

(1999 - 04 - 30 收稿 1999 - 06 - 28 修回)

Leptin 对大鼠肝细胞葡萄糖氧化影响的 剂量效应与时间效应^①

曹筱佩¹ 程桦² 钟女奇³ 黄冰³ 傅祖植²

(中山医科大学 1 附属第一医院内分泌科 2 孙逸仙纪念医院内分泌科 3 动物实验中心; 广州, 510080)

摘要 目的:观察 Leptin 对大鼠肝细胞葡萄糖氧化的影响, 及其剂量与时间效应。**方法:**培养肝细胞以不同剂量 Leptin 处理, 以及以同一剂量 Leptin 处理不同时间, 以液体闪烁计数法检测肝细胞氧化 $D-[U-^{14}C]$ 葡萄糖的量。**结果:**细胞培养 1 h, 当 Leptin 为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 肝细胞葡萄糖氧化与未予 Leptin 处理的对照组之间无明显差异, 当 Leptin 为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖氧化较对照组下降 ($P < 0.05$), 在 $50\sim 200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围随剂量的上升而逐渐下降。以 Leptin $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 延长作用时间至 3 h、12 h、24 h、48 h, 葡萄糖氧化反而较 1 h 时显著上升 ($P < 0.01$), 恢复至对照组水平。**结论:**低剂量 Leptin 对肝细胞葡萄糖氧化无明显影响, 高剂量 Leptin 对肝细胞葡萄糖氧化具剂量依赖性急性抑制作用, 慢性作用时, 其抑制作用消失。

主题词 Leptin^②; 肥胖症; 糖代谢**中图分类号** R 364.2; 587.1

The Dose and Time Effects of Leptin on Glucose Oxidation in Hepatic Cells

Cao Xiaopei¹ Cheng Hua² Zhong Nuqi³ Huang Bin³ Fu Zuzhi²

(1 Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital 2 Department of Endocrinology, Memorial Hospital 3 Animal Experimental Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To observe the dose and time effects of leptin on glucose oxidation in cultured rat hepatic cells. **Methods:** Hepatic cells were incubated with leptin of different doses and different time courses with a same dose. $D-[U-^{14}C]$ glucose oxidation were determined by liquid scintillation counting. **Results:** Leptin treatment of $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1h had no significant effects on glucose oxidation in hepatic cells. However, at the dose of $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, leptin significantly inhibited glucose oxidation vs control oxidation ($P < 0.05$). At the doses range from $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the inhibitory effect of leptin was dose dependent. This effects were reversed or glucose oxidation was slightly higher than the control group when hepatic cells were exposed to leptin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 3 h, 12 h, 24 h and 48 h. And comparing to the 1 h group the glucose oxidation were significantly elevated ($P < 0.01$). **Conclusion:** Low dose of leptin has no significant effect on glucose oxidation in hepatic cells. A relatively high dose of leptin has an acute, dose dependent inhibitory effect on the glucose oxidation in hepatic cells. This effect is reversed by prolonging the exposure time.

Subject headings leptin^②; obesity; glucose metabolism

Leptin(瘦素)是近年发现的肥胖基因(*OB*)的表达产物, 由脂肪细胞分泌, 具有促进产热及抑制食欲的功能, 被认为是机体维持正常体重不可缺少的激素。新近的研究认为, Leptin 除对机体能量代

谢有重要作用外, 对糖、脂肪等物质代谢亦存在影响。肥胖者易发生糖代谢异常, 并表现高 Leptin 血症。它们之间是否存在联系, 是目前肥胖症研究的重要课题之一。本实验探讨 Leptin 对肝细胞葡萄

糖氧化的影响,并观察其剂量效应与时间效应,以供作进一步的实验和临床研究参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

正常大鼠肝细胞株 BRL (上海细胞生物研究所), RPMI1640 培养基 (Gibcol BRL 公司), Leptin (R&D 公司), $D-[U-^{14}C]$ 葡萄糖 (中国科学院核医学技术中心), 闪烁液 PPO、POPOP (Sigma 公司)。

1.2 肝细胞的培养与处理

正常大鼠肝细胞株 BRL, 于含 $\varphi = 10\%$ 小牛血清、 $\varphi = 10\%$ 双抗 (青霉素、链霉素) 的 RPMI 1640 培养液中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\varphi = 5\%$ CO_2 , 培养箱中进行培养。每 2 d 换液 1 次, 培养 3~4 d 进行传代。选择生长良好的细胞进行实验。

1.3 Leptin 作用的剂量效应

细胞分为不加 Leptin (对照组)、加 Leptin $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 5 种条件, 预培养 1 h 后进行葡萄糖氧化检测, 每种条件重复检测 6 次。

1.4 Leptin 作用的时间效应

细胞不加 Leptin (对照组), 和以 Leptin $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别预培养 1、3、12、24、48 h 等 6 种条件, 然后进行葡萄糖氧化检测, 每种条件重复检测 6 次。

1.5 肝细胞葡萄糖氧化检测

参考文献[1]方法, 以液体闪烁计数法检测葡萄糖氧化: 细胞于含 5 g/L BSA RPMI1640 培养液中预培养 3 d。胰酶消化, 离心收集细胞, 细胞再以含 5.6 mmol/L 葡萄糖、Hepes 10 mmol/L 的 RPMI 1640 培养液, 于硅化瓶内培养 1 h。加 $D-[U-^{14}C]$ 葡萄糖 (放射性比活性为 $9.18 \times 10^9\text{ Bq/mmol}$) $3.7 \times 10^5\text{ Bq/mL}$, 于培养瓶内悬挂一小管, 胶塞密封瓶口, 继续培养 1 h。加 100 ml/L 三氯醋酸 0.2 mL 终止反应, 并于悬挂的小管内注入氢氧化海胺 0.3 mL , 以捕获 CO_2 。室温放置 3 h, 小管内加入闪烁液, 液体闪烁计数器 (LS3801, Bechman 公司) 检测放射活性。检测的批内变异系数为 3.1% 。

1.6 数据处理

数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数值比较采用 t 检验。葡萄糖氧化以每小时每 10^6 细胞氧化葡萄糖的物质的量 n/nmol 表示。

2 结果

2.1 Leptin 对肝细胞葡萄糖氧化影响的剂量效应

Leptin $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 葡萄糖氧化较对照组无差异, Leptin 质量浓度上升至 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 葡萄糖氧化较对照组显著下降, 并随剂量上升而逐渐下降, 至 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 葡萄糖氧化降至最低, 与对照组比较 $P < 0.01$, 见表 1。

表 1 不同浓度 Leptin 对肝细胞葡萄糖氧化的影响
Table 1 Effects of Leptin of different concentrations on glucose oxidation in cultured hepatic cells

Group ($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Glucose oxidized per hour per 10^6 cells (n/nmol)
Control	3.69 ± 1.08
Leptin 10	3.08 ± 1.88
Leptin 50	$1.78 \pm 0.59^{1)}$
Leptin 100	$1.64 \pm 0.54^{2)}$
Leptin 200	$1.60 \pm 0.18^{2)}$

vs control group 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

2.2 Leptin 对肝细胞葡萄糖氧化影响的时间效应

细胞以 Leptin $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 预培养 1 h, 肝细胞葡萄糖氧化均较对照组明显下降, 但延长 Leptin $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 预培养时间至 3 h 后, 肝细胞葡萄糖氧化并未继续下降, 反而较 1 h 显著上升, 达到或轻度高于对照组水平, 见表 2。

表 2 Leptin $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对肝细胞葡萄糖氧化影响的时间效应

Table 2 Time dependent effects of Leptin $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ on glucose oxidation in cultured hepatic cells (n/nmol)

Group t/h	Glucose Oxidized per Hour per 10^6 cells
0 ¹⁾	3.69 ± 1.08
1	$1.64 \pm 0.54^{2)}$
3	3.12 ± 1.95
12	3.50 ± 0.84
24	4.08 ± 0.45
48	4.04 ± 0.33

1) Control group, 2) each group vs 1 h group $P < 0.01$

3 讨论

Leptin 为近年发现的肥胖基因 (OB) 的表达产

物,由脂肪细胞分泌。它通过与下丘脑特异的受体结合,抑制食欲中枢,使食欲下降,进食量减少;并通过兴奋交感神经系统,促进脂肪组织的脂肪分解,产热增加,因而发挥降体重的功能。在 *OB* 突变的 *ob/ob* 小鼠,体内缺乏内源性 *Leptin*,表现出极度肥胖、多食,同时还表现高胰岛素血症、高血糖,给予外源性 *Leptin* 后,不但体重下降,高血糖与高胰岛素血症亦得以纠正^[2]。并且发现,*Leptin* 的功能性受体除主要分布在下丘脑外,外周组织如肝脏、胰腺、骨骼肌、脂肪亦有少量分布^[3]。这些结果提示 *Leptin* 可能直接或间接作用于胰岛素的分泌器官及靶器官,参与机体糖代谢的调节。但其具体机制目前尚不明了。

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利用,并通过糖异生与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。已发现在肝脏的表面存在 *Leptin* 的功能受体,并在培养的肝细胞观察到,*Leptin* 对胰岛素受体后的信号传导途径存在影响^[4]。这些研究说明 *Leptin* 可能直接参与影响肝内物质代谢。

本实验以肝细胞葡萄糖氧化为观察指标,初步探讨不同剂量、不同作用时间的 *Leptin* 对肝糖代谢可能存在的影响。实验结果显示,近似于正常人生理范围的低剂量 *Leptin* ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),对肝细胞葡萄糖氧化无明显影响,但当剂量上升至 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时,则抑制肝细胞葡萄糖氧化,并在 $50 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,随剂量增加抑制作用越明显,剂量达 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时最低。应用达到抑制剂量的 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ *Leptin* 继续作用时,其抑制作用并未持续存在,反而在作用 3 h 后葡萄糖氧化又显著上升,恢复甚至稍超过对照组水平。*Leptin* 对肝细胞葡萄糖氧化的影响主要表现在高浓度时的急性抑制作用,在高剂量慢性作用时抑制作用消失。Rossetti 等在大鼠一次性注射 *leptin* 观察其短期效应,发现 *Leptin* 可显著抑制糖酵解关键酶葡萄糖激酶的表达,且使游离脂肪酸减少^[5]。研究已证实 *Leptin* 的主要生理

功能是促进脂肪的氧化分解与产热,因而我们推测在急性作用期,*Leptin* 以促进脂肪的 β 氧化为主,此时大量的 ATP 生成可反馈抑制葡萄糖酵解的关键酶如葡萄糖激酶,使葡萄糖氧化减少,当后期脂肪氧化减速后,这种抑制作用解除,则葡萄糖氧化恢复;此外亦存在以下可能性:①为保证脂肪的充分氧化,*Leptin* 在急性期直接抑制葡萄糖酵解的关键酶,脂肪氧化完成后,抑制解除,为机体内物质代谢的一种协调行为;②*Leptin* 对肝细胞葡萄糖氧化过程中不同的关键酶作用不同,以及显效时间不一致。这些假设均有待进一步研究。结果还说明,*Leptin* 可不通过中枢而直接作用于肝细胞,发挥对糖代谢的影响。

本结果说明,低浓度 *Leptin* 对肝细胞葡萄糖氧化无明显影响,高浓度时具急性抑制作用,这可能是机体物质代谢之间协调作用的结果,为可逆的过程。长期高浓度作用时,肝细胞葡萄糖氧化仍能维持在稳定的范围内甚至轻度增加。

参 考 文 献

- 1 Assimacopoulos-Jeannet F, Thumelin S, Roche E, *et al*. Fatty acid rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase 1 gene in the pancreatic Beta-cell line INS-1. *J Biol Chem*, 1997, 272(3):1659
- 2 Weigle D S, Bukowski T R, Foster D C, *et al*. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 1995, 96(10):2065
- 3 Emilsson V, Liu Y, Cawthorne M A, *et al*. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes*, 1997, 46(1):313
- 4 Cohen B, Novick D, Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science*, 1996, 274(11. 15):1185
- 5 Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, *et al*. Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and *in vivo* insulin action. *J Biol Chem*, 1997, 272(44):27758

(1999 - 05 - 31 收稿 1999 - 09 - 13 修回)