

硒对红细胞膜抗氧化作用的探讨

秦德安 何学民

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

提 要

本文以红细胞膜在体外与超氧阴离子自由基(由邻苯三酚自氧化产生)反应所致氧化损伤作为实验模型, 研究了 Na_2SeO_3 , NaHSeO_3 , Na_2SeO_4 和 SeO_2 等硒化合物对红细胞膜的作用。结果表明, Na_2SeO_3 有抗氧化作用。表现为膜蛋白交联作用显著减小, 脂质过氧化物(膜荧光物质)含量下降。本文还就硒抗氧化作用的机理作了讨论。

关键词 硒, 红细胞膜, 脂质过氧化, 蛋白质交联

自从 Schwarz^[1] 证实硒是生物体营养必需的元素之后, 硒对生物体的作用日益引起人们的重视。近年来的研究表明, 硒对红细胞膜有保护作用^[2-4], 但其作用机理还有待进一步阐明。本文将就红细胞膜在体外与超氧阴离子自由基(邻苯三酚自氧化产生)反应所致氧化损伤为实验模型^[5], 观察硒化合物对红细胞膜的作用并探讨其作用机理。

材 料 与 方 法

健康人静脉血购自血库, 邻苯三酚为分析纯, Na_2SeO_3 , NaHSeO_3 , Na_2SeO_4 和 SeO_2 均为化学纯。

1. 红细胞膜制剂 按低渗溶血法^[6]制备, 低渗缓冲液为 pH8.4, 5mmol/L 磷酸缓冲液(简称 5P8.4)。膜制剂为 1:10 膜悬浮液。

2. 硒化合物抗氧化试验 取上述红细胞膜悬液 (pH8.4) 5ml, 先加入一定量硒化合物, 37℃ 保温 10min, 然后加 50 μl 新鲜配制的 0.1 mol/L 邻苯三酚溶液(最终浓度为 1 mmol/L), 在 37℃ 保温 10min, 立即用 6 倍的 pH7.4, 10 mmol/L 磷酸缓冲液(简称 10P7.4)稀释并离心 (15000r/min, 4℃) 40min。取膜备用。同

时以氧化膜(不加硒)或氧化后加硒的膜为对照。

3. 膜蛋白组分测定 按 SDS-PAGE 法^[7]进行。用 LKB UltraScan XL 激光光密度仪对凝胶板进行扫描, 并用线性积分计算膜蛋白组分的相对百分含量。

4. 荧光物质测定 按前文^[8]报道的方法进行。用日立 850 型荧光分光光度计测定甲醇: 氯仿萃取液(氯仿相)中红细胞膜荧光物质含量, 激发波长 360nm, 狭缝 4nm, 发射波长 440 nm, 狭缝 8nm, 以甲醇: 氯仿 (1:2 为空白对照, 以 0.05 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 奎宁的 0.05mol/L H_2SO_4 溶液为标准荧光单位。

结 果

1. Na_2SeO_3 对红细胞膜蛋白组分的影响

由图 1 可见, 人红细胞膜经 0.05mol/L Na_2SeO_3 , 37℃ 保温 30min 后, 其膜蛋白组分与正常膜相比没有明显的变化, 其中带 1、带 2 和带 3 等主要组分的百分含量没有变化。

2. Na_2SeO_3 对膜蛋白交联作用的影响

氧化作用促使膜蛋白交联。从图 2b 可见, 经邻苯三酚氧化处理的红细胞膜在 SDS-PAGE

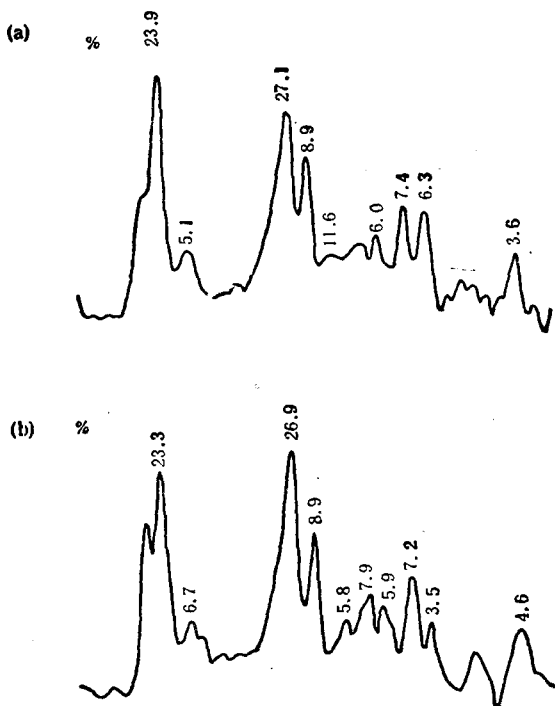


图1 Na_2SeO_3 对人红细胞膜蛋白组分的影响
Fig. 1 The effect of Na_2SeO_3 on the protein composition of erythrocyte membranes

(a) 正常膜(影泡); (b) 经 0.05mol/L Na_2SeO_3 处理膜
(a) ghosts (b) ghosts + $\text{Na}_2\text{SeO}_3(0.05\text{mol/L})$

扫描图谱上出现高分子聚合物(HMP), 含量约占总膜蛋白的 4.3%。图 2c 和图 2d 表明在氧化前和氧化后补加 $5.8 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 , 仍有明显的 HMP 条带。而在氧化前补加 0.05mol/L Na_2SeO_3 , 则几乎不出现 HMP 条带(图 2e)。这表明 Na_2SeO_3 浓度提高后能阻抑膜蛋白的交联作用; 由图 2f 可见, 氧化后再补加 0.05mol/L Na_2SeO_3 , 仍有明显的 HMP 条带, 这表明膜氧化产生的 HMP 不能可逆消除, 这也进一步提示只有在氧化前补硒才能阻抑膜氧化而不生成 HMP。

3. 其他硒化合物对膜蛋白交联的影响

由图 3 可见, 在 1mmol/L 邻苯三酚氧化处理前分别补加 NaHSeO_3 , Na_2SeO_4 和 SeO_2 的氧化红细胞膜均不出现 HMP 条带。表明这 3 种硒化合物都和 Na_2SeO_3 一样能阻抑膜蛋白的交联作用, 但它们对红细胞膜蛋白正常组分有显著影响。表现为膜蛋白严重丢失, 膜蛋白

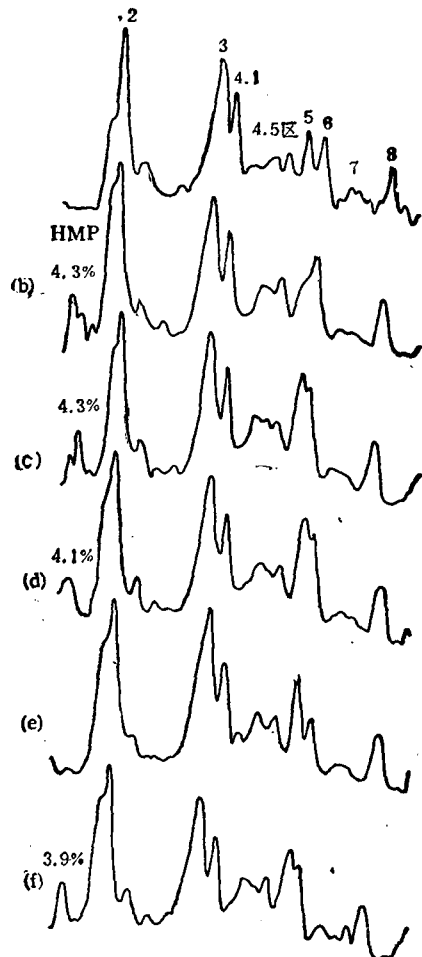


图2 Na_2SeO_3 对红细胞膜蛋白交联的影响
Fig. 2. The effect of Na_2SeO_3 on protein cross-linking of erythrocyte membranes

(a) 正常红细胞膜 (影泡); (b) 经邻苯三酚氧化的膜;
(c) 氧化前补加 $5.8 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 的氧化膜;
(d) 氧化后补加 $5.8 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 的氧化膜;
(e) 氧化前补加 0.05mol/L Na_2SeO_3 的氧化膜;
(f) 氧化后补加 0.05mol/L Na_2SeO_3 的氧化膜
(a) ghosts (b) ghosts oxidized by pyrogalllic acid
(c) ghosts + $\text{Na}_2\text{SeO}_3(5.8 \times 10^{-6}\text{mol/L})$, before oxidation (d) ghosts + $\text{Na}_2\text{SeO}_3(5.8 \times 10^{-6}\text{mol/L})$, after oxidation (e) ghosts + $\text{Na}_2\text{SeO}_3(0.05\text{mol/L})$, before oxidation (f) ghosts + $\text{Na}_2\text{SeO}_3(0.05\text{mol/L})$, after oxidation

的主要组分: 带1、带2蛋白几乎消失, 带3蛋白也大为减少。而 Na_2SeO_3 对带1、带2蛋白虽有影响, 但不显著。因此, 补加无机硒时, 不宜使用 NaHSeO_3 , Na_2SeO_4 和 SeO_2 。

4. Na_2SeO_3 对膜荧光物质含量的影响

膜荧光物质系膜脂质过氧化的产物, 可反

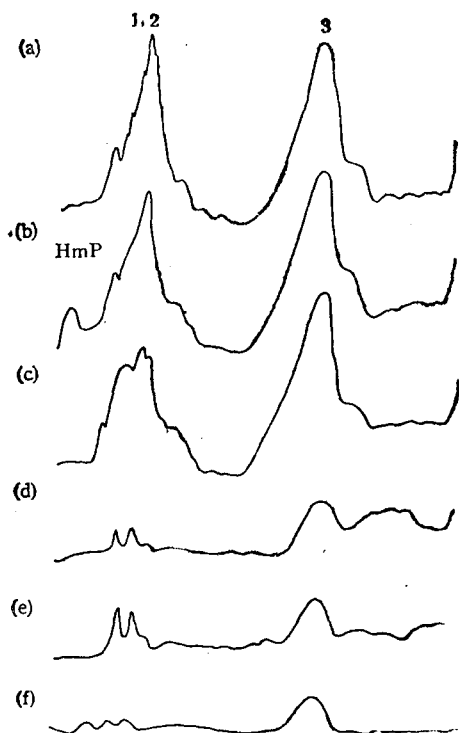


图3 不同硒化合物对膜蛋白交联的影响
Fig. 3. The effect of various selenic compounds on protein cross-linking of erythrocyte membranes

- (a) 正常红细胞膜(影泡)
- (b) 经邻苯三酚氧化的膜
- (c) 氧化前补加 0.05mol/L Na_2SeO_3 的氧化膜
- (d) 氧化前补加 0.05mol/L Na_2SeO_4 的氧化膜
- (e) 氧化前补加 0.05mol/L NaHSeO_3 的氧化膜
- (f) 氧化前补加 0.05mol/L SeO_2 的氧化膜

- (a) ghosts
- (b) ghosts oxidized by pyrogalllic acid
- (c) ghosts + Na_2SeO_3 (0.05mol/L), before oxidation
- (d) ghosts + Na_2SeO_4 (0.05mol/L), before oxidation
- (e) ghosts + NaHSeO_3 (0.05mol/L), before oxidation
- (f) ghosts + SeO_2 (0.05mol/L), before oxidation

映膜脂过氧化程度^[2]。红细胞膜经 1 mmol/L 邻苯三酚氧化处理后,膜荧光物质含量增加,为 1.85 ± 0.24 荧光单位/mg 膜蛋白(正常膜荧光物质为 1.36 ± 0.12 荧光单位/mg 膜蛋白),而经 0.1mol/L Na_2SeO_3 预处理的膜,氧化后荧光物质含量为 1.57 ± 0.32 荧光单位/mg 膜蛋白。表明 Na_2SeO_3 有抗脂质过氧化的作用。

5. Na_2SeO_3 对邻苯三酚自氧化反应的影响

邻苯三酚在碱性(pH8.4左右)条件下,能迅速自氧化,放出超氧阴离子自由基(O_2^-),生成中间产物(在 325nm 和 420nm 处有强烈光吸收)。图 4 表明,超氧化物歧化酶(SOD)对邻苯三酚自氧化有抑制作用,而 Na_2SeO_3 的作用不同于超氧化物歧化酶,对邻苯三酚自氧化反应没有抑制作用,反而有所增强。

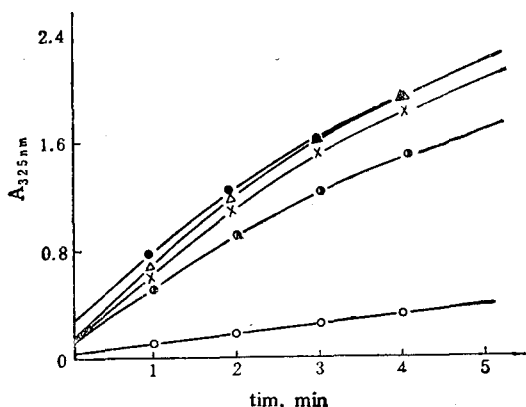


图4 Na_2SeO_3 对邻苯三酚自氧化反应的影响
Fig. 4. The effect of Na_2SeO_3 on pyrogalllic acid autoxidation

- 为对照(不加 Na_2SeO_3 和 SOD)
- 为加 30 U SOD
- 为加 0.05mol/L Na_2SeO_3
- △—△ 为加 0.1mol/L Na_2SeO_3
- ×—× 为加 0.2mol/L Na_2SeO_3
- control (no Na_2SeO_3 , no SOD)
- +SOD(30U)
- + Na_2SeO_3 (0.05mol/L)
- △—△ + Na_2SeO_3 (0.1mol/L)
- ×—× + Na_2SeO_3 (0.2mol/L)

讨 论

作者在前文^[3]中报导,邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生超氧阴离子自由基(O_2^-),导致红细胞膜过氧化损伤,表现为膜蛋白发生交联,在 SDS-PAGE 图谱上出现 HMP 条带以及膜荧光物质(脂褐质)含量增高。本文结果表明,加入一定量 Na_2SeO_3 后,能使膜蛋白交联作用显著减弱(HMP 条带含量明显减少)膜荧光物质含量下降。这提示 Na_2SeO_3 对红细胞膜的保护作用可能与硒抗氧化作用有关。值得注意的是本文所用硒浓度(0.05mol/L)已超过硒的生理浓度,有实验表明高浓度硒不仅不

起保护作用反而损害细胞^[8]。本文结果也表明 0.05mol/L NaHSeO₃, Na₂SeO₄ 和 SeO₂ 对膜蛋白组分有显著损伤作用(图 3), 这也为硒中毒提供一定的实验依据。但由于在本文条件下, 生理浓度硒的抗氧化作用不能直观地显示出来, 而提高硒浓度 (0.05mol/L—0.1mol/L) 后, 发现有明显的抗氧化作用, 而且 0.05 mol/L Na₂SeO₃ 对膜蛋白组分没有明显的影响(图 1)。

关于硒抗氧化作用机理, 一般认为是通过体内谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 来实现的^[4], 但沃维汉等人^[3]认为该酶主要分布在红细胞质内, 故很难用此说来解释硒对离体红细胞膜的作用。图 4 表明, Na₂SeO₃ 的作用不同于 SOD, 其抗氧化作用显然不是通过清除 O₂⁻ 来实现的。张罗平等^[9]用电子自旋共振 (ESR) 技术观察到 0.02mol/L 至 0.4mol/L SeO₂ 能清除过氧化自由基 (ROO·)。因此, Na₂SeO₃ 对红细胞膜的作用可能是通过清除由 O₂⁻ 引起的过氧化自由基途径进行的。对此还有待进一步实验证实。此外, 硒对红细胞膜的作用可能还

有另一些途径, 其中无机硒与膜结合形成结合硒再发挥作用的途径值得注意。沃维汉等^[3]指出添加微量硒 (0.1—1.0ppm) 可防止红细胞膜上收缩蛋白(带 1、带 2 蛋白)从膜上脱落。这表明硒具有稳定膜结构的作用, 从而减轻氧化所致的膜损伤作用。

肖冰梅、刘琳和于凤莲同学参加部分测试工作。

参 考 文 献

- 1 Schwarz K *et al.* *J Am Chem Soc.* 1957; 79:3292
- 2 潘华珍等. 生物化学与生物物理进展, 1984; (2): 34
- 3 沃维汉, 杨福愉. 中国科学(B 辑), 1986; (4): 401
- 4 何学民, 黄蔚, 秦德安. 华东师范大学学报(自然科学版), 1991; (1): 97
- 5 秦德安, 何学民, 王永江. 生物化学与生物物理进展, 1988; 15(2): 21
- 6 Dodge J T *et al.* *Arch Biochem Biophys.* 1963; 100: 119
- 7 Fairbanks G *et al.* *Biochemistry*, 1971; 10(13): 2607
- 8 王治荣等. 细胞生物学杂志, 1989; 11(4): 163
- 9 张罗平等. 自然杂志, 1985; 8(1): 73

[本文于 1990 年 4 月 9 日收到,

1991 年 1 月 6 日修回]

STUDIES ON THE ANTI-PEROXIDATION OF SEL- ENIUM ON ERYTHROCYTE MEMBRANES

Qin Dean He Xuemin

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)

ABSTRACT

The treatment of human erythrocyte membranes with superoxide anion (O₂⁻) produced by pyrogalllic acid, pH8.4, caused peroxidative damages to cell membranes, such as increase of fluorescent substance on membranes, formation of high molecular polymers (HMP) due to membrane protein cross-linking. However, these were almost not induced after adding a certain amount of Na₂SeO₃. It is suggested the anti-peroxidation effect of Na₂SeO₃ on erythrocyte membranes

Key words: selenium, erythrocyte membrane, lipoperoxide, protein cross-linking