-421.
[4] 李新燕，张学光，Klein B，等. 人多发性骨髓瘤细胞 Syndecan-1 的表达分泌与调节[J]. 中华血液学杂志，2000，(21)：572-576.
[5] Borset M，Hjertner O，Yaccoby S，*et al*. Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins[J]. Blood，2000，96(7)：2528-2536.
[6] Derksen P W，Keehnen R M，Evers L M，*et al*. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma[J]. Blood，2002，99(4)：1405-1410.
[7] Lacy H M，Sanderson R D. Sperm protein 17 is expressed on normal and malignant lymphocytes and promotes heparan sulfate-mediated cell-cell adhesion[J]. Blood，2001，98(7)：2160-2165.
[8] Vikhuul E，Loo B M，Hermonen J，*et al*. Expression and characterization of minican，a recombinant syndecan-1 with extensively truncated core protein[J]. Biochem Biophys Res Commun，2002，290(1)：146-152.
[9] Fitzgerald M L，Wang Z，Park P W，*et al*. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase[J]. J Cell Biol，2000，148(4)：811-824.
[10] Seidel C，Borset M，Hjertner O，*et al*. High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow：modulation of hepatocyte growth factor activity[J]. Blood，2000，96(9)：3139-3146.
[11] Bayer-Garner I B，Sanderson R D，Dhodapkar M V，*et al*. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma：shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions[J]. Mod Pathol，2001，14(10)：1052-1058.
[12] Seidel C，Sundan A，Hjorth M，*et al*. Serum syndecan-1：a new independent prognostic marker in multiple myeloma[J]. Blood，2000，95(2)：388-392.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2005)18-1893-03

综述

多药耐药蛋白在胆汁淤积中的作用研究进展

Advances of multidrug resistance proteins in cholestasis

祝建勇 综述，别　平，韩本立 审校　（第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所，重庆 400038）

多药耐药蛋白（multidrug resistance proteins，MRPs）是位于多种极性细胞膜表面介导其底物依赖 ATP 自细胞内转运至细胞外的一类膜糖蛋白，属于具有 ATP 结合域的盒式跨膜转运子蛋白超家族（ATP binding cassette，ABC-transporter proteins superfamily）[1]。人类多药耐药蛋白家族至少包括 6 个成员：MRP1（ABCC1）、MRP2（ABCC2）、MRP3（ABCC3）和目前认识尚不清楚的 MRP4、5、6[2,3]，既往的研究集中在肿瘤耐药性上，近来大量实验表明 MRPs 介导了淤胆时胆汁成分，特别是结合型胆红素跨细胞膜的转运[4~6]，现就此加以综述。

1　MRPs 的基因定位及蛋白表达

人类 MRP1 基因定位于染色体 16p13.12-13，约 200×10^3 bp，基因转录成（$7.8\sim8.2$）$\times10^3$ bp mRNA，编码一种由 1 531 个氨基酸组成、N 端糖基化、依赖 ATP 的膜糖蛋白，分子质量约为 190×10^3。进一步的研究表明，MRP2～6 基因分别定位于染色体 10q23-24、17q21.3、13q31-32、3q27 和 16p13.1，其中 MRP1，2，3 基因都含有 21 个保守的剪接结合位点，MRP2 基因含有 32 个外显子，长度从 56×10^3 bp（Exon 6）至 255×10^3 bp（Exon 10），而 MRP1、MRP3 基因只含有 31 个外显子，其编码氨基酸序列的一致性分别为 48%（MRP1 *vs* MRP2）、46%（MRP2 *vs* MRP3）和 58%（MRP1 *vs* MRP3）[3,7~9]。

MRP1 在多种正常组织中表达，肾上腺、肺、心脏和骨骼肌中表达较高，在肝、肾脏、结肠和脑组织中亦有低度表达[2]。在将 MRP1 cDNA 转染给猪肾细胞株 LLC-PK1 或狗肾细胞株 MDCKII 后，MRP1 蛋白定位于细胞膜的基侧面，将其底物快速地排出细胞[10]。原代培养的大鼠肝细胞研究表明，MRP1 在进入细胞周期的肝细胞膜上表达增高，而在静止的肝细胞膜上表达处于低水平，并且仅在相邻细胞膜上表达，在孤立细胞的膜上无表达，提示 MRP1 介导的将有机阴离子从基侧面排出细胞的功能与细胞增殖有关[11]，Roelofsen 等[12] 还发现大鼠 MRP1 的变化与细胞极性形成关系密切。

与 MRP1 在组织中广泛表达不同的是，MRP2 仅限于肝脏、肾脏、十二指肠和回肠，在肝细胞膜的毛细胆管面上表达水平最高，是现有 MRPs 中唯一表达于极性细胞顶浆面者，其生理功能在于将胆红素葡萄糖醛酸酯以及其他双亲性双价阴离子主动转运至胞外[13,14]。Scheffer 等[15] 研究发现，MRP3 蛋白存在于肾上腺、肾脏、结肠、胰腺和肝脏等，但在正常肝脏组织中表达甚低。MRP4 也仅微量表达于前列腺、肺、骨骼肌、胰腺、睾丸、卵巢、膀胱和胆囊，MRP5 分布与 MRP1 相似，广泛存在于各种极性细胞膜的基侧面[2]，但是 MRP6 仅存在于肝脏和肾脏[3]。

2　MRPs 的底物特异性

细胞转染以及膜囊泡（membrane vesicle）技术的成熟为研究 MRPs 的底物特异性和功能提供了有效而可靠的途径。众

作者简介：祝建勇（1978-），男，湖北省孝感市人，博士研究生，医师，主要从事肝胆外科方面的研究。电话：(023)68754169

收稿日期：2003-09-26；修回日期：2004-05-12

多学者的研究表明，MRP1、MRP2 转运的底物谱及其动力学特性相似[6,13,14]，包括双亲性的阴离子结合物，尤其是与谷胱苷肽、葡萄糖醛酸基或硫酸盐等结合的复合物。这些底物都含有一个亲脂的基团，如胆红素、雌三醇或花生四烯酸，并至少与一个阴离子残基结合，如葡萄糖醛酸基、谷胱苷肽或硫酸盐等。Hirohashi 等[16]发现许多葡萄糖醛酸基结合物，如 17β-雌三醇葡萄糖醛酸酯、地塞米松等也是 MRP3 的合适底物，前者的米氏常数(Michaelis-Menten constant，Km)是 MRP2 的 10 倍以上，但是，MRP3 对谷胱苷肽硫化物的转运能力很差，这是与 MRP1 和 MRP2 的显著不同。

在正常情况下，血液中的非结合性胆红素由钠-牛磺胆酸共转运多肽(Na^+-taurocholate cotransporting polypeptide，NTCP)介导自肝细胞膜基侧面主动转运入胞浆，在细胞内经过一系列的生化反应转化成结合型胆红素，后者再由位于毛细胆管面的 MRP2 泵入胆小管[6]。除此之外，其它 5 种 MRPs 在正常肝组织中表达水平均很低，其中 MRP5、6 的转运底物尚不清楚，而 MRP4 被认为介导了对核苷酸单磷酸酯的耐药，包括齐多夫定单磷酸酯和 9-(2-甲氧基、乙基磷酸酯)腺苷酸[17]，从而影响抗病毒药物及抗肿瘤药物的效能；加之目前关于动物活体的研究很少，相关的生理功能还有待深入的探讨。

3 MRPs 与先天性胆汁淤积综合征

人类 Dubin-Johnson 综合征是一种常染色体上的隐性遗传病，以慢性高结合型胆红素血症、选择性结合型阴离子排泄障碍以及因色素沉积所致的“黑棕肝”为特征，这与突变大鼠株 GY/TR⁻(Groningen Yellow/Transport-deficiency Wistar rat)或 EHBR (Eisai hyper -bilirubinemic rat)的表型相同[18]。Buchler 等[13]首先运用家系分析的方法研究两种遗传缺陷型大鼠 GY/TR⁻和 EHBR 大鼠，发现两类大鼠肝细胞膜上均没有 MRP2 表达，随后 Kartenbeck 等[19]的研究结果证实了 Dubin-Johnson 患者肝细胞膜上也未检测到 MRP2 的阳性荧光染色，而 MRP2/MRP2 是介导结合型胆红素向毛细胆管排泄的主要转运子[20]，这说明 MRP2 的缺失正是 Dubin-Johnson 综合征的病因。

进一步的研究表明，GY/TR⁻大鼠遗传性缺陷的分子基础是 MRP2 基因中一个碱基的突变，造成终止密码子以及 MRP2 蛋白的缺失，EHBR 大鼠中也存在类似的点突变[18]。目前已在 Dubin-Johnson 综合征患者中发现了 13 种基因异常[7]，见表 1。

Dubin-Johnson 综合征患者或 GY/TR⁻、EHBR 大鼠的肝细胞毛细胆管面上 MRP2/MRP2 的缺失，造成细胞内结合型胆红素以及某些胆汁成分蓄积，这是导致淤胆时机体损伤的主要因素之一[21]，因此机体有必要通过适应性调节诱导其他的代偿排泄途径[22]。Kartenbeck 等[19]在研究 Dubin-Johnson 综合征患者 MRP2 缺失的同时发现，肝细胞膜基侧面和红细胞膜上都有 MRP1 的高度表达，与肝细胞内合成的葡萄糖醛酸基、谷胱苷肽结合物转运入血有一致性，推测 MRP1 可能介导了血中结合型胆红素的继发性升高。在 GY/TR⁻大鼠和胆总管结扎的大鼠淤胆模型中，肝细胞内结合型胆红素转运入血也可能缘于 MRP1 表达升高，底物既而通过肾脏排泄[6]。

表 1 Dubin-Johnson 综合征患者 MRP2 基因突变与蛋白表达

	DNA	Protein
1	3196 (C→T)/3196 (C→T)	R1066/R1066
2	2302 (C→T)/2302 (C→T)	R768W/R768W
3	2302 (C→T)/wild type	R768W/wild type
	2439 + 2 (T→C) /wild type	Splice donor/wild type
	2302 (C→T)/2439 + 2 (T→C)	R768W/splicing donor
4	1815 + 2 (T→A)/1815 + 2 (T→A)	Splicing donor/splicing donor
5	2439 + 2 (T→C)/4145 (A→G)	Splicing donor/Q1382R
6	2439 + 2 (T→C)/2439 + 2 (T→C)	Splicing donor/splicing donor
	2439 + 2 (T→C)/wild type	Splice donor/wild type
7	2302 (C→T)/2272del168	R768W/splicing donor
8	1669del147/ 1669del147	Splicing donor/splicing donor
9	2002del67/ 2002del67	Splicing donor/splicing donor
10	4175 del 6	Loss of R and M

MRP3 也可能参与了这种代偿排泄机制，Scheffer 等[15]在进行性家族性肝内淤胆综合征Ⅲ型(progressive family intrahepatic cholestasis Ⅲ，PFIC 3)患者的肝脏中发现，增生的胆管上皮细胞膜上 MRP3 表达显著升高，在肝细胞膜基侧面也有低度表达，推测 MRP3 在胆-肝循环以及减轻肝组织免受胆汁中毒性成分损害等方面起到了重要作用。

4 MRPs 与实验性胆汁淤积

目前研究胆汁淤积的动物模型主要有两种：肝内和肝外淤胆，前者如用内毒素或促炎性介质 TNF-α、IL-6 等，以及避孕药(如乙炔基-雌二醇)诱导，后者是指通过结扎胆总管制备[22,23]。在这些淤胆模型中，MRP1-3 都有特征性的改变，这有助于解释临床上全胃肠外营养、酒精性或病毒性肝炎，妊娠期肝内淤胆以及肝外胆道梗阻等情况下胆汁排泄功能的缺陷。

Trauner 等[22]通过内毒素、乙炔基-雌二醇和胆总管结扎制备了 3 种淤胆模型，分别在转录水平、蛋白表达水平以及肝细胞膜上定位研究 MRP2 的变化，同时检测毛细胆管面上的 ecto-ATPase 和 mdr P 糖蛋白以衡量变化的特异性，结果表明 MRP2 在 3 种模型中的不同水平上都有明显的下调，其中内毒素的作用最显著。与此同时，ecto-ATPase 和 mdr P 糖蛋白的变化均不明显，说明在不同的淤胆模型中，MRP2 的特异性下调可以发生在转录及转录后水平，并在淤胆的发生发展中发挥了重要作用，但是确切的分子调控机制尚不明了。

然而，Vos 等[4]发现 MRP1 mRNA 及其蛋白在内毒素处理后 6 h 即有明显的上调，并在培养的肝细胞研究中得以证实，结合其跨膜转运功能，推测 MRP1 可能在内毒素诱导的淤胆中体现了一种自身上调机制，从而发挥代偿排泄胆红素及其他胆汁成分的作用。进一步的研究表明，这种代偿调节机制不仅存在于肝组织中，还存在于肾脏。Lee 等[24]研究了梗阻性黄疸时转运子的适应性调节，发现肾脏中 MRP2 mRNA 及其蛋白表达在梗阻形成后 1 d 就升高了 2 倍，这一结果提示了淤胆时胆汁排泌的肝外途径；Tanaka 等[5]认为肾脏 MRP2 和肝脏 MRP3 上调也可能作为梗阻性黄疸时增加胆红素清除的一种代偿机制。因此，作为“诱生”型的胆红素转运子，MRP1 和 MRP3 可以一方面部分代偿结合性胆红素以及胆汁中其他成分自肝脏向血中的排泄，减轻对肝细胞、胆管上皮细胞的损害，另一方面加速

血中胆盐、胆红素自尿的排泄，减轻淤胆时机体的病理生理改变。

5　小结与展望

多药耐药蛋白家族与胆汁淤积越来越受到国内外学者的关注，MRPs 不仅在淤胆的发生，而且在机体的适应性调节机制中都发挥了重要作用，淤胆时 MRPs 的变化减轻了胆汁成分蓄集对机体的毒性损害。但是，目前关于 MRPs 蛋白表达调控的分子机制研究很少，有学者推测与核因子 FXR/BAR、NFκB 及 STAT5 等有关[25,26]，然而确切的机制还有待分子生物学技术的不断进步和研究的逐步深入。

关键词：多药耐药蛋白；胆汁淤积

中图法分类号：R966；R575　　**文献标识码**：A

参考文献：

[1] Kullak Ublick G A, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport [J]. J Hepatol, 2000, 32 (1 Suppl 1): 3 - 18.

[2] Scheffer G L, Kool M, Heijn M, *et al*. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies[J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 5269 - 5277.

[3] Belinsky M G, Chen Z S, Shchaveleva I, *et al*. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6)[J]. Cancer Res, 2002, 62 (21): 6172 - 6177.

[4] Vos T A, Hooiveld G J, Koning H, *et al*. Up-regulation of the multidrug resistance genes, MRP1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, MRP2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver[J]. Hepatology, 1998, 28(6): 1637 - 1644.

[5] Tanaka Y, Kobayashi Y, Gabazza E C, *et al*. Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(4): G656 - G662.

[6] Keppler D, Konig J. Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances[J]. Semin Liver Dis, 2000, 20(3): 265 - 272.

[7] Tsujii H, Konig J, Rost D, *et al*. Exon-intron organization of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome[J]. Gastroenterology, 1999, 117(3): 653 - 660.

[8] Stockel B, Konig J, Nies A T, *et al*. Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison withthe multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(5): 1347 - 1358.

[9] Cherrington N J, Hartley D P, Li N, *et al*. Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (MRP1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of MRP3 by constitutive androstane receptor activators in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(1): 97 - 104.

[10] Furuta K, Hosoya T, Tomokiyo K, *et al*. [35S]S-[5-(4-benzoylphenyl)pentyl]glutathione: a versatile radioligand targeting GS-X pumps with the ability of photoaffinity labeling[J]. Bioorg Med Chem Lett, 1999, 9(18): 2661 - 2666.

[11] Rippin S J, Hagenbuch B, Meier P J, *et al*. Cholestatic expression pattern of sinusoidal and canalicular organic anion transport systems in primary cultured rat hepatocytes[J]. Hepatology, 2001, 33(4): 776 - 782.

[12] Roelofsen H, Hooiveld G J, Koning H, *et al*. Glutathione S-conjugate transport in hepatocytes entering the cell cycle is preserved by a switch in expression from the apical MRP2 to the basolateral MRP1 transporting protein[J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 9): 1395 - 1404.

[13] Buchler M, Konig J, Brom M, *et al*. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMRP, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats[J]. J Biol Chem, 1996, 271(25): 15091 - 15098.

[14] Cui Y, Konig J, Buchholz J K, *et al*. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells[J]. Mol Pharmacol, 1999, 55(5): 929 - 937.

[15] Scheffer G L, Kool M, de Haas M, *et al*. Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3[J]. Lab Invest, 2002, 82(2): 193 - 201.

[16] Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, *et al*. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)[J]. J Biol Chem, 2000, 275(4): 2905 - 2910.

[17] Schuetz J D, Connelly M C, Sun D, *et al*. MRP4, a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs[J]. Nat Med, 1999, 5(9): 1048 - 1051.

[18] Elferink R O, Groen A K. Genetic defects in hepatobiliary transport [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1586(2): 129 - 145.

[19] Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, *et al*. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome[J]. Hepatology, 1996, 23 (5): 1061 - 1066.

[20] Kamisako T, Leier I, Cui Y, *et al*. Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2[J]. Hepatology, 1999, 30(2): 485 - 490.

[21] Hofmann A F. Bile acids: the good, the bad, and the ugly[J]. News Physiol Sci, 1999, 14: 24 - 29.

[22] Trauner M, Meier P J, Boyer J L. Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis[J]. J Hepatol, 1999, 31(1): 165 - 178.

[23] Hartmann G, Cheung A K, Piquette Miller M. Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 303 (1): 273 - 281.

[24] Lee J, Azzaroli F, Wang L, *et al*. Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat [J]. Gastroenterology, 2001, 121(6): 1473 - 1484.

[25] Russell D W. Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism [J]. Cell, 1999, 97(5): 539 - 542.

[26] Pahl H L. Activators and target genes of Rel/NFκB transcription factors[J]. Oncogene, 1999, 18(49): 6853 - 6866.

（编辑　薛国文）