

中图分类号: R73

编号: 学号 20120225

承德医学院

硕士研究生毕业论文

沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对人肝癌 HepG2 细胞的 VEGF、Caspase-3 基因表达的研究

**Thalidomide and oxaliplatin and 5-fluorouracil for in HepG2 cells
Research VEGF, Caspase-3 gene expression in vitro tests**

研 究 生: 孙媛

导 师: 李青山 教授

学科专业: 肿瘤学

所在系部: 承德医学院附属医院

研究起止日期: 2013 年 9 月~2015 年 3 月

论文提交日期: 2015 年 3 月

沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对人肝癌 HepG2 细胞的
VEGF、Caspase-3 基因表达的研究
Thalidomide and oxaliplatin and 5-fluorouracil for in HepG2 cells
Research VEGF, Caspase-3 gene expression

研 究 生：孙媛

学 号：20120225

年 级：2012 级

导 师：李青山 教授

学科专业：肿瘤学

所在系部：承德医学院附属医院

研究方向：恶性肿瘤的综合治疗

研究起止日期：2013 年 9 月～2015 年 3 月

论文提交日期：2015 年 3 月

承德医学院

学位论文使用授权及知识产权归属承诺

本学位论文在导师（或指导小组）的指导下，由本人独立完成。本学位论文研究所获的研究成果，其知识产权归承德医学院所有。承德医学院有权对本学位论文进行交流、公开和使用。凡发表与学位论文主要内容相关的论文，第一署名单位为承德医学院，试验材料、原始数据、申报的专利等知识产权均归承德医学院所有。否则，承担相应的法律责任。

研究生签名：

导师签章：

年 月 日

承德医学院

研究生学位论文独创性声明

本论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢等内容外，文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，指导教师对此进行了审定。本论文由本人独立撰写，文责自负。

研究生签名：

导师签章：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	01
英文摘要.....	04
英文缩写.....	07
研究论文 沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对人肝癌 HepG2 细胞的 VEGF、Caspase-3 基因表达的研究	
前 言.....	08
材料与方法.....	11
结 果.....	19
附 图.....	21
附 表.....	24
讨 论.....	25
结 论.....	31
参考文献.....	32
综 述.....	36
致 谢.....	42
个人简历.....	43

沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对人肝癌 HepG2 细胞的 VEGF、Caspase-3 基因表达的研究

摘 要

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的恶性肿瘤,严重的危害着我国人类的健康。肝癌的恶性程度高、易复发转移、侵袭性强、进展快、对放疗、化疗不敏感,死亡率仍居高不下,是世界范围内肿瘤患者的主要死因。5-氟尿嘧啶联合奥沙利铂,是治疗原发性肝癌的最有效化疗方案之一,但有效率低,近期不良反应的发生率高。因此,针对肝癌细胞的特征,研究抗肿瘤新的治疗模式成为肿瘤治疗的热点。沙利度胺(thalidomide,ThD)具有抗新生血管的生成的作用,开始应用于一些恶性肿瘤治疗。沙利度胺联合奥沙利铂和 5-氟尿嘧啶是否可以抑制肝癌细胞的生长,还需要通过基础研究试验进一步证实。

目 的:

本实验通过体外人肝癌 HepG2 细胞培养技术,应用 MTT 法观察三药物对肝癌细胞增殖的影响,利用流式法检测不同药物干预组细胞凋亡的情况,应用 Western Blot 法检测不同药物干预组对肝癌细胞凋亡因子 VEGF、Caspase-3 蛋白的表达差异,探讨沙利度胺联合奥沙利铂及 5-氟尿嘧啶的疗效及可能作用机制。此次体外实验的研究结果将有助于为肝癌治疗的临床化疗提供新的实验支持 and 治疗思路。

方 法:

1. 细胞来源: HepG2 人肝癌细胞株购买自上海美轩生物科技有限公司
2. 实验分组: 设立空白对照组、沙利度胺组、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组及沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶组
3. MTT 法检测各干预组 HepG2 人肝癌细胞增殖活性的差异
4. 流式细胞仪体外研究各组对 HepG2 细胞周期的影响
5. Western blot 法测定各组细胞 Caspase-3 蛋白表达的差异
6. Western blot 法测定各组细胞 VEGF 蛋白表达的差异
7. 数据统计分析: 统计数据使用 SPSS17.0, 分别用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的数据进行表示。多组之间的比较使用单因素方差分析法, 两组之间的比较使用 LSD 或 SNK 法, $P < 0.01$ 则表示差异有统计学意义。

结 果:

1. 沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞增殖的影响:先筛选出各药物 48h 的 IC50 做为联合用药的 IC50 分别为:沙利度胺为 0.1mmol/L、5-氟尿嘧啶为 40umol/L 及奥沙利铂为 5umol/L 的。沙利度胺联合 5-氟尿嘧啶以及奥沙利铂、5-氟尿嘧啶联合奥沙利铂、沙利度胺组与空白对照组比较, OD 值均降低, 各用药组均抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而各干预组中沙利度胺联合 5-氟尿嘧啶以及奥沙利铂 OD 值最低, 说明沙利度胺与 5-氟尿嘧啶+奥沙利铂联合有效提高了对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制率。(沙利度胺联合 5-氟尿嘧啶以及奥沙利铂、5-氟尿嘧啶联合奥沙利铂间、沙利度胺组、空白对照组间的比较, $P < 0.001$, 差异具有统计学意义)。

2. 沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对肝癌 HepG2 细胞周期的影响 转染 48h 后, 空白对照组、沙利度胺组、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组, 沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶组 HepG2 细胞均在 G0/G1 期凋, 且依空白对照组、沙利度胺组、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组, 沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶组顺序, 凋亡百分比逐渐明显 ($P < 0.05$), 而在 S、G2/M 期百分比不成任何趋势, 表明随着药物的联合, 沙利度胺联合奥沙利铂及 5-氟尿嘧啶组对细胞凋亡的作用逐渐增加, 且被阻滞于 G0/G1 期。

3. 沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞中 Caspase-3 蛋白的表达: 予以空白对照组相比较, 各用药组 HepG2 细胞中 Caspase-3 蛋白的表达均升高, 且沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶组的蛋白表达最明显。表明随着药物的联合作用, Caspase-3 蛋白的表达逐渐增加 ($P < 0.001$, 各组差异有统计学意义)

4. 沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞中 VEGF 蛋白的表达最低: 予以空白对照组相比较, 各用药组 HepG2 细胞中 VEGF 蛋白的表达均降低, 且沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶组的蛋白表达最低。表明随着药物的联合作用, VEGF 蛋白的表达逐渐降低 ($P < 0.001$, 各组差异有统计学意义)。

结 论:

沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶有效提高了对 HepG2 细胞增殖的抑制作用。阻滞 HepG2 细胞生长停滞在 G1 期。可上调 HepG2 细胞中凋亡因

子 Caspase-3 的分泌，可下调 HepG2 细胞中血管内皮生长因子 VEGF 的分泌，从而促进细胞凋亡。

关键词：沙利度胺；5-氟尿嘧啶；奥沙利铂；化学治疗；肝癌；凋亡；VEGF；Caspase-3

Thalidomide and oxaliplatin and 5-fluorouracil for in HepG2 cells Research VEGF, Caspase-3 gene expression

ABSTRACT

HCC (hepatocellular carcinoma, HCC) is the most common type of malignant tumor in china which greatly threatened human health. It is also one of the leading causes of cancer deaths worldwide. Patient's mortality rate remains high due to its high grade malignancy, easy recurrence and metastasis, strong invasiveness, rapid progression and insensitive to radiotherapy or chemotherapy. 5-fluorouracil combined with oxaliplatin therapy is currently the best option, but the effect is still unsatisfying and the incidence of recent adverse events is high. Therefore, developing new anti-tumor therapy strategy according to the characteristics of liver tumor cells is becoming a hot spot. Thalidomide (thalidomide, ThD) can inhibit angiogenesis, thus it has been applied in a series of cancers treatment. Whether Thalidomide combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil can inhibit the growth of liver tumor cells remain to be confirmed by basic research.

Purpose:

In this study, we built an in vitro cultured model of human hepatoma HepG2 cells and intervened with three different strategies. MTT assay was used to observe the effects of the drugs on the proliferation of liver tumor cells. FACS was used to detect the apoptosis of liver tumor cells. Western Blot assay was applied to detect the expression of apoptotic factor of VEGF, Caspase-3 by liver tumor cells in different groups. Hereby we can compare the efficacy of thalidomide combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil, and to explore possible mechanisms. The results of this study may help to provide new theoretical supports and ideas for clinical application to the treatment of liver cancer.

Method:

1 Cell source: HepG2 human hepatoma cell line was purchased from Shanghai Biological Technology Co., Ltd. US

2 Groups: control group, the thalidomide group, oxaliplatin combined with 5-fluorouracil group, thalidomide combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil group.

3 MTT assay was used to detect the proliferation activity of HepG2 human hepatoma cells in different groups.

4 FACS were used to detect the effect of the drugs on the HepG2 human hepatoma cell cycle.

5 Western blot assay was used to detect the expression of Caspase-3 protein by HepG2 human hepatoma cells.

6 Western blot assay was used to detect the expression of VEGF protein by HepG2 human hepatoma cells.

7 Statistical analysis: SPSS17.0 was used and all the data were represented by Mean $\pm$ SD. ANOVA analysis was used to compare the data from different group, and SNK analysis was used to compare the data between two groups. $P < 0.01$ indicates the difference has statistical significance.

Results:

1 The effects of thalidomide combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil on the proliferation of HepG2 cells: Firstly, we screened IC₅₀ of each drug on 48h: Thalidomide was 0.1mmol/L, 5-fluorouracil was 40 μ mol/L and oxaliplatin was 5 μ mol/L. Compared with the control group, the OD values in three treatment groups were decreased and the proliferation of HepG2 cells were inhibited. The differences had statistical significance ($P < 0.01$). In three treatment groups, the OD values in the group of thalidomide combined with 5-fluorouracil and the group of oxaliplatin were the lowest, which suggest the two strategies inhibited the proliferation rate of HepG2 cells effectively. (The comparison among the four groups, $P < 0.001$, the differences have statistical significance).

2 The effects of Thalidomide combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil on the cycle of HepG2 cells. The HepG2 cells were in G₀ / G₁ phase on 48h after transfection in all four groups. The percentage of apoptotic increased follow the consequence of the control group, the thalidomide group, the oxaliplatin combined with 5-fluorouracil group, the thalidomide combined with oxaliplatin platinum and the 5-fluorouracil group ($P < 0.05$), but there had no such inclination in the S and G₂ /

M phase, which suggesting that the combining use of Thalidomide with oxaliplatin and 5 - fluorouracil gradually increased the apoptosis of tumor cells, and their cell cycles were stagnated in G0/G1 phase.

3 The effects of thalidomide combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil on the expression of Caspase-3 by HepG2 cells. Compared with the control group, the expression of Caspase-3 by HepG2 cells in three treatment groups were increased, especially the group of thalidomide combined with oxaliplatin and the group of 5-fluorouracil, which suggest the combining use of the drugs gradually improve the expression of Caspase-3 ($P < 0.001$, the differences have statistical significance).

4 The effects of thalidomide combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil on the expression of VEGF by HepG2 cells. Compared with the control group, the expression of VEGF by HepG2 cells in three treatment groups were decreased, especially the group of thalidomide combined with oxaliplatin and the group of 5-fluorouracil, which suggest the combining use of the drugs gradually prevent the expression of Caspase-3 ($P < 0.001$, the differences have statistical significance).

Conclusion:

Thalidomide combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil effectively promotes the inhibition of the drugs to the proliferation of HepG2 cells. HepG2 cells' growth was stagnated at the G1 phase. The apoptosis factor of Caspase-3 secreted by HepG2 cells were up-regulated and the secretion of VEGF by HepG2 cells were down-regulated, hereby promoting the apoptosis of tumor cells.

Keywords: thalidomide; 5-fluorouracil; chemotherapy;; oxaliplatin liver cancer; apoptosis; VEGF; Caspase-3

英文缩写

胎牛血清	Fetal bovin serum	FBS
沙利度胺	Epirubicin	T HD
奥沙利铂	oxaliplatin	OXA, L-OHP
5-氟尿嘧啶	5-fluorouracil	5-FU
磷酸缓冲液	Phosphate buffered saline	PBS
苯甲基磺酰氟	Phenylmethanesulfonyl fluoride	PMSF
四甲基乙二胺	N,N,N',N'-Tetramethylethylene diamine	TEMED
十二烷基磺酸钠	Sodium dodecyl sulfate	SDS
聚乙烯二氟	Polyvinylidene fluoride	PVDF
焦碳酸二乙酯	Diethylpyrocarbonate	DEPC
乙二胺四乙酸	Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
溴化乙啶	Ethidium bromide	EB
三磷酸脱氧核苷混合物	Deoxynucleoside triphosphate mixture	dNTP mix
寡聚脱氧胸苷酸	Oligodeoxythymidylic acid	Olig(dT)18
RNA 酶特异性抑制剂	Ribonuclease inhibitor	Rnasin
碱基对	base pairs	bp
反转录后的 DNA	Diethyl pyrocarbonate	cDNA
逆转录聚合酶链反应	Reverse transcriptase polymerase reaction	RT-PCR
转/分	Revolutions per minute	rpm
3- (4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐	3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	MTT

沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶诱导肝细胞株 HepG2 发生凋亡的研究

前言

我国的原发性肝癌发病率居世界较前位，死亡率极高，严重危及着人类健康。因其易侵袭转移的生物学特性，目前，肝癌的治疗及预后不满意。肿瘤诱导新生血管生成的能力对肿瘤生发生、发展、转移有关，因此寻找有效抑制肿瘤细胞的增殖以及血管生成的药物对提高肝癌疗效有重要意义。晚期原发性肝癌的治疗主要手段是系统化疗。因多数传统化疗药，如多柔比星、顺铂、5-氟尿嘧啶（5-FU）、丝裂霉素等，都曾被试用于肝癌的治疗，但单药有效率低（一般小于 10%）、毒副作用明显、可重复性差、未改善生存时间，多年来停滞不前，尚无标准化疗药物或方案。近年来，新一代细胞毒药物（如奥沙利铂、吉西他滨卡培他滨及伊立替康等）相继问世，使肝癌化疗有了长足进步，显著改善了患者的预后。

沙利度胺^[1]（反应停 Thalidomide,）在 20 世纪 50 年代是最先在德国上市的一种镇静剂，后引起畸胎被禁用。1994 年发现其致畸的作用与抑制胎儿发育中肢芽的血管生成相关，在经过一系列的动物试验后，利用其抑制血管生成的特点，临床上开始试用于一些恶性肿瘤的治疗。如：非激素依赖前列腺癌、神经胶质细胞瘤、恶性黑色素瘤、肾癌、血液肿瘤、卡波氏肉瘤的治疗等，I 期、II 期临床实验已显示有定成效。目前，有研究报告显示^[2]，沙利度胺能明显抑制 HepG2 人肝癌细胞的增殖，Marriot JB^[3]研究提示，沙利度胺能通过直接嵌入 DNA 碱基对之间，干扰其转录过程，阻止 mRNA 形成，从而抑制肿瘤；沙利度胺还可能通过抑制 VEGF 蛋白表达同时激活 Caspase-3，诱导肿瘤细胞凋亡。另有学者^[4]应用沙利度胺作用于荷人肝癌细胞瘤鼠，研究结果显示，瘤体阻止细胞 PI 增高，Caspase-3 表达阳性的细胞比例也明显升高，表明沙利度胺具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

奥沙利铂是第 3 代铂类抗癌药物，其作用机制为铂原子与 DNA 形成铂-DNA 加合物，抑制 DNA 的合成和修复，使 DNA 损伤，从而激活细胞信号传导通路，最终产生细胞毒性和抗肿瘤活性。因其作用靶点在 DNA，相对其他铂类药物具有更强的 DNA 结合率，增强了对 DNA 的抑制作用。奥沙利铂与 5-FU 具有协调作用。Gramont^[5]等在 2000 年的一项随机临床研究中证实了联合奥沙利铂比单用 5-FU/LV 可获得更高的 RR 和更长的 TTP^[6]。此后，

FOLFOX 方案成为治疗晚期结直肠癌的一线治疗方案，临床试验证实其不良反应低，患者的耐受性好，有效率达 34%–67%^[7]。近年 EORTC 的一项 III 期临床试验表明可切除肝转移患者围手术期化疗加手术（围手术期化疗指术前术后各 6 周期 FOLFOX4 化疗）与单纯手术治疗相比较，患者 3 年无进展生存率绝对值提高 8.1%（ $P=0.041$ ），实际能切除的患者提高 9.2%（ $P=0.025$ ）^[8]。

5-氟尿嘧啶是公认的可靠的药物之一，在临床上应用已久。在一项研究中，荟萃分析了 2 个随机的临床试验，可切除的转移瘤患者，在接受根治性转移瘤切除术后，随机分组接受术后 5-FU/LV 辅助化疗或单纯观察结果显示术后化疗组 PFS 为 27.9 个月，观察组 PFS 仅为 18.8 个月，但两组 OS 无显著性差异^[9]。

有学者等^[10]应用 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、亚叶酸钙，治疗 20 例原发性肝癌的患者，所有病例均可评价疗效，中位 TTP 为 2.1 个月，临床获益率为 55%，总有效率为 15%，治疗后血清 AFP 下降为 55%，患者的主要症状得以明显改善甚至消失。化疗药物对恶性肿瘤细胞抑制的同时，对正常细胞的代谢也有影响，尤其是化疗后短时间内手术患者，手术切口愈合可能会受到阻碍。此外，化疗导致免疫力下降，一定程度上也可能增加感染机会。化疗药物能引起组织脆性增加，导致渗血增多以及解剖困难，但轻柔操作、彻底止血、耐心解剖，一般不会造成太大威胁。因此，提示以奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶为主的新辅助化疗未增加患者术后近期不良反应的发生率，用药安全。但对于术后中远期的并发症，由于研究的时限较短，目前无法进行评估。

Caspase-1 自 1992 年首次被人类提取后，Caspase 家族（细胞调亡下游的关键酶）中的其他成员则陆续被发现。Caspase 具有相似的氨肽酸序列、空阿结构和酶的特点，通常是以非活化的酶原形式，存在细胞质中，酶原较高浓度时，相互接近形成寡聚复合体，从而促使自活化，而一般浓度情况下，酶原收到调亡信号后，发生蛋白水解，从而活化^[11]。经典的细胞调亡途径主要有 2 条：一为线粒体途径，也叫细胞外途径，通过释放细胞调亡因子从而激活一系列的 Caspase。细胞调亡因子信号传递至线粒体后，细胞色素 C 被释放入细胞质内，聚集起来的细胞色素 C 同激活因子 API 结合，从而激活一系列 Caspase，启动级联反应，诱导细胞的调亡^[12]；二为非线粒体途径，也叫细胞内途径，通过细胞膜上的死亡受体从而激活一系列的 Caspase。死亡受体上有一段被称为“死亡区域”的氨基酸片段，它有蛋白水解功能，一旦靶细胞表面死亡受体中的死亡区域

与其配体相结合,即能激活一系列的 Caspase,启动级联反应,导致细胞的调亡^[13]。目前 Caspase 家族成员依据分工不同主要分为 3 类:一为调亡启动因子:此类因子位于信号传递上游,可激活下游的 Caspase 因子,包括 Caspase-2、8、9。二为调亡执行因子,其处于信号传递下游,与特异底物相结合诱发调亡,包括 Caspase-3、6、7 等。三为炎症介导因子,介导炎症的反应,辅助传递调亡的信号,包括 Caspase-1、4、5、11 等。Caspase-3 是 Caspase 家族中重要的成员之一,在传递细胞调亡信号过程中,是主要效应因子^[14],是细胞调亡下游关键执行者^[15]。人类 Caspase-3 基因位于第 4 染色体长臂 3 区 4 带,编码产生 Caspase-3 蛋白,分子量为 32kD^[16]。Caspase-3 广泛分布于人体各种细胞中,但其大多分布在新陈代谢旺盛的细胞中,具有一定的组织特异性^[17]。Caspase-3 则是调亡途径的核心环节,以非活化酶原形式存在细胞质中,细胞受到、刺激或收到调亡信号时,Caspase-3 立即被激活,与 PARP(底物聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶)相结合,使细胞核内 DNA 发生片段化和细胞骨架发生崩解,引发细胞调亡^[18],且一旦 Caspase-3 被激活,细胞调亡不可避免^[19]。有一些研究表明,通过介导 Caspase-3 途径可以对许多恶性肿瘤进行治疗^[20]。Caspase-3 是 Caspase 家族的重要成员,它是能传递细胞调亡信号^[21],是细胞调亡下游关键执行者^[23]。Caspase-3 广泛分布于人体的各种细胞中,其分布与表达有一定的组织特异性,多分布于新陈代谢旺较盛的细胞中^[22]。

VEGF 是血管内皮细胞最特异、最关键的生长因子,几乎参与了人体内正常以及肿瘤血管生成的每一步,它可直接作用于血管的内皮细胞,刺激使其发生有丝分裂,促进新生血管生成。在多种肿瘤细胞中均发现 VEGF 有自分泌现象,游走转移的恶性肿瘤细胞在局部释放 VEGF,从而刺激局部血管的生成。VEGF 在多种恶性肿瘤中有高表达,但在血管生成活跃组织外表达则较少。因此,VEGF 被视为抑制肿瘤血管形成的最重要的分子之一^[23]。

沙利度胺联合奥沙利铂和 5-氟尿嘧啶是否可以抑制肝癌细胞的生长、是否可以延长肝癌患者的生存期、是否可以为肝癌患者带来希望,还需要通过试验进行证实。我们以人肝癌细胞株 HepG2 为体外研究对象,MTT 检测细胞增殖的抑制率,流式法检测细胞调亡周期,Western Blot 法检测亡因子 VEGF 蛋白、Caspase-3 蛋白,探讨沙利度胺联合奥沙利铂及 5-氟尿嘧啶的体外抗肝癌作用,旨在为提高临床化疗方案治疗提供依据。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞来源

上海美轩生物有限公司 HepG2 人肝癌细胞株

1.2 主要实验仪器

美国伯乐公司	BIO-RAD 680 型全自动酶标仪
日本 Olympus	CK40-F200 相差倒置显微镜
日本 SANYO	MCO-15AC CO ₂ 恒温培养箱
德国 Startorius	BP211D 精密电子天平
中国格兰仕	Wd750ASL23 微波炉
中国上海上净净化设备公司	SHJ 系列洁净工作台
北京医用离心机厂	LDR4-8.4C 低速冷冻离心机
北京雷勃尔离心机有限公司	LD5-IA 低速离心机
中国其林贝尔公司	QL-901 振荡器
温州市兴业机械设备有限公司	塑料薄膜封口机
中国其林贝尔公司	ULT1386-32-V14-70℃ 冷冻冰箱
上海医用光学仪器厂	细胞计数板
成都液氮容器厂	YDS-30-125 液氮生物容器
日本岛津	紫外分光光度计
Transilluminator2020Dcold sring 电泳成像分析系统	

1.3 主要药物和试剂

1.3.1 主要试剂

美国 sigma 公司	MTT
Invitrogen 公司	RPMI-1640
天津血液学研究所	胎牛血清 (FBS)
华北制药厂	链霉素
华北制药厂	青霉素
美国 Sigma 公司	胰蛋白酶
PI 单染试剂盒	Sigma 公司

1.3.2 药物

奥沙利铂（美国 Sigma 公司生产，生产批号：09512；规格：5mg/支），5-氟尿嘧啶（美国 Sigma 公司生产，生产批号：F6627；规格：1g/支），沙利度胺（美国 Sigma 公司生产，生产批号：T144，规格：100mg/支）

1.3.4 Western-blot 的主要试剂

美国 Santa Cruz 公司	Caspase-3 一抗
美国 Santa Cruz 公司	VEGF 一抗
美国 Santa Cruz 公司	β -actin 一抗
北京中杉金桥生物技术有限公司	Western-blot 二抗
美国 Promega 公司	Tris 碱
北京化工厂	甲醇
北京化工厂	甲叉双丙烯酰胺
加拿大 BBI 公司	丙烯酰胺
加拿大 BBI 公司	SDS
北京化工厂	TEMED
普利莱基因技术有限公司	Marker
北京化工厂	过硫酸铵

北京拜尔迪生物技术有限公司 甘氨酸 1.4 主要溶液的配制

1.4 主要溶液的配制

1.4.1 1640 培养基的配制

将一袋 1640 干粉，L-谷氨酰胺 0.1g,NaHCO₃ 2g，溶解于 1000ml 高压灭菌的双蒸水中，然后调 PH 值至 7.1~7.2，再用 0.22 μ m 的滤膜将之前所配溶液过滤除菌，最后分装，予-20℃保存。

1.4.2 链霉素和青霉素储存液

取链霉素 100mg，加入 5ml 灭菌的双蒸水中，另取青霉素 80 万 U，加入 4ml 灭菌的双蒸水中，然后分别取 4ml 青链霉素液，混匀稀释至 16ml，再用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌，将配好的溶液分装成 200 μ l/份，予-20℃保存备用。（工作液浓度：100 μ g/ml 链霉素，100U/ml 青霉素。）

1.4.3 完全培养液（含 100 μ g/ml 链霉素、100U/ml 青霉素、10%FBS）。

取已灭活的 10ml FBS 加入 90ml 已配好的 1640 培养基中，再加入 200 μ l 已配好的青、链霉素，至-20℃，保存备用。

1.4.4 胰蛋白酶(0.25%)

取 0.25g 胰蛋白酶, 于 100ml 的灭菌水中溶解, 再用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌, 适当分装, 予-20℃保存备用。

1.4.5 PBS 缓冲液 (0.01M)

取 8.0gNaCl, 0.2gKCl, 3.628gNa₂HPO₄ · 12H₂O, 0.24gKH₂PO₄, 加入高压灭菌的双蒸水中, 然后定容至 1000ml, 调 pH 值至 7.4, 再用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌, 最后分装, 予 4℃保存备用。

1.4.6 沙利度胺、OXA、5-FU 溶液的配制

将 100mg 沙利度胺、1g5-FU、以及 5mgOXA 分别溶于 DMSO (二甲基亚砷), 再用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌, 于 4℃保存备用, 使用前稀释成所需浓度。

实验分组: 设立空白对照组、沙利度胺组、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组及沙利度胺联合奥沙利铂、5-氟尿嘧啶组。

1.4.7 MTT 溶液的配制

取 0.5gMTT 粉, 加入 100mlPBS 溶液中, 再搅拌半小时, 最后用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 予 4℃保存备用。

1.4.8 SDS (10%)

将 10gSDS 溶于双蒸水中, 定容至 100ml, 予以常温保存。

1.4.9 30%丙烯酰胺 (29: 1)

将 29g 丙烯酰胺、1gN, N-亚甲基双丙烯酰胺分别溶解于温热的双蒸水中, 然后定容至 100ml, 滤纸过滤后, 予 4℃, 避光保存。

1.4.10 缓冲液 (1×TBST, 现用现配, 4℃)

将 8.8gNaCl、20ml 1.0MTris-HClpH6.8、0.5mlTween20 溶于双蒸水中, 定容至 1000ml。

1.4.11 封闭液 (5%脱脂奶粉)

将 2.5g 脱脂奶粉充分溶解于 1×TBST 中, 然后定容至 50ml。

1.4.12 过硫酸胺 APS (10%)

将 1g APS 溶于双蒸水, 然后定容至 10ml, 分装, 予-20℃, 保存备用。

2 方法

2.1 细胞的培养、传代、冻存以及复苏

2.1.1 细胞培养

培养 HepG2 人肝癌细胞的培养液为内含 10%的胎牛血清、100U/ml 的青霉

素、100 μ g/ml 的链霉素的 1640 完全培养液。将 HepG2 细胞放置于 37℃、5%CO₂ 培养箱内进行细胞培养，细胞呈对数生长时可进行试验，根据细胞对营养的需求适时进行换液、传代。

2.1.2 细胞传代

待 HepG2 人肝癌细胞长满至瓶底面积的 80%以上时，进行细胞传代。

(1) 将培养箱内长满 80%以上细胞的培养瓶取出，移入超净台内，吸弃培养瓶内的上清。

(2) 用生理盐水轻轻的将培养瓶内的细胞洗涤 2 遍（去除血清成分），吸弃旧生理盐水。

(3) 取约 1ml0.25%的胰蛋白酶溶液加入培养瓶内，轻晃培养瓶，使胰蛋白酶溶液与细胞充分接触，移入倒置显微镜下，观察细胞消化的情况，待细胞收缩变圆、细胞间隙变大时，吸弃胰蛋白酶液，再加入 3~5ml 含有 10%胎牛血清的 1640 完全培养液，以终止消化。用吸管反复轻轻吹打培养液至培养瓶底，使细胞悬浮于培养瓶内，制成单细胞悬液，进行细胞计数。

(4) 细胞计数后，根据实验需求，将细胞按一定浓度进行接种传代，继续培养传代细胞。

2.1.3 细胞的冻存

收集一定数量的对数生长期细胞，调整细胞浓度至 5×10^6 /ml 以上，1000rpm、5min 离心，去除上清液，加入含 20%FBS、70%RPMI-1640、10%DMSO 的培养基冻存液重悬，分装至无菌冻存管中，用封口膜封口。标记冻存管，依顺序放置于 4℃(40min)、-20℃(30~60min)、-80℃过夜，最后移入液氮内保存。

2.1.4 细胞的复苏

(1) 查找冻存管标记的编号，从液氮中取出 HepG2 细胞冻存管。

(2) 立即置于事先调制的 37℃~40℃温水中，快速度晃动，直至细胞冻存液能够完全融解。

(3) 酒精棉球擦拭细胞冻存管外壁，将其移入超净台内。细胞悬液移入离心管中，加 5 ml 1640 完全培养液，轻轻混匀，10min，1500rpm 离心，弃除上清液。

重复上述操作 1 次，加 10ml 完全培养液至离心管中，混匀，移至培养瓶，置培养箱内进行培养

2.1.5 MTT法检测细胞增殖抑制率

- (1) 取对数生长期的 HepG2 细胞, 用 0.25%胰蛋白酶进行充分的消化;
- (2) 加入配制好的培养液, 将细胞吹打成单细胞悬液;
- (3) 应用细胞计数板对细胞进行计数, 并将细胞悬液的浓度调到 2×10^5 /mL;
- (4) 将调整好的细胞接种于 96 孔板中, 每孔内加入细胞液 150ul;
- (5) 随后将 96 孔板置于 37℃、5%CO₂ 湿度为 80%的培养箱中继续细胞培养 48h, 待细胞贴壁并进入对数生长期。对实验进行分组: 实验设 4 组, 每组 5 个复孔。实验组分别为: 空白对照组、沙利度胺组、5-氟脲嘧啶+奥沙利铂组, 沙利度胺联合 5-氟脲嘧啶+奥沙利铂组, 空白对照组加入与实验组等量的培养液, 各实验组同时加样, 各标本最终容积为 200ul;
- (6) 加样后将 96 孔板置于 37℃、5%CO₂ 湿度 80%的恒温培养箱中;
- (7) 将各组放入培养箱中, 培养 48h。随后每孔加入 MTT 溶液 (5g/l) 20ul 继续培养 4h 后终止培养, 吸去上清, 加入 150ul DMSO, 置摇床上低速震荡 10min;
- (8) 在酶联免疫检测仪 490nm 处测量各孔的吸光度 U 值), 按照公式计算各组的细胞增殖抑制率: 抑制率 (%) = [(对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值] * 100%;

2.2 PI 单染流式细胞仪检测

2.2.1 收集培养的 HepG2 细胞, 1000rpm、5 min 离心, 在用预冷的 PBS 液使细胞重悬, 重复 1000rpm、5min 离心一次; 将收集的细胞团, 用 4℃预冷的体积分数为 0.75 的乙醇固定, 放入冰盒送检。样本在上机前作如下处理: 一、将用乙醇固定的细胞, 离心、洗涤, 去上清, 再摇匀; 二、加入 RNA50 μl 酶 (浓度为 0.5 mg/ml), 37℃水浴半小时; 三、加 50ul 碘化丙啶 (PI 浓度为 1 mg/ml), 振荡以混匀, 避光放置冰箱半小时; 四、用 300 目尼龙网过滤, 即可上机检测, 计算出 10000 个细胞, 最后进行 DNA 含量分析。

2.3 Western-blot 法检测各干预组 HepG2 人肝癌细胞凋亡因子 VEGF、Caspase-3 在蛋白水平表达的差异

原理: Western-blot 印迹方法, 又称免疫印迹, 是将获得的蛋白样品通过 SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE (SDS-聚丙烯酰胺) 电泳, 分离不同分子量的蛋白质, 并将凝胶上分离到的蛋白质通过转移电泳转印至硝酸纤维素膜或 PVDF 膜 (固相支持物) 上, 用一抗 (抗靶蛋白的非标记抗体) 与

转印后膜上的靶蛋白进行特异性结合，再与经辣根过氧化酶偶联（标记）的二抗结合后，用 ECL 试剂检测。若印迹膜上含有靶蛋白，经 X 光片曝光显影，会在曝光的 X 光片上出现特异性的蛋白条带。

2.3.1 细胞总蛋白的提取

（1）取对数生长期的 HepG2 细胞，胰酶消化，调整细胞浓度为 $4 \times 10^5/\text{ml}$ ，接种于 50ml 容量的培养瓶中，每瓶细胞悬液 10ml，每组 2 瓶，共 8 瓶。置于 5%CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中进行培养 3~4h，待细胞贴壁后，弃去上清液，分别加入不同的药物干预（沙利度胺组、OXA+5FU 组、沙利度胺联合 OXA+5-FU 组）的 1640 完全培养液，并以不加药物的 1640 完全培养液作参考对照，继续培养 48h。

（2）吸弃上清液，用 5ml 预冷的生理盐水洗三遍，去除残液。

（3）将培养瓶放置于冰上，每瓶加入 200μl 细胞蛋白裂解液（10μl PMSF:1ml 裂解液）冰上作用 30min，反复振荡，使其充分裂解。

（4）吸出含细胞碎片的裂解液入 Eppendorf 管中，4℃ 离心，15min，12000rpm，缓慢吸除上清，转入新的 Eppendorf 管中，-80℃ 保存。

2.3.2 细胞总蛋白的定量

（1）蛋白定量采用 BCA 法

原理：Cu²⁺与蛋白质在碱性环境下络合，将 Cu²⁺还原成 Cu⁺。Cu⁺与 BCA 结合成稳定的紫蓝色复合物，在 570nm 处有高吸收值，并且与蛋白质浓度成正比，因此可测定蛋白质的浓度。

（2）标准蛋白溶液及工作溶液的配制

将 50 体积的 BCA reagent 与 1 体积的 Cu reagent 混合即为工作溶液。将测蛋白样品匹配的缓冲液用 PBS 进行倍比稀释：25μl 4000μg/ml BSA+25μl 稀释溶液(PBS)= 50μl(BSA=2000μg/ml)，取 25μl 连续倍比稀释 7 次，得到 BSA 标准溶液分别为 2000μg/ml、1000μg/ml、500μg/ml、250μg/ml、125μg/ml、62.5μg/ml、31.25μg/ml、15.625μg/ml，各 25μl。

（3）微板的测定

将 25μl 标准品和待测样本与 200μl 的工作液混合，37℃，30min 孵育，将反应的微板温度冷却，至室温，测定 570nm 的 OD 值，再拟合标准品曲线，最后计算蛋白的浓度。

（4）根据测得的蛋白质浓度，计算上样量。

2.3.3 蛋白电泳

(1) 用双蒸水将玻璃板冲洗干净、晾干后，将两块玻璃板垂直、对齐且固定于电泳装置上，准备灌胶。

(2) 配胶：按照下表分别配制 12%的浓缩胶以及分离胶，然后加入 TEMED，立即混匀灌胶。

试剂	浓缩胶(4ml)	12%分离胶(10ml)
双蒸水(ml)	2.7	3.3
30%丙烯酰胺(ml)	0.67	4.0
1.5M Tris-HCl(ml)	—	2.5
1.0M Tris-HCl(ml)	0.5	—
10%SDS(ml)	0.04	0.1
10%APS(ml)	0.04	0.1
1%TEMED(ml)	0.004	0.004

(3) 将分离胶液加入电泳板中，在分离胶液上铺上一层水层以隔绝空气。

(4) 待分离胶凝固后，去除分离胶上面的水层，立刻加入浓缩胶，小心插入的梳子混入气泡。

(5) 待浓缩胶凝固后，将电泳缓冲液加入电泳槽，将梳子轻轻拔出。

(6) 将蛋白样品和 5×Loading Buffer 按体积比 4: 1 的比例混匀，沸水煮 5min 使蛋白变性，然后将蛋白分子进行标记，且将蛋白样品加入浓缩胶制成的加样孔中。

(7) 稳压电泳：分离胶，120V；浓缩胶，80V。待电泳至溴酚兰到达胶的底部时，终止电泳，最后转膜。

2.3.4 转膜

(1) 根据凝胶大小剪取 6 张滤纸和 1 张 PVDF 膜，PVDF 膜在甲醇中浸泡 5min 后，将滤纸、PVDF 膜放置于转移缓冲液中处理 15min，同时将海绵浸于转移缓冲液中。

(2) 按照阴极、1 层海绵垫、3 层滤纸、胶、PVDF 膜、3 层滤纸、1 层海

绵垫、阳极的顺序，安装转膜的装置，边安装边驱赶气泡。

(3) 扣紧转移槽惠普，接通电源，以 2mA/cm² 恒流转膜， β -actin 4℃转膜 2h，VEGF、Caspase-3 各转膜 3h。

(4) 转膜完成后，在 PVDF 膜的右上角剪口做标记。

2.3.5 免疫反应

(1) 将 PVDF 膜放入含有 5%脱脂奶粉的平皿中浸泡，室温摇动，封闭 2h。

(2) 用等量的封闭液和 TBST 配制成抗体稀释液，用抗体稀释液将一抗稀释至适当的浓度，兔抗人 VEGF 一抗按 1:100 比例稀释，兔抗人 Caspase-3 一抗按 1:1000 比例稀释，兔抗人 β -actin 一抗按 1:6000 稀释。PVDF 膜放置于杂交袋中，将适量的抗体溶液加入 PVDF 膜蛋白面，压紧四角，4℃孵育过夜。

(3) 洗膜，用 TBST 液洗 PVDF 膜，共 3 次，每次 10min。

(4) 用等量的封闭液和 TBST 配制成抗体稀释液，以 1:1000 进行稀释，用于检测 VEGF 蛋白的兔抗人二抗；以 1:1000 进行稀释，用于检测 Caspase-3 蛋白的兔抗人二抗；以 1:2000 进行稀释，用于检测 β -actin 蛋白的兔抗人二抗。将 PVDF 膜放置于杂交袋中，将适量的抗体溶液加入 PVDF 膜蛋白面，压紧四角，于室温摇床上摇动孵育 2h。

(5) 用 TBST 洗膜 3 次，每次 5min。

2.3.6 化学发光、显影、定影

(1) ECL 试剂盒化学发光。取等量的 A 液试剂和 B 液试剂，混合均匀后置于保鲜膜上，将 PVDF 膜蛋白面朝下与混合液充分接触，反应 1min。

(2) 将 PVDF 膜移入另一保鲜膜上，去残液，包好，放入 X 光片夹中，固定。

(3) 于暗室中，将定影液和显影液分别倒入盘中，将事先剪好适当大小并在右上角剪口做标记的 X 光片放在 PVDF 膜上，进行曝光，根据信号强弱适度调整曝光的时间，一般为 10s~3min。

(4) 曝光结束后，将 X 光片放入显影液中浸泡 1~2min，等出现明显条带，用自来水冲洗，于定影液中浸泡 2~4min，再自来水冲洗，晾干，扫描图像。实验每次重复 3 次。

(5) 用灰度扫描软件 BandScan 4.5 扫描的图像进行灰度分析，各目的蛋

白条带的相对灰度是以目的条带灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值表示，并用相对灰度进行统计分析。

结 果

3.1 沙利度胺组、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对肝癌 HepG2 细胞增殖的作用（表 1）

MTT 检测筛查出各药物组干预 HepG2 细胞 48h，各药物的 IC₅₀ 分别是：沙利度胺为 0.1mmol/L、5-FU 为 40 μ mol/L 及奥沙利铂为 5 μ mol/L。MTT 技术的检测结果表明：沙利度胺对 HepG2 人肝癌细胞有抑制增殖的作用，联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶后对 HepG2 细胞的生长抑制率则明显升高，且有时间依赖性，作用时间的延长，抑瘤的效率则越强（ $P < 0.01$ ）。

3.2 沙利度胺组、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 人肝癌细胞凋亡周期的影响（图 1-4，表 2）

转染 48h 后，流式细胞仪检测包括沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶组、奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶组、沙利度胺组、空白对照组的细胞周期显示，沙利度胺、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组以及沙利度胺联合奥沙利铂和 5-氟尿嘧啶组的细胞在 G₀/G₁ 期凋亡百分比均较多，而在 S、G₂/M 期的百分比没有趋势，且沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶组的细胞凋亡在 G₀/G₁ 期百分比明显增加（ $P < 0.05$ ），说明随着三种药物的联合作用，药物抑制率逐渐升高，且被阻滞于 G₀/G₁ 期。

3.3 沙利度胺、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞凋亡因子 Caspase-3 的影响（图 5，表 3）

各组干预 HepG2 细胞 48h 后，结果显示，各药物干预组的凋亡因子 Caspase-3 蛋白表达升高，且随着三种药物的联合作用，Caspase-3 蛋白表达逐渐升高。表明沙利度胺可诱导细胞 Caspase-3 蛋白的表达，且沙利度胺联合奥沙利铂及 5-氟尿嘧啶处理 HepG2 细胞后，可诱导更强烈的 Caspase-3 蛋白的表

达。

3.4 沙利度胺、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞血管内皮生长因子 VEGF 的影响（图 6，表 3）

同样，各组干预 HepG2 细胞 48h 后，结果显示，各药物干预组的 VEGF 蛋白表达降低且随着三种药物的联合作用，VEGF 蛋白的表达逐渐降低。表明沙利度胺可诱导细胞 VEGF 的表达，且沙利度胺联合奥沙利铂及 5-氟尿嘧啶处理 HepG2 细胞后，可下调 VEGF 的表达。

附 图

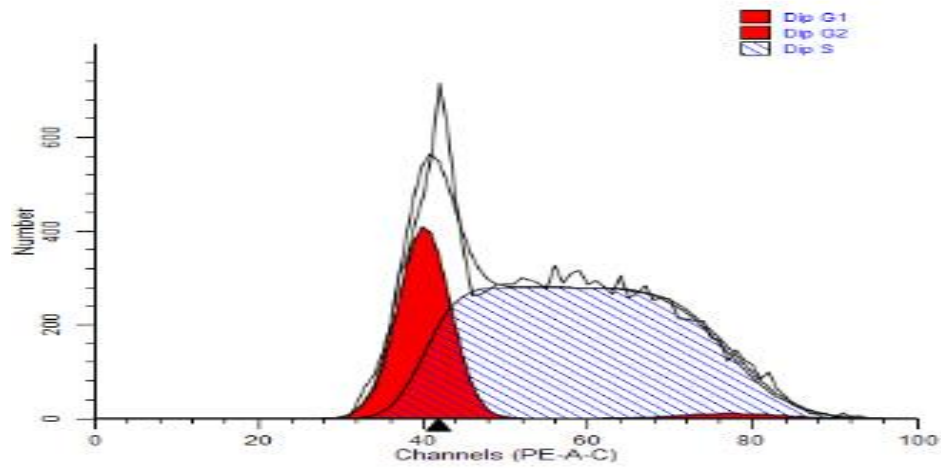


Fig.1 The Apoptosis cycle in HepG2 cells cultured with medium containing Blank drug of 1640 by Flow cytometry

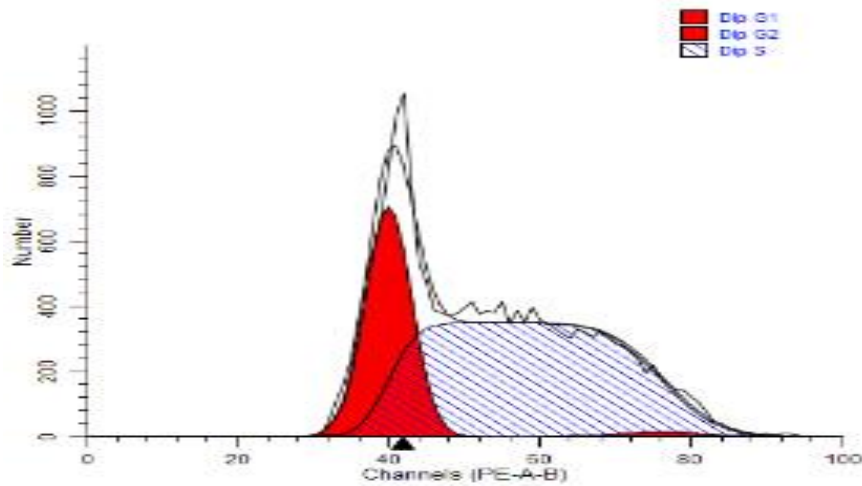


Fig.2 The Apoptosis cycle in HepG2 cells cultured with medium containing Thalidomide of 1640 by Flow cytometry

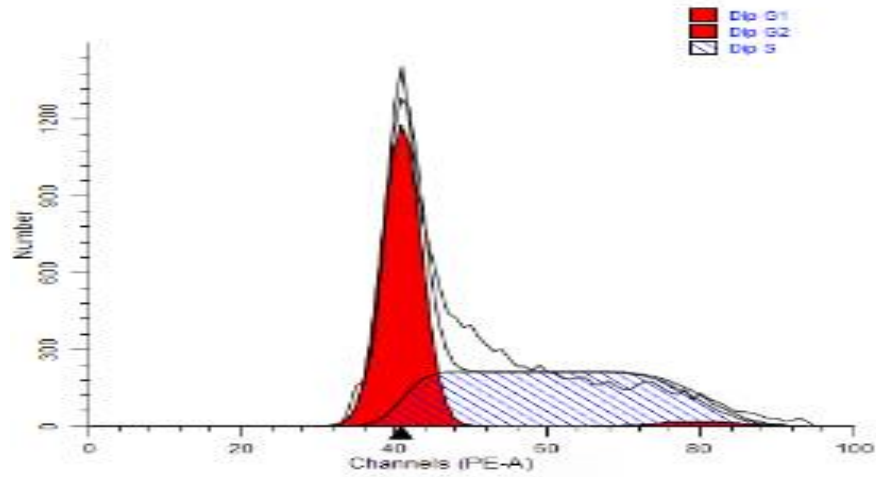


Fig.3 The Apoptosis cycle in HepG2 cells cultured with medium containing Oxaliplatin and 5-fluorouracil of 1640 by Flow cytometry

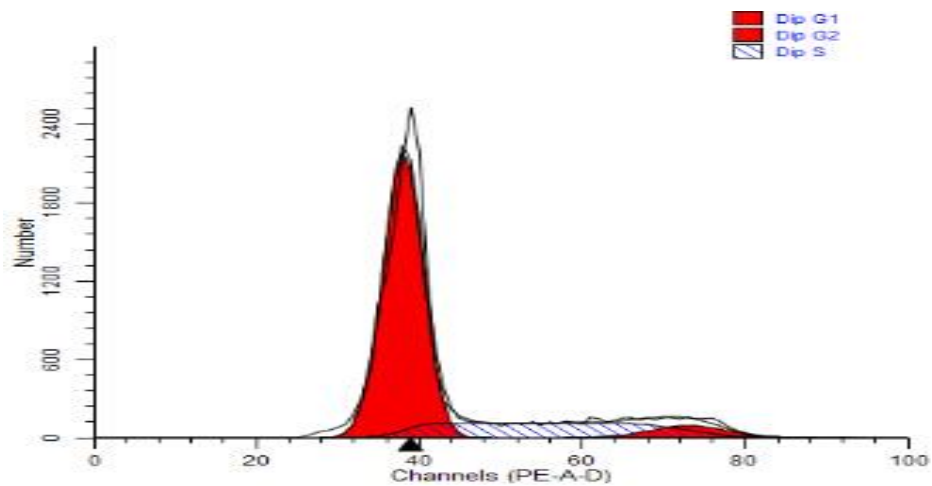


Fig.4 The Apoptosis cycle in HepG2 cells cultured with medium containing Oxaliplatin and 5-fluorouracil and Thalidomide of 1640 by Flow cytometry

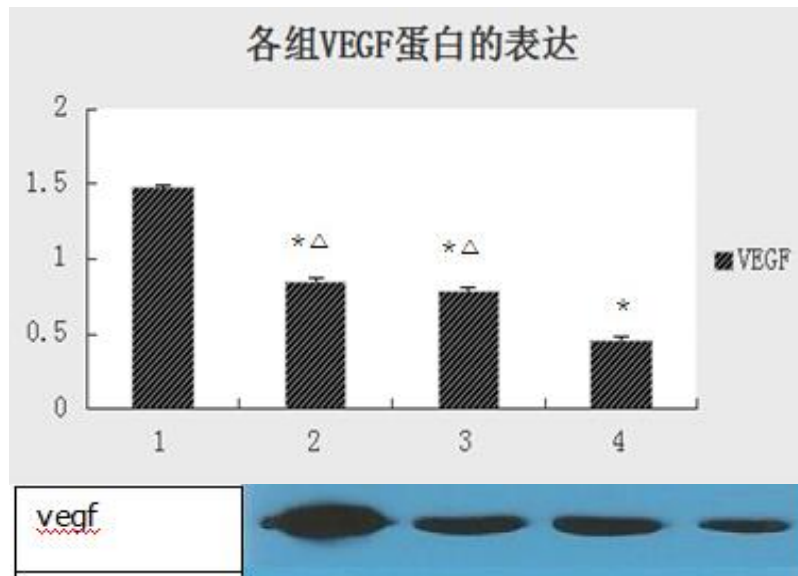


Fig.5 The expressions of VEGF in HepG2 cells cultured with medium containing different concentrations of 1640 by western blot (The control group; a drug: thalidomide group; two drugs: oxaliplatin + 5-fluorouracil group; three drugs: Thalidomide + oxaliplatin + 5-fluorouracil group)

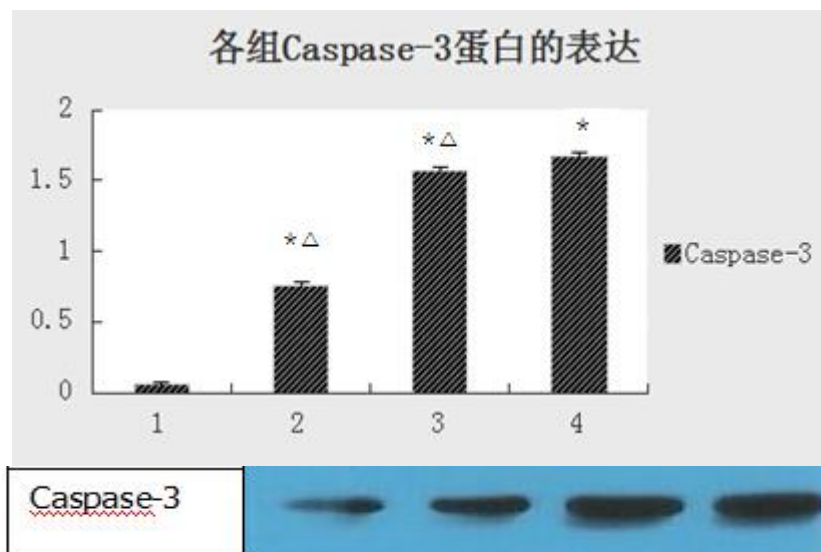


Fig.5 The expressions of Caspase-3 in HepG2 cells cultured with medium containing different concentrations of 1640 by western blot (The control group; a drug: thalidomide group; two drugs: oxaliplatin + 5-fluorouracil group; three drugs: Thalidomide + oxaliplatin + 5-fluorouracil group)

附表

Table1. The proliferating cells in HepG2 cells cultured by different drug groups

group	48h (%)		72h (%)	
	$\bar{x} \pm s$	Inhibition rate	$\bar{x} \pm s$	Inhibition rate
The control	1.414±0.036	0	2.012±0.061	0
Thalidomide (Tha)	0.741±0.016 ^{*Δ}	47.595 ^{*Δ}	1.245±0.037 ^{*Δ}	38.121 ^{*Δ}
oxaliplatin + 5-FU	0.613±0.011 ^{*Δ}	56.647 ^{*Δ}	1.004±0.013 ^{*Δ}	50.099 ^{*Δ}
Tha+ oxaliplatin +5-FU	0.325±0.026 [*]	77.015 [*]	0.825±0.010 [*]	58.996 [*]
<i>P</i>	<0.01		<0.01	

* $P < 0.01$, Compared with the control group; Δ $P < 0.01$, 5-FU group compared with Thalidomide combined OXA

Table2. The Apoptosis cycle in HepG2 cells cultured with different drug groups by Flow cytometry

Group	G0/G1 (%)
The control	24.5300±1.3413
Thalidomide	38.4833±0.9410 ^{*Δ}
oxaliplatin+ 5-FU	49.8133±1.4938 ^{*Δ}
Thalidomide+oxaliplatin+5-FU	73.4567±1.5101 [*]

* $P < 0.01$, Compared with the control group; Δ $P < 0.01$, 5-FU group compared with Thalidomide combined oxaliplatin

Table3. HepG2 cells cultured by different groups express VEGF and Caspase-3 test by Western blot ($\bar{x} \pm s$)

Group	VEGF	Caspase-3
The control	1.5033±0.1341	0.2333±0.0152
Thalidomide (Tha)	0.9400±0.0200 ^{*Δ}	0.9600±0.0100 ^{*Δ}
oxaliplatin +5-FU	0.7233±0.0251 ^{*Δ}	1.5767±0.0152 ^{*Δ}
Tha+oxaliplatin+5-FU	0.4300±0.0200 [*]	1.8533±0.0321 [*]

* $P < 0.01$, Compared with the control group; Δ $P < 0.01$, 5-FU group compared with Thalidomide combined oxaliplatin

讨 论

肝癌在临床上是比较常见的消化道恶性肿瘤，其死亡率在消化系统的恶性肿瘤中居高不下。近年来，一些研究显示，各种细胞外致病因素可通过细胞信号转导通路诱导癌基因的激活以及抑癌基因的失活，进而调控细胞周期，促进细胞的增殖以及抑制细胞凋亡，因此，深入研究肝癌的发生、发展过程中的分子生物学相关机制，为探索肝癌新的治疗策略提供坚实的理论基础。因肝癌起病隐匿，往往中、晚期才会被发现，常失手术时机，且肝癌术后的 5 年复发率为 90%左右。对于无法手术切除的晚期肝癌、肝癌术后预防复发以及术后复发再治疗的肝癌患者，化疗仍然是主要治疗的手段，单纯放化疗则副作用比较大，联合用药后，药物剂量减少且副作用降低，但目前还未找到标准的化疗方案，因此开发新的抗癌药以及治疗方案已成为人类对抗恶性肿瘤的重要手段之一，各种非手术疗法如联合化疗目前已成为肝癌治疗的重要手段。

沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶联合能否有效提高对肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用，为临床的肝癌治疗提供基础实验依据，我们设计并进行了此次实验。实验中，我们利用了 MTT 法来了解药物干预对细胞的增殖情况的影响，此外我们选择 VEGF 家族重要的调血管内皮生长因子 VEGF 以及 Caspase 家族中最重要的凋亡因子 Caspase-3 为检测因子，通过检测各实验组中其活性的变化，来了解分析其与沙利度胺、奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶发挥治疗作用的相关性，我们选择了应用流式细胞仪检测沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶对 HepG2 人肝癌细胞凋亡周期，以及应用 Western Blot 法检测沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶对 HepG2 人肝癌细胞凋亡因子 VEGF 蛋白、Caspase-3 蛋白表达的差异。

4.1 沙利度胺组、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对肝癌 HepG2 细胞增殖的作用

沙利度胺为一种抗癌药，其能抑制肿瘤生长、诱导细胞凋亡以及抗血管生成的作用。沙利度胺能够调节细胞因子表达，如白细胞介素-10(IL-10)、IL-12、肿瘤坏死因子(TNF- α)、核转录因子 NF- κ B、干扰素(IFN)及环氧合酶-2(COX-2)等。由于这种抗血管生成和免疫调节作用，沙利度胺在大多数肿瘤的治疗中取得了满意的疗效。Park E 等 27 人应用沙利度胺作用于脂多糖(LPS)激活的巨噬细胞(RAW246.7 细胞)，显示其能通过显著抑制一氧化氮

(NO)，影响 NF- κ B、cGMP 依赖的信号转导通路，进而影响多种炎症因子表达。沙利度胺抑制诱导型一氧化氮合酶已被证明，可能是其抗炎、抗癌作用的重要环节。

5-氟尿嘧啶是为数不多被证明对肝癌治疗有效的药物之一，一般有效率为 15%，同时也是治疗消化系统恶性肿瘤的最常用物，它能在体内转变为 5-氟尿嘧啶脱氧核苷，抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶，进而阻断尿嘧啶脱氧核苷酸转变为胸腺嘧啶脱氧核苷，以干扰 DNA 的合成，主要为 S 期时的特异性药。5-Fu 还可在体内转化为 5-氟尿嘧啶核苷酸，掺入到 RNA 中干扰蛋白质合成，对其他各时期细胞也有治疗作用。5-FU 属于细胞周期特异性化疗药物，对 S 期细胞最敏感，其作用时间越长效果越好，作用特点呈给药时间依赖性，5-FU 的应用途径主要有经肝动脉灌注和经静脉输注两种。经静脉给药目前已少用，其进入肝脏的药物较少，难以达到抑制肿瘤的有效浓度，且全身副作用大，发现许多缺点，如在体内分布广、对肿瘤细胞的选择性低、副作用多、毒性大、久用易耐药、作用时间较短等，限制了临床应用。有^[25]报道，5-FU 作用于肝癌细胞 Hep3b 和 HepG2，通过增强细胞表面的 Fas 以及肿瘤坏死因子相关配体的表达诱导肿瘤细胞凋亡。近年来，肝癌的化疗取得了进展，表现为给药方式的改进、新的化疗药物放出现、化疗药物联合应用以及多种给药方式的有机搭配等，使肝癌的化疗呈现新局面。5-FU 联合化疗的优点有小剂量化疗药物就可取得高疗效，不良反应减少、耐药性降低。因此，5-FU 联合化疗有着更广阔的临床应用前景^[26]。

奥沙利铂 (oxaliplatin, Oxa) 又叫草酸铂，在体内外均有广谱抗癌活性的抗癌药。目前奥沙利铂的作用机制尚未完全清楚，但已有研究表显示，奥沙利铂通过与 DNA 产生烷化结合物，即铂原子嵌合于 DNA 内的鸟嘌呤与腺嘌呤或两个相邻的鸟嘌呤之间，并使其断裂，形成链内、链间相交联，抑制 DNA 合成、复制，最终产生细胞毒性作用以及抗肿瘤活性^[27]。与传统铂类药相比，奥沙利铂的药效更显著，且毒副作用少。近来，有报道指出奥沙利铂能够引起肿瘤细胞自噬，进而影响肿瘤细胞活性。在体外研究中，OXA 对于人类、鼠类的多种肿瘤细胞株，包括肝细胞癌 (HCC)，都具有显著的抗肿瘤作用，而 5-FU 干扰 DNA 合成，联合 OXA，具有互补作用。在体内以及体外研究中，均可观察到 OXA 与 5-FU 联合应用的协同细胞毒作用，OXA 与 5-FU 目前已被用于临床晚期肝癌的治疗^[28]。

如何控制细胞的无限增殖是治疗肿瘤的关键^[29]，肿瘤细胞的增殖过程不受

任何外界因素的干扰，其程序也相当复杂，生长过程不受机体的调控，肿瘤在原发脏器的生长会使得脏器丧失原有功能，还会通过各种途径发生转移，转移到身体其他部位，最终导致机体的死亡。因此控制肿瘤细胞的增殖,是治愈肿瘤的关键。本实验尝试应用沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶这一新的模式检测对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响，为临床治疗肝脏肿瘤获得更好的治疗效果，提供有效的基础研究数据。

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臞 (Formazan)并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砜 (DMSO)能溶解细胞中的甲臞，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。我们采用 MTT 法了解药物对细胞增殖的作用，研究结果显示，与空白对照组相比较，各用药干预组均可抑制 HepG2 人肝癌细胞的增殖 ($P<0.01$)，且与其他两药物干预组比较（沙利度胺组、OXA+5-FU 组），沙利度胺联合 OXA 以及 5-FU 组对细胞的抑制率最高，差异有统计学意义 ($P<0.01$)，沙利度胺组、5-FU+OXA 组、沙利度胺+5-FU+OXA 组对 HepG2 细胞分别进行药物干预后，各组的抑制率分别为 19.71%、49.40%、67.88%，差异有明显统计学意义 ($P<0.001$)。因此，我们得出结论，沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶显著提高了对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用。

4.2 沙利度胺组、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 人肝癌细胞凋亡周期的影响

Dmoszynska A 等^[32]研究沙利度胺联合使用洛伐他汀，短期内培养多发性骨髓瘤患者的浆细胞，使用流式细胞仪 Annexin V/PI 法检测细胞的凋亡率，结果显示联合用药诱导的细胞凋亡率比单药高。还有学者^[30]应用低剂量沙利度胺作用成人 T 型细胞白血病细胞，用早期凋亡细胞膜表面磷脂酰丝氨酸结合 Annexin V 进行凋亡细胞的 DNA 断裂片段以及荧光分析，发现沙利度胺能诱导成人 T 型白血病细胞的死亡是通过凋亡作用。PI 即碘化丙锭，可以与细胞内

DNA 和 RNA 结合。如果应用于流式, 采用 RNA 抑制剂将 RNA 消化后, 通过流式细胞术检测到的与 DNA 结合的 PI 的荧光强度直接反映了细胞内 DNA 含量的多少。由于细胞周期各时相的 DNA 含量不同, 通常正常细胞的 G1 /G0 期具有二倍体细胞的 DNA 含量 (2N), 而 G2/M 期具有四倍体细胞的 DNA 含量 (4N), 而 S 期的 DNA 含量介于二倍体和四倍体之间。因此, 通过流式细胞术 PI 染色法对细胞内 DNA 含量进行检测时, 可以将细胞周期各时相区分为 G1 /G0 期, S 期和 G2 /M 期, 并可通过特殊软件计算各时相的百分率。因此我们选择了流式细胞仪检测沙利度胺组、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组、沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶组对 HepG2 人肝癌细胞凋亡周期, 结果显示沙利度胺药物干预肝癌细胞 HepG2 后, 检测细胞凋亡情况, 药物处理组细胞凋亡率较空白对照组升高, 且细胞生长停滞在 G1 期最明显, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶干预组较沙利度胺干预对细胞凋亡的促进明显。差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。而沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶组较沙利度胺组、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组最明显, 由此我们得出结论, 随着药物的联合作用, 沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶能够有效抑制肝癌细胞的增殖, 且细胞生长也停滞在 G1 期, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

4.3 沙利度胺、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞凋亡因子 Caspase-3 的影响

细胞凋亡是人体一种依赖信号传递的细胞自主程序性死亡, 许多生物、化学、物理因素都可诱发细胞凋亡, 如药物缺血、缺氧、毒素、射线、病毒感染等。在维持人体内环境稳态等生理过程细胞凋亡起着重要的作用。目前, 对细胞凋亡机制尚未完全清楚, 但可以明确的是机体在控制细胞凋亡的发生、发展这一复杂过程中, 酶对每一阶段都有着至关重要得作用。近年来, 研究显示, 肿瘤的发生不仅与抑癌基因的突变或者缺失以及癌基因的激活有关, 还可能与细胞凋亡以及增殖失衡有关, 因此, 肿瘤研究细胞凋亡在肿瘤的治疗过程中的逐渐被人们所重视。由于化学致癌物或病毒的作用使原癌基因激活成癌基因, 同时抗癌基因失活, 引起细胞的生长失控, 而形成恶性肿瘤。

Caspase 家族则属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶, 其典型的特点为天门

冬氨酸的残基肽键被其特异断开^[31]，参与肝癌细胞发生异常细胞调亡的病理过程，Caspase-3 是其家族成员中研究最多、功能相对明确，有着极其重要的地位，处于细胞调亡的公共通路上，是执行细胞调亡的关键因素。正常情况下，Caspase-3 则存在细胞质中，且以无活性酶原的形式存在，在细胞外出现刺激，诱导调亡产生信号时，才能够被激活成有活性的 Caspase-3，有活性的 Caspase-3 则可引起细胞构架的关键蛋白酶失活，导致细胞核、细胞质的结构发生变化，最终细胞调亡。提高恶性肿瘤细胞的调亡可以延缓恶性肿瘤的进展，进而改善肿瘤患者预后，故如何提高恶性肿瘤细胞调亡将成为恶性肿瘤研究的新方向^[32]。有^[33]研究发现甘氨酸鹅脱氧胆酸钠可明显诱导 SMMC7721 人肝癌细胞产生调亡，Caspase-3 和 Caspase-9 参与 GCDCA 诱导 SMMC7721 人肝癌细胞调亡的调控。还有学者^[34]研究 5-Fu 诱导 HepG2 人肝癌的细胞调亡中，发现 caspase-8 能够介导 caspase-3 的活化。5-Fu 通过 Caspase 级联反应诱导 HepG2 人肝癌细胞发生调亡，阻断此反应能抑制细胞调亡，诸多研究结果均支持上述观点。近来，人们发现 Caspase-3 蛋白酶在调亡信号传导中起着核心的作用，是细胞调亡的执行人，是 Fernander-Alnemri 等^[35]从 T 型淋巴细胞文库中筛选得到的，广泛分布于各类型细胞中。正常情况下，在细胞内是以无活性的 procaspase-3 存在着，当细胞调亡时转变成有活性的 Caspase-3，换句话说，Caspase-3 是细胞调亡蛋白酶级联反应的必经之路^[36]。

Western Blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品，转移到固相载体上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。因此，我们采用 Western Blot 法从蛋白水平的表达检测沙利度胺联合 OXA 以及 5-FU 对 HepG2 人肝癌细胞调亡因子 Caspase-3 蛋白表达的差异，实验结果显示，以空白对照组相比较，沙利度胺组、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组、沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶组 Caspase-3 蛋白表达均升高，且沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶组的 Caspase-3 蛋白表达增加最明显。

4.4 沙利度胺、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞血管内皮生长因子 VEGF 的影响

VEGF 在化实验室检查中在肿瘤组织内外都被大量发现, 血管内皮生长因子的特异性抗体能明显抑制肿瘤细胞生长, 与癌组织内的血管密度以及转移存在着相关性。VEGF 的信号转导通路活化, 对血管内皮细胞的增殖、迁移、水解基膜以及构建血管的调控作用均较强, 进而促进肿瘤血管的形成, 对大多数肿瘤特别是肝癌的浸润、生长、转移、治疗及预后有重要作用^[37]。有^[38]研究发现 siR-VEGF 能有效干扰 HepG2 肝癌细胞 VEGF 表达、降低微血管的密度以及减少肿瘤形成。VEGF 的表达与血管的复发、侵袭、转移、分化、血管密度、肿瘤的分期以及预后息息相关^[39]。学者^[40]对原发性肝癌术前术后的血液和组织标本, 采用免疫组织和 ELISA 法测定 VEGF 的表达, 结果发现血液中 VEGF 的表达高于正常对照组, 且复发组高于未复发组。细胞质中复发组也高于未复发组。1-3 年的生存率显示 VEGF(-) 比 VEGF(+) 的高。还有学者等^[36]报道, 应用 VEGF 结合 AFP, 诊断原发性肝癌的准确度、特异度及灵敏度均升高。

有学者^[41]研究沙利度胺联合使用洛伐他汀, 短期内培养多发性骨髓瘤患者的浆细胞, 检测了不同药物对 CD138+ 阳性的浆细胞株 VEGF 蛋白以及 Caspase-3 蛋白的调控作用, 发现 BCL-2/Caspase-3 的比率在联合用药组较单用沙利度胺或洛伐他汀均低, 显示沙利度胺、洛伐他汀对诱导骨髓瘤患者浆细胞凋亡具有协同作用。还有学者^[42]应用低剂量沙利度胺作用成人 T 型细胞白血病细胞, 发现沙利度胺能诱导成人 T 型白血病细胞的死亡是通过凋亡作用, 同时发现低剂量的沙利度胺作用于 T 型白血病细胞后, Caspase-3 活性迅速增加。

因此, 我们同样采用 Western Blot 法从蛋白水平的表达检测沙利度胺联合 OXA 以及 5-FU 对 HepG2 人肝癌细胞凋亡因子 VEGF 蛋白表达的差异, 实验结果显示, 以空白对照组相比较, 沙利度胺组、奥沙利铂联合 5-氟尿嘧啶组 VEGF 蛋白表达均降低, 且沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶组的 VEGF 蛋白表达降低最明显。

在本实验中我们发现, 沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶三药干预 HepG2 细胞后, Caspase-3 活性显著增加、VEGF 活性显著降低, 因此我们认为 Caspase-3、VEGF 作为凋亡过程中重要的执行因子。

因此, 我们得出结论, 沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶, 有效提高

了对 HepG2 细胞增殖的抑制作用，且细胞生长停滞在 G1 期，其细胞凋亡的机制可能是通过下调 VEGF 蛋白的表达，以激活 Caspase-3 分泌，从而诱导 HepG2 细胞凋亡。本实验研究揭示了沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶新方案的抗凋亡作用以及机制，同时为临床治疗肝癌化疗方案提供了新的线索。

结 论

1. 沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶有效提高了对 HepG2 细胞增殖的抑制作用。
2. 沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶阻滞 HepG2 细胞生长停滞在 G1 期。
3. 沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶可上调 HepG2 细胞中凋亡因子 Caspase-3 的分泌，从而促进细胞凋亡
4. 沙利度胺联合奥沙利铂以及 5-氟尿嘧啶可下调 HepG2 细胞中血管内皮生长因子 VEGF 的分泌，从而促进细胞凋亡

参考文献

- [1] Vasvari GP, Dyckhoff G, Kashfi F, et al Combination of thalidomide and cisplatin in a head and neck squameua cell carcinomas model results in an enhanced antiangiogenic activity in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, 2007, 121: 1697- 1704.
- [2] 蔡海鸥,张伟明,陆廷仁.全膝关节置换术后肌力训练对膝关节功能的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29(3):178-180.
- [3] Marriot JB, Malka D, Ducreux M. Therapeutic strategies using VEGF inhibitors in colorectal cancer. *Bull Cancer*, 2005, 92 (9) : 529- 536.
- [4] Gramont V, Celiker U, Turkcuoglu P, et al The effect of thalidomide on vascular endothelial growth factor and tumor necros is factor-a-lpha levels in retin alisch emia/ reperfusion injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008, 246(3):363- 368.
- [5] Worland RL, Johnson GV, Alemparte J, et al. Ten to fourteen year survival and functional analysis of the AGG total knee replacement system. *Knee*, 2002, 9(2):133- 137.
- [6] Dmoszynska A, Podhorecka M, Manko J, et al The influence of thalidom ide therapy on cytok ine secret ion, immunoph enotype, BCL- 2 express ion and microvessel density in patients with resistantor relapsed multiplem yeloma. *Neoplasnsa*, 2005, 52: 175-181.
- [7] 侯来勇,王廉,谢欲晓,等.全膝关节置换术后个性化系统化康复的疗效观察. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(8):707-710
- [8] Fernander-Alnemri T, Litwack G, Alnemrt ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced -3 and mammalian interleuki-1 beta converting enzyme. *J Biol Chem*, 1994, 269(49):30761- 30764
- [9] Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell deaths . *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14(6):727-733
- [10] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(3):162-174.
- [11] Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as Worst-line treatment in advanced colorectal cancer. *Clin*

Oncol, 2000,18(6):2938-2947.

[12]Kouroussis C, Souglakos J, Kakolyris S, et al. Oxaliplatin in combination with infusional 5-fluorouracil and leucovorin every 2 weeks as first-line treatment in patients with advanced colorectal cancer: a phase II study. *Oneology*,2001,61(1):36-41.

[13]Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*, 2008,37(1):1007-1016.

[14]Mitry E, Fields ALA, Bleiberg H, et al. Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *Clin Oncol*,2008,26:4906-4911.

[15]Chugh R,Tawbi H, Lucas DR, et al.Chordomathe nonsarcoma primary bone tumor. *Oncologist*,2007,12(3):1344-1351

[16] 邹移海,徐志伟,黄韧,等,实验动物学.(第2版).北京:科技出版社,2012,16(3):124-127

[17]赵福友,王子安,郑荣生.沙利度胺联合化疗治疗晚期胃癌的随机对照研究. *中华全科医学*,2010,8 (9): 1089-1090

[18]Madhu M,Alex S, Lawrence H,et al. A statistical simulation study finds discordance between WHO criteria and RECIST guideline. *Journal of Clinical Epidemiology*, 2004,57(6):358-365

[29]Julian PT,Sally G. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version. *The Cochrane Collaboration*, 2011,63(11):165-171

[20]王颖,王家陇. 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.

[21]Sturm I, Rau B, Schlag PM, et al. Genetic dissection of apoptosis and cycle control in response of colorectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. *B-MC Cancer*, 2006, 10(6): 154-160

[22] Raft M. Cell suicide for beginners. *Nature*, 1998, 396(7):119-122.

[23] Madhu Mazumdara? Alex Smith, Lawrence H. Schwartz. A statistical simulation study finds discordance between WHO criteria and RECIST guideline.

Journal of Clinical Epidemiology, 2004,57:358-365

[24]Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. N Engl J Med, 2004, 350(2): 2343-2351.

[25]Buie WD, MacLean AR, Attard JA, et al. Neoadjuvant excision of rectal cancer. Dis Colon Rectum, 2005, 48(10): 1868-1874.

[26]Li FZ. Survivin study: what is the next wave? Cell physiol, 2003, 1997(1): 8-29.

[27]Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer intervention. J Cell Mol Med, 2005, 9(2): 360-372.

[28] Ychou M, Hohenberger W, Thezenas S, et al. A randomized phase III study comparing adjuvant 5-fluorouracil/folinic acid with FOLFIRI in patients following complete resection of liver metastases from colorectal cancer. Ann Oncol, 2009, 20(16): 1964-1970.

[29]Raft M. Cell suicide for beginners. Nature, 1998, 396(7):119-122.

[30]Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of survivin in colorectal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. Int J Cancer, 2001, 95(2): 92-95.

[31]王颖, 王家陇. 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.

[32]Dmoszynska A, Rau B, Schlag PM, et al. Genetic dissection of apoptosis and cycle control in response of colorectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. B-MC Cancer, 2006, 10(6): 124.-127

[33]Chau I, Chan S, Cunningham D. Overview of preoperative and postoperative therapy for colorectal cancer: the European and United States perspectives. Clin Colorectal Cancer, 2003, 3 (1) : 19-33.

[34]Liu HF, Hu HC, Chao JI. Oxaliplatin down-regulates survivin by p38 MAP kinase and proteasome in human colon cancer cells. Chem Biol Interact, 2010, 188(3): 535-45.

[35]Fernander-Alnemri. Neoadjuvant therapy. Ann Surg, 1999, 229 (3) :309-312-315.[36]Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011, 61(22):69-90.

- [37] Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, et al. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2010,11(5): 38-47.
- [38] Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based firstline combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*,2011, 377(11): 2103-2114.
- [39] Garufi C, Torsello A, Tumulo S, et al. POCHER (preoperative chemotherapy for hepatic resection) study with cetuximab (Cmab) plus CPT-11/5-fluorouracil (5-FU)/ leucovorin (FA)/oxaliplatin (L-OHP) (CPT-11-FFL) in unresectable colorectal liver metastases(CLM).*Clin Oncol*,2009,27(6): 156-160.
- [40] Bokemeyer C, Kohne C, Rougier P, et al. Cetuximab with chemotherapy (CT) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of the CRYSTAL and OPUS studies according to KRAS and BRAF mutation status. *Clin Oncol*,2010, 28(12): 35-40.
- [41] Pozzo C, Basso M, Cassano A, et al. Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. *Ann Oncol*,2004,15(11): 933-939.
- [42] Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as firstline treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Clin Oncol*,2007, 25(14): 1670-1676.

综 述

血管内皮生长因子在恶性肿瘤中的最新研究进展

摘 要

肿瘤是指机体在各种致癌因素作用下,局部组织的细胞异常增生而形成的结节。良性肿瘤对器官、组织只有挤压和阻塞作用,但恶性肿瘤还可以破坏组织、器官的结构和功能,患者最终可能由于器官功能衰竭而死亡,严重威胁人类健康,且呈现增加趋势。很多肿瘤患者已经转移不适合手术切除,因此内科治疗越来越受到人们的重视。分子靶向治疗是指首先确定一些致癌基因或蛋白,根据这些治疗靶点设计治疗药物,药物特异性的与之结合,发挥作用。这种治疗方法在一些肿瘤中已经起到了重要的作用,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)即是分子治疗的一个重要靶点,学者对血管内皮生长因子进行了一系列的研究,本文将对近年来的研究进展作一综述。

关键词: 内皮生长因子; 恶性肿瘤; 研究进展

1 VEGF 家族及生物学特性

VEGF 家族是一种与血管生成密切相关的细胞因子^[1],1989 年 Ferrarra^[2]在牛垂体滤泡星状细胞培养液中分离并纯化出来,其化学本质是一类糖蛋白,分子量为 34~45KD,序列具有高度保守性,其家族成员主要有 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F 和胎盘生长因子(placenta growth factor,PIGF),前四种家族成员均与组织中血管及淋巴管的生成相关。人类 VEGF-A 基因位于染色体 6p21,全长 28kb,其编码区由 8 个外显子和 7 个内含子组成^[3~4]。VEGF-B 基因位于染色体 11q13,全长 4kb,由 7 个外显子和 6 个内含子组成。VEGF-C 位于染色体 4q34,广泛存在于人类的胚胎及成熟的组织中,VEGF-C 可能与肿瘤转移的关系更密切,因其可以诱导淋巴管增生、调节淋巴管内皮细胞,众所周知,肿瘤大多都是通过淋巴管转移的。VEGF-D 位于染色体 Xp22.31,全长 50kb,由 7 个外显子和 6 个内含子组成。研究发现,VEGF-D 存在于骨骼肌、结肠和小腺体中^[5]。PLGF 基因位于人染色体 2p16-21,

编码产物 46- 50kD 的同源二聚体糖蛋白。在胚胎组织及正常组织和肿瘤组织中均有表达。

2 VEGF 的功能

2.1 促进血管内皮细胞增殖和新生血管的形成

血管生成在肿瘤生长及转移过程中起着十分重要的作用，其意义越来越受到学者的重视。近年来，随着对肿瘤侵袭及转移的深入研究，血管生成成为肿瘤研究的热点之一，为肿瘤治疗开辟了一个新的思路。研究表明，在正常组织及早期肿瘤组织中，细胞的生长依赖于内环境中组织液渗透，随着肿瘤的体积增大，需要越来越多的营养成分来维持生存，周围正常的细胞外液已经无法满足其需要，肿瘤组织即出现缺氧现象，进一步促进血管生长因子的表达增加。VEGF 作用于细胞后，通过改变细胞骨架，进而改变细胞形态，激活内皮细胞。VEGF^[6]同时可诱导内皮细胞基因表达尿激酶，组织型纤维蛋白溶酶原激活剂，纤维蛋白溶酶原激活剂的抑制剂，尿激酶抑制剂，金属基质蛋白酶，谷氨酰胺葡萄糖载体，氮氧合酶，整合素，和多种分裂素，其中的组织型纤维蛋白溶酶原激活剂可以促使血浆蛋白渗透到血管外区域，形成血浆蛋白凝块，而这种物质可以作为血管新生的支持物，研究证明^[7]，三羟黄酮在活体内可以降低肿瘤组织 HIF-1 和 VEGF 的表达，从而抑制肿瘤血管的发生，同时，研究表明，HIF-1 可促进 VEGF 的表达，两者协同作用促进肿瘤血管的发生。

2.2 增强血管的通透性

组胺是较强的血管活性物质，VEGF 对小血管的作用远远强于组胺。VEGF 可以使血浆蛋白外渗到血管外细胞基质中，在细胞外基质中沉着，不仅改变了细胞生长的内环境，而且可以作为血管新生的支持物，使成纤维细胞及血管内皮细胞以此为基础基质迁入并生长^[8]，促进了血管的生成，为肿瘤细胞的生长和新生毛细血管网的建立提供营养。周强^[9]等通过免疫组化法分析了胃癌组织中 VEGF 的表达与肿瘤血管生成的关系，证明 VEGF 阳性表达的肿瘤组织微血管密度（MVD）值高于 VEGF 阴性表达的 MVD 值，且与肿瘤大小和临床分期有关，提示 VEGF 及微血管生成在胃癌的侵袭和转移中的作用。

2.3 促进肿瘤淋巴管形成

淋巴结转移是很多上皮源性恶性肿瘤最主要的转移途径，也是影响患者预后的重要因素之一。研究表明，VEGF-C 与淋巴管的关系较为密切，主要表现在：诱导淋巴管增生，有效调节淋巴内皮细胞。赵群等^[10]通过实时荧光定量

PCR 检测早期宫颈癌及前哨淋巴结 VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 表达, 结果证实 VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 在宫颈癌内、癌周、前哨转移淋巴结中的表达均显著高于正常宫颈组织和非前哨无转移淋巴结 ($P<0.05$), 且与淋巴结转移、淋巴管侵犯、肿瘤浸润深度有关。VEGF-C 和 VEGF-D 共同作用于 VEGFR-3 (Flt4) 受体^[11], 使 VEGFR-3 (Flt4) 磷酸化, 继而激活多条细胞内信号转导途径, 促使淋巴管内皮细胞增殖、分化、迁移, 最终促进淋巴管的生成。

3 VEGF 与恶性肿瘤

3.1 VEGF 在大肠癌中的表达

杨诚等^[12]评估了 45 例大肠癌组织中 VEGF-C、VEGF-D 及 Flt-4 的表达与大肠癌生物学特性及预后的关系, 提示 VEGF-C/-D-Flt-4 信号转导途径各环节在大肠癌组织中均有过度表达, 而其共同的过度表达与大肠癌淋巴结转移等生物学特性的高度相关说明三种因素在肿瘤组织淋巴管的发生及促进肿瘤淋巴道转移方面可能均有较为重要的作用。本组结果显示: VEGF-C、VEGF-D、Flt-4 在有淋巴管浸润和无淋巴管浸润组中阳性表达率的差异有显著性意义, 有无淋巴结转移组差别有极显著性意义, 提示 VEGF-C、VEGF-D 与其受体 Flt-4 的结合激活相关信号传导途径, 诱导和促进肿瘤组织中淋巴管生成, 在此基础上促进大肠癌淋巴转移的发生。Hanrahan^[13] 等对大肠癌和正常大肠粘膜的研究发现: 几种 VEGF 在大肠癌都有表达, 其中 VEGF-C 和 VEGF-D 较正常组织显著增高, 推测 VEGF-C、VEGF-D 在癌前病变及进展期大肠癌的转移中起重要作用。

3.2 VEGF 在胃癌中的表达

在肿瘤的转移过程中, 肿瘤细胞及被肿瘤浸润的肥大细胞和巨噬细胞能分泌高水平的 VEGF, 以旁分泌的形式刺激肿瘤相关血管内皮细胞, 促进其增殖和迁移, 诱导肿瘤血管形成, 有利于肿瘤转移^[14], 陈义钢等在含有 282 例胃癌标本的组织芯片上, 利用免疫组织化学检测 MIM 和 VEGF 的表达, 结果显示, VEGF 和胃癌组织的分化程度有关, 提示 VEGF 在胃癌的发生、发展和转移中起着重要的作用, VEGF 在胃癌组织高表达可能与肿瘤的复发、预后不良等相关。^[15] VEGF 在胃癌、异型增生、肠化生的阳性表达率均高于正常胃黏膜组织^[16], VEGF 在胃癌与肠化生组织的阳性表达率差异有统计学意义, 但 VEGF 在肠化生、异型增生组织之间均无差异, 表明 VEGF 在胃癌的整个发生、发展

过程中都起一定的作用，而且在胃癌的早期癌前病变中就已有改变。因此，开展以 VEGF 为靶点的基因治疗、针对 VEGF 的靶向药物等为临床治疗胃癌开辟了新思路。

3.3 VEGF 在宫颈癌中的表达

冯珊珊^[17]采用 ELISA 法检测 13 例正常对照、18 例宫颈上皮内瘤变 CINII/III、31 例无淋巴结转移宫颈癌患者、10 例淋巴结转移宫颈癌患者血清中 VEGF-C 的表达并比较各组间差异性，结果显示，宫颈癌组无淋巴结转移者血清 VEGF-C 水平高于正常宫颈组及 CIN 组，有淋巴结转移者血清 VEGF-C 水平高于宫颈癌组无淋巴结转移组，浸润深度 $\leq 1/2$ 宫颈癌患者血清中 VEGF-C 的表达较浸润深度 $> 1/2$ 的患者表达较低，提示宫颈癌患者血清 VEGF - C 水平升高可能与宫颈癌淋巴结转移有关，宫颈癌患者血清 VEGF-C 水平变化有可能成为宫颈癌早期诊断指标之一。

3.4 VEGF 在肝癌中的表达

免疫组织化学 EnVisionTM 法检测 108 例人肝细胞肝癌及相应的癌旁肝组织标本中 HDGF、VEGF 和 CD34 的检测^[18]，VEGF 在肝细胞癌中的表达水平明显高于癌旁肝组织，两者间有显著性差异，且 VEGF 的表达与 MVD 相关，提示 VEGF 能促进肝细胞癌的增殖和血管生成，促进肿瘤细胞的侵袭和转移。

小 结

VEGF 与肿瘤组织中血管的生成密切相关，因此在各种恶性肿瘤中均具有重要意义。了解 VEGFR 在恶性肿瘤中的作用途径及信号传导途径，进而针对其进行干扰，可以有效的抑制肿瘤血管及淋巴管的生成，抑制肿瘤的侵袭和转移，延长肿瘤患者的生存期。在肿瘤的基因治疗中受到越来越多的关注，但目前还有许多问题尚未解决，作用机制仍然不十分清楚，VEGF 及其家族成员仍将是肿瘤学科的研究热点。希望通过研究 VEGF 的作用机制可以为临床治疗提供参考，为肿瘤的基因治疗提供重要依据。

参考文献

- [1] Ana TC, Heitor S, Antonio JC, et al. Therapeutic and prophylactic thalidomide in TNBS-induced colitis: Synergistic effects on TNF- α , IL-12 and VEGF production. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(15): 2166-2173
- [2] Ferrar N, Henzel W J. Pituitary follicular cell secrete a novel heparin binding growth factors specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161(2) : 851
- [3] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB*, 1999, 13: 9-22
- [4] Yla-herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet*, 2000, 355: 213-222
- [5] Eichmann A, Corbel C, Jaffredo T, et al. A human VEGF-C cloning and embryonic expression pattern and stimulation of the differentiation of VEGFR-expressing endothelial cell precursors. *Development*, 1998, 125(11): 743-752.
- [6] Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Kagiya M, Kikuchi K, VEGF, basic-FGF, and TGF- β in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(15): 822-828
- [7] Fang J, Zhou Q, Liu LZ, et al. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression. *Carcinogenesis*, 2007, 28(19): 858-864.
- [14] Khatri VP, Chee KG, Petrelli NJ. Modern multimodality approach to hepatic colorectal metastases: solutions and controversies. *Surg Oncol*, 2007, 16(11): 71-83.
- [9] Goebel S, Huang M, Davis WWC, et al. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(18): G648-G654
- [10] Bao-He Z, Wen-Hua Z, Zheng-Rong Li, Zhao W, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of gastric cancer by reducing VEGF production and angiogenesis. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(8): 1162-1169
- [11] Lohela M, Saaristo A, Veikkola T, et al. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost*, 2003, 90(2): 167-184.
- [12] Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, et al. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J Nutr* 2002, 132(10): 2307-2311

- [13] Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A、VEGF-B、VEGF-C and VEGF-D in the adenoma- carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *Pathol*, 2003, 200(2): 183-194.
- [14] Claudia R, Gergios S, Michel OS, et al. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 18(11): 3202- 3206.
- [15] Xiong ZF, Li S. Expression and significance of COX- 2, VEGF and MMP- 9 in human gastric carcinoma. *China Journal of Modern Medicine*, 2008, 9(6): 2015-2021.
- [16] Masuda M, Suzui M, Lim JT, et al. Epigallocatechin-3-gallate decrease VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J Exp Ther Oncol* 2002, 2(1): 350-359
- [17] Yang CS, Lambert JD, Hou Z, et al. Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols. *Mol Carcinog*, 2006, 45(14): 432-435
- [18] Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(9): 17-20

致 谢

首先，衷心感谢我的导师李青山教授，李青山渊博的专业知识、严谨的治学态度，精益求精的工作作风以及高尚的人格魅力深深地感染和激励着我，将使我受益终生。三年来李老师在学习、生活、科研等诸多方面都给予了我无微不至的关怀和支持，他不但培养了我从事临床、科研的综合能力，还教会了我为人处事的道理。在此向李老师致以崇高的敬意和深深的感谢！

李老师在整個实验中倾注了大量心血，在课题设计、实验指导、数据统计、论文撰写等方面都给予了我悉心指导，使我的实验得以顺利完成。在整个实验过程中，李老师不仅教会了我实验技能，还培养了我的科研思维、锻炼了我的科研能力。李老师一丝不苟、坚持不懈的科研态度，更是令我钦佩不已，是我终身学习的榜样。

衷心感谢承德医学院附属医院肿瘤科李青山教授及全体医护人员，在课题完成及临床实践中给予的悉心指导与帮助。

衷心感谢承德医学院研究生部乔跃兵老师、李德臣老师、张晓英老师及其他老师在三年学习中给予的亲切关怀和帮助。

衷心感谢承德医学院附属医院中心实验室孙立新教授，感谢邢恩鸿、杨宁等老师，在实验过程中给予的悉心指导与帮助。正是在他们的帮助下，我的实验得以顺利进行。

衷心感谢承德医学院附属医院科研处各位老师，在课题完成及临床实践中给予的支持和指导。

衷心感谢我的家人，是他们的支持与鼓励一直鞭策着我不断前进！

在此，衷心向所有支持、帮助过我的各位老师和同学们致以最真诚的感谢。

个人简历

一、个人基本情况

姓名	孙媛	性别	女	民族	满族
出生日期	1987 年 1 月 1 日	籍贯	河北省承德市		

二、个人经历

2006 年 9 月～2009 年 7 月	承德医学院	大专
2010 年 9 月～2012 年 4 月	承德市中医院	工作
2012 年 9 月～2015 年 7 月	承德医学院肿瘤学	硕士研究生

三、论文发表情况

《FOLF0X 方案联合沙利度胺体外抑制人肝癌 HepG2 细胞 VEGF、Caspase-3 基因表达的研究》中国煤炭医学工业杂志，2015 年 2 月第 18 卷第 2 期

四、承担或主研课题情况

沙利度胺联合奥沙利铂及 5-氟尿嘧啶诱导人肝癌细胞 HepG2 的凋亡及机制研究