

# 芥菜籽通过抗氧化和免疫偏移预防 大肠肿瘤的实验研究

袁葵<sup>1</sup> 郭文<sup>1</sup> 朱明古<sup>2</sup>

1. 南方医科大学南方医院消化科, 广东 广州 510515 ;
2. 韶关市铁路医院消化科, 广东 韶关 512023

**[摘要]** **背景与目的:** 近年来有关十字花科植物预防肿瘤的研究, 主要探讨其抗氧化、抗突变作用、调节免疫功能及诱导细胞凋亡等。芥菜籽(mustard seeds, MS)是十字花科植物的种子。本研究旨在探讨MS对1,2-二甲基肼(1,2-dimethylhydrazine, DMH)诱导的大鼠大肠肿瘤的抗氧化和免疫偏移作用机制。**方法:** 将48只Wistar雄性大鼠随机均分为4组: DMH模型组(模型组)、DMH+5%MS干预组(5%MS干预组)、DMH+7.5%MS干预组(7.5%MS干预组)和正常对照组。模型组和MS干预组每周按30 mg/kg剂量给予DMH腹腔注射1次, 连续20周, 均于32周时处死大鼠观察大肠肿瘤发生率并HE染色确定肿瘤的组织分型, 检测血清脂质过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平、抗氧化酶活力、Th1和Th2亚群细胞因子含量。**结果:** 正常对照组大鼠无肿瘤发生。模型组总成瘤率为100%, 5%MS干预组和7.5%MS干预组总成瘤率分别降低33.3%和58.3%( $P<0.05$ )。DMH诱导大鼠形成肿瘤的过程中, 模型组MDA水平和Th2亚群细胞因子含量均显著高于正常对照组( $P<0.05$ ); 而抗氧化酶活力明显低于正常对照组( $P<0.05$ )。经MS干预后MDA呈显著下降趋势( $P<0.05$ ), 而抗氧化酶活力和Th1亚群细胞因子含量均呈显著升高趋势( $P<0.05$ )。**结论:** 芥菜籽显著降低DMH化学诱导的大鼠大肠肿瘤的发生, 作用机制可能与其抗氧化作用和免疫平衡偏移有关。

**[关键词]** 芥菜籽; 1,2-二甲基肼; 大肠肿瘤; 抗氧化作用; 免疫偏移

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.02.003

中图分类号: R735.3+4 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)02-0093-06

**Experimental study of mustard seeds prevent colorectal tumor by antioxidation and immune deviation** YUAN Kui<sup>1</sup>, GUO Wen<sup>1</sup>, ZHU Ming-gu<sup>2</sup> (1.Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510515, China; 2.Department of Gastroenterology, Shaoguan Railway Hospital, Shaoguan Guangdong 512023, China)

Correspondence to: GUO Wen E-mail: gwdoc@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Recently, a large number of researches have shown that cruciferous plants have the chemopreventive effect on tumor. Mechanisms of antitumorigenesis were investigated on antioxidation, antimutation, immunity and inducing apoptosis, and so on. Mustard seeds (MS) are the seeds belong to the cruciferous plants. This study aimed to investigate antioxidation and immune deviation of MS on colorectal tumor in rats induced by 1, 2-dimethylhydrazine (DMH). **Methods:** A total of 48 male Wistar rats were randomly divided into four groups: DMH alone, DMH+5%MS, DMH+7.5%MS, and the untreated control group(Saline). Colorectal tumorigenesis was induced by intraperitoneal injecting 30 mg/kg DMH once a week for 20 weeks. At the end of 32 weeks, the rats were sacrificed, then colorectal tumor incidence was observed and histological type was determined by HE staining. A colorimetric assay was used to detect levels of the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) and the activity of antioxidant enzymes in the serum of all rats. The levels of Th1 and Th2 cytokines were detected with Luminex200. **Results:** No tumorous lesion was found in the untreated control group. However, the total tumor incidence in DMH+5%MS group and DMH+7.5%MS group was significantly decreased 33.3% and 58.3% respectively, compared with the DMH group's (100%,  $P<0.05$ ). As DMH induced colorectal tumorigenesis, MDA and Th2 cytokines in the serum were significantly higher in the DMH group than those in the untreated control group ( $P<0.05$ ), but the activities

of antioxidant enzymes were significantly lower ( $P < 0.05$ ). While the MS treatment, compared with the DMH group, significantly suppressed the MDA level but enhanced the activities of antioxidant enzymes and levels of Th1 cytokines ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** MS significantly decrease prevalence rates of DMH-induced colorectal tumor in rats. The mechanism may be related with the antioxidation and immune balance deviation.

[Key words] Mustard seeds; 1,2-dimethylhydrazine; Colorectal tumor; Antioxidation; Immune deviation

流行病学调查显示, 大肠肿瘤是世界上常见的肿瘤之一, 有较高的发病率和病死率<sup>[1]</sup>。通过食疗预防大肠肿瘤的发生和降低其对生命的威胁是目前研究的热点。近来有研究发现, 十字花科植物可以通过清除体内自由基并诱导抗氧化酶形成, 同时刺激免疫反应从而达到降低肿瘤发病率的目的<sup>[2]</sup>。经常食用辣根、甘蓝、花椰菜、卷心菜等十字花科蔬菜能降低人类前列腺癌、肺癌、膀胱癌、食管癌和结肠癌等的患病危险<sup>[3-4]</sup>。芥菜籽(mustard seeds, MS)是十字花科属植物的种子, 而以其干预预防肿瘤形成的研究甚少。本实验以1,2-二甲基胍(1,2-dimethylhydrazine, DMH)化学诱导的大鼠大肠肿瘤作为研究对象, 研究MS对预防实验性大鼠大肠肿瘤作用及其作用机制, 为开发利用MS预防大肠肿瘤提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂

化学诱癌剂DMH购自美国Sigma公司, 以0.9%NaCl溶液配制, 终质量浓度为1 g/L, 用1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>调节溶液pH值至6.5~7.0并过滤除菌; 脂质过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; LEGENDplex™ Custom Rat 3-Plex Cytokine Panel试剂盒为Biolegend公司产品; Luminex200为美国Millipore公司产品。

#### 1.1.2 实验动物

48只清洁级雄性(5~6周龄)Wistar大鼠购自南方医科大学动物实验中心。MS购自广州长合种子有限公司, 我们根据参考文献[5-6]分别

设定5%和7.5%作为理想MS饲料干预浓度, 在动物中心加工制成含5%MS和7.5%MS的颗粒饲料。实验大鼠饲养于南方医院动物实验中心, 颗粒饲料喂养, 定量给食, 自由取食及饮水, 正常饲养1周, 自第2周开始实验。饲养室保持良好通风, 环境温度控制21~23℃, 湿度控制在40%~50%, 12 h循环光照。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组及处理

48只Wistar大鼠随机均分为: ①DMH模型组: 30 mg/kg腹腔注射DMH, 每周1次, 连续给药20周, 标准饲料喂养; ②DMH+5%MS干预组: DMH给药同模型组, 5%MS颗粒饲料喂养; ③DMH+7.5%MS干预组: DMH给药同模型组, 7.5%MS颗粒饲料喂养; ④正常对照组: 腹腔注射与DMH等量0.9%NaCl溶液, 标准饲料喂养。实验第32周以颈椎脱臼处死动物取整段大肠及外周血。

#### 1.2.2 HE染色

大肠肿瘤组织标本在4%甲醛溶液中固定24 h, 脱水, 石蜡包埋, 4 μm厚连续切片, HE染色, 中性树胶封片。

#### 1.2.3 血清MDA含量及抗氧化酶SOD、CAT、GSH-PX活力的检测

采用硫代巴比妥酸法检测MDA的含量; 采用黄嘌呤氧化酶法检测SOD的活性; 采用可见光分光光度法检测CAT的活性; 采用化学比色法检测GSH-PX的活性。严格按照试剂盒说明书操作。

#### 1.2.4 检测血清中的Th1亚群细胞因子和Th2亚群细胞因子的含量

设定96孔板上标准品以及待测品的位置, 严格按照LEGENDplex™ Custom Rat 3-Plex Cytokine Panel试剂盒操作, 采用Luminex200检测分析。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。应用 $\chi^2$ 检验(Chi-square test)比较各组间大鼠大肠肿瘤发生率的差异,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间多重比较采用SNK方法进行分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大肠肿瘤肉眼观察

模型组全部大鼠大肠黏膜可见向肠腔突出的大小不一的肿瘤;5%MS干预组有8只出现向肠腔突出的肿瘤;7.5%MS干预组有5只发现肠腔肿瘤(图1)。

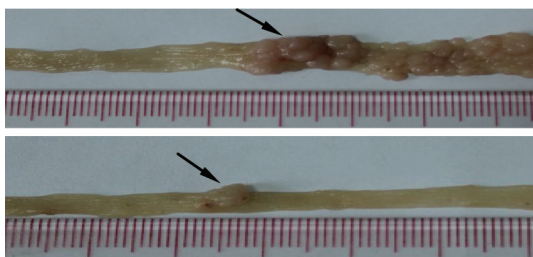


图1 DMH诱导的大鼠大肠肿瘤的大体形态

Fig.1 Morphology of DMH-induced colorectal tumors in rats

### 2.2 病理组织学检查

HE染色后镜下观察大肠肿瘤分为腺瘤及腺癌,模型组肿瘤组织多以腺瘤为主,浸润达黏膜下层以下,而MS干预组以腺瘤为主,局限于黏膜层内(图2)。模型组总成瘤率为100%,5%MS干预组和7.5%MS干预组总成瘤率分别降低33%和58.3%,正常对照组未发现肿瘤形成。 $\chi^2$ 检验显示,5%MS干预组和7.5%MS干预组总成瘤率与模型组相比明显降低,差异有统计学意义( $\chi^2=9.687, P=0.008$ ,表1)。

### 2.3 血清MDA含量和抗氧化酶活力

检测各组大鼠血清MDA的含量显示,模型组MDA含量明显高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );经MS干预后均呈下降趋势,其中7.5%MS干预组下降明显,与模型组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。检测抗氧化酶活力显示,各实验组间SOD、CAT、GSH-PX活力差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表2)。

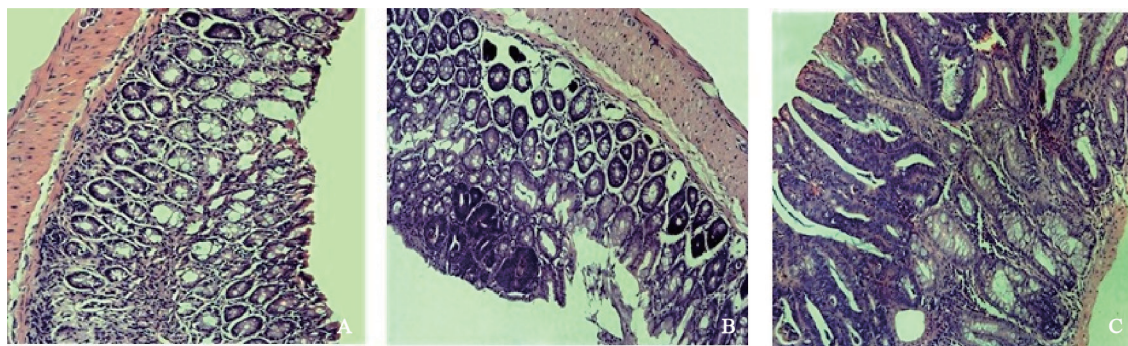


图2 DMH诱导大鼠大肠肿瘤过程中的黏膜病变

Fig. 2 Micrographs of various colorectal mucosa

A: Normal mucosa; B: Adenoma; C: Adenocarcinoma.

(HE,  $\times 100$ )

表1 MS对1,2-二甲基胍诱导大鼠大肠肿瘤发生的影响

Tab. 1 Effects of mustard seeds (MS) on DMH-induced colorectal tumor in rats

Groups	Total tumor incidence	Adenocarcinoma incidence	Adenoma incidence
DMH	12(100)	10(83.3)	2(16.7)
DMH + 5% MS	8(66.7)	3(25.0)	5(41.7)
DMH + 7.5% MS	5(41.7)	1(8.3)	4(33.3)
Saline	0(0)	0(0)	0(0)
<i>P</i> value	0.008	$< 0.001$	0.400

[n(%)]

表2 MS降低DMH诱导大肠肿瘤的大鼠血清MDA含量, 提高SOD、CAT、GSH-PX的活力

Tab. 2 MS suppress lipid peroxidation and enhance the activity of serum SOD, CAT, and GSH-PX in the DMH-induced rat model

Groups	MDA/nmol·mL <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	CAT/U·mL <sup>-1</sup>	GSH-PX/U·mL <sup>-1</sup>
DMH	27.59±9.04	156.29±6.48	9.29±1.98	5.67±4.30
DMH+5% MS	21.85±10.27	174.13±14.36**	12.43±2.12*	16.12±6.10*
DMH+7.5% MS	13.70±4.91*	174.13±6.74**	14.88±2.44**	18.51±11.48*
Saline	14.44±6.63*	167.59±3.81*	13.04±3.42*	16.72±8.06*
P value	0.043	0.006	0.010	0.045

\*:  $P < 0.05$  vs DMH group; \*\*:  $P < 0.01$  vs DMH group.

## 2.4 Th1亚群细胞因子(IL-2、IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )的含量

各实验组中, Th1亚群细胞因子含量经比较差异均有统计学意义( $P_{IL-2}=0.022$ ;  $P_{IL-12p70}=0.037$ ;  $P_{TNF-\alpha}=0.015$ ;  $P_{IFN-\gamma}=0.028$ ), 其中7.5%MS干预组IL-2 [(57.50±8.76)pg/mL]含量与模型组 [(48.68±6.33)pg/mL]相比显著增加( $P < 0.05$ ); 5%MS干预组IL-12p70、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的含量分别为(22.02±5.39)pg/mL、(16.56±7.95)pg/mL和(15.28±7.89)pg/mL, 与模型组的含量 [分别为(15.03±5.53)pg/mL、(10.02±1.41)pg/mL和(7.52±4.32)pg/mL]相比显著增加( $P < 0.05$ , 图3)。

## 2.5 Th2亚群细胞因子(IL-4、IL-5、IL-10、TGF- $\beta$ )的含量

各实验组中Th2亚群细胞因子含量经比较差异均有统计学意义( $P_{IL-4}=0.013$ ;  $P_{IL-5}=0.004$ ;  $P_{IL-10}=0.003$ ;  $P_{TGF-\beta}=0.039$ ), 其中7.5%MS干预组IL-4、IL-5含量分别为(2.41±0.77)pg/mL、(11.82±3.45)pg/mL, 与模型组的含量 [分别为(4.97±3.29)pg/mL、(26.34±12.03)pg/mL]相比显著减少( $P < 0.05$ ); 5%MS干预组IL-10、TGF- $\beta$ 含量分别为(36.89±5.74)pg/mL、(1 151.23±329.28)pg/mL, 较模型组含量 [分别为(49.79±9.69)pg/mL、(1 596.10±519.79)pg/mL]相比显著减少

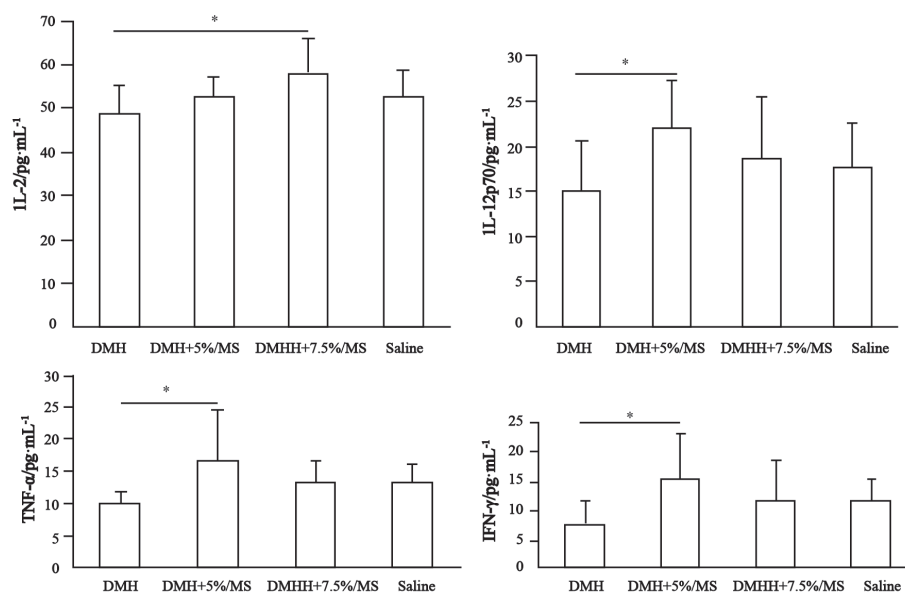


图3 MS增加DMH诱导大肠肿瘤的大鼠Th1亚群细胞因子含量

Fig. 3 MS increase levels of Th1 cytokines in the DMH-induced rat model

\*:  $P < 0.05$ ;  $n=12$ .

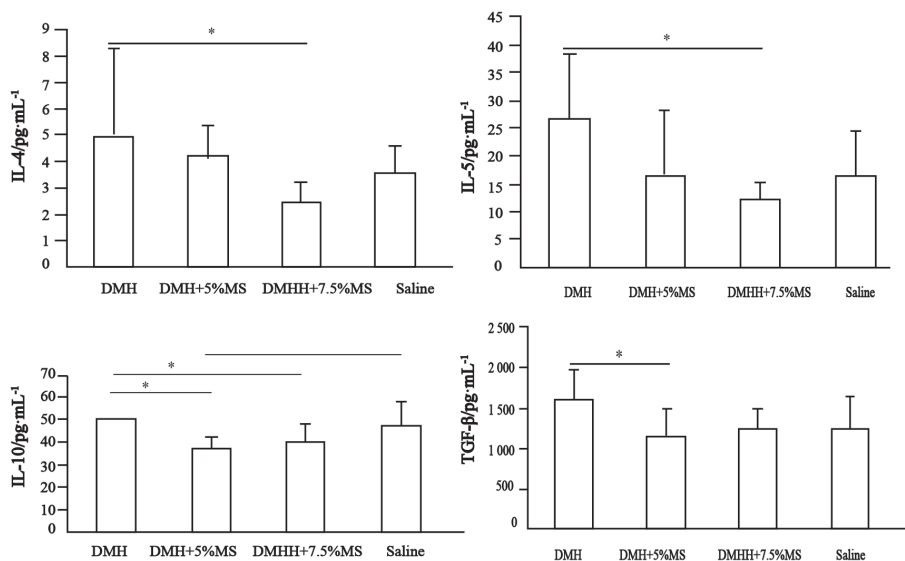


图4 MS降低DMH诱导大肠肿瘤的大鼠Th2亚群细胞因子含量

Fig. 4 MS decrease levels of Th2 cytokines in the DMH-induced rat model

\*:  $P < 0.05$ ;  $n = 12$ .

( $P < 0.05$ , 图4)。

### 3 讨 论

大鼠大肠肿瘤模型的建立采用参考文献的方法通过化学诱癌剂DMH成功诱导肿瘤发生,模型组成瘤率可高达100%<sup>[7]</sup>。DMH诱导的大鼠大肠肿瘤符合人类大肠癌多步骤、多阶段、多基因参与的慢性过程,存在息肉-腺瘤-腺癌的演变顺序,为研究摹拟人类大肠癌提供实验动物模型。本研究结果表明,MS对DMH诱导的大鼠大肠肿瘤具有明显的化学预防作用,并随MS浓度增加总成瘤率降低显著,其作用机制可能与其抗氧化作用和免疫平衡偏移有关。

一方面,近年来许多研究发现肿瘤的发生与自由基在体内产生的一种负面的氧化应激作用有关。当外界有毒的物理化学因素如放射线、毒物、化学致癌物等作用于机体后,自由基的产生与清除平衡严重失调,导致细胞分子结构破坏、细胞脂质过氧化、蛋白失去酶活性、DNA突变致癌等效应,而天然抗氧化剂(维生素E、维生素C等)及抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-PX等)有助于对抗自由基对机体的损害<sup>[8]</sup>。因而寻找更多有效清除自由基和对抗

氧化应激破坏机体连锁效应的天然抗氧化剂成为当今研究热点<sup>[9]</sup>。本研究发现,MS在干预DMH化学诱导大鼠形成大肠肿瘤的过程中具有极强的抗氧化能力,可明显降低体内脂质过氧化产物,同时又显著提高抗氧化酶活性。

另一方面,目前研究认为肿瘤发生与免疫系统改变有密切关系,包括免疫清除、免疫平衡、免疫逃逸3个阶段。当机体免疫功能失调或低下时,发生肿瘤的概率明显增高。机体免疫抗肿瘤的机制十分复杂,在控制具有免疫性肿瘤细胞的生长中,T细胞介导的免疫应答反应起重要作用,其中Th1亚群细胞因子又是主导对抗肿瘤免疫反应,而Th2亚群细胞因子促进肿瘤形成<sup>[10-12]</sup>。Th1主要分泌细胞因子包含IL-2、IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 等,而Th2主要分泌的细胞因子有IL-4、IL-5、IL-10、TGF- $\beta$ 等。本研究通过检测细胞因子水平变化发现,MS降低大鼠大肠肿瘤的发生还体现在Th1/Th2免疫偏移,DMH具有诱导抑制杀伤肿瘤细胞的Th2免疫反应,而MS可以使大鼠体内免疫系统的Th2反应完全逆转为对抗肿瘤的Th1反应,从而达到有效的预防肿瘤作用。

有文献报道氧化应激活性氧促进TGF- $\beta$ 表达

增多, 共同介导肿瘤形成<sup>[13]</sup>, 然而IL-4分泌增多又可诱导氧化应激共同促进细胞死亡<sup>[14]</sup>。由此推断, Th2细胞因子和氧化应激协同促进肿瘤发生、发展; 反之, Th1细胞因子和抗氧化作用可对抗肿瘤形成。本研究发现MS作为具有抗氧化作用的食物抗氧化剂同时能够使Th1/Th2免疫平衡向Th1偏移, 从而发挥抗肿瘤作用。MS具有兼顾调节抗氧化系统和主导Th1免疫调节的特性, 化学预防DMH诱导的大鼠大肠肿瘤的发生。因此, MS作为一种新的、天然的抗氧化剂和免疫调节剂, 为人类大肠肿瘤的防治提供了新思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4): 225–249.
- [2] KAPUSTA-DUCH J, KOPEC A, PIATKOWSKA E, et al. The beneficial effects of Brassica vegetables on human health [J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2012, 63(4): 389–395.
- [3] HIGDON J V, DELAGE B, WILLIAMS D E, et al. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(3): 224–236.
- [4] TANG L, ZIRPOLI G R, GURU K, et al. Intake of cruciferous vegetables modifies bladder cancer survival [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(7): 1806–1811.
- [5] YUAN H, ZHU M, GUO W, et al. Mustard seeds (*Sinapis Alba* Linn) attenuate azoxymethane-induced colon carcinogenesis [J]. *Redox Rep*, 2011, 16(1): 38–44.
- [6] GAGANDEEP, DHIMAN M, MENDIZ E, et al. Chemopreventive effects of mustard (*Brassica compestris*) on chemically induced tumorigenesis in murine forestomach and uterine cervix [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2005, 24(6): 303–312.
- [7] GIFTSON J S, JAYANTHI S, NALINI N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis [J]. *Invest New Drugs*, 2010, 28(3): 251–259.
- [8] DEVASAGAYAM T P, TILAK J C, BOLOOR K K, et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects [J]. *J Assoc Physicians India*, 2004, 52: 794–804.
- [9] TEKINER-GULBAS B, WESTWELL A D, SUZEN S. Oxidative stress in carcinogenesis: new synthetic compounds with dual effects upon free radicals and cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(36): 4451–4459.
- [10] NAKAYAMA H, KITAYAMA J, MUTO T, et al. Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2000, 30(7): 301–305.
- [11] HOU N, ZHANG X, ZHAO L, et al. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439(4): 471–476.
- [12] GUENOVA E, WATANABE R, TEAGUE J E, et al. TH2 cytokines from malignant cells suppress TH1 responses and enforce a global TH2 bias in leukemic cutaneous T-cell lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(14): 3755–3763.
- [13] HASSONA Y, CIRILLO N, LIM K P, et al. Progression of genotype-specific oral cancer leads to senescence of cancer-associated fibroblasts and is mediated by oxidative stress and TGF-beta [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(6): 1286–95.
- [14] WON S Y, KIM S R, MAENG S, et al. Interleukin-13/Interleukin-4-induced oxidative stress contributes to death of prothrombin-2 (pKr-2)-activated microglia [J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 265(1–2): 36–42.

(收稿日期: 2013-11-04 修回日期: 2014-01-22)