论著·实验研究

维生素 D 缺乏对子代大鼠肺形态结构及血小板源性生长因子-A 表达的影响

顾海燕　赵德育　王全

（南京医科大学附属南京儿童医院呼吸科，江苏 南京　210008）

［摘　要］ **目的**　研究孕期维生素 D（VitD）缺乏对子代大鼠肺形态发育及血小板源性生长因子-A（PDGF-A）表达的影响。**方法**　雌性 Sprague-Dawley（SD）大鼠随机分为对照组、VitD 缺乏模型组（每组 6 只）。对照组正常饲养；模型组予以避光、不含 VitD 的饲料喂养，2 周后与成熟 SD 雄性大鼠交配，每组取孕 20 d 的胎肺及生后 1 d 新生鼠肺，光镜及电镜下观察肺形态结构，RT-PCR 及 Western blot 分别检测肺组织 PDGF-A mRNA 及蛋白水平的表达。**结果**　光镜下，模型组子鼠肺泡平均表面积、平均呼吸膜周径均小于对照组（$P<0.05$），平均肺泡间隔厚度大于对照组（$P<0.05$）；电镜下，模型组子鼠的板层小体数量明显少于对照组，成熟细胞器较少见。RT-PCR 及 Western blot 结果显示模型组子鼠肺组织 PDGF-A mRNA 和蛋白表达水平均低于对照组（$P<0.05$）。**结论**　孕期 VitD 缺乏抑制孕晚期胎鼠及新生大鼠的肺形态发育。VitD 缺乏能显著抑制肺组织 PDGF-A 表达；PDGF-A 表达减低可能是 VitD 缺乏抑制大鼠肺发育的重要机制之一。　［中国当代儿科杂志，2011，13（4）：326－330］

［关　键　词］ 维生素 D；肺形态；血小板源性生长因子-A；大鼠

［中图分类号］ R－33　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1008－8830（2011）04－0326－05

Effect of maternal vitamin D deficiency on lung morphogenesis and platelet-derived growth factor-A expression in rat offspring

GU Hai-Yan, *ZHAO De-Yu*, *WANG Quan*. *Department of Respiration*, *Nanjing Children's Hospital*, *Nanjing Medical University*, *Nanjing* 210008, *China* (*Zhao D-Y*, *Email*: *zhaodeyu*98@126.*com*)

Abstract: **Objective**　To study the effect of maternal vitamin D deficiency on lung morphogenesis and platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) expression in rat offspring. **Methods**　Sprague-Dawley (SD) female rats were randomly divided into two groups: normal control and vitamin D deficiency, with 6 rats in each group. The vitamin D deficiecy group was kept away from light and fed with the forage without vitamin D. After 2 weeks, the rats were mated with normal SD male rats. The morphological changes of fetal rat lungs on day 20 of gestation and 1-day-old neonatal rat lungs were observed by light microscope and electronic microscope. The levels of PDGF-A mRNA and protein in fetal and neonatal rat lungs were measured by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and Western blot method respectively. **Results**　Under the light microscope, smaller alveolar space, smaller diameter of the respiratory membrane and thicker alveolus mesenchyma were observed in lungs of fetal and neonatal rats from the vitamin D deficiency group compared with the controls ($P<0.05$). Under the electronic microscope, fewer lamellar bodies but more glycogen deposition in intracytoplasm were observed in the lungs of fetal rats from the vitamin D deficiency group compared with the controls. There was an increased number of empty lamellar bodies in neonatal rats from the vitamin D deficiency group. The levels of PDGF-A mRNA and protein in lungs of fetal and neonatal rats from the vitamin D deficiency group were significantly lower than the controls ($P<0.05$). **Conclusions**　Maternal vitamin D deficiency during pregnancy may inhibit the development of lung morphogenesis and PDGF-A expression in late fetal and neonatal rats. The low expression of PDGF-A may be involved in the inhibitory effect of vitamin D deficiency on the lung development.

[**Chin J Contemp Pediatr**, **2011**, **13** (**4**): **326－330**]

Key words:　Vitamin D; Lung morphogenesis; Platelet-derived growth factor-A; Rats

维生素 D（Vit D）是一组脂溶性类固醇衍生物，具有广泛的生物学活性。近几十年来，尽管人们已普遍重视 Vit D 的适当补充，但 Vit D 缺乏仍为一项全球化的问题。已知 Vit D 缺乏可引起多系统疾病

［收稿日期］2010－09－27；［修回日期］2010－11－14
［基金项目］南京市卫生局医学科技发展项目（ZKM06045）；南京医科大学重点发展项目（06NMU2024）。
［作者简介］顾海燕，女，硕士，住院医师。
［通信作者］赵德育，主任医师。

的发生,严重危害了婴幼儿的健康。体外研究显示了 Vit D 对肺发育具有重要的促进作用[1-3],但有关 Vit D 缺乏对肺发育影响的在体研究目前国内外均尚未见报道。血小板源性生长因子 A(platelet-derived growth factor-A,PDGF-A)是一种重要的肺发育调控因子,其表达量与肺发育及成熟有关。本研究采用 Vit D 缺乏大鼠模型,观察 Vit D 缺乏对孕 20 d(E20 d)胚胎及新生 1 d 大鼠肺的形态发育及 PDGF-A 表达的影响,从而探讨 Vit D 缺乏对肺发育的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Sprague-Dawley(SD) 大鼠购自上海斯莱克动物中心,不含 Vit D 饲料及正常饲料均购自青龙山动物饲料中心。RT-PCR 试剂:Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,dNTP、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂及 Taq 酶购自 Fermentas (MBI)公司,引物由上海英骏生物技术有限公司合成。Western blot 试剂:小鼠抗大鼠 PDGF-A 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司;兔抗大鼠 β-actin 及 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 均购自 Bipec 公司,ESL 发光试剂盒由美国 Pierce 公司提供。

1.2 动物模型的建立

健康清洁级 SD 未经产的成年雌性大鼠 12 只,体重 200 ~ 250 g,随机分为对照组及 Vit D 缺乏模型组,每组 6 只。模型制作参照王华等[4]方法。所有雌鼠先于普通塑料笼内单笼喂养,模型组需避光,以不含 Vit D 的饲料喂养;对照组以正常饲料喂养。两组皆自由进水,不同饲料喂养 2 周。用高效液相色谱法(HPLC)检测两组大鼠血清 25-OH D_3 水平。验证 Vit D 缺乏模型制备成功后,雌鼠与正常 SD 成年雄鼠置于交配笼中 1∶1合笼,观察到阴栓的当日记为 E0.5 d。后转入普通饲养笼中饲养,每组继前不同方式喂养。

1.3 病理切片制作及光镜观察

每组于 E20 d 随机取 3 只孕鼠,引颈处死后立即剖腹取胎鼠,每只孕鼠取 6 只胎鼠,暴露胸腔并取胎肺;其余 3 只孕鼠自然分娩后每只各取 6 只新生鼠肺组织,新鲜肺组织以 4% 多聚甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,切片厚度 4 μm,梯度酒精脱蜡至水,伊红-苏木精染色,光镜观察肺泡形态发育。每张切片各选取 3 个视野,每视野随机选取 6 个肺泡,采用捷达 801 形态分析软件测量每个肺泡等效表面积、呼吸膜周径和肺泡间隔厚度。

1.4 电镜切片制作及观察

新鲜肺组织剪成 1 mm^3 大小,3% 戊二醛固定,PBS 漂洗,1% 锇酸后固定,丙酮梯度脱水,醋酸铀块染过夜,包埋后超薄切片,双铅染色,透射电镜下观察肺超微结构变化,并摄片。

1.5 RT-PCR 法检测 PDGF-A mRNA 表达

每例取肺组织 100 mg,Trizol 一步法抽提总 RNA,逆转录后取 1 μL 进行 PCR,PCR 体系为 20 μL。其中 PDGF-A 基因正义链引物序列:5′-CAGGACGGTCATTTACGAG-3′,反义链引物序列:5′-TGGTCTGGGTTCAGGTTC-3′,产物长度 270 bp,退火温度 58℃,28 个循环;GAPDH 正义链序列:5′-CAAGTTCAACGGCACAGTCAA-3′,反义链序列:5′-TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC-3′, 产物长度 149 bp,退火温度 60℃,28 个循环。取 5 μL PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,以 UVP 凝胶密度扫描仪对基因特异性扩增产物的电泳条带进行灰度扫描,用 Labwork 3.0 软件分析电泳条带吸光度(A)值,结果以 PDGF-A/GAPDH 的吸光值之比进行半定量分析。

1.6 Western blot 检测 PDGF-A 蛋白表达

每例取 150 mg 左右肺组织,加冰裂解液 1 mL(购自凯基生物公司,按 1∶1000 加入蛋白酶抑制剂)匀浆,冰上裂解 30 ~ 45 min,12000 r/min 15 min 离心后取上清,比色法(Bradford 法)测蛋白浓度。按 1∶4 加入 5 × 上样缓冲液,100℃ 煮沸 10 min 变性,取 60 μg 上 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(10%) 电泳,100 V 恒压转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗(PDGF-A,1∶200;β-actin,1∶500)4℃ 孵育过夜,1 × PBST 漂洗 4 次,每次 10 min。HRP 标记的二抗(1∶5000 稀释)室温孵育 1 h,1 × PBS 漂洗 4 次,每次 10 min。用 ECL 液显示蛋白条带。显色终止后在 Quantity One 软件下对阳性条带进行吸光度积分扫描,结果以目的条带/内参灰度值比进行分析。

1.7 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数的比较采用 t 或 t' 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组孕鼠血清 25-OH D_3 水平

实验开始前，模型组大鼠血清 25-OH D_3 水平为 65 ± 9 ng/mL，对照组为 57 ± 10 ng/mL，两组之间差异无统计学意义（$P > 0.05$）；实验 2 周后，模型组血清 25-OH D_3 水平为 39 ± 6 ng/mL，对照组为 66 ± 11 ng/mL，模型组低于对照组（$t = 5.45$，$P < 0.05$），提示 Vit D 缺乏大鼠模型建立成功。

2.2 光镜观察肺组织

与同龄正常对照组相比，模型组孕 20 d 胎鼠及初生 1 d 新生鼠肺组织肺泡腔较小，肺泡周围结缔组织多，间隔较厚，且孕 20 d 胎鼠肺组织可见假腺体化结构，见图 1。

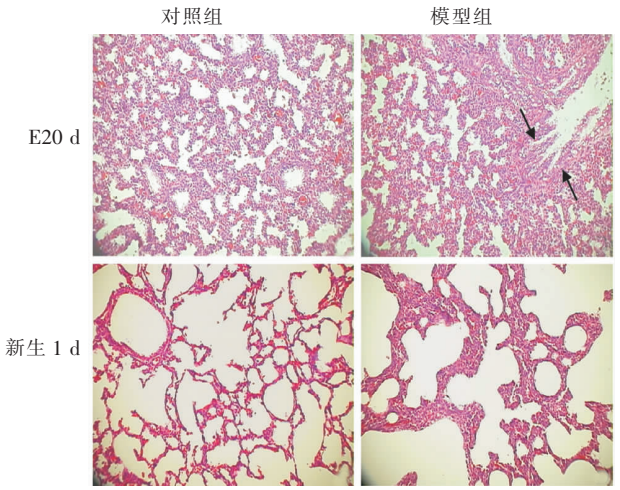

图 1 光镜下各组子鼠肺组织（苏木精-伊红染色，×200）对照组 E20 d 胎肺肺泡结构较规则，肺泡腔大小较均匀；模型组 E20 d 可见假腺体化现象（箭头所示）；对照组生后 1 d 原始肺泡数多，肺泡腔大，周围结缔组织薄；模型组生后 1 d 每视野肺泡数较少，结构不规则，周围结缔组织厚。

E20 d 模型组胎鼠肺泡平均表面积、平均呼吸膜周径均小于同龄对照组（$t = 17.39$，16.64；$P < 0.05$），平均肺泡间隔厚度大于对照组（$t = 3.07$，$P < 0.05$）；生后 1 d 模型组新生鼠肺泡平均表面积、平均呼吸膜周径小于对照组（$t = 15.77$，4.60；$P < 0.05$），平均肺泡间隔厚度大于对照组（$t = 4.51$，$P < 0.05$）。见表 1。

表 1 各组肺形态学比较 （$\bar{x} \pm s$）

组别	n	肺泡面积（μm^2）	呼吸膜周径（μm）	肺泡间隔（μm）
E20 d 胚胎对照组	18	185 ± 20	63 ± 4	8.2 ± 0.6
E20 d 胚胎模型组	18	137 ± 11[a]	50 ± 7[a]	9.4 ± 0.7[a]
新生 1 d 对照组	18	392 ± 33	85 ± 4	4.8 ± 0.8
新生 1 d 模型组	18	309 ± 39[a]	70 ± 6[a]	6.8 ± 1.0[a]

a：与同龄对照组相比，$P < 0.05$

2.3 透射电镜观察肺组织

对照组 E20 d 胎肺的 II 型肺泡上皮细胞含有较多板层小体，板层小体染色深，结构清晰、致密，胞质内可见内质网、线粒体等发达细胞器，少量糖原沉积；模型组胎肺含有板层小体的 II 型肺泡上皮数目较对照组少，单个 II 型肺泡上皮细胞胞质内的板层小体数目明显少于对照组，板层小体结构疏松，染色浅，胞质内糖原沉积丰富，细胞器难见。正常对照组生后 1 d 的大鼠肺组织 II 型肺泡上皮板层小体多且结构致密，胞质内发达细胞器多见，可见少量扁平结构的 I 型肺泡上皮细胞；模型组板层小体结构疏松，部分板层小体有排空明显而致空泡化，胞质内细胞器少，见图 2。

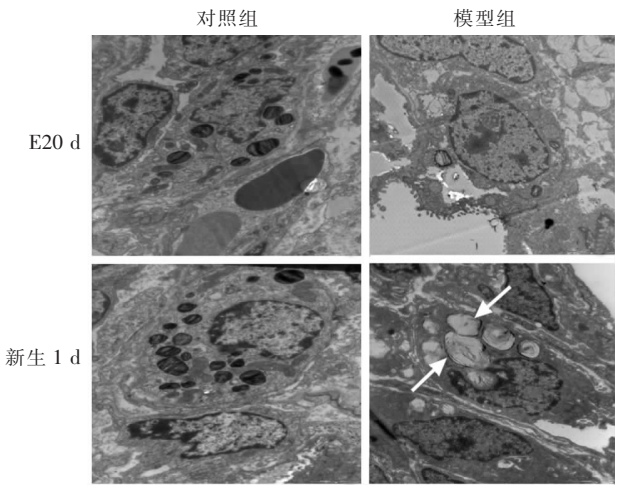

图 2 肺组织电镜结果（透射电镜，×12000） 对照组 E20 d 胎肺可见线粒体等发达细胞器；模型组 E20 d 板层小体少，结构疏松，细胞器难见，胞质内糖原沉积丰富；对照组生后 1 d 可见扁平结构的 I 型肺泡上皮细胞；模型组生后 1 d 板层小体排空明显致空泡化（箭头所示）。

2.4 RT-PCR 检测 PDGF-A mRNA 的表达

模型组 E20 d 的胚胎以及新生 1 d 鼠肺的 PDGF-A mRNA 的表达明显弱于对照组（$t = 4.94$，8.54；$P < 0.05$），见图 3 和表 2 。

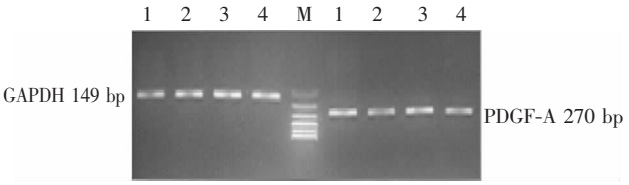

图 3　肺组织 PDGF-A mRNA 的表达　1:E20 d 对照组;2:E20 d 模型组;3:新生 1 d 对照组;4:新生 1 d 模型组;M:Marker

表 2　各组大鼠肺组织 PDGF-A 表达　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mRNA 相对吸光度	蛋白相对吸光度
E20 d 胚胎对照组	18	0.969 ± 0.100	0.517 ± 0.039
E20 d 胚胎模型组	18	0.678 ± 0.017[a]	0.407 ± 0.010[a]
新生 1 d 对照组	18	0.886 ± 0.049	0.663 ± 0.034
新生 1 d 模型组	18	0.784 ± 0.163[a]	0.374 ± 0.022[a]

a:与同龄对照组相比,$P < 0.05$

2.5　Western blot 检测 PDGF-A 蛋白的表达

模型组 E20 d 胚胎以及新生 1 d 鼠肺组织 PDGF-A 的蛋白表达明显弱于对照组($t = 4.79$, 12.36; $P < 0.05$),见图 4 和表 2。

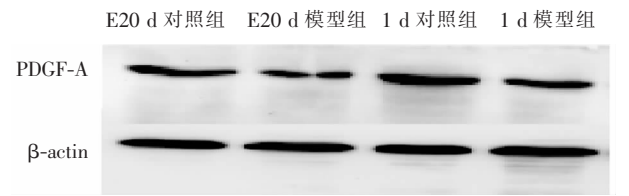

图 4　各组大鼠肺组织 PDGF-A 蛋白的表达

3　讨论

Vit D 对肺发育的促进作用已得到了普遍的认可。动物研究发现,佝偻病大鼠的肺重量较正常组减轻,且肺顺应性下降[5]。孕母体内 Vit D 含量会直接影响到胎儿体内 Vit D 的储备[6]。临床资料显示,Vit D 缺乏性佝偻病患儿常伴随肺发育障碍所引起的呼吸系统疾病如呼吸窘迫综合征等的发生,提示了 Vit D 缺乏可影响肺发育进程[7]。

人类肺发育通常分为 5 期,即胚芽期、腺体期、小管期、球囊期、肺泡期,大鼠的肺发育也似人类上述 5 个阶段的肺发育过程,但有时间上的差别:21 ~ 22 d 足月出生时肺发育相当于人类的孕 28 ~ 32 周胎儿肺,即球囊期及原始肺泡期;生后第 4 天开始肺泡化,约在第 2 ~ 3 周时完成[8]。本研究选取 E20 d 及生后 1 d 两个时间点,从形态学角度观察 Vit D 缺乏对孕晚期胎鼠及新生大鼠肺的原始肺泡化进程的影响。

本研究发现,与正常对照组相比,Vit D 缺乏影响了胚胎晚期(E20 d)及初生期(生后 1 d)大鼠肺形态结构的发育,表现为原始肺泡腔面积变小,肺泡间隔变厚,有效气血屏障发育不良,这种病理改变说明 Vit D 缺乏影响了肺的原始肺泡化,从而可能影响大鼠生后正常肺通气和换气功能的建立和形成。

肺泡表面活性物质由 II 型肺泡上皮细胞合成,储存在板层小体中,再分泌至肺泡发挥作用,所以板层小体可认为是肺 II 型上皮细胞分化成熟的特征性标志;而糖原沉积量与胎肺成熟程度呈负相关[1]。本研究的电镜观察结果也证实,Vit D 缺乏抑制 E20 d 胎肺及新生 1 d 大鼠肺 II 型肺泡上皮细胞的分化和细胞器的成熟,板层小体结构发生异常改变,影响表面活性物质的释放,且模型组 E20 d 胎肺 II 型肺泡上皮胞质内糖原沉积较对照组多,这与光镜观察到的影响肺发育结果一致。Nguyen 等[9]研究发现 1,25 二羟维生素 D_3[1,25-$(OH)_2$-D_3]可使人 II 型肺上皮细胞 NCI-H441 中 1,6 二磷酸果糖(F1, 6BP)的 mRNA 表达上调,推测 F1, 6BP 的活化可能通过糖异生途径参与 1,25-$(OH)_2$-D_3 促进肺泡表面活性物质的表达,同时糖原沉积相应减少。

肺发育过程受到体内多种激素及细胞因子的影响和调控[10]。PDGF 作为一种重要的促有丝分裂的肽类调节因子和趋化剂,其在肺发育中的重要性已越来越受到关注, PDGF 分为 A,B,C,D 4 种亚型,其中 PDGF-A 表达于 II 型肺泡上皮,可促进间质细胞的增殖,为气管分支所必需,它还诱导肺毛细血管的生成,而肺毛细血管发育是肺发育的重要环节,其发育缺陷将导致气管分支和肺泡分隔受阻[11-12]。近年来研究发现,定位于 PDGF-A 基因 5′转录启动位点上游的一个 66 bp 大小的增强子(ACE66)序列包含一 Vit D 反应元件(VDRE),当 1,25-$(OH)_2$-D_3 与受体(VDR)结合形成激素-受体复合物后,可通过 VDR 上的特异性 DNA 结合顺序与 PDGF-A 基因上的 VDRE 相互作用,从而刺激 PDGF-A 基因的表达[13-14]。Nguyen 等[9]已证实大鼠胎肺 II 型肺上皮的成熟程度与肺组织 VDR 的表达量密切相关。本研究结果发现,Vit D 缺乏模型组孕 20 d 胚胎、新生鼠肺组织 PDGF-A 基因及其蛋白表达,均明显低于对照组,表明孕鼠体内 Vit D 不足可以使孕晚期胎鼠及新生鼠肺组织 PDGF-A 的表达下调,证实了 Vit D 对 PDGF-A 的调控作用,与上述报道相一致。

并由此推测,孕期 Vit D 缺乏对子代鼠肺发育的影响可能与 PDGF-A 的表达量下降有关。

综上,本研究从形态学角度及分子水平探讨了 Vit D 缺乏对肺发育的影响及可能机制,提示 Vit D 参与了肺发育进程的调控,而 PDGF-A 作为一种重要的肺发育调控因子,可能也参与了其中一个环节,从而导致下游形态学的异常,其具体机制尚待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Marin L, Dufour ME, Nguyen TM, Tordet C, Garabedian M. Maturational changes induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in type II cells from fetal rat lung explants[J]. Am J Physiol, 1993, 265(1 Pt 1): L45-L52.

[2] Rehan VK, Torday JS, Peleg S, Gennaro L, Vouros P, Padbury J, et al. 1 alpha, 25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3, a natural metabolite of 1 alpha, 25-dihydroxy vitamin D3: production and biological activity studies in pulmonary alveolar type II cells[J]. Mol Genet Metab, 2002, 76 (1): 46-56.

[3] Nguyen TM, Guillozo H, Marin L, Tordet C, Koite S, Garabedian M. Evidence for a Vitamin D paracrine system regulating maturation of developing rat lung epithelium[J]. Am J Physiol, 1996, 271(15): L392-L399.

[4] 王华,黎海芪,杨锡强. 钙、维生素 D 缺乏大鼠长骨成骨细胞的维生素 D 受体水平[J]. 中华内分泌代谢杂志,2003,19(2): 146-147.

[5] Gaultier C, Harf A, Balmain N, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Lung mechanics in rachitic rats[J]. Am Rev Respir Dis, 1984, 130(6): 1108-1110.

[6] Andiran N, Yordam N, Ozön A. Risk factors for vitamin D deficiency in breast-fed newborns and their mothers[J]. Nutrition, 2002, 18(1): 47-50.

[7] Siddiqui TS. Respiratory distress: a rare presentation of rickets [J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2006, 18(3): 67-68.

[8] Samtani MN, Pyszczynski NA, Dubois DC, Almon RR, Jusko WJ. Modeling glucocorticoid mediated fetal lung maturation: I. Temporal patterns of corticosteroids in rat pregnancy[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(1): 117-126.

[9] Nguyen M, Trubert CL, Rizk-Rabin M, Rehan VK, Besancon F, Cayre YE, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and fetal lung maturation: immunogold detection of VDR expression in pneumocytes type II cells and effect on fructose 1, 6 bisphosphatase[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 89-90(1-5):93-97.

[10] 阚清,顾筱琪,周小玉. 正常胎儿肺发育调节研究进展[J]. 实用儿科临床杂志,2006,21(20): 1428-1429.

[11] Li J, Hoyle GW. Overexpression of PDGF-A in the lung epithelium of transgenic mice produces a lethal phenotype associated with hyperplasia of mesenchymal cells[J]. Dev Biol, 2001, 239 (2): 338-349.

[12] Assaad AM, Kawut SM, Arcasoy SM, Rosenzweig EB, Wilt JS, Sonett JR, et al. Platelet-derived growth factor is increased in pulmonary capillary hemangiomatosis[J]. Chest, 2007, 131(3): 850-855.

[13] Pedigo N, Zhang H, Koszewski NJ, Kaetzel DM. A 5′-distal element mediates vitamin D-inducibility of PDGF-A gene transcription[J]. Growth Factors, 2003, 21(3-4):151-160.

[14] Pedigo NG, Zhang H, Mishra A, McCorkle JR, Ormerod AK, Kaetzel DM. Retinoic acid inducibility of the human PDGF-a gene is mediated by 5′-distal DNA motifs that overlap with basal enhancer and vitamin D response elements[J]. Gene Expr, 2007, 14 (1): 1-12.

(本文编辑:王 霞)