

## 维生素 D 受体 mRNA 及其蛋白在不同体质指数人群皮下和大网膜脂肪组织中的表达差异

徐家蓉, 张力翔, 缪 珩\*

(南京医科大学第二附属医院内分泌科, 江苏 南京 210011)

**[摘要]** 目的:观察正常、超重和肥胖 3 组人群皮下和大网膜脂肪组织中维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)mRNA 及其蛋白表达水平的差异。方法:用半定量 RT-PCR 方法检测 20 例正常组、35 例超重组、27 例肥胖组人群的腹部皮下和大网膜脂肪组织 VDR 基因的 mRNA 表达水平;用 Western blot 方法检测 VDR 的蛋白表达水平。结果:在皮下脂肪组织中,肥胖组 VDR mRNA 和蛋白表达水平明显低于正常组和超重组( $P < 0.05$ );在大网膜脂肪组织中,超重组 VDR mRNA 及其蛋白表达增高( $P < 0.05$ ),肥胖组 VDR mRNA 及其蛋白表达与超重组相比降低( $P < 0.05$ )。结论:肥胖患者脂肪组织中 VDR 表达水平降低,可能是临床上补充维生素 D 干预肥胖达不到预期效果的机制之一。

**[关键词]** 皮下脂肪;大网膜脂肪;维生素 D;维生素 D 受体

**[中图分类号]** R589.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)11-1575-04

## The mRNA and protein expression differences of vitamin D receptor in subcutaneous and omental adipose tissues of people with different BMI

XU Jia-rong, ZHANG Li-xiang, MIAO Heng\*

(Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mRNA and protein expression differences of vitamin D receptor (VDR) in subcutaneous and omental adipose tissue of people with different BMI. **Methods:** Twenty people of normal BMI, 35 people of overweight and 27 people of obesity were selected. The mRNA transcription levels of VDR were assayed by RT-PCR, and the VDR protein expression was measured by Western blot. **Results:** ① In subcutaneous obesity tissue, mRNA transcription and protein expression of VDR was lower in obesity group than in the normal or overweight group ( $P < 0.05$ ); ② In omental adipose tissue, mRNA transcription and protein expression of VDR was highest in overweight group among 3 groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the overweight group, mRNA transcription and protein expression of VDR was lower in obesity group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The VDR expression decreased in the obesity group, which may be one of the mechanisms of the poor clinical outcome of vitamin D intervention therapy.

**[Key words]** subcutaneous fat; omental adipose tissue; vitamin D; vitamin D receptor

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1575-1578]

维生素 D 是一种脂溶性维生素,具有广泛而重要的生理作用,除了调节体内钙磷平衡外,还参与调节如免疫、神经、生殖、内分泌、上皮及毛发生长等系统的功能,现在的观点认为维生素 D 是一种激素而不仅仅是维生素,称之为维生素 D 内分泌系统<sup>[1]</sup>。维生素 D 在体内的活化形式 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 早已被证实可以抑制小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 分化增殖,而且

可以调节众多与脂肪代谢相关的基因比如 CCAAT 增强子结合蛋白 (CCAAT enhancer binding protein, C/EBP) $\alpha$ 、过氧化物酶体增殖物活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) $\gamma$ 、脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)、脂肪细胞特异脂肪酸结合蛋白(adipocyte fatty-acid binding protein, A-FABP/aP2)、固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins, SREBP)-1 和脂肪酸合酶(fatty acid synthetase, FAS)等<sup>[2]</sup>。多项研究结果均证实,肥胖患者血循环中的维生素 D 水平显著低

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金(2010NJMUZ50)

\*通讯作者, E-mail: miaoheng@medmail.com.cn

于非肥胖者<sup>[3-5]</sup>。因此维生素D与肥胖的关系非常密切。维生素D通过与细胞质内维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)结合形成激素-受体复合物,然后与细胞核内的维生素D反应元件结合,激活或抑制含有维生素D反应元件的基因,从而发挥其生物学作用<sup>[6]</sup>。本研究从VDR表达水平的角度出发,观察其在不同体质指数(body mass index, BMI)人群皮下和大网膜脂肪组织中mRNA和蛋白表达的差异。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

随机收集82例在南京医科大学第二附属医院外科接受慢性胆囊炎、胃溃疡、肝血管瘤等择期手术住院患者。根据中国肥胖问题专家组制定的成人标准,将患者分为3组。其中超重组35例, BMI: 24.0~27.9, 男15例, 女20例, 平均年龄(40.4 ± 10.2)岁; 肥胖组27例, BMI ≥ 28, 男10例, 女17例, 平均年龄(40.7 ± 10.2)岁; 正常组20例, BMI: 18.5~23.9, 男8例, 女12例, 平均年龄(37.5 ± 8.7)岁。3组患者间的性别、年龄均无统计学差异。

各组患者均为汉族,手术均排除恶性肿瘤、急性炎症、慢性肝肾功能损害、严重创伤等。近3个月体重无明显变化,4周内均未服用补充维生素D的药物。所有患者均告知研究目的,并签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本留置

手术过程中取约400 mg的腹部皮下脂肪和大网膜脂肪各1块,迅速置于液氮中后转至-80℃冰箱长期保存,用于RNA提取。

#### 1.2.2 脂肪组织总RNA提取

采用TRIzol一步抽提法抽提组织总RNA(日本TaKaRa公司),RNA浓度用比色法测定,RNA完整性用甲醛变性凝胶电泳验证。

#### 1.2.3 RT-PCR

逆转录合成cDNA采用加拿大Fermentas公司试剂盒,根据试剂盒说明书配制反应体系。 $\beta$ -actin和VDR的PCR反应引物由上海捷瑞公司设计合成。 $\beta$ -actin的上游引物:5'-TGCCTGACATTAAG-GAGAA-3',下游引物:5'-AAGGAAGGCTGGAA-GAGT-3',扩增产物为172 bp;VDR的上游引物:5'-ACTCACCTCTGCCTCAAT-3',下游引物:5'-CATTC-CTGCCTTCTCTGTT-3',扩增产物为511 bp。PCR反应采用即用型Taq酶PCR试剂盒(上海捷瑞),根据

试剂盒说明书配制50  $\mu$ l的反应体系,反应条件为95℃预变性1 min;95℃变性30 s、退火30 s( $\beta$ -actin:50℃,VDR:55℃)、72℃延伸30 s,30~34个循环,最后72℃延伸10 min终止。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶光密度扫描仪(上海天能)对PCR产物的电泳条带进行扫描和定量,得出各条带灰度值,并以相应 $\beta$ -actin条带灰度值进行校正。

#### 1.2.4 Western blot检测VDR蛋白表达

取脂肪组织约200 mg,匀浆机匀浆,加细胞裂解液提取全细胞蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。经过上样、电泳、转膜、封闭后分别给予兔抗VDR多克隆抗体(1:1 000)(香港Abcam公司)以及兔抗 $\beta$ -actin多克隆抗体(1:2 000)(武汉博士德公司)4℃孵育过夜,洗膜后给予抗兔的二抗孵育2 h(1:4 000)(上海艾比玛特生物医药有限公司)。经洗涤,ECL发光等处理后,在暗室下显影、定影。对胶片进行扫描,ImageJ软件分析条带,以VDR的灰度值与 $\beta$ -actin的灰度值的比值作为最终数据进行统计分析。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件进行统计分析,正态分布的数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析和LSD检验,方差不齐时采用Dunnett's T3检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 皮下脂肪组织VDR的表达

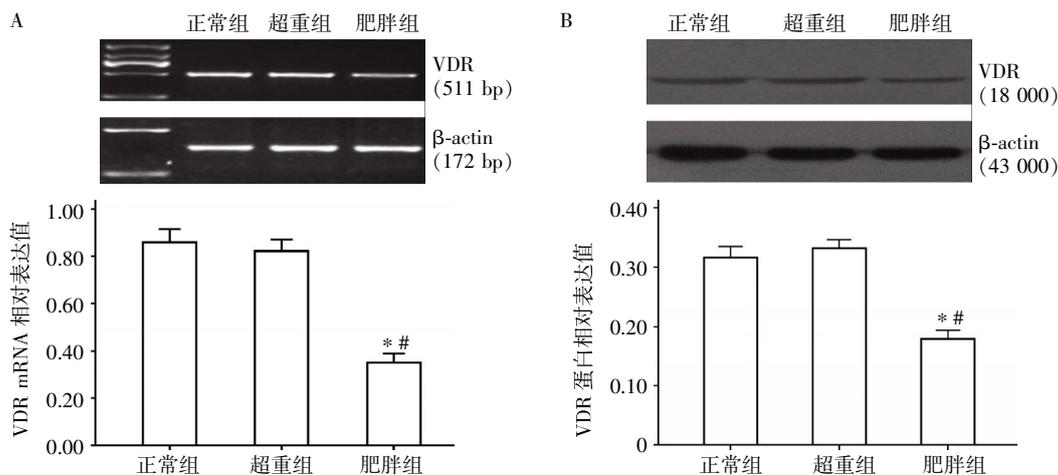
VDR mRNA(图1A)和蛋白表达(图1B)在肥胖组中明显减少( $P < 0.05$ )。

### 2.2 大网膜脂肪组织VDR的表达

VDR mRNA(图2A)和蛋白(图2B)在超重组表达增高,与其余两组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),正常组和肥胖组的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

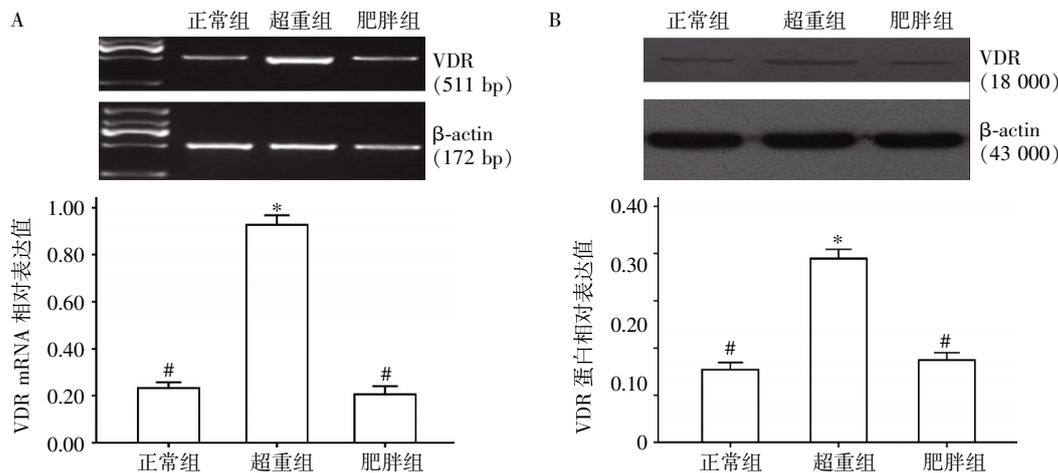
近几年,已有多篇文献报道肥胖患者血液循环中的维生素D水平显著低于非肥胖者<sup>[3-5]</sup>,因此人体内维生素D水平与肥胖密切相关,但到底是维生素D水平降低导致肥胖,还是肥胖导致的体内低维生素D水平,两者的因果关系并无统一论。观点一,维生素D水平低于正常会导致肥胖。维生素D可以抑制小鼠前脂肪细胞3T3-L1的分化和增殖,其机制是抑制脂肪细胞分化过程中关键因子,如C/EBP家族、



A:皮下脂肪组织中 VDR mRNA 表达情况;B:皮下脂肪组织中 VDR 蛋白表达情况。与正常组相比,\* $P < 0.05$ ;与超重组相比,# $P < 0.05$ 。

图 1 皮下脂肪组织中 VDR mRNA 和蛋白的表达情况

Figure 1 The mRNA transcription and protein expression of VDR in subcutaneous adipose tissue



A:大网膜脂肪组织中 VDR mRNA 表达情况;B:大网膜脂肪组织中 VDR 蛋白表达情况。与正常组相比,\* $P < 0.05$ ;与超重组相比,# $P < 0.05$ 。

图 2 大网膜脂肪组织 VDR mRNA 和蛋白的表达情况

Figure 2 The mRNA transcription and protein expression of VDR in omental adipose tissue

PPAR $\gamma$ 、SREBP-1c 等转录因子的表达,进而抑制其下游调节与糖、脂肪代谢密切相关的基因,如 FAS、LPL、aP2、葡萄糖转运蛋白 4、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、瘦素、胰岛素受体等<sup>[1]</sup>,从而减少脂肪细胞数目的增多和体积的增大。另外,有研究结果显示,肥胖者的甲状旁腺激素(parathyroid hormone,PTH)水平升高<sup>[7]</sup>。PTH 通过磷脂酶 C- $\beta$  活性的激活引起脂肪细胞内  $Ca^{2+}$ 水平上升<sup>[8]</sup>,从而导致脂肪合成相关酶的活性增加<sup>[9]</sup>;细胞内  $Ca^{2+}$ 的增加激活了磷酸二酯酶-3B,后者可抑制儿茶酚胺诱导的脂解作用<sup>[9-10]</sup>,导致脂肪分解减少;此外  $Ca^{2+}$ 水平上升也促进活性氧增加,有利于脂肪细胞的分化成熟<sup>[11]</sup>。因此低维生素 D 水平会导致脂肪细胞分化和增殖的活跃,脂解率减低。观点二,肥胖造成体内维生素 D 水平低。理由是肥胖者衣着保守,户外活动少,因此光照相对减

少,导致内源性维生素 D 合成下降。另外,维生素 D 是一种脂溶性维生素,脂肪组织对其有储存作用。肥胖者脂肪组织增多,维生素 D 的分布容积增大,增加的脂肪组织对维生素 D 的储留作用加强,释放到循环中的维生素 D 减少,从而导致维生素 D 的生物利用度降低,维生素 D 水平下降<sup>[12]</sup>。

维生素 D 要发挥其生物活性就需要与 VDR 结合,而且研究发现在前脂肪细胞中过表达 VDR 就可以抑制脂肪细胞的分化<sup>[13]</sup>。本研究发现肥胖患者皮下的 VDR 表达减少,因此不管此时体内维生素 D 是否在正常水平,都将造成维生素 D 在皮下脂肪组织中无法发挥正常的生物学功能,按照观点一的理论,则会导致肥胖患者皮下前脂肪细胞增殖和分化活跃,脂解率降低。而在大网膜脂肪组织中,超重组的 VDR mRNA 和蛋白表达增加,而肥胖组相对正

常组的表达却没有变化,按照观点一可以推测:维生素D在超重组大网膜脂肪组织中发挥高于正常水平的生物学活性,可认为是一种机体反馈调节代偿机制,以此来阻止分化和增殖活跃的前脂肪细胞,而若此种机制失代偿或因VDR表达降低,则导致大网膜脂肪细胞增生分化继续活跃,脂肪细胞数目和体积增大,最终导致肥胖,特别是内脏型肥胖;若用观点二解释,则认为肥胖者因VDR表达减少(具体机制不清),导致其虽然储存了大量的维生素D但是却因受体相对不足而无法发挥足够的生理学作用。

正因为维生素D与肥胖有着如此重要的联系,因此临床上通过应用维生素D来干预肥胖的试验,可结果却不统一。Ortega等<sup>[14]</sup>研究发现,在低热量减肥饮食中,补充维生素D可使女性脂肪重量减少的幅度更大。但是Holecki等<sup>[15]</sup>研究结果显示,在3个月的低热量饮食控制中补充钙和维生素D,肥胖妇女的体重减轻并不明显。Sneve等<sup>[16]</sup>给予肥胖者每周补充20 000 U的维生素D,1年后与服用安慰剂组相比,体重也未明显减轻。因此,结合本研究的结果可以推测,如要使用维生素D干预肥胖达到疗效,不仅需要提高血清维生素D水平,而且还要提高VDR表达水平,这样才能从本质上解决肥胖患者体内维生素D内分泌系统的紊乱。

#### [参考文献]

- [1] Reis AF, Hauache OM, Velho G. Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence [J]. *Diabetes Metab*, 2005, 31(4 Pt 1): 318-325
- [2] Zhuang H, Lin Y, Yang G. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on proliferation and differentiation of porcine preadipocyte *in vitro* [J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 170(2): 114-123
- [3] Hyponen E, Power C. Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British birth cohort: the role of obesity [J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(10): 2244-2246
- [4] McGill AT, Stewart JM, Lithander FE, et al. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity [J]. *Nutr J*, 2008, 7: 4
- [5] Cheng S, Massaro JM, Fox CS, et al. Adiposity, cardio-metabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study [J]. *Diabetes*, 2010, 59(1): 242-248
- [6] Mizwicki MT, Menegaz D, Yaghmaei S, et al. A molecular description of ligand binding to the two overlapping binding pockets of the nuclear vitamin D receptor (VDR): structure-function implications [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(1-2): 98-105
- [7] Hjelmæsaeth J, Hofso D, Aasheim ET, et al. Parathyroid hormone, but not vitamin D, is associated with the metabolic syndrome in morbidly obese women and men: a cross-sectional study [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2009, 8: 7
- [8] McCarty MF, Thomas CA. PTH excess may promote weight gain by impeding catecholamine-induced lipolysis-implications for the impact of calcium, vitamin D, and alcohol on body weight [J]. *Med Hypotheses*, 2003, 61(5-6): 535-542
- [9] Shi H, Norman AW, Okamura WH, et al. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action [J]. *FASEB J*, 2001, 15(14): 2751-2753
- [10] Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, et al. Mechanism of intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) inhibition of lipolysis in human adipocytes [J]. *FASEB J*, 2001, 15(13): 2527-2529
- [11] Sun X, Zemel MB. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte reactive oxygen species production [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2007, 15(8): 1944-1953
- [12] Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(3): 690-693
- [13] Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(5): E916-E924
- [14] Ortega RM, Aparicio A, Rodriguez-Rodriguez E, et al. Preliminary data about the influence of vitamin D status on the loss of body fat in young overweight/obese women following two types of hypocaloric diet [J]. *Br J Nutr*, 2008, 100(2): 269-272
- [15] Holecki M, Zahorska-Markiewicz B, Wiecek A, et al. Influence of calcium and vitamin D supplementation on weight and fat loss in obese women [J]. *Obes Facts*, 2008, 1(5): 274-279
- [16] Sneve M, Figenschau Y, Jorde R. Supplementation with cholecalciferol does not result in weight reduction in overweight and obese subjects [J]. *Eur J Endocrinol*, 2008, 159(6): 675-684

[收稿日期] 2012-07-23