

## 硒对猪细小病毒体外增殖抑制作用的研究\*

魏战勇<sup>1,2</sup>, 崔保安<sup>2</sup>, 黄克和<sup>1\*\*</sup>, 王学斌<sup>2</sup>, 潘翠玲<sup>1</sup>, 郭小权<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

### Inhibitory Effects of Different Selenium Sources on Porcine Parvovirus

#### Infection *in vitro*

WEI Zhan-yong<sup>1,2</sup>, CUI Bao-an<sup>2</sup>, HUANG Ke-he<sup>1\*\*</sup>, WANG Xue-bin<sup>2</sup>, PAN Cui-ling<sup>1</sup>, GUO Xiao-quan<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Henan Key Laboratory for Animal Food Safety, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Inhibitory effects of sodium selenite, DL-selenomethionine and Kappa-selenocarrageenan on *Porcine parvovirus* (PPV) infection of the PK-15 cells were studied. The influences of reduced glutathione (GSH) and D-mannitol on antiviral effects of selenium were also carried out in PK-15 cells. The results showed that all of the three selenium sources have an inhibitory effect on the PPV replication *in vitro*. DL-selenomethionine had the highest inhibitory effect while Kappa-selenocarrageenan had the lowest, and the inhibition was concentration-dependent. The GSH and D-mannitol have the ability to increase the antiviral effects of selenium. The antiviral effect was enhanced with the addition of both GSH and D-mannitol.

**Key words:** *Porcine parvovirus*; Sodium selenite; Kappa-selenocarrageenan; DL-Selenomethionine; Glutathione reduced; D-Mannitol

**摘要:** 本文以 PK-15 细胞为模型, 研究了亚硒酸钠、硒蛋氨酸和海藻硒多糖等三种硒化合物对猪细小病毒体外复制的抑制作用, 以及还原型谷胱甘肽、D-甘露醇等氧自由基清除剂对不同来源硒的抑制病毒作用的影响。结果表明: 三种硒化合物对猪细小病毒在 PK-15 中的复制呈现不同程度的抑制作用, 在相同浓度时其强度依次为硒蛋氨酸、亚硒酸钠、海藻硒多糖, 随着浓度的增加, 其抑制作用逐渐增强, 呈剂量依赖性关系。还原型谷胱甘肽和甘露醇均有增强硒的抑制病毒复制作用, 两者同时添加时, 协同增强硒的抑制病毒复制作用。

**关键词:** 猪细小病毒; 亚硒酸钠; 硒蛋氨酸; 海藻硒多糖; 还原型谷胱甘肽; 甘露醇

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)06-0613-05

硒是人和动物体内必需的微量元素, 具有多种生物活性<sup>[1]</sup>。在体内硒主要以硒酶和非酶硒蛋白的形式发挥其生理作用, 具有清除过氧化氢、脂及磷脂自由基, 保护细胞膜的结构和功能, 保护脂蛋白、DNA 等生物大分子免遭氧化应激损伤。硒缺乏会造成谷胱甘肽过氧化物酶活性降低, 导致组织细胞抗氧化损伤能力减弱, 直接影响细胞的分裂、繁殖、遗传及生长, 进而干扰核酸、蛋白质、粘多糖及酶的合成代谢, 引发心血管系统疾病、恶性肿瘤、肌营养

不良及关节病和繁殖障碍性疾病等<sup>[2]</sup>。研究还发现硒缺乏与一些病毒感染的发生、发展及防治等都有密切的联系。富硒对 Ebola 病毒、人类免疫缺陷病毒、鼠乳腺肿瘤病毒、流感病毒及甲型肝炎病毒等的感染有不同程度的抑制作用, 缺硒可引起病毒毒力发生改变, 使无致病力病毒变为强致病力病毒<sup>[3~6]</sup>。

硒具有多种形态, 分为无机硒和有机硒。无机硒主要有亚硒酸钠、硒酸钠等; 有机硒主要有硒胱氨酸、硒蛋氨酸以及硒多糖等。多数学者认为, 有机硒

收稿日期: 2005-05-16, 修回日期: 2005-06-27

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371060); 河南省重大科技攻关项目(0223013800)。

作者简介: 魏战勇(1975-), 男, 河南安阳籍, 讲师, 博士, 主要从事动物分子免疫学研究。

\*\* 通讯作者: 黄克和(1958-), 男, 江苏籍, 教授, 博士生导师, 从事动物临床病理与分子诊断学研究。

Corresponding author. Tel: 025-84395507; E-mail: khhuang@njau.edu.cn

与无机硒相比有许多优势,表现为毒性较小,适口性好,吸收利用率高,对环境的污染少。

猪细小病毒病是猪细小病毒(*Porcine parvovirus*, PPV)引起的猪主要繁殖障碍性疾病之一,以初产母猪流产、不孕、产死胎、畸形胎、木乃伊胎及弱胎等为特征,在猪群中检出率甚高,给养猪业带来巨大的经济损失<sup>[7]</sup>。对于本病的研究主要集中在对该病发生、流行和疫苗防制上,而在致病机理和环境因子作用方面研究较少。虽然国内外有大量文献报道猪的繁殖障碍性疾病与缺硒有密切的关系,但尚未见到硒与猪细小病毒之间关系的研究。本文的目的是探讨亚硒酸钠、硒蛋氨酸和海藻硒多糖等三种不同硒源对PPV体外复制的影响,以期对猪细小病毒病的致病机理的阐明和防治研究提供实验依据,同时为硒与病毒关系的研究积累基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

PPV7909株购自中国兽药药品监测所,分离自患有繁殖障碍的母猪组织中,已经适应PK-15细胞。PK-15细胞购自中国兽药药品监测所,细胞的培养与传代按常规方法进行<sup>[8]</sup>;胎牛血清购自Hyclone公司;RPMI 1640培养基、胰蛋白酶购自Gibco公司。 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ (分析纯)购自天津市化学试剂研究所,海藻硒多糖购自青岛鹏洋科技发展有限公司,硒蛋氨酸(DL-Selenomethionine)购自Nitrogen Acros公司,使用前分别配制成1 mmol/L贮备液,用0.22  $\mu\text{m}$ 混合纤维素酯微孔滤膜除菌。还原型谷胱甘肽(Glutathione reduced, GSH)购自AM-RESCO公司;D-甘露醇(D-Mannitol)购自BBI公司(Bio Basic Inc),使用前用Hank's分别配制成200mmol/L、500mmol/L,并过滤除菌。MTT、DM-SO购自Sigma公司,其它试剂由本实验室提供。

### 1.2 不同硒化合物对细胞生长的影响

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 、硒蛋氨酸、海藻硒多糖分别设0、2、4、8和16  $\mu\text{mol/L}$ 浓度,分别添加到细胞的分散液中,然后添加到96孔板中,0.2 mL/孔,每个处理做4孔,48 h后测定570 nm吸光值;测定前4 h在96孔培养板的每孔中加入30  $\mu\text{L}$  MTT溶液,测定时快速翻转培养板、甩去孔内培养液,每孔加入150  $\mu\text{L}$ 裂解液DMSO,室温震荡10min使结晶物溶解,然后用酶联免疫检测仪在570nm波长处测定OD值,作为细胞生长的指标。

### 1.3 不同硒化合物对病毒体外感染的影响

将试验分为三组:亚硒酸钠组、硒蛋氨酸组、海

藻硒多糖组,各组分别设0、2、4、8和16  $\mu\text{mol/L}$ 等五个浓度梯度,将各浓度药物加入到PK-15细胞的分散液中(细胞含量约 $10^5$ 个/mL,每孔1 mL);并加入100病毒蚀斑形成单位(PFU)猪细小病毒,每个处理做3个样,另设3个空白细胞对照,37  $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h,收取上清液,测定PFU。根据文献介绍的方法测定PFU<sup>[8]</sup>,方法是将含有猪细小病毒的上清液用分散后的PK-15细胞做10倍系列稀释,按 $10^5$ 个/mL细胞浓度接种于24孔培养板各孔中,每孔1 mL,置37  $^{\circ}\text{C}$ 培养。48 h后移去培养液,添加含有1%低熔点琼脂糖的RPMI 1640培养液于各孔中,1 mL/孔,添加时的温度控制在42  $^{\circ}\text{C}$ 左右,然后置37  $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,60 h后观察并记录蚀斑形成情况。

### 1.4 自由基清除剂与硒的抑制病毒作用的关系

将PK-15细胞的分散液,接种24孔培养板上,约 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔,添加各种试剂;将试验分为三组:亚硒酸钠组、硒蛋氨酸组、海藻硒多糖组,分别设0、2、4、8及16  $\mu\text{mol/L}$ 五个浓度梯度,在各浓度中分别加入还原型谷胱甘肽(终浓度为0.5 mmol/L)、D-甘露醇(终浓度20 mmol/L)、还原型谷胱甘肽+D-甘露醇、另设空白对照,然后加入100 PFU的猪细小病毒,每个处理做三个样,37  $^{\circ}\text{C}$ 培养48h后收取上清液,测定其PFU。

### 1.5 数据统计分析

使用SPSS 10.0统计软件中One-Way ANOVA对各项数据进行分析,以0.05为差异显著性评价水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同硒化合物对细胞生长的影响

由表1可知,4  $\mu\text{mol/L}$ 的亚硒酸钠处理细胞的OD明显高于其它浓度的OD,说明4  $\mu\text{mol/L}$ 不但不会影响PK-15细胞的生长,而且有一定的促进作用;2  $\mu\text{mol/L}$ 、8  $\mu\text{mol/L}$ 时的OD值与0  $\mu\text{mol/L}$ 的OD值差异不显著,说明2  $\mu\text{mol/L}$ 、8  $\mu\text{mol/L}$ 不影响PK-15细胞的生长;当亚硒酸钠的浓度升高到16  $\mu\text{mol/L}$ 时,OD值明显下降,可影响细胞的生长。硒蛋氨酸在0、2、4、8  $\mu\text{mol/L}$ 时的OD值差异不显著,说明在8  $\mu\text{mol/L}$ 时不影响PK-15细胞的生长,只有在16  $\mu\text{mol/L}$ 时才引起OD值显著下降,对细胞的生长产生影响。海藻硒多糖在本试验中的任何浓度,对PK-15细胞的OD值均无显著影响,说明对细胞没有毒性。

### 2.2 不同硒化合物对病毒体外感染的影响

将PFU的测定结果取其均值绘图,结果见图1。

表1 不同硒化合物对细胞生长的影响( $OD_{570}$ )

Table 1 Effect of different selenium sources on PK-15 cells growth

Group	Sodium selenite	Selenomethionine	Kappa-selenocarrageenan
0 $\mu\text{mol/L}$	1.302 $\pm$ 0.139 <sup>a</sup>	1.302 $\pm$ 0.139	1.302 $\pm$ 0.139
2 $\mu\text{mol/L}$	1.389 $\pm$ 0.219 <sup>a</sup>	1.333 $\pm$ 0.156	1.148 $\pm$ 0.102
4 $\mu\text{mol/L}$	1.906 $\pm$ 0.409 <sup>b</sup>	1.321 $\pm$ 0.421	1.004 $\pm$ 0.253
8 $\mu\text{mol/L}$	1.098 $\pm$ 0.195 <sup>a</sup>	1.265 $\pm$ 0.341	1.032 $\pm$ 0.078
16 $\mu\text{mol/L}$	0.686 $\pm$ 0.103	0.861 $\pm$ 0.159 <sup>a</sup>	0.951 $\pm$ 0.101

Note: Data with the different superscripts within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

由图1可知:亚硒酸钠、硒蛋氨酸和海藻硒多糖对猪细小病毒的增殖均有不同程度的抑制作用,并随着浓度的增高其抑制作用增强;在相同的浓度下,硒蛋氨酸对病毒增殖的抑制作用最强,其次是亚硒酸钠,海藻硒多糖最弱。

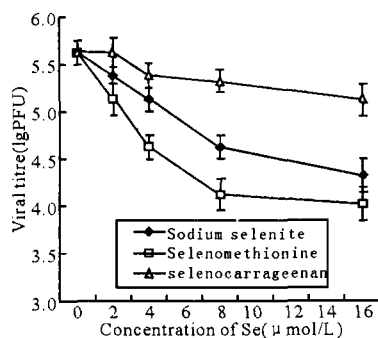


图1 不同硒源对PPV体外感染的影响

Fig. 1 Effects of different Selenium sources on PPV infection *in vitro*

### 2.3 自由基清除剂对硒抑制病毒感染的促进作用

2.3.1 自由基清除剂对亚硒酸钠抑制猪细小病毒复制作用的影响:在亚硒酸钠低浓度(2 $\mu\text{mol/L}$ )时添加0.5 mmol/L还原型谷胱甘肽(GSH),增加了对猪细小病毒复制的抑制作用,而在较高浓度(4 $\mu\text{mol/L}$ )和高浓度(8、16 $\mu\text{mol/L}$ )时还原型谷胱甘肽抑制作用不明显;添加甘露醇(D-Mannitol)不增强或者不明显增强硒抑制病毒复制作用,但其对增强亚硒酸钠抑制病毒复制作用更弱。同时添加谷胱甘肽和甘露醇时,比单独添加任何一种时对猪细小病毒复制的抑制作用均强(图2)。

2.3.2 自由基清除剂对硒蛋氨酸抑制猪细小病毒复制作用的影响:在低浓度硒蛋氨酸(2和4 $\mu\text{mol/L}$ )时,添加还原型谷胱甘肽、甘露醇或两者同时添加,均能不同程度地增强硒蛋氨酸对猪细小病毒复

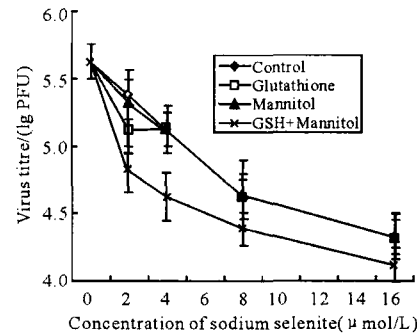


图2 自由基清除剂对亚硒酸钠抑制猪细小病毒复制作用的影响

Fig. 2 Effect of free radical scavenger on antiviral effects of sodium selenite *in vitro*

制的抑制作用;但在高浓度时对硒蛋氨酸抑制猪细小病毒的复制作用没有影响(图3)。

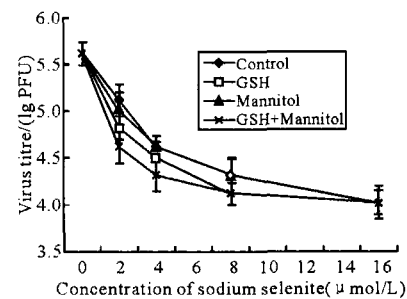


图3 自由基清除剂对硒蛋氨酸抑制猪细小病毒复制作用的影响

Fig. 3 Effect of free radical scavenger on antiviral effects of Selenomethionine *in vitro*

2.3.3 自由基清除剂对海藻硒多糖抑制猪细小病毒复制作用的影响:在各浓度的海藻硒多糖时,添加甘露醇、还原型谷胱甘肽或两者同时添加,均能够提高海藻硒多糖对猪细小病毒复制的抑制作用,其中两者同时添加时其抑制病毒复制作用最强,还原型谷胱甘肽次之,而甘露醇的抑制病毒复制作用最弱(图4)。

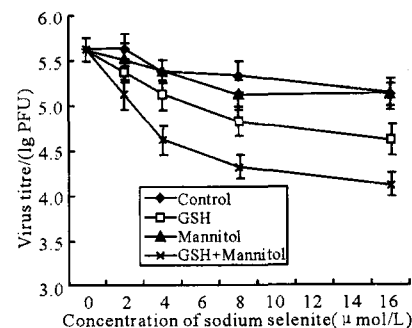


图4 自由基清除剂对海藻硒多糖抑制猪细小病毒复制作用的影响

Fig. 4 Effect of free radical scavenger on antiviral effects of Kappa-selenocarrageenan *in vitro*

### 3 讨论

硒目前被认为是具有重大生物学意义的微量元素,近来硒的抑制病毒复制作用也开始引起科学界的关注,如硒对人类免疫缺陷病病毒、传染性法氏囊病病毒、柯萨奇病毒、肝炎病毒、流感病毒等都有抵抗作用<sup>[3,9-12]</sup>。本试验首次证实,硒对PPV复制有抑制作用。

为了探讨硒抑制病毒的复制作用是否由于影响细胞的生长所引起,我们研究了不同硒化合物对细胞生长的影响。通过MTT法测定不同硒化合物对细胞生长的影响结果可知,亚硒酸钠在浓度 $\leq 8 \mu\text{mol/L}$ 时,对细胞不产生毒性作用,特别时在使用 $4 \mu\text{mol/L}$ 时,能够明显提高细胞的OD值,促进细胞的生长;在使用 $16 \mu\text{mol/L}$ 时细胞的OD值明显下降,对细胞产生毒性作用,这与Huang等报道的在使用亚硒酸钠 $12 \mu\text{mol/L}$ 时会对牛输卵管上皮细胞产生毒性作用相近<sup>[13]</sup>。硒蛋氨酸高浓度( $16 \mu\text{mol/L}$ )时,对细胞的生长呈现一定的抑制作用,而其它的浓度均无影响或影响不明显;海藻硒多糖在任何浓度时,对细胞都不产生毒性作用。这一结果表明,有机硒对细胞的毒性显著低于无机硒。

PPV在细胞上引起的细胞病变不明显,或者说病变比较缓慢。Mengeling(1984)介绍在刚分细胞时或者不等细胞长成单层时接种病毒,引起CPE较为明显<sup>[14]</sup>,本次试验在病毒感染细胞时,参照了前人的做法,采用了传细胞和接种病毒同步法,细胞在48 h时出现病变,60 h出现明显的细胞病变,取得了较好的效果。

硒化合物有多种形式,本试验比较了亚硒酸钠、硒蛋氨酸以及海藻硒多糖对PPV复制的抑制作用。硒蛋氨酸抑制病毒的复制作用最强,随着浓度的增加其抑制作用逐渐增强。亚硒酸钠也有显著的抑制病毒复制作用,且随着浓度的升高而加强,但由于高浓度的亚硒酸钠对细胞的毒性作用比硒蛋氨酸要强,因此亚硒酸钠的抑制病毒作用至少有部分原因是由于影响细胞的生长所引起的。Mahan等比较了用硒酵母(富含硒蛋氨酸)和亚硒酸钠配制的饲料饲喂缺硒成年猪,结果发现硒酵母的生物利用度明显高于亚硒酸钠,这可能是有机硒源更有利于机体吸收直接用于合成谷胱甘肽过氧化物酶的缘故<sup>[15]</sup>,本试验从体外证明了Mahan等的报道结果。海藻硒多糖是从海藻提取的一种水溶性多糖,其分子结构是由1,3-苷键键合的 $\alpha\text{-D}$ -吡喃半乳糖残基交替连接而成的线性硫酸酯多糖。对于其研究多集中在

抗癌、心血管疾病以及抗衰老等方面,而对于抑制病毒复制作用方面报道较少<sup>[16]</sup>。本试验证实,海藻硒多糖对PPV复制也有一定的抑制作用,但其效果不如硒蛋氨酸和亚硒酸钠显著,可能是由于不同硒化合物的含硒形式和结构不同而造成的,对于海藻硒多糖抑制病毒所需的有效浓度,有待于进一步的研究。

还原型谷胱甘肽、甘露醇作为自由基清除剂能够清除体内或细胞的氧自由基,切断氧化链反应,从而抑制脂质过氧化作用,使机体或细胞免遭氧化损伤<sup>[17,18]</sup>。本试验证明,还原型谷胱甘肽和甘露醇在一定条件下均有增强硒的抑制病毒复制作用,两者同时添加时,其对硒的抑制病毒复制作用提高更明显。当硒蛋氨酸和亚硒酸钠在低浓度时,还原型谷胱甘肽能够促进硒的抑制病毒复制作用,在高浓度时几乎无促进作用,但对海藻硒多糖的抑制病毒复制作用促进较为明显。这可能是由于在高浓度时亚硒酸钠、硒蛋氨酸能够产生足够强的抗氧化能力来清除氧自由基,而海藻硒多糖即使在高浓度时,也不能产生强的抗氧自由基能力,所以添加还原型谷胱甘肽和甘露醇能够较明显提高其抑制病毒复制的能力。同时也更进一步的证实了硒抑制病毒复制主要是通过清除自由基的损伤来抵抗病毒的复制。本试验研究结果,为进一步研究硒的生物学作用和为猪细小病毒致病机理的研究和防治提供了一定的实验和理论基础。

### 参考文献

- [1] Rayman M P. The importance of selenium to human health [J]. *Lancet*, 2000, 356: 233-241.
- [2] Webber M M, Perez-Ripoll E A, James G T. Inhibitory effects of selenium on the growth of DU-145 human prostate carcinoma cells *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 130(2): 603-609.
- [3] Levander O A, Beck M A. Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1997, 56(1): 5-21.
- [4] Ramanatham C S, Taylor E W. Computational genomic analysis of hemorrhagic fever viruses. Viral selenoproteins as a potential factor in pathogenesis [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1997, 56(1): 93-106.
- [5] Taylor E M, Nadimpalli R G, Ramanathan C S. Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1997, 56(1): 63-91.
- [6] Beck M A. Antioxidants and viral infections: host immune response and viral pathogenicity [J]. *J Am Coll Nutr*, 2001, 20(5): 384S-388S.

- [7] Leman A D, Straw B, Galock R D. Diseases of Swine [M] (Sixth Edition), Iowa State University Press, 1986, 411-424.
- [8] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京:科学出版社, 1997, 204-246.
- [9] 黄振武, 夏奔明, 金奇, 等. 低硒与柯萨奇病毒 B3/0 毒性突变[J]. 营养学报, 2002, 24(2):171-175.
- [10] Look M P, Rockstroh J K, Rao G S, et al. Serum selenium, plasma glutathione (GSH) and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px)-levels in asymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infection [J]. Europ J Clin Nutr, 1997, 51: 266-272.
- [11] Baum M K, Miguez-Burbano M J, Campa A, et al. Selenium and interleukins in persons infected with human immunodeficiency virus type 1 [J]. J Infect Dis, 2000, 182: S69-73.
- [12] Yu S Y, Zhu Y J, Li W G. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong [J]. Biol Trace Elem Res, 1997, 56: 117-124.
- [13] Huang K H, Yang S G. Inhibitory effect of selenium on *Cryptosporidium parvum* infection *in vitro* and *in vivo* [J]. Biol Trace Elem Res, 2002, 90: 261-272.
- [14] Mengeling W L, Pejsak Z, Paul P S. Biological assay of attenuated strain NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus [J]. Am J Vet Res, 1984, 45(11):2403-2407.
- [15] Mahan D C, Cline T R, Richert B. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality [J]. J Anim Sci, 1999; 77(8):2172-2179.
- [16] 魏虎来, 贾正平, 赵怀顺, 等. T-AK 细胞和 IL-2 脂质体联合硒酸酯多糖抗白血病效应的研究[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1999, 18(5): 410-413.
- [17] Yu S Y, Zhu Y J, Li W G. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong [J]. Biol Trace Elem Res, 1997, 56: 117-124.
- [18] 赵乃坤, 郑辉, 刘秀敏, 等. 硒酸酯多糖和复方硒酸酯多糖对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 肿瘤, 1996, 16(3): 432-434.