

9.21) 值较对照组 (前者 18.99 ± 5.16 、后者 56.71 ± 8.11) 明显升高 ($P < 0.01$, $P = 0.014$), 低氧高二氧化碳组 VA/TA 值 (32.72 ± 9.20) 较对照组 (43.29 ± 8.11) 明显降低 ($P = 0.014$); 提示肺动脉内外两层弹力板之间管壁增厚, 血管腔明显狭窄。

3. 两组大鼠肺血管超微结构: 对照组大鼠肺中小肌型动脉内皮细胞胞体扁平, 平滑肌细胞胞体小。低氧高二氧化碳组肺中小动脉内皮细胞数目增多, 线粒体空泡变性, 内质网扩张, 血管内皮细胞呈立方型, 竖状突起, 凸向管腔, 基底部变窄; 平滑肌细胞胞体肥大, 平滑肌间隙扩大, 胶原纤维插入, 内弹力板高度扭曲。

4. 两组大鼠肺中小动脉 sGC mRNA 表达及肺组织 sGC 酶活性的变化: 原位杂交显示: 低氧高二氧化碳组大鼠肺中小动脉 sGC₁ 亚基 mRNA 免疫反应显色减弱; 低氧高二氧化碳组 sGC₁ mRNA 在大鼠肺中小动脉上表达的平均吸光度值 (0.087 ± 0.014) 显著皆低于对照组 (0.160 ± 0.007), 差异有显著性意义 ($P < 0.001$)。酶动力学分析: 大鼠肺组织 sGC 活性在低氧高二氧化碳组和对照组比较明显降低 (前者为 32.03 ± 7.17 、后者为 114.76 ± 18.37 pmol cGMP · mg prot⁻¹ · min⁻¹), 差异有显著性意义 ($P < 0.001$)。

三、讨论

sGC 是 NO 的细胞内关键受体, 它的表达调控着细胞内第二信使 cGMP 的产生和血管对 NO 等小分子物质的舒张反应, 参与血管张力调控, 甚至影响细胞增殖、凋亡和细胞外基质的产生。因此, sGC 表达变化可能会改变肺动脉阻力并导致血管结构的重建。我们发现在大鼠低氧高二氧化碳性肺动脉高压的形成发展中, sGC 基因表达下降, 即转录减少, 酶动力学显示 sGC 酶活性随之削弱。长期低氧能提高 cAMP 水平, 而 sGC₁ 基因的 5' 上游区证实有 cAMP 反应元件, 两者结合是 sGC 基因转录抑制的可能原因^[3]。

我们还发现低氧高二氧化碳诱使大鼠肺动脉压明显增高, 同时电镜及光镜结果显示: 肺血管中膜平滑肌增生, 管壁增厚、管腔狭窄。以上提示低氧高二氧化碳肺动脉高压大鼠

的肺血管结构发生了重建。低氧高二氧化碳肺血管结构重建乃至肺动脉高压的形成机制至今尚未完全清楚。已有研究表明, 低氧时 sGC 活性下降, 是肺动脉平滑肌细胞 DNA 合成增多的原因之一^[4]。大鼠颈动脉球囊损伤后, sGC₁、₁ 亚基蛋白表达下降, 对 NO 的反应低下, 细胞 cGMP 水平降低, 进而胸腺嘧啶核苷整入增多, 促进颈动脉内皮、平滑肌细胞 DNA 的合成, 内膜增厚; 基因重组转染 sGC₁、₁ cDNA 能逆转上述现象^[5]。鉴于以上情况, 我们将低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠肺血管结构改变与 sGC 表达变化同步研究。结果表明, 低氧高二氧化碳肺血管结构发生重建, 同时肺组织 sGC 基因表达减少、酶活性降低, 合成 cGMP 能力低下。提示 sGC 表达及其酶活性降低, 可能参与肺血管结构重建, 从而促进低氧高二氧化碳性肺动脉高压的形成与发展; 若基因重组转染 sGC cDNA 可能有助于缓解或逆转低氧高二氧化碳性肺血管结构重建。

参 考 文 献

- 1 Fouty B, Komalavilas P, Muramatsu M, et al. Protein kinase G is not essential to NO-cGMP modulation of basal tone in rat pulmonary circulation. *Am J Physiol*, 1998, 274: H672-678.
- 2 Zuo Z, Johns RA. Halothane, enflurane, and isoflurane do not affect the basal or agonist-stimulated activity of partially isolated soluble and particulate guanylyl cyclases of rat brain. *Anesthesiology*, 1995, 83: 395-404.
- 3 Mikami T, Kusakabe T, Suzuki N. Tandem organization of mekaka fish soluble guanylyl cyclase alpha1 and beta1 subunit genes. *J Biol Chem*, 1999, 274: 18567-18573.
- 4 冯晓东, 蔡英年. ET-1 和 NO 对肺动脉平滑肌细胞 DNA 合成的作用及缺氧对其调制的研究. *中国医学科学院学报*, 1995, 17: 172-177.
- 5 Sinnaeve P, Chiche JD, Nong Z, et al. Soluble guanylate cyclase₁ and₁ gene transfer increases NO responsiveness and reduces neointima formation after balloon injury in rats via anti-proliferative and antimigratory effects. *Circ Res*, 2001, 88: 103-109.

(收稿日期: 2002-08-17)

(本文编辑: 齐文安)

有机硒对恶性转化人胚食管上皮永生细胞系作用的实验研究

黄海花 苏敏 田东萍 沈忠英 郑志超

一、材料与方 法

1. 材料: H5E973 细胞系^[1]由本院沈忠英教授提供; 亚硒酸钠 (天津市化学试剂研究所), 分析纯; 硒-甲基硒代半胱氨酸 (MSC) (美国 Sigma 公司), 分析纯。TUNEL 试剂盒 (美

国 Promega 公司)。

2. 细胞形态学的观察: MSC 和亚硒酸钠作用的终浓度分别为 0.1、1、2、4 和 8 μg/ml, 对照组加入生理盐水, 培养 48 h 后收取细胞爬片, HE 染色, 树胶封片后, 光镜下观察。

3. 细胞分裂指数 (MI): 细胞爬片经 Giemsa 染色, 高倍镜下计数 1 000 个细胞的分裂象数。

4. 流式细胞仪检测: 分组同上, 常规制样, 用碘化丙啶

作者单位: 515031 汕头大学医学院病理学教研室

通信作者: 苏敏

50 mg/L 染色, 360 目尼龙网过滤, 用 FACSort 流式细胞仪 (美国 B. D 公司) 检测, 细胞周期分析使用 Cylchred1 软件。

5. 细胞凋亡检测 (TUNEL 法): 按试剂盒说明步骤进行。结果判定: 阳性细胞, 核呈棕黄色。每张切片, 随机选择 5 个高倍视野, 记数 500 个细胞 (每个视野 100 个), 计算阳性细胞数并以百分数表示, 作为细胞凋亡指数 (PI)。

二、结果

1. 形态学观察: 对照组细胞密集, 呈多边形, 核大, 核质比例失调, 核分裂象多见。0.1 $\mu\text{g/ml}$ MSC 和亚硒酸钠组, 细胞形态无明显改变。1.0 $\mu\text{g/ml}$ MSC 组, 细胞密度轻度下降, 除见少量细胞呈凋亡形态学改变, 即细胞体积缩小, 胞质浓缩, 强嗜伊红, 有的核染色质聚集深染, 有的断裂为碎片或形成凋亡小体, 其余细胞形态无明显改变。随着 MSC 浓度增加, 凋亡细胞增多, 细胞密度进一步下降, 但值得注意的是即使 MSC 浓度达 8.0 $\mu\text{g/ml}$, 细胞仍未见明显的毒性改变。在 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 亚硒酸钠组, 细胞密度下降, 部分细胞出现肿胀变圆、胞质空泡增多和细胞表面泡状突起等毒性改变细胞肿胀变圆, 胞质空泡增多, 有时见散在的凋亡细胞。随着硒剂量增加, 细胞毒性改变更加明显, 当浓度为 8.0 $\mu\text{g/ml}$ 时, 大部分细胞已坏死、崩解。

2. 细胞分裂指数 (MI %): 除 8.0 $\mu\text{g/ml}$ 亚硒酸钠组 48 h 或 72 h 后, 大部分细胞坏死脱壁, 无法计算分裂指数外, 其余各加硒组的分裂指数均显著低于其相应的对照组 (P 均 < 0.01), 并呈浓度和时间依赖性降低, 剂量组或时间组间的差异有显著性意义 (除 48 h 亚硒酸钠浓度组的差别 $P < 0.05$, 其余各浓度或时间组间的差别 P 均 < 0.01)。

3. 流式细胞仪检测: 细胞周期和凋亡细胞分析结果见表 1, 细胞培养 48 h 后, 不同浓度硒-甲基硒代半胱氨酸组与

对照组相比, G_1 期及凋亡细胞百分率, 都随其浓度的增加而增多, S 期的百分率却随之下降, 而不同浓度亚硒酸钠组则相反, G_1 期的百分率随着硒浓度的增加而下降, S 期和凋亡细胞百分率则随之增加。亚硒酸钠浓度为 8.0 $\mu\text{g/ml}$ 时, 由于大部分细胞已坏死, 故该组没测。

4. TUNEL: 硒化合物浓度与细胞凋亡指数 (PI) 的关系 (表 2)。有机硒组 TUNEL 表达的阳性程度比相应的无机硒组强。

表 2 细胞凋亡指数与 NaSeO_3 和 MSC 作用浓度的关系

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	凋亡指数 ($n=5, \bar{x} \pm s$)	
	亚硒酸钠组	MSC 组
0	0.32 \pm 0.62	0.32 \pm 0.62
0.1	4.84 \pm 3.13	9.68 \pm 5.17
1.0	21.87 \pm 0.57 *	26.29 \pm 3.96 *
2.0	36.85 \pm 2.41 *	37.54 \pm 6.56 *
4.0	24.65 \pm 5.47 *	42.18 \pm 1.29 *
8.0	23.81 \pm 3.95 *	66.96 \pm 1.05 *

注: * 与对照组 (0 组) 比 $P < 0.01$

三、讨论

本实验结果提示, 两种硒化合物对食管癌细胞系 H5E973 均有生长抑制作用, 但两者的作用方式有所差别。亚硒酸钠的抑制作用比 MSC 强, 但亚硒酸钠在出现抑制作用的同时, 也出现了细胞毒性作用; 而 MSC 的作用较缓和, 在高剂量时, 不但能抑制细胞的生长, 而且细胞毒性不明显。有实验证实, 硒能显著影响细胞周期, 使其阻滞于细胞周期的不同时期。本实验结果显示: MSC 能明显降低 S 期而增加 G_1 期细胞的比例, 相反, 亚硒酸钠明显增加 S 期细胞而降低 G_1 期细胞的比例, 两种硒化合物对细胞周期的影响具有浓度依赖性, 这与文献的报道相类似^[2]。另外在实验中我们发现硒-甲基硒代半胱氨酸能使部分细胞变小, 伸出突起, 互相连接成网, 这种现象到底是细胞变性的一种表现还是细胞分化的结果, 有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Shen ZY, Cen S, Shen J, et al. Study of immortalization and malignant transformation of human embryonic esophageal epithelial cells induced by HPV18E6E7. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, 126: 589-594.
- 2 Lu J, Pei H, Ip C, et al. Effect on an aqueous extract of selenium-enriched garlic on in vitro markers and in vivo efficacy in cancer prevention. Carcinogenesis, 1996, 17: 1903-1907.

(收稿日期: 2002-09-27)

(本文编辑: 常秀青)

表 1 不同浓度的 NaSeO_3 和 MSC 对 H5E973 细胞细胞周期和细胞凋亡的影响

组别	细胞周期百分率 (%)			凋亡指数
	G_0G_1 期	S 期	G_2 期	
对照组	26.48	65.55	7.98	0.11
硒-甲基硒代半胱氨酸 ($\mu\text{g/ml}$)				
0.1	29.13	63.57	7.30	3.88
1.0	28.31	66.03	5.66	6.26
2.0	31.94	61.68	6.38	17.20
4.0	42.40	52.45	5.15	27.76
8.0	55.30	43.90	0.80	44.13
亚硒酸钠 ($\mu\text{g/ml}$)				
0.1	24.50	65.49	10.01	7.68
1.0	21.00	69.05	9.95	11.60
2.0	16.48	79.48	4.04	20.24
4.0	12.40	85.20	2.30	24.67
8.0	- *	- *	- *	- *

注: * 细胞大部分死亡, 细胞数不够, 无法测量