

飲水中添加硒對小白鼠 Sarcoma-180 腹水瘤 細胞影響之研究

郭倍榮 謝明哲* 陳美蓮**

摘 要

硒是人體的一種微營養元素，同時有多種生理上的功能。本實驗在飲水中添加亞硒酸鈉，依照不同的濃度和飲用時間，來觀察硒對小白鼠接種腫瘤後對腫瘤生長的抑制作用。

使用 Bald/C 小白鼠，將其隨意分成五組，第一組為對照組，在飲水中不添加硒；第二組在腫瘤細胞移植後，飲用 2 ppm 濃度的含硒飲水；第三組在腫瘤細胞移植後，飲用 4 ppm 濃度的含硒飲水；第四組先飲用 2 ppm 濃度的含硒飲水，待腫瘤細胞移植後，繼續使用 2 ppm 的含硒飲水；第五組先飲用 4 ppm 濃度的含硒飲水，待腫瘤細胞移植後，繼續飲用 4 ppm 濃度的含硒飲水。所有各組皆在第 18 天時移植 Sarcoma-180 腫瘤細胞。結果，在 38 天之間，對照組存活率為 44%，第二組 87%，但第三、四、五組經 112 天的觀察，皆無死於腹水瘤。所有各組死亡之小白鼠，皆經解剖及切片證實。而實驗組在第 130 天時，將存活之小白鼠犧牲，經解剖及切片觀察，皆無中毒現象發生。顯示：在飲水中添加硒劑是一種有效及安全的腫瘤預防與治療方法。

前 言

硒是一種稀有元素，在 1970 年以前，硒被認為祇是一種動物及細菌所必須的營養成份⁽¹⁾。而在 1970 年時，Shamberger⁽²⁾在動物實驗上發現，硒具有抗癌的效果。而曾經在中國大陸，由於使用亞硒酸鈉 (Sodium selenite) 成功的治療和減少了一種地區性疾病—克山病 (Keshan disease)⁽³⁾。而紐西蘭和芬蘭^(4,5,6)也成功的使用硒來治療因缺乏硒而造成肌肉痙攣

的病人。因此，在 1979 年，硒被認為是人體必須的微營養素之一。而在 1970 以後，有許多學者利用動物實驗或流行病學上的研究，陸續的說明了硒與癌症之間的關係⁽⁶⁻¹⁶⁾。此外，硒亦被報告與肝硬化⁽¹⁷⁾，冠狀動脈心臟病⁽¹⁸⁾，多發性硬化⁽¹⁹⁾，關節炎^(5,20)皆有密切的關係。硒對重金屬如砷、鎘、汞、銀亦有拮抗作用，而減少其對身體的毒性⁽⁶⁾。

本研究的主要目的：乃是利用不同設定條件下的含硒飲水給與小白鼠飲用，然後觀察其對接種過 S-180 腫瘤細胞小白鼠的影響，以及

台北醫學院牙醫學系

*台北醫學院營養保健學系

**陽明醫學院社會醫學科

民國七十六年十一月十一日受理

組織學上的反應，以作為癌症治療時，使用硒當作輔助療法的參考。

材料方法

動物：

Inbred Bald/C 雄性小白鼠，購自台灣大學醫學院實驗動物中心。斷乳後二週，體重 20-25 公克，總共 47 隻。將其隨意分成一個對照組和四個實驗組。每組置於一個塑膠鼠籠，並以消毒硬木屑為墊底。動物室維持在 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相對溼度為 50%，並有 12 小時亮-暗循環。以 Lab Chow 5001 (Charles River Co., Wilmington, MA, USA) 飼料餵食，整個實驗當中飼料和飲水皆為動物自由取食 (ad libitum)，所用之飲水皆以塑膠瓶裝盛，並且每週更換二次。

腫瘤：

Sarcoma-180 (S-180)，以腹水瘤方式，每 2 週移轉一次，將已經接近移轉期間的小白鼠取出腹水，用 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.5) 清洗三次後，稀釋 10 倍，再次以同體積之台盼藍 (trypan blue) 溶液染色，用血球計數器於顯微鏡下計算所得腫瘤細胞密度為每毫升 1.5×10^7 細胞。

實驗步驟：將小白鼠隨意分成五組，第一組為對照組，有 9 隻，在腫瘤細胞移植前和移植後，在飲水中不添硒。

第二組有 9 隻，在腫瘤細胞移植前飲水中不添加硒，但在移植後，在飲水中添加 2 ppm 硒。

第三組有 8 隻，在腫瘤細胞移植前飲水中不添加硒，但在移植後，在飲水中添加 4 ppm 硒。

第四組有 11 隻，在腫瘤細胞移植前和移植後整個實驗過程中，在飲水中皆添加 2 ppm 硒。

第五組有 10 隻，在腫瘤細胞移植前和移植後整個實驗過程中，在飲水皆添加 4 ppm 硒。

所添加的硒，皆以 Na_2SeO_3 (Sigmal Chemical Co., St. Louis, USA) 化合物方式給與。各組小白鼠皆在實驗開始後第 18 天移植腫瘤細胞，以 25 號針頭，由小白鼠右側腹部中央將皮膚肌肉挑起，每隻注射 0.2 ml (含腫瘤細胞約 3.0×10^6 個) 入腹腔之中。

然後觀察其存活率，並將存留的小白鼠在實驗開始後第 130 天，全部以頸椎脫臼法犧牲之。

全部因腹水瘤而死亡之小白鼠和最後犧牲之小白鼠，皆經過解剖，並經取肝臟、腎臟、小腸、脾臟和可見之淋巴結做成組織切片，以顯微鏡觀察鑑定之。所有之腹水亦皆以細胞抹片，經固定和 Hematoxylin-Eosin 法染色後，觀察腫瘤細胞之存在與否。並將各組之結果互相比較。

結 果

在小白鼠存活率方面，對照組在第 56 天時，祇剩 4 隻存活，佔 44%；而第二組有 8 隻存活，佔 89%；而第三、四、五組皆無死亡。所有死亡之小白鼠，在死亡之前腹部皆產生大量腹水 (圖一)，而造成呼吸困頓的現象 (respiratory distress)。經抹片檢查，可見到許多 S-180 腫瘤細胞 (圖二)。

將各組所得的結果，採用 Gehan's Generalized Wilcoxon Test⁽²¹⁾ 分析以後，顯示：第二組比對照組對於腹水瘤的治療來得有效。

($P < 0.05$) 當然，飲水中硒添加量愈高，治療效果較佳。

在組織學檢查方面，所有對照組因腹水瘤而死亡之小白鼠，在肝臟皆可見到被 S-180 腫瘤細胞破壞的現象 (圖三)，而在部分肝門區域可見到有明顯的炎症細胞浸潤的情形 (圖四)，而在腎臟及小腸的漿膜下亦有腫瘤細胞浸潤 (圖五、六)。而在淋巴結，可見到有淋巴增生 (lymphoid hyperplasia)，但不見有腫瘤細胞浸潤的現象。而第二組因腹水瘤而死亡之



圖 1. 小白鼠腹部產生大量腹水

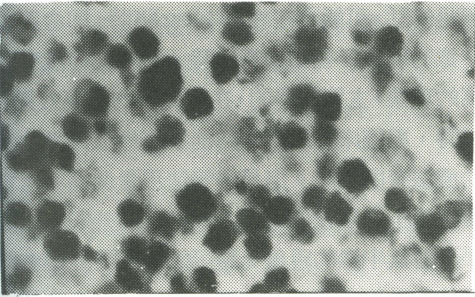


圖 2. 腹水抹片檢查, 可見到許多腫瘤細胞 (H&E 染色, $\times 800$)

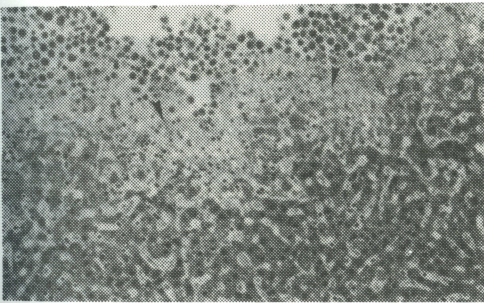


圖 3. 對照組, 腫瘤移植後 26 天時, 肝臟實質組織被腫瘤細胞破壞。 (H&E 染色, $\times 160$)

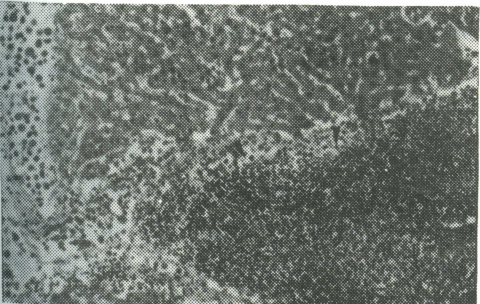


圖 4. 對照組, 腫瘤移植後 26 天時, 肝門區域有明顯炎症細胞浸潤。 (H&E 染色, $\times 160$)

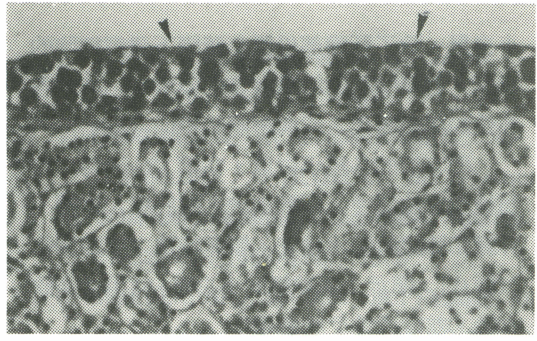


圖 5. 對照組, 腫瘤移植後 26 天時, 腎臟漿膜下有腫瘤細胞浸潤。 (H&E 染色, $\times 320$)

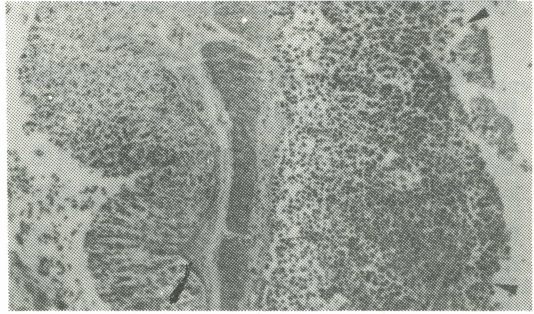


圖 6. 對照組, 腫瘤移植後 38 天時, 小腸漿膜下, 有大量的腫瘤細胞浸潤。 (H&E 染色, $\times 80$)

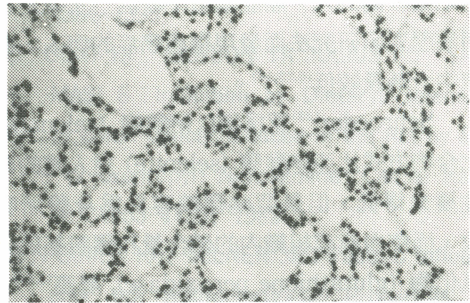


圖 7. 第二組, 腫瘤移植 26 天時肺部並無腫瘤細胞浸潤。 (H&E 染色, $\times 320$)

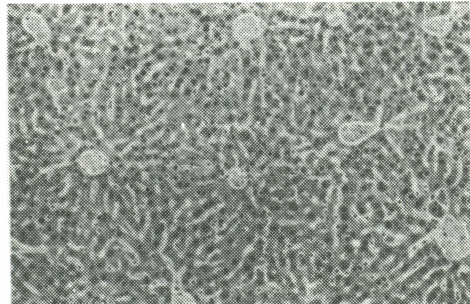


圖 8. 第五組, 以 4 ppm 含硒水, 飲用 130 天時, 肝臟細胞並無病理變化。 (H&E 染色, $\times 320$)

小白鼠，除了肝臟部份祇有漿膜下腫瘤細胞的浸潤，而無明顯的組織實質的破壞外，其餘各部位的組織變化，皆與對照組相似（圖七）。

而存活的各組小白鼠，在第 130 天時，以頸椎脫臼法犧牲，經解剖後，取肝臟、腎臟、脾臟和肺臟做切片檢查，皆無特殊之組織變化（圖八），顯示：實驗組的小白鼠，飲用含硒飲水後，並無毒性反應發生。

討 論

硒在 1943 年時，曾一度因會造成老鼠肝臟腫瘤，而被認為有致癌性⁽²²⁾；Schroeder⁽²³⁾在 1971 年時，曾使用較高含硒量的食物餵食老鼠，結果在 20 天到 23 個月之間，實驗組產生較高的致癌率。但是，後來大部份的學者，曾重覆這些實驗，但無法肯定硒有致癌性⁽¹⁴⁾。事實上，不僅在動物實驗不能確定硒有致癌性，反而顯示出硒具有抗癌的效果⁽⁸⁻¹²⁾。而在人類方面，利用流行病學調查方法，發現在血液中含硒量較高的人，癌症罹患率較低⁽¹⁴⁾，或是利用病歷對照研究法而發現罹患癌症的病人，血液中含硒量較低^(6,13,16)。

Schroeder⁽²³⁾認為硒以硒酸鹽 (selenate) 化合物方式比亞硒酸鹽 (selenite) 對人體的毒性要來得低，但是亞硒鹽較容易為身體所吸收，而使血液或組織內的硒含量和膠胺基硫過氧化酶 (glutathione peroxidase) 昇高^(3,24)，所以在最近臨床或動物實驗，供給硒成份時，皆以亞硒酸鈉化合物來授予^(3,9,10,11)。Sunde⁽²⁴⁾認為亞硒酸鹽合併甲硫胺基酸使用，可增加身體對硒的吸收和利用。Hsieh⁽²⁵⁾認為亞硒酸鹽可在肝臟中還原成硒化物，而被身體所利用。本實驗在整個過程中採用 Lab Chow 5001，其成份裡含有蛋白質，包括甲硫胺基酸以及 0.1 ppm 的硒，而在正常身體所須要的以硒為微營養素的濃度，亦為在食物中添加 0.1 ppm 的硒，因此，對照組的小白鼠，不會因硒不足而造成實驗結果的偏差，對實驗組而言，充份的

蛋白質亦可增加身體對硒的吸收。膠胺基硫過氧化酶是身體內含有硒的酵素，能夠分解身體內產生的過氧化氫，而避免因過氧化氫造成身體組織因游離基增加而產生破壞，同時，硒還有間接的抑制前列腺素形成的作用⁽²⁶⁾。而 LeBoeuf⁽²⁷⁾認為硒誘發的細胞裡硫氫基的氧化作用，與腫瘤生長的抑制有關。但是，無論如何硒在身體裡面有著多重生物化學效應⁽¹⁶⁾。而在人類，一般所謂高硒飲食，每天所食用的硒總量為 600 至 800 μg ⁽⁶⁾。但是，如果蛋白質不足的話，可能會在總量 1 mg 硒時，即會造成中毒的現象。在動物實驗時，硒的使用量有偏高的現象，主要的目的，在發揮硒的抗癌效果，這時，與臨床上以硒作為治療癌症低劑量的輔助療法有所不同。但是儘管使用量偏高，但實驗組的小白鼠在使用 130 天後，在外觀和組織學上並無中毒的現象，這可能與充份的蛋白質供給和動物的忍耐力有關。而 Danscher⁽²⁹⁾觀察，亞硒酸鹽中毒時，主要是在肝臟和腎臟引起組織細胞產生空泡狀的變化，而在本實驗中，並無此種現象。

S-180 腫瘤細胞是一種可移植而不會轉移的腹水瘤，本實驗的對照組在腫瘤移植 28 天後，有五隻死亡。經解剖後，除了在腎臟，小腸有漿膜下的浸潤外，在肝臟並有實質 (parenchyma) 的破壞現象，並且在肝門區有慢性炎症細胞的浸潤，這點和第二組因腹水瘤而死亡的小白鼠，在肝臟並無實質破壞的現象並不相同。這點可能與實驗組小白鼠肝臟有較為高含量的硒以及在肝臟有較高活性的膠胺基硫過氧化酶有關^(24,26,30)。

各組之小白鼠，因在恆溫恆溼條件的控制下，每隻每天平均飲水量為 4 ± 1 毫升，因此實驗組每天所攝取的會因為水中濃度的不同而有所差異。而對照組的第一隻小白鼠是在第 39 天死亡，而第五隻小白鼠的死亡是在第 56 天時，此後就不再有小白鼠死亡，因此，以第 56 天亦即腫瘤移植後第 38 天，為存活率的計算標準。

在本實驗中，硒在小白鼠體內可有效的抑

制腫瘤細胞的增生，因此具有腫瘤預防和治療的效果，而硒在體內可能有部份的堆積作用，因此，投予時間的增長亦可有效的抑制腫瘤細胞增生的效果。在臨床上，即使使用比本實驗更低的劑量，但是以長時間的投予，亦可得到理想的效果。在本實驗中，即使是在水中添加 4 ppm 硒，飲用 130 天後，小白鼠外觀、行爲、以及採用解剖與切片檢查，皆無特殊的變化。因此，在均衡的飲食下，即使適量的提高硒的劑量，在動物實驗上，亦不會產生中毒的現象。因此，可以說在飲水中添加硒劑，是一種有效、安全的腫瘤預防與治療方法。

誌 謝

本實驗中的 S-180 腫瘤細胞，承蒙本學院董教授大成及楊教授玲玲慨然贈予，特此誌謝。

REFERENCES

1. STADTMANTC : Selenium Biochemistry. Science 183 ; 915-922, 1974
2. SHAMBERGER RJ : Relationship of Selenium to Cancer. I. Inhibitory Effect of Selenium on Carcinogenesis. Nutr. Rev. 43 ; 342-344, 1985.
3. LUO X, WEI H, GUO J, SPALLHOLZ JE : Bioavailability of Selenium to Residents in a Low Selenium Area of China. Am. J. Clinic Nutr. 42 ; 439-448, 1985.
4. MUNRO I : Selenium in the Heart of China. The Lancet 27 ; 889-890, 1979.
5. JAMESON S, HOGIUND NJ : Pain Relief and Seselenium Balance in Patients with Connective Tissue Disease and Osteoarthritis. Nutr. Res. Suppl I ; 391-397, 1985.
6. CLARK LC, COMBS GF : Selenium Com- pounds and the Prevention of Cancer. J. Nutr. 116, 170-173, 1986.
7. BROGHAMER WL, MCCONNELL KP, GRIMALDIM , BLOTCKY AJ : Serum Selenium and Reticuloendothelial Tumors. Cancer 41 ; 1462-1466, 1978.
8. GREEDER GA, MILNER JA : Factors Influencing the Inhibitory Effect of Selenium on Mice Inoculated with Ehrlich Ascites Tumor Cellss. Science 209 ; 825-826, 1980.
9. IP C SINHA DK : Enhancement of Mammary Tumorigenesis by Dietary Selenium Deficiency in Rats with a High Polyunsaturated Fat Intake. Cancer Res. 41 ; 31-34, 1981.
10. IP C : Prophylaxis of Mammary Neplasis by Selenium Supplementation in the Initiation and Promotion Phases of Chemical Carcinogenesis. Cancer Res. 41 ; 4386-4390.
11. BERT DF, LAWSON TA JULIUS AD, SATMASI S : Inhibition by Dietary Selenium of Colon Cancer Induced in the Rat by Bis (2-oxopropyl) Nitrosamine. Cancer Res. 42 ; 4455-4459, 1982.
12. POIRIER KA, MILNER JA : Factors Influencing the Antitumorigenic Properties of Selenium in Mice. J. Nutr. 113 ; 2147-2154, 1983.
13. WILLETT WC, POLK BF, MORRIS JS, STAMPFER MJ : Prediagnostic Serum Selenium and Risk of Cancer. The Lancet 16 ; 130-134, 1983.
14. COMBS GF, CLARK LC : Can Dietary Selenium Modify Cancer Risk ? Nutr. Rev. 43 ; 325-331, 1985.
15. KOBAYASHI M, KOGATA M, YAMAMURA M, TAKADK H : Inhibitory Effect of Diet-

- ary Selenium on Carcinogenesis in Rat Glandular Stomach Induced by N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine. *Cancer Res.* 46 ; 2266-2270, 1986.
16. BURK RF : Selenium and Cancer : Meaning of Serum Selenium Levels. *J. Nutr.* 116 ; 1584-1586, 1986.
17. SOTANIEMI EA, KUMPULAINEN JT, KORPELA H : The Role of Selenium Deficiency in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. *Nutr. Rev. Suppl. 1* ; 424-425, 1985.
18. ALLEGRIN M, LANZOLA E, GALLORINI M : Dietary Selenium Intake in a Coronary Heart Disease Study in north Italy. *Nutr. Res. Suppl. 1* ; 398-402, 1985.
19. BRITT AW, PLANTIN LO, SUENSSON J : Selenium in Plasma, Erythrocytes and Platelets from Patients with Multiple Sclerosis. *Nutr. Res. Suppl. 1* : 403-405, 1985.
20. MCCONNELL KP, BROGHAMER WL, BLOTCKY AJ, HURT OJ : Selenium Levels in Human Blood and Tissues in Health and in Disease. *J. Nutr.* 105 ; 1026-1031. 1975.
21. LEE ET : Statistical Methods for Survival Data Analysis, Wadsworth Inc, California, pp. 122-127, 1980.
22. NELSON AA, FITZHUGH OG, CAIVERY HO : Liver Tumors following Cirrhosis Caused by Selenium in Pats. *Cancer Res.* 3 ; 230-233, 1943.
23. SCHROEDER HA, MITCHENER M : Selenium and Tellurium in Rats : Effect on Growth Survival and Tumors. *J. Nutr.* 101 ; 1531-1540, 1971.
24. SUNDE RA, GUTZKE CE, HOEKSTRA WG : Effect of Dietary Methionine on the Biopotency of Selenite and Selenomethionine in the Rat. *J. Nutr.* 111 ; 76-86, 1981.
25. HSIEH HS, GANTHER HE : Acid-Volatile Selenium Formation Catalyzed by Glutathione Reductase. *Biochemistry* 14 ; 1631-1636, 1975.
26. OLSON RE : Selenium-Containing Glutathione Peroxidase : Its synthesis and Function in Arachidonate Metabolism. *Nutr. Rev.* 39 ; 21-23, 1981.
27. LEBOEUF RA, HOEKSTRA WG : Adaptive Changes in Hepatic Glutathione Metabolism in Response to Excess Dietary Selenium. *J. Nutr.* 113 ; 845-854, 1983.
28. YANG GG, WANG SZ, ZHOV RH, SUH SH : Endemic Selenium Intoxication of Humans in China. *Am. J. Clin. Nutr.* 37 ; 872-881, 1983.
29. DANSCHER G, MØLLER-MADSEN B, RUNGBY J : Visualization of Selenium in Sodium Selenite Intoxicated Rats. *Nutr. Rev. Suppl. 1* ; 659-661, 1985.
30. HOGBERG J, STAHL A, ANUNDI I : Metabolism of High and Low Doses of Selenite in Isolated Hepatocytes. *Nutr. Res. Suppl. 1* ; 674-677, 1985.

Effects of Supplementation of Selenium in the Drinking Water on Sarcoma-180 Ascites Tumor Cells In Mice

BEY-RONG GUO, MING-JER SHIEH*,
MEI-LIEN CHEN**

ABSTRACT

Selenium is an essential trace element and plays a prominent role in the biological response. Provided by the different concentrations of selenium as sodium selenite in the drinking water, the result of tumor inhibition in mice was evaluated in this study.

Bald/c male mice were divided randomly into 5 groups: Group I, control group, no Se enhancement in the drinking water; Group II, enhanced 2 ppm Se in the drinking water after tumor cells transplantation; Group III, enhanced 4 ppm Se in the drinking water at the same time as Group II; Group IV, enhanced 2 ppm Se in the drinking water before and after the tumor cells transplantation. And Group V, enhanced 4 ppm Se in the drinking water at the same time as Group IV.

Transplantation of sarcoma-180 tumor cells were performed on the eighteenth day of this study. 38 days after transplantation, the survival rate of control group was 44%, Group II was 87%, but no mice died from tumor was found in Group III, IV, V. All of the mice were sacrificed on the 130th day of the study. The dying and sacrificed mice were checked by autopsy and histological study. No evidence of intoxication was found in the Se experimental groups. The data suggested that selenium was not only effective in the tumor inhibition but also safe in the practice.

School of Dentistry, Taipei Medical College.

School of Nutrition & Health Science, Taipei Medical College

Social Medical Department, Yang-Ming Medical College

Received for Publication: November 11, 1987.