

## 维生素 A 对 SD 大鼠脑组织 MC4R、POMC 基因表达的影响

李 芹<sup>1</sup>, 徐济达<sup>2</sup>, 王 嵘<sup>3</sup>, 敖淑清<sup>4</sup>, 张 娟<sup>4</sup>, 陆晓梅<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京妇幼保健院群体保健科, 江苏 南京 210004; <sup>2</sup>南京医科大学康达学院, <sup>3</sup>基础医学院, <sup>4</sup>公共卫生学院, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨维生素 A 对 SD 大鼠食欲和黑皮素 4 受体(MC4R)、阿片黑素促皮质激素原(POMC)基因表达的影响,初步探讨维生素 A 影响大鼠食欲的机制。方法:将雄性 SD 大鼠随机分为 A 组(维生素 A 缺乏组)和 B 组(对照组)。喂养 74 d,实验的第 75 天 A 组随机取出 16 只,分为 A1 组(维生素 A 缺乏组)和 A2 组(维生素 A 皮下补充组);B 组随机取出 8 只,为 B1 组(对照组)。实验第 79 天,将这 3 组大鼠全部处死,取血和组织进行相关指标测定。A 组剩余的动物按体重随机分为 A3 组(维生素 A 缺乏组)和 A4 组(维生素 A 食物补充组)。B 组剩余的 8 只动物为 B2 组(对照组)。30 d 后将其全部处死,取组织进行相关指标测定。结果:维生素 A 缺乏组进食量显著低于正常对照组,给予缺乏组大鼠维生素 A 皮下和食物补充后,大鼠进食量显著增多。维生素 A 缺乏组 MC4R 和 POMC 的 mRNA 表达升高,补充维生素 A 后大鼠 POMC mRNA 的表达水平明显降低。结论:维生素 A 影响大鼠食欲的可能机制是改变了下丘脑有关控制食欲的基因表达。

**[关键词]** 维生素 A;大鼠;食欲;黑皮素 4 受体;阿片黑素促皮质激素原;基因表达

**[中图分类号]** R591.41

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)10-1342-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20141011

## Effect of vitamin A on appetite and gene expression of MC4R and POMC in rats

Li Qin<sup>1</sup>, Xu Jida<sup>2</sup>, Wang Rong<sup>3</sup>, Ao Shuqing<sup>4</sup>, Zhang Juan<sup>4</sup>, Lu Xiaomei<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Department of Community Health Care, Nanjing Maternal and Child Health Care Hospital of NJMU, Nanjing 210004; <sup>2</sup>Kangda College, <sup>3</sup>School of Basic Medical Sciences, <sup>4</sup>School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of vitamin A on appetite and the gene expression of MC4R, POMC, and to explore the mechanism of vitamin A on rats' appetite. **Methods:** Male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into two groups: group A (the vitamin A deficient group) and group B (the vitamin A normal control group). Seventy-four days later, 16 rats were selected from group A and then divided into two groups: group A1 (the vitamin A deficient group) and group A2 (the vitamin A administration group). Also 8 rats were selected from group B as group B1 (the vitamin A normal control group). At the 79th day, all the rats in the three groups were sacrificed, and some relevant indices were measured. The remaining rats in group A were divided into two groups again: group A3 (the vitamin A deficient group) and group A4 (the vitamin A supplement group). The remaining 8 rats in group B was group B2 (the vitamin A normal control group). All the rats were sacrificed after 30 days. Some relevant indices were also measured. **Results:** In the VAD group, the total food intake was significantly lower than that of the control group. After giving vitamin A supplement, the total food intake obviously increased. The expression of MC4R and POMC in the VAD group was increased, while POMC was decreased obviously after vitamin A supplement. **Conclusion:** Vitamin A affects the expression of related appetite regulator, resulting in the change of food intake.

**[Keywords]** vitamin A; rats; appetite; MC4R; POMC; gene expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10):1342-1345]

维生素 A(vitamin A, VA)是儿童生长发育过程中必不可缺的微量营养素。维生素 A 缺乏是目前世界性三大微量营养素缺乏性疾病之一,在发展中国家孕妇和 5 岁以下儿童尤为严重。目前,因补充维生素的公共卫生政策的推广,全球维生素 A 缺乏症

(vitamin A deficiency, VAD)发生率有所下降,但 VAD 仍是许多发展中国家尤其是低收入国家或地区面临的一个重要公共卫生问题<sup>[1]</sup>。非洲和亚洲(南亚和东南亚)的发展中国家是 VAD 的高发地,儿童和孕妇是 VAD 的高危人群<sup>[2]</sup>。2009 年,联合国粮食

及农业组织报道,全世界大约有十亿人营养缺乏。本课题组先前在对厌食儿童的研究中发现 VAD 与儿童厌食有相关关系<sup>[3]</sup>,本研究通过动物实验,初步探讨 VA 对大鼠食欲的影响及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

维生素 A(Acros Organics 公司,美国)、全反式视黄酸(Sigma 公司,美国)。

#### 1.1.2 实验动物、饲料配方及制作

健康雄性 21~23 d 断乳期 SD 大鼠 48 只[清洁级,动物合格证号:SCXK(沪)2003-0003,上海斯莱克实验动物有限责任公司]。基础饲料配方参照美国营养学会(AIN)-93G 纯化饲料<sup>[4]</sup>要求及文献略加改良(表 1)。其中所含营养素和能量保证大鼠生长发育的基本要求。在此基础上减去维生素 A 含量,配置成维生素 A 缺乏颗粒状饲料。

表 1 基础饲料配方

Table 1 The formulation of the diet

成分	每公斤饲料中含量(g)
玉米淀粉	397.486
干酪素	200.000
糊精	132.000
蔗糖	100.000
纤维素	50.000
菜籽油 <sup>a</sup>	70.000
混合无机盐 <sup>b</sup>	35.000
混合维生素 <sup>c</sup>	10.000
L- 胱氨酸	3.000
酒石酸盐	2.500

a:维生素 A 含量低于可检测水平;b:每千克混合无机盐中各成分:碳酸钙 357.00 g、磷酸钾 196.00 g、氯化钠 74.00 g、硫酸钾 46.60 g、柠檬酸钾 70.78 g、氧化镁 24.00 g、柠檬酸铁 6.06 g、碳酸锌 1.65 g、碳酸锰 0.63 g、碳酸铜 0.30 g、碘酸钾 0.01 g、硒酸钠 0.010 25 g、钼酸铵 0.007 95 g、氧化铬 0.275 g、硼酸 0.081 5 g、氟化钠 0.063 5 g;c:每千克混合维生素中各成分:尼克酸 3.000 g、泛酸钙 1.600 g、维生素 B<sub>6</sub> 0.700 g、维生素 B<sub>1</sub> 0.600 g、核黄素 0.600 g、叶酸 0.200 g、生物素 0.020 g、维生素 B<sub>12</sub> 0.002 5 g、维生素 E 15 g、维生素 D<sub>3</sub> 0.25 g、维生素 K 0.075 g。

制作饲料前将结晶状矿物盐磨成粉状,然后与其他无机盐混匀,确保达到最小颗粒用于配制饲料。配饲料时首先将原料称好,将油、混合维生素、混合矿物质分别用少量淀粉充分混匀,然后将 3 种混合物与小量大宗原料混合,再逐步扩大混合,以达到充分混匀。饲料加工成颗粒状饲料,加工过程中严格控制温度,加工后用辐照灭菌。对加工好的

饲料进行 VA 检测,VA 含量已低于可检测水平,未能检出,近似为零<sup>[5]</sup>。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组

实验动物随机分为两组:A 组(维生素 A 缺乏组,VAD 组)32 只、B 组(正常对照组,Control 组)。两组平均体重分别为:A 组(80.38 ± 4.87)g,B 组(81.69 ± 4.05)g,组间差异无统计学意义。两组大鼠均给予 VA 缺乏饲料(表 1)。A 组大鼠用菜籽油按 1 ml/kg 灌胃,B 组维生素 A 的补充剂量为每天 18 μg/kg 体重,按 1 ml/kg 灌胃。实验第 74 天,A 组动物随机取出 16 只,分为两组:A1 组(VA 缺乏组),8 只,皮下注射菜籽油,剂量为 50 mg/kg;A2 组(VA 皮下补充组),8 只,皮下注射全反式视黄酸(A-TRA),剂量为 50 mg/kg。B 组动物随机取出 8 只,为 B1 组,皮下注射菜籽油,剂量为 50 mg/kg,连续注射 4 d,实验第 79 天,将这 3 组大鼠全部处死,取血和组织行相关指标的测定。A 组剩余的动物按体重随机分为两组:A3 组(VA 继续缺乏组)、A4 组(VA 食物补充组)。B 组剩余的动物作为 B2 组,3 组大鼠均给予 VA 缺乏饲料,A3 组大鼠用菜籽油按 1 ml/kg 灌胃,A4 组和 B2 组大鼠 VA 的补充剂量为 18 μg/(kg·d),按 1 ml/kg 灌胃,每组动物 8 只。30 d 后将其全部处死,取血和组织进行相关指标测定。实验动物分笼饲养,动物房温度控制在 16~25℃,湿度为 55%~65%,所有动物自由进食,饮用自来水。

#### 1.2.2 标本采集

隔日记录给食量和剩余量,每周定时称重 2 次,并观察记录动物活动。分别于实验的第 79 天和第 105 天处死动物(处死前 12 h 空腹),留取脑组织迅速放入液氮后转移至-70℃冰箱保存以备检测 mRNA。

#### 1.2.3 Real-time PCR 法检测基因表达量

按 TRIzol 说明书方法提取下丘脑组织总 RNA,经紫外可见分光光度计测 RNA 浓度后,逆转录成 cDNA,进行 PCR 扩增。PCR 反应以逆转录产物为模板,引物序列见表 2。引物由上海英俊生物技术有限公司合成。以 β-actin 为内对照,通过实时荧光定量 PCR 方法,检测维生素 A 干预前后黑皮素 4 受体(MC4R)、阿片黑素促皮质激素原(POMC)基因表达差异。反应体系:cDNA 1 μl,上游引物 0.2 μl,下游引物 0.2 μl,Evagreen 1 μl,dNTPs 0.6 μl,10 × PCR Buffer 2 μl,MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L)2 μl,Taq DNA Polymerase(5 U/L)0.2 μl,加无菌水至 20 μl。反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,退火温度:

POCM 64°C, MC4R 60°C,  $\beta$ -actin 60°C, 退火 40 s, 72°C 延伸 45 s, 共 45 个循环; 72°C 后延伸 10 min。

表 2  $\beta$ -actin 与 POMC、MC4R 基因引物序列及片段长度  
Table 2 Primer sequence and fragment length of  $\beta$ -actin, POMC and MC4R gene

基因类型	引物序列(5' → 3')	产物大小(bp)
MC4R	F:GGCACTCAGACGGAGGATG	313
	R:CAAATGGATGCGAGCAAGG	
POMC	F:AAGATGCCGAGATTCTGCTACA	128
	R:TTGCTTTCCGTGGTGAGGT	
$\beta$ -actin	F:ATCGTGGGGCGCCCCAGGCAC	543
	R:CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC	

### 1.3 统计学方法

实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表达, 采用 Stata 7.0 统计软件包对数据进行统计分析。两组间比较用 *t* 检验, 3 组间比较用单因素方差分析, 以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 维生素 A 缺乏大鼠的一般体征

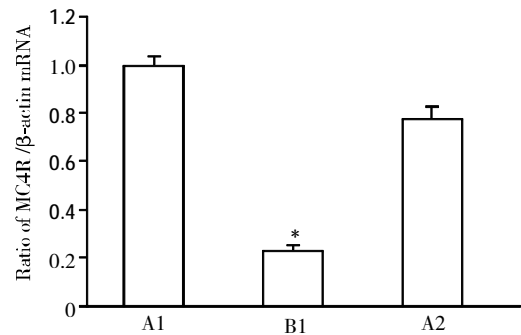
与正常对照组比较, 在实验的第 12 周末, VAD 组大鼠开始出现皮毛粗糙、光泽较差、竖毛、眼睛畏光、有眼分泌物, 但未观察到角膜溃疡、失明等眼部体征。

### 2.2 实验各期各组大鼠进食量情况

VAD 组大鼠自第 4 周起, 进食量显著低于对照组。在 VA 皮下补充实验中(4 d), 第 1 天 3 组大鼠进食量差异无统计学意义, 后 3 d VAD 组(A1 组)大鼠进食量显著低于正常对照组(B1 组)和 VA 皮下补充组(A2 组), A2 组第 2、3 天进食量显著低于正常对照组, 至第 4 天两组大鼠进食量无明显差异。在 VA 食物补充实验全程中, VAD 大鼠(A3 组)的进食量显著低于正常对照组(B2 组)和 VA 食物补充组(A4 组), A4 组的进食量与正常对照组间差异无统计学意义。

### 2.3 实验期间各组大鼠 MC4R mRNA 和 POMC mRNA 表达情况

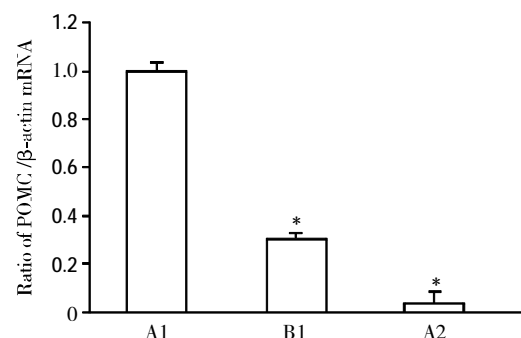
相对实时定量 PCR 结果表明, A1 组的食欲抑制因子(MC4R mRNA 和 POMC mRNA)存在高表达, 分别是正常对照组的 4.35 倍和 3.22 倍; 给予 VA 皮下补充后, A2 组大鼠的 POMC mRNA 表达下降明显(图 1、2); VA 食物补充实验中, A3 组的 MC4R mRNA 存在高表达, 是正常对照组的 4.55 倍(图 3); 给予 VA 食物补充后, A4 组大鼠 POMC mRNA 表达下降明显(图 4)。



与 A1 组比较, \* $P < 0.05$ ,  $n=3$ 。

图 1 皮下补充实验 MC4R mRNA 表达情况

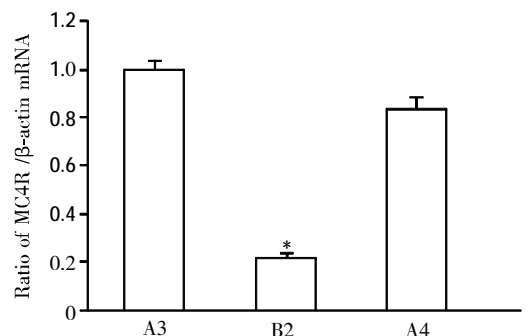
Figure 1 The expression of MC4R mRNA in the vitamin A subcutaneously administration group



与 A1 组比较, \* $P < 0.05$ ,  $n=3$ 。

图 2 皮下补充实验 POMC mRNA 表达情况

Figure 2 The expression of POMC mRNA in the vitamin A subcutaneously administration group



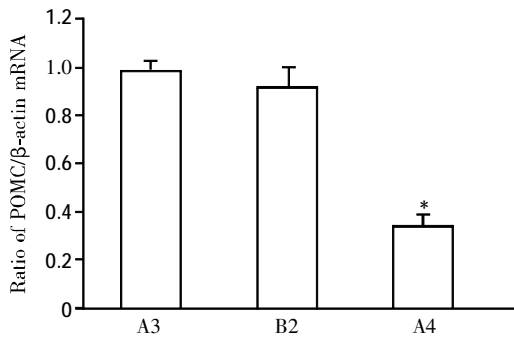
与 A3 组比较, \* $P < 0.05$ ,  $n=3$ 。

图 3 食物补充实验 MC4R mRNA 表达情况

Figure 3 The expression of MC4R mRNA in the chronic vitamin A supplementation group

## 3 讨论

能量摄入(摄食)与消耗的精细平衡是保持正常体重的关键。研究发现, 下丘脑中散在分布着数个调节摄食行为的关键区, 如下丘脑外侧区(LH)、腹内侧核(VMN)、弓状核(ARC)、室旁核(PVN)等, 它们协同合作、相互影响, 形成了一个复杂的“食欲调节网络(ARN)”。下丘脑 ARC 对于整合控制食欲的信号起枢轴作用。ARC 内的两组神经元<sup>[6]</sup>: 一是通过表达



与 A3 组比较, \*P < 0.05, n=3。

图 4 食物补充实验 POMC mRNA 表达情况

Figure 4 The expression of POMC mRNA in the chronic vitamin A supplementation group

POMC 和 CART 抑制摄食, 另一是通过神经肽 Y (NPY)和刺鼠相关蛋白(AgRP)的表达刺激摄食。

目前已克隆了 5 个与人的食欲及体重调节有关的基因,即 OB、LEPR、PC1、POMC 和 MC4R 基因;其中 POMC 和 MC4R 基因是食欲调节网络中的食欲抑制因子。黑皮质素系统包括促肾上腺皮质激素和促黑色素细胞系(MSHs),是 POMC 的裂解产物,通过结合到黑皮质素受体家族发挥作用。POMC 的表达水平反映机体的能量状态,黑皮质素与相应受体结合产生广泛的生物学效应,包括色素沉着、抗炎、卵泡生成、摄食、能量稳态、性行为等<sup>[7]</sup>,该受体即为黑皮质素受体(melanocortin receptor, MCR),已经克隆和鉴定了 5 种黑皮质素受体亚型,分别为 MC1R、MC2R、MC3R、MC4R 和 MC5R。近年来国内外学者的研究表明,MC4R 在控制食欲和体重调节中起关键作用。在脑内,人 MC4R 基因位于染色体 18q22 上,只有 1 个外显子,编码的蛋白质由 332 个氨基酸组成<sup>[8]</sup>。MC4R 属于含 7 个跨膜区的 G 蛋白偶联受体,MC4R 基因在下丘脑的室旁核、下丘脑侧区高度表达,而这两个区域在能量平衡的调节中起重要作用。MC4R 的中枢神经体重调节功能主要为抑制摄食,导致血糖降低、低胰岛素和瘦素水平,从而减少体脂,降低体重<sup>[9-10]</sup>。

本实验发现,VAD 组大鼠脑组织食欲抑制因子 mRNA(MC4R 和 POMC)存在高表达,因此 VAD 组大鼠较对照组食欲显著降低的可能机制是大鼠体内 VA 缺乏导致食欲抑制因子 MC4R mRNA 和 POMC mRNA 的表达升高,从而引起食欲下降。给予 VA 皮下或者食物补充后,大鼠的 POMC mRNA 的表达下降明显,而且 VA 补充实验过程中,缺乏组大

鼠进食量明显下降时,补充组大鼠进食量没有下降,较缺乏组显著升高,且维持和正常对照组基本持平的水平可能与补充组大鼠 POMC mRNA 的表达下降是相关的。而给予 VA 皮下或者食物补充后,补充组大鼠 MC4R mRNA 的表达下降倍数较小,说明 MC4R 可能不是 VA 补充试验中引起大鼠食欲改变的主要调节基因,可能还有其他食欲调节因子的参与。本文只是初步探讨了 VAD 与补充影响食欲的可能机制,其深入的机制仍需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Sherwin JC, Reacher MH, Dean WH, et al. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2012, 106(4): 205-214
- [2] World Health Organization. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005 WHO Global Database on Vitamin A Deficiency[M]. Geneva: World Health Organization, 2009: 55
- [3] 何云飞. 维生素缺乏与儿童厌食行为的相关研究[D]. 南京:南京医科大学, 2006
- [4] Reece PG, Nietsen FH, Fahey GC, et al. IN-93 purified diets for laboratory rodents final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [J]. *J Nutr*, 1993, 123(11): 1939-1951
- [5] 王 嵘, 敖淑清, 徐济达, 等. 单纯性维生素 A 缺乏大鼠模型建立及相关指标观察[J]. *中国学校卫生*, 2008, 29(4): 350-352
- [6] Cone RD, Cowley MA, Butler AA, et al. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001, 25(S5): 63-67
- [7] Emmerson PJ, Fisher MJ, Yan LZ, et al. Melanocortin-4 receptor agonists for the treatment of obesity[J]. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(11): 1121-1130
- [8] Mackenzie RG. Obesity-associated mutation in the human melanocortin-4 receptor gene [J]. *Peptides*, 2006, 27(2): 395-403
- [9] Nargund RP, Strack AM, Fong TM. Melanocortin-4 receptor (MC4R) agonists for the treatment of obesity [J]. *J Med Chem*, 2006, 49(14): 4035-4043
- [10] Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, et al. The MC4 receptor and control of appetite[J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 149(7): 815-827

[收稿日期] 2013-11-14