

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.30.004

# 孕期和哺乳期大鼠肝脏胆酸和胆酸调控法尼醇 X 受体、小异二聚体伴侣受体和胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶的变化\*

谢红梅<sup>1</sup>,朱琼妮<sup>2</sup>,张丹<sup>2</sup>,刘杰<sup>3</sup>,陆远富<sup>2△</sup>

(1. 遵义医学院第三附属医院妇产科,遵义 563003;2. 遵义医学院药理教研室暨贵州省基础药理重点实验室,遵义 563003;3. 美国堪萨斯大学医学中心,美国堪萨斯州 60016)

**[摘要]** 目的 研究健康 SD 鼠在妊娠和哺乳期肝脏胆酸代谢基因的变化。方法 取孕 10、14、19 d 及产后 1、7、14、21 d 的大鼠肝脏,检测胆酸水平和肝脏法尼醇 X 受体(FXR)、小异二聚体伴侣受体(SHP)、胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(Cyp7 $\alpha$ 1)的表达。用 Western blot 法测 Cyp7 $\alpha$ 1 的蛋白表达情况。结果 孕晚期健康大鼠,肝脏中胆酸及 Cyp7 $\alpha$ 1 表达不升高;哺乳期的大鼠,肝脏胆酸增加,FXR 表达升高;在孕晚期及哺乳期靶基因 SHP 表达均高于对照组,且其表达高峰期是第孕 19 天,其值可达对照组的 6 倍之多。结论 健康大鼠在产后肝脏胆酸合成增加,而孕期减少,可能与 Cyp7 $\alpha$ 1、FXR 及 SHP 表达有关。

**[关键词]** 孕鼠;哺乳鼠;肝脏胆酸;法尼醇 X 受体;小异二聚体伴侣受体;胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶

**[中图分类号]** R714.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)30-4187-03

## Hepatic bile acids and the expression of FXR, SHP, and Cyp7 $\alpha$ 1 in normal rats during pregnancy and lactation\*

Xie Hongmei<sup>1</sup>, Zhu Qiongni<sup>2</sup>, Zhang Dan<sup>2</sup>, Liu Jie<sup>3</sup>, Lu Yuanfu<sup>2△</sup>

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Teaching and Research Section of Pharmacology/Key Lab of Basic Pharmacology of Guizhou, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 3. University of Kansas Medical Center, Kansas, KS 60016, USA)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the accumulation of liver bile acids and bile acid regulated nuclear receptor farnesoid X (FXR) and its target gene cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase (Cyp7 $\alpha$ 1) and small different dimer partner (SHP) in normal rats during pregnancy and lactation. **Methods** SD rats were maintained in the SPF-grade facilities for time-controlled mate. Livers were collected at Gestation Day (GD) 10, 14, and 19 and Postnatal Day (PND) 1, 7, 14 and 21 d. Hepatic bile acids were quantified with a total bile acid assay kit, and mRNA expression of FXR, Cyp7 $\alpha$ 1 and SHP was determined by RT-PCR. Western blot was used for Cyp7 $\alpha$ 1 protein quantification. **Results** In livers of normal rats, bile acids was not elevated during pregnancy but was increased during lactation. The bile acid synthesis rate limiting enzyme Cyp7 $\alpha$ 1 increased during lactation but were normal during pregnancy. SHP was 6 fold higher at the late pregnancy, and slightly higher during lactation. FXR was increased at postpartum. **Conclusion** Under normal circumstances, hepatic bile acid synthesis during pregnancy was controlled by SHP feedback, while during lactation, hepatic bile acids increased, along with increased Cyp7 $\alpha$ 1 and FXR.

**[Key words]** pregeant rats; postnatal rats; liver bile acids; nuclear receptor farnesoid X; small different dimer partner; cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase

妊娠晚期的肝内胆汁淤积症(ICP)发病率为 0.8%~12.0%;少数发生在妊娠中期,以皮肤瘙痒和肝胆汁酸浓度增高为特征,表现为胆酸代谢紊乱。主要危及胎儿安全。目前病因尚不清楚,可能与雌激素、遗传及环境等因素有关<sup>[1]</sup>。在我国及国外大量实验研究提示,ICP 的发病机制与肝脏胆酸代谢紊乱有密切相关性<sup>[2]</sup>。则参与胆酸合成代谢的相关分子都可能是 ICP 的起病原因,基于动物的 ICP 模型。但在正常孕哺大鼠的肝内胆酸代谢少有报道。故笔者选用 SD 大鼠,观察孕期和哺乳期胆酸及相关调控胆酸代谢基因的变化,进一步探讨正常孕哺大鼠胆酸合成及其调控,为 ICP 的基础研究提供依据。

### 1 材料与方

**1.1 材料** 选 SD 雌性大鼠,体质量 250~300 g,在合格动物房(许可证号:SYXK2011-004)适应性喂养 1 周后,雌雄定期配种至配种成功。取孕 10、14、19 d 及产后 1、7、14、21 d 的大鼠

肝脏进行试验。所有实验动物均获遵义医学院实验动物伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 仪器** 美国 BIO-RAD 公司 RT-PCR 扩增仪,美国 Thermo 公司酶标仪,紫外分光光度计,德国 Eppendorf 公司多功能梯度 PCR 仪,贝克曼系列 DXC800 生化分析仪。试剂:Trizol (TakaRa 公司,批号: BK3502),上海华舜生物技术有限公司 RNA 纯化试剂盒,高通量 RT 试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 批号: 0912197)。Cyp7 $\alpha$ 1 兔抗大鼠单克隆抗体 (Abcam, 编号 A0208), 过氧辣根酶标记羊抗兔二抗 (碧云天, 编号 ab65596)。

**1.2.2 标本采集与处理** 于孕鼠第 10、14、19 d 及产后 1、7、14、21 d 用 7% 水合氯醛麻醉后收集肝脏,放入 -80 °C 保存。

\* 基金项目:贵州省科技厅国际合作项目[黔科合外 G 字(2009)70019];贵州省教育厅研究生教育创新基地项目(023)。作者简介:谢红梅(1973-),硕士,副主任医师,主要从事代谢与毒理工作。△ 通讯作者, Tel:13368527800; E-mail: yflu@zmc.edu.cn。

表 1 PCR 引物序列

基因	基因型	正向(5'-3')	反向(5'-3')
$\beta$ -actin	NM_031144	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC	ACC CTC ATA GAT GGG CAC AG
Cyp7a1	NM_012942	GAG AAC GGG TTG ATT CCG TA	AAA AAC GTG ACC ATG CTT CC
FXR	RNU18374	CGA GAT GCC TGT GAC AAA GA	GCA GAC CAC ACA CAG CTC AT
G3PDH	M32599	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG	GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT
SHP	RNU77038	TTA TGT GTG AGG GTG GAC GA	CCC GTC TTC TTG AAG TGC TC

**1.2.3 RNA 提取及 RT-PCR** 将肝组织标本按 RNA 提取步骤(匀浆、萃取、离心、分层、沉淀、洗涤、空干、溶解等)处理后,测其浓度和纯度(260/280 nm),反转录为 cDNA,用实时定量 PCR 测定相应基因的表达,以  $\beta$ -actin 及 G3PDH 为内参基因。

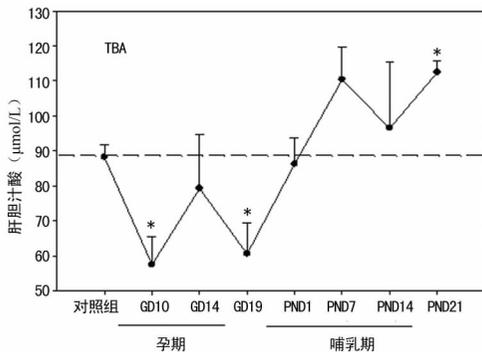
**1.2.4 肝胆酸测定** 取 50~100 mg 肝组织,匀浆,离心(12 000 g/min, 10 min, 4 °C),用上清液在贝克曼系列生化分析仪 DXC800(波长 405 nm 和 660 nm)测胆酸含量。

**1.2.5 Western blot 半定量分析肝组织 Cyp7a1** 用蛋白提取混合液匀浆提取,BCA 法测蛋白浓度。采用常规十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法,转膜,用 Abcam 公司的 Cyp7a1 抗体测其表达。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用两独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

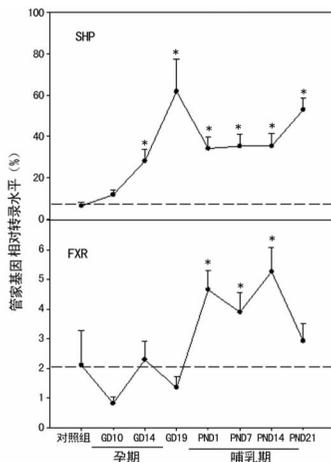
## 2 结果

**2.1 肝脏胆酸** 在妊娠 10 d 和 19 d 时下降,在哺乳期上升,产后 21 d 最高,与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; GD10: 孕 10 d; GD14: 孕 14 d; GD19: 孕 19 d; PND: 产 1 d; PND7: 产 7 d; PND14: 产 14 d; PND21: 产 21 d。

图 1 大鼠肝脏中的胆汁酸变化



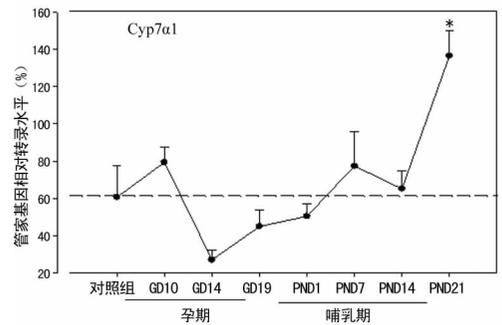
\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; GD10: 孕 10 d; GD14: 孕 14 d; GD19: 孕 19 d; PND: 产 1 d; PND7: 产 7 d; PND14: 产 14 d; PND21: 产 21 d。

图 2 SHP、FXR 在大鼠肝脏中的表达

**2.2 孕鼠及哺乳期大鼠肝组织中 SHP、FXR 表达变化** 在孕期 SHP 升高,孕晚期进一步升高,孕 19 d 升高 6 倍,哺乳期略下降;孕期 FXR 无明显变化,但哺乳期升高,产后 14 d 升至最高,与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

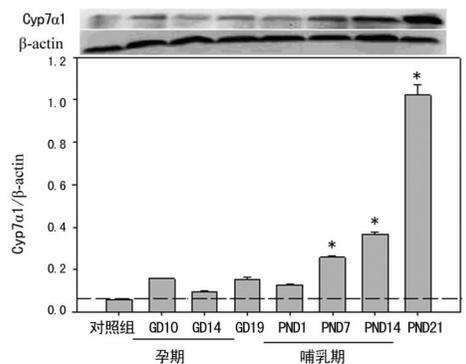
**2.3 肝脏 Cyp7a1 的表达** 大鼠肝脏组织中 Cyp7a1 mRNA 在孕晚期下降,但在哺乳期增加。差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。

**2.4 Cyp7a1 蛋白质在大鼠肝脏中的表达** Cyp7a1 在哺乳期增加,但在孕晚期无明显变化,与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 4。



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; GD10: 孕 10 d; GD14: 孕 14 d; GD19: 孕 19 d; PND: 产 1 d; PND7: 产 7 d; PND14: 产 14 d; PND21: 产 21 d。

图 3 Cyp7a1 在大鼠肝脏中的表达



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; GD10: 孕 10 d; GD14: 孕 14 d; GD19: 孕 19 d; PND: 产 1 d; PND7: 产 7 d; PND14: 产 14 d; PND21: 产 21 d。

图 4 Cyp7a1 蛋白在大鼠肝脏中的表达

## 3 讨论

随着医学的发展,由于 ICP 患者围生儿发病率及病死率较高,ICP 逐年引起围生医学界的重视。ICP 病因尚不清楚。研究表明,ICP 的发生可能与胆汁酸代谢紊乱相关<sup>[2]</sup>。胆酸可引起母体肝细胞损伤、绒毛毛细血管痉挛收缩,以及胆盐沉积胎盘等引起胎儿营养不良,导致胎儿羊水粪染、宫内窘迫、早产、死胎、死产,最严重者可发生不可预测胎儿宫内死亡,因此,

母体胆酸水平的异常增高与围生儿的预后相关<sup>[3]</sup>。但正常孕期胆酸及相关调控基因的研究目前鲜有报道。本实验表明:健康大鼠肝脏胆酸合成在孕期减少,产后增加且与肝脏 Cyp7 $\alpha$ 1 及核受体 FXR、SHP 表达相关<sup>[6]</sup>。胆汁酸的体内平衡主要是一些反馈和负反馈机制自动调节,调节过程有多种核受体参与,其中 FXR 是参与调控主要核受体,调控胆汁酸代谢过程中的关键酶和转运体,其靶基因包括 Cyp7 $\alpha$ 1 等<sup>[11]</sup>。FXR 主要通过下面 2 条途径调节胆汁形成:(1)FXR 可以参与调节 Bsep、Mdr3 来间接调控胆汁酸的合成及分泌。(2)通过上调其他 SHP,来降低 Cyp7 $\alpha$ 1 的活性,从而使胆汁酸的合成降低<sup>[12]</sup>。病理情况下,肝内胆酸淤积激活 FXR,阻遏 Cyp7 $\alpha$ 1 的转录从而使胆汁酸生成减少<sup>[14]</sup>。在本研究中,哺乳期胆酸、FXR 及 Cyp7 $\alpha$ 1 均升高,推测 FXR 对 Cyp7 $\alpha$ 1 的调节生理状况改变而异,但具体机制需进一步研究。SHP 主要在肝脏表达的一种特殊核受体,抑制 Cyp7 $\alpha$ 1 的表达,同时可以与肝脏因子 4 $\alpha$  结合,抑制 Cyp8 $\beta$ 1 和 Cyp27 $\alpha$ 1 的转录,导致胆汁酸合成减少。SHP 与肝受体同源物(LRH)结合后,抑制 LRH 转录,激活 Cyp7 $\alpha$ 1 基因的功能<sup>[13]</sup>。本研究中,孕晚期胆酸降低,FXR 表达水平降低,而 SHP 增加 6 倍,与文献中一致。妊娠期 SHP 提高,降低胆酸合成的酶量,从而使胆酸的合成量减少,胆酸对胎儿的毒性也减少。还有研究表明,产后哺乳期大鼠中 Cyp7 $\alpha$ 1 的表达及肝胆胆汁酸均增加 2~3 倍<sup>[9]</sup>。本实验表明,大鼠妊娠晚期肝内胆胆汁酸不变,哺乳期升高,与文献报道一致。另有文献报道:肝胆胆汁酸水平与 Cyp7 $\alpha$ 1 的表达量呈正相关<sup>[14]</sup>。孕期雌孕激素可降低 Cyp7 $\alpha$ 1 的活性从而抑制胆汁酸的合成,减少其对胎儿的毒性作用,利于胎儿的生长发育<sup>[3]</sup>,而哺乳期雌孕激素水平下降,使 Cyp7 $\alpha$ 1 的活性增加,从而使胆汁酸的合成增加。本研究也提示,肝胆胆汁酸水平与 Cyp7 $\alpha$ 1 的表达呈正相关。

综上所述,大鼠孕晚期肝胆酸下降,哺乳期升高,可能与妊娠期 SHP 的表达升高及产后胆酸合成酶 Cyp7 $\alpha$ 1 及 FXR、SHP 基因高表达相关。

## 参考文献

[1] 丰有吉,沈铿. 妇产科学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版, 2011:137-139.

- [2] 张利平,刘建. 胆汁酸致妊娠肝内胆胆汁淤积症围产儿并发症的机制研究[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(4):355-357.
- [3] 王会敏,王正平,董旻岳. 胆汁酸代谢与调控研究进展[J]. 国际消化病杂志,2010,4(30):79-82.
- [4] 郑吉春,王韞芳,裴雪涛. 胆汁酸代谢对肝细胞功能的影响[J]. 肝脏,2007,12(4):308-310.
- [5] 吴在得,吴肇汉. 外科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版, 2004:560-561.
- [6] Zhu QN,Zhang D,Liu J,et al. Hepatic bile acids and bile acid-related gene expression in pregnancy and lactating rats [J] Peer J,2013(1):e143.
- [7] Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis[J]. J Lipid Res,2009,50(10):1955-1966.
- [8] Li T,Matozel M,Boehme S,et al. Overexpression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis [J]. Hepatology,2011,53(3):996-1006.
- [9] 邢万佳,高聆,赵家军. 胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 Cyp7 $\alpha$ 1 表达及调控相关研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(16):1439-1446.
- [10] Huang W, Ma K, Zhang J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration[J]. Science,2006,312(5771):233-236.
- [11] Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulator cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis[J]. Mol Cell, 2000, 6(3): 517-526.
- [12] 陈秀奇. FXR、MDR3 基因与特发性婴儿肝炎胆汁淤积发病机制的初步探讨[D]. 南宁:广西医科大学,2010.
- [13] 兰易,刘建,邹姝丽,等. FXR、Cyp7 $\alpha$ 1 在妊娠期肝内胆胆汁淤积孕鼠胆汁酸代谢中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2008,30(16):1561-1563.
- [14] 周植星,王涛,江振洲,等. FXR 调节胆汁酸合成和转运研究进展[J]. 中南药学,2010,5(8):374-377.

(收稿日期:2015-03-08 修回日期:2015-05-27)

## 统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。