

不同硒化合物抗肿瘤作用的研究

朱茂祥, 杨陟华, 龚诒芬

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 目的: 探讨不同硒化合物体外抗肿瘤作用。方法: 用 MTT 法测定纳米粒元素硒、低价硒和亚硒酸钠体外对人白血病细胞 HL-60、人肺癌细胞 A549 和人肝癌细胞 HC 的细胞毒作用; 用化学发光法评价这些硒化合物对体外产生活性氧的清除效果。结果: 亚硒酸钠对三种肿瘤细胞有一定细胞毒作用, 但对体外产生的活性氧无抑制作用; 纳米硒和低价硒, 特别是低价硒, 对 HL-60 细胞有强烈的杀伤作用, 并能有效清除过氧化氢和超氧阴离子。结论: 不同硒化合物对不同肿瘤细胞有不同的细胞毒作用。纳米硒和低价硒对肿瘤细胞的杀伤作用可能与亚硒酸钠有不同的机制。低价硒在治疗白血病方面有潜在的应用价值。

关键词: 硒; 抗肿瘤; MTT; 活性氧; 化学发光

文献标识码: A **文章编号:** 1005-5320(2000)02-0014-03

硒是人体必需的微量元素, 具有广泛的生物学功能^[1]。人群调查资料显示, 机体硒水平与癌症发生率呈负相关^[2], 补硒能有效抑制多种人类肿瘤的发生^[3-5]。本研究用 MTT 法探索不同硒化合物对多种肿瘤细胞的细胞毒作用, 为硒的抗肿瘤作用提供实验依据和新形式的硒化合物。

材料与方法

1 材料

红色纳米粒元素硒和低价硒由合肥经济技术学院张劲松提供, 硒浓度分别为 5 mM 和 75 mM; 亚硒酸钠、噻唑兰(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)为美国 Sigma 公司产品; HL-60 细胞系由本所血液室提供; A549 人肺癌细胞、人肝癌细胞和人胚肺纤维细胞(HEL)均由本所其他研究室提供; RPM 1640 细胞培养液购自 Gibco 公司; 其他均为市售分析纯试剂。

2 MTT 试验^[6]

将细胞接种 96 孔培养板(Nunc 公司产品)中, 每孔接种 5000~10000 个细胞, 分别加入 0、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 mg/L 的亚硒酸钠、纳米粒硒和低价硒, 每种硒化合物每个浓度 3 个平行孔, 每孔总体积 0.1 ml。并设细胞对照和调零孔。置 5% CO₂、37℃和 95% 湿度条件下培养 72 h。培养结束前 4 h, 每孔轻轻吸去上清液 0.05 ml, 同时加入 MTT (5 mg/mL) 50 μl/孔, 继续培养 4 h, 培养结束后, 每孔加入 DMSO 100 μl, 吹打混匀, 使紫色结

晶完全溶解, 用酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长下的光密度值。

3 化学发光测量硒对活性氧的抑制作用^[7]

将不同浓度的硒化合物加入 0.1 mmol/L 的鲁米诺碳酸盐缓冲液中, 用 SHG-1 化学发光测量仪(上海)测定过氧化氢和超氧阴离子(黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系)产生的化学发光(6 s), 以空白对照的发光强度为 100%, 计算硒对过氧化氢和超氧阴离子产生化学发光的抑制率。以化学发光抑制率为纵坐标, 硒浓度为横坐标, 求出抑制 50% 化学发光时硒的浓度 IC₅₀。

4 数据处理

统计学分析采用相关线性回归计算 IC₅₀。

结果

1 不同硒化合物对不同肿瘤细胞的细胞毒作用

亚硒酸钠、纳米硒和低价硒对人肺癌 A549 细胞、人肝癌细胞和人白血病 HL-60 细胞杀伤作用结果如图 1 所示。可以看出, 不同的硒化合物对不同的肿瘤细胞表现出不同的细胞毒作用, 且在一定浓度范围内呈线性相关。对 OD 抑制率和硒浓度进行相关线性回归, 计算不同硒化合物对不同肿瘤细胞杀伤作用的 IC₅₀ 结果如附表所示。

从图 1 和附表结果可以看出, 三种硒化合物对人肺癌细胞 A549 的细胞毒作用相当, 亚硒酸钠对人肝癌细胞有较强的细胞毒作用, 而纳米硒和低价硒对人白血病 HL-60 细胞的杀伤作用明显高于亚

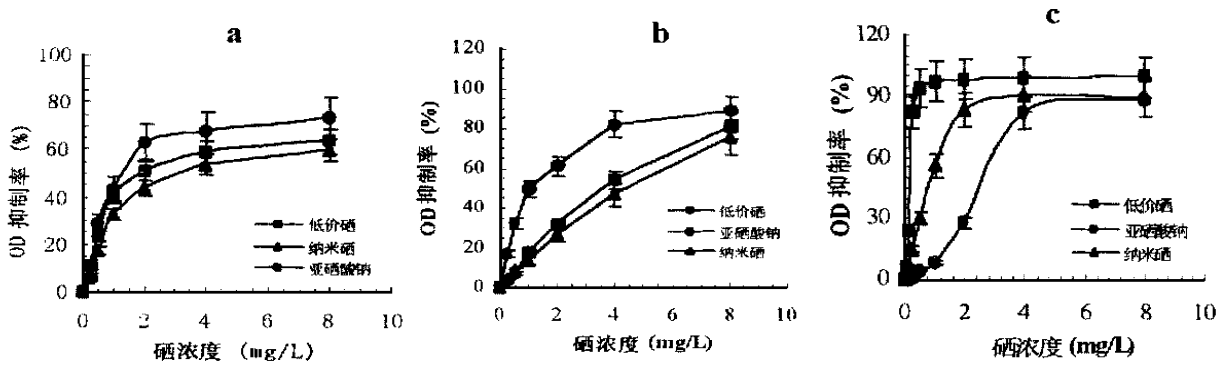


图 1 亚硒酸钠、纳米硒和低价硒对人肺癌细胞 A 549 (a)、人肝癌细胞 (b) 和人白血病细胞 HL-60 (c) 的细胞毒作用

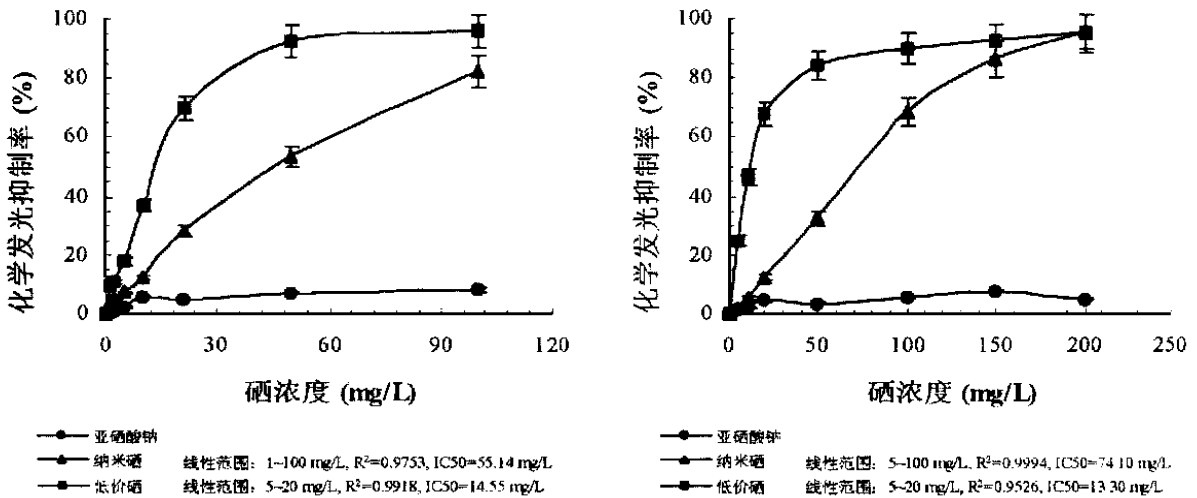


图 2 亚硒酸钠、纳米硒和低价硒对体外过氧化氢(a)和超氧阴离子(b)的清除作用

附表 不同硒化合物对不同肿瘤细胞的细胞毒作用比较 (IC₅₀, mg/L)

	亚硒酸钠	纳米硒	低价硒
人肺癌细胞 A 549	1.42	1.52	1.25
人肝癌细胞 HC	0.98	4.18	3.54
人白血病细胞 HL-60	2.82	0.88	0.18

硒酸钠,特别是低价硒,对人白血病 HL-60 细胞有强烈的细胞毒作用, IC₅₀为 0.18 mg/L,分别约是纳米硒和亚硒酸钠 1/5 和 1/15,暗示低价硒在白血病的预防和/或治疗中可能具有潜在的开发应用价值。

2 不同硒化合物对体外活性氧的清除作用

亚硒酸钠、纳米硒和低价硒对体外过氧化氢和超氧阴离子的清除作用结果如图 2 所示。可以看出,亚硒酸钠在体外对活性氧无清除作用,纳米硒和低价硒对过氧化氢和超氧阴离子均有显著清除作用,特别是低价硒,清除效果更明显,对过氧化氢和超氧阴离子产生化学发光的 IC₅₀分别是 14.55 和 13.30 mg/L,分别是纳米硒的约 1/4 和 1/6。

讨 论

60 年代以前,有关硒防治癌的研究虽有报道,

但并未真正引起人们的重视。1966 年,Shamberger 等报道了硒抑制巴豆油的致癌作用,并继续在这方面做了大量研究,从此,硒的抑癌作用才引起人们广泛注意。当前,在肿瘤研究领域,对硒的抑癌作用及其机理研究,引起了肿瘤学、营养学、流行病学以及生物化学等研究者的极大兴趣,并获得了有意义的研究证据,归纳起来主要有: (1) 实验肿瘤学方面,证明硒对动物自发的及化学致癌剂和病毒诱发的肿瘤以及移植肿瘤的形成均有抑制作用。(2) 人群调查资料方面,Shamberger 等对美国各州白人男性 55~64 岁特定年龄的癌症死亡率进行调查分析,结果表明,在高硒、中硒和低硒州之间癌症死亡率的差别非常显著^[8],Schrauzer 等在世界范围内调查了 27 个国家和地区的情况,得出了同样的结论,即摄入硒的量越高,癌症发病率越低^[9]。在我国,对肝癌高发区的江苏启东和肺癌高发区的云南锡矿人群的血硒水平分析的结果也表明,癌症发病率与血硒水平呈明显的负相关^[10]。更有意义的是,于树玉等在低硒地区江苏启东县用补充亚硒酸钠的方法有效地降低了当地居民的肝癌发病率,获得了硒抑制癌症的直接证据^[11,12]。(3) 体外实验方面,硒对肿瘤细胞的生

长和/或存活力有明显的抑制作用,即证实了硒对肿瘤细胞具有杀伤作用。研究还显示,硒对非癌变组织的细胞的生长和存活并无明显影响,揭示硒具有抑制肿瘤的特异性。本研究中,我们也观察了亚硒酸钠、纳米硒和低价硒对正常人胚肺细胞(HEL)增殖的影响,结果表明,低浓度(0.25~2 mg/L)的亚硒酸钠对HEL细胞有明显的促增殖作用,4~8 mg/L亚硒酸对HEL细胞的生长无明显影响,低浓度(0.25~1 mg/L)的纳米硒对HEL细胞生长无明显影响,其中0.25 mg/L剂量有明显促增殖作用,2~8 mg/L纳米硒对HEL细胞生长有抑制作用,0.25 mg/L低价硒对HEL细胞有明显促增殖作用,0.5~8 mg/L低价硒对HEL细胞的抑制作用明显。

硒的抑癌机理主要有以下几个方面:(1)调节谷胱甘肽过氧化物酶活性^[13]。谷胱甘肽过氧化物酶是一种含硒酶,它广泛分布于哺乳动物的各种组织中,其重要功能便是通过非特异地催化过氧化氢和一系列有机过氧化物的还原,从而保护细胞的膜系统不受损害。现已证明,细胞的膜系统的氧化性损伤与癌变密切相关,甚至有人提出癌是一种“膜系统疾病”,因此,硒通过调节谷胱甘肽过氧化物酶活性从而达到对膜的保护,是防止细胞癌变的重要作用,即硒的抑癌作用与其抗过氧化作用有密切关系。(2)介入某些致癌物的代谢。化学致癌物的致癌机理主要是通过体内进行代谢活化,形成一系列代谢产物,这些活化的代谢产物与细胞中某些大分子结合形成加合物,从而导致基因突变或蛋白质失活,进而影响细胞发挥正常生理功能甚至癌变。实验研究表明,硒能阻止某些化学致癌物的代谢活化,或拮抗其代谢产物,从而抑制化学致癌物的致癌作用^[14]。(3)促进DNA损伤修复。细胞癌变的产生归根结底是DNA的损伤,致癌物诱发的DNA损伤是多方面的,如DNA单链的断裂、染色体易位、姐妹染色体交换、DNA加合物的形成等。有证据表明,硒能有效地降低致癌物诱发的多种DNA损伤^[15]。(4)对肿瘤细胞的直接杀伤作用。许多实验研究表明,在体外培养条件下,硒对多种肿瘤细胞的生长有显著的抑制作用,而对正常组织细胞的生长无明显影响^[16]。(5)调节机体免疫功能。免疫功能的失调是机体发生病变的主要原因,癌症也是如此。许多研究表明,硒显著地影响免疫系统所包含的三种免疫防御方式,即非特异免疫、体液免疫和细胞免疫。硒对免疫功能的调节作用可能是硒抑制肿瘤的重要机制^[17]。

值得指出的是,硒的抑癌效果与机体内硒水平、所用硒制剂、生活环境中存在的和摄入的某些硒的

拮抗物质或协同物质的多少,以及硒的不同摄入途径有关,此外,硒对不同肿瘤的抑制结果也存在差异。本研究中,三种硒化合物对三种肿瘤细胞的细胞毒作用各不相同,提示用硒防治癌症时必须充分认识到硒化合物形式及其剂量的重要性。

参考文献

- [1] Brtkova A. Biological effects of selenium. Bratisl Lek Listy, 1992, 93(12): 629~32
- [2] Ujiie S, Itoh Y, Kikuchi H. Serum selenium contents and the risk of cancer. Gan To Kagaku Ryoho, 1992, 25(12): 1891~7
- [3] Clark LC, Dalkin B, Krongrad a, et al Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial Br J Urol, 1998, 81(5): 730~4
- [4] Combs GF Jr, Clark LC, Turnbull BW. Reduction of cancer mortality and incidence by selenium supplementation. Med Klin, 1997, 92 Suppl 3: 42~5
- [5] Patterson BH, Levander OA. Naturally occurring selenium compounds in cancer chemoprevention trials; a workshop summary. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997, 6(1): 63~9
- [6] Denecke J, Becker K, Jurgens H, et al Falsification of tetrazolium dye (MTT) based cytotoxicity assay results due to mycoplasma contamination of cell cultures Anticancer Res, 1999, 19(2A): 1245~8
- [7] Pascual C, romay C. Effect of antioxidants on chemiluminescence produced by reactive oxygen species J Biol Chem, 1992, 7(2): 123~32
- [8] Shamberger RJ, Frost DV. Possible protective effect of selenium against human cancer. Can Med Assoc J, 1969, 100(14): 682
- [9] Schrauzer GN, White DA, Schneider CJ. Cancer mortality correlation studies - III: Statistical associations with dietary selenium intakes Bioinorg Chem, 1977, 7(1): 23~31
- [10] Li WG, Gong HM, Xie JR, et al Regional distribution of liver cancer and its relation to selenium levels in Qidong county. China Chung Hua Chung Liu Tsa Chih, 1986, 8(4): 262~4
- [11] Yu SY, Zhu YJ, Li WG. Protective role of selenium against hepatitis B Virus and primary liver cancer in Qidong Biol Trace Elem Res, 1997, 56(1): 117~24
- [12] Yu Sy, Zhu YJ, Li WG, Huang QS, et al A Preliminary report on the intervention trials of primary liver cancer in high-risk populations with nutritional supplementation of selenium in China Biol Trace Elem res, 1991, 29(3): 289~94
- [13] Wilke BC, Viddailhet M, Favier A, (下转 27 页)

言,影响也是很大的。缺铁时,能直接损伤淋巴细胞合成DNA,抑制抗体形成,干扰溶菌酶的活性,降低白细胞内髓过氧化物酶的活性,使白细胞的杀伤能力下降;淋巴细胞对特别抗原的反应效能下降,对感染的应激能力降低,使组织易受感染^[4]。

牙龈炎和牙周炎,同属发生在牙周组织上的炎症,其局部致病因素均为口腔不洁、致病微生物、牙结石、软垢、食物嵌塞、不良修复体等,但这两种病的预后却截然不同,牙龈炎无论病程多长,病变只限于龈组织上,而牙周炎却顺着牙周组织不断扩大炎症范围,最终导致牙周膜破坏,牙槽管吸收及牙齿脱落。为了找到牙周炎的全身致病因素,人们作了大量的研究工作,目前公认细菌是牙周病的始动因子,但机体的免疫状态,可能是牙周病发生、发展的重要环节^[5]。通过对微量元素各自对机体的健康意义的研究和对牙龈炎、牙周炎患者头发微量元素的测定、比较,不难看出,机体锌、铁水平低下,是造成牙周炎患者免疫功能低下的原因之一。牙龈炎患者的牙龈在局部因素刺激下受损继发炎症,由于机体的锌、铁等微量元素处于正常水平,保证了正常的免疫

功能的实施。由于锌对组织的营养效应,使受损的龈组织得到及时的修复,这样,在局部因子去除以前,其对组织的损伤作用和机体的免疫修复作用互相抗衡,使炎症不能向牙周膜、牙槽管处发展,而只限于龈组织上。牙周病患者,由于机体锌、铁等微量元素水平低下,导致免疫功能低下,牙周组织对炎症的应激能力下降,使炎症能向深层组织扩散,破坏牙周组织。锌元素缺少,不使局部组织的修复能力低下,受损的组织得不到及时修复,就导致了牙周炎的发生。

通过这一测试结果,使我们想到,如果在合适的时候,给患者补充一定量的微量元素锌和铁剂,对提高患者的免疫力,防治牙周病,将会起到积极作用。

参考文献:

- [1] 余道文,杨爱德,沈迪,等 38 例急性白血病患者发硒的检测 微量元素,1988,(4): 43
- [2] 刘尚安 缺锌的临床判断 微量元素,1984,(创刊号): 16
- [3] 张天锡 人体锌代谢与疾病 微量元素,1989,(1): 1
- [4] 徐正谷,韩珊瑞,李颖艳,等 免疫功能指标与发血清铜、锌、铁含量相关分析 微量元素,1996,(1): 59
- [5] 李武修 牙周病患者的免疫学研究 实用口腔医学杂志,1990,6(3): 180

(上接 16 页)

- et al Selenium, glutathione peroxidase (GSH - Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. Clin Chim Acta, 1992, 207(1~ 2): 137 ~ 42
- [14] Shi CY, Chua SC, Lee HP, et al Inhibition of aflatoxin B1- DNA binding and adduct formation by selenium in rats Cancer Lett, 1994, 82(2): 203~ 8
- [15] Lawson T. Nicotinamide and selenium stimulate the

repair of DNA damage produced by N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine Anticancer Res, 1989, 9(2): 483~ 6

- [16] Zhu Z, Kimura M, Itokawa Y, et al Effect of selenium on malignant tumor cells of brain Biol Trace Elem Res, 1995, 49(1): 1~ 7
- [17] Kirem idjian - Schumancher L, Roy M. Selenium and immune function Z Ernahrungswiss, 1998, 37 Suppl 1: 50~ 6

Study on the antitumor effects of various selenium compounds

Zhu Maoxiang, Yang Zhihua, Gong Yifen

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract Objective: To investigate the antitumor effects in vitro of various selenium compounds such as sodium selenite, element selenium particles in nano- metre size and low valent selenium. Methods: The cytotoxicities of various selenium compounds on some tumor cells were measured using MTT assay. The scavenging actions of these selenium compounds on reactive oxygen species in vitro were evaluated by chemiluminescence assay. Results: Though sodium selenite showed some cytotoxicities on HL-60, A549 and HC, which the IC₅₀ were respectively 2.77, 1.43 and 0.98 μg selenium /ml, there were no inhibitory effect on reactive oxygen species in vitro. The cytotoxicities of element selenium particles in nano- metre size and low- valent selenium on A549 and HC were less than that of sodium selenite, but they showed a significant cytotoxicity on HL-60, especially low- valent selenium whose IC₅₀ was 0.18 μg selenium /ml, and showed a stronger suppression to hydrogen peroxide and superoxide anion radicals in vitro. Conclusion: There were different cytotoxicity effects on different tumor cells among various selenium compounds, and perhaps there were different mechanism between element selenium particles in nano- metre size and low- valent selenium and sodium selenite. It is indicated that the low- valent selenium had latency value applying in leukemic therapy.

Key words: Selenium; antitumor; Reactive oxygen species; MTT assay; Chemiluminescence