

硒对大鼠胃癌的作用及其内分泌细胞的影响

苏衍萍* 唐军民 唐岩 朴建华¹ 邓大君² 夏弈明¹

(北京医科大学组织学与胚胎学系, 北京 100083,

¹ 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所, 北京 100050; ² 北京医科大学第一附属医院, 北京 100034)

【摘要】 目的 探讨硒在机体自然抗肿瘤发生过程中的作用。方法 给断乳雄性Wistar大鼠MNING(N-甲基-N²-硝基-N-亚硝胍 20 mg/kg)灌胃, 每天一次, 连续 10 d, 以诱导大鼠胃粘膜异倍体形成(大鼠胃癌模型形成)。第 25 wk 时, 用流式细胞仪测定硒对大鼠胃幽门粘膜异倍体形成的影响, 用免疫组织化学ABC法观察大鼠胃粘膜异倍体形成过程中, 其胃的胃泌素细胞(G细胞)、生长抑素细胞(SS细胞)、5-羟色胺细胞(5-HT细胞)的免疫组织化学变化, 并对以上结果进行定性、定位、定量分析及统计学处理。结果 1. 硒能抑制MNING所致大鼠胃粘膜细胞异倍体的形成。2. 实验对照组与正常对照组比较, 大鼠胃粘膜胃泌素细胞的免疫组织化学反应明显增强($P < 0.01$), SS细胞、5-HT细胞也有增强的趋势($P > 0.05$)。3. 加硒各组与实验对照组比较, 大鼠胃粘膜胃泌素细胞的免疫组织化学反应明显减弱($P < 0.01$), SS细胞、5-HT细胞也有减弱的趋势($P > 0.05$)。结论 内分泌细胞可能与MNING所致大鼠胃粘膜细胞异倍体的形成和发展有关; 硒可能对大鼠胃内分泌细胞的功能有一定影响。

关键词: 胃泌素细胞; SS细胞; 5-HT细胞; 免疫组织化学; 胃癌

中图分类号: R151.2 文献标识码: A 文章编号: 0512-7955(2000)03-0209-05

在人类肿瘤死亡率中, 因胃癌而死亡者居我国各种恶性肿瘤之首。胃肠道内存在着大量内分泌细胞, 因此, 胃肠内分泌激素对胃癌发生的影响及其机制的研究引起国内外学者的日益关注。硒是人体所必需的营养元素, 同时也是一种广泛的抗癌因子。目前人们对硒抗癌机制的研究主要侧重于硒与抗氧化作用^[1,2], 硒与细胞免疫的关系^[3-5], 硒与肿瘤生物学活性之间的关系^[6]等, 而硒与机体内分泌的关系所知甚少。本实验拟观察硒在大鼠胃癌形成(胃粘膜异倍体形成)过程中的作用以及对胃的胃泌素细胞(gastrin cell, G细胞)、生长抑素细胞(somatostatin cell, SS细胞)、5-羟色胺细胞(5-hydroxytryptamine cell, 5-HT细胞)的影响, 以探讨硒在机体自然抗肿瘤发生过程中的作用。

1 材料与 方法

1.1 实验动物及其分组

断乳雄性Wistar大鼠 72 只, 体重 35~66 g, 由北京医科大学实验动物中心提供。分组见表 1。

1.2 染毒

MNING(N-甲基-N²-硝基-N-亚硝胍, 北京医科大学第一附属医院基因室邓大君教授惠赠)用二甲基亚砜(DMSO)助溶, 配成 100 mg/ml 溶液, 再用生理盐水稀释 100 倍即可使用, 现用现配。实验开始 1 wk 后(即断乳大鼠饲养一周后), 给Wistar大鼠MNING灌胃(20 mg/kg), 正常对照组以同样浓度的二甲基亚砜-生理盐水灌胃, 每日一次, 连续 10d, 期间每天称体重以调整致癌剂MNING给药量。

1.3 饲养观察

72 只雄性Wistar大鼠, 2 只一笼, 饲养在带托盘的钢丝笼内, 在一定时间内给所有动物相同的饲料量, 并吃完定量, 密切观察大鼠体重及精神状态的变化, 实验第 20 wk 后检测几只实验对照组大鼠胃

收稿日期: 1999-11-15

作者简介: *女, 1966 年出生, 硕士, 现在山东菏泽医学院组织与胚胎学教研室工作

幽门粘膜均出现异倍体后即处死全部大鼠。

Table 1 Groups of Wistar rats

Group	n	Doses of MNN G	Content of selenium in forage	Time of selenium given
I Nor G	12	0	Nor 0.1 mg/kg	No
II Exp G	12	20 mg/kg	Nor 0.1 mg/kg	No
III HiSe G before MNN G gavage	12	20 mg/kg	HiSe 2.0 mg/kg	One week before MNN G gavage
IV LoSe G before MNN G gavage	12	20 mg/kg	LoSe 0.2 mg/kg	One week before MNN G gavage
V HiSe G after MNN G gavage	12	20 mg/kg	HiSe 2.0 mg/kg	After MNN G gavage
VI LoSe G after MNN G gavage	12	20 mg/kg	LoSe 0.2 mg/kg	After MNN G gavage

Nor G: normal control group; Exp G: experimental control group; HiSe: high selenium; LoSe: low selenium group

1.4 取材

大鼠禁食 12 h, 用 2.5% 戊巴比妥腹腔注射麻醉 (1 ml/kg) 后, 取大鼠胃组织, 固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 用于 DNA 含量测量及免疫组织化学石蜡切片制作。

1.5 胃幽门粘膜上皮细胞悬液的制备及 DNA 含量的测定

大鼠胃组织用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 剥离胃窦部粘膜, 用 PBS (0.1 mol/L, pH 7.36) 浸泡 24 h, 剪成 1 mm³ 小块, 用 0.2% 透明质酸液室温消化以去除粘膜表面粘液; 然后用含 0.2% 胰酶和 0.02% 胶原酶的混合消化液, 37℃ 震荡消化 40 min。吸取悬液上层细胞至 10 ml 刻度离心管中, 加入等体积的 1% 小牛血清终止消化; 用上述蛋白酶消化液再消化残留组织 2 次, 每次 30 min。合并收集的细胞悬液, 500 r/min, 离心 5 min 后弃上清液。将沉淀细胞悬浮于 PBS (0.1 mol/L, pH 7.36) 中, 在同样条件下再离心一次, 然后用 RNA 酶 (20 μg/ml) 消化, 300 目尼龙网过滤, 用 PBS 调正细胞悬液浓度为 1 × 10⁶ ml⁻¹。碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 进行 DNA 染色, 流式细胞仪测定细胞 DNA 含量。用 DNA 指数 (DNA index, DI) 表示 DNA 含量。

$$DI = \frac{G_0/1 \text{ 实验样品细胞峰均道值}}{G_0/1 \text{ 正常胃粘膜上皮细胞峰均道值}}$$

DNA 倍体的判断指标为: DI = 0.90~1.10, 为二倍体; DI < 0.90~1.10, 为异倍体。

1.6 胃组织免疫组织化学石蜡标本的处理及免疫组织化学方法

4% 多聚甲醛固定后的大鼠胃组织, 常规石蜡包埋, 切成 5~6 μm 厚切片, 备用。分别选用兔抗人胃泌素、兔抗人 5-羟色胺、兔抗人生长抑素抗体, 行常规 ABC [卵清素-生物素-过氧化物酶复合体 (avidin-biotin peroxidase complex, ABC) 免疫组织化学染

色。

1.7 图像分析

将以上免疫组织化学方法所得图像用 Leica Q 500 MC 图像分析仪进行图像分析。测定空白区灰度值, 然后每个标本从幽门到胃体的方向, 按一定距离选取 10 个视野, 行二值化处理, 测定阳性细胞灰度。然后被测灰度换算成平均光密度 (MOD) 值。MOD 值 = 1 g GREV 0 / GREV 1; GREV 0 空白度灰度; GREV 1: 被测视野灰度值。

1.8 统计学处理

本实验应用 SPSS 软件包对组间均数进行方差分析。细胞异倍体发生率用卡方 (χ²) 检验等统计学处理。

2 结果

2.1 生长情况

在实验的第 15 wk 之前, 各组大鼠饮食情况良好, 体重增长速度基本相同, 未见不良现象发生; 但 15 wk 之后, 补硒组大鼠的体重有一定增长趋势, 尤其灌胃前补高硒组较为明显, 但各组比较无统计学意义。结果如图 1 所示。

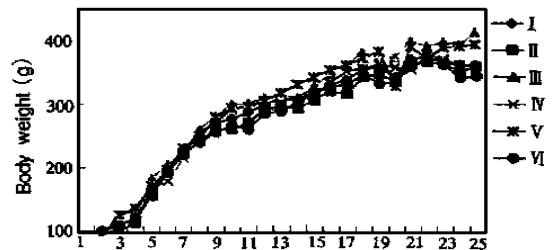


Fig. 1 Weight changes of rat in the experiment

2.2 DNA 含量测定及病理分析

大鼠异倍体发生率见表 2。

2.3 免疫组织化学结果

2 3 1 胃粘膜胃泌素细胞的免疫组织化学观察: 用胃泌素抗血清进行ABC 免疫组织化学染色显示, 大鼠胃泌素阳性细胞呈圆形、卵圆形或长梭形, 其细胞

Table 2 Incidence of aneuploid cells in mucosal epithelium of rat gastric antrum

Group	n	Number of aneuploid rats	Incidence of aneuploid rats%
I	5	0	0 ^b
II	8	8	100
III	10	5	50 ^a
IV	8	6	75
V	8	5	62.5
VI	9	7	77.8

a: compared with Exp G P < 0.05; b: compared with Exp G P < 0.01

质呈棕黄色, 方法对照未见阳性细胞。正常大鼠胃泌素细胞多分布在胃幽门腺的底部, 而腺体体部和颈部较少(图 2)。光镜下观察, 实验各组大鼠胃泌素细胞的数量无明显的变化。实验对照组的胃泌素阳性细胞较正常对照组反应强, 染色深, 而喂饲加硒饲料的各组胃泌素阳性细胞染色强于正常对照组, 而弱于实验对照组。

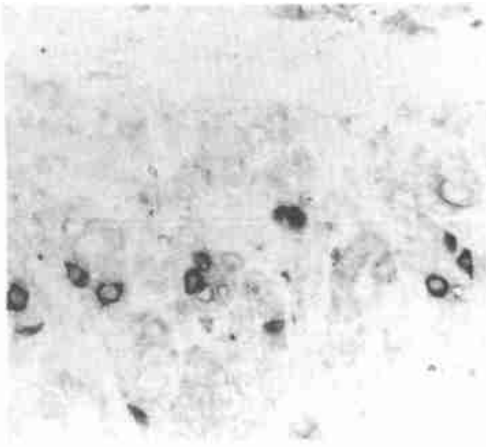


Fig. 2 Gastrin cells were distributed mainly in mucosal epithelium of Wistar rat gastric antrum ABC method, ×400

2 3 2 胃粘膜生长抑素细胞的免疫组织化学观察: 用生长抑素抗血清ABC 免疫组织化学染色, 可见大鼠生长抑素细胞呈卵圆形、长梭形或不规则形, 有长的胞浆突起, 突起末端可有一球形膨大(图 3)。阳性细胞可分布于胃粘膜各处, 以胃幽门部稍多, 而胃体部、胃底部较少; 另外, 在整个胃腺, 其底部、体部较多, 而在颈部较少。光镜下可见实验对照组大鼠胃粘膜生长抑素细胞染色较正常对照组和喂饲加硒饲料

各组大鼠阳性反应强。

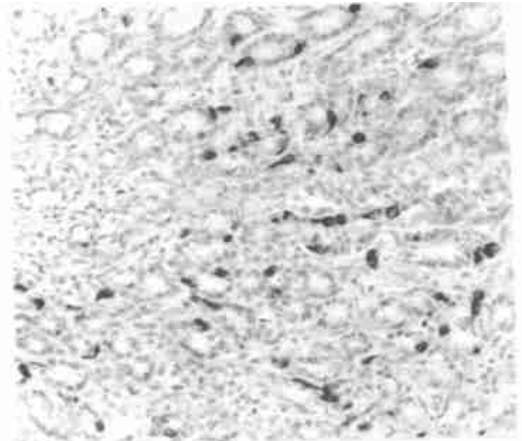


Fig. 3 SS cells displaying long cytoplasmic processes distributed mainly in mucosal epithelium of Wistar rat gastric antrum ABC method, ×200

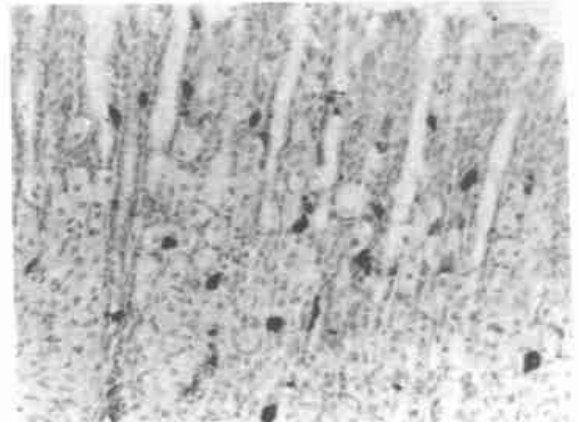


Fig. 4 5-HT cells distributed in mucosal epithelium of Wistar rat gastric corpus ABC method ×200

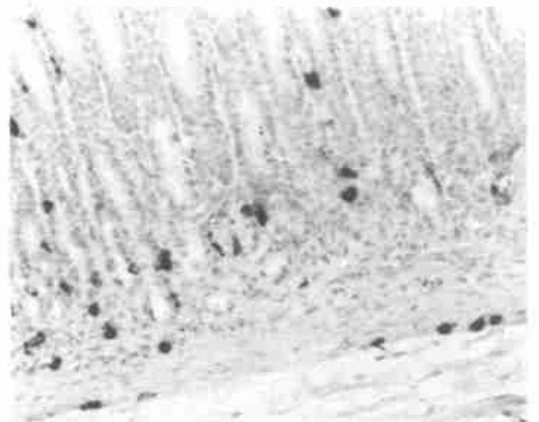


Fig. 5 5-HT cells distributed in mucosal epithelium of Wistar rat gastric antrum ABC method ×200

2 3 3 胃粘膜 5-HT 细胞的免疫组织化学观察: 5-HT 免疫阳性细胞形态多样, 呈圆形、卵圆形、长梭形或不规则形, 可见到细长细胞突起。5-HT 阳性

产物定位于细胞质中,呈棕色致密块状分布,染色较深,常常覆盖整个细胞核,方法对照片为阴性(图4,5)。5-HT免疫阳性细胞在胃壁内的分布无明显的区域性差异,但在胃,主要分布于胃的底部,而胃部颈部较少。细胞内5-HT的阳性反应强度,实验对照组高于正常对照组,喂加硒饲料的各组大鼠5-HT细胞内的阳性强度均稍低于实验对照组,但稍高于正常对照组。

2.3.4 图象分析: 用图象分析仪对以上免疫组织化学法所得图象进行平均光密度(MOD)测定结果见表3。

Table 3 MOD of GAS, SS, 5-HT cells in Wistar rat stomach ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Group	GAS	SS	5-HT
I	0.1359 ± 0.016 ^b	0.1422 ± 0.018	0.1896 ± 0.027
II	0.1661 ± 0.013	0.1638 ± 0.007	0.2187 ± 0.010
III	0.1395 ± 0.005 ^b	0.1509 ± 0.014	0.1926 ± 0.014
IV	0.1378 ± 0.010 ^b	0.1355 ± 0.030	0.1881 ± 0.030
V	0.1365 ± 0.008 ^b	0.1378 ± 0.039	0.2012 ± 0.022
VI	0.1357 ± 0.011 ^b	0.1282 ± 0.038	0.1955 ± 0.007

b: compared with EG $P < 0.01$

MOD: mean optical density, GAS: gastrin, 胃泌素; SS: somatostatin, 生长抑素; 5-HT: 5-hydroxytryptamine, 5-羟色胺

3 讨论

3.1 亚硒酸钠对MNNG所致大鼠胃癌中胃粘膜DNA异倍体形成的影响及其意义

本实验结果提示:亚硒酸钠可以抑制大鼠幽门粘膜异倍体形成,而且灌MNNG前喂饲加硒饲料组优于灌MNNG后喂饲加硒饲料组,尤其以灌MNNG前给高硒组大鼠的异倍体形成率与阳性对照组比较具有显著性意义($P < 0.05$)。另外,灌MNNG前补硒优于灌MNNG后补硒,补高剂量硒(2.0 mg/kg)优于补低剂量硒(0.2 mg/kg),这与Ip^[7]的研究结果基本一致。以上结果说明,补硒对大鼠胃癌的发生具有一定的预防作用。

根据国内、外和本研究结果推测可能机制如下:

因为硒可以通过调节细胞免疫^[3-4],调节L-2受体表达,增强自然杀伤细胞活性^[5]等免疫机制参与癌症的化学预防。推测亚硒酸钠可以通过增强机体的免疫能力,加强了机体的抗癌作用;GSH-Px可以有效地减少H₂O₂,抑制脂质、类固醇、核酸等的过氧化^[8]。推测机体可能通过含硒酶GSH-Px等抗氧化作用抑制自由基的产生,而减少了细胞内LPO

(指活性氧与不饱和脂肪酸作用产生的丙二醛等产物)的含量,从而抑制或拮抗了MNNG对DNA的损伤;亚硝酸钠也可能改变了MNNG的代谢或直接抑制了MNNG对ras基因的诱导,抑制了胃粘膜上皮细胞的增殖和转化;I型碘甲腺原氨酸5'脱碘酶可能也参与了抗癌作用,但Ip^[7]认为富硒的摄入并不影响此酶的活性,故T₄/T₃之比的变化并不影响硒的抗癌作用。所以,含硒I型碘甲腺原氨酸5'脱碘酶在抗癌中的作用,有待进一步探讨;本研究显示:到第20wk,喂饲加硒饲料组的大鼠体重有一定的上升趋势,尤以给MNNG前高硒组较为明显;推测硒可能影响了大鼠机体的代谢。

3.2 胃粘膜内分泌细胞的免疫组织化学结果及其意义

胃粘膜上皮和胰腺中存在着大量的内分泌细胞,近年来研究发现,胃、胰内分泌细胞分泌的激素除了对正常胃粘膜和胰具有调节作用外,对胃、肠恶性肿瘤也有一定的影响。虽然硒与内分泌的关系所知甚少,但也有研究表明^[9-11],硒与血管活性肠肽(VIP)受体、血清素(5-HT)、多巴胺等存在着某种相关关系。本实验结果提示,实验对照组大鼠胃粘膜内分泌细胞的免疫组织化学阳性强度与正常对照组相比较,胃泌素细胞阳性反应明显增强($P < 0.01$),SS细胞、5-HT细胞也有增强的趋势($P > 0.05$)。加硒各组大鼠胃内分泌细胞的免疫组织化学阳性强度与实验对照组比,胃泌素细胞阳性反应明显减弱($P < 0.01$),SS细胞、5-HT细胞也有减弱的趋势($P > 0.05$)。可能是因为硒抑制了胃粘膜细胞的增殖,抑制异倍体形成,调节了胃粘膜抗氧化作用,胃泌素细胞的活性因此而降低。提示胃内分泌细胞可能介导了MNNG所致胃癌的发生和发展,而且硒对机体胃、胰内分泌细胞的功能可能也具有一定的影响,有关机制有待进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Schwartz LH, Urban T, Herberg S. Antioxidant minerals and vitamins role in cancer prevention [J]. *Presse Med*, 1994, 23(39): 1826-1830
- [2] Rana MP, Sardar S, Chatterjee M. Selenomethionine in the inhibition of a transplantable murine lymphoma: reflection of hepatic drug metabolizing enzymes [J]. *Tumor Biol*, 1996, 17(2): 102-109
- [3] Taylor EW. Selenium and cellular immunity: evidence

- that selenoproteins may be encoded in the + 1 reading frame overlapping the human CD4, CD8 and HLA-DR genes [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1995, 45(2-3): 85-95
- [4] Taylor EW, Ramathanan CS, Jailuri RK, *et al* A basis for new approaches to the chemotherapy of AIDS Novel Genes in HIV-1 potentially encode selenoproteins expressed by ribosomal frame shifting and termination suppression [J]. *J Med Chem*, 1994, 37: 2637-2654
- [5] Kiremidjian-schumacher L, Roy M, Wishe H I, *et al* Regulation of cellular immune responses by selenium [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1992, 33: 23-33
- [6] Tempero MA, Deschner EE, Zedeck MS The effect of selenium on cell proliferation in liver and colon [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1986, 10: 145-152
- [7] Ip C, Lisk DJ Bioavailability of selenium from selenium-enriched garlic [J]. *Nutr Cancer*, 1993, 20(2): 129-137.
- [8] Rotruck JT, Pope AI, Ganther HE, *et al* Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase [J]. *Science*, 1973, 179: 588-590
- [9] Bellan C, Fabre C, Secchi J, *et al* Modulation of the expression of the VIP receptor by serum factors on the human melanoma cell line IGR39 [J]. *Exp Cell Res*, 1992, 200(1): 34-40
- [10] Castano A, Ayala A, Rodriguez Gomez JA, *et al* Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat [J]. *Neurochem Int*, 1997, 30(6): 549-555
- [11] Castano A, Ayala A, Rodriguez-Gomez JA, *et al* Increase in dopamine turnover and tyrosine hydroxylase enzyme in hippocampus of rats fed low selenium diet [J]. *J Neurosci Res*, 1995, 42(5): 684-691

EFFECTS OF SELENIUM ON CARCINOGENESIS AND ENDOCRINE CELLS OF RAT STOMACH

SU Yang-ping, TANG Jun-min, TANG Yan, PIAO Jian-hua¹, DENG Da-jun², XIA Yi-ming¹

(Department of Histology and Embryology, Beijing, 100083; ¹Institute of Nutrition and Food Hygiene, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing, 100050 ²The First Hospital, Beijing Medical University, Beijing, 100083)

【Abstract】 Objective: To investigate the action of dietary Se on carcinogenesis of gastric cancer in rat Methods: Wistar rat stomach carcinogenesis was induced by MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 20 mg/kg) gavage daily for 10 days At 25th week, the inhibitory effect of dietary Se on incidence of aneuploid cells in mucosal epithelium of gastric antrum was determined by flow cytometry (FCM). Changes of gastrin cell, ss cell, 5-HT cell in Wistar rat stomach were detected by ABC immunohistochemical method Results: 1. Dietary Se inhibited the aneuploid cell formation in Wistar rat stomach by MNNG gavage 2. The immunohistochemical positive activities of Wistar rat stomach gastrin cells were significantly stronger in experimental control group than that in normal control group ($P < 0.01$). The positive activities of ss and 5-HT cells also showed an increasing tendency ($P > 0.05$). 3. The immunohistochemical positive activities of Wistar rat stomach gastrin cells were significantly weaker in Se diet groups than that in experimental control group ($P < 0.01$). Moreover, the positive activities of ss and 5-HT cells showed a decreasing tendency ($P > 0.05$). Conclusion: Endocrine cells may have some relationship with aneuploid cell formation and development in Wistar rat stomach. Dietary Se may influence endocrine cell functions in rat stomach, but its mechanism needs to be further explored

Key words: gastrin cells; somatostatin cell; 5-HT cell; immunohistochemistry; rat stomach cancer