

硒-甲基硒代半胱氨酸对人食管癌 EC109 细胞 Ki-67 及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响*

裴小娟, 苏敏, 田东萍

(汕头大学医学院病理教研室, 广东 汕头 515041)

[摘要] 目的: 探讨硒-甲基硒代半胱氨酸(MSC)对人食管癌细胞系 EC109 细胞增殖及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响。方法: 用荧光染色、免疫组化及免疫蛋白印迹等技术, 在 MSC 的不同浓度(0、1、2、4、8、16 μ g/mL)与时间(6、12、24、48h)的作用下, 观察其对 EC109 细胞形态的影响以及细胞核增殖抗原 Ki-67 及凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 的表达。结果: 细胞主要表现出固缩, 生长密度降低, 凋亡小体形成并被吞噬等形态改变, 未见明显细胞毒性作用。各实验组的 Ki-67 标记指数均明显低于对照组($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 表达比值降低, 并呈明显的时间和浓度依赖性。结论: MSC 有抑制 EC109 细胞系增殖及下调 Bcl-2/Bax 表达的作用。

[关键词] 食管癌; 硒-甲基硒代半胱氨酸; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4716(2004)02-0065-03

The Effect of Se-Methylselenocystein on Ki-67 and Bcl-2/Bax Protein Expression in Human Esophageal Carcinoma EC109 Cell Line

PEI Xiaorjuan, SU Min, TIAN Dongping

(Department of Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Se-Methylselenocysteine (MSC) on Ki-67 and Bcl-2/Bax protein expression in human esophageal carcinoma EC109 cell line. Methods: Using fluorescence staining, immunohistochemistry and Western blot, the expression of Ki-67 and Bcl-2/Bax protein in human esophageal carcinoma EC109 cell line were observed and analysed at different concentrations(0、1、2、4、8、16 μ g/mL) and times(6、12、24、48hours). Results: MSC exposure could cause cell shrinking with rugous membrane and nuclei condensed in morphology and apoptosis body appeared in cytoplasm by Acridine Orange fluorescence staining. The preceding changes were conspicuously with the increasing dosage and no obvious cytotoxic changes. By immunohistochemistry and Western blot analyses, cell proliferation was inhibited inducing by MSC associated with decreased expression of Ki-67 labeling index and Bcl-2/Bax ratio following by concentration and time dependent ($P < 0.01$). Conclusion: MSC can decrease cell proliferation and Bcl-2/Bax ratio *in vitro*.

[Key Words] Esophageal Carcinoma; Se-Methylselenocysteine; Proliferation; Apoptosis

硒是对人类健康有着重要影响的一种微量元素^[1]。硒化合物具有多种生物学功能, 如营养、毒性、解毒抗氧化及抗肿瘤作用, 尤其是甲基化硒, 既有更强的抗肿瘤作用, 又有比无机硒酸盐更低的毒性。硒-甲基硒代半胱氨酸(MSC)是甲基硒的重要前体物质, 它具有抑制 EC109 细胞增殖的作用^[2], 但其作用机制尚不清楚。本实验主要通过免疫组化及 Western blot 技术观察 MSC 对食管癌 EC109 细胞的增殖指标 Ki-67、和凋亡指标 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响, 探讨硒化合物可能的抗肿瘤机制, 为硒在肿瘤防治方面的应用提供一些实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及其培养 人食管癌 EC109 细胞系, 是低分化

鳞状细胞癌细胞系, 由中科院肿瘤防治研究所细胞生物室建立。细胞常规培养于含 10% 灭活小牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵箱中生长, 2~3 天传代 1 次, 隔天换液。

1.2 主要试剂 MSC(Sigma 公司, 美国。批号 21 K1171); 鼠源 Ki-67、Bcl-2、Bax, 二抗、DAB 显色试剂盒(Santa Cruz 公司, 美国); 硝酸纤维素膜、低分子量蛋白标准(Amer-

收稿日期: 2004-01-09

基金项目: 国家自然科学基金国际合作重点项目(30210103904); 广东省十五攻关专案(A1080203)

作者简介: 裴小娟(1978-), 女, 山西省运城市人, 在读硕士生。

shamr Pharmacia 公司); 余试剂均购于 Amersico 公司。

1.3 实验分组 MSC 组, 其浓度分别为对照(0 μ g/mL)、MSC1(1 μ g/mL)、MSC2(2 μ g/mL)、MSC4(4 μ g/mL)、MSC8(8 μ g/mL)、MSC16(16 μ g/mL); 并分别作用 6、12、24、48h。对照组以 NS 代替硒化合物。

1.4 吖啶橙(AO)荧光染色 取 1×10^6 处于对数生长期的 EC109 细胞, 待细胞达 70%~80% 汇合后, 加入 MSC(0、2、4、8 μ g/mL), 作用 48h 后, 95% 酒精迅速固定 15min, 干燥; 1% 醋酸酸化 30s; 0.01% AO 37 避光作用 30min; PBS (pH4.8) 洗 3 次; 0.1mol/L CaCl₂ 分化 5min, PBS 洗 3 次, 荧光显微镜下观察, 拍照。

1.5 免疫组化染色 采用盖玻片培养法, 取 1×10^6 处于对数生长期的 EC109 细胞, 接种于 24 孔板中, 待细胞达 70%~80% 汇合后, 加入 MSC(0、2、4、8 μ g/mL) 组, 并分别作用 24、48h 后, 后纯丙酮固定。用 PBS 替代一抗做阴性染色对照; 用乳腺癌组织作阳性对照。爬片于室温 0.5% TritonX-100 浸泡 30 min, 后染色步骤按说明书进行。采用 HPIAS-1000P 高清晰度彩色病理图文分析系统对 Ki-67、Bcl-2、Bax 阳性染色进行图像自动分析, 在标准视野下, 测量不同条件下染色阳性细胞的平均灰度值。染色强度与其表达量相关。选取背景无色或浅黄色的显色片子进行图像分析, 每张切片随机录入 5 个视野图像, 测定视野内阳性细胞, 阳性产物强度应用平均阳性物灰度值(5 个视野阳性灰度值的平均)表示。本实验用平均阳性灰度值(AGA)表示测得的灰度值: $AGA = \frac{\text{平均阳性物灰度测量值} - \text{平均背景灰度测量值}}{\text{AGA}}$, AGA 越大, 阳性反应物的染色强度越大。

1.6 Western blot 免疫印迹法检测蛋白表达 取 5×10^6 处于对数生长期的 EC109 细胞, 分别加入 MSC(0、1、4、16 μ g/mL) 并分别作用 6、12、24h, 加入单去污剂细胞裂解液(50mmol/L Tris-Cl、150mmol/L NaCl、1% TritonX-100、1 μ g/mL Aprotinin、100 μ g/mL PMSF), 静置冰上 20min, 细胞刮刀刮下细胞, 4 12 000r/min 离心 5min, 上清分装, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白点样于 10% SDS-PAGE, 电泳分离蛋白质, 电印迹半干转移法转至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液 4 冰箱封闭过夜, 分别用一抗(Bcl-2; Bax 1:300 稀释)与二抗孵育, DAB 显色, 以图像处理系统对膜进行扫描, 测定其区带的感光密度, 并进行积分处理。

1.7 统计学处理 所有试验数据采用 SPSS10.0 for window 统计软件分析处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组内及组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 倒置显微镜下活细胞观察 对照组 EC109 细胞生长密集, 贴壁良好, 相互连接成片, 细胞呈多角形, 胞浆透亮, 核分裂相多见。MSC 2.0 μ g/mL 组, 细胞密度降低, 少部分细胞固缩, 偶见凋亡小体, 随浓度增加, 细胞固缩明显, 凋亡细胞增多, 即使浓度达 8.0 μ g/mL, 也未见明显的胞浆空泡及颗粒状物质增多等毒性改变。

2.2 AO 荧光染色(图 1、2, 封二) 对照组细胞密集, 多角形, 胞核呈亮绿色荧光。MSC 2 μ g/mL 组细胞密度降低, 少见胞浆吞噬火红色的凋亡小体, 随浓度增加, 部分胞核呈桔黄色荧光, 可见大量被吞噬的凋亡小体, 16 μ g/mL 组细胞稀少, 肿胀变圆, 核膜破裂, 偶见凋亡小体, 少部分细胞胞核呈火红色荧光。

2.3 MSC 对人食管癌 EC109 细胞增殖的影响(图3) Ki-67 标记指数(LI): Ki-67 阳性细胞为胞核着棕褐色, MSC 作用后的各试验组 LI 均明显低于对照组 ($P < 0.01$), 并呈浓度和时间依赖性下降, 各组间的差别有统计学意义 ($P < 0.01$)。

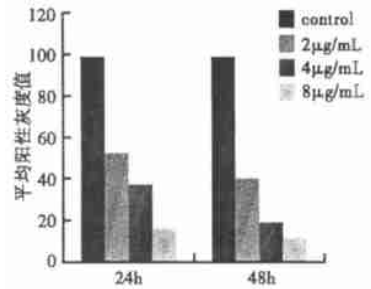


图3 MSC 对 EC109 细胞 Ki-67 蛋白表达的比较

Fig.3 Comparison of MSC on Ki-67 protein expression in esophageal carcinoma EC109 cell

2.4 MSC 对 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响 Western blot 免疫印迹灰度分析结果见图 4。免疫组化及 Western blot 结果均显示, MSC 各浓度(1、4、16 μ g/mL) 组的 Bcl-2 蛋白表达均低于对照组(图5), 且随浓度增加而降低 ($P < 0.01$); Bax 蛋白表达均高于对照组, 呈剂量依赖性增高 ($P < 0.01$)(图6); 各组 Bcl-2/Bax 比值均呈浓度依赖性降低。

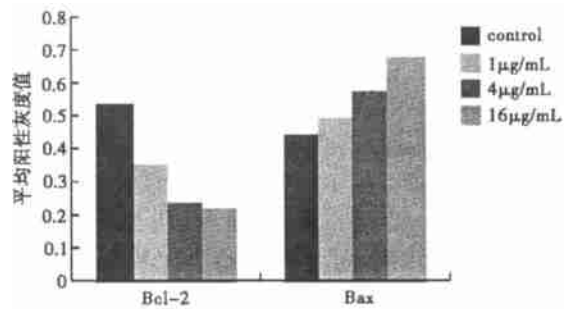


图4 各浓度 MSC 作用 24h 对人食管癌 EC109 细胞 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

Fig.4 The result of Bcl2 and Bax protein expression in human esophageal carcinoma EC109 cell at 24h by MSC

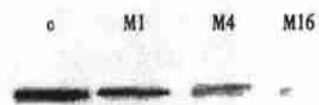


图5 Bcl-2 蛋白表达变化

Fig.5 The result of the Bcl-2 protein expression

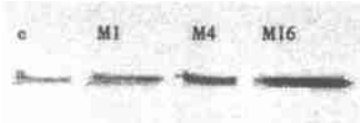


图6 Bax 蛋白表达变化

Fig.6 The result of the Bax protein expression

3 讨论

大量的流行病学调查及实验动物研究表明硒有抗癌作用^[6,7]。但硒并非对各种癌症有同样的抑制效率,而且不同的硒化合物对癌的抑制作用也不近相同^[8]。不同硒化合物的抗癌活性与其生物学效应和代谢途径密切相关,影响摄入硒生物效应的关键是其化学形式和剂量,但其作用机理尚不清楚^[9]。随着对微量元素硒的生物作用认识的不断深入,有机硒化合物尤其是甲基化硒,既有更强的抗肿瘤作用,又有比无机硒酸盐更低的毒性^[4,5],因此其作为药物的研究开发越来越受到重视。本实验选用的 MSC 是富硒大蒜的提取物,是甲基硒的重要前体物质^[10]。它对人早幼粒白血病细胞系有较强的诱导凋亡能力和较低的细胞毒性,显示出良好的发展前景^[13]。本实验中, MSC 作用较温和,在表现出较强的生长抑制作用的同时,细胞毒性作用不明显,即使浓度为 8.0 μ g/mL,作用 48h,仍未见明显的细胞肿胀、胞浆空泡增多等毒性改变。

细胞凋亡是由基因控制的程序性的细胞死亡,它可在不同的细胞周期中被启动,引发细胞凋亡的因素有很多,其中包括: DNA 损伤,来自细胞死亡受体的信号^[3],对细胞生长因子受体信号传导途径的抑制^[11]等等。Bcl-2 基因定位于 18q21,是一种凋亡抑制基因,它与 Bax 基因作为一对平衡体共同参与细胞凋亡的调控。硒可能通过抑制肿瘤的增殖并诱导 Bax 蛋白表达上调及 Bcl-2 蛋白下调,从而促使癌细胞的凋亡。本实验 Western blot 结果显示,各加硒组 Bcl-2 蛋白的表达均比对照组低,而 Bax 蛋白表达量增加,且两者 Bcl-2/Bax 比值降低,存在浓度和作用时间的依赖性。这一结果同本课题组对 Bcl-2 及 Bax 免疫化学染色图像分析结果一致^[4]。提示, MSC 可能通过下调 Bcl-2 基因和上调 Bax 基因,影响两者的蛋白的表达和功能,使 Bcl-2/Bax 蛋白比例失调,促进细胞凋亡, Bcl-2 和 Bax 基因可能参与了硒诱导细胞凋亡的调控。

综上所述, MSC 对体外培养的人食管癌 EC109 细胞的增殖有抑制作用,提示 MSC 可能是一更具发展前景的补硒制剂。

[致谢: 汕头大学医学院第二附属医院病理科郑志超主任, 黄海花主治医师协助免疫组化图像分析]

参考文献:

[1] Susan RS, Gnyy LG, Lisa FA, et al. Selenium potent stim-

ulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP Kinase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1335: 259 - 269.

- [2] 黄海花, 苏敏, 田东萍, 等. 有机硒对恶性转化人食管上皮永生细胞系作用的实验研究[J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32: 371 - 372.
- [3] Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery[J]. *Bioessays*, 2000, 22(9): 818 - 826.
- [4] Jiang C, Wang Z, Ganther H, et al. Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(12): 1059 - 1066.
- [5] Yoon SO, Kim MM, Park SJ, et al. Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI3-K/Akt pathways[J]. *FASEB J*, 2002, 16(1): 111 - 113.
- [6] Van RSI, Hall JM, Gathercole PS. Inhibition of esophageal carcinogenesis in cornfed rats by riboflavin, nicotinic acid, selenium, molybdenum, zinc and magnesium[J]. *Nutr Cancer*, 1986, 8: 167 - 170.
- [7] Newberne PM, Suphakarn V. Nutrition and cancer: A review, with emphasis on the role of vitamins C and Selenium [J]. *Nutr Cancer*, 1983, 5: 107 - 119.
- [8] IP C, Thompson HJ, Zhu Z, et al. In vitro and in vivo studies of methylselenenic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 2882 - 2886.
- [9] Liu SL, Shia DY, Liu GZ, et al. Roles of Se and NO in apoptosis of hepatoma cells[J]. *Life Sciences*, 2000, 68: 603 - 610.
- [10] Tacho K, Uhee J, Dae YC, et al. S₂-methylselenocysteine induces apoptosis through caspase activation in HL-60 cells [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(4): 559 - 565.
- [11] Akimoto T, Nonaka T, Ishikawa H, et al. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, enhanced radiosensitivity in human esophageal cancer cell lines in vitro: possible involvement of inhibition of survival signal transduction pathways[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50(1): 195 - 201.

硒-甲基硒代半胱氨酸对人食管癌EC109细胞Ki-67及Bcl-2/Bax蛋白表达的影响*

(正文见第65页)

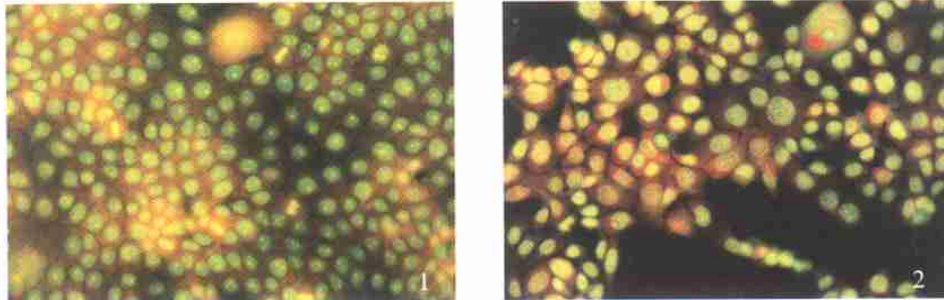


图1 对照组(×40)24h细胞密集呈多角形,胞核呈亮绿色荧光。图2 MSC8 μ g/mL组(×20)24h细胞密度降低,肿胀变圆,胞核呈橘黄色荧光,可见被吞噬的凋亡小体

Fig.1 In control group, cells appeared polygon and grew densely, nucleus showed brilliant green fluorescence.

Fig.2 MSC8 μ g/mL group displayed reducing cellular density with cells swelling, nucleus appeared orange red

fluorescence, red apoptosis body was showed by arrow

反义 c-myc 寡脱氧核苷酸对家兔髂总动脉损伤后内膜增生的影响*

(正文见第72页)



图1 正常血管段(内膜无增生)(×40)。图2 内膜增生非常明显(×40)。图3 内膜增生明显受抑制(×40)

Fig.1 No intimal hyperplasia. Fig.2 Obvious intimal hyperplasia significantly. Fig.3 Intimal hyperplasia was inhibited

彩色多普勒超声对肝癌肝动脉化疗栓塞的疗效评价

(正文见第96页)

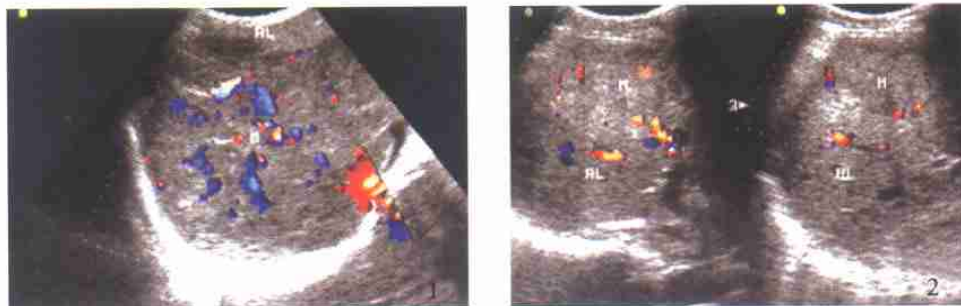


图1 肝癌TAE前。肿块内部及周边见丰富血流信号(M:肿块 RL:肝右叶)。图2 肝癌TAE后。肿块明显缩小,内部血流消失,周边血流显著减少(M:肿块 RL:肝右叶)

Fig.1 Hepatocellular carcinoma before TAE. The rich blood flow signals within and around the mass were found.

Fig.2 Hepatocellular carcinoma after TAE. The mass obviously reduced, with the blood flow within the mass disappeared and around the mass obviously decreased