文章编号:1000-5404(2008)16-1561-03

论著

FXR、CYP7A1在妊娠期肝内胆汁淤积症孕鼠胆汁酸代谢中的作用

兰 易,刘 建,邹姝丽,程 浩,甘晓玲 (重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

摘 要:目的 分析法尼醇受体(FXR)及其靶基因胆固醇7α-羟化酶(CYP7A1)在妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)孕鼠肝脏的表达情况,探讨FXR与CYP7A1在ICP发病机制中的作用。**方法** 用随机数字表法将30只孕15 d的SD大鼠分成2组:生理盐水(NS)组和苯甲酸雌二醇(estradiol benzoate, EB)组,每组15只。用药前和用药后第5天分别测定血清中ALT、AST、ALP、TBA水平,同时观察肝脏形态学变化,并应用RT-PCR和Western blot分别检测肝脏FXR、CYP7A1两者mRNA和蛋白的表达。**结果** EB组用药后各血清生化指标比用药前显著升高($P<0.01$),NS组用药前后无明显变化($P>0.05$);EB组孕鼠肝脏出现肝内胆汁淤积表现,NS组肝脏形态结构正常;EB组FXR和CYP7A1两者的mRNA和蛋白表达均显著高于NS组($P<0.01$)。**结论** EB诱导的ICP孕鼠肝脏FXR及CYP7A1表达均增加,说明存在胆汁酸合成自身反馈调节障碍,导致胆汁酸合成增加,这可能是ICP发病机制之一。

关键词: 孕鼠;胆汁淤积,肝内;法尼醇受体;胆固醇7α-羟化酶
中图法分类号: R333.3;R34;R714.25 **文献标识码:** A

Effects of FXR and CYP7A1 on metabolism of acid bile of pregnant rats with intrahepatic cholestasis

LAN Yi, LIU Jian, ZOU Shu-li, CHENG Hao, GAN Xiao-ling (Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical university, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of farnesoid X receptor (FXR) and its target gene cholesterol-7α-hydroxylase (CYP7A1) in liver of pregnant rats with intrahepatic cholestasis, and to explore the mechanism of intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **Methods** Thirty SD rats at gestation day 15 were randomly assigned to receive isotonic Na chloride (NS) and estradiol benzoate (EB) for 5 d. Blood (2 ml) was taken before and at the end of 5-day administration to measure the levels of ALT, AST, ALP, TBA, and the liver of pregnant rats after sacrifice were taken to observe morphologic changes. The mRNA and protein expressions of FXR and CYP7A1 in liver were determined by RT-PCR and Western blotting. **Results** The serum levels of ALT, AST, ALP, TBA in EB rats increased significantly ($P<0.01$), and the pathological changes of EB rats proved intrahepatic cholestasis. The mRNA and protein expressions of FXR and CYP7A1 were significantly higher in EB rats than NS rats ($P<0.01$). **Conclusion** Estradiol benzoate is the best candidate for inducing rat model of ICP. The mRNA and protein expressions of FXR and CYP7A1 in liver were increased, resulting in increased synthesis of bile acids, which may be one of the mechanisms of ICP.

Key words: pregnancy rat; cholestasis, intrahepatic; farnesoid X receptor; cholesterol-7α-hydroxylase

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是妊娠中晚期特发的肝脏疾病,其病因及发病机制至今尚未明确。国内外大量研究表明该疾病的发生与胆汁酸的代谢密切相关[1]。本实验通过苯甲酸雌二醇(estradiol benzoate, EB)诱导ICP模型,并用RT-PCR和Western blot检测FXR及其靶基因CYP7A1的表达,并从胆汁酸合成自身反馈调节角度探讨两者在ICP发病机制中的作用。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研基金(03-2-049)
Supported by the Chongqing Bureau of Public Health (03-2-049)
作者简介: 兰 易,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事围产医学方面的研究。电话:13594102394,E-mail:lanyi2005@126.com
通信作者: 刘 建,电话:(023)63693493
收稿日期: 2007-12-03;**修回日期:** 2007-12-24

1 材料与方法

1.1 材 料

EB 注射液(上海通用药业公司),羊抗大鼠 FXR 和 CYP7A1 多克隆抗体(Santa Cruz),细胞核与细胞质蛋白抽提试剂盒(碧云天公司),Trizol RNA 提取试剂(Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),引物由 Invitrogen 公司合成,日立 7600 全自动生化分析仪,GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统。

1.2 实验设计与方法

1.2.1 制备动物模型及分组 清洁级 SD 雌鼠 30 只,体质量 250~300 g,鼠龄 150~180 d,由本校实验动物中心提供。SD 雌鼠在室温 18~28 ℃,相对湿度 40%~70% 的屏障系统内饲养,不控制饮水和饲料。在发情期按 1∶1与雄性大鼠合笼,每天观察阴栓脱落情况,阴栓脱落日定为妊娠第 1 天,一直饲养到妊娠 15 d,并用随机数字表法分成 2 组:生理盐水(NS)组和 EB 组,每组 15 只,分别给予颈后皮下注射 NS(2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1})和 EB(2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1}),连续 5 d。

1.2.2 标本采集及处理 于用药前和用药后第 5 天分别采集心脏血 2 ml,用以测定 ALT、AST、ALP、TBA 血清生化指标。用药完毕后,以拉断颈髓法处死母鼠,分别取肝脏组织 3 份,其中 1 份用于病理检测,另 2 份用于 RT-PCR 和 Western blot 检测。

1.2.3 RT-PCR 半定量检测肝组织 FXR、CYP7A1 mRNA 表达

按 Trizol RNA 提取试剂操作说明提取肝组织总 RNA,应用逆转录试剂盒得到总 cDNA。PCR 引物序列为:FXR(283 bp),上游 5′-GACCACGAAGACCAGATTGCT-3′,下游 5′-TCTCCACTGCCTCTCTATCCTT-3′; CYP7A1 (381 bp),上游 5′-GCTATTCTCTGGGCATCTCAAG-3′,下游 5′-GAAAGTCAAAGGGTCTGGGTAG-3′;β-actin(600 bp),上游 5′-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3′,下游 5′-GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC-3′。PCR 反应条件:预变性 94 ℃ 2 min ,变性 94 ℃ 30 s,退 火 59 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,共循环 35 次,延伸 72 ℃ 5 min,4 ℃终止反应。反应后的扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,并用 Quantity One 软件对电泳结果进行分析,结果以目的基因条带与 β-actin 条带光密度的比值表示。

1.2.4 Western blot 半定量分析肝组织 FXR 和 CYP7A1 蛋白表达 用细胞核与细胞质蛋白抽提试剂盒提取蛋白,用考马斯亮蓝法检测蛋白浓度,制备 15% 分离胶和 5% 积层胶,上样,电泳后用电转移仪转移到 PVDF 膜上,封闭后加入羊多抗 FXR 和 CYP7A1 (1∶100 稀释),分别以 β-tublin 和 β-actin 为内参照(1∶400 稀释),4 ℃孵育过夜,与辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶2 000 稀释)室温孵育 1 h,ECL 化学发光剂作用后在 X 光胶片上曝光、显影和定影,经 Quantity One 软件分析光密度值,结果以目的蛋白条带与内参蛋白条带光密度的比值表示。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 15.0 统计软件,符合正态分布及方差齐性的参数采用独立样本 t 检验进行 2 组间比较(除 AST、TBA 外),组内比较采用配对 t 检验;不符合方差齐性的参数采用 Wilcoxon 秩和检验(AST、TBA)。

2 结果

2.1 血清生化指标变化

用药前 2 组各生化指标无明显差异($P>0.05$),用药后 EB 组各指标均显著高于 NS 组($P<0.01$,表 1)。

表 1 2 组用药前后血清生化指标检测($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	TBA(μmol/L)
NS 组				
用药前	34.67±4.64	95.27±6.34	90.33±6.89	12.48±2.13
用药后	36.33±5.21	99.60±6.39	92.93±6.61	12.11±1.89
EB 组				
用药前	35.93±4.41	97.33±7.94	90.53±7.52	12.33±2.03
用药后	60.73±7.47[a]	158.06±15.26[a]	121.33±9.93[a]	36.47±4.95[a]

a: $P<0.01$, 与 NS 组比较

2.2 孕鼠肝脏组织病理学改变

用药后,NS 组的肝脏形态结构正常;EB 组肝细胞肿胀,肝血窦变窄,少量肝细胞变性坏死,部分毛细胆管扩张且显影明显,可见部分毛细胆管内有胆栓形成。

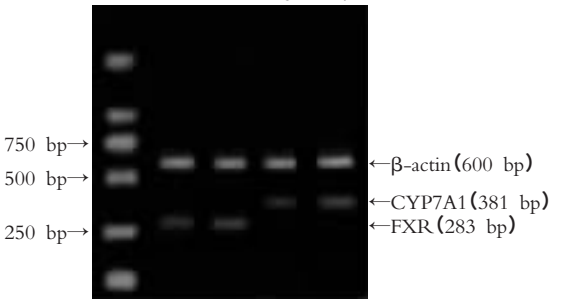
2.3 FXR、CYP7A1 mRNA 表达的变化

EB 组肝脏 FXR、CYP7A1 mRNA 的表达均强于 NS 组($P<0.01$,表 2、图 1)。

表 2 2 组肝脏 FXR、CYP7A1 mRNA 和蛋白表达($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	FXR mRNA	CYP7A1 mRNA	FXR	CYP7A1
NS 组	0.407±0.018	0.328±0.012	0.543±0.023	0.357±0.018
EB 组	0.524±0.019[a]	0.431±0.016[a]	0.658±0.024[a]	0.480±0.022[a]

a: $P<0.01$, 与 NS 组比较

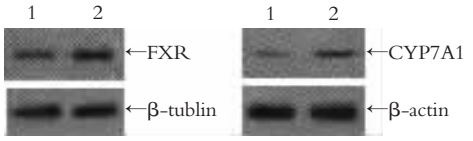


M:DNA 标准(DL 2000);1:NS 组 FXR; 2:EB 组 FXR; 3:NS 组 CYP7A1;4:EB 组 CYP7A1

图 1 RT-PCR 检测孕鼠肝脏 FXR、CYP7A1 mRNA 的表达

2.4 FXR 和 CYP7A1 Western 蛋白印迹结果

EB 组肝脏 FXR 和 CYP7A1 蛋白的表达均强于 NS 组($P<0.01$),与 RT-PCR 结果相符(表 2、图 2)。



1：NS 组；2：EB 组

图 2　Western blot 检测孕鼠肝脏 FXR 和 CYP7A1 蛋白表达

3　讨论

ICP 之所以引起围生医学界的高度重视，主要是 ICP 患者围生儿发病率及病死率较高。研究表明，胆汁酸中的主要毒性成分胆酸不仅能损伤母体肝细胞，还引起绒毛血管痉挛性收缩，从而导致胎儿宫内窘迫、羊水粪染、早产，甚至死胎、死产。母体胆汁酸水平的异常升高与胎儿的预后密切相关[1,2]，因此参与胆汁酸代谢的所有分子都可能成为 ICP 的病因。

FXR 是核受体超家族 lH 亚家族中的成员（nrlh4），FXR 的生理功能是通过 FXR/RXR 二聚体结合到相应的 DNA 反应元件上，从而调节靶基因的表达来实现的[3]。FXR 须通过胆酸调节才能够发挥其对靶基因的作用。多种人体内的生理性胆酸都能激活 FXR，并促进其转录，其中尤以鹅脱氧胆酸作用最强。活化的 FXR 可启动一系列基因的转录活性，从而降低肝细胞内的胆汁酸浓度，而 FXR 最重要的生理功能是对胆酸生物合成的负反馈作用。CYP7A1 是合成胆汁酸的限速酶，FXR 在胆汁酸的激活下，间接阻遏 CYP7A1 编码基因的转录，从而导致胆汁酸生成减少[4]。对人类和啮鼠动物肝细胞体外研究已经证实 FXR 通过调节 CYP7A1 的活性来调节胆汁酸合成[5]。然而在妊娠状态下，由于激素水平的显著变化，是否会影响这一反馈调节途径，国内外还缺乏相关研究。

本研究使用 EB 处理后的孕鼠，血生化指标 ALT、AST、ALP、TBA 均较对照组明显升高；其肝脏病理改变为肝细胞肿胀，肝血窦变窄，少量肝细胞变性坏死，部分毛细胆管扩张且显影明显，部分可见毛细胆管内有胆栓形成；两者均符合肝内胆汁淤积表现[6]，表明 EB 可以成功诱导孕鼠肝内胆汁淤积模型的建立。

本实验通过获取 2 组孕鼠肝脏组织，在基因转录和蛋白水平检测 FXR 与 CYP7A1 的表达，结果显示：EB 组孕鼠肝脏 FXR mRNA 和蛋白表达较对照组增加，但 FXR 表达的增加并未能抑制 CYP7A1 的表达，反而 CYP7A1 随 FXR 增加而增加。此结果表明：①2 组孕鼠肝脏存在 FXR 和 CYP7A1 的 mRNA 及蛋白表达。②EB 组 FXR 表达增加，可以推测高浓度的胆酸能够增强 FXR 转录活性，胆酸对 FXR 表达存在着正反馈调节。③EB 组 CYP7A1 表达增加，说明在 ICP 孕鼠肝脏 FXR 未能实现其对 CYP7A1 的负反馈调节作用，故导致胆汁酸合成增加。分析其原因可能是 FXR 是间接通过诱导转录抑制因子小分子异源二聚体伴侣（SHP）而发挥作用[4]，因此在胆汁酸合成反馈调节途径中还有另一个调节因子 SHP 对 CYP7A1 的表达发挥着重要的作用。有研究表明，雌激素和雌激素受体 α 选择性激活剂可诱导 SHP 的表达，但它并不能抑制 SHP 靶基因 CYP7A1 的活性[7]，从而导致 FXR 对 CYP7A1 的负反馈调节障碍。

综上所述，本实验结果表明：在 NS 组孕鼠，轻微增加的胆酸诱导了 FXR 的适量表达，从而抑制了 CYP7A1 的转录激活功能，使胆汁酸合成减少，实现胆汁酸合成的自我反馈调节；而在 ICP 时，血中高雌激素水平和高浓度胆酸诱导了肝脏 FXR 的大量表达，但大量表达的 FXR 并未能抑制 CYP7A1 的表达，CYP7A1 表达增加，导致胆汁酸合成增加，当胆汁酸的大量合成超过肝脏的排泄能力时将引发胆汁淤积，该过程可能参与了妊娠期肝内胆汁淤积症的发生，尚待进一步研究。

参考文献：

[1] 张利平，刘　建. 胆汁酸致妊娠肝内胆汁淤积症围产儿并发症的机制研究[J]. 国际检验医学杂志，2007，28(4)：355－357.

[2] 郭小娟. 妊娠合并肝内胆汁淤积症的护理体会[J]. 实用临床医药杂志，2007，11(12)：64－66.

[3] Huang L，Zhao A，Lew J L，*et al*. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3[J]. J Biol Chem，2003，278(51)：51085－51090.

[4] Boulias K，Katrakili N，Bamberg K，*et al*. Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP[J]. EMBO J，2005，24(14)：2624－2633.

[5] Fiorucci S，Clerici C，Antonelli E，*et al*. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid，a farnesoid X receptor ligand，in estrogen-induced cholestasis[J]. J Pharmacol Exp Ther，2005，313(2)：604－612.

[6] 葛　环，徐昌芬，焦中秀，等. 妊娠肝内胆汁淤积症动物模型的建立[J]. 中华腹部疾病杂志，2003，3(3)：157－160.

[7] Lai K，Harnish D C，Evans M J. Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner[J]. J Biol Chem，2003，278(38)：36418－36429.

（编辑　张　维）