

肝脏脂肪变对胰高血糖素受体的表达影响

王倩倩 肖元元 祝超瑜 魏燕燕 李 旭 张明亮 韩峻峰 魏 丽 贾伟平

摘 要 **目的** 观察胰高血糖素受体(GCGR)在 ob/ob 小鼠肝组织以及肝癌细胞株 HepG₂ 细胞脂肪变后表达变化。**方法** 分别检测 10 周龄的雄性 ob/ob 小鼠和同窝野生对照小鼠的体重、肝功、血糖、血脂以及胰岛素等指标,用荧光定量 PCR 方法、Western blot 法和免疫组化分别检测两组鼠肝脏中 gcgr 基因、蛋白表达的差异以及定位情况。不同浓度油酸处理 HepG₂ 细胞,油红 O 染色观察 HepG₂ 细胞脂肪病变程度,QPCR 法和 Western blot 法检测细胞 gcgr mRNA 和蛋白的表达变化。**结果** GCGR 广泛表达于多种组织,以肝脏表达较多,ob/ob 小鼠呈现明显的脂肪肝性病变,且免疫组化结果发现,ob/ob 小鼠与正常对照小鼠相比,肝脏中 GCGR 表达减少;mRNA 表达水平分别为 0.709 ± 0.174 vs 1.000 ± 0.000 ,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);蛋白表达水平分别为 0.761 ± 0.211 vs 1.200 ± 0.346 ,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同浓度梯度油酸处理 HepG₂ 细胞,其 GCGR mRNA 和蛋白水平表达随油酸浓度增加而逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 肝脏脂肪性病变降低了肝脏 GCGR 表达水平,从而可能影响肝脏的糖脂代谢。

关键词 胰高血糖素受体 非酒精性脂肪肝 糖尿病 ob/ob 小鼠 HepG₂ 细胞

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.09.010

Effect of Hepatic Steatosis on the Expression of Glucagon Receptor. Wang Qianqian, Xiao Yuanyuan, Zhu Chaoyu, et al. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Jiaotong University Affiliated 6th People's Hospital, Shanghai Diabetes Institute, Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus, Shanghai 200233, China

Abstract **Objective** To determine the expression of glucagon receptor (GCGR) in ob/ob mice liver and in hepatic steatosis HepG₂ cell. **Methods** We detected several indicators such as weight, liver function, blood glucose, blood lipids and insulin concentrations of 10-week-old male ob/ob mice and wild littermates. The expression of gcgr were measured by quantitative PCR, Western blot, and the localization of GCGR was achieved by immunohistochemistry. After HepG₂ cells were treated with different concentrations of oleic acid, oil red O staining was conducted to detect hepatic steatosis, gcgr mRNA and protein expression were measured by QPCR and Western blot, respectively. **Results** GCGR widely expressed in many tissues, especially in liver. ob/ob mice manifested fatty liver disease, and gcgr expression decreased in ob/ob mice liver($P < 0.05$). The GCGR protein expression levels in ob/ob mice liver were significantly decreased ($P < 0.05$). As concentrations of oleic acid increased, gcgr mRNA and protein levels decreased, and the difference was statistically significant. **Conclusion** Hepatic steatosis reduces the liver GCGR expression levels, which may affect glucose and lipid metabolism in the liver.

Key words Glucagon receptor; NAFLD; Diabetes mellitus; Ob/ob mice; HepG₂ cell

胰高血糖素是一种由胰岛 α 细胞分泌的激素,它通过与胰高血糖素受体(glucagon receptor, GCGR)结合后发挥功能。胰高血糖素受体是一个具有 7 个跨膜序列的 G 蛋白偶联受体,主要分布于肝脏。研究发现,胰高血糖素的主要作用是通过与肝脏胰高血糖素受体结合发挥升糖降脂的作用^[1]。Salehi 等^[2]的研究发现,抑制胰高血糖素的分泌可以改善 ob/ob

小鼠的高血糖。Franklin 等^[3]和 McShane 等^[4]的研究表明,GCGR 拮抗剂可维持野生型小鼠和高脂喂养的小鼠葡萄糖稳态,进而强调了 GCGR 拮抗剂在 2 型糖尿病中的潜在治疗价值。为了进一步阐明肝脏糖脂代谢紊乱的机制,胰高血糖素及其受体的研究引起了广泛的关注。本实验首先观察在小鼠组织中 GCGR 的表达分布,发现 HepG₂ 细胞中 GCGR 也存在表达。进一步再以 ob/ob 小鼠和油酸诱导的 HepG₂ 细胞为研究对象,旨在探讨当肝脂肪变后对 GCGR 的表达影响。

材料与方法

1. 实验细胞:选取贮存于上海交通大学附属第六

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81370956);上海交通大学无锡研究院交大专项基金资助项目(2011JDZX021)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科、上海市糖尿病研究所、上海市糖尿病重点实验室

通讯作者:魏丽,主任医师,电子信箱:weili63@hotmail.com

人民医院糖尿病研究所的 HepG₂ 细胞株和人胚肾细胞 (HEK293 细胞)。

2. 实验动物:SPF 级雄性 10 周龄小鼠共 10 只, ob/ob 小鼠 5 只,对照野生型小鼠 5 只(均购买于南京大学模式动物研究所,饲养于上海交通大学附属第六人民医院动物房)。

3. 实验试剂:GCCR 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, β -actin 抗体购自美国 Abcam 公司, IgG 二抗抗体购自美国 Promega 公司, GCCR 质粒由加拿大 Wheeler 教授实验室赠予, 油酸购自美国 Sigma 公司, RNA 抽提试剂 (Trizol) 购自美国 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒购自日本 Toyobo 公司, 荧光定量 PCR 试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司, 引物合成由上海生工生物工程公司合成, 胰岛素 (短效人胰岛素) 购自美国礼来公司, 血糖仪及血糖试纸购自美国罗氏公司, 血清胰岛素 ELISA 检测试剂盒购自美国 Millipore 公司, 低糖 Dmem 培养液购自美国 Gibco 公司, 高糖 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司, 青链霉素购自美国 Gibco 公司, 0.25% 胰酶购自美国 Gibco 公司, 牛血清白蛋白 (BSA) 购自瑞士 Roche 公司。

4. 动物实验:ob/ob 小鼠与对照小鼠适应性喂养 1 周, 禁食 8h 后, 以强生稳步血糖仪测定全血血糖水平, 留取空腹血清测定血脂水平以及检测肝功能, 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测空腹血清胰岛素水平。处死后留取正常对照小鼠心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、胰腺、脑、肌肉、腹内脂肪组织样本及 ob/ob 小鼠的肝脏组织, 保存于 -80℃ 冰箱。

5. 肝脏组织甘油三酯的抽提:称取保存于 -80℃ 冰箱中 50mg 肝脏组织, 充分研磨后, 加入 667 μ l 氯仿和 333 μ l 甲醇的混合液。冰浴并于室温下摇 20min。加入 250 μ l 1mol/L NaCl 溶液平摇 1min。室温 2000r/min 离心 5min。吸取下层液相, 慢慢风干后加入等体积异丙醇溶解, 进而检测溶液中甘油三酯含量。

6. 细胞实验:(1) 培养条件:HepG₂ 细胞培养于 100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素 + 10% 胎牛血清

(FBS) 的低糖 DMEM; HEK293 细胞培养在含有 1% 青链霉素以及 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液中, 两种细胞均放于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。(2) HepG₂ 细胞的培养及处理:当 HepG₂ 细胞处于对数生长期时, 按 1×10^6 /孔接种于 6 孔板, 待细胞生长至 80% 左右后, 处理组分别用不同浓度的油酸 (300 μ mol/L、500 μ mol/L) 处理, 对照组用含 1% BSA 的 DMEM 培养, 培养 24h 后, 收取细胞总 RNA 及总蛋白。油红 O 染色:HepG₂ 细胞经过不同浓度油酸处理后, 油红 O 染色。置于倒置显微镜下观察, 拍照。(3) HEK293 细胞的培养及处理:接种于 24 孔板的 HEK293 细胞, 用不同浓度的 G418 培养液培养, 筛选出实验最佳浓度为 700 μ l/ml。接种于 6 孔板中的 HEK293 细胞生长至 70% ~ 80%, 转染 GCCR 质粒:取 2 μ g 的 pcDNA3.1 - GCCR - Flag 质粒和 5 μ l 的 Lipofectamine 2000 分别加入 250 μ l Opti - MEM 培养液, 混匀, 室温放置 5min, 两者混匀后室温再次放置 30min, 加入至细胞中, 转染 6h 后, 加入含浓度为 700 μ l/ml 的 G418 培养基进行培养, 直至筛选出稳定转染 GCCR 的 HEK293 细胞。

7. 肝脏 GCCR mRNA 提取及荧光定量 PCR:取 ob/ob 小鼠及其对照鼠肝脏组织重量各约 50mg, 加入 1ml Trizol 试剂, 研磨后提取组织总 RNA。同种方法抽提不同浓度油酸处理的 HepG₂ 细胞 RNA, 荧光定量 PCR 法扩增检测 GCCR 基因的表达量。上海生工生物工程公司合成基因引物 (表 1)。反转录反应体系 10 μ l, 65℃ 5min 使 RNA 变性, 37℃ 5min 去除基因组 DNA 反应, 37℃ 15min, 98℃ 5min 后冰上放置终止反应。荧光定量 PCR 扩增采用 10 μ l 反应体系, 其中 cDNA 1 μ l, 上下游引物各 0.4 μ l, SYBR Green 5 μ l, 去离子水 3.2 μ l。 β -actin 作为内对照, 每个样本设置 3 个复孔。95℃ 预变性 10min, 95℃ 变性 15s, 60℃ 退火延伸 60s, 经 40 个循环, 融解曲线分析:95℃ 15s, 65℃ 60s, 97℃ 1s, 37℃ 30s。其结果根据公式可以算出 ob/ob 鼠组中 GCCR 表达/对照组 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。同时分析肝脏 GCCR 表达量与血糖、血脂、肝脂水平的相关性。

表 1 基因引物名称

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	长度 (bp)
小鼠 GCCR	GCACCCGAAACTACATCCAT	AGGTCATCGCCAATCTTCTG	110
小鼠 β -actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154
人 GCCR	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCTCAATCTCCTCGCCATCC	123
人 β -actin	GGATGCAGAAGGAGATCACTG	CGATCCACACGGAGTACTTG	90

小鼠 GCCR. 小鼠胰高血糖素受体; 小鼠 β -actin. 小鼠 β 肌动蛋白; 人 GCCR. 人胰高血糖素受体; 人 β -actin. 人 β 肌动蛋白

8. 蛋白提取及 Western blot 法检测 GCGR 蛋白表达:取 -80℃ 冰箱保存的 ob/ob 小鼠、正常对照小鼠以及人肝脏标本组织约 100mg,加 1ml 蛋白裂解液,放入组织研磨机中研磨,离心后取上清。收集用不同浓度油酸处理 24h 的 6 孔板 HepG₂ 细胞,提取细胞总蛋白,据 BCA 法测定蛋白浓度后,进行 SDS - PAGE 凝胶电泳,上样量为 30μg、转膜、封闭、1:200 稀释 GCGR 一抗 4℃ 孵育过夜、二抗孵育 90min、ECL 化学发光系统显色、曝光。最后用 Image J 软件分析测定 GCGR 和 β - actin 条带灰度值。用 GCGR/β - actin 代表 GCGR 蛋白相对表达量。

9. 小鼠肝组织 GCGR 免疫组化:(1)HE 染色:为观察肝脏病理学特征,取出实验组和对照组小鼠肝组织进行苏木精 - 伊红染色 (hematoxylin - eosin staining, HE),4% 多聚甲醛固定后,脱水、包埋,然后分别切片和贴片。放入乙醇伊红染色液染色 2 ~ 3min,乙醇脱水,经梯度二甲苯使切片透明,封片后显微镜观察拍照。(2)免疫组化染色:取小鼠肝组织固定,组织片脱蜡水化,PBS 漂洗两次,封闭 4h,37℃,加一抗 GCGR 抗体 (1:200 稀释),37℃ 孵育过夜,PBS 漂

洗 3 次,加生物素化二抗 (1:200),滴加 SABC 试剂,DBA 显色试剂盒显色,镜检拍片。阳性评判标准:GCGR 的蛋白表达以在细胞胞膜处出现浅棕黄色、棕黄色染色为阳性。高倍视野中随机计数 10 个不重复视野,每个视野中染色阳性细胞数及有核细胞总数的比值得出阳性率,染色结果结合阳性率进行半定量分析。

10. 统计学方法:所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 17.0 软件,两组间均数比较采用 *t* 检验,相关性分析采用 *Spearman* 方法,免疫组化结果采用 Image pro plus 分析软件,使用 Graphpad Prism5 做图,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠各组织及肝细胞中 GCGR 表达水平:Western blot 法检测发现 GCGR 在小鼠的心脏、肝脏、肌肉、腹内脂肪等多种组织广泛分布 (图 1A)。为了进一步证实 GCGR 在肝脏中的表达,笔者以稳定转染 GCGR 的 HEK293 细胞蛋白为阳性对照,Western blot 法检测了 HepG₂ 细胞系中有表达,表明胰高血糖素在肝脏的作用是通过其 GCGR 发挥作用的 (图 1B)。

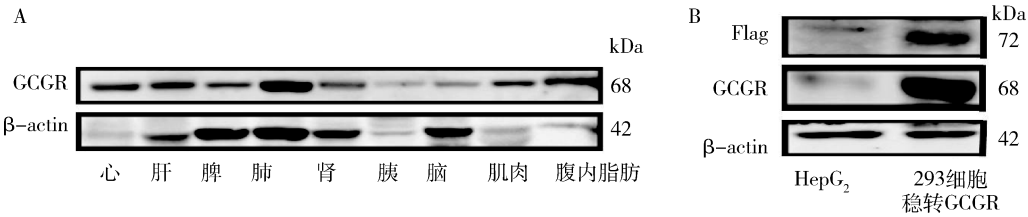


图 1 GCGR 在组织及细胞中的表达

A. GCGR 在小鼠组织中的表达;B. GCGR 在 HepG₂ 细胞的表达

2. ob/ob 小鼠糖脂代谢:ob/ob 小鼠体重、肝重量、甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL - C)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和肝脂较对照组小鼠明显升高,且差异有统计学意义 (*P* < 0.01),高密度脂蛋白胆固醇 (high - density lipoprotein cholesterol, HDL - C) 较对照组下降,差异有统计学意义 (*P* < 0.01),表明 ob/ob 小鼠有着明显的脂肪肝。与对照组相比,糖代谢指标中空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS)、胰岛素抵抗指数 (HOMA - IR) 显著升高,胰岛素分泌指数 (HOMA - IS) 降低,表明 ob/ob 小鼠处于糖尿病的胰岛素抵抗阶段,出现严重的血脂紊乱 (表 2)。

表 2 两组小鼠体脂和血脂谱差异比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

项目	正常对照组	ob/ob 小鼠组	<i>P</i>	<i>t</i>
体重 (g)	25.7 ± 0.6	55.0 ± 2.0	0.000	-14.131
肝重 (g)	1.2 ± 0.04	3.1 ± 0.2	<0.01	-8.978
FPG (mmol/L)	6.1 ± 0.1	7.6 ± 0.3	0.000	-4.246
FINS (ng/ml)	0.7 ± 0.2	10.6 ± 1.5	0.000	-6.825
TC (mmol/L)	2.5 ± 0.2	5.5 ± 0.4	0.003	-6.084
TG (mmol/L)	0.60 ± 0.04	0.90 ± 0.04	0.000	-4.579
HDL - C (mmol/L)	2.2 ± 0.1	1.30 ± 0.2	0.004	-4.062
LDL - C (mmol/L)	0.07 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.002	-4.647
AST (U/L)	51.8 ± 4.9	235.0 ± 33.5	<0.01	-1.764
ALT (U/L)	206.4 ± 21.3	266.4 ± 26.5	0.00	-5.411
肝脂 (mmol/L)	1.9 ± 0.3	20.5 ± 0.5	<0.01	-32.800
HOMA - IR	0.2 ± 0.08	10.8 ± 3.5	0.002	-6.823
HOMA - IS	0.3 ± 0.1	0.005 ± 0.002	0.004	6.158

FPG. 空腹血糖;FINS. 空腹胰岛素;TC. 总胆固醇;TG. 甘油三酯;HDL - C. 高密度脂蛋白胆固醇;LDL - C. 低密度脂蛋白胆固醇;AST. 天冬氨酸转氨酶;ALT. 丙氨酸转氨酶;HOMA - IR. 胰岛素抵抗指数;HOMA - IS. 胰岛素分泌指数

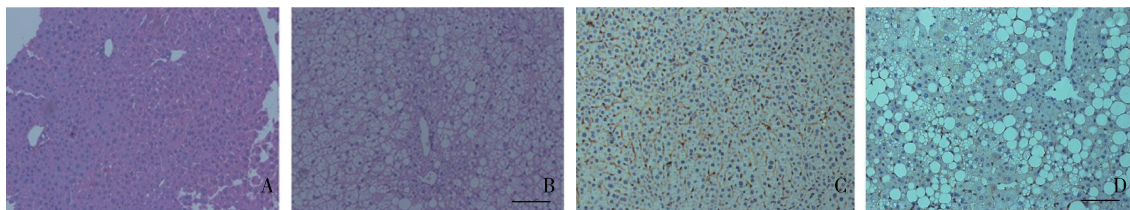
3. ob/ob 小鼠肝脏组织中 GCGR 的表达变化:

(1) ob/ob 小鼠肝脏组织中 GCGR 的免疫组化表现: 肝脏组织 HE 染色结果显示, ob/ob 小鼠肝脏组织呈现明显的脂肪沉积, 肝细胞中存在大量脂滴, 细胞核明显变大, 表现出肝脏炎性反应, 而正常对照小鼠未见上述脂肪肝性病变(图 2 中 A、B)。免疫组化结果显示, 肝脏中 GCGR 表达在细胞膜上; 与正常对照小鼠相比, ob/ob 小鼠肝脏中 GCGR 阳性表达减少(图 2 中 C、D), 差异有统计学意义($t = 17.462, P = 0.000$)。该结果提示肝脏发生脂肪变后, GCGR 表达降低。(2) ob/ob 小鼠肝脏中 gcgr 的 mRNA 表达水平: 两组小鼠肝脏总 RNA 进行荧光定量 PCR 扩增后, 发现 ob/ob 小鼠肝脏组织中 gcgr mRNA 表达水平(0.709 ± 0.174)较正常对照组小鼠(1.000 ± 0.000)降低, 差异有统计学意义($t = 3.745, P = 0.020$, 图 3A)。(3) ob/ob 小鼠肝脏中 GCGR 的蛋白表达水平: Western blot 法检测两组小鼠肝脏组织中 GCGR 蛋白表达水平, GCGR 蛋白在 ob/ob 小鼠表达(0.761 ± 0.211)较对照组($1.200 \pm$

0.346)降低, 差异有统计学意义($t = 2.423, P = 0.042$, 图 3B), 与荧光定量 PCR 结果相一致。

4. HepG₂ 细胞脂肪变对 GCGR 的表达水平影响:

为了进一步验证肝脏脂肪变后 GCGR 的表达变化, 使用不同浓度油酸处理 HepG₂ 细胞 24h, 使其发生脂肪变。油红 O 染色可以看到随着油酸浓度的升高, 油红 O 染色与正常对照组相比, 颜色逐渐加深, 说明肝细胞发生了脂肪性病变(图 4A)。同时荧光定量 PCR 观察到 HepG₂ 细胞中 gcgr mRNA 表达逐渐减少, 当油酸浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$ 时, 处理组的 gcgr mRNA 为对照组的 0.39 ($t = 5.116, P = 0.036$), $500 \mu\text{mol/L}$ 时为对照组的 0.1 ($t = 29.516, P = 0.000$, 图 4B)。Western blot 法分析发现, 浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$ 的油酸干预细胞 24h 后, 处理组的表达量为对照组 0.46 ($t = 9.509, P = 0.001$), $500 \mu\text{mol/L}$ 处理组是对照组的 0.15 ($t = 35.985, P = 0.000$, 图 4C)。当肝细胞发生脂肪变后, gcgr mRNA 和 GCGR 蛋白表达都随之下降, 与动物水平有着相同的结果。

图 2 小鼠肝脏组织 HE 及免疫组化染色 ($\times 200$)

A、B. 分别为正常对照组和 ob/ob 鼠组肝脏组织 HE 染色, 比例尺: $50 \mu\text{m}$;
C、D. 分别为正常对照组和 ob/ob 鼠组肝脏组织免疫组化染色, 比例尺: $50 \mu\text{m}$

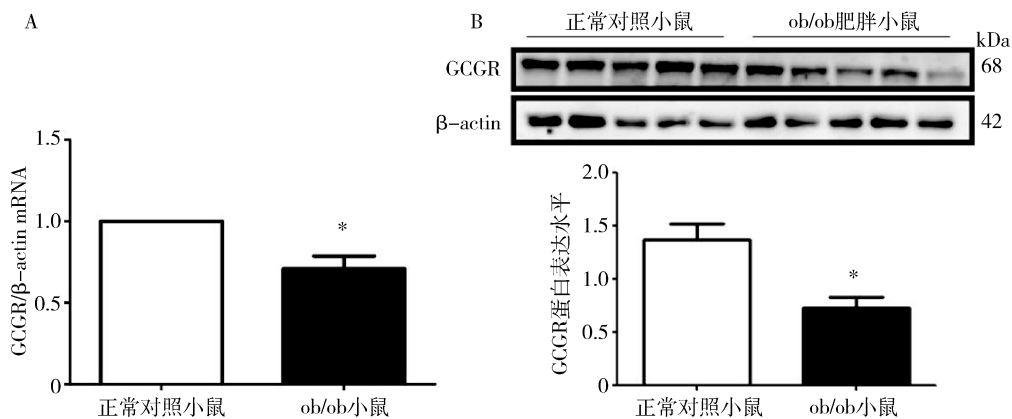


图 3 小鼠肝脏组织 gcgr mRNA 及蛋白的表达差异

A. 两组小鼠肝脏组织中 gcgr mRNA 的表达差异; B. 两组小鼠肝脏组织中 GCGR 蛋白的表达和 Western blot 法灰度分析结果。与正常对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

近年来, 关于非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty

liver disease, NAFLD) 与糖尿病密切相关的研究成为热点^[5, 6]。NAFLD 患者由于胰岛素抵抗, 易造成空

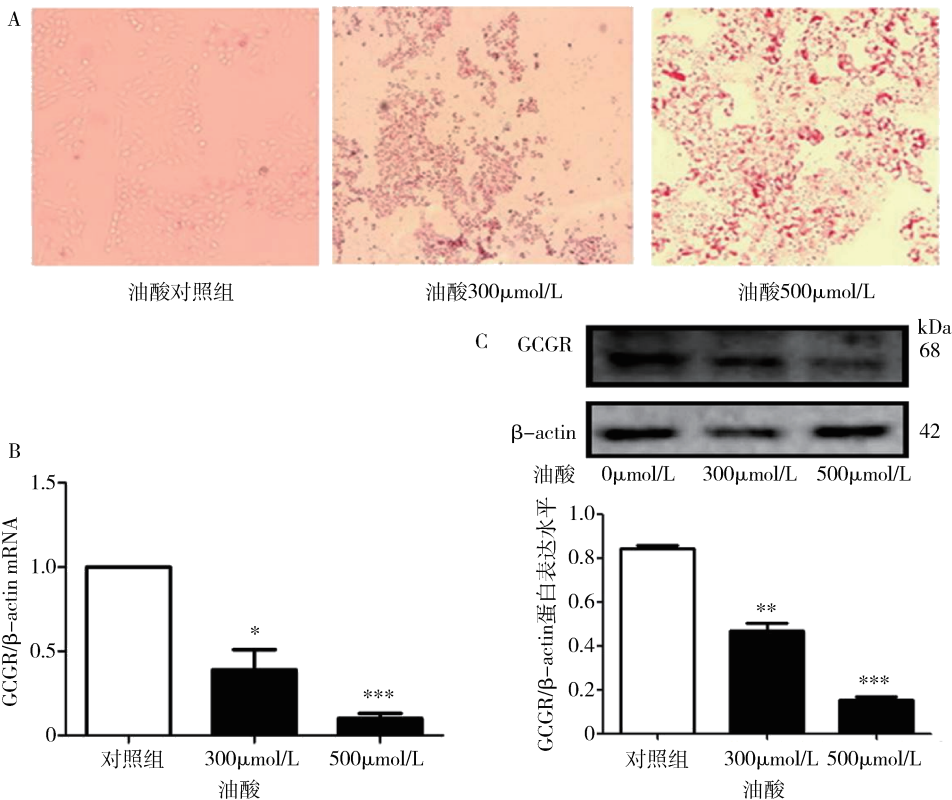


图 4 HepG₂ 细胞油红 O 染色及 GCGR 在 mRNA 和蛋白水平表达差异

A. 不同浓度油酸处理 HepG₂ 细胞的油红 O 染色 (×100); B. 不同浓度油酸对 HepG₂ 细胞 GCGR mRNA 的表达差异;

C. 不同浓度油酸对 HepG₂ 细胞 GCGR 蛋白的表达和 Western blot 法灰度分析结果。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P = 0.000$

腹及餐后血糖升高,增加糖尿病的发病风险^[7]。为了更好的阐明脂肪肝和糖代谢的关系,笔者选择了典型糖尿病 NAFLD 动物模型 - ob/ob 小鼠作为研究对象^[8]。本研究结果发现,GCGR 在小鼠的心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、胰腺、脑、肌肉、腹内脂肪等组织中均有表达,其中在肝脏中表达量丰富,这与国外报道一致^[9]。同时笔者以稳定转染 GCGR 的 HEK293 细胞作为阳性对照,发现 GCGR 在人肝癌细胞系 HepG₂ 细胞中也有所表达。

在肝脏中,胰高血糖素可激活肝细胞内的磷酸化酶、糖异生有关的酶系和脂肪酶系,从而发挥升高血糖、分解脂肪的作用,对维持血糖稳态和脂代谢平衡有着重要意义^[10, 11]。Longuet 等^[11]的研究显示,GCGR^{-/-}小鼠禁食后表现出肝脏甘油三酯显著增加,脂肪酸氧化减弱,高脂喂养 GCGR^{-/-}小鼠时肝脏可迅速发展为脂肪肝。Berglund 等^[12]的结果表明,通过运动或者其他干预方式激活肝脏 GCGR 的作用,可以改善脂肪肝。国内也有研究发现,对 2 型糖尿病大鼠采用高脂低碳水化合物饮食的同时给予运动干预,其代谢指标如血糖、血脂发生明显改善^[13, 14]。最

新文献显示,在 db/db 小鼠中,抑制肝脏胰高血糖素的信号转导将会导致脂代谢紊乱^[15]。这些研究说明 GCGR 在脂代谢中的重要作用。可是反过来当肝脏脂肪变后,对肝脏 GCGR 表达又有什么影响,国内未见报道。因此,笔者以 ob/ob 小鼠以及诱导 HepG₂ 脂肪变作为研究对象,进一步探讨了肝脏脂肪变后对 GCGR 的表达的影响。

笔者在实验中发现,ob/ob 小鼠肝脏组织中,与对照小鼠对比,GCGR 在 mRNA 水平和蛋白水平均有降低,这与其他研究结果一致^[16, 17]。但是他们的研究只局限在动物水平,笔者不仅在动物水平证实了这个结果,而且在油酸诱导 HepG₂ 细胞脂肪变的水平上进行了研究,又进一步证实肝细胞脂肪变降低 GCGR 表达。

目前关于肝脏 GCGR 表达减少的具体机制尚不明确。曾有研究发现,肝脏脂肪的浸润,不仅降低了胰高血糖素的敏感度,并且发现 GCGR 发生内在化,转移至细胞内的内涵体、溶酶体等泡状细胞器中,从而导致测得肝脏中发挥作用的胰高血糖素受体减少;还可能与 GCGR 的破坏或者其 mRNA 的翻译减少有

关^[17]。还有研究发现,增加血浆胰高血糖素和葡萄糖浓度以及升高的 cAMP 和氧浓度等因素也会影响 GCGR 的表达变化^[18]。笔者通过实验以及查阅文献考虑,肝脏 GCGR 表达减少的机制可能由于 ob/ob 小鼠肝脏发生了脂肪变,GCGR 表达水平减少,胰高血糖素敏感度降低,从而可能对脂肪的水解作用减弱,进一步加重了脂肪肝的进展。

综上所述,肝脏发生脂肪样变后,肝脏胰高血糖素受体的表达会有所下降。本研究只是初步,今后会进一步从细胞水平和分子水平来探讨糖脂代谢对 GCGR 的影响以及信号通路及具体机制,阐明 GCGR 在糖脂代谢中的作用及机制。

参考文献

- 1 Charron MJ, Vuguin PM. Lack of glucagon receptor signaling and its implications beyond glucose homeostasis[J]. J Endocrinol, 2015,224(3): R123-130
- 2 Salehi A, Vieira E, Gylfe E. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations[J]. Diabetes, 2006,55(8): 2318-2323
- 3 Franklin ZJ, O'Harte FP, Irwin N. Effects of short-term chemical ablation of glucagon signalling by peptide-based glucagon receptor antagonists on insulin secretion and glucose homeostasis in mice[J]. Biol Chem, 2014,395(4): 433-442
- 4 McShane LM, Franklin ZJ, O'Harte FP. Ablation of glucagon receptor signaling by peptide-based glucagon antagonists improves glucose tolerance in high fat fed mice[J]. Peptides, 2014,60:95-101
- 5 张喜婷,胡玲,王宁,等. 2型糖尿病并发非酒精性脂肪肝的危险因素及其与糖尿病大血管病变的相关性研究[J]. 中国全科医学, 2012,15(4): 1332-1334
- 6 Qu ZY, Zhu YH, Jiang JJ, et al. The clinical characteristics and etiological study of nonalcoholic fatty liver disease in Chinese women with PCOS[J]. Iran J Reprod Med 2013,11(9): 725-732
- 7 Kotronen A, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, et al. Liver fat

- and lipid oxidation in humans[J]. Liver Int, 2009,29(9): 1439-1446
- 8 Zhang JH, Wright W, David A, et al. Alterations of the classic pathway of complement in adipose tissue of obesity and insulin resistance[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007,292(5): E1433-E1440
- 9 Authier F, Desbuquois B. Glucagon receptors[J]. Cell Mol Life Sci, 2008,65(12): 1880-1899
- 10 Zhang GJ, Bei B. Glucagon and regulation of glucose metabolism[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003,284(4): E671-E678
- 11 Longuet C, Sinclair EM, Maida A, et al. The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting[J]. Cell Metab, 2008,8(5): 359-371
- 12 Berglund ED, Lustig DG, Baheza RA, et al. Hepatic glucagon action is essential for exercise-induced reversal of mouse fatty liver[J]. Diabetes, 2011,60(11): 2720-2729
- 13 朱兵,张晓雨,范鸣,等. 高脂低碳水化合物饲养加运动对2型糖尿病大鼠代谢指标的影响[J]. 中华糖尿病杂志, 2014,6(11): 826-830
- 14 Han S, Akiyama TE, Previs SF, et al. Effects of small interfering RNA-mediated hepatic glucagon receptor inhibition on lipid metabolism in db/db mice[J]. J Lipid Res, 2013,54(10): 2615-2622
- 15 Rao RH. Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon[J]. Metabolism, 1996,44:817-824
- 16 Charbonneau A, Unson CG, Lavoie JM. High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise[J]. J Physiol, 2007, 579(1): 255-267
- 17 Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003,284(4): E671-678
- 18 Iizuka K, Tomita R, Takeda J, et al. Rat glucagon receptor mRNA is directly regulated by glucose through transactivation of the carbohydrate response element binding protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(4): 1107-1112

(收稿日期:2016-01-12)

(修回日期:2016-02-19)

(接第184页)

- 7 Brendel R, Best JD, With, CD, et al. Standardized patients or patient simulator reality perception in emergency medical education[J]. Ann Emerg Med, 2008,51(4): 516-517
- 7 王晶,秦俭,孙长怡,等. 生理驱动高仿真模拟人在急诊呼吸机培训中的应用[J]. 医学综述, 2010,16(14): 2240-2241
- 8 于虹,果海青,万小超. CPR 模拟人在心肺复苏操作技能培训中的教学体会[J]. 医疗装备, 2014(5): 39-40
- 9 杨正飞,黄子通. 如何改善心肺复苏培训质量的研究进展[J]. 中国急救医学, 2012,12(32): 1139-1143
- 10 王春梅,覃秀川. 强化模拟训练在急诊心肺复苏教学中的效果[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013,5(3): 296-298
- 11 Maran NJ, Glavin RJ. Low-to-high-fidelity simulation-a continuum of medical education[J]. Med Educ, 2003,37(Suppl): 22-28
- 12 Wayne DB, Didwania A, Feinglass J, et al. Simulation-based education improves quality of care during cardiac arrest team responses at an academic teaching hospital: a case-control study[J]. Chest, 2008, 133(1): 56-61

- 13 刘树元,王立秋. 急诊临床教学中急救思维培养的探索[J]. 中国急救复苏与灾难医学杂志, 2012,9(7): 833-835
- 14 富学林,陈军宁,韦广粤. 深化急诊医学教学改革提高临床急救教学成效[J]. 医学信息, 2010,23(8): 2818-2819
- 15 刘毅华,付强,付秀华. 各种急救培训模式在医院心肺复苏培训中的应用评价[J]. 中国医学创新, 2013,10(12): 141-143
- 16 徐满琴,陈菊娣,居朝霞. 阶梯式培训考核在提高年轻护士人文素养中的应用[J]. 中国医学伦理学, 2015,8(4): 593-595
- 17 Hazinski MF, Nolan JP, Aicken R, et al. Part 1: executive summary: 2015 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations[J]. Circulation, 2015; 132(16): 212-218
- 18 刘力松,秦俭,孙长怡. 高仿真模拟技术在研究生急救技能培训中的应用[J]. 中华医学教育探索杂志, 2015,35(1): 95-97
- 19 姚珊珊,杨林,李云芳,等. 采用高仿真综合模拟人进行心肺复苏技能培训的效果研究[J]. 中华医学教育探索杂志, 2014, 13(1): 34-37

(收稿日期:2016-02-19)

(修回日期:2016-02-29)