

刘永仕, 吕茜, 袁何玲, 等. 硒代蛋氨酸羟基类似物对 H_2O_2 诱导的鸡肝癌细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (5): 35-43.
LIU Y S, LÜ X, YUAN H L, et al. Protective effect of selenomethionine hydroxyl analogues on H_2O_2 -induced oxidative damage in LMH cells [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (5): 35-43.

硒代蛋氨酸羟基类似物对 H_2O_2 诱导的鸡肝癌细胞氧化损伤的保护作用

刘永仕, 吕茜, 袁何玲, 龚倩梅, 王晓明, 黄金虎, 王丽平*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在探索硒代蛋氨酸羟基类似物 (SeOH) 缓解鸡肝癌细胞 (LMH) 氧化损伤的作用及潜在机制。建立 H_2O_2 氧化应激模型, 通过检测细胞活力和细胞氧化/抗氧化指标的变化以及核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 通路和内质网应激关键分子的表达情况, 评价不同浓度 SeOH (16、32 和 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的抗氧化应激和内质网应激作用。结果显示: 120 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 H_2O_2 刺激细胞 24 h 时, 细胞活力显著下降 ($P<0.001$), 活性氧 (ROS) 的荧光强度升高。不同剂量的 SeOH (16、32 和 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 均可显著提高 H_2O_2 处理后的 LMH 细胞活力 ($P<0.01$); 32 和 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SeOH 均可极显著提高 LMH 细胞的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性 ($P<0.01$), 显著降低丙二醛 (MDA) 含量 ($P<0.001$) 以及 ROS 的荧光强度。进一步研究显示 32 和 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SeOH 极显著上调 Nrf2 蛋白 ($P<0.01$) 并显著上调谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白的表达水平 ($P<0.05$), 极显著下调 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 蛋白的表达水平 ($P<0.001$), 极显著增加 Nrf2 的入核率 ($P<0.001$); 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SeOH 可显著降低葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) ($P<0.05$)、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (PERK) ($P<0.01$) 和转录激活因子 4 (ATF4) ($P<0.001$) 的表达水平。提示: SeOH 能通过激活 Nrf2 通路并且抑制内质网应激缓解 H_2O_2 诱导的 LMH 细胞氧化应激, 为畜禽养殖中 SeOH 作为抗氧化剂的应用提供理论基础。

关键词: SeOH; 氧化应激; Nrf2 信号通路; 内质网应激

中图分类号: S859.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)05-0035-09

Protective effect of selenomethionine hydroxyl analogues on H_2O_2 -induced oxidative damage in LMH cells

LIU Yongshi, LÜ Xi, YUAN Heling, GONG Qianmei, WANG Xiaoming, HUANG Jinhu, WANG Liping*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of this study was to explore the effect and potential mechanism of hydroxy-selenomethionine (SeOH) on oxidative damage of chicken hepatocellular carcinoma cells (LMH). An H_2O_2 oxidative stress model was established to evaluate the effects of different concentrations of SeOH (16, 32 and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on oxidative stress and ER stress by detecting the changes in cell viability and cell oxidation/antioxidant indexes, as well as the expression of the nuclear factor erythroid-related factor 2 (Nrf2) pathway and the key molecules of ER stress. The results showed that cell viability significantly decreased ($P<0.001$) and the fluorescence intensity of ROS increased, indicating that the H_2O_2 -induced (120 $\mu\text{mol}/\text{L}$, for 24 h) oxidative stress model was successfully established. The different concentrations of SeOH (16, 32 and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly enhanced the cell viability ($P<0.01$). Both 32 and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SeOH significantly promoted the activity of superoxide dismutase (SOD) in the LMH cells ($P<0.01$), significantly reduced the content of malondialdehyde (MDA) ($P<0.001$) and the production of fluorescence intensity of ROS in the LMH cells. Further research showed that SeOH (32 and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly up-regulated the protein expression level of Nrf2 ($P<0.01$) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) ($P<0.05$), and down-regulated the expression level of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) ($P<0.001$), and synergistically promoted the efficiency of nuclear translocation of Nrf2 ($P<0.001$). However, the protein expression levels of GRP78 ($P<0.05$), PERK ($P<0.01$) and ATF4 ($P<0.001$) were significantly decreased under the 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SeOH treatment. In conclusion, SeOH relieved H_2O_2 -induced oxidative stress in LMH cells by activating the Nrf2 pathway and inhibiting ER stress. This study provided a theoretical basis for the application of SeOH as an antioxidant in

收稿日期: 2023-11-29; 修回日期: 2024-02-28

基金项目: 江苏省自主创新项目 [CX (22) 3039]; 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX21_0239)

第一作者: 刘永仕, 男, 博士研究生

* 通信作者: 王丽平, 教授, 研究方向为兽医药理学, E-mail: wlp71@163.com。

livestock and poultry industries.

Keywords: SeOH; oxidative stress; Nrf₂ signaling pathway; endoplasmic reticulum stress

集约化的畜禽生产提高了生产力和经济效益,但也增加了动物发生氧化应激的风险。肉鸡生长速度快,使其更易受到各种来源的氧化应激(如热应激,细菌病毒疾病,霉菌毒素等)。肝脏是合成代谢的重要场所,因此极易受到活性氧(ROS)的损伤,导致肝炎和肝纤维化等疾病。此外,肝功能紊乱也是多种疾病的诱发因素。因此,当ROS产生和清除的动态平衡遭到破坏,过量的ROS对蛋白质、脂质和DNA造成损伤,引发机体一系列损伤^[1-2]。

Keap1-Nrf₂-抗氧化反应元件(ARE)信号通路是机体调节氧化应激的重要通路。无氧化应激时,Nrf₂(核转录因子E2相关因子2)的Nrf2-ECH同源结构2(Neh₂)区与细胞质中Keap1(Kelch样ECH相关蛋白1)通过Keap1的双甘氨酸重复结构(DGR)紧密结合^[3]。当细胞遭受氧化应激时,ROS可共价修饰Keap1半胱氨酸残基引起Keap1的DGR构象改变,使Nrf₂与Keap1解离,随后Nrf₂易位进入细胞核,结合ARE激活下游抗氧化蛋白表达,当氧化应激消除后,Nrf₂离开细胞核并发生降解^[4-6]。而在下游重要的抗氧化酶系统中,谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)以硒为活性中心,在细胞存活以及胚胎发育中均发挥重要作用^[7-8]。此外,过量的ROS也会引起内质网应激(ERS),进而导致内质网生理功能紊乱^[9],并启动未折叠蛋白反应(UPR)来适应蛋白质错误折叠的变化。真核细胞可通过葡萄糖调节蛋白78(GRP78)与蛋白激酶R样内质网调节激酶(PERK)、肌醇需求激酶1(IRE-1)和活化转录因子-6(ATF-6)3种经典信号蛋白结合以维持细胞内稳态。而ROS可导致错误折叠蛋白质增多,并竞争性结合GRP78,导致上述3种信号蛋白与GRP78解离并活化,诱导ERS^[10-11]。转录激活因子4(ATF4)是PERK的下游蛋白,能够调控氧化还原调节蛋白和促凋亡信号分子的表达^[12]。由此可见,氧化应激与ERS密切相关,相互协同,互为因果。

饲料中添加抗氧化剂以及加强饲养管理是目前缓解畜禽氧化应激的主要措施。研究表明硒可提高机体抗氧化和免疫功能,在动物生产中应用非常广泛^[13]。目前在畜禽养殖中主要应用和研究较多的是无机硒,但越来越多的研究显示有机硒安全性更高,并且可以通过联合应用或分子修饰更好地发挥其抗氧化作用^[14-15]。硒代蛋氨酸羟基类似物(SeOH)是一种安全的有机硒源,其生物利用度高于亚硒酸钠和酵母硒,作为新型硒制剂解决了科学补充硒的难题^[16]。

但SeOH缓解氧化应激损伤的作用及其作用机制尚不清楚。本文以鸡肝癌细胞(LMH)细胞为模型^[17],初步探讨了SeOH的抗氧化及缓解ERS的作用及其机制,以期为其在畜禽养殖中合理使用,预防氧化应激导致的肝损伤等疾病提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞

LMH细胞购自武汉尚恩生物技术有限公司,保存于南京农业大学动物医学院兽医药理组。

1.2 试剂与药品

高糖DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶和青霉素-链霉素,购自于赛默飞世尔公司;丙二醛(MDA)含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活力检测试剂盒和活性氧检测试剂盒,购自北京索莱宝科技有限公司;双吡啶甲酸(BCA)蛋白浓度检测试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)、细胞裂解液,购自北京博奥森生物技术有限公司;Nrf₂、β-actin单克隆抗体,购自英国Abcam生物技术公司;GRP78、PERK、ATF4单克隆抗体,购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;SeOH(含2%硒)由法国某公司提供。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养与分组

将LMH细胞置于在含10%FBS,1%青-链霉素双抗的DMEM高糖培养基中,控制培养箱CO₂浓度为5%,温度为37℃。预试验①:LMH细胞按照不同浓度H₂O₂(0、60、90、120、150、180、210、240、270、300 μmol/L)处理24 h。预试验②:LMH细胞按照不同浓度SeOH(0、2、4、8、16、32、64、128、256、512 μg/mL)处理24 h。

通过预试验得出H₂O₂最佳处理浓度为120 μmol/L,SeOH的安全剂量为64 μg/mL。基于预试结果,正式试验分组如下:对照(Control)组,用空白培养基处理;H₂O₂组,用终浓度120 μmol/L的H₂O₂处理;SeOH 16+H₂O₂组,用终浓度16 μg/mL的SeOH和120 μmol/L的H₂O₂处理;SeOH 32+H₂O₂组,用终浓度32 μg/mL的SeOH和120 μmol/L的H₂O₂处理;SeOH 64+H₂O₂组,用终浓度64 μg/mL的SeOH和120 μmol/L的H₂O₂处理。各组LMH细胞生长达到80%汇合度后,按照以上分组用H₂O₂和SeOH共同处理24 h后,采样测定各项指标。

1.3.2 CCK-8 法测定细胞活力

按照 1.3.1 分组处理 24 h 后, PBS 溶液冲洗细胞后, 每孔加入 100 μL 新鲜完全培养基和 10 μL CCK-8 试剂, 每组 5 个重复。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进一步培养 1 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长条件下检测每孔的 OD 值, 根据公式: 细胞活力 = $(OD_{\text{药物处理组}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{未处理组}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$, 计算细胞活力, 倒置显微镜 (Leica) 观察细胞形态。

1.3.3 ROS 水平检测

各组细胞用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次, 每孔加入 500 μL DCFH-DA (终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 20 min。弃掉孵育液, 用 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hoechst 33342 室温孵育 10 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。采用倒置荧光显微镜在 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长下检测 ROS 的荧光强度, 每组 3 个重复。

1.3.4 SOD 活性和 MDA 含量检测

各组细胞用胰酶消化细胞并收集到离心管中, 加入提取液进行超声处理。将上清液置于冰上, 在 8000 r/min 下离心 10 min 后根据试剂盒检测 SOD 活性和 MDA 含量, 每组 3 个重复。

1.3.5 Nrf2 通路和 ERS 相关蛋白的 Western blot 检测

各组细胞用 PBS 清洗细胞 2 次, 在冰上加 150 μL RIPA 裂解液, 反复吹打使细胞充分裂解, 提取细胞总蛋白。同时使用细胞核蛋白提取试剂盒, 提取细胞核蛋白。分别用 BCA 试剂盒测定总蛋白和核蛋白浓度并调整保持相同浓度。将均质蛋白进行 SDS-PAGE 检测。分离蛋白并转移到 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂牛奶在 TBST 溶液中室温封闭 2 h。一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 二抗在室温下孵育 2 h。使用 ECL 发光液显影, 用化学发光系统成像。

1.4 数据统计与分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。 $P > 0.05$ 表示无显著性差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 表示差异极显著。选择 Image J 软件分析条带的光密度值。数据以“平均数 \pm 标准差”表示。

2 结果

2.1 H_2O_2 氧化应激模型的建立

由图 1A 可见, 不同浓度的 H_2O_2 (0~300 $\mu\text{mol/L}$) 处理 LMH 细胞 24 h, 细胞活力逐渐降低。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 当浓度为 120 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 刺激细胞 24 h 时细胞活力显著下降 50% ($P < 0.001$, 图 1A), 细胞出现变圆、皱缩等细胞损伤 (图 1B), 细胞 ROS 荧光强度升高 (图 1C)。因此, 本研究采用 120 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理细胞 24 h 进行后续试验。

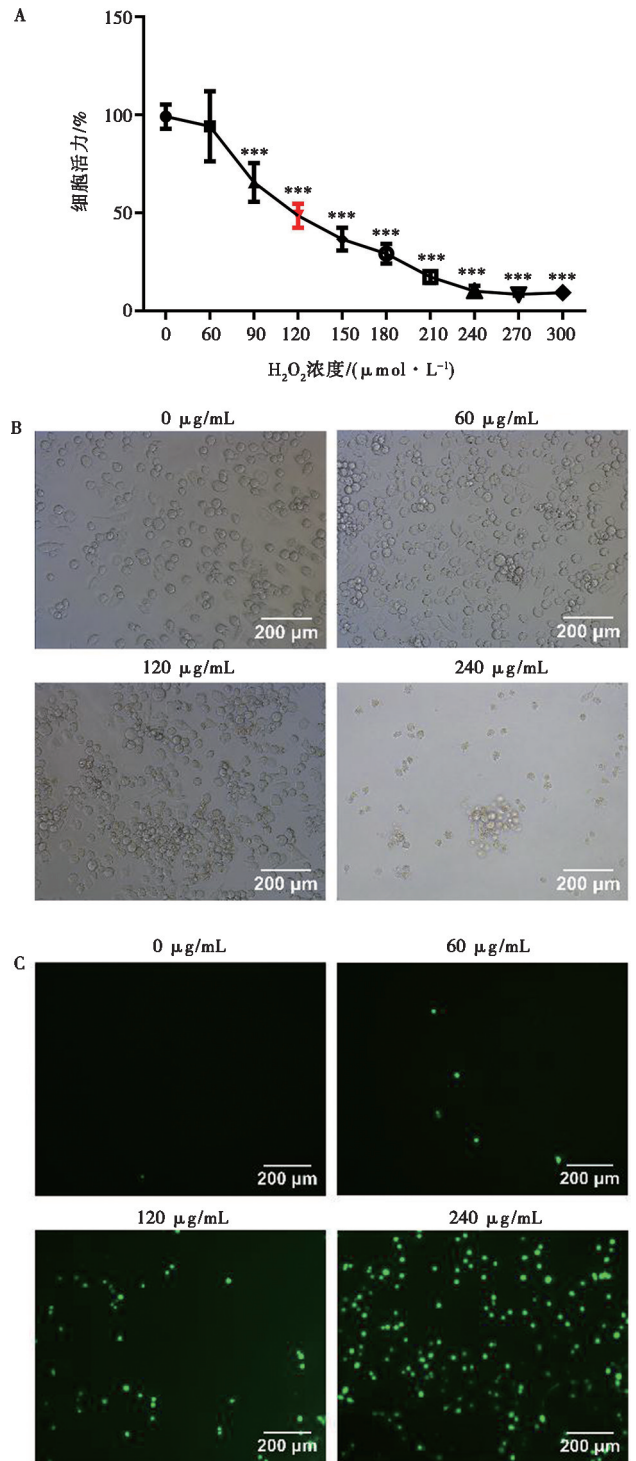


图 1 不同浓度 H_2O_2 对 LMH 细胞活力和 ROS 产生的影响。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, * * * 表示 $P < 0.001$ 。

图 1 不同浓度 H_2O_2 对 LMH 细胞活力和 ROS 产生的影响

2.2 SeOH 作用浓度的筛选

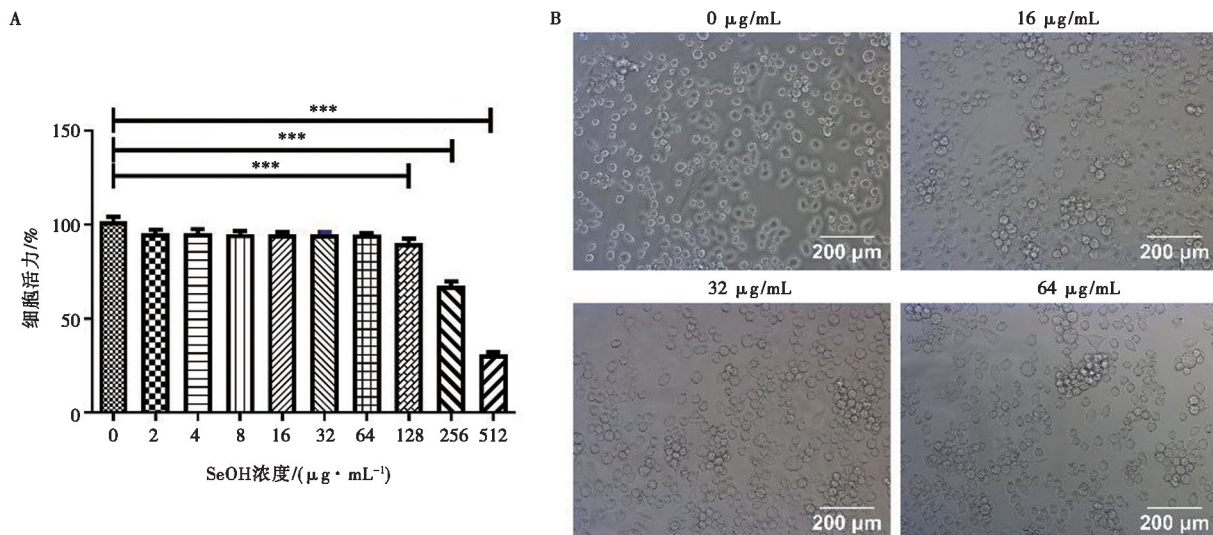
SeOH 处理 24 h 后, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, SeOH 在 2~64 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围对 LMH 细胞活力无显著影响 ($P > 0.05$); 当浓度升高到 128 $\mu\text{g/mL}$ 以上, 开始出现细胞损伤 (图 2A)。显微镜观察显示, SeOH 在 16、32 和 64 $\mu\text{g/mL}$ 浓度处理细胞, 细胞形态完好

(图 2B)。因此, 随后的试验采用 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (低剂量)、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (中剂量)、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (高剂量) 处理细胞。

2.3 SeOH 对 H_2O_2 处理的 LMH 细胞活力的影响

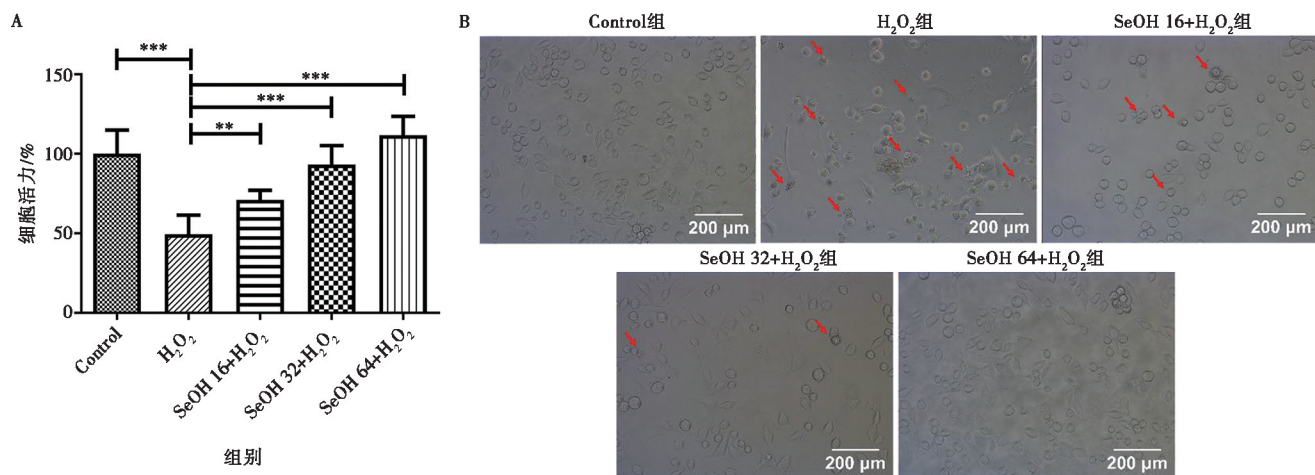
由图 3A 可见, 与 Control 组相比, H_2O_2 组细胞活力极显著降低 ($P<0.001$); 各剂量 (16、32 和 64

$\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 SeOH 均可以极显著提高 H_2O_2 处理的 LMH 细胞活力 ($P<0.01$), 且 32 和 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SeOH 较 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的作用更显著 ($P<0.001$)。显微镜下可观察到 H_2O_2 可使 LMH 细胞发生皱缩等变化, 而各剂量的 SeOH 均可显著改善细胞皱缩、变圆等细胞损伤 (图 3B)。



A. SeOH 对细胞活力的影响; B. SeOH 对细胞形态的影响。与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组相比, * * * 表示 $P<0.001$ 。

图 2 不同浓度 SeOH 对 LMH 细胞活力和形态的影响



A. SeOH 对细胞活力的影响; B. SeOH 对细胞形态的影响; 红色箭头: H_2O_2 加入后损伤的 LMH 细胞。

与 Control 组相比, * 表示 $P<0.05$, * * 表示 $P<0.01$, * * * 表示 $P<0.001$ 。下同。

图 3 SeOH 对 H_2O_2 损伤下 LMH 细胞活力和形态的影响

2.4 SeOH 对 LMH 细胞 ROS 产生的影响

由图 4 可见, H_2O_2 组细胞 ROS 荧光强度较 Control 组细胞增加明显, 而 32 和 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SeOH 处理能降低 H_2O_2 引起的细胞 ROS 荧光强度。

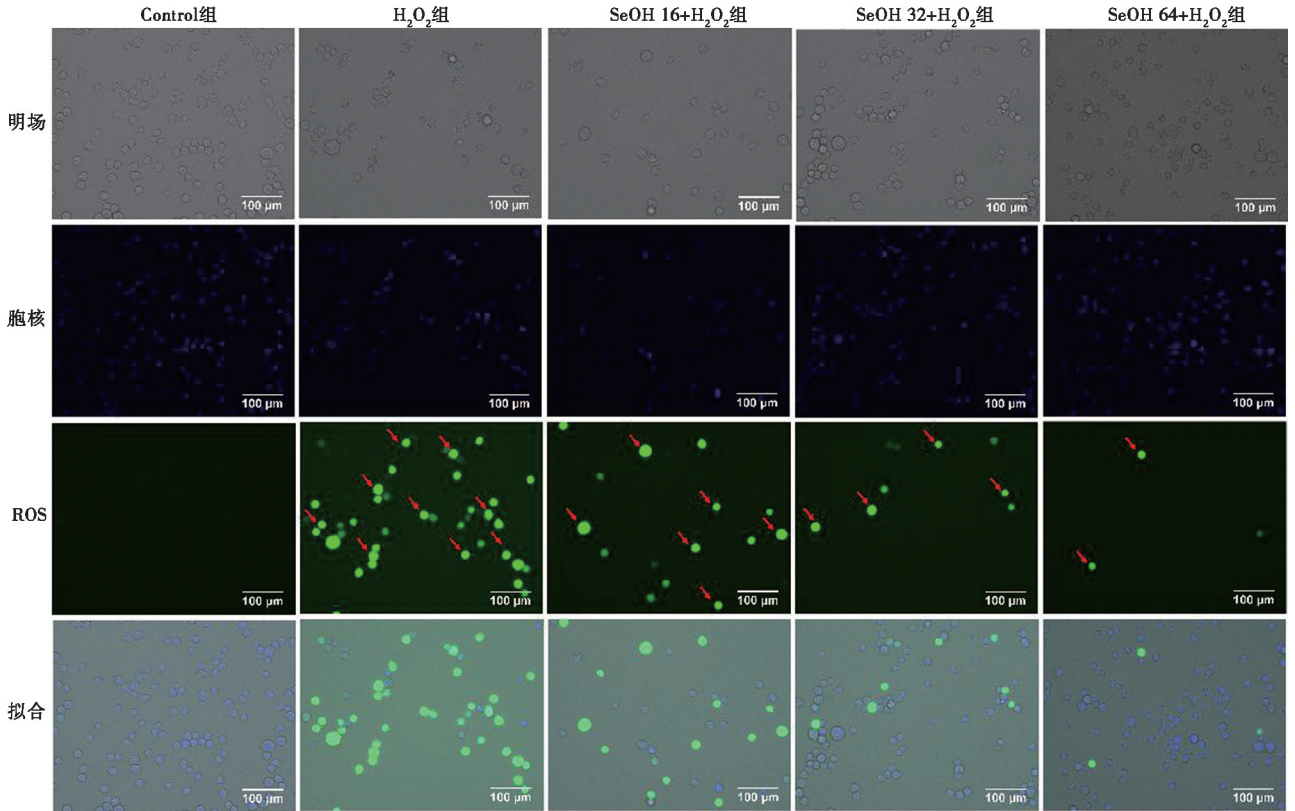
2.5 SeOH 对 LMH 细胞 SOD 活性和 MDA 含量的影响

由图 5A 可知, 与 Control 组相比, H_2O_2 组细胞

SOD 活性极显著下降 ($P<0.01$); 与 H_2O_2 组相比, SeOH 32+ H_2O_2 组和 SeOH 64+ H_2O_2 组 SOD 活性均极显著提高 ($P<0.01$), 而 SeOH 16+ H_2O_2 组 SOD 活性虽能提高, 但差异不显著 ($P>0.05$)。由图 5B 可知, H_2O_2 组细胞 MDA 含量也较 Control 组细胞极显著增加 ($P<0.001$); 与 H_2O_2 组相比, SeOH 16+ H_2O_2 组、SeOH 32+ H_2O_2 组和 SeOH 64+ H_2O_2 组 MDA 含量均极

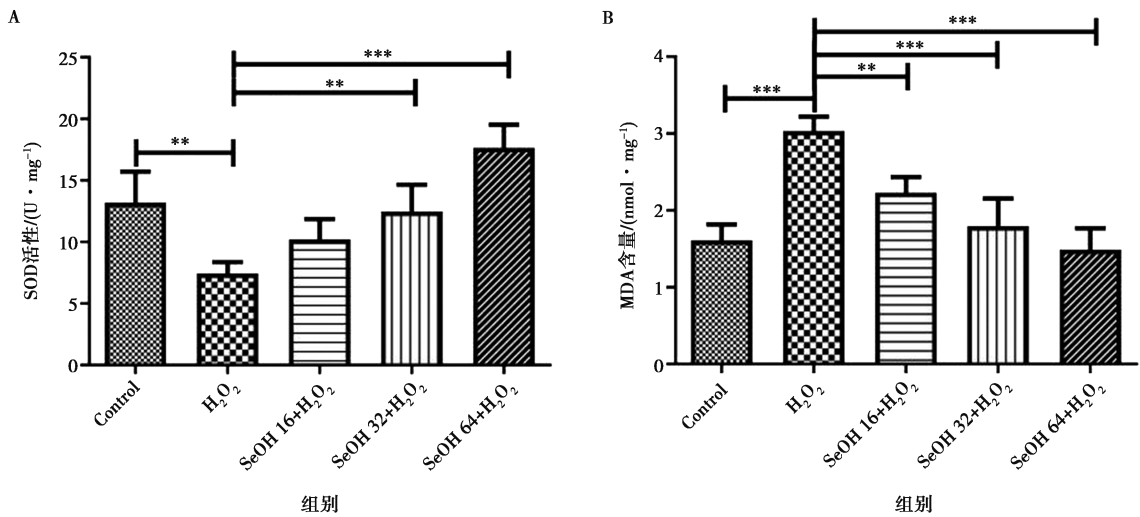
显著降低 ($P < 0.01$)。上述结果表明 H_2O_2 可引起细胞氧化损伤，而 SeOH 对 H_2O_2 引起的细胞氧化损伤

具有较好的缓解作用。



红色箭头表示产生 ROS 的 LMH 细胞。

图 4 SeOH 对 LMH 细胞 ROS 产生的影响



A. SeOH 对 SOD 活性的影响; B. SeOH 对 MDA 含量的影响。

图 5 SeOH 对 LMH 细胞 SOD 活力和 MDA 含量的影响

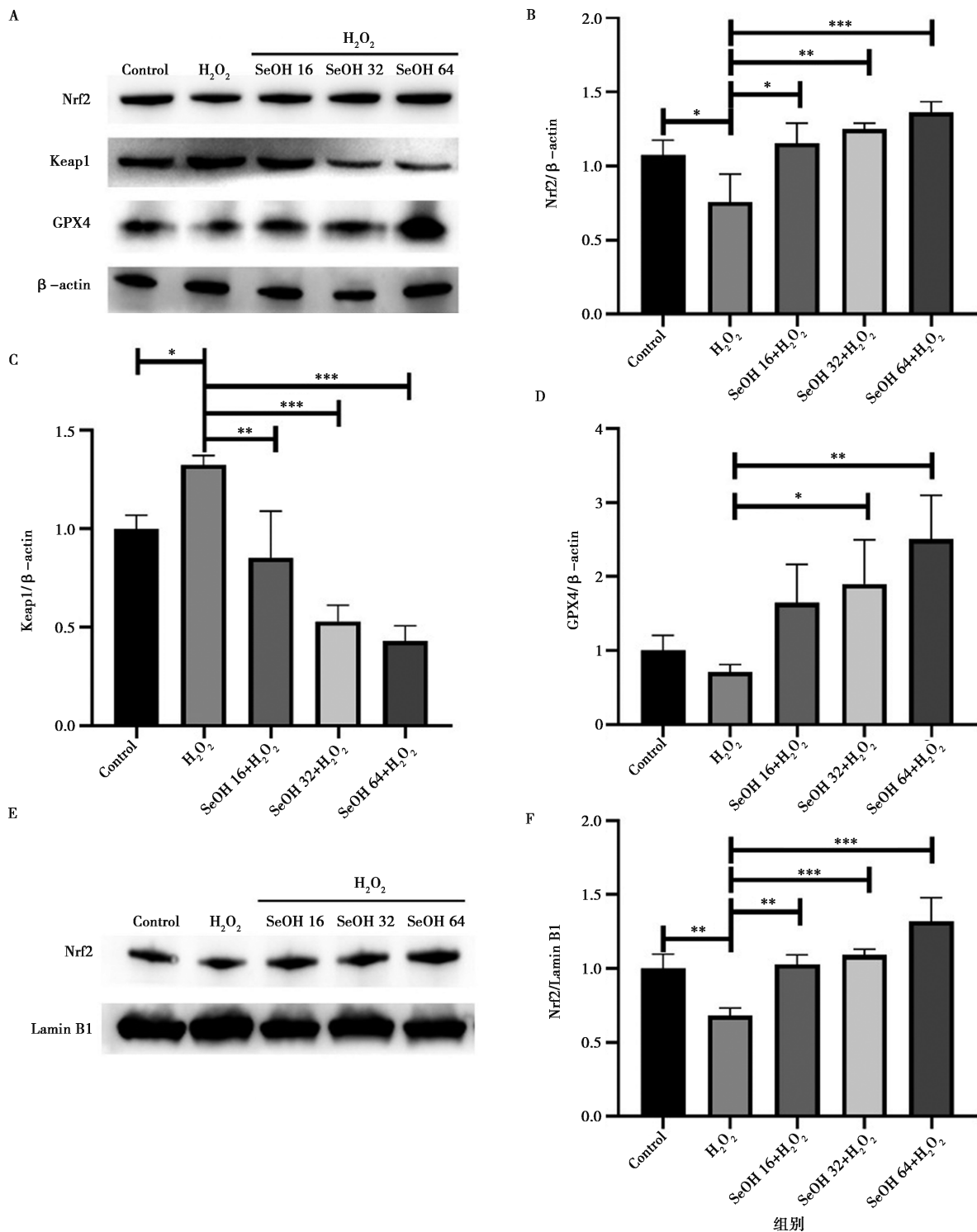
2.6 SeOH 对 Nrf₂ 抗氧化通路的作用

采用 Western blot 检测了 SeOH 对 Nrf₂ 通路中的 Nrf₂、Keap1 和 GPX4 蛋白表达的影响，结果如图 6 所示。与 Control 组相比，H₂O₂ 组显著降低了 LMH 细

胞中 Nrf₂ 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$)；与 H₂O₂ 组相比，SeOH 16+H₂O₂ 组、SeOH 32+H₂O₂ 组和 SeOH 64+H₂O₂ 组 Nrf₂ 蛋白的表达量均显著提高 ($P < 0.05$)。与 Control 组相比，H₂O₂ 组 Keap1 蛋白的表达量显著增

加 ($P < 0.05$)；与 H_2O_2 组相比，SeOH 16+ H_2O_2 组、SeOH 32+ H_2O_2 组和 SeOH 64+ H_2O_2 组 Keap1 蛋白的表达量均极显著降低 ($P < 0.01$)。与 Control 组相比， H_2O_2 组 GPX4 蛋白的表达水平有下降的趋势 ($P > 0.05$)；与 H_2O_2 组相比，SeOH 16+ H_2O_2 组 GPX4 蛋白的表达量有上升的趋势 ($P > 0.05$)，而 SeOH 32+ H_2O_2 组和 SeOH 64+ H_2O_2 组 GPX4 蛋白的表达量均显

著提高 ($P < 0.05$)。此外，与 Control 组相比， H_2O_2 组显著降低了细胞核中 Nrf2 蛋白的含量 ($P < 0.01$)；与 H_2O_2 组相比，SeOH 16+ H_2O_2 组、SeOH 32+ H_2O_2 组和 SeOH 64+ H_2O_2 组细胞核中 Nrf2 蛋白的含量均极显著增加 ($P < 0.01$)，表明 SeOH 提高了 Nrf2 的入核率。



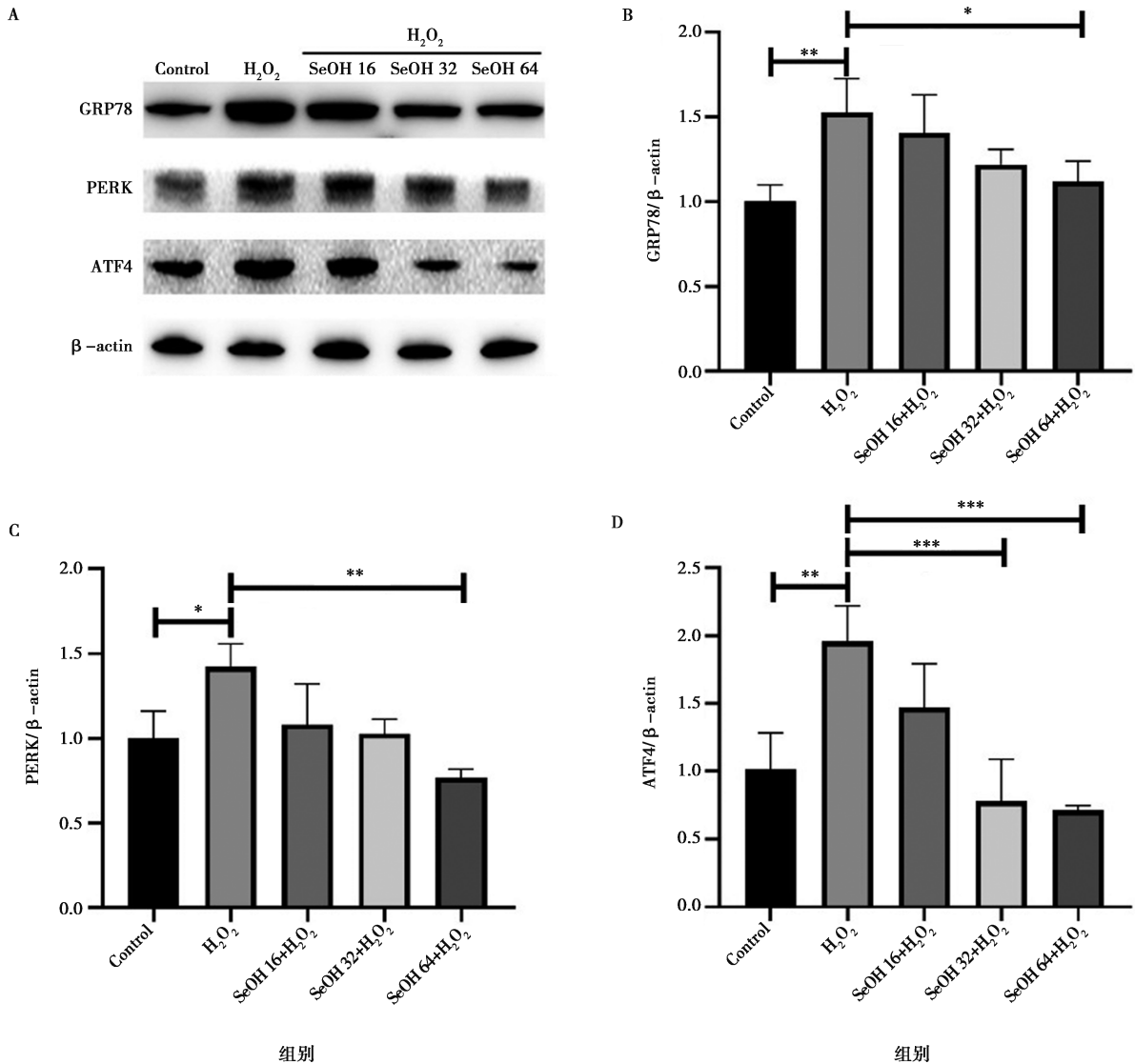
A. SeOH 对 LMH 细胞中 Nrf2 抗氧化通路蛋白表达的影响；B. Nrf2 蛋白表达水平的分析；C. Keap1 蛋白表达水平的分析；D. GPX4 蛋白表达水平的分析；E. SeOH 对 Nrf2 入核的影响；F. Nrf2 入核水平的分析。

图 6 SeOH 对 LMH 细胞中 Nrf2 抗氧化通路蛋白 Nrf2、Keap1、和 GPX4 表达及 Nrf2 入核的影响

2.7 SeOH 对 ERS 相关蛋白表达的影响

由图 7 可见, 与 Control 组相比, H_2O_2 组极显著升高了 LMH 细胞中 GRP78 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$); 与 H_2O_2 组相比, SeOH 16+ H_2O_2 组和 SeOH 32+ H_2O_2 组 GRP78 蛋白的表达水平有下降的趋势 ($P > 0.05$), 而 SeOH 64+ H_2O_2 组 GRP78 蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 Control 组相比, H_2O_2 组显著升高了 PERK 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$); 与

H_2O_2 组相比, SeOH 16+ H_2O_2 组和 SeOH 32+ H_2O_2 组 PERK 蛋白的表达水平有下降的趋势 ($P > 0.05$), 而 SeOH 64+ H_2O_2 组 PERK 蛋白的表达水平极显著降低 ($P < 0.01$)。与 Control 组相比, H_2O_2 组 ATF4 蛋白的表达水平极显著升高 ($P < 0.01$); 与 H_2O_2 组相比, SeOH 16+ H_2O_2 组 ATF4 蛋白的表达水平有下降的趋势 ($P > 0.05$), 而 SeOH 32+ H_2O_2 组和 SeOH 64+ H_2O_2 组 ATF4 蛋白的表达水平极显著降低 ($P < 0.001$)。



A. SeOH 对 LMH 细胞中 ERS 相关蛋白表达的影响; B. GRP78 蛋白表达水平的分析; C. PERK 蛋白表达水平的分析; D. ATF4 蛋白表达水平的分析。

图 7 SeOH 对 LMH 细胞中 ERS 相关蛋白 GRP78、PERK 和 ATF4 表达的影响

3 讨论

肝脏作为机体中重要的解毒器官, 在发挥合成、代谢、解毒的功能时, 极易受到氧化应激的损伤, 进而引起水肿、炎症等损伤^[18]。LMH 细胞具有典型上皮细胞特点, 保持了鸡肝细胞的大量表征, 是研究肝

脏氧化应激的重要模型^[19]。现有饲料添加的抗氧化剂存在生物利用度低、难溶于水等弊端, 而硒不仅具有促生长, 改善肠道健康的作用, 还具有抗氧化应激, 调节代谢等生物学功能, 可提高畜禽养殖效益。硒的重要功能是由硒蛋白实现的, 而硒蛋白的合成与摄入硒的种类密切相关。因而, 一种新型的安全高效

的硒补剂的开发至关重要。常见的硒补剂一般分为三代：第一代无机硒（亚硒酸盐和硒酸盐），具有生产方便和价格低廉等优势，但吸收效率较低且重金属污染率高；第二代为以硒酵母为代表的有机硒，具有安全性，但成分复杂且生产不稳定；第三代为 SeOH，在保持了硒代蛋氨酸的高吸收效率的同时又增加了不易被氧化的优点，具有安全性和高效性，因此 SeOH 在 2013 年被欧盟批准为饲料添加剂。SeOH 作为一种安全有效的硒源，可以非特异性结合到蛋白质中取代蛋氨酸，从而作为内源性硒库用于合成硒蛋白^[20]。

本研究利用 SeOH 研究其在 LMH 细胞中的抗氧化作用及其相关机制。细胞活力试验结果表明，120 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 能使细胞活力下降到 50% 左右，细胞损伤伴随 ROS 升高现象的出现表明已成功建立了氧化应激模型。然而，SeOH 的加入则可以逆转这种损伤。当 SeOH 与 H_2O_2 共同孵育 24 h，细胞活力显著升高，ROS 产生明显下降，同时 SOD 活力的增强及 MDA 生成的降低则表明细胞抗氧化能力的提高。Nrf₂ 信号通路是细胞应对氧化应激损伤的最重要机制之一。Telorack 等^[21] 阐明了谷胱甘肽和 Nrf₂ 的相互作用增加了角化细胞存活和加速伤口愈合。Li 等^[22] 阐明了酵母硒通过激活鸡的 Nrf₂/Keap1 通路保护肾脏免受霉菌毒素诱导的氧化损伤。本研究证实了 120 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 和 SeOH 共同处理 LMH 细胞能激活 Nrf₂ 信号通路。Western blot 试验结果显示， H_2O_2 单独处理 LMH 细胞后，导致细胞内氧化还原失衡，下调抗氧化蛋白 Nrf₂ 以及 GPX4 的表达水平，并上调 Keap1 蛋白表达水平，引起细胞凋亡或坏死。SeOH 处理后显著提高了 Nrf₂ 和 GPX4 的蛋白表达水平，而降低了 Keap1 的蛋白表达水平，提示 SeOH 更好地激活了 Nrf₂ 通路及下游抗氧化蛋白发挥抗氧化功能。GPX4 是人类首个发现的硒的生物活性酶，该酶将有毒的过氧化氢还原成无毒的羟基化合物，保护细胞膜免受活性氧的损伤。在本研究中，Nrf₂-Keap1 激活下游的重要抗氧化原件 GPX4 的表达，发挥重要的抗氧化保护作用。相关研究表明，ROS 的积累可诱导 ERS 激活 PERK 信号通路^[23]。本研究中， H_2O_2 单独处理 24 h 后，LMH 细胞中 GRP78、PERK、ATF4 蛋白表达水平均显著上调，当 SeOH 处理后降低了上述 ERS 标志物的蛋白表达。以上结果表明，氧化应激确实会引起 ERS，并且 SeOH 能够缓解 ERS。本研究表明 SeOH 可使 Nrf₂-Keap1 解离，提高 Nrf₂ 的入核效率，并且增加多种抗氧化硒蛋白的表达，进而提高抗氧化水平，减少 ROS 的产生，从而降低 H_2O_2 处理引起的 UPR 反应。一旦蛋白质被正确折叠，它们就不能与信号蛋白 PERK、IRE1 和 ATF6 竞争性结合 GRP78，

从而抑制 ERS 的发生。

4 结论

SeOH 可以保护 LMH 细胞免于 H_2O_2 引起的氧化损伤。SeOH 能激活 Nrf₂ 通路并且缓解 ERS，从而降低细胞 ROS 的生成，并维持细胞活力和形态，提高细胞的抗氧化能力。SeOH 作为一种新型饲料添加剂，在抗氧化、缓解肝氧化损伤方面起到重要作用，本研究为其在动物生产上的应用提供理论依据。

参考文献：

- [1] PERSSON T, POPESCU B O, CEDAZO-MINGUEZ A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 10 (5): 127-138.
- [2] PISOSCHI A M, POP A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 97: 55-74.
- [3] 姚娟, 吴平安, 李芸, 等. Keap1-Nrf2-ARE 信号通路及其激活剂的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35 (10): 1342-1346.
- [4] LI Q, XING S, CHEN Y, et al. Reasonably activating Nrf2: a long-term, effective and controllable strategy for neurodegenerative diseases [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 185: 111862.
- [5] AN R, LI D, DONG Y, et al. Methylcobalamin protects melanocytes from H_2O_2 -induced oxidative stress by activating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4837-4848.
- [6] FÃO L, MOTA S I, REGO A C. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 54: 100942.
- [7] INGOLD I, BERNDT C, SCHMITT S, et al. Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis [J]. *Cell*, 2018, 172 (3): 409-422.
- [8] 李秋杨, 闫顺昌, 蒙亚珍, 等. Nrf2-GPX4 介导的铁死亡通路参与右美托咪定对脑出血大鼠神经保护作用的机制研究 [J]. *天津医药*, 2022, 50 (8): 817-821.
- [9] HETZ C, SAXENA S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration [J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13 (8): 477-491.
- [10] ZHANG Z, ZHANG L, ZHOU L, et al. Redox signaling and unfolded protein response coordinate cell fate decisions under ER stress [J]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101047.
- [11] KOPP M C, LARBURU N, DURAIRAJ V, et al. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26 (11): 1053-1062.
- [12] SUN R, DENG Z, HAN X, et al. Porcine circovirus 2 manipulates the PERK-ERO1 α axis of the endoplasmic reticulum to favor its replication by derepressing viral DNA from HMGB1 sequestration within nuclei [J]. *J Virol*, 2021, 95 (19): e0100921.
- [13] 宋新磊. 甘露寡糖和有机硒联合应用对肉鸡的免疫功能及生产性能的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [14] WANG Y, DACOSTA C, WANG W, et al. Synergy between sulfora-

- phane and selenium in protection against oxidative damage in colonic CCD841 cells [J]. *Nutr Res*, 2015, 35 (7): 610-617.
- [15] BO R, JI X, YANG H, et al. The characterization of optimal selenized garlic polysaccharides and its immune and antioxidant activity in chickens [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 182: 136-143.
- [16] HE Y, LIU Y, TANG J, et al. Selenium exerts protective effects against heat stress-induced barrier disruption and inflammation response in jejunum of growing pigs [J]. *J Sci Food Agric*, 2022, 102 (2): 496-504.
- [17] KAWAGUCHI T, NOMURA K, HIRAYAMA Y, et al. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH [J]. *Cancer Res*, 1987, 47 (16): 4460-4464.
- [18] CHEN Y P, GU Y F, ZHAO H R, et al. Dietary squalene supplementation alleviates diquat-induced oxidative stress and liver damage of broiler chickens [J]. *Poult Sci*, 2021, 100 (3): 100919.
- [19] 赵蕾, 史爱华, 李林, 等. 鸡肝癌细胞系 LMH 培养特性的研究 [J]. *中国家禽*, 2021, 43 (2): 116-120.
- [20] BRIENS M, MERCIER Y, ROUFFINEAU F, et al. 2-Hydroxy-4-methylselenobutanoic acid induces additional tissue selenium enrichment in broiler chickens compared with other selenium sources [J]. *Poult Sci*, 2014, 93 (1): 85-93.
- [21] TELORACK M, MEYER M, INGOLD I, et al. A glutathione-Nrf2-thioredoxin cross-talk ensures keratinocyte survival and efficient wound repair [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12 (1): e1005800.
- [22] LI K, CAO Z, GUO Y, et al. Selenium yeast alleviates ochratoxin A-induced apoptosis and oxidative stress via modulation of the PI3K/AKT and Nrf2/Keap1 signaling pathways in the kidneys of chickens [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4048706.
- [23] GU S, CHEN C, JIANG X, et al. ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction underlie apoptosis induced by resveratrol and arsenic trioxide in A549 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 245: 100-109.



北京大学图书馆
PEKING UNIVERSITY LIBRARY

《中文核心期刊要目总览》2023年版入编通知

《畜牧与兽医》主编先生/女士:

我们谨此郑重通知:依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,贵刊《畜牧与兽医》入编《中文核心期刊要目总览》2023年版(即第10版)之畜牧、动物医学、狩猎、蚕、蜂(除草地学、草原学)类的核心期刊。

《中文核心期刊要目总览》2023年版从2021年10月开始研究,研究工作由北京大学图书馆主持,共32个单位的148位专家和工作人员参加了本项研究工作,全国各地9473位学科专家参加了核心期刊表的评审工作。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1987种核心期刊。

评选核心期刊的工作是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动。该研究成果只是一种参考工具书,主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考,例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等,不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂

撰安

编号: 2023-J2688

《中文核心期刊要目总览》

2023年版编委会

图书馆

T 01061604941

