维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)05－0660－03

抵抗素对肝细胞葡萄糖激酶和磷酸烯醇式丙酮酸激酶活性的影响

李超林[1]，龚　明[1]，肖　谦[1]，黄昶全[1]，彭惠民[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院老年科;2.重庆医科大学基础医学院生物教研室,重庆　400016)

【摘　要】目的:观察抵抗素(Resistin)对肝细胞糖代谢关键酶葡萄糖激酶(GK)和磷酸烯醇式丙酮酸激酶(PEPCK)活性的影响及剂量效应。方法:正常大鼠的肝细胞,以不加 Resistin 与加不同剂量的 Resistin 培养 24h,用 6－磷酸葡萄糖脱氢酶偶联比色法、乳酸脱氢酶偶联比色法检测不同剂量 Resistin 对 GK 和 PKPCK 的影响。结果:Resistin 浓度为 10nM/L、50nM/L 时,GK 活性与空白对照组无明显差异,PEPCK 活性明显升高($P<0.05$);当 Resistin 浓度上升为 100nmol/L 后,GK 活性较空白对照组明显下降($P<0.01$),而 PEPCK 活性升高更明显($P<0.01$)。结论:抵抗素浓度升高使大鼠肝细胞 GK 活性下降,PEPCK 活性升高,从而抑制糖酵解促进糖异生,升高血糖。上述两种酶的活性与抵抗素浓度呈现不同的剂量依赖关系。

【关键词】肝细胞;葡萄糖激酶;磷酸烯醇式丙酮酸激酶;抵抗素

【中国图书分类法分类号】R587　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－12－06

Effect of resistin on activity of glucoskinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in cultured liver cells

LI Chaolin, et al

(*Department of geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effect of resistin on activity of glucoskinase (GK) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in cultured rat liver cells. *Methods*: Rat liver cells were incubated with resistin of different doses (ranging from 10nM/L to 100nM/L). Controled liver cells were invubated without resistin. Glucose－6－phosphate dehydrogenase couple chromatometry and lactate dehydrogenase couple chromatometry were used to determine activity of GK and PEPCK. *Results*: Compared with the control group, treated with resistin of 10nM/L and 50nM/L for 24h had no significant effect on activity of GK, but activity of PKPCK increased significantly ($P<0.05$). At the dose of 100nM/L, resistin inhabited activity of GK markedly ($P<0.01$), while activity of PKPCK increased more significantly ($P<0.01$). *Conclusion*: The increase of Resistin leads to the decrease of activity of GK and increase of activity of PEPCK in rat liver cells, hence inhabite glycolysis and promote glyconeogenesis and increase blood glucose as well. The activity of two enzymes shows dose dependent relation with resistin.

【Key words】Liver cells; Glucoskinase; Phosphoemolpyruvate carboxykinase; Resistin

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病最显著的病理特征,也是肥胖、心血管疾病的重要发病机制。最近研究证实,发生胰岛素抵抗的患者血中的抵抗素水平明显升高。但是抵抗素参与胰岛素抵抗发生发展的机制尚不明了,是目前研究的重点课题之一。肝脏胰岛素抵抗是胰岛素抵抗的重要组成部分,本文拟通过抵抗素对肝细胞糖代谢关键酶—葡萄糖激酶和磷酸烯醇式丙酮酸激酶活性的影响,并初步探讨抵抗素对肝脏糖代谢的影响。

1　材料和方法

1.1　实验材料与试剂

正常大鼠肝细胞株 BRL(上海细胞研究所),RPMI1640 培养基(Gibcol BRL 公司;抵抗素(Americo);NADP、ATP、6－磷酸葡萄糖脱氢酶、三乙醇胺(TEA)、$ADPNa_2$、NADH、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶、肌苷、草酰乙酸,均购自 Sigma 公司;CO_2 孵箱(美国 Napco 公司)超速低温离心机,7520 型分光光

作者介绍:李超林(1978－　),男,住院医师,
主要研究方向:糖尿病及其慢性并发症。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助(03－2－109)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

度计。

1.2 肝细胞的培养与处理

正常大鼠肝细胞株 BRL，于含 10% 小牛血清(BSA)、1% 双抗(青霉素、链霉素)的 RPMI1640 培养液中，在 5% CO_2，37℃ 条件下，于 CO_2 培养箱用六孔板中进行培养。每 2 天换液 1 次。选择生长良好的细胞进行如下实验：细胞分不加抵抗素(空白对照组)、加终浓度分别为 10nmol/L、50nmol/L、100nmol/L 的抵抗素处理，每种条件重复 3 次以上，于培养 24h 后检测酶活性的变化。

1.3 样品的处理

吸出待检测细胞的培养液，用 PBS 洗细胞两次。250μl 匀浆缓冲液(Tris－HCl 0.1mol/L，pH 值 7.5；EDTA 5mmol/L；$MgCl_2$ 5mmol/l；KCl 0.15mmol/L)刮细胞至微量离心管内，超声破膜 30s(保持标本在冰上)，11000r/min，4℃ 离心 15min，取上清液 50μl 加入酶反应体系。

1.4 葡萄糖激酶活性测定

GK 活性测定采取 6－磷酸葡萄糖脱氢酶偶联比色法。反应体积 3ml，最终含：Tris－HCl 100mmol/L，pH 值 7.5；NADP 0.2mmol/L；ATP 5mmol/L；$MgCl_2$ 5mmol/L；6－磷酸葡萄糖脱氢酶 0.2U；每次设定高糖测定管(葡萄糖终浓度为 100mmol/L)和低糖测定管(葡萄糖终浓度为 0.5mmol/L)。上述溶液混匀后置 30℃ 预温 5min，再加肝细胞上清液 50μl 反应。用蒸馏水调零，在波长 340nm 处测吸光度，每 30s 记录 1 次，连续记录 3min。测出每分钟光密度的增加值，并从高糖管测得值中减去低糖管测得值。

1.5 磷酸烯醇式丙酮酸激酶活性测定

PEPCK 活性测定采用乳酸脱氢酶偶联比色法。测定管：肝细胞上清液 50μl，加入基质缓冲液 1ml，置 37℃ 水浴孵育 5min，加入 1.5mmol/L 的草酰乙酸 50μl，混匀。空白管：蒸馏水 50μl，加入基质缓冲液 1ml，置 37℃ 水浴孵育 5min，加入 1.5mmol/L 的草酰乙酸 50μl，混匀。选定 340nm 光波，用蒸馏水调零，分别读取空白管和测定管吸光值。每 30s 记录一次，连续记录 3min，用空白管的吸光值减去测定管。

1.6 其它

上述两种酶的活性的比活性的公式计算：吸光度变化/min×1/6.22(NADPH 吸光系数)×$V_{总}/V_{样}$×1000/蛋白质浓度(g/L)。蛋白值的测定以牛血清白蛋白为标准，按考马斯亮兰法进行测定。酶比活性的单位表示为 mU/min/mg protein。

1.7 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组数据间比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 不同浓度的抵抗素对肝细胞葡萄糖激酶活性的影响

分别用 10nmol/L、50nmol/L、100nmol/L 的抵抗素处理正常大鼠的肝细胞 24h，用 6－磷酸葡萄糖脱氢酶耦联比色法测定空白对照组(不加任何处理因素)和三个浓度组的葡萄糖激酶活性的变化。实验发现抵抗素浓度为 10nmol/L 和 50nmol/L 时，葡萄糖激酶的活性与对照组相比虽有所下降，但并无统计学意义。当抵抗素浓度上升为 100nmol/L 时，葡萄糖激酶的活性较对照组明显下降($P<0.01$)，见表 1。

2.2 不同浓度的抵抗素对肝细胞磷酸烯醇式丙酮酸激酶的影响

分别用 10nmol/L、50nmol/L、100nmol/L 的抵抗素处理正常大鼠的肝细胞 24h，用乳酸脱氢酶偶联比色法检测空白对照组(不加任何处理因素)和三个浓度组的磷酸烯醇式丙酮酸激酶活性的变化。实验发现抵抗素浓度为 10nmol/L 和 50nmol/L 时，磷酸烯醇式丙酮酸激酶活性明显较对照组明显升高($P<0.05$)，当抵抗素浓度上升为 100nmol/L 时，磷酸烯醇式丙酮酸激酶活性升高更明显($P<0.01$)，见表 2。

表 1 不同浓度的抵抗素对肝细胞葡萄糖激酶活性的影响

组别	葡萄糖激酶的活性 (mIU/min/mg protein)
对照组	3.63±0.76
抵抗素 10nmol/L	3.37±0.70
抵抗素 50nmol/L	3.31±0.65
抵抗素 100nmol/L	1.56±0.11

*：与正常对照组比较 $P<0.01$

表 2 不同浓度的抵抗素对肝细胞磷酸烯醇式丙酮酸激酶的影响

组别	磷酸烯醇式丙酮酸激酶活性 (mIU/min/mg protein。)
对照组	26.58±2.62
抵抗素 10nmol/L	31.76±2.38*
抵抗素 50nmol/L	31.98±2.30*
抵抗素 100nmol/L	40.37±1.52**

*：与正常对照组比较 $P<0.05$，**：$P<0.01$

3 讨 论

抵抗素是近年发现的由脂肪细胞特异分泌的一种多肽类激素，所以又称为脂肪组织特异分泌因子，它可能导致胰岛素抵抗，是联系肥胖和 2 型糖尿病

维普资讯 http://www.cqvip.com

的重要信号分子。已有研究证实遗传性和饮食诱导的肥胖小鼠，血浆抵抗素水平均升高，而给予抵抗素抗血清使胰岛素敏感性增加，血糖改善。用罗格列酮处理体外培养的 3T3－L1 细胞，发现抵抗素 mRNA 表达明显减低，4d 后抵抗素蛋白分泌量减少[1]。也有研究发现，给小鼠腹腔注射纯化抵抗素后，小鼠血糖较对照组升高 28%，且血胰岛素水平也升高，提示抵抗素导致糖耐量损害，不是体内胰岛素的分泌减少，而是与胰岛素抵抗有关。抵抗素可能通过抑制胰岛素介导的葡萄糖摄取，而引起糖耐量减低[2]。也有研究证实剔除抵抗素基因的小鼠的空腹血糖低于正常小鼠的 20%～30%。提示抵抗素可以明显损害肝脏的胰岛素敏感性，促进肝糖原的输出，升高血糖[4]。以上结果显示抵抗素参与胰岛素抵抗的形成，与 2 型糖尿病的关系十分密切。但其详细的机制尚不明了。

肝脏是物质代谢最活跃的场所，它可使过多的血糖迅速转化为糖原及进行氧化的利用，并通过糖异生和糖原分解补充血糖的不足，在维持血糖浓度的稳定中起关键作用。许多激素均通过影响肝脏的糖代谢过程发挥对血糖的调节。葡萄糖激酶和磷酸烯醇式丙酮酸激酶分别为肝内糖酵解和糖异生的关键酶，通过观察抵抗素对这两种糖代谢关键酶活性的影响，初步探讨抵抗素对血糖代谢的影响，以明确起其在胰岛素抵抗中的作用。本研究发现 10nmol/L、50nmol/L 的抵抗素对葡萄糖激酶的活性无明显影响，当浓度上升到 100nmol/L 时，抵抗素则明显抑制葡萄糖激酶的活性。但 10nmol/L、50nmol/L 的抵抗素则可以明显增强磷酸烯醇式丙酮酸激酶的活性，100nmol/L 的作用更明显。但上述作用产生的机制还不清楚，目前尚没有关于抵抗素在肝脏是否有受体的报道，但是不能排除这种可能性。也有报道认为抵抗素可能通过 AMPK（磷酸腺苷激活蛋白激酶）途径影响酶的活性，也可能通过影响胰岛素受体或受体后作用而发挥作用[3,4]。

目前抵抗素参与胰岛素抵抗的机制还存在争议，许多资料的研究报道差异比较大。本文观察抵抗素对肝细胞糖代谢关键酶活性的影响，发现 100nmol/L 的抵抗素使大鼠肝细胞 GK 活性下降，10nmol/L、50nmol/L、100nmol/L 的抵抗素使 PEPCK 活性升高。从而抑制糖酵解促进糖异生，升高血糖。而且两种酶的活性与抵抗素浓度呈现不同的剂量依赖关系。以上结果提示抵抗素水平的异常升高可影响糖代谢。本实验从一个方面证实了抵抗素在胰岛素抵抗患者糖代谢异常中的作用，有助于更全面的了解抵抗素在胰岛素抵抗发生发展中作用机制。

参 考 文 献

[1] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obsity to diabetes[J]. Nature, 2001; 409(6818): 307－312.

[2] Yamauchi T, Waki H, Kanon J, et al. Inhabition of RXR and PPARγdiet－induced obsity and type 2 diabetes[J]. J Clin Invest, 2001; 108(7): 1001－1013.

[3] Ronadip R, Shamina M, Jennifer S, et al. Regulation of Fasted Blood Glucose by Resistin [J]. Science, 2004; 303(5661): 1195－1198.

[4] Rajala M, Obici S, Scherer P, et al. Adipose－derived resistin and gut－derived resistin－like molecule－[beta] selectively impair insulin action on glucose production[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2003; 111(2): 225－230.

[5] 王毓三，马 莹，陈江华. 烯醇化酶活性测定的三种方法及其评价[J]. 临床检验杂志，1990; 8(3): 14.

[6] 周建新，钟小林，李蓉芬，等. 烫伤大鼠肝葡萄糖激酶、肌己糖激酶活性及红细胞三磷酸腺苷含量的变化[J]. 第三军医大学学报，1994; 16(3): 178－181.

[7] 马健飞，周希静. HB－EGF 对系膜细胞己糖激酶活性的调节[J]. 中国医科大学学报，2001; 30(2): 91－93.