

纳米硒对小鼠移植瘤 H₂₂ 的生长抑制作用及其机制

★ 施旻 乔玉丹 (江西中医学院 南昌 330004)

摘要:目的:研究纳米硒对小鼠移植瘤 H₂₂ 的生长抑制作用及其作用机理,探讨纳米硒抗肿瘤治疗的可能性。方法:采用体内抗肿瘤法观察各组的抑瘤率;肿瘤组织切片 HE 染色、甲基绿-派洛宁染色、透射电镜观察其病理改变;免疫组化法检测 Bax 蛋白的表达水平;HE 切片检测对胸腺脾脏的影响。结果:纳米硒抑制小鼠移植瘤 H₂₂ 的生长、浸润,减少核分裂,增加凋亡,血管生成减少;电镜见肿瘤细胞的典型凋亡形态,免疫组化显示肿瘤组织的 Bax 蛋白表达上调,SI、TI 无明显降低,脾小体、脾巨噬细胞数升高。结论:一定剂量的纳米硒可能通过增强免疫作用和上调 Bax 蛋白的表达诱导肿瘤细胞凋亡两种主要途径来实现抗肿瘤作用。

关键词:纳米硒;肿瘤;凋亡;免疫组化;电镜

中图分类号:R 965 **文献标识码:**A

Anti-tumour effect of Nano Seleniums and its mechanism for mice with transplanted tumour H₂₂

SHI Min, QIAO Yu-dan

Department of Pathology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

Abstract: Objective: Studying Nano Selenium's effect on growth-inhibition and mechanism for mice with transplanted tumor H₂₂, discussing whether it is possible to treat tumour with Nano Selenium. Method: Observe the tumour-inhibition rate of each group through anti-tumour experiment in the internal body; observe the lesions of tumour through HE staining, Methyl green-pyronine staining and electroscopie observation; investigate the expression of Bax by immunohistochemistry; observe Nano Selenium's influence on spleen and thymus through HE staining. Results: Nano Selenium can prevent transplanted tumor H₂₂ from growing and infiltrating effectively; The number of the nucleus fission and blood vessels decreased, The number of the apoptosis increased. Electroscopie observation showed that tumor tissue had more apoptosis condition; immunohistochemistry showed that the expression of Bax protein was up-regulated, thymus index (TI) and spleen index (SI) had no significant decrease among all experimental groups, but the number of macrophage and spenic segment increased in Nano Selenium group. Conclusion: The results suggest that a certain dose of Nano Selenium has obvious tumor inhibition through enhancing the immune system effects and Up-regulated expression of Bax protein in the internal body experiment.

Key words: Nano Selenium; Tumour; Apoptosis; Immunohistochemistry; Electroscopie

1 材料与方法

1.1 材料

纳米硒:南昌大学化学分析测试中心提供纳米硒,由本院化学教研室将纳米硒配成纤维素悬浮液。小鼠 H₂₂ 肝癌细胞株:由浙江省医学科学院引进,由江西中医学院病理教研室定期传代保存。鼠抗人 Bax(P-19)多克隆抗体与兔抗鼠 VEGF 多克隆抗

体,均为浓缩型 0.1ml 包装, Santa Cruz 生产; SABC 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验动物模型

H₂₂ 移植瘤:江西中医学院实验动物中心提供的近交系昆明小鼠, 4 周龄, 18~24 g。小鼠随机分为纳米硒低、中、高剂量处理组 [Nano Se, 0.5、1、2mg/(kg·d)]、环磷酰胺组 [CTX, 25mg/(kg·d)] 和正常

对照组[NS,90mg/(kg·d)],10只/组,共5组,在小鼠右腋皮下接种H₂₂瘤细胞,接种后次日开始灌胃给药,连续10日。停药次日,行断椎处死,称体重,剥离瘤体,取脾、胸腺,称重,并用10%福尔马林液固定标本。

1.3 观察指标

1.3.1 计算肿瘤生长抑制率和脾、胸腺指数 抑瘤率(%)=(对照组平均瘤重-给药组平均瘤重)/对照组平均瘤重×100%

脾脏指数(Spleen index, SI)=脾脏重量(mg)/体重(g)

胸腺指数(Thymus index, TI)=胸腺重量(mg)/体重(g)

1.3.2 肿瘤组织切片HE染色,观察肿瘤的病理变化 核分裂计数:5个高倍(40×10)视野核分裂数/5;血管计数:3个高倍(40×10)视野血管总数/3。

1.3.3 肿瘤切片甲基绿-派洛宁染色,凋亡细胞计数(APO积分) 每张切片记录3个高倍镜视野中的凋亡细胞数/3。

1.3.4 电镜观察 观察核凋亡形态及线粒体、内质网等细胞器改变。

1.3.5 肿瘤免疫组化标记Bax蛋白 采用二次记法评分^[1]。

1.3.6 脾脏、胸腺称重,切片HE染色病理形态学观察;脾小体计数 每张切片随机观察3个低倍(10×10)视野计数/3;巨核细胞计数:每张切片随机观察5个中倍(20×10)视野计数/5。

1.7 数据处理

实验数据统计分析采用SPSS 13.0 for windows统计软件包,计量资料用($\bar{x} \pm s$)描述,进行单因素方差分析及相关性检验,等级资料用多个独立样本的秩和检验分析。

2 结果

2.1 纳米硒对荷H₂₂小鼠的抑瘤作用结果

纳米硒低、中、高剂量组都具有较明显的抑瘤效果,但各纳米硒组的抑瘤率低于CTX组(见表1)。

表1 纳米硒对荷H₂₂小鼠的抑瘤作用

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	动物数 /只	末体重 /g	瘤重/g	抑瘤率 (%)
生理盐水组	90	10	21.1111±4.6296	1.6175±0.7046	-
环磷酰胺组	25	10	21.0100±5.0346	0.5959±0.2553**	63.16
低剂量组	0.5	10	22.1100±3.9720	1.0881±0.3943*△	32.73
中剂量组	1	10	23.7778±4.3130	1.0656±0.2778*	34.12
高剂量组	2	10	22.4400±4.2254	1.0649±0.5642*	34.16

注:与NS组比较,*P<0.05,**P<0.01;与CTX组比较,△P<0.05。

2.2 肿瘤组织HE切片及甲基绿-派洛宁染色观察

对照组瘤细胞生长旺盛,呈巢状,密集,或呈大片状;核分裂像多,病理性核分裂像易见;瘤细胞浸

润明显,侵入血管、胸腺、胸腔;瘤组织内微血管较丰富,但不充血;较多肿瘤灶状或片状坏死。相比较,纳米硒低、中、高剂量组及CTX组的瘤细胞生长不及NS组旺盛,部分呈腺样生长;核分裂较少,凋亡细胞较多,呈零散或小灶状分布于瘤细胞巢中,也可出现在坏死灶边缘。血管转移罕见,胸腺浸润亦少见,血管数较少,但明显充血,坏死程度不及NS组明显,坏死区有淋巴细胞和巨噬细胞浸润。凋亡细胞:核明显固缩,染色加深,染色质凝聚,有的凋亡核呈浓染的碎片,不整形小点,整个细胞体积明显缩小,胞浆明显红染,结构欠清,但细胞边界尚清楚。见表2。

表2 瘤组织病理形态观察镜检结果

组别	核分裂	血管	APO积分
生理盐水组	11.27±2.70	9.33±2.71	4.76±3.20
环磷酰胺组	6.92±3.01**	5.87±2.57**	12.48±4.96**
低剂量组	8.10±3.82*	6.92±2.40*	10.58±4.28**
中剂量组	6.93±3.85**	6.07±2.40**	12.16±4.16**
高剂量组	7.84±1.56*	6.54±1.41*	10.51±4.78**

注:与NS组比较,*P<0.05,**P<0.01。

2.3 肿瘤细胞超微结构观察

各组肿瘤细胞及其凋亡与光镜观察结果一致。纳米硒各剂量组瘤细胞凋亡易见,胞浆内细胞器可辨,线粒体嵴部分溶解,有空泡,内质网扩张,有溶酶体颗粒。并且可见肿瘤血管内皮细胞核染色质边集等凋亡倾向。说明该药可破坏线粒体,促进瘤细胞凋亡,抑制血管生长。

2.4 纳米硒对荷H₂₂小鼠肿瘤组织中Bax的影响

低中高剂量纳米硒组肿瘤组织中的Bax蛋白的阳性率分别是33.3%,44.4%,33.3%,高于生理盐水组,有显著差异。见表3。

表3 瘤组织Bax表达情况

组别	样本数 (n)	Bax				阳性率 (%)	P值
		-	+	++	+++		
生理盐水组	8	7	1	0	0	14.3	
环磷酰胺组	9	5	1	2	0	37.5	**
低剂量组	9	6	1	2	0	33.3	**
中剂量组	9	5	3	1	0	44.4	**
高剂量组	9	6	2	1	0	33.3	**

注:与对照组比较,**P<0.01。

2.4 纳米硒对免疫器官影响

2.4.1 SI、TI、脾小体数和巨核细胞数的变化 纳米硒低、中、高剂量组的TI及脾指数SI与对照组相比,均无显著性差异(P>0.05),其中,对照组的TI明显高于CTX组,P<0.01,有显著性差异,说明CTX有免疫抑制作用。纳米硒低、中剂量组的SI高于CTX组,P<0.05,说明一定剂量的纳米硒有促进免疫功能的作用。见表4。

表 4 纳米硒对荷 H₂₂ 小鼠脾脏、胸腺的影响

组别	SI	TI	脾小体计数	巨核细胞计数
生理盐水组	11.2654±5.0798	2.6300±0.7811**	4.41±1.46	7.89±2.28 [△]
环磷酸腺苷组	5.9670±2.3510	0.9180±0.2789	4.10±1.73	5.52±1.93
低剂量组	12.7607±2.5813**	2.0663±1.1364	5.33±1.21	11.50±2.69**
中剂量组	10.5216±2.6918*	2.2900±1.1152	4.47±1.09	8.40±3.30* [△]
高剂量组	11.8195±5.6542	1.8770±0.8358	4.00±1.17 [△]	8.86±3.31** [△]

注:与 CTX 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与低剂量组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.4.2 纳米硒对小鼠胸腺形态的影响 NS 组有 3 例标本胸腺受肿瘤细胞侵袭,其余结构尚佳,皮质髓质结构清楚;CTX 组的多数胸腺萎缩,纤维结缔组织增生明显,淋巴细胞数量减少,皮质髓质结构不清晰;纳米硒组胸腺基本未见异常,脾小体、脾巨噬细胞数升高。结合表 4 数据,可见 CTX 对免疫器官具有抑制作用。相比,纳米硒对免疫器官无抑制作用,还有一定的刺激增强作用。

3 讨论

纳米硒一直被用来作为补硒保健品,但关于纳米硒的抗肿瘤作用研究,国内仅有少数人在从事研究,而国外暂无报道。

本实验中通过各种检测,观察到与对照组相比,纳米硒与 CTX 组瘤细胞生长不旺盛,多数呈小巢生长或细胞较稀疏,核分裂像与血管数较少,浸润转移现象较轻。各组肿瘤的坏死情况无明显差别。但纳米硒低、中剂量组坏死程度较轻一些。但其这说明:(1)CTX 对瘤细胞具有较强的直接杀伤作用,导致瘤细胞大量坏死,这是 CTX 治疗肿瘤的一种主要途径,在大量的实验中都得到了证实。纳米硒对瘤细胞的直接杀伤作用相对较弱,因而坏死现象减少,但一定剂量的纳米硒能够增强 Bax 蛋白的表达,激活了凋亡信号的传导,通过氧化应激效应产生过氧化物和超氧阴离子从而诱导瘤细胞凋亡^[2]。(2)纳米硒与 CTX 都具有抑制肿瘤浸润,抑制血管生长的作用,纳米硒通过促进肿瘤血管内皮细胞凋亡实现其作用。现有研究表明,纳米硒能诱导肿瘤未成熟血管向成熟方向分化,修复新生血管基底膜,改善微血管通透性较高的状态,减少血浆等基质成份的渗出,消除血管内皮细胞及肿瘤细胞赖以生存的基础^[3]。

与 CTX 相比,纳米硒抑制肿瘤的作用较弱。因此单独应用纳米硒的效果不佳,但纳米硒能够减轻

一些抗肿瘤药物对免疫器官的抑制作用,促进脾小体和巨噬细胞增生,增强免疫作用。如果将纳米硒与 CTX 等其他化疗药联合使用,可能收到更理想的联合抗肿瘤效果。这有待进一步的深入研究。

本实验参考文献中纳米硒的剂量^[4],并结合预实验的结果,在抑瘤效果较好的区间内选取了 0.5、1、2 mg/kg 低、中、高三个浓度进行体内抗肿瘤实验,显示有一定效果,但无剂量梯度关系。这可能与用药剂量有关。有文献报道肿瘤患者进行放、化疗期间,可每日给予硒 600~800 μg 。折算成小鼠剂量为 85.7~114.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本实验中的剂量远远大于此剂量,故有可能纳米硒剂量过大,处于量效曲线后期,曲线平缓,效应接近于最大值,此现象可能与机体对纳米硒的吸收程度有关,增加剂量,但吸收量不一定增加。另有文献^[5]示纳米硒的小鼠中毒剂量(LD₅₀)为 112.98 mg/kg,远远高于本实验的剂量浓度,故本实验的剂量虽大,但相对还是安全的,从各组荷 H₂₂ 移植瘤小鼠的死亡情况及对重要器官的影响,提示本实验使用的超大剂量纳米硒对内脏有一定的损伤,但对死亡率没有影响。我们将进一步做体内、体外实验以深入探讨。

参考文献

- [1] Leake R, Barnes D, Pinder S, et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. [J]. Clin Pathology, 2000, 53: 634-635.
- [2] 王雷, 林德贵, 蒋金书. 硒化合物抗肿瘤血管形成和诱导肿瘤细胞凋亡的机制. [J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(5): 315-317.
- [3] Vaupé P, Thews O, Kelleher DK. Oxygenation of human tumors. [J]. Strahlenther Oncol, 1998, 174(4 suppl): 6-12.
- [4] 高学云, 张劲松, 张立德, 汪思应. 纳米红色元素硒对 C57 小鼠 Lewis 肺癌移植瘤形成与转移的影响. [J]. 中国公共卫生, 2000, 16(2): 109-110.
- [5] 张劲松, 高学云, 张立德等. 纳米红色元素硒的护肝、抑瘤和免疫调节作用. [J]. 营养学报, 2001, 23(1): 32-34.

(收稿日期: 2007-11-01)