

富硒大蒜对体内外人胃癌细胞生长的影响

唐福 周静 谷连坤 夏弈明 杨文婕 邓大君

【摘要】 目的 比较富硒大蒜、普通大蒜、亚硒酸钠以及普通大蒜与亚硒酸钠混合(蒜硒联合)处理影响人胃癌细胞生长的能力。方法 利用细胞计数、流式细胞术、Western blot 和裸鼠瘤体积测定等方法,观察富硒大蒜水溶物对离体培养的 MGC803 胃癌细胞系及其在裸鼠皮下生长的影响。结果 (1)在离体条件下,富硒大蒜对 MGC803 细胞增殖有明显抑制作用,与等蒜量普通大蒜作用强度相似;等硒量亚硒酸钠抑制作用最弱,蒜硒联合抑制作用最强。(2)富硒大蒜、普通大蒜和亚硒酸钠处理 24 h 后,未同步化的细胞 G₁ 期增多,已同步化的细胞 S 期增多;蒜硒联合处理则使未同步化和已同步化细胞 G₂ + M 期增多。(3)4 种处理 24 h 后,同步化细胞的 Cdk₂-CyclinE 和 Cdk₄-CyclinD₁ 复合物蛋白含量均降低。(4)饲喂 Balb/C 裸小鼠含 1.67% 富硒大蒜粉(含硒 2 μg/g)的饲料,对移植瘤生长的抑制率达 29.92%;0.83% 富硒大蒜、1.67% 普通大蒜和 4.38 μg/g 亚硒酸钠(含硒 2 μg/g)处理组未见明显抑制作用。(5)0.83% 富硒大蒜处理可诱发裸鼠单核细胞包裹肿瘤。结论 富硒大蒜能够抑制 MGC803 细胞在体外的生长,主要作用在于蒜。富硒大蒜对裸鼠移植胃癌有抑制作用,作用比普通大蒜和亚硒酸钠强。

【主题词】 胃肿瘤; 富硒大蒜; 肿瘤细胞,培养的; 胃癌细胞系 MGC803; 裸鼠; 细胞周期

In vivo and in vitro effects of selenium-enriched garlic on growth of human gastric carcinoma cells TANG Fu, ZHOU Jing, GU Liankun, et al. Peking University School of Oncology & Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100034, China

【Abstract】 **Objective** To compare the effects of selenium-enriched garlic (Se-garlic), garlic, Na₂SeO₃, and garlic + Na₂SeO₃ on growth of human gastric carcinoma cells. **Methods** In vivo and in vitro assays were carried out in the cultured human gastric carcinoma cell line MGC803 transplanted in the nude mice by cell count, flow cytometry, Western blot and neoplasm volume measurement. **Results** The inhibition effect of garlic was similar to that of Se-garlic, but Na₂SeO₃ was weaker than Se-garlic. Combination of garlic and Na₂SeO₃ was stronger than Se-garlic. In flow cytometry assay, the proportion of G₁ phase was increased after 24 hour treatment of Se-garlic, garlic and Na₂SeO₃ in the non-synchronized cells. However, the proportion of S phase was increased in the synchronized cells. The proportion of G₂ + M phase was increased both in non-synchronized and synchronized cells on treatment with the combination of garlic and Na₂SeO₃. The amount of Cdk₂-CyclinE complex and Cdk₄-CyclinD₁ complex was decreased in all treated synchronized cells in immunoprecipitation and immunoblot assays. The growth of MGC803 tumor in male Balb/c nude mice was inhibited by administration of 1.67% of Se-garlic (Se 2 μg/g) in diet with an inhibition rate of 29.92% in tumor weight. Treatment of either 0.83% of Se-garlic or 1.67% of garlic or 4.38 μg/g of Na₂SeO₃ (Se 2 μg/g) could not appreciably inhibit the growth of tumor. Wrapping of a number of monocytes around the tumor was induced in 62.50% of tumors in 0.83% of the Se-garlic group. **Conclusion** In vitro, Se-garlic is able to inhibit the growth of MGC803 cell through action of garlic. In vivo, Se-garlic is able to inhibit growth of MGC803 tumor in nude mice by being better than garlic and selenite.

【Subject words】 Stomach neoplasms; Selenium-enriched garlic; Tumor cell, cultured; MGC803; Nude mouse; Cell cycle

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7972009)

作者单位:100034 北京大学临床肿瘤学院暨北京市肿瘤防治研究所(唐福、周静、谷连坤、邓大君);中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所(夏弈明、杨文婕)

通信作者:邓大君(E-mail:dengdajun@sina.com)

Ip 等^[1]报道,在预防大鼠乳腺癌实验中富硒大蒜的作用主要在于硒,而不是蒜。邓大君等则报道富硒大蒜在体外可促进 MNNG 和 NMU 的降解,其作用同普通大蒜无明显差别,而亚硒酸钠无此作用。我们应用人胃腺癌细胞系和裸鼠移植人胃腺癌模

型,研究了富硒大蒜的抑癌作用及其机制。

材料与方法

一、材料

富硒大蒜制成蒜粉^[2],大蒜制成水溶液用于培养。MGC803 细胞株为人胃上皮型低分化黏液腺癌,由山东师范大学生物系王凯华建立。雄性 Balb/C 裸小鼠 4~6 周龄,体重 16.0~26.2 g,购自中国医学科学院实验动物中心。裸鼠常规粉状饲料购自北京医科大学实验动物中心,硒含量为 0.404 2 μg/g。细胞培养液为 DMEM 与 Ham F-12 (美国 Life Technologies 公司产品)等体积混合,新生牛血清(中国医学科学院血液学研究所产品)10%。

二、方法

1. 细胞生长的影响实验:细胞培养 24 h 后分别加入相应剂量的处理物(表 1),培养 48 h 后,观察细胞形态并计数。

2. 细胞周期分布的影响实验:(1)未同步化细胞实验:细胞培养 24 h 后以不同方式处理,24 h 后,用流式细胞计(美国 Coulter 公司 EPICS-Profile)测定细胞周期(碘化丙啶染色)。(2)同步化细胞实验:细胞培养 24 h 后,换含 TdR 2.5 mmol/L 的培养液。24 h 后,换常规培养液。16 h 可得 G₁ 期同步化细胞,细胞同步化至 G₁ 期后,与未同步化细胞实验一样处理细胞,分析细胞周期。

3. Cdk₄-CyclinD1 和 Cdk₂-CyclinE 复合物含量测定:细胞同步化后以不同方式处理细胞。培养 24 h 后,裂解细胞。取蛋白量为 1 mg 的样品,加入 Protein A Sepharose CL-4B (瑞典 Pharmacia 公司),抗-Cdk₄ 和抗-Cdk₂。洗涤,电泳,转移,封闭。CyclinE 抗体 5 μl/500 μl (1:100),CyclinD₁ 抗体 5 μl/500 μl (1:100),反应 1 h。HRP-羊抗兔 IgG 2 μl/ml (1:500),反应 1 h。DAB 显色,冲洗,扫描^[3]。

4. 富硒大蒜等对裸鼠移植性胃癌的生长抑制实验:Balb/C 雄性裸鼠随机分 6 组(5 只/组):阴性对照组和阳性对照组喂正常粉料,高富硒蒜组喂添加 1.67%富硒大蒜粉料(硒含量为 2 μg/g),低富硒蒜组喂添加 0.84%富硒大蒜粉料(硒含量为 1 μg/g),普通大蒜处理组喂添加 1.67%普通大蒜粉料(硒含量为 9.165 × 10⁻² μg/g),亚硒酸钠处理组喂添加 4.38 μg/g 亚硒酸钠粉料(硒含量为 2 μg/g)。阳性对照组的裸鼠自摸到第 1 个肿瘤的第 2 天开始注射环磷酸胺(腹部皮下注射,0.4 mg/次,1 次/d × 7 d)。各组喂相应饲料 1 周后,接种细胞。每只裸鼠

分别在左右后肢外侧背部皮下 2 个部位接种,每个部位接种细胞 250 万。每周称体重 1 次。接种细胞后每天观察肿瘤生长情况。肿瘤长出后,每 3~4 d 测量肿瘤长径和短径一次。对照组裸鼠肿瘤平均重量估计超过 1 g 时,乙醚麻醉,取全血和肝肾等脏器,称重,分离移植瘤。瘤块做病理学检查。

5. 硒含量的测定:饲料、全血、心肌和骨骼肌硒含量的测定应用荧光分光光度法^[4]。

6. 统计学分析:分别用 *t* 检验和 ² 检验比较计量资料和计数资料的 *P* 值。

结果

一、富硒大蒜等处理抑制 MGC803 细胞生长

MGC803 细胞经不同处理发现,富硒大蒜、普通大蒜和亚硒酸钠单独处理都能抑制生长,存在剂效关系。富硒大蒜和普通大蒜作用强度相近,与富硒大蒜含硒量相同的亚硒酸钠作用最弱,普通大蒜和亚硒酸钠联合作用对细胞生长抑制作用最强(表 1)。

表 1 富硒大蒜、普通大蒜处理抑制 MGC803 细胞生长

| 组别 | 大蒜加入量(μl) | 硒终浓度(nmol/L) | 细胞数(万, $\bar{x} \pm s$) | 抑制率(%) |
|-------|-----------|--------------|--------------------------|--------|
| 阴性对照组 | | | 56.08 ± 4.76 | |
| 富硒大蒜组 | 5 | 48.1 | 39.41 ± 5.59* | 30.63 |
| | 15 | 144.3 | 29.63 ± 6.05* | 47.89 |
| | 25 | 225.0 | 15.60 ± 3.36* | 72.54 |
| 蒜硒联合组 | 5 | 48.1 | 46.51 ± 8.37* | 19.01 |
| | 15 | 144.3 | 15.84 ± 3.49* | 72.18 |
| | 25 | 225.0 | 9.21 ± 1.79* | 83.80 |
| 普通大蒜组 | 5 | 0.2 | 47.00 ± 4.42* | 17.25 |
| | 15 | 0.7 | 27.61 ± 10.06* | 51.41 |
| | 25 | 1.0 | 14.23 ± 2.35* | 75.35 |
| 亚硒酸钠组 | | 48.1 | 49.12 ± 11.51 | 13.73 |
| | | 144.3 | 44.52 ± 9.03* | 22.54 |
| | | 225.0 | 36.98 ± 1.78* | 35.21 |

*与阴性对照组比较, *P* < 0.05

二、富硒大蒜等处理影响 MGC803 细胞周期分布

55%正常未同步化细胞处于 G₁ 期。在 2.5 mmol/L 胸腺嘧啶核苷(TdR)作用 18~22 h 后,可使处于 G₁~S 交界处的细胞增加到 75.90%。在常规培养液培养释放相应时间后,细胞经 S 期和 G₂ 期,相继进入下一周期时相;约 16 h 后,大多数细胞进入了 G₁ 期,可用于同步化细胞实验。在经富硒大蒜、普通大蒜和亚硒酸钠处理 24 h 后,再测定同步化 MGC803 细胞周期时相分布,发现 S 期细胞增多,

G₁ 期和 G₂ + M 期细胞减少。富硒大蒜和亚硒酸钠组主要阻断在 S 期, 硒蒜联合处理主要阻断细胞在 G₂ + M 期(表 2)。

表 2 同步化 MGC803 细胞不同处理后细胞周期变化($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | G ₁ 期 (%) | S 期 (%) | G ₂ + M 期 (%) |
|-------|----------------------|----------------|--------------------------|
| 阴性对照组 | 64.28 ± 2.23 | 23.58 ± 1.81 | 12.12 ± 3.31 |
| 富硒大蒜组 | 51.86 ± 2.94 * | 42.68 ± 1.51 * | 5.42 ± 2.53 * |
| 蒜硒联合组 | 59.26 ± 6.38 | 22.04 ± 5.06 | 18.68 ± 4.43 |
| 普通大蒜组 | 59.92 ± 6.13 | 36.60 ± 5.69 * | 3.46 ± 1.94 * |
| 亚硒酸钠组 | 60.12 ± 1.28 * | 37.94 ± 2.40 * | 1.94 ± 1.74 * |

*与阴性对照组比较, P < 0.05

三、富硒大蒜等处理对 MGC803 细胞 Cdk₄-CyclinD1 和 Cdk₂-CyclinE 复合物含量的影响

同步化 MGC803 细胞经富硒大蒜等处理 24 h 后, 以免疫沉淀裂解细胞液相关抗原, 免疫印迹法测定相应复合物, 发现富硒大蒜和亚硒酸钠处理使细胞内 Cdk₂-CyclinE 复合物和 Cdk₄-CyclinD₁ 复合物的含量明显降低, 普通大蒜处理则使 Cdk₂-CyclinE 复合物明显减少, 而 Cdk₄-CyclinD₁ 复合物的含量变化不明显。

四、富硒大蒜等对裸鼠移植性胃癌的生长抑制作用

1. 一般情况: 各组裸鼠均无异常。实验结束时, 与阴性对照组比较, 低富硒蒜组、普通大蒜组和阳性对照组裸鼠净体重略降低, 而亚硒酸钠组升高。亚硒酸钠组的裸鼠肝脏重量明显升高 (P = 0.006),

低富硒蒜组、普通大蒜组和阳性对照组肝重与体重比值明显升高(表 3)。

2. 体硒含量比较: 高富硒蒜组和低富硒蒜组均使全血、骨骼肌和心肌硒含量显著增高, 存在剂效关系。亚硒酸钠组的全血和心肌硒含量轻度增高(表 3)。

3. 肿瘤生长比较: (1) 潜伏期: 对照组小鼠第 1 个肿瘤出现的平均时间为 10.8 d, 其他各处理组为 8~9 d。(2) 肿瘤体积比较: 随实验时间延长, 各组肿瘤平均体积差别逐渐增大。其中阳性对照组肿瘤体积最小, 其次为高富硒蒜组; 而阴性对照组、普通大蒜组和亚硒酸钠组之间差别不大; 低富硒蒜组肿瘤体积最大(表 4)。此外, 普通大蒜组在实验结束前一天, 有 1 只裸鼠死亡, 其左右两个瘤块体积均较大, 分别为 3.93 cm³ 和 4.41 cm³ (实验第 15 周测量), 高于该组肿瘤均值 (3.41 cm³)。(3) 肿瘤重量比较: 阳性对照组肿瘤重量抑制率为 48.79% (P < 0.05); 高富硒蒜组(硒含量为 2 μg/g) 有抑制肿瘤生长作用, 抑制率为 29.92% (P = 0.28); 亚硒酸钠组有一定的抑制作用; 低富硒蒜组(硒含量为 1 μg/g) 和普通大蒜组未见肿瘤抑制作用(表 5)。(4) 病理镜检: 经 PAS 染色, 各组肿瘤组织均能分泌少量黏液, 存在少量形状不规则的毛细血管, 无血管处肿瘤组织中央大面积坏死, 肿瘤组织和细胞的异型性未见差别。在阳性对照组、高富硒蒜组和低富硒蒜组的少数肿瘤组织边缘, 可见少量胃腺腺管样结构。在 62.50% 的低富硒蒜组可见肿瘤组织周围有大量

表 3 各组裸鼠荷瘤体重、净体重(荷瘤重 - 瘤重)、肝重、体硒含量一览表($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | 荷瘤体重(g) | 净体重(g) | 肝重(g) | 肝重/净体重 (%) | 全血硒(ng/g) | 骨骼肌硒(ng/g) | 心肌硒(ng/g) |
|-------|----|--------------|--------------|---------------|----------------|---------------|------------|------------|
| 阴性对照组 | 5 | 32.72 ± 4.07 | 26.04 ± 4.04 | 1.80 ± 0.36 | 21.21 ± 1.75 | 339 ± 69 | 151 ± 56 | 231 ± 21 |
| 高富硒蒜组 | 5 | 31.62 ± 1.76 | 26.42 ± 2.30 | 1.82 ± 0.13 | 21.96 ± 2.60 | 1 039 ± 284 * | 259 ± 32 * | 418 ± 36 * |
| 低富硒蒜组 | 5 | 32.06 ± 3.71 | 22.86 ± 3.16 | 1.88 ± 0.41 | 25.51 ± 1.10 * | 731 ± 100 * | 225 ± 28 * | 376 ± 66 * |
| 普通大蒜组 | 4 | 28.95 ± 3.48 | 22.28 ± 2.79 | 1.73 ± 0.24 | 27.08 ± 3.70 * | 353 ± 62 | 143 ± 16 | 220 ± 9 |
| 亚硒酸钠组 | 5 | 36.58 ± 4.52 | 29.98 ± 1.37 | 2.40 ± 0.16 * | 21.99 ± 2.50 | 521 ± 60 * | 163 ± 12 | 293 ± 29 * |
| 阳性对照组 | 5 | 27.84 ± 1.94 | 24.42 ± 3.57 | 1.64 ± 0.11 | 24.92 ± 6.17 | 356 ± 25 | 119 ± 10 | 223 ± 7 |

*与阴性对照组比较, P < 0.05

表 4 各组肿瘤体积变化比较(cm³)

| 组别 | 实验时间(周) | | | | | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 |
| 阴性对照组 | 0.38 ± 0.24 | 0.44 ± 0.38 | 0.91 ± 0.69 | 1.38 ± 1.12 | 1.93 ± 1.37 | 3.42 ± 2.32 |
| 高富硒蒜组 | 0.36 ± 0.28 | 0.42 ± 0.40 | 0.42 ± 0.39 | 0.78 ± 0.64 | 1.36 ± 1.29 | 2.29 ± 1.76 |
| 低富硒蒜组 | 0.45 ± 0.22 | 0.73 ± 0.30 | 1.02 ± 0.50 | 2.21 ± 0.98 | 3.20 ± 1.32 | 4.85 ± 1.81 |
| 普通大蒜组 | 0.32 ± 0.09 | 0.58 ± 0.36 | 0.86 ± 0.57 | 1.44 ± 0.83 | 2.39 ± 1.07 | 3.41 ± 1.38 |
| 亚硒酸钠组 | 0.41 ± 0.15 | 0.58 ± 0.38 | 0.74 ± 0.51 | 1.45 ± 0.96 | 2.29 ± 1.58 | 3.31 ± 2.42 |
| 阳性对照组 | 0.20 ± 0.13 | 0.23 ± 0.16 | 0.39 ± 0.26 | 0.56 ± 0.41 | 1.10 ± 0.72 | 1.49 ± 1.00 |

注: 肿瘤体积 = 肿瘤长径 × 肿瘤短径 × 肿瘤短径 / 2

单核细胞浸润包裹(图 1A,表 5),有单核细胞浸润瘤块的重量均数(5.62 g)比无单核浸润瘤块(3.53 g)大 59.06%,而阴性对照组和阳性对照组均无此现象(图 1B, $P=0.01$)。

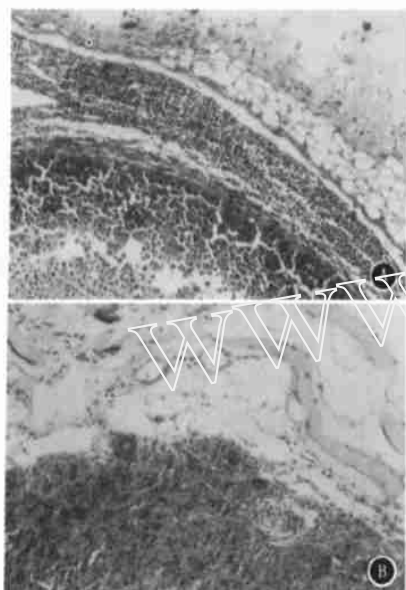


图 1 小鼠单核细胞包裹肿瘤现象 PAS 染色 ×400。A:低富硒蒜组;B:阳性对照组

表 5 各组裸鼠肿瘤生长情况比较

| 组别 | 瘤数 | 瘤重 [*] (g, $\bar{x} \pm s$) | 抑制率 (%) | 切片 瘤数 | 单核细胞 包裹数 [*] (%) |
|--------------------|----|--|------------|----------|------------------------------|
| 阴性对照组 | 9 | 3.71 ± 2.38 | | 8 | 0 |
| 高富硒蒜组 | 10 | 2.60 ± 1.99 | 29.9 | 10 | 1 |
| 低富硒蒜组 | 10 | 4.62 ± 1.64 | -24.5 | 8 | 5 [*] |
| 普通大蒜组 | 8 | 3.34 ± 1.59 | 10.0 | 8 | 1 |
| 亚硒酸钠组 | 10 | 3.30 ± 2.05 | 11.1 | 9 | 1 |
| 环磷酰胺组 [*] | 9 | 1.90 ± 0.87 [*] | 48.8 | 8 | 1 |

^{*}与阴性对照组相比, $P < 0.05$

讨 论

研究细胞周期分布有助于鉴别处理物的作用时相。我们的结果与文献^[5,6]类似,表明普通大蒜与亚硒酸钠联合处理对细胞有明显的非特异性毒性作用,DNA 合成受阻而使细胞停滞在 S 较晚期。

本研究中,高富硒蒜组的瘤重抑制率(29.92%)低,可能与富硒大蒜粉这一中药制剂的抑瘤强度低于化学药物有关。每组动物的数量(5 只)对于研究中中药制剂而言偏少,然而相对于细胞毒性剂环磷酰

胺而言,非细胞毒性的中药制剂富硒大蒜粉的抑瘤作用仍然相当可观。

低剂量(含硒 1 mg/kg 饲料)富硒蒜处理诱使裸鼠单核细胞在肿瘤周围的浸润是否与大蒜硒多糖有关^[7],尚待进一步研究。从裸鼠体硒水平看,富硒大蒜中的硒的生物利用度高于硒盐(亚硒酸钠)。低富硒蒜处理后,动物体硒水平已经高于亚硒酸钠组,提示摄入适当剂量富硒大蒜,在提高机体免疫功能中可能发挥特殊作用。矛盾的是,低富硒蒜处理不仅没有抑制肿瘤生长,相反还出现“促进”肿瘤生长的作用。裸鼠免疫能力的提高与裸鼠移植瘤生长之间是否存在内在联系,以及这种联系是否为无胸腺和无 T 细胞动物体内所特有,值得深入研究。由于单核细胞浸润同样会导致肿瘤体积或重量增加,观察动物的带瘤存活时间可能比观察肿瘤重量更有价值。

我们发现富硒大蒜导致骨骼肌中硒累积作用比亚硒酸钠强,与 Ip 等^[8]实验结果一致。本研究结果发现,富硒大蒜组裸鼠全血硒含量明显高于亚硒酸钠组,这可能是富硒大蒜造成了红细胞中的硒累积所致。以上结果表明,在多数情况下,富硒大蒜比亚硒酸钠更易造成体硒累积,可能与富硒大蒜中的蒜化硒比无机硒更易被机体吸收有关。

参 考 文 献

- Ip C, Lisk DJ. Modulation of phase and phase xenobiotic-metabolizing enzymes by selenium-enriched garlic in rats. *Nutr Cancer*, 1997, 28:184-188.
- 邓大君,杨文婕,夏弈明.富硒大蒜制剂及其制作方法.中华人民共和国国家知识产权局发明专利公报,2001,17:6.
- 寿成超.免疫沉淀.见:董志伟,王琰,主编.抗体工程.第 1 版.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997. 218-223.
- 王光亚,周瑞华,孙淑庄,等.生物样品、水及土壤中含量硒的荧光测定法.营养学报,1985,7:39-45.
- Lu J, Pei H, Ip C, et al. Effect of an aqueous extract of selenium-enriched garlic on in vitro markers and in vivo efficacy in cancer prevention. *Carcinogenesis*, 1996, 17:1903-1907.
- Sinha R, Medina D. Inhibition of cdk2 kinase activity by methylselenocysteine in synchronized mouse mammary epithelial tumor cells. *Carcinogenesis*, 1997, 18:1541-1547.
- Yang M, Wang K, Cao L, et al. Exploration for a natural selenium supplement characterization and bioactivities of se-containing polysaccharide from garlic. *J Chin Pharm Sci*, 1992, 1:28-32.
- Ip C, Lisk DJ. Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. *Carcinogenesis*, 1994, 15:573-576.

(收稿日期:2001-04-29)