

网络出版时间: 2022-04-01 10:28 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1419.017.html>

母体孕期维生素 D 缺乏对胎盘甾体激素合成的影响

付林¹ 陈远华² 徐德祥²

摘要 目的 探讨母体孕期维生素 D 缺乏(VDD)诱发胎儿宫内生长受限(IUGR)的机制。方法 4 周龄雌性 CD-1 小鼠随机分成 2 组:对照组(CTRL 组)和维生素 D 缺乏组(VDD 组),低维生素 D 饲料喂养 5 周构建 VDD 动物模型,然后与正常雄鼠交配,在孕第 16 天剖杀部分孕鼠,收集胎盘、母血以及胎血,Western blot 法检测胎盘甾体激素合成关键酶以及氧化应激信号蛋白表达水平,用放射免疫分析法检测母血雌激素、孕激素和 25-(OH)-D 水平;在孕第 19 天剖杀剩余孕鼠,称量胎盘和胎鼠重量,测量胎鼠身长和胎盘直径,观察妊娠结局。结果 5 周低维生素 D 饲料喂养成功构建 VDD 小鼠模型;母体孕期维生素 D 缺乏减轻胎鼠重和胎盘重量,降低胎鼠身长和胎盘直径。VDD 组胎盘芳香化酶 P450(CYP19)表达升高,孕鼠雌激素合成增多。此外,维生素 D 缺乏上调胎盘血红素加氧酶-1(HO-1)、NADPH 氧化酶-4(NOX-4)和 3-硝基酪氨酸(3-NT)蛋白表达水平,促进了胎盘核因子 E-2 相关因子 2(Nrf-2)核转位水平。结论 母体孕期维生素 D 缺乏可能部分通过诱发胎盘氧化应激损伤胎盘内分泌功能,促进胎盘雌激素合成进而诱发 IUGR。

关键词 维生素 D 缺乏;小鼠;雌激素;氧化应激;胎儿宫内生长受限

中图分类号 R 715.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0599-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.017

胎儿宫内生长受限(fetal intrauterine growth restriction, IUGR)是指受病理因素影响,胎儿出生未能达到其遗传决定的全部生长潜能^[1]。在美国和欧洲, IUGR 的发生率为 5%~15%,而在中国 IUGR 的发生率为 6%~10%^[2-3]。IUGR 不仅增加了死胎发生风险,同时也是诱发围产期胎儿高发病率和死亡率的主要原因^[4]。此外, IUGR 还会增加成年

期慢性疾病的风险,研究^[5-6]表明, IUGR 胎儿在成年期以后易患 II 型糖尿病、中心性肥胖、心血管疾病、代谢性疾病以及神经发育受损等。

维生素 D 缺乏(vitamin D deficiency, VDD)指血清中 25-(OH)-D 的水平低于 20 ng/ml,近年来母体孕期维生素 D 缺乏与不良妊娠结局的关系受到越来越多的关注,流行病学研究^[7-9]表明母体孕期维生素 D 缺乏增加了死胎、流产以及早产的发生风险,但是维生素 D 缺乏诱发 IUGR 具体机制不清楚。因此,该研究旨在通过低维生素 D 饲料喂养构建 VDD 诱发 IUGR 孕鼠模型,并从甾体激素合成方面探讨 VDD 诱发 IUGR 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 CD-1 系成年雌鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2017-0007。4 周龄雌鼠体质量 18~20 g,饲养在恒温恒湿鼠房中,自由进食和饮水,保持恒定的昼夜节律。动物实验遵从安徽医科大学实验动物科学协会和实验动物科学中心的管理章程,符合动物伦理学的规定。

1.1.2 药物与试剂 雌激素和孕激素检测试剂盒购于北京美正生物科技有限公司。核因子 E2 相关因子(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf-2; 货号: ab62352)、NADPH 氧化酶 2(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2, NOX-2; 货号: ab80508)、细胞色素 P450 家族成员 11A1(cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1, CYP11A1; 货号: ab67355)和 β -actin(货号: ab179467)一抗均购于美国 Abcam 公司; NADPH 氧化酶 2(NOX-4; 货号: D21F6)、血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1; 货号: E9H3A)和血红素氧合酶 2(HO-2; 货号: D9J9U)一抗均购于美国 Cell Signaling Technology 公司;芳香化酶 p450(aromatase cytochrome P450, CYP19; 货号: SC14245)、 3β -羟基类固醇脱氢酶(3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -HSD2; 货号: SC28206)和 3-硝基酪氨酸(3-nitroty-

2022-03-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81630084);安徽省卫生健康委科研项目(编号:AHWJ2021b091)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院呼吸与危重症医学科,合肥 230601;

²安徽医科大学卫生毒理系,合肥 230032

作者简介:付林,男,博士,助理研究员,副教授,硕士生导师;

徐德祥,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: xudex@126.com

rosine β -NT; 货号: SC32757) 一抗购于美国 Santa Cruz 公司。RNA 提取试剂盒由美国 Promega 公司提供, 逆转录试剂由瑞士 Roche 公司提供, PVDF 膜由美国 Millipore 公司提供, ECL 显色液由美国 Advansta 公司提供, 免疫组化试剂盒由北京中山金桥生物技术有限公司提供。其他常规试剂均购自美国 Abcam 公司。

1.1.3 仪器 Fine Do X6 全自动化学发光分析系统(上海天能科技有限公司), LightCycler® 480 定量 PCR 仪(美国 Roche 公司), Senenergy2 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司), Universal32R 低温高速离心机(德国 Hettich 科学仪器公司), UV-1200 型紫外可见分光光度计(中国上海翊艺有限公司), 光学显微镜和 DP71 成像系统(日本 Olympus 公司)。

1.2 动物模型的制备 小鼠适应性喂养 1 周以后, 随机均分成对照组(CTRL 组)和维生素 D 缺乏组(VDD 组)。CTRL 组小鼠喂养标准饲料(维生素 D 含量大于 800 IU/kg), VDD 组小鼠饲养在无紫外光的环境中, 并喂以低维生素 D 饲料(维生素 D 含量小于 25 IU/kg)。正常饲料和低维生素 D 饲料购于北京科奥协力有限公司。饲养 5 周以后, 于晚上 9:30 按照 4 只雌鼠与 2 只正常雄鼠合笼交配, 次日早上 7:30 检查阴栓, 以阴道口查到黄色栓状固体分泌物视为交配成功。查到阴栓的天数记为妊娠第 1 天, 在妊娠第 16 天剖杀部分孕鼠, 取母鼠血液检测血清黄体激素水平, 留取胎盘进行蛋白免疫印迹(Western blot)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组织化学检测; 在妊娠第 19 天剖杀剩余孕鼠, 取胎血检测血清 25-(OH)-D 水平, 统计活胎、死胎以及吸收胎数, 称取胎鼠和胎盘重量, 量取胎鼠身长和胎盘直径。

1.3 胎盘总蛋白的提取及 Western blot 实验 剪取 3/4 个胎盘组织到含有 500 μ l 蛋白裂解液的电动匀浆器中, 冰上快速匀浆 30 s, 结束后转移到 1.5 ml 离心管中, 插入冰盒中静置 12 min, 然后在 4 $^{\circ}$ C 离心机中 15 000 r/min 离心 10 min, 然后吸取上清液 300 μ l 至新的 EP 管中, 冰盒上继续静置 5 min, 然后 4 $^{\circ}$ C 离心机中 10 000 r/min 继续离心 5 min, 吸取上清液 250 μ l, 煮沸变性 10 min, 所得即为小鼠胎盘组织总蛋白, 分装于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存。接下来进行 SDS-PAGE 电泳, 取下 PVDF 膜, 清洗干净, 牛奶封闭, 孵育一抗(1:2 000 稀释)和二抗(1:10 000 稀释)^[10], PBS 漂洗干净, 加入 ECL 发光液, 然后自动发光显影, 拍照并分析目的条带灰度

值, 计算目的蛋白表达量。

1.4 放射免疫分析法 用放射免疫法检测血清中孕激素、雌激素以及 25-(OH)-D 的水平。试剂盒于室温中复温 30 min, 稀释标准品, 构建标准曲线。然后在玻璃管中加入 500 μ l 乙腈、标准品、质控和待测样品。剧烈震荡 20 s, 室温下 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 50 μ l 至新的玻璃管中, 加入 125 I 放射试剂, 然后加入抗体, 震荡混匀, 孵育 30 min 后, 加入二抗复合物, 继续孵育 30 min, 然后于放射免疫分析仪中检测其放射强度, 根据已知的标准曲线换算血清中雌激素、孕激素和 25-(OH)-D 的水平。

1.5 免疫组织化学法 取部分小鼠胎盘组织, 将其固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 期间不停晃动样品管, 固定 24 h 后液体石蜡包埋胎盘组织, 切片。石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇溶液(从高到低)水化, PBS 洗片。TritonX-100 通透液(含有双氧水)通透 50 min, 然后在微波炉中加热柠檬酸钠溶液进行抗原修复。抗原修复完成后, 进行冷却。然后加入血清, 湿盒中封闭 2 h, 吸干血清, 无需清洗, 直接加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜, 回收一抗, 加入二抗工作液, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中继续孵育 1.5 h, 然后将切片在 PBS 中漂洗干净, 继续 SP 反应 1 h, 最后 DAB 显色, 在封闭避光的房间中操作, 在显微镜下实时观察显色情况, 出现棕黄色或棕褐色及时终止反应。然后洗净切片, 苏木精复染, 中性树胶封片, 在显微镜下观察 Nrf-2 阳性细胞核数。

1.6 统计学处理 实验数据统计分析均由 SPSS 19.0 软件完成, 所有符合正态分布的定量数据以均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SEM$)表示, 两组数据之间的差异性用 t 检验分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低维生素 D 饲料喂养构建维生素 D 缺乏动物模型 为验证 VDD 模型是否成功建立, 检测母鼠血清 25-(OH)-D 水平。结果显示, VDD 组母鼠血清 25-(OH)-D (5.7 ± 0.44 ng/ml) 显著低于 CTRL 组 (17.5 ± 0.56 ng/ml)。以上结果表明 5 周连续的低维生素 D 饲料喂养, 成功构建维生素 D 缺乏小鼠模型。

2.2 母体孕期维生素 D 缺乏诱发 IUGR 在孕第 19 天剖杀孕鼠, 观察妊娠结局。结果如表 1 所示, 与 CTRL 组相比, VDD 组活胎数减少($t = 1.123$, $P < 0.05$), 晚死胎数增加($t = 1.123$, $P < 0.05$), 早死胎数和吸收胎数在两组之间无差异。称量胎鼠和胎盘

重量,结果显示 VDD 组胎鼠重量 ($t = 2.517, P < 0.01$) 和胎盘重量 ($t = 5.073, P < 0.01$) 均是低于 CTRL 组。测量胎鼠身长和胎盘直径,发现 VDD 组胎鼠身长 ($t = 1.830, P < 0.01$) 和胎盘直径 ($t = 1.831, P < 0.01$) 均低于 CTRL 组。

表1 两组孕鼠出生结局($\bar{x} \pm s$)

指标	CTRL 组	VDD 组
窝数 (n)	16	16
每窝活胎数 (n)	15.06 $\pm$ 0.281	13.80 $\pm$ 0.460*
每窝早死胎数 (n)	0.06 $\pm$ 0.063	0.20 $\pm$ 0.145
每窝晚死胎数 (n)	0.19 $\pm$ 0.136	0.53 $\pm$ 0.291*
每窝吸收胎数 (n)	0.44 $\pm$ 0.128	0.53 $\pm$ 0.215
胎鼠重量 (g)	1.45 $\pm$ 0.028	1.33 $\pm$ 0.030**
胎盘重量 (g)	0.099 $\pm$ 0.004	0.080 $\pm$ 0.002**
胎鼠身长 (mm)	24.96 $\pm$ 0.246	24.39 $\pm$ 0.259*
胎盘直径 (mm)	7.90 $\pm$ 0.122	7.46 $\pm$ 0.153*

与 CTRL 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 母体孕期维生素 D 缺乏上调胎盘雌激素合成

通过 Western blot 法检测小鼠胎盘雌激素合成关键酶 CYP19 的蛋白表达水平,结果如图 1 所示, VDD 组小鼠胎盘 CYP19 蛋白表达水平高于 CTRL 组(图 1A、1B),差异有统计学意义($t = 4.532, P < 0.01$)。此外,检测小鼠胎盘孕激素合成关键酶蛋

白表达水平,结果提示孕激素合成关键酶 CYP11A1 和 3β -HSD2 蛋白表达在 CTRL 和 VDD 两组之间无差异(图 1A、1C、1D)。通过免疫放射分析法检测两组孕鼠血清中雌激素和孕激素水平,结果提示,尽管孕激素水平在两组孕鼠之间差异无统计学意义,但是雌激素水平在 VDD 组孕鼠中显著升高($t = 2.637, P < 0.01$),见图 1E、1F。

2.4 母体孕期维生素 D 缺乏诱发胎盘氧化应激

通过 Western blot 法检测小鼠胎盘氧化应激相关蛋白表达水平,结果如图 2 所示,尽管 HO-2 蛋白在两组之间表达差异无统计学意义(图 2A、2B),但是 HO-1 表达水平在 VDD 组小鼠胎盘中升高($t = 6.102, P < 0.01$),见图 2A、2B;同时,小鼠胎盘中 NADPH 氧化酶水平检测结果提示,维生素 D 缺乏对小鼠胎盘 NOX-2 表达无影响(图 2),但是维生素 D 缺乏明显上调了小鼠胎盘 NOX-4 表达($t = 2.655, P < 0.01$),见图 2A、2B;小鼠胎盘 3-NT 蛋白水平检测结果表明,3-NT 蛋白在 VDD 组表达升高($t = 3.654, P < 0.01$),见图 2。此外,免疫组织化学法检测小鼠胎盘 Nrf-2 的核转位水平结果显示, VDD 组小鼠胎盘中 Nrf-2 核转位水平明显升高($t = 5.318, P < 0.01$),见图 3A、3B。

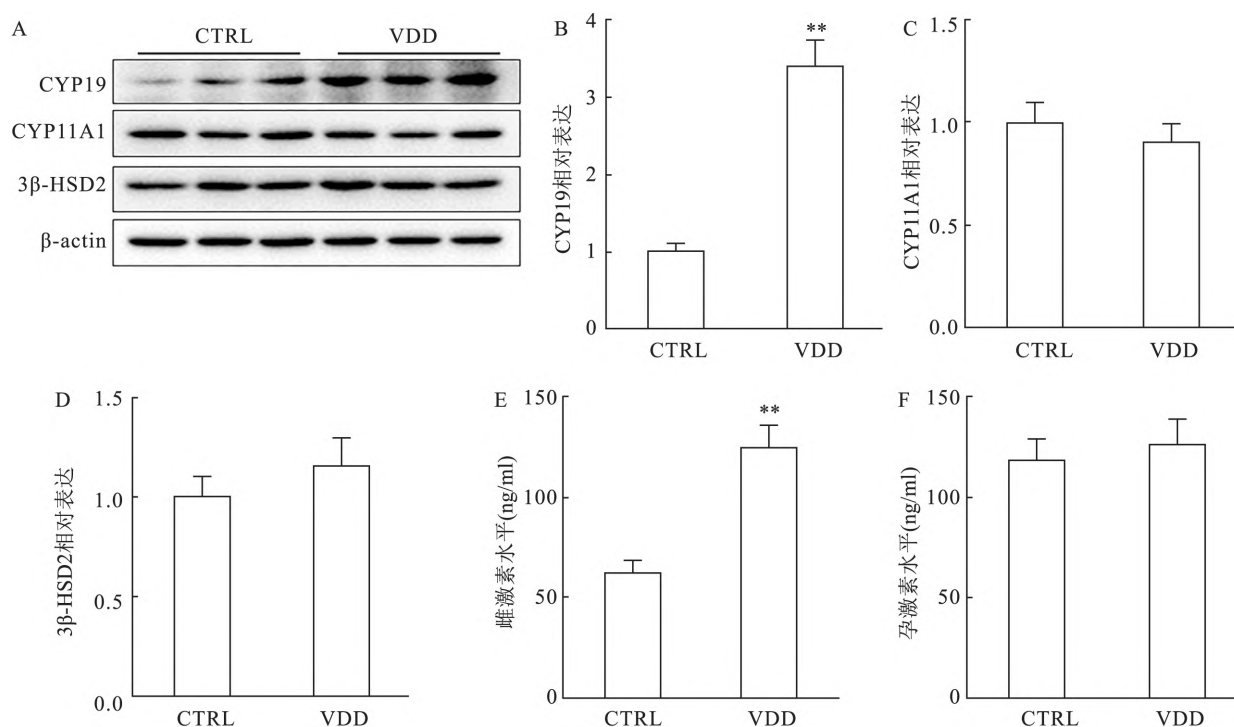


图1 母体孕期维生素 D 缺乏对小鼠胎盘激素的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

A: 胎盘 CYP19、CYP11A1 和 3β -HSD2 蛋白条带; B: CYP19 蛋白条带定量分析; C: CYP11A1 蛋白条带定量分析; D: 3β -HSD2 蛋白条带定量分析; E: 孕鼠雌激素水平; F: 孕鼠孕激素水平; 与 CTRL 组比较: ** $P < 0.01$

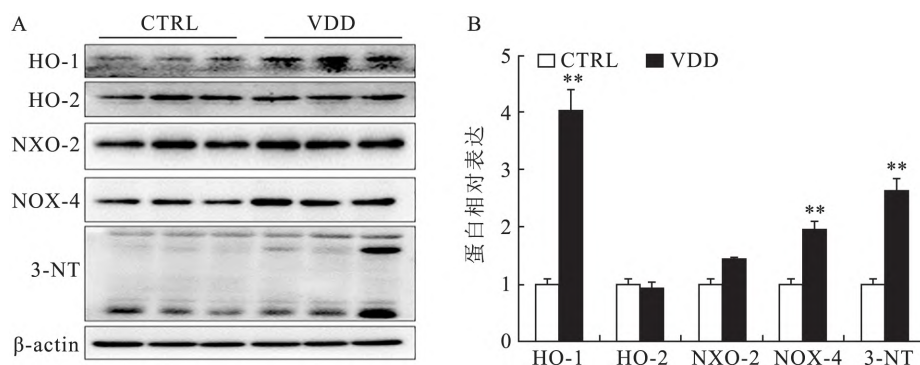


图2 母体孕期维生素D缺乏对小鼠胎盘氧化应激的影响($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

A: 胎盘 HO-1、HO-2、NOX-2、NOX-4 和 3-NT 蛋白条带; B: 蛋白条带定量分析; 与 CTRL 组比较: ** $P < 0.01$

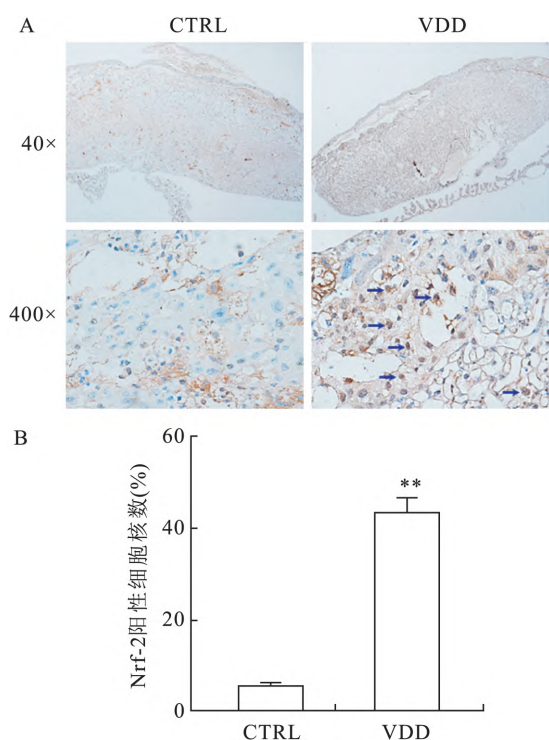


图3 母体孕期维生素D缺乏对小鼠胎盘 Nrf-2 核转位的影响
($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

A: 免疫组化检测小鼠胎盘 Nrf-2 的核转位; B: Nrf-2 阳性细胞核数; 与 CTRL 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

本研究通过无紫外光照环境中,连续5周低维生素D饲料喂养小鼠构建VDD小鼠模型,结果显示VDD组小鼠血清25-(OH)-D水平显著低于对照组,表明VDD小鼠模型被成功构建。进一步将VDD雌鼠与正常雄鼠交配,结果显示VDD组活胎数减少,晚死胎数增多,VDD组胎鼠和胎盘重量显著减轻,胎鼠身长和胎盘直径明显降低。以上结果表明,母体孕期维生素D缺乏可诱发IUGR,但是具

体机制不明。

越来越多的研究表明,雌激素和孕激素是人体中重要的甾体类固醇激素,在妊娠过程中发挥着重要作用。妊娠早期孕激素和雌激素主要由黄体产生,而在妊娠中、晚期可由胎盘合体滋养细胞合成和分泌,正常水平的雌激素和孕激素对胎盘功能维持和胎儿生长发育发挥重要作用^[11]。在正常妊娠过程中,母血中雌激素会出现短暂的、生理性的升高,但是在妊娠早起,过高的雌激素会抑制绒毛外血管内皮生长因子表达和子宫螺旋动脉的浸润,抑制胎盘的发育,进而导致IUGR^[12]。CYP19是一种重要的雌激素合成限速酶,调节雌激素的合成。本研究显示,CYP19蛋白在VDD胎盘中表达显著升高;此外,VDD组孕鼠血清雌激素水平升高,而孕激素合成限速酶以及孕激素水平无明显改变。以上实验结果提示,母体孕期维生素D缺乏可通过促进胎盘雌激素合成,升高母体内雌激素水平抑制胎盘的发育和功能进而导致IUGR。

氧化应激是指机体内活性氧的过量产生和机体内抗氧化能力的不平衡,活性氧是机体内游离的自由基,会导致氧化还原状态失衡,引起脂质过氧化、蛋白质羰基化以及DNA损伤等^[13]。已有研究^[13]表明,胎盘的氧化应激在IUGR的病理过程中发挥着重要作用。机体内活性氧的过量产生,可抑制胎盘的血管重构和营养物质的摄取和运输,改变激素的合成,损伤胎盘功能和胎儿发育,诱发IUGR。而本研究发现母体孕期维生素D缺乏上调胎盘HO-1、NOX-4和3-NT蛋白表达水平,促进胎盘Nrf-2核转位水平,以上结果表明孕期母体维生素D缺乏诱发胎盘氧化应激,损伤胎盘的发育。提示孕期母体维生素D缺乏可能通过诱发氧化应激促进胎盘雌激素合成而导致IUGR,然而,维生素D缺乏诱发胎盘

氧化应激的作用机制目前并不清楚。

Nrf-2 是细胞对抗氧化损伤的重要作用机制之一,通过调节细胞保护基因的表达,维持细胞正常功能。Nrf-2 的表达主要受细胞内泛素化过程和蛋白酶体降解系统调节,在静息状态下,Nrf-2 与 Keap1 型泛素连接酶接头蛋白(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)相结合而锚定在细胞质中,而当细胞内部受到活性氧或亲电体刺激后,可引发 Keap1 构象改变并导致 Nrf-2 游离出来,转位进入细胞核与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合发挥转录因子作用,调节下游的 II 相解毒酶、抗氧化及抗炎蛋白表达^[14]。维生素 D 可通过维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)激活细胞内的 Nrf-2 抗氧化系统,抵抗胞内氧化应激和炎症反应^[15]。而维生素 D 缺乏常导致 VDR 核转位减少,细胞核内 VDR 表达降低,进而诱发机体氧化应激^[16]。因此,有理由推测母体孕期维生素 D 缺乏通过诱发胎盘氧化应激,导致过多的活性氧产生,损伤胎盘功能和促进胎盘雌激素合成,进而诱发 IUGR。

综上所述,母体孕期维生素 D 缺乏导致 IUGR,其作用机制可能是维生素 D 缺乏诱发胎盘氧化应激,导致机体内活性氧过量产生,上调胎盘 CYP19 表达、促进雌激素合成,进而诱发 IUGR。本研究为母体孕期维生素 D 缺乏诱发 IUGR 的机制提供了新的证据。

参考文献

- [1] American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics and the Society for Maternal-Fetal Medicine. ACOG practice bulletin No. 204: Fetal growth restriction [J]. *Obstet Gynecol*, 2019, 133(2): e97–109.
- [2] Nathanielsz P W. Decreased placental amino acid transport and intrauterine growth restriction: which is the chicken and which is the egg? [J] *J Physiol*, 2006, 576(Pt 3): 649.
- [3] Yuan Q, Chen L, Liu C, et al. Postnatal pancreatic islet β cell function and insulin sensitivity at different stages of lifetime in rats born with intrauterine growth retardation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25167.
- [4] Barker D J, Eriksson J G, Forsén T, et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis [J]. *Int J Epidemiol*, 2002, 31(6): 1235–9.
- [5] 陈雪,于震,陈远华,等. 维生素 D 缺乏对宫内胎鼠发育的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(12): 1470–2.
- [6] Desai M, Gayle D, Han G, et al. Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring [J]. *Reprod Sci*, 2007, 14(4): 329–37.
- [7] Elson D H, Hammoud M S. Vitamin D deficiency in mothers, neonates and children [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 175: 195–9.
- [8] Hemmingway A, Kenny L C, Malvisi L, et al. Exploring the concept of functional vitamin D deficiency in pregnancy: impact of the interaction between 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone on perinatal outcomes [J]. *Am J Clin Nutr*, 2018, 108: 821–9.
- [9] Khalessi N, Kalani M, Araghi M, et al. The relationship between maternal vitamin D deficiency and low birth weight neonates [J]. *J Family Reprod Health*, 2015, 9(3): 113–7.
- [10] 丁章楠,博庆丽,费君,等. 罗格列酮对细菌脂多糖所致小鼠肺部炎症和氧化应激的保护效应 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 282–6.
- [11] Street M E, Bernasconi S. Endocrine-disrupting chemicals in human fetal growth [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1430.
- [12] Ozer A, Tolun F, Aslan F, et al. The role of G protein-associated estrogen receptor (GPER) 1, corin, raftlin, and estrogen in etiology of intrauterine growth retardation [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2021, 34(5): 755–60.
- [13] Rashid C S, Bansal A, Simmons R A. Oxidative stress, intrauterine growth restriction, and developmental programming of type 2 diabetes [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2018, 33(5): 348–59.
- [14] Mizumura K, Maruoka S, Shimizu T, et al. Role of Nrf2 in the pathogenesis of respiratory diseases [J]. *Respir Investig*, 2020, 58(1): 28–35.
- [15] Teixeira T M, da Costa D C, Resende A C, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling by 1, 25-dihydroxycholecalciferol prevents leptin-induced oxidative stress and inflammation in human endothelial cells [J]. *J Nutr*, 2017, 147(4): 506–13.
- [16] Fei J, Fu L, Cao W, et al. Low vitamin D status is associated with epithelial-mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Immunol*, 2019, 203(6): 1428–35.

The effect of maternal vitamin D deficiency on placental steroid hormone synthesis during pregnancy

Fu Lin¹, Chen Yuanhua², Xu Dexiang²

(¹Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ²Dept of Toxicology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the mechanism of maternal vitamin D deficiency (VDD)-induced fetal intra-

网络出版时间: 2022-04-01 10:30 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1419.018.html>

胚胎期炎症影响衰老海马 SNAP-25 含量及认知功能

韦琪瑶¹, 吴永芳², 张雨欣¹, 王亚涛², 曾立平², 陈贵海², 曹磊¹

摘要 目的 探讨胚胎期炎症暴露对中老年期海马突触体相关蛋白 25 (SNAP-25) 水平和认知功能的影响。方法 在 CD-1 母鼠孕第 15~17 天每天腹腔注射脂多糖 (LPS 50 μ g/kg) 或等容积生理盐水, 对应子鼠分别为 LPS 组和 CON 组。分别于青年 (3 月龄) 和中老年 (15 月龄) 用 Morris 水迷宫评估空间学习记忆能力, 用免疫组织化学染色及 Western blot 技术检测海马 SNAP-25 蛋白含量。结果 与 3 月龄 CON 组相比, 15 月龄 CON 组学习期游泳路程增加 ($P < 0.01$), 记忆期靶象限游泳路程百分比降低 ($P < 0.01$), 海马各亚区 SNAP-25 蛋白水平均升高 ($P < 0.01$)。15 月龄 LPS 组较同龄 CON 组学习期游泳路程增加 ($P < 0.05$), 记忆期游泳路程百分比下降 ($P < 0.05$), 海马 CA1 区及 DG 区 SNAP-25 水

平增加 ($P < 0.01$)。Pearson 相关分析显示海马 CA1 区、DG 区 SNAP-25 蛋白水平与学习期游泳路程呈正相关, 而与记忆期靶象限游泳路程百分比呈负相关。结论 胚胎期炎症暴露可加速中老年小鼠学习记忆能力损害和海马 CA1 区、DG 区 SNAP-25 蛋白的升高, 且两者可能存在关联。

关键词 衰老; 炎症; 学习记忆; SNAP-25

中图分类号 R 339.38; R 338.64

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0604-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.018

胚胎期炎症暴露会加速小鼠年龄相关的记忆减退^[1], 但其确切机制仍不清楚。研究^[2]表明年龄相关的记忆减退可能与突触可塑性相关蛋白含量的改变有关。突触体相关蛋白 25 (synaptosomal-associated protein 25, SNAP-25) 是可溶性 N-乙酰马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (SNARE) 的囊泡蛋白, 参与突触可塑性和神经递质的胞吐过程^[3]。研究^[4]表明, SNAP-25 在成年大鼠海马中过表达会导致记忆巩固的解除以及突触传递障碍, 即 SNAP-25 可以通过改变突触可塑性来影响认知能力。细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌细胞壁的成分, 会使机体发生神经炎症, 可用于制作经典的炎症模型^[5]。本课题组前期研究^[6]显示胚胎期暴露 LPS

2022-03-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81671316); 安徽省自然科学基金 (编号: 1708085QH182)

作者单位: ¹安徽医科大学第二附属医院神经内科, 合肥 230601

²安徽医科大学附属巢湖医院神经内科 (睡眠障碍科), 巢湖 238000

作者简介: 韦琪瑶, 女, 硕士研究生;

陈贵海, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: doctoregh@163.com;

曹磊, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: caolei0531@163.com

terine growth restriction (IUGR) during pregnancy. **Methods** Four weeks female CD-1 mice were divided into two groups: control mice (CTRL) and vitamin D deficiency mice (VDD). VDD mice were fed with diet with low concentration of vitamin D and mated with normal male mice. Several pregnant mice were killed on gestational sixteenth day, and the placentas, serum of maternal and fetal mice were collected. Proteins of placental key enzymes of steroid hormone synthesis and signaling pathways of oxidative stress were measured using Western blot. Serum estrogen, progesterone and 25-(OH)-D were measured via radioimmunoassay. The remaining pregnant mice were killed. Placentas and fetus were weighted, fetus height and placental diameter were calculated. The pregnancy outcomes were observed. **Results** Diet with low concentration of vitamin D were used and VDD mice model were established after five weeks. Maternal VDD during pregnancy decreased the weight of placenta and fetus, reduced the height of fetus and the diameter of placentas. The expression of placental aromatase cytochrome p450 (CYP19) and the level of estrogen were increased in VDD pregnant mice. Besides, maternal VDD during pregnancy increased the expressions of placental heme oxygenase 1 (HO-1), NADPH oxidase 4 (NOX-4) and 3-nitrotyrosine (3-NT). VDD promoted placental nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf-2) nuclear translocation. **Conclusion** Maternal vitamin D deficiency during pregnancy causes IUGR partially through evoking placental oxidative stress and promoting estrogen synthesis.

Key words vitamin D deficiency; mice; estrogen; oxidative stress; fetal intrauterine growth restriction