

文章编号:1001-0580(2002)08-0915-03

【论 著】

硒对氧自由基引起大鼠脑线粒体损伤的影响*

华东师范大学生命科学学院(上海 200062) 高良才 陈婉蓉 田翠平 傅中滇
上海市预防医学研究所 阮素云

摘要:目的 探讨硒对氧自由基引起的大鼠脑线粒体损伤的影响。方法 采用 Fe^{2+} - 半胱氨酸(Cys)为氧自由基生成系统,在体外模仿脑出血或脑外伤引起的氧自由基损伤模型,观测不同浓度($5.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \mu\text{mol/L}$)亚硒酸钠对 Fe^{2+} - Cys 致损伤脑线粒体的肿胀程度、膜流动性、MDA 含量以及线粒体形态结构的影响。结果 低浓度硒($5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$)可明显防止氧自由基对线粒体的损伤,高浓度硒($0.5 \sim 5.0 \mu\text{mol/L}$)则产生毒性作用,二者均至剂量-效应关系。结论 低浓度硒有利于延缓衰老和防治某些神经系统疾病。

关键词:硒;氧自由基;线粒体;透射电镜

中图分类号:R114 文献标识码:A

Effects of Selenium on Oxygen Free Radical Induced Injury of Rat Cerebral Mitochondria GAO Liangcai, CHEN Wanrong, TIAN Cunping, et al. School of Life Science, East China Normal University (Shanghai 200062, China)

Abstract: **Objective** The effects of selenium on oxygen free radical inducing injury of rat cerebral mitochondria were investigated. **Methods** The oxygen free radicals (OFRs) injured cerebral mitochondria induced by Fe^{2+} - Cys in vitro were exposed to $5.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 and the changes of injured mitochondria swelling, membrane fluidity, MDA levels and mitochondria structures were observed. **Results** Low Se concentration ($5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$) can inhibit the injury of rat cerebral mitochondria induced by oxygen free radicals while high Se concentration ($0.5 \sim 5.0 \mu\text{mol/L}$) cause toxicity and both are with a relationship of dose - dependent response. **Conclusion** Low Se concentration is helpful to delay aging and against nervous disease.

Key words: selenium; oxygen free radicals; mitochondria; transmission electron microscope

自由基学说是现代衰老理论中最具代表性的学说。许多因素都能引起脑组织中氧自由基的生成和释放,如衰老、缺血再灌、脑外伤及颅内出血等。活泼的氧自由基与细胞膜、蛋白质、核酸等大分子反应会引起一系列生理和病理改变。自由基的氧化损伤是导致机体老化及许多老年性疾病的重要因素。某些中枢神经系统疾病也与氧自由基损伤有关。硒作为人体必需的微量元素,已报道具有抗氧化、增强机体免疫力等功能。本实验以大鼠脑线粒体为材料,以 Fe^{2+} - Cys 为氧自由基生成系统,观察硒对氧自由基致脑线粒体损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 体重 $200 \pm 20\text{g}$, 雄性 SD 大鼠,由复旦大学医学院实验动物中心提供。

1.2 线粒体的制备 用蔗糖梯度离心法制备线粒体。取大鼠脑组织,以 0.32mol/L 介质制成匀浆, $4\ 800\text{r/min}$ 离心 15min ,取上清 $11\ 000\text{r/min}$ 离心 30min ,取沉淀以蔗糖介质重悬。所有操作均在 4°C 进行。

1.3 蛋白含量测定 Follin 酚法。

1.4 线粒体肿胀测定 以 0.1mol/L PBS(pH7.4)为缓冲体系,反应液 1ml 含线粒体蛋白 0.5mg , FeSO_4 (Fe^{2+}) $50\mu\text{mol/L}$, Cys $200\mu\text{mol/L}$ 和不同浓度的 Se, 37°C 水浴 25min ,每隔 5min 于 520nm 处测一次吸光度,吸光度降低与线粒体肿胀程度成正比。

1.5 丙二醛(MDA)含量测定 以 0.1mol/L 组氨酸溶液(溶于 0.15mol/L KCl 中, pH7.5)为缓冲体系,反应终体积 1ml 含线粒体蛋白 0.5mg , FeSO_4 (Fe^{2+}) $50\mu\text{mol/L}$, Cys $200\mu\text{mol/L}$ 和不同浓度的 Se, 37°C 水浴 30min 后加入 20% 三氯乙酸 1ml 终

止反应,用硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 含量。

1.6 膜流动性的测定 以 0.1mol/L PBS(pH7.4)为缓冲体系,反应液 1ml 含线粒体蛋白 0.5mg , FeSO_4 (Fe^{2+}) $50\mu\text{mol/L}$, Cys $200\mu\text{mol/L}$ 和不同浓度的 Se, 37°C 水浴 30min , $10\ 000\text{g}$ 离心取沉淀,以 3ml PBS 重悬,迅速测定荧光偏振度(P) (激发波长 360nm , 发射波长 430nm),利用 P 计算膜的微粘度(η), $\eta = 2 \times P / (0.46 - P)$ 。值与膜的流动性呈反比。

1.7 透射电镜观察 以 0.1mol/L PBS(pH7.4)为缓冲体系,反应液 1ml 含新鲜制备的线粒体蛋白 0.5mg , FeSO_4 (Fe^{2+}) $50\mu\text{mol/L}$, Cys $200\mu\text{mol/L}$ 和不同浓度的 Se, 37°C 水浴 30min 后 $20\ 000\text{g}$ 离心取沉淀, 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,常规乙醇梯度脱水, 618 环氧树脂包埋,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,超薄切片。用 JEM-100CX 透射电镜观察摄片。

1.8 数据处理 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验比较组间显著性差异。

2 结果

2.1 不同浓度硒对 Fe^{2+} - Cys 引起线粒体肿胀的影响 与 Fe^{2+} - Cys 共孵育后线粒体的肿胀程度明显增加;预先加入 $5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ 硒可显著抑制线粒体肿胀, $5 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$ 硒抑制效果不明显;高浓度硒 ($5.0 \mu\text{mol/L}$) 开始可抑制线粒体肿胀,随着时间延长,线粒体则迅速肿胀(图 1)。

2.2 不同浓度硒对 Fe^{2+} - Cys 引起线粒体 MDA 变化的影响 与 Fe^{2+} - Cys 共同温孵 30min 后线粒体的 MDA 含量显著增加;预先加入低浓度硒能明显抑制 Fe^{2+} - Cys 引起的线粒体 MDA 生成且呈剂量-效应关系,其中硒的浓度为 $5 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 时,MDA 生成抑制作用最明显,硒浓度过高或过低,抑制作用均不明显(表 1)。

*国家自然科学基金资助项目(No. 39670637)

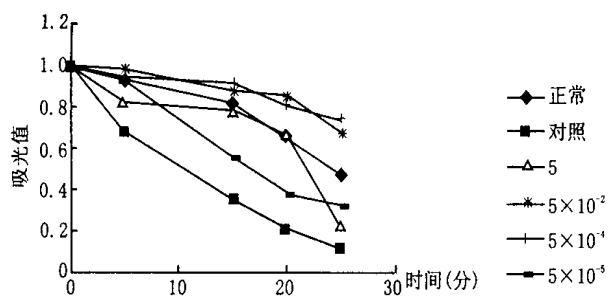


图 1 不同浓度硒对 Fe²⁺ - Cys 引起线粒体肿胀的影响

表 1 不同浓度硒对 Fe²⁺ - Cys 引起线粒体 MDA 变化的影响 (n = 5)

组别	硒(μmol/L)	Fe ²⁺ - Cys	MDA (nmol/mg pro)	抑制率 (%)
正常	-	-	1.41 ±0.12	
对照	-	+	4.12 ±0.15 *	
加硒	5.0	+	3.95 ±0.21	4.13 %
	0.5	+	3.54 ±0.15 #	14.08 %
	5.0 ×10 ⁻²	+	2.90 ±0.17	29.61 %
	5.0 ×10 ⁻³	+	2.84 ±0.15	31.07 %
	5.0 ×10 ⁻⁴	+	3.06 ±0.18 #	25.73 %
	5.0 ×10 ⁻⁵	+	3.93 ±0.29	4.61 %

与正常组比较, * P < 0.01, 与对照组比较 # P < 0.05, P < 0.01

2.3 不同浓度硒对 Fe²⁺ - Cys 引起线粒体膜流动性变化的影响 线粒体与 Fe²⁺ - Cys 共同温孵 30min 后膜的流动性显著下降,微粘度明显升高,加入低浓度硒可明显抑制 Fe²⁺ - Cys 的损伤作用,使膜的流动性趋于正常,且低浓度硒的作用优于高浓度硒(表 2)。

表 2 不同浓度硒对 Fe²⁺ - Cys 引起线粒体膜流动性变化的影响 (n = 5)

组别	硒(μmol/L)	Fe ²⁺ - Cys	
正常	-	-	1.78 ±0.21
对照	-	+	2.78 ±0.13 *
加硒	5.0	+	2.50 ±0.16 #
	0.5	+	2.29 ±0.17
	5.0 ×10 ⁻²	+	1.74 ±0.29
	5.0 ×10 ⁻³	+	1.73 ±0.12
	5.0 ×10 ⁻⁴	+	1.98 ±0.22
	5.0 ×10 ⁻⁵	+	2.79 ±0.10

与正常组比较 * P < 0.01, 与对照组比较 # P < 0.05, P < 0.01

2.4 不同浓度硒对 Fe²⁺ - Cys 引起线粒体形态结构变化的影响 透射电镜观察可见,正常的线粒体外膜完整,内嵴排列整齐(图 A)。Fe²⁺ - Cys 致损伤线粒体明显肿胀、外膜破裂、空泡化严重,内嵴断裂脱落并缩成微环(图 B)。预先加入低浓度硒(5 ×10⁻² μmol/L)对线粒体的结构完整性具有较好的保护作用,空泡化减少,微环少见(图 C)。过低浓度硒(5 ×10⁻⁵ μmol/L)和高浓度硒(5 μmol/L)的保护作用均不明显,其中高浓度硒产生毒性作用,线粒体空泡化严重(图 D)。

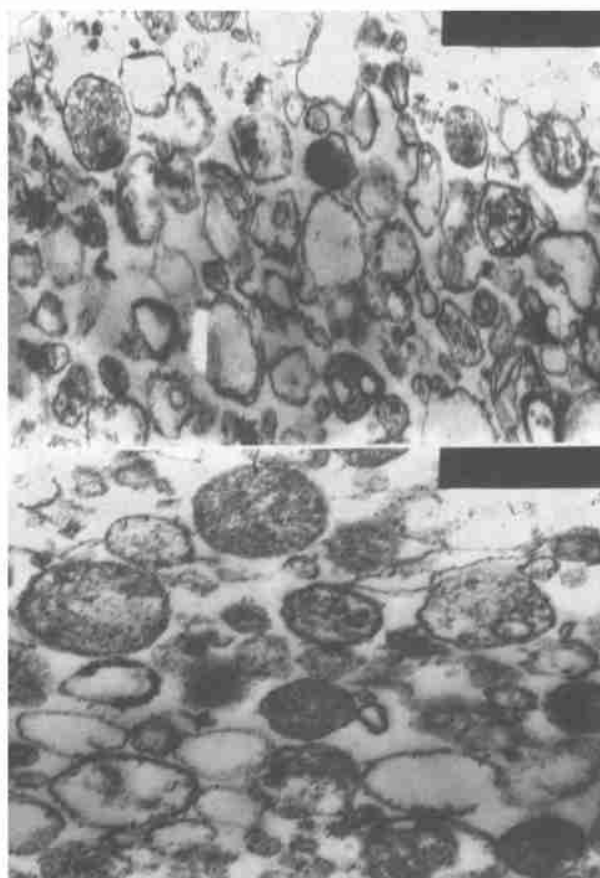
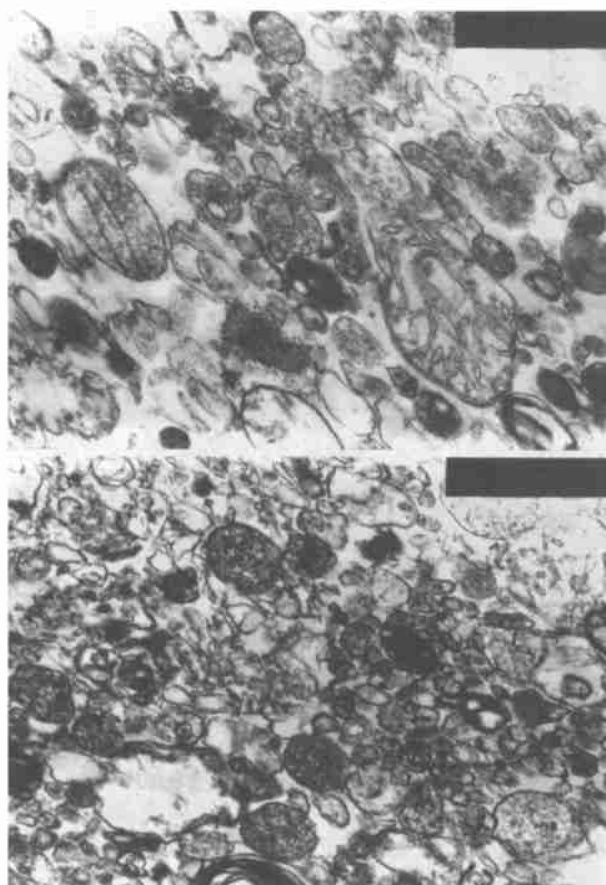


图 A:正常线粒体(×27 000);图 B:Fe²⁺ - Cys 致损伤线粒体(×40 000);
图 C:加入 5 ×10⁻² μmol/L 硒的线粒体(×27 000);图 D:加入 5 μmol/L 硒的线粒体(×40 000)
图 2 大鼠脑线粒体的透射电镜照片

3 讨论

与其它组织相比,脑组织产生氧自由基的机会较多,能力较强,但脑细胞清除自由基及修复损伤的能力较弱,对各种不良因素十分敏感,故更易受到自由基的损伤,从而诱发各种老年性疾病,因此外来的抗氧化剂对脑组织氧化应激损伤的保护作用尤为重要^[1,2]。线粒体是细胞内能量代谢的主要场所,其膜上富含多不饱和脂肪酸,使得线粒体成为自由基攻击的主要靶部位^[3]。由于异常的线粒体可以产生大量的氧自由基,所以细胞老化首先表现为线粒体老化。

本实验采用 Fe^{2+} -Cys 作为氧自由基生成系统,从生化和形态学角度体外观察硒的抗氧化作用。结果显示 Fe^{2+} -Cys 可引起大鼠脑线粒体肿胀,脂质过氧化物 MDA 的生成增加,膜流动性下降,电镜下观察到线粒体严重水肿乃至外膜破裂、空泡化明显,内嵴断裂脱落并与被损伤的线粒体 DNA 一起聚集成形状大小不一的斑块,称之为“微环”,此为衰老线粒体的主要特征。我们在另一项研究中的衰老动物模型中也观察到线粒体的水肿、空泡化和“微环”。预先加入低浓度范围的硒对上述变化有明显的抑制作用,提示硒在脑保护方面具有潜在的应用价值。实验结果还显示,高浓度硒对线粒体损伤的保护作用比低浓度硒弱,此结果与我们曾研究的硒对神经细胞的增殖和分化的影响的结果是一致的^[4]。其原因与过高浓度硒的细胞毒有关,我们已作过有关报道^[5]。

线粒体膜的流动性与其功能密切相关,为膜上受体、离子通道、钙泵等发挥正常作用所必需。已有研究表明^[6],氧自由基脂质过氧化使膜的流动性降低,使神经细胞间的信号传递和细胞离子梯度的维持等无法正常进行,影响到神经细胞的功能。硒是机体重要的抗氧化酶——谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的组成成分,适当浓度硒通过提高抗氧化酶活性而保护线粒体免受氧化损伤,可延缓脑神经细胞及线粒体的老化。

作者简介:高良才(1976-),男,福建人,在读硕士,研究方向:细胞生化与药理学。

参 考 文 献

- [1] 曾昭惠,张宗玉. 自由基对线粒体 DNA 的氧化损伤与衰老[J]. 生物化学与生物物理进展,1995,22(5):429-432.
- [2] Evans PJ, Hilf A. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues[J]. Anal Biochem,1976,74:214.
- [3] Boffoli D, Scacco S C, Vergari R G, et al. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle, *Bilchim*[J]. *Bio-phys. Acta*,1994,1226:73-82.
- [4] 陈婉蓉,鲁心安,傅中滇,等. 硒对大鼠胚胎神经细胞增殖和分化的影响[J]. 中国公共卫生,2000,16(11):992-994.
- [5] 吴建民,陈婉蓉,傅中滇,等. 亚硒酸钠诱发大鼠胚胎中脑神经细胞凋亡的观察[J]. 卫生毒理学杂志,2001,15(1):11.
- [6] Chio J H, Byung P Y. Brain synaptosomal aging: Free radicals and membrane fluidity[J]. *Free Rad Biol med*,1995,18:133.

(2001-06-11 收稿 郭长胜编辑 刘铁校对)

文章编号:1001-0580(2002)08-0917-01

【研究简报】

血清 GPDA 活性与甲胎蛋白及肝癌关系

刘伶¹ 曹咏² 万冰³

中图分类号:R115

文献标识码:B

本文采用日立 7170 型全自动生化分析仪动态分析法对肝癌正常人血清中 GPDA 活性并进行比较,以探索血清中 GPDA 活性与 AFP(甲胎蛋白)测定结果互补对肝癌诊断鉴别的临床价值。结果简要报告如下。

对象与方法 (1)研究对象: 原发性肝癌组 51 例,男 44 例,女 7 例,年龄 28~74 岁,平均年龄 47.5 岁。继发性肝癌组 32 例,男 28 例,女 4 例,年龄 29~75 岁,平均年龄 48 岁。以上以上两组每例均符合 1997 年全国肝癌防治协作会议诊断标准。肝血管瘤组 57 例,男 52 例,女 5 例,年龄 30~68 岁,平均年龄 42 岁。此组病人为临床确诊的术前或术后病人。正常组 95 例,男 72 例,女 23 例,年龄 27~75 岁,平均年龄 46.8 岁。此组是经体检、化验确认为健康的正常者。(2)方法: 血清中 GPDA 活性测定采用上海长征医学有限公司的试剂盒并在日立 7170 型全自动生化分析仪上进行测定,正常值为 44~116U/L, >200U/L 为原发性肝癌诊断标准(阳性)。操作按试剂说明书中动态分析法进行。AFP 测定采用郑州博赛生物技术研究所的单克隆抗体酶免诊断试剂盒(阳性 >400mg/ml,阴性,20mg/ml),操作方法按说明书进行。血清标本收集:全部病例及正常人均清晨空腹抽静脉血,2 小时内离心,血清存放于 -20 度冰箱内待检。

结果 (1)原发性、继发性肝癌组 GPDA 活性明显高

于正常组,肝血管瘤组 GPDA 活性在正常范围。见表 1。

表 1 各组受检血清 GPDA 活性($\bar{x} \pm s$)及阳性率(%)

组别	例数	GPDA 活性	可疑数	阳性数	阳性率	t	P
原发性肝癌	51	274.6+148.8	9	32	62.75	2.428	<0.01
继发性肝癌	32	267.2+131.5	6	22	68.75	2.444	<0.01
肝血管瘤	57	87.36+32.28	1	0	0	1.032	>0.05
正常	95	80.95+31.45	0	0	0	—	—

(2)原发性肝癌 GPDA 阳性率为 62.75%,AFP 阳性率为 64.71%,两者互补阳性率为 86.27%。其中 33 例 AFP 阳性和 18 例 AFP 阴性的患者血清中 GPDA 阳性分别为 21 例(占 63.64%)和 11 例(占 61.11%)。在 AFP 阴性和阳性的原发性肝癌患者中血清 GPDA 的活性和阳性率无明显差异($P>0.05$)。

讨 论 临床上,AFP 是原发性肝癌诊断最特异的标记物之一,阳性率约为 60~70%。但并非所有的肝癌细胞都分泌大量的 AFP,约有 30~40%的原发性肝癌患者 AFP 表现为假阳性结果,单测 AFP 有漏诊的可能。本研究结果表明,AFP 阳性率与 GPDA 阳性率两者互补,可以大大提高原发性肝癌的检出率。开展血清 GPDA 检测,可提高原发性肝癌诊断的准确性,起到良好的互补作用,尤其对 AFP 阴性的原发性肝癌患者意义更大。对于影像学诊断为肝脏占位性病变的患者检测其 GPDA 活性,具有良好的定性鉴别作用。血清 GPDA 活性是一项有使用价值的临床指标,对原发性肝癌诊断具有特异性,可成为原发性肝癌诊断的新标记物。

(2002-07-08 收稿 郭长胜编校)

1. 辽宁丹东市第一医院(118000)
2. 沈阳市第四医院
3. 沈阳市第八医院