PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2004 June;12(6):1264-1267
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

MNNG诱导大鼠胃癌中亚硒酸钠和胃黏膜内分泌细胞的作用

苏衍萍, 唐军民, 唐 岩, 高慧英

苏衍萍, 高慧英, 泰山医学院组胚教研室 山东省泰安市 271000
唐军民, 唐岩, 北京大学医学部人体解剖与组织胚胎学系 北京市 100083
苏衍萍, 女, 1966-06-01生, 山东省菏泽市人, 汉族. 1999年北京大学医学部硕士, 副教授, 教研室副主任. 主要从事硒与肿瘤关系的研究.
山东省教育厅资助项目, No. J00K67
项目负责人: 苏衍萍, 271000, 山东省泰安市, 泰山医学院组胚教研室. su-yanping@163.com
电话: 0538-6225198
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-03-16

Influence of Na_2SeO_3 and gastric endocrine cells on MNNG induced gastric carcinogenesis in rats

Yang-Ping Su, Jun-Min Tang, Yan Tang, Hui-Ying Gao

Yang-Ping Su, Hui-Ying Gao, Department of Histology and Embryology, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China
Jun-Min Tang, Yan Tang, Department of Histology and Embryology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China
Supported by the Research Funds of Shandong Educational Office, No. J00K67
Correspondence to: Yang-Ping Su, Department of Histology and Embryology, Taishan Medical College,Taian 271000, Shandong Province, China. su-yanping@163.com
Received: 2004-02-11 Accepted: 2004-03-16

Abstract

AIM: To investigate influence of Na_2SeO_3 and gastric endocrine cells on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) induced gastric carcinogenesis in rats and its mechanism.

METHODS: Weaning male Wistar rats were divided randomly into four groups: The normal control group, experiment control group, low selenium (2 mg/L) group and high selenium group (4 mg/L). The Wistar rat gastric cancer was induced by MNNG (20 mg/kg) gavage daily for 10 days. Na_2SeO_3 was given by piped drinking before one week of MNNG (20 mg/kg) gavage. The Wistar rats were killed at the 43th week. The surface characters of gastric mucosa were observed with nude eyes. Histopathologic changes were observed by HE stain and AB-PAS methods. Changes of gastric endocrine cells were detected by immunohistochemical S-P method. The immunohistochemical results were quantitatively analyzed by the image analyzer. Statistical analysis was taken by SPSS.

RESULTS: Dietary Na_2SeO_3 (2 mg/L, 4 mg/L) aggravated gastric erosion and hemorrhage and promoted intestinal metaplasia of gastric mucosa (45.5%, 66.7%, 92.9%; 92.9% *vs* 45.5%, P <0.05). Leiomyoma formed in the process of induced rats gastric carcinoma. Dietary Na_2SeO_3 (2 mg/L, 4 mg/L) increased incidence rate of leiomyoma. The numeric density of area (N_A) of SP immunohistochemical positive cells was significantly increased in low selenium group than those of normal control group (9.909±5.665 *vs* 4.455±2.583, P <0.05). Absorbance mean (Amean) of gastrin immunohistochemical positive cells was significantly decreased in experimental control group, low selenium than that of normal control group (0.187±0.033, 0.119±0.024 *vs* 0.306±0.011, P <0.01), and low selenium group than experiment control group (0.119±0.024 *vs* 0.187±0.033, P <0.01). N_A and Amean of somatostation cells (SOM) were not significantly different in each group.

CONCLUSION: These findings suggested that dietary Na_2SeO_3 by piped drinking might not decrease incidence of Wistar rat gastric caner induced by MNNG. The mechanism may be involved in that selenium promoted SP cells proliferation and decreased secretion of gastrin cells in gastric mucosa.

Su YP, Tang JM, Tang Y, Gao HY. Influence of Na_2SeO_3 and gastric endocrine cells on MNNG induced gastric carcinogenesis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1264-1267

摘要

目的: 探讨N甲基-N'-硝基-N亚硝胍(MNNG)诱导Wistar大鼠胃癌形成过程中亚硒酸钠和胃黏膜内分泌细胞的作用.

方法: 用MNNG (20 mg/kg)诱导大鼠胃癌形成. 用HE染色、显微镜观察和AB-PAS方法比较了硒在MNNG诱导大鼠胃癌形成过程中的作用, 用免疫组织化学SP法研究在此过程中胃黏膜内P物质(SP)、胃泌素(GAS)和生长抑素(SOM)阳性细胞的免疫组织化学变化, 并对以上结果进行定性、定位、图像分析和统计学处理.

结果: 饮水中加入2 mg/L和4 mg/L的亚硒酸钠加重胃黏膜糜烂、出血, 促进胃黏膜肠上皮化生(45.5%, 66.7%, 92.9%; 92.9% *vs* 45.5%, P <0.05), 在MNNG诱癌过程中发生了浆膜下平滑肌瘤,亚硒酸钠可以增加平滑肌瘤的发生率. 胃黏膜内P物质阳性细胞的面数密度(NA)低硒组比正常对照组显著升高(9.909 ± 5.665 *vs* 4.455 ± 2.583, P <0.05); GAS阳性细胞的吸光度(Amean)实验对照组和低硒组显著低于正常对照组(0.187 ± 0.033, 0.119 ± 0.024 *vs* 0.306 ± 0.011, P <0.01), 低硒组显著低于实验对照组(0.119 ± 0.024 *vs* 0.187 ± 0.033, P <0.01); SOM阳性细胞的NA和Amean各组之间无显著性差异.

结论: 在MNNG所致胃癌形成过程中亚硒酸钠并不能降低

大鼠胃癌的发生率; 其机制可能与硒促进SP阳性细胞的增生和抑制G细胞的分泌功能有关.

苏衍萍, 唐军民, 唐岩, 高慧英. MNNG 诱导大鼠胃癌中亚硒酸钠和胃黏膜内分泌细胞的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1264-1267
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1264.asp

0 引言

因胃癌而死亡者居我国各种恶性肿瘤之首. 体内激素水平与胃癌的发生和发展有很大的关系. 肿瘤细胞以自分泌方式产生激素[1-4], 通过旁分泌方式发挥作用[5]. 硒是人体所必需的营养元素, 硒对肿瘤的预防和治疗作用尚不能肯定[6-7], 硒与胃癌的关系中是否胃黏膜内分泌细胞参与了作用还没有报道.

1 材料和方法

1.1 材料 断乳♂ Wistar 大鼠 62 只, 体质量 31-56 g, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 分 4 组(表 1). MNNG(N甲基-N-硝基-N亚硝胍)由北京大学第一临床医院基因室邓大君教授惠赠, 用二甲基亚砜(DMSO)助溶, 配成 100 g/L 溶液, 再用生理盐水稀释 100 倍即可使用, 现用现配. 实验开始1 wk后(即断乳大鼠饲养1 wk后), 给 Wistar 大鼠 MNNG 灌胃(20 mg/kg), 正常对照组以相同浓度的二甲基亚砜 - 生理盐水灌胃, 1 次/d, 连续 10 d, 期间每天称体质量以调整致癌剂 MNNG 给药量. 每 2 d 换含硒水和自来水并记录每只大鼠的摄水量.

表 1 Wistar 的大鼠分组

分组	n	MNNG 剂量	硒水浓度	开始补硒时间
正常对照	10	0	0	自来水
实验对照	22	20 mg/kg	0	自来水
低硒	15	20 mg/Kg	2 mg/L	灌 MNNG 前 1wk 饮用含硒水
高硒	15	20 mg/kg	4 mg/L	灌 MNNG 前 1wk 饮用含硒水

1.2 方法 密切观察大鼠的营养状况及摄食和饮水情况. 实验开始后 43 wk 开始取材, 一次性处死大鼠. 取大鼠腺胃组织, 固定在 40 g/L 多聚甲醛溶液中, 常规石蜡包埋, 切成 5-6 μm 厚切片, 行 HE 和 AB-PAS 染色, 进行病理诊断, 胞质内蓝色及紫蓝色颗粒的细胞为肠上皮化生. 分别选用兔抗人和鼠胃泌素(GAS)、P 物质(SP)和生长抑素(SOM)多克隆抗体, 行常规 SP 免疫组织化学染色. 用LeicaQ500MC图像分析仪进行图像分析. 平均吸光度(Amean)值 = 1 g GREV0/GREV1; GREV0∶空白度灰值; GREV1∶被测视野灰度值.

统计学处理 应用 SPSS 软件进行方差分析, 对病理诊断结果进行 χ^2 分析.

2 结果

2.1 病理诊断结果 正常组大鼠胃的浆膜面光滑、红润, 黏膜皱襞清晰. 实验对照组和加硒组均有不同只数的大鼠胃黏膜糜烂、出血、有白色或黄色的渗出物(图 1), 并且低硒组重于实验对照组, 高硒组重于低硒组, 特别高硒组胃壁失去弹性, 黏膜皱襞消失. 实验对照组和加硒组均有不同只数的大鼠胃大弯浆膜面可见1肿块, 直径约0.2-1 cm, 位置约在距离幽门1 cm处, 表面光滑、突破浆膜, 与周围组织无粘连, 除了1只有出血外, 其余均无出血和坏死, 肿块大小, 加硒组大于实验对照组, 高硒组略大于低硒组, 均为单发肿块(图 2A, 表 2). HE 染色: 浆膜面肿块为平滑肌瘤. 显微镜下观察可见肿瘤处平滑肌增厚、排列紊乱, 而且增生活跃, 细胞核略增大, 不见核分裂像(图 2B). 胃黏膜腺体排列规律, 但是可见高硒组胃底腺腺腔略大, 腺细胞无异常发现. AB-PAS 反应: 显微镜下观察所见, 正常组大鼠胃黏膜的游离面均为紫红色颗粒, 黏膜面完整(图 3A). 其他各组均发现一定数量的大鼠胃黏膜近游离面细胞胞质内有蓝色及紫蓝色颗粒, 多少不等, 其为肠上皮化生, 黏膜不完整(图 3B). 并且低硒组高于实验对照组, 高硒组高于低硒组(表 2).

表 2 大鼠病理诊断结果

分组	n	平滑肌瘤	肠上皮化生
正常对照	10	0	0
实验对照	22	23%	45.5%
低硒	15	46.6%	66.7%
高硒	14	42.8%	92.9%[a]

[a]P <0.05 *vs* 实验对照组.

表 3 SP、GAS 和 SOM 阳性细胞的 N_A 和 Amean(mean±SD)

	细胞	正常对照	实验对照	低硒	高硒
N_A	SP	4.455 ± 2.583	7.000 ± 3.838	9.909 ± 5.665[a]	6.750 ± 3.845
	G	6.833 ± 2.137	8.467 ± 3.357	7.333 ± 3.011	9.100 ± 1.663
	D	4.000 ± 2.479	3.444 ± 2.007	12.111 ± 9.943	4.333 ± 3.317
Amean	SP	0.154 ± 0.048	0.168 ± 0.056	0.182 ± 0.044	0.155 ± 0.028
	G	0.306 ± 0.011	0.187 ± 0.033[b]	0.119 ± 0.024[bd]	0.246 ± 0.0 639
	D	0.189 ± 0.028	0.166 ± 0.019	0.171 ± 0.024	0.159 ± 0.033

[a]P <0.05 *vs* 正常对照组; [b]P <0.01 *vs* 正常对照组; [d]P <0.01 vs 实验对照组.

2.2 免疫组织化学结果 免疫组织化学阳性结果呈棕黄色, 定位于胞质中, 阴性对照未见阳性着色. 大鼠 SP 阳性细胞(EC 细胞)多分布在胃底和幽门部, 大多分布在胃底腺的体部, 细胞呈圆形或椭圆形, 有的细胞有短小的突起(图 4A). 大鼠 G 细胞呈圆形、卵圆形或长梭形, 其细胞质呈棕黄色, 多分布在胃幽门腺的体部, 而腺体峡、颈部较少(图 4B). D 细胞呈卵圆形、长梭形或不规则形, 基部有长的突起, 突起末端可有一球形膨大(图 4C). 阳性细胞可分布于胃黏膜各处, 以胃幽

门部稍多，而胃体部、胃底部较少. SP 细胞的面数密度低硒组比正常对照组显著增高(P <0.05). G 细胞的面数密度及 D 细胞的面数密度组间比较没有明显的差异(表 3). P 物质阳性细胞的吸光度在各组之间没有显著性的差异. G细胞的吸光度实验对照组和低硒组比正常对照组明显降低，低硒组也明显低于实验对照组(P <0.01)，高硒组与其他各组相比没有显著性差异. D 细胞的吸光度实验对照组、加硒各组比正常对照组略有下降(表 3).

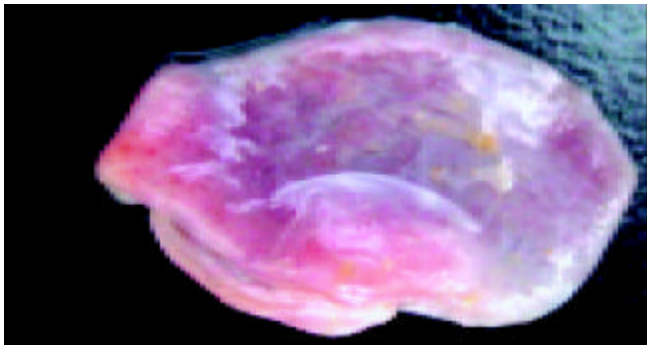


图 1 大鼠糜烂胃黏膜.

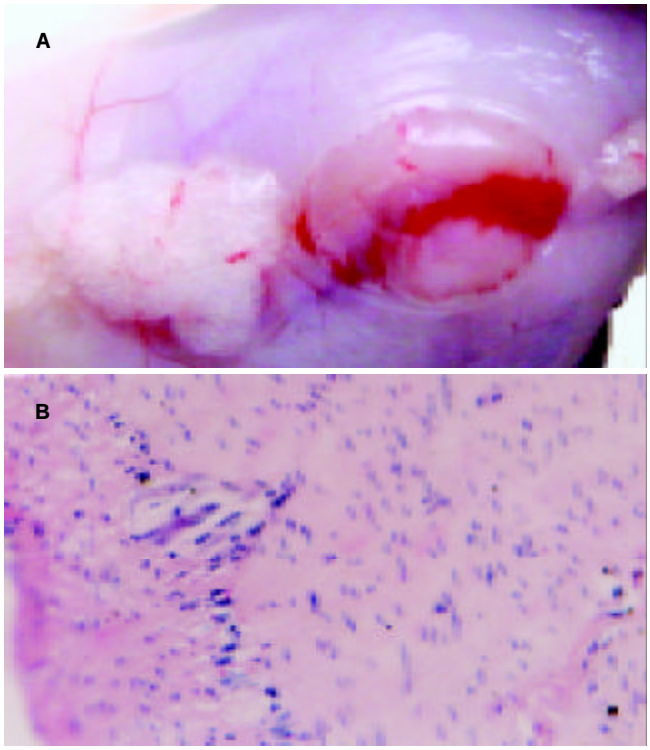
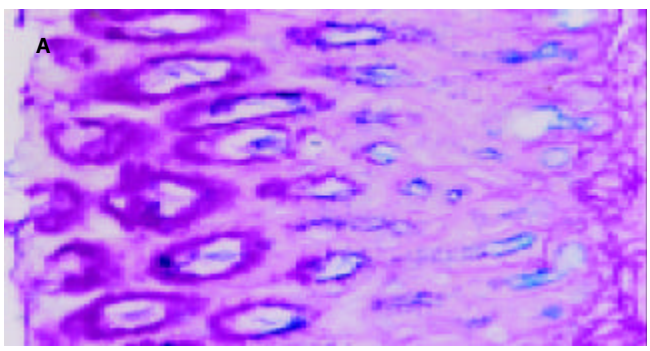


图 2 浆膜下肿瘤. A: 大体; B: HE × 200.



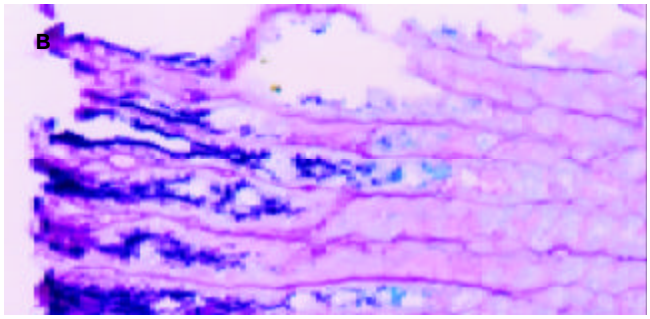


图 3 大鼠胃黏膜. A: 正常胃黏膜; B: 糜烂胃黏膜 AB - PAS, × 200.

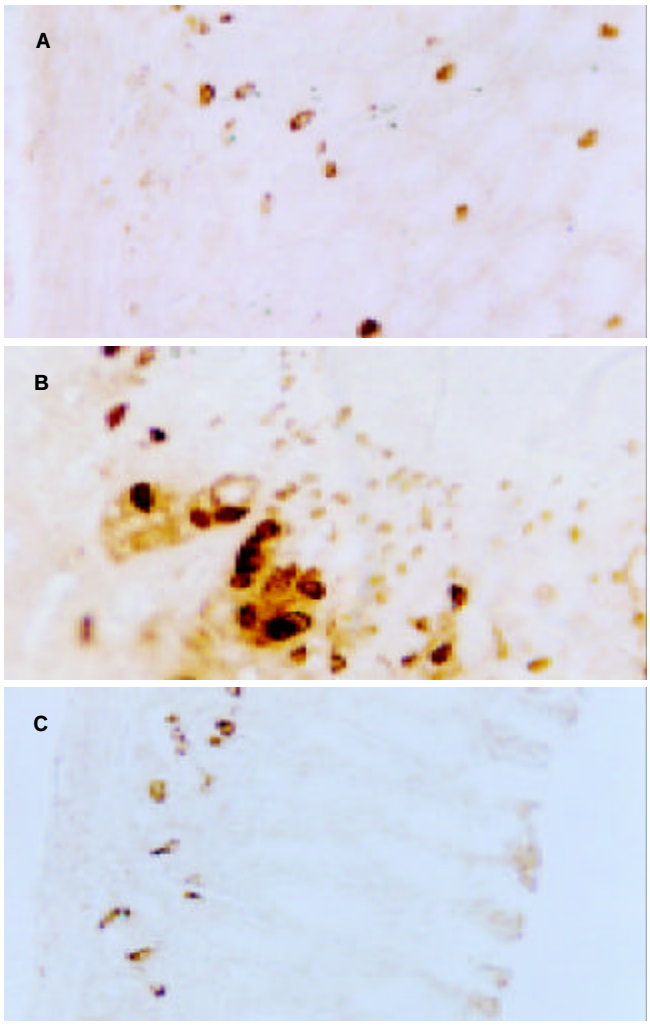


图 4 免疫组织化学显示大鼠胃黏膜内分泌细胞. A: SP 阳性内分泌细胞; B: G 细胞; C: D 细胞. SP × 200.

3 讨论

硒的摄入可以预防肿瘤的发生和发展，降低癌症患者的死亡率[8-15]. 事实上各国学者对硒是否具有普遍的抗癌作用一直存在争议[6-7]，甚至有促进肿瘤发生和发展，提高肿瘤发病率的报道[16]. 我们在给大鼠 MNNG 灌胃的前 1 wk 饮用含硒水，持续整个实验过程，在实验开始的 43 wk 处死大鼠，在 MNNG 诱导 Wistar 大鼠腺胃癌过程中，饮水中加入 2 mg/L 和 4 mg/L 的亚硒酸钠可以增加胃黏膜糜烂、出血、肠上皮化生的发生率，提示在饮水中加入 2 mg/L 和 4 mg/L 的亚硒酸钠并不能预防肿瘤

的发生，而是可能促进大鼠实验性胃癌的形成. 并且在MNNG诱癌过程中发生了浆膜下平滑肌瘤，亚硒酸钠可以增加平滑肌瘤的发生率.

硒是人体所必需的营养元素，是构成谷胱甘肽过氧化物酶的重要成分，能够保护细胞膜和线粒体膜免受脂质过氧化的损伤，从而对肿瘤及对多种疾病起到预防和治疗作用[17-21]. 同时硒具有生物毒性，损害人体健康，早期的毒性作用主要是影响人体内分泌功能. 因为Ⅰ型碘甲腺原氨酸5'脱碘酶(Ⅰ-5' Iodothyronine deiodiase)是一种硒蛋白，在甲状腺素的代谢过程中，可使T4 (Thyroxine)转化为T3 (3.5.3-Triiodothyronine)[22]，硒又有重要的胰岛素样模拟作用[23-25]，因此对硒与内分泌关系的研究主要集中在甲状腺素合成代谢相关疾病[22, 26]，以及对生长激素和胰岛素样生长因子Ⅰ(IGFⅠ)的代谢、作用影响[27]. 胃黏膜内存在大量的内分泌细胞，亚硒酸钠增加胃黏膜糜烂、出血、肠上皮化生的发生率是否与胃黏膜内分泌细胞有关？尚未见报道. 本结果提示，实验对照组和补硒各组比正常对照组P物质免疫阳性细胞吸光度略有增强，面数密度也略有增高，特别是低硒组的面数密度明显的升高. 说明在MNNG所致胃癌的过程中P物质免疫阳性细胞增生较活跃，分泌功能也略有加强，补硒可能进一步促进SP阳性细胞的增生; 也可能亚硒酸钠通过其他机制促进了胃黏膜糜烂、出血和肠上皮化生，而这一阶段P物质阳性细胞的增生和分泌也相对活跃. 胃泌素大部分由胃窦部G细胞分泌，而胃癌又好发于胃窦部小弯侧，二者是否相关，已引起人们重视. 许多实验也已证实有些胃癌在发生、发展过程中有胃泌素参与，但胃泌素对致癌剂诱发胃癌的作用也有相互矛盾的结论. 本结果提示，在MNNG所致胃癌的过程中胃泌素细胞的分泌活性实验对照组和低硒组比正常对照组明显降低，低硒组也明显低于实验对照组($P<0.01$). 说明在MNNG所致胃癌的过程中胃泌素细胞的分泌活性发生了一定的变化，加硒对其分泌也发生一定的抑制作用. SOM是D细胞分泌的胃、肠、胰内重要的内分泌激素. SOM的分泌对胃癌发生、发展的影响可能是双向的局部作用，即SOM可直接刺激胃黏膜癌前病变细胞增生，而另一方面又抑制其他激素的释放，抑制胃癌的发生和发展. 本结果提示，加硒组胃、肠黏膜D细胞数量略有增加，但是激素分泌有所减少. 因此，在MNNG所致胃癌形成过程中亚硒酸钠并不能降低大鼠腺胃癌的发生，其机制可能与亚硒酸钠促进胃黏膜SP阳性细胞增生，抑制G内分泌细胞分泌功能有关.

4 参考文献

1 Matsuo M, Koga S, Kanetake H, Ohtani H, Higami Y, Shimokawa I, WatanabeJ. EPO-producing gastric carcinoma in a hemodialysis patient. *Am J Kidney Dis* 2003;42:E3-4

2 Ota H, Azuma K, Horiuchi T, Kazama H, Araki A, Hosoi T, Sawabe M, Amizuka N, Orimo H. An elderly case of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) with hypercalcemia. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2003;40:167-171

3 Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E.Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5052-5059

4 Dockray GJ, Varro A, Dimaline R, Wang T.The gastrins: their production and biological activities. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:119-139

5 Varro A, Hemers E, Archer D, Pagliocca A, Haigh C, Ahmed S, Dimaline R, Dockray GJ. Identification of plasminogen activator inhibitor-2 as a gastrin-regulated gene: Role of Rho GTPase and menin. *Gastroenterology* 2002;123:271-280

6 Vinceti M, Wei ET, Malagoli C, Bergomi M, Vivoli G. Adverse health effects of selenium in humans. *Rev Environ Health* 2001; 16:233-251

7 Vinceti M, Nacci G, Rocchi E, Cassinadri T, Vivoli R, Marchesi C, Bergomi M. Mortality in a population with long-term exposure to inorganic selenium via drinking water. *J Clin Epidemiol* 2000;53:1062-1068

8 Klein EA.Selenium: epidemiology and basic science. *J Urol* 2004;171(2 Pt 2):S50-53

9 Klein EA, Thompson IM. Update on chemoprevention of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2004;14:143-149

10 Sinha R, El-Bayoumy K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:13-28

11 Nakaji S, Fukuda S, Sakamoto J, Sugawara K, Shimoyama T, Umeda T, Baxter D.Relationship between mineral and trace element concentrations in drinking water and gastric cancer mortality in Japan. *Nutr Cancer* 2001;40:99-102

12 La Vecchia C, Franceschi S. Nutrition and gastric cancer. *Can J Gastroenterol* 2000;14(Suppl D):51D-54D

13 Prokopczyk B, Rosa JG, Desai D, Amin S, Sohn OS, Fiala ES, El-Bayoumy K.Chemoprevention of lung tumorigenesis induced by a mixture of benzo(a)pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by the organoselenium compound 1, 4-phenylenebis (methylene)selenocyanate. *Cancer Lett* 2000;161:35-46

14 Beno I, Klvanova J, Magalova T, Brtkova A. Blood levels of natural antioxidants in gastric and colorectal precancerous lesions and cancers in Slovakia. *Neoplasma* 2000;47:37-40

15 Yang CS. Vitamin nutrition and gastroesophageal cancer. *J Nutr* 2000;130(2S Suppl):338S-339S

16 Thompson HJ, Becci PJ.Effect of graded dietary levels of selenium on tracheal carcinomas induced by 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Lett* 1979;7:215-219

17 Tinggi U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett* 2003;137:103-110

18 Kim SY, Kim JW, Ko YS, Koo JE, Chung HY, Lee-Kim YC. Changes in lipid peroxidation and antioxidant trace elements in serum of women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Nutr Cancer* 2003;47:126-130

19 Wu Q, Huang K.Effect of long-term se deficiency on the antioxidant capacities of rat vascular tissue. *Biol Trace Elem Res* 2004;98:73-84

20 Foster HD. How HIV-1 causes AIDS: implications for prevention and treatment. *Med Hypotheses* 2004;62:549-553

21 Karunasinghe N, Ryan J, Tuckey J, Masters J, Jamieson M, Clarke LC, Marshall JR, Ferguson LR. DNA stability and serum selenium levels in a high-risk group for prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:391-397

22 Duntas LH, Mantzou E, Koutras DA.Effects of a six month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 2003;148:389-393

23 Heart E, Sung CK. Insulin-like and non-insulin-like selenium actions in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 2003;88:719-731

24 Stapleton SR. Selenium: an insulin-mimetic. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1874-1879

25 Battell ML, Delgatty HL, McNeill JH. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1998;179:27-34

26 Gartner R, Gasnier BC, Dietrich JW, Krebs B, Angstwurm MW. Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1687-1691

27 Aydin K, Bideci A, Kendirci M, Cinaz P, Kurtoglu S. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 levels of children living in an iodine- and selenium-deficient endemic goiter area. *Biol Trace Elem Res* 2002;90:25-30