

维生素A缺乏调节肺泡巨噬细胞M1极化在新生大鼠ARDS中的作用及其机制

曾毅文, 龚放*

重庆医科大学附属永川医院儿科, 重庆 402160

[中图分类号] R332; R364.4 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2023.0619

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 曾毅文, 龚放. 维生素A缺乏调节肺泡巨噬细胞M1极化在新生大鼠ARDS中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(10): 1144-1152.

[收稿日期] 2022-11-18 [录用日期] 2022-11-28 [上线日期] 2023-06-19

[摘要] **目的** 探讨维生素A缺乏(VAD)调节肺泡巨噬细胞极化在新生大鼠急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中的作用及其机制。**方法** 将60只新生SD大鼠分为维生素A正常对照组(VAN ctrl组, $n=10$)、维生素A正常组(VAN组, $n=10$)、维生素A缺乏对照组(VAD ctrl组, $n=10$)、维生素A缺乏组(VAD组, $n=10$)、维生素A挽救对照组(VADR ctrl组, $n=10$)及维生素A挽救组(VADR组, $n=10$), 其中, VADR ctrl及VADR组SD大鼠于生后第2天一次性给予腹腔注射25 μg VA。6组新生大鼠分别予以脂多糖(LPS)建立ARDS新生大鼠模型并收集血清及肺组织标本。记录建模前各组新生大鼠的体重, 采用May-Grunwald-Giemsa染色法检测肺泡灌洗液(BALF)中主要细胞数量, HE染色观察肺组织病理损伤情况, 免疫荧光染色评估肺泡巨噬细胞极化情况, qRT-PCR、ELISA检测肺泡巨噬细胞极化下游标志物诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-10、精氨酸酶1(Arg-1)等炎症因子的表达情况, 比色法检测肺组织氧化应激标志物超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量, TUNEL检测细胞凋亡情况。**结果** 与VAN组新生大鼠比较, VAD组新生大鼠体重较轻、体格偏小、毛发稀疏, 而VADR组新生大鼠体重、一般情况无明显变化; 与VAD组比较, VADR组新生大鼠体重增加, 毛发光亮。与VAN组比较, VAD组ARDS新生大鼠肺部损伤加重, BALF中主要细胞数量增加、肺泡巨噬细胞M1极化激活($P<0.05$), M1极化标志物iNOS、IL-6、TNF- α 、CD86表达水平明显升高($P<0.05$), 氧化应激标志物MDA含量增多($P<0.05$), 细胞凋亡增加($P<0.05$), SOD活性降低($P<0.05$), 而IL-10、Arg-1水平差异无统计学意义($P>0.05$); 与VAN组相比, VADR组新生大鼠巨噬细胞M1极化及TNF- α 、IL-6、SOD、MDA、IL-10、Arg-1水平等差异均无统计学意义($P>0.05$); 与VAD组比较, VADR组ARDS新生大鼠肺部损伤明显减轻, 肺泡巨噬细胞数量及肺泡巨噬细胞M1极化减少($P<0.05$), 且M1极化标志物iNOS、IL-6、TNF- α 、CD86表达水平降低($P<0.05$), 氧化应激标志物MDA含量及细胞凋亡减少($P<0.05$), SOD活性增加($P<0.05$)。**结论** VAD可通过调节肺泡巨噬细胞M1极化, 上调M1极化下游炎症标志物表达, 增加肺部氧化应激及细胞凋亡, 从而加重新生大鼠ARDS的肺部损伤。

[关键词] 维生素A缺乏; 新生儿; 急性呼吸窘迫综合征; 肺泡巨噬细胞M1极化; 氧化应激; 炎症因子

Effect and mechanism of vitamin A deficiency in regulating M1 polarization of alveolar macrophage in neonatal rats with ARDS

Zeng Yi-Wen, Gong Fang*

Department of Pediatrics, Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China

*Corresponding author, E-mail: gf607812@163.com

This work was supported by the Chongqing Education Commission Project (KJQN201900420)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and its mechanism of vitamin A (VA) deficiency (VAD) on regulating alveolar macrophage polarization in neonatal rats with acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods** Sixty neonatal SD

[基金项目] 重庆市教委项目(KJQN201900420)

[作者简介] 曾毅文, 硕士研究生, 副主任医师, 主要从事新生儿疾病方面的研究

[通信作者] 龚放, E-mail: gf607812@163.com

rats were divided into vitamin A normal control group (VAN ctrl group, $n=10$), normal vitamin A group (VAN group, $n=10$), vitamin A deficiency control group (VAD ctrl group, $n=10$), vitamin A deficiency group (VAD group, $n=10$), vitamin A rescue control group (VADR ctrl group, $n=10$) and vitamin A rescue group (VADR group, $n=10$). The VADR ctrl and VADR groups were injected with 25 μg VA at the second day after birth. All the neonatal rats were given lipopolysaccharide (LPS) to establish the neonatal rat model of ARDS, and serum and lung tissue samples were collected. The weight of newborn rats in each group was recorded before modeling, the May-Grunwald-Giemsa staining was performed to observe the number of main cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and HE staining was used to detect the pathological damage of lung tissue. The polarization of alveolar macrophages was evaluated by immunofluorescence. qRT-PCR and ELISA were performed to detect the expression of downstream markers of the polarization of alveolar macrophages inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-10 and arginase-1 (Arg-1). The content of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in lung tissue were calculated by colorimetric method, and cell apoptosis was detected by TUNEL. **Results** Compared with the neonatal rats in VAN group, the neonatal rats in VAD group had lower body weight, small physique, and sparse hair, while the body weight and general condition of the newborn rats in the VADR group did not change significantly. Compared with the VAD group, the neonatal rats in VADR group gained weight and shiny hair. Compared with VAN group, the lung damage of ARDS neonatal rats in VAD group was aggravated, the number of major cells in BALF increased, the M1 polarization of alveolar macrophages activated ($P<0.05$), the expression levels of M1 polarization markers iNOS, IL-6, TNF- α and CD86 increased significantly ($P<0.05$), the content of oxidative stress marker MDA and cell apoptosis increased ($P<0.05$), SOD activity decreased ($P<0.05$), while the levels of IL-10 and Arg-1 were not statistically significant ($P>0.05$); Compared with VAN group, there were no significant differences in macrophage M1 polarization, TNF- α , IL-6, SOD, MDA, IL-10 and Arg-1 in newborn rats in VADR group ($P>0.05$). Compared with VAD group, the lung damage of ARDS neonatal rats in VADR group was significantly reduced, the number of alveolar macrophages and the polarization of alveolar macrophages M1 decreased ($P<0.05$), the expression levels of M1 polarization markers iNOS, IL-6, TNF- α and CD86 decreased ($P<0.05$), the content of the oxidative stress marker MDA and cell apoptosis decreased ($P<0.05$), and the SOD activity enhanced ($P<0.05$). **Conclusion** VAD could regulate the M1 polarization of alveolar macrophages, up-regulated the expression of inflammatory markers downstream of M1 polarization, increased pulmonary oxidative stress and apoptosis, and aggravated ARDS in neonatal rats.

[Key words] vitamin A deficiency; newborn; acute respiratory distress syndrome; alveolar macrophage M1 polarization; oxidative stress; inflammatory factors

新生儿急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是威胁新生儿生命健康的主要疾病之一^[1]。在新生儿重症监护室 (neonatal intensive care unit, NICU) 住院治疗的患儿中, 新生儿 ARDS 发病率为 10%, 病死率高达 35%~46%^[2]。ARDS 临床表现为气促、呼吸窘迫、低氧血症、双肺透光度降低甚至白肺等^[3]。维生素 A (VA) 作为人体代谢必需的微量营养素, 可参与胎儿肺部早期的发育并影响肺部的免疫功能^[4]。不同地区新生儿中维生素 A 缺乏 (vitamin A deficiency, VAD) 的发生率虽然不同, 但总体均较高^[5]。目前, 有研究发现, 发生 ARDS 的早产儿血清 VA 水平较同胎龄未发生 ARDS 的早产儿更低, 且 VAD 早产儿更容易发生 ARDS^[6]; Elfarargy 等^[7]发现, VAD 可加重 ARDS 的严重程度, 并可作为新生儿 ARDS 发展和严重程度的预测指标。以上研究结果均提示 VAD 与新生儿 ARDS 的严重程度密切相关, 但其机制尚未阐明。本课题组前期建立 VAD 新生大鼠 ARDS 模型, 检测肺泡灌洗液 (BALF) 时发现肺泡巨噬细胞为主要的差异细胞^[8]。本研究拟检测肺泡巨噬细胞 M1 及 M2 型的极化情况, 探讨 VAD 调节 ARDS 的作用及其机制, 旨在改善新生儿 ARDS 的预后, 为临床防治该疾病提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂 54 只 180~220 g SPF 级 SD 大鼠, 其中雌鼠 36 只, 雄鼠 18 只, 购自重庆医科大学动物中心。RNA 提取及反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); CD206、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 等 ELISA 试剂盒 (美国 Abcam 公司); 丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (南京建成科技有限公司); 超氧化物歧化酶 (SOD) 及 TUNEL 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); F4/80 抗体 (美国 CST 公司); CD86 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); VAD 饲料及 VA 正常 (VAN) 饲料 (常州鼠一鼠二生物科技有限公司), 脂多糖 (LPS, 美国 Sigma-Aldrich 公司); RNA 引物 (上海生物生工有限公司)。本研究已通过动物伦理委员会审查 (AMUWEC20219010), 并严格按照动物伦理委员会要求完成实验。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备及分组 24 只 SD 雌鼠在孕前 2 周给予 VAD 饲料 (400 U VA/kg) 喂养, 12 只 SD 雌鼠则予以 VAN 饲料 (2300 U VA/kg) 喂养; 雄鼠均给予普通常规饲料。将 SD 大鼠按照雌:雄=2:1 的比例合笼

交配 12 h 后取出雌鼠，随后继续分别给予 VAD 及 VAN 饲料喂养至新生大鼠生后 7 d，分别获得 VAD ($n=40$) 及 VAN ($n=20$) 新生大鼠模型^[8]。从 VAD 新生大鼠中选取 20 只，于生后第 2 天一次性给予腹腔注射 VA (25 μg VA/只，相当于人体内 1 个月 1000 U/d 的剂量)，获得 VAD 挽救 (VAD recover, VADR) 新生大鼠模型。将 VAD 新生大鼠分为 VAD ctrl 组 ($n=10$) 与 VAD 组 ($n=10$)，VAN 新生大鼠分为 VAN ctrl 组 ($n=10$) 与 VAN 组 ($n=10$)，VADR 新生大鼠分为 VADR ctrl 组 ($n=10$) 与 VADR 组 ($n=10$)，其中，VAD ctrl 组、VAN ctrl 组及 VADR ctrl 组新生大鼠于生后第 7 天给予气管内灌注磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)；VAD 组、VAN 组及 VADR 组新生大鼠于生后第 7 天给予气管内灌注 LPS (5 mg/kg) 4 h，分别构建各组新生大鼠 ARDS 模型^[9]。

1.2.2 新生大鼠一般情况、BALF 中细胞计数检测及病理学形态观察 记录各组新生大鼠一般情况。建模后 4 h 断颈处死各组新生大鼠，并以无菌 PBS 灌洗并收集 BALF，予以过滤器过滤除去 BALF 中的黏液后，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下、500 r/min 离心 5 min，涂片后用 May-Grunwald-Giemsa 染色，用于细胞分类计数。建模后 4 h 取肺组织标本，观察各组新生大鼠肺组织出血、水肿等情况。取肺组织样本固定、包埋、切片、染色、封片后，在显微镜下观察肺组织病理损伤情况。肺组织湿干比 (W/D) 检测：取新生大鼠右上肺叶称重；随后将样本置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中 72 h 烘干，取出后再次称重；肺叶湿重与烘干后重量的比值即为 W/D^[10]。

1.2.3 ELISA 检测血清中的 VA 含量及肺组织中炎症因子的表达情况 收集各组大鼠的血液，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，3000 r/min 离心 10 min，取上清液，用 PBS 稀释后检测各组大鼠的 VA 含量。取出冻存的新生大鼠肺组织标本，按比例 (1 mg 组织：5 μl 裂解液) 加入组织裂解液，加入蛋白酶抑制剂，匀浆后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min，取上清液，各炎症因子指标检测严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.4 比色法检测各组氧化应激情况 在 100 mg 肺组织中加入 PBS 匀浆，样本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下、1000 r/min 离心 10 min，取上清。(1) SOD 活性检测：各组样本分别取 20 μl 上清液后加入 200 μl 工作液；继续加入 20 μl 稀释缓冲液及 20 μl 酶工作液，充分混合；混合后样本于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 20 min；用酶标仪在 450 nm 处读数^[11]。(2) MDA 含量检测：酶标仪预热 30 min 以上，将各组待测标本分别加入 MDA 检测工作液、样本、蒸馏水，立即混匀；混合液在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 60 min 后，置于冰浴中冷却，常温

10 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min。吸取 200 μl 上清液于微量玻璃比色皿中，测定各样本在 532 nm 处的吸光度^[12]。

1.2.5 qRT-PCR 检测肺部炎症因子水平 将肺组织样本按说明书步骤提取 RNA 后测定其浓度；将 RNA 反转录为 cDNA，再以 cDNA 为模板进行扩增。以 GAPDH 为内参照，计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 PCR primer sequence

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	上游: ATGGGTGTGAACCACGAGA
	下游: CAGGGATGATGTTCTGGGCA
IL-6	上游: CACAGAGGATACCACTCCCAACAGA
	下游: ACAATCAGAATTGCCATTGCACAAC
TNF- α	上游: AGCACAGAAAGCATGATCCG
	下游: CTGATGAGAGGGAGGCCATT
iNOS	上游: TTGGTCCAGCATGTACCCT
	下游: TCCTGCCACTGAGTTCGTC
IL-10	上游: GCTGGACAACATACTGCTAACCG
	下游: CACAGGGGAGAAATCGATGACAG
Arg-1	上游: ATCGTGTACATTGGCTTGCG
	下游: CGTCGACATCAAAGCTCAGG

IL-6. 白细胞介素-6; TNF- α . 肿瘤坏死因子- α ; iNOS. 诱导型一氧化氮合酶; Arg-1. 精氨酸酶 1

1.2.6 TUNEL 检测各组细胞凋亡情况 肺组织标本进行包埋、切片及脱蜡后，用蛋白酶 K 工作液修复，破膜工作液破膜；按试剂说明书步骤加入相应试剂后将样本置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 2 h；BSA 封闭后加入 TDT 酶，再给予 dUTP 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 50 min；滴加 DAPI 染液，避光孵育 10 min，PBS 洗 3 次；封片后置于 Eclipse Ci 正置荧光显微镜下观察并采集图像^[13]。

1.2.7 免疫荧光染色检测肺泡巨噬细胞极化情况 取肺组织样本包埋后行冷冻组织切片，冷丙酮固定 10 min 后，再用 10% 山羊血清封闭 1 h；加入 F4/80 抗体 (1:50) 孵育 2 h 后加入 CD86 抗体 (1:200)，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。同时设置 Isotype 组，加入抗体同种属、同来源、同型的免疫球蛋白作为对照，以排除假阳性。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后，加入羊抗兔二抗 (1:100, FITC 标记) 孵育 1 h，DAPI 染色后 PBS 洗 3 次，封片后置于荧光显微镜下观察^[14]。

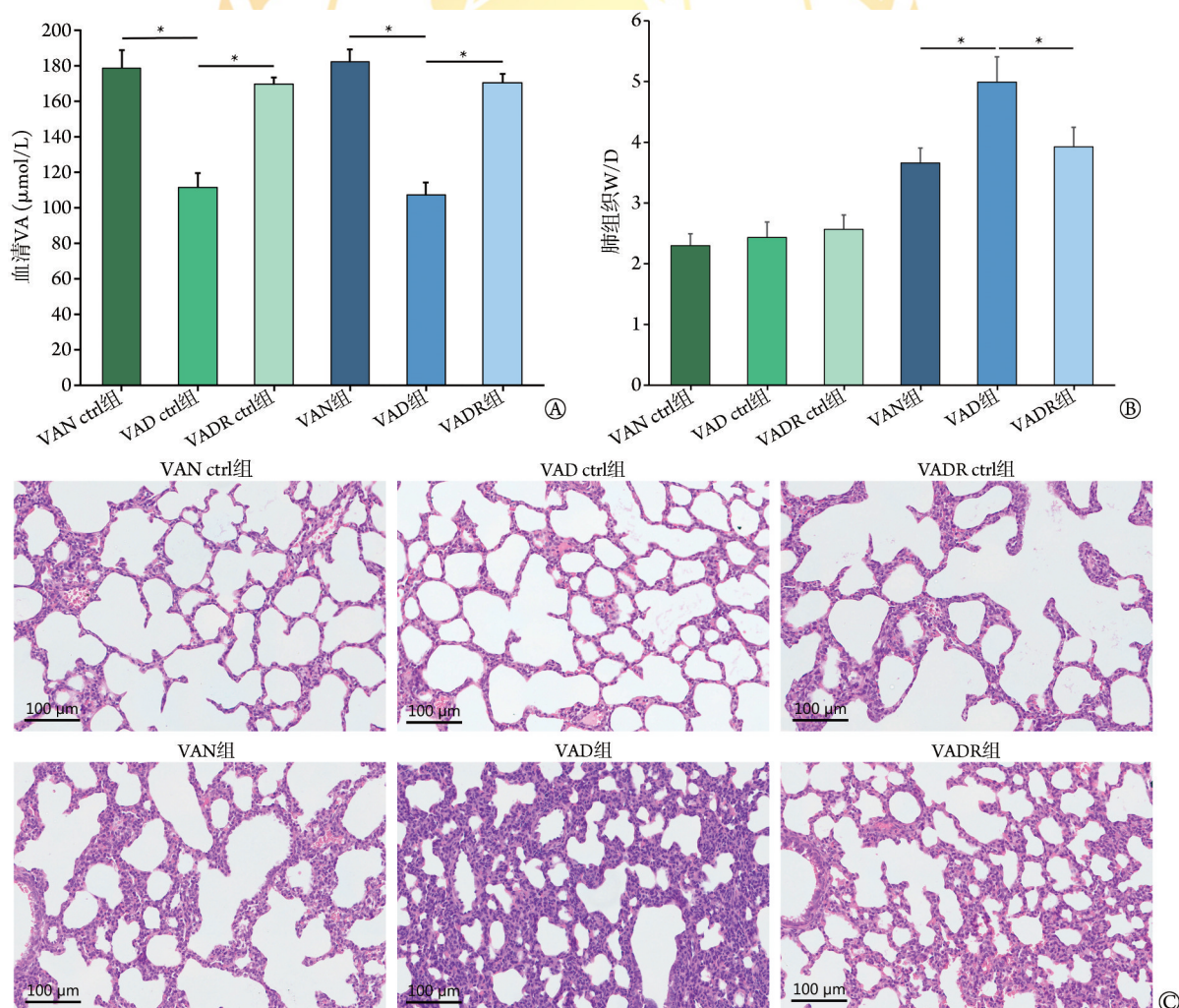
1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。所有数据均为计量资料，符合正态分布且方差齐时以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 LSD- t 检验；方差不齐时以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示，组间比较采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组新生大鼠一般情况、血清VA含量及肺组织损伤情况比较 取生后7d的新生大鼠建模。建模前，VAD新生大鼠体重较VAN新生大鼠体重减轻、体格偏小、毛发稀疏；而VADR组新生大鼠一般情况较好，毛发光滑，发育良好。与VAN组比较，VAD新生大鼠血清VA含量明显降低($P<0.05$) (图1A)，而VADR组无明显差异；与VAD组比较，VADR组血清VA含量明显增高($P<0.05$) (图1A)。与VAN组比较，VAD组新生大鼠表现为更为严重的气促、呼吸窘迫，肺部组织水肿、充血情况更为明显，W/D明显增高($P<0.05$)，而VADR组无明显差异；与VAD组比较，VADR组新生大鼠肺组织水肿、充血情况明显减轻，W/D明显降低($P<0.05$) (图1B)。HE染色结果显示，VAN ctrl组、VAD ctrl组及VADR ctrl组肺组织屏障完整，炎性细胞浸润较少；与VAN组比较，

VAD组新生大鼠肺组织炎性细胞浸润更严重，屏障损伤更明显；与VAD组比较，VADR组新生大鼠肺组织炎性细胞浸润减少，肺损伤减轻 (图1C)。

2.2 各组新生大鼠BALF中主要细胞数量比较 BALF中，肺泡巨噬细胞含量最高，且为主要的差异细胞。与VAN组比较，VAD组BALF中细胞总数、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数均明显增多($P<0.05$)，而VADR组细胞总数、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数差异无统计学意义；与VAD组比较，VADR组细胞总数、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数均明显减少($P<0.05$)。进一步检测BALF中肺泡巨噬细胞数量发现，与VAN组比较，VAD组BALF中巨噬细胞数增多($P<0.05$)，而VADR组中巨噬细胞数差异无统计学意义；与VAD组比较，VADR组中肺泡巨噬细胞数明显减少($P<0.05$)。而VAN ctrl组、VAD ctrl组及VADR ctrl组所有指标差异均无统计学意义($P>0.05$) (图2)。



A. 血清中的维生素A(VA)含量; B. 肺组织湿干比(W/D); C. 肺组织HE染色; * $P<0.05$

图1 各组新生大鼠VA含量及肺组织损伤情况比较

Fig.1 Comparison of VA content and lung tissue damage in neonatal rats in each group

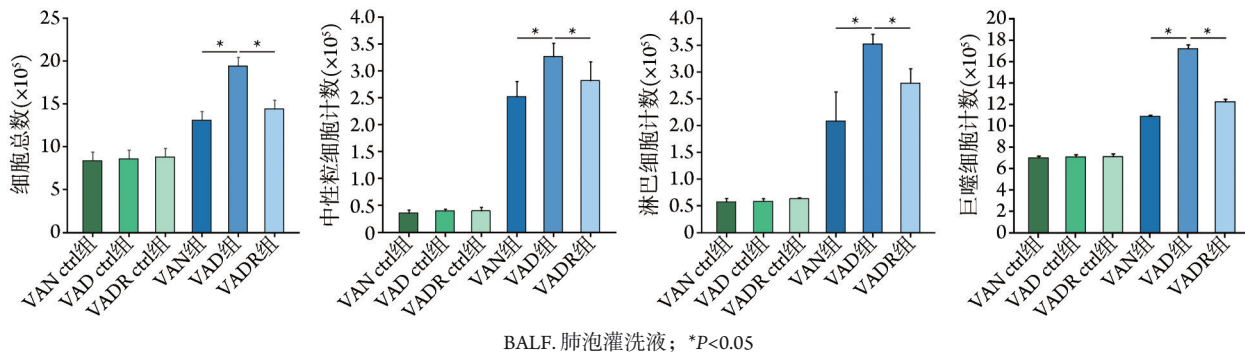


图2 各组新生大鼠BALF中细胞数量检测情况

Fig.2 Detection of cells count in the bronchoalveolar lavage fluid of neonatal rats in each group

2.3 各组新生大鼠肺泡巨噬细胞极化及炎症因子表达情况比较 免疫荧光染色检测显示,与VAN组比较, VAD组肺泡巨噬细胞M1标志物CD86表达水平明显升高($P<0.05$),而VADR组差异无统计学意义($P>0.05$);与VAD组比较, VADR组肺泡巨噬细胞M1标志物CD86表达水平明显降低($P<0.05$)。与VAN组比较, VAD组巨噬细胞M1极化免疫荧光强度增强($P<0.05$),而VADR组差异无统计学意义($P>0.05$) (图3)。三组间M2极化下游标志物*IL-10*、*Arg-1* mRNA水平差异均无统计学意义($P>0.05$,图4A)。与VAN组比较, VAD组巨噬细胞M1型分泌的炎症因子*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* mRNA及蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$),而VADR组差异无统计学意义($P>0.05$);与VAD组比较, VADR组新生大鼠*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* mRNA及蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$) (图4B、C)。而VAN ctrl组、VAD ctrl组及VADR ctrl组所有指标差异均无统计学意义($P>0.05$) (图3—4)。

2.4 各组新生大鼠肺组织细胞凋亡及氧化应激标志物比较 与VAN组比较, VAD组新生大鼠肺部组织细胞凋亡指数明显增高($P<0.05$),而VADR组差异无统计学意义;与VAD组比较, VADR组新生大鼠肺部组织细胞凋亡指数明显降低($P<0.05$) (图5A、B)。与VAN组比较, VAD组新生大鼠肺组织SOD活性降低、MDA含量增高($P<0.05$),而VADR组差异无统计学意义;与VAD组比较, VADR组新生大鼠肺组织SOD活性增强、MDA含量降低($P<0.05$) (图5C)。而VAN ctrl组、VAD ctrl组及VADR ctrl组所有指标差异均无统计学意义($P>0.05$) (图5)。

3 讨论

ARDS是新生儿常见的临床危重症之一,早期防治对改善新生儿ARDS预后具有重要意义^[15]。因此,本研究建立VAD及VADR新生大鼠ARDS模型,检测BALF中的主要细胞时发现,肺泡巨噬细胞含量最高,且为主要的差异细胞。肺泡巨噬细胞M1极化在

ARDS的启动过程中发挥关键作用^[16],其极化可促进下游标志物*iNOS*、*TNF- α* 、*IL-6*等炎症因子的表达,诱导ARDS肺部损伤^[17]。Deng等^[18]发现,间充质干细胞可通过增加肺泡巨噬细胞M2极化,增强肺泡巨噬细胞的吞噬能力,促进ARDS肺损伤的修复。

VA是维持人体代谢的必需营养素,但由于其难以通过胎盘进入胎儿体内,因此新生儿血清和肝脏中的VA含量明显低于母体。围产期发生的VAD不仅可影响胎儿免疫器官的发育,还可增加肺部疾病的感染风险^[19]。本研究采用Antoine等^[8]的方法建立VAD大鼠模型,并参考Zhen等^[9]的方法建立VADR新生大鼠模型,结果显示,与VAN组比较, VAD组新生大鼠血清VA含量明显降低,且一般情况较差,毛发稀疏,体格偏小,反应欠佳;与VAD组比较, VADR组新生大鼠血清VA含量增加,一般情况改善,毛发光亮,反应尚可。提示VAD及VADR新生大鼠模型建立成功,符合现有的研究结果,且VAD可影响新生儿的生长发育及免疫功能。

VA参与了早期的肺发育、肺泡屏障形成及组织再生,在感染诱导的免疫反应中发挥重要作用。视黄酸是VA的主要活性形式,在调节早期的肺发育、促进肺泡的形成及分支形态发生、维持细胞增殖及合成肺表面活性物质中具有重要价值,还可促进肺表面活性物质蛋白C的表达,并预防ARDS的发生。与健康儿童比较, VAD患儿的呼吸道感染发病率约高2倍;反复感染的患儿VA水平降低,补充VA则可缓解新生儿肺炎链球菌诱导的肺损伤^[20]。程晨等^[21]发现,发生ARDS的早产儿血清VA水平较同胎龄未发生ARDS的早产儿低。Elfarargy等^[7]发现, VAD可加重ARDS的严重程度,并可作为新生儿ARDS发展和严重程度的预测指标。本研究发现,与VAN组比较, VAD组新生大鼠表现为更为严重的肺部损伤,组织水肿、坏死、炎性细胞及免疫细胞聚集、屏障破坏,而补充VA则可减轻VAD新生大鼠的肺部损伤、组织水肿及炎性细胞聚集,提示VAD

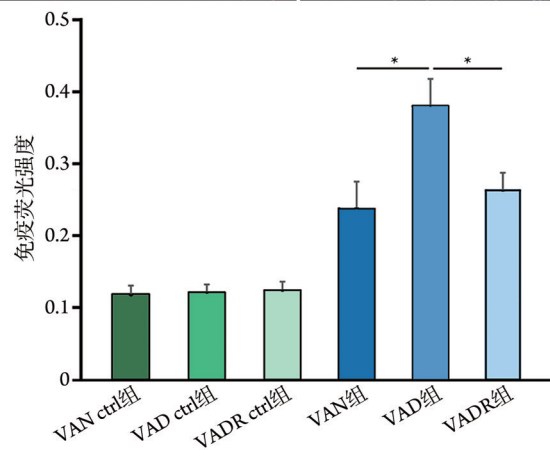
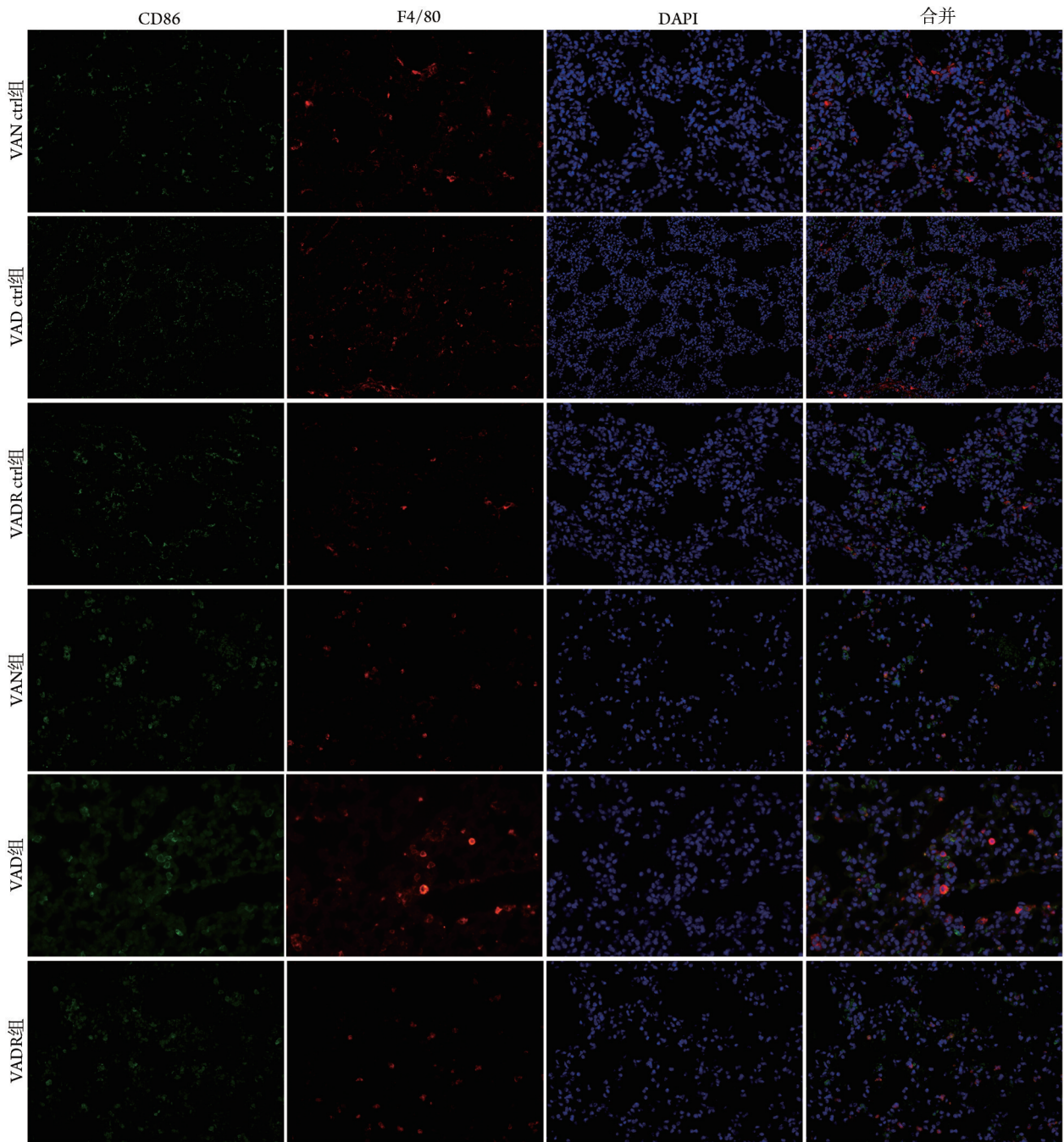
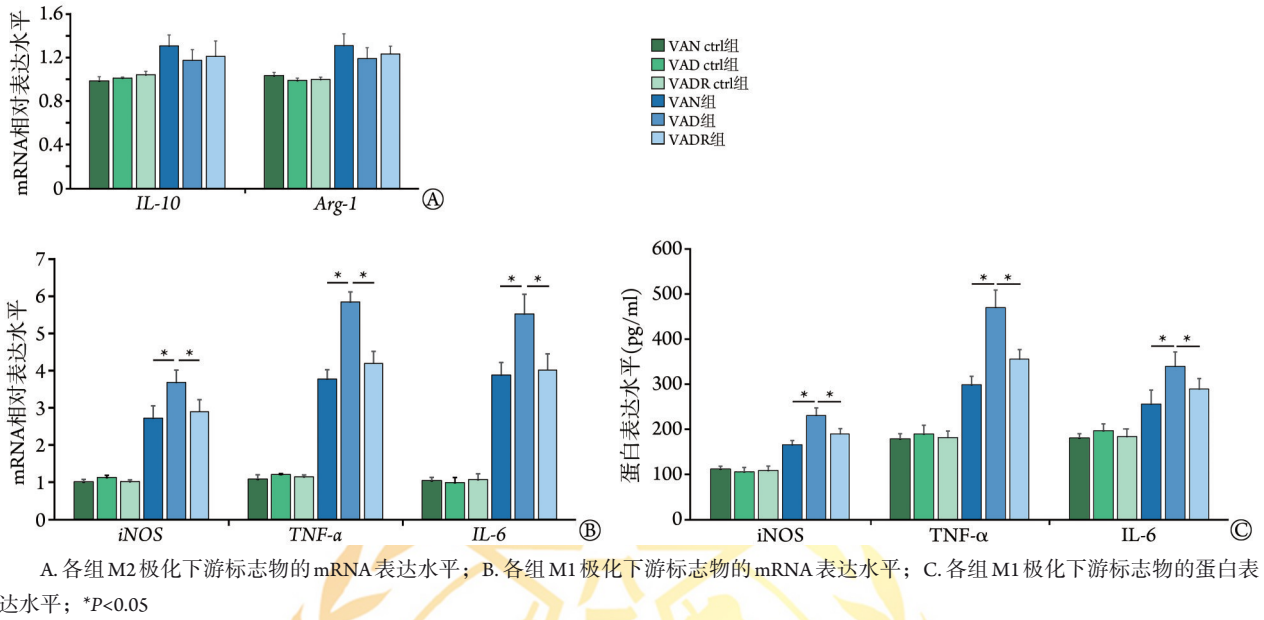


图3 免疫荧光染色检测各组新生大鼠M1型肺泡巨噬细胞标志物CD86的表达情况(×400)

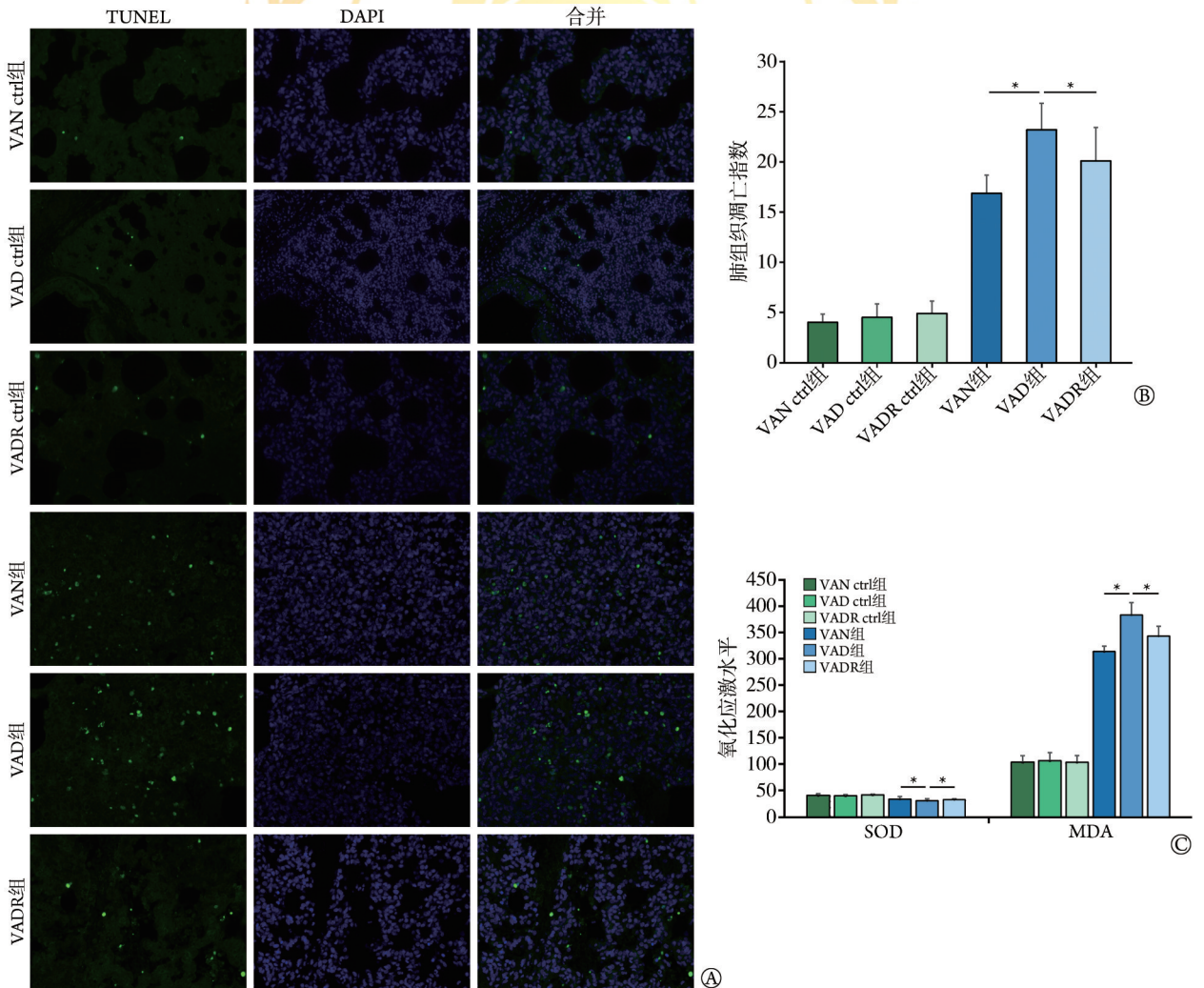
Fig.3 Immunofluorescence detection of M1 marker CD86 expression in four groups of rats (×400)



A. 各组M2极化下游标志物的mRNA表达水平; B. 各组M1极化下游标志物的mRNA表达水平; C. 各组M1极化下游标志物的蛋白表达水平; * $P < 0.05$

图4 VAD对肺泡巨噬细胞M1、M2极化标志物及炎症因子的影响

Fig.4 Effect of VAD on M1 and M2 polarization markers and inflammatory factors in alveolar macrophages



A. TUNEL 检测细胞凋亡情况; B. 各组肺组织凋亡指数比较; C. 各组小鼠氧化应激标志物表达情况比较; * $P < 0.05$

图5 各组新生大鼠肺组织细胞凋亡及氧化应激的比较

Fig.5 Comparison of oxidative stress and apoptosis of lung tissue in neonatal rats in various groups

与儿童尤其是新生儿ARDS的严重程度密切相关。但顾志勇^[22]发现,血浆VA浓度与ARDS疾病的发生无明显关系,研究结果出现争议可能与ARDS的严重程度有关,即机体存在轻度ARDS时具有自我免疫调节功能,VAD对ARDS的影响较小,而存在中重度ARDS时,VAD则可诱导免疫失衡,加重ARDS肺损伤。

此外,本研究建立VAD及VADR新生大鼠ARDS模型,检测BALF中主要细胞时发现肺泡巨噬细胞为主要的差异细胞。而Zhen等^[9]发现,VAD可通过调节巨噬细胞M1与M2的平衡来参与新生儿的肺部慢性炎症,调控支气管肺部发育不良。为进一步探讨在ARDS中VAD对肺泡巨噬细胞极化的影响,本研究检测了各组大鼠M1及M2型标志物的表达情况,结果发现,与VAN组比较,VAD组新生大鼠肺泡巨噬细胞M1型极化增加,炎症因子TNF- α 、IL-6及iNOS的表达水平明显升高,而VADR组新生大鼠补充VA后其肺部巨噬细胞M1型极化减轻,炎症因子表达水平明显降低。与VAN组比较,VAD组新生大鼠肺泡M2型极化及其下游标志物IL-10、Arg-1表达水平差异均无统计学意义,提示VAD主要是通过诱导巨噬细胞M1型极化来加重ARDS的肺部损伤。Gundra等^[23]发现,VAD可调节单核细胞衍生巨噬细胞在替代激活过程中转化为组织驻留巨噬细胞的过程。Erkelens等^[24]发现,肠道巨噬细胞通过VA和 β 葡聚糖受体抗体(Dectin-1)介导的信号转导来平衡炎症表达谱,调节肠道的炎症反应。Esteban-Pretel等^[25]则认为,VA可影响肺泡上皮细胞和内皮细胞的发育,甚至通过调控免疫细胞来抑制炎症对内皮屏障造成的损害。从以上研究结果推测,VAD可能通过调节肺部免疫微环境,诱导巨噬细胞M1型极化,从而加重新生儿ARDS的肺部损伤。但VAD对肺泡巨噬细胞M2型极化虽有下调趋势,但差异无统计学意义,可能与LPS在诱导ARDS模型时的作用时间较短、对肺泡巨噬细胞M2极化作用影响较小有关。

视黄酸可通过增强细胞活力、促进更多细胞从G₁期进入S期、抑制细胞凋亡来促进细胞增殖。在ARDS中,肺泡巨噬细胞M1极化可激活下游的炎症反应,并诱导氧化应激及细胞凋亡。Petiz等^[26]发现,VA能够减轻氧化锌诱导的肝脏氧化应激,从而减轻肝脏损伤。本研究进一步检测各组新生大鼠肺组织的氧化应激及细胞凋亡情况发现,与VAN组比较,VAD组新生大鼠肺部损伤标志物MDA含量增多、SOD活性降低,且细胞凋亡增加;而VADR组新生大鼠补充VA后其肺部损伤标志物MDA含量降低、SOD活性增强,细胞凋亡减少,提示VAD可增加肺部氧化应激、炎症反应及细胞凋亡,从而加重新生

大鼠ARDS肺部损伤。

综上所述,本研究发现,VAD与新生大鼠ARDS的严重程度有关,并可调节肺泡巨噬细胞M1型极化及其标志物iNOS、CD86的表达,增加肺部MDA含量,并下调SOD活性,上调炎症因子IL-6、TNF- α 的表达及细胞凋亡,最终加重新生大鼠ARDS的肺部损伤。因此,在新生儿尤其是早产儿中,早期VA干预可改善新生儿ARDS的肺损伤严重程度及预后。但在复杂的机体免疫微环境中,VAD如何调节巨噬细胞M1型极化及具体分子信号通路仍有待进一步阐明。

【参考文献】

- [1] de Luca D, van Kaam AH, Tingay DG, *et al.* The Montreux definition of neonatal ARDS: biological and clinical background behind the description of a new entity[J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(8): 657-666.
- [2] Oishi P, Fineman JR. Equipoise and acumen in pediatric acute respiratory distress syndrome research[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(11): 1326-1327.
- [3] Hendriks G, Stephenson R, Yajamanyam PK. Current practice in early management of neonatal respiratory distress syndrome: is it evidence-based? [J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2018, 103(2): F191.
- [4] Talaei M, Hughes DA, Mahmoud O, *et al.* Dietary intake of vitamin A, lung function and incident asthma in childhood[J]. *Eur Respir J*, 2021, 58(4): 2004407.
- [5] Liu RP, Wu HB, Chen Y, *et al.* Prevalence of vitamin A and vitamin D deficiency in hospitalized neonates in Xi'an, China[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2022, 31(2): 275-281.
- [6] Timoneda J, Rodríguez-Fernández L, Zaragoza R, *et al.* Vitamin A deficiency and the lung[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1132.
- [7] Elfaragy MS, Abu-Risha S, Al-Ashmawy G, *et al.* Serum vitamin A levels as a novel predictor for respiratory distress syndrome in neonates: is it beneficial? [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2022, 22(2): 235-240.
- [8] Antoine T, Borel P, Govers R, *et al.* Vitamin A deficiency during the perinatal period and first weeks of life modifies vitamin A and lipid postprandial metabolism in both female and male young rats[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65(21): e2100451.
- [9] Zhen H, Hu HB, Rong GJ, *et al.* VitA or VitD ameliorates bronchopulmonary dysplasia by regulating the balance between M1 and M2 macrophages[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 141: 111836.
- [10] Zhang YF, Song DL, Peng ZY, *et al.* Anisodamine enhances macrophage M2 polarization through suppressing G9a-mediated interferon regulatory factor 4 silencing to alleviate lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2022, 381(3): 247-256.
- [11] Ma HT, Wang HL, Zhang HJ, *et al.* Effects of phenanthrene on oxidative stress and inflammation in lung and liver of female rats[J]. *Environ Toxicol*, 2020, 35(1): 37-46.
- [12] Pu XY, Li FX, Lin X, *et al.* Oxidative stress and expression of inflammatory factors in lung tissue of acute mountain sickness rats

- [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(2): 49.
- [13] Ma YM, Liu XM, Luo LJ, *et al.* Effect of pirfenidone protecting against cigarette smoke extract induced apoptosis[J]. *Tob Induc Dis*, 2022, 20: 24.
- [14] Yagi Y, Aly RG, Tabata K, *et al.* Three-dimensional histologic, immunohistochemical, and multiplex immunofluorescence analyses of dynamic vessel co-option of spread through air spaces in lung adenocarcinoma[J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(4): 589-600.
- [15] Ketcham SW, Sedhai YR, Miller HC, *et al.* Causes and characteristics of death in patients with acute hypoxemic respiratory failure and acute respiratory distress syndrome: a retrospective cohort study[J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 391.
- [16] Mahida RY, Scott A, Parekh D, *et al.* Acute respiratory distress syndrome is associated with impaired alveolar macrophage efferocytosis[J]. *Eur Respir J*, 2021, 58(3): 2100829.
- [17] Sun SS, Yao YZ, Huang C, *et al.* CD36 regulates LPS-induced acute lung injury by promoting macrophages M1 polarization[J]. *Cell Immunol*, 2022, 372: 104475.
- [18] Deng HM, Wu LM, Liu MY, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate LPS-induced ARDS by modulating macrophage polarization through inhibiting glycolysis in macrophages[J]. *Shock*, 2020, 54(6): 828-843.
- [19] Gannon BM, Rogers LM, Tanumihardjo SA. Metabolism of neonatal vitamin A supplementation: a systematic review[J]. *Adv Nutr*, 2021, 12(3): 942-958.
- [20] Penkert RR, Smith AP, Hrinčius ER, *et al.* Effect of vitamin A deficiency in dysregulating immune responses to influenza virus and increasing mortality rates after bacterial coinfections[J]. *J Infect Dis*, 2021, 223(10): 1806-1816.
- [21] Cheng C, Bao L. Correlation analysis between serum vitamin A level and neonatal respiratory distress syndrome in premature infants[J]. *J Clin Pediatr*, 2015, 33(8): 734-737. [程晨, 包蕾. 早产儿血清维生素A水平与新生儿呼吸窘迫综合征的相关性分析[J]. *临床儿科杂志*, 2015, 33(8): 734-737.]
- [22] Gu ZY. Clinical study on the relationship between vitamin A and neonatal diseases[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2014: 89-94. [顾志勇. 维生素A与新生儿疾病关系的临床研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014: 89-94.]
- [23] Gundra UM, Girgis NM, Gonzalez MA, *et al.* Vitamin A mediates conversion of monocyte-derived macrophages into tissue-resident macrophages during alternative activation[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(6): 642-653.
- [24] Erkelens MN, Govers G, Konijn T, *et al.* Intestinal macrophages balance inflammatory expression profiles *via* vitamin A and dectin-1-mediated signaling[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 551.
- [25] Esteban-Pretel G, Marín MP, Renau-Piqueras J, *et al.* Vitamin A deficiency disturbs collagen IV and laminin composition and decreases matrix metalloproteinase concentrations in rat lung. Partial reversibility by retinoic acid[J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(1): 137-145.
- [26] Petiz LL, Kunzler A, Bortolin RC, *et al.* Role of vitamin A oral supplementation on oxidative stress and inflammatory response in the liver of trained rats[J]. *Physiol Appliquee Nutr Metab*, 2017, 42(11): 1192-1200.

(责任编辑: 张小利)

解放军医学杂志®