

硒-甲基硒代半胱氨酸抑制原发性肝癌大鼠肿瘤血管生成的作用及机制

邓银芝¹, 丁俊², 张家耀², 张勇², 李锦貌², 樊斌² (1.恩施土家族苗族自治州中心医院 消化内科, 湖北 恩施 445000; 2.恩施土家族苗族自治州中心医院 肝胆外科, 湖北 恩施 445000)

摘要: 目的 探讨硒-甲基硒代半胱氨酸(Se-methyl selenocysteine, MSC)抑制原发性肝癌大鼠肿瘤血管生成的作用及机制。方法 选取重庆医科大学实验动物中心提供的清洁级SD大鼠120只, 采用随机数字表法分成4组, 分别为对照组(30只)、MSC低剂量组(30只)、MSC中剂量组(30只)和MSC高剂量组(30)只, 采用小剂量间断DNE法制备原发性肝癌大鼠模型, MSC低、中、高剂量组大鼠分别使用12.5 mmol/L、50 mmol/L和200 mmol/L MSC灌胃, 给药剂量为5 ml/kg, 对照组使用等剂量生理盐水灌胃, 每周5次, 共进行6周。采用全自动生化分析仪检测血清AST和ALT水平, 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)水平, 观察大鼠肝脏病理状态, 采用免疫组织化学法检测大鼠微血管密度(microvascular density, MVD)与组织内VEGF、HIF- α 的表达。结果 MSC低剂量组AST水平最高, 对照组ALT水平最高, 组间大鼠血清AST、ALT水平差异有统计学意义(F 值分别为13.057、12.991, P 值分别为0.015, 0.023)。对照组大鼠HIF-1 α 、VEGF及MVD水平最高, 组间差异有统计学意义(F 值分别为13.054、12.973、13.068, P 值分别为0.029、0.014、0.032)。MSC中、高剂量组大鼠肝组织内VEGF、HIF-1 α 表达强度显著低于对照组(χ^2 值分别为13.521、14.205, P 值分别为0.042、0.033)。结论 MSC可有效抑制原发性肝癌大鼠模型瘤体中新生血管的生成, 其机制与MSC抑制癌组织内HIF-1 α 和VEGF的表达有关。

关键词: 肝癌, 原发性; 硒-甲基硒代半胱氨酸; 新生血管; 大鼠

Inhibitory effects and mechanisms of Se-methyl selenocysteine on angiogenesis of rats with primary liver cancer

DENG Yin-zhi¹, DING Jun², ZHANG Jia-yao², ZHANG Yong², LI Jin-mao², FAN Bin² (1.Department of Gastroenterology, The Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China; 2.Department of Hepatobiliary Surgery, The Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects and mechanisms of selenium-methylselenocysteine (MSC) on angiogenesis of rats with primary liver cancer. **Methods** Total of 120 clean SD rats were selected from Experimental Animal Center of Chongqing Medical University and divided into control group (30 rats), MSC low-dose group (30 rats), MSC medium-dose group (30 rats) and MSC high-dose group (30 rats) according to the random number table method. The rat model of hepatocellular carcinoma was established by low-dose intermittent DNE method. Rats in low, middle and high doses group of MSC were administrated with 12.5 mmol/L, 50 mmol/L and 200 mmol/L, the dosage was 5 ml/kg. The rats in the control group were given equal dosage of normal saline, 5 times a week for 6 weeks. The levels of serum AST and ALT were detected by automatic biochemical analyzer and the serum levels of VEGF and HIF-1 α were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes of liver tissues were observed. The expression of VEGF and HIF- α in MVD and the tissues were detected by immunohistochemistry. **Results** The serum levels of AST in the low-dose MSC group was the highest and the serum levels of ALT in the control

group was the highest. There were statistically significant differences in serum AST and ALT levels among the four groups ($F = 13.057, 12.991; P = 0.015, 0.023$). The levels of HIF-1 α , VEGF, and MVD of rats in control group were the highest and had statistically significant differences among the four groups ($F = 13.054, 12.973, 13.068; P = 0.029, 0.014, 0.032$). The expression of VEGF and HIF-1 α in liver tissue of middle and high dose groups of MSCs were significantly lower than those of the control group ($\chi^2 = 13.521, 14.205; P = 0.042, 0.033$).

Conclusion MSC can effectively inhibit the neovascularization in rats with primary liver cancer, and the mechanism may be related to the inhibition of HIF-1 α and VEGF expression in primary liver cancer by MSC.

Key words: Liver cancer, primary; Selenium-methylseleno-cysteine; Neovascularization; Rats

原发性肝癌是临床常见疾病,其发病隐匿、病情进展快、易出现转移且预后较差,病死率较高。原发性肝癌患者首选疗法为手术切除,但目前手术切除率较低,手术后易复发,远期治疗效果不理想^[1,2]。复发转移是原发性肝癌患者远期疗效不佳的主要因素,原发性肝癌的转移主要为血行播散,血管生成可为癌细胞发生浸润转移提供病理基础,与肿瘤的发病和进展密切相关,因此抗血管生成治疗也逐步成为研究重点。硒-甲基硒代半胱氨酸(Selenium-methylselenocysteine, MSC)是硒代半胱氨酸甲基化的衍生物,是天然有机类硒化物,其作用包括抗衰老、补硒、治疗心脑血管病及抗氧化等。相关研究显示, MSC对于前列腺癌、乳腺癌及胃癌等都有诱导凋亡和抑制增殖的作用^[3,4]。因此,本文通过分析MSC对原发性肝癌肿瘤血管生成抑制作用及相关机制,以期临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 实验动物 选取清洁级SD大鼠120只,雌雄各60只,6周龄,平均体重(190.17 ± 15.26) g,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号为SCXK(渝):2017-0153。适应性喂养1周后开始实验,喂养条件:笼具均经高温灭菌,以清洁柔软干燥木屑为垫料,室内环境清洁,温度20~26℃,湿度40%~60%,通风、采光良好,自由饮食、饮水。

1.2 主要仪器试剂 试剂:二乙基亚硝胺(DEN,日本化成公司),兔抗鼠HIF-1 α 抗体(美国Bioss公司),血管内皮生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)试剂盒(美国Sigma公司),兔抗鼠VEGF抗体(美国Bioss公司),DAB显色试剂盒(美国Sigma公司生产),二抗试剂盒(美国Zymed公司)。仪器:微量式移液器(型号:PIPETTOR,大龙医疗设备公司),全自动酶标仪(型号:BioTek ELX800,美国宝特公司),高速台式离心机(型号:TGL-16B,上海安亭科学仪器厂),普通光学显微镜(型号:ECLIPSE551,

日本尼康公司),包埋机、烤片机(型号:YB-7LF、YT-7FB,孝感亚光医用电子公司)。

1.3 实验方法 依据随机数字表法将大鼠分为4组,分别为对照组(30只)、MSC低剂量组(30只)、MSC中剂量组(30只)和MSC高剂量组(30只),每组雌雄各半。采用小剂量间断DNE法制备原发性肝癌大鼠模型,使用0.2% DEN灌胃,给药剂量为10 mg/kg,每只大鼠每天1.5~2 ml,每周灌胃15次,共进行14周。MSC低、中、高剂量组大鼠分别使用12.5 mmol/L、50 mmol/L和200 mmol/L MSC灌胃^[5],给药剂量为5 ml/kg,对照组使用等剂量生理盐水灌胃,每周灌胃5次,共进行6周,大鼠灌胃时在正常室温下均由同组研究人员在同一时间内进行。末次给药后腹腔内注入10%水合氯醛麻醉大鼠,剪开腹腔,暴露腹主动脉,取血5 ml,3000 rpm离心15分钟(离心半径为15 cm),取上清液保存;摘取大鼠肝脏,置入4%多聚甲醛固定液备用^[6,7]。

1.4 观察指标 采用全自动生化分析仪检测血清AST和ALT水平,酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清VEGF和HIF-1 α 水平。将大鼠肝组织标本脱水、透明后使用石蜡包埋,连续切片,厚度为4~6 mm,行HE染色后观察大鼠肝组织形态。采用免疫组织化学法[链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(streptavidin-peroxidase, SP)法染色]检测大鼠微血管密度(microvascular density, MVD)与组织内VEGF和HIF-1 α 表达状况,VEGF和HIF-1 α 阳性计数使用二级计分方法,即一个视野内计数细胞100个,每个切片选取5个视野,阳性细胞数量高于75%计4分,50%~75%计3分,25%~49%计2分,5%~24%计1分,低于5%计0分;染色强度方面,棕褐色为3分,棕黄色为2分,淡黄色为1分,相加之后强阳性(+++)为6~7分,中度阳性(++)为4~5分,弱阳性(+)为2~3分,阴性(-)为0~1分,MVD计数依据Weidner法^[8-10]。

1.5 统计学处理 使用SPSS19.0统计软件进行数据分

析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和独立样本 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 等级资料多样本对比采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏形态和肝功能 对照组大鼠肝脏表层较粗糙, 可见较多灰白色且大小不一的癌结节, 肝小叶结构有损害, 增生结节部位癌细胞胞核变大, 异型性显著, 核质所占比例增多, 核分裂相多, 核仁增多但不显著, 细胞呈松散紊乱状排列; MSC低剂量组大鼠和对照组差异较小, MSC中、高剂量组大鼠肝脏表层较光滑, 癌结节较少, 癌细胞异型性较低且分化程度高, 见图1。MSC低剂量组AST水平最高, 对照组ALT水平最高, 组间大鼠血清AST、

ALT水平差异有统计学意义(F 值分别为13.057、12.991, P 值分别为0.015, 0.023), 见表1。

2.2 各组大鼠血清VEGF、HIF-1 α 含量及MVD 对照组大鼠HIF-1 α 、VEGF及MVD水平最高, 组间差异有统计学意义(F 值分别为13.054、12.973、13.068, P 值分别为0.029、0.014、0.032)。

2.3 各组大鼠原发性肝癌组织内VEGF、HIF-1 α 表达 MSC中、高剂量组大鼠肝组织内VEGF、HIF-1 α 表达强度显著低于对照组, 差异有统计学意义(χ^2 值分别为13.521、14.205, P 值分别为0.042、0.033)见表3。

3 讨论

硒是大脑中的一种重要微量元素, 大脑中硒含量较低时会有限摄取硒, 适当补硒有益健康。硒的生物利用度与机体营养程度有关, 有机硒的利用度

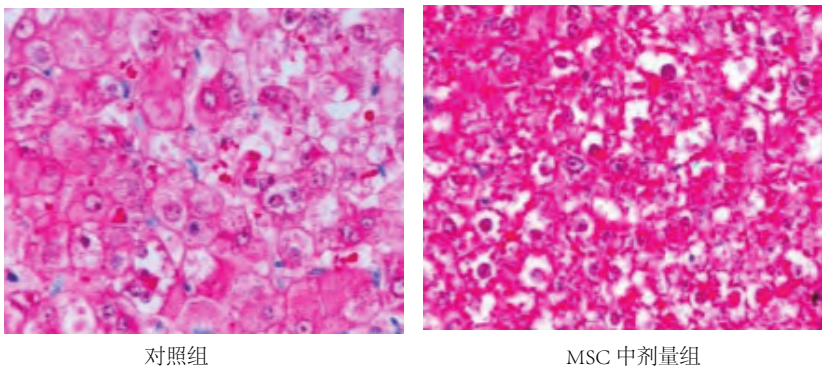


图1 大鼠肝脏病理形态 (HE 染色, $\times 400$)

表1 各组大鼠肝功能对比 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	AST	ALT
对照组 ($n = 30$)	340.18 \pm 42.14	287.13 \pm 35.29
MSC低剂量组 ($n = 30$)	331.61 \pm 40.27	279.16 \pm 34.18
MSC中剂量组 ($n = 30$)	157.13 \pm 40.19 ^a	108.26 \pm 34.19 ^a
MSC高剂量组 ($n = 30$)	160.09 \pm 41.21 ^a	107.25 \pm 34.21 ^a
F 值	13.057	12.991
P 值	0.015	0.023

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠血清 VEGF、HIF-1 α 含量及 MVD 对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α (ng/L)	VEGF (ng/L)	MVD (条/mm ²)
对照组 ($n = 30$)	45.02 \pm 5.37	380.24 \pm 23.61	40.27 \pm 5.17
MSC低剂量组 ($n = 30$)	43.15 \pm 5.10	372.59 \pm 22.54	38.25 \pm 4.98
MSC中剂量组 ($n = 30$)	25.18 \pm 5.09 ^a	260.19 \pm 22.41 ^a	28.13 \pm 4.82 ^a
MSC高剂量组 ($n = 30$)	26.05 \pm 5.84 ^a	257.51 \pm 22.73 ^a	27.05 \pm 4.94 ^a
F 值	13.054	12.973	13.068
P 值	0.029	0.014	0.032

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠肝组织内 VEGF、HIF-1 α 表达对比（例）

组别	HIF-1 α 表达强度				VEGF表达强度			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-
对照组（n=30）	21	9	0	0	23	7	0	0
MSC低剂量组（n=30）	18	10	1	1	20	8	2	0
MSC中剂量组（n=30）	0	13	14	3	2	9	16	3
MSC高剂量组（n=30）	0	13	13	4	3	9	14	4
χ^2 值	14.205				13.521			
P值	0.033				0.042			

较高且生物毒性低，其治疗疾病主要依赖于自身的多种活性。MSC为有机硒化合物，和其他有机硒或无机硒相比，其在抵抗肿瘤方面的效果更好，且毒性也更小^[11]。既往相关研究显示，MSC可抑制多种肿瘤细胞的生长，这可能和其抑制新生血管与诱导细胞凋亡有关^[12-15]。

原发性肝癌是血管含量丰富的肿瘤，在患者病情进展、转移与浸润中新生血管具有重要作用，是原发性肝癌细胞转移的必要条件^[16-19]。患者体内癌组织直径< 2 mm前，一般是向周边组织弥散营养物质和氧气以满足其生长需求，若癌组织直径大于2 mm后，弥散的营养物质与氧已不能满足癌细胞的生成需求，此时则需要新生血管来提供更多营养成分^[20,21]。MVD可准确反映患者体内血管生成程度，是检测肿瘤转移与生长的主要指标。本研究显示，MSC中、高剂量组大鼠癌组织内MVD数值较对照组显著降低，说明MSC对癌组织生成新血管有抑制作用。肿瘤的新生血管受血管生长抑制因子与血管生成诱导因子联合调控，在促血管生成因子中VEGF活性最强，其可结合血管内皮细胞膜内VEGF受体，加速内皮细胞的迁移与增殖，促进生成新血管^[22-24]。本研究中对对照组大鼠癌组织内VEGF高表达，血清内VEGF含量上升，和相关研究一致。MSC中、高剂量组大鼠癌组织内VEGF表达及血清VEGF含量较对照组显著降低，说明MSC可通过抑制VEGF分泌来抑制生成新血管。缺氧条件下会使癌细胞形成的HIF-1 α 降解量下降，稳定性升高，同时由胞浆移动至核内和HIF-1 β 产生二聚体，在转活后可结合下游靶基因内缺氧反应元件，增强VEGF的基因表达与转录活性，促进新生血管生成^[16]。本研究MSC中、高剂量组大鼠癌组织内HIF-1 α 表达及血清内HIF-1 α 含量较对照组显著降低，说明MSC对通过HIF-1 α 的有效表达来抑制新生血管的生成。

综上所述，MSC可有效抑制原发性肝癌大鼠模型瘤体的新生血管，其机制与抑制肝癌组织内HIF-

1 α 和VEGF表达有关，但对于MSC在肝癌治疗中的应用还需进一步研究。

参考文献

- [1] 向琴, 邹金艳, 易三凤, 等. 甲基硒代半胱氨酸上调硒结合蛋白1的表达对胃癌SGC7901细胞增殖的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(15): 2343-2346.
- [2] Klimaszewska M, Górska S, Dawidowski M, et al. Biosynthesis of Se-methyl-seleno-l-cysteine in Basidiomycetes fungus *Lentinula edodes*(Berk.) Pegler[J]. Springerplus, 2016, 5(1): 733-735.
- [3] 陈若蝉, 黄燕, 周蓉蓉, 等. 高迁移率族蛋白B1和糖基化终产物受体与肝癌发生发展的关系[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2011, 3(4): 54-58.
- [4] Dalla Corte CL, Ramos A, Dos Santos CM, et al. Selenium and mercury levels in rat liver slices co-treated with diphenyl diselenide and methylmercury[J]. Biometals, 2016, 29(3): 543-547.
- [5] 袁国海, 黄秋, 邵继红, 等. 硒-甲基硒代半胱氨酸诱导乳腺癌细胞凋亡作用[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(9): 1183-1185.
- [6] He S, Guo X, Tan W, et al. Effect of selenium deficiency on phosphorylation of the AMPK pathway in rats[J]. Biol Trace Elem Res, 2016, 169(2): 254-260.
- [7] 盛玉璐, 黄秋, 邵继红, 等. 硒甲基硒代半胱氨酸对乳腺癌细胞凋亡及Caspase蛋白表达影响的研究[J]. 营养学报, 2015, 37(5): 448-450.
- [8] Tufarelli V, Ceci E, Laudadio V. 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid as new organic selenium dietary supplement to produce selenium-enriched eggs[J]. Biol Trace Elem Res, 2016, 171(2): 453-458.
- [9] 龙烁, 张海军, 武书庚, 等. 胱氨酸类硒源对产蛋鸡蛋品质、抗氧化能力和蛋中硒含量的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(5): 1600-1609.
- [10] 张巍, 钱晟, 朱梁, 等. 稳定表达绿色荧光蛋白肝癌大鼠肿瘤微转移时间窗的筛选[J]. 中国临床医学, 2017, 24(3): 328-333.
- [11] 方敏, 袁静萍, 刘璐璐, 等. 微环境中肿瘤新生血管巨噬细胞和 α 平滑肌动蛋白的表达及其与肝癌患者预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(7): 104-107.
- [12] 闫亚南, 王宁, 王卓昱, 等. 直接灸“肝俞”对原发性肝癌癌前病变大鼠T淋巴细胞亚群的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(4): 321-326.
- [13] 吴鸿峰, 余梁, 胡茂能. 肝动脉门静脉化栓栓塞治疗兔VX2肝癌后残癌新生血管的研究[J]. 安徽医学, 2017, 38(12): 215-218.
- [14] Chakraborty P, Roy SS, Bhattacharya S. Molecular mechanism behind the synergistic activity of diphenylmethyl selenocyanate and cisplatin against murine tumor model[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2015, 15(4): 501-510.

- [15] 李文婷, 周红光, 刘颖, 等. 消癌解毒方对移植性肝癌大鼠免疫功能影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 11(8): 1880-1883.
- [16] 门昌君, 张国梁, 祖彩华, 等. miRNA与小鼠肝癌肝移植模型术后肿瘤复发的相关性及其意义[J]. 中华器官移植杂志, 2016, 37(6): 214-217.
- [17] 谢蒙蒙, 黄秋, 罗雅婕, 等. 硒-甲基硒代半胱氨酸对乳腺癌细胞端粒酶活性和hTERT基因表达的影响[J]. 营养学报, 2014, 36(5): 471-474.
- [18] 袁国海, 黄秋, 邵继红, 等. 硒-甲基硒代半胱氨酸诱导乳腺癌细胞凋亡作用[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(9): 1183-1185.
- [19] 向琴, 邹金艳, 易三凤, 等. 甲基硒代半胱氨酸上调硒结合蛋白1的表达对胃癌SGC7901细胞增殖的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(15): 2343-2346.
- [20] 黄秋. 硒甲基硒代半胱氨酸诱导乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡机制的研究[D]. 徐州: 徐州医学院, 2013.
- [21] 王春阳, 庄小捷, 张增萍, 等. 原发性肝癌患者检测血清同型半胱氨酸的临床意义[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(5): 695-696.
- [22] 王智. 硒-甲基硒代半胱氨酸诱导肝癌SMMC-7721细胞株的凋亡及机制探讨[J]. 江苏医药, 2012, 38(11): 1263-1266.
- [23] 钟明珠, 尧凯, 董培, 等. 硒-甲基硒代半胱氨酸通过缝隙连接蛋白43抑制前列腺癌DU145细胞生长的研究[C]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(12): 2364-2366.
- [24] 谢永丽. 硒甲基硒代半胱氨酸通过调控自噬和线粒体功能干预阿尔茨海默症病理的机制研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2017.

收稿日期: 2018-02-07

邓银芝, 丁俊, 张家耀, 等. 硒-甲基硒代半胱氨酸抑制原发性肝癌大鼠肿瘤血管生成的作用及机制[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018, 10(2): 82-86.

· 编者 · 作者 · 读者 ·

《中国肝脏病杂志(电子版)》视频及幻灯文献引用格式说明

为了更好地发挥医学学术性电子期刊的文献作用, 方便和规范引用电子期刊的视频文献和幻灯文献, 现将文献著录和引用规范试用说明如下。

1. 在制作视频及幻灯文献时体例格式应规范, 片头应有片名、著作者姓名及单位, 片尾应有责任编辑、制作者、出版者及其单位。

2. 视频和幻灯文献引用格式标注在视频或幻灯文献播放窗口下方, 方便读者引用。视频或幻灯文献著录格式: 周祥福. 截石位经皮肾镜取石术及经尿道前列腺电切术[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志: 电子版, 2010, 4(1).

3. 视频和幻灯文献科学引用相关文献。①视频文献: 在正片结束后(即制作者及出版者署名前)列出本片的所有引用文献, 引用文献按在视频中出现的先后顺序编码著录。②幻灯文献: 作者引用的文献须随幻灯同页面标注, 标注在当前页面最下方, 格式: [1] 刘志华, 周祥福. 输尿管下段结石的治疗进展[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志: 电子版, 2010, 4(1): 76-78. 引用文献按在幻灯片中出现的先后顺序编码著录, 并在幻灯课件最后再次按顺序列出所有引用文献。③文献引用具体格式依据“GB/T 7714-2005文后参考文献著录规则”(即同文本文章的文献著录格式)。

本刊编辑部