

的不同阶段他们之间的关系也可能会发生不同的改变. 我们的结果提示细胞凋亡对增生的刺激也许仅发生在肝癌发生的早期, 在肿瘤发展过程中其他因素参与, 或同一种蛋白还有其他功能, 如 Bid 是否还参与细胞周期的调节等, 有可能使其在肿瘤发生过程中的作用发生改变, 需进一步进行研究.

4 参考文献

- 1 Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Mullaer L, Taper H, Huber W, Bursch W, Schult-Hermann R. Inherent increase of

- apoptosis in liver tumors: Implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology* 1997;25:906-912
- 2 Fausto N. Mouse Liver Tumorigenesis: Models, Mechanisms and relevance to human disease. *Seminars Liver Dis* 1999;19: 243-252
- 3 Grasl-Kraupp B, Rossmanith W, Ruttkay-Nedecky B, Mullaer L, Kammerer B, Bursch W, Schult-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology* 1998;28:717-726
- 4 Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, Fausto N. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knock-out mice. *J Exp Med* 2000;192:1809-1818

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000

于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430000

项目负责人: 陈滋华, 442000, 湖北省十堰市, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科. pollex001163@com

电话: 0719-8801431 传真: 0719-8883809

收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-01-08

摘要

目的: 探讨硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 增生的影响.

方法: 通过 MTT 比色法、细胞生长曲线描绘研究硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 增生的影响, 采用流式细胞仪观察硒蛋氨酸诱导 EC9706 细胞凋亡的作用及对细胞周期的影响.

结果: 硒蛋氨酸呈时间、剂量依赖性方式抑制 EC9706 细胞增生, 改变细胞周期分布, 增加 G₀/G₁ 期细胞比例, 诱导细胞凋亡.

结论: 硒蛋氨酸可能通过影响细胞周期分布和诱导细胞凋亡, 来抑制 EC9706 细胞增生. 硒蛋氨酸可能是预防和治疗食管癌的一种新方法.

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平. 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1215-1217

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1215.asp>

0 引言

食管癌在我国是常见病, 严重威胁着人类的生命健康, 其发生、发展涉及多个基因及分子水平的变化, 目前无论是传统手术还是化疗及放疗都未能取得满意的疗

效^[1-13]. 因此, 有必要寻找新的防治方法. 大量流行病学和临床研究发现, 微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关性. 硒是人体所必需的微量元素, 在生命过程中发挥着重要作用, 本研究的目的在于观察硒蛋氨酸对体外培养食管癌细胞系 EC9706 生长的影响, 为探讨其对食管癌防治作用提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂: RPMI-1640 培养基, 小牛血清, 胰蛋白酶、蛋氨酸为 Gibco 公司产品; MTT、DMSO、硒蛋氨酸(selenomethionine)为 sigma 公司产品. 仪器设备: 恒温 CO₂ 培养箱(SanyD 日本), 倒置显微镜(Olympus IX-70)、酶联免疫检测仪(Σ 960 美国), 流式细胞仪(Epics XL, Beckman coulter 公司). 细胞系: 人食管癌细胞系 EC9706 由中国医学科学院王明荣教授惠赠.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 食管癌细胞 EC9706 常规培养于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养.

1.2.2 硒蛋氨酸对食管癌细胞 EC9706 生长的影响 取对数生长期的食管癌细胞 EC9706 按每孔 1×10^4 个细胞/mL 接种于 96 孔培养板中, 24 h 后换液, 加入不同浓度硒蛋氨酸 100、200、300、400、500 μmol/mL 设不接种细胞的空白对照组和只加入等体积溶剂 DMSO 的对照组. 每组浓度每个时间点设 8 个复孔, 继续培养, 于第 24、48、72、96 h 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)10 μL, 37 °C 孵育 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 轻轻振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在 490 nm 波

长酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(A值), 求其平均值, 对照组细胞存活率记为100%, 实验组按下列公式计算细胞存活率: 细胞存活率 = 实验组A值 / 对照组A值 \times 100%.

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡情况 根据MTT法测出的最佳药物浓度处理食管癌细胞EC9706, 取96 h后实验组、空白对照组及阴性对照组细胞用PBS洗涤后, 加入700 mL/L冷乙醇固定, 离心后PI染液(PI 5 mg、Rnase 2 mg、TritmX-100 1.0%, 生理盐水65 mL, 枸橼酸钠0.1 g, 加蒸馏水至100 mL) 4℃染色30 min, 用流式细胞仪检测. 选用488 nm激发波长测定样品.

1.2.4 细胞生长曲线 把细胞按 1×10^4 个/孔分别接种在24孔培养板中, 待细胞分别长到40-50%融合时, 按一定的MOI感染食管癌细胞EC9706, 定期消化收集细胞, 每个时间点设3个平行组, 计数取平均值及标准差, 连续计数4 d, 对照组包括加蛋氨酸阴性对照组和不加药物空白对照组.

统计学处理 所有数值均以mean \pm SD表示, 采用SPSS10.0统计分析软件进行t检验.

2 结果

2.1 MTT 测定结果 各组浓度硒蛋氨酸对食管癌细胞EC9706的增生有较强的抑制作用, 与空白对照组比较差异显著($P < 0.01$), 且呈现一定的浓度、时间依赖性, 结果见(表1). 当硒蛋氨酸浓度为400 μ mol/mL处理食管癌细胞96 h, 对癌细胞增生的抑制作用最明显, 所以以下实验均以此作用浓度进行.

2.2 流式细胞仪分析凋亡细胞的结果 食管癌细胞EC9706经400 μ mol/mL硒蛋氨酸处理96 h后行流式细胞仪分析, 在 G_1 期前出现一个二倍体峰, G_2/M 期细胞减少. 400 μ mol/mL硒蛋氨酸致食管癌细胞凋亡百分率为52.3%, 与空白对照组及阴性对照组相比有非常显著差异($P < 0.01$) (见图1).

2.3 细胞生长曲线 细胞生长曲线显示硒蛋氨酸组癌细胞计数随时间推移有明显降低趋势, 96 h癌细胞计数最少. 而空白对照组及阴性对照组癌细胞计数随时间推移有明显增多趋(见图2).

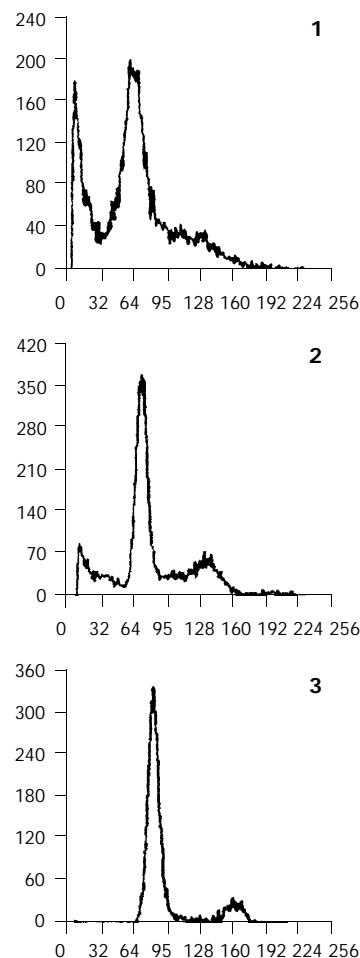


图1 流式细胞仪分析结果. 1: 硒蛋氨酸组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组.

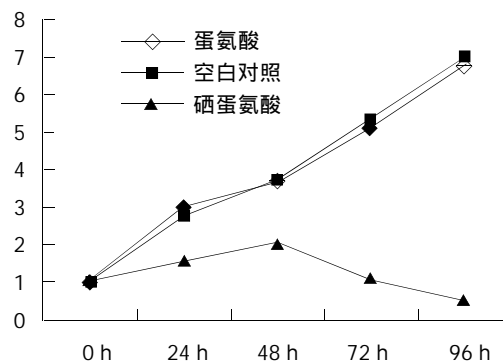


图2 细胞生长曲线.

3 讨论

硒是人体所必需的微量元素, 在生命活动过程中发挥

表1 硒蛋氨酸处理食管癌细胞EC9706后MTT法检测结果(mean \pm SD, $n=8$)

组项	剂量 (μ mol/mL)	n	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组		8	0.812 \pm 0.124	0.843 \pm 0.154	0.855 \pm 0.186	0.886 \pm 0.135
硒蛋氨酸组	100	8	0.725 \pm 0.173	0.662 \pm 0.165	0.605 \pm 0.132	0.585 \pm 0.118
	200	8	0.683 \pm 0.112	0.627 \pm 0.101	0.558 \pm 0.148	0.455 \pm 0.113
	300	8	0.598 \pm 0.179	0.503 \pm 0.128	0.406 \pm 0.134	0.351 \pm 0.116
	400	8	0.467 \pm 0.148	0.382 \pm 0.136	0.302 \pm 0.111	0.157 \pm 0.100
	500	8	0.465 \pm 0.114	0.390 \pm 0.132	0.314 \pm 0.125	0.160 \pm 0.118

着重要作用.大量流行病学和临床研究发现,微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关.在中国河南林县,对大量食管鳞状细胞癌和胃贲门腺癌患者做微量元素硒测定,发现其血清硒水平明显低于正常人^[14].在美国,科学家在硒缺乏地区,补充硒化干酵母酶,经追踪观察,整个硒缺乏地区恶性肿瘤发生率明显减低.有实验研究证实硒蛋氨酸对前列腺癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌等癌细胞均有生长抑制作用^[15-23].

本实验研究证实,硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 的生长有明显抑制作用,其有一定时间、浓度的依赖性,随浓度的增加、时间的延长,EC9706 的生长明显受到抑制.MTT法测定显示各组浓度硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 增生均有较强的抑制作用,最大抑制率可达 82.3%,与空白对照组有显著性差异($P < 0.01$),与细胞生长曲线基本一致.流式细胞仪检测发现,EC9706 细胞经硒蛋氨酸 400 $\mu\text{mol/mL}$ 处理 96 h 后在 G_1 期前出现一个亚二倍体高峰,硒蛋氨酸可诱导 EC706 细胞发生凋亡,凋亡率为 52.3%,与对照组比有显著性差异.

总之,我们认为硒蛋氨酸对食管癌 EC9706 细胞增生的抑制作用可能机制之一在于改变细胞周期分布,增加 G_0/G_1 期细胞比例,诱发细胞凋亡.由于细胞凋亡是一个多阶段、多系统参与极其复杂的过程,本实验仅探讨了硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 生长抑制及诱导凋亡的作用,其具体作用机制还有待进一步研究.本实验及国外大量研究证实硒蛋氨酸对恶性肿瘤的细胞生长有抑制作用;在硒缺乏地区补充硒可减少整个恶性肿瘤的发生.硒蛋氨酸作为硒的载体,在许多动植物体内存在,容易获取,与其他硒化物相比,毒性小,相对安全^[24].在硒缺乏地区补充硒预防肿瘤发生或把硒及其化合物用作治疗肿瘤的一种新手段,其前景非常广阔.

4 参考文献

- Zhang LJ, Chen KN, Xu GW, Xiang HP, Shi XT. Con genital expression of mdr-1 gene in tissues of carcinoma and its relation with pathomorphology and prognosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:53-56
- Wang LD, Zhou Q, Wei JP, Yang WC, Zhao X, Wang LX, Zou JX, Gao SS, Li YX, Yang C. Apoptosis and its relationship with cell proliferation, p53, Waf1p21, bcl-2 and c-myc in esophageal carcinogenesis studied with a high-risk population innorthern china. *World J Gastroenterol* 1998;4:287-293
- Lin J, Deng CS, Sun J, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. Study on the genetic susceptibility of HLA-DQB1 alleles in esophageal cancer of Hubei Chinese Hans. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:965-968
- Liu J, Chen SL, Zhang W, Su Q. P21^{WAF1} gene expression with p53 mutation in esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1350-1353
- Gu HP, Shang PZ, Su H, Li ZG. Association of CD15 antigenexpression with cathepsin D in esophageal carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:259-261
- Qin HY, Shu Q, Wang D, Ma QF. Study on genetic polymorphisms of DCC gene VNTR in esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:782-785
- Wu QM, Li SB, Wang Q, Wang DH, Li XB, Liu CZ. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:11-14
- Tan LJ, Jiang W, Zhang N, Zhang XR, Qiu DH. Fas/FasL expression of esophageal squamous cell carcinoma, dysplasia tissues and normal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:15-19
- Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cells lines. *World J Gastroenterol* 2002;8:203-207
- Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- Wang AH, Sun CS, Li LS, Hang JY, Chen QS. Relationship of tobacco smoking CYP1A1 GSTM1 gene polymorphism and esophageal cancer in xi' an. *World J Gastroenterol* 2002;8:49-53
- 张卫国, 吴清明, 董强, 于皆平. 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用. *世界华人消化病杂志* 2003;11:512-516
- 李胜保, 吴清明, 王强, 王小虎, 谢国建. 腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响. *世界华人消化病杂志* 2003;11:517-521
- Gerhard N. Nutrition selenium supplement: product types, quality, and safety. *J Am Coll Nutr* 2001;20:1-4
- Miki K, Xu MX, Gupta A, Ba Y, Tan YY, Al-Refaie W, Bouvet M, Makuuchi M, Moossa AR, Hoffman RM. Methioninase cancer gene therapy with selenomethionine as suicide Prodrug substrate. *Cancer Res* 2001;61:6805-6810
- Seo YR, Kelley MR, Smith ML. From the cover:Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. *PNAS* 2002;99:14548-14553
- Menter DG, Selenium AL. Effects on prostate cell growth cancer epidemiol. *Biomarkers Prev* 2000;9:1171-1182
- Baines A, Taylor-Parker M, Goulet AC, Renaud C, Gerner EW, Nelson MA.Selenomethionine inhibits growth and suppresses cyclooxygenase-2(COX-2) protein expression in human colon cancer cell line. *Cancer Biol Ther* 2002;1:370-374
- Chigbrow M, Nelson M. Inhibition of mitotic cyclin B and cdc2 kinase activity by selenomethionine in synchronized coloncancer cells. *Anticancer Drugs* 2001;12:43-50
- Yamamoto N, Gupta A, Xu M, Miki K, Tsujimoto Y, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells. *Cancer Gene TherN* 2003;10:445-450
- Redman C, Scott JA, Baines AT. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer Lett* 1998;125:103-110
- Redman C, Xu MJ, Peng YM, Scott JA, Payne C, Clark LC, Nelson MA. Involvement of polyamines in selenomethionine induced apoptosis and mitotic alterations in human tumor cells. *Carcinogenesis* 1997;18:1195-1202
- Duffield-Lillico AJ, Slate EH, Reid ME, Turnbull BW, Wilkins PA, Combs GF Jr, Park HK, Gross EG, Graham GF, Stratton MS, Marshall JR, Larry C. Clark for the nutritional prevention of cancer study group. Selenium supplementation and secondary prevention of nonmelanoma Skin cancer in a randomized. *Trial J Natl Cancer Inst* 2003;95:1477-1481
- Mark SD, Qiao YL, Dawsey SM, Wu YP, Katki H, Cunter EW, Fraumeni JF Jr, Blot WJ, Dong ZW, Taylor PR. Prospective study of serum selenium levels and incident esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1753-1763