

低硒大鼠不同组织硒蛋白利用硒的优先性

张在香, 杨晓光, 田园, 夏弈明, 陈孝曙

(中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所, 北京 100050)

摘要: 硒(Se)耗竭20周的雄性Wistar大鼠分别饲以含硒为0.01、0.02、0.05和0.20mg/kg的四种饲料, 于1、3、7、14、21和35天宰杀, 动态观察不同组织中硒蛋白的变化, 了解硒耗竭后补硒时组织及硒蛋白利用硒的优先性, 由此推测它们的功能的相对重要性。结果表明硒蛋白利用硒的优先性顺序为硒蛋白P(Se-P)、脱碘酶、磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(PHGPX)、细胞外谷胱甘肽过氧化物酶(eGPX)、细胞内谷胱甘肽过氧化物酶(cGPX)和硒蛋白W(Se-W); 组织利用硒的优先性顺序首先为脑, 其次是甲状腺, 睾丸和垂体, 最后是心脏, 肾脏, 肝脏, 肌肉, 红细胞。

关键词: 硒; 硒蛋白; 优先性

中图分类号: TQ125.2 文献标识码: A

近年来研究发现硒的功能是通过硒蛋白来表现的。在目前发现的10种硒蛋白中只有cGPX的功能了解得比较清楚, 其余9种硒蛋白的功能均不完全清楚^[1]。我们通过给硒耗竭20周后的大鼠补不同剂量的硒, 动态观察分布比较广泛的7种硒蛋白, 了解它们功能的相对重要性。

1 材料与方法

1.1 动物饲料

本动物实验基础饲料为低硒酵母(torular-yeast, Rhineland Paper Co, WI, USA)配制的半合成饲料, 其组成为(%): 低硒酵母30, 玉米淀粉60.7, 花生油5, 混合无机盐3, 混合维生素1, DL-蛋氨酸0.3^[2]。每千克饲料加维生素A2500IU、维生素D250IU和维生素E60mg^[3]。向基础饲料中加不同剂量的亚硒酸钠, 使饲料硒含量分别为0.01、0.02、0.05和0.20mg/kg。两周配一次饲料, 饲料测定硒合格后喂养大鼠

1.2 动物分组及饲养

122只断乳Wistar雄性大鼠, 随机分为105只和17只两组, 分别饲以0.01及0.20mg/kg硒饲料。单笼饲养, 自由进食饮水, 每周称体重一次。于20周时两组各宰杀6只作为补硒0天时的水平。99只0.01mg/kg组大鼠再随机分成4组, 分别饲0.01、0.02、0.05

和0.20mg/kg硒饲料, 于1, 3, 7, 14, 21, 35天分批宰杀。11只0.20mg/kg硒饲料组大鼠作为适硒对照, 于1, 3, 5周宰杀。

宰杀前一天禁食禁水。乙醚麻醉大鼠, 一次性注射器取腹主动脉血, 5% EDTA抗凝(20 μ L/mL血液), 肝脏用冷生理盐水经门静脉灌流至灰白色后取出, 随后取脑、甲状腺、心脏、肾脏、睾丸和肌肉等其它器官, 用冷生理盐水漂洗后滤纸吸干, 称重分装后于液氮中速冻。血液经3000r/min离心20min分离血浆和红细胞, 分装后与其它器官于一80 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3 指标测定及方法

1.3.1 样品和饲料硒测定 采用王光亚等建立的荧光法^[4]。

1.3.2 GPX活力测定 采用夏弈明等改良的偶联法^[5]。

1.3.3 PHGPX: PHGPX底物合成采用哈鹏程等建立的方法^[6]。PHGPX活力测定参考哈鹏程和Wendel的方法^[7, 8]。

1.3.4 脱碘酶活力: T₃测定用放射免疫法, 北京北方生物技术研究所生产的三碘甲腺原氨酸T₃放射免疫分析测定盒。

1.3.5 总蛋白用双缩脲法测定。血红蛋白用高铁氰化钾法测定。

1.3.6 硒蛋白P和硒蛋白W的mRNA测定 用Northern

收稿日期: 1998-09-11; 修回日期: 2000-04-18

基金项目: 自然科学基金(39670634); 卫生部基金96-1-081资助

和狭线杂交^[9]。用TRIZOL试剂(Gibco公司产品)提取组织中的总RNA, Northern杂交的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳上样量为30 μ g总RNA, 毛细管洗脱法转膜。狭线杂交的上样量为10 μ g总RNA。用 α -³²P-dCTP标记的硒蛋白P和硒蛋白W的cDNA探针(硒蛋白P和硒蛋白W的探针分别由美国Vanderbilt大学Burk RF教授和Oregon州立大学Whanger教授馈送, 硒蛋白P的cDNA探针长度为1.2kb, 硒蛋白W的cDNA探针长度为650bp。随机引物标记试剂盒为Promega产品)进行杂交。总RNA用亚甲蓝染色法^[10]来代替常用的 β -actin。用Molecular Analyst Software对Northern杂交、狭线杂交条带(硒蛋白P或硒蛋白W的mRNA)以及亚甲蓝染色带(总RNA)进行扫描定量, 用杂交带的量除以亚甲蓝染色带量来定量硒蛋白P和硒蛋白W的mRNA相对量(%)。

1.4 数据处理

用SAS统计软件, ANOVA进行显著性检验。

2 结果

2.1 血浆eGPX活性和血浆Se水平

2.1.1 血浆eGPX活性 补0.02mg/kg硒时, 其活性无明显变化。补0.05mg/kg硒时, 它的活性增加至5周时 $P < 0.05$ 。补0.20mg/kg硒, 3天即显著升高, 3周达峰。

2.1.2 血浆硒的变化: 血浆硒的变化与eGPX活性基本相同。不同的是补0.20mg/kg硒时, 血浆硒第5周比前3周高。

2.2 红细胞cGPX活性和硒

2.2.1 红细胞cGPX活性: 其活性上升较慢, 补0.02mg/kg硒时, 升高不明显。补0.05mg/kg硒5周时为对照组的23.2%。补0.20mg/kg硒时, 第5周仅为对照组的33.7%。

2.2.2 红细胞硒的变化: 红细胞硒的变化与cGPX活性的变化不同, 红细胞硒在补硒时上升速度较慢, 但上升幅度较大。补0.02mg/kg硒3周和5周时为对照组的23%左右。补0.05mg/kg和0.20mg/kg硒5周时分别为对照组的30.9%和63.1%。

2.3 肝脏cGPX活性、I型脱碘酶(IDI)活性、硒蛋白P的mRNA水平和肝硒的变化

2.3.1 肝脏cGPX活性的变化 补0.02mg/kg硒时, 活性无明显增加。补0.05mg/kg硒5周时为对照组15%。补0.20mg/kg硒时, 活性最高时为对照组的75%。

2.3.2 肝脏IDI活性的变化 IDI的活性在补硒时上升

速度比cGPX快, 补0.02mg/kg硒5周时为对照组的41%。补0.05mg/kg硒5周时酶的活性已达到对照组的水平。补0.20mg/kg时, 2周活性与对照组无统计学差异。

2.3.3 硒蛋白P的mRNA变化: 硒蛋白P的mRNA在补硒时上升的速度比前两者都快, 在补0.05mg/kg7天和补0.20mg/kg3天时硒蛋白P的表达水平已与对照组无明显差异。

2.3.4 肝硒的变化: 0.01mg/kg组无变化。补0.02mg/kg硒时, 5周时间从对照组的15%上升到19%。补0.05mg/kg硒时, 5周期间内从对照组15%上升到30%。补0.20mg/kg硒第5周时, 已升至对照组的90%。

2.4 肾脏cGPX活、IDI活性、硒蛋白P的mRNA水平和硒的变化

2.4.1 肾脏cGPX活性的变化: 补0.02mg/kg硒时升高没有显著性。补0.05mg/kg硒5周时为对照组的30%。补0.20mg/kg硒第5周时已是对照组的107%。

2.4.2 肾脏IDI活性的变化: 其变化与cGPX活性不同, 补0.02mg/kg硒组2周时与0天有明显差异。补0.05mg/kg硒1周时已与对照组无统计学差异。

2.4.3 肾脏硒蛋白P的mRNA的变化: 其变化与IDI的活性变化一致。

2.4.4 肾脏硒变化 肾脏硒变化与硒蛋白的变化有所不同, 补0.02mg/kg硒组5周时与0天有明显差异。补0.20mg/kg硒组5周时硒水平与对照组相同。

2.5 大脑cGPX、PHGPX活性、型脱碘酶(ID)活性、硒蛋白P mRNA和硒蛋白W mRNA水平以及硒的变化

2.5.1 大脑cGPX活性的变化 补0.02mg/kg硒时, 其活性有升高的趋势, 但无统计学差异。补0.05mg/kg硒5周和补0.20mg/kg硒1周时, 其活性均达到对照组的水平。

2.5.2 大脑PHGPX活性的变化: 其反应与cGPX相似, 补0.02mg/kg硒时, 活性升高不明显。补0.05mg/kg硒5周和补0.20mg/kg硒1周时其活性均达到对照组的水平。

2.5.3 大脑ID活性的变化 其活性在补硒时变化不大(数据略)

2.5.4 大脑硒蛋白P的mRNA的变化: 脑中硒蛋白P的mRNA水平在补硒时无明显的变化(数据略)。

2.5.5 大脑硒蛋白W的mRNA水平的变化: 脑中硒蛋白W的mRNA在补硒时的变化与前几种硒蛋白不同, 补0.02mg/kg硒时, 硒蛋白W的mRNA虽有明显的升

高, 但明显低于对照组, 仅为对照组的 44%。补 0.05mg/kg 硒时, 其水平随时间逐渐升高, 5周时与对照组无统计学差异。补 0.20mg/kg 硒 2周时已升高到对照组的水平。

2.5.6 大脑硒的变化: 补硒过程中脑硒基本无变化(数据略)。

2.6 心脏cGPX活性、PHGPX活性和硒的变化

2.6.1 心脏cGPX活性的变化: 补0.02mg/kg硒5周时, 与0.01mg/kg硒组相比 $P < 0.05$ 。补0.05mg/kg硒5周时, 与0.02mg/kg硒组相比 $P < 0.05$, 但仅为对照组的47%。补0.20mg/kg硒5周时达到对照组的水平。

2.6.2 心脏PHGPX活性的变化: 补0.02mg/kg硒时它的活性明显高于0.01mg/kg组。补0.05mg/kg硒5周时活性为对照组74%。补0.20mg/kg硒3周时活性升至对照组水平。

2.6.3 心脏硒的变化: 补0.02mg/kg硒时, 升高不明显。补0.05mg/kg硒5周时为对照组的60%。补0.20mg/kg硒时, 它高于0.05mg/kg组的水平, 但为对照组水平的88%。

2.7 睾丸cGPX活性、PHGPX活性和硒的变化

2.7.1 睾丸cGPX活性的变化: 补0.02和0.05mg/kg硒时升高不明显。补0.20mg/kg硒3周时活性升至对照组水平。

2.7.2 睾丸PHGPX活性的变化: 补0.02mg/kg硒时活性升高不明显。补0.05mg/kg硒时, 其活性逐渐升高, 5周时已升至对照组水平。补0.20mg/kg硒1周已达到对照组水平。

2.7.3 睾丸硒的变化: 补0.02和0.05mg/kg硒组的睾丸硒均升高不明显。而补0.20mg/kg硒2周时硒水平

已达到对照组水平。

2.8 甲状腺cGPX和ID I的活性

2.8.1 甲状腺cGPX活性的变化: 补0.02mg/kg硒时其活性无明显增加。补0.05mg/kg硒5周和补0.20mg/kg硒2周时其活性均升至对照组水平。

2.8.2 甲状腺ID I活性的变化: 甲状腺ID I的活性在补硒时升高较快, 补0.02mg/kg硒5周、补0.05mg/kg硒1周和补0.20mg/kg硒3天时它的活性均达到对照组水平。

2.9 垂体cGPX和ID活性的变化

2.9.1 垂体cGPX活性的变化: 补0.02mg/kg硒时其活性有增加趋势, 但无统计学差异。补0.05mg/kg硒时其活性比0天时明显增高, 3周时达对照组的85%。补0.20mg/kg硒3周时达到对照组水平。

2.9.2 垂体ID活性的变化: 垂体ID活性在补0.02mg/kg硒开始2周内稍微降低, 与0天无差异, 5周时活性增高, 但无统计学意义。补0.05mg/kg硒时活性逐渐升高, 5周时已达到对照组水平。补0.20mg/kg硒2周时活性与对照组无差异。

2.10 肌肉硒蛋白W的mRNA和硒

2.10.1 肌肉硒蛋白W的mRNA: 肌肉硒蛋白W的mRNA在补0.02mg/kg硒时升高不明显。补0.05mg/kg硒时它的水平比补硒前明显升高, 但低于对照组。补0.20mg/kg硒3周时已达到对照组水平。

2.10.2 肌肉硒的变化: 补0.02mg/kg硒时肌肉硒明显增高。补0.05mg/kg硒5周与补0.02mg/kg硒5周时的硒水平基本持平。补0.20mg/kg硒时其硒水平的升高大于其它组水平, 但仍未达到对照组水平, 为对照组的70.3%。

表1 补0.05mg/kg硒饲料时各种硒蛋白达到对照组的水平的程度(%)和时间(日)

Table 1 The recovery level (%) and time (day) of selenoproteins in different tissues with supplement Se 0.05mg/kg diet

	Se	eGPX	cGPX	PHGPX	ID I	ID	Se-P	Se-W
Plasma	63%(35)	71%(35)						
RBC	31%(35)		23%(35)					
Liver	30%(35)		15%(35)		100%(3)		100%(21)	
Kidney	65%(35)		30%(35)		100%(14)		100%(14)	
Brain	100%(0)		100%(35)	100%(21)		100%(0)	100%(0)	100%(35)
Heart	60%(35)		47%(35)	74%(35)				
Testis	92%(35)		52%(35)	100%(35)				
Thyroid			100%(5)		100%(7)			
Pituitary			85%(35)			100%(35)		
Muscle	42%(35)							51%(35)
Bone	60%(35)							

3 讨论

通过对补硒不同剂量和时间时大鼠不同组织中各种硒蛋白的变化我们可以看出补硒时所有器官的所有硒蛋白都有所升高,但升高的程度和顺序不同。通过一种组织器官中不同硒蛋白的变化我们可以得出硒蛋白利用硒的优先性,即硒蛋白相对功能的重要性;同一种硒蛋白在不同组织器官的升高的先后我们可以判断组织器官的利用硒的优先性。

从本实验结果我们可以看出随着补硒剂量的增大,组织硒和硒蛋白水平升高的速度加快。组织硒升高的速度和程度同硒蛋白的变化不完全相同,这是由于每种组织中都有多种硒蛋白并且还有一些未确定的硒蛋白,同时亦可能存在有储存形式的硒。

由表 1 可知,在各种组织器官中 cGPX 的活性的升高落后于其它硒蛋白,提示其它硒蛋白的功能相对 cGPX 更重要。cGPX 在不同组织器官中升高的速度和程度也不同,补硒 0.05mg/kg 时除脑和甲状腺外其余组织中均未达到适硒对照组的水平,而在这两种组织中均在 5 周时达到对照组的水平,在其它组织中升高速率由高到低的顺序为垂体,睾丸,心脏,肾脏,红细胞和肝脏。补硒 0.20mg/kg 时它升高的顺序在各种组织器官中与补 0.05mg/kg 时基本相同。我们都可以看出它在脑中达到适硒对照组水平较其它组织优先,

其次为甲状腺,垂体和睾丸,心脏和肾脏,肝脏,红细胞。

PHGPX 在补硒 0.05mg/kg 和 0.20mg/kg 时在不同组织器官中的升高顺序为脑,睾丸,心脏。ID I 在不同组织器官中的升高顺序为甲状腺,肾脏,肝脏,而 ID 的升高顺序则为脑,垂体。

硒蛋白 P 的 mRNA 在补硒 0.05mg/kg 饲料时升高的先后顺序为脑,肾脏,肝脏,在补硒 0.20mg/kg 饲料时升高的顺序却为脑,肝脏,肾脏。肝脏和肾脏的顺序变化的原因不清。硒蛋白 W 的 mRNA 在补不同剂量硒时的顺序均为脑先于肌肉。从以上各种硒蛋白在不同组织器官的升高顺序可以知道脑中各种硒蛋白的硒利用都优先于其它组织,其次是甲状腺,睾丸和垂体,最后是心脏,肾脏,肝脏,肌肉,红细胞。

从各个组织器官看,脑中硒蛋白 P 和 II 型脱碘酶先于 PHGPX,随后是 cGPX,最后是硒蛋白 W。在肝脏中补硒时硒蛋白优先升高的顺序为硒蛋白 P, ID I,最后是 cGPX。在甲状腺和垂体中 ID I 和 ID 优先于 cGPX。在心脏和睾丸中 PHGPX 优先于 cGPX。由此我们可以知道补硒时硒蛋白利用硒的优先性顺序为硒蛋白 P, 脱碘酶, PHGPX, eGPX, cGPX 和硒蛋白 W,从而可以推测出它们功能的相对重要性顺序,为较先研究功能相对重要的硒蛋白提供线索。

参考文献:

- [1] Burk RF, Hill KE. Regulation of selenoproteins[J]. Annu Rev Nutr, 1993, 13: 65-81.
- [2] 白锦,葛可佑,邓学俊. 硒摄入量对柯萨奇病毒引起小白鼠实验性心肌坏死的影响[J]. 营养学报, 1982, 4(3): 235-241.
- [3] Deagen JT, Butler JA, Whanger PD, et al. Effects of dietary selenite, selenocystine and selenomethionine on selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues[J]. J Nutr, 1987, 117: 91-98.
- [4] 王光亚,周瑞华,孙淑庄,等. 生物样品、水及土壤中痕量硒的荧光测定法[J]. 营养学报, 1985, 7(1): 39-45.
- [5] Xia Y, Hill KE, Burk RF. Biochemical studies of a selenium deficient population in China: Measurement of selenium, glutathione peroxidase and other oxidant defense index in blood[J]. J Nutr, 1989, 119: 1318-1326.
- [6] 哈鹏程,夏弈明. PHGPX 底物合成及其活力测定方法的研究(I) [J]. 卫生研究, 1995, 24(3): 162-165.
- [7] 哈鹏程,夏弈明. PHGPX 底物合成及其活力测定方法的研究(II) [J]. 卫生研究, 1995, 24(2): 97-100.
- [8] Weitzel F, Ursini F, Wendel A. Phospholipid hydroperoxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion[M]. Biochem Biophys Acta, 1990, 88-94.
- [9] 金冬雁,黎孟枫,等译. 分子克隆实验指南 第二版 [M]. 北京:北京科学出版社, 1992. 372-373.
- [10] Savonet V, Maenhaut C, Pirson I, et al. Notes & Tips. pitfalls in the use of several housekeeping genes as standards for quantitation of mRNA: The example of thyroid cells[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 247: 165-167.

Preference of selenium incorporating into selenoproteins in different tissues in selenium depleted rats

ZHANG Zai-xiang, YANG Xiao-guang, TIAN Yuan, et al

(Institute of Nutrition and Food Hygiene Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China)

Abstract: Four different selenium (Se) level diets which contained 0.01, 0.02, 0.05, 0.20 mg/kg diet were fed to male weanling Wistar rats which were depleted of selenium for 20 weeks. The rats were killed at 0, 1, 3, 7, 14, 21 and 35 day of selenium repletion to observe the kinetic change of tissue Se concentration, the activities of cellular glutathione peroxidase (cGPX), extracellular glutathione peroxidase (eGPX), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX), type I deiodinase (IDI), type deiodinase (ID), and the mRNA level of selenoprotein P and selenoprotein W so that we can know the preference of Se incorporating into selenoprotein. The results showed that selenoprotein P was expressed in preference to deiodinase, the preferential order was followed by PHGPX, eGPX, cGPX and selenoprotein W during Se repletion and the order for organs was brain, thyroid, testis, pituitary, heart, kidney, liver, muscle and red blood cell.

Key words: selenium; selenoprotein; preference

(上接第 67 页)

Ultraviolet Blood Irradiation and Oxygenation Affect Blood Circulation after Rabbit Spinal Cord Injury

DONG Ying-hai, SHOU Tian-de, ZHOU Yi-feng, et al

(School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230027, China)

Abstract: In order to study the mechanism of ultraviolet blood irradiation and oxygenation (UBIO) on blood circulation, rabbits were divided randomly into the control group, the injured group and the treated group after incompletely spinal cord injury were stroked with modified Allen's system. The content of TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} and ET-1 in blood and spinal cord tissues, as well as the volume of blood flow of gray matter, white matter and total in spinal cord tissues were separately determined. The experiment found that the content of elevated TXB₂, descending 6-keto-PGF_{1α} and elevated ET-1 in blood and spinal cord tissues, as well as the descending volume of blood flow of gray matter, white matter and total in spinal cord tissues were discovered in the injured group. After treatment with UBIO, the content of descending TXB₂, elevated 6-keto-PGF_{1α} and descending ET-1 in blood and spinal cord tissues, as well as the elevated volume of blood flow of gray matter, white matter and total in spinal cord tissues were discovered. The experiment shown that UBIO may improve the blood circulation all over the body and spinal cord tissues.

Key words: ultraviolet therapy; blood transfusion; autologous; spinal cord injury; blood circulation