

上海交通大学医学院



学者介绍

Author introduction

**余晓丹** 博士

主任医师、博士生导师

ORCID ID: 0000-0003-2283-7138

YU Xiao-dan

Ph.D

Chief Physician, Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0003-2283-7138

余晓丹 (1971—), 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心主任医师。2004 年获上海第二医科大学 (现上海交通大学医学院) 博士学位。现任上海微量元素学会理事兼临床医学专业委员会副主任委员、上海医学会儿科学分会委员、中华医学会变态反应学分会儿童过敏性疾病学组委员、上海预防医学会环境卫生专业委员会委员、上海市出生缺陷一级预防工作专家组成员、“973”计划项目专家成员。

- 长期致力于儿童保健, 尤其是儿童营养性疾病、过敏性疾病的研究。主要方向为营养、环境与儿童生长发育, 微量营养素与儿童健康领域。近年来以第一作者或通信作者在国内国际学术杂志发表论文 50 余篇, 其中 SCI 收录论文 20 余篇。作为负责人主持 1 项国家重点专项课题、3 项国家自然科学基金、2 项省部级科研项目, 2 项美国国立卫生研究院课题 (中方负责人), 1 项“973”课题 (技术骨干), 8 项局校级项目。2012 年获第七届宋庆龄儿科医学成果奖及江苏省卫生厅医学新技术引进二等奖 (第二完成人)。2015 年入选上海市教育委员会高峰高原学科建设计划。

YU Xiao-dan born in 1971, chief physician of Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. She received her Ph.D in pediatrics from Shanghai Second Medical University in 2004. She is currently the member of Shanghai Society of Microelement and the vice chairman of the Clinical Medicine Committee, the member of Shanghai Medical Association Pediatrics Branch, the member of Chinese Society Allergic Diseases Branch, the member of Shanghai Preventive Medicine Society of Environmental Health Professional Committee, the member of expert group on prevention of birth defects in Shanghai and the expert member of “973” Program of China.

- She is devoted to the study in children's health care, especially in children's nutritional diseases and allergic diseases. Her main research areas are the associations of nutrition, environment and children growth and development, with a focus on micronutrients and children's health. In recent years, she has published more than 50 papers as the first author or corresponding author at home and abroad, including more than 20 SCI articles. At present, she is the main person in charge of one National Key Project, three National Natural Science Foundation of China and two Ministerial and Provincial Scientific Research Projects. She is also the Chinese principal of two US National Institutes of Health Projects, the technical backbone of one “973” Program and the person in charge of eight Bureau-level Projects. In 2012, she won “the Seventh Soong Ching Ling Pediatric Medical Achievement Award” and the second prize of “Jiangsu Provincial Health Department of New Medical Technology Introduction” (the second completer). In 2015, she was enrolled into “Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support”.



论著·基础研究

孕前和孕期维生素 D 缺乏对子代大鼠肠道菌群及抗菌肽 cathelicidin 的影响

王磊¹, 焦先婷¹, 魏真真¹, 刘斌³, 刘晓艳³, 余晓丹^{1,2}

1. 上海交通大学医学院附属新华医院, 环境与儿童健康教育部和上海市重点实验室, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心儿童保健科, 上海 200127; 3. 福建农林大学食品科学学院, 福州 350002

[摘要] **目的**·探讨孕前和孕期维生素 D 缺乏对子代大鼠肠道菌群及抗菌肽 cathelicidin (cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP) 的影响。**方法**·将 24 只 8 周龄雌性 SD 大鼠分为 3 组, 对照组 (C 组)、维生素 D 缺乏组 (VDD 组) 及维生素 D 补充组 (VDS 组) 各 8 只。通过特殊饲料饮食构建大鼠孕前和孕期维生素 D 缺乏模型。母鼠孕第 14 日用液相色谱-串联质谱联用法检测血清 25(OH)D 水平。子鼠 4 周龄时, 取血检测 25(OH)D 水平; 取粪便检测肠道菌群; 取结肠组织, 用实时荧光定量 RT-qPCR 法、Western blotting 法分别测定大鼠 CAMP 的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果**·大鼠孕前和孕期维生素 D 缺乏模型构建成功。C 组、VDD 组及 VDS 组子鼠肠道乳酸杆菌的相对丰度分别为 0.050 ± 0.016 、 0.028 ± 0.013 及 0.033 ± 0.021 。与 C 组相比, VDD 组子鼠肠道乳酸杆菌的相对丰度显著降低 ($P < 0.05$), 结肠 CAMP 的 mRNA 及蛋白表达水平亦显著降低 (均 $P < 0.05$)。与 VDD 组相比, VDS 组子鼠肠道乳酸杆菌的相对丰度有升高的趋势, 但差异无统计学意义; 结肠 CAMP 的 mRNA 表达水平无明显改变, 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。**结论**·孕期维生素 D 缺乏可致子代大鼠结肠 CAMP 的 mRNA 及蛋白表达水平和肠道乳酸杆菌的相对丰度显著降低。孕期维生素 D 补充后, 子代大鼠结肠 CAMP 的蛋白表达水平显著升高, 肠道乳酸杆菌的丰度也有升高的趋势。

[关键词] 孕期; 维生素 D; 肠道菌群; 抗菌肽 cathelicidin**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.08.004 **[中图分类号]** R392 **[文献标志码]** A

Effects of maternal vitamin D deficiency before and during pregnancy on intestinal flora and cathelicidin antimicrobial peptide expression in offspring rats

WANG Lei¹, JIAO Xian-ting¹, WEI Zhen-zhen¹, LIU Bin³, LIU Xiao-yan³, YU Xiao-dan^{1,2}

1. MOE-Shanghai Key Lab of Children's Environmental Health, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Department of Developmental and Behavioral Pediatrics, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 3. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

[Abstract] **Objective**·To explore the effects of maternal vitamin D deficiency before and during pregnancy on the intestinal flora and cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) in offspring rats. **Methods**·Twenty-four female Sprague-Dawley rats (8-week-old) were randomly assigned to three groups ($n=8$ per group), i.e. control group (C group), vitamin D deficiency group (VDD group), and vitamin D supplement group (VDS group). Special diets were used to build the rat models of vitamin D deficiency before and during pregnancy. Maternal 25(OH)D level was detected by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) at gestational day 14. At the age of 4 weeks in offsprings, the level of 25(OH)D was measured; the faeces were collected for the detection of intestinal flora; the mRNA and protein expression of CAMP were evaluated by real-time quantitative RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results**·The rat models of vitamin D deficiency before and during pregnancy were successfully established. The relative abundance of intestinal *Lactobacillus* in the offspring rats in C group, VDD group and VDS group was 0.050 ± 0.016 , 0.028 ± 0.013 and 0.033 ± 0.021 , respectively. Compared with C group, the relative abundance of intestinal *Lactobacillus* in VDD group significantly decreased ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expression of colonic CAMP significantly decreased as well ($P < 0.05$). Compared with VDD group, VDS group showed a trend of increase in the abundance of intestinal *Lactobacillus*; the mRNA expression of colonic CAMP didn't change significantly, but the protein expression of colonic CAMP significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion**·Vitamin D deficiency during pregnancy results in decreased abundance of intestinal *Lactobacilli* as well as reduced mRNA and protein expression of colonic CAMP in offspring rats. Vitamin D supplementation significantly improves the protein expression of colonic CAMP and induces a trend of increase in the abundance of intestinal *Lactobacilli* in offspring rats.

[Key words] pregnancy; vitamin D; intestinal flora; cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP)

[基金项目] 国家自然科学基金 (81773411, 81373004); 国家重点研发计划 (2016YFC1305204); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20152220) (National Natural Science Foundation of China, 81773411, 81373004; National Key Research and Development Program of China, 2016YFC1305204; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20152220)。

[作者简介] 王磊 (1992—), 女, 硕士生; 电子邮箱: 15961061113@163.com。**[通信作者]** 余晓丹, 电子邮箱: xd_yu2003@126.com。

维生素 D 缺乏是影响儿童、青少年、成年人和老年人的严重健康问题。妊娠期是维生素 D 缺乏的高发阶段, 在全世界大部分地区, 有超过一半的孕妇存在维生素 D 缺乏^[1]。疾病的胎儿起源假说 (developmental origins of health and disease, DOHaD) 理论认为, 宫内环境可影响胎儿发育及其出生后对疾病的易感性^[2], 因此孕期营养有不可忽视的作用。大量的观察性研究^[3-5]表明, 孕期维生素 D 状况与儿童期免疫性疾病相关。而在儿童早期免疫功能的发育过程中, 肠道微生物起决定作用, 肠道菌群的变化与一系列免疫介导疾病的发生相关^[6-7]。在人体内, 肠道菌群的组成依赖于 α 、 β 防御素和抗菌肽 cathelicidin (cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP) 等物质的调控^[8-9]。CAMP 是生物体内一种具有抗菌活性的小分子多肽, 体外研究^[10]证实: $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 通过位于 CAMP 基因启动子中的维生素 D 作用元件 (vitamin D response elements, VDREs) 直接诱导 CAMP 的表达。由此可见, 维生素 D 状态可以影响肠道微生物群的组成。到目前为止, 孕前和孕期维生素 D 缺乏影响子代肠道菌群的研究未见报道。因此, 本研究建立孕前和孕期维生素 D 缺乏的大鼠模型, 并检测子鼠肠道菌群和大鼠 CAMP 的表达水平, 探讨孕前和孕期维生素 D 缺乏对子代大鼠肠道菌群及抗菌肽的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雌性 8 周龄, 体质量 200 ~ 220 g; 雄性 12 周龄, 体质量 350 ~ 370 g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司。动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2013-0016, 动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2013-0106。本实验中所有大鼠的实验均符合美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 关于实验动物使用及处理的准则。

1.2 实验材料

标准饲料和维生素 D 缺乏饲料均购于江苏南通特洛菲饲料科技有限公司, 其中标准饲料维生素 D_3 含量为 1 000 U/kg, 维生素 D 缺乏饲料维生素 D_3 含量为 25 U/kg。

DNA 抽提试剂盒购于美国 Life Technologies 公司, RNA 提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司, 反转录及实时荧光定量 PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司, BCA 蛋白定量试剂盒购于上海冠泰生物科技有限公司, 大鼠 CAMP

多克隆抗体购于瑞典 Innovagen 公司。

1.3 方法

1.3.1 孕前和孕期维生素 D 缺乏模型建立 雌性 SD 大鼠 24 只随机分为 3 组, 对照组 (C 组)、维生素 D 缺乏组 (VDD 组) 和维生素 D 补充组 (VDS 组) 各 8 只, 分笼饲养。VDD 组及 VDS 组给予维生素 D 缺乏饲料, 自由饮食、进水, 恒温 (22.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 恒湿 (50 ± 10) %, 昼夜 12 h 交替循环 (过滤光照紫外波段)。C 组给予标准饲料, 正常光照, 其余条件同其他 2 组。喂养 4 周后按雌雄比 2:1 合笼, 次日检查雌鼠的阴栓, 查到阴栓者视为交配成功, 且定为妊娠第 1 日 (D1)。妊娠成功后 C 组及 VDS 组给予标准饲料, VDD 组继续喂以维生素 D 缺乏饲料。妊娠 D14 每组取受孕时间相近的 6 只母鼠, 检测孕中期血清 25(OH)D 水平。每组的这 6 只母鼠分娩后, 每窝随机留取 2 只子鼠 (1 只雄鼠和 1 只雌鼠, 每组 12 只子鼠), 分娩后 3 组母鼠均给予标准饲料喂养。每周称量并记录子鼠体质量。子鼠 21 d 后断乳, 断乳后 3 组子鼠均给予标准饲料喂养。至子鼠 4 周龄时, 取血检测 25(OH)D 水平。

1.3.2 血清 25(OH)D 水平检测

(1) 制备空白血清 用小牛血清配制空白血清。取 2.14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.268 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.9 g NaCl 和 5 g 小牛血清粉剂, 溶于 75 mL 去离子水中, 稀释至 100 mL, 使用震荡仪均匀混匀后储存于 -4°C 冰箱。

(2) 样本前处理 将大鼠血清从 -80°C 中取出, 置于室温平衡后轻微震荡混匀。取 200 μL 血清置于 1.5 mL 离心管中, 加入 10 μL 内标, 再加入 250 μL 甲醇、100 μL 乙腈及 50 μL 硫酸锌饱和溶液, 震荡 10 s, 静置 5 min, 24°C 2 700 \times g 离心 7 min。离心后样本垂直存放于 4°C 冰箱待测。

(3) 质控品的制备 在质控品中加入 2 mL 去离子水, 充分混匀 15 min 后进行分装, 每支 200 μL 共分装 10 支, 存放于 4°C 。

(4) 色谱条件及质谱条件 色谱柱为 Poroshell 120 EC-C18 (2.1 mm \times 50.0 mm, 2.7 μm), 柱温为 50°C , 流速为 0.5 mL/min, 进样量为 10 μL 。流动相 A 为去离子水 +0.1% 甲酸, 流动相 B 为甲醇 +0.1% 甲酸。按表 1 进行梯度洗脱。

质谱采用电喷雾离子源, 多反映监测模式, 喷雾压力为 241.325 kPa, 喷雾温度为 180°C , 鞘气温度为 350°C , 鞘气流速为 11.0 L/min。定量分析的离子对设置见表 2。

表 1 流动相去离子水 +0.1% 甲酸 (A) 与甲醇 +0.1% 甲酸 (B) 的梯度洗脱程序
Tab 1 Procedure of mobile phase gradient elution

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	20	80
2.30	20	80
2.40	2	98
3.90	2	98
4.00	20	80

表 2 用于质谱定量分析的离子对
Tab 2 Ion pairs for quantitative analysis

反应物名称	质荷比		极性
	母离子	子离子	
25 (OH) D ₂ -d ₃	416.4	398.3	正极
25 (OH) D ₂	413.3	395.3	正极
25 (OH) D ₂	413.3	355.2	正极
25 (OH) D ₂ -d ₃	404.3	386.3	正极
25 (OH) D ₂	401.3	383.2	正极
25 (OH) D ₂	401.3	159.1	正极

(5) 测样方法 将处理好的样本取出, 取上清液 100 μL 注入 96 孔板中, 按上述液相色谱—串联质谱联用 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 条件, 采用 inject/waste 方法进行检测。

1.3.3 子鼠肠道菌群的检测 每组按雌雄等比例抽取 6 只子鼠, 4 周龄时取粪便 (约 1 g), 标记后放入液氮中冷冻, 随后转移入 -80 ℃ 冰箱保存。用试剂盒提取样本基因组 DNA, 干冰条件下送往上海欧易生物医学科技有限公司, 对样品进行 PCR 扩增及测序。针对 16S rRNA 基因 V3 ~ V4 区, 合成带有条形码 (barcode) 的特异引物。利用 343F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 798R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 2 种引物进行 PCR 扩增。将各样本序列进行质量控制过滤后, 对样品进行菌群构成的分析。

1.3.4 子鼠结肠 CAMP 的 mRNA 及蛋白表达 取 1.3.3 中检测的 4 周龄子鼠结肠组织, 标记后放入液氮中冷冻, 随后转移入 -80 ℃ 冰箱保存。试剂盒提取 RNA。反转录试剂盒合成 cDNA, 保存于 -20 ℃ 待用。以 *Gapdh* 为内参, 使用 SYBR Green 试剂盒进行实时定量 PCR, 检测 *Camp* mRNA 表达, 表达水平用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。所用引物见表 3。

表 3 实时定量 PCR 引物序列
Tab 3 Primer sequences in real-time qPCR

目标基因	正向引物 (5' → 3')	反向引物 (5' → 3')
<i>Gapdh</i>	GCATCTTCTTGTGTCAGTGCC	TACGGCCAAATCCGTTTACA
<i>Camp</i>	ACCTGAGCAATGTGCCTTCA	TGTATACCAGGCGCATCACA

提取结肠组织蛋白, 应用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后, 每个样本取 20 μg 用于 Western blotting 分析。检测 CAMP 的一抗为兔来源的多克隆抗体, 稀释比例为 1:500; 以 β- 肌动蛋白为内参, 其检测一抗为兔来源的单克隆抗体, 稀释比例为 1:1 000; 二抗稀释比例为 1:10 000。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验和方差分析法。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 孕鼠孕中期血清 25 (OH) D 水平

与 C 组孕鼠相比, VDD 组孕鼠血清 25 (OH) D 水平显著降低 (*P* < 0.05); 与 VDD 组相比, VDS 组孕鼠血清 25 (OH) D 水平显著升高 (*P* < 0.05); VDS 组孕鼠血清 25 (OH) D 水平与 C 组孕鼠差异无统计学意义 (表 4)。

表 4 孕鼠孕中期血清 25 (OH) D 水平 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 4 Serum level of 25 (OH) D during second-trimester in female rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 / <i>n</i>	25 (OH) D/ (ng/mL)
C 组	6	12.84 ± 3.51
VDD 组	6	7.78 ± 1.53 ^①
VDS 组	6	12.67 ± 1.78 ^②

注: ^① *P* = 0.008, 与 C 组比较; ^② *P* = 0.007, 与 VDD 组比较。

2.2 子鼠血清 25 (OH) D 水平

与 C 组子鼠相比, VDD 组子鼠血清 25 (OH) D 水平显著降低 (*P* < 0.05); 与 VDD 组子鼠相比, VDS 组子鼠血清 25 (OH) D 水平显著升高 (*P* < 0.05); VDS 组子鼠血清 25 (OH) D 水平与 C 组子鼠差异无统计学意义 (表 5)。

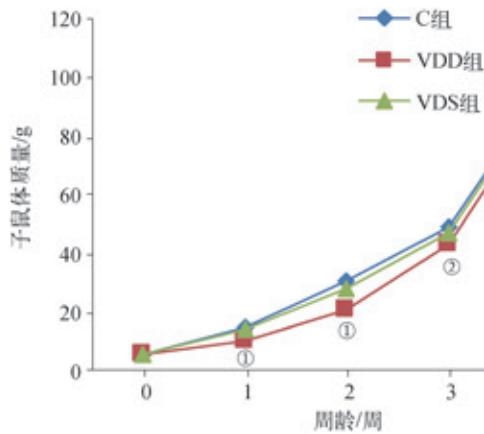
表 5 子鼠血清 25 (OH) D 水平 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 5 Serum level of 25 (OH) D in offspring rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 / <i>n</i>	25 (OH) D/ (ng/mL)
C 组	12	10.07 ± 2.27
VDD 组	12	7.17 ± 1.75 ^①
VDS 组	12	9.84 ± 1.53 ^②

注: ^① *P* = 0.004, 与 C 组比较; ^② *P* = 0.037, 与 VDD 组比较。

2.3 不同组别子鼠体质量增长情况

如图 1 所示, 3 组子鼠出生时体质量水平差异无统计学意义。在 1 周龄、2 周龄和 3 周龄时, VDD 组子鼠体质量水平均显著低于 C 组 (均 $P<0.05$); 而 VDS 组子鼠与 C 组差异无统计学意义。在 4 周龄时, 3 组子鼠体质量水平差异无统计学意义。



注: ① $P=0.000$, ② $P=0.038$, 与 C 组比较。

图 1 不同组别子代 SD 大鼠体质量增长情况 ($n=12$)

Fig 1 Weight gain of offspring SD rats in different groups ($n=12$)

2.4 子鼠肠道菌群构成分析

图 2 所示为属水平上排在前 15 位的肠道菌群的丰度柱状图。由图可知, 3 组子鼠中细菌的分布不一, 拟杆菌属 (*Bacteroidetes*) 和毛螺菌属 (*Lachnospiraceae*) 的丰度普遍较高。统计前 10 位肠道菌群的相对丰度结果显示: 与 C 组子鼠相比, VDD 组及 VDS 组子鼠肠道乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 的相对丰度显著降低 (均 $P<0.05$), 而其余细菌的丰度差异无统计学意义; 与 VDD 组相比, VDS 组子鼠肠道乳酸杆菌的相对丰度有升高的趋势, 但差异无统计学意义 (表 6)。

2.5 子鼠结肠 *Camp* 的 mRNA 及蛋白表达水平

如图 3A 所示, 与 C 组子鼠相比, VDD 组及 VDS 组子鼠结肠 *Camp* 的 mRNA 表达水平均显著降低 (均 $P=0.000$); VDS 组与 VDD 组子鼠之间差异无统计学意义。

如图 3B 所示, 与 C 组子鼠相比, VDD 组子鼠结肠 *CAMP* 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与 VDD 组子鼠相比, VDS 组子鼠结肠 *CAMP* 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$); VDS 组子鼠与 C 组子鼠之间差异无统计学意义。

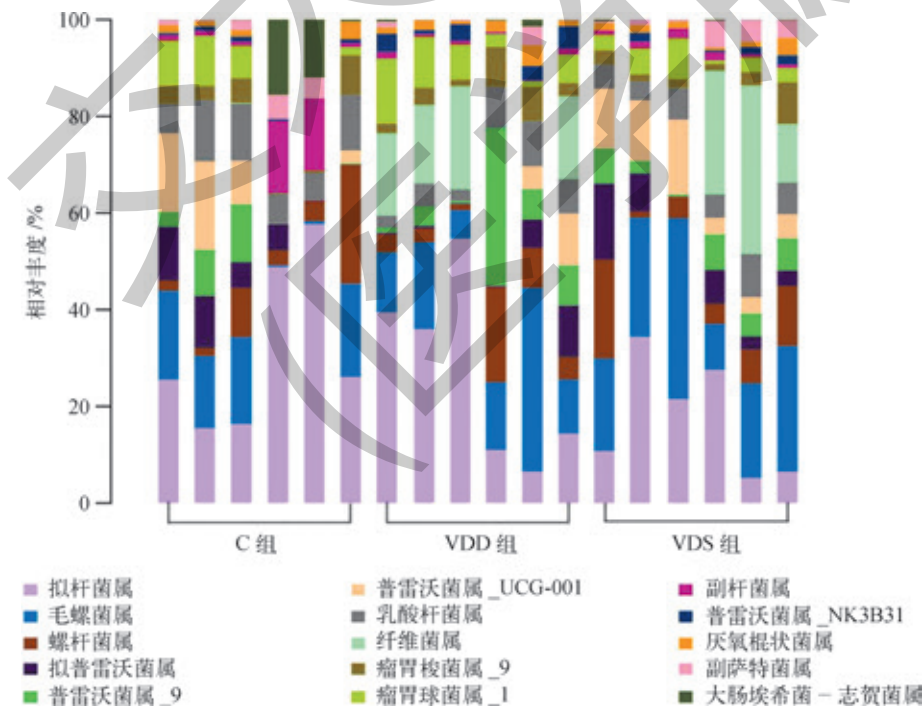


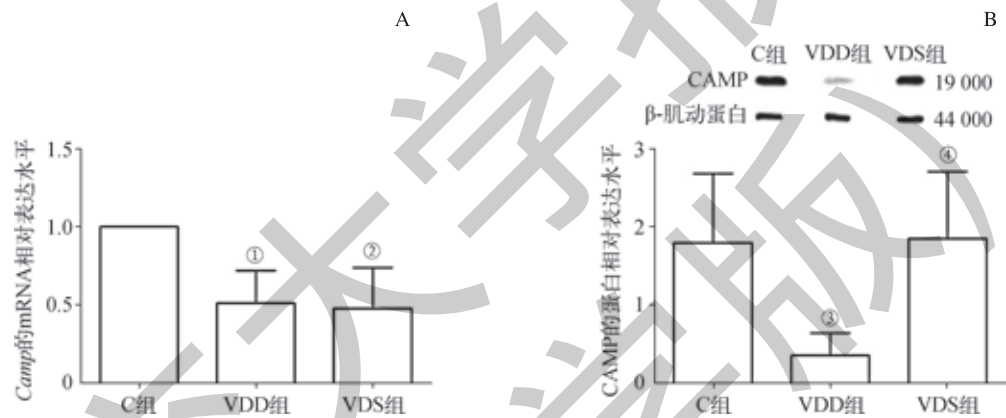
图 2 子鼠肠道菌群在属水平上的丰度 ($n=6$)

Fig 2 Barplot of intestinal flora abundance in offspring rats at the level of genus ($n=6$)

表 6 子鼠肠道菌群在属水平上的相对丰度 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Tab 6 Relative abundance of intestinal flora in offspring rats at the level of genus ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

菌属	C 组	VDD 组	VDS 组
拟杆菌属	0.190 ± 0.130	0.138 ± 0.104	0.096 ± 0.065
毛螺菌属	0.062 ± 0.046	0.079 ± 0.050	0.122 ± 0.044
乳酸杆菌属	0.050 ± 0.016	0.028 ± 0.013 ^①	0.033 ± 0.021 ^②
螺杆菌属	0.038 ± 0.038	0.032 ± 0.029	0.046 ± 0.040
普雷沃菌属_9	0.023 ± 0.029	0.040 ± 0.053	0.027 ± 0.016
纤维菌属	(1.358 ± 3.010) × 10 ⁻⁴	0.062 ± 0.050	0.070 ± 0.091
瘤胃球菌属_1	0.026 ± 0.027	0.035 ± 0.024	0.022 ± 0.013
普雷沃菌属_UCG-001	0.043 ± 0.047	0.013 ± 0.023	0.047 ± 0.028
拟普雷沃菌属	0.031 ± 0.028	0.015 ± 0.023	0.034 ± 0.032
瘤胃梭菌属_9	0.017 ± 0.014	0.019 ± 0.012	0.017 ± 0.013

注: ^① $P=0.013$, ^② $P=0.047$, 与 C 组比较。



注: ^① $P=0.000$, ^② $P=0.000$, ^③ $P=0.021$, 与 C 组比较; ^④ $P=0.016$, 与 VDD 组比较。

图 3 子鼠结肠 CAMP 的 mRNA 及蛋白表达水平 ($n=6$)
Fig 3 mRNA and protein expression of colonic CAMP in offspring rats ($n=6$)

3 讨论

妊娠期是一个特殊的时期, 此时母体摄入的营养物质不仅要满足自身需求, 还要供给胎儿生长发育, 因此极易造成营养素的缺乏。由于光照和摄入的相对不足, 孕期维生素 D 缺乏尤为常见。

本实验参照既往维生素 D 缺乏模型建立^[11]。考虑到维生素 D 严重缺乏 (完全缺乏) 时有可能引起低钙血症和 / 或低磷血症, 此时很难明确维生素 D 缺乏所致的生理效应是维生素 D 缺乏的直接后果, 还是钙、磷缺乏引起的继发效应。因此, 本研究采用含有微量维生素 D 的模型饲料 (维生素 D 含量为 25 U/kg), 该饲料可以维持正常血清钙、磷水平。对于 VDD 组, 本研究从妊娠前 4 周就给予维生素 D 缺乏饲料, 以保证整个孕期 25(OH)D 水平都处于比较低的状态; 而对于 VDS 组, 通过孕前 4 周维生素 D 缺乏饲料的喂养, 大鼠在孕早期时血清 25(OH)D 水平处于较

低的状态, 从孕期开始喂以维生素 D 含量正常的饲料, 相当于孕期维生素 D 补充的过程。通过 VDS 组不仅能够了解孕前维生素 D 缺乏对子代大鼠的影响, 又能与 VDD 组相比, 观察孕期维生素 D 补充对子代大鼠的影响。母鼠孕中期维生素 D 检测结果显示: 与 C 组相比, VDD 组母鼠血清 25(OH)D 水平显著下降, 表明孕期维生素 D 缺乏模型建立成功; VDS 组母鼠血清 25(OH)D 水平显著高于 VDD 组母鼠而与 C 组母鼠无显著差异, 表明孕期维生素 D 补充能够显著改善血清维生素 D 水平。另外, 孕期维生素 D 缺乏的母鼠, 其子鼠血清 25(OH)D 水平显著下降, 这与人的流行病学研究一致^[12]。而孕期维生素 D 补充可使子代血清 25(OH)D 处于正常水平, 提示孕期维生素 D 的补充可显著改善子代血清维生素 D 水平。本研究还发现, VDD 组子代大鼠出生后前 2 周体质量增长速率低于 C 组, 后 2 周的体质量增长速率高于 C 组; 而 VDS 组子代大鼠出生后的体质量增长速率与 C 组无显著差异; 这一结果表明, 孕期维

生素 D 缺乏会影响子代大鼠体质量的增长, 而孕期维生素 D 补充可使子代大鼠体质量的增长接近正常水平。

目前有关维生素 D 缺乏与肠道菌群的研究, 大部分都是在炎症模型或维生素 D 受体 (vitamin D receptor, *Vdr*) 敲除模型中进行。在结肠炎小鼠模型中, 饮食中维生素 D 缺乏导致小鼠结肠组织抗微生物活性下降、细菌浸润增加^[13]。*Vdr* 敲除的小鼠, 其肠道总的细菌数量增加, 而肠道的优势菌群包括一些有益菌群 (如乳酸杆菌) 数量减少^[14]。在人体中, 一项有关饮食和微生物组成的调查发现, 维生素 D 补充量的不同可使粪便样品中拟杆菌数量存在显著差异^[15]。本研究结果发现, 孕期维生素 D 缺乏可导致小鼠肠道乳酸杆菌减少, 与 *Vdr* 敲除小鼠的研究结果基本一致。此外, 本研究还发现母鼠维生素 D 缺乏后再补充维生素 D, 其子鼠粪便乳酸杆菌的相对丰度虽有升高趋势, 但仍低于对照组, 这在一定程度上说明胚胎早期“胎源性”维生素 D 缺乏对肠道菌群影响的不完全可逆性。

至今, 维生素 D 影响肠道菌群的机制尚不清楚。既往体外研究表明, 维生素 D 可调控 *CAMP* 基因的表达, 从而影响抗菌活性^[10]。在人群中, 血浆 *CAMP* 水平与血清 25(OH)D 水平呈正相关^[16]。Pound 等^[17] 在大鼠体内也证实, 补充 *CAMP* 可引起大鼠肠道潜在有益细菌 (包括乳酸杆菌) 表达的显著上调。基于这些研究, 我们推

测, 孕期维生素 D 缺乏对子代肠道菌群的影响可能与肠道 *CAMP* 改变有关。为验证维生素 D 对 *CAMP* 的作用, 本研究检测了子代大鼠结肠 *CAMP* 的表达水平, 发现 VDD 组子鼠结肠 *CAMP* 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低, 这与子鼠肠道乳酸杆菌相对丰度的变化一致。该结果结合上述文献^[16-17] 的报道, 可在一定程度上认为维生素 D 对肠道菌群的影响可能通过 *CAMP* 起作用。本研究发现与 VDD 组相比, VDS 组子鼠 *Camp* 的 mRNA 表达水平无显著改变, 而其蛋白表达水平显著升高至 C 组水平。mRNA 与蛋白水平表达的不一致提示维生素 D 对于 *CAMP* 的作用不仅涉及转录前的基因调控, 还涉及转录后的蛋白修饰。另外, VDS 组子鼠乳酸杆菌的丰度并未随着 *CAMP* 蛋白表达的显著升高而显著升高, 提示乳酸杆菌可能并不只是受到抗菌肽的单一调控。后续研究还需要通过报告基因及抗菌活性试验, 深入探究维生素 D、*CAMP* 和肠道菌群间的相互作用。

综上所述, 本研究首次报道了孕期维生素 D 缺乏导致子代大鼠结肠 *CAMP* 的基因及蛋白表达水平和肠道乳酸杆菌的丰度降低。孕期维生素 D 补充可显著改善子代大鼠结肠抗菌肽 *CAMP* 的蛋白表达水平, 而肠道乳酸杆菌的丰度也有上升的趋势。今后将基于此结果, 对孕期维生素 D 影响子代肠道菌群的分子机制开展进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Saraf R, Morton SM, Camargo CA, et al. Global summary of maternal and newborn vitamin D status: a systematic review[J]. *Matern Child Nutr*, 2016, 12(4): 647-668.
- [2] Prescott SL. Allergic disease: understanding how in utero events set the scene[J]. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69(3): 366-372.
- [3] Erkkola M, Kaila M, Nwaru BI, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(6): 875-882.
- [4] Wjst M. Is vitamin D supplementation responsible for the allergy pandemic?[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2012, 12(3): 257-262.
- [5] Weisse K, Winkler S, Hirche F, et al. Maternal and newborn vitamin D status and its impact on food allergy development in the German LINA cohort study[J]. *Allergy*, 2013, 68(2): 220-228.
- [6] Kaplan JL, Shi HN, Walker WA. The role of microbes in developmental immunologic programming[J]. *Pediatr Res*, 2011, 69(6): 465-472.
- [7] Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship[J]. *Front Microbiol*, 2011, 2: 180.
- [8] Nijnik A, Hancock RE. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications[J]. *Curr Opin Hematol*, 2009, 16(1): 41-47.
- [9] Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007, 23(1): 32-38.
- [10] Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting edge: 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression[J]. *J Immunol*, 2004, 173(5): 2909-2912.
- [11] 魏真真, 陈威威, 王磊, 等. 孕期维生素 D 缺乏对子鼠 Th1/Th2 细胞免疫功能的影响[J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2016, 36(9): 1278-1281.
- [12] Yu X, Wang W, Wei Z, et al. Vitamin D status and related factors in newborns in Shanghai, China[J]. *Nutrients*, 2014, 6(12): 5600-5610.
- [13] Lagishetty V, Misharin AV, Liu NQ, et al. Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(6): 2423-2432.
- [14] Ooi JH, Li Y, Rogers CJ, et al. Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate-induced colitis[J]. *J Nutr*, 2013, 143(10): 1679-1686.
- [15] Mai V, McCrary QM, Sinha R, et al. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers[J]. *Nutr J*, 2009, 8: 49.
- [16] Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis[J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 28.
- [17] Pound LD, Patrick C, Eberhard CE, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide: a novel regulator of islet function, islet regeneration, and selected gut bacteria[J]. *Diabetes*, 2015, 64(12): 4135-4147.

[收稿日期] 2018-01-12

[本文编辑] 瞿麟平

