

含硒化合物联合医用长春新碱应用对艾氏腹水癌的抑制机制

宋筱瑜¹ 林德贵¹ 王雷² 王金秋¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 美国明尼苏达大学 癌症研究中心, 明尼阿波利斯 55455)

摘要 为寻找医治艾氏腹水癌的新型制剂,并评价药效,对小鼠腹腔注射肿瘤细胞,建立荷艾氏腹水癌细胞(EAC)的小鼠模型;并于接种后第7天开始用抗癌药,观察荷瘤小鼠(接种EAC后产生血性腹水的小鼠)的生存周期,通过对动物体内抗氧化水平指标(SOD、GSH、MDA)的检测,判定硒化合物的保护作用;用流式细胞术及对细胞进行DNA梯检测,评估药物对肿瘤细胞凋亡的影响。结果表明含硒化合物,尤其是有机硒化合物,甲基硒代半胱氨酸(SeMC)与抗癌药长春新碱联合应用可使荷瘤小鼠的生存期延长、机体的抗氧化水平升高及肿瘤细胞凋亡率增多,较对照组有显著差异($P < 0.01$)。研究认为,含硒化合物与医用长春新碱联用对荷瘤小鼠的保护性,主要是出于硒的抗氧化能力,以及使长春新碱促进肿瘤细胞的凋亡来实现的。

关键词 硒; 长春新碱; 小鼠模型; 艾氏腹水癌; 联合用药

中图分类号 R 73-36

文章编号 1007-4333(2007)03-0014-05

文献标识码 A

Inhibitory effect of selenium compounds combined with vincristine on Ehrlich ascites carcinoma and the mechanism of action

Song Xiaoyu¹, Lin Degui¹, Wang Lei², Wang Jinqiu¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. University of Minnesota, Minneapolis 55455, U. S. A)

Abstract This study was designed to assess the effect and mechanism of action of selenium compounds and vincristine (VCR) on mice bearing Ehrlich ascites carcinoma (EAC), a tumor-bearing mice, and compare the toxicity of a single drug with combination of two drugs. An EAC mouse model was established by injecting tumor cells intraperitoneally and drugs were given to mice on the 7th day after injection. The survival time of Ehrlich ascites tumor-bearing mice was recorded. The protective effect of selenium compounds on mice carrying tumor was evaluated by antioxidant indices (SOD, GSH, MDA) and their effects on tumor cells apoptosis evaluated by flow cytometry and DNA ladder. Selenium compounds, especially methylselenocysteine (MSeC) combined with VCR significantly ($P < 0.01$) prolonged the life span of tumor-bearing mice, improved the antioxidant level in vivo, and simultaneously promoted the apoptosis of tumor cells. In general, selenium compounds combined with VCR played a powerful role in protection of tumor-bearing mice. This mainly depended on the anti-oxidant function of selenium but the anticancer activity of VCR was also enhanced in combination with selenium, by inducing apoptosis.

Key words selenium; vincristine (VCR); mouse model; Ehrlich ascites carcinoma (EAC); drug combination

许多研究表明,微量元素硒有防癌和抗癌作用。Larry Clark 等于 1996 年证明了使用硒酵母(200 $\mu\text{g}/\text{d}$)对皮肤癌有疗效,同时高硒食物能有效而安全的预防人类的几种主要上皮源性癌,包括前列腺癌、

肺癌和结肠癌^[1]。通过研究硒及其相关因子在促进肿瘤细胞凋亡和肿瘤内血管形成过程中的作用,可以确定硒在预防和治疗某些癌症中的确切机理,有助于研发含硒药物,丰富预防和治疗癌症的方法。

收稿日期: 2006-11-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471275)

作者简介: 宋筱瑜,博士研究生, E-mail: xiaoyujoyce@163.com; 林德贵,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事动物肿瘤和皮肤病研究, E-mail: csama@sina.com

目前,医用长春新碱是临床最常用的肿瘤化疗药之一,在临床应用中,该药常与其他类型的抗肿瘤药,如阿霉素,紫杉醇,环磷酰胺等联合应用来提高药效^[3]。长春新碱(vincristine, VCR)是可与微管蛋白结合,其作用机制主要是破坏细胞的有丝分裂周期,导致细胞凋亡。但是 VCR 对所有的分裂细胞都有毒性作用,所以 VCR 治疗毒性大,不能大剂量用于肿瘤治疗,而且 VCR 促肿瘤细胞凋亡的灵敏性也在逐渐降低^[4]。许多研究表明,大多数化疗药的抗癌活性是通过介导细胞凋亡来实现的,因此,对细胞凋亡抗性的减弱可能是许多抗癌药效降低的主要原因^[4]。基于此,目前许多肿瘤治疗学的研究把重点放在了增强药物促肿瘤细胞凋亡的有效率上^[5]。硒作为一种具有防癌和抗癌活性的物质,尚无研究证明与其他抗癌药物联合应用后的效果。鉴于硒促肿瘤细胞凋亡及对抵抗抗癌药物毒副作用等功能,本实验旨在研究硒与长春新碱两种药物联合应用对抗艾氏腹水癌的作用,并进一步了解含硒化合物在化疗过程中起保护作用机制。

1 实验材料

1.1 药物与试剂

医用硫酸长春新碱(VCR),北京制药厂生产;亚硒酸钠(Na_2SeO_3)购自美国 Sigma 公司;甲基硒代半胱氨酸(SeMC)购自美国 IKT 试剂公司;SOD、MDA、GSH 试剂盒,南京建成生物技术有限公司生产;DNA 快速提取试剂盒,北京新经科生物技术有限公司生产。

1.2 细胞株及培养条件

艾氏腹水癌细胞株(EAC),购于协和医科大学。细胞培养于含有 10% (体积分数)的胎牛血清的 DMEM 培养液中,细胞培养箱温度保持 37℃、 CO_2 5% (体积分数)的培养环境。每隔 3 d 换 1 次培养液。用 0.25 mg/100 mL 的胰蛋白酶联合 EDTA 消化传代。

1.3 动物来源

ICR 小鼠(简称小鼠)96 只,雌雄各半,5~6 周龄,体重 18~20 g,购自北京市实验动物中心(北京维通利华公司)。

1.4 主要仪器

流式细胞仪,美国 B-D 公司;琼脂糖凝胶电泳系统和凝胶成像系统;奥林帕斯显微照相系统。

2 实验方法

2.1 EAC 小鼠模型的建立及分组

收集 EAC 细胞 2.5×10^6 个,注射到建模型用小鼠的腹腔中,8 d 后小鼠产生大量的腹水,将已经产生腹水的小鼠断颈处死,在无菌条件下打开腹腔,用吸管吸取腹水。用生理盐水稀释腹水,台盼蓝染色计数活细胞,调整 EAC 细胞为 1×10^7 个/mL。然后给每只实验小鼠腹腔注射 0.25 mL 即 2.5×10^6 个肿瘤细胞。对照组(CK_0)小鼠注射等量的生理盐水,实验组小鼠随机分组,分别单独注射亚硒酸钠(CK_1 组),甲基硒代半胱氨酸(CK_2 组),长春新碱(CK_3 组),以及亚硒酸钠(Na_2SeO_3) + VCR 联合注射(处理组 1),甲基硒代半胱氨酸 SeMC + VCR 联合注射(处理组 2)。每组 16 只,雌雄各半,动物分组及用药见表 1。6 d 后小鼠开始产生大量的腹水,第 7 天开始用药。

表 1 实验动物用药量

Table 1 Drug and dosages administered to the animals

处 理	药物剂量 / ($\mu\text{g/g}$)
CK_0 (生理盐水)	NS
CK_1 (Na_2SeO_3)	4.0
CK_2 (SeMC)	4.0
CK_3 (VCR)	0.4
处理 1(Na_2SeO_3 + VCR)	2.0 + 0.4
处理 2(SeMC + VCR)	2.0 + 0.4

注: 每 g 体重用量。

2.2 血清超氧化物歧化酶(SOD)、脂质过氧化产物丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)的检测

接种肿瘤第 10 天,每组取 6 只小鼠摘除眼球采血,离心,收集血清,按照试剂盒说明书进行操作。

2.3 流式细胞术检查肿瘤细胞的周期和凋亡

收集接种肿瘤第 10 天小鼠腹腔中的细胞约 10^6 个,用终浓度为 70% (体积分数)的乙醇固定后,置于 4℃ 冰箱过夜。用 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 缓冲液清洗固定的细胞悬液 2 次,1 000 r/min 离心 10 min。在细胞悬液中加入 PI 染色液使之质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 37℃ 作用 30 min。经过 300 目筛,用流式细胞仪检测,测定细胞周期,观察 DNA 合成前期(G_1 期)、DNA 合成后期(G_2 期)、DNA 合成期(S 期)各期细胞所占的比例,并观察是否存在凋亡

细胞并测定其含量。

2.4 DNA 梯检测

酚/氯仿法抽提细胞总 DNA,取 10 μ L DNA 于 1g/100 mL 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察并拍照。

3 结果与分析

3.1 接种 EAC 小鼠的生存周期

对接种 EAC 小鼠的生存周期进行记录并比较(表 2)。实验结果显示小鼠腹腔接种 2.5×10^6 个 EAC 细胞后的平均生存周期为 13 d,平均第 7 天开

始产生大量的腹水,均为淡黄色内含大量瘤细胞的腹水(有时浑浊或者清亮),第 10 天后开始出现血性腹水(此时称为荷瘤小鼠)。每 g 体重腹腔注射 4 μ g Na_2SeO_3 药物的荷瘤小鼠的平均生存周期较对照组减少,并且 $\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{VCR}$ 组的荷瘤小鼠与对照组比较也没有明显的差异,但是 SeMC 组和 SeMC + VCR 组的生存期与对照组比较具有明显差异,表明均能延长荷瘤小鼠的生存周期,其中腹腔注射 SeMC + VCR 组荷瘤小鼠的生存周期与对照组比较差异极显著,说明 SeMC、VCR 以及它们联合使用均有延长荷瘤小鼠的生存周期的作用。

表 2 荷瘤小鼠生存周期的比较

Table 2 Survival time of tumor-bearing mice

处 理	生存期/d	处 理	生存期/d
CK ₀ (生理盐水)	13.00 \pm 1.30	CK ₃ (VCR)	15.25 \pm 1.92 [*]
CK ₁ (Na_2SeO_3)	11.62 \pm 1.77	处理组 1 ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{VCR}$)	15.38 \pm 4.17
CK ₂ (SeMC)	14.62 \pm 2.00 [*]	处理组 2 (SeMC + VCR)	16.50 \pm 2.18 ^{**}

注: *与对照组比较差异显著 $P < 0.05$, **与对照组比较差异极显著 $P < 0.01$ ($\pm S$, $n = 10$);下同。

3.2 小鼠血清中 SOD、MDA、GSH 含量的测定

对各组小鼠血清中 SOD、MDA、GSH 的含量进行检测。测定结果(表 3)表明,小鼠的血清 SOD 含量在使用含有硒的药物 Na_2SeO_3 和 SeMC 后均有显著升高。VCR 与 SeMC 合用时, SOD 值较对照组

有显著差异,血清中 MDA 含量较对照组极显著的下降。在实验中对对照组小鼠的血清 GSH 含量最低,而其他用药各组较对照组均有不同程度的升高,其中 SeMC 和 VCR 与 SeMC 合用时升高幅度最大。

表 3 各组小鼠血清 SOD、MDA、GSH 含量的变化

Table 3 Content of SOD, MDA and GSH in mice blood plasma

处 理	SOD 活性浓度/(U/mL)	MDA 浓度/(nmol/mL)	GSH 质量浓度/(mg/L)
CK ₀ (生理盐水)	144.04 \pm 7.53	8.80 \pm 0.40	18.72 \pm 4.77
CK ₁ (Na_2SeO_3)	177.00 \pm 16.11 [*]	6.90 \pm 0.50 [*]	30.05 \pm 2.52 [*]
CK ₂ (SeMC)	172.74 \pm 12.96 [*]	7.16 \pm 0.23 [*]	43.39 \pm 6.14 ^{**}
CK ₃ (VCR)	157.12 \pm 7.16	7.45 \pm 0.35	28.10 \pm 2.15
处理组 1 ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{VCR}$)	146.88 \pm 14.13	7.03 \pm 0.92 [*]	27.24 \pm 3.83
处理组 2 (SeMC + VCR)	168.47 \pm 16.24 [*]	6.40 \pm 0.50 ^{**}	34.87 \pm 4.87 [*]

3.3 EAC 肿瘤细胞凋亡率的检测

使用流式细胞术对 EAC 肿瘤细胞凋亡率的检查结果见表 4。在实验中利用不同的药物和药物组合,发现它们对小鼠腹腔 EAC 肿瘤细胞具有明显的作用。该实验使用的药物将小鼠腹腔 EAC 细胞抑制在 G₁ 期,其中以高剂量 4 μ g/g 的 SeMC 对 G₁ 期

的扣留作用最为明显,另外 Na_2SeO_3 和 SeMC 与 VCR 的联合使用对 EAC 细胞的 G₁ 扣留作用也非常明显分别达到 81.02% 和 84.62%,较单独使用 VCR 的 74.05% 的扣留作用强。VCR 能明显引起 EAC 细胞的凋亡,但是与 Na_2SeO_3 和 SeMC 联合使用时其作用更强。

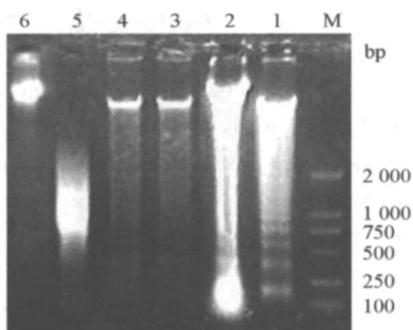
表4 EAC肿瘤细胞凋亡率

Table 4 Percentage of apoptotic cell death

处 理	G ₁ 期 (DNA 合成前期)	S 期 (DNA 合成期)	G ₂ 期 (DNA 合成后期)	apoptosis (细胞凋亡期)
CK ₀ (生理盐水)	46.48	40.55	12.97	0.38
CK ₁ (Na ₂ SeO ₃)	64.96	23.48	11.56	4.80
CK ₂ (SeMC)	91.05	4.42	4.52	2.11
CK ₃ (VCR)	74.05	17.04	8.91	8.36
处理组 1 (Na ₂ SeO ₃ + VCR)	81.02	16.78	3.90	9.80
处理组 2 (SeMC + VCR)	84.62	8.60	6.78	15.12

3.4 各组 EAC 肿瘤细胞凋亡的 DNA 梯

由图 1 可见,泳道 1 形成了明显的 DNA 梯;泳道 2 几乎看不到梯状条带,主要是拖尾较长的条带;3,4 虽有 DNA 梯形成,但不如 1 明显;泳道 5 和 6 没有 DNA 梯形成。可见 SeMC + VCR 联合使用时能引起 EAC 细胞的凋亡和坏死;Na₂SeO₃ 主要引起 EAC 细胞的坏死(2 和 5 泳道均可看出);对照组的肿瘤细胞生长旺盛,没有凋亡带和坏死而形成的 DNA 碎片。



M 为 Marker;1 为处理 2 组 (SeMC + VCR);2 为处理 1 组 (Na₂SeO₃ + VCR);3 为 CK₃ (VCR);4 为 CK₂ (SeMC);5 为 CK₁ (Na₂SeO₃);6 为 CK₀ (生理盐水)。

图 1 药物对小鼠 EAC 腹水癌产生的 DNA 片段化的影响

Fig. 1 Induction of DNA Ladder in EAC from mice treated with Se and VCR

4 讨 论

1) 艾氏腹水癌细胞株 (Ehrlich ascites carcinoma, EAC) 起源于 1932 年,由 Ehrlich 氏癌(自发性乳腺癌)生理盐水悬液注入小鼠腹腔内而成,1956 年引进我国,一般采用 KM 小鼠腹腔传代保存,广泛应用于肿瘤治疗药物的筛选及肿瘤机理研究^[6]。小鼠 EAC 模型的建立过程中,多数研究者^[7-8]对于 EAC 肿瘤细胞的接种数量每只小鼠在 1×10^6 个以

下,本实验中是腹腔接种 2.5×10^6 个/只,使小鼠肿瘤发生以及生长的日期一致性更强,加快了死亡周期,对于药物的敏感性更强,减少小鼠个体间的差异,一致性更高。在本实验中,腹腔接种 EAC 7 d 后,所有小鼠开始产生腹水,腹部开始膨大。腹水产生速度很快,到第 8 天腹腔内便充满淡黄色清亮的腹水。对照组的小鼠第 10 天腹水中开始出现血液,其他用药的各组分别在最后的几天内出现。小鼠的死亡时间多数集中在 13 ~ 16 d 之间,较资料报道的^[7-8]死亡周期 20 d 左右明显缩短。

2) $4 \mu\text{g/g}$ 剂量的 Na₂SeO₃ 和 SeMC 单独作用于 ICR 小鼠腹腔艾氏腹水癌时,小鼠的生存周期没有明显的延长,甚至不如对照组。但是它们能有效的抑制肿瘤细胞的增殖,使 G₁ 期细胞比率升高,并且血清中的抗氧化指标 SOD、GSH 和 MDA 得到提高。在硒的抗癌实验中,通过实验动物模型显示^[9],补硒可以减少正常细胞的 DNA 损伤程度,并且同时增加肿瘤细胞的凋亡。有实验表明^[10],荷瘤小鼠服用含硒化合物后血清组织中的 GSH、SOD 明显高于对照组,而氧化脂质产物 MDA 明显低于对照组,小鼠服硒后,体内 GSH-Px、SOD 活性增加,清除氧自由基及过氧化能力加强,促进了肿瘤细胞的分化,抑制其分裂,保护生物膜不受损伤,防止 DNA 突变,从而达到抑癌效果。在本实验中也得到了类似的结果,除了 Na₂SeO₃ 组的小鼠生存期降低外,其他各组使用 SeMC 和 VCR 药物的小鼠生存期均明显延长。

3) 由于腹腔接种了恶性的 EAC 肿瘤,小鼠在产生腹水后机体的健康水平迅速下降,并出现恶病质状态。使用了抗癌药物 VCR 和含硒化合物后,肿瘤细胞的生长受到抑制,并且机体的健康状态得到改善。尤其是 $2 \mu\text{g/g}$ SeMC 和 $0.4 \mu\text{g/g}$ VCR 联用,

可以明显的升高血清中 SOD 和 GSH 的含量,降低 MDA 的水平,表明机体的抗氧化性损伤的水平升高。并且肿瘤细胞凋亡率升高,小鼠生存期延长,说明 SeMC 与 VCR 在抗 EAC 肿瘤方面具有良好的协同作用。VCR 的抗肿瘤机制主要是其与细胞微管蛋白结合,从而使中期细胞分裂停止,导致细胞有丝分裂的停止,进而发生细胞凋亡或者死亡。在对硒化合物抗癌活性的研究中,一些研究表明^[12-13],甲基硒酸及硒氧化谷胱甘肽等硒化合物可介导人及动物模型中肿瘤细胞的凋亡,因此提出硒抗肿瘤及抗肿瘤扩散的特性可能是由其介导细胞凋亡所致。本实验中证实硒化合物与 VCR 联合用药能够增强抗肿瘤效果,有一定的协同作用,并且硒化合物还可以降低 VCR 的细胞毒性。笔者的实验结果提示某些含硒化合物可能降低化疗药物的副作用,增强化疗药物促肿瘤细胞凋亡活性,这是肿瘤治疗中的重要研究方向之一。

参 考 文 献

- [1] Clark L C, Combs G F Jr, Turnbull B W, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group[J]. JAMA, 1996, 276: 1957-1963
- [2] Fernandez-Banares F, Cabre E, Esteve M, et al. Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97 (8): 2103-2108
- [3] Jastrzebski Z, Czyzewska-Szafran H, Remisyewska M, et al. Pharmacokinetics of selol, a new agent containing selenium in rat[J]. Drugs Exptl Clin Res, 1997, 23(1): 7-11
- [4] Uckun F M, Morar S, Qazi S. Vinorelbine-based salvage chemotherapy for therapy-refractory aggressive leukaemias[J]. Brit J Haematol, 2006, 135(4): 500-508
- [5] Bloomfield C D, Mrozek K, Caligiuri M A. Cancer and leukemia group B leukemia correlative science committee: major accomplishments and future directions [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12, 3564-3571
- [6] 郭鹞. 人类疾病的动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982
- [7] 张红艳,徐增年,王秀芳,等. 艾氏腹水癌克隆细胞株 E2G8 建立小鼠动物模型生物学特性研究[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(2): 96-100
- [8] 李文钧,马张英,彭小英,等. 脱氧氟尿苷制剂对小鼠移植性肿瘤的抑制作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2004, 21(4): 271-274
- [9] Waters D J, Shen S, Cooley D M, et al. Effect of dietary Se supplementation on DNA damage and apoptosis in canine prostate[J]. J Natl Cancer, 2003, 95: 237-241
- [10] Sards S. The role of antioxidants in cancer prevention and treatment[J]. Indoor Built Environ, 2003, 12: 6, 401-404
- [11] Lopez-Varela S, Gonzalez-Gross M, Marcos A, et al. Functional foods and the immune system: a review[J]. Eur J Clin Nutr, 2002, 56: Supplement 3, 29-33
- [12] Jiang Cheng, Kim K H, Wang Zaisen, et al. Methyl selenium-induced vascular endothelial apoptosis is executed by caspases and principally mediated by p38 MAPK pathway[J]. Nutr Cancer, 2004, 49(2): 174-183
- [13] Fleming J, Ghose A, Harriso P R. Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds[J]. Nutr Cancer, 2001, 40(1): 42-49