

亚硒酸钠对小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖及细胞因子分泌的影响

李冰心¹, 李婉雁^{1,2}, 田允波^{1,2}, 曹楠^{1,2}, 许丹宁^{1,2*}

(1. 广东省水禽健康养殖重点实验室, 广东广州 510225; 2. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东广州 510225)

摘要 [目的] 研究亚硒酸钠对小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖及脾脏淋巴细胞中细胞因子分泌的影响, 进而探讨亚硒酸钠调节机体免疫可能的作用途径。[方法] 从 BALB/c 小鼠脾脏中分离淋巴细胞, 采用 MTS 法检测不同浓度 (0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L) 的亚硒酸钠培养基培养 48 h 后的淋巴细胞增殖率并筛选出最适浓度的亚硒酸钠进行脾脏淋巴细胞培养, 最后采用 ELISA 法检测培养 48 h 后培养液中 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4 和 IL-6 的分泌量。[结果] 与对照组相比, 10^{-7} mol/L 亚硒酸钠处理使淋巴细胞增殖率显著提高, 且培养液中 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4 和 IL-6 的分泌量分别为对照组的 10.34、2.15、1.06 和 6.68 倍 ($P < 0.05$)。[结论] 亚硒酸钠可能通过调节脾脏淋巴细胞增殖和细胞因子的分泌来调节机体免疫功能。

关键词 亚硒酸钠; 小鼠; 淋巴细胞; 增殖率; 细胞因子

中图分类号 S852.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)02-0080-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.02.023



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Sodium Selenite on the Proliferation of Splenic Lymphocytes and Cytokine Secretion *in vitro* of Mice

LI Bing-xin¹, LI Wan-yan^{1,2}, TIAN Yun-bo^{1,2} et al (1. Guangdong Province Key Laboratory of Waterfowl Healthy Breeding, Guangzhou, Guangdong 510225; 2. College of Animal Science & Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

Abstract [Objective] To study the effects of sodium selenite on the spleen lymphocyte's proliferation and the cytokines secretion of mice *in vitro*, and explore the possible immune regulation ways of sodium selenite. [Method] The lymphocyte was isolated from the spleen of BALB/c mice. MTS method was used to detect the proliferation rate of lymphocytes cultured in sodium selenite medium with different concentrations (0, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L) after 48 h and screen out the optimum concentration of sodium selenite for spleen lymphocyte culture. The secretion quantity of IFN- γ , IL-1 β , IL-4 and IL-6 in culture supernatant after culturing 48 h were measured by ELISA. [Result] The proliferation rate of lymphocytes treated by 10^{-7} mol/mL sodium selenite was significantly increased compared with that in control group, and the secretion quantity of IFN- γ , IL-1 β , IL-4 and IL-6 in culture supernatant increased by 10.34, 2.15, 1.06, and 6.68 times, respectively. [Conclusion] Sodium selenite may regulate the body immunity by regulating spleen lymphocyte's proliferation and secretion of cytokines.

Key words Sodium selenite; Mice; Lymphocyte; Proliferation rate; Cytokine

硒(selenium, Se)是维持动物健康的必需微量元素, 在抗癌、抗氧化和调节免疫等方面发挥着重要作用^[1-4]。亚硒酸钠作为无机硒的代表, 是畜牧生产中常用的微量元素添加剂^[5-8]。大量研究表明, 硒提高机体免疫功能主要是通过其强大的抗氧化能力实现的。硒作为各种含硒酶类和硒蛋白的重要组成部分^[9], 可通过增强氧化还原反应、清除过多的脂质过氧化物及氧自由基等有害物质、保护细胞的结构完整, 进而增强机体抗氧化及免疫功能^[10]。硒也具有直接促进免疫功能的生物学活性。硒能够促进淋巴细胞增殖^[8], 提高免疫细胞分泌细胞因子的能力^[11], 从而直接调控机体免疫功能。硒还可以拮抗有害金属造成的机体免疫抑制。硒通过与有害金属结合形成金属硒蛋白复合物, 降低有害金属毒性, 减轻因有害金属诱导产生的氧化应激及细胞功能障碍, 增强体内淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等免疫细胞功能, 从而调节机体免疫。上述研究揭示了硒对机体免疫功能的调节途径及作用效果, 但硒对体外培养的小鼠脾脏淋巴细胞增殖及分泌细胞因子是否有直接的促进作用尚无定论。笔者选取不同浓度的亚硒酸钠体外培养小鼠脾脏淋巴细胞,

采用 MTS 法检测不同浓度亚硒酸钠对淋巴细胞增殖的影响, 进而筛选出适宜的亚硒酸钠浓度, 并在此基础上采用 ELISA 法检测亚硒酸钠对小鼠脾脏淋巴细胞培养液中 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4 和 IL-6 含量的影响, 以探索硒直接促进机体免疫功能的作用途径。

1 材料与方法

1.1 试验动物 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 购自南方医科大学动物实验中心, 动物质量合格证号为 44005800004284, 许可证号为 SCKK(粤)2013-0034。

1.2 主要试剂及耗材 亚硒酸钠购自德国 SIGMA 公司; 小鼠脾脏淋巴细胞分离液购自北京康为世纪科技有限公司; RPMI-1640 培养液购自美国 Thermo 公司; 植物血凝素 (PHA) 购自广州市达辉生物技术有限公司; IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4 和 IL-6 ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司; MTS 试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.3 脾脏淋巴细胞悬液的制备 将小鼠安乐死后, 无菌摘除脾脏, 于 200 目细胞筛上垂直按压, 收集滤液。根据小鼠脾脏淋巴细胞说明书处理滤液, 得到淋巴细胞悬液, 将淋巴细胞悬液置于培养瓶中, 37 °C、5% CO₂ 培养 2 h, 以去除贴壁细胞, 收集细胞悬液得到纯化的脾脏淋巴细胞, 台盼蓝染色检测结果显示细胞活性为 97%。根据细胞计数结果, 将细胞稀释至终浓度 1×10^6 个/mL 进行细胞培养。

1.4 淋巴细胞培养及增殖率检测 在 RPMI-1640 完全培养

基金项目 广东省“创新强校工程”基础研究重大项目(2017KZDXM046); 广东省科技计划项目(2017B020202010)。

作者简介 李冰心(1995—), 男, 河南商丘人, 博士研究生, 研究方向: 动物营养生理和动物疫病防控。* 通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事动物营养生理和动物疫病防控研究。

收稿日期 2018-10-04

液(10%血清、1%双抗、1%谷氨酰胺)中加入无菌的亚硒酸钠溶液,配制成亚硒酸钠含量分别为 0 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L的体外细胞培养液。各处理组均设有刺激孔及对照孔,刺激孔中添加 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ PHA,然后将各组细胞分别接入96孔板中,每个浓度2个重复,每个重复9孔, 37.0°C 、5% CO_2 培养44 h,然后从每孔分别取 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液至新96孔板中,加入 $20 \mu\text{L}$ MTS试剂, 37.0°C 避光孵育4 h,在波长 490 nm 处测定吸光值(OD值),按照细胞增殖率 = $\text{OD}_{\text{刺激孔}} / \text{OD}_{\text{对照孔}}$,计算不同硒含量处理组中淋巴细胞的增殖率。

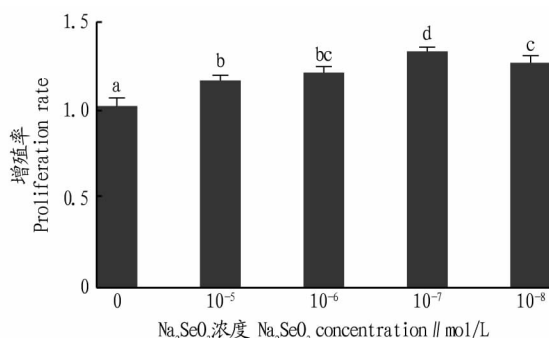
1.5 细胞因子检测 根据淋巴细胞增殖率结果,选取最适浓度的亚硒酸钠培养液进行小鼠脾脏淋巴细胞体外培养。试验分为硒处理组与对照组2组,培养48 h后 $3000 \text{ r}/\text{min}$ 离心5 min收集培养上清液,采用ELISA法检测上清液中IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4和IL-6的含量。

1.6 数据统计及分析 试验数据用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。使用SPSS 19.0统计软件进行数据统计与分析,细胞增殖率采用单因素方差分析LSD多重比较法;细胞因子结果采用独立样本 t 检验法。

2 结果与分析

2.1 不同浓度亚硒酸钠对小鼠脾脏淋巴细胞增殖率的影响 从图1可以看出,与对照组相比,培养液中添加不同浓度的亚硒酸钠均能显著提高小鼠脾脏淋巴细胞增殖率($P < 0.05$),淋巴细胞增殖率随着亚硒酸钠的浓度降低而上升,当硒含量为 10^{-7} mol/L时,淋巴细胞增殖率达到最大值且与其他试验组均存在显著差异($P < 0.05$),较对照组、 10^{-5} mol/L亚硒酸钠组、 10^{-6} mol/L亚硒酸钠组和 10^{-8} mol/L亚硒酸钠组

分别提高了31.20%、15.09%、9.7%和4.9%;当亚硒酸钠浓度为 10^{-5} 和 10^{-6} mol/L时,淋巴细胞增殖率较低,表明体外培养液中硒浓度与淋巴细胞增殖率之间存在量效关系。



注:各柱状图上标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters on the different bars indicated significant differences ($P < 0.05$)

图1 不同浓度亚硒酸钠对脾脏淋巴细胞体外增殖率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of sodium selenite on the proliferation rate of spleen lymphocytes in vitro

2.2 不同浓度亚硒酸钠对细胞上清液中细胞因子分泌的影响 细胞因子检测结果(图2)显示, 10^{-7} mol/L的亚硒酸钠可显著提高培养48 h后淋巴细胞上清液中4种细胞因子的含量,但亚硒酸钠溶液对这4种细胞因子分泌的促进作用不同,与对照组相比亚硒酸钠处理组上清液中IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4和IL-6含量分别提高了10.34、2.15、1.06和6.68倍($P < 0.05$)。

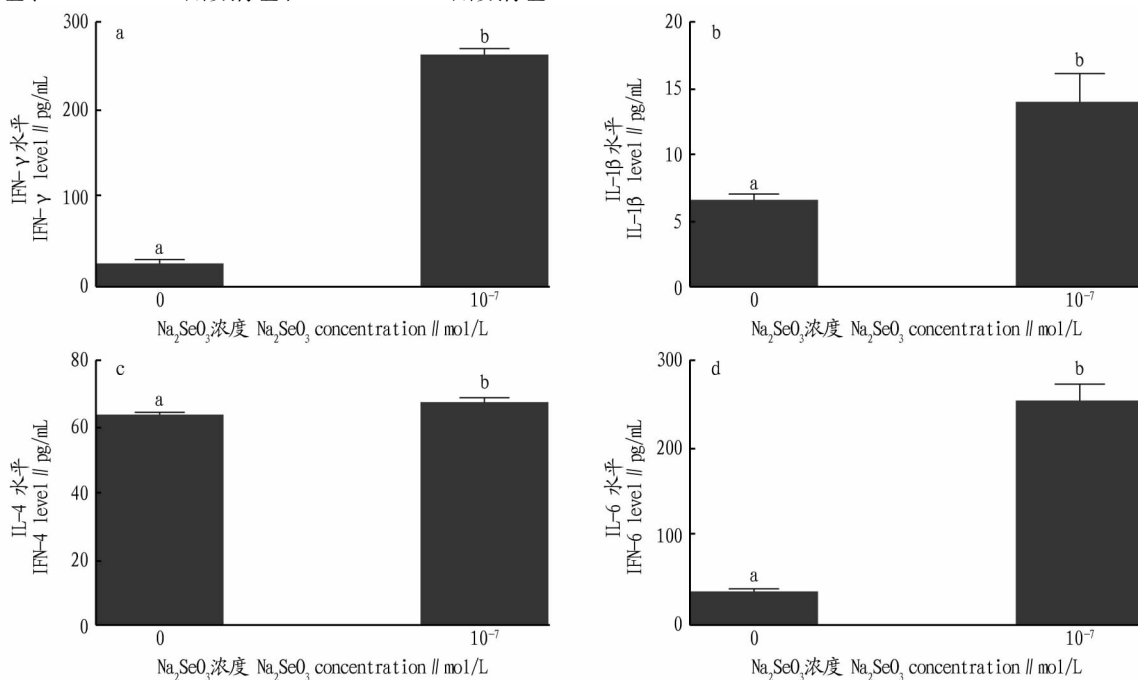


图2 不同浓度亚硒酸钠对淋巴细胞上清液中IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4和IL-6水平的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of sodium selenite on the levels of IFN- γ , IL-1 β , IL-4 and IL-6 in lymphocyte supernatant

3 讨论与结论

3.1 亚硒酸钠对脾脏淋巴细胞增殖率的影响 在合理营养

范围内补充硒可以增强细胞和体液免疫反应^[12],淋巴细胞作为细胞和体液介导免疫反应的主要参与者,淋巴细胞增殖

率一直被认为是机体免疫力提高的代表性指标^[13]。前期研究结果显示,低剂量的硒可以提高机体特异性免疫能力,但过量的硒会诱导细胞凋亡^[14]和氧化应激^[15]。该试验结果发现,亚硒酸钠能够显著提高 PHA 诱导的淋巴细胞增殖率,随亚硒酸钠浓度的升高,对增殖率的促进作用呈先上升后下降的趋势,具有剂量效应,当亚硒酸钠浓度为 10^{-7} mol/L 时促进效果最好。这种现象可能与淋巴细胞对硒的摄取及利用率有关,也可能与诱导剂的不同有关。据报道,T 细胞受体和刀豆蛋白 A 作为诱导剂,当体外培养液中亚硒酸钠含量在 2×10^{-6} mol/L 时,原代猪脾淋巴细胞增殖的能力最强^[12],这说明亚硒酸钠对 T、B 淋巴细胞的体外增殖均具有良好的促进效果。另外,动物的种属可能也是影响淋巴细胞增殖的因素之一,同为哺乳动物的猪和小鼠,其适宜浓度相差接近 10 倍,对小鼠脾淋巴细胞而言,较低的亚硒酸钠浓度即可达到最佳的作用效果。

3.2 亚硒酸钠对细胞因子分泌的影响 细胞因子在免疫细胞的分化、增殖及功能中发挥着重要作用,是机体免疫的重要组成部分^[16-17]。IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4 和 IL-6 在刺激 T、B 淋巴细胞增殖、诱导辅助性 T 细胞(T helper cells,Th)定向分化、维持 Th1/Th2 比例、活化巨噬细胞等方面有重要的调节能力,进而增强机体的固有免疫和适应性免疫^[17-18]。研究发现,在体外培养的环境下,IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌,IL-4 主要由 Th2 细胞分泌。该试验结果表明,硒处理组中 IFN- γ 含量为对照组的 10.34 倍,IL-4 含量为对照组的 1.06 倍,由于 IFN- γ 与 IL-4 之间存在拮抗效应,IFN- γ 抑制了 Th2 细胞的分泌能力,因此 IL-4 分泌量提高相对较少。IL-6 同样由 Th2 细胞分泌,不仅能够诱导 B 淋巴细胞增殖、分化、产生抗体,而且能促进 PHA 诱导的 T 淋巴细胞增殖分化^[19]。硒处理组中 IL-6 分泌量为对照组的 6.68 倍,显著低于 IFN- γ 提高水平,因此可推测在 Th0 细胞定向分化时更倾向于 Th1 方向,Th1/Th2 比值升高,对 T 淋巴细胞介导的细胞免疫促进作用更显著。IL-1 β 主要由树突状细胞、单核-巨噬细胞、B 淋巴细胞产生,能增强 B 淋巴细胞增殖和成熟并协同 IL-2 刺激 T 淋巴细胞活化^[20]。该试验中硒处理组 IL-1 β 含量为对照组的 2.15 倍,显著低于 IFN- γ 提高水平,也证实了在 PHA 诱导下硒更倾向于促进 T 淋巴细胞的增殖和分化,而对 B 淋巴细胞的作用不明显。虽然硒处理组中的 4 种细胞因子含量均显著高于对照组,但提高程度不同,结合细胞因子的来源及功能,可间接揭示亚硒酸钠对淋巴细胞分泌细胞因子的调控作用。

综上所述,当亚硒酸钠浓度为 10^{-7} mol/L 时,可显著提高 PHA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖率,并促使淋巴细胞大量分泌 IFN- γ 和 IL-6。该试验结果表明,亚硒酸钠可能通过增强 Th0 细胞的分化能力,提高 Th1/Th2 比值,从而提高 T 淋巴细胞介导的细胞免疫功能。

参考文献

[1] GAO H,LIU C P,SONG S Q,et al.Effects of dietary selenium against lead

- toxicity on mRNA levels of 25 selenoprotein genes in the cartilage tissue of broiler chicken[J].Biological trace element research,2016,172(1):234-241.
- [2] BINTE HOSSAIN K F,RAHMAN M M,SIKDER M T,et al.Inhibitory effects of selenium on cadmium-induced cytotoxicity in PC12 cells via regulating oxidative stress and apoptosis[J].Food Chem Toxicol,2018,114:180-189.
- [3] XU D N,TIAN Y B.Selenium and polysaccharides of *Atractylodes macrocephala* Koizd play different roles in improving the immune response induced by heat stress in chickens[J].Biological trace element research,2015,168(1):235-241.
- [4] JELINEK P D,ELLIS T,WROTH R H,et al.The effect of selenium supplementation on immunity, and the establishment of an experimental *Haemonchus contortus* infection,in weaner Merino sheep fed a low selenium diet[J].Aust Vet J,1988,65(7):214-217.
- [5] DELEZIE E,ROVERS M,VAN DER AA A,et al.Comparing responses to different selenium sources and dosages in laying hens[J].Poult Sci,2014,93(12):3083-3090.
- [6] LESSON S,NAMKUNG H,CASTON L,et al.Comparison of selenium levels and sources and dietary fat quality in diets for broiler breeders and layer hens[J].Poult Sci,2008,87(12):2605-2612.
- [7] LI B X,LIU Y,LI W Y,et al.Effect of selenium on ion profiles and antioxidant defense in mice livers[J].Biological trace element research,2018,184(1):127-135.
- [8] RAO S V R,PRAKASH B,RAJU M V L N,et al.Effect of supplementing organic selenium on performance,carcass traits,oxidative parameters and immune responses in commercial broiler chickens[J].Asian-Australasian journal of animal sciences,2013,26(2):247-252.
- [9] YANG Z J,LIU C,LIU C P,et al.Selenium deficiency mainly influences antioxidant selenoproteins expression in broiler immune organs[J].Biological trace element research,2016,172(1):209-221.
- [10] HUANG Z,ROSE A H,HOFFMANN P R.The role of selenium in inflammation and immunity:From molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J].Antioxidants & redox signaling,2012,16(7):705-743.
- [11] REN F,CHEN X X,HESKETH J,et al.Selenium promotes T-cell response to TCR-stimulation and ConA,but not PHA in primary porcine splenocytes[J].PLoS One,2012,7(4):1-10.
- [12] HPFFMANN P R,BERRY M J.The influence of selenium on immune responses[J].Molecular nutrition & food research,2008,52(11):1273-1280.
- [13] HAWKES W C,KELLEY D S,TAYLOR P C.The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men[J].Biol Trace Elem Res,2001,81(3):189-213.
- [14] WEILLER M,LATTA M,KRESSE M,et al.Toxicity of nutritionally available selenium compounds in primary and transformed hepatocytes[J].Toxicology,2004,201(1/2/3):21-30.
- [15] MISRA S,NIYOGI S.Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by inducing oxidative stress[J].Toxicology in vitro,2009,23(7):1249-1258.
- [16] WANG W S,XU L,BRANDSMA J H,et al.Convergent transcription of interferon-stimulated genes by TNF- α and IFN- α augments antiviral activity against HCV and HEV[J].Scientific reports,2016,6(1):1-14.
- [17] KUTTY R K,SAMUEL W,BOYCE K,et al.Proinflammatory cytokines decrease the expression of genes critical for RPE function[J].Mol Vis,2016,22:1156-1168.
- [18] APTE R N,DOTAN S,ELKABETS M,et al.The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness,metastasis and tumor-host interactions[J].Cancer and metastasis reviews,2006,25(3):387-408.
- [19] TANAKA T,NARAZAKI M,KISHIMOYO T.IL-6 in inflammation,immunity, and disease[J].Cold spring harbor perspectives in biology,2014,6(10):1-16.
- [20] CARAMORI G,ADCOCK I M,DI STEFANO A,et al.Cytokine inhibition in the treatment of COPD[J].Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2014,9:397-412.