

· 实验研究 ·

雌激素与人尿酸盐转运子(hUAT)基因表达的相关性研究

卢彦敏¹, 王霞^{2△}, 付正菊², 宋妮², 李长贵², 付爱荣¹

(1. 青岛经济技术开发区第一人民医院保健科, 山东 266555;

2. 青岛大学医学院附属医院内分泌科, 山东 266003)

摘要:目的 观察不同浓度雌激素对肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)人尿酸盐转运子(hUAT)基因表达的调节作用。方法 根据培养液中所含雌激素浓度由低到高,将 HK-2 细胞分为 5 组,每组均培养 6 瓶细胞。上述细胞在不同培养液中分别培养 48 h。采用荧光定量 PCR 法检测 HK-2 细胞中 hUAT mRNA 的相对表达量。结果 所有标本均能检测到 hUAT mRNA 的表达,其中,与 B0 组(乙醇对照组)比较,B3(10^{-8} mol/L)、B4(10^{-6} mol/L)组 hUAT mRNA 水平明显升高($P < 0.05$),B1(10^{-12} mol/L)、B2(10^{-8} mol/L)组 hUAT mRNA 水平变化不明显($P > 0.05$)。与 B1、B2 组比较,B3、B4 组 hUAT mRNA 水平明显升高($P < 0.05$)。B3 组与 B4 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。B1 组与 B2 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。B4 组 hUAT mRNA 水平最高,是 B0 组的 1.87 倍。结论 雌二醇可上调 hUAT mRNA 的表达,且可能存在相应的作用阈值。

关键词:雌激素;尿酸;肾小管;细胞;培养;基因表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.017

中图分类号:R589.702

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)20-2739-02

Research on the relationship between estradiol and human urate transporter (hUAT)

LU Yan-min¹, WANG Xia^{2△}, FU Zheng-ju², et al.

(1. Department of Health Protection, First People's Hospital of Qingdao Economic and Technology Development Area, Shandong 266555, China; 2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Shandong 266003, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of estradiol in different concentrations on the expression of human urate transporter (hUAT) gene in HK-2 cells. **Methods** HK-2 cells were divided into control and other 4 groups which were cultured with different concentrations of estradiol in each group, 6 bottles of the cells were cultured in vitro for 48 hours. Then the relative quantity of hUAT mRNA in the HK-2 cells was detected by real-time fluorescent quantitative PCR assay. **Results** hUAT mRNA could be detected in all the samples. And the level of hUAT mRNA in the control group was significantly lower than that in the groups of B3 and B4. The quantity of hUAT mRNA in the B4 group was 187% of that in the control. **Conclusion** Estradiol can up-regulate the expression of hUAT gene, and there may be a Threshold.

Key words: estradiol; uric acid; kidney tubules; cells; cultured; gene expression

近年来随着人们生活水平的提高,原发性高尿酸血症的患病率明显上升,人尿酸盐转运子(human urate transporter, hUAT)是调节肾尿酸分泌的关键物质,进入肾近端小管上皮细胞内的尿酸盐 50% 由其介导分泌到管腔,经肾脏排出体外^[1]。推测 hUAT 基因低表达或功能降低可能是原发性高尿酸血症的重要发病原因。目前,对雌激素在尿酸排泄中的作用研究发现,绝经后合并高尿酸血症的女性应用雌激素替代疗法可使血尿酸水平明显下降^[2-3]。本实验对雌激素通过何种机制降低血尿酸水平进行研究。

1 材料与方

1.1 材料 肾小管上皮细胞(HK-2 细胞,购自中国典型培养物收藏中心 CCTCC 细胞库),雌激素(Merck 公司),Trizol RNA 抽提试剂(Takara 公司),DMEM 培养基(美国 Invitrogen GIBCO 公司),hUAT、甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和 Taqman 荧光探针、引物(宝生物工程大连有限公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 HK-2 细胞的培养和分组 细胞培养于 DMEM 培养基中,外加 10% 胎牛血清,每 3~4 天换液 1 次,至细胞生长达

90% 汇合后进行传代。实验所用的细胞为第 3~5 代细胞(将从液氮中复苏的未知代细胞定为第 1 代)。取汇合达 90% 的细胞经胰酶/EDTA 消化制成细胞悬液,继续培养 24 h,使细胞生长达汇合,弃去含血清的培养液,用 PBS 清洗 3 遍后换无血清培养液,继续培养 24 h,使细胞同步处于 G₀ 期。以后所有实验均在无血清条件下进行。

取培养后同步处于 G₀ 期的 HK-2 细胞,按继续培养条件的不同分为 5 组:B0 组(DMEM+乙醇对照组)、B1 组(DMEM + 10^{-12} mol/L 雌激素 + 0.5% 乙醇)、B2 (DMEM + 10^{-10} mol/L 雌激素 + 0.5% 乙醇)、B3 组(DMEM + 10^{-8} mol/L 雌激素 + 0.5% 乙醇)、B4 组(DMEM + 10^{-6} mol/L 雌激素 + 0.5% 乙醇),每组均培养 6 瓶细胞。上述细胞在不同培养液中分别培养 48 h,用胰酶消化,离心后抽提总 RNA 及总蛋白。

1.2.2 HK-2 细胞总 RNA 抽提及 cDNA 制备 应用 Trizol 试剂抽提细胞总 RNA,采用紫外分光光度计测定其浓度。按照逆转录试剂盒说明进行逆转录,制备 cDNA。反应体系如下:2 μ L 的 5 \times primer buffer、0.5 μ L prime enzyme mixI、0.5 μ L oligo dT primer 和 0.5 μ L random 6 mers,终体积为 20 μ L。向反应

△ 通讯作者, E-mail: qdjanewang@126.com。

表 1 不同浓度雌激素对 hUAT 基因表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	雌激素浓度(mol/L)	hUAT C _T	GAPDH C _T	ΔC _T	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_T}
B0 组	0	33.681±0.414	18.892±0.533	14.788±0.207	0.000±0.207	1.000(0.867,1.150)
B1 组	10 ⁻¹²	33.687±0.848	18.926±0.979	14.760±0.207	-0.027±0.207	1.028(0.867,1.189)
B2 组	10 ⁻¹⁰	32.880±0.892	18.151±0.860	14.729±0.211	-0.059±0.211	1.051(0.882,1.221)
B3 组	10 ⁻⁸	32.501±1.014	18.386±1.208	14.114±0.444	-0.674±0.444 ^Δ	1.669(1.003,2.336)
B4 组	10 ⁻⁶	31.847±0.359	17.835±0.803	14.012±0.658	-0.776±0.658*	1.875(0.925,2.825)

与 B0 组比较, ^Δ: $P<0.05$, *: $P<0.01$ 。

体系中加入 0.5 μg/μL 的 RNA 1 μL, 37 °C 水浴 15 min, 85 °C 加热 5 s。逆转录所得的 cDNA 用作 PCR 反应的模板, -20 °C 保存备用。

1.2.3 hUAT mRNA 表达的检测 hUAT、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因引物与探针均由宝生物工程(大连)有限公司设计合成,采用看家基因 GAPDH 进行标化。hUAT 上游引物:5'-ATG GTC AGC ACC TGT TTG AAT AC-3',下游引物:5'-CAG GAA GCC GCC TAT GTC TG-3';TAQMAN 探针 5'-ACC ATC GCC TGA GGA ACC TGC CCA-3',扩增片段长度为 115 bp。内参 GAPDH 上游引物:5'-GGA CCT GAC CTG CCG TCT AG-3',下游引物:5'-TAG CCC AGG ATG CCC TTG AG-3';TAQMAN 探针 5'-CCT CCG ACG CCT GCT TCA CCA CCT-3',扩增片段长度 99 bp。取同一个 cDNA 为模板进行 hUAT、GAPDH 的 PCR 反应。反应体系如下:2 μL cDNA、1.6 μL 探针引物、10 μL Premix ExTaq、0.4 μL ROX II 和 6 μL 超纯水,终体积为 20 μL。按如下程序扩增:96 孔反应板置于荧光定量 PCR 扩增仪,反应参数如下:95 °C、10 s,95 °C、5 s,60 °C、45 s,40 个循环。应用 SDS 软件自动分析,给出各反应的扩增曲线和 Ct 值。依照文献[4-8]的方法进行定量 PCR 的检测与分析。荧光定量 PCR 的结果以 Ct 值显示。Ct 值为每个反应管内的荧光信号达到设定区域值时所经历的循环数。每个样本重复检测 3 次,取平均值为 Ct 值,用 SPSS11.5 软件计算出各段各基因表达的平均 Ct 值,采用相对定量 2^{-ΔΔC_T}法比较各基因的表达差异[4-6]。以 B0 组表达量为 1,2^{-ΔΔC_T}值,即为目的段较正常段基因表达的倍数。

1.3 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用非配对 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

不同浓度雌激素对 hUAT 基因表达的影响见表 1、彩插 I 图 1。加入不同浓度激素培养 48 h 的各组 HK-2 均上调 hUAT 基因的表达。随雌激浓度增加,hUAT mRNA 水平明显升高。与 B0 组比较,B3、B4 组 hUAT mRNA 水平明显升高($P<0.05$),B1、B2 组 hUAT mRNA 水平变化不明显($P>0.05$)。与 B1、B2 组比较,B3 和 B4 组 hUAT mRNA 水平明显升高($P<0.05$)。B3 组与 B4 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。B1 组与 B2 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。B4 组 hUAT mRNA 水平最高,是 B0 组的 1.87 倍。

3 讨 论

高尿酸血症目前已成为严重危害人类健康的常见病、多发病,对高尿酸血症防治的研究已成为国内外学者关注的焦点。

hUAT 是近年来发现的与尿酸排泄有关的管道蛋白,是尿酸由细胞内到细胞外的关键转运子,hUAT 广泛分布于各种组

织细胞中。乳糖和葡萄糖可调节其活性,尿酸酶特异阻断剂——OxOlate、抗结核药物——吡嗪酰胺(PZA)、腺苷在胞浆外侧均可阻断重组 hUAT 的通道活性,影响 hUAT 对尿酸盐的转运[9]。进入肾近端小管的尿酸盐 50% 由其介导分泌到细胞外,排出体外。因此,推测其功能降低将导致肾脏对尿酸的排泄减少[9-10],导致高尿酸血症。Hong 等[11]研究发现,高尿酸环境中,人肾小管上皮细胞 hUAT mRNA 水平明显上调。提示 hUAT 在尿酸转运过程中发挥重要作用。hUAT 与高尿酸血症的关系有待进一步深入研究。

流行病学调查结果显示女性在绝经前血尿酸水平明显低于男性,绝经后血尿酸水平与男性相似,因此,世界卫生组织对女性高尿酸血症的定义为:绝经前血尿酸水平大于 357 μmmol/L 即可诊断为高尿酸血症,绝经后与男性相同,即大于 416 μmmol/L 才可诊断为高尿酸血症。此外,大量临床资料及近期对山东沿海地区高尿酸血症和痛风的流行病学调查资料也显示女性痛风和高尿酸血症患病率明显低于男性。提示性激素在维持机体尿酸的平衡中发挥重要作用。但性激素通过何种机制降低血尿酸水平,目前仍不清楚。

本研究结果显示,雌激素可直接调节 hUAT 基因的表达,雌激素水平越高,hUAT mRNA 水平越高。该结果说明雌激素通过上调 hUAT 基因的表达,促进肾脏尿酸排泄,是女性维持机体尿酸水平稳定的保护因素,可能是绝经前、后女性高尿酸和痛风发病率明显不同的重要原因。本研究发现雌激素达到一定浓度后对 hUAT 基因的表达差异有统计学意义,因此,作者认为在尿酸代谢的过程中存在雌激素的作用“阈值”,正常生理状态下,体内雌激素浓度高于该阈值时,雌激素发挥正调节功能,体内尿酸水平得以维持正常;而在女性绝经后或是某些病理状态下,体内雌激素水平降低,达不到其作用阈值,雌激素对相关尿酸基因的正向调节功能减弱,尿酸排泄减少,血尿酸水平升高。同时,参与肾脏尿酸排泄的尿酸盐转运蛋白还包括阴离子交换器 1(URAT1)、有机阴离子转运子 1(OAT1)和 OAT3 等,因此,可对上述基因的表达进行检测,以提供更全面的资料,从而进一步研究雌激素对尿酸排泄的影响。

参考文献:

- [1] Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels[J]. Nature, 2002, 417(4): 447.
- [2] Alderman M, Redfern JS. Serum uric acid—a cardiovascular risk factor[J]. Ther Umsch, 2004, 61(9): 547.
- [3] Sundstrom J, Sullivan L, D'Agostino RB, et al. Relations of serum uric acid to longitudinal blood(下转第 2743 页)

mRNA 阳性率分别为 83.3%、53.3%，二者比较差异有统计学意义。表明 RT-PCR 技术能检出常规病理检查不能发现的微转移灶，可显著提高对乳腺癌外周血转移诊断的敏感度及准确率。

乳腺癌患者外周血 CK19 mRNA 的水平在各 TNM 分组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，并随着临床分期的递增，CK19 mRNA 的水平及阳性检出率逐渐升高，提示患者发生肿瘤细胞血行播散的危险随着临床分期的递增有增加的趋势。本研究结果显示，II、III 期患者 CK19 mRNA 的表达水平高于 I 期患者，各分期间比较差异有统计学意义，与 Wong 等^[9]的报道一致。提示 CK19 mRNA 的表达与乳腺癌的生物学行为及恶性程度有关，CK19 mRNA 的检测将有助于评估乳腺癌患者的预后。

本实验结果显示 CK19 mRNA 在乳腺癌外周血中阳性率仅为 62.2%，对此可能的解释有：(1) 可能与肿瘤细胞呈间歇性释放入血有关^[10]；(2) 由于肿瘤在基因表达上具有异质性，加上微循环的某种因素，血循环中肿瘤细胞也许不表达该基因，有别于组织标本^[11]；(3) 标志物的特异性或检测的方法的敏感性有待提高。因此，可采用多次采血、多种肿瘤标志基因等检测方法以提高检测阳性率。

参考文献：

- [1] Noriko I, Yasuo M, Kazuyoshi M, et al. Prognostic significance of occult bone marrow micrometastases of breast cancer detected by quantitative polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91: 918.
- [2] Pretlow TG, Schwartz S, Giaconia JM, et al. Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(15): 4033.
- [3] Noriko I, Yasuo M, Kazuyoshi M, et al. Prognostic significance of occult bone marrow micrometastases of breast

cancer detected by quantitative polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91: 918.

- [4] Zhang J, Shen KW, Liu G, et al. Antigenic profiles of disseminated breast tumor cells and microenvironment in bone marrow[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2003, 29(2): 121.
- [5] 茹景顺, 周伟, 黎红, 等. 乳腺癌细胞 CD44V6 的表达与淋巴结微转移[J]. *广东医学*, 2002, 23(5): 465.
- [6] 陆云飞, 陈波, 曾健, 等. 乳腺癌前哨淋巴结定位切除、微转移检测及其临床意义[J]. *广西医学*, 2006, 28(1): 28.
- [7] Parikh RR, Yang Q, Higgins SA, et al. Outcomes in young women with breast cancer of triple-negative phenotype: the prognostic significance of CK19 mRNA expression[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 70(1): 35.
- [8] 王梅, 葛明建. 非小细胞肺癌患者术后化疗过程中外周血 CK19 mRNA 表达水平的变化及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2009, 38(19): 2423.
- [9] Wong IH, Yeo W, Chna AT, et al. Quantitative correlation of cytokeratin-19 mRNA level in peripheral blood with disease stage and metastasis in breast cancer patients: potential prognostic implications[J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(3): 633.
- [10] Graves D, Huben RP, Weiss L. Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas[J]. *Br J Cancer*, 1988, 57(1): 32.
- [11] Hoon DS, Wang Y, Dale PS, et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay[J]. *J Clin Oncol*, 1995, 13(8): 2109.

(收稿日期: 2010-02-26 修回日期: 2010-03-04)

(上接第 2740 页)

- pressure tracking and hypertension incidence[J]. *Hypertension*, 2005, 45(1): 28.
- [4] 李爱武, 张文同, 刘春喜, 等. 先天性巨结肠层粘连蛋白的表达及与 RET 基因相关性的研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2006, 27(5): 237.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402.
- [6] 杨扬, 何威, 吴军, 等. 脂溢性角化病皮损中 Smad4 mRNA 表达水平的变化[J]. *重庆医学*, 2008, 37(8): 833.
- [7] 唐家宏, 徐兵, 宋小燕, 等. 荧光定量 PCR 方法检测急性髓系白血病 FLT3 基因 mRNA 的表达[J]. *广东医学*, 2008, 29(3): 377.
- [8] 吴华, 曹骥, 杨春, 等. 荧光定量 RT-PCR 检测肝细胞肝癌

中 B-myb 的表达及其临床意义[J]. *广西医学*, 2007, 29(11): 1663.

- [9] Leal-Pinto E, Cohen BE, Lipkowitz MS, et al. Functional analysis and molecular model of the human urate transporter/channel, hUAT[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(1): 150.
- [10] Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, Rappoport JZ. Functional reconstitution, membrane targeting, genomic structure, and chromosomal localization of a human urate transporter[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(9): 1103.
- [11] Hong Q, Wu D, Chen XM, et al. Cloning and sequence analysis of human uric acid transporter gene[J]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 25(6): 623.

(收稿日期: 2010-02-19 修回日期: 2010-03-05)