

亚硒酸钠对斑点叉尾鮰卵巢细胞的形态、生长及抗氧化能力的影响

田珍 刘小玲 王敏 汤蓉*

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 以 MTT 法检测了亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 对斑点叉尾鮰卵巢细胞 (CCO) 生长及抗氧化能力的影响, 并在倒置显微镜下观察了 CCO 形态。结果表明: Na_2SeO_3 对 CCO 的作用呈浓度和时间依赖性。低浓度的亚硒酸钠对细胞的形态和生长没有显著的影响, 而随着亚硒酸钠浓度的增加 ($5 \mu\text{mol/L}$) 和作用 CCO 的时间的延长 (24 h), 细胞生长受到抑制, 细胞形态出现损伤样变化, 且随着 Na_2SeO_3 浓度的增加, 抑制作用增强。高浓度 Na_2SeO_3 ($10 \mu\text{mol/L}$) 作用 CCO 24 h , 细胞内的超氧化物歧化酶 (SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性显著下降, 乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率显著增加, 脂质过氧化水平显著升高, 提示细胞受到严重氧化损伤。

关键词 亚硒酸钠; 斑点叉尾鮰卵巢细胞; 细胞生长; 抗氧化能力

中图分类号 S 963.73⁺4; Q 959.46 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0217-04

必需微量元素硒 (selenium, Se) 在鱼类的生长、发育、繁殖、肉质、健康特别是免疫维持方面扮演重要角色。魏文志等^[1]在异育银鲫饵料中添加亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 和硒多糖, 能明显提高其增重率, 降低饵料系数。国内外许多研究也已经证实硒可以影响水生动物的免疫功能, 缺硒会造成水生动物免疫力低下, 而补硒则会提高其免疫力^[2-3]。但 Hilton 等^[4]发现, 长期喂食硒含量超过 3 mg/kg 的干饲料给虹鳟, 会对虹鳟产生毒性。目前硒对水生动物的作用在细胞水平上的研究很少, 笔者以斑点叉尾鮰卵巢细胞 (CCO) 为研究对象, 在细胞水平上研究不同剂量的亚硒酸钠对 CCO 的细胞形态、生长和抗氧化能力的影响。

材料与amp;方法

试验材料

斑点叉尾鮰卵巢细胞株 (CCO) 为华中农业大学水产学院细胞保藏中心保存细胞株。高糖 DMEM 干粉培养基、新生牛血清 (NCS) 购自 GIBCO 公司; 噻唑蓝 (MTT)、胰蛋白酶、谷胱甘肽-青霉素-链霉素 (GPS) 购自 Sigma 公司; 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-

Px) 测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒及乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 亚硒酸钠 (Na_2SeO_3)、二甲基亚砷 (DMSO) 及其它试剂均为国产分析纯。

细胞的培养与传代

按常规方法进行, CCO 培养于含 10% NCS、 1% GPS 的高糖 DMEM 培养基中, 每 $3 \sim 4 \text{ d}$ 传代 1 次。用 0.25% 的胰蛋白酶消化单层细胞, 按 $1:2$ 的比例接种于培养瓶内, 置 28°C , 5% CO_2 培养箱培养。取对数生长期细胞用于试验。

细胞形态观察

收集对数生长期细胞, 用培养液调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 24 孔培养板中, 每孔 1 mL , 培养 24 h 后, 加入含 Na_2SeO_3 及 5% NCS 的培养基, 使其终浓度分别为 0 、 0.01 、 1 、 5 、 10 、 $100 \mu\text{mol/L}$, 每个浓度设 2 个平行, 继续培养 24 h 后, 于倒置显微镜下观察细胞形态的变化。

对生长的影响

实验采用 MTT 法^[5]。取对数生长期的 CCO 细胞, 按 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔培养板中, 每孔 $180 \mu\text{L}$, 培养 24 h 后, 加入含 Na_2SeO_3 及 5% NCS 的培养基, 设空白组 (不加细胞)、对照组和 Na_2SeO_3

收稿日期: 2009-05-13; 修回日期: 2009-06-20

* 农业部 948 项目 (2005Z37)、中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题 (2007FEA0207) 和华中农业大学科研启动项目 (52204-06002) 资助

** 通讯作者。E-mail: tangrong@mail.hzau.edu.cn

田珍, 女, 1982 年生, 硕士研究生。研究方向: 细胞生物学。E-mail: tianzhen@webmail.hzau.edu.cn

不同浓度组(0.01、0.1、1、5、10、100 $\mu\text{mol/L}$),每孔终体积为200 μL ,每组8个平行,28 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱培养。于CCO培养6、12、24、48和72 h后,每孔加入20 μL MTT继续培养4 h,再加入DMSO每孔150 μL ,室温振荡10 min,置于酶标仪,测定570 nm处的OD值。

对总SOD活性及脂质过氧化物水平(LPO)的影响

收集对数生长期细胞,用培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于25 cm^2 细胞培养瓶中,每瓶5 mL,置培养箱中培养24 h后,加入 Na_2SeO_3 ,使其终浓度为0、0.1、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$,每个浓度3个平行,分别培养24 h后,去掉培养基,0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞(1 000 r/min离心10 min,弃上清)。然后用PBS洗涤2次,悬浮于1 mL PBS中,-80 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融4次后,于4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min离心15 min取上清,用于酶活性测定。总SOD活性、GSH-Px活性及脂质过氧化物水平(以其降解产物丙二醛MDA含量表示)测定均严格按试剂盒说明进行操作。

对细胞膜通透性的影响

收集对数生长期细胞,用培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于6孔培养板中,每孔2 mL,置

培养箱中培养24 h后,加入 Na_2SeO_3 ,使其终浓度为0、0.1、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$,每个浓度3个平行,分别培养24 h后,取培养液上清0.2 mL,其余上清和细胞一起冻融,12 000 r/min离心10 min,取上清。按照LDH测试试剂盒说明书测定培养液上清和混合冻融液上清中LDH活性,并计算LDH释放率。

$$\text{LDH 释放率}(\%) = \frac{\text{培养基中LDH活性}}{\text{培养基中LDH活性} + \text{所有死细胞中的LDH活性}} \times 100$$

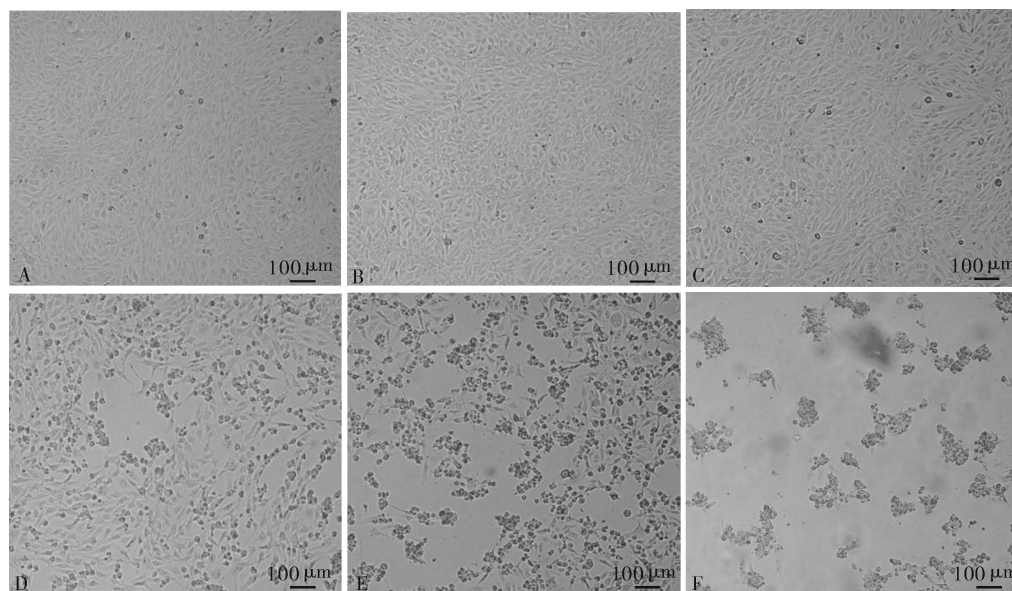
数据处理与分析

数据通过STATISTICA 6.0统计软件进行方差分析(One-Way ANOVA),以平均值 \pm 标准差表示,差异显著水平为0.05,极显著水平为0.01。

结果与分析

对细胞形态的影响

不同浓度的 Na_2SeO_3 作用于CCO,细胞形态和贴壁情况发生显著变化。如图1所示,对照组细胞呈梭形,细胞平行均匀排列成单层(图1-A);与对照组相比,0.01 $\mu\text{mol/L}$ 和1 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 作用24 h组,细胞未见明显的变化(图1-B,C);5 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 作用24 h组,单层细胞中出现明显的空泡,可见少量细胞发生死亡(图1-D);10 $\mu\text{mol/L}$



A. 对照细胞 Control cells; B. 0.01 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 作用24 h 0.01 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 for 24 h; C. 1 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 作用24 h 1 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 for 24 h; D. 5 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 作用24 h 5 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 for 24 h; E. 10 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 作用24 h 10 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 for 24 h; F. 100 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 作用24 h 100 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 for 24 h.

图1 Na_2SeO_3 对CCO细胞形态的影响

Fig. 1 Effects of sodium selenite on morphology of CCO

Na₂SeO₃作用 24 h 组,大部分细胞变圆,脱落,细胞密度较对照组明显降低(图 1-E); 100 μmol/L Na₂SeO₃作用 24 h 组,可见 90%以上的细胞基本死亡,死亡细胞成团漂浮于培养基中(图 1-F)。

对细胞生长的影响

如表 1 所示,低浓度 Na₂SeO₃作用 CCO 12 h,对其生长无明显抑制;而浓度为 10 μmol/L 及 100

μmol/L 时,细胞生长的抑制率分别为 22.8% ($P < 0.05$)和 35.8% ($P < 0.05$)。作用 48 h,0.01 ~ 0.1 μmol/L 的 Na₂SeO₃对 CCO 的生长均有抑制作用,且抑制作用随剂量和时间的增加而加强。100 μmol/L 的 Na₂SeO₃作用 72 h,细胞生长的抑制率达到 83.2% ($P < 0.01$)。由此可知,Na₂SeO₃对 CCO 的增殖抑制呈浓度和时间依赖性。

表 1 Na₂SeO₃对 CCO 细胞生长的影响

Table 1 Effects of sodium selenite on cell growth of CCO

组别 Groups	作用时间 Time/h				
	6	12	24	48	72
对照 Control	0.401 ±0.013	0.413 ±0.047	0.474 ±0.042	0.810 ±0.036	0.939 ±0.059
0.01 μmol/L Na ₂ SeO ₃	0.419 ±0.041	0.415 ±0.027	0.473 ±0.074	0.752 ±0.053	0.926 ±0.072
0.1 μmol/L Na ₂ SeO ₃	0.421 ±0.013	0.395 ±0.024	0.445 ±0.029	0.736 ±0.085	0.910 ±0.051
1 μmol/L Na ₂ SeO ₃	0.410 ±0.037	0.412 ±0.025	0.472 ±0.048	0.584 ±0.050	0.780 ±0.024
5 μmol/L Na ₂ SeO ₃	0.336 ±0.027	0.381 ±0.025	0.362 ±0.060	0.257 ±0.012 *	0.318 ±0.013 *
10 μmol/L Na ₂ SeO ₃	0.357 ±0.021	0.319 ±0.017 *	0.230 ±0.011 *	0.172 ±0.010 **	0.281 ±0.023 **
100 μmol/L Na ₂ SeO ₃	0.341 ±0.024	0.265 ±0.030 *	0.185 ±0.016 **	0.101 ±0.006 **	0.158 ±0.010 **

对 的总、- 活性及的影响

如表 2 所示,0.1 μmol/L 和 1 μmol/L Na₂SeO₃对细胞的总 SOD 和 GSH-Px 酶活性无显著影响。但 10 μmol/L Na₂SeO₃作用 CCO 24 h 导致总 SOD 和 GSH-Px 酶活性分别下降至正常对照组的 82.1% ($P < 0.05$)和 73.1% ($P < 0.05$)。这说明高剂量的亚硒酸钠能对细胞产生氧化损伤,致使细胞内的抗氧化酶活性降低。5 μmol/L 和 10 μmol/L Na₂SeO₃作用 CCO 后,MDA 含量显著增加,比对照组分别增加了 34.6% ($P < 0.05$)和 219.4% ($P < 0.01$),说明高浓度 Na₂SeO₃作用后引起细胞发生严重的脂质过氧化损伤。

表 2 Na₂SeO₃对 CCO 细胞总 SOD、GSH-Px 及 LPO 的影响

Table 2 Effects of sodium selenite on T-SOD, GSH-Px activity and the lipid peroxidation of CCO

组别 Groups	SOD/ (U/ mg)	GSH-Px/ (U/ mg)	MDA/ (nmol/ mg)
对照 Control	41.73 ±1.49	24.26 ±1.57	3.41 ±0.06
0.1 μmol/L Na ₂ SeO ₃	44.29 ±1.23	25.70 ±1.16	3.34 ±0.07
1 μmol/L Na ₂ SeO ₃	43.93 ±1.89	24.53 ±0.38	3.35 ±0.05
5 μmol/L Na ₂ SeO ₃	40.56 ±2.38	23.18 ±1.93	4.59 ±0.06 *
10 μmol/L Na ₂ SeO ₃	34.28 ±2.32 *	17.73 ±0.62 *	10.89 ±0.38 **

对 的细胞膜通透性的影响

LDH 属于胞浆酶,其漏出率反映细胞膜的完整性,当细胞通透性改变或细胞受损破裂时,LDH 会释放到基质中。如图 2 所示,0.1 μmol/L 和 1 μmol/L Na₂SeO₃对细胞的 LDH 的释放率无显著影响。5 μmol/L 和 10 μmol/L Na₂SeO₃作用 CCO 24 h 后,LDH 的释放率分别由对照组的 6.27% ±

0.58% 提高到 8.27% ±1.23% ($P < 0.05$)和 19.27% ±1.54% ($P < 0.01$)。

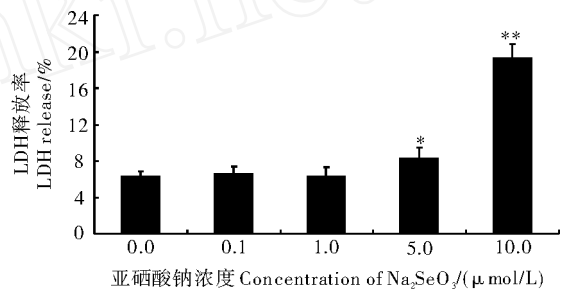


图 2 Na₂SeO₃对 CCO LDH 释放的影响

Fig. 2 Effects of sodium selenite on the LDH release of CCO

讨 论

硒虽然是生物体必需的微量元素,但如果硒的摄入超出了营养范围则会有一定的毒性作用。薛伟光等^[6]在大鼠慢性硒中毒的病理学形态研究中指出,慢性硒中毒会导致大鼠的肝脏和肾脏细胞发生变性坏死。

本试验通过不同浓度的亚硒酸钠体外培养斑点叉尾鮰卵巢细胞不同时间,发现低浓度(1 μmol/L)亚硒酸钠对细胞的形态和生长没有显著的影响,而高浓度(5 μmol/L)亚硒酸钠可抑制 CCO 的增殖,并产生损伤。这与侯小东等^[7]研究硒对血管内皮细胞的结果是相一致的,低浓度硒(50 ~ 500 nmol/L)促进血管内皮细胞的增殖,高浓度硒(2 μmol/L)对血管内皮细胞产生毒性作用。

在正常生理状态下,生物体内存在多种抗氧化

防御体系能有效清除氧化应激引起的氧化损伤;一旦氧化应激的强度超出机体的抵抗限度,就会引起一系列的氧化损伤,导致机体发生病变^[8]。本研究中 Na_2SeO_3 ($5 \mu\text{mol/L}$) 呈剂量和时间依赖性地抑制 CCO 的生长,同时细胞脂质过氧化物水平大大升高,说明 Na_2SeO_3 导致细胞脂质过氧化损伤。 Na_2SeO_3 ($10 \mu\text{mol/L}$) 作用 CCO 24 h 后,细胞内 GSH-Px、SOD 活性均显著下降,这提示细胞受到严重氧化损伤,GSH-Px、SOD 发挥其抗氧化活性而耗损。 $5 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 作用 CCO 24 h,LDH 漏出率显著增加,提示此时细胞膜严重受损,这可能是由于细胞氧化损伤所致,具体机制还需要进一步研究。也有学者认为硒的毒性可能是由于亚硒酸与谷胱甘肽反应形成活性的三硫化硒,产生具有毒性的过氧化物而引起的^[9]。

近年来,随着硒对水生生物促生长以及增强免疫力作用的越来越明朗化,各种硒化合物已经越来越多的应用到水产行业中,但作为生物体的必需微量元素,硒存在着一定的安全浓度范围,本试验可以为水产饲料行业中硒的添加剂量提供一定的依据。

参 考 文 献

- [1] 魏文志,杨志强,罗方妮,等. 饲料中添加有机硒对异育银鲫生长的影响[J]. 淡水渔业,2001,31(3):45-46.
- [2] 万敏. 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 营养免疫学初步研究[D]. 青岛:中国海洋大学图书馆,2003.
- [3] LOW K W, SIN U Y M. *In vitro* and *in vivo* effects of mercuric chloride and sodium selenite on some non-specific immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) [J]. Fish Shellfish Immunology, 1996, 6:351-361.
- [4] HILTON J W, HODSON P V, SINGER S J. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Journal of Nutrition, 1980, 110:2527-2535.
- [5] 边兴艳,尹学念. MTT 比色法及其应用[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1998,19(2):83-84.
- [6] 薛伟光,秦礼让,雷健保. 大鼠慢性硒中毒的病理形态学研究[J]. 华中农业大学学报,1990,9(2):188-193.
- [7] 侯小东,边建朝,杨晓霞,等. 硒对体外培养血管内皮细胞的影响[J]. 环境与健康杂志,2008,25(2):135-137.
- [8] NOGUCHI N, WATANABE A, SHI H. Diverse functions of antioxidants[J]. Free Radical Research, 2000, 33:809-817.
- [9] 王文娟,杨建一,李莉. 高剂量硒对外周血淋巴细胞的遗传毒性[J]. 毒理学杂志,2006,20(5):322-323.

Effects of Sodium Selenite on the Morphology, Growth and Antioxidant Capacity of Channel Catfish Ovary Cell

TIAN Zhen LIU Xiao-ling WANG Min TANG Rong

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The effects of sodium selenite (Na_2SeO_3) on the morphology, growth and antioxidant capacity of channel catfish ovary cell (CCO) were investigated by inverted microscope and the method of MTT. The results showed the effects of Na_2SeO_3 on CCO were in dose response and related with time. Low doses of Na_2SeO_3 had little effect on CCO, while higher dose ($5 \mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the cell viability and finally induced cell death. The longer the incubation time was, the stronger the damage was. Na_2SeO_3 at high concentration ($10 \mu\text{mol/L}$) induced CCO oxidative damage due to its oxidant properties. Significant decreases in activities of SOD and GSH-Px were observed. The level of lipid peroxidation (the content of MDA) and the release of LDH increased significantly.

Key words sodium selenite; channel catfish ovary cell; cell growth; antioxidant capacity

(责任编辑:边书京)