维普资讯 http://www.cqvip.com

硒与肿瘤 Ⅲ、植瘤小鼠给抑瘤剂量硒后胞浆中^{75}Se的分布与含硒蛋白变化*

基础核医学教研室 颜学先 王鼎年**

提 要 植H615肝癌实体瘤的615纯种小鼠，于植瘤后第15天开始每隔5天腹腔注射2ugSe/g体重的亚硒酸钠及示踪剂量^{75}Se，给硒6次后处死，通过葡聚糖凝胶层析观察^{75}Se在红细胞、肝及瘤细胞胞浆中的分布。结果发现：胞浆中不仅GPX上结合有硒，也存在着其它的含硒蛋白质；营养水平的硒和抑瘤水平的硒在红细胞、肝及瘤胞浆中的分布情况不同；同一水平的硒在植瘤和未植瘤鼠上述胞浆内的分布也不同。并伴有GPX和其它含硒蛋白质改变。这些现象可能与硒的抑瘤作用有联系

关键词 $^{75}Se—Na_2SeO_3$；谷胱甘肽过氧化物酶；含硒蛋白质；硒的抑瘤特性

硒作为生物必需微量元素，其抑瘤作用已得到肯定，但到目前为止，其抑瘤机制尚不清楚。同时硒在动物体内的分布问题也远未解决。现有的研究表明，尽管谷胱甘肽过氧化酶（GPX）是哺乳动物体内唯一已知的含硒酶，但实际上它结合的硒仅占体硒的1/3，大多数的硒系以与其它蛋白结合的形式存在[1]。对这些含硒蛋白质已有不少研究[2~4]，甚至有人指出某些含硒蛋白质可能参予介导硒的抗细胞生长作用[5]。

几乎所有的关于非GPX含硒蛋白的研究都是在正常动物身上进行的，在带瘤动物身上这些含硒蛋白的情况尚未见报道。

本文通过^{75}Se示踪研究了抑瘤剂量硒在植瘤小鼠红细胞、肝及瘤细胞胞浆内GPX和其它蛋白质上的分布，并与具营养水平的硒和非植瘤小鼠比较，试图探讨硒的抑瘤作用是否与该剂量下硒的分布情况及含硒蛋白变化有联系。

材料与方法

1. 主要试剂

Na_2SeO_3，西德Merck产品；二硫基双硝基苯甲酸(DTNB)，军事医学科学院产品；$^{75}Se-Na_2SeO_3$，英国Amersham产品，比放70.6mci/mgSe；SephadexG-150，Pharmacia产品；溶菌酶，层析纯，上海生化所产品；BSA，层析纯，上海生化试剂站分装厂产品；其它均为国产分析纯试剂。

2. 实验动物及处理

（1）健康615纯种小鼠，性别不论，20～25g，喂饲本校制合成饲料，供蒸馏水。饲料硒含量为0.11±0.008μgSe/g，水中硒含量接近空白。

（2）小鼠按体重性别均衡原则分为4组，各组分笼隔离饲养。

* 四川省卫生厅科研课题

** 课题负责人

维普资讯 http://www.cqvip.com

对照组（不给硒不植瘤）　2P组（给2ppm硒不植瘤）

OP＋瘤组（不给硒植瘤）　2P＋瘤组（给2ppm硒植瘤）

（3）瘤种为H615肝癌实体瘤。接种时以植瘤后约40天的种鼠肿瘤组织适量接种于实验小鼠前腋一侧皮下，使成实体瘤生长。

（4）亚硒酸钠溶液（400μgSe/ml）于植瘤后第15天（刚能扪及已生长的瘤块）开始给小鼠腹腔注射2μgSe/g体重(2ppm)，以后每隔5天注射一次，共6次。对照组和OP＋瘤组给生理盐水。^{75}Se-Na_2SeO_3用生理盐水稀释成10uci/ml于植瘤后第15、20、30、40天时每只小鼠腹注2uci。^{75}Se的化学量极微，不致干扰实验。

3. 组织处理

于植瘤后第45天，戊巴比妥麻醉动物，眼眶取血于EDTA抗凝管中，然后以生理盐水经心脏灌流，取肝、瘤组织各约300mg，称重。抗凝血离心后，以生理盐水洗红细胞两次，再加红细胞体积之5倍量重蒸水，使之溶血。4000rpm×10min离心，沉淀弃去，上清液留待上层析柱。肝、瘤组织按1.0ml/100mg加入蔗糖溶液（0.25mol/L，含Triton X-100 0.1%）匀浆后，经过5000g×10min离心的上清液再经110000g×60min离心，弃沉淀及表层悬浮物，上清液即为胞浆液留待上层析柱。

所得红细胞及肝，瘤细胞胞浆液分别各取2.5ml过Sephadex G-150柱(80×2cm)，流动相为PBS（PH7.4，0.05mol/L，Triton X-100 0.1%），流速1ml/6'，每管收4ml。

1. 观察指标

（1）放射性分布　收集液在γ计数器上记录每管的cpm数。

（2）酶活性分布　采用稍改进的Hafeman法[6]测定每管中酶活性强度。以20ul血浆或8mg湿组织在37℃下3min使[GSH]减少1μmol为一个酶活性单位。

（3）蛋白分布　红细胞溶血物的层析收集液在540nm下比色，记录Hb分布；肝、瘤细胞胞浆液的层析收集物在280nm下比色，记录蛋白质分布。

以溶菌酶（分子量14400），牛血清白蛋白（分子量67000）及Blue Dextran等为标准从各流出峰的Ve/Vo值，推算该蛋白峰的分子量的估计值。

结　果

1. 对照组　红细胞的层析谱中，^{75}Se呈单一的峰，这个峰与GPX的活性主峰重合，位于Hb峰之前。在Hb范围无可见的^{75}Se峰，但有一GPX活性小峰存在，（图1上）。GPX分子量约80000，与文献报道相似[7]。肝胞浆中，^{75}Se呈两个高低相似，紧密相邻的峰，与它们相对应，GPX也呈现两个活性峰与^{75}Se两个峰完全重合，前一峰分子量约94000，后一峰约80000，（图1下）。

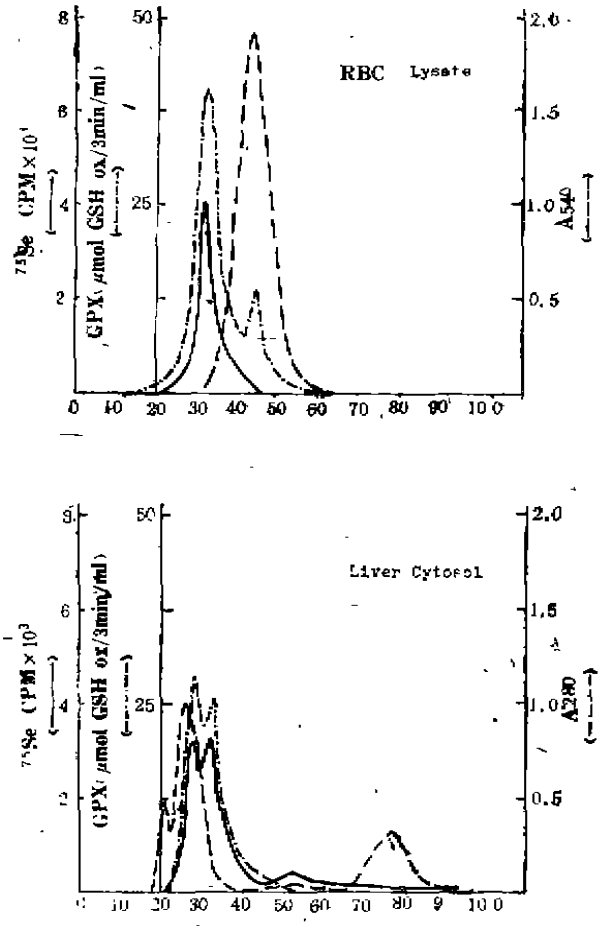


图 1　对照组红细胞溶血物和肝细胞胞浆液凝胶层析谱。样品来自3只小鼠

2. 2P组　红细胞层析谱中，^{75}Se分为一个主峰和一个小峰，GPX上有一个主峰

维普资讯 http://www.cqvip.com

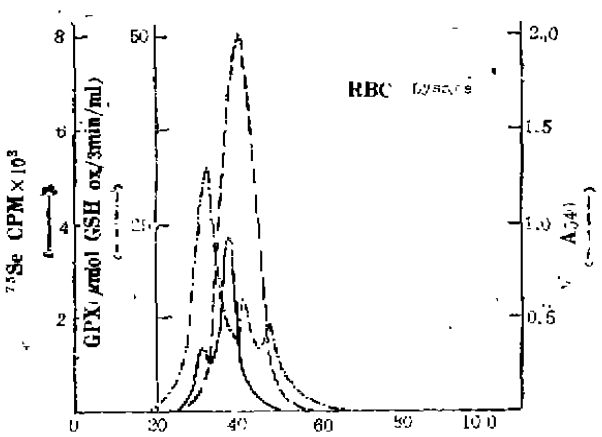


图 2　2P 组红细胞溶血物和肝细胞胞浆液凝胶层析谱。
样品来自4只小鼠。

和二个小峰出现。^{75}Se的小峰与GPX的主峰重合。GPX的另一小峰上无^{75}Se分布，(图2上)。肝细胞胞浆液层析谱中，^{75}Se和GPX均成单一峰，两峰重合。与对照组比较，GPX峰的高度无显著改变，但^{75}Se峰高度明显减低。(图2下)。

3、OP＋瘤组　红细胞层析谱中，^{75}Se呈现一个峰，与GPX的主峰完全重合，而GPX的另一小峰与Hb重合，(图3上)。肝细胞胞浆中，^{75}Se只有一个峰，与GPX主峰重合。在该主峰后，280nm下有一小峰上有少量^{75}Se分布、但无酶活性，(图3中)。瘤细胞胞浆中，^{75}Se和GPX均有一大一小两个峰，

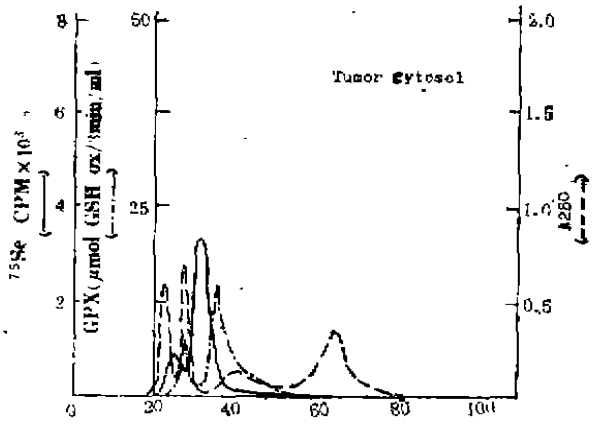


图 3　OP＋瘤组红细胞溶血物、肝及瘤细胞胞浆液凝胶层析谱
样品来自4只小鼠。

维普资讯 http://www.cqvip.com

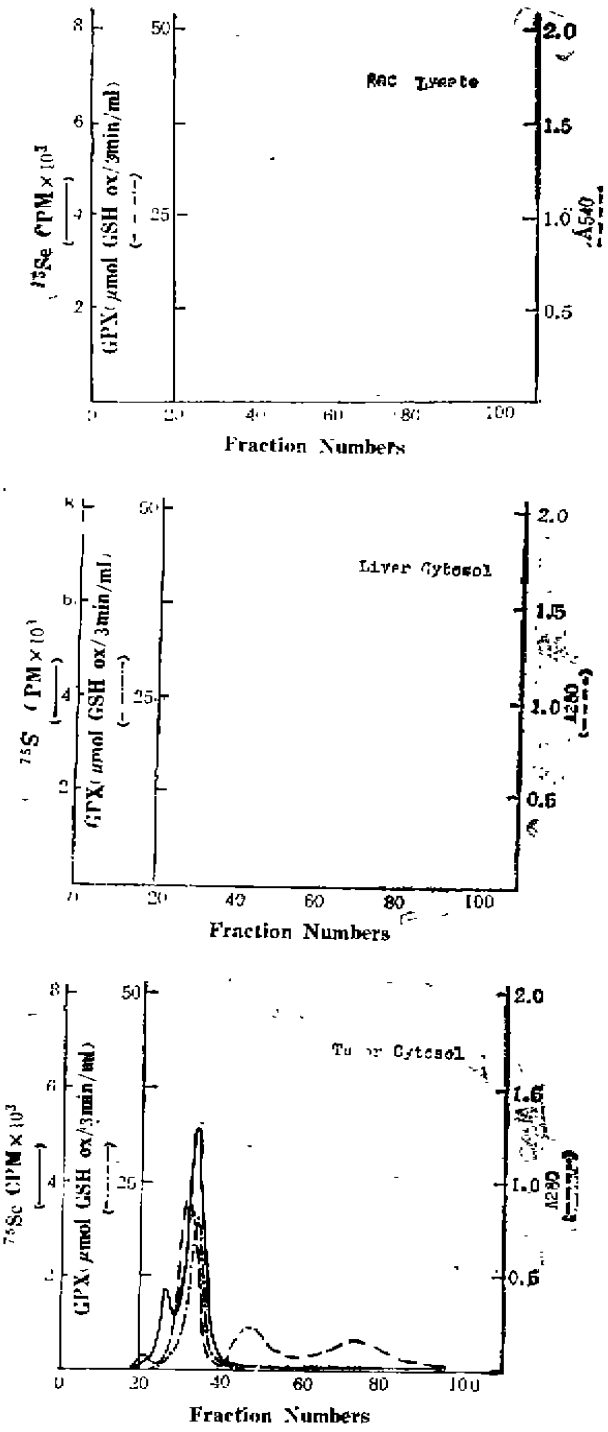


图 4　2P＋瘤组红细胞溶血物、肝及瘤细胞胞浆液凝胶层析谱。样品来自4只小鼠。

值得注意的是，^{75}Se的峰和GPX峰完全不重合，(图3下)。肝和瘤细胞胞浆中GPX主峰位置相同，均较对照组延后，对应的分子量为73000。

4．2P＋瘤组　红细胞层析谱中，^{75}Se有三个较低的峰，前一峰与GPX重合，后两峰与Hb峰重合。但是，Hb处并无酶活性峰出现，(图4上)，这与其它组均不相同。肝细胞胞浆液中，^{75}Se和GPX均分为两峰，且分别相重合，与对照组相似，(图4中)。瘤胞浆中，^{75}Se呈一个主峰与一个小峰，小峰与（图3下）中小峰位置相同，对应的分子量超过110000，主峰与GPX主峰重合，(图4下)。该组的GPX峰均出现在对应的分子量约80000的位置上。与OP＋瘤组比较，瘤细胞胞浆中^{75}Se峰值明显升高，红细胞和肝细胞胞浆中^{75}Se峰值明显降低。

讨　论

本实验结果显示，在营养水平硒的条件下，小鼠自食物中摄入的硒在红细胞中主要分布于GPX上，而Hb上的极少。腹腔注抑瘤剂量亚硒酸钠后，Hb上^{75}Se普遍增加并远高于GPX上的峰值。这可能是在大剂量硒给予后，GPX酶蛋白被饱和，过量的硒自动转移到Hb上作为机体的一种贮存手段，此现象其它学者在大鼠中也有发现[6,8,9]。

正如许多学者在其它动物中的研究报道一样[10,12~16]，实验小鼠肝胞浆中也存在着非GPX的其它含硒蛋白，其中有一种分子量约30000瘤细胞胞浆中同样也存在着非GPX的含硒蛋白，其中一种分子量约80000，另一种>110000。在硒营养水平下，绝大多数瘤胞浆中的硒都结合在这两种蛋白上，而GPX尽管仍具有抗氧化活性，但几乎无硒沉积。给予抑瘤剂量硒后，一部份仍与上述蛋白结合，绝大多数则又沉积到了GPX上，这是一种有趣的现象，瘤细胞中的这种变化可能与硒干扰肿瘤细胞代谢有联系。当然，这种联系不一定是通过GPX的抗氧化功能中介的，或它不是主要的中介途径，更可能是通

维普资讯 http://www.cqvip.com

过其它途径，诸如抑制DNA合成，影响瘤细胞有丝分裂[17]等发挥作用。

瘤细胞胞浆中，^{75}Se峰值在给大剂量稳定性硒组，反而较营养水平组高，印证了硒的亲瘤性[18,19]，而其中非GPX的含硒蛋白质对硒的大量结合可能正是硒亲瘤性的基础。

对多种动物和组织中GPX的研究已知[7,20]，它是由4条多肽链组成的，分子量约80000。本实验中证实有三种不同分子量的GPX，分别为73000，80000，94000，同一组织中可以有不止一种存在，不同个体也有差异。在某些组的肝、瘤细胞胞浆中，还存在着两种具有GPX酶活性的蛋白质上并无^{75}Se沉积，这种现象，其它学者在羊[10]，大鼠[3,11]组织中也有类似发现，值得进一步研究。

实验结果表明：营养水平和抑瘤水平的硒在植瘤和非瘤小鼠的RBC、肝及瘤细胞胞浆中的分布不同，并伴有GPX和其它含硒蛋白的改变，这些现象可能与硒的抗瘤作用有联系。

参考文献

[1] Hawkes WC, et al. J Inorg Biochem 1985; 23:77

[2] Hawkes Wc, et al. ibid 1985; 25:77

[3] Motsenbocker MA, Tappel AL. Biochim Biophys Acta 1982; 719:147

[4] Whanger PD. Biochim Biopys Res Commun 1973; 53:1031

[5] Danielson KG, Medina D. Can Res 1986; 46:4852

[6] Hafeman DG, et al. J Nutr 1974; 104:580

[7] Flohe L, et al. FEBS Lett 1973; 32:132

[8] Beilstein MA, Wanger PD. J Nutr 1986; 116:1701

[9] Burk RF. Proc Soc Exp Biol Med 1973; 143:719

[10] Black Rs, et al. Bioinorg Chem 1978; 8:161

[11] Beilstein MA, Wanger PD. J Nutr 1983; 113:2138

[12] Beilstein MA, et al. J Inorg Biochem 1981; 15:339

[13] McConnell KP. Biochim Biophys Acta 1979; 588:113

[14] Herrman JE. Biochim Biophys Acta 1977; 500:61

[15] Motsenbocker MA, Tappel AL. Biochim Biophys Acta 1982; 704:263

[16] Burk RF. Arch Biochem Biophys 1982; 213:73

[17] Medina D, et al. Can Res 1983; 43:2460

[18] 王鼎年，等. 重庆医科大学学报 1986; 11(3):149

[19] Cavalieri RR, et al. J Nucl Med 1966; 7:197

[20] Nakamura W, et al. Biochim Biophys Acta 1974; 358:251

简报

《科学引文索引》简介

《科学引文索引》（简称《SCI》）是由美国科学情报所编制的一种大型多学科综合性检索工具，也是一种比较科学的检索体系。由于编制方法独特，通过揭示引证与被引证的关系，可以沟通当年、几年、几十年甚至上一世纪与当前作者或学科之间的关系，已越来越被世人所认识和采纳。用“引证分析”可以评价学科的发展状况，预测学科可能的发展趋势和蕴育的突破。评价科学家的影响或成就，评价科学期刊甚至重要论文的学术价值，《SCI》收录了世界上3300多种重要期刊，这是由各个学科的专家组成的编辑委员会通过引证统计和用户调查等方式精心选出来的，其学术价值比较高，如《苏联科学院院报》，其全部内容都在《SCI》收录之列。美国耶鲁大学一位教授研究后认为，世界最重要的1000种期刊，能包含全部论文的80%，甚至有人认为，能包含90%的论文。美国科学情报所认为，它收录的3000多种期刊所包含的情报量是足够的。

（科研处供稿）