

硒蛋氨酸诱导食管癌细胞株凋亡的实验研究

鄢阳医学院附属太和医院消化内科(鄢阳 442000) 陈滋华 吴清明 谢国建 王晓虎 于皆平*

摘要 目的:探讨硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC 9706 凋亡的影响。方法:采用 MTT 比色法,细胞生长曲线描绘观察硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC 9706 增殖的影响。采用流式细胞仪观察硒蛋氨酸对 EC 9706 细胞诱导其凋亡的作用及对细胞周期的影响。琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA ladder。结果:硒蛋氨酸呈时间、剂量依赖性方式抑制 EC 9706 细胞增殖,改变细胞周期分布,增加 G₀/G₁ 期细胞比例,诱导细胞凋亡。结论:硒蛋氨酸可能通过影响细胞周期分布和诱导细胞凋亡,从而抑制 EC 9706 细胞增殖。硒蛋氨酸可能是预防和治疗食管癌的一种新制剂。

关键词 硒蛋氨酸; 食管癌细胞; 凋亡

[中图分类号]R735.1 [文献标识码]A [文章编号]1005-541X(2004)02-068-03

A Study Apoptosis of Esophageal Cancer Cells Induced by Selenomethionine

Chen Zi-hua, Wu Qing-ming, Xie Guo-jian, et al.

Department of Gastroenterology, the Taihe Hospital of Yunyang Medicine College, Yunyang 442000, Chian

Abstract Objective: The current study was designed to evaluate the potential role of selenomethionine for proliferation and apoptosis of esophageal cancer cell line EC 9706. Methods: MTT assay and growth curve of cells were used to determine the influence of selenomethionine on the proliferation of EC 9706 cells. Flow cytometry was used to observe the induction of selenomethionine on the apoptosis of EC 9706 cells and influence on the distribution cell cycle. DNA ladder were examined by DNA agarose gel electrophoresis. Results: Selenomethionine inhibited the cells proliferation in a time-and dose-dependent fashion, induced apoptosis of the cells in a dose-dependent and increased the proportion of cell in the G₀/G₁ phase. Conclusion: Selenomethionine may inhibit the of esophageal cancer cells EC 9706 through effecting the distribution of cell cycle and inducing apoptosis. Selenomethionine may be a new way of chemoprevention and chemotherapy for esophageal cancer

Key words: Selenomethionine; Esophageal cancer cells; Apoptosis

恶性肿瘤已成为常见病,多发病,严重威胁着人类的生命健康。食管癌常见,其发生、发展涉及多个基因及分子水平的变化,目前无论是传统的手术、化疗及放疗都未能取得满意的疗效。寻找新的防治方法已势在必行。大量流行病学和临床研究发现,微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关性。硒是人体所必需的微量元素,在人类生命过程中发挥着重要作用。本研究的目的在于观察硒蛋氨酸对体外培养食管癌细胞系 EC 9706 生长的影响,以探讨其是否对食管癌亦具有防治作用。

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂:BPME-1640 培养基、小牛血清、胰蛋白酶、蛋氨酸为 Gibco 公司产品;MTT、DMSO、硒蛋氨酸为 Sigma 公司产品。仪器设备:恒温 CO₂ 培养箱(SanyD 日本)、倒置显微镜(Olympus IX-70)、酶联免疫检测仪(Σ 960 美国)、流式细胞仪(Epics XL, Beckman coulter 公司)。细胞系:人食管癌细胞系 EC 9706 由中国医学科学院王明荣教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 食管癌细胞 EC 9706 常规培养于含 10% 小牛血清、100 u/ml 青霉素及 100 u/ml 链霉素的 BPME-1640 培养基中,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 硒蛋氨酸对食管癌细胞 EC 9706 生长的影响

取对数生长期的食管癌细胞 EC 9706 按每孔 1×10^4 个/ml 细胞接种于 96 孔培养板中,24 h 后换液,加入不同浓度硒蛋氨酸 100、200、300、400、500 μmol/ml。设不接种细胞的空白对照组和只加入等体积溶剂 DMSO 的对照组。每组浓度每个时间点设 8 个复孔,继续培养,于第 24、48、72、96 h 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 10 μl,37℃ 孵育 4 h 后弃去上清液,每孔加入 100 μl DMSO,轻轻振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在 490 nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(OD 值),求其平均值。对照组细胞存活率记为 100%。实验组按下述公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡情况

根据 MTT 法测出的最佳药物浓度处理食管癌细胞 EC 9706,96 h 后实验组、空白对照组及阴性对照组细胞。标本用 PBS 洗涤后,加入 70% 冷乙醇固定,离心后 PI

* 武汉大学人民医院消化内科

染液(PI 5 mg、Rnase 2 mg, Tritm X - 100 1.0%, 生理盐水 65 ml, 枸橼酸钠 0.1 g, 加蒸馏水至 100 ml) 4℃ 染色 30 min, 用流式细胞仪检测。选用 488 nm 激发波长测定样品。

1.2.4 细胞生长曲线 把细胞按 1×10^4 个/孔分别接种在 24 孔培养板中, 待细胞分别长到 40% ~ 50% 融合时, 按一定的 MOI 感染食管癌细胞 EC 9706, 定期消化收集细胞, 每个时间点设 3 个平行组, 计数取平均值及标准差, 连续计数 4 d, 对照组包括加蛋氨酸阴性对照组和加不加药物空白对照组。

1.2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳法 收集硒蛋氨酸处理后的食管癌细胞 EC 9706, 加入细胞裂解液 [100 mmol/L tris-HCl (pH 8.5), 5 mmol/L EDTA, 0.2 mol/L NaCl, 0.2% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 含浓度为 0.002 mg/ml 的蛋白酶 K], 37℃ 静置过夜。次日 4℃ 12 000 r/min 离

心 15 min 后取沉淀, 加入适量 TE 缓冲液溶解, 加入 1 mg/ml 的 Rnase 使终浓度达到 200 μ g/ml, 37℃ 静置 2 h, 加入适量 DNA 加样缓冲液, 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙啶染色, 紫外线透射仪下检测自动成像系统拍照。

1.2.6 统计学处理 所有数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行 *t* 检验。

2 结 果

2.1 MTT 测定结果 各组浓度硒蛋氨酸对食管癌细胞 EC 9706 的增殖有较强的抑制作用, 与空白对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$), 且呈现一定的浓度、时间依赖性。结果见表 1。当硒蛋氨酸浓度为 400 μ mol/ml 处理食管癌细胞 96 h, 对癌细胞增殖的抑制作用最明显, 所以以下实验均以此作用浓度进行。

表 1 硒蛋氨酸处理食管癌细胞 EC 9706 后 MTT 法检测结果

组 项	剂量(μ mol/ml)	n	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组		8	0.812 \pm 0.124	0.843 \pm 0.154	0.855 \pm 0.186	0.886 \pm 0.135
硒蛋氨酸组	100	8	0.725 \pm 0.173	0.662 \pm 0.165	0.605 \pm 0.132	0.585 \pm 0.118
	200	8	0.683 \pm 0.112	0.627 \pm 0.101	0.558 \pm 0.148	0.455 \pm 0.113
	300	8	0.598 \pm 0.179	0.503 \pm 0.128	0.406 \pm 0.134	0.351 \pm 0.116
	400	8	0.467 \pm 0.148	0.382 \pm 0.136	0.302 \pm 0.111	0.157 \pm 0.100
	500	8	0.465 \pm 0.114	0.390 \pm 0.132	0.314 \pm 0.125	0.160 \pm 0.118

2.2 流式细胞仪分析凋亡细胞的结果 400 μ mol/ml 硒蛋氨酸处理食管癌细胞 EC 9706 96 h 后流式细胞仪分析, 在 G_1 期前出现一个二倍体峰, G_2/M 期细胞减少。400 μ mol/ml 硒蛋氨酸致食管癌细胞凋亡百分率为 52.3%, 与空白对照组及阴性对照组相比差异非常显著 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.3 细胞生长曲线 细胞生长曲线显示硒蛋氨酸组癌细胞计数随时间推移有明显降低趋势, 96 h 癌细胞计数最少。而空白对照组及阴性对照组癌细胞计数随时间推移有明显增多趋势。见图 2。

2.4 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA ladder 结果 400 μ mol/ml 硒蛋氨酸处理食管癌细胞 EC 9706 96 h 后提取细胞 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 能检测到细胞发生凋亡时, 由于 DNA 有规律的降解而形成的梯状带; 阴性对照组未见 DNA 有规律的降解而形成的梯状带。见图 3。

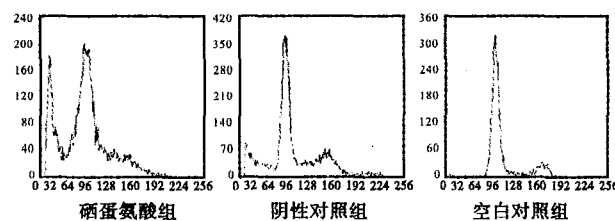


图 1 流式细胞仪分析凋亡细胞的结果

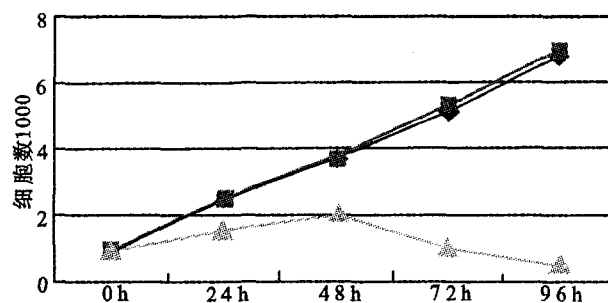


图 2 细胞生长曲线

◆ 蛋氨酸 ▲ 硒蛋氨酸 ■ 空白对照组

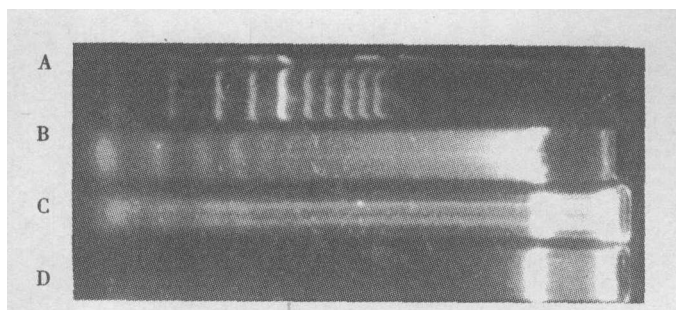


图 3 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA ladder 结果
A: DNA mark B, C: 硒蛋氨酸 D: 阴性对照组

3 讨 论

硒是人体所必需的微量元素,在生命活动过程中发挥着重要作用。大量流行病学和临床研究发现,微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关性。在中国河南林县,对大量食管鳞状细胞癌和胃贲门腺癌患者作微量元素硒测定,发现其血清硒水平明显低于正常人^[1]。在美国,科学家在硒缺乏地区,补充硒化干酵母酶,经追踪观察,整个硒缺乏地区恶性肿瘤发生率明显减低。有实验研究证实硒蛋氨酸对前列腺癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌等癌细胞的生长均有抑制作用^[1]。

本实验研究证实,硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC 9706 的生长有明显抑制作用,其有一定时间、浓度的依赖性。随着浓度增大,时间延长,EC 9706 生长明显受到抑制。MTT 法测定各组浓度硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC 9706 增殖有较强的抑制作用,最大抑制率可达 82.3%,与空白对照组比较差异非常显著($P < 0.01$),与细胞生长曲线基本一致。流式细胞仪检测发现,硒蛋氨酸 400 $\mu\text{mol/ml}$ 处理 EC 9706 细胞 96 h 在

G_1 期前出现一个亚二倍体高峰,硒蛋氨酸可诱导 EC 9706 细胞凋亡,凋亡率为 52.3%,与对照组比有显著差异。400 $\mu\text{mol/ml}$ 硒蛋氨酸处理食管癌细胞 EC 9706 96 h 后提取细胞 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,能检测到细胞发生凋亡时,由于 DNA 有规律的降解而形成的梯状带,与流式细胞仪检测结果一致。

综上所述,我们认为硒蛋氨酸对食管癌 EC 9706 细胞的增殖抑制作用可能机制之一在于改变细胞周期分布,增加 G_0/G_1 期细胞比例,诱发细胞凋亡。由于细胞凋亡是一个多阶段、多系统参与极其复杂的过程。本实验仅探讨了硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC 9706 生长抑制及其诱导凋亡的作用,其作用机制还有待进一步研究。本实验及国外研究证实硒蛋氨酸对恶性肿瘤的细胞生长有抑制作用;在硒缺乏地区补充硒可减少整个恶性肿瘤的发生。硒蛋氨酸作为硒的载体,在许多动植物体内存在,容易获取,与其它硒化物相比,毒性小,相对安全^[2-4]。在硒缺乏地区补充硒预防肿瘤发生或把硒及其化合物用作治疗肿瘤的一种新手段,其前景非常广阔。

参考文献

- Gerhard N, Schrauzer. Nutrition selenium supplement: product types, quality, and safety [J]. J Am Coll Nutr, 2001, 20: 1.
- Kenji M, Mingxu X, Anshu G, et al. Methioninase cancer gene therapy with selenomethionine as suicide prodrug substrate. Cancer Res, 2001, 61: 6805.
- Young RS, Mark RK, Martin L, et al. From the cover: Selenomethionine regulation of p53 by a refl-dependent redox mechanism [J]. PNAS, 2002, 99: 14548.
- David G. Menter, Anita L. Selenium effects on prostate cell growth cancer epidemiol [J]. Biomarkers Prev. 2000, 9: 1171.

(收稿日期:2004-02-10)

(上接 67 页)血淀粉酶的下降显著增快,其原因可能与肠道水疗直接清除肠道内的毒素,减轻了毒素对人体的继发损害,促进肠道的运动,改善肠道血液循环和黏膜屏障功能,缓解患者的临床症状,避免了因肠道损害致“细菌移位”,从而造成对人体的“二次打击”。

综上所述,在急性胰腺炎的早期即开展进行肠道水疗,可有效减轻急性胰腺炎患者的毒血症,改善患者的临床表现,防止转化为重症或恶化,促进患者的康复,有一定的临床推广价值。

参考文献

- Schmid ST, Uhl MW. Acute pancreatitis: bacterial translocation and pancreatic infections, in: Jankisch PC, Dimagno EP(EDS)[M]. Pancreatic disease,

Springer, 1999, 39.

- 朱斌,孙家邦,周继盛,等.重症急性胰腺炎非手术治疗方法的探讨[J].首都医科大学学报,2000,21(4):315.
- Yol S, Ozer S, Aksoy F, et al. Whole gut washout ameliorates the progression of acute experimental pancreatitis [J]. Am J Surg, 2000, 180(2): 121.
- 王兴鹏.重视肠道衰竭在重症急性胰腺炎发病中的作用[J].中华消化杂志 2002, 21(2): 5.
- Iwasaki G, Takeda K, Sunamura M, et al. The role of intestinal flora in the pathogenesis of infection and aggravation of experimental acute pancreatitis in rats [J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1994, 95: 669.
- 陈晓理,冯凯祥.肠道动力学改变在急性胰腺炎的病程及治疗中的意义[J].中国普外基础与临床杂志,1999,6(6):325.

(收稿日期:2003-12-30)