

硒对淋巴细胞抗大肠癌作用影响的基础和临床研究

上海第二医科大学附属瑞金医院外科¹ 上海第二医科大学² 200025 郁宝铭¹ 赵任¹
冯国光¹ 邹鸿志¹ 王志伟² 史奎雄²

摘要 目的: 探讨硒对淋巴细胞抗大肠癌的作用。方法: 包括实验与临床二部分, 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、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 TNF- α (肿瘤坏死因子 α) 的含量。然后, 于 1998 年 3 月至 1999 年 3 月, 将 40 例大肠癌患者, 随机分成对照组和治疗组分别给予一般酵母和酵母硒 (600 $\mu\text{g}/\text{d}$) 持续两周, 观察治疗前后血硒水平、T 细胞亚群和免疫球蛋白, 以及细胞因子 αTNF 的变化。结果: 半胱氨酸硒在一定的浓度范围内 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 可增强人 T 淋巴细胞的抗肿瘤活性 ($P < 0.05$), 促进人结肠癌细胞的凋亡, 且肿瘤细胞的凋亡比例上升 ($P < 0.05$); T 淋巴细胞抗肿瘤作用的增强与上清液中的 TNF- α 的增高有关 ($P < 0.05$)。大肠癌患者经补硒后, 血硒由 (0.76 \pm 0.17) $\mu\text{mol}/\text{L}$ 上升到 (0.99 \pm 0.23) $\mu\text{mol}/\text{L}$, $P < 0.05$; CD4 由 (24.09 \pm 4.10)% 上升到 (27.95 \pm 4.91)%, CD8 由 (20.18 \pm 2.48)% 上升到 (23.09 \pm 4.47)%, $P < 0.05$; 血清中 IgM 从 (83.7 \pm 23.37) mg 上升到 (103.69 \pm 35.49) mg, $P < 0.05$ 。结论: 硒可提高淋巴细胞的抗肿瘤作用, 改善机体的免疫功能。

关键词 结直肠癌; 硒; T 淋巴细胞; 细胞凋亡; 免疫球蛋白

中国图书资料分类号 R392.11 R735.34

STUDY ON SELENIUM TO ENHANCE T LYMPHOCYTE ANTI-COLONIC CANCER FUNCTION

Yu Baoming, Zhao Ren, Feng Guoguang, et al. Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China

Abstract Objective: This paper is to study whether selenocysteine could enhance T lymphocyte anti-colonic cancer cell function. **Methods:** This study includes two parts: the experiment and clinical practice. Selenocysteine was tested as an influencing factor to human T lymphocyte in human colonic tumor cells (LoVo cell: human colonic adenocarcinoma) as a target cell. MTT and acridine orange for quantitative measurement were used. TNF α was also measured. 40 patients with colorectal carcinoma were randomly divided into two groups, therapeutic group and control group. Subjects were assigned to a 2-weeks trial with either 600ug Se/day (as selenium enriched yeast) or pure yeast as a placebo. The changes of serum selenium levels, T lymphocyte subsets, immunoglobulin, and cytokine TNF α in serum were examined before and after the experiment. **Results:** MTT and acridine orange dying showed that selenium enhanced T lymphocyte anti-tumor function of and induced LoVo cells to apoptosis within the proper levels (0.5-1.0g/L). Enhancement of T lymphocyte anti-tumor function is related to TNF α ($P = 0.01$), and not to SOD and MDA ($P > 0.05$). Serum Se level (0.81 \pm 0.10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), T lymphocyte subsets, were lower in colorectal cancer patient than normal, but improved significantly after Se supplementation in therapeutic group ($P < 0.05$), and was significant different from control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Administration selenocysteine can enhance T lymphocyte anti-colonic cancer function, and improve the immunity of patients with colorectal cancer.

Key words Colorectal carcinoma; Selenocysteine; T lymphocyte

硒是人体必须的微量元素之一。流行病学资料表明缺硒不但与大肠癌, 并与多种癌肿的发生和死亡相关^[1], 因而明确低硒是癌肿高发的危险因素^[2]。

动物实验显示硒可抑制自发性肿瘤的发生^[3], 也可阻抑化学物质二甲胂的致癌作用^[4], 这些资料有力地支持, 并为临床上补充微量元素硒以防止和降低

癌肿发病率的合理性提供了依据, 但硒又是通过什么作用机理来降低和防止癌肿的发生? 我们在临床研究发现大肠癌患者血硒浓度低于正常值, 血中 T 细胞亚群包括 CD3, CD4, CD4/CD8, NK 细胞, LAK 细胞均下降。在给予补硒后, 随着因硒浓度的提高 CD3, CD4, CD4/CD8, NK 细胞, LAK 细胞值均相应增高, 从而表明硒与人体免疫功能的密切关系^[5], 同时也提示临床上应用硒后有可能通过提高人体的免疫力来防止和降低大肠癌的发生。为了进一步阐明补硒后能否通过增强细胞免疫功能以抑制大肠癌细胞的生长或增强 T 淋巴细胞的杀伤作用使肿瘤细胞灭活以致凋亡, 我们进一步对此进行了实验和临床研究。

1 材料方法

1.1 实验研究

半胱氨酸硒为美国 Sigma 公司产品, 人结肠癌细胞株 LoVo 细胞购自中科院上海细胞所, 人外周血单个核细胞 (淋巴细胞) 由健康志愿者全血分离得到。

1.1.1 荧光染色法: LoVo 细胞浓度调整至 1×10^5 /ml,

淋巴细胞与肿瘤细胞之比为 20:1 混合。按不同浓度分组为: 对照组, 硒 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 硒 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 和硒 $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。待培养至 24 h、48 h、72 h 时, 胰酶消化, 吸出 25 ml 细胞悬液于载玻片上, 加入 $1 \mu\text{l}$ 混合荧光染色液 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 丫叮橙和 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 嗅乙啶) 混匀, 置荧光显微镜下, 观察并计算细胞凋亡指数。

1.1.2 MTT 法的细胞毒活性测定: 同上, 培养 (37 °C、饱和湿度, 5% CO₂ 孵箱) 12 h、24 h、48 h 和 72 h; 结束前 4 h, 加入 MTT $100 \mu\text{g}/25 \text{ ml}$, 孵育 4h, 去上清液, 加入 DM SO 100 ml 溶解甲替结晶, 微振混匀, 呈色 10 min, 用酶标仪 630 nm 波长下测光密度 (OD) 值。计算各实验孔肿瘤细胞的抑制率。

肿瘤抑制率 (%) = $1 - \text{试验孔 OD 值} / \text{对照孔 OD 值}$ 。

1.2 临床研究

1998 年 3 月至 1999 年 3 月瑞金医院外科患大肠癌的住院病人 40 例 (男 26 例, 女 14 例) 中位年龄 58 岁 (26~85 岁), 全部经手术及病理证实。随机分成二组, 治疗组和对照组。见表 1。

表 1 40 例大肠癌患者一般情况 (例)

组别	n	性别 (男/女)	中位年龄 (岁)	结肠癌	直肠癌	Dukes 分期		
						A	B	C
治疗组	20	14/6	58	7	13	4	9	7
对照组	20	11/9	58	8	12	3	9	8
总计	40	25/15	58	15	25	7	18	15

1.2.1 临床观察: 采用随机对照的方法抽取临床上大肠癌患者 (术前未经化疗、放疗及免疫治疗), 分为二组: 治疗组和对照组。治疗组在入院后测定血硒 CD3, CD4, CD8, TNF α 及免疫球蛋白等各项指标, 手术前 7 d 给予酵母硒片 $200 \mu\text{g}$, 每日 3 次, 手术后第四天开始继续给予硒治疗 7 d, 对照组除给予一般酵母治疗, 余均相同。

1.2.2 血硒测定: 取样: 外周静脉穿刺抽得 0.5 ml 的血清, 用 V DEO 22 型原子吸收分光光度计 (美国 L 公司) 和 WHB-9B 型氢化物发生器 (北京翰时科学制作所) 测定。

1.2.3 T 淋巴细胞亚群的检测方法: 采用间接免疫荧光染色法: CD3, CD4, CD8 单抗来自上海免疫所。

1.2.4 免疫球蛋白检测: 散射比浊法: 采用 BECKMAN 的 IgG IgA IgM 单抗, 及 Array Protein System。

1.3 统计学处理: 采用国际标准的 SAS 统计软件包中多因素方差分析, 统计显著性水平定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 实验研究

2.1.1 硒对 T 淋巴细胞杀伤 LoVo 细胞的影响: 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: $F = 5.16$, $P = 0.042$, 其组间异差有显著意义, T 淋巴细胞与 LoVo 细胞作用受硒影响并有浓度依赖关系。按时间分组: $F = 5.14$, $P = 0.019$, 具有显著意义, T 淋巴细胞与 LoVo 细胞作用不仅受硒影响而且随时间的变化而增强。

2.1.2 硒对淋巴细胞致 LoVo 细胞凋亡荧光染色的结果: 见表 3。

表 2 不同浓度硒对 T 淋巴细胞杀伤 LoVo 细胞的影响

(MTT 波长 630 nm 的肿瘤抑制率: %)

时间 (h)	0 $\mu\text{g}/\text{m}1$	0.5 $\mu\text{g}/\text{m}1$	1.0 $\mu\text{g}/\text{m}1$	2.0 $\mu\text{g}/\text{m}1$
24	17.1 \pm 2.14	28.7 \pm 4.56	33.3 \pm 6.81	67.4 \pm 5.11
48	24.9 \pm 1.29	25.12 \pm 3.91	46.17 \pm 3.68	68.34 \pm 7.75
72	67.4 \pm 10.31	67.31 \pm 6.58	76.0 \pm 11.84	70.62 \pm 7.43

表 3 经硒作用后淋巴细胞致 LoVo 细胞凋亡指数的变化 (%)

时间 (h)	0 $\mu\text{g}/\text{m}1$	0.5 $\mu\text{g}/\text{m}1$	1.0 $\mu\text{g}/\text{m}1$	2.0 $\mu\text{g}/\text{m}1$
24	13 \pm 1.5	14.2 \pm 3.1	26.6 \pm 2.4	39.7 \pm 3.3
48	25 \pm 1.9	18.6 \pm 4.1	32.7 \pm 2.1	53.4 \pm 6.0
72	27 \pm 2.2	29.1 \pm 2.7	31.1 \pm 3.8	78.0 \pm 10.1

总的模型方差值 $F = 10.87$, $P = 0.0062$ 有显著意义。按时间分组及组比较: $F = 5.52$, $P = 0.048$ 各组间差异有显著意义, 即各实验组的凋亡细胞数随时间变化而增加。按浓度分组及组间比较: $F = 31.19$, $P = 0.0009$ 。各浓度组间差异有显著意义, 细胞凋亡数随硒的浓度增加而增加。

2.2 临床研究

2.2.1 血硒浓度: 见表 4。

表 4 治疗前后大肠癌患者血硒浓度的变化 ($C_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

分组	n	血硒浓度 ($\bar{x} \pm s$)		P
		治疗前	治疗后	
治疗组	20	0.76 \pm 0.17	0.99 \pm 0.23	< 0.05
对照组	20	0.82 \pm 0.15	0.83 \pm 0.17	> 0.05
P		> 0.05	< 0.05	

2.2.2 T 细胞亚群的测定: 见表 5。

表 5 大肠癌患者治疗前后 T 细胞亚群的测定的情况 (%)

指标	正常值	治疗组 (n= 20)			对照组 (n= 20)		
		治疗前	治疗后	P	治疗前	治疗后	P
CD3	65%	46.36 \pm 8.30	51.63 \pm 13.75	> 0.05	50.29 \pm 10.76	49.81 \pm 8.63	> 0.05
CD4	40%	24.09 \pm 4.10	27.95 \pm 4.91	< 0.01	25.65 \pm 3.40	26.25 \pm 3.80	> 0.05
CD8	30%	20.18 \pm 2.48	23.09 \pm 4.47	< 0.01	21.38 \pm 2.11	20.75 \pm 1.60	> 0.05
CD4/CD8	2.0	1.20 \pm 0.21	1.28 \pm 0.18	> 0.05	1.21 \pm 0.14	1.25 \pm 0.16	> 0.05

大肠癌对照组和治疗组患者的 T 细胞亚群的测定结果: CD3、CD4、CD8 及 CD4/CD8 的比例均低于正常值, 有显著差异 ($P < 0.01$)。治疗组治

疗前后 CD3、CD4/CD8 比值比较无显著差异, 而 CD4、CD8 值治疗前后有显著 ($P < 0.01$)。

2.2.3 免疫球蛋白的测定: 见表 6。

表 6 大肠癌患者治疗前后的免疫球蛋白测定的情况

指标	正常值 ($\text{g}/\text{m}g \cdot \text{L}^{-1}$)	治疗组 (20 例)			对照组 (20 例)		
		治疗前	治疗后	P	治疗前	治疗后	P
IgG	1070 (723~ 1685)	1090.0 \pm 215.5	1008.7 \pm 249	> 0.05	1024 \pm 207.5	1081 \pm 180.5	> 0.05
IgA	170 (69~ 382)	253.08 \pm 83.56	300.2 \pm 130.3	> 0.05	230.8 \pm 75.41	270 \pm 54.15	> 0.05
IgM	84 (63~ 277)	83.7 \pm 22.37	103.69 \pm 35.49	< 0.05	95.6 \pm 20.47	90.1 \pm 19.5	> 0.05

对照组和治疗组中 IgA 和 IgG 值在治疗前后均无明显差异。治疗组中 IgM 在治疗前后有明显提高 ($P < 0.05$), 而对对照组的无明显差异。

3 讨论

3.1 硒对淋巴细胞抗大肠癌细胞作用的影响
原瑜等的研究表明, 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,但在高浓度时,则具有明显的抑制作用^[6],即所谓的双相性(biphase)。本研究表明,在半胱氨酸硒 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对肿瘤细胞和淋巴细胞均无抑制作用;而当半胱氨酸硒 $> 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对肿瘤细胞和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(人结肠癌细胞株)强。半胱氨酸硒 $= 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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,肿瘤细胞核染色质浓聚呈橙黄色。MTT 法^[5]检测显示,T 淋巴细胞抗 LoVo 细胞的细胞毒作用上升,其和丫啶橙凋亡细胞荧光染色结果具有良好的相关性。

本实验结果表明,硒在一定浓度下可显著地增高淋巴细胞的抗肿瘤能力。其机制目前争论较多。顾公望等认为硒使淋巴细胞和巨噬细胞内的硒依赖型 GSH-Px 水平升高,增强其特异性硒依赖性,从而促进免疫功能^[8]。也有人认为硒作为一种非特异性免疫刺激物,刺激免疫细胞功能。Brown 等观察到硒可使 MLA₁₄₄ 细胞分泌白细胞介素-2,即硒调节 T 淋巴细胞抗肿瘤活性还可能与细胞因子有关。

3.2 硒对大肠癌患者免疫功能的影响

硒具有抗肿瘤作用已为许多实验研究所证实。对于硒抗肿瘤的作用机理也已提出了不少的理论。但临床上对硒的抗肿瘤的研究却较少报道。鉴于流行病学资料表现低硒与许多恶性肿瘤的发生相关,是恶性肿瘤发生机理中共性的较强的一个,同样免疫功能低下的现象在恶性肿瘤病人中也可经常发现。通过补硒来改善机体免疫功能引起了关注。本研究再次显示,大肠癌患者全血中的 T 淋巴细胞亚群均低于正常值^[5,9]。补硒后,CD4、CD8 均较治疗前明显提高,提示硒对 T 淋巴细胞的增殖有促进作用^[10,11]。免疫功能包括细胞免疫和体液免疫。反映体液免疫状态的免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM)在肿瘤免疫中也起一定的作用,即通过直接或间接方式发挥免疫效应。本研究发现,大肠癌患者的免疫球蛋白中的 IgG、IgM 处于正常水平,而 IgA 则明显低于正常值($P < 0.05$)。补硒后,血中 IgG、IgA 无明显的变化,而 IgM 则有明显地升高。此结果表明,大肠癌患者的低硒状态,似乎对体液免疫功能

的影响较小。

硒的疗效与剂量有密切的关系。随着摄入量由小到大,硒的生物效应也依次出现“缺乏-适量-过量”(中毒)。当缺硒时,通过适量补硒提高血硒的水平,也相应地改善机体免疫功能和抗氧化能力。当过量补硒时,血硒过度升高可引起毒性作用,反而会损伤机体功能。因此,适量补硒以避免副作用是补硒治疗的前提。本实验使用的制剂是富硒酵母片剂,每日总剂量 $600 \mu\text{g}$,时间两周,因此是安全、可靠的,无中毒危险性。完全按照我国营养学会所规定的每日补充量范围,以不超过 $600 \mu\text{g}/\text{d}$ 为宜。作为长期保健补充,每日 $50 \sim 200 \mu\text{g}$ 以足够。

参 考 文 献

- 1 Virtamo J, Esko V, Aflthan G, et al. Serum selenium and risk of cancer. *Cancer*, 1987, 60: 145-148.
- 2 Willet WC, Polk BF, Morris JS, et al. Prediagnostic serum selenium and risk of cancer. *Lancet*, 1983, 322: 130-134.
- 3 Reddy BS, Surgie S, Maruyama H, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the synthetic organic selenium compound 1, 4-phenylenobis(methylene) Seleno-cyanate. *Cancer Res*, 1992, 52: 5635-5640.
- 4 原 瑜, 贾鹏翔, 王德全, 等. 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.
- 5 Bansal MP, Oborn CT, Danielson KG, et al. Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis*, 1989, 3: 541-546.
- 6 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.
- 7 陈雪华, 等. 进展期胃癌病人 NK 细胞和 T 细胞亚群的变化. *中华实验外科杂志*, 1995, 12 (1): 55.
- 8 吴振荣, 王文余. 低硒环境下的免疫应答. *国外医学地理分册*. 1990, 11 (1): 8.
- 9 Peretz A, Neve J, Desmelt J, et al. Lymphocyte response is enhanced by supplementation of elderly subjects with selenium-enriched yeast. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53 (5): 1323-1328.

(收稿日期: 2001- 08- 03)