

王少康您好,

我首先祝贺您, 您于2020年4月至5月间向“达能营养中心膳食营养研究与宣教基金”提交的项目计划书经过初评、复评、专家委员会的终评, 在2020年达能营养中心收到的111份合格的项目申请中脱颖而出, 并最终通过了达能营养中心理事会的批准, 现正式通知您。您提交的“维生素B12与食管鳞癌癌前病变关系及机制研究”项目计划书将作为达能营养中心(中国)以“达能营养中心膳食营养研究与宣教基金”方式在2020年资助的项目, 项目编号欲为: DIC2020-08。

修改建议:

1. 混杂因素较多, 应详细说明如何进行质量控制;
2. 诊断食管鳞癌癌前病变的患者预期会改变原有的不良饮食习惯, 而健康人的饮食习惯如果欠佳, 可能会得出相反的结论, 如何考虑饮食习惯的改变这一问题? 请给与说明;
3. 维生素B12与食管鳞癌癌前病变关系及机制研究, 要明确是膳食还是血中的水平?
4. 将项目做资助金额改为19万元。

如您能接受如上建议及附件中由达能营养中心提供的项目资助协议、保证书等条款, 请将修改后的①纸质版(中文)、电子版(中英文, 需补交英文版)项目计划书②项目协议书③保证书, 各一式三份, 按情况填写各文件中空白项及各项签字盖章后, 于10月25日前邮寄给达能营养中心张国雄。我们将把您今年提交的三份“项目计划书”当作“项目资助协议”的附件, 并由达能营养中心的代表签字后再快递给您。

我们将于2020年10月29~30日的达能营养中心在西安举办的第二十三届学术会议上举行特殊仪式宣布该项基金评审的结果, 届时将向广大营养科学工作者公布本年度基金中标的11个项目, 并向每个项目的负责人颁发“达能营养中心膳食营养研究与宣教基金”资助证书, 因此特邀请您出席本次会议。您参加此次会议的差旅费、食宿费及会议费由达能营养中心提供。

预祝我们的项目合作成功, 并盼望在此次大会上与您见面。



达能营养中心总代表  
2020年9月28日



项目批准号	81673147
申请代码	H3003
归口管理部门	
收件日期	



20200181673147

# 国家自然科学基金

## 资助项目结题/成果报告

资助类别： 面上项目

亚类说明：

附注说明： 常规面上项目

项目名称： 黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝胺在食管癌前病变过程中的联合作用及维生素C的干预作用研究

负责人： 王少康 电话： 025-83272567

电子邮件： shaokangwang@seu.edu.cn

依托单位： 东南大学

联系人： 程小易 电话： 02552091182

直接费用： 50.0000（万元） 执行年限： 2017.01-2020.12

填表日期： 2021年01月02日

国家自然科学基金委员会制（2016年）



## 项目摘要

### 中文摘要:

流行病学调查提示黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺的联合作用及维生素C缺乏可能在食管癌前病变过程中发挥了重要作用,但仍缺少人群病例对照研究资料和实验室的直接证据。本研究选择江苏淮安食管癌高发区2017-2018年食管癌前病变新筛查患者100例,以同地区、同性别、年龄相差2岁以内匹配健康人100例,应用双份饭法备份研究对象连续3天的膳食,采集血样,通过检测三种致癌物的内外暴露水平和维生素C的营养状况,分析三种致癌物的联合作用及维生素C缺乏与食管癌前病变的关系。同时结合人群研究结果,用黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺处理人类食管正常上皮细胞并用维生素C干预,观察三种致癌物的联合作用对人类正常食管上皮细胞周期、凋亡和相关基因表达的影响及维生素C的干预效果,寻找三种致癌物的联合作用和维生素C缺乏与食管癌前病变关系更直接的证据,探讨其在食管癌发生发展中的意义及其机理,为食管癌一级预防措施的制定提供科学依据。

### Abstract:

A large number of studies have shown that lack of vitamin C and the combined effects of aflatoxin, fumonisins and nitrosamine were related with the process of precancerous esophageal cancer, but it still lacks a comprehensive system of population-based case-control studies and laboratory direct evidence. This case-control study based on the evaluation of the nutritional status of populations who were different stage of esophageal cancer, and selected 100 cases of new precancerous cases in Jiangsu Huai'an which was the high esophageal cancer area from 2017 to 2018. According to the same region, the same sex, age difference less than two years, we match 100 normal cases with controls, collect the blood samples, and detect the internal and external exposure levels of three carcinogen. The vitamin c in serum will also be detected, and the diet of cases will be investigated for three days by duplicate portion method. For the laboratory studies, we treat human normal esophageal epithelial cells with aflatoxin, fumonisins and nitrosamine, then intervene with vitamin c, and observe the cytotoxicity, cell cycle, cell apoptosis, related genes expression and effect of vitamin C so that it could verify the results of population studies, find direct evidences about lack of vitamin C and the combined effects of aflatoxin, fumonisins and nitrosamine in the process of precancerous esophageal cancer. All the results will provide a scientific basis for making the precautionary measures of esophageal cancer.

**关键词 (用分号分开):** 黄曲霉毒素; 伏马菌素; 亚硝胺; 食管癌; 维生素C

**Keywords (separated by;):** aflatoxin; fumonisins; nitrosamine; esophageal cancer; vitamin C



## 结题摘要

**中文摘要（对项目的背景、主要研究内容、重要结果、关键数据及其科学意义等做简单概述）：**

食管癌的发生是多因素共同作用的结果，流行病学调查提示黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺的膳食暴露及微量营养素的缺乏可能在食管癌前病变过程中发挥了重要作用。本研究选择江苏淮安食管癌高发区开展病例对照研究，对该地区人群血液和膳食样本中的黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐水平以及微量元素水平、血清维生素C和氧化应激相关指标进行检测，探究黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐的内暴露和外暴露之间的关系、微量营养素摄入量与体内营养状况之间的关系，及其与食管癌前病变和氧化损伤之间的关系，同时结合细胞实验，对人群研究的结论进行验证。流行病学调查结果显示饮酒、喜食玉米和腌晒食品为该地区食管癌前病变的危险因素，喜食豆制品为保护因素。而玉米在贮存过程中易被黄曲霉毒素和伏马菌素污染，腌晒食品则常含有较高含量的亚硝酸盐。实验结果进一步发现食管癌前病变组人群的黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐的内、外暴露水平较高，而膳食硒摄入量、血浆硒、锰、铁、锌含量和血清维生素C含量均较低，且黄曲霉毒素、亚硝酸盐、硒、锰、铁、锌元素和维生素C的结果具有统计学差异，提示江苏淮安地区居民食管癌高发的原因很可能与膳食中黄曲霉毒素和亚硝酸盐的高暴露以及较差的营养状况有关，而黄曲霉毒素和亚硝酸盐的联合暴露和抗氧化营养素如维生素C和硒元素的缺乏可能通过促进氧化损伤从而在食管癌前病变发生发展中起重要作用。体外实验结果验证了AFB1+ FB1+ MNNG的联合染毒对人类正常食管上皮细胞的毒性及机制，而维生素C对MNNG产生的毒性具有保护作用。该研究为食管癌一级预防措施的制定提供科学依据，具有极为重要的科学意义和现实意义。该地区应进一步加强饮用水源、周边环境、土壤植物及食品的保护，落实食管癌防治知识的宣传，通过给群众普及食管癌防治知识并提供合理的膳食指导，加强对主要粮食作物中霉菌毒素的防控工作，让居民逐步建立起健康的生活和饮食习惯，改善营养状况，从而预防食管癌的发生。

**Abstract (Brief description of research background, main methods, contributions, and research data):**

The occurrence of esophageal cancer is the result of multiple factors. Epidemiological investigation suggests that dietary exposure to aflatoxin, fumonisin, nitrosamine and micronutrient deficiency may play important roles in the process of esophageal precancerous lesions. In this study, a case-control study was conducted in a high-risk area of esophageal cancer in Huai'an, Jiangsu Province. The levels of aflatoxin, fumonisin and nitrite, trace elements, serum vitamin C and oxidative stress related indicators in blood and dietary samples were detected to explore the relationship between internal and external exposure of aflatoxin, fumonisin and nitrite, micronutrient intake and nutritional status, and their relationship with esophageal precancerous lesions and related oxidative damage. At the same time, cell experiment was conducted to verify the conclusions drew by the population study. The results of epidemiological investigation showed that drinking, eating corn and pickled food were the risk factors of esophageal precancerous lesions, whereas eating bean products was the protective factor. Corn is easy to be polluted by aflatoxin and fumonisin during storage, and pickled food often contains high content of nitrite. Experimental results showed that the exposure levels of aflatoxin, fumonisin and nitrite were high in the population with esophageal precancerous lesions, while the dietary selenium intake, plasma selenium, manganese, iron and zinc contents and serum vitamin C contents were low in this population. Additionally, the results of aflatoxin, nitrite, selenium, manganese, iron, zinc and vitamin C were statistically significant, suggesting that the high incidence of esophageal cancer in Huai'an area may be associated with high dietary aflatoxin and nitrite exposure and poor nutritional status, while the combined exposure of aflatoxin and nitrite and deficiency of antioxidant nutrients such as vitamin C and selenium may play important roles in the development of esophageal precancerous lesions by promoting oxidative damage. The results of in vitro experiments verified the joint



toxicity and mechanism of AFB1, FB1 and MNNG on normal human esophageal epithelial cells, and vitamin C had protective effect on the toxicity of MNNG. This study provides scientific evidence for the establishment of primary prevention measures for esophageal cancer, thus has important scientific and practical significance. The prevention and control of mycotoxins in main food crops should be strengthened by popularizing esophageal cancer prevention and control knowledge and providing dietary guidance to the residents, so that the residents can gradually establish healthy living and eating habits, so as to prevent the occurrence of esophageal cancer.

**关键词 (用分号分开)：** 黄曲霉毒素； 伏马菌素； 亚硝胺； 食管癌； 维生素C

**Keywords (separated by;)：** aflatoxin; fumonisins; nitrosamine; esophageal cancer; vitamin C



## 正文

《结题/成果报告》正文分为两个部分：**结题部分和成果部分**。请按照《结题/成果报告》填报说明及撰写要求填写。

### (一) 结题部分

#### 1. 研究计划执行情况概述。

##### (1) 按计划执行情况。

本项目的研究计划包括：在江苏淮安食管癌高发区继续开展食管癌前病变患者的筛查，并收集癌前病变患者和健康人的血液样本和流行病学调查数据，按配对原则完成食管癌前病变患者和健康人的匹配工作，开展病例对照研究；对研究对象开展膳食营养状况调查，应用双份饭法备份癌前病变患者和健康人群连续三天的膳食，完成测定膳食中 AFB<sub>1</sub>、FB<sub>1</sub>、亚硝酸盐、NDMA、维生素 C 含量的测定；完成血清中 AFB<sub>1</sub>-ALB、Sa/So、NDMA、维生素 C 的含量的测定；完成黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺对人类正常食管上皮细胞的联合作用及维生素 C 的干预作用研究，并完成细胞周期和凋亡相关基因的 mRNA 及蛋白表达的检测。

课题组遵照研究计划，保质保量的完成了各项任务和要求，并增加了如下内容：

- ①氧化应激和氧化损伤程度与食管癌前病变的关系研究；
- ②膳食微量元素摄入量以及血浆微量元素营养状况与食管癌前病变相关性研究。

##### (2) 研究目标完成情况。

本项目的研究目标包括三个方面：①通过双份饭法备份食管癌前病变患者和健康人连续 3 天的膳食，直接测定膳食中 AFB<sub>1</sub>、FB<sub>1</sub>、亚硝酸盐、NDMA、维生素 C 的含量，排除了膳食加工、烹调等因素的影响，准确掌握黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺三种致癌物和维生素 C 在两组人群中的外暴露水平和差异。②通过分析食管癌前病变患者和健康人血清中 AFB<sub>1</sub>-ALB、Sa/So、NDMA、维生素 C 的内暴露水平，掌握黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺三种致癌物和维生素 C 在两组人群中的内暴露水平和差异，探讨三种致癌物和维生素 C 在食管癌前病变过程中的作用和内外暴露之间的关系，确定三种致癌物在食管癌前病变中联合暴露的比例，为实验室体外人类正常食管上皮细胞染毒及干预研究提供科学依据。③研究黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺三种致癌物的联合作用对人类正常食管上皮细胞周期、细胞凋亡及相关基因表达的影响，研究维生素 C 对黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺三种致癌物在人类正常食管上皮细胞联合毒性的干预作用，寻找黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺的联合作用和维生素 C 缺乏与食管癌前病变关系更直接的证据，探讨其在食管癌发生发展中的意义及其机理，为食管癌一级预防措施的制定提供科学依据。

上述研究目标已完成，并增加了新的研究内容，具体包括：

- ①食管癌前病变患者氧化应激状态较正常对照处于较强水平，氧化损伤比较严重，黄曲



霉毒素和亚硝酸盐可能通过氧化损伤在食管癌前病变发生发展中起重要作用；

②获得江苏淮安食管癌高发区居民膳食微量元素摄入量以及血浆微量元素营养状况，以及微量元素与食管癌前病变相关性数据。发现食管癌前病变人群硒摄入量与血浆硒含量显著低于健康人群。

## 2. 研究工作主要进展、结果和影响。

### (1) 主要研究内容。

#### ①食管癌前病变危险因素病例对照研究

依托 2017-2018 年淮安地区食管癌早诊早治项目的筛查工作，选择江苏淮安食管癌高发区食管癌前病变新筛查患者 100 例，以同地区、同性别、年龄相差 2 岁以内匹配健康居民各 100 例，进行病例对照研究。

- 进行膳食营养状况调查，应用双份饭法（即化学分析法）备份癌前病变患者和健康人群连续三天的膳食，测定膳食中 AFB<sub>1</sub>、FB<sub>1</sub>、亚硝酸盐、NDMA、维生素 C 的含量，掌握 AFT、FB、亚硝酸盐、NDMA、维生素 C 在癌前病变患者和健康人群中的外暴露水平，进一步分析黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝酸盐、二甲基亚硝胺在食管癌前病变中的联合毒性和维生素 C 的保护作用。
- 采集癌前病变患者和健康人群外周血，测定血清中 AFB<sub>1</sub>-ALB、Sa/So、NDMA、维生素 C 的含量，掌握黄曲霉毒素、伏马菌素、二甲基亚硝胺、维生素 C 在癌前病变患者和健康人群中的内暴露水平及其联合作用，并进一步探讨其内暴露水平与外暴露水平之间的关系。

#### ②黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺对人类正常食管上皮细胞的联合作用及维生素 C 的干预作用研究

根据人群病例对照研究的结果，选择黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺之间合理的配比浓度，分别处理人类正常食管上皮细胞，并用维生素 C 干预，检测指标包括：

- 用 MTT 法检测对细胞生存能力的影响
- 用流式细胞仪检测对细胞周期的影响
- 用流式细胞仪检测对细胞凋亡的影响

#### ③黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺对人类正常食管上皮细胞的联合作用及维生素 C 的干预的机制研究

- 细胞周期相关基因 p53、p21、cyclin D1、bax、bcl-2 mRNA 表达的测定，掌握黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺对人类正常食管上皮细胞周期相关基因 mRNA 表达的联合作用及维生素 C 的干预作用。
- 细胞凋亡相关基因 p53、p21、cyclin D1、bax、bcl-2 蛋白表达的测定，掌握黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺对人类正常食管上皮细胞凋亡相关基因蛋白表达的联合作用及维生素 C 的干预作用。



④综合分析实验结果提出黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺在食管癌前病变中的的联合作用及维生素 C 干预的机制，为江苏淮安地区食管癌一级预防措施的制定提供科学依据。

(2) 取得的主要研究进展、重要结果、关键数据等及其科学意义或应用前景。

## 第一章 江苏淮安地区食管癌前病变危险因素病例对照研究

食管癌作为我国高发的恶性肿瘤之一，在所有肿瘤的发病中位居第七，在所有肿瘤的死因中位居第六，食管癌的形成是在长时间的作用下受多种因素的影响引起的。食管癌上皮不典型增生是食管癌的重要癌前病变期，由癌前病变期发展成为食管癌需要数年甚至数十年的时间，因此发现食管癌前病变期的危险因素对于食管癌的一级预防具有重要意义。食管癌患者的疾病状态会造成机体生理功能改变，消化系统吸收和代谢异常，增强患者对其健康状况的重视程度，这些均会改变食管癌患者的饮食生活习惯，因此本研究以食管癌前病变患者作为研究对象进行问卷调查，分析得出的食管癌前病变的危险因素和保护因素会更加贴近于癌症发生的实际情况。

### 1 研究对象与方法

#### 1.1 研究对象

依托于 2015 年 1 月至 2017 年 6 月在江苏省淮安市淮安区季桥镇、泾口镇和仇桥镇开展的食管癌早诊早治项目。该项目会对 39 岁以上、79 岁以下的所有居民进行胃镜检查，临床医生仔细观察食管黏膜的状态，对于存在异常状态的居民，用 1.2% 碘液对全部食管粘膜进行染色，对可疑病变活检取样进行病理学诊断。根据《江苏省食管癌早诊早治项目技术方案》，食管癌前病变的诊断标准：轻度异型增生：异型增生细胞主要分布在鳞状上皮的基底部分，不超过上皮全层的下 1/3；中度异型增生：异型的细胞累及上皮中层或不超过全层的 2/3；重度异型增生/原位癌为尚未突破基底膜的上皮全层的癌前病变，上皮全层或几乎全层被异型增生的细胞所取代，上皮基底结构完整清晰。

本研究中研究对象分为食管癌前病变组和正常对照组。癌前病变组仅纳入轻度异型增生和中度异型增生患者，重度异型增生/原位癌患者会进行手术治疗所以被排除。正常对照组是在同时期内经胃镜检查食管无异常增生的居民，癌前病变组和正常对照组按 1: 1 配对，配对原则为同地区、同性别、年龄相差 2 岁以内且在淮安区有 5 年以上的居住史。

满足纳入条件的癌前病变患者和正常对照者，若存在以下情况予以排除：

- ①癌症患者；
- ②心脑血管疾病，如冠心病、心肌梗塞、动脉粥样硬化等患者；
- ③近 2 个月内有外科手术史；
- ④处于妊娠期和乳母状态；



- ⑤巨幼红细胞贫血、白细胞减少症患者；
- ⑥老年痴呆、神经管畸形、外周神经性疾病患者；
- ⑦生活不能自理，行动不便者；
- ⑧其他可能影响膳食摄入的疾病。

所有研究对象签署知情同意书，并通过东南大学附属中大医院伦理委员会审批。

## 1.2 样本量估计

以食管癌高发区健康人和癌症患者腌制食品的暴露率为切入点，采用 1:1 匹配设计样本量估计，公式如下：

$$m = \left[ U_{\alpha}/2 + U_{\beta}\sqrt{p(1-p)} \right]^2 / (p-1/2)^2$$

式中  $p = OR/(1+OR) \approx RR/(1+RR)$

$m$  为结果不一致的对子数，则需要的对子数  $M$  为： $M \approx m/(p_0q_1+p_1q_0)$

$p_1 = p_0RR/[1+p_0(RR-1)]$ ,  $q_1 = 1-p_1$ ,  $q_0 = 1-p_0$

$p_0$ 、 $p_1$  分别代表目标人群中对照组与暴露组的估计暴露率。田东等<sup>[1]</sup>在“食管癌高发区农村居民饮食状况及对食管癌认知调查”一文中指出，食管癌高发区居民食用含亚硝胺前体亚硝酸盐较多的腌菜的暴露率为 27.6%，Knekt 等<sup>[2]</sup>在“硝酸盐、亚硝酸盐和 N-亚硝基化合物暴露与胃肠道癌症危险因素的队列研究”中发现，腌制食品的相对危险度为 2.58， $\alpha$  取 0.05， $\beta$  取 0.20，查流行病学相关表格得到  $U_{\alpha}$  和  $U_{\beta}$  分别为 1.96 和 0.84，代入上述公式结果不一致的对字数  $m$  是 38，需要的对子数  $M$  为 76，考虑研究对象的顺应性和失访率等因素，将样本量定为 100 对。

## 1.3 研究方法

### 1.3.1 资料收集

本次调查使用统一的调查问卷，通过面对面的方式询问被调查对象。调查内容包括一般情况（如文化水平、婚姻状况，性格类型等）、饮水情况、吸烟情况、饮酒情况、饮茶情况、饮食习惯、食物摄入频率（新鲜蔬菜、新鲜水果、肉蛋奶类、豆类食品、主食、干果干菜、腌晒食品、油炸食品、热烫食品和霉变食品）、消化系统疾病史和家族史等，食物摄入情况采用食物频率问卷法（food frequency question, FFQ）。食管癌前病变危险因素与赋值情况具体见表 1.1。被调查对象进行统一体检，在体检前禁食 12 小时以上，体检内容包括身高、体重、腰围、臀围、空腹血糖、血压和心率。体检在当地卫生院完成。

#### 1.3.1.1 身高测量方法

被测者赤脚以立正姿势站于身高计底板上，脚跟、骶骨及两肩胛间紧靠身高计的立柱上，测量者站在被测量者的左右，将其头部调整到耳屏上缘与眼眶下缘最低点齐平，再移动身高计的水平板至被测者的头顶即可测量出身高，以厘米（cm）为单位记录，精确至 0.1cm。

#### 1.3.1.2 体重测定

体重称置于地面平坦处，被测者赤脚站立于体重称，显示屏上即显示出其实际体重，以



千克 (kg) 为单位, 精确至 0.1kg。

#### 1.3.1.3 腰围测定

被测者清晨空腹, 身体直立, 双脚合并, 腹部放松, 双臂自然下垂于身体两侧, 露出腹部皮肤, 测量时平缓呼吸, 不要收腹或屏气。测量员立于被测者正前方, 以腋中线肋弓下缘和髂嵴连线中点的水平位置为测量点, 测量员目光与皮尺刻度在同一水平面上, 记录读数, 以厘米 (cm) 为单位, 精确至 0.1cm。

#### 1.3.1.4 臀围测定

被测者自然站立, 臀部放松, 平视前方。测量员将卷尺置于臀部向后最突出部位, 以水平绕臀部一周测量, 卷尺围绕臀部的水平面要与身体垂直, 记录数据, 以厘米 (cm) 为单位, 精确至 0.1cm。

#### 1.3.1.5 空腹血糖测定

被测者清晨空腹, 测量员使用血糖仪进行血糖测定, 记录数据。

#### 1.3.1.6 血压测定

被测者取坐位, 露出上臂, 将衣袖卷至肩部, 伸直肘部, 手掌向上。测量者放平血压计, 打开盒盖呈 90°垂直位置, 打开水银槽开关。将袖带缠于上臂, 袖带下缘距肘窝 2~3 厘米, 松紧以能放入一指为宜。戴好听诊器, 在袖带下缘将听诊器紧贴肱动脉搏动最强点, 一手固定听诊器, 另一手关闭气门, 握住输气球向袖带内打气至肱动脉搏动消失, 再上升 20~30mmHg。松开气门, 使汞柱缓慢下降, 速度为 4mmHg/s, 并注视汞柱所指的刻度, 当从听诊器中听到第一声搏动音时汞柱所指刻度即为收缩压, 随后搏动声逐渐增强, 当搏动声突然变弱或消失时, 汞柱所指刻度即为舒张压, 记录数据。

#### 1.3.1.7 心率测定

测量者用食指、中指和无名指的指端摸住腕部动脉处, 连续测 3 个 10 秒。若其中两次相同, 并与另一次相差不超过一次时, 即认为是安静状态的脉搏, 然后换算成 1 分钟的脉搏数。

表 1.1 食管癌前病变危险因素与赋值

变量	研究因素	赋值			
		1	2	3	4
X1	人年均收入	>10000	6000-10000	4000-5999	<4000
X2	人际关系	良好	一般	较差	很差
X3	性格类型	开朗	比较开朗	内向	—
X4	进食速度	快	适中	慢	—
X5	按时就餐	否	是	—	—
X6	喜食肥肉	不吃	全部	部分	吃瘦肉
X7	辛辣口味	非常辣	比较辣	不太辣	不辣
X8	咸淡口味	非常咸	比较咸	不太咸	不咸
X9	储粮霉变	否	是	—	—



X10	十年前辛辣口味	非常辣	比较辣	不太辣	不辣
X11	十年前咸淡口味	非常咸	比较咸	不太咸	不咸
X12	十年前储粮霉变	否	是	—	—
X13	饮水来源	地窖水、池塘水、 浅井水	湖水、河水	深井水、泉水	自来水 (经处理)
X14	饮酒 <sup>a</sup>	否	是	—	—
X15	吸烟 <sup>b</sup>	否	是	—	—
X16	被动吸烟 <sup>c</sup>	无	有	—	—
X17	饮茶 <sup>d</sup>	否	是	—	—
X18	新鲜水果 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X19	橘 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X20	菠萝 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X21	山楂 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X22	柑橙 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X23	香蕉 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X24	草莓 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X25	新鲜蔬菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X26	西红柿 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X27	小白菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X28	菠菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X29	韭菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X30	蒜苗 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X31	茼蒿 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X32	香菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X33	油菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X34	莴苣 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X35	苋菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X36	豆制品 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X37	赤小豆 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X38	黄豆 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X39	绿豆 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X40	腐竹 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X41	肉蛋奶类 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X42	鸡肝 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X43	鸭肝 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X44	猪肝 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X45	羊肝 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X46	鸡蛋 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X47	鸭蛋 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X48	腌晒食品 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X49	榨菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X50	萝卜干 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天



X51	腌雪里蕻 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X52	咸鱼 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X53	咸肉 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X54	咸鸭蛋 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X55	酱黄瓜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X56	腌大头菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X57	腐乳 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X58	干果干菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X59	干蘑菇 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X60	紫菜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X61	喜食花生 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X62	核桃 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X63	葱、蒜 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X64	主食 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X65	玉米粉 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X66	玉米 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X67	烫热食品 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X68	霉变食品 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X69	油炸食品 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X70	酵母粉 <sup>e</sup>	不吃	偶尔	经常	每天
X71	消化系统疾病史	无	有	—	—
X72	食管癌家族史	无	有	—	—
X73	肿瘤家族史	无	有	—	—
X74	BMI 值 <sup>f</sup>	<18.5	18.5-23.9	24.0-27.9	≥28

注：a 饮酒：每天至少一次并持续半年以上；b 吸烟：每天至少一支并持续半年以上；c 被动吸烟：家庭成员包括配偶、父母、亲属、寄宿者中有吸烟的习惯；d 饮茶：每天至少一杯并持续半年以上；e 偶尔：<1次/周，经常：≥1次/周，每天：≥7次/周；f BMI=体重 (kg)/身高 (m)<sup>2</sup>

### 1.3.2 质量控制

食管癌前病变组均是经胃镜和病理检查确诊的登记在册人员，正常对照组是同时期经胃镜检查食管无异常增生的居民。两组人群来源于同地区，生活环境相似。调查人员和问卷核查员均为在校学生并经过统一培训。对于调查过程中出现的语言沟通障碍问题，当地村医将辅助调查者完成调查。问卷完成后，问卷核查员对问卷进行检查，若问卷存在漏项、缺项和逻辑错误等问题，调查人员次日需重新询问被调查对象，以确保结果真实、可靠。问卷采用双人双机的方式录入，以确保结果录入的准确性。

### 1.4 统计分析

将问卷结果录入 Epidata 软件并建立数据库，运用 SPSS 20.0 软件对数据进行处理和分析。两样本间计量资料的分析采用配对 T 检验，两组数据差值符合正态分布，数据以均数±



标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示; 两组数据差值不符合正态分布, 则采用 Wilcoxon 符号秩检验, 数据以中位数 (全距) 表示。计数资料采用 Fisher 精确检验法。对食管癌前病变发生的相关因素进行单因素 Logistic 回归分析, 筛选出具有统计学意义的变量后 ( $P < 0.05$ ), 进一步进行多因素条件 Logistic 回归分析, 估计各因素对食管癌前病变发生的比值比 (odds ratio, OR) 及 95% 可信区间 (confidence interval, CI)。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组人群一般情况比较

本研究共招募 100 对食管癌前病变患者和正常对照, 其中女性 48 对, 男性 52 对, 分布于淮安区季桥镇、泾口镇和仇桥镇 3 个乡镇。食管癌前病变组平均年龄为 (64.5±5.3) 岁, 正常对照组平均年龄为 (64.4±5.1) 岁。经配对 T 检验或 Wilcoxon 符号秩检验, 两组人群在身高、体重、体质指数 (body mass index, BMI)、血压、空腹血糖、心率、腰围、臀围、腰臀比、文化程度和婚姻状况方面差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1.2。

表 1.2 食管癌前病变组和对照组的一般情况比较

变量	癌前病变组 (N=100)	对照组 (N=100)	P
身高/cm	158.9±7.6	159.4±7.1	0.551
体重/kg	60.0±9.6	60.6±11.1	0.689
BMI	23.7±3.2	23.8±3.3	0.947
收缩压/mmHg	137.0 (99.0-181.0)	134.5 (52.0-193.0)	0.696
舒张压/mmHg	77.0±10.7	78.5±10.7	0.352
空腹血糖/mmol · L <sup>-1</sup>	5.7 (4.6-11.2)	5.8 (4.6-16.5)	0.202
心率/ (次/分钟)	69.0 (51.0-95.0)	70.0 (51.0-110.0)	0.828
腰围/cm	85.7±8.7	85.4±10.0	0.886
臀围/cm	95.2±5.8	95.4±7.0	0.803
腰臀比	0.9±0.1	0.9±0.1	0.479
教育水平			0.257
未正式上过学	57	53	
小学	26	19	
初中	15	25	
高中及以上	2	3	
婚姻状况			0.508
未婚	4	2	
已婚	84	90	
离婚	1	0	
丧偶	11	8	



## 2.2 食管癌前病变危险因素单因素 Logistic 回归分析

本研究对人年均收入、人际关系、性格类型、饮食习惯、饮水来源、饮酒、吸烟、饮茶、新鲜水果、新鲜蔬菜、豆类食品、肉蛋奶类、腌晒食品、干果干菜、葱蒜、主食、烫热食品、油炸食品、疾病史、家族史和体质指数等 74 个相关变量进行了单因素 Logistic 回归分析 ( $\alpha=0.05$ ), 共筛选出 10 个有统计学意义的变量。其中饮酒、喜食腌晒食品、喜食咸鱼、喜食干果干菜、喜食干蘑菇和喜食玉米与食管癌前病变呈显著正相关, 可能是危险因素; 而进食速度慢、喜食新鲜水果、喜食菠菜、喜食豆制品与食管癌前病变呈负相关, 可能是其保护因素, 见表 1.3。

表 1.3 食管癌前病变危险因素单因素 Logistic 回归分析结果

变量	研究因素	$\beta$	<i>SE</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>
X4	进食速度慢	-0.752	0.280	0.007	0.471	0.272-0.816
X14	饮酒	0.875	0.329	0.008	2.398	1.258-4.572
X18	喜食新鲜水果	-0.476	0.234	0.042	0.621	0.393-0.983
X28	喜食菠菜	-1.001	0.474	0.035	0.367	0.145-0.930
X36	喜食豆制品	-0.513	0.254	0.043	0.598	0.364-0.984
X48	喜食腌晒食品	0.530	0.216	0.014	1.698	1.112-2.593
X52	喜食咸鱼	0.619	0.296	0.036	1.857	1.040-3.314
X58	喜食干果干菜	0.552	0.255	0.030	1.736	1.054-2.861
X59	喜食干蘑菇	0.733	0.289	0.011	2.081	1.182-3.664
X66	喜食玉米	0.693	0.308	0.025	2.000	1.093-3.659

注: *SE*: Standard error, 标准误; *OR*: Odds ratio, 比值比; 95%*CI*: 95%confidence interval, 95%可信区间

## 2.3 食管癌前病变危险因素多因素 Logistic 回归分析

将单因素 Logistic 回归中有显著性意义的变量以及年龄和性别两个基础变量逐步引入条件 Logistic 回归模型, 以  $P=0.05$  为界限, 进一步筛选出 4 个有意义的变量。结果表明, 饮酒与食管癌前病变的相关性最大, 其次是喜食腌晒食品和玉米。而喜食豆类食品则显示出对食管癌前病变具有保护作用, 见表 1.4。

表 1.4 食管癌前病变危险因素多因素 Logistic 回归分析结果

变量	研究因素	$\beta$	<i>SE</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>
X14	饮酒	1.408	0.477	0.003	4.086	1.605-10.402
X36	喜食豆制品	-1.121	0.365	0.002	0.326	0.159-0.666
X48	喜食腌晒食品	1.086	0.327	0.001	2.963	1.561-5.625
X66	喜食玉米	0.904	0.375	0.016	2.468	1.183-5.152



### 3 小结

本章对食管癌前病变患者和正常对照的问卷调查中我们发现喜食玉米和腌晒食品是食管癌前病变发生的重要危险因素。部分食管癌流行病学调查还发现消化道疾病史、家族遗传史与食管癌的发生有关,而本研究通过对食管癌前病变患者与正常对照进行危险因素问卷调查,仅发现饮酒、喜食腌晒食品和喜食玉米是危险因素,多摄入豆制品是保护因素,没有发现消化道疾病史、家族遗传史和饮茶等因素与食管癌前病变的发生有关。可能原因是本研究样本量还不够,需要更大的样本来进一步进行验证。该研究结果给我们的启示是淮安作为食管癌高发区,在生活环境和遗传条件不能改变的前提下,腌制食品、霉菌毒素污染和饮酒是更有可能引发食管癌发生的危险因素,当地居民可以通过控制腌制食品和酒精的摄入以及防止粮食被霉菌毒素污染来降低食管癌的发生风险,并定期进行体检来预防食管癌的发生。

第二章中我们将对两组人群膳食中的黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝胺前体物质亚硝酸盐进行测定,来进一步验证和探讨玉米和腌晒食品中的有害物质及其暴露水平与食管癌前病变之间的关系。



## 第二章 黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐暴露水平与食管癌前病变关系的病例对照研究

食管癌的发病机制尚未明确，但是大量的流行病学调查结果显示不良的饮食习惯是食管癌发生发展的重要危险因素。喜食热烫食物、喜食油炸腌制食品、进食速度快、三餐不规律等都可能造成食管黏膜受损，长时间的反复刺激下可造成食管炎、食管溃疡和食管上皮异型增生，从而促进癌症的发生。目前部分研究结果显示食管癌的发生与食品中 AFB<sub>1</sub>、FB 和亚硝酸盐的暴露有关。大部分研究都是将食品中污染物污染水平与膳食摄入频率结合来对危险因素的暴露水平进行评估，而通过膳食直接摄入体内的暴露水平的研究还未见报道。因此本研究应用双份饭法备份调查对象连续三天的膳食，测定膳食中 AFB<sub>1</sub>、FB 和亚硝酸盐的含量，掌握其在食管癌前病变患者和正常对照的外暴露水平和差异。通过采集食管癌前病变患者和正常对照血样，掌握 AFB<sub>1</sub>-Alb、Sa、So 和亚硝酸盐的内暴露水平和差异，同时探讨三种污染物内外暴露水平之间的相关性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 研究对象

同第一章 1.1。

#### 1.2 双份饭样本的采集

调查对象每天摄入的所有食物（包括三餐及餐间食物如零食、饮料等）均需准备两份，一份由调查员利用电子秤准确称重后供调查对象食用，同时留取等质等量的另一份食物，储存在聚乙烯饭盒中。由于饮水量无法准确量化，故未纳入本次研究中。收集到的食物的重量和质量要与调查对象的实际消费情况一致，如当调查对象食用鸡腿时，调查员也应收集鸡腿肉而不能用鸡胸肉来替代。每餐采集食物时需去除不可食用的部分并记录每餐食物的重量。早上和中午采集的食物先储存于 4℃ 冰箱中，等收集完调查对象一天摄入的所有食物后，将其混合制成匀浆，装入聚乙烯饭盒中，置于 -20℃ 冰柜冷冻保存，备检。调查持续三天，包括 2 个工作日和 1 个休息日，排除影响日常膳食习惯的特殊节假日。

#### 1.3 血液样本的采集

采集调查对象抗凝和非抗凝血样各 5ml，3000r/min 离心 5 分钟，将血清和血浆分别装入冻存管中，于 -20℃ 冰箱保存备用，血液的采集与医学体检（详见第一章 1.2）同时在当地卫生所进行。

#### 1.4 主要的试剂和仪器

AFB <sub>1</sub> 测定试剂盒	江苏省苏微微生物研究有限公司
AFB <sub>1</sub> -Alb 加合物试剂盒	南京森贝伽生物科技有限公司
FB 测定试剂盒	江苏省苏微微生物研究有限公司
人血清 Sa 试剂盒	南京森贝伽生物科技有限公司
人血清 So 试剂盒	南京森贝伽生物科技有限公司



亚硝酸盐试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
甲醇（色谱纯）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
亚铁氰化钾（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
乙酸锌（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
冰乙酸（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
硼酸钠（分析纯）	上海易恩化学技术有限公司
盐酸（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
对氨基苯磺酸（分析纯）	成都市科隆化学品有限公司
盐酸萘乙二胺（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
亚硝酸钠（分析纯）	成都市科隆化学品有限公司
ME203E 天平	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
SHP-250 智能生化培养箱	上海精宏实验设备有限公司
Biotek Epoch 酶标仪	美国 Bio TEK 公司
电热鼓风干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司
数显恒温水浴锅	南京顺流仪器有限公司
德国 EPPENDORF5424 离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司
722N 可见分光光度计	上海仪电控股（集团）公司

### 1.5 膳食中 AFB<sub>1</sub>、FB 和亚硝酸盐的测定

在进行膳食指标测定前，分别从每天的食物样品中称取当天膳食总量的 2% 进行混匀（为保证混匀后的样品量能满足三个膳食指标的测定，根据 200 名调查对象三天膳食总量的最低值，最终确定取样百分比为 2%），200 份混匀后的复合样品分别代表 200 名调查对象。

#### 1.5.1 膳食中 AFB<sub>1</sub> 的检测：ELISA 方法

##### 1.5.1.1 样品中 AFB<sub>1</sub> 的提取方法

准确称取 5.0g 膳食样品，放入 100ml 锥形瓶中，加入 25ml 甲醇水（甲醇：水为 1：1），密封后震荡 15min，过滤并弃去 1/4 初滤液，收集剩余滤液备检。

##### 1.5.1.2 样品中 AFB<sub>1</sub> 的测定方法

反应板先用洗涤液洗涤 2 次，然后加入 AFB<sub>1</sub> 标准溶液和样品提取液与酶标抗原溶液，轻轻震荡混匀，放入 37℃ 恒温培养箱孵育 30min，再用洗涤液重复洗板 5 次，加入显色底物，恒温培养箱中 37℃ 显色反应 15min，最后加入终止液，用酶标仪在 450nm 波长处测定各孔的吸光度。

#### 1.5.2 膳食中 FB 的检测：ELISA 方法

##### 1.5.2.1 样品中 FB 的提取方法

准确称取 5.0g 膳食样品，放入 100ml 锥形瓶中，加入 50ml 甲醇水（甲醇：水为 7：3），密封后震荡 15min，过滤并弃去 1/4 初滤液，收集剩余滤液备检。



### 1.5.2.2 样品中 FB 的测定方法

反应板用洗涤液洗涤 1 次，然后加入 FB 标准溶液和样品提取液，再加入酶标物和抗试剂震荡混匀，放入恒温培养箱中 37℃ 反应 30min，再用洗涤液重复洗板 5 次，加入底物液和显色液后于培养箱中 37℃ 显色 15min，最后加入终止液，用酶标仪在 450nm 波长处测定各孔的吸光度。

### 1.5.3 膳食中亚硝酸盐的检测：分光光度法

#### 1.5.3.1 样品中亚硝酸盐的提取方法

称取 5.0g 膳食样品置于 250ml 具塞锥形瓶中，加入浓度 50g/L 的饱和硼砂溶液 12.5ml，然后加入约 150ml 的 70℃ 左右的水进行混匀。在沸水浴中加热 15min，取出放入冷水浴中进行冷却并放置至室温。将上述提取液全部转移至 200ml 容量瓶中，加入浓度 106g/L 亚铁氰化钾溶液 5ml，摇匀后再加入浓度 220g/L 乙酸锌溶液 5ml 使蛋白质沉淀。然后加水至刻度并摇匀，放置 30min 后去除上层脂肪，用滤纸过滤上清液，弃去 30ml 初始滤液，剩余滤液备用。

#### 1.5.3.2 样品中亚硝酸盐的测定方法

吸取上述剩余滤液 40.0ml 置于 50ml 带塞比色管中，另分别吸取 0.00ml、0.20ml、0.40ml、0.60ml、0.80ml、1.00ml、1.50ml、2.00ml、2.50ml 的亚硝酸钠标准使用液（5μg/ml）置于 50ml 的带塞比色管中。在试样管和标准管中分别加入浓度 4g/L 对氨基苯磺酸溶液 2ml，混匀后静置 3min~5min。然后再各加入浓度 2g/L 盐酸萘乙二胺溶液 1ml，加水至刻度后混匀并静置 15min。最后于波长 538nm 处测吸光度，绘制标准曲线。同时做试剂空白。

#### 1.5.3.3 亚硝酸盐含量计算

亚硝酸盐（以亚硝酸钠计）的含量按以下公式计算：

$$X1 = (m2 \times 1000) / [m3 \times (\frac{V1}{V0}) \times 1000]$$

公式中：X1—试样中亚硝酸钠的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

m2—测定用样液中亚硝酸钠的质量，单位为微克（μg）；

1000—转换系数；

m3—试样质量，单位为克（g）；

V1—测定用样液体积，单位为毫升（ml）；

V2—试样处理液总体积，单位为毫升（ml）。

### 1.6 血液中 AFB<sub>1</sub>-Alb、Sa、So 和亚硝酸盐的测定

#### 1.6.1 血清中 AFB<sub>1</sub>-Alb 的检测：ELISA 方法

反应板上分别设标准品孔、待测样品孔和空白孔。标准品溶液加入标准品孔，空白孔中加样品稀释液，待测样品孔中加入样品稀释液和血清，轻轻晃动摇匀，封板膜封板后置 37℃ 温育 30min。用洗涤液重复洗板 5 次，标准品孔和待测样品孔中加入酶标试剂，封板后放入恒温培养箱中 37℃ 反应 30min。用洗涤液再次重复洗板 5 次，每孔中加入显色剂 A 和



B, 轻轻震荡混匀, 37℃避光显色。最后每孔中加终止液, 450nm 波长测定各孔的吸光度。

## 1.6.2 血清中 Sa、So 的检测: ELISA 方法

### 1.6.2.1 血清中 Sa 的测定方法

反应板上设有标准品孔、待测样品孔和空白孔。标准品孔中加标准品溶液, 空白孔中加样品稀释液, 待测样品孔中加入样品稀释液和血清, 混匀封板后置恒温培养箱中 37℃温育 30min。洗涤液重复洗板 5 次, 标准品孔和待测样品孔中再加入酶标试剂, 封板, 37℃反应 30min。洗涤液再次重复洗板 5 次, 每孔中加入显色剂, 轻轻震荡混匀, 37℃避光显色。每孔中加终止液, 450nm 波长测定各孔的吸光度。

### 1.6.2.2 血清中 So 的测定方法

反应板上设标准品孔、待测样品孔和空白孔。标准品孔中加标准品溶液, 空白孔中加样品稀释液, 待测样品孔中加入样品稀释液和血清, 混匀, 封板膜封板后置恒温培养箱中 37℃温育 30min。洗涤液重复洗板 5 次, 标准品孔和待测样品孔中再加入酶标试剂, 封板 37℃反应 30min。洗涤液再次重复洗板 5 次, 每孔中加入显色剂, 轻轻震荡混匀, 37℃避光显色。每孔中加终止液, 450nm 波长测定各孔的吸光度。

## 1.6.3 血浆中亚硝酸盐的检测: 分光光度法

该试验中分为空白管、标准管和测定管。空白管中加双蒸水 0.3ml, 标准管中加 100μmol/L 亚硝酸钠 0.3ml, 测定管中加待测血浆 0.3ml; 然后三种试管中再分别加入 1 号试剂 0.8ml 和 2 号试剂 0.4ml, 混匀并静置 10min。然后离心机 3500r/min 离心 10min, 取上清液 0.8ml 进行显色反应。在 0.8ml 的上清液中加显色剂 0.4ml, 混匀, 静置 15min 后双蒸水调零, 在分光光度计 550nm 处比色, 测各管的 OD 值。亚硝酸盐含量 (μmol/L) = (测定 OD 值-空白 OD 值) / (标准 OD 值-空白 OD 值) × 标准品浓度 (100μmol/L)

## 1.7 统计分析

采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计学处理, 两组数据差值符合正态分布, 用配对 T 检验方法分析两组指标之间是否存在显著性差异, 数据以均数±标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示; 两组数据差值不符合正态分布, 则采用 Wilcoxon 符号秩检验, 数据以中位数 (全距) 表示; 使用 Pearson 相关性检验分析内外暴露指标间的关联性;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AFB<sub>1</sub> 暴露水平

#### 2.1.1 AFB<sub>1</sub> 经膳食摄入水平

食管癌前病变组和正常对照组膳食中 AFB<sub>1</sub> 检出人数分别为 93 和 98 人。经 Wilcoxon 符号秩检验, 两组人群 AFB<sub>1</sub> 经膳食摄入水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。食管癌前病变组 AFB<sub>1</sub> 经膳食摄入水平的中位数为 4.19μg/d, 正常对照组中位数为 3.56μg/d, 具体见表 2.1。



表 2.1 食管癌前病变组和正常对照组膳食 AFB<sub>1</sub> 水平

组别	例数	AFB <sub>1</sub> (μg/d)
食管癌前病变组	100	4.19 (0~33.62)
正常对照组	100	3.56 (0~19.88)
<i>P</i>	0.899	

### 2.1.2 AFB<sub>1</sub>-Alb 血液浓度水平

经 Wilcoxon 符号秩检验, 食管癌前病变组和正常对照组血清中 AFB<sub>1</sub>-Alb 水平存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。癌前病变组血清 AFB<sub>1</sub>-Alb 水平的中位数为 71.02pg/ml, 正常对照组中位数为 44.48pg/ml, 具体见表 2.2。根据两组人群血清 AFB<sub>1</sub>-Alb 水平的中位数将其分为黄曲霉毒素高暴露组和黄曲霉毒素低暴露组。血清 AFB<sub>1</sub>-Alb 高暴露水平在食管癌前病变发生中 *OR* 值为 10.097 (95%*CI*: 5.266-19.359), 具体见表 2.3。

表 2.2 食管癌前病变组和正常对照组血清 AFB<sub>1</sub>-Alb 水平

组别	例数	AFB <sub>1</sub> -Alb (pg/ml)
食管癌前病变组	100	71.02 (20.88~352.85)
正常对照组	100	44.48 (16.25~331.46)
<i>P</i>	<0.001	

表 2.3 Logistic 回归分析血清 AFB<sub>1</sub>-Alb 水平与食管癌前病变发生关联

logistic regression analysis					
AFB <sub>1</sub> -Alb (pg/ml)	食管癌前病变组	正常对照组	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i>
低水平 (≤60.3125)	24	76	1.0	—	—
高水平 (>60.3125)	76	24	10.097	5.266-19.359	0.000

注: 数据经年龄和性别调整

### 2.1.3 AFB<sub>1</sub> 内外暴露间相关性分析

膳食中 AFB<sub>1</sub> 水平与血清中 AFB<sub>1</sub>-Alb 水平之间存在显著相关性, 相关系数  $r=0.272$ ,  $P < 0.01$ , 两者相关性散点图见图 2.1。

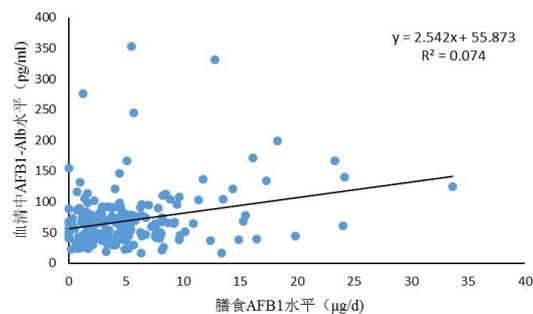


图 2.1 膳食 AFB<sub>1</sub> 和血清 AFB<sub>1</sub>-Alb 相关性散点图



## 2.2 FB 暴露水平

### 2.2.1 FB 经膳食摄入水平

食管癌前病变组和正常对照组膳食 FB 的检出人数分别为 58 和 52 人。经配对 T 检验, 两组人群 FB 经膳食摄入水平无显著差异 ( $P>0.05$ ), 食管癌前病变组 FB 经膳食摄入平均水平为  $(77.01\pm 75.32)$   $\mu\text{g}/\text{d}$ , 正常对照组 FB 经膳食摄入平均水平为  $(68.73\pm 75.40)$   $\mu\text{g}/\text{d}$ , 具体见表 2.4。联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂专家委员会 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) 暂定 FB<sub>1</sub> 的每日最大耐受摄入量 (provisional maximum tolerable daily intake, PMTDI) 为  $2\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ , 食管癌前病变组和正常对照组分别有 34 和 28 人超出该标准, 两组人群膳食中 FB 总超标率为 31%。经卡方检验, 两组人群膳食中 FB 超标情况间无统计学差异 ( $P>0.05$ ), 具体见表 2.5。

表 2.4 食管癌前病变组和正常对照组膳食 FB 水平

组别	例数	FB ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )
食管癌前病变组	100	$77.01\pm 75.32$
正常对照组	100	$68.73\pm 75.40$
<i>P</i>	0.408	

表 2.5 食管癌前病变组和正常对照组膳食 FB 超标情况

组别		$>2\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{w.}$ (N)	FB ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )	$\leq 2\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{w.}$ (N)	FB ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )
			(中位数)		(中位数)
食管癌前病变组		34	157.81	66	0
			(106.48~274.05)		(0~135.17)
正常对照组		28	149.71	72	0 (0~152.95)
			(93.55~267.14)		
<i>P</i>			0.359		

### 2.2.2 Sa、So 和 Sa/So 血液浓度水平

经 Wilcoxon 符号秩检验, 食管癌前病变组和正常对照组血清 Sa、So 和 Sa/So 比值之间都无显著性差异 ( $P>0.05$ )。癌前病变组血清 Sa 水平的中位数为  $229.57\text{pg}/\text{ml}$ , 正常对照组中位数为  $195.59\text{pg}/\text{ml}$ ; 癌前病变组血清 So 水平的中位数为  $83.31\text{pg}/\text{ml}$ , 正常对照组中位数为  $71.06\text{pg}/\text{ml}$ ; 癌前病变组血清 Sa/So 比值的中位数为 2.57, 正常对照组中位数为 2.91, 具体见表 2.6。

表 2.6 食管癌前病变组和正常对照组血清 Sa、So、Sa/So 水平

组别	例数	Sa ( $\text{pg}/\text{ml}$ )	So ( $\text{pg}/\text{ml}$ )	Sa/So
食管癌前病变组	100	229.57	83.31	2.57
		(57.45~695.90)	(13.90~401.72)	(0.58~20.82)
正常对照组	100	195.59	71.06	2.91
		(85.90~888.86)	(3.67~386.87)	(0.51~37.76)
<i>P</i>		0.139	0.241	0.138



### 2.2.3 FB 内外暴露水平间相关性分析

膳食中 FB 水平与血清中 Sa 水平间无显著相关性, 相关系数  $r=0.074$ ,  $P=0.332$ , 两者相关性散点图见图 2.2; 膳食中 FB 水平与血清中 So 水平间无显著相关性, 相关系数  $r=-0.021$ ,  $P=0.768$ , 两者相关性散点图见图 2.3; 膳食中 FB 水平与血清中 Sa/So 水平间也无显著相关性, 相关系数  $r=0.1$ ,  $P=0.185$ , 两者相关性散点图见图 2.4。

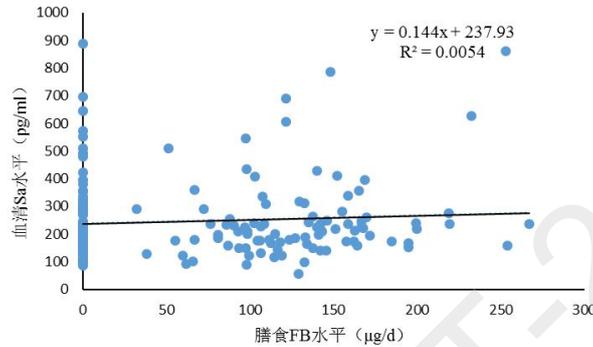


图 2.2 膳食 FB 和血清 Sa 相关性散点图

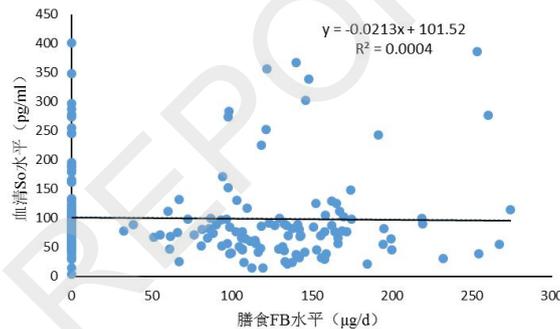


图 2.3 膳食 FB 和血清 So 相关性散点图

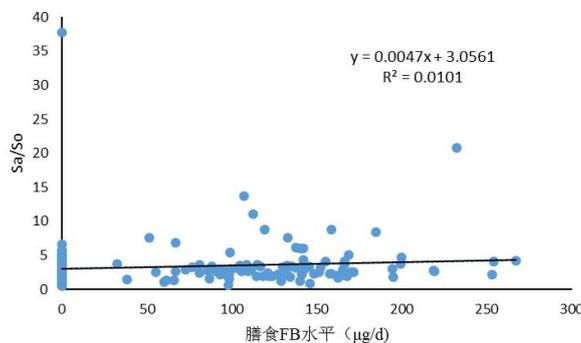


图 2.4 膳食 FB 和 Sa/So 相关性散点图

## 2.3 亚硝酸盐暴露水平

### 2.3.1 亚硝酸盐经膳食摄入水平

食管癌前病变组和正常对照组都存在不同程度的亚硝酸盐暴露, 暴露范围为



0.81mg/d~71.57mg/d。食管癌前病变组人群每天摄入亚硝酸盐水平的中位数为 8.76mg，正常对照组中位数为 5.33mg。经 Wilcoxon 符号秩检验，食管癌前病变组每天亚硝酸盐的摄入量明显高于正常对照组，差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )，具体见表 2.7。根据两组人群膳食中亚硝酸盐外暴露水平四分位数分组，亚硝酸盐摄入量最高四分位与最低四分位相比，其对食管癌前病变的 *OR* 值为 2.256 (95%*CI*: 1.012-5.026)，较高亚硝酸盐摄入是食管癌前病变的危险因素 ( $P<0.05$ )，且膳食亚硝酸盐摄入量与食管癌前病变发生之间存在有剂量效应关系，具体见表 2.8。2002 年，JECFA 规定亚硝酸盐的每日允许摄入量为 0~0.07mg/ (kg·bw)。以 0.07mg/ (kg·bw) 作为每日最高摄入量，食管癌前病变组和正常对照组分别有 76 人和 59 人超出该标准，两组人群膳食中亚硝酸盐的总超标率为 67.5%。经卡方检验，食管癌前病变组每天亚硝酸盐摄入超标率明显高于正常对照组，差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )，具体见表 2.9。

表 2.7 食管癌前病变组和正常对照组膳食亚硝酸盐摄入水平

组别	例数	亚硝酸盐 (mg/d)
食管癌前病变组	100	8.76 (1.44~66.21)
正常对照组	100	5.33 (0.81~71.57)
<i>P</i>	0.011	

表 2.8 膳食亚硝酸盐的四分位数与食管癌前病变的 *OR* 和 95%*CI*

亚硝酸盐 mg/d	食管癌前病变组	正常对照组	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i>
第一分位数 (0~3.7350)	20	30	1.0	—	—
第二分位数 (3.7351~7.1300)	23	27	1.175	0.532-2.598	0.690
第三分位数 (7.1301~17.3275)	25	25	1.373	0.618-3.051	0.437
第四分位数 (17.3276~71.5700)	31	19	2.256	1.012-5.026	0.047

注：数据经年龄和性别调整

表 2.9 食管癌前病变组和正常对照组膳食亚硝酸盐超标情况

组别	食管癌前病变组	>0.07mg/kg	亚硝酸盐 mg/d	≤ 0.07mg/kg	亚硝酸盐 mg/d
		b.w. (N)	(中位数)	b.w. (N)	(中位数)
		76	13.13 (3.85~66.21)	24	2.74 (1.44~4.51)
	正常对照组	59	11.24 (3.77~71.57)	41	2.98 (0.81~5.57)
<i>P</i>			0.015		

### 2.3.2 亚硝酸盐血液浓度水平

经 Wilcoxon 符号秩检验，食管癌前病变组和正常对照组血浆亚硝酸盐水平间无显著性差异 ( $P>0.05$ )。癌前病变组血浆亚硝酸盐水平的中位数为 0.13 $\mu$ mol/L，对照组血浆亚硝酸



盐水平的中位数为  $0.11\mu\text{mol/L}$ ，具体见表 2.10。

表 2.10 食管癌前病变组和正常对照组血浆亚硝酸盐水平

组别	例数	亚硝酸盐 ( $\mu\text{mol/L}$ )
食管癌前病变组	100	0.13 (0~1.26)
正常对照组	100	0.11 (0~0.78)
<i>P</i>	0.211	

### 2.3.3 亚硝酸盐内外暴露水平间相关性分析

膳食中亚硝酸盐水平与血浆中亚硝酸盐水平间无显著相关性，相关系数  $r=-0.066$ ， $P=0.353$ ，两者相关性散点图见图 2.5。

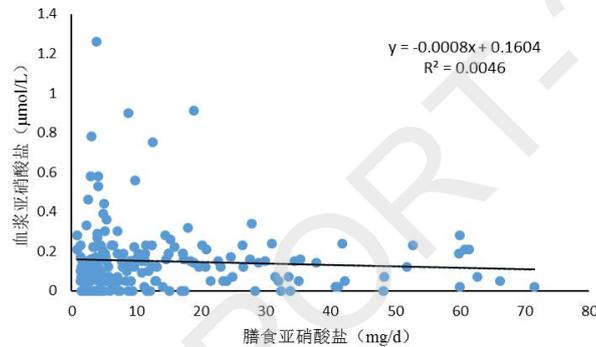


图 2.5 膳食亚硝酸盐和血浆亚硝酸盐相关性散点图

## 3 小结

本章结果显示，与 FB 相比， $\text{AFB}_1$  和亚硝酸盐的高水平暴露可能是淮安地区食管癌高发的主要诱因，因此该地区应加强对主要粮食作物中霉菌毒素的防控工作和减少腌晒食品的摄入。本研究仍存在有一定的不足之处。首先，本次调查中没有采集调查对象的尿液样本，尿液中生物标志物指标有时比血液指标更为敏感，且能更好的反映有害物质在机体的滞留和代谢情况。其次，膳食样品采集于 7 月至 8 月，每个季节的食物种类和消耗量都不同，本研究的数据仅能反映该地区夏季膳食中  $\text{AFB}_1$ 、FB 和亚硝酸盐的摄入量，不能反映淮安地区居民对这三者的年摄入量。最后，由于资金和人员的限制，仅有 100 对调查对象参加了本研究，需要更大的样本人群来确定  $\text{AFB}_1$ 、FB 和亚硝酸盐暴露与食管癌之间的关系。

本章对食管癌前病变患者和正常对照膳食和血液中的指标进行测定发现两组人群都存在有  $\text{AFB}_1$ 、FB 和亚硝酸盐的暴露，但食管癌前病变患者膳食亚硝酸盐和血液  $\text{AFB}_1\text{-Alb}$  水平显著高于正常对照组，这可能导致导致食管癌前病变患者处于较高的氧化应激状态并存在更严重的氧化损伤，因此第三章中我们将通过测定血清中相关氧化应激指标来分析两组人群的氧化应激状态和氧化损伤程度，进一步探讨氧化损伤在食管癌前病变发生中的作用。



### 第三章 氧化损伤与食管癌前病变关系的病例对照研究

食管癌是严重危害人们健康的恶性肿瘤，它的发生具有连续性、阶段性特点，一般需要经历上皮基底细胞过度增生，不典型增生，原位癌和食管鳞癌等多个阶段。近年来国内外大量研究表明，自由基所引发的氧化损伤是导致肿瘤发病的重要机理之一，机体的氧化和抗氧化状态与癌症的发生密切相关。相关研究显示，氧化损伤程度与机体暴露于环境污染物的剂量有一定的联系<sup>[3]</sup>，本研究第二章中我们发现，与正常对照组相比，食管癌前病变患者膳食亚硝酸盐水平和血液 AFB<sub>1</sub>-Alb 水平较高，这可能导致食管癌前病变患者处于较高的氧化应激状态并存在更严重的氧化损伤。目前已有的文献都是对食管癌患者氧化、抗氧化能力和氧化损伤情况进行研究<sup>[4,5]</sup>，但是有关食管癌前病变状态人群机体的氧化应激状态的研究还比较少，因此本研究通过检测食管癌前病变患者和正常对照血清中维生素 C、抗氧化酶、脂质过氧化损伤产物 MDA 和 DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 含量的变化，探讨食管癌前病变患者和正常对照体内氧化应激状态和氧化损伤程度。

#### 1 材料与amp;方法

##### 1.1 研究对象

同第一章 1.1。

##### 1.2 血液样本的采集

同第二章 1.3。

##### 1.3 主要的试剂和仪器

MDA 测试盒	南京建成生物工程研究所有限公司
8-OHdG 试剂盒	南京森贝伽生物科技有限公司
T-SOD 测试盒	南京建成生物工程研究所有限公司
GSH-PX 测试盒	南京建成生物工程研究所有限公司
CAT 试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
抗坏血酸（分析纯）	上海麦克林生化科技有限公司
磷酸二氢钾（色谱级）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
偏磷酸（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
磷酸（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
冰醋酸（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
SHP-250 智能生化培养箱	上海精宏实验设备有限公司
Biotek Epoch 酶标仪	美国 Bio TEK 公司
安捷伦 1260 液相色谱仪	安捷伦科技有限公司
ME203E 天平	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
KQ5200 型超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
旋涡混匀器	美国赛洛捷克公司



722N 可见分光光度计

上海仪电控股（集团）公司

数显恒温水浴锅

南京顺流仪器有限公司

德国 EPPENDORF5424 离心机

湖南湘仪离心机仪器有限公司

#### 1.4 血液指标的测定

##### 1.4.1 血清维生素 C 的检测：高效液相色谱法

###### 1.4.4.1 血清维生素 C 的提取方法

取 0.1ml 血清，加入 50g/L 偏磷酸溶液 0.034ml，震荡混匀后 4000r/min 离心 10min，取上清液 20 $\mu$ l 进样测定。

###### 1.4.4.2 血清维生素 C 的测定方法

上述提取的上清液在流动相为 0.05mol/L 磷酸二氢钾，pH 值为 3.0，流速为 1ml/min，检测波长为 254nm 的色谱条件下进行检测，记录相应的峰面积。

###### 1.4.4.3 维生素 C 标准曲线的绘制

准确称取抗坏血酸 0.01g，加入 50g/L 偏磷酸溶液 15ml，溶解后用 0.22 $\mu$ m 的滤膜过滤，加水稀释至 50ml，定容，制成维生素 C 标准储备液。吸取标准储备液 0.125、0.25、0.5、1.25、2.5、3.75、5、6.25ml 分别置于 50ml 容量瓶中，加水定容，配制成浓度为 0.5、1、2、5、10、15、20、25 $\mu$ g/ml 的维生素 C 标准溶液，绘制标准曲线。

##### 1.4.2 血清 T-SOD 的检测：羟胺法

测定管中依次加入试剂一 1.0ml，血清 0.03ml，试剂二 0.1ml，试剂三 0.1ml 和试剂四 0.1ml，用旋涡混匀器混匀后放入恒温水浴锅中 37 $^{\circ}$ C 孵育 40min，然后加入 2ml 显色剂混匀，在室温中放置 10min，于波长 550nm 处测定吸光度。对照管操作流程与测定管相同，只是 0.03ml 血清要替换成 0.03ml 双蒸水。总 SOD 活力 (U/ml) = (对照管吸光度 - 测定管吸光度) / 对照管吸光度 / 50%  $\times$  反应体系的稀释倍数。

##### 1.4.3 血清 GSH-PX 的检测：

测定过程分为酶促反应和显色反应两步。酶促反应中，非酶管加 1mmol/L 还原型谷胱甘肽标准液 0.2ml，37 $^{\circ}$ C 水浴预温 5min，然后加入试剂一 0.1ml，再次 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5min，然后加入试剂二 2ml 和待测血清 0.1ml，混匀后离心机 3500~4000r/min 离心 10min，取 1ml 上清液作显色反应。酶管加 1mmol/L 还原型谷胱甘肽 0.2ml 和血清 0.1ml，37 $^{\circ}$ C 水浴预温 5min，然后加入试剂一 0.1ml，再次 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5min，然后加入试剂二 2ml，混匀后离心 10min，取 1ml 上清液作显色反应。

显色反应中，在非酶管和酶管 1ml 的上清液中依次加入试剂三 1ml，试剂四 0.25ml 和试剂五 0.05ml。混匀后室温静置 15min，然后在波长 412nm 处测定各管吸光度值。空白管中依次加入还原型谷胱甘肽标准品溶剂 1ml，试剂三 1ml，试剂四 0.25ml 和试剂五 0.05ml，混匀后静置 15min 并测定吸光度。标准管中依次加入 20 $\mu$ mol/L 还原型谷胱甘肽标准液 1ml，试剂三 1ml，试剂四 0.25ml 和试剂五 0.05ml，混匀后静置 15min 并测定吸光度。血清 GSH-PX



活力 = (非酶管 OD 值 - 酶管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 空白管 OD 值) × 标准管浓度 × 稀释倍数 × 样本测试前稀释倍数。

#### 1.4.4 血清 CAT 的检测：可见光法

测定管中依次加入血清 0.1ml、试剂一 1.0ml 和试剂二 0.1ml，混合均匀后在水浴锅中 37℃ 准确反应 60s，然后加试剂三 1.0ml 和试剂四 0.1ml，混匀后于 405nm 波长处测定吸光度。对照管中加试剂一 1.0ml 和试剂二 0.1ml，混匀后在水浴锅中 37℃ 准确反应 60s，然后加入试剂三 1.0ml，试剂四 0.1ml 和血清 0.1ml，混匀并测定吸光度。血清中 CAT 活力 (U/ml) = (对照 OD 值 - 测定 OD 值) × 271 / (60 × 取样量) × 样本测试前稀释倍数。

#### 1.4.5 血清 MDA 的检测：硫代巴比妥酸法

空白管中加无水乙醇和试剂一各 0.2ml；标准管中加 10nmol/ml 的标准品和试剂一各 0.2ml；测定管中加血清和试剂一各 0.2ml。混匀后，三类管子中都加试剂二 3.0ml 和试剂三 1.0ml，旋涡混匀器混匀。然后将试管口用保鲜膜扎紧，刺一小孔，水浴锅中 95℃ 反应 40min，然后取出用流水进行冷却，然后 3500~4000r/min，离心 10min，取上清液在 532nm 波长处测吸光度。血清中 MDA 含量 (nmol/ml) = (测定 OD 值 - 空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值) × 标准品浓度 × 样本测定前稀释倍数。

#### 1.4.6 血清 8-OHdG 的检测：ELISA 法

在酶标包被板上设标准品孔 10 孔，加入标准品溶液并进行稀释，稀释后各孔加样量都为 50μl，浓度分别为 240ng/L、160ng/L、80ng/L、40ng/L 和 20ng/L。待测样品孔中加样品稀释液 40μl，然后再加待测样品 100μl，加样时将样品加于酶标孔板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。空白对照孔中加样品稀释液 40μl。用封板膜封板后置 37℃ 培养箱内温育 30 分钟。揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，重复 5 次操作，拍干。然后加入酶标试剂 50μl，空白孔除外，于 37℃ 再次温育 30 分钟。弃去液体，加洗涤液洗涤，重复操作 5 次，拍干。每孔先加入显色剂 A 50μl，再加入显色剂 B 50μl，轻轻震荡混匀，37℃ 避光显色 15 分钟，然后每孔加终止液 50μl，终止反应。最后于 450nm 波长依序测量各孔的吸光度 OD 值。

### 1.5 统计分析

采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计学处理，两组数据差值符合正态分布，用配对 T 检验方法分析两组指标之间是否存在显著性差异，数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示。两组数据差值不符合正态分布，则采用 Wilcoxon 符号秩检验，数据以中位数 (全距) 表示， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组人群血清维生素 C 水平的比较

食管癌前病变组血清中维生素 C 水平的中位数为 0.45μg/ml，正常对照组中位数为 0.87μg/ml，经 Wilcoxon 符号秩检验，食管癌前病变组维生素 C 水平显著低于对照组，差异



具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3.1 和图 3.6。

表 3.1 食管癌前病变组和正常对照组血清维生素 C 水平

组别	例数	维生素 C ( $\mu\text{g/ml}$ )
食管癌前病变组	100	0.45 (0~3.98)
正常对照组	100	0.87 (0~4.89)
<i>P</i>		0.003

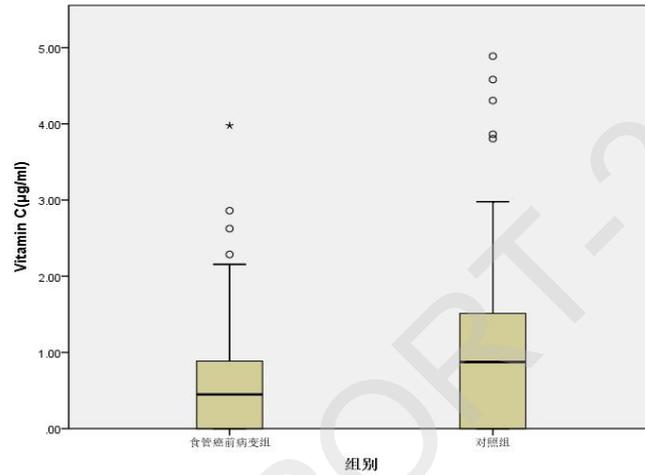


图 3.6 食管癌前病变组和正常对照组血清维生素 C 水平

## 2.2 两组人群血清 T-SOD、GSH-PX、CAT 水平的比较

食管癌前病变组血清中 T-SOD 水平的中位数为 117.62U/ml, 正常对照组中位数为 111.00U/ml, 经 Wilcoxon 符号秩检验, 食管癌前病变组 T-SOD 水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3.2 和图 3.7; 食管癌前病变组血清中 GSH-PX 平均水平为 (245.63±86.55) 活力单位, 正常对照组血清 GSH-PX 平均水平为 (222.76±57.35) 活力单位, 经配对样本 T 检验, 食管癌前病变组 GSH-PX 平均水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3.2 和图 3.8; 食管癌前病变组血清中 CAT 水平的中位数为 12.88U/ml, 正常对照组中位数为 11.11U/ml, 经 Wilcoxon 符号秩检验, 食管癌前病变组 CAT 水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3.2 和图 3.9。

表 3.2 食管癌前病变组和正常对照组血清中 T-SOD、GSH-PX、CAT 的水平

组别	例数	T-SOD (U/ml)	GSH-PX (活力单位)	CAT(U/ml)
食管癌前病变组	100	117.62 (57.63~183.19)	245.63±86.55	12.88 (1.61~35.54)
正常对照组	100	111.00 (27.12~175.71)	222.76±57.35	11.11 (2.28~18.22)
<i>P</i>		0.002	0.028	0.026

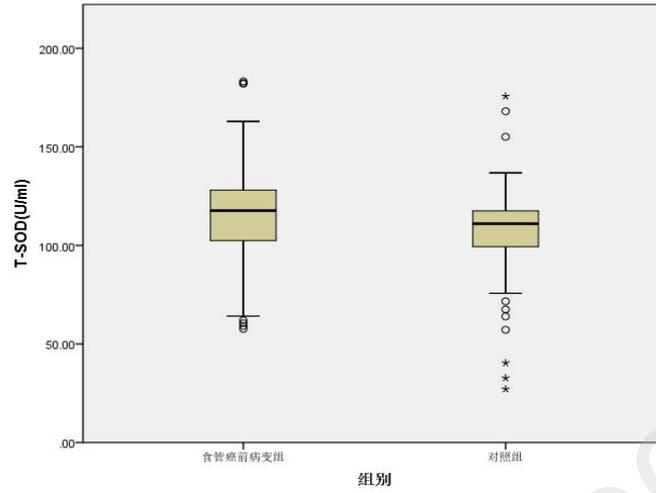


图 3.7 食管癌前病变组和正常对照组血清中 T-SOD 水平

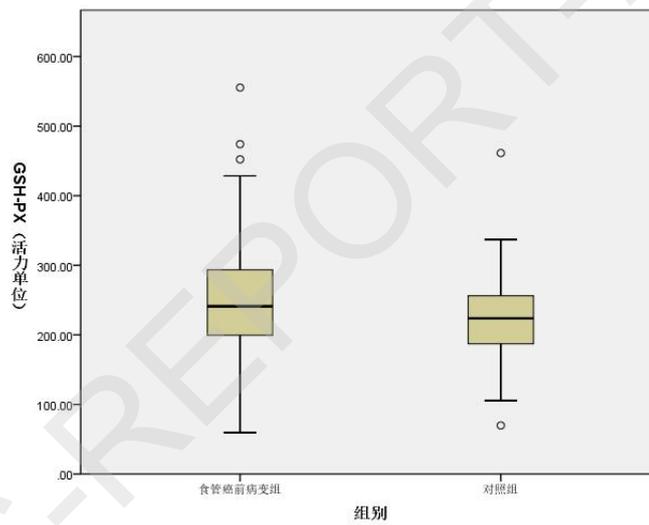


图 3.8 食管癌前病变组和正常对照组血清中 GSH-PX 水平

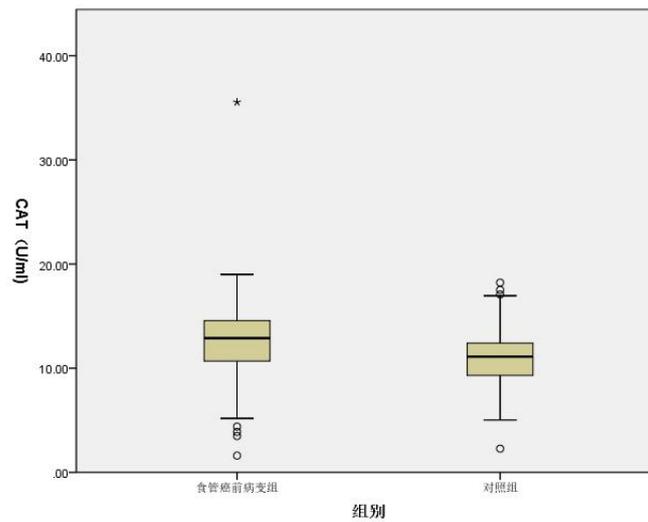


图 3.9 食管癌前病变组和正常对照组血清中 CAT 水平



### 2.3 两组人群血清 MDA 水平的比较

食管癌前病变组血清中 MDA 水平的中位数为 9.65nmol/ml，正常对照组中位数为 5.94nmol/ml，经 Wilcoxon 符号秩检验，食管癌前病变组 MDA 水平明显高于对照组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见表 3.3 和图 3.10。

表 3.3 食管癌前病变组和正常对照组血清中 MDA 的水平

组别	例数	MDA (nmol/ml)
食管癌前病变组	100	9.65 (5.27~15.91)
正常对照组	100	5.94 (2.82~10.26)
<i>P</i>		<0.001

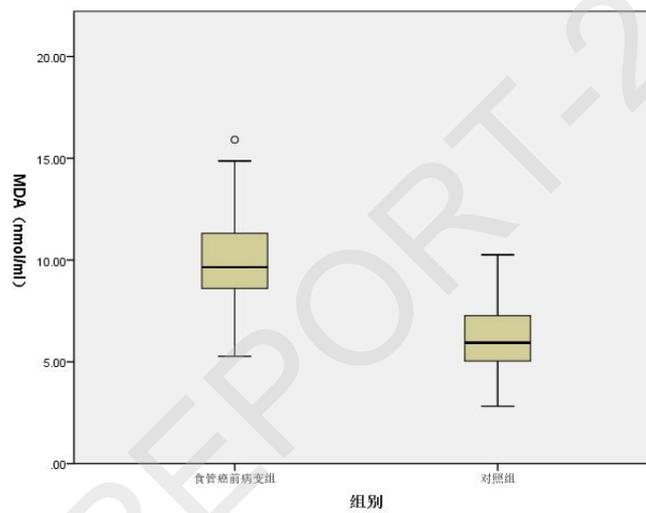


图 3.10 食管癌前病变组和正常对照组血清中 MDA 的水平

### 2.4 两组人群血清 8-OHdG 水平的比较

食管癌前病变组血清中 8-OHdG 水平的中位数为 34.61pg/ml，正常对照组中位数为 34.72pg/ml，经 Wilcoxon 符号秩检验，食管癌前病变组和正常对照组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。虽无统计学差异，但食管癌前病变组 8-OHdG 含量的最低水平和最高水平都高于对照组，见表 3.4 和图 3.11。

表 3.4 食管癌前病变组和正常对照组血清中 8-OHdG 的水平

组别	例数	8-OHdG (pg/ml)
食管癌前病变组	100	34.61 (22.79~236.32)
对照组	100	34.72 (18.44~129.50)
<i>P</i>		0.480

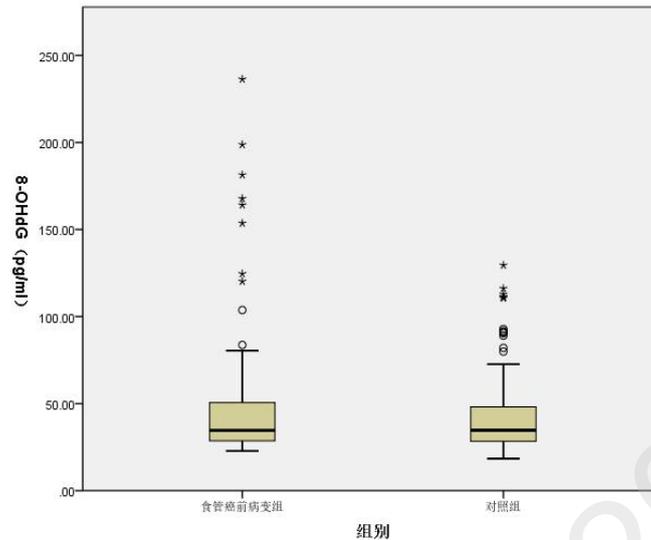


图 3.11 食管癌前病变组和正常对照组血清中 8-OHdG 的水平

### 3 小结

本章通过测定血清中 MDA 和 8-OHdG 水平来反映机体的氧化损伤程度。研究结果显示，食管癌前病变患者血清 MDA 含量显著高于对照组，食管癌前病变患者机体脂质过氧化损伤明显。食管癌前病变患者血清中 8-OHdG 水平和正常对照之间不存在显著性差异，造成这种结果的可能原因是，第一，本次研究的样本量还不够充足，需要更大的样本来验证 8-OHdG 在食管癌前病变患者和正常对照之间的水平差异；第二，本次研究对象为食管鳞状上皮轻度异型增生和中度异型增生患者，疾病严重程度没有癌症患者严重，DNA 损伤程度尚在机体修复能力范围内，所以差异不是很显著。但是食管癌前病变组 8-OHdG 的最低水平和最高水平都高于对照组，也可以在一定程度上提示食管癌前病变患者 DNA 氧化损伤情况是高于对照组的。总体而言，食管癌前病变组人群氧化损伤程度较高。而为了修复过多自由基所造成的氧化损伤，机体又会负反馈的上调酶类抗氧化剂的水平和消耗外源性抗氧化剂水平来提高机体抗氧化能力，降低氧化损伤程度。因此本研究中食管癌前病变组维生素 C 的水平显著低于对照组，T-SOD，GSH-PX 和 CAT 水平食管癌前病变组显著高于对照组。

综上所述，本研究发现食管癌前病变患者处于氧化应激状态，氧化和抗氧化水平失衡，氧化损伤严重，由黄曲霉毒素和亚硝酸盐引起的氧化损伤可能在食管癌前病变的发生发展中起重要作用。癌前病变患者可以考虑通过增加外源性抗氧化剂的摄入量，来降低氧化应激水平，减少氧化损伤对机体的危害，避免食管癌的发生。



## 第四章 MNNG 对 HEEC 毒性及机制研究

N-亚硝基化合物常存在于加工鱼肉制品、烟草制品和污染的水中，与食管癌发生有关，MNNG 是 NOC 的一种，属于 N-亚硝酰胺类，是在环境中广泛存在的化学诱变剂和致癌剂，也是化学致癌物诱变机制研究中常用的一种模式化合物。由于食管对 MNNG 的敏感，故 MNNG 经常被用作诱导食管癌模型物质<sup>[6]</sup>。

本研究用 MNNG 染毒处理 HEEC，研究 MNNG 对 HEEC 的毒性及 MNNG 对 HEEC 凋亡和周期的影响及可能途径。首先用 CCK8 法来检测 MNNG 对 HEEC 活力的影响，为后续凋亡周期等检测选择合适的染毒浓度，进而为第二章维生素 C 对 MNNG 染毒作用的干预研究选择合适的 MNNG 染毒剂量。采用流式细胞仪检测细胞凋亡，细胞周期，检测 P53、Bax、Bcl-2、CDC25C、Cyclin B<sub>1</sub>、CDK1、CDC25AmRNA 的表达，P53、CDC25C、Cyclin B<sub>1</sub>、CDK1、p-CDK1 蛋白的表达，分别来观察 MNNG 对 HEEC 的作用及可能机制。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 细胞

HEEC 购自上海中科院细胞库。

#### 1.2 试剂和仪器

MNNG	美国 Accustandard 公司
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)	以色列 BI 公司
双抗 (青霉素、链霉素)	美国 Hyclone 公司
0.25%EDTA 胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
磷酸缓冲液 (Phosphate-Buffered Saline, PBS)	美国 Hyclone 公司
DMSO	美国 Sigma 公司
LDH 检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
活性氧检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
细胞凋亡试剂盒	美国 BD 公司
细胞周期试剂盒	江苏凯基生物技术股份有限公司
氯仿 (三氯甲烷)	国药集团化学试剂有限公司
Trizol	北京索莱宝科技有限公司
PCR 试剂盒	日本 toyobo 公司
ECL	武汉赛维尔生物技术有限公司



P53	武汉三鹰生物技术有限公司
CDC25C	北京博奥森生物技术有限公司
Cyclin B <sub>1</sub>	苏州睿瀛生物技术有限公司
CDK1	武汉赛维尔生物科技有限公司
p-CDK1 (Tyr 15)	美国 CST 公司
HRP 标记山羊抗兔	武汉赛维尔生物科技有限公司
HRP 标记驴抗山羊	武汉赛维尔生物科技有限公司
HRP 标记山羊抗小鼠	武汉赛维尔生物科技有限公司
β-actin	武汉赛维尔生物科技有限公司
聚偏氟乙烯膜 (PVDF)	武汉赛维尔生物科技有限公司
二氧化碳培养箱	新加坡 ESCO 公司
生物安全柜	山东博科科学仪器有限公司
RT-6000 酶标分析仪	美国 Rayto 公司
PCR 基因扩增仪	德国 Ependof 公司
CFX connect 实时荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-rad 公司
IX51 倒置显微镜	日本 OLYMPUS 公司
Axio Vert A1 荧光倒置显微操作系统	德国 ZEISS 公司
离心机	德国 Eppendorf 公司
电泳仪	北京六一仪器厂
Image Master VDS 凝胶自动成像仪	瑞典 Pharmacia 公司
扫描仪	日本 EPSON 公司
灰度分析软件	美国 Alpha Innotech 公司

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养基本操作

#### 2.1.1 细胞培养

用高糖 DMEM 培养液、FBS (Fetal bovine serum)、双抗 (100 U/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素) 配制培养基, 三者比例为 10:1:0.1, HEEC 在配置好的完全培养基中并置于 5%CO<sub>2</sub>、37°C 培养箱中培养, 待细胞密度达 80%-90%即可传代、实验或冻存。

#### 2.1.2 细胞复苏

(1) 用 75%酒精擦拭生物安全柜台面, 放入移液管, 15 mL 离心管, 培养瓶等所需耗材, 开紫外灯照射 30min, 水浴锅提前 37°C 预热。取配好的培养基 3-5 mL 放入 15 mL 离心管中。

(2) 从液氮罐拿出 HEEC, 迅速放入水浴锅中, 融化过程中不断晃动确保其 1min 完全融化。将融化的细胞悬液转移至 15 mL 离心管中, 800rpm, 5min 离心后, 弃去上清, 加入 1-2 mL



培养基吹打制成单细胞悬液，25cm<sup>2</sup>培养瓶中放入 1-2 mL 培养基，再将细胞悬液放入，上下左右充分摇匀后放入培养箱培养。

### 2.1.3 细胞传代

(1) 倒置显微镜下观察细胞形态，细胞密度达 80%-90%即可传代。吸弃旧培养基，用 PBS 洗涤两遍，加入含 0.25%EDTA 的胰酶消化，37℃温箱消化 3-4min，待细胞变圆略微有飘起时加入等量培养基终止消化。

(2) 转移至 15 mL 离心管，800rpm 离心 5min，弃去上清，加入培养基吹打制成单细胞悬液，1:2 或 1:3 分至放有培养基的新培养瓶中，保证培养瓶内 3-4 mL 培养基，摇晃均匀后放入培养箱培养。

### 2.1.4 细胞冻存

(1) 镜下观察，细胞状态较好且密度达 80%-90%即可冻存，按 FBS:DMSO=9:1 配好冻存液，现配现用。弃去细胞旧培养基，用 PBS 洗涤两遍，加入含 0.25%EDTA 的胰酶消化，37℃温箱消化 3-4min，待细胞变圆略微有飘起时加入等量培养基终止消化。

(2) 转移至 15 mL 离心管，800rpm 离心 5min，弃去上清，每瓶细胞加入 1 mL 冻存液，吹打混匀，转移至 1.8 mL 冻存管中。

(3) 将冻存管放入冰箱 4℃ 20-30min，-20℃ 30min，再放入-80℃冰箱过夜，后转移保存于液氮罐中。

2.2 溶液配制：将 50mgMNNG 溶于 340μLDMSO 中，制成 1000mM 母液保存于-20℃冰箱中，使用时用培养液稀释 1000 倍为 1000μmol/L 标准液（现配现用），稀释成所需浓度使用。

### 2.3 CCK8 法测细胞活力

将细胞以  $6 \times 10^4$  个/孔密度接种于 3 个 96 孔板中，每孔体积 100μL，置于 37℃、5%CO<sub>2</sub>、培养箱内培养。24 h 后，三板分别加入 100μL 含 0、5、10、20、40、80、160μmol/L 的 MNNG 的培养液，每组 5 个复孔，并设置空白孔（不含细胞，只含培养液，为去除背景值）分别染毒 24、48、72h；后弃去培养液，换成 100μL DMEM 培养液，随即每干预孔贴壁加入 10μL CCK8 溶液，小心避免产生气泡，培养箱内孵育 1.5 h，于酶标仪 450nm 处测定各孔 OD 值，记录结果取平均值。按上述操作步骤进行 3 次重复实验。计算细胞存活率：

细胞存活率 = (试验组 OD - 空白组 OD) / (对照组 OD - 空白组 OD) × 100%。

### 2.4 经 MNNG 染毒后 HEEC 内 LDH 含量的测定

将细胞接种于 96 孔板中， $6 \times 10^4$  个/孔，每孔体积 100μL，置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养，24 h 后，吸去培养液，用 PBS 液洗涤一次，分别加入含 0、5、10、20μmol/L 的 MNNG 低血清（浓度为 1%）培养液，另设无细胞的培养液孔（背景空白对照孔），未经药物处理的对照细胞孔(样品对照孔)，同样加入新鲜的 1%血清的低血清培养液，并做好标记，每孔体积 200μL，染毒 24h 后将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。分别取各孔的上清液 120μL，加入到一新的 96 孔板相应孔中，随即进行样品测定。临检测前新鲜配置适量的



检测工作液(配制过程中避光),各孔分别加入 60 $\mu$ L LDH 检测工作液,混匀后室温避光孵育 30min,然后 490nm 处测定吸光度。LDH 释放活性表示为相对于对照组的增加倍数:(处理 OD-空白 OD)/(对照 OD-空白 OD)。

## 2.5 经 MNNG 染毒后 HEEC 内活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测

DCFH-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯)探针法测定细胞内总 ROS 水平。细胞接种于 6 孔板,  $2 \times 10^5$  个细胞/孔,每孔培养液 2 mL,细胞贴壁后分别加入含 0、5、10、20 $\mu$ mol/L 的 MNNG 的新鲜培养液,24h 后加入含 DCFH-DA 探针的无血清高糖培养基(1:3000),37 $^{\circ}$ C 培养,期间不断晃动六孔板,确保探针全部溶解,30min 后,用无血清培养液洗涤三遍,倒置荧光显微镜观察拍照(200 $\times$ ),软件读取各组荧光强度均值。

## 2.6 细胞凋亡的流式细胞检测

用流式细胞仪、Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡。将细胞种于 6 孔板中,每孔细胞  $2 \times 10^5$  个,培养液 2 mL,置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁,生长至对数生长期时,弃去原培养液,分别加入含 0、5、10、20 $\mu$ mol/L MNNG 的培养液,染毒 24h 后,分别收集各组细胞进行流式检测。收集各组培养液,用 PBS 洗涤细胞并收集,加入 800 $\mu$ L 无 EDTA 的胰酶消化细胞,待细胞全部变圆并有少量飘起后终止消化,轻柔吹打转移至 15 mL 离心管 1200rpm 离心 5min 后,再用 PBS 洗两遍(1200rpm,离心 5min)后加入对应体积 Binding buffer 重悬细胞,保证细胞密度  $1 \times 10^4$ - $5 \times 10^4$ ,轻柔吹打。后取 100-200 $\mu$ L 单细胞悬液先加 5 $\mu$ L Annexin V-FITC 避光孵育 10min,再加 5 $\mu$ L PI (Propidium Iodide) 继续避光孵育 2-3 min 后上流式细胞仪检测。

## 2.7 细胞周期的流式细胞检测

将细胞种于 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中,细胞  $6 \times 10^5$  个,培养液 3 mL,置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁,生长至对数生长期时,弃去原培养液,分别加入含 0、5、10、20 $\mu$ mol/L MNNG 的培养液,干预 24h 后,分别收集各组细胞进行流式检测。用 PBS 洗涤细胞 2 次,随即加入 1 mL 含 0.25% 的 EDTA 胰酶消化细胞,待细胞全部变圆并有少量飘起后终止消化,转移至 15 mL 离心管 1000rpm 离心 5min 后,再用 PBS 洗两遍(1000rpm,离心 5min)调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  个,并转移至 1.5 mL EP 管,逐滴加入 500 $\mu$ L 70%冰乙醇(提前配制并置于冰箱 4 $^{\circ}$ C 预冷)。将各组 EP 管置于冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜,第二天离心弃去冰乙醇,用 PBS 洗涤 1 次离心弃去,随即放入 500 $\mu$ L 提前配置好的染液(Rnase 酶:PI=1:9),轻柔吹打混匀,避光放置 30min 后,吸取单细胞悬液过 300 目筛后上流式细胞仪检测。

## 2.8 RT-qPCR 法检测凋亡、周期相关基因的表达

将细胞种于 6 孔板中,每孔细胞  $2 \times 10^5$  个,培养液 2 mL,置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁,生长至对数生长期时,弃去原培养液,分别加入含 0、5、10、20 $\mu$ mol/L MNNG 的培养液染毒 24h。



### 2.8.1 提 RNA

- (1) 配制除酶水，实验之前喷洒通风橱、桌面及空气，保证无酶环境。
- (2) 每孔加入 600 $\mu$ L Trizol，静置 5min，随即吹打转移至 1.5 mL 无酶 EP 管，每管加入 120 $\mu$ L 氯仿（Trizol:氯仿=5:1），涡旋混匀后，置于冰上静置 10-15min，打开离心机 4 $^{\circ}$ C 预冷。
- (3) 待看到分层后，12000g 离心 15-20min，离心后看到清楚的上中下三层，吸取最上层（透明层）转移至新的 1.5 mL 无酶 EP 管，切忌吸到中间层或下层，1:1 加入异丙醇（提前 4 $^{\circ}$ C 预冷），上下颠倒混匀，冰上静置 10min。
- (4) 12000g 离心 10-15min，弃去上清，轻柔防止 RNA 沉淀脱落。
- (5) 用乙醇洗涤沉淀两次，10000g 离心 10min。弃去乙醇，倒置放置于滤纸上干燥 15-30min，控干沉淀。
- (6) 加入适量（10-50 $\mu$ L）DEPC 水溶解 RNA，30min 后用酶标仪测 RNA 浓度及纯度。OD 260/280 正常范围在 1.8-2.0 之间。<1.8 表示受到蛋白（芳香族）或酚类物质的污染，>2.0 为 RNA 降解。

### 2.8.2 逆转录

- (1) RNA 的变性：RNA 置于 65 $^{\circ}$ C 条件下 5 min 后，立即冰上冷却。
- (2) 反应液的配制

表 4.1 逆转录反应液配制

试剂	添加量
RNA	0.5pg-1 $\mu$ g
Primer Mix	0.5 $\mu$ L
RT Enzyme Mix	0.5 $\mu$ L
5 $\times$ RT Buffer	2 $\mu$ L
Nuclease-free Water	up to 10 $\mu$ L

- (3) 逆转录反应

37 $^{\circ}$ C，15 min（逆转录反应）；98 $^{\circ}$ C，5 min（酶失活反应）。反应结束之后，可于 4 $^{\circ}$ C 或者 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存。

### 2.8.3 PCR 反应

- (1) 反应液的配制：根据表 4.2 配制引物扩增反应液，引物序列见表 2.3。

表 4.2 引物扩增反应液配制

试剂	添加量	终浓度
蒸馏水	6.4 $\mu$ l	
SYBR $^{\circledR}$ Green Realtime PCR Master Mix	10 $\mu$ L	1x
上游引物 (10 Mm)	0.8 $\mu$ L	0.4 Mm
下游引物 (10 Mm)	0.8 $\mu$ L	0.4 Mm
样品溶液	2 $\mu$ L	



## (2) PCR 的循环条件

95℃ 60s, PCR 循环 ( $\times 40$  循环): 95℃ 15s, 60℃ 15s, 72℃ 45s, 融解曲线分析 65℃。

2.8.4 PCR 结果表达方式: 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示各基因 mRNA 的相对表达量。

表 4.3 PCR 反应引物序列

基因名称	引物序列
P53	F CATCTACAAGCAGTCACAGCAC
	R CTGTACCAGACCGAGATGTCA
Bax	F CGGGTTGTCGCCCTTTTCTAC
	R GACAGGGACATCAGTCGCTTCAG
Bcl-2	F GACAACAGCCTCAAGATCATCAG
	R ATGGCATGGACTGTGGTCATGAG
Cyclin B <sub>1</sub>	F TGTTGGTTTCTGCTGGGTGT
	R TGCCATGTTGATCTTCGCCT
CDK1	F GGATGTGCTTATGCAGGATTCC
	R CATGTACTGACCAGGAGGGATAG
CDC25A	F AGCCCCAAAGAGTCAACTAATCCAGA
	R CCGGTAGCTAGGGGGCTCACA
CDC25C	F ACTGAGTTGCTGAGGTGTCG
	R GCCTCTTTCTGCTCAGGGTT

## 2.9 Western blot 法检测凋亡、周期相关蛋白的表达

将细胞种于 6 孔板中, 每孔细胞  $2 \times 10^5$  个, 培养液 2 mL, 置于 37℃ 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁, 生长至对数生长期时, 弃去原培养液, 分别加入含 0、5、10、20 $\mu$ mol/LMNNG 的培养液染毒 24h。

- (1) 总蛋白提取: 弃去培养基, 用 PBS 洗涤 2 遍, 配制含 PMSF 的 RIPA 裂解液 (RIPA:PMSF=99:1, PMSF 提前几分钟加入, 现配现用), 每孔加 150-200 $\mu$ L 裂解液, 用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。冰上裂解 10min, 后用细胞刮刀刮下裂解的细胞 (粘稠似鼻涕状), 转移至 1.5 mL EP 管中冰上继续裂解 30min, 期间用枪吹打确保其裂解充分, 充分裂解后 4℃、12000g 离心 10min, 取上层清液, 即为总蛋白溶液。
- (2) 蛋白浓度检测: 用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 根据标准品和样品数量配制适量 BCA 工作液 (A:B=50:1, 现配现用), 配制不同浓度蛋白标准液, 在 96 孔板中加入标准液和样品, 再加入 200 $\mu$ LBCA 工作液, 37℃ 孵育 30min 后上酶标仪于 570nm 处检测



- OD 值，绘制标准曲线求出各组蛋白浓度。
- (3) 蛋白变性：统一蛋白浓度，将蛋白溶液按照 4:1 的比例加入 5×蛋白上样缓冲液，95-100℃煮 15min，收入-20℃冰箱保存备用。
  - (4) 制胶：玻璃板洗净晾干、将一个毛玻璃板和一个平玻璃板组成一对装架，检查底部是否对齐以免漏胶。制备 10%的 SDS 分离胶，将分离胶注入玻璃板夹层，预留出浓缩胶所需空间（1/3，梳子齿距离分离胶上液面大约 5-8mm 为宜），加入适量的甲醇/水封面；待胶凝固后倒掉甲醇/水，并用吸水纸将甲醇/水吸干。配置一定体积的浓缩胶，注入已经凝固的下层分离胶之上，插入点样梳，待上层浓缩胶凝固后，小心拔去上样梳。
  - (5) 电泳：在凝胶两侧泳道加入 8μL 预染蛋白 marker，其余每孔分别加各处理组蛋白样品。电泳电压先设为 90V，待跑完浓缩胶后（约半小时）调整为 120V 跑分离胶，待电泳至溴酚蓝刚跑出（条带迁移至胶下缘 1cm 左右）即可终止电泳，进行转膜。
  - (6) 转膜：根据 marker 标记，切取相应蛋白处的凝胶，充分浸泡在转膜液中，裁剪合适大小的 PVDF 膜，用甲醇浸泡激活 30s 后与滤纸同样浸泡在转膜液中待用。转膜板黑色负极朝下，将浸泡后的凝胶、PVDF 膜、滤纸按照海绵-滤纸-胶-膜-滤纸海绵的顺序叠放，整理平整赶走气泡，电压设置为 70V，低温冰浴转膜 4h。
  - (7) 封闭：转完膜后，取出 PVDF 膜，标记各条带，用 1×TBST 溶液漂洗，3 次×10min，置于 5%脱脂奶粉（0.5%TBST 配）于摇床上室温封闭 1h。
  - (8) 一抗孵育：稀释所需一抗（TBST 溶解的 5%脱脂牛奶，磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5%BSA）。TBST 溶液清洗封闭后的条带，3 次×10min，清洗好后放入稀释好的一抗中，4℃摇床上孵育过夜。
  - (9) 二抗孵育：一抗孵育结束后，1×TBST 漂洗，3 次×5min。将洗好的膜放入稀释好的二抗（用 TBST 稀释 3000 倍）中，室温摇床孵育 1h。
  - (10) ECL 化学发光、显影：二抗孵育结束，1×TBST 漂洗，3 次×5min，在暗室中将 ECL 显影试剂 A 液和 B 液等体积混合（现配现用），滴加适量的显影液在在曝光板上，夹取 PVDF 膜，并用滤纸吸掉膜上多余液体，平铺于曝光板上，置于化学发光成像分析系统中曝光。

## 2.10 数据分析

实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示，用 Graph pad 画图，运用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析，如果满足方差齐性，采用 LSD 检验，反之，采用 Dunnett's-T3 检验，若  $P < 0.05$ ，则差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 MNNG 对 HEEC 活性的影响



当 HEEC 暴露于不同浓度 MNNG 后, 结果如图 4.1 显示: 经 MNNG 染毒 24、48、72h 后, 随着剂量的升高, HEEC 活力逐渐下降, 呈剂量依赖性。观察同一剂量不同时间点, 随着时间升高, HEEC 活力下降, 呈现时间依赖性。且 MNNG 干预 24h 后, 得出半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 39.96  $\mu\text{mol/L}$ 。因此, 选择 5 (1/8 IC<sub>50</sub>)、10 (1/4 IC<sub>50</sub>)、20 (1/2 IC<sub>50</sub>)  $\mu\text{mol/L}$  MNNG 用于 24h 染毒 HEEC 的实验。

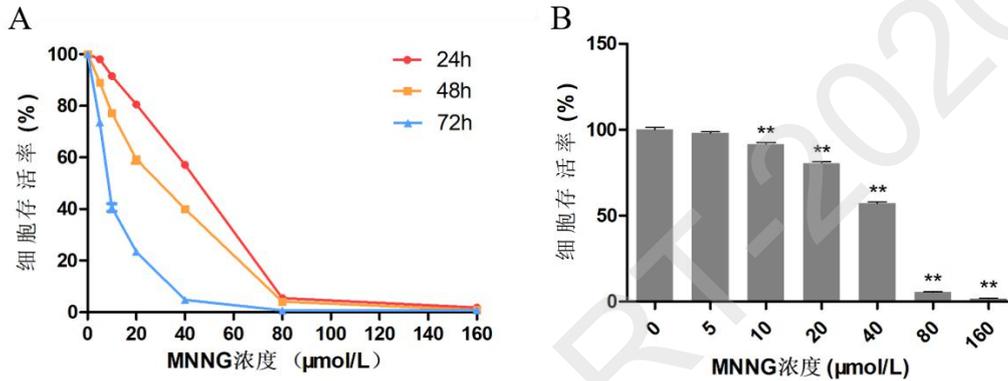


图 4.1 MNNG 对 HEEC 存活率的影响

(A) 不同时间点 MNNG 对 HEEC 存活率的影响; (B) MNNG 染毒 HEEC 24h 后存活率  
注: \*与对照组相比,  $P < 0.05$ ; \*\*与对照组相比,  $P < 0.01$

### 3.2 MNNG 诱导 HEEC 损伤

当 HEEC 暴露于不同浓度 MNNG 后, 结果如图 4.2 所示: 经 MNNG 染毒 24h 后, 随着剂量的升高, LDH 释放逐渐增多, 与对照组相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

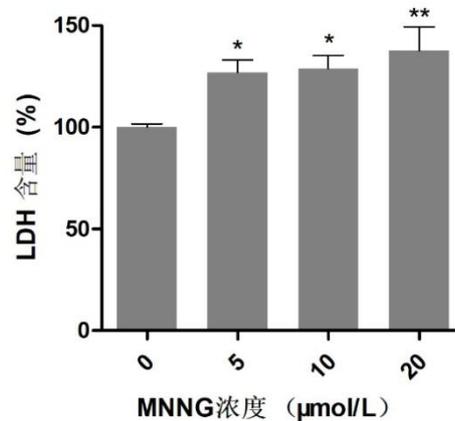


图 4.2 MNNG 对 HEEC LDH 含量的影响

注: \*与对照组相比,  $P < 0.05$ ; \*\*与对照组相比,  $P < 0.01$



### 3.3 MNNG 对 HEEC 内总 ROS 的影响

为研究 MNNG 对 HEEC 内总 ROS 生成的影响，采用 DCFH-DA 探针法检测细胞内总 ROS 的产生。如图 4.3 所示，经 MNNG 处理后，荧光显微镜观察到 HEEC 内 ROS 产生增加，且荧光强度均值逐渐增大，其中 10 $\mu\text{mol/L}$  和 20 $\mu\text{mol/L}$  组 MNNG 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

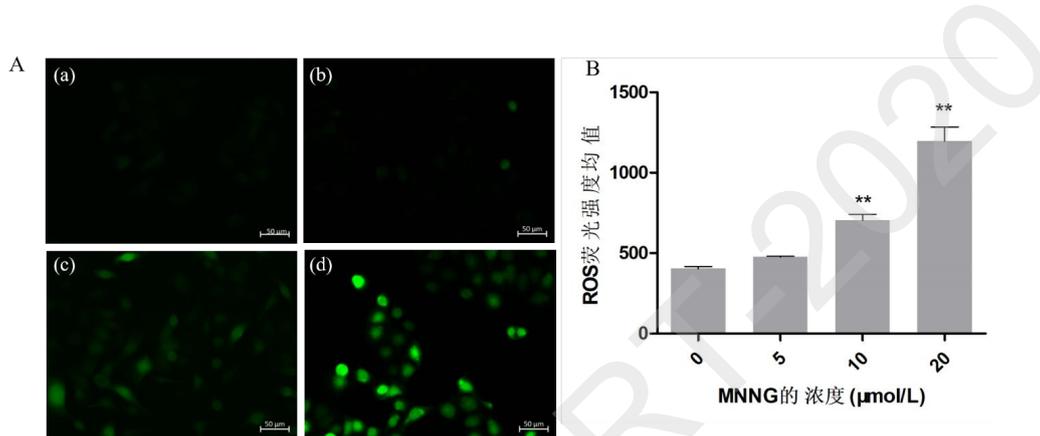


图 4.3 MNNG 对 HEEC ROS 产生的影响

(A) 荧光显微镜下观察 ROS 的产生 (200 $\times$ ) (a) 对照组 (b) 5 $\mu\text{mol/L}$  MNNG (c) 10 $\mu\text{mol/L}$  MNNG (d) 20 $\mu\text{mol/L}$  MNNG; (B) 各组 ROS 荧光强度比较

注: \*与对照组相比,  $P<0.05$ ; \*\*与对照组相比,  $P<0.01$

### 3.4 MNNG 对 HEEC 凋亡的影响

用流式细胞术检测细胞凋亡情况，当 HEEC 暴露于 0、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$  MNNG 24h 后，结果显示各组 HEEC 凋亡情况均有改变，结果见表 4.4 及图 4.4。检测结果发现 MNNG 能诱导 HEEC 凋亡，与对照组相比，各染毒组的总凋亡率均增加 ( $P<0.05$ )，呈剂量依赖性。

表 4.4 MNNG 对 HEEC 总凋亡率的影响

组别	凋亡率 (%)
对照组	5.07 $\pm$ 0.28
5 $\mu\text{mol/L}$ MNNG	9.61 $\pm$ 0.47**
10 $\mu\text{mol/L}$ MNNG	13.97 $\pm$ 0.38**
20 $\mu\text{mol/L}$ MNNG	17.18 $\pm$ 0.64**

注: \*与对照组相比,  $P<0.05$ ; \*\*与对照组相比,  $P<0.01$

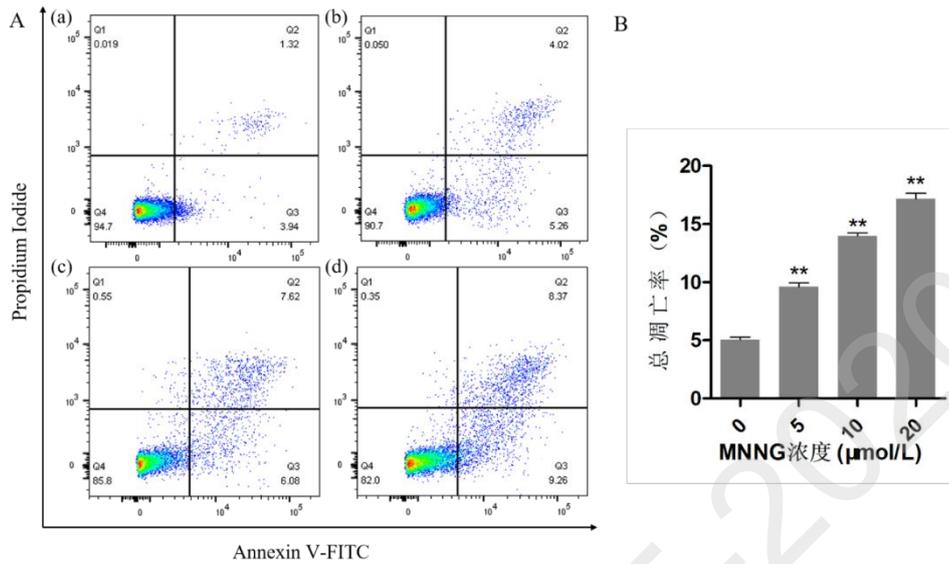


图 4.4 MNNG 对 HEEC 凋亡的影响

(A)MNNG 染毒后的凋亡流式图 (a)对照组 (b)5μmol/L MNNG (c)10μmol/L MNNG

(d)20μmol/L MNNG; (B)MNNG 染毒后各组总凋亡率

注: \*与对照组相比,  $P<0.05$ ; \*\*与对照组相比,  $P<0.01$

### 3.5 MNNG 染毒对 HEEC 周期的影响

分别用 0、5、10 和 20μmol/L MNNG 染毒 HEEC 24 h 后, 经流式细胞术分析各组细胞周期变化, 如表 4.5, 图 4.5。结果显示: 与对照组相比, 各染毒组的细胞周期均发生了改变。与对照组相比, 所有染毒组 G0/G1 期细胞减少, S 期比例增加, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 20μmol/L MNNG 组 S 期细胞及 G2/M 细胞均较对照组增加 ( $P<0.05$ )。

表 4.5 MNNG 染毒对 HEEC 周期的影响(n=3,  $\bar{x}\pm s$  %)

组别	细胞周期		
	G0/G1	S	G2/M
对照组	51.64±1.23	32.67±2.93	15.69±1.70
5μmol/L MNNG	37.55±1.12**	46.91±1.03**	15.55±0.08
10μmol/L MNNG	35.84±1.56**	50.32±1.24**	13.85±0.32
20μmol/L MNNG	28.09±0.89**	48.31±1.02**	23.61±1.92**

注: \*\*与对照组相比,  $P<0.01$

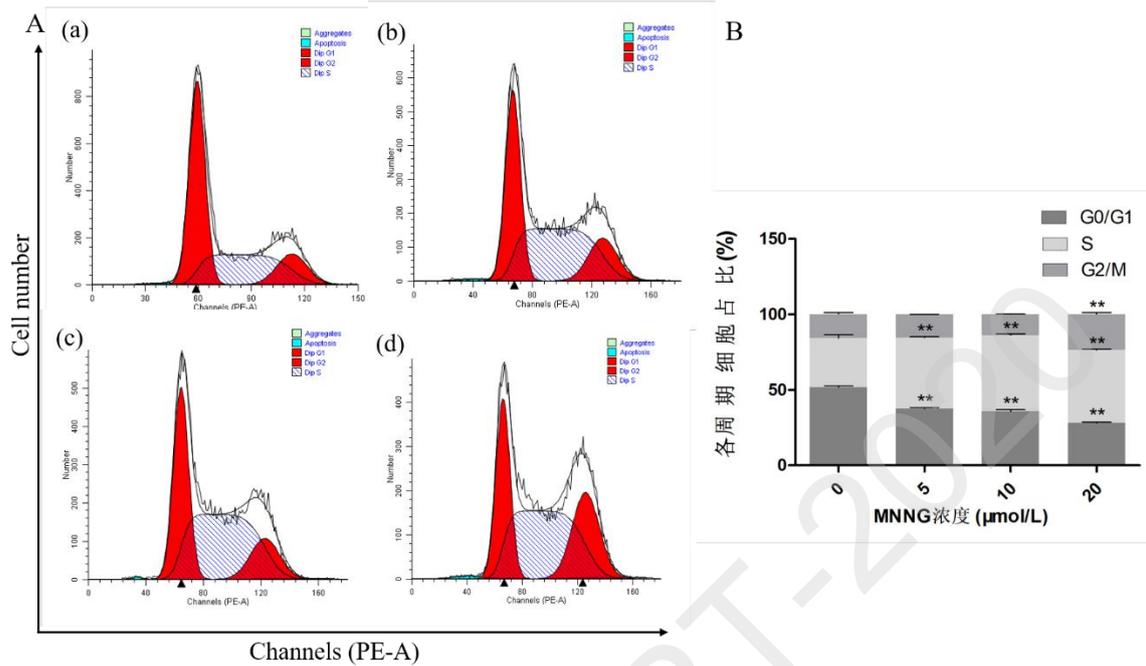


图 4.5 MNNG 对 HECC 周期分布的影响

(A)MNNG 染毒后的周期分布流式图 (a)对照组 (b)5 $\mu\text{mol/L}$  MNNG (c)10 $\mu\text{mol/L}$  MNNG  
(d)20 $\mu\text{mol/L}$  MNNG; (B)MNNG 染毒后各周期分布比较

注: \*\*与对照组相比,  $P < 0.01$

### 3.6 MNNG 染毒对 HECC 凋亡、周期相关基因表达的影响

不同浓度 MNNG 对细胞中 P53、Bcl-2/Bax、CDC25C、Cyclin B<sub>1</sub>、CDK1、CDC25A mRNA 表达结果如表 4.6、图 4.6。随着染毒浓度的增加, P53 mRNA 表达上升, 10、20 $\mu\text{mol/L}$  MNNG 与对照组相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax mRNA 表达比值下降, 且 10、20 $\mu\text{mol/L}$  组比值明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), CDC25C mRNA 表达有所降低, 且各组均低于对照组 ( $P < 0.01$ )。Cyclin B<sub>1</sub> mRNA 表达降低, 各组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), CDK1 mRNA 上升, 各染毒组表达明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), CDC25A mRNA 表达上升, 且各组均明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

表 4.6 MNNG 对 HECC 凋亡、周期相关基因 mRNA 表达的影响

组别	基因					
	P53	Bcl/Bax	CDC25C	Cyclin B <sub>1</sub>	CDK1	CDC25A
对照组	1.00 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.08
5 $\mu\text{mol/L}$ MNNG	1.15 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.36	0.90 $\pm$ 0.02**	0.83 $\pm$ 0.02*	1.45 $\pm$ 0.09**	1.37 $\pm$ 0.09*
10 $\mu\text{mol/L}$ MNNG	1.81 $\pm$ 0.22**	0.35 $\pm$ 0.10*	0.77 $\pm$ 0.01**	0.71 $\pm$ 0.05**	2.12 $\pm$ 0.08**	1.51 $\pm$ 0.25**
20 $\mu\text{mol/L}$ MNNG	2.11 $\pm$ 0.03**	0.29 $\pm$ 0.02*	0.47 $\pm$ 0.02**	0.55 $\pm$ 0.07**	2.39 $\pm$ 0.10**	3.80 $\pm$ 0.08**

注: \*与对照组相比  $P < 0.05$ , \*\*与对照组相比  $P < 0.01$ 。

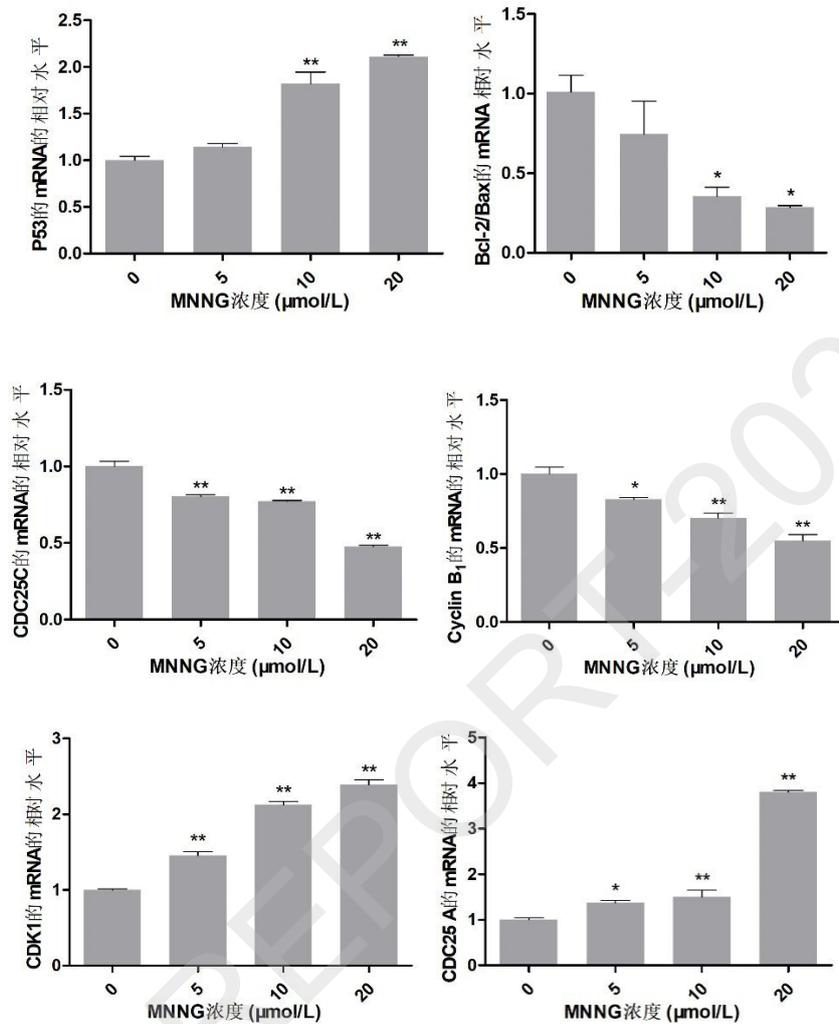


图 4.6 MNNG 染毒对 HEEC 凋亡、周期相关基因 mRNA 表达的影响

注：\*与对照组相比， $P < 0.05$ ；\*\*与对照组相比， $P < 0.01$

### 3.7 MNNG 染毒对 HEEC 凋亡、周期相关蛋白表达的影响

不同浓度 MNNG 对细胞中 P53、Cyclin B<sub>1</sub>、CDK1、CDC25C 蛋白表达结果如图 4.7。随着染毒浓度的增加，P53 蛋白表达升高，10、20 $\mu\text{mol/L}$  MNNG 与对照组相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。CDC25C 的蛋白表达随着浓度升高而降低，10、20 $\mu\text{mol/L}$  MNNG 组与对照组相比，差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Cyclin B<sub>1</sub> 基因的蛋白表达也逐渐降低，与对照组相比，10、20 $\mu\text{mol/L}$  MNNG 组均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，而 CDK1 和它的磷酸化位点 Tyr 15 的蛋白表达上升，各组蛋白表达明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

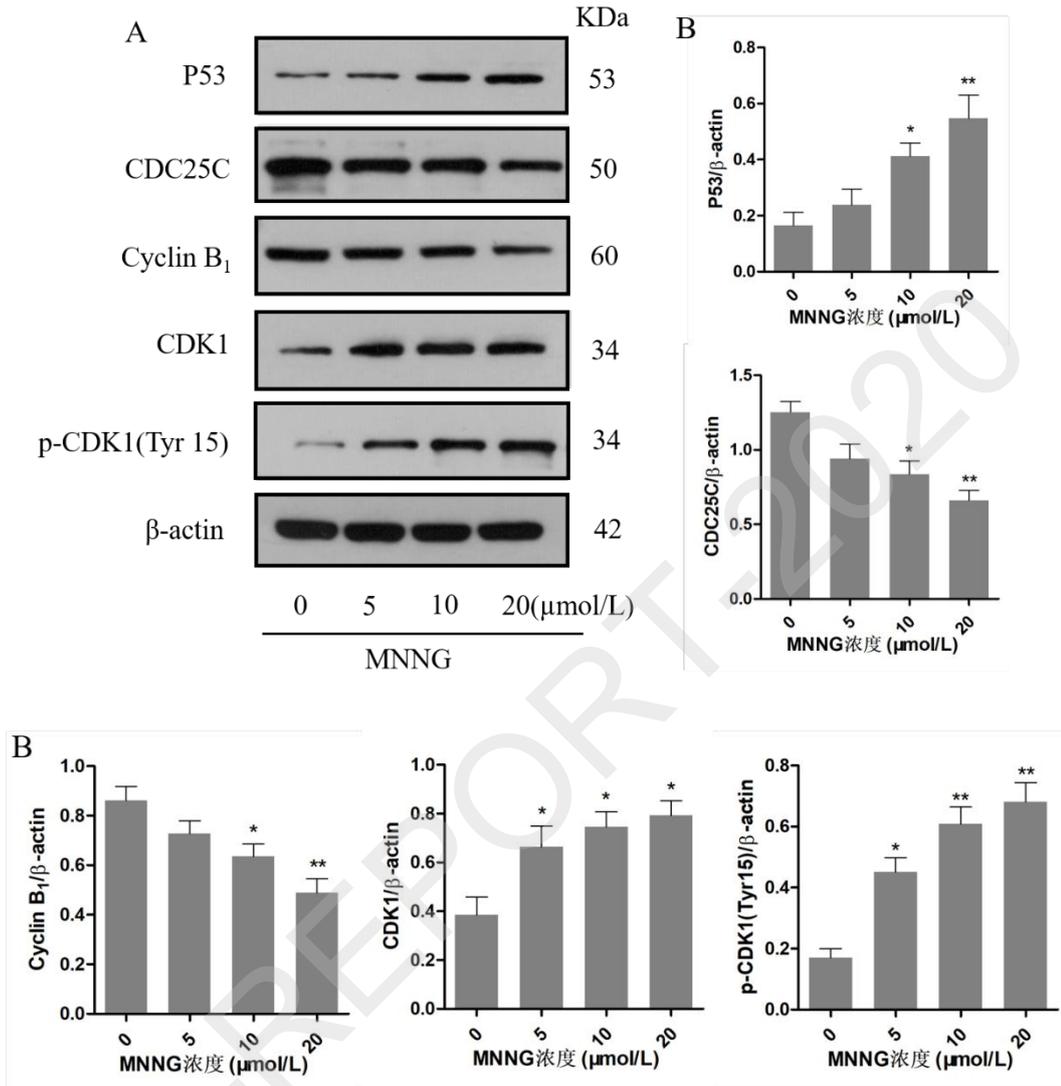


图 4.7 MNNG 对 HECC 凋亡、周期相关蛋白表达的影响

(A)凋亡、周期相关蛋白表达灰度图；(B)各组凋亡、周期相关蛋白比较

注：\*与对照组相比， $P < 0.05$ ；\*\*与对照组相比， $P < 0.01$

#### 4 小结

本章以 NOC 代表物 MNNG 染毒 HECC 探讨其对食管细胞的毒性作用，探讨 MNNG 对 HECC 活性、膜完整性、胞内总活性氧 (ROS) 水平、周期以及凋亡的影响，RT-qPCR 和 Western blot 法探讨凋亡周期相关机制。结果显示 MNNG 对 HECC 产生了毒作用，表现在 HECC 暴露于不同浓度的 MNNG 中后细胞存活率下降、发生细胞损伤、活性氧产生增多、细胞凋亡率增加。而细胞凋亡增加可能与 P53 表达上调，Bcl-2/BaxmRNA 下调有关，细胞周期主要通过 CDC25C/CDK1/Cyclin B<sub>1</sub> 通路阻滞，涉及 CDC25C 和 Cyclin B<sub>1</sub> 蛋白表达下调以及 CDK1 和 p-CDK1 (Tyr15) 蛋白表达的上调。根据以上实验选择 20 μmol/L 作为后续实验的染毒浓度。



## 第五章 维生素 C 对 MNNG 致 HEEC 毒性的影响及机制研究

维生素 C (Vitamin C, VC) 是必需的维生素, 需要通过外源提供。它是一种有效的抗氧化剂, 并且是许多酶 (包括调节表观遗传调控基因表达的一组酶) 的重要辅助因子<sup>[7, 8]</sup>。维生素 C 具有促进造血, 促进免疫细胞分化, 抗肿瘤, 抗氧化, 延缓衰老, 调节表观遗传的作用, 此外还有上节研究结果表明 MNNG 使 HEEC 产生更多的 ROS, MNNG 又是诱导食管癌的模式物, 根据维生素 C 的抗肿瘤、抗氧化、抗毒作用, 推断维生素 C 对 MNNG 产生的毒性和氧化应激反应有一定的作用。

本研究用维生素 C 与 MNNG 同时处理 HEEC, 研究维生素 C 对 MNNG 染毒 HEEC 的导致的毒性及凋亡、周期的影响及可能机制。首先用 CCK8 法来检测维生素 C 对 MNNG 染毒的 HEEC 活力的影响, 采用流式细胞仪检测该处理后的细胞凋亡, 细胞周期, 检测 P53、Bax、Bcl-2、CDC25C、Cyclin B<sub>1</sub>、CDK1mRNA 的表达及 P53、CDC25C、Cyclin B<sub>1</sub>、CDK1、p-CDK1 蛋白的表达, 分别来观察维生素 C 对 MNNG 染毒的影响及可能机制。为维生素 C 降低 MNNG 对食管毒性保护食管提供一定的理论依据。

### 1. 材料与仪器

#### 1.1 细胞

细胞: HEEC 购于上海中科院细胞库

#### 1.2 试剂

维生素C	上海麦克林生化科技有限公司
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)	以色列 BI 公司
双抗 (青霉素、链霉素)	美国 Hyclone 公司
0.25%EDTA 胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
磷酸缓冲液 (Phosphate-Buffered Saline, PBS)	美国 Hyclone 公司
DMSO	美国 Sigma 公司

其他材料与仪器同第四章 1.2

### 2. 实验方法

2.1 溶液配制: 每 5mg 维生素 C 加入到 2.84 mL 培养液中溶解, 制成 10mM 母液 (避光), 滤膜过滤后稀释成所需浓度 (现配现用)。

#### 2.2 CCK8 法检测细胞活力

##### 2.2.1 测维生素 C 干预后的 HEEC 活力

将细胞以  $6 \times 10^4$  个/孔密度接种于 96 孔板中, 每孔体积 100 $\mu$ L, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、培养箱内培养。24 h 后, 分别加入 100 $\mu$ L 含 0、1、10、100、1000 $\mu$ mol/L 的维生素 C 的培养



液，每组 5 个复孔，并设置空白孔（不含细胞，只含培养液，为去除背景值）干预 24 h 后处理步骤同第四章 2.3。

### 2.2.2 测维生素 C 干预后 MNNG 染毒的 HEEC 活力

将细胞以  $6 \times 10^4$  个/孔密度接种于 96 孔板中，每孔体积 100  $\mu$ L，置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、培养箱内培养。待细胞 7h 贴壁后，分为以下 6 个处理组：空白对照组、MNNG 染毒组（20  $\mu$ mol/L MNNG）、1  $\mu$ mol/L VC + MNNG 组（1  $\mu$ mol/L VC + 20  $\mu$ M MNNG）、10  $\mu$ mol/L VC + MNNG 组（10  $\mu$ mol/L VC + 20  $\mu$ mol/L MNNG）、100  $\mu$ mol/L VC + MNNG 组（100  $\mu$ mol/L VC + 20  $\mu$ mol/L MNNG）、1000  $\mu$ mol/L VC + MNNG 组（1000  $\mu$ mol/L VC + 20  $\mu$ mol/L MNNG），每组 5 个复孔，并设置空白孔，干预 24h 后处理，步骤同第四章 2.3。

### 2.3 测维生素 C 干预后 MNNG 染毒的 ROS 活性水平的测定

DCFH-DA 探针法测定细胞 ROS 水平。细胞接种于 6 孔板， $2 \times 10^5$  个细胞/孔，置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养，细胞贴壁后，分为以下 5 个处理组：空白对照组、MNNG 染毒组（20  $\mu$ mol/L MNNG）、0.1  $\mu$ mol/L VC + MNNG 组（0.1  $\mu$ mol/L VC + 20  $\mu$ mol/L MNNG）、1  $\mu$ mol/L VC + MNNG 组（1  $\mu$ mol/L VC + 20  $\mu$ mol/L MNNG）、10  $\mu$ mol/L VC + MNNG 组（10  $\mu$ mol/L VC + 20  $\mu$ mol/L MNNG），干预 6 小时后处理，步骤同第四章 2.5。

### 2.4 细胞凋亡的流式细胞检测

用流式细胞仪、Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡。将细胞种于 6 孔板中，每孔细胞  $2 \times 10^5$  个，培养液 2 mL，置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁时，弃去原培养液，随即进行分组处理，具体同本章 2.3，干预 24h 后分别收集各组细胞进行流式检测。处理步骤同第四章 2.6。

### 2.5 细胞周期的流式细胞检测

流式细胞术检测细胞周期，将细胞种于 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中，细胞  $6 \times 10^5$  个，培养液 3 mL，置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁时，弃去原培养液，继而分组处理，具体同本章 2.3，24h 后分别收集各组细胞进行流式检测。处理步骤同第四章 2.7。

### 2.6 RT-qPCR 检测凋亡、周期相关基因的表达

将细胞种于 6 孔板中，每孔细胞  $2 \times 10^5$  个，培养液 2 mL，置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁后，弃去原培养液，同本章 2.3 相同分组处理，24h 后处理步骤同第四章 2.8。

### 2.7 Western blot 法检测凋亡、周期相关蛋白的表达

将细胞种于 6 孔板中，每孔细胞  $2 \times 10^5$  个，培养液 2 mL，置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁时，弃去原培养液，进行同本章 2.3 的分组处理，干预 24h，其后步骤同第四章 2.9。

### 2.8 数据分析

实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示，用 Graph pad 画图，运用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析，



如果满足方差齐性, 采用 LSD 检验, 反之, 采用 Dunnett's-T3 检验, 若  $P < 0.05$ , 则差异具有统计学意义。

### 3. 结果

#### 3.1 CCK8 检测不同干预对 HEEC 活力的影响

##### 3.1.1 维生素 C 干预对 HEEC 活力的影响

当 HEEC 暴露于不同浓度维生素 C 后, 结果如图 5.1, 维生素 C 干预对 HEEC 活力无明显影响 ( $P > 0.05$ )。

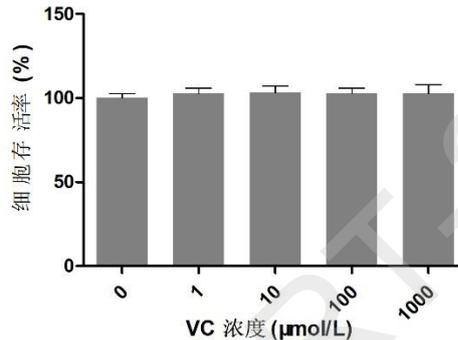


图 5.1 维生素 C 对 HEEC 存活率的影响

##### 3.1.2 维生素 C 对 MNNG 染毒的 HEEC 活力降低的影响

当 HEEC 经过处理后, 结果如图 5.2 显示, 与空白对照组相比, 各组细胞活力均有所降低 ( $P < 0.01$ ), 但加入维生素 C 后, 可减少 MNNG 对细胞存活率的抑制, 即维生素 C 可以抑制 MNNG 对 HEEC 活力降低, 维生素 C 浓度为 1、10  $\mu\text{mol/L}$  时差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 1  $\mu\text{mol/L}$  效应最明显, 随着维生素 C 干预浓度继续升高, 对 MNNG 引起的细胞活力降低的改变减小, 100  $\mu\text{mol/L}$  VC + MNNG 组、1000  $\mu\text{mol/L}$  VC + MNNG 组与 MNNG 染毒组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 考虑 1  $\mu\text{mol/L}$  效应最好, 故后续实验采用 0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$  浓度的维生素 C 进行。

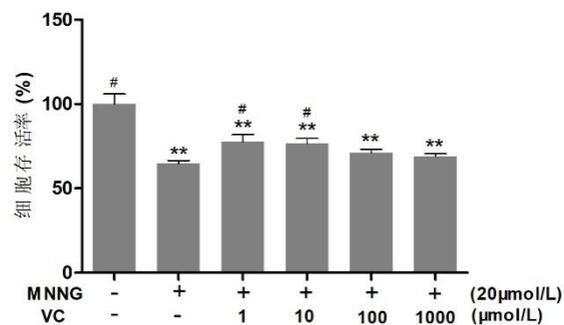


图 5.2 维生素 C 对 MNNG 染毒的 HEEC 存活率降低的影响

注: \*\*与空白对照组相比,  $P < 0.01$ ; #与 MNNG 染毒组相比,  $P < 0.05$ 。

##### 3.2 维生素 C 对 MNNG 染毒的 HEEC 内总 ROS 升高的影响

当 HEEC 经过处理后, 各组细胞内总 ROS 变化见图 6.3。观察图像可知经 MNNG 处理



后的细胞具有更高的荧光强度，与空白对照组相比，MNNG 处理组的荧光强度明显升高 ( $P < 0.05$ )，有维生素 C 干预的组别，与 MNNG 染毒组相比，ROS 生成减少，各组荧光强度降低 ( $P < 0.05$ )，其中  $10\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组与空白对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

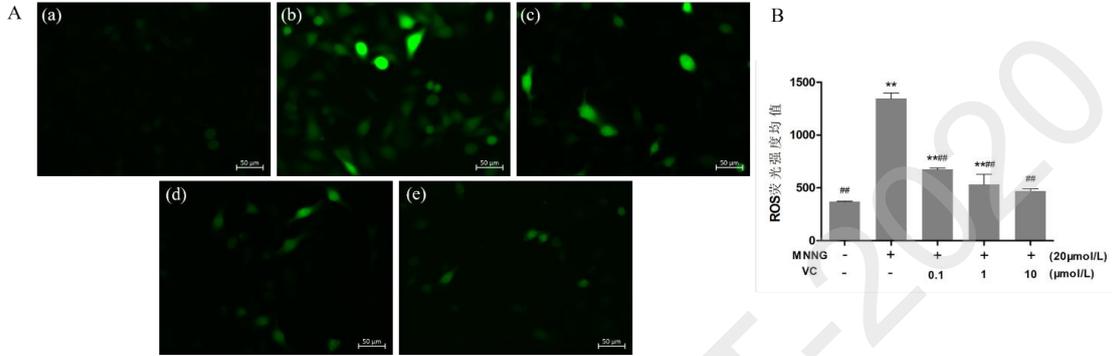


图 5.3 维生素 C 对 MNNG 染毒的 HEEC 总 ROS 升高的影响

(A) 荧光显微镜下观察 ROS 的产生 (200×) (a) 空白对照组 (b) MNNG 染毒组 (c)  $0.1\mu\text{mol/L VC} + \text{MNNG}$  组 (d)  $1\mu\text{mol/L VC} + \text{MNNG}$  组 (e)  $10\mu\text{mol/L VC} + \text{MNNG}$  组; (B) ROS 荧光强度比较

注: \*与空白对照组相比,  $P < 0.05$ , \*\*与空白对照组相比,  $P < 0.01$ ; #与 MNNG 染毒组相比,  $P < 0.05$ 。##与 MNNG 组染毒组相比,  $P < 0.01$ 。

### 3.3 维生素 C 对 MNNG 促 HEEC 凋亡的影响

当 HEEC 经过处理后, 各组细胞凋亡变化见表 5.1, 图 5.4。结果表明, 与空白对照组相比, 各组总凋亡率均发生改变 ( $P < 0.05$ ), MNNG 染毒组总凋亡明显升高 ( $P < 0.05$ )。有维生素 C 干预的组别, 与 MNNG 染毒组相比, 各组凋亡率有所降低 ( $P < 0.05$ ), 但还是高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

表 5.1 维生素 C 干预对 MNNG 染毒的 HEEC 总凋亡率升高的影响

组别	凋亡率 (%)
对照组	$5.01 \pm 0.45^{##}$
$20\mu\text{mol/L MNNG}$	$17.28 \pm 1.44^{**}$
$0.1\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$	$15.08 \pm 0.45^{***##}$
$1\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$	$10.95 \pm 0.30^{***##}$
$10\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$	$10.23 \pm 0.67^{***##}$

注: \*与空白对照组相比,  $P < 0.05$ , \*\*与空白对照组相比,  $P < 0.01$ ; #与 MNNG 染毒组相比,  $P < 0.05$ 。##与 MNNG 组染毒组相比,  $P < 0.01$ 。

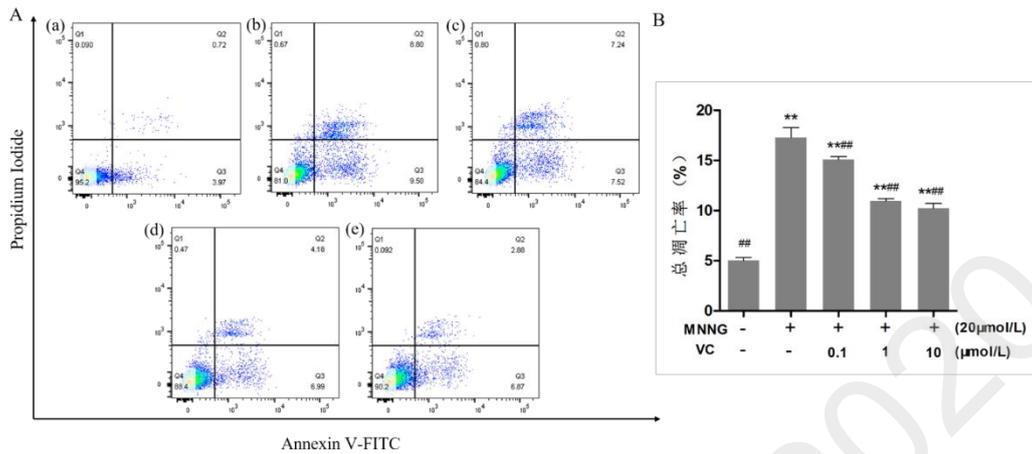


图 5.4 维生素 C 对 MNNG 促 HECC 凋亡的影响

(A)维生素 C 和 MNNG 共同处理的凋亡流式图 (a)对照组 (b) MNNG 染毒对照组 (c)0.1μM VC +MNNG 组 (d)1μM VC +MNNG 组 (e)10μM VC +MNNG 组;(B)各组总凋亡率比较  
注: \*与空白对照组相比,  $P<0.05$  , \*\*与空白对照组相比,  $P<0.01$  ; #与 MNNG 染毒组相比,  $P<0.05$ 。##与 MNNG 染毒组相比,  $P<0.01$ 。

### 3.4 维生素 C 对 MNNG 致 HECC 周期阻滞的影响

HECC 经过处理后, 各组细胞周期变化见表 5.2, 图 5.5。结果表明, 与空白对照组相比, 各处理组的细胞周期均发生改变, 所有组别 G0/G1 期细胞减少, S 期比例增高, G2/M 细胞较对照组增多, 差异均具有统计学意义 ( $P<0.01$ ) ; MNNG 染毒组 S 期细胞明显增多 ( $P<0.05$ ) , G2/M 细胞较对照组增多 ( $P<0.05$ ) 。但有维生素 C 干预的组别, 相对于 MNNG 单独处理组, 除 0.1 μmol/L VC + MNNG 组的 G0/G1 无明显变化外, 其余各组 G0/G1 期细胞均有所增多 ( $P<0.01$ ) , 各组 S 期比例均有所降低 ( $P<0.05$ ) , G2/M 细胞也均降低 ( $P<0.05$ ) 。一定浓度的维生素 C 减轻了 MNNG 对 HECC 的 G2/M 阻滞, 减轻了 MNNG 对 HECC 的增殖抑制作用。

表 5.2 维生素 C 对 MNNG 染毒的 HECC 周期阻滞的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$  %)

组别	细胞周期		
	G0/G1	S	G2/M
对照组	53.13±1.49##	36.64±1.44##	10.24±0.05##
20μmol/L MNNG	29.08±1.23**	47.04±0.04**	23.19±1.20**
0.1μmol/LVC+ MNNG	30.37±4.11**	48.70±0.06***	20.94±4.16***
1μmol/LVC+ MNNG	39.16±1.01***##	44.84±0.92***	16.01±0.08**
10μmol/LVC+ MNNG	39.75±0.49***##	44.73±2.19***	15.53±1.70**

注: \*与空白对照组相比,  $P<0.05$  , \*\*与空白对照组相比,  $P<0.01$  ; #与 MNNG 染毒组相比,  $P<0.05$ 。##与 MNNG 染毒组相比,  $P<0.01$ 。

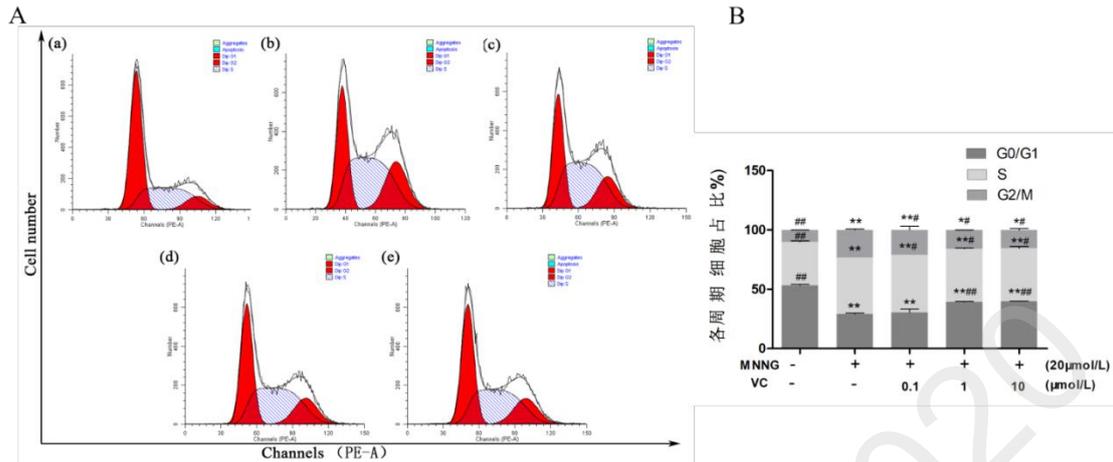


图 5.5 维生素 C 对 MNNG 染毒 HEEC 周期阻滞影响

(A)维生素 C 和 MNNG 共同处理的周期分布流式图 (a)空白对照组 (b) MNNG 染毒组 (c)0.1 $\mu$ M VC +MNNG 组(d)1 $\mu$ M VC +MNNG 组 (e)10 $\mu$ M VC +MNNG 组; (B)各组周期分布比较

注: \*与空白对照组相比,  $P < 0.05$ , \*\*与空白对照组相比,  $P < 0.01$ ; #与 MNNG 染毒组相比,  $P < 0.05$ 。##与 MNNG 染毒组相比,  $P < 0.01$ 。

### 3.5 维生素 C 对 MNNG 染毒的 HEEC 凋亡、周期相关基因表达的影响

不同处理组的 P53、Bcl/Bax、Cyclin B<sub>1</sub>、CDK1、CDC25A、CDC25C mRNA 表达结果如表 5.3、图 5.6。经过 MNNG 染毒处理, P53 mRNA 表达上升, 与空白对照组相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 经过维生素 C 干预的组别 P53mRNA 表达开始下降, 1  $\mu$ mol/L VC +MNNG 组、10  $\mu$ mol/L VC +MNNG 组与 MNNG 染毒组比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 且该两组 P53mRNA 表达明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。Bcl-2 与 Bax mRNA 的比值先降低后升高, MNNG 染毒组下降与空白对照相比不显著 ( $P > 0.05$ ), 1  $\mu$ mol/LVC +MNNG 组、10  $\mu$ mol/LVC +MNNG 组 Bcl-2 基因与 Bax 基因的 mRNA 比值升高至超过对照组 ( $P < 0.05$ )。CDC25C mRNA 表达先降低后升高, MNNG 染毒组比空白对照组表达低 ( $P < 0.01$ ), 含维生素 C 的各组与 MNNG 染毒组相比, CDC25C mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ )。Cyclin B<sub>1</sub> mRNA 表达先降低后升高, 各组与对照组相比差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), MNNG 染毒组 Cyclin B<sub>1</sub> mRNA 表达低于对照组, 含维生素 C 的干预组相对于 MNNG 染毒组 Cyclin B<sub>1</sub> mRNA 表达升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。CDK1 mRNA 先升高后降低, 其中 MNNG 染毒组、0.1  $\mu$ mol/LVC +MNNG 组 CDK1 mRNA 明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 1  $\mu$ mol/LVC +MNNG 组、10  $\mu$ mol/LVC +MNNG 组低于 MNNG 染毒组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。



表 5.3 维生素 C 对 MNNG 染毒的 HEEC 凋亡、周期相关基因 mRNA 表达的影响

组别	基因				
	P53	Bcl/bax	CDC25C	Cyclin B <sub>1</sub>	CDK1
对照组	1.00±0.02 <sup>#</sup>	1.00±0.12	1.00±0.04 <sup>###</sup>	1.00±0.03 <sup>###</sup>	1.00±0.01 <sup>###</sup>
20μmol/L MNNG	1.21±0.02 <sup>*</sup>	0.83±0.11	0.84±0.03 <sup>**</sup>	0.73±0.02 <sup>**</sup>	1.38±0.02 <sup>**</sup>
0.1μmol/LVC+ MNNG	1.06±0.16	1.06±0.15	0.94±0.02 <sup>***#</sup>	0.83±0.02 <sup>***#</sup>	1.53±0.04 <sup>***#</sup>
1μmol/LVC+ MNNG	0.81±0.07 <sup>*##</sup>	2.13±0.21 <sup>*#</sup>	0.97±0.03 <sup>##</sup>	0.89±0.01 <sup>***#</sup>	0.97±0.01 <sup>##</sup>
10μmol/LVC+ MNNG	0.76±0.08 <sup>***#</sup>	2.24±0.27 <sup>*#</sup>	1.05±0.02 <sup>##</sup>	0.91±0.02 <sup>***#</sup>	0.93±0.07 <sup>##</sup>

注：\*与空白对照组相比， $P<0.05$ ，\*\*与空白对照组相比， $P<0.01$ ；#与 MNNG 染毒组相比， $P<0.05$ 。##与 MNNG 染毒组相比， $P<0.01$ 。

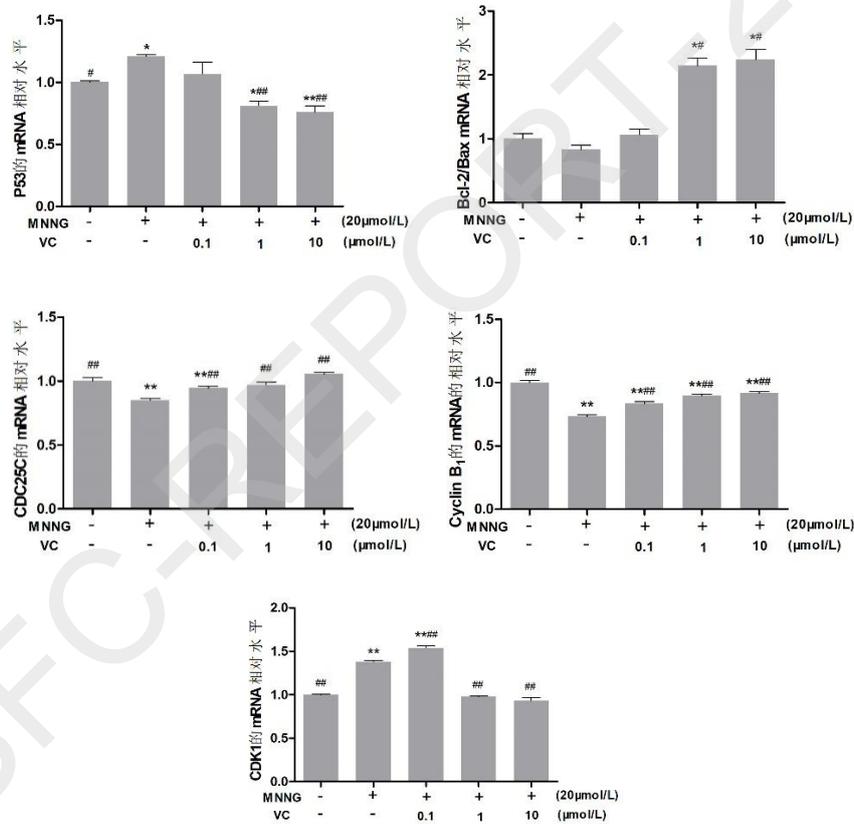


图 5.6 维生素 C 对 MNNG 染毒 HEEC 凋亡、周期相关基因 mRNA 表达的影响

注：\*与空白对照组相比， $P<0.05$ ，\*\*与空白对照组相比， $P<0.01$ ；#与 MNNG 染毒组相比， $P<0.05$ 。##与 MNNG 染毒组相比， $P<0.01$ 。

### 3.6 维生素 C 对 MNNG 染毒 HEEC 凋亡、周期相关蛋白表达的影响

不同处理对细胞中 P53、CDC25C、Cyclin B<sub>1</sub>、CDK1、p-CDK1 (Tyr 15) 蛋白表达结果如图 5.7。P53 蛋白表达呈现先升高后降低的趋势，与空白对照组相比，MNNG 染毒组 P53 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )，含维生素 C 的组别与 MNNG 染毒组相比 P53 蛋白的表达明显



降低 ( $P < 0.01$ )，0.1  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组的 P53 蛋白表达与对照组相近 ( $P > 0.05$ )，1  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$ 、10  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组 P53 表达甚至降低至低于空白对照组 ( $P < 0.01$ )。CDC25C 蛋白表达先降低再略微升高，相对于空白对照组，MNNG 染毒组的 CDC25C 蛋白略有降低，有维生素 C 干预的组别 CDC25C 蛋白表达略有升高，但各组之间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。经过不同处理，Cyclin B<sub>1</sub> 蛋白表达先降低后升高，经 MNNG 染毒后，与空白对照组相比，蛋白表达明显降低 ( $P < 0.01$ )，有维生素 C 干预的组别，Cyclin B<sub>1</sub> 蛋白表达逐渐升高，其中 10  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组 Cyclin B<sub>1</sub> 蛋白表达与 MNNG 单独染毒组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与空白对照组相比，MNNG 染毒组 CDK1 蛋白表达略微升高，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，但 0.1  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组 CDK1 蛋白表达继续升高，明显高于空白对照 ( $P < 0.01$ )，而 1  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$ 、10  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组 CDK1 蛋白表达较 MNNG 染毒组降低，但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，10  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组蛋白表达降低至低于对照 ( $P < 0.01$ )。p-CDK1 (Tyr 15) 蛋白表达呈现与 CDK1 相似的趋势，先升高后降低，也在 0.1  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组最高，不同的是 1  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$ 、10  $\mu\text{mol/LVC} + \text{MNNG}$  组降低与 MNNG 组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，且低于对照组表达水平 ( $P < 0.01$ )。

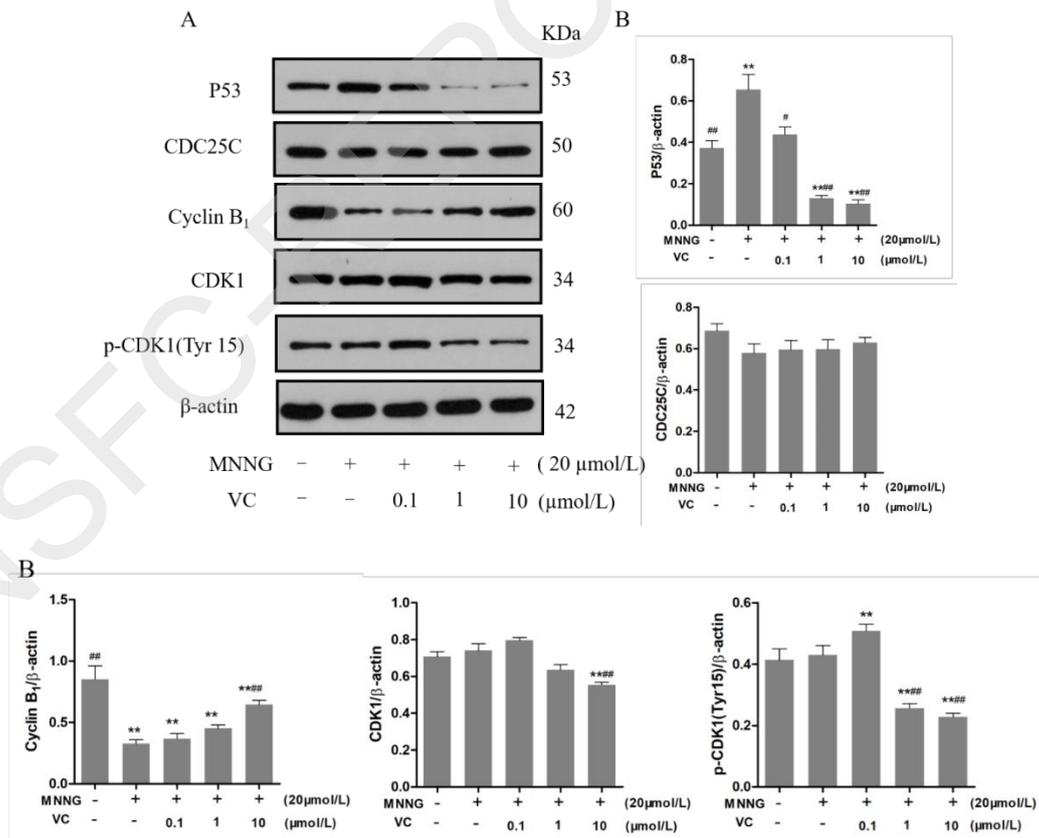


图 5.7 维生素 C 对 MNNG 染毒 HEEC 凋亡、周期相关蛋白表达的影响

(A)凋亡、周期相关蛋白表达灰度图(B)各组凋亡、周期相关蛋白表达比较

注：\*与对照组相比， $P < 0.05$ ，\*\*与对照组相比， $P < 0.01$ ；#与 MNNG 染毒组相比， $P < 0.05$ 。##与 MNNG 染毒组相比， $P < 0.01$ 。



#### 4 小结

本章探讨了维生素 C 对 NOC 代表物 MNNG 的毒性的干预作用，用不同浓度维生素 C 和 20  $\mu$ M MNNG 共同干预，探讨维生素 C 对 MNNG 致 HEEC 活力降低、ROS 升高、促凋亡作用、周期阻滞作用的影响，并通过 RT-qPCR 检测 P53、Bcl-2/Bax、Cyclin B1、CDK1、CDC25A、CDC25C mRNA 的表达，Western blot 法检测 P53、CDC25C、Cyclin B1、CDK1、p-CDK1 (Tyr 15) 蛋白的表达，探讨维生素 C 作用的机制。结果显示维生素 C 对 MNNG 产生的毒性具有保护作用，具体体现在减轻其对 HEEC 活力的抑制，减少 ROS 的产生，减轻促凋亡作用，通过调控 CDC25C/CDK1/Cyclin B<sub>1</sub> 通路减轻细胞周期阻滞。为维生素 C 抵抗 NOC 毒性保护食管细胞提供了一定的理论依据。



## 第六章 黄曲霉毒素、伏马菌素、亚硝胺对人类正常食管上皮细胞的联合作用

黄曲霉毒素是目前发现的最强的致癌物质,除了与人类的原发性肝癌有关外,还可以在动物的多部位诱发多种肿瘤。在肿瘤流行病学调查研究中发现,常吃霉烂变质的花生米、玉米、小麦及大米等食物者,消化道癌变的发病率比正常人高 3-4 倍。大量流行病学资料提示,黄曲霉毒素与人类食管癌的发生有关。伏马菌素主要是由串珠镰刀菌产生的有毒水溶性代谢产物,主要污染玉米及其制品,被认为是当今世界危及人类食品安全的重要因素之一。N-亚硝基化合物常存在于加工鱼肉制品、烟草制品和污染的水中,与食管癌发生有关,MNNG 是 NOC 的一种,属于 N-亚硝酰胺类,是在环境中广泛存在的化学诱变剂和致癌剂,也是化学致癌物诱变机制研究中常用的一种模式化合物。由于食管对 MNNG 的敏感,故 MNNG 经常被用作诱导食管癌模型物质<sup>[6]</sup>。目前未见黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝胺三种致癌物的联合染毒与食管癌关系的体外细胞实验研究的相关报道。

本章用 AFB<sub>1</sub>、FB<sub>1</sub>、MNNG 联合染毒处理 HEEC,研究三者联合作用对 HEEC 的毒性及对 HEEC 凋亡和周期的影响及可能途径。

### 1 实验方法

#### 1.1 CCK8 法测细胞活力

将细胞以  $6 \times 10^4$  个/孔密度接种于 3 个 96 孔板中,每孔体积 100 $\mu$ L,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、培养箱内培养。24 h 后,三板分别加入 100 $\mu$ L 含 0 (A 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub> (B 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (C 组)、2 $\mu$ mol/L MNNG (D 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (E 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (F 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (G 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (H 组)的培养液,每组 5 个复孔,并设置空白孔(不含细胞,只含培养液,为去除背景值)染毒 24h;后弃去培养液,处理步骤同第四章 2.3。

#### 1.2 细胞凋亡的流式细胞检测

用流式细胞仪、Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡。将细胞种于 6 孔板中,每孔细胞  $2 \times 10^5$  个,培养液 2 mL,置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁,生长至对数生长期时,弃去原培养液,分别加入含 0 (A 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub> (B 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (C 组)、2 $\mu$ mol/L MNNG (D 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (E 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (F 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (G 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (H 组)的培养液,染毒 24h 后,处理步骤同第四章 2.6。

#### 1.3 细胞周期的流式细胞检测

将细胞种于 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中,细胞  $6 \times 10^5$  个,培养液 3 mL,置于 37 $^{\circ}$ C 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁,生长至对数生长期时,弃去原培养液,分别加入含 0 (A 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub> (B 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (C 组)、2 $\mu$ mol/L MNNG (D 组)、10 $\mu$ mol/L



AFB<sub>1</sub>+10μmol/L FB<sub>1</sub> (E 组)、10μmol/L AFB<sub>1</sub>+2μmol/L MNNG (F 组)、10μmol/L FB<sub>1</sub>+2μmol/L MNNG (G 组)、10μmol/L AFB<sub>1</sub>+10μmol/L FB<sub>1</sub>+2μmol/L MNNG (H 组) 的培养液, 干预 24h 后处理步骤同第四章 2.7。

#### 1.4 RT-qPCR 法检测凋亡、周期相关基因的表达

将细胞种于 6 孔板中, 每孔细胞  $2 \times 10^5$  个, 培养液 2 mL, 置于 37℃ 且含 5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁, 生长至对数生长期时, 弃去原培养液, 分别加入含 0 (A 组)、10μmol/L AFB<sub>1</sub> (B 组)、10μmol/L FB<sub>1</sub> (C 组)、2μmol/L MNNG (D 组)、10μmol/L AFB<sub>1</sub>+10μmol/L FB<sub>1</sub> (E 组)、10μmol/L AFB<sub>1</sub>+2μmol/L MNNG (F 组)、10μmol/L FB<sub>1</sub>+2μmol/L MNNG (G 组)、10μmol/L AFB<sub>1</sub>+10μmol/L FB<sub>1</sub>+2μmol/L MNNG (H 组) 的培养液染毒 24h。余后步骤同第四章 2.8。

表 6.1 PCR 反应引物序列

基因名称		引物序列
P21	F	TGAGCCGCGACTGTGATG
	R	GTCTCGGTGACAAAGTCGAAGTT
Bax	F	CGGGTTGTCGCCCTTTTCTAC
	R	GACAGGGACATCAGTCGCTTCAG
Bcl-2	F	GACAACAGCCTCAAGATCATCAG
	R	ATGGCATGGACTGTGGTCATGAG
Cyclin D <sub>1</sub>	F	TCAAGTGTGACCCGGACTGCCT
	R	GCACGTCGGTGGGTGTGCAA
GAPDH	F	GCCGAGCCACATCGCTCAGACACCA
	R	GGGATCTCGCTCCTGGAAGATGGTGATGGG A

## 2 结果

### 2.1 联合染毒对 HEEC 活力的影响

当 HEEC 经过不同的联合染毒处理后, 结果如图 6.1 显示, 与空白对照组相比, 各组细胞活力有所降低, 其中 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组与 AFB<sub>1</sub> 组相比, 存活率降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), FB<sub>1</sub>+MNNG 组细胞存活率较 MNNG 组升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub>+MNNG 组存活率低于 FB<sub>1</sub>+MNNG 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 联合染毒对 HEEC 凋亡的影响

当 HEEC 经过处理后, 各组细胞凋亡变化见图 6.2、6.3。结果表明, 与空白对照组相比, 各组总凋亡率均上升, 其中 AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 组总凋亡率低于 FB<sub>1</sub> 组 ( $P < 0.01$ ), AFB<sub>1</sub>+MNNG 组与 AFB<sub>1</sub> 组、MNNG 组相比, 总凋亡率均升高 ( $P < 0.01$ )。与 FB<sub>1</sub> 组相比, FB<sub>1</sub>+MNNG 组总凋亡率明显降低 ( $P < 0.01$ ), AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub>+MNNG 组总凋亡率低于 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组 ( $P < 0.05$ ), 但高于 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组和 FB<sub>1</sub>+MNNG 组 ( $P < 0.01$ )。

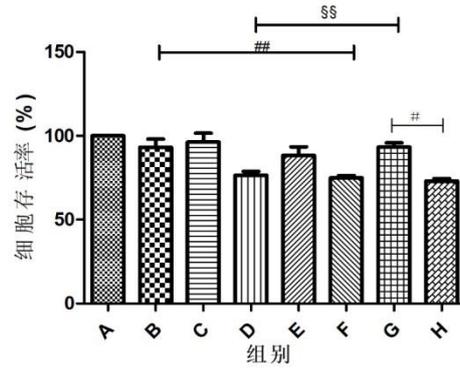


图 6.1 不同联合染毒对细胞存活率的影响

注：0 (A 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub> (B 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (C 组)、2 $\mu$ mol/L MNNG (D 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (E 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (F 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (G 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (H 组)  
 # 三者联合染毒与两两染毒比较,  $P < 0.05$ , ## 三者联合染毒与两两染毒比较,  $P < 0.01$ ;  
 § FB<sub>1</sub>+ MNNG 组与 FB<sub>1</sub> 组或 MNNG 组比较,  $P < 0.05$ , § § FB<sub>1</sub>+ MNNG 组与 FB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较,  $P < 0.01$ ;  
 # AFB<sub>1</sub>+ MNNG 与 AFB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较,  $P < 0.05$ ; ## AFB<sub>1</sub>+ MNNG 与 AFB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较,  $P < 0.01$ 。  
 \*AFB<sub>1</sub>+ FB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>1</sub> 或 FB<sub>1</sub> 组比较,  $P < 0.05$ ; \*\* AFB<sub>1</sub>+ FB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>1</sub> 或 FB<sub>1</sub> 组比较,  $P < 0.01$ 。

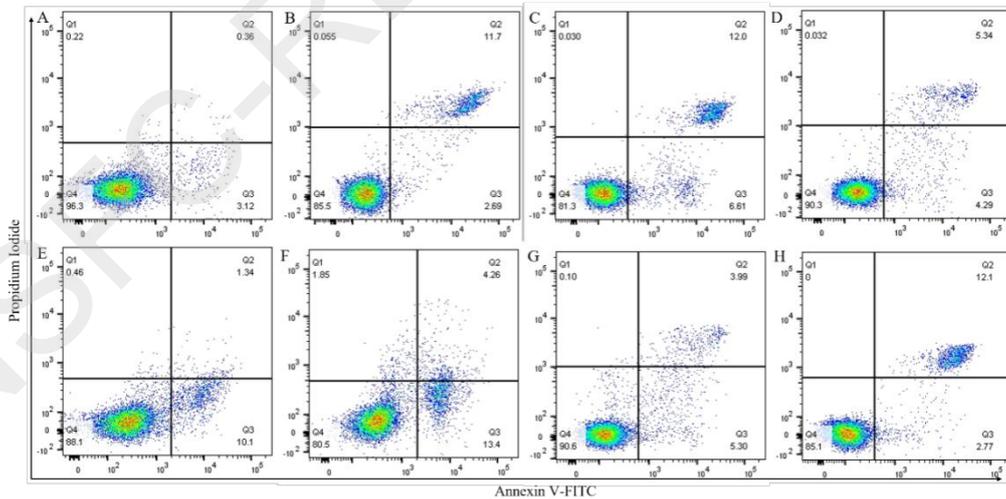


图 6.2 联合染毒后的凋亡流式图

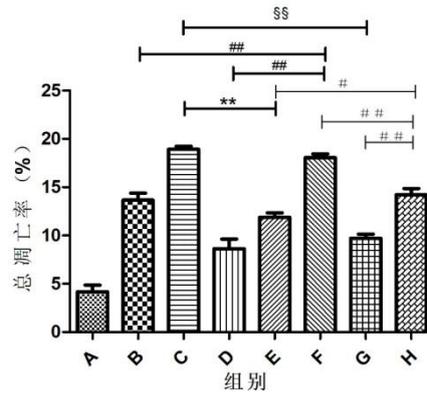


图 6.3 联合染毒后各组总凋亡率

注：0 (A 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub> (B 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (C 组)、2 $\mu$ mol/L MNNG (D 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (E 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (F 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (G 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (H 组)

# 三者联合染毒与两两染毒比较,  $P < 0.05$ , ## 三者联合染毒与两两染毒比较,  $P < 0.01$ ;  
 §FB<sub>1</sub>+ MNNG 组与 FB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较,  $P < 0.05$ , §§FB<sub>1</sub>+ MNNG 组与 FB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较,  $P < 0.01$ ; # AFB<sub>1</sub>+ MNNG 与 AFB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较,  $P < 0.05$ ; ## AFB<sub>1</sub>+ MNNG 与 AFB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较,  $P < 0.01$ ; \*AFB<sub>1</sub>+ FB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>1</sub> 或 FB<sub>1</sub> 组比较,  $P < 0.05$ ; ## AFB<sub>1</sub>+ FB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>1</sub> 或 FB<sub>1</sub> 组比较,  $P < 0.01$ 。

### 2.3 联合染毒对 HECC 周期的影响

HECC 经过处理后, 各组细胞周期变化见图 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9。结果表明, 与空白对照组相比, AFB<sub>1</sub> 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多, FB<sub>1</sub> 组与 MNNG 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图)。单独染毒与两两联合染毒相比, AFB<sub>1</sub> 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞多于 AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 组, FB<sub>1</sub> 组 S 期细胞多于 AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 组, AFB<sub>1</sub> 组 G<sub>2</sub>/M 期细胞少于 AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); AFB<sub>1</sub> 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞多于 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组, MNNG 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞少于 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组, MNNG 组 S 期细胞多于 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组, AFB<sub>1</sub> 组 G<sub>2</sub>/M 期细胞少于 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); MNNG 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞少于 FB<sub>1</sub>+MNNG 组, FB<sub>1</sub> 组、MNNG 组 S 期细胞均多于 FB<sub>1</sub>+MNNG 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与两两染毒相比, AFB<sub>1</sub>+ FB<sub>1</sub>+ MNNG 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞减少, S 期细胞增多, G<sub>2</sub>/M 期细胞增多 ( $P < 0.05$ )。

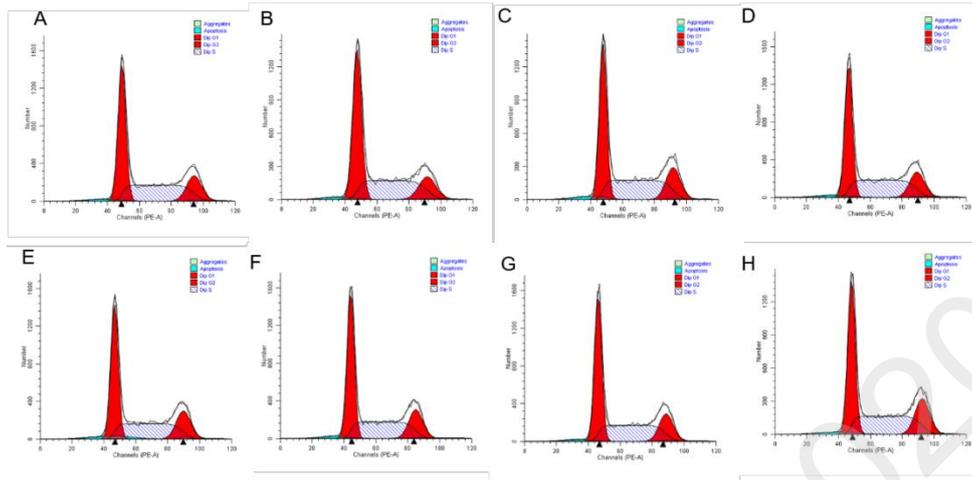


图 6.4 不同联合染毒的周期流式图

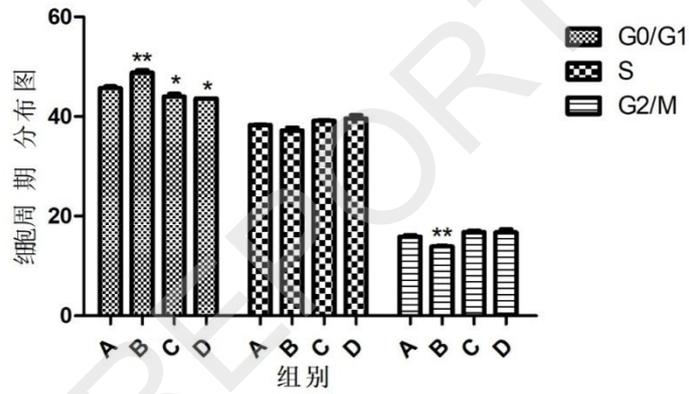


图 6.5 三个染毒物单独染毒对周期的影响

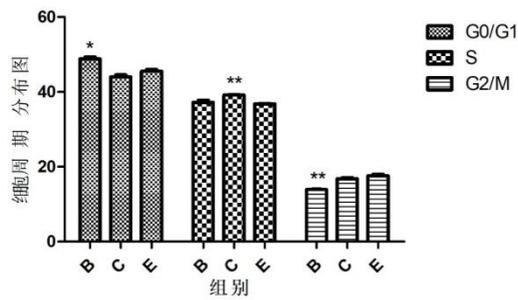


图 6.6 AFB1+FB1 组与 AFB1、FB1 单独染毒对周期的影响的比较

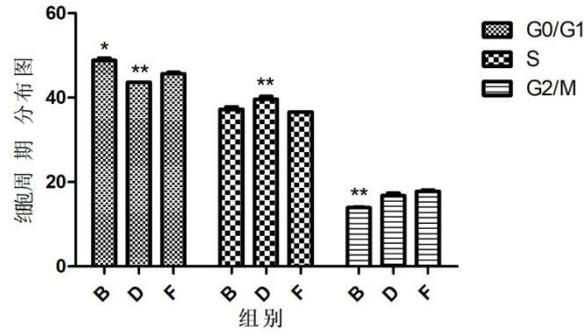


图 6.7 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组与 AFB<sub>1</sub>、MNNG 单独染毒对周期的影响的比较

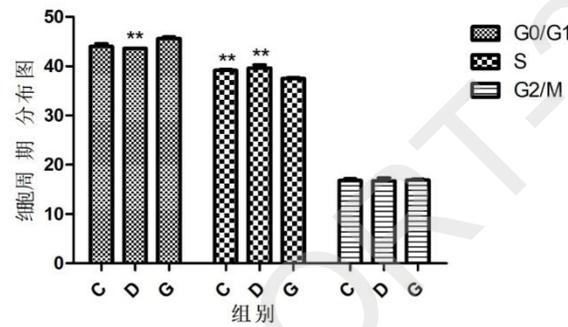


图 6.8 FB<sub>1</sub>+MNNG 组与 FB<sub>1</sub>、MNNG 单独染毒对周期的影响的比较

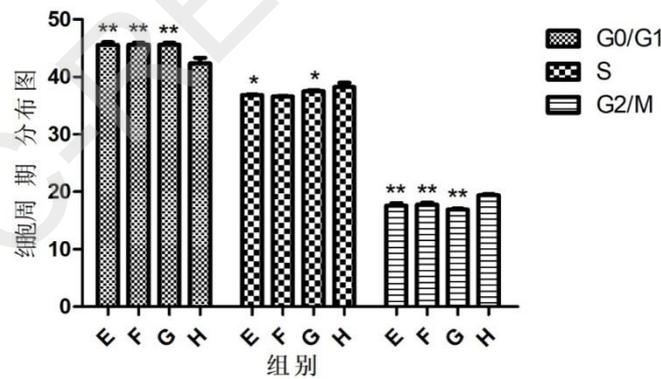


图 6.9 三者联合染毒与两两联合染毒的比较

注：0 (A 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub> (B 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (C 组)、2 $\mu$ mol/L MNNG (D 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (E 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (F 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (G 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (H 组)

# 三者联合染毒与两两染毒比较, P<0.05, ## 三者联合染毒与两两染毒比较, P<0.01; §FB<sub>1</sub>+ MNNG 组与 FB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较, P<0.05, §§FB<sub>1</sub>+ MNNG 组与 FB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较, P<0.01; # AFB<sub>1</sub>+ MNNG 与 AFB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较, P<0.05; ## AFB<sub>1</sub>+ MNNG 与 AFB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较, P<0.01; \*AFB<sub>1</sub>+ FB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>1</sub> 或 FB<sub>1</sub> 组比较, P<0.05; ## AFB<sub>1</sub>+ FB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>1</sub> 或 FB<sub>1</sub> 组比较, P<0.01。



#### 2.4 联合染毒对 HEEC 凋亡、周期相关基因表达的影响

不同处理组的 Bcl-2/Bax、P21、Cyclin D<sub>1</sub>mRNA 表达结果如图 6.10、6.11、6.12。经过染毒，Bcl-2/BaxmRNA 表达均有所升高，单独染毒与两两联合染毒相比，FB1 组与 AFB1+FB1 组相比，Bcl-2/BaxmRNA 表达较高，差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )，AFB1 组、FB1 组与 AFB1+MNNG 组相比，Bcl-2/BaxmRNA 表达较低，差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )，FB1 组、与 FB1+MNNG 组相比，Bcl-2/BaxmRNA 表达较高，MNNG 组与 FB1+MNNG 组相比，Bcl-2/BaxmRNA 表达较低，差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )，三者联合染毒与两两联合染毒相比，AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub>+MNNG 组 Bcl-2/BaxmRNA 表达较 FB<sub>1</sub>+MNNG 组升高，差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

如图 6.11，单独染毒与两两联合染毒相比，AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 组与 AFB<sub>1</sub> 组、FB<sub>1</sub> 组相比，P21mRNA 表达均较高，差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。AFB<sub>1</sub> 组、FB<sub>1</sub> 组与 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组相比，P21 mRNA 表达均较低，差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )，FB<sub>1</sub> 组、MNNG 组与 FB<sub>1</sub>+MNNG 组相比，P21 mRNA 表达均较低，差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )，三者联合染毒与两两联合染毒相比，三者联合染毒 P21 mRNA 表达均升高 ( $P<0.01$ )。

如图 6.12，单独染毒与两两联合染毒相比，AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 组与 AFB<sub>1</sub> 组、FB<sub>1</sub> 组相比，Cyclin D<sub>1</sub>mRNA 表达均较高，差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。AFB<sub>1</sub> 组、FB<sub>1</sub> 组与 AFB<sub>1</sub>+MNNG 组相比，Cyclin D<sub>1</sub>mRNA 表达均较低，差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )，FB<sub>1</sub> 组、MNNG 组与 FB<sub>1</sub>+MNNG 组相比，Cyclin D<sub>1</sub>mRNA 表达均较低，差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )，三者联合染毒与两两联合染毒相比，Cyclin D<sub>1</sub>mRNA 表达差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

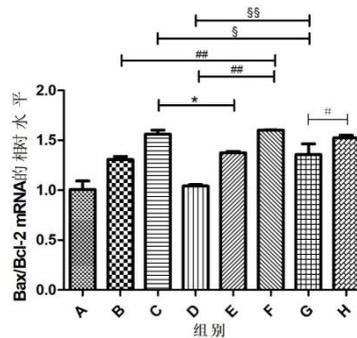


图 6.10 不同处理组的 Bcl-2/Bax 表达水平

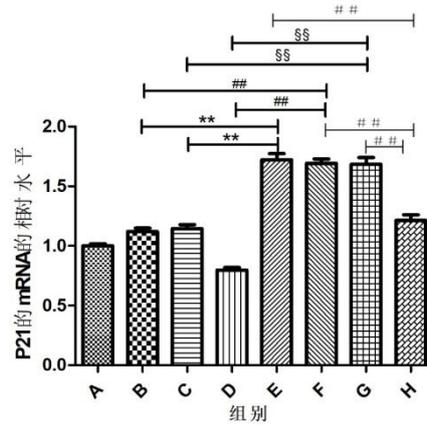


图 6.11 不同处理组的 P21 表达水平

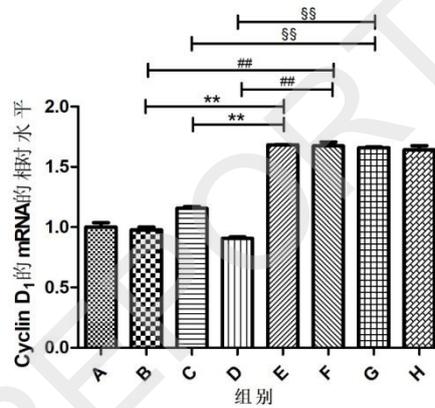


图 6.12 不同处理组的 Cyclin D<sub>1</sub> 表达水平

注：0 (A 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub> (B 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (C 组)、2 $\mu$ mol/L MNNG (D 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub> (E 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (F 组)、10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (G 组)、10 $\mu$ mol/L AFB<sub>1</sub>+10 $\mu$ mol/L FB<sub>1</sub>+2 $\mu$ mol/L MNNG (H 组)  
#三者联合染毒与两两染毒比较, P<0.05, ##三者联合染毒与两两染毒比较, P<0.01;  
§FB<sub>1</sub>+MNNG 组与 FB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较, P<0.05, §§FB<sub>1</sub>+MNNG 组与 FB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较, P<0.01; #AFB<sub>1</sub>+MNNG 与 AFB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较, P<0.05; ##AFB<sub>1</sub>+MNNG 与 AFB<sub>1</sub> 或 MNNG 组比较, P<0.01; \*AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>1</sub> 或 FB<sub>1</sub> 组比较, P<0.05; ##AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>1</sub> 或 FB<sub>1</sub> 组比较, P<0.01。

### 3 小结

本章结合 AFB<sub>1</sub>、FB<sub>1</sub>、MNNG 三者单独染毒, AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub>、AFB<sub>1</sub>+MNNG、FB<sub>1</sub>+MNNG 两两联合染毒, 以及三者联合染毒 HECC, 探讨了 AFB<sub>1</sub>、FB<sub>1</sub>、MNNG 联合作用对 HECC 的作用, 并通过 RT-qPCR 检测 Bcl-2/Bax、P21、Cyclin D<sub>1</sub> mRNA 的表达, 探讨联合染毒作用的机制。结果发现与单独染毒组相比, 两两联合染毒组 AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub> 组、AFB<sub>1</sub>+MNNG 组、FB<sub>1</sub>+MNNG 组的 P21mRNA 和 Cyclin D<sub>1</sub>mRNA 表达均上调。和单独染毒组或两两染毒组相比, AFB<sub>1</sub>+FB<sub>1</sub>+MNNG 三者联合染毒致 Bcl-2/Bax、P21、Cyclin D<sub>1</sub>mRNA 表达上调。



## 第七章 淮安食管癌高发区居民膳食微量元素摄入量以及血浆微量元素营养状况

食管癌的发生是多因素共同作用的结果,遗传、饮食、营养不良、肥胖、不洁的口腔卫生、胃部疾病、饮酒、抽烟、职业暴露、年龄、环境等多种因素的综合作用可导致食管癌的发生<sup>[9,10]</sup>。Zhang 等<sup>[11]</sup>研究表明,环境和遗传因素交互作用,对食管癌发生产生重要影响,同时揭示了部分危险因素(微量元素缺乏及重金属污染等)是导致食管癌发生的分子基础。研究发现,食管癌高发区的土壤多偏碱性,严重影响了农作物对微量元素的吸收,从而导致人体微量元素的摄入量随之减少,且食管癌高发区的居民常存在营养不良的状况<sup>[12]</sup>。谭丽等<sup>[13]</sup>利用病例对照研究,通过相关环境因素调查和统计学分析发现,微量元素缺失或重金属等所造成的居民生活区空气水体等周边的环境污染均会增加食管癌患病风险;同时规律饮食,增加新鲜蔬菜、水果的摄入量有利于降低食管癌的发生。微量元素可通过改变机体组织细胞活动等,影响癌的形成过程;而重金属元素则可通过土壤-植物-食品的食物链过程逐渐在人体内蓄积,引起机体的生理心理的异常变化,最终可促进癌症形成。

本章基于双份饭法探讨膳食中微量元素营养状况及重金属污染水平与食管癌癌前病变的关系,为淮安地区食管癌的一级预防提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 研究对象

本项目依托 2015 年 1 月至 2017 年 6 月间江苏淮安地区食管癌早诊早治项目的筛查工作,选择食管癌癌前病变患者 100 例,以同地区、同性别、年龄相差 2 岁以内配对正常对照 100 例,进行 1:1 配对病例对照研究。

#### 1.2 样本采集

##### 1.2.1 食物样本采集

通过流行病学调查表采集研究对象的人口学信息、生活习惯、饮食习惯以及食管癌家族史等信息。通过双份饭法采集食管癌癌前病变患者及健康人群连续三天所摄入的所有食物(包括三餐及餐间的零食和饮料)。所采集的食物样本的重量和质量需与调查对象的实际消费情况一致,且不可食部分需去除,并记录每餐食物的重量。将每位调查对象的连续三天膳食样本混合制成 200 份匀浆,置于-20℃冰柜冷冻保存待测。

##### 1.2.2 血液样本采集

采集调查对象抗凝血样 5ml 和非抗凝血样 5ml,3000r/min 离心 5 分钟,将血清和血浆分别装入冻存管中,于-20℃冰箱保存备用,血液的采集与医学体检同时在当地卫生所进行。



### 1.3 主要的试剂和仪器

多元素单一浓度标准储备溶液（71 元素， 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）	美国 Inorganic Ventures 公司
硝酸（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
30%过氧化氢（分析纯）	上海凌峰化学试剂有限公司
高纯氩（Ar，纯度 $\geq 99.999\%$ ）	南京文达特种气体有限公司
高纯氦（He，纯度 $\geq 99.999\%$ ）	南京文达特种气体有限公司
一次性针式过滤器（0.22 $\mu\text{m}$ ，有机）	天津科艺隆实验设备有限公司
ME203E 天平	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
氮吹仪（UGC-24M）	常州诺基仪器有限公司
电感耦合等离子体质谱仪（Agilent 7700x ICP-MS）	安捷伦科技(中国)有限公司
电热鼓风干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司

### 1.4 样本中钠、钾、锰、铁、铜、锌、硒、砷、镉、铅元素的测定

#### 1.4.1 标准曲线的配置

使用初始浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的包含钠、钾、锰、铁、铜、锌、硒、砷、镉、铅的多元素单一浓度标准储备溶液稀释 10 倍成为 1000  $\mu\text{g}/\text{L}$  的混合标准工作溶液，然后通过梯度稀释法以 1%硝酸稀释，分别配制得到浓度为 0、0.1、0.5、2、10、50、200、1000  $\mu\text{g}/\text{L}$  的钠、钾、锰、铁、铜、锌、硒、砷、镉、铅的混合标准工作液。以标准工作液的浓度为横坐标、定量离子对峰面积为纵坐标，经电感耦合等离子体质谱仪绘制标准曲线。在相同实验及仪器工作条件下连续测定试样空白溶液 11 次，以信噪比 3:1 对应浓度确定检出限。

#### 1.4.2 样品前处理及检测方法

##### 1.4.2.1 食物样本

样品解冻后准确称取 0.5g 于立式离心管中，加入 5 mL 硝酸，用封口膜封住离心管口后放入氮吹仪中，设置氮吹仪温度 120 $^{\circ}\text{C}$ ，时间 1.5 小时，消解样品至溶液澄清透明。待样品冷却后取出离心管，将所得样品用超纯水定容至 50 mL，混匀后使用孔径 0.22 $\mu\text{m}$  的一次性针式过滤器（有机）对样品进行过滤。病例组与对照组均采取上述方法共制备待测样品 200 例。在仪器的最佳工作条件下，试样空白、混合标准工作液和稀释后的待测样品溶液由进样系统和蠕动泵导入电感耦合等离子体质谱仪中，由仪器自动绘制标准曲线，并根据样品测定的丰度值与相应元素标准曲线对应，通过计算机自动计算可得样品中元素的含量。

##### 1.4.2.2 血浆样本

样品解冻后取 0.2mL 于 10mL 离心管中，移取 0.3 mL  $\text{HNO}_3$ 、0.3 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  加入血浆样品，将离心管置于 120 $^{\circ}\text{C}$  电烘箱中高温消解 2 h，取出后冷却，超纯

水定容至 5 mL，混匀，待测。病例组与对照组均采取上述方法共制备待测样品 200 例。



### 1.4.3 所测元素每日膳食摄入量计算

钠、钾、锰、铁、铜、锌、硒、砷、镉、铅的每日膳食摄入量按以下公式计算：

$$X = \frac{C \times V \times m_0}{m_1 \times 3}$$

公式中： $X$ 为元素每日膳食摄入量（ $\mu\text{g}/\text{d}$ ），单位可进一步换算为 $\text{mg}/\text{d}$ ；

$C$ 为仪器测定的元素含量结果（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

$V$ 为样品消解至澄清透明并定容后的体积（ $\text{L}$ ），实验中 $V$ 为 $0.05\text{L}$ ；

$m_0$ 为研究对象连续三天的食物摄入总重量（ $\text{g}$ ）；

$m_1$ 为样品解冻后所称取至离心管的重量（ $\text{g}$ ），实验中 $m_1$ 为 $0.5\text{g}$ 。

血浆中钠、钾、锰、铁、铜、锌、硒、砷、镉、铅的浓度按以下公式计算：

$$X = \frac{(C \times V)}{V_0}$$

公式中： $X$ 为血浆中元素浓度（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ），单位可进一步换算为 $\text{mg}/\text{L}$ ；

$C$ 为仪器测定的元素含量结果（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

$V$ 为样品消解至澄清透明并定容后的体积（ $\text{L}$ ），实验中 $V$ 为 $0.05\text{L}$ ；

$V_0$ 为样品解冻后取至离心管的体积（ $\text{L}$ ）。

### 1.4.4 加标回收率计算

对样品中待测元素进行加标试验，评价方法的回收率。准确称取 $0.5\text{g}$ 样品于立式离心管中，根据三个不同水平分别加入 $0.05\text{mL}$ 、 $0.15\text{mL}$ 、 $0.25\text{mL}$ 的混合标准工作液（ $2\mu\text{g}/\text{L}$ ），按照前处理后，测定加标回收率。

## 1.5 统计分析

应用SPSS 22.0软件对两组人群年龄和身体质量指数进行两个独立样本 $t$ 检验，结果采用 $\bar{x} \pm S$ 表示；对两组人群元素每日膳食摄入量和血浆中元素浓度进行两个配对样本比较的Wilcoxon符号秩检验，结果采用Median（25th-75th）表示。食管癌癌前病变与硒元素摄入量和浓度之间的关系使用条件Logistic回归模型，将病例和对照一一对应进行分析（等效于分层Cox比例风险回归）。检验水准取双侧 $\alpha=0.05$ ，当 $p<0.05$ 时，认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

该病例对照研究共100对研究对象，其中男性52对，女性48对。病例组平均年龄为 $64.45 \pm 5.34$ 岁，平均身体质量指数（BMI）为 $23.72 \pm 3.21\text{kg}/\text{m}^2$ ，对照组平均年龄为 $64.38 \pm 5.09$ 岁，平均BMI为 $23.75 \pm 3.32\text{kg}/\text{m}^2$ 。 $t$ 检验结果显示两组人群的年龄和BMI没有显著性差异。

### 2.2 食物样本

#### 2.2.1 微量营养素每日膳食摄入量

Wilcoxon符号秩检验显示，两组人群的钠、钾、锰、铁、铜、硒元素膳食摄入量并无显



著性差异，但食管癌前病变组的锌每日摄入量为5.90 (3.69-7.58) mg/d，显著高于对照组的4.70 (2.98-6.59) mg/d ( $p=0.010$ )，结果见表7.1。

表7.1 两组人群钠、钾、锰、铁、铜、锌、硒元素膳食摄入量 ((Median (25th-75th))

元素种类	对照组 (n=100)	食管癌前病变组 (n=100)	$p$ value <sup>1</sup>
钠 (mg/d)	2078.28 (1440.15-2830.59)	1988.29 (1358.28-2951.62)	0.872
钾 (mg/d)	841.66 (603.57-1155.75)	880.28 (641.21-1200.59)	0.520
锰 (mg/d)	4.50 (3.27-7.21)	5.08 (3.53-6.66)	0.739
铁 (mg/d)	27.98 (20.40-49.56)	29.49 (21.13-47.67)	0.580
铜 (mg/d)	1.86 (1.40-2.52)	1.90 (1.31-2.31)	0.362
锌 (mg/d)	4.70 (2.98-6.59)	5.90 (3.69-7.58)	0.010
硒 ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )	147.20 (99.20-177.65)	136.72 (94.77-181.05)	0.767

### 2.2.2 砷、镉、铅每日膳食摄入量

Wilcoxon符号秩检验显示，两组人群的砷、镉、铅元素膳食摄入量并无显著性差异，计算结果见表7.2。

表7.2 两组人群砷、镉、铅元素膳食摄入量 ((Median (25th-75th))

元素种类	对照组 (n=100)	食管癌前病变组 (n=100)	$p$ value <sup>1</sup>
砷 ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )	50.53 (24.54-68.90)	42.33 (22.20-62.39)	0.280
镉 ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )	14.58 (8.40-21.36)	13.44 (8.20-20.14)	0.451
铅 ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )	140.28 (46.81-344.76)	105.95 (29.68-318.46)	0.215

## 2.3 血浆样本

### 2.3.1 血浆中微量营养素浓度

Wilcoxon符号秩检验显示，两组人群血浆中的钠、钾、铜元素浓度并无显著性差异，但食管癌前病变组血浆中的锰、铁、锌、硒元素浓度分别为38.44 (26.37-60.14)、2674.50 (2021.19-3534.42)、3243.24 (2018.32-4830.15)、55.97 (43.07-68.23) $\mu\text{g}/\text{l}$ ，显著低于对照组的28.02 (23.61-37.57)、2329.52 (1868.11-2832.06)、2498.39 (1633.34-3935.02)、49.46 (41.75-59.57) $\mu\text{g}/\text{l}$  ( $p<0.001$ ,  $p=0.008$ ,  $p=0.009$ ,  $p<0.001$ )，结果见表7.3。



表7.3两组人群血浆中钠、钾、锰、铁、铜、锌、硒元素浓度 ((Median (25th-75th))

元素种类	对照组 (n=100)	食管癌前病变组 (n=100)	<i>p</i> value <sup>1</sup>
钠 (mg/l)	2445.89 (2029.78-2604.16)	2432.98 (2297.92-2529.93)	0.638
钾 (mg/l)	469.56 (405.34-510.70)	446.20 (391.58-487.57)	0.273
锰 (μg/l)	38.44 (26.37-60.14)	28.02 (23.61-37.57)	<0.001
铁 (μg/l)	2674.50 (2021.19-3534.42)	2329.52 (1868.11-2832.06)	0.008
铜 (μg/l)	1481.41 (1257.59-1826.99)	1493.76 (1239.72-1727.33)	0.086
锌 (μg/l)	3243.24 (2018.32-4830.15)	2498.39 (1633.34-3935.02)	0.009
硒 (μg/l)	55.97 (43.07-68.23)	49.46 (41.75-59.57)	<0.001

## 2.3.2 血浆中砷、镉、铅浓度

Wilcoxon符号秩检验显示, 食管癌前病变组人群血浆中的砷、镉、铅元素浓度为1.46 (0.86-2.68)、0.71 (0.51-1.10)、45.01 (33.24-71.32)μg/l, 显著低于对照组的1.21 (0.74-2.05)、0.60 (0.45-0.86)、29.56 (20.93-43.10)μg/l ( $p=0.013$ ,  $p=0.004$ ,  $p<0.001$ ) 计算结果见表7.4。

表7.4两组人群血浆中砷、镉、铅元素浓度 ((Median (25th-75th))

元素种类	对照组 (n=100)	食管癌前病变组 (n=100)	<i>p</i> value <sup>1</sup>
砷 (μg/l)	1.46 (0.86-2.68)	1.21 (0.74-2.05)	0.013
镉 (μg/l)	0.71 (0.51-1.10)	0.60 (0.45-0.86)	0.004
铅 (μg/l)	45.01 (33.24-71.32)	29.56 (20.93-43.10)	<0.001

## 2.4 硒元素与食管癌前病变相关性

## 2.4.1 硒元素每日膳食摄入量与食管癌前病变相关性

条件Logistic回归分析显示, 相比于硒元素摄入量最低四分位数, 第三四分位数和最高四分位数对食管癌前病变的OR值为0.15 (95% CI, 0.03-0.76) 和0.21 (95% CI, 0.04-0.99), 且趋势分析表明伴随着硒元素每日膳食摄入量的增高, 食管癌前病变的发病风险呈下降趋势 ( $p=0.046$ ), 结果见表7.5。

表7.5 硒元素摄入量与食管癌前病变相关性

硒 (μg/d)	病例数/对照数	Crude OR (95% CI)	<i>p</i> value	Adjusted OR (95% CI)*	<i>p</i> value
Q1 (11.44-97.61)	28/22	1.00 (reference)	—	1.00 (reference)	—
Q2 (97.62-142.30)	27/23	0.71 (0.27-1.89)	0.489	0.44 (0.11-1.85)	0.264
Q3 (142.31-179.36)	19/31	0.44 (0.17-1.14)	0.091	0.15 (0.03-0.76)	0.022
Q4 (179.36-502.52)	26/24	0.69 (0.25-1.87)	0.467	0.21 (0.04-0.99)	0.049
<i>p</i> for trend		0.441		0.046	

\* 调整性别、年龄、BMI、教育水平、家庭人均收入、吸烟状况、按时就餐情况、血压、消化道病史、饮食咸淡辛辣口味、食管癌家族史



#### 2.4.2 血浆中硒元素浓度与食管癌癌前病变相关性

条件Logistic回归分析显示，相比于硒元素摄入量中浓度组，高浓度组对食管癌癌前病变的OR值为0.36（95% CI, 0.156-0.836），表明血浆硒高浓度较中浓度降低了食管癌癌前病变风险64%，结果见表7.6。

表7.6血浆中硒元素浓度与食管癌癌前病变相关性

硒 ( $\mu\text{g/d}$ )	病例数/对照数	Crude OR (95% CI)	<i>p</i> value	Adjusted OR (95% CI)*	<i>p</i> value
低浓度 ( $\leq 114.28$ )	28/22	0.98(0.466-2.064)	0.960	0.80(0.345-1.837)	0.593
中浓度 (114.28~166.72)	27/23	1.00 (reference)	-	1.00 (reference)	-
高浓度 ( $> 166.72$ )	19/31	0.48(0.228-0.997)	0.049	0.36(0.156-0.836)	0.017

\* 调整性别、年龄、BMI、教育水平、家庭人均收入、吸烟状况、按时就餐情况、血压、消化道病史、饮食咸淡辛辣口味、食管癌家族史

### 3 小结

本章基于双份饭法探讨膳食中微量元素营养状况及重金属污染水平与食管癌癌前病变的关系，发现癌前病变组人群膳食硒摄入量和血浆硒含量均显著低于健康人群，提示应当密切关注当地人群硒的膳食摄入情况，并且在该地区可以进一步围绕硒的作用和人体内硒的含量与食管癌癌前病变的关系开展深入研究。食管癌前病变组血浆中的锰、铁、锌、硒元素浓度均显著低于对照组。此外，探究膳食中微量元素的含量及食物、饮水中的重金属污染情况，进一步研究食管癌的危险因素，加强饮用水源、周边环境、土壤植物及食品的保护，落实食管癌防治知识的宣传，通过给群众普及食管癌防治知识并提供合理的膳食指导，让居民逐步建立起健康的生活习惯，对预防食管癌的发生发展，减少发病率和死亡率等都具有极为重要的科学意义和现实意义。



### 3. 研究人员的合作与分工。

#### 研究人员的合作、分工及实际贡献

序号	研究人员	单位	承担的工作
1	王少康	东南大学	项目负责人，负责课题总体安排、实施与总结
2	俞谦	东南大学	体外试验研究的工作安排，协助完成病例对照研究的流行病学调查
3	苏明	淮安市淮安区疾病预防控制中心	病例对照研究现场的指导与安排
4	李莉	江苏省肿瘤医院	病例对照研究样本的采集和流行病学调查
5	程科萍	东南大学	体外试验研究的工作安排，协助完成病例对照研究的流行病学调查
6	张红	东南大学	病例对照研究现场的指导与安排
7	缪彩云	淮安市淮安区疾病预防控制中心	人群调查和样品收集
8	何亚琼	东南大学	体外试验研究的工作安排
9	王锋	东南大学	协助完成病例对照研究样本的采集和流行病学调查
10	王敌	东南大学	协助完成病例对照研究样本的采集和流行病学调查
11	肖红梅	东南大学	体外实验与指标检测、完成基因表达的检测和资料的汇总分析
12	潘达	东南大学	病例对照研究样本的采集和流行病学调查、人群资料的汇总分析、人群指标的检测
13	张婷	东南大学	病例对照研究样本的采集和流行病学调查、人群数据分析、人群指标的检测
14	Adama Koroma (洛黛)	东南大学	流行病学调查、人群资料的汇总分析
15	付凌萌	东南大学	完成体外实验与指标检测
16	魏婕	东南大学	完成体外实验与指标检测



资助项目执行期间新增和退出的研究人员名单

序号	研究人员	单位	新增或退出	原因
1	李莉	江苏省肿瘤医院	新增	现场人群样品采集负责人，确保现场工作顺利实施
2	王锋	东南大学	退出	研究生毕业
3	肖红梅	东南大学	退出	研究生毕业
4	王敌	东南大学	退出	研究生毕业
5	张婷	东南大学	退出	研究生毕业
6	Adama Koroma (洛黛)	东南大学	退出	研究生毕业
7	付凌萌	东南大学	退出	研究生毕业
8	潘达	东南大学	新增	新入学博士研究生，作为其毕业课题内容
9	魏婕	东南大学	新增	新入学硕士研究生，作为其毕业课题内容

#### 4. 国内外学术合作交流等情况。

项目组于 2017 年 1 月至 2020 年 12 月先后委派王少康副教授、潘达博士、吴逸硕士、肖红梅硕士、张婷硕士、付凌萌硕士、魏婕硕士、汪元元硕士、胡玥明硕士、许登峰硕士、王静硕士、陈子彤硕士、郭子琪硕士、王念念硕士、朱小盼硕士等 16 名项目成员参加了中国营养学会第十三届全国营养科学大会暨全球华人营养科学家大会、第十三届全国营养与保健食品科学大会暨第七届中韩植物营养素国际学术研讨会、江苏省营养学会第六届会员代表大会暨 2018 年营养与健康学术大会、2018 届国际植物营养素研讨会、第十四届全国营养与保健食品科学大会暨研发科技创新专题讨论会、江苏肿瘤防治大会、2018 中国肿瘤学大会、2018 营养、能量代谢和肥胖研讨会、2019 中国肿瘤学大会、2019 年亚洲营养大会、第十一届亚太临床营养大会暨中国营养学会第十四届全国营养科学大会、第二届中国真菌毒素大会、长三角营养论坛等 13 次各类学术会议（包括 5 次国际学术会议），共计 36 人次（包括 20 人次国际学术会议）。项目组于 2019 年 12 月 9-10 日委派哈佛大学公共卫生学院张学宏助理教授来华，进行学术合作交流与指导，并做学术报告《肿瘤的三级预防》；于 2020 年 6 月邀请美国乔治亚大学公共卫生学院环境健康科学系主任王加生教授与课题组成员进行在线学术交流。



## 5. 存在的问题、建议及其他需要说明的情况。

无。

### (二) 成果部分

#### 1. 项目取得成果的总体情况。

本研究经过流行病学调查问卷,通过多因素 Logistic 回归分析发现淮安食管癌高发区饮酒、喜食玉米和腌晒食品为食管癌前病变的危险因素,喜食豆制品为保护因素。而玉米及其制品在贮存过程中易被黄曲霉毒素和伏马菌素污染,腌晒食品则常常含有较高含量的 N-亚硝基化合物和亚硝酸盐。基于流行病学调查结果,进一步对该地区人群血液样本和膳食样本中的以上三种致癌物水平以及膳食微量元素摄入量、血浆微量元素营养状况、血清维生素 C 和氧化应激相关指标进行检测,探究黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐的内暴露和外暴露之间的关系、微量营养素摄入量与体内营养状况之间的关系,及其与食管癌前病变和氧化损伤之间的关系。结果发现食管癌前病变组人群的黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐的内、外暴露水平较高,而膳食硒摄入量、血浆硒、锰、铁、锌含量和血清维生素 C 含量均较低,且黄曲霉毒素、亚硝酸盐、硒、锰、铁及锌元素和维生素 C 的结果具有统计学差异,提示江苏淮安地区居民食管癌高发的原因很可能与膳食中黄曲霉毒素和亚硝酸盐的高暴露以及较差的营养状况有关,而黄曲霉毒素和亚硝酸盐的联合暴露和抗氧化营养素如维生素 C 和硒元素的缺乏可能通过促进氧化损伤从而在食管癌前病变发生发展中起重要作用。体外实验表明 AFB<sub>1</sub>+ FB<sub>1</sub>+ MNNG 联合染毒致 Bcl-2/Bax、P21、Cyclin D<sub>1</sub>mRNA 表达均上调,且 MNNG 抑制 HEEC 活力,呈时间和剂量依赖性,还可致细胞膜完整性破坏,增加细胞内 ROS 的产生,且可促进细胞凋亡,凋亡呈剂量依赖性,促凋亡作用与 P53 表达上调, Bcl-2/Bax mRNA 表达下调有关。MNNG 通过 CDC25C/CDK1/Cyclin B1 通路将细胞周期阻滞在 G2/M 期,体现在 Cyclin B1, CDC25C 蛋白表达的下调以及 CDK1 和 p-CDK1(Tyr15)蛋白表达的上调。维生素 C 可以减弱 MNNG 对细胞活力的抑制,减少 ROS 的产生,抑制其凋亡作用,以及减少细胞 G2/M 期阻滞。抑制细胞凋亡作用与下调 P53 表达,上调 Bcl-2/Bax mRNA 表达有关。减轻周期阻滞主要是通过调控 CDC25C/CDK1/ Cyclin B1 通路,具体表现在上调 MNNG 引起的 Cyclin B1, CDC25C 的蛋白表达下调,降低 MNNG 导致的 CDK1 和 p-CDK1 (Tyr15) 蛋白表达升高。该研究为食管癌一级预防措施的制定提供科学依据,通过进一步落实食管癌防治知识的宣传,普及食管癌防治知识并提供合理的膳食指导,让居民逐步建立起健康的生活和饮食习惯,对预防食管癌的发生发展,减少发病率和死亡率等都具有非常重要的科学意义和现实意义。

本项目目前共发表论文 30 篇,其中期刊论文 12 篇(包括 SCIE 收录论文 7 篇、EI 收录论文 1 篇、CSCD 收录论文 5 篇)、会议论文 18 篇(包括 1 次国际会议论文的墙报交流,1 次国际会议论文的口头汇报);本项目目前共培养硕士博士研究生 6 名,包括培养毕业硕士 4 名,在读硕士 1 名,在读博士 1 名。



## 2. 项目成果转化及应用情况。

本项目人群流行病学调查结果已经写成报告,并已提交淮安市淮安区疾病预防控制中心,上报淮安区卫生局,作为该区肿瘤防治的重要科学依据和健康教育重点内容,将为淮安食管癌高发区的食管癌防控措施的制定和实施提供有力的支持和保障。

## 3. 人才培养情况。

通过本项目,目前培养了硕士4名、在读博士1名、在读硕士1名,具体如下:

研究生姓名	研究方向	论文题目	导师姓名	已答辩或预计答辩的年月
肖红梅 (硕士)	营养与肿瘤	一碳单位代谢相关B族维生素与食管癌的关系及其对微囊藻毒素-LR 致癌性的干预研究	王少康	2018.6
Adama Koroma (洛黛) (硕士)	营养与肿瘤	中国江苏淮安食管癌高发区食管癌前病变相关影响因素的流行病学调查研究	王少康	2018.6
张婷 (硕士)	营养与肿瘤	黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐暴露及氧化损伤与食管癌前病变关系的病例对照研究	王少康	2019.6
付凌萌 (硕士)	营养与肿瘤	N-亚硝基化合物对食管细胞的毒性作用机制及维生素C的干预作用研究	王少康	2020.6
潘达 (博士)	营养与肿瘤	维生素B12与食管鳞癌癌前病变关系及机制的人群研究	孙桂菊、 王少康	2021.6
魏婕 (硕士)	营养与肿瘤	黄曲霉毒素B1致食管正常上皮细胞恶性转化机制及MAPK通路机制研究	王少康	2021.6



#### 4. 其他需要说明的成果。

依据本项目的合作研究基础,项目负责人王少康副教授于 2017 年 11 月被江苏省科学技术协会确认为江苏省营养学会选派淮安市淮安区疾病预防控制中心的首席专家。

#### 5. 项目成果科普性介绍或展示网站。

食管癌是起源于食管柱状上皮和食管鳞状上皮的消化道恶性肿瘤,在我国大陆地区中高居各类肿瘤发病率的第 5 位,死亡率高居第 4 位。食管癌发病率在我国呈明显的地区差异,其中山东、河南和河北等地发病率和死亡率均较高,农村地区食管癌发病率高于城市地区,中西部地区食管癌发病率高于东部地区,在不同少数民族中其发病率也不相同,在新疆不同民族食管癌的调查中,哈萨克族在所研究的民族中的发病率最高。不同国家,不同种族人群食管癌发病率也有显著差别,中国、日本、南美等地食管癌的发病率普遍较高,大洋洲、北美等地发病率较低,其中英格兰,法国,澳大利亚,芬兰,荷兰等,食管癌发病率都有所上升。江苏省淮安市淮安区是食管癌的高发区域,2014 年该地区男性食管癌发病数占男性全部癌症发生数的 30.11%,男性癌症死亡人数的 30.21%归因于食管癌;女性食管癌发病数占女性全部癌症发生数的 27.08%,女性癌症死亡人数的 34.7%归因于食管癌。高水平的食管癌发病率和死亡率严重威胁到了淮安当地居民的健康状况。

本研究通过在淮安食管癌高发区开展流行病学调查,发现饮酒、喜食玉米和腌晒食品为食管癌前病变的危险因素,喜食豆制品为保护因素。而玉米及其制品在贮存过程中易被黄曲霉毒素和伏马菌素污染,腌晒食品则常常含有较高含量的 N-亚硝基化合物和亚硝酸盐。进一步研究发现食管癌前病变组人群具有较高水平的黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐的内、外暴露和较低水平的膳食硒摄入量、血浆硒、锰、铁、锌含量和血清维生素 C 含量,且黄曲霉毒素、亚硝酸盐、硒、锰、铁、锌元素和维生素 C 的结果具有统计学差异,提示江苏淮安地区居民食管癌高发的原因很可能与膳食中黄曲霉毒素和亚硝酸盐的高暴露以及较差的营养状况有关,而黄曲霉毒素和亚硝酸盐的联合暴露和较低的抗氧化营养素摄入可能通过氧化损伤在食管癌前病变发生发展中起重要作用。

食管癌的发生是多因素共同作用的结果,该地区居民应加强对主要粮食作物中霉菌毒素的防控工作,改善饮食习惯和营养状况,从而预防食管癌的发生。此外,进一步加强饮用水源、周边环境、土壤植物及食品的保护,落实食管癌防治知识的宣传,通过给群众普及食管癌防治知识并提供合理的膳食指导,让居民逐步建立起健康的生活习惯,对预防食管癌的发生发展,减少发病率和死亡率等都具有极为重要的科学意义和现实意义。

#### 参考文献

[1] 田东,贺巧,王洋,等. 食管癌高发区农村居民饮食状况及对食管癌认知调查 [J]. 川北



医学院学报. 2010, 25(5): 470-473.

[2] KNEKT P, JARVINEN R, DICH J, et al. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study [J]. *Int J Cancer*. 2015, 80(6): 852-856.

[3] 王佳曼. 黄曲霉毒素 B1 亚慢性暴露对雄性小鼠氧化、遗传系统的损伤及其作用机制 [D]; 西南大学, 2017.

[4] 杨金禄, 孙永忠. 氧化、脂质过氧化在食管癌患者中的变化 [J]. *浙江临床医学*. 2002, 4(12): 883-884.

[5] HUANG Q, FENG J, WU R, et al. Total Oxidant/Antioxidant Status in Sera of Patients with Esophageal Cancer [J]. *Med Sci Monit*. 2017, 23: 3789-3794.

[6] GHONEUM M H, EL-DIN N K B, FATTAH S M A, et al. Hydroferrate Fluid, MRN-100, Provides Protection against Chemical-Induced Gastric and Esophageal Cancer in Wistar Rats [J]. *International Journal of Biological Sciences*. 2015, 11(3): 295-303.

[7] PETERS C, KOUAKANOU L, KABELITZ D. A comparative view on vitamin C effects on alpha beta- versus gamma delta T-cell activation and differentiation [J]. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020, 107(6): 1009-1022.

[8] KOUAKANOU L, XU Y, PETERS C, et al. Vitamin C promotes the proliferation and effector functions of human gamma delta T cells [J]. *Cellular & Molecular Immunology*. 2020, 17(5): 462-473.

[9] ARNOLD M, SOERJOMATARAM I, FERLAY J, et al. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012 [J]. *Gut*. 2015, 64(3): 381.

[10] PENNATHUR A, GIBSON M K, JOBE B A, et al. Oesophageal carcinoma [J]. *The Lancet*. 2013, 381(9864): 400-412.

[11] ZHANG P, XIA J H, ZHU J, et al. High-throughput screening of prostate cancer risk loci by single nucleotide polymorphisms sequencing [J]. *Nat Commun*. 2018, 9:2022

[12] 陆建邦. 食管癌流行因素及预防研究概况 [J]. *肿瘤防治研究*. 1996(6): 387-390.

[13] 谭丽, 王茜, 景学安. 环境因素与食管癌发病关系的研究 [J]. *泰山医学院学报*. 2010, 31(5): 376-378.



## 研究成果目录

项目负责人通过ISIS系统，从文献库中检索研究成果或者按要求格式自行填入。请按照期刊论文、会议论文、学术专著、专利、会议报告、标准、软件著作权、科研奖励、人才培养、成果转化的顺序列出，其它重要研究成果如标本库、科研仪器设备、共享数据库、获得领导人批示的重要报告或建议等，应重点说明研究成果的主要内容、学术贡献及应用前景等。

项目负责人不得将非本人或非参与者所取得的研究成果，以及与受资助项目无关的研究成果列入报告中。发表的研究成果，项目负责人和参与者均应如实注明得到国家自然科学基金项目资助和项目批准号，科学基金作为主要资助渠道或者发挥主要资助作用的，应当将自然科学基金作为第一顺序进行标注。

### 期刊论文

#### 1. 第一作者论文

(1) **Wang, Shaokang<sup>#\*</sup>**; Pan, Da<sup>#</sup>; Zhang, Ting; Su, Ming; Sun, Guiju; Wei, Jie; Guo, Ziqi; Wang, Kai; Song, Guang; Yan, Qingyang; [Corn Flour Intake, Aflatoxin B\(1\)Exposure, and Risk of Esophageal Precancerous Lesions in a High-Risk Area of Huai'an, China: A Case-Control Study](#), *Toxins*, 2020, 12(5): 0-299. SCIE. 第一标注

(2) **Wang Shaokang<sup>#\*</sup>**; Pan Da<sup>#</sup>; Su Ming; Huang Guiling; Sun Guiju; [Moderately high folate level may offset the effects of aberrant DNA methylation of P16 and P53 genes in esophageal squamous cell carcinoma and precancerous lesions.](#), *Genes and Nutrition*, 2020, 15(1): 18-18. SCIE. 第一标注

(3) **Wang, Shaokang**; Fu, Lingmeng; Wu, Yi; Xiao, Hongmei; Wang, Jing; Sun, Guiju<sup>\*</sup>; [Influence of luteolin on the apoptosis of esophageal cancer Eca109 cells and its mechanism of action](#), *FOOD SCIENCE AND HUMAN WELLNESS*, 2019, 8(2): 189-194. SCIE. 第一标注

(4) **Wang Shao Kang**; Xiao Hong Mei; Xia Hui; Sun Gui Ju<sup>\*</sup>; [Tea consumption and risk of breast cancer: A meta-analysis](#), *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2018, 56(12): 617-619. SCIE. 第一标注

#### 2. 通讯作者论文（勿与第一作者论文重复）



- (1) Zhang Ting; Pan Da; Su Ming; Fu Ling Meng; Miao Cai Yun; Yan Qing Yang; Wang Jing; Yang Li Gang; **Wang Shao Kang\***; Sun Gui Ju; [Determination of dietary nitrite in patients with esophageal pre-cancerous lesion and normal people: a duplicate diet study](#), *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure& Risk Assessment*, 2018, 35(12): 2298-2308. SCIE. 第一标注
- (2) Pan, Da; Su, Ming; Zhang, Ting; Miao, Caiyun; Fu, Lingmeng; Yang, Ligang; Song, Guang; Raine, Philip J; **Wang, Shaokang\***; Sun, Guiju\*; [A Distinct Epidemiologic Pattern of Precancerous Lesions of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a High-risk Area of Huai'an, Jiangsu Province, China](#), *Cancer Prevention Research*, 2019, 12(7): 449-462. SCIE. 第一标注
- (3) 张婷; 潘达; 付凌萌; 苏明; 缪彩云; **王少康\***; 孙桂菊; [江苏淮安地区食管癌前病变病例-对照研究](#), *肿瘤*, 2018, 38(10): 973-979. 北大中文核心期刊. 第一标注
- (4) 付凌萌; 吴逸; 王菁; 魏婕; **王少康\***; 孙桂菊; [木犀草素与叶酸对黄曲霉毒素B<sub>1</sub>致食管上皮细胞毒性及MTHFR基因高甲基化的影响](#), *食品科学*, 2019, 40(23): 142-150. EI, 北大中文核心期刊. 第一标注
- (5) Pan, Da; Su, Ming; Huang, Guiling; Luo, Pengfei; Zhang, Ting; Fu, Lingmeng; Wei, Jie; **Wang, Shaokang\***; Sun, Guiju\*; [MTHFR C677T genetic polymorphism in combination with serum vitamin B-2, B-12 and aberrant DNA methylation of P16 and P53 genes in esophageal squamous cell carcinoma and esophageal precancerous lesions: a case-control study](#), *Cancer Cell International*, 2019, 19(1): 0-288. SCIE. 第一标注
- (6) 肖红梅; 吴逸; 张婷; **王少康\***; 孙桂菊; [微囊藻毒素-LR对人正常食管上皮细胞凋亡及对Caspase-3和Caspase-9蛋白表达的影响](#), *癌变·畸变·突变*, 2017, 29(6): 418-421+426. 其他. 第一标注
- (7) 陈子彤; 苏明; 宋光; 王凯; 开海涛; **王少康\***; 孙桂菊; [淮安市淮安区1998—2016年胃癌患者发病死亡情况趋势分析](#), *肿瘤*, 2020, 40(9): 633-640. 北大中文核心期刊. 第一标注



(8) 肖红梅; 潘天齐; 董淑楠; 付凌萌; **王少康\***; 孙桂菊; [绝经状态影响饮茶与乳腺癌患病风险关系的meta分析](#), *癌变·畸变·突变*, 2018, 30(5): 395-399. 第一标注

## 会议论文

### 1. 第一作者论文

(1) **Wang Shaokang**; Chen Zitong; Xiao Hongmei; Fu Lingmeng; Wei Jie; Pan Da; Sun Guiju; [Effect of Folic Acid and Vitamin B6 on Cytophysiology of Human Normal Esophageal Epithelial Cells Exposed to Microcystin-LR](#), *The Asian Congress of Nutrition 2019*, Bali Indonesia, 2019-8-4至2019-8-7. SCIE. 第一标注

(2) **王少康**; 杨阳; 吴逸; 肖红梅; 刘钰; 孙桂菊; [一碳单位相关B族维生素对黄曲霉毒素处理的人类正常食管上皮细胞的保护作用研究](#), *中国营养学会第十三届全国营养科学大会暨全球华人营养科学家大会*, 中国北京, 2017-5-22至2017-5-24. 第一标注

(3) **Shaokang Wang**; Da Pan; Ting Zhang; Ming Su; Jie Wei; Guiju Sun; High exposure of aflatoxin B1 and risk of esophageal precancerous, *2020中国肿瘤学大会*, 中国广州, 2020-11-12至2020-11-15. 其他. 第一标注

(4) **王少康**; 苏明; 潘达; 张婷; 王凯; 陈子彤; 孙桂菊; [食管鳞癌癌前病变与氧化损伤状态关系的病例对照研究](#), *2019中国肿瘤学大会*, 中国重庆, 2019-8-16至2019-8-19. 其他. 第一标注

(5) **王少康**; 张婷; 潘达; 付凌萌; 苏明; 王凯; 宋光; 陈子彤; 孙桂菊\*; [黄曲霉毒素B1暴露与食管癌前病变关系的病例对照研究](#), *第二届中国真菌毒素大会*, 中国北京, 2019-5-10至2019-5-13. 其他. 第一标注

### 2. 通讯作者论文 (勿与第一作者论文重复)

(1) 魏婕; 吴逸; 付凌萌; 潘达; 王静; **王少康\***; 孙桂菊; [木犀草素及叶酸对AFB1处理的人类正常食管上皮细胞的MTHFR、FOLR1 mRNA及蛋白表达的影响](#), *第二届中国真菌毒素大会*, 中国北京, 2019-5-10至2019-5-13. 其他. 第一标注



### 3. 既非第一作者又非通讯作者论文

- (1) Pan, Da; Huang, Guiling; Su, Ming; Zhang, Ting; Fu, Lingmeng; Miao, Caiyun; **Wang, Shaokang**; Sun, Guiju; [Gene-Nutrient Interaction between Vitamin B2 and B12 and The Mthfr C677T Polymorphism Impact on The Risks of Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Precancerous Lesions](#), *The Asian Congress of Nutrition 2019*, Bali, Indonesia, 2019-8-4至2019-8-7. SCIE. 第一标注
- (2) 肖红梅; **王少康**; 杨立刚; 夏惠; 孙桂菊; [饮茶对乳腺癌患病风险影响的meta分析](#), 中国营养学会第十三届全国营养科学大会暨全球华人营养科学家大会, 中国北京, 2017-5-22至2017-5-24. 第一标注
- (3) 潘天齐; **王少康**; 苏明; 缪彩云; 开海涛; 孙桂菊; [淮安居民生活及社会因素与消化道疾病史的关系](#), 中国营养学会第十三届全国营养科学大会暨全球华人营养科学家大会, 中国北京, 2017-5-22至2017-5-24. 第一标注
- (4) 吴逸; 刘钰; **王少康**; 孙桂菊; [木犀草素抗肿瘤细胞增殖及其作用机制的研究](#), 中国营养学会第十三届全国营养科学大会暨全球华人营养科学家大会, 中国北京, 2017-5-22至2017-5-24. 第一标注
- (5) 潘天齐; **王少康**; 苏明; 缪彩云; 开海涛; 孙桂菊; [饮茶与不同消化道疾病相关性研究](#), 第十三届全国营养与保健食品科学大会暨第七届中韩植物营养素国际学术研讨会, 中国, 江苏省, 无锡市, 2017-9-14至2017-9-15. 第一标注
- (6) 张婷; **王少康**; 孙桂菊; [补充维生素C与高尿酸血症的Meta分析](#), 第十三届全国营养与保健食品科学大会暨第七届中韩植物营养素国际学术研讨会, 中国, 江苏省, 无锡市, 2017-9-14至2017-9-15. 第一标注
- (7) 魏婕; 潘达; **王少康**; 孙桂菊; [食管癌流行现状及相关影响因素研究进展](#), 营养研究与临床实践——第十四届全国营养科学大会暨第十一届亚太临床营养大会、第二届全球华人营养科学家大会, 中国江苏南京, 2019-9-20至2019-9-22. 第一标注
- (8) 付凌萌; 王菁; 吴逸; 肖红梅; 张婷; 汪元元; **王少康**; 孙桂菊; [木犀草素及叶酸对黄曲霉毒素B1处理的人类正常食管上皮细胞的保护效果研究](#), 第十四届全国营养与保健食品科学大会暨研发科技创新专题研讨会, 中国福建厦门, 2018-12-11至2018-12-12. 第一标注



(9) 王静; **王少康**; 孙桂菊; **乳腺癌与饮食关系的营养流行病学研究**, *营养研究与临床实践——第十四届全国营养科学大会暨第十一届亚太临床营养大会、第二届全球华人营养科学家大会*, 中国江苏南京, 2019-9-20至2019-9-22. 第一标注

(10) 许余玲; 付凌萌; **王少康**; 孙桂菊; **叶酸在食管癌细胞血管拟态中的作用研究**, *营养研究与临床实践——第十四届全国营养科学大会暨第十一届亚太临床营养大会、第二届全球华人营养科学家大会*, 中国江苏南京, 2019-9-20至2019-9-22. 第一标注

(11) Da Pan; Ting Zhang; Jie Wei; Ming Su; Ziqi Guo; **Shaokang Wang**; Guiju Sun; The relationship between the transport capability of bio-active form of vitamin B12 and the risk of esophageal precancerous lesions, *2020中国肿瘤学大会*, 中国广州, 2020-11-12至2020-11-15. 其他. 第一标注

(12) 潘达; 苏明; **王少康**; 张婷; 宋光; 颜庆洋; 孙桂菊; **食管鳞癌癌前病变与血清叶酸及维生素B12关系的病例对照研究**, *2019中国肿瘤学大会*, 中国重庆, 2019-8-16至2019-8-19. 其他. 第一标注

## 人才培养

### 1. 出站博士后/毕业博士/毕业硕士/在站博士后/在读博士/在读硕士

(1) 肖红梅; 毕业硕士, **一碳单位代谢相关B族维生素与食管癌的关系 及其对微囊藻毒素 族维生素与食管癌的关系 及其对微囊藻毒素-LR 促细胞增殖的干预研究**, 王少康, 2016-10-1至2018-5-26.

(2) 张婷; 毕业硕士, **黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝酸盐暴露及氧化损伤与食管癌前病变关系的病例对照研究**, 王少康, 2017-6-1至2019-5-20.

(3) 付凌萌; 毕业硕士, **N-亚硝基化合物对食管细胞的毒性作用机制及维生素C的干预作用研究**, 王少康, 2018-6-1至2020-7-16.

(4) Adama Koroma (洛黛); 毕业硕士, **Relationship Between Selected Factors And The Occurrence Of Esophageal Precancerous Lesion In China: An Epidemiological Study In Huai' an, Jiangsu Province**, 王少康, 2017-6-1至2018-5-26.



- (5) 潘达（潘天齐）；在读博士，2017-6-1至2020-12-31.
- (6) 魏婕；在读硕士，2019-6-1至2020-12-31.

### 学术交流

- (1) 2017-5-22至2017-5-24, 参加中国营养学会第十三届全国营养科学大会暨全球华人营养科学家大会, 中国北京, 王少康、潘天齐（潘达）、吴逸、肖红梅.
- (2) 2017-9-14至2017-9-15, 参加第十三届全国营养与保健食品科学大会暨第七届中韩植物营养素国际学术研讨会, 中国无锡, 王少康、潘天齐（潘达）、张婷.
- (3) 2018-9-10至2018-9-14, 参加2018届国际植物营养素研讨会（2018 International Phytonutrient Symposium）, 韩国首尔, 王少康.
- (4) 2019-8-4至2019-8-7, 参加2019年亚洲营养大会（the Asian Congress of Nutrition (ACN) 2019）, 印度尼西亚巴厘岛, 王少康、潘达.
- (5) 2019-9-20至2019-9-22, 参加第十四届全国营养科学大会暨第十一届亚太临床营养大会, 中国南京, 王少康、潘达、付凌萌、汪元元、魏婕、王静、陈子彤、郭子琪、王念念、朱小盼.

### 项目成果应用前景

本项目成果拟应用领域：1、疾病预防与控制 2、营养改善 3、食品污染物控制

预计在5-10年推广使用



**附表：研究成果统计数据表**（本表针对各种类型资助项目收集数据以便进行整体资助效果分析使用，并非要求每类项目都具有以下各类成果。）

获奖(项)	国家级						省部级				其他			
	自然科学奖		科技进步奖		发明奖		自然科学奖		科技进步奖					
	一等	二等	一等	二等	一等	二等	一等	二等	一等	二等				
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
学术报告/论文/专著/其他(篇)	特邀学术报告		学术论文						学术专著		其他			
	国际学术会议	国内学术会议	发表论文数		论文检索收录情况				中文	外文	标本库	数据库	科研仪器设备	重要报告
			期刊论文	会议论文	SCIE/SSCI	EI	北大中文核心期刊	CSSCI						
	0	0	12	18	9	1	3	0	0	0	0	0	0	0
专利/标准/软著/成果转化	专利(项)				标准				软件著作权	成果转化				
	国内		国外		国际	国内				技术转让	技术许可	作价投资	经济效益(万元)	
	申请	授权	申请	授权		国家	行业	地方						企业
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
人才培养及学术交流	人才培养(人)						举办和参加学术会议							
	中青年学术带头人				出站博士后	毕业博士	毕业硕士	举办国际学术会议		举办国内学术会议		参加国际学术会议		
	优青	杰青	创新群体	其他				次数	人数	次数	人数	次数	人数	
	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	20	



## 国家自然科学基金项目资金决算表（定额补助）

项目批准号：81673147

项目负责人：王少康

金额单位：万元

序号	科目名称	预算数			累计支出数	结余
		批准预算	预算调整数	调整后预算		
		(1)	(2)	(3) = (1) + (2)	(4)	(5) = (3) - (4)
1	合计	50.0000	0.0000	50.0000	49.9750	0.0250
2	1、设备费	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	（1）设备购置费	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	（2）设备试制费	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	（3）设备升级改造与租赁费	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
6	2、材料费	20.7000	2.6581	23.3581	23.3581	0.0000
7	3、测试化验加工费	5.8000	0.0000	5.8000	5.8000	0.0000
8	4、燃料动力费	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	12.0000	-3.4965	8.5035	8.4785	0.0250
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	4.0000	0.8384	4.8384	4.8384	0.0000
11	7、劳务费	7.0000	0.0000	7.0000	7.0000	0.0000
12	8、专家咨询费	0.5000	0.0000	0.5000	0.5000	0.0000
13	9、其他支出	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

注:1.本表中(1)、(3)、(5)栏为系统自动生成,不需项目负责人填写; 2.本表中(2)栏填列经批准的预算调整数; 3.本表中(4)栏填列项目的实际支出数;



## 决算说明书（定额补助）

（请按照《国家自然科学基金项目决算表编制说明》等的有关要求，说明项目预算支出情况、预算调整情况、合作研究外拨资金情况、单笔总额10万元（含）以上的设备情况、资金管理和使用过程中的问题建议，以及其他需要说明的事项。）

### 1、项目预算支出情况

本项目批准预算为50.0000万元，严格按调整后预算执行，截止至2020年12月31日，累计支出49.9750万元，结余差旅费/会议费/国际合作与交流费0.0250万元，用于支付因东南大学财务处年底封账原因未及时报销的少量市内交通费。

### 2、预算调整情况

本项目因材料费批准预算额度不足，发表科研论文数量增加，新冠疫情期间计划参与的部分学术会议以及和境外专家的合作交流改为了网络会议或网络在线的方式，故对材料费、出版/文献/信息传播/知识产权事务费、差旅费/会议费/国际合作与交流费进行了调整，其余支出项目未进行调整。经单位审核（《东南大学国家自然科学基金项目经费预算调整申请表》扫描件，见附件36），经费调整如下：

本项目在实际检测中增加了人群膳食和血清中氧化损伤和矿物元素等指标，故对材料费进行了调增2.6581万元（由批准预算20.7000万调整为23.3581万），增加预算2.6581万元用于：①血清中氧化损伤指标的检测费1.32万元，包括MDA、T-SOD、CAT、GSH-PX试剂盒500元/盒（96孔）×12盒=0.60万元，8-OHdG试剂盒2000元/盒（96孔）×3盒=0.6万元，其他实验耗材0.12万元；②膳食和血清中矿物元素的检测1.3381万元，包括矿物元素混合标准品500元/支×8支=0.40万元，高纯氩气400元/瓶×20瓶=0.80万元，其他实验耗材费0.1381万元。

本项目实际发表科研论文数量增加，实际发表科研论文12篇，其中SCI收录的论文7篇（预计发表科研论文7-9篇，其中SCI收录的论文4-5篇），故对出版/文献/信息传播/知识产权事务费进行了调增0.8384万元（由批准预算4.0000万调整为4.8384万），调整后预算4.8385万元用于sci论文版面费5000元/篇×7篇=3.50万元、中文论文版面费2500元/篇×5篇=1.25万元、资料检索费0.0885万元。

本项目新冠疫情期间计划参与的部分学术会议以及和境外专家的合作交流改为了网络会议或网络在线的方式，故对差旅费/会议费/国际合作与交流费进行了调减3.4965万元（由批准预算12.0000万调整为8.5035万），调整后预算8.5035万元用于：项目成员往来淮安人群现场差旅费1000元/人次×24人次=2.40万元；参加国内学术会议差旅费4000元/人次×10人次=4.00万元；项目成员出国合作交流2.00万元，每次出访5天，费用为10000元/人次（包括机票5000元+会议费2000元+交通住宿费3000元）×2人次=2.00万元；境外专家来华合作交流改为网络在线交流；项目组成员在本市内由于本项目研究任务产生的市内交通费0.1035万元。

### 3、合作研究外拨资金情况

本项目合作单位为淮安市淮安区疾病预防控制中心，为行政事业单位，负责人群现场流行病学调查、食物和血液样品的收集与处理等工作，研究任务负责人为苏明，承担直接经费5.0000万元，占总直接经费的10%，按已签订的合作申请协议书执行。

本项目合作经费按原计划由东南大学转账到淮安市淮安区疾病预防控制中心直接经费5.0000万元，该部分经费由淮安市淮安区疾病预



防控制中心严格按预算执行，截止至2020年12月31日，累计支出5.0000万元，无结余。

4、单价10万元以上的设备名称及使用情况

本项目无设备费预算，无任何设备购置情况。

5、资金管理和使用过程中遇到的问题及建议

无。

6、其他需要说明的事项

无。

NSFC-REPORT-2020

**签字及审核意见表****项目负责人承诺：**

我所承担的项目（编号：81673147 名称：黄曲霉毒素、伏马菌素和亚硝胺在食管癌前病变过程中的联合作用及维生素C的干预作用研究）结题报告内容真实，数据准确，未出现《国家科学技术保密规定》中列举的属于国家科学技术秘密范围的内容。在今后的研究工作中，如有与本项目相关的成果，将如实注明得到国家自然科学基金项目资助和项目批准号，并报送国家自然科学基金委员会。

项目负责人（签章）：

日期：

**依托单位科研管理部门：**

负责人（签章）：

日期：

**依托单位财务管理部门：**

负责人（签章）：

日期：

**依托单位审查意见：**

依托单位公章：

**科学处审核意见：**完成情况  
综合评分  
(划√)

优

良

中

差

负责人（签章）：

日期：

**科学部核准意见**（对重点项目等）：

负责人（签章）：

日期：

**分管委领导意见**（对重大项目等）：

委领导（签章）：

日期：



## 电子附件目录

序号	附件类型	附件名称	备注
1	论著	代表性论文-1	期刊论文, SCIE, 第一标注
2	论著	代表性论文-2	期刊论文, SCIE, 第一标注
3	论著	代表性论文-3	期刊论文, SCIE, 第一标注
4	论著	代表性论文-4	期刊论文, 北大中文核心期刊, 第一标注
5	论著	代表性论文-5	期刊论文, EI, 北大中文核心期刊, 第一标注
6	论著	其余论文-1	期刊论文, SCIE, 第一标注
7	论著	其余论文-2	期刊论文, SCIE, 第一标注
8	论著	其余论文-3	期刊论文, SCIE, 第一标注
9	论著	其余论文-4	期刊论文, SCIE, 第一标注
10	论著	其余论文-5	期刊论文, 第一标注
11	论著	其余论文-6	期刊论文, 北大中文核心期刊, 第一标注
12	论著	其余论文-7	期刊论文, 第一标注
13	论著	其余论文-8	会议论文, SCIE, 第一标注
14	论著	其余论文-9	会议论文, 第一标注
15	论著	其余论文-10	会议论文, 第一标注
16	论著	其余论文-11	会议论文, 第一标注
17	论著	其余论文-12	会议论文, 第一标注
18	论著	其余论文-13	会议论文, 第一标注
19	论著	其余论文-14	会议论文, SCIE, 第一标注
20	论著	其余论文-15	会议论文, 第一标注
21	论著	其余论文-16	会议论文, 第一标注
22	论著	其余论文-17	会议论文, 第一标注
23	论著	其余论文-18	会议论文, 第一标注
24	论著	其余论文-19	会议论文, 第一标注
25	论著	其余论文-20	会议论文, 第一标注
26	论著	其余论文-21	会议论文, 第一标注
27	论著	其余论文-22	会议论文, 第一标注
28	论著	其余论文-23	会议论文, 第一标注
29	论著	其余论文-24	会议论文, 第一标注
30	论著	其余论文-25	会议论文, 第一标注



31	其他	首席专家证书	依据本项目的合作研究基础，项目负责人王少康副教授于2017年11月被江苏省科学技术协会确认为江苏省营养学会选派淮安市淮安区疾病预防控制中心的首席专家
32	其他	硕士研究生学位论文-1	硕士研究生学位论文，肖红梅
33	其他	硕士研究生学位论文-2	硕士研究生学位论文，张婷
34	其他	硕士研究生学位论文-3	硕士研究生学位论文，付凌萌
35	其他	硕士研究生学位论文-4	硕士研究生学位论文，Adama Koroma（洛黛）
36	其他	经费预算调整申请表	东南大学国家自然科学基金项目经费预算调整申请表-扫描件

NSFC-REPORT-2020