

文章编号: 1000-7423(2014)-04-0299-05

【论著】

旋毛虫排泄分泌蛋白对小细胞肺癌 NCI-H446 细胞凋亡的影响

常红敏¹, 赵蕾¹, 王小杰², 方艳辉¹, 李丹¹, 罗婧梅¹, 杜雯英^{1*}

【摘要】 目的 研究旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白对人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞凋亡的影响。方法 旋毛虫肌幼虫培养 24 h, 收集培养液, 取上清, 即为旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白。将人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞 (编号 A054) 随机分为 3 组, 实验组 (A 组) 和细胞凋亡组 (B 组) 的 NCI-H446 细胞 ($5 \times 10^6/\text{ml}$) 分别与旋毛虫排泄分泌蛋白 (终浓度为 0.3 mg/ml) 和顺铂 (6.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培养 24 h, 空白对照组 (C 组) 的 NCI-H446 细胞培养 24 h, 不作任何处理。RT-PCR 检测 3 组 NCI-H446 细胞中凋亡抑制基因 Bcl-2、凋亡相关基因 Fas 和 Fas 配体 (Fasl) mRNA 的表达水平。以抗原癌基因 C-myc 标签鼠单克隆抗体为一抗, 蛋白质印迹 (Western blotting) 检测 3 组细胞 C-myc 蛋白的表达情况。免疫荧光检测 3 组 NCI-H446 细胞中 C-myc 蛋白阳性表达情况。结果 RT-PCR 结果显示, 经旋毛虫排泄分泌蛋白处理的 NCI-H446 细胞 (A 组), Bcl-2 mRNA 相对表达水平最低, 为 (0.575±0.047), 与 B (0.850±0.073)、C 组 (0.975±0.069) 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。A 组 Fas mRNA 相对表达量最高, 为 (0.975±0.115), B (0.817±0.121)、C 组 (0.769±0.061) 相对较低 ($P < 0.05$)。A、B 和 C 组细胞 Fasl mRNA 相对表达水平分别为 0.669±0.051、0.787±0.124、0.875±0.125 ($P < 0.05$)。A、B 和 C 组细胞 Fas/Fasl mRNA 比值分别为 1.475、1.038 和 0.878。Western blotting 分析结果显示, A 组 C-myc 相对表达水平最低 (0.566±0.054), B (1.074±0.069)、C 组 (1.172±0.026) 相对较高 ($P < 0.05$)。免疫荧光定位结果显示, 旋毛虫排泄分泌蛋白和顺铂作用后 24 h, C-myc 蛋白在细胞浆/细胞核表达。结论 旋毛虫排泄分泌蛋白可促进人小细胞肺癌细胞系 NCI-H446 细胞凋亡, 可能是通过调节凋亡蛋白 C-myc 表达、进而抑制 Bcl-2 mRNA 的表达并调节 Fas/Fasl mRNA 比例来实现的。

【关键词】 旋毛虫; 排泄分泌蛋白; 小细胞肺癌; NCI-H446; 凋亡基因; 凋亡蛋白

中图分类号: 383.15 文献标识码: A

Effect of the Excretory/Secretory Proteins from *Trichinella spiralis* on Apoptosis of NCI-H446 Small-cell Lung Cancer Cells

CHANG Hong-min¹, ZHAO Lei¹, WANG Xiao-jie², FANG Yan-hui¹,
LI Dan¹, LUO Jing-mei¹, DU Luan-ying^{1*}

(1 Department of Pathogen Biology, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2 Institute of Basic Medical of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of excretory/secretory proteins from *Trichinella spiralis* on apoptosis of NCI-H446 small-cell lung cancer cells. **Methods** *Trichinella spiralis* muscle stage larvae ($5 \times 10^6/\text{ml}$) were cultured in culture media for 24 h, the excretory/secretory proteins were collected from the supernatant of culture media. NCI-H446 small-cell lung cancer cells (No. A05) were randomly divided into three groups: experiment group (A), standard control group (apoptosis group, B), and control group (C). NCI-H446 cells in groups A and B were cultured with 0.3 mg/ml *T. spiralis* excretory/secretory proteins, and 6.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cisplatin for 24 h, respectively. NCI-H446 cells of group C were cultured for 24 h without any treatment. The expression of Bcl-2, Fas and Fasl mRNA was detected by RT-PCR. C-myc protein expression level was examined by Western blotting and immunofluorescence assay. **Results** The level of Bcl-2 mRNA was lowest in group A (0.575±0.047), Bcl-2 mRNA level in group C (0.975±0.069) was higher than that of group B (0.850±0.073) ($P < 0.05$). Fas mRNA level was highest in group A (0.975±0.115), followed by group B (0.817±0.121) and group C (0.769±0.061) ($P < 0.05$). The level of Fasl mRNA in groups A, B, and C was 0.669±0.051, 0.787±0.124, and 0.875±0.125, respectively ($P < 0.05$). Fas/Fasl mRNA ratio in groups A, B, and C was 1.475, 1.038,

基金项目: 河北省卫生厅资助课题 (No. 20130020); 河北省教育厅资助重点课题 (No. ZD2014049)

作者单位: 1 承德医学院病原生物学教研室, 承德 067000; 2 承德医学院基础医学研究所, 承德 067000

* 通讯作者, E-mail: luanyingd@126.com

and 0.878. Western blotting showed that the expression of C-myc protein in group C(1.172±0.026) was highest, followed by group B (1.074±0.069) and A(0.566±0.054)($P<0.05$). Immunofluorescence test indicated that the C-myc protein was found in the cytoplasm and the nucleus 24 h after treated with 0.3 mg/ml *T. spiralis* excretory/secretory proteins and 6.4 µg/ml cisplatin. **Conclusion** *Trichinella spiralis* excretory/secretory proteins may inhibit apoptosis of NCI-H446 small-cell lung cancer cells by reducing the apoptosis protein C-myc and Bcl-2 mRNA levels, and causing the increase of Fas/Fasl mRNA ratio.

【Key words】 *Trichinella spiralis*; Excretory/secretory protein; Apoptotic gene; Small-cell lung cancer cell; NCI-H446; Apoptotic protein

Supported by a project from Hebei Provincial Health Department (No. 20130020) and a key project from Hebei Provincial Education Department (No. ZD2014049)

* Corresponding author, E-mail: luanyingd@126.com

肺癌是常见的肺原发性恶性肿瘤之一，而肺癌中的小细胞肺癌生长迅速、侵袭性极高，传统治疗以全身性化疗为主，化疗近期疗效较好，但不良反应大，而且复发率高，治愈率低，90%以上的患者治疗后出现复发，5 年生存率仅为 1%~3%，预后极差^[1-3]。因此，需要寻找新的可用于治疗小细胞肺癌的生物药物。大量研究证明，旋毛虫具有抗肿瘤作用^[4-10]，而抗肿瘤活性物质多来源于旋毛虫的不同抗原，根据旋毛虫来源部位，将旋毛虫抗原分为表面抗原、排泄分泌抗原和虫体可溶性抗原。有研究表明，表面抗原、排泄分泌抗原蛋白组分复杂，为主要的抗原^[11]。研究较多的是旋毛虫的排泄分泌抗原 (excretory-secretory antigens)^[12,13]，王学林等^[14]研究发现旋毛虫虫体蛋白对多种肿瘤细胞有抑制作用。本课题组前期实验证实，旋毛虫排泄分泌蛋白对小细胞肺癌有抑制作用，本实验进一步研究其对肿瘤细胞凋亡的促进作用，以及调节细胞凋亡相关基因，如原癌基因 (C-myc)、凋亡抑制基因 (Bcl-2) 表达情况，探讨旋毛虫作用于人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞与细胞凋亡信号通路 (Fas/Fasl) 的关系，为应用旋毛虫排泄分泌蛋白治疗小细胞肺癌提供理论依据。

1 材料与方法

1 材料

1.1.1 虫株和细胞 河南猪源旋毛虫株，由本教研室昆明小鼠传代保种。人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞 (编号 A054) 由中国医科大学郑学川教授惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 总 RNA 提取试剂 (TRIzol Reagent) 购自美国 Invitrogen 公司，反转录试剂盒 (TaKaRa RNA PCR Kit AMV Ver.3.0) 购自日本 TaKaRa 公司，抗 C-myc 标签鼠单克隆抗体 (Mouse monoclonal [9E10] to C-Myc-Chlp Grade) 购自英国 Abcam 公司，抗 β-actin 标签鼠单克隆抗体 [Mouse Anti-beta Actin Monoclonal Antibody (TA-09) β-

actin]、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (ZB-2305) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。CO₂ 培养箱 (Thermofisher 3543 型) 为美国 THERMO 公司产品，PCR 仪 (Biomad) 为美国 Bio-Rad 公司产品，倒置相差显微镜 (CK40-F200) 为日本 Olympus 公司产品。电泳成像系统 (Transilluminator 2020D) 为日本 Shimadza 公司产品，酶标仪 (ELX808) 为美国 BIOTEK 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 旋毛虫肌幼虫的收集和排泄分泌蛋白的制备 将感染旋毛虫肌幼虫 45 d 的昆明小鼠剖杀，取其肌肉置于粉碎机搅碎，用人工消化液 (1%胃蛋白酶: 1% HCl=1: 10) 于 37 °C 消化 3~4 h，用改良贝氏法收集肌幼虫，除去粗渣和较细纤维，用含 500 U/ml 链霉素、青霉素的生理盐水反复洗涤沉淀，100 目无菌铜网过滤，获得纯净的肌幼虫。按 3 000~4 000 条/ml 移入 37 °C 预温的含双抗的生理盐水中，每瓶 10 ml，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。

按文献[15]的方法提取肌幼虫排泄分泌蛋白。培养 24 h 后，挑选污染少、死虫率低的培养瓶，收集上清放入无菌离心管内，4 °C 1 000×g 离心 30 min，提取上清，即为旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白。

1.2.2 肿瘤细胞的传代、培养与分组 在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中加入复苏的 NCI-H446 细胞，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养，待细胞生长至对数生长期，用于后续实验。取对数生长期 NCI-H446 细胞，胰酶消化，调整细胞浓度为 5×10⁶/ml，接种于 60 mm 培养皿中，每皿 4 ml 细胞悬液。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养，待细胞贴壁后，弃培养液。将 NCI-H446 细胞 (5×10⁶/ml) 随机分为 3 组，A 组为实验组，将旋毛虫排泄分泌蛋白以无血清培养基稀释至 0.3 mg/ml (预试验为最适浓度)，与 NCI-H446 细胞共培养 24 h；B 组为细胞凋亡组，将顺铂稀释至 6.4 µg/ml (预试验为最适浓度)，与 NCI-H446

细胞共培养 24 h; C 组为空白对照组, NCI-H446 细胞单纯培养 24 h, 不作任何处理。

1.2.3 RT-PCR 检测 NCI-H446 细胞中 Bcl-2、Fas 和 FasL mRNA 的表达情况 取上述各组处理 24 h 的 NCI-H446 细胞, 每孔加入 1 000 μ l Trizol, 抽提所得总 RNA 经紫外分光光度计检测吸光度 (A_{260}/A_{280} 值) 为 2.02, 表明抽提的总 RNA 无蛋白污染。取 2 μ g 总 RNA 为模板反转录成 cDNA, 反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 反转录 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min 灭活 M-MLV 反转录酶。进行 PCR 扩增: Bcl-2 mRNA 上游引物 5'-ATTTCTCCTG-GCTGTCTC-3', 下游引物 5'-TACTGCTTTAGTGAAC-CTTT-3', 长度 153 bp; Fas mRNA 上游引物 5'-GG-CATCAACCCAGATTC-3', 下游引物 5'-CATCC-CCAGCCTCAAGAACT-3', 长度 336 bp; FasL mRNA 上游引物 5'-CCAGAGGAAATGGTGAGATGAG-3', 下游引物 5'-CCTGTTATGTTGCCAGATGA-3', 长度 256 bp; β 肌动蛋白 (β -actin) 上游引物 5'-AGCGG-GAAATCGTGCCTGAC-3', 下游引物 5'-ACATCTCTG GAAGGTGGAC-3', 长度 453 bp。取 2 μ l 产物以 β -actin 为内参进行 PCR 扩增。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 40 s, 退火温度分别为 55 $^{\circ}$ C (Bcl-2)、58 $^{\circ}$ C (Fas)、59 $^{\circ}$ C (FasL) 和 52 $^{\circ}$ C (β -actin), 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 经凝胶成像系统结合软件 Band-scan5.0 进行吸光度分析, 该值为各目的基因 mRNA 表达的相对水平。判断细胞凋亡情况的依据: ① 原癌基因 Bcl-2 生理功能主要是抑制细胞凋亡, 当应用抗肿瘤活性物质时, 其表达水平降低, 促进肿瘤细胞凋亡; ② 抗肿瘤活性物质致细胞凋亡时, Fas mRNA 高表达, FasL mRNA 低表达, Fas/FasL mRNA 比例升高。

1.2.4 蛋白质印迹 (Western blotting) 检测 NCI-H446 细胞中 C-myc 蛋白的表达 上述各组处理 24 h 的细胞, 6 孔板每孔加入 200 μ l 细胞裂解液, 反复冻融裂解。4 $^{\circ}$ C 1 000 \times g 离心 15 min, 取上清, BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。每孔加样 40 μ g 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 稳压冰浴电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗 (抗 C-myc 标签鼠单克隆抗体和抗 β -actin 标签鼠单克隆抗体的工作浓度均为 1:1 000) 孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜, 分别加入山羊抗兔 HRP-IgG、山羊抗小鼠 HRP-IgG (1:5 000) 室温孵育 1 h, 使用增强型化学发光 (ECL) 试剂盒按照说明进行后续实验。应用 Quantity One 4.62 软件对蛋白质印迹条带进行定量分析。当应用抗肿瘤活性物质时, C-myc 蛋白表达水平降低, 说明有促凋亡作用。

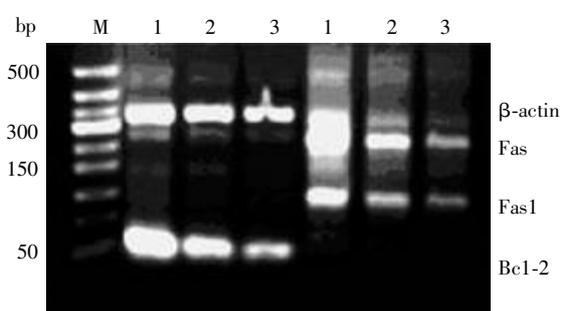
1.2.5 免疫荧光检测 NCI-H446 细胞中 C-myc 蛋白阳性表达情况 在 24 孔板上接种对数生长期的 NCI-H446 细胞 (1×10^6 /ml), 细胞爬片, A、B 两组细胞分别与旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白 (终浓度为 0.3 mg/ml)、顺铂 (终浓度为 6.4 μ g/ml) 共培养, C 组为对照组, NCI-H446 细胞单纯培养。培养后 24 h, 将爬片取出, 4% 多聚甲醛固定, 加一抗 (抗 β -actin 标签鼠单克隆抗体, 1:500) 和荧光二抗 (山羊抗小鼠 HRP-IgG, 1:1 000, 避光), 用荧光显微镜下观察 NCI-H446 细胞中 C-myc 蛋白阳性表达情况, 拍照并分析, 体外培养的活细胞经荧光色素染色后呈均匀绿色荧光, 而凋亡细胞呈致密浓染的颗粒状和块状绿色荧光。

2 结果

2.1 3 组 NCI-H446 细胞中 Bcl-2、Fas 和 FasL mRNA 的表达情况 RT-PCR 结果显示, 经旋毛虫排泄分泌蛋白处理的 NCI-H446 细胞 (A 组), Bcl-2 mRNA 相对表达最低, 为 (0.575 ± 0.047), 与 B、C 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。A 组 Fas mRNA 相对表达量最高, 为 (0.975 ± 0.115), B、C 组相对较低 ($P < 0.05$)。A、B 和 C 组细胞 FasL mRNA 相对表达量分别为 0.669 ± 0.051 、 0.787 ± 0.124 、 0.875 ± 0.125 ($P < 0.05$) (表 1、图 1)。A、B 和 C 组细胞 Fas/FasL

表 1 各组细胞 Bcl-2 mRNA、Fas mRNA 和 FasL mRNA 表达水平
Table 1 Levels of Bcl-2 mRNA, Fas mRNA, and FasL mRNA in the three groups

组别 Group	mRNA 表达水平 mRNA level		
	Bcl-2	Fas	FasL
A	0.575 ± 0.047	0.975 ± 0.115	0.669 ± 0.051
B	0.850 ± 0.073	0.817 ± 0.121	0.787 ± 0.124
C	0.975 ± 0.069	0.769 ± 0.061	0.875 ± 0.125



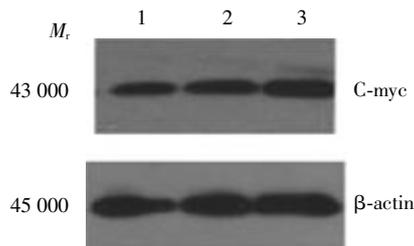
M: DNA 标志物; 1: 空白对照组 (C 组); 2: 顺铂组 (B 组); 3: 旋毛虫排泄分泌蛋白组 (A 组)。

M: DNA marker; 1: Blank control group (C); 2: Cisplatin group (B); 3: *Trichinella spiralis* excretory-secretory proteins group (A).

图 1 3 组 NCI-H446 细胞 Fas、FasL 和 Bcl-2 mRNA 表达情况
Fig. 1 mRNA expression levels of Fas, FasL, and Bcl-2 in the three groups

mRNA 比值分别为 1.475、1.038 和 0.878。

2.2 3 组 NCI-H446 细胞中 C-myc 蛋白的表达情况
Western blotting 分析结果显示, A 组 C-myc 相对表达水平最低 (0.566 ± 0.054), B (1.074 ± 0.069)、C 组 (1.172 ± 0.026) 相对较高 ($P < 0.05$) (图 2)。



1: 旋毛虫排泄分泌蛋白组 (A 组); 2: 顺铂组 (B 组); 3 空白对照组 (C 组)。

1: *Trichinella spiralis* excretory-secretory proteins group (A); 2: Cisplatin group (B); 3: Blank control group (C) .

图 2 各组 C-myc 蛋白表达情况

Fig. 2 C-myc protein expression level in the three groups

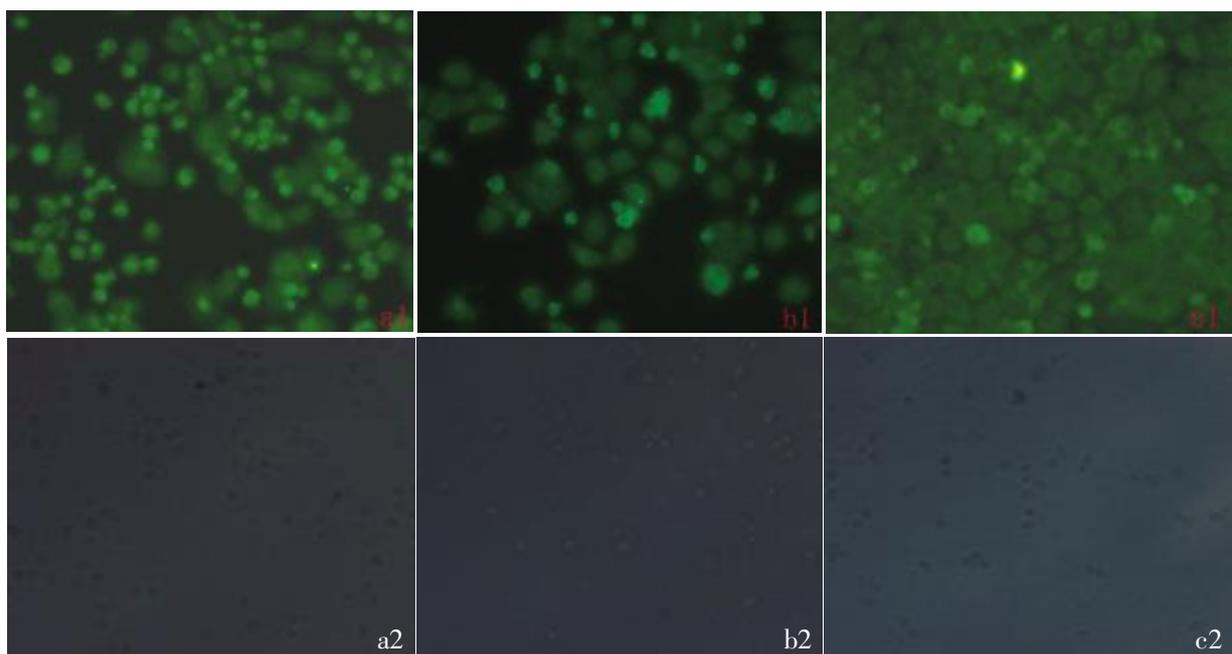
2.3 3 组 NCI-H446 细胞中 C-myc 蛋白的表达情况
免疫荧光定位结果显示, 旋毛虫排泄分泌蛋白和顺铂分别作用后 24 h, C-myc 蛋白可在细胞浆和细胞核中表达 (图 3)。

3 讨论

研究发现, 旋毛虫不同发育阶段的虫体及其分

泌物均有不同程度的抗肿瘤作用^[5,16-18], 但旋毛虫及其活性物质的抗肿瘤机制尚无定论。细胞凋亡是多细胞生物体内一种自发、主动的细胞死亡过程, 是生物体维持细胞数量相对稳定的重要环节。细胞凋亡调控涉及众多基因参与凋亡过程, 其中 Bcl-2 和 C-myc 具有重要的调节作用。目前检测细胞凋亡的方法有形态学检测、DNA 片段化检测、流式细胞仪检测法和细胞凋亡相关物质的检测等^[19]。

Bcl-2 家族的表达和调控在细胞凋亡信号转导途径中发挥着重要作用, 据其在细胞凋亡调控中的不同作用, Bcl-2 蛋白家族分为抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白。Bcl-2 与 Bax 基因均属于 Bcl-2 家族, 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抑制凋亡和促进凋亡基因, 在肿瘤细胞凋亡中具有重要的调控作用^[20]。Bcl-2 基因家族是细胞凋亡的重要调节因子, 主要功能是参与线粒体凋亡通路的调节, 它们可直接控制线粒体膜的通透性, 并促进线粒体释放促凋亡因子^[21]。有研究显示, 众多癌细胞内 Bcl-2 表达水平显著增高, 临床上小细胞肺癌 Bcl-2 蛋白的阳性表达率明显高于其他类型的肺癌, 达 75% 以上^[22]。多种体外培养的小细胞肺癌细胞株亦有 Bcl-2 蛋白过表达的现象^[23]。而 Bcl-2 蛋白的表达可抑制程序性细胞死亡的过程, 能阻断细胞凋亡的最后共同通道, 还可阻断由多种化疗药物以及 γ -射线照射造成的肺癌细胞程序性死亡^[24,25]。本研究结



1: 荧光显微镜下; 2: 光学显微镜下。a: 旋毛虫排泄分泌蛋白组 (A 组, $\times 200$); b: 顺铂组 (B 组, $\times 400$); c: 空白对照组 (C 组, $\times 200$) .

1: Under fluorescence microscope; 2: Under light microscope. a: *Trichinella spiralis* excretory-secretory proteins group (A, $\times 200$); b: Cisplatin group (B, $\times 400$); c: Blank control group (C, $\times 200$) .

图 3 免疫荧光法检测 3 组 NCI-H446 细胞中 C-myc 蛋白的表达情况

Fig. 3 C-myc protein expression by immunofluorescence assay

果显示, 经旋毛虫排泄分泌蛋白处理的 NCI-H446 细胞中的 Bcl-2 mRNA 表达水平降低, 可抑制 NCI-H446 细胞增殖。这一结果是直接使 Bcl-2 蛋白表达量降低, 还是通过降低 C-myc 蛋白表达量, 进而降低 Bcl-2 蛋白的表达水平, 尚需进一步实验证实。

Fas/FasL 信号通路是细胞凋亡的一个重要途径, 两者结合后向细胞内传递死亡信号, 这种结合可发生在不同细胞间或同一细胞内。在人类恶性肿瘤的发展过程中, 常伴有肿瘤细胞表面 Fas 表达缺失或功能丧失, 故诱导或增强 Fas 的表达可促进肿瘤细胞发生凋亡。宿杰等^[26]研究发现人小细胞肺癌组织中 Fas 低表达可能对人小细胞肺癌的发展起促进作用, FasL 高表达可能与人小细胞肺癌的转移和预后相关。本研究结果提示, 经旋毛虫排泄分泌蛋白处理的 NCI-H446 细胞通过 Fas mRNA 表达量高, FasL mRNA 表达量低, Fas/FasL mRNA 比值升高来实现其凋亡促进作用。

C-myc 蛋白参与增殖、分化和转导等多细胞程序过程, 通过上调其目的基因来诱导凋亡, C-myc 蛋白的过表达或低表达均会诱导凋亡^[27]。本研究结果提示, 实验组细胞 C-myc 蛋白的表达降低可能是旋毛虫诱导 NCI-H446 细胞凋亡重要途径之一。

因此, 旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白抑制小细胞肺癌细胞系 NCI-H446 的增殖, 可能是通过降低凋亡抑制蛋白 C-myc 的表达, 进而影响 Bcl-2 的表达及调节 Fas/FasL 比例升高来实现的。由于旋毛虫排泄分泌蛋白组分复杂, 是哪种蛋白对人小细胞肺癌起作用尚不清楚, 需要进一步研究以证实。但旋毛虫诱导肿瘤的细胞凋亡可作为抗癌药物开发和研究的新思路。

参 考 文 献

- [1] 吴超, 李方. 局部放疗联合化疗 172 例局限期小细胞肺癌疗效分析[J]. 生物医学工程与临床, 2011, 15(3): 257-260.
- [2] 陈年春, 周丽华, 张为民. 化疗联合放疗治疗局限期小细胞肺癌近期疗效[J]. 肿瘤研究与临床, 2007, 19(12): 827-828.
- [3] 李佩佩, 梁丽峰, 常蕊静, 等. 3 株人小细胞肺癌细胞系细胞线粒体 DNA 基因组突变研究 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(3): 216-219.
- [4] 段玲欣, 关学敏, 张传生, 等. 旋毛虫抗肿瘤机制研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(2): 142-146.
- [5] 于金玲, 刘孝刚. 旋毛虫感染诱导的抗 MCF-7 肿瘤细胞作用[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(1): 80-83.
- [6] 宫鹏涛, 张西臣, 李健华, 等. 旋毛虫抗小鼠体内 A549 肺癌细胞作用研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(3): 200-202.
- [7] Deng B, Gong P, Li J, et al. Identification of the differentially expressed genes in SP2/0 myeloma cells from Balb/c mice infected with *Trichinella spiralis* [J]. Vet Parasitol, 2013, 194(2-4): 179-182.
- [8] Duan L, Li J, Cheng B, et al. Identification of a novel gene product expressed by *Trichinella spiralis* that binds antiserum to Sp2/0 myeloma cells [J]. Vet Parasitol, 2013, 194 (2-4): 183-185.
- [9] Wang, XL, Fu, BQ, Yang, SJ, et al. *Trichinella spiralis*-a potential anti-tumor agent [J]. Vet Parasitol, 2009, 159(3-4): 249-252.
- [10] 张媛媛, 宫鹏涛, 张西臣, 等. 旋毛虫抗 C57BL/6 小鼠体内 Hepal-6 肝癌细胞作用的研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(1): 24-26.
- [11] 马鸣旺, 张志兰, 申丽洁, 等. 旋毛虫肌幼虫 3 种抗原的蛋白组分及免疫反应性比较研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(8): 1929-1931.
- [12] 刘娟娟, 殷国荣, 张建红, 等. 弓形虫排泄分泌抗原鼻内免疫小鼠诱导的脾与肠相关淋巴组织细胞免疫效应及动态变化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(8): 580-583.
- [13] 吴静, 刘娟娟, 殷国荣, 等. Vero 细胞无血清培养制备弓形虫排泄分泌抗原适宜条件的筛选 [J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(10): 903-905.
- [14] 王学林, 杨世杰, 吴秀萍, 等. 旋毛虫虫体蛋白对肝癌细胞 H7402 的抑制作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(5): 440-444.
- [15] 王国英, 马远方, 刘广超, 等. 两种方法制备的旋毛虫 ES 抗原对小鼠免疫保护作用的研究 [J]. 免疫学杂志, 2007, 23(5): 586.
- [16] Cui J, Wang ZQ. Outbreaks of human trichinellosis caused by consumption of dog meat in China [J]. Parasite, 2001, 8(2 Suppl): 574-577.
- [17] Helmby H, Grecis RK. IL-18 regulates intestinal mastocytosis and Th2 cytokine production independently of IFN-gamma during *Trichinella spiralis* infection [J]. J Immunol, 2002, 169(5): 2553-2560.
- [18] 李文桂, 陈雅棠, 蒋霞, 等. 旋毛虫病患者血清细胞因子和一氧化氮水平检测 [J]. 中国地方病学杂志, 2002, 21(3): 220-221.
- [19] 顾芳, 秦宜德, 罗欣, 等. 细胞凋亡检测方法的研究进展 [J]. 医学信息, 2014, 27(4): 517-518.
- [20] Guo B, Zhai D, Cabezas E, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation [J]. Nature, 2003, 423(6938): 456-461.
- [21] 沈晓咏, 吕帆真, 武韞, 等. bcl-2, bax 和 p53 在小细胞肺癌中的表达及对细胞凋亡的影响 [J]. 四川医学, 2013, 34(7): 917-917.
- [22] Kaiser U, Schilli M, Haag U, et al. Expression of bcl-2 protein in small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 1996, 15(1): 31-40.
- [23] Zangemeister-Wittke U, Schenker T, Luedke GH, et al. Synergistic cytotoxicity of Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines [J]. Br J Cancer, 1998, 78(8): 1035-1042.
- [24] Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, et al. Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(8): 2048-2058.
- [25] Sirzen F, Zhivotovsky B, Nilsson A, et al. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in lung carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities [J]. Anticancer Res, 1998, 18(2A): 695-699.
- [26] 宿杰, 赵志龙, 陈东义, 等. Fas/FasL mRNA 在小细胞肺癌石蜡包埋组织中的表达及其临床意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(22): 3245-3248.
- [27] Birocio A, Benassi B, Filomeni G, et al. Glutathione influence C-myc induced apoptosis in M14 human melanoma cells [J]. J Bio Chem, 2002, 277(46): 43763-43770.

(收稿日期: 2013-12-20 编辑: 杨频)