标准溶液应注意其单位的信誉度。(4)由于电子捕获检测器的线性范围相对较窄,应当要求检测样品的测定值在线性范围内或配制与样品浓度一致或相近的标准溶液以消除误差。

2.2 加强对检验人员基本功的培养 随着科学技术不断发展和仪器设备更新换代,分析仪器在检验中起的作用越来越大,但分析者在分析工作中的作用并不是削弱了而应当不断加强,仪器设备总归属于工具,人才是第一位的,如何保证前处理质量、正确使用仪器设备、对检测结果进行准确判断将是今后检验机构和检验人员需要解决的重要方面。检验人员应注意学习,通过大量实际工作发现问题、总结经验。

2.3 规范管理制度 作为检验机构应当根据本单位的仪器设备状况、分析手段和检验中所出现问题的关键点等建立适用的检验方法规范操作程序,保证检验人员能够正确使用分析方法。建立完善的数据报告审核制度,及时发现检验工作中存在的问题及出具数据的审核工作,通过层层把关、层层落实,保证出具数据的准确性。

2.4 建立标准品供给体系 应当考虑建立本系统标准品库以保证各级检验机构使用标准品的需要和准确度的要求。各单位拥有的标准品与能开展的工作密不可分,作为国家级食品卫生检验机构有责任和义务为各级检验机构提供标准品,保证工作的顺利进行。

2.5 开展经常性质量控制工作 作为国家级食品卫生检验机构有义务帮助带动基层单位提高其检验能力和检验水平,除采用培训、进修等方式外,质量控制工作也是相当必要的。国内外大量经验表明,通过分析具有真值的质量控制样品可以确定本单位在分析过程中是否存在问题,通过查找出引起问题的原因并在今后工作中加以解决是提高检验水平的重要途径。

参考文献:

〔1〕 钱者生,沈国超. 化工产品质量保证—标准化·计量·质量管理[M]. 北京:中国计量出版社,1994.
〔2〕 蒋子刚,顾雪梅. 分析检验的质量保证和计量认证[M]. 上海:华东理工大学出版社,1998.
〔3〕 韩永志. 标准物质手册[M]. 北京:中国计量出版社,1998.

收稿日期:2003-03-30 (任旭红编辑 赵淑艳校对)

文章编号:1001-0580(2003)11-1387-03 中图分类号:Q786 文献标识码:A

【论 著】

钙对高脂膳食大鼠解偶联蛋白基因表达的影响*

于新凤,孙长颢,周晓蓉,刘荣,李颖

摘 要:目的 探讨膳食钙对高脂饮食大鼠白色脂肪组织和骨骼肌解偶联蛋白2(uncoupling protein2,UCP2)基因表达的影响。方法 将雄性Wistar大鼠随机分成6组,每组9只,分别喂以基础饲料A组(0.5%钙)、高脂低钙饲料B组(0.08%钙)、高脂正常钙饲料C组(0.5%钙)、高脂高钙饲料D和E组(1%和1.5%钙)和高脂高钙(1.5%钙)+维生素D(600U%)饲料F组,9周后断头取血测血糖、血清胰岛素和瘦素,应用RT-PCR方法测定白色脂肪组织和骨路肌UCP2 mRNA表达水平。结果 C组体重和体脂含量显著高于其它各组($P<0.01$),膳食高脂高钙的D、E、F组体重增加的趋势明显降低,体重与A组接近;C组血糖和胰岛素均有增高趋势,C组胰岛素显著高于A、D、E、F组($P<0.05$),但血糖各组无显著性差异($P>0.05$)。与A组相比,C组血清瘦素水平显著增高($P<0.05$),D、E、F组血清瘦素有增高趋势,但无显著性差异($P>0.05$)。高脂高钙的D、E、F组与高脂正常钙的C组相比,白色脂肪UCP2 mRNA并未增强,但骨骼肌UCP2 mRNA表达明显增强。高脂低钙的B组白色脂肪UCP2 mRNA比C组明显降低。结论 膳食高钙不但可以明显降低体重增加的趋势,还可以改善高胰岛素血症,促进瘦素分泌和骨骼肌UCP2 mRNA的表达,有利于肥胖的防治。

关键词:解偶联蛋白2;钙;高脂膳食

Effect of dietary calcium on expression of uncoupling protein-2 gene of rat fed with high fat diet *YU Xin-feng, SUN Chang-hao, ZHOU Xiao-rong, et al. Department of Nutrition and Food Hygiene of Harbin Medical University (Harbin 150001, China)*

Abstract: Objective To explore the effect of dietary calcium on the expression of uncoupling protein2 (UCP2) in white adipose tissue and skeletal muscle of Wistar rat fed with high fat diet. **Methods** Fifty-four male Wister rats were randomly divided into 6 groups: A group was fed with basic diet(0.5% calcium), B group was fed with high fat and low calcium diet (0.08% calcium), C group was fed with high fat and normal calcium diet(0.5% calcium), D and E group were fed with high fat, high calcium diet(1% and 1.5% calcium respectively), F group was fed with high fat, high calcium diet (1.5% calcium) supplemented with vitamin D(600IU%). After 9 weeks, serum triglycerides, cholesterol and high-density lipoprotein were measured and reverse transcription polymerase chaih reaction (RT-PCR) was used to measure the level of UCP mRNA. **Results** The body weight and fat content in C group were significantly higher than those of other groups($P<0.01$) However, the body weight in D, E, F groups fed with high fat, high calcium diet decreased significantly compared with C group. The serum insulin in C group increased significantly compared with that of A, D, E, F groups($P<0.05$), but there was no significant difference in blood glucose among all groups. Compared with A group, the level of serum leptin increased significantly in

* 基金项目:国家自然科学基金资助(30070655)
作者单位:哈尔滨医科大学营养与食品卫生学教研室,哈尔滨 150001
作者简介:于新凤(1976-),女,黑龙江哈尔滨市人,硕士,主要从事肥胖分子机制研究。

C group(P< 0.05) and increased slightly in D, E, F groups(P> 0.05). Compared with C group the UCP2 mRNA expression in D, E, F groups increased significantly in skeletal muscle but there was no significant change in white adipose tissue and UCP2 mRNA expression in B group decreased significantly in white adipose tissue. **Conclusion** Dietary high calcium can not only reduce body weight and fat content, but also improve hyperinsulinemia, increase serum leptin and enhance the expression of UCP2 mRNA in skeletal muscle which contributed to the prevention of obesity.

Key words: uncoupling protein 2; calcium; high fat diet

肥胖是机体能量摄入大于能量消耗的一种慢性能量平衡失调症。基础代谢、体力活动和食物特殊动力学是代表能量消耗的3个基本部分,在静息状态下,基础代谢占消耗总热能的70%左右,较低的静息代谢率(RMR)是体重增加的一个危险因素。

大部分RMR是由跨线粒体内膜的质子漏(proton leak)引起的[1]。线粒体内膜的解偶联蛋白(UCP)可能与质子漏形成有关,UCP参与机体的能量代谢,通过产生大量的热量而增加能量消耗[2]。Shi[3]等推测膳食钙可能通过减少细胞内钙离子浓度调节小鼠UCP2基因的表达。故本文主要研究膳食钙对Wistar大鼠体重及体脂含量的影响,深入探讨膳食钙是否调节白色脂肪组织及骨骼肌中解偶联蛋白(UCP2)基因的表达。

1 材料与方法

1.1 *实验动物* 54只雄性Wistar大鼠,110~140 g,购于哈尔滨药品检验所实验动物中心。根据大鼠体重随机分为6组,大鼠自由饮去离子水,每天记录给食量和撤食量,每周称1次体重,喂养9周。

1.2 *饲料配方* 参照官方分析化学协会(Association of Official Analytic Chemistty(AOAC)配方和实验大鼠合成饲料配方美国营养学会(American Institute of Nutrition, AIN)-93G,选用纯合成饲料,配成基础饲料,其所含营养素和能量能保证大鼠生长发育的基本要求,在此基础上调整脂肪含量配成高脂饲料。基础饲料配方(%):酪蛋白20,脂肪5,淀粉63,蔗糖6,混合矿物质3.5,混合维生素1.5,纤维素1。高脂饲料配方(%):酪蛋白20,脂肪15,淀粉53,蔗糖6,混合矿物质3.5,混合维生素1.5,纤维素1。并根据实验要求用碳酸钙适当调整膳食钙含量,使高脂饲料的B、C、D、E、F组总热能相等均为1 887.0 kJ/100g饲料,基础饲料总热能为1 677.8 kJ/100g饲料。各组饲料钙含量A组为基础饲料组(0.5%钙)、B组为高能低钙组(0.08%钙)、C组为高能正常钙组(0.5%钙)、D组为高脂高钙组(1%钙)、E组为高脂高钙组(1.5%钙)、F组为高脂高钙(1.5%钙)+维生素D(600 IU%)组。

1.3 *组织材料准备* 大鼠饲养9周后,断头处死,留取肾周白色脂肪组织和后肢前侧运动肌群,迅速放入液氮中冷冻,然后放置-80 ℃超低温冰箱中保存以备检测UCP2 mRNA。

1.4 *脂体比的计算* 脂体比=〔睾周脂肪重量(g)+肾周脂肪重量(g)〕/体重(g)×100%。

1.5 *血糖血清胰岛素瘦素的测定* 血糖采用血糖仪(美国强生公司)和试纸测定,胰岛素放射免疫检测试剂盒购于天津德普公司,大鼠瘦素放射免疫检测试剂盒购于美国Linco公司。

1.6 *UCP2 mRNA的测定* 按GIBCO公司总RNA提取试剂盒操作步骤,分别从200 mg大鼠肾周白色脂肪组织和骨骼肌中提取总RNA。逆转录反应以总RNA 1.5 μg为模板,UCP2和β-actin基因采用寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸oligo(dT)为逆转录引物,加入鸟髓母细胞过多症病毒(Avian myelobastosis virus, AMV)逆转录酶10 U,总反应体积为20 μl,42 ℃水浴1 h,合成第一条cDNA链;PCR反应以逆转录产物2 μl为模板,加入引物20 pmol,TaqDNA聚合酶0.35 μl,总反应体积为25 μl。UCP2上游引物为:5'-TAAAGCAGTTCTACACCAAGGG-3';下游引物为5'-CGAAGGCAGAAGTGAAGTGG-3'。以β-actin(β-肌动蛋白)为内参,上游引物为5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3';下游引物为5'-GGTCAGGATCTTCATGAGGT-3'。β-actin(β-肌动蛋白)扩增条件为:94 ℃,4 min;94 ℃变性30 s,57 ℃退火30 s,72 ℃延伸40 s;27个循环,72 ℃,10 min;白色脂肪和骨骼肌UCP-2扩增条件为:94 ℃,4 min,94 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸40 s,35循环;72 ℃,10 min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳并与DNA标准分子量比较鉴定,在数字成像仪上照相、扫描分析。

1.7 *结果分析* 运用SPSS 10.0软件包,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用方差分析进行处理。

2 结果

2.1 *不同剂量钙对大鼠体重、体脂含量的影响*(表1) 由表1可见,各组大鼠实验前体重无显著性差异,随时间推移,各组体重逐渐增加,实验结束时C组大鼠体重与其它各组比有显著性差异($P<0.01$);B组由于严重缺钙导致长期腹泻而使体重下降,属异常性体重下降,终末体重略低于A组。高脂高钙膳食的D、E、F组体重和体脂含量略高于A组($P>0.05$),与C组相比有显著性差异($P<0.01$)。说明膳食钙可以明显抑制高脂膳食诱导的大鼠肥胖的发生。

2.2 *不同剂量钙对大鼠血糖、血清胰岛素和瘦素的影响*(表2) 由表2可见,C组血糖和胰岛素均有增高趋势,C组胰岛素显著高于A、D、E、F组($P<0.05$),但血糖各组无显著性差异。B组胰岛素水平低于C组,但无显著性差异。C组血清瘦素水平明显增高,与A组比有显著性差异($P<0.05$),与B组比有显著性差异($P<0.01$)。D、E、F组血清瘦素与A组相比有增高趋势,低于C组,但无显著性差异。

表1 各组大鼠体重和体脂含量($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

组别	初始体重(g)	终末体重(g)	体脂含量(%)
A	131.56±8.50	355.78±31.36**	3.53±0.76**
B	127.67±10.33	333.11±30.91**	3.17±0.66**
C	129.67±11.02	420.44±30.64	4.88±0.62
D	131.00±13.44	368.00±36.67**	3.93±0.47**
E	128.11±13.03	352.89±29.33**	3.85±0.52**
F	129.56±14.76	350.44±19.43**	3.82±0.68**

注:与C组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

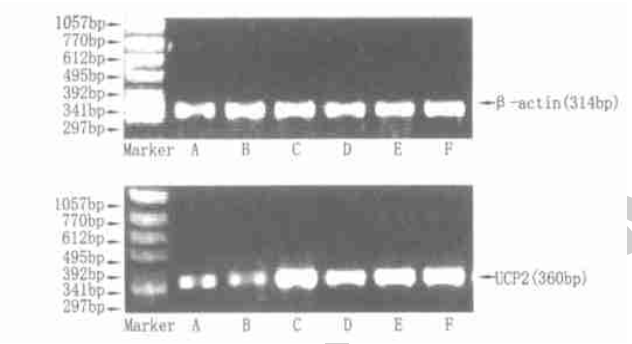
2.3 *不同剂量钙对大鼠白色脂肪组织UCP2 mRNA表达的影响*(图1) 由图1可见,C、D、E、F组UCP2 mRNA显著高于A组;与C组相比,B组UCP2 mRNA显著降低,说明缺钙可以影响UCP2 mRNA的表达,而D、E、F组并未使白色脂肪UCP2 mRNA表达增加,说明高脂高钙饲料对白色脂肪UCP2

mRNA 的表达影响不大。

表 2　各组大鼠血糖、血清胰岛素和瘦素水平($n=9, \bar{x}\pm s$)

组别	血糖(mmol/L)	胰岛素(mmol/L)	瘦素(ng/ml)
A	4.17±1.07	12.73±3.17*	3.22±1.63*
B	4.19±0.85	13.41±4.46	1.54±0.76**
C	4.69±0.79	17.53±4.86	6.64±2.01
D	3.59±0.72	12.92±3.67*	4.87±1.94
E	3.87±0.02	11.87±3.56*	5.17±1.98
F	3.80±0.94	12.76±3.64*	5.21±2.01

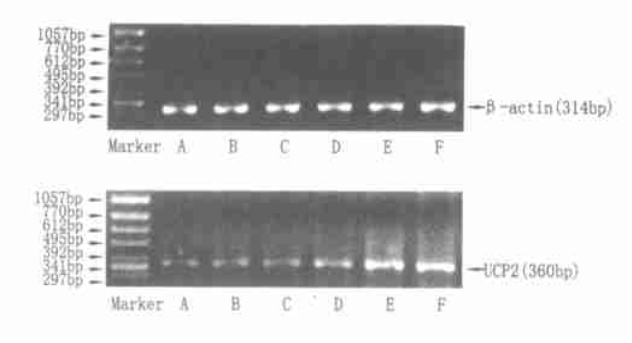
注: 与 C 组相比, * $P<0.05$, * * $P<0.01$



数字成像仪扫描 UCP2 mRNA 的琼脂糖凝胶电泳的光密度结果 A 组为基础饲料组, B 组为高能低钙组(0.08% 钙), C 组为高能正常钙组(0.5% 钙), D 组为高脂高钙组(1% 钙), E 组为高脂高钙组(1.5% 钙), F 组为高脂高钙(1.5% 钙+ 600IU% 维生素 D)组

图 1　不同饲料对大鼠白色脂肪组织 **UCP2 mRNA** 表达的影响

2.4　不同剂量钙对大鼠骨骼肌解偶联蛋白-2 基因表达的影响(图 2)　由图 2 可见, C、D、E、F 组 UCP2 mRNA 明显高于 A 组, 而 B 组 UCP2 mRNA 与 A 组接近; 与 C 组相比, D、E、F 组 UCP2 mRNA 有增高趋势, 尤其 1.5% 钙剂量组增高最显著, 说明膳食钙可明显增强骨骼肌 UCP2 mRNA 的表达。E 与 F 组 UCP2mRNA 表达相近, 说明维生素 D 并未影响高钙膳食对 UCP2 mRNA 的表达。B 组 UCP2 mRNA 与 C 组相比略降低, 与 A 组接近, 说明低钙膳食可能影响骨骼肌 UCP2mRNA 的表达, 但作用不明显。



数字成像仪扫描 UCP2 mRNA 的琼脂糖凝胶电泳的光密度结果 A 组为基础饲料组, B 组为高能低钙组(0.08% 钙), C 组为高能正常钙组(0.5% 钙), D 组为高脂高钙组(1% 钙), E 组为高脂高钙组(1.5% 钙), F 组为高脂高钙(1.5% 钙+ 600IU% 维生素 D)组

图 2　不同饲料对大鼠骨骼肌 **UCP2 mRNA** 表达的影响

3　讨论

本研究显示, 高脂高钙的 D、E、F 组与高脂正常钙的 C 组相比体重和体脂含量均显著下降, 表明膳食高钙可显著抑制高脂膳食诱导的大鼠肥胖的趋势。该结果与 Shi[3]等对 αP2-刺蛋白(nP2-agouti)转基因小鼠的研究结果一致。

D、E、F 组血糖和胰岛素水平低于 C 组, 说明高钙膳食具有明显改善高胰岛素血症的作用, 原因可能是高钙膳食使细胞内钙离子降低。而研究表明细胞内钙离子浓度是胰岛素释放的首要信号[4], 故胰岛素分泌减少。研究表明, 血瘦素水平与体质指数(BMI)和体脂含量呈显著正相关[5]。本研究显示, C 组瘦素明显升高, 这可能与 C 组大鼠体脂含量明显增高有关。高脂高钙膳食的 D、E、F 组体脂含量与基础组接近, 但瘦素水平高于基础组, 表明高钙膳食可促进瘦素的表达。瘦素的作用是促进脂肪分解, 抑制脂质合成, 增加能量消耗, 故 D、E、F 组大鼠体脂含量降低可能与瘦素水平的增高有关。

与高脂正常钙组比较, 高钙膳食并未影响白色脂肪 UCP2 的基因表达, 而低钙膳食白色脂肪 UCP2 的基因表达明显降低。一方面可能是因为高脂高钙组体重和体脂明显下降, 而 UCP2 mRNA 的表达与体脂含量密切相关, 因此部分掩盖了膳食钙增加 UCP2 基因表达的作用。另一方面, 高钙可能并不影响 UCP2 mRNA 的表达, 而是通过其它代谢途径降低体重和体脂含量。与高脂正常钙组比较, 高钙膳食明显促进骨骼肌 UCP2 mRNA 的表达, 说明膳食钙对 UCP2 mRNA 表达的影响可能有组织特异性。骨骼肌是静息能量消耗的主要决定因子, 也是机体最大适应性产热器官。高钙膳食使骨骼肌 UCP2 mRNA 表达增加, 使骨骼肌产热耗能增加, 这可能是高钙膳食大鼠体重和体脂含量降低的原因之一。

总之, 膳食高钙不但可以明显降低体重和体脂含量, 防止高脂膳食诱导的肥胖, 还可以改善高胰岛素血症, 促进瘦素分泌和骨骼肌 UCP2 mRNA 的表达, 从而促进能量消耗, 但对白色脂肪 UCP2 mRNA 的表达并无影响。膳食钙通过什么机制调节激素分泌和促进骨骼肌 UCP2 的基因表达, 有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Stuart JA, Brindle KM, Harper JA, et al. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins[J]. J Bioenerg Biomembr, 1999, 31(5): 517-525.

[2] Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism[J]. Diabetes, 2000, 49(2): 143-156.

[3] Shi H, Dirienzo D, Zemel MB, et al. Effect of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy restricted aP2-agouti transgenic mice[J]. J FASEB, 2001, 15: 291-293.

[4] Newgard C B and McGarry D. Metabolic coupling factors in pancreatic b-cell signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 1995, 64: 689-719.

[5] Considine RV, Sinha MK, Heiman M L, et al. Serum immunoreaetive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans [J]. N Engl J Med, 1996, 334(5): 292-295.

收稿日期: 2003-03-04　(任旭红编辑　赵淑艳校对)