

# 硒与红细胞膜的研究

## ——II. 硒对红细胞膜的保护作用

沃维汉 杨福愉

(中国科学院生物物理研究所,北京)

### 摘 要

人红细胞膜老化(4°C, 1—3周)过程中,收缩蛋白(spectrin)含量减少, Na, K-ATP 酶活性和流动性都有明显降低. 如果在老化介质中加入微量 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>(0.1—1.0ppm Se)可防止收缩蛋白从膜上脱落并延缓 Na, K-ATP 酶活性和膜流动性的变化. 在 0.1—1.0 ppm Se 范围内,加入硒量愈多,效应也愈明显. 当完整红细胞老化时,外加硒对膜也有相似的保护作用.

硒对膜的保护作用一般用含硒的谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)的活性来解释,但该酶主要分布在红细胞细胞质内,因此人红细胞膜结合硒对膜具有明显保护作用似乎很难归结于 GSHPx 的作用.

流行病学研究证明,硒缺乏是克山病、大骨节病的一个致病因素,但不是唯一的因素,硒可预防这两种地方病的发生,但没有明显的治疗作用<sup>[1,2]</sup>. 也有许多学者报告,无论是人群调查还是动物实验结果,都表明硒具有防癌、抗癌性能,但却没有明显的治癌作用<sup>[3,4]</sup>. 这说明硒的主要生理功能可能是提高机体抵抗外界因素致病能力. 文献[5]已报告,人红细胞膜含结合硒,结合硒含量与膜的结构和功能密切相关<sup>[5]</sup>. 本文通过外加微量硒对红细胞膜老化过程的作用,以进一步研究结合硒在维持膜结构与功能中的作用. 实验结果表明,外加硒对红细胞膜老化有明显的延缓作用,换言之,它对膜有着显著的保护作用. 这可能提示,微量元素硒对稳定膜的结构从而维持整个红细胞的功能,防止各种有害因素侵袭具有重要的作用.

### 一、材料与方 法

红细胞膜制备、蛋白量、Na, K-ATP 酶活性、膜流动性测定见文献[5]. 分离的红细胞膜依下述步骤进行老化: 将分离过程中洗涤三次的膜样品悬浮于10倍体积的 Tris-HCl (10mM, pH7.4) 溶液中(分外加硒组与不加硒组), 4°C 保存4—21天不等. 完整红细胞老化: 将新鲜红细胞悬浮于20倍体积的市售无菌生理盐水中(亦分外加硒与不加硒组), 37°C 保温36—72h不等. 红细胞膜蛋白组分分析按瑞典 Pharmacia 公司方法<sup>[6]</sup>, 用 SDS-聚丙烯酰胺

1984年11月22日收到, 1985年4月5日收到修改稿.

胶梯度凝胶电泳进行分析,并用日本岛津 CS-910 型双波长薄层扫描仪进行凝胶扫描。红细胞膜 spectrin 的去除按 Nicolson 方法<sup>[1]</sup>,但温度为 4°C,时间 24h。膜蛋白巯基测定按 Ellman 方法<sup>[2]</sup>;用巯基反应试剂 DTNB (5,5'-二硫对二硝基苯甲酸)进行测定。谷胱甘肽过氧化物酶 (GSHPx)活性按 Hefeman 方法<sup>[3]</sup>测定。Na, K-ATP 酶对 Ouabain 的敏感性按 pearson 方法进行计算<sup>[4]</sup>。

A. 在下列体系中测得 Na, K, Mg-ATP 酶活性: Tris-HCl (pH 7.0, 50 mM), NaCl (150 mM), KCl (20 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), ATP (0.5 mM);

B. 在 A 体系中不加入 NaCl, KCl 测得 Mg-ATP 酶活性;

C. 在 A 体系中加入 0.1mM Ouabain 测得的酶活性, Na, K-ATP 酶对 Ouabain 敏感性的百分比 =  $\frac{A-C}{A-B} \times 100$ 。

## 二、实验结果

### 1. 硒对于分离的人红细胞膜的保护作用

将分离的正常人红细胞膜悬浮于 10 倍体积的 Tris-HCl (10 mM, pH 7.4) 溶液中,置于 4°C 环境中老化,其中一组在介质中加入 0.16 ppm Se (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>),另一组则加入离子强度相等的 NaCl 作为对照。老化一定时间后,将老化样品离心,去上清液后,分别测定它们的下述指标: ① Na, K-ATP 酶对 Ouabain 抑制的敏感性; ② DPH 荧光偏振度; ③ 膜蛋白组份的电泳分析; ④ 膜蛋白巯基含量。

(1) 硒对于老化人红细胞膜 Na, K-ATP 酶对 Ouabain 抑制敏感性的影响 图 1 表明,分离的红细胞膜老化过程中, Ouabain 对 Na, K-ATP 酶活性抑制百分数越来越低,在缺硒老化系统中,老化二周后 Ouabain 非但不能抑制,反而激活 Na, K-ATP 酶;而在外加硒 (0.16 ppm Se, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 系统中, Ouabain 抑制百分数只小幅度下降。

(2) 硒对老化人红细胞膜脂流动性的影响 表 1 表明膜老化过程中, DPH 荧光偏振度增加幅度。随着老化时间增加,红细胞膜 DPH 荧光偏振度逐渐增加,但是如果老化体系中加入 0.16 ppm Se (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), 则 DPH 荧光偏振度增加幅度明显减少。

(3) 硒对老化人红细胞膜蛋白组份的影响 图 2 是分离的红细胞膜蛋白组份在老化过程中的相对变化。SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分析表明,外加硒与不加硒老化系统中,蛋白组份的差异主要表现在第一、二条带,即收缩蛋白 (spectrin) 上。分离的红细胞膜老化 4 天后,不加硒系统中收缩蛋白含量只有 14.5%, 而外加硒系统收缩蛋白含量是 21.4%, 说明结合硒具有维持收缩蛋白与膜结合的作用。

(4) 硒对老化人红细胞膜蛋白构象变化的影响 图 3 是不加硒与外加硒 (0.16 ppm Se, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 两种老化体系中红细胞膜的 DTNB 的差光谱。随着老化时间增长,不加硒老化系统中红细胞膜蛋白巯基明显多于外加硒老化系统,因而两者的 DTNB 差光谱愈趋明显,这说明老化会使红细胞膜蛋白有明显构象变化,从而使更多的-SH 基团暴露,而硒却能延缓和防止这种变化。

上述结果说明硒对分离的红细胞膜老化有明显的保护作用。一般认为,硒对生物膜保护主要由于含硒的谷胱甘肽过氧化物酶 (Se-GSHPx)。

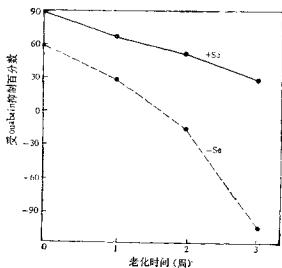


图 1 分离的红细胞膜在含硒 (0.16ppm Se,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) 以及不含硒体系内进行老化过程中,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性对 Ouabain 敏感性的变化 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性受 Ouabain 抑制百分数的计算方法详见“材料与方法”一节)

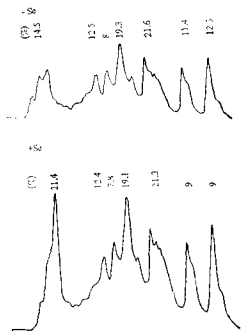


图 2 分离的红细胞膜在含硒 (0.16ppm Se,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) 及不含硒体系中进行老化 4 周后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶变凝胶电泳扫描图谱

表 1 分离的红细胞膜在含硒及无外加硒体系内老化过程中 DPH 荧光偏振度增加幅度的比较

老化时间 (周)	0	1	2	3
-Se	0	0.004	0.014	0.020
+Se (0.16ppm Se)	0	0.002	0.005	0.008
t 值检验 $P <$		0.05	0.001	0.01
实验例数		20	5	5

表 2 人红细胞与人红细胞膜 GSHPx 活性比较

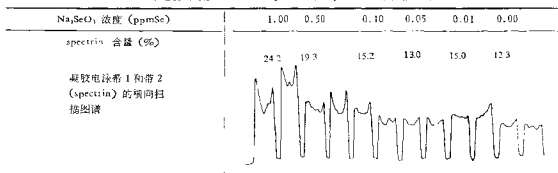
样品	每 ml 压碎红细胞	由 1ml 压碎红细胞制备得到的膜热态
GSHPx 活性*	78.6 ± 2.1	0.81 ± 0.11
实验例数	5	5

\* 酶活单位为每分钟使  $\log[\text{GSH}]$  减少非酶反应后降低 1 为一个酶活单位。

的作用, 但此酶主要定位于胞质可溶性部份<sup>[11]</sup>。本文表 2 数据也证明, 分离的人红细胞膜仅有极微的 GSHPx 活性, 而且在离体情况下进老化也不具备由 Se 合成该酶的条件, 因此上述外加硒对分离的红细胞膜老化的保护作用显然难以用 GSHPx 作用来解释。

(5) 硒对人红细胞膜收缩蛋白的保护作用 由图 2 我们看到硒具有维持收缩蛋白与膜

表3 在不同浓度硒溶液中(含1.0M EDTA)去除 spectrin 后\*  
红细胞膜上残存的 spectrin (Band 1 和 2) 凝胶电泳扫描图谱



\* spectrin 的部分去除: 将红细胞膜样品溶于 1mM EDTA 中, 4℃ 过夜后离心去上清后得到部分去除 spectrin 的样品

结合的作用, 而收缩蛋白是红细胞膜上非常重要的一种外周蛋白, 为此我们设计了下述实验, 以便再次证实硒具有维持收缩蛋白与膜结合的作用(表3)。将新制备的红细胞膜悬浮于 1mM EDTA (pH9.0) 中, 4℃ 冰箱放置过夜, 然后离心取沉淀进行 SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳, 分析比较在 EDTA 溶液中加入不同浓度 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 及未加硒对照组的红细胞膜收缩蛋白含量变化。表3是将上述样品电泳的第一、二条带, 即收缩蛋白带进行横向扫描的结果。它清楚地表明, 随着硒浓度增加(由 0 到 1.0 ppm Se, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), 收缩蛋白含量越来越多, 证明硒确实可以保护分离的红细胞膜结构的完整性, 防止膜骨架蛋白组份因外界影响脱落下来, 而加入

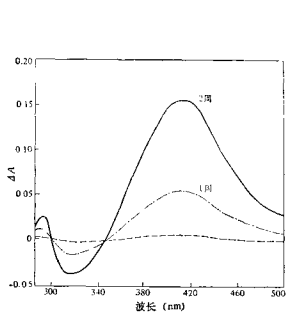


图3 分离的红细胞膜在含硒 (0.16ppm Se, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 及不含硒体系中老化后, 与 DTNB 反应的差光谱

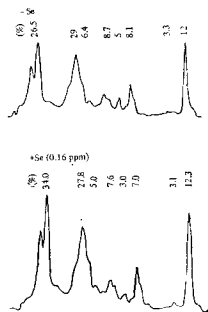


图4 硒对完整红细胞老化过程的影响——老化后红细胞膜 SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳扫描图谱

离子强度相等的 NaCl 却没有相似的保护作用。

## 2. 完整红细胞老化过程中硒对膜的保护作用

上述结果是以分离的红细胞膜为实验材料得到的,那么在完整红细胞老化过程中,硒是否还具有类似的保护作用呢?

我们将完整的红细胞悬浮于等渗 NaCl 溶液中,分外加硒组 (0.16ppm Se,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) 与不加硒对照组, 37°C 保温 1—3 天后发现,不加硒组红细胞体积膨胀,继而发生溶血,而加硒组红细胞却未出现上述现象,这时将各组红细胞膜分离出来,分别测定它们的 Na, K-ATP 酶活性、DPH 荧光偏振度及它们的蛋白组份的相对变化。表 4 表明不加硒组红细胞膜 Na, K-ATP 酶活性及膜脂流动性均较外加硒组显著下降。图 4 表明,外加硒组红细胞膜上收缩蛋白(电泳第一及第二条带)含量较不加硒组明显增多。

表 4 硒对完整红细胞老化过程的影响——老化后红细胞膜 Na, K-ATP 酶活力及 DPH 荧光偏振度的比较

	Na, K-ATP 酶 相对活力	DPH 荧光偏振度
-Se	100	0.298
+Se (0.16ppm)	314	0.290
t-TEST	$P < 0.001(3)$	$P < 0.05(5)$

上述实验结果说明,硒对完整红细胞的膜也有保护作用。

## 三、讨 论

文献[5]报道,人红细胞膜制备过程中,随着洗涤次数增加,膜结合硒和膜蛋白呈平行性减少(见文献[5]的表1)。本研究外加硒对人红细胞膜老化的保护作用,结果表明,红细胞膜经老化后收缩蛋白(spectrin)明显减少。如果在老化体系中加入微量硒(0.1—1.0 ppm)就能防止红细胞膜收缩蛋白的减少,而且随着硒浓度增加这种效果就愈益明显。这提示,硒对于维持收缩蛋白与红细胞膜的结合具有重要作用。收缩蛋白系外周蛋白,是膜骨架的一个主要组份,通过 ankyrin(一种膜蛋白)与内在蛋白——带3蛋白结合。有报道<sup>[12,13]</sup>,收缩蛋白的四聚体比二聚体更易与膜结合,一般认为红细胞膜收缩蛋白主要是四聚体,因此硒的作用很可能在于维持收缩蛋白以四聚体形式存在。收缩蛋白表面带负电荷,因此阳离子可能由于屏蔽膜脂和膜蛋白表面的负电荷,从而具有促进收缩蛋白与膜结合的作用。而金属离子螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA)则能够促使收缩蛋白由膜上脱落下来。但如果同时加入微量  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,则可以防止收缩蛋白的脱落。硒的这种效应既很难用屏蔽电荷的作用来解释,更不能用它具有与 EDTA 相结合来说明,因为介质中  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  的浓度至少要比 EDTA 小 1000 倍,因此硒促进或维持收缩蛋白与膜结合的机理尚有待进一步探讨。

我们在文献[5]中曾报道,人红细胞膜在制备过程中由于多次洗涤会导致结合硒的减少,与此同时膜蛋白含量、Na, K-ATP 酶活性和膜脂流动性都下降。本文结果显示老化人红细胞膜的收缩蛋白量明显减少,Na, K-ATP 酶活性和膜脂流动性也都明显降低,如果介质中加入微量硒则可防止收缩蛋白从膜上脱落,延缓 Na, K-ATP 酶活性和膜脂流动性的变化。

关于收缩蛋白影响 Na, K-ATP 酶的构象和功能已有报告<sup>[14-16]</sup>, 红细胞膜去除收缩蛋白以后也会导致磷脂分子有序度增加、流动性降低<sup>[17-19]</sup>。综上所述, 可以设想, 在入红细胞膜老化过程中如果加入微量硒, 可减少膜结合酶的解离, 从而维持收缩蛋白与膜的结合, 这样也就有可能延缓 Na, K-ATP 酶构象和活性以及膜脂流动性的变化。

关于硒的生理作用过去往往归结于含硒的谷胱甘肽过氧化物酶 (Se-GSHPx), 它能够催化膜脂过氧化物与谷胱甘肽的反应, 从而保护生物膜。但是, 有些学者已经发现硒的许多重要生理功能完全与 GSHPx 活性无关<sup>[20-22]</sup>。而且 Beilstein 等人还报道<sup>[21, 24]</sup>, 人红细胞 GSHPx 活性主要集中在含硒量非常少的血红素上, 而珠蛋白含硒量虽高, 但 GSHPx 活性却相对较低。还有报道<sup>[22]</sup>, 在多种组织中尚有不含硒的 GSHPx, 更值得注意的是, GSHPx 在细胞中主要分布在细胞质内, 我们的实验也得到相似的结果, 因此人红细胞膜结合硒能维持膜结构与功能的实验结果就很难用 GSHPx 活性加以解释。

克山病与大骨节病主要发生在低硒地区, 应用 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 进行群体防治的试验表明, 硒对预防克山病、大骨节病的发生具有明显的作用, 但却无治疗效果<sup>[12]</sup>。因此, 一般认为, 缺硒是克山病、大骨节病发病的重要条件, 但不是致病因子。根据本文实验结果, 从细胞水平考虑是否可以设想: 在缺硒条件下, 红细胞膜结构处于不稳定状态, 当遭到各种有害因素作用时就容易产生病变, 不同的致病因素可能导致不同的疾病, 而硒的预防作用很可能在于增加膜的稳定性。

本文与文献 [5] 仅研究了硒与红细胞膜的关系, 微量元素硒对它生物膜结构与功能有否相似的影响? 这是一个很有趣而又值得进行探索的问题, 有关研究正在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] Chen Xiaoshu (陈晓曙) et al. *Selenium in Biology and Medicine* (Eds. Spallholz, J. E. et al.). 1980, 171-175.
- [2] 李崇正等, 中华医学杂志, 3(1979), 169.
- [3] Schrauzer, G. N. *Selenium in Biology and Medicine* (Eds. Spallholz, J. E. et al.), 1980, 98-102.
- [4] Shamberger, R. J. *Biochemistry of Selenium* (Ed. Earl Frieden), Plenum Press, New York and London, 1983, 222-224.
- [5] 杨福梅等, 中国科学 B 辑, 1986, 4: 396-400.
- [6] Polyacrylamide Gel Electrophoresis-Laboratory Techniques, *Pharmacia Fine Chemicals*, 1983, 25
- [7] Nicolson, G. L. et al. *J. Cell Biol.* 51(1971), 265-272.
- [8] Eilman, G. L. et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 82(1979), 70-77.
- [9] Hefemas, D. G. et al. *J. Nutr.* 104(5) (1974), 580.
- [10] Pearson, T. W. *Life Sciences*, 22(1978), 127.
- [11] Rotruck, J. T. et al. *J. Nutr.* 102(1972), 689-696.
- [12] Mikuni-Takagaki, Y. et al. *J. Biol. Chem.* 256(1981), 8463-8469.
- [13] Underhill, C. B. et al. *Exp. Cell Res.* 131(1981), 419-523.
- [14] Fosse, E. F. et al. *Biochem. Biophys. Acta*, 649(1981), 507.
- [15] Morichesi, V. T. et al. *J. Membrane Biol.* 51(1979), 101-131.
- [16] Steck, Th. L. et al. *J. Cell Biol.* 62(1974), 1-19.
- [17] Cogan, U. et al. *Biochem.* 20(1981), 6396-6403.
- [18] Henis, Y. L. et al. *J. Biol. Chem.* 257(1982), 1407-1411.
- [19] Schachter, D. et al. *Biochem.* 21(1982), 2146-2150.
- [20] Siami, G. et al. *J. Nutr.* 102(1972), 857-863.
- [21] Combs, G. F. et al. *Poult. Sci.* 54(1975), 1152-1158.
- [22] Wu, S. H. et al. *Biol. Reprod.* 20(1973), 793-798.
- [23] Beilstein, M. A. et al. *J. Inorg. Biochem.* 15(1981), 339-347.
- [24] Beilstein, M. A. et al. *J. Nutr.* 113(1983), 2138-2146.
- [25] Lawrence, R. A. et al. *ibid.* 108(1978), 211-215.