

纳米硒对肉鸡肝细胞中细胞谷胱甘肽 过氧化物酶活性的影响

胡彩虹* 夏枚生

(浙江大学动物科学学院; 浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029)

摘要 以亚硒酸钠和蛋氨酸硒为对照, 研究了纳米单质硒(纳米硒)对肉鸡肝细胞中细胞谷胱甘肽过氧化物酶(cGPx)活性的影响。每种硒源分别以0.01、0.05、0.10、0.30、0.50、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 6个硒添加浓度培养肉鸡肝细胞, 测定培养后0、24、48、72、96 h肉鸡肝细胞cGPx活性。结果显示: 亚硒酸钠添加浓度(以硒计)在0.01~0.10 $\mu\text{mol/L}$ 、蛋氨酸硒和纳米硒添加浓度(以硒计)在0.01~0.30 $\mu\text{mol/L}$, cGPx活性随着硒添加浓度的增加而增加; 亚硒酸钠添加浓度在0.10~1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、蛋氨酸硒添加浓度在0.30~1.0 $\mu\text{mol/L}$, cGPx活性随着硒添加浓度的增加而下降, 而纳米硒添加浓度在0.30~1.0 $\mu\text{mol/L}$, cGPx活性始终保持在高峰平台。结果表明, 3种硒源的剂量-效应关系曲线中的最适剂量范围宽度依次为: 纳米硒>蛋氨酸硒>亚硒酸钠。

关键词 硒; 纳米; 细胞谷胱甘肽过氧化物酶; 肝细胞; 肉鸡

硒是动物机体必需的微量元素, 对动物的生长发育、免疫机能和抗氧化发挥着重要的作用。但是, 硒在最佳浓度和致毒浓度之间的安全限度非常狭窄^[1], 开发低毒、高效的硒源一直是硒营养研究的重点。长期以来, 对硒源的研究主要围绕着硒的化学形式(如亚硒酸钠、蛋氨酸硒)进行, 而忽略了对硒的物理形式的深入研究。一般认为, 常规方法制备的单质硒无生物活性和生物毒性^[2]。纳米硒是纳米级的单质硒, 纳米硒在提高小鼠免疫功能、抗氧化和延缓衰老等方面作用显著^[3,4]。

硒的生物学功能主要是通过各种硒蛋白(硒酶)表现出来。细胞谷胱甘肽过氧化物酶(cellular glutathione peroxidase, cGPx, EC 1.11.1.9)是动物体内重要的抗氧化酶, 特异地催化谷胱甘肽还原机体内有毒的过氧化物反应, 清除过氧化物, 保护生物膜和生物大分子免受氧化损伤^[5]。cGPx既是一种抗氧化酶, 又是体内硒的代谢库。cGPx的重要作用是硒的很多生物学功能的基础^[5]。本试验研究了3种硒源(亚硒酸钠、蛋氨酸硒、纳米硒)对肉鸡肝细胞cGPx活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

纳米硒由中国科技大学高学云博士惠赠。经日

本岛津SPM-9500J3型原子力显微镜观察和粒径分析软件分析, 纳米硒粒径在30~70 nm之间, 平均粒径为45 nm。X光电子能谱的Se 3d为55.3 eV, 表明为零价硒(Se^0)。

亚硒酸钠(Na_2SeO_3)和蛋氨酸硒(Se-Met)为Sigma公司产品。主要试剂: RPMI 1640培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、EDTA、淋巴细胞分离液、青霉素、链霉素均为Hyclone公司产品; 细胞裂解液(protein extraction reagent)为Pierce公司产品。

1.2 鸡肝细胞的分离培养

30日龄艾维茵肉鸡肝细胞。鸡肝细胞的分离培养参考江青艳等^[6]的方法, 采用2.5 g/L胰蛋白酶加0.1 g/L EDTA 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化10 min、用淋巴细胞分离液分离获取肝细胞。苔盼蓝染色排斥法计算肝细胞的存活率。按 1×10^5 个/ml接种于24孔培养板, 接种培养24 h后于倒置显微镜下观察生长情况及肝细胞的纯度。结果表明, 肝细胞存活率为(93.6 \pm 3.4)%, 纯度>95%。

1.3 试验分组和肝细胞培养

3种硒源分别为亚硒酸钠、蛋氨酸硒和纳米

收稿日期: 2005-07-11 接受日期: 2005-09-26

浙江省自然科学基金(No.M303435)、国际科学基金(No.B/3452-1)、浙江省教育厅(No.20040175)资助

* 通讯作者。Tel: 0571-86985607, Fax: 0571-86961553, E-mail: chhu@zju.edu.cn

硒。每种硒源设 0.01、0.05、0.10、0.30、0.50、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 6 个浓度梯度(以硒计), 每个浓度梯度设 3 个重复, 并设一个不加硒的空白对照。细胞培养液为含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640, 其中含双抗(100 u/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素), 用 7.5% NaHCO_3 调至 pH 7.2, 过滤灭菌。使用 24 孔培养板, 将制备的肉鸡肝细胞分别接种到含有不同硒源/浓度梯度的细胞培养液中, 使细胞终浓度为 5×10^5 个/ml, 每孔内细胞培养液的总体积为 1 ml。置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

1.4 细胞提取液制备和 cGPx 活性分析

将培养 24、48、72、96 h 后的不同处理的细胞连同培养液, 转移至 1.5 ml Eppendorf 管中, 2 500 g 离心 10 min, 移去上清液, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液重复洗涤 2 次, 2 500 g 离心 10 min, 离心, 弃去上清液, 加入细胞裂解液。轻轻摇动 10 min, 27 000 g、4 $^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 吸取上清液转移至 Eppendorf 管中, 得到细胞提取液, 4 $^\circ\text{C}$ 保存待测。

采用二硫代二硝基苯甲酸法(DTNB 法)测定 cGPx 活性, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。规定在 180 μl 酶促反应体系中, 扣除非酶促反应作用, 1 mg 蛋白质使反应体系中谷胱甘肽(GSH)浓度降低 1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 为一个酶活力单位(u)。

1.5 统计学分析

数据处理与分析采用 SAS (6.12), 应用 LSD 处理组间平均数差异显著性检验。

2 结果

2.1 亚硒酸钠对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响

亚硒酸钠对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响见表 1。不加硒的空白组和添加 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 硒的亚硒酸钠组 cGPx 活性随培养时间的增加而降低。添加 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 硒的亚硒酸钠不同时间的 cGPx 活性与起始酶活差异不显著($P > 0.05$), 说明 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 硒的亚硒酸钠已能满足肉鸡肝细胞 cGPx 发挥稳定活性的需要。添加 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 硒的亚硒酸钠, cGPx 活性较起始酶活显著提高($P < 0.05$), 24、48、72 和 96 h 的酶活差异不显著($P > 0.05$)。硒添加浓度在 0.01~0.10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, cGPx 活性随着硒添加浓度的增加而增加; 硒添加浓度在 0.10~1.0 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 随着硒添加浓度的增加, cGPx 活性显著下降; 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 硒添加组培养 72 h 后的酶活显著低于起始酶活($P < 0.05$); 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 硒添加组随着培养时间的增加, 肝细胞 cGPx 活性逐渐降低, 且均与起始酶活差异显著($P < 0.05$)。

2.2 蛋氨酸硒对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响

蛋氨酸硒对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响见表 2。添加 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 硒的蛋氨酸硒组 cGPx 活性随培养时间的增加而降低, 48 h 后与起始酶活差异显

表 1 亚硒酸钠对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

Se($\mu\text{mol/L}$)	培养时间(h)				
	0	24	48	72	96
0	65.7 \pm 7.2 ^a	53.2 \pm 6.4 ^{bd}	47.3 \pm 5.3 ^{bc}	42.6 \pm 5.8 ^c	40.2 \pm 5.1 ^{cB}
0.01	65.7 \pm 7.2 ^a	57.2 \pm 6.5 ^{abcd}	54.0 \pm 4.8 ^{bc}	50.3 \pm 5.9 ^{bc}	47.6 \pm 5.4 ^{bB}
0.05	65.7 \pm 7.2 ^a	67.2 \pm 7.2 ^{abc}	68.5 \pm 7.6 ^{ab}	71.2 \pm 6.8 ^{ab}	72.0 \pm 6.4 ^{aA}
0.10	65.7 \pm 7.2 ^b	83.4 \pm 10.1 ^{aA}	83.2 \pm 9.4 ^{aA}	83.8 \pm 8.7 ^{aA}	81.1 \pm 9.2 ^{aA}
0.30	65.7 \pm 7.2 ^a	74.3 \pm 6.8 ^{aAB}	73.9 \pm 7.6 ^{aAB}	74.7 \pm 8.1 ^{aAB}	73.1 \pm 7.4 ^{aA}
0.50	65.7 \pm 7.2 ^a	62.4 \pm 6.7 ^{abcd}	56.2 \pm 6.1 ^{abc}	52.3 \pm 5.7 ^{bc}	48.6 \pm 5.1 ^{bB}
1.0	65.7 \pm 7.2 ^a	29.2 \pm 4.1 ^{be}	23.4 \pm 3.7 ^{bcd}	18.6 \pm 2.6 ^{cd}	15.9 \pm 2.2 ^{cC}

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; $n=3$ 。同一行中肩标小写字母不同者差异显著($P < 0.05$), 同一列中肩标大写字母不同者差异显著($P < 0.05$)。

表 2 蛋氨酸硒对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

Se($\mu\text{mol/L}$)	培养时间(h)				
	0	24	48	72	96
0	65.7 \pm 7.2 ^a	53.2 \pm 6.4 ^{bc}	47.3 \pm 5.3 ^{bcd}	42.6 \pm 5.8 ^c	40.2 \pm 5.1 ^{cC}
0.01	65.7 \pm 7.2 ^a	58.4 \pm 6.1 ^{abc}	52.1 \pm 5.7 ^{bd}	50.6 \pm 4.8 ^{bc}	49.7 \pm 5.5 ^{bC}
0.05	65.7 \pm 7.2 ^a	65.4 \pm 6.8 ^{ab}	66.7 \pm 7.1 ^{aC}	67.8 \pm 7.3 ^{ab}	65.4 \pm 6.5 ^{aB}
0.10	65.7 \pm 7.2 ^b	82.2 \pm 8.4 ^{aA}	80.7 \pm 8.1 ^{ab}	85.2 \pm 9.0 ^{aA}	84.3 \pm 7.8 ^{aA}
0.30	65.7 \pm 7.2 ^b	90.3 \pm 9.2 ^{aA}	93.6 \pm 10.1 ^{aA}	92.7 \pm 9.8 ^{aA}	91.0 \pm 8.7 ^{aA}
0.50	65.7 \pm 7.2 ^b	82.3 \pm 8.5 ^{aA}	84.3 \pm 7.5 ^{aAB}	83.2 \pm 8.9 ^{aA}	82.1 \pm 7.8 ^{aA}
1.0	65.7 \pm 7.2 ^a	61.3 \pm 6.8 ^{abc}	53.1 \pm 6.7 ^{bd}	50.7 \pm 6.2 ^{bc}	45.3 \pm 5.6 ^{bC}

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; $n=3$ 。同一行中肩标小写字母不同者差异显著($P < 0.05$), 同一列中肩标大写字母不同者差异显著($P < 0.05$)。

著($P<0.05$); 添加 $0.05 \mu\text{mol/L}$ 硒的蛋氨酸硒, cGPx 活性与起始酶活差异不显著($P>0.05$), 说明 $0.05 \mu\text{mol/L}$ 硒的蛋氨酸硒已能满足肉鸡肝细胞 cGPx 发挥稳定活性的需要。添加 $0.10\sim 0.50 \mu\text{mol/L}$ 硒的蛋氨酸硒, cGPx 活性较起始酶活显著提高($P<0.05$), 24、48、72 和 96 h 的酶活差异不显著($P>0.05$)。硒添加浓度在 $0.01\sim 0.30 \mu\text{mol/L}$ 范围内, cGPx 活性随着蛋氨酸硒添加浓度的增加而增加; 硒添加浓度在 $0.30\sim 1.0 \mu\text{mol/L}$ 范围内, cGPx 活性随着蛋氨酸硒添加浓度的增加而下降。

2.3 纳米硒对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响

纳米硒对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响见表 3。添加 $0.10\sim 1.0 \mu\text{mol/L}$ 硒的纳米硒, 24 h cGPx 活性较起始酶活显著提高($P<0.05$), 24、48、72 和 96 h 的酶活差异不显著($P>0.05$)。硒添加浓度在 $0.01\sim 0.30 \mu\text{mol/L}$ 范围内, cGPx 活性随着纳米硒添加浓度的增加而增加($P<0.05$); 硒添加浓度在 $0.30\sim 1.0 \mu\text{mol/L}$ 范围内, 随着纳米硒添加浓度的增加, cGPx 活性无显著变化($P>0.05$)。

2.4 3 种硒源对肉鸡肝细胞 cGPx 活性影响的比较

图 1 表示了 3 种硒源对肉鸡肝细胞 cGPx 活性影响的比较。由图 1 可见, 基础培养液中添加 0.01 、 0.05 、 $0.10 \mu\text{mol/L}$ 硒的 3 个浓度时, 3 种硒源的肉鸡肝细胞 cGPx 彼此之间没有差异($P>0.05$), 肝细胞 cGPx 活性随硒添加浓度的增加而逐渐升高。添加 $0.30 \mu\text{mol/L}$ 硒浓度时, 纳米硒和蛋氨酸硒添加组在各时间点(24、48、72、96 h)的 cGPx 无显著差异($P>0.05$), 但是均显著高于亚硒酸钠添加组($P<0.05$)。添加 0.50 和 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 硒浓度时, 纳米硒、蛋氨酸硒、亚硒酸钠添加组在各时间点(24、48、72、96 h)的 cGPx 彼此之间的差异均达到显著水平($P<0.05$), 并且纳米硒>蛋氨酸硒>亚硒酸钠。

3 讨论

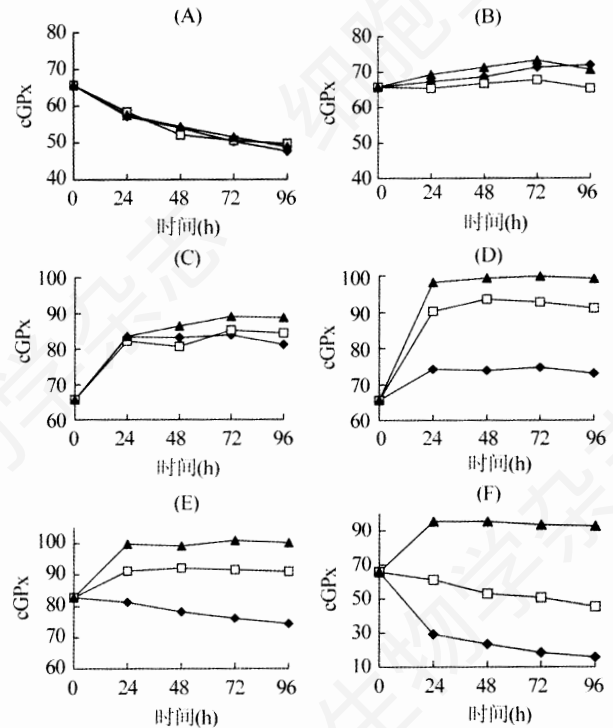


图 1 3 种硒源对肉鸡肝细胞 cGPx 活性影响的比较

A: $0.01 \mu\text{mol/L}$ 硒; B: $0.05 \mu\text{mol/L}$ 硒; C: $0.10 \mu\text{mol/L}$ 硒; D: $0.30 \mu\text{mol/L}$ 硒; E: $0.50 \mu\text{mol/L}$ 硒; F: $1.0 \mu\text{mol/L}$ 硒。◆: 亚硒酸钠; □: 蛋氨酸硒; ▲: 纳米硒。

一般认为, 零价元素硒(单质硒)无生物活性和生物毒性^[2]。我们在本次实验中, 在培养液中添加 $0.01\sim 1.0 \mu\text{mol/L}$ 硒粉, 发现细胞 cGPx 活性与不加硒的空白组无显著差异。Nuttal^[2]猜测, 胶体状态单质硒具有生物活性。纳米硒(纳米级的单质硒)具有常规单质硒所不具备的生物学效应与其纳米特性有关。纳米微粒表面原子所占的体积百分数大, 表面的键态和电子态与颗粒内部不同, 表面原子配位不全等, 使颗粒表面的活性位置大大增加, 呈现出许多既不同于宏观物体, 也不同于单个孤立原子的奇异现象, 具有量子尺寸效应、表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应, 纳米粒子的特殊物理

表 3 纳米硒对肉鸡肝细胞 cGPx 活性的影响($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)

Se($\mu\text{mol/L}$)	培养时间(h)				
	0	24	48	72	96
0	65.7 ± 7.2^a	53.2 ± 6.4^{bd}	47.3 ± 5.3^{bcd}	42.6 ± 5.8^{cd}	40.2 ± 5.1^{cd}
0.01	65.7 ± 7.2^a	57.5 ± 6.8^{abd}	54.3 ± 6.2^{bd}	51.5 ± 6.1^{bd}	48.8 ± 5.7^{bd}
0.05	65.7 ± 7.2^a	69.3 ± 7.5^{ac}	71.3 ± 7.4^{ac}	73.2 ± 7.4^{ac}	70.6 ± 7.6^{ac}
0.10	65.7 ± 7.2^b	83.5 ± 9.1^{ab}	86.4 ± 8.9^{ab}	89.1 ± 9.2^{ab}	88.7 ± 9.4^{ab}
0.30	65.7 ± 7.2^b	98.2 ± 10.5^{aA}	99.3 ± 10.8^{aA}	99.8 ± 9.7^{aA}	99.2 ± 10.7^{aA}
0.50	65.7 ± 7.2^b	99.6 ± 10.6^{aA}	98.4 ± 10.3^{aA}	102.1 ± 11.6^{aA}	100.5 ± 10.7^{aA}
1.0	65.7 ± 7.2^b	95.3 ± 9.7^{aA}	95.5 ± 10.1^{aA}	93.4 ± 9.8^{aA}	92.7 ± 8.7^{aA}

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; $n=3$ 。同一行中肩标小写字母不同者差异显著($P<0.05$), 同一列中肩标大写字母不同者差异显著($P<0.05$)。

和化学性质是其具有广泛的生物学效应的基础^[7]。表观分子量高达 60 万的纳米碳管可以在小鼠的不同器官之间自由穿梭, 通过尿液排泄, 显示出小分子的生理行为; 而 60 万分量子的常规物质是不可能出现如此奇特的现象的^[8]。

动物(细胞)对硒的营养需要存在一个剂量范围, 在这个范围内, 硒对动物具有营养作用, 而在这个范围之外会引起硒缺乏症或慢、急性中毒, 这种关系就是硒的剂量-效应关系曲线^[1]。本试验结果表明, 3 种硒源都能提高细胞 cGPx 活性, 但是纳米硒的剂量-效应关系曲线中的最适剂量范围宽于亚硒酸钠和蛋氨酸硒, 高剂量添加时比亚硒酸钠和蛋氨酸硒具有更强的营养生物学作用。研究报道, 纳米金属毒性低, 其传感特性和弹性模量可接近正常的天然生物组织, 可使细胞在其表面生长, 并具有修复病变组织的功能^[9]。按照徐辉碧等^[10]提出的硒毒性的自由基机制, 谷胱甘肽与硒(化合物)的不

断反应产生大量活性氧自由基是硒产生毒性的原因之一。Gao 等^[11]报道, 纳米硒与谷胱甘肽的反应速率仅仅是 Na_2SeO_3 与谷胱甘肽的反应速率的 1/12.3。这能部分解释纳米硒 Weinberg 剂量-效应的最适剂量范围较宽的原因, 但其作用机制还有待于进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] 陈春英等. *营养学报*, 1996, **18**: 57
- [2] Nuttal KL. *Med Hypotheses*, 1985, **16**: 155
- [3] Zhang JS *et al. Biofactors*, 2001, **15**: 27
- [4] 张劲松等. *营养学报*, 2000, **22**: 219
- [5] Rotruck JT *et al. Science*, 1973, **179**: 588
- [6] 江青艳等. *华南农业大学学报*, 2001, **22**: 66
- [7] 江 龙. *无机化学学报*, 2000, **16**: 185
- [8] 汪 冰等. *中国科学 B 辑 化学*, 2005, **35**: 1
- [9] 朱屯等编著. *国外纳米材料技术进展与应用*, 北京: 化学工业出版社, 材料科学与工程出版中心, 2002: 163
- [10] 徐辉碧等. *华中理工大学学报*, 1991, **19**: 13
- [11] Gao X *et al. Adv Mater*, 2002, **14**: 290

Effect of Nano-selenium on Cellular Glutathione Peroxidase Activity in Chick Hepatocytes

Cai-Hong Hu*, Mei-Sheng Xia

(College of Animal Science; The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, ZheJiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract A new selenium source, nano elemental selenium (Nano-Se) was used to study the effect on cellular glutathione peroxidase (cGPx) in chick hepatocytes, and sodium selenite (Na_2SeO_3) and seleno-L-methionine (Se-Met) were used as controls. Se was added to the chick hepatocytes at 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ Se, respectively. The results showed that the cGPx activity was increased with elevation of Se concentrations in the range of 0.01–0.10 $\mu\text{mol/L}$ for Na_2SeO_3 and 0.01–0.30 $\mu\text{mol/L}$ for Se-Met or Nano-Se, respectively. The cGPx activity was decreased with elevation of Se concentrations in the range of 0.10–1.0 $\mu\text{mol/L}$ for Na_2SeO_3 and 0.30–1.0 $\mu\text{mol/L}$ for Se-Met, respectively. However, the cGPx activity still remained steady at a range of 0.30–1.0 $\mu\text{mol/L}$ for Nano-Se. The results implicated that the ranking of width range of the most suitable Se concentration for nutrition curve of the three Se forms was: Nano-Se>Se-Met> Na_2SeO_3 .

Key words selenium; nano; cellular glutathione peroxidase; hepatocyte; chick

Received: July 11, 2005 Accepted: September 26, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.M303435), the International Foundation For Science (No.B/3452-1) and the Zhejiang Educational Office (No.20040175)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86985607, Fax: 86-571-86961553, E-mail: chhu@zju.edu.cn