论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1298-04

阻塞性胆汁淤积大鼠肝细胞膜蛋白MRP3与核受体RXRα蛋白表达关系的研究

李 琼[1], 陈文生[2], 罗东林[3], 肖天利[2], 房殿春[2] (第三军医大学:[1]基础医学部计算机教研室, [2]西南医院全军消化内科中心, 重庆 400038, [3]大坪医院野战外科研究所普通外科, 重庆 400042)

提 要: 目的 通过体外细胞培养和建立大鼠胆管结扎(bile duct ligation, BDL)所致阻塞性胆汁淤积动物模型,在蛋白水平观察多耐药相关蛋白MRP3(multidrug resistance-associated protein 3, MRP3)和核受体RXRα(retinoid-X receptor alpha, RXRα)表达的关系。**方法** 用鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)或苯巴比妥(phenobarbital, PB)分别刺激培养的肝癌细胞HepG2并建立DBL阻塞性胆汁淤积大鼠模型后,分别抽提HepG2细胞总蛋白、核蛋白和大鼠肝脏细胞膜蛋白和核蛋白,Western blot方法检测MRP3和RXRα蛋白表达水平的变化。**结果** 在细胞水平,CDCA和PB可诱导HepG2细胞膜MRP3蛋白表达增高,并抑制细胞核RXRα蛋白表达;在动物体内,BDL大鼠肝脏MRP3明显增加,同时RXRα表达明显下降。**结论** 肝细胞膜蛋白MRP3表达的上调可能与核受体RXRα表达抑制有关。

关键词: MRP3;RXRα;BDL大鼠模型;HepG2细胞

中图法分类号: R322.47;R394.2;R657.430.2 **文献标识码**: A

Relationship between hepatic membrane protein MRP3 and nuclear receptor RXRα

LI Qiong[1], CHEN Wen-sheng[2], LUO Dong-lin[3], XIAO Tian-li[2], FANG Dian-chun[2] ([1]Department of Computer Sciences, College of Medicine, [2]Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the hepatic membrane protein MRP3 (multidrug resistance-associated protein 3, MRP3) expression and the nuclear hormone receptor RXRα(retinoid-X receptor alpha, RXRα) expression in both cultured hepatoma cell HepG2 and bile duct ligated (BDL) rat liver. **Methods** Total cellular protein and nuclear protein were isolated from HepG2 cells induced by chenodeoxycholic acid (CDCA) or phenobarbital (PB), as well as from the liver tissue of BDL rats. The protein expressions of MRP3 and RXRα were determined by Western blotting. **Results** The membrane protein MRP3 expression was significantly enhanced and the nuclear receptor RXRα expression was suppressed by CDCA or PB in HepG2 cells. Similarly up-regulation of MRP3 and down-regulation of RXRα were also observed in BDL rat liver. **Conclusion** The up-regulation of hepatic membrane protein MRP3 may be associated with down-regulation of nuclear receptor RXRα.

Key words: MRP3; RXRα; BDL rat model; HepG2 cell

MRP3是近年新克隆的一种转运蛋白基因,MRP3基因在正常肝细胞的基底侧膜上低表达或不表达,但在人体胆汁淤积性疾病如:胆道梗阻、原发性毛细胆管性肝硬变(PBC)、Dubin-Johnson综合征等时,MRP3在肝细胞膜基底侧面表达量大为增加,而同时肝细胞膜小管面的MRP2表达量却急剧降低[1]。MRP3的高表达被认为是代偿性的,以补偿小管面膜上MRP2的下调,有助于肝细胞排出聚积的胆酸,减轻其毒性损伤,这可能是肝细胞的自身保护性反应[2]。目前MRP3高表达的分子机制尚不清楚。近来的研究结果显示,核受体RXRa与一些其他的伴侣核受体形成的异源二聚体复合物(heterodimer),以及其自身形成的同源二聚体(homodimer)均对MRP2的转录表达起重要的调控作用[3]。RXRa作为MRP2转录调控中起关键作用的核受体是否同样参与了MRP3基因的表达调节是一项值得探索的课题,为此,我们进行了体外和体内的实验以诱导MRP3的表达,在蛋白水平观察MRP3基因与核受体RXRa表达间的相关性,为进一步研究MRP3基因转录调控分子机制提供有益的线索。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570842)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570842)

作者简介:李 琼(1974-),女,重庆市人,助理实验师,主要从事基因表达调控方面的研究。电话:13228686303

通讯作者:陈文生,电话:(023) 68754678, E-mail: wenshengchen@hotmail.com

收稿日期:2006-03-10;修回日期:2006-04-12

1　材料与方法

1.1　材料

HepG2 细胞购自中科院上海细胞研究所。DMEM 培养基购自 GIBCO 公司,鹅脱氧胆酸(Chenodeoxycholic acid, CDCA)和苯巴比妥(Phenobarbital, PB)均为 Sigma 公司产品。MRP3 所有抗体(MRP3、MRP2、RXRα、GAPDH、SH-PTP1 及兔抗羊和鼠 IgG-HRP)均购自 Santa Cruz 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养和化合物诱导　　HepG2 细胞用 DMEM 培养基(每 1 000 ml 含 DMEM 培养基干粉 10.4 g、Hepes 3.57 g、$NaHCO_3$ 2.0 ~ 2.2 g、青霉素 0.062 5 g、链霉素 0.1 g)加入 10% 胎牛血清培养,置 37 ℃5% CO_2 培养箱培养,细胞贴壁 85% ~ 90% 融合时用 EDTA-胰酶(每1 000 ml含 EDTANa 2 0.2 g、Trypsin 2.5 g、NaCl 8 g、KCl 0.4 g、$NaHCO_3$ 0.58 g、Dextrose 1 g) 消化以台盼蓝拒染试验测定细胞活率细胞活率 90% 以上进行传代。当细胞融合生长至 60% ~ 80% 密度时,以终浓度 50 μl CDCA 或 2 mol/L PB 加入无血清 DMEM 培养液与 HepG2 细胞孵育 48 h,弃上清,用冰冷的 PBS 液清洗细胞 3 次后收获细胞。对照组以无血清 DMEM 培养 HepG2 细胞 48 h 为对照组。

1.2.2　动物模型及分组　　健康雄性 Wistar 大鼠 24 只,体质量 260 ~ 300 g(第三军医大学实验动物中心提供)。数字表法随机分为 2 组,每组 12 只:假手术对照组(Sham)、梗阻性黄疸 14 d 组(DBL)。所有动物在室温、每日光照/黑夜循环条件下,分笼以标准饲料喂养,自由饮水。手术前禁食 12 h ,BDL 组以 2.5% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,剑突下纵形切口进腹,沿肝十二指肠韧带找到胆总管,在十二指肠上方丝线双重结扎切断胆总管,Sham 组仅游离胆总管而不予结扎切断。术后 14 d,麻醉大鼠放血处死,获取肝脏,并立即冻存于液氮中备用。

1.2.3　细胞总蛋白、核蛋白和膜蛋白提取　　分别分离 HepG2 细胞总蛋白和核蛋白、以及大鼠肝脏组织膜蛋白和核蛋白,方法分别按 Mem-PER 膜蛋白抽提试剂盒和 NE-PER 核蛋白抽提试剂盒(Pierce Biotechnology)操作说明书进行。用 Bio-Rad 核酸蛋白仪测定提取液的蛋白浓度,用细胞裂解液将膜蛋白和核蛋白液稀释成相同浓度,-70 ℃保存备用。

1.2.4　Western blot 检测 MRP3、MRP2、GAPDH、RXRα 和 SH-PTP1 蛋白的表达　　分别取核蛋白 20 μg 或膜蛋白 100 μg 与等体积上样缓冲液混匀,其中核蛋白行 100 ℃加热 5 min 变性,冷却后上样,而膜蛋白不需加热直接上样,核蛋白或膜蛋白分别使用 12% 或 7.5% SDS-PAGE 电泳胶进行电泳分离,然后电转移至硝酸纤维素膜,丽春红染色确定上样的均一性和电转移效率,含 1% 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 2 h,加一抗(1∶100)室温孵育过夜,用 PBST 洗去一抗后加入相应二抗(1∶2 000),室温孵育 2 h。MRP3 或 RXRα 免疫印迹所用的同一硝酸纤维素膜上免疫复合物经洗脱(Stripped)以后,再与另一胞浆蛋白 GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)抗体或核蛋白 SH-PTP1(酪氨酸磷酸酯酶)抗体孵育后,Western blot 检测 GAPDH 位于 36×10^3、SH-PTP1 位于约 67×10^3 的位置,以此条带为内参照确定上样量。DAB 显色后于凝胶成像系统上成像记录,然后用 Quntity one 图像分析软件测定所采集图像目的条带的负相光密度。实验重复 3 次,蛋白表达定量水平用目的条带的负相光密度值表示。

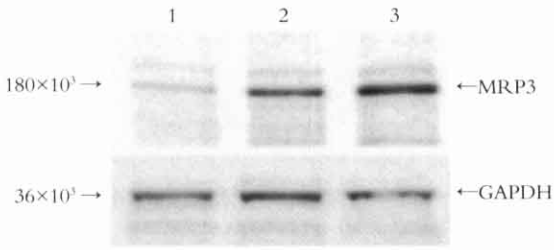
1.3　统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　HepG2 细胞在化合物 CDCA 和 PB 诱导后膜蛋白 MRP3 和核蛋白 RXRα 的表达水平

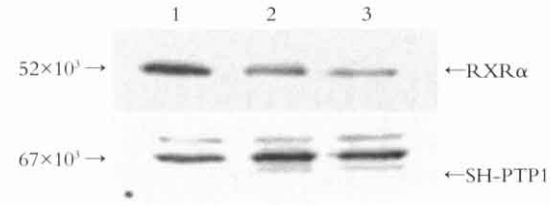
HepG2 细胞在抽提各组细胞总蛋白和核蛋白后行 Western blot。膜蛋白 MRP3 位于 180×10^3 处可见 2 条条带(图 1),均为 MRP3 蛋白,其原因为该蛋白不同程度的糖基化结果所致,通常人的 MRP3 都可见此 2 条带。胆酸 CDCA 和 PB 均可诱导 MRP3 的表达,而 PB 更强。确定上样量的内参照 GAPDH 位于 36×10^3 处。



1:对照组;2:CDCA 组;3:PB 组

图 1　Western blot 检测 CDCA 和 PB 对 HepGZ 细胞 MRP3 蛋白表达的影响

核蛋白 RXRa 表达于 52×10^3(图 2),CDCA 和 PB 均抑制其表达,尤以 PB 较强,内参照 SH-PTP1 分子质量为 67×10^3。



1:对照组;2:CDCA 组;3:PB 组

图 2　Western blot 检测 CDCA 和 PB 对 HepG2 细胞 RXRa 蛋白表达的影响

2.2　大鼠 BDL 14 d 时肝脏组织中膜蛋白 MRP3 和核蛋白 RXRα 的表达水平

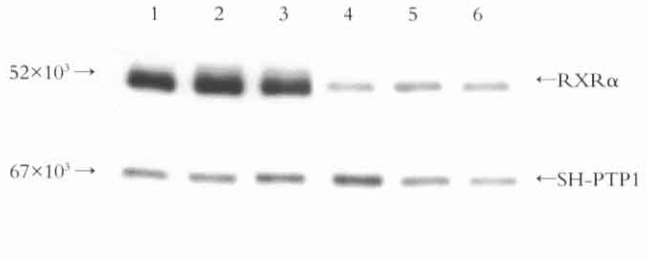
大鼠行 BDL 14 d 时肝脏中膜蛋白 MRP3 的表达量如图 3,假手术组 Sham 和手术组 BDL 大鼠肝脏膜蛋白 MRP3 均在约 180×10^3 处表达一清晰条带,BDL 组 MRP3 的表达明显增强。这一 MRP3 条带不同于 HepG2 细胞,为单一条带,可能为其糖基化程度较低且均一的缘故。同一硝酸纤维素膜上免疫复合物经洗脱以后,再与另一膜蛋白 MRP2 抗体孵育后,Western blot 检测 MRP2 的表达与 MRP3 呈相反趋势,即 BDL 组较 Sham 组明显减弱。MRP3 和 MRP2 蛋白的定量分析提示,二者在 Sham 和 BDL 组间表达均有非常显著差异($P < 0.01$),在 BDL 组 MRP3 蛋白表达量增加为 Sham 组的(679 ± 86)%,而 MRP2 降低为 Sham 组的(13 ± 6)%。



1-3：Sham 组；4-6：BDL 组

图3 Western blot 检测 Sham 和 BDL 大鼠肝脏 MRP3 和 MRP2 蛋白表达量

BDL 大鼠肝脏 14 d 时核蛋白 RXRα 表达量见图 4，BDL 手术组 RXRα 蛋白条带位于约 52×10^3 处，BDL 较假手术组 Sham 大鼠肝脏 RXRα 的蛋白表达明显减弱。光密度定量分析提示 BDL 组 RXRα 表达较 Sham 组减弱并有非常显著差异（$P<0.01$），约为 Sham 组的（11±3）%。



1-3：Sham 组；4-6：BDL 组

图4 Western blot 检测 Sham 和 BDL 大鼠肝脏 RXRa 的蛋白表达量

3 讨论

多耐药相关蛋白 MRP3 是的一种含有 ATP 结合域的转运蛋白基因，表达于肝细胞、胆管上皮、肠黏膜上皮和肾小管上皮细胞，在极性化的肝细胞 MRP3 位于的基底侧膜，而同一家族中另一成员 MRP2 基因表达于肝细胞膜的小管面或顶端面，二者均为肝细胞膜上的排出泵，MRP2 将细胞内的物质排出到毛细胆管，而 MRP3 可将物质排出到血液中。先前的研究已证实，MRP3 同 MRP2 相似可转运胆酸、17β-雌二醇和一些抗癌药等。正常肝细胞主要表达 MRP2，MRP3 的表达量很低或甚至不表达，但在一些病理条件下，如：梗阻性胆汁淤积、Dubin-Johnson（MRP2 突变致功能缺陷的一种遗传病）及 PBC[4] 等时 MRP2 在肝细胞膜小管面的表达下降，而 MRP3 在基底侧膜-血管面的表达却急剧升高，MRP2 与 MRP3 相反的表达变化方式常在这些疾病中偶连并存。人们普遍认为在胆汁淤积状态下 MRP3 表达的升高是肝细胞自身的一种保护机制，当胆汁淤积出现时肝细胞向毛细胆管排泌胆酸的正常通道受阻，小管面的 MRP2 表达下调，而肝细胞将寻求另外的通路排泌细胞内聚积的胆酸盐，即血管面的 MRP3 表达上调，将胞内聚积的胆酸排泌到血液中，最后通过肾脏排出体外。本研究在 BDL 大鼠肝脏中也证明，MRP2 的蛋白表达明显下降，而 MRP3 表达明显增高，可能有利于减少胆酸盐在肝细胞内的淤积，减轻胆酸盐对肝细胞的毒性损伤。

对于胆汁淤积状态下 MRP3 表达上调的分子机制不清楚。最近研究表明一些调节基因转录的核受体的配体，包括：细胞因子[2,4]（TNFα、IL1β）、胆酸和 PB 等，均可以诱导 MRP3 的表达，可能说明 MRP3 的表达调控存在多种信号途径[5,6]。在阻塞性胆汁淤积时 MRP3 表达的明显增加可能提示肝细胞内聚积的物质可能参与了 MRP3 表达的调控[2,7]。本研究中证实，作为胆汁中主要成分之一的鹅脱氧胆酸 CDCA 可以在人肝癌细胞 HepG2 直接诱导 MRP3 蛋白表达的增高，尽管其增高的程度较 BDL 低，但说明胆汁淤积病理状态下（包括 DBL 动物模型）肝细胞中淤滞的胆酸盐可能是导致 MRP3 代偿性表达增高的因素之一。同时，在本实验中应用 MRP3 免疫印迹的同一硝酸纤维素膜同另一内参照的 MRP2 抗体杂交时发现 MRP2 的蛋白表达明显降低，这一方面说明可以除外 Western blot 时因上样量导致的 MRP3 表达的误差，另一方面也显示，当正常的胆酸盐排出通道-胆管阻塞时，作为小管面的胆酸盐排出泵 MRP2 表达明显下降，证明了其他学者的研究结果。

核受体为一个转录因子超家族，在结构上其氨基酸（N 端）都含有一个高度保守的胱氨酸富含区——DNA 结合结构域（DBD），含有两个锌指结构；羧基端（C 端）有配体结合结构域（LBD），保守程度低，识别和结合配体，并参与受体二聚化和转录活化或抑制。维生素 A 类受体包括[8]：RARα、β、γ，RXRα、β、γ，维生素 A 类受体介导天然的和合成的维生素 A 类似物——视黄醇活性物质（retinoids）的生物学作用。RXRα 是一个非常重要的、广泛参与多种基因转录活性调控的核受体。核受体 RXRα 可以与其他的一些伙伴核受体（partner）结合或自身结合，形成异源二聚体（heterodimer）或自身形成同源二聚体（homodimer）。

最近的研究表明，RXRα 可以与其伙伴核受体 FXR、CAR 和 PXR 结合形成的异源二聚体参与 MRP2 基因 mRNA 转录的正向调控，而 CDCA 和 PB 分别是 FXR 和 CAR 核受体的配体。PB 是目前发现的最强的 MRP3 诱导剂，本实验结果也证明 PB 在 HepG2 细胞中刺激 MRP3 的表达，并强于 CDCA。令人感兴趣的是 CDCA 和 PB 在诱导 MRP3 表达的同时，明显抑制核受体 RXRα 的蛋白表达。在 BDL 大鼠模型中的实验结果也证明，MRP2 表达下调和 MRP3 表达的上调均伴随有核受体 RXRα 蛋白表达的明显减低。本研究

结果提示，在胆汁淤积时，RXRα 的表达下降是导致 MRP2 表达减低的重要因素之一，它同时也与 MRP3 表达的代偿性升高存在有关系。RXRα 可能参与 MRP3 的转录调控，其具体机制尚待进一步研究。

参考文献：

[1] KULLAK-UBLICK G A, STIEGER B, MEIER P J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 322-342.

[2] BOHAN A, CHEN W S, DENSON L A, *et al*. Tumor necrosis factor alpha-dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3(Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(38): 36688-36698.

[3] BOYER J L. Nuclear receptor ligands: rational and effective therapy for chronic cholestatic liver disease? [J]. Gastroenterology, 2005, 129(2): 735-740.

[4] KEITEL V, BURDELSKI M, WARSKULAT U, *et al*. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis[J]. Hepatology, 2005, 41(5): 1160-1172.

[5] CHEN J, RAYMOND K. Nuclear receptors, bile-acid detoxification, and cholestasis[J]. Lancet, 2006, 367(9509): 454-456.

[6] WAGNER M, HALILBASIC E, MARSCHALL H U, *et al*. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice[J]. Hepatology, 2005, 42(2): 420-430.

[7] QATANANI M, MOORE D D. CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease[J]. Curr Drug Metab, 2005, 6(4): 329-339.

[8] ABU J, BATUWANGALA M, HERBERT K, *et al*. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(9): 712-720.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2006)12-1301-01

个案与短篇

纳洛酮与醒脑静注射液治疗慢性肺心病合并肺性脑病的临床观察

田 进 （贵州铝厂职工医院内科，贵阳 550058）

肺性脑病是慢性肺心病晚期严重的并发症之一，发生率约30%，病死率较高。近年来有报道醒脑静和纳洛酮注射液用于治疗肺性脑病，现就我院1998年1月-2004年12月收治的136例肺心病合并肺性脑病患者的治疗情况报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择

本组136例均符合肺性脑病诊断和临床分级标准[1]。随机分成4组，做样本的均衡性分析，各组在年龄、性别、病程、临床分级等方面无显著差异($P>0.05$)。

1.2 方法

4组患者均给常规吸氧，祛痰、抗感染、支气管扩张药，纠正电解质紊乱，控制心衰和支持治疗。纳洛酮组用盐酸纳洛酮(湖南制药有限公司)注射液1.6 mg加入10%葡萄糖注射液250 ml静脉输注，每分钟15~20滴，每日1次。醒脑静组用醒脑静注射液(无锡健宏药业有限公司生产)30 ml，加入5%葡萄糖250 ml中静脉滴注，每天1次。醒脑静-纳洛酮合用组醒脑静注射液20 ml/d和盐酸纳洛酮注射液1.2 mg/d；对照组用尼可刹米1.5 g加10%葡萄糖注射液250 ml静脉滴注，每日1次，均以3-7 d为一疗程。

1.3 疗效标准

依据《内科疾病诊断标准》[2]：显效：清醒时间<12 h，精神症状及神经系统异常的体征消失，血气分析基本恢复正常。有效：清醒时间12~48 h，精神症状及神经系统异常的体征好转，血气分析有所好转。无效：意识障碍、精神症状及神经异常的体征、血气分析无改善或加重。用药前及用药后第1、3、5、7天详细观察临床表现和体征、血气分析等结果。

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0软件对治疗前后的计量资料比较行t检验，对多组间的计量资料比较行方差分析。对计数资料行χ^2检验。

2 结果

纳洛酮组、醒脑静组与醒脑静-纳洛酮组的PaO_2、$PaCO_2$治疗前后的组内变化有显著差异($P<0.05$)，而3组之间变化无显著差异($P>0.05$)。对照组治疗前后无显著差异($P>0.05$)，见表1。

表1 4组治疗前后动脉血气分析结果

组别	n	PaO_2(kPa)		$PaCO_2$(kPa)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
纳洛酮组	30	7.86±1.34	9.36±1.74*	8.47±2.35	5.19±4.22*
醒脑静组	36	6.76±1.2	8.96±1.02*	8.87±2.14	6.06±1.88*
纳洛酮-醒脑静组	42	6.58±1.26	10.05±1.12*	9.31±1.76	5.38±0.14*
对照组	28	8.52±1.37	9.48±1.54	7.96±2.29	6.26±2.01

a：$P<0.05$，与治疗前比较。

纳洛酮组(90.00)%、醒脑静组(88.89)%与醒脑静-纳洛酮合用组(90.40)%之间的总有效率无显著差异($P>0.05$)，治疗组总有效率明显高于对照组(67.90)%($P<0.05$)。

（下转1304页）

作者简介：田 进(1961-)，男，北京市人，副主任医师，主要从事呼吸内科方面的研究。电话：0851-4897543

收稿日期：2005-10-10；修回日期：2005-11-03