

亚硒酸钠对人胃腺癌细胞线粒体 结构与功能的影响^①

吴 乔 李祺福 汪德耀

(细胞生物学研究室)

摘要 3×10^{-6} mol/l 亚硒酸钠处理人胃腺癌 MGc80-3 细胞后, 线粒体结构发生了明显变化: 线粒体结构典型, 多呈短棒状, 大小较一致, 分布均匀, 线粒体嵴明显增多, 密度和长度增大, 排列方向较一致, 线粒体空泡化和嵴扩张现象显著减少, 表现出与人正常胃粘膜原代培养细胞线粒体基本相似的特征. 进一步分析与线粒体相关的细胞色素氧化酶活性, 发现亚硒酸钠可以显著提高该酶活性. 由此表明, 亚硒酸钠通过改变胃癌细胞线粒体的恶性结构, 使线粒体功能恢复正常, 调节了细胞代谢机能, 从而诱导胃癌细胞向正常细胞方向分化.

关键词 MGc80-3 细胞, 亚硒酸钠, 线粒体

硒是人体生命活动所必需的微量元素, 对癌细胞的生长具有明显的抑制作用^[1]. 本研究工作已证实亚硒酸钠能够诱导胃癌细胞分化, 改变其恶性表型特征^[2]. 前人的工作认为, 硒能调控肝癌细胞线粒体, 限制其能量代谢^[3], 还能改变心肌线粒体受损、能量偶联功能障碍的状况^[4,5]. 线粒体是细胞呼吸的主要场所, 硒首先影响细胞的呼吸^[6], 本文通过研究亚硒酸钠对胃癌细胞线粒体结构和相关酶系的影响, 旨在探讨线粒体结构与功能的变化对胃癌细胞恶性表型逆转的意义.

1 材料和方法

细胞培养与药物处理 MGc80-3 细胞培养于含 20% 灭活小牛血清、适量青、链霉素和卡那霉素的 RPMI-1640 培养液中, 灌 5% CO₂, 置 37 °C 培养. 实验组细胞接种 24 h 后, 弃旧培养液, 换上含 3×10^{-6} mol/l 亚硒酸钠新培养液, 对照组换上不含亚硒酸钠新配液, 连续培养供实验用.

透射电镜样品制备 用橡皮刮刀推下亚硒酸钠处理 8 d 的实验组细胞和对照组 MGc80-3 细胞, 离心 (2 000 r/min) 10 min, 所得细胞团经戊二醛 (2.5%, 2 h)、锇酸 (1%, 2 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-100CXII 型透射电镜下观察.

细胞色素氧化酶电镜细胞化学样品制备 按上述方法制成的细胞团经 2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛混合液固定 10 min, 0.1 mol/l 磷酸缓冲液 (pH 7.4, 内含 0.2 mol/l 蔗糖) 充分洗涤后, 于酶反应液中孵育 (37 °C, 2 h), 1% 锇酸再固定 2 h, 乙醇系列脱水, 环氧树脂 618 # 包埋, 超薄切片不经铀、铅染色, 直接于电镜下观察.

酶反应液组成: 蒸馏水 5 ml, DAB (3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐) 25 ml, 0.2 mol/l 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 5 ml, 过氧化氢酶 (C-100 型) 1 ml, 细胞色素 C (III 型) 10 ml, 蔗糖 684 mg

① 本文 1991-07-03 收到

空白对照实验 在酶反应液中加入 1 mmol/l 氰化钾作为抑制剂。

细胞色素氧化酶活性测定 收集亚硒酸钠处理 3 d 和 6 d 实验组细胞和对照组 MGc80-3 细胞,于少量磷酸钾缓冲液(pH6.0)中破碎,离心(3 000 r/min) 15 min,取上清液测定酶活性。在具塞试管中加入磷酸钾缓冲液 2 ml,50 μ mol/l 细胞色素 C(III型)0.2 ml,样品稀释液 1 ml,重蒸水 0.8 ml,使终体积为 4 ml。以重蒸水替代样品稀释液作空白对照,721 分光光度计测定消光值(波长 422 nm,25 $^{\circ}$ C)。根据已知标准细胞色素氧化酶消光值及样品测得的消光值求出该酶的活力。以 Folin-酚法测定总蛋白含量。

2 实验结果

2.1 亚硒酸钠对线粒体超微结构的影响

电镜观察显示 MGc80-3 细胞中的线粒体数量差异较大,有些细胞中线粒体较多,有些细胞则较少。线粒体大小不一,分布不规则,大多分布在核的周围或集中在细胞一端。大多数线粒体肿胀变圆,其内嵴少且短,排列紊乱,有的嵴内腔扩张,甚至因嵴断裂破碎而使线粒体呈空泡样状,线粒体基质电子密度较低(Fig. 1)。经亚硒酸钠处理的细胞内线粒体数量较均匀,大多分布在细胞核的两端,线粒体大小较一致,多呈短棒状,线粒体嵴明显增多和增长,排列方向也较一致,线粒体空泡化和嵴扩张现象很少见到,基质电子密度较高(Fig. 2),显示了亚硒酸钠处理的 MGc80-3 细胞线粒体结构典型发达,趋向于正常化。

2.2 亚硒酸钠对细胞色素氧化酶分布的影响

细胞色素氧化酶存在于线粒体内膜和嵴上,无论在实验组细胞还是在 MGc80-3 细胞中,此酶在电镜下均以高电子密度的非结晶性沉淀物出现。但在加入抑制剂氰化钾的空白对照细胞中,则无沉淀物出现(Fig. 3)。MGc80-3 细胞中线粒体的内膜、嵴上存在着酶反应物,但这种酶反应很微弱,反应物的电子密度很低,且分布不均匀,有的内膜或嵴上无沉淀物出现,显示酶活性很低(Fig. 4,5)。在亚硒酸钠处理的细胞线粒体中,酶反应则显著加强,反应物的电子密度提高,分布均匀,内膜和嵴上均可见到沉淀物出现,显示此酶反应产物增多,活性提高(Fig. 6,7)。由此表明亚硒酸钠处理后,MGc80-3 细胞线粒体内细胞色素氧化酶的活性和分布出现显著的变化。

2.3 亚硒酸钠对细胞色素氧化酶活性的影响

细胞色素氧化酶活性测定结果如 Tab. 1。

测定结果显示,MGc80-3 细胞中,细胞色素氧化酶纯度平均为 32.5%,培养第 3 d 和第 6 d 的细胞中酶活力无明显变化,不受细胞培养天数和传代次数的影响。但在亚硒酸钠处理的细胞中,细胞色素氧化酶纯度平均为 38.1%,比对照组提高了 17.2%,并随着处理时间的长短,酶活力有显著变化。处理 3 d 的细胞酶纯度为 34.8%,比对照组提高了 8.1%,处理 6 d 时,酶纯度达到 41.4%,比对照组提高了 26.2%,由此进一步表明,亚硒酸钠可显著提高 MGc80-3 细胞的细胞色素氧化酶活性。

Tab. 1 Activity of cytochrome oxidase

Treatment time	Enzyme purity (%)		Rise efficiency (%)
	MGc80-3 cell	Treated cell	
3 d	32.2	34.8	8.1
6 d	32.8	41.4	26.2
Average	32.5	38.1	17.2

3 讨 论

线粒体是细胞进行有氧呼吸、调节细胞代谢的重要场所^[7]。细胞内外环境稍微改变,首先就会引起线粒体结构发生变化。电镜观察结果显示, MGc80-3 细胞线粒体形状大小不一,分布不规则,线粒体嵴较少且短,排列紊乱,有的嵴内腔扩张,有的嵴断裂破碎,致使部分线粒体呈空泡样状,基质电子密度较低。而亚硒酸钠处理的 MGc80-3 细胞,线粒体结构较为典型,多为短棒状,嵴清晰可见,嵴的数量和长度明显增多,排列方向较为一致,线粒体空泡化现象显著减少,基质电子密度较高,从而出现了与人正常胃粘膜原代培养细胞的线粒体结构特点基本相似的变化(待发表资料),并且也与用不同的分化诱导剂处理癌细胞后线粒体结构发生的变化结果相似^[8]。由此表明亚硒酸钠在诱导胃癌细胞恶性表型逆转过程中,能促使线粒体形态和结构都朝正常方向转变,成为结构典型、功能活跃的线粒体。

细胞色素氧化酶是线粒体的标志酶,电镜细胞化学观察可见, MGc80-3 细胞中细胞色素氧化酶反应弱,分布不均匀,有的线粒体内膜和嵴上甚至无沉淀物出现。而亚硒酸钠处理的细胞线粒体中酶反应增强,分布均匀,内膜和嵴上均可见到沉淀物出现,表明该酶分布发生变化,活性得到显著提高。进一步定量测定结果显示, MGc80-3 细胞中细胞色素氧化酶纯度平均为 32.5%,但亚硒酸钠处理 3 d 的细胞中,酶纯度为 34.8%,比对照组提高了 8.1%,处理 6 d 时,酶纯度为 41.4%,比对照组提高了 26.2%,由此充分证实了亚硒酸钠可显著提高该酶活性。细胞色素氧化酶在细胞呼吸过程中起着电子传递的作用,是细胞氧化代谢水平的可靠参考指标^[9],因此细胞色素氧化酶活性的提高,不仅表明了亚硒酸钠能够促进细胞能量代谢的正常化,同时还提示了线粒体正常功能的恢复,对于胃癌细胞由恶性向正常方向分化具有重要的影响。

硒能通过调节线粒体结构与功能,对肿瘤细胞的生长起抑制作用^[10]。我们的实验结果也证实了亚硒酸钠-线粒体结构与功能-细胞恶性表型逆转三者之间联系密切。MGc80-3 细胞是一种低分化、恶性程度高、增殖能力强的细胞,它需要线粒体提供足够的能量以进行分裂增殖活动,这就要求线粒体自身不断地分裂,但在线粒体构建过程中,又得行使其供能的功能,分裂—供能—分裂……如此循环,就使得线粒体处于一种“代偿性”的供能活动之中,从而表现出线粒体结构异常。线粒体结构发生变化,无疑会影响到线粒体功能的发挥,线粒体功能则是由其结构上的酶系来执行,所以,细胞色素氧化酶活性变化就是线粒体功能活动的表现,该酶与线粒体膜、嵴结构紧密结合,并和氧化磷酸化系统相偶联而进行 ATP 合成,因此, MGc80-3 细胞中该酶活性降低,显示其氧化磷酸化系统和 ATP 合成出现障碍,从而影响细胞能量代谢,致使整个细胞功能失调,出现许多恶性表型特征^[2]。而 MGc80-3 细胞在亚硒酸钠诱导下,线粒体结构与功能则发生明显的变化。Reith 认为,线粒体嵴的数目多,氧化磷酸化活性高,反之则低;细胞色素氧化酶活性的强弱不仅取决于线粒体的数目,也与线粒体嵴膜的多少和机能状态有关^[11]。所以亚硒酸钠处理后细胞中线粒体结构恢复正常,调节了线粒体的功能,使细胞色素氧化酶活性显著提高,加强了细胞呼吸链的电子传递和氧化磷酸化作用,ATP 合成和能量供应正常化,从而调节了细胞代谢机能,使整个细胞功能趋于正常化,导致细胞恶性表型逆转,诱导了胃癌细胞向正常细胞方向分化。

Mason 指出,细胞色素氧化酶的生物合成是受线粒体和细胞核两个遗传系统共同控制的,其活性是由线粒体基因组和核基因组联合表达的结果^[12]。由此可以认为,亚硒酸钠对于细胞

色素氧化酶活性的影响,是它对线粒体基因组或细胞核基因组调控作用的结果.亚硒酸钠可能通过影响线粒体DNA或细胞核DNA的复制、转录或翻译的某一水平,改变胃癌细胞基因表达的异常现象,从而使细胞的基因表达正常化,达到诱导胃癌细胞向正常方向逆转的结果.显然,深入探讨此问题有十分重要的理论和实践意义.

参 考 文 献

- 1 Reddy BS et al. *Cancer Res.*, 1988, 48(7):1 777~1 780
- 2 吴乔等. 厦门大学学报(自然科学版), 1992, (3):275~280
- 3 于树玉等. 中华肿瘤杂志, 1983, (4):319~321
- 4 Li FS et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 1986, (1):209~216
- 5 林治焕等. 细胞生物学杂志, 1990, 增刊:67
- 6 于树玉等. 中华肿瘤杂志, 1983, (1):8~11
- 7 李柏等. 解剖学报, 1987, (3):269~273
- 8 许世稳等. 肿瘤, 1989, (6):260~262
- 9 Loida Z et al. *Enzyme Histochemistry*, Berlin:Springer-Verlag, 1979, 91~283.
- 10 Medina D et al. *Cancer Res.*, 1983, (43):2 100~2 105
- 11 Reith A et al. *J. Ultrastructure Res.*, 1982, (38):206~209
- 12 Mason TL et al. *J. Biol. Chem.*, 1973, (248):1 355~1 361

Effect of Sodium Selenite on Mitochondrial Structure and Function of Human Gastric Adenocarcinoma Cells

Wu Qiao Li Qifu Wang Deyao

(*Lab. of Cell Biology*)

Abstract After treating gastric carcinoma cells (MGC80-3) with 3×10^{-6} mol/l sodium selenite, there were many changes; mitochondrial structures were typical and in short-rod-like form, mitochondria distributed equally, and their swelling disappeared, mitochondrial cristae increased and arranged regularly, crista length enlarged and crista expansion decreased obviously. These features were similar to those of their corresponding normal cell's mitochondria. Further analysis showed that sodium selenite could increase cytochrome oxidase's activity remarkably. These results confirmed that sodium selenite could change mitochondrial function through reversing mitochondrial malignant structure in gastric carcinoma cell, It could regulate cell's metabolism and induce cancer cells differentiated towards the normal cells.

Key words MGC80-3 cells, Sodium selenite, Mitochondria

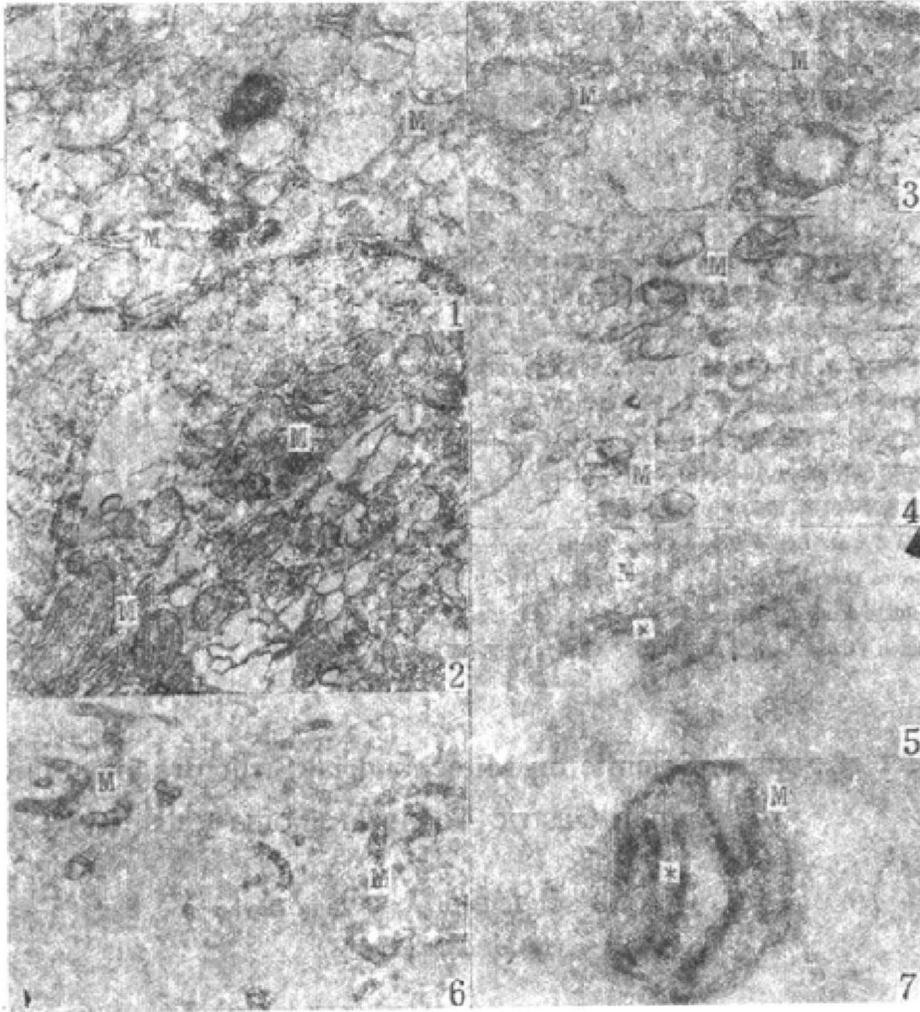


Fig. 1 In MGc80-3 cells, mitochondria(M) expand, cristae break, $\times 14\ 800$.

Fig. 2 In treated cells, mitochondria cristae increase and arrange regularly. $\times 15\ 000$.

Fig. 3 After adding KCN as inhibitor, there is not cytochrome oxidase, $\times 19\ 400$.

Fig. 4,5 In MGc80-3 cells, cytochrome oxidase(*) distribute unequally. $\times 10\ 100$, $\times 73\ 800$.

Fig. 6,7 in treated cells, cytochrome oxidase distribute equally, $\times 10\ 100$, $\times 78\ 600$.