

硒的抗自由基损伤作用

江岩 钟国赣 赵春燕 岳刚
李云义 孙晓霞 张文杰 王小明

(白求恩医科大学 长春 130021)

摘要 用黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系或低硒饲料诱发自由基损伤。在培养的鼠心肌细胞上, 硒能使受损心肌细胞的自由基含量、超微结构、动作电位、膜输入阻抗恢复正常; 在离体灌流的鼠心上, 硒能改善受损心脏的心肌收缩性能; 硒能使受损鼠的心硒含量与肝谷胱甘肽过氧化物酶(GSH_{px})活力回升、肝过氧化脂质(LPO)含量下降。上述结果提示硒保护作用的基本机制可能与增强 GSH_{px} 活力、促进自由基清除有关。

关键词 硒 动作电位 膜输入阻抗 心肌收缩性能 超微结构 自由基

缺硒与衰老、癌症等多种疾病有关^{〔1〕}。本实验拟从自由基代谢角度探讨硒的广泛作用的基本机理。

材料与方 法

心肌细胞培养^{〔2〕} 新生 Wistar 大鼠的心肌细胞分 3 组培养: 对照组培养基为 80% DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)+20% 小牛血清; 加酶组于实验前 16d 向上述培养基中加入 0.42mmol/L 黄嘌呤与 5.3nmol/L 黄嘌呤氧化酶 (X-XO); 酶硒组在培养及观察全过程中向培养基中加硒 0.173 μ g/ml, 其它同加酶组。

整体动物准备 27 只断乳 Wistar 大鼠分 5 组: 对照组饲常规饲料, 含硒 0.041ppm; 低硒组饲低硒饲料, 含硒 0.013ppm; 补硒组将亚硒酸钠掺入低硒饲料, 含硒量 0.061ppm; 加酶组于实验前连续 3d 注射黄嘌呤 6.4mg \cdot 100g⁻¹ \cdot d⁻¹、黄嘌呤氧化酶 0.1U \cdot 100g⁻¹ \cdot d⁻¹; 酶硒组除与加酶组同样注射 X-XO 外, 于实验观察前连续两周注射亚硒酸钠, 补硒量为 4.9 μ g \cdot 100g⁻¹ \cdot d⁻¹。

离体心脏灌流 上述 3 组动物饲喂两个月后, 断髓取心, 制备工作心脏。做左心室插管, 记录左室内压; 在右心房与心尖部安置电

极, 引导心电。自相应处的侧管测量主动脉与冠脉流量。

心肌细胞膜输入阻抗测定 两个微电极分别插入同一个心肌细胞群落的两个心肌细胞内, 两电极尖端相距 100~120 μ m, 共用的参考电极置于培养基中。当两电极同时导出完全重叠的两个动作电位时, 表示两者均已插入细胞。然后, 用其中一个电极注射电流 (I), 另一个记录 I 跨膜流动所致的膜电位改变 (ΔV)。算出心肌细胞膜的输入阻抗 (R_{inp}), $R_{inp} = \Delta V / I$ 。

超微结构观察 将培养的心肌细胞机械脱壁、离心, 使心肌细胞堆积成块。按常规进行固定、包埋、超薄切片后, 用 JEM-1200EX 电镜做透射电镜观察。

自由基含量测定 将培养的心肌细胞置入石英样本管内, 在液氮环境中用 ER200D-SRC 电子自旋共振 (ESR) 仪测定自由基含量。

心肌细胞动作电位记录、心脏硒含量、肝脏过氧化脂质 (LPO) 含量与谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH_{px}) 活力测定参照文献 [4~7]。

结 果

心肌细胞动作电位与膜输入阻抗 在培养

4~10d 时进行。用微机联机分析动作电位参数。从表 1 可见, 加酶组动作电位参数与膜输

入阻抗减小, 硒使所有数值回升。图 1 为动作电位与膜输入阻抗的典型记录。

Table 1. X-XO and Se on electric parameters of rat heart cells (mean \pm SD)

Parameter	Control group	X-XO group	X-XO+Se group
APA (mV)	66.0 \pm 9.9 (60)	55.1 \pm 8.0 (63)***	65.9 \pm 6.4 (21)###
OS (mV)	21.9 \pm 3.9 (60)	18.0 \pm 4.4 (63)**	21.6 \pm 5.0 (21)##
MDP (mV)	44.1 \pm 7.8 (60)	37.1 \pm 5.1 (63)**	44.3 \pm 9.2 (21)###
TP (mV)	28.0 \pm 6.6 (60)	22.4 \pm 4.6 (63)**	27.2 \pm 9.6 (21)##
V _{max} (V/s)	19.8 \pm 9.9 (60)	9.5 \pm 3.9 (63)**	13.0 \pm 3.7 (21)####*
APD ₅₀ (ms)	87.2 \pm 21.9 (60)	78.6 \pm 18.5 (63)*	89.4 \pm 24.5 (21)##
APD ₉₀ (ms)	143.5 \pm 36.9 (60)	126.3 \pm 42.3 (63)*	161.3 \pm 57.7 (21)###
R _{inp} (M Ω)	0.338 \pm 0.11 (23)	0.244 \pm 0.10 (23)**	0.414 \pm 0.11 (23)####*

Figures in the parentheses are numbers of penetrations. APA = amplitude of action potential. OS = overshoot. MDP = maximal diastolic potential. TP = threshold potential. V_{max} = maximal rate of depolarization. APD₅₀, APD₉₀ = action potential duration at 50%, 90% depolarization. R_{inp} = membrane input resistance. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs control. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs X-XO group.

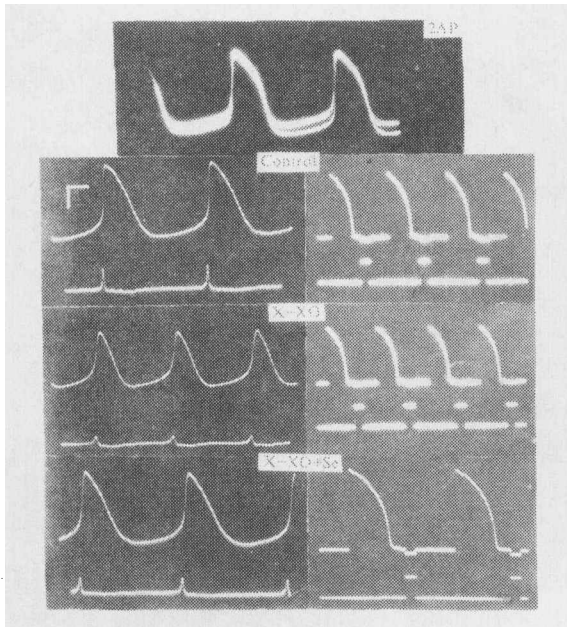


Fig 1. Typical recordings of cardiomyocyte action potentials and membrane input resistances. Horizontal bar = zero line, 100 ms. Vertical bar = 20 mV, 10 nA. 2AP = 2 superimposed action potentials from 2

microelectrodes. Control = control group. X-XO = enzyme group. X-XO+Se = enzyme+Se group. Left part (action potential recordings); upper trace = action potential, lower trace = dV/dt of action potential. Right part (membrane input resistance measurements); upper trace = membrane input resistance, lower trace = injected current.

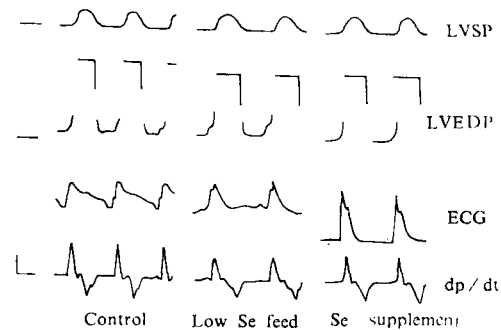


Fig 2. Intraventricular pressure recordings of isolated working rat hearts. Horizontal bar = zero line, 0.1 s. Vertical bar = LVSP 13.33 kPa, LVEDP 1.333 kPa, ECG 1 mV, dp/dt 266.6 kPa \cdot s⁻¹.

Table 2. Low Se feed and Se on contractility of isolated rat heart (mean ± SD)

Group	n	CO (ml · g ⁻¹ · min ⁻¹)	SV (ml / g)	+dP / dt _{max} (kPa / s)	-dP / dt _{max} (kPa / s)
Control	6	55.5 ± 7.5	0.257 ± 0.02	422.3 ± 24.4	273.2 ± 35.0
Low Se feed	6	46.9 ± 6.6	0.198 ± 0.02 ^{***}	311.5 ± 27.7 ^{***}	248.8 ± 41.2
Se supplement	6	57.1 ± 10.3 [#]	0.254 ± 0.06 [#]	403.7 ± 43.2 ^{##}	273.3 ± 36.1

*** p < 0.001 vs control. # p < 0.05, ## p < 0.01 vs low Se feed group.

Table 3. Cardiac Se and liver GSH_{px}, LPO contents of rats (mean ± SD)

Group	Se(ppm)	GSH _{px} (IU / g)	LPO(nmol / g)
Control	0.60 ± 0.10 (7)	13.0 ± 3.4 (6)	764 ± 63 (5)
Low Se feed	0.37 ± 0.05 (8) ^{***}	6.2 ± 0.6 (6) ^{***}	924 ± 74 (5) ^{**}
Se supplement	1.09 ± 0.11 (8) ^{***###}	36.1 ± 1.7 (8) ^{***####}	642 ± 95 (5) ^{*#}

Figures in the parentheses are numbers of samples. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs low Se feed group. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs control group.

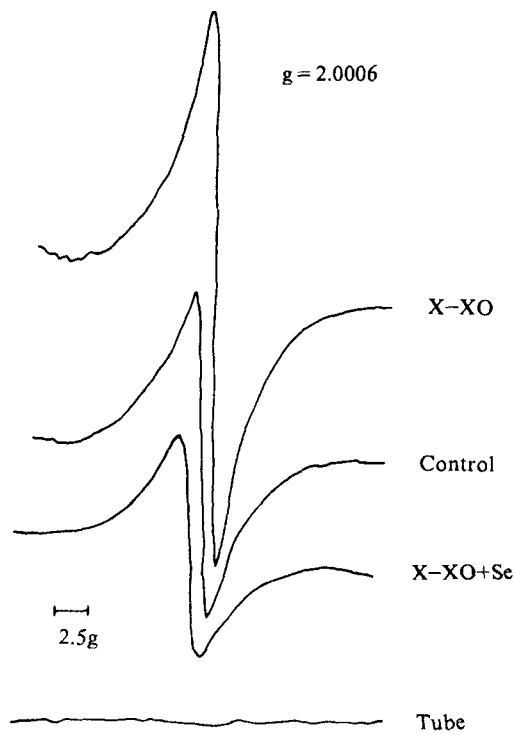


Fig 3. ESR spectra of cultured rat heart cells. Test conditions: temperature 96 K, microwave frequency 9.53 GHz, microwave power 17 dB 4.1 mW, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 32 G, gain 2.5×10^5 .

心肌细胞的超微结构 对照组肌丝排列整齐、肌节及Z线明显、可见糖原颗粒、线粒体基本正常；加酶组肌节消失、肌丝断裂、线粒体肿胀空泡化、出现致密颗粒；酶硒组与对照组相似。

心肌收缩性能 用RM6000型八导生理记录仪，每10min描记一次工作心脏的心电、左室内压、主动脉流量与冠脉流量。据此得出室内压最大升降速率 ($\pm dP / dt_{max}$)、每搏输出量 (SV)、心输出量 (CO)。表2为灌流10min时的数值，可见低硒组各项指标降低、补硒组各项指标均有回升。离体工作20、30、40min时的数值表明，灌流时间越长，低硒组的收缩性能下降越剧烈，与其它两组的差异越大。图2为离体工作10min时的典型记录。

ESR测定 图3为培养5d的心肌细胞谱线。各组谱线的线形、线宽相似，g值相同。从谱线幅度可见，加酶组的自由基含量高于对照组，而酶硒组则低于对照组。

各组动物在体心肌的ESR谱线线形、线宽亦相似，g值均为2.0001。加酶组、低硒组、补硒组谱线幅度 (mm / g干重心肌) 分别为70.1、79.1、56.6。可见X-XO与低硒饲料都能使心肌自由基含量上升，而硒能有效地

使之降低。

生化测定 如表 3 所示, 与对照组比较, 低硒组心 Se 与肝 GSH_{px} 活力降低、肝 LPO 增多; 补硒组的 Se、GSH_{px} 回升, LPO 减少。

讨 论

已知 X-XO 反应系统中可产生超氧阴离子自由基, 从而始动自由基链锁反应, 导致自由基损伤⁽⁸⁾。GSH_{px} 是体内重要的自由基清除酶, 硒是其活性中心⁽⁹⁾。因此本实验用 X-XO 与低硒饲料, 分别从促进自由基形成与减少自由基清除角度, 增加自由基含量。

在本实验中, 低硒组心肌收缩性能下降, 补硒使之回升, 提示低硒饲料对心脏有损伤作用, 硒能对抗低硒饲料的致损作用。

在自由基损伤时, 心肌细胞膜的脂质降解、断裂, 烷过氧基簇形成以钙通透性为主的非特异性离子通道⁽¹⁰⁾。因之, 使膜电导加大、膜电阻减小; 使膜内外离子分布紊乱、膜除极化; 使 [Ca²⁺]_i 增高、抑制 Ca²⁺ 通道开放。从而全面抑制培养心肌细胞的慢反应动作电位, 呈心肌细胞膜损伤的典型电位表现⁽⁴⁾。因此, 加酶组动作电位各参数与 R_{inp} 减小, 硒使之恢复正常。表明 X-XO 诱发、硒对抗心肌细胞膜的自由基损伤。

电镜下直接看到了 X-XO 对心肌细胞的损伤及硒的抗损伤作用。

ESR 测定确切证明了 X-XO、低硒饲料使心肌及心肌细胞自由基含量增多, 硒使之减少。

自由基与 LPO 的含量同时增减, 符合自由基使脂质过氧化而导致细胞损伤。

Se、GSH_{px} 含量一起下降, 加硒后一道

回升。符合硒通过此酶而起作用。

总之, 本实验证实硒对心肌的保护作用, 这种作用很可能通过加强 GSH_{px} 活性而实现。

参 考 文 献

1. 白乃彬, 张克明. 我国“硒与健康”数据库与营养研究. 营养学报 1989; 11: 60.
2. 江岩, 等. 硒对培养心肌细胞成活的影响. 中国地方病学杂志 1986; 5: 163.
3. Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J Biochem 1970; 245: 4053.
4. 江岩, 等. 硒与培养心肌细胞的自发性搏动. 中国应用生理学杂志 1987; 3: 76.
5. 安汝国, 等. 克山病病人与心肌硒含量的测定. 中国地方病防治杂志 1986; 5: 163.
6. 关金阳, 等. 克山病患儿红细胞及尸体心肌的硒及谷胱甘肽过氧化物酶. 中国地方病防治杂志 1987; 2: 206.
7. Ohkawa H. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351.
8. Marklund SL. Role of toxic effects of oxygen in reperfusion damage. J Mol Cell Cardiol 1988; 20 (suppl III): 23.
9. Ytrehus K, et al. The selenium-deficient rat heart with special reference to tolerance against enzymatically generated oxygen radicals. Scand J Clin Lab Invest 1988; 48: 289.
10. Meerson FZ, et al. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of heart. Basic Res Cardiol 1982; 77: 465.

PROTECTIVE ACTION OF SELENIUM AGAINST THE FREE RADICAL DAMAGE

Jiang Yan, Zhong Guogan, Zhao Chunyan, Yue Gang,
Li Yunyi, Sun Xiaoxia, Zhang Wenjie, Wang Xiaoming
(Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

ABSTRACT

Xanthine-xanthine oxidase and low selenium (Se) feed were used to induce free radical damage. In cultured rat heart cells, Se could bring the free radical content, ultrastructure, action potential and membrane input impedance of injured heart cells back to normal condition. In isolated perfused rat heart, Se could improve the contractility of injured heart. Se could raise the cardiac Se content and the liver GSH_{px} activity, and decrease the liver LPO content of the injured rat. The above results indicate that the basic mechanism of protective action of Se might relate to the promotion of the scavenge of free radicals by enhancing the activity of GSH_{px} .

KEY WORDS selenium; action potential; membrane input impedance; contractility of myocardium; ultrastructure; free radical

1990-09-18 收稿 1990-12-12 修回

一种冠脉灌注和后负荷完全分离的离体工作心脏模型

陈英茂 张 诚 陈淑芝 黄素珍

(承德医学院低温生理学研究室 承德 067000)

传统的 Langendorff 离体心脏灌注模型, 不能用以观察心脏做功条件下的生理功能。为此, 我们建立了一种新的离体做功心脏模型。它的特点是冠脉灌注和体循环完全分离, 从而使得这两方面可以各自独立变化, 互不影响。这样新模型不仅可以完成目前离体工作心脏灌注模型所能做的一切实验, 而且可以单独观察冠脉中物理、化学因素变化对心脏功能的影响。同时在一些需要长时间观察药物作用的实验中, 因只需要在冠脉灌注液中加入药物, 使得用药量大为减少。另外在本模型中不需要心尖插管和左心房捆扎, 手术简单, 可提高实验成功率。本模型可用于生理学、生物化学、病理生理学、尤其是药理学的实验研究。

实验装置主要由两部分组成: 一是冠脉灌注系统, 它与 Langendorff 系统类似。另一是体循环系统, 它由心室稳压恒温池, 动脉模拟管路、人工瓣膜(T_1 和 T_2) 和一个心室内套组成, 心室稳压恒温池给左心室提供恒定前负荷并起恒温作用, 动脉模拟管路给左心室提供一恒定的后负荷。心室内套为极薄、极软的乳胶泡, 通过二尖瓣口将它送入心室内, 待液体充满泡后, 它则贴附于心室内壁上, 起阻断左心室射血时液体流入主动脉的作用, 从而使液体沿人工体循环系统流动, 达到冠脉灌注与体循环分离的目的。人工瓣膜起二尖瓣和主动脉瓣的作用。体循环系统中的液体与心脏无直接接触, 可以用生理盐水或水等。为观察模型的稳定性和对刺激的反应, 用大鼠进行了实验。结果稳定性符合要求, 在 1h 内心脏功能无明显变化, 对乙酰胆碱反应敏感, 符合药理学实验要求。