

校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720080150424

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

暹罗鳄胆汁提取物抗胆管癌细胞
的作用机理研究

Studies on the inhibitory mechanism of *Crocodylus siamensis*
bile extract on cholangiocarcinoma cells

指导教师姓名: 陈清西 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 05 月

论文答辩时间: 2011 年 05 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 06 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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(陈清西教授酶学)课题(组)的研究成果,获得(陈清西教授酶学)课题(组)经费或实验室的资助,在(陈清西教授酶学)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): 康劲翻

2011年6月3日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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）：康劲翻

2011年6月3日

本文主要缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
MTT	Methyl Thiazolyltetrazolium	噻唑蓝
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲亚砜
AO	Acridine orange	吖啶橙
EB	Ethidium bromide	溴乙锭
SDH	Succinodehydrogenase	琥珀脱氢酶
PI	Propidine iodide	碘化丙啶
FCM	Flow cytometry	流式细胞术
PS	Phosphatidylserine	磷脂酰丝氨酸
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
CA	Cholic acid	胆酸
DCA	Deoxycholic acid	去氧胆酸
CDCA	Chenodeoxy cholic acid	鹅去氧胆酸
UCDA	Ursodeoxycholic acid	熊去氧胆酸
CDK	Cyclin-dependent kinas	细胞周期素依赖酶

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
1 前 言.....	5
1.1 胆管癌基础研究概况	5
1.1.1 胆管癌的发病原因.....	5
1.1.1.1 慢性炎症.....	5
1.1.1.2 肝内胆管结石.....	5
1.1.1.3 肝炎病毒感染.....	5
1.1.1.4 化学致癌物暴露.....	6
1.1.1.5 其他危险因素.....	6
1.1.2 胆管癌的分子生物学机制.....	6
1.1.2.1 癌基因的激活与胆管癌.....	6
1.1.2.2 抑癌基因的失活与胆管癌.....	8
1.1.2.3 胆管上皮细胞的周期调控异常.....	9
1.1.2.4 胆管癌的血管生成.....	10
1.1.2.5 胆管癌的侵袭和转移.....	11
1.1.3 胆管癌的诊断.....	12
1.1.3.1 生化检测.....	12
1.1.3.2 影像学检测.....	12
1.1.4 胆管癌的治疗.....	13
1.1.5 蛋白质组学技术在胆管癌研究中的应用.....	14
1.2 动物来源的抗肿瘤活性物质	14
1.2.1 蛋白质及其水解产物.....	15
1.2.2 生物碱.....	15
1.2.3 甾类化合物.....	15
1.2.4 多糖.....	15
1.2.5 萜类成分.....	16

1.2.6 大环内酯类	16
1.2.7 聚醚类	16
1.2.8 酮类、酸类	16
1.3 鳄及其药用价值研究概况	16
1.4 动物胆汁研究概况	18
1.4.1 胆汁酸研究概况	18
1.4.2 胆汁在肿瘤治疗中的应用	19
1.5 细胞凋亡	19
1.5.1 细胞凋亡及其信号通路	20
1.5.2 细胞凋亡的检测方法	23
1.6 急性毒性研究	24
1.6.1 急性毒性研究的主要目的	24
1.6.2 给药的主要途径	25
1.6.2.1 经口给药	25
1.6.2.2 经皮肤给药	25
1.6.2.3 经呼吸道给药	25
1.6.3 急性毒性分级	26
1.7 本论文研究的内容和意义	27
2 实验试剂与仪器	29
2.1 主要材料和试剂	29
2.2 主要实验仪器	31
3 实验方法	33
3.1 暹罗鳄胆汁提取物的制备	33
3.2 肿瘤细胞的培养	33
3.3 MTT 法测定细胞增殖	33
3.4 细胞形态的观察	34
3.4.1 普通光学显微镜下细胞形态的观察	34
3.4.2 荧光显微镜下细胞形态的观察	34

3.4.3 透射电镜下细胞超微结构的观察	35
3.4.4 扫描电镜下细胞超微结构的观察	35
3.5 PI 单染流式细胞术检测细胞周期变化	35
3.6 FITC-ANNEXIN V/PI 双染流式细胞术	36
3.7 Caspase-3 活性的测定	36
3.8 细胞内活性氧 ROS 的测定	36
3.9 细胞内线粒体膜电位的测定	37
3.10 Western Blot	37
3.10.1 细胞的裂解	37
3.10.2 免疫印迹	37
3.11 激光共聚焦显微镜样品的制备与观察	37
3.12 核蛋白提取	38
3.13 细胞黏附能力分析	38
3.14 细胞迁移能力分析-划痕实验	38
3.15 细胞侵袭能力分析-TRANSWELL® 细胞侵袭实验	39
3.16 RT-PCR 检测基因表达	39
3.16.1 总 RNA 提取	39
3.16.2 cDNA 合成	40
3.16.3 荧光 PCR	40
3.17 乳酸脱氢酶活性检测	41
3.18 蛋白质组学技术方法	41
3.18.1 QBC939 细胞全蛋白样品制备	41
3.18.2 等电聚焦电泳	41
3.18.3 SDS-PAGE 电泳	42
3.18.4 硝酸银染色	42
3.18.5 凝胶扫描和图象处理	42
3.18.6 差异蛋白质点的胶内酶切与质谱分析	42
3.19 急性毒理实验	43
4 结 果	44

4.1 暹罗鳄胆汁有机溶剂萃取物对胆管癌 QBC939 细胞增殖的影响	44
4.2 鳄胆素对人胆管癌细胞 QBC939 的抑制作用	46
4.3 鳄胆素对胆管癌 QBC939 细胞形态学的影响	47
4.3.1 普通光镜下鳄胆素作用前后 QBC939 形态学变化	47
4.3.2 荧光显微镜下鳄胆素作用前后 QBC939 形态学变化	49
4.3.3 透射电镜观察鳄胆素作用前后 QBC939 细胞超微结构的变化	51
4.3.4 扫描电镜观察鳄胆素作用前后 QBC939 细胞超微结构的变化	51
4.4 鳄胆素对胆管癌细胞周期分布的影响	52
4.5 Annexin V/PI 双染流式细胞术定量检测细胞凋亡	55
4.6 鳄胆素作用后 QBC939 细胞内活性氧 (ROS) 的变化	56
4.7 鳄胆素作用后 QBC939 细胞内线粒体膜电位的变化情况	57
4.8 鳄胆素对胆管癌细胞 QBC939 周期相关基因表达的调控	58
4.8.1 总 RNA 的提取	58
4.8.2 鳄胆素对胆管癌细胞 QBC939 野生型 p53 基因 mRNA 转录的影响	58
4.8.3 鳄胆素对胆管癌 QBC939 细胞 cyclinD1 基因 mRNA 转录的影响	59
4.8.4 鳄胆素对胆管癌 QBC939 细胞 p21 基因 mRNA 转录的影响	60
4.9 胆管癌细胞基因蛋白表达水平的变化	60
4.9.1 p53 对鳄胆素诱导的胆管癌细胞 QBC939 凋亡的调控	60
4.9.2 Bcl-2 和 Bax 对鳄胆素诱导的胆管癌细胞 QBC939 凋亡的调控	61
4.9.3 Cytochrome C 对鳄胆素诱导的胆管癌细胞 QBC939 凋亡的调控	61
4.9.4 caspase 3 对鳄胆素诱导的胆管癌细胞 QBC939 凋亡的调控	62
4.9.5 Fas 对鳄胆素诱导的胆管癌细胞 QBC939 凋亡的调控	62
4.10 Caspase 抑制剂对鳄胆素抑制作用的影响	63
4.11 鳄胆素对 QBC939 细胞 Caspase 3 酶活力的影响	63
4.12 鳄胆素对 QBC939 细胞 AIF 蛋白定位的影响	64
4.13 鳄胆素对 QBC939 细胞乳酸脱氢酶释放率的影响	65
4.14 鳄胆素对胆管癌 QBC939 细胞迁移能力的影响	66
4.15 鳄胆素对胆管癌 QBC939 细胞基质黏附能力的影响	67
4.16 鳄胆素对胆管癌 QBC939 细胞侵袭能力的影响	68
4.17 急性毒理实验	70

4.18 鳄胆素作用后人胆管癌 QBC939 细胞全蛋白谱的差异表达变化.....	70
5 讨 论	74
5.1 不同暹罗鳄胆汁提取物抗胆管癌效果的分析.....	74
5.2 鳄胆素体外抗胆管癌机制的研究.....	74
5.2.1 鳄胆素阻滞胆管癌细胞周期并诱导细胞凋亡.....	74
5.2.2 鳄胆素对细胞周期调节相关基因表达的影响.....	75
5.2.3 凋亡相关蛋白对鳄胆素诱导的胆管癌细胞凋亡的调控.....	76
5.2.4 活性氧 ROS 在鳄胆素诱导胆管癌细胞凋亡机制中的作用.....	77
5.2.5 线粒体在鳄胆素抗胆管癌作用机制中的作用.....	77
5.2.6 鳄胆素引起胆管癌细胞坏死.....	78
5.2.7 鳄胆素对胆管癌细胞迁移能力的影响.....	79
5.3 鳄胆素的急性毒理实验分析.....	80
5.4 利用蛋白质组学技术研究鳄胆素抗胆管癌作用的可能分子机制.....	80
5.4.1 代谢相关酶和蛋白.....	82
5.4.1.1 焦磷酸酶 (PPAI).....	82
5.4.1.2 甲硫腺苷磷酸化酶 (MTAP).....	83
5.4.1.3 嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP).....	84
5.4.2 膜联蛋白.....	85
5.4.3 细胞核自身抗原精子蛋白 (NASP).....	86
5.4.4 蛋白激酶 C 底物 80K-H (PRKCSH protein).....	86
5.4.5 核内不均一核糖核蛋白(hnRNP K).....	86
5.4.6 增殖细胞核抗原 (PCNA).....	88
5.4.7 蛋白酶体.....	89
6 结 论	91
7 展 望	93
参考文献	94
在学期间发表论文	110

致谢 111

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
1 Introduction	5
1.1 General introduction of cholangiocarcinoma	5
1.1.1 Pathogenic reason of cholangiocarcinoma	5
1.1.1.1 Chronic inflammation	5
1.1.1.2 Intrahepatic bile duct calculi	5
1.1.1.3 Hepatitis virus infection	5
1.1.1.4 Chemical carcinogens exposure	6
1.1.1.5 Other risk factors	6
1.1.2 Molecular biology mechanism of cholangiocarcinoma	6
1.1.2.1 Oncogene activation and cholangiocarcinoma	6
1.1.2.2 Tumor-suppressor gene inactivation and cholangiocarcinoma	8
1.1.2.3 Cycle regulation abnormal of bile duct epithelial cells	9
1.1.2.4 Angiogenesis of cholangiocarcinoma	10
1.1.2.5 Invasion and metastasis of cholangiocarcinoma	11
1.1.3 Diagnosis of cholangiocarcinoma	12
1.1.3.1 Biochemical tests	12
1.1.3.2 Imaging detection	12
1.1.4 Therapy of cholangiocarcinoma	13
1.1.5 Application of proteomics technology in study of cholangiocarcinoma	14
1.2 Active antitumor substances from animal	14
1.2.1 Protein and hydrolysis product	15
1.2.2 Alkaloids	15
1.2.3 Steroid compound	15
1.2.4 Polysaccharide	15
1.2.5 Terpenoids	16
1.2.6 Big ring lactone class	16
1.2.7 Polyether class	16
1.2.8 Ketone、 acids	16
1.3 General introduction of Crocodile and medicinal value	16

1.4 General introduction of animal bile	18
1.4.1 General introduction of bile acids	18
1.4.2 Application of bile in the treatment of cancer	19
1.5 Cell apoptosis	19
1.5.1 Cell apoptosis and the pathway	20
1.5.2 Detection methods of apoptosis.....	23
1.6 Research of acute toxicology	24
1.6.1 Main purpose of Research of acute toxicology	24
1.6.2 The main way to medicine.....	25
1.6.2.1 Oral administration	25
1.6.2.2 Dermal absorption	25
1.6.2.3 Administration through the respiratory tract.....	25
1.6.3 Classification of acute toxicity	26
1.7 Contents and significance of this study	27
2 Reagents and instruments	29
2.1 Major reagents and materials	29
2.2 Major instruments	31
3 Methods	33
3.1 Preparation of extraction of crocodile bile	33
3.2 Tumor cell culture	33
3.3 Cell survival rate determined by MTT assay	33
3.4 Observation of cell morphology	34
3.4.1 Observation of cell morphology by ordinary light microscope.....	34
3.4.2 Observation of cell morphology by fluorescence microscope	34
3.4.3 Observation of cell ultrastructure by transmission electron microscope.....	35
3.4.4 Observation of cell ultrastructure by scanning electron microscope.....	35
3.5 The changes of cell cycle determined by PI single staining flow cytometry ...	35
3.6 FITC-Annexin V/PI double staining flow cytometry	36
3.7 Caspase-3 activity assay	36
3.8 ROS activity assay	36
3.9 Mitochondrial membrane potential assay	37
3.10 Western blot	37

3.10.1 Cell lysis	37
3.10.2 Immunoblot	37
3.11 Preparation and observation of laser confocal microscope samples	37
3.12 Extraction of nucleoprotein	38
3.13 Cell adhesion ability analysis	38
3.14 Cell motility ability analysis-scratches experiment.....	38
3.15 Cell invasion ability analysis- Transwell® cell invade experiment.....	39
3.16 Gene expression detected by RT-PCR	39
3.16.1 Extraction of total RNA.....	39
3.16.2 cDNA synthesized by reverse transcription.....	40
3.16.3 Quantitative fluorescent PCR.....	40
3.17 Detection of the activity of lactic dehydrogenase	41
3.18 Methods of proteomic.....	41
3.18.1 Preparation of total QBC939 cells proteome samples.....	41
3.18.2 IEF	41
3.18.3 SDS-PAGE electrophoresis	42
3.18.4 Silver staining.....	42
3.18.5 Scan and computer assisted 2-D image analysis	42
3.18.6 In gel digestion, analysis of MALDI-TOF-MS and database searches.....	42
3.19 Acute toxicology experiment	43
4 Results.....	44
4.1 Effect of crocodile bile extract on the proliferation of QBC939 cells.....	44
4.2 Inhibitory effect of crocobilin on QBC939 cells.....	46
4.3 Effect of crocobilin on the morphology of QBC939 cells.....	47
4.3.1 Crocobilin change morphology of QBC939 cells under optical microscope .	47
4.3.2 Crocobilin change morphology of QBC939 cells under fluorescence microscope.....	49
4.3.3 Crocobilin change the ultrastructure of QBC939 cells under transmission electron microscope.....	51
4.3.4 Crocobilin change the ultrastructure of QBC939 cells under scanning electron microscope.....	51
4.4 Effect of crocobilin on cell cycle	52
4.5 Quantitative detection of apoptosis of QBC939 cells by Annexin V-FITC/PI	

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库