论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2142-03

法尼酯X受体对脂肪酸合酶表达的影响

申丽丽[1*],彭家和[1*],刘 红[2],彭彦孟[3],甘 淋[1],鲁 立[1],张 迁[1],江 渝[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,[3]学员旅,重庆 400038,[2]新桥医院血液内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨法尼酯X受体(farnesoid X receptor,FXR)对脂肪酸合酶(fatty acid synthetase, FAS)表达的影响。**方法** 用FXR激动剂CDCA作用人肝癌细胞株(HepG2),应用RT-PCR和Western blotting分别从mRNA水平和蛋白质水平检测FAS的表达情况。**结果** 用不同浓度的CDCA(25、50、75 μmol/L)分别作用于HepG2细胞,6、12、24、48 h后,FAS mRNA和蛋白质水平呈时间和剂量依赖性下调。**结论** FXR激动剂可抑制脂肪酸合酶的表达。

关键词: 法尼酯X受体;脂肪酸合酶;动脉粥样硬化;甘油三酯;胆汁酸

中图法分类号: Q591.5;R394;R541.402 **文献标识码:** A

Effects of farnesoid X receptor on expression of fatty acid synthetase in HepG2 cells

SHEN Li-li[1], PENG Jia-he[1], LIU Hong[2], PENG Yan-meng[3], GAN Lin[1], LU Li[1], ZHANG Qian[1], JIANG Yu[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, [3]Administration Office of Undergraduates, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of the farnesoid X receptor (FXR) on fatty acid synthetase expression. **Methods** Human hepatoblastoma HepG2 cells were treated with a FXR's agonist, chenodeoxycholic acid (CDCA) at 75 μmol/L for 6, 12, 24 and 48 h respectively, or at 25, 50 and 75 μmol/L for 48 h. Expressions of FAS mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blot analysis respectively. **Results** RT-PCR and Western blot analysis indicated that the mRNA and protein were expressed in a time- and dose-dependent manner in the HepG2 cells treatmented by CDCA. **Conclusion** FXR agonist decreases the expression of fatty acid synthetase.

Key words: farnesoid X receptor; fatty acid synthetase; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是常见的心脑血管疾病,其中甘油三酯(triglyceride, TG)的增高是其形成的重要原因之一[1]。现已明确高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia)是引起冠心病(coronary artery disease, CHD)的独立危险因素。法尼酯X受体(farnesoid X receptor,FXR)是孤儿核受体超家族中的一员,在胆汁酸、甘油三酯代谢、胆固醇代谢中发挥重要作用[2]。因此,研究FXR对甘油三酯合成代谢的调节对于防治AS有重要意义。

FXR又称胆汁酸受体,可被内源性配体胆汁酸激活,在肝脏、肾脏和小肠等组织中高表达[3,4],可以与视黄醇X受体(RXR)形成异二聚体后与靶基因的FXR反应元件(FXR response element,FXRE)结合发挥转录调节作用。脂肪酸合酶(fatty acid synthetase, FAS)是在脂肪酸生物合成过程中将小分子碳单位聚合生成长链脂肪酸的关键酶,存在于肝、肾、脑、肺、乳腺及脂肪等组织[5]。正常情况下,FAS先将乙酰CoA中的二碳合成脂肪酸,再与甘油形成甘油三酯,在脂肪生成中发挥重要作用。目前国内外对FXR调控甘油三酯代谢的研究是一个新的热点,主要集中在FXR对一些靶基因的调控作用上,其中对甘油三酯代谢中酶的研究还很少,尤其是对脂肪酸合酶的研究。本研究以脂肪酸合酶为研究对象,观察FXR激动剂对FAS表

基金项目:第三军医大学留学回国人员启动基金(2006);重庆市自然科学基金计划项目(2007BB5050)
Supported by the Starting Funds for Personnel Returning from Oversea of Third Military Medical University (2006) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5050)

作者简介:申丽丽(1980-),女,山东省德州市人,硕士研究生,主要从事动脉粥样硬化方面的研究。电话:(023)68752842,E-mail: shenlily_828@163.com
*:同等贡献者
通讯作者:江 渝,电话:(023)68752841

收稿日期:2007-07-11;修回日期:2007-09-10

达的影响，以期研究 FXR 对甘油三酯代谢的调控作用。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

HepG2 人肝癌细胞株由本室提供，主要试剂：DMEM 高糖培养基（HyClone 公司），CDCA（chenodeoxycholic acid）（Sigma 公司），Tripure 试剂（Roche 公司），一步法 RT-PCR 试剂盒（Promega 公司），鼠抗人 FAS 单克隆抗体（美国 Santa Cruz 公司），辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗（广州中杉公司），其余试剂均为国产分析纯。

1.2　细胞培养

HepG2 细胞株采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37 ℃、5% 的 CO_2 温箱内培养。2～4 d 更换培养基 1 次，取对数生长期细胞进行实验。按文献[6]的方法，将细胞以 0.5×10^6/孔密度接种至 6 孔细胞培养板中，每孔加培养液为 2 ml 左右，逐孔加入 CDCA（75 μmol/L），分别于加 CDCA 6、12、24、48 h后收集细胞；此外，以加入 DMSO 作为对照组，于 DMSO 作用 6、12、24 h 和 48 h 后收集细胞；其次加入 CDCA，作为实验组，设 3 个剂量，分别是 25、50、75 μmol/L，作用 48 h 后收集细胞，－20 ℃冻存。

1.3　RT-PCR

FAS 和 β-actin 的引物使用 Primer Premier 5.0 自行设计，FAS 和 β-actin 的引物由上海英骏公司合成。序列为：FAS 上游引物：5′-ATCGGCTCCACCAAGTCCAA-3′，下游引物：5′-CCGCGATGTCGTTCAGCA-3′，扩增产物片段为 412 bp。β-actin 上游引物：5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′，下游引物：5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3′，扩增产物片段为 308 bp。采用 Tripure 一步提取法（按 Roche 公司说明书）提取细胞总 RNA，然后逆转录为 cDNA。PCR 按照试剂盒说明书进行操作，采用 50 μl 反应体系。PCR 反应条件：94 ℃变性 5 min 后，94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s 和 72 ℃ 30 s，顺序循环 30 次，最后 72 ℃延伸 7 min。反应结束后取 PCR 产物 10 μl，以含有 0.5 μg/ml 溴化乙锭的 10% 琼脂糖凝胶电泳分离。将凝胶置于 UVP 凝胶成像系统中扫描，进行图像分析，测出 FAS 与 β-actin 的吸光度值。

1.4　Western blotting 检测蛋白质水平

在收集的细胞中加入细胞裂解液进行细胞裂解，于 4 ℃离心 10 min，弃除沉淀，BAC 法进行蛋白定量。取 50 μg 蛋白加入 5 × SDS 凝胶加样缓冲液中，100 ℃加热 5 min 使蛋白质变性。用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离，转 PVDF 膜，丽春红染色观察转移效果，并确定蛋白相对分子质量标准位置。封闭液封闭 2 h，按 1∶500 加入鼠抗人 FAS 一抗，4 ℃孵育过夜，TBST 洗 3 次。1∶5 000 加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗，室温孵育 1 h，TBST 洗 3 次，用辣根过氧化物酶 HRP-ECL 发光法显色。暗室内曝光 X 线胶片，常规方法显影、定影。用 Quantity one 软件（Bio-Rad）对杂交条带进行定量分析，以蛋白条带吸光度和条带面积的乘积作为代表蛋白表达水平的计量资料。

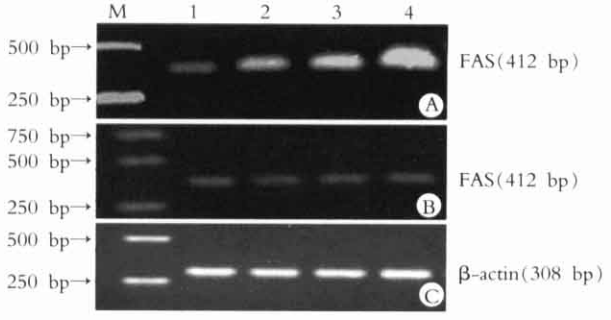
1.5　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，以空白对照条带的灰度值为 1，实验组数据与对照组数据相比取值，两组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　FXR 激动剂 CDCA 下调 FAS 的基因表达

我们用 RT-PCR 检测 HepG2 细胞 FAS mRNA 的表达情况。结果表明，经 CDCA（75 μmol/L）处理的 HepG2 细胞 FAS mRNA 表达明显降低。随着 CDCA（75 μmol/L）作用时间的延长，FAS mRNA 表达逐渐降低（$P<0.05$），且表现为时间依赖型，而对照（DMSO 处理后）无明显变化（$P<0.05$）。6、12、24 h 和 48 h CDCA 处理的 FAS 与 β-actin 的灰度值比值分别从 2.89 降到 1.16，其中 24 h 和 48 h 的 FAS mRNA 水平与对照（DMSO）比较，降低程度最为显著（$P<0.05$）。见图 1。

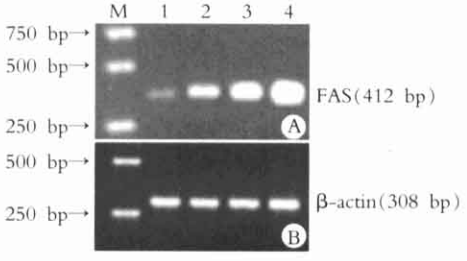


M：DNA 标准（DL 2000）；1：48 h；2：24 h；3：12 h；4：6 h

A：加入 CDCA 后 FAS mRNA 的表达；B：加入 DMSO 后 FAS mRNA 的表达；C：相对应的 β-actin 的表达

图 1　75 μmol/L CDCA 不同作用时间对 FAS mRNA 水平表达的影响

同样，用 CDCA（浓度依次是 25、50、75 μmol/L）处理细胞 48 h 后，随着剂量的增大，FAS mRNA 水平也有明显的下降。除此之外，CDCA 处理的 FAS 与 β-actin 的灰度值比值也由 25 μmol/L 时的 2.83 降到 75 μmol/L 时的 1.13。见图 2。



M：DNA 标准（DL 2000）；1：CDCA 75 μmol/L；2：CDCA 50 μmol/L；3：CDCA 25 μmol/L；4：DMSO

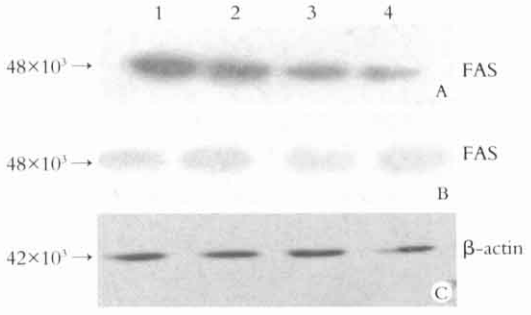
A：加入不同浓度的 CDCA 75、50、25 μmol/L 和 DMSO 处理 48 h 后 FAS mRNA 的表达；B：相对应的 β-actin 的表达

图 2　不同浓度 CDCA 作用 48 h 后对 FAS mRNA 水平的影响

2.2　FXR 激动剂对 HepG2 细胞 FAS 蛋白质表达的影响

HepG2 细胞 CDCA（75 μmol/L）处理 6、12、24 h 和 48 h 后，提取细胞总蛋白质经 Western blotting 检测显示，FAS 蛋白质表达也受到明显抑制（$P<0.05$），蛋白质水平的结果与 FAS mRNA 表达水平相一致，而 DMSO 处理的细胞却无明显变化（$P>$

0.05)。见图3。



1：6 h；2：12 h；3：24 h；4：48 h

A：加入 CDCA 后 FAS 的蛋白表达；B：加入 DMSO 后 FAS 的蛋白表达；C：相对应的 β-actin 的表达

图3 75 μmol/L CDCA 对 FAS 蛋白质水平的诱导

3 讨论

目前，研究已经证实 FXR 参与调控甘油三酯代谢[7]，发现 FXR 基因敲除小鼠血浆甘油三酯含量增高[8]。FXR 对血浆和肝脏甘油三酯的调节主要通过两个途径：一是降解血浆中的甘油三酯，主要通过调控与其代谢密切相关的酶类以及一些重要脂蛋白和相应受体的表达来发挥作用。如 FXR 可诱导 Syndecan-1（SDC1）的转录，降低血浆甘油三酯[9]。SDC1 是跨膜的乙酰肝素硫酸盐蛋白聚糖的家族成员，通过脂蛋白脂肪酶、ApoE、肝脂酶等桥蛋白与脂蛋白相连，在肝脏清除脂蛋白残粒中发挥作用。另 1 个途径是抑制肝脏合成新的脂肪。FXR 由胆汁酸激活后可激活小异二聚体伴侣分子（small heterodimer partner，SHP）的表达，SHP 是一种抑制性核受体，可通过抑制肝 X 受体（liver X receptors，LXR）的激活而下调甾醇调节元件结合蛋白 1c（sterol regulatory element-binding proteins，SREBP-1c）的表达，最终使血浆中 TG 含量减少。SREBP-1c 负责调控脂肪合成相关基因的表达，在肝脏合成新的脂肪中发挥重要的作用。

本研究结果显示，当不同浓度的 FXR 激动剂作用于 HepG2 细胞后，FAS 在 mRNA 水平和蛋白质水平上都有明显的下调。在 mRNA 水平上，相同剂量的 CDCA 处理的 FAS 48 h 和 6 h 相比，其 mRNA 水平几乎降低了 50%，其抑制程度和 CDCA 的剂量呈量效关系，两者呈负相关。同样，在蛋白质水平上也出现雷同的现象。推测其机制可能是通过抑制肝脏合成新的脂肪这条途径发挥作用。FAS 是 SREBP-1c 调控的下游基因，FXR 通过 SHP 下调 SREBP-1c 和 FAS 的表达，使血浆中甘油三酯含量减少，保持血液中胆固醇和甘油三酯的内环境稳定。然而新近研究报道，FXR 只在短时间内（大约 24 h）下调 FAS 的表达，随后转变为上调 FAS[10]。其机制推测可能是因为 FXR 由胆汁酸激活后激活了 SHP，通过 SHP 下调 FAS。但这只是短暂的，随着胆汁酸和胆固醇浓度的持续升高，需要大量的脂肪酸供胆固醇酯化。因此，SHP 对 FAS 的抑制作用不再占主导地位，随即转变为胆汁酸调控脂肪的形成，即胆汁酸通过 FAS 启动子 IR-1 对 FAS 进行调节，促进 FAS 生成大量的脂肪酸供胆固醇酯化，实现胆固醇的储存。本研究仅做了 CDCA 作用 48 h 内 FAS 的表达情况，与文献[10]报道的 SHP 在短时间内抑制 FAS 的表达是一致的。

总之，我们可以推断 FAS 可能是 FXR 作用于人肝脏的 1 个新的靶基因，但 FXR 调节 FAS 的作用机制还需要进一步了解。这可能是胆汁酸在人肝细胞中调节脂肪酸代谢的新机制。因而，下一步我们可以考虑进行动物模型实验来研究在长时间内胆汁酸和胆固醇持续升高下 FAS 的表达情况。通过研究这种机制和通路，我们可以寻找到治疗 AS 的新药物和手段，这对于防治动脉粥样硬化具有重要意义。

参考文献：

[1] Nakamura T, Kugiyama K. Triglycerides and remnant particles as risk factors for coronary artery disease [J]. Curr Atheroscler Rep, 2006, 8(2): 107-110.

[2] Sinal C J, Tohkin M, Miyata M, *et al*. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis[J]. Cell, 2000, 102(6): 731-744.

[3] Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors[J]. J Pharmacol Sci, 2005, 97(2): 177-183.

[4] Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, *et al*. Role of FXR in regulating bile acid homeostasis and relevance for human diseases[J]. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2005, 5(3):289-303.

[5] Jayakumar A, Tai M H, Huang W Y, *et al*. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(19): 8695-8699.

[6] Sirvent A, Verhoeven A J, Jansen H, *et al*. Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression[J]. J Lipid Res, 2004, 45(11): 2110-2115.

[7] Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K, *et al*. Effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on the metabolism of endogenous triglyceride in hyperlipoproteinemia[J]. J Lipid Res, 1978, 19(8): 1017-1024.

[8] Kast H R, Nguyen C M, Sinal C J, *et al*. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-Ⅱ transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids[J]. Mol Endocrinol, 2001, 15(10): 1720-1728.

[9] Anisfeld A M, Kast-Woelbern H R, Meyer M E, *et al*. Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor[J]. J Biol Chem, 2003, 278(22): 20420-20428.

[10] Matsukuma K E, Bennett M K, Huang J, *et al*. Coordinated control of bile acids and lipogenesis through FXR-dependent regulation of fatty acid synthase[J]. J Lipid Res, 2006, 47(12): 2754-2761.

（编辑 邓强庭）