

胰高血糖素和双丁酰环腺苷酸对 HepG2 细胞分泌载脂蛋白 A_{iv}、A_I、B100、C_{III}及 E 的影响

刘 皓, 刘秉文, 吴兆丰

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 四川省成都市 610041)

[主题词] HepG2 细胞; 胰高血糖素; 双丁酰环腺苷酸; 载脂蛋白

[摘 要] 为了解胰高血糖素和双丁酰环腺苷酸在肝脏载脂蛋白代谢中的作用, 以培养的人肝癌细胞系 HepG2 细胞为研究对象, 采用“冻干浓缩培养液载脂蛋白测定法”, 观察了胰高血糖素和双丁酰环腺苷酸对 HepG2 细胞分泌载脂蛋白 A_{iv}、A_I、C_{III}、B100 及 E 的影响。结果表明, 胰高血糖素浓度为 4×10^{-7} mol/L 时, 载脂蛋白 A_{iv}、A_I、B100 及 E 的分泌分别减少 47.7%、54.1%、32.7% 和 33.2% ($P < 0.01$), 载脂蛋白 C_{III}的分泌增加 89.1% ($P < 0.01$); 双丁酰环腺苷酸的浓度为 1×10^{-3} mol/L 时, 载脂蛋白 A_{iv}、B100 和 E 的分泌分别减少 12.3%、24.9% 和 16.1% ($P < 0.01$), 载脂蛋白 A_I和 C_{III}的分泌分别增加 66.1% 和 142.6% ($P < 0.01$)。胰高血糖素和双丁酰环腺苷酸对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响基本一致。

[中图分类号] Q513

[文献标识码] A

Effects of Glucagon and Dibutyryl cAMP on Secretion of Apolipoproteins A_{iv}, A_I, B100, C_{III} and E by Cultured HepG2 Cells

LIU Hao, LIU Bing- Wen, and WU Zhao- Feng

(Apolipoprotein Research Unit, West China University of Medical Science, Chengdu 610041, China)

MeSH HepG2 Cells; Glucagon; Dibutyryl cAMP; Apolipoproteins

ABSTRACT **Aim** To study the effects of glucagon, dibutyryl cAMP on secretion of apolipoproteins A_{iv}, A_I, C_{III}, B100 and E by HepG2 cells. **Methods** The apolipoproteins contents in culture media were measured by radioimmunoassay (RIA) kits developed by authors' research laboratory. 20- fold lyophilized condensed culture media were used for the assays.

Results When the concentration of glucagon is 4×10^{-7} mol/L in culture media, the secretion of apoA_{iv}, A_I, B100 and E decreased 47.7%, 54.1%, 32.7% and 33.2% ($P < 0.01$) respectively, while the secretion of apoC_{III} increased 89.1% ($P < 0.01$); When the concentration of dibutyryl cAMP is 1×10^{-3} mol/L in culture media, the secretion of apoA_{iv}, B100 and E decreased 12.3%, 24.9% and 16.1% ($P < 0.01$) respectively, while the secretion of apoA_I and C_{III} increased 66.1% and 142.6% ($P < 0.01$).

Conclusion Glucagon and dbcAMP had similar effects on the secretion of apolipoproteins by cultured HepG2 cells.

刘秉文等^[1]从中国人膳食以高糖低脂为特点出发, 对内源性高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia, HTG) 发病机制进行了研究, 设想高糖膳食可能是我国 HTG 发病的重要原因。在大鼠中的研究发现, 高淀粉膳食诱发血胰岛素升高的同时, 血浆 cAMP 下降, 肝载脂蛋白 (apolipoprotein) AI 及 C_I 基因表达减少^[2], 肠载脂蛋白 C_{III} 基因表达增加^[3], 从而引起血浆中相应载脂蛋白改变。因此推测血浆载脂蛋白 C_I 含量的降低及 C_{III} 含量的升高可通过抑制脂蛋白脂酶的活性和/或肝脂蛋白受体功能而抑制极低

密度脂蛋白的降解, 导致 HTG 的形成。其后, 王洪敏等^[4]发现胰岛素能促进 HepG2 细胞分泌载脂蛋白 C_{III} 这一结果亦支持上述设想。胰岛素、胰高血糖素和 cAMP 三者体内的作用密切相关, 但目前有关胰高血糖素对肝脏载脂蛋白代谢影响的报道仅限于载脂蛋白 A_{iv} 和 B100, 对载脂蛋白 A_I、C_{III} 及 E 的影响则未见报道。因此我们对胰高血糖素和双丁酰环腺苷酸 (dibutyryl cAMP, dbcAMP) 对培养 HepG2 细胞分泌载脂蛋白 A_{iv}、A_I、B100、C_{III} 及 E 的影响, 进行了较为全面的观察。

1.1 材料

人肝癌细胞系 HepG2 细胞由华西医科大学免疫教研室章崇杰教授馈赠; RPMI-1640 培养基 (Gibco); L-谷氨酰胺 (EMK 进口分装); 新生小牛血清 (成都华西生化制品厂); 青霉素 G 钠、硫酸链霉素 (华北制药厂); 胰蛋白酶 (1:250, Difco 进口分装); 牛胰岛素 (Sigma); 胰高血糖素 (Gibco); 双丁酰环腺苷酸 (Sigma); 载脂蛋白试剂盒 (载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 A ①、载脂蛋白 B100、载脂蛋白 C ④、载脂蛋白 E) 为华西医科大学载脂蛋白研究室研制; 其它试剂均为国产分析纯。二氧化碳孵箱 (Queue, USA)。

1.2 人肝癌细胞系 HepG2 的培养

复苏的 HepG2 细胞种入 100 mL 培养瓶中, 其中加入约 5 mL 完全培养基 (90% RPMI1640、10% 新生小牛血清、4 mmol/L 谷氨酰胺、100 mg/L 硫酸链霉素和 1.0×10^5 u/L 青霉素 G 钠), 水平静置于二氧化碳孵箱内, 在 5% CO₂、95% 空气和 37 °C 下静置培养。2~3 天更换一次新鲜培养液, 6~7 天按 1:3 传代一次。

1.3 HepG2 细胞培养液的收集和冻干

取约 80% 单层铺满的 HepG2 细胞, 用 pH7.4 的 PBS 液洗涤三次, 随机分组 (每组各含 6 瓶细胞), 按组别加入不同的实验培养基 (均不含小牛血清) 5 mL。分别培养一定的时间后, 收集细胞培养液离心, 准确吸取 1.5 mL 上清液三份, 冻干。

1.3.1 加入不同浓度的胰高血糖素 (或 dbcAMP)

将细胞随机分成 5 组, 对照组中不加胰高血糖素 (或 dbcAMP), 其余各组均加入不同浓度的胰高血糖素 (或 dbcAMP), 48 h 后终止培养。

1.3.2 37 °C 培养不同时间的影响 将细胞随机分成 4 大组, 其中每组又分为对照组和实验组, 加入实验培养基 (不含小牛血清)。对照组中不加胰高血糖素 (或 dbcAMP), 实验组中均加入同一浓度的胰高血糖素 (或 dbcAMP), 使其终浓度为 4×10^{-7} mol/L (或 1×10^{-3} mol/L)。每组分别培养 5 h、16 h、24 h 和 48 h。

1.4 冻干浓缩培养液中载脂蛋白的测定

准确加入样品稀释液 75 μ L, 使冻干的样品重新溶解。经此操作, 样品被浓缩 20 倍。用本室研制的 RID 试剂盒^[5]测定样品中载脂蛋白 A iv、A ①、C ④、B100 及 E 的含量。

1.5 细胞总蛋白的测定

培养瓶内贴壁的 HepG2 细胞以 0.1 mol/L 的 NaOH 6.0 mL 混匀, 室温放置 2 h。按改良 Lowry 法^[6]测定细胞总蛋白。

2 结果

2.1 不同浓度胰高血糖素对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响

由表 1 (Table 1) 可见, 胰高血糖素对 HepG2 细胞载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 A ①、载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的分泌均有抑制作用, 而对载脂蛋白 C ④的分泌则有促进作用, 且这种作用随胰高血糖素浓度的增加而增强。在本实验条件下, 当胰高血糖素浓度为 4×10^{-7} mol/L 时, 其使载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 A ①、载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的分泌分别减少 47.7%、54.1%、32.7% 和 33.2% ($P < 0.01$), 使载脂蛋白 C ④的分泌增加 89.1% ($P < 0.01$)。

表 1 不同浓度的胰高血糖素 (mol/L) 对 HepG2 细胞载脂蛋白 A iv、A ①、B100、C ④和 E 分泌的影响

Table 1 Effect of glucagon (mol/L) on secretion of apolipoprotein A iv, A ①, B100, C ④ and E by cultured HepG2 cell (μ g/g cell protein, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Groups	ApoA iv	ApoA ①	ApoB100	ApoC ④	ApoE
Control	1 182 \pm 59	196 \pm 9	2 343 \pm 46	110 \pm 3	238 \pm 5
4×10^{-10}	946 \pm 69 ^a	195 \pm 18	1 878 \pm 65 ^a	104 \pm 8	212 \pm 9 ^a
4×10^{-9}	930 \pm 59 ^a	171 \pm 7 ^a	1 737 \pm 84 ^a	122 \pm 5 ^a	187 \pm 13 ^a
4×10^{-8}	693 \pm 25 ^a	142 \pm 6 ^a	1 617 \pm 42 ^a	162 \pm 5 ^a	168 \pm 9 ^a
4×10^{-7}	618 \pm 22 ^a	90 \pm 6 ^a	1 577 \pm 47 ^a	208 \pm 9 ^a	159 \pm 7 ^a

a: $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 胰高血糖素培养不同时间对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响

由表 2 (Table 2) 可见, 对照组和实验组中, HepG2 细胞各载脂蛋白的分泌量均随培养时间的延长而增加。与对照组相比, HepG2 细胞在分别培养 5、16、24 和 48 h 后, 实验组中载脂蛋白 A iv、载脂蛋

白 A ㊟、载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 分泌的增加程度逐渐减少, 而载脂蛋白 C ㊟分泌的增加程度逐渐增加。48 h 后, 载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 A ㊟、载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的分泌分别减少 38. 8%、53. 4%、31. 1% 和 47. 5% ($P < 0. 01$), 而载脂蛋白 C ㊟的分泌增加 88. 4% ($P < 0. 01$)。

表 2 胰高血糖素培养不同时间对 HepG2 细胞载脂蛋白 A iv、A ㊟、B100、C ㊟和 E 分泌的影响

Table 2 Time course of effect of glucagon on secretion of apolipoprotein A iv, A ㊟, B100, C ㊟ and E by cultured HepG2 cell ($\mu\text{g/g}$ cell protein, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Groups		0 h	5 h	16 h	24 h	48 h
ApoA I	control	0	0	362 \pm 15	471 \pm 30	1 109 \pm 76
	exp.	0	0	343 \pm 10 ^a	430 \pm 21 ^b	679 \pm 25 ^b
ApoA ㊟	control	0	0	68 \pm 5	107 \pm 12	223 \pm 25
	exp.	0	0	64 \pm 2	84 \pm 2 ^b	104 \pm 12 ^b
ApoC ㊟	control	0	65 \pm 5	87 \pm 8	98 \pm 11	121 \pm 17
	exp.	0	85 \pm 6 ^b	124 \pm 4 ^b	162 \pm 12 ^b	228 \pm 32 ^b
ApoB100	control	0	1 279 \pm 55	1 353 \pm 82	1 481 \pm 74	2 227 \pm 115
	exp.	0	1 124 \pm 72 ^b	1 282 \pm 63 ^b	1 380 \pm 61 ^b	1 535 \pm 90 ^b
ApoE	control	0	0	77 \pm 6	107 \pm 15	259 \pm 36
	exp.	0	0	72 \pm 2	96 \pm 7	136 \pm 14 ^b

a: $P < 0. 05$, b: $P < 0. 01$, compared with control group.

2.3 不同浓度双丁酰环腺苷酸对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响

由表 3 (Table 3) 可知, dbcAMP 对 HepG2 细胞载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 E 的分泌有抑制作用, 对载脂蛋白 A ㊟和载脂蛋白 C ㊟的分泌有促进作用, 且这种作用随 dbcAMP 浓度的增加而

增强。在本实验条件下, 当培养液中 dbcAMP 的浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时, 载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 E 的分泌分别减少 12. 3%、24. 9% 和 16. 1% ($P < 0. 01$), 载脂蛋白 A ㊟和载脂蛋白 C ㊟的分泌分别增加 66. 1% 和 142. 6% ($P < 0. 01$)。

表 3 不同浓度的双丁酰环腺苷酸 (mol/L) 对 HepG2 细胞载脂蛋白 A iv、A ㊟、B100、C ㊟和 E 分泌的影响

Table 3 Effect of dbcAMP (mol/L) on secretion of apolipoprotein A iv, A ㊟, B100, C ㊟ and E by cultured HepG2 cell ($\mu\text{g/g}$ cell protein, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Groups	ApoA iv	ApoA ㊟	ApoB100	ApoC ㊟	ApoE
Control	803 \pm 26	174 \pm 10	2 535 \pm 98	108 \pm 6	211 \pm 8
1×10^{-6}	809 \pm 39	227 \pm 11 ^b	2 526 \pm 61	120 \pm 11 ^a	219 \pm 5
1×10^{-5}	813 \pm 30	240 \pm 15 ^b	2 379 \pm 56 ^b	162 \pm 7 ^b	193 \pm 8 ^b
1×10^{-4}	778 \pm 25	284 \pm 10 ^b	2 169 \pm 134 ^b	200 \pm 2 ^b	191 \pm 2 ^b
1×10^{-3}	704 \pm 17 ^b	289 \pm 7 ^b	1 905 \pm 97 ^b	262 \pm 11 ^b	177 \pm 5 ^b

a: $P < 0. 05$, b: $P < 0. 01$, compared with control group.

2.4 双丁酰环腺苷酸培养不同时间对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响

由表 4 (Table 4) 可见, 对照组和实验组中, HepG2 细胞各载脂蛋白的分泌量均随培养时间的延

长而增加。与对照组相比, HepG2 细胞在分别培养 5、16、24 和 48 h 后, 实验组中载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的分泌逐渐减少, 载脂蛋白 A ㊟和载脂蛋白 C ㊟的分泌逐渐增加。48 h 后, 载脂

蛋白 A iv、载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的分泌分别减少 17. 1%、24. 9% 和 20. 7% ($P < 0. 01$), 而载脂蛋白 A ㊟和载脂蛋白 C ㊟的分泌分别增加 57. 4% 和 98. 5% ($P < 0. 01$)。

表 4 双丁酰环腺苷酸培养不同时间对 HepG2 细胞载脂蛋白 A iv、A ㊟、B100、C ㊟和 E 分泌的影响
Table 4 Time course of effect of glucagon on the secretion of apolipoproteinA iv, A ㊟, B100, C ㊟and E by culturedHepG2 cell
($\mu\text{g/g}$ cell protein, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Groups		0 h	5 h	16 h	24 h	48 h
ApoAI	Control	0	0	711 \pm 27	817 \pm 44	908 \pm 52
	exp.	0	0	633 \pm 14 ^b	707 \pm 31 ^b	750 \pm 18 ^b
ApoAII	Control	0	0	113 \pm 5	134 \pm 3	190 \pm 14
	exp.	0	0	174 \pm 8 ^b	195 \pm 7 ^b	299 \pm 28 ^b
ApoCIII	Control	0	0	69 \pm 5	102 \pm 11	131 \pm 12
	exp.	0	0	91 \pm 2 ^b	143 \pm 16 ^b	259 \pm 18 ^b
ApoB100	Control	0	705 \pm 20	1 632 \pm 73	1 932 \pm 64	2 660 \pm 143
	exp.	0	671 \pm 14 ^a	1 552 \pm 54 ^b	1 859 \pm 82 ^b	1 998 \pm 138 ^b
ApoE	Control	0	0	118 \pm 6	156 \pm 17	232 \pm 24
	exp.	0	0	114 \pm 4	139 \pm 14	184 \pm 15 ^b

a: $P < 0. 05$, b: $P < 0. 01$, compared with control group.

3 讨论

本研究观察了胰高血糖素和双丁酰环腺苷酸对人肝癌细胞系 HepG2 分泌 5 种载脂蛋白的影响, 发现胰高血糖素和 dbcAMP 均对 HepG2 细胞载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的分泌有抑制作用, 而对载脂蛋白 C ㊟的分泌则有促进作用, 且这种作用随胰高血糖素和 dbcAMP 浓度的增加而增强。大量研究已证实 cAMP 是胰高血糖素等肽类激素的第二信使; Joan 等^[7]在研究胰高血糖素和 cAMP 对原代培养的成年大鼠肝细胞 DNA 合成的影响时也发现, 胰高血糖素的作用可被 cAMP 所“复制”。胰高血糖素对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响是否也通过 cAMP 来实现, 值得进一步的研究。本研究结果表明, 胰高血糖素可抑制 HepG2 细胞载脂蛋白 A iv和载脂蛋白 B100 的分泌。以往在大鼠肝细胞中的实验发现, 胰高血糖素可抑制载脂蛋白 A iv^[8]和极低密度脂蛋白^[9]的分泌; 活体实验也证实, 胰高血糖素可抑制肝脏极低密度脂蛋白的合成和分泌^[10]。其主要原因是胰高血糖素抑制了极低密度脂蛋白载脂蛋白 B100 的合成, 后者是极低密度脂蛋白合成的限速步骤^[10]。显然, 本研究结果与从大鼠肝细胞中所得的结果一致。

本研究还表明, 胰高血糖素和 dbcAMP 均可抑制 HepG2 细胞载脂蛋白 E 的分泌。1996 年 Andreani 等^[11]报道, 在载脂蛋白 E 启动子近端有一正性 cAMP 反应元件, 在载脂蛋白 E 基因- 614~ + 804 区域有多个负性调节和正性调节元件, 它们对载脂蛋白 E 基因转录总的影响是抑制性的, dbcAMP 可通过抑制载脂蛋白 E 基因转录, 使载脂蛋白 E mRNA 水平下降, 从而抑制载脂蛋白 E 的分泌。我们的结果与之相符。本研究初期, 作者也曾观察了胰岛素对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响, 其结果与王洪敏等^[4]的结果基本一致。一般认为, 胰岛素和胰高血糖素是体内两种相互拮抗的激素。但从我们的结果看来, 这两种激素在对 HepG2 细胞分泌载脂蛋白的影响上, 未见彼此互相拮抗的作用。这和国外报道胰岛素、胰高血糖素及 dbcAMP 对载脂蛋白 AI^[4、8、12]、载脂蛋白 B100^[4、9、12]和载脂蛋白 E^[4、11、12]的分泌均有抑制作用一致, 他们也未观察到这两种激素对肝细胞这几种载脂蛋白的分泌有互相拮抗的作用。

本研究还表明胰高血糖素和 dbcAMP 均可显著促进 HepG2 细胞载脂蛋白 C ㊟的分泌, 迄今尚未见国内外有类似报道。本室以往的研究发现, 内源性高甘油三酯血症患者血浆胰岛素水平升高的同时,

常伴有血浆载脂蛋白 C_Ⅲ水平升高。曾设想 HTG 患者血载脂蛋白 C_Ⅲ水平升高可能与胰岛素促进肝脏合成及分泌载脂蛋白 C_Ⅲ增加有关^[1]。在本研究中,胰高血糖素及 dbcAMP 也显著刺激 HepG2 细胞合成及分泌载脂蛋白 C_Ⅲ由此可见除胰岛素外,胰高血糖素也刺激肝细胞载脂蛋白 C_Ⅲ的分泌。因此胰高血糖素在 HTG 中的作用值得重视。

参考文献

- [1] 刘秉文, 曾成林. 内源性高甘油三酯血症发病机制探讨 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1993, 1(1): 67- 68
- [2] 彭 腾, 刘秉文, 蓝天鹤. 高糖膳食对大鼠载脂蛋白 AI, CII 及 CIII 基因表达的影响 [J]. 生物化学杂志, 1992, 8(3): 293 - 297
- [3] 彭 腾, 刘秉文, 蓝天鹤. 胰岛素对大鼠载脂蛋白 AI, CII 及 CIII 基因表达的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(3): 199- 202
- [4] 王洪敏, 刘秉文. 胰岛素对人肝癌细胞系 HepG2 分泌载脂蛋白 A_Ⅰ, A_Ⅱ, C_Ⅲ, B₁₀₀ 及 E 的影响 [J]. 华西医科大学学报, 1999, 30(3): 233- 235
- [5] 刘秉文. 血浆载脂蛋白的免疫测定及临床应用. 见: 王克勤 (主编). 脂蛋白与动脉粥样硬化 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995; 350- 360
- [6] Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, et al. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples [J]. *Anal Biochem*, 1978, 87: 206
- [7] McGowan JA, Strain AJ, Bucher NL. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: Effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic- AMP [J]. *J Cell Physiol*, 1981, 108: 353
- [8] Masumoto A, Koga S, Uchida E, et al. Effects of insulin, dexamethasone and glucagon on the production of apolipoprotein A- 1 in cultured rat hepatocytes [J]. *Atherosclerosis*, 1988, 70: 217
- [9] Pullinger CR, Gibbons GF. Effects of hormones and ovruvate on the rates of secretion of very low density lipoprotein triacylglycerol and cholesterol by rat hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1985, 833: 44
- [10] Liang ZY. *Physiological Chemistry* [M]. Shanghai: Shanghai Technology Publishing Company, 1990; 230- 231
- [11] Andreani- Mangeney M, Vandenbrouck Y, Janvier B, et al. Transcriptional regulation of apolipoprotein E expression by cyclic AMP [J]. *FEBS Lett*, 1996, 397, 155
- [12] Dashti N. Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoprotein by human hepatoma cell line, HepG2: effect of oleic acid and insulin [J]. *J Lipid Res*, 1987, 28: 423
- [13] 吴兆锋, 王德恭, 熊清洁, 等. 糖餐后血浆 3, 5- 环腺苷酸含量的改变及其与血浆胰岛素的关系 [J]. 四川医学院学报, 1983, 14: 14- 18

(此文 2000- 03- 21 收到, 2000- 06- 10 修回)

(此文编辑 朱雯霞)