

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2024080502

CSTR:32061.14.hjhx.2024080502

张小鸿, 陆秋艳. 富硒食品中四价硒含量的测定及对结肠癌细胞的抑制作用[J]. 环境化学, 2024, 43(12): 4104-4111.

ZHANG Xiaohong, LU Qiuyan. Determination of tetravalent selenium content in Se-enriched foods and its inhibitory effect on colon cancer cells[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43 (12): 4104-4111.

富硒食品中四价硒含量的测定及对结肠癌细胞的抑制作用*

张小鸿 陆秋艳**

(福建省疾病预防控制中心 福建省人兽共患病研究重点实验室, 福州, 350012)

摘要 硒是人体必需微量营养元素, 具有免疫调节、抗氧化、抗癌等生物学功能. 从富硒食品中获取无机硒, 是一种安全、健康且有效的补充硒元素的方式. 为了解富硒食品中无机硒含量及其对 HCT116 结肠癌细胞凋亡、迁移、侵袭的影响及机制, 采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用 (HPLC-ICP-MS) 测定富硒食品中无机硒的含量, 并以一定浓度的亚硒酸钠处理 HCT116 结肠癌细胞 48 h, 测定细胞活力、凋亡、迁移、侵袭能力及相关蛋白表达. 实验结果表明富硒食品中仅检测出四价硒, 且四价硒亚硒酸钠能降低 HCT116 细胞活力、提高细胞凋亡率、抑制细胞迁移及侵袭能力, 下调 Bcl-2、MMP-2、MMP-9、intergrin α V β 3、PI3K、p-AKT 及 p-mTOR 蛋白表达, 上调 Bax、cleaved caspase 3 及 E-cadherin 蛋白表达, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$). 从而说明亚硒酸钠对结肠癌的抑制作用, 可能是通过阻断 PI3K/AKT/mTOR 信号通路实现的, 为富硒食品功能的深入研究、进一步开发及临床研究提供数据支撑, 也为结肠癌的临床治疗的研究提供新的策略和理论参考.

关键词 四价硒, 亚硒酸钠, 结肠癌细胞, 细胞培养, PI3K/AKT/mTOR 信号通路.

中图分类号 R735.3; O6 **文献标识码** A

Determination of tetravalent selenium content in Se-enriched foods and its inhibitory effect on colon cancer cells

ZHANG Xiaohong LU Qiuyan**

(Fujian Provincial Key Laboratory of Zoonosis, Fujian Center for Disease Prevention and Control, Fuzhou, 350012, China)

Abstract Selenium is an essential micronutrient element for the human body, which has biological functions such as immune regulation, antioxidant, and anti-cancer. Inorganic selenium obtaining from Se-enriched foods is a safe, healthy, and effective way to supplement selenium elements. The objective of this study was to explore the inorganic selenium content in Se-enriched foods as well as its mechanisms and effect on apoptosis, migration, and invasion of HCT116 colon cancer cells. Inorganic selenium content in Se-enriched foods was detected by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). HCT116 colon cancer cells were cultured with a certain concentration of sodium selenite for 48 hours. Cell viability, apoptosis, migration, invasion ability, and related protein expression was measured. The results showed that only tetravalent selenium was detected in Se-enriched foods. Sodium selenite could reduce HCT116 cell viability, increase cell apoptosis rate, inhibit cell migration and invasion ability,

2024年8月5日收稿 (Received: August 5, 2024).

* 福建省卫生健康科研人才培养项目医学创新课题 (2019-CXB-14) 资助.

Supported by Medical Innovation Project of Fujian Provincial Health Research Talent Training (2019-CXB-14).

** 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: 34844650@qq.com

down-regulate the expression of Bcl-2, MMP-2, MMP-9, integrin $\alpha V\beta 3$, PI3K, p-AKT, and p-mTOR, and up-regulate the expression of Bax, cleaved caspase 3, and E-cadherin. The differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The results suggest that the inhibitory effect of sodium selenite on colon cancer may be achieved by blocking the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. So it provides data support for the in-depth study, further development, and clinical research of Se-enriched foods, as well as new strategies and theoretical references for the clinical treatment of colon cancer.

Keywords tetravalent selenium, sodium selenite, colon cancer cell, cell culture, PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

结肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,至 2022 年, GLOBOCAN 全球癌症统计结果显示:全球新发癌症病例近 2000 万,其中新增结肠癌病例 192.6 万,占新发癌症总病例数 9.6%,居第三位;全球癌症死亡病例 970 万,因结肠癌死亡的患者 90.4 万人,占癌症总死亡病例数 9.3%,居第二位^[1]。我国的结肠癌发病率及死亡率也居处于较高水平,给人们带来沉重的疾病和经济负担^[2]。且结肠癌早期缺乏典型临床症状,一经确诊多数患者已处于晚期,只能采取姑息性手术治疗或无法手术治疗,导致预后较差^[3-4]。因此需要不断探索研究新的治疗药物来解决这一难题。

硒是人体必需的微量营养元素,参与机体多种酶的合成^[5]。研究显示硒与人的健康息息相关,如在某些国家或地区存在硒的缺乏会导致克山病、肿瘤的发生及死亡率的增加,而某些硒含量高的地区癌症发病率较低^[6]。自然界中的硒存在形式主要分为无机硒和有机硒,无机硒主要是亚硒酸盐,如亚硒酸钠,是膳食补充硒的重要来源,其作为四价硒,不仅化学性质稳定,还具有免疫调节、抗氧化作用,且抗癌作用特性优于有机硒化合物,适合应用于疾病临床前期的研究^[7-8]。研究显示亚硒酸钠可以通过抗氧化还原反应进而调节细胞凋亡、细胞周期、信号通路变化来起到抑制肿瘤生长的效果^[9-10],也对结肠癌细胞具有凋亡诱导作用,并抑制癌细胞增殖^[11-12],但相关机制尚不明确。

因此,本研究将参照前期研究基础^[13],采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用(HPLC-ICP-MS)测定富硒食品中无机硒的含量,接着以四价硒化合物亚硒酸钠为研究对象,探讨亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞生物学行为的影响及相关作用机制,以期富硒食品功能的开发应用提供数据支撑,为结肠癌患者的治疗提供新的理论参考和策略。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪、Agilent 7900 型电感耦合等离子体质谱仪、LabTech EH20A plus 微控数显电热板、MileStone ETHOS A 微波消解系统、THERMO GENPURE 纯水机、日本松下三洋 MCO-170 CO₂ 培养箱、日本 Nikon ECLIPSE Ts2-FL 倒置显微镜、日本 Olympus IX51 倒置荧光显微镜、上海伯乐 ChemiDoc MP Imaging System、高速离心机、超声波清洗器、漩涡振荡仪等。

硒酸根溶液 [GBW 10033, 以硒计: 41.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]、亚硒酸根溶液 [GBW 10032, 以硒计: 42.9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]、总硒溶液 [GBW(E) 080215, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] 标准物质均购自中国计量科学研究院;实验样品为富硒茶叶、富硒铁皮石斛、富硒鸭蛋、富硒葛粉,实验中硒形态含量均以硒计。

HCT116 结肠癌细胞购自中国科学院上海细胞库;亚硒酸钠购自美国 sigma 公司;transwell 小室购自美国 Corning 公司;兔抗 Bcl-2、Bax、GAPDH 单克隆抗体、Hoechst 染色试剂盒购自南京碧云天生物技术有限公司;兔抗 cleaved caspase 3、MMP-2、MMP-9、E-cadherin、integrin $\alpha V\beta 3$ 、PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司。

1.2 硒测定仪器条件

微波消解条件 消解功率 1500 W,升温程序:由室温升至 120 $^{\circ}\text{C}$,升温 3 min,恒温 3 min;120 $^{\circ}\text{C}$ 升至 190 $^{\circ}\text{C}$,升温 5 min,恒温 40 min。

色谱条件 色谱柱: hamilton PRP-X100 色谱柱(4.1 mm×250 mm, 10 μm), 流动相: 40 mmol·L⁻¹ 磷酸氢二铵(pH=6.0, 含 1% 甲醇), 等度洗脱, 流速: 1.2 mL·min⁻¹, 进样量: 20 μL.

ICP-MS 条件 射频功率 1550 W, 蠕动泵速率 0.4 r·min⁻¹, 雾化室温度 2.0 °C, 载气流量 1.09 L·min⁻¹, 冷却气流量 15 L·min⁻¹, 采样深度: 8.0 mm, 积分时间 1 s, 氦气流量 6.0 mL·min⁻¹, 检测同位素 ⁷⁸Se.

标准溶液配制 用超纯水稀释 Se(IV)、Se(VI)标准溶液, 配制 Se(IV)、Se(VI)混合标准溶液, 浓度分别为 1、2、5、10、20 μg·L⁻¹, 临用现配.

1.3 硒测定方法

总硒测定: 依据《食品安全国家标准 食品中硒的测定》GB 5009.93—2017^[14], 称取 0.5000 g 样品, 加入 6 mL 硝酸, 按照 1.2 节条件微波消解. 直接用 ICP-MS 测定总硒含量. 同时做空白对照实验.

硒形态测定: 参照前期研究基础^[13]. 称取 0.3000 g 样品于 15 mL 离心管内, 加入 10 mL 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液, 涡旋混匀后于 90 °C 超声 30 min, 冷却, 9000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 得到待测液, 同时做空白对照实验.

1.4 细胞实验

细胞培养: 将 HCT116 细胞接种到含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中. 每隔 2 d 换液, 当细胞生长到 80% 时候, 胰酶消化细胞并以 1:3 分配到新的培养瓶进行扩大培养, 取对数生长期细胞进行后续实验.

细胞分组: 将 HCT116 细胞随机分为 0(对照组)、2.5、5、10 μmol·L⁻¹ 亚硒酸钠组, 每组 6 个复孔, 除对照组加入等体积的 DMEM 培养液后, 其余组分别加入 0、2.5、5、10 μmol·L⁻¹ 的亚硒酸钠, 与 HCT116 细胞共同培养 48 h 后进行后续实验.

CCK8 检测细胞活力: 96 孔板每孔加入 100 μL 密度为 4×10⁴ 个·mL⁻¹ 的 HCT116 细胞, 每组设 6 个复孔, 按 1.4.2 节进行分组处置细胞 48 h, 加入 CCK8 溶液孵育 1 h, 使用酶标仪测定每孔在 450 nm 处的吸光度(OD 值), 计算细胞增殖抑制率, 细胞增殖抑制率=(亚硒酸钠组 OD 值-对照组 OD 值)/对照组 OD 值×100%.

Hoechst 检测细胞凋亡情况: 6 孔板每孔加入 2 mL 密度为 1×10⁶ 个·mL⁻¹ 的 HCT116 细胞, 每组设 6 个复孔, 按 1.4.2 节进行分组处置细胞 48 h, 弃培养液, 4% 聚乙烯醇固定细胞 10 min, PBS 洗涤, Hoechst 染色液染色 30 min, PBS 洗涤, 倒置荧光显微镜下观察细胞形态, 浓染致密的颗粒块蓝色荧光被认为是细胞凋亡, Image J 软件分析细胞凋亡率.

划痕实验检测能力: 使用 marker 笔, 直尺比着, 每间隔 0.5—1 cm 在 6 孔板背面画水平线, 每孔至少画 5 条水平线和一条垂直线. 6 孔板每孔加入 2 mL 密度为 1×10⁶ 个·mL⁻¹ 的 HCT116 细胞, 每组设 6 个复孔, 隔天使用 200 μL 移液枪轻划细胞, PBS 洗涤掉细胞, 倒置显微镜下观察细胞形态并拍照划痕距离(0 h, L₀), 48 h 后显微镜下再次拍照划痕距离(48 h, L₁), 细胞迁移率=(L₀-L₁)/L₀×100%.

Transwell 实验检测细胞侵袭能力: 将基质胶平铺于 transwell 上室待用. HCT116 细胞接种到 transwell 上室, 按 1.4.2 节进行分组处置, 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基加入到 transwell 下室. 48 h 后, 棉签擦拭 transwell 上室未迁移的细胞, 4% 多聚甲醛固定迁移到 transwell 下室的细胞 15 min, 接着 0.1% 结晶紫染色 20 min, 倒置荧光显微镜下观察细胞染色情况, 并取 5 个视野下染色细胞平均值作为细胞侵袭数目.

Western blot 检测蛋白表达: 6 孔板每孔加入 2 mL 密度为 1×10⁶ 个·mL⁻¹ 的 HCT116 细胞, 每组设 6 个复孔, 按 1.4.2 节进行分组处置细胞 48 h, PBS 洗涤, 细胞刮刮下细胞, 加入预先制冷的并含有磷酸酶抑制剂的细胞裂解液 4 °C 裂解细胞 30 min, 取上清液, 测定蛋白浓度, 加上样缓冲液并煮沸使蛋白变性. 制作 5% 浓缩胶, 12% 分离胶, 进行 SDS-PAGE 电泳, 待目的蛋白分离后, 采用“三明治”进行恒流冰浴转膜, 3%BSA 室温封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次, 一抗溶液 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 二抗溶液室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤 3 次, 使用 ECL 化学发光液进行显色, 并在凝胶成像系统中曝光, 以 GAPDH 为内参, Image J 软件分析目的蛋白灰度值.

1.5 统计分析

所有实验均重复 3 次, SPSS20.0 进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析组间差异性, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 无机硒形态的色谱图

按照《生活饮用水标准检验方法 第 6 部分: 金属和类金属指标》GB/T 5750.6—2023 进行无机硒形态测定^[15], 四价(Se(IV))和六价硒(Se(VI))形态在 9 min 内实现了基线分离(图 1), 满足实验要求。

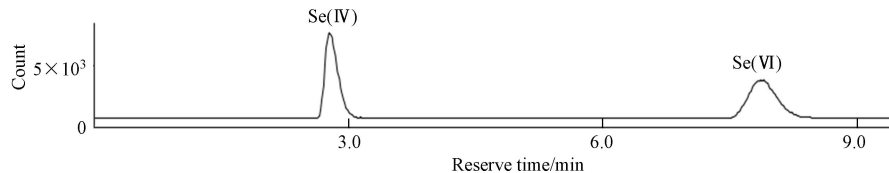


图 1 无机硒形态色谱图

Fig.1 Chromatogram of inorganic selenium forms

2.2 富硒食品中总硒及四价硒含量测定结果

对 4 种富硒食品中总硒及无机硒含量进行分析, 测定结果见表 1. 富硒食品中检出四价硒, 未检出六价硒, 这和方勇^[16]、张俊杰^[17]、周晓华^[18]等的研究结果一致, 说明富硒食品中含有四价硒. 亚硒酸钠是主要的四价硒存在形式, 是膳食补充硒的主要来源, 且化学性质稳定, 具有一定的抗癌作用^[10-12, 19], 因此本研究将以四价硒亚硒酸钠为研究对象, 探讨亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞活力、凋亡、迁移、侵袭的影响及相关机制。

表 1 富硒食品中总硒及硒形态含量(mg·kg⁻¹)

Table 1 The content of total selenium and selenium form in Se-enriched foods (mg·kg⁻¹)

	Se(IV)	Se(VI)	总硒 Total selenium
富硒茶叶	0.0275	<0.01	0.403
富硒铁皮石斛	0.121	<0.01	1.33
富硒鸭蛋	0.0492	<0.01	0.445
富硒葛粉	0.696	<0.01	2.26

2.3 亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞活力、凋亡、迁移、侵袭的影响

本研究参考相关文献^[10-12, 19]并结合预实验证实, 2.5、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠能显著的降低 HCT116 细胞活力, 使细胞增殖抑制率提高(表 2), 差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$). 接着采用 Hoechst 染色、划痕实验、transwell 实验检测 2.5、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠对 HCT116 细胞凋亡、迁移及侵袭能力的影响, 实验结果表明, 与对照组比较, 2.5、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组 HCT116 细胞凋亡率提高(图 2、表 2), 细胞迁移率降低(图 3、表 2), 细胞侵袭数目减少(图 4、表 2), 差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$). 而且有文献报道证实 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠能通过 ROS 介导的 NF- κB 信号通路抑制肾癌癌细胞增殖、迁移及侵袭, 并诱导细胞凋亡^[10], 也能通过 ERK 信号通路抑制甲状腺癌细胞增殖^[19]. 结合本实验结果及以上报道, 本研究推测一定剂量亚硒酸钠能诱导 HCT116 细胞凋亡, 并抑制细胞迁移、侵袭, 进而发挥其抗癌作用, 其作用机制值得进一步探讨。

表 2 亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞活力、凋亡、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of sodium selenite on on HCT116 cells viability, apoptotis, migration and invasion ($\bar{x}\pm s$)

组别 Experimental group	<i>n</i>	细胞增殖抑制率/% Cell proliferation inhibitory rate	细胞凋亡率/% Cell apoptotic rate	细胞迁移率/% Cell migration rate	细胞侵袭数目 Cell invasion number
对照组	6	0	3.47±0.051	52.9±0.57	210.3±2.38
2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	17.9±0.36**	13.6±0.04**	42.7±0.40**	154.4±2.80**
5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	25.3±0.15**	24.1±0.15**	31.3±0.31**	111.3±2.55**
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	33.3±0.26**	35.3±0.26**	17.4±0.21**	77.1±1.11**

**与对照组比较, $P<0.01$. Compared with control, $P<0.01$.

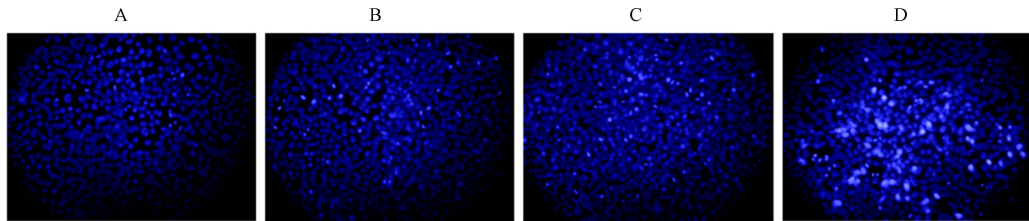


图 2 亚硒酸钠诱导 HCT116 细胞凋亡(Hoechst 染色, $\times 200$, $n=6$)

(A. 对照组; B. $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; C. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; D. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组)

Fig.2 Apoptosis of HCT116 cells induced by sodium selenite ($\times 200$, $n=6$)

(A. control; B. $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; C. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; D. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite)

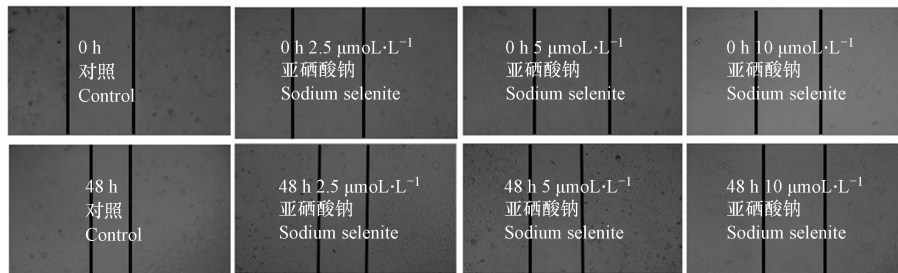


图 3 亚硒酸钠抑制 HCT116 细胞迁移($\times 200$, $n=6$)

(A. 对照组; B. $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; C. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; D. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组)

Fig.3 Inhibition of sodium selenite on migration of HCT116 cells($\times 200$, $n=6$)

(A. control; B. $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; C. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; D. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite)

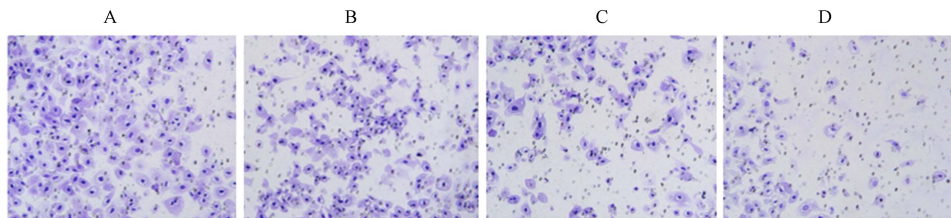


图 4 亚硒酸钠抑制 HCT116 细胞侵袭($\times 200$, $n=6$)

(A. 对照组; B. $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; C. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; D. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组)

Fig.4 Inhibition of sodium selenite on invasion of HCT116 cells($\times 200$, $n=6$)

(A. control; B. $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; C. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; D. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite)

2.4 亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved caspase 3、MMP-2、MMP-9、intergrin $\alpha\text{V}\beta 3$ 及 E-cadherin 蛋白表达量的影响

细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭等生物学过程与细胞凋亡蛋白(Bax、Bcl-2、cleaved caspase 3)、细胞蛋白水解酶(MMPs)及黏附蛋白等有关,因此为了探讨亚硒酸钠对 HCT116 细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭相关蛋白表达量的影响,本研究接着采用 western blot 检测亚硒酸钠对上述蛋白表达量的影响,western blot 实验结果表明,与对照组比较,2.5、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组中 Bcl-2、MMP-2、

MMP-9 及 intergrin $\alpha\text{V}\beta 3$ 蛋白表达量降低, Bax、cleaved caspase 3 及 E-cadherin 蛋白表达量升高,差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 5、表 3),从而说明亚硒酸钠能通过增加凋亡蛋白表达,降低抗凋亡蛋白表达,抑制肿瘤侵袭转移相关蛋白表达水平,提高黏附蛋白 E-cadherin 的表达量,进而诱导 HCT116 细胞凋亡、抑制细胞增殖、迁移及侵袭。

2.5 亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞中 PI3K、p-AKT 及 p-mTOR 蛋白表达量的影响

研究表明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路及其下游信号分子直接参与结肠癌细胞增殖、凋亡、细胞周期、迁移、侵袭及转移等恶性生物学过程,因此 PI3K/AKT/mTOR 信号通路成为结肠癌治疗药物研发的热点靶通路^[20-22]。PI3K 是一种异源二聚体,被上游的信号激活后,可作为第二信使激活下游靶蛋白 AKT。mTOR 是 AKT 的底物,被 AKT 激活磷酸化后,参与 mRNA 翻译相关蛋白及抑制蛋白表达的调控。激活的 mTOR 能增加 MMPs 的表达促进细胞外基质降解,进而增强癌细胞侵袭及迁移能力^[23]。

AKT 能够通过靶向 Bcl-2、Caspase 3 表达进而抵抗细胞凋亡^[24]。本研究前期已证实亚硒酸钠对 Bcl-2、Caspase 3 及 MMPs 的调节作用(图 5、表 3), 也发现硒代蛋氨酸对结肠癌细胞的凋亡、黏附、侵袭具有显著的抑制作用, 可能是通过抑制 GSK-3 β /PI3K/AKT 信号通路实现的^[25]。且有表观遗传学实验证实亚硒酸钠能通过 PI3K/AKT 信号通路参与乳腺癌的发生发展^[26], 也能通过 ROS 介导的 AKT/mTOR 通路诱导甲状腺癌细胞周期阻滞和凋亡^[27]。进而推测亚硒酸钠对结肠癌细胞恶性生物学行为的抑制作用与调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。因此为了证实此推测, 本研究继续采用 western blot 实验检测 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白的表达, 结果表明亚硒酸钠可显著减少 PI3K 表达及 AKT、mTOR 磷酸化水平, 而对总的 AKT、mTOR 表达没有显著的影响(图 6、表 4)。因此, 本研究初步认为亚硒酸钠通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥其抗结肠癌作用。

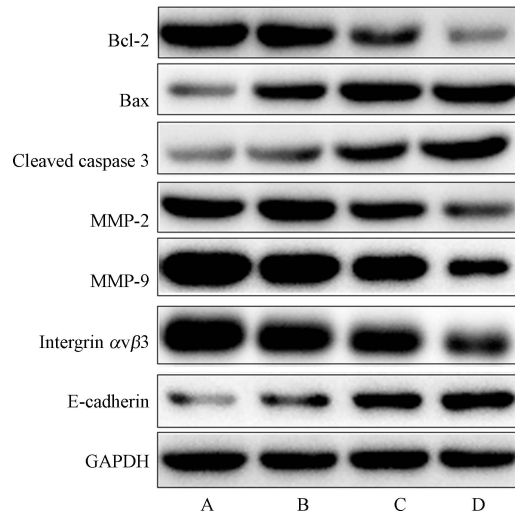


图 5 亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved caspase 3、MMP-2、MMP-9、intergrin $\alpha\beta$ 3 及 E-cadherin 蛋白表达量的影响

(A. 对照组; B. 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; C. 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; D. 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组)

Fig.5 The effect of sodium selenite on the expression of Bcl-2, Bax, cleaved caspase 3, MMP-2, MMP-9, intergrin $\alpha\beta$ 3 and E-cadherin in HCT116 cells

(A. control; B. 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; C. 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; D. 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite)

表 3 亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved caspase 3、MMP-2、MMP-9、intergrin $\alpha\beta$ 3 及 E-cadherin 蛋白表达量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 The effect of sodium selenite on the expression of Bcl-2, Bax, cleaved caspase 3, MMP-2, MMP-9, intergrin $\alpha\beta$ 3 and E-cadherin in HCT116 cells ($\bar{x}\pm s$)

组别 Experimental group	n	Bcl-2	Bax	cleaved caspase 3	MMP-2	MMP-9	intergrin $\alpha\beta$ 3	E-cadherin
对照组	6	1.6 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02	0.20 \pm 0.01	1.03 \pm 0.01	2.37 \pm 0.08	2.36 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01
2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	1.25 \pm 0.06**	0.71 \pm 0.01**	0.31 \pm 0.02**	0.95 \pm 0.01**	2.07 \pm 0.03**	1.83 \pm 0.04**	0.36 \pm 0.01**
5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	0.57 \pm 0.02**	1.07 \pm 0.04**	0.73 \pm 0.02**	0.75 \pm 0.01**	1.65 \pm 0.03**	1.22 \pm 0.01**	0.69 \pm 0.04**
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	0.11 \pm 0.01**	1.25 \pm 0.02**	1.27 \pm 0.03**	0.31 \pm 0.01**	0.43 \pm 0.01**	0.44 \pm 0.01**	1.00 \pm 0.02**

**与对照组比较, $P<0.01$. Compared with control, $P<0.01$.

表 4 亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞中 PI3K、p-AKT 及 p-mTOR 蛋白表达量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of sodium selenite on the expression of PI3K, p-AKT and p-mTOR in HCT116 cells ($\bar{x}\pm s$)

组别 Experimental group	n	PI3K	p-AKT	p-mTOR
对照组	6	0.84 \pm 0.01	1.21 \pm 0.01	1.20 \pm 0.01
2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	0.52 \pm 0.01**	0.97 \pm 0.01**	1.00 \pm 0.02**
5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	0.50 \pm 0.02**	0.66 \pm 0.01**	0.42 \pm 0.01**
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组	6	0.40 \pm 0.01**	0.29 \pm 0.01**	0.29 \pm 0.01**

**与对照组比较, $P<0.01$. Compared with control, $P<0.01$.

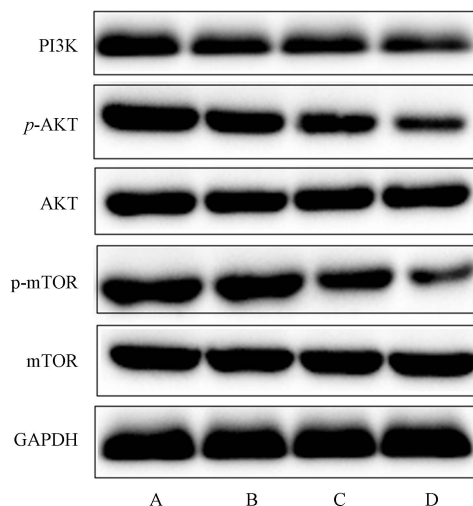


图6 亚硒酸钠对 HCT116 结肠癌细胞中 PI3K、p-AKT 及 p-mTOR 蛋白表达量的影响
(A. 对照组; B. $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; C. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组; D. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠组)

Fig.6 Effect of sodium selenite on the expression of PI3K, p-AKT and p-mTOR in HCT116 cells
(A. control; B. $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; C. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite; D. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium selenite)

3 结论(Conclusion)

综上所述,本研究采用 HPLC-ICP-MS 仅检出富硒食品中含有四价硒,接着采用 2.5 、 5 、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硒酸钠处理 HCT116 结肠癌细胞 48 h,实验结果表明亚硒酸钠能降低 HCT116 结肠癌细胞活力,诱导细胞凋亡,抑制细胞迁移及侵袭能力,发挥其抗癌的作用,这可能是亚硒酸钠通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路实现的.研究结果为含有亚硒酸钠等硒化合物的富硒食品的深入研究、进一步开发及临床研究提供新的实验依据,为结肠癌的治疗提供新的线索.但也需要采用结肠癌动物模型来进一步补充和验证本研究的结果,这将是下一步的研究方向.

参考文献 (References)

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] 郑荣寿, 张思维, 孙可欣, 等. 2016 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2023, 45(3): 212-220.
ZHENG R S, ZHANG S W, SUN K X, et al. Cancer statistics in China, 2016[J]. Chinese Journal of Oncology, 2023, 45(3): 212-220 (in Chinese).
- [3] LINGAS E C. Early-onset colon cancer: A narrative review of its pathogenesis, clinical presentation, treatment, and prognosis[J]. Cureus, 2023, 15(9): e45404.
- [4] TO Y H, GIBBS P, TIE J, et al. Health economic evidence for adjuvant chemotherapy in stage II and III colon cancer: A systematic review[J]. Cost Effectiveness and Resource Allocation, 2023, 21(1): 11.
- [5] GARBO S, Di GIACOMO S, ŁAŻEWSKA D, et al. Selenium-containing agents acting on cancer-a new hope?[J]. Pharmaceutics, 2022, 15(1): 104.
- [6] GENCHI G, LAURIA G, CATALANO A, et al. Biological activity of selenium and its impact on human health[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2633.
- [7] LIPINSKI B. Sodium selenite as an anticancer agent[J]. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2017, 17(5): 658-661.
- [8] PFISTER C, DAWZCZYNSKI H, SCHINGALE F J. Sodium selenite and cancer related lymphedema: Biological and pharmacological effects[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2016, 37: 111-116.
- [9] QI L, WANG Y Y, SU S Q, et al. Sodium selenite inhibits cervical cancer growth via ROS mediated AMPK/FOXO3a/GADD45a axis[J]. Chemico-Biological Interactions, 2022, 367: 110171.
- [10] LIU X, JIANG M, PANG C G, et al. Sodium selenite inhibits proliferation and metastasis through ROS-mediated NF- κ B signaling in renal cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 870.
- [11] LI Z, MENG J, XU T J, et al. Sodium selenite induces apoptosis in colon cancer cells via Bax-dependent mitochondrial pathway[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2013, 17(16): 2166-2171.

- [12] KRÁLOVÁ V, BRIGULOVÁ K, ČERVINKA M, et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of sodium selenite in human colon cancer cells[J]. *Toxicology in Vitro*, 2009, 23(8): 1497-1503.
- [13] 陆秋艳, 张小鸿, 张文婷, 等. 富硒葛粉中硒形态分析及其对脂多糖诱导的 AML12 细胞氧化损伤的影响 [J]. 环境化学, 2023, 42(10): 3603-3607.
LU Q Y, ZHANG X H, ZHANG W T, et al. Determination of selenium species in Se-enriched puerarin powder and its effect on oxidative damage of AML12 cells induced by Lipopolysaccharide[J]. *Environmental Chemistry*, 2023, 42(10): 3603-3607 (in Chinese).
- [14] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中硒的测定: GB 5009.93—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. National food safety standard Determination of selenium in foods: GB 5009.93—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [15] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法 第 6 部分: 金属和类金属指标: GB/T 5750.6—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
State Administration for Market Regulation; Standardization Administration of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Standard examination methods for drinking water: Part 6: Metal and metalloid indices: GB/T 5750.6—2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023 (in Chinese).
- [16] 方勇, 罗佩竹, 胡勇, 等. 大蒜的生物富硒作用及其硒的形态分析 [J]. 食品科学, 2012, 33(17): 1-5.
FANG Y, LUO P Z, HU Y, et al. Bioaccumulation and speciation analysis of selenium in garlic (*Allium sativum* L.)[J]. *Food Science*, 2012, 33(17): 1-5 (in Chinese).
- [17] 张俊杰, 郭志强, 王娟娟, 等. 施加硒代蛋氨酸和亚硒酸钠对韭菜总硒及硒形态的影响 [J]. 山西大学学报(自然科学版), 2019, 42(3): 605-610.
ZHANG J J, GUO Z Q, WANG J J, et al. Effects of selenomethionine and sodium selenite fertilizer on total selenium and selenium species in Chinese chives[J]. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 2019, 42(3): 605-610 (in Chinese).
- [18] 周晓华, 王铁良, 魏亮亮, 等. 高效液相色谱-原子荧光光谱联用技术测定富硒鸡蛋中的硒形态 [J]. 中国无机分析化学, 2023, 13(12): 1451-1458.
ZHOU X H, WANG T L, WEI L L, et al. Determination of selenium species in Se-enriched eggs by high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry[J]. *Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry*, 2023, 13(12): 1451-1458 (in Chinese).
- [19] KIM J B, YANG E Y, WOO J, et al. Sodium selenite enhanced the anti-proliferative effect of MEK-ERK inhibitor in thyroid cancer cells[J]. *In Vivo*, 2020, 34(1): 185-190.
- [20] DAI W, DAI Y G, REN D F, et al. Dieckol, a natural polyphenolic drug, inhibits the proliferation and migration of colon cancer cells by inhibiting PI3K, AKT, and mTOR phosphorylation[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2023, 37(5): e23313.
- [21] ATANASOVA V S, RIEDL A, STROBL M, et al. Selective eradication of colon cancer cells harboring PI3K and/or MAPK pathway mutations in 3D culture by combined PI3K/AKT/mTOR pathway and MEK inhibition[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 1668.
- [22] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1): 138.
- [23] ZHOU H K, LI X C, RANA M, et al. mTOR inhibitor rapalink-1 prevents ethanol-induced senescence in endothelial cells[J]. *Cells*, 2023, 12(22): 2609.
- [24] ZHOU S K, GAO X Q, CHEN C, et al. Porcine cardiac blood - *Salvia miltiorrhiza* root alleviates cerebral ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress induced apoptosis through PI3K/AKT/Bcl-2/Bax signaling pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 316: 116698.
- [25] 张小鸿, 陆秋艳. 硒代蛋氨酸对结肠癌细胞凋亡、粘附、侵袭的影响及机制 [J]. 营养学报, 2023, 45(5): 436-440.
ZHANG X H, LU Q Y. Effects of selenomethionine on apoptosis, adhesion and invasion of colon cancer cells and the mechanism involved[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2023, 45(5): 436-440 (in Chinese).
- [26] LIANG Z Z, ZHU R M, LI Y L, et al. Differential epigenetic profiles induced by sodium selenite in breast cancer cells[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2021, 64: 126677.
- [27] CHENG Z, YU S, HE W M, et al. Selenite induces cell cycle arrest and apoptosis via reactive oxygen species-dependent inhibition of the AKT/mTOR pathway in thyroid cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 668424.