

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01398

## 阻塞性胆汁淤积大鼠肝脏胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶和核受体 FXR、SHP 表达变化

吴晓平, 柴进, 陈文生\*

第三军医大学西南医院全军消化病研究所, 重庆 400038

**[摘要]** **目的:**通过建立梗阻性黄疸动物模型,观察胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP7A1)、类法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)及小异源二聚体伴侣受体(small heterodimer partner, SHP)的表达变化,并分析 CYP7A1 和 FXR、SHP 之间的关系。**方法:**采用胆总管结扎术制备大鼠梗阻性黄疸模型,分别于术后 1、3、14 d 麻醉后放血处死。取大鼠肝脏,抽提总 RNA,采用实时定量 RT-PCR 检测 CYP7A1 mRNA 表达;提取肝细胞核蛋白,采用蛋白质印迹技术检测 FXR 和 SHP 蛋白表达。**结果:**与假手术对照组相比,梗阻性黄疸组大鼠肝细胞 CYP7A1 mRNA 表达明显增强,FXR 和 SHP 蛋白表达同步降低,差异均有统计学意义( $P < 0.001, P < 0.05$ )。**结论:**CYP7A1 表达增强可能与 FXR、SHP 表达减弱有关。

**[关键词]** 胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶;类法尼醇 X 受体;小异源二聚体伴侣受体;阻塞性黄疸

**[中图分类号]** R 575.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)12-1398-04

### Changes of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, farnesoid X receptor, and small heterodimer partner expression in liver tissues of rats with obstructive cholestasis

WU Xiao-ping, CHAI Jin, CHEN Wen-sheng\*

Institute of Gastrointestinal Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the changes of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase(CYP7A1), farnesoid X receptor(FXR), and small heterodimer partner (SHP) expression in liver tissues of bile duct ligated (BDL) rats, and to analyze the relationship between their expression. **Methods:** Obstructive cholestasis rat model was induced by bile duct ligation, and rats were sacrificed on day 1, 3, and 14 after operation. The hepatic tissues were collected and the total mRNA was extracted. The CYP7A1 mRNA expression was determined by real-time RT-PCR. The protein expression of FXR and SHP in the nuclei was determined by Western blotting analysis. **Results:** Compared with sham-operated group, experimental obstructive cholestasis group had significantly enhanced CYP7A1 mRNA expression and decreased FXR, SHP expression( $P < 0.001, P < 0.05$ ). **Conclusion:** The up-regulation of CYP7A1 may be associated with the down-regulation of FXR and SHP.

**[KEY WORDS]** cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase; farnesoid X receptor; small heterodimer partner; obstructive jaundice

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(12):1398-1401]

胆汁酸是体内胆固醇的溶解剂和肠内脂类的乳化剂,对胆固醇代谢及肝肠内疏水化合物的吸收、清除和转运有重要作用;但其本身也具有细胞毒性,在肝内蓄积可引起肝脏疾病,如胆汁淤积。在体内,胆固醇转化为胆汁酸是胆固醇代谢的主要途径。其中胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP7A1)是经典(中性)途径中的限速酶之一,通常情况下,由 CYP7A1 起始的经典途径在胆汁酸合成中占主导地位。近年来发现体内有多种核受体参与胆汁酸代谢调节,如类法尼醇受体、孕烷 X 受体、肝

X 受体  $\alpha$  等,其中类法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)已被证明是一种胆汁酸受体和胆汁酸合成生物感受器,其通过小异源二聚体伴侣受体(small heterodimer partner, SHP)参与机体胆汁酸代谢调节<sup>[1-2]</sup>。在梗阻性胆汁淤积机体应答调节中,FXR、SHP 及 CYP7A1 的表达有何变化及三者之间的关系如何尚不完全清楚。本研究即对梗阻性黄疸大鼠体内上述三种物质的表达进行了检测,并初步分析了三者之间的关系,为进一步探讨淤积时胆汁酸调节机制提供实验依据。

**[收稿日期]** 2009-06-22 **[接受日期]** 2009-10-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30570842), Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570842).

**[作者简介]** 吴晓平, 硕士生, 讲师、主治医师, E-mail: wxpxh\_2008@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-68754678, E-mail: wenshengchen@hotmail.com

## 1 材料和方法

1.1 动物及试剂 健康雄性 Wistar 大鼠 24 只, 体重 260~300 g, 由第三军医大学实验动物中心提供。细胞总 RNA 提取试剂 Tripure (Roche 公司), SYBRGreen PCR MasterMix (Applied Biosystems 公司), M-MLV 逆转录酶 (Invitrogen 公司), SDS-PAGE 试剂盒 (北京中彬公司), NE-PER 核蛋白抽提试剂盒 (Pierce Biotechnology 公司), FXR、SHP、SHPTP1 (酪氨酸磷酸酯酶) 一抗和羊抗鼠、羊抗兔 IgG-HRP 二抗均购自 Santa Cruz 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备 用数字表随机法将健康雄性 Wistar 大鼠分为 2 组: 梗阻性黄疸 (BDL) 组和假手术对照 (Sham) 组, 每组 12 只动物。按本实验室前期报道中所述方法<sup>[3]</sup>, 所有动物在室温、每日光照/黑夜循环条件下, 分笼以标准饲料喂养, 自由饮水。手术前禁食 12 h。BDL 组以 2.5% 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 剑突下纵形切口进腹, 沿肝十二指肠韧带找到胆总管, 在十二指肠上方丝线双重结扎切断胆总管, Sham 组仅游离胆总管而不予结扎切断。分别于术后 1、3、14 d 将两组大鼠各 4 只麻醉后放血处死, 取肝脏立即冻存于液氮, 备用。

1.2.2 实时定量 RT-PCR 检测 CYP7A1 mRNA 表达 将新鲜肝脏匀浆, 用 Tripure 试剂提取总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 质量和浓度。大鼠 Cyp7A1 上游引物: 5'-GCG CTG TCT GGG TCA CG-3'; 下游引物: 5'-GCG TTA GAT ATC CGG CTT AAA-3'; 探针: 5'-AGG GAT GTA TCG CTT CTG CTA CCG AGT GAT-3'; GAPDH 作为内参。反转录得到 cDNA, 取 cDNA 2、1、0.5、0.25 ml 制作标准曲线。反应条件: 所有样品 50℃ 孵育 2 min, 95℃ 10 min, 然后 90℃ 15 s, 60℃ 1 min, 共 40 个循环。操作系统为美国 7300 实时定量 PCR 系统。

1.2.3 肝组织核蛋白提取 用 NE-PER 核蛋白抽提试剂盒提取, 具体操作按试剂盒说明书进行。用 Bio-Rad 核酸蛋白仪测定提取液的蛋白浓度之后将提取液放入 -70℃ 冰箱保存, 备用。

1.2.4 蛋白质印迹法检测 FXR、SHP 的表达 用 SHPTP1 蛋白作内参照。分别取核蛋白 20  $\mu$ g 与等体积上样缓冲液混匀, 100℃ 孵育 5 min 变性, 冷却后上样, 12% SDS-PAGE 分离, 然后电转移至硝酸纤维素膜, 丽春红染色确定上样的均一性和电转移效率, 用含 2% 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 2 h, 分别

加入 FXR、SHP 一抗 (1 : 100) 4℃ 孵育过夜, 用 PBST 洗去一抗后加入相应的二抗 (1 : 2 000), 室温孵育 2 h。FXR、SHP 蛋白质印迹所用的同一硝酸纤维素膜上免疫复合物经洗脱以后, 分别再与另一胞质蛋白 SHPTP1 的抗体孵育, 蛋白质印迹检测 SHPTP1, 并以此条带确定上样量。DAB 显色后用凝胶成像系统照像记录, 然后用 Quantity one 分析软件测定目的条带的负相光密度 ( $D$ )。实验重复 3 次, 表达蛋白定量用目的条带负相  $D$  值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

2.1 肝组织 CYP7A1 mRNA 表达 分别于胆总管结扎手术后 1、3、14 d 定量检测 BDL 组与 Sham 组 CYP7A1 mRNA, 其表达比值分别是 (195  $\pm$  17.4) %、(240  $\pm$  15.3) %、(350  $\pm$  20.1) %。结果表明, 阻塞性胆汁淤积大鼠肝脏 CYP7A1 mRNA 表达随胆道阻塞时间延长逐渐增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 1)。

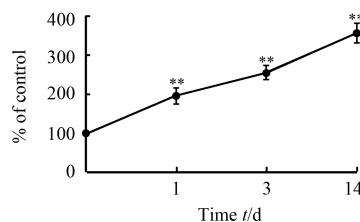


图 1 Real-time RT-PCR 检测 CYP7A1 mRNA 表达

Fig 1 Expression of CYP7A1 mRNA as examined by real-time RT-PCR

$n=4, \bar{x} \pm s, ** P < 0.01$  (One-way analysis of variance)

2.2 肝组织核受体 FXR 的表达变化 蛋白质印迹检测 FXR 蛋白在 BDL 组及 Sham 组术后 1、3、14 d 的结果显示, FXR 蛋白随胆淤时间的增加表达逐渐减弱, Sham 组无明显变化。二组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

2.3 肝组织核受体 SHP 的表达变化 蛋白质印迹检测 SHP 蛋白在 BDL 组及 Sham 组术后 1、3、14 d 的结果显示, SHP 蛋白随胆淤时间的增加表达逐渐降低, Sham 组无明显变化。二组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

## 3 讨论

胆汁酸是胆固醇的代谢终产物, 其生成有两条途径: 经典 (中性) 途径和替代 (酸性) 途径, 胆固醇

7 $\alpha$ -羟化酶(CYP7A1)和胆固醇 27 $\alpha$ -羟化酶(CYP27)分别是这两条途径的限速酶,其中由 CYP7A1 限速的经典途径在胆汁酸合成中占主导地位。正常情况下,胆汁酸的合成由体内负反馈机制调整,有多种核受体参与这种调节<sup>[4-6]</sup>,如类法呢醇受体(FXR)、孕烷 X 受体(PXR)、组成性雄烷受体(CAR),肝 X 受体  $\alpha$ (LXR $\alpha$ ),维生素 D 受体(VDR)和过氧化物酶增

殖物激活受体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )等。它们作为转录因子,可结合特异性配体启动子的反应元件,在转录水平调节参与胆汁酸代谢的关键酶和转运体的基因表达,从而调节体内胆汁酸水平。这对治疗胆汁酸代谢相关疾病有重要意义。已有报道胆汁酸代谢相关核受体激活或拮抗配体可用于治疗胆汁淤积<sup>[7-8]</sup>。

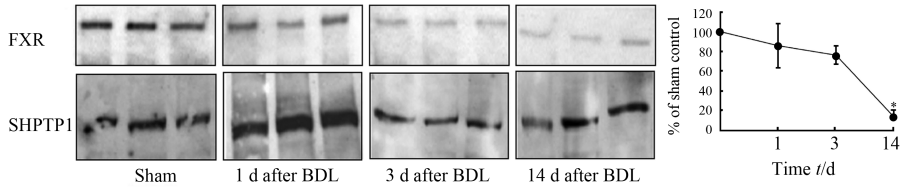


图 2 FXR 蛋白术后 1、3、14 d 的表达变化

Fig 2 Change of FXR protein expression in sham-operated and BDL groups on day 1,3, and 14 after operation

$n=4, \bar{x} \pm s, * P < 0.05$  (One-way analysis of variance)

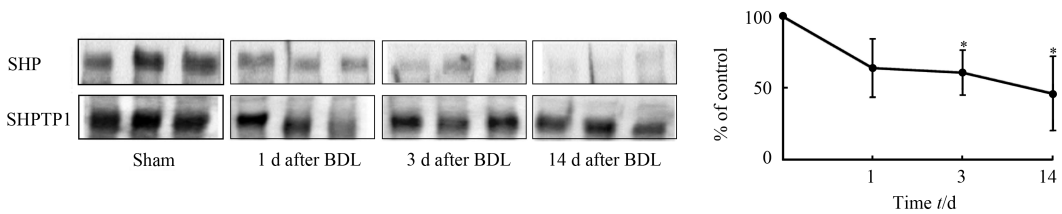


图 3 SHP 蛋白术后 1、3、14 d 的表达变化

Fig 3 Change of SHP protein expression in sham-operated and BDL groups on day 1,3, and 14 after operation

$n=4, \bar{x} \pm s, * P < 0.05$  (One-way analysis of variance)

类法呢醇 X 受体(FXR)是胆汁酸受体之一,又称为胆汁酸感应器,具有典型的核受体结构,含有与 DNA 结合及二聚化有关的锌指结构;主要在肝肠系统、肾脏、肾上腺表达,在心、肺、脂肪和胃也有低水平表达<sup>[9]</sup>。FXR 是参与调控胆汁酸代谢过程的主要核受体之一,主要靶基因包括 CYP7A1、磷脂转移蛋白、小异源二聚体伴侣受体(SHP)基因等。胆汁酸在转录水平抑制胆固醇 7 $\alpha$ 1 单加氧酶基因的表达,抑制 CYP7A1 活性<sup>[10]</sup>。不同胆汁酸激活 FXR 的效率也不同<sup>[6,11]</sup>。小异二聚体伴侣(SHP)是一种特殊的核受体,它没有 DNA 结合域,主要表达在肝脏。SHP 可通过与其他核受体家族成员的相互作用,抑制核受体介导的转录活性<sup>[2,12]</sup>。在肝脏,它可以与 CYP7A1 启动子肝受体同源物 1(liver receptor homologue-1,LRH-1)形成一个抑制性复合物,从而阻断 CYP7A1 和其他 LRH-1 靶基因(如 CYP8B1 和 SHP 本身)的转录,也可以通过与其他特异受体如甲胎蛋白转录因子作用,抑制 CYP7A1 的表达,还可以和肝脏核因子 4 $\alpha$  结合来抑制 CYP8B1 和

CYP27A1 的转录<sup>[13]</sup>。通过上述这些作用,SHP 可实现对胆汁酸的精密调节。

本研究结果显示,阻塞性胆汁淤积大鼠肝脏 CYP7A1 表达随胆道阻塞时间延长逐渐增强,而 FXR 和 SHP 表达却同时降低。以往有研究报道,FXR 被激活后可抑制 CYP7A1 转录,使胆汁酸合成速度下降,说明 FXR 对 CYP7A1 具有负性调节作用<sup>[14]</sup>。本实验中 FXR 表达减少同时 CYP7A1 活性增强,与此相一致。已有实验证明 FXR 并不是直接与 CYP7A1 结合而抑制后者转录,CYP7A1 基因启动子序列中没有 FXR 结合点,它是通过间接诱导转录抑制因子 SHP 而发挥作用。SHP 与 CYP7A1 启动子 LRH-1 形成抑制性复合物,LRH-1 是 CYP7A1 的强烈激活剂,被抑制后可阻断 CYP7A1 转录<sup>[15]</sup>。本实验中大鼠胆总管被阻断后 SHP 表达降低,与 FXR 表达相一致。因此作如下推测:在阻塞性胆汁淤积大鼠肝脏中,FXR 表达下降,其诱导作用下降,致 SHP 表达下降;SHP 表达下降使其对 CYP7A1 转录抑制作用减弱,从而使 CYP7A1 表达

增强, 由此实现对胆汁酸代谢的精密调节。对阻塞性胆汁淤积大鼠, 上述是一种现象分析, 确证还需做进一步深入的工作。但这对于研究胆汁酸代谢调节的分子机制, 探索新药, 指导临床安全、合理用药有着重要意义。

### [参考文献]

- [1] Tu H, Okamoto A Y, Shan B. FXR, a bile acid receptor and biological sensor[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2000, 10: 30-35.
- [2] Goodwin B, Jones S A, Price R R, Watson M A, McKee D D, Moore L B, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis[J]. *Mol Cell*, 2000, 6: 517-526.
- [3] 吴晓平, 柴进, 何宇, 王槐志, 夏锋, 陈文生. 阻塞性胆汁淤积大鼠肝细胞 MRP3 与 Lrh-1 蛋白表达的关系[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2008, 20: 232-234.
- [4] 李小林, 朱心强. 胆汁酸代谢相关核受体的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2007, 21: 152-156.
- [5] Handschin C, Meyer U A. Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR[J]. 2005, 433: 387-396.
- [6] Lee F Y, Lee H, Hubbert M L, Edwards P A, Zhang Y. FXR, a multipurpose nuclear receptor[J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31: 572-580.
- [7] Zhang Y, Edwards P A. FXR signaling in metabolic disease[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582: 10-18.
- [8] Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccar-

- di L, et al. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127: 1497-1512.
- [9] Higashiyama H, Kinoshita M, Asano S. Immunolocalization of farnesoid X receptor (FXR) in mouse tissues using tissue microarray[J]. *Acta Histochem*, 2008, 110: 86-93.
- [10] Chen W, Owsley E, Yang Y, Stroup D, Chiang J Y. Nuclear receptor-mediated repression of human cholesterol 7-hydroxylase gene transcription by bile acids[J]. *J Lipid Res*, 2001, 42: 1402-1412.
- [11] Claudel T, Staels B, Kuipers F. The farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 2020-2030.
- [12] Lee Y S, Chanda D, Sim J, Park Y Y, Choi H S. Structure and function of the atypical orphan nuclear receptor small heterodimer partner[J]. *Int Rev Cytol*, 2007, 261: 117-158.
- [13] Abrahamsson A, Gustafsson U, Ellis E, Nilsson L M, Sahlin S, Björkhem I, et al. Feedback regulation of bile acid synthesis in human liver: importance of HNF-4 $\alpha$  for regulation of CYP7A1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330: 395-399.
- [14] Li H, Xu G, Shang Q, Pan L, Shefer S, Batta A, et al. Decreased ileal bile acid reabsorption lowered plasma cholesterol levels by reducing hepatic FXR activation to stimulate CYP7A1[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124: A159-A160
- [15] Xu G, Anan M, Mark Forman B, Li X, Shefer S, Chiang J Y, et al. CYP7A1 is inhibited by activated FXR via SHP and LRH-1 in cholesterol-fed rabbits[J]. *Gastroenterology*, 2001, 120: A13

[本文编辑] 陈波, 邓晓群

· 消息 ·

## 《第二军医大学学报》征订启事

《第二军医大学学报》(CN31-1001/R, ISSN 0258-879X)是由第二军医大学主办的国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊, 1980年6月创刊。本刊面向全国和海外作者征稿, 主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果。由著名肝胆外科专家、国家最高科技奖获得者吴孟超院士任主编。辟有: 院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、临床病理(例)讨论、病例报告等栏目。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、预防机构人员和高等医药院校的师生。

本刊一直被《中文核心期刊要目总览》确认为综合性医药卫生类核心期刊; 是中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库源期刊; 被包括中国学术期刊综合评价数据库、万方数据——中国数字化期刊群等在内的国内所有重要检索系统收录, 并被荷兰《医学文摘》(EMBASE)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、英国《国际农业与生物科学中心文摘数据库》(CAB Abstracts)、英国《公共健康研究数据库》(Global Health)、《WHO 西太平洋地区医学索引》(WPRIM)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstracts Journal)、波兰《哥白尼索引》(IC)等国际检索系统收录。先后获得“第二届国家期刊奖百种重点期刊奖”、“第三届国家期刊奖提名奖”和“全国高校精品科技期刊奖”, 并被评为“2008年中国精品科技期刊”。

本刊为月刊, A4开本, 80g铜版纸彩色印刷, 每期定价15元, 全年180元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-373), 漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址: 上海市翔殷路800号《第二军医大学学报》编辑部, 邮编: 200433

联系人: 魏学丽 电话: 021-81870787 转 826 分机 E-mail: bxue@smmu.edu.cn 或 bxue304@yahoo.com.cn

http://www.ajsmmu.cn 或 http://journals.smmu.edu.cn