DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.009

亚硒酸钠对 MNNG所致胃粘膜上皮细胞损伤的预防作用*

刘 卫** 房殿春 梁后杰 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,630038

提 要 对亚硒酸钠预防甲基硝基亚硝基胍(MNNG)所致胃粘膜细胞损伤的作用进行研究。结果发现,胃粘膜细胞先用 1×10^{-5} mol/L或 1×10^{-6} mol/L亚硒酸钠预处理4 h,再给 MNNG组细胞的增殖速率、软琼脂集落形成能力、非程序 DNA合成水平、质脂过氧化物和 ras p21蛋白含量均显著低于 MNNG组($P<0.05\sim0.01$)。结果提示,一定剂量亚硒酸钠对 MNNG诱导的胃粘膜细胞损伤有防护作用。

关键词 胃粘膜;上皮细胞;甲基硝基亚硝基胍;亚硒酸钠
中图法分类号 R573.39

国内外大量流行病学调查证明,硒与人类癌症死亡率呈负相关,硒缺乏可增加人类患癌的危险性[1]。动物实验亦证明,硒具有拮抗或抑制化学致癌剂的致癌、诱癌作用。为了解硒对胃粘膜细胞的保护作用,本文观察了亚硒酸钠(Na_2SeO_3)对甲基硝基亚硝基胍(MNNG)所致胎胃粘膜上皮细胞损伤的预防作用。

1 材料与方法

1.1 实验设计

胎胃粘膜上皮细胞的分离、培养和鉴定见文献[2]。实验共分4组,包括 MNNG组和 1×10^{-5} mol/L Na_2SeO_3+ MNNG组(S1组),1×10^{-6} mol/L Na_2SeO_3+ MNNG组(S2组)及 1×10^{-7} mol/L Na_2SeO_3+ MNNG(S3组)。MNNG用量在培养液中终浓度均为 10^{-5} mol/L,取第2代培养24 h后细胞,S1、S2、S3组分别用相应浓度 Na_2SeO_3预处理4 h,再与 MNNG组同时加入 MNNG,培养24 h后,更换正常培养液,继续培养40 d,观察实验过程中各组细胞各项指标的变化。

1.2 研究内容与方法

1.2.1 细胞生长曲线 不同处理后,将细胞以 2×10^5 瓶的密度接种于培养瓶,次日起每天每组取3瓶细胞,消化后制备细胞悬液,计数细胞,取平均值共计5 d,绘制出生长曲线,比较各组细胞生长速度。

1.2.2 软琼脂集落形成试验 取培养第30天细胞悬液0.2 ml(含细胞1000个)与0.35%软琼脂3 ml混匀后,注入含0.6%琼脂底层平皿,置 CO_2孵箱中培养10 d,取出计数集落形成个数。

1.2.3 非程序 DNA合成(UDS)测定 各组细胞经不同处理后分别加入羟基脲(5mmol/L, Sigma公司)和 ^{3}H-TdR 5μci/ml(中国原子能研究所),细胞继续培养4 h,每瓶取小量细胞行台盼蓝染色,以观察细胞成活情况,其余制备样品,按文献[3]方法测定 UDS。

1.2.4 脂质过氧化物(LPO)测定 采用硫代巴比妥酸比色法,检测培养第1、5、10、20、30和40天细胞 LPO含量[4]。

1.2.5 ras p21酶联免疫吸附实验 取各组第10、20、30、40天细胞测定 ras p21蛋白,检测方法见文献[4]。

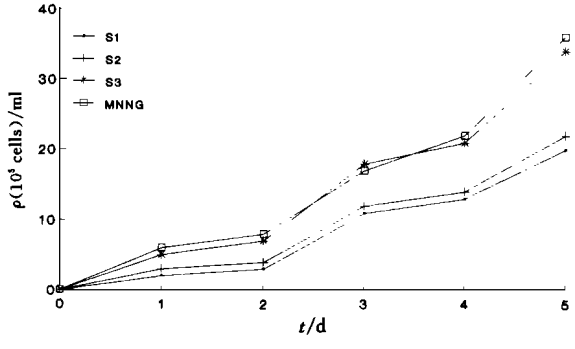
1.3 统计学处理

采用方差分析比较各组间差异的显著性,$P<0.05$为差别显著,$P<0.01$为差别非常显著。

2 结果

2.1 细胞生长速度比较

以细胞生长曲线表示。Na_2SeO_3处理后,S1、S2组细胞生长速度明显减慢,培养第5天细胞数分别比 MNNG组低64%和42%,见附图。



附图 各组胃粘膜上皮细胞生长曲线

Fig Growth curves of different groups of gastric epithelial cells

* 全军"八五"攻关项目
** 解放军105医院 合肥,230000

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

2.2 软琼脂集落形成情况见表 1

表 1 各组胃上皮细胞软琼脂中集落形成个数 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The numbers of colony formation in soft agar in different groups of gastric epithelial cells ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Number of colony
MNNG	6.2± 0.84
S_3	5.4± 1.14
S_2	2.4± 1.14**
S_1	0.8± 0.84**

** : $P<0.01$ *vs* MNNG

由表 1可见,S1和 S2组集落形成个数显著低于 MNNG组 ($P<0.01$),而 S3组集落形成个数与 MNNG组相比差别不显著 ($P>0.05$)。

2.3 Na_2SeO_3 对 MNNG诱导胎胃粘膜上皮细胞 UDS的影响

经台盼蓝染色观察,各组细胞成活率均在 90%以上。Na_2SeO_3对 MNNG诱导胎胃粘膜上皮细胞 UDS的影响见表 2由表 2可见,S1组和 S2组胃粘膜上皮细胞的 UDS水平显著低于 MNNG组 ($P<0.05$~ 0.01),而 S3组 UDS水平与 MNNG组相比差别不显著 ($P>0.05$)。

表 2 各组胃粘膜细胞的 UDS水平 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The levels of unscheduled DNA synthesis in different groups of gastric epithelial cells ($\bar{x}\pm s$)

Groups	cpm/10^6 cells
MNNG	183.8± 20.5
S_3	169.0± 19.1
S_2	156.6± 18.7*
S_1	116.6± 15.6**

*: $P<0.05$,** : $P<0.05$ *vs* MNNG

2.4 LPO测定结果见表 3

表 3 各组胃上皮细胞 LPO含量 (C_B/nmol·ml^{-1}) ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 LPO contens in different groups of gastric epithelial cells (C_B/nmol·ml^{-1}) ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Time (d)					
	1	5	10	20	30	40
MNNG	5.40± 0.64	5.95± 0.65	6.43± 0.63	7.42± 0.68	5.53± 0.69	4.05± 0.52
S_3	5.47± 0.63	5.90± 0.63	6.44± 0.62	7.30± 0.65	5.74± 0.62	4.22± 0.54
S_2	4.11± 0.55*	4.28± 0.61**	4.47± 0.56**	4.68± 0.59**	4.72± 0.61	4.78± 0.63
S_1	3.87± 0.54**	4.12± 0.58**	4.32± 0.58**	4.52± 0.57**	4.65± 0.60	4.66± 0.63

*: $P<0.05$, ** : $P<0.01$ *vs* MNNG

由表 3可见,S1组和 S2组培养第 1 5 10 20天细胞 LPO含量显著低于 MNNG组 ($P<0.05$~ 0.01),而 S3组与 MNNG组相比差别不显著 ($P>0.05$)。

2.5 各组细胞 ras p21检测结果见表 4

表 4 胃上皮细胞 ras p21表达变化 (A值) ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Expression of ras p21 in different groups of gastric epithelial cells ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Time (d)			
	10	20	30	40
MNNG	0.98± 0.99	1.08± 0.11	1.12± 0.11	1.12± 0.12
S_3	0.95± 0.11	1.04± 0.11	1.08± 0.12	1.18± 0.11
S_2	0.79± 0.07*	0.86± 0.07*	0.87± 0.09**	0.91± 0.09**
S_1	0.65± 0.08**	0.68± 0.08**	0.68± 0.09**	0.69± 0.08**

*: $P<0.05$, ** : $P<0.01$ *vs* MNNG

由表 4可见,在各时相点,S3组细胞 ras p21水平与 MNNG组相比差别不显著 ($P>0.05$),而 S1和 S2组细胞 ras p21水平则显著低于 MNNG组 ($P<0.05$~ 0.01)。

3 讨论

体外研究表明,硒能有效地抑制直接诱变剂 MNNG对细胞遗传物质的损伤及诱发突变作用,还可抑制肿瘤细胞的生长,使其向正常细胞分化[5]。本文观察了不同浓度 Na_2SeO_3对 MNNG所致胎胃粘膜上皮细胞损伤的预防作用,结果发现,先加 1×10^{-5} mol/L和 1×10^{-6} mol/L Na_2SeO_3 预处理 4 h后,再加 MNNG组细胞增殖速度及软琼脂中集落形成个数均明显低于对照组,提示一定剂量下硒对胃粘膜上皮细胞异常增殖有抑制作用。

正常情况下,细胞 DNA合成仅见于 S期,但当细胞 DNA受到损伤进行修复时,其 DNA合成可发生在

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

整个细胞周期. 那些发生于 S期以外的 DNA合成,谓之非程序 DNA合成(Unscheduled DNA synthesis, UDS). 测定 UDS是一种检测致突变因子的可靠生物学方法,我们过去研究提示 MNNG可损伤细胞 DNA使细胞 UDS水平显著升高[4]。本研究发现,先用 1×10⁻⁵ mol/L(S1组)和 1×10⁻⁶ mol/L Na_2SeO_3(S2组)预处理胃粘膜 4 h,其 UDS水平显著低于 MNNG组,而用 1×10⁻⁷ mol/L Na_2SeO_3(S3组)预处理,其 UDS水平与 MNNG组相比则无显著差别,提示一定剂量 Na_2SeO_3可防止 MNNG对胃粘膜细胞 DNA的损伤。

LPO是指活性氧与不饱和脂肪酸作用产生的丙二醛等产物,它可致细胞 DNA损伤,参与肿瘤的启动和促进过程[6]。本研究发现,S3组细胞 LPO含量与 MNNG组同步升降,而 S1组和 S2组细胞 LPO含量在培养第 1、5、10和 20天显著低于 MNNG组. 提示一定剂量维甲酸可抑制 MNNG引起的脂质过氧化,防止其对胃粘膜细胞的损伤。

p21蛋白是癌基因 ras产物,我们过去的研究发现,MNNG组 ras p21含量显著高于对照组,提示 MNNG可诱发 ras p21异常表达. 本研究还发现,S1组和 S2组 ras p21水平显著低于 MNNG组,而 S3组与 MNNG组相比则差异不显著,提示一定剂量 Na_2SeO_3可抑制胃粘膜上细胞 ras p21的表达,防止细胞癌变。

目前对硒的抗癌机理仍不完全清楚,根据本文资料推测可能与以下有关:(1)抑制肿瘤细胞生长繁殖;(2)拮抗化学致癌物对细胞遗传物质的损伤,保护细胞 DNA,并促进受损 DNA的修复[7];(3)抑制癌基因的表达;(4)抑制致癌物引起的脂质过氧化及自由基的产生,达到防癌目的。

参考文献

1 Lane H W, Medina D. Mode of action of selenium inhibition of 7, 12-dimethylbena(α) anthracene-induced mouse mammary tumorigenesis. J Natl Cancer Inst, 1985; 75(6): 675

2 刘　卫,房殿春,梁后杰等.胃粘膜上细胞分离、培养和鉴定.第三军医大学学报,1996; 18(3): 255

3 徐永玲,张启行,李益农. MNNG诱导的胃粘膜细胞的非程序 DNA合成.中华肿瘤杂志,1991; 13(2): 90

4 刘　卫,房殿春,梁后杰等.甲基硝基亚硝基胍诱导胃粘膜上皮细胞恶性转化作用.第三军医大学学报,1996; 18(4): 330

5 Peter T. In vivo effect of selenium on the mutagenic activity of aflatoxin BL. J Hgy Epidemiol Microbiol Immunol, 1990; 2(2): 123

6 Takahashi M, Hasegawa T, Furukawa F *et al*. Enhanced lipid peroxidation in rat gastric mucosa caused by NaCl. Carcinogenesis, 1991; 12(11): 2201

7 顾公望,孙　燕.硒抗癌机理研究进展.中国肿瘤临床,1994; 21(2): 139

(收稿: 1996-03-15;修回: 1996-11-08)

(编辑　冷怀明)

Preventive effects of Na_2SeO_3 on injury of gastric epithelial cells induced with N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine

Liu Wei, Fang Dianchun, Liang Houjie, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The study of the preventive effects of Na_2SeO_3 on injury of gastric epithelial cells (GECs) induced with N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) revealed that the proliferating rate, number of colony formation in soft agar, level of unscheduled DNA synthesis, content of lipid peroxidative products and concentrations of ras P21 in GECs in the group with pretreatment using 1×10⁻⁵ mol/L or 1×10⁻⁶ mol/L Na_2SeO_3 were significantly decreased as compared with the group without. This suggests that a certain dosage of Na_2SeO_3 can effectively prevent injury of GECs induced with MNNG.

Key words gastric mucosA; epithelial cell; N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG); Na_2SeO_3

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