

I/R 组中 6h 组与 3 天组和 7 天组比较无统计学意义;假手术组与 7 天组、1 天组与 72h 组比较,有显著差异($P < 0.05$),其余各组组间两两比较,差异非常显著($P < 0.01$)。LP 组与 I/R 组,比较差异非常显著($P < 0.01$)。

讨 论

本实验选择天然生物提取抗氧化剂——番茄红素作为脑缺血再灌注损伤的干预手段,是因为其具有良好的氧自由基清除能力。番茄红素属于烃类胡萝卜素,是由 11 个共轭及两个非共轭碳-碳双键构成的直链型碳氢化合物,是维生素 A 的前体类胡萝卜素^[5]。

番茄红素可作为生物抗氧化剂,主要体现在其较强的淬灭单线态氧的能力,捕集氧自由基等反应^[6]。此外番茄红素富含于日常所见的番茄、石榴等多种食物中,来源方便;生物利用度高,可在人和动物血液及各种组织中通过积累达到较高浓度,无毒性不良反应,为其广泛的应用提供了有利条件。

本实验证明番茄红素可提高血清中超氧化物歧化酶的活力、降低丙二醛的含量,说明番茄红素可以通过抗脂质过氧化反应对脑缺血再灌注损伤起到保护作用。可明显减轻缺血所致的脑组织总抗氧化能力的降低,减少机体抗氧化酶的消耗,有助于改善缺血后脑组织的抗氧化能力。

本实验结果提示脑组织中超氧化物歧化酶活力和丙二醛含量存在负性相关。丙二醛是氧自由基发

生脂质过氧化的产物,测定其含量的多少可反映出氧自由基的含量;超氧化物歧化酶是体内主要的自由基清除剂,超氧化物歧化酶活力与丙二醛含量在理论上是互相牵制,为此消彼长的关系。

番茄红素对大鼠脑缺血再灌注损伤有明显保护作用,其作为天然抗氧化剂可以清除自由基,抑制丙二醛含量,干预超氧化物歧化酶活性的降低;减轻脑水肿的形成,改善神经功能的缺失。

参考文献

- 1 Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, *et al.* Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rat in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *stroke*, 1986, 8: 1-8
- 2 Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 2008, 20: 84-91
- 3 王会娟, 李馨儒, 黄燕清, 等. 番茄红素微囊的体内外药理学行为 [J]. *药理学学报*, 2005, 40(9): 787-791
- 4 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91
- 5 Pan H, Shi G, Chen W, Wang D. Effect of lycopene on the function of antioxidative enzyme system in rats [J]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2003, (32): 441-442
- 6 Becker KJ, Kindrick DL, Lester MP, *et al.* Sensitization to brain antigens after stroke is augmented by lipopolysaccharide [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(12): 1634-1644

(收稿: 2011-01-01)

(修回: 2011-06-22)

百里醌对大肠癌生长和转移的抑制作用

吴志豪 胡丽萍 沈 跃 韩邵伟 黄莉莉 柯品好 蒋 平

摘 要 目的 探讨百里醌对大肠癌生长及转移的影响及其机制。**方法** 百里醌作用大肠癌细胞株 SW480 后, cell counting kit-8 (CCK-8) 法检测细胞增殖; 荧光显微镜下观察细胞形态; 划痕试验和 Transwell 小室实验分别测定大肠癌细胞体外迁移和侵袭能力; 用 Western blotting 检测大肠癌细胞中 Mucin-4、HER-2 和 FAK 蛋白表达; 建立起裸鼠大肠癌皮下移植模型, 观察百里醌对裸鼠大肠癌移植瘤生长的影响; 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 Ki-67 和 Mucin-4 阳性表达。**结果** 与对照组相比较, 百里醌可显著抑制体外大肠癌 SW480 细胞生长、迁移和侵袭, 并明显诱导细胞凋亡; 百里醌可呈显著下调大肠癌细胞中 Mucin-4 和 HER-2 的表达, 并抑制 FAK 磷酸化; 百里醌可显著抑制裸鼠大肠癌皮下移植瘤生长; 百里醌可明显降低大肠癌肿瘤组织中 Ki-67 和 Mucin-4 的阳性表达。**结论** 百里醌可显著抑制大肠癌生长和转移, 该作用可能通过抑制 Mucin-4 蛋白表达而实现。

基金项目: 温州市科技局资助项目 (Y20090121)

作者单位: 325027 温州医学院附属第二医院外科 (吴志豪、沈跃、韩邵伟、蒋平); 325000 温州医学院 (胡丽萍、黄莉莉、柯品好)

通讯作者: 蒋平, 硕士研究生导师, 电子信箱: hosrml@126.com

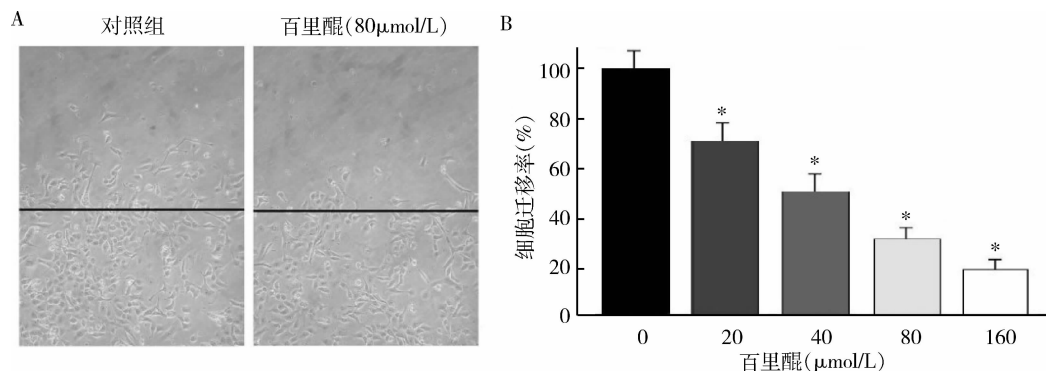


图2 百里醌对体外大肠癌 SW480 细胞迁移的抑制作用

A. 倒置显微镜下观察百里醌对大肠癌 SW480 细胞迁移的影响 ($\times 200$);

B. 不同浓度百里醌作用大肠癌 SW480 细胞 2h 后, 计算迁移出划痕的细胞数。与对照组比较, $*P < 0.05$

3. 大黄素对体外大肠癌 SW480 细胞侵袭的抑制作用: 百里醌能显著抑制体外大肠癌细胞侵袭, 呈浓度依赖性 (图 3A)。百里醌 ($20\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$ 和 $160\mu\text{mol/L}$) 处理大肠癌 SW480 细胞 2h 后分别抑制 55.8%、51.3%、46.8% 和 34.2% 的大肠癌细胞侵袭出人工基膜, 与对照组相比较, 均有统

计学意义 ($P < 0.05$) (图 3B)。为排除百里醌抑制大肠癌细胞迁移和侵袭作用并非由于百里醌的增殖抑制作用, 预实验中细胞增殖实验表明, 最高浓度百里醌 ($160\mu\text{mol/L}$) 作用大肠癌 SW480 细胞 2h 对大肠癌细胞增殖无明显抑制作用。

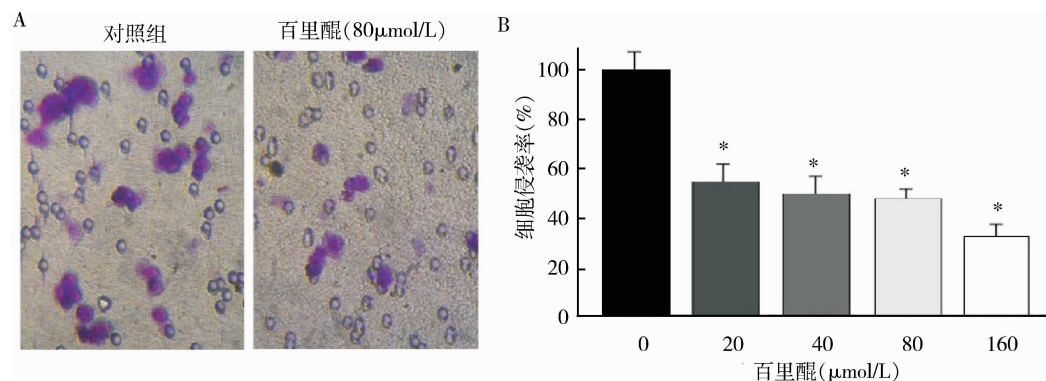


图3 百里醌对体外大肠癌 SW480 细胞侵袭的抑制作用

A. SW480 细胞穿过 matrigel 后, 结晶紫染色, 倒置显微镜下观察 ($\times 400$);

B. 不同浓度百里醌作用 2h 后明显抑制 SW480 细胞侵袭行为, 呈浓度依赖性。与对照组比较, $*P < 0.05$

4. 百里醌对 SW480 细胞中 Mucin-4、HER-2、p-FAK 和 FAK 蛋白表达的影响: 如图 4 所示, 与对照组相比较, $80\mu\text{mol/L}$ 百里醌作用大肠癌 SW480 细胞 24h 后, SW480 细胞中 Mucin-4、HER-2 和 p-FAK 的表达明显上调, 而 FAK 的表达无明显影响。

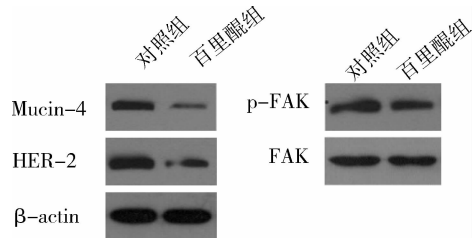


图4 Western blotting 检测百里醌对 SW480 细胞中 Mucin-4、HER-2、p-FAK 和 FAK 蛋白表达的影响
以 β -actin 为内参

5. 百里醌对裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用: 实验结束后, 对照组和百里醌组的体重均有不同程度的降低, 但对照组的裸鼠体重下降更为明显 ($P < 0.05$); 实验组少量裸鼠治疗期间出现腹泻、稀便及脱水表现, 但疗程结束也随之停止。实验第 56 天处死

动物后, 对照组肿瘤平均重量为 $0.94 \pm 0.21\text{g}$; 百里

酞组肿瘤平均重量为 $0.32 \pm 0.11\text{g}$, 抑瘤率为 73.8%。实验组与对照组相比较, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。

6. 百里酞对裸鼠肿瘤组织细胞 Ki-67 和 Mucin-4 阳性表达的影响: 免疫组织化学染色可见对照组肿瘤组织中大量细胞中细胞增殖因子 Ki-67 和 Mucin-4 蛋白阳性表达 (图 5); 而百里酞组肿瘤组织中 Ki-67 和 Mucin-4 阳性表达细胞显著减少。各组肿瘤组织切片经 PBS 代替特异性一抗作为空白对照, 肿瘤组织镜下均无阳性表达。

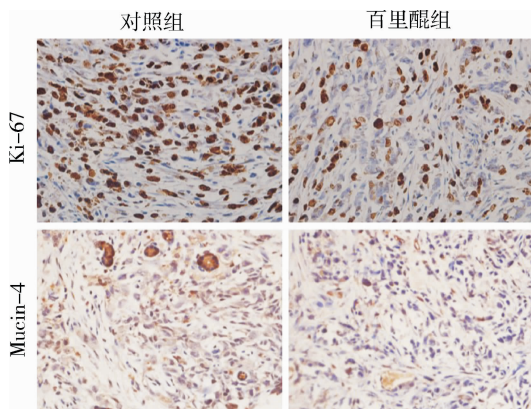


图 5 免疫组织化学法检测百里酞对裸鼠大肠癌皮下移植瘤中 Ki-67 和 Mucin-4 蛋白阳性表达的影响 ($\times 400$)

讨 论

目前针对肿瘤的各种治疗手段和抗癌药物的应用都具有一定的危险性和不良反应, 因此寻求一种安全而不良反应小的抗肿瘤药物成为人们关注的焦点。近年来大量研究表明提取自黑种草籽油的单体百里酞能有效抑制多种恶性肿瘤生长, 其抑制肿瘤细胞生长方式以诱导细胞凋亡为主, 且没有明显的细胞毒性^[3,4]。本研究中笔者发现百里酞对体外人大肠癌 SW480 细胞有明确的增殖抑制作用, 并诱导大肠癌细胞凋亡, 表明百里酞抑制大肠癌生长方式可能也是以诱导细胞凋亡方式为主; 同时在体内实验中也观察到百里酞能有效抑制大肠癌皮下移植瘤生长, 与体外实验结果相仿。另外, 在本实验中裸鼠在百里酞给药期间仅有轻微不良反应, 表明百里酞在对机体无明显影响的前提下仍可显著抑制大肠癌生长。

癌转移是大肠癌患者主要死因之一, 抑制肿瘤转移可有效提高患者生存率。而传统化疗药物一般对缩小原发肿瘤有效, 但对肿瘤转移无明显抑制作用^[5]。肿瘤转移是一个多因素、多步骤的生物学过

程, 在肿瘤转移过程中, 肿瘤细胞穿过细胞外基质从而实现肿瘤细胞迁移和侵袭, 是肿瘤细胞发生转移的重要环节^[6]。本研究中, 百里酞在对大肠癌细胞短时间 (2h) 作用期间对大肠癌细胞未表现出明显的增殖抑制作用, 而迁移实验表明百里酞可明显减慢大肠癌细胞迁移出划痕的速度, 侵袭实验也表明百里酞可显著抑制大肠癌细胞侵袭出人工基膜, 表明百里酞在未表现出明显不良反应的前提下即可明显抑制大肠癌细胞转移。

目前对包括大肠癌在内的恶性肿瘤的诊断缺乏特异性和灵敏性较高的检测指标。研究发现 Mucins 家族变异及表达的变化在恶性肿瘤的生长、分化以及逃避机体的免疫监视中发挥了重要的作用, 从而表明其在恶性肿瘤的诊断中具有一定价值^[7,8]。据报道 Mucins 家族中重要成员 Mucin-4 在正常组织细胞中未见表达, 但在肿瘤组织中呈高表达状态, 表明 Mucin-4 作为恶性肿瘤的一种新的诊断指标的潜在价值^[9]。有研究表明 Mucin-4 在恶性肿瘤对传统化疗药物耐药中发挥了巨大作用^[10]; 另外作为与 Mucin-4 共存的膜蛋白 HER-2/ErbB-2, HER-2 在稳定 Mucin-4 蛋白中发挥了重要的作用, 而 HER-2 在多种肿瘤中业已证实与肿瘤转移密切相关^[11,12]。Torres 等^[13]报道 Mucin-4 在胰腺癌细胞中高表达, 且与胰腺癌细胞生长、转移等生物学行为密切相关。因此, 笔者猜想 Mucin-4 在调控大肠癌生长和转移中也发挥了一定作用, 在本研究中, 百里酞作用大肠癌细胞 SW480 后, Mucin-4 和 HER-2 蛋白的表达显著下调, 同时百里酞还能显著抑制大肠癌生长和转移, 与笔者的猜想相吻合, 从而首次证实 Mucin-4 在调控大肠癌生长和转移中发挥了一定的作用。另外, 作为 HER-2 的下游蛋白 FAK, p-FAK 在恶性肿瘤的发生和肿瘤的多种恶性生物学行为呈正相关, 在本实验中, 百里酞可显著抑制 FAK 的磷酸化, 而对总 FAK 的表达无明显影响, 从而与 Mucin-4 和 HER-2 的表达结果相对应^[14]。另外, 本研究体内试验表明百里酞不仅可抑制体外大肠癌细胞中 Mucin-4 的表达, 还能有效抑制 Mucin-4 在体内肿瘤中的表达, 从而进一步表明 Mucin-4 在百里酞抑制大肠癌生长和转移中发挥了一定的作用, 与文献报道相符。

总之, 本次实验结果首次表明百里酞可抑制 Mucin-4 在大肠癌中的表达; 另外百里酞不仅可显著抑制体内外大肠癌生长, 还能抑制体外大肠癌细胞迁移和侵袭; 同时还能下调 HER-2 和 p-FAK 在大肠癌

中的表达。因此,笔者推断百里酞可能通过抑制 Mucin-4 从而抑制大肠癌生长和转移,而 Mucin-4 有望成为大肠癌新的诊断指标。但还需大量工作研究 Mucin 家族在百里酞抑制大肠癌中的更多机制。

参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9): 533-543
- 2 Banerjee S, Padhye S, Azmi A, *et al*. Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62(7): 938-946
- 3 Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, *et al*. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13): 5575-5583
- 4 Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, *et al*. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7782-7788
- 5 贾林, 袁世珍, 黄文革, 等. 细胞毒药物 (Gemcitabine) 治疗人胰腺癌裸鼠胰腺原位移植瘤的实验研究 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2002, 8(9): 557-559
- 6 Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis [J]. *Oncogene*, 2003, 22(42): 6524-6536
- 7 Rachagani S, Torres MP, *et al*. Current status of mucins in the diagnosis and therapy of cancer [J]. *Biofactors*, 2009, 35(6): 509-527

- 8 Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1): 45-60
- 9 Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, *et al*. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia [J]. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117(5): 791-796
- 10 Workman HC, Sweeney C, Carraway KL 3. The membrane mucin Muc4 inhibits apoptosis induced by multiple insults via ErbB2-dependent and ErbB2-independent mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 2845-2852
- 11 Ponnusamy MP, Singh AP, Jain M, *et al*. MUC4 activates HER2 signaling and enhances the motility of human ovarian cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(3): 520-526
- 12 Chaturvedi P, Singh AP, Chakraborty S, *et al*. MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2065-2070
- 13 Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, *et al*. Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5): 1419-1431
- 14 Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(5): 516-523

(收稿: 2011-01-22)

(修回: 2011-02-06)

老年人脊柱结核的围手术期处理

薛海滨 马远征 李宏伟 彭伟 刘海容

摘要 **目的** 探讨老年人脊柱结核外科治疗的围手术期处理经验。**方法** 回顾分析行手术治疗的 44 例老年人脊柱结核的病例资料。年龄 61~86 岁, 平均年龄 71.4 岁。合并截瘫者 23 例。15 例行经前路病灶清除、植骨、前路内固定术; 5 例选择经前路清除病灶、植骨、后路内固定术; 10 例行采用经肋横突病灶清除、椎间植骨, 后路椎弓根系统内固定术; 11 例行经后路病灶清除、植骨和内固定术; 3 例行 CT 引导下经皮穿刺置管引流术。随访时间 1.5~7.0 年, 平均 3.7 年。总结住院期间合并症、并发症及其处置和手术疗效。**结果** 术前有内科合并症者 35 例。术后全身并发症 22 症次, 主要包括心功能不全、心律失常及肺部感染等, 1 例术后肺部感染死亡, 其余均安全度过围手术期。局部并发症 23 例次, 主要包括窦道形成、肋骨供骨区疼痛及椎弓根螺钉松动等。术后 1.5 年、2.5 年因心肌梗死及脑出血各死亡 1 例, 余皆生存, 病灶治愈。合并截瘫者完全恢复 13 例, 部分恢复 6 例。**结论** 老年脊柱结核患者可选择手术治疗, 积极的围手术期评估和正确处理围手术期合并症是老年人脊柱结核手术成功的重要保证。

关键词 老年人 脊柱结核 外科手术 围手术期

Perioperative Management of Spinal Tuberculosis in the Aged. Xue Haibin, Ma Yuanzheng, Li Hongwei, Peng Wei, Liu Hairong. Department of Orthopaedic, The 309th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100091, China

Abstract Objective To investigate the experience of perioperative of spinal tuberculosis in the aged. **Methods** A retrospective review of 44 aged patients with spinal tuberculosis who were surgically treated in our department from May 1998 to Oct 2008 was performed. The average age at the time of surgery was 71.4 years. The surgical procedures include: anterior debridement and bony grafting with

关键词 大肠癌 百里醌 转移

Anti - proliferation and Anti - metastasis Effects of Thymoquinone on Human Colon Cancer. Wu Zhihao, Hu Liping, Shen Yue, Han Shaowei, Huang Lili, Jiang Ping. Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the anti - proliferation and anti - metastasis effects of thymoquinone on the colon cancer. **Methods** After human colon cancer cell line SW480 was treated with thymoquinone, the cellular proliferation was detected by cell counting kit - 8 (CCK - 8) assay. SW480 cells morphological changes were observed under the fluorescence microscopy after DAPI staining. The effects of thymoquinone on the migration and invasion of SW480 cells were examined by using wound assay and matrigel counting. Western blotting was used to detect the protein expression in colon cancer cells. SW480 cells were injected subcutaneously into nude mice to establish colon xenograft tumors. The tumor weight was weighed at the termination of experiment, and the tumor growth inhibition rate was calculated after mice were sacrificed. Immunohistochemistry was used to detect the positive expression of Ki - 67 and Mucin - 4 in the xenograft tumors. **Results** Thymoquinone induced a higher percentage of growth inhibition in colon cancer cell line SW480 than that of control, and thymoquinone induced typical features of apoptosis in SW480 cells. Thymoquinone significantly suppressed the migration and invasion of SW480 cells. The expression of Mucin - 4, HER - 2 and phosphorylation of FAK was down - regulated in SW480 cells after treatment of thymoquinone. The final tumor weight showed significant decrease in the thymoquinone group compared with control ($P < 0.05$). Furthermore, the positive expression of Ki - 67 and Mucin - 4 was decreased in tumors after treatment of thymoquinone. **Conclusion** Thymoquinone exerts anti - proliferative and anti - metastatic activity in colon cancer, which may be related to down - regulation of Mucin - 4 protein.

Key words Colon cancer; Thymoquinone; Metastasis

大肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其发生率有逐年上升的趋势。手术是治疗大肠癌的主要手段,但术后患者的5年生存率徘徊在50%~60%,浸润和转移是大肠癌的主要特点,也是大肠癌患者术后死亡的主要原因。然而,仍有20%患者失去手术机会,且对化疗和放疗不敏感^[1]。因此,寻找新的化疗药物有效抑制大肠癌生长和转移显得尤为重要。

一种在中东国家常用的药材 - 黑种草籽油具有多种生物活性,应用于哮喘、痢疾、湿疹及高血压等疾病的治疗具有悠久的历史,近年来发现从黑种草籽油中分离出来的主要有效单体 - 百里醌(thymoquinone)可有效抑制胰腺癌和前列腺癌等多种肿瘤细胞生长和转移,证实其具有强大的抑癌作用,目前已将其用于临床I期试验^[2-4]。但百里醌对人大肠癌转移的抑制作用却未见报道,因此,本研究将探讨百里醌对体外人大肠癌生长的影响以及对大肠癌细胞体外转移的影响及其可能机制,为百里醌的临床应用提供可靠的实验依据。

材料与方法

1. 材料:百里醌(Sigma公司,美国);胎牛血清、RPMI - 1640培养基(Gibco公司,美国);DAPI染色试剂盒和CCK - 8试剂盒(碧云天生物技术研究,中国);Mucin - 4抗体(Sigma公司,美国),HER - 2、p - FAK和FAK抗体(Santa Cruz公司,美国),Ki - 67抗体(北京中杉金桥生物技术公司,中

国);人工基膜(BD公司,美国)。百里醌用无水乙醇配制成10mmol/L, - 20℃冰箱保存,用时用不含血清的RPMI - 1640培养基稀释成所需浓度。

2. 实验动物:4~6周龄健康BALB/c雌性小鼠购于中科院上海实验动物中心,体重18~20g,许可证号:SCXK(沪)2007 - 0005。饲养于温州医学院动物实验中心SPF屏障系统的洁净层流架内(无特定病原体级),室温控制在 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~60%。

3. 细胞培养:人大肠癌细胞株SW480购自ATCC,培养在含10%胎牛血清、质量浓度100U/ml青霉素和100μ/(g·ml)链霉素的RPMI - 1640培养液中,37℃、5%的CO₂条件下培养。细胞单层贴壁生长,至70%~80%融合时胰蛋白酶消化传代。

4. CCK - 8法检测细胞增殖:收集处于对数生长期的SW480细胞,制成单细胞悬液,以每孔 5×10^3 个细胞接种到96孔板,过夜待细胞贴壁后,分别加入不同浓度百里醌(20μmol/L、40μmol/L、80μmol/L和160μmol/L)作用24h,同时设置空白调零组(不加细胞加入等量的PBS),以及阴性对照组(加入等量的溶媒)。药物作用结束前1h,各孔加入0.01ml CCK - 8溶液,继续培养1h,酶标仪(Bio - Tek, ELX800)测A450值,实验重复3次。细胞存活率 = (实验组A450值 - 空白调零组A450值)/(对照组A450值 - 空白调零组A450值) × 100%。

5. 形态学观察:取1ml浓度为 1×10^5 /ml的SW480细胞悬液接种于普通载玻片上,过夜贴壁后,第2天更换培养液,加入百里醌(80μmol/L)作用24h后,经甲醛固定后,DAPI染色5min,荧光显微镜(OLYMPUS, BX51TF)下观察。

6. 迁移实验:将大肠癌 SW480 细胞接种于 6 孔培养板,待细胞长满底面,不同浓度百里醌 ($20\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$ 和 $160\mu\text{mol/L}$) 作用 2h 后,用 $200\mu\text{l}$ 枪头刮出 $2\text{mm} \times 2\text{cm}$ 刮痕,PBS 冲洗 2 次,显微镜下见刮痕内无细胞。至培养箱培养 24h 后倒置显微镜 (Nikon, TS100) 下观察,计算刮痕内细胞。实验重复 3 次,取平均值。

7. 侵袭实验:在 24 孔 Transwell 小室 (Corning 公司,美国) 滤膜上方涂敷人工基膜 (matrigel) $50\mu\text{l}$,放置于 37°C 培养箱孵育 5h,使其形成凝胶状。不同浓度百里醌 ($20\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$ 和 $160\mu\text{mol/L}$) 作用大肠癌 SW480 细胞 2h 后,计数 1×10^4 个细胞加入 $100\mu\text{l}$ 不含血清的 RPMI - 1640 培养基中,至入上室,下层培养孔加 $500\mu\text{l}$ 含 20% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基,每组设 5 个复孔。培养 24h 后取出滤膜,小心用棉棒擦掉小室内表面未穿过膜的细胞,甲醛固定后结晶紫染色,至倒置显微镜下计数膜背面的细胞数,随机计数 20 个视野,计算平均值。每组重复 3 次。

8. Western blotting 检测 SW480 细胞中 Mucin - 4、HER - 2、p - FAK 和 FAK 表达:收集处于对数生长期的 SW480 细胞,接种于 6 孔板,待细胞过夜贴壁后,百里醌 ($80\mu\text{mol/L}$) 作用 24h 后,RIPA 裂解液裂解细胞,提取上清液,测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品 (20 微克/孔),8% SDS - PAGE 电泳,半干转膜仪转膜,经 5% 脱脂奶粉封闭后滴加特异性抗体作为一抗,HRP 标记的 IgG 为第二抗体,ECL 显色,X 线胶片曝光。

9. 裸鼠大肠癌皮下移植瘤的建立和给药方案:选择 4 ~ 6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠,将 2×10^7 个 SW480 细胞悬浮于 0.2ml 无血清 RPMI - 1640 培养基中,注射到裸鼠背部靠近右侧后肢皮下建立裸鼠大肠癌皮下移植瘤模型。接种 2 周后,

待移植瘤体积长至 $100 \sim 150\text{mm}^3$,将荷瘤裸鼠随机分为对照组和实验组,每组 10 只,分别灌胃给予溶媒 (1% 乙醇) 0.2 毫升/只和百里醌 3 毫克/只^[3],每周给药 3 次,共 2 周。第 8 周处死动物留取肿瘤组织,并测量肿瘤重量,计算抑瘤率。抑瘤率 = $(1 - \text{治疗组平均重量} / \text{对照组平均重量}) \times 100\%$ 。

10. 免疫组织化学法检测 Ki - 67 和 Mucin - 4 表达:每组各选取 5 个肿瘤组织,按照 Envision 法的操作步骤进行免疫组化实验,选取新鲜肿瘤组织经石蜡切片常规脱蜡水化、一抗孵育和封片后。在高倍镜 (400 倍) 下随机选择 20 个视野,计算镜下染色阳性细胞所占比例。

11. 数据的统计处理:实验所得计量数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和 T 检验,以 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

结 果

1. 百里醌对体外大肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的影响:百里醌可显著抑制大肠癌 SW480 细胞增殖,呈浓度依赖性。SW480 细胞经不同浓度百里醌 ($20\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$ 和 $160\mu\text{mol/L}$) 作用 24h 后,细胞存活率分别为 92.4%、76.1%、57.5% 和 35.7% (图 1B)。百里醌作用大肠癌 SW480 细胞 24h 后 IC₅₀ 为 $91.2\mu\text{mol/L}$,因此在本实验中选用百里醌最佳浓度为 $80\mu\text{mol/L}$ 。百里醌 ($80\mu\text{mol/L}$) 作用 SW480 细胞 24h 后经 DAPI 染色,荧光显微镜下观察到百里醌处理后大肠癌细胞核出现明显固缩、染色体凝集和典型凋亡小体等凋亡特征性改变 (图 1A)。表明百里醌可明显诱导体外大肠癌 SW480 细胞凋亡。

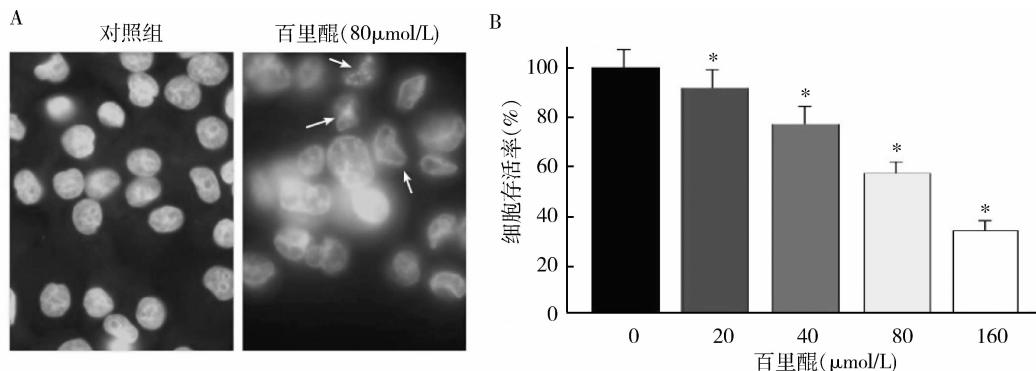


图 1 百里醌对体外培养的大肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的影响

A. SW480 细胞经 DAPI 染色后在荧光显微镜下观察细胞形态学变化 (箭头示典型凋亡细胞);

B. CCK - 8 法检测不同浓度百里醌对大肠癌 SW480 细胞增殖的影响。与对照组比较, * $P < 0.05$

2. 百里醌对体外大肠癌 SW480 细胞迁移的抑制作用:百里醌能显著抑制大肠癌细胞迁移,呈浓度依赖性 (图 2A)。百里醌 ($20\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$

和 $160\mu\text{mol/L}$) 作用 2h 可分别抑制 71.2%、53.4%、33.5% 和 19.7% 的大肠癌 SW480 细胞迁移,与对照组相比较,均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2B)。