

Insulin und Glukagon im Blutplasma teilhepatektomierter Ratten

Insulin and Glucagon in the Blood Plasma of Partial Hepatectomized Rats

Wolf Strecker, Siegfried Silz, Gerhard Ruhenstroth-Bauer

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Experimentelle Medizin, D-8033 Martinsried bei München

und

Ingolf Böttger

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik rechts der Isar (Dir.: Prof. Dr. H. W. Pabst), Technische Universität, D-8000 München

Z. Naturforsch. **35 c**, 65–71 (1980); eingegangen am 2. März/2. August 1979

Rat, Partial Hepatectomy, Blood Plasma, Glucagon, Insulin

Up to 4 weeks after partial hepatectomy the concentrations of immunoreactive insulin and glucagon in the blood plasma of rats were determined. Furthermore we measured the activity of acid phosphatase in the serum, the concentration of cyclic AMP in liver cells, the activities of acid phosphatase in whole liver cells and in the cytosol of liver cells after partial hepatectomy.

2 h after partial hepatectomy there was a decline of the concentration of insulin in the plasma to about 13% of the initial value. 12 h after surgery a 5-fold increase of glucagon was found in the plasma. Shortly after this cyclic AMP reached its highest concentration.

The activity of acid phosphatase in the whole liver cells and in the cytosol decreases slightly in the first 24 h after surgery whereas there is an increase of the activity of acid phosphatase in the serum.

Im Gleichgewichtszustand halten sich der Abbau und die Teilung von Zellen in den Organen des menschlichen und tierischen Körpers die Waage. In der Leber ist der Zellumsatz unter physiologischen Bedingungen verhältnismäßig gering: unter etwa 10 000–40 000 Leberparenchymzellen befindet sich nur eine einzige im Teilungsstadium. Wird jedoch ein größerer Teil der Leber auf einmal funktionell ausgeschaltet, beispielsweise durch Zellgifte, O₂- oder Blutmangel oder durch eine operative Entfernung eines Teils der Leber (= Teilhepatektomie), so steigt die Zellteilungsrate auf ein Vielfaches des Ruhewertes an. Werden bei etwa 200 g schweren Ratten 2/3 der Leber operativ entfernt, so zeigt sich 22 bis 24 Stunden postoperativ eine Steigerung der DNA-Syntheserate auf das 50–80fache des Ausgangswertes, der wenige Stunden später eine Welle von Zellteilungen folgt. Diese erhöhten Mitoseraten der Leberzellen vermindern sich im Laufe der nächsten Tage, bis nach etwa zwei Wochen die ursprüngliche Lebermasse fast wieder erreicht ist.

Die Frage, auf welche Weise die Regelung der Leberzellproliferation vor sich geht, ist trotz einer Reihe von wichtigen Fortschritten der letzten Zeit

[1–5] in vielen Einzelheiten noch ungeklärt. Insbesondere ist noch offen, ob mehrere unspezifische Faktoren zusammenspielen, um eine Steigerung der Leberproliferation im Bedarfsfall herbeizuführen, oder aber, ob es ein leberspezifisches Proliferationshormon gibt, das zur Entfaltung seiner Wirkung jedoch unspezifische Zusatzfaktoren benötigt; diese würden die Wirkung des spezifischen Hormons modifizierend beeinflussen. Die oben zitierten Arbeiten sprechen eher für die zweite Alternative.

Zu den Faktoren, denen eine Mitwirkung an der Proliferationssteigerung zugesprochen wird, gehören die beiden Pankreashormone Insulin und Glukagon. Beim Insulin finden die meisten Autoren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine gewisse Proliferationssteigerung [6–9], während beim Glukagon die Ergebnisse kontrovers sind [6, 7, 10–14]. Möglicherweise ist dies auf Unterschiede in den Versuchsansätzen zurückzuführen. Unseres Wissens ist jedoch bisher keine genaue Analyse der Konzentrationen dieser beiden Hormone im Blutplasma über einen längeren Zeitraum nach Teilhepatektomie mitgeteilt worden. Wir haben dies in vorliegender Arbeit durchgeführt und einige weitere damit im Zusammenhang stehende Parameter im Zeitverlauf nach Teilhepatektomie bestimmt, um die Bedeutung des Pankreas bei der Regelung der Leberzellproliferation einzugrenzen.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer.

0341-0382/80/0100-0065 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Materialien und Methoden

Tiere

Die Untersuchungen wurden an 98 weiblichen Wistar-Ratten (Institut für Strahlen- und Umweltforschung, München-Neuherberg) mit einem Körpergewicht von 227 ± 29 g durchgeführt. Die Tiere wurden bis zum Erreichen des angegebenen Körpergewichtes in Makrolonkäfigen bei 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50 \pm 5\%$ gehalten. Als Futter bekamen sie Altromin 1324 und Wasser ad libitum.

Operation

Die Teilhepatektomien wurden in Äther-Narkose nach Higgins und Anderson [15] ausgeführt. Die Scheinteilhepatektomien entsprachen im Haut- und Muskelschnitt, der Manipulation an der Leber und der Wundversorgung den Teilhepatektomien. Die Tötungszeit lag bei $8.55 \text{ Uhr} \pm 35 \text{ min}$. Die Operationszeit wurde entsprechend darauf abgestimmt. Die Tiere wurden durch Punktion der Aorta an der Bifurcatio aortae entblutet. Die ersten 4,5 ml Blut wurden zur Bestimmung von Insulin und Glukagon verwendet, das restliche Blut zur Bestimmung der sauren Phosphatase im Serum. Die Leber wurde gewogen, und etwa 1 g schwere Leberstücke zur Messung von saurer Phosphatase sofort weiterverarbeitet. Die Restleber wurde zur Bestimmung von cAMP in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Bestimmung von Insulin und Glukagon im Plasma

4,5 ml Blut wurden in einer Spritze, die 0,5 ml einer eisgekühlten Trasylo-EDTA- Na_2 -Lösung enthielt (5 mg EDTA- Na_2 in 0,25 ml 0,9% NaCl-Lösung und 0,25 ml Trasylo[®] \cong 2500 K. I. E.) aufgenommen und in ein eisgekühltes Reagenzglas gegeben. Das nach Zentrifugation bei 4°C gewonnene Plasma wurde bis zur Bestimmung bei -20°C aufbewahrt.

Insulin

Immunoreaktives Insulin im Plasma wurde nach dem von Herbert [16] modifizierten Radioimmunoassay nach Yalow-Berson [17] bestimmt.

Glukagon

Immunoreaktives Glukagon im Plasma wurde radioimmunologisch [18] unter Verwendung von Antiserum 30 K bestimmt, das sehr spezifisch für pankreatisches Glukagon ist.

Bestimmung von cAMP in der Leber

Die Leberproben wurden nach einem modifizierten Verfahren nach Gilman [19] aufbereitet und mittels eines handelsüblichen Radioisotopen-Verdünnungstestsatzes (Nr. 15289, Boehringer, Mannheim) bestimmt. Die hierbei erhaltenen Werte geben Konzentrationen bezogen auf das Leberfeuchtgewicht wieder. Mittels der von Murray [20] gefundenen Veränderung des Hepatocytenvolumens nach Teilhepatektomie konnte die prozentuale Veränderung des cAMP-Gehaltes/Hepatocyt bestimmt werden.

Bestimmung der sauren Phosphatase

Im Serum

Die saure Phosphatase im Serum wurde mit einem handelsüblichen Reagenziensatz (Merckotest Nr. 3305, E. Merck, Darmstadt) binnen 60 Minuten nach Serumgewinnung bestimmt.

Im Zytosol der Leberzellen

Etwa 1 g schwere Leberstückchen wurden zusammen mit 9 Teilen einer Lösung von 0,32 M Sucrose und 3 mM MgCl_2 in einem Elvehjem-Potter homogenisiert (10 leichte Schläge bei 1200 Upm). 3 ml des Homogenats wurden 15 min bei $100 \times g$ zentrifugiert, 2 ml des Überstandes weiterhin bei $15000 \times g$ und 20 min. 1 ml Überstand wurde nach Verdünnung mit 0,9% physiologischer NaCl-Lösung zur photometrischen Bestimmung der sauren Phosphatase (Merckotest Nr. 3305) verwendet.

In der gesamten Leberzelle

Leberstückchen wurden mit 0,1% Triton X-100 homogenisiert (10 kräftige Schläge bei 1500 Upm). Die weiteren Schritte verliefen wie vorstehend. Auch hier wurde die prozentuale Veränderung des Gehaltes an saurer Phosphatase im Zytosol sowie in der gesamten Leberzelle mittels der von Murray [20] übernommenen Daten bestimmt.

Ergebnisse

Insulin (Abb. 1)

Bereits 15 Minuten nach Teilhepatektomie tritt ein starker Abfall der Plasmainsulin-Konzentration ein, der nach 2 Stunden seinen Tiefpunkt erreicht. Mit $5,0 \pm 0,5 \mu\text{E/ml}$ Plasma findet sich ein Abfall auf etwa $1/9$ des Ausgangswertes von $44,5 \pm 4,4 \mu\text{E/ml}$ Plasma.

Das immunreaktive Insulin scheinheilhepatektomierter Tiere zeigt ebenfalls einen initialen Abfall in der ersten postoperativen Stunde. Bereits in der 12. Stunde wird aber der Ausgangswert mit $43,25 \pm 5,12 \mu\text{E/ml}$ Plasma fast wieder erreicht.

Glukagon (Abb. 2)

Dem schnellen Abfall des Insulins nach Teilhepatektomie steht ein Anstieg der Glukagon-Konzentration gegenüber. Die Plasmakonzentration liegt 12 Stunden nach Teilhepatektomie mit $1872 \pm 318 \text{ pg/ml}$ Plasma etwa 5–6mal höher als die Ausgangskonzentration von $347 \pm 34 \text{ pg/ml}$ Plasma. Auch nach 48 Stunden ist sie noch stark erhöht, unterschreitet jedoch 7 Tage nach Teilhepatektomie mit $158 \pm 19 \text{ pg/ml}$ Plasma den Ausgangswert. Das anfängliche Absinken der Glukagon-Konzentration postoperativ findet sich entsprechend auch bei scheinoperierten Tieren. Dieses gleichartige Verhalten ver-

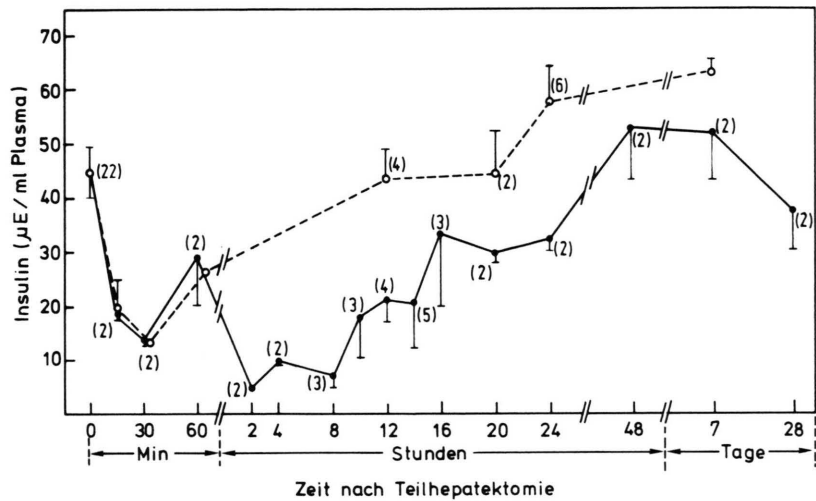


Abb. 1. Immunreaktives Insulin im Plasma ($\mu\text{E/ml}$ Plasma) im Zeitverlauf nach Teilhepatektomie —●—; und nach Scheinteilhepatektomie —○—. Die einzelnen Punkte ergeben sich aus $\bar{X} \pm \text{S.D.}$; in Klammern die jeweilige Anzahl der Bestimmungen.

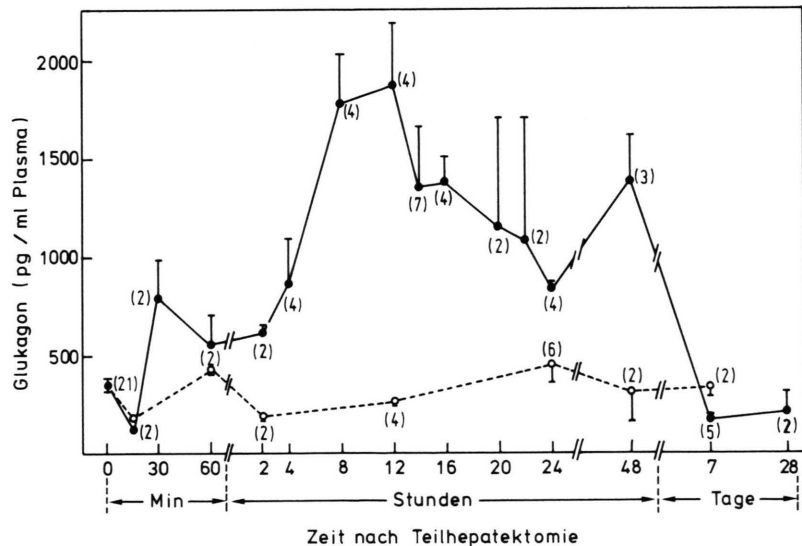


Abb. 2. Immunreaktives Glukagon im Plasma (pg/ml Plasma) nach Teilhepatektomie —●—; nach Scheinteilhepatektomie —○—.

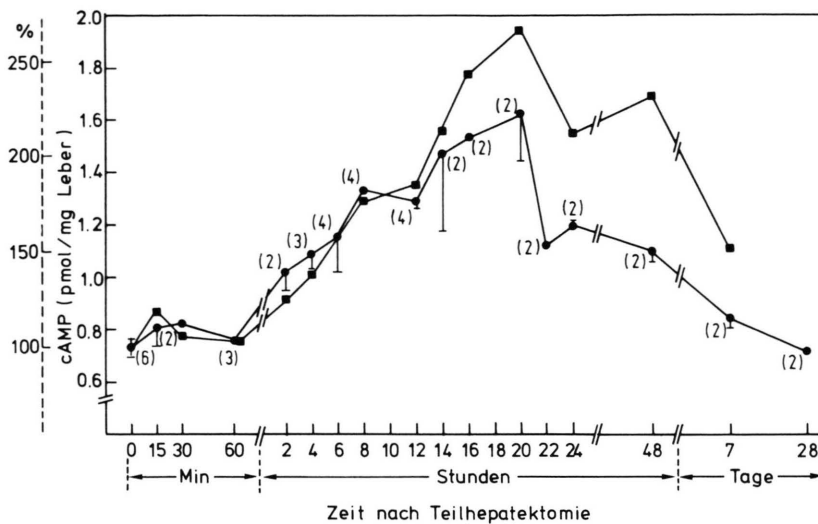


Abb. 3. 3',5'-cyclic AMP-Konzentration nach Teilhepatektomie in pmol/mg Leberfeuchtgewicht —●—; als prozentuale Veränderung gegenüber dem Ausgangswert —■—.

schiedener Parameter, wie auch der Insulin-Konzentration im Plasma, der Glukose-Konzentration im Vollblut [21], in der frühen postoperativen Phase sowohl nach Teilhepatektomie wie auch nach Scheinteilhepatektomie, ist vermutlich eine unspezifische Reaktion auf die Operationsbelastung.

cAMP (Abb. 3)

Mit einer Verzögerung von einigen Stunden gegenüber dem Anstieg der Glukagon-Konzentration im Plasma steigt die cAMP-Konzentration in der Leber auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes von $0,73 \pm 0,02$ pmol/mg Leber mit einem Maximum von $1,62 \pm 0,18$ pmol/mg Leber nach 20 Stunden. Bezogen auf den einzelnen Hepatozyten steigt der cAMP-Gehalt um maximal 166,5%.

Saure Phosphatase in der gesamten Leberzelle (Abb. 4A)

Die Aktivität der sauren Phosphatase sinkt nach einem kurzfristigen Anstieg und darauffolgenden Abfall in der ersten postoperativen Stunde allmählich um etwa 40% nach 16–24 Stunden. Die Enzymaktivität in Lebern scheinoperierter Tiere bleibt hingegen etwa konstant.

Legt man jedoch die postoperative Volumenänderung der Hepatozyten [20] zugrunde, zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in der Enzymaktivität/Einzelle zwischen teilhepatektomierten und scheinhepatektomierten Tieren (Abb. 4B).

Der Verlauf der Aktivität der sauren Phosphatase im Zytosol (Abb. 4A, 4B) verhält sich entsprechend.

Die Serumaktivität der sauren Phosphatase steigt 24 Stunden postoperativ etwa um das Dreifache an. Nach 7 Tagen werden die Ausgangswerte wieder erreicht (Abb. 4C).

Besprechung

Insulin

Der starke Abfall der Insulin-Konzentration nach Teilhepatektomie ist in Anbetracht der von der Mehrzahl der Autoren gefundenen proliferationssteigernden Wirkung von Insulin *in vivo* [7, 9] und *in vitro* [6, 8] überraschend. Leffert [3] spricht von einem Insulin-Paradox. Da jedoch in der ersten postoperativen Stunde nach Scheinteilhepatektomie ebenfalls ein deutlicher Abfall der Insulin-Konzentration eintritt, ist anzunehmen, daß es sich wenigstens zum Teil um eine unspezifische Erscheinung handelt.

Glukagon

Ob der Anstieg der Glukagon-Konzentration im Plasma nach Teilhepatektomie bei der Regelung der Leberzellproliferation von Bedeutung ist, läßt sich aus unseren Versuchen nicht beantworten. Eine alleinige Zufuhr von Glukagon zeigt in *in vivo* keine stimulierende Wirkung [11, 13], *in vitro* waren die Ergebnisse widersprüchlich [6, 8, 12]. In Kombination mit anderen Stoffen, wie z. B. Insulin, Thyro-

Abb. 4A. Aktivität der sauren Phosphatase (E/mg Leberfeuchtgewicht als prozentuale Änderung gegenüber der Ausgangsmenge) in gesamten Leberzellen (obere Kurven); im Zytosol von Leberzellen (untere Kurven); nach Teilhepatektomie —●—; nach Scheinteilhepatektomie --○--.

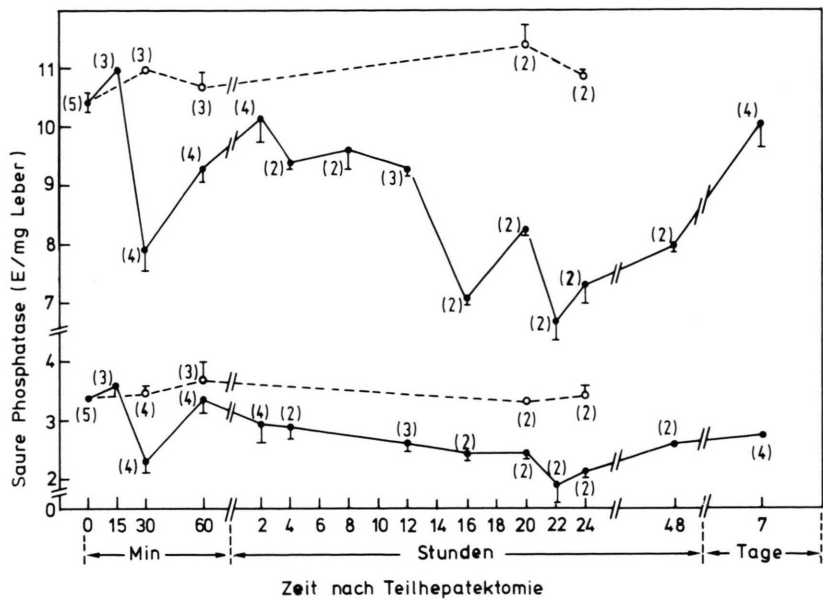
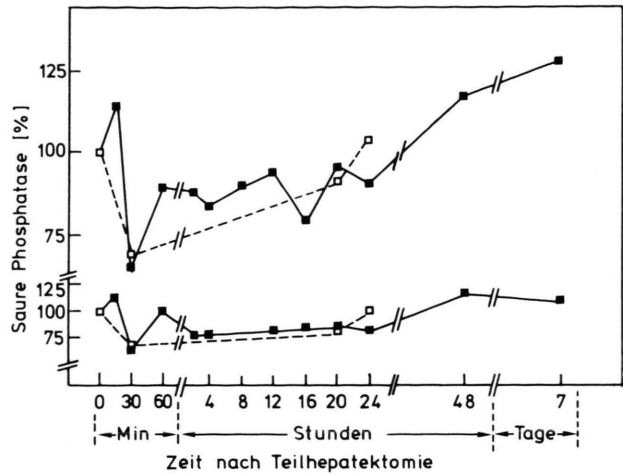


Abb. 4B. Prozentuale Veränderung der Aktivität der sauren Phosphatase gegenüber dem Ausgangswert, sonst entsprechend Abb. 4A.

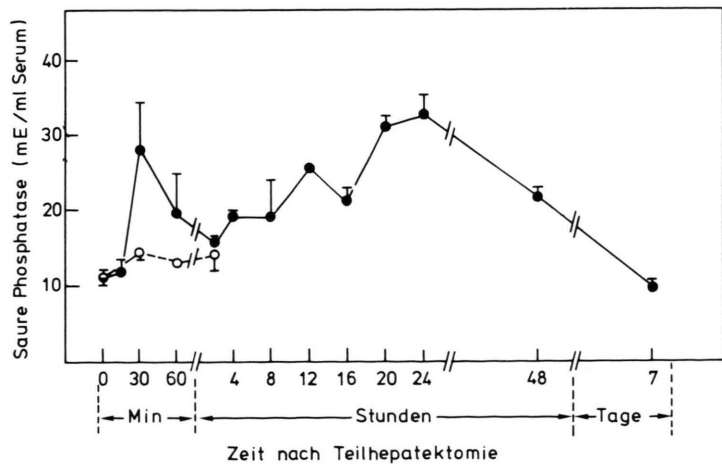


Abb. 4C. Aktivität der sauren Phosphatase im Serum (mE/ml Serum) nach Teilhepatektomie —●—; nach Scheinteilhepatektomie --○--.

nin, Katecholaminen, Aminosäuren, zeigte Glukagon *in vivo* allerdings eine überwiegend stimulierende Wirkung auf die Leberzellproliferation [7, 11, 13, 22, 23]. Die unterschiedlichen Versuchsanordnungen und Dosierungen der applizierten Substanzen, die meist im pharmakologischen Bereich liegen, lassen jedoch nur schwer Vergleiche und Schlüsse zu.

Durch Langzeitinfusionen unterschiedlicher Mengen von Glukagon versuchten wir das hier gefundene Verhalten des immunoreaktiven Glukagons nach Teilhepatektomie nachzuahmen. Dabei ergab sich eine deutlich suppressive Wirkung des zugeführten Glukagons auf die DNA-Syntheserate nach Teilhepatektomie [24].

cAMP

Das Verhalten von Glukagon und Insulin steht mit der gefundenen Zunahme der cAMP-Konzentration in Einklang. Jefferson [25] bestätigte, daß Insulin einen Abfall der cAMP-Konzentration in der Leberzelle bewirkt. Die *in vivo* wie *in vitro* gefundene Stimulierung der Adenylatzyklase-Aktivität in der Leber durch Glukagon wird durch Insulin antagonisiert [26]. Durch Infusion einer Mischung von Glukagon, Thyronin, Aminosäuren und Heparin konnte MacManus den nach Teilhepatektomie gefundenen Anstieg der cAMP-Konzentration in der Leber nicht teilhepatektomierter Ratten nachahmen [27]. In beiden Fällen folgte dem Maximum des cAMP-Anstieges etwa 8 bis 10 Stunden später der Gipfel einer DNA-Synthese.

Saure Phosphatase

Die von unserer Arbeitsgruppe elektronenmikroskopisch gefundene prozentuale Zunahme der Lyso-

somen/Leberzelle auf etwa das Doppelte nach Teilhepatektomie [28], findet keine Entsprechung in einer Aktivitätszunahme der sauren Phosphatase. Die Aktivität des Enzyms fällt im Gegenteil postoperativ sowohl nach Teilhepatektomie als auch nach Scheinteilhepatektomie im Zytosol und in der gesamten Leberzelle gleichermaßen ab. Die Unspezifität des Enzyms erlaubt keine Aussage, ob dieser Aktivitätsverlust etwa eine Histonphosphorylierung [29, 30] mit einer möglicherweise nachfolgenden DNA-Synthese begünstigt.

Metabolische Veränderungen nach Teilhepatektomie [22] scheinen eine vermehrte Ausschüttung von Glukagon in das Portalblut zu bewirken. Wie jedoch in ref. [24] gezeigt wird, kommt dem Verhalten von Glukagon offenbar keine ursächliche Bedeutung bei der Stimulation der Leberzellproliferation nach Teilhepatektomie zu. Es handelt sich demnach lediglich um einen unspezifischen Begleiteffekt.

Danksagung

Herr Dr. Roger H. Unger, University of Texas, Medical School and the Veterans Administration Hospital, Dallas, Texas, USA, überließ uns freundlicherweise das Antiserum 30 K für die Glukagonbestimmung.

Die Firma Eli Lilly, Inc., Indianapolis, USA, stiftete Rinder- und Schweine-Glukagon und die Bayer AG, München, das verwendete Trasylol®.

Für technische Assistenz danken wir Frau M. Hiller und Frau B. Schmid, Institut für Diabetesforschung, Städt. Krankenhaus München-Schwabing.

- [1] N. L. R. Bucher, U. Patel u. S. Cohen, Hepatrophic Factors, Ciba Foundation Symposium **55**, 95, Elsevier, Amsterdam 1978.
- [2] M. Goldberg, W. Strecker, D. A. Feeny u. G. Ruhenstroth-Bauer, Hormone and Metabol. Res., im Druck.
- [3] H. L. Leffert u. K. S. Koch, Hepatotropic Factors, Ciba Foundation Symposium **55**, 61, Elsevier, Amsterdam 1978.
- [4] G. Ruhenstroth-Bauer, M. Goldberg, S. Silz u. W. Strecker, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 543 (1978).
- [5] T. E. Starzl, J. Terblanche, K. A. Porter, A. F. Jones, S. Usui u. G. Mazzoni, Lancet **i**, 127 (1979).
- [6] U. Armato, E. Draghi u. P. Andreis, Endocrinology **102**, 1155 (1978).
- [7] L. R. Duguay, W. P. Skivlocki, S. Lee u. M. J. Orloff, Gastroenterology **72**, 1053 (1977).
- [8] H. L. Leffert, J. Cell Biol. **62**, 792 (1974).
- [9] T. E. Starzl, K. A. Porter u. W. P. Putnam, Lancet **ii**, 1241 (1975).
- [10] J. C. Sgro, A. C. Charters, D. E. Grambort, C. Broelsch u. M. J. Orloff, Digestion **10**, 244 (1974).
- [11] N. L. R. Bucher u. M. N. Swaffield, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 1157 (1975).
- [12] U. Junge u. W. Creutzfeldt, Hepatotropic Factors, Ciba Foundation Symposium **55**, 269, Elsevier, Amsterdam 1978.
- [13] K. Hasegawa u. M. Koga, Life Sci. **21**, 1723 (1977).
- [14] S. R. Bloom, Hepatotropic Factors, Ciba Foundation Symposium **55**, 161 Elsevier, Amsterdam 1978.

- [15] G. M. Higgins u. R. M. Anderson, Arch. Path. (Chicago) **12**, 186 (1931).
- [16] V. Herbert, K. S. Lau, C. W. Gottlieb u. S. Bleicher, J. Clin. Endocr. **25**, 1375 (1965).
- [17] R. S. Yalow u. S. A. Berson, J. Clin. Invest. **39**, 1157 (1960).
- [18] I. Böttger u. G. Löffler (H. Schwiebk, Hrsg.), Handbuch der Inneren Medizin, III/6, 368–400, Springer-Verlag, Berlin 1976.
- [19] A. G. Gilman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68**, 305 (1970).
- [20] A. B. Murray, W. Strecker, S. Silz u. G. Ruhenstroth-Bauer, Acta Hepato-Gastroenterol., im Druck.
- [21] W. Strecker, S. Silz, A. Salem u. G. Ruhenstroth-Bauer, in Vorbereitung.
- [22] J. P. MacManus, D. J. Franks, T. Youdale u. B. M. Braceland, Biochem. Biophys. Res. Commun. **49**, 475 (1974).
- [23] J. Short, R. F. Brown, A. Husakowa, J. R. Gilbertson u. R. Zemel, J. Biol. Chem. **247**, 1757 (1972).
- [24] W. Strecker, M. Goldberg, D. A. Feeny u. G. Ruhenstroth-Bauer, Acta Hepato-Gastroenterol., im Druck.
- [25] L. S. Jefferson, J. H. Exton, R. W. Butcher, E. W. Sutherland u. C. R. Park, J. Biol. Chem. **243**, 1031 (1968).
- [26] J. H. Exton, S. B. Lewis, R. J. Ho, G. A. Robinson u. C. R. Park, Ann. N. Y. Ac. Sci. **185**, 85 (1971).
- [27] J. P. MacManus u. J. F. Withfield, Prostaglandins **6**, 475 (1974).
- [28] A. B. Murray, W. Strecker, S. Silz u. G. Ruhenstroth-Bauer, unveröffentlicht.
- [29] T. A. Langan, Biochemistry **64**, 1276 (1969).
- [30] W. S. Stevely u. L. A. Stocken, Biochem. J. **110**, 187 (1968).