基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0728-04

孕鼠 VA 缺乏对胎肺 VA 及其受体和表面活性蛋白基因的影响

刘友红[1],陈贻骥[1],房春晓[2],瞿 平[3]
(重庆医科大学附属儿童医院 1. 新生儿科;3. 儿童营养研究中心,重庆 400014;
2. 广州市儿童医院,广州 510120)

【摘 要】目的:探讨孕鼠维生素 A(Vitamin A,VA)缺乏对胎肺 VA 及其受体和表面活性蛋白基因的影响。方法:建立孕期 VA 正常(Vitamin A normal,VAN)和亚临床缺乏(Marginal vitamin A deficiency,MVAD)动物模型各 6 只,每组再随机分为地塞米松(Dexamethasone,Dex)组和生理盐水(Normal saline,NS)组,即 VAN-Dex 组、VAN-NS 组、MVAD-Dex 组和 MVAD-NS 组。各组均于孕 16、17、18 d 肌肉注射 Dex 或 NS,于孕 19 d 剖宫取胎鼠,高效液相色谱法(High performance liquid chromatography,HPLC)检测胎鼠肺组织 VA 含量,逆转录 - 聚合酶链反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)方法检测胎鼠肺表面活性蛋白(Pulmonary surfactant,PS)和视黄酸受体(Retinoic acid receptor,RAR)mRNAs 的表达,以甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)mRNA 扩增产物为内参照,密度扫描作半定量分析。结果:(1)胎鼠肺单位组织 VA 水平:VAN-Dex 组 >VAN-NS 组,MVAD-Dex 组 >MVAD-NS 组,VAN-Dex 组 >MVAD-Dex 组,VAN-NS 组 >MVAD-NS 组,各组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。(2)SP-B 和 SP-C mRNAs 的表达水平:VAN-NS 组 >MVAD-NS 组,MVAD-Dex 组 >MVAD-NS 组,比较差异均有统计学意义($P<0.05$);VAN-Dex 组 >VAN-NS 组,VAN-Dex 组 >MVAD-Dex 组,但比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。(3)RAR-α、RAR-γ 和 RAR-β mRNAs 表达水平:VAN-Dex 组 >VAN-NS 组,MVAD-Dex 组 >MVAD-NS 组,VAN-Dex 组 <MVAD-Dex 组,VAN-NS 组 <MVAD-NS 组,3 个基因的表达水平各组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:孕期 VA 缺乏能不同程度的影响胎鼠肺单位组织 VA 水平、SP-B 和 SP-C mRNAs 以及 RAR-α、RAR-γ 和 RAR-β mRNAs 的表达;孕期 MVAD 时其胎肺成熟度较低,但不影响 Dex 促胎肺成熟作用的发挥。

【关键词】维生素 A;表面活性蛋白;视黄酸受体;胎鼠
【中国图书分类法分类号】R722.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-12

Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on the lung vitamin A status, its receptor and pulmonary surfactant of fetal rats

LIU You-hong, et al
(*Department of Neonatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of vitamin A deficiency during pregnancy on the lung vitamin A status, its receptor and pulmonary surfactant of fetal rats. *Methods*: Prenatal vitamin A normal(VAN)and marginal vitamin A deficiency(MVAD)of Sprague-Dawley rat models were employed.There were 6 in each group.Then they were randomly divided into dexamethasone(Dex)group and control group respectively.I.e VAN-Dex group, VAN-NS group, MVAD-Dex group and MVAD-NS group.From the gestational days 16 to 18, all the rats were given Dex or Saline by intramuscular injection respectively.On the gestational day 19, fetal rats were harvested by cesarean section.The vitamin A concentrations of lung were detected by high-performance liquid chromatography(HPLC), and the levels of pulmonary surfactant(PS)and retinoic acid receptor(RAR)mRNAs were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR); then the values of PS and RAR mRNAs were compared to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)mRNA. *Results*: (1)The vitamin A concentrations of lungs in VAN-NS group were higher than those of MVAD-NS group, higher in VAN-Dex group than in MVAD-Dex group, higher in MVAD-Dex group than in MVAD-NS group, and higher in VAN-Dex group than in VAN-NS group.There were significant differences among the four groups ($P<0.05$); (2)As to the levels of SP-B and SP-C mRNAs, they were higher in VAN-NS group than those in MVAD-NS group, and higher in MVAD-Dex group than in MVAD-NS group.There were significant differences between the two groups($P<0.05$). The

作者介绍:刘友红(1982-),女,硕士,
研究方向:新生儿肺发育。
通讯作者:陈贻骥,男,教授,E-mail:chenyiji55@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局科研项目(渝卫科教[2005]31-05-2-81)。

levels in VAN-Dex group were higher than those in VAN-NS group, higher in VAN-Dex group than in MVAD-Dex group, but there were no significant differences ($P>0.05$). (3) With regard to the levels of RAR mRNA, the levels of RAR-α and RAR-γ mRNAs in VAN-Dex group were higher than those in VAN-NS group, higher in MVAD-Dex group than in MVAD-NS group, lower in VAN-Dex group than in MVAD-Dex group, lower in VAN-NS group than in MVAD-NS group. The levels of RAR-β mRNA in the four groups were similar to those of the RAR-α and RAR-γ mRNAs. And There were significant differences ($P<0.05$). *Conclusion*: The vitamin A concentrations of lungs and the levels of SP-B and SP-C mRNAs, the levels of RAR mRNA, were all influenced by vitamin A deficiency during pregnancy. The fetal lungs of the MVAD's mother is immature, but the effects of Dex will not be affected.

【Key words】Vitamin A; Pulmonary surfactant; Retinoic acid receptor; Fetal rats

VA 在肺发育成熟过程中发挥重要作用[1-4]。产前补充视黄酸(Retinoic acid, RA)能促进膈疝动物的肺发育[5-7]。孕期 MVAD 并非少见,它对胎肺发育成熟的影响已受到广泛关注。本实验通过建立孕期 VAN 和 MVAD 动物模型,观察胎鼠肺单位组织 VA 水平、PS 和 RAR mRNA 表达水平的变化,探讨孕期不同 VA 水平对胎鼠肺成熟的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级成年雌性 SD 大鼠 12 只,体重 230~250 g,随机分为两组,各 6 只,分别饲以 VAN 饲料(含 VA 6500 U/kg)和 MVAD 饲料(含 VA 400U/kg),雄鼠饲以普通饲料,单独喂养。各组 SD 大鼠均用不锈钢鼠笼饲养,自由进食水,自然光照,湿度 55%~65%,室温 20℃~25℃,建立模型。饲养过程中定期检测母鼠血清 VA 水平,直至模型建立成功。模型建成后,以雌:雄 =1:1 的比例合笼,找到阴栓的次日定为孕第 1 d,孕期进食同前。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 模型建成后,每组孕鼠再随机分为 Dex 组和 NS 组,每组 3 只,即 VAN-Dex 组、VAN-NS 组、MVAD-Dex 组和 MVAD-NS 组。药物干预为:(1)Dex 组:孕鼠于孕 16 d 开始给予 Dex 0.8mg/(kg·d),用 NS 稀释至 0.5 ml 肌肉注射,每日 1 次,连续 3 d;(2)NS 组:注射 NS 0.5 ml,方法同前。

1.2.2 标本采集 于孕 19 d 用 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉孕鼠后行剖宫产,每组各取胎鼠 20 只,迅速置于冰上取出胎肺,用 NS 冲洗后称重记录,分出左肺和右肺,放入已消毒的 2 ml 冻存管并迅速投入液氮速冻,后移至 -70℃冰箱保存,用于各基因和组织 VA 的检测。

1.2.3 指标检测

1.2.3.1 胎鼠肺单位组织 VA 检测 从 -70℃冰箱中迅速取出胎肺,称重后移入 2 ml 匀浆器中,加入 200 μl 双蒸水,充分研磨至匀浆,将匀浆液移入 10 ml 塑料离心管内,并用 200 μl 双蒸水清洗匀浆器 2 次,清洗液亦转入离心管中;向组织匀浆液中加入 500 μl 饱和硫酸铵充分混匀后,再加入500 μl 无水乙醇充分混匀,最后加入 2 ml 正己烷充分混匀后 7 000 r/min 离心 5 min,小心吸取上层液体 1 ml 于 40℃水浴箱中用氮气吹干,加入 100 μl 流动相(甲醇:水 =96:4)充分复溶后,用 Waters HPLC 检测(检测波长 UV 315 nm,流速 1.4 ml/min,保留 6 min)。

1.2.3.2 RT-PCR 肺组织总 RNA 的提取按照 EZgenoTMTotal RNA Isolation 使用说明书进行,每个标本的肺组织约 50mg。RT-PCR 分别按照 Promega 公司和 TaKakRa Taq 公司的试剂盒说明书进行。引物、随机引物和内参照均由百瑞公司合成(引物序列见表 1)。产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳 30 min(电压 100 V,电流 50 mA)后,放入溴化乙锭溶液染色 15~20 min 后紫外凝胶照相,RT-PCR 方法检测胎鼠肺 PS 和 RAR mRNAs 的表达,以 GAPDH mRNA 扩增产物为内参照,密度扫描作半定量分析,结果用 Quantity One(User Guide for Version4.4)凝胶半定量分析软件分析。RT-PCR 反应体系均为 25 μl,PCR 反应条件为:预变性 94℃ 5 min,94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃延伸 5 min。

1.3 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件进行分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间用独立样本 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胎鼠肺单位组织 VA 水平

VAN-Dex 组 >VAN-NS 组,MVAD-Dex 组 >MVAD-NS 组,VAN-Dex 组 >MVAD-Dex 组,VAN-NS 组 >MVAD-NS 组,各组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。

2.2 SP-B 和 SP-C mRNAs 的表达水平

VAN-NS 组 >MVAD-NS 组,MVAD-Dex 组 >MVAD-NS 组,比较差异均有统计学意义($P<0.05$);VAN-Dex 组 >VAN-NS 组,VAN-Dex 组 >MVAD-Dex 组,但比较差异均无统计学意义($P>0.05$)(表 3、图 1 和图 2)。

2.3 RAR-α、RAR-γ 和 RAR-β mRNAs 表达水平

VAN-Dex 组 >VAN-NS 组,MVAD-Dex 组 >MVAD-NS 组,VAN-Dex 组 <MVAD-Dex 组,VAN-NS 组 <MVAD-NS 组,3 个基因的表达水平各组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)(表 3、图 1 和图 2)。

表 1 RT-PCR 方法扩增各基因以及内参照的引物序列

基因名称	引物序列	产物(bp)
GAPDH	F:5'-TGCTGGTGCTGAGTATGTCG-3' R:5'-ATTGASGAGCAATGCCAGC-3'	646
SP-B	F:5'-CTGTGCCAAGAGTGTGAGGA-3' R:5'-CAAGCAGCTTCAAGGGTAGG-3'	124
SP-C	F:5'-CACCGGATTACTCGACAGGT-3' R:5'-GCAGTAGGTTCCTGGAGCTG-3'	329
RAR α	F:5'-CAGATGCACAACGCTGGC-3' R:5'-CCGACTGTCGGCTTAGAG-3'	397
RAR β	F:5'-ATGCTGGCTTCGGTCCTC-3' R:5'-CTGCAGCAGTGGTGACTG-3'	470
RAR γ	F:5'-GTGGAGACCGAATGGACC-3' R:5'-GACAGGGATGAACACAGG-3'	521

表 2 肺单位组织 VA 水平比较(nmol/g, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	肺
VAN-NS[a]	10	0.93 ± 0.27
VAN-Dex[b]	10	1.93 ± 0.50
MVAD-NS[c]	10	0.59 ± 0.29
MVAD-Dex[d]	10	1.24 ± 0.43

注:[a] 与 [b,a] 与 [c,c] 与 [d,b] 与 [d] 比较,$P<0.05$

表 3 各组胎鼠肺 SP-B、SP-C 和 RAR-α、RAR-β 和 RAR-γ mRNAs 表达水平的比较

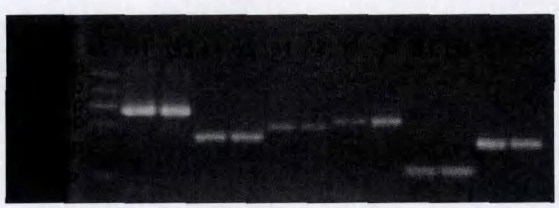
组别	n	SP-B	SP-C	*RAR α*	*RAR β*	*RAR γ*
VAN-NS	10	0.96 ± 0.13[a]	0.95 ± 0.18[a]	0.69 ± 0.13[c]	0.51 ± 0.07[c]	0.67 ± 0.11[c]
VAN-Dex	10	1.03 ± 0.17[aa]	1.06 ± 0.16[aa]	0.82 ± 0.05[cc]	0.62 ± 0.12[cc]	0.78 ± 0.06[cc]
MVAD-NS	10	0.68 ± 0.11[b]	0.76 ± 0.15[b]	0.81 ± 0.06[d]	0.63 ± 0.11[d]	0.75 ± 0.05[d]
MVAD-Dex	10	1.02 ± 0.16[bb]	0.95 ± 0.14[bb]	0.99 ± 0.22[dd]	0.79 ± 0.16[dd]	0.88 ± 0.10[dd]

注:[a] 与 [b,b] 与 [bb,c] 与 [cc,c] 与 [d,d] 与 [dd,cc] 与 [dd] 比,$P<0.05$;[a] 与 [aa,aa] 与 [bb],$P>0.05$



M.Marker;G.内参照;1.NS 组;2.Dex 组

图 1 VAN--M-G-α-β-γ-SP-B-SP-C



M.Marker;G.内参照;1.NS 组;2.Dex 组

图 2 MVAD--M-G-α-β-γ-SP-B-SP-C

3 讨 论

VA 尤其是其主要代谢产物 RA 在全身各组织器官的细胞分化中起着激素样的关键作用,它对肺发育成熟有重要作用。VA 缺乏能损伤肺实质、削弱肺泡Ⅱ型上皮细胞的功能,降低肺表面活性物质的磷脂和蛋白质成分,影响肺发育[1-3]。早产儿肺成熟度低,PS 生成少,如果孕母存在 VA 缺乏,就有可能影响胎肺成熟。

肺是 VA 的主要靶器官,其 VA 水平对肺发育有重要作用。我们通过建立孕期 VAN 和 MVAD 的 SD 大鼠模型,取孕 19 d 的胎鼠肺,检测其 VA 水平,结果显示,MVAD-NS 组显著低于 VAN-NS 组,说明母孕期 VA 水平可影响其胎鼠肺单位组织 VA 水平,孕期 MVAD 时,其胎鼠肺单位组织 VA 水平也较低。

VA 在 PS 生成中发挥重要作用,PS 生成是肺发育成熟的关键指标[1-4]。本实验用 RT-PCR 方法对胎鼠肺 SP-B 和 SP-C mRNAs 表达水平的检测结果显示,MVAD-NS 组显著低于 VAN-NS 组,提示母孕期 VA 水平不同也影响其胎鼠肺

组织 SP-B 和 SP-C mRNAs 的表达。结合胎鼠肺单位组织 VA 水平的变化，我们认为，母孕期 VA 水平能影响其胎鼠肺单位组织 VA 水平及 SP mRNAs 的表达，进而影响 PS 的生成，据此推测，当孕期 MVAD 时，胎鼠肺成熟度相对较低。

临床上常对有先兆早产的孕妇产前应用 Dex 以促进胎肺成熟，本实验对各组孕鼠均进行了产前 Dex 干预，检测其胎鼠肺 VA 水平以及 SP-B 和 SP-C mRNAs 表达水平的变化。结果这 3 个指标 MVAD-Dex 组均显著高于 MVAD-NS 组，提示孕期 MVAD 不影响 Dex 促胎肺成熟作用的发挥，即 Dex 能提高 MVAD 孕鼠其胎鼠肺单位组织 VA 水平，以及 SP-B 和 SP-C mRNAs 的表达水平。

SP-B 和 SP-C mRNAs 在 VAN-Dex 组和 MVAD-Dex 组、VAN-Dex 组和 VAN-NS 组的表达水平，各组比较均无显著差异，这可能是由于产前应用 Dex 使 MVAD 孕鼠的胎鼠肺 VA 水平升高[8]，后者又促进了这两个基因的表达，以弥补孕期 MVAD 时其表达较低的状况，促进肺成熟；而孕期 VA 水平正常的胎鼠，可能受到某种反馈机制的影响，Dex 的作用受限，提示孕期 VA 正常时，Dex 促胎肺成熟可能还存在其他调节机制。当孕期 VA 重度缺乏时，产前应用 Dex 是否仍能促进胎鼠肺组织 SP-B 和 SP-C mRNAs 的表达，还需进一步研究。

RAR 是 RA 发挥作用的相关因子。RARα 和 RARγ 在肺泡发育中发挥促进作用[9-11]，RAR-β 则是其内源性抑制剂[12,13]，三者作用平衡才能有效促进肺泡发育。本实验各组均检测到 RAR-α、RAR-γ 和 RAR-β mRNAs 的表达。与 VAN-NS 组相比，三者在 MVAD-NS 组的表达均显著升高，与文献报道基本一致[14]。我们认为这可能是孕期 MVAD 时，在机体可以代偿的范围内，RAR 反应性升高，即其表达位置改变或功能性受体的比例增加，以结合更多的 RA 促进肺成熟，但其升高幅度可能有一个限度。

对成年大鼠肺组织的研究认为，VA 重度缺乏时其肺部 RAR-α 和 RAR-γ mRNAs 的表达不受影响，RAR-β mRNA 则显著下降；补充 VA 后，三者均不同程度升高，尤其是 RAR-β mRNA 可迅速恢复到接近正常的水平，并且认为要使 RAR-β mRNA 正常表达，其血浆 VA 水平应保持较高阈值(>25 μg/dl)[15,16]，这就提示肺组织 RAR 对其自身 VA 水平变化非常敏感。本实验在应用 Dex 后，VAN-Dex 组和 VAN-NS 组、MVAD-Dex 组和 MVAD-NS 组相比，三个受体基因的表达均升高就不难理解。Dex 升高了胎肺组织 VA 水平[8]，进而诱导 RAR 的表达来发挥作用。本试验条件与有关文献[15,16]有所不同，能否用其研究结果来解释本实验的一些现象还有待进一步研究。我们推测孕期 VA 缺乏在机体能代偿时，三者在胎肺的表达反应性升高；当机体失代偿时，正性基因的表达不受影响，负性基因下降，以尽可能地促进肺发育。也就是说，孕期 VA 缺乏程度不同，RAR-α、RAR-γ 和 RAR-β mRNAs 的表达不同。

孕鼠 MVAD 能不同程度的影响胎肺单位组织 VA 含量、SP-B 和 SP-C mRNAs 以及 RAR-α、RAR-γ 和 RAR-β mRNAs 的表达。当孕期存在 MVAD 时其胎鼠肺成熟度可能较低，但不影响 Dex 促胎肺成熟作用的发挥。有关 MVAD 孕鼠补充 VA 后对其胎鼠肺成熟度的影响即 PS 蛋白合成、生后肺组织中这些相关基因表达的动态变化以及 VA 与 RAR 结合后的信号转导与 PS 生成的关系都是我们下一步研究的重点。

参 考 文 献

[1] Baybutt R C, Hu L, Molteni A, et al. Vitamin A deficiency injures lung and liver parenchyma and impairs function of rat type 2 pneumocytes[J]. J Nutr, 2000, 130(5): 1159-1165.

[2] Frey G, Egli E, Chailley-Heu B, et al. Effects of mild vitamin A deficiency on lung maturation in newborn rats: a morphometric and morphologic study[J]. Biol Neonate, 2004, 86(4): 259-268.

[3] Chailley-Heu B, Chelly N, Lelievre-Pegorier M, et al. Mild vitamin A deficiency delays fetal lung maturation in the rat[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 21(1): 89-96.

[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]. 儿科药学杂志，2007，13(2)：54-56.

[5] Montedonico S, Sugimoto K, Felle P, et al. Prenatal treatment with retinoic acid promotes pulmonary alveologenesis in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia[J]. J Pediatr Surg, 2008, 43(3): 500-507.

[6] Sugimoto K, Takayasu H, Nakazawa N, et al. Prenatal treatment with retinoic acid accelerates type 1 alveolar cell proliferation of the hypoplastic lung in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia[J]. J Pediatr Surg, 2008, 43(2): 367-372.

[7] Nakazawa N, Montedonico S, Takayasu H, et al. Disturbance of retinol transportation causes nitrofen-induced hypoplastic lung[J]. J Pediatr Surg, 2007, 42(2): 345-349.

[8] 房春晓，陈贻骥，瞿 平，等. 产前地塞米松对胎鼠组织维生素 A 水平的影响[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(5)：546-548.

[9] Yang L, Naltner A, Yan C. Overexpression of dominant negative retinoic acid receptor-α causes alveolar abnormality in transgenic neonatal lungs[J]. Endocrinology, 2003, 144(7): 3004-3011.

[10] Massaro G D, Massaro D, Chambon P. Retinoic acid receptor-alpha regulates pulmonary alveolus formation in mice after, but not during, perinatal period[J]. Am J Physiol, 2003, 284(2): 431-433.

[11] McGowan S, Jackson S K, Jenkins-Moore M, et al. Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 23(2): 162-167.

[12] Snyder J M, Jenkins-Moore M, Jackson S K, et al. Alveolarization in retinoic acid receptor-β-deficient mice[J]. Pediatr Res, 2005, 57(3): 384-391.

[13] Massaro G D, Massaro D, Chan W Y, et al. Retinoic acid receptor-β: an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli[J]. Physiol Genomics, 2000, 4(1): 51-57.

[14] McMenamy K R, Zachman R D. Effect of gestational age and retinol(vitamin A) deficiency on fetal rat lung nuclear retinoic acid receptors[J]. Pediatr Res, 1993, 33(3): 251-255.

[15] Kato S, Mano H, Kumazawa T, et al. Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues[J]. Biochem, 1992, 286(pt3): 755-760.

[16] Haq R, Pfahl M, Chvtil F. Retinoic acid affects the expression of nuclear retinoic acid receptors in tissues of retinol-deficient rats[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(18): 8272-8276.

(责任编辑：冉明会)