

硒增强T淋巴细胞抗大肠癌作用的实验研究

赵任¹ 郝宝铭¹ 张国弛² 李东华¹ 朱佑明² 胡宝瑜²

上海第二医科大学附属瑞金医院外科¹(200025) 上海第二医科大学微生物教研室²

目的: 探讨硒对T淋巴细胞抗结肠癌细胞作用的影响。**方法:** 以半胱氨酸硒作为影响因素,人T淋巴细胞为效应细胞,人结肠癌细胞(LoVo细胞株)为靶细胞,采用MTT比色法和凋亡细胞荧光计数检测凋亡细胞的数量;同时检测上清液中肿瘤坏死因子(TNF) α 、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量的变化。**结果:** 半胱氨酸硒在一定浓度范围内(0.5 $\mu\text{g/ml}$ ~1.0 $\mu\text{g/ml}$)可增强人T淋巴细胞的抗肿瘤活性($P<0.05$),促进人结肠癌细胞凋亡,且肿瘤细胞凋亡比例上升($P<0.05$);T淋巴细胞抗肿瘤作用的增强与上清液中TNF- α 水平增高有关($P<0.05$),与SOD和MDA无关($P>0.05$)。**结论:** 硒可提高T淋巴细胞的抗肿瘤作用。

关键词 结肠直肠癌 硒 T淋巴细胞 脱噬作用 肿瘤坏死因子 超氧化物歧化酶 丙二醛

Study of Enhancing Effect of Selenium on Anti-tumor Function of T-lymphocyte in Colonic Cancer Cell ZHAO Ren, YU Baoming, ZHANG Guochi, LI Donghua, ZHU Youming, HU Baoyu
Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai (200025)

Background/Aims: To study whether selenocystine (Se) could enhance the anti-tumor function of T-lymphocyte in colonic cancer cell. **Methods:** Selenocystine is a factor influencing human T-lymphocyte which acts as an effector cell and human colonic tumor cell (LoVo cell) as a target cell. This study was allocated into four groups: control, Se 0.5 $\mu\text{g/ml}$, Se 1.0 $\mu\text{g/ml}$ and Se 2.0 $\mu\text{g/ml}$. The ratio of effector cell to target cell was 20:1. MTT and acridine orange were used for quantitative measurement, TNF- α , SOD and MDA were also measured. **Results:** The selenium enhanced the anti-tumor effect of T-lymphocyte and induced LoVo cells apoptosis within a certain concentration range of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ~1.0 $\mu\text{g/ml}$, and this effect was time- and dose-dependent ($P<0.05$). Enhancement of T-lymphocyte anti-tumor effect was related to TNF- α ($P<0.05$), but not to SOD and MDA ($P>0.05$). **Conclusions:** Selenocystine can enhance the anti-tumor function of T-lymphocyte in colonic cancer cell, which is related to TNF- α , but not to SOD and MDA.

Key words Colorectal Neoplasms Selenium T-Lymphocytes Apoptosis
Tumor Necrosis Factor Superoxide Dismutase Malondialdehyde

据报道硒(Se)在生理剂量范围内能阻止或延缓病毒和化学物质的诱癌作用。动物实验表明,硒能抑制自发性、移植性和诱发性肿瘤的生长。临床上给肿瘤患者适量补硒,可提高患者的机体免疫功能,增强防癌和抗癌能力。硒能否增强细胞免疫功能,抑制大肠癌细胞的生长或增强T淋巴细胞的抗肿瘤活性和致肿瘤细胞凋亡是本研究的主要内容。

材料与方法

一、试剂

半胱氨酸硒为美国Sigma公司产品,人结肠癌LoVo细胞株购自中科院上海细胞研究所,人外周血单个核细胞(T淋巴细胞)由健康志愿者全血分离得到。超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)含量测定均使用南京建成生物工程公司的试剂盒。

二、仪器

Ultrospec III型紫外光/可见光分光光度计(瑞典Pharmacia公司)、荧光显微镜(德国Axioskop公司)和细胞培养箱(美国Heraens公司)。

三、方法

1. 荧光染色法:调整LoVo细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$,加入96孔板中,每孔100 μl ,显微镜高倍视野下观察并记录每个视野中的细胞数。细胞放入培养箱内培养并按时更换培养液,待细胞贴壁长满整个孔面积的90%时,各组分别加入不同浓度的硒和T淋巴细胞,对照组不加硒,其余各组硒浓度为0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1.0 $\mu\text{g/ml}$ 和2.0 $\mu\text{g/ml}$ 。T淋巴细胞和肿瘤细胞数之比为20:1。培养至24 h、48 h和72 h时,分别加入胰酶,每孔20 μl 。待细胞脱落后,立即吸出25 ml细胞悬液于载玻片上,加入1 μl 混合荧光染色液(100 $\mu\text{g/ml}$ 吖啶橙和100 $\mu\text{g/ml}$ 溴乙锭)混

匀,压上盖玻片,置荧光显微镜下观察并计算细胞凋亡指数。细胞凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数。细胞凋亡的标准为荧光染色下细胞核呈黄色,细胞浆呈绿色。

2. MTT比色法细胞毒活性测定:取对数生长期浓度为 $5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ 的LoVo细胞,加样 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液于96孔板中,并将制备好的T淋巴细胞悬液加入相应孔中。效应细胞和靶细胞数之比为20:1。半胱氨酸硒分组同荧光染色法。每一剂量各设3个复孔,并设培养液调零孔。96孔板置培养箱中(37°C ,饱和湿度,5% CO_2 孵箱)分别作用12 h、24 h、48 h和72 h;实验结束前4 h,每孔加入MTT $100 \mu\text{g}/25\text{ml}$,再孵育4 h,2 000 r/min 10 min,弃上清液,加入DMSO 100 ml溶解甲替结晶,微振混匀,呈色10 min,用酶标仪在490 nm及630 nm波长下测光密度(OD)值。计算各实验孔的肿瘤细胞抑制率。肿瘤细胞抑制率(%)=[1-试验孔OD值/对照孔OD值]×100%。

3. TNF- α 检测方法:每只标本均分别置于甲、乙两个抗凝管中(0.5 ml),甲管加入RPMI 1640培养液4.5 ml,内毒素10 ng;乙管加入培养液4.5 ml,PHA 1.5 mg,摇匀后置 37°C ,5% CO_2 培养24 h,2 000 r/min离心10 min;上清液置 -30°C 保存。将L929细胞用培养液配制成 $3.5 \times 10^4 / \text{ml}$ 的悬液,接种于96孔培养板,培养箱中孵育24 h;弃上清,加入对倍稀释的标本,每孔0.1 ml,同时加入放线菌素D,再培养24 h,弃上清液,每孔加入0.2%结晶紫0.3 ml染色2 min,冲洗后加入1%SDS 0.1 ml, 37°C 30 min后,置酶标仪检测OD值,细胞毒(%)=[1-实验孔OD值/对照孔OD值]×100%,以能使L929细胞50%死亡的最大稀释倍数的倒数为TNF活性单位。

4. SOD和MDA测定方法:均参照南京建成生物工程公司试剂盒的使用方法。

四、统计学处理

采用SAS统计软件包中的多因素方差分析,统计显著性水平定为 $P < 0.05$ 。

结 果

一、硒对T淋巴细胞致LoVo细胞凋亡影响的荧光染色结果(见表1)

总的模型方差值 $F = 10.87, P = 0.0062$,有显著

意义。按浓度分组: $F = 31.19, P = 0.0009$,各组间差异有显著意义,细胞凋亡指数随硒浓度增加而增加。按时间分组: $F = 5.22, P = 0.048$,各组间差异有显著意义,即各组的细胞凋亡指数随时间变化而增加,尤以72 h组最为明显。

表1 硒对T淋巴细胞致LoVo细胞凋亡的影响(%)

分组	24 h	48 h	72 h
对照组	13.0±1.5	25.0±1.9	27.0±2.2
Se 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	14.2±3.1	18.6±4.1	29.1±2.7
Se 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	26.6±2.4	32.7±2.1	31.1±3.8
Se 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.7±3.3	53.4±6.0	78.0±10.1

二、硒对T淋巴细胞杀伤LoVo细胞影响的MTT比色法结果(见表2)

总的模型方差值 $F = 6.04, P = 0.02$,有显著意义。按浓度分组: $F = 5.16, P = 0.042$,各组间差异有显著意义,T淋巴细胞对LoVo细胞的作用受硒影响并有浓度依赖关系。按时间分组: $F = 5.14, P = 0.019$,各组间差异有显著意义,T淋巴细胞对LoVo细胞的作用不仅受硒影响而且随时间变化而增强。

表2 硒对T淋巴细胞杀伤LoVo细胞的影响(%)

分组	24 h	48 h	72 h
对照组	17.10±2.14	24.90±1.29	67.40±10.31
Se 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	28.70±4.56	26.12±3.91	67.31±6.58
Se 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	33.30±6.81	46.17±3.68	76.00±11.84
Se 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	67.40±5.11	68.34±7.75	70.62±7.43

三、MTT比色法和荧光染色法结果的相关性分析(见表3)

取48 h时的荧光染色法结果和MTT比色法计数值分析两者的相关性。 $r = 0.973, P = 0.02$,有显著意义,两种检验方法的结果线性相关,即两者具有一定的相关性。

表3 MTT比色法和荧光染色法结果的相关性分析(%)

方法	对照组	Se 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Se 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Se 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
MTT	24.96	25.12	46.10	68.31
吖啶橙	25.10	18.66	32.70	53.40

四、淋巴细胞和肿瘤细胞作用后上清液中TNF- α 的浓度(见表4)

总体方差值 $F = 5.72, P = 0.01$,差异有显著意义。按时间分组:48 h、72 h和96 h组与24 h组间差异有显著意义,而48 h、72 h和96 h组间差异无显著

意义。按浓度、时间分组及组间比较: 对照组和Se 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组与72 h和96 h组间比较差异有显著意义, 而24 h和48 h组之间与72 h和96 h组间比较差异无显著意义。

表4 硒对反应液中TNF- α 浓度的影响(U/ml)

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0.55 \pm 0.04	5.02 \pm 0.61	4.38 \pm 0.35	1.25 \pm 0.10
Se 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.65 \pm 0.049	4.02 \pm 0.27	2.02 \pm 0.016	1.35 \pm 0.09
Se 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.01 \pm 0.00	10.24 \pm 1.31	6.16 \pm 0.57	5.23 \pm 0.48
Se 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.01 \pm 0.00	12.30 \pm 1.64	13.10 \pm 2.09	13.81 \pm 1.27

五、MDA和SOD水平

硒对反应液中MDA水平的影响, 按时间、浓度分组及组间比较, 总体方差 $F=0.37$, $P=0.854$, 差异无显著意义。硒对反应液中SOD水平的影响, 按时间、浓度分组及组间比较, 总体方差 $F=3.37$, $P=0.102$, 差异无显著意义, 硒影响T淋巴细胞对LoVo细胞的作用与MDA和SOD水平变化无关。

讨 论

硒是人体必需的微量元素, 对肿瘤具有化学预防作用。流行病学资料表明, 地理环境、食物、血硒水平与肿瘤的发病率和死亡率呈负相关^[1]。低硒时人群肿瘤发病的危险性相对增高^[2]。动物实验显示, 硒可抑制自发性肿瘤的发生^[3]。但硒抑制肿瘤发生的机制目前尚未阐明。

动物实验显示, 硒可促进荷瘤动物的细胞免疫功能以提高其杀伤肿瘤的作用^[4]。但有关硒对淋巴细胞免疫活性影响的体外实验报道不多。原瑜等^[5]研究表明, 低浓度硒化合物对淋巴细胞的DNA、RNA和蛋白质合成具有促进作用, 但高浓度时则具有明显的抑制作用, 即所谓的双相性(biphase)。本研究结果表明, 半胱氨酸硒 $<1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 对肿瘤细胞和T淋巴细胞均无抑制作用; $\geq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 对肿瘤细胞和T淋巴细胞均有明显的抑制作用, T淋巴细胞对硒毒性的敏感性要比肿瘤细胞(LoVo细胞株)强。Se 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 肿瘤细胞凋亡指数和T淋巴细胞抗肿瘤活性虽较高, 但镜检发现这时硒毒性作用较大, 可使T淋巴细胞和肿瘤细胞均凋亡, 而Se 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时毒性作用较小, 主要通过增强T淋巴细胞的抗肿瘤作用起效, 因此, Se 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, T淋巴细胞的抗肿瘤活性最强, 肿瘤细胞的凋亡比例最高。凋亡的肿瘤细胞经荧光染色, 细胞核染色质浓

聚呈橙黄色。电镜下肿瘤细胞核染色质浓聚, 形成密集的团块状, 呈边缘化和半月形^[6]。DNA电泳出现特征性的阶梯状条带^[7]。流式细胞仪检测出现亚G1峰, 且比例上升。MTT比色法检测显示^[8]T淋巴细胞抗LoVo细胞的细胞毒作用上升, 其和吖啶橙凋亡细胞荧光染色结果具有良好的相关性。此过程中TNF- α 含量相应上升, 而SOD和MDA却未见相应变化。

TNF- α 具有多种生物学活性。其积极方面为具有杀伤肿瘤细胞、激活宿主细胞攻击肿瘤细胞、破坏肿瘤供血系统及和其他细胞因子协同抗肿瘤的作用; 而其负面作用为参与形成恶病质、促进肿瘤细胞的有丝分裂等^[9]。因此, 要评价TNF- α 在体外实验中的作用, 需综合各种因素加以评估。本研究结果表明, 反应液中的TNF- α 水平随硒浓度的上升而升高。在Se 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组中, 硒对肿瘤细胞和T淋巴细胞的直接毒性作用并不明显, TNF- α 水平升高可能和T淋巴细胞抗肿瘤细胞作用的增强有一定关系。在Se 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组中, 硒对肿瘤细胞和淋巴细胞的直接毒性作用明显, TNF- α 水平升高反映了两者的坏死。

机体的氧化和抗氧化功能在肿瘤的发生、发展和预后中具有相当重要的意义。体内产生氧自由基, 引发脂质过氧化反应, 形成脂质过氧化物, 测试MDA的含量可反映机体内脂质过氧化的程度, 间接反映细胞损伤程度; SOD能消除超氧阴离子而保护细胞免受损伤, SOD水平的高低反映了机体的抗氧化能力。两者结合考虑能较全面反映机体的氧化和抗氧化情况。本实验中未见MDA和SOD水平随T淋巴细胞抗肿瘤作用的变化而出现相应变化, 提示MDA和SOD在本实验所涉及的抗肿瘤机制中未起主要作用。

本研究结果表明, 硒在一定浓度下可增强T淋巴细胞的抗肿瘤能力。其机制目前争论较多。有研究认为硒使淋巴细胞和巨噬细胞内的硒依赖型谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平升高, 增强其特异性硒依赖性, 从而促进免疫功能^[10]。也有研究认为硒作为一种非特异性免疫刺激物刺激免疫细胞功能^[11]。Brown等^[12]观察到硒可使MLA₁₄₄细胞分泌白细胞介素2, 国内也有类似报道。上述报道与本实验结果一致, 即硒调节T淋巴细胞抗肿瘤活性可能与细胞因子有一定关系。

(下转第60页)

能为继发性改变。

对Ménétrier病与癌肿并存的关系认识不一。有学者认为两者无直接关系。而另有学者发现Ménétrier病增生的腺体与癌组织有移行,故认为两者关系密切。Ménétrier病与癌肿并存有3种可能,一是胃癌弥漫性增生导致皱襞肥大,酷似Ménétrier病;二是Ménétrier病癌变;三是两者各为独立性疾病。本组6例中2例并存胃癌,1例为高分化腺癌,1例为低分化腺癌,组织学上均见正常上皮、不典型增生上皮和癌组织的移行,1例发生多灶性癌,支持癌是在Ménétrier病基础上发生的观点。癌变过程可能是在较大皱襞上先形成息肉状突起,长期的刺激使上皮增生、癌变。

本组1例并发尿崩症,手术后7个月低蛋白血症明显好转,但尿崩症的症状无改善,行全身CT检查,颅内及骨骼均未见异常。本病与尿崩症并存尚未见文献报道。

对Ménétrier病的自然病史及预后认识模糊。文献曾报道2例未经手术治疗的成年患者,随诊3年和8年后,经胃镜取活检发现演化为慢性萎缩性胃炎^[3,5]。另有报道16例小儿病例,外周血嗜酸性粒细胞升高,病变为局限性,短期内病变可消失,提示其发病机制为局部变态反应性炎症或病毒感染^[6]。因此,探讨Ménétrier病的病因、病理学改变、自然病史和与淋巴细胞性胃炎的关系具有理论和实用价值。

参考文献

1 Fieber SS, Rickert RR. Hyperplastic gastropathy.

Analysis of 50 selected cases from 1955~1980. *Am J Gastroenterol*, 1981, 76: 321~329.

2 Haot J, Bogomletz WV, Jouret A, Mainguet P. Ménétrier's disease with lymphocytic gastritis: an unusual association with possible pathogenic implications. *Hum Pathol*, 1991, 22: 379~386.

3 Berenson MM, Sannella J, Freston JW. Ménétrier's disease. Serial morphological, secretory, and serological observations. *Gastroenterology*, 1976, 70: 257~263.

4 Dixon MF, Wyatt JI, Burke DA, Rathbone BJ. Lymphocytic gastritis—relationship to *Campylobacter pylori* infection. *J Pathol*, 1988, 154: 125~132.

5 Frank BW, Kern F Jr. Menetrier's disease. Spontaneous metamorphosis of giant hypertrophy of the gastric mucosa to atrophic gastritis. *Gastroenterology*, 1967, 53: 953~960.

6 Chouraqui JP, Roy CC, Brochu P, Gregoire H, Morin CL, Weber AM. Menetrier's disease in children: report of a patient and review of sixteen other cases. *Gastroenterology*, 1981, 80 (5 Pt 1): 1042~1047.

(1999-05-31收稿;1999-07-23修回)

(上接第38页)

参考文献

1 Virtamo J, Valkeila E, Alfthan G, Pansar S, Hutunen JK, Karvonen MJ. Serum selenium and risk of cancer. *Cancer*, 1987, 60: 145~148.

2 Willett WC, Polk BF, Morris JS, Stampfer MJ, Pressel S, Rosner B, Taylor JO, Schneider K, Hames CG. Prediagnostic serum selenium and risk of cancer. *Lancet*, 1983, 2: 130~134.

3 Reddy BS, Rivenson A, Kulkarni N, Upadhyaya P, elBayoumy K. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the synthetic organoselenium compound 1, 4-phenylenebis(methylene) selenocyanate. *Cancer Res*, 1992, 52: 5635~5640.

4 郁宝铭, 吴金, 周锡庚. 硒、钙、锗对大肠癌的阻抑作用. *中华外科杂志*, 1995, 33: 167~169.

5 原瑜, 贾鹏翔, 王德全. 不同硒化合物对淋巴细胞代谢的影响. *西安医科大学学报*, 1992, 13: 212~216.

6 Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, Ahmed T, Gong J, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Induction of DNA strand breaks associated with apop-

tosis during treatment of leukemias. *Leukemia*, 1993, 7: 659~670.

7 Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J*, 1992, 286 (Pt 2): 331~334.

8 Suto A, Kubota T, Shimoyama Y, Ishibiki K, Abe O. MTT assay with reference to the clinical effect of chemotherapy. *J Surg Oncol*, 1989, 42: 28~32.

9 Balkwill FR. Cytokines in cancer therapy. Oxford: Oxford University Press, 1989. 54~61.

10 Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG, Medina D. Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis*, 1989, 10: 541~546.

11 胡先珍, 张友会. 缺硒和补充硒对小鼠肿瘤免疫反应的影响. *中华肿瘤杂志*, 1990, 5: 328~330.

12 Brown RL, Griffith RL, Ruscetti FW, Robin H. Modulation of interleukin 2 release from a primate lymphoid cell line in serum-free and serum-containing media. *Cell Immunol*, 1985, 92, 14~21.

(1999-08-27收稿;1999-10-06修回)