

日粮硒、铜水平对大鼠体内有关的抗氧化酶活性及脂质过氧化产物的影响^①

刘向阳^② 计成 丁丽敏 戎易
(动物科技学院)

摘要 本试验以大鼠为动物模型研究日粮中微量元素硒、铜对体组织中抗氧化酶活性及脂质过氧化物等的影响。试验按2×4随机设计,日粮含2个水平铜分别为0.54和6.05 mg·kg⁻¹,4个水平硒分别为0.021,0.301,0.605和1.102 mg·kg⁻¹。结果表明:组织GSH-Px活性随组织硒水平的升高而显著上升($P < 0.01$),缺硒时组织GST-Px活性下降($P > 0.05$)。缺铜时大鼠组织Cu,Zn-SOD、血浆铜蓝蛋白活性极显著地下降($P < 0.01$)和肝脏等组织中GSH-Px活性也显著下降($P < 0.05$)。组织中脂质过氧化产物MDA丙二醛在硒和铜缺乏时显著上升($P < 0.05$)。肝中GSH-Px活性不仅受硒水平影响,缺铜也下降了。试验认为:硒、铜通过影响有关酶的活性而影响机体的抗氧化能力。

关键词 硒;铜;抗氧化酶;脂质过氧化产物

中图分类号 S816.72

The Effects of Dietary Selenium and Copper on Rat's Activity of Some Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation Products

Liu Xiangyang Ji Cheng Ding Limin Rong Yi
(College of Animal Science & Technology)

Abstract One experiment was designed to study the effects of dietary Se and Cu levels on activity of some antioxidant enzymes and lipid peroxidation production in rat body. The experiment was a 2×4 factorial design with two dietary Cu levels i. e. , 0.54 and 6.05 mg·kg⁻¹, as well as four Se levels i. e. , 0.021, 0.301, 0.605 and 1.102 mg·kg⁻¹ respectively. The results showed that the activities of ceruloplasmin and Cu,Zn-SOD were decreased significantly in case of Cu-deficiency ($P < 0.01$). Tissue Se levels can cause increasing of GSH-Px activity significantly ($P < 0.01$). The results also showed that liver GSH-Px activity was depressed significantly when dietary Cu was deficient. The content of lipid peroxidation in liver was increased significantly not only when dietary Se level being higher but also Cu level decreasing ($P < 0.05$).

Key words selenium; copper; antioxidant enzyme; lipid peroxidation

微量元素Se,Cu分别是谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(Cu,Zn-SOD)的组成成分。Cu,Zn-SOD可清除超氧离子自由基,GSH-Px可清除过氧化氢和脂质过氧化物。铜和硒的缺乏都导致肝和心脏的严重损伤,硒和铜缺乏引起的组织损伤与自由基的破坏

收稿日期: 1997-05-16

①国家教委资助项目 1995年回国人员启动资助。

②刘向阳,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

有关。Cu,Zn-SOD,GSH-Px 和过氧化氢酶(CAT)之间可能存在着相互保护机制^[1],超氧化物歧化酶可把超氧离子转化成过氧化氢,GSH-Px 和 CAT 负责把过氧化氢转化成水和氧,以防止过氧化氢对 SOD 的抑制。据报道超氧离子可对 CAT 和过氧化物酶(oxidase)产生抑制。但超氧离子是否对 GSH-Px 产生抑制还不清楚。Blum 等^[3]用体外试验观察到 GSH-Px 可被超氧化物灭活,Cu,Zn-SOD 的活性是取决于铜的,因此有可能铜通过影响该酶的活性而影响到 Se-GSH-Px 的活性。而 Condell 等人^[2]在体外把 GSH-Px 暴露到过氧化氢中时,观察到 GSH-Px 比较稳定。Prohaska 等^[3]提出铜可能影响肝脏中的 GSH-Px mRNA 的合成,从而影响 GSH-Px 的合成。因此铜和硒之间是否存在相互作用关系,报道资料比较少并且也不一致。本试验的主要目的:研究铜与硒营养状态与相关抗氧化酶类的关系,探讨硒和铜对机体抗氧化能力的影响。

1 试验材料

1.1 试验设计

试验动物采用断乳 Wistar 大白鼠(由中国军事医学科学院试验动物中心繁育)初始体重(54±3)g,随机分成 8 组,饲养在不锈钢网底有机玻璃笼中,室温控制在(21±1)℃,空气湿度 45%~50%,光照时间 12 h,自由采食,饮水(去离子水)。北京农业大学试验动物中心提供场地。

试验按 2×4 因子设计,硒和铜两个因子,硒设四个水平分别为 0.021,0.301,0.605 和 1.102 mg·kg⁻¹;铜两个水平分别为 0.54(缺铜)和 6.05 mg·kg⁻¹(正常铜)(见表 1)。

1.2 试验步骤及样品采集

试验开始分组时随机抽取大鼠,麻醉后颈静脉采血,肝素抗凝,随后取出肝脏、心脏。肝脏用冷生理盐水冲洗透析,用无灰分滤纸吸去水分,称重。贮存在-40℃冷柜中供以后分析,作为基础参考。另批大鼠 6 周试验结束前一天,断食 24 h 后,大鼠麻醉,如上法采集血液、肝脏、心脏,2 000×g 离心 10 min 分离血浆待以后分析使用。

1.3 样品分析

1.3.1 组织匀浆 各组织样品在 4℃下解冻,称取组织样按 1:9(W/V)在 Tris-HCl 缓冲液(Tris-HCl 25 mmol·L⁻¹,pH7.4,KCl 0.175 mol·L⁻¹)中匀浆,匀浆器为杆式玻璃研磨匀浆器,转速 5 000 r·min⁻¹,3 min,匀浆在冰浴中进行。

1.3.2 蛋白的测定(Lowry 法)^[4]:采用 Folin-酚试剂法,在 722 分光光度计 500 nm 下测 OD 值。

1.3.3 脂质过氧化物分析方法 根据向荣等(1990)^[5]过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度改进法。

1.3.4 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的测定(Wendel 法 1981)^[6] 10%组织匀浆 800×g

表 1 基础纯合日粮(低硒和低铜)主要成分和配比

主要成分	配比/%
干酪素	20
蔗糖	25
玉米淀粉	45.1
玉米油	5
复合维生素	1
矿物添加剂	3.5
氯化胆碱	0.1
DL-蛋氨酸	0.3

注:复合维生素和矿物添加剂的配制参考 AIN-76^[2](蔗糖为载体,不加硒源,试剂均为分析纯)。矿物添加剂中不加硒和铜。补硒和补铜日粮在基础日粮中补加 selenite 和 CuSO₄·5H₂O。

离心 20 min(4℃)取上清液,然后 $17\ 000\times g$ 离心 20 min(4℃),上清液用于酶活性分析,按酶联分光光度法:在 37℃ 每 min 每氧化 1 微摩尔数的 NADPH 为一个酶单位。反应体系为 1 mL K-PO₄ 缓冲液最终浓度为 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0, EDTA, $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN₃, $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH, $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPH, $0.25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 谷胱甘肽还原酶 $1.0\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, H₂O₂ $0.25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 在 37℃ 下用光栅分光光度计在 340 nm 处观察光吸收的下降。

1.3.5 谷胱甘肽转硫酶(GST)活性测定 按 Habig 等人的分光光度计法^[7]。酶的活性单位定义为:25℃ 每分钟形成 1 μmol 1-硫-2,4-二硝基苯谷胱甘肽作为该酶的一个活性单位。反应液含有:K-PO₄ $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.5 GSH, $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, CDNB $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和适量样品,总容量为 1.0 mL 在 25℃ 下用光栅分光光度计在 340 nm 处观察光吸收的上升值。

1.3.6 Cu,Zn-SOD 活性测定^[8] 1 mL 匀浆加 0.4 mL 的 25:15(V:V)乙醇:氯仿,振荡,离心,取上清液测定酶的活性;在 25℃ 时 4.5 mL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.30 K-PO₄ 缓冲液中加入联苯三酚 10 μL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 迅速摇匀,倒入光径 1 cm 的比色杯中,在 325 nm 波长下每隔 30 s 测 OD 值一次,自氧化率控制在 $0.07\ 0\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}$ 左右,在测酶活性时,加入样液适量(空白用重馏水代替),然后加入联苯三酚,迅速摇匀记录 $\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}$ 值。酶的活性单位是每分钟抑制联苯三酚自氧化率达 50% 时的酶量。

1.3.7 饲料和组织硒的测定用氢化物发生原子吸收法^[9] 饲料和组织样品的消化,消化装置为 Behrotest 程控装置,称取样品适量(根据硒含量而定)放入 200 mL 消化管中,加入混合酸 35 mL(硝酸+高氯酸+硫酸=4:1:1),然后放进程序控制温度的消化装置中消化,步骤为①50℃ 消化 20 min;②75℃ 20 min;③100℃ 120 min;④150℃ 60 min 待冷却后加入 7 mL HCL 使 6 价硒还原为 4 价硒;⑤150℃ 6 h,把消化液定容于 50 mL 容量瓶中,用无灰分滤纸过滤后待上机测定(同时以空白作对照)。采用氢化物发生器的原子吸收发射光谱仪。

1.3.8 饲料和组织中 Cu 的分析 原子吸收法^[9]。饲料消化采用干消化法,组织用湿消化法。铜的测定条件为波长 324.7 nm,狭缝 0.2 nm,乙炔空气火焰(同时以空白作对照)。

2 试验结果

1)铜对 Cu,Zn-SOD 有极显著的影响,补铜组比缺铜组肝脏 Cu,Zn-SOD 酶活性提高了 2.76 倍,心脏酶活性提高了 50%(表 2)。

2)肝脏和心脏中的 GSH-Px 活性受硒水平的显著影响,硒的缺乏引起其活性的显著下降,补硒能提高其活性。补硒组与缺硒组相比,肝脏 GSH-Px 活性分别提高了 16.7,20.6 和 23.8 倍;心脏分别提高了 11.0,12.68 和 13.9 倍,铜缺乏时可影响到 GSH-Px 活性,缺铜组与补铜组相比肝脏的 GSH-Px 活性降低。在日粮缺铜时肝脏 GSH-Px 的活性与铜含量正常组相比降低 24%,心脏酶活性降低 15%。试验表明在铜缺乏时,肝等组织 GSH-Px 的活性下降(表 3)。

表2 组织中Cu,Zn-SOD活性

U·mg⁻¹(protein)

组织	Cu mg·kg ⁻¹	Se/mg·kg ⁻¹				M±SD
		0.021	0.301	0.605	1.102	
肝脏	0.54	20.12±1.77	2.20±1.76	21.78±1.27	19.80±1.27	20.98±1.77A
	6.05	78.25±4.622	80.49±4.37	77.65±5.59	76.54±4.73	78.23±4.69B
M±SD		49.19±30.81A	51.35±30.88A	49.72±29.69A	48.17±30.08A	
心脏	0.54	19.24±1.77	18.98±1.27	20.47±1.77	19.87±1.27	19.64±1.53A
	6.05	30.24±2.26	29.94±2.33	29.21±2.13	28.83±1.69	29.56±3.33B
M±SD		24.74±6.11A	24.46±6.04A	24.84±6.27A	24.35±4.93A	

注:表中酶活性平均值在同一行或者同一列标有相同字母者为差异不显著。下同。

表3 日粮铜和硒对组织GSH-Px活性的影响

U·g⁻¹(protein)

组织	Cu mg·kg ⁻¹	Se/mg·kg ⁻¹				M±SD
		0.021	0.301	0.605	1.102	
肝脏	0.54	0.020±0.002	0.401±0.025	0.510±0.040	0.645±0.045	0.394±0.252A
	6.05	0.036±0.004	0.590±0.035	0.699±0.045	0.740±0.045	0.516±0.288B
M±SD		0.028±0.004D	0.496±0.094C	0.605±0.074B	0.693±0.052A	
心脏	0.54	0.024±0.002	0.256±0.017	0.324±0.016	0.350±0.025	0.239±0.133A
	6.05	0.025±0.002	0.341±0.016	0.359±0.025	0.396±0.028	0.280±0.154B
M±SD		0.025±0.002D	0.299±0.047C	0.342±0.027B	0.373±0.035A	

3) GST酶活性在硒缺乏时,显著升高,肝脏中GST酶活性在硒缺乏时与其他三个补硒组相比分别提高了25%,27%和19%,血浆GST酶活性则分别提高了20%,28%和21%,铜对GST的影响不显著(表4)。

表4 硒和铜对GST活性的影响

U·mg⁻¹(protein)

组织	Cu mg·kg ⁻¹	Se/mg·kg ⁻¹				M±SD
		0.021	0.301	0.605	1.102	
肝脏	0.54	0.210±0.015	0.167±0.012	0.170±0.013	0.180±0.018	0.182±0.035A
	6.05	0.225±0.018	0.182±0.010	0.173±0.012	0.190±0.016	0.193±0.025A
M±SD		0.218±0.040A	0.175±0.013B	0.172±0.012B	0.185±0.016B	
血浆	0.54	0.203±0.013	0.189±0.011	0.176±0.011	0.184±0.013	0.188±0.015A
	6.05	0.210±0.016	0.154±0.011	0.146±0.011	0.155±0.011	0.166±0.028A
M±SD		0.207±0.014A	0.172±0.021B	0.161±0.019B	0.170±0.019B	

5) 日粮中的硒水平对组织中的MDA水平有显著影响,硒缺乏时测得肝中MDA平均值分别比三个补硒组提高了12%,16%和16%,血浆中分别提高了9%,13%和6%;日粮中

铜的水平对MDA的水平也有一定的影响,缺铜与正常铜水平相比肝脏中的MDA提高了18%,血浆中的MDA提高了9%(表5)。

表5 日粮中硒和铜水平对组织MDA的水平的影响

组织	Cu mg·kg ⁻¹	Se/mg·kg ⁻¹				M±SD
		0.021	0.301	0.605	1.102	
肝脏	0.54	999±55	980±45	950±45	942±45	968±50A
/ng·g ⁻¹	6.05	978±45	782±35	751±35	760±35	818±101B
M±SD		989±49A	881±111B	850±112B	851±103B	
血浆/	0.54	0.421±0.025	0.405±0.025	0.391±0.023	0.410±0.025	0.407±0.025A
nmol·mL ⁻¹	6.05	0.412±0.023	0.357±0.025	0.342±0.025	0.375±0.025	0.372±0.035B
M±SD		0.417±0.023A	0.381±0.035B	0.367±0.034B	0.393±0.030AB	

注:表中MDA在同一行或者同一列中标有相同字母者为差异不显著

3 讨论

日粮铜的缺乏从组织中铜浓度和Cu,Zn-SOD活性的显著降低得到证实,日粮缺铜引起肝和心脏组织Cu,Zn-SOD活性的显著降低,研究表明Cu,Zn-SOD活性取决于组织铜的含量^[13]。日粮硒对组织中的Cu,Zn-SOD活性没有显著影响。硒的缺乏引起组织中硒的浓度和组织GSH-Px的显著下降。本试验结果表明硒的缺乏显著抑制组织GSH-Px的活性,缺硒时肝脏和心脏中的GSH-Px极显著地下降,补硒能提高GSH-Px活性。铜的缺乏影响大鼠肝脏中的GSH-Px酶的活性,缺铜与铜正常相比降低24%,心脏中的GSH-Px活性也降低了15%。铜缺乏时GSH-Px活性的降低也可通过补加硒来提高。缺铜常造成心脏的严重损伤及心血管疾病的发生^[12],这也可能是由于Cu,Zn-SOD和GSH-Px活性的同时下降造成自由基对心肌细胞的直接损害。缺铜导致GSH-Px的活性下降是由于铜缺乏时影响过氧化氢的代谢,反过来影响GSH-Px的诱导,由于Cu,Zn-SOD活性在铜缺乏时下降,抑制超氧离子向过氧化氢的转化,过氧化氢浓度降低,抑制诱导GSH-Px的产生,也可能是超氧离子积累直接抑制了GSH-Px的活性。另一个可能的机制是铜通过酶的作用影响GSH-Px的合成。

谷胱甘肽硫转移酶(GST)可起到非硒谷胱甘肽过氧化物酶的作用,缺硒明显抑制GSH-Px的活性使有害的脂质过氧化物浓度升高,GST此时的升高是对GSH-Px的活性降低的一种补偿作用^[13]。本试验结果表明铜对GST活性的影响统计上不明显。

日粮铜和硒对脂质过氧化物的产生有显著影响。SOD和CAT以及GSH-Px是组织中最重要抗氧化酶系,由于铜缺乏时Cu,Zn-SOD和CAT活性降低^[12],日粮硒的不足显著降低组织中的硒和GSH-Px的活性,因此组织的抗氧应激的能力下降。缺铜、缺硒造成Cu,Zn-SOD,CP和GSH-Px的活性的下降,氧自由基的积累,机体抗氧化的能力受损,使组织中的MDA的生成增加。以往的试验也证明缺铜时,动物对一些氧应激因子的敏感性升高,例如:氧过量,四氯化碳和臭氧等^[14]。缺铜与铜正常时相比,肝线粒体和微粒体在诱导体系

中产生的 MAD 量增多^[15]。这些研究提示铜缺乏时易遭受氧应激的损伤。

4 小结

肝和心脏组织中的 GSH-Px 的活性不仅受日粮硒营养状况影响,在铜缺乏时 GSH-Px 的活性也下降,硒缺乏时 GSH-Px 活性显著下降,组织中 MDA 含量增高;缺铜时肝和心脏中的 GSH-Px 活性显著下降,组织 MDA 水平升高。结果表明日粮硒和铜水平的变化影响大鼠的抗氧化能力。

参 考 文 献

- 1 Blum J, Fridovich L. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1985,240(2):500~508
- 2 Condell R A, Tappel A. Evidence for suitability of glutathione peroxidase as protective enzyme; studies of oxidative damage, renaturation and proteolysis. Arch Biochem Biophys, 1983,22(3): 407~416
- 3 Prohaska J R, et al. Livers from copper-deficient rats have lower glutathione peroxidase activity and mRNA levels but normal liver selenium levels. J Biochem, 1992, (3):429
- 4 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the rolin phenol reagent. J Biol Chem, 1951,193: 265
- 5 向荣,王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进. 生物化学与生物物理进展, 1990,17(3): 241
- 6 Wendel A F, et al. Method in enzymology. New York: Acad Press, 1981,77: 325
- 7 Hbig W H, Pabst H J, Jakoby W B. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem, 1974,249: 7 130~7 139
- 8 邓碧玉,袁勤生,李文杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法. 生物化学与生物物理进展, 1991,18(2):163
- 9 PERKIN-ELMER Model-1100 atomic absorption spectrometer Operator's manual
- 10 Lehman H P, et al. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity activity in serum by hydrochloric. Clin Chem, 1974,20:1 556~1 563
- 11 郭世炳,句海松,韩哲武. 运动对小鼠肌肉和肝脏内 MDA 及 GSH 含量的影响. 生物化学与生物物理进展, 1991,18(3):232
- 12 Chung K, Romero N, Tinker D, Keen C L, Amemige K, Rucker R. Role of copper in the regulation and accumulation of superoxide dismutase and metallothionein in rat liver. J Nutr, 1988,118,859
- 13 Arthur J R, Morrice P C, Beddows S E, Bogd R, Hayes J D, Beckett G J. The effects of selenium and copper deficiencies on glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in rat liver. Biochem J, 1987,248:539~544
- 14 Jinkinson S G, et al. Enhanced pulmonary toxicity in copper-deficient rats exposed to hyperoxia. Fundam Appl Toxicol, 1987,4,170
- 15 Paynter D I. The role of dietary copper, manganese, selenium and vitamin E in lipid peroxidation in tissues of the rat. Biol Trace Elem Res, 1980,2:121~135