ease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(1): 24 – 28.
[7] Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes[J]. Curr Diab Rep, 2010, 10(4): 306 – 315.
[8] Lee Y, Lingvay I, Szczepaniak LS, et al. Pancreatic steatosis: harbinger of type 2 diabetes in obese rodents[J]. Int J Obes (Lond), 2010, 34(2): 396 – 400.
[9] Yang S, Xia C, Li S, et al. Defective mitophagy driven by dysregulation of rheb and KIF5B contributes to mitochondrial reactive oxygen species (ROS)-induced nod-like receptor 3 (NLRP3) dependent proinflammatory response and aggravates lipotoxicity[J]. Redox Biol, 2014, 3: 63 – 71.
[10] 杨丽霞, 豆伍应, 刘铜华, 等. 脂肪细胞因子与代谢综合征关系研究进展[J]. 2009, 25(10): 1277 – 1279.

收稿日期: 2015 – 01 – 27　（刘铁编辑　解学魁校对）

· 实验研究 ·

硒化合物在 HepG2 细胞中代谢生成硒蛋白效应*

王琴, 卢佳希, 韩枫, 孙丽翠, 刘轶群, 黄振武

摘　要: 目的　探讨亚硒酸钠(Na_2SeO_3), 硒代蛋氨酸(SeMet)和甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)3 种硒化合物在 HepG2 细胞内代谢生成硒蛋白 P(SEPP)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)效应。**方法**　将 HepG2 细胞分为对照组、低、中、高剂量硒化合物组(0.01、0.10、1.00 μmol/L), 作用 48、72 h, 收集细胞上清液和裂解液; 采用双抗夹心酶联免疫吸附试验检测上清中 SEPP 浓度与裂解液中 GPx 活力。**结果**　与对照组比较, 高剂量 Na_2SeO_3、SeMet、MeSeCys 作用 HepG2 细胞 48 h 时, 上清中 SEPP 浓度[分别为(115.78 ± 1.70)、(140.73 ± 0.97)、(114.92 ± 1.46) pg/mL]均明显升高($P < 0.01$), 裂解液中 GPx 活力[分别为(490.52 ± 5.40)、(643.26 ± 5.40)、(603.35 ± 6.40) U/L]明显升高($P < 0.01$); 与 Na_2SeO_3、MeSeCys 比较, SeMet 作用效果最好($P < 0.05$); 3 种硒化合物作用 HepG2 细胞 48 h 与 72 h 比较, 各指标差异均无统计学意义。**结论**　3 种硒化合物中, 以 SeMet 作用于 HepG2 细胞后代谢生成 SEPP 和 GPx 的效果最明显。

关键词: 硒化合物; 代谢; 硒蛋白 P(SEPP); 谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)
中图分类号: R　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1001-0580(2015)06-0787-03　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-06-27

Effects of various selenocompounds on production of SEPP and GPx in HepG2 cells

WANG Qin, LU Jia-xi, HAN Feng, et al (*National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing* 100050, China)

Abstract: Objective　To examine stimulative effects of various selenocompounds on the production of selenoprotein P(SEPP) and glutathione peroxidase(GPx) in HepG2 cells. **Methods**　The cultured HepG2 cells were divided into a control group, three low-(0.01 μmol/L), midium-(0.1 μmol/L), and high-dose(1.00 μmol/L) groups treated with different selenocompounds, including sodium selenite(Na_2SeO_3), selenomethionine(SeMet), and slenocysteine(SeCys). Fourty-eight or 72 hours after the treatments, the cell culture supernatants and homogenates were collected for the detections of SEPP and GPX with double-antibody sandwich enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA). **Results**　Compared to that of the control group, the concentrations of SEPP(115.78 ± 1.70, 140.73 ± 0.97, and 114.92 ± 1.46 pg/mL) increased significantly in high-dose Na_2SeO_3, SeMet, and MeSeCys groups 48 hours after the treatment(all $P < 0.01$) and those of GPx(490.52 ± 5.40, 643.26 ± 5.40, and 603.35 ± 6.40 U/L) was also increased significantly(all $P < 0.01$). Compared with the other two selenocompounds(Na_2SeO_3 and MeSeCys), SeMet showed the highest stimulative effect($P < 0.05$). No significant difference in the stimulative effect was observed between the treatments of 48 and72 hours. **Conclusion**　Among the three selenocompounds, SeMet has the highest stimulative effect on productions of SEPP and GPx in HepG2 cells.

Key words: selenocompounds; metabolism; selenoprotein P; glutathione peroxidase

硒是哺乳动物和人体必需的一种微量元素, 以无机和有机 2 种化学形态存在。无机硒以硒酸盐和亚硒酸盐等形式存在, 在中国的大骨节病和克山病区广泛采用的就是亚硒酸钠(sodium selenite,

* **基金项目:** 国家自然科学基金(81372989); 国家自然科学青年基金(31201352); 中国营养学会伊利营养与健康研究基金(2013 – 013)
作者单位: 中国疾病预防控制中心营养与健康所营养与代谢研究室, 北京 100050
作者简介: 王琴(1981 –), 女, 湖北黄冈人, 助理研究员, 研究方向: 营养与代谢。
通讯作者: 黄振武, E-mail: zhenwuhuang@ sina. com
数字出版日期: 2015 – 5 – 20 15:
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150520.15.0.html

Na_2SeO_3)作为补硒药物。有机硒主要以硒代蛋氨酸(selenomethionine, SeMet)和硒代半胱氨酸(slenocysteine, SeCys)等形式存在于蛋白质肽链中。SeMet 和 SeCys 是膳食硒的主要化学形式,植物性食物中以 SeMet 为主,动物性食物中以 SeCys 为主。目前,通过同位素标记和生物信息学方法已从人类基因组中发现 25 种硒蛋白[1]。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)是机体内广泛存在的一种重要硒蛋白,其活性中心是 SeCys。GPx 活性与硒摄入量有关,是最典型的含硒酶,其主要作用是促进氢过氧化物代谢,减少对机体的损伤。硒蛋白 P(selenoprotein P, SEPP)是一种硒转运蛋白,结合的硒含量约占体内总硒量的 60%,影响全身硒平衡,其特殊性在于含有至少 10 个 SeCys 残基[2]。本研究选取来源于人肝癌组织的 HepG2 细胞,利用具有高灵敏度和特异性的双抗体夹心酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测 3 种硒化合物在体外合成 GPx 和 SEPP 效应,比较不同硒化合物合成硒蛋白能力,为缺硒人群合理补硒提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　*主要试剂与仪器*　HepG2 细胞(中国疾病预防控制中心营养与健康所营养与代谢研究室保存),Na_2SeO_3(中国疾病预防控制中心营养与健康所保存),SeMet、MeSeCys(美国 Sigma-Aldrich 公司),SEPP、GPx 双抗体夹心 ELISA 检测试剂盒(北京安迪华泰科技有限公司),达尔伯克必需基本培养基(Dulbecco′s modified eagle medium/nutrient mixture F-12 ham′s, DMEM/F12)、胎牛血清和胰蛋白酶(trypsin-EDTA, 0.05%)(美国 Gibco 公司)。分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),Synergy HTX 多功能酶标仪(美国 Biotek 公司)。

1.2　*分组与处理*　将培养好的 HepG2 细胞随机分为 4 组:对照组、Na_2SeO_3 组、SeMet 组、MeSeCys 组,各组硒化合物均设低、中、高(0.01、0.10、1.00 mmol/L)3 种剂量;待细胞处于对数生长期时,吸去培养液,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 3 次后加入新鲜培养液,同时加入配好的 3 种硒化合物,使其终浓度分别为 0.01、0.10、1.00 mmol/L,对照组加相同体积的 PBS;将细胞置 37℃、5% CO_2 孵箱中继续培养 48、72 h。

1.3　*指标与方法*

1.3.1　样品收集　SEPP 主要分泌至细胞外,而 GPx 位于细胞内胞浆中。用无菌管分别收集细胞培养上清液(用于检测 SEPP)和裂解液(用于检测 GPx),将细胞培养上清液吸至离心管中,4 ℃离心(3 000 r/min)20 min 仔细收集上清液。收集细胞内成份时,用 PBS(pH 7.4)稀释细胞悬液,使细胞浓度达到 10^6 个/mL 左右,加入细胞裂解液或反复冻融方式,使细胞壁破坏并释放出细胞内成份,4 ℃离心(3 000 r/min)20 min 收集上清。收集的样品均保存于 −80 ℃,并在 2 周内完成检测。

1.3.2　细胞上清液中 SEPP 浓度检测　设置 5 个标准品浓度用于制作标准曲线,分别为 120、80、40、20、10 pg/mL,并设空白对照孔(空白孔不加样品及酶标试剂,其余操作同样品孔),每组做 3 个复孔;在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL,再加待测样品 10 μL(样品最终稀释 5 倍);用封板膜封板后置 37 ℃温育 30 min,揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 弃去,重复 5 次,拍干;每孔加入酶标试剂 50 μL,空白孔除外,再置 37 ℃温育 30 min;重复 5 次,拍干,每孔先加入显色剂 A 50 μL,再加入显色剂 B 50 μL,震荡混匀,37 ℃避光显色 15 min;每孔加终止液 50 μL,终止反应,以空白孔调零,450 nm 波长测量各孔吸光度(A)值,计算样品浓度。

1.3.3　细胞裂解液中 GPx 活力检测　设置 5 个标准品,分别为 600、400、200 、100、50 U/L,并设空白对照孔,每个样品均做 3 个复孔;ELISA 检测步骤同上。

1.4　*统计分析*　数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 软件录入数据并进行统计学分析,用 Kolmogorov-Smirnov 方法检验各指标是否符合正态分布,符合正态分布则采用单因素方差分析比较组间差异,两两比较采用最小显著差法,两独立样本比较采用 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　*各种硒化合物对细胞上清中 SEPP 浓度影响*(表 1)　硒化合物作用于 HepG2 细胞 48 h 时,与对照组比较,除低剂量 MeSeCys 组外,其他各剂量硒化合物组上清中 SEPP 浓度均明显升高($P < 0.05$);硒化合物作用于 HepG2 细胞 72 h 时,与对照组比较,SeMet、MeSeCys 中、高剂量组及 Na_2SeO_3 高剂量组上清中 SEPP 浓度均明显升高($P < 0.05$);与 48 h 比较,作用 72 h 时,低剂量 MeSeCys 组上清中 SEPP 浓度下降($P < 0.05$)。

2.2　*各种硒化合物对细胞裂解液中 GPx 活力影响*(表 2)　硒化合物作用于 HepG2 细胞 48 h 时,与对照组比较,3 种硒化合物各剂量组细胞裂解液中 GPx 活力均明显升高($P < 0.0$);硒化合物作用于 HepG2 细胞 72 h 时,与对照组比较,除低剂量 Na_2SeO_3、MeSeCys 组外,其他各组细胞裂解液中 GPx 活力均明显升高($P < 0.05$);硒化合物作用时

间 48 h 与 72 h 比较，各剂量硒化合物组各指标均未见明显统计学差异。

表 1　硒化合物对上清中 SEPP 浓度影响

（pg/mL，$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

组别（μmol/L）		作用时间	
		48 h	72 h
对照组		39.72 ± 1.70	35.59 ± 1.70
Na_2SeO_3 组	0.01	52.28 ± 1.46[b]	41.78 ± 1.22
	0.10	85.49 ± 0.73[a]	71.72 ± 1.70
	1.00	115.78 ± 1.70[b]	102.70 ± 1.70[a]
SeMet 组	0.01	60.37 ± 0.24[a]	46.43 ± 1.95
	0.10	98.91 ± 1.22[b]	84.29 ± 0.49[a]
	1.00	140.73 ± 0.97[a]	129.38 ± 0.97[a]
MeSeCys 组	0.01	62.95 ± 0.97	46.26 ± 1.22[c]
	0.10	90.83 ± 1.46[b]	78.61 ± 0.24[a]
	1.00	114.92 ± 1.46[b]	112.16 ± 0.49[a]

注：与对照组比较，a $P < 0.05$，b $P < 0.01$；与 48 h 比较，c $P < 0.05$。

表 2　硒化合物对细胞裂解液中 GPx 活力影响

（U/L，$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

组别（μmol/L）		作用时间	
		48 h	72 h
对照组		152.96 ± 7.56	162.89 ± 4.32
Na_2SeO_3 组	0.01	167.47 ± 6.48[a]	149.90 ± 7.56
	0.10	313.34 ± 1.08[a]	317.92 ± 5.40[a]
	1.00	490.52 ± 5.40[b]	472.19 ± 7.56[b]
SeMet 组	0.01	380.54 ± 7.56[a]	340.07 ± 6.48[b]
	0.10	518.78 ± 4.32[b]	500.45 ± 8.64[a]
	1.00	643.26 ± 5.40[b]	630.28 ± 2.16[b]
MeSeCys 组	0.01	246.26 ± 5.34[a]	240.98 ± 8.54
	0.10	462.93 ± 2.14[b]	413.12 ± 2.14[b]
	1.00	603.35 ± 6.40[b]	595.80 ± 2.14[b]

注：与对照组比较，a $P < 0.05$，b $P < 0.01$。

3　讨　论

硒是人体必需微量元素，对人类健康有着重要影响[3]。硒在生物体内主要以硒蛋白形式参与调节各种生理环节、发挥不同生物学功能[4]。硒的生物利用率与硒在体内的代谢密切相关，无机硒和有机硒具有不同代谢途径，合成硒蛋白能力也存在差异[5-6]。关于不同硒化合物生物利用率和生物活性的动物试验结果表明，有机硒的生物活性较高，更能有效地在体内同化，比无机硒的应用效果更好[7-8]。研究显示，补充硒酸钠（$NaSeO_4$）和 SeMet 均能有效提高低硒人体 GPx 活力，但补 SeMet 后可见“富裕”硒进入红细胞的血红蛋白和血浆的白蛋白中[9]；补充 SeMet 比 Na_2SeO_3 更易发生硒蓄积[10]。本研究结果显示，Na_2SeO_3、SeMet 和 MeSeCys 均能刺激 HepG2 细胞代谢生成 SEPP 和 GPx，且呈剂量依赖效应；其中，SeMet 效果最明显，其次为 MeSeCys 和 Na_2SeO_3。本研究未观察到硒化合物作用的时间效应关系，可能与细胞生长状态有关。本研究结果表明，与无机硒比较，有机硒更有利于 HepG2 细胞代谢生成 SEPP 和 GPx。SeMet 是人类通过饮食摄入硒的主要形式，与无机硒比较，SeMet 的生物利用率较高且毒性小[11]。本研究进一步证实不同硒化合物（Na_2SeO_3、SeMet 和 MeSeCys）因其化学形态不同导致补硒后合成硒蛋白的能力存在差异。因此，针对缺硒地区人群，应以补充有机形式的硒为宜。

参考文献

[1] Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes[J]. Science, 2003, 300(5624): 1439 - 1443.

[2] Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1790(11): 1441 - 1447.

[3] 马秀杰，张跃安. 硒对人体健康影响研究进展[J]. 中国公共卫生，2009，25(8)：1021 - 1023.

[4] 刘哲，张峰，梁建斌，等. 硒蛋白家族及其功能的研究进展[J]. 中国兽医杂志，2014，50(7)：61 - 63.

[5] Anan Y, Ohbo A, Tani Y, et al. Metabolic pathway of inorganic and organic selenocompounds labeled with stable isotope in Japanese quail[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(30): 7959 - 7966.

[6] Oefig CS, Renko K, Köhrle J, et al. Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs toxicity using liver cells in culture[J]. J Nutr Biochem, 2011, 22(10): 945 - 955.

[7] 田俊梅. 低硒大鼠对三种硒强化剂生物利用效果的比较[D]. 郑州：郑州大学硕士学位论文，2010.

[8] Zhang L, Wang YX, Zhou Y, et al. Different sources of maternal selenium affect selenium retention, antioxidant status, and meat quality of 56-day-old offspring of broiler breeders[J]. Poult Sci, 2014, 93(9): 2210 - 2219.

[9] 夏弈明，赵新娥，周燕，等. 硒的化学形式对人血中含硒组分的影响[J]. 营养学报，1993，15(2)，157 - 162.

[10] 田园，牟维鹏，李鹏高，等. 补充不同水平亚硒酸钠和硒蛋氨酸对大鼠硒代谢的影响[J]. 卫生研究，2004，33(6)：749 - 751.

[11] Schrauzer GN. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine[J]. Adv Food Nutr Res, 2003, 47: 73 - 112.

收稿日期：2015-03-02　（解学魁编校）

中国公共卫生 CPH