مهار ترشح تری اسیل گلیسرول وابسته به فراکسیون VLDL توسط اگونیست های آلفا- و بتا- ادرنوسپور در هپاتوسیت تهیه شده از کبد رت (Rat)

مهدی رسولی (Ph.D.) * مهین زهرایی (Ph.D.) **

چکیده

سابقه و هدف : در حالت گرسنگی کبد منشا اصلی سنتز و ترشح لیپوپروتئین ها با دانسیته بسیار کم (VLDL) می باشد. بدین منظور تری اسیل گلیسرول، فسفولیپیدها، کلسترول و استرهای آن بایستی به اپو – B تازه سنتز شده اضافه و به صورت VLDL تازه سنتز شده ترشح شوند.متابولیسم VLDL تحت کنترل هورمونی و متابولیک بوده تحریک هر دو مسیر وابسته به کلسیم و مسیر cAMP سبب مهار ترشح VLDL از کبد می گردد. در این تحقیق اثرات تحریک آلفا- و بتا- ادرنرژیک بر روی ترشح تری اسیل گلیسرول در هپاتوسیت رت (Rat) بررسی شده است.

مواد و روش ها : هپاتوسیت از کبد رت توسط تکنیک دو مرحله ای با استفاده از شلاتور کلسیم و کلاژناز تهیه گردید. لیپیدها بر اساس متد استخراج و جرم تری اسیل گلیسرول توسط متد تریندر (GPO-PAP) سنجش گردید. هپاتوسیت ها در محلول کربس- رینگر به مدت سه ساعت در حضور عوامل دارویی مختلف انکوبه گردید.

نتایج : اپی نفرین طی سه ساعت انکوباسیون ترشح تری اسیل گلیسرول را ۳۵ درصد مهار کرد و محتوی سلولی آن را ۱۸ درصد افزایش داد. اثر مهاری اپی نفرین بر ترشح تری اسیل گلیسرول در حضور فنتول آمین و پرازوسین حذف شد ولی در حضور پروپرانولول باقی ماند. تری فلوپرازین به صورت وابسته به غلظت اثر مهاری اپی نفرین را لغو نمود در حالی که تئوبرومین اثر قابل توجهی نداشت. ترشح تری اسیل گلیسرول نه تنها توسط آلفا- اگونیست (فنیل افرین) بلکه توسط بتا- اگونیست (ایزوپروتونول) مهار گشت. دی بوتیریل سیکلیک- ادنوزین منو فسفات ترشح تری اسیل گلیسرول را حدود ۳۰ درصد مهار نمود. اپی نفرین در حضور پروپرانولول محتوی سلولی تری اسیل گلیسرول را افزوده، مجموع محتوی تری اسیل گلیسرول سیستم (مجموعه سلول و محیط انکوباسیون) در حضور و عدم حضور اپی نفرین تقریباً ثابت ماند.

استنتاج: نتایج نشان می دهند که اپی نفرین ترشح تری اسیل گلیسرول را ازطریق آلفا-ادرنورسپتور مهار می نماید، با این وجود تحریک ادرنرژیک توسط آلفا- و بتا- اگونیست اثر مشابهی را اعمال می نماید. پروتئین کیناز وابسته به کلسیم- کالمودولین ممکن است در تنظیم کاهشی ترشح VLDL شرکت نماید. اثر غیر متداول ایزوپروترنول در رابطه با دو فرضیه «ورود کلسیم وابسته به ذخایر» بحث شده است. اثر مهاری اپی نفرین احتمالاً از طریق مهار مسیر ترشحی اعمال می گردد.

واژه های کلیدی : ادرنوسپتور ، اپی نفرین ، ایزوپروترونول ، تری اسیل گلیسیرول ، VLDL ، Rat

* استادیار بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران ✉ ساری - بلوار خزر- دانشکده پزشکی

** استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران ، مدیر بورد بیوشیمی بالینی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

مقدمه

بررسی های انجام شده در سالهای اخیر نشان می دهد که سنتز، تجمع و ترشح اجزاء وابسته به فراکسیون VLDL تابع کنترل هورمونی و متابولیک بوده (۱-۶). ترشح VLDL نه تنها توسط عوامل وابسته به کلسیم نظیر کاتکولامین ها(۷-۹)،پروستاگلاندینها (۱۰)، آنتاگونیست های کلسیم (۱۲،۱۱) بلکه توسط عوامل عمل کننده از مسیرcAMP نظیر گلوکاگون (۱۳-۱۵)، مشتقات cAMP (۱۵-۱۷) و پروتئین کیناز وابسته به cAMP (۱۵) نیز مهار می گردد. اگرچه ترشح VLDL توسط هردو سیستم انتقال پیام (یعنی مسیرهای وابسته به کلسیم و cAMP کنترل می شود ولی اپی نفرین در کبد بیشتر از طریق رسپتور- α_1 عمل می نماید (۱۸).

کلسیم در متابولیسم VLDL حداقل در یک یا چند فرایند زیر ایفای نقش می نماید: ۱. سنتز محصولات ترشحی:عوامل موثربرکلسیم درتنظیم فعالیت آنزیم های شرکت کننده در بیوسنتز گلیسروليپیدها شرکت می نمایند. (۱۹-۲۱) تحریک آلفا ادرنرژیک سبب مهار لیپوژنز وسوق سوبسترای اسید چرب از مسیر استریفیکاسیون به اکسیداسیون می گردد(۲۲). ۲. پردازش پس از نسخه برداری و ترانسلوکاسیون از طریق مسیر ترشحی؛ کلسیم اینترالومینال برای عمل آنزیم های سیگنال پپتیداز، چاپرون و اپوپروئین -B(apo-B) لازم می باشد(۴). غلظت بهینه کلسیم درشبکه آندوپلاسمیک (ER) برای تا خوردن صحیح، تجمع و ترشح اپو -B تازه سنتز شده ضروری می باشد (۲۳، ۲۴). فرضیه فوق توسط این مشاهده که پروستاگلاندینها و نیز وراپامیل به طور ویژه ترشح VLDL را مهار می کنند ولی بر هیچ پارامتر دیگری در متابولیسم لیپیدها در کبد اثری ندارد تایید می گردد (۱۰). ۳ تنظیم میکروتوبول ها و میکروفیلامان ها و ۴. صاق وزیکول های ترشحی به غشاء پلاسمایی. ترشح VLDL از طریق مکانیسم عمومی ترشح پروتئین، وابسته به میکروتولول ها بوده به طوری که توسط کلچیسین (Cholchicin) مهار می گردد (۲۴). افزایش کلسیم میتوزولی در سلول های کبدی بر خلاف سایر سلول ها به همراه مهار فرایندهای ترشحی می باشد(۷).

در این تحقیق اثرات عوامل مختلف موثر بر ادرنوسپتور روی ترشح تری گلیسیرید از هپاتوسیت رت بررسی شده است. نتایج نشان می دهند که اپی نفرین ترشح تری گلیسیرید را از طریق رسپتور آلفا-۱ مهار می نماید با این وجود اگونیست های آلفا و بتا- ادرنرژیک اثر مشابهی اعمال می نمایند.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی: Bt_2-cAMP (دی بوتیریل ادنوزین "۳ و "۵- سیکلسک منو فسفات)، (-)اپی‌نفرین،اسیداولئیک، سرم آلبومین گاوی (BSA) (عاری از اسید چرب) و تری فلوپرازین از سیگما (آمریکا) تهیه شدند. کلاژناز (5000 U/mg protein) از Merk (آلمان)، پرازوسین از Pfizer (آمریکا) و تئوبرومین از BDH (انگلستان) خریداری شده اند. منشاء بقیه مواد شیمیایی قبلاً ذکر شده است (۲۵، ۲۶).

جداسازی هپاتوسیت

هپاتوسیت ها از رت های نر Spargue- Dawley با وزن ۳۰۰- ۲۵۰ گرم تهیه شده، رت ها در خوردن غذا و نوشیدن آب آزاد بوده اند. هپاتوسیت - L_4 توسط تکنیک دو مرحله ای کلاژناز همان گونه که پیش از این تشریح گردید، تهیه شده است (۲۶). ویابیلیتی سلولی توسط منع نشت تریپان بلو (بیش از ۹۰درصد) و درصد تراوش LDH (کمتر از ۱۰درصد) ارزیابی شده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

انکوباسیون هپاتوسیت

هپاتوسیت ها (۰/۵ ± ۸ mg protein/ml) در حجم کلی ۴ml در محلول کربس- رینگربی کربنات (KRB) حاوی ۰/۵٪ BSA ۰/۲۵ mM- اولئات، ۲۰ mM- گلوکز و ۲/۵ sm.M کلرید کلسیم به مدت سه ساعت در ۳۷° C در فلاسک های سیلیکونیزه شده که تحت جو (۱:۱۹) $O_2:CO_2$ با سرعت ۹۰ cycles/ml حرکت داده می شوند انکوبه گردیده اند.

آنالیز لیپیدها

در خاتمه، انکوباسیون توسط انتقال محیط های انکوباسیون روی یخ و حذف محیط انکوباسیون توسط سانتریفوژ (۱۵۰۰g×۳min) خاتمه می پذیرفت. برای حذف سلول های شکسته و اجزاء سلولی محیط انکوباسیون در ۴° C در ۱۲۰۰۰g ×۱۰min سانتریفوژ گردید. تمامی حجم بخش رویی بر اساس روش فولچ توسط کلروفرم، متانل (۲:۱) استخراج شد (۲۷). میزان حذف تری گلیسیرید طی عمل استخراج توسط افزایش glycerol(^{14}C)- trioleate به عنوان استاندارد داخلی ارزیابی گردید. بازیابی اخیر توسط سنجش سنتیلاسیون مایع (LS) ارزیابی شد (۴). پلیت سلولی توسط محلول هموژناسیون (۴۰° C) دو بار شسته شده (۲۸) و توسط پروسس اولتراسونیک سونیکه و بر اساس روش قبلی برای لیپیدها استخراج گردید (۲۶). جرم تری گلیسیرید با استفاده از متد GPO-PAP با استفاده از کیت زیست- شیمی (ایران) سنجش گردید (۲۶). از آنجایی که ثابت شده بیش از ۹۵درصد تری گلیسیرید ترشح شده وابسته به فراکسیون VLDL می باشد، ترشح VLDL توسط سنجش تری گلیسیرید به محیط انکوباسیون تخمین زده شد (۲۸). وابستگی تری گلیسیرید ترشح شده به فراکسیون VLDL توسط روش‌های رسوبی و اولتراسانتریفوژ ثابت گردید (۲۸).

سایر روش های آنالیز

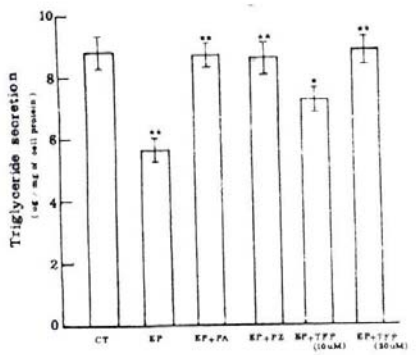
غلظت پروتئین توسط روش لوری تعیین شد (۲۹). LDH توسط روش کلدیمتری با استفاده از کیت سیگما (آمریکا) تعیین شد.

آنالیز آماری

نتایج به صورت Mean ± S.E.M بیان شده اند. اهمیت و اعتبار اختلاف آماری بین نتایج توسط t-test ارزیابی شده اند.

نتایج

اثر اپی نفرین بر ترشح تری اسیل گلیسرول در غیاب و حضور آنتاگونیست های آلفا- ادرنورسپتور درنمودار ۱ ارایه شده است. جرم تری اسیل گلیسرول در عصاره استخراج شده لیپیدی محیط انکوباسیون سنجش شده است . سرعت ترشح تری اسیل گلیسرول در غیاب اپی نفرین ۸/۸۵ ± ۰/۵۲µg/ ۳h. mg of cell protein می باشد. اپی نفرین در غلظت ۱۰µM ترشح تری اسیل گلیسرول را حدود ۳۵درصد ($P\leq0.005$) مهار اثر نهایی اپی نفرین در حضور فنتول آمین (۱۰µM) به عنوان آنتاگونیست عمومی آلفا و نیز در حضور پرازوسین (۱ µM) به عنوان آنتاگونیست اختصاصی آلفا-۱ حذف گردید. تری فلوپرازین به عنوان مهار کننده رقابتی کالمودولین به صورت وابسته به دوز، اثر اپی نفرین را در غلظت (۱۰µM) به میزان ۵۰ درصد و در غلظت (۲۰ µM) به طور کامل حذف نمود.

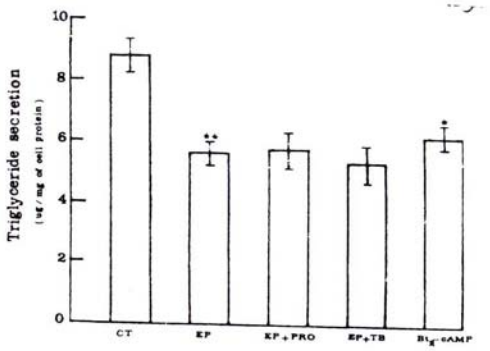


نمودار ۱ : اثر اپی نفرین بر ترشح تری اسیل گلیسرول در غیاب و حضور آنتاگونیست های آلفا- ادرنوسپتور در هپاتوسیت تهیه شده از کبد رت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

هپاتوسیت ها درغلظت ۰/۵mg cell protein/ml ± ۸ به مدت ۳h در KRB حاوی گلوکز (۰/۲۵ mM) در حجم کلی ۴ml در ۳۷° C انکوبه شده اند. هپاتوسیت ۵min قبل از افزایش اپی نفرین(۱۰μMو PA)، پرازوسین(۱μMو PZ) وتری فلوپرازین (۲۰ μM، ۱۰ و TPF) پرانکوبه شده اند. جرم تری اسیل گلیسرول در عصاره استخراج شده لیپیدی محیط انکوباسیون سنجش شده است. نتایج به صورت mean ± S.E. چهار سنجش در حداقل سه نمونه سلولی مختلف (n) بیان شده اند. نمونه حاوی اپی نفرین نسبت به کنترل (CT) و بقیه نسبت به نمونه حاوی اپی نفرین سنجیده شده اند.* و ** به ترتیب بیانگر اختلاف نمونه از کنترل مربوطه درسطح اطمینان۰/۰۲۵ ≥ P و ۰/۰۰۵ ≥ P می باشند.

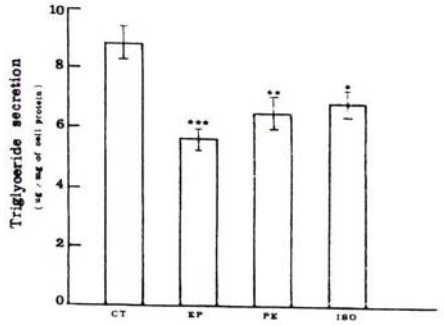
اثر اپی نفرین بر ترشح تری اسیل گلیسرول در غیاب وحضورعوامل مربوط به cAMP در نمودار-۲ نشان داده شده است. مقادیر سرعت ترشح تری اسیل گلیسرول در کنترل و درحضور اپی نفرین همانند نمودار-۱ می باشد. اثر مهاری اپی نفرین در حضور پروپرانولول (۱۰ μM) به عنوان آنتاگونیست بتا- ادرنوسپتور همچنان ابقاست. به علاوه تئوبرومین (TB,1mM) به عنوان مهار کننده – cAMP- فسفو دی استراز اثر قابل توجهی بر اثر مهاری اپی نفرین نداشت. دی بوتیریل سیکلیک آدنوزین منوفسفات (Bt_2 -cAMP, 0.1mM)، به تنهایی ترشح تری اسیل گلیسرول را حدود ۳۰درصد (P≤0/01) مهار نمود.



نمودار ۲ : اثر اپی نفرین بر ترشح تری اسیل گلیسرول در غیاب و حضور عوامل موثر بر cAMP.

مقادیرترشح تری اسیل گلیسرول درکنترل ودرحضوراپی نفرین همانند نمودار قبلی می باشند. پروپرانولول (۱۰ μM و PRO) و تئوبرومین (۱mM و TB) ۵ دقیقه قبل ازاپی نفرین(۱۰ μ M و EP) اضافه شده اند. دی بوتیریل cAMP (۰/۱ mM) و -Bt_2 cAMP) نیز به تنهایی اثر داده شده است. بقیه شرایط مشابه نمودار-۱ می باشد. نمونه های حاوی اپی نفرین و دی بوتیریل - cAMP نسبت به کنترل (CT) و نمونه های حاوی پروپرانولول و تئوبرومین نسبت به نمونه حاوی اپی نفرین سنجیده شده است. * و ** به ترتیب بیانگراختلاف درسطح اطمینان۰/۰۱ ≥P و۰/۰۰۵ ≥P می باشند.

اثر اپی نفرین، فنیل آفرین و همچنین ایزوپروترنول بر ترشح تری اسیل گلیسرول در نمودار۳ ارایه شده است. سرعت ترشح تری اسیل گلیسرول در حضور فنیل افرین (PE,10μM) و ایزوپروترنول (ISO,10μM) به ترتیب ۶/۵۵± ۰/۳۹ و ۰/۵۱ ± ۶/۸۹ (μg/3h.mg of cell protein) بوده که بیانگر ۲۵درصد و ۲۲درصد مهار می باشند. هیچ کدام از آنتاگونیست ها به تنهایی اثری بر ترشح تری اسیل گلیسرول نداشتند.



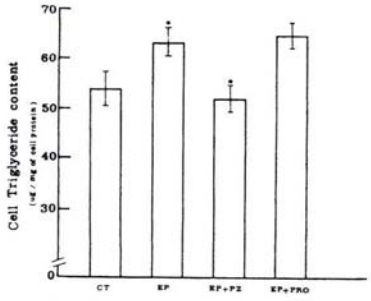
نمودار۳ : اثر اپی نفرین، آلفا- و بتا- آگونیست های ادرنوسپتور بر ترشح تری اسیل گلیسرول.

مقادیر ترشح در کنترل و در حضور اپی نفرین همانند نمودار ۱ می باشد.هپاتوسیت ها به مدت۳ ساعت با اپی نفرین (۱۰μM وEP)، فنیل افرین (۱۰ μM و PE)،ایزوپرترنول (۱۰ μM وISO)، ونیزدر حضور توام فنیل افرین۱۰μMوایزوپرترنول۱۰ μM انکوبه شده اند. سایرشرایط همانند نمودار۱می باشد.نمونه های حاویEP PE,و ISO نسبت به کنترل سنجیده شده اند. نتایج به صورت mean ± S.E

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

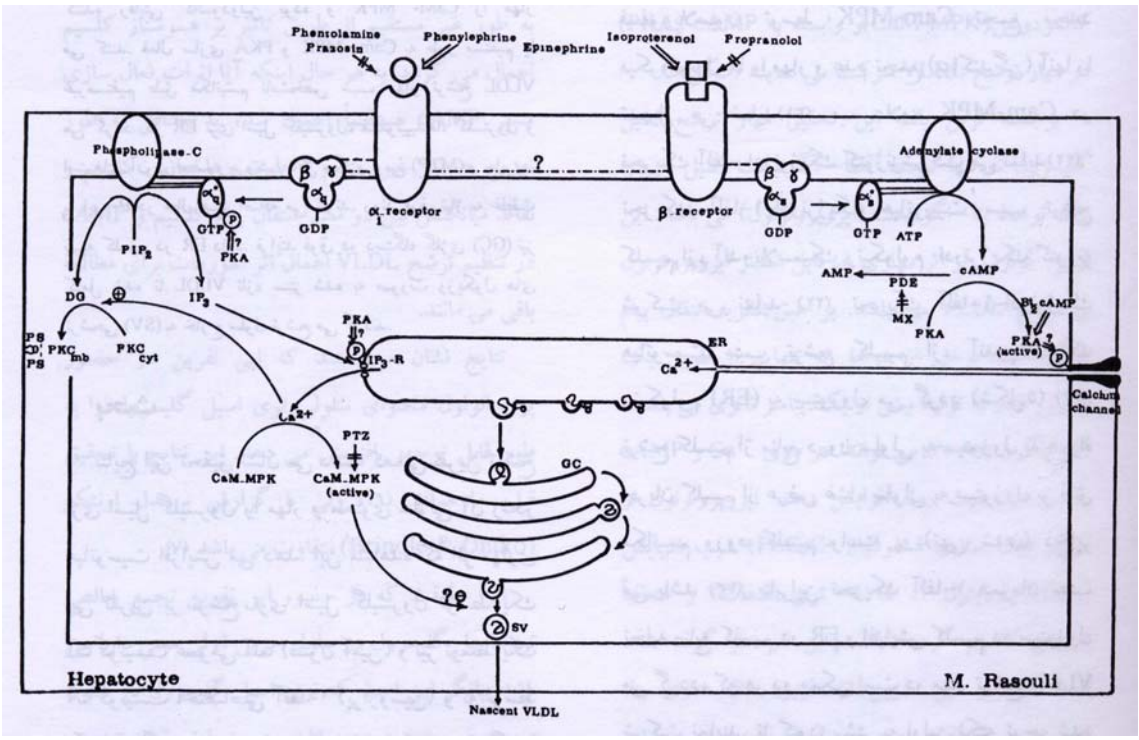
ارایه شده ومتوسط چهار سنجش حداقل درسه نمونه هپاتوسیت مختلف می باشد. *** P≤۰/۰۰۵ ، ** P≤۰/۰۱ ، *P≤۰/۰۲۵ .

اثر اپی نفرین بر محتوی سلولی تری اسیل کلیسرول در نمودار-۴ ارائه شده است. جرم تری اسیل گلیسرول در عصاره لیپیدی سلول هپاتوسیت سنجیده شده است. محتوی تری اسیل گلیسرول سلولی در غیاب و حضور اپی نفرین به ترتیب ۵/۶ ± ۵۳/۹۸ و (µg/mg of protein) ۴/۸۲ ± ۶۳/۳۴ بوده که بیانگر ۱۸درصد (P≤0/05) افزایش می باشد. اثر تحریکی اپی نفرین (بر محتوی تری اسیل گلیسرول سلولی) درحضور پرازوسین آنتاگونایز شده در حالی که در حضور پروپرانولول هنوز باقی است. در هر حال محتوی تری گلیسیرید کل سیستم (مجموعه سلول ومحیط انکوباسیون) تقریباً ثابت می باشد.



نمودار۴: اثر اپی نفرین بر محتوی تری اسیل گلیسرول سلولی در حضور و غیاب آنتاگونیست های - آلفا و بتا.

کلیه شرایط انکوباسیون هپاتوسیت همانند قبل می باشد. جرم تری اسیل گلیسرول در عصاره استخراج شده لیپیدی سلول ها تعیین شده است. نمونه EP نسبت به کنترل (CT) و نمونه های حاوی EP و آنتاگونیست ها نسبت به EP سنجیده شده اند. نتایج به صورت mean ± S.E. بیان شده و متوسط چهار سنجش حداقل در سه نمونه هپاتوسیت مختلف می باشند. P≤ ۰/۰۵ *



نمودار۵ : نقش احتمالی کلسیم و cAMP در تنظیم ترشح VLDL تازه سنتز شده.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

فعال سازی رسپتور -α1 از طریق G_q سبب فعال سازی فسفولیپاز -C(PLC) می گردد. PLC سبب هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول ۴، ۵- دی فسفات (PIP_2) به اینوزیتول ۱، ۴، ۵- تری فسفات (IP_3) و دی اسیل گلیسرول (DG) می گردد. DG سبب ترانسلوکاسیون پروتئین کیناز- C(PKC) به غشاء سلولی می گردد. IP_3 به رسپتور ویژه خود (IP_3-R) روی شبکه آندوپلاسمیک (ER) صاق و سبب ترشح کلسیم به سیتوزول می گردد. فعال سازی رسپتور -β از طریق Gs سبب فعال سازی ادنیلات سیکلازشده،آنزیم فوق،ATPرابه cAMPتبدیل می کند. cAMP توسط فسفودی استراز (PDE) به AMP هیدرولیز و غیرفعال می گردد. متیل گزانتین ها (MX) آنزیم PDE را مهار می کنند. cAMP سبب فعال شدن پروتئین کیناز (PKA) و PKA سبب فسفوریلاسیون کانال های کلسیم به داخل سلول می شود. فراینـــد اخیر در سلول های غیر تحریک پذیر نظیر کبد فاقد اهمیت می باشد. به علاوه PKA سبب فعال سازی α_q و IP_3 و طی مکانیسم نامشخص سبب القاء ورود کلسیم به سلول می شود. ترشح کلسیم از ER به سیتوزول سبب ورود کلسیم از خارج سلول به داخل مکانیسم « ورود کلسیم وابسته به ذخایر» می گردد. کلسیم سیتوزولی سبب فعال سازی پروتئین کیناز وابسته به کلسیم- کالمودولین (CaM- MPK) می گردد. فنوتیازین ها (PTZ) مهار کننده رقابتی کالمودولین بوده و CaM- MPK را مهار می کنند. فعال سازی PKA و Cam- MPK به طور مستقیم یا غیرمستقیم طبق مکانیسم نامشخص سبب مهار ترشح VLDL می گردد. در ER تری اسیل گلیسرول، فسفولیپیدها، کلسترول و استرهای آن در حضور پروتئین ناقل میکروزومی (MTP) و چاپرون به اپو -B در حال سنتز اضافه می شوند. روند فوق نیاز به غلظت بهینه کلسیم در ER دارد. فرایند فوق در دستگاه گلژی (GC) نیز کامل شده تا VLDL تازه سنتز شده به صورت وزیکول های ترشحی (SV) به خارج سلول ترشح می گردند.

بحث

نتایج این تحقیق نشان می دهند که اپی نفرین ترشح تری اسیل گلیسرول را مهار و محتوی سلولی آن را در هپاتوسیت افزایش می دهد. این مشاهده که اثر مهاری اپی نفرین بر ترشح تری اسیل گلیسرول توسط یک آنتاگونیست عمومی آلفا (فنتول آمین) و نیز توسط یک آنتاگونیست اختصاصی آلفا-۱ (پرازوسین) و نه توسط یک آنتاگونیست-بتا (پروپرانولول) حذف می گردد دال بر دخالت رسپتور- آلفا- ۱ می باشد. تاثیر تری فلوپرازین (TFP) و عدم تاثیر تئوبرومین (TB) بر اثر مهاری اپی نفرین نظریه فوق را بیشتر تقویت می نماید. مهار آلفا-۱ ادرنرژیک مشاهده شده در این تحقیق موافق با سایر گزارشات یم باشد (۷، ۹). TFP مهار کننده رقابتی کالمودولین بوده، میتواند سیگنال وساطت شده توسط آن را خنثی نماید (۳۰، ۳۱). نتایج اخیر نشان می دهند که TPF به صورت وابسته به غلظت می تواند اثر مهاری اپی نفرین را خنثی نماید (شکل ۵) بنابراین محتمل است که مالتی- پروتئین کیناز کلسیم- کالمودولین (CaM-MPK) در تنظیم ترشح VLDL نقش داشته باشد. این یافته که مسیر کلسیم- کالمودولین برای تنظیم کاهشی ترشح VLDL ضروری است برای اولین بار است که گزارش می گردد. پروتئین وابسته به میکروتوبول۲ (MAP-2)، فاکتور تآو (Tau) و احتمالاً خود توبولین توسط Cam-MPK فسفوریله می کردند. فسفوریلاسیون توسط Cam-MPK تجمع مجدد میکروتوبول ها را مهار و عدم تجمع (پراکندگی) آنها را تسهیل می نماید(۳۱). ب علاوه Cam-MPK در تحریک آلفا- ادرنرژیک کتوژنزشرکت می نماید(۲۲). تحریک آلفا-۱-ادرنرژیک هپاتوسیت سبب ترشح کلسیم از، آندوپلاسمیک رتیکولوم ادرنرژیک کتوژنز شرکت می نماید (۲۲). تحریک آلفا-۱-ادرنرژیک هپاتوسیت سبب ترشح کلسیم از، آندوپلاسمیک رتیکولوم (ER) به سیتوزول می گردد (شکل۵) (۳۲). ترشح کلسیم از منابع درون سلولی به سیتوزول به همراه جریان کلسیم از عرض غشاء سلولی به سیتوزول بر طبق مکانیسم ورود کلسیم وابسته به (تهی شدن) ذخایر می‌باشد (۳۳). بنابراین تحریک آلفا-۱ همزمان سبب تخلیه منابع کلسیم در ER و افزایش کلسیم در سیتوزول می گردد، که هر دو ممکن است در مهار ترشح VLDL شرکت نمایند. تا کنون بیشتر به اولین نکته توجه شده است و غلظت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

بهینه کلسیم در ER برای تا خوردن، ترانسلوکاسیون و ترشح اپو -B ضروری در نظر گرفته شده است (۴). ولی افزایش کلسیم سیتوزولی از طریق کلسیم- کالمودولین نیز ممکن است در مهار ترشح VLDL نقش داشته باشد. به هر حال اثبات قطعی دخالت کلسیم، کالمودولین درتنظیم ترشح VLDL نیاز به کار بیشتری دارد.

این حقیقت که اثر اپی نفرین از طریق رسپتور -α اعمال می گردد الزاماً امکان تنظیم ترشح VLDL را از طریق مسیر cAMP رد نمی نماید. در حقیقت متابولیسم VLDL توسط هر دو سیستم انتقال پیام کنترل می گردد (۳۴،۱۷،۷) نتایج این تحقیق نیز نشان می دهند که -Bt_2 cAMP نیز ترشح تری گلیسیرید را مهار می نماید. این یافته موافق با نتایج به دست آمده باکبد پرفیوز شده (۱۶). انکوباسیون هپاتوسیت (۱۷) و کشت هپاتوسیت (۱۵) می باشد. تا کنون هر دو پروتئین کینازهای وابسته به کالمودولین(CaM-MPK)و وابسته به cAMP (PKA) در مهار ترشح VLDL شرکت می نمایند (شکل ۵).

برجسته ترین یافته این تحقیق مهار ترشح اسیل گلیسرول نه تنها توسط آلفا- آگونیست (فنیل افرین) بلکه توسط بتا- اگونیست (ایزوپروترنول) می باشد. این اولین گزارش از اثر مهاری غیرقابل انتظار ایزوپروترنول بر ترشح VLDL می باشد. بر طبق نظریه انتقال پیام دوگانه (۳۵) برخی از عوامل به تنهایی از طریق یک رسپتور قادر به تولید بیش از یک پیامبر ثانوی می باشند. گلوکاگون (۳۶، ۳۷) می توانند هر دوی Ca^{2+} و cAMP را در هپاتوسیت رت افزایش دهند. ایزوپروترنول از طریق فعال سازی فسفولیپاز -C(PLC) سبب افزایش (IP_3) (اینوزیتول ۱، ۴، ۵- تری فسفات) و متعاقباً افزایش کلسیم گردد (۳۷). چنین در نظر گرفته شده است که اثر اپی نفرین از طریق فعال سازی بتا، ادرنوسپتور انجام شده و از طریق G- پروتئین های مختلف G_q و G_s به ترتیب منجر به فعال سازی PLC (فسفولیپاز) و ادنیلات سیکلاز شده است (۳۵). تنظیم ترشح VLDL توسط گلوکاگون و ایزوپروترنول مثال هایی از عملکرد توام کلسیم و cAMP برای تنظیم متابولیسم می باشند. میانکنش های متقاطع متعددی بین دو سیستم انتقال پیام در رسپتورها، G- پروتئین ها، افکتورها و پیامبرهای ثانوی وجود دارد (۳۵). آنالوگ هاب cAMP (نظیر Bt_2 -cAMP) و نیز Forskolin (فعال کننده مستقیم جزء کاتالیتیک ادنیلات سیکلاز) نیز سبب افزایش کلسیم سیتوزولی در هپاتوسیت رت می گردند (۳۷). برخی شواهد دال بر فعال سازی مستقیم PLC از طریقGq می باشد شکل ۵ (۳۷) در حالی که میانکنش در نقاط دورتر نیز محتمل می باشد (۳۵). cAMP سبب القاء فسفوریلاسیون رسپتور IP_3 شده آن را نسبت به IP_3 حساس تر می نماید (شکل ۵) (۳۳). در حال حاضر به نظر می رسد که برخی از اثرات cAMP به طور غیر مستقیم از طریق تاثیر بر هموستاز کلسیم اعمال می گردد. به هر حال اینکه آیا اثرات فعال سازی مسیر cAMP مستقیماً اعمال شده یا حداقل به طور جزیی به طور غیرمستقیم از طریق رها سازی کلسیم و نقاط میانکنش بین دو مسیر انتقال پیام کلسیم و cAMP در تنظیم ترشح VLDL اعمال اثر نمورمات برای مطالعه باقی می مانند.

نتایج نشان می دهند که اپی نفرین در حضور پروپرانولول محتوای سلولی تری اسیل گلیسرول را به طور قابل توجهی افزایش می دهد. این نتایج با تحقیق قبلی ما موافق (۲۶) ولی با گزارش برینذل اونتکو (Brindle & Ontko) متفاوت می باشد (۷).

این حقیقت که در حضور اپی نفرین تجمع خالص تری اسیل گلیسرول در سلول جزیی (ولی معنی دار) می باشد بیانگر این است که تری اسیل گلیسرول در سلول در معرض تجزیه می باشد. در تحقیق قبلی منحنی گذشت زمان لیپیدهای سلولی نشان داد که محتوی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

سلولی تری گلیسرید و فسفولیپید در حضور اپی نفرین نسبت به کنترل (عدم حضور اپی نفرین) در همه زمان ها بیشتر بوده و این اختلاف طی زمان تقریباً ثابت می ماند (۲۶، ۳۸). از آنجایی که افزایش محتوی لیپید سلولی طی زمان ثابت بوده (۲۶) و محتوی تری اسیل گلیسرول کل سیستم (مجموعه سلول و محیط انکوباسیون) همان طوری که نتایج این تحقیق نشان می دهد در حضور و عدم حضور اپی نفرین تقریباً ثابت می باشد، لیپیدهای تجمع یافته در داخل سلول تنها بیانگر لیپیدی است که تا کنون ترشح نشده است. بنابراین به نظر می رسد که اپی نفرین ترشح تری اسیل گلیسرول را از طریق اثر مهاری بر مسیر ترشحی مهار می نماید.

فهرست منابع

1. Gibbons G F. Assembly and secretion of hepatic very low density lipoprotein. Biochem. J. 1990; 268: 1-13.
2. Dixon J L, Ginsberg H N. Regulation of hepatic secretion of apolopoprotein B containing lipoprotein Informations obtained from cultured liver cells.J.Lipid Res. 1993; 34: 167-79.
3. Hahn S E, Goldberg D M. Factors affecting the regulation of apo B secretion by liver cells. J. Clin. Lab. Anal. 1995; 9: 431- 49.
4. Spark J D, Sparks C E. Insulin regulation of triacylglycerol rich lipoprotein synthesis and secretion. Biochem. Biophys. Acta. 1994; 1215: 9- 32.
5. Vance J E, Vance D E. Lipoprotein assembly and secretion by hepatocytes. Rev. Nutr. 1990; 10: 337- 56.
6. Yao Z, Mcleod R S. Synuthesis and secretion of hepatic apolipoprotein B-containing lipoprotein.Biochem.Biophys. Acta. 1994; 1212: 152- 66.
7. Brindle N P J, Ontko J A. Suppression of triglyceride secretion by epinephrine in isolated rat hepatocytes. Biochem. Biophys.Res.Comm. 1986; 141(1):191-7.
8. Brindle NPJ, Ontka J A. (α1) Adrenergic suppression of VLDL triacylglycerol secretion by isolated rat hepatocytes. Biochem. J. 1988; 250 (36): 3- 368.
9. Rasouli M, Zahraei M.Epinephine supprese secretion of VLDL-triacylglycerol and accumulates triacylgly ceral and phosholipid contents in isolated rat hepatocy tes sention. MJIRI, 1999, In press.
10. Bjornsson O G, Sparks J D, Sparks C E, Gibbons G F. Prostaglandins suppress VLDL secretion in primary rat hepatocyte cultures relationship to hepatic cacium metabolism. J. Lipid Res. 1992, 33: 1017- 27.
11. Nossen J U, Rustan A C, Drevon Ch A, Calcium- antagonists inhibits secretion of VLDL from cultured rat hepatocytes. Biochem. J. 1987; 247: 433- 9.
12. Kwong T C, Sparks J D, Cianci J F, sparks CE. Inhibition of apolipoprotein – B net synthesis and secretion from cultured rat hepatocytes by the calcium –

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

channel blocker Diltiazem. Biochem. J. 1989; 263: 411- 5.

13. Bjornsson OG, Duerden JM, Bartlet SM, Sparks JD, Sparks CE, Gibbons GF. The role of pancreatic hormones in the regulation of lipid storage, oxidation and secretion in primary cultures of rat hepatocytes. Biochem. J. 1992; 281- 6.
14. Pullinger CR, Gibbons GF. Effects of hormones and pyruvate on the rates of secretion of VLDL triacylglycerol and cholestrol by rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Acta, 1985; 833: 44- 51.
15. Bjornsson OG, Sparks JD, Sparks CE, Gibbons GF. Regulation of VLDL secretion in primary culture of rat hepatocytes: involvement of cAMP and cAMP- depondent protein kinases. Eur. J. Clin. Invest. 1994; 24: 137- 48.
16. Klausner H, Soler-Argilaga C, Heimborg M. Effects of dibutyryl-cAMP on hepatic metabolism of free fatty acids. Metab. 1978, 27(1): 13- 25.
17. Edwards PA, Lemongello D, Fogelmen AM. The effect of glucagons, norepinephrine and dibutyryl cyclic-AMP on cholesterol efflux and on the activity of HMG-CoA reductase in rat hepatocytes. J. Lipid Res. 1979; 20:2-7.
18. Tsujimoto A, tsujimoto G, Azhar S, Hoffman BB.Altered responsiveness to alpha-and beta–adrenoceptor stimulation in hepatocytes cultured in defined medium. Biochem. Pharm. 1986; 35(8): 1400-4.
19. Sanghera JS, Vance DE. Stimulation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase and phosphatidylcholine synthesis by calcium in rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Acta. 1989; 1003: 284-92.
20. Pollard AD, Brindley DN. Effects of vassopressin and corticosterone on fatty acid metabolism and on the activities of glycerolphosphate acyltransferase and PAP in rat hepatocytes. Biochem. J. 1984; 217: 461- 9.
21. Roitelman J, Bar-Nun S, Ivove S, Simoni RD. Involvement of calcium in the mevalonate-accelerated degradation of HMG – CoA reductase. J. Biol. Chem. 1991; 266 (24): 16085- 91.
22. Kosugi K, Harano Y, Nakano T, Suzuki M, Kashiwagi A, Shigeta Y. Mechanism of adrenergic stimulation of hepatic ketogensis. Metab. 1983; 32(1): 1081- 7.
23. Lodish HF, Kong N. Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 1990; 265(19): 10893-9.
24. Stein O, Stein Y. Colchicine- induced inhibition of VLDL release by rat liver in vivo. Biochem. Biophys. Acta. 1973; 306: 142-7.
25. Rasouli M, Haghighi B, Suzangar M. Diurnal variation in hepatic and plasma lipids and in the activites of hepatic PAP

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

and heart LPL. Iran. J. Med. Sci. 1991; 16(1): 46- 53.

26. Rasouli M, Zahraei M. Epinephin suppresses VLDL- triacylglycerol secretion and incteases triacylglycerol and phospholipid contents in isolated rat hepatocytes. MJIRI, 1999. In Press.
27. Foich J, Less M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957; 226: 497- 509.
28. Mangiapane EH, Brindley DN. Effects of dexametasone and insulin on the synthesis of triacylglycerol and phosphatidylcholine in cultures of rat hepatocytes. Biochem. J. 1986; 233: 151- 60.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.Protein measurement with the folin- phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265- 75.
30. Schatzman RC, Wise BC, Kuo JF. phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase: inhibition by anti-psychotic drugs. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1981; 98(3): 669-76.
31. Cohen P. the calmodulin- dependent multiprotein kinases. In: Cohen P. and klce C.R. eds, Calmodulin, Molecular aspects of cellular regulation, V.5 Netherlands, PP: 145- 187, 1988.
32. Charest R, Blackmore PF, Berthon B, Exton JH. Changes in free cytosolic Ca^{2+} in hepatocytesm following α1–adrenergic stimulation J.Biol. Chem. 1983; 258(14): 8769- 73.
33. Bode HP, Netter KJ. Agonist –releasable intracellular calcium stores and phenomenon of store–dependent calcium entry. Biochem. Pharm. 1996; 51: 993- 1001.
34. Haghighi B, Rasouli M, Suzangar M. Inhibitory effect of epinephrine on PAP activity in isolated rat hepatocytes. Rev. roum. Endocrinol. 1990; 28: 149- 54.
35. Bygrave FL, Roberts HR. Regulation of cellular calcium through signaling cross-talk involves an intricate interplay between the actions of receptors G-protein,and second messengers. FASEBJ. 1995; 9: 1297-303.
36. Wakelam MJO, Murphy GJ, Hruby VJ, houslay MD. Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagons. Nature. 1986; 323: 68- 72.
37. Combettes L, Berthon B, Binet A, Claret M.Glucagon and vasopressin interactions on Ca^{2+} movements in hepatocytes. Biochem. J. 1986; 237: 675- 83.
38. Rasouli M, Zahraei M. suppretion of VLDL- triacylglycerol by bath alpha- and beta- adrenergic agonists in isolated rat hepatocytes. MJIRT. In press.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]