

# 亚硒酸钠对人胃腺癌细胞生长 和超微结构的影响<sup>①</sup>

吴 乔 李祺福 汪德耀

(细胞生物学研究室)

**摘要** MGc80-3 细胞经  $3 \times 10^{-6}$  mol/l 亚硒酸钠处理后,细胞生长曲线与分裂指数显著下降,倍增时间延长,生长抑制率达 64.8%。<sup>3</sup>H-TdR 放射自显影观察表明标记指数从 44.4% 下降至 7.1%,核内几乎见不到银粒,显示胃癌细胞 DNA 合成得到有效抑制。电镜下可见亚硒酸钠处理的细胞,核质比例下降,核形规则,核仁体积缩小,数量减少,核内异染色质减少,常染色质增多,细胞质内高尔基复合体发达,线粒体结构典型,粗糙型内质网丰富,细胞表面微绒毛减少等显著变化。结果证实亚硒酸钠能改变 MGc80-3 细胞的恶性表型特征,具有诱导胃癌细胞分化的显著作用。

**关键词** MGc80-3 细胞,亚硒酸钠,诱导分化

许多研究证实硒能抑制癌的发生和发展,对癌细胞的生长具有良好的抑制作用<sup>[1]</sup>,认为硒是一种天然的抗致癌和抗肿瘤的微量元素<sup>[2]</sup>。现有文献在硒对癌细胞的作用上存在着不同看法,一些研究认为硒的抑癌作用是由于硒对癌细胞的直接接触杀伤所致<sup>[3]</sup>,另一些研究则指出,硒通过抑制癌细胞能量代谢,生物大分子合成等而抑制细胞增殖<sup>[4]</sup>。本工作通过研究亚硒酸钠对人胃腺癌 MGc80-3 细胞增殖与超微结构变化的效应,探讨其对癌细胞的作用,为硒在癌症防治的应用进一步提供资料。

## 1 材料和方法

**细胞培养和药物处理** MGc80-3 细胞接种在含有适量的灭活小牛血清,青、链霉素和卡那霉素的 RPM I-1640 培养液中,灌入 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养 24 h,实验组换上含  $3 \times 10^{-6}$  mol/l 亚硒酸钠新培液,对照组换上不含亚硒酸钠新培液,连续培养 8 d 供实验所用。

**生长曲线和分裂指数的测定** MGc80-3 细胞制成  $5 \times 10^4$  细胞/ml 的细胞悬液,分别以 2 ml/瓶和 1 ml/瓶的接种量接种于小培养瓶和带玻片条的小青霉素瓶中,24 h 后药物处理。加药后 1-7 d 逐日取实验组和对照组各三瓶细胞,用台盼蓝排除法计数活细胞,作图得细胞生长曲线。实验组和对照组的玻片条经 Bouin-Hollande 液固定, H. E 染色后,计算 1 000 个细胞中的分裂细胞数,作图得细胞分裂指数图。

**扫描电镜样品制备** 培养于玻片条上的实验组细胞和对照组 MGc80-3 细胞分别用戊二醛(2.5%, 2 h), 锇酸(1%, 1 h) 双固定,乙醇系列脱水,入醋酸异戊酯,经临界点干燥,真空喷镀金膜后于日立 S-520 扫描电镜下观察。

① 本文 1991-07-03 收到

**透射电镜样品制备** 橡皮刮刀推下实验组细胞和对照组 MGc80-3 细胞,离心(2 000 r/min)10 min,所得细胞团分别用戊二醛(2.5%, 2 h)、锇酸(1%, 1 h)双固定,乙醇系列脱水,环氧树脂 618# 包埋,超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色后,于 JEM-100CX 透射电镜下观察。

**<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶脱氧核苷(<sup>3</sup>H-TdR)放射自显影样品制备** a. 光镜放射自显影样品制备 培养于玻片条上的实验组细胞和对照组 MGc80-3 细胞分别换上含  $14.8 \times 10^4$  Bq 的 <sup>3</sup>H-TdR 新培养液,37 ℃ 标记 1 h,取出后 Carnoy 液固定 1 h,国产核 4 乳胶涂片,置暗盒于 4 ℃ 曝光 23 d,D-19 显影液显影,酸性定影液定影,H. E 染色。b. 电镜放射自显影样品制备 实验组细胞和对照组 MGc80-3 细胞按上述方法进行 <sup>3</sup>H-TdR 标记,制成的细胞团包埋同上,超薄切片喷镀碳膜后,国产 HW-4 乳胶涂片,置暗盒于 4 ℃ 曝光 60 d,Microdo-X 显影液显影,酸性定影液定影。

## 2 实验结果

### 2.1 亚硒酸钠对 MGc80-3 细胞增殖的影响

MGc80-3 细胞经  $1 \times 10^{-6}$  mol/l,  $3 \times 10^{-6}$  mol/l,  $4 \times 10^{-6}$  mol/l 亚硒酸钠处理后,细胞生长受到明显抑制,表现在细胞生长速度明显下降,群体倍增时间延长,生长抑制率在一定范围内随亚硒酸钠浓度的增加而提高(Fig1),显示亚硒酸钠能有效抑制 MGc80-3 细胞的增殖活动。根据实验结果,我们选用  $3 \times 10^{-6}$  mol/l 亚硒酸钠作为最佳浓度处理细胞,在此浓度下细胞可传代但生长缓慢,并表现类似正常上皮细胞的形态特点。

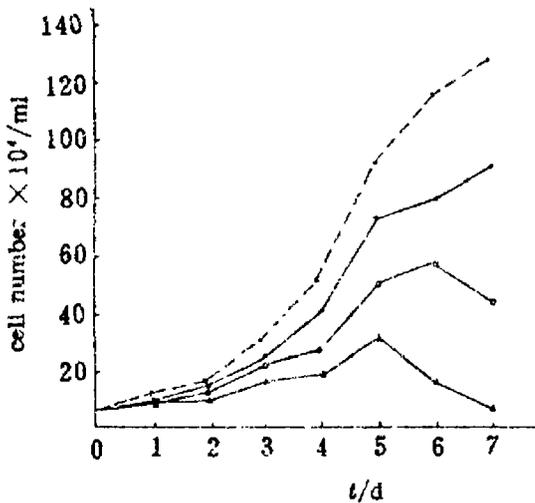


Fig. 1 Effect of sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) on the growth curve of MGc80-3 cells, ---MGc80-3 cell, ●—●  $1 \times 10^{-6}$  mol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  treatment, ○—○  $3 \times 10^{-6}$  mol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  treatment, ▲—▲  $4 \times 10^{-6}$  mol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  treatment.

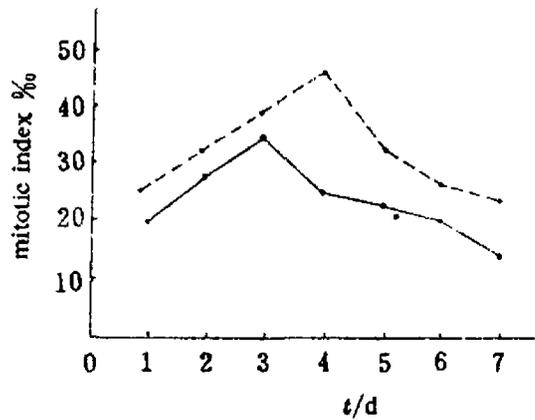


Fig. 2 Effect of sodium selenite on the mitotic index of MGc80-3 cells, ---MGc80-3 cell, ●—●  $3 \times 10^{-6}$  mol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  treatment.

细胞分裂指数测定结果(Fig2)显示, MGc80-3 细胞分裂能力强,增殖旺盛,接种后第 4 d 分裂达到最高峰(分裂指数为 44%),经亚硒酸钠处理的细胞,分裂指数的变化趋势虽相似于对照组,但分裂指数值始终低于对照组,分裂最高峰出现在接种后的第 3 d(分裂指数为 35%),比对照组低 1.29 倍,差异显著。

## 2.2 亚硒酸钠对 MGc80-3 细胞超微结构变化的影响

扫描电镜观察显示 MGc80-3 细胞表面微绒毛丰富,边缘有许多细而长的丝状伪足向四周伸出(Fig. 3). 亚硒酸钠处理的细胞表面微绒毛显著减少甚至消失,出现许多小泡状突起及皱痕状结构,边缘丝状伪足消失(Fig. 4). 透射电镜观察结果是 MGc80-3 细胞核大,细胞质少,核质比值大,核形态不规则,有畸形现象,核内异染色质较多,呈小团块聚集于核膜内侧,核仁数量较多,体积较大,其内有较多的核仁丝和核仁小泡(Fig. 6). 亚硒酸钠处理的细胞体积明显增大,核质比值下降,核形态较规则,畸形现象基本消失,核内异染色质减少,常染色质增多并均匀分布,核仁数量减少,体积缩小,核仁丝和核仁小泡减少,呈较致密均匀状(Fig. 9). MGc80-3 细胞质中粗糙型内质网较少,内质网腔扩张,其上所附的核糖体较为稀疏,而细胞质中多聚核糖体较多. 高尔基复合体不发达,高尔基囊数目较少,排列不规则、极性不明显,常见囊腔膨大,高尔基小泡和液泡较少. 线粒体较少,大小不一,大多数线粒体肿胀变圆,其内嵴少且短,排列紊乱,基质电子密度较低,有的线粒体甚至因嵴断裂破碎而出现空泡化现象(Fig. 5). 亚硒酸钠处理的细胞内出现丰富的内质网,呈细长状,平行排列,内质网腔扩张消失,附在其上的核糖体明显增多,细胞质中多聚核糖体减少,游离核糖体增多(Fig. 9),高尔基复合体较发达,高尔基囊数目增多,排列规则,极性明显,高尔基小泡和液泡增多(Fig. 10),线粒体较多,多呈短棒状,嵴明显增多,排列方向较一致,基质电子密度较高,线粒体空泡化现象基本消失(Fig. 11).

## 2.3 亚硒酸钠对 MGc80-3 细胞 DNA 合成变化的影响

$^3\text{H-TdR}$  放射自显影标记结果显示, MGc80-3 细胞中被标记的细胞很多,标记指数为 44.4%,银粒主要分布于细胞核,核仁中未见银粒,细胞质内只见几个(Fig. 7). 亚硒酸钠处理后被标记的细胞则显著减少,标记指数下降至 7.1%,比对照组减少 6.25 倍,核内几乎见不到银粒,核膜边缘偶尔见到,细胞质中也有几个银粒(Fig. 8).

## 3 讨论

本实验结果显示,亚硒酸钠处理的胃癌细胞,生长曲线和分裂指数明显下降,生长抑制率在一定范围内随亚硒酸钠浓度的增加而上升,表明亚硒酸钠能有效抑制胃癌细胞恶性增殖,所得结果与前人应用亚硒酸钠对其它类型癌细胞的生长抑制效应相同<sup>[5]</sup>. 在  $3 \times 10^{-6}$  mol/l 亚硒酸钠处理下,实验组细胞生长良好,未见细胞脱落或自溶现象,说明此浓度的亚硒酸钠对胃癌细胞并不产生毒性作用,而是抑制其增殖活动,并主要在于有效抑制胃癌细胞的 DNA 合成.  $^3\text{H-TdR}$  放射自显影结果显示 MGc80-3 细胞中银粒较多地集中于核内,标记指数为 44.4%,表明胃癌细胞 DNA 合成旺盛,经亚硒酸钠处理的细胞,标记指数下降为 7.1%,核内几乎见不到银粒,充分表明胃癌细胞的 DNA 合成已受到有效抑制. 前人工作认为硒可以抑制 DNA 的合成<sup>[6]</sup>,本实验结果与此一致. 因此认为亚硒酸钠通过抑制细胞的 DNA 合成,使细胞增殖速率减慢,并能诱导其向正常细胞方向分化,这对胃癌细胞恶性表型逆转十分重要.

前人已证明经诱导分化处理的癌细胞,其超微结构随之发生了变化<sup>[7]</sup>,这表明细胞超微结构变化是癌细胞分化的一个重要特征. 本工作的电镜观察结果表明, MGc80-3 细胞具有核质比例大,核形不规则,核内异染色质多,核仁体积大,细胞质内线粒体少,嵴断裂,高尔基复合体不发达,粗糙型内质网数量少,细胞表面微绒毛丰富等一系列特点,表现了癌细胞典型的超微结构恶性特征. 但亚硒酸钠处理后,细胞超微结构则出现十分明显的变化:核质比例下降,核形规

则,核内异染色质减少,常染色质增多,核仁体积缩小.细胞质内线粒体结构典型,嵴增多,高尔基复合体发达,粗糙型内质网丰富,细胞表面微绒毛减少等.由此表明用亚硒酸钠处理的 MGc80-3 细胞已失去它原有的超微结构恶性特征,并且这一系列变化与人正常胃粘膜原代培养细胞的超微结构特征(未发表资料)基本相同,充分证明了亚硒酸钠具有促使 MGc80-3 细胞恶性表型逆转的作用.

细胞超微结构变化是细胞代谢与功能活动的基础.癌细胞核质比例高,核仁较大,数量较多,核仁丝与核仁小泡增多,是蛋白质合成机能旺盛的形态表现,也是低分化细胞的特征之一<sup>[9]</sup>,因此 MGc80-3 细胞所出现的上述形态特征正是与其旺盛地合成蛋白质以满足细胞不断分裂增殖的功能活动相适应,这与细胞质内粗糙型内质网减少和多聚核糖体增多所反映出蛋白质合成代谢旺盛的现象也是一致的.亚硒酸钠处理后细胞核质比例下降,核仁体积缩小,数量减少,核仁丝与核仁小泡减少等变化,不仅显示了亚硒酸钠具有诱导胃癌细胞超微结构恶性特征向正常细胞方向逆转的作用,同时也表明亚硒酸钠诱导的细胞核机能状态的改变是导致胃癌细胞蛋白质合成机能减弱而抑制细胞增殖的一个重要原因.处理后细胞质中粗糙型内质网增多,多聚核糖体减少和游离核糖体增多的变化也正是细胞合成与增殖相关的蛋白质机能的减弱和正常分泌功能得到一定程度恢复的有力印证.异染色质多少不仅是细胞癌变的重要现象,而且也作为衡量细胞分化程度的重要特征<sup>[9]</sup>.亚硒酸钠处理后核中异染色质减少,常染色质增多的结果,与丛笑倩、姚鑫等人在 HMBA 处理的小鼠畸胎癌细胞中所观察到的变化相似<sup>[10]</sup>,这样既证实亚硒酸钠具有诱导分化作用,也表明核内异染色质变化是癌细胞分化的一个形态学指标.一般认为,异染色质是无转录活性部位,常染色质是转录活跃的区域<sup>[11]</sup>,因此上述染色质的变化显然与基因转录活性变化有关,由此提示亚硒酸钠与基因表达和调控有联系.显然,对这些问题的进一步了解有助于阐明亚硒酸钠对胃癌细胞的作用机制,值得更深入的探讨.

## 参 考 文 献

- 1 Medina D. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1986, 206: 465~472
- 2 Milner J A. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1986, 206: 449~463
- 3 马志章等,杭州大学学报 1986, 1: 75~82
- 4 敖藤等,中华肿瘤杂志 1987, 6: 408~410
- 5 Webber M M et al. *Bioche. Biophys. Res. Comm.*, 1985, 2: 603~609
- 6 Morrison D G. *Cancer letters*, 1988, 3: 227~236
- 7 王刚,国外医学(肿瘤分册) 1986, 1: 25~28
- 8 Gossh S. *Int. Rev. Cytol.*, 1976, 44: 1~28
- 9 F. 费明顿等编,杨简等译,肿瘤的科学基础,北京:科学出版社,1984. 11~18
- 10 丛笑倩等,实验生物学报, 1984, 3: 309~321
- 11 De Robertis E D P et al. *Cell and Molecular Biology*, Seventh edition, Saunders College Philadelphia, 1980: 333~362

## Effect of Sodium Selenite on the Multiplication and Ultrastructure of Human Gastric Adenocarcinoma Cells

Wu Qiao Li Qifu Wang Deyao

(*Lab. of Cell Biology*)

**Abstract** After treating with  $3 \times 10^{-6}$  mol/l sodium selenite, the growth curve and mitotic index of MGC80-3 cells decreased remarkably, cell multiplicative time prolonged, and cellular growth inhibitory rate amounted to 64.8%,  $^3\text{H-TdR}$  autoradiography showed that labeling exponent decreased from 44.4% to 7.1%, there were no labeling silver granules within cell's nucleus, the result indicated that MGC80-3 cell's DNA synthesis had been inhibited effectively. The electron microscope revealed that the nuclear-cytoplasmic ratio decreased in treated cells, the nuclei were regular, nucleolus lessened, heterochromatin reduced. In the cytoplasm, Golgi complexes were rather developed, mitochondria were typical, rough endoplasmic reticulum increased, the microvilli at cell's surface reduced obviously. It is confirmed that sodium selenite could reverse MGC80-3 cells' malignant phenotypic characteristics, and had certain induced and differentiated role for gastric carcinoma cells.

**Key words** MGC80-3 cell, sodium selenite, induce and differentiate.

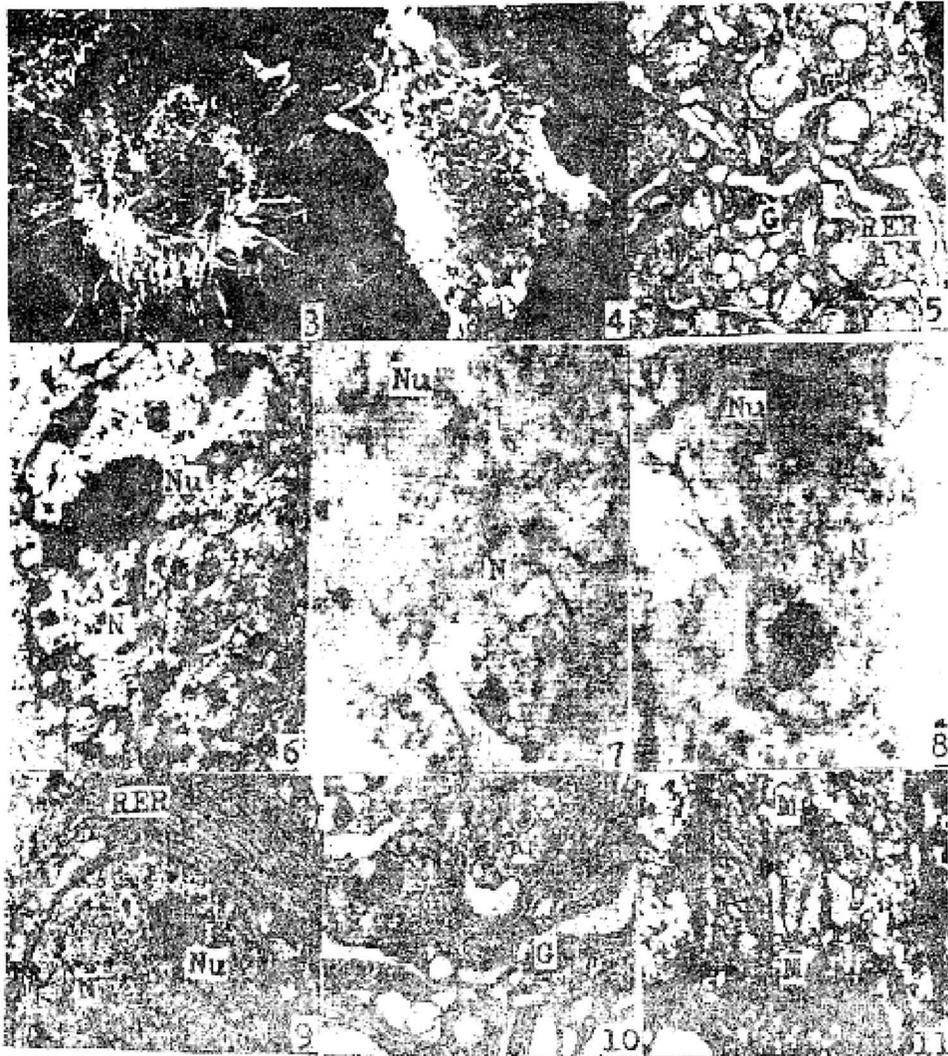


Fig. 3 Plentiful microvilli(Mv) appeared at MGe80-3 cell's surface,  $\times 3\ 000$ .

Fig. 4 Mv decreased and even disappeared after  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  treatment,  $\times 3\ 000$ .

Fig. 5,6 In MGe80-3 cells, nuclear shape (N) was irregular, heterochromatin(★) increased, there were more nucleolus (Nu), rough endoplasmic reticuli(RER) were expansive, Golgi complex(G) were non-developed, mitochondrial structure (M) were not typical, 5,  $\times 2\ 700$ ; 6,  $\times 10\ 500$ .

Fig. 7 Silver granules appeared in MGe80-3 cellular nucleus,  $\times 7\ 600$ .

Fig. 8 There were no silver granules in nucleus after  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  treatment,  $\times 6\ 000$ .

Fig. 9-11 N became regular, euchromatin(↑) increased, RER grew in number, G developed, M were typical after  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  treatment, 9  $\times 6\ 050$ , 10  $\times 13\ 000$ ; 11  $\times 21\ 500$ .