

# 亚硒酸钠对脑胶质瘤细胞生长及线粒体膜电位的影响<sup>\*</sup>

吕小生<sup>1</sup>, 陈旭义<sup>2\*\*</sup>, 汤锋武<sup>2</sup>, 张 赛<sup>2</sup>, 蒋显锋<sup>2</sup>

(1. 唐山市乐亭县医院 外四科, 河北 唐山 063600; 2. 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院 脑系科, 天津 300162)

**[摘 要]** 目的: 研究亚硒酸钠对人脑胶质瘤细胞生长抑制效应及线粒体膜电位的影响。方法: 使用不同浓度的亚硒酸钠(0.004、0.020、0.100 及 0.500  $\mu\text{mol/L}$ )对人脑胶质瘤细胞 SHG-44 进行侵染,通过四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测亚硒酸钠对 SHG-44 增殖的影响,提取细胞线粒体后通过激光扫描共聚焦显微镜下观察 SHG-44 的荧光强度,分析 SHG-44 的线粒体膜电位。结果: 亚硒酸钠对人脑胶质瘤细胞生长具有明显的抑制作用,且随亚硒酸钠浓度的增加抑制作用逐渐加强,0.100 及 0.500  $\mu\text{mol/L}$  染硒组与对照组相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),0.004 及 0.020  $\mu\text{mol/L}$  染硒组与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ );0.100、0.500  $\mu\text{mol/L}$  染硒组线粒体膜电位显著降低( $P < 0.05$ ),0.004 及 0.020  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论: 亚硒酸钠能抑制人脑胶质瘤细胞 SHG-44 生长,并且降低其线粒体膜电位。

**[关键词]** 亚硒酸钠; 神经胶质瘤; 细胞; 线粒体; 膜电位

**[中图分类号]** R962; R977.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)02-0167-03

## Inhibitory Effect of Sodium Selenite on the Growth of Human Glioma Cell and Its Effect on Mitochondrial Membrane Potential

LV Xiaosheng<sup>1</sup>, CHEN Xuyi<sup>2</sup>, TANG Fengwu<sup>2</sup>, ZHANG Sai<sup>2</sup>, JIANG Xianfeng<sup>2</sup>

(1. Department of Surgery, Hospital of Leting County, Tangshan 063600, Hebei, China; 2. Department of brain, the Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effects of sodium selenite on the growth of human glioma cell SHG-44 and its effect on mitochondrial membrane potential. **Methods:** SHG-44 cells were treated with different concentrations(0.004  $\mu\text{mol/L}$ , 0.020  $\mu\text{mol/L}$ , 0.100  $\mu\text{mol/L}$ , 0.500  $\mu\text{mol/L}$ ) of sodium selenite. The effect of sodium selenite on proliferation of SHG-44 cells was detected by MTT assay. The mitochondria was extracted, and fluorescence intensity of SHG-44 cells were detected under laser scanning confocal microscopy, and mitochondrial membrane potential of SHG-44 cells was analyzed. **Results:** Sodium selenite significantly suppressed the growth of SHG-44 cells. The cell growth rate decreased with the concentration increase of sodium selenite. Statistical differences were found between 0.100  $\mu\text{mol/L}$ , 0.500  $\mu\text{mol/L}$  groups and control group( $P < 0.05$ ), but not between 0.004  $\mu\text{mol/L}$ , 0.020  $\mu\text{mol/L}$  groups and control group( $P > 0.05$ ). Mitochondrial membrane potential was decreased significantly in 0.100 and 0.500  $\mu\text{mol/L}$  groups( $P < 0.05$ ), but not in 0.004  $\mu\text{mol/L}$  and 0.020  $\mu\text{mol/L}$  groups( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** Sodium selenite can suppress the SHG-44 cell growth, and down-regulate the mitochondrial membrane potential.

**[Key words]** sodium selenite; glioma; cells; mitochondria; membrane potentials

<sup>\*</sup>[基金项目]武警后勤学院科研基金面上项目(WYM201118)。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 E-mail:hbtslx@126.com;E-mail:chenxuyi1979@sina.com.cn

脑胶质瘤是脑外科中最常见的神经肿瘤,首选的治疗方法是手术切除瘤体后,配合放、化疗处理。由于胶质瘤恶性度高,很多患者的肿瘤在手术中不能完全切除,术后极易复发,化、放疗的效果亦不甚满意。因此,寻求对脑胶质瘤具有治疗作用且价廉易获取的药物就显得较为重要。硒是人体的必需微量元素,在硒的多种生物学功能中,其防治肿瘤的作用日益受到国内外学者的关注<sup>[1]</sup>。本研究使用不同浓度亚硒酸钠对人脑胶质瘤细胞 SHG-44 进行侵染,通过检测细胞增殖情况及 ROS 的含量,探讨亚硒酸钠对脑胶质瘤的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及分组

人脑胶质瘤细胞 SHG-44 由武警后勤学院附属医院脑系科陈旭义博士惠赠。用不同浓度的亚硒酸钠对 SHG-44 细胞进行侵染,分为 4 个实验组:0.004  $\mu\text{mol/L}$  组,0.020  $\mu\text{mol/L}$  组,0.100  $\mu\text{mol/L}$  组,0.500  $\mu\text{mol/L}$  组,并设立空白对照组。

### 1.2 试剂与仪器

亚硒酸钠,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5 二苯基四氮唑溴盐,罗丹明 123,DMEM,胎牛血清(武汉博士德公司),酶标仪(芬兰 Wellscan MK3 公司)及激光共聚焦显微镜(美国 Leica TGS-NT 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 MTT 法检测细胞生长抑制效应** 对数生长期的胶质瘤 SHG-44 细胞以  $8 \times 10^3$ /孔转入 96 孔培养板,每孔 200  $\mu\text{l}$  培养液,继续培养 24 h 后弃原培养液,加入含不同浓度亚硒酸钠的 DMEM 培养液 200  $\mu\text{l}$ ,对照组加入含等体积溶剂的 DMEM 培养液,每组设 6 个复孔,并设空白对照,各组于加亚硒酸钠后 24 h 检测细胞活力。细胞孵育终止前,每孔加入新配制的 MTT(5 g/L)溶液 20  $\mu\text{l}$ ,培养箱内继续作用 4 h 后弃上清液,每孔加 DMSO 150  $\mu\text{l}$  振荡 10 min 充分溶解结晶,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度值,取 6 孔平均值。计算细胞抑制率( $\text{IR}, \%$ ) = (对照组平均 OD - 实验组 OD) / 对照组平均 OD  $\times 100\%$ ,实验重复 3 次。

**1.3.2 提取 SHG-44 细胞线粒体** 细胞贴壁培养于含 10% 小牛血清,青、链霉素各 100 U/L 的 DMEM 中,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的饱和湿度培养箱中培养。取处于对数生长期的 SHG-44 细胞,按线粒体提取试剂盒说明书从细胞中提取线粒体。提

取线粒体的所有步骤均在冰上操作,2 h 内完成。

**1.3.3 线粒体膜电位检测** 使用不同浓度亚硒酸钠侵染 SHG-44 细胞,侵染时间为 24 h,分别加入罗丹明 123,使其终浓度为 10 mg/L,按文献的方法采用激光共聚焦显微镜测定线粒体膜电位<sup>[2]</sup>。

### 1.4 统计分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析,计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,资料符合正态且方差齐用单因素方差分析,两两比较用 SNK 法,率的比较用  $\chi^2$  检验,检验水准为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 亚硒酸钠对 SHG-44 细胞生长的抑制作用

实验结果提示,亚硒酸钠侵染细胞的吸光度( $A_{490}$ )值随亚硒酸钠浓度的增高而逐渐降低,与对照组比较,0.100 及 0.500  $\mu\text{mol/L}$  染硒组显著抑制细胞生长,抑制率随亚硒酸钠浓度上升而增高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );从吸光度值上看出,虽然 0.004 及 0.020  $\mu\text{mol/L}$  亚硒酸钠对细胞生长有一定的抑制作用,但由于剂量偏少,其抑制率的改变无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 亚硒酸钠对 SHG-44 细胞的生长抑制效应

Tab. 1 Inhibitory effect of sodium selenite on the growth of SHG-44 cells

组别	$A_{490}$	IR (%)	F 值	P 值
对照组	0.47 $\pm$ 0.02			
0.004 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.45 $\pm$ 0.02	3.83	4.89	0.071
0.020 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.41 $\pm$ 0.03	7.71	4.65	0.064
0.100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.35 $\pm$ 0.02	16.54 <sup>(1)</sup>	17.76	0.013
0.500 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.29 $\pm$ 0.01	27.96 <sup>(1)</sup>	30.55	0.001

注:IR 为抑制率,<sup>(1)</sup>与对照组相比  $P < 0.05$ 。

### 2.2 SHG-44 细胞线粒体膜电位

用激光共聚焦显微镜检测的 SHG-44 细胞线粒体膜电位,与对照组比较,0.100 和 0.500  $\mu\text{mol/L}$  的亚硒酸钠显著降低 SHG-44 细胞线粒体膜电位( $P < 0.05$ ),而且随着亚硒酸钠浓度的增高,呈现剂量效应关系,而 0.004 和 0.020  $\mu\text{mol/L}$  的亚硒酸钠有降低线粒体膜电位的趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 亚硒酸钠对 SHG-44 细胞线粒体膜电位的影响  
Tab. 2 Effect of sodium selenite on the mitochondrial membrane potential of SHG-44 cells

组别	$\Delta A = A_{\max} - A_{\min}$	F 值	P 值
对照组	22.427 ± 1.192		
0.004 μmol/L 组	19.624 ± 1.053	5.24	0.083
0.020 μmol/L 组	19.136 ± 0.551	4.92	0.072
0.100 μmol/L 组	15.489 ± 1.293 <sup>(1)</sup>	23.54	0.012
0.500 μmol/L 组	11.343 ± 0.728 <sup>(1)</sup>	127.83	0.001

注：<sup>(1)</sup>与对照组相比， $P < 0.05$ 。

3 讨论

硒是人体必需的微量元素,具有抗肿瘤作用,并可影响癌基因与抑癌基因的表达,与恶性肿瘤间存在明显的负相关关系<sup>[3]</sup>。1992 年国内学者曾经应用人脑神经胶质瘤裸鼠模型研究亚硒酸钠对神经胶质瘤的生长抑制作用,并推测其机理可能与亚硒酸钠破坏线粒体结构、阻断能量供应等有关<sup>[4]</sup>。近 20 年来,国内外对硒具有抗癌作用的研究逐渐关注,已进行的一些研究认为与硒的抗氧化作用有关,或认为与硒能提高免疫功能等有关,但其机理仍不明确<sup>[1,5]</sup>。本实验从细胞接受亚硒酸钠侵染后的生长抑制效应切入,结合与细胞氧化应激密切相关的线粒体膜电位,探讨亚硒酸钠对人脑胶质瘤细胞的影响。

综合国内外文献,目前尚未在脑胶质瘤研究领域对硒作用的较深入的报道,因此以人脑胶质瘤 SHG-44 细胞作为研究对象,采用不同浓度的亚硒酸钠侵染细胞,观察细胞的生长状况。结果提示亚硒酸钠可显著抑制细胞生长,其细胞生长抑制率随亚硒酸钠浓度上升而增高,当亚硒酸钠的浓度达到一定程度时,可出现显著性抑制效应。由于选用的细胞株较为单一,且由于本实验属初步探索,所以尚不明确在何种浓度时,既能排除高硒带给人体的中毒副作用,又能达到最好的治疗量效比例。

由于硒的抗癌机制目前较为集中在其抗氧化作用,且硒中毒的损伤机制目前也集中在氧化应激层面<sup>[6]</sup>;故本实验选取线粒体膜电位作为测量的另一指标,旨在从线粒体层面探索与氧化应激密切相关的线粒体膜电位的变化,为下一步深入研究提供理论和实验基础。线粒体是细胞内的重要细胞器,与细胞呼吸、氧的代谢、酶活性和能量供应有

关,这些功能与线粒体膜的通透性和跨膜电位有关<sup>[7]</sup>,线粒体膜电位指生物膜两侧离子浓度不同所产生的跨膜电位差,它反映了线粒体功能和膜的完整性,是评价线粒体功能的敏感指标。当跨膜电位下降,线粒体产生了形态和功能的改变,在死亡信号的诱导下,生物膜通透性改变、孔道开放是细胞凋亡的早期特征<sup>[8]</sup>。本次实验结果表明 0.1 和 0.5 μmol/L 亚硒酸钠能显著降低脑胶质瘤细胞线粒体膜电位,显示出对线粒体功能和膜完整性的破坏作用。

本实验初步探讨了亚硒酸钠对人脑胶质瘤 SHG-44 细胞的抑制作用,从生长抑制实验到线粒体膜电位的测量,初步印证了亚硒酸钠能够影响胶质瘤细胞的生长,并且其机制可能是通过影响线粒体膜电位来介导细胞发生凋亡和影响线粒体的功能 2 个方向进行,但是其具体的分子机制尚需深入的研究来明确。

4 参考文献

[1] Clark LC, Combs GF, Turnbull BW, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin[J]. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA, 1996 (24): 1957 - 1963.

[2] 张杰,刘祯,景鹏,等. 细胞线粒体膜电位的测量方法[J]. 首都医科大学学报,2006 (1):124 - 125.

[3] 俸家富,李少林. 硒、硒蛋白和硒的抗癌机理[J]. 微量元素与健康研究,2001 (1):70 - 72.

[4] 刘静颖,王海帆,赏诗樟. 亚硒酸钠对移植于裸鼠人神经胶质瘤的生长抑制作用[J]. 临床与实验病理学杂志,1992 (8):56 - 58.

[5] Nève J. Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity[J]. J Trace Elem Med Biol, 1995 (2):65 - 73.

[6] Seko Y, Satito Y, Kitabara J. Selenium in biology and medicine[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1989: 70 - 73.

[7] Mohamad N, Gutierrez A, Nunez M, et al. Mitochondrial apoptotic pathways[J]. Biocell. 2005 (2): 149 - 161.

[8] Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization[J]. J Cell SCI, 2005(3): 473 - 483.

(2011 - 12 - 17 收稿,2012 - 02 - 27 修回)  
编辑:周 凌