

3. 体内研究通过建立腺样囊性癌裸鼠实验性肺转移模型, 经腹腔注射 PD98059, 肉眼和组织学观察肺转移结节的情况;

4. 建立涎腺腺样囊性癌裸鼠背部移植瘤模型, 探讨 ERK1/2 与涎腺腺样囊性癌的发生发展的关系。

三. 研究方法:

(一). ERK 在 ACC-M 中的表达和 ERK 抑制剂 PD98059 对 ACC-M 细胞增殖影响

1 免疫细胞化学

抗 ERK 抗体的胞核或胞浆呈程度不同基本均匀的棕黄色。

2 培养细胞 HE 染色

将已清洗并高温高压灭菌的盖玻片预先放到小培养皿中; 取生长良好的细胞, 用 0. 25% 胰酶消化后, 以 1×10^5 个/孔细胞浓度接种到小培养皿中, 待细胞爬满盖玻片 80% 后, 弃去培养基, PBS 充分冲洗, 4% 多聚甲醛 (PBS 配制) 固定 30 分钟, PBS 洗 3 次, 每次 1 分钟, 浸入苏木素染液, 染色 5 分钟, 自来水充分冲洗; 浸入稀盐酸酒精溶液进行分色数秒钟, 自来水冲洗; 浸入浓氨水中, 使胞核蓝化 3 分钟, 自来水冲洗; 浸入伊红染液中染色 5 分钟, 自来水冲洗; 梯度酒精脱水, 每次 1 分钟, 二甲苯透明 3 次, 每次 1 分钟, 中性树胶封固。光镜下观察。

3 药物敏感性 MTT 测定法

PD98059 配制

PD98059 为黄色粉末, -20°C 避光保存; 先用纯 DMSO 溶解, 再用无菌 PBS (细胞培养用) 稀释到所需浓度。

MTT 原理

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶的蓝紫色结晶物 (Formazen) 并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能, DMSO 能溶解此结晶, 用酶联免疫检测仪测定的光吸收值 (OD 值) 可间接反映活细胞数量。

统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件对细胞增殖率进行统计, 对照组和实验组间的比较采用 student t 检验。