

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.17.005

硒对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠的保护作用 *

程 昱 王松柏 姚 红 樊 健 卢宝玲 钟丽华 于 雷 朱丽影[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:通过研究硒对流感病毒悬液滴鼻处理的小鼠的体重变化、死亡率、血清硒水平和细胞因子的影响,探讨硒对感染流感病毒小鼠的保护作用。**方法:**将 60 只昆明小鼠分为 5 组,每组 12 只,分别为缺硒组(0 mg/kg)、正常给硒组(0.2 mg/kg)、补充硒组(0.3 mg/kg)、补充硒组(0.4 mg/kg)、补充硒组(0.5 mg/kg)。给 5 周龄的小鼠滴鼻接种 50 μ L 的 A/NWS/33(H1N1)病毒悬液并观察 21 天,监测每组小鼠的体重变化和死亡率;并在接种病毒后的第 3 天、第 5 天,检测小鼠的血清硒、TNF- α 和 IFN- γ 水平。**结果:**缺硒组小鼠的死亡率高于正常给硒组和补充硒组($P<0.05$);缺硒组小鼠的血清硒水平明显低于正常给硒组和补充硒组 ($P<0.05$);在病毒感染第 5 天,缺硒组小鼠的 TNF- α 和 IFN- γ 含量低于正常给硒组和补充硒组($P<0.05$),差异均有统计学意义。**结论:**硒可以提高机体对抗流感病毒的免疫反应。

关键词: 硒;流感病毒;TNF- α ;IFN- γ

中图分类号: R459.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)17-3220-03

Protection from H1N1 Influenza Virus Infections in Mice by Supplementation with Selenium*

CHENG Yu, WANG Song-bai, YAO Hong, FAN Jian, LU Bao-ling, ZHONG Li-hua, YU Lei, ZHU Li-ying[△]

(The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To explore protective effects of supplemental selenium in mice inoculated intranasally with suspensions of influenza virus by investigating the effects of supplemental selenium on weight loss and recovery, mortality, serum selenium levels and cytokine of mice. **Methods:** 60 Kunming mice were divided into five groups with 12 mice in each one, Se-deficient group (0 mg/kg), Se-adequate group (0.2 mg/kg), Se-supplemented group (0.3 mg/kg), Se-supplemented group (0.4 mg/kg), Se-supplemented group (0.5 mg/kg). Mice (5 weeks old) were inoculated intranasally with 50 μ L of viral suspension and observed for 21 days to monitor body weight change and mortality. The serum content of TNF- α , IFN- γ and selenium were detected at 3 and 5 days after virus inoculation. **Results:** The mortality in mice of Se-deficient group was higher than that of Se-adequate group and Se-supplemented group ($P<0.05$). The lever of serum selenium in mice of Se-deficient group was much lower than that of Se-adequate group and Se-supplemented group ($P<0.05$). The concentration of TNF- α and IFN- γ in mice of Se-deficient group was lower than that of Se-adequate group and Se-supplemented group at 5 days after virus inoculation ($P<0.05$), the differences were all statistically significant. **Conclusions:** The data indicates that selenium supplementation may provide a feasible approach to improving the immune response to lethal influenza infection.

Key words: Selenium; Influenza virus; TNF- α ; IFN- γ

Chinese Library Classification(CLC): R459.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)17-3220-03

前言

甲型 H1N1 流感病毒 (Influenza A virus subtype H1N1, H1N1) 初始称为“人感染猪流感”,于 2008 年 3 月在墨西哥首次发现并引起了全球范围内的流感大流行,截止 2009 年 8 月 13 日,此次疫情共导致 182166 人感染,部分患者出现重症肺炎、急性呼吸窘迫综合征等严重的肺部损害,其中 1799 人死亡,死亡率高 0.99%^[1]。由于甲型 H1N1 流感病毒是 RNA 病毒,

具有高度的遗传变异性,其致病机制一直是学者的研究热点^[2,3]。

硒(Selenium, Se)是人类和其他哺乳动物饮食中重要的微量元素,可以为感染流感病毒提供预防性保护^[4]。研究表明,人体缺乏硒可使机体免疫机制受损,并可诱使流感病毒变异,甚至出现比母本病毒更致命的病毒种类^[5,6]。目前关于硒与 H1N1 病毒感染的研究少见。为进一步阐明硒在预防呼吸道病毒感染中的作用,本研究设计了缺硒组、正常给硒组 and 不同剂量的补

* 基金项目:黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z12195);黑龙江省教育厅科学技术项目(12521294)

作者简介:程昱(1977-),女,硕士研究生,主要研究方向:传染病学

[△] 通讯作者:朱丽影,电话:0451-82574841, E-mail: zlyhmu@163.com

(收稿日期:2015-01-06 接受日期:2015-01-29)

充硒组三种小鼠体内模型,用以探讨硒对感染流感病毒小鼠的体重变化、死亡率、血清硒和 TNF- α 、IFN- γ 水平的影响,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验使用昆明小鼠 60 只,体重约 20-22 g,由中国医学科学院实验动物中心提供。A/NWS/33(H1N1)病毒由中科院病毒研究所提供。肿瘤坏死因子 - α (Tumor necrosis factor-alpha,

TNF- α)和干扰素 - γ (Interferon-gamma, IFN- γ)的 Elisa 试剂盒由中国上海乐延生物技术股份有限公司提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 实验动物的处理 将昆明小鼠置于室温、昼夜交替的自然条件下饲养,给予新鲜的水和标准的实验室饲料,饲料中的硒以亚硒酸钠五水合物的形式提供。将 60 只小鼠随机分为正常给硒组(0.2 mg/kg)、缺硒组(0 mg/kg)、补充硒组(0.3 mg/kg)、补充硒组(0.4 mg/kg)、补充硒组(0.5 mg/kg),每组小鼠的饲料成分中仅硒水平不同,具体成分见表 1。

表 1 实验中所用饲料的成分

Table 1 Composition of the Diets Used in the Experiments

Different groups	Casein (g/kg)	Corn starch (g/kg)	Maltodextrin (g/kg)	Corn oil (g/kg)	Se (mg/kg)
Se-adequate group	200	500	150	50	0.2
Se-deficient group	200	500	150	50	0
Se-supplemented group (0.3 mg/kg)	200	500	150	50	0.3
Se-supplemented group (0.4 mg/kg)	200	500	150	50	0.4
Se-supplemented group (0.5 mg/kg)	200	500	150	50	0.5

1.2.2 流感病毒的感染 将 Influenza A/NWS/33 (H1N1)病毒接种于 MDCK 细胞形成的单层细胞簇中,在 37℃、5%的 CO₂ 培养箱内培养 3-5 天,当病毒的细胞病变效应达到 90%-100% 时获得细胞。将制备的病毒悬液置于安瓿瓶,于 -80℃ 冰箱保存。给 5 周龄的小鼠滴鼻接种 50 μ L 的病毒悬液(2×10^5 PFU/每只小鼠),采集小鼠在接种病毒后第 3 天、第 5 天的血液标本,并观察 21 天,监测体重变化和死亡率。

1.2.3 细胞因子及血清硒水平的检测 分别在小鼠接种病毒后的第 3 天、第 5 天剪尾取血,分离血清后置于 -22℃ 保存。使用 Elisa 方法检测血清中 TNF- α 、IFN- γ 水平^[7]。使用 Andrea P^[8] 的方法,采用原子吸收光谱仪测定血浆中的硒水平,设定波长为 64 nm,最小检测浓度为 5 ng/mL^[9]。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较用 t 检验。用 SPSS10.0 软件处理数据,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠感染流感病毒后死亡率和体重的变化

经比较,小鼠的生存率随着饲料中硒含量的增加而增加,

小鼠的体重减少值随着饲料中硒含量的增加而减少。缺硒组小鼠的体重下降最明显,死亡率高达 75%,但在补充硒组(0.4 mg/kg)和补充硒组(0.5 mg/kg)中,虽然小鼠的体重也下降,但是死亡率仅为 25%,明显低于缺硒组,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表 2,图 1。

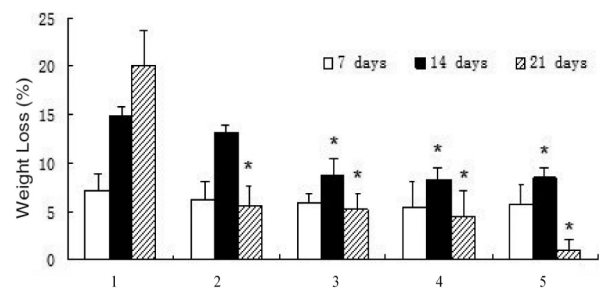


图 1 小鼠感染流感病毒后体重变化的分析

Fig. 1 Analysis of weight loss and recovery in Se-supplemented mice after influenza infection

Note: 1. Se-deficient group; 2. Se-adequate group; 3. Se-supplemented group 0.3 mg/kg; 4. Se-supplemented group 0.4 mg/kg; 5. Se-supplemented group 0.5 mg/kg. $n=12$ mice per group at baseline. Values are presented by ($\bar{x} \pm s$). * $P<0.05$, compared with the Se-deficient group at the same days.

表 2 小鼠感染流感病毒后的生存率分析

Table 2 Analysis of Mortality in Se-supplemented Mice after Influenza Infection

Different groups	Total no.	Survivors no.	Mortality (%)
Se-deficient (0 mg/kg)	12	3	75
Se-adequate (0.2 mg/kg)	12	5	58.3
Se-supplemented (0.3 mg/kg)	12	6	50
Se-supplemented (0.4 mg/kg)	12	9	25*
Se-supplemented (0.5 mg/kg)	12	9	25*

Note: $n=12$ mice per group at baseline. * $P<0.05$, compared to Se-deficient animals in the same experiment.

2.2 小鼠感染流感病毒后的细胞因子水平

在小鼠接种病毒后的第3天,正常给硒组和补充硒组的TNF- α 和IFN- γ 的含量与缺硒组没有任何差异($P>0.05$)。在小鼠接种病毒后的第5天,正常给硒组和补充硒组的TNF- α 和IFN- γ 的含量高于缺硒组,差异有统计学意义($P<0.05$),详见图2。

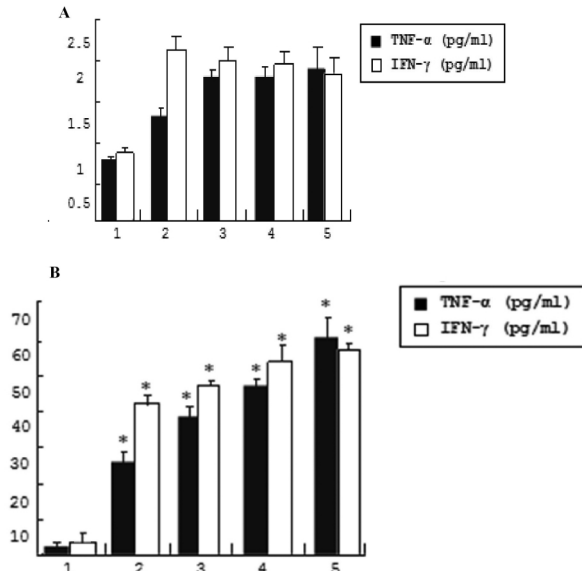


图2 硒对感染流感病毒的小鼠TNF- α 和IFN- γ 水平的影响

Fig.2 Effects of Se-supplemented on TNF- α and IFN- γ levels in mice infected with influenza virus

Note: Value was presented by ($\bar{x} \pm s$). 1. Se-deficient group;

2. Se-adequate group; 3. Se-supplemented group 0.3 mg/kg;

4. Se-supplemented group 0.4 mg/kg; 5. Se-supplemented group 0.5 mg/kg. A: Levels of TNF- α and IFN- γ in mice infected with influenza virus at 3 day; B: Levels of TNF- α and IFN- γ in mice infected with influenza virus at 5 day. * $P<0.05$, compared to Se-deficient group.

2.3 小鼠感染流感病毒后的血清硒水平

小鼠感染病毒21天后收集血液标本,测定血清硒水平。缺硒组小鼠的血清硒水平明显低于正常给硒组和补充硒组,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表3。

表3 不同硒浓度食物的小鼠血清中硒的浓度($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Serum Se Concentration of Mice Fed Diets with Different Dietary Concentration and Sources of Se ($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$)

Different groups	n	Serum Se concentration
Se-deficient (0 mg/kg)	3	0.062 $\pm$ 0.001
Se-adequate (0.2 mg/kg)	5	0.148 $\pm$ 0.006*
Se-supplemented (0.3 mg/kg)	6	0.159 $\pm$ 0.009*
Se-supplemented (0.4 mg/kg)	9	0.170 $\pm$ 0.007**
Se-supplemented (0.5 mg/kg)	9	0.178 $\pm$ 0.009**

Note: Blood were collected from mice at 21 days after virus infection.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with Se-deficient group.

3 讨论

硒是人体红细胞谷胱甘肽过氧化物酶和磷脂过氧化氢谷

胱甘肽过氧化物酶的组成成分^[10]。硒可以影响呼吸道上皮细胞的形态及功能,增强其抵御外来病毒及细菌侵袭的能力^[11],缺乏硒的小鼠在感染呼吸道病毒时肺部病理变化明显增强^[12]。以上结果说明,硒与机体感染呼吸道流感病毒密切相关。研究表明,硒的缺乏可使人体的免疫机制受损,增加感染呼吸道病毒的易感性^[13],甚至影响流感病毒的病原体,导致出现比母本病毒更致命的病毒种类^[14,15]。

本研究结果显示,硒可以保护小鼠免受致命性流感病毒的感染,补硒小鼠的生存率表现出剂量依赖性增加。硒是判断感染严重程度的一个重要指标。已有研究表明,TNF- α 、IFN- γ ,尤其是TNF- α ,具有针对流感病毒感染的抗病毒作用^[16,17]。因此,我们通过检测小鼠血液中TNF- α 和IFN- γ 水平来研究硒对机体免疫的作用。在病毒感染后的第3天,TNF- α 和IFN- γ 在硒缺乏和硒补充组之间没有任何差异。然而,在病毒感染后的第5天,补充硒组血液样本中的TNF- α 和IFN- γ 均增高,反之在缺硒组却很少增加,说明硒对流感病毒感染的保护作用可能至少部分归因于血清中TNF- α 和IFN- γ 含量的增加。

研究表明,低水平的血清硒含量与低水平的NK细胞百分比相关^[18]。此外,在HIV病毒感染中,血清硒含量的降低与疾病进展和炎症反应的升高有关^[19,20]。本研究发现缺硒组小鼠的血清硒水平明显低于正常给硒组和补充硒组。血清硒含量的降低可导致感染流感病毒时的免疫力相对不足,使TNF- α 和IFN- γ 的产生减少,小鼠的存活率降低。补充硒可以提高血清硒浓度,有助于提高其在动物体内的抗流感病毒活性。

综上所述,硒可以提高动物对抗流感病毒感染时的免疫反应,对提高机体抗流感病毒能力有重要意义。下一步,我们还需要研究硒与人呼吸道上皮细胞的作用,以进一步阐明硒对机体抗流感病毒的作用。

参考文献(References)

- [1] 钟南山, 李兰娟, 王辰, 等. 甲型H1N1流感诊疗方案(2009年第三版)[J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2009, 2(1): 15-18
Zhong Nan-shan, Li Lan-juan, Wang Chen, et al. Diagnosis and treatment scheme of Influenza A virus subtype H1N1 (the third edition, 2009) [J]. Chinese journal of critical care medicine(electronic edition), 2009, 2(1): 15-18
- [2] 朱广蕊, 潘耀耀, 夏银可, 等. 甲型H1N1流感病毒致病机理研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(8): 70-74
Zhu Guang-rui, Pan Yao-qian, Xia Yin-ke, et al. Research progress of pathogenesis of Influenza A (H1N1) [J]. Journal of progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(8): 70-74
- [3] 张复春, 胡凤玉. 新型甲型H1N1流感研究进展 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2009, 30(5): 481-485
Zhang Fu-chun, Hu Feng-yu. Research progress of New Influenza A (H1N1) [J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2009, 30(5): 481-485
- [4] Tamerius J, Nelson M I, Zhou S Z, et al. Global influenza seasonality: reconciling patterns across temperate and tropical regions[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(4): 439-445
- [5] Harthill M. Review: micronutrient selenium deficiency influences evolution of some viral infectious diseases [J]. Biol Trace Elem Res, 2011, 143(3): 1325-1336

(下转第3227页)

- Ren Guang-mu, Bai Ji-wei, Gao Cai-rong, et al. Lethal Anaphylactic Shock model Induced by Human Mixed Serum in Guinea Pigs[J]. Journal of Forensic Medicine, 2005, 21(3):169-170
- [11] 王昌亮, 张国华, 吴旭, 等. 豚鼠过敏性休克肺组织中类胰蛋白酶和胃促胰酶的表达[J]. 中国法医学杂志, 2010, 25(4): 236-239
- Wang Chang-liang, Zhang Guo-hua, Wu Xu, et al. An immunohistochemical study of tryptase and chymase in the lungs of guinea pigs died of anaphylactic shock[J]. Chin J Forensic Med, 2010, 25(4): 236-239
- [12] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2009:32-33
- Gong Fei-li. Medical Immunology [M]. Beijing: Science Press, 2009: 32-33
- [13] 王红杰, 宋纬平, 阳宇, 等. 血清总 IgE、类胰蛋白酶和类糜蛋白酶在药物过敏性休克死亡鉴定中的应用 [J]. 法医学杂志, 2012, 28(3): 167-171
- Wang Hong-jie, Song Wei-ping, Yang Yu, et al. Application of Serum Total IgE, Tryptase and Chymase in the Identification of Death Caused by Drug Anaphylactic Shock [J]. Journal of Forensic Medicine, 2012, 28(3): 167-171
- [14] 杨旭, 刘艳. 过敏性休克鉴定研究进展 [J]. 华南国防医学杂志, 2011, 25(6): 552-554
- Yang Xu, Liu Yan. The Progress on Identification of Anaphylactic Shock[J]. Mil Med J S Chin, 2011, 25(6): 552-554
- [15] 王伯云, 李玉松, 黄高昇, 等. 病理学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 171-172
- Wang Bo-yun, Li Yu-song, Huang Gao-sheng, et al. Pathology Technology [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2000: 171-172
- [16] Caughey GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense[J]. Immunol Rev, 2007, 217: 141-154
- [17] Krishnaswamy G, David S Chi. Mast cells: methods and protocols [M]. New York: Humana Press, 2006:13-34
- [18] Perskvist N, Edston E. Differential accumulation of pulmonary and cardiac mast cell-subsets and eosinophils between fatal anaphylaxis and asthma death: A postmortem comparative study [J]. Forensic Sci Int, 2007, 169(1): 43-49
- [19] Caughey GH, Beauchamp J, Schlatter D, et al. Guinea pig chymase is leucine-specific: a novel example of functional plasticity in the chymase/granzyme family of serine peptidases[J]. J Biol Chem, 2008, 283(20): 13943-13951
- [20] Nishio H, Takai S, Miyazaki M, et al. Usefulness of serum mast cell-specific chymase levels for postmortem diagnosis of anaphylaxis [J]. Int J Legal Med, 2005, 119(6):331-334

(上接第 3222 页)

- [6] Evans DM, Zhu G, Dy V, et al. Genome-wide association study identifies loci affecting blood copper, selenium and zinc[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(19): 3998-4006
- [7] Petricevich VL, Lebrun I. Immunomodulatory effects of the Tityus serrulatus venom on murine macrophage functions in vitro [J]. Mediators Inflamm, 2005, 2005(1): 39-49
- [8] Arsnoe DM, Ip HS, Owen JC. Influence of body condition on influenza A virus infection in mallard ducks: experimental infection data[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22633
- [9] Baum MK, Miguez-Burbano MJ, Campa A, et al. Selenium and interleukins in persons infected with human immunodeficiency virus type 1[J]. J Infect Dis, 2000, 182(1): S69-73
- [10] 程建中, 杨萍, 桂仁意. 植物硒形态分析的研究综述 [J]. 浙江农林大学学报, 2012, 29(2): 288-395
- Cheng Jian-zhong, Yang Ping, Gui Ren-yi. Research progress on speciation of selenium compounds in plants[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2012, 29(2): 288-395
- [11] Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, et al. Selenium in human health and disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(7): 1337-1383
- [12] Sanmartin C, Plano D, Font M, et al. Selenium and clinical trials: new therapeutic evidence for multiple diseases [J]. Curr Med Chem, 2011, 18(30): 4635-4650
- [13] Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(15): 2457-2478
- [14] Moreno-Reyes R, Egrise D, Nève J, et al. Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(8): 1556-1563
- [15] Duntas LH. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms[J]. Horm Metab Res, 2009, 41(6): 443-447
- [16] Seo SH, Webster RG. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells[J]. J Virol, 2002, 76(3): 1071-1076
- [17] Jaspers I, Zhang W, Brighton LE, et al. Selenium deficiency alters epithelial cell morphology and responses to influenza [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(12): 1826-1837
- [18] Ravaglia G, Forti P, Maioli F, et al. Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged ≥ 90 y[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(2): 588-590
- [19] Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, et al. Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-1 infection [J]. Biol Trace Elem Res, 1997, 56(1): 31-41
- [20] Hoffmann PR, Berry MJ. The influence of selenium on immune responses[J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52(11): 1273-1280