

· 药物研究 ·

维生素 D₃ 对大鼠血清铁和肝脏铁调素
基因表达的影响

李光飞 徐又佳 丁晓飞 张增利 肖莉

中图分类号: R589.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)07-0620-04

摘要: 目的 探讨维生素 D₃ 对大鼠体内铁代谢的影响。方法 雌性 SD 大鼠 12 只, 随机分成 2 组: 实验组和对照组。实验组给予肌肉注射维生素 D₃ 3×10^5 U/Kg, 每周一次, 持续 4 周; 对照组按相同方法给予肌肉注射生理盐水。用全自动生化分析仪测大鼠血清钙、铁水平, 用一步法逆转录聚合酶链反应方法测定肝脏铁调素(hepcidin)的 mRNA 水平。结果 对照组大鼠血清钙、铁水平分别为 2.48 ± 0.03 mmol/L 和 58.06 ± 4.14 μ mol/L; 实验组大鼠血清钙、铁水平分别为 3.01 ± 0.12 mmol/L 和 51.02 ± 5.31 μ mol/L; 与对照组相比, 实验组大鼠血清钙显著升高 ($P < 0.01$), 血清铁显著降低 ($P < 0.05$), 肝脏铁调素 mRNA 水平无显著变化。结论 维生素 D₃ 可能通过增加肠道对钙的吸收降低了血清铁。

关键词: 维生素 D₃; 铁调素; 铁代谢

Effect of vitamin D₃ on the expression of hepatic hepcidin mRNA and serum iron in rats LI Guangfei, XU Youjia, DING Xiaofei, et al. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China

Corresponding author: XU Youjia, Email: xuyoujia@medmail.com.cn

Abstract: **Objective** To investigate the influence of vitamin D₃ on the iron metabolism in rats in vivo. **Methods** Twelve female SD rats were divided into 2 groups; the experimental group and the control group. The rats in the experimental group were given vitamin D₃ 3×10^5 U/Kg by intramuscular administration once a week for 4 weeks. The rats in the control group were given normal saline by intramuscular administration. Automatic biochemical analyzer was used to measure serum iron and calcium levels. The expression of hepcidin mRNA in the liver were detected with one-step reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The levels of serum calcium and iron were 2.48 ± 0.03 mmol/L and 58.06 ± 4.14 μ mol/L, respectively in rats of control group, and 3.01 ± 0.12 mmol/L and 51.02 ± 5.31 μ mol/L, respectively in rats of experimental group. Serum calcium increased ($P < 0.01$) and serum iron ($P < 0.05$) decreased in rats of experimental group significantly than those in control group. Expression of hepcidin mRNA in the liver did not change significantly. **Conclusion** Vitamin D₃ may decrease serum iron level by increasing intestinal calcium absorption.

Key words: Vitamin D₃; Hepcidin; Iron metabolism

维生素 D 是骨质疏松症防治的基础药物, 其与钙剂联合使用时可以有效促进机体对钙的吸收, 循

证医学认为: 两者联合使用可明显增加骨密度, 减少骨折发生率。

近年来, 机体铁代谢与骨质疏松症的关系也越来越为人们所认识, 临床和实验研究均有报道: 铁过载可能是骨质疏松症的一个危险因素^[14]。铁调素, 肝脏表达的一种小分子抗菌肽, 是铁代谢的负调节因素, 其被用来治疗围绝经期和绝经后妇女骨质疏松症的专利申请已于 2010 年 8 月 12 日在美国公开

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2008165); 教育部博士学科点专项科研基金(20103201110020)

作者单位: 215004 苏州大学附属第二医院 骨科(李光飞、徐又佳); 苏州大学附属第二医院 实验中心(肖莉); 苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院(丁晓飞、张增利)

通讯作者: 徐又佳, Email: xuyoujia@medmail.com.cn

(专利申请公开号:US 2010/0204122 A1)。自此,骨质疏松症的防治很可能即将展开新的序幕。

因此,本实验以大鼠为研究对象,观察维生素 D 对大鼠体内铁代谢的影响,探讨维生素 D 对骨质疏松症的防治作用除了与钙有关,是否还可能与铁代谢有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及设备 维生素 D3 注射液(上海通用药业股份有限公司),焦碳酸乙二酯(DEPC)(美国 Sigma 公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司),AU5400 自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司),一步法 RT-PCR 试剂盒 Access RT-PCR Introductory System A1260(美国 Promega 公司),UV-2000 紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司),Gene Amp PCR System 9700 PCR 仪(美国 ABI 公司),Champ Gel 5000 凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司)。

1.1.2 实验动物及处理 健康成年 SD 雌性大鼠 12 只,购于上海斯莱克实验动物中心,许可证号:SCXK(沪)2007-0005,体重 250~300g。随机分为两组,实验组(S 组)和对照组(C 组),每组 6 只。自由饮食水,标准颗粒饲料,铁笼喂养,自然昼夜光线照明,室内通风良好,相对湿度 40%~70%,室温保持在 18~28℃。S 组给予肌肉注射维生素 D₃ 3 × 10⁵ U/kg,每周一次,C 组在同一时刻肌肉注射等容量生理盐水。4 周后采用 3.6% 水合氯醛腹腔麻醉,心脏取血,用于测定血清铁和钙,然后心脏灌注后取大鼠肝脏,剪成小块,用 PBS 冲掉残留肝脏表面的血液,迅速置于 1.5ml 经 DEPC 处理过的离心管中,冻存于 -80℃ 冰箱中,用于测定肝脏铁调素的 mRNA 水平。

1.2 方法

1.2.1 血清指标测定 血清钙、铁的测定由苏州大学附二院生化实验室完成(奥林巴斯 AU5400 自动生化分析仪)。

1.2.2 一步法 RT-PCR 测定肝脏铁调素的 mRNA 水平

总 RNA 提取:取出冻存于 -80℃ 冰箱中的离心管,向每一离心管中加入 1ml 的 Trizol 试剂,用匀浆器匀浆。室温放置 5min。各加入 0.2ml 的氯仿,振荡混匀后室温放置 15min,以 4℃,12000r/min 离心 15min。取上层水相,加等体积的异丙醇混合,室温放置 10min。于 4℃,12000r/min 离心 10min,弃

上清。沉淀用 75% 乙醇冲洗后,室温晾干,以 50ulDEPC 处理的去离子水溶解,用紫外分光光度计测量 RNA 的浓度。

引物的设计及合成:大鼠铁调素的引物由上海生工生物有限公司合成,上游序列为 5'-ACA GAA GGC AAG ATG GCA CT -3',下游为 5'-GAA GTT GGT GTC TCG CTT CC -3'。同时合成 β-actin 引物,上游序列为 5'-GAG AGG GAA ATC GTG CGT GAC -3',下游为 5'-CAT CTG CTG GAA GGT GGA CA -3'。Hepcidin 扩增产物的大小为 201bp,β-actin 扩增产物的大小为 452bp。

一步法 RT-PCR:在 50ul 的反应体系中加入 1ug 总 RNA,1ul Tfl DNA polymerase,1ul AMV Reverse Transcriptase,2ul 25mM MgSO₄,1ul dNTP Mix,10ul AMV/Tfl 5X Reaction Buffer,上下游引物各 2ul。置 45℃ 加热 45min,94℃ 预变性 2min;94℃ 15s,58℃ 30s,72℃ 30s,进行 35 个循环;72℃ 延伸 7min。

PCR 扩增产物结果分析:取各扩增产物 8ul,经 15g/L 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后,用凝胶成像系统进行检测,并用 LANE-1D Analyzer 软件对各阳性条带进行光量子强度测定。将阳性条带的密度与 β-肌动蛋白条带密度的比值作为 hepcidin mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行数据处理,数据以均数 ± 标准差表示,两组间比较用两样本均数比较 t 检验, P < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血清铁、钙含量

表 1 可见,实验组大鼠血清钙水平显著高于对照组,差异有统计学意义(P < 0.01)。实验组大鼠血清铁水平显著低于对照组,差异有统计学意义(P < 0.05)。

表 1 实验组(S 组)和对照组(C 组)血清钙、铁水平(n = 6)

组别	C 组	S 组
血清钙(mmol/L)	2.48 ± 0.03	3.01 ± 0.12**
血清铁(μmol/L)	58.06 ± 4.14	51.02 ± 5.31*

注: * P < 0.05, ** P < 0.01

2.2 大鼠肝脏 hepcidin mRNA 的表达变化

一步法 RT-PCR 结果显示,肝脏 hepcidin mRNA 的表达水平在实验组和对照组间无显著性差异(P > 0.05)(图 1)。

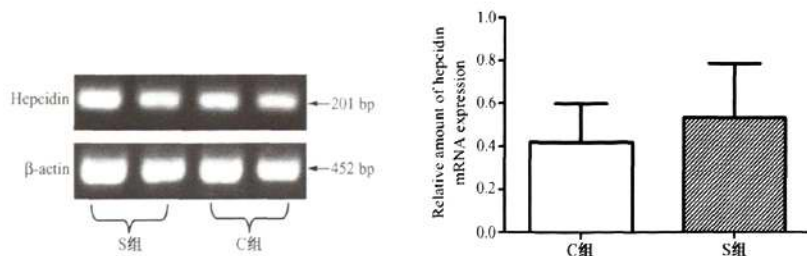


图1 维生素D对大鼠肝脏 hepcidin mRNA 表达的影响。C组和S组 hepcidin mRNA 的相对表达量无显著差异($P=0.424$)。

3 讨论

近年来,铁代谢尤其是机体铁过载与骨质疏松症的关系越来越为人们所认识。2005年, Guggenbuhl等^[1]报道:在38例男性遗传性血色病确诊患者中,骨量减少的患者比例为78.9%,而骨质疏松的比例也达34.2%。2006年,Liu等^[5]去除大鼠卵巢制作骨质疏松模型,然后观察大鼠体内铁的变化,结果显示:去势大鼠体内游离铁的含量较假手术组显著增加;为了进一步证实该骨质疏松模型的形成与铁有关,Liu等^[5]又在大鼠去势后第二天开始给予口服铁螯合剂,九周后观察其对骨质疏松模型形成的影响,结果显示:口服铁螯合剂之后骨矿物质密度依旧比假手术组低,但是与未口服铁螯合剂相比,骨矿物质密度显著增加。2009年,Jian等^[6]研究指出:绝经过渡期女性体内雌二醇水平和铁蛋白水平正好向相反的方向变化,雌激素水平下降而铁蛋白水平升高,于是提出疑问:绝经后女性体内升高的铁是否影响了其健康,如老年女性多发的骨质疏松症是否与绝经后铁升高有关?2010年,Tsay^[2]等在《Blood》杂志报道大鼠腹腔内注射右旋糖酐铁2周后,大鼠部分器官铁含量显著增加,同时发现骨髓结构、骨小梁和皮质骨厚度发生明显改变,骨吸收增加,并且铁过载使大鼠体内活性氧(ROS)增加;给予铁过载大鼠抗氧化剂N-乙酰-L-半胱氨酸处理后,大鼠骨小梁的发育异常得到有效抑制。对于这篇报道,我国徐又佳^[7]在《Blood》E-letter上报告“高龄女性髌部骨折患者存在铁过载”,发表部分临床比较结果予以支持。

综上所述,铁代谢异常与骨质疏松症关系越来越受到研究者关注。那么,传统意义上与骨质疏松密切相关的维生素D是否与铁代谢变化相关?这对了解骨质疏松症干预方法有比较积极的临床意

义。

维生素D及其衍生物具有钙调节激素作用,可以促进小肠上皮细胞对钙的吸收,并可协同PTH、降钙素使旧骨释放磷酸钙,提高血钙、血磷浓度,促进骨钙化和骨细胞功能^[8]。

2001年,北美绝经学会理事会认为,任何一种抗骨质疏松药物应用时,都应同时摄入钙和维生素D作为基础干预。

本实验采用的维生素D3浓度(3×10^5 U/Kg)是大鼠动脉钙化模型中增加血清钙的外源性干预浓度^[9];当本实验中维生素D3干预4周后,实验组大鼠血清钙从 2.48 ± 0.03 mmol/L上升到 3.01 ± 0.12 mmol/L,统计学比较有显著差异($P < 0.01$),这一结果说明维生素D实验浓度促进了肠道对钙的吸收,提示本实验剂量有实验干预效果。与此同时,这一剂量维生素D3干预4周后,血清铁从 58.06 ± 4.14 μ mol/L降低到 51.02 ± 5.31 μ mol/L(比较有统计学意义, $P < 0.05$),这一结果说明:维生素D3既可以提高血清钙离子浓度水平也同时降低了铁离子浓度水平。由于近几年研究认为铁调素可以参与、引起体内血清铁离子浓度变化,故本实验还观察了维生素D3干预后肝脏铁调素mRNA表达,实验结果提示在本实验剂量干预4周后铁调素mRNA表达并无显著性变化($P > 0.05$)。

关于维生素D与铁代谢的文献报道目前较少,Masuhara等^[10]在1963年报道:维生素D可在短时间(< 8 h)内使鸡血清中铁升高。然而,本实验结果发现:给予大鼠肌肉注射维生素D₃4周后血清中铁显著降低,这可能与肠道钙与铁的相互作用有关。Cook等^[11]报道:当钙剂与食物一起服用时,其显著抑制了肠道对铁的吸收;Hallberg等^[12]的实验结果支持这一结论,他们发现:钙不仅可以抑制血红素铁的吸收,也抑制非血红素铁的吸收,尽管两者的吸收

方式存在不同;因此, Hallberg^[12] 研究认为在黏膜细胞到血浆的最后转运过程中, 钙和铁可能使用相同的转运载体, 并且存在相互竞争抑制作用。所以, 维生素 D 在促进肠道对钙的吸收时, 可能由于两者的相互竞争抑制作用, 间接地抑制了肠道对铁的吸收。

【参 考 文 献】

- [1] Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, et al. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int*, 2005, 16(12):1809-1814.
- [2] Tsay J, Yang Z, Ross FP, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood*, 2010, 116(14):2582-2589.
- [3] Weinberg ED. Iron loading: a risk factor for osteoporosis. *Biomaterials*, 2006, 19(6):633-635.
- [4] Weinberg ED. Role of iron in osteoporosis. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2008, 6 Suppl 1:81-85.
- [5] Liu G, Men P, Kenner GH, et al. Age-associated iron accumulation in bone: implications for postmenopausal osteoporosis and a new target for prevention and treatment by chelation. *Biomaterials*, 2006, 19(3):245-251.
- [6] Jian J, Pelle E, Huang X. Iron and menopause: does increased iron affect the health of postmenopausal women? *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(12):2939-2943.
- [7] Youjia Xu, Pierre Sirois, Kai Li. Iron overload plays a unique role in osteoporosis. *Blood (E-letter)* 9 September 2010.
- [8] Nakayama H. Active vitamin D3 therapy for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Calcium*, 2006, 16(7):1201-1207.
- [9] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(2):317-327.
- [10] Masuhara T, Migicovsky BB. Vitamin D and the intestinal absorption of iron and cobalt. *J Nutr*, 1963, 80:332-336.
- [11] Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P. Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(1):106-111.
- [12] Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, et al. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(1):112-119.

(收稿日期: 2010-12-28)

(上接第 626 页)

- [5] 李宁华, 区品中, 杨定焯, 等. 中国部分地区一般人群标准化骨密度正常参考值的研究. *中国华骨科杂志*, 2001; 21(5): 272-274.
- [6] LI N, Ou P, Zhu H. Prevalence rate of osteoporosis in the midaged and elderly in selected parts of China. *China Med*. 2002, 115(5):773-775.
- [7] Cranney A, Jamal SA, Tsang JF. Low bone mineral density and fracture burden in postmenopausal women. *CMAJ*. 2007, 177(6):575-580.
- [8] Finkelstein JS, Brockwell SE, Mehta V, et al. Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93:861-868.
- [9] Riggs BL, Melton LJ, Robb RA, et al. A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *J Bone Miner Res*, 2008, 23:205-214.
- [10] 刘忠厚, 潘子昂, 王石麟. 原发性骨质疏松诊断标准的探讨. *中国骨质疏松诊断标准的探讨*. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3(2):1-15.
- [11] Drage NA, Palmer RM, Blake G, et al. A Comparison of bone mineral density in the spine, hip and jaws of edentulous subjects. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(4):496-500.
- [12] 林俊红, 庞莲平, 刘忠厚, 等. 中国人口状况及原发性骨质疏松诊断标准和发生率. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8(1):1-5.

(收稿日期: 2010-12-23)

(上接第 642 页)

- [19] Altmann P, Barnett ME, Finn WF. Cognitive function in Stage 5 chronic kidney disease patients on hemodialysis: no adverse effects of lanthanum carbonate compared with standard phosphate binder therapy. *Kidney Int*, 2007, 71(3):252-259.
- [20] Block GA, Spiegel DM, Ehrlich J, et al. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int*, 2005, 68(4):1815-1824.
- [21] Duggal A, Hanus M, Zhorov E, et al. Novel dosage forms and regimens for sevelamer-based phosphate binders. *J Ren Nutr*, 2006, 16(3):248-252.
- [22] Jean G, Souberbielle JC, Chazot C. Monthly cholecalciferol administration in haemodialysis patients: a simple and efficient strategy for vitamin D supplementation. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(12):3799-3805.
- [23] Palmer SC, McGregor DO, Macaskill P, et al. Meta-analysis: vitamin D compounds in chronic kidney disease. *Ann Intern Med*, 2007, 147(12):840-853.
- [24] Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, et al. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med*, 2004, 350(15):1516-1525.
- [25] 林岩. 慢性肾功能衰竭继发性甲状旁腺功能亢进的治疗进展. *吉林医学*, 2009, 30(3):269-270.

(收稿日期: 2011-01-17)

维生素D3对大鼠血清铁和肝脏铁调素基因表达的影响

作者: [李光飞](#), [徐又佳](#), [丁晓飞](#), [张增利](#), [肖莉](#)
作者单位: [李光飞, 徐又佳 \(苏州大学附属第二医院骨科 215004\)](#), [丁晓飞, 张增利 \(苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院\)](#), [肖莉 \(苏州大学附属第二医院实验中心\)](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2011, 17 (7)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201107017.aspx