

• 基础研究 •

成年维生素 D 缺乏大鼠模型的建立及评价

李清华¹,张丰香²,邵丽军²,王 飞¹,翟 强¹,连 波³,杨潍潍^{4△},王国辉⁴

(潍坊医学院:1. 公共卫生学院预防实验室;2. 公共卫生学院营养食品与儿童少年卫生学教研室;

3. 药学与生物科学学院生物技术实验室;4. 药学与生物科学学院细胞生物学教研室,山东潍坊 261053)

摘 要:**目的** 建立维生素 D 缺乏大鼠模型,并进行初步评价,为研究维生素 D 缺乏与高血压的关系奠定基础。**方法** 将成年的 SD 大鼠分成正常对照组、维生素 D 缺乏组和维生素 D 对照组,分别采用普通正常饲料、维生素 D 缺乏饲料和维生素 D 对照饲料进行饲养,饲养环境采用白炽灯作为照明光源,维持 12 h:12 h 光暗周期;饲养 6 周后通过眼底取血的方式采集外周血,使用 EIA 法测定血清维生素 D 含量,之后每隔两周测定 1 次。**结果** 饲养 10 周后维生素 D 缺乏组大鼠血浆维生素 D 平均含量降至 2.07 nmol/L;维生素 D 对照组为 56.74 nmol/L,正常对照组为 57.61 nmol/L,正常对照组与维生素 D 对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。与其余两组相比,维生素 D 缺乏组大鼠血压显著升高。**结论** 通过控制光照和特殊饲料饲养方法建立维生素 D 缺乏大鼠模型是可行的,相比对照组,维生素 D 缺乏动物的血压显著升高。

关键词:维生素 D 缺乏;SD 大鼠;高血压

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.029 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)32-3923-03

Establishment and evaluation of model for adult rats with vitamin D deficient

Li Qinghua¹,Zhang Fengxiang²,Shao Lijun²,Wang Fei¹,Zhai Qiang¹,Lian Bo³,Yang Weiwei^{4△},Wang Guohui⁴

(1. Department of Prevention Laboratory, School of Public Health;2. Department of Nutrition Food and Children Hygiene,

School of Public Health;3. Department of Biotechnology, School of Pharmaceutical and Biological Sciences;4. Department of

Cell Biology, School of Pharmaceutical and Biological Sciences, Weifang Medical University Weifang, Shandong 261053, China)

Abstract:**Objective** To establish and evaluate animal model of adult rats with vitamin D deficient and assess the association of vitamin D deficiency and hypertension. **Methods** Adult SD rats were divided into 3 groups;normal controls group(feed with ordinary forage),vitamin D deficient groups(feed without vitamin D)and vitamin D control group(feed with vitamin D),which were fed with different diets under 12 h:12 h without ultraviolet light bulb(UV-B). After treatment for 6 weeks,Retinal blood was collected,and Serum vitamin D levels was tested by EIA every 2 weeks. **Results** After treatment for 10 weeks,Serum level of vitamin D in vitamin D deficient group were reduced to 2.07 nmol/L,while vitamin D group and normal control group were measured as 56.74 nmol/L and 57.61 nmol/L,there was no statistically significant difference between vitamin D group and normal control group($P>0.05$). hypertension of vitamin D deficient group was significantly higher than other two groups. **Conclusion** It is feasible to establish model of adult rats with vitamin D by UV-B free light and diets control,hypertension of rats vitamin D deficiency has a significant rise compared with the control group.

Key words: vitamin D deficiency;SD rats;hypertension

维生素 D 是人体必需的一种维生素。在人体内,维生素 D 最重要的作用是调节肝、肾以及小肠中钙、磷吸收与骨合成和代谢^[1-2]。近年研究表明,维生素 D 在免疫、细胞增殖、分化和激素分泌中发挥重要功能,对免疫调节等正常生理过程的维持起到重要的调控作用,并可保护人群免受多种疾病的困扰,相反维生素 D 缺乏或不足会引起或影响很多疾病的发生和发展,如糖尿病、心血管疾病、肿瘤等^[3-6]。美国 41.6%的健康人群处于维生素 D 缺乏或不足的状态^[7],欧洲人群中维生素 D 缺乏或不足的情况还要严重;由于饮食习惯的差异,我国人群中维生素 D 缺乏或不足的情况更为严重^[8]。为更好地研究维生素 D 缺乏与其导致的一系列疾病间的关系,深入探讨维生素 D 在体内的生理作用,有必要建立维生素 D 缺乏动物模型。大鼠作为一种常见的实验动物,在营养代谢、血压调节等方面具有独特的研究价值,且在营养代谢等生理方面与人比较接近,因此,本文选取 SD 大鼠作为建模动物,以探讨维生素 D 缺乏与高血压发生的相关性,为进一步探讨维生素 D 缺乏与高血压的相关机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 动物与饲料 实验所用大鼠与正常对照饲料均购自北京

维通利华公司。维生素 D 对照饲料与维生素 D 缺乏饲料均购自江苏特洛非公司。血清维生素 D 浓度检测采用 IDS vitamin D 酶免疫试验(EIA)试剂盒,购自北京荣志海达公司(货号:IDS 57F1)。

1.2 动物模型的建立 将所购得的大鼠分成正常对照组、维生素 D 对照组、维生素 D 缺乏组,分别喂以正常对照饲料、维生素 D 对照饲料、维生素 D 缺乏饲料。饮水采用清洁饮用水,光照采用无紫外光的白炽灯,维持光暗周期 12 h:12 h,饲养环境为清洁级。

1.3 方法 饲养 6 周后通过眼底取血的方式采集外周血,使用 EIA 方法测定血清维生素 D 含量,之后每隔两周测定 1 次。

1.4 动物模型评价 记录测量不同处理大鼠的取食情况和生长情况,包括饲料每日消耗、体质量等。

1.5 统计学处理 所有实验数据采用 GraphpadPrism 6 软件进行统计分析,采用 Student-t 检验,所有测量或测定数据均重复 3 次以上,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆维生素 D 水平 饲养 6 周后,维生素 D 缺乏组的动物血浆维生素 D 浓度为 42.71 nmol/L,相比对照组显著下降。

随饲养时间的进行,维生素 D 缺乏组的动物血浆维生素 D 浓度进一步降低,到第 10 周时,血浆维生素 D 浓度接近或低于检测下限(5 nmol/L),平均浓度 2.07 nmol/L,大鼠处于维生素 D 缺乏状态。正常对照组与维生素 D 对照组的维生素 D 浓度在整个饲养过程中基本保持平稳,统计表明两组的维生素 D 浓度差异无统计学意义($P=0.55$)。见图 1。

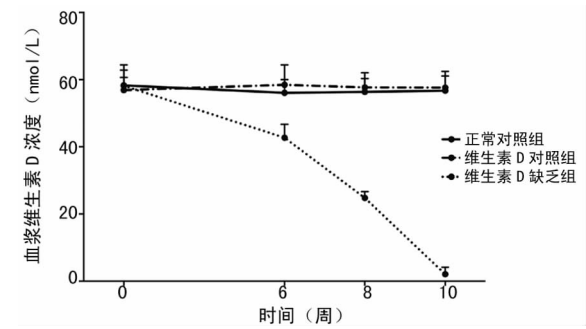


图 1 各组大鼠血浆维生素 D 浓度

2.2 动物的生长曲线 实验开始后在不同时间点对大鼠体质量进行测量纪录。结果表明,正常对照组与维生素 D 对照组大鼠体质量差异无统计学意义($P=0.53$),正常饲料与维生素 D 对照饲料均可提供充足的营养,满足动物的日常生长需要。维生素 D 缺乏组大鼠体质量相比维生素 D 对照组较轻,但差异不显著($P=0.14$)。见图 2。

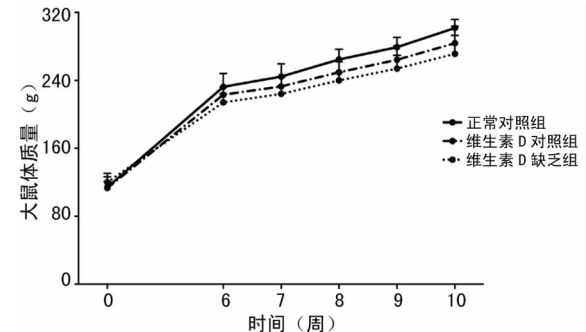


图 2 各组大鼠生长曲线

2.3 每日摄食量 在实验过程中对大鼠的饲料摄食量进行监测纪录。研究发现,在饲养开始时和饲养过程中,大鼠的每日摄食量在不同组别间差异无统计学意义;但是,在饲养第 12 周,维生素 D 缺乏组大鼠的每日摄食量低于维生素 D 对照组,但差异不显著($P=0.08$),见图 3。

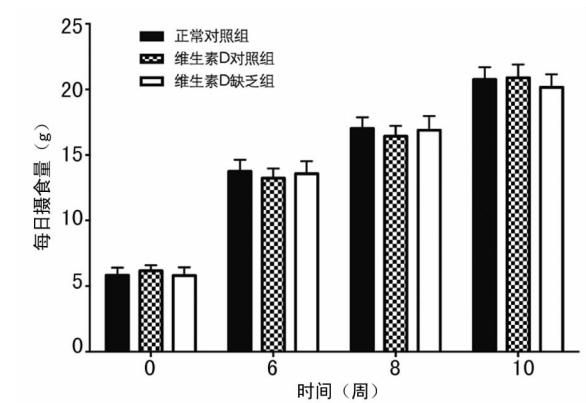


图 3 各组大鼠每日摄食量

2.4 动物血压 维生素 D 缺乏大鼠建模成功后,通过颈动脉插管的方式对大鼠的血压进行测量。结果显示,维生素 D 缺乏组大鼠血压为(118.5±3.1)mm Hg,维生素 D 对照组和正

常对照组分别为(113.5±3.7)mm Hg、(114.4±1.6)mm Hg。统计表明,维生素 D 缺乏组动物血压高于维生素 D 对照组($P=0.046$),维生素 D 对照组与正常对照组动物血压差异统计不显著($P=0.55$)。见图 4。

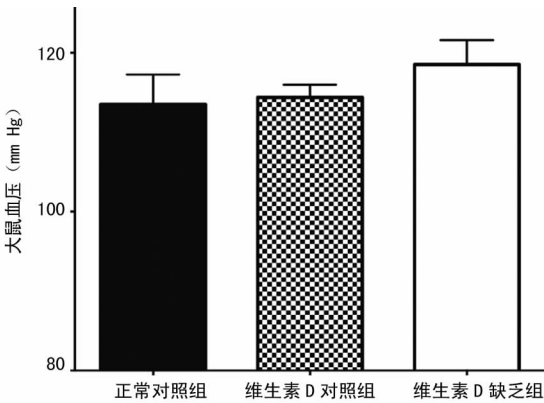


图 4 各组大鼠血压

3 讨 论

3.1 维生素 D 缺乏的原因 人体绝大部分维生素 D 是通过阳光照射自身合成获得,皮肤内的 7-脱氢胆固醇经阳光中的紫外线照射变成维生素 D₃ 前体,然后在体内经过两次羟化作用后发挥生物效应。预防维生素 D 缺乏所需要的日光照剂量难于确定,因为影响日光照的因素很多,如季节、生活方式、空气污染、纬度等,同时皮肤颜色、衣着、防晒剂的使用等都会影响维生素 D 的合成。食物中富含维生素 D 的种类极少,含量也不高,单纯靠食物满足对维生素 D 的需求是不可能的;一项妊娠期间维生素 D 临床研究表明,典型的西方饮食每天提供的维生素 D 不多于 200 IU,不足以满足人体的生理需要。维生素 D 自身合成与饮食摄入不足是造成人体维生素 D 缺乏的主要原因。

3.2 维生素 D 缺乏与血压调节 维生素 D 水平与血压的关联已经有较多的流行病学研究。早期的研究发现^[9],纬度越高的地区,高血压发病率越高;纬度越高,阳光中的紫外线 UV-B 越少,维生素 D 的合成减少。此后,大量临床研究和调查表明,维生素 D 缺乏与高血压发病具有相关性,Martains 等^[10]和 Scragg 等^[11]等分别对美国第 3 次全国健康与营养调查研究的数据分析显示,维生素 D 水平低者患高血压的风险较高,血清维生素 D 水平与血压呈明显的负相关。在一项评价维生素 D 补充对血压影响的随机双盲对照试验中,维生素 D 补充患者的收缩压和舒张压均有显著下降。本研究结果也表明,维生素 D 缺乏会导致血压显著升高。目前,维生素 D 缺乏导致血压升高的机制目前还不明确。Li 等^[12]的研究提示,维生素 D 是肾素-血管紧张素系统的负调控因子。维生素 D 可通过与 VDR 结合形成受体复合物入核,结合于肾素表达基因的上游,从而抑制肾素的表达。维生素 D 缺乏时,对肾素表达的抑制作用减弱,肾素的表达上调,从而增强血管紧张素的活性,一方面促进全身的血管收缩,另一方面通过醛固酮增加血容量,共同导致血压升高。此外,也有研究表明,维生素 D 也可通过作用于甲状旁腺激素系统、胰岛素拮抗、血管收缩、血管发生等机制参与血压的调节。

3.3 本实验动物模型的优点与合理性 此前的研究表明,人和动物体内的维生素 D 主要来自于自身合成和食物摄取。在本研究中,通过改变照明光源,切断动物体内维生素 D 的自身合成途径,同时给予维生素 D 缺乏饮食,经过 6 周的饲养,体内的维生素 D 储存被消耗,体内血浆维生素 D 水平开始下降,

进一步到第 10 周时,动物进入维生素 D 缺乏状态;对动物的生长观察也发现,动物的生长、摄食情况没有显著改变。建模方法较简单,速度较快,指标直观容易检测。有研究表明,维生素 D 对婴幼儿的早期发育存在一定影响,维生素 D 缺乏与婴幼儿的许多骨性和非骨性疾病密切相关。因此,本研究选取成年的大鼠进行维生素 D 缺乏动物模型建立研究,可以更好地研究维生素 D 缺乏对于动物营养代谢、血压调节的影响,有利于阐明维生素 D 缺乏在高血压、心血管疾病等发生过程中的作用和机制。研究建立的维生素 D 缺乏动物模型建立方法相比常正奇等^[13]的研究来说,方法简单易行,建模时间较短,重复性好,成功率高,是研究维生素 D 缺乏与疾病发生的一种相对较好的模型。

本文通过控制维生素 D 来源造成其缺乏,对高血压的深入研究有重要意义。但是,任何一种动物模型都不能完整模拟出所有的人类疾病表现,只能从一个侧面或一个方向对疾病发生进行认识。所以,在实际的研究工作中,要与临床研究相结合,才可能更好地、充分地发挥好动物模型在疾病研究中的作用。

参考文献:

- [1] Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency[J]. N Engl J Med, 2011, 364(3): 248-254.
- [2] Singer T. Nutrition: The vitamin D complex[J]. Nature, 2012, 489(7417): 10-11.
- [3] 黄金,周智广. 维生素 D 与代谢综合征关系的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(23): 3521-3523.
- [4] 吉薇,蒋雄京. 维生素 D 与心血管疾病的研究进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2012, 10(1): 13-16, 58.
- [5] Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, et al. Vitamin d deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes[J]. Ann Nutr

Metab, 2012, 61(4): 337-348.

- [6] Guessous I, Bochud M. Vitamin D and cardiovascular disease: epidemiological aspects[J]. Rev Med Suisse, 2012, 8(360): 2059-2060, 2062-2065.
- [7] Forrest KY, Stuhldreher WL. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults[J]. Nutr Res, 2011, 31(1): 48-54.
- [8] Wat WZ, Leung JY, Tam S, et al. Prevalence and impact of vitamin D insufficiency in southern Chinese adults[J]. Ann Nutr Metab, 2007, 51(1): 59-64.
- [9] Rostand SG. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences[J]. Hypertension, 1997, 30(2 Pt 1): 150-156.
- [10] Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the third national health and nutrition examination survey [J]. Arch Int Med, 2007, 167(11): 1159-1165.
- [11] Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the third national health and nutrition examination survey[J]. Am J Hypertens, 2007, 20(7): 713-719.
- [12] Li YC, Kong J, Wei M, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system[J]. J Clin Invest, 2002, 110(2): 229-238.
- [13] 常正奇,张泽华,罗飞,等. 维生素 D 缺乏动物模型的建立[J]. 重庆医学, 2011, 40(11): 1041-1043.

(收稿日期: 2013-06-01 修回日期: 2013-07-08)

(上接第 3922 页)

- [2] 崔振宇,杨文增,周洪月,等. 超声在经皮肾镜取石术中的价值与操作技巧[J]. 临床泌尿外科杂志, 2012, 27(7): 535-537, 539.
- [3] 肖汝涛. 超声引导在经皮肾镜取石术中的应用价值[J]. 航空航天医学杂志, 2012, 23(4): 441-442.
- [4] 贡雪灏,刘伟宗,李泉水,等. 超声引导下经皮肾镜碎石术治疗复杂性肾结石[J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7(3): 260-263.
- [5] 沙文,潘运高,王静. 标准通道和微通道经皮肾镜取石术对血生化指标的影响[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志: 电子版, 2012, 6(5): 357-361.
- [6] 彭国辉,魏强,曹满超,等. 两步法建立标准通道经皮肾镜取石术治疗上尿路结石: 附 208 例报告[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志: 电子版, 2012, 6(1): 34-37.
- [7] Zhu Z, Xi Q, Wang S, et al. Percutaneous nephrolithotomy for proximal ureteral calculi with severe hydronephrosis: assessment of different lithotriptors[J]. J Endourol, 2010, 24(2): 201-205.
- [8] 龙平华,杨秀江,阮定红,等. B 超引导下猪经皮肾镜通道的建立[J]. 重医医学, 2012, 41(2): 158-159, 162.
- [9] Matlaga BR, Shah OD, Zagoria RJ, et al. Computerized tomography guided access for percutaneous nephrostolithotomy[J]. J Urol, 2003, 170(1): 45-47.

- [10] Gu Z, Qi J, Shen H, et al. Percutaneous nephroscopic with holmium laser and ultrasound lithotripsy for complicated renal calculi[J]. Lasers Med Sci, 2010, 25(4): 577-580.
- [11] Basiri A, Najjaran TV, Mohammadi SM, et al. Spontaneous resolution of severe hemorrhagic intrarenal pseudoaneurysm after percutaneous nephrolithotomy[J]. Urol J, 2010, 7(1): 10-11.
- [12] Rastinehad AR, Andonian S, Smith AD, et al. Management of hemorrhagic complications associated with percutaneous nephrolithotomy [J]. J Endourol, 2009, 23(10): 1763-1767.
- [13] 王声兴,梁培养,许海波,等. 微通道经皮肾镜取石术的出血及其治疗[J]. 海南医学, 2008, 19(1): 44-45.
- [14] 钱冲,黎显瑞,刘成倍. 超选择性肾动脉栓塞对微创经皮肾镜取石术后肾出血的应用价值: 附 14 例报告[J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(5): 465-467.
- [15] Vorrakitpokatorn P, Permtongchuchai K, Raksamani EO, et al. Perioperative complications and risk factors of percutaneous nephrolithotomy [J]. J Med Assoc Thai, 2006, 89(6): 826-833.

(收稿日期: 2013-07-09 修回日期: 2013-08-10)