

## 硒对大鼠心、肝、肌、胰、肺和肾脏细胞 线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取的影响

赵君庸 贾锡安 王玉珍 侯建政 张平川

(西安医科大学生化教研室, 西安 710061)

**摘要** 用低硒饲料和该饲料补硒分别喂大鼠, 对比观察硒对动物心、肝、肌、胰、肺和肾脏线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取及心肌线粒体呼吸的影响。结果表明硒非常显著地刺激此六脏器细胞线粒体钙摄取, 其中, 对心、肝、肌的刺激强大而稳定; 对胰、肺, 在温育过程中逐渐增强; 对肾则稍差。硒还非常显著地刺激心肌线粒体呼吸功能。提示硒对维持整体线粒体钙运转及心肌线粒体呼吸功能具有重要作用。

**关键词:** 硒; 心、肝、肌、胰、肺和肾脏线粒体; 钙摄取; 心肌线粒体呼吸功能

硒是人和动物必需微量元素, 参与构成谷胱甘肽过氧化酶<sup>[1]</sup>、磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化酶<sup>[2]</sup>及脱碘酶<sup>[3]</sup>活性中心, 在机体抗氧化系统和保护生物膜机制中有重要作用<sup>[4]</sup>。文献报道<sup>[5,6]</sup>, 缺硒动物心肌线粒体氧化磷酸化显著障碍, 后者又与线粒体钙转运密切相关<sup>[7]</sup>。我们选择循环、呼吸、消化、泌尿、运动系统各一脏器(心、肺、胰、肾、骨骼肌)及物质代谢旺盛的肝脏, 分别观察硒对其线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取及心肌线粒体呼吸功能的影响, 并探讨其机理。

### 材 料 和 方 法

#### 一、动物及喂养

Sprague-Dawley 种大鼠, 雌雄各半, 断奶1周, 完全随机分为两组:

1. 低硒组: 饲料取自陕西省黄陵县双龙乡。配方组成(%): 玉米 64, 小麦 27.5, 黄豆 7.5, 氯化钠 0.6, 鱼肝油 0.2, 酵母 0.2, 含 0.009mg Se/kg。

2. 补硒组: 同低硒组饲料, 但用亚硒酸钠补硒到 0.232mg Se/kg (接近西安粮含硒量<sup>[8]</sup>)。

动物自由进食, 饮自来水。喂至16周, 配对活杀, 用于实验。

## 二、主要试剂及仪器

琥珀酸钾, 上海试剂二厂。ATP, Boehringer Mannheim, West Germany。 $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ , 74mBq/g(mL), 中国科学院原子能研究所, 北京。混合纤维素酯微孔滤膜, HA 0.54 $\mu$ , 上海市新亚净化器件厂。2,5-二苯基噁唑(PPO)及1,4-双-[5-苯噁唑基-2]-苯(POPOP), 上海试剂总厂(进口分装)。dL-苹果酸, 上海试剂二厂。L-谷氨酸, 上海试剂二厂。ADP-Na, Fluka Chemic, Switzerland。亚硒酸钠, 北京化工厂。EDTA, 西安化学试剂厂。HSC-20R型高速冷冻离心机, 图们离心机厂。LS-9000 Backman 液体闪烁计数器, LKB 1214 Rackbeta, USA。YSI 5300型生物样品用测氧仪及5331型Clark氧电极, Yellow Spring Inst.Co., Ohio, USA。

## 三、方法

1. 心、肝、肌、胰、肺和肾脏细胞线粒体制备及心肌线粒体呼吸功能测定: 断头处死动物, 迅速取出心、肝、股部骨骼肌、胰、肺和肾脏, 4 $^{\circ}\text{C}$ 以下环境中参照Gazzotti等<sup>[8]</sup>及中国科学院生物物理所<sup>[10]</sup>方法进行。

2. 微孔滤膜法测定各脏器线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取: 参照Malmstrom及Carafoli<sup>[11]</sup>法进行。底物为0.5m mol/L琥珀酸钾。加入 $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ 量为10 $\mu\text{L}$ (含 $^{45}\text{Ca}$  740 $\mu\text{Bq}$ , 即温育开始时,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为8.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。本底滤膜与测定滤膜处理相同, 但不加线粒体悬浮液。计算线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取量时, 由测定滤膜中扣除本底滤膜之放射强度。 $^{45}\text{Ca}$ 摄取量以CPM/mg线粒体蛋白(CPM/mg of protein)表示。

3. 血硒浓度测定: 按2,3-二氨基萘荧光法<sup>[12]</sup>进行, 结果以ng Se/mL表示。

4. 各脏器线粒体悬浮液蛋白质含量的确定: 以牛血清白蛋白为标准品, 用Hartree's法<sup>[13]</sup>测定各脏器线粒体制备液中蛋白质含量, 再按20mg线粒体蛋白质/mL要求, 用温育介质配制成悬浮液。0 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 立即使用。

## 结 果

### 一、硒对大鼠心肌线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取的影响

喂养16周时两组大鼠心肌线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取量的比较见Table 1。统计学处理显示, 补硒组

Table 1 The counts of  $^{45}\text{Ca}$  uptaken by myocardial mitochondria from selenium-deficient and selenium-supplemented rat<sup>1</sup>

Incubation time (min.)	Group of Se-deficient <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	Group of Se-supplemented <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	P
3	51230.0 $\pm$ 2762.0	70612.6 $\pm$ 3401.9	*
6	62235.1 $\pm$ 2639.7	78010.1 $\pm$ 3519.5	*
9	71781.2 $\pm$ 2762.0	90531.3 $\pm$ 3018.8	*
12	77884.4 $\pm$ 4244.6	95346.1 $\pm$ 1684.2	*
15	79016.9 $\pm$ 3934.6	100788.6 $\pm$ 7236.6	*
30	80453.6 $\pm$ 3418.8	103387.9 $\pm$ 7292.8	*

1: n=18. 2: X $\pm$ SD. \*: P<0.001

在各温育时间的  $^{45}\text{Ca}$  摄取量均非常显著而稳定地高于缺硒组 ( $P < 0.001$ )。

## 二、硒对大鼠肝脏线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取的影响

喂养 16 周时两组大鼠肝脏线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取量的比较见 Table 2。统计学处理显示, 补硒组在各温育时间的  $^{45}\text{Ca}$  摄取量均非常显著而稳定地高于缺硒组 ( $P < 0.001$ )。

**Table 2** The counts of  $^{45}\text{Ca}$  uptaken by mitochondria of liver from selenium-deficient and selenium-supplemented rat<sup>1</sup>

Incubation time (min.)	Group of Se-deficient <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	Group of Se-supplemented <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	P
3	19524.0 ± 3304.4	34261.9 ± 8861.6	*
6	21297.0 ± 3880.8	35314.8 ± 8342.4	*
9	22550.7 ± 3740.5	40134.6 ± 8674.5	*
12	23609.9 ± 4620.7	43085.4 ± 9035.0	*
15	24498.2 ± 4273.5	46251.5 ± 10949.6	*
30	27117.9 ± 5981.3	54929.4 ± 12497.5	*

1: n = 18. 2:  $\bar{X} \pm \text{SD}$ . \*:  $P < 0.001$

## 三、硒对大鼠骨骼肌线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取的影响

喂养 16 周时两组大鼠股部骨骼肌线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取量的比较见 Table 3。统计学处理显示, 补硒组在各温育时间的  $^{45}\text{Ca}$  摄取量均非常显著而稳定地高于缺硒组 ( $P < 0.001$ )。

**Table 3** The counts of  $^{45}\text{Ca}$  uptaken by mitochondria of muscle from selenium-deficient and selenium-supplemented<sup>1</sup>

Incubation time (min.)	Group of Se-deficient <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	Group of Se-supplemented <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	P
3	15457.8 ± 4884.9	28159.6 ± 6594.2	*
6	16408.5 ± 4422.5	29275.5 ± 6594.2	*
9	17467.1 ± 4223.2	31117.6 ± 8088.7	*
12	18423.8 ± 4178.4	33056.8 ± 8385.3	*
15	20648.0 ± 3993.2	36073.9 ± 7549.7	*
30	22751.3 ± 4002.7	41201.6 ± 8125.6	*

1: n = 18. 2:  $\bar{X} \pm \text{SD}$ . \*:  $P < 0.001$

## 四、硒对大鼠胰脏线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取的影响

喂养 16 周时两组大鼠胰脏线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取量的比较见 Table 4。统计学处理显示, 补硒组随温育时间的延长, 线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取量越来越非常显著地高于缺硒组 (温育 3~6 min 时,  $P < 0.01$ ; 9~30min 时,  $P < 0.001$ )。

**Table 4** The counts of  $^{45}\text{Ca}$  uptaken by mitochondria of pancreas from selenium-deficient and selenium-supplemented<sup>1</sup>

Incubation time (min.)	Group of Se-deficient <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	Group of Se-supplemented <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	P
3	15269.0 ± 3376.3	21847.8 ± 5904.2	**
6	17281.3 ± 5599.2	28058.4 ± 6269.8	**
9	18189.9 ± 5782.9	31315.2 ± 7822.4	*
12	20193.6 ± 5536.1	34578.1 ± 8177.8	*
15	21275.1 ± 5962.3	38578.1 ± 8292.8	*
30	23612.9 ± 6460.2	40223.6 ± 9175.6	*

1: n=18. 2:  $\bar{X} \pm \text{SD}$ . \*: P<0.001. \*\*: P<0.01

### 五、硒对大鼠肺脏线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取的影响

喂养 16 周时两组大鼠肺脏线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取的比较见 Table 5。统计学处理显示，补硒组

**Table 5** The counts of  $^{45}\text{Ca}$  uptaken by mitochondria of lung from selenium-deficient and selenium-supplemented rat<sup>1</sup>

Incubation time (min.)	Group of Se-deficient <sup>2</sup> (BPM/mg of protein)	Group of Se-supplemented <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	P
3	18445.5 ± 6266.3	27755.4 ± 5283.6	**
6	20057.3 ± 6688.7	30752.1 ± 7740.0	**
9	22371.2 ± 6712.9	33617.0 ± 8368.3	**
12	23947.5 ± 6864.3	37950.3 ± 9061.7	**
15	25294.0 ± 7231.8	41147.3 ± 4870.6	*
30	28626.9 ± 7088.8	45185.8 ± 8984.6	*

1: n=18. 2:  $\bar{X} \pm \text{SD}$ . \*: P<0.001. \*\*: P<0.01

随温育时间的延长，线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取量逐渐地、越来越非常显著地高于缺硒组(温育 3~12min 时, P<0.01; 15~30min 时, P<0.001)。显然，增高的速度，与胰脏比较则稍差。

### 六、硒对大鼠肾脏线粒体 $^{45}\text{Ca}$ 摄取的影响

喂养 16 周时两组大鼠肾脏线粒体  $^{45}\text{Ca}$  摄取的比较见 Table 6。统计学处理显示，补硒组

**Table 6** The counts of  $^{45}\text{Ca}$  uptaken by mitochondria of kidney from selenium-deficient and selenium-supplemented rat<sup>1</sup>

Incubation time (min.)	Group of Se-deficient <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	Group of Se-supplemented <sup>2</sup> (CPM/mg of protein)	P
3	17060.9 ± 6089.3	25825.0 ± 5358.0	**
6	17978.4 ± 7145.6	27188.5 ± 5886.5	**
9	19087.1 ± 7669.7	28601.2 ± 5775.7	**
12	19907.2 ± 8404.7	29642.8 ± 5479.5	**
15	20753.7 ± 8510.7	32224.0 ± 5506.4	**
30	25131.4 ± 9919.9	36334.4 ± 9101.7	**

1: n=18. 2:  $\bar{X} \pm \text{SD}$ . \*\*: P<0.01

在各温育时间的  $^{45}\text{Ca}$  摄取量虽也非常显著地高于低硒组 ( $P < 0.01$ ), 并且差异较稳定, 但与心、肝、肌、胰和肺脏比较则稍差。

### 七、硒对心肌线粒体呼吸功能的影响

Table 7 是喂养 12 周时两组大鼠心肌线粒体呼吸功能的变化。统计学处理显示, 硒可非常显著地刺激心肌线粒体呼吸功能。补硒组  $S_3$  及 RCR 均非常显著地高于缺硒组,  $S_4$  及 P/O 无显著差异。

**Table 7** The effects of selenium on respiratory functions in rat myocardial mitochondria<sup>1</sup>

Group	$S_3^2$ ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	$S_4^2$ ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	RCR <sup>2</sup> ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	P/O <sup>2</sup> ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )
Se-deficient	130.22 ± 4.81	23.14 ± 3.45	5.63 ± 0.42	3.22 ± 0.52
Se-supplemented	191.22 ± 3.99*	24.59 ± 2.72	6.85 ± 0.79**	3.19 ± 0.50

1: n = 18

2: The unit of  $S_3$ ,  $S_4$  is O nA/min./mg protein of mitochondria. RCR and P/O are ratio.

\*: P 0.001, \*\*: P < 0.01

### 八、大鼠血硒浓度的变化

两组大鼠血硒浓度测定结果见 Table 8。统计学处理显示, 补硒组非常显著地高于缺硒组, 但未超过西安粮喂养大鼠的血硒浓度<sup>[8]</sup>。

**Table 8** Blood selenium concentration of rats (ng Se/mL blood)<sup>1</sup>

Group	Selenium concentration ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	P
Se-deficient	31 ± 6	0.001
Se-supplemented	309 ± 18	

1: n = 18

## 讨 论

与补硒组比较, 低硒饲料使动物心、肝、肌、胰、肺和肾脏线粒体钙摄取均非常显著下降, 其中, 心、肝、肌下降得显著而稳定, 胰和肺在温育过程中逐渐下降, 肾相对较差。提示硒可从整体上促进线粒体钙摄取, 能量要求较严的心、肌和代谢旺盛的肝线粒体作用尤为明显。

线粒体通过内膜单向钙转运载体摄取钙, 驱动力是呼吸过程产生的膜势能, 损害线粒体呼吸功能的因素皆可降低其钙摄取<sup>[14]</sup>。本文结果表明缺硒心肌线粒体呼吸功能非常显著下降, 故推测缺硒动物线粒体钙摄取的下降可能与其呼吸功能障碍、导致膜势能下降有关。

$\text{Ca}^{2+}$  可激活线粒体中丙酮酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶及  $\alpha$  酮戊二酸脱氢酶, 解除某些抑

制剂对 ATP 合成酶的抑制, 在泛醌水平池上刺激呼吸链活性<sup>[7]</sup>, 但  $\text{Ca}^{2+}$  浓度过高或过低时均失却此作用<sup>[15]</sup>。已证明缺硒动物肝线粒体钙释出非常显著下降, 甚至用大量刺激线粒体钙释放的诱导物 (Tert-butylhydroperoxide 等) 也不能诱导钙释放, 而补硒后则迅速释出堆积的钙<sup>[16]</sup>。本文又证实缺硒使线粒体钙摄取非常显著下降, 故在缺硒状态下动物线粒体钙释放及钙摄取均下降。但线粒体钙释放的最大能力还不及摄取的 1%<sup>[17]</sup>, 即在二者相同程度损害下, 释放能力的下降可使线粒体钙堆积。缺硒状态下二者均非常显著下降, 故使其钙堆积。而线粒体钙堆积又加重其呼吸功能障碍<sup>[18]</sup>, 形成恶性循环。故硒通过影响线粒体钙释放和钙摄取, 全面调节线粒体钙运转, 在整体上维持重要脏器线粒体的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度正常, 从而参与保证其呼吸功能正常。

### 参 考 文 献

- 1 Rotruck J T, et al. *Science*, 1973, 179: 588—590
- 2 Ursini F, et al. *Biochem Biophys Acta*, 1985, 836: 63—70
- 3 Dehne D, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173: 1143—1149
- 4 孔祥瑞. 必需微量元素的营养、生理及临床意义, 合肥: 安徽科学技术出版社, 1982: 296—320
- 5 赵君庸, 等. 西安医科大学学报, 1987, 8: 258—260
- 6 卫生部地方病防治局. 楚雄克山病综合性考察文集, 北京: 人民卫生出版社, 1988: 178—184
- 7 McCormack T G, et al. *Biochem Biophys Acta*, 1990, 1018: 287—291
- 8 朱世英, 等. 陕西医药资料, 1982, 4: 88
- 9 Gazzotti P, et al. In: Carafoli E, Semenza G ed. *Membrane Biochemistry*, New York Springer-Verlag New York Inc., 1979: 61—67
- 10 中国科学院生物物理所线粒体研究小组. 线粒体的分离与活性测定, 北京: 内部交流资料, 1980: 1—11
- 11 Malmstrom K, et al. In: Carafoli E, Semenza G ed. *Membrane Biochemistry*, New York, Springer-Verlag New York Inc., 1979: 103—112
- 12 中国医学科学院克山病防治小分队. 生物样品中微量硒的荧光测定方法, 卫生研究, 1976, 2: 175—177
- 13 Hartree E F. *Analytical Biochemistry*, 1972, 48: 422—427
- 14 Williams A. In: Dreke-Holland A J, Noble M I M ed. *Cardiac Metabolism*, Chichester, John Wiley and Sons Ltd. 1983: 151—171
- 15 Lucas-Heron B, et al. *Neuroscience Letters*, 1990, 155: 103—107
- 16 Richter C, et al. *Chem Biol Interactions*, 1991, 77: 1—23
- 17 Fiskum G. In: Fiskum G ed. *Mitochondrial Physiology and Pathology*, New York, Van Nostrand Reinhold Company Inc., 1986: 180—201

## The Effects of Selenium on $^{45}\text{Ca}$ Uptake in Mitochondria From Myocardia, Liver, Muscle, Pancreas, Lung and Kidney in Rat

Zhao, Jun-yong    Jia, Xi-an    Wang, Yu-zhen    Hou, Jian-zheng    Zhang Ping-chuan

(Department of Biochemistry, Xi'an Medical University, Xi'an 710061)

**Abstract** In order to determine the effects of Se on Ca uptake by mitochondria

in whole-body, we investigated the counts of  $^{45}\text{Ca}$  uptaken by mitochondria from myocardia, liver, muscle, pancreas, lung and kidney and myocardial mitochondrial respiratory functions in rats fed separatly with a Se-deficient (0.009mg Se/kg) diet and the diet supplemented(0.232 mg Se/kg)as selenite. The results show that dietary selenium has high significantly stimulative effects on Ca uptake by mitochondria from these six organs. among them, myocardia,liver and muscle are most strongly stimulated, and the stimulation effects on mitochondria in pancreas and lung gradually increase in the course of incubation, while stimulation effects on mitochondria in kidney are weak. Besides can also remarkably stimulate respiratory functions. The present results suggest that Se can maintain mitochondrial normal Ca transport in whole-body and myocardial mitochondrial respiratory function in rat.

**Key words:** Selenium, Mitochondria, Calcium uptake, Myocardia, Liver, Muscle, Pancreas, Lung, Kidney