bik 和 Bid) 被激活, 引起其构象改变, 导致 BH3 结构域暴露, 并转移到线粒体。促凋亡蛋白被转移到线粒体后, 引起线粒体释放大量的细胞色素 C 和其他蛋白, 进而激活 caspase 级联反应, 引起

细胞凋亡^[55]。随着线粒体通路研究的不断深入,在肿瘤发生发展中作用机制也逐渐阐明,将可能为抗肿瘤药物的研发和肿瘤治疗提供新靶点。

1.1.7 VEGF通路

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)的信号转导通路的活化对血管内皮细胞的增殖、迁移、水解基膜和构建血管的调控作用较强,能促进肿瘤血管形成,对多种肿瘤特别是肝癌的生长、浸润、转移、治疗和提示预后都有重要的作用^[56-58]。Esther 等^[59]将 VEGF siRNA 经 Lipofectamine 2000 脂质体转染肝癌 Hepal 29 细胞核 SVEC4-10 细胞后,发现 siR-VEGF 能有效地干扰肝癌 HepG2 细胞 VEGF 的表达和减少肿瘤的形成,降低微血管的密度。VEGF 的表达水平与血管的侵袭及转移、复发、血管密度、分化、肿瘤的分期和预后等息息相关^[60-63]。Zhong 等^[64]通过原发性肝癌术前术后血液及组织标本,采用 ELISA 及免疫组织化学方法测定 VEGF 的表达量,结果发现血液中的表达量明显高于正常对照组。复发组明显高于未复发组。在细胞质中,复发组明显高于未复发组。1-3 年生存率明显 VEGF(-)比 VEGF(+)高。凡兴卫等^[65]报道,AFP 联合 VEGF 应用,诊断原发性肝癌的灵敏度、特异度及准确度均明显升高。刘尧等^[56]指出在 VEGF/VEGFR-1 信号转导通路中,VEGFR-1 的激活涉及一系列复杂的信号转导和程序性基因表达还需要进一步研究。

1.1.8 其他通路

其他信号转导通路除上述肝癌信号转导通路外,还有泛素-蛋白酶体途径、caspase 级联反应、Notch 信号通路等。泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin - proteasome pathway, UPP)是细胞内三磷酸腺苷依赖的非溶酶体蛋白降解机制,研究证实,细胞内的蛋白通过泛素蛋白酶体途径降解^[66]。近年来研究报道^[67,68],异常的泛素蛋白酶体生物学行为与恶性肿瘤的发生和发展有着密切的关系,这主要是由于异常的 UPP 对细胞内重要功能蛋白质的降解失常所造成的。caspase(cystine containing aspartate specific protease)意为含半胱氨酸的天冬氨酸特异水解酶,是凋亡的主要执行者^[69]。Caspase 的活化在细胞凋亡调控中起核心作用,位于 Caspase 级联反应上下游的启动型 Caspase 和执行型 Caspase 表现出不同类型的活化机制^[70]。Notch 信号通路是一个在进化过程中高度保守的信号通路,广泛存在于无脊椎和脊椎动物中,动态影响细胞发育的多个过程,包括细胞的分化、增殖及凋亡等^[71]。Wang 等^[72]报道,乙肝病毒 HBx 蛋白通过上调 Notch 信号通路促进肝癌的

生长, 转染 HBx 基因的 HEPG2 对比未转染的细胞, 其 Notch-1、Jagged-1 和 Hes-1 表达上调, 细胞的恶性生物性特征增加。当阻断 Notch 信号通路后, 蛋白诱导的肝癌恶性生长被部分阻滞。

综上所述, 肝癌的发生发展是多步骤发生、多基因参与、环境因素与遗传因素共同作用的复杂过程, 肝癌相关分子生物学研究表明信号传递通路在肝癌的发生发展中发挥重要作用, 肝癌信号转导通路是近年来研究的热点, 介导肝癌的信号转导通路十分复杂, 涉及多种调节因子及信号通路, 其转导通路也不是一对一的对应关系, 而是各通路间相互交叉形成复杂的网络关系。对信号传递通路的研究将有利于阐明引起细胞恶变的分子机制, 确定肝癌治疗的新靶点, 开发新的靶向治疗药物, 最终延长肝癌患者生存期, 改善生存质量, 为预防肝癌发生, 提高肝癌治愈率提供坚实的理论基础^[73]。因此全面的研究探讨这些信号通路有助于我们进一步了解肝癌的发生发展机制, 为其治疗靶点提供新的科学依据, 更好地指导临床工作。

1.2 原发性肝癌与凋亡相关基因的关系

1.2.1 线粒体与细胞凋亡

细胞凋亡是一个受一系列相关基因严格调控的细胞死亡过程。线粒体是细胞凋亡调控的活动中心, 它不仅是细胞赖以生存的产能场所, 而且是调控细胞凋亡的重要细胞器^[74]。在细胞凋亡过程中, 线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore) 过度开放, 线粒体跨膜电位降低, 还会导致一些相关的促凋亡因子, 如细胞色素 C、Smac/ Diablo 等, 凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor)、B 细胞淋巴瘤 (Bcl-2) 家族以及膜间隙中的 caspase 前体蛋白等从线粒体释放到胞质中, 这一过程有消除体内老化细胞与潜在异常生长细胞的功能对保持机体的稳态起着重要作用^[75-77]。线粒体凋亡的调控主要是通过调控线粒体途径中凋亡相关蛋白及各种复合物来完成的, 从而达到促进或抑制凋亡的作用, 最近研究表明: 一些新的抗肿瘤策略主要是针对线粒体通路中的凋亡相关蛋白的表达, 如促凋亡相关蛋白的释放等来制定诱导肿瘤细胞凋亡的方案^[78-79], 从而研发一些新的药物。也有部分研究设想利用信号转导通路进而引起线粒体膜通透性的改变, 最终引起肿瘤细胞的凋亡, 从而达到治疗肿瘤的目的^[80]。由此看来线粒体改变引起的细胞凋亡在许多生理病理过程中起着重要作用。

1.2.2 Caspase 与细胞凋亡

Caspase 家族属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶, 参与肝细胞癌发生过程中的细

胞凋亡异常的病理过程, Caspase是结构上相关的在细胞浆溶胶中存在的一类半胱氨酸蛋白酶,天门冬氨酸的残基肽键被其特异地断开为其典型的特征^[81]。Caspase-3在Caspase家族中有极其重要的地位,它处在细胞凋亡的公共通路上,是执行细胞凋亡的关键因素之一,在原发性肝癌发生过程中,参与细胞异常凋亡的病理过程。正常情况下,Caspase-3存在于细胞质中,并且以无活性的酶原形式存在,当细胞外出现刺激诱导凋亡信号时,才能被激活为有活性的Caspase-3,有活性的Caspase-3可引起细胞构架的关键蛋白酶失活,细胞质、细胞核的结构发生变化,最终导致细胞凋亡。增加肿瘤细胞的凋亡可延缓肿瘤的进展,改善肿瘤患者的预后,故如何增加肿瘤细胞的凋亡将成为肿瘤研究的新方向^[82-83]。代琼等^[84]研究发现甘氨酸鹅脱氧胆酸钠可明显诱导肝癌SMMC7721细胞凋亡,Caspase3、Caspase9参与GCDCA诱导SMMC7721细胞凋亡调控。易彤波等^[85]研究发现5-Fu诱导HepG2细胞凋亡中caspase-8介导caspase-3的活化。5-Fu通过caspase级联反应诱导HepG2细胞凋亡,阻断此反应能抑制凋亡。诸多研究均支持上述观点。

1.2.3 p53基因

p53基因被认为是人类肿瘤中最常发生变化的基因,被称为“基因组卫士”,越来越多的证据表明p53基因的突变与失活和肝癌的发生发展有着密切联系^[86],由于血清p53抗体表达水平与肿瘤组织p53基因突变及蛋白积累程度相一致而使p53蛋白及其抗体成为研究热点^[87]。在人体中TLR(Toll-Like Receptor)家族能够通过识别保守的病原相关分子模式调节自然免疫,研究发现p53直接增强TLR表达水平,并且该发现有望为肿瘤的诊断和治疗提供新思路^[88-89]。另外,p53在调节mirRNA加工过程中发挥重要作用,可能与促进肿瘤生物学行为方面发挥重要作用有关^[90]。欧盛秋等^[91]采用rad-P53注射液联合TACE治疗中晚期共60例,与同期接受常规TACE治疗期肝细胞癌患者60例进行对照观察,其中两组患者P53表达阳性、阴性各30例,结果P53表达阳性患者中治疗组有效率为73.33%,明显高于对照组46.67%($P < 0.05$)。在P53表达阴性患者中两组有效率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),提示rad-P53注射液联合TACE治疗中晚期肝细胞癌能够提高P53表达阳性患者的疗效。谭军英等^[92]采用PCR和逆转录RT-PCR的方法检测了24例原发性肝癌患者癌组织和癌旁组织中p53与ASPP2的基因突变情况,对ASPP2mRNA进行半定量分析。研究发现24例肝癌患者中p53基因在肝癌组织中的突变率是75%,在癌旁组织中的突变率为20%, $P < 0.01$;肝癌组织中ASPP2与GAPDH的灰度比值平均为0181,癌旁组织中为0185, $P > 0.05$;但是癌组织和癌旁组织均未检测到ASPP2基因突变。发生

过程中, p53基因突变比AS-PP2基因突变可能起到更重要的作用。研究表明在肿瘤病人中虽然有50%存在p53突变或缺失, 剩余的50%病人即使p53基因本身没有突变, 但仍存在功能的丧失, 因此在这些肿瘤病人中恢复p53功能为肿瘤的治疗提供了重要策略。而且利用各种可诱导基因构建内源性野生型 p53 被认为是p53缺失的肿瘤治疗的“开关”^[93,94]。

1.2.4 Fas/FasL

Fas/Fas 配体 (Fas Ligand, Fas-L) 系统是调节细胞凋亡的主导基因调控系统之一, 肿瘤细胞能在肿瘤微环境中获得免疫特赦使肿瘤得以进展。Fas表达下调与p53突变有关, 这使淋巴细胞由其Fas-L介导的对肿瘤细胞杀伤敏感性下降^[95]。Fas和Fas-L的研究已成为细胞分子生物学领域中重要进展之一。从对Fas和Fas-L的分离、鉴定、表达及功能等的研究发现Fas-Fas-L系统在人体细胞凋亡、免疫赦免及维持机体的稳态平衡上有重要生理功能。而且与多种免疫性疾病和肿瘤的发生有关。王平等^[96]选择Fas-L表达阳性的肝癌组织标本, 通过可溶性Fas受体阻断肝癌细胞内Fas/Fas-L途径诱导凋亡, 并激活T细胞, 与正常对照组比较观察阻断凋亡的效果, 同时了解T细胞增殖杀伤活性, 最终结果证实可溶性Fas受体阻断激活T细胞凋亡后, 细胞增殖显著升高, 与未阻断组比较差异有统计学意义。梁云等^[97]研究发现wtp53基因联合争光霉素后则在上调肝癌细胞Fas/Fas-L表达的同时使肝癌细胞在原本较不敏感的药物浓度(600mg/ L)作用下发生了显著凋亡。

1.2.5 c-myc

c-myc基因是最早于禽类髓瘤病毒Mc29中发现的一种癌基因, 自其发现以来一直受到人们的广泛重视。c-myc基因是较早发现并研究的原癌基因之一, 在肿瘤发生中起重要作用。在正常细胞中c-myc的活化和c-Myc蛋白的表达参与细胞的增殖、分化和凋亡等一系列生理过程, 但在多种因素的共同作用下, c-myc的异常激活和c-Myc蛋白的过表达与肿瘤的发生密切相关。c-myc是调控细胞增殖的主要基因, 其表达产物是一种转录因子与细胞增殖分化及癌变有密切关系^[98,99]。癌基因c-myc被证明为细胞增殖必不可少的早期基因, 其表达产物在细胞增殖过程中是调控转录的反式作用因子, 是细胞增殖信号转导的必需因子^[100]。c-myc及cyclinD1与E2F1基因相互作用是肝细胞生长周期活化过程中必须的。抑制c-myc和cyclinD1使得E2F1基因下调可抑制HCC生长起治疗作用^[101]。郭晓林等^[102]研究发现C-myc基因在HCC中高度表达, 癌旁组织中的表达明显下降, 在正

常肝组织中则无表达。C-myc基因表达与HCC的发病年龄、性别、肿瘤大小及分化无关，而与HCC的转移有明显的相关性，同时可以作为判断HCC有否转移的指标之一。

1.2.6 Bcl-2和Bax

Bcl-2蛋白家族在细胞凋亡过程中起着关键的作用，主要包括两类蛋白：一类是促凋亡蛋白，另一类是抗凋亡蛋白，主要作用于线粒体外膜、内质网膜和核膜上，对细胞的生死起着重要的调控作用，在线粒体上外膜上，Bcl-2家族蛋白通过与其它凋亡相关蛋白的协同作用来调控线粒体结构与功能的稳定性，发挥着细胞凋亡“主开关”的作用。在细胞凋亡时，Bcl-2家族成员通过形成同源或异源二聚体，促凋亡蛋白成员发生蛋白质的加工修饰，当促凋亡作用占优势时，促凋亡蛋白易位到线粒体外膜上，引起凋亡诱导因子、细胞色素C等因子的释放，使得线粒体功能丧失，最终导致细胞凋亡^[103]。激活的促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白成员发生相互作用后，抗凋亡蛋白丧失凋亡的抑制作用，造成细胞器内促凋亡因子的释放及线粒体等细胞器的功能丧失，仍可导致细胞凋亡。Bcl-2家族中促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的代表分别为Bax蛋白和Bcl-2蛋白，在线粒体凋亡途径中起着重要的作用，Bax是Bcl-2主要调控因子，正常细胞中Bax主要定位于细胞浆内，当细胞受到刺激、损伤后Bax将被激活，激活的Bax将重新分布于线粒体表面，使线粒体外膜的通透性显著升高，从而引起细胞色素的释放，诱导细胞凋亡^[104,105]。总之，当细胞凋亡时Bax通过破坏线粒体膜的完整性发挥作用，而Bcl-2则在线粒体外膜发挥作用以维持膜的完整性^[106]。胡泰洪等^[107]研究发现姜黄素可能通过降低肝细胞表达Bax减少肝细胞凋亡而减轻肝脏损伤，通过降低Bcl-2表达、诱导肝星状细胞凋亡发挥减轻肝纤维化的作用。

1.2.7 Survivin

Survivin是凋亡抑制蛋白家族的新成员。具有抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、参与调节细胞有丝分裂及血管生成的多重功能。在恶性肿瘤组织中高特异性表达，与肿瘤的发生、转移、预后、复发等密切相关。Survivin是凋亡抑制蛋白中的一种，选择性地表达于恶性肿瘤组织。王颖等^[108]通过WB方法研究了SMMC-7721人肝癌细胞株和hepG2人肝癌细胞株及肝癌组织中Survivin蛋白的表达情况，结果表明两株人肝癌细胞株中Survivin均呈高表达，明显高于正常对照组，差异有统计学意义，而85%的肝癌组织Survivin表达呈阳性，所有的癌旁组织均未见Survivin表达。李先东等^[109]研究表明Survivin蛋白的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小无关，但Survivin蛋白在肝癌的发生

发展过程中起着重要作用。这与Survivin蛋白在肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌中的表达情况一致。在所有常见的肿瘤中Survivin都有过量的表达,这一普遍现象表明Survivin蛋白表达在癌症处于失控状态,并且成为评估患者预后的一个重要指标^[110, 111]。最近其它一些研究也表明^[112-113], Survivin在肝癌组织和几乎所有肝癌细胞株中均呈高水平的表达。且高特异性的表达将可作为早期诊断的指标。通过上述多项研究表明: Survivin蛋白表达在肝癌的发生发展过程中起重要作用。

1.3 肝癌化疗的研究进展

肝癌起病隐匿,一经发现往往是中、晚期,常失去手术时机。肝癌术后5年复发率在90%左右。早期治疗是改善肝癌预后的最主要因素。早期肝癌应尽量采取手术切除,以根治性切除疗效最佳,对不能切除的肝癌,可通过手术或非手术的综合疗法,使肿瘤缩小后再行2期或2步切除,以达到减缓肿瘤发展,延长生存期的目的。某些类型的小肝癌可以通过各种非手术方法的局部治疗而达到治愈的目的。晚期患者无法耐受各种治疗时,应以保肝、改善全身状况及对症处理为主,以减轻痛苦,提高生活质量,对于无法手术切除的晚期肝癌、肝癌手术切除后预防复发及切除后复发再治疗的肝癌,化学药物治疗仍然是主要治疗手段。全身化疗是肝癌药物治疗最基本的方法,应用广泛,可采用口服、静脉注射、腹腔注射、腹腔动脉或肝动脉灌注以及灌肠等多种途径给药。

肿瘤化疗药物耐药性的存在严重阻碍了化疗药物的应用,尤其是多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象,目前大多数研究都认为,ERK的过度激活与多种化疗药物的耐药性存在明显正相关,其作用机制可能是通过调控耐药相关基因和蛋白的表达。Weldon等^[114]通过基因芯片技术对MCF7细胞株1186个基因进行分析后发现,MEK5(ERK5上游激酶)的过表达与耐药株APO-MCn的耐药性存在明显的相关性。Kisucka等^[115]发现,鼠白血病细胞系的耐药株L1210/VCR(长春新碱)多药耐药与ERK持续激活相关,其机制可能是ERK激活引起肿瘤细胞表面多药转运蛋白P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)基因表达量增加,P-gp可将药物从细胞内栗出,使细胞内VCR浓度降低从而产生耐药,而MEK特异性抑制剂PD98059和U0126可以抑制ERK活性,从而提高细胞内VCR浓度并且逆转U210/VCR的耐药性。

MDR 癌细胞的存在是肝癌化疗失败的根本原因,因此,如何较满意地解决肝癌细胞MDR问题已成为当务之急^[116]。有资料表明,通过调节肿瘤细胞MAPK激酶系统的表达有可能逆转MDR,将成为肿瘤治疗的新方法^[117]。此外,联合用药将成为我们将来

研究的新方向,尤其是中西医结合的方法,已在临床上取得了较好的疗效,已有多项研究表明两者结合能够减轻化疗的副作用,增加患者机体免疫力及抗肿瘤的能力,以达到治疗的目的,以延长患者的生存期^[118]。

在肝癌的化疗药物中,5-FU 是为数不多的被证明对肝癌有效的药物之一。其对肝癌的疗效各家报道不一,一般有效率约15%。也是治疗消化系统肿瘤最常用的药物,它在体内转变为5-氟尿嘧啶脱氧核苷,可以抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶,阻断尿嘧啶脱氧核苷酸转变为胸腺嘧啶脱氧核苷,干扰 DNA 的生物合成,主要为 S 期特异性药物。但氟尿嘧啶(5-Fu)在体内转化为5-氟尿嘧啶核苷酸后,能掺入 RNA 中干扰蛋白质的合成,对其他各期细胞也有一定的治疗作用。5-FU 属细胞周期特异性化疗药物,对 S 期细胞最为敏感,其作用特点是呈给药时间依赖性,作用时间越长效果越好。5-FU 应用途径主要有经静脉输注和经肝动脉灌注两种。经静脉给药进入肝脏药物较少,难达到对肿瘤抑制的有效浓度,并且全身副作用较大,目前已少用。在实际使用过程中,发现有许多缺点,如体内分布广、缺乏对肿瘤细胞的选择性、毒性大、副作用多、作用时间短、久用易耐药等,均限制了临床的应用。因此,解决中晚期的肝癌化疗中的5-FU 的耐药问题和优化化疗方案显得尤为必要。Ganten 等^[119]也报道了5-FU 作用于肝癌细胞 HepG2 和 Hep3b,可以通过增强细胞表面的 Fas 及肿瘤坏死因子相关凋亡配体的表达来诱导肿瘤细胞的凋亡。

近年来肝癌化疗取得了较大进展,表现在给药方式的改进、一些新的化疗药物出现、化疗药物的联合应用和多种给药方式的有机搭配等,使肝癌的化疗呈现出新的局面。5-FU 应用于联合化疗优点包括只需小剂量化疗药物就可以取得高效果,药物不良反应减少、耐药性降低、还可以降低化疗药物自身的毒性。因此,5-FU 的联合化疗拥有更广阔的临床应用前景^[120-125]。

1.4 本论文选题的依据和思路

原发性肝癌传统的治疗方法有手术、介入、放疗、化疗、中药治疗等,手术介入易造成医源性种植转移,放化疗副作用大,中药作用机制不清,因此探讨新的药物及治疗策略、方法十分必要^[4-8]。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。各种非手术疗法成为目前治疗肝癌的重要手段。本研究中,以寻找到更好的联合化疗方案,提高原发性肝癌的治疗的有效率,延长生存期。对手术、化疗、放疗、中医中药、免疫治疗和其他支持疗法、对症处理等综合措施,要从整体出发,针对病情合理

选用，才能达到提高疗效的目的^[119,120]。

洁悠神（JUC）是一种长效抗菌材料，也是一种新型的纳米材料，是物理抗菌喷雾敷料。喷洒在皮肤表面，形成正电荷膜杀灭和隔离病原微生物（包括细菌、真菌和病毒），物理抗菌能避免耐药菌产生，可以避免抗菌药物引起的生物耐药性这一严重的社会问题。洁悠神成分为水溶性高分子阳离子活性剂，即有机硅季铵盐2%，蒸馏水98%；其特性通过正负电荷静电作用达到抗菌目的，不会产生耐药菌。与抗菌药物比较避免抗菌药物导致的耐药菌产生，可更安全、更有效地应用于局部感染治疗和预防；它有广谱抗菌，避免继发感染的特点经微生物学检验可杀灭细菌、真菌和病毒，突破抗菌药物只能抗细菌或只能抗真菌的局限；避免应用抗细菌药物导致继发真菌感染，应用抗真菌药物导致继发细菌感染，以及没有有效的抗病毒药物问题。

经生物学检验：洁悠神对皮肤一次喷洒能使皮肤表面保持8小时抗菌功能；对物品一次喷洒能使织物洗涤40次仍保持抗菌功能。与消毒剂区别：避免消毒剂只能有十几分钟的短效抗菌效果，突破性解决使用消毒剂预防院内感染的不足，实现介入管、医生手、病人手术区、无菌手套和无菌衣、手术器械等的长效无菌。经口无毒性，对皮肤粘膜无刺激性，无致敏，对细胞无毒性，与抗菌药物的区别：避免抗菌药物导致的多种毒副作用。符合理想敷料的四个需求的标准：a)满足生物学需求：提供更安全、更有效的物理抗菌创新的治疗方法。b)满足医生的需求：提高医生换药治疗的效率和效果的要求，例如：换药简单，无需纱布包扎或缝合固定，透明便于观察，不损伤新生组织。并可方便用于传统敷料不易或不能用的人体局部。c)满足病人的需求：提高病人生活质量的要求，例如：换药不痛、可洗澡、无异物感、不影响外观。d)满足环保的需求：无需消毒，节省能源；无需垃圾处理，环保。

洁悠神在皮肤表面形成“正电荷膜”，“正电荷膜”强力吸附中和带负电的病原微生物（细菌、真菌和病毒），病原微生物在“正电荷膜”无法与外界交换而窒息死亡，起到物理式抗菌作用。当产品水溶性制剂喷洒于皮肤或物体表面，粘着后很快固化，形成分子级隐形抗菌敷料，其结构为复式叠加：“胶联膜”和“正电荷膜”。胶联膜以化学键方式与体表牢固连接，因此独具长时效抗菌性。正电荷膜成分为阳离子（季铵盐）活性剂，在皮肤或物品表面形成正电荷网状膜，对带负电荷的病原微生物（细菌、真菌和病毒）极具强力吸附作用，致使其赖以生存的呼吸酶失去作用而窒息死亡，起到物理杀灭或抑制病原微生物的作用，故具广谱抗菌性。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。目前国内研究已明确其长效抗菌作用及在临床各种感染中的应用，未见其副作用的报道^[126]。目前尚未有文献报道其抗肿瘤作用。但目前未见洁悠神在抗肿瘤方面的研究报道。

我们设想洁悠神在肿瘤细胞表面是否形成“正电荷膜”，吸附肿瘤细胞，致使其赖以生存的呼吸酶失去作用而窒息死亡，起到抗肿瘤的作用，尤其是在手术中难免发生种植转移，当手术中喷洒于粘膜表面可预防肿瘤种植转移，故我们课题组在体内试验通过建立肝癌 R15 细胞大鼠肿瘤种植转移模型，实验结果证实了洁悠神具有防止肝癌种植性转移形成的作用，未见明显副作用。并行体外实验培养膀胱肿瘤细胞 T24 及 EJ，给予不同浓度 JUC 处理，已明确洁悠神有抗肿瘤作用，且有时间剂量依赖关系，还发现凋亡 P53 蛋白及 Bcl-2 蛋白表达的变化证实了诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

故本课题在上述实验的基础上再次探讨了洁悠神抑制不同肝癌细胞增殖的作用，揭示 JUC 对肝癌细胞是否有促进凋亡的作用及肿瘤细胞发生凋亡的机制；此外，设立化疗药物对照组，并联合化疗药物处理不同的肝癌细胞，比较其与传统化疗药物抗肿瘤的作用及是否具有协同作用，以达到减少化疗药物的用量及减轻化疗药物的副作用，为临床肿瘤治疗及预防提供新的药物及思路。

第二章 有机硅季铵盐联合 5-FU 对肝癌细胞增殖及凋亡的影响

洁悠神 (JUC) 是一种长效抗菌材料, 其主要成分为有机硅季铵盐, 也是一种新型的纳米材料, 是“皮肤物理抗菌膜”专利产品, 由南京神奇科技有限公司生产, 已在2002年获得了中国食品药品监督管理局的产品注册。于2006年获得了美国 FDA 认证, 主要由新型高分子活性剂加有机硅季铵盐制成, 其水溶性制剂喷洒于皮肤表面, 很快固化, 形成“正电荷层”及“胶联层”, 胶联层成分为高分子有机硅, 以化学键方式与体表牢固连接, 具有长效抗菌的功效。在本章中, 我们主要研究考察 JUC 联合化疗药物5-FU 对肝癌细胞增殖及凋亡的影响, 考察 JUC 是否具有抑制肿瘤细胞增殖作用, 并明确其与5-FU 是否具有协同作用, 能否减轻5-FU 的副作用, 为临床肿瘤治疗及预防提供新的药物及思路。

2.1 材料与方方法

2.1.1 主要材料与试剂

(1)实验所用药物洁悠神 (JUC) 由南京神奇科技开发有限公司免费提供, 化疗药物 5-FU 购自兰州大学第二医院药房 (扬子江药业集团有限公司 国药准字 H20031075)。

(2)人肝癌细胞系 SMMC-7721 为兰州大学第二医院泌尿研究所液氮冻存, R15 大鼠肝癌细胞株购自上海拜力生物科技有限公司。

(3)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, BCA 蛋白定量试剂盒购自中国碧云天公司 (Beyotime), 增强化学发光检测试剂盒购自美国 Upstate 公司。

(4)DMSO、MTT、PI 染料等常规试剂购于 Sigma-Aldrich 公司。

(5)RPMI(Roswell Park Memorial Institute)1640 培养基购自 GIBCO 公司(Invitrogen Corporation)、胎牛血清 (FBS) 均购于 GIBCO 公司 (Invitrogen Corporation)。

(6)Annexin V-FITC apoptosis detection kit 购于 BD Biosciences 公司。

(7)Hochest33342 染色试剂盒购自上海研卉生物科技有限公司。

(8)抗体: Bcl-2 Antibody, Bax Antibody, Caspase-3 Antibody, Caspase-8 Antibody, Survivin Antibody (美国 Upstate 公司, 05-644); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠和山羊抗兔的二抗均购于北京中杉金桥公司。

2.1.2 主要溶液配制

(1) D-Hanks 液: KH_2PO_4 0.06g, NaCl 8g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.06g, NaHCO_3 0.35g, KCl 0.4g, 酚红 0.02g, 加入蒸馏水约 800ml, 搅拌至完全溶解, 定容至 1000ml, 分装高压灭菌, 保存于 4°C 。

(2) PBS 缓冲液: NaCl 8g、 KCl 0.2g、 Na_2HPO_4 1.44g、 KH_2PO_4 0.24g, 加入 800ml 去离子水, 充分搅拌, 用 HCl 调节 Ph 值至 7.4, 补充去离子水定容至 1000ml, 高压蒸汽灭菌, 保存于 4°C 。

(3) 0.25%胰酶: 称取 0.25g 胰蛋白酶, 加入 D-Hanks 液 100ml, 搅拌至完全溶解, 一次性滤器过滤, 分装, 4°C 保存。

(4) 0.5mol/L EDTA ($\text{Ph}8.0$): $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 186.1g 溶于 700ml 去离子水中, 用 10mol/L NaOH 溶液调 PH 值至 8.0, 补加水至 1000ml, 高压灭菌后保存于 4°C 。

(5) MTT 溶液: 称取 250mg MTT, 加入 50ml PBS, 搅拌至完全溶解, 过滤除菌, 分装, 4°C 保存。

(6) 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 ($0.22\mu\text{m}$ 滤芯) 过滤除菌, 用前每 90ml 加入 10ml 经 56°C 30 分钟水浴灭活的胎牛血清。

(7) 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°C 保存。

(8) 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°C 保存。

(9) 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。

(10) 0.5mol/L EDTA($\text{Ph}8.0$): 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。

(11) 1.0mol/L 的 $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ 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。

(12) 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。

(13) 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。

(14) 20%吐温 20 (Tween 20)：Tween 20 20ml 加蒸馏水至 100ml，混匀后 4℃保存。

(15)考马斯亮蓝 G250 溶液 (测蛋白含量)：考马斯亮蓝 G250 100mg 加入 50ml95%乙醇，溶解后加入磷酸 100ml，加水至 1000ml，混匀后滤纸过滤，4℃保存。

(16) 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。

(17) 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。

(18) 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。

(19) 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。

(20) 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。

(21) 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。

(22) 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。

(23) 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。

(24) 显影液配方：

温水 (50℃-60℃)	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。

(25) 定影液：

温水 (50℃-60℃)	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。

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

(27) 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。

2.1.3 主要仪器

(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. 倒置显微镜：EVOS 公司 (AMG)，美国。

(3) 电子天平：GMI302 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-6M 型，德国 Beckman 公司产品。

(6) 超净工作台：CW-CJ-18，苏州净化设备厂。

(7) 台式低温离心机：RS-20III 型(日本)。

(8) 生物安全柜：Thermmo Scientific，美国

(9) 流式细胞仪：Becton Dickson 公司。

(10) CO₂ 细胞培养箱：Thermmo Scientific，美国。

(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) 电子天平：GM1302 型，Mettler Toledo 公司。

(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。
- (26) 低温高速离心机：Beckman, 德国
- (27) 超纯水仪器：Millipore, 美国
- (28) 25cm²、75cm² 培养瓶, 6 孔板、24 孔板、96 孔板, 10ml 离心管、50ml 离心管, 2ml 冻存管等, Corning, 美国
- (29) 高压灭菌锅：SANYO(MLS-3750), 日本
- (30) 恒温循环水浴锅：DZ-84 型, 上海跃进医疗器械一厂
- (31) 酶标仪：Elx800, BiOTEK, 美国

2.1.4 细胞培养

(1) 细胞复苏和培养

(a) 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 30min 后开启通风 10 min, 并用酒精纱布擦拭超净台台面。

(b) 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。

(c) 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。

(d) 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。

(e) 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。

(f) 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 25cm² 的经高压蒸汽灭菌的培养瓶中。

(g) 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℃、湿度 95%、CO₂ 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

(a) 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℃水中水浴。

(b) 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。

(c) 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。

(d) 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

(a) 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(1000r/min, 10min)。

(b) 去上清液，加入含 20%小牛血清的完全培养基，于 4℃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 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 以上，但密度不能太多，不能超过 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。

(c) 将上述细胞分装于专用冷冻塑料管中，安瓿装 1~1.5ml 在火焰喷灯上封口。

(d) 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。

先吸净培养瓶内细胞培养液，用 D-Hanks 平衡液轻轻的洗涤细胞两遍，吸净培养瓶 D-Hanks 液，加入胰酶 1ml，轻轻晃动培养瓶，使胰酶均匀的与细胞接触，弃去胰酶，放置于培养箱孵育 3min 左右观察细胞变圆，立即加入含 10%血清完全培养液 10ml 以终止消化，吸管轻轻吹打，避免细胞成团，以 1:2 传开，置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中。观察细胞生长状况，待细胞铺满培养瓶底约 80%时，准备 D-hanks 液、胰酶、完全培养基、细胞瓶。

SMMC-7721 及 R15 细胞复苏后培养于含 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。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）。

2.1.5 细胞生存率 MTT 法检测

MTT 全称 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium 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，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。二甲基亚砜（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。

(1) 试验用品

(a) MTT 溶液（配置方法见上）

(b) 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）

(c) 96 孔培养板（平底型，不看重复使用，以免影响吸光值），可调移液器、吸管、离心管、计数板。

(d) 细胞培养箱，倒置显微镜，振荡仪、酶联免疫检测仪。

(2) 试验步骤

(a) 接种细胞：将处于对数生长期的肝癌细胞 SMMC-7721 及 R15 用 0.25%胰酶消化后，配制成细胞悬液，按 4000~5000 个细胞/孔接种于 96 孔板，每孔加 100ul 含 5%PBS

完全培养基。

(b) 培养细胞：将 96 孔板放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱培养 24 小时后，按分组情况加入浓度梯度的 JUC，分 4 个梯度（分别药物比例是 5/10000、1/1000、3/1000 和 5/1000），并加入浓度梯度的 5-FU，分 4 个梯度（分别药物比例是 5μmol/l、10μmol/l、30μmol/l 和 50μmol/l），每孔 100ul，设 5 个复孔，以减少试验操作误差，每组设 3 个平行对照孔，再放入培养箱中，根据实际情况培养至所需时间点；

(c) 呈色：弃掉旧培养液，每孔加入 100ul 含 0.5% MTT 和 0.5% FBS 的 RPMI1640 培养液，温育 4 小时，小心弃掉上清液，每孔加入 150 μl DMSO，振荡 10 分钟，使结晶物充分融解。

(d) 比色：使用酶联免疫检测仪选择 490nm 波长测定各孔光吸收值，记录结果，以时间为横坐标，细胞存活率为纵坐标，绘制细胞生长曲线。

2.1.6 显微照相观察细胞病变效应（CPE）

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。

不同浓度的 JUC 和不同浓度的 5-FU 处理细胞后，光镜下表现为细胞表型的改变。根据前期实验组药物浓度的筛选，选择 1/1000 体积比 JUC 和 0.1mol/l 的 5-FU 处理两种肝癌细胞后，随着时间的延长，细胞出现回缩、变圆、皱缩，甚至脱壁、崩解的现象。并将这种现象称之为细胞病变效应（CPE）。

试验步骤:

(1) 培养 SMMC-7721 及 R15 细胞, 显微镜下观察 2 种细胞株的生长增殖情况。

(2) 根据细胞生长状态达到细胞瓶底 60%-70%时加入 1/1000 体积比 JUC, 0.1mol/l 的 5-FU 及两者联合组。

(3) 分别在显微镜下观察 6h, 12h, 24h, 48h 的细胞形态并拍照。

2.1.7 透射电镜观察细胞超微结构变化

选取 1/1000 体积比 JUC, 0.1mol/l 的 5-FU 及两者联合组分别作用于 SMMC-7721 人肝癌细胞及 R15 大鼠肝癌细胞, 为证实两种药物及两药联合作用对两种肝癌细胞结构的影响, 采用透射电镜观察细胞形态学和亚细胞结构的改变。选取两种细胞为实验对象, 置于培养箱中孵育 24h, 同时选取无干预的 SMMC-7721 人肝癌细胞及 R15 大鼠肝癌细胞作为空白对照。

(1) 试验主要试剂及设备

PBS, 2.5%戊二醛, 1%饿酸, 乙醇, 环氧树脂, 柠檬酸铅, 醋酸铀等, 透射电子显微镜。

(2) 试验步骤

(a) 培养 SMMC-7721 人肝癌细胞及 R15 大鼠肝癌细胞, 用上述三种方案干预后培养 24h

(b) 取培养箱中细胞收集上清液至无菌离心管, PBS 轻轻洗涤 2 次, 用胰酶消化, 约 1 分钟后取出, 见细胞变圆, 吸除消化液, 添加完全培养液终止消化;

(c) 轻轻吹打均匀成细胞悬液加入到无菌离心管离心 1000rpm3min, 弃上清液, 用无菌 PBS 洗涤 2 次, 转移至 EP 管中, 离心 1000rpm 2min;

(d) 弃上清后, 添加适量 2.5%戊二醛固定细胞 30min 后用 1%饿酸固定 1 小时, 不同浓度梯度的乙醇逐级脱水后包埋入环氧树脂, 用超薄切片机切成 50nm 厚的超薄切片, 用柠檬酸铅和醋酸铀对切片进行染色, CO₂ 临界点干燥;

(e) 透射电子显微镜下观察并拍照。

2.1.8 流式细胞术检测细胞周期分布及凋亡情况

流式细胞仪(flow cytometer)又名荧光激活细胞分类仪(fluorescenceactivated cell

sortor, 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。

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。

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。

(1) 试验用品

(a)流式细胞仪 (FCM)

(b)Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒:包括 Annexin-V-FITC,结合缓冲液,碘化丙啶。

(c)PBS PH7.4,细胞消化液(视细胞状态使用)

(d)冰乙醇 4℃70%的乙醇。

(e)离心机等。

(2) 试验步骤

AnnexinV/PI 双染测细胞凋亡

(a) SMMC-7721 及 R15 细胞汇合率达到 70~80%时, 予以 JUC 或 5-FU 单独或联合处理 24h, 胰酶消化后收集细胞悬液, 离心 2000rpm, 5min, 弃培养基。

(b) PBS 预冷后, 洗涤两次, 2000 rpm, 离心时间 5min, 收集细胞。

(c) 用 Buffer 100ul 悬浮细胞, 加入 AnnexinV-FITC 5ul, 轻轻混匀, 避光孵育 15 分钟。

(d) 加入 10ul PI 混匀于 2-8° C 避光条件下孵育 5 分钟。

(e) 补加缓冲液至 500ul, 流式细胞仪检测。

PI 单染法测细胞周期变化

(a) SMMC-7721 及 R15 细胞细胞汇合率达到 70~80%时, 予以 JUC 或 5-FU 单独或联合处理 24h 小时。

(b) 0.25%胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 调整细胞数量至 3×10^6 /ml 制成单细胞悬液。加入 3ml 预冷 PBS 重悬细胞, 800rpm 离心 5min, 吸除上清。

(c) 加入 500 μ l PBS, 轻轻重悬细胞, 逐滴加入预冷的无水乙醇 1.5ml, 使其终浓度为 75%, -20°C 固定过夜。

(d) 取出固定的样品, 1000rpm 离心 5min, 弃上清。用 PBS 洗涤 2 次, 1000rpm, 离心 5min, 收集细胞。加入 150 μ l RNaseA 重悬细胞, 37°C 消化 30min。加入 150 μ l PI 工作液, 4°C 避光染色 30min。

(e) 转至流式检测管, 通过流式细胞仪进行检测并分析 DNA 含量, 以及 PI 荧光直方图上细胞各周期和凋亡细胞百分率。

2.1.9 Hoechst 染色

细胞凋亡时产生最显著的变化是染色体固缩, DNA 裂解使细胞核形态发生变化。而 Hoechst 33342 可作为荧光探针与 DNA 分子结合。在凋亡细胞中, 细胞膜对 Hoechst 33342 的摄取增高, 并且由于染色体高度浓缩, Hoechst 33342 与之结合增强, 染色呈强蓝色荧光, 而正常细胞只呈微弱荧光, 死细胞则不被染色, 由此可检测出凋亡。染色后

可用荧光显微镜观察；也可用于普通的细胞核染色，或常规的 DNA 染色。Hoechst 33342 的最大激发波长为 346nm，最大发射波长为 460nm；Hoechst 33342 和双链 DNA 结合后，最大激发波长为 352nm，最大发射波长为 461nm。

(1) 试验用品

荧光显微镜、低速离心机、微量移液器、1.5m L 离心管、载玻片、盖玻片、4%甲醛溶液，PBS

(2) 试验步骤

(a) Hoechst 33342 工作液的配制：使用前，取试验盒中 Hoechst 33342 原液用蒸馏水稀释 10 倍，即得 Hoechst 33342 工作液。

(b) 样品的处理

※ 取普通洁净盖玻片于 70%乙醇中浸泡 5 分钟或更长时间，无菌超净台内吹干或用细胞培养 PBS 或 0.9%NaCl 等溶液洗涤三遍，再用细胞培养液洗涤一遍。将盖玻片置于六孔板内，种入细胞培养过夜，使约为 50%-80%满。

※ 刺激细胞发生凋亡后，吸尽培养液，加入 0.5ml 固定液，固定 10 分钟或更长时间（可 4℃过夜）。

※ 去固定液，用 PBS 或 0.9%NaCl 洗两遍，每次 3 分钟，吸尽液体。洗涤时宜用摇床，或手动晃动数次。

※ 加入 0.5ml Hoechst 33342 染色液，染色 5 分钟。也宜用摇床，或手动晃动数次。

※ 用 PBS 或 0.9%NaCl 洗两遍，每次 3 分钟。

※ 滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上，盖上贴有细胞的盖玻片，尽量避免气泡。使细胞接触封片液，切勿弄反。

※ 荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。

2.1.10 Western Blot 法检测 Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-8, survivin 的表达及线粒体凋亡途径蛋白水平。

Western Blot 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。

(1) 试验用品

- (a) 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，半干转膜仪。
- (b) 单去污剂裂解液、0.01mol/L PBS(PH 3.0)、10%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。
- (c) 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) 主要溶液配制

- (a) 10%SDS: 称量 SDS 10g, 蒸馏水定容至 100ml, 于 50℃水浴下溶解后置室温保存;
- (b) 10%AP: 0.1g 过硫酸胺, 用超纯水 1.0ml 溶解, 分装置于 4℃保存。
- (c) 1.5mol/L Tris · HCl (pH 8.8): Tris 45.43g, 超纯水 200ml 溶解后, 用浓盐酸调 pH 至 8.8, 再用超纯水定容至 250ml, 高温灭菌后, 室温下保存备用。
- (d) 0.5mol/L Tris · HCl (pH 6.8): Tris 15.14g, 超纯水 200ml, 溶解后, 调 pH 至 6.8, 用超纯水定容至 250ml, 高温灭菌后, 室温下保存。
- (e) 30% Acr/Bic (37.5:1): 丙烯酰胺 30g, 甲叉双丙烯酰胺 0.8g, 超纯水定容至 100ml, 37℃下溶解, 置于棕色瓶中 4℃保存。
- (f) 10×电泳缓冲液: Tris 15.158, 甘氨酸 93.85g, SDS 5g, 溶于 500ml 超纯水, 室温保存。使用时将其稀释 10 倍。
- (g) 1.74mg/ml(10mmol/L) PMSF: 称取 PMSF 0.174g, 异丙醇 100ml, 溶解后分装,

置于 -20°C 冰箱保存。

(h) $10\times\text{TBS}$: NaCl 80g, KCl 2g, Tris 碱 30g, 调 PH 值至 7.4, 用蒸馏水定容至 1L。

(i) $10\times\text{TBST}$: NaCl 88g, 1.0M Tris-HCl (PH8.0) 200ml, Tween20 5ml, 溶于 1000ml 超纯水, 4°C 保存。TBST: TBS: Tween20=1000:1。

(j) 封闭液: 脱脂奶粉 5g, TBST 100ml。

(k) 抗体的准备: 按照抗体试剂说明书及预实验摸索, 按一定的稀释比例加入上述封闭液。

(3) 实验步骤

(a) 提取细胞总蛋白

将药物作用后的 SMMC-7721 和 R15 细胞取出, 置于冰上, 每瓶细胞 3ml 预冷的 PBS, 平放轻轻摇动 1min 洗涤细胞, 弃洗液, 重复 2 次, 置于冰上。加入 600ul PBS 刮取细胞吸入 EP 管, 再重复一次。按比例每 1ml 裂解液加入 10ul PMSF, 振荡混匀置于冰上。2500rpm, 4°C , 6 分钟, 离心收集细胞, 每管加入 150ul 裂解液, 吹打均匀, 冰上裂解 30min, 每 10min 吹打一次。 4°C 下, 16000rpm 离心 5min, 将离心后的上清分装于 0.5ml 离心管中 -80°C 保存。

(b) 测定蛋白浓度

※ 根据样品数量, 按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B 配制适量 BCA 工作液, 充分混匀。

※ 取适量 25mg/ml 蛋白标准, 稀释至终浓度 0.5mg/ml。将稀释至终浓度的蛋白标准液按对应的梯度加到每个标准孔中, 加标准稀释液补足到 $20\mu\text{l}$ 。加适当体积 2ul 样品到 96 孔板的样品孔中, 加标准品稀释液到 20ul。

※ 各孔加入 200 ul BCA 工作液, 37°C 放置 20-30 分钟。

※ 测定 OD562。根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

※ 蛋白变性。测完蛋白含量后, 计算含 30-50ug 蛋白的溶液体积即为上样量。取出上样样品至离心管中, 加入 $5\times\text{SDS}$ 上样缓冲液, 将样品于沸水中煮 5 分钟使蛋白完全变性。

(c) SDS-PAGE 电泳

※ 清洗玻璃板，风机吹干。将玻璃板对齐后，用夹子夹紧，将玻璃板平稳的桌面。

※ 配制分离胶，缓慢灌入胶。当胶面升合适的高度时即可。然后缓慢在胶

※ 上面加入水液封，等合适的时间胶充分凝固后，倒去胶上层水，用吸水纸将水吸干。

(d) 配制浓缩胶

将剩余的部分灌满浓缩胶，然后梳子平插入浓缩胶中。等待合适的时间后浓缩胶凝固，拔出梳子。将玻璃板放置电泳槽，然后加入合适的电泳液后上样进行检测。

(e) 80V 恒压电泳

蛋白样本进入分离胶后更换电压为 100V，电泳时间一般约 2 小时。观察预染蛋白 Marker 的情况，适当的时间终止电泳，将样本进行转膜。

(f) 转膜

从玻璃板上取下凝胶，去除所有浓缩胶，根据大小判断目的条带的位置，用小刀将凝胶切成适当大小用于转印，完成后将凝胶浸泡缓冲液中。剪与凝胶大小相同的 PVDF 膜，在甲醇中活化 30s，放入超纯水中浸泡 2min 后放入阳极缓冲液 II 中平衡。剪与 PVDF 膜大小相同的滤纸 6 张，三张浸泡入阴极缓冲液中，两张浸泡入阳极缓冲液 I 中，一张浸泡入阳极缓冲液 II 中。将凝胶、PVDF 膜和滤纸依次放置转移槽中，用干净的玻棒驱赶气泡。以 $0.8\text{Ma}/\text{cm}^2$ 凝胶的电流转印 45 分钟后取出 PVDF 膜，减掉一角作为标记。

(g) 免疫反应

※ 膜用 TBS 从下向上浸湿后，移至含有封闭液的培养皿中，室温下脱色摇床上摇动封闭 1 小时。

※ 将一抗用 TBST 稀释至适当浓度后将抗体溶液加到培养皿中；从封闭液中取出膜并用滤纸吸去残留液，将膜蛋白面朝下放于抗体液面上，掀动膜四角以赶出残留气泡；脱色摇床上摇动 4°C 过夜孵育。

※ 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗三次，10 分钟/次；再用 TBS 洗一遍，10min；同样方法处理二抗。

(h) 化学发光、显影和定影

※ 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。

※ 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。

※ X-光片晾干后，将胶片进行扫描或拍照。

2.1.11 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 SPSS17.0 处理，两独立样本组间均数比较采用 Student t 检验， $P < 0.05$ 为有统计学意义。多组间均数比较采用方差分析（analysis of variance, ANOVA）， $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2.2 试验结果

2.2.1 MTT 法检测药物对肿瘤细胞存活率影响。

(1) 药物浓度依赖性检测

我们首先我们用 5/10000(体积比)、1/1000(体积比)、3/1000(体积比)、5/1000(体积比)的 JUC; 5 μ mol/l, 10 μ mol/l, 30 μ mol/l, 50 μ mol/l 的 5-FU 作用于 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞 24h, 检测了药物对细胞存活率的影响。如图 1A、1B 所示, MTT 检测结果表明, 用不同浓度 JUC 及 5-FU 处理 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞后, 以浓度为依赖关系显著降低细胞的存活率。同时 MTT 检测结果计算得出 JUC 的 IC₅₀ 约为 1/1000(体积比), 5-FU 的 IC₅₀ 约为 10 μ mol/l。(如图 1A 及图 1B) 如下所有方法两药均选用此浓度进行试验。

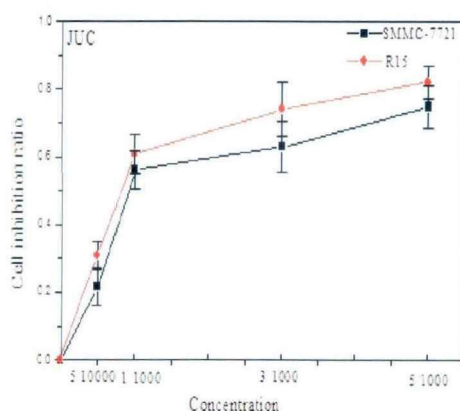


图 1A, 我们用不同浓度的 JUC 分别处理 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞 24h 后, 用 MTT 法分析各种浓度的药物对细胞增长的抑制作用, 并统计分析各组之间细胞抑制率的差异有统计学意义 ($p < 0.05$), 且细胞的存活率呈剂量依赖关系。

Fig.1A The inhibitory effect of Jieyoushen on SMMC-7721 and R15 cells. SMMC-7721 and R15 cells were treated with various concentration of Jieyoushen for 24h. Dose-dependent inhibition of liver carcinoma cells growth could be observed ($p < 0.05$, Tukeys post hoc analysis). After cells were incubated, cell proliferation was determined by MTT assay.

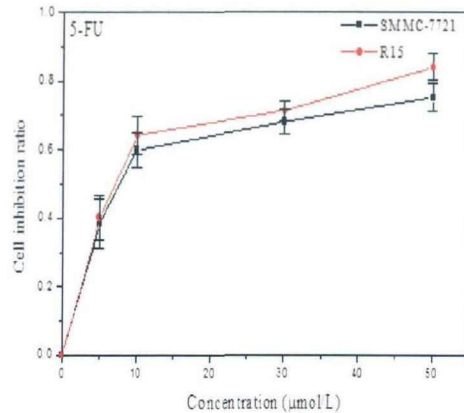


图 1B, 我们用不同浓度的 5-FU 分别处理 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞 24h 后, 用 MTT 法分析各种浓度的药物对细胞增长的抑制作用, 并统计分析各组之间细胞抑制率的差异有统计学意义 ($p < 0.05$), 且细胞的存活率呈剂量依赖关系。

Fig.1B The inhibitory effect of 5-FU on SMMC-7721 and R15 cells. SMMC-7721 and R15 cells were treated with various concentration of 5-FU for 24h. Dose-dependent inhibition of liver carcinoma cells growth could be observed ($p < 0.05$, Tukeys post hoc analysis). After cells were incubated, cell proliferation was determined by MTT assay.

(2) 药物时间依赖性检测

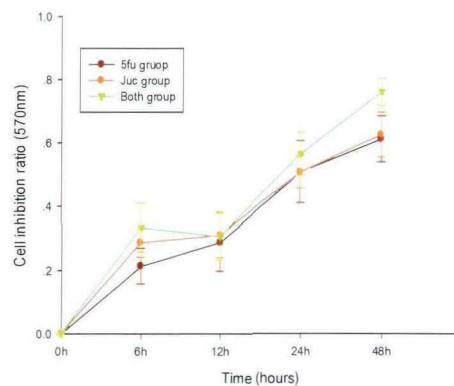


图 2A 正常肝组织 LO2 细胞 MTT 比色试验, 给予正常肝组织 LO2 细胞 1/1000(体积比)的 JUC, 10μmol/l 的 5-FU 及两药联合处理 6h, 12h, 24h and 48h 后 MTT 结果 (细胞存活率, 计算方法见材料与与方法)。可以看到细胞的存活率随着药物作用时间延长逐渐降低, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, Tukeys post hoc analysis)。

Fig.2A Cell proliferation inhibiting effects of drugs on hepatocyte lines LO2 (A). The cells were treated with 1/1000 Jieyoushen, 10μmol 5-FU and the Combination for 6h, 12h, 24h

and 48h. Time-dependent inhibition of liver carcinoma cells growth could be observed ($P > 0.05$, Tukeys post hoc analysis). After cells were incubated and cell proliferation was determined by MTT assay.

通过上述药物浓度的筛选,我们用 1/1000(体积比)的 JUC,10 $\mu\text{mol/l}$ 的 5-FU 及两药联合后分别作用于人 SMMC-7721 肝癌细胞、大鼠 R15 肝癌细胞及正常肝组织 LO2 细胞 6h,12h,24h,48h,检测了 JUC、5-FU 及两药联合对三株细胞存活率的影响。如图 2A, 2B, 2C 所示, MTT 检测结果表明,用 JUC, 5-FU 及两药联合处理细胞,以时间为依赖关系显著降低细胞的存活率。随着药物作用时间的延长,细胞的存活率显著下降,正常肝细胞三组之间细胞存活率无统计学意义,两种肝癌细胞不同药物处理后各组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$),尤其是以联合治疗组对肿瘤细胞的抑制率明显增加,说明联合治疗效果优于单药治疗组。

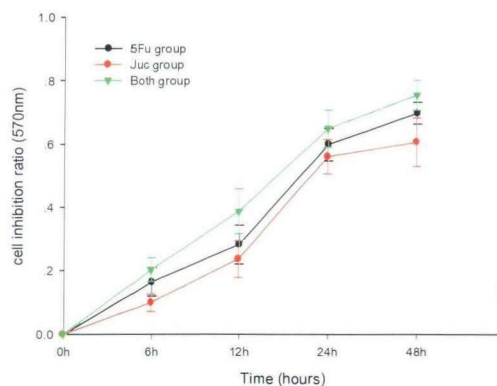


图 2B 人 SMMC-7721 肝癌细胞 MTT 比色试验,给予人 SMMC-7721 肝癌细胞 1/1000(体积比)的 JUC、10 $\mu\text{mol/l}$ 的 5-FU 及两药联合处理后 MTT 结果,可以看到细胞的存活率随着药物作用时间延长逐渐降低,差异有统计学意义。(Student's t test, $p < 0.05$)。

Fig.2B Cell proliferation inhibiting effects of drugs on SMMC7721 of liver carcinoma cells. The cells were treated with 1/1000 Jieyoushen, 10 μmol 5-FU and the Combination for 6h, 12h, 24h and 48h. Time-dependent inhibition of liver carcinoma cells growth could be observed ($P < 0.05$, Tukeys post hoc analysis). After cells were incubated and cell proliferation was determined by MTT assay

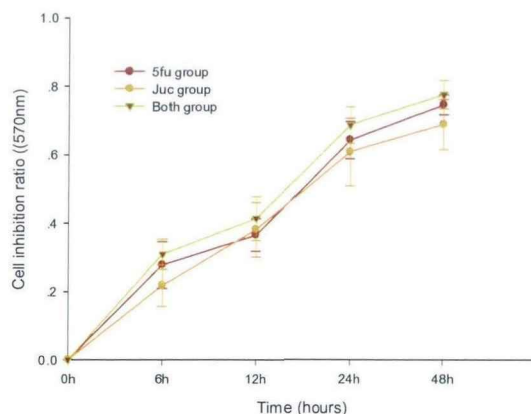


图 2C 图,大鼠 R15 肝癌细胞 MTT 比色试验,给予大鼠 R15 肝癌细胞 1/1000(体积比)的 JUC,10 μ mol/l 的 5-FU 及两药联合处理后 MTT 结果。可以看到细胞的存活率随着药物作用时间延长逐渐降低。差异有统计学意义 (Student's t test, $p < 0.05$)。

Fig.2C Cell proliferation inhibiting effects of drugs on R15 (C) of liver carcinoma cells. The cells were treated with 1/1000 Jieyoushen, 10 μ mol 5-FU and the Combination for 6h, 12h, 24h and 48h. Time-dependent inhibition of liver carcinoma cells growth could be observed ($P < 0.05$, Tukeys post hoc analysis). After cells were incubated and cell proliferation was determined by MTT assay.

2.2.2 细胞形态学观察

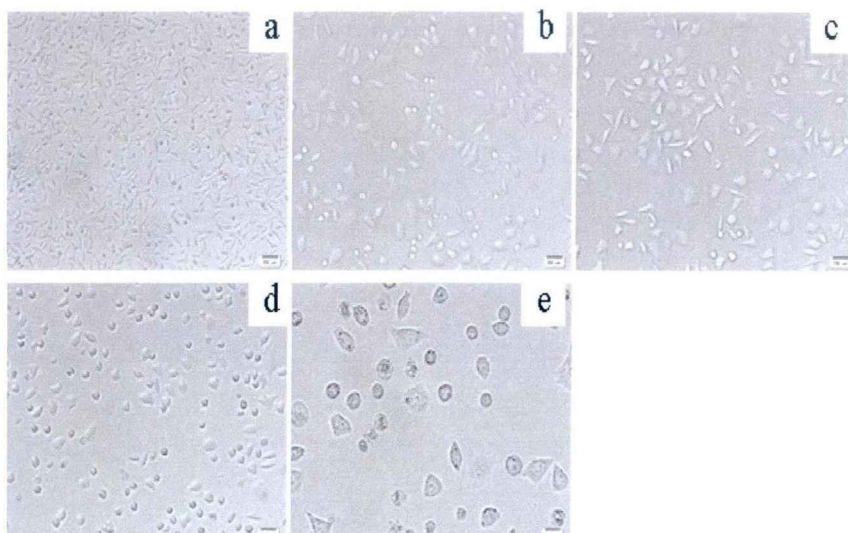


图 3A. 两药联合处理 SMMC7721 细胞 6 小时、12 小时、24 小时和 48 小时形态与未处理组对照观察。放大倍数均为 20 \times 10, 6 小时后加药组同未加药组比较细胞形态发生变化, 加药组出现细胞变圆, 皱缩、脱壁漂浮现象。12 小时后, 加药组同未加药组比较, 细胞形态发生更大变化, 贴壁的细胞形态也发生变化, 不规则, 细胞脱壁现象更加严重。24 小时后加药组同未加药组比较, 贴壁细

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, 48 小时后存活细胞数量极少。

Fig.3A The morphological change when SMMC7721(A) cells were treated with the mixtures of 1/1000 Jieyoushen and 10 μ mol 5-FU for 6h,12h,24h and 48h.(a: control; b:6h; c:12h;d:24h;e:48h)

我们观察了药物对肿瘤细胞的形态影响。给予 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞加 1/1000(体积比)的 JUC 及 10 μ mol/l 的 5-FU 两药联合, 分别于 6 小时、12 小时、24 小时、48 小时, 用倒置相差显微镜观察细胞形态的变化, 放大倍数均为 20 \times 10。随着时间的延长, 细胞逐渐出现变圆, 皱缩、甚至脱壁漂浮, 最终出现死亡或凋亡现象。对细胞的损害逐渐加重(见图 3)。说明药物对细胞的作用呈时间依耐性。

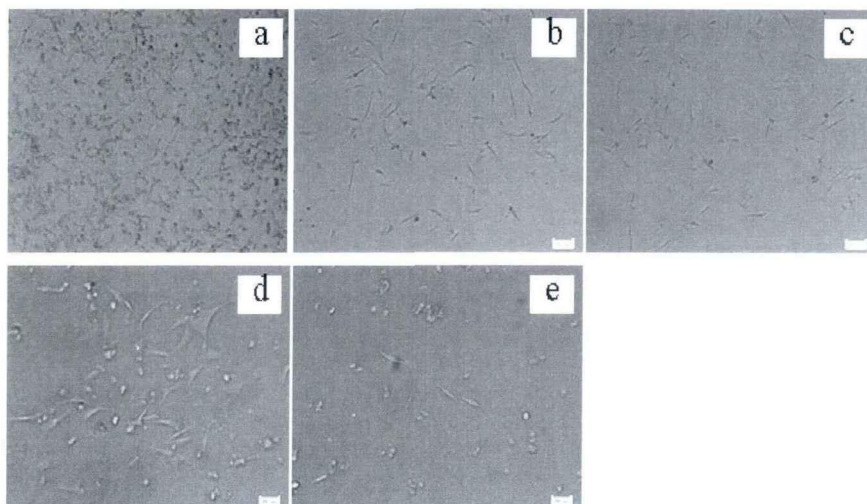


图 3B. 两药联合处理 R15 细胞 6 小时、12 小时、24 小时和 48 小时形态与未处理组对照观察。放大倍数均为 20 \times 10, 6 小时后加药组同未加药组比较细胞形态发生变化, 加药组出现细胞变圆, 皱缩、脱壁漂浮现象。12 小时后, 加药组同未加药组比较, 细胞形态发生更大变化, 贴壁的细胞形态也发生变化, 不规则, 细胞脱壁现象更加严重。48 小时后加药组同未加药组比较, 贴壁细胞仅占 10%左右, 部分细胞已经发生崩解, 细胞数量明显减少, 可见细胞脱壁漂浮现象。

Fig.3B The morphological change when R15 cells were treated with the mixtures of 1/1000 Jieyoushen and 10 μ mol/L 5-FU for 6h,12h,24h and 48h.(a: control; b:6h; c:12h;d:24h;e:48h).

2.2.3 Hoechst 染色观察肿瘤细胞凋亡

细胞凋亡时产生最显著的变化是染色体固缩，DNA 裂解使细胞核形态发生变化。而 Hoechst 33342 可作为荧光探针与 DNA 分子结合。我们给予 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞加 1/1000(体积比)的 JUC, 10 $\mu\text{mol/l}$ 的 5-FU 及两药联合处理 24 小时后，用荧光显微镜观察细胞形态学的变化及蓝色荧光的强度，与正常对照组相比，我们可以看出，药物处理后的细胞膜对 Hoechst 33342 的摄取增高，Hoechst 33342 与之结合增强，染色呈强蓝色荧光，而正常细胞只呈微弱荧光，死细胞则不被染色，由此可推断药物处理后的细胞发生凋亡。药物处理后发现两药联合组呈强蓝色荧光，荧光强度大于单药处理组，切强荧光点数减少，推测可能有死亡细胞，与形态学观察结果一致。

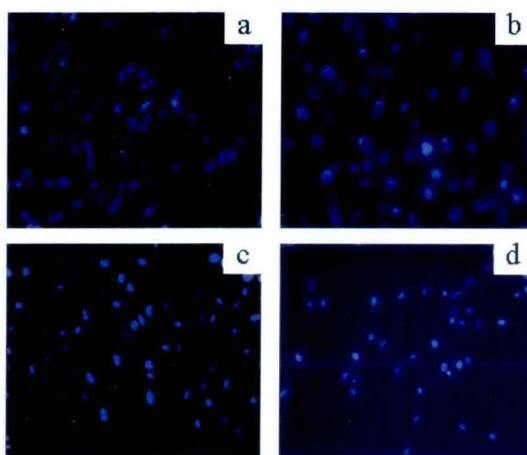


图 4A: 我们将 SMMC-7721 细胞加 1/1000(体积比)的 JUC, 10 $\mu\text{mol/l}$ 的 5-FU 及两药联合处理 24 小时后，用荧光显微镜 ($\times 20$) 观察 Hoechst 33342 染色情况，判断细胞核的形态变化及凋亡片段情况，[a: SMMC7721 细胞正常对照组; b: SMMC7721 细胞 10 μmol 5-FU 处理后 c: SMMC7721 细胞 1/1000JUC 处理后; d: SMMC7721 细胞两药联合处理后;]

Fig.4A: Morphological change and the number of apoptotic nuclei formed after SMMC7721 cells were treated with these drugs for 24h. Stained with Hoechst 33342 and analyzed under fluorescence microscope ($\times 20$). [a: SMMC7721-control; b: SMMC7721-10 μmol 5-FU; c: SMMC7721-1/1000Jieyoushen; d: SMMC7721-both group]

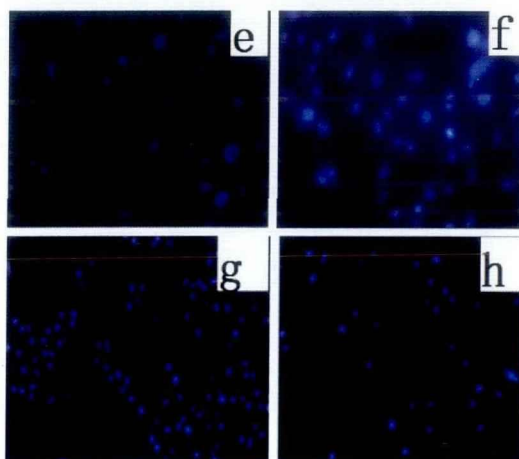


图 4B: 我们将 R15 细胞加 1/1000(体积比)的 JUC, 10 $\mu\text{mol/l}$ 的 5-FU 及两药联合处理 24 小时后, 用荧光显微镜 ($\times 20$) 观察 Hoechst 33342 染色情况, 判断细胞核的形态变化及凋亡片段情况, [e: R15 细胞正常对照组; f: R15 细胞 10 μmol 5-FU 处理后; g: R15/1000JUC 处理后; h: R15 细胞两药联合处理后]

Fig.4B: Morphological change and the number of apoptotic nuclei formed after R15 cells were treated with these drugs for 24h. Stained with Hoechst 33342 and analyzed under fluorescence microscope ($\times 20$). [e: R15-control; f: R15-10 μmol 5-FU; g: R15-1/1000Jieyoushen; h: R15-both group]

2.2.4 透射电镜观察肿瘤细胞凋亡及细胞亚显微结构形态变化

药物作用于肿瘤细胞引起细胞凋亡, 用 1/1000JUC、10 $\mu\text{mol/l}$ 5-FU 及两药联合处理细胞, 24h 收集细胞, 2.5%的戊二醛固定, 透射电子显微镜对细胞进行拍照分析。结果显示: SMMC-7721 细胞、R15 细胞及空白对照细胞, 可见核分叶等恶性肿瘤细胞改变; JUC 作用 SMMC-7721 及 R15 细胞 24h, 可见大量的线粒体空泡化, 部分被溶酶体吞噬; JUC 及 5-FU 联合作用 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞后 24h, R15 细胞出现细胞固缩、空泡化, 核浓缩、核边集等凋亡现象, SMMC-7721 细胞出现凋亡小体等。以上结果表明, JUC 及 5-FU 联合作用可明显增强细胞凋亡的诱导作用, 凋亡程度与不同的药物相关。

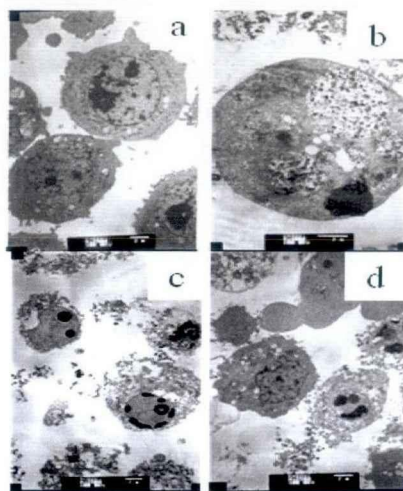


图 5A: 我们采用 1/1000JUC、10 $\mu\text{mol/l}$ 5-FU 及两药联合处理 MMC-7721 细胞 24h, 用透射电镜观察各组药物诱导凋亡的效果, 并与正常对照组比较, 发现药物处理后的细胞出现细胞核皱缩, 染色质浓集, 并出现凋亡小体。

Fig.5A: Effects of drugs on ultrastructure of SMMC7721 cells by transmission electron microscope. Including blank control group (a), 10 μmol 5-FU (b) 1/1000Jieyoushen (c) and the combination group (d) for 24h; the karyopyknosis and chromatic agglutination (2500 \times), apoptotic cells (2500 \times) are shown as right picture.

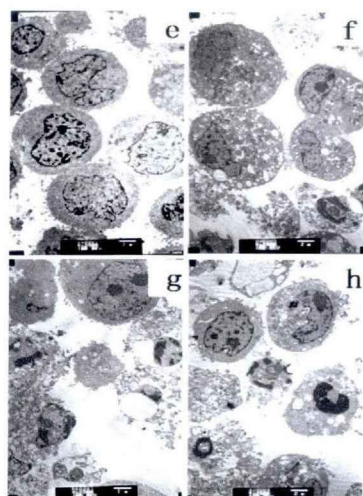


图 5B: 我们采用 1/1000JUC、10 $\mu\text{mol/l}$ 5-FU 及两药联合处理 R15 细胞 24h, 用透射电镜观察各组药物诱导凋亡的效果, 并与正常对照组比较, 发现药物处理后的细胞出现细胞核皱缩, 染色质浓集, 并出现凋亡小体。

Fig.5B: Effects of drugs on ultrastructure of R15 cells by transmission electron microscope. Including blank control group (e), 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU (f) 1/1000Jieyoushen (g) and the combination group (h) for 24h; the karyopyknosis and chromatic agglutination (2500 \times), apoptotic cells (2500 \times) are shown as right picture.

2.2.5 流式细胞术检测细胞周期

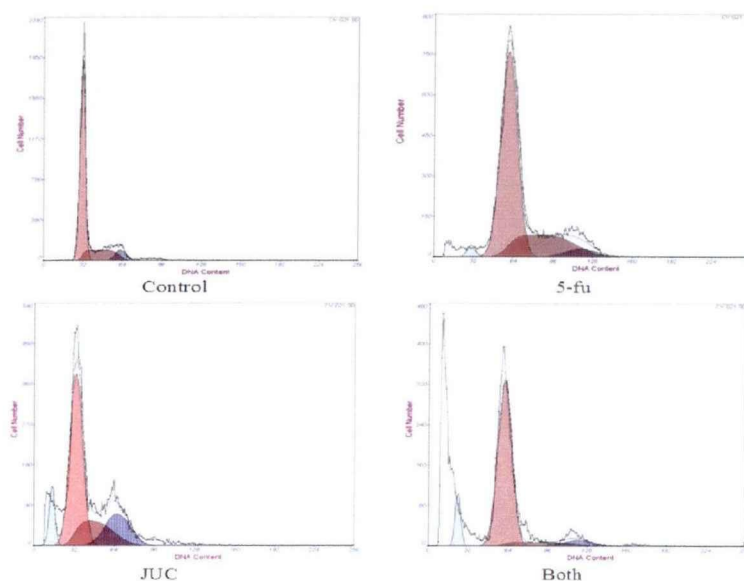


Fig.6A : FACS analyses of the cell cycle of SMMC7721 cells treated with 1/1000 Jieyoushen, 10 μ mol/L 5-FU or their combination for 24h.

图 6A: 采用 1/1000JUC, 10 μ mol/L 5-FU 以及两药联合处理 SMMC7721 细胞, 24 小时后用流式细胞仪分析细胞周期。

流式细胞术检测细胞周期, 从而探究 JUC 及 5-FU 对细胞周期分布的影响, 能否引发细胞周期阻滞现象。取对数生长期 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞, 待细胞汇合率为 70%时,用 1/1000JUC、10 μ mol/l 5-FU 及两药联合处理细胞, 24h 后 PI 染色。结果如图 7 所示: JUC 单独作用 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞 24 小时后 G0/G1 期细胞比例分别为 57.301 \pm 10.73 和 69.016 \pm 9.25 (图 6b 和 e), 两药联合组 24 小时后 G0/G1 期细胞比例为 85.774 \pm 4.85, 与空白对照细胞周期被阻滞于 G1 期比较, 差异具有显著性 ($p < 0.05$), 两药联合治疗组与其它两组药物处理后差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。可以看出, 正常对照组未见凋亡峰, SMMC-7721 细胞及 R15 细胞在 JUC、5-FU 单独作用组、两药联合作用组均可看到明显的凋亡峰。

表 1: 采用 1/1000JUC, 10 μ mol/L 5-FU 以及两药联合处理 SMMC7721 细胞 24 小时后各组细胞周期分布比率。

Table 1 Cell cycle distribution of SMMC7721cells treated with 1/1000 JUC, 10 μ mol/L 5-FU or their combination for 24h.

Group	Dose	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Control	-	54.88 \pm 6.34	26.159 \pm 5.63	18.961 \pm 7.70
5-FU	10 μ mol/L	69.016 \pm 9.25 \blacktriangle	25.609 \pm 8.17	5.375 \pm 12.38 \blacktriangle
JUC	1/1000	57.301 \pm 10.73	21.784 \pm 3.41	20.914 \pm 3.54
Combination	10 μ mol+1/1000	85.774 \pm 4.85 $*$	8.080 \pm 4.39 $*$	6.145 \pm 1.26 $*$

$*$ Represent between the combination group and control group have statistical significance ($P < 0.05$); \blacktriangle Represent between 5-FU group and control group have statistical significance ($P < 0.05$).

$*$ 代表两药联合组和正常对照组比较有统计学意义 ($P < 0.05$), \blacktriangle 代表 5-FU 组和正常对照组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)

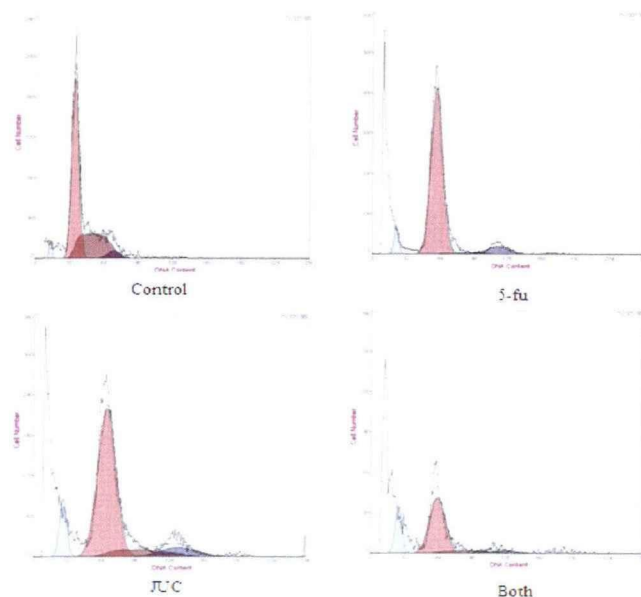


Fig.6B: FACS analyses of the cell cycle of R15 cells treated with 1/1000 Jiyeoushen, 10 μ mol/L 5-FU or their combination for 24h.

图 6B: 采用 1/1000JUC, 10 μ mol/L 5-FU 以及两药联合处理 R15 细胞, 24 小时后用流式细胞仪分析细胞周期。

表 2: 采用 1/1000JUC, 10 μ mol/L5-FU 以及两药联合处理 R15 细胞 24 小时后各组细胞周期分布比率。

Table 2 Cell cycle distribution of R15 cells treated with 1/1000 JUC, 10 μ mol/L 5-FU or their combination for 24h.

Group	Dose	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Control	-	57.614 \pm 5.73	30.928 \pm 8.71	11.457 \pm 6.32
5-FU	10 μ mol	90.023 \pm 11.24 \blacktriangle	7.784 \pm 13.44 \blacktriangle	2.193 \pm 1.31 \blacktriangle
JUC	1/1000	78.679 \pm 9.82 \blacklozenge	11.512 \pm 5.45 \blacklozenge	9.809 \pm 3.03
Combination	10 μ mol+1/1000	80.523 \pm 6.29 \ast	7.480 \pm 4.13 \ast	11.997 \pm 2.89

* Represent between the combination group and control group have statistical significance (P < 0.05); \blacktriangle Represent between 5FU group and control group have statistical significance(P < 0.05). \blacklozenge Represent between Jieyoushen group and control group have statistical significance (P < 0.05).

* 代表两药联合组和正常对照组比较有统计学意义(P < 0.05), \blacktriangle 代表 5-FU 组和正常对照组比较有统计学意义(P < 0.05), \blacklozenge 代表 JUC 组和正常对照组比较有统计学意义(P < 0.05)。

2.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

我们用流式细胞术检测了 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞在不同药物处理 24 小时的凋亡情况如图 4, 我们发现与正常对照组相比, 不同的药物处理后, 凋亡比率明显增加, 同时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。通过透射电镜观察到的凋亡现象和细胞周期结果中出现的凋亡峰可以定性看出, JUC,5-FU 及两药联合均可以诱导细胞凋亡, 为进一步探讨这种凋亡作用, 选用 Annexin-V 和 PI 双染方法定量检测 JUC,5-FU 及两药联合作用 24 小时后 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞凋亡百分率。干预后 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞凋亡结果

在细胞散点图上可以看出, 正常对照组 SMMC-7721 细胞及 R15 细胞几乎未出现凋亡情况, 正常细胞百分率分别占 99.2% (图 7A) 和 98.4% (图 7B); 5-FU 单独作用 24 小时后, SMMC-7721 细胞早、晚期凋亡率为 2.45% 和 4.41% (图 7A), 大多数细胞存活, R15 细胞早、晚期凋亡率为 6.98% 和 0.16% (图 7B), 大多数细胞存活; 未做时间和浓度依赖关系; JUC 单独作用 24 小时后, SMMC-7721 细胞早、晚期凋亡率为 2.72% 和 22.20% (图 7A), 以晚期凋亡细胞数为主, R15 细胞早、晚期凋亡率为 5.19% 和 25.39%

(图 7B)，以晚期凋亡细胞数为主，未做时间和浓度依赖关系；两药联合作用细胞 24 小时后，SMMC-7721 细胞早、晚期凋亡率为 1.01%和 16.10% (图 7A)，以晚期凋亡细胞数为主，R15 细胞早、晚期凋亡率为 8.19%和 25.89% (图 7B)，以晚期凋亡细胞数为主，未做时间和浓度依赖关系；结果表明三种药物均可诱导细胞凋亡，且 JUC 组及两药联合组诱导细胞凋亡较 5-FU 明显增强，且组间有统计学意义 ($P<0.05$)，三种药物均可诱导两组细胞凋亡，细胞之间同一种药物凋亡比率差异无显著性。

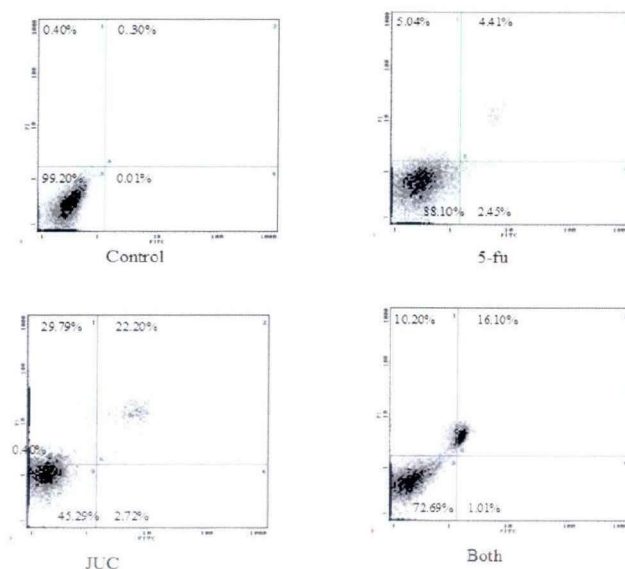


图 7A: SMMC-7721 细胞细胞在 1/1000 洁悠神, 10 μ mol/l 5-FU 及两药联合处理 24 小时的流式细胞术检测结果 (Annexin-V 和 PI 双染), 第 1 图凋亡几乎未检出, 第 2 图凋亡率为 6.86%, 第 3 图凋亡率为 24.92%, 第 4 图凋亡率为 17.11%。

Fig.7A Apoptosis of SMMC7721 cells were treated with 1/1000 Jieyoushen, 10 μ mol/L5-FU and the combination for 24h. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry (Fig.7A). The AnnexinV-positive cells were defined as apoptotic cells, including viable apoptotic cells (the Annexin V-positive, PI-negative) and and non-viable apoptotic cells (the AnnexinV/PI-positive).

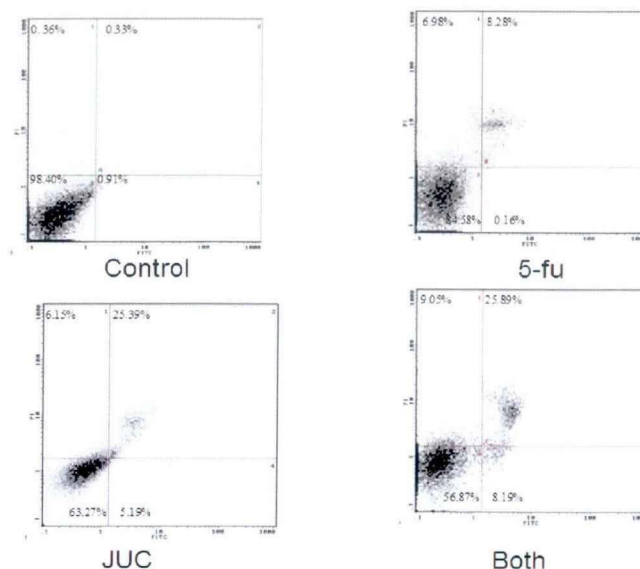


图 7B: R15 细胞在 1/1000 洁悠神, 10 μ mol/l 5-FU 及两药联合处理 24 小时的流式细胞术检测结果 (Annexin-V 和 PI 双染), 其中第 1 图凋亡几乎未检出, 第 2 图凋亡率为 8.3%, 第 3 图凋亡率为 30.49%, 第 4 图凋亡率为 34.08%。

Fig.7B Apoptosis of R15 cells were treated with 1/1000 Jieyoushen, 10 μ mol/L 5-FU and the combination for 24h. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry (Fig.7B). The AnnexinV-positive cells were defined as apoptotic cells, including viable apoptotic cells (the Annexin V-positive, PI-negative) and and non-viable apoptotic cells (the AnnexinV/PI-positive).

2.2.7 Bax,Bcl-2,caspase-3,caspase-8 及 survivin 蛋白的表达

通过流式细胞术检测明确了 JUC、5-FU 及两药联合可以引起 SMMC-7721 及 R15 细胞的凋亡, 为了进一步了解引起细胞凋亡的机制, 我们利用 Western bolt 法检测了凋亡线粒体途径中的关键蛋白 Bax, Bcl-2,caspase-3,caspase-8 及 survivin 的表达, Western blot 结果显示, 1/1000 JUC、10 μ mol/l 5-FU 及两药联合处理后 24 小时 (具体试验方法见第二部分), 各组 survivin 及 Bcl-2 蛋白表较正常对照降低, 且 Bax, caspase-3,caspase-8 蛋白表达较正常对照增加, 两药联合处理后 Bax, caspase-3,caspase-8 蛋白表达增加较单药处理后明显, survivin 及 Bcl-2 蛋白表达降低也较单药治疗组明显, 且组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。根据上述研究结果, 我们采用 1/1000 JUC 联合 10 μ mol/l 5-FU 处理 SMMC-7721 及 R15 细胞, 随着时间的延长 SMMC-7721 及 R15 细胞 Bax, caspase-3,caspase-8 蛋白表达增加, survivin 及 Bcl-2 蛋白表达降低, 且各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

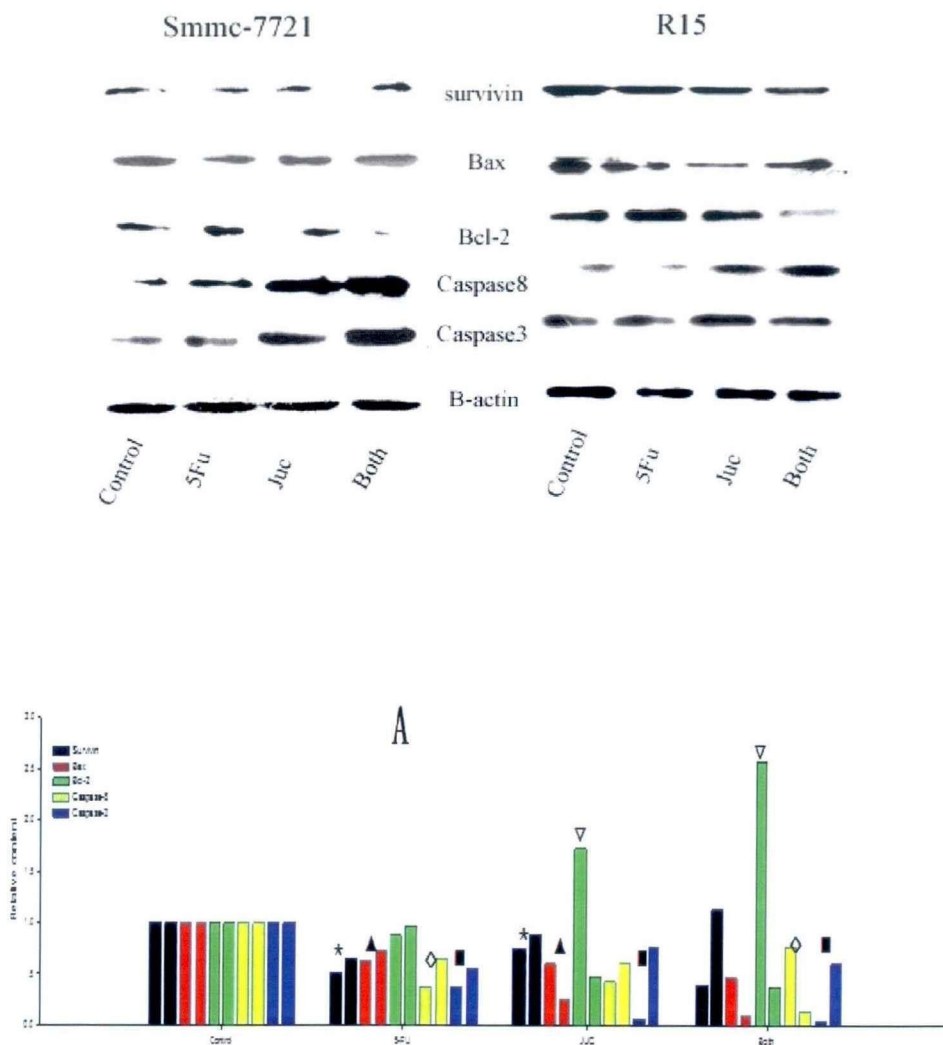


图 8A. 将 1/1000 JUC、10 μ mol/L 5-FU 及两药联合处理 SMMC-7721 及 R15 细胞后 24 小时, 收集细胞, 提取总蛋白, 蛋白定量后, 采用 5%浓缩胶、12%分离胶, 采用 Bax, caspase-3,caspase-8 及 survivin, Bcl-2 一抗、二抗, 化学发光检测法 (具体 western blotting 操作步骤见试验材料与方方法), 检测 Bax, caspase-3,caspase-8 及 survivin, Bcl-2 蛋白表达, 参照为 β -actin 蛋白, 可以看出不同药物 Bax, caspase-3,caspase-8 蛋白表达较正常增加的程度不同, 以两药联合组增加最显著。

Fig.8A: Expression of caspases-3 and 8, Bax, Bcl-2, and Survivin protein detected by Western blotting when SMMC7721 and R15 cells were treated with 1/1000 JUC, 10 μ mol/L 5-FU and the combination group for 24h, The comparison of the relative content of proteinsThe relative to protein express of the quantity change in two kinds of cell. * stand for Bax protein; ▲ stand for Bcl-2 protein; ▽ stand for Caspase-8 protein; ◇ stand for Caspase-3 protein; ■ stand for Survivin protein, compared with the control group have obviously statistical significance (A)

($P < 0.05$).

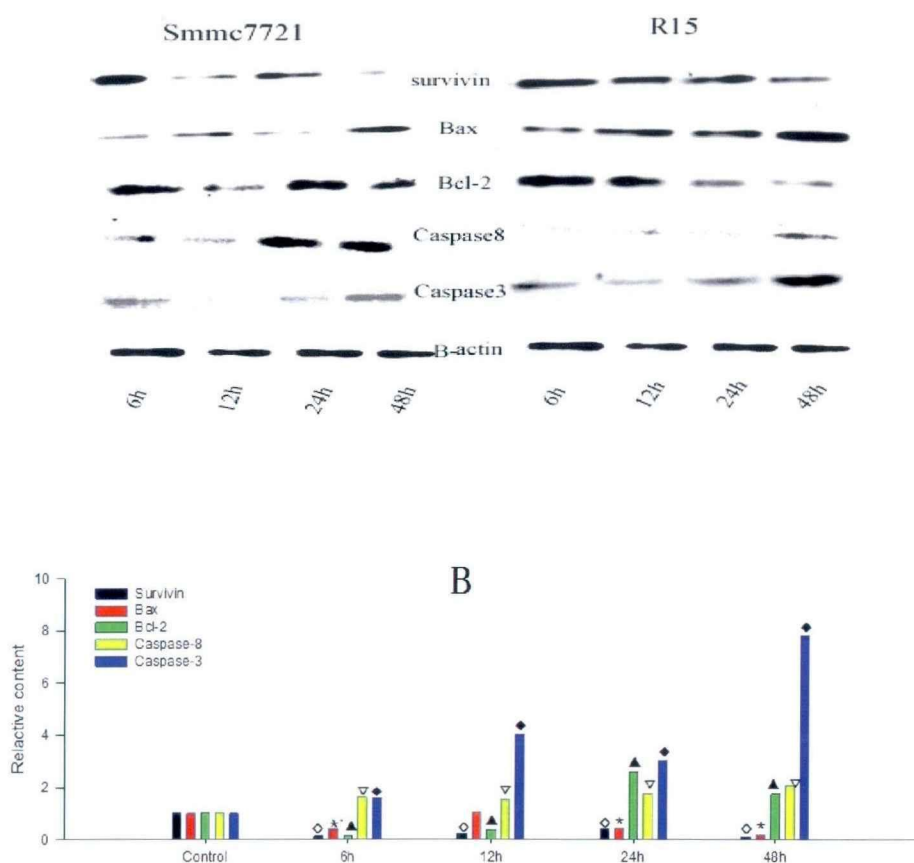


图 8B. 将 1/1000 JUC、10 μ mol 5-FU 两药联合处理 SMMC-7721 及 R15 细胞后 6、12、24、48 小时，收集细胞，提取总蛋白，蛋白定量后，采用 5%浓缩胶、12%分离胶，采用 Bax, caspase-3,caspase-8 及 survivin, Bcl-2 一抗、二抗，化学发光检测法（具体 western blotting 操作步骤见试验材料与方 法），检测 Bax, caspase-3,caspase-8 及 survivin, Bcl-2 蛋白表达，参照为 β -actin 蛋白，随着药物作用时间的延长两药联合组 Bax, caspase-3,caspase-8 表达量逐渐增加，survivin, Bcl-2 蛋白则是随着药物作用时间的延长而减少。

Fig.8B: Expression of caspases-3 and 8, Bax, Bcl-2, and Survivin protein detected by Western blotting when SMMC7721 and R15 cells were treated with 1/1000 Jieyoushen, 10 μ mol/L 5-FU and the combination group for 6h,12h,24h and 48h. The comparison of the relative content of proteinsThe relative to protein express of the quantity change in two kinds of cell. * stand for Bax protein; ▲ stand for Bcl-2 protein; ▼ stand for Caspase-8 protein; ◇ stand for Caspase-3 protein; ■ stand for Survivin protein, There is the relationship of time-dependent in the protein expression(B).($P < 0.05$).

2.3 讨论

原发性肝癌是一种严重威胁人类健康和生命的疾病，目前发病率高，严重危害人类健康。因此肝癌的预防和治疗显得尤为重要。原发性肝癌的治疗包括放化疗、免疫治疗和手术治疗等。化疗是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一，但临床研究者也发现越来越多的肿瘤如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤等都对化疗药物产生耐药现象，故寻找解决这种现象的方法势在必行^[127-129]。原发性肝癌的另外一个重要的治疗手段是手术治疗，但术中引起肿瘤的种植性转移难免发生，为了防止医源性的种植性转移，术中往往采用多种方法，如术中热化疗、纱布阻隔、蒸馏水冲洗切口、化疗药物冲洗暴露的组织等，但是这些预防医源性的种植性转移的效果还不明确^[130-131]，且显得尤为繁琐，给手术带来了极大的不便，故寻找新的有效防止肿瘤医源性种植转移的药物仍是需要解决的问题。

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。我们课题组已完成部分洁悠神与肿瘤的研究，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。在本研究中，我们进一步探讨洁悠神抗肿瘤作用，并与化疗药物作对照及联合化疗药物作用与肝癌细胞。通过 MTT 法来检测洁悠神，5-FU 及两药联合对肝癌细胞增殖活力的影响。试验结果表明：洁悠神，5-FU 及两药联合均可以有效的抑制 SMMC-7721 及 R15 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，两药联合治疗组对肿瘤细胞的抑制增值作用较单药治疗组明显；同时我们通过流式细胞术检测洁悠神，5-FU 及两药联合是否影响肿瘤细胞的周期改变，是否具有诱导细胞凋亡的作用；在不同药物处理细胞后我们观察了细胞形态学的改变，发现药物处理后细胞变圆，并出现皱缩、脱壁等类似凋亡的形态学改变，随着时间及药物浓度的变化，这种现象也发生变化。我们还通过透射电镜观察了药物处理后细胞核的超微结构变化，发现了细胞核内染色质边集，甚至出现凋亡小体，证实了凋亡的发生。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，5-FU 及两药联合均能够诱导肝癌细胞凋亡，并且这种诱导凋亡的作用以两药联合作用更显著，诱导凋亡的机制可能与细胞凋亡的线粒体途径有关。

线粒体途径由 Bcl-2 蛋白家族成员组成，当细胞接受外源性信号刺激时，该通路才

被激活，导致细胞凋亡发生。细胞凋亡是受基因调控的一种细胞主动的自杀形式，已知 Bcl-2 和 Bax 是重要的细胞凋亡调控基因。Bcl-2 基因属于 Bcl-2 基因家族的抗凋亡基因，Bcl-2 位于线粒体外膜，能抑制多种因素引起的细胞凋亡，在凋亡发生的通路中发挥重要的负性调控作用。研究表明 Bcl-2 高表达与肿瘤耐药相关。在基因治疗领域，Bcl-2 已成为当前研究的重要分子靶点^[132]。Bax 与 Bcl-2 生理作用相反，能促进细胞的凋亡。研究表明 Bcl-2 和 Bax 的表达程度及其比例决定细胞接受凋亡信号后的命运，Bcl-2 占优势时细胞生存，Bax 蛋白大量表达时加速细胞的死亡。另外还有许多研究资料证实，蛋白 Bcl-2 高表达与肿瘤细胞对化疗药物耐药性和凋亡抑制密切相关。下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 启动子表达，引起线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降和细胞色素 C 释放，导致 caspase-3 激活使肿瘤细胞凋亡^[133]。Bax 基因有促凋亡作用，Bax/Bcl-2 比值决定化疗药诱导癌细胞凋亡敏感性^[134]。

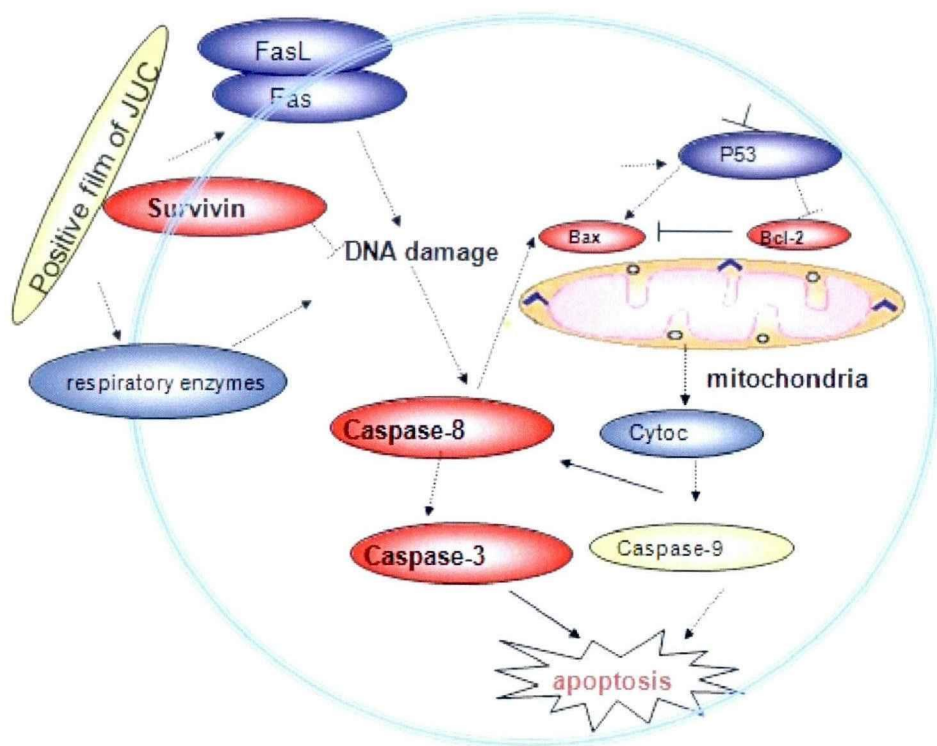


图 9 线粒体凋亡路径

Fig.9 The apoptosis of mitochondrial pathway

本实验中，肝癌细胞经洁悠神，5-FU 及两药联合作用后，可能引起细胞的 DNA 损伤，激活线粒体通路的外源性途径，同时，Bax 蛋白表达上调，Bcl-2 蛋白的表达明显

下调，我们推测可能引起线粒体外膜面的 Bcl-2 家族成员 Bax、Bak 等发生相互作用，引起线粒体膜的通透性明显增加，致使线粒体跨膜电位降低或消失，致使促凋亡因子及释放，释放的细胞色素 C 可与 Caspase-9 及凋亡蛋白酶活化因子形成复合体，启动下游 Caspase 级联反应，激活 Caspase-8、Caspase-3 等，执行细胞凋亡。我们分析抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达对维持肝癌细胞的分化更为重要，因此洁悠神和 5-FU 合用于肝癌细胞可使 Bcl-2 蛋白的表达下调更明显。由此推断二者联用能使抗凋亡的 Bcl-2 相关蛋白表达下调是其促进肝癌细胞凋亡的机制之一，凋亡的发生是通过线粒体的途径来诱导的。（如图 9）

JUC 主要由新型高分子活性剂加有机硅季铵盐制成，其水溶性制剂喷洒于皮肤或粘膜表面，迅速固化，形成“胶联层”及“正电荷层”，正电荷层主要成分为阳离子活性剂，在皮肤或黏膜表面形成纳米正电荷网状膜，具有很强的静电作用（如图 10），正电荷膜对带负电荷的病原微生物(病毒、细菌、真菌)具有极强的吸附作用，致使病原微生物与其赖以生存的代谢酶及呼吸酶不能结合而窒息死亡，由于带负电荷的病原微生物与正电荷膜之间存在显著的电位差，可使微生物的细胞膜破坏导致死亡。以达到长效抗菌的作用；胶联层的成分为高分子有机硅季铵盐，主要以化学键的方式与体表或粘膜牢固结合，保持 8 小时以上，故洁悠神具有长效物理抗菌作用，也避免了耐药菌的产生。

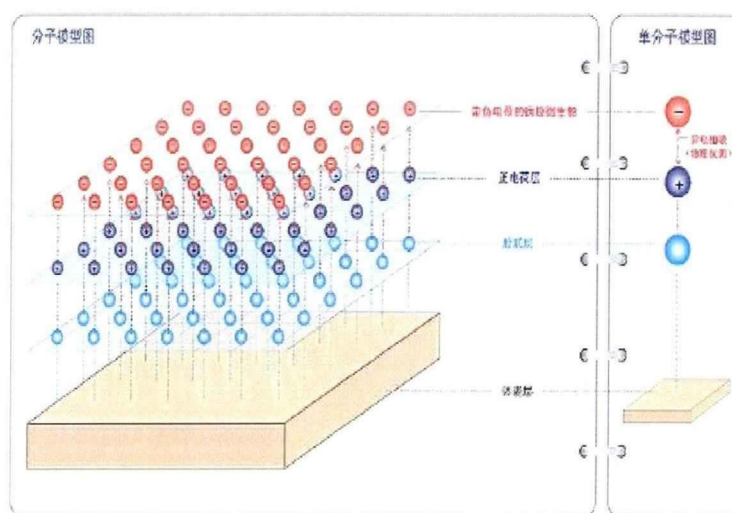


图 10 洁悠神结构示意图

Fig.10 The struction of JUC

目前洁悠神在临床中广泛应用于预防手术创面感染。结合洁悠神细胞试验具有促进细胞凋亡作用，抑制肿瘤细胞的增殖能力，我们推测洁悠神作用于肿瘤细胞后，在细胞表面形成一层正电荷膜，使其与赖以生存的呼吸，代谢酶不能结合，导致细胞的 DNA

受到损伤,并激活细胞凋亡途径,起到抑制肿瘤细胞的增殖和促使其凋亡的作用。一般的抗肿瘤药物,如丝裂霉素、顺铂等抗肿瘤机制是直接抗肿瘤作用,而在本研究中,洁悠神不仅可以起化学药物的作用,而且它可以协助一般抗肿瘤药物,增强化疗药物的抗肿瘤作用,并减少化疗药物的用量,减轻化疗药物的副作用,所以洁悠神具有其它抗肿瘤药物所不具有的优势,有较广泛的临床应用前景。

细胞周期调控紊乱是造成肿瘤细胞恶性生物学性状的重要原因,研究表明 5-FU 主要是在细胞周期的 S 期发挥作用,当细胞阻滞于 G1 期时相对减少了 5-FU 作用的细胞数,因此 G1 期的细胞阻滞可能会对 5-FU 的药物敏感性产生影响。在本研究中,我们用洁悠神联合 5-FU 的方式致使大量的细胞被阻滞在细胞周期的 G1 期,当其余的部分细胞进入 S 期时,5-FU 发挥了其抗肿瘤的作用,从而达到了协同抑制的效果。我们所检测的细胞周期变化是药物作用后 24h 的细胞周期变化,通过分析早期细胞周期变化曲线,发现早期 G1 期的细胞发生阻滞,推测洁悠神诱导细胞的阻滞主要发生在 G1 期,同时也激活了细胞凋亡程序,同样对肿瘤细胞有封闭及杀伤作用。如果根据作用时间的长短对联合用药的细胞周期的变化进行持续观察,可能更好地解释上述不同的对联合用药协同效果的影响。在今后的研究中我们将会进一步研究药物作用后不同时间细胞周期的变化及周期蛋白表达的变化来探讨其抗肿瘤的作用。

本研究仍存在大量不足,我们在洁悠神诱导细胞凋亡的机制研究中,仅仅对凋亡相关的部分蛋白的表达进行了检测,虽然检测了细胞的周期变化,并且发现不同的药物均会影响到肿瘤细胞的周期变化,但并未对细胞的周期相关蛋白进行检测,且我们仅仅完成了药物作用后早期的细胞周期变化,而往往肿瘤的发生涉及到多基因,多步骤,多阶段的变化,几乎所有的癌基因、抑癌基因的功效都与细胞周期变化的调控机制有关,这些基因可能直接或间接参与细胞周期变化的调控,或直接作为细胞周期调控机制中的重要成员,参与细胞周期的调控,所以,我们近一步的工作将对洁悠神及与化疗药物联合作用的抗肿瘤机制进行探讨,包括其它癌基因、原癌基因、肿瘤抑制基因的失活、突变、激活或过度表达等,并探讨其与细胞周期的关系,以便了解洁悠神抗肿瘤的具体机制;并且对联合作用后增强抗肿瘤的作用机制进行细致的探讨,明确其与化疗药物起协同作用的具体机制,因为近年来发现多种化疗耐药基因,进一步探讨洁悠神是否是通过改变化疗耐药相关基因的途径来增强化疗效果的;若洁悠神的抗肿瘤机制能得到完善及明确,我们可以进一步设想行临床试验,有望应用与临床,如在晚期肝癌 TACE 术中,

可作为一种新的药物单独或联合化疗药物进行灌注，以达到更好的疗效，为我们的临床治疗肝癌提供新药及新的治疗方案。

2.4 结论

1) JUC, 5-FU 及两药联合对人 SMMC-7721 肝癌细胞及大鼠 R15 肝癌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 JUC, 5-FU 对人 SMMC-7721 肝癌细胞及大鼠 R15 肝癌细胞的作用时间延长和 JUC, 5-FU 浓度的增加, 对人 SMMC-7721 肝癌细胞及大鼠 R15 肝癌细胞的抑制增殖作用逐渐增强, 且两药联合对肝癌细胞的抑制作用明显强于单药治疗组。各组之间有统计学意义。

2) JUC, 5-FU 及两药联合可以诱导细胞凋亡, 并且诱导细胞凋亡的作用呈时间依赖性, 即随着 JUC 对人 SMMC-7721 肝癌细胞及大鼠 R15 肝癌细胞的作用时间延长, 诱导细胞凋亡的作用逐渐增强, 且两药联合诱导细胞凋亡的作用明显强于单药治疗组, 各组之间有统计学意义。

3) JUC, 5-FU 及两药联合诱导人 SMMC-7721 肝癌细胞及大鼠 R15 肝癌细胞细胞凋亡的机制可能与下调 Bcl-2 蛋白表达及 survivin 蛋白表达和上调 Bax 蛋白表达, caspase-3 蛋白表达, caspase-8 蛋白表达有关, 这一结果提示 JUC, 5-FU 诱导凋亡可能是通过激活细胞凋亡的线粒体途径信号转导通路实现的。

4) 综上所述, JUC 在体外具有抗肿瘤作用, 尤其两药联合后可显著提高抗肿瘤作用, 可减少化疗药用量及减轻化疗的副作用。JUC 可能是预防及治疗肿瘤的有效药物, 且为联合治疗提供新思路。

参考文献

- [1]Jemal A, Bray R Center MM. Global cancer statistics, CA Cancer J Clin, 2011,61(2): 69-90.
- [2]李坚,张阳德,刘恕.选择性半肝血流阻断在肝癌半肝切除术中的应用研究.中国现代医学杂志.2006. 16(15):2331-2333
- [3]Andrea T, Christian W. Genes involved in hepatocellular carcinoma:deregulation in Cell cycling and apoptosis. Virchows Arch,2002,440:345-352
- [4]Venook, AP. Treatment of Hepatocellular Carcinoma- Too Many Options. Journal of Clinical Oncology. 1994,12(6):1323-1334
- [5]Stacy S, Hyder O, Cosgrove D. Herman JM, Kamel I, Geschwind JFH, Gurakar A , Anders R , Cameron A , Pawlik TM. Patterns of Consultation and Treatment of Patients with Hepatocellular Carcinoma Presenting to a Large Academic Medical Center in the US. Journal of Gastrointestinal Surgery. 2013,17(9): 1600-1608.
- [6]Padhya KT, Marrero JA , Singal AG . Recent advances in the treatment of hepatocellular carcinoma. Current Opinion In Gastroenterology. 2013,29(3):285-292.
- [7]Finn Richard S. Overview and description of hepatocellular carcinoma. Clinical advances in hematology & oncology : H&O. 2013,11(4):4-7.
- [8]Abou-Alfa G, Colombo M. Shaping the Future Management of Hepatocellular Carcinoma. Seminars In Liver. 2013, 33(1): S20-S23.
- [9]Neel BG. Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome. Proc Natl Acad Sci USA,1982,79(24):7842-7844.
- [10]Iavarone, Massimo; Colombo, Massimo. HBV infection and hepatocellular carcinoma. Clinics in liver disease. 2013,17(3): 375-97 .
- [11]Yu VW L, Ho WS. Tetrandrine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through the caspase pathway and G(2)/M phase. ONCOLOGY REPORTS. 2013,29(6):2205-2210.
- [12]Uehara T, Ainslie GR, Kutanzi K, Pogribny IP, Muskhelishvili L, Izawa T, Yamate J , Kosyk O, Shymonyak S, Bradford BU, Boorman GA , Bataller R, Rusyn I . Molecular Mechanisms of Fibrosis-Associated Promotion of Liver Carcinogenesis. Toxicological Sciences. 2013,132(1): 53-63.

- [13]Li JT, Wang H, Liao ZX. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and strategies of anti-fibrosis therapy. *Wuhan Daxue Xuebao (Yixue Ban)*, 2007,28(2): 256-261.
- [14]Czekaj P. Molecular and cellular mechanisms of chemically induced hepatocarcinogenesis. *Polish Journal Of Environmental Studies*. 2004,13(5):477-486.
- [15]Dominguez-Malagon H, Gaytan-Graham S. Hepatocellular carcinoma: An update. *Ultrastructural Pathology*. 2001,25(6):497-516.
- [16]Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002, 298(5600):1911-1912.
- [17]Aroor AR, Shukla SD. MAP kinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life Science*. 2004,74(19):2339-2364.
- [18]Berdiel-Acer M, Bohem ME, Lopez-Doriga A , Vidal A, Salazar R, Martinez-Iniesta M, Santos C, Sanjuan X, Villanueva A, Mollevi DG . Hepatic Carcinoma-Associated Fibroblasts Promote an Adaptative Response in Colorectal Cancer Cells That Inhibit Proliferation and Apoptosis: Nonresistant Cells Die by Nonapoptotic Cell Death. *Neoplasia*, 2011,13(10):931-946.
- [19]Lin RY, Wang JH, Lu XM, Zhou XT, Mantion G,Wen H, Vuitton DA , Richert L. Components of the mitogen-activated protein kinase cascade are activated in hepatic cells by *Echinococcus multilocularis* metacestode. *World Journal Of Gastroenterology*, 2009,15 (17): 2116-2124.
- [20]Seki E, Brenner DA, Karin M. A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches. *Gastroenterology*, 2012,143(2):307-320.
- [21]Cai HB, Sun XG, Liu ZF, Liu YW,Tang J, Liu QA, Ji BM, Song YH, Zhou YC, Yang MH. Effects of dahuangzhechong pills on cytokines and mitogen activated protein kinase activation in rats with hepatic fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010,132(1): 157-164.
- [22]Macanas-Pirard P, Yaacob NS, Lee PC, Holder JC, Hinton RH, Kass GEN. Glycogen synthase kinase-3 mediates acetaminophen-induced apoptosis in human hepatoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005,313(2):780-789.
- [23]Wang N, Feng YB, Zhu MF, Tsang CM,Man K, Tong Y, Tsao SW. Berberine Induces Autophagic Cell Death and Mitochondrial Apoptosis in Liver Cancer Cells: The Cellular

Mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010,111(6): 1426-1436.

[24]Bellacosa A, Testa JR, StAAL SP. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 1991, 254(5029): 274-277.

[25]Park JS, Arcaroli J, Yum HK, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(4):C870-879.

[26]McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul*. 2006, 46: 249-279.

[27]Koul D, Takada Y, Shen R. PTEN enhances TNF α -induced apoptosis through modulation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in human glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350(2): 463-467.

[28]Yin P, Zhao C, Li ZX, Mei CZ, Yao WT, Liu YL, Li N, Qi JJ, Wang LY, Yinghong Shi YH, Qiu SJ, Fan J, Zha XL. Spl Is Involved in Regulation of Cystathionine γ -lyase gene Expression and Biological Function by PI3K/Akt pathway in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Cellular Signalling*, 2012, 24(6): 1229-1240.

[29] Hu HB, Jiang C, Li GX, Lu JX. PKB/AKT and ERK regulation of caspase-mediated apoptosis by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 2005, 26(8): 1374-1381.

[30]Wu P, Hu YZ. PI3K/Akt/mTOR Pathway Inhibitors in Cancer: A Perspective on Clinical Progress [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(35): 4326-4341.

[31]Wu P, Hu YZ. PI3K/Akt/mTOR Pathway Inhibitors in Cancer: A Perspective on Clinical Progress. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(35): 4326-4341.

[32]Bollig R, Dawn B, Xuan Y T. Role of the JAK-STAT pathway in protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(2): 72-79.

[33]Booz GW, Day JN, Baker KM. Interplay between the cardiac renin-angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *J Mol Cell Cardio*, 2002, 34(11): 1443-1453.

[34]吴剑锋, 沈佐君. JAK/STAT 信号通路及其与肿瘤侵袭、转移的关系. *生命的化学*, 2009, 29(2): 176-198

- [35]张斌, 钟德玟, 王群伟, 苗雄鹰, 戴卫东, 刘春, 潘凯华. JAK/STAT 信号通路与肝细胞性肝癌的肿瘤进展和预后的相关性研究. 细胞与分子免疫学杂志. 2010, 26(4):368-373.
- [36]Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS. Targeting STAT3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution *Ann NY Acad Sci* 2006, 1091: 151-169.
- [37]Choudhari SR, Khan MA, Harris G. Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anti-cancer agent, Atiprimod. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(1): 112-121.
- [38]Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 1989, 342(6248): 440-443.
- [39]Kokoszynska K, Krynski J, Rychlewski L, Wyrwicz LS. Unexpected domain composition of MACC1 links c-Met signaling and apoptosis. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(2):317-23.
- [40]陈碧华等. C-Met 信号阻断对肝癌细胞生长和运动能力的影响. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(8):487-489.
- [41] Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL. Identification of the hepatocyte growth Factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*. 1991;251(4995):802-804.
- [42]吴福生, 郑树森, 吴灵娇, 等. 肝细胞生长因子及其受体 c-met 在肝细胞癌中的表达与预后价值[J]. *中华外科杂志*, 2006, 44(9): 603-608.
- [43]Vejchapipat P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A. Association between serum hepatocyte growth factor and survival in untreated hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol*, 2004, 39(12):1182-1188.
- [44]刘焯, 王海生, 刘淑萍. Wnt 信号转导通路与细胞凋亡. *内蒙古医学杂志*. 2011, 43(1): 50-53.
- [45]Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology*, 2007, 45(5):1298-1305.
- [46]Merle P, Kim M, Herrmann M. Oncogenic role of the Fzd-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2005, 43(5):854-862.
- [47]Kim M, Lee HC, Tsendensodnom O. Functional interaction between Wnt3 and Fzd-7

leads to activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol*, 2005, 48(5):780-791.

[48]Yoshikawa H, Matsubara K, Zhou X. WNT10B functional dualism: beta-catenin/Tcf-dependent growth promotion or independent suppression with deregulated expression in cancer. *Mol Biol Cell*, 2007,18(11):4292-4303.

[49]周 威, 熊奇如. Wnt/ β -catenin 信号通路重要分子及其靶基因在原发性肝癌中的作用机制. *肝胆外科杂志*. 2013,21(2):150-155.

[50]Pospisilik JA, Knauf C, Joza N, Benit P, Orthofer M, Cani PD, Ebersberger I, Nakashima T, Sarao R, Neely G, Esterbauer H, Kozlov A, Kahn CR, Kroemer G, Rustin P, Burcelin R, Penninger JM. Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell*. 2007, 131(3):476-491.

[51]Eskes,Desagher S, Antonsson B. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*,2000;20 (3:929-935.

[52]Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing actor. *J Biol Chem*, 2001;276 (19) :6391-16398.

[53]Godbole A, Varghese J, Sarin A. VDAC is a conserved element of death pathway in plant and animal system. *Biochimica & Biophysica Acta (BBA) -Molecular Cell Research*, 2003,1642(1-2):87-96.

[54]Gross A, Medonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes&development*. 1999,13(15):1899-1911.

[55] Su E, Han X, Jiang G. The transforming growth factor beta 1/SMAD signaling pathway involved in human chronic myeloid leukemia. *Tumori*, 2010,96(5):659-666.

[56]刘尧, 王长振, 刘明华, 胡向军. VEGF/VEGFR 信号转导通路在肝癌靶向治疗中的研究进展. *中国免疫学杂志*. 2013,29(1): 97-101.

[57]阮四军, 邬林泉, 周凡. VEGF 与肝脏疾病的关系. *世界华人消化杂志*. 2013, 21(13): 1191-1196.

[58] Wang ZG, Richard J. Characterization of novel VEGF (vascular endothelial growth factor)-C Splicing isoforms from mouse. *The Biochemical Journal*. 2010,428(3):347-354.

[59]Esther Raskopf, Annabelle Vogt. siRNA targeting VEGF inhibits hepatocellular carcinoma growth and tumor angiogenesis in vivo. *J Hepatology*, 2008, 49:977-984.

- [60]Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* 2011; 31: 146-162
- [61]Mukozu T, Nagai H, Matsui D, Kanekawa T, Sum-ino Y. Serum VEGF as a Tumor Marker in Patients with HCV-related Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* 2013; 33: 1013-1021
- [62]Eveno C, Pocard M. VEGF levels and the angiogenic potential of the microenvironment can affect surgical strategy for colorectal liver metastasis. *Cell Adh Migr* 2012; 6: 569-573
- [63]Gao DM, Sun L, Guo K, Li Y, Liu YK, Kang XN. Applicability of the multiplex quantitative anti-body array system for early diagnosis of hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi*. 2012, 20: 785-788
- [64]Zhong C, Wei W, Su XK, Li HD, Xu FB, Guo RP. Serum and tissue vascular endothelial growth factor predicts prognosis in hepatocellular carcinoma patients after partial liver resection. *Hepatogastro-enterology*. 2012, 59: 93-97
- [65]凡兴卫.原发性肝癌患者血清 VEGF 的检测及临床意义.中外医疗.2012, (1):173-175.
- [66] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: Structure,function ,mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2011,1695(1-3):55-72.
- [67]Wang X, Trotman LC, Koppie T. NED4-1 is a protooncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*. 2011,128(1):129-139.
- [68]Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent function of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. 2011,35(5809):201-205.
- [69]韩阳, 官大威, 侯震寰, 赵锐, 路斌。caspase-8 及其研究进展. 中国法医学杂志. 2006,21 (2): 94-96.
- [70]王筱冰, 张小翠, 夏妙红, 刘全宏。Caspase 的活化机制. 现代生物医学进展. 2006, 6 (3): 53-55.
- [71] 胡彦建, 韩明子, 胡彦华。Notch 信号通路与原发肝癌关系的研究进展. 胃肠病学和肝病学杂志. 2013,22(7):611-614.
- [72]Wang F, Zhou H, Yang Y. Hepatitis B virus X protein promotes the growth of hepatocellular carcinoma by modulation of the Notch signaling pathway. *Oncol Rep*. 2012,27(4):1170-1176.

- [73]王阁, 张志. 肝癌发生机制的探索以及分子靶向治疗的契机与挑战. 世界华人消化杂志. 2013,21(19):1791-1796.
- [74]Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Biomembranes*. 1997, 29(2):185-193.
- [75]刘萍, 丛国正, 独军政等. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展. 湖北农业科学. 2010,49(3):715-716.
- [76]睦维国, 崔甄甄, 薛雯, 邹贵勉, 陈洁晶, 戴勇. 线粒体蛋白质组学与细胞凋亡信号转导的研究进展. 国际检验医学杂志. 2012, 33(17):2107-2109
- [77]刘晓婷, 王延让, 张明. 线粒体介导细胞凋亡的研究进展. 环境与健康杂志. 2013,30(2): 182-185.
- [78] Mass C, Verbrugge I, Savich G. Smac/DIABLO released from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death Differ*. 2010,17(10):1613-1623.
- [79]Buron N, Porceddu M, Brabant M. Use of human cancer cell lines mitochondria to explore the mechanisms of BH3 peptides and ABT-737-induced mitochondrial membrane permeabilization. *Plos One*. 2010,5(3):e9924.
- [80]Kroemer G. Pathophysiological implications of mitochondrial cell death control. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 2010,165(3-4):205-210.
- [81]Li P, Nijhaw an D, Budihardjo I. Cytochrome C and Datp-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997, 91(4): 479-489.
- [82]Zeiss CJ, Neal J, Johnson EA. Caspase-3 in postnatal retinal development and degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004, 45(3):964-970.
- [83] Sharma AK, Rohrer B. Calcium induced calpain mediates apoptosis via caspase-3 in amouse photoreceptor cell line. *J Biol Chem*, 2004,279(34): 35564-35572.
- [84]代琼, 陈江, 郭渝, 逯心敏, 李光富. Caspase3 和 Caspase 9 在甘氨酸脱氧胆酸钠诱导肝癌细胞 SMMC7721 细胞凋亡中的影响. 现代预防医学, 2011,38(2):314-318.
- [85]易彤波, 杨连粤, 吕军. Caspase-8、caspase-3 在 5-氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡中的作用. 消化外科. 2004,3(5):363-365.
- [86]Brito AF, Abrantes AM, Pinto-Costa C. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy*. 2012,58(5):381-386.

- [87]Gadellhak NA, Gadelhak SA, EI-Morsi DA. Prognostic significance of three hepatitis marker (p53 antibodies, vascular endothelial growth factors and alpha fetoprotein) in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*.2009,56(94-95):1417-1424.
- [88]Menendez D, Shatz M, Azzam K, et al. The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLoS Genet*. 2011, 7(3):e1001360.
- [89]Menendez D, Shatz M, Resnick MA. Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses. *Curr Opin Oncol*. 2013, 25(1):85-92.
- [90] Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 2009, 460(7254):529-533.
- [91]欧盛秋,马亦龙,康平等.重组人 p53 腺病毒联合经肝动脉化疗栓塞治疗不同 p53 表达的中晚期肝细胞癌. *中国介入影像与治疗学*.2010,7 (4): 354-357.
- [92]谭军英,张洪海,郭洪亮,孙玉,王磊,季万胜,陈德喜,李宁. 原发性肝癌组织 p53 和 ASPP2 基因突变检测及临床意义. *中华肿瘤防治杂志*. 2010, 17(7):513-516.
- [93]Feldser DM, Kostova KK, Winslow MM. Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression. *Nature*. 2010, 468(7323):572-575.
- [94]Junttila MR, Karnezis AN, Garcia D Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumours. *Nature*. 2010, 468(7323):567-571.
- [95]Zalcenstein A, Stambolsky P, Weisz L. Mutant P53 gain of function: repression of CD95 (Fas/Apo-1) gene expression by tumor-associated P53 mutants. *Oncogene*, 2003, 22(36): 5667-5676.
- [96]王平,卫立辛,张柏和,吴孟超. 可溶性 Fas 阻断肝癌细胞通过 Fas/FasL 途径触发 T 淋巴细胞的凋亡. *中华普通外科杂志*.2004,19(12):747-749.
- [97]梁云,陆斌,王华菁,李晓冬,崔贞福,郭亚军,刘彦君. p53 基因、Fas/FasL 在提高肝癌细胞化疗药物敏感性中的作用. *中华实验外科杂志*, 2002,19 (4): 342-344.
- [98]Jonas JC, Laybutt DR, Steil GM. High glucose stimulates early response gene c-myc expression in rat pancreatic beta cells. *Biol Chem*, 2001; 276(38): 35375-811
- [99]Fields WR, Desiderio JG, Putnam KP. Quantification of changes in c-myc mRNA levels in normal human bronchial epithelial (NHBE) and lung adenocarcinoma (A549) cells following chemical treatment. *Toxicol Sci*, 2001; 63(1): 107-141

- [100]Patel JH, McMahon S B. Targeting of MIZ_1 is essential for MYC mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 2005, 12(13): 1074_1084.
- [101]Simile MM, De Miglio MR, Muroli MR. Down regulation of c_myc and cyclinD1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells. *Carcinogenesis*, 2004, 25(3): 333-341.
- [102]郭晓林, 姜雅秋, 迟宝荣. C-myc 基因和 P16 基因在肝细胞癌中的表达及其临床意义. *临床肝胆病杂志*. 2007,23(6):440-441
- [103]Lindsay J, Esposi MD, Glimore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta*. 2011,1813(4):532-539.
- [104]Kotsafti A, Farinati F, Cardin R. Bax inhibitor-1 down-regulation in the progression of chronic liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2010,10:35
- [105]赵和平, 解燕茹. Bcl-2、Bax 蛋白表达在非酒精性脂肪性肝病中的作用. *世界华人消化杂志*. 2009,17(23):2409-2412.
- [106]李捷萌, 陈彦青, 刘荣国. 线粒体凋亡途径与 Bcl-2 家族蛋白研究进展. *医学综述*. 2008,14(4):489-490
- [107]胡泰洪, 蒋祥虎, 朱锐等. 姜黄素对实验性肝纤维化大鼠肝脏 bax 和 bcl-2 表达的影响. *中国中西医结合消化杂志*. 2008,16(6):362-364.
- [108]王颖, 王家. Survivin 在原发性肝细胞癌中的表达及意义. *中华消化杂志*. 2002,22(8):463-466.
- [109]李先东, 曾斌, 谢立群. Survivin 蛋白及 B-catenin 蛋白在原发性肝癌组织中的表达及其临床意义. *现代肿瘤医学*. 2008,16(1):62-66.
- [110]Bian YS, Osterheld MC, Bosman FT. Nuclear accumulation of beta-catenin is a common and early event during neoplastic progression of Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol*. 2000, 114: 583-590.
- [111]Kato J, Kuwabara Y, Mitam. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer*. 2001, 163: 109-116
- [112]Montorsi M, Maggioni M, Falleni M, Pellegrini C, Donadon M, Torzilli G, Santambrogio R, Spinelli A, Coggi G, Bosari S. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 2040-2044

- [113]常宏, 王永康, 吴泰璜, 穆庆岭, 靖昌庆, 潘晓华. 肝细胞肝癌 Survivin 与血管内皮生长因子表达相关性及其临床意义. 中华实验外科杂志 2004; 21: 669-670
- [114]Weldon C B, Scandurro A B, Rolfe K W. Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray. *Surgery*. 2002, 132(2): 293-301.
- [115]Kisucka J, Barancik M, Bohacova V. Reversal effect of specific inhibitors of extracellular-signal regulated protein kinase pathway on P-glycoprotein mediated vincristine resistance of L1210 cells[J]. *Gen Physiol Biophys*. 2001, 20(4); 439-444.
- [116]Lasagna N, Fantappie O, Solazzo M.. Hepatocyte growth factor and inducible nitric oxide synthase are involved in multidrug resistance-induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Res*. 2006, 66(5):2673-2682.
- [117]Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy . *Ann Med*. 2006, 38(3): 200-211.
- [118]林建军, 林圣远. 中西医结合治疗原发性肝癌的概况. *福建中医药*, 2005, 36(2): 49-51.
- [119]Gaten T M, Haas T L, Sykora J. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ*. 2004, 11(1):86-96.
- [120]Asghar U and Meyer T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? *Journal of Hepatology* 56: 686-695, 2012
- [121]Ca H, Phan H and Yang LX. Improved Chemotherapy for Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Research* 32: 1379-1386, 2012
- [122]Bu XX, Le C, Jia FQ, Guo XL, Zhang L, Zhang BH, Wu MC and Wei LX. Synergistic effect of mTOR inhibitor rapamycin and fluorouracil in inducing apoptosis and cell senescence in hepatocarcinoma cells. *Cancer Biology & Therapy* 7:1-5, 2008.
- [123]Mukai M, Sato S, Tajima T, Ninomiya H, Wakui K, Komatsu N, Tsuchiya K, Nakasaki H and Makuuchi H. Recurrence and 5-FU sensitivity of stage I/II nodenegative breast, lung, or gastric cancer with occult neoplastic cells in lymph node sinuses, *Oncol Rep* 15: 815-820, 2006
- [124]Shang DH, Ito N, Watanabe J, Awakura Y, Nishiyama H, Kamoto T and Ogama O. Synergy of interferon-alpha and 5-fluorouracil in human renal cell carcinoma requires p53

activity. *European Urology* 52: 1131-1139,2007.

[125]Xie Q, Liang BL, Wu YH, Zhang J, Chen MW, Liu HY, Gu XF and Xu J. Synergistic anticancer effect of rAd/P53 combined with 5-fluorouracil or iodized oil in the early therapeutic response of human colon cancer in vivo. *Gene*, 499: 303-308,2012.

[126]He W, Wang DM, Ye ZQ, Qian WH, Tao Y, XF Shi, L Liu, J Chen, L Qiu, P Wan, Loo WTY, Chow LWC, Yip AYS, Ng ELY, Cheung MNB and Wang ZP: Application of a nanotechnology antimicrobial spray to prevent lower urinary tract infection: a multicenter urology trial. *Journal of Translational Medicine* 10:S14, 2012.

[127]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): 398-418.

[128]La Porta, C.A., Mechanism of drug sensitivity and resistance in melanoma. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. 9(3): 391-397.

[129] 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): 761-776.

[130] Lippert, T., Ruoff, H. and Volm, M. Resistance in malignant tumors: can resistance assays optimize cytostatic chemotherapy? *PHARMACOLOGY-BASEL-*, 2008. 81(3): 196.

[131] 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): 29-37.

[132]Boise LH , Gonzalez - Garcia M, Postema CE , et al . Bcl - x , a bcl - 2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.*Cell* , 1993 ,74 :597 - 608.

[133]Sharma J, Srinivasan R Mir S, et al. BCL-XL protein levels determine apoptotic index in pancreatic carcinoma. *Pancreas*, 2005,30: 337-342.

[134]Manoj K, Liu Z R, Tian R, et al. Mechanisms of inhibition of growth of human pancreatic carcinoma implanted in nude mice by somatostatin receptor .*Zhonghua Yixue Zazhi*. 2004,84:760-765.

个人简介

王娟霞，女，汉族，中共党员，甘肃省会宁人，1982年4月出生。2006年6月毕业于兰州大学临床医学院，获得医学学士学位，2009年6月毕业于兰州大学第一临床医学院获得医学硕士学位。2009年7月进入兰州大学第二医院肝病科工作。2010年9月考入兰州大学第二临床医学院攻读外科学专业博士学位，师从王志平教授，主要从事洁悠神对肝癌细胞增殖、凋亡等作用机制的研究。在攻读博士学位期间，参加了国家自然科学基金、科技部“863”等项目的研究工作。

攻读博士学位期间发表论文目录

1. **Juan-Xia Wang**, Yong-Ning Zhou, Shao-Jing Zou, Tao-Wen Ren, Zhi-Yi Zhang. Correlations of P21activated kinase 1 expression to clinicopathological features of gastric carcinoma and patients prognosis. Chinese Journal of Cancer.2010, 29 (7): 649-654.
2. **Juan-Xia Wang**, Ling-Yi Zhang, Jun Zhang, Hui Ding, Dong-Min Wang, Zhi-Ping Wang. The synergistic effect of organic silicone quaternary ammonium salt and 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. European Journal Of Cancer Prevention. (Accept)
3. 王娟霞, 张岭漪, 李光明, 王亮, 赵睿, 孔银, 李娟。慢性乙型病毒性肝炎伴发白癜风 1 例。中华医学会第十六次全国病毒性肝炎及肝病学术会议, 会议论文。
4. 李娟, 马建忠, 王亮, 丁洁, 孔银, 赵睿, 李光明, 王娟霞, 何晶晶, 张岭漪。血管内皮生长因子和瘦素在非酒精性脂肪肝形成过程中的作用。肝脏, 2013, 18 (1) : 39-42.
5. 丁洁, 王亮, 李娟, 孔银, 赵睿, 何晶晶, 李光明, 王娟霞, 张岭漪。高脂乳剂灌胃构建大鼠非酒精性脂肪性肝病模型可靠性的再研究。临床肝胆病杂志. 2012,28(7):531-534.

致谢

本课题是在尊敬的导师王志平教授悉心指导和亲切关怀下完成的。导师为课题的设计和实施创造了良好的条件,并为课题的完成提供了可靠的物资保证。在论文初稿完成之时,王志平教授在百忙之中对论文进行了仔细地推敲和修改。他渊博的学识、对事业不懈的追求、严谨的治学态度与高尚的医德使我永生难忘,并将时刻激励着我不断向前借此机会,学生表示崇高的敬意和衷心的感谢。

在攻读博士期间,感谢一直关心帮助我的老师和朋友,感谢兰大二院泌尿研究所的洪梅老师、付生军老师、卢建中老师、马宝良老师、刘晓老师等在实验过程中给予的支持和帮助。感谢张俊师兄,张耘新博士、丁辉博士、王芳博士,王东敏、祁眉娇等对我的热心帮助,我们和谐、团结、奋进的集体使我度过了充实快乐的学习时光,在实验过程中的帮助和讨论使我受益颇多,我们一起度过的时光将使我终生难忘。

在博士就读期间,兰大二院肝病科张岭漪主任,李光明、王亮、赵睿、何晶晶、孔银、丁洁、李娟、王兴蕾护士长及各位护士给予了大力支持,在此表示衷心感谢!

感谢研究生科各位老师在学习、生活等各方面给予的关心和教育。

特别感谢长期关心、支持我工作、学习、生活的父母、爱人、兄妹以及孩子。走过人生的许多道路,是他们一直在背后默默地支持,呵护着我,使我勇于面对生活中的困难与困境,并坚定自己的信念。他们无声的爱催我奋进,伴我前行,这篇论文是对他们最好的报答。

感谢在百忙之中为本论文进行审阅和答辩的各位老师!

王娟霞

2013年11月

附 一

经直肠超声引导下的前列腺活检术后感染相关并发症的研究进展

摘要: 前列腺癌是全球范围内常见的男性肿瘤,近年来,发病率呈增高趋势,但由于前列腺癌起病隐匿,早期临床表现不明显,大多患者发现已近中晚期,早期诊断尤为重要,前列腺穿刺活检术是诊断的金标准,但穿刺活检术后感染相关并发症也影响患者预后,本文对经直肠超声引导下的前列腺活检术后引发的感染相关并发症的流行病学,危险因素,预防及治疗进行综述。

关键词: 前列腺穿刺活检, 超声检查, 感染后并发症

前列腺癌(prostate cancer, PCA)是全世界范围内男性的常见肿瘤, 2002 年全球新发病例 679000 例,位列男性肿瘤的第 2 位。流行病学资料显示前列腺癌发病具有显著的地区差异,2006 年美国预期新发病例 234460 例,占有男性肿瘤的 1/3。而 2002 年中国的标化发病率为 1.6/10 万,仅占美国的 1/10(124.8/10 万),然而近年来国内部分发达地区的前列腺癌发病率迅速升高^[1-6]。国内大部分患者是以尿路症状或骨痛而就诊,由于大部份患者病变已为晚期,长期预后不佳。

在 PCA 的各种检出手段中,经直肠超声(TRUS)引导下前列腺穿刺活检是通过获得组织学样品而对前列腺相关疾病进行诊断的标准程序,是目前确诊 PCA 的主要方法。TRUS 可以帮助医生进行前列腺系统的穿刺活检。在 TRUS 引导下在前列腺以及周围组织结构寻找可疑病灶,并能初步判断肿瘤的体积大小。其参与了前列腺癌的筛查,诊断,治疗及预后评估等各个流程。该方法具有可视性强,简便灵活,费用适中,确诊率高等优点,是目前确诊前列腺癌的金标准^[7-12]。但 TRUS 在前列腺癌诊断特异性方面较低,发现一个前列腺低回声病灶要与正常前列腺、BPH、PIN、急性或慢性前列腺炎、前列腺梗死和前列腺萎缩等鉴别。其也存在一些感染引起的并发症(血尿,血精,尿路感染,前列腺炎,睾丸附睾炎,菌血症,败血症等),这些并发症主要涉及到尿路、直肠和性功能等方面,严重的可导致菌尿症,败血症等致死性并发症^[13-16]。

随着活检前预防性抗生素的应用,感染引起的相关并发症的发生率有所下降,然而随着耐药性的增加,其发病率也在逐年增加。因此,在穿刺中实施积极有效的措施及并发症发生后采取有效的治疗措施是防治的关键。本文将对经直肠超声引导下的前列腺活检术后引发的感染相关并发症的流行病学,发病率,危险因素,预防及治疗等方面进行

综述。

流行病学:

感染是 TRUS 最常见的并发症, 穿刺过程中, 肠道内的细菌可以通过穿刺口中破坏的毛细血管进入微循环, 同时, 细菌也可在前列腺与尿道的连接处进行繁殖, 从而造成泌尿道及前列腺的感染。

Natalia 等^[17]设计了一个前瞻性非随机对照研究来确定其并发症的发病率, 轻微的并发症包括: 血尿 (10-74%), 血精 (9-78%), 直肠出血 (1-40%) 和排尿困难。而作为主要的并发症: 疼痛 (9-30%), 发热 (0.6-4.2%), 菌血症 (100%), 菌尿症 (13-36%), 泌尿道感染症状 (13-20%), 急性尿潴留(AUR) (0-4.6%) 和住院治疗 (0-1.6%)。除此, 还有少数 TRUS 可引起椎间盘炎和脊椎骨髓炎等。

在引起感染的众多细菌中, 大肠杆菌是最常见的致病菌, Williamson 等^[18]同时发现大肠杆菌 ST131 型是败血症的重要致病因素。Steensels 等人^[19]进行了一项回顾性研究, 对每年进行 TRUS 的患者进行回顾, 从 2003 年到 2009 年, 由大肠杆菌引起的败血症总发病率为 0.95% (54/5663)。此外, 有一名患者败血症由脆弱类杆菌所造成, 另一个败血症由对氟喹诺酮类药物敏感的产酸克雷伯菌菌株引起的, 同时, 另外也报道过其他菌株致病。随着防止术后感染而预防性使用抗生素以后, 其对抗生素的耐药性便一直呈增加趋势。随着耐药性的不断提高, 所耐药菌的种类也呈多样化趋势。

感染的危险因素:

经直肠超声引导下的前列腺穿刺活检前为了预防感染, 常提前使用抗菌药物, 其中采用佛喹诺酮类药物是预防感染的常用措施, 但是, 如何避免一些不必要的易感的因素, 对于防止减少感染等相关并发症也起到至关重要的作用。以下是感染常见危险因素:

1. 排尿困难, 发热, 糖尿病, 免疫抑制, 尿路感染史, 或前列腺炎, 前列腺体积, 切片张数之间没有显著相关性。Utrera 等^[20]研究发现只有当活检钳尿路培养为阳性并且活检切片超过 14 张时才在诊断菌尿症中有显著性意义; 只有存在活检前尿培养阳性且超过 14 个活检标本证实有菌的存在时才有统计学意义。在治疗过程中, 单次剂量, 短时间的口服方案是没有危险因素的首选。但长期方案 (大于四天) 对高危患者 (糖尿病患者, 随之而来的类固醇, 免疫缺陷, 已有的菌尿, 前列腺炎和前列腺 > 75 毫升的病史) 的治疗可能更为有效。

2. 在活检前六个月使用过 FQ: Liss 等^[21]在 2009 年 12 月至 2010 年 7 月对进行前列腺穿刺活检的 342 患者进行前瞻性研究。研究表明, 236 例患者中, 22.0% (52/236) 有耐环丙沙星大肠杆菌菌株, 在活检前六个月使用 FQ 类抗生素引起的大肠杆菌对 FQ 耐药性增加是引起感染性并发症的一个危险因素。Yagci 等^[22]研究发现, 活检前 6 个月使用过氟喹诺酮类药物是一个危险因素, 大肠杆菌对喹诺酮类药物的耐药率会随着用药时间的延长而增长。

3. 慢性前列腺炎: 在活检前 6 个月使用过氟喹诺酮类药物和患有慢性前列腺炎及粪便运载耐药大肠杆菌有关, 而慢性前列腺炎的存在不是一个独立的危险因素。

感染的预防:

为了减少并发症的发病率, 2008 年, 美国泌尿外科协会 (AUA) 发布了最佳实践使用抗菌政策声明^[23]。其指出在经直肠超声引导下前列腺活检术前, 建议使用氟喹诺酮类药物的抗菌药物进行预防, 或者用甲硝唑或克林霉素氨基糖苷类药物。美国泌尿协会建议氟喹诺酮类或第二代及第三代头孢菌素类抗菌剂作为选择, 氨基糖苷类加甲硝唑或克林霉素作为替代。没有给出具体的有关给药次数的推荐意见。建议的持续时间是 24 小时之内, 对同时患有共存疾病的患者范围已扩大 3-4 天。欧洲泌尿外科协会亦已发布关于经直肠超声引导下穿刺活检前预防性抗生素运用指南, 推荐使用氟喹诺酮类药物, 甲氧苄氨嘧啶或不伴复方磺胺甲恶唑和甲硝唑;

虽然对于抗生素的种类和剂量并未达到共识, 但是大部分都使用喹诺酮类药物, 不同地区剂量与用药次数及持续用药时间存在差异, 文献回顾显示^[23], 虽然美国泌尿学协会在 2008 年推荐一个 IB 的证据, 氟喹诺酮类药物是预防 TRUS 感染等并发症的最合适的预防性抗生素, 但是许多组织继续使用他们自己的预防性抗生素方案。同样, 我们也观察到最合适的活检前镇痛和肠道准备方案的分歧。

现将方案归纳如下:

(1) 直肠拭子用于细菌种类的鉴别:

Christopher 等^[24]将 235 份直肠拭子分别接种到含 10-ug/MI 环丙沙星的麦康凯琼脂平板和普通麦康凯琼脂平板, 用于分离出直肠拭子中对 FQ 耐药的大肠菌群和肠道致病菌。James 等^[25]发现在 TRUS 前用选择培养基对直肠培养物进行选择, 明确耐喹诺酮菌株来进行预防性抗生素的选择, 可以有效地减少感染并发症和医疗花费。但是, 相关的辅助操作并未明确, 如灌肠, 清肠, 直肠消毒等。

Taylor 等^[26]在 2010 年 6 月至 2011 年 5 月对 457 例患者行 TRUS 术, 其中 112 (24.5%) 例在术前进行 RS, 其余 345 (75.5%) 例无 RS, 前者在选择性培养基中加入 FQ, 22 例显示对 FQ 耐药并使用针对性的抗生素, 对 FQ 敏感者使用环丙沙星, 最终未出现一例感染。而 345 例使用经验抗生素者 9 例出现感染, 一例出现败血症, 前者花费 1346, 后者花费 5598。结果显示 RS 后针对性运用抗生素能有效减少由 FQ 耐药引起的并发症, 同时也能降低治疗费用。

(2) 剂量和服药时间:

Smyth 等^[27]研究发现喹诺酮类抗生素是最有效的药物, 环丙沙星比氧氟沙星优越, 在活检前至少一小时单剂量用药和持续 3 天的用药效果一样。同时, 在一个 meta 分析了提到, 单剂量和多剂量没有显著性差异, 为节约成本考虑, 应使用单剂量为最优方案。

(3) 灌肠清肠:

在术前基于预防和灌肠的抗生素方案依旧存在争议, 不必要的长期疗程的使用抗生素可能使耐药菌出现, 单剂量方法能够使耐药菌的出现最小化, 它能省去病人许多的不适以及与一些并无明显益处的复杂疗法相关的开销^[28]。

(4) 碘酒消毒穿刺针:

是否用碘酒消毒清洗穿刺针对于降低感染率无效, 而预防性使用抗生素和清洁穿刺设备是降低感染率的有效方法^[29]。

(5) 用口服氟喹诺酮类药物与另一种抗生素更换:

随着氟喹诺酮耐药的大肠杆菌菌株的增加, 一些介入研究已经比较了不同抗生素预防方案 TRUSPB。总体而言, 把口服氟喹诺酮类药物与另一种抗生素更换(如哌拉西林他唑巴坦或头孢三嗪)或口服氟喹诺酮类加上另一种抗生素(如: 头孢西丁, 庆大霉素, 或丁胺卡那霉素)。

(6) 喹诺酮类药物:

Aron 等^[30]发现使用氟喹诺酮类药物与安慰剂组相比(8%对 25%), 感染性并发症的发生率降低了 3 倍。抗生素的选择和其疗效在根本上取决于生物利用度和目标微生物的敏感性。氟喹诺酮类药物可以广泛抵抗泌尿道病原体并在尿液和前列腺组织达到高聚集度。预防性应用抗生素降低感染的风险的作用是公认的。虽然对于应用哪种药物还处在争论中, 但是氟喹诺酮类抗菌药物仍然是最常见的。主要是因为在泌尿生殖道具有

广谱抗菌的作用。

(7) 喹诺酮类加卡那霉素:

加入卡那霉素减少感染率,我们推荐加入阿米沙星到喹诺酮中作为基础的预防性抗生素,这一方案能显著降低感染率^[31]。对于环丙沙星的高耐药和阿米沙星的高敏感性,Batura 等^[32]研究发现环丙沙星添加阿米沙星是一个有用的预防方案,类似的 ciproxacin 中加入庆大霉素也有报道。随着对环丙沙星耐药性的增加,它将不再是一个治疗感染的好选择,阿米沙星更加适合。此外,丁胺卡那霉素的标准预防方案,大大降低了尿路感染和菌血症的风险。

(8) 氧氟沙星:

Manecksha 等^[33]研究发现,在活检前 24 小时使用氧氟沙星能有效减少发热的发生,并且 β -内酰胺类新型抗生素美罗培南(Meropenem)(作为抑菌抗生素和以潮霉素为筛选元件进行选择)可以用来解决正在发展的败血症。

(9) 头孢曲松钠和环丙沙星结合:

头孢曲松钠和环丙沙星结合口服是预防的最好方法^[34]。

(10) 孢曲松钠:

在用药过程中不仅应考虑治疗方案的疗效,也要考虑其成本和临床适用性。Zhou 和 Meyers 等^[35, 36]研究发现,在 2009 年,90.2%的大肠杆菌(从尿液样本中分离的)对第三代头孢菌素敏感。传统手术术前 1 小时内静脉注射进行预防。活检前 1~3 小时肌肉注射,其操作更简洁更容易,并且 1 克肌肉注射剂量和 1 克静脉注射头孢曲松的生物利用度和血清水平相当。此外,Pichichero 等^[37]研究发现头孢曲松钠没有显著增加青霉素过敏反应的患者的风险。

(11) 环丙沙星:

环丙沙星比阿莫西林钠-克拉维酸钾有更好的预防作用,并且不伴有增加喹诺酮诱发的艰难梭状芽胞杆菌感染的风险^[38]。

(12) 口服磷霉素:

Falagas 等^[39]研究建议单独口服磷霉素,或结合其他药物,可能会被视为一种有效的可供选择的预防性抗生素。

(13) 密集抗生素预防方案:

密集抗生素预防方案比现有的抗生素更加意义重大, 尽管它可能花费更多。

感染的治疗:

Miura 等^[40]推荐使用静脉注射碳青霉烯类抗生素治疗由多重耐药性的大肠杆菌引起的败血症。直到培养结果出来之前, 活检后的感染治疗应该用喹诺酮类结合头孢菌素。Akduman 等^[41]研究发现当败血症被发生由于之前使用过 FQ 类药物, 抗生素除了 FQ 类, 还应经验性地使用碳青霉烯类或者第三代头孢菌素。

总结:

对于病原体类型的诊断, 可以促进预防性抗生素的有效选择。随着大肠杆菌对喹诺酮药物的耐药性不断增加, 感染并发症也不断增加, 为了保持抗生素的有效性, 对于不同地区耐药性的出现, 应结合当地情况来合理地使用针对性的抗生素。可供选择的预防性抗生素有待进一步研究, 应重视其合理使用。同时应该重新审核以前的用法。预防性抗生素的使用将成为研究的热点。

参考文献

- [1]Lina Fassi Fehri, Tim N. Mak, Britta Laube, Volker Brinkmann, Lesley A. Ogilvie, Hans Mollenkopf, Michael Lein, Timo Schmidt, Thomas F. Meyer, Holger Brüggemann. Prevalence of *Propionibacterium acnes* in diseased prostates and its inflammatory and transforming activity on prostate epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011,301(1):69-78.
- [2]Ben T. Copeland, Matthew J. Bowman, Claude Boucheix, Leonie K. Ashman. Knockout of the tetraspanin Cd9 in the TRAMP model of de novo prostate cancer increases spontaneous metastases in an organ-specific manner. *International Journal of Cancer*. 2013,133(8):1803-1812.
- [3]Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *Cancer J Clin* 2012;62(1):10-29.
- [4]Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2005, 55(2): 74-108.
- [5]Ferlay J, Bray F, Pisani P, et al. GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0. IARC Press, Lyon, 2004.

- [6]唐志柳, 白洁, 顾丽娜, 李岚, 薛迪. 2000~2010 年我国前列腺癌和乳腺癌流行状况的系统性综述. 中国肿瘤. 2013, 22 (4): 260-265.
- [7]Zhang HF, Wang HL, Xu, N. Mass screening of 12,027 elderly men for prostate carcinoma by measuring serum prostate specific antigen. Chin Med J (Engl), 2004, 117(1): 672-701.
- [8]Ayman S. Moussa, Ahmed El-Shafei, Ed Diaz, Tianming Gao, Osama M. Zaytoun, Khaled Fareed, James C. Ulchaker, J. Stephen Jones. Identification of the variables associated with pain during transrectal ultrasonography-guided prostate biopsy in the era of periprostatic nerve block: the role of transrectal probe configuration. BJU International. 2013, 111(8): 1281-1286.
- [9]邹曙东, 王昊, 陈燕芬. 经直肠超声引导下前列腺穿刺活检的临床意义. 现代医药卫生, 2013, 29 (9): 1380-1381.
- [10]Otunctemur, Alper; Dursun, Murat; Besiroglu, Huseyin; Can Polat, Emre; Cakir, Suleyman Sami; Ozbek, Emin; Karadeniz, Tahir. The effectivity of periprostatic nerve blockade for the pain control during transrectal ultrasound guided prostate biopsy. Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica / Associazione ricerche in urologia. 2013, 85(2): 69-72 .
- [11]Langenhuijsen, JF. Donker, R, McColl, GM. Postprostatectomy ultrasound-guided transrectal implantation of gold markers for external beam radiotherapy. STRAHLENTHERAPIE UND ONKOLOGIE. 2013, 189(6): 476-481.
- [12]Harvey CJ, Pilcher J, Richenberg J, Patel U, Frauscher F. Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. The British journal of radiology. 2012, 85 (1) : S3-17.
- [13]Taylor Stephen, Margolick Joseph, Abughosh Zeid. Ciprofloxacin resistance in the faecal carriage of patients undergoing transrectal ultrasound guided prostate biopsy. BJU INTERNATIONAL. 2013, 111(6): 946-953.
- [14]Sanders A, Buchan N. Infection-related hospital admissions after transrectal biopsy of the prostate. ANZ JOURNAL OF SURGERY. 2013, 83(4): 246-248.
- [15]Nam Robert K, Saskin Refik, Lee Yuna. Increasing Hospital Admission Rates for Urological Complications After Transrectal Ultrasound Guided Prostate Biopsy. Journal Of Urology. 2013, 189 (1) : S12-S17.
- [16]Colli J. Increasing Hospital Admission Rates for Urological Complications After

Transrectal Ultrasound Guided Prostate Biopsy EDITORIAL COMMENTS. *Journal Of Urology*.2013, 189 (1) : S17-S18.

[17]Natalia Miranda Utrera, María Blanco Álvarez, José Medina Polo, Angel Tejido Sánchez, Juan Passas Martínez, Rafael Díaz González. Infectious complications after transrectal ultrasound-guided prostatic biopsy. Analysis of our experience. *Archivos Espanoles de Urologia*. 2011, 64 (7): 605-610 .

[18]Williamson DA, Roberts SA ,Paterson DL, Sidjabat H , Silvey A, Masters J, Rice M, Freeman JT. Escherichia coli bloodstream infection after transrectal ultrasound-guided prostate biopsy: implications of fluoroquinolone-resistant sequence type 131 as a major causative pathogen. *Clin Infect Dis*. 2012, 54(10):1406-1412.

[19]Steensels D,Slabbaert K, De Wever L,Vermeersch P,Van Poppel H, Verhaegen J. Fluoroquinolone-resistant E. coli in intestinal flora of patients undergoing transrectal ultrasound-guided prostate biopsy—should we reassess our practices for antibiotic prophylaxis? *Clin Microbiol Infect*. 2012,18(6): 575-581.

[20]Utrera NM, Alvarez MB, Polo JM, Sanchez AT, Martinez JP, Gonzalez RD. Infectious complications after transrectal ultrasound-guided prostatic biopsy. Analysis of our experience. *Arch Esp Urol*. 2011,64(7):605-610.

[21]Liss MA, Chang A, Santos R. Prevalence and significance of fluor-quinolone resistant Escherichia coli in patients undergoing transrectal ultrasound guided prostate needle biopsy. *J Urol*. 2011; 185(4): 1283–1288

[22]Yagci D, Yoruk F, Azap A, Memikoglu O. Prevalence and risk factors for selection of quinolone-resistant Escherichia coli strains in faecal flora of patients receiving quinolone therapy. *Antimicrob Agents Chemother*.2009; 53(3): 1287–1289

[23]American Urological Association. 2008. Best practice policy state-ment on urologic surgery antimicrobial prophylaxis.

[24]Christopher A. Duplessis, Mary Bavaro, Mark P. Simons, Charles Marguet, Michael Santomauro, Brian Auge, Daniel A. Collard, Joshua Fierer,

[25]James Lesperance. Rectal Cultures Before Transrectal Ultrasound-guided prostate Biopsy Reduce Post-prostatic Biopsy Infection Rates. *Urology*. 2012,79(3):556-561.

[26]Taylor AK, Zembower TR, Nadler RB, Scheetz MH, Cashy JP, Bowen D, Murphy AB,

Dielubanza E, Schaeffer AJ. Targeted antimicrobial prophylaxis using rectal swab cultures in men undergoing transrectal ultrasound guided prostate biopsy is associated with reduced incidence of postoperative infectious complications and cost of care. *J Urol*.2012,187(4):1275-1279.

[27]Smyth LG, Mulvin D W. Antibiotic prophylaxis for transrectal ultrasound biopsy of the prostate in Ireland. *Ir J Med Sci*. 2011,181(1):33-35.

[28]Osama M. Zaytoun, Thomas Anil, Ayman S. Moussa, Li Jianbo, Khaled Fareed, J Stephen Jones.Morbidity Of Prostate Biopsy After Simplified Versus Complex Preparation Protocols: Assessment of Risk Factors. *Urology*. 2011,77(4):910-914.

[29]Gokhan Koc, Sitki Un,Devrim Nihat Filiz, Kaan Akbay,Yuksel Yilmaz. Does Washing the Biopsy Needle with Povidone-Iodine Have an Effect on Infection Rates after Transrectal Prostate Needle Biopsy? *Urol Int*,2010,85(2):147-151.

[30]Aron M, Rajeev TP, Gupta NP. Antibiotic prophylaxis for transrectal needle biopsy of the prostate: a randomized controlled study. *BJU Int* 2000; 85 (6) : 682–685.

[31]Batura D,Rao GG, Bo Nielsen P,Charlett A. Adding amikacin to fluoroquinolone based antimicrobial prophylaxis reduces prostate biopsy infection rates. *BJU Int*.2011,117 (5) : 760-764

[32] Batura D, Rao GG, Nielsen P B. Prevalence of antimicrobial resistance in intestinal flora of patients undergoing prostatic biopsy: implications for prophylaxis and treatment of infections after biopsy. *BJU Int*. 2010,106(7):1017-1020.

[33]Manecksha RP,Nason GJ, Cullen IM, Fennell JP, McEvoy E, McDermott T, Flynn RJ, Grainger R, ThornhillJA. Prospective study of antibiotic prophylaxis for prostate biopsy involving >1100 men. *Scientific World Journal*. 2012,650858(4).

[34]Pace G, Carmignani L,Marengi C,Mombelli G,Bozzini G. Cephalosporins periprostatic injection: are really effective on infections following prostate biopsy? *Int Urol Nephrol*. 2012,44(4):1065-1070.

[35]Zhou HH, Chan YP, Arnold K, Sun M. Single-dose pharmacokinetics of ceftriaxone in healthy Chinese adults. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 192–196.

[36]Meyers BR, Srulevitch ES, Jacobson J, Hirschman SZ. Crossover study of the pharmacokinetics of ceftriaxone administered intravenously or intramuscularly to healthy

volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24: 812–814.

[37]Pichichero M. Cephalosporins can be prescribed safely for penicillin-allergic patients. *J Fam Pract* 2006; 55: 106–112.

[38]Satoshi Hori, Anup Sengupta, Alexis Joannides, Ben Balogun-Ojuri, Rebecca Tilley, John McLoughlin. Changing antibiotic prophylaxis for transrectal ultrasound-guided prostate biopsies: are we putting our patients at risk? *BJU international*. 2010,106(9):1298-1302.

[39]Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomycin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis*. 2008, 46(7): 1069–1077

[40]Miura T, Tanaka K, Shigemura K, Nakano Y, Takenaka A, Fujisawa M. Levofloxacin resistant *Escherichia coli* sepsis following an ultrasound-guided transrectal prostate biopsy: report of four cases and review of the literature. *Int J Urol*. 2008,15(5):457-459.

[41]Akduman B, Akduman D, Tokgoz H, Erol B, Turker T, Ayoglu F, Mungan NA. Long-term fluoroquinolone use before the prostate biopsy may increase the risk of sepsis caused by resistant microorganisms. *Urology*.2011,78(2):250-255.

附二 缩略语

缩略语	英文全称	中文全称
FCM	Flow Cytometry	流式细胞术
CDKI	cyclin dependent kinase inhibitor	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂
Caspase	cysteiny aspartate specific protease	天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶
SDS	dodecyl sulfate,sodium salt	十二烷基硫酸钠
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
EDTA	Ethylenediaminetetraaceticacid	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- polyacrylamine gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5 二苯基四氮唑嗅盐
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
5-FU	5-fluorouracil	5-氟尿嘧啶
PI	Propidium iodide	碘化丙啶
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	有丝分裂原激活激酶
ERK	extracellular signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶
SAPK	stress-activated protein kinase	应激激活蛋白激酶
STAT	Signal transducer and activator of transcription	转录活化蛋白
c-JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
JAK	Janus protein tyrosine kinase	Janus 蛋白酪氨酸激酶
MDR	multidrug resistance	多药耐药
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮细胞生长因子
SPSS	statistical package for social science	社会科学统计软件包