

文章编号:1005-6947(2007)07-0653-04

· 基础研究 ·

胰升血糖素样肽-1对肝切除后肝细胞胞浆游离钙影响的实验研究

贾乾斌, 彭兵, 刘自明, 吴红斌, 李双庆, 吴言涛

(四川大学华西医院 普通外科, 四川 成都 610041)

摘要:目的 探讨胰升血糖素样肽-1 (GLP-1)对肝切除后肝细胞胞浆游离钙的影响。方法 将大鼠随机分2组, A组不切肝, B组切肝65%。于术后第1, 3, 5天收集血标本5 mL测定血糖、GLP-1、胰岛素(In)和胰升血糖素(G1)。同时用酶法分离制备肝细胞悬液。以Fura-2/AM荧光指示剂, 用荧光分光光度仪检测肝切除后肝细胞的荧光强度及GLP-1对荧光强度的影响。**结果** B组肝切除术后血糖明显增高($P < 0.05$), 血浆GLP-1也明显高于A组($P < 0.001$), 尤以术后第1天更显著; In则明显下降($P < 0.001$), 而G1手术后升高, 但差异无显著性($P > 0.05$), 术后In/GL值明显下降($P < 0.05$)。所测正常肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 为 (707.46 ± 122.59) nmol/L, 肝切除术后第1, 3, 5天肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 较正常肝细胞略降低($P > 0.05$); 加入GLP-1后肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 略有升高($P > 0.05$)。**结论** 大鼠肝切除术后存在明显胰岛素抵抗, 主要系因胰岛素水平明显下降, 致In/G1值也明显降低的结果; GLP-1的拟胰岛素作用并非通过增加肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 而实现的。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(7):653-656]

关键词: 肝切除术; 肝细胞/代谢; 胰升血糖素样肽-1; 胞浆游离钙

中图分类号: R657.3

文献标识码: A

The influence of glucagon-like peptide-1 on cytosolic free calcium ion concentration in isolated rat hepatocytes after hepatectomy

JIA Qian-bin, PENG bing, LIU Zi-ming, WU Hong-bin, LI Shuang-qing, WU Yan-tao

(Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on cytosolic free calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in isolated rat hepatocytes after hepatectomy. **Methods** The rats were allocated randomly to two groups: The rats of group one did not undergo hepatectomy. The rats of group two had 65% liver resection. The blood specimen taken from vena cava was mensurated for glucose, insulin, glucagon, and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on the first, third and fifth day after hepatectomy. The $[Ca^{2+}]_i$ in isolated rat hepatocytes was investigated by using fura-2 fluorescence, and then, in vitro, the effect of GLP-1 on the $[Ca^{2+}]_i$ in hepatocytes was investigated in 2 groups. **Results** The blood glucose value in group two was significantly higher than that in group one after operation ($P < 0.05$), especially on the first day. The plasma GLP-1 value was also significantly higher than that of group one ($P < 0.001$). The level of serum insulin was decreased obviously ($P < 0.001$), while the value of glucagon was increased, but not significantly, which led to reduction of the ratio of insulin to glucagon. The $[Ca^{2+}]_i$ in hepatocytes on the first, third and fifth day after hepatectomy was decreased slightly ($P > 0.05$) compared with that of group one. In vitro, GLP-1 produced a slightly increase in the $[Ca^{2+}]_i$ in hepatocytes ($P > 0.05$). **Conclusions** After hepatectomy, in rats is associated with an obvious insulin resistance,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600143)

收稿日期:2006-11-06; **修订日期:**2007-03-27。

作者简介:贾乾斌,男,重庆云阳人,四川大学华西医院副主任医师,主要从事肝胆外科与营养代谢方面的研究。

通讯作者:贾乾斌 E-mail:qb_jia@msn.com

mainly due to the level of serum insulin was obviously decreased ($P < 0.001$), and the value of glucagon was increased, which led to reduced ratio of insulin to glucagon. GLP-1 is insulinomimetic upon glucose metabolism in hepatic tissue, which acting through specific receptors is not associated to $[Ca^{2+}]_i$ increase.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (7) : 653 - 656]

Key words: Hepatectomy; Hepatocytes/metab; Glucagon-like Peptide-1; Cytosolic Free Calcium Ion Concentration

CLC number: R657.3

Document code: A

外科手术与创伤应激后葡萄糖代谢紊乱很常见,其原因主要是周围组织葡萄糖利用障碍,即胰岛素(insulin, In)抵抗。Donmoyer等^[1]的研究表明,肝组织的胰岛素抵抗较其他组织如肌肉组织、脂肪组织更明显。近来的研究^[2]发现,胰升血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)在胰腺外组织中具有拟胰岛素(insulinomimetic)作用,而并不引起细胞内cAMP增加。因此,GLP-1可能是通过与腺苷酸环化酶活化无关的特异性受体结合发挥其作用。钙离子是细胞内重要的第二信使,对维持细胞的各种代谢过程极为重要。但GLP-1是否像胰岛素那样诱导肝细胞钙离子内流^[3],目前还不清楚,本实验拟对此进行初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

Fura-2/AM 购于 Sigma 公司,用二甲亚砜(DMSO, Sigma 公司产品)配成 0.25 mmol/L 储存液, -20℃ 避光保存。小牛血清白蛋白(BSA)、IV型胶原酶、抑肽酶购于 Sigma 公司,DMEM 购于 Gibco 公司,GLP-1 购于 Peninsula Laboratories 公司。恒温振荡水浴箱、RF-5301PC 荧光分光光度仪带恒温水浴及微混悬器购于日本岛津公司。

1.2 动物分组及实验方法

Sprague-Dawley 大鼠 24 只,雌雄不拘,体重 220 ~ 250 g,由四川大学实验动物中心提供,符合二级实验动物标准,称重后随机分为对照组和实验组。

1.2.1 A 组(对照组, $n = 6$) 实验前禁食 12 h,用 5% 氯醛(按 300 mg/kg)腹腔注射麻醉,从腔静脉采集血标本约 5 mL,同时参照徐勇等^[4]法分离纯化肝细胞。肝门静脉插管,用 37℃ 无钙灌流液以 40 ~ 50 mL/min 流速原位灌注肝脏,并迅速剪开下腔静脉建立流出道;灌流 2 ~ 4 min 后分离肝周韧带,将肝脏移至平皿内,立即用 37℃ 0.05% IV型胶原酶灌流液以 40 ~ 50 mL/min 流速灌注

10 ~ 15 min,待肝脏肿大变软,肝被膜出现裂纹时中止灌流;将肝脏置于 DMEM 平皿中,用眼科剪、眼科镊撕去肝被膜,小心梳理,振荡,搅拌等使肝细胞分散脱落。将细胞悬液收集在锥形瓶中,37℃ 振荡培养 15 min,冰上冷却 10 min,200 目滤网过滤。200 r/min 离心 5 min,去上清液,以清洗液反复清洗离心 3 次,去上清液后以含 2% BSA DMEM 10 ml 重悬为 2×10^6 /mL 肝细胞悬液。0.4% 台盼蓝与肝细胞悬液 1:1 混合,光镜下计数拒染色细胞的百分率,即细胞活率 > 80% 才适合实验要求。

1.2.2 B 组(实验组, $n = 18$) 按 Higgins 等^[5]法切除肝左外叶、左中叶及中叶(约 65%),于术后第 1 (pod1), 3 (pod3), 5 (pod5) 天上午按 A 组方法收集血标本及制备肝细胞悬液。

1.2.3 血糖、胰岛素、胰升血糖素(glucagon, G1)和 GLP-1 的测定 血糖用 One Touch Basic 血糖仪(美国强生公司产品)测定;In, G1 和 GLP-1 用放射免疫分析法测定^[6]。

1.3 肝细胞胞浆游离钙浓度测定^[7]

1.3.1 Fura-2/AM 负载 分别取肝细胞悬液 200 μ L 于 DMEM 中,加入终浓度为 5 μ mol/L 的 Fura-2/AM, 37℃ 恒温振荡水浴孵育 30 min,并向试管内通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体(60 个气泡/min)。B 组的 1, 3, 5 d 组分别加入终浓度为 0.01 nmol/L GLP-1 及抑肽酶(2 μ g/mL),反应总体积为 1 mL。将负载后的肝细胞悬液用 Hanks 液(含 0.2% BSA)洗涤 3 次后悬浮于 4 mL 测定液中。

1.3.2 荧光测定 将仪器比色池恒温在 37℃,首先以光谱方式测定 Fura-2/AM 标准液和负载液的激发光谱(图 1),可见最大激发波长从 380 nm 移至 340 nm,说明 Fura-2 负载入肝细胞内。其后以时间方式测定(激发波长 340 nm,发射波长 500 nm)肝细胞悬液(自发荧光)和 Fura-2 负载液(F)及加入 Triton X-100(Fmax)和 EGTA(Fmin)等的荧光强度(图 2)。按公式计算出 $[Ca^{2+}]_i$:

$$[Ca^{2+}]_i \text{ (nmol/L)} = Kd \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

Kd 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数,37 °C 时

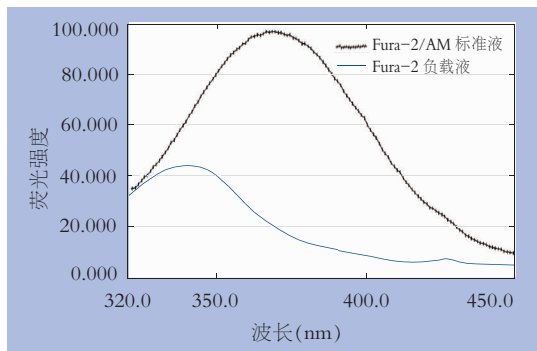


图1 Fura-2/AM 标准液及负载液的激发光谱图

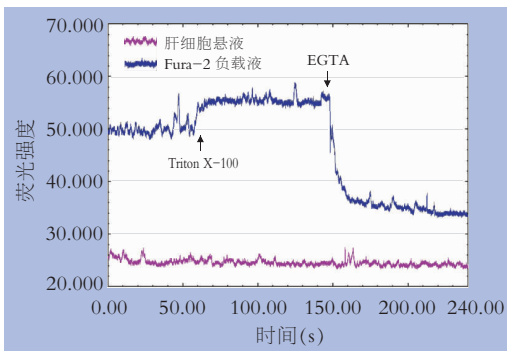


图2 肝细胞悬液和 Fura-2 负载液的荧光强度图

1.4 统计学处理

资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计采用 SPSS 软件进行。

2 结果

2.1 肝切除术后血糖与激素的变化

肝切除术后血糖明显增高 ($F = 7.178, P < 0.05$), 而血浆 GLP-1 也明显高于 A 组 ($F = 17.869, P < 0.001$), 尤于术后第 1 天更为显著; In 则明显下降 ($F = 14.889, P < 0.001$), 而 G1 手术后升高, 但差异无显著性 ($F = 2.226, P > 0.05$), 致手术后 In/G1 值明显下降 ($F = 8.456, P < 0.05$) (附表)。

附表 肝切除术后血糖与激素的变化($\bar{x} \pm s$)

分组	n	血糖 (mmol/L)	GLP-1 (pmol/L)	胰岛素 (nmol/L)	胰升血糖素 (nmol/L)	In/G1 值
A	6	12.90 ± 1.17	5.05 ± 2.40	11.01 ± 4.4	94.11 ± 25.17	0.13 ± 0.07
B	18					
Pod1	6	13.20 ± 1.27	85.20 ± 40.02	10.82 ± 3.43	146.29 ± 26.63	0.07 ± 0.03
Pod3	6	14.30 ± 1.14	70.98 ± 17.45	2.33 ± 0.18	116.48 ± 46.69	0.02 ± 0.07
Pod5	6	15.70 ± 1.04	23.60 ± 5.54	4.59 ± 0.22	146.17 ± 58.29	0.03 ± 0.02
F 值		7.178	17.869	14.889	2.226	8.456
P 值		<0.05	<0.001	<0.001	>0.05	<0.05

2.2 GLP-1 对肝切除术后肝细胞胞浆游离钙 ($[Ca^{2+}]_i$) 的影响

正常肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 为 (707.46 ± 122.59) nmol/L, 肝切除术后第 1, 3, 5 天肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$

为 224 nmol/L。测定值减去自发荧光后再代入公式进行计算。

分别为 (449.50 ± 181.48) nmol/L, (652.43 ± 270.24) nmol/L 和 (625.43 ± 99.40) nmol/L, 较正常肝细胞略降低 ($F = 2.406, P > 0.05$); 体外实验中加入 GLP-1 后肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 略有升高, 分别为 (858.08 ± 294.07) nmol/L, (660.08 ± 192.19) nmol/L 和 (859.7 ± 190.61) nmol/L, 但差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 3)。

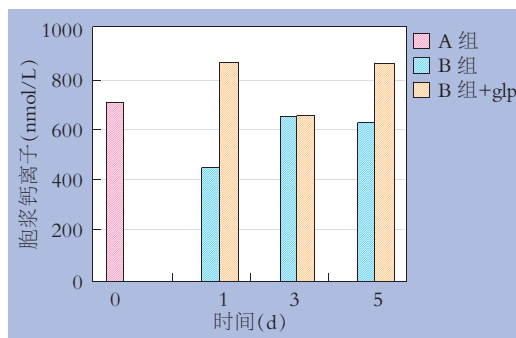


图3 GLP-1 对胞浆钙的影响

3 讨论

手术后血糖升高是机体的应激反应之一,也是机体内分泌代谢紊乱的结果。本实验的结果也说明了这一观点。究其原因主要是周围组织对葡萄糖的利用障碍,即胰岛素抵抗,其中肝脏较肌肉组织和脂肪组织的作用更明显^[1]。Redondo 等^[2] 研究发现, GLP-1 在胰腺外组织中具有拟胰岛素作用,可能是通过与腺苷酸环化酶活化无关的特异性受体结合,激活蛋白激酶 C (PKC), 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3-K), 蛋白磷酸酶-1 (PP-1)

等而使糖原合成酶 α 活化,增加肝脏葡萄糖摄取或抑制葡萄糖产生,促进肝糖元合成,从而发挥其改善糖代谢的作用。GLP-1 还可通过胰岛细胞膜上 G 蛋白偶联的特异性受体结合,引起 cAMP 依赖性胞浆钙浓度增加,刺激胰岛素分泌增加,抑制胰升血糖素分泌;还可增加胰岛 β 细胞的数量^[8]。但 GLP-1 并不引起肝细胞内 cAMP 增加^[2]。本实验发现,肝叶切除术血浆 GLP-1 水平明显升高($P < 0.001$),而肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 则略有下降($P > 0.05$);体外实验中, GLP-1 也无明显增加肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用($P > 0.05$)。因此认为, GLP-1 对肝叶切除术后肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显影响。说明 GLP-1 的拟胰岛素作用不是通过改变肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 而实现的,它可能系通过第二信使肌醇磷脂糖苷分子(inositolphosphoglycan molecules, IPGs)途经来调节糖代谢^[9]。

本实验还发现,肝切除后血浆 GLP-1 水平明显升高,而胰岛素水平却明显下降,致 In/G1 值也明显下降。说明在应激状态下,内源性 GLP-1 刺激胰岛素分泌的作用减弱,若此时补充大剂量外源性 GLP-1,仍可增加 In 的分泌,改善机体对葡萄糖的利用^[10]。导致肝切除术后 GLP-1 升高的原因目前还不清楚。创伤(包括外伤、手术、烧伤等)、感染等导致机体产生应激反应,也可通过激活交感肾上腺素系统和下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴,触发促肾上腺皮质激素(ACTH)增加,导致血中儿茶酚胺、皮质激素、生长激素、胰升血糖素、神经肽如 P 物质和胃泌素释放肽等的增加,从而引起以糖代谢紊乱为突出表现的一系列内分泌代谢改变^[11]。神经肽(特别是 P 物质和胃泌素释放肽)是一类强力促进 GLP-1 分泌的神经递质^[12-14]。这可能是肝切除术后 GLP-1 升高的原因之一。

参考文献:

[1] Donmoyer CM, Chen SS, Lacy DB, *et al.* Infection impairs insulin-dependent hepatic glucose uptake during total parenteral nutrition [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(3): E574 - 582.

[2] Redondo A, Trigo MV, Acitores A, *et al.* Cell signalling of

the GLP-1 action in rat liver [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 204(1-2): 43 - 50.

- [3] Benzeroual K, van de Werve G, Meloche S, *et al.* Insulin induces Ca^{2+} influx into isolated rat hepatocyte couplets [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(6 Pt 1): G1425 - 1432.
- [4] 徐勇,杨清,涂植光. 荧光探针 Fura-2/AM 测定大鼠肝细胞内游离钙离子浓度 [J]. *重庆医科大学学报*, 1997, 22(4): 305 - 307.
- [5] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal [J]. *Arch Pathol*, 1931, 12: 186.
- [6] Hvidberg A, Nielsen MT, Hilsted J, *et al.* Effect of glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107amide) on hepatic glucose production in healthy man [J]. *Metabolism*, 1994, 43(1): 104 - 108.
- [7] 张均田,李锡明,石成璋,等. 用 Fura-2/AM 测定细胞内游离钙浓度的方法 [J]. *中国药理学杂志*, 1991, 26(11): 655 - 658.
- [8] Brubaker PL, Drucker DJ. Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(6): 2653 - 2659.
- [9] Marquez L, Trapote MA, Luque MA, *et al.* Inositolphosphoglycans possibly mediate the effects of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide on rat liver and adipose tissue [J]. *Cell Biochem Funct*, 1998, 16(1): 51 - 56.
- [10] 贾乾斌,汪静,赵纪春,等. 胰升血糖素样肽-1 对肝切除术后葡萄糖耐量的影响 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2001, 8(4): 215 - 217.
- [11] Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1-3): 235 - 272.
- [12] Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, *et al.* Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas [J]. *Endocrinology*, 1986, 119(4): 1467 - 1475.
- [13] Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides [J]. *Endocrinology*, 1991, 128(6): 3175 - 3182.
- [14] Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, *et al.* A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(10): 4522 - 4528.