

高压氧联合化疗药物对结肠腺癌细胞 CT26 小鼠移植瘤生长的影响

夏 扬¹ 汪爱国² 张 伟² 黄 平³ 黄培林² 张丽达³

(1 东南大学附属中大医院康复科 南京 210009; 2 东南大学医学院病理学系 南京 210009;

3 东南大学附属中大医院高压氧科 南京 210009)

摘要 目的:探讨高压氧联合化疗药物对结肠腺癌细胞 CT26 小鼠移植瘤生长的影响。**方法:**建立小鼠结肠腺癌移植瘤模型,观察 0.2 Mpa HBO 及联合化疗药物 5-FU 或紫杉醇对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响,计算肿瘤抑制率;用流式细胞仪观察 0.2 Mpa HBO 对 CT26 细胞周期的影响。**结果:**动物实验结果显示:HBO 组小鼠肿瘤体积抑制率为:22.39%,肿瘤质量抑制率为:25.77%;5-FU 组分别为:42.38%,43.61%;5-FU + HBO 组分别为:72.10%,71.47%;紫杉醇组分别为:26.31%,23.04%;紫杉醇 + HBO 分别为:33.24%,30.96%。5-FU + HBO 组与 5-FU 组及 HBO 组相比较有显著性差异($p < 0.01$);紫杉醇 + HBO 组与紫杉醇组及 HBO 组相比差异不明显。流式细胞仪检测结果显示:0.2 Mpa HBO 诱导 CT26 细胞在 S 期积蓄 (G0/G1 期(55.89%)、S 期(40.79%)、G2/M 期(3.32%))。**结论:**0.2 Mpa HBO 可抑制了 CT26 结肠腺癌小鼠移植瘤的生长,并能增强细胞周期特异性化疗药物的敏感性。

关键词:高压氧;化疗药物;结肠癌细胞;移植瘤;小鼠

中图分类号:R73-36 R753.3 R459.6 **文献标识码:**A

Effects of hyperbaric Oxygen Combined with Chemotherapy on the Proliferation of Colorectal Carcinoma in Vivo

XIA Yang¹, WANG Ai-guo², ZHANG Wei², HUANG Ping¹, HUANG Pei-lin², ZHANG Li-da³

(1 Department of Rehabilitation, Zhong Da Hospital of Southeast University, Nanjing, 210009

2 Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Southeast University, Nanjing, 210009

3 Department of Hyperbaric oxygen, Zhong Da Hospital of Southeast University, Nanjing, 210009)

ABSTRACT Objective: To study the effects of hyperbaric oxygen (HBO) or combined with chemotherapy (5-FU or paclitaxel) on the proliferation of colon adenocarcinoma cell CT26 transplanted in mice. **Methods:** The cell cycle of CT26 under hyperbaric oxygen was examined with flow cytometry; BALB/c mouse tumor models were established and the effects of 0.2 Mpa HBO or combined with chemotherapy (5-FU or paclitaxel) on the growth of tumors were observed. The tumor inhibitory ratio was calculated. **Results:** The volume inhibitory ratios or weight inhibitory ratios in different groups were as follows: HBO group(22.39%, 25.77%); 5-FU group(42.38%, 43.61%); 5-FU+HBO group(72.10%, 71.47%); Paclitaxel group(26.31%, 23.04%); Paclitaxel+HBO group (33.24, 30.96%). The tumor inhibitory ratio in 5-FU+HBO group was higher than that in 5-FU group or HBO group, but there was no difference between Paclitaxel+HBO group and Paclitaxel group or HBO group. **Conclusion:** These results show that HBO can improve the effect of cell cycle specific antitumor drugs, HBO itself may inhibit the growth of transplanted mouse tumor. HBO may induce cancer cells into cell cycle and accumulate in S phase in vitro; and inhibit the growth of epidermic tumors in vivo.

Key words: Hyperbaric oxygen; 5-FU; Paclitaxel; CT26; Mice; Transplanted tumor

前言

高压氧(Hyperbaric Oxygen, HBO)作为一种辅助治疗手段已广泛应用于临床,但 HBO 能否用于肿瘤的辅助治疗尚有争议。有学者认为,HBO 可以减轻癌症患者术后、放疗和化疗后遗症,但有学者认为 HBO 本身可能会刺激肿瘤组织的增生。目前,有关 HBO 辅助化疗药物治疗肿瘤的实验研究并不多见,5-氟脲嘧啶(5-FU)和紫杉醇均为细胞周期特异性药物,5-FU 主要作用于细胞周期的 S 期,而紫杉醇主要作用于细胞周期的 M 期,HBO 能否增强 5-FU 或紫杉醇治疗肿瘤的疗效,日前国内外均未见报道。

本文通过建立动物肿瘤模型,初步研究了 HBO 联合 5-FU

或紫杉醇对荷结肠癌小鼠肿瘤生长的影响。探讨 HBO 联合化疗药物(5-FU 或紫杉醇)对 CT26 小鼠结肠腺癌移植瘤生长的影响,以期临床探索使用化疗联合 HBO 治疗肿瘤提供实验理论依据。

1 材料和方法

1.1 结肠腺癌细胞(CT26)株

小鼠结肠癌细胞(CT26)株,由上海第二军医大学免疫教研室惠赠。细胞培养于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液 (pH7.2)(美国 GIBCO 公司)中,在 37℃、5%CO₂ 充分湿度条件下培养,细胞呈单层贴壁生长,每 2-3d 传代一次。传代时用 0.25% 胰酶室温下消化 3-5 min,选用对数生长期细胞用于实

* 基金项目:南京市社会发展科技计划(200401070-3),江苏高校高新技术产业发展项目(HJ03-059)资助

作者简介:夏扬,(1963-),女,医学本科,主治医师,主要研究方向:康复医学

通讯作者:张丽达,E-mail:hpl@seu.edu.cn

(收稿日期 2006-10-08 接受日期:2006-10-30)

验。收集并调整细胞数为 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ 。

1.2 流式细胞仪检测细胞周期

将呈对数生长期 CT26 细胞分为 3 组: ①正常对照组: 即不作 HBO 暴露; ②HBO-A 组: 无菌状态下细胞暴露于 0.2 MPa HBO, 出舱后置 CO_2 培养箱继续培养 12h; ③HBO-B 组: 无菌状态下细胞暴露于 0.2 MPa HBO, 出舱后置 CO_2 培养箱继续培养 24h。上述 3 组细胞, 均用 0.25% 胰酶消化, 同时收集细胞数量 1×10^6 个左右, 800~1000r/min 离心 5min, 弃去培养液, PBS 洗 3 次, 离心去 PBS, 加入冰预冷的 70% 的乙醇固定 (4℃, 1h), 用流式细胞仪 (Becton-Dickinson 公司制造) 检测 CT26 细胞在 HBO 处理后 G0/G1 期、S 期、G2/M 期的比例。HBO 处理方法: 入舱前用紫外灯消毒氧舱 20min, 纯氧洗舱 10min。然后将各组培养细胞放入舱内, 15min 内缓慢升压至 0.2MPa, 维持氧压不变, 60min 后开始减压, 在 15min 内减至常压状态后出舱。纯氧流量 2L/min。

1.3 人结肠癌 BALB/c 小鼠移植瘤模型的建立

待 CT26 瘤细胞贴壁生长后, 取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 离心后用 0.2 ml 0.9% 生理盐水吹打成细胞悬液, 在无菌实验条件下, 将瘤细胞悬液 ($2.0 \times 10^6/0.2\text{ml}$ /只) 接种于 BALB/c 小鼠右前肢背部皮下, 注射局部出现明显皮丘, 3~4 d 后出现结节, 10d 后直径约 1.0cm 左右, 手术剥离瘤体, 切成小块接种在另外 3 只小鼠右腋窝皮下, 如此在小鼠体内反复传代两次后, 最后再剥离瘤体, 将瘤组织块切成 $1 \times 1 \times 1\text{mm}$ 大小, 用外科手术套管针接种到 25 只小鼠右腋皮下, 7 d 后挑选其肿瘤直径约 0.5 cm 左右的小鼠分组实验, 移植瘤动物模型建立。

1.4 实验动物及分组

实验动物: BALB/c 小鼠 24 只, 4~6 周龄, 体重 $22 \pm 2.0\text{g}$, 雌雄各半, 购自中科院上海斯莱克实验动物中心; 饲养于清洁级动物室 (22~25℃), 垫料, 饮用水和食物均经消毒灭菌。用 8 只无瘤鼠作空白对照, 从荷瘤鼠中挑选 48 只 (荷瘤直径约 0.5 cm) 作为动物模型随机分为 6 组: ①空白对照组 (8 只, 无瘤, 雌雄各半); ②模型对照组 (8 只雌雄各半,); 每日腹腔注射生理盐水 0.2ml/只, 常压常氧下饲养; ③模型+HBO 组 (8 只, 雌雄各半): 模型鼠每日腹腔注射生理盐水 0.2ml/只, 每日实施 HBO; ④模型+5-FU 组 (8 只, 雌雄各半): 模型鼠每日按 5mg/kg 体重腹腔注射 5-FU, 常压常氧下饲养; ⑤模型+HBO+5-FU 组 (8 只, 雌雄各半): 模型鼠每日按 5mg/kg 腹腔注射 5-FU, 每日实施 HBO; ⑥模型+紫杉醇组 (8 只, 雌雄各半):

模型鼠隔日按 5mg/kg 腹腔注射紫杉醇, 常压常氧下饲养; ⑦模型+HBO+紫杉醇组 (8 只, 雌雄各半): 模型鼠隔日按 5mg/kg 腹腔注射紫杉醇, 每日实施 HBO。

1.5 HBO 暴露

实验开始前先用纯氧清洗加压舱 10min, 然后将模型鼠给药 2h 后送入动物加压舱 (DWC150-300 型动物实验舱为上海 701 所产品), 15 min 内缓慢升压, 当舱压升至 0.2MPa 稳住压力不变, 持续 60 min 后缓慢减压, 在 15 min 内减压至常压状态后出舱。每天暴露 HBO 一次, 共 15 天。

1.6 测量移植瘤重量和体积并计算肿瘤抑制率

按实验设计要求, 移植瘤模型建立后次日隔天用电子数显卡尺测量皮下肿瘤的长径 (a) 和短径 (b), 用公式 $V=1/2ab^2$, 计算肿瘤体积的大小, 绘制肿瘤生长曲线, 实验共进行 15d 后处死动物, 剥离皮下肿瘤, 测量其大小并用电子秤 (上海天平仪器厂生产) 称重, 用公式: 肿瘤抑制率 = (对照组 - 实验组) / 对照组 $\times 100\%$, 计算肿瘤抑制率。

1.7 动物静脉外周血 WBC、RBC、Hb、PLT 检测

实验进行 15 天后颈椎脱臼处死动物前, 眼球取血 (采血管中先加两滴抗凝剂), 样本送中大医院血液生化分析室作血常规检测。

1.8 病理组织学观察

实验进行 15 天后颈椎脱臼处死动物, 取各组全部肿瘤组织及心、肝、脑、肾、肺等脏器, 4% 甲醛固定, 取材, 脱水, 透明, 石蜡包埋, $4\mu\text{m}$ 厚连续切片, 脱蜡、HE 染色、封片, 光镜下进行形态学观察, 检查是否有脏器转移等。

1.9 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件, 根据数据的资料性质, 选用 t 检验, 若 $p < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 CT26 细胞移植瘤模型的建立

CT26 细胞接种于 BALB/c 小鼠体内 3~4 d, 可在皮下摸到粟粒大小的结节, 以后逐渐增大。接种后第 10d 统一处死动物, 所有移植肿瘤的动物均见肿瘤生长, 其移植成功率为 100%。解剖全部 BALB/c 小鼠, 肉眼可见: 肿瘤呈结节状 (图 1), 包膜较完整, 未向周围浸润, 肿瘤切面呈灰白色, 无出血坏死灶; 镜下观察: 移植瘤为未分化结肠腺癌 (图 2)。



图 1 小鼠 CT26 结肠腺癌移植瘤模型 (右腋后)

Picture.1 CT26 colorectal carcinoma models in BALB/c mouse

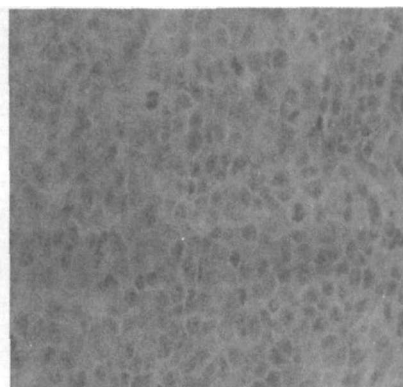


图 2 CT26 未分化结肠腺癌 (400×)

Picture.2 CT26 undifferentiated colorectal carcinoma (400×)

2.2 HBO 对 CT26 细胞周期的影响

流式细胞仪检测细胞周期各时相比比例 (G0/G1 期、S 期、G2/M 期)结果显示:对照组为 74.82%、20.38%、4.80%; HBO-A 组为 66.48%、33.16%、0.36%;HBO-B 组为 55.89%、40.79%、3.32%(图 3)。提示 HBO 可诱导 CT26 细胞在 S 期积蓄,且 HBO-B 组 S 期积蓄量要略高于 HBO-A 组。提示:HBO 可诱导 CT26 细胞在 S 期积蓄,且 HBO 后 24h 组 S 期积蓄量要高于 HBO 后 12h 组。

2.3 HBO 及其联合 5-FU、紫杉醇对荷瘤鼠外周血常规的影响

眼球取血,检测各组小鼠外周血中 WBC、RBC、Hb、PLT 的情况如下(见表 1)。

2.4 HBO 联合 5-FU、紫杉醇对小鼠移植瘤生长的影响

实验 15 天后颈椎脱臼处死动物,肉眼可见各处理组皮下肿瘤的体积大小差别,完整剥离瘤体,测量瘤体体积和重量,

计算肿瘤抑制率(表 2)。

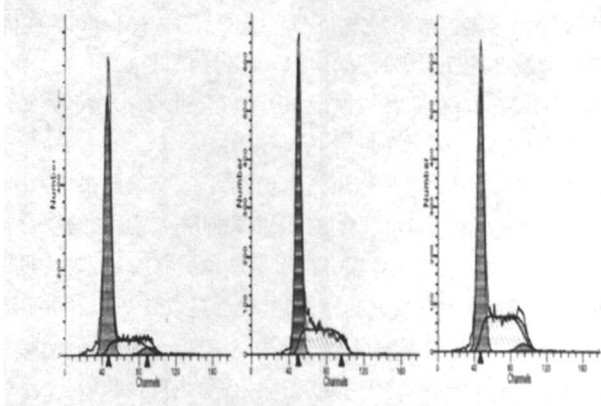


图 3 HBO 对 CT26 细胞周期的影响
Picture.3 Effect of HBO on cycle of CT26 cell

表 1:HBO 及联合 5-FU、紫杉醇对荷瘤鼠外周血常规的影响(̄x±s)

Table.1 The effects of 0.2 Mpa HBO combined with chemotherapy(5-FU or paclitaxel) on the peripheral blood in BALB/c mouse tumor models

实验分组	WBC(10 ⁹ /l)	RBC(10 ¹² /l)	Hb(g/l)	PLT(10 ⁹ /l)
空白对照组	8.27±1.18	6.51±0.90	95.87±10.93	864.12±79.95
模型对照组	9.04±0.97	6.49±0.89	96.51±13.90	874.80±121.96
模型+HBO 组	8.96±0.48	6.35±0.50	91.30±7.69	811.00±90.38
模型+5-FU 组	7.89±0.59	7.27±1.16	101.12±15.11	764.87±151.42
模型+5-FU+HBO 组	8.32±1.18	6.74±0.99	109.75±14.25	711.87±132.15
模型+紫杉醇组	9.14±1.05	7.35±0.83	102.87±11.16	791.50±130.95
模型+紫杉醇+HBO 组	8.77±0.91	7.75±1.12	109.62±9.36	729.87±112.64

HBO 组及其联合化疗组小鼠外周血常规中的 WBC、RBC、Hb 及 PLT 的平均值和模型对照组及空白对照组比较皆无显著性差异,(P>0.05)。

表 2:HBO 联合 5-FU、紫杉醇对 BALB/c 鼠移植瘤生长抑制的影响

Table.2 The effects of 0.2 Mpa HBO combined with chemotherapy(5-FU or paclitaxel) on the the growth of tumors in BALB/c mouse tumor models

组别	肿瘤体积(cm3, ± S)	肿瘤体积抑制率(%)	肿瘤质量(g, ± S)	肿瘤质量抑制率(%)
空白对照组	0	0	0	0
模型对照组	2.692±0.391	0	2.513±0.414	0
模型+HBO 组	1.729±0.402	25.77	1.699±0.359	22.39
模型+5-FU 组	1.551±0.234	42.38	1.417±0.325	43.61
模型+5-FU+HBO 组	0.751±0.212	72.10	0.717±0.223	71.47
模型+紫杉醇组	1.984±0.451	26.31	1.934±0.413	23.04
模型+紫杉醇+HBO 组	1.797±0.154	33.24	1.735±0.541	30.96

5-FU + HBO 处理组肿瘤抑制率与单纯 5-FU 组及 HBO 组相比有显著差异(p<0.05);紫杉醇+HBO 处理组肿瘤抑制率与单纯紫杉醇组及 HBO 组相比差异不明显(p>0.05); 模型+HBO 组肿瘤体积和质量与模型对照组相比有显著差异,(p<0.05)。

2.5 HBO 对移植瘤组织及荷瘤鼠重要器官的病理学观察

HBO 组及联合化疗组肿瘤的均出现不同程度的坏死,特别是 HBO+5-FU 组坏死最为严重,而模型对照组较少坏死发生。心、肝、脾、肺、肾等各内脏组织没有发现明显的形态学改变,无肿瘤脏器转移现象发生。

3 讨论

目前,恶性肿瘤的治疗方法主要是手术治疗、化疗和放疗,但都会引起相应并发症,同时由于在肿瘤组织中大约有三分之一的癌细胞处于乏氧状态,这可能是癌细胞对放疗和化疗产生耐受的主要原因之一^[1]。

HBO 是机体呼吸压力超过 0.1MPa 的纯氧而用于治疗疾

病的一种新的治疗手段,它能改善微循环,提高氧分压,增强机体免疫机能,临床上已将其应用于多种疾病的治疗和辅助治疗,但是 HBO 用于肿瘤的治疗尚有争议。1966 年 Johnson 和 Lauchlan 首次报道 HBO 可能促进肿瘤增长;而近年来相继有人报道 HBO 是肿瘤患者较好的辅助疗法^[2];Linda 等发现单纯 HBO 对 DMBA 诱导的鼠乳腺癌抑制率为 17~24.2%^[3]。Takiguchi^[4]等在成功建立小鼠肉瘤 180 移植瘤模型的基础上,分别给予 5-FU、HBO、和 HBO+5-FU 联合治疗,结果提示,在实验 27 天后,模型组移植瘤体积直径增加 277.8%、单纯 HBO 组增加 244.1%、单纯 5-FU 组肿瘤直径增加 182.7%、联合 HBO 治疗组为 138.5%,显示化疗药物联合 HBO 可提高化疗疗效;Petre^[5]等对小鼠 MCA-2 模型进行试验,结果显示 HBO 结合阿

霉素化疗不仅会增加对 MCA-2 细胞溶解同时也明显降低了肺转移数量。本实验结果显示:5-FU+HBO 组对 BALB/c 鼠移植瘤体积抑制率达 72.10%,较单纯 5-FU 组(42.38%)、单纯 HBO 组(25.77%)为高($p<0.05$),提示 HBO 联合细胞周期特异性药物 5-FU 可明显增强了 5-FU 的抗癌作用。

有关 HBO 对肿瘤的作用机制仍不明白,有文献报道 HBO 提高了肿瘤组织的氧自由基含量,来发挥抑制肿瘤生长的作用^[6];实体瘤内的缺氧状况与肿瘤恶性表型和预后有关系,缺氧的肿瘤细胞为了能够逃避缺氧的损伤,其可通过改变基因表达来适应缺氧环境,如肿瘤细胞可通过高表达缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α)来调控血管内皮生长因子、促红细胞生成素、糖酵解酶等表达,以适应缺氧环境而继续增殖^[7,8],亦有研究报道,肿瘤组织中的 HIF-1 α 水平随着组织内氧含量增加而降解,继而抑制肿瘤的生长^[8,9]。本研究结果显示 HBO 处理荷瘤鼠可抑制肿瘤的生长,与上述报道相一致。这进一步支持了 HBO 联合细胞周期特异性药物治疗肿瘤的可行性。

HBO 对化疗药物的增效机制是什么?目前认为 HBO 能使处于静止期的肿瘤细胞重新进入细胞周期,这有利于提高细胞周期特异性药物的抗癌效能。Kalns^[10]发现 HBO 可使 LNCaP 癌细胞在 G2/M 期积蓄,并可使缺氧区域的癌细胞分裂增殖加速,推测 HBO 具有导致肿瘤细胞周期同步化的作用。我们通过检测了 HBO 作用于 CT26 瘤细胞的增殖周期的改变,显示对照组 G0/G1 期 (74.82%)、S 期 (20.38%)、G2/M 期 (4.80%); HBO-A 组为 66.48%、33.16%、0.36%; HBO-B 组为 55.89%、40.79%、3.32%,提示 HBO 可以诱导 CT26 结肠腺癌细胞在 S 期积蓄,但这与 Kalns 发现的 HBO 可使 LNCaP 癌细胞在 G2/M 期积蓄不一致,这可能与实验用的细胞种类及其生长特性有关,有待进一步证实。

本实验我们选择了两种不同的细胞周期特异性药物 5-FU (主要作用于 S 期)和紫杉醇(主要作用于 M 期),联合 HBO 开展动物实验。结果表明 HBO 明显增强 5-FU 的抑制肿瘤增殖的作用,而 HBO 对紫杉醇的作用无显著统计学意义,初步验证 HBO 具有提高细胞周期特异性药物的抗癌作用。有关 HBO 联

合细胞周期特异性药物治疗肿瘤的研究值得进一步探究。

参考文献

- [1] Haffty BG, Hurley RA, Peters LG. Carcinoma of the larynx treated with hypofractionated radiation and hyperbaric oxygen: long-term tumor control and complications [J]. Int J Radiation Oncology Biol Phys, 1999,45(1):13-20
- [2] Feldmeier J, Carl U, Hartmann K, et al. Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy? [J]. Undersea Hyperb Med, 2003,30(1):1-18
- [3] Linda E.B, Stuhra VV1, Oddbj?rn S, et al. Hyperbaric oxygen alone or combined with 5-FU attenuates growth of DMBA-induced rat mammary tumors[J]. Cancer Letters, 2004,210:35-40
- [4] Takiguchi N, Saito N, Nunomura M, et al. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001,47(1):11-4
- [5] Petre PM, Baciewicz FA, Tigan S, et al. Hyperbaric oxygen as a chemotherapy adjuvant in the treatment of metastatic lung tumors in a rat model[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2003,125(1):85-95
- [6] Ogiso Y, Tomida A, Lei S, et al. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II -directed drugs [J]. Cancer Res 2000,60(6): 2429-2434
- [7] 练庆林,杭荣椿,严惠芳等,高压氧对小鼠 s-18 肉瘤化学治疗增效作用研究[J].中华航海医学杂志,1997,4(1):30-33
- [8] Feldkamp MM, Lau N, Rak J, et al. Normoxic and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by astrocytoma cell is mediated by Ras [J]. Int J Cancer, 1999,81(1):118-120
- [9] Marxsen JH, Schmitt O, Metzén E, et al. Vascular endothelial growth factor gene expression in the human breast cancer cell line MX-1 is controlled by O₂ availability in vitro and in vivo [J]. Ann Anat, 2001,183(3):243-249
- [10] Marc-Andr e CD., Maude D, Michaud DE., et al. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005,37: 535-540

张薇(上接第 26 页)

参考文献

- [1] Michael M Shi, Scott P Myrand, Michael R Bleavins, et al. High-throughput genotyping method for glutathione S-transferase T1 and M1 gene deletions using TaqMan probes[J]. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 1999,103(1): 3-15
- [2] Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, et al. Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase P locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer [J]. Carcinogenesis, 1997,18: 641-644
- [3] Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, et al. Pi-class glutathione S-transferase :regulation and function [J]. Chem Biol Interact, 1998, 112:69-82
- [4] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance [J]. Biochem. Mol. Biol., 1995, 30: 445-600
- [5] Carol Sweeney, Gail Y McClure, Manal Y Fares, et al. Association between Survival after Treatment for Breast Cancer and Glutathione S-Transferase P1 Ile105Val Polymorphism [J]. Cancer Research, 2000,60: 5621-5624
- [6] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells [J]. Nucleic Acids Res., 1998, 16: 1215
- [7] Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques,1994, 17: 915-919
- [8] 冷曙光,宋文佳,王雅文,等.中国汉族人口三种谷胱甘肽 S- 转移酶基因多态性分析[J].中华预防医学杂志,2001,35(3):159-162
- [9] 马晴雯,林国芳,陈纪刚,等.上海“本地人”正常人群 h GSTP1 基因 A1578G 多态性研究[J].癌变 畸变 突变,2000,12(1):6-8