

14-3-3 β 蛋白介导胰高血糖素作用下糖异生的特点及机制

冯丽帅 王倩倩 马 旭 王建波 魏 丽

摘 要 **目的** 分别观察胰高血糖素在空质粒转染组和 14-3-3 β 蛋白过表达组对 HepG2 细胞糖异生的影响,并对 14-3-3 β 蛋白介导此现象出现的可能原因初步探讨。**方法** 对转染空质粒或 14-3-3 β 质粒低糖培养基培养的 HepG2 细胞分别在有无胰高血糖素作用下,进行培养基中葡萄糖产量的测定并观察糖异生关键酶蛋白表达量的变化;用免疫共沉淀的方法判定稳定转染胰高血糖素受体的 293 细胞在胰高血糖素对待下,14-3-3 β 蛋白与胰高血糖素受体结合的变化。**结果** 在未加及加入胰高血糖素对待下,14-3-3 β 转染组与空质粒对照组相比葡萄糖产量降低(P 均 < 0.05);糖异生关键酶表达量降低(P 均 < 0.05);免疫共沉淀显示胰高血糖素受体、14-3-3 β 蛋白与碳水化合物反应元件三者处于结合状态,且在胰高血糖素作用下 14-3-3 β 蛋白与胰高血糖素受体结合减少而与碳水化合物反应元件结合增多(P 均 < 0.05)。**结论** 过表达 14-3-3 β 蛋白可起到抑制胰高血糖素的糖异生作用且这种现象发生的原因可能与其同碳水化合物反应元件间的相互作用及产生的后续效应有关。

关键词 胰高血糖素 胰高血糖素受体 14-3-3 β 蛋白 碳水化合物反应元件

中图分类号

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.010

Research on the Effect and Mechanism of 14-3-3 Beta Protein on Gluconeogenesis in the Action of Glucagon. Feng Lishuai, Wang Qianqian, Ma Xu, et al. Shanghai Diabetes Institute, Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus, Shanghai Key Clinical Center for Diabetes, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract **Objective** To observe the effect of glucagon on the expression of HepG2 cell and the expression of 14-3-3 protein in the empty plasmid group and the expression of 14-3-3 protein, and to explore the possible causes of the phenomenon. **Methods** The differences of glucose yield and the expression between empty plasmid or 14-3-3 beta plasmid transfected HepG2 cells to culture medium glucose yield of determination were observed and the expression of key enzymes of gluconeogenesis glucagon action was observed. with CO immunoprecipitation method, we determined the binding changes between glucagon receptor 14-3-3 protein and glucagon receptor under the treatment of glucagon. **Results** 14-3-3 beta plasmid transfected group was shown to yield less glucose compared with empty plasmid control group ($P < 0.05$), and also less expression of gluconeogenesis enzymes ($P < 0.05$). CO immunoprecipitation displayed the combination and also the alternative of bound state between glucagon receptor, 14-3-3 protein and carbohydrate response element under the treatment of glucagon ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of 14-3-3 protein may inhibit the glucagon induced gluconeogenesis due to the characteristic of them in the combination with glucagon receptor and carbohydrate response element.

Key words Glucagon; Glucagon receptor; 14-3-3 protein; Carbohydrate response element

胰高血糖素 (glucagon, Gln) 是由胰岛 α 细胞分泌的一种多肽类激素,其主要通过与肝脏胰高血糖素受体 (glucagon receptor, GCGR) 结合,激活肝细胞内的糖异生主要关键酶:葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK),起到加

速肝脏糖异生的作用^[1]。通过查阅文献和前期免疫共沉淀实验已证实,14-3-3 β 蛋白 (YWHAB) 作为 GCGR 辅助蛋白的一种,可通过与其结合介导受体下游信号通路的转导^[2-4]。但在 Gln 作用下 YWHAB 介导 GCGR 下游信号转导的机制尚不明确。本研究在验证 YWHAB 可介导 Gln 作用的基础上,对其中所涉及的相关机制进行研究探讨。

材料与方法

1. 细胞培养:人肝癌细胞系 HepG2 细胞、人胚肾 HEK293 细胞由上海市糖尿病研究所提供。培养条

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81570778)

作者单位:200023 上海市第六人民医院、上海市糖尿病研究所

通讯作者:魏丽,电子信箱:fenglisshuai1991@163.com

件为低糖 DMEM 培养基加入 10% 胎牛血清,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

2. 瞬时转染、药物干预及细胞葡萄糖产量的测定:将处于最佳生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,用未添加抗生素的含 10% FBS 低糖 DMEM 培养。待细胞达到 80% 左右,开始转染。先在 Nanodrop 2000 分光光度仪上测定 pc DNA 3.1 - YWHAB - HA 质粒和 pc DNA 3.1 - empty 质粒的浓度,然后配制每孔所需的转染试剂量:A:250μl Opti - MEM + 2μg DNA,混匀,室温静置 5min;B:250μl Opti - MEM + 5μl Lipofectamine 2000;A、B 1:1 混匀,室温孵育 30min,在孵育期间,将待转染的 6 孔板换液后,将混合液加入板内。转染 6h 后吸掉原培养液,换新鲜的完全培养基,放于 5% CO₂ 培养箱中继续。转染后 26h 后吸掉原培养液,换用未添加 FBS 的 DMEM 培养基饥饿处理 10h 后,换用无糖培养基 2h 后,分别在转染 empty 及 YWHAB 质粒孔板中不加或加入浓度为 100nmol/L 的 Gln,对待 4h 后,用葡萄糖检测试剂盒检测培养基中葡萄糖产量,并在吸掉原培养基后,用 BCA 蛋白测定试剂盒测定每孔板中蛋白表达量。用葡萄糖产量除以蛋白表达量则算出每孔板中单个细胞的产糖量。

3. 细胞 β - actin、YWHAB、G6pase、PEPCK 表达检测:采用 Western blot 法对上述每组蛋白各取 30μg 蛋白进行电泳,转膜,5% 脱脂牛奶封闭 1h,根据目的蛋白分子质量的不同切取不同分子质量的条带,一抗 4℃ 孵育过夜:β - actin、YWHAB、GCCR、G6pase、PEPCK、CHREBP;次日回收一抗,TBST 洗膜 10min × 3 次;相应二抗室温孵育 1.5h,TBST 洗膜 10min × 3 次。加入 ECL 发光剂,化学发光成像系统自动提取结果,应用 Image J 软件测定条带灰度值,以目标条带与内参条带灰度的比值作为上述各蛋白的相对表达量。

4. 免疫共沉淀检测 GCCR、YWHAB、CHREBP 之间的结合情况:培养 2 盘 10cm 圆盘稳定转染 GCCR 的 293 细胞,其中 1 盘用 100nmol/L Gln 对待 4h 后,分别用 CO - IP 试剂盒中裂解液提取 2 盘细胞蛋白,把 GCCR 抗体特异性结合至试剂盒中的过滤柱中,共沉淀细胞中 YWHAB 及 CHREBP 蛋白,以 IgG 设为阴性对照组进行免疫印迹法检测。上样顺序依次为总细胞蛋白组(Lysate 组)、IgG 对照组与 GCCR 抗体免疫共沉淀(IP)组。结果表明总细胞蛋白组及 GCCR 抗体免疫共沉淀组中均有 GCCR、YWHAB 及

CHREBP 蛋白的表达且在 Gln 作用下 YWHAB 与 GCCR 结合减少而 CHREBP 结合增多。重复实验 3 次,实验结果均显示在稳定转染 GCCR 293 细胞中,GCCR 抗体能够共沉淀 YWHAB 及 CHREBP,说明三者处于相互结合的状态,而 Gln 的加入则可使三者的结合发生变化,且这种变化可能与 YWHAB 影响 Gln 对待下的肝脏糖异生作用有关。

5. 统计学方法:以上实验所获取的数据均使用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用 *t* 检验进行比较,每次实验至少重复 3 次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组细胞葡萄糖产量比较:转染空质粒未加 GLN 处理组与转染空质粒加 GLN 处理组葡萄糖产量的显著升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 Gln 可通过促进糖异生作用,增加葡萄糖产量。而转染空质粒加 GLN 处理组与转染 YWHAB 加 GLN 处理组葡萄糖产量下降,且差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

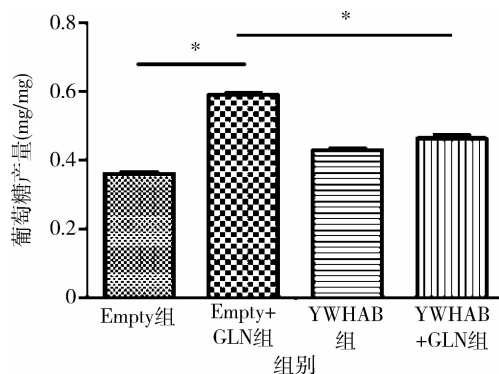


图 1 各组葡萄糖产量测定(* $P < 0.05$)

2. 各组糖异生相关蛋白表达比较:转染 empty 组未加 GLN 处理组 YWHAB 的表达量 0.61 ± 0.02 mg/mg,与转染 YWHAB 组未加 GLN 处理组 YWHAB 的表达量 1.07 ± 0.05 mg/mg;与转染 empty 组 GLN 处理组 YWHAB 的表达量 0.68 ± 0.03 mg/mg,转染 YWHAB 组 GLN 处理组 YWHAB 表达量 1.09 ± 0.07 mg/mg,可以看出说明通过转染 pc DNA 3.1 - YWHAB - HA 质粒可以显著提高 YWHAB 的表达水平($P < 0.05$,图 2A),保证了后续 YWHAB 功能研究的有效进行。糖异生关键酶 PEPCK 及 G6pase 在空质粒加 Gln 处理组及空质粒组中表达量 1.05 ± 0.04 mg/mg、 1.28 ± 0.09 mg/mg;而在空质粒组中的

表达量 $0.78 \pm 0.03 \text{ mg/mg}$ 、 $1.07 \pm 0.05 \text{ mg/mg}$ 均下降,说明 Gln 可促进糖异生作用,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2 中 B、C),而 PEPCK、G6pase 两种关键酶分别在转染 YWHAB 质粒加 Gln 处理组中的表达量 $0.76 \pm 0.03 \text{ mg/mg}$ 、 $1.05 \pm 0.03 \text{ mg/mg}$,与空质粒

加 Gln 处理组两个蛋白的表达量 $1.05 \pm 0.04 \text{ mg/mg}$ 、 $1.28 \pm 0.09 \text{ mg/mg}$ 降低,说明 YWHAB 过表达可使 Gln 的糖异生作用减弱,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2 中 B、C)。

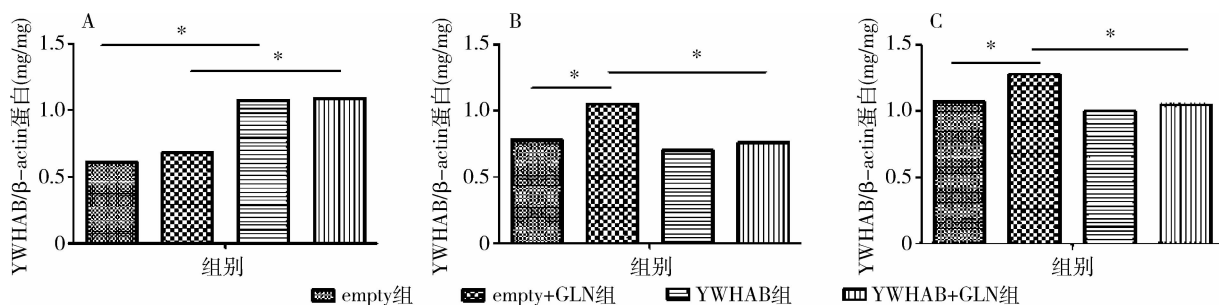


图 2 各组糖异生相关蛋白表达比较

A. YWHAB 表达;B. PEPCK 表达;C. G6pase 表达; * $P < 0.05$

3. 两组免疫共沉淀结果比较:免疫共沉淀的结果显示,GCGR、YWHAB 及 CHREBP 三者处于结合状态。但 GCGR 及 YWHAB 表达量在未加及加入 Gln 作用降低;但 CHREBP 表达量升高说明在未加或加入 Gln 情况下,三者之间两两结合量发生改变,且这种改变提示在 Gln 作用下 YWHAB 可能在原来的结合状态的基础上发生了转位,且这种转位可造成 CHREBP 和 GCGR 表达及磷酸化的改变(图 3)。

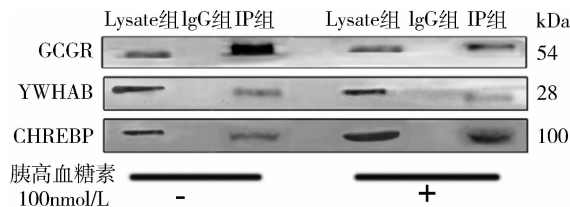


图 3 两组免疫共沉淀结果比较

讨 论

近年来在对糖尿病的发病机制的研究中发现,Gln 分泌过多也是重要原因之一。有研究发现在糖尿病患者中,Gln 分泌增加,同时其与 GCGR 的结合能力增强^[5]。Salehi 等^[6]研究发现,抑制 Gln 的分泌可以改善 ob/ob 小鼠的高血糖^[6]。但 Guzman - Perez 等^[7]的研究发现 GCGR 新型拮抗剂,化合物 17,与之前发现 GCGR 的拮抗剂相比,分子质量小,细胞毒性低,且在大鼠肝细胞中降低了由 Gln 引起的血糖升高。但是目前这些研究由于拮抗剂自身的效应及特异性的局限,没有真正应用于临床治疗中。研究发现辅助蛋白 YWHAB 与 G 蛋白偶联受体结合可以改变受体的定位、稳定性、构象、磷酸化状态等^[8-10]。

GCGR 作为 G 蛋白偶联受体的一种,经文献复习和前期免疫共沉淀实验均已证明其与体内表达量最多的辅助蛋白—YWHAB 结合的事实,通过测定葡萄糖产量及糖异生关键酶表达实验均证明过表达 YWHAB 的 HepG2 细胞的确可以起到抑制 Gln 的生糖作用及 GCGR 表达量的下降。为探讨 YWHAB 影响肝脏糖脂代谢的具体机制,笔者进一步查阅文献及再次免疫共沉淀实验发现 YWHAB 同样可以与糖脂代谢重要转录因子 CHREBP 结合,影响其磷酸化状态及核内定位^[11]。通过 GCGR、YWHAB 和 CHREBP 三者共沉淀结果我们看出随着 Gln 的加入,GCGR 表达量及与之结合的 YWHAB 减少,但通过 YWHAB 共沉淀的 CHREBP 增多,这提示笔者 Gln 可能是通过促进 GCGR 与 YWHAB 的解离而影响糖异生过程,除此之外随着 Gln 的加入,共沉淀的 CHREBP 增加同样提示,CHREBP 可能参与介导了影响糖异生关键酶的基因转录过程,而免疫印迹实验中 YWHAB 过表达组 GCGR 与对照组相比的明显下降是否与 Gln 作用下 GCGR 及 CHREBP 与 YWHAB 结合后磷酸化状态及核定位改变有关,包括免疫荧光在内的后续实验将继续基于此对相关机制进行研究及验证验证,力求深入发掘并系统阐述 YWHAB 影响 Gln 作用下糖异生作用的信号途径^[12]。

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 - R130

(下转第 47 页)

ADSCs 的 B 组比注射 PBS 的 C 组相比阴茎海绵体内压 (intracavernous pressure, ICP) 和阴茎组织中神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 明显升高, 说明 ADSCs 在损伤的阴茎海绵体神经中起积极的作用, 但其机制未有明确阐述。

Fandel 等^[14]在实验中发现阴茎海绵体神经受损害后分泌的 SDF-1 比假手术组明显升高, 并在损伤神经周围聚集了更多的 ADSCs。故本实验从促进更多 ADSCs 向损伤的阴茎海绵体神经迁移出发, 探索 IGF-1 预处理的 ADSCs 应用于大鼠勃起功能障碍的治疗, 为后续相关实验提供一个新思路。本实验仅在体外证实 IGF-1 促进 ADSCs 迁移, 并未证实在大鼠体内 IGF-1 能提高 ADSCs 的归巢效率, 下一步笔者将 DAPI 标记的 IGF-1 预处理的 ADSCs 通过静脉注射于大鼠体内, 并观察与对照组相比迁移的细胞数、ICP 和 nNOS 有无升高, 以及勃起次数有无改善。

综上所述, IGF-1 能够上调 ADSCs 表面表达的 CXCR4 蛋白, 从而促进 ADSCs 向 SDF-1 迁移, 并为下一步将 IGF-1 预处理的 ADSCs 通过静脉注射于大鼠体内治疗勃起功能障碍提供基础。

参考文献

- 1 An C, Cheng Y, Yuan Q, *et al.* IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose - derived mesenchymal stem cells into chondrocytes - like cells[J]. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38(4):1647 - 1654
- 2 Wu G, Zheng X, Jiang Z, *et al.* Induced differentiation of adipose - derived stromal cells into myoblasts[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2010, 30(3):285 - 290
- 3 Xiao J, Yang X, Jing W, *et al.* Adipogenic and osteogenic differentiation of Lin(-) CD271(+) Sca-1(+) adipose - derived stem cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 377(1-2):107 - 119
- 4 Li Q, Zhang A, Tao C, *et al.* The role of SDF-1 - CXCR4/CXCR7

- axis in biological behaviors of adipose tissue - derived mesenchymal stem cells in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(3):675 - 680
- 5 Wynn RF, Hart CA, Corradi - Perini C, *et al.* A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow[J]. *Blood*, 2004, 104(9):2643 - 2645
- 6 Toma C, Wagner WR, Bowry S, *et al.* Fate of culture - expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature; in vivo observations of cell kinetics[J]. *Circ Res*, 2009, 104(3):398 - 402
- 7 Huang YL, Qiu RF, Mai WY, *et al.* Effects of insulin - like growth factor - 1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(1):20 - 28
- 8 Xinari C, Morigi M, Benedetti V, *et al.* A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(3):423 - 436
- 9 Zhu M, Feng Y, Dangelmajer S, *et al.* Human cerebrospinal fluid regulates proliferation and migration of stem cells through insulin - like growth factor - 1[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(2):160 - 171
- 10 侯凯, 李梅, 杨逸昆, 等. SD 大鼠脂肪源间充质干细胞分离培养特性及影响因素[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(1):29 - 32
- 11 Stuermer EK, Lipenksy A, Thamm O, *et al.* The role of SDF-1 in homing of human adipose - derived stem cells[J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(1):82 - 89
- 12 Li Y, Yu X, Lin S, *et al.* Insulin - like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(3):780 - 784
- 13 Ying C, Hu W, Cheng B, *et al.* Erectile function restoration after repair of resected cavernous nerves by adipose - derived stem cells combined with autologous vein graft in rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(3):393 - 402
- 14 Fandel TM, Albersen M, Lin G, *et al.* Recruitment of intracavernously injected adipose - derived stem cells to the major pelvic ganglion improves erectile function in a rat model of cavernous nerve injury[J]. *Eur Urol*, 2012, 61(1):201 - 210

(收稿日期:2016-06-24)

(修回日期:2016-07-04)

(上接第 38 页)

- 2 Han J, Zhang M, Froese S, *et al.* The identification of novel protein - protein interactions in liver that affect glucagon receptor activity. *PLoS One*. 2015, 10(6):e0129226
- 3 王倩倩, 魏丽. 14-3-3 β 蛋白与常见疾病关系的研究进展[J]. *山东医药*, 2016, 56(16):104 - 106
- 4 曾媛媛, 魏丽. 酪氨酸 3-加单氧酶/色氨酸 5-加单氧酶激活蛋白的新研究进展[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(9):59 - 62
- 5 Cryer PE. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(3):1039 - 1048
- 6 Salehi A, Vieira E, Gylfe E. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations[J]. *Diabetes*, 2006, 55(8):2318 - 2323
- 7 Guzman - Perez A, Pfefferkorn JA, Lee EC, *et al.* The design and synthesis of a potent glucagon receptor antagonist with favorable physicochemical and pharmacokinetic properties as a candidate for the treat-

- ment of type 2 diabetes mellitus[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(10):3051 - 3058
- 8 Bridges D, Moorhead GB. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein[J]. *Sci STKE*, 2004, 2004(242):re10
- 9 Dougherty MK, Morrison DK. Unlocking the code of 14-3-3[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 10):1875 - 1884
- 10 Millar RP, Newton CL. The year in G protein - coupled receptor research[J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(1):261 - 274
- 11 Ge Q, Huang N, Wynn R M, *et al.* Structural characterization of a unique interface between carbohydrate response element - binding protein (ChREBP) and 14-3-3 β Protein[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50):41914 - 41921
- 12 Pierre - Damien D, Pascale B, Jean - Marc AL, *et al.* ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose - regulated genes in mouse liver[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(3):956 - 964

(收稿日期:2016-07-21)

(修回日期:2016-07-25)