

孕哺期补硒对仔鼠海马硒蛋白 mRNA 表达的影响

杨永存^{1*}, 何建凡¹, 刘建军¹, 吕子全¹, 陈依玲²

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055; 2. 桂林医学院生物技术学院, 桂林 541004)

摘 要: **目的** 探讨孕期和哺乳期补硒对仔鼠海马硒蛋白 mRNA 表达的影响。**方法** 从孕 1 d 开始给予母鼠含亚硒酸钠的饮水补硒, 低、中、高 3 个剂量组饮水中亚硒酸钠的浓度分别为 400、1600、6400 $\mu\text{g/L}$, 自由饮用。补硒持续至仔鼠出生后 21 d。采用 RT-PCR 测定仔鼠海马中 25 种硒蛋白 mRNA 的表达。**结果** 仔鼠海马中 25 种硒蛋白 mRNA 均有不同程度的表达, 其中 SelW、SelP、GPX4、SelK15、SelK、SelM、SelT 和 GPX1 的表达量明显优于其他硒蛋白, Dio1 表达量最低; 母鼠孕哺期补硒后, 有 15 个硒蛋白基因表达量发生了不同程度的变化, 高剂量组改变尤为显著; Sel15、SPS2、SelW 和 Txnrd2 的表达相对稳定, 不受饮食补硒的影响。

结论 孕哺期补硒能够对仔鼠海马硒蛋白的 mRNA 表达产生影响, 进而影响仔鼠神经发育。

关键词: 硒; 海马; 硒蛋白; mRNA

Effect of selenium supplementation during pregnancy and lactation on the expression of selenoprotein mRNA in hippocampus of progeny mouse

YANG Yong-Cun^{1*}, HE Jian-Fan¹, LIU Jian-Jun¹, LV Zi-Quan¹, CHEN Yi-Ling²

(1. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China; 2. Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of selenium supplementation during pregnancy and lactation on the expression of selenoprotein mRNA in hippocampus of progeny mouse. **Methods** From the first day of pregnancy, pregnancy rats were given water containing sodium selenite for free drinking. The concentration of sodium selenite in drinking water of low, medium and high dose groups were 400, 1600, 6400 $\mu\text{g/L}$, respectively. Selenium supplementation lasted 21 days after birth of offspring. The expression of selenoprotein mRNA in hippocampus of offspring was determined by RT-PCR. **Results** Total of 25 kinds of selenoprotein mRNA could be detected in the hippocampus of progeny mouse. The expression levels of SelW, SelP, GPX4, SelK15, SelK, SelM, SelT and GPX1 were significantly higher than other selenoproteins, and which of Dio1 was the lowest. After selenium supplementation during pregnancy and lactation, the expression of 15 selenoprotein genes changed to different degrees, especially in the high-dose group. The expression levels of Sel15, SPS2, SelW and Txnrd2 were relatively stable and not were affected by dietary supplementation. **Conclusion** Selenium supplementation during pregnancy and lactation can affect the expression of selenoprotein mRNA in hippocampus of progeny mouse, and then influence its neurodevelopment.

KEY WORDS: selenium; hippocampus; selenoprotein; mRNA

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2018451)

Fund: Supported by Guangdong Medical Science and Technology Research Fund Project (A2018451)

*通讯作者: 杨永存, 副主任技师, 主要研究方向为营养与食品安全及相关疾病的预防。E-mail: lilac_zdx@126.com

*Corresponding author: YANG Yong-Cun, Associate Chief Technician, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518055, China. E-mail: lilac_zdx@126.com

1 引言

硒是人体必需的微量元素之一,具有拮抗重金属毒性、提高人体免疫力、维持甲状腺功能、保护心血管系统等作用。硒对脑组织的发育至关重要,已有研究表明,硒能够促进神经系统发育、防止阿尔茨海默病、帕金森综合症以及癫痫等神经系统疾病的作用^[1]。

硒在人体发挥生理作用主要通过硒蛋白来实现。目前在人体内共发现 25 种硒蛋白,通过对转录组的研究发现,脑组织中的神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞均表达多种硒蛋白,尤其在海马、嗅区和皮质中硒蛋白含量最为丰富。这些硒蛋白在中枢神经系统中具有抗氧化的功能,硒蛋白基因的敲除,将导致脑组织抗氧化能力降低、生长缺陷、协调运动、认知功能障碍以及焦虑和抑郁^[1-4]。

大脑具有优先摄取硒元素的优势,研究表明,当饮食中硒含量较低时,机体将优先满足大脑对硒的需要,脑中硒含量相对保持稳定^[1,5]。硒蛋白表达受到多种因素的影响。目前硒蛋白的研究仅有 20 年的历史,各种硒蛋白在促进神经系统发育方面的作用及其机制目前尚不明确。饮食补硒是否影响大脑中硒蛋白的表达以及将会带来何种后续的生理效应将是一个长远的研究课题。本研究旨在通过孕哺期对母鼠进行饮食补硒观察仔鼠海马硒蛋白 mRNA 表达的变化,以期为后续研究硒蛋白在促进神经发育方面的作用及其机制提供基础数据。

2 材料与方法

2.1 实验动物

KM 小鼠购于广东省医学实验动物中心,28~35 d 龄,雌性 24 只,雄性 8 只。在本中心动物房饲养,温度 22~24 °C,湿度 60%~70%,自然昼夜节律光照,自由获得食物和饮水。

2.2 主要试剂和仪器

亚硒酸钠(Na_2SeO_3 , 货号 S5261-25g, 美国 Sigma 公司); Trizol 试剂盒(美国 Ambion 公司); PrimeScriptTM RT reagent KIT、SYBR[®] Premix Ex TaqTM(日本 TAKARA 公司); 引物探针由上海生物工程有限公司合成; Gradient96 梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司); ABI7500 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 实验动物分组

KM 小鼠维持饲料和正常饮水饲养至 70 d 龄开始按照雄:雌=1:3 的比例进行合笼。将 24 只孕鼠分为 4 组,每组 6 只,分别为对照组、低剂量硒干预组、中剂量硒干预组和高剂量硒干预组。从受孕第 1 d 起,对照组继续给予维持饲料和正常饮水,硒干预组在正常饮水中加入亚硒酸钠,低、中、

高 3 个剂量组的亚硒酸钠剂量分别为 400、1600、6400 $\mu\text{g/L}$,自由饮用。至仔鼠出生 21 d,每组按照每窝 1 只随机选取 6 只仔鼠,雌雄各半,取海马进行后续检测。

2.3.2 硒蛋白 mRNA 表达的检测

采用 Trizol 提取海马中总 mRNA,按照反转录试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA 第一链。采用荧光定量 PCR 进行扩增,按照荧光 PCR 扩增试剂盒(TAKARA, 货号 DRR039A)说明书操作,扩增的引物序列参考 Zhang 等^[6]的研究;扩增的反应体系总体积为 20 μL ,其中引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$,模板量为 5 μL ;扩增条件:95 °C 预变性 30、95 °C 变性 5 s、60 °C 退火和延伸 34 s,40 个循环。

分别扩增同一样本的目的基因和看家基因($\beta\text{-actin}$),利用其 ΔCt 值进行相对定量。即每个样本目的基因的 Ct 值减去该样本看家基因的 Ct 值得到 ΔCt 值,计算 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 作为该基因 mRNA 相对于内参基因的相对表达量,以此进行 25 种硒蛋白 mRNA 表达量的横向比较;再用处理组的 ΔCt 值减去对照组的 ΔCt 均值等到 $\Delta\Delta\text{Ct}$,计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 作为该基因 mRNA 经对照组标准化后的相对表达量,统计分析和比较不同处理组同一硒蛋白基因 mRNA 的表达量。

2.3.3 数据处理

不同剂量处理组与对照组间差异比较采用成组 t 检验进行统计分析,采用 EXCEL2007 和 Graphpad Prism6 进行统计和作图。

3 结果与分析

3.1 对照组仔鼠海马硒蛋白 mRNA 的表达

对照组仔鼠海马中 25 种硒蛋白 mRNA 均有不同程度的表达,其中 SelW、SelP、GPX4、SelK15、SelK、SelM、SelT 和 GPX1 的表达量明显优于其他硒蛋白,位居前 8 位,其他硒蛋白表达相对较低,Dio1、Th、SelV、Txnrd3 和 Dio3 表达量排在最末 5 位,其中 Dio1 表达量最低,排在最末位。对照组仔鼠海马 25 种硒蛋白基因 mRNA 相对于内参基因的表达量见图 1。

3.2 孕哺期补硒后仔鼠海马硒蛋白 mRNA 表达的变化

不同剂量组各硒蛋白表达的变化见表 1。母鼠孕哺期补硒后,和对照组相比,仔鼠海马中,25 个硒蛋白基因有 15 个基因表达量发生了不同程度的变化,占比 60%;大部分硒蛋白在低剂量和中剂量组没有明显的改变,而在高剂量组则出现比较显著的变化;SelR(Msrbl)和 SelM 2 种硒蛋白表达的改变较为明显,前者的表达在低、中、高 3 个剂量组均显著升高,而后的表达则在 3 个剂量组均显著降低;SelI 和 Dio1 的表达在中、高剂量组均出现显著升高;GPx2 的表达在中剂量组出现升高而高剂量组则显著降低;大部分硒蛋白的表达在高剂量组出现显著升高,包括 GPx1、Txnrd1、SelK、SelI、SelO、SelT 和 Th 等;少部分

硒蛋白的表达在高剂量出现明显降低, 包括 GPx2 和 SelS; 上述结果经统计学检验均有显著性差异($P<0.05$)。

部分硒蛋白的表达也出现升高或降低的趋势, 但统计学检验没有显著性差异, 其中, Dio2 和 Dio3 在低、中剂

量组出现升高, 而高剂量组出现降低; Gpx3、Gpx4 和 SelH 在高剂量组略有升高的趋势; SelP 在中剂量组的表达略有升高。Sel15、SPS2、SelW 和 Txnrd2 的表达相对较为稳定, 不受饮食补硒的影响。

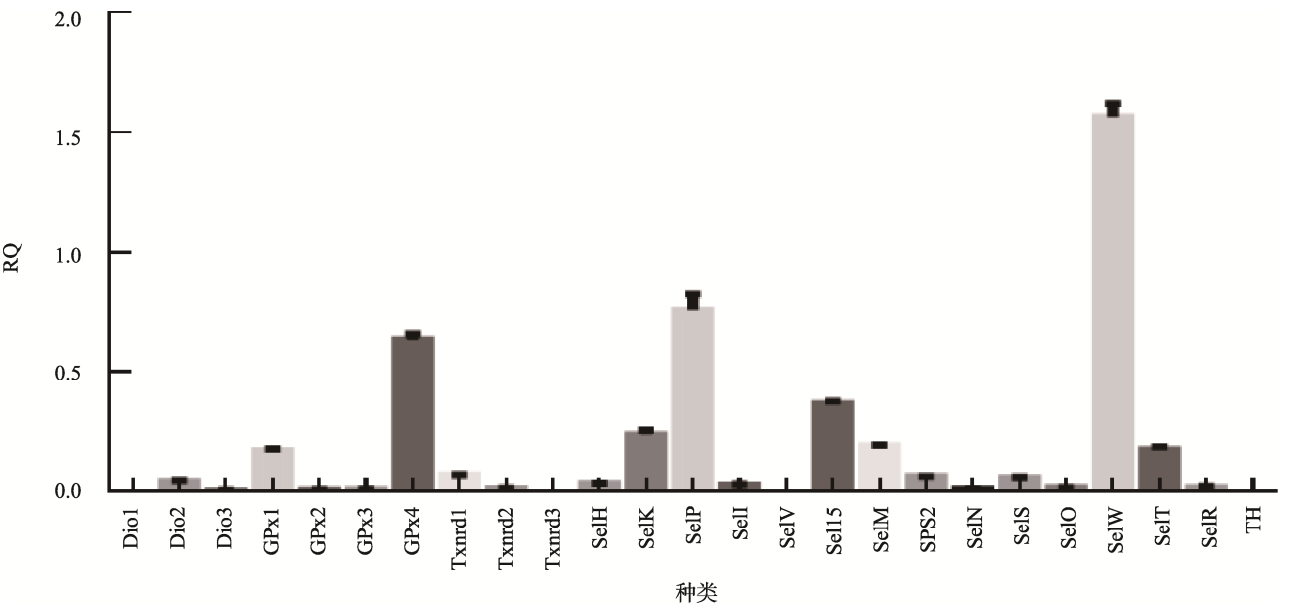


图 1 对照组仔鼠海马 25 种硒蛋白 mRNA 的表达($n=6$)

Fig.1 mRNA expression of selenoproteins in hippocampus of control progeny mouse ($n=6$)

表 1 仔鼠海马硒蛋白 mRNA 表达量

Table 1 mRNA expression of selenoproteins in hippocampus of progeny mouse

家族	硒蛋白	硒蛋白基因表达量($n=6$)			
		对照组	低剂量硒组	中剂量硒组	高剂量硒组
DIO	Dio1	1.04±0.31	1.30±0.24	2.01±0.46*	1.73±0.41*
	Dio2	1.04±0.33	1.20±0.36	1.26±0.34	1.02±0.22
	Dio3	1.19±0.69	1.56±0.74	1.59±0.44	1.38±0.30
GPx	GPx1	1.01±0.13	1.01±0.18	1.02±0.13	1.24±0.19*
	GPx2	1.01±0.13	1.17±0.33	1.31±0.27*	0.83±0.09*
	GPx3	1.06±0.34	1.05±0.72	1.29±0.30	1.22±0.24
	GPx4	1.00±0.09	0.99±0.09	1.04±0.08	1.11±0.17
Txnrd	Txnrd1	1.01±0.12	1.04±0.05	0.98±0.11	1.16±0.10*
	Txnrd2	1.01±0.12	0.91±0.09	1.00±0.17	1.02±0.12
	Txnrd3	1.01±0.12	1.15±0.14	1.12±0.24	1.28±0.27*
	SelH	1.01±0.17	1.04±0.09	1.04±0.09	1.19±0.36
	SelK	1.02±0.19	0.96±0.19	1.11±0.13	1.24±0.14*
	SelP	1.02±0.23	0.95±0.08	1.11±0.17	0.99±0.13
	SelI	1.01±0.18	1.10±0.17	1.35±0.27*	1.48±0.08*
	SelV	0.91±0.14	1.34±0.30*	1.33±0.40*	1.00±0.18
	Sel15	1.00±0.06	0.99±0.10	0.98±0.90	0.97±0.10

续表 1

家族	硒蛋白	硒蛋白基因表达量(n=6)			
		对照组	低剂量硒组	中剂量硒组	高剂量硒组
	SelM	1.00±0.04	0.91±0.05*	0.92±0.05*	0.88±0.09*
	SelD(SPS2)	1.00±0.08	0.98±0.08	0.94±0.14	0.96±0.18
	SelN	1.01±0.15	1.25±0.18*	1.12±0.13	1.09±0.20
	SelS	1.01±0.15	0.88±0.06	0.91±0.16	0.83±0.08*
	SelO	1.00±0.09	1.12±0.12	1.12±0.15	1.20±0.06*
	SelW	1.00±0.09	0.99±0.06	1.07±0.09	1.07±0.16
	SelT	1.01±0.16	1.05±0.17	1.13±0.13	1.39±0.23*
	SelR(Msrb1)	1.41±1.08	2.80±0.52*	2.64±0.53*	2.73±0.44*
	Th	1.04±0.30	1.26±0.12	1.39±0.28	1.62±0.24*

注: *表示与对照组相比, 表达量变化有统计学差异($P<0.05$)。

4 结论与讨论

世界上人体内的日硒摄入量从每日 7 μg 到每日 4990 μg 不等, 欧共体食品科学委员会推荐的成年人日硒摄入量为 55 μg, 每天 19 μg 是预防硒缺乏相关的疾病发生所需的最低摄入量, 中国营养学会推荐的日硒摄入量为 50 μg^[1]。胡滨等^[7]对亚硒酸钠的急性毒性的研究表明, 亚硒酸钠小鼠经口 LD₅₀ 为 3.86 mg/kg; 国内外也有较多关于硒抗氧化和拮抗重金属作用的实验研究, 在小鼠实验中所用到的亚硒酸钠剂量在 45~1300 μg/kg·BW 不等^[8-11]。考虑到亚硒酸钠过量的毒性效应, 根据文献资料, 本次实验将亚硒酸钠加入到动物饮水中, 假定动物体重 35 g、日饮水 7 mL, 亚硒酸钠的给药剂量初步设定为 80 μg/kg·BW、320 μg/kg·BW 和 1280 μg/kg·BW 3 个剂量。实际上, 母鼠的饮水量在整个孕期和哺乳期是在不断增长的, 在孕早期为 6~9 mL/d, 到孕中晚期和哺乳期增加至 9~13 mL/d; 孕鼠体重在孕期也是不断增长的, 从孕早期的平均 38 g 增至孕晚期平均 55 g, 由此计算得到母鼠实际上亚硒酸钠的日摄入量为: 低剂量组 68~94 μg/kg·BW、中剂量组 274~378 μg/kg·BW 和高剂量组 1097~1513 μg/kg·BW。当然, 由于本次实验采用自由饮水的给药方式, 加上母鼠饮水量和体重的不断变化, 上述剂量并不是一个非常确切的数据, 但仍然有参考价值。

DIOs 家族的主要作用是维持机体甲状腺激素代谢的动态平衡, 将甲状腺产生的 T4 脱碘转化为有生物活性的 T3^[12]。Dio1 虽然相对其余 24 中硒蛋白而言在海马中表达量最低, 然而却极易受到饮食的影响, 在中、高剂量组均出现了显著升高, 此种改变极有可能影响脑组织局部 T3 水平, 从而影响大脑发育。Dio2 和 Dio3 在 3 个剂量组表达量的改变却不具有统计学意义, 说明虽然同属脱碘酶家

族, 但不同型别在大脑中的功能有很大差异。

GPx 家族主要利用谷胱甘肽(glutathione, GSH)还原过氧化氢等活性氧(reactive oxygen species, ROS)发挥抗氧化作用, GPx1~4 依次为细胞内、胃肠道、血浆和磷脂氢过氧化物型 GPx^[3]。本次研究发现, GPx1 和 GPx4 在小鼠海马中的表达显著优于 GPx2 和 GPx3, 孕哺期母鼠高剂量补硒后, GPx1 的表达显著增加, GPx2 反而降低, 值得进一步关注; GPx3 和 GPx4 的表达略有升高, 但变化没有显著性差异; 虽然 GPx2 主要在胃肠道表达, 但是孕哺期母鼠饮食补硒能够显著影响其在仔鼠海马中的表达, 提示其在神经发育中有可能发挥重要作用。

其他的硒蛋白中, SelP 的主要功能目前比较认可的是一种转运蛋白, 影响全身硒平衡^[13]。SelP 已成为体外培养细胞必要的添加剂^[14]。本次研究发现, 仔鼠海马 SelP 的表达在中剂量组略有升高, 但这种改变没有统计学差异; SelW、SelI5、SPS2 和 Txnr2 在海马中表达的表达也十分稳定, 并且 SelW 为海马中表达量最高的硒蛋白, 总体而言, 这几种硒蛋白在海马中的表达相对比较稳定, 不受饮食摄入的影响; SelR 又称蛋氨酸 R 亚砷还原酶 B1(Msrb1, 是一种具有氧化还原活性的硒蛋白, 主要位于细胞核和细胞质中; SelM 位于内质网膜, 与内质网中的二硫键的重排相关, 研究表明, SelM 还有拮抗重金属、参与细胞内钙水平的调节等作用^[1,2]; 孕哺期母鼠补硒后, SelR 的表达出现显著升高, 而 SelM 却出现了下降的趋势。

SelT 是锚定在内质网(endoplasmic reticulum, ER)膜上的硫氧还蛋白样酶, 其主要结构在进化过程中高度保守, 是 ER 蛋白稳态, 内分泌稳态和神经保护的关键参与者, 在胚胎组织中含量丰富, 在小鼠中该基因的敲除在胚胎发生早期是致命的, 尽管其表达在大多数成人组织中受到抑制, 但在内分泌器官如垂体, 胰腺, 甲状腺和睾丸中仍然

特别丰富, 主要通过调节 ER 蛋白稳态在胰岛素和促肾上腺皮质激素的生物合成和释放中发挥关键作用。在大多数脑结构中 SeIT 表达较低或检测不到, 但其在大脑发育和功能中是必不可少的, 条件敲除该基因将引起小鼠行为及解剖学改变, 其在发育期间以及在成人内分泌器官或损伤的脑中的基本功能, 最有可能通过调节 ER 氧化还原通路来控制具有强烈代谢活动的细胞的稳态和存活^[15]。孕哺期母鼠补硒后, SeIT 的表达在中剂量组出现升高的趋势, 但没有统计学差异, 到了高剂量组则出现明显升高, 但这种升高对仔鼠大脑的发育是否具有促进作用或者对仔鼠的内分泌产生了何种影响都还不能确定。

由于硒蛋白中均含有硒代半胱氨酸(selenocysteine, Sec), 因而抗氧化损伤是它们共有的重要生物学功能。但由于硒蛋白种类繁多、生理作用广泛, 每个硒蛋白确切的生理功能尚不明确, 关于硒蛋白的功能的研究目前在起步阶段。本次研究结果表明孕哺期通过饮食补硒能够改变仔鼠海马硒蛋白的表达量, 有可能因此产生后续的生物效应, 对仔鼠的海马神经发育造成影响, 但是这种影响究竟是保护性的还是毒性的, 还有待进一步研究。由于硒对机体的作用与摄入硒的剂量密切相关, 本研究的剂量下硒对仔鼠神经生长发育的作用的研究还在进行中, 相关结论将在后续文章中论述。

参考文献

- [1] 陈长兰, 邹丰宁, 孟雪莲, 等. 硒对人体的作用机理及科学补硒方法[J]. 辽宁大学学报, 2016, 43(2): 155-168.
Chen CL, Huan FN, Meng XL, *et al.* The effects of selenium on human health and diseases and the scientifically supplementation of selenium to human bodies [J]. J Liaoning Univ, 2016, 43(2): 155-168.
- [2] 杨玉洁, 李楠. 硒蛋白与神经退行性疾病[J]. 生物技术进展, 2017, 7(5): 511-517.
Yang YJ, Li N. Selenoproteins and neurodegenerative diseases [J]. Current Biotechnol, 2017, 7(5): 511-517.
- [3] 刘哲, 张峰, 梁建斌, 等. 硒蛋白家族及其功能的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(7): 61-63.
Liu Z, Zhang F, Liang JB, *et al.* Research progress on selenoprotein family and its function [J]. Chin J Veter Med, 2014, 50(7): 61-63.
- [4] Solovyev ND. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signaling [J]. J Inorgan Biochem, 2015, 153: 1-12.
- [5] 杨晓光, 张在香, 田园, 等. 大鼠脑中的硒蛋白[J]. 卫生研究, 1999, 28(3): 146-149.
Yang XG, Zhang ZT, Tian Y, *et al.* Selenoproteins in rat brain [J]. J Hyg

Res, 1999, 28(3): 146-149.

- [6] Zhang X, Ye YL, Zhu H, *et al.* Selenotranscriptomic analyses identify signature selenoproteins in brain regions in a mouse model of Parkinson's disease [J]. PLoS One, 2016, 11(9): 1-15.
- [7] 胡滨, 陈一资, 辜雪冬. 亚硒酸钠的急性和蓄积性试验研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(10): 1043-1046, 1080.
Hu B, Chen YZ, Gu XD. Study of the acute and accumulative toxicity of sodium selenium [J]. Mod Food Sci Technol, 2010, 26(10): 1043-1046, 1080.
- [8] Murano K, Ogino H, Okuno T, *et al.* Role of supplementary selenium on the induction of insulin resistance and oxidative stress in NSY mice fed a high fat diet [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41: 92-98.
- [9] Iqbal J, Zhang K, Jin N, *et al.* Effect of sodium selenate on hippocampal proteome of 3×Tg-AD mice exploring the antioxidant dogma of selenium against Alzheimer's disease [J]. ACS Chem Neurosci, 2018, 9(7): 1637-1651.
- [10] Cao Z, Shao B, Xu F, *et al.* Protective effect of selenium on aflatoxin B₁-induced testicular toxicity in mice [J]. Biol Trace Elem Res, 2017, 2: 233-238.
- [11] 莫俊奎, 张丽君, 周继昌, 等. 过量硒加重二硝基氯苯诱导的小鼠特异性皮炎样表现[J]. 中华皮肤科杂志, 2018, 51(7): 495-499.
Mo JL, Zhang LJ, Zhou JC, *et al.* Excessive selenium supplementation aggravates atopic dermatitis-like skin lesions induced by dinitrochlorobenzene in mice [J]. Chin J Dermatol, 2018, 51(7): 495-499.
- [12] 潘利斌, 范辉政, 蒋建东, 等. 微量元素硒的体内过程及生物学效应研究进展[J]. 药学报, 2017, 52(12): 1849-1858.
Pang LB, Fan HZ, Jiang JD, *et al.* Advance in the *in vivo* metabolism and the biological effects of selenium [J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(12): 1849-1858.
- [13] Shetty S, Marsicano JR, Copeland PR. Uptake and utilization of selenium from selenoprotein P [J]. Biol Trace Elem Res, 2018, 181(1): 54-61.
- [14] Steinbrenner H, Sies H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: Implications for disorders in the central nervous system [J]. Arch Biochem Biophys, 2013, 536: 152-157.
- [15] Anouar Y, Lihmann I, Falluel-Morel A. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection [J]. Free Radical Bio Med, 2018, 127: 145-152.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



杨永存, 副主任技师, 主要研究方向为营养与食品安全及相关疾病的预防。
E-mail: lilac_zdx@126.com