论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0458-04

法尼酯X受体可下调肝细胞中肝型脂肪酸结合蛋白的表达

董金瑜[1],刘 红[2],彭家和[1],张 艳[1],王 强[1],李良鹏[1],王永超[1],江 渝[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院血液科[2])

[摘要] **目的** 研究法尼酯X受体(farnesoid X receptor,FXR)对肝型脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid-binding protein,L-FABP)表达的影响。**方法** 用终浓度为50、100 μmol/L的鹅脱氧胆酸(chenodesoxycholic acid,CDCA)以及1、5 μmol/L的GW4064分别处理人胚胎肝细胞LO2和人肝癌细胞株HepG2后,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测FXR特异靶基因小异二聚体配体(small heterodimer partner,SHP)和L-FABP mRNA表达,再用Western blot法检测L-FABP蛋白水平的变化。**结果** LO2和HepG2细胞经FXR特异性激动剂CDCA以及GW4064刺激后,细胞内的SHP mRNA水平均明显升高,表明FXR在这两种细胞中是有功能活性的;而L-FABP mRNA和蛋白水平显著下降($P<0.05$)。**结论** 激活后的FXR可抑制L-FABP的表达活性。

[关键词] 法尼酯X受体;肝型脂肪酸结合蛋白;肝细胞
[中图法分类号] R333.4;R341;R394.2 [文献标志码] A

Farnesoid X receptor down-regulates expression of liver fatty acid-binding protein in liver cells

Dong Jinyu[1], Liu Hong[2], Peng Jiahe[1], Zhang Yan[1], Wang Qiang[1], Li Liangpeng[1], Wang Yongchao[1], Jiang Yu[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objectives** To investigate the effect of farnesoid X receptor (FXR) on the expression of liver fatty acid-binding protein (L-FABP). **Methods** Human hepatoblastoma HepG2 cells and hepatocyte LO2 cells were treated with FXR agonists chenodesoxycholic acid (CDCA) at 50 and 100 μmol/L or GW4064 at 1 and 5 μmol/L respectively. The L-FABP and the specific gene of FXR-small heterodimer partner (SHP) were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The L-FABP protein level was determined by Western blotting. **Results** After treated with CDCA or GW4064, SHP mRNA level in HepG2 and LO2 was increased obviously, which suggested FXR was functional in those cells. The mRNA and protein levels of L-FABP was decreased dramatically in those cells ($P<0.05$). **Conclusion** Farnesoid X receptor down-regulates the expression of L-FABP in hepatocytes.

[**Key words**] farnesoid X receptor; liver fatty acid-binding protein; hepatocytes

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5050) and the Starting Funds for Personnel Returning from Overseas of Third Military Medical University (06HG010). Corresponding author: Jiang Yu, Tel: 86-23-68752841, E-mail: yujiang61@gmail.com

法尼酯X受体(farnesoid X receptor,FXR)是核受体超家族成员之一[1],除参与胆汁酸与糖代谢以外[2,3],还密切参与机体脂质调节[4,5]。目前FXR对脂肪酸代谢的影响主要体现在对脂肪酸合成以及β氧化等相关因子的调节[6-8],但对细胞如何摄取、转运脂肪酸的影响尚待进一步研究。L-FABP作为脂肪结合蛋白超家族的一员,调节着脂肪酸的摄取,并转运到线粒体、过氧化物酶体、内质网和细胞核等细胞器中[9]。L-FABP同时参与脂肪酸代谢酶的调控,因而在脂质代谢中起重要作用。近年来研究发现,L-FABP缺陷性小鼠能有效抵抗脂肪肝、肥胖、胰岛素抵抗的发生[10,11],提示L-FABP在代谢性疾病的多个方面起重要作用。FXR和L-FABP在肝脏中高表达,两者在脂代谢中均起重要作用,但FXR对L-FABP表达的影响尚不清楚。本实验拟通过研究FXR激动剂鹅脱氧胆酸(chenodesoxycholic acid,CDCA)和GW4064对L-FABP表达的影响,以期为治疗和预防脂质代谢紊乱提供实验依据。

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5050);第三军医大学留学回国人员启动基金(06HG010)
[通信作者] 江 渝,电话:(023)68752841,E-mail:yujiang61@gmail.com

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人肝癌细胞株 HepG2 和人胎肝细胞株 LO2 由本室保存。DMEM 高糖培养基和 1640 培养基购自 HyClone 公司，CDCA 购自 Sigma 公司，GW4064 为美国匹兹堡大学药学院黎松教授惠赠，Trizol 和 M-MLV 反转录酶均购自美国 Invitrogen 公司，Ex *Taq* DNA 聚合酶及 DNA Marker 均购自大连宝生物公司，蛋白预染 Marker 购自加拿大 Fermentas 公司，羊抗人 L-FABP 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司，辣根过氧化物酶标记鼠抗羊二抗购自广州中杉公司，β-actin 一抗购自 Abcam 公司，其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 和 LO2 细胞株分别采用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基和 1640 培养基，37 ℃、5% 的 CO_2 温箱培养，2～4 d 更换培养基 1 次，待细胞到对数生长期时，细胞以 1×10^6/孔接种至 6 孔板，再用终浓度为 50、100 μmol/L 的 CDCA 以及 1、5 μmol/L 的 GW4064 分别处理 LO2 和 HepG2 细胞，以溶解配体的溶剂 DMSO（终浓度为 1‰）做对照。24 h 后按 Trizol 试剂操作说明提取细胞总 RNA。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应（RT-PCR） SHP：94 ℃变性 2 min；94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，循环 28 次；72 ℃延伸 5 min。L-FABP：95 ℃变性 4 min；95 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，循环 28 次；72 ℃延伸 5 min。反应结束后取 PCR 产物 7.5 μl，用含有 0.5 μg/ml 溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。经凝胶成像系统扫描软件分析后，计算目的基因与 β-actin 二者光密度的比值。L-FABP、SHP 及 β-actin 引物使用 Primer Premier 3.0 自行设计，SHP 上游引物序列：5′-TGGCCCAAGATGCTGTG-3′，下游：5′-TCGGGGTTGAAGAGGA-3′，扩增产物长度为 232 bp；L-FABP 上游引物序列：5′-GTTTCTCCGGCAAGTACCAA-3′；下游：5′- CGTTGAGTTCGGTCACAGAC-3′，扩增产物长度为 312 bp；β-actin 上游引物序列：5′-CCATGTACGTTGCTATCCAGG-3′，下游：5′-TCTCCTTAATGTCATGCACGA-3′，扩增产物长度为 252 bp，所有引物均由上海英骏公司合成。

1.2.3 Western blot 细胞总蛋白提取液抽提细胞总蛋白，考马斯亮蓝法进行蛋白定量，各组样品等量上样后行 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，Bio-Rad 半干转至 PVDF 膜，5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h，一抗（L-FABP：1∶500，β-actin：1∶2 000）4 ℃过夜，TBST 洗涤，二抗（1∶5 000）室温 1 h，TBST 洗涤，使用 HRP-ECL 显色，暗盒压片曝光。

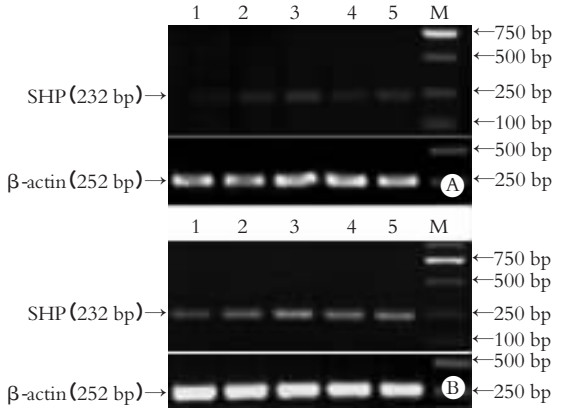
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 GW4064 和 CDCA 激活 FXR 活性

LO2 细胞在 FXR 配体 GW4064（1、5 μmol/L）或 CDCA（50、100 μmol/L）作用下，SHP mRNA 的表达与对照组比较显著增加（$P<0.05$，图 1A，表 1）。HepG2 细胞在给予 GW4064（1、5 μmol/L）或 CDCA（50、100 μmol/L）后，SHP 的表达与对照组相比也明显升高（$P<0.05$，图 1B，表 1）。



1：含 0.1‰DMSO 的对照组；2：GW4064 1 μmol/L 处理；3：GW4064 5 μmol/L 处理；4：CDCA 50 μmol/L 处理；5：CDCA 100 μmol/L 处理；M：标准

A：LO2 细胞；B：HepG2 细胞

图 1 RT-PCR 检测不同浓度 CDCA、GW4064 处理后 LO2、HepG2 细胞 SHP mRNA 的表达

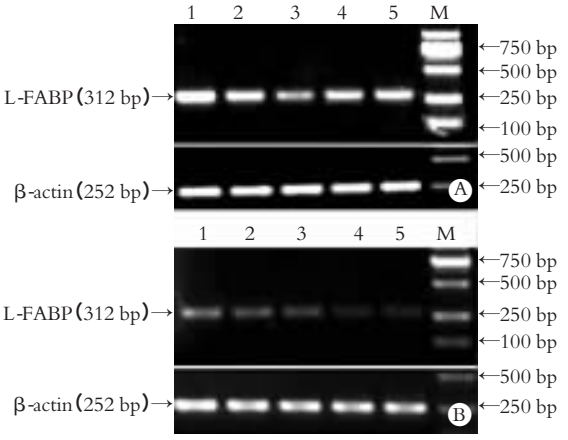
表 1 不同浓度的 GW4064、CDCA 处理对 LO2、HepG2 细胞 SHP mRNA 表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

细胞株	GW4064（μmol/L）		CDCA（μmol/L）	
	1	5	50	100
LO2 细胞	0.221 ± 0.008[a]	0.254 ± 0.020[a]	0.184 ± 0.002[a]	0.238 ± 0.025[a]
HepG2 细胞	0.508 ± 0.020[a]	0.680 ± 0.021[a]	0.587 ± 0.002[a]	0.630 ± 0.033[a]

对照组 LO2、HepG2 细胞中 SHP mRNA 的表达分别为（0.112 ± 0.013）、（0.341 ± 0.010）；a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2 FXR 下调 L-FABP 的 mRNA 表达水平

在 LO2 和 HepG2 细胞中，分别给予 GW4064（1、5 μmol/L）、CDCA（50、100 μmol/L），L-FABP mRNA 水平明显低于对照组（$P<0.05$，图 2，表 2）。



1：含 0.1‰DMSO 的对照组；2：GW4064 1 μmol/L 处理；3：GW4064 5 μmol/L 处理；4：CDCA 50 μmol/L 处理；5：CDCA 100 μmol/L 处理；M：标准

A：LO2 细胞；B：HepG2 细胞

图 2 RT-PCR 检测不同浓度 CDCA、GW4064 处理后 LO2、HepG2 细胞 L-FABP mRNA 的表达

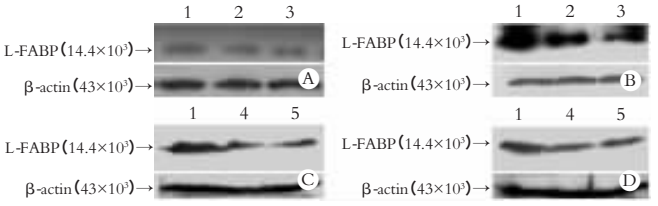
表2 不同浓度的GW4064、CDCA处理对LO2、HepG2细胞L-FABP mRNA表达的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

细胞株	GW4064(μmol/L)		CDCA(μmol/L)	
	1	5	50	100
LO2细胞	0.393±0.014[a]	0.253±0.047[a]	0.367±0.076[a]	0.365±0.026[a]
HepG2细胞	0.324±0.020[a]	0.293±0.025[a]	0.145±0.007[a]	0.142±0.015[a]

对照组LO2、HepG2细胞中L-FABP mRNA的表达分别为(0.620±0.010)、(0.440±0.02);a:$P<0.05$,与对照组比较

2.3 FXR下调L-FABP的蛋白表达水平

Western blot检测结果显示:GW4064(1、5 μmol/L)、CDCA(50、100 μmol/L)作用下,LO2、HepG2细胞中的L-FABP蛋白表达显著低于对照组($P<0.05$,图3,表3),变化趋势与mRNA表达一致。



1:含0.1‰DMSO的对照组;2:GW4064 1 μmol/L处理;3:GW4064 5 μmol/L处理;4:CDCA 50 μmol/L处理;5:CDCA 100 μmol/L处理
A、C:分别为LO2细胞经GW4064、CDCA处理后L-FABP蛋白水平的变化;B、D:分别为HepG2细胞经GW4064、CDCA处理后L-FABP蛋白水平的变化

图3 Western blot检测CDCA、GW4064处理后LO2、HepG2细胞L-FABP蛋白水平变化

表3 不同浓度的GW4064、CDCA处理对LO2、HepG2细胞L-FABP蛋白表达的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

细胞株	GW4064(μmol/L)		CDCA(μmol/L)	
	1	5	50	100
LO2细胞	1.675±0.031[a]	0.987±0.015[a]	0.271±0.013[a]	0.195±0.025[a]
HepG2细胞	0.405±0.026[a]	0.379±0.014[a]	0.450±0.033[a]	0.422±0.024[a]

GW4064对照组LO2、HepG2细胞中L-FABP蛋白表达分别为(2.177±0.025)、(0.668±0.020),CDCA对照组分别为(0.383±0.036)、(1.096±0.041);a:$P<0.05$,与相应对照组比较

3 讨论

脂肪酸代谢与多种疾病的发生、发展密切相关,作为脂肪酸载体的L-FABP,大量存在于细胞质中,对脂肪酸的吸收、转运、氧化及酯化[9]起重要作用。提示肝脏型脂肪酸结合蛋白与脂肪酸代谢有密切关系。核受体超家族的成员也可以配体依赖和非依赖的形式参与机体的脂肪酸代谢过程,其中肝核因子1α(hepatocyte nuclear factor 1α, HNF1α)、过氧化酶体增殖物激活受体-α(peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPARα)等都是通过调节L-FABP的表达参与脂肪酸代谢过程。有研究[12]报道HNF1α敲除小鼠中,L-FABP的表达显著下降,对鼠的L-FABP基因进行研究,发现+21到−132序列包含了1个HNF1α结合位点、1个TATA盒和CCAAT盒。L-FABP存在PPAR反应元件,PPARα激活后,与视黄醇受体形成异源二聚体,作用于PPAR反应元件,上调L-FABP的表达[13]。而FXR作为重要的核受体超家族成员,在脂肪酸代谢过程中也发挥相当重要的作用。FXR主要是通过两条途径影响脂肪酸代谢,一是减少脂肪酸合成,FXR被激活后可经过SHP途径下调甾醇反应元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding proteins, SREBP-lc),SREBP-lc负责非饱和脂肪酸合成及酯化相关基因的表达,如乙酰辅酶A羧化酶、乙酰辅酶A合成酶、脂肪酸合酶等,从而减少脂肪酸的合成;二是促进脂肪酸β氧化,FXR可诱导PPAR-α的表达[7],PPAR-α主要调控脂肪酸β氧化相关基因的水平,激活后可增加脂肪酸的β氧化,减少组织中脂质含量,降低血浆中甘油三酯(triglyceride, TG)水平,一些研究还发现过氧化酶体增殖物激活受体γ辅激活因子-1α也可作为FXR的辅激活因子促进脂肪酸β氧化[8]。但FXR对细胞如何摄取、转运脂肪酸的影响尚待进一步研究。

本研究采用LO2和HepG2为模型细胞,经CDCA或GW4064处理后,FXR的特异性靶基因SHP上调,说明FXR在这两种细胞中有功能活性的。之后重点观察FXR对L-FABP表达的影响,发现在HepG2和LO2细胞中FXR激动剂CDCA和GW4064均可使L-FABP的mRNA和蛋白水平显著下调,提示激活的FXR可能通过直接或间接的方式下调L-FABP的表达。FXR激活后,通常与视黄酸X受体以异二聚体形式结合于靶基因启动子区的FXRE来调控基因的转录。大多数的FXRE由反向重复模序AGGTCA组成,中间被一个核苷酸隔开,即IR-1(inverted repeats separated by 1 bp),也有同向重复的AGGTCA模序组成的重复序列如DR-3(direct repeats separated by 3 bp)和IR-10(inverted repeats separated by 10 bp)等[14]。有关FXR下调L-FABP的具体机制尚不清楚,有待进一步的实验研究。

研究发现,L-FABP基因剔除小鼠肝脏的TG和磷脂聚集显著降低,有效抵抗了高脂饮食诱导的肥胖和脂肪肝[11]。L-FABP基因剔除小鼠的能量供应的底物也发生改变,脂肪酸的利用降低,对糖依赖性增强,提示L-FABP的敲除可能会改善胰岛素抵抗。由此推测FXR通过下调L-FABP对改善脂质紊乱起一定作用。总之,FXR可在肝细胞中抑制L-FABP的表达,本研究结果为深入阐明FXR和L-FABP参与脂肪酸代谢调节的机制及与相关疾病的关系积累了新的资料。

参考文献:

[1] Huber R M, Murphy K, Miao B, *et al*. Generation of multiple farne-

soid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters [J]. Gene, 2002, 290(1/2): 35-43.
[2] Willson T M, Jones S A, Moore J T, *et al*. Chemical genomics: functional analysis of orphan nuclear receptors in the regulation of bile acid metabolism[J]. Med Res Rev, 2001, 21(6): 513-522.
[3] Cariou B, van-Harmelen K, Duran-Sandoval D, *et al*. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice [J]. J Biol Chem,2006, 281(16): 11039-11049.
[4] Watanabe M, Houten S M, Wang L, *et al*. Bile acids lower triglyceride levels *via* a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c[J]. J Clin Invest, 2004, 113(10): 1408-1418.
[5] Wang Y D, Chen W D, Huang W. FXR, a target for different diseases [J]. Histol Histopathol, 2008, 23(5): 621-627.
[6] 申丽丽,彭家和,刘红, 等. 法尼酯X受体对脂肪酸合成酶表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(22): 2142-2144.
[7] Pineda-Torra I, Claudel T, Duval C, *et al*. Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene *via* activation of the farnesoid X receptor [J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(2): 259-272.
[8] Zhang Y, Castellani L W, Sinal C J, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR[J]. Genes Denv, 2004, 18(2): 157-169.
[9] Storch J, Thumser A E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1486 (1): 28-44.
[10] Newberry E P, Xie Y, Kennedy S, *et al*. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene[J]. J Biol Chem, 2003, 278(51): 51664-51672.
[11] Newberry E P, Xie Y, Kennedy S M, *et al*. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice[J]. Hepatology, 2006, 44(5): 1191-1205.
[12] Akiyama T E, Ward J M, Gonzalez F J. Regulation of the liver fatty acid-binding protein gene by hepatocyte nuclear factor 1alpha (HNF1alpha). Alterations in fatty acid homeostasis in HNF1alpha-deficient mice[J]. J Biol Chem, 2000, 275(35): 27117-27122.
[13] Landrier J F, Thomas C, Grober J, *et al*. Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent[J]. J Biol Chem, 2004, 279(44): 45512-45518.
[14] 彭家和,刘红,张迁,等. 小鼠MCP-1基因启动子的克隆及核受体FXR下调其活性初步分析[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 33-35.

(**收稿**:2009-10-10;**修回**:2009-11-20)
(编辑 吴培红)

(上接453页)

2 讨论

有研究[3]报道原发性睾丸非霍奇金淋巴瘤患者发病年龄为24~74岁,平均44岁,绝大多数见于35岁以后[3],但也曾报道过1例12岁儿童发病[4]。由于病例少,病因尚不明确,可能与外伤、慢性炎症感染、隐睾等因素有关[5]。本例患者行绝育术可能为其诱因之一。临床表现主要为一侧睾丸无痛性肿大,左右侧发病率约为3∶1,全身症状包括发热、盗汗、体质量下降,全身症状少见,为5%~25%[5]。本病有广泛播散的倾向,除腹膜后淋巴结、盆腔淋巴结外,还易侵犯结外器官,主要累及对侧睾丸、中枢神经系统和肺等[6]。原发睾丸非霍奇金淋巴瘤确诊需靠组织病理学及免疫组织化学,其病理类型主要为弥漫性大B细胞型(占80%~90%),其他类型较少见[5-8]。

由于原发性睾丸非霍奇金淋巴瘤少见,缺乏前瞻性研究,尚未形成规范治疗模式,目前已达成共识的是首先行经腹股沟精索高位结扎睾丸切除术[5]。但是单纯手术治疗效果极差,5年生存率仅12%~20%[7]。相关文献主张术后积极全身化疗,最常用的化疗方案是CHOP方案,有学者建议用CHOP方案同时加上利妥昔单抗可增加治疗弥漫大B细胞型的疗效[9],也有学者建议在CHOP化疗方案中改用毒性较小的吡柔比星替代阿霉素,以减少阿霉素对心脏和骨髓的毒性作用[10]。但是由于血睾屏障和血脑屏障的存在,化疗药物难以到达对侧睾丸和中枢神经系统,而难以预防对侧睾丸和中枢神经系的复发,所以有学者主张在全身化疗的同时,进行对侧睾丸放疗和鞘内注射化疗药(MTX-甲氨蝶呤+A-阿糖胞苷+P-泼尼松)[5,7]。但是也有人认为中枢神经系统受浸多发生在脑实质,脑脊膜受浸较少,而鞘内化疗对脑实质受侵的作用不大[6],翟林柱等[7]提出大剂量的甲氨蝶呤(HD-MTX)可以透过血脑屏障对脑实质起预防作用,将HD-MTX化疗和鞘注联合起来进行中枢预防更有意义。我们建议对于原发性睾丸非霍奇金淋巴瘤的治疗早期行精索高位结扎睾丸切除术,术后对侧睾丸放疗和全身化疗,必要时加以HD-MTX化疗+鞘注化疗。当然也需考虑病人的身体状况、经济情况等多方面因素。

参考文献:

[1] 吴在德, 吴肇汉. 外科学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 716-717.
[2] Vural F, Cagirgan S, Saydam G, *et al*. Primary testicular lymphoma [J]. J Nat Med Assoc, 2007, 99(11): 1277-1282.
[3] 温建成, 苏少雪, 黄小萍, 等. 附睾原发性恶性淋巴瘤1例及文献复习[J]. 现代医药卫生, 2006, 22(8): 1141-1143.
[4] 张敬悌, 王琪, 王旺强. 儿童原发性睾丸非霍奇金淋巴肉瘤一例[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 27(1): 12.
[5] 姚波, 李晔雄. 原发性睾丸非霍奇金淋巴瘤[J]. 癌症进展杂志, 2004, 2(6): 462-467.
[6] 宋斌, 陈雁, 姜铧, 等. 以睾丸肿大为首发表现的非霍奇金淋巴瘤1例并文献复习[J]. 中国现代医生, 2008, 46(4): 136-137.
[7] 翟林柱, 王树森, 黄岩, 等. 30例睾丸原发非霍奇金淋巴瘤回顾性临床分析[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(11): 644-646, 649.
[8] 江炜, 刘卫平, 李雷, 等. 26例睾丸非霍奇金淋巴瘤的临床病理及其免疫表型[J]. 四川大学学报: 医学版, 2006, 37(1): 156-158.
[9] 王宗平, 李长岭. 原发性睾丸淋巴瘤诊断及治疗现状[J]. 癌症进展, 2009, 7(2): 135-140.
[10] 王跃闽, 文伟, 张先有, 等. 睾丸非霍奇金淋巴瘤15例[J]. 临床泌尿外科杂志, 2001, 16(3): 138-140.

(**收稿**:2009-12-01;**修回**:2010-01-10)
(编辑 栾 嘉)