

食用低硒地区粮食对豚鼠体内谷胱甘肽转硫酶和脂质过氧化物的影响

段有金 李 立 马 萍 张仲林 李秀英 李芳生

(辽宁省基础医学研究所, 沈阳)

提 要

用低硒地区粮食饲养豚鼠 105 天, 在其肝匀浆及其亚细胞级分中发现硒含量和谷胱甘肽过氧化物酶活性低于对照, 二者呈正相关; 脂质过氧化物水平和谷胱甘肽转硫酶活性在实验组则呈明显个体差异, 其中 3 例与对照相同, 4 例脂质过氧化物水平高于对照, 而谷胱甘肽转硫酶活性低于对照, 二者呈负相关。

Rotruck 等人^[1]在 1973 年确定了谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 是含硒酶, 从而奠定了微量元素硒抗机体过氧化的理论根据。Lawrence 等人^[2]在大鼠肝脏中发现两种 GSH-Px: 一种是依赖硒的 (GSH-Px I 型), 另一种是非依赖硒的 (GSH-Px II 型), 后者被证实为谷胱甘肽转硫酶 (GST)^[3]。令人感兴趣的是在低硒条件下 GSH-Px 活性显著低下, 而 GST 的活性反而增高, 起着消除体内过氧化物的补偿作用^[4]。在我国低硒地区存在一些地方性疾病如大骨节病和克山病。从前的实验证实, 病区粮中存在致病因子: 如实验动物出现心肌、骨骼肌及肝脏损害^[5]; 血清酶如 ALP 和 GOT 活性升高; 血清及心肌低硒, 脂质过氧化物增加, GSH-Px 活性下降^[6]。虽然近年对用病区粮饲养动物的 GSH-Px 作了较多的研究, 但对于具有消除体内过氧化物及解毒双重功用的 GST 的活性改变却未见报道。本次实验用低硒地区粮食饲养豚鼠, 在肝匀浆及其亚细胞级分中硒含量和 GSH-Px 活性均呈明显降低; 而 GST 活性不但不升高, 反而在部分动物中降低, 而且脂质过氧化物水平与其呈负相关。

材 料 和 方 法

一、实验动物与饲养 生后 40 天 DHP En1, 纯系雄性豚鼠。实验组饲以云南省楚雄地区的粮食(玉米购于陕西省永寿县), 饲料组成(%): 玉米 50, 大米 20, 小麦 10, 脱脂豆粉 10, 猪油 5, 鱼肝油 2, 食盐 1, 混合盐 1。对照组饲以沈阳地区的粮食, 饲料构成比例与实验组相同。自由进食进水(去离子水), 饲养 105 天。实验组饲料硒含量为 0.018 ppm, 对照组为 0.041 ppm。饲料中硒含量的测定方法见实验方法。

二、实验方法

1. 组织匀浆及亚细胞成分的分离: 所有分离步骤均在 4℃ 下完成。乙醚麻醉下取肝脏, 用冷 0.9% NaCl 洗净后用同液作肝脏透析。按 1:9 (W/V) 加入 0.175 mol/L KCl, 25mmol/L Tris-HCl, pH7.4/5mmol/L 2-巯基乙醇(缓冲液 I), 用组织捣碎机(英国 MSE 公司产)以 10,000 r/min 捣 2 分钟制成匀浆。线粒体的制备按 Schneider 的方法^[7]并作某些改进。将 10% 肝匀浆液以 600g 离心 10 分钟,

弃去沉淀,将上清以 12500g 离心 20 分钟,将得到的线粒体沉淀用缓冲液 I 洗三遍后,悬浮于缓冲液 I 中。将除去线粒体的上清以 105000 g 进行超速离心 60 分钟,沉淀微粒体并使其悬浮于缓冲液 I 中。制备的所有样品在使用前保存于 -40℃。

2. 谷胱甘肽过氧化物酶的测定:按 Wendel 的酶联分光光度计法^[8]。反应液含有: 0.1 mol/L K-PO₄, pH 7.0, 1.5 mmol/L EDTA, 1.5 mmol/L NaN₃, 1.0 mmol/L GSH, 0.25 mmol/L NADPH, 0.68 U/ml 谷胱甘肽还原酶, 1.0 mmol/L 叔丁基氢过氧化物 (t-Butyl hydroperoxide) 或 1.0 mmol/L 异丙基苯氢过氧化物 (Cumene hydroperoxide), 总容量为 1.0ml。应用岛津自动记录分光光度计 UV 265 FW 在 340 nm 处观察光吸收的下降,反应温度为 37℃。在测定红细胞内该酶活性时,红细胞的溶血液的制备按文献^[8]的方法。

3. 谷胱甘肽转硫酶的活性测定:按 Habig 等人的分光光度计法^[9]。反应液含有: 50 mmol/L K-PO₄; pH 6.5, 1.0 mmol/L GSH, 1.0

mmol/L 1-氯 2, 4-二硝基苯 (CDNB), 适量样品,总容量为 1.0 ml。当加入 CDNB 后立即开始反应,在 25℃ 下,用岛津自动记录分光光度计 UV 265 FW 在 340 nm 处观察光吸收的上升值。在 25℃ 下每分钟形成 1 微光分子 1-硫-2, 4-二硝基苯谷胱甘肽作为该酶的 1 个活性单位。

4. 脂质过氧化物 (LPO) 的测定方法按 Ohkawa 等人的 TBA 法^[10]。硒的测定按 Wilkie 等人的荧光法^[11]。蛋白质定量按 Lowry 等人的方法^[12]。

结果与讨论

一、硒含量与谷胱甘肽过氧化物酶活性平行

红细胞,肝匀浆及肝组织亚细胞级分中的硒水平和 GSH-Px 活性的测定结果列于表 1。实验组的所有动物的红细胞、肝匀浆,线粒体,及微粒体后上清均出现低硒状态,明显低于对照组。所有实验组动物的各组织及级分中 GSH-Px 活性明显低于对照,而且与硒含量的

表 1 硒含量与谷胱甘肽过氧化物酶的平行变化

组 织	硒 含 量 (ng/mg 蛋白质)		GSH-Px 活 性 (nmol/min · mg 蛋白质)	
	实验组	对照组	实验组	对照组
红细胞*	0.032±0.009†(7)	0.347±0.023(7)	6.62±1.61†(5)	20.88±2.07(5)
肝匀浆	0.665±0.042†(6)	1.519±0.161(6)	7.67±0.99††(5)	15.60±2.38(5)
线粒体**	0.405±0.077(4)	0.765±0.190(6)	17.85±3.23(3)	26.83±5.55(3)
微粒体后上清	0.495±0.065†(6)	1.027±0.123(6)	6.64±1.13†(6)	27.47±2.58(5)

* 硒含量为 μg/g 血红蛋白 GSH-Px 活性为 nmol/min · mg 血红蛋白。

** GSH-Px 活性的测定用 Cumene hydroperoxide 为底物。

△ 表中所有数据表示为 $M \pm SE(n)$; † $P < 0.01$; †† $P < 0.05$ 。

改变相平行(见表 1)。

红细胞的硒含量与 GSH-Px 活性的平行变化与以前在克山病区人群^[13]及动物实验^[6]的报道结果相符合。虽然曾有人报道克山病区胎儿肝组织内低硒,但肝组织及其亚细胞级分中的硒含量与 GSH-Px 活性的平行变化,无论在克山病或大骨节病的病区人群、病人还是动物实验上均未见报道。虽然谷胱甘肽过氧化物酶和微量元素硒是生物体内必需的营养素^[14],几

乎同时在 1957 年被发现,但直到 1973 年 Rotruck 等人^[1],才发现在低硒条件下 GSH-Px 活性明显降低,而再投硒后其活性又恢复,以及 ⁷⁵Se 参入实验证实了 GSH-Px 是含硒酶。此后许多人的实验都证实了在缺硒条件下 GSH-Px 活性降低甚至消失,而补硒后或在加硒的条件下该酶活性恢复或升高^[2,15,16]。硒对 GSH-Px 活性的作用机理,有人认为硒元素处于 GSH-Px 的活性中心^[17],同时硒能加速 GSH-Px 的

生物合成^[16]。至于缺硒动物体内的 GSH-Px 的 硒元素是维持 GSH-Px 活性必不可少的因 构象变化还未见报道。 本次实验结果也证实 素。

表 2 肝组织 LPO 和 GST 活力的个体差异及相关

动物号	匀 浆		线 粒 体	微 粒 体	微粒体后上清	
	LPO*	GST**	LPO	LPO	LPO	GST
实验组 [△]						
1	165.7	1.03	398.8	171.7	71.5	1.56
2	176.9	0.92	300.2	177.4	56.5	1.34
3	950.0	0.75	—	—	—	—
4	683.9	0.36	1097.6	507.3	114.8	0.80
5	216.8	0.83	328.0	301.8	79.8	1.21
6	470.7	0.65	1317.2	743.5	108.1	0.91
7	885.4	0.33	1096.7	466.6	135.8	0.64
对照组 [▲]	216.4±13.1(7)	0.99±0.03(6)	434.4±41.9(6)	351.5±39.1(6)	78.7±1.0(5)	1.86±0.21(5)

* LPO 含量为 nmol MDA/100 mg 蛋白质

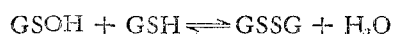
** GST 活性为 μmol 被结合 CDNB/min·mg 蛋白质

△ 实验组的数据是测定两次的平均数

▲ 对照组的数据表示为 $M \pm SE (n)$

二、肝内脂质过氧化物含量和谷胱甘肽转硫酶活性的变化及其相关

实验组动物肝脏匀浆及其亚细胞级分中的 LPO 水平及 GST 活性均出现明显的个体差异(见表 2)在 1、2、5 号豚鼠各级分的 LPO 水平和 GST 活性均与对照相似,而其他动物的这些级分中的 LPO 水平明显高于对照, GST 活性则明显低于对照(线粒体和微粒体的 GST 活性没有测定)。LPO 水平与 GST 活性呈明显负相关(其相关系数在匀浆中为 $r = -0.7359$, $P < 0.05$; 在微粒体后上清为 $r = -0.9317$, $P < 0.01$),而与 GSH-Px 则无明显相关。谷胱甘肽转硫酶 (EC 2, 5, 1, 18) 是在 60 年代初被证实存在于生物体内具有解毒功能的酶类^[18],分布于生物体内多种组织,其中以睾丸、肝脏、胃肠道粘膜及肾脏活性较高^[16], 80% 的活性见于细胞上清部分,而在线粒体和微粒体也有少量存在^[19]。自 1977 年 Prohaska 报道了从肝脏纯化的 GST 具有 GSH-Px 活性^[20]以来,又有许多人证实了该酶能还原脂质过氧化物,但不能作用于过氧化氢。其反应通式如下:



许多实验结果证实,在缺硒条件下 GSH-Px 活

性明显降低,而 GST 的活性却升高^[2,16],他们认为 GSH-Px 和 GST 的活性均受体内硒水平的调解,尽管后者是非含硒酶^[16]。虽然 GST 能还原过氧化物,但在正常生物体内其对于消除体内生成的过氧化物的作用甚微,而只有在由于硒缺乏等因素所致的 GSH-Px 活性显著低下时,才能起消除体内过氧化物的功能^[4]。本次实验用低硒地区粮食饲养的豚鼠体内含硒量低,同时 GSH-Px 活性也低,如果单从低硒角度看, GST 活性应升高,然而结果却与此相反,即部分豚鼠出现了 GST 活力降低。这一事实说明在低硒病区粮中的致病因子不仅是低硒,可能还存在其它因子、后者使动物体内 GST 活力下降,同时又由于 GSH-Px 活力处于低水平,从而引起 LPO 的上升,体内脂质过氧化作用的增强可能引起机体的病理状态。LPO 水平与 GST 活性呈负相关,说明该酶在 GSH-Px 活性低下的条件下确有消除体内 LPO 的功能。关于为什么 LPO 水平和 GST 活性只在部分动物体内发生变化,其原因还不清楚,也许是生物学因素,正象同样都吃病区粮的病区人群中只有部分人患病一样。至于病区粮的致病因子是通过何种途径影响 GST 活力的,尚有待于进一步研究。(下转第 289 页)

表4 TSPC 合并照光对肝癌细胞微粒体
G-6-P 酶的影响

组 别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	光照时间 (分)	G-6-P 酶活力 (Pinmol/mg 蛋白/分)
对 照	—	—	$21.6 \pm 2.0^{(a)}$
光	—	30	$19.5 \pm 1.2^*$
TSPC	30	—	$19.0 \pm 1.2^*$
TSPC + 光	30	30	$10.1 \pm 1.9^{**}$
TSPC + 光	60	30	$5.4 \pm 0.6^{**}$

(a) 3 次实验平均值 $\pm$ S. E.

* $P > 0.05$; ** $P < 0.001$

讨 论

酞菁化合物在体外和体内对瘤细胞都有较明显光动力作用。Chan 等^[8]观察到 PC 和 Al 螯合后,在红光作用下对 UV-2237 纤维肉瘤细胞株有很强的光杀伤作用。Brasseur 等^[9]用磺酸化的 PC 与 Al 螯合,观察对小鼠 EMT-6 乳腺癌有明显的光动力治疗作用。PC 化合物对癌细胞光杀伤的作用机理尚不清楚。细胞膜和膜系统是光敏剂光杀伤的重要靶部位^[2,10,11],本文结果表明,在光激发下 TSPC 对肝癌细胞线粒体和微粒体膜脂质的过氧化作用显著增强,膜蛋白巯基含量明显减少,表明膜脂质和膜蛋白的结构受到破坏。ATP 酶存在于线粒体内膜,和能量代谢有关,对 TSPC 光敏效应很敏感,MAO 在线粒体外膜,和单胺类代谢有关,对 TSPC 光敏不敏感,说明 TSPC 对线粒

体功能的损伤有一定选择性。G-6-P 酶是微粒体的标志酶,分布于微粒体膜上,其活性的减低表示微粒体膜脂质组分的完整性遭受损害。线粒体肿胀试验反映线粒体膜对溶质的通透性发生改变,提示在 TSPC 光辐射作用下膜结构的完整性受到破坏。以上结果表明,TSPC 对线粒体和微粒体产生明显的光敏效应,破坏其结构和功能。这表明线粒体和微粒体是细胞内 PC 化合物光动力作用的敏感部位。关于 PC 化合物对细胞质膜和其他亚细胞器的光敏效应有待进一步实验研究。

参 考 文 献

- [1] Weber, JH & Bush, DH: *Inorganic Chemistry*, 1965, 4, 469.
- [2] 傅乃武、叶树勇、张谨等,《中国医学科学院学报》,1985, 7, 442.
- [3] Lanzetta, PA et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 100: 95.
- [4] Salach, JI.: *Methods in enzymol.*, 1978, LIII, 495.
- [5] Ellman, GL: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 82, 70.
- [6] Lowry, OH et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [7] Edmud, F et al.: *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 614.
- [8] Chan WS et al.: *Photochem and Photobiol.*, 1987, 45, 757.
- [9] Brasseur, N et al.: *Photochem and Photobiol.*, 1987, 45, 581.
- [10] Kessel, D: *Biochemistry*, 1977, 16, 3443.
- [11] 傅乃武、全兰萍、张立生:《中国药理学报》1987, 8, 551.

[本文于 1988 年 6 月 6 日收到]

(上接第 292 页)

参 考 文 献

- [1] Rotruck, J. T. et al.: *Science*, 1973, 179, 588.
- [2] Lawrence, R. A. and Burk, R. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 71, 952.
- [3] Prohaska, J. R.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1980, 611, 87.
- [4] Miwa, T. et al.: *J. Pharm. Dyn.*, 1983, 6, 459.
- [5] 朱世英等:《陕西医药资料》,1982, 4, 28.
- [6] 杨建国等:《陕西医药资料》,1982, 4, 59.
- [7] Schneider, C. W.: *J. Biol. Chem.*, 1948, 176, 259.
- [8] Wendel, A.: *Method in Enzymology*, Acad. Press, New York, 1981, Vol. 77, 325—332.
- [9] Habig, W. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 7130.
- [10] Ohkawa, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 95, 351.

- [11] Wilkie, J. B. et al.: *Agric. Food Chem.*, 1970, 18, 944.
- [12] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [13] 朱蓬珍等:《营养学报》,1982, 4, 229.
- [14] Mills, G. C.: *J. Biol. Chem.*, 1957, 229, 189.
- [15] Prohaska, J. R. and Ganther, H. E.: *J. Neurochem.*, 1976, 27, 1379.
- [16] Masukawa, T. et al.: *Biochem. Pharmac.*, 1984, 33, 2635.
- [17] Tappel, W. A.: *Free Radicals in Biology*, Acad. Press, New York, 1980, Vol. 4, 1—47.
- [18] Booth, J. et al.: *Biochem. J.*, 1961, 79, 516.
- [19] Wahllander, A. et al.: *FEBS Lett.*, 1979, 97, 138.
- [20] Prohaska, J. R. and Ganther, H. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 76, 437.

[本文于 1988 年 7 月 20 日收到]