论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0766-03

多药耐药相关蛋白1在梗阻性黄疸大鼠肝组织中的表达及意义

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

提 要:目的 探讨多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1, Mrp1)在梗阻性黄疸大鼠胆红素代谢中的作用。**方法** 将80只Wistar大鼠完全随机分为假手术组(sham operation, SHAM)、胆总管结扎组(common bile duct ligation, CBDL)、胆流复通组(bile reflow, REF),测定各时相点血清前白蛋白(prealbumin, PA)、总胆红素(DBIL)以及尿样直接胆红素(DBIL),采用RT-PCR和间接法免疫荧光染色分别在基因转录、蛋白表达及细胞膜定位上检测mrp1在大鼠肝组织中的表达情况。**结果** CBDL术后PA迅速下降($P<0.01$);TBIL在CBDL术后急剧升高($P<0.01$),峰值出现在术后7 d,然后水平有所回落,尿中DBIL在梗阻期间一直上升($P<0.05$);复通术后上述指标逐步好转,至术后7 d接近或已达到正常水平;mrp1 mRNA水平随着梗阻时间的延长明显升高,在梗阻解除后仍处于较高水平,免疫荧光结果显示Mrp1定位表达于肝细胞膜上,变化规律与mRNA一致($P<0.05$)。**结论** 在梗阻性黄疸以及梗阻解除早期,Mrp1介导了胆红素的排泄。

关键词: 梗阻性黄疸;多药耐药相关蛋白1

中图法分类号: R322.47;R394.3;R575 **文献标识码:** A

Expression and significance of multidrug resistance-associated protein 1 in the liver tissues of rat obstructive jaundice models

ZHU Jian-yong, CHEN Ying-guo, BIE Ping (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the role of multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp1) on bilirubin metabolism in rat obstructive jaundiced (OJ) models. **Methods** Eighty Wistar male rats were randomly divided into three groups: sham operation group in which the common bile duct was educed but not ligated; common bile duct ligation (CBDL) group in which the common bile duct was ligated and cut off; bile reflow group in which on day 14 after common bile duct ligation operation, the internal drainage from common bile duct to duodenum by silica gel duct was performed. Serum prealbumin, serum total bilirubin and urine direct bilirubin were assayed routinely. The expressions of mrp1 mRNA and protein were detected in the liver tissues by semi-quantitative RT-PCR and indirect immunofluorescence respectively. **Results** Serum prealbumin was descending significantly ($P<0.01$), while serum total albumin and urine direct bilirubin were ascending ($P<0.05$) after common bile duct ligation. The level of total bilirubin peaked on postoperative day 7, followed by a moderate decline. After bile reflow, the above-mentioned indice were taking a gradually favourable turn and drew near to normal levels. The expression of mrp1 mRNA grew stronger as the obstruction duration prolonged ($P<0.05$). After bile reflow, moderate level was maintained with a small amount of descent. A similar profile was found in immunofluorescence detection. **Conclusion** Mrp1 might play a compensatory role in excreting bilirubin and other bile components in obstruction and early stage of obstruction removal, which might be an adaptive self-regulation mechanism in obstructive jaundice.

Key words: obstructive jaundice; multidrug resistance-associated protein 1

梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)时胆汁淤积常可导致复杂而严重的全身性病理生理改变,长期重度淤胆还可影响手术方式的选择,导致术后恢复慢以及严重并发症。多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1, Mrp1)是位于肝细胞膜表面介导其底物依赖ATP自细胞内转运至细胞外血窦的

基金项目: 全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA176)
Supported by the General Program of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01MA176)

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。E-mail:zhujy_tmmu@yahoo.com.cn

通讯作者: 别 平,电话:(023)68754169

收稿日期: 2005-03-02;**修回日期:** 2005-07-19

一种膜糖蛋白，而结合型胆红素是其合适底物[1]。本研究观察 Mrp1 在胆道梗阻及再通大鼠肝组织中的表达变化，探讨其在 OJ 时胆红素代谢中的作用。

1　材料与方法

1.1　动物模型建立

健康雄性 Wistar 大鼠 80 只，体质量 200～250 g，由重庆中医药研究所动物中心提供，标准饲料喂养，将其完全随机分为 3 组，即假手术组（sham operation，SHAM）、胆总管结扎组（common bile duct ligation，CBDL）和胆流复通组（bile reflow，REF），前两组各 24 只，分设胆总管结扎术后 3、7、10 和 14 d 四个时相点；REF 组 18 只，分设胆流复通术后 1、3 和 7 d 3 个时相点，每个时相点 6 只。术前禁食 12 h，自由饮水，乙醚吸入麻醉，消毒后取上腹正中切口入腹，游离胆总管 3-0 丝线双重结扎并切断，关腹；14 d 后再次开腹，以直径为 1.5 mm 的硅胶管架桥行胆总管-十二指肠内引流术。SHAM 组只游离出胆总管但不结扎。

1.2　标本制备

各时相点大鼠均于后腔静脉穿刺取血 4～5 ml，冰浴，离心 15 min（4 ℃，3 000 r/min），取上清置于 -70 ℃保存待测；同时经门静脉灌注冰生理盐水冲去血液，取肝组织切成约 1.0 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 大小，立即置入液氮中留待冰冻切片和总 RNA 提取。尿样采集后，避光 4℃冰箱保存，检测直接胆红素（DBIL）[2]。

1.3　检测指标及方法

1.3.1　胆红素指标的检测　　包括血清总胆红素（TBIL）和尿样直接胆红素（DBIL），均按照试剂盒说明测定。

1.3.2　前白蛋白（prealbumin，PA）的检测　　药盒购自福建太阳生物技术公司，采用免疫浊度法，在紫外分光光度计上测吸光度，PA 含量（mg/L）=（测定管吸光度/参比管吸光度）× 参比品浓度（mg/L）。

1.3.3　逆转录 PCR 检测 mrp1 mRNA 水平　　①采用 Tripure 试剂一步法提取肝组织匀浆总 RNA，1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计测定纯度并定量；②逆转录扩增按 RT-PCR 试剂盒（Promega，Madison，USA）说明书在 GeneAmp 2700 PCR 仪（Perkin Elmer，USA）中进行，自行设计 mrp1 引物序列：上游为 5′-TTCTAGTGTTGGACGAGGCT-3′，下游为 5′-TGGCCATGCTATAGAAGACG-3′；内参照 GAPDH 引物序列：上游为 5′-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3′，下游为 5′-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3′，预计扩增产物大小分别为 227 bp 和 576 bp；③将 RNA 逆转录为 cDNA，50 ℃温育 1 h，95 ℃变性 5 min；④PCR扩增，95 ℃ 预变性 3 min，94 ℃变性 1 min，62 ℃复性 1 min，72 ℃延伸 1.5 min，循环 35 次，最后 72 ℃延伸 5 min；⑤取 6 μl产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳成像（Bio-Capt 凝胶成像系统，France）。

1.3.4　Mrp1 蛋白在大鼠肝组织中的表达检测　　采用间接法免疫荧光染色（一抗为兔抗大鼠 Mrp1 的多克隆抗体，二抗为荧光素 FITC 标记羊抗兔 IgG，均购自美国 Sigma 公司，工作浓度分别为 1∶200 和 1∶100），运用 Mias99 病理图像分析系统（四川大学图形图像研究所）测量荧光的平均积分光密度（integration optic density，IOD）。每张切片随机选取 5 个视野，每个视野测定 30 个阳性染色的肝细胞，取其均值。

1.4　统计学分析

计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 双因素方差分析。

2　结果

2.1　肝功能及尿样 DBIL 的变化

大鼠结扎胆总管术后 PA 迅速下降，TBIL 在术后 7 d 达到峰值，此后水平有所回落，而尿中 DBIL 在梗阻期间一直上升。胆道再通术后 PA 和 TBIL 逐步好转，至术后 7 d 接近或已达到正常水平。CBDL 术后 3 d 大鼠尿样中 DBIL 即显著上升，与 SHAM 组有非常显著的差异（$P<0.01$）。随梗阻时间的延长，尿样中 DBIL 持续上升，先快后缓，再通术后 DBIL 迅速下降，但术后 7 d 仍显著高于正常水平（$P<0.01$）。见表 1。

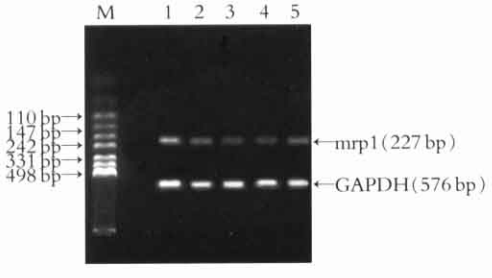
表 1　胆道梗阻-再通大鼠胆红素指标、PA 及肝组织 Mrp1 表达的血清变化（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	总胆红素（μmol/L）	尿直接胆红素（μmol/L）	前白蛋白（mg/L）	Mrp1 积分光密度
假手术组				
3 d	5.6 ± 1.1	1.0 ± 0.3	261.9 ± 32.7	12.86 ± 3.97
7 d	5.9 ± 1.2	0.9 ± 0.2	274.2 ± 31.4	15.23 ± 4.98
10 d	5.3 ± 1.0	0.8 ± 0.2	278.0 ± 37.8	13.38 ± 3.02
14 d	5.3 ± 0.7	0.6 ± 0.3	284.1 ± 34.7	12.12 ± 4.54
胆总管结扎组				
3 d	142.7 ± 33.6[b]	5.9 ± 1.2[b]	214.7 ± 22.5[a]	44.56 ± 10.05[b]
7 d	180.8 ± 36.7[b]	22.7 ± 8.7[b]	180.4 ± 25.1[b]	124.65 ± 23.66[b]
10 d	156.4 ± 35.1[b]	34.7 ± 9.2[b]	139.8 ± 19.6[b]	145.99 ± 29.60[b]
14 d	136.7 ± 29.5[b]	44.7 ± 11.7[b]	90.4 ± 10.8[b]	254.72 ± 32.34[b]
胆流复通组				
1 d	120.3 ± 26.7[b]	34.9 ± 11.1[b]	82.7 ± 16.4[b]	232.36 ± 34.57[b]
3 d	90.9 ± 25.3[b]	20.5 ± 7.4[b]	142.7 ± 33.6[b]	214.25 ± 35.84[b]
7 d	64.1 ± 14.6[b]	9.7 ± 4.9[b]	180.8 ± 36.6[b]	195.25 ± 36.73[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$ 与假手术组比较

2.2　mrp1 mRNA 表达

紫外分光光度计检测肝组织匀浆总 RNA 的 $D260/D280 = 1.92 > 1.8$，含量为 98 ng/μl，说明提取的 RNA 较纯，无蛋白质或异硫氰酸胍的污染。经甲醛变性凝胶电泳检测，可见清晰的 18S rRNA 和 28S rRNA 两条带。mrp1 mRNA 水平随着梗阻时间的延长明显升高，在梗阻解除后表达水平有所下降，但仍处于较高水平，见图 1。

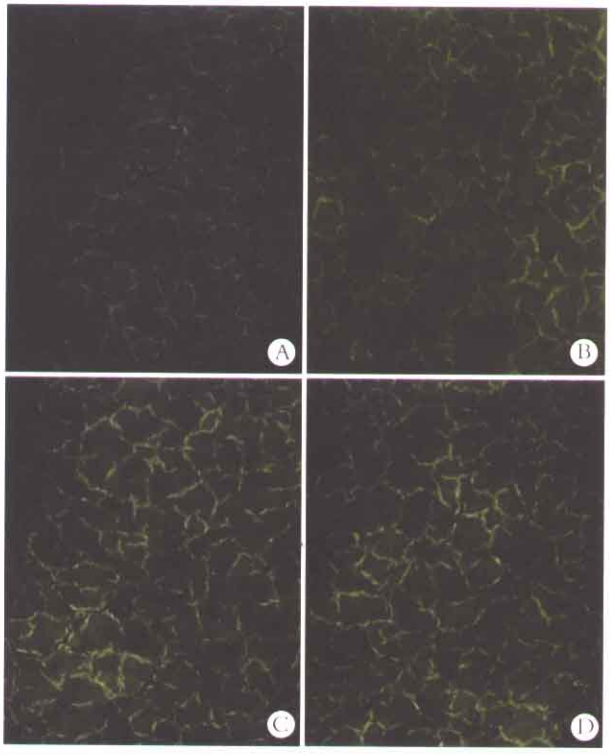


M：标准；1－5：胆总管结扎 14、10、7、3 d 和胆流复通 7 d

图 1　mrp1 mRNA 在胆道梗阻-再通大鼠肝组织中的表达

2.3 Mrp1 在大鼠肝组织中表达的变化

SHAM 组大鼠肝组织中 Mrp1 表达极少，CBDL 术后 3d 仅见微弱的特异性黄绿色荧光，术后 7 d 始出现明确荧光染色，呈点线状沉着于肝细胞膜的表面，在小叶间隔的结缔组织中和血管壁上均无特异性染色。随梗阻时间的延长，Mrp1 在肝细胞膜上的表达逐渐增强（$P<0.05$），表达范围也逐渐增大，但由于术后 14 d 肝细胞受损害严重，Mrp1 的表达在部分标本中有减少。再通术后 Mrp1 表达虽有所下降，但仍维持在较高水平（$P<0.05$）。见图 2 和表 1。



A－C：胆管结扎 7、10、14 d；D：胆流复通 7 d

图 2 Mrp1 在胆道梗阻-再通大鼠肝组织中的表达 （免疫荧光 ×400）

3 讨论

Mrp1 是位于肝细胞膜上介导其底物依赖 ATP 自细胞内转运至细胞外血窦的一种膜糖蛋白，含有1 531 个氨基酸，对结合型胆红素的亲合转运能力很强[1]。本实验结果显示，SHAM 组大鼠肝组织中 Mrp1 表达量极微，随梗阻时间的延长，Mrp1 在肝细胞膜上的表达逐渐增强，表达范围也逐渐增大。血清前白蛋白由肝细胞合成，半衰期仅 1.9 d，是反映肝脏蛋白合成功能的良好指标。本研究表明，梗阻 14 d 时 PA 水平仅为正常的 1/3 左右，说明胆道梗阻造成肝功能的急剧恶化、蛋白合成能力低下，这从另一方面亦说明梗阻期间表达增高的 Mrp1 可能发挥了某种独特的作用。

有研究表明，在内毒素血症时，Mrp1 可能作为一种“诱生”型的膜上外排泵先将胆红素主动转运至血窦，再通过肾脏从尿中排泄[2]。结合我们的前期研究发现，胆红素主要转运子 Mrp2 在梗阻期间明显下降[3]，胆红素自毛细胆管排泄途径受阻；而 Mrp1 表达明显上调，与此同时，血清 TBIL 呈现下降趋势，CBDL 术后 14 d 比术后 7 d 下降了 24.4% ~ 30.2%，尿中 DBIL 排泄持续增多，这与孙杨忠等[4]的研究较为一致，说明 Mrp1 可能介导了结合型胆红素自肝脏向血中的排泄，减轻对肝细胞、胆管上皮细胞的损害，Tanaka 等[5]亦发现肾远曲小管上皮细胞膜上的 Mrp2 可介导血中胆盐、胆红素自尿的排泄，减轻淤胆时机体的病理生理改变，体现出机体的自身代偿调节机制。梗阻解除后，Mrp2 缓慢恢复，而 Mrp1 的表达呈下降趋势，早期仍维持在较高的水平，一方面说明 Mrp1 的代偿排泄作用具有延迟性，另一方面也提示正常生理状况下的转运系统功能逐渐恢复。

本研究加深了对胆红素转运机制的认识，为今后进一步探讨上调 Mrp1 水平的分子机制、发挥其“利胆”作用开拓了新的视野，同时针对临床上长期重度淤胆患者治疗上的难题，为寻找有效促进肝脏自身排泄胆红素的途径开辟了新的思路。

参考文献：

[1] KAMISAKO T, KOBAYASHI Y, TAKEUCHI K, *et al*. Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance[J]. J Gastroenterol, 2000, 35(9): 659－664.

[2] 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.

[3] 陈应果，别 平，祝建勇. 胆红素主要转运子 Mrp2 在大鼠梗阻性黄疸肝脏中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(16): 1429－1431.

[4] 孙杨忠，耿小平. 阻塞性黄疸大鼠胆总管直径、压力及血清胆红素代谢变化的观察[J]. 肝胆外科杂志, 2003, 11(2): 141－142.

[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.

（编辑 薛国文）