

硒对大鼠腺胃癌的作用及其对腺胃、胰 CGRP 阳性细胞的影响*

** 苏衍萍 唐军民 唐岩 *** 朴建华 **** 邓大君 *** 夏弈明

(北京医科大学组织学与胚胎学系,北京 100083)

**** 第一临床医院 **** 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所)

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:用 MNNG(20 mg/kg)灌胃诱导大鼠腺胃粘膜异倍体形成(大鼠腺胃癌模型形成)。用流式细胞仪测定硒对大鼠腺胃幽门粘膜异倍体形成的影响,用免疫组织化学 ABC 法观察硒在大鼠腺胃粘膜异倍体形成过程中,大鼠腺胃、胰 CGRP 阳性细胞的变化。并对以上结果进行图像分析及统计学处理。结果:(1)硒能抑制 MNNG 所致大鼠腺胃粘膜细胞异倍体的形成。(2)在 MNNG 所致大鼠异倍体的形成过程中,其腺胃、胰 CGRP 阳性细胞的免疫组织化学反应与正常组大鼠相比较均增强($P < 0.05$, $P < 0.01$);而在加硒饲料组大鼠腺胃、胰中 CGRP 阳性细胞的免疫组织化学反应与正常组大鼠相比较无显著性差异,但与实验对照组大鼠相比较则分别减弱($P > 0.05$)和明显减弱($P < 0.01$)。结论:硒和 CGRP 阳性细胞可能参与了预防和抑制 MNNG 所致胃粘膜细胞异倍体的形成。

关键词 胃;胃肿瘤;癌;硒;大鼠

在人类肿瘤死亡率中,因患胃癌而死亡者居我国各种恶性肿瘤之首。降钙素基因相关肽(Calcitonin gene related peptide, CGRP)是 37 个氨基酸的多肽^[1],大量分布于大鼠胃、肠、胰^[2],具有舒血管^[3],保护胃粘膜免受溃疡剂的损伤^[4],调节免疫等作用^[5],CGRP 与胃癌的关系至今尚未见报道。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。因此本实验拟观察硒在大鼠腺胃癌(腺胃粘膜异倍体形成)形成过程中的作用以及其对大鼠腺胃、胰 CGRP 阳性细胞的影响,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。I 正常对照组;II 实验对照组;III 给 MNNG 前高硒组;IV 给 MNNG 前低硒组;V 给 MNNG 后高硒;VI 给 MNNG 后低硒组。

1.2 大鼠染毒 N 甲基 N 硝基 N 亚硝基胍(N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine MN-

NG)配成 1 mg/ml 溶液。实验开始一周后,给 Wistar 大鼠 MNNG 灌胃(20 mg/kg),正常对照组以同样浓度的生理盐水灌胃,每日一次,连续 10 天。

1.3 大鼠饲养观察 72 只雄性 Wistar 大鼠,2 只一笼,在带托盘的钢丝笼里,定时、定量饲养,实验第 20 周后检测几只实验对照组大鼠腺胃幽门粘膜均出现异倍体后即处死全部大鼠。

1.4 取材 大鼠禁食 12 h,2.5%戊巴比妥腹腔麻醉(1 mg/kg),取近胰尾组织和大鼠腺胃组织,4%多聚甲醛固定,用于免疫组织化学石蜡切片的制作,同时腺胃组织也用于 DNA 含量测量。

1.5 胃幽门粘膜上皮细胞悬液的制备及 DNA 含量的测定 剥离胃窦部粘膜,用含 0.2%胰酶和 0.02%胶原酶的混合消化液消化,制成单细胞悬液,300 目尼龙网过滤,PBS 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 /ml,上机前用碘化丙啶(Pro-

* 国家自然科学基金资助项目(7972009)

** 现在工作地址:菏泽医专组织学与胚胎学教研室,菏泽 274030

pidium 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的含量。 $DI = G_0/1$ 实验样品

细胞峰均道值/ $G_0/1$ 正常胃粘膜上皮细胞峰均道值。DNA倍体的判断指标为: $DI = 0.90 \sim 1.10$,为二倍体; $DI \neq 0.90 \sim 1.10$,为异倍体。

表1 Wistar大鼠分组一览表

组别	大鼠数	MNNG剂量	饲料硒含量	加硒时间
I	12	0	常规饲料,含硒0.1 mg/kg	无
II	12	20 mg/kg	常规饲料,含硒0.1 mg/kg	无
III	12	20 mg/kg	加硒饲料,含硒2.0 mg/kg	给MNNG前一周
IV	12	20 mg/kg	加硒饲料,含硒0.2 mg/kg	给MNNG前一周
IV	12	20 mg/kg	加硒饲料,含硒2.0 mg/kg	给MNNG结束后
VI	12	20 mg/kg	加硒饲料,含硒0.2 mg/kg	给MNNG结束后

1.6 大鼠腺胃、胰腺免疫组织化学方法 腺胃、胰组织固定24h,常规石蜡包埋,切5~6 μm 的石蜡切片,备用。免抗人CGRP多克隆抗体购自PENISULALABINC。免疫组织化学方法采取常规ABC法。

1.7 图像分析 将以上免疫组织化学结果用LeicaQ500MC图像分析仪进行图像分析。测定阳性细胞灰度,被测灰度换算成平均光密度(MOD值), $MOD \text{值} = \lg GREV_0 / GREV_1$; $GREV_0$:空白度灰值; $GREV_1$:被测视野灰度值。

1.8 结果的统计学处理 本实验应用SPSS软件包对组间均数进行方差分析。细胞异倍体发生率的检验用卡方(X^2)检验等统计学处理。

2 结果

2.1 大鼠生长一般情况 整个实验过程中观察和记录了每组大鼠体重变化,结果见图1。

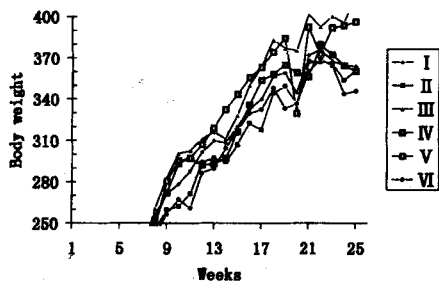


图1 硒抗MNNG所致大鼠胃癌过程中,大鼠体重变化曲线

2.2 DNA含量测定及病理分析 大鼠异倍体发生率见表2。

表2 大鼠异倍体发生率

组别	动物数	动物异倍体数	异倍体发生率%
I	5	0	0*
II	8	8	100
III	10	5	50**
IV	8	6	75
V	8	5	62.5
VI	9	7	77.8

*与实验对照组比 $P < 0.05$, **与实验对照组比 $P < 0.01$

2.3 大鼠腺胃粘膜CGRP免疫组织化学观察 CGRP阳性细胞和神经均显示为深棕色,背底为浅黄色和不着色,较易辨认,方法对照片为阴性反应。从胃的幽门部到胃体部都有CGRP阳性神经纤维的分布,在固有层,CGRP阳性神经纤维较细,走行不规则,多数纤维沿消化腺及小血管周分布。在粘膜下层,神经纤维较粗,多数为纵行走行,但胃内没有观察到CGRP阳性的神经元胞体。胃窦部可见有少量的CGRP阳性的内分泌细胞,细胞呈卵圆形或锥体形,单个分布在幽门腺的基底部,胞质内充满CGRP免疫组织化学反应阳性物质,细胞核为阴性,而胃体,胃底部未见到CGRP阳性内分泌细胞(图2)。光镜下观察,实验对照组的CGRP阳性反

应强于正常对照组,但给加硒饲料的各组大鼠 CGRP 阳性反应稍弱于实验对照组。



图2 显示分布在大鼠胃幽门固有膜内的 CGRP 阳性神经纤维(「)和少量的 CGRP 阳性细胞(||),ABC 免疫组织化学方法,×400

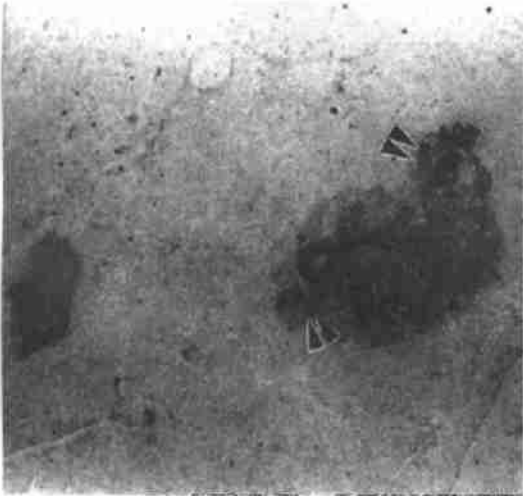


图3 显示分布在大鼠胰腺岛内 CGRP 阳性细胞(||),ABC 免疫组织化学方法,×200

2.4 胰腺内 CGRP 阳性内分泌细胞的免疫组织化学观察 CGRP 阳性产物呈棕黄色,方法对照片未见阳性反应。CGRP 阳性细胞在胰岛的外周和中心均有分布,偶可见单个分布的 CGRP 阳性细胞。CGRP 阳性细胞呈圆形、卵圆形或不规则形,可见到粗短的突起,阳性产物定

位于细胞质,呈斑块状(图3)。光镜下观察,实验对照组的 CGRP 免疫组织化学反应产物高于正常对照组,喂硒饲料各组大鼠又低于实验对照组。

2.5 图像分析 我们对实验各组大鼠腺胃、胰腺内 CGRP 免疫组织化学反应阳性细胞进行了图像分析,结果见表3。

表3 大鼠腺胃、胰腺 CGRP 阳性细胞 MOD 值($\bar{X} \pm S_{2D}$)

	腺胃	胰腺
I	0.1359±0.016**	0.1921±0.006**
II	0.2406±0.021	0.2542±0.010
III	0.1989±0.034	0.1915±0.005**
IV	0.2091±0.041	0.1886±0.019**
V	0.2036±0.017	0.1980±0.017**
VI	0.2034±0.016	0.2022±0.028**

* 与实验对照组比 $P < 0.05$ ** 与实验对照组比 $P < 0.01$

0.01

3 讨论

3.1 亚硒酸钠对大鼠腺胃癌粘膜 DNA 异倍体形成的影响及其意义 实验的结果提示:补硒对大鼠腺胃癌的发生具有预防作用。在预防大鼠胃癌方面,接触致癌剂前补硒优于接触致癌剂后补硒,补高剂量硒(2.0 mg/kg)优于补低剂量硒(0.2 mg/kg)。这一结果与 Ip^[6]的研究基本一致。根据我们的研究和国内、外的研究结果推测可能的机制如下:(1)因为硒可以通过调节细胞免疫^[7],调节 IL-2 受体的表达,增强自然杀伤细胞的活性^[8]等免疫机制参与癌症的化学预防作用。因此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;(2)GSH-Px 可以拮抗组织和细胞的自由基损伤,有效的减少 H₂O₂,抑制脂质、类固醇、核酸等的过氧化^[9]。因此推测机体可能通过 GSH-Px 等抗氧化作用抑制了自由基的产生,而减少了细胞内 LPO 的含量(LPO 是指活性氧与不饱和脂肪酸作用产生的丙二醛等产物,它可导致细胞内染色体 DNA 损伤,参与肿瘤启动和

促进的过程,从而抑制或拮抗了 MNNG 对 DNA 的损伤;(3)亚硒酸钠也可能改变了 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;(4)我们的研究结果还显示:观察到第 20 周,喂饲加硒饲料组的大鼠体重有一定上升趋势,尤以给 MNNG 前高硒组较为明显,因此推测硒可能影响大鼠机体的代谢。

3.2 大鼠腺胃和胰内 CGRP 免疫组织化学结果及其意义 Schwartz 等^[10]报道给予大鼠辣椒碱灌胃,引起 CGRP 阳性输入神经功能的耗竭,从而促进消炎痛所致胃粘膜损伤的形成,而辣椒碱急速灌胃可保护大鼠胃粘膜免受阿司匹林的损伤。Maggi 等^[11]认为给予外源性 CGRP 可增强大鼠的抗溃疡能力。我们的实验结果提示:(1)在 MNNG 所致胃癌发生过程中,大鼠腺胃和胰内 CGRP 阳性细胞的免疫组织化学反应与正常对照组相比较明显增强($P < 0.05$, $P < 0.01$),因此推测机体 CGRP 阳性物质对胃粘膜起到一定程度的保护作用;(2)加硒各组大鼠腺胃、胰内 CGRP 阳性细胞的免疫组织化学反应较实验对照组减弱($P > 0.05$)和明显减弱($P < 0.01$)。推测硒或许与 CGRP 存在一定的相关性,其机理有待进一步的探讨。

参考文献

- 1 Rosenfeld MG, Mermod JJ, AMara SG, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue specific RNA processing. *Nature*, 1983, 304: 129.
- 2 Sternin C, Reeve JR. Distribution and characterization of calcitonin gene-related peptide im-

- munoreactivity in digestive system of normal and capsaicin-treated rats. *Gastroenterology*, 1987, 93: 852.
- 3 Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, et al. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 1985, 313: 54.
- 4 Holzer P, Sametz W. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. *Gastroenterology*, 1986, 91: 975.
- 5 Torii H, Hosoi J, Asahina A, et al. Calcitonin gene-related peptide and Langerhans cell function. *J Investing Dermatol Symp proc*, 1997, 2: 82.
- 6 Ip C, Lisk DJ. Bioavailability of selenium from selenium-enriched garlic. *Natr Cancer*, 1993, 20: 129.
- 7 Taylor EW. Selenium and cellular immunity, evidence that Seleno-proteins may be encoded in the +1 reading frame overlapping the human CD4 CD8 and HLA-DR Genes. *Biol Trace Elem Res*, 1995, 45: 85.
- 8 Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Wishe HI, et al. Regulation of cellular immune responses by selenium. *Biol Trac Elem Res*, 1992, 33: 23.
- 9 Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, et al. Selenium; Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973, 179: 588.
- 10 Schwartz LH, Urban T, Herberg S. Antioxidant minerals and vitamins role in cancer prevention. *Presse Med*, 1994, 23: 1826.
- 11 Maggi CA, evangelista S, Giuliani S, et al. Antiulcer activity of Calcitonin genrelated peptide in rats. *Gen Pharmacol*, 1987, 18: 33.

EFFECTS OF SELENIUM ON GLANDULAR STOMACH CARCINOMA AND ITS INFLUENCE ON GLANDULAR STOMACH AND PANCREAS POSITIVE CGRP CELLS IN RATS

** Su Yanping, Tang Junmin, Tang Yan, *** Piao Jianhua,

**** Deng Dajun, *** Xia Yiming

(Department of Histology and Embryology, * * * * The First Clinic Hospital,
Beijing Medical University, Beijing 100083, * * * Institute of Nutrition
and Food Hygiene, Chinese Academic of Preventive Medicine)

Objective: To investigate the role of dietary selenium in natural carcinogenesis-resistance. **Methods:** In the experiment, Wistar rats stomach carcinogenesis (formation of aneuploid cells in the glandular stomach mucosa) was induced by MNNG (N-methyl-N-nitroso-guanidine, 20 mg/kg) gavage. The inhibitory effect of dietary selenium on incidence of aneuploid cells in mucosal epithelium of gastric antrum was determined by flow cytometry (FCM). Immunohistochemical changes of positive CGRP cells in Wistar rats glandular stomach and pancreas were detected by immunohistochemical ABC method in the course of selenium preventing gastric carcinogenesis. Image analysis and statistical analysis were carried out with all results above. **Results:** (1) Dietary selenium might inhibit the formation of aneuploid cells in Wistar rats glandular stomach. (2) The immunohistochemical reaction of Wistar rat glandular stomach and pancreas positive CGRP cells were both significantly stronger in experimental than in normal control group in the course of the rat stomach carcinogenesis ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The immunohistochemical reaction of Wistar rat glandular stomach and pancreas positive CGRP cells had no significant difference in selenium diet group compared with that in normal control group. But slightly weaker and significantly weaker respectively in selenium diet group than that in experimental control group. **Conclusion:** Selenium and CGRP positive cells might be involved in the prevention and inhibition of the formation of aneuploid cells in the glandular stomach mucosa induced by MNNG gavage.

Key words stomach; stomach carcinoma; carcinoma; selenium; rat

解剖学杂志 2000年23卷5期

欢迎购买《中国人体质调查续集》和《中国人体质调查第三集》

由中国解剖学会体质调查委员会编辑的《中国人体质调查》和《中国人体质调查续集》已分别于1986年、1990年出版发行,并在1992年获得了国家教委科技进步一等奖。《中国人体质调查第三集》也已于1999年12月出版发行。三书均按体质测量与运动器官、内脏学(附内分泌腺)、脉管系、神经系、感官等编写。三书内容简明扼要,数据正确可靠,被公认为是中国人解剖学数值的权威著作。该著作给人类学者和基础医学工作者的教学和科研提供了方便,给临床医师提供了诊断治疗疾病的依据,是公安司法人员进行案件分析的必备工具书,同时也为工业、国防、体育、艺术和教育等行业提供了有价值的人体器官常数,更是编辑基础医学和临床教科书和专著的必备书。

《中国人体质调查》早已销售一空。

《中国人体质调查续集》和《中国人体质调查第三集》尚有余书。各单位和个人需购书者可汇款至:上海市(200433),翔殷路第二军医大学《解剖学杂志》编辑部黄瀛教授收。

《中国人体质调查续集》每本定价20.00元,另加邮费2.00元,共计22.00元。

《中国人体质调查第三集》每本定价50.00元,另加邮费2.00元,共计52.00元。

《解剖学杂志》编辑部