

大鼠睾丸组织中的含硒蛋白

瞿祥虎¹, 钟山², 吴政星³, 邓利群¹, 黄开勋¹, 徐辉碧¹

(1 华中理工大学 化学系, 湖北 武汉 430074; 2 湖北医科大学 生物学教研室, 湖北 武汉 430071;
3 华中理工大学 生物物理与生物化学研究所, 湖北 武汉 430074)

[摘要] 目的 探讨雄性大鼠睾丸组织中的含硒蛋白。方法 采用⁷⁵Se活体标记, SDS-PAGE和 γ 射线探测等技术研究睾丸组织中含硒蛋白的分布。结果 在睾丸组织中检测到9种含硒蛋白质或亚单位, 其分子量分别为117.0, 78.0, 66.6, 57.2, 43.0, 38.1, 25.0, 20.1和18.0 kDa。结论 其中有些是已知的硒蛋白, 有些则可能是先前未被认识的新硒蛋白, 它们对雄性大鼠性腺的发育和分泌功能可能具有一定影响。

[关键词] 硒; 硒蛋白; 睾丸

[中图分类号] O613.52

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-4955(2000)06-0417-03

A study on testis selenium-containing proteins of male rats

QU Xiang-hu, ZHONG Shan, WU Zheng-xing, et al

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Objective Testis selenium (Se)-containing proteins of male animals are investigated. **Methods** The Se-containing proteins in testis of the rat were investigated by in vivo labeling with ⁷⁵Se-selenite, separation of the tissue homogenate proteins by SDS-PAGE, and determination of the labeled proteins by γ -detector and γ -counter. **Results** Nine ⁷⁵Se-containing proteins or protein subunits with relative molecular weights of 117.0, 78.0, 66.6, 57.2, 43.0, 38.1, 25.0, 20.1 and 18.0 kDa were detected in the testis homogenates. **Conclusions** Some of the Se-containing proteins detected in testis of rats were the known selenoproteins, but the others may be the Se-containing proteins which have not been identified and characterized yet.

Key words: Selenium; Selenoprotein; Testis

动物缺硒可以诱发骨骼肌和心肌坏死、肝损伤和雄性不育症等。近期研究表明, 缺硒对雄性大鼠性腺及胰腺的发育和分泌功能具有不良影响。关于性腺与硒状态的关系, 目前大多用具有抗氧化作用的谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性的变化来解释。但是, 新近研究发现, 硒对雄性生殖能力的影响与磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶(phGPx)在精子发育过程中的双重作用有关^[1]。在精细胞中, phGPx以可溶性过氧化物酶的形式存在, 具有催化功能; 在成熟精子中, 它以一种无活性的线粒体囊泡结构蛋白质存在, 参与维持线粒体结构的稳定。另外, 有研究证实, 睾丸的硒含量明显高于除肾以外的其它组织, 低硒动物的睾丸组织对硒的亲合力很大^[2]; 睾丸组织的发育和功能可能还受到其它未知硒蛋白的影响。深入研究睾丸组织中的硒蛋白, 将对进一步认识

硒对性腺细胞保护作用及其机理, 为从营养角度防治雄性不育症开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 动物的饲养及⁷⁵Se活体标记 刚断奶的雄性Wistar大鼠10只, 用低硒饲料饲养18周后, 以7 μ Ci (0.5 μ g Se)/只 (22.5 μ Ci/kg) 的剂量腹腔注射2次含⁷⁵Se的亚硒酸钠, 每4天1次。动物购自湖北省卫生防疫站实验动物中心。低硒饲料(玉米69%、麸皮20%、黄豆10%、食盐1%)原料购自陕西省黄陵县双龙镇。低硒饲料中的硒含量为(0.022 \pm 0.020) mg/kg。 [⁷⁵Se]亚硒酸钠(110 mCi/mmol, 即4.07 \times 10¹² Bq/mmol) 为中国原子能科学院产品。

1.2 睾丸组织粗蛋白的制备 将第2次注射⁷⁵Se 4 d后的低硒鼠用颈椎脱臼法处死, 迅速分离睾丸组织, 在冷生理盐水(4 $^{\circ}$ C)中, 洗去残血后, 于玻璃匀浆器中用含1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L PMSF和0.1%吐温-20缓冲溶液(含30 mmol/L Tris-HCl, 2

[收稿日期]2000-01-03; [修订日期]2000-03-30

[基金来源]国家自然科学基金资助项目(2974003, 29971012)

[作者简介]瞿祥虎(1963-), 男, 副教授, 博士后。



mmol/L DTT 和 1 mmol/L EDTA, pH 7.5), 按 1:4 (重量/体积) 的比例匀浆。所得匀浆液在 4℃ 以 1200 r/min 离心 10 min, 沉淀再用 1 体积的匀浆缓冲液匀浆, 1200 r/min 离心 10 min, 合并 2 次上清液以 20 000 r/min 离心 (4℃) 30 min, 取上清即为睾丸组织粗蛋白, 4℃ 保存备用。

蛋白质浓度测定采用 Lowry 法^[3], 以牛血清白蛋白制作标准曲线。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和⁷⁵Se 的检测 SDS-PAGE 参照 Laemmli 的方法^[4]进行。睾丸组织粗蛋白在厚 3 mm 的凝胶上进行垂直板电泳分离。浓缩胶浓度为 3% 丙烯酰胺, 含 0.1% SDS 和 0.125 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)。分离胶浓度为 12% 丙烯酰胺, 含 0.1% SDS 和 0.375 mol/L Tris-HCl (pH 8.9)。电极缓冲液含 25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸和 0.1% SDS (pH 8.3)。样品溶解液采用内含 2% SDS, 2% 巯基乙醇, 20% 甘油, 0.04% 溴酚蓝的 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 即所谓浓样品缓冲液。蛋白质分子量标准: 兔磷酸化酶 B (97.4 kDa)、牛血清白蛋白 (66.2 kDa)、兔肌动蛋白 (43.0 kDa)、牛碳酸酐酶 (31.0 kDa)、胰蛋白酶抑制剂 (20.1 kDa) 和鸡蛋清溶菌酶 (14.4 kDa), 均为 Promega 公司产品。

约 1 mg 蛋白质分别点于 6 孔, 将分离的每条蛋白质带小心切下, 分别在 γ 计数器和 γ 射线探测仪上测其 ⁷⁵Se 放射活性。用 B5002-01 型 γ 计数器 (美国 COBRA-Packard 公司) 测量每个样品 ⁷⁵Se 的时间为 10 min 以上, 将标准差控制在 2% 以下。用 γ 射线探测仪 (γ -detector, 井型探头, 高纯度锗, 美国 EG&G Ortec 公司) 检测 ⁷⁵Se 的 γ 射线时, 每个样品的测量时间大约为 10 000~30 000 s。采用多道分析器, 谱收集软件为 Fullshot, the Complete Image Capture Program for Microsoft Windows; 解谱软件为 SPAN 96 系统。

所有凝胶的干燥在 HR-GI 平板凝胶真空干燥器 (北京市新技术应用研究所产品) 上进行。

2 结果

本研究以 ⁷⁵Se 作为研究大鼠睾丸组织硒蛋白的示踪元素。由于动物体内硒水平越低, ⁷⁵Se 掺入硒蛋白的机会越大, 所以本研究先用低硒饲料喂养雄性大鼠, 造成动物体内缺硒, 然后注射 ⁷⁵Se, 以增加大鼠睾丸硒蛋白被 ⁷⁵Se 标记的机会。将 ⁷⁵Se 活体标记大鼠的睾丸粗蛋白约 1 mg, 用 300 μ l 浓样品缓冲液溶解, 采用非连续系统 SDS-PAGE 分离, 得到分子

量各不相同的多条蛋白质带 (图 1)。小心切下凝胶中各条蛋白质带, 所有凝胶组份用 γ 计数器测量, 检测到 9 个 ⁷⁵Se 计数峰, 即分子量分别为 117.0, 78.0, 66.6, 57.2, 43.0, 38.1, 25.0, 20.1 和 18.0 kDa 的蛋白质条带 (图 2)。其中 ⁷⁵Se 放射活性最高的是 57.2 kDa 条带 (187 cpm), 其次是 25.0 kDa (81 cpm), 117.0 kDa (78 cpm), 20.1 kDa (68 cpm) 和 38.1 kDa (68 cpm) 等条带。

这些凝胶组份在 γ 射线探测仪上分析, 结果它们都放射 ⁷⁵Se 的特征 γ 射线, 检测到的能量分别为 96.7, 121.1, 136.0, 264.6, 279.6 和 400.7 KeV。由于 γ 射线探测仪的灵敏度和分辨率更高, 因而进一步证实, 这 9 个蛋白质条带是含硒蛋白质带。

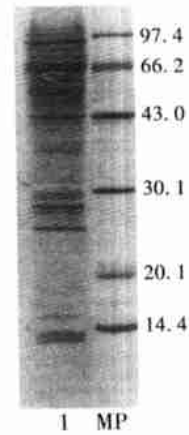


图 1 大鼠睾丸组织匀浆中蛋白质的 SDS-PAGE 分析
Fig 1 Proteins in testis homogenate of rats separated by SDS-PAGE. Lane M P: the molecular weight standards (from top to bottom: 97.4 kDa, 66.2 kDa, 43.0 kDa, 31.0 kDa, 20.1 kDa and 14.4 kDa). Lane 1: 150 μ g of water-soluble proteins from testis homogenate of rats.

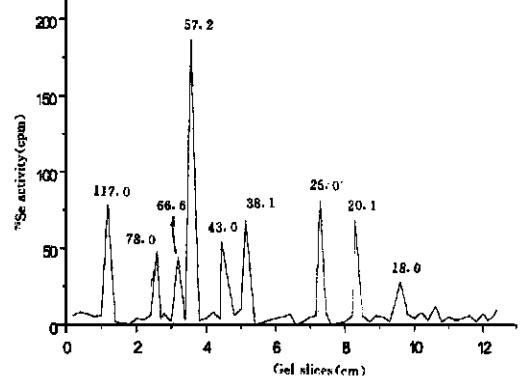


图 2 大鼠睾丸组织中的 ⁷⁵Se 标记蛋白质
Fig 2 ⁷⁵Se-labeled selenoproteins in testis homogenates of rats separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. ⁷⁵Se distribution in SDS-PAGE gel slices and the molecular weight of ⁷⁵Se-labeled selenoproteins are shown. Samples containing up to 1 mg of protein were loaded in six 1-cm wide well and separated using a 3.0mm thick slab gel. Each lane was sliced into 2mm slices which were counted individually for 10 min using the Packard Model B 5002 - 01 gamma counter.

3 讨论

必需微量元素硒在哺乳动物不同组织中的分布是不均一的,其中睾丸和肾的硒含量明显高于其它组织。我们曾以低硒饲料饲养大鼠39周后,注射一定量的 ^{75}Se 亚硒酸钠,结果也是睾丸提取液中的放射性硒含量最高^[2]。这说明低硒动物的睾丸组织对硒的亲合力很大。大量研究表明,硒在动物体内的主要存在形式是硒蛋白,即含硒代半胱氨酸(Sec)的蛋白质^[5]。如有报道^[6],大鼠体内80%以上的硒以这种形式存在。

虽然迄今在睾丸组织发现的已表征硒蛋白只有cGPx、phGPx和硫氧还蛋白还原酶(TR)等,但是已有研究提示,在这种组织中还有更多的硒蛋白未被认识。Karimpour等(1992)曾报道克隆到小鼠精子线粒体囊泡硒蛋白(MCS)的基因,其中含有3个可能译为硒代半胱氨酸的TGA密码子。但是,该基因是否编码MCS尚存疑问,这是因为尚无基因表达实验的证实,而且后来从大鼠等其它哺乳动物所克隆的可能的MCS基因并不含有框内TGA码。Ursini等新近^[1]报道,所谓精子MCS实际上应是phGPx。

Hawkes等^[6]采用柱层析技术从大鼠睾丸组织中分离到4种硒蛋白,其中主要的硒蛋白是分子量分别为8.4 kDa和14.7 kDa的蛋白质,分别约占55%和35%,另有少量46.4 kDa(约占8.3%)和(89.2 kDa(约1.1%))的硒蛋白。Behne等^[7,8]采用 ^{75}Se 活体标记,SDS-PAGE和放射自显影等技术在雄性大鼠睾丸组织中检测到13种不同分子量的含硒蛋白或亚单位(10.0, 15.6, 18.0, 19.7, 22.2, 23.7, 33.3, 38.0, 45.0, 59.9, 64.9, 70.1, 116.0 kDa),其中大多数硒蛋白的组织特异性不强,仅少部分具有较强的组织特异性。如在精子中较丰富的19.7 kDa phGPx也广泛存在于其它组织,但22.2 kDa和33.3 kDa硒蛋白只存在于睾丸组织。本研究在雄性大鼠睾丸组织中检测到的含硒蛋白(或亚单位)的分子量大多与Behne等^[7,8]报道的相同或相近。不过,数量比Behne等报道的稍少。其原因可能有二:其一是本研究用于 ^{75}Se 活体标记的大鼠,其硒水平稍高于Behne等所用的实验动物。动物体内硒

水平越高,其硒蛋白被 ^{75}Se 标记的机会越小。其二是所用 ^{75}Se 试剂放射性活度较低,导致部分低丰度硒蛋白未被 ^{75}Se 标记,这可能是主要的原因。

从分子量来看,在睾丸组织中检测到的25.0 kDa, 20.1 kDa条带可能分别是早已得到表征的cGPx的亚单位和phGPx。由于phGPx常与膜系统结合,本文所用蛋白质提取液中表面活性剂浓度较低,难以使其大部分被提取出来,这可能是该蛋白质条带 ^{75}Se 计数峰偏低的原因。57.2 kDa条带则可能是新近得到表征的TR的亚单位^[9]。其它分子量的条带可能是至今尚未表征的新的含硒蛋白。它们在有关组织细胞中可能具有一定的生物功能。

[参考文献]

- [1] Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roreri A, Wissing J and Flohe L. Dual function of the selenoprotein phGPx during sperm maturation [J]. *Science*, 1999, 285 (5432): 1393-1396
- [2] 瞿祥虎,邓利群,黄开勋,等. 低硒对雄性大鼠性腺发育和分泌功能的影响[J]. *中国地方病学杂志*, 1999, 18(6): 12-15
- [3] Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-275
- [4] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685
- [5] Stadtman TC. Selenocysteine [J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 83-100
- [6] Hawkes WC, Wilhelm sen EC and Tappel AL. A bundance and tissue distribution of selenocysteine-containing proteins in the rat [J]. *J Inorg Biochem*, 1985, 23: 77-92
- [7] Behne D, Himert H, Scheid S, Gessner H and Elger W. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 966: 12-21
- [8] Behne D, Kyriakopoulos A, Weiss-Nowak C, Kalckloesch M, Westphal C and Gessner H. Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1996, 55: 99-110
- [9] Gladyshev VN, Jeang KT and Stadtman TC. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6146-6151