

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

※

※ 以體外模式探討鼠肝 α -生育醇轉移蛋白合成之調節因子 ※

※

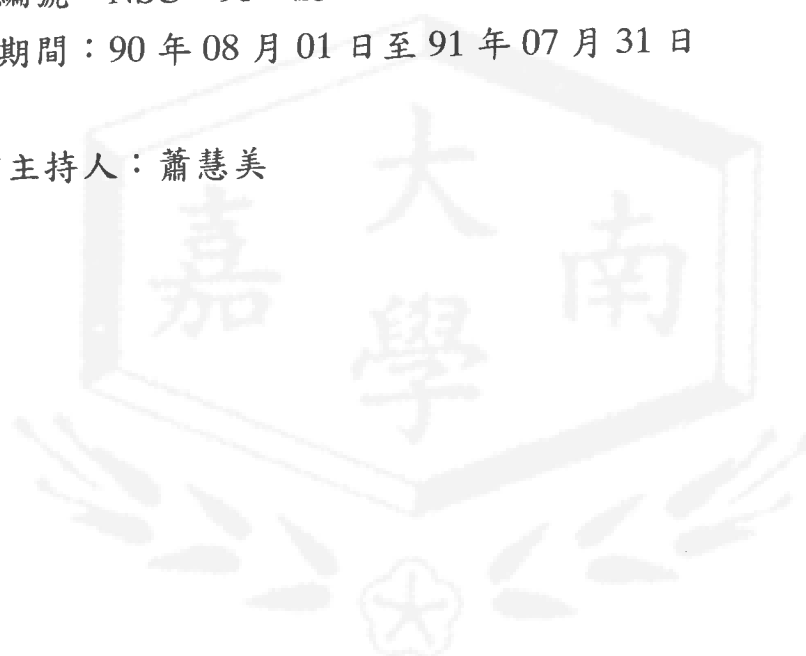
※※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2320-B-041-010

執行期間：90年08月01日至91年07月31日

計畫主持人：蕭慧美



執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

中華民國九十一年十月二十三日

以體外模式探討鼠肝 α -生育醇轉移蛋白合成之調節因子

The Study of α -Tocopherol Transfer Protein Synthesis in Primary Culture of Rat Hepatocyte

計畫編號：NSC 90 - 2320 - B - 041 - 010

執行期限：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：蕭慧美 助理教授 私立嘉南藥理科技大學

一、中文摘要

蛋白質營養不良會顯著影響鼠肝 α -生育醇轉移蛋白的含量及其 mRNA 表現。本實驗利用初代肝細胞之培養來探討肝中 α -生育醇轉移蛋白的含量及其 mRNA 表現受荷爾蒙、維生素 E 與氨基酸等因子影響之情形。鼠肝 α -生育醇轉移蛋白的含量隨著培養基中合成糖皮質固醇(Dexamethasone)濃度的增加而隨之增加，尤其是培養 18 與 24 小時。100 μ M 維生素 E 的添加會誘導肝中 α -生育醇轉移蛋白的含量。但是肝細胞 α -生育醇轉移蛋白含量並未受培養基中 IGF-1 或過氧化氫之添加而有明顯的改變。高量的甲硫胺酸與麩胺酸對於肝細胞 α -生育醇轉移蛋白的含量亦無顯著影響。總之，糖皮質固醇與維生素 E 二者可使肝細胞 α -生育醇轉移蛋白的含量增加。

關鍵詞： α -生育醇轉移蛋白、初代肝細胞、合成糖皮質固醇、維生素 E、胺基酸

Abstract

Liver α -tocopherol transfer protein and its mRNA are reduced in rats fed low protein diet. To investigate the regulation factor of

α -tocopherol transfer protein, the primary culture of rat hepatocyte were incubated in the present of various concentrations of vitamin E, hormone or amino acid containing medium. The protein levels of α -tocopherol transfer protein increased when the concentration of Dexamethasone increased in medium, especially at 18h and 24h incubation period. The α -tocopherol acetate in medium significantly induced the protein content of α -tocopherol transfer protein in hepatocyte. Nevertheless, the medium containing IGF-1 or hydrogen peroxide showed no obvious effects on the content of hepatocyte α -tocopherol transfer protein. High concentration of methionine or glutamate in medium also showed no effects on α -tocopherol transfer protein. In conclusion, the α -tocopherol transfer protein in hepatocyte was regulated by Dexamethasone and vitamin E.

Keywords: α -Tocopherol transfer protein, Primary culture of hepatocyte, Vitamin E, Dexamethasone, Amino acid

二、緣由與目的

蛋白質營養不良會造成動物生長遲滯等現象，可能與生長激素 (GH)[1]、Insulin-like growth factor (IGF-1)[2]分泌不足所致，此外內臟與血清蛋白質的合成量亦大幅受到影響[3,4]；有的會受到能量與蛋白質不足所影響，有的則單受蛋白質攝取不足所影響。諸多蛋白質的合成調控機制有可能是受限於氨基酸來源，也有可能透過荷爾蒙所控制，其調控層次包括 mRNA 表現量的改變以及蛋白質合成量或轉錄因子合成量或結合性等問題。由於本人在研究蛋白質營養不足對維生素 E 代謝之議題中發現，肝臟 α -生育醇轉移蛋白 (α -tocopherol transfer protein, α -TTP) 之蛋白質量與 mRNA 表現皆明顯受蛋白質不足而下降 [5]，其調控情形已非侷限於蛋白質轉譯的層次，而其在基因表現的控制機制則有待探討；由於在蛋白質不足下，動物體的內分泌有大幅改變，甚至有的是呈現分泌增加的現象，例如 GH，Glucocorticoid 和 Corticotropin-releasing factor (GRF) 等，他們使身體改變代謝以適應低蛋白的環境，其參與了各組織中蛋白質之分解與合成，其中亦可能包括肝中 α -TTP 等蛋白質的合成。因此本實驗採用具 α -TTP 活性的鼠肝細胞來進行培養，藉以觀察上述荷爾蒙以及氨基酸與維生素 E 等營養物質是否扮演了調控 α -TTP 表現的重要角色，以進一步闡明在蛋白質營養不良狀態下，身體可能會藉由荷爾蒙來傳達抑制 α -TTP 合成與表現的訊息。

三、結果與討論

本研究採用鼠齡六週至七週的 Wistar 大白鼠，以膠原蛋白酶灌流方法 [6] 取得初代肝細胞與各種物質培養後以 Western blot 觀察 α -TTP 的蛋白質表現情形。

無論是否添加合成糖皮質固醇 (Dex) 進行培養，肝臟 α -TTP 的含量皆以培養 3 小時和 24 小時兩時間點為多，其餘時間點的含量皆比 0 小時的含量還少，一如圖 1A 所示；培養期間的細胞總蛋白質含量則隨著培養時間增加而漸下降 (結果未列出)。因此之後的實驗皆以 24 小時作為最主要的細胞收集時間點。

從圖 1B 可以發現，不管在培養 18 小時或 24 小時後，肝臟 α -TTP 的含量皆隨著培養基中 Dex 濃度之增加而增加，其中又以 24 小時最為顯著。此點結果與前人研究報告相似 [7]。由於 Dex 會抑制細胞分化 [8]，而 Kim 等人 [7] 使用會刺激細胞分化的上皮細胞生長因子 (EGF) 來進行培養時發現肝臟 α -TTP 的含量減少了，因此認為 α -TTP 的含量與細胞分化與否有密切關係。

蛋白質營養不良時會使老鼠肝中 α -TTP 的含量減少 [5]，此外血漿的 IGF-1 濃度亦有下降現象 [1]。給予高濃度 IGF-1 和肝細胞培養 24 後，結果如圖二所示，肝中 α -TTP 的含量並沒有受到影響，表示 IGF-1 之濃度不會直接誘導 α -TTP 的含量；由此得以釐清蛋白質營養不足時造成 α -TTP 含量之下降可能與 IGF-1 之下降沒有直接的關係。

使用含有 100 μ M 的生育醇酯 (α -tocopherol acetate) 培養基，不管和肝細胞培養了 24 或 48 小時，皆可觀察到 α -TTP 含量有增加情形 (見圖三)，而 50 μ M 的生育醇酯添加量的誘導情形較不明顯。

Fechner 等人[9] 餵予維生素E耗損鼠含有 α -或 δ -維生素E之飼料，24小時後發現鼠肝 α -TTP mRNA 含量皆上升；本人曾餵予大鼠高量維生素E飼料長達6週，發現肝中 α -TTP蛋白質與mRNA含量卻不受影響[5]。可見 α -TTP受飼料或培養基中維生素E濃度所誘導的情形可能是屬於短期(例24小時)的刺激作用，在長期作用下便可能失去誘導功能，至於其間的機制與控制因素為何則待進一步探討。

肝細胞與過氧化氫(H_2O_2)培養24小時的結果如圖四。從細胞的總蛋白濃度來看(0M H_2O_2 , 4.11 mg/mL, 250 μ M H_2O_2 , 4.62 mg/mL, 25 μ M H_2O_2 , 4.29mg/mL)，本實驗採用的 H_2O_2 濃度並未對肝細胞造成直接的毒性，結果顯示肝中 α -TTP的含量在添加 H_2O_2 之後有略為下降之趨勢，但並不十分明顯。由於本實驗未測定細胞中的抗氧化酵素活性或其他氧化指標，因此無法得知該濃度的 H_2O_2 是否足以改變細胞的氧化壓力，以及其影響 α -TTP表現的真正原因。氧化壓力對於 α -TTP的影響，在本實驗中的結果並不明確，因此宜增加 H_2O_2 濃度或是採用他種增加氧化壓力的方式並配合細胞中抗氧化酵素或其他指標之測定才能有較完整的觀察與推測。

額外添加過量的甲硫胺酸和麩胺酸至培養基中，對於肝臟 α -TTP的含量未見有顯著的影響(見圖五)。表示過多的胺基酸並未能刺激 α -TTP的合成，或是說上述兩種胺基酸不具有刺激 α -TTP合成的作用。

四、計畫成果自評

本研究有兩個重點在此提出來討論：

1. 維生素E之添加會誘導肝細胞 α -TTP的含量，一如預期成果。由

於本人在以前的動物實驗發現長期餵飼高量維生素E並未使肝中 α -TTP含量增加。兩者結果之不同，表示維生素E對 α -TTP的調控有著時間長短之不同，此外應還牽涉其他因子如誘導層次、維生素E濃度之極限或其他分子值得進一步探討。

2. 蛋白質營養不良的動物，常伴隨有血漿葡萄糖皮質固醇濃度上升、IGF-1濃度下降之現象。因此推測肝中 α -TTP含量亦因飼料蛋白質含量不足而下降，可能與上述荷爾蒙有相關。然而在本實驗中卻觀察到 α -TTP並不受IGF-1之添加而有影響，反之， α -TTP隨著Dex之添加而含量增加；由此可見在蛋白質不足時造成肝中 α -TTP之下降並非與體內此兩種荷爾蒙濃度之改變有直接之關聯性。

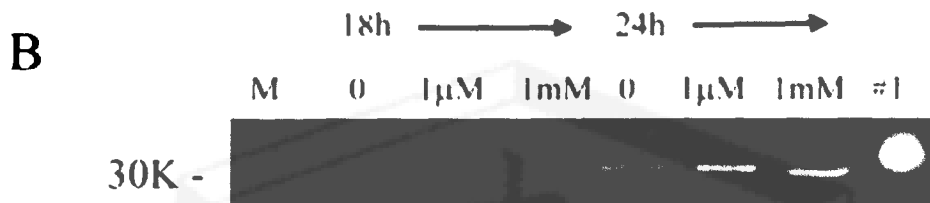
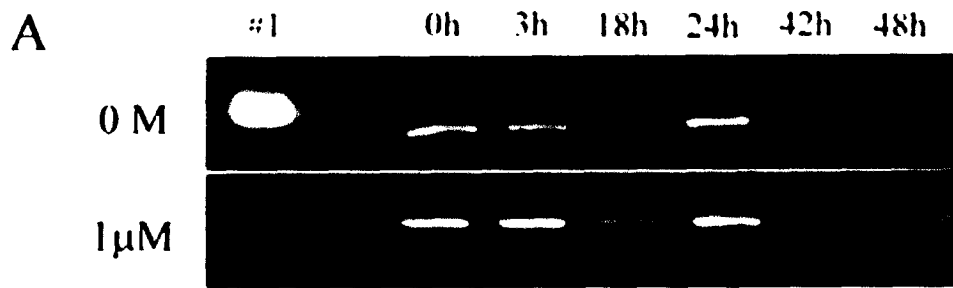
五、參考文獻

- [1] Harel, Z. and Tannenbaum, G. S. (1995) Long-term alterations in growth hormone and insulin secretion after temporary dietary protein restriction in early life in the rat. *Pediatric Res.* 38: 747-753.
- [2] Straus, D. S. (1994) Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *FASEB J.* 8: 6-12.
- [3] Lunn, P.G. and Austin, S. (1983) Dietary manipulation of plasma albumin concentration. *J. Nutr.* 113: 1791-1802.
- [4] Spiekerman, A. M. (1993) Proteins used in nutritional assessment. *Clin. Lab. Med.* 13: 353-369.
- [5] Shaw, H. M. and Huang, C. J. (1998) Liver α

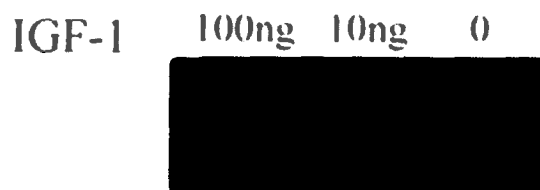
-tocopherol transfer protein and its mRNA are differentially altered by dietary vitamin E deficiency and protein insufficiency in rats. *J. Nutr.* 128: 2348-2354.

- [6] Berry, M. N. & Friend, D. S. (1973) High yield production of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Biol. Chem.* 59: 722-734.
- [7] Kim, H. S., Arai, H., Arita, M., Sato, Y., Ogihara, T., Tamai, H., Inoue, K., Mino, M. (1996) Age-related changes of α -tocopherol transfer protein expression in rat liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 42: 11-18.
- [8] Bjorneboe, A., Bjorneboe, G-E. A., Hagen, B. F., Nossen, J. O., Drevon, C. A. (1987) Secretion of α -tocopherol from cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 922: 199-205.
- [9]. Fechner, H., Schlame, M., Guthmann, F., Stevens, P. A., Rustow, B. (1998) α - and δ - tocopherol induce expression of hepatic α -tocopherol transfer protein mRNA. *Biochem. J.* 331: 577-581.

六、附圖 (見下頁)



圖一 鼠肝細胞中 α -生育醇轉移蛋白於不同 Dex 濃度與培養時間的含量。圖 A，Dex 添加與否(0M, 1 μ M) 以及各種培養時間點的影響。圖 B 為肝細胞與不同濃度的 Dex (0, 1 μ M, 1mM)培養 18 小時與 24 小時對 α -生育醇轉移蛋白含量之影響。 $\#1$ 表示製作 α -生育醇轉移蛋白抗體所使用的蛋白質，M 表示蛋白質分子量標準品。



圖二 鼠肝細胞與含有不同 IGF-1 濃度的培養基培養 24 小時後 α -生育醇轉移蛋白的含量。