

· 论 著 ·

## 妊娠期过多接触糖皮质激素对子代大鼠肝脏 11 $\beta$ -HSD1 表达的印迹效应

李召峰, 曲宪成, 万顺伦, 孙 刚\* (第二军医大学基础医学部生理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**探讨妊娠期过多接触糖皮质激素对子代大鼠肝脏再生糖皮质激素代谢酶 11 $\beta$  羟基类固醇脱氢酶 I 型(11 $\beta$ -HSD1)表达的印迹效应。**方法:**根据大鼠发情周期进行合笼,次晨阴道涂片发现精子作为受孕 0.5 d。孕鼠共 8 只,随机分为地塞米松(DEX)组和生理盐水(NS)组,每组 4 只。DEX 组孕鼠整个妊娠期注射 DEX 0.05 mg/(kg·d),NS 组孕鼠同等条件注射 NS。取 DEX 和 NS 组出生后 120 d 子代大鼠肝脏组织,采用 Western 印迹法检测 11 $\beta$ -HSD1 蛋白,RT-PCR 方法检测 11 $\beta$ -HSD1 mRNA、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK) mRNA,葡萄糖氧化酶法测定血糖浓度。**结果:**DEX 组大鼠子代出生时的体质量比 NS 组明显降低,但生后 120 d 子代大鼠的体质量与 NS 组无显著性差异。生后 120 d 子代大鼠中 DEX 组雌性子代肝脏组织内 11 $\beta$ -HSD1 蛋白和 mRNA 表达、PEPCK mRNA 表达以及血糖浓度均显著高于 NS 组雌性子代( $P < 0.05$ ),但雄性子代大鼠没有显著差异。**结论:**妊娠期过多接触糖皮质激素可以印迹雌性子代大鼠肝脏 11 $\beta$ -HSD1 的表达增加,从而可能进一步导致 PEPCK 表达的增加和血糖浓度升高。这可能是妊娠期过多接触糖皮质激素印迹糖尿病发生的重要机制之一。

**[关键词]** 糖皮质激素;11 $\beta$  羟基类固醇脱氢酶 I 型;肝;妊娠

**[中图分类号]** R 714.431 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0061-04

### Imprinting effects of prenatal overexposure to glucocorticoids on 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in rat offspring liver

LI Zhao-feng, QU Xian-cheng, WAN Shun-lun, SUN Gang\* (Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the imprinting effects of prenatal overexposure to glucocorticoids on 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1(11 $\beta$ -HSD1) expression in the rat offspring liver. **Methods:** Pregnancy was determined by examining vaginal smear. Eight pregnant rats were divided into dexamethasone(DEX) group and normal saline(NS) group at random with each group containing 4 rats. DEX group was given subcutaneous injection of DEX [0.05 mg/(kg·d)] and NS group was given injection of NS. Western blot was adopted to determine 11 $\beta$ -HSD1 protein in the liver of the offspring at the age of 4 months; RT-PCR was used to determine 11 $\beta$ -HSD1 mRNA and hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) mRNA; and glucose oxidase method was used to measure the blood glucose concentration. **Results:** Western blot and RT-PCR showed that prenatal overexposure to DEX increased the expression of 11 $\beta$ -HSD1 protein and mRNA in the liver of the female offsprings at 4 months old, but not in male offsprings. Prenatal overexposure to DEX also increased the expression of PEPCK mRNA and blood glucose level in the female offsprings at 4 months old. **Conclusion:** Our study suggests that prenatal overexposure to glucocorticoids throughout gestation can imprint the expression of 11 $\beta$ -HSD1 in rat offsprings liver, which may lead to the PEPCK overexpression and blood glucose elevation. Development of diabetes may be induced in individuals overexposed to glucocorticoids during fetal period.

**[KEY WORDS]** glucocorticoids; 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; liver; pregnancy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 61-64]

糖皮质激素(glucocorticoids, GC)是胎儿器官成熟所必不可少的激素。但近年来的研究发现,妊娠期胎儿体内 GC 过量不仅导致胎儿宫内发育迟缓,而且还能印迹或编码某些成年疾病的发生,如糖尿病、心血管疾病和行为的异常等,此即目前引起人们广泛关注的“胎儿起源的成年人疾病”(fetal origin of adult diseases)<sup>[1,2]</sup>。GC 在组织的局部浓度受 GC 代谢酶 11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶(11 $\beta$ -HSD)的调节<sup>[3,4]</sup>。目前发现有 2 种类型 11 $\beta$ -HSD: 11 $\beta$ -

HSD1 主要为还原酶,能提高组织局部的 GC 浓度,从而放大 GC 的效用;11 $\beta$ -HSD2 是专一的氧化酶,具有降低组织局部 GC 浓度的作用<sup>[3,4]</sup>。以往的实验研究发现,GC 能促进体内多处组织 11 $\beta$ -HSD1 的表达,但是否对大量表达 11 $\beta$ -HSD1 的肝脏组织的

**[基金项目]** 国家重点基础研究规划(“973”计划)课题(G1999054000)。

**[作者简介]** 李召峰(1978-),男(汉族),硕士生。

\* Corresponding author. E-mail: sunkang2000@yahoo.com

11 $\beta$ -HSD1 表达具有印迹效应,进而增加肝脏组织局部 GC 水平、放大 GC 的局部作用,从而印迹糖尿病的发生,目前尚不清楚。本实验观察了妊娠期母体大鼠注射 GC 对子代成年后肝脏 11 $\beta$ -HSD1 表达的印迹效应,并初步探讨了此印迹效应与糖尿病发生的关系。

## 1 材料和方法

1.1 动物的饲养和处理 成年 SD 大鼠(第二军医大学实验动物中心)饲养于清洁卫生的动物房内,可自由饮食。房间温度控制在 25 $^{\circ}$ C,光照周期 12 h。根据大鼠的发情周期进行合笼,次晨阴道涂片发现精子作为受孕 0.5 d。孕鼠共 8 只,随机分为地塞米松(DEX)组和生理盐水(NS)组,每组 4 只。受孕后即开始给 DEX 组孕鼠皮下注射 DEX 0.05 mg/(kg·d)直至分娩,注射时间为 7:00~8:00,NS 组注射等量 NS。用精确度为千分之一的天平称取出生后 1 d、120 d 时子代大鼠的体质量(称量均在哺乳前进行)。待子代大鼠 120 d 时,禁食 12 h,断头取血,用肝素钠抗凝,3 000 $\times$ g 离心 15 min 后,取血浆测定血糖。取血的同时迅速取肝脏左叶组织,放入液氮速冻,-80 $^{\circ}$ C 保存,待提取 RNA 和蛋白。

1.2 Western 印迹法检测 11 $\beta$ -HSD1 蛋白 取适量 DEX 和 NS 组出生后 120 d 子代大鼠肝脏组织,分别加入含有蛋白酶抑制剂(苯甲基磺酰氟 0.6 mmol/L、抑胃肽 1 mmol/L、亮抑蛋白酶肽 50 mmol/L、抑肽酶 1.5  $\mu$ g/ml)的组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5、150 mmol/L NaCl,1% Triton-X100,1% 脱氧胆酸钠,0.1% SDS)1 ml,在冰浴下用匀浆器(Ultra Turrax)匀浆,将匀浆液 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,测定蛋白浓度。取 50  $\mu$ g 样本蛋白用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,用电转膜仪(Bio-Rad)转印蛋白到硝酸纤维素膜(Amersham)上,用 10% 的脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h 后,加入用 TBST(TBS 缓冲液内含 0.1% Tween-20)新鲜配制的兔来源的 11 $\beta$ -HSD1 抗体(加拿大西安大略大学杨开平教授惠赠,滴度为 1:1 000),室温孵育 1~2 h。用 TBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次,加入羊抗兔 IgG 抗体(华美公司),滴度为 1:1 000,室温孵育 1 h 后,用 TBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次,在膜上加增强化学发光剂(Perfect 公司),在暗室内压 X 线片。同一 Western 杂交膜显示 11 $\beta$ -HSD1 条带后,用洗脱缓冲液(50 $^{\circ}$ C)洗涤 30 min,然后用同样的方法显示内参照  $\beta$ -actin 条带,以此作为加样的内参照。 $\beta$ -actin 单克隆抗体购于

Sigma 公司。X 线片上的条带用图像分析系统(上海复日科技有限公司)读其密度值,并进行定量分析。以 11 $\beta$ -HSD1 条带密度值/ $\beta$ -actin 条带密度值来纠正上样量的偏差,用密度比值的高低表示 11 $\beta$ -HSD1 蛋白量的多少。

1.3 RT-PCR 方法检测 11 $\beta$ -HSD1、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK) mRNA 取适量 DEX 和 NS 组出生后 120 d 子代大鼠肝脏组织,分别放入经过 DEPC 水处理的试管内。按照制造商提供的方法使用 TRIzol(上海华舜生物公司)提取肝脏组织内的总 RNA。用紫外分光光度计(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech)测定样品中 RNA 的浓度,根据  $D_{260}/D_{280}$  的比值判断其纯度。取 2  $\mu$ g 总 RNA,用反转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase, Promega)合成 cDNA。利用 cDNA 以及针对大鼠 11 $\beta$ -HSD1 基因的特异性引物(forward:5'-GTG GAC TFF ACA TGC TCA TT, reverse:5'-GTG ATG GAC ACG TTG ACC TT, 301 bp)和针对大鼠  $\beta$ -actin 基因的特异性引物(forward:5'-CCC ATT GAA CAC GGC ATT G, reverse:5'-GGT ACG ACC AGA GGC ATA CA, 236 bp)进行 PCR 扩增(Personal Cycler, Biometra),PCR 反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,24 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min)。将扩增后的产物在含有溴化乙锭 1.5% 的琼脂糖凝胶内电泳。胶中的条带用图像分析系统(上海复日科技有限公司)读其密度值,并进行定量分析。以 11 $\beta$ -HSD1 条带密度值/ $\beta$ -actin 条带密度来纠正上样量的偏差。用密度比值的高低表示 11 $\beta$ -HSD1 mRNA 量的多少。用同样的方法检测肝脏中 PEPCK mRNA 水平的表达,针对大鼠 PEPCK 基因的特异性引物序列为(forward:5'-AGG CTG GCT AAG GAG GAA GG, reverse:5'-GCC ACG TTG GTG AAG ATG GT, 326 bp),PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,59 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,24 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应循环数是根据反应过程中每隔 2 个循环 3 次取样的条带密度确定的,所选择的循环数均在线性范围内。

1.4 葡萄糖氧化酶法测定血糖浓度 利用葡萄糖氧化酶法和葡萄糖分析试剂盒(上海丰汇医学科技有限公司)和日立 7600 自动生化分析仪测定。

1.5 统计学处理 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用非配对  $t$  检验。

## 2 结果

2.1 妊娠期母体大鼠注射 GC 对子代大鼠体质量

的影响 整个孕期母体注射 DEX 的大鼠,其妊娠时间和产仔数无明显改变,但子代出生时的体质量较整个孕期母体注射 NS 的大鼠明显降低( $n=40$ ,  $P<0.05$ ),DEX 组和 NS 组生后 1 d 子代体质量分别为( $7.22\pm 0.12$ )和( $7.65\pm 0.10$ ) g。但生后 120 d 时,DEX 组和 NS 组子代体质量分别为( $251.2\pm 14.3$ )、( $235.0\pm 19.6$ ) g,无明显差异( $n=20$ ,  $P>0.05$ )。

2.2 妊娠期母体大鼠注射 GC 对子代大鼠肝脏 11 $\beta$ -HSD1 蛋白和 mRNA 表达的影响 Western 杂交和 RT-PCR 结果显示,整个孕期注射 DEX 的大鼠,其生后 120 d 子代的肝脏组织内 11 $\beta$ -HSD1 蛋白表达和 mRNA 水平均显著高于 NS 组( $P<0.05$ ),而且以雌性子代肝脏组织内 11 $\beta$ -HSD1 蛋白表达和 mRNA 水平升高更为显著(图 1A、1B)。

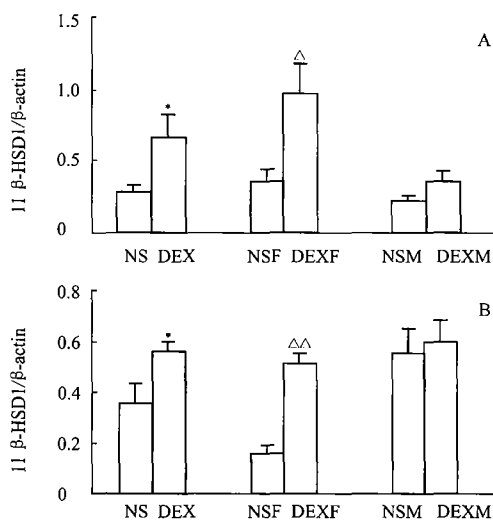


图 1 妊娠期注射 DEX 对 120 d 龄子代大鼠肝脏 11 $\beta$ -HSD1 蛋白(A)和 11 $\beta$ -HSD1 mRNA(B)表达的影响  
Fig 1 Effect of prenatal DEX injection throughout gestation on expression of 11 $\beta$ -HSD1 protein(A) and 11 $\beta$ -HSD1 mRNA(B) in rat offsprings liver at 120 d

\*  $P<0.05$  vs NS,  $n=10$ ;  $\Delta$   $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P<0.01$  vs NSF,  $n=4$ ; NS: Normal saline; DEX: Dexamethasone; NSF: NS female group; NSM: NS male group; DEXF: DEX female group; DEXM: DEX male group

2.3 妊娠期母体大鼠注射 GC 对子代大鼠肝脏 PEPCK mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示,整个孕期注射 DEX 的大鼠,其生后 120 d 雌性子代的肝脏组织内 PEPCK mRNA 水平显著高于 NS 组雌性子代( $P<0.05$ ),而雄性子代大鼠肝脏组织内 PEPCK mRNA 表达水平与 NS 组雄性子代相比无显著性差异(图 2)。

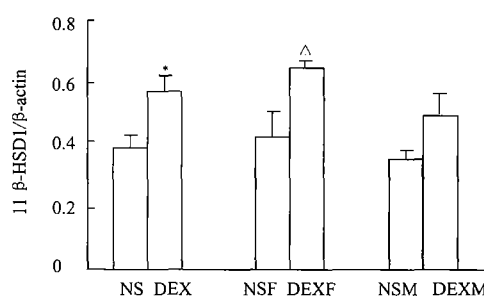


图 2 妊娠期注射 DEX 对 120 d 龄子代大鼠肝脏 PEPCK mRNA 表达的影响及性别差异  
Fig 2 Effect of prenatal DEX injection throughout gestation on expression of PEPCK mRNA in liver of rat offspring 120 d old and their sex differences

\*  $P<0.05$  vs NS,  $n=8$ ;  $\Delta$   $P<0.05$  vs NSF,  $n=4$ ; NS: Normal saline; DEX: Dexamethasone; NSF: NS female group; NSM: NS male group; DEXF: DEX female group; DEXM: DEX male group

2.4 妊娠期母体大鼠注射 GC 对子代大鼠血糖的影响 用葡萄糖氧化酶法测定 DEX 组和 NS 组子代出生 120 d 时的血糖浓度,结果显示 DEX 组雌性子代血糖浓度( $6.22\pm 0.32$ ) mmol/L 比 NS 组雌性子代的血糖浓度( $5.09\pm 0.33$ ) mmol/L 显著增高( $n=10$ ,  $P<0.05$ ),而 DEX 组雄性子代的血糖浓度( $4.22\pm 0.88$ ) mmol/L 与 NS 组雄性子代的血糖浓度( $4.63\pm 0.49$ ) mmol/L 相比无显著性差异( $n=6$ ,  $P>0.05$ )。

### 3 讨论

本研究发现,整个妊娠期注射 DEX 的大鼠,其子代大鼠出生体质量减低,这与既往报道是一致的<sup>[5]</sup>。Seckl 等<sup>[6]</sup>发现,低出生体质量的个体在成年后易于发生高血压、糖尿病、高脂血症等,并且往往死于心脏病。然而,低出生体质量本身不可能导致上述成年疾病的发生<sup>[2]</sup>,那么又是何种机制介导两者之间联系的呢?目前,有一种观点认为,宫内胎儿过多暴露于糖皮质激素可能是导致“胎儿起源的成年人疾病”的重要因素<sup>[7]</sup>。

近年来发现,11 $\beta$ -HSD 是决定组织局部 GC 浓度的关键因素,特别是具有活化 GC 功能的 11 $\beta$ -HSD1 可能与 GC 印迹作用的关系更为密切。肝脏是表达 11 $\beta$ -HSD1 的主要器官之一,研究发现,DEX 可以使原代培养的肝脏细胞中 11 $\beta$ -HSD1 的活性增高<sup>[8]</sup>。本研究发现,整个妊娠期注射 DEX 的大鼠,其生后 120 d 的子代,特别是雌性子代肝脏 11 $\beta$ -HSD1 蛋白和 mRNA 的表达均比对照组明显增高,从而使更多

无活性的 GC 转化为有活性的 GC, 肝脏局部的 GC 浓度升高、效应增强。说明妊娠期过多的 GC 对子代大鼠肝脏 11 $\beta$ -HSD1 表达增加具有印迹效应。

由于 GC 可以拮抗胰岛素的效应, 并在多个水平调节葡萄糖-胰岛素间的平衡, 如抵抗胰岛素的外周作用、抑制胰岛素的释放、刺激糖异生<sup>[9]</sup>。尤其是糖皮质激素可以促进多种葡萄糖代谢酶如糖异生关键酶——磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)的表达<sup>[9]</sup>。研究表明, GC 可以促进成年大鼠肝脏中 PEPCK 基因的转录<sup>[9]</sup>, 11 $\beta$ -HSD1 基因剔除可以减弱 GC 对 PEPCK 表达的诱导作用<sup>[10]</sup>, 提示 GC 和 11 $\beta$ -HSD1 与肝脏 PEPCK 的表达关系密切。我们的研究发现, 整个妊娠期注射 DEX 的大鼠, 生后 120 d 的雌性子代肝脏中 PEPCK mRNA 表达增加、血糖水平升高, 这与肝脏 11 $\beta$ -HSD1 表达变化相一致, 提示雌性子代大鼠肝脏 11 $\beta$ -HSD1 表达增加导致肝脏局部 GC 水平的升高, 后者又进一步诱导雌性子代大鼠肝脏 PEPCK mRNA 表达增加和血糖的升高。

有趣的是, 我们发现孕期过量 DEX 对子代大鼠肝脏 11 $\beta$ -HSD1、PEPCK 的表达和血糖水平的影响存在性别差异, 雌性子代肝脏 11 $\beta$ -HSD1、PEPCK 的表达以及血糖的浓度均比对照组明显增高, 而雄性子代与对照组相比无显著差异, 这可能与不同性别体内性激素的水平有关。众所周知, 雌性体内存在高水平的雌二醇, 文献报道和我们的工作<sup>[8,9,11]</sup>都发现 GC 促进 11 $\beta$ -HSD1、PEPCK 的表达, 而雌二醇能够特异性降低肝脏中 11 $\beta$ -HSD1 和 PEPCK 的表达<sup>[12,13]</sup>。根据文献报道 GC 和雌二醇对一些基因的表达具有竞争性的调节作用<sup>[14,15]</sup>, 我们认为, 体内过多的 GC 很可能通过竞争性机制阻断了雌性大鼠体内雌激素对肝脏 11 $\beta$ -HSD1 和 PEPCK 表达的抑制效应, 从而印迹了雌性子代肝脏 11 $\beta$ -HSD1 和 PEPCK 的表达水平升高, 并且最终导致血糖水平的升高。

本实验结果提示, 妊娠期胎儿过多暴露于 GC 印迹了雌性子代肝脏中 11 $\beta$ -HSD1 的高表达, 使肝脏局部 GC 浓度升高, 效应增强, 进而使 PEPCK 的表达增高, 糖异生增强, 血糖浓度升高, 并最终可能导致非胰岛素依赖性糖尿病的发生。GC 对肝脏 11 $\beta$ -HSD1 和 PEPCK 表达的这种性别差异可能与体内的性激素水平有关。

#### [参考文献]

[1] Seckl JR. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phe-

notypes and molecular mechanisms[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 185(1-2):61-71.

- [2] Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain[J]. *J Neuroendocrinol*, 2001, 13(2): 113-128.
- [3] Seckl JR, Walker BR. Minireview: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1-a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(4):1371-1376.
- [4] Seckl JR, Chapman KE. Minireview series: the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action[J]. *Eur J Biochem*, 1997, 249(2):361-364.
- [5] Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, et al. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension[J]. *Lancet*, 1993, 341(6):339-341.
- [6] Seckl JR, Nyirenda MJ, Walker BR, et al. Glucocorticoids and fetal programming[J]. *Biochem Soc Trans*, 1999, 27(2):74-78.
- [7] Cleasby ME, Livingstone DE, Nyirenda MJ, et al. Is programming of glucocorticoid receptor expression by prenatal dexamethasone in the rat secondary to metabolic derangement in adulthood[J]? *Eur J Endocrinol*, 2003, 148(1):129-138.
- [8] Liu YJ, Nakagawa Y, Nasuda K, et al. Effect of growth hormone, insulin and dexamethasone on 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity on a primary culture of the rat hepatocytes[J]. *Life Sci*, 1996, 59(3):227-234.
- [9] Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, et al. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxylase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(10):2174-2181.
- [10] Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, et al. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(26):14924-14929.
- [11] 万顺伦, 廖茂瑶, 郝如松, 等. 大鼠海马神经元内 11 $\beta$ -HSD1 和 GR 的共存及其意义[J]. *生理学报*, 2002, 54(6):473-478.
- [12] Low SC, Chapman KE, Edwards CR, et al. Sexual dimorphism of hepatic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat: the role of growth hormone patterns[J]. *J Endocrinol*, 1994, 143(3):541-548.
- [13] Jamieson PM, Nyirenda MJ, Walker BR, et al. Interactions between oestradiol and glucocorticoid regulatory effects on liver-specific glucocorticoid-inducible genes: possible evidence for a role of hepatic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1[J]. *J Endocrinol*, 1999, 160(1):103-109.
- [14] Houben H, Denef C. Negative regulation by dexamethasone of the potentiation of neuromedin C-induced growth hormone and prolactin release by estradiol in anterior pituitary cell aggregates[J]. *Life Sci*, 1992, 50(11):775-780.
- [15] Rhen T, Grissom S, Afshari C, et al. Dexamethasone blocks the rapid biological effects of 17 $\beta$ -estradiol in the rat uterus without antagonizing its global genomic actions[J]. *FASEB J*, 2003, 17(13):1849-1870.

[收稿日期] 2004-05-06

[修回日期] 2004-08-28

[本文编辑] 李丹阳