

学校编码：10384

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学号：24520141153579

DUC \_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

参苓白术散对 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤化疗模型小鼠  
协同促凋亡作用研究

The combination effects of Shen-Ling-Bai-Zhu on promoting  
apoptosis of transplanted H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma in  
mice receiving chemotherapy

彭 樱

指导教师姓名：奚胜艳 副教授

专业名称：中医内科学

论文提交日期：2017 年 4 月

论文答辩时间：2017 年 5 月

学位授予日期：2017 年 6 月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2017 年 5 月

参苓白术散对H<sub>22</sub>肝癌移植瘤化疗模型小鼠协同促凋亡作用研究

彭樱

指导教师

奚胜艳

副教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人提交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为奚胜艳课题组的研究成果,获得奚胜艳课题组经费或实验室的资助,在“厦门市中医湿病与神经免疫重点实验室”完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人(签名)：

年 月 日

## 摘要

背景：肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC, 简称肝癌)是我国常见恶性肿瘤之一，具有恶性程度高、生存时间较短、易转移复发、预后差等特点，死亡率在全世界所有肿瘤中高居第3位。我国肝癌高发，在肿瘤相关死亡中仅次于肺癌，居第2位。目前化疗(chemotherapy)是肿瘤治疗的常用手段，但同时易引起肝肾功能异常，导致骨髓抑制、消化道损伤，出现白细胞减少、恶心呕吐、食欲不振、腹痛腹泻、便秘等不良反应。西医尚缺乏具有良好疗效缓解化疗毒副作用的西药；中医临床诊疗实践发现，复方中药能够减轻患者化疗的毒副作用，具有增效减毒作用。大量临床观察证实健脾益气中药复方参苓白术散能改善肝癌患者化疗后的不适症状、提高其生存质量，但机理未完全阐明，深入探讨其作用机制可以为肝癌的临床用药提供科学依据。

目的：研究参苓白术散(Shen-Ling-Bai-Zhu Powder, SLBZP)单用或联合环磷酰胺(Cytosan, CTX)对H<sub>22</sub>肝癌移植瘤化疗后小鼠肿瘤细胞凋亡直接或间接相关因子的影响。

研究方法：SPF(Specific pathogen-free)级昆明小鼠64只，4周龄，18-22g，将肝癌H<sub>22</sub>细胞悬液调整至 $2 \times 10^7/\text{mL}$ ，接种于小鼠右前腋皮下，长出肉眼可见肿瘤后，以200mg/kg CTX一次性腹腔注射，建立肿瘤化疗模型。随机分组为8组：模型组、CTX(20mg/kg)组、SLBZP高中低(6.00g/kg、3.00g/kg、1.50g/kg)剂量组、SLBZP高中低剂量+CTX(20mg/kg)组，每组8只，均自由食水，除模型组和化疗组每天以生理盐水灌注干预外，其余各组每天分别给予相应浓度SLBZP灌胃，SLBZP高中低剂量+CTX组及CTX组每两天腹腔灌注一次CTX，模型组和SLBZP高中低剂量组每两天腹腔灌注一次生理盐水。期间观察小鼠的生存状态及肿瘤生长情况，连续给药14天，禁食禁水24h后，取样本。据瘤体长短径，计算瘤体体积；称取瘤重，计算抑瘤率；光镜及透射电镜观察肿瘤组织病理及肿瘤细胞超微结构改变情况；运用酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测血清及瘤组织中肿瘤细胞凋亡相关因子血小板源性生长因子-BB(Platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素-1(Angiogenin-1, Ang-1)、血管生成素-2(Angiogenin-2, Ang-2)蛋白含量；运用蛋白印迹法(Western

blotting, WB) 检测肿瘤细胞凋亡直接或间接相关蛋白含半胱氨酸天冬水解酶-3 (CysteinyI aspartate-specific proteinase-3, Caspase-3)、含半胱氨酸天冬水解酶-7 (CysteinyI aspartate-specific proteinase-7, Caspase-7)、含半胱氨酸天冬水解酶-9 (CysteinyI aspartate-specific proteinase-9, Caspase-9)、核转录因子-KB (Nuclear Factor kappa B, NF-KB)、蛋白激酶 B (Akt) 及磷酸化蛋白激酶 B (pAkt) 等的表达水平; 运用实时荧光定量-聚合酶链式反应 (Realtime fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 法检测肿瘤组织中细胞凋亡相关因子 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9、NF-KB、B 淋巴细胞瘤 -2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 及 B 淋巴细胞瘤 -XL (B-cell lymphoma-extra large, Bcl-XL) 基因表达情况。

结果:

1. SLBZP 联合 CTX 对 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤化疗模型小鼠存在抑瘤作用。SLBZP 高剂量+CTX 组和 SLBZP 中剂量+CTX 组肿瘤体积大小较模型组瘤体明显偏小。SLBZP 高剂量组、SLBZP 高剂量+CTX 组及 SLBZP 中剂量+CTX 组、单一 CTX 组抑瘤率分别为 45.84%、58.41%、52.77%、52.39%。

2. 通过肿瘤组织病理形态学观察, SLBZP 高中低剂量+CTX 组及 SLBZP 高中低剂量组病理切片显示肿瘤组织恶性度较模型组低, 肿瘤细胞分布密度降低; 超微病理亦发现 SLBZP 联合化疗治疗后肿瘤细胞凋亡明显增多。

3. 经 ELISA 检测, SLBZP+CTX 联合治疗组及单一 SLBZP 组血清及肿瘤组织中 PDGF-BB、VEGF、Ang-1、Ang-2 含量降低; 经蛋白印迹及 PCR 检测, SLBZP+CTX 联合治疗组肿瘤组织中 NF-KB、Akt 及 pAkt 蛋白表达和 Bcl-2 及 Bcl-XL 基因表达较单一化疗组呈现出被下调的趋势; 肿瘤组织中 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 表达较单一化疗组增加。且以 SLBZP 高剂量+CTX 组上述作用最为显著。

结论: SLBZP 联合化疗较单用 SLBZP 或 CTX 更能有效减缓 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤化疗模型小鼠肿瘤的生长, 能够协同促进瘤细胞的凋亡, 其机制可能与调节肿瘤凋亡的促进或抑制因子的表达有关。

**关键词:** 参苓白术散; 化疗; 肝癌; 细胞凋亡

## Abstract

**Background:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the common malignant tumors in China, with a high degree of malignancy, short survival time, easy recurrence and poor prognosis. Hepatocellular carcinoma is currently the 3rd leading cause of cancer death in the world. While the mortality of hepatic carcinoma ranks second, just next to lung cancer, in China. At present, chemotherapy as an important method for the treatment of liver cancer is easy to cause adverse reactions such as leukopenia, abnormal liver function, nausea and vomiting, loss of appetite, diarrhea, constipation and abdominal pain. And Chinese medicine can reduce the side effects of chemotherapy in patients, with increased treatment effects and reduce toxicity. It has been found that, Shen-Ling-Bai-Zhu Powder can relieve unwell symptoms and improve quality of life, in patients with hepatocellular carcinoma receiving chemotherapy. However, the related mechanism is still incompletely clear, and further study on the mechanism is necessary.

**Aim:** To investigate the effects of SLBZP alone and in combination with Cytosin (CTX) on tumor growth, malignant cell apoptosis and Akt/Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling in a murine chemotherapeutic model of hepatocellular carcinoma (HCC).

**Methods:** Sixty-four Kunming mice were subcutaneously injected with suspension of H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma cells ( $2 \times 10^7$ /mL) into the right anterior armpit. All mice were received intraperitoneal injection with cytosin (CTX, 200mg/kg) to establish the chemotherapeutic animal model of HCC. Mice were then randomized into eight study groups. One was treated with CTX (20mg/kg) alone (positive control), one with physiologic saline (untreated, negative control), three with SLBZP (6.00, 3.00, 1.50 g/kg), and three with SLBZP (6.00, 3.00, 1.50g/kg) plus CTX (0.02g/kg). Mice were allowed free access to food and water. The SLBZP (H), SLBZP (M) and SLBZP (L) treated groups received their treatments by intragastric administration of SLBZP aqueous solution once a day. The three combined treatment groups were treated with SLBZP as described above, plus intraperitoneal injections of CTX every 2 days. The CTX alone treated group was treated

with CTX every 2 days. Finally, the untreated negative control group was injected with 0.2 mL/10g Sodium Chloride Physiological Solution as per the CTX alone group. All groups were treated for 14 days. Tumor size, histology and serum or tissue levels and/or mRNA expression of PDGF-BB, VEGF, Ang-1, Ang-2, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-9, NF-KB, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL), Akt and phosphorylated Akt expression were documented at the end of treatment.

Results: Tumor inhibitory ratios in CTX alone, SLBZP (H), SLBZP (H) plus CTX, and SLBZP (M) plus CTX were 52.39%, 45.84%, 58.41% and 52.77%, respectively. Tumor cell density was decreased in all treated groups but most apparent in the SLBZP (H) plus CTX group. Electron microscopic evidence of apoptosis was also most apparent in this group. Compared to untreated negative controls, the protein expression of PDGF-BB, VEGF, Ang-1, Ang-2, NF-KB, and XIAP were obviously lower in all treated groups. And the the protein expression of Caspase-3, Caspase-7 and Caspase-9 in all treated groups were obviously higher than those in negative controls. But their downstream signaling proteins and anti-apoptotic markers were lowest and pro-apoptotic markers highest in SLBZP (H) plus CTX treated mice.

Conclusion: In this chemotherapeutic animal model of HCC, SLBZP was most efficacious as adjunctive therapy and appears to act by inhibiting tumor growth promoters and anti-apoptotic proteins while enhancing pro-apoptotic proteins.

**Keywords:** Shen-Ling-Bai-Zhu Powder (SLBZP); Chemotherapy; Hepatocellular carcinoma; Apoptosis



目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
目 录.....	V
Contents.....	VI
英文缩略词表.....	VII
第一章 前 言.....	1
第二章 材料与方 法.....	3
2.1 实验材料.....	3
2.2 实验方 法.....	4
第三章 实验结果.....	11
3.1 药 效.....	11
3.2 作用机制.....	15
第四章 讨 论.....	20
4.1 中医对恶性肿瘤的认识.....	20
4.2 参苓白术散的方剂分析.....	20
4.3 参苓白术散联合化疗药治疗肝癌的优势分析.....	24
4.4 实验结果分析.....	25
结 论.....	30
展 望.....	31
参考文献.....	32
综 述.....	36
攻读硕士期间成果.....	53
致 谢.....	54

## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Contents in Chinese</b> .....	<b>V</b>
<b>Contents</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbreviation</b> .....	<b>VII</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	<b>3</b>
2.1 Experiment Materials.....	3
2.2 Experiment Methods.....	4
<b>Chapter 3 Results</b> .....	<b>11</b>
3.1 Potency.....	11
3.2 Mechanism of action.....	15
<b>Chapter 4 Discussion</b> .....	<b>20</b>
4.1 Clinical and experimental study of traditional Chinese medicine on side effects of hepatocellular carcinoma receiving chemotherapy.....	20
4.2 Analyze for composition of Shen-Ling-Bai-Zhu Powder.....	20
4.3 Analyze for advantages SLBZP combined with chemotherapy in the treatment of hepatocellular carcinoma.....	24
4.4 Analyze for experiment results.....	25
<b>Conclusion</b> .....	<b>30</b>
<b>Prospect</b> .....	<b>31</b>
<b>References</b> .....	<b>32</b>
<b>Summary</b> .....	<b>36</b>
<b>Master Achievements</b> .....	<b>53</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>54</b>

## 英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
SLBZP	Shen-Ling-Bai-Zhu Powder	参苓白术散
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor-BB	血小板源性生长因子-BB
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
Ang-1	Angiogenin-1	血管生成素-1
Ang-2	Angiogenin-2	血管生成素-2
NF-KB	Nuclear Factor kappa B	核转录因子-KB
Caspase-3	Cysteiny aspartate-specific proteinase-3	含半胱氨酸天冬水解酶-3
Caspase-7	Cysteiny aspartate-specific proteinase-7	含半胱氨酸天冬水解酶-7
Caspase-9	Cysteiny aspartate-specific proteinase-9	含半胱氨酸天冬水解酶-9
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
RTFQ-PCR	Realttime fluorescence quantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量-聚合酶链式反应
WB	Western blotting	蛋白印迹法
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色法
TEM	Transmission electron microscopy	透射电子显微镜

## 第一章 前言

在我国，肿瘤发病率和死亡率呈现出逐年上升的趋势。肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, 以下简称肝癌) 是我国常见恶性肿瘤之一，具有恶性程度高、生存时间较短、易转移复发、预后差等特点。《2015 中国肿瘤登记年报》显示，肝癌居全国恶性肿瘤发病数第 4 位，死亡数第 2 位，5 年生存率为 10.1%。随着恶性肿瘤危害日益严重，肿瘤防治工作愈加重要和迫切。

肝癌，据其临床表现可归属于传统医学中“肝积”、“臌胀”、“胁痛”、“虚劳”等疾病范畴。传统医学认为本病的发生因痰凝、血瘀、毒聚、气滞等引起，与痰、虚、瘀(郁)等相关，病机属本虚标实，治疗上宜扶正兼顾祛邪。现代医学认为，肝癌的发生与乙型和丙型肝炎病毒感染、肝硬化、酒精、黄曲霉素、亚硝胺类物质等多因素相关。西医治疗包括手术、放化疗、生物靶向治疗等。因肝癌发病的隐匿性，多数患者明确诊断时已是中晚期，丧失手术治疗的时机，治疗上以化疗(chemotherapy)为主。化疗作为肝癌治疗的常用手段，在临床上对杀灭肝癌细胞等存在一定的作用。但化疗药物的选择性差，且存在耐药性等问题，易引起肝功能异常、胃肠功能紊乱、免疫功能减退和骨髓抑制等不良后果，影响了化疗的疗程、剂量，并严重影响患者的生存质量。而中药能够减轻患者化疗的毒副反应，改善化疗耐药性的问题，具有增效减毒作用。

参苓白术散 (Shen-Ling-Bai-Zhu Powder, SLBZP) 是治疗脾虚夹湿证的代表方剂。肝癌属本虚标实之病，本虚以脾虚为主。化疗药缺乏特异性，易杀伤人体正常细胞，对机体正常组织器官造成损伤，从而引起各脏腑功能失常，尤其是影响脾胃及其气血生化能力。脾虚是肝癌发病和化疗后的重要病机。故应用参苓白术散作为肝癌治疗或辅助化疗用药，符合中医治病求本的治则。

实体肿瘤的不断增殖与其凋亡受到抑制密切相关。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序的死亡，涉及一系列基因的激活、表达以及调控等。在多种生长因子的作用下，核转录因子-KB (Nuclear Factor kappa B, NF-KB) 被活化，而 NF-KB 可减少肿瘤细胞对化疗药物的摄取，加速损伤 DNA 片段的修复，诱导多种抗凋亡基因表达，以抑制凋亡终末效应酶活性，拮抗化疗药物的促凋亡作用<sup>[1-2]</sup>。从肿瘤组织微

环境分析，肿瘤细胞在增殖过程中能释放大量的生长因子，如血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板源性生长因子 (Platelet-derived growth factor, PDGF)以及血管生成素 (Angiotensin, Angs) 等，加速肿瘤细胞的增殖，抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[3]</sup>。调节肿瘤凋亡相关因子，促进肿瘤细胞凋亡，是控制肿瘤发展的重要途径。

近年来，大多数实验研究都是针对肝癌细胞或肝癌移植瘤动物模型，探索中药单药或复方对比西药在肿瘤治疗方面的疗效及作用机理。本课题采用肝癌移植瘤化疗后动物模型，研究参苓白术散单用或与化疗药联合应用对模型动物的化疗协同作用，更切合临床实际。

本研究在前人发现健脾益气中药复方参苓白术散能改善肝癌患者化疗后症状并提高生存质量，但机理未被完全阐明的基础上，深入探讨参苓白术散联合化疗药对 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤化疗后小鼠肿瘤凋亡直接或间接相关因子的影响。实验采用 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠移植瘤化疗后模型，观察并记录小鼠的一般情况，计算肿瘤体积和抑瘤率；光镜及透射电镜下观察肿瘤组织及肿瘤细胞超微病理结构改变；分子生物学方法检测细胞凋亡相关因子含量或表达情况。从整体和分子层面，探索参苓白术散辅助化疗的作用机制，可以为中药复方在肿瘤化疗时联合应用的合理性提供新的科学依据，并为今后中药治疗肝癌及辅助化疗的中药研发开辟新的途径。

## 第二章 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验动物及细胞

SPF 级 (Specific pathogen-free) 昆明小鼠 64 只, 雌雄各半, 4-6 周龄, 体重 (20±2g), 许可证号: SCXK(沪)2012-0002 购自于上海斯莱克实验动物有限责任公司。实验动物在厦门大学实验动物中心屏障系统内 SPF 级动物房饲养, 常规喂食和饮水, 于一周后进行实验。本动物实验按照厦门大学实验动物管理与伦理委员会 (The Laboratory Animal Administration and Ethics Committee of Xiamen University) (No. XMULAC 2012-0039) 批准方案进行。接种瘤株采用移植瘤小鼠腹水传代 1 周的肝癌 H<sub>22</sub> 细胞悬液, 由厦门大学抗癌中心提供。

#### 2.1.2 实验用药

参苓白术散, 规格每盒 6g×8 袋, 国药准字 Z14020346, 批号: 20140704, 由山西华康药业股份有限公司(中国山西)生产。

环磷酰胺注射液 (CTX), 规格每安瓿 200mg, 批号: 131207, 由吉林通化茂祥医药有限公司(中国通化)生产。

0.9%氯化钠注射液, 规格每瓶 100mL, 批号: 1407312311, 由辰欣药业股份有限公司(中国山东)生产。

#### 2.1.3 主要试剂、批号、生产厂家

酶联免疫吸附试验检测试剂盒: CSB-E08925m 血小板源性生长因子-BB ELISA 试剂盒 (批号: I19018251); CSB-E04756m 血管内皮生长因子 ELISA ELISA 试剂盒 (批号: I08014457); CSB-E08529m 血管生成素-1 ELISA 试剂盒 (批号: I11015111) 以及 CSB-E04495m 血管生成素-2 ELISA 试剂盒 (批号: I12015879), 均购买自中国 Cusabio 生物科技有限公司 (武汉)。

蛋白印迹试验用抗体: BS1256 NF-KB 抗体 (批号: AA12121); BS5644 Caspase-3 抗体 (批号: CN75131); BS6544 Caspase-7 抗体 (批号: CC36121); AP0186 Caspase-9

抗体(批号: AA00111); BS1801 AKT 抗体(批号: AA22131)以及 BS4007 p-Akt 抗体(批号: CJ00101), 均购买自美国 Bioworld 生物科技有限公司(Minnesota)。

基因表达水平检测用试剂盒: 柱式 DNA 胶回收试剂盒(SK8131); SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒(SK8191)以及一步法快速感受态细胞制备试剂盒(SK9307), 均购买自上海 Sangon 生物有限公司。

### 2.1.4 主要仪器型号及生产厂家

ZS-3 板式酶标仪	(北京市新风机电技术公司)
37℃ 恒温培养箱 GNP-9270	(上海精宏实验设备有限公司)
电泳仪 DG-300C	(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)
DYCZ-24DN 型迷你双垂直电泳槽	(北京市六一仪器厂)
DYCZ-40D 型迷你转印电泳槽	(北京市六一仪器厂)
TDK-2 水平摇床	(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)
JY92-II 超声波细胞粉碎机 (上海新芝生物技术研究、宁波新芝科器研究所)	
TGL-20M 型台式高速冷冻离心机	(长沙湘仪离心机仪器有限公司)
PCR 反应扩增仪	(美国 ABI 公司)
DYY-8 型稳压稳流电泳仪	(上海琪特分析仪器有限公司)
YXJ-2 离心机	(湘仪离心机仪器有限公司)
H6-1 微型电泳槽	(上海精益有机玻璃制品仪器厂)
CX41 奥林巴斯光镜	(日本东京奥林巴斯有限公司)

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 药物制备

将参苓白术散用蒸馏水溶解, 高、中、低剂量组分别配成 0.75g/mL、1.50g/mL 与 3.00g/mL (6g/kg、3g/kg 与 1.5g/kg, 约等效于人的 20、10、5 倍剂量), 在 4℃ 冰箱中保存。以 0.9% 的氯化钠注射液稀释环磷酰胺, 调整浓度为 1.00mg/mL (相当于 20mg/kg) 以及 10mg/mL (相当于 200mg/kg)。

### 2.2.2 动物造模

无菌条件下，在超净台内，取传代 H<sub>22</sub> 肝癌腹水型小鼠的腹水，腹水呈乳白色悬液，在倒置显微镜下计数( $\times 100$ )。以台盼蓝染色计数法测定活细胞 $>95\%$ ，然后用磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, 以下简称“PBS”)稀释，配制成 H<sub>22</sub> 肝癌细胞悬液，调整浓度为  $2 \times 10^7$  个/mL；按每只 0.2mL (约为  $4 \times 10^6$ /mL) 接种于小鼠右前腹部皮下，以出现皮丘为皮下接种部位正确。于小鼠移植瘤形成后，一次性大剂量腹腔注射 CTX 200mg/kg (0.2mL/10g) 造模。

### 2.2.3 动物分组与给药

将 64 只小鼠，随机分为模型组、CTX 组、SLBZP 高中低剂量组、SLBZP 高中低剂量加 CTX 组，共 8 组，每组 8 只。造模成功 24h 后开始给药：分组后称重并记录，按照小鼠体重给药，模型组以 0.9%生理盐水 0.2mL/10g 进行灌胃，1 次/d，并以 0.9%生理盐水 0.2mL/10g 进行腹腔注射，1 次/2d；CTX 组以 0.9%生理盐水 0.2mL/10g 进行灌胃，1 次/d，并以 20mg/kg CTX 注射液 0.2mL/10g 进行腹腔注射，1 次/2d；SLBZP 高中低剂量组分别以 3.00g/mL、1.50g/mL、0.75g/mL 中药 0.2mL/10g 进行灌胃，1 次/d，以 0.9%生理盐水 0.2mL/10g 进行腹腔注射，1 次/2d；SLBZP 高中低剂量加 CTX 组分别以 3.00g/mL、1.50g/mL、0.75g/mL 中药 0.2mL/10g 进行灌胃，1 次/d，并以 20mg/kg CTX 注射液 0.2mL/10g 进行腹腔注射，1 次/2d。连续给药 14 天。

### 2.2.4 观察小鼠一般情况

每日观察小鼠精神状态、毛发柔顺度和光泽、饮食、活动度、大小便等。每周用电子秤称量并记录小鼠体重。用游标卡尺于造模后第 5 天和 15 天，测量并记录小鼠瘤组织的长径与短径。

### 2.2.5 样本提取与保存

常规取材之前，每只小鼠于电子天平称体重并记录。末次给药 24h 后，摘眼球取血，无菌促凝管收集，室温凝固 60min， $3000r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10min，收集血清。

取血后处死，完整剥离肿瘤组织，经用 PBS 冲洗去血渍，滤纸吸干后，放于称量纸上，用电子秤称取瘤体重量。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库