论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1040-03

大鼠无肝状态肾脏罗库溴铵相关转运蛋白OATP-3及其基因的表达变化的研究

陈毅飞,陶国才,崔 剑,易 斌 (第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

提 要:目的 研究无肝状态前后大鼠肾脏罗库溴铵相关转运蛋白阴离子转运多肽-3(organ anion-transporting polypeptides 3, oatp-3)及其基因表达的变化,以期初步阐释罗库溴铵无肝期肝外代谢特点形成的原因。**方法** 12只大鼠随机分为2组(6只/组),对照组与阻断肝门60 min组,取各组大鼠肾脏组织,采用Western blot检测各组OATP-3蛋白的表达。采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测各组oatp-3 mRNA的表达。**结果** 大鼠肾脏组织OATP-3蛋白表达水平阻断肝门60 min组表达水平高于对照组($P<0.01$);大鼠肾脏组织oatp-3 mRNA表达水平阻断肝门60 min组明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** 大鼠肾脏组织oatp-3在无肝期比无肝期前增多,oatp-3基因表达在无肝期比无肝期前增多,这可能是罗库溴铵无肝期肝外代谢增强的机制。

关键词: 罗库溴铵;oatp-3;无肝期;Western blot;RT-PCR

中图法分类号: R322.61;R394.2;R657.3 **文献标识码:** A

Expression variation of kidney OATP-3 relating to rocuronium metabolism in rats during anhepatic phase

CHEN Yi-fei, TAO Guo-cai, CUI Jian, YI Bin (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression variation of kidney OATP-3 in rats relating to rocuronium metabolism in anhepatic phase and to primarily explain the reason of extrahepatic metabolism characters of rocuronium. Methods Twelve rats were distributed to 2 groups randomly with 6 in each: Group A (control group) and Group B in which the hepatic portal devascularization was performed for 60 min. Kidney tissues of the rats were taken. oatp-3 mRNA was detected by RT-PCR and OATP-3 protein by Western blotting. Results The expression levels of kidney OATP-3 mRNA and protein in Group B were significantly higher than those in Group A($P<0.01$). Conclusion Kidney OATP-3 and its gene expression levels are increased in rats during anhepatic phase than before hepatic portal dissociation, which is presumably due to the enhanced extrahepatic metabolism of rocuronium in anhepatic phase.

Key words: rocuronium; oatp-3; anhepatic phase; gene; Western blotting; RT-PCR

阴离子转运多肽(oatp)超家族是介导药物及多种体内外化合物进入细胞代谢的一种重要转运受体,是药物分布代谢的关键因素之一,并且能够介导细胞摄取大量结构各异的药物[1]。罗库溴铵在体内有两种代谢途径:一种是通过肝脏经胆道以原形排出体外;另一种是通过肾脏以原形排出体外。前一种途径占主导地位,两条途径均需要oatp超家族将罗库溴铵的转运入细胞进行代谢。oatp-3是该家族的成员之一,主要分布于肾脏、小肠等组织器官中。

当肝移植进入无肝期,失去肝脏的主要代谢作用后,罗库溴铵仍能保持相对的代谢稳定,这提示无肝期罗库溴铵的肝外代谢增强,进一步推测与罗库溴铵转运相关的oatp-3在肝外组织器官中的蛋白及基因表达可能增强。本研究选择大鼠为动物模型,以肾脏为研究对象采用RT-PCR和Western blot来验证无肝状态下oatp-3基因及OATP-3蛋白表达增强是否成立。这对于阐释罗库溴铵的肝外代谢机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

兔抗大鼠oatp-3多克隆抗体购于美国Chemicon公司,辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体购于北京中杉公司,DAB显色剂博

作者简介:陈毅飞(1977-),男,四川省荥经县人,硕士研究生,主要从事肝移植期间麻醉药物的药代动力学方面的研究。电话:13594140322,E-mail:feixu79@163.com

收稿日期:2005-12-19;修回日期:2006-02-27

士德公司。PVDF 膜，蛋白酶抑制剂购于莫克公司。罗库溴铵由欧家农公司提供，DEPC 购于美国 Sigma 公司，Tripure 购于美国 Invitrogen 公司，合成引物、反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶等购于上海博亚公司。低温高速冷冻离心机（2K15 型），-20 ℃低温冰箱（BCD-272 型），孵箱，电泳仪，摇床，转膜仪，高速离心机，PCR 仪（PTC-15 型），核酸蛋白紫外分光光度仪（Smartspect3000 型），凝胶成像分析仪（BIO-RAD 型）。

1.2　实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只（购于第三军医大学实验动物中心），12～14 周龄，体质量 280～330 g，分成 2 组：对照组和阻断肝门 60 min 组，每组 6 只。

1.3　无肝动物模型的建立及肾脏组织的取材

乙醚麻醉大鼠，对照组大鼠开腹后直接取肾脏组织约 100 mg，0.01% PBS 洗涤；阻断肝门 60 min 组开腹后分离出肝门，夹闭 60 min，肾脏取材同对照组。

1.4　RNA 提取

将约 100 mg 肾脏组织置入匀浆器，冰浴中加入 1 ml Tripure，充分混匀，加入氯仿后低温高速离心，取上清加入异丙醇后再次低温高速离心，弃上清，经乙醇洗涤烘干，加无菌双蒸水溶解，紫外分光光度仪测定 RNA 密度，-20 ℃保存。

1.5　RT-PCR 分析

采用两步法，先将提取到的 RNA 反转录为 cDNA，加入 oatp-3 特异性引物（正义引物：5′-CGCTTTGATAGACAGAACCT-3′，反义引物：5′-AGTAGCAGCATGAAACGACA -3′）及内参引物 β-actin 后经 PCR 仪循环扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳，紫外分光密度扫描，并以共同扩增的 β-actin 蛋白基因作为内参照，二者扩增条带密度之比表示 oatp-3 mRNA 表达水平。

1.6　细胞膜成分的提取

将肾脏组织在玻璃匀浆器加入适当缓冲液（0.23 mol/L 蔗糖，2 mmol/L EDTA，5 mmol/L Tris 盐酸、pH 7.5，0.1 mmol/L PMSF，2 μg/ml 亮肽素，2 μg/ml 胰肽酶）。将匀浆后的组织悬液在1 000 × *g* 离心 15 min，7 500 × *g* 离心 15 min，最后将上清液在 4 ℃下，100 000 × *g* 离心 60 min。将沉淀溶解在缓冲液中（0.23 mol/L 蔗糖，2 mmol/L EDTA，5 mmol/L Tris 盐酸、pH 7.5）。

1.7　聚丙烯酰胺凝胶电泳

Bradford 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度，调整样本蛋白质浓度，保证上样量一致，上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，采用 5% 的浓缩胶，10% 的分离胶。用电转法将蛋白转移到 PVDF 膜（100 V，65 min）。PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 60 min，加用抗 oatp-3 抗体（10 μg/ml）37 ℃ 孵育 1.5 h，用 TBST 洗脱 2 次，TBS 洗脱 1 次后加入二抗室温孵育 1.5 h；用 TBST 洗脱 2 次，TBS 洗脱 1 次后用二氨基联苯胺（DAB）显色，扫描成像。以 oatp-3 条带面积与光密度乘积比值计算其相对表达量。

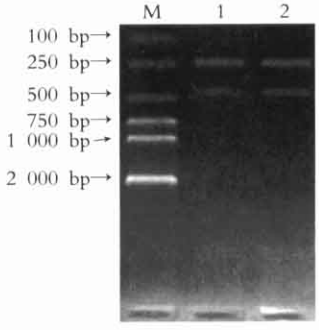
1.8　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 12.0 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增结果

如图 1 所示，2 组大鼠肾脏组织 RT-PCR 扩增出 2 条 cDNA。



M：DL2000 标准；1：对照组；2：阻断肝门 600 min 组

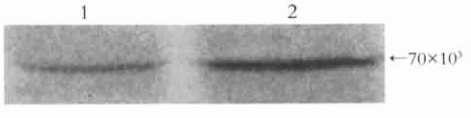
图 1　无肝期前后大鼠肾脏组织 oatp-3 mRNA 的表达

2.2　oatp-3 mRNA 表达密度扫描结果

以 oatp-3 和 β-actin 扫描密度值的比值为相对密度，代表各组大鼠肾脏 oatp-3 mRNA 的表达水平。对照组的表达量为（0.680 ± 0.109），阻断肝门 60 min 组的表达量为（0.822 ± 0.045），阻断肝门 60 min 时大鼠肾脏组织 oatp-3 的表达水平明显高于对照组（$P < 0.05$）。

2.3　Western blot 结果

OATP-3 蛋白条带分子量约为 70×10^3，如图 2 所示阻断肝门 60 min 组 oatp-3 表达高于对照组。



1：对照组；2：阻断肝门 60 min 组

图 2　无肝期前后大鼠肾脏组织 oatp-3 的表达

2.4　OATP-3 蛋白表达密度扫描结果

以 oatp-3 条带面积与光密度乘积比值计算其相对表达量，代表各组大鼠 OATP-3 蛋白的表达水平。对照组表达量为（1 012.37 ± 232.86），阻断肝门 60 min 组蛋白表达量为（1 481.78 ± 268.42）。阻断肝门 60 min 组大鼠肾脏组织 oatp-3 的表达水平明显高于对照组（$P < 0.01$）。

3 讨论

传统观点认为药物的分布和其代谢密切相关，然而研究表明细胞膜转运蛋白在药物分布中具有重要作用。药物在组织细胞间的定向运动依赖于位于细胞膜上的药物摄入和排出转运蛋白的协同作用。oatp 超家族是一个重要的摄入转运蛋白，其包括多个亚家族，目前在人类 OATPs 发现了 11 个亚家族，在大鼠发现了 14 个亚家族[2]。oatp 家族在体内存在于肝脏、肾脏、小肠、脑等多种组织器官中。罗库溴铵正是 oatp 超家族的底物之一。在人体和大鼠 oatp 超家族均可将罗库溴铵转运入细胞然后以原形排出体外。

无肝期是肝移植手术中出现的一个特殊时期，期间将对大多数药物的药代动力学产生较严重影响。然而研究显示罗库溴铵虽然主要在肝脏代谢，但肝移植无肝期罗库溴铵血药浓度和血浆清除率并无明显变化，其在无肝期的代谢仍然可以维持基本稳定[3-5]。为何主要在肝脏代谢的罗库溴铵失去肝脏的代谢作用后，其代谢未受明显影响，这提示肝外代谢可能得到增强，肝外罗库溴铵相关转运蛋白表达可能增多。本实验结果表明 oatp-3 在大鼠无肝状态时 mRNA 及蛋白表达量均升高。

目前究竟是什么因素促使 oatp-3 在无肝期的表达增多尚不清楚。已有研究显示 oatp-3 的表达受多种因素影响[6-12]。Beery 等[13]报道受促肾上腺皮质激素预处理的大鼠的 oatp-3 表达增强，相对应的在切除垂体的大鼠 oatp-3 的表达明显减少[14-16]。肝移植期间机体内环境发生剧烈变化均有可能对肝外 oatp-3 的表达及活性产生影响从而影响罗库溴铵的代谢。

本实验结果显示与无肝前期相比无肝期 60 min 时大鼠肾脏的 oatp-3 的表达明显增强，从一个角度说明了罗库溴铵肝外代谢增强的可能原因，如果能够检测无肝期前后 OATP-3 蛋白功能的变化，则能进一步证实和说明无肝期前后 oatp-3 表达变化与罗库溴铵药代特点之间的关系。至于无肝期究竟什么因素通过什么机制促使 oatp-3 表达增强，尚需进一步研究。

参考文献：

[1] MARZOLINI C, TIRONA R G, KIM R B. Pharmacogenomics of the OATP and OAT families[J]. Pharmacogenomics, 2004, 5(3): 273-282.

[2] KIM R B. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition[J]. Eur J Clin Invest, 2003, 33(Suppl 2): 1-5.

[3] GAO L, RAMZAN I, BAKER B. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for rocuronium with potential for quantifying its metabolite, 17-desacetylrocuronium, in human plasma[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 757(2): 207-214.

[4] GAO L, RAMZAN I, BAKER B. Rocuronium plasma concentrations during three phases of liver transplantation: relationship with early postoperative graft liver function[J]. Br J Anesth, 2002, 88(6): 764-770.

[5] GAO L, RAMZAN I, BAKER B. Rocuronium infusion requirements and plasma concentrations at constant levels of neuromuscular paralysis during three phases of liver transplantation[J]. J Clin Anesth, 2003, 15(4): 257-266.

[6] URAKAMI Y, OKUDA M, SAITO H, *et al*. Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney[J]. FEBS Lett, 2000, 473(2): 173-176.

[7] MESOTTEN D, VAN-DEN-BERGHE G, LIDDLE C, *et al*. Growth hormone modulation of the rat hepatic bile transporter system in endotoxin-induced cholestasis[J]. Endocrinology, 2003, 144(9): 4008-4017.

[8] HARTMANN G, KIM H, PIQUETTE-MILLER M. Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(2): 189-199.

[9] 邹毅清，龚捷音，林财珠，等. 氯胺酮对罗库溴铵气管插管条件的影响[J]. 临床麻醉学杂志，2003，19(6)：373-374.

[10] 寿红艳，徐旭仲，余微萍，等. 老年人术中低体温对罗库溴铵药效动力学的影响[J]. 实用医学杂志，2005，21(16)：1768-1769.

[11] 周少丽，蔡 珺，黑子清，等. 罗库溴铵对乙型肝炎肝硬化患者肌松时效的影响[J]. 中国新药杂志，2005，14(7)：918-921.

[12] GOTOH Y, KATO Y, STIEGER B, *et al*. Gender difference in the Oatp1-mediated tubular reabsorption of estradiol 17beta-D-glucuronide in rats[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 282(6): E1245-E1254.

[13] BEERY E, MIDDEL P, BAHN A, *et al*. Molecular evidence of organic ion transporters in the rat adrenal cortex with adrenocorticotropin-regulated zonal expression[J]. Endocrinology, 2003, 144(10): 4519-4526.

[14] CHRENCIK J E, ORANS J, MOORE L B, *et al*. Structural disorder in the complex of human pregnane X receptor and the macrolide antibiotic rifampicin[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(5): 1125-1134.

[15] KRASOWSKI M D, YASUDA K, HAGEY L R, *et al*. Evolution of the pregnane x receptor: adaptation to cross-species differences in biliary bile salts[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(7): 1720-1739.

[16] 顾健腾，陶国才，鲁开智，等. 大鼠肾脏异丙酚代谢相关 ugt1a6 基因在无肝期表达变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(16)：1697-1699.

（编辑 张大春）