

孕鼠叶酸缺乏对幼鼠肺发育及其 SP-A 变化的研究

乔立兴¹ 余章斌¹ 韩树萍¹ 顾筱琪¹ 陈玉林¹ 沙莉¹ 金俊霞¹ 晏路标¹ 郭锡熔^{1,2}

(1. 南京医科大学附属南京妇幼保健院儿科, 江苏 南京 210004;
2. 南京医科大学儿科医学研究所, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的 研究孕鼠叶酸缺乏对幼鼠肺发育的影响及幼鼠 SP-A 基因表达的变化, 探讨孕鼠叶酸缺乏引起幼鼠肺发育障碍的发病机制。方法 成熟雌性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只随机分为实验组和对照组 (各 18 只), 分别喂以缺乏叶酸和添加叶酸的纯合饲料。2 周后与雄性大鼠交配, 分别于生后 1、7、14 d 留取幼鼠肺组织标本。苏木精-伊红染色观察肺组织病理改变, 免疫组化检测肺组织 SP-A 蛋白表达, 实时荧光定量 RT-PCR 技术检测 SP-A mRNA 表达。结果 与对照组比较, 实验组幼鼠肺组织结构紊乱。实验组幼鼠 SP-A 阳性的 II 型细胞免疫组化染色平均光密度从第 1 天到第 14 天逐渐减少, 与对照组第 1 天至第 14 天比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RT-PCR 检测表明实验组幼鼠 SP-A mRNA 从第 1 天到第 14 天逐渐减少, 与对照组第 1 天至第 14 天比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 孕期叶酸缺乏能影响新生大鼠肺组织 SP-A 的表达, 从而可能导致肺成熟障碍。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(7): 573-576]

[关键词] 叶酸; 肺表面活性物质相关蛋白 A; 新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)07-0573-04

Effects of maternal deficiency of folic acid during pregnancy on pulmonary development and SP-A expression in newborn rats

QIAO Li-Xing, YU Zhang-Bin, HAN Shu-Ping, GU Xiao-Qi, CHEN Yu-Lin, SHA Li, JIN Jun-Xia, YAN Lu-Biao, GUO Xi-Rong. Department of Pediatrics, Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China (Guo X-R, Email: xrguo@njmu.edu.cn)

Abstract: Objective This study examined the effects of maternal deficiency of folic acid during pregnancy on pulmonary development and protein A (SP-A) expression in newborn rats in order to explore the possible mechanism of lung developmental disorders. **Methods** Thirty-six adult Sprague-Dawley female rats were randomly assigned into two groups: control and study ($n = 18$). The study and the control groups were fed with fodder containing folic acid or not respectively. Two weeks later, the female rats in the two groups copulated with normal male rats. Newborn rats were sacrificed at 1, 7 and 14 days after birth (8 pups at each time point). Lung sections were stained with hematoxylin and eosin for histological examination. SP-A expression of protein and mRNA were determined by immunohistochemistry and real-time quantitative RT-PCR, respectively. **Results** The newborn rats from the study group showed damaged lung tissue structures. The mean optical density of type II cells with positive expression of SP-A decreased significantly from 1 to 14 days in newborn rats of the study group compared with the control newborn rats ($P < 0.05$). The real-time quantitative RT-PCR showed that the expression of lung SP-A mRNA also decreased significantly from 1 to 14 days in newborn rats of the study group compared with control newborn rats ($P < 0.05$). **Conclusions** Maternal deficiency of folic acid during pregnancy can decrease the expression of SP-A in lung tissues of newborn rats, which might lead to the disorder of lung development maturation. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (7): 573-576]

Key words: Folic acid; Surfactant protein A; Newborn rats

新生儿呼吸窘迫综合征是由于肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 缺乏导致的严重疾病, 病死率极高^[1]。肺表面活性物质相关蛋白 A (surfactant protein A, SP-A) 是由肺泡 II 型上皮细胞 (alveolar type II cell, AEC-II) 和气道 Clara 细胞合成和分泌到肺泡腔中的一种胶原糖蛋白, 为 PS 的重要组成

[收稿日期] 2010-09-21; [修回日期] 2010-12-29
[基金项目] 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2008079); 南京市医学科技发展基金重点资助项目 (ZKX08002); 南京医科大学科技发展基金重点资助项目 (08NMUZ036)。
[作者简介] 乔立兴, 男, 博士研究生, 副主任医师。
[通信作者] 郭锡熔, 教授。

部分,故检测 SP-A 可评价肺气血屏障的完整性,并且可作为反映肺泡上皮细胞发育成熟与肺损伤的标志物^[2-3]。

已知 PS 表达受多种因素如糖皮质激素、促甲状腺素释放激素等调控。近年来营养素在 PS 生成中的作用日益受到关注,国内外已有维生素 A 促进肺成熟及 PS 生成的大量研究报道^[4-5]。以往的研究主要发现作为孕期重要营养素的叶酸与神经管发育畸形密切相关,Xiao 等^[6]发现孕期叶酸缺乏可以引起胎肺实质细胞减少,影响胎肺的发育,但对于叶酸缺乏对肺发育影响的机理仍不清楚。因此,本研究通过建立叶酸缺乏的动物模型,探讨孕鼠叶酸缺乏对幼鼠肺发育的影响的可能机制,从而为叶酸在肺发育中的调节作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备

采用 Walzem 和 Clifford 首次提出的 RHAA 配方饲料喂养建立叶酸缺乏大鼠模型^[7],RHAA 配方饲料以混合氨基酸为膳食氮源,含 1% 琥珀磺胺噻唑(SS),完全断绝内外源叶酸供应^[8]。健康清洁级未经产的成年雌性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 36 只,体重 200 ~ 250 g。随机分为实验组 18 只(RHAA 饲料喂养)和对照组 18 只(补充叶酸的 RHAA 饲料喂养)。2 周后与无饮食干预的成年 SD 雄鼠置于交配笼中 1:1 合笼。观察到阴栓的当日记为孕 0.5 d,而后转入普通饲养笼中饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 标本收集与处理 将各组生后 1、7、14 d 的幼鼠(每组每时间点 8 只)以 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉后,固定在蜡盘上,快速剪开胸腔,迅速切取左肺,用冷生理盐水洗净残血,吸干水分,液氮速冻后存于 -80℃ 冰箱,用于 SP-A mRNA 表达检测。右支气管注入 4% 多聚甲醛至肺尖膨胀,取右肺,置 4% 多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋切片,连续切片,5 μm/片,用于苏木精-伊红染色和免疫组化检测。

1.2.2 病理学检查 常规制备石蜡切片(5 μm),乙醇梯度脱水,苏木精-伊红染色,光镜下观察肺组织病理变化。

1.2.3 肺组织 SP-A 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学方法。SP-A 一抗购自美国 Santacruz 公司。主要步骤如下:常规脱蜡、水化、过氧化氢去除内源性过氧化物酶、抗原修复液 37℃ 10 min 修复抗原,正常血清封闭;加一抗 37℃ 2 h 后加入生物素化

二抗 37℃ 20 min;再加入 ABC 复合物,37℃ 20 min 孵育,DAB 显色;苏木素复染、透明、封片,以胞浆染色呈棕黄色的细胞为阳性细胞。每张切片随机选取 6 个视野,采用捷达 801 病理图像分析仪测定免疫组织化学染色平均光密度。

1.2.4 实时荧光定量 RT-PCR 检测肺组织 SP-A mRNA 表达 用 Trizol 一步法提取新生鼠左肺组织总 RNA。应用实时荧光定量 RT-PCR 法(ABI Prism 7300 荧光定量 PCR 仪,美国 PE 公司)检测新生鼠左肺组织中 SP-A mRNA 的表达水平,上下游引物均由上海生物工程有限公司设计合成。SP-A 上游引物序列:5'-TGGGAAATGGAATGATAAGG-3',下游引物序列:5'-GTGGGAGATGGCGTAACTAA-3';内参照 β-actin 上游引物序列:5'-AACCCCTAAGGC-CAACAGTGAAAAG-3',下游引物序列:5'-TCATGAGGTAGTCTGTGAGGT-3'。探针 5'端标记荧光报告基团 FAM (6-Carboxy-fluorescein),3'端标记荧光淬灭基团 TAMRA (6-Carboxy-tetramethy-rhodamine)。PCR 扩增反应条件为:50℃ 2 min、95℃ 10 min 后,以 95℃ 15 s、66℃ 1 min 循环 40 次。采用参照基因的 ΔCT 法计算 SP-A mRNA 的相对表达量;SP-A mRNA 相对表达量 = 2 [CT (β-actin) - CT (SP-A)]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件分析处理,所有数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同组不同观察时间点比较采用方差分析及 *q* 检验,各时间点两组之间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型的制备

孕初期大鼠血清叶酸水平:实验组为 2.71 ± 0.12 μg/L,低于对照组(4.72 ± 0.20 μg/L),差异有统计学意义(*t* = 2.11, *P* < 0.05);孕晚期大鼠血清叶酸水平:实验组为 1.55 ± 0.14 μg/L,低于对照组(2.93 ± 0.16 μg/L),差异有统计学意义(*t* = 27.54, *P* < 0.05),提示叶酸缺乏孕鼠模型建立成功。

2.2 肺组织病理学检查

与对照组比较,实验组新生鼠肺组织结构紊乱,肺泡数量明显减少,肺间隔明显增宽,肺泡、孔腔形状较不规则,有开口,肺组织结构明显被破坏。见图 1。

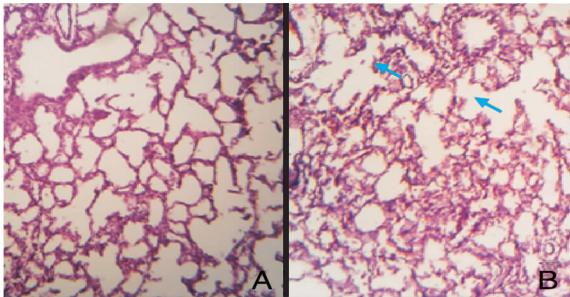


图1 两组新生大鼠肺组织苏木精-伊红染色(×200)
A:对照组幼鼠1 d; B:实验组幼鼠1 d。与对照组比较,实验组肺泡、孔腔形状较不规则,有开口,肺组织结构明显被破坏(箭头所指)。

2.3 肺组织 SP-A 免疫组织化学染色

免疫组织化学见 SP-A 表达阳性为棕黄色,主要分布在肺泡Ⅱ型细胞。在对照组幼鼠,可见多个 SP-A 强阳性的Ⅱ型细胞,部分肺泡腔表面有薄层黄

染物质。实验组幼鼠 SP-A 阳性的Ⅱ型细胞明显减少,棕色染色较淡,特异性显色区域较少。见图 2。对照组幼鼠Ⅱ型细胞 SP-A 平均光密度第 1 天(0.7431±0.0068)、第 7 天(0.7593±0.0052)到第 14 天(0.7825±0.0084)变化不大;实验组幼鼠Ⅱ型细胞 SP-A 平均光密度第 1 天(0.5077±0.0037)、第 7 天(0.4012±0.0041)、第 14 天(0.3976±0.0039)逐渐减少($F=9.62, P<0.05$);两组同时时间点的 SP-A 平均光密度比较差异有统计学意义(t 分别为 2.11, 152.96, 117.55, $P<0.05$),见图 3。生后 7 d 实验组幼鼠Ⅱ型细胞 SP-A 平均光密度与 1 d 实验组比较明显降低($P<0.05$),而在生后 14 d 实验组幼鼠Ⅱ型细胞 SP-A 平均光密度较 7 d 差异无统计学意义。

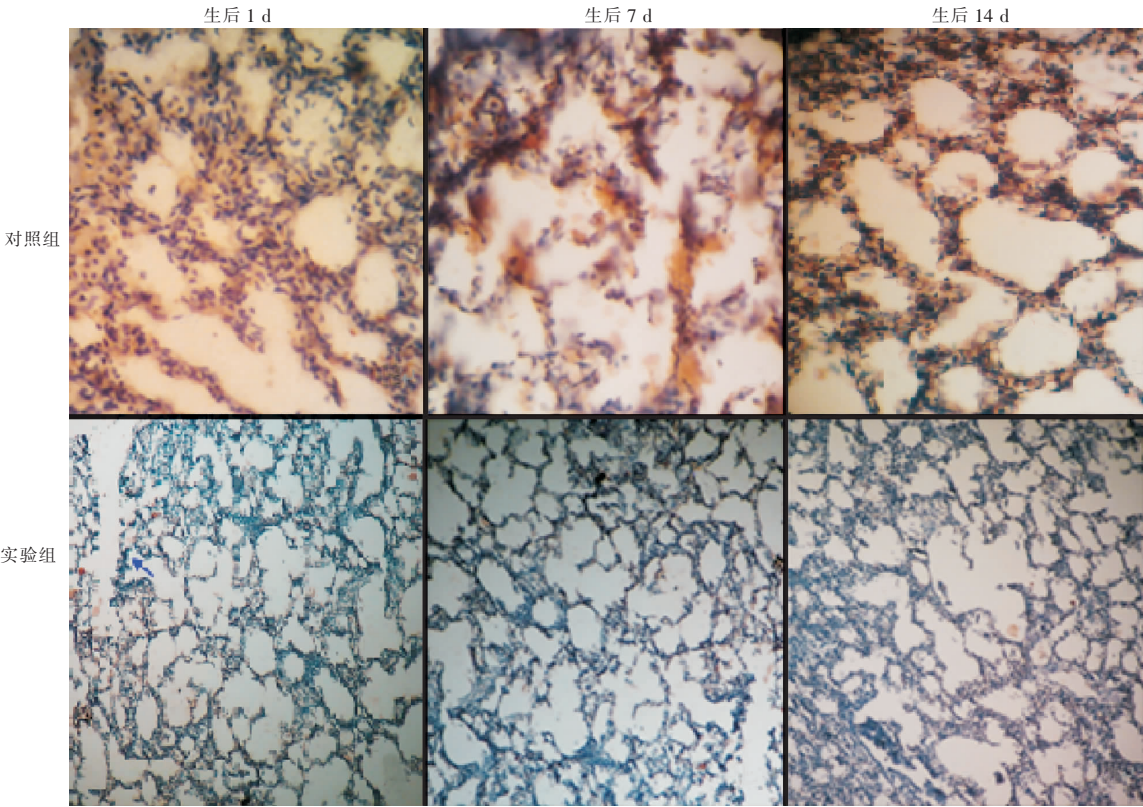
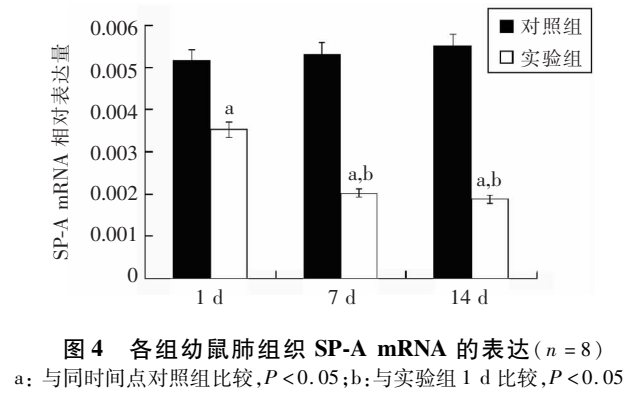
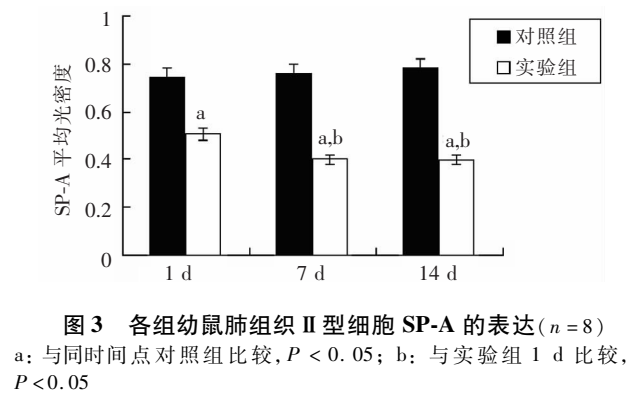


图2 两组新生大鼠肺组织 SP-A 免疫组织化学染色(×200) SP-A 表达阳性为棕黄色,分布在肺泡Ⅱ型细胞。可见实验组新生大鼠的 SP-A 表达比对照组相应时间点明显减少,棕色染色较淡。

2.4 实时荧光定量 RT-PCR 检测肺组织 SP-A mRNA 表达

实时荧光定量 RT-PCR 技术检测表明实验组幼鼠肺组织 SP-A mRNA 从第 1 天(0.003528±0.000487)、第 7 天(0.002019±0.000423)到第 14 天(0.001876±0.000326)逐渐减少($F=8.19, P<0.05$),分别与对照组第 1 天(0.005169±

0.000624)、第 7 天(0.005322±0.000798)和第 14 天(0.005514±0.000711)比较差异有统计学意义(t 分别为 5.86, 10.34, 13.16, 均 $P<0.05$);实验组幼鼠生后 7 d SP-A mRNA 表达明显低于第 1 天,而第 14 天 SP-A mRNA 表达与第 7 天的差异无统计学意义。见图 4。



3 讨论

叶酸是一种水溶性B族维生素,参与人体新陈代谢的全过程,而孕妇叶酸需求量较大,加之人体不能自身合成叶酸,因此孕期容易造成叶酸缺乏^[9]。四氢叶酸作为叶酸衍生物为人体内重要的辅酶成分,其缺乏会引起神经管发育畸形、先天性心脏病^[10-11]。本课题组前期研究发现孕鼠叶酸的缺乏影响子代心脏叶酸受体-Folbp1基因功能低下,从而可能导致心脏发育过程中形态异常,造成心脏功能缺陷^[12]。Xiao等^[6]发现孕鼠叶酸水平缺乏时,不仅可以影响子代心脏Folbp1的基因表达,而且可以影响子代胎肺Folbp1的基因表达,并导致胎肺超微结构和大体结构的改变,从而造成胎肺发育异常。本研究观察到实验组幼鼠肺组织结构紊乱,肺泡数量明显减少,肺间隔明显增宽,肺泡、孔腔形状较不规则,有开口,肺组织结构明显被破坏,表明孕期叶酸缺乏对胎儿肺发育造成一定的影响。叶酸缺乏能损伤肺实质、削弱肺泡Ⅱ型上皮细胞的功能,降低PS的磷脂和蛋白质成分,影响肺发育^[6]。早产儿肺成熟度低,PS生成少,如果孕母存在叶酸缺乏,就有可能影响胎肺成熟。

PS是由肺泡Ⅱ型上皮细胞和气道Clara细胞合成并分泌的脂蛋白复合物,其中以SP-A的含量最丰富,约占总蛋白量的50%。SP-A是一种多功能糖

蛋白,在调节PS代谢、基因表达、肺内免疫及炎症反应中起重要作用。尽管SP-A在许多动物的肺发育及肺损伤过程中的表达模式都得到证实^[2-5],但在叶酸缺乏胎肺发育中的表达模式报道较少。本研究用免疫组织化学染色和实时荧光定量RT-PCR方法对新生鼠肺SP-A表达水平的检测结果显示,实验组幼鼠的SP-A表达显著低于对照组,提示母孕期叶酸缺乏影响其胎鼠肺组织SP-A mRNA的表达,进而影响PS的生成。

本研究通过建立孕期叶酸缺乏的动物模型,发现孕期叶酸水平能影响其胎鼠肺组织SP-A的表达,进而影响PS的生成,对叶酸在肺发育中的作用提供了一定的依据。但有关叶酸缺乏孕鼠补充叶酸后对其胎鼠肺成熟度的影响即PS蛋白合成、生后肺组织中SP-A基因表达的动态变化以及PS生成的关系都是下一步研究的重点。

【参 考 文 献】

- [1] Montan S, Arulkumaran S. Neonatal respiratory distress syndrome [J]. Lancet, 2006, 367(9526):1878-1879.
- [2] 杨琳琳,封志纯. 肺表面活性物质蛋白A的提纯及其表面活性功能分析[J]. 中国当代儿科杂志,2000,4(2):260-262.
- [3] 舒林华,魏克伦,尚云晓,吴红敏,李娟,韩晓华,等. 急性肺损伤幼鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞和SP-A变化相关性的研究[J]. 中国当代儿科杂志,2008,10(4):504-508.
- [4] 房春晓,陈贻骥. 维生素A在肺表面活性物质生成中的作用[J]. 儿科药理学杂志,2007,13(2):54-56.
- [5] Singh AJ, Bronshtein V, Khashu M, Lee K, Potts JE, Friel J, et al. Vitamin A is systemically bioavailable after intratracheal administration with surfactant in an animal model of newborn respiratory distress[J]. Pediatr Res, 2010, 67(6):619-623.
- [6] Xiao S, Hansen DK, Horsley ET, Tang YS, Khan RA, Stabler SP, et al. Maternal folate deficiency results in selective upregulation of folate receptors and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-E1 associated with multiple subtle aberrations in fetal tissues [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2005, 73(1):6-28.
- [7] Walzem RL, Clifford AJ. Folate deficiency in rats fed diets containing free amino acids or intact proteins [J]. J Nutr, 1988, 118(9):1089-1096.
- [8] Schwahn BC, Laryea MD, Chen Z, Melnyk S, Pogribny I, Garrow T, et al. Betaine rescue of an animal model with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency [J]. Biochem J, 2004, 382(Pt 3):831-840.
- [9] Sherwood KL, Houghton LA, Tarasuk V, O'Connor DL. One-third of pregnant and lactating women may not be meeting their folate requirements from diet alone based on mandated levels of folic acid fortification [J]. J Nutr, 2006, 136(11):2820-2826.
- [10] Ryan-Harshman M, Aldoori W. Folic acid and prevention of neural tube defects [J]. Can Fam Physician, 2008, 54(1):36-38.
- [11] 韩树萍,彭宇竹,李静,陈吉庆,刘茹,郭锡熔,等. 叶酸缺乏对孕鼠子代心脏超微结构及心脏发育相关基因表达的影响 [J]. 实用儿科临床杂志,2007,22(10):774-776.
- [12] 刘茹,彭宇竹,李静,童华,顾筱琪,韩树萍,等. 孕鼠叶酸缺乏对子代心脏叶酸结合蛋白1基因及WNT信号转导途径的影响 [J]. 实用儿科临床杂志,2006,31(13):820-822.

(本文编辑:俞燕)