文章编号:1000-5404(2005)08-0753-03

论著

重组生长激素对兔血脂及肝脏 LDL 受体 mRNA 的影响

傅春江,王旭开,杨成明,王红勇,方玉强,石伟彬 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆 400042)

提 要: 目的 研究重组生长激素(recombinant growth hormone, rGH)对高胆固醇饮食的新西兰兔的血脂调节作用及rGH对肝脏低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体mRNA表达的影响。初步探讨rGH影响血脂的机制。**方法** ①健康新西兰白兔,均为雄性,兔龄4个月,体质量(2.2±0.3)kg,随机分组观察高胆固醇饮食的条件下,rGH对血脂的影响。②RT-PCR技术测定兔肝低密度脂蛋白受体(low density lipoprorein receptor, LDL-R) mRNA的表达情况。**结果** ①rGH组血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)低于对照组($P<0.01$)但对甘油三酯(TG)无明显影响。②rGH组LDL-R mRNA的表达高于对照组($P<0.01$)。**结论** rGH能够有效的降低高胆固醇饮食条件下的TC、LDL-C,2.rGH降血脂的作用,可能与rGH促进LDL-R mRNA表达上调有关。

关键词: 重组生长激素;总胆固醇;低密度脂蛋白受体
中图法分类号: R322.47; R331.1; R977.1 **文献标识码**: A

Effects of recombinant growth hormone on serum lipid levels and hepatic LDL receptor mRNA of rabbits

FU Chun-jiang, WANG Xu-kai, YANG Cheng-ming, WANG Hong-yong, FANG Yu-qiang, SHI Wei-bin (Department of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effects of recombinant growth hormone (rGH) on serum lipid levels and the expression of hepatic LDL receptor mRNA of rabbits by high-cholesterol diet. **Methods** Four-month-old male rabbits with high-cholesterol diet were randomly divided into two groups: control group and rGH group. Serum lipid levels were measured after 1 or 3 months. Expression of LDL receptor mRNA in liver was determined by RT-PCR. **Results** As compared with control group, rGH group had lower levels of serum TC, LDL-C, higher levels of LDL receptor mRNA in liver, but no change for serum TG. **Conclusion** rGH enhanced the expression of LDL receptor mRNA in liver, which may be related to the mechanisms of rGH lowering serum lipid levels.

Key words: recombinant growth hormone; total cholesterol; low density lipoprotein receptor

高脂血症是冠心病的主要危险因素,大量临床和病理研究证实,总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和载脂蛋白B(apolipoprotein B, Apo-B)升高可促进人类动脉粥样硬化的形成,流行病学资料表明,心血管的疾病发病率和病死率与TC、LDL-C水平成正相关。现已公认,血清TC水平升高是冠心病的主要危险因素之一,因此,降TC治疗已成为冠心病的基础防治措施。De Boer等[1]发现生长激素(growth hormone, GH)缺乏患者血中TC、低密度脂蛋白胆固醇LDL-C和ApoB明显高于正常人,Li、Hassan等[2,3]采用GH替代治疗生长激素缺乏患者,能降低患者血中TC和LDL-C,但重组生长激素(rGH)对血脂的调节机理目前仍未阐明,本研究采用高脂饮食动物模型,给予rGH干预,探讨rGH对血脂的调节作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

28只健康雄性4月龄新西兰家兔,体质量(2.2±0.3) kg,分4组,每组7只,具体分为:对照组(NC):给予正常饮食;高胆固醇组(HC):给予高胆固醇饲料+注射用水0.2 ml/d皮下注射;rGH 0.2组(HC+rGH 0.2):给予高胆固醇饲料+rGH 0.2 IU·kg^{-1}·d^{-1}皮下注射;rGH 0.4组(HC+rGH 0.4):给予高胆固醇饲料+rGH 0.4 IU·kg^{-1}·d^{-1}皮下注射。

1.2 试剂

rGH(Sigma公司)、Tripure总RNA抽提试剂盒、RT-PCR试剂盒(Promega); LDL-R primer (148 bp): 5′-GACATTTGCACTTG-

作者简介:傅春江(1972-),男,重庆市大足县人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事血脂与动脉硬化的关系方面的研究。电话:(023)68757246
通讯作者:王旭开,电话:(023)68757266
收稿日期:2003-09-19;修回日期:2004-01-12

GTGCGT-3′、5′-ATACAGTGGTTCAAATGCGC -3′; GAPDH primer(220 bp): 5′-GGTATCAATGGGTTTGGTCG -3′、5′-AATGGATCCCTCTCGC -AGTA-3′,由上海博亚生物公司合成。

1.3 兔高脂血症模型的建立和 rGH 的干预方法

参照文献[4,5]方法:以全价营养饲料 + 3% 胆固醇粉 + 5%猪油乳剂喂饲动物,建立高脂血症的兔模型, rGH 干预组同时给予 0.2 IU/kg 或 0.4 IU/kg,每天颈部皮下注射 1 次,连续 3 个月。

1.4 血脂的测定

抽取兔耳缘静脉血 2 ml,置入肝功管,4 000 r/min 离心 5 min 后分离出血清,送入 Beckman 全自动生化分析仪,测定血脂。

1.5 兔肝组织 LDL 受体 mRNA 表达水平

按试剂盒说明提取兔肝脏组织总 RNA,紫外测定 RNA 浓度和纯度, $D(260)$、$D(280)$, $D(260)/D(280)$ 在 1.8 ~ 2.0,说明 RNA 纯度较高。逆转录酶反应体系如下:总 RNA (1 μg)、Oligo (dT) 151 μl、DEPC H_2O 6 μl、5 × cDNA buffer 4 μl、10 mmol/L dNTPs 1 μl、100 mmol/L DTT 2 μl、AMV 1 μl、Rnasin 1 μl,混匀后短暂离心,25 ℃ 15 min、42 ℃ 50 min、95 ℃ 5 min、冰浴 10 min,逆转录兔肝 cDNA。GAPDH、LDL-R PCR 扩增反应体系如下:10 × PCR buffer(5 μl)、上下游引物(20 μmol/L)各 1 μl、cDNA(5 μl) *Tag* 酶(2 U)、dNTPs (10 mmol/L) 2 μl、25 mmol/l $MgCl_2$ 5 μl、DEPC H_2O 30 μl,R 反应条件:99 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min;58 ℃ 1 min;72 ℃ 1 min,35 cycles;72 ℃ 10 min,反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, Biorad 凝胶扫描分析各产物表达水平,每批实验结果至少重复 3 次。

1.6 统计分析

采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各实验组兔血 TC 变化

实验前各组 TC 无明显差别, 对照组实验 1、3 个月,均无显著差别。rGH 0.2 组、rGH 0.4 组 TC 明显升高,但低于高胆固醇组,说明在高胆固醇饮食的条件下,给予生长素干预,可部分降低高脂饮食兔血 TC 水平。各实验组,1 个月后均出现 TC 升高的现象,3 个月后又出现下降,但是所有喂食高胆固醇的动物 TC 升高均特别明显,表明高胆固醇饮食能够促使兔血脂升高。我们发现 rGH 0.4 组降 TC 的作用有优于 rGH 0.2 组的趋势,但无明显差异($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 实验前后 TC 的变化 ($n = 7$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab 1 Changes of serum TC in rabbits ($n = 7$, ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Group	Before treatment	1 month after treatment	3 months after treatment
NC	2.17 ± 0.29	3.28 ± 0.73▲▲	2.44 ± 0.17▲▲
HC	3.11 ± 0.45	46.03 ± 6.23△	33.88 ± 2.97
HC + 0.2rGH	2.75 ± 0.39	36.52 ± 5.17△	12.38 ± 1.51▲▲
HC + 0.4rGH	2.86 ± 0.65	30.49 ± 3.67▲△	10.87 ± 1.76▲▲

▲: $P < 0.05$, ▲▲: $P < 0.01$, *vs* HC; △: $P < 0.01$, *vs* before treatment

2.2 各实验组兔血 LDL-C 变化

从表 2 可看出,实验前各组 LDL-C 无明显差别, 实验 3 个月后,除对照组外,其余各组 LDL-C 均明显升高,升高的程度 rGH 0.4 组 < rGH 0.2 组 < 高胆固醇组。在各组中,LDL-C 在实验后 1 个月达到最高水平,3 个月后又有所下降。和 TC 一样,所有喂食高胆固醇的动物 LDL-C 升高都特别明显,表明高胆固醇饮食能够促使兔血脂升高。经统计学分析,实验 3 个月后 rGH 0.2 组和 rGH 0.4 组的 LDL-C 水平与高胆固醇组相比较 $P < 0.01$,说明 rGH 能有效预防由高胆固醇饮食引起的 LDL-C 升高。虽然 rGH 0.4 IU/kg 组 3 个月后 TC 的水平有低于 rGH 0.2 IU/kg 组的趋势,但经检验差异不显著(表 2)。

表 2 实验前后 LDL-C 的变化 ($n = 7$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab 2 Changes of serum LDL-C in rabbits ($n = 7$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Group	Before treatment	1 month after treatment	3 months after treatment
NC	1.17 ± 0.20	1.21 ± 0.27▲▲	1.14 ± 0.17▲▲
HC	1.28 ± 0.62	18.62 ± 2.00△	18.15 ± 1.57▲▲
HC + 0.2rGH	1.63 ± 0.37	22.85 ± 1.17△	8.26 ± 0.90▲▲
HC + 0.4rGH	1.75 ± 0.54	20.95 ± 1.27△	7.57 ± 1.10▲▲

▲▲: $P < 0.01$, *vs* HC; △: $P < 0.01$, *vs* before treatment

2.3 各实验组兔血 TG 变化

实验前各组血 TG 无明显差别,无论是干预 1 个月还是 3 个月后,除对照组外,各组都有明显的升高,其中以 rGH 0.2 组升高最为明显($P < 0.01$)。说明 rGH 不能预防由高胆固醇饮食引起的 TG 升高(表 3)。

表 3 实验前后 TG 的变化 ($n = 7$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab 3 Changes of serum TG in rabbits ($n = 7$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Group	Before treatment	1 month after treatment	3 months after treatment
NC	0.77 ± 0.06	0.50 ± 0.05▲▲	0.89 ± 0.17▲▲
HC	0.76 ± 0.15	1.06 ± 0.14	1.58 ± 0.23
HC + 0.2rGH	0.82 ± 0.17	1.34 ± 0.34	1.67 ± 0.23
HC + 0.4rGH	0.57 ± 0.11	0.93 ± 0.14	1.30 ± 0.34

▲▲: $P < 0.01$, *vs* HC

2.4 各干预组兔肝脏 LDL-R mRNA 表达水平变化

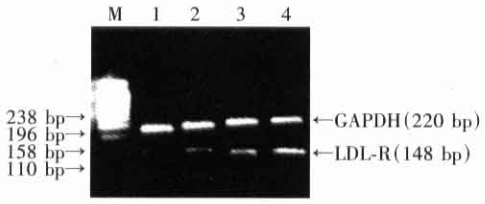
由表 4、图 1 可看出,正常饮食组 Rx 为 11.47,rGH 0.2 IU/kg 的 Rx 为 57.25,rGH 0.4 IU/kg 组的 Rx 值为 77.55,单纯高胆固醇饮食组的 Rx 为 27.98,也明显比正常饮食组高。说明在高胆固醇饮食组中,由于血脂升高,可能代偿性的引起肝脏 LDL 受体 mRNA 表达增加。在两个 rGH 组 LDL-R mRNA 的表达增加更为明显,说明 GH 降低血脂的作用有可能与促使 LDL-R mRNA 表达增加有关。

表 4 各干预组兔肝脏 LDL-R mRNA 表达水平 ($n = 7$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab 4 Expression of LDL receptor mRNA in liver tissue after high-cholesterol diet ($n = 7$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Group	V_X OD/mm^2	V_{GAPDH} OD/mm^2	Rx
NC	0.5141 ± 0.0810	4.4835 ± 0.1206	11.47▲
HC	1.3610 ± 0.0690	4.9856 ± 0.1299	27.98
HC + 0.2rGH	2.8910 ± 0.1518	5.0499 ± 0.1170	57.25▲▲
HC + 0.4rGH	4.2585 ± 0.1034	5.4911 ± 0.1232	77.55▲▲

▲: $P < 0.05$, ▲▲: $P < 0.01$, *vs* HC; Rx = Vx/VGAPDH, Vx = f(ODx)



M: Marker; 1: NC; 2: HC;3: HC + rGH 0.2 IU/kg; 4: HC + rGH 0.4 IU/kg

图 1　兔肝脏组织 LDL-R mRNA 表达电泳图

Fig 1　Electrophoretic results of LDL-R mRNA from rabbit liver

3　讨论

我们的实验结果证实,rGH 能够影响血脂代谢。在本实验中,rGH 组经过 3 个月的 rGH 的干预,其 TC、LDL-C 比 HC 组明显降低。以前的研究表明,在总体生理功能上,GH 具有促进机体生长、维持肌肉基质和长度,并有对抗胰岛素和促进合成代谢的作用。我们的研究证实了 GH 对血脂存在重要的影响,主要体现在对 TC 和 LDL-C 的影响上。而以前国内对 GH 的研究主要集中在对蛋白质和糖代谢的影响上。GH 发挥功能作用主要经由两个途径:①诱导肝细胞、肌细胞产生生长激素介质(somtomedin, SM) 再经由 SM 间接起作用;②直接作用于靶细胞产生生理效应。无论哪一种方式 GH 都需要首先同细胞表面特异性受体结合,再由受体介导,激发一系列生化事件并最终产生生物学效应。这也有可能是 GH 调节血脂的最基本的基础。不同种属 GH 同源性有差异,人类和兔 GH 的同源性有 81% ~ 99% 相同。由于人类生长激素和兔的同源性较高,所以具有相似的生理作用。

至于 GH 对血脂代谢的影响很多学者都有发现,大部分学者的研究表明生长激素能够降低血中 TC、LDL-C[6-8],我们的结果也证实了这一点。从我们的实验结果看,无论是 0.2 IU/kg 组还是 0.4 IU/kg 组,对 TG 虽然有降低作用,但和高胆固醇组相比,无显著差异($P > 0.05$)。说明 rGH 对 TG 的影响是比较小的。在生长激素缺乏的患者中,血脂水平是明显升高的,其心血管危险因素也比正常人要增加许多。Eiholzer 研究了 25 例生长激素缺乏患者儿童的心血管病危险因素,发现所有患儿的脂肪是超标的,腰-髋比增加约 35%。经过 GH 治疗后,脂肪和腰-髋比均降至接近正常水平。LDL-C 亦降低,但 HDL-C 却增高,以至 LDL-C/HDL-C 明显降低[9]。

我们的结果表明,rGH 能够促进肝脏 LDL 受体 mRNA 的表达,而单纯高胆固醇饮食的兔也出现肝脏 LDL-C 受体 mRNA 表达上调的情况,这有可能是由于血脂升高后的一种反馈,是机体调节血脂的一种保护措施。但其促进肝脏 LDL 受体 mRNA 表达上调的程度不如 rGH 组。因此,我们推测 rGH 在调节血脂的过程当中与其促进肝脏 LDL-C 受体 mRNA 表达上调有关,在使用 rGH 干预后,兔肝脏 LDL-R mRNA 表达是增加的,从而肝脏摄取 LDL 的能力提高,加速血脂代谢,达到降低血脂的作用,继而起到防止动脉粥样硬化及脂肪肝的作用。关于 GH 调节血脂的进一步机制,目前仍不明确,过去曾有人提出 GH 对血脂的影响,是通过胰岛素样生长因子-I(IGF-I)起作用的。总之,关于 GH 调节血脂的机制,研究尚未深入,目前仍不明确。从整个实验来看,我们的研究只能初步证实 rGH 具有一定的降脂作用,而且其机制可能和 rGH 促进 LDL-R mRNA 的表达有关,但具体环节仍不清楚。由于目前 GH 对血脂的影响大部分限制于动物实验和 GH 缺乏的患者,加之有可能有升高 Lpa 的作用,因此目前对于生长激素降低血脂的作用能否应用于临床尚持保守态度。但如果应用于高脂血症并存生长激素缺乏的患者,应该是很有前景的。

参考文献:

[1] De Boer H, Blok G J, Voerman H J, *et al*. Serum lipid levels in growth hormone-deficient men[J]. Metabolism, 1994, 43(2): 199 - 203.

[2] Li Voon Chong J S, Benbow S, Foy P, *et al*. Elderly people with hypothalamic-pituitary disease and growth hormone deficiency: lipid profiles, body composition and quality of life compared with control subjects[J]. Clin endocrinol(Oxf), 2000, 53(5): 551 - 559.

[3] Hassan H M, Kohno H, Kuromaru R, *et al*. Body composition, atherogenic risk factors and apolipoproteins following growth hormone treatment[J]. Acta Paediatr, 1996, 85(8): 899 - 901.

[4] 郑晓伟, 曾定尹, 王晓静, 等. 血脂康对高脂饮食家兔血管内皮细胞功能的保护作用[J]. 中华内科杂志, 1998, 37(6): 367 - 370.

[5] 张　彤, 徐成斌, 张新超, 等. 普伐他汀和西立伐他汀对高胆固醇喂养兔的血管内皮功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(12): 1324 - 1326.

[6] Weltman A, Despres J P, Clasey J L, *et al*. Impact of abdominal visceral fat, growth hormone, fitness, and insulin on lipids and lipoproteins in older adults[J]. Metabolism, 2003, 52(1): 73 - 80.

[7] Van Pareren Y K, De Muinck Keizer Schrama S M, Stijnen T, *et al*. Effect of discontinuation of long-term growth hormone treatment on carbohydrate metabolism and risk factors for cardiovascular disease in girls with Turner syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(12): 5442 - 5448.

[8] Florakis D, Hung V, Kaltsas G, *et al*. Sustained reduction in circulating cholesterol in adult hypopituitary patients given low dose titrated growth hormone replacement therapy: a two year study[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2000, 53(4): 453 - 459.

[9] l'Allemand D, Eiholzer U, Schlumpf M, *et al*. Cardiovascular risk factors improve during 3 years of growth hormone therapy in Prader-Willi syndrome [J]. Eur J Pediatr, 2000, 159(11): 835 - 842.

(编辑　张大春)