

递。研究显示睡眠剥夺可引起海马在内的脑功能区活性下降。动物实验显示, 损毁双侧海马可妨碍动物视觉分辨学习, 使大鼠水迷宫分辨学习和防御条件反应的保持遭到严重破坏^[7]。本研究结果显示, 与对照组比较, 间歇低氧组大鼠海马神经元结构随缺氧时间延长, 海马区神经细胞结构受损, 神经元密度明显减少, 提示间歇低氧可造成海马神经细胞损伤。结合间歇低氧对动物神经功能的影响, 可以推断间歇低氧是通过诱导海马区神经细胞损伤甚至死亡, 导致脑功能障碍出现, 这可能是 OSAHS 患者认知功能损害的病理基础。

参考文献

- [1] Gozal D, Daniel M, Dohanich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat [J]. *J Neurosci* 2001, 21: 2442-2450
- [2] 高秋菊, 勾凌燕, 王璟, 等. 不同剂量碘对迷宫前后鼠脑神经递

质的影响 [J]. *中国公共卫生*, 2005, 21(6): 710-711

- [3] Nieto FJ, Young TB, Lind BK, et al Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study* [J]. *JAMA*, 2000, 283: 1829-1836
- [4] Newman AB, Spiekerman CF, Enright P, et al Daytime sleepiness predicts mortality and cardiovascular disease in older adults. The Cardiovascular Health Study Research Group [J]. *Am Geriatr Soc*, 2000, 48: 115-123.
- [5] Coughlin SR, Mavdeley L, Mugarza JA, et al Obstructive sleep apnea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome [J]. *Eur Heart J* 2004, 25: 735-741
- [6] 郑庆, 杨宇. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与认知功能障碍及痴呆 [J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(12): 2392-2393
- [7] Chee MW, Chuah LY, Venkatraman V, et al Functional imaging of working memory following normal sleep and after 24 and 35 h of sleep deprivation: correlations of frontoparietal activation with performance [J]. *Neuroimage* 2006, 31(1): 419-428.

收稿日期: 2010-08-26

(解学魁编辑 郭长胜校对)

【实验研究】

硒对氧化损伤大鼠肝细胞糖代谢关键酶影响*

林晓静, 廖明, 周书川, 吴蕴棠

摘要: 目的 研究硒对氧化损伤大鼠肝细胞糖代谢关键酶表达的影响, 并初步探讨其作用机制。方法 采用 0.1 mmol/L 的 H₂O₂ 建立氧化损伤细胞模型, 并施加不同剂量硒干预, 通过实时定量 PCR 技术检测葡萄糖激酶 (glucokinase, GK)、糖原合成酶 (glycogen synthase, GS) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 的 mRNA 表达, 并采用蛋白免疫印迹 (Western blot) 方法检测 Akt 的蛋白表达水平。结果 补硒各组 GK 的 mRNA 表达量为 (9.692~16.588) × 10⁻⁶, 均高于 H₂O₂ 损伤组 (P < 0.05); 高剂量补硒组 GS 和 Akt 的 mRNA 表达量分别为 57.618 × 10⁻⁶ 和 0.2398 × 10⁻³, 均高于 H₂O₂ 损伤组 (P < 0.05); 补硒各组 Akt 的蛋白表达量为 (0.3343~0.4346) × 10⁻³, 均高于 H₂O₂ 损伤组 (P < 0.05)。结论 补硒可以在一定程度上改善氧化损伤对肝细胞糖代谢关键酶 GK、GS 的影响, 其机制可能与上调胰岛素信号传导通路的关键信号分子 Akt 的表达有关。

关键词: 氧化损伤; 硒; 葡萄糖激酶; 糖原合成酶; 蛋白激酶 B

中图分类号: R 575.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)01-0076-02

Effects of selenium on glycometabolism key enzymes in hepatocytes of rats with oxidative damage LIN Xiaojing, LIAO Ming, ZHOU Shuchuan, et al Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tianjin Medical University (Tianjin 300070, China)

Abstract Objective To study effects of selenium on glycometabolism key enzymes and its mechanism in hepatocytes of rats with oxidative damage. **Methods** Rat hepatocytes were exposed to 0.1 mM H₂O₂ and then were incubated with different dosages of selenium for 24 hours. The mRNA expression of glucokinase (GK), glycogen synthase (GS), and protein kinase B (PKB/Akt) were detected with real-time PCR. The protein expression of PKB/Akt was measured with Western blot. **Results** The mRNA expression of GK in selenium groups was 9.692-16.588 × 10⁻⁶, higher than that of in H₂O₂ oxidative model group (P < 0.05). The mRNA expression of GS and Akt in high dose selenium were 57.618 and 0.2398 × 10⁻³, higher than those of in H₂O₂ oxidative model group (P < 0.05). The expression of protein in selenium groups was 0.3343-0.4346 × 10⁻³, higher than that of in H₂O₂ oxidative model group (P < 0.05). **Conclusion** Selenium could improve the glycometabolism key enzymes GK and GS in rat hepatocytes with oxidative damage. The mechanism of the effect may relate to that selenium could up-regulate the expression of Akt which is the key molecule in insulin signal pathway.

Key words oxidative damage; selenium; glucokinase; glycogen synthase; PKB/Akt

肝脏是人体代谢的中枢性器官, 在血糖的调节过程中起至关重要作用^[1]。2型糖尿病时肝脏存在不同程度的氧化损伤, 影响糖代谢。硒是人体必需微量元素, 有关硒的研究大多

集中在抗氧化、抗癌作用等方面^[2], 但有资料表明, 硒与糖尿病之间具有高度相关性^[3-4]。本研究以 H₂O₂ 损伤建立氧化应激细胞模型, 探讨硒对氧化损伤肝细胞糖代谢关键酶影响, 为进一步研究硒改善糖尿病糖脂代谢紊乱分子机制和生物学作用靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 正常大鼠肝细胞株 (BRL) (中科院上海细胞库); 亚硒酸钠 (Na₂SeO₃) (美国 Sigma 公司); 胎牛血清培养液 (DMEM)、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 标准胎牛血清 (北京民海生物技术有限公司); 双抗 (青霉素和链霉素)

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30471459); 天津市自然科学基金 (033611611)

作者单位: 天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生教研室, 天津 300070

作者简介: 林晓静 (1984-), 女, 天津人, 硕士在读, 研究方向: 营养与疾病研究。

通讯作者: 吴蕴棠, E-mail: wuyuntang@120.com

(美国 Signa公司);放射免疫沉淀蛋白裂解液 (RIPA) (上海碧云天生物技术公司);小鼠抗蛋白激酶 B (Akt) 单克隆抗体 (美国 Santacruz公司);CO₂ 生物恒温培养箱 (德国热电公司);BFZ4-450-1 低速离心机 (保定白洋淀离心机厂);Optima™ TLX 台式超速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司);ECP 3000 多用电泳仪 (北京六一仪器厂);垂直板电泳转移装置 (上海天能科技有限公司)。

1.2 细胞培养 用含 5% 胎牛血清的完全培养液培养 BRL 细胞,培养条件为 5% CO₂、37℃。

1.3 剂量分组 (1)正常对照组:完全培养液培养 24 h (2) H₂O₂ 损伤组:完全培养液培养 24 h 0.1 mmol/L H₂O₂ 作用 1 h (3)低、中、高剂量补硒组:用含 0.1 mmol/L H₂O₂ 的完全培养液作用 1h 再分别用含有 0.05、0.1、1 μmol/L Na₂SeO₃ 的完全培养液培养 24 h

1.4 引物设计 采用 primer premier 5.0 软件进行设计,由上海英骏生物技术公司合成。葡萄糖激酶上游引物:5'-GGATGAAAGCTCAGCGAACCC-3',下游引物:5'-GGATGAAAGCTCAGCGAACCC-3',扩增片段长度:187 bp。糖原合成酶上游引物:5'-TCCCATCCTCAGCACCATT-3',下游引物:5'-TGTAACCCAGGGCTCATAGT-3',扩增片段长度:182 bp。Akt 上游引物:5'-TGAAGCTACTGGCAAGGG-3',下游引物:5'-AGGGCTGTAAGGAAGGGATG-3',扩增片段长度:181 bp。内参 β-actin 上游引物:5'-GCACGCTGAGAGAAATCCAG-3',下游引物:5'-CAGCTTGTCAGGTCCGCTCTC-3',扩增片段长度:146 bp

1.5 指标及测定方法 在倒置显微镜下观察细胞形态;采用实时定量 PCR 技术检测葡萄糖激酶 (GK)、糖原合成酶 (GS) 和 Akt 的 mRNA 表达;采用 Western blot 方法检测 Akt 的蛋白表达水平。

1.6 统计分析 采用 SPSS 11.5 统计软件分析,多组间比较采用单因素方差分析,各组间两两比较采用多样本比较方差分析 (SNK-q) 检验,检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 硒对大鼠肝细胞形态影响 正常对照组大鼠肝细胞生长状态良好,细胞间连接紧密,边界清楚,大小均匀;胞浆丰富。H₂O₂ 损伤组细胞收缩、变圆,胞体变小,细胞边界不清,部分胞膜不完整,甚至损伤断裂,有细胞脱落现象。低剂量补硒组与 H₂O₂ 损伤模型组比较,细胞形态已有所改善,部分细胞呈三角形或梭形,但细胞间隙仍然很大,数量较少;随着硒剂量增加,细胞数量逐渐增多,形态基本正常,细胞间连接更加紧密,细胞边界逐渐清晰,接近正常对照组。

2.2 硒对 GK、GS 基因 mRNA 表达影响 (表 1) 氧化损伤组、低、中剂量补硒组细胞 GK 的 mRNA 表达量低于正常对照组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。补硒组 GK 的 mRNA 表达量高于损伤组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。随着补硒剂量升高,GK 的 mRNA 表达水平有增加趋势。氧化损伤

表 1 硒对 H₂O₂ 氧化损伤肝细胞 GK、GS mRNA 表达的影响 (x̄ ± s, n = 4)

组别 (μmol/L)	GK β-actin (× 10 ⁻⁶)	GS β-actin (× 10 ⁻⁶)
正常对照组	19.308 ± 4.835	74.383 ± 7.798
H ₂ O ₂ 损伤组	4.170 ± 1.089 ^a	28.388 ± 7.044 ^a
补硒组	0.05 9.692 ± 1.827 ^{ab}	37.917 ± 5.587 ^a
	0.10 12.983 ± 1.909 ^{ab}	38.064 ± 4.954 ^a
	1.00 16.588 ± 2.356 ^{bc}	57.618 ± 7.662 ^{abcd}

注:与正常对照组比较,a P < 0.05 与 H₂O₂ 损伤组比较,b P < 0.05 与低剂量补硒组比较,c P < 0.05 与中剂量补硒组比较,d P < 0.05

组和补硒组细胞 GS 的 mRNA 表达水平低于正常对照组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。高剂量补硒组 GS 的 mRNA 表达水平高于损伤组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。

2.3 硒对氧化损伤肝细胞 Akt mRNA 和蛋白表达的影响 (表 2) 氧化损伤组和补硒组细胞 Akt 的 mRNA 表达量低于正常对照组,差异有统计学意义 (P < 0.05);高剂量补硒组细胞 Akt 的 mRNA 表达量高于损伤组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。补硒组蛋白表达量高于损伤组,差异有统计学意义 (P < 0.05);中、高剂量补硒组 Akt 蛋白表达量高于低剂量补硒组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。

表 2 硒对于 H₂O₂ 氧化损伤肝细胞 Akt mRNA 和蛋白表达的影响 (x̄ ± s)

组别 (μmol/L)	mRNA 表达水平		蛋白表达水平	
	只数	Akt/β-actin (× 10 ⁻³)	只数	Akt/β-actin (× 10 ⁻³)
正常对照组	4	0.4990 ± 0.124 2	3	0.514 8 ± 0.091 9
H ₂ O ₂ 损伤组	4	0.129 8 ± 0.035 5 ^a	3	0.237 6 ± 0.033 4 ^a
补硒组	0.05 4	0.112 5 ± 0.017 4 ^a	3	0.334 3 ± 0.047 3 ^{ab}
	0.10 4	0.159 8 ± 0.015 4 ^a	3	0.452 7 ± 0.046 1 ^{bc}
	1.00 4	0.239 8 ± 0.079 6 ^{abc}	3	0.434 6 ± 0.014 8 ^{bc}

注:与正常对照组比较,a P < 0.05;与 H₂O₂ 损伤组比较,b P < 0.05;与低剂量补硒组比较,c P < 0.05。

3 讨论

GK 在调节肝细胞糖代谢与胰岛 β 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌过程中发挥重要作用,其活性下降与糖代谢紊乱密切相关^[5-6]。GS 是糖原合成的限速酶,胰岛素抵抗时肝脏中的丙酮酸脱氢酶 (PDH) 和 GS 活性降低。Akt 在胰岛素抵抗的形成和发展中起重要作用。大量研究表明,胰岛素刺激的组织中 Akt 表达和 (或) 活性的改变可能在胰岛素抵抗的形成和发展中起重要作用^[7]。

本研究结果表明,氧化损伤模型组细胞 GK、GS 的 mRNA 表达水平、Akt 的 mRNA 和蛋白表达水平低于正常对照组,补硒组的 mRNA 和蛋白表达水平较氧化损伤模型组有不同程度提高,且随着补硒剂量的升高,其表达水平有增加趋势,提示补硒可通过上调损伤细胞 GK 和 GS 基因 mRNA 的表达水平同时,可以在一定范围内上调细胞 Akt 的表达水平,进一步影响 Akt 下游信号分子,对细胞糖代谢功能起调节作用。这可能是硒改善氧化损伤对肝细胞糖代谢关键酶影响机制之一,但硒是通过何种途径上调 Akt 表达,以及氧化损伤是否造成细胞 Akt 蛋白磷酸化程度改变,硒是否可以增加 Akt 活化水平尚不清楚,有待于进一步研究。

参考文献

[1] Edgerton DS, Johnson KM, Cherrington AD. Current strategies for the inhibition of hepatic glucose production in type 2 diabetes [J]. Front Biosci 2009 1(14): 1169-1181

[2] 陈敏. 微量元素硒的存在形式及其生物学功能 [J]. 中国畜牧杂志, 2005 41(6): 60-62

[3] Bleys J, Guallar E. Serum selenium and diabetes in U. S. adults [J]. Diabetes Care 2007, 30(4): 829-834

[4] 吴蕴棠, 孙忠, 张万起, 等. 硒对糖尿病大鼠肝脏蛋白磷酸酶基因表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2006 22(7): 799-800

[5] Mas A, Montane J, Anguela XM, et al. Reversal of type I diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle [J]. Diabetes 2006, 55(6): 1546-1553

[6] 郑宏庭, 邓华聪. 葡萄糖激酶与糖尿病的研究进展 [J]. 中国临床康复, 2004 27(8): 5960-5961

[7] Croutham el MC, Kahana JA, Korenchuk S, et al. Mechanism and management of AKT inhibitor-induced hyperglycemia [J]. Clin Cancer Res 2009, 15(1): 217-225