

孕乳期补充维生素 D 对仔鼠生长发育及细胞免疫功能的影响*

黄利华¹, 胡庆兰¹, 李伟明¹, 柳国胜², 李宜花²

(1. 广东省清远市妇幼保健院科教科 511500; 2. 暨南大学附属第一医院儿科, 广州 510630)

[摘要] **目的** 研究孕乳期补充维生素 D (VitD) 对仔鼠生长发育及细胞免疫功能的影响。**方法** 选用 120 只小鼠依据 VitD 治疗剂量不同分为高、中、低剂量组 (各 30 只), 分别给予 VitD 滴剂 3.44、1.72、0.86 IU, 并设置对照组 (30 只) 不给予 VitD。观察幼鼠体质量、外周血 25-羟维生素 D₃ [25-(OH)D₃], 分别测定细胞免疫功能 (迟发性变态反应实验)、体液免疫功能 [包括抗体生成细胞数和半数溶血值 (HC₅₀) 测定]、单核-巨噬细胞吞噬功能 (包括小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验和碳廓清实验), 并进行 T 淋巴细胞亚群流式细胞术测定。**结果** 随着 VitD 剂量的增加, 仔鼠外周血中 25-(OH)D₃ 及钙离子水平逐渐升高, 与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 体质量及体长逐渐增加, 各剂量组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 高剂量组、中剂量组足趾肿胀度、吞噬百分率、抗体生成细胞数、血清溶血素 HC₅₀ 均增加, 吞噬指数均减低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。随 VitD 剂量的增加, CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量和 CD4⁺/CD8⁺ 逐渐增加。**结论** 孕乳期补充 VitD 可促进子代小鼠的生长发育, 具有增强机体免疫功能的作用。

[关键词] 维生素 D; 免疫功能; 小鼠**[中图分类号]** R720.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)19-2615-03**Effects of Vitamin D on growth and immune function in neonatal mice***Huang Lihua¹, Hu Qinglan¹, Li Weiming¹, Liu Guosheng², Li Yihua²

(1. Department of Science and Education, Maternal and Child Healthcare Hospital of Qingyuan City, Qingyuan, Guangdong 511500, China; 2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of Vitamin D (VitD) supplementation on growth and immune function in neonatal mice. **Methods** A total of 120 mice were divided into four groups (30 mice in each group) according to dose of VitD. The high-dose group, medium-dose group and low-dose group was given 3.44, 1.72, 0.86 IU VitD drops, respectively. The control group was not treated with VitD drops. Rat body weight, level of peripheral blood 25-(OH)D₃ were observed. The cellular immune function (determined by using delayed hypersensitivity reaction experiment), humoral immune function (assessed by antibody producing cells counts and HC₅₀ determination) and mononuclear-macrophage phagocytic function (assessed by mouse peritoneal macrophage phagocytosis of chicken red blood cells test and carbon clearance test) were detected. The flow cytometry assay was carried out to differentiate T lymphocyte subsets. **Results** With the increase of dose of VitD, levels of peripheral blood 25-(OH)D₃ and calcium ion were gradually increased, there were statistically significant differences when compared with the control group ($P < 0.05$); the body weight and body length were gradually increased, while no statistically significant difference was found among the groups treated with VitD ($P > 0.05$). Compared to the control group, the toes swelling, phagocytic percentage, number of antibody producing cells, serum soluble HC₅₀ in the high-dose group and medium-dose group were increased significantly, while carbon clearance test phagocytic index were decreased significantly ($P < 0.05$). With the increase of dose of VitD, the number of CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes and the CD4⁺/CD8⁺ ratio were gradually increased. **Conclusion** VitD could promote the growth and development of offspring mice, and enhance the immune function of the body.

[Key words] Vitamin D; immune function; mice

维生素 D (Vitamin D, VitD) 是一类具有生物活性的维生素, 其生物学功能表现为维持血钙磷稳定和保持骨骼的生长。近年来大量研究证实, VitD 具有神经内分泌激素功能, 可以调节组织细胞的免疫功能^[1]。最近学者越来越重视母体 VitD 状况对子代生长发育和免疫功能影响的研究。有临床研究证实, 小于胎龄的胎儿其母亲孕期 VitD 水平显著低于正常人群, 这提示母亲孕期 VitD 水平可能与胎儿的生长发育有关^[2]。关于不同剂量母体 VitD 对子代生长发育及免疫功能的影响鲜见文献报道。基于此, 本研究观察了母体接受不同剂量 VitD 干预对小鼠生长发育及细胞免疫功能的影响, 从而为 VitD 的合理使用提供实验依据。

1 材料与方**1.1 材料** 120 只清洁级 ICR 小鼠, 8 周龄, 雄鼠体质量为

32~34 g, 雌鼠体质量为 28~30 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物合格证批号: SCXK (京) 2012-0001]。小鼠饲养于第三军医大学实验动物饲养中心, 分笼饲养, 温度 (20±2)℃, 湿度 (55±5)%, 人工光照, 明暗各 12 h/d, 24 h 自由取食和饮水。

1.2 主要仪器与试剂 含小牛血清的细胞培养液、磷酸盐缓冲液 (PBS)、绵羊红细胞 (SRBC)、补体、鸡红细胞、瑞氏染液、文齐氏液、异硫氰酸荧光素标记的抗小鼠 CD4 及 CD8 (FITC-CD4、FITC-CD8) 单克隆抗体 (武汉博士德生物有限公司)、25-羟维生素 D₃ [25-(OH)D₃] 测定试剂盒 (上海生工生物有限公司)、紫外分光光度仪 (美国 BD 公司)、FAC sort 流式细胞仪 (美国 BD 公司)、二氧化碳培养箱 (上海基玛公司)、离心机 (上海基玛公司)、倒置显微镜 (日本 Nikon 公司)、恒温水浴锅、细* 基金项目: 清远市产业技术研究与开发资金项目 (2013A014)。
免疫机制方面的研究。

作者简介: 黄利华 (1975—), 副主任中医师, 博士, 主要从事血液病及其

胞计数板、游标卡尺、全自动生化分析仪等。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 将雌鼠分成 A、B、C、D 4 组, 每组 30 只, A、B、C 组分别给予 VitD 滴剂, A 组为高剂量组 (VitD 滴剂 3.44 IU), B 组为中剂量组 (VitD 滴剂 1.72 IU), C 组为低剂量组 (VitD 滴剂 0.86 IU), D 组为对照组不给予 VitD。常规饲养 3 d 后, 按雌雄比例 2:1 将大鼠合笼, 从第 2 天清晨开始观察, 查到阴栓者单笼饲养, 并记录为孕 0 d。实验期从孕 19 d 至哺乳期第 22 天, 在常规给予普通饲料的基础上, 将上述实验药物灌胃。观察雌鼠的一般情况, 至雌鼠分娩期及哺乳第 22 天, 分别测定母鼠、仔鼠各实验室指标。每组取 20 只孕鼠于孕 18 周剖杀, 称量活胎体质量, 测量活胎鼠身长, 并对胎鼠免疫功能进行评价。

1.3.2 外周血 25-(OH)D₃ 及钙离子水平检测 分娩期与哺乳第 22 天分别抽取母鼠、仔鼠鼠尾静脉血, 于 30 min 内, 3 500 r/min 离心 5 min, 采用放射免疫分析 (radioimmunoassay, RIA) 检测外周血 25-(OH)D₃ 水平, 步骤均严格按照试剂盒说明书操作。采用全自动生化分析仪测定血钙水平。

1.3.3 细胞免疫功能检测 采用足趾增厚法, 每只小鼠静脉注射 0.2 mL 2% (v/v) SRBC。免疫后 4 d, 测量左后足趾部厚度, 然后在测量部位皮下注射 20 μL 20% (v/v) SRBC, 注射后于 24 h 测量左后足趾部厚度, 同一部位测量 3 次, 取平均值。

1.3.4 小鼠体液免疫功能检测 采用腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞及碳廓清实验方法: 给予小鼠腹腔注射 1% 的鸡红细胞悬液 1 mL, 然后处死小鼠, 用毛细吸管吹吸混匀腹腔内液体, 制作涂片, 瑞氏染液染色 5 min。计数巨噬细胞吞噬鸡红细胞情况, 计算吞噬百分率。吞噬百分率 = 吞噬有鸡红细胞的巨噬细胞数/总巨噬细胞数。按 0.1 mL/10 g 剂量给予小鼠墨汁, 注入墨汁后 2、10 min 分别从内眦静脉丛取血 20 μL, 并立即将其加入到体积总数为 3 mL 的 0.1% Na₂CO₃ 溶液中。用 721 分光光度计在 600 nm 波长测定的吸光度 (A) 值, 以 0.1% Na₂CO₃ 溶液作空白对照。k = (lgA₁ - lgA₂) / (t₂ - t₁)。

1.3.5 小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能检测 采用半数溶血值 (HC₅₀) 和抗体生成细胞数测定方法: 小鼠处死后无菌条件下取出脾脏, 制成细胞悬液, 2 000 r/min 离心 15 min, 加入裂解液裂解红细胞, 反复离心去除血小板。用培养液调整细胞浓度为 5 × 10⁶ /mL。取 1 mL 细胞悬液, 加入 10% SRBC 0.5 mL, 补体 1.00 mL, 设生理盐水为空白组。37 °C 水浴 30 min, 冰浴终止反应。分光光度计测定 A 值。将小鼠血清 1.00 mL, 5% SRBC 0.50 mL, 补体 1.00 mL 混合, 另设生理盐水为空白组。37 °C 水浴 30 min, 冰浴终止反应, 2 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 1.00 mL 加文齐氏液 3.00 mL, 静置 10 min, 分光光度计测定 A 值。另取 5% SRBC 0.25 mL, 加入文齐氏液 4 mL, 分光光度计测定 A 值, 即为实验中所用 SRBC 半数溶血时的 A 值。血清溶血素 HC₅₀ = (样品的 A 值 / SRBC 半数溶血时的 A 值) × 稀释倍数。

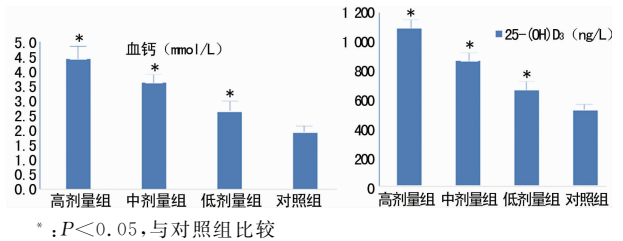
1.3.6 流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群变化 制备淋巴细胞悬液 1 × 10⁶ /mL, 分别加入 FITC-CD4, FITC-CD8 单克隆抗体 20 μL。4 °C 温浴 30 min。PBS 溶液洗涤 3 次, 采用流式细胞仪检测阳性率。

1.4 统计学处理 GraphPad Prism 4.0 软件 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 对数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布者两样本比较采用独立样本 *t* 检验, 非正态分布者采用非参数统计 Mann-Whitney 检验或 Kruskal-Wallis 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 各剂量组吸收胎数、平均每窝吸收胎数与对

照组相比, 差异均无统计学意义 (*P* > 0.05); 而各剂量组死胎数和平均每窝死胎数均高于对照组, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。随着 VitD 注射剂量的增加, 子鼠外周血中 25-(OH)D₃ 及钙离子水平逐渐升高, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 见图 1。



*: *P* < 0.05, 与对照组比较

图 1 各组小鼠外周血 25-(OH)D₃ 及钙离子水平比较

2.2 VitD 对子鼠体质量及体长的影响 与对照组比较, 各剂量组子鼠的体质量及体长均不同程度的增加, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。随着 VitD 剂量的增加, 体质量及体长逐渐增加, 各剂量组间比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 1。

表 1 VitD 对子鼠体质量及体长的影响 (*n* = 30, $\bar{x} \pm s$)

组别	体质量 (g)	体长 (cm)
高剂量组	1.89 ± 0.09*	2.89 ± 0.09*
中剂量组	1.66 ± 0.05*	2.67 ± 0.07*
低剂量组	1.53 ± 0.04*	2.54 ± 0.03*
对照组	1.41 ± 0.02	2.48 ± 0.04

*: *P* < 0.05, 与对照组比较

2.3 VitD 对迟发型变态反应及吞噬功能的影响 与对照组比较, 高剂量组、中剂量组足趾肿胀度、吞噬百分率均增加, 碳廓清实验吞噬指数均降低, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。随 VitD 剂量的增加, 足趾肿胀度、吞噬百分率逐渐增加, 吞噬指数逐渐减低, 各剂量组间比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 2。

表 2 VitD 对小鼠迟发型变态反应及吞噬功能的影响 (*n* = 30, $\bar{x} \pm s$)

组别	足趾肿胀度 (mm)	吞噬百分率 (%)	吞噬指数
高剂量组	0.53 ± 0.18*	51.5 ± 8.6*	4.03 ± 0.77*
中剂量组	0.46 ± 0.22*	48.7 ± 9.1*	4.06 ± 0.69*
低剂量组	0.39 ± 0.16	35.8 ± 10.2	4.11 ± 0.51
对照组	0.35 ± 0.13	33.4 ± 8.4	4.47 ± 0.61

*: *P* < 0.05, 与对照组比较

2.4 VitD 对体液免疫功能的影响 与对照组比较, 高剂量组、中剂量组抗体生成细胞数、血清溶血素 HC₅₀ 均升高, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。随 VitD 剂量的增加, 抗体生成细胞数、血清溶血素 HC₅₀ 逐渐增加, 各剂量组间比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 3。

表 3 VitD 对小鼠抗体生成细胞数的影响 (*n* = 30, $\bar{x} \pm s$)

组别	抗体生成细胞数 (%)	血清溶血素 HC ₅₀
高剂量组	235.1 ± 51.3*	259.1 ± 39.9*
中剂量组	209.7 ± 44.8*	254.9 ± 44.7*
低剂量组	196.5 ± 47.6	238.7 ± 39.8
对照组	183.8 ± 41.5	198.2 ± 43.4

*: *P* < 0.05, 与对照组比较

2.5 VitD 对 T 淋巴细胞亚群的影响 与对照组比较, 各剂量组 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量和 CD4⁺/CD8⁺ 升高, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。随 VitD 剂量的增加, CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量和 CD4⁺/CD8⁺ 逐渐增加, 且高剂量组增加较为明显, 见表 4。

表 4 VitD 对小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 ($n=30, \bar{x} \pm s$)

组别	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺ /CD4 ⁺
高剂量组	14.18±1.23*	50.06±4.27*	3.64±0.38*
中剂量组	13.77±2.23*	45.81±3.57*	3.32±0.53*
低剂量组	13.37±1.18*	41.09±4.12*	3.11±0.42*
对照组	13.05±2.01	37.29±3.51	2.79±0.31

* : $P < 0.05$, 与对照组比较

3 讨 论

VitD 作为一种微量元素,可以促进钙从肠道内吸收。活性 VitD 完全缺乏的小鼠具有明显的低血钙现象。除了调节钙磷平衡和骨代谢作用外,其在胚胎和胎儿发育过程中发挥着至关重要的作用,众所周知,胚胎与胎儿发育所需 VitD 主要通过胎盘由母体转运到胎儿循环,因此孕早期补充 VitD 对子代的生长发育具有决定性作用^[8]。本次实验笔者观察了孕前和孕期母体补充 VitD 对胎鼠生长发育的影响,同时本次实验设置了 3 种剂量的 VitD₃,分别为高剂量组(VitD 滴剂 3.44 IU)、中剂量组(VitD 滴剂 1.72 IU)、低剂量组(VitD 滴剂 0.86 IU),对大鼠进行为期 4 周的补充干预。结果显示,随着 VitD 注射剂量的增加,子鼠外周血中 25-(OH)D₃ 及钙离子水平逐渐升高,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。进一步观察发现,与对照组比较,各剂量组子鼠的体质量及体长均不同程度的增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$),随着 VitD 剂量的增加,体质量及体长逐渐增加。这些结果提示,母体补充 VitD 对维持子代的正常生长发育起到至关重要的作用。对于 VitD 在维持胎儿生长发育中的机制,有大样本的调查提示 VitD 缺乏能够引起 HIV-肺结核混合感染者的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平显著性升高^[4]。动物实验结果发现,VitD 通过下调 Toll 样受体下游的酪氨酸蛋白激酶-1/信号转导激活转录因子-3(JAK1/STAT3)信号通路,来抑制 TNF- α 的产生^[5]。另外研究表明,TNF- α 与胎儿生长发育迟缓密切相关。故笔者认为,孕期 VitD 可能通过一定的通道引起子代 TNF- α 改变,进而影响胎儿的生长发育,导致生长发育迟缓^[6]。

VitD 作为一种新型的免疫调节激素,在细胞免疫调节中发挥着重要的作用,VitD 对免疫系统的影响可以从以下几方面得到证实^[7-8]:(1) VitD 受体存在于活化炎性细胞中;(2) 1,25-二羟基维生素 D₃[1,25-(OH)D₃]可以抑制 T 淋巴细胞增殖;(3) 激活巨噬细胞,使之产生 1,25-(OH)D₃。在 T 淋巴细胞分类中,CD4 具有 T 淋巴细胞辅助功能,而 CD8 则抑制、杀伤 T 淋巴细胞。另外,CD4 能产生一些细胞因子协助 B 淋巴细胞抗体的产生,调节免疫反应的活性,而 CD8 则可以抑制免疫功能和损伤细胞。CD4/CD8 是反映 T 淋巴细胞活性的重要指标,正常人群其比值相对稳定,比值增加提示免疫增强,反之则减弱^[9]。有研究结果表明,VitD 缺乏可以降低小鼠外周血白细胞数量,淋巴细胞 CD4、CD8 阳性率,而对体液免疫(B 淋巴细胞)改变不大^[10-13]。本次实验笔者观察了不同剂量的 VitD 对 T 淋巴细胞亚群分化的影响。结果提示,随 VitD 剂量的增加,CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量和 CD4⁺/CD8⁺ 逐渐增加,且高剂量组增加较为明显。随后笔者按照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)关于增强免疫功能检验方法从细胞免疫、体液免疫等多角度进行了实验,结果表明,与对照组比较,不同剂量的小鼠足趾肿胀度、吞噬百分率显著增加,碳廓清实验吞噬指数显著减低,抗体生成细胞数、血清溶血素 HC₅₀ 显著升高。对细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫可能具有增强作用。同时笔者发现,随着 VitD 补充剂量的增加,其免疫能力的增加幅度无明显差异,提示加大 VitD 补充剂量并不能进一步改善及促进免疫调节作用。

虽然宫内胎儿生长发育迟缓、免疫功能低下与母体微量营养素缺乏密切相关,为围产期胎儿的 VitD 补充、减少围产期并发症提供了依据。但由于 VitD 和宫内胎儿发育的相关激素与基因的多重性及生理调控关系微妙,该过程相当复杂。为进一步详细了解和掌握 VitD 对宫内发育迟缓的作用机制,控制胎源性成年疾病的发生,提供新思路、新方法,笔者将继续对 VitD 在宫内发育迟缓、免疫功能低下中的相关途径进行研究。

综上所述,孕早期补充 VitD 可以促进仔鼠生长发育,提高子代的免疫功能。因此,孕期可补充足量的 VitD 添加剂,尤其会为冬季妊娠孕妇带来更多益处。但加倍补充 VitD 并不能成比例的增加其效果,尚需进一步确定更为合理的补充剂量,为 VitD 的合理补充提供科学依据,为临床及预防应用提供指导。

参考文献

- [1] 吴桐,向菲,欧亚萍,等. 孕妇血清维生素 D 水平与妊娠结局的相关性研究[J]. 重庆医学,2016,45(7):893-895.
- [2] 王强,沈影超. 孕期维生素 D 摄入对子代远期健康的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2013,7(11):5017-5019.
- [3] Liu J, Liu L, Chen H. Antenatal taurine supplementation for improving brain ultrastructure in fetal rats with intrauterine growth restriction[J]. Neuroscience,2011,18(1):265-270.
- [4] Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management[J]. Am J Obstet Gynecol,2011,204(4):288-300.
- [5] Bucher BS, Tschumi S, Simonetti GD. Childhood's determinants for high blood pressure in adulthood[J]. Ther Umsch,2012,69(5):295-298.
- [6] Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD neonatal research network[J]. Pediatrics,2010,126(3):443-456.
- [7] Li Y, Qi Q, Workalemahu T, et al. Birth weight, genetic susceptibility, and adulthood risk of type 2 diabetes[J]. Diabetes Care,2012,35(12):2479-2484.
- [8] Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity[J]. Lancet Neurol,2014,13(3):330-338.
- [9] Goodman J, Marsh R, Peterson BS, et al. Annual research review: the neurobehavioral development of multiple memory systems-implications for childhood and adolescent psychiatric disorders[J]. J Child Psychol Psychiatry,2013,12(8):245-248.
- [10] Morales E, Guxens M, Llop S, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D₃ in pregnancy and infant neuropsychological development[J]. Pediatrics,2012,130(4):e913-920.
- [11] Whitehouse AJ, Holt BJ, Serralha M, et al. Maternal serum vitamin D levels during pregnancy and offspring neurocognitive development[J]. Pediatrics,2012,129(3):485-493.
- [12] 刘雪婷,任立红. 补充维生素 D 对佝偻病大鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2012,27(19):1485-1487.
- [13] 陈摇雪,于摇震,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):1470-1471.