

# 地塞米松对 HepG2 细胞分泌载脂蛋白的影响

刘 皓 吴兆丰 刘秉文\*

(华西医科大学基础医学院载脂蛋白研究室, 成都 610041)

**摘要** 以培养的人肝癌细胞系 HepG2 为研究对象, 采用“冻干浓缩培养液载脂蛋白测定法”, 考察了地塞米松对 HepG2 细胞载脂蛋白 (apolipoprotein, apo) A I、A II、C III、B100 及 E 分泌的影响。结果表明: 地塞米松对 HepG2 细胞 apoA I 和 apoE 的分泌有促进作用, 对 apoA II、apoB100 和 apoC III 的分泌有抑制作用, 且这种作用随地塞米松浓度的增加而增强。当培养液中地塞米松的浓度为  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/L 时, apoA I 和 apoE 的分泌分别增加 36.6% 和 49.4% ( $P < 0.01$ ), apoA II、apoB100 和 apoC III 的分泌分别减少 38.9%、31.9% 和 29.8% ( $P < 0.01$ )。

**关键词** 细胞系 HepG2, 地塞米松, 载脂蛋白

**学科分类号** Q513

肝脏脂质和脂蛋白的合成和分泌受众多因素的精密调节, 如激素、营养、代谢物等。现知大多数激素均可影响脂蛋白代谢, 激素作用于脂蛋白代谢的多个环节, 可涉及脂蛋白的合成和降解; 脂蛋白分子的组装和分泌; 脂蛋白分子的转化等, 但总的效果表现为血浆的不同脂蛋白组分水平的升降<sup>[1]</sup>。糖皮质激素对脂蛋白代谢的作用亦很复杂。研究表明, 服用糖皮质激素可增加血浆 HDL 的浓度<sup>[2]</sup>。也有报道表明, 长期服用糖皮质激素和内源性糖皮质激素过量均会导致血浆低密度脂蛋白 (LDL) 和极低密度脂蛋白 (VLDL) 浓度的增加<sup>[3-5]</sup>。有资料显示, 糖皮质激素可通过促进基因转录来调节肝脏蛋白质的合成, 糖皮质激素引起脂蛋白代谢改变的一个可能机制是影响肝脏载脂蛋白的合成和分泌。我们就地塞米松对人肝癌细胞系 HepG2 载脂蛋白 A I、A II、B100、C III 及 E 分泌的影响进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝癌细胞系 HepG2, 由华西医科大学免疫教研室章崇杰教授馈赠; RPMI-1640 培养基 (Gibco); L-谷氨酰胺 (EMK 进口分装); 新生小牛血清 (成都华西生化制品厂); 青霉素 G 钠、硫酸链霉素 (华北制药厂); 胰蛋白酶 (1:250, Difco 进口分装); 地塞米松 (dexamethasone, Sigma 公司); 载脂蛋白测定试剂盒 (apoA I、apoA II、apoB100、apoC III、apoE), 由华西医科大学载脂蛋白研究室研制; 其他试剂均为国产分

析纯。

### 1.2 人肝癌细胞系 HepG2 的培养

复苏的 HepG2 细胞种入 100 ml 培养瓶中, 其中加入约 5 ml 完全培养基 (90% RPMI1640、10% 新生小牛血清、4 mmol/L 谷氨酰胺、100 mg/L 硫酸链霉素、100 U/ml 青霉素 G 钠), 水平静置于二氧化碳孵箱内, 在 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空气, (37 ± 1) °C 条件下静置培养。2~3 d 更换一次新鲜培养液, 6~7 d 按 1:3 传代一次。

### 1.3 HepG2 细胞培养液的收集和冻干

取约 80% 单层铺满的细胞, 用 pH 7.4 的 PBS 液洗涤三次。随机分组 (每组各含 6 瓶细胞), 按组别加入不同的实验培养基 (均不含小牛血清) 5 ml。依实验要求 (见结果部分) 分别培养一定的时间后, 按编号收集细胞培养液离心, 准确吸取 1.5 ml 上清液三份, 冻干。

### 1.4 冻干浓缩培养液中载脂蛋白的测定

准确加入样品稀释液 75 μl, 使冻干的样品重新溶解。经此操作, 样品被浓缩 20 倍。用本室研制的载脂蛋白测定试剂盒<sup>[6]</sup>测定样品中 apoA I、A II、C III、B100 及 E 的含量。

### 1.5 细胞总蛋白的测定

培养瓶内贴壁的 HepG2 细胞, 用 pH 7.4 的 PBS 液洗涤三次。然后加入 0.1 mol/L 的 NaOH 6.0 ml 混匀, 室温放置 2 h。按改良 Lowry 法测定细胞总蛋白质浓度<sup>[7]</sup>。

\* 通讯联系人。

Tel: 028-5501289, E-mail: mailbox@wucms.edu.cn

收稿日期: 1999-12-23, 接受日期: 2000-02-29

## 2 结 果

### 2.1 加入不同浓度地塞米松的影响

HepG2 细胞在含不同浓度地塞米松的培养基中培养 48 h, 测定冻干培养液中载脂蛋白含量 (表 1). 由表 1 可见, 地塞米松对 HepG2 细胞 apoA I 和 apoE 的分泌有促进作用, 对 apoA II、apoB100

和 apoC III 的分泌有抑制作用, 其作用随地塞米松浓度的增加而增强. 在  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度下, 较对照组 apoA I 和 apoE 的分泌分别增加 36.6% 和 49.4% ( $P < 0.01$ ), apoA II、apoB100 和 apoC III 的分泌分别减少 38.9%、31.9% 和 29.8% ( $P < 0.01$ ).

Table 1 Effect of dexamethasone on secretion of apolipoproteinA I、A II、B100、C III and E by cultured HepG2 cell

Group	μg/g				
	apoA I	apoA II	apoB100	apoC III	apoE
Control	985 ± 71	154 ± 17	2130 ± 114	161 ± 9	259 ± 23
$5.5 \times 10^{-8}$ mol/L	997 ± 70	141 ± 6	1806 ± 88 <sup>2)</sup>	163 ± 5	267 ± 26
$5.5 \times 10^{-7}$ mol/L	1015 ± 36	131 ± 7 <sup>1)</sup>	1616 ± 86 <sup>2)</sup>	156 ± 6	302 ± 14 <sup>1)</sup>
$5.5 \times 10^{-6}$ mol/L	1106 ± 41 <sup>2)</sup>	113 ± 8 <sup>2)</sup>	1589 ± 70 <sup>2)</sup>	138 ± 12 <sup>2)</sup>	374 ± 9 <sup>2)</sup>
$5.5 \times 10^{-5}$ mol/L	1346 ± 74 <sup>2)</sup>	94 ± 6 <sup>2)</sup>	1450 ± 90 <sup>2)</sup>	113 ± 10 <sup>2)</sup>	387 ± 13 <sup>2)</sup>

Compared with control group, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ .  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ .

### 2.2 与地塞米松保温不同时间的影响

HepG2 细胞在含  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/L 地塞米松的培养基中分别培养 5 h、12 h、24 h 和 48 h, 然后观察这一浓度的地塞米松在不同的时间段对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响 (表 2). 由表 2 可见, 对照组和实验组中, HepG2 细胞各载脂蛋白的分泌量均随培养时间的延长而增加. 与对照组相比, HepG2 细胞在分别培养 5、16、24 和 48 h

后, 实验组中 apoA I 和 apoE 的分泌逐渐增加, apoA II、apoB100 和 apoC III 的分泌逐渐减少. 保温 48 h 后, apoA I 及 apoE 的分泌分别增加 44.5% 和 29.9% ( $P < 0.01$ ), 而 apoA II、apoB100 和 apoC III 的分泌分别减少 34.5%、21.5% 和 27.4% ( $P < 0.01$ ). 显然这一结果与 2.1 部分中所得的结果一致.

Table 2 Time course of effect of dexamethasone on secretion of apolipoproteinA I、A II、B100、C III and E by cultured HepG2 cell

Group	μg/g									
	apoA I		apoA II		apoC III		apoB100		apoE	
	Experiment	Control	Experiment	Control	Experiment	Control	Experiment	Control	Experiment	Control
0 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 h	481 ± 14	479 ± 18	82 ± 2	82 ± 4	0	0	819 ± 24 <sup>2)</sup>	942 ± 20	81 ± 13	74 ± 3
16 h	815 ± 42	807 ± 33	110 ± 3	114 ± 3	68 ± 4 <sup>2)</sup>	90 ± 3	1062 ± 23 <sup>2)</sup>	1204 ± 19	143 ± 7	143 ± 5
24 h	1066 ± 57 <sup>2)</sup>	841 ± 21	131 ± 12	137 ± 6	90 ± 4 <sup>2)</sup>	109 ± 10	1207 ± 52 <sup>2)</sup>	1406 ± 41	171 ± 7 <sup>1)</sup>	161 ± 3
48 h	1659 ± 85 <sup>2)</sup>	1148 ± 40	148 ± 7 <sup>2)</sup>	226 ± 15	122 ± 11 <sup>2)</sup>	168 ± 22	1692 ± 48 <sup>2)</sup>	2156 ± 75	354 ± 29 <sup>2)</sup>	274 ± 11

Compared with control group, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ .  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ .

## 3 讨 论

肝脏在脂质和脂蛋白代谢中起十分重要的作用, 但在生理条件下获得人肝脏细胞非常困难, 且

正常人肝脏细胞个体差异大, 难于稳定地传代培养, 因而不利于长期研究肝脏脂质和脂蛋白代谢. 而人肝癌细胞系 HepG2 不仅可以连续地传代培养, 且保持有正常肝细胞的许多特异功能, 包括载脂蛋

白的合成、脂蛋白的分泌及分解代谢等<sup>[8]</sup>。因而近年来 HepG2 细胞系作为人肝细胞模型，被广泛用于研究人肝脏脂质和脂蛋白代谢。本研究亦以 HepG2 细胞为研究对象，观察了地塞米松对其载脂蛋白分泌的影响。

Varma 等<sup>[9]</sup>于 1992 年报道，在 HepG2 培养基中加入  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/L 地塞米松，培养基中 apoA I 的浓度增加 54%。本研究发现，培养的人肝癌细胞系 HepG2 在同一浓度地塞米松的作用下，apoA I 的分泌增加 36.6%。大量临床研究表明，服用糖皮质激素可增加血浆 HDL 的浓度，短期服用去氢可的松也可增加血浆 HDL 及 apoA I 的浓度<sup>[2-4,9]</sup>。Masumoto 等<sup>[10]</sup>于 1988 年报道，浓度在  $10^{-6}$  mol/L 以上的地塞米松均可刺激培养的大鼠肝脏细胞 apoA I 的分泌，本研究亦获得类似的结果。显然，上述的研究均表明，糖皮质激素可促进 apoA I 的表达和分泌，但其机制尚未阐明。Varma 等<sup>[9]</sup>的研究表明，地塞米松通过增加 HepG2 细胞内 apoA I mRNA 的丰度来促进 apoA I 的表达，从而使 apoA I 分泌增加。也有人认为，糖皮质激素在 apoA I 前体-RNA 的加工过程和 mRNA 的稳定中发挥作用。糖皮质激素还有可能在 apoA I 基因翻译后发挥作用，但细胞内 apoA I 的转运时间极短<sup>[11]</sup>。因此，地塞米松引起细胞内 apoA I mRNA 丰度增加很可能是基因转录增加的结果。

Varma 等<sup>[9]</sup>于 1992 年报道，在 HepG2 细胞培养基中加入  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/L 的地塞米松，可使培养基中的 apoB100 的浓度降低 43%，但细胞内 apoB100 mRNA 的丰度未发生改变。本研究发现，同样浓度的地塞米松可使 HepG2 细胞 apoB100 的分泌减少 31.9% ( $P < 0.01$ )，与 Varma 等<sup>[9]</sup>的研究结果相近。地塞米松引起培养基中 apoB 浓度的降低，一方面，可能是地塞米松促进细胞内 apoB 的降解；另一方面，地塞米松可能促进 HepG2 细胞对 apoB 的摄取。活体研究表明，糖皮质激素可促进肝脏 VLDL 分泌，长期服用糖皮质激素和内分泌性糖皮质激素过量均会导致血浆 VLDL 和 LDL 的浓度增加<sup>[5]</sup>。在原代培养的大鼠肝脏细胞中，地塞米松也能促进 VLDL 的分泌<sup>[12]</sup>。显然，这与从 HepG2 细胞中所得的结果不符。造成这种差异的原因尚不清楚。

本研究还发现地塞米松对 HepG2 细胞 apoA II 和 apoC III 的分泌有抑制作用，在  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度下，分别减少 39% 和 29.8% ( $P < 0.01$ )；而

对 apoE 的分泌则有促进作用，在上述浓度下，其分泌增加 49.4% ( $P < 0.01$ )。地塞米松对 HepG2 细胞分泌 apoA II、apoC III 及 apoE 的影响迄今尚未见报道。

王洪敏等<sup>[13]</sup>于最近报道了胰岛素对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响，作者也观察了胰高血糖素、dbcAMP 和视黄酸对 HepG2 细胞载脂蛋白分泌的影响（见待发表资料），它们的作用并不相同。显然，HepG2 细胞载脂蛋白的分泌受多种激素的调节，其作用机制和生理意义值得进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 王克勤. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 328~ 349  
Wang K Q. Lipoprotein and Atherosclerosis. Beijing: People Health Press, 1995. 328~ 349
- 2 Taskinen M R, Kuusi T, Yki-Jarvinen H, *et al.* Short-term effects of prednisone on serum lipids and high density lipoprotein subfractions in normal-lipidemic healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, **67** (2): 291~ 299
- 3 Taskinen M R, Nikkila E A, Pelkonen R, *et al.* Plasma lipoproteins, lipolytic enzymes, and very low density lipoprotein triglyceride turnover in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983, **57** (3): 619~ 626
- 4 Ettinger W H, Hazzard W R. Elevated apolipoprotein-B levels in corticosteroid-treated patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, **67** (3): 425~ 428
- 5 Ettinger W H, Dysko R C, Clarkson T B. Prednisone increase low density lipoprotein in cynomolgus monkeys fed saturated fat and cholesterol. *Artherosclerosis*, 1989, **9** (6): 848~ 855
- 6 刘秉文. 血浆脂蛋白的免疫测定及临床应用. 见: 王克勤主编. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 350~ 362  
Liu B W. Immuno-measurements of serum apolipoproteins and application. In: Wang K Q ed. Lipoprotein and Atherosclerosis, Beijing: People Health Press, 1995. 350~ 362
- 7 Markwell M A K, Hass S M, Bieber L L, *et al.* A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*, 1978, **87** (1): 206~ 210
- 8 Zannis V I, Breslow J L, Sangiacomo T R, *et al.* Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochemistry*, 1981, **20** (24): 7089~ 7095
- 9 Varma V K, Smith T K, Sorci-Thomas M, *et al.* Dexamethasone increases apolipoprotein A I concentration in medium and apolipoprotein A I mRNA abundance from HepG2 cells. *Metabolism*, 1992, **41** (10): 1075~ 1080
- 10 Masumoto A, Koga S, Uchida E, *et al.* Effects of insulin, dexamethasone and glucagon on the production of apolipoprotein A-I in cultured rat hepatocytes. *Atherosclerosis*, 1988, **70** (3): 217~ 223
- 11 Dixon J L, Battini R, Ferrari D P, *et al.* Expression and secretion of chicken apolipoprotein A I in transfected COS cells. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **1009** (1): 47~ 53
- 12 Salter A M, Fisher S C, Brindley D N. Binding of low-density lipoprotein to monolayers of rat hepatocytes is increased by insulin and decreased by dexamethasone. *Fed Eur Biochem Soc Lett*,

1987, 220 (1): 159~ 162

13 王洪敏, 刘秉文. 胰岛素对培养的人肝癌细胞 HepG2 分泌载脂蛋白 A I、A II、B100、C III 及 E 的影响. 华西医科大学报,

1999, 30 (3): 233~ 235

Wang H M, Liu B W. J West China Uni Med Sci, 1999, 30 (3): 233~ 235

## Effects of Dexamethasone on Secretion of Apolipoproteins A I , A II , B100, C III and E by Cultured HepG2 Cells

LIU Hao, WU Zhao-Feng, LIU Bing-Wen\*

(Apolipoprotein Research Unit, West China University of Medical Science, Chengdu 610044, China)

**Abstract** In order to observe the effect of dexamethasone on the secretion of apolipoproteins A I , A II , C III, B100 and E by cultured HepG2 cells. The apolipoproteins contents in culture media were measured by radioimmunoassay (RID) kits developed by authors' research unit. 20-fold lyophilized condensed culture media were used for the assays. The results showed that dexamethasone can increase the secretion of apoC and E, and inhibit the secretion of apoA II, B100 and C III; and the effect of dexamethasone were strengthened in a dose-dependent manner. When the concentration of dexamethasone was  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/L in the culture media, the secretion of apolipoprotein A I and E increased 36.6% and 49.4% ( $P < 0.01$ ) respectively, while the secretion of apo A II, B100 and C III decreased 38.9%、31.9% and 29.8% ( $P < 0.01$ ) respectively.

**Key words** HepG2 cells, dexamethasone, apolipoproteins

\* Corresponding author. Tel: 86-28-5501289, E-mail: mailbox@wcums.edu.cn

Received: December 25, 1999 Accepted: February 29, 2000