

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.08.1023

维生素 D 对老龄大鼠超负荷诱导的骨骼肌肥大及维生素 D 受体表达的影响

安合定^{1△}, 张海燕^{2△}, 李玉祥¹, 田向阳¹, 史仍飞^{1*}

1. 上海体育学院运动科学学院, 上海 200438

2. 第二军医大学长海医院预防保健科, 上海 200433

[摘要] **目的** 采用腓肠肌远端腱切术方案建立老龄大鼠骨骼肌肥大模型, 探讨维生素 D 补充对老龄大鼠骨骼肌肥大的影响及可能机制。 **方法** 雄性大鼠(24个月龄)20只, 手术切断左后肢单侧腓肠肌远端肌腱造成超负荷骨骼肌肥大模型(Overload, Ovld侧), 另一侧行假手术(Sham侧)。造模完成后将大鼠随机分为对照组和维生素 D 组, 维生素 D 组每天灌胃 1 000 IU/kg 的维生素 D, 对照组灌胃等量大豆油(溶剂), 干预 1 周后处死。无菌条件下取腹主动脉血待检; 取左、右后肢跖肌称量, 并液氮速冻, 置低温冰箱保存待测。采用 ELISA 法检测血清 25(OH)D 含量和骨骼肌中维生素 D 受体(VDR)的含量; 采用蛋白质印迹法检测 mTOR、rpS6 蛋白及其磷酸化水平的表达。 **结果** 在实验期间, 2 组大鼠摄食量和体质量差异无统计学意义。2 组大鼠 Ovld 侧跖肌质量均较 Sham 侧增加($P < 0.05$), 且维生素 D Ovld 侧跖肌的质量高于对照组($P < 0.05$), 而 2 组 Sham 侧跖肌质量差异无统计学意义。ELISA 结果显示, 补充维生素 D 提高了大鼠血清 25(OH)D 水平(与对照组比较 $P < 0.05$), 促进了 Ovld 侧肌组织 VDR 的表达(与 Sham 侧比较, $P < 0.05$), 而对照组 Ovld 侧肌组织 VDR 的表达与 Sham 侧比较差异无统计学意义。蛋白质印迹结果显示, 2 组 Ovld 侧肌组织中 p-mTOR/mTOR、p-rpS6/rpS6 比值均比 Sham 侧增加, 但仅在维生素 D 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。 **结论** 腓肠肌远端腱切术能够有效促进老龄大鼠骨骼肌肥大, 而维生素 D 补充能进一步促进骨骼肌肥大, 其机制可能与维生素 D 促进老龄大鼠骨骼肌中 VDR 的表达和蛋白质合成相关信号蛋白 mTOR、rpS6 的表达有关。

[关键词] 维生素 D; 骨骼肌肥大; 维生素 D 受体; 衰老

[中图分类号] R 685.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)08-1023-05

Effect of vitamin D on overload-induced hypertrophy of skeletal muscle and expression of vitamin D receptor in aged rats

AN He-ding^{1△}, ZHANG Hai-yan^{2△}, LI Yu-xiang¹, TIAN Xiang-yang¹, SHI Reng-fei^{1*}

1. School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China

2. Department of Prevention and Health Care, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish an overload-induced hypertrophy model in aged rats by severing the distal tendon of gastrocnemius muscle, and to investigate the effect of vitamin D on overload-induced hypertrophy and the related mechanism. **Methods** A total of 20 male rats (24 months old) underwent tenotomy of the achilles tendon of the gastrocnemius muscle in the left hind limb; and a control sham operation was performed on the right hind limb. The rats were randomly divided into control group and experimental group. Experimental group received 1 000 IU/kg of vitamin D by intragastric administration, and the control group was given soybean oil. The animals were sacrificed one week later, the blood samples were collected, and the left, right hind musculus plantaris tissues were weighed and kept in liquid nitrogen. ELISA assay was used to examine serum 25(OH)D level and vitamin D receptor (VDR) in the skeletal muscle. Western blotting analysis was used to examine mTOR, rpS6 protein and their phosphorylation. **Results** The food intake and body mass were not significantly different between the two

[收稿日期] 2015-09-04 **[接受日期]** 2016-04-23

[基金项目] 上海市教育委员会科研创新项目(13YZ100), 上海市人类运动能力开发与保障重点实验室项目(11DZ2261100)。Supported by Innovation Project of Shanghai Municipal Education Commission (13YZ100) and Project of Shanghai Key Laboratory for Development and Security of Human Movement Ability (11DZ2261100)。

[作者简介] 安合定, 硕士生。E-mail: 1873460193@qq.com; 张海燕, 硕士, 主治医师。E-mail: zhanghaiyan9316@163.com

△共同第一作者 (Co-first authors)。

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-51252347, E-mail: rfshi@sus.edu.cn

groups. Compared with the control side, vitamin D supplement significantly increased the muscle mass of the overload side in both groups ($P < 0.05$); and the mass of the overload side in the vitamin D supplement group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), while the masses were not significantly different for the sham sides in the two groups. The results of ELISA assay showed that vitamin D supplement significantly increased serum 25(OH)D levels in rats compared with the control group ($P < 0.05$), and significantly promoted the expression of VDR in the overload side compared with the Sham side ($P < 0.05$), while there was no significant difference between the two sides in the control group. Western blotting analysis showed that p-rpS6/rpS6 and p-mTOR/mTOR ratios in the overload sides were higher than those in the Sham sides, but significant difference was only found for the vitamin D supplement group ($P < 0.05$). **Conclusion** Tenotomy of the achilles tendon of the gastrocnemius muscle can effectively promote the skeletal muscle hypertrophy in aging rats, and vitamin D supplement can further enhance overload-induced skeletal muscle hypertrophy, which might be related to VDR expression in skeletal muscle and protein synthesis protein mTOR and rpS6.

[Key words] vitamin D; skeletal muscle hypertrophy; vitamin D receptors; aging

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(8): 1023-1027]

维生素 D 的主要功能是维持钙磷的平衡,调节骨代谢和促进多种组织细胞的生长、分化。但近期研究发现维生素 D 除了参与骨钙的代谢之外,还参与骨骼肌代谢,与骨骼肌衰减症(骨骼肌萎缩)有关^[1-2],如 González-Reimers 等^[2]研究发现,维生素 D 水平与肌肉萎缩具有一定的相关性,血浆维生素 D 越低,肌肉萎缩的程度越明显。维生素 D 水平在衰老过程中趋于下降^[3],近年来 Gilsanz 等^[4]运用计算机断层扫描技术发现,维生素 D 严重缺乏的女性萎缩的肌纤维之间产生的空隙会由脂肪、糖原颗粒渗透进去,并发生肌纤维变性;而 Moreira-Pfrimer 等^[5]研究发现,补充维生素 D 有助于提高肌肉力量和平衡性,并有助于降低老年人跌倒的风险,提示维生素 D 有助于改善肌肉功能。在骨骼肌中有维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)表达^[6-7],而维生素 D 以其活化形式 1,25-(OH)₂-D₃ 结合 VDR 发挥作用,经由基因机制和非基因机制调节维生素 D 靶基因转录水平和蛋白质合成^[8],调节肌细胞的增殖与分化^[9]。上述研究结果表明高维生素 D 水平对骨骼肌质量有着利好的调节作用,但在老年个体水平上关于维生素 D 对骨骼肌组织作用机制的研究还很少。

Bischoff-Ferrari 等^[10]研究表明在衰老的骨骼肌细胞内 VDR 表达较低,即肌肉萎缩与 VDR 的低表达有关。抗阻运动可以改善骨骼肌质量,但在老年个体身上这种抗阻运动改善骨骼肌质量的机制是否也受维生素 D 水平的调节尚不清楚。Blough 等^[11]研究表明超负荷手术可以引起骨骼肌肥大,这与抗阻运动引起骨骼肌肥大的原理与效果相同。鉴于采用抗阻力量方案难以控制,故本研究采用手术

代偿性肥大模型代替抗阻力量肥大方案,探讨抗阻训练结合维生素 D 补充对大鼠骨骼肌生长及 VDR 表达的影响,为改善老年骨骼肌质量提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂和仪器 成年雄性(2个月龄)SD 大鼠 20 只,清洁级,购于第二军医大学实验动物中心[动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0003],自然饲养至 24 个月龄用于实验。维生素 D 购于索莱宝公司(货号 V8070-1),血浆维生素 D 检测试剂盒购自 Elabscience 公司(货号 E-EL-0015c),骨骼肌 VDR ELISA 试剂盒购于 Usen Life Science 公司(货号 L130411445)。检测仪器为美国 BIOTEK 酶标仪。肌蛋白提取、BCA 蛋白定量及蛋白质印迹检测等试剂盒与抗体均购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 动物模型及干预方案 大鼠饲养环境保持在(22±2)℃,相对湿度 40%~60%,光照时间为 12 h/d,自由进食饮水,标准啮齿类动物饲料喂养。大鼠适应性饲养 1 周后,称重并麻醉(吸入 2%~3%异氟醚),手术切断大鼠单侧腓肠肌远端肌腱造成超负荷骨骼肌肥大模型(Overload, Ovld 侧),另一侧行假手术(Sham 侧)。手术后将 20 只大鼠随机均分为 2 组:对照组和维生素 D 组。维生素 D 补充采用灌胃方式,1 000 IU/kg,每天 1 次,对照组大鼠灌胃补充等量的大豆油(溶剂)。共干预 1 周。

1.3 取材及处理 维生素 D 干预 1 周后称量,采用 3.6%水合氯醛腹腔麻醉大鼠,腹主动脉取血。无菌条件下取左右侧跖肌(快肌)和比目鱼肌(慢肌),用 4℃预冷的生理盐水清洗,滤纸吸干肌组织表面的水分并称量,液氮速冻后转至-80℃保存待测。

1.4 ELISA 检测大鼠血清 25(OH)D 浓度 大鼠血液样品采集后 30 min 内 $1\ 000\times g$ 离心 15 min, 取上清。在 ELISA 酶标板各孔中加入标准品或样品各 $50\ \mu\text{L}$, 稍后立即在各孔中加入 $50\ \mu\text{L}$ 生物素化抗体工作液, 37°C 孵育 45 min; 孵育后洗涤液洗 3 次, 加入 $100\ \mu\text{L}$ 酶结合物工作液, 37°C 孵育 30 min; 孵育后再洗涤液洗 5 次, 加入 $90\ \mu\text{L}$ 底物溶液, 37°C 孵育 15 min 左右; 然后加入 $50\ \mu\text{L}$ 终止液, 立即在 450 nm 波长处测定光密度(D)值, 计算 25(OH)D 浓度。

1.5 ELISA 检测大鼠肌组织 VDR 含量 取适量肌组织块, 用预冷 PBS($0.01\ \text{mol/L}$, pH 7.0~7.2) 清洗后称量备用。先将称量后的组织剪碎置于玻璃匀浆器中, 冰上匀浆, 而后 $1\ 500\times g$ 离心 5 min 取上清。在 ELISA 酶标板各孔中加入标准品或样品各 $100\ \mu\text{L}$, 酶标板加上覆膜后 37°C 孵育 2 h, 弃去液体甩干并洗涤。每孔加 A 工作液 $100\ \mu\text{L}$ 加覆膜 37°C 孵育 1 h。弃去孔内液体, 每孔 $350\ \mu\text{L}$ 洗涤液浸泡 2 min 后弃去。每孔加 B 工作液 $100\ \mu\text{L}$, 加覆膜 37°C 孵育 30 min。弃液 $350\ \mu\text{L}$ 洗板液浸泡 2 min, 重复洗板 5 次。每孔加底物溶液 $90\ \mu\text{L}$, 加覆膜 37°C 避光显色 20 min。每孔加终止液 $50\ \mu\text{L}$ 终止反应。用酶标仪在 450 nm 波长下测量各孔 D 值, 计算 VDR 含量。

1.6 蛋白质印迹法检测大鼠肌组织中 p-rpS6 和 p-mTOR 表达 取约 100 mg 肌组织, 置于试管中, 加入 1 mL 组织裂解液, 每 1 mL 裂解液含磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和 PMSF 各 $5\ \mu\text{L}$ 。剪碎肌组织, 4°C 静置 30 min 后, 用玻璃研磨器将肌组织充分匀浆, 然后移至 1.5 mL 离心管中, 4°C 以 $12\ 000\times g$ 离心 10 min。取上清, 采用 BCA 法测定肌组织总蛋白含量。取已定量的蛋白, 按 1:4 的体积比加入 $5\times$ protein loading buffer, 沸水煮 10 min, 待用。采用 Bio-Rad Precast Gel 进行电泳, 上样量为 $15\ \mu\text{L}$, 电压调至 130 V, 时间约 1~2 h。以 100 V 电压转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。加入用 1% BSA 稀释的 rpS6 (1:1 000)、p-rpS6 (1:1 000)、mTOR (1:1 000)、p-mTOR (1:1 000) 抗体, 摇床 4°C 孵育过夜; 加入辣根过氧化物酶标记的驴抗兔 IgG (1:7 500), 孵育 1 h。化学发光, 显影、定影, 扫描图像, 用 Image J 分析软件读取图片目的条带光密度值。

1.7 统计学处理 数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理。实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 组内 Sham 侧与 Ovld 侧之间的比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 补充维生素 D 提高老龄大鼠血清维生素 D 含量 ELISA 结果显示, 补充维生素 D 可提高大鼠血清 25(OH)D 水平[维生素 D 组 (589.86 ± 97.64) ng/L, 对照组 (345.35 ± 86.34) ng/L, $P<0.05$]。

2.2 补充维生素 D 促进大鼠超负荷诱导的骨骼肌肥大 两组大鼠在实验期摄食量和体重质量差异均无统计学意义。由图 1 可见, 两组大鼠 Ovld 侧跖肌质量较 Sham 侧跖肌均增加 ($P<0.05$), 其中对照组增加了 18.4%, 维生素 D 组增加了 23.7%。与对照组比较, 维生素 D 组 Ovld 侧跖肌质量增加了 29.2% ($P<0.05$), 但两组 Sham 侧肌肉质量差异无统计学意义。

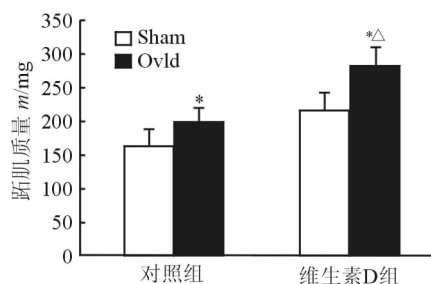


图1 两组大鼠跖肌质量测定结果

Ovld: 超负荷骨骼肌肥大模型; Sham: 假手术。* $P<0.05$ 与同一组内 Sham 侧比较; $\Delta P<0.05$ 与对照组 Ovld 侧比较。 $n=10$, $\bar{x}\pm s$

2.3 补充维生素 D 和超负荷刺激可使骨骼肌组织 VDR 表达增强 由图 2 可见, 维生素 D 组 Ovld 侧肌组织中 VDR 含量高于 Sham 侧 ($P<0.05$), 而对照组 Ovld 侧和 Sham 侧肌组织中的 VDR 含量差异无统计学意义。说明补充维生素 D 提高了 Ovld 侧肌组织中 VDR 的表达。

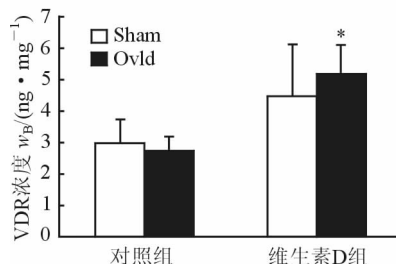


图2 两组大鼠骨骼肌组织中 VDR 含量检测结果

VDR: 维生素 D 受体; Ovld: 超负荷骨骼肌肥大模型; Sham: 假手术。* $P<0.05$ 与同一组内 Sham 侧比较。 $n=10$, $\bar{x}\pm s$

2.4 补充维生素 D 增强 rpS6 和 mTOR 信号蛋白的表达 由图 3 可见, Ovld 模型促进了 p-rpS6/rpS6 比值和 p-mTOR/mTOR 比值的增加, 但仅在维生素 D 组与 Sham 侧比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

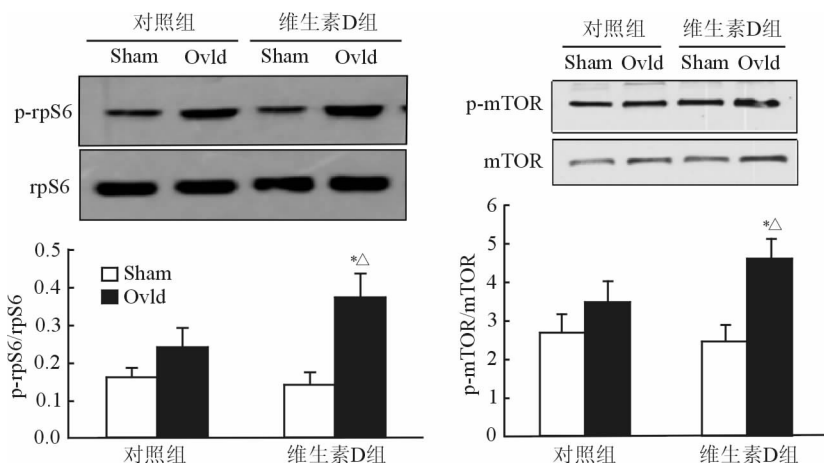


图3 两组大鼠骨骼肌组织 rpS6 和 mTOR 信号蛋白的表达

Ovld: 超负荷骨骼肌肥大模型; Sham: 假手术。* $P < 0.05$ 与同一组内 Sham 侧比较; $\triangle P < 0.05$ 与对照组 Ovld 侧比较。 $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究结果显示补充维生素 D 可提高大鼠血清维生素 D 水平,这与以往的研究结果^[12-13]一致。超负荷诱导(Ovld)能够促使骨骼肌肥大在本实验中再次被验证,而且维生素 D 组与对照组 Ovld 侧跖肌相比肥大程度更明显,这证明维生素 D 具有增强骨骼肌肥大效果的作用;但两组大鼠 Sham 侧跖肌质量差异无统计学意义,其可能原因是老年大鼠蛋白质负平衡作用影响了维生素 D 的促进效果,也可能是维生素 D 干预时间短导致效果不明显。进一步研究发现维生素 D 组 VDR 水平高于对照组,而且 Ovld 侧又高于 Sham 侧,说明维生素 D 补充可提高个体肌组织中 VDR 水平,而且 Ovld 促进了 VDR 表达。提示维生素 D 和超负荷诱导在骨骼肌肥大过程中有可能相互促进。近年研究中发现,VDR 可与 caveolin-1 关联介导维生素 D 激活 MAPKs 进而促进蛋白质合成^[7],这一机制被推测与细胞膜钙离子相关受体蛋白的合成有关,因此维生素 D 的水平或者 VDR 的水平决定着相关细胞代谢通路的完整。

骨骼肌的质量受肌肉蛋白质平衡调节的控制,当蛋白质合成大于分解时骨骼肌就会肥大,反之就会发生肌肉萎缩。在本次研究中发现,各组大鼠在实验期摄食量和体质量差异均无统计学意义,但 Ovld 侧肢体骨骼肌肥大程度差异却有统计学意义。也许对于老年大鼠而言发生肌肉萎缩并不是蛋白质营养缺乏,而是某些受体数量减少或敏感性降低,抑制了蛋白质合成的相关信号通路。本研究结果显

示,手术肥大模型可促进 p-mTOR/mTOR、p-rpS6/rpS6 比值的增加,但仅在维生素 D 补充组差异有统计学意义。这说明手术模拟的超负荷模型激活了细胞 mTOR 通路,使蛋白质合成增加,而且维生素 D 能进一步激活相关信号蛋白,其可能机制是维生素 D 在 VDR 激活的情况下与之结合形成复合物,启动了蛋白质合成相关的 mTOR 通路,进一步促进了蛋白质的表达。但是还有一点我们应当看到,在 Sham 侧虽然维生素 D 补充同样提高了 VDR 水平,但蛋白质合成相关信号蛋白活化并不明显,而且骨骼肌肥大程度也不显著。这提示我们维生素 D 对骨骼肌肥大是有积极效应的,但却不能直接单独促进骨骼肌肥大,或者效果不显著。

本研究探索性地揭示了维生素 D 在骨骼肌肥大过程中所起到的作用,但实验设计还存在一定的不完善之处,如在大鼠干预前后可对生长因子进行检测,这样更能说明蛋白质平衡的状态;还可对基因转录水平进行检测,进一步确定维生素 D 在蛋白质合成中的作用。此外,我们没有做更详细的维生素 D 浓度梯度的探究,我们的预实验只分了补充 800 IU 和 1 000 IU 两个梯度,而且在 800 IU 剂量下各组间差异无统计学意义,因此后续研究中只采用了 1 000 IU 的剂量;虽然日本有研究表明,老年女性每天补充 1 000 IU 维生素 D 可显著提高女性的 II 型肌纤维(快肌纤维)的质量^[14],但仍应继续探究更有效的维生素 D 干预范围。尽管本次研究尚有如此多需要改进的方面,但实验研究所取得的结果在一定程度上证明维生素 D 在骨骼肌肥大过程中具有

促进作用, 其机制可能与维生素 D 激活 VDR 和 mTOR 信号蛋白、促进骨骼肌肥大有关。这提示高维生素 D 水平有利于老年个体骨骼肌健康, 同时适当的抗阻运动对保持骨骼肌质量是有益的。

[参考文献]

- [1] BUITRAGO C G, ARANGO N S, BOLAND R L. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -dependent modulation of Akt in proliferating and differentiating C2C12 skeletal muscle cells[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113: 1170-1181.
- [2] GONZÁLEZ-REIMERS E, DURÁN-CASTELLÓN M C, LÓPEZ-LIROLA A, SANTOLARIA-FERNÁNDEZ F, ABREU-GONZÁLEZ P, ALVISA-NEGRÍN J, et al. Alcoholic myopathy: vitamin D deficiency is related to muscle fibre atrophy in a murine model[J]. *Alcohol Alcohol*, 2010, 45: 223-230.
- [3] TUOHIMAA P. Vitamin D and aging[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 114(1/2): 78-84.
- [4] GILSANZ V, KREMER A, MO A O, WREN T A, KREMER R. Vitamin D status and its relation to muscle mass and muscle fat in young women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: 1595-1601.
- [5] MOREIRA-PFRIMER L D, PEDROSA M A, TEIXEIRA L, LAZARETTI-CASTRO M. Treatment of vitamin D deficiency increases lower limb muscle strength in institutionalized older people independently of regular physical activity: a randomized double-blind controlled trial[J]. *Ann Nutr Metab*, 2009, 54: 291-300.
- [6] SRIKUEA R, ZHANG X, PARK-SARGE O K, ESSER K A. VDR and CYP27B1 are expressed in C2C12 cells and regenerating skeletal muscle; potential role in suppression of myoblast proliferation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303: C396-C405.
- [7] BUITRAGO C, BOLAND R. Caveolae and caveolin-1 are implicated in $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ -vitamin D₃-dependent modulation of Src, MAPK cascades and VDR localization in skeletal muscle cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(1/2): 169-175.
- [8] HAUSSLER M R, JURUTKA P W, MIZWICKI M, NORMAN A W. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25: 543-559.
- [9] GARCIA L A, KING K K, FERRINI M G, NORRIS K C, ARTAZA J N. $1, 25(\text{OH})_2$ vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells[J]. *Endocrinology*, 2011, 152: 2976-2986.
- [10] BISCHOFF-FERRARI H A, BORCHERS M, GUDAT F, DÜRMÜLLER U, STÄHELIN H B, DICK W. Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age[J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19: 265-269.
- [11] BLOUGH E R, LINDERMAN J K. Lack of skeletal muscle hypertrophy in very aged male Fischer 344 × Brown Norway rats[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2000, 88: 1265-1270.
- [12] MUIR S W, MONTERO-ODASSO M. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength, gait and balance in older adults: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2011, 59: 2291-2300.
- [13] KHAN Q J, REDDY P S, KIMLER B F, SHARMA P, BAXA S E, ODEA A P, et al. Effect of vitamin D supplementation on serum 25-hydroxy vitamin D levels, joint pain, and fatigue in women starting adjuvant letrozole treatment for breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 119: 111-118.
- [14] SATO Y, IWAMOTO J, KANOKO T, SATOH K. Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2005, 20: 187-192.

[本文编辑] 孙岩