

高胆固醇摄入对新西兰兔胆汁酸代谢的影响

邱冬妮 孙旭[△] 钟良 毛奇琦 陈坚 蒋蔚茹 黄剑平 孙大裕

(复旦大学附属华山医院消化科 上海 200040)

【摘要】 目的 观察2周高胆固醇食物摄入对新西兰兔胆汁酸经典合成途径基因调节的影响。**方法** 20只新西兰兔随机分为对照组和高胆固醇组,分别喂饲普通兔粮及高胆固醇兔粮2周,测定实验前后血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、胆汁酸(bile acid, BA)及肝脏胆固醇7 α 羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)活性及mRNA、小分子异源二聚体伴侣(short heterodimer partner, SHP) mRNA、胆盐输出泵(bile salt export pump, BSEP) mRNA和三磷酸腺苷结合盒转运蛋白A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) mRNA、胆固醇酯转移蛋白(cholesteryl-ester transfer protein, CETP) mRNA。**结果** 高胆固醇组TC、LDL、BA均较对照组升高($P<0.05$);高胆固醇组CYP7A1活性及mRNA均较对照组降低($P<0.05$);高胆固醇组SHP mRNA、BSEP mRNA均较对照组升高($P<0.05$);胆固醇组ABCA1 mRNA、CETP mRNA均较对照组升高。**结论** 高胆固醇摄入后肝脏FXR、LXR受体均被激活,CYP7A1活性下降,胆汁酸经典合成减少。**【关键词】** 胆汁酸; 胆固醇; 法尼酯衍生物X受体; 肝脏X受体; 胆固醇7 α 羟化酶; 兔**【中图分类号】** Q548+.5 **【文献标志码】** A

Effects of dietary cholesterol intake on bile acids metabolism in New Zealand white rabbits

QIU Dong-ni, SUN Xu[△], ZHONG Liang, MAO Qi-qi, CHEN Jian,
JIANG Wei-ru, HUANG Jian-ping, SUN Dayu

(Department of Gastroenterology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To detect the effect of 2-week dietary cholesterol intake on bile acids classic synthesis pathway in New Zealand white rabbits. **Methods** Twenty New Zealand white rabbits were divided into two groups randomly: control group and cholesterol group. Each group contained 10 rabbits. The control group was fed regular forage, and the cholesterol group was fed 2% cholesterol forage. Serum TC, LDL, bile acid (BA), hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) activity and mRNA, short heterodimer partner (SHP) mRNA and bile salt export pump (BSEP) mRNA, ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNA and cholesteryl-ester transfer protein (CETP) mRNA were measured. **Results** Serum TC, LDL and BA were higher in cholesterol group compared with those in control group ($P<0.05$). Hepatic CYP7A1 activity and mRNA in cholesterol group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Hepatic SHP mRNA, BSEP mRNA were elevated in cholesterol group compared with those in the control group ($P<0.05$). Hepatic ABCA1 mRNA and CETP mRNA were elevated in cholesterol group compared with those in the control group ($P<0.05$). **Conclusions** Dietary cholesterol intake activates hepatic nuclear receptor FXR and LXR, decreases CYP7A1 activity and bile acid classic synthesis. **【Key words】** bile acid; cholesterol; farnesoid X receptor; liver X receptor; cholesterol 7 α -hydroxylase; rabbit

[△]Corresponding author E-mail: sxzyys@163.com

胆汁酸合成是肝细胞内酶促反应,胆固醇 7 α 羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)是胆汁酸经典合成途径的限速酶^[1]。法尼酯衍生物 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)及肝 X 受体(liver X receptor, LXR)是肝细胞内两个核受体,分别为 CYP7A1 的转录抑制因子和转录激活因子。FXR 是胆汁酸生理性配体^[2],短异源二聚体伴侣(short heterodimer partner, SHP)和胆盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)是 FXR 正向调节靶基因^[3,4]。LXR 是氧化甾醇的生理性配体^[5],三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)和胆固醇酯转移蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)是 LXR 的正向调节靶基因^[6,7]。本文目的是研究饮食中的高胆固醇摄入是如何影响核受体 FXR 和 LXR 的激活状态,继而影响 CYP7A1 的活性以及胆汁酸的经典合成代谢。

本文分别检测 2 周高胆固醇食物摄入前后新西兰兔血清总胆固醇、低密度脂蛋白、胆汁酸水平及肝脏核受体 FXR 和 LXR 的激活状态和 CYP7A1 的转录及活性改变,揭示高胆固醇摄入对胆汁酸代谢基因调节的影响。

由于核受体 FXR 和 LXR 的激活状态目前难以直接检测,故本文检测核受体公认的正向调节靶基因的 mRNA 来间接反映核受体的激活情况。FXR 的靶基因为 SHP 和 BSEP; LXR 的靶基因为 ABCA1 和 CETP。靶基因 mRNA 表达增高提示核受体为激活状态,靶基因 mRNA 表达降低提示核受体为非激活状态。

材 料 和 方 法

动物分组及干预 清洁级雄性新西兰白兔 20 只(复旦大学实验动物中心提供)体重 2.5~3.0 kg,单笼 25℃ 饲养,普通兔粮喂食,每只兔每日总食量约为 120 g。动物在复旦大学实验动物中心动物房观察饲养 1 周后,随机分为高胆固醇组 and 对照组,每组 10 只,自由进食和饮水。其中高胆固醇组喂饲高胆固醇兔粮(含 2% 胆固醇,由复旦大学上海医学院实验动物中心提供)2 周,对照组喂饲普通兔粮 2 周。

标本采集 喂饲结束前后分别从兔耳缘静脉空腹采血 2 mL(采血前夜 10:00 PM~当天 8:00 AM 禁食禁水),保存于血清管(美国 BD 公司),常温下静置 30 min 后置于高速离心机中,4 000 r/min 离心 5 min 后,分离出血清,在 2~8℃ 保存,用于测定

血清总胆固醇、低密度脂蛋白和胆汁酸水平。抽血后自新西兰兔耳缘静脉注射空气 20~40 mL 处死实验动物。立即取肝脏组织切成小块置液氮中速冻,后迅速转移至 -80℃ 低温冰箱保存,用于测定肝脏 CYP7A1 活性及 CYP7A1 mRNA、FXR 的靶基因 SHP mRNA、BSEP mRNA 和 LXR 的靶基因 ABCA1 mRNA、CETP mRNA。

血清胆固醇水平测定 用酶水解法,胆固醇测定试剂盒购自上海名典生物工程有限公司,在 Olympus AU600 型全自动生化分析仪上测定。

血清胆汁酸水平测定 用酶循环法,全自动胆汁酸测定试剂盒购自日本第一化学药品株式会社,在 Olympus AU600 型全自动生化分析仪上测定。

肝脏 CYP7A1 活性测定 用酶联免疫吸附法,采用兔胆固醇 7 α -羟化酶活性测定试剂盒(美国 ADL 公司),在 ELX800 通用酶标仪(Bio-Tek 公司)上测定。依照如下步骤检测:使用前将盒内各试剂取出,室温放置至少 30 min;取出酶标板,依照次序对应分别加入 50 μ L 的标准品于空白微孔中;分别标记样品编号,加入 50 μ L 样品于空白微孔中;在样品孔中加入 10 μ L 的生物素标记液,(36 \pm 2)℃ 孵育反应 30 min;洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20 s;在标准品孔和样品孔中加入 50 μ L 的酶标记溶液,(36 \pm 2)℃ 孵育反应 30 min;洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20 s;每孔加入底物呈色剂 A、B 液各 50 μ L,2℃ 避光孵育反应 15 min;每孔加入 50 μ L 终止液,终止反应。于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的吸光度(D)值,以 D 值为纵坐标,以标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线,根据样品 D 值查找对应的浓度范围,敏感度 0.01 μ g/mL。

实时荧光逆转录聚合酶链反应(Real-time RT-PCR) 应用 Trizol 试剂(ABI 公司)以一步法抽提总 RNA;对 RNA 行逆转录;SYBRGreen PCR 试剂盒(达辉生物)进行 PCR 扩增,用 ABI PRISM® 7300 定量 PCR 仪(ABI 公司)检测。引物由上海广实生物科技有限公司合成,保存于 -20℃,各基因引物序列见表 1。PCR 反应体系为 50 μ L,以 GAPDH 作为内参照。数据采用定量 PCR 仪自带软件 ABI Prism 7300 SDS 分析,为相对定量,采取 CT 值比较法,由 PCR 反应获取 CT 值,计算公式是:mRNA 相对表达量(%) = $2^{-\Delta CT} \times 100\%$,其中 ΔCT 值 = 目标基因 CT 值 - 内参(GAPDH) CT 值。

统计学分析 应用 SPSS 10.0 统计软件包,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,行非配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 各基因引物序列		
Tab 1 Gene primer sequences		
Gene	Primer sequences	Length
SHP	F 5'-TGGCCCAAGACATGGTGAC-3'	115
	R 5'-GCTCCTCCAGCAGGATCTTCT-3'	
BSEP	F 5'-CAACGCATTGCTATTGCTCG-3'	130
	R 5'-GTTCTGGATGGTGGACAAACG-3'	
CYP7A1	F 5'-AGGAGAAGGCGAATGGGTGC-3'	151
	R 5'-GCACAGCCCAGATATGGAATC-3'	
ABCA1	F 5'-GTGAATCTCTGGGGCCAGGA-3'	170
	R 5'-CTTACACACCACTGCCTGATA-3'	
CETP	F 5'-AGACCCTGTGCCCCGGAAGA-3'	86
	R 5'-CAGGCTGAACGGCTCGGGCCAC-3'	
GAPDH	F 5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3'	166
	R 5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGA-3'	

结 果

血清总胆固醇水平和低密度脂蛋白水平 两组新西兰兔在 2 周实验过程中均未出现腹泻或便秘。高胆固醇组和对照组血清总胆固醇水平分别为(36.57±3.27)mmol/L 和(3.47±1.52)mmol/L,低密度脂蛋白水平分别为(30.51±3.27)mmol/L 和(1.26±0.13)mmol/L;高胆固醇组均较对照组升高($P<0.05$)。

血清胆汁酸水平 高胆固醇组和对照组血清总

表 2 两组兔肝脏组织各基因实时 RT-PCR 相对值比较						
Tab 2 Real-time RT-PCR results of liver genes in the two rabbit groups						
Group	n	CYP7A1 mRNA	SHP mRNA	BSEP mRNA	ABCA1 mRNA	CETP mRNA
High cholesterol group	10	0.28±0.19 ⁽¹⁾	35.54±1.75 ⁽¹⁾	10.27±2.11 ⁽¹⁾	23.10±2.46 ⁽¹⁾	16.91±2.53 ⁽¹⁾
Control group	10	1.71±0.61	10.30±2.59	6.74±1.60	5.37±1.91	6.36±1.91

⁽¹⁾ Compared with control group, $P<0.05$

讨 论

胆汁酸的合成速度与 CYP7A1 的活性相平行。胆汁酸通过调控参与胆汁酸/胆固醇代谢的基因表达来维持自身总量平衡。胆汁酸主要通过负反馈机制调节自身代谢^[8]:胆汁酸池增大后,激活核受体 FXR,使 CYP7A1 转录被抑制,胆汁酸合成速度下降。胆汁酸对 CYP7A1 的负反馈调节可以确保整体胆汁酸的产生受到严格调控。

胆汁酸对自身合成的负反馈机制是通过肝脏核受体 FXR 实现的^[9]。法尼酯衍生物 X 受体的命名源于其可以被生理水平的法尼酯激活。FXR 属于激素核受体超家族的一员,具有典型的核受体结构,即氨基末端高度保守的 DNA 结合区(DBD)、羧基末端配体结合区(LBD)等。与其他核受体家族成

胆固醇水平分别为(13.20±2.78) μ mol/L 和(7.34±1.12) μ mol/L,高胆固醇组较对照组升高($P<0.05$)。

肝脏 CYP7A1 活性 高胆固醇组和对照组肝脏组织 CYP7A1 活性分别为(1.52±1.30) μ g/mL 和(3.03±1.88) μ g/mL,高胆固醇组较对照组降低($P<0.05$)。

肝脏各基因实时 RT-PCR 相对值比较 具体数值见表 2。

肝脏 CYP7A1 mRNA 表达 高胆固醇组新西兰兔的肝脏组织 CYP7A1 mRNA 表达较对照组低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

肝脏 FXR 的靶基因 SHP mRNA 和 BSEP mRNA 的表达 高胆固醇组肝脏组织 SHP mRNA 和 BSEP mRNA 表达均较对照组高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

肝脏 LXR 的靶基因 ABCA1 mRNA 和 CETP mRNA 的表达 高胆固醇组肝脏组织 ABCA1 mRNA 和 CETP mRNA 表达均较对照组高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

上述实验结果表明,2 周高胆固醇摄入后,新西兰白兔血清总胆固醇水平和低密度脂蛋白水平升高,血清胆汁酸水平升高,CYP7A1 的活性及其基因表达水平降低,肝脏 LXR 及 FXR 受体均被激活,核受体靶基因的表达均升高。

员一样,FXR 的 DBD 区内有与 DNA 结合和二聚化有关的锌指结构。当配体与 LBD 结合后,核受体空间构象发生变化,并与靶基因的启动子结合从而调节靶基因的转录。FXR 需要和视黄醛衍生物受体(RXR)形成异源二聚体后才能直接和特定 DNA 反应元件结合。1999 年,多个研究小组独立报道生理浓度的胆汁酸是 FXR 的配体,FXR 又被称为胆汁酸受体(bile acid receptor,BAR)。FXR 作为胆汁酸的受体可以通过调控参与胆汁酸代谢基因的表达来维持胆汁酸的内环境稳定。初级胆汁酸鹅脱氧胆酸是 FXR 的最有效的配体,次级胆汁酸石胆酸和脱氧胆酸也可以激活 FXR。

在胆汁酸/胆固醇代谢调节中,肝 X 受体(liver X receptor, LXR)与 FXR 作用相反,两者协同调节胆汁酸/胆固醇的平衡^[8]。当胆固醇升高时,氧化甾醇刺激 LXR 的转录,进而增加 CYP7A1 转录,

使胆固醇转变成胆汁酸。LXR 是从肝脏 cDNA 文库分离获得的并在肝脏高水平表达,故而得名。环氧化胆固醇与 LXR α 结合的亲和力最强,因此 LXR 又称为氧化胆固醇受体(oxysterol receptors)。

本研究表明,2 周高胆固醇摄入后,胆固醇作为 LXR 受体的配体,使得 LXR 受体被激活,间接刺激胆汁酸合成。体内胆汁酸水平升高进而激活 FXR 受体;此时尽管 LXR 受体也被激活,但 FXR 对 CYP7A1 的抑制作用强于 LXR 对 CYP7A1 激活作用,最终 CYP7A1 活性下降,胆汁酸经典途径合成减少。肝内胆固醇转化为胆汁酸减少,肝细胞内胆固醇积聚,负反馈抑制肝细胞从外周血循环中摄取胆固醇,最终外周血胆固醇升高,形成高胆固醇血症。

参 考 文 献

[1] Zhang Z, Li D, Blanchard DE, *et al.* Key regulatory oxysterols in liver: analysis as delta4232ketone derivatives by HPLC and response to physiological perturbations[J]. *J Lipid Res*, 2001, 42(4): 649 - 658.

[2] Hua Tu, Okamoto AY, Bei S. FXR, a bile acid receptor and

biological sensor[J]. *TCM*, 2000, 10(1): 30 - 34.

[3] Suchy FJ, Ananthanarayanan M. Bile salt excretory pump: biology and pathobiology[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006, 43(7): S10 - S16.

[4] Ananthanarayanan M, Balasu N, Makishima M, *et al.* Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 28 857 - 28 865.

[5] Peet DJ, Turley SD, Ma W, *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR[J]. *Cell*, 1998, 93(5): 693 - 704.

[6] Glass CK, Witztymjl L. Atherosclerosis: the road ahead[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 503 - 516.

[7] Laffutte BA, Repaj J, Joseph SB, *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 507 - 512.

[8] Lefebvre P, Cariou B, Lien F, *et al.* Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(1): 147 - 191.

[9] Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. The role of FXR in disorders of bile acid homeostasis[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2008, 23(10): 286 - 295.

(收稿日期:2009 - 02 - 16;编辑:张秀峰)

(上接第 600 页)

[14] Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, *et al.* Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells[J]. *Infect Immun*, 2001, 69: 7 326 - 7 333.

[15] Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, *et al.* Are the PE-PGRS proteins of Mycobacterium tuberculosis variable surface antigens[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 44: 9 - 19.

[16] Abul K. Azad, Tatiana D. Sirakova, Norvin D. Fernandes, *et al.* Gene knockout reveals a novel gene cluster for the

synthesis of a class of cell wall lipids unique to pathogenic mycobacteria[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 16 741 - 16 745.

[17] Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, *et al.* Dissection of ESAT-6 system 1 of Mycobacterium tuberculosis and impact on immunogenicity and virulence[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(1): 88 - 98.

(收稿日期:2009 - 03 - 05;编辑:王蔚)