

妊娠期糖尿病患者脂肪组织 ER α 表达水平对胰岛素抵抗的影响

徐 宁 张 薇

摘 要 **目的** 通过临床样本和体外实验,研究脂肪组织雌激素受体表达情况与胰岛素抵抗的相关性以及可能的作用机制。**方法** 选择 2016 年 1 月~2017 年 3 月在杭州市第一人民医院产检并行择期剖宫产的孕妇为研究对象,其中 40 例妊娠期糖尿病患者为 GDM 组,同期 41 例正常妊娠孕妇作为对照组,于剖宫产手术时收集所有患者皮下、腹膜外及大网膜部位的脂肪组织各两小块,RT-PCR 法检测脂肪组织 ER α RNA 的表达,Western blot 法检测 ER α 蛋白的表达水平。将 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞,给予不同浓度 17 β -雌二醇(0、0.1、1、10、100nmol/L)刺激,RT-PCR 法测定 ER α 和 GLUT4 在成熟脂肪细胞 RNA 的表达水平,Western blot 法检测其在蛋白水平的表达。高浓度 17 β -雌二醇刺激后 Western blot 法检测 MAPK 通路 JNK、ERK1/2、P38 活性,PI $_3$ K/Akt 信号通路 PI $_3$ K、Akt 活性。**结果** GDM 患者组 E $_2$ 水平、HOME-IR 明显高于正常妊娠组,差异有统计学意义($P=0.000$)。GDM 患者皮下、腹膜外及大网膜 3 处脂肪组织中,雌激素受体 α 在 RNA 和蛋白的表达水平均明显低于正常妊娠患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。随着 17 β -雌二醇浓度的升高,雌激素受体 α 不论在 RNA 水平还是在蛋白水平,其表达均逐步受到抑制,并且在 10nmol/L 浓度下,雌激素受体 α 表达水平达到最低,差异有统计学意义($P<0.05$),GLUT4 的表达情况与 ER α 相似。**结论** 妊娠期高雌激素水平导致脂肪组织雌激素受体 α 水平的下降与胰岛素抵抗的发生密切相关。ER α 可能通过抑制 PI $_3$ K/Akt 通路和激活 JUN 通路,加剧了胰岛素抵抗的发生。

关键词 ER α 雌激素受体 胰岛素抵抗 信号通路

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.11.025

Effect of ER α Expression in Adipose Tissue of Gestational Diabetes Mellitus on Insulin Resistance. Xu Ning, Zhang Wei. Department of Obstetric, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To study the relationship between estrogen receptor expression in adipose tissue and insulin resistance, and its possible mechanism. **Methods** From January 2016 to March 2017, 40 pregnant women with gestational diabetes mellitus (GDM) were selected as GDM group and 41 normal pregnant women as control group. Subcutaneous, extraperitoneal and greater omentum adipose tissues were collected at the time of caesarean section. The expression of ER α RNA in adipose tissue was detected by RT-PCR and the expression of ER α protein was detected by Western blot. 3T3-L1 were induced differentiation into mature adipocytes and stimulated with 17 β -estradiol at different concentrations(0, 0.1, 1, 10, 100nmol/L). The expression of ER α and GLUT4 in mature adipocytes was measured by RT-PCR method. The protein expression level was detected by Western blot. The activity of JNK, ERK1/2, P38 in MAPK pathway and PI $_3$ K, Akt activity in PI $_3$ K/Akt pathway were detected by Western blot method after high concentration 17 β -estradiol stimulation. **Results** The level of E $_2$ and HOME-IR in GDM group were significantly higher than those in normal pregnancy group ($P=0.000$). The expression of ER α in subcutaneous, extraperitoneal and omentum adipose tissues in GDM patients was significantly lower than that in normal pregnant women ($P<0.05$). With the increase of 17 β -estradiol concentration, the expression of ER α was gradually inhibited, and the expression of ER α reached the lowest level at the concentration of 10nmol/L. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of GLUT4 was similar to that of ER α . **Conclusion** The decrease of ER α level in adipose tissue induced by high estrogen level during pregnancy is closely related to the occurrence of insulin resistance. ER α may aggravate the occurrence of insulin resistance by inhibiting PI $_3$ K/Akt pathway and activating JUN pathway.

Key words ER α ; Estrogen receptor; Insulin resistance; Signaling pathway

基金项目:浙江省杭州市卫生科技计划医学重点专科专病项目 (20150733Q03)

作者单位:310006 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院

通讯作者:张薇,电子邮箱:zhangwei_hz1983@163.com

胰岛素抵抗是妊娠期糖尿病的主要发病原因之一。目前认为妊娠期出现胰岛素抵抗与胎盘分泌的多种激素有关。其中与雌激素的关系尤为密切,雌激素可通过与受体结合降低脂肪与肌肉组织葡萄糖转

运蛋白 4 (GLUT4) 的表达,降低胰岛素敏感度。另外,雌激素受体本身也可调节细胞膜 GLUT4 的水平,从而参与妊娠引起的胰岛素抵抗以及妊娠期糖尿病^[1]。脂肪组织是发生胰岛素抵抗的主要场所之一^[2]。研究显示,脂肪组织的分布情况会对胰岛素抵抗产生影响,妊娠期间由于雌激素水平的改变以及能量的过多摄入,会改变体内脂肪组织的分布,笔者试图通过对晚期妊娠期糖尿病患者及正常妊娠者脂肪组织雌激素受体表达情况的研究,探究其与胰岛素抵抗的相关性以及可能的作用机制。

对象与方法

1. 临床病例研究:病例选择:选择 2016 年 1 月 ~ 2017 年 3 月在杭州市第一人民医院产检并行择期剖宫产的孕妇为研究对象,其中 40 例妊娠期糖尿病患者为 GDM 组,患者平均年龄 32.05 ± 2.13 岁,平均分娩孕周 38.88 ± 1.20 周,同期 41 例正常妊娠孕妇作为对照组,平均年龄 31.25 ± 3.12 岁,平均分娩孕周 39.26 ± 1.02 周。GDM 诊断参照国际妊娠与糖尿病研究组织的标准,所有患者无产科合并症如妊娠期高血压、妊娠期肝内胆汁淤积症等,无内外科合并症如 2 型糖尿病、甲状腺功能减退或亢进、非药物依赖、无胎儿先天异常、无吸烟史、非借助辅助生殖技术以及非多胎妊娠。记录患者剖宫产分娩前身高、体重、宫高、腹围以及孕前体重。于手术前抽取空腹静脉血,电化学发光免疫法测定血清雌二醇水平,己糖激酶法测定空腹血糖水平、直接化学发光法测定空腹胰岛素水平。按胰岛素抵抗稳态模型 (HOMA 模型) 计算胰岛素抵抗指数 ($HOMA-IR$) = 空腹血浆胰岛素 ($\mu U/ml$) $\times$ 空腹血浆葡萄糖 ($mmol/L$) / 22.5 评估胰岛素抵抗水平。于剖宫产手术时收集所有患者皮下、腹膜外及大网膜部位的脂肪组织各两小块,保存于 $-80^{\circ}C$ 冰箱。所有标本获取均得到患者的知情同意。

2. RT-PCR 法检测 GDM 组及正常妊娠组不同部位脂肪组织 ER α RNA 的表达:将收集的脂肪组织分为用 Trizol 裂解细胞,提取细胞总 RNA。然后测定 RNA 含量,并进行反转录成 cDNA。使用 primer 3 进行引物设计,ER α 上游引物为:5' - CTGCCAC-CCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC - 3',下游引物:5' - TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA - 3', β -actin 上游引物:5' - CATGTACGTTGCTATC-CAGGC - 3',下游引物:5' - CTCCTTAATGTCACG-CACGAT - 3',然后进行 RT-PCR,以 actin 为标准,将 CT 值进行比较之后得到的 ER α 表达。

3. Western blot 法检测 ER α 蛋白的表达水平:将收集的脂肪组织用含蛋白酶抑制剂的裂解液裂解细胞,提取总蛋白^[3]。BCA 法测定蛋白含量,配制上样蛋白。进行蛋白电泳,250mA 电流运行 2.5h 转膜转至 PVDF 膜,质量分数为 5% 脱脂牛奶封闭 1h。洗膜 3 次后,加入一抗,4 $^{\circ}C$ 孵育过夜。洗膜 3 次后,加入二抗,室温继续孵育 1h。最后加入化学发光辣根过氧化物酶 (HRP) 底物,于化学发光成像仪进行分析。使用 Quantity one (bio-rad) 软件量化相关条带的发光强度。

4. 3T3 - L1 前脂肪细胞培养和诱导分化^[4]: 3T3 - L1 前脂肪细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。取第 4 ~ 6 代的 3T3 - L1 前脂肪细胞进行实验。将其接种于 6 孔板,完全培养基 [高糖 DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司) 中添加质量分数为 10% 的 BSA、10U/L 青霉素和 10U/L 链霉素] 培养待细胞融合 2 天后,加含 0.5mmol/L 的异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX)、0.25 $\mu mol/L$ 地塞米松和 1mg/L 胰岛素的完全培养基 (诱导分化培养基 I) 培养 2 天后,用只含 1mg/L 胰岛素的完全培养基 (诱导分化培养基 II) 继续培养,每隔 2 天更换 1 次培养液,约 12 天到 14 天后,90% 以上细胞分化为成熟脂肪细胞,细胞体积增大,胞体变圆,胞质内脂滴明显。

5. RT-PCR 法测定 ER α 和 GLUT4 在成熟脂肪细胞 RNA 的表达水平,Western blot 法检测其在蛋白水平的表达:将分化成熟的脂肪细胞在含有 20ml/L 胎牛血清 (美国 Abcam 公司) 高糖 DMEM 中培养 6h,在成熟脂肪细胞中加入不同浓度的 17 β -雌二醇 (0、0.1、1、10、100nmol/L),培养 12h 后收集细胞,分别用 RT-PCR 法和 Western blot 法测定 ER α (美国 Abcam 公司) 和 GLUT4 的表达水平。

6. Western blot 法检测 MAPK 通路 JNK、ERK1/2、P38 活性:将 10nmol/L 浓度 17 β -雌二醇与成熟脂肪细胞共同孵育 12h 后,收集细胞,提取蛋白,用博士德 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后各取蛋白 50 μg 变性,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转移至硝酸纤维素膜,含有 5% 牛奶的 TBST 缓冲液封闭 1h, PVDF 膜与小鼠抗人 p-JNK (美国 CST 公司),兔抗人 p-ERK1/2 (美国 CST 公司),p-p38 单克隆抗体 (美国 CST 公司,1:1000) 4 $^{\circ}C$ 下孵育过夜, TBST 15min 漂洗 3 次,加入羊抗鼠 (武汉博士德公司),羊抗兔二抗 (武汉博士德公司,1:1000) 室温下孵育 1h, TBST 15min 漂洗 3 次,使用 ImmobilonTM Western

Chemiluminescent HRP Substrate 显色剂显色,全自动凝胶成像分析仪器拍照。为校正总蛋白上样量一致,检测完上述磷酸化抗体后的膜以洗脱液(100mmol/L β -ME,2% SDS,62.5mmol/L Tris-HCL pH 值 6.7)于 50℃ 洗脱 30min,再用兔抗人 JNK,ERK1/2、p38 多克隆抗体(1:1000)检测总 JNK、ERK1/2、p38 作为内对照,测定杂交信号的吸光度,每组实验重复 3 次,p-JNK、p-ERK1/2、p-p38 代表被激活的 MAPK^[5]。同上方法检测 PI₃K/Akt 信号通路 PI₃K、Akt 活性。

7. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计分析,数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用完全随机单因素方差分析;两两比较采用 *q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. GDM 患者组与正常妊娠孕妇组一般资料比较:GDM 患者组 E₂ 水平、HOME-IR 明显高于正常妊娠组,差异有统计学意义(*P* = 0.000),两组孕妇年龄、孕周、孕前体重指数(pre-BMI)、宫高比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05),详见表 1。

表 1 一般资料			
指标	正常妊娠组	GDM 组	<i>P</i>
年龄(岁)	31.25 ± 3.12	32.05 ± 2.13	0.220
孕周(周)	39.26 ± 1.02	38.88 ± 1.20	0.650
pre-BMI(kg/m ²)	24.76 ± 4.43	25.42 ± 4.86	0.060
宫高(cm)	33.13 ± 1.67	34.23 ± 1.85	0.060
E ₂ (pg/ml)	6.11 ± 3.78	22.91 ± 8.98	0.000
HOME-IR	2.97 ± 1.29	4.34 ± 1.37	0.000

2. GDM 患者组及正常妊娠组不同部位脂肪组织雌激素受体 α 的表达情况:GDM 患者皮下、腹膜外及大网膜 3 处脂肪组织中,雌激素受体 α 在 RNA 和蛋白的表达水平均明显低于正常妊娠者,且差异有统计学意义(*P* < 0.05),详见图 1、图 2。

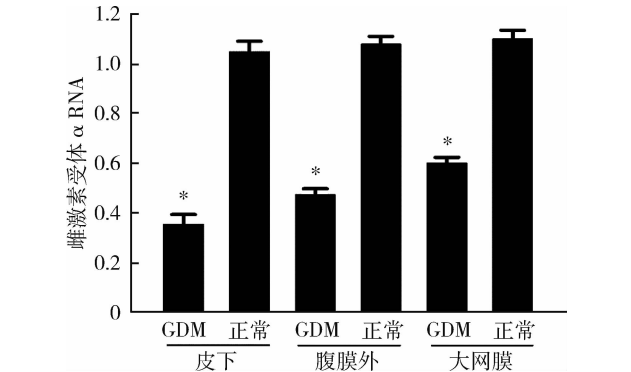


图 1 雌激素受体 α 在 RNA 水平的表达
与正常妊娠组比较,**P* < 0.05

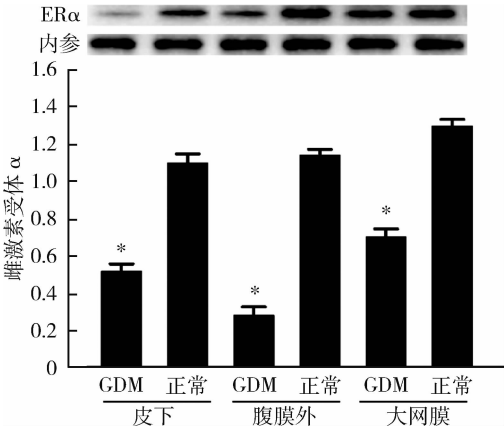


图 2 雌激素受体 α 在蛋白水平的表达
与正常妊娠组比较,**P* < 0.05

3. 不同浓度 17β-雌二醇处理后成熟脂肪细胞雌激素受体 α 及 GLUT4 的表达情况:随着 17β-雌二醇浓度的升高,雌激素受体 α 不论在 RNA 水平还是在蛋白水平,其表达均逐步受到抑制,并且在 10nmol/L 浓度下,雌激素受体 α 表达水平达到最低,差异有统计学意义(*P* < 0.05),详见图 3、图 4。GLUT4 的表达情况与 ERα 相似,也在 10nmol/L 浓度时表达水平最低,差异有统计学意义(*P* < 0.05),详见图 5、图 6。

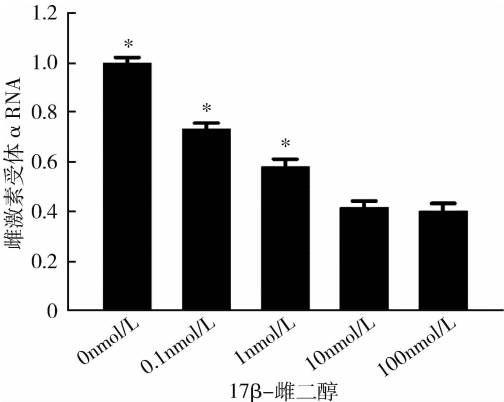


图 3 不同浓度 17β-雌二醇刺激下雌激素受体 α 在 RNA 水平的表达
与 10nmol/L 比较,**P* < 0.05

4. 高浓度 17β-雌二醇刺激下胰岛素信号通路(PI₃K/Akt 和 MAPK)的表达情况:在 10nmol/L 浓度的 17β-雌二醇刺激下,脂肪细胞 PI₃K/Akt 信号通路的 PI₃K 和 p-Akt 的蛋白表达量均下调,MAPK 通路的 p-Erk、p-MAPK 和 p-p38 的蛋白表达量下调,而 p-JNK 的蛋白表达量上调(图 7)。

讨 论

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus

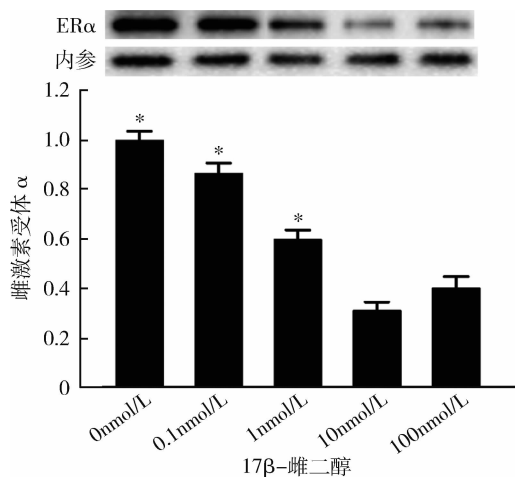


图4 不同浓度 17β-雌二醇刺激下雌激素受体 α 在蛋白水平的表达
与 10nmol/L 比较, * $P < 0.05$

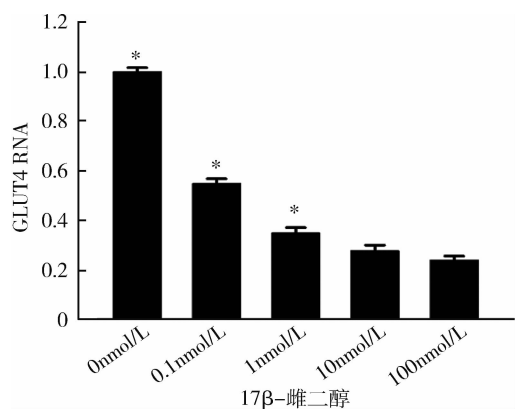


图5 不同浓度 17β-雌二醇刺激下 GLUT4 在 RNA 水平的表达
与 10nmol/L 比较, * $P < 0.05$

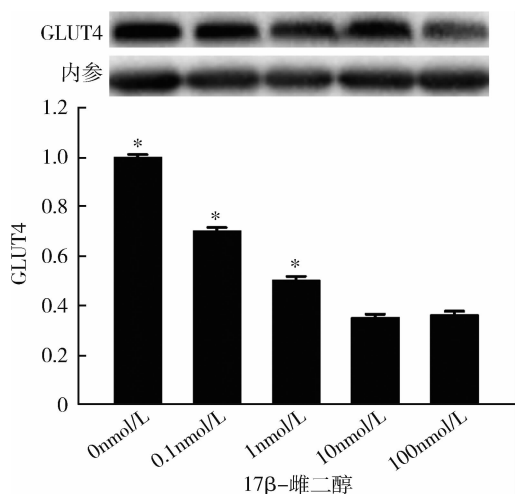


图6 不同浓度 17β-雌二醇刺激下 GLUT4 在蛋白水平的表达
与 10nmol/L 比较, * $P < 0.05$

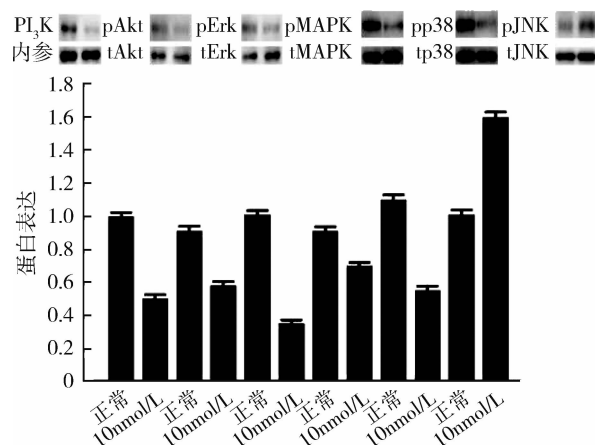


图7 高浓度 17β-雌二醇刺激下 PI₃K/Akt 和 MAPK 信号通路表达情况

GDM)是指妊娠期间发生的糖代谢异常,与孕期胰岛素抵抗和分泌相对不足密切相关^[6]。其发生率世界各国报道为1%~14%。我国GDM的发生率也呈逐年上升趋势。妊娠期是女性漫长的人生过程中的特殊时期。妊娠期间为了适应胎儿的生长,激素和代谢环境会发生明显的改变,胎盘分泌的多种激素在维持妊娠的同时,可增加胰岛素抵抗,使胰岛素的靶组织对胰岛素的敏感度降低,从而使无糖尿病者发生妊娠期糖尿病(GDM),隐性糖尿病呈显性或原有糖尿病的患者病情加重。除了肝脏和骨骼肌,胰岛素信号途径在脂肪组织葡萄糖代谢中同样起重要作用,并且有越来越多的研究证实,脂肪组织才是胰岛素抵抗产生的始发部位^[7]。

雌激素是女性生殖系统中最重要的一类固醇激素之一,在调节人体代谢中发挥了重要作用^[8]。妊娠期间女性雌激素水平可显著升高,与受体(estrogen receptor, ER)结合后,可介导经典的信号转导途径,产生过度肥胖、胰岛素抵抗等多种雌激素效应^[9]。本研究也显示 GDM 组不但雌激素水平显著高于正常妊娠组,胰岛素抵抗的严重程度也显著高于正常妊娠组,表明 GDM 患者胎盘会分泌更多的雌激素,也证实高雌激素水平与胰岛素抵抗之间密切相关。

雌激素核受体(ER)是核受体超家族的成员之一,ERα 和 ERβ 是其中主要的两种亚型,两者由不同基因编码,从而在生物学特性上体现出许多差异^[10]。ERα 在调节脂质代谢中发挥重要作用,动物研究实验证实雌激素对葡萄糖代谢的调节作用主要由 ERα 介导,并且与妊娠期胰岛素敏感度改变和糖耐量异常

相关^[11]。ER α 主要分布于雌二醇作用的经典靶组织,包括脂肪组织。妊娠期间充足的营养摄入,以及胎盘分泌多种激素的调控,使得孕妇体内脂肪组织的数量和分布产生明显的改变,不论是皮下脂肪还是内脏脂肪,含量均会明显升高,由此导致的 ER α 在脂肪组织的表达水平也会发生变化。本研究显示,GDM 患者皮下、腹膜外及大网膜 3 处脂肪组织中,雌激素受体 α 在 RNA 和蛋白的表达水平均明显低于正常妊娠患者,表明高浓度的雌激素水平会抑制脂肪组织 ER α 的表达,并与胰岛素抵抗的发生密切相关,这与雌激素可导致 GLUT4 以雌激素受体依赖的方式转移到质膜上,从而降低组织中雌激素受体与 GLUT4 的表达有关^[12]。

脂肪细胞占脂肪组织的 1/3 ~ 1/2,笔者将 3T3-L1 前脂肪细胞株培养分化为成熟脂肪细胞,并给予不同浓度的 17 β -雌二醇,发现随着 17 β -雌二醇浓度的升高,雌激素受体 α 不论在 RNA 水平还是在蛋白水平,其表达均逐步受到抑制,并且在 10nmol/L 浓度下,雌激素受体 α 表达水平达到最低,而 GLUT4 的表达情况与 ER α 相似,进一步证实了高浓度的雌激素水平会抑制雌激素受体 α 在脂肪细胞的表达。研究表明葡萄糖转运体 (GLUT) 在胰岛素作用下可以运动到细胞膜上吸收血液中的葡萄糖,GLUT4 是脂肪组织对葡萄糖摄取过程中一个重要的调节因子,GLUT4 表达受抑制,表明脂肪组织对胰岛素的敏感度降低,胰岛素抵抗加重^[13]。在成熟脂肪细胞中,高能浓度 17 β -雌二醇刺激下,GLUT4 与雌激素受体 α 表达同步受抑制,也证明了雌激素受体 α 表达与胰岛素抵抗的发生密切相关。

目前已知的胰岛素信号通路主要有 PI $_3$ K/Akt 通路和 ERK/MAPK 通路^[14]。二磷酸磷脂酰肌醇在 PI $_3$ K 催化下转化为三磷酸磷脂酰肌醇,激活的 PI $_3$ K/Akt 能够促使 GLUT4 从胞质转位至胞膜,同时细胞外的葡萄糖经由胞膜上的 GLUT4 转运至细胞内,因此这一通路的活化增加了细胞对葡萄糖的摄取,如果上述信号通路转导过程发生障碍,将导致脂肪组织发生胰岛素抵抗^[15]。笔者进一步研究了高浓度 17 β -雌二醇作用下,对成熟脂肪细胞 PI $_3$ K/Akt 信号通路的影响,发现其在抑制 ER α 表达的同时,抑制 PI $_3$ K/Akt 信号通路,故而推测 ER α 可能通过抑制 PI $_3$ K/Akt 信号通路,加剧了胰岛素抵抗。笔者也观察到 ER α 对 MAPK 通路的影响表现为下游 p-Erk、p-MAPK 和 p-p38 的蛋白表达量下调,而 p-JNK 的蛋白表达量

上调,表明 ER α 可能通过激活 JNK 通路而对胰岛素抵抗产生影响。

综上所述,脂肪组织 ER α 的表达水平与胰岛素抵抗密切相关,并且可能通过抑制 PI $_3$ K/Akt 信号通路和激活 JNK 通路从而对胰岛素抵抗产生影响。

参考文献

- Shi ZH, Zhao C, Guo XR, *et al.* Differential expression of MicroRNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a Regulator of ER α expression in estrogen-induced insulin resistance[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(5):1982-1990
- Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, *et al.* Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(9):1847-1856
- 陈能,周玲美,徐加英,等.亮氨酸对人脂肪组织培养的脂解影响[J].*营养学报*,2015,37(6):614-615
- 罗新新,朱水兰,黎宇,等.3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立、优化及分子指标鉴定[J].*中药新药与临床药理*,2018,29(2):225-231
- 张薇,许嵩,张治芬. M-CSF 对卵泡颗粒细胞功能调节及其分子机制[J].*医学研究杂志*,2016,45(1):100-105
- 郝丽萍,杨明鲜. 妊娠期糖尿病的相关危险因素分析及其对母婴结局的影响[J].*中国妇幼保健*,2019,34(4):476-478
- Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaption[J]. *Lipid Res*, 2007, 48(6):1253-1262
- Rettberg JR, Jia Y, Brinton RD. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2014, 35(1):8-30
- Kleiblova P, Dostalova I, Bartlova M, *et al.* Expression of adipokines and estrogen receptors in adipose tissue and placenta of patients with gestational diabetes mellitus[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 34:150-156
- 苗知春,罗志勇. 雌激素受体信号转导的研究[J].*生命的化学*, 2010,30(6):854-859
- Van Sinderen ML, Steinberg GR, Jorgensen SB, *et al.* Effects of estrogens on adipokines and glucose homeostasis in female aromatase knockout mice[J]. *J Mol Med*, 2005, 83(6):457-467
- Garrido P, Morian J, Alonso A, *et al.* 17 β -Estradiol activates glucose uptake via GLUT4 translocation and PI $_3$ K/Akt signaling pathway in MCF-7 cells[J]. *Endocrinology*, 2013, 154:1979-1989
- 赵平,熊明睿,杨新洲,等. 调节 GLUT4 转位化合物及相关的信号通路的研究进展[J].*生命的化学*,2017,37(3):361-366
- 苏健,苏恒. 脂肪细胞分化过程中 MAPK 信号通路的调控机制[J].*生命的化学*,2016,36(2):252-256
- 刘萍,农晰婷,刘晓霞,等. Vaspin 通过胰岛素信号通路改善地塞米松诱导的 3T3-L1 脂肪细胞的胰岛素抵抗[J].*西安交通大学学报:医学版*,2018,39(2):366-370

(收稿日期:2019-02-24)

(修回日期:2019-03-18)