

性激素对女性脂肪组织 11 β HSD mRNA 表达的部位特异性调控

王 晶¹, 张 丽¹, 沈宇飞², 韩树萍³, 李晓南^{1*}

(¹南京医科大学附属南京儿童医院, 江苏 南京 210008; ²南京医科大学附属南京妇幼保健院妇科, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学第一附属医院妇科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察性激素对育龄期和绝经期妇女不同部位脂肪组织 11 β 羟基类固醇脱氢酶 I 型(11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 11 β HSD1)mRNA 表达水平的调控作用。方法: 育龄期非妊娠妇女 6 例, 年龄(29.83 \pm 3.43)岁及绝经期妇女 16 例, 年龄(65.19 \pm 6.81)岁, 取其皮下和网膜脂肪组织进行培养, 应用雌激素和雄激素刺激脂肪组织 24h, 实时定量 PCR 方法测定脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 水平。结果: 雌激素可使绝经期妇女皮下脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达明显增加($P < 0.05$), 使网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平下降 30%。雄激素刺激可抑制育龄期妇女皮下脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达近 40%($P = 0.001$), 而使绝经期妇女网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达增加 1.9 倍($P = 0.005$)。结论: 性激素对脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达的调控呈现年龄和部位特异性改变, 可能是不同时期女性体脂分布的重要分子生物学机制。

[关键词] 11 β 羟基类固醇脱氢酶 I 型; 雌激素; 雄激素; 脂肪组织; 部位差异

[中图分类号] R335

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-053-05

The depot-specific regulation of sex hormones on 11 β HSD1 mRNA expression in adipose tissue

WANG Jing¹, ZHANG Li¹, SHEN Yu-fei², HAN Shu-ping³, LI Xiao-nan^{1*}

(¹Nanjing Children Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008; ²Department of Gynecology, Nanjing Maternal and Children Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the depot-specific regulation of sex hormones on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1) mRNA expression in adipose tissue in child-bearing and menopausal women. **Methods:** Subcutaneous(Sc) and omental(Om) adipose tissues were obtained from 6 child-bearing (aged 29.83 \pm 3.43 years) and 16 menopausal women (aged 65.19 \pm 6.81 years). Pieces of adipose tissue were incubated with estrogen or testosterone for 24h. The expression of 11 β HSD1 mRNA in adipose tissues was measured by real time PCR. **Results:** Estrogen increased 11 β HSD1 mRNA expression in Sc adipose tissue ($P < 0.05$) but decreased 11 β HSD1 mRNA expression in Om adipose tissue by 30% among menopausal women. Androgen decreased 11 β HSD1 mRNA expression in Sc adipose tissue of child-bearing period women by 40%($P = 0.001$), and up-regulated 11 β HSD1 mRNA expression in Om adipose tissue of menopausal women by 1.9 fold($P = 0.005$). **Conclusion:** The sex hormones stimulate 11 β HSD1 mRNA expression in adipose tissue in age- and depot-specific pattern, which may be important molecular mechanism of distribution of body fat in child-bearing period and menopausal women.

[Key words] 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; estrogen; androgen; adipose tissue; depot-specific

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 053-057]

人类脂肪组织的分布呈明显性别差异, 循环中性激素水平与脂肪组织的分布密切相关。女性绝经

后卵巢分泌雌激素明显减少, 形成雄激素相对升高状态, 并且体重增加, 尤其是体脂增加, 脂肪重新分布(由外周转移至内脏)^[1,2]。绝经期后更易发生胰岛素抵抗、向心性肥胖、高血压、血脂代谢障碍和心血管疾病。性激素可能在脂肪分布以及糖脂代谢方面

[基金项目] 国家科学自然科学基金(30672269)

*通讯作者, E-mail: xiaonan6189@yahoo.com

发挥重要的作用,但确切机制尚不清楚。11 β 羟基类固醇脱氢酶 I 型 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 11 β HSD1) 是一种 NADP(H) 依赖性酶,属短链脱氢/还原酶蛋白超家族。它在糖皮质激素作用的靶组织(如:肝脏、脑、脂肪组织、生殖腺、骨骼肌^[3])中都有表达。在体内 11 β HSD1 主要作为还原酶起作用,催化无活性的糖皮质激素可的松为有活性的氢化可的松(Cortisol, C)。氢化可的松能够抑制前脂肪细胞的增殖,促进前脂肪细胞向脂肪细胞分化成熟,脂质积聚。内脏脂肪组织 11 β HSD1 过表达是连接内脏肥胖和代谢综合征的重要枢纽^[4]。

本研究通过体外培养脂肪组织,观察雌激素和雄激素对育龄期和绝经期女性不同部位脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达的影响,以阐明性激素调控脂肪分布的分子机制。

1 对象和方法

1.1 对象

研究对象均为腹部手术患者。其中育龄期妇女 6 例,年龄(29.83 \pm 3.43)岁,绝经期妇女 16 例,年龄(65.19 \pm 6.81)岁, BMI 值在 20~25 kg/m² 之间。绝经期妇女至少月经停止 12 个月以上。本研究中 6 名为子宫肌瘤患者,16 名为胆囊结石患者。凡患有全身严重感染、代谢疾病、恶性肿瘤或糖尿病的患者均不作为研究对象,以排除疾病因素对基因表达的影响。本研究通过南京医科大学伦理委员会的审批,并征得患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 脂肪组织培养

采用 M199 培养基加入 1% 胎牛血清, 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (MIX), 5 μ g/ml 胰岛素, 100 U/ml 青链霉素为脂肪组织完全培养液。手术开始后

30 min 内取皮下和网膜脂肪组织各一块,用眼科剪及眼科镊去除标本中明显的血管及纤维结缔组织。将组织分切成 10 mm³ 大小的组织块,将脂肪组织块连同培养液倾倒入细胞筛,用生理盐水冲洗。在 6 孔培养板中每孔加入 3 ml 完全培养液。将细胞筛中的脂肪块分入培养板中,每孔约 150~200 mg 脂肪组织。在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的孵箱中培养 24 h 后,换液(不含 MIX),加入激素。本研究采用氢化可的松(C) 100 nmol/L 作为阳性参照,分别应用雌激素(estrogen, E) 0、50、500 nmol/L 及雄激素(testosterone, T) 0、50、500 nmol/L 刺激脂肪组织,24 h 后收集脂肪组织, M199 培养液中保存, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平的检测

按 TRIzol 方法抽提脂肪组织总 RNA,根据分光光度测定的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值计算 RNA 含量和纯度。通过 1% 琼脂糖凝胶验证 RNA 的完整性。1 μ g 总 RNA 用反转录试剂盒(美国 Promega 公司)合成 cDNA。探针 5' 端标记荧光报告基团 FAM(6-carboxy-fluorescein), 3' 端标记荧光淬灭基团 TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine)。11 β HSD1 及管家基因 β -actin 引物及探针直接由美国 Applied Biosystems 公司合成(表 1)。应用 ABI PRISM 7500 荧光定量仪进行 PCR 扩增,反应条件:50 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 循环 45 次, 4 $^{\circ}$ C 保存。采用相对定量法计算 11 β HSD1 mRNA 表达水平,用管家基因校正样品初始量。计算公式为 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, Ct 值为每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。 Δ Ct=待测样品目的基因平均 Ct 值-待测样品管家基因平均 Ct 值。 $\Delta\Delta$ Ct=(待测样品目的基因平均 Ct 值-待测样品管家基因平均 Ct 值)-(标准品目的基因平均 Ct 值-标准品管家基因平均 Ct 值)^[5]。

表 1 实时定量 PCR 中引物及探针

Table 1 Primers and probes used for mRNA quantification by real-time PCR

	引物(5'→3')	探针(5'→3')
11 β HSD1	上游:TCCAGGGTCAATGTATCAATCACT 下游:GACTATCCCAGA AACTGCCTTCA	CTTGGCCTCATAGACACAGAAACAGCCA
β -actin	上游:TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA 下游:CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	CCAGGGCGTGATGGTGGGCAT

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行数据整理和统计。首先进行正态性检验,正态分布资料的结果表示为均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$), 3 组间均数比较采用方差分析 F 检验,进一步采用 q 检验进行两两比较,配

对比较采用配对 t 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

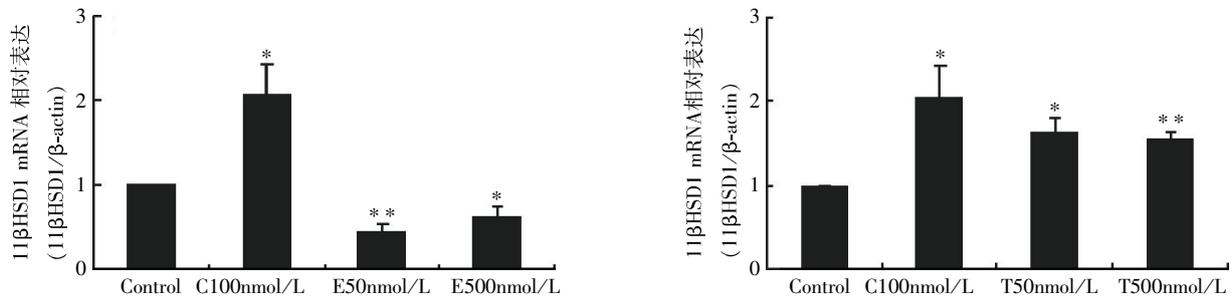
2 结果

2.1 不同浓度性激素对网膜脂肪组织 11 β HSD1

mRNA 表达水平的影响

不同浓度性激素对绝经期妇女网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平的影响如图 1 所示。与空白对照组相比,氢化可的松可明显增加 11 β HSD1

mRNA 表达,50、500 nmol/L 雌激素可显著抑制 11 β HSD1 mRNA 表达,但两者之间无显著差别(图 1A)。50、500 nmol/L 雄激素亦明显增加 11 β HSD1 mRNA 表达,两者间也无显著差别(图 1B)。



A 雌激素对网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平调控的剂量效应($n = 16$);B:雄激素对网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平调控的剂量效应($n = 16$)。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

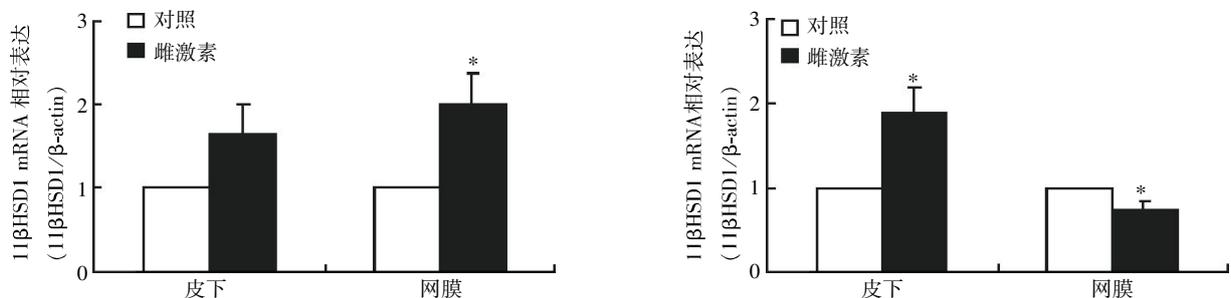
图 1 雌激素和雄激素对网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平调控的剂量效应。

Figure 1 Dose-effect of estradiol and androgen on 11 β HSD1 mRNA expression in omental adipose tissue

2.2 雌激素对皮下和网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平的调控

雌激素(500 nmol/L)对育龄期和绝经期妇女脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达调控如图 2 所示,雌激素作用下育龄期妇女网膜脂肪组织中 11 β HSD1 mRNA 表达增加,但与皮下组织比较并无统计学差异

(图 2A)。雌激素对绝经期妇女脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达调控具有明显的部位差异性,皮下脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平明显增加 ($P = 0.023$),而网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平下降 30%($P = 0.03$,图2B)。



A:雌激素对育龄期妇女 11 β HSD1 mRNA 表达水平调控($n = 6$);B:雌激素对绝经期妇女 11 β HSD1 mRNA 表达水平调控($n = 16$)。500 nmol/L 雌激素与脂肪组织孵育 24 h,与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 2 雌激素对育龄期(A)和绝经期(B)妇女不同部位脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平调控。

Figure 2 Effect of estradiol on 11 β HSD1 mRNA expression in subcutaneous and omental adipose tissue of childbearing period and menopausal women

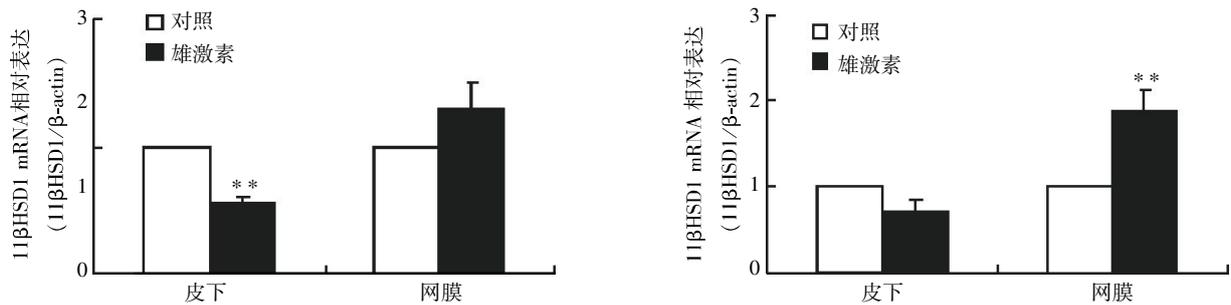
2.3 雄激素对皮下和网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平调控

雄激素(500 nmol/L)对育龄期和绝经期妇女脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达水平的调控如图 3 所示。雄激素可抑制育龄期妇女皮下脂肪组织中 11 β HSD1 mRNA 表达近 40%($P = 0.001$),网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达虽增加,但无统计学意义(图 3A)。同样条件刺激下,绝经期妇女网膜脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达增加 1.9 倍($P = 0.005$),而皮下脂肪组织中 11 β HSD1 mRNA 表达无明显

改变(图 3B)。

3 讨论

研究认为,雌激素可能通过调控糖皮质激素而影响体脂分布^[6],但确切的分子机制尚不清楚。Andersson 等^[7]对卵巢切除术后的大鼠给予雌激素治疗后发现雌激素下调了肾周脂肪组织 11 β HSD1 mRNA 表达及活性,人类研究尚无确切报道,有研究发现雌激素对人类脂肪组织 11 β HSD1 活性无调控作用^[8],但也有报道雌激素上调育龄期女性内脏前



A: 雄激素对育龄期妇女 11βHSD1 mRNA 表达水平调控 (n = 6); B: 雄激素对绝经期妇女 11βHSD1 mRNA 表达水平调控 (n = 16)。500 nmol/L 雄激素与脂肪组织孵育 24 h。与对照组比较, **P < 0.01。

图 3 雄激素对育龄期和绝经期妇女不同部位脂肪组织 11βHSD1 mRNA 表达水平调控。

Figure 3 Effect of androgen on 11βHSD1 mRNA expression in subcutaneous and omental adipose tissue of childbearing ages and menopausal women

体脂肪细胞中 11βHSD1 mRNA 表达^[9]。导致这种结果差异的原因尚不清楚。由于脂肪组织内分泌相关的受体分布和代谢特点存在明显部位特征和年龄差异, 本文研究了不同年龄妇女皮下和网膜脂肪组织对雌激素刺激后的反应。结果发现雌激素明显上调育龄期妇女网膜 11βHSD1 mRNA 表达水平, 但抑制更年期妇女网膜脂肪组织 11βHSD1 mRNA 表达水平, 增加皮下脂肪组织 11βHSD1 mRNA 表达水平。业已知, 雌激素发挥作用需依赖于体内的雌激素受体 (estrogen receptor, ER), 正常女性腹部皮下、臀部皮下及腹部内脏脂肪组织中 ERα 的表达没有差异, 但 ERβ1 在腹部皮下脂肪组织中的基因表达明显高于内脏^[10]。绝经期妇女应用雌激素替代疗法可导致皮下脂肪细胞中 ERα 表达下降而 ERβ 表达上调, 对网膜脂肪细胞的调控则呈相反的作用, 呈现部位和年龄的差异^[11-12]。因此, 雌激素部位特征性的调节 11βHSD1 表达与其受体的分布特点相关。此外, 脂肪组织存在与 11βHSD1 基因表达密切相关的 P450 芳基酶^[9]、核受体以及细胞因子, 雌激素可能通过对这些细胞因子的影响, 间接调节 11βHSD1 的表达水平^[13]。由于内脏脂肪特殊的解剖部位、活跃的代谢特征以及代谢产物直接回流进入门脉系统, 使内脏脂肪组织的积聚与肥胖、胰岛素抵抗关系更为密切。因此, 更年期补充雌激素有可能通过部位差异性调控脂肪组织 11βHSD1 的表达, 使体脂从危险的内脏转移至相对安全的皮下, 从而改善胰岛素抵抗。但育龄期妇女的研究结果似与临床不符, 其确切的作用机制还需进一步研究。

临床观察显示, 女性血循环中雄激素水平与肥胖指数呈正相关, 而这种关系持续女性一生。如育龄期雄激素过多引起的多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS), 表现为中心性肥胖和代谢

综合征; 女性绝经期后卵巢分泌雌激素明显减少, 形成雄激素相对升高状态, 引起胰岛素敏感性下降, 同时伴体内脂肪组织的重新分布^[14]; 女性性腺肌注睾酮后体脂重新分布, 呈向心性肥胖^[15]。体外研究发现, 雄激素可上调男性脂肪基质细胞中 11βHSD1 mRNA 的表达, 但对女性脂肪组织的作用尚不清楚^[9]。本研究发现, 在雄激素刺激下, 网膜脂肪组织 11βHSD1 表达呈上调趋势, 尤其增加绝经后妇女网膜脂肪组织 11βHSD1 表达, 尽管育龄期妇女网膜脂肪组织 11βHSD1 mRNA 表达也呈上调趋势, 但没有达到统计学差异, 这可能与样本例数较少有关。雄激素受体 (androgen receptor, AR) 在体内的分布也具有部位差异性, 内脏脂肪组织明显高于皮下^[16], 并且雄激素本身也上调前体脂肪细胞中 AR 水平^[17]。进一步, AR 与糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 同为类固醇激素受体, 两者具有交互作用^[18]。此外, 11βHSD1 启动子主要受 CCAT/增强子结合蛋白 (C/EBP) 家族包括 C/EBPα 和 C/EBPβ 转录因子调控, 而类固醇激素对内脏脂肪组织 C/EBPα 具有明显的调节作用^[4]。这些因素可能致雄激素特异性上调内脏脂肪组织 11βHSD1 mRNA 表达。通过放大组织局部糖皮质激素浓度和作用, 进而增加了内脏脂肪的积聚。

由于本研究对象主要来源腹部手术患者, 基于体外培养条件和实验设计中不同年龄等要求及伦理学问题, 临床取材十分困难, 样本数较少, 可能在一定程度上影响了结果的意义。

本研究报道了性激素对育龄期和绝经期妇女皮下和网膜脂肪组织 11βHSD1 mRNA 表达的调控作用。性激素导致 11βHSD1 mRNA 表达呈现年龄和部位特异性改变, 可能是不同时期妇女体脂分布的重要分子生物学机制, 进一步扩大样本深入探讨

11 β HSD1 mRNA 调控机制,可为中心性肥胖和代谢综合征的临床干预和治疗开拓新的思路。

[参考文献]

- [1] Bjorkelund C, Lissner L, Andersson S, et al. Reproductive history in relation to relative weight and fat distribution. [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996, 20 (3): 213-219
- [2] Shen W, Punyanitya M, Silva AM, et al. Sexual dimorphism of adipose tissue distribution across the lifespan: a cross-sectional whole-body magnetic resonance imaging study. [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2009, 6: 17
- [3] Waddell BJ, Hishah S, Krozowski ZS, et al. Localization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the male reproductive tract [J]. *Endocrinology*, 2003, 144 (7): 3101-3106
- [4] Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25 (5): 831-866
- [5] Bujalska IJ, Quinkler M, Tomlinson JW, et al. Expression profiling of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and glucocorticoid-target genes in subcutaneous and omental human preadipocytes. [J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 37(2): 327-340
- [6] Andersson T, Simonyte K, Andrew R, et al. Tissue-specific increases in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in normal weight postmenopausal women. [J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8475
- [7] Andersson T, Soderstrom I, Simonyte K, et al. Estrogen reduces 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in liver and visceral, but not subcutaneous, adipose tissue in rats. [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2010, 18(3): 470-475
- [8] Friedberg M, Zoumakis E, Hiroi N, et al. Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in mature human subcutaneous adipocytes by hypothalamic messengers. [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(1): 385-393
- [9] Dieudonne MN, Sammari A, Dos SE, et al. Sex steroids and leptin regulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase I and P450 aromatase expressions in human preadipocytes; Sex specificities. [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006, 99(4-5): 189-196
- [10] Pedersen SB, Bruun JM, Hube F, et al. Demonstration of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human adipose tissue; influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 182 (1): 27-37
- [11] Anwar A, Mcternan PG, Anderson LA, et al. Site-specific regulation of oestrogen receptor-alpha and -beta by oestradiol in human adipose tissue [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2001, 3(5): 338-349
- [12] Dieudonne MN, Leneuve MC, Giudicelli Y, et al. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells; regional specificities and regulation by estrogens [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286 (3): C655-C661
- [13] Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(27): 2918-2924
- [14] Ross R, Freeman J, Hudson R, et al. Abdominal obesity, muscle composition, and insulin resistance in premenopausal women. [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(11): 5044-5051
- [15] Elbers JM, Giltay EJ, Teerlink T, et al. Effects of sex steroids on components of the insulin resistance syndrome in transsexual subjects. [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 58(5): 562-571
- [16] Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences [J]. *Obes Rev*, 2010, 11(1): 11-18
- [17] Singh R, Artaza JN, Taylor WE, et al. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells; nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(1): 141-154
- [18] Yen PM, Liu Y, Palvimo JJ, et al. Mutant and wild-type androgen receptors exhibit cross-talk on androgen-, glucocorticoid-, and progesterone-mediated transcription [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11(2): 162-171

[收稿日期] 2011-08-31