

亚硒酸钠和硒代蛋氨酸对人结肠腺癌细胞的毒性作用

覃焱, 许海钊, 徐境懋, 顾明华, 韦燕燕

(广西大学农学院, 广西农业环境与农产品质量安全重点实验室, 广西南宁 530004)

摘要: 探讨两种硒化物对人结肠腺癌 Caco-2 细胞的毒性作用。将 Caco-2 细胞暴露在不同浓度的亚硒酸钠 (SeIV) 和硒代蛋氨酸 (SeMet) 中培养 24 h, 用 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测在同样浓度的 SeIV 和 SeMet 培养下细胞的凋亡率, 并设置不做硒处理的空白对照。用 MTT 法检测细胞存活率; 检测细胞培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 释放率、细胞内的超氧化物歧化酶 SOD 活力和谷胱甘肽 GSH 的含量。相同浓度时 (0.8 $\mu\text{g Se/mL}$), 与对照相比, SeIV 诱导细胞凋亡显著率上升 ($p<0.05$), SeMet 变化不显著。一定浓度的 SeIV ($\geq 0.4 \mu\text{g Se/mL}$) 和 SeMet ($\geq 40 \mu\text{g Se/mL}$) 与对照组相比均显著降低细胞的存活率 ($p<0.05$); 随着 Se 含量的升高细胞的存活率呈下降趋势, SeIV、SeMet 的 IC_{50} 分别为 2.56、215.55 $\mu\text{g Se/mL}$ 。当 SeIV 浓度为 $\geq 0.8 \mu\text{g Se/mL}$, SeMet 浓度为 $\geq 40 \mu\text{g Se/mL}$ 时, 细胞的 LDH 释放率均显著高于对照组 (14.80%) ($p<0.05$)。当 SeIV 浓度 $\geq 4 \mu\text{g Se/mL}$, SeMet $\geq 4 \mu\text{g Se/mL}$ 时, 细胞的 SOD 活性均显著低于对照组 (56.76 U/mg prot) ($p<0.05$)。当 SeIV 浓度 $\geq 4 \mu\text{g Se/mL}$, SeMet 浓度为 160 $\mu\text{g Se/mL}$ 时, 细胞的 GSH 含量均显著低于对照组 (61.67 $\mu\text{g/mg prot}$) ($p<0.05$)。一定浓度的 SeIV 和 SeMet 会使 Caco-2 细胞产生氧化应激而导致细胞毒性, 诱导细胞凋亡。

关键词: 亚硒酸钠; 硒代蛋氨酸; Caco-2 细胞; 氧化应激; 细胞凋亡; 细胞毒性

文章编号: 1673-9078(2021)01-1-6

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.1.0637

Cytotoxicity in Human Colon Adenocarcinoma Caco-2 Cell Induced by Selenite and Selenomethionine

QIN Yan, XU Hai-zhao, XU Jing-mao, GU Ming-hua, WEI Yan-yan

(Colleges of Guangxi Key Laboratory of Agricultural Environment and Agricultural Products Quality and Safety, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The cytotoxicity and oxidative stress which was induced by selenite (SeIV) and selenomethionine (SeMet) in Caco-2 cells was investigated. Caco-2 cells were exposed to SeIV, SeMet at the difference dose for 24 h. At the same dose of SeIV and SeMet (0.8 $\mu\text{g Se/mL}$), the apoptosis of Caco-2 cells was detected by Annexin V-FITC/PI assay. The cell viability was evaluated by MTT assay. The leakage of lactate dehydrogenase (LDH), the activity of the superoxide dismutase (SOD), the glutathione (GSH) content were detected respectively. At the dose of 0.8 $\mu\text{g Se/mL}$, SeIV increased the apoptosis of Caco-2 cells ($p<0.05$), but there was no change in SeMet treatment. SeIV ($\geq 0.4 \mu\text{g Se/mL}$), SeMet ($\geq 40 \mu\text{g Se/mL}$) could all decrease the cell viability in a certain dose range ($p<0.05$) and as their exposure concentration increased, Caco-2 cell viability was gradually decreased. The IC_{50} values of Caco-2 cell exposed to SeIV and SeMet for 24 h were determined to be 2.56, 215.55 $\mu\text{g Se/mL}$, respectively. SeIV $\geq 0.8 \mu\text{g Se/mL}$ and SeMet $\geq 40 \mu\text{g Se/mL}$ showed the higher leakage of LDH than the control group 14.80% ($p<0.05$). SeIV $\geq 4 \mu\text{g Se/mL}$ and SeMet $\geq 4 \mu\text{g Se/mL}$ could decreased the SOD activity (56.76 $\pm$ 3.64 U/mg prot) ($p<0.05$). SeIV $\geq 4 \mu\text{g Se/mL}$ and SeMet (160 $\mu\text{g Se/mL}$) could decreased the GSH contents at the same time (61.67 $\mu\text{g/mg prot}$) ($p<0.05$). A certain concentration of SeIV and SeMet can induce oxidative stress in Caco-2 cells, leading to cytotoxicity and inducing apoptosis.

引文格式:

覃焱, 许海钊, 徐境懋, 等. 亚硒酸钠和硒代蛋氨酸对人结肠腺癌细胞的毒性作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(1): 1-6

QIN Yan, XU Hai-zhao, XU Jing-mao, et al. Cytotoxicity in human colon adenocarcinoma Caco-2 cell induced by selenite and selenomethionine [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 1-6

收稿日期: 2020-07-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41967048); 广西自然科学基金项目 (2016GXNSFAA380308); 广西创新驱动重大专项 (AA17202038)

作者简介: 覃焱 (1992-), 硕士研究生, 研究方向: 作物环境及生态

通讯作者: 顾明华 (1962-), 博士, 教授, 研究方向: 农业资源与环境; 韦燕燕 (1985-), 博士, 副教授, 研究方向: 农业资源与环境

Key words: selenite; selenomethionine; Caco-2 cells; oxidative stress; apoptosis; cytotoxicity

硒(Se, selenium)是一种人体必需的微量元素,是生物体内多种重要酶重要组成部分,具有抗氧化、抗衰老、提高免疫力等作用^[1],据统计,全世界有40多个国家和地区缺硒,中国是世界上缺硒最严重的地区,三分之二的地区属于缺硒地区,约站国土面积70%,其中30%为严重缺硒地区(硒含量小于或等于0.02 mg/kg),全国有72%的人口存在不同程度的硒摄入不足^[2,3],缺硒会导致大骨节病、克山病的发生,在大骨节病区人群补充硒可稳定控制病情^[4]。由于人体内不能合成硒,只能靠外界摄入来补充。硒的形态可分为无机硒和有机硒,其中亚硒酸钠是常见的无机硒营养补充剂,而硒代蛋氨酸是植物中硒的主要形式,也是重要的有机硒营养补充剂。但是,硒对动物既有营养性又存在毒性,且其营养剂量和毒性剂量范围较窄,摄入过量的硒会引起中毒,如急性毒性,慢性毒性,免疫毒性以及细胞毒性等^[5],胡滨^[6]等利用小鼠模型进行亚硒酸钠的急性和蓄积毒性试验研究,结果表明小鼠在5.61 mg/kg、7.90 mg/kg亚硒酸钠溶液灌胃4 min后开始出现活动减少、嗜睡、乏力,反应迟钝等状况。随后精神极度沉郁,站立不稳,呼吸困难,全身抽搐后死亡。而近期的研究则表明,硒毒性依赖于其化学形式,无机硒化合物毒性强于有机硒化合物^[7,8]。因此,进一步阐明无机硒与有机硒的生物学效应和毒性差异,为缺硒人群选择合适硒源、合理补充硒提供科学依据。

肠道是人体中重要的消化器官,单层肠上皮细胞在机体和外部环境之间形成了一道物理和功能性的屏障,调节维持人体生命活动所需营养物质的吸收、转运,并能够抵御有害物质侵袭发挥重要作用。Caco-2细胞来自人结肠癌细胞,其结构和生化作用类似于人体小肠上皮细胞,目前是用于研究肠上皮细胞的常见体外模型^[9]。目前,不同硒形态对对肠道上皮细胞Caco-2细胞的生物效应机制研究不多。本研究采用体外培养的Caco-2细胞,探讨两种不同形态硒化合物(亚硒酸钠和硒代蛋氨酸)对肠细胞的毒性和氧化应激作用,为进一步阐明硒的细胞毒性作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

MCO-18AIC 二氧化碳培养箱,日本三洋电机株式会社;SW-CJ-1F型超净工作台,中国苏净安泰公司;

80-2 电动离心机、XDS-1B型倒置显微镜均购自重庆光电仪器有限公司;M200型酶标仪,瑞士 Tecan 公司;亚硒酸钠(Na_2SeO_3 , SeIV, 分析纯)、硒代蛋氨酸($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$, SeMet, 纯度99.5%)、MTT试剂、Annexin V-FITC/PI双染色法试剂盒、SOD酶检测试剂盒、LDH酶检测试剂盒、GSH检测试剂盒、BCA蛋白试剂盒、DMEM高糖完全培养基、25% EDTA胰酶、PBS购买于索来宝公司;胎牛血清购买于四季青;人结肠腺癌Caco-2细胞购于中国科学院干细胞库。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞传代于25 cm²的培养瓶中,用10%的胎牛血清,1%的双抗高糖完全培养基,并置于37℃,5% CO₂的培养箱中进行培养。当细胞长到80%左右,用PBS清洗细胞,25% EDTA胰酶消化细胞,以每孔10⁶个接种于6孔板,每孔10⁵个接种于12孔板,6孔板培养48 h后更换含硒培养基,每孔1 mL,培养24 h后用于检测细胞凋亡。12孔板每隔2 d换一次新鲜培养基,培养7 d后,更换含硒化物的培养基,每孔1 mL,用于检测酶。

1.2.2 硒溶液配制

准确称量适量的SeIV, SeMet溶于PBS中,过滤除菌后,用含10%胎牛血清的培养基稀释成适当的硒剂浓度。其中SeIV为0.4、0.8、2.0、4.0、8.0 μg Se/mL, SeMet为0.8、40、80、160、320 μg Se/mL。

1.2.3 细胞凋亡检测

待细胞处于对数生长期,以每孔10⁵个细胞接种于6孔板,培养7 d后加入含0.8 μg Se/mL的SeIV和SeMet的培养基培养,并设置不含硒的空白组进行对照。细胞经处理24 h后,弃去培养基,用不含EDTA的25%胰酶消化细胞并收集,用预冷的PBS清洗三次,800 r/min离心5 min。再将收集好的细胞重悬于结合缓冲液中,调整细胞密度为5×10⁸细胞/L。加入5 μL AnnexinV-FITC和5 μL PI,混匀,室温避光孵育10 min染色。设置以下对照组:单独加细胞不染色、细胞单独染Annexin V-FITC和细胞单独染PI。200目筛网过滤后,用ACCURI C6型流式细胞仪流式细胞仪检测AnnexinV-FITC和PI的荧光强度(Ex=488 nm, Em=525 nm; Ex=488 nm, Em=620 nm),每个剂量设置3个平行孔。

1.2.4 细胞存活率的测定

待细胞处于对数生长期时,用胰酶消化以每孔

7000 个细胞接种于 96 孔板培养 48 h, 48 h 后每孔加入 100 μL 含硒培养基, 处理浓度分别为 SeIV 0.4、0.8、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{g Se/mL}$, SeMet 为 40、80、160、320 $\mu\text{g Se/mL}$, 并设置不含硒的培养基空白组作为对照。培养 24 h 后每孔加入 10 μL MTT (5 g/L), 温育 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 200 μL DMSO, 震荡 10 分钟, 于酶标仪 490 nm 处检测吸光 (A) 值, 代入以下公式:

$$\text{细胞存活率 (\%)} = \frac{(A_{\text{处理组}} - A_{\text{空白组}})}{(A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})} \times 100\%$$

应用线性回归模型计算各硒化物对细胞的半抑制浓度 (IC_{50}), 实验重复 3 次, 每个剂量 (含对照) 设置 6 个平行孔。

1.2.5 细胞染毒及酶的测定

待细胞处于对数生长期, 以每孔 10^5 个细胞接种于 6 孔板, 培养 7 d 后加入含硒的培养基培养, 处理浓度为 SeIV 0.8、4.0、8.0 $\mu\text{g Se/mL}$, SeMet 为 40、80、160 $\mu\text{g Se/mL}$, 并设置不含硒的空白组进行对照。细胞培养 24 h 收集培养上清液, 冷冻 PBS 清洗细胞 2 次后, 用定量 PBS 收集细胞, 采用超声波破碎细胞。用相关试剂盒检测 SOD、GSH、LDH、总蛋白, 每个剂量设 4 个平行孔, 具体操作方法严格按照试剂盒说明书进行, LDH 释放率计算公式为:

$$\text{LDH 释放率 (\%)} = \frac{(\text{培养液中的 LDH 活力})}{(\text{细胞中的 LDH 活力})} \times 100\% \quad [10]$$

1.3 统计学分析

应用 SPSS 24.0 软件进行统计学处理分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果和讨论

2.1 SeIV 和 SeMet 处理下 Caco-2 细胞的凋亡率

在此前的研究中, 1 μM 的亚硒酸钠显著提高了 HepG-2 细胞的凋亡率, 1 μM 的硒代蛋氨酸处理则不显著^[11]。在本实验中, 当浓度为 0.8 $\mu\text{g Se/mL}$ 时, SeIV 处理组的 Caco-2 细胞的凋亡率与对照组相比显著增加 ($p < 0.05$), 而 SeMet 处理的细胞凋亡率差异不显著, 见表 1、图 1, 其中对应的细胞状态 Q1 是细胞坏死状态, Q2、Q3 是细胞凋亡状态, Q4 是细胞存活状态。由此说明在较低浓度时, SeIV 即可对 Caco-2 细胞表现出一定的细胞毒性, 从而导致细胞凋亡, 但是 SeMet 则没有显著影响。

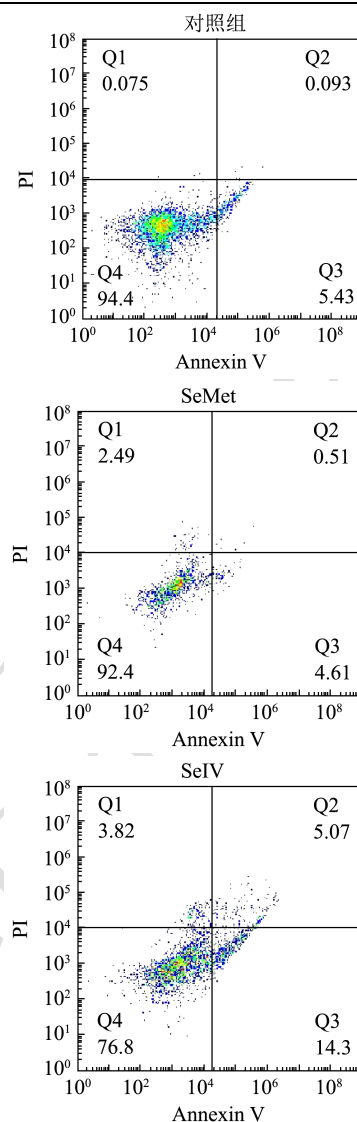


图 1 0.8 $\mu\text{g Se/mL}$ SeIV 和 SeMet 处理下 Caco-2 细胞的凋亡图

Fig.1 The effect of the SeIV and SeMet on apoptosis of Caco-2 cell (0.8 $\mu\text{g Se/mL}$)

表 1 SeIV 和 SeMet 培养对 Caco-2 细胞的凋亡率影响

Table 1 The effect of the SeIV and SeMet on apoptosis of Caco-2 cell ($n \pm 3$, $\bar{x} \pm s$)

处理组	凋亡率/%
对照组 (0 $\mu\text{g Se/mL}$)	5.38 $\pm$ 0.57
SeIV (0.8 $\mu\text{g Se/mL}$)	19.09 $\pm$ 0.95*
SeMet (0.8 $\mu\text{g Se/mL}$)	4.75 $\pm$ 0.39

注: *表示与对照组的差异显著 ($p < 0.05$)。

2.2 不同硒形态作用下 Caco-2 细胞的存活率

本研究采用 MTT 评估不同硒形态对 Caco-2 细胞增殖的影响。结果显示, 当 SeIV 浓度范围是 0.4~8 $\mu\text{g Se/mL}$, 细胞存活率分别为 75.94%, 74.10%, 36.82% 和 19.29%, 均显著低于对照组 ($p < 0.05$); SeMet 浓

度范围是 40~320 $\mu\text{g Se/mL}$ 时, 细胞存活率分别为 75.88%, 67.47%, 50.73%和 45.76%, 均显著低于对照组 ($p<0.05$); 两者对细胞增殖的影响均并呈现出显著的剂量-反应效应关系。经计算 SeIV 和 SeMet 的 IC_{50} 分别为 2.56、215.55 $\mu\text{g Se/mL}$, 见表 2、表 3, 对 Caco-2 细胞生长的抑制作用 $\text{SeIV}>\text{SeMet}$ 。且 SeIV 和 SeMet 对 Caco-2 细胞的毒性呈剂量依赖。这与此前研究结果相似, 无机硒对 HepG-2 细胞的细胞毒性大于有机硒^[11], Takahashi^[12]利用 HepG-2 研究硒对细胞毒性研究发现 SeIV 毒性强于 SeMet, Hoefig^[13]研究表明不同硒化合物对细胞毒性作用的阈值存在一定差异, Lazard^[14]研究表明不同的细胞系对硒化合物的敏感性不同。

表 2 SeIV 暴露对 Caco-2 细胞存活率的影响

Table 2 Effect of SeIV on Caco-2 cell viability ($n\pm 6$, $\bar{x}\pm s$)

Se 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	存活率/%
0	100.61 $\pm$ 7.77
0.4	75.94 $\pm$ 7.04*
2	74.10 $\pm$ 12.84*
4	36.82 $\pm$ 5.34*
8	19.29 $\pm$ 6.89*

注: *表示差异显著 ($p<0.05$)。下同。

表 3 SeMet 暴露对 Caco-2 细胞存活率的影响

Table 3 Effect of SeMet on Caco-2 cell viability ($n\pm 6$, $\bar{x}\pm s$)

Se 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	存活率/%
0	100.61 $\pm$ 7.77
40	75.88 $\pm$ 6.84*
80	67.47 $\pm$ 2.11*
160	50.73 $\pm$ 8.32*
320	45.76 $\pm$ 5.67*

2.3 LDH 释放率的测定

表 4 SeIV 暴露对 Caco-2 细胞 LDH 释放率的影响

Table 4 Effect of SeIV on Caco-2 cell LDH release ($n\pm 4$, $\bar{x}\pm s$)

Se 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	释放率/%
0	14.80 $\pm$ 2.01
0.8	35.72 $\pm$ 1.45*
4	80.73 $\pm$ 4.18*
8	85.83 $\pm$ 3.39*

在体外的细胞实验中, LDH 属于一种稳定存在细胞内部的酶, 而当细胞遭受应激损伤后能迅速释放到细胞外, 因此, 细胞外液中的 LDH 活性是衡量细胞发生应激损伤的指标物^[15]。当 SeIV 浓度为 0.8~8 $\mu\text{g Se/mL}$ 时, LDH 释放率分别为 35.72%, 80.73%和 85.83%, 均显著高于对照组 ($p<0.05$), 见表 4; SeMet 浓度为 40~320 $\mu\text{g Se/mL}$ 时, LDH 释放率分别为

28.39%, 32.69%和 50.08%, 均显著高于对照组 ($p<0.05$), 见表 5。在刘洋洋^[16]等在人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的实验中, 在 1.2~2.4 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, SeMet 处理的细胞 LDH 渗出比 SeIV 处理的细胞少, 这说明不同形态的硒对肠上皮细胞 Caco-2 细胞膜的损伤程度存在差异, 表现为 $\text{SeIV}>\text{SeMet}$ 。

表 5 SeMet 暴露对 Caco-2 细胞 LDH 释放率的影响

Table 5 Effect of SeMet on Caco-2 cell LDH release ($n\pm 4$, $\bar{x}\pm s$)

Se 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	释放率/%
0	14.80 $\pm$ 2.01
40	28.39 $\pm$ 9.51*
80	32.69 $\pm$ 2.23*
160	50.08 $\pm$ 10.31*

2.4 细胞中 SOD 活力和 GSH 含量的测定结果

作为机体内重要的抗氧化物 SOD 和 GSH, 在机体对抗氧化应激损伤的过程中发挥着相当重要的作用。SOD 能够清除外源物质刺激产生的活性氧, 减轻氧化物自由基对细胞质膜的毒害^[17-19]。已有研究表明, SeIV 可以刺激人急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞细胞内的活性氧物质生成, 对 NB4 细胞造成损伤^[20]。采用不同浓度的 SeIV 处理大鼠口腔鳞癌细胞, 细胞内的 SOD 活性随着 SeIV 浓度的增加而降低^[21]。在本研究中, 当 SeIV 浓度为 4 和 8 $\mu\text{g Se/mL}$, SOD 活性分别为 40.43 U/mg prot 和 13.02 U/mg prot, Caco-2 细胞的 SOD 活性均显著低于对照组 ($p<0.05$); SeMet 浓度 40~160 $\mu\text{g Se/mL}$ 时, SOD 活性分别为 40.35 U/mg prot、23.24 U/mg prot 和 9.39 U/mg prot, Caco-2 细胞的 SOD 活性均显著低于对照组 ($p<0.05$)。当 SeIV 浓度 4 $\mu\text{g Se/mL}$, GSH 含量为 31.40 $\mu\text{g/mg prot}$, Caco-2 细胞 GSH 含量均显著低于对照组 ($p<0.05$); 而 SeMet 浓度则为 160 $\mu\text{g Se/mL}$ 时, Caco-2 细胞 GSH 含量 (39.05 $\mu\text{g/mg prot}$) 显著低于对照组 ($p<0.05$)。随着 SeIV 硒浓度的升高, 细胞中的 SOD 活力和 GSH 含量成下降趋势, SeMet 在较高浓度时, 细胞中的 SOD 活力和 GSH 含量也明显下降, 见表 6、表 7。这些结果说明, 高于一定剂量的 SeIV 和 SeMet 可降低机体内源抗氧化系统活性, 破坏细胞氧化与抗氧化之间的平衡从而导致氧化损伤的产生, 造成细胞的活性下降和诱导凋亡。比较 SeIV 和 SeMet, 相同剂量下 SeIV 对肠上皮细胞 Caco-2 的氧化损伤能力高于 SeMet。

GSH 是细胞内的三肽物质, 参与无机硒在细胞内代谢^[22], 本实验结果显示, 一定浓度 (4~8 $\mu\text{g Se/mL}$) 的 SeIV 显著降低 Caco-2 细胞内的 GSH 含量, 最高浓度 (160 $\mu\text{g Se/mL}$) 的 SeMet 显著降低 Caco-2 细胞内

GSH 的含量。Cristina^[23]的研究得到相似结果,不同浓度(1~50 μM)的 SeIV 处理增加了 F36P 细胞的 GSH 水平。但 SeMet 处理(5~500 μM),低浓度诱导谷胱甘肽水平下降,而高浓度诱导谷胱甘肽水平显著上升。Ganther 和 Kumari 等人^[24-26]研究发现,在体外实验中,SeIV 在谷胱甘肽(GSH)的作用下被还原成氢化硒, Bao 等^[27]研究发现,细胞内产生的纳米硒引起的多重毒理效应是硒化物引起细胞毒性的原因之一,这与 GSH 参与硒的还原反应有密切关系,超过一定剂量的 SeIV 在细胞内与谷胱甘肽(GSH)进一步反应生成内生性纳米硒,细胞内 GSH/GSSG 比值降低以及蛋白质氧化和脂质过氧化的增加,硒纳米粒子的尺寸效应、边缘效应引起细胞氧化还原失衡和氧化应激,加剧细胞凋亡或坏死^[28]。

表 6 SeIV 对 Caco-2 细胞内 SOD、GSH 的影响

Table 6 Effects of SeIV on Caco-2 cell SOD and GSH activity

(n±4, $\bar{x}\pm s$)		
Se 浓度/ $\mu\text{g/mL}$	SOD/(U/mg prot)	GSH/ $\mu\text{g/mg prot}$
0	56.76±3.64	61.67±4.73
0.8	48.62±7.41	54.27±3.47
4	40.43±2.30*	31.40±4.03*
8	13.02±5.39*	27.90±1.45*

表 7 SeMet 对 Caco-2 细胞内 SOD、GSH 的影响

Table 7 Effects of SeMet on Caco-2 cell SOD and GSH activity

(n±4, $\bar{x}\pm s$)		
Se 浓度/ $\mu\text{g/mL}$	SOD/(U/mg prot)	GSH/ $\mu\text{g/mg prot}$
0	56.76±3.64	61.67±4.73
40	40.35±8.53*	64.05±8.78
80	23.24±6.85*	67.96±2.48
160	9.39±1.66*	39.05±4.39*

本实验中一定浓度的 SeIV 和 SeMet 均不同程度的降低 Caco-2 细胞的 SOD 活性和 GSH 的含量,并提高细胞外液的 LDH 活性(见 2.3),说明高剂量的 SeIV 和 SeMet 均能破坏 Caco-2 的氧化还原平衡,损伤其细胞膜,进而诱导细胞凋亡。此前的研究表明,SeMet 与 SeIV 的细胞毒性可能是硒在细胞内还原而产生活性氧自由基(ROS 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$)导致,但是它们的毒性中心不同,SeIV 的毒性中心为 H_2Se ,SeIV 在还原成 H_2Se 的过程中降低谷胱甘肽比例(GSH/GSSG),并产生的 ROS 可诱导细胞的 DNA 损伤,导致细胞凋亡和坏死;而 SeMet 进入细胞后会生成硒代半胱氨酸(SeCys),进而生成硒代胱氨酸(SeCys₂),SeCys₂ 和 SeCys 的循环可产生 ROS 导致细胞氧化应激,并引起内质网蛋白错误折叠破坏细胞功能,有研究认为,SeCys 可能是通过诱导蛋白质毒性而使细胞产生应激,这与无机硒

诱导的 DNA 损伤不同^[29-32]。

3 结论

硒是哺乳动物的必需的微量元素,但环境中过高的硒背景值和过量的摄入会对机体产生毒害作用。国家食品营养强化剂标准(GB14880-2012)中食物内硒的添加量为 0.03~0.280 mg/kg,添加剂为亚硒酸钠(SeIV)和硒酸钠(SeVI),远低于本研究的剂量范围。由于植物可将无机硒转化成硒蛋白储存,其硒蛋白组成主要为 SeMet,近年来富硒农产品如富硒大米成为新的补硒手段,而对农产品进行外源添加无机硒或者有机硒是生产富硒农产品的主要途径。本研究对比了 SeIV 和 SeMet 的细胞毒性和氧化损伤能力,发现高于一定剂量的 SeIV 和 SeMet 均可不同程度地对细胞产生毒性,但是 SeIV 的氧化损伤能力明显高于 SeMet,因此在生产和销售富硒农产品的过程中,需加强对富硒农产品的硒含量和无机硒残留的检测,同时更需要关注农产品中有机硒和无机硒的占比。

参考文献

- [1] Weekley C M, Harris H H. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease [J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(23): 8870-8894
- [2] 陈冬.富硒农业技术推广模式的探索与实践[D].苏州:苏州大学,2016
CHEN Dong. Selenium-Enriched agricultural technology promotion mode of exploration and practice [D]. Suzhou: Soochow University, 2016
- [3] 彭大明.中国硒矿资源概述[J].化工矿地质,1997,1:38-43
PENG Da-ming. Selenium resources of China: an outline [J]. Geology of Chemical Minerals, 1997, 1: 38-43
- [4] 尹丹,李欣雨,刘苡轩,等.渭北典型大骨节病区居民膳食硒营养调查评价[J].农业环境科学学报,2019,38(5):991-999
YIN Dan, LI Xin yu, LIU Yi-xuan, et al. Dietary selenium nutrition levels among the residents of a typical kaschin-beck disease-endemic area in Weibei highland, China [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(5): 991-999
- [5] 李丽辉,林亲录,陈海军.硒的生理学功能及富硒强化食品的研究进展[J].现代食品科技,2005,3:198-200
LI Li-hui, LIN Qin-lu, CHEN Hai-jun. The biological functions of selenium and research development of Se-enriched foodstuff [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 3: 198-200
- [6] 胡滨,陈一资,辜雪冬.亚硒酸钠的急性和蓄积毒性试验研

- 究[J].现代食品科技,2010,26(10):1043-1046,1080
- HU Bin, CHEN Yi-zi, GU Xue-dong. Study of the acute and accumulative toxicity of sodium selenium [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(10): 1043-1046, 1080
- [7] 王广珠,牛作霞.微量元素硒的毒性研究进展[J].西北药学杂志,2010,25(3): 237-238
- WANG Guang-zhu, NIU Zuo-xia. Research progress on the toxicity of trace element selenium [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2010, 25(3): 237-238
- [8] 金家志,邵凤君.动物与环境中的硒[J].农业环境科学学报,1985,5:36-37,41
- JIN Jia-zhi, SHAO Feng-jun. Selenium in animals and environment [J]. Journal of Agro-environmental Science, 1985, 5: 36-37, 41
- [9] 吕晓君,曹易丹,何开勇.Caco-2细胞体外吸收模型的建立及验证[J].医药导报,2018,37(11):1311-1315
- LYU Xiao-jun, CAO Yi-dan, HE Kai-yong. Establishment and validation of Caco-2 cell *in vitro* absorption Model [J]. Herald of Medicine, 2018, 37(11): 1311-1315
- [10] 郑小曼,顾明华,吕梦婷,等.不同形态砷化合物对非致瘤性人源性肝细胞的毒性作用[J].环境与健康杂志,2017,34(1):13-17
- ZHENG Xiao-man, GU Ming-hua, LYU Meng-ting, et al. Cytotoxicity in human liver cells QSG7701 induced by different speciations of arsenic [J]. Journal of Environment and Health, 2017, 34(1): 13-17
- [11] Qin Y, Xu H, Liang H, et al. Effects of Selenium Compounds on Oxidative Stress and Apoptosis in HepG-2 Cells [M]. Selenium Research for Environment and Human Health: Perspectives, Technologies and Advancements, 2019
- [12] Takahashi K, Suzuki N, Ogra Y. Bioavailability comparison of nine bioselenocompounds *in vitro* and *in vivo* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3): 506
- [13] Hoefig C S, Renko K, Koehle J, et al. Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2011, 22(10): 945-955
- [14] Lazard M, Dauplais M, Blanquet S, et al. Trans-sulfuration pathway seleno-amino acids are mediators of selenomethionine toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290: 10741-10750
- [15] 郭晶,宋文华,丁峰,等.萘醌类化合物对HL-7702细胞LDH释放率以及线粒体膜电位的影响[J].南开大学学报(自然科学版), 2012,45(4):6-12
- GUO Jing, SONG Wen-hua, DING Feng, et al. Changes of LDH release rate and mitochondrial membrane potential of HL-7702 cells exposed to naphthoquinones [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2012, 45(4): 6-12
- [16] 刘洋洋,范学文,陈健茂,等.不同硒源对人脐静脉内皮细胞活性的影响[J].宁夏医科大学学报,2016,38(5): 542-545
- LIU Yang-yang, FAN Xue-wen, CHEN Jian-mao, et al. Effects of different selenium sources on the activity of human umbilical vein endothelial cells [J]. Journal of Ningxia Medical University, 2016, 38(5): 542-545
- [17] 徐靖,赵兰华,宋功武.化学发光法测定SOD活性的干扰因素及消除方法[J].分析科学学报,2002,4:321-323
- XU Jing, ZHAO Lan-hua, SONG Gong-wu. A preliminary study on interference and its elimination in chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity [J]. Journal of Analytical Science, 2002, 4: 321-323
- [18] 窦俊辉,喻树迅,范术丽,等.SOD与植物胁迫抗性[J].分子植物育种,2010,8(2):359-364
- DOU Jun-hui, YU Shu-xun, FAN Shu-li, et al. SOD and plant stress resistance [J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(2): 359-364
- [19] 王小巍,张红艳,刘锐,等.谷胱甘肽的研究进展[J].中国药理学杂志(网络版), 2019, 17(4):141-148
- WANG Xiao-wei, ZHANG Hong-yang, LIU Rui, et al. Progress in research of glutathione [J]. Chinese Journal of Pharmaceutics (Online Edition), 2019, 17(4): 141-148
- [20] LI J, ZUO L, SHEN T, et al. Induction of apoptosis by sodium selenite in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells: involvement of oxidative stress and mitochondria [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2003, 17(1): 19-26
- [21] QIAO B, HE B, CAI J, et al. Induction of oxidative stress and cell apoptosis by selenium: the cure against oral carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(69): 113614-113621
- [22] Misra S, Boylan M, Selvam A, et al. Redox-active selenium compounds-from toxicity and cell death to cancer treatment [J]. Nutrients, 2015, 7(5): 3536-3556
- [23] Gonçalves Ana Cristina, Barbosa-Ribeiro André, Alves Vera, et al. Selenium compounds induced ROS-dependent apoptosis in myelodysplasia cells [J]. Biological trace element research, 2013, 154(3): 440-447

(下转第72页)