论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0916-04

法尼酯X受体上调载脂蛋白F在肝细胞中的表达

李良鹏[1],刘 红[2],彭家和[1],王永超[1],张 艳[1],董金瑜[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内科[2])

【摘要】 **目的** 研究法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR)的激活在肝细胞中对载脂蛋白F(apolipoprotein F, ApoF)基因表达的影响。**方法** 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法和Western blot检测不同浓度鹅脱氧胆酸(chenodeoxy cholic acid,CDCA,0、25、50、100 μmol/L)和人工合成FXR配体GW4064(0、0.02、0.2、2 μmol/L)处理后HepG2和L02细胞中的小分子异二聚体伴侣(small heterodimer partner,SHP)及ApoF的mRNA和蛋白水平变化。**结果** 结果 ①经FXR天然配体CDCA处理24 h后,不同浓度处理组细胞SHP mRNA水平、ApoF mRNA和蛋白水平均显著高于未处理组($P<0.05$)。② 经FXR人工合成配体GW4064处理24 h后,不同浓度处理组细胞SHP mRNA水平、ApoF mRNA和蛋白水平均显著高于未处理组($P<0.05$)。**结论** 肝细胞株HepG2和L02经FXR配体CDCA或GW4064处理后,FXR被激活,并上调ApoF的mRNA和蛋白水平。

【关键词】 法尼酯X受体;载脂蛋白F;胆固醇酯转运蛋白

【中图法分类号】 R333.4;R341;R394.2 【文献标志码】 A

Farnesoid X receptor upregulates apolipoprotein F expression in cultured liver cells

Li Liangpeng[1], Liu Hong[2], Peng Jiahe[1], Wang Yongchao[1], Zhang Yan[1], Dong Jinyu[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 apolipoprotein F (ApoF) 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, 25, 50 or 100 μmol/L, or with another agonist GW4064 at 0, 0.02, 0.2, or 2 μmol/L respectively, the mRNA expressions of FXR specific target gene small heterodimer partner (SHP) and ApoF were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The apolipoprotein F protein level was determined by Western blotting. **Results** After treated with CDCA for 24 h, the mRNA levels of SHP and ApoF in the treated cells were significantly higher than the untreated cells ($P<0.05$), so did the protein expression of ApoF (0.884 ± 0.091 *vs* 0.185 ± 0.030, $P<0.05$). After treated with GW4064 for 24 h, the SHP and ApoF expressions at mRNA level were significantly increased in the treated cells than the untreated cells ($P<0.05$), so did the protein expression of ApoF ($P<0.05$). **Conclusion** After the treatment of CDCA and GW4064, FXR is activated in HepG2 cells and L02 cells, which upregulates the expression of apoF.

【**Key words**】 Farnesoid X receptor; apolipoprotein F; cholesterol ester transfer protein

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

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是常见的心脑血管疾病[1],体内高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)降低是AS形成的危险因素之一[2]。法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR)是一种参与调控脂代谢的核受体,以鹅脱氧胆汁酸(chenodexycholicacid, CDCA)为最适天然配体,其基因敲除模型表现出HDL清除率下降。FXR在肝、小肠、肾上腺皮质等组织细胞高表达[2-3],而在血管内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞中有少量表达[4-6]。FXR可通过调控脂代谢相关基因,而影响血中HDL、LDL、TG的水平[7-8]。载脂蛋白F(apolipoprotein F, ApoF)为1999年新克隆的一种载脂蛋白[9],在血浆中主要存在于高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)中,少量存在低密度脂蛋白中(low density lipoprotein,LDL),其生理作用是抑制CETP介导的脂蛋白之间的胆固醇酯(cholesterol ester, CE)和甘油三酯(triglyceride, TG)的交换。这

【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

种脂质交换可降低血中 HDL 的水平，故 CETP 的人工合成抑制剂被认为有望成为治疗动脉粥样硬化的药物[10]。ApoF 作为天然存在的蛋白质分子，发挥抑制 CETP 活性的作用，目前少见 FXR 影响 ApoF 表达的报道。因此，本研究通过观察 FXR 激动剂对 ApoF 表达的影响，为 FXR 调节 ApoF 及在脂代谢中的作用提供实验依据及为心脑血管疾病防治提供新的靶标分子。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 人肝癌细胞，L02 人胎肝细胞株由本实验室保存。DMEM 高糖培养基，RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司；胎牛血清购自 TBD，小牛血清购自四季青公司。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 试剂购自 Invitrogen 公司；RT-PCR 逆转录试剂盒试剂盒购自 Promega 公司；r*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司，羊抗人 ApoF 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗购自广州中杉金桥公司，RIPA 蛋白裂解液购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 使用含有 10% 小牛血清的 DMED 高糖培养基培养，L02 细胞株使用还有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养，均加入 100 U/ml 青霉素和 10 mg/ml 链霉素（碧云天）。细胞培养于 37 ℃恒温、CO_2 含量为 5% 的细胞孵箱。选择进入对数生长期的细胞进行胰酶消化，以 0.5 $\times 10^6$/孔密度接种至 6 孔细胞培养板中，加药时使用含 2% 小牛/胎牛血清的细胞培养基，加入不同浓度的 CDCA（0、25、50、100 μmol/L）或者 GW4064（0、0.02、0.2、2 μmol/L）培养 24 h，以备下一步实验。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应（RT-PCR） 细胞加入不同浓度 CDCA 和 GW4064 后培养 24 h，然后用 Trizol（Invitrogen）试剂提取总 RNA，逆转录按 Promega 逆转录试剂盒说明书操作，将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA 第 1 链，以供下一步 PCR 使用。ApoF、SHP 及 β-actin 引物使用 Primer 3 在线引物设计软件设计，序列为：SHP 上游引物：5′-TGGCCCAAGATGCTGTG-3′，下游引物：5′-TCGGAGGATGGTCCCTTTC-3′；ApoF 上游引物：5′-GCAGCCTGAAGAGTGGTACTCTC-3′，下游引物：5′-CATTCAGCCAACATTCCCATCTC-3′；β-actin 上游引物：5′-CCATGTACGTTGCTATCCAGG-3′，下游引物：5′-AGAGGCGATTTCCCGCTCGG-3′。引物委托 Invitrogen 公司（上海）合成，工作浓度为 10 μmol/L。反应步骤：SHP：94 ℃热变性 4 min；94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 min，循环 30 次；ApoF：94 ℃变性 4 min；94 ℃ 30 s，62 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，循环 30 次；β-actin：94 ℃ 4 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，25 个循环，反应结束后取 PCR 产物 5 μl，经含有 0.5 g/ml 溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，经 Bio-Rad 凝胶成像系统扫描软件分析后，计算目的基因片段条带与 β-actin 条带二者光密度的比值[11]。

1.2.3 Western blot 细胞总蛋白提取液（RIPA）抽提细胞总蛋白，考马斯亮蓝法进行蛋白定量，各组样品上样量统一为 60 μg，经 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶 100 V 电泳 1.5 h。使用 Bio-Rad 半干转膜仪将蛋白转移至 NC 膜，5% 脱脂奶粉 37 ℃封闭 1 h，与一抗（ApoF 一抗稀释比例 1∶500，β-actin 一抗稀释比例1∶1 000）4 ℃孵育过夜，0.1% PBST 洗涤 30 min，二抗（1∶30 000）室温孵育 1 h，0.10% PBST 洗涤 30 min，使用 ECL（Pierce）显色，暗室内曝光 X 线胶片 30 s、常规方法显影、定影。Quantity One 软件（Bio-Rad）对杂交条带进行扫描，收集灰度值的密度，以供定量分析。

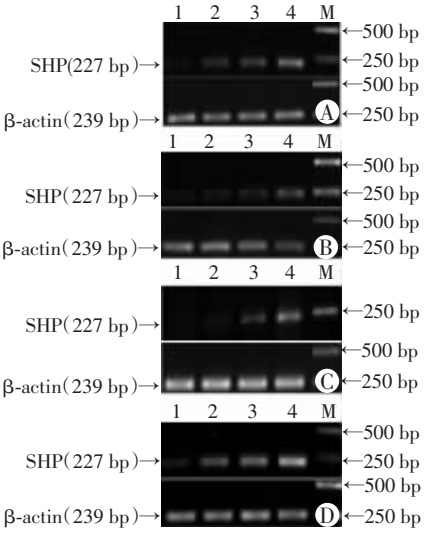
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件分析，组间比较采用 t 检验，组内差异采用方差分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 GW4064 和 CDCA 激活 FXR 活性

SHP 是目前公认 FXR 的靶基因，为证明 FXR 在 HepG2 细胞中具有功能活性，用 RT-PCR 方法检测 HepG2 细胞 SHP 的 mRNA 水平，从而反映 FXR 的功能活性。结果显示：FXR 天然配体 CDCA 作用 HepG2 细胞 24 h，随着 CDCA 浓度的增加（0、25、50、100 μmol/L），SHP mRNA 表达升高（$P < 0.05$），说明 FXR 在 HepG2 中具有功能活性（图 1、表 1）。



A、B：L02 细胞；C、D：HepG2 细胞；M：DNA 标准；A、C 中 1：空白对照（加入 5 μl DMSO）；2～4 分别为 CDCA 25、50、100 μmol/L 组；B、D 中 1：空白对照（加入 1 μl DMSO）；2～4 分别为 GW4064 0.02、0.2、2 μmol/L 组

图 1 CDCA、GW4064 上调 HepG2 和 L02 细胞中 SHP mRNA 水平

2.2 FXR 上调 ApoF mRNA 表达水平

为探讨 FXR 激动剂 CDCA 和 GW4064 可否诱导 HepG2 和 L02 细胞中 ApoF mRNA 表达，RT-PCR 结果显示：FXR 天然配体 CDCA 和人工合成激动剂 GW4064 作用 HepG2 和 L02 细胞 24 h，随着 CDCA 和 GW4064 浓度的增加（0、25、50 及 100 μmol/L 和 0、0.02、0.2、2 μmol/L），ApoF mRNA 表达升高（$P < 0.05$），说明 FXR 在 HepG2 和 L02 中被其配体激活后，可上调 ApoF mRNA 表达水平（图 2、表 2）。

2.3 FXR 上调 ApoF 的蛋白表达水平

HepG2 细胞经不同浓度 CDCA（0、25、50、100 μmol/L）和 GW4064（0、0.02、0.2、2 μmol/L）处理 24 h 后，提取细胞总蛋白经 Western blot 检测 ApoF 蛋白质表达量，结果显示：随着 CDCA 和 GW4064 浓度增加，ApoF 蛋白表达升高（$P < 0.05$），其趋势与其 mRNA 表达水平相一致（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($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

细胞株	CDCA(μmol/L)				GW4064(μmol/L)			
	0	25	50	100	0	0.02	0.2	2
HepG2细胞	0.632±0.061	1.042±0.129[a]	1.373±0.051[a]	1.895±0.036[a]	0.983±0.028	1.606±0.133[a]	1.830±0.184[a]	2.540±0.182[a]
L02细胞	0.351±0.034	0.564±0.032[a]	0.661±0.081[a]	0.929±0.076[a]	0.921±0.181	1.341±0.309[a]	1.534±0.092[a]	2.354±0.172[a]

a:$P<0.05$,与对应未加药物处理组(0 μmol/L)比较

表2 不同浓度CDCA、GW4064处理对HepG2、L02细胞ApoF mRNA水平的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

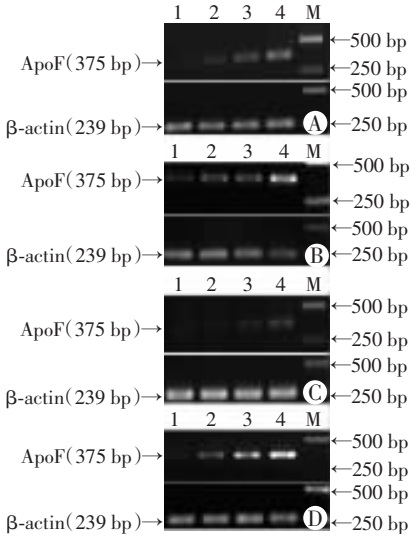
细胞株	CDCA(μmol/L)				GW4064(μmol/L)			
	0	25	50	100	0	0.02	0.2	2
HepG2细胞	0.155±0.033	0.195±0.017	0.290±0.020[a]	0.442±0.014[a]	1.116±0.078	1.881±0.159[a]	1.992±0.133[a]	2.716±0.254[a]
L02细胞	0.193±0.022	0.371±0.034[a]	0.528±0.085[a]	0.759±0.047[a]	0.449±0.056	0.849±0.061[a]	0.917±0.086[a]	1.156±0.117[a]

a:$P<0.05$,与对应未加药物处理组(0 μmol/L)比较

表3 不同浓度CDCA、GW4064处理对HepG2、L02细胞ApoF蛋白表达的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

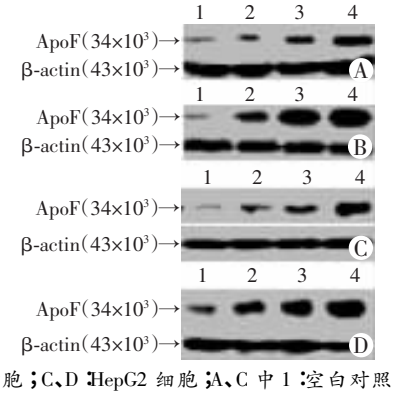
细胞株	CDCA(μmol/L)				GW4064(μmol/L)			
	0	25	50	100	0	0.02	0.2	2
HepG2细胞	3.680±0.121	9.904±0.333[a]	11.164±0.376[a]	11.883±0.310[a]	3.134±0.506	5.125±0.010[a]	10.303±0.505[a]	10.859±0.569[a]
L02细胞	0.185±0.030	0.280±0.046[a]	0.496±0.122[a]	0.884±0.091[a]	0.204±0.053	0.286±0.038[a]	0.446±0.045[a]	0.770±0.120[a]

a:$P<0.05$,与对应未加药物处理组(0 μmol/L)比较



A、B:L02细胞;C、D:HepG2细胞;M:DNA标准;A、C中1:空白对照(加入5 μl DMSO);2~4分别为CDCA 25、50、100 μmol/L组;B、D中1:空白对照(加入1 μl DMSO);2~4分别为GW4064 0.02、0.2、2 μmol/L组

图2 CDCA、GW4064上调HepG2和L02细胞中ApoF mRNA水平



A、B:L02细胞;C、D:HepG2细胞;A、C中1:空白对照(加入5 μl DMSO);2~4:CDCA 25、50、100 μmol/L组;B、D中1:空白对照(加入1 μl DMSO);2~4:GW4064 0.02、0.2、2 μmol/L组

图3 CDCA、GW4064上调HepG2和L02细胞中ApoF蛋白表达

3 讨论

高LDL水平和低HDL水平是动脉粥样硬化中的2个危险因素,HDL负责胆固醇的逆向转运(RCT),把外周组织的胆固醇运送到肝脏进行代谢清除,因而HDL被认为是具有抗动脉粥样硬化作用的脂蛋白[2]。CETP是调控胆固醇的逆向转运的一个关键分子,它负责把HDL中的胆固醇酯运送到LDL和VLDL中,同时把LDL,VLDL中的TG运送到HDL中,有研究证实,CETP直接减少了血浆中HDL的水平,并且增加了LDL的水平,有减弱RCT的作用,在兔的在体实验中发现因为血浆存在高水平CETP的而具有高动脉粥样硬化易患性,而在先天性CETP缺陷的人群研究中发现高水平的HDL(>60 mg/dl),且具有低冠心病易患性,因此认为CETP的抑制能起到抗动脉粥样硬化的作用[12]。目前有3种人工合成的CETP抑制剂进行了临床实验[13],因出现了严重的高血压副作用而中止并且没有取得预想的结果[14],但是CETP抑制剂的研究却并没有停止。

一种具有抑制CETP功能的蛋白分子在1982年首次从血浆分离[14],命名为载脂蛋白F(ApoF),并于1999年完成克隆与鉴定[15]。ApoF具有抑制CETP的脂质交换的作用,并且有研究发现这种作用是通过ApoF与血浆中的各种脂蛋白竞争CETP的结合位点来实现的,在随后的研究中还发现ApoF水平与血浆甘油三酯水平呈负相关[16-19]。

在脂代谢的调节中,FXR发挥了广泛而重要的作用,越来越多的参与脂代谢的基因被证实受到FXR直接或者间接的调控。FXR属于核受体超家族成员,具有典型的核受体结构,对其功能的研究最初发现FXR

参与调节胆汁酸代谢,它的激活可以抑制合成胆汁酸的限速酶 CYP7A1[9]。在后来的研究中人们发现 FXR 参与调控糖代谢,在体研究发现 FXR 的激活可以改善 db/db 小鼠的胰岛素抵抗,而 FXR 基因缺陷型小鼠则表现为糖耐量受损和胰岛素抵抗。FXR 在调节脂代谢方面亦发挥着广泛而重要的作用,FXR 可以通过抑制甾醇反应原件结合蛋白-1c(SREBP-1c)和激活 PPARγ 来减少 TG 的合成。FXR 可以通过上调 Apo-CⅡ,并负性调节 apo-CⅢ来增加 LPL 的活性,LPL 是催化脂蛋白脂肪分解的关节酶,可以催化极度密度脂蛋白(VLDL)和乳糜微粒(CM)中的脂肪分解,进而降低血浆甘油三酯浓度。此外,在 FXR 基因缺陷型的 $apoe^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化程度明显加重[20]。以上研究表明,FXR 具有抗 AS 作用。

为研究 ApoF 是否受 FXR 调控,我们使用 FXR 天然配体 CDCA 和人工合成配体 GW4064 处理 HepG2 细胞和 L02 细胞 24 h,为验证 FXR 的激活,我们检测了 FXR 经典的靶基因 SHP mRNA 水平,结果表明 SHP mRNA 水平显著升高,提示 FXR 被激活;进一步检测 CDCA 和 GW4064 处理 HepG2 和 L02 细胞后 ApoF mRNA 水平和蛋白水平,发现 ApoF mRNA 和蛋白水平都显著上调,提示 FXR 的激活可以上调 ApoF 的表达。FXR 被激活后,可和 RXR 结合形成异源二聚体,结合到基因调控序列的结合位点上,调节其靶基因的转录;也可以通过激活另一基因(如 SHP)来间接调控其下游基因的转录。通过在线分析软件(www.nubiscan.unibas.ch)对 ApoF 基因上游序列(约 3 000 bp)进行生物信息学分析,发现在 -2 100 bp 处存在可能的 FXR 结合位点(ER1, TCACCTtAGGTCA),故我们推测 FXR 可能直接以 FXR/RXR 二聚体的形式直接结合 ApoF 的上游调控序列,但是 FXR 是否通过和 RXR 形成异源二聚体结合到该序列而发挥调控作用还需进一步实验证实。FXR 激活后上调 ApoF,进而抑制 CETP 的活性,最终导致血浆 HDL 水平升高,具有抗 AS 作用。该研究为 CETP 抑制剂的开发提供新的路径和新的靶分子,为进一步研究 FXR 上调 ApoF 的分子机制奠定实验基础。

参考文献:

[1] Hageman J, Herrema H, Groen A K, *et al*. A role of the bile salt receptor FXR in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(8): 1519 - 1528.

[2] 李亚, 王玉明, 贺勇, 等. ABCA1 基因变异与血浆高密度脂蛋白胆固醇水平的关系[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(24): 2347 - 2349.

[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] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Lu T T, Makishima M, Repa J J, *et al*. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors[J]. Mol Cell, 2000, 6(3): 507 - 515.

[9] Izem L, Morton R E. Molecular cloning of hamster lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) and regulation of its expression by hyperlipidemia[J]. J Lipid Res, 2009, 50(4): 676 - 684.

[10] Barter P J, Brewer H B Jr, Chapman M J, *et al*. Cholesteryl ester transfer protein: a Novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(2): 160 - 167.

[11] 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.

[12] Navab M, Anantharamaiah G M, Reddy S T, *et al*. HDL as a biomarker, potential therapeutic target, and therapy [J]. Diabetes, 2009, 58(12): 2711 - 2717.

[13] Shah P K. Inhibition of CETP as a novel therapeutic strategy for reducing the risk of atherosclerotic disease[J]. Eur Heart J, 2007, 28(1): 5 - 12.

[14] Masson D. Anacetrapib, a cholesterol ester transfer protein (CETP) inhibitor for the treatment of atherosclerosis[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2009, 10(9): 980 - 987.

[15] Hermann M, Ruschitzka F T. The hypertension peril: lessons from CETP inhibitors[J]. Curr Hypertens Rep, 2009, 11(1): 76 - 80.

[16] Koren E, McConathy W J, Alaupovic P. Isolation and characterization of simple and complex lipoproteins containing apolipoprotein F from human plasma [J]. Biochemistry, 1982, 21(21): 5347 - 5351.

[17] Wang X, Driscoll D M, Morton R E. Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F[J]. J Biol Chem, 1999, 274(3): 1814 - 1820.

[18] Morton R E, Gnizak H M, Greene D J, *et al*. Lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) concentration in normolipidemic and hyperlipidemic subjects[J]. J Lipid Res, 2008, 49(1): 127 - 135.

[19] Paromov V M, Morton R E. Lipid transfer inhibitor protein defines the participation of high density lipoprotein subfractions in lipid transfer reactions mediated by cholesterol ester transfer protein (CETP) [J]. J Biol Chem, 2003, 278(42): 40859 - 40866.

[20] Zhang Y, Wang X, Vales C, *et al*. FXR deficiency causes reduced atherosclerosis in $Ldlr^{-/-}$ mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(10): 2316 - 2321.

(收稿 2010-11-08 修回 2011-01-10)
(编辑 王 红)