

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01495

妊娠期接触糖皮质激素对子代大鼠海马 SGK mRNA 表达的影响

丛滨海,黎跃华,孙婷婷,朱晓燕,温健男,胡佳,盛慧,倪鑫*

第二军医大学基础部生理学教研室,上海 200433

[摘要] **目的:**研究妊娠期大鼠接触糖皮质激素(GCs)对子代大鼠海马组织血清和糖皮质激素调节蛋白激酶(SGK)表达的影响,并初步探讨其可能原因。**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。孕鼠随机分为对照组和地塞米松组,每组 10 只。地塞米松组大鼠在妊娠第 14 日起皮下注射地塞米松 0.1 mg/(kg·d),对照组注射等量生理盐水。取出生后 1、7 和 42 d 的子代大鼠海马组织,采用 real-time PCR 法检测 SGK 和糖皮质激素受体(GR)mRNA 表达情况。**结果:**地塞米松组子代出生时体质量明显低于对照组,随后出现追赶性生长;地塞米松组子代在出生后 1、7、42 d,其海马组织 SGK 和 GR mRNA 表达较对照组明显减少($P<0.05$)。**结论:**妊娠晚期接触 GCs 可使子代大鼠海马 SGK 和 GR 的基础表达降低。

[关键词] 妊娠;糖皮质激素;印痕效应;海马;SGK

[中图分类号] R 335 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1495-04

Glucocorticoid exposure of pregnant rats influences hippocampus SGK expression in rat offsprings

CONG Bin-hai, LI Yue-hua, SUN Ting-ting, ZHU Xiao-yan, WEN Jian-nan, HU Jia, SHENG Hui, NI Xin*

Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effect of glucocorticoid exposure of pregnant rats on hippocampus SGK expression in rat offsprings, and to explore the related mechanism. **Methods:** Pregnancy was determined by examining vaginal smear in the morning of cohabiting. Pregnant rats were divided into control group and dexamethasone group, with each group containing 10 rats. Dexamethasone group was subcutaneously injected with dexamethasone (0.1 mg/[kg·d]) and control group was injected with normal saline. The hippocampuses of rat offsprings were collected 1 d, 7 d, and 42 d after birth. Real-time PCR was used to determine SGK and GR mRNA expression. **Results:** The body weight of rat offsprings in the dexamethasone group was obviously lower than that in the control group at birth, then those in the dexamethasone group had a rapid growth. Prenatal exposure to dexamethasone significantly decreased the expression of SGK and GR mRNA in the hippocampuses of rat offsprings (1 d, 7 d and 42 d after birth) compared with control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Prenatal exposure to glucocorticoid in pregnancy stage can decrease the hippocampus expression of SGK and GR in rat offsprings.

[KEY WORDS] pregnancy; glucocorticoids; imprinting effect; hippocampus; SGK

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1495-1498]

糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)是由肾上腺皮质分泌的一种类固醇激素,在机体代谢、应激反应、神经系统发育以及下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)的调节等过程中起着重要的作用。临床上经常应用 GCs 来治疗具有早产倾向的孕妇,以减少胎儿死亡率。然而,越来越多的研究表明,出生前接触过多的 GCs 会引起胎儿体内某些基因的表达发生永久性改变,从而导致子代成年后某些疾病,如高血压、2 型糖尿

病以及神经精神疾患等的发生率明显增加^[1]。这种在生命早期某种异常因素所导致的永久性基因表达的改变称为编程作用(programming effects)或印痕效应(imprinting effects)。海马结构对编程作用高度敏感。海马是 HPA 轴的高级调节中枢,静息状态下,海马参与抑制 HPA 轴功能,形成 HPA 轴功能节律的波谷期;应激状态下,海马则起着关闭 HPA 轴的作用,防止 HPA 轴过度的应激反应。在大脑发育过程中,海马对内源性和外源性 GCs 尤为

[收稿日期] 2008-06-27 **[接受日期]** 2008-09-17

[作者简介] 丛滨海,博士生,助教. E-mail: cong bh2003@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070308, E-mail: nxljq2003@yahoo.com.cn

敏感,妊娠期应激或接触 GCs 可使海马神经元丢失,树突萎缩,突触减少,糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)和盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR) mRNA 表达减少,同时还可使海马内的神经递质系统发生改变,而 GCs 在海马产生的印痕效应对子代成年后的行为反应具有深远的影响。

血清和糖皮质激素调节蛋白激酶(serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase, SGK)是1993年在大鼠乳腺癌细胞中发现的一种丝/苏氨酸蛋白激酶,当细胞受到 GCs 或者血清刺激后,SGK 的转录水平在30 min 内即迅速升高。大量研究显示,SGK 是多种细胞信号转导通路上的一个交汇点,参与离子通道调节、学习记忆、细胞增殖及细胞存活等多种生理功能^[2-5]。SGK mRNA 和蛋白在大鼠海马神经元上均有表达。Ma 等^[3]利用 SGK 不同的突变体证实,SGK 可以易化大鼠海马 CA1 区神经元长时程增强的表达,并上调突触后致密物-95(postsynaptic density-95, PSD-95)水平,提示 SGK 可能参与突触效率及可塑性的调节。Boehmer 等^[6]研究显示,SGK 可以上调谷氨酸转运体的表达,并清除细胞外蓄积的谷氨酸,提示 SGK 可能具有神经保护作用。近期 Yang 等^[7]还证实,SGK 能够通过促使微管解聚来调节海马神经元突起的发育。总之,SGK 参与了中枢神经系统众多的生理和病理过程,并对海马功能的调节有着复杂且重要作用。

GCs 能明显诱导 SGK 基因的转录,并影响其在细胞内的定位。此外,众多激素,如促卵泡激素、醛固酮等,以及多种应激刺激等也能显著地影响 SGK 的表达^[8-9]。但目前有关孕期母体接触 GCs 是否对子代海马 SGK 表达产生影响尚未见报道。本实验主要研究孕期接触 GCs 的 SD 大鼠子代在出生后不同时间海马组织 SGK mRNA 水平的变化情况,并初步探讨其可能机制,以进一步认识 GCs 对海马的印痕效应。

1 材料和方法

1.1 原代培养大鼠海马神经元 出生24 h 内的 SD 大鼠10 只,以75%乙醇消毒皮肤后断头、取脑,用显微解剖器械夹取双侧海马,置于解剖液中,剔除多余脑组织并剪碎。加入1 ml 0.25%胰蛋白酶,放置在37℃、体积分数为5%CO₂细胞培养箱中,消化15~20 min;将消化后的组织块和消化液一起移入15 ml 离心管中,加入完全培养液3 ml 终止消化5 min,待组织块下沉至管底,弃去上清;加入完全培养

液3 ml 清洗5 min,弃去上清;加入完全培养液3 ml,玻璃吸管吹打20次,将离心管倾斜静置5 min;吸取上层细胞悬液至另一离心管,以完全培养液稀释成(5~10)×10⁵/ml 的细胞悬液,接种于经0.1%多聚赖氨酸包被过的玻片或细胞培养板中,将培养板置于37℃、体积分数为5%CO₂细胞培养箱内培养;接种24 h 后,去除完全培养液,改加B27无血清培养基,以后每3 d 换液。培养至第7日的海马神经元给予10⁻⁷ mol/L 地塞米松处理24 h,随后加入1 ml TRIzol, -80℃保存。

1.2 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℃,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。孕鼠随机分为地塞米松组和对照组,每组10只。为模拟糖皮质激素在临床控制早产中的应用,实验中我们在大鼠妊娠晚期开始给药,以探索母体妊娠晚期接触糖皮质激素对胎儿的影响。给药方法:受孕后第14日(大鼠妊娠时程21 d)起开始给地塞米松孕鼠皮下注射地塞米松0.1 mg/(kg·d)直至分娩,对照组则注射等量生理盐水。孕鼠分娩后,随机取出1/3子代大鼠,用精确度为千分之一的天平称量体质量后,断头取海马,于5 ml 离心管中以1 ml TRIzol 匀浆后, -80℃保存;剩余子代大鼠生长至7 d 时,再随机选出1/3称质量,取海马组织匀浆冻存;最后剩余的子代大鼠雌雄分开,饲养至42 d,称质量,海马组织匀浆冻存。

1.3 RNA 提取和逆转录 PCR 在 TRIzol 中的海马神经元和海马组织,按 Invitrogen 公司 TRIzol Reagent 说明书流程提取总 RNA,并用紫外分光光度计测定样本中 RNA 浓度。取2 μg 总 RNA,加入1 μg Oligo(dT),70℃ 5 min 后立即冰浴,并加入5×扩增缓冲液、dNTPs、RNA 酶抑制剂、逆转录酶和 DEPC 水,42℃ 1 h,72℃ 10 min 逆转录成 cDNA。

1.4 荧光实时定量 PCR 针对大鼠 β-actin、GR、SGK 基因序列,利用 PrimerPremier5.0 软件设计引物。以 SYBR Green 作荧光标记染料,应用 RG-3000 荧光实时定量 PCR 仪,进行 PCR 扩增。采用浓度递增的 cDNA 作为相对已知浓度的标准品,应用 Roter-gene6.0 软件绘制标准曲线,用标准曲线法定量样本中特异 cDNA 的相对浓度,用 β-actin 与目的基因的相对 cDNA 浓度比值反映目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.5 统计学处理 本实验所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差别用单因素方差分析(one-way ANO-

VA) 进行统计, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 地塞米松诱导原代培养海马神经元 SGK mRNA 表达 给予地塞米松处理 24 h, 结果显示 10^{-7} mol/L 地塞米松可诱导原代培养大鼠海马神经元 SGK mRNA 表达增加至对照的 3 倍以上 ($n=5$, $P < 0.05$)。

2.2 妊娠晚期过多接触糖皮质激素对子代大鼠体质量的影响 妊娠 14 d 给予地塞米松处理的 SD 大鼠, 在妊娠时间和产仔数目上与对照组无明显差异。地塞米松组新生 1 d 的大鼠体质量为 (5.28 ± 0.71) g, 比对照组减少 13.1% ($P < 0.05$, $n=33$); 而地塞米松组子代大鼠在出生后生长速度明显加快, 在出生第 7 日起, 体质量与对照组无统计学差异(表 1)。

表 1 地塞米松对子代大鼠体质量的影响

Tab 1 Effect of dexamethasone on bodyweight of rat offsprings

Group	$(\bar{x} \pm s, mB/g)$		
	Day1 ($n=33$)	Day7 ($n=21$)	Day42 ($n=10$)
Control	6.08 ± 0.52	15.7 ± 1.59	157.3 ± 21.4
Dexamethasone	$5.28 \pm 0.71^*$	14.6 ± 2.84	153.2 ± 25.3

* $P < 0.05$ vs control group

2.3 妊娠晚期过多接触糖皮质激素对子代大鼠海马 SGK 和 GR mRNA 表达的影响 荧光实时定量 PCR 结果显示, 地塞米松组子代大鼠海马 SGK mRNA 表达比对照组明显减少, 出生第 1、7、42 日时分别降低 28.3%、35.2%、24.2% ($n=6$, 图 1A)。地塞米松组子代大鼠海马 GR mRNA 表达比对照组明显减少, 出生第 1、7、42 日时分别降低 27.8%、28.2%、27.8% ($n=6$, 图 1B)。

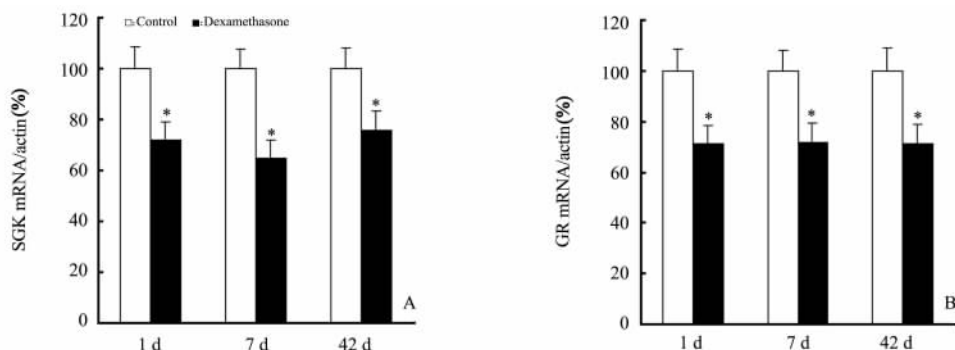


图 1 地塞米松对子代大鼠海马 SGK mRNA(A) 和 GR mRNA(B) 表达的影响

Fig 1 Effect of dexamethasone on hippocampus SGK mRNA (A) and GR mRNA(B) expression in rat offsprings

* $P < 0.05$ vs control group; $n=6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

体质量是胎儿生长发育情况的重要指标。O'Regan 等^[10]发现, 给予妊娠晚期的 Wistar 大鼠注射地塞米松, 其子代出生时体质量比对照组减轻 14%。我们在妊娠晚期 SD 大鼠上同样证实, 给予 GCs 处理后, 其子代体质量在出生第 1 日明显低于对照组, 提示妊娠末期母体环境中过高的 GCs 可能抑制了胎儿的生长发育。Fernandez-Cancio 等^[11]认为, GCs 能够调节胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 的表达, 而后者对胎儿生长至关重要, 但 GCs 是否通过 IGF 系统减少子代大鼠体质量, 尚有待进一步研究。我们的实验结果还显示, 地塞米松组子代生长至第 7 日时, 其体质量与对照组无明显差异, 提示该组子代大鼠出现了“追赶性生

长”, 但其原因及远期影响尚不清楚。

前面提到, SGK 在中枢神经系统中具有十分重要的作用, 其作为多种受体胞内信号转导通路上的一个的交汇点, 主要有 3 种调节方式: 快速基因转录调节、磷酸化酶活性调节和细胞内定位调节。Webster 等^[12]发现, 地塞米松 (10^{-6} mol/L) 作用 30 min 后, 大鼠乳腺癌细胞 SGK mRNA 表达比对照组增加 2 倍, 在蛋白合成抑制剂放线菌酮存在的情况下, 地塞米松的诱导作用仍然存在, 说明 GCs 对 SGK 的诱导作用并不依赖新蛋白合成的直接作用。此外, 血清醛固酮、黄体生成素、促卵泡激素、 β -转化生长因子、渗透压、神经损伤等多种因素也可以诱导 SGK 基因转录。本实验中, 我们在原代培养的大鼠海马神经元上再次证实, GCs 可以诱导 SGK mRNA 表达增加。而与离体结果不同, 妊娠晚期 SD 大鼠

接触地塞米松后其子代海马组织中 SGK mRNA 的表达较对照组明显减少,考虑在体环境十分复杂,孕期母体接触 GCs 可能产生了多方面的效应,例如影响 SGK 其他调节因子的表达,并最终导致海马组织中 SGK mRNA 水平降低。

GCs 受体有两种类型:盐皮质激素受体(MR)和糖皮质激素受体(GR)。这两型受体广泛分布于海马,参与了海马对 HPA 轴的调节,神经元突触的发育和可塑性等重要生理功能。Maiyar 等^[13]证实,地塞米松可通过结合胞质中的 GR 作用于 SGK 启动子上的糖皮质激素反应元件(glucocorticoid responsive element, GRE),进而发挥对 SGK 表达的调节作用。因此我们希望了解孕期母体接触 GCs 后子代 SGK mRNA 的低表达是否与其 GR 水平有关。结果显示,与 SGK mRNA 表达类似,地塞米松组子代海马 GR mRNA 水平也较对照组明显降低,与文献报道一致。以上结果提示,SGK mRNA 表达减少可能与其 GR 的低水平有关,但是否是由于 GR 的低表达进而抑制了海马 SGK mRNA 水平尚不清楚。Shoener 等^[14]还发现大鼠妊娠晚期注射 GCs 也可下调子代海马 MR 的表达,这是否是导致 SGK 表达下降的另一原因,仍需进一步研究。

综上所述,本研究发现母体大鼠在妊娠晚期注射 GCs 能下调子代海马 SGK 和 GR mRNA 表达,并至少持续到出生后第 42 日。至于该效应可能的原因,在 GCs 对海马印痕效应中的作用,以及远期生物学效应还有待进一步探索。

[参考文献]

- [1] Seckl J R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming [J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(Suppl 3): U49-U62.
- [2] Fejes-Tóth G, Frindt G, Náray-Fejes-Tóth A, Palmer L G. Epithelial Na⁺ channel activation and processing in mice lacking SGK1 [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294: F1298-F1305.
- [3] Ma Y L, Tsai M C, Hsu W L, Lee E H. SGK protein kinase facilitates the expression of long-term potentiation in hippocampal neurons [J]. *Learn Mem*, 2006, 13: 114-118.
- [4] Shanmugam I, Cheng G, Terranova P F, Thrasher J B, Thomas C P, Li B. Serum/glucocorticoid-induced protein kinase-1 facilitates androgen receptor-dependent cell survival [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14: 2085-2094.
- [5] Tsai K J, Chen S K, Ma Y L, Hsu W L, Lee E H. Sgk, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 3990-3995.
- [6] Boehmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Schniepp R, Amara S, Lang F. Posttranslational regulation of EAAT2 function by coexpressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases [J]. *J Neurochem*, 2006, 97: 911-921.
- [7] Yang Y C, Lin C H, Lee E H. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) increases neurite formation through microtubule depolymerization by SGK1 and by SGK1 phosphorylation of tau [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 8357-8370.
- [8] Coletta D K, Balas B, Chavez A O, Baig M, Abdul-Ghani M, Kashyap S R, et al. Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle *in vivo* [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294: E910-E917.
- [9] Nishida Y, Nagata T, Takahashi Y, Sugahara-Kobayashi M, Murata A, Asai S. Alteration of serum/glucocorticoid regulated kinase-1 (sgk-1) gene expression in rat hippocampus after transient global ischemia [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 123: 121-125.
- [10] O'Regan D, Kenyon C J, Seckl J R, Holmes M C. Prenatal dexamethasone 'programmes' hypotension, but stress-induced hypertension in adult offspring [J]. *J Endocrinol*, 2008, 196: 343-352.
- [11] Fernandez-Cancio M, Esteban C, Carrascosa A, Toran N, Andalu P, Audi L. IGF- I and not IGF- II expression is regulated by glucocorticoids in human fetal epiphyseal chondrocytes [J/OL]. *Growth Horm IGF Res* [2008-05-30].
- [12] Webster M K, Goya L, Ge Y, Maiyar A C, Firestone G L. Characterization of SGK, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 2031-2040.
- [13] Maiyar A C, Phu P T, Huang A J, Firestone G L. Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response element within the serum/glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) gene promoter by the p53 tumor suppressor protein [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11: 312-329.
- [14] Shoener J A, Baig R, Page K C. Prenatal exposure to dexamethasone alters hippocampal drive on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult male rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290: R1366-R1373.

[本文编辑] 尹 茶