

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.23.003

文章编号: 1005-8982 (2019) 23-0013-04

rhGLP-1 (7-36) 联合他克莫司 对人肝细胞 Akt 的作用研究*

姚瑶¹, 王宏宇², 徐春²

(1. 锦州医科大学 研究生学院, 辽宁 锦州 121001, 2. 中国人民解放军总医院
第三医学中心, 北京 100039)

摘要: 目的 观察重组人胰高血糖素样肽-1 (7-36) [rhGLP-1 (7-36)] 联合他克莫司作用于人肝细胞系 HL7702 细胞系后对 Akt 表达的影响。**方法** 选用处于对数生长期的人肝细胞系 HL7702, 分为 4 组: 对照组、G 组、F 组及 GF 组。对照组用等量的培养基处理 90 min; G 组用含 100 nmol/L 的 rhGLP-1 (7-36) 培养基处理 90 min; F 组用含 5 mg/L 的他克莫司处理 90 min; GF 组用含 100 nmol/L 的 rhGLP-1 (7-36) 及 5 mg/L 的他克莫司处理 90 min。Western blotting 检测各组 Akt 蛋白表达水平。**结果** 各组 p-Akt^{Thr308} 相对表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$); G 组、F 组及 GF 组 p-Akt^{Thr308} 相对表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), G 组、F 组及 GF 组均升高; 各组 p-Akt^{Ser473} 相对表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); G 组、F 组及 GF 组 p-Akt^{Ser473} 相对表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** rhGLP-1 (7-36) 联合他克莫司能使 Akt 蛋白活化, 提示 GLP-1 可能不依赖 Akt 蛋白改善他克莫司引起的肝脏脂质代谢紊乱。

关键词: 糖尿病; 胰高血糖素样肽-1 (7-36); Akt; 他克莫司

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Effect of rhGLP-1 (7-36) combined with FK506 on expression of Akt in human hepatocytes*

Yao Yao¹, Hong-yu Wang², Chun Xu²

(1. School of Postgraduate, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Third Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of rhGLP-1 (7-36) combined with FK506 on the expression of Akt in human liver HL7702 cells. **Methods** Human liver HL-7702 cell line in logarithmic phase were divided into 4 groups: control group, group G, group F, group GF. The control group was treated with the same amount of medium as the experiment groups for 90 minutes. Group G was treated with 100 nmol/L rhGLP-1 (7-36) medium for 90 minutes. Group F was treated with 5 mg/L FK506 medium for 90 minutes. Group GF was treated with 100 nmol/L rhGLP-1 (7-36) and 5 mg/L FK506 medium for 90 minutes. We used western blotting to detect the expression of Akt protein in each group. **Results** There was significant difference in the expression of p-Akt^{Thr308} among all the groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of p-Akt^{Thr308} protein increased significantly in the experiment groups ($P < 0.05$). However, no significant difference was observed in the expression of p-Akt^{Ser473} protein. Compared with the control group, the expression of p-Akt^{Ser473} protein increased to a certain degree in all groups, but the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions** Akt protein can be activated in human liver

收稿日期: 2019-05-29

* 基金项目: 中华国际医学交流基金会青年医生糖尿病研究项目 (No: WZHZ2016010)

[通信作者] 徐春, E-mail: wjxuchun@sohu.com; Tel: 13161696121

HL7702 cells with rhGLP-1 (7-36) combined with FK506, which means GLP-1 may not depend on Akt protein to improve hepatic lipid disorder induced by FK506.

Keywords: diabetes mellitus; glucagon-like peptide 1; proto-oncogene proteins c-Akt; tacrolimus

器官移植术后糖尿病是器官移植后常见的并发症之一。研究提出器官移植术后糖尿病的发生与器官移植术后患者常用的免疫抑制剂他克莫司、环孢素有关,其中,他克莫司相较于环孢素更容易引起器官移植术后糖尿病^[1]。他克莫司引起器官移植术后糖尿病的机制尚不清楚,有研究发现,他克莫司增加正常大鼠的血糖浓度具有时间及浓度依赖性^[2],尤其是与时间有关。有学者将他克莫司短期注入正常健康人体中,发现胰岛素敏感性增加,同时对胰岛素的分泌无影响^[3]。SHIVASWAMY 等^[4]用他克莫司短期处理正常的大鼠,大鼠会出现高血糖,并伴有轻度的高胰岛素血症,即大鼠体内有轻度的胰岛素抵抗;用他克莫司长期处理大鼠后,大鼠仅出现高血糖,未再出现高胰岛素血症,即大鼠已丧失胰岛素分泌功能,该研究提示他克莫司引起糖代谢紊乱与时间有关。还有研究提出他克莫司具有促进胰岛细胞凋亡,抑制胰岛素分泌,增加胰岛素抵抗的作用^[5]。目前,研究多集中于胰岛 B 细胞,对胰岛外的细胞(如肝脏细胞)研究较少。但笔者前期研究发现他克莫司能够促进肝细胞丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 的磷酸化, Akt 的磷酸化能导致肝脏脂质代谢紊乱,提示他克莫司引起肝细胞中胰岛素抵抗可能与胰岛素信号通路中关键蛋白 Akt 的活化有关^[6]。

2016 年器官移植术后糖尿病诊治指南指出,器官移植术后糖尿病与 2 型糖尿病的发病机制方面存在某些交叉,因此在治疗上与 2 型糖尿病类似。目前,二甲双胍和 DDP-4 抑制剂可能是理想的首选药物^[7]。其中, DPP-4 抑制剂是通过增加体内胰高血糖素样肽(glucagon-like peptide 1, GLP-1)浓度来降低血糖。GLP-1 能从多方面降低血糖:延缓胃排空,增加饱腹感;促进葡萄糖依赖性的胰岛素分泌,抑制胰高血糖素的释放;增加葡萄糖的利用,改善胰岛素敏感性等。GLP-1 对胰岛及胰岛外细胞均有作用,比如,在肝脏细胞中, GLP-1 能促进肝脏中糖原的合成,减少肝脏脂肪的累积^[8]。因此可推测, GLP-1 能改善他克莫司引起的肝脏脂质的紊乱,该过程可能与 Akt 有关。GLP-1 的主要活性成分为 rhGLP-1 (7-36),因此,本研究拟用 rhGLP-1 (7-36) 联合他克莫司共同作用于人正常肝细胞,通过检测 Akt 的表达,证明 GLP-1 尚不能通过影响 Akt 蛋白来改善他克莫司引起的肝脏脂代谢紊乱。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物与试剂

rhGLP-1 (7-36) 购自上海仁会生物制药股份有限公司,人肝细胞系 HL-7702 细胞株购自中国科学院细胞所,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自杭州四季青生物工程有限公司, RPMI 1640 培养基购自英国 Gibco 公司,他克莫司粉末、兔来源 p-Akt^{Thr308} 单克隆抗体、兔来源 p-Akt^{Ser473} 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP) 标记抗鼠/兔 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司,鼠来源 actin 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,脱脂奶粉购自上海碧迪医疗器械有限公司,其他常用试剂为进口或国产分析纯化。

1.2 仪器与设备

二氧化碳 CO₂ 恒温细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司),化学发光凝胶成像系统(美国 Aplegen 公司), Synergy HT 酶标仪(美国 Bio Tek 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组及处理 培养人肝细胞系 HL7702 细胞株至对数生长期,按 5×10^5 个/ml 均匀接种于 60 mm 培养皿上,随机分为对照组、F 组、G 组、GF 组。于 37℃、5% CO₂ 湿化培养箱中培养 24 h,弃去旧培养基。F 组用含 5 mg/L 他克莫司的 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基处理 90 min; G 组用含 100 nmol/L rhGLP-1 (7-36) 的相同培养基处理 90 min; GF 组用含 5 mg/L 他克莫司和 100 nmol/L rhGLP-1 (7-36) 的相同培养基处理 90 min; 对照组用等量的相同培养基处理相同时间。

1.3.2 Western blotting 检测 Akt 蛋白的表达水平 各组细胞处理后,弃掉旧培养基,分别用预冷的磷酸盐缓冲液洗 2 遍。每组细胞加入适量 RIPA 裂解液(内含终浓度为 1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟、氟化钠、正钒酸钠), 4℃放置 15 min。充分裂解后,收集裂解液至离心管中, 16 000 r/min 离心 20 min。收集上清液,蛋白质定量(BCA 法)测定蛋白浓度并分装。制备 8% 分离胶和 5% 浓缩胶(SDS-PAGE),等量蛋白与 4× 上样缓冲液混合,沸水中加热 5 min 至蛋白变性。蛋白上样,电泳。再于 100 V 电压下将蛋白转至硝化纤

维膜上。将膜用含 5% 脱脂奶粉的封闭液孵育 3 h, 用 TBST (Tris-HCl 缓冲盐溶液加 Tween-20) 洗 5 min, 孵育一抗, 4℃ 过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 室温下孵育二抗 1 h。再次用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。用化学发光凝胶成像系统进行检测, 用 Image J 软件进行灰度分析。所有实验重复 3 次以上。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

人肝细胞系 HL7702 细胞经过不同处理组处理后, 不同组中 p-Akt^{Thr308} 蛋白的表达有差异 ($P < 0.05$), 进一步与对照组比较, 各实验组 p-Akt^{Thr308} 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$) (见图 1 和表 1); 不同组中 p-Akt^{Ser473} 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 2 和表 1)。

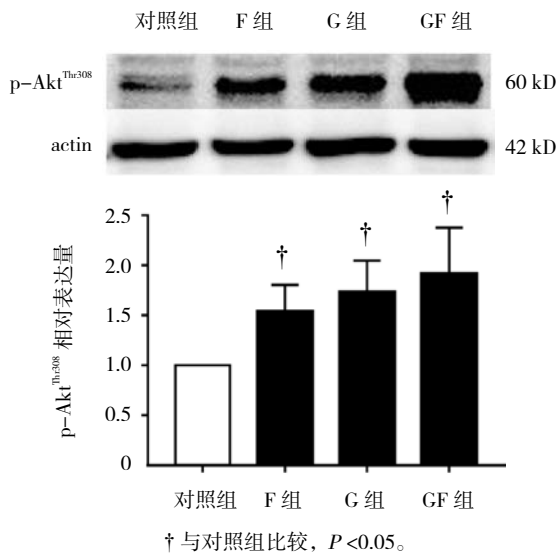


图 1 不同处理组 p-Akt^{Thr308} 蛋白的表达

表 1 不同处理组对 Akt 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-Akt ^{Thr308}	p-Akt ^{Ser473}
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
F 组	1.54 ± 0.27 [†]	1.22 ± 0.13
G 组	1.73 ± 0.31 [†]	1.22 ± 0.18
GF 组	1.91 ± 0.46 [†]	1.28 ± 0.31
F 值	6.521	1.648
P 值	0.007	0.231

注: † 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

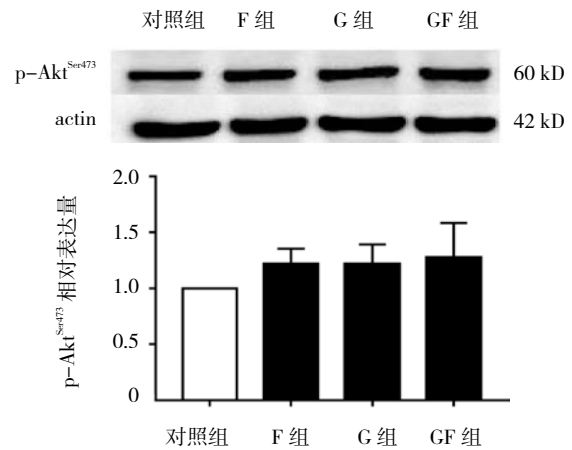


图 2 不同处理组 p-Akt^{Ser473} 蛋白的表达

3 讨论

丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 Akt 是蛋白激酶 AGC 家族中一员, 与细胞的调节如细胞的生长、存活、增殖、凋亡、代谢及血管形成密切相关^[9]。Akt 的活化受到 PI3Ks 的调节, PI3Ks 能产生脂类的第二信使 PIP3。PIP3 直接与 Akt 的 PH 结构域结合, 从而将 Akt 征募至细胞膜上, 使 Akt 活化。Akt 的完全活化与 Ser473 及 Thr308 位点的磷酸化有关。本质上来说, Akt 的活化是一个磷酸化与脱磷酸化的平衡过程。促进 Akt 磷酸化的激酶主要有 PDK1 与 mTORC2: PDK1 的 PH 结构域, 直接与 PIP3 结合, 使 Thr308 磷酸化, mTORC2 能直接磷酸化 Ser473。使 Akt 脱磷酸化的磷酸酶有以下几种: 脂类磷酸酶 PTEN 能使 PIP3 脱磷酸化, 抑制 Akt 活性; PP2A 酶、PHLPP1 能使 Akt 脱磷酸化。而近年来发现他克莫司的结合蛋白——FKBP51 能促进 PHLPP1 与 Akt 结合使 Akt 脱磷酸化, 提示他克莫司可能通过与 FKBP51 结合抑制 Akt 的脱磷酸化, 提高细胞内磷酸化 Akt 的水平^[10]。活化的 Akt 从胞膜转移至细胞内, 并且磷酸化其下游分子, 在众多下游分子中, 与细胞代谢相关的蛋白主要包括: GSK3、FOXO1 以及 Akt 亚基 160^[11]。其中, GSK3 已被证实通过脂质合成的关键因子 SREBP 调节脂肪的合成^[12]。提示 Akt 能通过影响下游的 GSK3 来调节脂肪合成, 与 ONO 等^[13] 肝脏中过表达 Akt 能引起肝脏脂肪变性 & 高甘油三脂血症的研究相符合。本研究发现, 他克莫司单独作用于人正常肝脏细胞时能促进 Akt 的磷酸化, 提示他克莫司可能会因此引起肝脏脂质代谢紊乱。

GLP-1 是人体内降低血糖的一种多肽。进食后, 受营养物质的刺激, 胃肠道黏膜上的朗格汉斯细胞 (L

细胞)分泌 GLP-1。GLP-1 发挥降糖作用后,很快被 DPP-4 酶水解终止效应。目前市面上以 GLP-1 为基础的药物包括 GLP-1R 激动剂(艾塞那肽、利拉鲁肽等),以及 DPP-4 酶抑制剂(西格列汀、沙格列汀、利格列汀、阿格列汀、维格列汀、吉格列汀)^[14]。有研究发现,这些药物不仅能调节血糖,也能改善肝脏中胰岛素抵抗^[15-17]。TAHER 等^[18]发现在胰岛素抵抗的小鼠模型中,艾塞那肽能抑制果糖喂养引起的血脂紊乱及肝脏极低密度脂蛋白的过度表达。尽管如此, GLP-1 对肝脏脂肪代谢的机制仍不清楚,有学者提出 GLP-1 直接调节肝细胞内的胰岛素信号通路,降低肝脏脂肪变性^[16]。肝脏脂肪合成的增加与异位脂质的累积有关:肌肉中因异位脂质累积,将已处理的糖传递给肝脏,导致肝脏的脂肪合成增加,引起高脂血症,随后巨噬细胞进入脂肪组织引起脂肪分解,由于脂肪酸的脂酰化,能进一步增加肝脏甘油三酯的合成,该过程大部分与肝脏中胰岛素信号通路无关。本研究中用 rhGLP-1(7-36)联合他克莫司作用于人正常肝细胞时发现 Akt 的磷酸化仍然升高,说明 GLP-1 改善他克莫司引起的肝细胞脂质紊乱与 Akt 蛋白无关,其可能通过影响其他蛋白来降低肝脏脂质的累积。本研究仅研究 GLP-1 对他克莫司短期作用的影响,且只研究 Akt 蛋白,因此还需继续研究他克莫司长时间作用于肝细胞后, GLP-1 是否能通过 Akt 改善他克莫司引起肝脏脂肪代谢的紊乱;并继续研究胰岛素信号通路中的其他蛋白,进一步确定 GLP-1 能否通过胰岛素信号通路改善他克莫司引起的肝脂质紊乱。

参 考 文 献:

- [1] LI Q Y, LI F, SUN J H, et al. Mechanisms of diabetes mellitus induced with FK506 in SD rats models[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2009, 31(4): 675-681.
- [2] XU C, NIU Y J, LIU X J, et al. Tacrolimus reversibly reduces insulin secretion, induces insulin resistance, and causes islet cell damage in rats[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2014, 52(7): 620-627.
- [3] OZBAY L A, MOLLER N, JUHL C, et al. Calcineurin inhibitors acutely improve insulin sensitivity without affecting insulin secretion in healthy human volunteers[J]. Br J Clin Pharmacol, 2012, 73(4): 536-545.
- [4] SHIVASWAMY V, BOERNER B, LARSEN J. Post-transplant diabetes mellitus: causes, treatment, and impact on outcomes[J]. Endocr Rev, 2016, 37(1): 37-61.
- [5] NIU Y J, SHEN Z Y, XU C, et al. Establishment of tacrolimus-induced diabetes in rat model and assessment of clinical treatments for post-transplant diabetes mellitus in liver transplant recipients[J]. Clin Lab, 2013, 59(7/8): 869-874.
- [6] 李浩言,张雪梅,安军,等. FK506 对人肝 HL-7702 细胞中 Akt 表达的影响[J]. 中华灾害救援医学, 2017(3): 148-151.
- [7] 石炳毅,贾晓伟. 中国器官移植术后糖尿病诊疗指南(2016 版). 器官移植, 2016(6): 407-416.
- [8] 李春君,于德民. GLP-1 受体激动剂治疗非酒精性脂肪肝的新进展[J]. 天津医药, 2015(11): 1230-1234.
- [9] RISSO G, BLAUSTEIN M, POZZI B, et al. Akt/PKB: one kinase, many modifications[J]. Biochem J, 2015, 468(2): 203-214.
- [10] WANG L. FKBP51 regulation of AKT/protein kinase B phosphorylation[J]. Curr Opin Pharmacol, 2011, 11(4): 360-364.
- [11] SCHULTZE S M, HEMMINGS B A, NIESEN M, et al. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis[J]. Expert Rev Mol Med, 2012, 14: e1.
- [12] MANNING B D, CANTLEY L C. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. Cell, 2007, 129(7): 1261-1274.
- [13] ONO H, SHIMANO H, KATAGIRI H, et al. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement[J]. Diabetes, 2003, 52(12): 2905-2913.
- [14] NADKARNI P, CHEPURNY O G, HOLZ G G. Regulation of glucose homeostasis by GLP-1[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014, 121: 23-65.
- [15] CUTHBERTSON D J, IRWIN A, GARDNER C J, et al. Improved glycaemia correlates with liver fat reduction in obese, type 2 diabetes, patients given glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50117.
- [16] GUPTA N A, MELLS J, DUNHAM R M, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway[J]. Hepatology, 2010, 51(5): 1584-1592.
- [17] TUSHUIZEN M E, BUNCK M C, POWWELS P J, et al. Incretin mimetics as a novel therapeutic option for hepatic steatosis[J]. Liver Int, 2006, 26(8): 1015-1017.
- [18] TAHER J, BAKER C L, CUIZON C, et al. GLP-1 receptor agonism ameliorates hepatic VLDL overproduction and de novo lipogenesis in insulin resistance[J]. Mol Metab, 2014, 3(9): 823-833.

(张西倩 编辑)