文章编号:1000-5404(2012)18-1831-04

论著

CDCA在C57BL/6小鼠中上调肝脏成纤维细胞生长因子21表达及其效应

刘小花[1],王永超[2],李良鹏[2],彭家和[2],江 渝[2],刘智敏[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,分子医学与肿瘤研究中心[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[2])

[摘要] **目的** 研究法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR)的激活对C57BL/6小鼠肝脏中纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor 21,FGF21)基因表达的影响。**方法** 将18只3~4周龄C57BL/6小鼠随机分为3组,分别使用不同浓度鹅脱氧胆酸(chenodeoxy cholic acid,CDCA,0、10 mg/kg和50 mg/kg)给小鼠灌胃7 d,处死后分别提取小鼠肝脏总RNA和总蛋白,采用RT-PCR法和Western blot法检测各组小鼠FGF21RNA和蛋白表达水平的变化;同时用酶法测定检测小鼠血甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)及血糖(GLU)变化。**结果** C57BL/6小鼠肝脏中FGF21 RNA和蛋白的表达水平呈CDCA剂量依赖型增高;小鼠血脂及血糖测定结果显示:TG,TC和血糖随CDCA浓度的升高而下降。**结论** CDCA可上调C57BL/6小鼠肝脏中FGF21的表达并导致血TG、TC及GLU下降。

[关键词] 法尼酯X受体;成纤维细胞生长因子21;鹅脱氧胆酸;血脂;血糖
[中图法分类号] R322.47;R329.26;R394.2 [文献标志码] A

Chenodesoxycholic acid up-regulates fibroblast growth factor 21 and its effect on C57BL/6 mice

Liu Xiaohua[1], Wang Yongchao[2], Li Liangpeng[2], Peng Jiahe[2], Jiang Yu[2], Liu Zhimin[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Molecular Medicine and Tumor Research, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences. Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the activation of the farnesoid X receptor (FXR) on the expression of fibroblast growth factor 21 (FGF21) in C57BL/6 mice. **Methods** A total of 18 male C57BL/6 mice (3 to 4 weeks old) were randomly divided into 3 groups and treated with FXR agonist, chenodesoxycholic acid (CDCA) at different doses of 0, 10, and 50 mg/kg respectively for a week. After the treatment, the mice was sacrificed for their liver tissue. RT-PCR and Western blotting were performed to test the expression of FGF21 at mRNA and protein levels in the liver tissue. Blood triglycerides (TG), cholesterol (TC) and blood glucose (GLU) were measured by enzymatic determination test. **Results** FXR agonist CDCA up-regulated the FGF21 at mRNA and protein levels in a dose-dependent manner in C57BL/6 liver tissue after treatment for a week. While, blood concentrations of TG, TC and GLU were decreased with the increase of CDCA doses. **Conclusion** CDCA up-regulates FGF21 expression in C57/BL6 mice liver and results in a decrease in plasma TG, TC and blood glucose.

[**Key words**] farnesoid X receptor; fibroblast growth factor 21; chenodesoxycholic acid; plasma lipid; blood glucose

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070228). Corresponding author: Liu Zhimin, E-mail: liuzm9999@yahoo.com.cn

近年来,肥胖已成为危害人体健康的重要因素,常伴有高胆固醇、高血压、高血脂及糖尿病等[1]。成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor 21,FGF21)是新发现的代谢调控因子,主要在肝脏和脂肪细胞中表达[2-3],具有降糖、降脂、降低胰岛素水平,逆转肝脏脂肪变性,提高胰岛素的敏感性[4-5]。法尼酯X受体(Farnesoid X receptor,FXR),作为核受体超家族成员之一,可以通过调节诸多靶基因的表达而在调节糖

[基金项目] 国家自然科学基金(81070228)
[通信作者] 刘智敏,E-mail:liuzm9999@yahoo.com.cn

代谢、脂代谢和胆固醇代谢中发挥着极其重要的作用[6]。我们前期实验已表明,FXR 激活后可在 HepG2 细胞和 L02 细胞中上调 FGF21 的表达[7],因此本实验通过喂食 FXR 激动剂 CDCA 予 C57BL/6 小鼠,以观察在动物体内 FXR 激活后是否对 FGF21 的表达有调节作用及对血脂,血糖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠由第三军医大学实验动物中心购买 3 ~ 4 周,体质量约 10 g。

CDCA 购自 Sigma 公司;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,羊抗小鼠 FGF-21 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;Rat 抗羊辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥公司,PCR 引物合成于英潍捷基(上海)贸易有限公司,RIPA 蛋白裂解液购自碧云天公司。测甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)及血糖试剂盒购自浙江伊利康生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理方法 18 只 C57BL/6 小鼠分成 3 组,每组 6 只。①对照组:用 200 μl 含 0.1% DMSO 的生理盐水灌胃;②CDCA 低剂量组:每只小鼠使用 10 mg/kg CDCA,并混于 100 μl 生理盐水中给小鼠灌胃;③CDCA 高剂量组:每只小鼠使用 50 mg/kg CDCA,并混于 100 μl 生理盐水中给小鼠灌胃。每天 9:00 灌胃 1 次,连续灌胃 7 d,灌胃第 8 天,眼眶取血,将小鼠处死,并取肝脏,将肝脏剪成几块,部分立即提取 RNA,其他则立即放入液氮内保存。

1.2.2 小鼠肝脏 RNA 提取 利用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(invitrogen 公司)提取,所有操作均按说明书进行。取 50 ~ 100 mg 肝脏,加入 1 ml Trizol 试剂,匀浆后于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,上清经 1/5 体积氯仿抽提后,再以 1/2 体积异丙醇沉淀 RNA,沉淀经适量 75% 乙醇洗涤后晾干,溶于适量无 RNase 水,-70 ℃保存备用。

1.2.3 RT-PCR 使用在线引物设计软件 Primer 3.0 设计小鼠 FGF21 引物,上游引物 5′-TACACAGATGACGACCAAGA-3′,下游引物 5′-CTGTAAAGGCTCTACCATGC-3′,产物长度 456 bp,β-actin 上游引物 5′-CCATGTACGTTGCTATCCAGG-3′,下游引物 5′-TCTCCTTAATGCATGCACGA-3′,产物长度 252 bp。引物由 Invitrogen 公司(上海)合成,PCR 反应条件为:95 ℃,5 min 预变性→(95 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,30 s)×30 个循环→72 ℃,5 min PCR 反应完成后,取 10 μl 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 Western blot 检测 ①提取小鼠肝脏总蛋白:液氮罐中取出冻存肝脏,放于冰上待其融化。取 0.1 g 肝脏放入干净玻璃匀浆器中,加入 1 ml RIPA 裂解液(含 1 × cocktail 蛋白酶抑制剂),冰上匀浆,至无明显颗粒。放于冰上30 min,使细胞充分裂解。4 ℃高速离心机中,12 000 r/min 离心 30 min,吸取上清,转移至一新的干净 1.5 ml 离心管中,取 2 μl 蛋白溶液,采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。②检测小鼠肝脏中 FGF21 蛋白表达:配制 12% 聚丙烯酰胺凝胶,100 V 电泳 1.5 h。使用 Bio-Rad 半干转仪将蛋白转移至 NC 膜,5% 脱脂奶粉37 ℃封闭 1 h,与一抗(FGF21:和 β-actin 抗稀释比例:1∶1 000)4 ℃孵育过夜,0.1% PBST 洗涤 30 min,二抗(1∶20 000)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。Quantityone 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 C57BL/6 血浆 TC、TG 和血糖检测

C57BL/6 小鼠眼眶取血得到全血后,室温放置 30 min,4 ℃,3 000 r/min 离心 10 min,取上清,得到血清。将血清放入 EP 管中,可直接用于 TG、TC 及血糖试剂盒测定。血糖采用葡萄糖氧化酶法检测;TG、TC 均采用酶法。

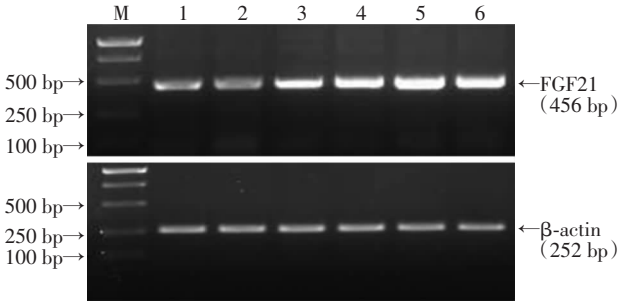
1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 CDCA 上调 C57BL/6 小鼠肝脏中 FGF21 mRNA 的表达

各组取小鼠肝脏组织提取总 mRNA,通过 RT-PCR 检测经 CDCA 处理 7 d 后 C57BL/6 小鼠肝脏组织的 mRNA 水平。结果发现,FXR 激动剂 CDCA 能上调 C57BL/6 小鼠肝脏组织 FGF21 的 mRNA 水平($P < 0.05$,图 1)。

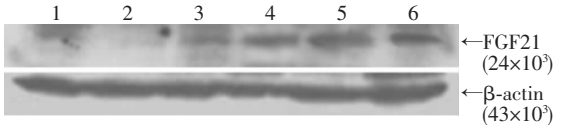


M:标准;1、2:对照组;3、4:CDCA 低剂量组;5、6:CDCA 高剂量组

图 1 RT-PCR 检测各组小鼠肝脏组织 FGF21 mRNA 的表达

2.2 CDCA 上调 C57BL/6 小鼠肝脏中 FGF21 蛋白的表达

各组取小鼠肝脏组织提取总蛋白,通过 Western blot 检测经 CDCA 处理 7 d 后 C57BL/6 小鼠肝脏组织的蛋白。结果发现,FXR 激动剂 CDCA 能上调 C57BL/6 小鼠肝脏组织 FGF21 的蛋白水平($P < 0.05$,图 2)。

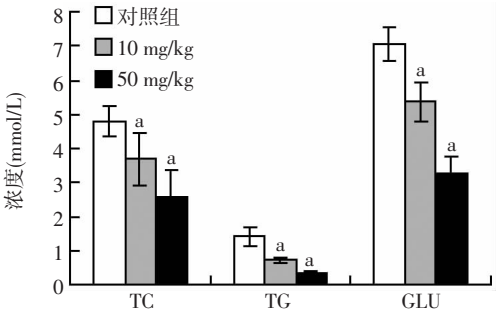


1、2:对照组;3、4:CDCA 低剂量组;5、6:CDCA 高剂量组

图 2 Western blot 检测各组小鼠肝脏组织 FGF21 蛋白的表达

2.3 C57BL/6 小鼠血浆 TC、TG 及血糖检测结果

各组眼眶分别取血后，得到血清。用酶法测定的各组血脂及血糖指标，C57BL/6 小鼠测定结果显示：TG、TC、血糖（GLU）随 CDCA 浓度的升高而下降（图 3）。



a：$P<0.05$，与对照组比较

图 3 灌胃处理各组 C57BL/6 小鼠后 TG、TC 和 GLU 的变化

3 讨论

FGF 生物活性包括细胞凋亡、细胞生存、细胞趋向性、细胞黏附、细胞迁移、细胞分化和细胞增殖等[8]。其中 FGF21 具有内分泌因子的功能，参与机体物质代谢，维持机体内糖脂代谢的平衡[9-10]。Coskun 等[4]对饮食诱导肥胖的 OB/OB 鼠用 FGF21 全身性给药治疗 2 周后，发现其平均体质量下降 20%，并且能量消耗、脂肪的利用、脂质的排泄均增加，肝脏脂肪减少。此外，FGF21 基因缺陷小鼠研究发现：FGF21 基因缺陷小鼠调节和利用脂质的能力显著降低[11]。临床研究[3]发现：在肥胖个体中，FGF21 的血清水平显著升高，与正常对照组存在显著的差异。动物研究[4-5]表明：FGF21 不仅能促进脂肪细胞对葡萄糖的吸收，同时能抑制高脂食物引起的机体肥胖，纠正高脂饮食诱导的脂肪肝，增加能量消耗和改善胰岛素的敏感性，缓解因肥胖引起的综合征。Wente 等[12]发现，在正常小鼠细胞中，FGF-21 可提高胰岛素 mRNA 及蛋白水平，但并不诱导葡萄糖依赖的胰岛素分泌，而在糖尿病小鼠中，FGF-21可增加胰腺 β 细胞数量，提高葡萄糖依赖的胰岛素分泌。此外，在糖尿病伴有高脂血症的猴实验模型中，FGF21 仅能有效的降低血糖浓度，而且能显著降低血清总胆固醇、LDL 和甘油三酯水平，并且在短时间内提高血清 HDL 水平[13]。这些研究结果表明，在病理和生理调节下，FGF21 对维持机体内的糖脂代谢平衡具有重要的作用。

FXR 在肝、小肠、肾上腺皮质等组织细胞高表达[14]，而在血管内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞中有少量表达[15]。FXR 可通过调控脂代谢相关基因，而影响血中 HDL，LDL，TG 的水平。有研究表明，FXR 激动剂已经证实可以减低血浆总胆固醇水平，而增加 HDL-C 的水平[16]。近期研究[17]也发现合成的 FXR 激动剂 GW4064 可下调 db/db 小鼠 SREBP-1C 的表达，改善了该糖尿病小鼠的血脂异常，综上，表明 FXR 可能通过与多个转录因子间的相互作用对胆汁酸、胆固醇、甘油三酯及糖代谢具有调控作用。

本课题组前期研究[7]表明，在细胞水平上 FXR 激活后可上调 FGF21 的表达，因此我们选用了 C57BL/6 小鼠作为动物模型，随机分为 3 组，通过灌胃分别给予不同剂量的 CDCA（0、10、50 mg/kg），处理 7 d 后处死小鼠，取肝脏组织提取总 mRNA 和总蛋白，通过 RT-PCR 和 Western blot 检测 C57BL/6 小鼠肝脏组织的 mRNA 和蛋白表达。结果发现，小鼠肝脏组织中 FGF21mRNA 和蛋白水平明显升高，FXR 上调 FGF21 在 C57BL/6 小鼠肝脏的表达，与细胞水平的结果相符合。此外，我们测定小鼠血脂（TG、TC）及 GLU 经统计学处理分析可知：C57BL/6 小鼠血清中 TG、TC 和 GLU 随 CDCA 浓度的升高而下降，与对照组相比都有显著差异（$P<0.05$），该研究证实了在 C57BL/6 小鼠中 CDCA 可上调肝脏成纤维细胞生长因子 21 表达，并引起血 TG、TC 及血糖下降，与以往相关研究[4-5,12-13]相一致。

参考文献：

[1] Haslam D W, James W P. Obesity [J]. Lancet, 2005, 366(9492): 1197-1209.

[2] Lundasen T, Hunt M C, Nilsson L M, *et al*. PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 360(2): 437-440.

[3] Zhang X, Yeung D C, Karpisek M, *et al*. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans [J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1246-1253.

[4] 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.

[5] 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]. Diabetes, 2009, 58(1): 250-259.

[6] Zhang Y, Edwards P A. FXR signaling in metabolic disease [J]. FEBS Lett, 2008, 582(1): 10-18.

[7] 王永超，刘红，彭家和，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2011，33(9)：912-915.

[8] 任桂萍，尹杰超，王文飞，等. FGF 受体-1 和 FGF 受体-2 介导成纤维细胞生长因子-21 信号传导[J]. 中国科学：生命科学，2010，40(4)：332-341.

[9] 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.

[10] Moyers J S, Shiyanova T L, Mehrbod F, *et al*. Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling [J]. J Cell Physiol, 2007, 210(1): 1-6.

[11] Badman M K, Koester A, Flier J S, *et al*. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis[J]. Endocrinology, 2009, 150(11): 4931-4940.
[12] 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]. Diabetes, 2006, 55(9): 2470-2478.
[13] 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.
[14] Lee F Y, Lee H, Hubbert M L, *et al*. FXR, a multipurpose nuclear receptor [J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(10): 572-580.
[15] 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.
[16] Moschetta A, Bookout A L, Mangelsdorf D J. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model [J]. Nat Med, 2004, 10(12): 1352-1358.
[17] Zhang Y, Lee F Y, Barrera G, *et al*. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(4): 1006-1011.

(**收稿**:2012-03-25;**修回**:2012-05-28)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)18-1834-01

无痛人工流产术应用米索前列醇后的临床观察

张慧娟 (030002 太原,太原市第二人民医院妇产科)

[**关键词**] 米索前列醇;丙泊酚;人工流产术
[**中图法分类号**] R719.3 [**文献标志码**] B

无痛人工流产术的开展使越来越多早孕患者放弃药物流产,直接选择无痛人工流产术。丙泊酚静脉麻醉用于人工流产术,有较好的临床效果,但遇到宫颈条件差(宫颈小、长、坚韧,初孕),扩宫困难时,勉强操作可致麻醉状态下患者身体不自主扭动、抵抗,有致手术损伤的可能(如子宫穿孔、宫颈裂伤)。如无阴道明显出血,则改药物流产。90年代以后,国外越来越多的产科诊所对无痛人工流产术应用米索前列醇。据报道,美国东海岸三州有43%产科诊所在无痛人工流产术应用米索前列醇。英国50.6%产科诊所在无痛人流产术中应用米索前列醇。90年代初,国内部分医疗单位妇产科开始在无痛人工流产术中用米索前列醇。2005年,张艳娥等[1]报道了在无痛人工流产术加米索前列醇终止早孕的临床案例。在此研究基础上,我们应用术前舌下含化米索前列醇片后行无痛人工流产术300例,效果满意,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料

2010年11月至2011年11月本院接诊妊娠6~10周,自愿要求无痛人工流产的健康妇女300例,年龄24.7(16~27)岁,孕1~5次,产0~4次,均无严重呼吸循环系统及内科合并症。随机分为3组,每组100例,A组:术前30 min内诊检查,阴道后穹隆置米索前列醇400 μg;B组:术前30 min舌下含化米索前列醇400 μg;C组:术前不进行任何处理。各组年龄、孕周、体质量、孕次无统计学差异($P>0.05$)。

[**通信作者**] 张慧娟,E-mail:yufeng6119@sina.com

1.2 方法

3组术前禁食水4~6 h。手术时初孕妇取膀胱截石位常规消毒,铺巾,经开放的上脚静脉缓慢推注丙泊酚10~30 ml,平均14 ml。孕妇意识消失后立即开始手术,手术均由经验、专业医师常规操作。观察术后镇痛效果、宫颈软化度、手术时间(开始扩宫至停止吸引时间)、术中出血(量杯法测量)、不良反应(恶心呕吐、寒战、体温升高等)。

1.3 评价标准

1.3.1 术后镇痛效果 显著:患者无腹痛,表情平淡舒适,术中无意识、无呻吟,醒后对手术无记忆。效果欠佳:受术者表情不适,甚至痛苦面容,下腹牵拉感,腰底部酸胀,手捂腹部,休息时间较长。

1.3.2 宫颈软化度 按手术情况分显效,7号宫颈扩张器一次性顺利通过;有效,7号宫颈扩张器有阻力通过;无效,7号宫颈扩张器不能通过,需进一步扩宫。

1.4 统计学方法

计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验和χ^2检验。

2 结果

2.1 术后镇痛效果比较

A、B组患者术后镇痛效果显著,C组60例患者术后有镇痛效果欠佳。A、B组镇痛显效率均为100%,差异无显著性($P>0.05$)。A组或B组与C组比较,差异有显著性($P<0.05$)。

2.2 宫颈软化情况

计数能一次性通过7号扩张器的例数,A组91例(91%),B组58例(58%),C组39例(39%)。A组和B组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),A组或B组与C组比较,差异有显著性($P<0.05$)。

(下转1843页)