

文章编号: 0253-9950(2002)03-0138-06

中子活化法研究硒在人体组织中的亚细胞分布

陈春英, 赵九江, 章佩群, 高愈希, 柴之芳

中国科学院 高能物理研究所 核分析技术重点实验室, 北京 100039

摘要:用细胞器的差速离心分离技术和中子活化分析法研究了微量元素硒在人体重要组织中的亚细胞分布, 并用国际标准参考物质小牛肝 (NIST-1577a)、马肾 (IAEA-H8) 等检验分析结果的准确性。结果表明:不同个体的硒水平差异较大;在所研究的组织中,肾脏中硒含量最高。不同组织中硒的亚细胞分布模式明显不同, 硒的浓度从高到低依次为:肝脏, 线粒体 > 细胞核 > 胞液 > 溶酶体、微粒体;肾脏, 细胞核 > 线粒体 > 胞液 > 溶酶体、微粒体;心脏, 细胞核、线粒体 > 胞液、溶酶体、微粒体。

关键词: 硒; 中子活化分析; 亚细胞分布; 肝; 肾; 心脏

中图分类号: O657.4 **文献标识码:** A

硒是一种人体必需的微量元素,具有重要的生物化学功能。人类和动物的很多疾病与体内缺硒密切相关。我国在用硒防治克山病、大骨节病及启东县肝癌等方面取得了重大的进展。芬兰、美国、新西兰等国家对不同人群进行长时间大规模的跟踪研究证实:较高水平的硒摄入可降低前列腺癌、肺癌、直肠癌等疾病的发病率,并对这些疾病有一定的治疗作用^[1,2]。近年来还发现硒与艾滋病病毒(HIV)的复制、激活和艾滋病的发生、发展有关^[3,4]。但有关硒生理生化功能的知识还不能很好地说明硒与相关疾病的发生、发展间的联系。

细胞中各种亚细胞组分具有特定的生物学功能,因此研究体内组织中硒的亚细胞分布有助于认识硒的生理生化功能。目前,关于硒在人体主要脏器细胞中的分布和定位方面的研究还很少见报道。文献[5,6]利用本实验室的人体脏器标本库,对正常人肝组织中硒和硒蛋白的亚细胞分布作了一些探索性的工作,发现肝脏中硒在细胞核、

线粒体和胞液大量富集,在线粒体中浓度最高。并发现含硒蛋白在各亚细胞组分中的分布有显著的不同,硒和硒蛋白的分布特征表明硒可能通过一些不同的代谢途径进入细胞内不同的细胞器,并起着不同的生物学作用。本文重点研究硒在人体肝脏、肾脏以及心脏等重要组织器官中的亚细胞分布特征,比较其差异性,以期评价人体的硒营养状态,为进一步探讨硒在人体中的生物学作用提供依据。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

Beckman L7 型离心机,美国 Beckman 公司产品;超纯水以及去离子水由 Milli-Q 系统 (Millipore, Bedford, MA) 制备。所有玻璃容器、聚乙烯袋、聚四氟乙烯工具等均在 4 mol/L 硝酸中浸泡后用超纯水洗净备用。

乙酸铵,美国 Sigma 公司产品;其它试剂均为国产优级纯。

收稿日期:2001-10-11; 修订日期:2001-12-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(19935020 和 20071023);中国科学院重要方向性资助项目(KJC ×2-N101)

作者简介:陈春英(1969—),女,湖北武汉人,副研究员,博士,从事生物无机化学研究。

1.2 人体组织的采集

各种人体组织样本均取自意外死亡的健康成年人。在死后 24 h 内取样,聚乙烯塑料袋密封后,置于聚四氟乙烯小罐中于 -70°C 保存待用。实验前取出部分脏器样品解冻,经福尔马林固定后,进行组织病理学检查,选取细胞形态正常、无病变的样品作为研究对象。

1.3 亚细胞组分的分离

取一定量(30~80 g)的人体肝脏、肾脏以及心脏组织,用肱刀及聚四氟乙烯镊子除去外膜及结缔组织,用 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 缓冲液($\text{pH}=7.4$)洗涤 3 次。切成小块,加入 3 倍体积的上述缓冲液于玻璃匀浆器中匀浆。采用连续差速离心法将匀浆液分离成不同的亚细胞组分,即在 4 000, 11 000, 19 000 和 36 000 r/min 的转速下离心 10, 10, 30, 120 min, 分别获得细胞核、线粒体、溶酶体、微粒体和细胞上清液等亚细胞组分。各步沉淀均用缓冲液洗涤,相同条件离心分离后将上清液合并,进行下一步离心。以上操作均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。

1.4 仪器中子活化分析(INAA)

将得到的各个组分冷冻干燥,称重。取 50 mg 左右样品,用 5 cm $\times$ 5 cm 聚乙烯膜密封。在中国原子能科学研究院微型反应堆照射 20 s, 中子注量率为 $1 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 冷却 3 s, 测量 20 s。在 γ 谱上用 $^{77}\text{Se}^{\text{m}}$ 的 161.6 keV 峰计数。

另称取样品 150 mg 左右,用两层擦镜纸及高纯铝箔包裹,在中国原子能科学研究院重水反应堆照射 8 h, 中子注量率 $7 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 冷却 20 d, 用高纯 Ge 探测器及多道分析系统进行测量。采用中国原子能科学研究院研制的活化分析 CIAE/SPAN 分析程序进行谱分析。用 ^{75}Se 的 264.65 keV γ 峰计数。

1.5 氢化物-原子荧光光谱法(HGAFS)

取适量样品(5~20 mg),以超纯硝酸与高氯酸组成的酸溶液(体积比为 3:1)作为消化试剂,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化 2~3 h。溶液完全透明后,加入 1 mL 5 mol/L HCl,将 $\text{Se}(\text{VI})$ 转化为 $\text{Se}(\text{IV})$ 。在酸性介质中,用 NaBH_4 将 $\text{Se}(\text{IV})$ 还原为 H_2Se 进行硒的测定,检测限为 0.05 ng/mL。所用仪器为国产 WPY-2 型原子荧光光度计。

2 结果和讨论

2.1 分析方法

用于测定微量元素在人体脏器中的亚细胞分

布的多元素分析方法(INAA),其主要优点之一就是样品在照射完后基本上不产生元素污染。但样品在反应堆照射前的取样和处理过程必须十分小心,以避免在操作中引入元素的污染和丢失。此外,分离样品所用的化学试剂(如蔗糖、氯化钠等)常含有杂质,从而影响分析的准确性。为此,本实验采用国际规范化的人肝样品操作规程,在 100 级超净室内进行分离操作,避免使用金属器皿,仅用高纯醋酸铵作分离缓冲液,以实现良好的分离效果并降低测量本底值。HGAFS 和 INAA 法测定 $^{77}\text{Se}^{\text{m}}$ 和 ^{75}Se 的结果列入表 1。实验共测定了 4 种标准参考物(小牛肝 NIST-1577 a, 马肾 IAEA-H8, 牛肝 GBW08193 和猪肝 GBW08551)和两种亚细胞组分的硒含量。由表 1 可以看出,4 种标准参考物的测量值与推荐值基本相符。HGAFS 的结果均稍低于推荐值。这可能与低温消化时消化不完全或含硒组分挥发损失有关。从两种代表样品的分析结果可以看出,不同方法得到的测量值基本一致。说明所采用的二种方法均可给出可靠、准确的测定结果。在实验中,大部分样品采用照射 8 h 的 INAA 法测定。

2.2 硒在不同组织中的含量

组织中硒含量的测定结果及文献值列入表 2。表 2 结果表明:硒在 3 种脏器中的质量分数为: $w(\text{肾脏}) > w(\text{肝脏}) > w(\text{心脏})$ 。这与文献报道的结果相同。本研究所涉及的 3 种脏器中硒的质量分数均低于文献值。这可能与样本提供者的硒营养状态差别有关。在不同的硒营养状态下,硒的体内分布模式不同。有报道指出:血硒水平不同时,硒在血液内各蛋白中的分布情况也有区别^[9,10]。本研究中,心脏和肾脏中的硒明显小于文献值,而肝脏中硒接近文献值。说明肝脏可能是硒发挥其生理功能的主要器官。

2.3 硒的亚细胞分布

硒在人体肝、肾、心等组织中的分析结果列入表 3。从表 3 可以看出,不同脏器的相同亚细胞组分中,硒的含量存在着与组织中硒含量相同的规律,即 $w(\text{肾脏}) > w(\text{肝脏}) > w(\text{心脏})$ 。从同一组织中各亚细胞器的硒平均含量看,肝脏中硒含量(w_1)由高到低的顺序是线粒体 > 细胞核 > 胞液 > 溶酶体、微粒体。但由于细胞核在细胞中所占的比例较大,因此从总量来看,肝细胞中的 Se 主要分布于细胞核,占肝脏总硒量的(44.9 $\pm$ 7.4)%,其次为胞液和线粒体,各约占 25%,微粒

体和溶酶体中硒的总量最低。肾脏的亚细胞中硒的质量分数顺序为细胞核 > 线粒体 > 胞液 > 溶酶体,微粒体。肾脏中约有 70 % 的硒存在于细胞核中,线粒体和胞液中各含肾脏总硒的 14 % 左右。心脏亚细胞中硒的含量顺序为细胞核,线粒体 > 胞液,溶酶体,微粒体。细胞核中硒占总组织硒的 71.3 %,其次是胞液为 19.6 %。实验表明:硒在不同组织中的亚细胞分布情况是不同的。

表 1 不同分析方法对几种标准参考物和样品中硒含量的测定结果
Table 1 Comparison of determination of Se in standard reference materials

SRMs 和样品 (SRMs and samples)	(SRMs) and samples by different analysis		10 ⁻⁶	
	INAA		HGAAS	w (Se) _{rce}
	w (⁷⁷ Se ^m)	w (⁷⁵ Se)	w (Se)	
小牛肝(Bovine liver, NIST 1577a)	0.75 ±0.05	0.75 ±0.08	0.69 ±0.10	0.71 ±0.03
马肾(Horse kidney, IAEA H8)	4.62 ±0.62	5.01 ±0.92	4.04 ±1.0	4.67 ±0.83
猪肝(Chinese pork liver, GBW08551)	0.83 ±0.22	0.79 ±0.15	0.85 ±0.12	0.94 ±0.05
牛肝(Chinese bovine liver, GBW08193)	0.59 ±0.10	0.57 ±0.08	0.54 ±0.05	0.56
第 42 号肝胞液(No. 42 liver cytosol) *	0.014 ±0.002	0.016 ±0.001	0.014 ±0.003	
第 42 号肝细胞核(No. 42 liver nuclei)	0.75 ±0.05	0.83 ±0.08	0.670 ±0.07	

注(Notes): (1) $n = 2 \sim 4$;
(2) “*” 为肝胞液中 Se 的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; 其它为干重样品中 Se 的质量分数 (“*” express the mass concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of Se in the liver cytosol, other are the mass fraction of dry samples)

表 2 不同组织中的硒含量
Table 2 Selenium contents in different tissues 10⁻⁶

组织 (Tissues)	w (Se) _{mea}	w (Se) _{ref}
心脏 (Heart)	0.50 ±0.04	1.17 ±1.1 ^[7]
肝脏 (Liver)	1.23 ±0.49	1.63 ±1.21 ^[7] , 1.45 ±0.38 ^[8]
肾脏 (Kidney)	3.22 ±1.68	5.13 ±1.1 ^[8]

表 3 硒在人体肝脏,肾脏和心脏组织各亚细胞组分中的含量
Table 3 Selenium content in each subcellular fraction of human liver, kidney and heart specimens

组织 (Tissues)		细胞核 (Nuclei)	线粒体 (Mitochondria)	溶酶体 (Lysosome)	微粒体 (Microsome)	胞液 (Cytosol)
肝脏 (Liver) ($n = 10$)	$10^6 w_1$	1.28 ±0.40	1.39 ±0.50	0.67 ±0.34	0.77 ±0.31	1.00 ±0.42
	$w_2/\%$	43.6 ±6.4	22.2 ±5.7	4.7 ±2.0	3.0 ±1.1	26.4 ±2.6
	$w_3/\%$	44.9 ±7.4	25.4 ±4.0	1.7 ±0.8	2.1 ±1.0	25.7 ±4.2
肾脏 (Kidney) ($n = 5$)	$10^6 w_1$	3.92 ±2.03	2.62 ±1.38	1.02 ±0.43	1.25 ±0.81	1.15 ±0.43
	$w_2/\%$	48.4 ±13.9	13.0 ±8.5	4.4 ±1.1	5.2 ±1.8	29.1 ±5.1
	$w_3/\%$	68.8 ±14.6	14.2 ±12.1	1.7 ±0.5	2.2 ±0.6	13.1 ±6.0
心脏 (Heart) ($n = 5$)	$10^6 w_1$	0.61 ±0.06	0.67 ±0.23	0.41 ±0.21	0.42 ±0.11	0.39 ±0.11
	$w_2/\%$	78.2 ±8.2	4.9 ±2.5	1.2 ±0.8	1.7 ±0.6	14.0 ±5.7
	$w_3/\%$	71.3 ±6.1	4.8 ±3.7	2.1 ±1.4	2.2 ±0.8	19.6 ±4.3

注(Notes): 质量分数 w_1, w_2, w_3 分别表示某一亚细胞组分中 Se 的质量与亚细胞组分质量,亚细胞组分质量与组织总量,亚细胞组分中 Se 的质量与组织总硒量之比 (The mass fractions w_1, w_2, w_3 express the mass of Se in some subcellular fraction to that of subcell, the mass of some subcellular fraction to that of the tissue, the mass of Se in some subcellular fraction to that in the tissue, respectively); 所有样品为干重 (All samples are dry)

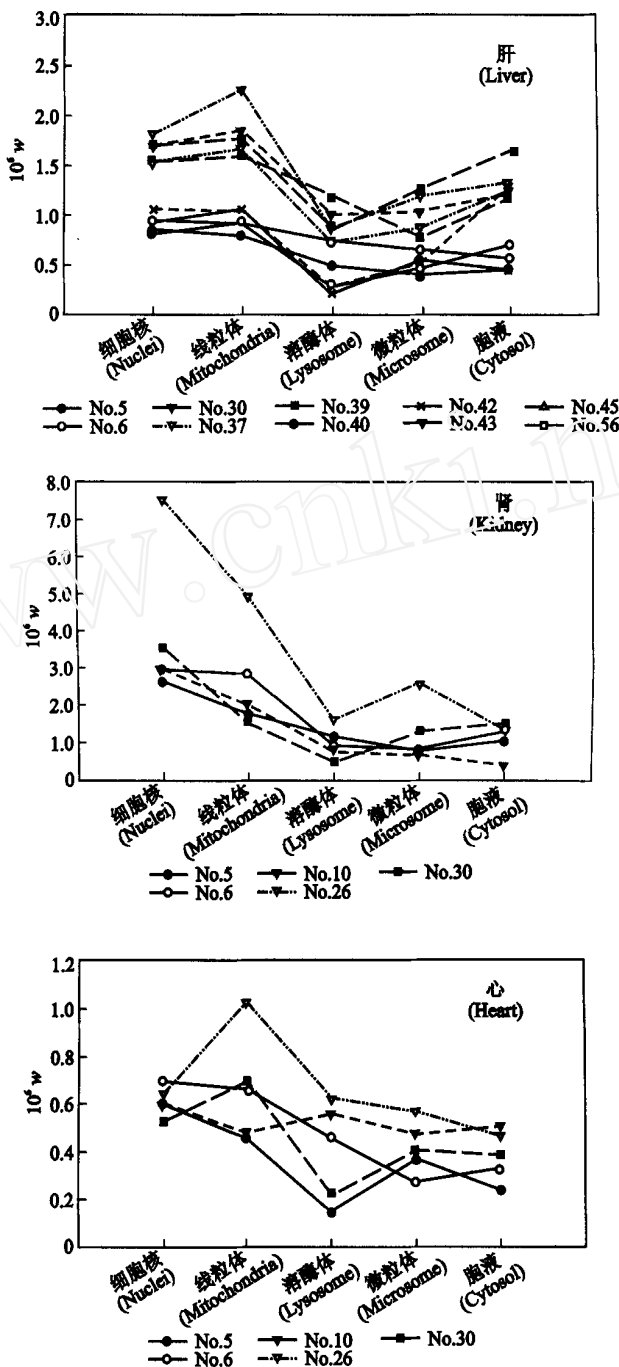


图 1 人体组织亚细胞组分中硒的分布

Fig. 1 Subcellular distribution pattern of selenium in human specimens

在不同人的三种脏器中,硒在各亚细胞中的质量分数变化情况示于图 1。从图 1 可以看出,同一组织中,尽管硒在组织、亚细胞中的质量分数在每一例样品之间存在个体差异,但在各细胞器中硒的质量分数大小有大致相同的规律。在肝中硒在线粒体中最高,其次为细胞核和胞液。而在

肾脏中其分布规律则为细胞核中最高,其次为线粒体和胞液。这与牛肾中硒的亚细胞分布结果(细胞核、线粒体、溶酶体、微粒体和胞液中硒的浓度分别为 9.40, 1.08, 0.86, 1.08 和 1.27 mg/kg)^[11]是基本一致的。硒在不同人体心脏亚细胞组分中的分布趋势与在肝脏和肾脏中的不同,其中 3 例

硒的浓度为细胞核 > 线粒体 > 溶酶体, 微粒体, 胞液, 另外 2 例硒的浓度为线粒体 > 细胞核 > 溶酶体, 微粒体, 胞液。这说明硒的亚细胞分布情况与不同的组织有关, 基本不受样品来源的个体差异影响, 心脏中硒的亚细胞分布受样品来源的个体差异影响略大。

在所研究的几种器官中, 高浓度的硒存在于细胞核和线粒体中, 意味着硒在这两种重要细胞器中发挥着某些特定的生物学功能。肝脏是人体重要的新陈代谢器官, 同时也是人体重要的解毒器官, 可用作污染物在体内负荷的较好的指示器。它被用来评估与饮食习惯及当地环境有关的微量元素水平。因此, 肝脏可作为研究体内微量元素水平的良好的生物指示器 (Bioindicator), 许多国家生物环境标本库已将人体肝脏列为环境监测标本之一^[12]。肾脏也是重要的解毒和排泄器官。肝脏和肾脏也是体内最大的硒蓄积库之一, 硒在细胞内的定位与分布应当与其代谢和功能是分不开的。

线粒体是一种具有能量转换、物质转运、信息传递和合成腺苷三磷酸 (ATP) 等功能的重要细胞器。在它的膜上含有丰富的各种酶体系, 它们都非常精细有序地排列在膜上, 如呼吸链的酶体系、氧化磷酸化酶体系、三羧酸循环及脂肪酸氧化的酶体系等。于树玉等进行的体外实验发现, 亚硒酸钠能调控肝线粒体的结构和功能, 选择性抑制肝癌细胞能量代谢, 对肝癌细胞线粒体结合的己糖激酶活力有抑制作用, 从而抑制肝癌细胞的高糖酵解, 达到抗肿瘤的作用^[13, 14]。在人和动物的精子线粒体中已经分离出一种 24 kD 的硒蛋白^[15]。Aho 等曾采用 LKB-2277 生物活性微量热检测系统研究了体外硒对鲫鱼肝线粒体能量代谢的影响, 发现硒缺乏和硒过量时明显地影响鲫鱼肝线粒体能量代谢以及代谢速率常数。过量硒对线粒体具有很强的毒性, 明显阻碍细胞的呼吸功能^[16]。毫无疑问, 硒对维持肝脏以及线粒体的正常功能起着重要的作用。

细胞核存储细胞的遗传信息, 含有大量的 DNA、RNA、组蛋白、非组蛋白、其它调控基因表达的蛋白质、核糖体。本文结果表明在这三种组织尤其是肾脏中, 大量的硒存在于细胞核中。细胞核中高浓度硒的存在, 其生物学意义还不十分清楚。硒究竟以何种形式存在, 以及是否对遗传物质的功能有影响都是值得深入探讨的问题。

3 结 论

用中子活化分析方法研究了人的心脏、肝脏、肾脏中硒的亚细胞分布情况。结果表明: 硒在这三种组织中的含量大小顺序为: 肾脏、肝脏、心脏。在不同脏器的同种亚细胞分之间, 硒含量也有相同的大小次序。硒的亚细胞分布情况和不同的脏器有关。在肝脏中, 各亚细胞组分中硒含量的大小顺序为线粒体 > 细胞核 > 胞液 > 溶酶体, 微粒体; 肾脏中为细胞核 > 线粒体 > 胞液 > 溶酶体, 微粒体; 而心脏中则是细胞核, 线粒体 > 胞液, 溶酶体, 微粒体。亚细胞分布情况受样品来源的个体差异影响一般较小, 仅心脏中硒的亚细胞分布受样品来源的个体差异影响比较明显。

参考文献:

- [1] CLARK L C, KAL KIN B, KRON GRAD A, et al. Decreased Incidence of Prostate Cancer With Selenium Supplementation: Results of a Double-Blind Cancer Prevention Trial [J]. Br J Urol, 1998, 81 (5): 730 ~ 734.
- [2] LUSH D T. Preventing Heart Disease and Cancer. What Randomized, Primary-prevention Studies Show [J]. Postgrad Med, 1999, 106 (5): 143 ~ 148.
- [3] BAUM M K, Shor Posner G, LAI S, et al. High Risk of HIV-Related Mortality Is Associated With Selenium Deficiency [J]. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997, 15 (5): 370 ~ 374.
- [4] CHEN C Y, ZHOU J Y, XU H B, et al. Effect of Selenium Supplementation on Mice Infected With LP-BM5 MuLV, a Murine AIDS Model [J]. Biol Trace Element Res, 1997, 59 (1 ~ 3): 187 ~ 193.
- [5] CHEN C, ZHANG P, HOU X, et al. Subcellular Distribution of Selenium and Se-Containing Proteins in Human Liver [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1427: 205 ~ 215.
- [6] CHEN C, ZHANG P, HOU X, et al. Investigation of Selenium Distribution in Subcellular Fractions of Human Liver by Neutron Activation Analysis [J]. Biol Trace Elem Res, 1999, 71 ~ 72: 131 ~ 138.
- [7] 陈清, 王耐芬, 严春红. 北京成人血、发和脏器硒参考值研究 [J]. 中华预防医学杂志, 1994, 28 (5): 267 ~ 271.
- [8] WANG Y S, ZHUANG G S, TAN M G, et al. Distribution of Some Elements in Human Hairs and Internal Organs, Determined by Neutron Activation Analysis [J]. J Radioanal Nucl Chem, 1991, 151: 301 ~ 311.

- [9] WHANGER P D ,XIA X , THOMSON C D . Protein Technics for Selenium Speciation in Human Body Fluid [J]. J Trace Elem Electrolytes Health Dis ,1994 ,8:1 ~ 7.
- [10] BURK R F ,HILL K E ,READ R ,et al . Response of Rat Selenoprotein P to Selenium Administration and Fate of its Selenium [J]. Am J Physiol ,1991 ,26:126 ~ 130.
- [11] JAYAWICKREME C K ,CHATT A. Determination of Protein-Bound Trace Elements in Bovine Kidneys I, Neutron Activation Subcellular Fractions [J]. J Radioanal Nucl Chem ,1987 ,110:583 ~ 593.
- [12] KEMPER F H . Human Organ Specimen Banking-15 Years of Experience[J]. Sci Total Environ ,1993 ,13 ~ 25:139 ~ 140.
- [13] 于树玉,诸亚君,刘秋燕,等. 硒对肝癌及正常肝线粒体的膨胀-收缩、ATP 酶活性及氧化功能的影响[J]. 中华肿瘤杂志,1983 ,5(4) :319 ~ 322.
- [14] 李芳生,张秀芳,邹黎明,等. 克山病心肌线粒体氧化损伤的实验研究[J]. 生物化学杂志,1992 ,8(6) : 650 ~ 655.
- [15] CHEN C ,LIU Y , ZHOU J ,et al . Microcalorimetric Study on The Toxic Effect of Selenium on The Mitochondrial Metabolism of Cyprinus Carpio Liver[J]. Biol Trace Elem Res ,1997 ,60(1 ~ 2) :115 ~ 122.
- [16] AHO H , SCHWEMMER M , TESSMAN D ,et al . Isolation ,Expression ,and Chromosomal Localization of the Human Mitochondrial Capsule Selenoprotein Gene (MCSP) [J]. Genomics ,1996 ,32 (2) : 184 ~ 190.

STUDY OF Se SUBCELLULAR DISTRIBUTION IN HUMAN TISSUES BY NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS

CHEN Chun-ying , ZHAO Jiur-jiang , ZHANG Pei-qun , GAO Yu-xi , CHAI Zhi-fang

Laboratory of Nuclear Analytical Techniques ,Institute of High Energy Physics ,
the Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100039 , China

Abstract : Subcellular distribution of selenium in certain important human tissues is studied by neutron activation analysis combined with differential centrifugation method. The standard reference materials ,bovine liver NIST 1577a and horse kidney IAEA H8 , are used to validate the analytical quality . The experimental results show that the selenium levels in various individuals are significantly different . Body selenium is highly enriched in human kidney . Different subcellular selenium distribution patterns are also found in different tissues. The selenium levels in various organelles are sequenced as mitochondria > nuclei > cytosol > lysosome ,microsome in liver ; nuclei > mitochondria > cytosol > lysosome ,microsome in kidney ;and mitochondria , nuclei > cytosol ,lysosome ,microsome in heart.

Key words : selenium ; neutron activation analysis ; subcellular distribution ; liver ; kidney ; heart