

硒对慢性肝病患者外周血单个核细胞膜流动性的影响

李长顺¹, 和水祥¹, 刘恩岐², 李红霞¹, 苒新明¹

(西安交通大学: 1. 第一医院消化内科, 陕西西安 710061; 2. 医学院实验动物中心, 陕西西安 710061)

摘要:目的 探讨硒对慢性肝病患者外周血单个核细胞(PBMC)膜流动性的影响。方法 分离健康人和慢性肝病患者的 PBMC, 分别体外培养, 对比观察了预加硒($1.156 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和不同剂量脂质过氧化诱导剂叔丁基过氧化氢(tBHP)作用后各组 PBMC 膜流动性和培养液中过氧化脂质(MDA)含量变化。结果 健康人 PBMC 膜流动性随 tBHP 剂量的增加而降低, 培养液中 MDA 含量呈相反变化; 慢性肝病患者 PBMC 膜流动性明显下降, 培养液中 MDA 含量增加。而经硒预保护作用 6h 后两组细胞上述指标均有改善。结论 脂质过氧化反应可影响人 PBMC 的膜流动性, 硒对此具有保护作用。

关键词: 硒; 人外周血单个核细胞; 脂质过氧化反应; 白细胞介素 2

中图分类号: R512.6 文献标识码: A 文章编号: 1671-8259(2003)02-0131-02

Effects of selenium on the membrane fluidity of peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis

Li Changshun, He Shuixiang, Liu Enqi, Li Hongxia, Chang Xinming

(Department of Internal Medicine, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: Objective To study effects of selenium on membrane fluidity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with chronic hepatitis in vitro. Methods The PBMC isolated from patients with chronic hepatitis were pretreated with selenium in the dosage of $1.156 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 6 hours, the PBMC isolated from normal controls were stimulated by tert-Butylhydroperoxide (tBHP) for another 48 hours after being treated with selenium in the dosage of $1.156 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 6 hours, the membrane fluidity of PBMC and the malondialdehyde (MDA) concentration in medium were determined. Results The decrease in membrane fluidity of PBMC and the increase in MDA concentration in medium were observed both in experiment group and in normal control group ($P < 0.01$). In vivo administration of selenium can reverse above parameters ($P < 0.05$). Conclusion Selenium can suppress lipid peroxidation mediated by tBHP and thus maintain the membrane fluidity of PBMC of patients with chronic hepatitis.

KEY WORDS: selenium; peripheral blood mononuclear cells (PBMC); membrane fluidity; chronic hepatitis

临床研究发现,慢性乙型肝炎患者血中中性粒细胞膜流动性下降,功能异常,并随患者病情变化而变化,其机制可能与脂质过氧化损伤有关^[1]。提示抗氧化治疗可能有益于纠正上述病理生理过程。我们以前的工作证实,预防性补硒可提高机体和细胞的抗氧化能力,维护离体人胚肝细胞超微结构和慢性肝病患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)功能,促进慢性活动性肝炎患者的肝功能恢复^[2-4]。但补硒治疗对慢性肝病患者 PBMC 膜流动性的影响尚不清楚。本文体外观察了人 PBMC 在脂质过氧化作用下膜

流动性的变化及硒的保护作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象 16 例慢性肝病患者均为本院 1995 年至 1997 年住院患者。男 11 例,女 5 例,年龄 21~52 岁。其中慢性肝炎 3 例,肝炎肝硬化 13 例,HBsAg 均阳性。诊断符合 1990 年上海全国病毒性肝炎学术会议修订标准。另以 10 例健康献血员作正常对照。取空腹肘静脉血,抗凝分离 PBMC,悬于 RPMI1640 培养基中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 备用。

1.2 实验分组与处理 取上述健康献血员 PBMC 悬液移入 24 孔培养板中,每孔 1 mL,加 ConA ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),同时加入不同浓度的脂质过氧化诱导剂叔丁基过氧化氢(tert-Butylhydroperoxide, tBHP),

收稿日期:2002-12-30 修回日期:2003-01-12
基金项目:院科研基金项目(No. 95-049)
作者简介:李长顺(1953-),男(汉族),副教授。

置 37 °C, 5% CO₂ (体积分数) 条件下培养 48 h 后结束; 另取上述细胞悬液接种于培养板, 并随机分为 3 组: 正常对照组; tBHP 诱导损伤组; 加硒预防组。另取患者 PBMC 分为: 患者对照组和患者加硒组。管内加入亚硒酸钠 (终浓度 $1.156 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硒), 余组加等量培养液, 孵育 6 h, 换液漂洗 2 次, 各组加入 ConA ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时、组内加 tBHP ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 置 37 °C, 5% CO₂ (体积分数) 条件下培养 48 h 后结束。

1.3 检测指标与方法 取各组上清, -20 °C 保存。采用微量荧光法^[5]测定脂质过氧化反应的代谢产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量。收集各组细胞, 用 Beceerea^[6]法测定膜流动性。各组细胞悬于 RPMI1640 培养基中, 细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{L}^{-1}$ 。加等量 $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧光探针 DPH (Sigma 产品), 于 25 °C 温育 30 min, 在 MPF-4 型荧光分光光度计上, 432 nm (发射光) / 362 nm (激发光) 条件下, 测定荧光偏振度 (P), 并计算成微粘度 (μ)。μ 与膜流动性呈反比。

1.4 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 *t* 检验及直线相关分析。

2 结 果

2.1 脂质过氧化对人 PBMC 膜流动性的影响

见表 1。PBMC 膜流动性随 tBHP 剂量和培养液中 MDA 含量的增加而下降。直线相关分析表明, PBMC 膜流动性与 MDA 含量呈负相关 ($r = -0.965, P < 0.01$)。

表 1 不同剂量 tBHP 对人 PBMC 膜流动性的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

tBHP/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
0	0.200 ± 0.012 0.141 ± 0.009 0.93 ± 0.06
10	0.250 ± 0.014 0.186 ± 0.015 1.68 ± 0.12
20	0.275 ± 0.018 0.192 ± 0.020 2.33 ± 0.22
30	0.288 ± 0.015 0.211 ± 0.016 3.15 ± 0.18
40	0.295 ± 0.020 0.223 ± 0.021 3.75 ± 0.25

2.2 硒对人 PBMC 膜流动性的影响 见表 2。人 PBMC 经硒预防作用 6 h 后, 可明显对抗叔丁基过氧化氢诱导的脂质过氧化损伤, 仍保持较好的膜流动性。

表 2 硒对人 PBMC 膜流动性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照	10	0.200 ± 0.012 0.141 ± 0.009 0.93 ± 0.08
tBHP 诱导损伤	10	0.275 ± 0.018 0.192 ± 0.020 2.32 ± 0.25
加硒预防	10	0.226 ± 0.020* 0.160 ± 0.022* 1.36 ± 0.09*
患者对照	16	0.232 ± 0.018 0.166 ± 0.008 1.44 ± 0.08
患者对照加硒	16	0.211 ± 0.019 0.148 ± 0.011 1.21 ± 0.09

注: 与 tBHP 诱导损伤组比较 * $P < 0.01$; 与正常对照组比较 $P < 0.01$; 与患者对照组比较 $P < 0.05$

3 讨 论

流动性是细胞膜的基本特征, 是细胞表现其各种功能的基本前提。大量研究证实, 在许多病理情况下过多产生的自由基及其引发的脂质过氧化可导致细胞膜结构损伤、膜流动性下降、肝功能减退、细胞免疫功能紊乱, 而抗氧化剂对此具有明显的保护作用^[7,8]。本文发现, 正常人 PBMC 膜流动性在叔丁基过氧化氢作用下明显下降, 伴培养液中 MDA 水平升高, 且 PBMC 膜流动性与 MDA 含量呈负相关, 这可能与叔丁基过氧化氢诱导 PBMC 膜的脂质过氧化反应有关。而预加硒的结果能明显改善这一变化, 与在慢性肝病患者 PBMC 培养中观察的结果一致。这进一步证实了自由基、脂质过氧化反应影响人 PBMC 膜流动性, 补硒对此具有积极保护作用。

硒具有广泛地抗氧化作用, 亦可调节许多免疫细胞的功能。临床上已被用于改善慢性肝病患者的细胞免疫功能紊乱, 促进肝功能恢复疗效明显^[2,3,9]。因此, 我们认为抗氧化、维持 PBMC 膜流动性可能是补硒治疗慢性肝病的机制之一。

参考文献:

- [1] 范学工, 张 铮. 病毒性肝炎患者血中性粒细胞膜流动性变化 [J]. 中华医学杂志, 1992, 31(5): 315.
- [2] 和水祥, 裴新明, 张树林, 等. 补硒对慢性肝炎患者 IL-2 及其受体表达的影响 [J]. 陕西医学杂志, 1999, 28(2): 71 - 72.
- [3] 和水祥, 舒昌杰, 谢蔚玫, 等. 硒防护离体人胚肝细胞脂质过氧化损伤的初步观察 [J]. 中华预防医学杂志, 1996, 29(3): 165 - 167.
- [4] 舒昌杰, 和水祥, 张复春. 补硒治疗慢性活动性肝炎的临床评价 [J]. 中华传染病杂志, 1996, 14(3): 180 - 181.
- [5] 八木国夫. Thiobarbituric acid 荧光法にする血浆 スは血清中の过氧化脂质的微量定量法 [J]. Vitamins, 1985, 49(5): 403 - 408.
- [6] Beccercia E, Piergiacomini G, Curatola G, et al. Changes of lymphocyte membrane fluidity in rheumatoid arthritis: a fluorescence polarization study [J]. Annals Rheum Dis, 1988, 47: 472 - 479.
- [7] 和水祥, 韩 丞, 舒昌杰, 等. 硒保护人肝细胞膜流动性的机制探讨 [J]. 广东微量元素科学, 1996, 2(9): 4 - 5.
- [8] 梁华平, 王国正. 维生素 E 对创伤小鼠 T 细胞功能以及脂质过氧化和膜流动性的影响 [J]. 中国药理学通报, 1996, 12(1): 47 - 49.
- [9] Kiremidjian-Schumacher L, Roy M. Selenium and immune function. Z Ernahrungswiss [J], 1998, 37 (Suppl 1): 50 - 56.

(编辑 韩维栋)