

• 基础研究 •

大鼠急性肺栓塞后 hnRNP-H₂ 和 FAH 的表达变化及其促细胞凋亡的机制研究

李圣青 刘阿茹 欧阳海峰 简文 赵峰 连新宇

【摘要】 目的 研究大鼠急性肺栓塞模型肺组织中异质性核糖核蛋白 H₂ (hnRNP-H₂) 和延胡索酰乙酸水解酶 (FAH) 的表达变化及其促细胞凋亡的机制。方法 建立大鼠急性肺栓塞模型, 分别在急性肺栓塞后 1、8、24、48h 开胸取肺组织。常规提取肺组织的总 RNA 和总蛋白, 以正常组为对照, 半定量 RT-PCR 法测定 hnRNP-H₂ 和 FAH mRNA 表达水平的变化; Western-blot 法测定 hnRNP-H₂ 和 FAH 蛋白表达水平的变化。半定量 RT-PCR 和 Western-blot 法测定 Bcl-x mRNA 的不同剪接体 Bcl-x_s 和 Bcl-x_L 在肺栓塞前后的表达变化; Western-blot 法测定细胞周期相关蛋白 MPM-2 和凋亡相关蛋白 cytochrome c 和 caspase-3 的表达变化。TUNEL 法观察急性肺栓塞后组织细胞的凋亡情况。结果 在大鼠急性肺栓塞后, hnRNP-H₂ 的 mRNA 水平和蛋白水平均逐渐升高, 在 24h 和 48h 升高最为明显。大鼠急性肺栓塞后 Bcl-x_s 的表达逐渐升高, 而 Bcl-x_L 的表达逐渐下降, 导致 Bcl-x_s/Bcl-x_L 的比例逐渐升高。FAH 的 mRNA 水平和蛋白水平均逐渐下降, 在 24h 和 48h 下降最为明显。MPM-2, cytochrome c 和 caspase-3 的表达在急性肺栓塞后 24h 和 48h 都有明显升高。TUNEL 染色发现肺组织内出现明显的细胞凋亡现象。结论 大鼠急性肺栓塞后肺组织内 hnRNP-H₂ 的表达明显升高, 可能导致 Bcl-x_s/Bcl-x_L 的比例升高; FAH 的表达明显下降, 可能导致急性肺栓塞后肺组织细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 二者共同促进了肺组织细胞的凋亡。

【关键词】 肺栓塞; 核糖核蛋白类; 细胞凋亡

Expression changes of hnRNP-H₂ and FAH and their effects on cell apoptosis in rat lung tissue after acute pulmonary embolism

LI Shengqing, LIU Aru, OUYANG Haifeng, et al

Department of Respiratory Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To study the expression changes of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H₂ (hnRNP-H₂) and fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) in the lung tissues of a rat model of acute pulmonary embolism (PE) and their effects on the cell apoptosis. Methods A rat model of acute PE was established. The samples of lung tissues were collected at different time points: 1h, 8h, 24h and 48h. The normal rats were used as control. The changes of hnRNP-H₂ and FAH mRNA levels were identified by semi-quantitative RT-PCR, and the changes of their protein levels were validated by Western blot method. The methods of semi-quantitative RT-PCR and Western blot were also employed to study the expression changes of Bcl-x_L and Bcl-x_S in the lung tissues after PE, which were the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. The expression changes of cell cycle-related protein MPM-2 and apoptosis-related proteins cytochrome c and caspase-3 were studied by Western blot method. Apoptotic cells in lung tissue sections were identified by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. Results At different time points, the mRNA levels and the protein levels of hnRNP-H₂ increased in the lung tissues of rat acute PE models, obviously at 24 and 48h. The expression of Bcl-x_S increased gradually after acute PE, while that of Bcl-x_L decreased obviously, resulting in the up-regulation of the Bcl-x_S/Bcl-x_L ratio. The mRNA levels and the protein levels of FAH were down-regulated in the lung tissues of rat acute PE models, obviously at 24 and 48h. The expression of MPM-2, cytochrome c and caspase-3 was up-regulated after acute PE, obvi-

收稿日期: 2007-04-03

作者单位: 710033 西安市, 第四军医大学西京医院呼吸科

作者简介: 李圣青, 女, 1970年1月生, 安徽芜湖市人, 医学博士, 副主任医师, 副教授。Tel: 029-84775237, E-mail: shengqingli@gmail.com

ously at 24 and 48h. Many apoptotic cells could be observed in the lung tissues by the method of TUNEL after acute PE. **Conclusion** The expression of hnRNP-H₂ increased obviously after acute PE, which might result in the up-regulation of the Bcl-x_S/Bcl-x_L ratio. The expression of FAH was down-regulated obviously after acute PE, which might result in a transient cell cycle arrest at the G₂/M transition. Both mechanisms might facilitate the cell apoptosis in the lung tissues.

【Key words】 acute pulmonary embolism; ribonucleoproteins; apoptosis

肺栓塞是血栓性或者其他性质的栓子(如气体、羊水、脂肪)顺着血流方向堵塞肺动脉的结果。我们实验室采用比较蛋白质组学的方法研究发现大鼠急性肺栓塞后出现了一系列的蛋白表达变化,可归纳为以下10类:第1类与肺组织的血管和气管平滑肌收缩相关;第2类与肺组织内胶原代谢有关;第3类与组织细胞损伤和凋亡相关;第4类与毒性物质代谢相关;第5类与血压调节相关;第6类与有氧代谢相关;第7类与维持机体酸碱平衡相关;第8类与蛋白翻译水平的调节相关;第9类为其他类,该类蛋白在肺栓塞中的具体作用仍有待进一步探讨;第10类为以前未研究过的新蛋白^[1]。本研究探讨与细胞损伤和凋亡密切相关的两种蛋白异质核糖核蛋白H₂(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H₂, hnRNP-H₂)和延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)。其中 hnRNP-H₂ 在急性肺栓塞后出现了明显的表达升高。hnRNP-H₂ 是一种不均一核糖核蛋白,主要参与前mRNA的选择性剪接过程。前mRNA的选择性剪接是导致蛋白多样性的一个重要原因,人类约有74%的基因通过选择性剪接过程产生不同功能甚至功能截然相反的蛋白。Bcl-x就是通过前mRNA的选择性剪接产生了两种蛋白:Bcl-x_S和Bcl-x_L,前者具有促凋亡作用,而后者具有抗凋亡作用^[2]。hnRNP-H₂与Bcl-x前mRNA的选择性剪接过程密切相关。FAH在急性肺栓塞后出现了明显的表达下降。FAH是酪氨酸的毒性降解产物延胡索酰乙酰乙酸(fumarylacetoacetate, FAA)的水解酶,FAH的缺乏或功能障碍将导致FAA的大量堆积。FAA的堆积对肝、肾功能有较大的影响,不仅可以导致组织细胞的纤维化和癌变,还可以导致细胞凋亡^[3]。本研究探讨了hnRNP-H₂和FAH在急性肺栓塞后的表达变化及其促进肺组织细胞凋亡的机理。

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol Reagent 和 SuperScript III 均购

自 Invitrogen 公司。rTaq 酶购自 Takara 公司。Bcl-x_S和Bcl-x_L的兔多抗均购自 Santa Cruz 公司, hnRNP-H₂ 兔多抗购自 Biocompare 公司。cytochrome c 和 caspase-3 单抗均购自 Chemicon 公司, MPM-2 单抗购自 Upstate 公司。紫外分光光度计 UV330 购自英国 Unicam 公司, PE 9700 PCR 仪和 Image Master TotalLab v1.11 软件均购自 Amersham Pharmacia 公司。雄性 Wistar 大鼠购自第四军医大学实验动物中心。

1.2 大鼠急性肺栓塞模型的建立 在 Clozel 等^[4]模型的基础上做如下修改:首先制备体外血栓,取 Wistar 大鼠 1 只,心脏穿刺取血,注入医用输液器的前段塑料管(内径约 2mm)。每毫升全血中加入 33 nkat 凝血酶,室温下静置过夜,制备直径 2mm、长 10mm 的自体血栓。取 40 只 Wistar 大鼠,随机分 5 组,每组 8 只。将大鼠用 10g/L 戊巴比妥 1.2ml 麻醉,经大鼠颈总静脉插管注入栓子,3 个/只。以正常组为对照。分别在 1、8、24、48h 开胸取肺组织。

1.3 半定量 RT-PCR 采用 TRIzol 试剂提取大鼠肺组织总 RNA。采用琼脂糖凝胶电泳验证总 RNA 的质量,采用紫外分光光度计进行 RNA 定量。采用 SuperScript III 合成 cDNA 第一链,总反应体系达 20μl,反应物-20℃保存或直接用于 PCR。采用 Primer Premier 5.0 PCR 引物设计软件分别设计 Bcl-x、hnRNP-H₂ 和内参 β-actin 的引物。同时采用 Sequencher 序列比对软件对 Bcl-x、hnRNP-H₂ 和内参 β-actin 的引物序列做了特异性验证。Bcl-x 引物序列:上游 5'-AGG CTG GCG ATG AGT TTG GAA -3',下游 5'-CGG CTC TCG GCT GCT GCA TT -3'。hnRNP-H₂ 引物序列:上游 5'-GGC AGA AGA GCC AGG TTT -3',下游 5'-ATG GGA TGA AGA GGT GAG AA -3',扩增长度 278bp。FAH 引物序列:上游 5'-ATG GAA GGA GGC AAG AGC -3',下游 5'-TGA GGA CCA TCC CGA AAA -3',扩增长度 461bp。内参 β-actin 引物序列:上游 5'-GAT GAC CCA GAT CAT GTT TG-3',下游 5'-TAG GAG CCA GGG CAG TAA-3',

扩增长度 614bp。采用 PE 9700 PCR 仪,反应体系 25 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 2min, 94 $^{\circ}$ C 变性 10s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。分别在 20、30 和 35 个循环取样,用 12g/L Agorase 跑琼脂糖电泳。采用 Image Master TotalLab v1.11 软件作图像分析。首先确定条带,消除背景,然后以 Marker 条带为标准计算待测条带的 Volume 值,最后计算目的条带与对应内参条带的比值。

1.4 Western-blot 先用三氯醋酸/丙酮沉淀法沉淀肺组织蛋白,然后在沉淀中加入裂解液(50 mmol/L Tris HCl (pH8.0), 10 g/L SDS, 10 g/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA, 0.7 mg/L 抑肽素, 0.5 mg/L 亮肽素)。15 $^{\circ}$ C, 40 000 $\times$ g, 离心 1h, 取上清。用 Bradford 法对上清进行蛋白定量,分装后-80 $^{\circ}$ C 保存。SDS-PAGE 电泳的蛋白上样量为 40 μ g, 经过转膜和封闭处理后,按顺序加一抗和二抗,最后用 A、B 液显色。采用 ImageMaster3.0 软件扫描测定每个蛋白条带的 Volume 值。

1.5 TUNEL 检测 采用凯基 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒检测急性肺栓塞后肺组织内的细胞凋亡情况。组织切片常规脱蜡至水,0.3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性,0.1 g/L 蛋白酶 K 消化 40min, TdT 反应液,链霉亲和素-辣根过氧化物酶(SP-HRP)37 $^{\circ}$ C 各作用 1h, 二氨基联苯胺(DAB)显色,最后用苏木精复染 1min, 脱水,封片。实验设加 Dnase I 的为阳性对照,阴性对照的反应液中不添加 TdT 酶。

1.6 统计学分析 采用 SPSS10.0 统计软件分析,测量值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用重复测量方差分析法

2 结果

2.1 急性肺栓塞动物模型 在注入血栓栓子后,大鼠立刻出现呼吸急促,30 次/min 以上;口唇及趾端出现明显紫绀;活动明显减少,多为俯卧位;食欲下降,24h 内未主动进食。随着时间的延长,大鼠逐渐适应了急性缺氧。虽然口唇及趾端紫绀无明显减轻,但 24h 后活动量有所增加。肺组织 HE 染色显示与支气管伴行的肺动脉及其他小血管内存在大小不同的栓子(图 1)。

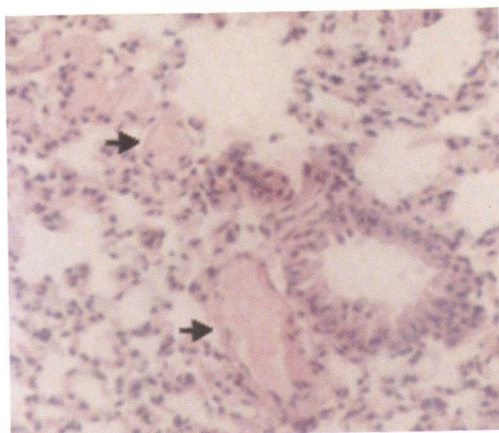


图 1 急性肺栓塞 48h 后大鼠肺组织的 HE 染色

2.2 hnRNP-H₂ 和 FAH 的表达变化 大鼠急性肺栓塞后,肺组织中 hnRNP-H₂ mRNA 水平逐渐升高,在 24h 和 48h 升高尤为显著。肺组织中 FAH mRNA 水平逐渐下降,在 24h 和 48h 下降尤为显著(图 2,表 1)。hnRNP-H₂ 蛋白水平在急性肺栓塞后逐渐升高,在 24h 和 48h 升高最明显。FAH 蛋白水平在急性肺栓塞后逐渐下降,在 24h 和 48h 下降最明显(图 3,表 1)。

表 1 急性肺栓塞后 hnRNP-H₂ 和 FAH 及凋亡相关蛋白 Bcl-x_s、Bcl-x_L、MPM-2、caspase-3 和 cytochrome c 的表达变化(n=8; $\bar{x} \pm s$)

时间	hnRNP-H ₂ (mRNA)	hnRNP-H ₂	Bcl-x _s (mRNA)	Bcl-x _L (mRNA)	Bcl-x _s	Bcl-x _L
0h	0.19 $\pm$ 0.09	87398 $\pm$ 828	0.12 $\pm$ 0.07	1.18 $\pm$ 0.37	424585 $\pm$ 2384	983746 $\pm$ 3475
1h	0.36 $\pm$ 0.12	85374 $\pm$ 645	0.12 $\pm$ 0.09	1.19 $\pm$ 0.41	394857 $\pm$ 2148	982968 $\pm$ 3958
8h	0.54 $\pm$ 0.21*	86934 $\pm$ 659	0.34 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.32	674938 $\pm$ 2273	438597 $\pm$ 2857
24h	0.83 $\pm$ 0.24*	497383 $\pm$ 2746*	0.56 $\pm$ 0.14*	0.32 $\pm$ 0.11*	1293858 $\pm$ 6365*	218497 $\pm$ 1837*
48h	0.98 $\pm$ 0.26*	623984 $\pm$ 3149*	0.78 $\pm$ 0.25*	0.29 $\pm$ 0.12*	1348847 $\pm$ 7393*	228477 $\pm$ 1984*
时间	FAH (mRNA)	FAH	MPM-2	Pro-caspase-3	cytochrome c	
0h	0.79 $\pm$ 0.37	494783 $\pm$ 3249	87923 $\pm$ 923	1129348 $\pm$ 4884	183746 $\pm$ 975	
1h	0.75 $\pm$ 0.28	456893 $\pm$ 2574	85948 $\pm$ 845	979485 $\pm$ 3748	212968 $\pm$ 1228	
8h	0.62 $\pm$ 0.21	408483 $\pm$ 2148	92578 $\pm$ 985	973847 $\pm$ 2873	108597 $\pm$ 857	
24h	0.23 $\pm$ 0.12*	78463 $\pm$ 834*	844358 $\pm$ 3284*	158744 $\pm$ 973*	1218497 $\pm$ 6837*	
48h	0.19 $\pm$ 0.09*	79017 $\pm$ 792*	829585 $\pm$ 2958*	98847 $\pm$ 782*	1284773 $\pm$ 7984*	

注:与对照组(0 h)相比较,* $P < 0.05$, * $P < 0.01$

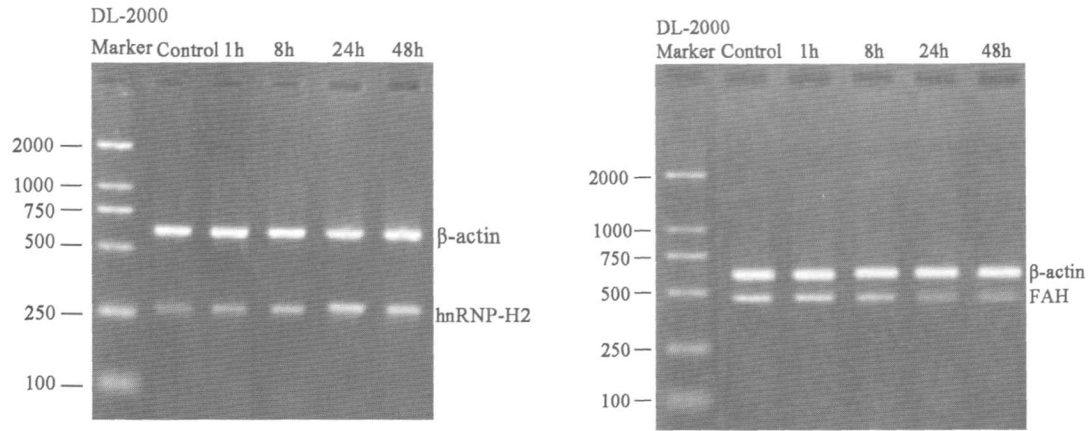


图 2 不同时间点肺组织 hnRNP-H₂ 和 FAH 的半定量 RT-PCR 结果

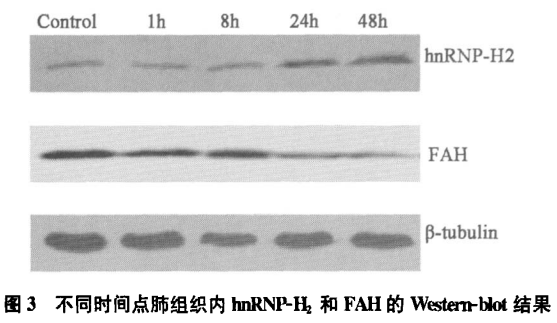


图 3 不同时间点肺组织内 hnRNP-H₂ 和 FAH 的 Western-blot 结果

2.3 Bcl-x_s 和 Bcl-x_L 的表达变化 大鼠急性肺栓塞后, Bcl-x_s 的 mRNA 水平逐渐升高, 在 24h 和 48h 升高尤为显著。Bcl-x_L 的 mRNA 水平在急性肺栓塞后却逐渐下降, 在 24h 和 48h 下降尤为明显(图 4, 表 1)。大鼠急性肺栓塞后, Bcl-x_s 蛋白水平的表达逐渐升高, 在 8h 即有升高趋势, 在 24h 和 48h 升高尤为显著。Bcl-x_L 在急性肺栓塞后的蛋白水平表达逐渐减低。在 8h 即有减低趋势, 在 24h 和 48h 减低最为明显(图 5, 表 1)。

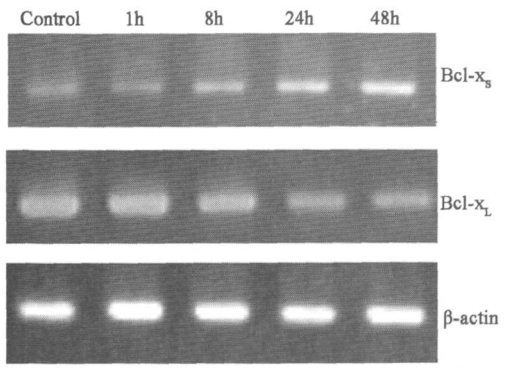


图 4 不同时间点肺组织 Bcl-x_s 和 Bcl-x_L 的半定量 RT-PCR 结果

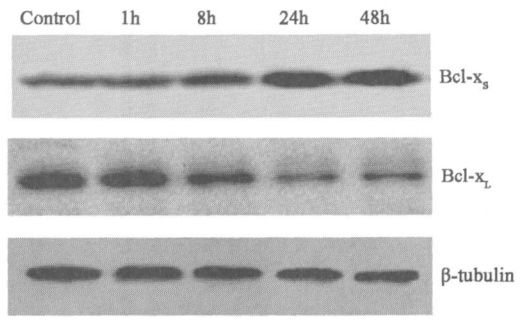


图 5 不同时间点肺组织 Bcl-x_s 和 Bcl-x_L 的 Western blot 结果

2.4 MPM-2 及凋亡相关蛋白的表达变化(图 6, 表 1) 大鼠急性肺栓塞后, MPM-2 的蛋白水平逐渐升高, 在 24h 和 48h 升高尤为显著, 表明阻滞于 G₂/M 期的细胞增多。Pro-caspase-3 的蛋白水平在急性肺栓塞后逐渐下降, 在 24h 和 48h 下降尤为明显, 表明 pro-caspase-3 被大量的活化。大鼠急性肺

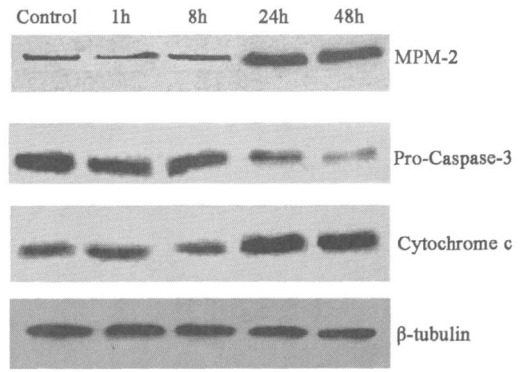
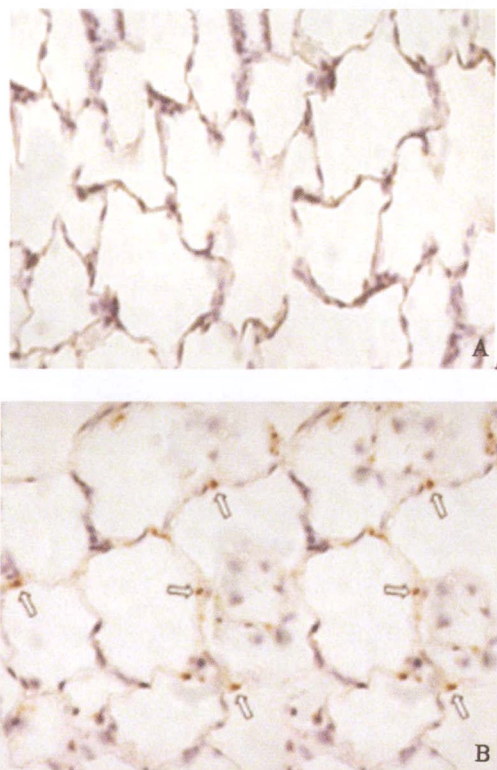


图 6 不同时间点肺组织 MPM-2、caspase-3 和 cytochrome c 的 Western blot 结果

栓塞后, cytochrome c 的蛋白水平逐渐升高, 在 24h 和 48h 升高尤为显著, 这是细胞程序性死亡的重要标志。

2.5 肺组织内的细胞凋亡 急性肺栓塞后肺泡间隔增厚, 肺泡腔内有渗出和细胞浸润。TUNEL 染色显示在急性肺栓塞后 48h 肺泡上皮细胞出现了大量的细胞凋亡现象(图 7)。



注: A: 对照组, B: 急性肺栓塞后 48h 凋亡细胞如箭头所示
图 7 肺组织的 TUNEL 染色($\times 250$)

3 讨论

本研究发现, 大鼠急性肺栓塞后 hnRNP-H₂ mRNA 和蛋白的表达水平均显著升高。Bcl-x_s mRNA 和蛋白的表达水平也逐渐升高, 但是 Bcl-x_L 无论是 mRNA 还是蛋白的表达水平均逐渐减低。hnRNP-H₂ 与 Bcl-x 前 mRNA 的选择性剪接过程密切相关。研究^[5]发现, Bcl-x mRNA 的第二个外显子内有 2 个区域可以调节 Bcl-x 的 5' 剪切位点的选择性剪接过程。一个区域是 B3 区, 它位于 Bcl-x_L 的 5' 剪切位点的上游, 能够促进细胞生成 Bcl-x_L。另一个区域是 B2 区, 它直接位于 Bcl-x_s 的 5' 剪切位点的下游, 能够促进 Bcl-x_s 的蛋白表达。其中一个富含 G 的 30 个核苷酸的元件(B2G)与 B2 区的活

性密切相关。hnRNP-H₂ 能够与 B2G 结合使 B2 区活化, 从而促进 Bcl-x_s 的蛋白表达。因此大鼠急性肺栓塞后 hnRNP-H₂ 的高表达促进了 Bcl-x_s 在 mRNA 水平的高表达。

Bcl-x 是 Bcl-2 凋亡基因家族的一员。Bcl-x 通过调节线粒体内蛋白的释放来诱导细胞凋亡。在许多肿瘤细胞中, 具有抗凋亡作用的 Bcl-x_L 的表达显著升高。高表达的 Bcl-x_L 能够抑制肿瘤细胞的凋亡, 促进肿瘤转移, 增加肿瘤细胞对化疗药物的抗药性。与此相反, Bcl-x_s 却能够诱导细胞凋亡, 提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。因此 Bcl-x_s/Bcl-x_L 比例的增加将有助于细胞凋亡的发生^[6]。笔者发现, 急性肺栓塞后随着 Bcl-x_s 表达的升高和 Bcl-x_L 表达的下降, Bcl-x_s/Bcl-x_L 比值显著升高。Bcl-x_s/Bcl-x_L 比值的升高将促进急性肺栓塞后肺组织细胞的凋亡。

FAH 的缺乏和不足可以导致遗传性高酪氨酸血症, 引起酪氨酸代谢产物 FAA 在体内的大量堆积, 主要导致肝脏和肾脏的结构和功能损害。一方面, FAA 通过抑制 DNA 连接酶的功能而妨碍 DNA 的修复, 从而导致肝细胞发生癌变^[7]。另一方面, FAA 通过促进肝细胞的凋亡而形成一个肝细胞凋亡和增殖的无限循环, 从而导致肝纤维化和硬化, 进一步巩固了癌变的形成^[8]。因此 FAA 诱导细胞凋亡的作用在遗传性高酪氨酸血症的发病机制中发挥了重要的作用。

本研究发现大鼠急性肺栓塞后, 肺组织中 FAH 的 mRNA 水平和蛋白水平都逐渐下降, 在 24h 和 48h 下降最明显。FAH 的表达下降必然会导致肺组织局部酪氨酸的代谢障碍和 FAA 的大量堆积, 从而出现 FAA 引起的一系列细胞毒性反应。进一步的研究发现, 大鼠急性肺栓塞后 MPM-2 的蛋白水平逐渐升高, 在 24h 和 48h 升高尤为显著。由于 MPM-2 是 M 期细胞的特异性蛋白, 表明肺组织内阻滞于 G₂/M 期的细胞增多, 因此 FAA 可能具有促进肺组织细胞阻滞于 G₂/M 期的作用。对肺组织细胞凋亡的研究发现 Pro-caspase-3 的蛋白水平在急性肺栓塞后逐渐下降, 在 24h 和 48h 下降尤为明显, 表明 pro-caspase-3 被大量的活化裂解为具有活性的 caspase-3 蛋白。大鼠急性肺栓塞后, cytochrome c 的蛋白水平逐渐升高, 在 24h 和 48h 升高尤为显著, 这是细胞程序性死亡的重要标志。进一步的组织病理学研究发现急性肺栓塞后肺泡间隔增厚, 肺泡腔内有渗出和炎性细胞的浸润。TUNEL 染色显示在急性肺栓塞后 48h 肺泡上皮细胞出现了大量的细胞凋亡现象。综上所述, 大鼠急性肺栓塞

后肺组织内 hnRNP-H₂ 的表达明显升高,可能导致 Bcl-xS/Bcl-xL 的比例升高;FAH 的表达明显下降,可能导致急性肺栓塞后肺组织细胞周期阻滞于 G₂/M期,二者共同促进了肺组织细胞的凋亡。

参考文献

- [1] 李圣青,赵峰,戚好文,等.肺组织灌注前后的双向电泳比较.西安交通大学学报(医学版),2006,27:203-206.
- [2] Alkan SA, Martincic K, Milcarek C. The hnRNPs F and H2 bind to similar sequences to influence gene expression. Biochem J, 2006, 393(Pt 1):361-371.
- [3] Endo F, Sun MS. Tyrosinaemia type I and apoptosis of hepatocytes and renal tubular cells. J Inherit Metab Dis, 2002, 25:227-234.
- [4] Clozel JP, Holvoet P, Tschopp T. Experimental pulmonary embolus in the rat: a new *in vivo* model to test thrombolytic drugs. J Cardiovasc Pharmacol, 1988,

12: 520-525.

- [5] Garneau D, Revil T, Fiset JF, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. J Biol Chem, 2005, 280:22641-22650.
- [6] Rohrbach S, Muller-Werdan U, Werdan K, et al. Apoptosis-modulating interaction of the neuregulin/erbB pathway with anthracyclines in regulating Bcl-x_S and Bcl-x_L in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38:485-493.
- [7] Luijckx MC, Van Beurden EA, Malingre HE, et al. Renal proximal tubular cells acquire resistance to cell death stimuli in mice with hereditary tyrosinemia type 1. Kidney Int, 2004, 66: 990-1000.
- [8] Vogel A, Van Den Berg IE, Al-Dhalimy M, et al. Chronic liver disease in murine hereditary tyrosinemia type 1 induces resistance to cell death. Hepatology, 2004, 39:433-443.

(上接第 307 页)

者均于地塞米松刺激后约 1h 达到最高峰。在 FOXO1 mRNA 水平表达增高的同时,肝细胞 FoxO1 蛋白水平亦显著升高。在肝脏中固有活化 FOXO1 的表达能够增加胰岛素抵抗^[10],而糖皮质激素能够增加 FOXO1 的表达,故糖皮质激素可通过升高 FOXO1 的表达水平来拮抗胰岛素作用。且因为 PEPCK mRNA、PGC-1 α mRNA 表达的增加并不迟滞于 FOXO1 mRNA 水平表达增高,可以推测 PEPCK mRNA、PGC-1 α mRNA 表达增高并不是继发于 FOXO1 mRNA 的蛋白合成后。Pere 等^[8]证实 FOXO1 能与 PGC-1 α 相互作用促进糖异生,故作者推测地塞米松促进 FOXO1 表达的升高在糖异生的慢调节机制中占有重要地位,FOXO1 转录的增高在诱发 PEPCK 的转录增高有重要意义。本研究结果有助于对 2 型糖尿病患者空腹血糖升高机制的认识。本实验所采取的时间点分布较宽,PEPCK 的表达是否存在多个表达峰尚需进一步研究,并深入探讨转录因子表达和 PEPCK 表达之间的关系。

参考文献

- [1] Donkin SS, Bertics SJ, Armentano LE. Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glycogenesis by insulin and glucagon in neonatal calf hepatocytes. J Anim Sci, 1997,75:3082-3087.
- [2] Zhang WW, Sandip P, Balwant C, et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver. J Biol

Chem, 2006, 281: 10105-10117.

- [3] Yuan L, Ziegler R, Hamann A. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by metformin in cultured hepatocytes. Chin Med J, 2002, 115:1843-1848.
- [4] Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, et al. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. Nature, 1999, 398: 630-634.
- [5] Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. Trends Endocrinol Metab, 2005, 16:183-189.
- [6] Yoon JC, Puigserver P, Chen G, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 α . Nature, 2001,413:131-138.
- [7] 李玉秀,王姮,曾静波,等.转录因子 FoxO1、FoxO3a 在 KKAY 胰岛素抵抗糖尿病小鼠肌肉和肝组织中的表达.基础医学与临床,2006,26:860-862.
- [8] Pere P, James R, Bruce MS. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. Nature, 2003, 423:550-555.
- [9] Herzig S, Long F, Jhala US, et al. CREB regulates gluconeogenesis through transcriptional coactivator PGC-1 α . Nature, 2001, 413:179-183.
- [10] Nakae J, Biggs WH 3rd, Kitamura T, et al. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor FoxO1. Nat Genet, 2002, 32: 245-253.