

富硒乳酸菌抗肝损伤小鼠红细胞脂质过氧化作用

朱善良^{1 2 3} 陈龙¹ 高伟¹ 赵洁明¹

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097 南京)

(2. 江苏省应用毒理重点实验室 210029 南京)

(3. 江苏教育学院生物科学系 210013 南京)

[摘要] 选择 60 只健康雌雄对半成年小鼠,随机分成对照组(C 组)、富硒乳酸菌组(Se 组)、CCl₄-富硒乳酸菌组(CCl₄-Se 组)、CCl₄ 注射组(CCl₄ 组),通过腹腔注射 CCl₄ 诱发肝损伤,分别在第 2、4、6 周采集血样并测定红细胞溶血液中 GSH-Px、GST 和 SOD 活性及 MDA 含量。研究富硒乳酸菌对 CCl₄ 诱发肝损伤小鼠红细胞脂质过氧化损伤的保护作用。结果显示,在整个实验期内,SOD 各组间未见明显差异,GST 表现为 Se 组最高,呈上升趋势,且在第 6 周高于或明显高于其他各组,CCl₄ 组低于或明显低于 C 组和 CCl₄-Se 组,C 组和 CCl₄-Se 组相近;C 组、Se 组和 CCl₄-Se 组 GSH-Px 活性无明显差异,而 CCl₄ 组随负荷时间呈下降趋势,第 4 周后明显低于其余三组,C 组和 CCl₄-Se 组的 MDA 无明显差异,Se 组整体水平低于或明显低于其它三组,CCl₄ 组高于或显著高于其它三组。提示 CCl₄ 诱发肝损伤小鼠红细胞脂质过氧化变化剧烈,富硒乳酸菌制剂能通过抗损伤保护以及增强抗氧化酶活性发挥有效作用。

[关键词] 富硒乳酸菌 肝损伤 红细胞 脂质过氧化

[中图分类号] Q955, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2004)01-0074-04

红细胞是血液的主要细胞成分,在机体内主要起着运送 O₂ 和 CO₂ 的作用。但进一步的研究资料证实,红细胞具有识别、粘附、浓缩、杀伤异己、清除免疫复合物的能力,参与机体的免疫调控^[1]。在许多疾病发生机理中,红细胞免疫缺陷占有很重要的地位。而在多种病理生理状态下,红细胞会发生脂质过氧化,引起抗氧化酶系诸如 SOD、GSH-Px 等和脂质过氧化产物如 MDA 的变化^[2],从而影响红细胞生理功能的发挥。硒是机体必需的一种微量元素,是构成重要的抗氧化酶 GSH-Px 的活性中心,具有明显的抗氧化作用^[3-5]。硒及硒产品的研究与开发在防病治病方面具有重要意义,富硒乳酸菌是借助乳酸菌富集并转化无机硒为有机硒以制备和生产有机硒的功能性调节剂,其生物学价值和作为补硒途径的潜在前景非常广阔。本实验采用 CCl₄ 诱发小鼠肝损伤模型,研究 CCl₄ 负荷小鼠红细胞脂质过氧化损伤以及富硒乳酸菌的抗损伤保护作用,旨在揭示富硒乳酸菌抗肝损伤小鼠红细胞脂质过氧化保护作用机制,为进一步研究和开发提供科学实验资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60 只健康成年小鼠,雌雄对半,体重 32.503 ± 0.711 g,经 3 d 的适应性饲养后,随机分成 4 组,即对照组(C 组)、富硒乳酸菌保护组(Se 组)、CCl₄+富硒乳酸菌保护组(CCl₄-Se 组)、CCl₄ 注射组(CCl₄ 组),每组 15 只。C 组和 CCl₄ 组饲喂普通全价饲料,Se 组和 CCl₄-Se 组饲喂添加含硒 3 mg/kg 饲料的富硒乳酸菌制剂全价饲料。大鼠自由采食、饮水,饲养过程中,每天换水,隔日换笼中的木屑垫料以保持清洁。环境温度 20~25℃。

1.2 注射 CCl₄ 诱发肝损伤模型

将分析纯 CCl₄(南京化学试剂一厂提供)用橄榄油稀释成 50%(v/v)的 CCl₄ 注射溶液,CCl₄、CCl₄-Se 组小鼠按 0.07 mL/100 g 体重腹腔隔日注射 CCl₄ 注射液,连续 6 周,C 组和 Se 组以相同方法注射与 CCl₄ 组同等剂量的橄榄油。

收稿日期 2003-07-28。

基金项目 江苏省应用毒理重点实验室开放基金(No. KJS01072)和江苏教育学院“十五”科研课题(No. X8703)。

作者简介 朱善良,1962-,硕士,江苏教育学院生物科学系副教授,从事动物生理学与毒理学研究,E-mail: redkindszhusl@tom.com

通讯联系人 陈龙,1964-,博士,南京师范大学生命科学学院教授,从事内分泌、免疫生理学与生物化学研究,E-mail: lchen@njnu.edu.cn

1.3 样品采集和处理

分别于实验后第 2、4、6 周,每组随机取 5 只小鼠,称重后摘眼球取血样 1 mL 置于含有肝素钠(1:500)的塑料管内,混匀,按下法取血液红细胞作预处理:

(1)取 0.3 mL 全血加入 4.0 mL 生理盐水中,1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清液,加入 1.2 mL 双蒸水,旋涡振荡 1 min,加入 0.6 mL 无水乙醇,旋涡振荡 30 s,再加入 0.6 mL 三氯甲烷,旋涡振荡 1 min,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液供检测 MDA 含量。

(2)取全血 50 μ L 用 PBS(pH7.0)洗 3 次,离心得红细胞压积,再加入 0.95 mL 蒸馏水制备 1:20(v/v)溶血液,供测定 GSH-Px 和 GST。

(3)取全血 50 μ L 加入 4.0 mL 生理盐水中,1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清液,依次加入冰双蒸水 0.2 mL,95%乙醇 0.1 mL 和三氯甲烷 0.1 mL,边加边旋涡振荡,3 000 r/min 离心 5 min 后取上清液供 SOD 测定。

1.4 测定指标与方法

谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)和谷胱甘肽-S 转移酶(glutathione S-transferase,GST)活性测定采用硫代二硝基苯甲酸法,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性测定采用黄嘌呤氧化酶法,丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸比色法。以上测定所用试剂盒均由南京建成工程研究所提供。

1.5 数据处理

以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SEM)表示,实验数据用 Statistics 软件作方差分析以确定差异的显著性。

2 结果

2.1 富硒乳酸菌抗损伤保护红细胞几种抗氧化物酶活性变化

由表 1 可见,在整个实验期内,红细胞 SOD 活性各组间未见差异性变化;GST 表现为 Se 组最高,呈上升趋势,且在第 6 周高于明显高于其他各组,CCl₄ 组低于或明显低于 C 组和 CCl₄-Se 组,C 组和 CCl₄-Se 组相近;GSH-Px 活性 C 组、Se 组和 CCl₄-Se 组相互间无明显差异,而 CCl₄ 组随负荷时间呈下降趋势,第 4 周后明显低于其余 3 组。

2.2 富硒乳酸菌抗损伤保护红细胞 MDA 含量变化

在整个实验期内,C 组 MDA 在 2.62 ~ 3.29 nmol/mL 范围内波动,Se 组整体水平低于或明显低于其它 3 组,CCl₄ 组高于或显著高于其它 3 组,而 CCl₄-Se 组在 2.49 ~ 2.99 nmol/mL 范围内波动,与对照组相近(图 1)。

3 讨论

本实验显示,富硒乳酸菌能提高或显著提高 Se 组和 CCl₄-Se 小鼠红细胞 GSH-Px 活性,提示富硒乳酸菌具有增强机体抗氧化能力,起到抗损伤保护作用。研究早已证实硒是 GSH-Px 发挥催化活性所必需的一种微量元素,GSH-Px 是机体内最强的抗氧化酶,能清除脂质过氧化物,并在过氧化氢酶含量很少的组织中代替过氧化氢酶清除 H₂O₂,减少自由基的产生,防止细胞膜中不饱和脂肪酸及其它脂类受到自由基攻击,保护机体组织细胞膜结构和功能的完整^[6-7]。此外,GSH-Px 在二十碳花生四烯酸代谢中也起着重要作用^[8]。SOD

表 1 富硒乳酸菌抗损伤保护红细胞溶血液几种抗氧化物酶活性变化(n=5,Mean \pm SEM)

Indice	Group	weeks of post-injection with CCl ₄		
		2	4	6
SOD ($\times 10^3$ U/mL)	C	2.83 \pm 0.04	2.81 \pm 0.03	2.759 \pm 0.03
	Se	2.99 \pm 0.03	2.76 \pm 0.04	2.821 \pm 0.05
	CCl ₄	2.82 \pm 0.10	2.52 \pm 0.08	2.621 \pm 0.06
	CCl ₄ -Se	2.95 \pm 0.05	2.60 \pm 0.12	2.644 \pm 0.07
GST ($\times 10^2$ U/mL)	C	3.56 \pm 0.17	3.40 \pm 0.24	3.533 \pm 0.37 ^a
	Se	3.80 \pm 0.46	4.02 \pm 0.28	4.532 \pm 0.37 ^b
	CCl ₄	3.06 \pm 0.19	3.19 \pm 0.30	2.511 \pm 0.05 ^c
	CCl ₄ -Se	3.42 \pm 0.44	3.29 \pm 0.40	3.103 \pm 0.59 ^a
GSH-Px ($\times 10^2$ U/mL)	C	2.58 \pm 0.11	2.59 \pm 0.09	2.46 \pm 0.21 ^{ab}
	Se	2.56 \pm 0.17	2.72 \pm 0.10	2.72 \pm 0.11 ^a
	CCl ₄	2.69 \pm 0.08	2.42 \pm 0.08	1.98 \pm 0.18 ^b
	CCl ₄ -Se	2.61 \pm 0.18	2.77 \pm 0.10	2.60 \pm 0.010 ^{ac}

Significant difference ($p < 0.05$) with superscript by a, b, c and indifference ($p > 0.05$) by same letter was indicated in the same column of table, respectively.

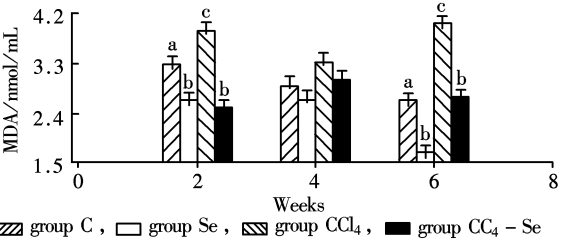


图 1 富硒乳酸菌抗损伤保护红细胞溶血液 MDA 含量变化

也是重要的抗氧化酶,不仅具有清除超氧化物自由基,调节机体内超氧化物自由基和 NO 水平,防止自由基对机体的直接或间接损伤作用^[6],而且还能参与清除吞噬细胞产生的超氧自由基,减小自由基对巨噬细胞膜与淋巴细胞的破坏作用,使得其产生的诸如白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)等因子的能力增强^[8]。本研究结果显示,实验期内虽然各组间 SOD 活性未见显著性差别,但 Se 组小鼠红细胞溶血液 SOD 活性在第 2 周和第 6 周时略高于对照组,CCl₄-Se 组小鼠溶血液在实验期内 SOD 活性均高于 CCl₄ 组,这进一步提示富硒乳酸菌通过提高或增强抗氧化酶活性以发挥有效的抗损伤保护作用。一些资料显示, SOD 与 GSH-Px 之间存在着相互保护机制^[7], SOD 分解 O₂⁻ 生成 H₂O₂ 和 H₂O, GSH-Px 则负责将 H₂O₂ 转化为 H₂O 和 O₂;另外, GSH-Px 还可减少过氧化物对 SOD 的损害^[9]。本实验富硒乳酸菌保护组 GSH-Px 活性升高清除更多的过氧化物,打破原先 SOD 歧化反应的平衡,使其催化速度加快,防止 H₂O₂ 对 SOD 抑制。

本研究发现, CCl₄ 组小鼠红细胞 MDA 含量在整个实验期间升高或显著升高,说明 CCl₄ 诱发肝脏损伤而导致红细胞脂质过氧化损伤。有研究表明,一方面 CCl₄ 进入体内生成三氯甲基游离基(·CCl₃)和过氧化三氯甲基自由基(·OOCCL₃),攻击细胞膜不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化反应,损伤细胞膜的结构与功能^[10]。另一方面 CCl₄ 可以抑制内质网上的钙泵,使 Ca²⁺ 水平增加,升高的 Ca²⁺ 也可激活细胞膜上的磷酸化酶,从而引起膜的脂质过氧化损伤^[11]。本研究还显示, Se 组 MDA 水平低于或显著低于对照组,而 CCl₄-Se 组 MDA 水平均低于或显著低于 CCl₄ 组,提示富硒乳酸菌能够增强正常机体的抗氧化能力,抑制 CCl₄ 对红细胞脂质过氧化损伤。这可能与富硒乳酸菌中硒元素有关。因为有实验证实,硒可以通过维持血影蛋白(Spectrin)与红细胞骨架结合而保持红细胞膜稳定性^[12]。

[参考文献]

- [1] 刘景田,张洁.红细胞免疫学[M].西安:陕西科学技术出版社,1995.10—110.
- [2] 黄益民,赵辉,虞欣,等.自由基损伤红细胞膜分子的机理研究[J].生物物理学报,1997,13(2):315—323.
- [3] 李宣海,汪余勤,程五凤,等.不同硒水平饲料对大鼠抗氧化和肝纤维化的影响[J].中华消化杂志,1999,19(5):309—311.
- [4] Brown K M, Arthur J R. Selenium, selenoproteins and health: a review[J]. Public health nutr, 2001, 4(2B):593—599.
- [5] 谢忠忱,王海宏.动物蛋白种类及其生理功能研究进展[J].中国实验动物学杂志,2002,13(3):190—194.
- [6] 方允中,郑荣梁.自由基生物学的理论与应用[M].北京:科学出版社,2002.179—225.
- [7] 黄峙,向军俭,郭高江.硒酶及硒化合物功能研究的新进展[J].生理科学进展,2001,32(4):293—296.
- [8] 陈龙,王丙云,殷定忠,等.免疫与未免疫鸡感染 IBDV 后血浆 TNF-α 和 NO 变化[J].南京师大学报(自然科学版),1999,22(4):77—80.
- [9] 黄峙,郭宝江.含硒酶与非酶作用机制[J].生命科学,2002,14(2):99—102,69.
- [10] 仲来福,张瑾岗,张富勤,等.四氯化碳致大鼠肝损伤的机理[J].中国药理学与毒理学杂志,1989,3:298—303.
- [11] Long R M, Moore L. Cytosolic calcium after carbon tetrachloride, 1,1-dichloroethylene, and phenylephrine exposure. Studies in rat hepatocytes with phosphorylase A and quin[J]. Biochem Pharmacol, 1987, 36(8):1215—1221.
- [12] 刘为民,李广生,张秀云.改变硒、维生素 E 饮食摄入量对红细胞变形性的影响[J].临床血液学杂志,1995,8(3):104—105.

Protection Effect of Lactobacillus Rich in Selenium to RBC Lipid Peroxidation in Liver Injury Mice

Zhu Shanliang^{1,2,3}, Chen Long¹, Gao Wei¹, Zhao Jieming¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, PRC)

(2. Key Laboratory of Applied Toxicology, Jiangsu Province 210029, Nanjing, PRC)

(3. Department of Biology, Jiangsu Institute of College, 210013, Nanjing, PRC)

Abstract Sixty healthy mice with half females and half males were chosen and randomly divided into four groups, control group

(group C), lactobacillus rich in selenium group(group Se), CCl₄ loading group(group CCl₄) and CCl₄ plus lactobacillus rich in selenium group(group CCl₄ - Se). Liver injury was induced by abdominal injection of CCl₄ on every other day over six weeks. The blood samples were collected at the 2nd ,4th and 6th weeks , respectively , and the enzyme activities of glutathione superoxidase(GSH - Px) , glutathione S - transferase(GST) , superoxide dismutase(SOD) , the content of malondialdehyde (MDA) in RBC haemolytic liquid were determined. Effect of lactobacillus rich in selenium on lipid peroxidation damage of red blood cell(RBC) in mice with CCl₄ - loading liver injury were studied. The results showed that during the whole experiment period , there were no obvious differences among the groups for SOD activity ; GST activity in group Se tended to increase with the highest values , and rose or did significantly as compared with other three groups at the 6th week , GST in group CCl₄ was low or significantly low to groups C and CCl₄ - Se , there were similar values between groups C and CCl₄ - Se ; GSH - Px activity in groups C , Se and CCl₄ - Se had no significant differences between each other , but group CCl₄ tended to decrease with time of CCl₄ - loading , and was low to other three groups after the 4th week. MDA content had no obvious differences between groups C and CCl₄ - Se , the entire level of MDA in group Se was lower or significantly lower than that of other three groups , group CCl₄ had opposite changes to group Se. It was suggested that the violent changes of lipid peroxidation of RBC in mice with CCl₄ - induced liver injury were confirmed ; beneficial action of lactobacillus rich in selenium was mediated through the protection of some antioxidant enzyme activity in RBC.

Key words :Lactobacillus rich in selenium , Liver injury , Red blood cell , Lipid peroxidation

[责任编辑 孙德泉]

(上接第73页)

Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Full-length cDNA of a Novel Gene EJO5 From the Ovary of *Eriocheir japonica sinensis*

Ma Changyan¹ , Zhou Kaiya¹ , Zhao Naigang² , Wang Zhaohui²

(1. Institute of Genetic Resources School of Life Sciences ,Nanjing Normal University , 210097 , Nanjing , PRC)

(2. Anhui Fisheries New Technology Research Institute , 230088 , Hefei , PRC)

Abstract :A full-length cDNA sequence of a novel gene EJO5 (*Eriocheir japonica* ovary gene 5 , EJO5)(GenBank Accession Number : AY185921) from the ovary of *Eriocheir japonica sinensis* was obtained by RACE. The full-length cDNA sequence of EJO5 is 1 425 bp in size and has an open reading frame of 585 bp encoding a polypeptide of 194 amino acids. The pI/Mw deduced from the amino acids sequence is 9.5 and 22 344 respectively. However , we were unable to predict the function of EJO5 gene by means of bioinformatics.

Key words :*Eriocheir japonica sinensis* , ovary , novel gene EJO5 , RACE , cDNA cloning

[责任编辑 孙德泉]