

## 吡格列酮提高 C57bl 小鼠胆盐肠肝循环相关基因的表达

王 刚, 陈 敏, 王诗佳, 傅 赞\*

(南京医科大学第一附属医院结直肠外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察吡格列酮对小鼠胆盐肠肝循环转运相关基因的表达影响。方法: 将 16 只小鼠随机分为两组: 对照组(normal control, NC)、药物组(medicine, M), 分别给予普通饮食、普通饮食加吡格列酮(pioglitazone)灌胃, 喂养 10 周后处死小鼠取血、胆汁、小鼠肝脏、小肠组织, 生化分析仪分析小鼠血样代谢指标, qRT-PCR 技术检测各组小鼠组织内胆盐肠肝循环相关基因的表达。结果: M 组小鼠胆汁中胆盐含量 NC 组显著升高, 肝脏法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)及胆盐合成相关基因胆固醇 7 羟化酶(cytochrome P450 enzyme 7 A1, CYP7A1)、胆固醇 27 羟化酶(CYP7A1 cytochrome P450 enzyme 27 A1, CYP27A1)以及胆盐转运基因胆盐输出泵基因(bile salt export pump, BSEP)、牛黄胆酸钠转运基因(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)的表达较 NC 组也明显升高( $P < 0.01$ )。肝脏组织免疫组化证实了 M 组 BSEP 在蛋白层面表达升高。M 组小肠组织内胆盐转运基因顶膜钠离子依赖性胆汁酸转运体(apical sodium dependent bile acid transporter, ASBT)的表达较 NC 组明显升高( $P < 0.01$ )。结论: 吡格列酮能够诱导胆盐合成相关基因的表达, 并上调胆盐在肝脏以及小肠内的转运相关基因的表达, 在转录水平参与胆盐肠肝循环的调控。

[关键词] 吡格列酮; 胆盐; 肠肝循环; C57bl 小鼠; PPAR $\gamma$

[中图分类号] R730.53

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)12-1562-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20171205

## Pioglitazone enhanced the expression of genes involved in bile acid enterohepatic circulation in C57bl mice

Wang Gang, Chen Min, Wang Shijia, Fu Zan\*

(Department of Colorectal Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Pioglitazone on genes involved in bile acid enterohepatic circulation in C57bl mice. **Methods:** C57bl mice were randomly divided into two groups, named NC (normal control, n=8) group and M (medicine, n=8) group, respectively. Mice in NC group were fed with chow diet, while mice in M group were fed with both Pioglitazone and chow diet, and the feeding last for 10 weeks. At the end of our experiment, all mice were sacrificed and blood samples, liver and intestine tissues were collected. Fully automatic biochemical analyzer was used for the detection of blood metabolic parameters, and qRT-PCR was used for the detection of gene expression, which were involved in bile acid enterohepatic circulation. **Results:** Mice in group M displayed an increased biliary BA content. FXR, CYP7A1 and CYP27A1, which play important roles in bile acid synthesis were detected in an induced expression in group M mice. Hepatic bile acid transporters BSEP and NTCP were also detected in an increased expression in group M compared with group NC. Immunohistochemical examination testified an increased protein expression of BSEP in mice liver tissue. ASBT, a gene regulates intestinal bile acid reabsorption, were detected in an increased expression in group M mice. **Conclusion:** Pioglitazone increased the expression of genes involved in bile acid synthesis, bile acid transport, as well as intestinal reabsorption, which indicates the drug, may play a great role in regulating genes involved in enterohepatic circulation.

[Key words] Pioglitazone; bile acid; enterohepatic circulation; C57bl mice; PPAR $\gamma$

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(12): 1562-1566]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470881)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fu\_zan@qq.com

胆汁酸是一大类胆烷酸的总称,同时具有亲水亲脂性,并以钾盐或钠盐的形式存在。胆汁酸具有许多重要的生理功能,最早被人们发现的是胆汁酸可以乳化脂肪和脂溶性维生素,促进脂质吸收。胆汁酸在胆汁中可与卵磷脂、胆固醇结合形成微胶粒,促进胆固醇的溶解并随肠道排出<sup>[1]</sup>。还可以作为胃肠道内分泌系统的刺激剂,促进胃肠道消化液的分泌,促进消化。近年来,人们研究发现,胆汁酸也可作为一种信号分子,激活 FXR、VDR、PXR 等核受体并通过信号通路的调节在体内能量代谢平衡、肥胖、高脂血症病等代谢疾病中起重要作用<sup>[2-4]</sup>。胆盐肠肝循环是胆盐代谢的关键,决定了体内胆盐池的大小,调节胆盐的肠肝循环对胆盐生理功能的发挥起到极其重要的作用。

吡格列酮是噻唑烷二酮类的胰岛素增敏剂,在调节血糖以及血脂的代谢活动中起到显著作用。吡格列酮同时也是 PPAR $\gamma$  的配体激动剂,通过激活 PPAR $\gamma$  可以在冠心病、糖尿病、高脂血症等代谢综合征中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。目前关于噻唑烷二酮类药物对胆盐合成与转运调节的影响方面的研究甚少,本研究拟通过吡格列酮灌胃的方法,探讨吡格列酮对小鼠胆盐肠肝循环相关基因表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

C57bl 小鼠(扬州大学比较医学中心)。吡格列酮(江苏恒瑞公司),TRIzol(Invitrogen 公司,美国),荧光定量 PCR 用品反转录试剂盒 (TaKaRa 公司,日本),Sybrgreen(Roche 公司,瑞士),引物合成委托上海 Invitrogen 公司,免疫组化抗体(Santa Cruz 公司,美国),定量 PCR 仪 LightCycler96 (Roche 公司,瑞士)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验动物及处理

16 只 6 周龄 C57bl/6j 雄性小鼠被随机分为 2 组,每组 8 只,分别为对照组(CN 组)与药物组(M 组)。NC 组给予普通小鼠饲料喂养并接受纯水灌胃阴性处理,M 组在普通饲料喂养的基础上给予吡格列酮灌胃,剂量为 8 mg/(kg·d);持续 10 周。给予自由饮水,充足饮食,12 h 光照与黑夜循环的环境饲养。

#### 1.2.2 标本的收集与处理

喂养 10 周后经禁食水 12 h 后行眼球取血,将所有血液收集于干净 EP 管中,室温放置过夜,隔天转移上层血清至干净 EP 管中,-20 °C 保存备用。取

血后处死小鼠,开腹暴露胆囊,经结扎胆总管后,取胆囊并转移至新的 EP 管中吸取胆汁。另取肝脏组织及小肠组织,分离小肠系膜,截取上段空肠,放入生理盐水中洗净。称取 100 mg 所取组织,并放入加有 1 mL TRIzol 的无 RNA 酶的 EP 管中,用匀浆机充分匀浆后放入-80 °C 冰箱备用。

#### 1.2.3 体重和血生化指标的检测

体重:喂养 10 周后称取小鼠体重。胆汁胆盐、血生化指标测定:胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL)、胆盐(bile acid,BA)均在南京医科大学实验动物检测中心由全自动生化分析仪检测。

#### 1.2.4 qRT-PCR 检测小鼠肠肝循环相关基因 mRNA

TRIzol 法提取肝脏及小肠组织总 RNA,用 NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度。依据逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本)的使用说明,逆转录获得 cDNA。用 SYBRGreen 荧光实时定量 PCR 法扩增 cDNA。GADPH 作为参照基因,仪器为 Roche Lightcycler 96 qRT-PCR 仪。结果由仪器配套软件分析,用根据公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  来标准化不同组织内基因的相对表达水平。引物设计如下:BSEP 上游 5'-TG-GAAAGGAATGGTGATGG G-3',下游 5'-CAGAAG-GCCAGTGCATAACAGA-3';CYP7A1 上游 5'-GTC-CGGATATTC AAGGATGCA-3',下游 5'-AGCAAC-TAAACAACCTGCCAGTACTA-3';CYP27A1 上游 5'-GACAACCTCCTTTGGGACTTAC-3',下游 5'-GTG-GTCTCT TATTGGGTA CTTGC-3';ASBT 上游 5'-TGG-GTTTCTTCTGCTAGACT-3',下游 5'-TG TTCTG-CATTCCAGTTTCCAA-3';NTCP 上游 5'-GCATGAT-GCCACTCCTCTTATAC-3',下游 5'-TACATAGTGTG-GCCTTTTGGACT-3';FXR 上游 5'-TGGGTACCAGG-GAGAGACTG-3',下游 5'-G TGAGCGGTTGTAGTG-GTA-3';GADPH 上游 5'-GCTCGGCCGGCTGGAA-GAACT-3',下游 5'-CCCTCGTTCTGCACGCG GAT-3'。

#### 1.2.5 免疫组化分析肝内胆盐转运基因的表达

取小鼠肝脏标本,用 4%多聚甲醛固定 24 h 后,送至本院病理科行石蜡包埋切片。用免疫组化的方法检测组织内胆盐转运基因的表达。方法流程如下:石蜡切片脱蜡至水;抗原修复液加热修复抗原,自然冷却后用 PBS(pH7.4)洗涤 3 次;用 3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶。3%BSA 封闭组织,室温孵育 30 min。甩掉封闭液,在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的一抗(BSEP,Santa Cruz 公司,美国),4 °C 孵育过夜;PBS 洗涤 3 次,切片稍甩干后在圈内

滴加二抗(HRP 标记)覆盖组织,室温孵育 50 min。DAB 显色,并用 Harris 苏木素复染细胞核;用不同浓度的乙醇将组织脱水,中性树胶封片。最后用卡尔蔡司倒置显微镜镜检并图像采集,棕黄色显色为阳性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,使用独立 *t* 检验以分析不同组数据之间的统计学差异。所有数据以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,平行实验均重复 3 次。 $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血代谢指标及血胆盐含量

吡格列酮灌胃 10 周后,M 组小鼠的体重较 NC 组明显降低( $P<0.05$ ,表 1),血胆盐的含量较 NC 组升高,因为检测精度问题,统计学上未有明显差异,而血脂指标 TC、TG、HDL 两组间无明显差异。

表 1 各组小鼠体重、血脂及血胆盐含量

Table 1 Body weight and metabolic parameters of each group mice ( $\bar{x}\pm s$ )

代谢指标	M 组(n=8)	NC 组(n=8)
体重 (g)	27.35 ± 1.30*	29.77 ± 1.17
TC(mmol/L)	2.78± 0.18	29.77 ± 1.17
TG(mmol/L)	0.59 ± 0.20	0.60 ± 0.10
HDL(mmol/L)	2.00 ± 0.11	2.17 ± 0.20
BA (μmol/L)	9.33 ± 5.92	8.83 ± 4.57

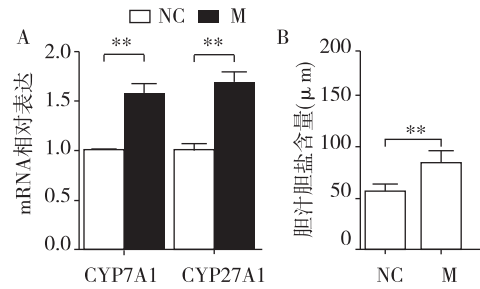
与 NC 组比较,\* $P<0.05$ 。

2.2 吡格列酮诱导肝组织胆盐合成关键基因的表达

经吡格列酮灌胃 10 周后,胆盐合成过程中起关键酶作用的基因 CYP7A1 与 CYP27A1 转录水平的表达较 NC 组有约 1.5 倍以上的提高,说明吡格列酮能在转录水平诱导胆盐合成相关基因的表达,在胆盐合成代谢过程中发挥重要作用(图 1A)。我们同时检测了胆囊胆汁中胆盐的含量,结果显示 M 组胆汁中胆盐的含量明显高于 NC 组,这与胆盐合成基因受诱导相符合,进一步证明了吡格列酮在胆盐合成过程中起到了重要作用(图 1B)。

2.3 吡格列酮诱导肝内胆盐转运基因的表达

胆盐输出泵 (bile acid export pump, BSEP),基因主要作用是将肝内的胆汁酸通过微管膜向胆汁中转运。它由 1 321 个氨基酸组成,蛋白大小为 63 kDa,并且有 6 个穿膜受体组成<sup>[6]</sup>。NTCP 是胆盐肠肝循环中重要的一环,可以将小肠内重吸收的胆盐转运入

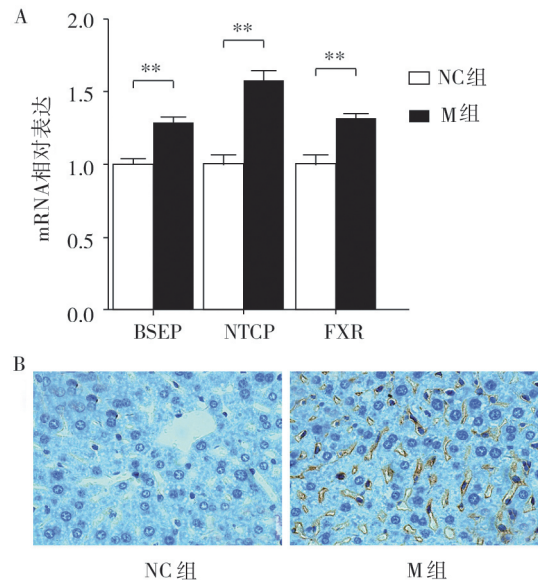


A: qRT-PCR 方法检测胆盐合成相关基因 CYP7A1 与 CYP27A1 mRNA 在两组小鼠肝脏组织中的表达,\*\* $P<0.01$ ;B:两组小鼠胆汁中胆盐含量对比,\*\* $P<0.01$ 。

图 1 吡格列酮对胆盐合成关键基因的影响

Figure 1 The effect of pioglitazone on key regulators involved in hepatic BA synthesis.

肝。FXR 是胆盐调控的核心基因,在胆盐代谢的各个环节中发挥作用。本研究结果表明,经吡格列酮灌胃处理后,小鼠肝脏内的 FXR、BSEP、NTCP 的表达均被诱导而升高(图 2A)。用免疫组化检测了两组小鼠肝脏 BSEP 蛋白表达差异,结果表明,M 组 BSEP 在蛋白层面的表达较 NC 组显著升高,与定量 PCR 结果相符,进一步表明了吡格列酮在胆盐转运过程中也起到了关键作用(图 2B)。



A:小鼠肝脏中胆盐转运相关基因检测结果,两组比较,\*\* $P<0.01$ ; B:肝脏 BSEP 免疫组化结果( $\times 200$ )。

图 2 吡格列酮对肝脏胆盐转运基因的影响

Figure 2 The effect of pioglitazone on hepatic BA transporters

2.4 小肠 ASBT 实时定量 PCR 结果

M 组小鼠小肠组织中主管胆盐重吸收的基因 ASBT 的表达较 NC 组有明显升高,表明吡格列酮在胆盐重吸收的过程中同样能发挥重要作用(图 3)。

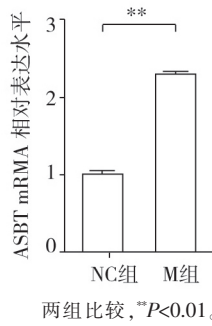


图 3 吡格列酮对小鼠小肠 ASBT 表达的影响

Figure 3 The effect of pioglitazone on the expression of intestinal ASBT

### 3 讨论

本实验分别给予小鼠吡格列酮及安慰剂,揭示了吡格列酮处理能有效诱导 C57bl 小鼠胆盐合成及转运过程中的各个基因,提高了胆汁中胆盐的含量,并参与小鼠胆盐肠肝循环各个环节的调控。

最早认为胆盐经十二指肠乳头分泌入肠道后,可以乳化食物中的脂质,促进脂质吸收。随后在空肠与末端回肠会被重吸收入血,经门脉系统重新返回肝脏。肝脏内的胆盐经肝细胞的微管膜转运系统转运入胆道中,再随胆汁排入小肠,构成胆汁酸的肠肝循环<sup>[7]</sup>。有研究表明,胆汁酸还可以作为信号分子,在调节糖脂代谢、能量代谢等方面的作用越来越受到研究者的重视,而胆盐肠肝循环是胆盐特有的高效调节过程,对胆盐合成与代谢有着至关重要作用。Watanabe 等<sup>[8]</sup>报道胆汁酸干预可以抑制高脂饮食诱导的小鼠肥胖及胰岛素抵抗的发生、发展,从而抑制了高脂饮食带来的不良影响。增强胆盐的生理合成以及肠肝循环的效率可能会对代谢性疾病的治疗提供一个新思路。

吡格列酮作为 PPAR $\gamma$  的配体激动剂可以上调 PPAR $\gamma$  的表达,在抑制冠心病、糖尿病、高脂血症、肥胖等代谢综合征发生发展的过程中发挥了重要作用。另有文献报道称在胆盐合成与转运过程中起核心作用的基因 FXR 与 PPAR $\gamma$  有相互调节作用。我们推测吡格列酮可以通过激活 PPAR $\gamma$  诱导 FXR 的表达对胆盐的合成与转运起到调节作用。

本研究结果显示,吡格列酮灌胃在单纯给予普通饮食的基础上,能明显减少小鼠体重,这可能与激活 PPAR $\gamma$  后优化了脂肪成熟、促进脂肪重新分配有关。本课题组前期实验表明吡格列酮处理后的小鼠能有效抵抗高脂饲料引起的体重与体脂的增加,并改善其代谢指标<sup>[9]</sup>。但本实验结果显示,两组小鼠血

液中的代谢指标 TC、TG、HDL 等并没有明显差异。这可能与普通饮食本身就不会引起脂质代谢异常有关。M 组小鼠血胆盐含量较 NC 组明显升高,这可能与胆盐的合成或者胆盐从肝细胞内向血中转运增强有关。CYP7A1 与 CYP27A1 是胆盐合成过程中的关键基因,可以翻译为胆盐合成代谢过程中的关键限速酶,在胆盐的合成代谢中发挥了重要作用<sup>[10]</sup>。FXR 是在胆盐的代谢活动中起核心作用的基因,在胆盐代谢以及转运的各个环节发挥重要作用,并且是 CYP7A1 与 CYP27A1 的上游调控基因。本结果表明,FXR 及其下游基因 CYP7A1 与 CYP27A1 均受吡格列酮的诱导而表达升高。但有文献报道称 FXR 对胆盐的合成起抑制作用,FXR 受诱导而表达增强会抑制 CYP7A1、CYP27A1 等胆盐合成关键基因的表达<sup>[11]</sup>,推测吡格列酮诱导胆盐合成基因表达升高的作用可能与 PPAR $\gamma$  本身有关,又或者 PPAR $\gamma$  能通过诱导肝脏 X 受体(liver X receptor,LXR)的表达,对胆盐合成关键酶产生正向调控作用<sup>[12]</sup>。胆盐转运基因 BSEP 又称胆盐输出泵,是肝内胆盐转运的主要基因。2014 年的一份研究表明利用致石饲料诱导 C57bl 小鼠胆固醇结石的形成,并利用免疫组化与 Western blot 检测肝脏 BSEP 表达。结果显示,结石组小鼠肝脏 BSEP 表达量明显降低,导致了胆汁中胆盐含量的减少<sup>[13]</sup>。NTCP 则在将门静脉内重吸收的胆盐转运入肝细胞内<sup>[14]</sup>。这 2 种基因在转录水平均受 FXR 的调控。本结果显示这 2 种基因的表达在吡格列酮的作用下,较对照组有明显升高,并且可能对胆盐的肠肝循环产生有效促进作用。小肠中负责胆盐重吸收的关键基因 ASBT 的表达在药物组同样升高,而文献报道称 ASBT 的表达可以受到 FXR 的诱导而升高<sup>[15]</sup>,表明吡格列酮可能会通过 PPAR $\gamma$ -FXR 的调控通路增强小鼠肠道胆盐的重吸收。

综合来看,PPAR $\gamma$  激动剂吡格列酮提高了 C57bl/6j 小鼠胆盐肠肝循环中的关键基因 FXR、CYP7A1、CYP27A1、BSEP、NTCP 以及 ASBT 转录水平的表达,在转录水平有效参与了胆盐的合成、转运以及肠道重吸收等整个肠肝循环的调控。这与推测相符,后期蛋白层面的研究以及机制探讨将有助于揭示吡格列酮这类 PPAR $\gamma$  配体激动剂对胆盐代谢的调控机理,为阐明 PPAR $\gamma$  干预肥胖、冠心病、高脂血症等代谢综合征发生发展的机制提供了新思路。

#### [参考文献]

[1] Zhu Y,Liu H,Zhang M,et al. Fatty liver diseases,bile

- acids, and FXR[J]. ,2016 ,6(5): 409-412
- [2] Alan FH, Lee RH, Matthew DK. Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance [J]. J Lipid Res,2010 ,51(2): 226 - 246
- [3] Li G, L Guo G. Farnesoid X receptor, the bile acid sensing nuclear receptor, in liver regeneration[J]. Acta Pharm Sin B,2015 ,5(2):93-98
- [4] Tiangang Li, John YL Chiang. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy[J]. Pharmacol Rev, 2014,66(4):948-983
- [5] Ahmadian M,Suh JM,Hah N,et al. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future[J]. Nat Med,2013 ,19(5): 557-566
- [6] Kubitz,R, Drge,C, Stindt,J,et al. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2012 ,36(6):536-553
- [7] John YL Chiang. Bile acid metabolism and signaling [J]. Compr Physiol. 2013 ,3(3): 1191 - 1212
- [8] Watanabe M, Houten SM, Matak C, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation[J]. Nature. 2006 ,439(7075):484-489
- [9] Han T, Zhang D, Fu Z, et al. Retinol-binding protein 4 as a risk factor for cholesterol gallstone formation[J]. Mol Cell Biochem,2013 ,377 (1-2):219-227
- [10] Daniel WN, Kjell W, Walter LM. Human cytochromes P450 in health and disease[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013 ,368(1612): 20120431
- [11] Qi YP,Jiang CT, Cheng J, et al. Bile acid signaling in lipid metabolism:Metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice[J]. Biochim Biophys Acta, 2015 ,1851 (1): 19 - 29
- [12] Chai J, He Y, Cai SY, et al. Elevated hepatic multidrug resistance-associated protein 3/ATP-binding cassette subfamily C 3 expression in human obstructive cholestasis is mediated through tumor necrosis factor alpha and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase-signaling pathway[J]. Hepatology.2012,55(5):1485-1494
- [13] Kong J, Liu BB, Wu SD, et al. Enhancement of interaction of BSEP and HAX-1 on the canalicular membrane of hepatocytes in a mouse model of cholesterol cholelithiasis [J]. Int J Clin Exp Pathol,?2014 ,7(4):1644-1650
- [14] Paul AD, Saul JK. Intestinal transport and metabolism of bile acids. J Lipid Res,2015 ,56(6): 1085 - 1099
- [15] Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, et al. Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter[J]. J Clin Invest, 1995 ,95(2):745-754

[收稿日期] 2017-03-03

## 本刊来稿题名和作者署名的注意事项

### 1. 题名

- (1)题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词。
- (2)中文题名一般不超过 20 个字,必要时可加副题名。
- (3)英文题名应与中文题名含义一致。
- (4)题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号,尽量不出现数学式或化学式。

### 2. 作者署名和工作单位

- (1)文章都应有作者署名,这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2)作者姓名署于题名下方;
- (3)英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序,写法为:姓前名后,姓全部大写,名的首字母大写,其余字母小写,如 Zhou Ping, Shi Honglei;
- (4)作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位,如“南京医科大学第一附属医院心内科”,“南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5)对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“\*”,并在论文首页下补充基金名称、编号,以及课题负责人的 E-mail。
- (6)本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。