

硒抑制人癌细胞株和人 B 细胞的 EB 病毒效应

罗慧玲 李满枝 江慧民

(中山医科大学肿瘤研究所, 广州 510060)

摘要 应用间接免疫荧光法和显微荧光分光光度技术, 研究了试管内无细胞毒性浓度的亚硒酸钠 (硒) 对来源于伯基特淋巴瘤的 Raji 细胞株, Epstein-Barr 病毒 (EBV) 抗原表达的影响以及抑制 EBV 转化人脐血 B 淋巴细胞 (BL) 的作用。结果表明, 0.01 ~ 0.1mg/L 的硒使 Raji 细胞的 EA 抗原抑制 35.3% ~ 50.1%; 0.01 ~ 0.5mg/L 的硒令 EBNA-MFS 值降低 8.4% ~ 21.8%; 0.1 ~ 1.0mg/L 的硒明显抑制 EBV 转化 BL, 抑制率为 63.3% ~ 92.1%。由于 EBV 与鼻咽癌 (NPC) 密切相关, NPC 病人血清和头发中硒含量明显低于健康人。本研究提示: 对 NPC 患者和 EBV 基因表达活跃的人群适当补硒, 可能有助于 NPC 和与 EBV 相关疾病的预防和辅助治疗。

关键词: 硒, 人癌细胞株, EB 病毒, 抗原表达, 淋巴细胞转化。

广东省鼻咽癌 (NPC) 高发区的病因研究发现, NPC 患者血清、头发硒水平明显低于正常人^[1], 普遍认为, Epstein-Barr 病毒 (EBV) 与 NPC 密切相关。本文报道了试管内无细胞毒性浓度的亚硒酸钠 (硒) 对携带 EBV 基因组、来源于伯基特淋巴瘤的 Raji 细胞株 EBV 抗原表达的影响及对 EBV 转化人脐血 B 淋巴细胞 (BL) 的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

无水亚硒酸钠 (Na_2SeO_3), Sigma 产品; 正丁酸, 广州化学试剂厂出品; 巴豆油, 由中山医科大学肿瘤研究所应用技术室提供; 羊抗人 C_3 荧光抗体, 丹麦 Dako 公司产品; 抗 EBV 早期抗原 (EA) 及核抗原 (EBNA) 的抗体来自混合多份高滴度 NPC 患者血清; 人 C_3 补体, 由多份输血员抗 EBNA 抗体 (<1:5) 的新鲜血清混合而成, 以上抗体置-20 冰箱冻存。

1.2 细胞株

Raji 细胞: 来源于人伯基特淋巴瘤携带 EBV 基因组的细胞株, 稳定表达 EBNA, 经巴豆油和正丁酸联合诱导产生 EA, 由本室常规培养。

1.3 方法

1.3.1 细胞毒性试验 用染料排斥法, 以锥兰染色计数, 评价硒对细胞的毒性作用。

1.3.2 EBV 的 EA 和 EBNA-MFS 的检测 (1) 以间接免疫荧光法经伊文氏蓝复染, 检测用巴豆油与正丁酸联合诱导, 以及同时加硒作用 72h 的 Raji 细胞 EA 阳性率; (2) 应用抗补体免疫荧光反应与显微荧光定量 (microfluorescence spectrophotometer-quantitation, MFS) 技术, 采用 opton-03 型程控显微荧光分光光度仪测量硒与 Raji 细胞作用 48h 核内 EBNA 荧光强度——EBNA-MFS 值。每批每组随机检测 100 个细胞, 每个细胞测量 20 次, 采用细胞荧光分析程序, 整个过程由计算机控制。

1.3.3 EBV 转化 BL 实验 采集新鲜的新生儿脐带血, 分离 B 淋巴细胞 (BL) 用于: (1) 0.1 ~ 1.0mg/L 硒预处理 BL 24h, 再按常规 EBV 转化 BL; (2) 硒与 EBV 共同转化 BL。在常规培养

液中加入 0.1 mg/L 球菌素 A (CSA), 培养 4 周观察细胞转化团数, 转化团的标准 25 个细胞/转化团, 细胞折光良好, 形态正常。

2 结果

2.1 Na_2SeO_3 对 Raji 细胞和 BL 的毒性测定

结果表明: Raji 细胞, Se 浓度 0.5 mg/L、0.1 mg/L 分别作用 48 h、72 h; BL, Se 浓度 1.0 mg/L 作用 24 h, 均对细胞生长存活无明显影响 ($P > 0.05$)。选用以上无细胞毒性浓度进行实验。

2.1 Na_2SeO_3 对 Raji 细胞 EBV-EA, EBNA 抗原表达抑制

见表 1。

表 1 Na_2SeO_3 控制 Raji 细胞抗原表达

$(\text{Na}_2\text{SeO}_3)$ / mg L^{-1}	EA 抗原 [*]			$(\text{Na}_2\text{SeO}_3)$ / mg L^{-1}	EBNA 抗原 ^{**}		
	阳性/ %	抑制率/ %	P 值		EBNA-MFS 值	降低率/ %	F 值
0	14.34	0		0	19.29		21.69
0.01	9.28	35.3	0.001	0.01	17.67	8.4	
0.10	7.15	50.1	0.001	0.10	15.86	17.8	
				0.50	15.09	21.8	

* EA 抗原是 Raji 细胞与 Se 作用 72h 的结果, P 值采用 χ^2 检验。

** EBNA-MFS 值是 Raji 细胞与 Se 作用 48h 的结果, 采用医学统计程序 POMS-05 电脑处理 (方差分析), F 值为组间 F 值, $P < 0.001$ 。

从表 1 可见, 硒对 EBV 抗原表达的抑制呈浓度效应, 随硒浓度增高, 明显抑制 Raji 细胞 EA 表达和降低 EBNA-MFS 值。

2.3 Na_2SeO_3 抑制 EBV 转化 BL

为研究硒对 BL 的影响, 设计了硒预处理实验。从表 2 可见, 硒的预处理组比共同转化组抑制 EBV 转化 BL 更有效。

表 2 Na_2SeO_3 抑制 EBV 转化入脐血 B 淋巴细胞 (BL)

组 别	组 数	细胞转化		转化抑制率/ %	F 值 ^{**}
		团 数	平均团数		
共同转化组					
EBV + BL	12	368	30.67		25.28
EBV + BL + 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Se	12	146	12.17	60.3	
EBV + BL + 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Se	12	130	10.83	64.7	
EBV + BL + 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Se	9	63	7.00	77.2	
预处理组 [*]					
EBV + BL	12	368	30.67		44.61
0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Se + BL + EBV	12	98	8.17	73.4	
0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Se + BL + EBV	12	44	3.67	88.0	
1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Se + BL + EBV	7	17	2.43	92.1	

* Se 预处理 BL 24h 后, 洗去 Se, 再加 EBV 按常规转化 BL。

** 结果采用医学统计程序 POMS-05 电脑处理 (方差分析), F 值为组间 F 值, $P < 0.001$ 。

3 讨 论

硒作为一种天然存在的抗癌物,对病毒诱发肿瘤和化学致癌有抑制作用^[2,3],NPC 病因研究表明,NPC 与 EBV 密切相关。EBNA 由 EBV 编码,不仅是维持病毒复制所必需,对于启动和维持上皮细胞和 B 淋巴细胞的转化也是起着重要作用的蛋白抗原^[4],EBNA 的含量与细胞携带的 EBV 基因拷贝呈正相关^[5]。EA 抗原是致癌物或促癌物激发下诱导 EBV 早期复制的产物。硒对 EBNA、EA 表达的抑制,表明硒具有抑制 EBV 基因组表达和拮抗促癌物诱导 EBV 抗原的双重作用。

EBV 是嗜人类及某些灵长类 B 细胞的疱疹病毒,EBV 感染人的 BL 主要是 EBV 壳蛋白 gP350/220 的 N-末端的多肽 EDPGFNVE 与 BL 膜上 EBV 受体 CR₂/CD₂₁的 SCR₁ 和 SCR₂ 相互作用的结果^[6]。本研究表明,无细胞毒性浓度的硒预处理比共同作用更有效阻抑 EBV 转化 BL,这似提示硒的靶点可能主要是 BL 膜上的 EBV CR₂/CD₂₁。近期研究表明,人鼻咽癌细胞和正常人胚鼻咽上皮的受体的 EBV 结合区的编码序列,与正常人 B 细胞的 EBV 的相应序列完全相同^[7]。可见深入研究抗癌剂硒与 EBV 受体的生物效应很有必要。硒抑制 EBV 转化 BL 的机制尚待阐明,本研究提示,硒在 EBV 感染时可能损伤 BL 膜上的 EBV 受体 CR₂/CD₂₁,阻止 EBV 导入 BL;EBV 感染 BL 后,硒还能抑制细胞中 EBV 基因的表达,这些双重效应最终阻抑 EBV 转化 BL。

NPC 与 EBV 关系密切,NPC 患者血清和头发中硒含量明显低于健康人。本研究表明无细胞毒性浓度的 Na₂SeO₃ 能明显抑制 EBV 基因表达和 EBV 转化 BL,以及拮抗 EBV 抗原诱导剂的双重作用。若在 NPC 患者和 EBV 基因表达活跃的人群中适量补硒,可能会阻抑 EBV 感染人 BL,感染鼻咽上皮细胞及其恶性化。硒在 NPC 及与 EBV 相关的肿瘤和疾病的化学预防和辅助治疗方面有着潜在的应用前景,作者正深入研究。

参 考 文 献

- 1 黄家琛,杨容甫,冯公侃等.鼻咽癌高发区四会县鼻咽癌病人与健康人血清及头发中硒含量测定.癌症,1986,5:17
- 2 Ip C. Slenium inhibition of chemical carcinogenesis. Federation Proc, 1985, 44: 2573
- 3 Clark L C. The epidemiology of Selenium and cancer, Fedration Proc, 1985, 44: 2584
- 4 张饮明. EB 病毒基因组结构及其基因体外转染研究现状. 广东医学院学报, 1997, 15 (4): 352
- 5 Erberg I, Andersson-Anvret M, Klein C et al. Relationship between the amount of EpsteinBarr virus-determined nuclear antigen per cell and number of EBV-DNA copies per cell. Nature, 1977, 266: 269
- 6 Martin D R, Yuryev A Kalli K R et al. Determination of the structural basis for selective binding of EpsteinBarr virus to human complement receptor type 2. J Exp Med, 1991, 11: 15
- 7 邵细芸,陈主初,姚开泰.鼻咽癌 EpsteinBarr 病毒受体 (EBV R/CR₂) 基因的病毒结合区的序列测定.病毒学报,1995,11:15

(收稿日期:1999.2.25)

Inhibition of Selenium on Effects of Epstein-Barr Virus in Human Cancer Cellular Line and Human B Cells

Luo Huiling, Li Manzhi, Wang Huimin

(Cancer Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060)

Abstract The effects of non-toxic doses of sodium selenite (Se) on the expression of Epstein-Barr virus (EBV) antigens in Raji cell line originated from Burkitt's lymphoma were studied by indirect immunofluorescence staining and micro fluorescence spectrophotometry (MFS), as well as the inhibiting transformation in B lymphocytes from human umbilical cord blood (BL) with EBV in vitro by Se. It was found that the early antigen (EA) was inhibited 35.3% ~ 50.1% by Se (0.01 ~ 0.1 mg/L) and Se (0.01 ~ 0.5 mg/L) can lower nuclear antigen (EBNA)-MFS value for 8.4% ~ 21.8% in Raji cell line. The transformation effect of BL with EBV was inhibited by Se (0.1 ~ 1.0 mg/L). The inhibition rate of BL transformation was 60.3% ~ 92.1%. EBV is associated with the nasopharyngeal carcinoma (NPC). The Se levels in serum and hair of patients with NPC were lower than that of healthy persons. The results suggest that supplement Se to patients with NPC and persons for active expression of EBV gene may protect against and treat NPC and diseases associated with EBV.

Key words: Selenium, Human cancer cellular line, Epstein-Barr virus (EBV), Antigen expression, Lymphocyte transformation