

雷替曲塞及其联合 PD98059 对 HT-29 细胞的影响

昌 兰 路 亮 姚 矾 金 水

摘要 目的 研究雷替曲塞及其联合 PD98059 对结肠癌细胞 HT-29 增殖及凋亡的影响,并探讨其分子机制。方法 ① 在倒置显微镜下观察处理 24 h 后各组细胞的形态及数量变化;② 使用细胞计数法检测不同处理条件下的细胞数;③ 使用流式细胞术检测各处理组细胞的凋亡率;④ 使用 RT-PCR 法检测各组 K-RAS、ERK1、ERK2 mRNA 的相对表达量。结果 ① 倒置显微镜下观察可见与对照组相比,除 PD98059 组外,其他各组细胞数量均减少,形态均发生凋亡变化,且随雷替曲塞浓度增高,变化程度增加;联合组细胞形态及数量变化较对应雷替曲塞组程度更深。② 细胞计数法显示各组细胞数均明显低于对照组的细胞数,且随着雷替曲塞浓度的增加,细胞数呈递减趋势;联合组与其他各组间均存在明显差异;③ 流式细胞仪检测显示和对照组相比,各组凋亡率均明显上升,在雷替曲塞组中存在浓度依赖性;联合组与其他各组的细胞凋亡率均存在差异;④ RT-PCR 结果显示:与对照组相比,PD98059 组、雷替曲塞组及联合组在 K-RAS、ERK1、ERK2 mRNA 的表达上均未表现出明显的差异。结论

① 雷替曲塞对结肠癌细胞 HT-29 增殖及凋亡的影响呈浓度依赖性;② 雷替曲塞联合 ERK 抑制剂对 HT-29 细胞具有协同作用;③ ERK 抑制剂不是在基因表达水平影响细胞的增殖及凋亡。

关键词 结肠癌;雷替曲塞;PD98059;RAS-MEK-ERK1/2 通路;HT-29 细胞

中图分类号 R 574.62;R 735.3+5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0692-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.015

结直肠癌占全球肿瘤的 10%~15%,并且成为肿瘤死亡的第二大主要原因^[1]。化疗或化疗联合放疗是当前中晚期肿瘤的主要治疗方法^[2]。雷替曲塞作为新型抗消化道肿瘤药物,具有毒副作用轻、给药方便的特点,但近年来显示雷替曲塞在临床上的敏感性并不高。RAS-MEK-ERK1/2 信号途径是一个酪氨酸激酶和胞浆蛋白激酶级联反应,该信号

途径能促进细胞由 G0/G1 期进入 S 期^[3]。PD98059 是一种特异性抑制剂,能够阻断 MEK 对 ERK(细胞外调节蛋白激酶)的磷酸化活化,阻碍细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,从而影响细胞的增殖、分化、凋亡等一系列生物学效应。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人结肠癌细胞 HT-29 购自上海赛齐生物工程有限公司;胎牛血清购自美国 CLARK Bioscience 公司;高糖 DMEM 及双抗购自美国 Hyclone 公司;DMSO 购自合肥 Biosharp 公司;雷替曲塞购自大连美仑生物有限公司;PD98059 购自美国 MedChem Express 公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司;TRIzol、cDNA 合成试剂盒均购自美国 Thermo 公司;SYBR Green master mix 购自美国 Omega 公司;引物由上海生工生物工程有限公司设计及合成。

1.2 细胞培养和分组

1.2.1 细胞培养与传代 将细胞种于 60 mm 培养皿,加入含 10% 胎牛血清、1% 双抗、1% 非必须氨基酸的高糖 DMEM,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养。2~3 d 更换一次培养液,待细胞生长密度达 80% 左右时进行传代。

1.2.2 细胞分组 本实验将细胞分为对照组、雷替曲塞组、PD98059 组、联合组。对照组加入含等量 DMSO 的培养液;雷替曲塞组加入含雷替曲塞的培养液,终浓度梯度为 1、10、20 μmol/L;PD98059 组加入含终浓度为 20 μmol/L 的 PD98059 的培养液;联合组加入含终浓度为 10 μmol/L 的雷替曲塞及终浓度为 20 μmol/L 的 PD98059 的培养液。

1.3 显微镜下观察细胞的形态与数量 取对数生长期细胞种于 6 孔板中,各组处理 24 h 后在倒置显微镜下观察细胞性状的变化,包括细胞的形态及数量的变化。

1.4 细胞计数法测定细胞增殖 取出已处理 24 h 的 12 孔板,弃去培养基,用 PBS 清洗后加入胰酶进行消化;待消化完全,终止消化后轻轻吹打成细胞悬液;将悬液转移至离心管中,1 000 r/min 离心 5

2017-01-13 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究项目(编号:KJ2015A334)

作者单位:安徽医科大学附属巢湖医院消化内科,巢湖 238000

作者简介:昌 兰,女,硕士研究生;

路 亮,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

564661924@qq.com

min; 弃去上清液, 各样本均加入 1 ml 培养基, 吹打成均匀的细胞悬液。用 75% 无水乙醇将计数板及盖玻片擦拭干净, 并晾干。吸取细胞悬液小心滴入计数板与盖玻片交界处, 使其充满计数板与盖玻片之间, 注意避免气泡; 静置 30 s 后于显微镜下观察, 计算计数板四大格内的细胞数, 压线细胞只计数上方与左侧, 若见细胞聚集成团时只按单个细胞计算。细胞数/ml = 四大格细胞总数/4 × 10⁴。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 各组处理 24 h 后取出 6 孔板。收集培养液到 5 ml 离心管备用, PBS 清洗后加入胰酶进行消化, 待消化完全, 弃去胰酶, 加入收集的培养液轻轻吹打均匀, 转移至离心管中 1 000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 用 PBS 重悬细胞并计数(确保细胞数量不少于 10⁵), 然后 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 加入 400 μl 结合缓冲液轻轻重悬细胞后将悬液分别转入相应的流式管中, 加入 5 μl Annexin V-FITC 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min; 加入 10 μl PI 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置 5 min; 在 30 min 内进行流式细胞仪检测。检测结果使用 Flowjo 软件进行分析。

1.6 RT-PCR 法检测目的 mRNA 的表达

1.6.1 总 RNA 的提取 各组细胞处理 8 h 后取出 6 孔板, 吸净培养基, 每孔加入 1 ml 的 TRIzol Reagent, 用枪吹打至确保全部裂解后转入离心管中; 室温静置 5 min, 使样本充分裂解; 加入 0.2 ml 氯仿, 手动上下翻转 15 s, 室温放置 3 min; 4 °C、11 240 r/min 离心 15 min, 吸取上层水相至新离心管中; 加入 0.5 ml 异丙醇, 混匀后室温放置 10 min; 4 °C、11 240 r/min 离心 10 min, 弃上清液留沉淀; 加入 75% 乙醇 (DEPC 水配制) 1 ml, 混匀后 4 °C、8 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液风干 5 ~ 10 min; 加入 20 μl DEPC 水 55 °C 金属浴 10 min 溶解 RNA; 检测 RNA 浓度及纯度。

1.6.2 cDNA 的合成 在冰上按照顺序将 1 μg 总 RNA、1 μg Oligo(dT) 18 引物、10 μl DEPC 水加入无菌无酶 PCR 管 1 中, 将 4 μl 5 × Reaction Buffer、1 μl Ribolock RNase inhibitor、2 μl 10 mmol/L dNTP Mix、1 μl RevertAid M-M μl V RT 顺序加入 PCR 管 2 中, 混合将管 1 和管 2 内容物放在一起轻轻混匀后简短离心, 于 42 °C 金属恒温浴中孵育 60 min, 70 °C 加热 5 min 终止反应。

1.6.3 荧光定量 PCR 将引物浓度稀释为 100 μmol/L 保存, 取部分稀释为 10 μmol/L 待用, 引物序列见表 1。按照表 2 准备每个 PCR 板, 总体积为

10 μl 的反应体系。按步骤设置 PCR 仪: 95 °C 10 min 预变性, 95 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共 40 ~ 45 个循环。混匀每个 PCR 板, 按设置的程序进行试验。

表 1 PCR 引物的核酸序列

基因	序列
β-actin	R: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3' F: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAAGT T-3'
ERK1	R: 5'-CGCTGGCAGTAGTCTGATGT-3' F: 5'-GGGGAGGTGGAGATGGTGA-3'
ERK2	R: 5'-CGTCACTCGGGTCTGTAAT-3' F: 5'-CCCAAATGCTGACTCCAA-3'
K-RAS	R: 5'-CTCCTCTTGACCTGCTGTG-3' F: 5'-AGAGTGCCTTGACGATACAG-3'

表 2 RT-PCR 反应体系

试剂	添加量(μl)
2 × SYBR Green qPCR master mix	5.0
Forward primer, 10 μmol/L	0.4
Reverse primer, 10 μmol/L	0.4
Rox Reference Dye	0.2
Template	1.0
DEPC-treated water	3.0

1.7 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用单因素方差分析(两两比较使用 LSD), 两样本均数的比较采用配对样本均数 *t* 检验。

2 结果

2.1 倒置显微镜下观察细胞形态及增殖 各组处理 24 h 后, 倒置显微镜下显示与对照组相比, PD98059 组细胞形态无明显变化, 数量上有稍许减少; 雷替曲塞组的细胞变细变长, 折光性增强, 皱缩或漂浮脱落于培养基中, 贴壁生长的细胞稀疏, 且随着浓度的增加, 变化的程度愈加明显; 联合组细胞形态与数量变化与对应的雷替曲塞组相似, 但程度更明显, 见图 1。

2.2 细胞计数法检测雷替曲塞及其联合 PD98059 处理 HT-29 细胞后对其凋亡率的影响 细胞计数法中, 各组细胞数均明显低于对照组的细胞数, 且随着雷替曲塞浓度的增加, 细胞数呈递减趋势; 联合组与对应的雷替曲塞组的细胞数均存在差异 ($t = 6.209, P = 0.011$), 与 PD98059 组间也存在明显差异 ($t = -3.799, P = 0.007$), 见表 3。

2.3 流式细胞仪检测雷替曲塞及其联合 PD98059 处理 HT-29 细胞后对其凋亡率的影响 Annexin V-

FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡的散点图中,左上象限表示机械性损伤细胞,右上象限表示晚期凋亡或继发性死亡细胞,左下象限表示正常细胞,右下象限表示早期凋亡细胞。流式细胞仪分析表明:与对照组相比,各组凋亡率均明显上升,在雷替曲塞组中,随雷替曲塞作用浓度增高,细胞凋亡呈递增趋势;联合组与对应的雷替曲塞组的细胞凋亡率存在差异($t = -14.772, P = 0.01$),与 PD98059 组间也存在明显差异($t = -6.090, P = 0.002$),见图 2、表 3。

表 3 各组处理 24 h 后的细胞增殖及凋亡变化($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞数(个/孔)	凋亡率(%)
对照	88.137 ± 26.392 [#]	10.614 ± 2.998 [#]
雷替曲塞 1 μmol/L	42.163 ± 8.894 [*]	19.881 ± 2.686 [*]
雷替曲塞 10 μmol/L	26.527 ± 6.973 [*]	26.834 ± 2.588 [*]
雷替曲塞 20 μmol/L	20.842 ± 3.583 [*]	30.707 ± 1.583 [*]
PD98059	72.04 ± 2.833 [#]	15.153 ± 0.454 [*] #
联合	15.692 ± 3.631 [*] #	30.804 ± 3.014 [*] #
F 值	4.918	8.636
P 值	0.019	0.008

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 10 μmol/L 雷替曲塞组比较: # $P < 0.05$

2.4 各实验组对 HT-29 细胞相关 mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测各组目标基因,得出:在 ERK1 mRNA 的表达中,与对照组相比,PD98059 组、雷替曲塞组及联合组的相对表达量分别为(0.799 ± 0.062)、(0.850 ± 0.063)、(0.811 ± 0.081)。在

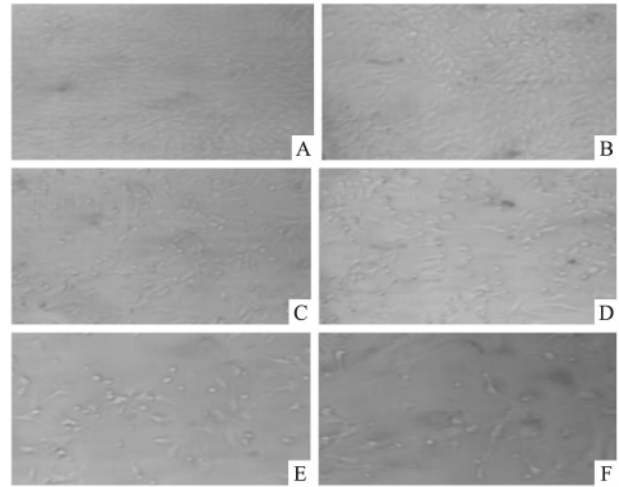


图 1 各实验组在显微镜下变化 ×100

A: 对照组; B: PD98059 组; C: 1 μmol/L 雷替曲塞组; D: 10 μmol/L 雷替曲塞组; E: 20 μmol/L 雷替曲塞组; F: 联合组

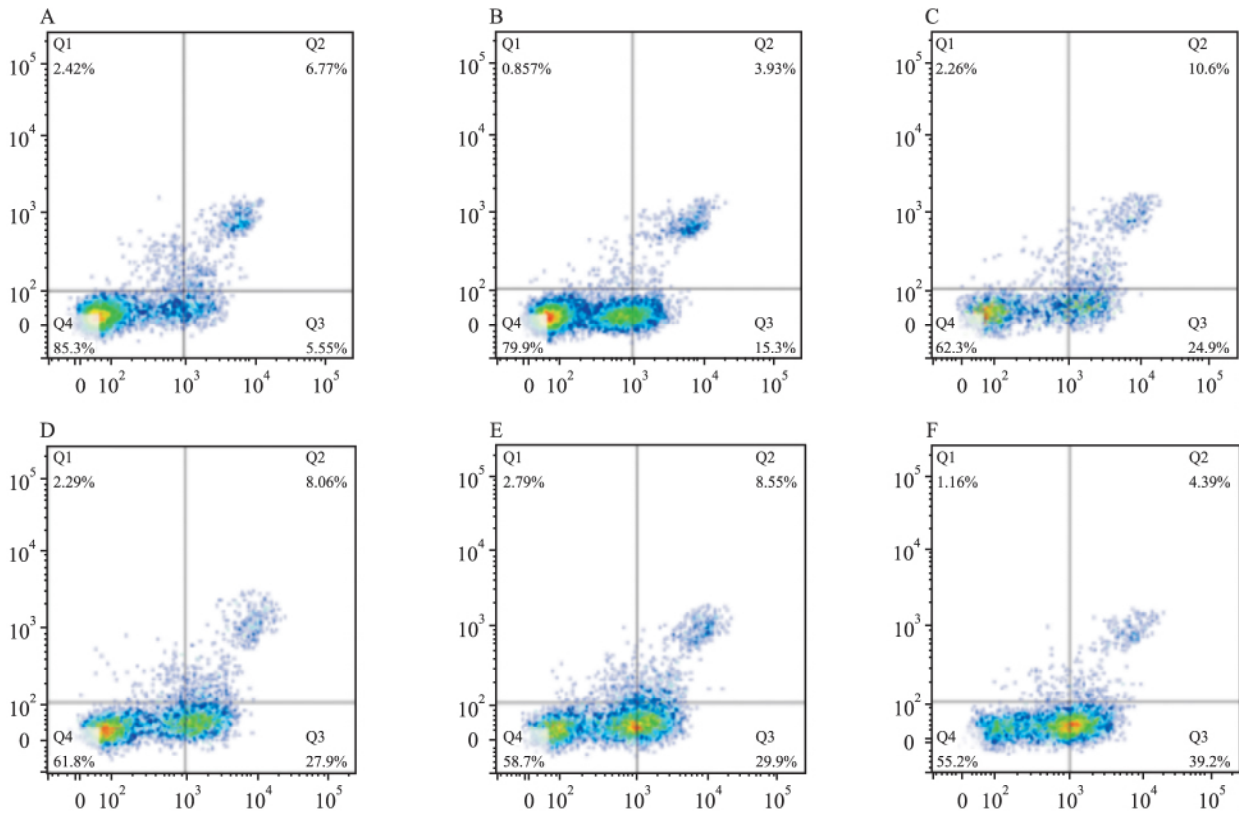


图 2 各实验组的凋亡率

A: 对照组; B: PD98059 组; C: 1 μmol/L 雷替曲塞组; D: 10 μmol/L 雷替曲塞组; E: 20 μmol/L 雷替曲塞组; F: 联合组

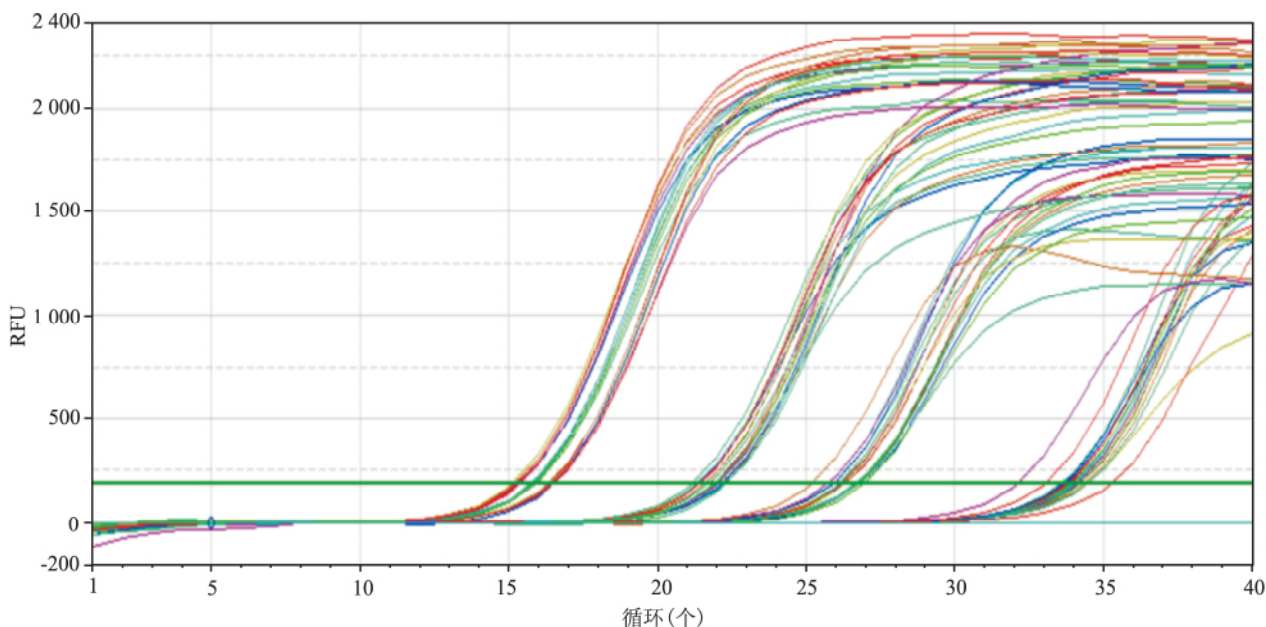


图3 各实验组中 K-RAS、ERK1、ERK2 mRNA 的相对表达量

ERK2 mRNA 的表达中,与对照组相比,PD98059 组、雷替曲塞组及联合组的相对表达量分别为 (0.799 ± 0.152) 、 (0.836 ± 0.052) 、 (0.837 ± 0.104) 。在 K-Ras mRNA 的表达中,与对照组相比,PD98059 组、雷替曲塞组及联合组的相对表达量分别为 (0.871 ± 0.062) 、 (0.841 ± 0.010) 、 (0.840 ± 0.021) ,见图 3。各组的 目标基因的表达与对照组均无明显差异。

3 讨论

雷替曲塞作为新型抗叶酸剂,是一种高选择性、高特异性的胸苷酸合酶(Thymidylate Synthase, TS)抑制剂^[4]。雷替曲塞主要竞争叶酸盐转运载体进入细胞,这种喹啉叶酸盐类似物通过叶酸多聚谷氨酸合酶增加细胞内多聚谷氨酰化合物含量,从而导致持久的 TS 抑制活性、DNA 破碎(包括 DNA 双链断裂)及细胞死亡^[5]。本研究采用不同浓度的雷替曲塞对体外培养的结肠癌 HT-29 细胞的生长影响进行研究,结果表明抑制 TS 的活性可以抑制 HT-29 细胞的增殖,促进其凋亡;并且随着作用浓度的增加,结肠癌细胞的增殖呈明显的下降趋势,而其凋亡呈上升趋势,表现出明显的浓度依赖性。有文献^[6]报道,雷替曲塞还可以降低脱氧胸苷三磷酸的水平,而 DNA 的损失与失衡在凋亡与增殖之间是由脱氧胸苷二磷酸生物合成损伤导致的重要事件^[7]。本实验中雷替曲塞对结肠癌细胞有明显的杀伤力,因此推测其可能通过损伤细胞 DNA、诱导细胞凋亡

而发挥抗结肠癌作用。

PD98059 是一种 MEK 特异性抑制剂,可通过结合去磷酸化的未活化的 MEK 的腺嘌呤核苷三磷酸位点,特异性抑制 MEK 的磷酸化,继而阻断 MEK 对 ERK1/2 的磷酸化活化,阻碍细胞外刺激信号转入细胞及核内,从而影响细胞的增殖、分化、转化或凋亡等一系列生物学效应^[8]。本实验将终浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 分别单独、联合雷替曲塞作用于结肠癌细胞株,可观察到在 PD98059 组中,与对照组相比,HT-29 细胞增殖被抑制,凋亡则被促进,但其增殖抑制及凋亡促进的程度较低;由此可知,PD98059 可通过抑制信号通路的传导而影响细胞的凋亡。而当 PD98059 联合雷替曲塞作用于 HT-29 时,其增殖抑制及凋亡促进的程度均高于 PD98059 组及对应的雷替曲塞组;故可以推测:PD98059 联合雷替曲塞对结肠癌细胞的增殖及凋亡具有协同作用。

RAS-MEK1/2-ERK1/2 信号转导系统与细胞的生长、增殖、分化等过程的调节以及肿瘤的发生有着密切的关系^[9]。最近有报道指出,在肿瘤发生发展过程中,ERK 的活化能够调节内皮细胞的增殖、转移、重组,促进血管的形成,为肿瘤提供充足的血供^[10-11]。在本研究中,对照组、PD98059 组、终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的雷替曲塞组、联合组处理 8 h 后,使用 RT-PCR 法检测各组 K-RAS、ERK1、ERK2 mRNA 的相对表达量,可得:单药 PD98059 与单药雷替曲塞及其联合均不能影响 K-RAS、ERK1、ERK2 mRNA

的表达。由此可推测: PD98059 虽可以阻断 MEK 对 ERK1/2 蛋白的磷酸化活化,但在 ERK1/2 mRNA 的表达上却没有明显的影响,且对其上游基因 K-RAS mRNA 没有产生正反馈或负反馈的影响;雷替曲塞虽可以抑制 TS 合酶的合成,却对 ERK1/2、K-RAS mRNA 的表达无特异作用;因此两种药物联合形成的协同关系,可能是因为影响了蛋白水平的表达,也可能是存在其他信号通路的改变,从而对结肠癌细胞的增殖抑制及凋亡产生协同作用。

综上所述,联合应用 ERK 抑制剂 PD98059 和雷替曲塞可以对结肠癌细胞 HT-29 产生协同抑制作用,提示 PD98059 可明显提高雷替曲塞对结肠癌细胞的敏感性,增强雷替曲塞对 HT-29 的杀伤力,因此将 MEK/ERK 通路特异性抑制剂应用于结肠癌的联合化疗中是可行的。临床上可以考虑以雷替曲塞为基础的化疗联合应用 MEK/ERK 通路特异性抑制剂,提高肿瘤对雷替曲塞的敏感性,从而减少雷替曲塞量,降低其副反应及耐药性的发生率。由于目前还没有关于通路抑制剂的大规模的临床试验,因此其在临床应用的安全性有待进一步研究。

参考文献

- [1] Zhang Q, Shen J, Wang H, et al. TS mRNA levels can predict pemetrexed and raltitrexed sensitivity in colorectal cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014, 73(2): 325-33.
- [2] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in China [J]. *Jpn J Clin Oncol* 2010, 40(4): 281-5.
- [3] Schepers H, Wierenga A T, Eggen B J, et al. Oncogenic Ras blocks transforming growth factor-β-induced cell-cycle arrest by degradation of p27 through a MEK/ERK/SKP2-dependent pathway [J]. *Exp Hematol* 2005, 33(7): 747-57.
- [4] Avallone A, Di Gennaro E, Silvestro L, et al. Targeting thymidylate synthase in colorectal cancer: critical re-evaluation and emerging therapeutic role of raltitrexed [J]. *Expert Opin Drug Saf* 2014, 13(1): 113-29.
- [5] Popov I, Carrato A, Sobrero A, et al. Raltitrexed (Tomudex) versus standard leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil: results from the randomised phase III pan-european trial in adjuvant colon cancer 01 (PETACC-1) [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(15): 2204-11.
- [6] Grogan B C, Parker J B, Guminski A F, et al. Effect of thymidylate synthase inhibitors on dUTP and TTP pool levels and the activities of DNA repair glycosylases on uracil and 5-fluorouracil in DNA [J]. *Biochemistry* 2011, 50(5): 618-27.
- [7] Dong Y, Wang X, Zhang J, et al. Raltitrexed's effect on the development of neural tube defects in mice is associated with DNA damage, apoptosis, and proliferation [J]. *Mol Cell Biochem* 2015, 398(1-2): 223-31.
- [8] 宋广玉, 李艳, 王萍萍. PD98059 对 HL-60 细胞 Ras-MEK1/2-ERK1/2 信号转导影响的研究 [J]. *山西医药杂志*, 2012, 41(6): 529-31.
- [9] Kamio N, Akifusa S, Yamaguchi N, et al. Induction of granulocyte colony-stimulating factor by globular adiponectin via the MEK-ERK pathway [J]. *Mol Cell Endocrinol* 2008, 292(1-2): 20-5.
- [10] Mirza A M, Gysin S, Malek N, et al. Cooperative regulation of the cell division cycle by protein kinases RAF and AKT [J]. *Mol Cell Biol* 2004, 24(24): 10868-81.
- [11] 李倩玉, 魏旭东, 陈琳, 等. PD98059 对急性淋巴细胞白血病细胞 MAPK 信号通路的抑制作用 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(6): 1399-402.

Effects of Raltitrexed and combination use of PD98059 on HT-29 cells

Chang Lan, Lu Liang, Yao Fan, et al

(Dept of Gastroenterology, The Affiliated Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000)

Abstract Objective To study the effects of Raltitrexed and combination use of PD98059 on HT-29 cell proliferation and apoptosis and explore their potential molecular mechanisms. **Methods** ① Inverted microscope was used to observe changes in cell morphology and counting of each group after treatment for 24 hours. ② Cell counting method was used to detect cell quantity in each group. ③ Flow cytometry instrument was used to test the apoptosis rate of every groups. ④ RT-PCR method were used to detect each group's K-RAS, ERK1, ERK2 mRNA expression. **Results** ① Each group had fewer cells and apoptotic changes except PD98059 group under inverted microscope, and the concentration of Raltitrexed higher, the change deeper. Changes in the joint group deeper than that of Raltitrexed group on cell quantity and form. ② The result showed that the number of cells of each group were lower than control group, with higher concentration of raltitrexed, cell quantity decreased, and joint group had significant difference with other group exerted by cell counting method. ③ Flow cytometry instrument testing showed that cell apoptosis of each group was increased compared with control group significantly, and Raltitrexed groups depended on concentra-

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.016.html>

甘肃省敦煌地区普通人群卡波肉瘤 相关疱疹病毒感染的血清学分析

方 圆, 许常青, 周 畅, 陈 伟, 王林定

摘要 目的 研究卡波肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)在甘肃敦煌地区普通人群中的血清阳性率,并分析KSHV感染的危险因素。方法 随机收集1000例敦煌地区普通人群血清,以KSHV 3个基因片段 *orf65*、*orf73*、*orf k8.1* 编码蛋白为抗原,间接ELISA检测样本中KSHV抗体,SPSS软件分析危险因素。结果 1000份血清中,KSHV抗体总阳性率为19%,男性阳性率(22.9%)高于女性(16.6%) ($P=0.016$);KSHV感染与梅毒螺旋体($P=0.004$)和丙肝病毒($P=0.027$)感染间有相关性,而与年龄、乙肝五项无关。多因素Logistic回归分析显示梅毒螺旋体感染的OR(95% CI)为10.142(1.920~53.577)。结论 甘肃敦煌地区普通人群中KSHV的感染率较高,且与性别有关;梅毒螺旋体感染是该地区KSHV感染最重要的独立危险因素。

关键词 卡波肉瘤相关疱疹病毒;血清阳性率;危险因素;甘肃;敦煌

中图分类号 R 373.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0697-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.016

卡波肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)为近年来发现的一种新的疱疹病毒,又称人类疱疹病毒8型(human herpesvirus type 8, HHV-8),属于 γ 疱疹病毒亚科,是卡波肉瘤(Kaposi's sarcoma, KS)的相关病原体,另外与

两种淋巴增殖性疾病原发性渗出性淋巴瘤(primary effusion lymphoma, PEL)和多心性牧牛人病(multi-centric cattleman's disease, MCD)密切相关^[1]。大量文献^[2-4]显示,KSHV感染率存在明显的地域差异,其中在赤道附近的非洲地区KSHV的血清阳性率显著高于世界其他地区。但有关KSHV感染在中国境内的研究较少,目前仅对新疆地区的调查较为深入。结果显示新疆维吾尔族人群中经典型KS的发病率明显高于其他地区 and 民族^[5],且新疆汉族人群的感染率也高于我国中部地区^[6]。该课题组选择了临近新疆的甘肃敦煌地区进行调查,敦煌地区地理环境和人文环境与新疆地区十分相似,且目前未有文献对新疆周边地区的KSHV感染进行研究。该调查意在比较新疆周边地区与新疆地区以及我国中部地区KSHV感染率的差异,为以后研究我国其他地区 and 民族的KSHV流行病学提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2015年9~12月甘肃省敦煌市各医院普通人群1000份血清样品。研究计划经安徽医科大学伦理委员会审批并已获得研究对象的知情同意。KSHV阳性对照血清和阴性对照血清检测参见文献^[7]。

1.2 主要试剂 *k8.1* 基因编码的裂解期蛋白、*orf73* 基因编码的潜伏期相关核抗原LANA、*orf65* 基因编码的衣壳蛋白参见文献^[8-9];辣根过氧化物酶标记山羊抗人IgG抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);TMB单组份显色液(北京索莱宝生物科技有限公司);即用型山羊血清(武汉博士德生物工程有限公司)。

2017-01-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271837);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012A161);安徽医科大学博士科研经费资助项目(编号:XJ200914)

作者单位:安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032

作者简介:方 圆,女,硕士研究生;

王林定,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wanglinding@ahmu.edu.cn

tion, and joint group had significant difference with other group. ④ There was no significant difference on K-RAS, ERK1, ERK2 mRNA expression in every groups by RT-PCR. **Conclusion** ① Raltitrexed exerts anti-proliferation and apoptosis-promoting effects on colon cancer cell HT-29 in a concentration dependent manner. ② Raltitrexed combined with ERK inhibitor has synergistic effect on HT-29 cells. ③ ERK inhibitor does not affect cell proliferation and apoptosis at gene expression levels.

Key words colon cancer; Raltitrexed; PD98059; RAS-MEK-ERK1/2 pathway; HT-29 cells