

成纤维细胞生长因子(FGF)-21 改善胰岛素抵抗 肝细胞对葡萄糖的吸收和肝糖原的合成*

刘铭瑶 王文飞 于艺雪 侯玉婷 任桂萍 李德山**

(东北农业大学生命科学学院生物制药教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 在体外建立胰岛素抵抗肝细胞模型, 探讨在胰岛素抵抗状态下成纤维细胞生长因子(FGF)-21 对模型细胞糖代谢的影响及机制. 将 HepG2 细胞置于 10^{-7} mol/L 的胰岛素培养基中培养 24 h, 建立胰岛素抵抗细胞模型. 分别用不同浓度的胰岛素和 FGF-21 处理模型细胞, 采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶(GOD-POD)法检测细胞对葡萄糖的摄取情况, 并检查胰岛素与 FGF-21 的协同作用. 利用实时荧光定量 PCR 检测 FGF-21 对模型细胞葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)mRNA 表达的影响, 蒽酮法检测模型细胞糖原合成量, 探讨 FGF-21 对胰岛素抵抗细胞模型葡萄糖摄取的影响及机制. 结果发现, 用高浓度胰岛素处理 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞对胰岛素的敏感性显著降低, 说明成功建立了胰岛素抵抗细胞模型, 抵抗状态可维持 48 h, 未发现细胞形态学变化. FGF-21 能改善胰岛素抵抗模型细胞的葡萄糖摄取, 参与肝糖原的合成, 并与胰岛素产生协同作用. 实时荧光定量 PCR 结果发现, FGF-21 作用模型细胞后, 细胞的 GLUT1 mRNA 表达量显著增加, 说明 FGF-21 促进模型细胞摄取葡萄糖的作用机制与其增加 GLUT1 的表达有关.

关键词 胰岛素抵抗, 细胞模型, HepG2, FGF-21

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00238

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和利用的效率下降. 1995 年, Stern 提出胰岛素抵抗是高胰岛素血症, 高密度脂蛋白增加, 甘油三酯增加等代谢异常表现共同的危险因素, 即“共同土壤学说”, 随着研究的深入, 胰岛素抵抗已被证明是高血压、向心性肥胖、血脂异常、糖代谢紊乱同时并存和相互联系的基础. 因此, 改善胰岛素抵抗, 从源头上降低上述代谢疾病的危险因素一直是临床治疗的重点之一, 科研人员也一直在寻求可改善胰岛素抵抗的药物. 成纤维细胞生长因子(FGF)-21 是近期发现的体内又一个代谢调节因子^[1], 其不依赖于胰岛素、有效、安全地调节血糖能力深得研究人员青睐. 除此之外, 在动物实验上 FGF-21 可以有效改善胰岛素抵抗, 降低胰岛素浓度^[2-3]. HepG2 细胞来源于肝细胞, 其表型与肝细胞极为相似, 并保留了肝细胞的许多生物学特性, 应用十分广泛^[4]. 因此, 为了深入研究 FGF-21 改善胰岛素抵抗的作用机理, 本实验以人肝细胞 HepG2 为对象, 用超生理浓度的胰岛素刺激细胞建立具有 IR 特点的细胞模型^[5-7]. 探

讨在细胞形成胰岛素抵抗的情况下, FGF-21 能否改善胰岛素抵抗细胞模型的葡萄糖摄取和利用. 结果表明, 在细胞形成抵抗的情况下, FGF-21 可以通过促进 GLUT1 的表达来促使细胞摄取葡萄糖, 此外, FGF-21 还参与肝糖原的合成, 与胰岛素产生协同作用.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株. HepG2 细胞由本实验室提供.

1.1.2 主要试剂. 高糖 DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司; 新生牛血清(NCS)、优质胎牛血清(FBS)购自 Invitrogen 公司; 重组人胰岛素购自 Sigma 公司; 鼠源 FGF-21 由本实验室纯化获得; 葡萄糖检测试剂盒购自四川迈克科技有限责任公司.

* 黑龙江省科技厅重点攻关项目(2006G0461-00).

** 通讯联系人.

Tel: 0451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

收稿日期: 2009-04-15, 接受日期: 2009-06-29

司; RNA 酶抑制剂(RNasin, RNase inhibitor), 逆转录酶(M-MuLV), RNA 提取试剂 Trizol, 1 kb Plus DNA Ladder 购自 Invitrogen 公司; Oligo(dT)₁₅ 购自 Takara 公司. 其他化学试剂均为分析纯.

1.1.3 实时荧光定量 PCR 引物由 Invitrogen 公司合成.

1.2 细胞培养

从液氮中取出冻存的 HepG2 细胞, 复苏后转入 100 ml 培养瓶中, 用含 10% 灭活新生牛血清的 DMEM 培养液在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养. HepG2 肝癌细胞株为贴壁细胞, 当细胞形成细胞单层后, 倾去培养基, 用 PBS 缓冲液洗 1 次, 0.25% 胰蛋白酶按 1:3 比例传代, 细胞密度为 1×10^6 , 取对数生长期的细胞用于后续实验.

1.3 FGF-21 对细胞增殖的影响

0.25% 胰酶消化细胞后, 用低糖 DMEM 培养液配成单个细胞悬液, 按每孔细胞浓度为 5×10^4 个/ml 接种于 96 孔培养板, 每孔体积为 200 μ l, 每竖排 8 个孔为一组. 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件的培养箱中培养 1 天后, 去掉培养液, 换成新鲜的含 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} mol/L FGF-21 的培养液, 对照组给予不含 FGF-21 的培养液, 培养 24 h, 弃掉孔内培养上清液, 每孔加入 200 μ l MTT 培养液, 37℃ 孵箱继续培养 4 h, 弃掉孔内培养上清液, 每孔加入 200 μ l 二甲基亚砜, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 用酶标仪检测 A₅₇₀ 值, 细胞存活百分数(survial fraction)=实验组 A₅₇₀/对照组 A₅₇₀ × 100%. 实验至少重复 3 次, 取平均值, 统计学分析实验结果.

1.4 HepG2 细胞 IR 模型的建立

取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板中, 加入含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养. 待细胞贴壁后, 用不含小牛血清的 DMEM 培养液洗涤 2 次, 加入 200 μ l 新配制的含 10^{-7} mol/L 的人重组胰岛素于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 使细胞对胰岛素的生物学效应产生抵抗, 同时设置不加胰岛素的对照组.

1.5 胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型鉴定

用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法(GOD-POD)检测培养基中的葡萄糖含量, 根据细胞的葡萄糖摄取量来确定胰岛素抵抗细胞模型的形成. 将经过 10^{-7} mol/L 人重组胰岛素预先孵育 24 h 的细胞及未经胰岛素处理的正常组细胞加入不含小牛血清的

DMEM 培养液洗 2 次, 再分别加入含 1 000、100、10、1 nmol/L 人胰岛素或不含人胰岛素的培养基, 于 37℃、5% CO₂ 条件下继续孵育 24 h. 用 GOD-POD 法检测培养液中残留的葡萄糖含量, 以未接种细胞空白复孔的葡萄糖含量均值相减, 算出各孔细胞的葡萄糖消耗量. 用统计学分析实验结果.

1.6 葡萄糖消耗试验

1.6.1 FGF-21 对胰岛素抵抗肝细胞模型糖吸收作用的检测. 用无血清培养基稀释成熟 FGF-21 蛋白和胰岛素, 使其终浓度为 1 000、100、10、1、0.1 nmol/L. 取经 1×10^{-7} mol/L 胰岛素孵育 24 h 的胰岛素抵抗模型细胞, 试验分 2 组: I 组加入含上述 FGF-21 不同浓度梯度的培养基, II 组加入含上述胰岛素不同浓度梯度的培养基, 继续培养细胞 24 h, 取培养基中的上清液 2 μ l 于葡萄糖检测液中测定葡萄糖的含量, 以未接种细胞空白复孔的葡萄糖含量均值相减, 算出各孔细胞的葡萄糖消耗率. 每个浓度至少设 3 个独立的重复组, 用统计学分析实验结果.

1.6.2 FGF-21 与胰岛素联合作用对模型细胞糖吸收的影响. 取胰岛素抵抗模型细胞, 实验组分别加入 100 nmol/L 人重组胰岛素, 100 nmol/L FGF-21 和上述浓度的胰岛素和 FGF-21 的混悬液处理细胞 24 h. 对照组为未加任何处理的正常培养基培养的模型细胞. 用 GOD-POD 法检测不同处理组细胞对培养基中葡萄糖的消耗情况, 并做统计学分析.

1.7 FGF-21 对模型细胞葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1) mRNA 表达的影响

HepG2 模型细胞用无血清培养基培养 12 h 后, 分别用 100 nmol/L 胰岛素和 100 nmol/L FGF-21 培养细胞, 以未加任何处理的模型细胞为对照, 培养 6 h 后收获细胞, 用 Trizol 法提取细胞总 RNA. 以不同处理的细胞总 RNA 为模板, Oligo(dT)₁₅ 为引物合成 cDNA. 利用实时荧光定量 PCR 方法检测模型细胞内 GLUT1 mRNA 的表达变化. 选用在 HepG2 细胞中稳定表达的 GAPDH 作为内参. 按照 Thermal Cycler Dice™ Real Time PCR (TaKaRa Code: TP800) 的使用说明书要求进行实验操作, 同时扩增内参及 GLUT1 目的基因. GAPDH 内参上游引物为 5' GGAAGGTGAAGGTCGGA-GTC 3', 下游引物为 5' ACTCCACGACGTACT-CAGCG 3'. GLUT1 目的基因扩增上游引物^[8]为 5' CATCAATGCCCCCAGAA 3', 下游引物为 5' AAGCGGCCAGGATCAG 3'. 反应体系为

20 μ l: 2.0 μ l cDNA 模板, 10.0 μ l SYBR Premix Ex Taq™ (2 $\times$), 0.4 μ l PCR 正反引物(10 mol/L), 0.4 μ l ROX Reference Dye II (50 $\times$), 灭菌三蒸水补足 20 μ l (内参和目的片段同批扩增). 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环. 每次扩增均设由三蒸水代替模板的空白对照, 每个样品至少重复 3 次. 使用相对定量分析方法(2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)对目的基因进行相对定量.

1.8 细胞内糖原检测试验

取葡萄糖按 50、25、12.5、6.25、3.12 及 1.6 mg/L 配制葡萄糖标准液, 制作标准曲线. 1.6 mg/L 的葡萄糖量相当于 1.44 mg/L 的糖原^[9]. 细胞经饥饿处理后, 分别用 1 000 nmol/L 人重组胰岛素, 1 000 nmol/L FGF-21 及 1 000 nmol/L 的人重组胰岛素和 FGF-21 的混悬液处理细胞, 24 h 后用 PBS 重悬细胞, 控制细胞密度为 1×10^5 /ml. 取 0.5 ml 细胞悬液用 30% KOH 溶解, 100 $^{\circ}$ C 放置 10 min 后, 置于室温下 3 min, 加入 1.5 ml 无水乙醇, 4 000 g 离心 20 min. 弃去上清液, 将沉淀中加入蒸馏水使之体积为 0.5 ml. 随后添加 1 ml 浓度为 0.2% 的蒽酮试剂(0.2 g 蒽酮与 100 ml 98% H₂SO₄ 混合配制并混匀, 现用现配), 100 $^{\circ}$ C 煮沸 30 min. 620 nm 波长下检测其 A 值.

1.9 统计学方法

应用 Excel 710 进行统计学分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间计量资料比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析. 两变量间采用相关分析, $P < 0.05$ 为差异显著有统计学意义.

2 结 果

2.1 MTT 法检测 FGF-21 对 HepG2 细胞增殖的影响

分别用 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} mol/L 的 FGF-21 作用 HepG2 细胞 24 h, 以不含 FGF-21 的培养液为对照. 结果表明 FGF-21 对 HepG2 细胞增殖无影响(表 1).

Table 1 Effect of FGF-21 on HepG2 cell's mitogenicity by MTT assay

Groups	c(FGF-21)/(mol/L)	A	Survival rate
Control	0	0.71 $\pm$ 0.06	
1	1×10^{-6}	0.73 $\pm$ 0.05	102.82
2	1×10^{-7}	0.69 $\pm$ 0.01	97.18
3	1×10^{-8}	0.70 $\pm$ 0.05	98.59
4	1×10^{-9}	0.71 $\pm$ 0.07	100.14
5	1×10^{-10}	0.71 $\pm$ 0.05	99.86

2.2 高浓度胰岛素诱导 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗

高浓度胰岛素处理后的细胞与正常培养的对照细胞的葡萄糖摄取率都随着胰岛素浓度的升高而升高, 呈剂量依赖性关系, 但高浓度胰岛素处理后的细胞葡萄糖消耗率明显低于正常培养的细胞 ($P < 0.05$, 差异显著). 说明胰岛素处理后, HepG2 细胞表现出胰岛素抵抗(IR)(图 1), 在胰岛素浓度为 100 nmol/L 时, IR 组细胞葡萄糖消耗率与对照组细胞相比, 差异极显著, 在生理浓度下, 胰岛素已不能很好地发挥其促进靶细胞消耗葡萄糖的作用. 可见, 利用高浓度胰岛素处理 HepG2 细胞, 可使细胞对胰岛素的敏感性降低, 建立胰岛素抵抗肝细胞模型.

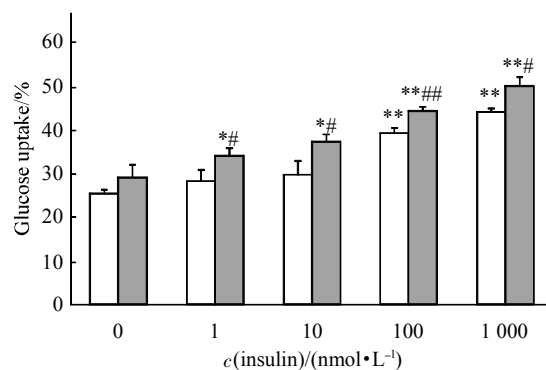


Fig. 1 Glucose uptake of insulin-resistant HepG2 cells after treatment with different concentrations of insulin

The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with no stimulation control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with IR HepG2 cells. □: IR HepG2; ■: HepG2.

2.3 FGF-21 改善 HepG2 胰岛素抵抗模型的葡萄糖摄取情况

分别用不同浓度的胰岛素和 FGF-21 处理 IR HepG2 模型细胞 24 h 后, 经微量化的 GOD-POD 法检测培养基中葡萄糖含量, 与无细胞的培养基中葡萄糖含量相减计算出细胞的葡萄糖消耗率, 进行统计学分析. 结果表明, 虽然胰岛素和 FGF-21 处理的细胞葡萄糖的消耗率均随剂量增加而升高, 但在胰岛素浓度为 0.1 nmol/L 和 1 nmol/L 时, 模型细胞的葡萄糖消耗率与未经处理的对照细胞葡萄糖消耗率无明显差异, 而用相同剂量 FGF-21 刺激的模型细胞与对照组相比, 葡萄糖的摄取利用显著增加, 统计学处理显示差异显著. 所有 FGF-21 处理组的葡萄糖消耗率均显著或极显著高于同等剂量胰

胰岛素处理组, 说明在胰岛素抵抗情况下, FGF-21 仍可以有效调节糖的代谢. 每组数据均以 3 个平行样的平均数和标准差表示(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 分别表示与未处理组相比差异显著和差异极显著, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 分别表示与胰岛素处理组相比差异显著和差异极显著)(图 2).

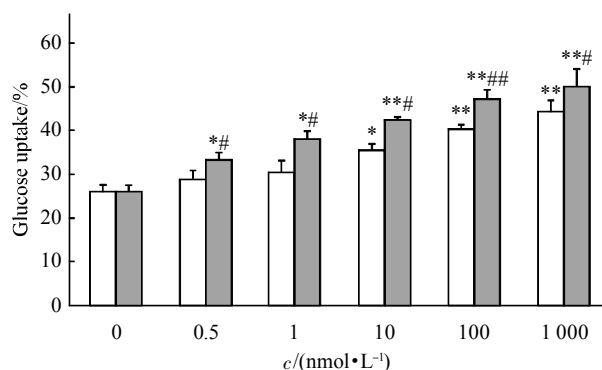


Fig. 2 Effects of FGF-21 on glucose uptake of IR HepG2 cells

The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with no stimulation control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with insulin stimulation cells. □: Insulin; ■: FGF-21.

2.4 FGF-21 与胰岛素的协同作用

在细胞处于胰岛素抵抗的情况下, 用含有 1 nmol/L 胰岛素和 1 nmol/L FGF-21 的混合培养基共同孵育 HepG2 模型细胞, 24 h 后取培养基检测细胞的葡萄糖摄取情况, 同时以 1 nmol/L 胰岛素和 1 nmol/L FGF-21 单独作用为模型细胞给药对照组, 以正常培养基培养的 HepG2 模型细胞为空白对照组. 结果见图 3, 胰岛素单独作用后的细胞葡

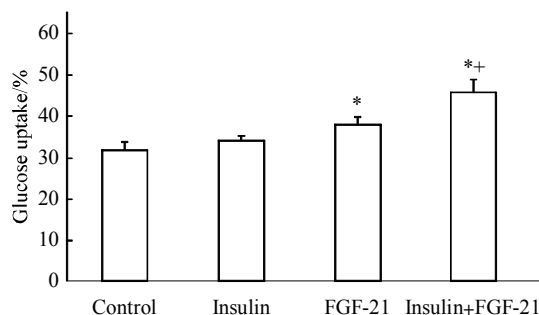


Fig. 3 The synergism of FGF-21 and insulin on glucose uptake of IR HepG2 cells

The insulin-resistant model cells were separately treated with 1 nmol/L insulin, 1 nmol/L FGF-21 alone, 1 nmol/L insulin and FGF-21 co-treatment. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, compared with no stimulation control, + $P < 0.05$, compared with insulin and FGF-21 treatment alone.

萄糖消耗率与空白对照组相比差异不显著, 说明细胞对胰岛素继续作用已不敏感, 而 1 nmol/L FGF-21 单独作用及胰岛素和 FGF-21 共同作用的模型细胞的葡萄糖消耗率显著高于正常培养的空白对照组, 并且, 胰岛素和 FGF-21 共同作用的模型细胞葡萄糖消耗率比 FGF-21 单独作用的模型细胞葡萄糖消耗率显著增加, 可见, 在细胞形成抵抗的情况下, 胰岛素和 FGF-21 对模型细胞葡萄糖摄取存在一定的协同作用.

2.5 FGF-21 促进 GLUT1 mRNA 表达

葡萄糖不能自由通过细胞膜进入细胞, 在哺乳动物细胞内外葡萄糖的跨膜转运主要是通过协助扩散来完成的, 而这种作用需要葡萄糖转运蛋白 (GLUTs) 的协助^[10]. 葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1) 是葡萄糖转运蛋白中最重要的载体, 是一种与代谢密切相关的膜蛋白, 在体外培养的细胞内具有高表达. 用 100 nmol/L 的 FGF-21 处理抵抗模型细胞 6 h 后, 收获细胞提取细胞总 RNA, 以反转录后的 cDNA 为模板, 用特异性引物进行 Real-time PCR 扩增检测细胞经 FGF-21 处理后 GLUT1 mRNA 的表达变化, 以胰岛素处理的细胞为对照, 结果见图 4. 经 FGF-21 处理的胰岛素抵抗 HepG2 模型细胞 GLUT1 mRNA 的表达量与未处理的细胞相比, 增加了 5 倍多, 而胰岛素处理的细胞 GLUT1 的表达有微量的增加, 但与未经处理的细胞相比差异不显著. 可见, 在细胞形成胰岛素抵抗的情况下, FGF-21 可以通过增加细胞 GLUT1 的表达, 从而促进细胞摄取葡萄糖.

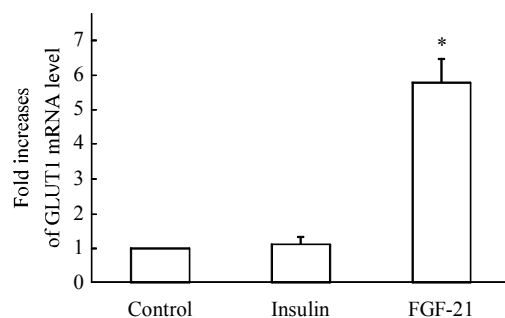


Fig. 4 FGF-21 enhances GLUT1 mRNA expression in insulin-resistance HepG2 cells

The insulin-resistant model cells were treated with either 100 nmol/L insulin or 100 nmol/L FGF-21 for 6 h. Total RNA were extracted by Trizol method. The expression of GLUT1 in these cells was measured by real-time PCR. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.01$ compared with no stimulation control.

2.6 FGF-21 对模型细胞糖原合成的影响

HepG2 细胞形成胰岛素抵抗后, 用含胰岛素, FGF-21 及同时含有胰岛素和 FGF-21 的混合培养基处理模型细胞 24 h 后, 收获细胞, 经蒽酮法检测细胞内的糖原含量(图 5)。结果表明, FGF-21 可促进肝细胞合成糖原, 与未经任何处理的模型对照组细胞相比差异显著, 并且胰岛素与 FGF-21 的协同作用组细胞糖原合成量显著高于单独作用组。

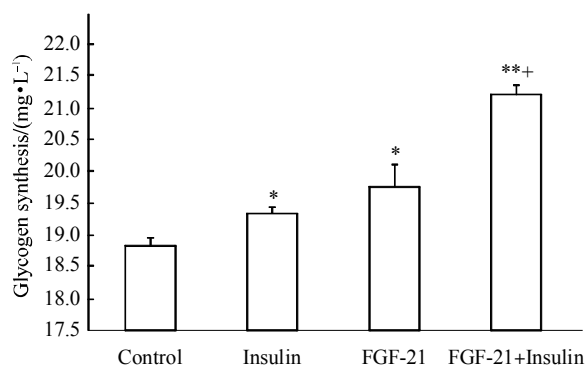


Fig. 5 The glycogen synthesis of IR HepG2 cells by FGF-21 stimulation

The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with no stimulation control, + $P < 0.05$ compared with insulin treatment alone or FGF-21 treatment alone.

3 讨 论

糖尿病是人类重要的代谢疾病, 是继心脑血管疾病和癌症之后人类第三大杀手^[1]。1999 年世界卫生组织(WHO)的调查结果表明, 全世界糖尿病患者已达 2 亿, 据估计, 到 2050 年全世界糖尿病患者将达到 3 亿, 其中发达国家发病率高于发展中国家。随着经济的日益发展, 我国的糖尿病患者数量也呈上升趋势, 据调查结果估计我国大约有 4 000 万糖尿病患者。而在糖尿病患者中, 2 型糖尿病患者占 90% 以上, 是糖尿病患者中的主要人群。2 型糖尿病是一种慢性进行性疾病, 其主要致病机制为胰腺 β 细胞的胰岛素分泌量下降和胰岛素作用下降, 即胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)。胰岛素抵抗不仅是 2 型糖尿病的重要发病机制之一^[12], 更贯穿着 2 型糖尿病的发生、发展全过程, 是导致糖尿病各种并发症的“动力”根源。因此, 开发可有效改善胰岛素抵抗或者可独立调节血糖的药物一直是研究人员的研究热点^[13]。

FGF-21 是最近发现的体内又一个能够独立调

节代谢水平的蛋白质因子^[14]。在已经完成的研究中发现, 在动物水平上, FGF-21 在体内具有高效并持续调节机体糖脂代谢, 提高胰岛细胞功能及其数量, 改善脂蛋白谱等功能, 并且能够有效地改善胰岛素抵抗^[14]。尽管已有文献报道了 FGF-21 的诸多生理功能, 但对其复杂作用机制的报道却很少。在糖尿病中后期, 胰岛素抵抗症状已经较为明显, FGF-21 在胰岛素抵抗状态下是否仍然可以有效调节血糖仍未有报道。因此, 本课题组对 FGF-21 作用机制的研究, 尤其是对其改善胰岛素抵抗的机制研究, 将为 FGF-21 成为治疗胰岛素抵抗的 2 型糖尿病新药提供必要的理论依据。

肝脏为机体内产生胰岛素抵抗的三大组织之一, 胰岛素从胰岛细胞分泌后, 经过门静脉, 约一半以上被肝脏摄取。由于人体试验的局限性不便于对胰岛素抵抗的发生机制及其环节进行深入研究, 且难以广泛开展。因此, 国内外大多数有关胰岛素抵抗机制的基础研究都是以细胞模型或动物模型为研究对象。HepG2 细胞源于人的肝胚胎瘤细胞, 保留了肝细胞的许多生物学特性^[15~17]。目前, 以高浓度胰岛素培养 HepG2 细胞所复制的体外胰岛素抵抗模型稳定、可靠, 已被多个实验室用来筛选或研究糖尿病新药^[5, 6]。高浓度胰岛素诱导的胰岛素抵抗其最直观的判定特征就是葡萄糖的摄取利用, 模型细胞葡萄糖摄取率与正常细胞相比明显降低, 说明模型的建立成功^[5]。葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法(GOD-POD 法)是一种临床应用的糖检测方法, 与同位素标记 H-DG 的摄取判定指标相比, 污染小、经济、方便, 而且检测后的细胞可用于作进一步的研究^[18]。因此, 本试验借鉴现已成熟的技术, 用高浓度胰岛素诱导 HepG2 细胞, 以 GOD-POD 法检测抵抗和非抵抗 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取能力, 判定其抗性细胞模型的形成。结果表明, 经高浓度胰岛素诱导的细胞葡萄糖摄取能力明显低于未诱导细胞, 证明 HepG2 胰岛素抵抗模型建立成功。在此基础上, 进行 FGF-21 参与的葡萄糖消耗试验, 并用蒽酮法检测处理后模型细胞的糖原合成情况, 探讨 FGF-21 在胰岛素抵抗状态下对 HepG2 细胞糖吸收能力的影响及其机制, 以期更进一步阐述 FGF-21 在人体上的药理作用。实验结果表明, 在胰岛素抵抗状态下 FGF-21 能有效促进 HepG2 细胞葡萄糖吸收, 且结果呈剂量依赖性。而且, FGF-21 与胰岛素产生明显的协同作用, 同时加入 FGF-21 和胰岛素的实验组, 细胞糖吸收效率明显

优于单独作用组。为了研究 FGF-21 促进模型细胞葡萄糖摄取的机制, 我们利用实时荧光定量 PCR 方法检测在 HepG2 细胞中具有高表达的 GLUT1 的 mRNA 表达水平, 结果显示 FGF-21 使模型内的 GLUT1 表达量显著增加。因此, 我们认为 FGF-21 促进胰岛素抵抗模型细胞摄取葡萄糖的作用与其增加 GLUT1 的表达有关。对细胞内糖原含量的检测证明, FGF-21 可以有效增加肝细胞糖原合成。由此我们可以推测, 在胰岛素抵抗状态下, FGF-21 可以独立或者协助胰岛素抑制肝糖产生及输出, 从而达到控制空腹血糖的作用。相信随着研究的展开, 更多地了解 FGF-21 与糖尿病的关系, 将为糖尿病的治疗开辟一条崭新的途径。

参 考 文 献

- 1 Kharitonov A, Shiyanova T L, Li D S, *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*, 2005, **115** (6): 1627~1635
- 2 Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, *et al.* The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*, 2007, **148** (2): 774~781
- 3 Coskun T, Bina H A, Schneider M A, *et al.* Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*, 2008, **149** (12): 6018~6027
- 4 郑兴锋, 蒋春雷. 肝糖代谢研究中的模型选择. *生物技术通讯*, 2006, **17**(6): 942~944
Zheng X F, Jiang C L. *Letters in Biotechnology*, 2006, **17**(6): 942~944
- 5 张汝学, 贾正平, 李茂星, 等. 体外胰岛素抵抗细胞模型的建立及在药物筛选中的应用. *中国药理学通报*, 2008, **24** (7): 971~976
Zhang R X, Jia Z P, Li M X, *et al.* *Chin Pharmac Bull*, 2008, **24**(7): 971~976
- 6 陈 秋, 夏永鹏, 邱宗荫. 吡格列酮对胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的药理学评价. *中国药理学通报*, 2006, **22** (2): 248~251
Chen Q, Xia Y P, Qiu Z Y. *Chin Pharmac Bull*, 2006, **22**(2): 248~251
- 7 陈 秋, 夏永鹏, 邱宗荫. 蛻皮甾酮对胰岛素抵抗细胞模型胰岛素敏感性和糖代谢的影响. *中国药理学通报*, 2006, **22** (4): 460~464
Chen Q, Xia Y P, Qiu Z Y. *Chin Pharmac Bull*, 2006, **22** (4): 460~464
- 8 Ge T F, Law P Y, Wong H Y, *et al.* Gatifloxacin affects GLUT1 gene expression and disturbs glucose homeostasis *in vitro*. *Eur J Pharmacol*, 2007, **573**(1~3): 70~74
- 9 Chun Y, Yin Z D. Glycogen assay for diagnosis of female genital *Chlamydia atrachomatis* infection. *J Clin Microbiol*, 1998, **36** (4): 1081~1082
- 10 Widdas W F. Old and new concepts of the membrane transport for glucose in cells. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **947**(3): 385~404
- 11 Wild S, Roglic G, Green A, *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 2004, **27**(5): 1047~1053
- 12 Girard J. Insulin resistance: role in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, 1994, **20**(3Pt2): 330~336
- 13 Moller D E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 2001, **414** (6865): 821~827
- 14 王文飞, 李笑堃, 李德山. 糖尿病治疗的新视点 - 成纤维生长因子 21. *中国药理学通报*, 2009, **25**(4): 433~435
Wang W F, Li X K, Li D S. *Chin Pharmac Bull*, 2009, **25**(4): 433~435
- 15 Ciaraldi T P, Goldberg M, Odom R, *et al.* *In vitro* effects of amylin on carbohydrate metabolism in liver cells. *Diabetes*, 1992, **41** (8): 975~981
- 16 Frittitta L, Sbraccia P, Costanzo B V, *et al.* High insulin levels do not influence PC-1 gene expression and protein content in human muscle tissue and hepatoma cells. *Diabetes Metab Res Rev*, 2000, **16**(1): 26~32
- 17 Kosaki A, Webster N J. Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem*, 1993, **268**(29): 21990~21996
- 18 杨桂枝, 高小平, 晏菊芳, 等. GOD-POD 法微量测定方法的建立及其在 3T3-L1 脂肪细胞和 HepG2 细胞糖摄取中的应用. *四川解剖学杂志*, 2003, **11**(1): 12~15
Yang G Z, Gao X P, Yan J F, *et al.* *SiChuan J Anatomy*, 2003, **11** (1): 12~15

FGF-21 Improves Glucose Uptake and Glycogen Synthesis of Insulin-resistant Liver Cells*

LIU Ming-Yao, WANG Wen-Fei, YU Yi-Xue, HOU Yu-Ting, REN Gui-Ping, LI De-Shan**

(Northeast Agricultural University, College of Life Science, Harbin 150030, China)

Abstract Insulin resistance in insulin sensitive organ results in metabolic disorder such as hyperglycemia, hyperinsulinemia and hyper triglyceridemia which are common features of type 2 diabetes. Insulin resistance in liver cells mainly causes impaired glycogen synthesis, failed to suppress glucose production which is the major contribution to hyperglycemia. FGF-21 as a new metabolic regulator can control fasting blood glucose. The mechanism of FGF-21 effects on regulating plasma glucose has little to known. In order to establish an *in vitro* insulin resistant model of liver cells and evaluate the effects and mechanism of FGF-21 on glucose metabolism in the cell model, HepG2 cells were incubated with 10^{-7} mol/L insulin for 24 h to build insulin-resistant cell model. To evaluate the cells for insulin resistance, the cells were stimulated with fresh insulin for 24 h and the glucose uptake by these cells was carried out. The insulin-resistant cells were treated with different concentrations of FGF-21 for 24 h and insulin-treated cells were used as a control. The glucose uptake by the cells was detected by the method of glucose oxidizes/peroxides (GOD-POD); the synergy between insulin and FGF-21 was evaluated. The mRNA expression of GLUT1 in the insulin-resistant cells was detected by the real-time PCR. Glycogen synthesis of the cells was examined by the anthrone method. The results showed that HepG2 cells treated with 10^{-7} mol/L insulin for 24 h became resistant to insulin and the insulin resistance status was maintained for 48 h without change of cell morphology. FGF-21 could stimulate glucose consumption of the insulin-resistant model in a dose-dependent manner. The glucose consumption and glycogen synthesis of the insulin-resistant model were significantly improved by FGF-21 treatment. FGF-21 showed strong synergy with insulin in glucose uptake and glycogen synthesis of the model cells. While the cells became resistant to insulin, FGF-21 could increase the mRNA expression of GLUT1. Thus, It is concluded that FGF-21 stimulates glucose uptake in insulin resistant HepG2 cells through GLUT1 expression, stimulates glycogen synthesis and improves the glucose metabolism in the insulin resistant liver cell model.

Key words insulin resistance, cell model, HepG2 cell line, FGF-21

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00238

*This work was supported by a grant from Science and Technology Planning Program of Heilongjiang Province (2006G0461-00).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

Received: April 15, 2009 Accepted: June 29, 2009