

IGF-1 抑制妊娠合并糖尿病诱导的鼠胚胎细胞凋亡*

罗晓敏^{1,2)**} 邹海燕^{1,2)**} 张 喆^{2)**} 潘爱华²⁾

尹 芳¹⁾ 魏 苗²⁾ 杨 静²⁾ 黄 河^{2)***}

(¹长沙医学院基础医学系, 长沙 410219; ²中南大学湘雅医学院组织学与胚胎学系, 长沙 410013)

摘要 为研究妊娠合并糖尿病对孕妇及胎儿产生危害的机制, 构建妊娠合并糖尿病的昆明小鼠动物模型, 检测不同浓度葡萄糖对体外培养胚泡细胞生长的影响。观察不同浓度胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)对体外高糖环境胚泡细胞发育的影响, 利用细胞核 DNA 双染实验观察不同浓度 IGF-1 作用下胚泡细胞的凋亡。采用实时定量 PCR(RT-PCR)分析不同凋亡相关基因在体外培养胚泡中的表达情况。结果显示, 随着葡萄糖浓度的增加, 胚泡细胞总数减少, 高浓度葡萄糖(≥ 30 mmol/L)则能显著性抑制胚泡细胞的生长($P < 0.01$)。RT-PCR检测发现妊娠合并糖尿病小鼠的胚泡 *igf-1* 表达下调, 且与葡萄糖的浓度成正相关。凋亡相关基因 *bcl-2* 和 *bcl-xl* 的表达随着体外 IGF-1 培养浓度的增加而表达上调, 而 *p53* 基因和凋亡相关基因 *Bax* 的表达则下调。细胞凋亡实验显示, 随着 IGF-1 浓度的增加, 体外培养胚泡细胞的凋亡逐渐降低, 当 IGF-1 浓度达到 100 $\mu\text{g/L}$ 时, 几乎未发现细胞凋亡。因此, 高血糖能抑制胚泡细胞的生长发育, 导致 *igf-1* 的表达下调, 而 IGF-1 能抑制胚泡细胞的凋亡, 有利于胚泡细胞的生长发育。

关键词 妊娠合并糖尿病, 鼠胚胎, 体外培养, IGF-1, 凋亡

学科分类号 R321-33, R714.256

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00711

妊娠合并糖尿病(孕期糖尿病和妊娠糖尿病)对孕妇及胎儿均产生危害, 其不孕率达 25%, 自然流产发生率达 15%~30%, 而胎儿心血管系统及中枢神经系统等重要器官畸形的发生率为 4%~12.9%^[1~3]。尽管最近 25 年来在全世界内通过给予糖尿病孕妇胰岛素治疗以及采取严格代谢控制, 使这一发病率有所下降, 但其仍是正常对照组的 3~4 倍^[4]。因此, 进行妊娠合并糖尿病对胚胎毒性的研究对胎儿畸形的预防具有重要意义。

细胞凋亡信号转导途径是参与基因表达调控、细胞增殖和死亡的重要机制, 妊娠合并糖尿病对孕妇及胎儿的危害很可能与其信号通路的参与有关^[5]。高血糖引起的胚胎卵黄囊细胞膜的损伤可能影响细胞凋亡信号通路的蛋白激酶、蛋白酶活性及其功能^[6,7]。我们预实验研究发现, 妊娠合并糖尿病的小鼠胚胎在 2 细胞时, *igf-1* 的表达就开始下调, 其是否与上述信号途径的调控有关亟待深入阐明。此研究对 IGF-1 参与妊娠合并糖尿病体外胚胎细胞凋亡信号传导机制的具体作用方式进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 动物

取 8 周龄的雌性昆明小鼠, 按 75 mg/kg 腹腔注射溶于 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.5)的链脲菌素(streptozotocin, STZ), 连续注射 3 天, 每天注射 1 次。注射 STZ 1 周后, 检测昆明鼠血糖浓度, 非空腹血糖浓度高于 16.7 mmol/L 的昆明鼠被认为是糖尿病模型鼠^[8], 用于下一步实验。将构建成功的糖尿病模型鼠腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG)促进超排卵, 46 h 后腹腔注射 5 U 绒毛膜促性腺激素(HCG)。将注射了 HCG 的雌性昆明小

* 国家自然科学基金资助项目(30600224, 30700438, 30771135), 中国博士后科学基金(20060390886), 湖南省自然科学基金(06JJ30014), 湖南省科技计划(2008FJ3138)和湖南省教育厅科研资助项目(07B008)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。Tel: 0731-2650436

E-mail: huanghe@xysm.net, luoxiaomin@gmail.com.

收稿日期: 2008-10-18, 接受日期: 2009-01-19

鼠与 6~8 周龄大小的雄性昆明小鼠进行交配, 交配完毕后, 分开雌性昆明小鼠, 并确定为受精后的第一天(1 d).

1.2 植入前胚胎的分离与培养

在受精后第 2 天处死雌性昆明小鼠, 用 37℃ KSOM 培养液冲洗输卵管分离 2 细胞胚胎.

1.2.1 不同浓度葡萄糖培养. 所有胚胎用含有不同浓度葡萄糖的 KSOM 培养基培养, 葡萄糖的浓度分别为 1.0 mmol/L、5.0 mmol/L、15.0 mmol/L、30.0 mmol/L 或者 45.0 mmol/L.

1.2.2 不同浓度 IGF-1 拮抗高糖环境. 选用含 30.0 mmol/L 葡萄糖的 KSOM 培养基培养胚胎. 所有 KSOM 培养基加入不同浓度 IGF-1, IGF-1 的浓度分别为 0 μg/L、1 μg/L、10 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、300 μg/L.

1.3 凋亡细胞检测

将培养的胚胎用 4%多聚甲醛固定在玻片上,

进行透化处理, 然后加入 0.01 g/L 碘化丙锭(propidium iodide, PI), 孵育 20 min, 再用 PBS 溶液洗涤 3 次, 然后采用 TUNEL(terminal dUTP nick end-labeling)法检测细胞的凋亡^[9]. 实验重复 3 次, 每次至少取 20 个培养胚胎用于凋亡实验.

1.4 荧光定量 PCR 检测

用于实时定量 PCR(RT-PCR)分析的引物由 Oligo Primer Analysis 软件(5.0 版)设计. 为避免基因组 DNA 的污染, 在设计引物和探针的时候尽量避免扩增基因组 DNA, 设计的引物至少跨越 1 个内含子. 收集培养的胚胎细胞, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 取 2 μl 进行荧光定量 PCR 检测. 引物和探针序列见表 1. 反应条件: 45℃ 90 min, 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 55℃ 50 s, 共 40 个循环. 每一例样本反应结束后由计算机自动计算并读出定量结果 Ct 值(threshold cycle).

Table 1 Primers and probes employed in Real-time PCR

Name of gene	Forward primers	Reverse primers	Probe
<i>GAPDH</i>	AAGGCCATCACCATCTTCCA	CCACTACATACTCAGCACCAGGAT	AGCGAGATCCTGCCAACATCAAGTGG
<i>p53</i>	TGCGTGTGGAGTATTTGGATG	TGGTACAGTCAGAGCCAACCAG	AAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCC
<i>Bax</i>	AAGCTGAGCGAGTGCTCAAGC	TGGTACAGTCAGAGCCAACCAG	CTGGACAGTAACATGGAGCTGCAGAGGA
<i>igf-1</i>	CTTCAGTTCGTGTGTGGAGACAG	CGCCCTCCGACTGCTG	TTTATTTCACAAAGCCACAGGTATGGC
<i>bcl-2</i>	AAGCGGTCCCGTGGATAGA	TCCGGTATTCGCAGAAAGTCC	TGTGCGCGGTATAAATTGCCGA
<i>bcl-xl</i>	GAGGCAGGCGACGAGTTTGAA	GGGGTGGGAGGGTAGAGTGGA	TGCGTGGAAGCGTAGACAAGGAGATGC

1.5 统计学分析

所有细胞计数采用 $\bar{x} \pm s$, 以 1.0 mmol/L 葡萄糖培养条件下培养的正常胚胎为对照, 利用统计学软件 SPSS 11.0 进行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义.

2 结 果

2.1 不同浓度葡萄糖对植入前胚胎发育的影响

将植入前的胚泡用不同浓度的葡萄糖培养基培养, 在受精后的第 5 天, 发现随着葡萄糖浓度的增加, 与对照组葡萄糖浓度为 1.0 mmol/L 时相比, 胚泡细胞总数逐渐减少, 特别是在葡萄糖浓度为 30.0 mmol/L 时, 下降最为明显($P < 0.01$, 图 1), 因此我们选取 30.0 mmol/L 的葡萄糖浓度作为体外培养

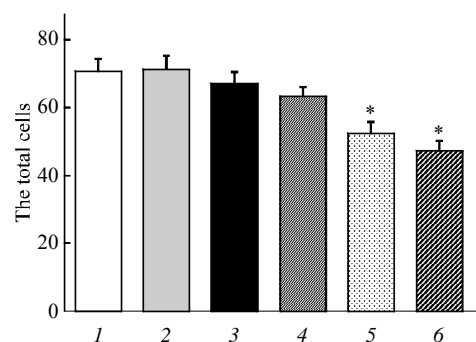


Fig. 1 The cell growth numbers cultured in KSOM medium with different glucose concentration

1: The blastocyst which originates from the normal embryo cultured in KSOM medium with 1.0 mmol/L glucose. * $P < 0.01$; 2: 1.0 mmol/L; 3: 5.0 mmol/L; 4: 15.0 mmol/L; 5: 30.0 mmol/L; 6: 45.0 mmol/L.

2.2 *igf-1* mRNA 在不同葡萄糖浓度组胚泡中的表达

提取不同浓度葡萄糖培养条件下培养 5 天的胚泡总 RNA, RT-PCR 检测胰岛素样生长因子 -1 (*igf-1*) 的表达情况, 以同时期正常胚泡为对照, 结果发现, 随着葡萄糖浓度的增加, 胚泡中 *igf-1* 的表达量逐渐下降, 与对照组比较, 当葡萄糖浓度达到 30.0 mmol/L 时, *igf-1* 的表达量显著性降低 ($P < 0.01$, 图 2a), 即使是受精后第 2 天的 2 细胞胚泡中, 其 *igf-1* 的表达也下降(图 2b), 提示妊娠合并高血糖影响了胚泡细胞中 *igf-1* 的表达。

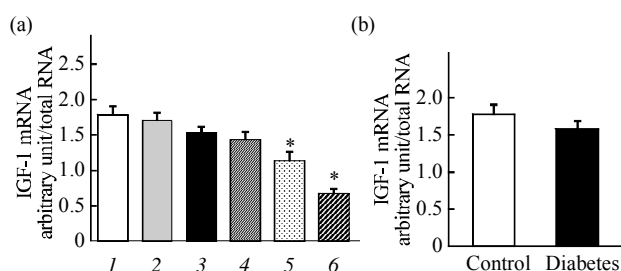


Fig. 2 The expression of *igf-1* mRNA in the blastocyst

(a) The expression of *igf-1* in the blastocyst which raised in different glucose concentration for 5 day *in vitro*. 1: Control; 2: 1.0 mmol/L; 3: 5.0 mmol/L; 4: 15.0 mmol/L; 5: 30.0 mmol/L; 6: 45.0 mmol/L. (b) The expression of IGF-1 in blastomeres of 2-cell embryo.

2.3 不同浓度 IGF-1 对高糖浓度下胚泡发育的影响

在 30.0 mmol/L 葡萄糖浓度的培养条件下, 观察培养第 5 天的胚泡, 发现, 随着 IGF-1 浓度的增加, 胚泡细胞总数逐渐增加, 当 IGF-1 的浓度达到 100.0 $\mu\text{g/L}$ 时, 胚泡细胞总数显著性增加 ($P < 0.01$), 而当 IGF-1 的浓度再继续增加时, 胚泡细胞总数却无明显变化(图 3)。

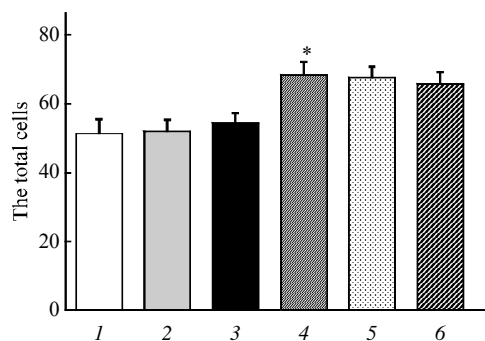


Fig. 3 The cell growth number cultured in 30.0 mmol/L glucose with different IGF-1 concentration

* $P < 0.01$. 1: 0 $\mu\text{g/L}$; 2: 1.0 $\mu\text{g/L}$; 3: 10.0 $\mu\text{g/L}$; 4: 100.0 $\mu\text{g/L}$; 5: 200.0 $\mu\text{g/L}$; 6: 300.0 $\mu\text{g/L}$.

2.4 IGF-1 对胚泡细胞凋亡的影响

取培养第 13 天的胚泡, 进行胚泡细胞核 DNA

双染, 观察细胞凋亡情况, 发现随着 IGF-1 浓度的增加, 胚泡中细胞凋亡率逐渐下降, 当 IGF-1 的浓度达到 100 $\mu\text{g/L}$ 时, 其细胞状态和对照组相一致, 未见明显的细胞凋亡(图 4)。

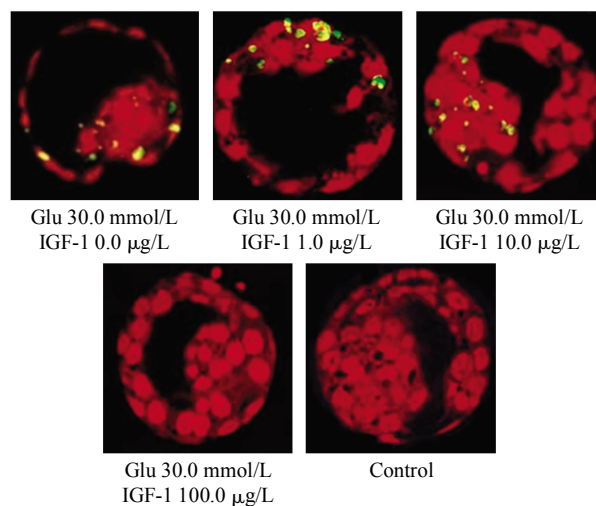


Fig. 4 The apoptosis of mouse embryo cultured in

30.0 mmol/L glucose with different IGF-1 concentration

Control: The blastocyst which originates from the normal embryo cultured in KSOM medium with 1.0 mmol/L glucose.

2.5 凋亡相关基因的表达

检测凋亡相关基因 *Bax*、*bcl-2*、*bcl-xl* 以及 *p53* 基因在不同浓度 IGF-1 诱导条件下的表达情况, 发现 *bcl-2*、*bcl-xl* 基因的表达随着 IGF-1 浓度的增加而表达上调, 而 *Bax* 基因则表达下调(图 5)。同时, 随着 IGF-1 浓度的增加, *p53* 基因表达下调, 其与 *Bax* 基因的表达下调相一致(图 5), 提示 *igf-1* 的表达诱导胚泡细胞凋亡可能需要 *p53* 基因的参与。

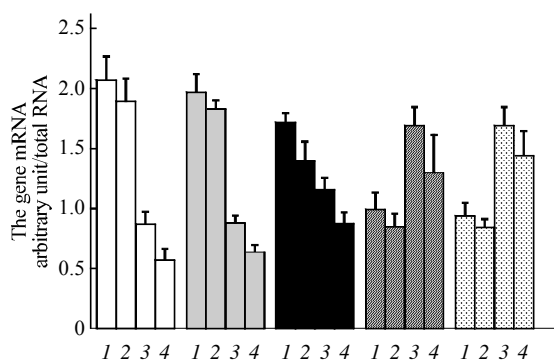


Fig. 5 The expression of apoptosis-related genes in the blastocyst cultured in 30.0 mmol/L glucose with different IGF-1 concentration

□: 0 $\mu\text{g/L}$ IGF-1+30 mmol/L glucose; ▤: 1 $\mu\text{g/L}$ IGF-1+30 mmol/L glucose; ■: 10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1+30 mmol/L glucose; ▨: 100 $\mu\text{g/L}$ IGF-1+30 mmol/L glucose; ▩: 200 $\mu\text{g/L}$ IGF-1+30 mmol/L glucose. 1: *p53*; 2: *Bax*; 3: *bcl-2*; 4: *bcl-xl*.

3 讨 论

妊娠合并糖尿病对孕妇和胎儿造成危害的分子机制和作用方式仍不清楚。目前,认为可能的影响因素包括高血糖对卵黄囊细胞膜的原发性损伤、卵黄囊细胞膜主要脂质成分的代谢失衡、超氧阴离子自由基的释放以及信号转导机制的参与等^[7,10]。

妊娠合并糖尿病在前3个月时孕妇的自然流产危险性升高,与畸形胚胎细胞凋亡程序的启动密切相关,可能是由于妊娠合并糖尿病的高血糖环境启动孕体植入前、后胚胎的细胞凋亡程序^[11]。本实验中,我们发现,不同浓度的葡萄糖能导致鼠胚泡细胞生长延缓,特别是当体外培养的葡萄糖浓度超过30 mmol/L时,胚泡细胞总数明显减少($P < 0.05$),说明妊娠合并糖尿病的高血糖环境有可能引起胚胎细胞的凋亡增加而导致胚泡发育迟缓。此外,我们发现,在高糖培养的体外生长胚泡中,其凋亡抑制基因 *Bax* 表达下调,而促凋亡基因 *bcl-2* 和 *bcl-xl* 则表达上调,进一步说明了妊娠合并糖尿病的高血糖环境能引起胚泡细胞的凋亡而导致胚胎发育障碍。

胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是一个具有70个氨基酸残基的单链多肽,通过3个二硫键交联而成,其主要通过自分泌和旁分泌发挥生理功能^[12]。研究发现,IGF-1在胚胎早期发育过程中起着重要的作用,如调节器官的分化、抑制细胞的凋亡等^[13,14]。在本实验中,我们发现妊娠合并糖尿病的胚胎在2细胞时 *igf-1* 表达下调,这可能与高血糖抑制胚泡细胞生长有关。当在体外培养液中加入不同浓度IGF-1时,发现随着IGF-1浓度的增加,高糖对胚泡生长抑制作用减低,当IGF-1浓度达到100 $\mu\text{g/L}$ 时,高糖对胚泡细胞的生长几乎没有什么抑制作用了。进一步研究发现,随着IGF-1浓度的增加,胚泡细胞的凋亡细胞数逐渐下降,当IGF-1浓度达到100 $\mu\text{g/L}$ 时,几乎见不到细胞凋亡,这与IGF-1抵制高糖对胚泡细胞的生长结果相一致,说明 *igf-1* 的表达对于胚胎细胞的发育有很重要的作用,特别是在抑制胚胎细胞的凋亡方面。

实时荧光定量PCR检测发现,胚胎细胞表达的凋亡相关基因 *bcl-2*、*bcl-xl*、*Bax* 以及 *p53* 基因等的表达丰度与培养液中IGF-1的浓度相关,随着其浓度增加,抗凋亡基因 *bcl-2*、*bcl-xl* 表达上调,而促凋亡基因 *Bax* 以及 *p53* 基因表达则下调。因

此,我们推测IGF-1可能通过调节 *p53* 基因的表达来进一步调节凋亡相关基因的表达,从而达到调节胚胎细胞的生长发育。提示妊娠合并糖尿病对胚胎的危害之一,可能是通过下调 *igf-1* 的表达,从而使细胞凋亡信号传导通路中的凋亡相关基因 *bcl-2*、*bcl-xl* 等表达下调,而上调 *p53* 基因和 *Bax* 基因等,启动细胞凋亡程序,导致胚泡发育障碍。而通过增加IGF-1的量,能有效拮抗高糖对胚泡细胞生长发育的抑制。其分子机制的进一步深入研究将对阐明分子病因学、探讨有效的预防和治疗途径具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Doblado M, Moley K H. Glucose metabolism in pregnancy and embryogenesis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2007, **14**(6): 488~493
- 2 Kanwar Y S, Nayak B, Lin S, *et al*. Hyperglycemia: its immol/Linent effects on mammol/Lalian nephrogenesis. *Pediatr Nephrol*, 2005, **20**(7):858~866
- 3 Jungheim E S, Moley K H. The impact of type 1 and type 2 diabetes mellitus on the oocyte and the preimplantation embryo. *Semin Reprod Med*, 2008, **26**(2):186~195
- 4 Polanco Ponce A C, Revilla Monsalve M C, Palomino Garibay M A, *et al*. Effect of maternal diabetes on human and rat fetal development. *Ginecol Obstet Mex*, 2005, **73**(10): 544~552
- 5 Rademacher T W, Gumaa K, Scioscia M. Preeclampsia, insulin signalling and immol/Lunological dysfunction: a fetal, maternal or placental disorder?. *J Reprod Immol/Lunol*, 2007, **76**(1~2): 78~84
- 6 罗晓敏, 邹海燕, 尹芳, 等. 高浓度葡萄糖对昆明小鼠早期胚胎发育的影响. *生命科学研究*, 2008, **12**(4): 347~350
- 7 Luo X M, Zhou H Y, Yin F, *et al*. *Life Science Research*, 2008, **12**(4): 347~350
- 8 Robitaille J, Grant A M. The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. *Genet Med*, 2008, **10**(4): 240~250
- 9 Loeken M R. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc Gynecol Investig*, 2006, **13**(1): 2~10
- 10 Liu G, Sun Y, Li Z, *et al*. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress involved in diabetic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commol/Lun*, 2008, **370**(4): 651~656
- 11 Kanwar Y S, Nayak B, Lin S, *et al*. Hyperglycemia: its immol/Linent effects on mammol/Lalian nephrogenesis. *Pediatr Nephrol*, 2005, **20**(7): 858~866
- 12 Moley K H. Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *Trends Endocrinol Metab*, 2001, **12**(2): 78~82
- 13 Hinkal G, Donehower L A. How does suppression of IGF-1 signaling by DNA damage affect aging and longevity?. *Mech Ageing Dev*, 2008, **129**(5): 243~253

- 13 Ezzat V A, Duncan E R, Wheatcroft S B, *et al.* The role of IGF-I and its binding proteins in the development of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Obes Metab*, 2008, **10**(3): 198 ~ 211
- 14 Lauszus F F. The clinical significance of IGF-I in maternal serum during pregnancy in type 1 diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 2007, **3**(3): 194 ~ 197

IGF-1 Inhibits The Apoptosis of Mouse Embryo Induced by Diabetes*

LUO Xiao-Min^{1,2**}, ZOU Hai-Yan^{1,2**}, ZHANG Zhe^{2**}, PAN Ai-Hua²⁾,
Yin Fang¹⁾, WEI Miao²⁾, YANG Jing²⁾, HUANG He^{2)***}

⁽¹⁾Department of Basic Medicine, Changsha Medical School, Changsha 410219, China;

⁽²⁾Department of Histology and Embryology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract In order to investigate the mechanisms of pregnancy associated with diabetes harm to gravida and fetal, The Kunming mice models for pregnancy associated with diabetes were simulated, The effects of glucose in different concentrations was detected on the growth of embryo cells *in vitro* culture. The effects of IGF-1 in different concentrations was determined on the development of blastocyst in hyperglycemic conditions (30.0 mol/L glucose) *in vitro*, as well as the apoptosis of embryo cells by using nuclear DNA double-dyed assays. Moreover, the expression of *igf-1* and other genes associated with apoptosis *in vitro* embryo was detected by Real-time quantitative PCR. The results showed that the total cell number of blastocyst fell off along with the increasing of glucose concentration. High concentrations of glucose (≥ 30 mmol/L) could significantly inhibit the growth of embryo cells ($P < 0.01$). The results of real-time quantitative PCR showed that the expression of *igf-1* was down-regulated in mouse blastocyst with pregnancy associated with diabetes, and positively correlated with the concentration of glucose. The expressions of apoptosis-related genes *bcl-2* and *bcl-xl* were up-regulated along with the increasing of IGF-1 concentration, while the *p53* gene and the apoptosis-related gene *Bax* were down-regulated. The embryo cells apoptosis had been gradually reduced with the increasing of IGF-1 concentration *in vitro*, and in the IGF-1 concentration of 100 $\mu\text{g/L}$, there was almost no apoptosis in embryo cells. These experiments demonstrated that hyperglycemic conditions *in vitro* can inhibit the growth and development of the embryo cells resulting in the down-regulated expression of *igf-1*, and IGF-1 could inhibit the apoptosis of blastocyst and be benefit for the growth of blastocyst.

Key words pregnancy associated with diabetes, mouse embryos, *in vitro* culture (IVC), IGF-1, apoptosis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00711

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30600224, 30700438, 30771135), China Postdoctoral Science Foundation of China (20060390886), Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (06JJ30014), Hunan Province Scientific Program (2008FJ3138) and Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (07B008).

** LUO Xiao-Min, ZOU Hai-Yan and ZHANG Zhe contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-2650436, E-mail: huanghe@xysm.net, luoxiaomin@gmail.com

Received: October 18, 2008 Accepted: January 19, 2009