

## 维生素 D 缺乏对大鼠哮喘模型气道炎症的影响

顾海燕,赵德育\*

(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:研究维生素 D(vitamin D, Vit D)缺乏对哮喘模型大鼠气道炎症的影响。方法:雄性 SD 大鼠 16 只(体重 150 g 左右),随机分为正常对照组、Vit D 缺乏模型组,每组 8 只,对照组予正常光照及普通饲料喂养;模型组予以避光、不含 Vit D 的饲料喂养,4 周后同时用卵清蛋白致敏和激发,建立哮喘动物模型。收集支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)进行细胞计数;取肺组织石蜡包埋切片,观察气道炎症情况。结果:Vit D 缺乏组的 BALF 中细胞总数及嗜酸性粒细胞百分比均明显高于对照组( $P < 0.05$ );Vit D 缺乏组的肺部病理改变程度较对照组更为严重。结论:Vit D 缺乏加重哮喘大鼠气道炎症病变程度。

**[关键词]** 维生素 D 缺乏;哮喘;大鼠

**[中图分类号]** R562.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)10-1369-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20151007

## Effects of vitamin D deficiency on airway inflammation in asthmatic rats

Gu Haiyan, Zhao Deyu\*

(Department of Respiration, Nanjing Children's Hospital of NJMU, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of vitamin D deficiency on airway inflammation in rats with asthma. **Methods:** Sixteen Sprague-Dawley rats were divided into 2 groups randomly, including normal control group and vitamin D deficiency experiment model group, with 8 rats in each group. On days 1 and 7, the rats were sensitized with ovalbumin *via* intraperitoneal injection and challenged with daily ovalbumin inhalation for 7 consecutive days since day 14. After the challenge, the bronchial alveolar lavage fluid (BALF) was collected for examining the total cell number and eosinophil count, and the lung tissue was taken to evaluate the airway inflammation. **Results:** Compared with the control group, the total BALF cell count and eosinophil percentage were found to increase in the vitamin D deficient model group ( $P < 0.05$ ). More serious pathological changes and asthmatic airway inflammation were found in the lung tissues of rats lack of vitamin D. **Conclusion:** Vitamin D deficiency could give rise to more frequent asthmatic attack and aggravate airway inflammation in asthmatic rats.

**[Key words]** vitamin D deficiency; asthma; rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1369-1371]

维生素 D(vitamin D, Vit D)是一组脂溶性类固醇衍生物,因其具有广泛的生物学活性而被人们高度重视,它与过敏性疾病的关系正日益受到关注。流行病学资料显示 Vit D 缺乏与哮喘发病率具有相关性,日光照射机会较少的国家和地区哮喘的发病率明显增高<sup>[1]</sup>。但目前有关 Vit D 在哮喘发病中作用的研究结果并不一致,其在哮喘的发病机制中所起的作用尚不清楚。本研究拟以 Vit D 缺乏大鼠模型模拟 Vit D 缺乏内环境,通过在体研究探讨 Vit D 缺乏的哮喘模

型大鼠气道炎症的变化,从而为 Vit D 对哮喘的影响及机制提供一定的理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

SD 大鼠购自上海斯莱克动物中心,不含 Vit D 饲料及正常饲料购自南京青龙山动物饲料中心。卵清蛋白(OVA)购自美国 Sigma 公司。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 实验动物准备及模型的建立

雄性 SD 大鼠 16 只(体重 150 g 左右),随机分为正常对照组、Vit D 缺乏模型组,每组 8 只,对照组

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金面上项目(2010NJ-MU123)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhaodeyu98@126.com

予正常光照及普通饲料喂养;模型组予以避光、不含 Vit D 的饲料喂养,4 周后两组大鼠同时制作哮喘模型。致敏阶段:分别于实验第 1 天及第 7 天给两组大鼠腹腔注射 OVA 致敏液 0.5 mL(1 mg OVA+200 μg Al(OH)<sub>3</sub>+0.5 mL 生理盐水)。激发阶段:于第 14 天起每天上午将大鼠置于雾化箱内,以 1% OVA(W/V)溶液(0.6 g OVA+10 mL 生理盐水)进行 30 min 雾化激发,每天 1 次,连续激发 7 d。

1.2.2 肺泡灌洗液的细胞分类和计数

最后 1 次激发后 24 h,3%异戊巴比妥(剂量为 3 mg/kg)麻醉大鼠,将大鼠固定消毒,分离气管,插入导管,用 0.5 mL 生理盐水进行支气管肺泡灌洗。反复 3 次(回吸率为 80%~90%)。将所得支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)在光学显微镜下计数细胞总数。取细胞沉渣 50 μL 作涂片,细胞经瑞氏染色后进行细胞分类计数。

1.2.3 肺脏病理学比较

取每组动物的右下肺组织标本,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,光镜下分析比较 Vit D 缺乏对哮喘大鼠支气管肺组织病理学影响。

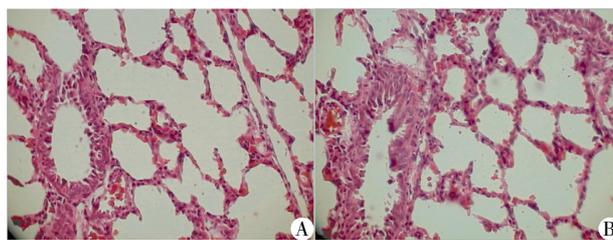
1.3 统计学方法

测定结果均采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS17.0 软件统计分析,两组数据资料比较采用 *t* 检验,  $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为改变

与正常组相比较, Vit D 缺乏模型组大鼠在造模 20 d 左右出现行动迟缓,反应迟钝,背部拱曲,皮毛散



A:对照组见支气管轻度增生紊乱,管腔内有少量的黏液和脱落的上皮细胞,支气管周围可见轻度的炎症细胞浸润;B:Vit D 缺乏模型组支气管上皮明显增生紊乱,管腔内有较多黏液和脱落的上皮细胞,支气管周围可见明显的炎症细胞浸润。

图 1 两组大鼠肺组织病理学变化(HE, × 400)

Figure 1 Pathological changes of lung tissue in two groups (HE, × 400)

乱,光泽度差。两组大鼠在致敏后激发雾化过程中出现烦躁不安,呼吸急促,加深、加快,口唇四肢末梢发绀;雾化结束后雾化箱内遗留较多的排泄物。每次雾化结束数十分钟后,上述症状自行缓解。

2.2 光镜观察

各组肺组织病理切片中均表现为以嗜酸性粒细胞为主的气道炎症。肺间质和肺泡腔内可见嗜酸性粒细胞浸润,支气管管腔内见黏液栓,气道上皮有不同程度的损伤、增生。与对照组相比, Vit D 缺乏组的病理改变程度较重,支气管上皮细胞坏死脱落、增生紊乱程度较明显,黏液栓较多(图 1)。

2.3 BALF 中细胞计数及分类

Vit D 缺乏组哮喘大鼠 BALF 中细胞总数及嗜酸性粒细胞百分比明显高于对照组( $P < 0.05$ ,表 1)。

3 讨论

哮喘是常见的呼吸系统疾病之一,近十年来,随着生活方式和生存环境的改变,哮喘和过敏性疾病的患病率迅猛增加,在儿童中尤为显著。据估计,

表 1 哮喘大鼠 BALF 中细胞计数及分类比较

Table 1 Cell count and classification in BALF of the athmatic rats

| 组别         | 细胞总数<br>(个/mL) | 细胞分类(%)       |             |              |              |
|------------|----------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
|            |                | 嗜酸性粒细胞        | 中性粒细胞       | 淋巴细胞         | 单核细胞         |
| Vitd 缺乏模型组 | 21.13 ± 2.16*  | 21.00 ± 1.85* | 5.50 ± 0.92 | 16.37 ± 1.59 | 57.25 ± 1.90 |
| 对照组        | 18.13 ± 1.35   | 17.62 ± 1.68  | 6.37 ± 1.59 | 17.12 ± 1.72 | 58.87 ± 2.03 |

与对照组相比, \* $P < 0.05$ 。

全世界已有超过 3 亿的哮喘患者,给个人和家庭带来沉重的经济和社会负担<sup>[2]</sup>。

Vit D 是维持人体生命所必需的营养素。随着经济发展,生活环境改变,人们的室外活动越来越少, Vit D 缺乏的现象日趋全球化。 Vit D 是免疫系统一个有选择性的调节剂,它与过敏性疾病的关系正日益

受到关注。2007 年, Litonjua 等<sup>[3]</sup>的研究发现 Vit D 缺乏多发生于肥胖、美国黑人(尤其是住在城市内)和新移民到西方国家的人们,而他们也是哮喘流行的人群,从而提出了 Vit D 缺乏假说,该假说认为随着人口迅速增加,生活更加西方化,更多的时间在户内度过,从而较少暴露于阳光,导致 Vit D 缺乏,哮

喘发病率增加。Weiss 等<sup>[4]</sup>也提出既然人群归因危险度评估有至少 40%的哮喘儿童存在脂溶性维生素缺乏,有理由认为儿童哮喘发生的部分原因是脂溶性维生素缺乏所致。

Vit D 可通过多种复杂的途径影响气道反应性、气道炎症以及气道重塑,进而影响哮喘等过敏性疾病发生的危险性。其中,Vit D 的免疫调节作用被认为是影响哮喘发生发展的主要机制。但已有的研究报告显示,Vit D 对 Th1/Th2 细胞及其相关因子的调控作用呈现多效性作用<sup>[5]</sup>。提示 Vit D 在哮喘气道炎症中的作用还有待进一步的证实。

Vit D 主要由皮肤中的 7-脱氢胆固醇(7-HDC)经日光中紫外线的光化学作用转变而成,而食物如蛋黄、鱼、奶等是 Vit D 的另一来源。既往认为,外界摄入的 Vit D 首先在肝脏 25 羟化酶作用下转化为无活性的 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 进入全身循环,然后在 1 $\alpha$  羟化酶(CYP27B1)等作用下转化为活性 Vit D,后者再发挥调节作用。但近期研究发现,气道上皮细胞具有转化无活性 Vit D 为活性 Vit D 的功能<sup>[6]</sup>,提示局部活性 Vit D 的作用更为重要。有研究证实了支气管组织具有 CYP27B1 表达,可能参与了局部 Vit D 的活化。CYP27B1 在哮喘小鼠中高表达且应用地塞米松后降低<sup>[7]</sup>,提示 CYP27B1 也参与了哮喘的发病,其具体作用机制尚不明确。

鉴于机体不能自行合成 VitD 而需通过食物摄入及日晒来获取,本实验参照国内相关研究中报道的 Vit D 缺乏模型制备方法<sup>[8]</sup>,模型组通过避光及回避 Vit D 饮食喂养,从两个途径阻断 Vit D 合成,观察到 20 d 左右,模型组大鼠出现行动迟缓,皮毛散乱无光泽等 VitD 缺乏的表现。4 周后予卵清蛋白刺激诱发大鼠哮喘状态,光镜观察两组大鼠的肺形态学改变,显微镜下计数肺泡灌洗液中细胞数。结果发现,与对照组相比,Vit D 缺乏组哮喘大鼠肺组织病理改变程度较重,与之相一致,肺泡灌洗液中细胞总数及嗜酸性粒细胞百分比均明显高于对照组( $P$ 均 $<0.05$ )。本研究结果表明,Vit D 缺乏加重了大鼠哮喘的严重程度,这一结果间接说明了 Vit D 在哮喘发生发展中的保护性作用,其机制可能为通过调控 Vit D 相关分子表达,影响炎症因子的释放和炎症细胞的聚集,从而减轻哮喘的发生。Ginde 等<sup>[9]</sup>证实血清低浓度 Vit D 与呼吸道疾病如哮喘的发生及其严重性非常相关,国内有回顾性分析报道了儿童体内 Vit D 水平与哮喘严重性呈负相关<sup>[10-11]</sup>,这

与本研究结论相一致。补充 Vit D 被证实可有效预防和减轻哮喘的严重程度,但相关报道多见于动物模型,且过量补充反而得出相反结论<sup>[12]</sup>。因此临床 Vit D 有效补充量和时机选择仍待进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] Moorman JE, Rudd RA, Johnson CA, et al. National surveillance for asthma--United States, 1980-2004 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2007, 56(8): 1-54
- [2] Ait-Khaled N, Pearce N, Anderson HR, et al. Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children; The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three [J]. *Allergy*, 2009, 64(1): 123-148
- [3] Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(5): 1031-1035
- [4] Weiss ST, Litonjua AA. Childhood asthma is a fat-soluble vitamin deficiency disease [J]. *Clin Exp Allergy*, 2008, 38(3): 385-387.
- [5] Chen WJ, Hou XJ, Yang SF, et al. Effect of vitamin D supplementation during pregnancy on the Th1/Th2 cell balance of rat offspring [J]. *Pharmazie*, 2014, 69(5): 385-390
- [6] Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, et al. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense [J]. *J Immunol*, 2008, 181(10): 7090-7099
- [7] 张丹, 蔡绍曦, 侯长春, 等. 支气管哮喘小鼠模型中维生素 D 相关分子的表达 [J]. *中华哮喘杂志: 电子版*, 2010, 4(3): 181-185
- [8] 吴越, 周晓玉, 李婵娟. 孕鼠维生素 D 缺乏对子鼠长骨维生素 D 受体蛋白表达的影响 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2009, 29(3): 361-363, 385
- [9] Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. *Arch Intern Med*, 2009, 169(4): 384-390
- [10] 马秀丽, 甄艳芬. 支气管哮喘儿童血清 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 和总免疫球蛋白 E 的变化 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(7): 551-553
- [11] 唐小红. 维生素 D 水平与儿童支气管哮喘的相关性研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(14): 1884-1886
- [12] 李霞, 周小建, 陈凌燕, 等. 不同剂量 1, 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对生命早期大鼠哮喘模型气道重塑的影响 [J]. *临床儿科杂志*, 2013, 31(2): 170-174

[收稿日期] 2015-07-11