

仓鼠妊娠期瘦素分泌及其调节机制

王诚^{①②} 杨利国^{①①} Gen Watanabe^③ Kazuyoshi Taya^③

(^①南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; ^②厦门大学生命科学学院, 厦门 361005; ^③Laboratory of Veterinary Physiology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509, Japan. E-mail: wangch@njau.edu.cn)

摘要 对妊娠期瘦素的分泌及其调节机制进行探讨. 将100只3月龄雌性金黄仓鼠分成16组, 每组6~7只, 每天采血样用于测定其妊娠期的瘦素分泌. 实验结果表明, 瘦素于妊娠第9天开始显著升高, 于妊娠第12天达到高峰. 为验证不同生殖阶段的血清是否对瘦素分泌有不同影响, 将不同生殖阶段抽提与未抽提类固醇激素的血清加入培养液中进行培养, 发现动情期及妊娠期的血清均可刺激体外培养的脂肪细胞瘦素分泌, 动情期抽提与未抽提类固醇激素的血清对脂肪细胞瘦素分泌的刺激作用没有显著差异($P > 0.05$). 与动情期血清相比, 妊娠中后期未抽提类固醇激素的血清显著刺激脂肪细胞瘦素分泌($P < 0.01$). 但妊娠中后期的血清在抽提类固醇激素后对瘦素分泌的刺激作用显著下降, 与动情期的血清对瘦素分泌的刺激作用已没有显著差异($P > 0.05$). 妊娠不同阶段未抽提类固醇激素的血清对瘦素分泌的刺激作用有很大差异, 妊娠第15天的血清对瘦素分泌的刺激作用显著高于妊娠第8天($P < 0.0001$)和妊娠第12天($P < 0.001$)的血清. 体外研究进一步表明, 肾上腺皮质激素、孕酮以及胰岛素均能刺激瘦素分泌, 而雌激素却能抑制体外瘦素分泌. 研究结果提示, 妊娠期血液类固醇激素水平的上升是引起妊娠期瘦素峰出现的重要因素.

关键词 金黄仓鼠 妊娠期 瘦素 分泌 调节机制

瘦素(leptin)主要由白色脂肪细胞分泌, 是一种由167个氨基酸残基组成的多肽, 能通过负反馈方式调节机体的能量平衡. 体内瘦素浓度增高能够抑制摄食, 增加能量消耗, 使体重下降; 反之则增加摄食, 抑制能量消耗, 使体重上升^[1]. 正常情况下, 瘦素的浓度与体重呈强正相关^[2], 但在妊娠期, 血液中瘦素浓度不再与体重成正比. 在怀孕中期至后期的大鼠^[3,4]、小鼠^[5,6]、人^[7]和蝙蝠^[8], 血液中瘦素浓度迅速升高. 瘦素水平于妊娠期显著上升的调节机理至今不明. 虽然许多体内和体外实验报道了一些与妊娠相关的激素对瘦素分泌有调节作用, 但结果很不一致. 例如就雌激素而言, 一些研究表明, 雌激素对瘦素的分泌具有刺激作用^[9-11], 而另一些研究结果则相反^[12,13].

仓鼠是除大鼠和小鼠外应用最广的实验动物, 是研究内分泌和能量代谢最好的动物模型之一, 而且, 仓鼠妊娠期的瘦素分泌模式至今未见报道. 本实验以金黄色仓鼠为动物模型, 旨在探讨妊娠期瘦素的分泌及其内分泌调节机制.

1 材料与方 法

(i) 实验材料. I型胶原酶、孕酮、雌二醇、

胰岛素和地塞米松均购自美国Sigma公司; M199培养液购自美国Gibco公司; 小鼠瘦素测定试剂盒由Parlow博士(NIDDK, NIH, Bethesda, MD, USA)惠赠.

(ii) 实验动物. 取体重相差在10g以内的3月龄雌性金黄仓鼠100只, 分为16组, 饲养在恒温(25℃)、严格控制光照(L:D=14:10)的条件下, 自由采食颗粒饲料(Nisshin Petfood Inc, 日本), 自由饮水. 连续观察3个发情周期的阴道分泌物, 以确定发情周期的第1天. 于第4个发情周期中的发情前1d下午将雌鼠与有交配经验的雄鼠放于同一笼中, 于次日晨以阴道精子涂片上有无大量精子确定是否交配受孕, 并以该天作为妊娠第1天. 分娩当天定为泌乳第0天, 依次类推. 另选雌性3月龄处女鼠10只, 饲养条件同前, 用于提供脂肪细胞.

(iii) 样品采集. 妊娠期间, 每天上午11时用肝素钠处理过的采血管颈静脉采血. 血液于3000 r/min离心30 min. 收集血清, 冻存备用, 同体重的处女鼠于发情间期取脂肪细胞用于体外培养.

(iv) 脂肪细胞体外培养. 脂肪细胞培养方法参照Machinal^[11]的方法并做适当修改. 将雌性3月龄处

1) 现工作单位: 华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070

大鼠脂肪样品置于无菌的玻皿中迅速剪碎后移入 I 型胶原酶中消化 30 min; 加入 2 倍体积的冷 M199, 以终止酶解反应; 然后用 150 和 46 μm 的灭菌不锈钢网过滤, 所得大小均匀的细胞用 M199 洗 3~4 次后吸除培养液, 摇匀, 用血球计数板计数. 然后用微量加样器以 2×10^6 细胞/孔的浓度将细胞迅速移入事先加有 M199 的 24 孔培养板中, 于 37 C, 含 5%CO₂, 95% 空气的二氧化碳培养箱中培养. 为验证妊娠期的内分泌变化是否导致瘦素水平升高, 在体外用含有 20%(体积比)血清的 M199 培养液培养脂肪细胞, 血清分别采自处于间情期、妊娠第 8 天、第 12 天、第 15 天以及泌乳第 2 天的仓鼠. 为了解血清类固醇激素对瘦素分泌的影响, 将上述不同生理时期的血清置于冰水混合物上用乙醚抽提其中的类固醇激素, 再于低温下将抽提或未抽提的血清分别与 M199 培养液按照 1:4 的比例混匀, 用 0.22 μm 滤膜过滤后用于培养. 同时将含有 20% 上述不同生理时期血清但未加脂肪细胞的 M199 培养液也在同一条件下孵育, 以便在含有血清的脂肪细胞培养液测定瘦素水平后, 分析结果时去除血液中本身所含瘦素的干扰. 以无添加物的 M199 培养液培养的脂肪细胞作为对照组. 为证明与妊娠有关的激素, 如孕酮、雌激素、肾上腺皮质激素和胰岛素等对瘦素分泌有无直接作用, 将这些激素分别按不同的剂量梯度加入 M199 培养液中培养脂肪细胞, 观察其对瘦素分泌的影响. 所有脂肪细胞培养物均于 60 h 后取培养液冻存, 以用于检测瘦素浓度.

(v) 瘦素放射免疫测定. 血清及培养液中瘦素的水平用小鼠瘦素测定试剂盒进行测定.

(vi) 统计与分析. 采用 SPSS(10.01 正式版) 统计分析软件分析数据, 检测数据均以平均数 ± 标准差表示, 组间均数差异用 *t* 检验, 相关性用直线相关分析.

2 结果

2.1 妊娠期瘦素分泌

与妊娠前(对照组, 即图 1 中 C 组)相比, 瘦素水平从妊娠第 9 天开始显著升高($P < 0.05$), 于第 12 天达到高峰. 自第 13 天开始, 瘦素水平显著降低. 到第 14 天, 瘦素水平又显著上升($P < 0.05$). 妊娠第 15 天后瘦素水平一直保持下降趋势, 至泌乳第 2 天(即图 1

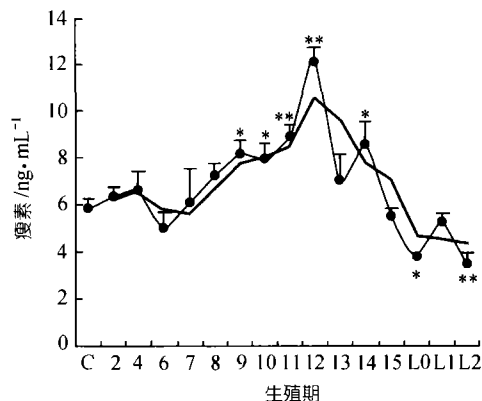


图 1 金黄仓鼠生殖期瘦素水平变化

C 示对照组, 2~15 示妊娠天数, L0~L2 示泌乳第 0~2 天. * 示 $P < 0.05$ (与 C 组相比差异显著), ** 示 $P < 0.01$. 粗线为模拟趋势线. 妊娠第 10 天组因 1 只未孕, 为 5 只动物血清瘦素浓度均值, 其余各点为 6~7 个动物血清瘦素浓度均值

中 L2 组)时, 血中瘦素已显著低于妊娠前的瘦素水平 ($P < 0.01$, 图 1).

2.2 脂肪细胞培养的时间依赖性曲线

为证明细胞的分泌活性, 从分离培养的脂肪细胞培养板中取出一块板(24 孔), 各孔以 12 h 间隔时间取样, 以 RIA 测定培养液中的瘦素浓度, 以每个取样点(时)24 个孔中浓度的均值作曲线, 结果表明, 培养液中的瘦素浓度呈现时间依赖性增长(图 2), 证明该法分离培养的细胞具有分泌活性.

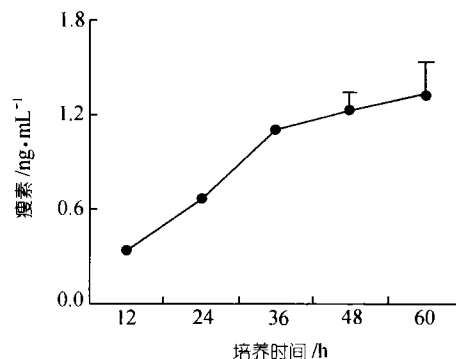


图 2 脂肪细胞瘦素分泌活性检测的时间依赖曲线

2.3 不同生殖时期的血清对瘦素分泌的影响

与空白对照(无任何添加物, 即图 3 中 con 组)相比, 无论间情期的血清(情期第 2 天, 即图 3 中 cyc 组)还是妊娠期的血清, 均可使脂肪细胞瘦素的分泌显

著升高($P < 0.001$), 这表明血清中含有对脂肪细胞瘦素分泌起刺激作用的物质. 间情期的血清, 无论抽提与未抽提类固醇激素, 对脂肪细胞瘦素分泌活动的作用效果没有显著差异($P > 0.05$); 与间情期末抽提类固醇激素的血清相比, 妊娠第8天(图3中P8组)未抽提类固醇激素的血清对脂肪细胞瘦素分泌有显著的刺激作用($P < 0.05$), 妊娠第12和第15天(图3中P12和P15组)极显著地刺激瘦素分泌($P < 0.01$ 和 $P < 0.0001$). 泌乳第2天(图3中L2组)未抽提类固醇激素的血清与间情期末抽提类固醇激素的血清对瘦素分泌的刺激作用无显著差异($P > 0.05$). 处于同一生殖阶段的血清, 间情期和泌乳第2天抽提与未抽提类固醇激素对瘦素分泌的刺激作用无差异($P > 0.05$). 但妊娠第8天未抽提类固醇激素的血清对瘦素分泌的刺激作用显著大于($P < 0.05$)同期抽提类固醇激素的血清对瘦素分泌的刺激作用, 妊娠第12和第15天极显著大于同期抽提类固醇激素的血清对瘦素分泌的刺激作用($P < 0.01$, $P < 0.0001$, 图3).

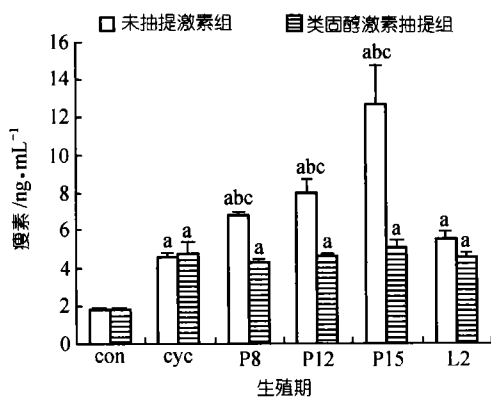


图3 不同生殖期的血清对体外培养脂肪细胞瘦素分泌的影响

以 $P < 0.05$ 为差异显著, a 示各组与无血清对照(con)组相比差异显著, b 示各组与孕前血清组(cyc)相比差异显著, c 示各组与同期抽提类固醇激素组相比差异显著

2.4 地塞米松对瘦素分泌的调节

地塞米松对瘦素分泌具有强烈的刺激作用. 3.125 nmol/L 的地塞米松使瘦素分泌水平显著上升($P < 0.0001$). 与对照组(0 nmol/L)相比, 瘦素的分泌增加了2.3倍; 12.5 nmol/L 的地塞米松使瘦素分泌增加了将近3倍(由 0.578 ± 0.012)上升到 1.576 ± 0.118 ng/mL, 图4).

2.5 孕酮对瘦素分泌的调节

孕酮是妊娠期的代表激素. 实验表明, 孕酮能刺

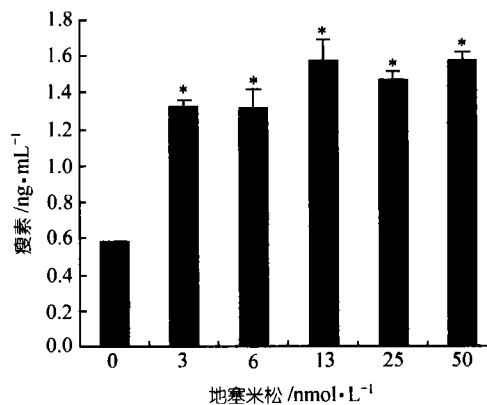


图4 地塞米松对体外培养脂肪细胞瘦素分泌的影响
* 示 $P < 0.01$ (与对照组相比差异显著)

激仓鼠体外培养的脂肪细胞瘦素分泌(图5). 与未添加孕酮的空白对照组(0 ng/mL)相比, 31.25 ng/mL 以上浓度的孕酮即可使体外培养的脂肪细胞瘦素分泌显著增高($P < 0.01$).

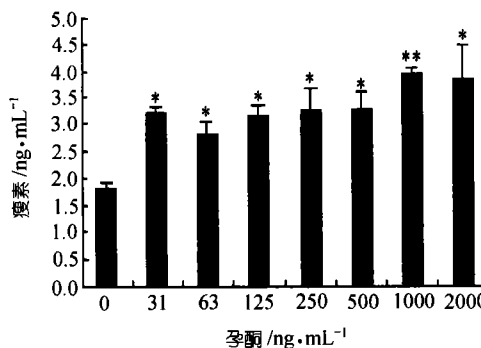


图5 孕酮对体外培养脂肪细胞瘦素分泌的影响
* 示与对照组相比差异显著, * 示 $P < 0.05$, ** 示 $P < 0.01$

2.6 雌激素对瘦素分泌的调节

雌激素对体外培养的正常金黄仓鼠脂肪细胞瘦素分泌有抑制作用(图6). 与对照组(0 nmol/L)相比, 6.25 nmol/L 雌二醇显著抑制体外瘦素的分泌($P < 0.05$). 但6.25, 12.5, 25和50 nmol/L 雌二醇对体外培养的脂肪细胞瘦素分泌活动的影响无显著差异($P > 0.05$).

2.7 胰岛素对瘦素分泌的影响

胰岛素对金黄仓鼠脂肪细胞体外瘦素分泌亦有强烈的刺激作用(图7). 浓度为3 μ g/mL 的胰岛素显著促进瘦素的分泌($P < 0.01$). 3和6 μ g/mL 的胰岛素对瘦素分泌的刺激作用无显著差异($P < 0.05$).

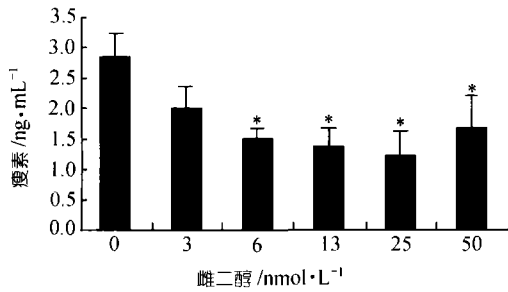


图 6 雌二醇对仓鼠体外瘦素分泌的影响
* 示 $P < 0.05$ (与对照组相比差异显著)

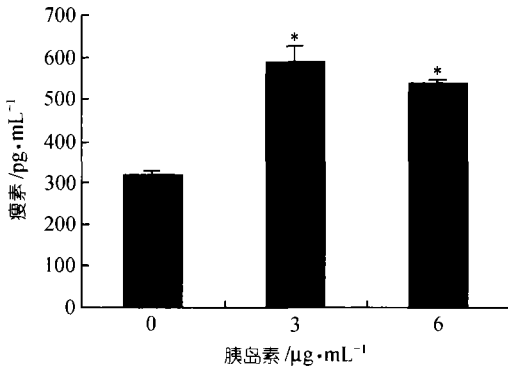


图 7 胰岛素对金黄仓鼠体外瘦素分泌的影响
* 示 $P < 0.01$ (与对照组相比差异显著)

3 讨论

最近, Horton 等人^[14]报道了金黄仓鼠正常发情周期中瘦素分泌有明显的昼夜节律, 但金黄仓鼠妊娠期的瘦素分泌模式至今未见报道. 本实验结果表明, 与灵长类和大、小鼠等啮齿类动物妊娠期瘦素分泌相似, 金黄仓鼠于妊娠期也存在瘦素分泌高峰. 从妊娠第 9 天开始瘦素分泌显著上升. 到妊娠第 12 天分泌活动达到高峰. 妊娠第 13 天时瘦素水平显著下降. 其后瘦素水平一直呈下降趋势直至泌乳早期. 金黄仓鼠妊娠期大约 15 天, 瘦素峰位于第 12 天; 小鼠妊娠期为 21 天, 瘦素峰位于第 17 天^[6]. 两者瘦素高峰出现时间在妊娠阶段上非常相似. 在人和其他动物, 妊娠中后期瘦素亦显著上升并于分娩前下降^[15]. 通过对更大样本数的血液分析后, 发现人类血液瘦素浓度下降是在分娩前相当长的一段时期就已经开始, 而不是正好在分娩这一时间点才开始下降^[15]. 这与我们的结论是相同的. 妊娠后期瘦素水平下降对于动物泌乳准备至关重要.

肥胖患者对于瘦素的作用不敏感, 即有所谓的瘦素抵抗. 瘦素抵抗的机理至今不明. 肥胖患者的瘦

素抵抗是目前瘦素难以应用于临床减肥的障碍, 而瘦素抵抗机理的阐明则是解决这一问题的关键. 如前所述, 人在妊娠中后期血中瘦素水平显著高于正常生理水平; 正常情况下, 这种高水平的瘦素应该抑制摄食, 增加能耗. 而 Wade 等人^[16]的实验表明, 金黄仓鼠在整个妊娠期间摄食量没有显著变化, 我们的摄食记录也验证了这一观点. 很明显, 妊娠期高水平的瘦素并未抑制动物的摄食活动, 可见妊娠期确实也存在着瘦素抵抗. 肥胖患者和妊娠中后期的动物均对于高水平的瘦素缺乏反应性, 表现型极相似, 因此, 妊娠期的瘦素抵抗很可能与肥胖患者的瘦素抵抗有着同样的机理. 如果真的如此, 那么妊娠期母体一些显著的生理变化很可能与瘦素抵抗的形成有关, 这些显著的生理变化, 特别是内分泌代谢上的显著变化, 可能会给瘦素抵抗发生机理的阐明提供非常重要的线索. 妊娠期的实验动物可能给我们提供了一个新的用于研究瘦素抵抗的良好动物模型.

关于妊娠期瘦素分泌上升的原因, 目前尚没有合理的解释. 研究表明, 人的胎盘对妊娠期的瘦素分泌峰出现起着重要的作用. 因为不论在体还是离体的实验都表明, 人的胎盘可以分泌较多量的瘦素^[7]. 但关于啮齿类动物的胎盘是否分泌瘦素这一问题目前尚有很大的争议. Kawai 等人^[3]的实验表明, 妊娠期间大鼠的胎盘组织没有瘦素 mRNA 的表达, 但其他的研究者则观察到了大鼠胎盘存在瘦素 mRNA^[4]. 小鼠的研究也同样有争议存在^[15, 17]. 我们对金黄仓鼠的实验表明, 胎盘确实可以分泌瘦素, 但量很少, 不足以促成妊娠期的瘦素分泌峰. 关于妊娠期内对瘦素分泌的调节, 目前也存在很大争论. 本研究中, 我们通过用采自不同生理时期、不同处理的血清培养脂肪细胞的方法, 直接证明妊娠后期的血液中含有大量刺激瘦素分泌的因子, 且主要是类固醇激素. 妊娠期的瘦素峰在很大程度上可以归因于这种(些)内分泌因子的刺激, 尽管目前还不能肯定它(们)是那一种(些)激素或因子. 在妊娠期间孕激素、雌激素、肾上腺皮质激素等类固醇激素以及胰岛素等激素水平都显著上升. 而我们的体外实验证明, 孕酮、地塞米松和胰岛素均能强烈刺激瘦素的分泌.

关于雌激素对瘦素分泌的作用, 目前已有的研究结果尚不一致. Pellemounter^[13]和 Kronfeld 等人^[12]对小鼠的研究表明雌激素对于瘦素的分泌没有影响, 但其他研究者^[9~11]对大鼠的研究则表明雌二醇对瘦

素的分泌有刺激作用. 我们用金黄仓鼠作为动物模型的结果则表明, 雌激素能抑制体外瘦素的分泌. 此外, Casabiell 等人^[18]对人的实验更表明, 雌二醇对瘦素分泌的影响有性别差异, 雌激素和肾上腺皮质激素能刺激妇女脂肪细胞分泌瘦素, 对正常男性脂肪细胞则没有刺激作用. 最新研究又表明, 雌激素结合孕酮处理能显著促进妇女血液中瘦素水平的升高^[19]. 由此可见, 可能是许多内分泌因子的综合作用才促成了妊娠期的瘦素分泌峰.

值得注意的是, 早年对金黄仓鼠的研究表明, 妊娠相关激素大多均是在分娩前才下降^[20], 但从本研究结果来看, 瘦素水平下降要远早于这些因子的下降. 可见除了内分泌因素外, 可能还有其他因素也对妊娠期瘦素的分泌活动起着重要的调节作用. 妊娠期能量代谢的特殊性以及瘦素作为体内能量平衡调节的功能提示我们, 除内分泌因素外, 能量代谢对妊娠期瘦素分泌活动起着不容忽视的作用.

4 结论

本实验表明, 金黄仓鼠妊娠中后期出现一明显的瘦素峰; 妊娠期的内分泌活动, 特别是妊娠中后期存在于血液中的一些高水平的类固醇激素对于妊娠期瘦素峰的出现可能起着决定性的作用; 妊娠期金黄仓鼠可为瘦素抵抗的研究提供良好的动物模型.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30070555)和STEP计划(日本)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Brann D W, Wade M F, Krishnan M, et al. Leptin and Reproduction. *Steroids*, 2002, 67: 95~104
- 2 Considine R V, Caro J F. Leptin: genes, concepts and clinical perspective. *Horm Res*, 1996, 46: 249~256
- 3 Kawai M, Yamaguchi M, Murakami T, et al. The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 240: 798~802
- 4 Amico J A, Thomas A, Crowley R S, et al. Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. *Life Sci*, 1998, 63: 1387~1395
- 5 Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, et al. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 1997, 272: 30546~30551
- 6 Tomimatsu T, Yamaguchi M, Murakami T, et al. Increase of mouse leptin production by adipose tissue after midpregnancy: gestation profile of serum leptin concentration. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 240: 213~245
- 7 Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, 1997, 3: 1029~1033
- 8 Kunz T H, Bicer E, Hood W R, et al. Plasma leptin decreases during lactation in insectivorous bats. *J Comp Physiol(B)*, 1999, 169: 61~66
- 9 Brann D W, De Svilla L, Zamorano P L, et al. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroids hormones. *Steroids*, 1999, 64: 659~663
- 10 Kristensen K, Pederson S B, Richelson B. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259: 624~630
- 11 Machinal F, Dieudonne M N, Leneuve M C, et al. *In vivo* and *in vitro* gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroids hormones. *Endocrinology*, 1999, 140: 1567~1574
- 12 Kronfeld S N, Zhao J, Silvia B A, et al. Steroids-dependent up-regulation of adipose leptin secretion in vitro during pregnancy in mice. *Biology of Reproduction*, 2000, 63: 274~280
- 13 Pellemounter M A, Baker M B, Caleb M. Does estradiol mediate leptin's effects on adiposity and body weight. *Am J Physiol*, 1999, 276: E955~963
- 14 Horton T H, Buxton O M, Losee-Olson S, et al. Twenty-four-hour profiles of serum leptin in siberian and golden hamsters: photoperiodic and diurnal variations. *Horm Behav*, 2000, 37: 388~398
- 15 Henson M C, Castracane V D. *Leptin in pregnancy. Biology of Reproduction*, 2000, 63: 1219~1228
- 16 Wade G N, Jennings G, Trayhurn P. Energy balance and brown adipose tissue thermogenesis during pregnancy in Syrian hamsters. *American Journal of Physiology*, 1986, 250: R845~R850
- 17 Hoggard N, Hunter L, Duncan J S, et al. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 11073~11078
- 18 Casabiell X, Pineiro V, Peino R, et al. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83: 2149~2155
- 19 Messinis I E, Papageorgiou I, Milingo S, et al. Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Human Reproduction*, 2001, 16: 1827~1832
- 20 Greenwald G S, Bast J D. Hormone patterns in pregnant or pseudopregnant hamsters after unilateral ovariectomy or hysterectomy. *Biol Reprod*, 1978, 18: 658~662

(2002-12-06 收稿, 2003-02-10 收修改稿)