基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0974-04

孕期边缘性维生素 A 缺乏对新生大鼠 VA 营养及 LRAT 的影响

何 剑,张小娟,刘友学,陈 洁,李廷玉
(重庆医科大学附属儿童医院营养研究中心,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨孕期边缘性维生素 A 缺乏(Marginal vitamin A deficiency,MVAD)对胎鼠维生素 A(Vitamin A,VA)营养及 VA 储存关键酶:卵磷脂视黄醇酰基转移酶(Lecithin retinol acyltransferase,LRAT)的影响。方法:16 只健康成年雌性 Wistar 大鼠(260~300 g)随机分为正常对照(Control)组和 MVAD 组,每组 8 只,成功制备上述模型后,与正常雄性 Wistar 大鼠合笼。收集孕鼠和胎鼠血清、肝脏组织。采用高效液相色谱法测定 VA 含量;分别采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测肝脏 LRAT 在 mRNA 水平和蛋白水平上的变化。结果:MVAD 组孕鼠,胎鼠血清 VA,肝脏 VA 明显低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.001$);同时,相对于 Control 组,MVAD 组 LRAT mRNA 和蛋白水平明显下调($P<0.001$)。结论:孕期 MVAD,胎鼠的血清维生素 A 水平明显下降,不能满足肝脏 VA 储存。血清 VA 水平不能很好地反映机体 VA 营养的真实水平,肝脏 VA 含量更能准确反映机体 VA 含量。LRAT 在维生素 A 储存过程中起着关键作用。

【关键词】维生素 A;肝脏;大鼠;视黄醇;视黄酯;边缘性维生素 A 缺乏;卵磷脂视黄醇酰基转移酶
【中国图书分类法分类号】R723.13;R723.2;R34 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-04

Neonatal vitamin A and LRAT is affected in marginal vitamin A deficiency rats

HE Jian, et al
(*Nutritional Research Center, The Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of neonatal vitamin A and LRAT in marginal vitamin A deficiency (MVAD) rats during pregnancy. *Methods*: Sixteen adult female Wistar rats were randomly separated into control and MVAD groups (eight per group). Serum and livers from mothers and newborns were collected after the establishment of the above two animal models. The vitamin A level was analyzed by HPLC. RT-PCR and Western blot analysis were used to assay the transcriptional level and protein level of LRAT in neonatal liver. *Results*: The plasma and liver vitamin A level from maternal and neonatal was significantly lower in the MVAD compared to the control group ($P<0.001$) Meanwhile, LRAT mRNA and protein level were down-regulated ($P<0.001$). *Conclusion*: In the absence of dietary vitamin A from pregnancy, a normal level of plasma retinol alone was not enough to support body vitamin A storage. We can also conclude from our data that LRAT plays a crucial role in vitamin A storage.

【Key words】Vitamin A; Liver; Rat; Retinol; Retinyl ester; Marginal vitamin A deficiency(MVAD); Lecithin retinol acyltransferase (LRAT)

维生素 A(Vitamin A,VA)是维持机体正常生长发育及生命活动所不可或缺的营养素,体内,VA 以 3 种主要形式存在,视黄醇、视黄酯、视黄酸。体内,VA 主要以视黄醇-视黄醇结合蛋白(Retinol binding protein,RBP)的形式在血液中转运到目的组织器官发挥作用,视黄酸是 VA 发挥生物学效应的活性形式,而视黄酯则是机体 VA 储存的主要形式[1-3]。VA 缺乏可导致暗适应力下降、夜盲症及干眼病。儿童 VAD 会出现生长停滞,发育迟缓。骨骼发育不全,免疫力低下,孕妇 VAD 会造成新生儿体重低于正常水下,甚至是不可逆转的先天畸形,甚至是死胎[4]。大部分的 VA 缺乏是亚临床维生素 A 缺乏,即边缘性维生素 A(Marginal vitamin A deficiency,MVAD)。卵磷脂视黄醇酰基转移酶(Lecithin retinol acyltransferase,LRAT)是 VA 视黄醇形式向视黄酯形式转变的关键酶,LRAT 广泛分布于肝脏,肺,视网膜上皮等组织。LRAT 不仅在 VA 醇形式向酯形式起着作用,同时也在体内 VA 储存起着重要作用,肝脏是机体 VA 储存的主要器官。有报道指出,敲除小鼠的 LRAT 基因,小鼠体内 VA 储存下降明显[5]。为探讨孕期母体 MVAD 对胎儿 VA 营养的影响及机制,在本研究中,我们建立了孕期 MVAD 母鼠模型,观察孕期边缘性 MVAD 对胎鼠 VA 储存关键酶:LRAT 的影响,阐明其对胎鼠 VA 营养

作者简介:何 剑(1983-),男,硕士,
研究方向:儿童保健和儿童营养。
通讯作者:李廷玉,女,教授,E-mail:tyli@vip.sina.com。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30471462)。

及储存可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 MVAD 母鼠模型的建立

1.1.1 动物分组 健康成年雌性 Wistar 大鼠 16 只,体重 260~300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,全部采用不锈钢鼠笼喂养。常规适应性饲养 1 周后,随机分为 2 组,MVAD 组和 control 组。以健康成年雄性 Wistar 大鼠作为交配雄鼠。

1.1.2 动物饲料 配方同常用方法[6],其中 MVAD 组饲料含 VA 400 IU/kg,正常组饲料含 VA 6 500 IU/kg。

1.1.3 实验动物的饲养 雌鼠于合笼前 3 周开始分别饲以正常组饲料和边缘性缺乏组饲料,自由进食进水,自然光照,湿度 55%。室温 20~25℃。观察一般表现。注意是否有 VAD 症状出现,第 3 周末采取尾静脉血,测定血清 VA 含量。判断造模是否成功。将雌雄大鼠按 2:1 于每日 18:00 合笼,第 2 d 清晨进行阴道涂片检查,查到精子者记为妊娠第 0.5 d。2 组继续饲以正常组饲料和边缘性缺乏组饲料。

1.2 实验方法

1.2.1 血清和组织标本的收集 妊娠第 19.5 d 将孕鼠处死,剖腹取出胚胎,准确称量胚胎重量,留取血标本和肝脏标本。肝脏标本迅速置于液氮冷冻后转于 -80℃冰箱保存备用,将血标本静止 2 h 后,以 3 000 r/min 离心 15 min,收集血清,置于 -20℃冰箱保存备用。

1.2.2 血清 VA 含量的测定 吸取 0.2 ml 血清,加入无水乙醇(0.2 ml)、正己烷(1 ml)提取 VA,氮气吹干,流动相溶解后,用 Waters 高效液相色谱仪(746 积分仪、501 泵、440 紫外线检测仪、uBandpakC18 柱)检测 VA 浓度。检测波长 313 nm,流速 1.4 ml/min,保留时间 3.8 min。

1.2.3 肝脏视黄醇和视黄酯含量的测定 准确称取适量组织加入 PBS(1:19),置于匀浆器内充分匀浆。离心吸取上清,加入饱和硫酸铵、无水乙醇、正己烷提取视黄醇,HPLC 测定肝脏组织视黄醇含量;加入 0.025 mol/L KOH 皂化肝脏组织中的视黄酯,加入饱和硫酸铵、无水乙醇、正己烷提取,HPLC 测定[6]。

1.2.4 胎鼠肝脏组织 LRAT mRNA 水平检测

1.2.4.1 RNA 的提取 组织样本从 -80℃冰箱中取出后,取 30~50 mg 组织置于匀浆器内,按 EzgenoTM Total RNA Isolation 说明书加入提取试剂后充分匀浆、离心、洗涤、溶解提取总 RNA。采用分光光度计检测 D_{260}/D_{280} 的比值,当两者比值大于 1.8 时,说明提取的 RNA 较纯,可用于 RT-PCR,置于 -80℃保存备用。

1.2.4.2 逆转录 各样本取 500 ng RNA,各管按 TaKaRa (PrimeScriptTM RT reagent Kit) 说明书加入试剂:5 × PrimeScriptTM Buffer(2 μl),PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I(0.5 μl),Oligo dT Primer (0.5 μl),Random 6 mers (2 μl),RNase Free dH_2O up to 10 μl。于 37℃进行反转录反应 15 min,85℃灭活 5 s。将逆转录所得 cDNA 置于 -20℃冰箱保存备用。

1.2.4.3 PCR 检测引物 LRAT:上游 5-ATGAAGAACCCAATGCTGGAA-3;下游 5-CTAATCCCAAGACAGCCGAAG-3;β-actin:上游 5-CGGAGGGAAAGATT-CCTCTGGC-3;下游 5-AGGGCCGGCACATTGGAAGGTCT-3。LRAT 扩增片段为 610 bp,β-actin 扩增片段为 556 bp。

按下列组分配制 PCR 反应液:TaKaRa Ex Taq(0.25 μl),10xEx Taq Buffer(5 μl),$MgCl_2$(4 μl),dNTP Mixture(4 μl),模板 DNA(2.5 ng),引物 1(1 μl),引物 2(1 μl),RNase Free dH_2O up to 50 μl。混匀后置于 PCR 扩增仪上进行 PCR 扩增反应,反应条件为:94℃预变性 30 s;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,总计 35 个循环,最后 72℃ 7 min。电泳:PCR 产物 10 μl 与 6X Loading Buffer 2 μl 混合上样,1.5%琼脂糖凝胶电泳 70 V 30 min, 紫外凝胶分析系统对凝胶成像分析(Bio-Rad ,美国),用图像分析软件 Quantity One 计算分析条带的强度。

1.2.5 胎鼠肝脏组织 LRAT 蛋白水平检测 取约 300 mg 肝脏组织置匀浆器内,立即加入 250 μl RIPA 裂解液(北京白泰克生物),冰浴充分匀浆 15 min,12 000 × g、4℃离心 5 min 取上清,按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量,将提取液的蛋白浓度调整一致,加入 5 × SDS—PAGE sample loading buffer 100℃煮沸 10 min 变性,分装于 -20℃保存。各取 50 μg 蛋白经 10% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,湿法转膜至 PVDF 膜上。转膜结束后用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。随后分别加入兔抗大鼠 LRAT 单克隆抗体(1:200)和羊抗大鼠 β-actin 单克隆抗体(1:200),4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。然后加入辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG(1:300),摇床孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。将 A 和 B 2 种发光试剂等体积混合,加在 PVDF 膜的正面,将 PVDF 膜放入凝胶扫描系统,进行化学发光分析,用图像分析软件 Quantity One 计算分析条带的强度。

1.3 统计学处理

所有计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 统计软件进行数据分析,t 检验进行组间比较。

2 结 果

2.1 血清 VA 含量

MVAD 组孕鼠血清 VA 含量明显低于正常对照组($P<0.001$),MVAD 组胎鼠血清 VA 含量明显低于正常对照组($P<0.001$),见表1。

2.2 肝脏 VA 含量

MVAD 组孕鼠肝脏视黄醇含量明显低于正常对照组($P<0.001$),MVAD 组胎鼠肝脏视黄醇含量明显低于正常对照组($P<0.001$),见表 2;MVAD 组孕鼠肝脏视黄酯含量明显低于正常对照组($P<0.001$),MVAD 组胎鼠肝脏视黄酯含量明显低于正常对照组($P<0.001$),见表 2、3。

2.3　MVAD 对胎鼠肝脏组织 LRAT mRNA 的影响

在电泳图上 610 bp 和 556 bp 的位置目的条带和内参条带。与正常对照组肝脏 LRAT mRNA 相对表达水平（0.86 ± 0.06）比较，MVAD 组肝脏 LRAT mRNA 的相对表达水（0.44 ± 0.05）明显降低。2 组间 LRAT mRNA 相对表达水平有着明显差别（P<0.001，n=4），见图 1、2。

2.4　MVAD 对胎鼠肝脏组织 LRAT 蛋白表达的影响

在电泳图上 43 kD 和 25 kD 的位置目的蛋白条带和内参条带，与抗体所述一致。与正常对照组肝脏 LRAT 蛋白的相对表达水平（0.87 ± 0.03）比较，MVAD 组肝脏 LRAT 蛋白的相对表达水（0.49 ± 0.05）明显降低。2 组间 LRAT 蛋白相对表达水平有着明显差别（P<0.001，n=4），见图 3、4。

3　讨　论

VA（视黄醇、视黄醛、视黄酯、视黄酸）是对机体起着重要作用的微量营养素，它在胚胎发育，上皮分化，视觉功能方面都起着作用重要[1~3,7]。在正常机体 VA 营养情况下，体内大部分的 VA 是以视黄酯的形式储存在肝脏中，这部分储存的视黄酯可看成是机体 VA 的营养库，这保证了机体在 VA 摄

表 1　各组血清 VA 含量

组别	血清视黄醇（μ mol/L）	
	孕鼠（n=8）	胎鼠（n=24）
对照组	1.59 ± 0.09	1.04 ± 0.06
MVAD 组	1.03 ± 0.09[a]	0.80 ± 0.08[b]

a.P<0.001 与正常对照组孕鼠比较；b. P<0.001 与正常对照组胎鼠比较

表 2　各组肝脏视黄醇含量

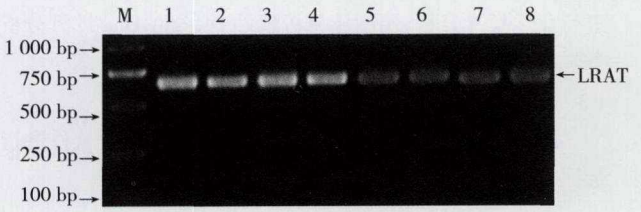
组别	肝脏视黄醇 (nmol/g)	
	孕鼠（n=8）	胎鼠（n=24）
对照组	31.88 ± 7.72	10.0 ± 2.81
MVAD 组	11.84 ± 2.86[a]	5.20 ± 1.33[b]

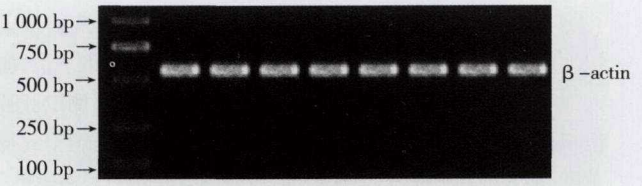
a. P<0.001 与正常对照组孕鼠比较；b. P<0.001 与正常对照组胎鼠比较

表 3　各组肝脏视黄酯含量

组别	肝脏视黄酯 (nmol/g)	
	孕鼠 (n=8)	胎鼠 (n=24)
对照组	830.60 ± 161.70	432.98 ± 96.40
MVAD 组	364.20 ± 86.20[a]	112.00 ± 46.50[b]

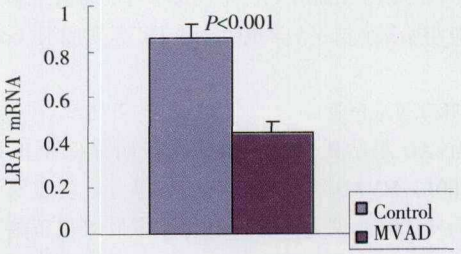
a.P<0.001 与正常对照组孕鼠比较；b.P<0.001 与正常对照组胎鼠比较





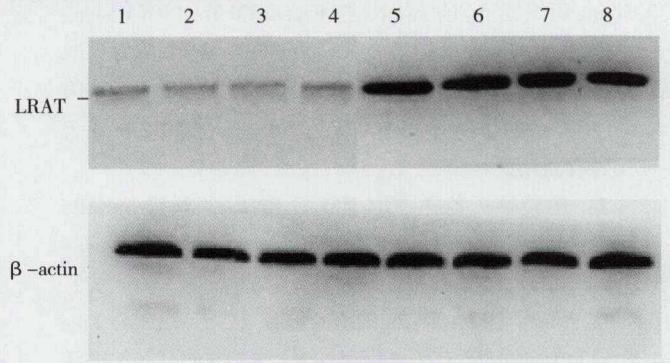
M.标准；1 ~ 4.正常对照组；5 ~ 8.MVAD 组

图 1　各组胎鼠肝脏组织 LRAT mRNA 电泳结果



control：正常对照组；MVAD：边缘性维生素 A 缺乏组 n=4，P<0.001

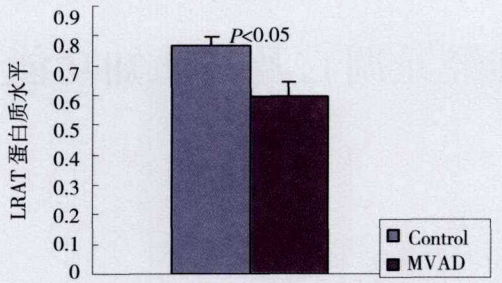
图 2　各组胎鼠肝脏组织 LRAT mRNA



1~4. MVAD 组；5~8. 正常对照组

图 3　各组胎鼠肝脏组织 LRAT 蛋白质表达

Figure 4



control. 正常对照组;MVAD. 边缘性维生素 A 缺乏组,n=4,P<0.001

图 4 各组胎鼠肝脏组织 LRAT 蛋白质水平

入不足的情况下,可动用肝脏储存的 VA 到血液中以转运到组织中发挥生物学效应,保证重要脏器和生命活动 VA 供应。胎儿没有其它的 VA 来源,胚胎发育所需 VA 全部由母体供应。由于在机体 VA 摄入不足的情况下,机体可动用肝脏储存的 VA 到血液中,仅血清 VA 含量不能很好的反映机体的 VA 营养状况。

本研究中,我们建立了孕期 MVAD 母鼠模型,观察胎鼠 VA 营养状况和 VA 储存关键酶 LRAT 的表达变化。资料显示,孕期 MVAD 对胎鼠 VA 营养影响明显,MVAD 组的胎鼠血清 VA 含量较正常组较低,但波动不大(0.80 ± 0.08 μ mol/L vs 1.04 ± 0.06 μ mol/L);MVAD 组胎鼠肝脏视黄酯较正常组下降明显(112.0 ± 46.5 nmol/g vs 432.98 ± 96.4 nmol/g)。我们发现在母体 VA 摄入不足的情况下,母体可释放肝脏储存 VA 到血液中,提高 VA 的胎盘转运率以保证胎儿血清 VA 水平[8]。这部分血清 VA 可保证胎儿重要器官(脑,肺)的 VA 营养,满足重要器官发育所需;但不能保证胎儿 VA 的储存量。这对胎儿娩出后器官的继续发育是不利的,如对肺发育[9]。

为探讨胎儿在 VA 缺乏的情况下,是如何保证血清 VA 水平以满足重要器官发育,我们分析了 VA 储存关键酶 LRAT 的表达变化。结果显示 MVAD 组肝脏 LRAT mRNA 水平和蛋白水平都较正常组明显下降。LRAT 是视黄醇向视黄酯转变的关键酶,LRAT 在机体 VA 储存起着关键作用[5,10,11]。有研究报道:LRAT 基因突变的小鼠肝脏 VA 含量明显减低[12],敲除 LRAT 基因的小鼠更容易发生 VA 缺乏[13],Lorraine J 等研究发现小鼠通过提高 LRAT 的表达,可将机体更多的视黄醇转化为视黄酯,于肝脏及其它组织储存[14,15]。本实验研究发现 MVAD 组通过降低 LRAT 的表达,保证了血清 VA 在较小范围波动,但同时不能保证机体 VA 的储存。

综上所述,孕期 MVAD 对胎儿 VA 营养影响很大,在 VA 摄入不足的情况下,仅正常的血清 VA 水平不能满足机体VA 储存。血清 VA 水平不能很好地反映机体真实的维生素 A 营养状况和需求,肝脏 VA 含量更能反映机体真实的 VA 水平。LRAT 在维持机体 VA 水平的稳定和机体 VA 储存方面起着重要调节作用。

参 考 文 献

[1] Chambon P. The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses[J]. Semin Cell Biol, 1994, 5(2): 115-125.

[2] Clagett-Dame M, DeLuca H F. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development[J]. Annu Rev Nut, 2002, 22(1): 347-381.

[3] Cvekl A.Retinoic acid signaling in mammalian eye development[J]. Experimental Eye Rresearch, 2009, 89(3):280-291.

[4] Black R E, Allen L H, Bhutta Z A. Maternal and child undernutrition study group. Maternal and child undernutrition : global and regional exposures and health consequences[J]. Lancet, 2008, 371(9608):243-260.

[5] A Catharine R. Lung retinyl ester is low in young adult rats fed a vitamiA deficient diet after weaning, despite neonatal vitamin A supplementation and maintenance of normal plasma retinol[J]. Nutr, 2007, 137(10):2213-2218.

[6] 陈丽娜,李廷玉,瞿 平,等.维生素 A 缺乏对初生大鼠脑发育的影响[J].营养学报,2002,24(4):363-367.

[7] Maureen A K, Alexandra E F, Joseph L N. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues[J]. Anal Biochem, 2008, 378(1): 71-79.

[8] Zhang X, Chen K, Li T Y, et al. Perinatal vitamin A status in relation to neurodevelopmental outcome at two years of age[J]. Int J Vitam Nutr Res, 2009, 79(4):238-249.

[9] Hua W. Marginal vitamin A deficiency affects lung maturation in rats from prenatal to adult stage[J]. Nutr Sci Vitaminol, 2009, 55(3):208-214.

[10] Liu L M, Tang X H, Gudas L J. Homeostasis of retinol in lecithin retinol acyltransferase gene knockout mice fed a high retinol diet[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(12): 2316-2324.

[11] Guo X, Knudsen B S, Peehl D M, et al. Retinol metabolism and lecithin:retinol acyltransferase levels are reduced in cultured human prostate cancer cells and tissue specimens[J].Cancer Res, 2002, 62(6): 1654-1661.

[12] Simmons1 D P, Peach M L, Friedman1 J R, et al. Evidence that sequence homologous region in LRAT like proteins possesses anti-proliferative activity and DNA binding properties: translational implications and mechanism of action[J]. Carcinogenesis vol, 2006, 27(4):693-707.

[13] Ruiz A, Ghyselinck N B. Somatic ablation of the lrat gene in the mouse retinal pigment epithelium drastically reduces its retinoid storage[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48:5377-5387.

[14] Liu L, Gudas L J. Disruption of the lecithin:retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency[J]. J Biol Chem, 2005, 280(48):40226-40234.

[15] Kim Y K, Wassef L, Hamberger L, et al. Retinyl ester formation by lecithin:Retinol acyltransferase is a key regulator of retinoid homeostasis in mouse embryogenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(9): 5611-5621.

(责任编辑:张学颖)