

急性肝内胆汁淤积大鼠肝组织法尼醇受体表达的变化及意义

姚嘉明 于芳芳 王小奇 叶蔚 刘彬彬 刘庆生

摘要 **目的** 观察异硫氰酸萘酯 (ANIT) 诱导的急性肝内胆汁淤积大鼠肝组织法尼醇受体 (FXR) 的表达的变化及意义。**方法** 雄性 SD 大鼠随机分为正常组 8 只, 模型组 24 只, 模型组采用 4% ANIT (麻油配制) 100mg/kg 一次性灌服诱导大鼠肝内胆汁淤积, 于给药后 24、48、72h 3 个时相点随机处死 8 只大鼠, 正常组以等容量麻油一次性灌胃后 48h 处死; 生化法检测血清 TBA 水平, 荧光定量 PCR 检测肝组织 FXRmRNA 的表达, 免疫组化法检测 FXR 蛋白的表达。**结果** 模型组大鼠血清 TBA 水平在灌服 ANIT 24h 后明显升高并达高峰, 之后逐渐下降, 3 个时间点均较正常组明显升高; 而肝组织 FXRmRNA 和蛋白表达在 3 个时间点均较正常组明显下降, 其中 24h 最低, 随时间推移, 48、72h 逐渐增高; 相关性分析发现, 大鼠肝组织 FXRmRNA 表达与血清 TBA 水平均呈明显的负相关 ($r = -0.589, P < 0.01$)。**结论** 大鼠肝组织 FXRmRNA 和蛋白表达的下降可能参与 ANIT 诱导的急性肝内胆汁淤积病理过程。

关键词 法尼醇受体 肝内胆汁淤积

Expression Change and Significance of Farnesoid X Receptor in the Liver Issue of Rats with Acute Intrahepatic Cholestasis. Yao Jiaming, Yu Fangfang, Wang Xiaoqi, et al. The Hangzhou Hospital of TCM, Zhejiang 310007, China

Abstract **Objective** To investigate the expression of farnesoid X receptor in the liver issue of rats with acute intrahepatic cholestasis and its significance. **Methods** Male SD rats were randomly divided into 2 groups, with 8 rats in the normal group, 24 rats in the model. The model of acute intrahepatic cholestasis in rat was induced by 4% ANIT prepared with sesame oil by gastric gavage. At the ends of 24th, 48th and 72th hour after the administration of ANIT, 8 rats in model group were respectively randomly sacrificed. The rats in the normal group were administrated with sesame oil by gastric gavage and sacrificed at the 48th hour. The serum TBA level of the rats were detected by full automatic biochemical analyzer. The expression of FXRmRNA in liver were measured by RT-PCR. The protein expression of FXR were detected by immunohistochemistry. **Results** The serum TBA level was significantly increased in the model group at all three time points. In the 24 hour after administration of ANIT, the serum TBA level was increased and reached the peak time, and then it was decreased. At the same time the protein and mRNA expression of FXR were significantly decreased in the model group at all three time points. The expression of FXRmRNA in liver and the serum TBA level had significantly negative correlation ($r = -0.589, P < 0.01$) by correlation analysis. **Conclusion** The decrease of the protein and mRNA expression of FXR in the rats liver may participate in the pathologic process of acute intrahepatic cholestasis induced by ANIT.

Key words Farnesoid X receptor; Intrahepatic cholestasis

肝内胆汁淤积是目前临床常见的一种疾病, 其发生原因较为复杂, 包括遗传性、感染性、药物性、酒精性、自身免疫性、妊娠性和手术后等。该病发生机制尚未完全探明, 目前缺乏疗效确切的治疗药物。法尼醇受体 (farnesoid X receptor, FXR) 又称胆汁酸受体, 属于核受体超家族成员。其可通过调控一系列基因的表达, 参与胆汁酸的代谢调节, 是胆汁酸合成和转运的关键调节因子。因此, 其有望成为治疗肝内胆汁

淤积性疾病的药物靶点。本研究使用异硫氰酸萘酯建立大鼠急性肝内胆汁淤积模型。在前期研究中笔者成功地制作了大鼠急性肝内胆汁淤积的模型, 大鼠 ALT、AST、TBIL、ALP 及 TBA 在应用 ANIT 24h 后明显升高, 于 48h 达高峰, 72h 下降, 模型组 3 时相点 ALT、AST、TBIL、ALP、TBA 水平均显著高于正常组^[1]。本次研究通过对该模型形成过程中大鼠肝组织中 FXRmRNA 及蛋白表达的变化进行动态观察, 分析探讨其特点, 为进一步探索肝内胆汁淤积的发病机制提供实验支持。

材料与方法

1. 实验动物: SD 大鼠 32 只, 雄性, 清洁级, 体重 190 ~

作者单位: 310007 杭州市中医院 (姚嘉明、王小奇、叶蔚、刘彬彬、刘庆生); 浙江中医药大学 2009 级硕士研究生 (于芳芳)

210g,由上海市西普-必凯实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(沪)2008-0016,饲养于浙江中医药大学实验动物中心,饲养环境通风良好,温度 18~22℃,湿度为 45%~65%。

2. 主要试剂:异硫氰酸萘酯由 ACROS ORGANICS 公司提供,FXR(H-130)兔多克隆抗体为美国 Santo Cruz 公司产品,Envision 两步法免疫组化生物检测试剂盒为美国 DAKO 公司产品,AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒为爱思进生物技术有限公司产品,反转录试剂盒、Perfect Realtime-SYBR Premix EX Taq™ 试剂盒均为宝生物工程(大连)有限公司;引物由上海生工生物工程技术有限公司合成:大鼠 FXR 上游引物:5'-GAC CAC GAA GAC CAG ATT GCT-3',下游引物:5'-TCT CCA CTG CCT CTC TAT CCT T-3',扩增片段 283bp;大鼠 GAPDH 上游引物:5'-GAC AAC TTT GGC ATC GTG GA-3',下游引物:5'-ATG CAG GGA TGA TGT TCT GG-3',扩增片段 133bp。

3. 分组及处理:32 只 SD 大鼠随机分成两组,正常组 8 只,模型组 24 只。适应性常规喂养 1 周后,模型组一次灌服用麻油配成 4% 浓度的异硫氰酸萘酯(ANIT)100mg/kg 体重,正常组灌服等容量的麻油;所有大鼠予以标准大鼠饲料喂养,自由饮水。模型组在灌服 ANIT 后 24、48、72h 3 个时相点随机处理 7~8 只,正常组于灌服麻油 24h 后全部处理。各大鼠于处理前 16h 禁食不禁水,上午空腹麻醉下取血,分离血清待用;取右叶部分肝组织,以 4% 多聚甲醛固定,逐级乙醇脱水,常规石蜡包埋待用;其余肝组织投入液氮中冻存,3h 后移入-70℃ 冰箱中保存。其中正常组、模型组 24h 时相点各有 1 只大鼠因灌胃时误灌入气管导致窒息死亡。

4. 检测方法:血清总胆汁酸(TBA)水平采用全自动生化仪检测。肝组织 FXR mRNA 表达采用 Real-time PCR 法,以 RNA 制备试剂盒抽提肝组织总 RNA,经鉴定无降解、纯度高,紫外分光光度计测 OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间,根据 OD260 值计算总 RNA 浓度。以 500ng 总 RNA 为模板进行反转录,反转录反应产物于 20μl 反应体积(2×SYBR10μl、10μmol/L 浓度的 10μmol/L 上下引物各 0.4μl、10ng/μl cDNA 模板 2μl、ddH₂O 补充体积至 20μl)中进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:预变性 95℃×3min;95℃×5s、60℃×45s,共 40 个循环。溶解曲线分析:95℃×15s,60℃×15s,缓慢上升至 95℃×15s。以 GAPDH 作内参,相对表达量($2^{-\Delta Ct} \times 10^2$)来表示目的基因 mRNA 的表达水平($\Delta Ct = \text{目的基因 Ct} - \text{内参 Ct}$)。肝组织 FXR 蛋白表达采用免疫组织化学 Envision 两步法检测,结果判定标准:根据阳性细胞的着色程度及着色范围进行半定量。阳性强度:不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,中等着色为 2 分,着色深者为 3 分。着色细胞阳性范围:无着色为 0 分,着色阳性细胞 <1/3 为 1 分,着色阳性细胞 1/3~1/2 为 2 分,着色阳性细胞 >1/2 为 3 分。将每张切片着色程度与着色细胞阳性范围得分各自相加为其最后计分。

5. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 软件包进行统计,所有数

据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析和非参数秩和检验,相关性分析使用 Spearman, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 急性肝内胆汁淤积大鼠各时相点血清 TBA 水平的变化:模型组大鼠 TBA 水平在灌服 ANIT 24h 后明显升高并达高峰,后开始下降,72h 点 TBA 水平较 24h 点有明显下降($P < 0.01$)。3 个时相点均较正常组差异有显著性($P < 0.01$, $P < 0.05$,表 1)。

表 1 急性肝内胆汁淤积大鼠各时相点血清 TBA 水平的变化($\bar{x} \pm s$)

分组	n	TBA
正常组	7	21.39 ± 11.88
模型组 24h	7	466.00 ± 32.52 **
48h	8	422.44 ± 34.90 **
72h	8	136.44 ± 74.84 * ^Δ

与正常组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$;与模型组 24h 比较, ^Δ $P < 0.01$

2. 急性肝内胆汁淤积大鼠各时相点肝组织 FXRmRNA 及蛋白表达的变化:模型组大鼠肝组织中 FXRmRNA 和蛋白表达在 24、48 及 72h 3 个时相点均较正常组明显下降($P < 0.01$, $P < 0.05$),其中 24h 最低,随时间推移,48、72h 逐渐增高,而 72h 点 FXRmRNA 较 24h 点表达量明显增高($P < 0.05$,表 2)。

表 2 模型组各时相点大鼠肝组织中 FXR 蛋白及 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

分组	n	FXRmRNA	FXR 蛋白
正常组	7	8.47 ± 3.32	4.50 ± 0.58
模型组 24h	7	3.11 ± 2.11 **	2.36 ± 0.56 **
48h	8	3.54 ± 1.65 **	2.63 ± 0.74 **
72h	8	3.96 ± 1.91 * ^Δ	2.88 ± 0.69 **

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组 24h 比较, ^Δ $P < 0.05$

3. 大鼠肝组织 FXRmRNA 表达与血清 TBA 水平的相关性分析:经 Spearman 检验,大鼠肝组织 FXRmRNA 表达与血清 TBA 水平均呈明显的负相关($r = -0.589$, $P < 0.01$)。

讨 论

法尼醇受体(FXR)是核受体超家族中的一员,胆汁酸为其生理性配体,因此又称为胆汁酸受体,它在肝脏和肠道高表达,其活化能改变一系列参与调节胆汁酸代谢的基因的表达^[2,3]。因此,法尼醇受体高表达对于维持胆汁酸的內环境稳态、降低胆汁酸对肝脏

的毒性具有重要意义,已有研究表明,FXR 激动剂可以改善肝脏疾病包括胆汁淤积、肝纤维化等^[4-6]。

异硫氰酸萘酯(ANIT)能够诱发动物肝内胆汁淤积,导致明显胆管上皮细胞损伤,引起血清 ALP 的活性、胆汁酸和胆红素含量的升高,胆汁流量减少,同时造成肝细胞损伤,引起血清中转氨酶快速升高,类似于人类急性肝内胆汁淤积的病理改变。本实验采用其对大鼠灌胃制作急性肝内胆汁淤积模型。在用药后 24、48 及 72h 大鼠血清中 TBA 水平较正常组明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),同时肝组织中 FXR 蛋白及 FXRmRNA 表达均较正常组有明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。3 个时相点血清 TBA 水平表现为逐渐降低,而肝组织中 FXR 蛋白及 mRNA 表达则逐渐增多,其中 FXRmRNA 表达与血清 TBA 水平均呈明显的负相关($r = -0.589$, $P < 0.01$)。有研究提示,大鼠在灌服 ANIT 24h 内就诱发了胆汁淤积,并且随着时间的延长绝大部分肝功能指标呈现先加重后逐渐恢复的趋势,其中灌药后 48h 为肝功能损伤的高峰,至灌药后 72h 肝功能已有较大的恢复,与笔者的前期研究结果一致。

目前已有研究显示由乙炔雌二醇诱发的肝内胆汁淤积症孕鼠的血清 TBA 水平及肝组织 FXRmRNA 表达较对照组明显升高,FXR 参与了肝内胆汁淤积的发生过程^[3]。故笔者认为,在 ANIT 诱发的大鼠急性肝内胆汁淤积模型中,用药后 24h 内肝组织中 FXR 蛋白及 mRNA 的表达即出现明显下降,由此出现了胆汁酸代谢的障碍,血清胆汁酸水平上升,从而导致

急性肝内胆汁淤积及肝细胞损伤,肝功能出现恶化,其后随着 FXR 蛋白及 mRNA 的表达的回升,胆汁酸代谢障碍逐渐得到缓解,血清胆汁酸水平下降,进而肝内胆汁淤积及肝细胞损伤情况得到好转。研究提示,FXR 在肝内胆汁淤积肝损伤中起重要作用,通过对 FXR 表达的调控可能为肝内胆汁淤积的治疗提供新的手段。

参考文献

- 1 姚嘉明,王小奇,刘庆生. 清热化湿祛瘀疏肝法对急性肝内胆汁淤积大鼠的防治作用[J]. 中华中医药学刊, 2012,30(10):2102-2104
- 2 Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, *et al.* Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor[J]. *Science*, 1999,284(5418):1365-1368
- 3 时青云,林宇庚,周新,等. 胆汁酸代谢主要调节核受体和相关基因在胆汁淤积孕鼠肝脏中的表达[J]. 中华肝病杂志,2010,18(12):927-930
- 4 Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, *et al.* Bile - acid - activated farnesoid X receptor regulates hydrogen sulfide production and hepatic microcirculation[J]. *World J Gastroenterol*, 2009,15(17):2097-2108
- 5 Renga B, Migliorati M, Mencarelli A, *et al.* Reciprocal regulation of the bile acid - activated receptor FXR and the interferon - gamma - STAT - 1 pathway in macrophages[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009,1792(6):564-573
- 6 Lindor KD. Farnesoid X receptor agonists for primary biliary cirrhosis[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2011,27(3):285-288

(收稿:2012-04-09)

(修回:2012-05-02)

足部原发性软组织肿瘤的影像学分析

姚庆东 许崇永 王营营 张 硅 王小蓉 程小杰 杨建生

摘 要 **目的** 探讨足部原发性软组织肿瘤的影像学诊断价值。**方法** 搜集我院足部软组织肿瘤患者 55 例,其中男性 28 例,女性 27 例,年龄 4 个月~79 岁,18 例行 X 线检查,17 例行 CT 检查,44 例行 MRI 检查,分析其临床资料及影像学表现,包括位置、大小、形态、信号或密度、增强特点。**结果** 55 例中,良性 49 例,恶性 6 例,大小 1.1~8.3cm,单发居多(41 例,74.5%),影像学定性诊断 39 例,其余 16 例中 3 例恶性肿瘤误诊为良性。X 线、CT、MRI 可有效发现病灶,敏感度分别为 88.9%、94.1% 及 100%。部分肿瘤 MR 表现较有特征:19 例海绵状血管瘤 T₂WI 及 STIR 上明亮高信号,可见分隔;6 例脂肪瘤及脂肪母细胞瘤在 T₁WI、T₂WI 上信号较高,STIR 信号降低;2 例滑膜肉瘤有侵袭性表现;3 例黑色素瘤见短 T₁ 短 T₂ 信号;色素沉着绒毛结节性滑膜炎与腱鞘巨细胞瘤均见骨质破坏,由于相似 T₂WI 低信号,难以鉴别。**结论** 影像学检查可有效发现病灶且能准确定位,对于部