

法尼醇类受体基因在胆囊中的表达 *

王南斗¹ 袁作彪² 王凌³

(1 江西省遂川县人民医院 遂川 343900; 2 上海第二医科大学附属瑞金医院 上海 200032; 3 江西医学院研究生部 南昌 330006)

摘要 :目的 探讨法尼醇类受体基因 (FXR) 的表达与胆囊的关系。方法 采用含 17000cDNA 克隆的基因微矩阵,与 2 例正常胆囊之 cDNA 杂交,发现 FXR 基因信号后,进一步进行 RT-PCR 和测序验证。结果 基因芯片能够检测出 FXR 在正常胆囊中的表达,其平均灰度值为 16.80。在进一步的 RT-PCR 实验中,扩增出 FXR 的特异性片段,为 352 碱基。该 PCR 片段经测序后,其结果在 GENE BANK 数据库经 BLAST 比对,证实其同源性与 FXR 一致。结论 FXR 在胆囊中表达,提示该基因可能还有新的未知功能。

关键词 法尼醇类受体 胆囊 基因表达 胆结石

Objective: To investigate the relationship between the expression of farnesoid X receptor (FXR) gene and gallbladder. **Method**: cDNA of 2 normal gallbladder tissues was used to hybridize with a cDNA array representing 17,000 cDNA clusters. If the signal of FXR was found, it would be confirmed by reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequencing. **Results**: The signal of FXR, which was 16.80 of gray level, was found in the cDNA array. Then, FXR gene was amplified by RT-PCR, and its peculiar fragment of 352 bp was detected. Furthermore, the sequence of the fragment is confirmed as FXR when it was BLASTed in GENE BANK database. **Conclusion**: FXR gene is expressed in gallbladder, which suggests a novel function of this gene.

关键词 farnesoid X receptor; gallbladder; gene expression

中图分类号 R 394.3

文献标识码 B

文献编号: 1671-4040(2004)06- 0004-02

法尼醇类受体 (FXR; farnesoid X receptor, 或 NR1H4: nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4) 属于核受体的一种,是胆盐,尤其是鹅去氧胆酸的配基,在胆固醇的降解中起到一个十分重要的作用,并且很可能在胆固醇结石的形成中起重要作用^[1]。它与另一个核受体 RXR [Retinoid X receptor A, (NR2B1), 视黄醇类受体] 形成杂二聚体 (heterodimers) 且和胆盐结合后,抑制胆固醇 7 α 羟化酶的转录,最终减少胆汁酸的合成。在既往的文献报道中,FXR 仅在肝、肾和小肠中表达,在其他器官中的表达还没有报道。由于胆囊是胆结石形成的病灶,而且我们在分析正常胆囊的基因表达谱时,发现有一些脂类代谢相关基因在胆囊中表达^[2]。为此,我们分析了 FXR 在胆囊中的表达情况,希望能深入了解 FXR 对胆囊的直接影响,并期待能为胆石病的发病机理提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 组织来源 胆囊组织来源于征得家属书面同意的意外死亡的正常男性,共 2 例,分别为 20 岁和 25 岁。死亡后 4h 内获取组织,立即置液氮速冻后,-70℃保存备用。

1.2 RNA 提取,mRNA 纯化及探针制备 用 Trizol 试剂盒 (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) 提取总 RNA,用 poly (dT) 树脂 (Qiagen, Hilden, Germany) 纯化 mRNA。加入 33P-dATP (DuPont NEN, Boston, MA, USA) 于逆转录体系 (Promega Corp., Madison, WI, USA) 中,经逆转录后的 cDNA 即为制备好的探针。

1.3 杂交及图像处理 制备好的尼龙膜芯片^[3], (含 17000cDNA 克隆),经 20mL 预杂交液在 68℃预杂交 2h 后,与 33P 标记好的临床样本 cDNA 在 2mL 杂交液 (6×SSC,

0.5SDS, 100 μ g/mL 鲑鱼精子 DNA) 杂交过夜,在洗脱液 (0.1×SSC, 0.5%SDS) 中洗涤 1h,用富士光学胶片公司的 FLA-3 000A 分析仪 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)、扫描仪及分析软件分析结果,该系统中,每 50 微米的图象其最大像素值为 65536。

1.4 数据收集与分析 以膜上无点样区的区域作为本底值,每个点在减去本底值 (3倍) 后,如果图象灰度值 ≥ 2 则作为有效数据;该域值确保了 99.9%的点与本底有明显区别。以扣除本底后的数据为基础进行均一化,去除无效的点数,以 2 个样本杂交点的平均放射强度作为表达丰度,分析最终结果。

1.5 降落 RT-PCR 由于胆囊组织的 mRNA 表达量过低,难以用点杂交或原位杂交检测,甚至常规 PCR 也难以检测出,我们采用了 Touch Down-PCR 以增加敏感性。PCR 的引物为: 上游:5' CgCCT gACTg AATTA CggAC 3', 下游:5' CAAAC AgggC TTgCC AATTA g 3'。PCR 程序: Step 1: 94.0℃ for 5:00, Step 2: 94.0℃ for 0:45, Step 3: 59.0℃ for 0:45, -1.0℃ per cycle, Step 4: 72.0℃ for 1:00, Step 5: Go to step 2, 9 times, step 6: 94.0℃ for 0:45, Step 7: 54.0℃ for 0:45, Step 8: 72.0℃ for 1:00, Step 9: Go to step 6, 30 times, Step 10: 72.0℃ for 10:00。

1.6 测序 将准备进行测序分析的 PCR 产物于 1.5%低熔点琼脂糖凝胶中电泳 40min,电压 80V,紫外灯下切胶,采用 QIAquick Gel Extraction 试剂盒纯化 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物用 ABI377 测序仪测序,所用载体为 pmd18-t 载体 (大连宝生物公司),将测序结果与 GENE BANK 序列对比以验证 PCR 结果。

* 国家自然科学基金资助项目 (编号:30271272) 及国家基因组南方中心基金资助项目 (编号:CNCS-99M-06)

利百素对术中静滴甘露醇所致静脉炎的防治作用

程秀英 吴先平 苏雯 李凤娟 伍燕芳

(广东省佛山市顺德中西医结合医院 佛山 528333)

摘要 :目的 观察利百素对静滴甘露醇所致静脉炎的防治作用。 方法 78 例神经外科手术患者被分为利百素组和常规组,利百素组患者在静脉穿刺成功后,固定针头覆盖针眼,将利百素凝胶适量涂抹于静脉穿刺点周围及沿穿刺点血管向上走行涂擦,每 2 h 1 次,至手术结束,常规组则不做此处理。观察患者术中静滴甘露醇 250~500mL 后静脉炎的发生情况。结果:与常规组相比,利百素组静脉炎发生率显著降低 ($P < 0.01$, $\chi^2 = 43.18$, $P = 0.0001$)。结论 预防性应用利百素凝胶可以减少静脉炎的发生。

关键词 利百素凝胶;复方七叶草苷;二乙胺水杨酸;甘露醇;静脉炎;防治作用

Objective: Infusing mannitol always leads to the symptoms of phlebitis such as redness, swelling, hotness, and pain. The study was to observe effect of reparil-gel on phlebitis incidence. **Methods**: 78 cases with brain tumor or brain trauma were randomly divided into two groups: reparil-gel group and control group. 20% mannitol 250-500ml were used in all patients. In reparil-gel group, after the needle was inserted, reparil-gel was used near the point of acupuncture once every two hours until the end of operation. **Results**: Compared with control group, phlebitis incidence in reparil-gel group was lowered markedly ($P < 0.01$, $\chi^2 = 43.18$, $P = 0.0001$). **Conclusion**: Reparil-gel can decrease the occurrence of phlebitis when infusing mannitol.

关键词 reparil-gel; mannitol; phlebitis

中图分类号 R 543.7

文献标识码 B

文献编号: 1671-4040(2004)06- 0005-02

静脉注射甘露醇脱水是治疗颅内高压的重要方法之一,在神经外科手术中应用非常广泛。但是,由于输入过快等原因,易发生药物渗漏及静脉炎。利百素是德国马博士大药

厂研发生产的复方七叶皂苷凝胶,是一种配方独特的外用消肿镇痛药^[1]。在输注甘露醇等高渗液体时预防性应用利百素凝胶,发现它能明显改善静脉炎的临床症状。现报道如下:

2 结果

2.1 基因芯片结果 研究发现 FXR 在基因芯片上显影,2 例胆囊中 FXR 表达的平均灰度值为 16.80, 信号值较低,但还是能够被芯片所检测。

2.2 RT-PCR 结果 FXR 特异性 PCR 扩增产物为 352bp。2 例胆囊间 FXR 的表达无明显差异。

2.3 PCR 产物测序结果 测序结果在 GENE BANK 数据库经 BLAST 比对后,其同源性 with FXR 一致。

3 讨论

本次研究表明,经基因芯片,RT-PCR,测序三重验证,FXR 确实在胆囊中表达,这提示 FXR 在胆囊中也起作用。经典胆汁酸代谢的代谢通路,是由胆固醇经胆固醇 7 α -羟化酶的作用,经过系列反应而成。其深入的机理探讨,自从晚近核受体类作用的发现后,给人一种豁然开朗的感觉。法尼醇类受体就是其中的一个重要组成成分。

FXR 是人体内脂类代谢和转录调节的一个重要的细胞核内受体。它是胆汁酸在细胞核内的特异性受体^[3],而且还参与人体代谢的多种功能调节。例如,它是激肽原(kininogen)的靶体,在血管舒张和抗血小板凝集中起一定作用^[4]。它还可以上调多药耐药基因(MDR3)的表达,控制肝细胞分泌胆汁酸和磷脂^[5]。作为在血清甘油三酯代谢中起决定性作用的载脂蛋白 CIII(Apolipoprotein CIII)、FXR 的拮抗剂可以降低它的表达^[6]。尤其重要的是,FXR 在胆汁酸代谢中具有十分重要的作用。作为细胞内胆汁酸敏感性转录因子,FXR 还调节胆汁酸的硫酸化,在胆汁酸的肠肝循环中起重要作用^[7],于减少胆汁酸对细胞内的毒性作用也有重要影响^[8]。由于 FXR 对胆汁酸的重要作用,很可能是胆石病形成的一个重要影响因素。

但是,既往研究报道均提示 FXR 仅在肝、脾和肾脏中表

达,本次研究发现,FXR 在胆囊中同样发挥着作用。从前面的介绍中我们知道,FXR 与胆汁酸结合后,最终的结果是减少胆汁酸的分泌。而事实上,胆囊对胆汁的作用为浓缩胆汁,或分泌粘液,或通过收缩与舒张进行排泄或储存胆汁;但它并不分泌胆汁。因此,深入探讨 FXR 在胆囊中的具体作用,很可能会导致该基因新功能的发现,也很可能为胆汁酸代谢乃至胆石病的形成机理提供新的元素。

参考文献

[1]Lammert F, Carey MC, Paigen B. Chromosomal Organization of Candidate Genes Involved in Cholesterol Gallstone Formation: A Murine Gallstone Map[J]. Gastroenterology, 2001,120:221-238
[2]袁作彪,韩天权,蒋兆彦,等. 正常人胆囊组织基因表达谱研究[J]. 外科理论与实践,2003,8(2):103~106
[3]Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids[J]. Science,1999,284:1 362~1 365
[4]Zhao A, Lew JL, Huang L,et al. Human kininogen gene is transactivated by the farnesoid X receptor[J]. J Biol Chem, 2003,278: 28 765~28 770
[5]Huang L, Zhao A, Lew JL, et al. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3 [J]. J Biol Chem, 2003,278:51 085~51 090
[6]Clausel T, Inoue Y, Barbier O, et al. Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression [J]. Gastroenterology, 2003 ,125:544~555
[7]Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, et al. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation [J]. J Biol Chem,2003, 278:27 703~27 711
[8]Barbier O, Torra IP, Sirvent A,et al. FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity[J]. Gastroenterology, 2003 ,124:1 926-1 940

(收稿日期: 2004 -07-20)