维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)04－0567－03

脂联素对大鼠肝细胞葡萄糖激酶与磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性影响的研究

龚　明,李超林,肖　谦,黄昶荃

(重庆医科大学附属第一医院老年病科内分泌组,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨脂联素对体外培养大鼠肝脏细胞葡萄糖激酶与磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性影响,及其在胰岛素抵抗中的意义。方法:以 BRL 肝脏细胞株为细胞模型,分别用 10μg/ml、30μg/ml、50μg/ml 脂联素处理细胞,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大鼠肝脏细胞葡萄糖激酶与磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性。结果:与对照组比较,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶在脂联素处理 24h 后活性明显降低,且随脂联素浓度升高作用越明显,$P<0.05$。葡萄糖激酶在脂联素处理 24 小时后,活性与对照组比较没有显著性差异,$P>0.5$。结论:脂联素对葡萄糖激酶无明显的调节作用,而对于磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶具有显著的抑制作用。脂联素通过对肝细胞磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性的调节,降低肝脏葡萄糖异生,减少肝糖输出,改善胰岛素抵抗。

【关键词】脂联素;葡萄糖激酶;磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶;胰岛素抵抗

【中国图书分类法分类号】R538　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－12－13

Study on the effect of adiponectin on enzymatic activity of glucokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in cultured rat's liver cells

GONG Ming, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of adiponectin on enzymatic activity of glucokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in cultured rat's liver cells. *Methods*: The BRL was used as cell model. The rat liver cells were incubated with adiponectin of three different concentrations (10μg/ml, 30μg/ml and 50μg/ml). Controlled cells were incubated without adiponectin. Enzymatic activity of GK was investigated by using a standard G6P－coupled assay. Enzymatical activity of PEPCK was assessed by using a standard LDH－coupled assay. *Results*: Compared with the control group, treated group with adiponectin of all concentrations for 24h had no significant effect on enzymatic activity of glucokinase. Enzymatic activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase was significantly decreased even in the lowest concentration of adiponectin, and along with increased in adiponectin concentration enzymatic activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase decreased more significantly. *Conclusion*: Adiponectin has no significant effect on ezymatic activity of glucokinase. However adiponectin decreases enzymatic activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase significantly. Through this effect, adiponectin decreases liver glucose production and improves insulin resistance.

【Key words】Adiponectin; Glucokinase; Phosphoenolpyruvate; Carboxykinase; Insulin resistance

近年来的研究发现,脂肪组织除储存甘油三酯外,尚具有活跃的内分泌功能,其分泌的多种激素与细胞因子参与神经、内分泌与免疫网络的调节,尤其是对于能量代谢的调节具有重要的作用。

脂联素(adiponectin,APN)亦称 Acrp30、Apm1、AdipoQ 及 GBP28,是脂肪组织分泌的肽类激素之一,具有增强胰岛素敏感性、抗高血糖的作用,目前认为脂联素是一种改善胰岛素抵抗的激素[1]。多项研究发现 Pima 印第安人、高加索人及日本人血浆脂联素水平与空腹和餐后血糖、空腹和餐后胰岛素水平成负相关,与胰岛素敏感性成正相关[2~4]。但对于脂联素抗高血糖、增强胰岛素敏感性的机制仍不明确,为此本研究通过采用不同浓度的脂联素处理体外培养的大鼠肝脏细胞,考察处理前后细胞葡

作者介绍:龚　明(1974－　),男,主治医师,硕士,主要研究方向:糖尿病及其慢性并发症。

基金项目:重庆市卫生局课题(03－2－109)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

葡萄糖激酶(GK)与磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)活性的变化,从能量代谢调节途径探讨脂联素改善胰岛素抵抗的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞株 BRL-大鼠肝脏细胞株,购自中科院细胞库。

1.1.2 实验试剂与设备 脂联素购自美国 BioVendor 公司,6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)、烟酸胺腺嘌呤二核苷酸磷酸($NADP^+$)、三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、肌苷、草酰乙酸、乙二胺四乙酸(EDTA)均购自 Sigma 公司。RPMI1640 购自 Gibcol BRL 公司。CO_2 孵箱(美国 Napco 公司)、超声破膜仪、高速低温离心机(Sigma 公司)、紫外分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 BRL 细胞用含 10% 新生小牛血清、100Ku/L 青霉素、100Ku /L 链霉素的 RPMI1640 培养液,置于 5%CO_2、37℃孵箱内进行培养。每天换液、隔日传代,选取生长良好的细胞种植于 24 孔板。

1.2.2 实验分组 把培养的 BRL 细胞随机分为空白对照组和脂联素(实验)组,在实验组根据不同脂联素终浓度又分为 10μg/ml、30μg/ml 及 50μg/ml 三个组,每组样本量为 3 孔细胞。

1.2.3 GK 活性测定 把 BRL 细胞种植于 24 孔板,待细胞贴壁生长达孔底 80% 左右时,在实验组加入脂联素分别达到 10μg/ml、30μg/ml 及 50μg/ml 终浓度,对照组不加脂联素。继续培养 24h 后,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;在 10 磅强度超声下 30s 破碎细胞;4℃、12000r/min 低温离心 15min 获取细胞上清液用于酶活性测定。

GK 活性测定采取 6-磷酸葡萄糖脱氢酶偶联比色法。反应体系 3ml,其中含 Tris-HCl 100mmol/L,$NADP^+$ 0.2mmol/L,ATP 5mmol/L,MgCl 5mmol/L,G6PD 0.2U,pH 为 7.5。每次测定设高糖管(葡萄糖终浓度为 100mmol/L)和低糖管(葡萄糖终浓度为 0.5mmol/L)。反应体系充分混匀后 30℃水浴 5min,再加入肝细胞上清液 50μl 进行反应。反应中 $NADP^+$ 被还原生成 NADPH,其产量与样品中 GK 活性呈正相关。NADPH 在 340nm 处有一吸收峰,故通过吸光度的增加可间接反应酶活性。用蒸馏水调零,在 340nm 处读取吸光度的变化,每 30s 记录 1 次,连续记录 3min,测出每分钟光密度的增加值,根据以下公式计算酶活性:酶活性(U/ml)=吸光度变化(/min)/6.22(NADPH 吸光系数)

其中高糖管测得的是样品中总己糖激酶活性,低糖管测得的是低 Km 己糖激酶活性,高糖管减去低糖管就得到样品的 GK 活性。然后用考马斯亮兰法测定上清液中蛋白质含量,并计算酶比活性。

1.2.4 PEPCK 活性测定 用上述方法处理并获得肝细胞上清液。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,充分混匀。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,充分混匀。反应中 NADPH 被氧化生长 $NADP^+$,其减少的量与样品中 PEPCK 的活性呈正相关,故通过 NADPH 在 340nm 处吸光度的减少可间接反应酶活性。用蒸馏水调零,在 340nm 处读取吸光度的变化,每 30s 记录 1 次,连续记录 3min,测出每分钟光密度的增加值,酶活性计算公式同前。最后用考马斯亮兰法测定上清液中蛋白质含量,并计算酶比活性。

1.3 统计学处理

计量资料的表示采用($\bar{x} \pm s$),统计学处理运用 SAS 8.0 统计软件,各组之间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 脂联素对 PEPCK 活性的影响(结果见表 1)

不同浓度的脂联素处理 BRL 细胞 24h 后,检测 PEPCK 活性。与对照组比较,可见较低浓度(10μg/ml)脂联素对 PEPCK 活性即存在显著的抑制作用,$P<0.05$。且随着脂联素浓度的提高,对 PEPCK 活性的抑制效应增强,50μg/ml 脂联素对 PEPCK 抑制作用最强,$P<0.01$。

表 1 脂联素对 PEPCK 活性的影响

组 别	酶活性均值	P
对照组	26.58±2.42	
10μg/ml	20.34±2.48	<0.05
30μg/ml	15.36±2.34	<0.05
50μg/ml	8.71±2.02	<0.01

表 2 脂联素对 GK 活性的影响

组 别	酶活性均值	P
对照组	3.63±0.76	
10μg/ml	3.68±0.80	>0.50
30μg/ml	3.70±0.75	>0.50
50μg/ml	3.71±0.79	>0.50

2.2 脂联素对 GK 的影响(结果见表 2)

不同浓度的脂联素处理 BRL 细胞 24h 后,检测 GK 活性。与对照组比较,可见不同浓度的脂联素对 GK 活性稍有增高,但增高没有显著性差异,$P>$

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.5。

3 讨 论

胰岛素抵抗(insulin resistance IR)是 2 型糖尿病、代谢综合征、高血压、多囊卵巢综合征等多种疾病共同的病理生理基础。IR 主要表现为外周组织(骨骼肌、肝脏与脂肪组织)对胰岛素敏感性降低,在肌肉组织主要表现为骨骼肌对葡萄糖摄取利用减少;而在肝脏则表现为基础状态下肝脏葡萄糖的生成与输出增多。目前普遍认为 IR 形成是遗传与环境因素共同作用的结果,但是对于 IR 形成的具体机制仍未完全明了。新近发现脂肪组织分泌的一种肽类激素-脂联素具有提高胰岛素敏感性、抗高血糖的作用,但其具体机制仍不完全清楚。

最近的研究发现,脂肪组织分泌的多种激素与细胞因子在能量代谢的调节中具有重要的意义。脂联素是脂肪组织分泌的一种肽类激素,由 244 个氨基酸组成,约占血清总蛋白的 0.01%,在结构上与肿瘤坏死因子(TNF)-α具有高度的同源性[5]。近来对脂联素基因剔除动物模型、2 型糖尿病患者及其一级亲属的研究表明,脂联素与 IR 的发生具有高度的相关性[2,3,6]。但是,脂联素提高胰岛素敏感性的具体机制仍不十分清楚。肝脏是体内物质代谢最活跃的脏器,亦是胰岛素的重要靶器官,在维持血糖浓度稳定与 IR 形成中具有重要的地位。GK 与 PEPCK 分别是葡萄糖酵解与糖异生途径中两个重要的关键酶,其活性的改变对于肝脏葡萄糖代谢的调节具有重要的意义,可能是肝脏 IR 形成的靶点。

正常大鼠血浆脂联素水平约为 30μg/ml,在 IR 时血浆脂联素水平降低。我们在实验中,分别采用终浓度为 10μg/ml、30μg/ml 与 50μg/ml 脂联素,模拟低浓度、正常浓度与高浓度水平脂联素。在实验中发现,用不同浓度脂联素处理培养的 BRL 细胞 24h 后,与对照组比较,PEPCK 酶活性显著降低;且随脂联素水平升高,其对 PEPCK 酶活性的抑制作用愈显著,各组间有显著性差异。这与国外采用高浓度水平脂联素,在大鼠体内的实验结果相似[7]。在实验中同时发现,不同浓度脂联素处理 BRL 细胞 24h 后,与对照组比较,GK 酶活性无显著性改变。我们的实验结果证实脂联素可直接抑制肝细胞 PEPCK 酶活性,但其作用机制不明了。国外的研究提示,PEPCK 活性调节主要是位于基因转录水平,而我们的实验结果是在脂联素处理 BRL 细胞 24h 后,这可能正是脂联素抑制 PEPCK 基因转录表达、酶蛋白翻译合成的结果。脂联素是否通过以上途径抑制 PEPCK 酶活性,仍需进一步的研究。

正常生理情况下,脂联素通过抑制 PEPCK 酶活性,降低基础状态肝脏糖异生作用,从而减少肝脏葡萄糖的生长与输出,提高胰岛素敏感性。如血浆脂联素水平降低,其对肝脏 PEPCK 酶活性抑制作用减弱,基础状态下肝脏糖异生作用增强,肝脏葡萄糖生成与输出增多,从而降低肝细胞胰岛素敏感性、引起 IR 形成。我们的实验结果提示,脂联素可能在抑制或延缓 IR 形成中具有重要的作用。

综上所述,脂联素可能通过抑制肝脏 PEPCK 活性、降低肝脏糖异生作用、减少基础状态下肝脏葡萄糖的生成与输出,从而减轻 IR。我们的实验同时发现脂联素对于肝脏 GK 的活性则无明显的调节作用,可能需要作进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Stefan N, Stumvoll M, Vozarovs B, et al. Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans[J]. Diabetes Care, 2003;26(12):3315-3319.

[2] Lindsay RS, Funahashi T, Hanson, RL, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima India population [J]. Lancet, 2002;360(9326):57-58.

[3] Lihn, AS, Ostergard T, Nyholm B, et al. Adiponectin expression in adipose tissue is reduced in first-degree relatives of type 2 diabetic patients[J]. Am J lhysiol Endocrinol Metab, 2003;284(2):E443-448.

[4] Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, et al. Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study[J]. Diabetes Care, 2003;26(7):2015-2020.

[5] Yokota T, Oritani K, Takhashi I, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages[J]. Blood, 2000;96(5):1723-1732.

[6] Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation [J]. J Biol Chem, 2002;277(29):25863-25866.

[7] Combs TP, Berg AH, Obici S, et al. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30 [J]. J Clin Invest, 2001;108(12):1875-1881.