

• 基础研究 •

地塞米松对人肝癌细胞系 FOXO1、PEPCK 和 PGC-1 α 表达的影响

朱晓军 孙琦 曾静波 潘清荣 李玉秀 王炬

【摘要】 目的 研究地塞米松对 FOXO1 表达的影响以及 FOXO1 表达和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)及过氧化物酶体增生激活受体 γ 协同刺激因子 1 α (PGC-1 α)表达之间的关系。方法 采用 RT-PCR 技术和 Western blot 技术观察地塞米松刺激人肝癌细胞系(HepG₂)后转录因子 FOXO1、PCK1 和 PGC-1 α 的 mRNA 水平及蛋白水平的改变。结果 500 nmol/L 地塞米松刺激 HepG₂ 细胞 30 min 后,FOXO1 mRNA 水平明显升高,约在 1 h 达到最大值,刺激 4 h 后,FoxO1 蛋白水平也升高。地塞米松刺激的 HepG₂ 细胞 FOXO1、PCK1 和 PGC-1 α mRNA 表达均在 1h 达到峰值,未发现三者时间上的先后顺序。结论 地塞米松能促进 HepG₂ 细胞中 FOXO1、PEPCK 和 PGC-1 α mRNA 的同时表达。

【关键词】 地塞米松;肝肿瘤;细胞系,肿瘤

Dexamethasone on expression of FOXO1、PEPCK and PGC-1 α in hepatic cells (HepG₂)

ZHU Xiaojun, SUN Qi, ZENG Jingbo, et al

Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of dexamethasone on the expression of FOXO1 in hepatic cells (HepG₂ cells) and relationship with expression of PCK1 and PGC-1 α . Methods FOXO1, PEPCK(PCK1) and PGC-1 α mRNA levels and protein levels in HepG₂ cells cultured with dexamethasone were observed using RT-PCR technology and Western blot technology. Results Dexamethasone significantly increased the mRNA levels of FOXO1 in HepG₂ cells, which reached the maximum by 1h. Dexamethasone increased the protein level of FOXO1 paralleling with the mRNA levels. The time of reaching peaks of FOXO1, PCK1 and PGC-1 α mRNA expression stimulated by dexamethasone was identical at 1h, which meant that there was no sequence relationship among them. Conclusion Dexamethasone promotes the expression of FOXO1 in HepG₂ cells. The changes in FOXO1 gene expression do not precede the changes in PCK1 and PGC-1 α gene expression.

【Key words】 dexamethasone; liver neoplasms; cell line, tumor

2 型糖尿病是影响人类健康的主要慢性代谢性疾病之一,其主要临床表现为空腹及餐后血糖升高,但在临床上有一部分 2 型糖尿病患者餐后血糖稍高或正常的情况下,空腹血糖明显升高。研究发现肝糖异生增加而导致肝糖输出增加是 2 型糖尿病空腹血糖升高的重要原因,但目前对于引起肝糖异生增加的机制尚不清楚,深入了解肝糖异生增加的机制将有助于进一步了解 2 型糖尿病特别是以空腹血糖升高为主的 2 型糖尿病发生发展的病理生理机制。

肝糖异生的调控,最主要是通过调节磷酸烯

醇丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)的表达来实现。胰高血糖素和糖皮质激素促进 PEPCK 的表达,而胰岛素抑制 PEPCK 的表达。胰高血糖素和胰岛素作用于肝细胞后,PEPCK 的转录和表达在很短时间就出现,表明胰高血糖素和胰岛素的这种调控并不依赖于转录因子的蛋白合成,称之为快调节;更进一步研究表明胰岛素的调控不仅于此,存在依赖于转录蛋白合成的调控,称之为慢调节^[1]。

FoxO1 蛋白是一种转录因子,在没有胰岛素的

收稿日期:2007-03-06

作者单位:100730 北京,中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院 内分泌科

作者简介:朱晓军,男,1981 年 6 月生,浙江义乌人,医学博士,住院医师(现单位:310006 杭州,浙江大学附属妇产科医院)

通讯作者:李玉秀, E-mail:liyuxiu@medmail. com. cn

情况下, FoxO1 位于细胞核内, 作为一种转录因子, 可以激活糖异生的一些关键酶, 目前的研究表明, FoxO1 可能在肝脏葡萄糖异生中起重要作用, 通过转基因技术增加 FoxO1 的表达能够增加 PEPCK 的表达^[2]。糖皮质激素为重要的升糖激素, 其升高血糖主要是通过促进肝脏葡萄糖异生。因此本研究观察人肝癌细胞(HepG₂ 细胞)在糖皮质激素地塞米松刺激下 FOXO1 mRNA 和蛋白表达水平与糖异生的关键酶 PEPCK 及另一转录因子过氧化物酶体增生激活受体 γ 协同刺激因子 1 α (peroxisome proliferator- γ activated receptor-coactivator-1 α , PGC-1 α)表达的关系, 来探讨 FOXO1 在肝脏糖异生发生机制(慢调节)中的作用。

1 材料与方法

1.1 HepG₂ 细胞的培养和传代 HepG₂ 细胞由北京协和医院内科实验室赠送, 在 1640 培养液中培养, 当生长细胞铺展面积达培养瓶底面积的 90% 时进行传代培养。分别以 10⁵, 10⁴, 10³/ml 3 个浓度, 200 μ l/孔将 HepG₂ 细胞接种于 96 孔板。HepG₂ 细胞在 96 孔培养板分别生长 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11d 时用 MTT 法检测细胞的生长状态。生长状态良好的细胞培养约 48h 后, 细胞长到 60%~70%, 将细胞分为对照组和实验组, 换无血清培养基, 加地塞米松 500 nmol/L^[3] 刺激细胞, 刺激前和刺激后 0.5、0.75、1、2、3、4、5h 收集细胞备检。

1.2 FOXO1、PGC-1 α 和 PCK mRNA 检测 将收集的细胞裂解提取 RNA, 采用 SYBR 染料法的 RT-PCR 技术测定 FOXO1、PGC-1 α 和 PCK mRNA 的相对量的表达, β -actin 为内对照。

FOXO1: N-末端 5'-TTTCTCGAGATGGCCGAG-GCGCCTCAGGTG-3'

C-末端 5'-TTTCTGTCA CAGATCTAC GAGTGGATGGT-3'

PCK1: N-末端 5'-GTACAAAAAACAGCAGGCT CCA

C-末端 5'-GCCAGATGTTGGACCAGCTTTC

PGC-1 α : N-末端 5'-GCCACTCGAAGGAAGTTCA GAT-3'

C-末端 5'-GGGTTAAGGCTGTTATCAA TCAAT CGC-3'

β -actin: N-末端 5'-TCATGAAGTGTGACGTGGA-CATC-3'

C-末端 5'-CAGGAGGAGCAATGATCT TGATCT-3'

1.3 FoxO1 蛋白表达的检测 将刺激前和刺激后 4h 收集的细胞加入细胞裂解液, 采用蛋白免疫印迹法分析地塞米松刺激后 FoxO1 蛋白表达水平的变化, β -actin 为内对照。采用免疫印迹法用扫描仪将 X 光胶片上的图像扫描至电脑中, 用 ScionImage 分析各个条带的灰度值。

1.4 数据分析 RT-PCR 结果采用 Applied Biosystem 公司的 7500 system SDS software 进行分析, 得到基因表达的相对定量结果。

1.5 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, 统计软件 SPSS13.0。

2 结果

2.1 地塞米松刺激 HepG₂ 细胞后 FOXO1、PGC-1 α 和 PCK1 mRNA 水平变化 FOXO1 和 PGC-1 α 是调节 PEPCK 转录的重要转录因子, 而 PEPCK 是糖异生途径的重要限速酶。为了解地塞米松在刺激细胞进行糖异生时 FOXO1 和 PGC-1 α , 以及 PCK1 的变化, 笔者用 RT-PCR 技术观察不同刺激时间点 FOXO1、PGC-1 α 和 PCK1 mRNA 水平的变化(表 1、2、3)。FOXO1、PGC-1 α 和 PCK1 的 mRNA 水平在地塞米松刺激后均升高, 在 1h 左右达到最大值, 后逐渐下降, FOXO1 mRNA 在 5h 时仍明显高于对照组, 而 PGC-1 α 及 PCK1 mRNA 已与对照组无显著差异。

2.2 地塞米松刺激 HepG₂ 细胞 4h 后 FoxO1 蛋白水平的变化 见图 1。地塞米松刺激后, FoxO1 蛋白水平高于对照[(3.36 $\pm$ 0.35) vs (0.95 $\pm$ 0.28), $P < 0.05$]。

表 1 地塞米松刺激 HepG₂ 细胞的 FOXO1 mRNA 表达水平

组别	FOXO1 mRNA 相对表达量					
	0.5h	0.75h	1h	2h	4h	5h
对照组	1.134 $\pm$ 0.156	1.918 $\pm$ 0.640	1.062 $\pm$ 0.179	1.145 $\pm$ 0.941	1.263 $\pm$ 0.134	0.950 $\pm$ 0.170
地塞米松组	8.479 $\pm$ 0.397 [#]	9.850 $\pm$ 1.825 [*]	16.906 $\pm$ 1.620 [#]	12.410 $\pm$ 1.412 [#]	7.753 $\pm$ 0.702 [*]	4.843 $\pm$ 0.295 [#]

注: 每个时间点为每次 3 孔, 重复 3 次的平均值, 对照为 β -actin/FOXO1 拷贝数相对比值。与对照组相比, ^{*} $P < 0.05$, [#] $P < 0.001$

表 2 地塞米松刺激 HepG₂ 细胞的 PGC-1 α mRNA 表达水平

组别	PGC-1 α mRNA 相对表达量					
	0.5h	0.75h	1h	2h	4h	5h
对照组	1.473 $\pm$ 0.115	1.474 $\pm$ 0.393	1.555 $\pm$ 0.703	1.566 $\pm$ 0.842	1.499 $\pm$ 0.471	1.102 $\pm$ 0.484
地塞米松组	2.468 $\pm$ 0.422*	2.879 $\pm$ 0.289#	3.644 $\pm$ 0.224*	1.964 $\pm$ 0.248*	1.274 $\pm$ 0.077*	0.983 $\pm$ 0.184

注:每个时间点为每次 3 孔,重复 3 次的平均值,对照为 β -actin/PGC-1 α 拷贝数相对比值。与对照组相比,* P < 0.05,# P < 0.001

表 3 地塞米松刺激 HepG₂ 细胞的 PCK1 mRNA 表达水平

组别	PCK1 mRNA 相对表达量					
	0.5h	0.75h	1h	2h	4h	5h
对照组	1.822 $\pm$ 0.138	1.342 $\pm$ 0.152	1.904 $\pm$ 0.221	0.988 $\pm$ 0.142	1.002 $\pm$ 0.095	1.269 $\pm$ 0.306
地塞米松片	2.637 $\pm$ 0.265*	3.224 $\pm$ 0.287*	4.782 $\pm$ 0.690*	2.782 $\pm$ 0.089*	1.771 $\pm$ 0.18*	0.678 $\pm$ 0.185

注:每个时间点为每次 3 孔,重复 3 次的平均值,对照为 β -actin/PCK1 拷贝数相对比值。与对照组相比,* P < 0.05,# P < 0.001

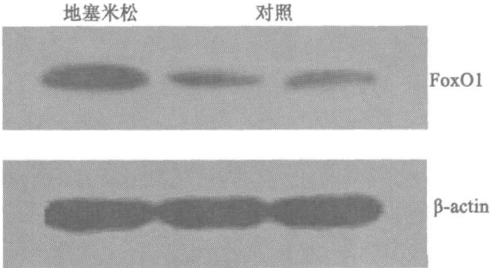


图 1 地塞米松刺激 HepG₂ 细胞 4h 后的 FoxO1 蛋白表达变化

3 讨论

多种激素对血糖水平有着重要的调节作用,其中糖皮质激素的升糖作用虽慢但持久,是体内主要的升糖激素。地塞米松是一种半衰期较长的糖皮质激素,其升糖机制主要是通过肝糖异生,因此是体外培养诱导糖异生的常用制剂^[3]。本实验采用地塞米松刺激 HepG₂ 细胞来诱导糖异生。经地塞米松诱导后,葡萄糖异生关键酶 PEPCK 的表达增多,说明本实验成功地应用地塞米松诱导了肝糖异生的发生。

FoxO 蛋白是 Fox 转录因子家族中的一个亚族,这一亚族特色是能够被胰岛素/PI3K/Akt^[4] 信号通路所调节,在代谢、细胞增殖和氧化应激中起重要作用^[5]。在基础状态下,FoxO 位于细胞核内,作为一种转录因子与辅激活因子例如 PGC-1 α ^[6] 结合,激活其靶基因包括葡萄糖异生的关键酶及蛋白胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin growth factor binding proteins),葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase,G6Pase)和 PEPCK 等。一旦胰岛素激活 PI3K/Akt 通路,可以诱导 FoxO 蛋白特异丝氨酸 24 和苏氨酸 256 和 329 磷酸化,磷酸化的 FoxO 蛋白不能与反应元件结合,从胞核中释放出来进入胞浆,从而使之调控的基因转录停止。人类中有 4 个 FOXO 同源基因,FOXO1 是其中一员,余

为 FOXO2,FOXO3a 和 FOXO4。近年来的一些研究表明,FoxO1 蛋白表达增加可能是糖尿病的一个发病机制,体外细胞培养的研究显示重组腺病毒编码转染肝细胞过度表达 FoxO1 可以使基础 G6p 水平增加,肝细胞糖输出增加;FOXO1 基因敲除(FOXO1+/-)的胰岛素抵抗小鼠,肝脏葡萄糖生成基因的表达式减少,糖尿病表型减少。对 KKAY 胰岛素抵抗小鼠的研究结果发现 FoxO1 表达在胰岛素抵抗动物 KKAY 小鼠肝脏、肌肉显著高于对照 C57BL 小鼠,FoxO3a 蛋白肝脏中表达在 KKAY 糖尿病小鼠和对照小鼠没有显著差别,而肌肉中表达在 KKAY 糖尿病小鼠显著高于对照小鼠^[7]。这些实验结果显示,FoxO 表达增多可能在糖尿病的发生机制中具有重要的作用。

2 型糖尿病患者空腹血糖升高主要源于基础状态下糖异生升高所致,因此肝脏基础状态下 FoxO 表达增多可能是引发糖异生增多从而至空腹血糖升高的重要原因,但是有关 FoxO 表达与肝糖异生的研究甚少,需要进一步的实验来证实。而 PGC-1 α 是细胞中的重要辅激活因子,能与多种转录因子相互作用,在糖异生方面,能与 FoxO1、肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor)、CREB 及糖皮质激素受体等相互作用,形成复合体,调节 PEPCK 的转录,促进糖异生^[6,8,9]。本实验应用地塞米松诱导肝细胞糖异生后来观察 FOXO1 及 PGC-1 α 、PEPCK 的表达情况。肝细胞经地塞米松持续刺激后,取多个时间点测定糖异生关键酶 PEPCK 及转录因子 FOXO1 的 mRNA 水平,结果表明在地塞米松持续刺激下,肝细胞 FOXO1 mRNA 的表达显著增加。与 FOXO1 mRNA 表达增加同步的是糖异生关键酶 PEPCK mRNA、PGC-1 α mRNA 表达的增加,三

(下转第 313 页)

后肺组织内 hnRNP-H₂ 的表达明显升高,可能导致 Bcl-xS/Bcl-xL 的比例升高;FAH 的表达明显下降,可能导致急性肺栓塞后肺组织细胞周期阻滞于 G₂/M期,二者共同促进了肺组织细胞的凋亡。

参考文献

- [1] 李圣青,赵峰,戚好文,等.肺组织灌注前后的双向电泳比较.西安交通大学学报(医学版),2006,27:203-206.
- [2] Alkan SA, Martincic K, Milcarek C. The hnRNPs F and H2 bind to similar sequences to influence gene expression. Biochem J, 2006, 393(Pt 1):361-371.
- [3] Endo F, Sun MS. Tyrosinaemia type I and apoptosis of hepatocytes and renal tubular cells. J Inherit Metab Dis, 2002, 25:227-234.
- [4] Clozel JP, Holvoet P, Tschopp T. Experimental pulmonary embolus in the rat: a new *in vivo* model to test thrombolytic drugs. J Cardiovasc Pharmacol, 1988,

12: 520-525.

- [5] Garneau D, Revil T, Fiset JF, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. J Biol Chem, 2005, 280:22641-22650.
- [6] Rohrbach S, Muller-Werdan U, Werdan K, et al. Apoptosis-modulating interaction of the neuregulin/erbB pathway with anthracyclines in regulating Bcl-x_S and Bcl-x_L in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38:485-493.
- [7] Luijckx MC, Van Beurden EA, Malingre HE, et al. Renal proximal tubular cells acquire resistance to cell death stimuli in mice with hereditary tyrosinemia type 1. Kidney Int, 2004, 66: 990-1000.
- [8] Vogel A, Van Den Berg IE, Al-Dhalimy M, et al. Chronic liver disease in murine hereditary tyrosinemia type 1 induces resistance to cell death. Hepatology, 2004, 39:433-443.

(上接第 307 页)

者均于地塞米松刺激后约 1h 达到最高峰。在 FOXO1 mRNA 水平表达增高的同时,肝细胞 FoxO1 蛋白水平亦显著升高。在肝脏中固有活化 FOXO1 的表达能够增加胰岛素抵抗^[10],而糖皮质激素能够增加 FOXO1 的表达,故糖皮质激素可通过升高 FOXO1 的表达水平来拮抗胰岛素作用。且因为 PEPCK mRNA、PGC-1 α mRNA 表达的增加并不迟滞于 FOXO1 mRNA 水平表达增高,可以推测 PEPCK mRNA、PGC-1 α mRNA 表达增高并不是继发于 FOXO1 mRNA 的蛋白合成后。Pere 等^[8]证实 FOXO1 能与 PGC-1 α 相互作用促进糖异生,故作者推测地塞米松促进 FOXO1 表达的升高在糖异生的慢调节机制中占有重要地位,FOXO1 转录的增高在诱发 PEPCK 的转录增高有重要意义。本研究结果有助于对 2 型糖尿病患者空腹血糖升高机制的认识。本实验所采取的时间点分布较宽,PEPCK 的表达是否存在多个表达峰尚需进一步研究,并深入探讨转录因子表达和 PEPCK 表达之间的关系。

参考文献

- [1] Donkin SS, Bertics SJ, Armentano LE. Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glycogenesis by insulin and glucagon in neonatal calf hepatocytes. J Anim Sci, 1997, 75:3082-3087.
- [2] Zhang WW, Sandip P, Balwant C, et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver. J Biol

Chem, 2006, 281: 10105-10117.

- [3] Yuan L, Ziegler R, Hamann A. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by metformin in cultured hepatocytes. Chin Med J, 2002, 115:1843-1848.
- [4] Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, et al. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. Nature, 1999, 398: 630-634.
- [5] Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. Trends Endocrinol Metab, 2005, 16:183-189.
- [6] Yoon JC, Puigserver P, Chen G, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 α . Nature, 2001, 413:131-138.
- [7] 李玉秀,王姮,曾静波,等.转录因子 FoxO1、FoxO3a 在 KKAy 胰岛素抵抗糖尿病小鼠肌肉和肝组织中的表达.基础医学与临床,2006,26:860-862.
- [8] Pere P, James R, Bruce MS. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. Nature, 2003, 423:550-555.
- [9] Herzig S, Long F, Jhala US, et al. CREB regulates gluconeogenesis through transcriptional coactivator PGC-1 α . Nature, 2001, 413:179-183.
- [10] Nakae J, Biggs WH 3rd, Kitamura T, et al. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor FoxO1. Nat Genet, 2002, 32: 245-253.