

胃癌细胞中硒分布、含量 与谷胱甘肽过氧化物酶的关系^①

吴 乔 李祺福 汪德耀

(细胞生物学研究室)

摘要 通过电镜放射自显影,原子吸收光谱法分析硒在胃癌细胞中的分布和含量,光谱法测定细胞中谷胱甘肽过氧化物酶活性,结果表明亚硒酸钠主要作用于胃癌细胞的线粒体和细胞核,对线粒体 DNA,细胞核 DNA 的复制和基因表达均有一定的作用.在亚硒酸钠处理的胃癌细胞中,随着硒含量的提高,谷胱甘肽过氧化物酶活性也提高,从而阻止了线粒体中的脂质过氧化反应,使线粒体结构与功能恢复正常.

关键词 MGc80-3 细胞、亚硒酸钠、谷胱甘肽过氧化物酶

微量元素硒的抗癌作用已引起人们的重视^[1].我们的研究已证实亚硒酸钠能够有效地抑制人胃腺癌 MGc80-3 细胞的恶性增殖活动,对胃癌细胞具有显著的诱导分化作用^[2].本文拟通过定位硒在胃癌细胞中的分布和分析硒含量及其与谷胱甘肽过氧化物酶活性的关系,探讨硒抑制胃癌细胞生长,逆转其恶性表型的作用机制,以期阐明硒的抗癌作用机理提供进一步的科学依据.

1 材料和方法

细胞培养与药物处理 MGc80-3 细胞培养于含有小牛血清、适量的青、链霉素和卡那霉素的 RPMI-1640 培养液中,灌入 5%CO₂,置 37℃培养.实验组细胞接种 24 h 后弃旧培液,换上含 3×10^{-6} mol/l 亚硒酸钠的新培液,对照组同时换上不含亚硒酸钠的新培液,连续培养供实验用.

⁷⁵Se 电镜放射自显影样品制备 对照组 MGc80-3 细胞换上含 14.8×10^4 Bq 的 ⁷⁵Se 的新培液,37℃标记 2 h, D-Hanks 液洗涤后,用橡皮刮刀推下细胞,离心(2 000 r/min)10 min,所得的细胞团经戊二醛(2.5%, 2 h),锇酸(1%, 2 h)双固定,乙醇系列脱水,环氧树脂 618# 包埋,超薄切片喷镀碳膜后,乳胶 HW-4 涂片,置暗盒于 4℃曝光 80 d, Microdo-x 显影液显影,酸性定影液定影,透射电镜 JEM-100CX 观察.

原子吸收光谱法测定硒含量 分别收集亚硒酸钠处理 3 d、6 d 和 9 d 的实验组细胞和对照组 MGc80-3 细胞,用 9%蔗糖溶液制成细胞悬液,精确计算细胞总数,离心(2 000 r/min)15

① 本文 1992-06-11 收到

min, 所得的细胞团中加入 0.5 ml 纯硝酸溶液, 密封瓶口, 置 4 ℃ 过夜. 测定之前再加入 2~3 滴纯高氯酸溶液, 水浴锅中(80~90 ℃)温浴 3~4 h, 使细胞完全消化. 上述溶液适当稀释后于 Perkin-Element 30B 原子吸收光谱仪及 HGA-500 石墨炉(AS-40 自动进样器, PR-100 打印机)上测定硒含量, 实验重复三次.

谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定 参照朱桦方法^[3]. 分别收集亚硒酸钠处理 3 d、6 d 和 9 d 的实验组细胞和对照组 MGc80-3 细胞, 于少量磷酸缓冲液(0.2 mol/l, pH 7.0)中破碎, 离心(3 000 r/min)10 min, 取上清液测定酶活力. 试管中加 1.0 mmol/l 谷胱甘肽 0.4 ml, 样品稀释液 0.4 ml, 置 37 ℃ 水浴锅加热 5 min, 加入已预热的 1.25 mmol/l 过氧化氢 0.2 ml, 准确反应 5 min 后, 立即加入偏磷酸沉淀液 4 ml, 停止反应(以重蒸水替代样品稀释液作非酶反应). 取上述溶液 0.2 ml, 加入 0.32 mol/l 磷酸氢二钠 2.5 ml, 0.5 ml DTNB(5,5'-二硫对 2 硝基苯甲酸)显色液, 显色 0.5 h 后测定光密度(422 nm, 25 ℃). 根据 Folin 酚法测定蛋白含量, 计算该酶活力(事先测定并制出谷胱甘肽标准曲线). 实验重复三次.

2 实验结果

2.1 硒在 MGc80-3 细胞中的分布

⁷⁵Se 电镜放射自显影结果表明, 硒可以很快透过细胞膜(2 h), 进入细胞质和细胞核中发挥作用. 从银粒分布情况来看, 细胞核、核膜边缘及核仁边缘都有银粒出现(图 1, 2), 细胞质中银粒则较多地出现在线粒体区域, 有的位于线粒体膜上, 有的位于线粒体基质中(图 2, 3). 另外, 在细胞表面微绒毛上也发现银粒(图 3, 1).

2.2 亚硒酸钠对 MGc80-3 细胞中硒含量变化的影响

实验结果(图 4)表明, MGc80-3 细胞中有微量硒存在, 硒含量平均为 0.0161×10^{-9} mol/10 万细胞. 在培养第 3 天、第 6 天和第 9 天的细胞中, 硒含量并无明显变化, 表明 MGc80-3 细胞中的硒含量不受培养天数, 传代次数的影响. 经亚硒酸钠处理的 MGc80-3 细胞, 硒含量发生了明显的变化, 细胞中硒含量平均为 0.0639×10^{-9} mol/10 万细胞. 比对照组提高 3.97 倍, 并随着亚硒酸钠处理时间的不同, 硒含量也有所改变, 处理第 3 天时细胞中硒含量为对照组的 3.06 倍, 处理第 6 天时硒含量最高, 为对照组的 4.67 倍, 处理第 9 天时硒含量略低于第 6 天, 但仍高于第 3 天, 为对照组的 4.18 倍.

2.3 亚硒酸钠对 MGc80-3 细胞中谷胱甘肽过氧化物酶活性变化的影响

测定结果(图 5)显示, MGc80-3 细胞中谷胱甘肽过氧化物酶平均比活力为 203.3 u/(mg protein · min), 第 3 天, 第 6 天和第 9 天该酶活性变化较小, 不受培养天数, 传代次数的影响. 经亚硒酸钠处理的 MGc80-3 细胞中谷胱甘肽过氧化物酶平均比活力为 373.3 u/(mg protein · min) 比对照组高 1.84 倍, 并随亚硒酸钠处理天数的不同, 该酶活性发生了变化, 处理第 3 天时, 酶活力比对照组提高 1.40 倍, 处理第 6 天时, 提高 2.24 倍, 处理第 9 天时, 提高 1.90 倍. 结果表明, MGc80-3 细胞在亚硒酸钠作用下, 谷胱甘肽过氧化物酶活性第 6 天达到最高峰, 第 9 天活性略为降低, 但仍高于第 3 天. 这一变化趋势与亚硒酸钠影响 MGc80-3 细胞中硒含量的变化趋势相同.

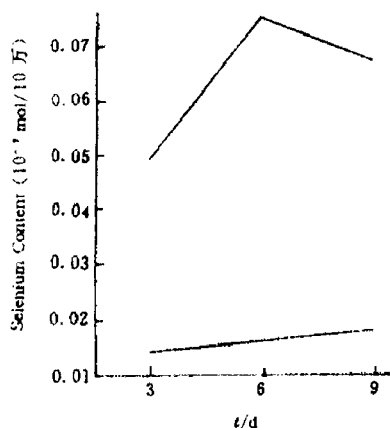


图4 硒含量的变化

Fig. 4 The change of content of selenium

△-△-△ MGc80-3 cell
 ······ Na₂SeO₃ treatment

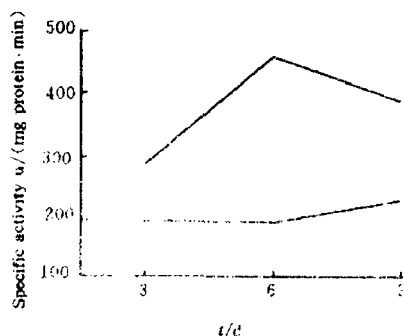


图5 谷胱甘肽过氧化物酶活性的变化

Fig. 5 The change of activity of glutathione peroxidase

△-△-△ MGc80-3 cell
 ······ Na₂SeO₃ treatment

3 讨论

⁷⁵Se 电镜放射自显影结果显示,硒可以在较短的时间内对癌细胞起作用,从标记的银粒分布情况来看,线粒体区域和细胞核中出现的银粒较多,表明亚硒酸钠透过细胞后,主要作用于线粒体和细胞核.在微绒毛上出现的银粒可能是残留在细胞表面的放射性硒元素造成的.

研究表明,亚硒酸钠不仅能促使胃癌细胞线粒体结构恢复正常,还能提高线粒体中电子传递系的末端酶——细胞色素氧化酶的活性^[4],该酶活性是由线粒体基因组和核基因组联合表达的结果,由此提示亚硒酸钠对线粒体基因表达有一定的影响. Medina 认为,线粒体 DNA 与肿瘤生长之间有联系,硒能通过调节线粒体的功能而抑制肿瘤细胞的生长^[5].所以,我们推测, MGc80-3 细胞的恶性增殖活动,可能与其线粒体 DNA 复制失控有一定关系,亚硒酸钠作用于 MGc80-3 细胞后,调节了细胞线粒体 DNA 的复制,使能量代谢恢复正常,甚至有可能通过作用于线粒体 DNA,调控线粒体基因组,使基因得以正常表达,从而诱导胃癌细胞向正常细胞方向分化.

实验表明,亚硒酸钠对细胞核有一定的作用,我们以前的研究也证明亚硒酸钠能够有效抑制 MGc80-3 细胞的 DNA 复制^[2],赵清正等人认为硒的抗癌作用可能与癌细胞核的基因表达在转录水平上的调控有某些失常有关^[4],郑美莲的观察表明硒能促进细胞内 DNA 的修复过程,抑制癌基因的表达^[7],Medina 指出硒在 DNA-RNA 合成,蛋白质合成和结构形成上起了一定的作用^[4],因此我们认为,亚硒酸钠不仅可以抑制癌细胞的 DNA 复制,还可能作用于 RNA 的转录和蛋白质的转译,调控癌细胞核基因表达在转录,转译等水平上的某些失常,使基因表

达正常化,起到逆转癌细胞恶性表型的作用。

在不同的处理时间内分别测定硒含量和谷胱甘肽过氧化物酶活性的结果表明, MGc80-3 细胞中含有极微量的硒, 谷胱甘肽过氧化物酶活性较低, 而亚硒酸钠处理后, 细胞中的硒含量均显著高于 MGc80-3 细胞, 第 6 天达到最高峰, 这表明细胞代谢在第六天最旺盛, 吸收外界硒最多, 因而硒含量最高。同样, 谷胱甘肽过氧化物酶活性也大幅度提高, 第 6 天活性最高, 这一结果与有关学者报道的观点相一致^[1], 即: 随着细胞内硒含量的增加, 谷胱甘肽过氧化物酶活性也将提高。谷胱甘肽过氧化物酶是一种含硒的酶蛋白, 其主要功能是阻止过氧化物和自由基的形成。目前认为, 体内谷胱甘肽过氧化物酶活性过低, 将影响其抗氧化作用, 使生物体内自由基、过氧化物生成过多, 并大量堆积, 如果这种反应十分强烈, 将造成细胞膜、线粒体膜等结构与功能的损伤, 使 DNA, RNA 酶等产生异常反应, 干扰细胞的代谢机能, 直接影响细胞的生长^[1]。我们分析认为, 线粒体膜上脂类含量高, 易发生过氧化反应, MGc80-3 细胞中硒含量和谷胱甘肽过氧化物酶活性低, 可能造成了线粒体中过氧化物的堆积, 由此可能直接或间接地损伤线粒体结构, 影响线粒体 DNA 合成体系, 导致线粒体功能异常, 而适量的亚硒酸钠处理细胞后, 通过提高谷胱甘肽过氧化物酶活性, 阻止了自由基的产生和脂质过氧化反应, 使线粒体膨胀、空泡化和嵴断裂的现象消失, 线粒体结构恢复正常, 从而促使线粒体功能得以正常发挥, 细胞色素氧化酶活性的提高就是一个很好的佐证^[4]。

综合我们的研究^[2,4]认为, 亚硒酸钠主要通过两条途径作用于胃癌细胞, 一条途径是作用于胃癌细胞的细胞核, 抑制其 DNA 复制, 还可能作用于 RNA 的转录和蛋白质的转译, 从而使基因表达正常化, 基因的正常表达导致了胃癌细胞恶性表型特征向正常细胞方向逆转。另一条途径则是通过提高细胞中的硒含量, 刺激谷胱甘肽过氧化物酶活性的提高, 减少细胞内过氧化物的堆积, 特别是通过对线粒体结构与功能的影响, 抑制线粒体 DNA 的复制, 促使细胞的能量代谢恢复正常, 进而使细胞有序地进行一系列复杂的代谢活动, 胃癌细胞的恶性增殖得到抑制。由此可见, 亚硒酸钠对胃癌细胞具有明显的抑制作用, 它可以通过多方面途径作用于癌细胞, 最终能够诱导胃癌细胞向正常方向分化, 逆转胃癌细胞的恶性表型。

参 考 文 献

1. Grunalicinska J et al. Glutathione peroxidase activity, selenium and lipid peroxides level in blood of cancer children. *Annals of Clinical Res.*, 1988, 20(3), 177~183
2. 吴 乔等. 亚硒酸钠对人胃癌细胞生长和超微结构的影响. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1992, (3), 275~280
3. 朱 彬. 硒对金鼠淋巴瘤生长谷胱甘肽过氧化物酶及超微结构的影响. *动物学研究*, 1987, 8(2), 125~131
4. 吴 乔等. 亚硒酸钠对胃癌细胞线粒体结构与功能的影响. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1992, (5), 528~532
5. McElna D et al. Mitochondrial inclusions in selenium-treated mouse mammary epithelial cell lines. *Cancer Res.*, 1983, 43, 2:100~2:105
6. 赵清江等. 硒对正常大鼠肝及肝癌细胞核转录活性的影响. *中华肿瘤杂志*, 1984, 6(3), 225
7. 郑美莲. 硒谷胱甘肽过氧化物酶与肿瘤. *癌症*, 1989, 8(5), 399~401
8. Nicholas D et al. Selenium inhibition of DNA synthesis in mouse epithelial cell line YN-4. *Cancer Res.*, 1984, 44, 4:361~4:365

- 9 Luoma P V. 血清硒、谷胱甘肽过氧化物酶、脂质和人肝微粒体的酶活性. 国外医学(医学地理), 1987, (1): 10~15
- 10 陈 媛等. 脂质过氧化作用与疾病. 中华医学杂志, 1985, 65(11): 704~707

The Distribution and the Content of Selenium in Carcinoma Cells and Relation of Glutathione Peroxidase

Wu Qiao Li Qifu Wang Deyao
(*Lab. of Cell Biol.*)

Abstract The distribution of selenium and the content of selenium in the cells had been studied through electron microscope autoradiography and atomic absorption spectrophotometry, the activity of glutathione peroxidase in the cells had also been analysed through spectrophotometry. The result showed that sodium selenite acted mainly on mitochondria and nucleus in human gastric adenocarcinoma cells, it might effect on the duplication of mitochondrial DNA, the duplication of nuclear DNA and gene expression. The activity of glutathione peroxidase also increased when the content of selenium increased in carcinoma cells treated with sodium selenite, it could prevent lipid peroxidatic reaction in mitochondria and made mitochondrial structure and function return to normal.

Key words MGc80-3 cell, Sodium selenite, Glutathione peroxidase

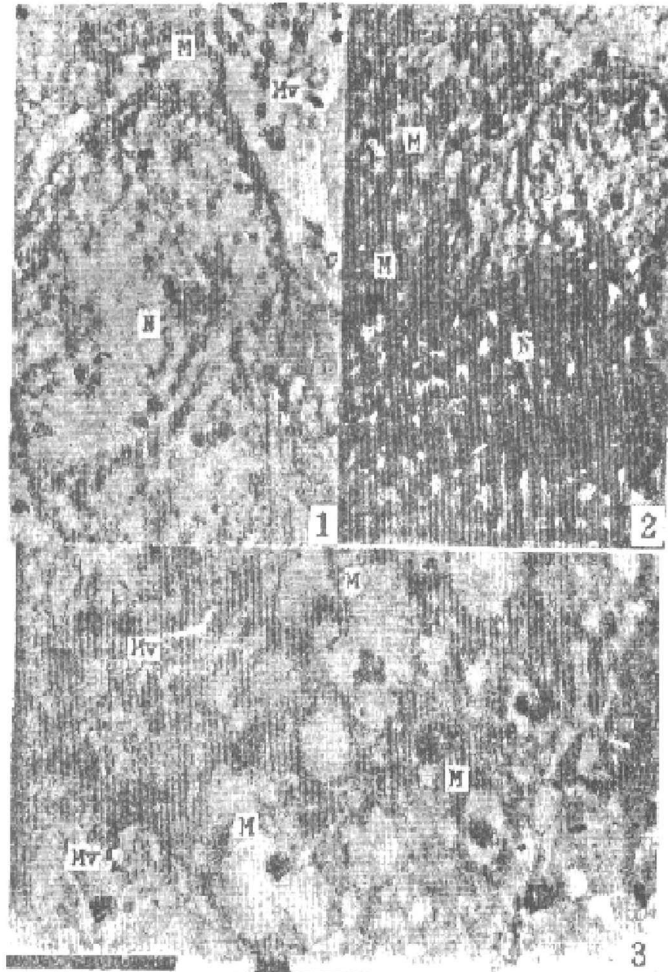


图 1~3 在 MGc80-3 细胞中, 标记银粒出现在细胞核和线粒体中, 微绒毛上也有一些标记银粒
 Fig. 1~3 In MGc80-3 cells, the labeling silver granules appeared in nucleus (N) and mitochondria (M),
 there were some labeling silver granules in microvilli (Mv)