

多种含硒复合物对犬乳腺癌细胞 CTM1211 的抑制作用及其机制

刘玉芝 李文玉 李成叶 刘玉竹 穆维维 邱昌伟

华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

摘要 研究不同剂量、形式、配伍的含硒复合物对犬乳腺癌细胞 CTM1211 的影响,以探究硒抗癌的有效剂量、形式和机制。用低、中、高剂量的 CTX(环磷酰胺, 1、2、4 mg/mL)、SSE(亚硒酸钠, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)、MSA(甲亚硒酸, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)、MSC(硒代半胱氨酸, 200、400、800 $\mu\text{mol/L}$)、CTX+SSE(0.5 mg/mL+5 $\mu\text{mol/L}$ 、1 mg/mL+10 $\mu\text{mol/L}$ 、2 mg/mL+20 $\mu\text{mol/L}$)、CTX+MSA(0.5 mg/mL+5 $\mu\text{mol/L}$ 、1 mg/mL+10 $\mu\text{mol/L}$ 、2 mg/mL+20 $\mu\text{mol/L}$)、CTX+MSC(0.5 mg/mL+100 $\mu\text{mol/L}$ 、1 mg/mL+200 $\mu\text{mol/L}$ 、2 mg/mL+400 $\mu\text{mol/L}$)分别作用 CTM1211 细胞 24、48、72 h, MTT 法检测以上各组细胞存活率;用 CTX(2 mg/mL)、SSE(40 $\mu\text{mol/L}$)、MSA(20 $\mu\text{mol/L}$)、MSC(400 $\mu\text{mol/L}$)、CTX+MSA(2 mg/mL+20 $\mu\text{mol/L}$)分别作用 CTM1211 细胞 48 h, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率, 免疫组化法及 RT-qPCR 法分别检测 VEGF-a(血管内皮生长因子 a)、PTEN(磷酸酯酶与张力蛋白同源物)、Ang-2(血管生成素 2)、HIF-1a(缺氧诱导因子 1a)蛋白和 mRNA 的表达。与对照组比较, 各硒作用组的细胞存活率在 48 h/72 h 时显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)、凋亡率显著增高($P<0.01$), 其中 CTX+MSA 组效果最显著; VEGF-a、Ang-2 和 HIF-1a 蛋白及 mRNA 的表达在整体上被显著下调, PTEN 蛋白及 mRNA 的表达在整体上被显著上调。结果表明, 硒尤其是 MSA 能显著抑制犬乳腺癌细胞 CTM1211, 其作用机制与诱导凋亡和调节肿瘤血管生长相关因子 VEGF-a、PTEN、Ang-2、HIF-1a 有关。

关键词 硒; 犬乳腺癌; 细胞凋亡; VEGF-a; PTEN; Ang-2; HIF-1a

中图分类号 R 73-36⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)02-0078-08

硒对癌症、HIV、心血管疾病等有防治意义, 其中硒对癌症的防治最为引人关注, 现已证明硒对前列腺癌、胃肠癌、肺癌、乳腺癌等均有防治作用, 其对癌症的防治机制可体现在调节免疫系统、DNA 修复、抗血管生成等多个方面^[1-3]。近年来的研究还发现, SEPW1(硒蛋白 W)可磷酸化 P53 中的丝氨酸-33, 进而下调 p21 基因的表达, 影响细胞周期从 G1 期到 S 期的转变^[4]; 灭活 U-2 OS 骨肉瘤细胞中的 WRN(沃纳综合征蛋白)可阻碍 DNA 氧化修复以提高硒的抑癌作用^[5]; TF(转铁蛋白)作为配体, 可增强纳米硒的肿瘤细胞靶向性^[6]。这些研究进一步阐明了硒的抑癌机制和应用前景。硒蛋白是硒发挥生物学功能的重要形式, 现已发现的一百多种硒蛋白中至少有一半的功能仍不为人知^[1]。最初认为硒主要通过抗氧化发挥抗癌活性^[7], 但越来越多的研

究表明, 某些硒蛋白一方面可以预防癌症, 而另一方面当肿瘤恶化时又促进癌症发展^[2], 在饮食中添加硒以预防癌症的动物实验表明, 硒的浓度-功效之间呈现 U 形曲线, 过量补硒反而有害^[8]。此外, 证明硒有抗癌活性的基本上都是临床前试验, 而临床试验(前列腺癌)的效果并不显著^[1]。

近年来发现的某些硒蛋白在癌症中的双重角色以及多数硒蛋白功能的未知、过量补硒反而促进癌症恶化、硒抗癌临床试验的失败, 均反映了人们对硒抗癌分子机制的认识不足, 以及在硒防治癌症的具体作用机制、最佳剂量和最佳形式等方面的研究的缺乏。本试验通过研究不同剂量、不同形式、不同配伍的硒对犬乳腺癌细胞 CTM1211 的影响, 探究硒抗癌的有效剂量、形式和相关分子机制。

收稿日期: 2014-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101864); 中央高校基本科研业务费专项(2012ZYTS053)

刘玉芝, 硕士研究生, 研究方向: 犬乳腺癌防治。E-mail: Lyz20081135@qq.com

通信作者: 邱昌伟, 博士, 副教授, 研究方向: 兽医临床学。E-mail: sdqiu2001@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1)细胞系。CTM1211 细胞系由中国农业大学动物医学院提供,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2)药物。CTX(纯度≥97%,相对分子质量 297),SSE(纯度≥95%,相对分子质量 173),MSA(纯度≥95%,相对分子质量 143),MSC(纯度≥95%,相对分子质量 219),均购于 Sigma 公司。

3)主要试剂。DMEM 购自 Gibco 公司;胎牛血清购于四季青生物工程材料有限公司;MTT(四唑盐)购于 Biosharp 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于南京碧波生物科技有限公司;兔抗犬 VEGF-a、PTEN、Ang-2、HIF-1a 多克隆抗体均购于北京博奥森生物技术有限公司;即用型 SABC-AP(兔 IgG)免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒(蓝)购于武汉博士德生物工程有限公司;cDNA 合成试剂盒及 PCR 合成试剂盒购于 Toyobo 公司。

4)主要仪器。HERA CELL150i 二氧化碳恒温培养箱(Thermo),SW-CJ 超净工作台(CIMO),CKX41 倒置相差显微镜(Olympus),RT-6000 全自动 ELISA 酶标仪分析仪(Rayto),FC500 流式细胞仪(Beckman Coulter),FDQ48A 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems),Uniersal Hood II 凝胶成像分析系统(BIO-RAD)。

1.2 方法

1)细胞培养。CTM1211 细胞用含 20% 胎牛血清(V/V)、100 U/mL 双抗、0.03% L-谷氨酰胺(m/V)的 DMEM 细胞培养液,培养于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中。

2)分组与处理。先分为 CTX、SSE、MSA、MSC、CTX+SSE、CTX+MSA、CTX+MSC 及对照组 8 个组,每个组分别设低、中、高 3 个质量浓度,每个质量浓度均分别作用于对数期细胞 24、48、72 h。其中,CTX 组的质量浓度设为 1、2、4 mg/mL;SSE、MSA 组的浓度设为 10、20、40 μmol/L;MSC 组的浓度设为 200、400、800 μmol/L;CTX+SSE、CTX+MSA 组的浓度设为 0.5 mg/mL+5 μmol/L、1 mg/mL+10 μmol/L、2 mg/mL+20 μmol/L;CTX+MSC 组的浓度设为 0.5 mg/mL+100 μmol/L、1 mg/mL+200

μmol/L、2 mg/mL+400 μmol/L。经 MTT 法筛选后,设为 CTX、SSE、MSA、MSC、CTX+MSA、对照组 6 个组,前 5 组分别为 2 mg/mL、40 μmol/L、20 μmol/L、400 μmol/L、2 mg/mL+20 μmol/L,均作用于对数期细胞 48 h。

3)MTT 法检测肿瘤细胞存活率。96 孔板内培养细胞并经药物作用后,加入 MTT 于培养箱内孵育 4 h,加 DMSO 振荡 10 min 后经酶标仪检测 OD 值,计算细胞存活率。

4)流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡率。消化细胞并收集后 PBS 润洗重悬,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书的步骤进行操作,经流式细胞仪检测后计算各组细胞凋亡率。

5)免疫组化法检测肿瘤细胞 VEGF-a、PTEN、Ang-2、HIF-1a 蛋白的表达。24 孔板内制作细胞爬片并经药物作用后,SABC 法检测各组细胞 VEGF-a、PTEN、Ang-2、HIF-1a(一抗稀释倍数分别为 400、300、400、300)蛋白的表达,DAB 镍增强显色法显色,IPP6.0 图像处理软件进行分析。

6)RT-qPCR 法检测肿瘤细胞 VEGF-a、PTEN、Ang-2、HIF-1a mRNA 的表达。引物由南京金斯瑞公司合成,Trizol 一步法提取各组细胞总 RNA 后反转录为 cDNA,以 GAPDH 为内参,按 PCR 合成试剂盒说明书操作,经凝胶成像系统分析 VEGF-a、PTEN、Ang-2、HIF-1a mRNA 的表达结果。

1.3 统计学方法

应用 SPSS19.0 统计软件分析,多组间比较采用单因素方差分析,单变量 2 组间比较采用 *t* 检验。检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 含硒复合物对犬乳腺癌细胞的生长抑制作用

用药后镜下观察细胞可见其逐渐变小变圆、透光率降低,同时细胞间空隙增加,活细胞总数变少,死细胞则渐渐增多(图 1)。

与对照组相比,除 24 h 时 CTX+SSE 组的细胞生长抑制作用不显著,其余各组药在各作用浓度、各作用时间下均对细胞生长有显著的抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。MSA 组对细胞的生长抑制作用显然大于含相同物质的量的硒的 SSE 及含 10 倍物质的量的硒的 MSC($P<0.01$),且 CTX 与 MSA 配伍后低、中浓度的 CTX 对细胞的生长抑制作用显著增强($P<0.01$),而 CTX 与 SSE、MSC 配

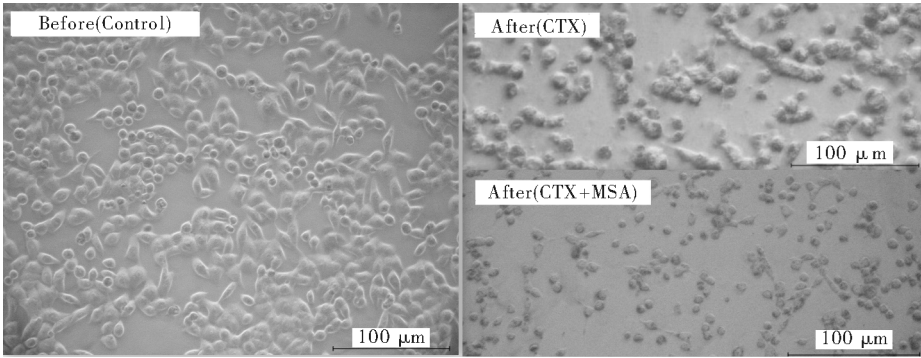
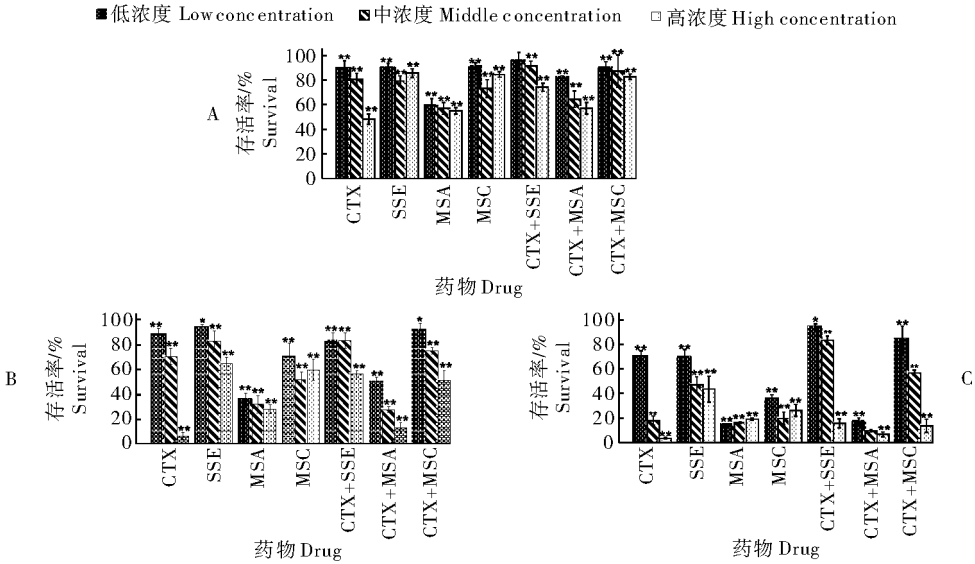


图 1 药物作用细胞前后示例图 (CTX、CTX+MSA)

Fig. 1 An example of the effects drugs have on cells for 48 h (“CTX”、“CTX+MSA”)

伍后细胞抑制作用没有显著变化。随着各组药物作用时间的增加,细胞存活率整体上呈下降趋势。除 MSA、MSC 组外,细胞存活率也随着各组药物作用浓度的增加而下降;在药物作用 24、48 h 时,MSA 组细胞的存活率随 MSA 浓度增加而下降,但差异

不显著,当作用时间达到 72 h 时,该组细胞存活率随药物浓度增加而增加,差异极显著($P<0.01$);在 24、48、72 h 时,中浓度 MSC 对细胞存活率的抑制作用均大于低浓度和高浓度 MSC,差异显著($P<0.05$)(图 2)。



A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h; 与空白对照组对比,差异显著用“*”表示,差异极显著用“**”表示。下图同。CTX:环磷酰胺;SSE:亚硒酸钠;MSA:甲亚硒酸;MSC:硒代半胱氨酸;CTX+SSE:环磷酰胺+亚硒酸钠;CTX+MSA:环磷酰胺+甲亚硒酸;CTX+MSC:环磷酰胺+硒代半胱氨酸。Compared with ‘control group’, ‘*’ denotes significant difference; ‘**’ denotes extremely significant difference. The same as below. CTX: Cyclophosphamide; SSE: Selenite; MSA: Methylseleninic acid; MSC: Selenocysteine; CTX+SSE: Cyclophosphamide+Selenite; CTX+MSA: Cyclophosphamide+Methylseleninic acid; CTX+MSC: Cyclophosphamide+Selenocysteine.

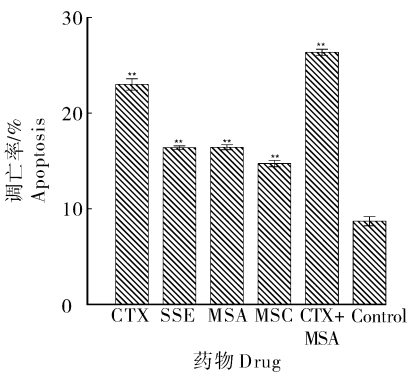
图 2 MTT 法测药物对细胞存活率的影响

Fig. 2 MTT measuring the effects of drugs on cell viability

2.2 含硒复合物对犬乳腺癌细胞的凋亡诱导作用

用药后,各组细胞的凋亡率均显著升高($P<0.01$),CTX与MSA配伍后细胞凋亡率显著

高于单用药组($P<0.01$)。MSA组细胞凋亡率与2倍硒含量的SSE组相比没有显著差异,且显著高于20倍硒含量的MSC组($P<0.05$)(图3)。



CTX:环磷酰胺, 2 mg/mL; SSE:亚硒酸钠, 40 μ mol/L; MSA:甲亚硒酸, 20 μ mol/L; MSC:硒代半胱氨酸, 400 μ mol/L; CTX+MSA:环磷酰胺+甲亚硒酸, 2 mg/mL+20 μ mol/L。下同。CTX:Cyclophosphamide, 2 mg/mL; SSE:Selenite, 40 μ mol/L; MSA:Methylseleninic acid, 20 μ mol/L; MSC:Selenocysteine, 400 μ mol/L; CTX+MSA:Cyclophosphamide+Methylseleninic acid, 2 mg/mL+20 μ mol/L. The same as below.

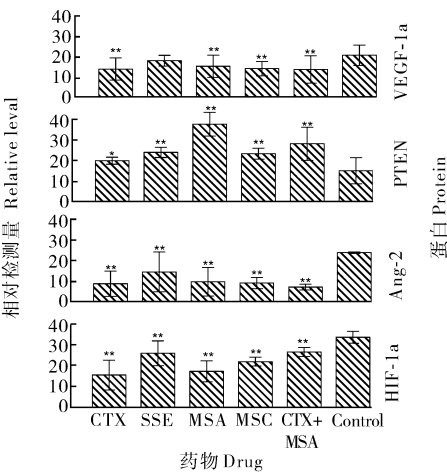
图 3 流式细胞仪检测药物对细胞凋亡率的影响

Fig. 3 Flowcytometry measuring the effects of drugs on cell apoptosis rate

2.3 含硒复合物对犬乳腺癌细胞血管生成相关蛋白表达的影响

相比于对照组,除 SSE 组外,其余各组细胞在药物作用后 VEGF-1a 蛋白的表达均下降 ($P<0.01$);各组细胞的 PTEN 蛋白表达量均上升 ($P<0.05$),而 Ang-2 蛋白和 HIF-1a 蛋白的表达量均下降 ($P<0.01$)。CTX 与 MSA 配伍后,两者对细胞 HIF-1a 蛋白表达量的下调作用均减弱 ($P<0.01$),配伍组与 CTX、MSA 单用药组其余蛋

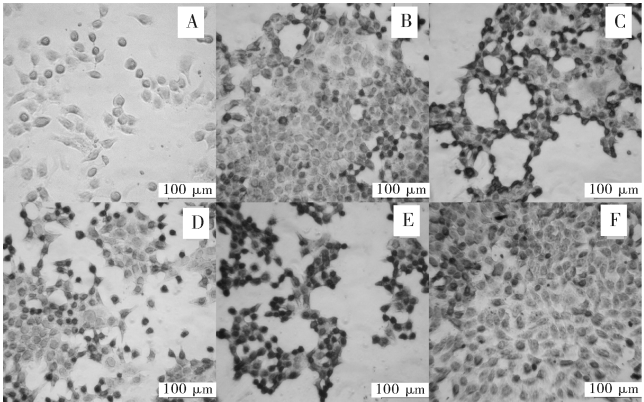
白平均表达量之间的差异不显著。MSC 组降低细胞 VEGF-1a 蛋白表达量的作用显著高于 SSE 组 ($P<0.05$);MSA 组提高细胞 PTEN 蛋白表达量的作用显著高于 SSE 组和 MSC 组 ($P<0.01$);SSE 组降低细胞 Ang-2 蛋白、HIF-1a 蛋白表达量的作用显著低于 MSA 组和 MAC 组 ($P<0.05$, $P<0.01$) (图 4)。免疫组化法测相关蛋白表达量的部分图像结果见图 5。



VEGF-1a: 血管内皮生长因子 a; PTEN:磷酸酯酶与张力蛋白同源物; Ang-2:血管生成素 2; HIF-1a:缺氧诱导因子 1a。下同。VEGF-1a:Vascular endothelial growth factor a; PTEN:Phosphatase and tensin homolog; Ang-2:Angiopoietin-2; HIF-1a:Hypoxia inducible factor1a. The same as below.

图 4 药物对肿瘤血管生成相关因子蛋白表达量的影响

Fig. 4 The effects of drugs on protein expression of tumor angiogenesis-related factors



DAB 镍增强显色法,紫蓝色为阳性表达,黄褐色表示阴性。A:空白对照,不加药物、一抗及二抗;B:SSE 组 HIF-1a 蛋白表达;C:MSC 组 Ang-2 蛋白表达;D:阴性对照组 PTEN 蛋白表达;E:MSA 组 PTEN 蛋白表达;F:CTX 组 VEGF-a 蛋白表达。Nickel-enhanced DAB, violet blue indicates positive, while tan indicates negative. A: Blank, without drugs and antibody; B: SSE, HIF-1a protein expression; C: MSC, Ang-2 protein expression; D: Negative control, PTEN protein expression; E: MSA, PTEN protein expression; F: CTX, VEGF-a protein expression.

图 5 免疫组化法测血管生成相关因子蛋白表达示例图

Fig. 5 Examples of immunohistochemistry measuring the protein expression of tumor angiogenesis-related factors

2.4 含硒复合物对犬乳腺癌细胞血管生成相关基因表达的影响

相比于对照组,各组细胞 *VEGF-1a* 基因的表达均下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$);除 SSE 组对细胞 *PTEN* 基因表达量的上调作用不显著外,其余含硒组对 *PTEN* 基因的表达量显著上调,而 CTX 组则显著下调 *PTEN* 基因表达量($P<0.01$);各用药组均显著下调 *Ang-2* 基因的表达量($P<0.01$);除 CTX+MSA 配伍组外,各组细胞的 *HIF-1a* 基因表达量均下降($P<0.01$)。

CTX 与 MSA 配伍后,两者对细胞 *VEGF-1a* 基因表达量的下调作用、对细胞 *PTEN* 基因表达量的上调作用均增强,但两者对 *HIF-1a* 基因表达量的下调作用均减弱($P<0.01$)。MSC 组对细胞 *VEGF-1a* 基因表达量的下调作用、对细胞 *PTEN* 基因表达量的上调作用显著高于 MSA 组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),且该两组的上述作用又显著高于 SSE 组($P<0.01$)。SSE 组对细胞 *Ang-2* 基因表达量的下调作用显著高于 MSC 组,而 MSC 组的上述作用又显著高于 MSA 组($P<0.01$)。MSA 组对细胞 *HIF-1a* 基因表达量的下调作用显著高于 SSE 组,而 SSE 组的上述作用又显著高于 MSC 组($P<0.01$)(图 6)。

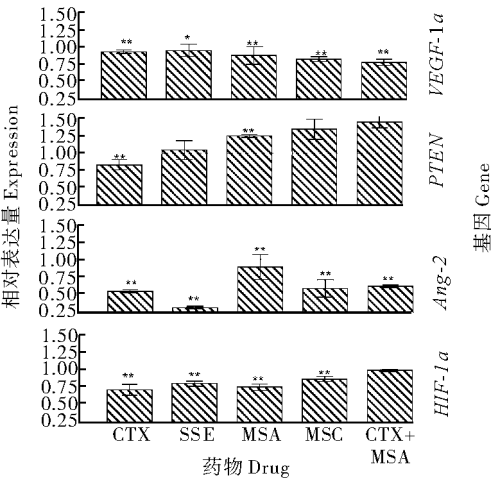


图 6 药物对细胞肿瘤血管生成相关因子 mRNA 表达量的影响

Fig. 6 The effects of drugs on mRNA expression of tumor angiogenesis-related factors

3 讨论

硒缺乏会引起硒蛋白及相关基因表达水平的改变,同时影响其他蛋白的活性,这些蛋白可共同参与

微环境的氧化平衡,例如 SOD(超氧化物歧化酶)和 GPx1(谷胱甘肽过氧化物酶 1)的不足会导致细胞的氧化损伤,从而增加乳腺癌风险^[7]。另一方面,缺硒者摄入硒可以提高乳腺癌特异性生存率和总生存率^[9]。但越来越多的研究表明,硒可能是通过其促氧化毒性作用而不是抗氧化作用抑制肿瘤的。报道称亚硒酸钠可诱导 DNA 损伤^[10];硒的过量摄取还可导致 H₂O₂ 的过量消除,从而对糖酵解、糖异生和脂质合成过程的关键步骤产生影响^[11]。纳米硒的癌细胞毒性作用主要体现在诱导产生活性氧,使谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统受损^[12];另外,纳米硒的抗癌作用还与半胱氨酸蛋白酶介导的细胞凋亡有关^[13]。最为关键的是,硒引起的癌细胞氧化应激作用,在正常细胞中大大衰减^[14],硒对癌细胞和肝细胞(硒富集组织)发挥细胞毒性作用的有效浓度相差至少 10 倍^[12]。可见,硒是通过诱导肿瘤细胞(而非正常细胞)损伤、凋亡而发挥抗癌作用的^[15]。

一方面,硒的抗氧化作用可用于癌症的预防;另一方面,其促氧化作用涉及抗癌作用^[16]。这可能是由于硒的生物学功能与其浓度及所在环境有密切关联,硒缺乏或硒过量,均会促进癌症发生发展。本试验中,3 种含硒复合物均可显著抑制细胞生长、诱导细胞凋亡,且作用效果均为 CTX+MSA>MSA>SSE>MSC,表明硒的肿瘤细胞抑制作用在很大程度上与硒促氧化诱导细胞凋亡有关。各组硒对细胞的抑制作用有显著的时效关系,且 SSE 表现出量效关系,但 MSA、MSC 未表现出量效关系,表明硒浓度的增加不一定导致抑癌作用的增加。CTX 是细胞周期非特异性细胞毒性抗癌药,具有毒副作用,硒可经抗氧化作用减轻 CTX 对卵巢产生的退行性损伤^[17]。本试验结果中,配伍组 CTX+MSA 的抑制作用最强而用药量最少,可见两者配伍既可以增强抑癌作用,又可以从整体上减轻毒性作用。

各种硒复合物须先转换为甲基硒的形式才会具有抗癌活性^[18],这一转化过程与 α 、 β -裂解酶的作用有关^[15]。本试验中 MSA 的体外抑癌作用显著强于 10 倍其硒含量的 MSC,这是因为:MSC 可能直接参与合成蛋氨酸^[14],MSA 可通过抑制 β -连环蛋白/TCF 途径而抑制肿瘤细胞^[19];最主要的原因是体外环境中缺乏 β -裂解酶^[20],MSC 在体外难以被转化为甲基硒。硒抗癌的临床试验效果的失败,就是因为人体内的该类裂解酶含量比啮齿类动物低 800 倍^[7]。另外,有机硒的毒性显著小于无机硒^[21],

可以推测,与无机硒 SSE 相比,有机硒 MSA 和 MSC 在体内是更加安全有效的抗癌形式。

缺氧导致的氧化应激主要由 ROS(活性氧)的增多介导^[22]。低、中水平的 ROS 是肿瘤存活的最重要的机制(促进肿瘤细胞增殖、肿瘤血管生成和肿瘤侵袭而诱导正常细胞坏死、凋亡),这与 *HIF-1 α* 的上调密切相关^[23];但更高水平的 ROS 则可能会引起肿瘤细胞的氧化应激(包括 DNA 损伤和细胞凋亡),从而产生治疗效果;ROS 过量累积时,为阻止 ROS 的累积同时保持肿瘤细胞对 ROS 的高耐受性,肿瘤细胞会引发多种抗氧化系统。因此,ROS 及与之相关的抗氧化剂、促氧化剂对肿瘤细胞是发挥促进作用还是抑制作用,与其作用剂量、作用时间、细胞类型等密切相关。这或可解释为何添加过量抗氧化剂反而导致癌症进一步恶化,以及为何硫氧还蛋白还原酶 1 和硒蛋白 15 在癌症前中期对癌症有抑制作用,却在癌症后期富集并促进癌症恶化^[2]。微环境氧平衡的关键在于 *HIF-1 α* ,肿瘤处于相对缺氧的微环境,*HIF-1 α* 在肿瘤中的水平高于正常组织^[24]。低氧胁迫下,细胞会发生 2 种反应,诱导适应性反应(导致糖酵解和血管生成增加)或者诱导细胞坏死、凋亡。这种适应性反应或死亡性反应的平衡取决于 *HIF-1 α* 稳定性的调节、转录活性的调控、翻译后羟基化与否、对其他细胞因子(尤其是生长因子、代谢产物)的反应性等^[25]。为了掌控微环境中的氧平衡,肿瘤细胞比正常细胞更加显著地调控着相关因子的水平以获得有利于自身生长的微环境^[23]。试想,通过影响经 *HIF-1 α* 调控的相关信号,把有利于肿瘤细胞的微环境调换为有利于正常细胞的微环境,诱导肿瘤细胞的死亡性反应而促进正常细胞的适应性反应,可为开发安全有效的抗癌药提供可能。

抗氧化剂对肿瘤微环境的影响,主要体现在抑制肿瘤血管生成,继而抑制肿瘤转移并提高化疗药的药效^[26],这一过程主要与 *HIF-1 α* 有关,而 *HIF-1 α* 作为氧敏感性转录因子,受 PI3K/PTEN/Akt/mTOR 信号通路的调控^[27]。硒对多种蛋白激酶有抑制作用,蛋白激酶在细胞生长和增殖中起重要作用^[10],其中的 PI3K(磷脂酰肌醇 3-激酶)参与影响包括细胞生长、存活、蛋白合成在内的各种生理过程,而 *PTEN* 作为一种抑癌基因可拮抗 PI3K。PI3K 诱导 *HIF-1 α* 的表达促进肿瘤生长和血管生成^[28],经 NF κ B/*HIF-1 α* 途径又可上调乳腺癌

VEGF^[29]。已有研究证明,PTEN 可以下调 VEGF 的表达,从而抑制肿瘤血管生成^[30]。Ang 既能通过刺激内皮细胞诱导血管生成,又能通过刺激肿瘤细胞 RNA 转录促进其增殖^[31]。肿瘤内皮细胞出芽形成微血管及血管成熟,关键在于 VEGF-a 和 Ang(尤其是 Ang-2)的调控;Ang 和 VEGF-a 分别促进内皮细胞出芽和血管生成,同时还可以激活基质降解酶(MMPs 和 PAs)以促进内皮细胞的移行,为肿瘤迁移减少阻碍^[32]。在乳腺癌中就观察到,Ang 参与纤溶酶(PAs)形成,且阻断 Ang 时,uPAR(尿激酶受体)不再与 uPA(尿激酶)作用^[33]。Ang-1 和 Ang-2 共同平衡血管生成,但后者被证实是更佳的干预对象^[32]。在口腔癌中的试验发现,缺氧主要导致 Ang 的上调,而 *HIF-1 α* 与 VEGF 之间没有显著相关性。表明 Ang 的上调至少部分是由缺氧导致的 *HIF-1 α* 上调所介导的,是 Ang 而不是 VEGF 主要受缺氧诱导^[31]。

本试验中各因子 mRNA、蛋白的表达存在微差异性,但总体上的变化方向是一致的,各组细胞 VEGF-a、Ang-2 和 *HIF-1 α* 蛋白及 mRNA 的表达量均下降,PTEN 蛋白及 mRNA 的表达量均上升,表明 3 种硒复合物对这 4 种蛋白及 mRNA 的表达均有积极意义。值得注意的是,4 种因子中 PTEN、Ang-2 的变化最大,尤其是 Ang-2,MSC 组的该变化最为显著。此外,值得寻味的是,CTX 和 MSA 都下调了 *HIF-1 α* ,但两者配伍后 *HIF-1 α* 蛋白和 mRNA 的表达都没有显著下调,说明 CTX、MSA 下调 *HIF-1 α* 的机制是不同的,甚至可能是相反的。同时 CTX+MSA 配伍组对 *HIF-1 α* 下调作用的减弱并没有减弱该组的抑癌作用,该组细胞的抑制率和凋亡率均高于其他各组,表明硒可能通过有效转变 CTM1211 内的氧平衡,诱导肿瘤细胞由适应性反应转变为死亡性反应。有文献^[27]指出,CTX 通过提高氧化应激可导致 *HIF-1 α* 的上调,但本试验中 CTX 下调了 *HIF-1 α* ,这与国内的研究结果一致^[34],却与国外的研究结果不一致^[27],更加反映了肿瘤细胞内微环境及其氧平衡的复杂性,微环境中的氧平衡值得更加深远全面的研究。

综上所述,3 种硒复合物均可有效抑制 CTM1211,其中有机硒 MSA 效果最显著,其与 CTX 配伍后更佳,但硒的抑癌作用不一定随其剂量的增加而增强;硒可以有效诱导 CTM1211 细胞凋亡,下调肿瘤血管生成相关因子 *HIF-1 α* 、VEGF-a

和 Ang-2,上调肿瘤血管生成相关因子 PTEN,对抑制肿瘤血管生成有积极意义;硒可能主要通过影响肿瘤微环境中的氧平衡而起到防癌和抗癌作用,同时导致血管生成抑制等功效。

参 考 文 献

- [1] HATFIELD D, TSUJI P, CARLSON B, et al. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2014, 39(3): 112-120.
- [2] 硒是双刃剑? ——谈微生物中的硒代谢[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(5): 1-8.
- [3] KUMAR B, PRIYADARSINI K. Selenium nutrition: how important is it[J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2014, 4: 333-341.
- [4] HAWKES W, ALKAN Z. Delayed cell cycle progression from SEPW1 depletion is p53- and p21-dependent in MCF-7 breast cancer cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 413: 36-40.
- [5] CHENG W, WU R, WU M, et al. Targeting werner syndrome protein sensitizes U-2 OS osteosarcoma cells to selenium-induced DNA damage response and necrotic death[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 420: 24-28.
- [6] HUANG Y, HE L, LIU W, et al. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles[J]. Biomaterials, 2013, 34: 7106-7116.
- [7] DAVIS C, TSUJI P, MILNER J. Selenoproteins and cancer prevention[J]. Annu Rev Nutr, 2012, 32: 73-95.
- [8] FERGUSON L, KARUNASINGHE N, ZHU S, et al. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability[J]. Mutation Research, 2012, 733: 100-110.
- [9] RAYMAN M. Selenium and human health[J]. Lancet, 2012, 379: 1256-1268.
- [10] LETAVAYOV' A L, VL'CKOV' A V, BROZMANOV' J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage[J]. Toxicology, 2006, 227: 1-14.
- [11] ZHOU J, HUANG K, LEI X. Selenium and diabetes—evidence from animal studies[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 65: 1548-1556.
- [12] WANG X, SUN K, TAN Y, et al. Efficacy and safety of selenium nanoparticles administered intraperitoneally for the prevention of growth of cancer cells in the peritoneal cavity[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2014, 72: 1-10.
- [13] KONG L, YUAN Q, ZHU H, et al. The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis[J]. Biomaterials, 2011, 32: 6515-6522.
- [14] POERSCHKE R, FRANKLIN M, MOOS P. Modulation of redox status in human lung cell lines by organoselenocompounds: selenazolidines, selenomethionine, and methylseleninic acid[J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22: 1761-1767.
- [15] DRAKE E. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant[J]. Medical Hypotheses, 2006, 67: 318-322.
- [16] STEINBRENNER H, SIES H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1790: 1478-1485.
- [17] GÜLS SÜRGEN E, ERDO D, et al. Chemoprotective effect of ascorbic acid, α -tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovary[J]. Nutrition, 2013, 29: 777-784.
- [18] ABDULAH R, MIYAZAKI K, NAKAZAWA M, et al. Chemical forms of selenium for cancer prevention[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005, 19: 141-150.
- [19] ZHANG W, YAN S, LIU M, et al. β -Catenin/TCF pathway plays a vital role in selenium induced-growth inhibition and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells[J]. Cancer Letters, 2010, 296: 113-122.
- [20] SUZUKI K, KURASAKI K, SUZUKI N. Selenocysteine beta-lyase and methylselenol demethylase in the metabolism of selenomethylated selenocompounds into selenide[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1770(7): 1053-1061.
- [21] BENKO, NAGY G, TANCZOS B, et al. Subacute toxicity of nano-selenium compared to other selenium species in mice[J]. Environ Toxicol Chem, 2012, 31(12): 2812-2820.
- [22] PIALOUX V, RÉMI M, ALLISON D, et al. Relationship between oxidative stress and HIF-1 α mRNA during sustained hypoxia in humans[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2009, 46: 321-326.
- [23] KARDEH S, SOHEIL E, ALIZADEH A. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer[J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 735: 150-168.
- [24] SOSA V, MOLINÉ T, SOMOZA R, et al. Oxidative stress and cancer: an overview[J]. Ageing Research Reviews, 2013, 12: 376-390.
- [25] LEE K, ROTH R, LAPRES J. Hypoxia, drug therapy and toxicity[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2007, 113: 229-246.
- [26] DENG P, HU C, XIONG Z, et al. Treatment with EGCG in NSCLC leads to decreasing interstitial fluid pressure and hypoxia to improve chemotherapy efficacy through rebalance of Ang-1 and Ang-2[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(3): 245-253.
- [27] QING Z, ZHONG Y, GAO Y, et al. Treating triple-negative breast cancer by a combination of rapamycin and cyclophosphamide: an *in vivo* bioluminescence imaging study[J]. European Journal of Cancer, 2010, 46: 1132-1143.
- [28] JIANG B, LIU L. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1784: 150-158.
- [29] GONZALEZ R, XU B, GUO S, et al. Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and non-canonical signaling path-

ways and NFκB/HIF-1α activation [J]. Cellular Signalling, 2010,22:1350-1362.

[30] MATSUO Y,SHIBATA T,TSUBOI K. PTEN down-regulates the VEGF expression and angiogenesis in pancreatic cancer[J]. Pancreatology,2013,13:17-23.

[31] KISHIMOTO K,YOSHIDA S,IBARAGI S,et al. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer[J]. Oral Oncology, 2012, 48: 1120-1127.

[32] FAGIANI E,CHRISTOFORI G. Angiopoietins in angiogenesis [J]. Cancer Letters,2013,328:18-26.

[33] DUTTA S,BANDYOPADHYAY C,BOTTERO V,et al. Angiogenin interacts with the plasminogen activation system at the cell surface of breast cancer cells to regulat eplasmin formation and cell migration[J]. Molecular Oncology, 2014, 8: 483-507.

[34] 吴秀丽. 散结抗癌方对 S180 荷瘤小鼠抑瘤作用和抗血管生成的实验研究[D]. 广州:南方医科大学图书馆,2010.

Inhibition and related mechanisms of different selenium compounds on canine breast cancer cells CTM1211

LIU Yu-zhi LI Wen-yu LI Cheng-ye LIU Yu-zhu MU Wei-wei QIU Chang-wei
College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To evaluate the effect of different doses, forms and compatibility of selenium on canine breast cancer cells CTM1211 and to explore the related mechanisms, CTM1211 cells were intervened by different doses of CTX (cyclophosphamide: 1, 2, 4 mg/mL), SSE (selenite: 10, 20, 40 μmol/L), MSA (methylseleninic acid: 10, 20, 40 μmol/L), MSC (selenocysteine: 200, 400, 800 μmol/L), CTX+SSE (0.5 mg/mL+5 μmol/L, 1 mg/mL+10 μmol/L, 2 mg/mL+20 μmol/L), CTX+MSA (0.5 mg/mL+5 μmol/L, 1 mg/mL+10 μmol/L, 2 mg/mL+20 μmol/L) and CTX+MSC (0.5 mg/mL+100 μmol/L, 1 mg/mL+200 μmol/L, 2 mg/mL+400 μmol/L) for 24 h, 48 h and 72 h, and the cell viability of each group was determined by MTT. While simplified cells were intervened by CTX (2 mg/mL), SSE (40 μmol/L), MSA (20 μmol/L), MSC (400 μmol/L) and CTX+MSA (2 mg/mL+20 μmol/L) for 48 h and the cell apoptosis rate was measured by flow cytometry, the protein and mRNA expression of VEGF-a (vascular endothelial growth factor a), PTEN (phosphatase and tensin homolog), Ang-2 (angiopoietin-2) and HIF-1a (hypoxia inducible factor 1a) were measured by immunohistochemistry and RT-qPCR, respectively. The cell viability of each group at 48 h/72 h was significantly lower ($P<0.01$ or $P<0.05$), while the apoptosis rate was significantly higher at each time point ($P<0.01$) than that of the control group, and the effect of group CTX + MSA was the most significant. Generally, the expression of VEGF-a, Ang-2 and HIF-1a protein and mRNA were significantly low, while that of PTEN were significantly up regulated. In conclusion, selenium, especially MSA, could significantly inhibit breast cancer cell CTM1211, which is partly due to the induction of apoptosis and regulation of tumor angiogenesis-related factors VEGF-a, PTEN, Ang-2 and HIF-1a by selenium.

Key words selenium; canine breast cancer; apoptosis; VEGF-a; PTEN; Ang-2; HIF-1a

(责任编辑:边书京)