论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0912-04

法尼酯X受体上调肝细胞中成纤维细胞生长因子21的表达

王永超[1],刘 红[2],彭家和[1],李良鹏[1],董金瑜[1],张 艳[1],江 渝[1] (400038 重庆,第三军医大学基础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内科[2])

【摘要】 **目的** 研究法尼酯X受体(farnesoid X receptor,FXR)对成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor,FGF21)表达的影响。**方法** 用FXR特异性激动剂终浓度为0、50、100 μmol/L的CDCA和0、1、5 μmol/L的GW4064分别处理人肝癌细胞株HepG2和人胚胎肝细胞L02细胞后,用逆转录-聚合酶链法(RT-PCR)检测FXR特异性靶基因小异源二聚体配体(small heterodimer parterner,SHP)和FGF21 mRNA的表达变化,再用Western blot法检测FGF21蛋白表达水平的变化。**结果** 用FXR特异性激动剂CDCA和GW4064刺激后,分别比较HepG2和L02细胞SHP与β-actin mRNA RT-PCR产物光密度比值,比值均明显增高($P<0.05$),反应HepG2和L02细胞内SHP mRNA水平均明显升高,表明FXR在2种细胞中被激活;分别比较HepG2和L02细胞FGF21与β-actin RT-PCR产物光密度比值以及FGF21与β-actin蛋白光密度比值,比值均明显升高($P<0.05$),表明FGF21 mRNA和蛋白水平均明显升高。**结论** 激活的FXR可以上调FGF21的表达。

【关键词】 法尼酯X受体;成纤维细胞生长因子21;鹅脱氧胆酸;肥胖
【中图法分类号】 R333.4;R341;R394.3 【文献标志码】 A

Farnesoid X receptor upregulates fibroblast growth factor 21 expression in cultured liver cells

Wang Yongchao[1], Liu Hong[2], Peng Jiahe[1], Li Liangpeng[1], Dong Jinyu[1], Zhang Yan[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**】 **Objective** To determine the effect of farnesoid X receptor (FXR) on the expression of fibroblast growth factor21 (FGF21) in human hepatoblastoma HepG2 cells and hepatocyte L02 cells. **Methods** After HepG2 cells and L02 cells were treated with FXR agonist chenodesoxycholic acid (CDCA) at 0, 50 or 100 μmol/L, or with another agonist GW4064 at 0, 1 or 5 μmol/L respectively. The FXR specific target gene small heterodimer partner (SHP) and the FGF21 mRNA level were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and FGF21 protein level was determined by Western blotting. **Results** After treated with CDCA and GW4064, the mRNA expression of SHP was significantly increased in the treated HepG2 and L02 cells when compared with the untreated cells respectively ($P<0.05$), which suggested that FXR was functionally activated in those cells. The mRNA and protein expressions of FGF21 were also increased in those treated cells ($P<0.05$). **Conclusion** FXR receptor upregulates the expression of FGF21 in hepatocytes.

【**Key words**】 Farnesoid X receptor; fibroblast growth factor21; chenodesoxycholic acid; obesity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070228) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5050).
Corresponding author: Jiang Yu, Tel: 86-23-68752842, E-mail: yujiang@gmail.com

近年来,随着人们生活方式的改变及高糖、高脂饮食摄入水平的不断增高,导致肥胖人群不断增加,而肥胖与众多健康危险因子密切相关,如糖尿病、高血压、高胆固醇血症等[1],成为危害人们健康的重要因素之一。成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor,FGF21)是新近发现的成纤维细胞生长因子家族成员[2],也是新型的代谢调控因子。Kharitonenkov等[3]首先发现FGF21转基因小鼠代谢状态得到了明显改善:血浆胆固醇、总甘油三酯降低,胰岛素敏感性、糖清

【基金项目】 国家自然科学基金(81070228);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5050)
【通信作者】 江 渝,电话:(023)68752842,E-mail:yujiang@gmail.com

除等得到改善,并可以抵抗高脂饮食诱导的体质量增加和脂肪堆积,提示 FGF21 可能成为治疗或预防肥胖的新因子。核受体家族成员法尼酯 X 受体(farnesoid X receptor,FXR)因其转录活性可被超生理浓度的法尼酯而命名,最早于 1995 年被发现[4],后来发现胆汁酸为其天然配体,又被命名为胆汁酸受体,其中鹅脱氧胆酸(chenodesoxycholic acid,CDCA)为其最适天然配体,GW4064 为其人工合成配体。它通过调节糖脂代谢中相关因子,在调节糖脂代谢,维持 体内糖脂平衡中具有重要作用[5],因此成为研究治疗各种代谢紊乱疾病的重要靶点,而 FXR 在肥胖中的作用还报道甚少。本实验就 FXR 人肝癌细胞株(HepG2)和人胚胎肝细胞株(L02)中被激活与 FGF21 表达的关系进行研究,为 FXR 在肥胖中的作用和 FGF21 的表达调控机制的研究提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞株 HepG2 和人胎肝细胞株 L02 由本实验室保存。DMEM 高糖培养基购自 HyClone 公司,1640 培养基购自 Gbico 公司,FXR 特异性激动剂 CDCA 和 GW4064 分别购自 Sigma 公司和由美国匹兹堡大学药学院黎松教授惠赠,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,M-MLV 反转录酶购自美国 Promega 公司,*Ex Taq* DNA 聚合酶及 100 bp DNA Ladder Marker 均购自大连宝生物公司,蛋白预染 Marker 购自加拿大 Fermentas 公司,兔抗人 FGF-21 多克隆抗体购自美国 Abacam 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司,β-actin 一抗购自北京博奥森公司,SuperSignal West Femto trial Kit 购自美国 Pierce 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 L02 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 L02 和 HepG2 细胞,以溶解配体的溶剂 DMSO(终浓度为 0.1%)作对照。24 h 后按 Trizol 试剂操作说明提取细胞总 RNA,或提取细胞胞浆蛋白。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) FGF-21、SHP 及 β-actin 引物为使用引物在线设计软件 Primer Premier 3.0 自行设计。FGF-21 上游引物:5′-aGGACTGTGGGTTTCTGTGC-3′,下游引物:5′-aGTGGAGCGATCCATACAGG-3′,扩增产物长度为 314 bp;SHP 上游引物:5′-TGGCCCAAGATGCTGTGAC-3′,下游引物:5′-TCGGGGTTGAAGAGGATGGT-3′,扩增产物长度为 232 bp;β-actin 上游引物:5′-CCATGTACGTTGCTATCCAGG-5′,下游引物:5′-TCTCCTTAATGTCACGCACGA-3′,扩增产物长度为 252 bp。所有引物为上海 Invitrogen 公司合成。RT-PCR 反应条件:FGF-21:94 ℃变性 5 min;94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环 35 次;72 ℃延伸 5 min;SHP:94 ℃变性 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃30 s,72 ℃30 s,循环 35 次;72 ℃延伸 5 min;β-actin:94 ℃变性 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环 25 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。

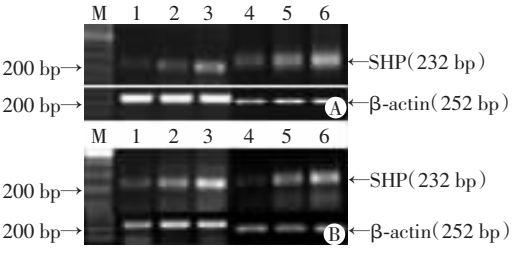
1.2.3 Western blot 使用蛋白提取液提取细胞总蛋白,考马思亮蓝法测定总蛋白浓度,将各组样品等量上样后,进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,Bio-Rad 半干转至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,4℃孵育一抗(FGF-21:1∶600,β-actin:1∶500)过夜,TBST 洗涤,室温孵育二抗(1∶3 000)40 min,TBST 洗涤,使用 HRP-ECL 显色,暗盒压片曝光。

1.2.4 统计学分析 所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 P_{50}(P_{25},P_{75})表示,多组比较用 Kruskal-Wallis H 检验,多组之间两两比较用 Nemenyi 检验。

2 结果

2.1 CDCA 和 GW4064 激活 FXR 活性

采用 RT-PCR 方法检测了 2 种细胞中 FXR 靶基因 SHP mRNA 的表达情况。HepG2 细胞在 50 μmol/L 和 100 μmol/L CDCA 或 1 μmol/L 和 5 μmol/L GW4064 作用下,SHP mRNA 的表达水平与对照组比较显著增加($P < 0.05$)。同样,L02 细胞在给予 50 μmol/L 和 100 μmol/L CDCA 或 1 μmol/L 和 5 μmol/L GW4064 后,其 SHP mRNA 的表达水平与对照组比较也显著增加($P < 0.05$)。见图 1、表 1。以上结果表明,HepG2 与 L02 细胞 FXR 的活性在 FXR 配体 CDCA 和 GW4064 作用下呈剂量依赖性升高。



A:HepG2 细胞;B:L02 细胞

M:100 bp DNA 标准;1:CDCA 对照组;2:CDCA 50 μmol/L 处理;3:CDCA 100 μmol/L 处理;4:GW4064 对照组;5:GW4064 1 μmol/L 处理;6:GW4064 5 μmol/L 处理

图 1 RT-PCR 检测不同浓度 CDCA 和 GW4064 处理 HepG2 和 L02 细胞后 SHP mRNA 表达

2.2 FXR 上调 FGF21 mRNA 的表达水平

分别给予 HepG2 与 L02 细胞 50 μmol/L 和 100 μmol/L CDCA 或 1 μmol/L 和 5 μmol/L GW4064 后 FGF21 mRNA 表达水平与对照组比较也明显升高,并呈配体剂量依赖性($P < 0.05$,图 2、表 2)。

2.3 FXR 上调 FGF21 蛋白表达水平

采用 Western blot 方法检测了分别给予 HepG2 与 L02 细胞 0、50 μmol/L 和 100 μmol/L CDCA 或 0、1 μmol/L 和 5 μmol/L GW4064 后 FGF21 蛋白表达情况。结果显示,HepG2 与 L02 细胞 FGF21 蛋白表达水平呈配体依赖性增加($P < 0.05$,图 3、表 3)。

表1 不同浓度 CDCA、GW4064 处理对 HepG2、L02 细胞 SHP mRNA 表达的影响[$n=3$, P_{50}(P_{25}, P_{75})]

细胞株	CDCA(μmol/L)			GW4064(μmol/L)		
	0	50	100	0	1	5
HepG2 细胞	0.473(0.446,0.479)	0.679(0.646,0.692)[a]	1.352(1.286,1.385)[a]	0.638(0.637,0.668)	0.844(0.787,0.866)[a]	1.089(1.019,1.119)[a]
L02 细胞	0.985(0.962,1.024)	1.080(1.073,1.144)[a]	1.545(1.517,1.597)[a]	1.126(1.086,1.139)	1.865(1.844,1.917)[a]	1.892(1.866,1.975)[a]

a：$P<0.05$，与对应 0 μmol/L 浓度比较

表2 不同浓度 CDCA、GW4064 处理对 HepG2、L02 细胞 FGF21 mRNA 表达的影响[$n=3$, P_{50}(P_{25}, P_{75})]

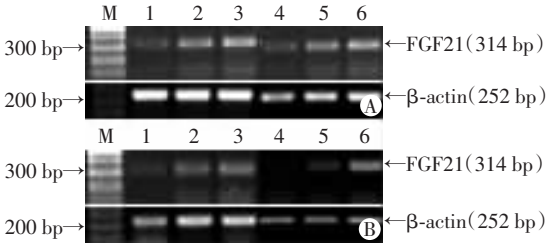
细胞株	CDCA(μmol/L)			GW4064(μmol/L)		
	0	50	100	0	1	5
HepG2 细胞	0.489(0.472,0.524)	0.606(0.600,0.637)[a]	0.887(0.830,0.890)[a]	1.041(1.039,1.103)	1.364(1.267,1.404)[a]	1.775(1.697,1.780)[a]
L02 细胞	1.257(1.254,1.283)	1.685(1.670,1.703)[a]	2.152(2.138,2.181)[a]	0.687(0.662,0.695)	1.094(1.025,1.096)[a]	1.862(1.804,1.864)[a]

a：$P<0.05$，与对应 0 μmol/L 浓度比较

表3 不同浓度 CDCA、GW4064 处理对 HepG2、L02 细胞 FGF21 蛋白表达的影响[$n=3$, P_{50}(P_{25}, P_{75})]

细胞株	CDCA(μmol/L)			GW4064(μmol/L)		
	0	50	100	0	1	5
HepG2 细胞	0.225(0.221,0.226)	0.359(0.358,0.360)[a]	0.441(0.425,0.451)[a]	0.258(0.235,0.261)	0.330(0.328,0.330)[a]	0.567(0.561,0.597)[a]
L02 细胞	0.387(0.380,0.403)	0.695(0.694,0.731)[a]	1.187(1.150,1.194)[a]	0.524(0.495,0.526)	0.868(0.839,0.901)[a]	1.538(1.456,1.546)[a]

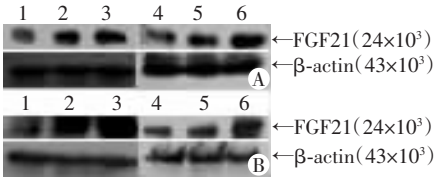
a：$P<0.05$，与对应 0 μmol/L 浓度比较



A：HepG2 细胞；B：L02 细胞

M：DNA 标准；1：CDCA 对照组；2：CDCA 50 μmol/L 处理；3：CDCA 100 μmol/L 处理；4：GW4064 对照组；5：GW4064 1 μmol/L 处理；6：GW4064 5 μmol/L 处理

图2 RT-PCR 检测不同浓度 CDCA 和 GW4064 处理 HepG2 和 L02 细胞后 FGF21 mRNA 表达



A：HepG2 细胞；B：L02 细胞

1：CDCA 对照组；2：CDCA 50 μmol/L 处理；3：CDCA 100 μmol/L 处理；4：GW4064 对照组；5：GW4064 1 μmol/L 处理；6：GW4064 5 μmol/L 处理

图3 Western blot 检测不同浓度 CDCA 和 GW4064 处理 HepG2 和 L02 细胞后 FGF21 蛋白表达

3 讨论

FGF21 主要表达于肝脏，在脂肪组织中有少量表达[3]，又发现在鼠胰腺 β-细胞也有少量表达[6]，自其被发现以来，由于其极强的生物学功能，如改善胰岛素抵抗[7]；抑制胰腺 β 细胞凋亡[6]；清除甘油三酯，促进机体生酮作用、肝脂质氧化[8]等，迅速受到人们的关注，而其降低体质量，改善肥胖动物代谢状态的作用也不断被发现。当给予患糖尿病的恒河猴 FGF21 喂养时，空腹血糖、果糖胺、甘油三酯、胰岛素、糖原均降低，并且未出现低血糖血症，恒河猴的体质量明显降低，同时还发现，低密度脂蛋白(LDL)胆固醇水平降低，而高密度脂蛋白(HDL)胆固醇水平增高[7]。另一项研究发现，FGF21 在给饮食诱导肥胖小鼠和 Leptin 缺失肥胖小鼠中，体现了很好的减肥功效[9]。Xu 等[10]通过使用高脂饮食喂养小鼠，诱导小鼠肥胖，然后给予 FGF21 处理，发现肥胖小鼠体质量明显降低，血循环中糖、胰岛素、甘油三酯、胆固醇、游离胆汁酸等水平，并伴有能量消耗的增加。目前，FGF21 降低体质量的机制尚未清楚。研究表明，FGF21 表达受过氧化物增殖受体 α(peroxisome profilerators activated receptorα，PPARα)[11]、过氧化物增殖受体 γ(peroxisome profilerators activated receptor γ，PPARγ)[12]、视黄酸受体相关孤儿受体 α(retinoic acid receptor-related orphan receptorα，RORα)调控[13]，而 FXR 对 FGF21 的调控作用尚少见报道。

FXR 高表达于肝脏、小肠、肾和肾上腺[14-15]，在血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中也有低水平的表达[16-18]，目前研究发现，FXR 通过对不同糖脂代谢相关基因的调控，在抗糖尿病和动脉粥样硬化等代谢性疾病中具有重要的作用[5]。本实验组以前研究发现，FXR 可下调在脂肪的吸收、转运、氧化及酯化过程中起到重要作用的肝型脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid-binding protein，L-FABP)的表达，为 FXR 生物学功能及其调控基因的研究提供了新的内容[19]。那么 FXR 作为体内具有重要功能的代谢调控因子在抵抗肥胖是否也具有作用呢？为此，本实验以 HepG2 和 L02 细胞为模型，就 FXR 与 FGF21 的关系进行了研究。首先，使用 FXR 激动剂 CDCA 或 GW4064 处理细胞，检测到 FXR 特异性靶基因 SHP mRNA 上调，证明 FXR 在两种细胞中被激活。之后的实验发现，CDCA

和GW4064均可使HepG2和L02细胞中FGF21的mRNA和蛋白水平上调，并呈明显的CDCA或GW4064剂量依赖性，说明FXR活化后可以上调FGF21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FXR结合元件（FXR element，FXRE）来调控基因的表达[20]。目前发现的FXRE大多数由反向重复模序AGGTCA组成，中间被一个核苷酸隔开，即反向重复序列IR-1（inverted repeats separated by 1 bp，IR-1），此序列为FXR结合的经典序列。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，而关于FXR对FGF21调控的具体机制还需进一步研究。

参考文献：

[1] Mokdad A H, Ford E S, Bowman B A, *et al*. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001 [J]. JAMA, 2003, 289(1): 76-79.
[2] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, *et al*. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1492(1): 203-206.
[3] Kharitonenkov A, Shiyanova T L, Koester A, *et al*. FGF-21 as a novel metabolic regulator [J]. J Clin Invest, 2005, 115(6): 1627-1635.
[4] Forman B M, Goode E, Chen J, *et al*. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites [J]. Cell, 1995, 81(5): 687-693.
[5] Zhang Y, Edwards P A. FXR signaling in metabolic disease [J]. FEBS Lett, 2008, 582(1): 10-18.
[6] Wente W, Efanov A M, Brenner M, *et al*. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways [J]. Diabeties, 2006, 55(9): 2470-2478.
[7] Kharitonenkov A, Wroblewski V J, Koester A, *et al*. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21 [J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 774-781.
[8] Badman M K, Pissios P, Kennedy A R, *et al*. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states [J]. Cell Metab, 2007, 5(6): 426-437.
[9] Coskun T, Bina H A, Schneider M A, *et al*. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice [J]. Endocrinology, 2008, 149(12): 6018-6027.
[10] Xu J, Lloyd D J, Hale C, *et al*. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice [J]. Diaberes, 2009, 58(1): 250-259.
[11] Lundasen T, Hunt M C, Nilsson L M, *et al*. PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21 [J]. Biochem Res Biophys Res Commun, 2007, 360(2): 437-440.
[12] Muise E S, Azzolina B, Kuo D W, *et al*. Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states [J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(2): 403-412.
[13] Wang Y, Solt L A, Burris T P. Regulation of FGF21 expression and secretion by the retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha [J]. J Biol Chem, 2010, 285(21): 15668-15673.
[14] 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.
[15] 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.
[16] Bishop-Bailey D, Walsh D T, Warner T D. Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(10): 3668-3673.
[17] He F, Li J, Mu Y, *et al*. Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells [J]. Circ Res, 2006, 98(2): 192-199.
[18] Renga B, Migliorati M, Mencarelli A, *et al*. Reciprocal regulation of the bile acid-activated receptor FXR and the interferon-gamma-STAT-1 pathway in macrophages [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1792(6): 564-573.
[19] 董金瑜，刘红，彭家和，等. 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 [J]. 第三军医大学学报，2010，32(5)：458-461.
[20] 彭家和，刘红，张迁，等. 小鼠mcp-1基因启动子的克隆及核受体EXR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 2010-11-08 修回 2010-12-07）
（编辑 张 维）

第三军医大学快速高效编成《核事件医学应急与公众防护》

2011年3月11日日本特大地震、海啸引发的福岛5级核电站事故，受到各方面的高度关注。第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室、全军复合伤研究所积极行动，3月18日完成初稿，快速高效编著完成《核事件医学应急与公众防护》，3月31日由人民军医出版社正式出版发行。

这本具有权威性的科普性读物，由我国著名防原医学专家程天民院士和粟永萍教授担任主编，罗成基等专家学者参编，以新颖的“条目式”编写方式，分设基本知识、核事件、核损伤、医学应急、辐射防护和心理防护等六个部分，100项条目，共9万余字。该书阐述了有关核的基本知识，介绍了核事件，特别是核电站事故的发生情况和核事件造成的伤害，地区医院到专科医院的医学应急处置，不同层次的辐射防护，以及心理防护的原则和措施。这本书的出版，对公众普及核知识、防控核事件、加强核防护、医治核损伤、消缓核恐慌、确保核安全将起到积极的促进作用。

（冉新泽，赵虹霖 供稿）