

· 论 著 ·

维生素 D 缺乏动物模型的建立*

常正奇[#], 张泽华, 罗 飞, 许建中[△]

(第三军医大学西南医院骨科/全军矫形外科中心, 重庆 400038)

摘要:目的 采用 BALB/c 小鼠建立维生素 D(VD)缺乏模型并进行评价。方法 将 BALB/c 小鼠分成正常组、VD+ 组及 VD- 组, 测 4~10、12 周小鼠体质量, 并观察其运动习性, 8、12 周期间饮食消耗; 12 周时测血浆 VD、清蛋白水平; 将 VD 缺乏老鼠 10 只分为组 I 继续遮光加正常饮食, 组 II 正常环境加正常饮食, 6 周后测 VD 水平。结果 正常组与 VD+ 组体质量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); VD+ 组与 VD- 组 8 周时日平均消耗饲料, 有差异, 12 周时无差异; 正常组、VD+ 组、VD- 组血浆清蛋白分别为 (33.2 ± 1.04) 、 (32.4 ± 0.53) 、 (32.8 ± 0.67) g/L, 差异无统计学意义; 正常组与 VD+ 组血浆 VD 水平无显著差异, VD- 组血浆 VD 水平下降到正常的 20% 以下; 6 周后, 组 I、组 II VD 水平分别为 (18.46 ± 1.53) 、 (58.46 ± 5.53) nmol/L ($P < 0.001$)。结论 通过控制维生素来源建立维生素 D 缺乏 BALB/c 小鼠动物模型是可行的。

关键词: 维生素 D 缺乏; 维生素 D 生理作用; BALB/c 小鼠; 动物模型

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.11.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)11-1041-03

To establish the animal model of vitamin D deficiency*

Chang Zhengqi[#], Zhang Zehua, Luo Fei, Xu Jianzhong[△]

(Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038 China)

Abstract: Objective To establish and evaluate the animal model of vitamin d deficiency using BALB/c mice. Methods Put BALB/c mice into normal group, VD+ group and VD- group, measured the weight of the three groups of 4-10, 12th week; observed the mouse activity; Recorded food consumption during 8 and 12th week; Assay for serum albumin and 25-hydroxyvitamin D level after 12 weeks. Then 10 mouse of vitamin D deficiency were divided into two groups with normal diet for six weeks, but one group as beginning the other one as normal group, then measured the serum level of 25-hydroxyvitamin D. Results Normal group and VD+ group had no statistical differences in body weight ($P > 0.05$); At 8th week, the average consumption of synthesis food in VD+ group was (6.72 ± 0.89) g/d, VD- group was (5.82 ± 1.34) g/d; At 12th week times VD+ group was (7.05 ± 0.72) g/d, VD- group was (6.67 ± 0.84) g/d, there was a little difference at 8th week but no statistical differences at 12th weeks; The plasma albumin of normal group, VD+ group, VD- group were (33.2 ± 1.04) , (32.4 ± 0.53) , (32.8 ± 0.67) g/L, respectively. Two of the three groups and between the two groups were no statistically differences; Serum 25-hydroxyvitamin D had no significant differences between normal group and VD+ group, but significant differences in VD- group with decreased into normal 20%; The serum 25-hydroxyvitamin D of two deficiency groups after six months were (18.46 ± 1.53) and (58.46 ± 5.53) nmol/L ($P < 0.001$). Conclusion The establishment of vitamin deficiency BALB/c mice animal model by controlling the sources of vitamin D is feasible.

Key words: vitamin D deficiency; physiological effects of vitamin D; BALB/c mice; animal model

维生素 D(vitamin D, VD)不仅是维生素,也可以说是来自皮肤分泌的激素,有广泛且比较重要的生理作用。VD 缺乏是全世界发病率最高的疾病,在健康欧洲人中 VD 缺乏 (< 37.5 nmol/L) 达到了 34%^[1]。大量的医学证据表明,VD 缺乏时可导致佝偻病、软骨病、糖尿病、高血压、冠心病、多发硬化、风湿性关节炎,甚至结肠癌、乳腺癌、前列腺癌等癌症的发生^[2]。其对健康的损害如此严重,遗憾的是人们到目前为止,仍未阐明各种导致诸如糖尿病、高血压、自身免疫性疾病和癌症的致病因素与 VD 之间的关系。为对 VD 缺乏导致的一系列疾病进行深入研究,有必要探讨一种建立稳定成型的动物模型的方法,本文考虑小鼠体积小、饲料容易配置及基因与人同源性强,决定采用 BALB/c 小鼠建立 VD 缺乏模型。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 怀孕 2 周的 BALB/c 母鼠 36 只及生长繁殖饲料(正常饲料)均购自第三军医大学动物实验中心,VD 缺乏纯合成饲料原料购自重庆化玻有限公司,不含紫外线黄光灯购自飞利浦公司,VD 检测试剂盒购自 IDS 公司。

1.2 VD 缺乏小鼠饲料配制 将双蒸水 50 L 平均分装到容量为 50 L 的金属桶装容器中,分别加入 625 g 琼脂,于 105 °C 加热 40 min,然后放入到 60 °C 的保温箱中备用。将比例^[3]称量的各种原料放入混合机中混合 30 min 后加入到无尘粉碎机中粉碎,全部一次性通过 200 目。将其平均分两份分别加入到琼脂溶液中,并加入脂溶性维生素溶液各 250 mL^[3](一份含 VD,一份未含),充分搅拌 30 min,室温下冷却 1 h,然后放入到-20

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(30901174)。 △ 通讯作者, Tel: 13228683070; E-mail: treasureyuning@qq.com, E-mail: xjzslw@hotmail.com。 # 现工作单位:山东潍坊解放军第八十九医院。

℃冰箱中冻存。

1.3 VD 缺乏小鼠模型的建立 将 36 只怀孕 2 周的 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,单笼饲养。正常组喂正常饲料、自来水,清洁级饲养;VD+组喂 VD+饲料、自来水,清洁级饲养;VD-组喂 VD-饲料、自来水,超净工作台饲养。VD-组将鼠笼放入超净工作台,工作台四周内部用门板遮盖,外部用不通风布帘遮盖,12 h 通风一次,用不含紫外线黄光灯白天 12 h 照射,夜间熄灯。怀孕母鼠在放入笼中 6 d 左右产子鼠,子鼠出生 3 周断奶,饲养环境同母鼠,同时剔除雄性子鼠,不同窝小鼠分开饲养。最终去除死去小鼠的数据,正常组、VD+、VD-组分别剩余 18、15、13 只。检测 4~10、12 周小鼠体质量,8、12 周时测每天饮食消耗量,同时观察小鼠运动习性。

1.4 检测血浆 VD、清蛋白 12 周时将上述 3 组小鼠剪尾取血 100 μ L 离心取血浆测 VD 水平,每组随机取 3 只小鼠摘眼球取血,测清蛋白水平;将 VD 缺乏老鼠 10 只随机分为组 I 继续遮光加正常饮食,组 II 正常环境加正常饮食,6 周后摘眼球取血测 VD 水平。

1.5 统计学处理 实验数据用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,组间差异用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验;VD+组与 VD-组饮食消耗比较采用配对 *t* 检验。

2 结 果

2.1 3 组 BALB/c 小鼠的体质量 从第 4 周开始进行饲料喂养,每周记录小鼠体质量变化。结果显示,正常组与 VD+组每周体质量比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。提示配方饲料能够给小鼠提供足够的营养。

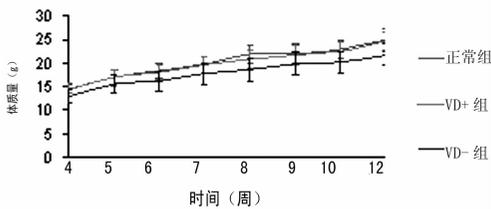


图 1 3 组小鼠体质量变化图

2.2 8、12 周 VD+组与 VD-组饮食区别 8 周时日平均消耗合成饲料 VD+组为(6.72 \pm 0.89)g,VD-组为(5.82 \pm 1.34)g;12 周时 VD+组为(7.05 \pm 0.72)g,VD-组为(6.67 \pm 0.84)g。8、12 周时两组小鼠每天饮食消耗量经成对 *t* 检验,8 周时 $P<0.001$,12 周时 $P=0.178$,提示随体质量趋于稳定,饮食消耗差异消失。

2.3 3 组 BALB/c 小鼠血浆清蛋白水平 喂养到 12 周时检测血浆清蛋白水平,正常组、VD+组、VD-组血浆清蛋白分别为(33.2 \pm 1.04)、(32.4 \pm 0.53)、(32.8 \pm 0.67)g/L,3 组之间血浆清蛋白含量差异无统计学意义($P=0.762$),正常组与 VD+组差异无统计学意义($P=0.479$),VD+组与 VD-组差异无统计学意义($P=0.707$),正常组与 VD-组差异无统计学意义($P=0.730$)。

2.4 3 组 BALB/c 小鼠血浆 VD 水平 正常组、VD+组、VD-组血浆 VD 水平分别为(64.9 \pm 8.23)、(76.1 \pm 8.18)、(9.2 \pm 2.26)nmol/L。正常组与 VD+组血浆 VD 水平无显著差异,但 VD-组血浆 VD 水平显著下降,低于正常的 20%以下,

提示 VD 缺乏小鼠模型建立成功(图 2)。

2.5 再次饲养后血浆 VD 水平 VD 缺乏 BALB/c 小鼠组 I、组 II 饲养 6 周后,测其血浆 VD 水平分别为(18.46 \pm 1.53)、(58.46 \pm 5.53)nmol/L。组 I 小鼠 VD 水平稍有升高,但仍远低于正常水平;而组 II 小鼠血浆 VD 水平接近正常。

2.6 小鼠活动习性 VD 缺乏小鼠从出生 6 周开始活动量较正常组及 VD+组明显减少,并且贴地行走,导致 8 只小鼠腹部有(1~3)cm \times (1~2)cm 左右的皮肤脱毛。

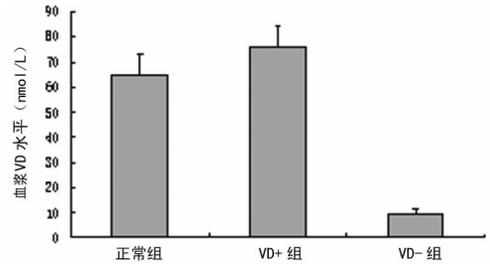


图 2 3 组小鼠血浆 VD 水平

3 讨 论

3.1 人为干预 VD 缺乏的理论 VD 是固醇类衍生物,有 5 种,对健康关系较密切的是 VD₂、VD₃,均为 VD 原经紫外线照射后的衍生物^[4]。25-OHD 为血清中多种 VD 代谢产物中含量最多且最稳定的一种,其血清浓度可代表机体 VD 营养状态。人体每天需要 1 000 IUVD 才能使体内的 25-OHD 达到 50 nmol/L^[5],但无论植物还是动物主要是含 VD 原(需要紫外线照射),从食物中得到的 VD 很难超过 100 IU,远无法满足机体的需要。由此所知维生素的来源主要是日光照射皮肤生成,多余的可以贮存在脂肪及肝数月^[6]。在建立动物模型的时候从 3 个方面进行,确保 BALB/c 小鼠体内 VD 缺乏:(1)日光中的紫外线照射对 VD 生成至关重要^[7],采用遮光,用不含紫外线黄光灯照射,饲养地为四周木板遮挡加不透光布围绕的超净工作台(可保证清洁级饲养及经常透风);(2)采用的饲料为纯合成饲料,完全不含 VD 原,更不含 VD;(3)考虑到 VD 可以贮存在脂肪及肝数月,为使试验小鼠饲养前体内 VD 降到最低,缩短建模时间,作者采用二代小鼠饲养 12 周。试验结果显示其体内 VD 水平降至 10 nmol/L 以下,完全符合公认的维生素缺乏标准。

3.2 VD 水平及其生理作用 VD 的主要功能是调节体内钙、磷代谢,减少骨质疏松及骨折的风险;另外其作用于 VD 受体,直接或间接调控 200 多个基因,减少癌细胞的增生,并诱导其末端分化^[8],发挥免疫调节作用^[9],明显减少许多慢性疾病(癌症、自身免疫性疾病、传染性疾病及心血管疾病等)的罹病风险。关于血浆中对所有器官都适合的 VD 浓度目前还无法确定,但小于 25 nmol/L 被认为缺乏,可能导致佝偻病或骨软化症^[10];小于 50 nmol/L 被认为不足,可能导致一系列慢性疾病^[11];50~100 nmol/L 时属于可代偿范围^[12];100~150 nmol/L 目前被认为健康水平。本试验中正常组、VD+组、VD-组 VD 水平分别为(64.9 \pm 8.23)、(76.1 \pm 8.18)、(9.2 \pm 2.26)nmol/L,所以,此动物模型从 VD 水平上看完全达到缺乏标准。观察 VD 缺乏老鼠活动明显减弱且肚皮贴地行走,减轻自身重量防止骨折,达到佝偻病及骨软化症诊断标准。与

Anderson 等^[13]建立的动物模型比较,本研究 3 组小鼠体内 VD 偏低,排除鼠种原因外,正常组与 VD+ 组主要因为清洁级饲养过滤紫外线较多导致,VD+ 组也与合成饲料中添加 VD 较少有关,VD- 组则可能因为遮光较为彻底。

3.3 本研究建立的动物模型的合理性 目前,用于 VD 缺乏疾病研究的动物包括猪、狗、大鼠和小鼠。在动物的选择上作者考虑到小鼠易行、经济,且关于 VD 缺乏疾病的研究已经从佝偻病转向免疫、肿瘤、心血管等疾病研究^[14],逐步进展到细胞及分子水平,小鼠完全可满足需要,并且小鼠与人类的同源性最好;应用纯合成饲料,根据化学及物理因素来造动物模型,造成 VD 缺乏与人类有较高的相似性,在建立的动物模型中再次设计 3 个指标即体质量、饮食消耗及血浆清蛋白,从体质量上观察 VD+ 组与正常组小鼠体质量差异无统计学意义,VD+ 组与 VD- 组饮食消耗在 8 周时稍有差异,12 周时差异无统计学意义,随体质量趋于稳定后饮食差别消失,血浆清蛋白水平 3 组小鼠间差异无统计学意义,所以,纯合成饲料的营养状况可以满足小鼠的生长需要;通过控制光照及饲料中 VD 含量控制 VD 水平,具有较高的可控性,并且作者在第一期试验结束后通过调整饮食及光照 6 周后发现,遮光组体内 VD 稍有升高,但仍然为缺乏,不遮光组基本回复到正常水平,证明光照较饮食对体内 VD 水平的维持更重要。BALB/c 小鼠 VD 缺乏模型的优点有制作方法简便易行、成本低、结果可靠、周期短、成功率高、重复性好等,因此,是 VD 缺乏系列疾病的一种较好的动物模型。

总之,VD 也被称为“疾病预防的明日之星”^[15],与之相关的研究越来越多,在本文建立的动物模型中通过控制 VD 来源造成其缺乏,对其相关疾病的深入研究有重要意义。但是,任何一种动物模型都不能全部复制出人类疾病的所有表现,只可能在一个局部或一个方面与人类疾病相似。所以,模型实验结论的正确性是相对的,需要根据实际情况进行调整、完善。

参考文献:

- [1] Macfarlane GD, Sackrison JL, Body JJ, et al. Hypovitaminosis D in a normal apparently healthy urban European population[J]. *J Steroid Biochem*, 2004, 90(5): 621-623.
- [2] John S, Adams, Martin H. Unexpected actions of vitamin D; new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity [J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4(1): 80-90.
- [3] Yang SL, Smith C. Vitamin D deficiency suppresses cell-mediated immunity in vivo [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 303(1): 98-106.
- [4] Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(18): 2062-2072.
- [5] Margheita T, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229(11): 1136-1142.
- [6] Holick MF. Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(1): 4-6.
- [7] Zhang W, Chang LW, Wang SR, et al. Effect of ultraviolet irradiation dose and style on 25-hydroxyvitamin D and bone metabolism in growing rats [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2009, 46(2): 192-194.
- [8] Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands [J]. *Endocr Rev*, 2005, 26(5): 662-664.
- [9] Romagnani S. Regulation of the T cell response [J]. *Clin Exp Allergy*, 2006, 36(11): 1357-1358.
- [10] Basha B, Rao DS, Han ZH, et al. Osteomalacia due to vitamin D depletion; a neglected consequence of intestinal malabsorption [J]. *Am J Med*, 2000, 108(4): 296-298.
- [11] Vieth R, Cole DE, Hawker GA, et al. Wintertime vitamin D insufficiency is common in young Canadian women, and their vitamin D intake does not prevent it [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2001, 55(12): 1091-1093.
- [12] Lamberg-Allardt CJ, Outila TA, Karkkainen MU, et al. Vitamin D deficiency and bone health in healthy adults in Finland; could this be a concern in other parts of Europe [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(11): 2066-2068.
- [13] Anderson PH, Sawyer RK, May BK, et al. 25-Hydroxyvitamin D requirement for maintaining skeletal health utilising a Sprague-Dawley rat model [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103(5): 592-594.
- [14] Michael F, Holick. Vitamin D deficiency [J]. *Hew Engl J Med*, 2007, 357(3): 266-268.
- [15] Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality; a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Arch Intern Med*, 2007, 167(16): 1730-1732.

(收稿日期: 2010-10-02 修回日期: 2011-01-12)

启事: 本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道, 欢迎投稿。