

25-OH 维生素 D 通过调控 TGF- β 介导的 YAP/TAZ 核转位机制对新生儿感染性肺炎的抗炎作用研究

刘 阳, 石 芸, 钟林平, 秦贵阳 (电子科技大学医学院附属妇女儿童医院 / 成都市妇女儿童中心医院新生儿科, 成都 611731)

摘要: 目的 探讨 25-OH 维生素 D (25-OH vitamin D, 25-OH-VD) 对新生儿感染性肺炎 (neonatal infectious pneumonia, NIP) 的抗炎作用及其作用机制。方法 选取 2022 年 1 月~2023 年 1 月成都市妇女儿童中心医院收治的 65 例 NIP 患儿, 根据病情严重程度, 分为轻症组 ($n=34$) 和重症组 ($n=31$), 另选取同期 60 例健康新生儿为对照组。通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清 25-OH-VD, 白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-1 β 水平; 蛋白免疫印迹法检测外周血单个核细胞中维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR)、细胞核转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)/Yes 相关蛋白 (nucleus-Yes-associated protein, n-YAP) 和细胞核转录共激活因子 PDZ 结合基序 (nucleus-transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, n-TAZ) 通路相关蛋白表达。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激人肺上皮细胞构建 NIP 体外模型, 分为 Control 组、LPS 组和 LPS+VD 组; CCK-8 检测细胞活力; qRT-PCR 检测各组细胞中细胞色素 P450 家族成员 28B1 (recombinant cytochrome P450 27B1, CYP27B1) 和 VDR 的 mRNA 表达; 免疫细胞化学法检测各组细胞 YAP 阳性细胞核数; 免疫荧光检测各组细胞 YAP/TAZ 复合物核转位; 蛋白免疫印迹法检测各组细胞炎症因子相关蛋白表达。结果 与对照组相比, 轻症组和重症组患儿血清中 IL-2 ($1.91 \pm 0.18 \mu\text{g/L}$, $2.63 \pm 0.27 \mu\text{g/L}$ vs $1.05 \pm 0.12 \mu\text{g/L}$), IFN- γ ($1.73 \pm 0.13 \mu\text{g/L}$, $2.18 \pm 0.19 \mu\text{g/L}$ vs $1.03 \pm 0.07 \mu\text{g/L}$), TNF- α ($1.79 \pm 0.08 \mu\text{g/L}$, $2.38 \pm 0.13 \mu\text{g/L}$ vs $0.97 \pm 0.04 \mu\text{g/L}$) 和 IL-1 β ($2.18 \pm 0.07 \mu\text{g/L}$, $2.59 \pm 0.11 \mu\text{g/L}$ vs $0.96 \pm 0.02 \mu\text{g/L}$) 含量以及 TGF- β (1.67 ± 0.21 , 2.43 ± 0.42 vs 1.02 ± 0.04), n-YAP (2.08 ± 0.11 , 4.23 ± 0.37 vs 0.99 ± 0.02) 和 n-TAZ (2.47 ± 0.42 , 4.21 ± 0.58 vs 1.03 ± 0.05) 蛋白表达逐渐升高, 25-OH-VD ($12.57 \pm 2.21 \mu\text{g/L}$, $7.85 \pm 2.03 \mu\text{g/L}$ vs $16.76 \pm 1.02 \mu\text{g/L}$) 含量和 VDR (0.73 ± 0.09 , 0.51 ± 0.06 vs 1.03 ± 0.08) 蛋白表达逐渐降低, 差异具有统计学意义 ($F=18.983 \sim 56.782$, 均 $P<0.001$)。细胞实验结果显示, 与 Control 组相比, LPS 组细胞存活率在 12h ($76.23\% \pm 0.73\%$ vs $116.72\% \pm 2.14\%$), 24 h ($57.23\% \pm 0.94\%$ vs $125.76\% \pm 1.67\%$) 和 48 h ($41.23\% \pm 0.56\%$ vs $138.56\% \pm 1.35\%$) 时显著降低 ($t=10.342, 26.562, 37.821$); YAP 阳性细胞数 (47.35 ± 3.47 个 vs 12.46 ± 1.34 个) 和 YAP/TAZ 复合物核转位率 ($2.56\% \pm 0.32\%$ vs $1.01\% \pm 0.06\%$) 升高 ($t=46.362, 26.921$); IL-2 (2.03 ± 0.09 vs 1.03 ± 0.08), IFN- γ (2.07 ± 0.21 vs 1.02 ± 0.04), TNF- α (2.18 ± 0.11 vs 0.99 ± 0.02) 和 IL-1 β (3.17 ± 0.42 vs 1.03 ± 0.05) 的蛋白表达水平升高 ($t=28.341, 26.713, 31.235, 47.823$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$), 而两组间 CYP27B1 和 VDR mRNA 表达差异无统计学意义 ($t=0.872, 0.786$, 均 $P>0.05$)。与 LPS 组比较, LPS+VD 组在 12 h ($85.23\% \pm 0.36\%$), 24 h ($79.82\% \pm 0.63\%$), 48 h ($76.28\% \pm 0.72\%$) 的细胞存活率和 CYP27B1 (4.42 ± 0.14), VDR mRNA (5.13 ± 0.56) 表达升高, YAP 阳性细胞核数 (24.41 ± 3.23 个) 和 YAP/TAZ 复合物核转位率 ($1.47\% \pm 0.26\%$) 降低, IL-2 (1.21 ± 0.06), IFN- γ (1.13 ± 0.42), TNF- α (1.03 ± 0.37) 和 IL-1 β (1.61 ± 0.58) 蛋白表达降低, 差异具有统计学意义 ($t=7.263, 19.892, 23.145, 27.872, 26.982, 14.762, 13.623, 18.273, 25.314, 27.873, 22.134$, 均 $P<0.01$)。结论 血清 25-OH-VD 水平与 NIP 严重程度相关, 外源性给予 VD 补充可通过调控 TGF- β 介导的 YAP/TAZ 核转位机制发挥抗炎作用, 减轻 NIP 损伤。

关键词: 新生儿感染性肺炎; 25-OH 维生素 D; 转化生长因子 β ; Yes 相关蛋白 / 细胞核转录共激活因子 PDZ 结合基序核转位

中图分类号: R722.135; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2024) 04-028-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.04.006

Anti-inflammatory Effect of 25-OH Vitamin D in Neonatal Infectious Pneumonia by Modulating the TGF- β -mediated YAP/TAZ Nuclear Translocation

基金项目: 四川省科技计划项目 (编号: 19RKX0835)。

作者简介: 刘阳 (1978-), 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 新生儿循环相关, E-mail:liuyang5748@126.com。

LIU Yang, SHI Yun, ZHONG Linping, QIN Gaoyang

(Department of Neonatology, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China/Chengdu Women and Children's Center Hospital, Chengdu 611731, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory effect of 25-OH vitamin D (25-OH-VD) on neonatal infectious pneumonia (NIP) and its mechanism. **Methods** A total of 65 children with NIP admitted to Chengdu Women and Children's Central Hospital from January 2022 to January 2023 were selected. According to the severity of the disease, they were divided into mild group ($n=34$) and severe group ($n=31$), and 60 healthy neonates in the same period were selected as the control group. Serum 25-OH-VD, interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-1 β levels were measured by ELISA. The expressions of vitamin D receptor (VDR), transforming growth factor- β (TGF- β)/nucleolar Yes-associated protein (n-YAP) and nuclear transcriptional coactivator PDZ-binding motif (n-TAZ) pathway related proteins in peripheral blood mononuclear cells were detected by Western blot. NIP in vitro models were established by lipopolysaccharide (LPS) stimulation of human lung epithelial cells, which were divided into control group, LPS group and LPS+VD group. Cell viability was detected by CCK-8 assay. The mRNA expressions of recombinant cytochrome P450 27B1 (CYP27B1) and VDR in each group were detected by qRT-PCR. The number of YAP positive nuclei in each group was detected by immunocytochemistry. The nuclear translocation of YAP/TAZ complex in each group was detected by immunofluorescence. The expression of inflammatory factor-related proteins in each group was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the serum levels of IL-2 ($1.91 \pm 0.18 \mu\text{g/L}$, $2.63 \pm 0.27 \mu\text{g/L}$ vs $1.05 \pm 0.12 \mu\text{g/L}$), IFN- γ ($1.73 \pm 0.13 \mu\text{g/L}$, $2.18 \pm 0.19 \mu\text{g/L}$ vs $1.03 \pm 0.07 \mu\text{g/L}$), TNF- α ($1.79 \pm 0.08 \mu\text{g/L}$, $2.38 \pm 0.13 \mu\text{g/L}$ vs $0.97 \pm 0.04 \mu\text{g/L}$), IL-1 β ($2.18 \pm 0.07 \mu\text{g/L}$, $2.59 \pm 0.11 \mu\text{g/L}$ vs $0.96 \pm 0.02 \mu\text{g/L}$), TGF- β (1.67 ± 0.21 , 2.43 ± 0.42 vs 1.02 ± 0.04), n-YAP (2.08 ± 0.11 , 4.23 ± 0.37 vs 0.99 ± 0.02) and n-TAZ (2.47 ± 0.42 , 4.21 ± 0.58 vs 1.03 ± 0.05) proteins of the children in the mild and severe groups were gradually increased, but the content of 25-OH-VD ($12.57 \pm 2.21 \mu\text{g/L}$, $7.85 \pm 2.03 \mu\text{g/L}$ vs $16.76 \pm 1.02 \mu\text{g/L}$) and the expression of VDR (0.73 ± 0.09 , 0.51 ± 0.06 vs 1.03 ± 0.08) proteins were gradually decreased, and the differences were significant ($F=18.983 \sim 56.782$, all $P<0.001$). Cell experiment results showed that cellular survival rate was lower at 12 h ($76.23\% \pm 0.73\%$ vs $116.72\% \pm 2.14\%$), 24 h ($57.23\% \pm 0.94\%$ vs $125.76\% \pm 1.67\%$) and 48 h ($41.23\% \pm 0.56\%$ vs $138.56\% \pm 1.35\%$) in the LPS group compared with the control group ($t=10.342$, 26.562 , 37.821), but the rate of cytosolic n-YAP positivity (47.35 ± 3.47 vs 12.46 ± 1.34), the rate of nuclear translocation of the YAP/TAZ complex ($2.56\% \pm 0.32\%$ vs $1.01\% \pm 0.06\%$) ($t=46.362$, 26.921), the protein expression levels of IL-2 (2.03 ± 0.09 vs 1.03 ± 0.08), IFN- γ (2.07 ± 0.21 vs 1.02 ± 0.04), TNF- α (2.18 ± 0.11 vs 0.99 ± 0.02) and IL-1 β (3.17 ± 0.42 vs 1.03 ± 0.05) were up-regulated ($t=28.341$, 26.713 , 31.235 , 47.823), with significant differences (all $P<0.001$), while there was no significant difference in the mRNA expression of CYP27B1 and VDR ($t=0.872$, 0.786 , all $P>0.05$). Compared with the LPS group, the cell survival rate at 12h ($85.23\% \pm 0.36\%$), 24h ($79.82\% \pm 0.63\%$) and 48h ($76.28\% \pm 0.72\%$) and the mRNA expression of CYP27B1 (4.42 ± 0.14) and VDR (5.13 ± 0.56) were elevated in the LPS+VD group, while the nucleus n-YAP positivity (24.41 ± 3.23), nuclear translocation of the YAP/TAZ complex ($1.47\% \pm 0.26\%$), IL-2 (1.21 ± 0.06), IFN- γ (1.13 ± 0.42), TNF- α (1.03 ± 0.37) and IL-1 β (1.61 ± 0.58) protein levels were down-regulated, and the differences were significant ($t=7.263$, 19.892 , 23.145 , 27.872 , 26.982 , 14.762 , 13.623 , 18.273 , 25.314 , 27.873 , 22.134 , all $P<0.01$). **Conclusion** The serum 25-OH-VD level is related to the severity of NIP. Exogenous VD supplementation may play an anti-inflammatory role in reducing NIP injury by regulating the TGF- β -mediated YAP/TAZ nuclear translocation mechanism.

Keywords: neonatal infectious pneumonia; 25-OH-VD; TGF- β ; YAP/TAZ nuclear translocation

新生儿感染性肺炎(neonatal infectious pneumonia, NIP)是新生儿期最常见的感染性疾病,如不予以积极有效干预治疗,可能导致患儿死亡^[1]。故此,如何有效治疗该病患儿显得尤为重要。维生素D(vitamin D, VD)是人体所必需的维生素,主要以25-羟基VD(25-hydroxy-vitamin D, 25-OH-VD)形式存在^[2],通过与维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)结合发挥生物学效应,调节机体钙磷代谢和炎症反应^[3]。有学者提出,新生儿VD缺乏可影响免疫功能、促进炎症因子产生、诱发

感染性疾病^[4],然而VD在NIP中的作用与机制相关研究鲜有报道。Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)和转录共激活因子PDZ结合基序(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)属于Hippo信号的表征转录效应因子,参与调控多种生理病理过程。研究显示^[5],肺部炎症促进YAP/TAZ激活和核转位,并与促炎因子分泌呈正相关,表明YAP/TAZ对维持肺稳态具有重要作用。因此本研究观察了25-OH-VD与NIP病情严重程度的相关性,并构建NIP体外模型,探讨25-OH-VD

是否可通过调控 YAP/TAZ 核转位对 NIP 发挥治疗作用, 以期为 NIP 的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2022 年 1 月 ~ 2023 年 1 月成都市妇女儿童中心医院收治的 65 例经临床诊断为 NIP 且符合纳入和排除标准的新生儿为研究对象, 按照病情严重程度分为轻症组 ($n=34$) 和重症组 ($n=31$)。纳入标准: ① NIP 诊断符合第五版《临床新生儿学》^[13] 中的相关标准; ②无器官功能障碍或先天性疾病者; ③日龄 ≤ 28 天者; ④监护人对本研究知情同意。排除标准: ①并发血液系统疾病者; ②并发其他呼吸系统疾病者; ③近期使用抗生素、免疫抑制剂、抗凝药或激素治疗者; ④不同意或不配合此次研究的家属; ⑤母体并发感染性疾病、免疫功能障碍疾病者等; ⑥资料不全者或数据丢失者。另选取 60 例健康新生儿作为对照组。三组新生儿的性别、胎龄、出生体重、分娩方式、出生季节和产妇科疾病等一般资料比较, 差异均无统计学意义 ($F/\chi^2=0.071, 0.301, 2.356, 0.197, 0.053, 0.594$, 均 $P>0.05$)。本研究所有样本和临床资料收集时均严格按照医学伦理要求收集, 经我院伦理委员会批准 (伦审〔2021〕202 号), 并经患儿监护人签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 BEAS-2B 人肺上皮细胞株 (美国 Lonza BioWhittaker™ 公司); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)(SMB00704, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) (M1020, 北京索莱宝科技有限公司); VDR (ab3508), 转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) (ab215715), n-YAP (ab205270), n-TAZ (ab242313), 白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) (ab92381), γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) (ab134070), 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (ab183218), IL-1 β (ab216995) 和 β -actin (ab8226) 抗体 (美国 Abcam 公司); 25-OH-VD ELISA 试剂盒 (YKW-20259, 上海优科唯生物科技有限公司); IL-2 (88-7025-88), IFN- γ (KHC4021) 和 TNF- α (88-7346-88) ELISA 试剂盒 (美国赛默飞公司); IL-1 β (ab217608) ELISA 试剂盒 (美国 Abcam 公司)。Cytation3 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Chemi Doc XRS 化学发光凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); NIB 910 光学显微镜 (深圳博士达器械设备有限公司); 细胞色素 P450 家族成员 28B1 (recombinant cytochrome P450 27B1, CYP27B1) 和 VDR 引物序列由上海生工生物设计合成。

1.3 方法

1.3.1 重症肺炎评价方法: 根据《临床新生儿学》^[6] 中的相关标准, NIP 新生儿符合下列任何一项, 即判断为重症肺炎: ①吸入氧浓度 $\geq 60\%$, 动脉血氧饱和度 $< 92\%$; ②出现休克; ③出现呼吸窘迫或多器官衰竭; ④出现反复呼吸暂停或慢而不规则的呼吸。

1.3.2 临床新生儿血液样本收集: 受试对象入院 24h 内或体检当日抽取空腹静脉血 8ml, 平均分为 2 管, 1 管经 4°C 3 000r/min 离心 20min, 半径 10cm 收集上层血清并放入 -80°C 冰箱备用; 另 1 管采用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。

1.3.3 ELISA 检测新生儿血清 25-OH-VD 和炎症指标含量: 获取的各组受试者血清应用 ELISA 试剂盒测定 25-OH-VD 和炎症标志物 (IL-2, IFN- γ , TNF- α 和 IL-1 β) 的水平。整个测定步骤均按照试剂盒中附加说明书进行操作, 按照标准品吸光度以及浓度获得标准曲线, 按照待测样本吸光度获取其水平。

1.3.4 细胞培养和处理: 将人肺上皮细胞 (BEAS-2B) 复苏后放至 DMEM-F12 培养液中 (含有 10g/dl 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素), 在 37°C 含有 5ml/dl CO_2 的湿润培养箱中培养。取对数生长期的细胞, 加入 0.25% EDTA-Trypsin 胰酶消化, 重悬于 2 ml 培养液中, 以 1×10^5 个/孔的密度铺至 6 孔板中培养。随机分为对照 (Control) 组、LPS 组和 LPS+VD 组。待细胞融合度达 80% 左右时, LPS 组和 LPS+VD 组细胞加入 LPS (0.5 $\mu\text{g/ml}$, 用生理盐水稀释), 在 37°C 和 5 ml/dl CO_2 条件下培养 24 h 建立炎症模型。模型构建成功后, LPS+VD 组加入 25-OH-VD (100 nmol/L, 溶解于无水乙醇) 继续培养 48 h。Control 组仅给予等量磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 处理。

1.3.5 CCK-8 检测细胞活力: 将对数生长期的三组 BEAS-2B 细胞 (1×10^5 个/孔) 接种于 96 孔板中分别培养 0, 6, 12, 24 和 48 h, 另设不接种细胞的培养孔为空白对照组, 每组设置 6 个复孔。加入 CCK-8 溶液 (10 μl /孔), 37°C 孵育 2 h, 在酶标仪 450 nm 波长处读取吸光度 (A) 值。细胞活力 = ($A_{\text{药物处理组}} - A_{\text{空白对照组}}$) / ($A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白对照组}}$)。

1.3.6 qRT-PCR 检测 CYP27B1 和 VDR 的 mRNA 表达: 采用 TRIzol 一步法提取各组 BEAS-2B 细胞总 RNA。核酸定量后, 采用 Prime Script RT 反转录试剂盒将单链 RNA 逆转录为 cDNA, 转录条件: 65°C 5min (RNA 变性), 25°C 5min (退火), 42°C 30min (反转录工作温度), 85°C 5min (逆转录酶失活)。使用 Light Cycler 480 系统

和 SYBR Green Master Mix 试剂盒将上述条件合成的双链 cDNA 进行 RT-PCR 扩增, 条件为 95 ℃ 5min (预变性), 95 ℃ 40s (变性), 40 ℃ 40s (退火), 72 ℃ 1min (延伸), 共 40 个循环, 以 GAPDH 为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因相对表达水平。引物序列如下: VDR 上游引物: 5'-TGCCTGACCCTGGAGACTTTGACC-3', 下游引物: 5'-CATCATGCCGATGTCCACACAGCG-3'; CYP27B1 上游引物: 5'-TGGCCCAGATCCTAACA CATT-3', 下游引物: 5'-GTCCGGGTCTTGGGTCTAACT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GGTATCGTGG AAGGACTCATGAC-3', 下游引物: 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'。

1.3.7 免疫细胞化学法检测 YAP 阳性细胞核数: 参考 FANG 等^[7]的方法, 将各组 BEAS-2B 细胞 (2×10^5 个/孔) 接种于 24 孔板中, 细胞密度达 50% ~ 60% 时用 4g/dl 多聚甲醛固定 30 min, 0.5g/dl TritonX-100 破膜, 37℃ 孵育 30 min, 3ml/dl H₂O₂ 阻断灭活。10 ml/dl 山羊血清封闭 30 min 后加入 YAP 一抗 (1:200) 4℃ 孵育过夜, PBS 代替一抗设为阴性对照。次日, 二抗避光孵育 30 min; 二脒基苯基吲哚 (diamidinyl phenylindole, DAPI) 显色 5 min, 苏木素复染细胞核 30s。光学显微镜下随机选取 10 个视野 ($\times 200$), 计数核阳性细胞, 取平均值。YAP 阳性表达表现为棕黄色颗粒, 同时存在于细胞膜和细胞核中。

1.3.8 免疫荧光法检测 YAP/TAZ 复合物核转位: 将各组 BEAS-2B 细胞接种到 6 孔板 (1×10^5 /孔) 中, 抗体孵育前干预方法同 1.3.7, 加入 YAP/TAZ 一抗 (1:500), 4℃ 孵育过夜。次日加入山羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 45 min。使用 DAPI (2 mg/ml) 进行核染色并封片, 使用荧光显微镜观察并拍照。每组细胞计数 10 个视野 ($\times 200$), 每个视野下计数核转位阳性细胞 (红、蓝色重合细胞核)。

表 1 三组新生儿血清 25-OH-VD 和炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)					
项目	对照组 (n=60)	轻症组 (n=34)	重症组 (n=31)	F 值	P 值
25-OH-VD	16.76 \pm 1.02	12.57 \pm 2.21	7.85 \pm 2.03	39.672	<0.001
IL-2	1.05 \pm 0.12	1.91 \pm 0.18	2.63 \pm 0.27	26.314	<0.001
IFN- γ	1.03 \pm 0.07	1.73 \pm 0.13	2.18 \pm 0.19	24.743	<0.001
TNF- α	0.97 \pm 0.04	1.79 \pm 0.08	2.38 \pm 0.13	31.234	<0.001
IL-1 β	0.96 \pm 0.02	2.18 \pm 0.07	2.59 \pm 0.11	36.652	<0.001

2.2 三组新生儿外周血 PBMC 中 VDR 和 TGF- β /YAP/TAZ 通路相关蛋白表达比较 见表 2。Western blot 结果显示, 与对照组比较, 轻症组和重症组新生儿外周血 PBMC 中 TGF- β , n-YAP 和 n-TAZ 蛋白表达水平逐渐上调, 而 VDR 的表达逐渐下调, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。

YAP/TAZ 复合物核转位率 (%) = 核转位阳性细胞数 / 细胞核总数 $\times 100\%$, 取平均值。

1.3.9 Western blot 检测 NIP 新生儿外周血 PBMC 中 VDR, TGF- β /YAP/TAZ 通路和 BEAS-2B 细胞中促炎因子相关蛋白表达: 按照之前的文献方法对 NIP 新生儿外周血 PBMC 细胞和 BEAS-2B 细胞进行细胞核 / 质分离^[8]。RIPA 放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解缓冲液提取总蛋白, 采用二喹啉甲酸测定 BCA 法检测蛋白浓度。将 50 μg 蛋白通过 12g/dl 的十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液行电泳 (SDS-PAGE) 分离。湿转至聚偏二氟乙烯膜上。室温下, 将膜放入 5g/dl 脱脂牛奶中封闭 1 h, 4℃ 下用抗 VDR (1:1 000), TGF- β (1:200), n-YAP (1:1 000), n-TAZ (1:500), IL-2 (1:1 000), IFN- γ (1:1 000), TNF α (1:1 000), IL-1 β (1:1 000) 和 β -actin (1:10 000) 一抗孵育过夜。次日, 加入山羊抗兔 IgG (DyLight[®] 488) (1:1 000) 二抗, 室温下孵育 1 h。再次洗膜后利用化学发光法 (ECL) 试剂盒并用胶片显影, Image J 软件分析蛋白灰度值, 所有目的蛋白以 β -actin 作为内参。

1.4 统计学分析 所有实验数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并利用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。单因素方差分析三组及三组以上数据的统计学差异, 其中两两比较采用 LSD- t 检验。所有实验均重复三次, 取其均值为最终结果。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三组新生儿血清 25-OH-VD 和炎症相关指标水平比较 见表 1。与对照组相比, 轻症组和重症组新生儿血清中炎症指标 IL-2, IFN- γ , TNF- α 和 IL-1 β 的水平随病情加重而逐渐升高, 25-OH-VD 含量逐渐降低, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。

2.3 各组肺上皮细胞活力比较 见表 3。CCK-8 结果显示, 与 Control 组相比, LPS 组细胞存活率在 12, 24 和 48h 时均显著降低 ($t=10.342, 26.562, 37.821$), LPS+VD 组细胞存活率在 12, 24 和 48h 时均较 LPS 组明显升高 ($t=7.263, 19.892, 23.145$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.01$)。

2.4 各组肺上皮细胞 CYP27B1 和 VDR mRNA 表达比较 见表 4。qRT-PCR 结果显示, 与 LPS 组相比, LPS+VD 组细胞 CYP27B1 和 VDRmRNA 表达显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=27.872$, 26.982 , 均 $P<0.001$); 而 Control 组和 LPS 组两组间 CYP27B1 和 VDRmRNA 表达差异无统计学意义 ($t=0.872$, 0.786 , 均 $P>0.05$)。

2.5 各组肺上皮细胞 YAP 阳性细胞核数量比较 免疫细胞化学结果显示, 与 Control 组相比, LPS 组细胞核 n-YAP 阳性核数 (47.35 ± 3.47 vs 12.46 ± 0.34) 明显升高 ($t=46.362$), 与 LPS 组比较, LPS+VD 组细胞

核 n-YAP 阳性核数 (24.41 ± 3.23) 降低 ($t=14.762$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。

表 2 外周血 PBMC 中 VDR 和 TGF- β /YAP/TAZ 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 ($n=60$)	轻症组 ($n=34$)	重症组 ($n=31$)	F 值	P 值
VDR	1.03 ± 0.08	0.73 ± 0.09	0.51 ± 0.06	18.983	<0.001
TGF- β	1.02 ± 0.04	1.67 ± 0.21	2.43 ± 0.42	34.723	<0.001
n-YAP	0.99 ± 0.02	2.08 ± 0.11	4.23 ± 0.37	53.245	<0.001
n-TAZ	1.03 ± 0.05	2.47 ± 0.42	4.21 ± 0.58	56.782	<0.001

表 3 各组 BEAS-2B 肺上皮细胞活力比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

时间 (h)	Control 组	LPS 组	LPS+VD 组	F 值	P 值
0	100.03 ± 1.14	99.78 ± 0.72	100.01 ± 0.98	1.225	0.288
6	107.86 ± 2.31	88.23 ± 0.68	90.65 ± 0.57	2.873	0.142
12	116.72 ± 2.14	76.23 ± 0.73	85.23 ± 0.36	6.672	0.015
24	125.76 ± 1.67	57.23 ± 0.94	79.82 ± 0.63	29.303	<0.001
48	138.56 ± 1.35	41.23 ± 0.56	76.28 ± 0.72	56.314	<0.001

表 4 各组 BEAS-2B 肺上皮细胞 CYP27B1 和 VDR mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Control 组	LPS 组	LPS+VD 组	F 值	P 值
CYP27B1	1.03 ± 0.02	1.05 ± 0.03	4.42 ± 0.14	67.342	<0.001
VDR	1.01 ± 0.04	0.98 ± 0.06	5.13 ± 0.56	56.234	<0.001

2.6 各组肺上皮细胞 YAP/TAZ 复合物核转位率比较 见图 1。免疫荧光结果显示, 与 Control 组相比, LPS 组细胞 YAP/TAZ 复合物核转位率 ($2.56\% \pm 0.32\%$ vs $1.01\% \pm 0.06\%$) 显著升高

($t=26.921$); 与 LPS 组比较, LPS+VD 组细胞 YAP/TAZ 复合物核转位率 ($1.47\% \pm 0.26\%$) 明显降低 ($t=13.623$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。

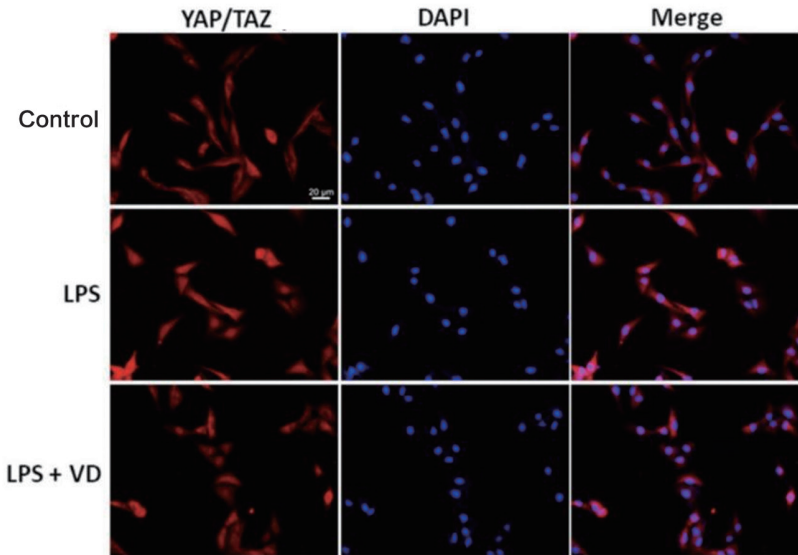


图 1 免疫荧光检测各组 BEAS-2B 人肺上皮细胞 YAP/TAZ 复合物核转位率

2.7 各组肺上皮细胞促炎因子蛋白表达比较 见表 5。Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, LPS 组 IL-2, IFN- γ , TNF- α 和 IL-1 β 的蛋白表达水平大幅上调 ($t=28.341$, 26.713 , 31.235 ,

47.823); 与 LPS 组比较, LPS+VD 组细胞 IL-2, IFN- γ , TNF- α 和 IL-1 β 蛋白水平明显降低 ($t=18.273$, 25.314 , 27.873 , 22.134), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。

表5 各组 BEAS-2B 肺上皮细胞促炎因子蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

项目	Control 组	LPS 组	LPS+VD 组	F 值	P 值
IL-2	1.03 ± 0.08	2.03 ± 0.09	1.21 ± 0.06	26.371	<0.001
IFN- γ	1.02 ± 0.04	2.07 ± 0.21	1.13 ± 0.42	31.892	<0.001
TNF α	0.99 ± 0.02	2.18 ± 0.11	1.03 ± 0.37	38.213	<0.001
IL-1 β	1.03 ± 0.05	3.17 ± 0.42	1.61 ± 0.58	57.813	<0.001

3 讨论

NIP 是新生儿期最常见的严重呼吸系统传染性疾病。由于新生儿呼吸系统发育不足, 肺脏呼吸调控能力不佳, 故而该病的发病率和死亡率较高^[9]。由于临床治疗方法有限, 当前常规治疗以抗感染为主, 可在一定程度上改善患儿症状, 但效果并不十分理想, 且对患儿免疫功能并无明显改善作用^[10]。因此, 需要新的治疗策略来抑制 NIP 的发展。

天然化合物具有显著的抗菌功能, 这一点已得到充分证实。VD 作为一种来源于胆固醇的类固醇激素, 在血液循环中多以半衰期较长且稳定的前体 25-OH-VD 形式存在, 是人类生长发育的关键性营养元素^[11]。研究报道表明, VD 不但可有效维持血循环中的钙磷平衡并防治骨质疏松, 亦可在调控宿主防御、免疫和炎症之间平衡中发挥至关重要的作用^[12]。迄今为止, VD 已被广泛应用于类风湿性关节炎及系统性红斑狼疮等多种免疫性疾病和慢性气道炎症等多器官炎症损伤中的辅助治疗。新生儿时期免疫系统发育不全使新生儿对肺部感染易感, 前期临床研究显示, 社区获得性肺炎患儿血清 25-OH-VD 水平明显低于正常对照组, 提示 VD 水平与新生儿患感染性肺炎的风险呈负相关^[13]。此外, WAIDEN 等^[14]发现孕期 VD 缺乏可增加其子代呼吸道感染风险, 妊娠期接受 VD 补充饮食可通过减轻新生小鼠肺组织炎症并改善发育中的气道重塑来影响子代肺健康。本研究同样发现, NIP 病情程度与血清 25-OH-VD 水平呈负相关, 病情越重, VD 缺乏率和炎症因子表达量越高, 这些结果与雷玉琳等^[15]的研究一致。提示血清 VD 水平对于早期诊断 NIP 病情程度可能具有重要临床指导意义。

除了早期诊断意义, VD 还被用于调节肺部炎症和对固有免疫防御反应的影响。感染性肺炎是由细菌、病毒或真菌感染引起的一种常见肺部疾病, 肺炎的严重程度与患者的抵抗能力和组织恢复机制有关。研究发现, SARS-CoV-2 感染性肺炎可归因于 VD 不足, 尽早补充 VD 能够在一定程度上预防感染^[16]。周伟等^[17]发现, 血清 25-OH-VD 低水平可显著增加新生儿肺炎, 新生儿呼吸窘迫综合征和支气管肺发育不良的发生率。鉴于此, 本研究进一

步探讨了 VD 是否对 NIP 具有保护作用。LPS 是革兰氏阴性细菌产生的一种内毒素, 也是诱发肺炎相关炎症的危险因素之一。本研究使用 LPS 诱导的人肺上皮细胞系 BEAS-2B 来模拟感染性肺炎的细胞模型, 并探讨了 25-OH-VD 对该模型的作用机制。结果发现, VD 处理对细胞活力具有显著改善作用, 并上调 CYP27B1 和 VDR 表达水平, 提示 VD 对于肺脏结构和功能可能具有保护作用。

TGF- β 是肺脏和其他器官免疫反应和纤维化的重要驱动因素, 其激活会破坏宿主防御系统, 导致细菌感染加重^[10]。最近 LO SARDO 等^[18]研究证实, 肺上皮细胞对 TGF- β 的反应性依赖于 Hippo 通路下游效应物, 即转录辅助效应因子 YAP 和 TAZ。YAP 和 TAZ 的活性主要受其亚细胞定位的调控, 健康组织中无活性的 YAP 和 TAZ 主要定位于细胞质。相反, 在炎症浸润和纤维化的组织中, 活化的 YAP 和 TAZ 则优先转位于细胞核, 通过激活 TGF- β 依赖性机制促进坏死信号传导^[18]。研究发现, 长期 VD 缺乏会促进小鼠肾脏纤维化和功能损伤, 外源性激活 VDR 能够通过抑制 TGF- β -SMAD 信号转导改善肾损伤^[19]。本研究结果同样发现, 在 NIP 患儿血清中 TGF- β , n-YAP 和 n-TAZ 蛋白表达水平随病情严重程度逐渐上调, 而 VDR 的表达水平逐渐下调。这些研究结果共同确定了 YAP 和 TAZ 是 NIP 肺损伤的关键驱动因素。但这些促炎转录辅助因子在器官损伤后是如何被激活, 本研究在细胞水平进一步探索此问题。结果发现, 25-OH-VD 可能是调控 YAP/TAZ 信号通路的重要上游分子, 它不仅可以直接上调 VDR 的表达水平, 抑制 TGF- β 表达, 阻断 YAP/TAZ 复合体核转位, 还可以降低下游促炎指标的表达, 这些发现与既往研究的结果一致^[20]。本研究也有不足之处, 未进行 NIP 患儿不同程度病情的血清 VD 水平与临床症状或指标的独立相关性分析, 这对于阐述血清 VD 水平在 NIP 临床诊断中的确切指导作用非常重要。

综上所述, 血清 25-OH-VD 水平与 NIP 严重程度相关, 外源性补充 25-OH-VD 可通过抑制 TGF- β 介导的 YAP/TAZ 核转位机制发挥抗炎作用, 为预防和诊断 VD 缺乏引起的 NIP 提供了一种新方法。

参考文献:

[1] KORANG S K, NAVA C, MOHANA S P, et al. Antibiotics for hospital-acquired pneumonia in neonates and children[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2021, 11(11): CD013864.
[2] 程巧林, 王丹虹, 卢田甜, 等. 感染性疾病早产儿血清 25-(OH)D3, IL-12, HNL 水平变化及其临床意义[J]. 海南医学, 2023, 34 (18) : 2691-2695.

(下转第 39 页)

- LncRNA-H19 silencing suppresses synoviocytes proliferation and attenuates collagen-induced arthritis progression by modulating miR-124a[J]. *Rheumatology (Oxford, England)*, 2021, 60(1): 430-440.
- [21] YANG Bo, XU Lei, WANG Shuang. Regulation of LncRNA-H19/miR-140-5p in cartilage matrix degradation and calcification in osteoarthritis[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2020, 9(4): 1896-1904.
收稿日期: 2023-10-09
修回日期: 2023-12-21
-
- (上接第33页)
- CHENG Qiaolin, WANG Danhong, LU Tiantian, et al. Changes of serum 25 hydroxyvitamin D3, interleukin-12, and human neutrophil lipocalin levels in preterm infants with infectious diseases and their clinical significance [J]. *Hainan Medical Journal*, 2023, 34(18): 2691-2695.
- [3] ZMIJEWSKI M A, CARLBERG C. Vitamin D receptor(s): in the nucleus but also at membranes?[J]. *Experimental Dermatology*, 2020, 29(9): 876-884.
- [4] DAS R R, SINGH M, NAIK S S. Vitamin D as an adjunct to antibiotics for the treatment of acute childhood pneumonia[J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, 2018, 7(7): CD011597.
- [5] LACANNA R, LICCARDO D, ZHANG P, et al. Yap/Taz regulate alveolar regeneration and resolution of lung inflammation[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2019, 129(5): 2107-2122.
- [6] 马加宝, 陈凯. 临床新生儿学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2003: 34-37.
MA Jiabao, Chen Kai. *Clinical neonatology*[M]. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 2003: 34-37.
- [7] FANG Long, WANG Baolong, YANG Zengkun, et al. PNO1 promotes the progression of osteosarcoma via TGF- β and YAP/TAZ pathway[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 21827.
- [8] ZUO Jingjing, HU Zhangwei, LIU Tao, et al. Calpeptin attenuates cigarette smoke-induced pulmonary inflammation via suppressing calpain/I κ B α signaling in mice and BEAS-2B cells[J]. *Pathology Research and Practice*, 2018, 214(8): 1199-1209.
- [9] 白石, 周卫, 谷颖. 新生儿肺炎患者血清 YKL-40, 25(OH)D3 和 HMGB1 表达水平与感染类型及病情评估的相关性研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(6): 166-170.
BAI Shi, ZHOU Wei, GU Ying. Correlation of serum YKL-40, 25(OH)D3 and HMGB1 expression levels with infection types and disease assessment in neonatal pneumonia[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(6): 166-170.
- [10] DONG Xueping, ZHOU Peipei, ZHU Guannan. Common pathogens and drug resistance of neonatal pneumonia with new multichannel sensor [J]. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2022, 2022: 2208636.
- [11] 王志强, 李贤慧. 维生素 D 缺乏与多系统疾病相关性的研究进展 [J]. *武警医学*, 2021, 32(4): 358-361.
WANG Zhiqiang LI Xianhui. Research progress on the correlation between vitamin D deficiency and multi-system diseases[J]. *Medical Journal of the Chinese People's Armed Police Force*, 2021, 32(4): 358-361.
- [12] BILEZIKIAN J P, FORMENTI A M, ADLER R A, et al. Vitamin D: dosing, levels, form, and route of administration: does one approach fit all?[J]. *Reviews in Endocrine Metabolic Disorders*, 2021, 22(4): 1201-1218.
- [13] 赵晓芬, 杨米凤, 赵朋娜, 等. 血清 25-羟基维生素 D 水平与新生儿感染性肺炎风险的相关性 [J]. *中国医药导刊*, 2022, 24(12): 1190-1193.
ZHAO Xiaofen, YANG Mifeng, ZHAO Pengna, et al. Correlation of serum 25-hydroxy-vitamin D level with the risk of infectious pneumonia in newborns [J]. *Chinese Journal of Medicinal Guide*, 2022, 24(12): 1190-1193.
- [14] WAIDEN J, HEYDARIAN M, OAK P, et al. Prenatal vitamin D supplementation mitigates inflammation-related alveolar remodeling in neonatal mice[J]. *American Journal of Physiology*, 2023, 325(2): L95-L103.
- [15] 雷玉琳, 刘翠兰, 熊伶俐, 等. 新生儿感染性肺炎血清维生素 D, IL-6 和 PCT 水平与病情程度相关分析 [J]. *中国热带医学*, 2022, 22(7): 607-610.
LEI Yulin, LIU Cuilan, XIONG Lingli, et al. Relationship between serum vitamin D, IL-6, PCT levels and severity of neonatal infectious pneumonia[J]. *China Tropical Medicine*, 2022, 22(7): 607-610.
- [16] KAYA M O, PAMUKÇU E, YAKAR B. The role of vitamin D deficiency on COVID-19: a systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. *Epidemiology and Health*, 2021, 43: e2021074.
- [17] 周伟, 尹晓光, 杨蓉. 不同血清 25-羟维生素 D3 水平早产儿并发症、临床转归的差异 [J]. *中国医刊*, 2023, 58(11): 1252-1256.
ZHOU Wei, YIN Xiaoguang, YANG Rong. Differences in complications and clinical regression of preterm infants with different serum 25-hydroxyvitamin D3 levels[J]. *Chinese Journal of Medicine*, 2023, 58(11): 1252-1256.
- [18] LO SARDO F, PULITO C, SACCONI A, et al. YAP/TAZ and EZH2 synergize to impair tumor suppressor activity of TGFBR2 in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Letters*, 2021, 500: 51-63.
- [19] ZHANG Zhihui, LUO Biao, XU Shen, et al. Long-term vitamin D deficiency promotes renal fibrosis and functional impairment in middle-aged male mice[J]. *British Journal of Nutrition*, 2021, 125(8): 841-850.
- [20] YEO M K, PARK H S, PARK Y H, et al. Expression pattern of the hippo pathway effector TAZ in cellular and fibrotic nonspecific interstitial pneumonia[J]. *Chinese Medical Journal (England)*, 2018, 131(5): 626-628.
收稿日期: 2023-12-02
修回日期: 2024-04-17