DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.026

硒对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌生长的抑制作用的观察

肖天利* 袁爱力 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆,630038

提 要 目的: 观察硒对二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌的影响。方法: 在诱癌过程中,大鼠分别投予含0.2、1.0、3.0×10⁻⁶硒(Se)的饲料,检测血、肝组织 LPO、GSH-Px 活性,观察诱癌率及癌结节面积。结果: 补 Se后对诱癌率无显著影响,但补充3.0×10⁻⁶ Se可使癌结节面积显著减少;补 Se可显著地减轻诱癌早期血和肝组织中 LPO的形成及诱癌过程中血和肝组织中 GSH-Px 活性的降低。结论: Se可能具有通过提高 GSH-Px活力、抑制脂质过氧化作用而抑制肝癌生长的作用。

关键词 硒;二乙基亚硝胺;谷胱甘肽过氧化物酶;过氧化脂质
中图法分类号 R735.7

大量的流行病学和动物实验资料证明,硒(Se)与多种人类癌症的发病率呈负相关关系,并能显著地预防和抑制动物的自发性、移植性和化学致癌剂诱发的肿瘤的发生、发展、播散和复发[1,2,3]。迄今为止,虽已对 Se的抗癌机理作了大量的研究,但其确切机理尚未完全阐明[4]。自由基脂质过氧化作用与肿瘤的关系极为密切。Se作为谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的重要组成部分,具有清除自由基对抗氧化损伤的作用。本实验观察 Se对实验大鼠肝癌的抑制作用,并重点观察 Se的抗氧化能力在抑癌作用中的可能机理,为肝癌防治研究及对 Se抑癌机理的进一步研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与实验方法

Wistar大鼠150只,雌雄各半,体重200±20 g,将大鼠随机分为对照组、补 SeⅠ组和补 SeⅡ组,每组50只。分笼饲养,定量给食。对照组食用普通饲料(含 Se量0.2×10⁻⁶),补 SeⅠ组及补 SeⅡ组于普通饲料中分别添加1.0及3.0×10⁻⁶ Se(Na₂SeO₃)。3组大鼠均进行诱癌: 将 DEN(二乙基亚硝胺)配成0.01%水溶液,置于棕色瓶中让大鼠自由饮用。

1.2 取材方法

于诱癌开始后,每3周处死一批动物,每组5只。大鼠活杀后取血、肝素抗凝,分离血浆和红细胞。红细胞用冷生理盐水洗涤3遍,等量双蒸水制取溶血液。肝右叶用于病理切片,肝左叶制取匀浆,进行各项指标的测定。

1.3 测定方法

1.3.1 GSH-Px活力测定 采用 DTNB比色法。
1.3.2 LPO测定 采用改良的硫代巴比妥酸荧光法。
1.3.3 血红蛋白测定 采用氰化高铁血红蛋白法。
1.3.4 组织匀浆蛋白浓度测定 采用双缩脲法。

1.4 组织学检查

组织标本用常规方法处理。考虑到肝癌分布的随机性,将大鼠整个肝右叶作连续切片,HE染色,光镜下行癌结节计数,测微器测量癌结节的面积,用以代表整个肝脏肝癌的发生情况。肝脏急性炎症病变程度参照林丛等[5]的分法。

1.5 统计处理

诱癌率的比较用精确概率法检验,组间比较用两样本均数的 t 检验,批间比较用方差分析。

2 结果

2.1 DEN诱癌过程中肝脏组织学表现

在诱癌的1~6周,大鼠肝脏肉眼观察未见异常。镜下见肝小叶结构基本完整,肝细胞变性坏死,并有炎细胞浸润。胆小管轻度增生。诱癌第9周后,肝脏体积逐渐增大,肝叶表面及切面均可见灰白色结节。镜下以大量异常肝细胞构成的增生结节为特征,伴有大量纤维组织增生,在实验的晚期可见结节性肝硬化形成。实验的第15周出现肝癌。癌肿多为多发性,分布无规律,多为肝细胞癌。

2.2 补 Se对 DEN诱发大鼠肝癌的影响

补 Se后对诱癌各个时期有不同的作用。实验第3周对照组、补 SeⅠ组及补 SeⅡ组的急性炎症病变程度依次递减,第6周3组间病变程度则相似,见表1。实验第9周后,补 SeⅡ组较对照组肉眼观察细胞增生结节数少,直径小。而补 SeⅠ组与对照组则无明显区别。实验第15周时开始出现肝癌,自15周至21周对照组、补 SeⅠ组及补 SeⅡ组的诱癌率分别为40%、28.5%、28.5%,统计学上3组间差异不显著($P > 0.05$);3组荷瘤大鼠平均癌结节数分别为2.33、1.75、1.25,统计学也差异不显著。然而补 SeⅡ组癌结节平均面积显著低于对照组($P < 0.05$),见表2。

表1 补硒后肝组织急性炎症分级

Tab 1 The grading of acute inflammation in the liver after Se supplementation

Weeks	Control group	Se suppl.Ⅰ	Se suppl.Ⅱ
3	22.5	17.5	15
6	12	14	14

* 肖天利,男,34岁,讲师,主治医师,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　大鼠肝癌发生情况 (mm^2, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The status of carcinogenesis(mm^2, $\bar{x}\pm s$)

Time of experiment (wk)	Control group				Se suppl group Ⅰ				Se suppl group Ⅱ			
	n	No of tumor-bearing rats	No. of tumor nodules	Area of tumor nodules	*n*	No of tumor-bearing rats	No. of tumor nodules	Area of tumor nodules	*n*	No of tumor-bearing rats	No. of tumor nodules	Area of tumor nodules
15	5	1	2	7.53± 6.25	5	0			5	0		
18	5	1	2	5.94± 4.37	5	1	2	6.0± 2.0	5	1	1	0.53
21	5	4	10	12.38± 12.45	4	3	5	12.19± 14.08	4	3	4	2.41± 1.80
Total	15	6	14	10.77± 11.63	14	4	7	10.42± 13.25	14	4	5	2.04± 1.99##

* : $P < 0.05$ *vs* control group;# : $P < 0.05$ *vs* suppl. group Ⅰ

2.3　补 Se对诱癌过程中红细胞、肝细胞中 GSH-Px活力的影响见表 3

表 3　诱癌过程中 GSH-Px活性的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　The changes of GSH-Px activities during carcinogenesis ($\bar{x}\pm s$)

Time of experiment (wk)	Control group		Se suppl group Ⅰ		Se suppl. group Ⅱ	
	RBC (u/mg Hb)	Liver tissue (u/g of liver)	RBC (u/mg Hb)	Liver tissue (u/g of liver)	RBC (u/mg Hb)	Liver tissue (u/g of liver)
0	180.04± 6.33	9033.23± 415.67	180.04± 6.33	9033.23± 415.67	180.04± 6.33	9033.23± 415.67
3	125.78± 10.11	7144.80± 458.68	157.73± 7.09**	7149.70± 483.48	156.44± 5.46**	7285.83± 517.99
6	160.69± 4.05	1694.21± 191.31	259.64± 8.08**	2123.64± 279.43*	261.87± 11.06**	2090.17± 179.89
9	92.45± 9.67	5330.78± 483.61	184.14± 13.13**	5303.01± 327.94	189.72± 8.55**	5314.83± 534.62
12	135.56± 5.89	5145.74± 453.92	213.47± 10.35**	6188.83± 477.41*	833.44± 8.59**##	8839.64± 740.87**##
15	79.12± 5.89	2928.49± 376.81	228.31± 8.47**	5692.14± 500.11**	226.01± 4.32**	5539.76± 420.23**
18	120.14± 45.08	2182.09± 126.74	237.01± 8.11**	2393.86± 323.73	263.74± 10.54**	2329.53± 196.64
21	149.48± 8.58	5169.52± 520.79	198.1± 7.51**	5452.21± 349.10	287.61± 8.904**##	5483.77± 318.56

* : $P < 0.05$;** : $P < 0.01$ *vs* control group;## : $P < 0.01$ *vs* Se suppl. group Ⅰ

2.4　补 Se对诱癌过程中血浆、肝组织 LPO含量的影响见表 4

表 4　诱癌过程中 LPO的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　The change of LPO during carcinogenesis ($\bar{x}\pm s$)

Time of experiment (wk)	Control group		Se suppl. group Ⅰ		Se suppl. group Ⅱ	
	Blood plasma[a]	Liver tissue[b]	Blood plasma	Liver tissue	Blood plasma	Liver tissue
0	3.52± 0.55	0.30± 0.06	3.52± 0.55	0.30± 0.06	3.52± 0.55	0.30± 0.06
3	5.16± 0.82	0.61± 0.08	4.35± 0.60	0.51± 0.04	3.72± 0.46*	0.48± 0.07**#
6	4.43± 0.34	0.51± 0.08	4.09± 0.13	0.42± 0.04	3.94± 0.29*	0.36± 0.05**#
9	4.53± 0.82	0.38± 0.05	4.06± 0.65	0.35± 0.07	3.37± 0.78	0.35± 0.07
12	3.58± 0.53	0.37± 0.02	3.52± 0.48	0.35± 0.02	3.52± 0.49	0.34± 0.02
15	3.68± 0.53	0.32± 0.05	3.58± 0.67	0.32± 0.03	3.57± 0.46	0.32± 0.05
18	2.82± 0.29	0.32± 0.32	3.1± 0.45	0.31± 0.03	3.36± 0.61	0.37± 0.05
21	3.36± 0.57	0.30± 0.05	3.70± 0.57	0.31± 0.02	3.85± 0.28	0.33± 0.04

a: values are expressed as nmol MDA/ml; b: values are expressed as nmol MDA/mg protein;* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* control group;# : $P < 0.05$ *vs* Se suppl. group Ⅰ .

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

3.1 LPO在癌发生过程中的作用

近年来,氧自由基及 LPO在癌发生中的作用受到了广泛的重视[6]。本实验观察到 LPO在诱癌早期(第3 6周)显著升高,至12周随着癌前增生结节的形成和肝癌的发生发展而降低。诱癌早期 LPO升高可能是 DEN代谢活化过程中产生的氧自由基引发的脂质过氧化作用致。随着癌的产生和发展,LPO逐渐下降。癌组织脂质过氧化反应低下被认为是癌细胞丧失细胞增殖的自我控制机理有关[7]。从本实验可以看出,补 Se后可抑制诱癌早期 LPO的升高作用。因此我们认为 Se可能是部分通过其抗氧化能力即抑制脂质过氧化作用来达到其抑癌效应的。

3.2 Se与 GSH-Px及其抑癌机理

部分 Se存在于 GSH-Px必需基因中。GSH-Px、SOD、CAT等作为机体的抗氧化系统,能催化超氧化物、过氧化氢及脂质过氧化物的还原,从而控制脂质过氧化物的水平。本实验发现,在 DEN诱癌过程中,补 Se可显著地提高红细胞 GSH-Px的活力,然而,肝细胞中 GSH-Px活力在诱癌过程中则一直在正常水平以下波动。饲料中补充1.0 3.0× 10^{-6} Se在实验的第6 12 15周时相点可显著提高肝组织中 GSH-Px活力,但升高的 GSH-Px水平仍低于诱癌前水平。可见在 DEN诱癌过程中,肝组织的 GSH-Px严重受损。同时本实验还发现,饲料中添加3.0× 10^{-6} Se可显著地抑制诱癌早期(第3 6周)LPO的升高作用。由于补 Se后 LPO变化与 GSH-Px的变化不完全一致,所以我们推测 Se对 DEN诱癌早期 LPO升高的抑制效应似乎不全是通过肝组织 GSH-Px的抗氧化作用来实现的,可能还存在另一种依赖于 Se的抗氧化因子的存在。本实验结果显示:饲料中添加3.0× 10^{-6} Se组与对照组相比较,能显著地降低癌结节面积($P < 0.01$),亦即显著地抑制癌结节的生长速度。由此可以推测:在此模型中,Se的抑癌作用可能部分是通过其抗氧化作用来实现的;另一可能机理是 Se抑制肝癌细胞的增殖而达到抑癌作用[8]。

参考文献

1 顾公望.硒与肝癌研究进展.肿瘤,1987;7(2):89

2 诸亚君,曹禄森,于树玉.亚硒酸钠与维生素 E对三甲基胆蒽诱发肉瘤的影响.肿瘤防治研究,1994;21(2):67

3 Colditz G A. Selenium and cancer prevention. Promising results indicate further trials requred. JAMA, 1996; 276(24): 1984

4 Spallholz J E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. Free Radi Biol Med, 1994; 17(1): 45

5 林 丛,焦解歌,许淑媛等.黄曲霉素 B1引起的鸭雏急性肝损害.中华病理学杂志,1983;12(3):199

6 Guyton K Z, Kensler T W. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. In: Cheesman KH, Slater TE. Free radicals in medicine (British Medical Bulletin 1993 vol 49 No 3). London: Churchill Livingstone, 1993; 523~544

7 Cheeseman K H, Emery S, Maddix S P *et al*. Studies on lipid peroxidation in normal and tumor tissue. Biochem J, 1988; 250(1): 247

8 Zhu Z, Kimura M, Itokawa Y *et al*. Effect of selenium on malignant tumor cells of brain. Biol Trace Elem Res, 1995; 49(1): 1

(收稿:1996-11-21;修回:1997-04-25)

(编辑 张大春)

Inhibitory effects of Se on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats

Xiao Tianli, Yuan Aili, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To observe the inhibitory effects of Se on diethylnitrosamine (DEN)-induced hepatocarcinogenesis. Methods: During carcinogenesis, Wistar rats were fed with 3 different dietary levels of Se (0.2, 1.0 and 3.0× 10^{-6} respectively). Then the activities of LPO and GSH-Px in the blood and liver were determined and the tumor incidence and area of tumor nodules observed. Results: Supplementation of Se significantly inhibited the increase of LPO in both blood and liver at the early stage of carcinogenesis and restored the values of GSH-Px in the red blood cells and liver. Conclusion: Se might inhibit the growth of liver cancer through improving the activity of GSH-Px and depressing the lipid peroxidation.

Key words Se; diethylnitrosamine; liver cancer; gluthione peroxidase; lipid peroxide; rat

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net