文章编号:1000-5404(2009)02-0101-04

论著

熊脱氧胆酸和利福平诱导 HepG2 细胞核受体 FTF 和膜转运蛋白 MRP3 的表达

柴 进[1],吴晓平[1],夏 锋[2],何 宇[2],王槐志[2],肖天利[1],陈文生[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军消化病研究所,[2]全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 体外细胞培养观察利胆药物熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid,UDCA)及其衍生物牛磺熊脱氧胆酸(tauroursdeoxycholic acid,TUDCA)或利福平(rifampicin,Rif)对多耐药相关蛋白3(multidrug resistance-associate protein 3,MRP3)及其核受体FTF(fetoprotein transcription factor)表达的影响。**方法** 用UDCA及其衍生物TUDCA或Rif分别刺激培养的肝癌细胞HepG2后,抽提HepG2的总RNA与细胞总膜蛋白、核蛋白,分别用Quantitative real-time PCR和Western blot检测MRP3和FTF mRNA与蛋白水平表达的变化。**结果** UDCA及其衍生物TUDCA与Rif均可诱导HepG2细胞内核受体FTF表达增高,同时MRP3 mRNA和蛋白水平表达也相应增高。**结论** UDCA及其衍生物TUDCA和Rif刺激肝癌细胞HepG2细胞膜转运蛋白MRP3表达上调可能与核受体FTF途径相关。

关键词: UDCA;TUDCA;MRP3;FTF;肝癌细胞HepG2
中图法分类号: R341;R394.2;R657.302 **文献标识码:** A

Ursodeoxycholic acid, taurousrdeoxycholic acid or rifampicin induces expression of nuclear receptor FTF and membrane transporter MRP3 in HepG2 cells

CHAI Jin[1], WU Xiao-ping[1], XIA Feng[2], HE Yu[2], WANG Huai-zhi[2], XIAO Tian-li[1], CHEN Wen-sheng[1] ([1]Gastroenterology Research Center,[2]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of ursodeoxycholic acid (UDCA), and its derivative, tauroursdeoxycholic acid (TUDCA), or rifampicin (Rif) on the expressions of membrane transporter, multidrug resistance-associate protein 3 (MRP3), and its nuclear receptor, fetoprotein transcription factor (FTF) in HepG2 cells. **Methods** Both total RNA and total membrane or nuclear proteins were extracted from HepG2 cells after 48 h treatment with UDCA, TUDCA or Rif (100, 100 or 10 μmol/L). The mRNA and protein expression levels of MRP3 and FTF were determined by quantitative real-time PCR and Western blot analysis. **Results** Both FTF and MRP3 expression was significantly induced either at mRNA or protein level by UDCA, TUDCA or Rif in HepG2 cells. **Conclusion** The up-regulation of hepatic MRP3 expression induced by UDCA, TUDCA or Rif may be associated with FTF pathway.

Key words: ursodeoxycholic acid; tauroursdeoxycholic acid; multidrug resistance-associate protein 3; fetoprotein transcription factor; HepG2 cells

多耐药相关蛋白3(multidrug resistance-associate protein 3,MRP3)属于MRP家族的成员,是一种近年克隆并存在于极性化肝上的一种有机阴离子排泌泵,包含跨膜区和核甘酸结合域。其主要转运葡萄糖醛酸结合物、谷胱甘肽、硫酸盐以及某些抗癌药物。MRP3主要分布于肠道、肾脏及肾上腺,而在正常肝细胞基底侧膜上表达很低或不表达[1]。但在病理状态如胆汁淤积性疾病(如胆道梗阻、原发性毛细胆管性肝硬化、Dubin-Johnson综合征等)时MRP3在肝细胞膜基底侧面表达量大大增加[2]。近来的研究显示:核受体FTF(fetoprotein transcriotion factor)在胆酸合成代谢途径、肝特异性基因表达的调控网络中具有非常重要的作用。它可调控多种转运蛋白基因的表达,是机体对胆汁淤积病理应激状态产生适应性改变的重要核转录因

基金项目:国家自然科学基金(30570842)
Supporyed by the National Natural Science Foundation of China(30570842)
作者简介:柴 进,男,湖南省益阳市人,硕士研究生,主要从事肝脏膜转运蛋白结构与功能方面的研究。E-mail:janhic11@163.com
通信作者:陈文生,电话:(023)68765183,E-mail:wenshengchen@hotmail.com
收稿日期:2008-04-01;修回日期:2008-05-27

子之一。已经研究证实 FTF 能够上调 MRP3 的表达[3]。临床常用利胆药物如熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)及其衍生物 TUDCA 等,能有效改善患者淤胆,但其作用机制十分复杂。目前主要认为:利胆药物能够有效诱导 MRP2、Bsep 等有机阴离子转运泵的表达上调,使细胞内淤积的胆酸泵到血液,从而减轻患者的淤胆[4]。但是,利胆药物是否能够诱导 MRP3 的表达,目前还不清楚。为此,本实验用利胆药物 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和利福平(Rif)诱导培养的肝癌细胞 HepG2,检测其核受体 FTF 和膜转运蛋 MRP3 的表达变化,为进一步研究利胆药物的作用机制提供线索。

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,DEME 培养基购于 Gibco 公司,利胆药物 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 均购于 Sigma 公司,Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司,ProSTAR RT-PCR kit 购于 Stratagene 公司(Lajolla,CA),Mem-PER 真核膜蛋白提取试剂盒、NE-PER 核蛋白提取试剂盒以及 ECL 试剂盒均购于 Pierce Biotechnology 公司,抗体(MRP3、FTF、SH-PTP1、GAPDH、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 毫升含 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,细胞贴墙 85%~90% 融合时用 EDTA-胰酶(每 1 000 毫升含 $EDTANa_2$ 0.2 g、Tryp-sin 2.5 g、NaCl 8 g、KCl 0.4 g、$NaHCO_3$ 0.58 g、Dextrose 1 g)消化,以台盼蓝拒染实验测定细胞活率 90% 以上进行传代。当细胞融合生长至 60%~80% 密度时,以终浓度 100 μmol/L UCDA、100 μmol/L TUDCA 或 10 μmol/L Rif 加入无血清培养液与 HepG2 细胞孵育 48 h,弃上清,用预冷的 PBS 液清洗细胞 3 次后收获细胞。对照组以无血清 DMEM 培养的 HepG2 细胞 48 h。

1.2.2 Quantitative real-time PCR 按 Trizol 试剂说明书提取 HepG2 细胞的总 RNA。然后用分光光度计和甲醛变性琼脂糖电泳分别测定其浓度和纯化。取 5 μg 的总 RNA 按 ProSTAR RT-PCR kit 说明书逆转录成 cDNA。TaqMan real-time quantitative PCR 依照 ABI Prism 7700 Sequence Detecton System 仪器(Applied Biosystems)说明书操作。以无血清 DMEM 培养的 HepG2 细胞作对照组,UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 诱导的 HepG2 细胞作为处理组。GAPDH 作为内参照。MRP3 上游引物:5′-CGTGAAGATGCGCGCC-3′,下游引物:5′-TCAGCTTGATGCGCGAGTC-3′,探针:5′-TCCAGGTAAAGCAAATG-3′;FTF 上游引物:5′-TGCACGGCAGCCTGC-3′,下游引物:5′-TGGGTACTCAGACTTGATGGCC-3′,探针:5′-AGGTTACCAAACATATGGCCACTTTCCTAGCC-3′;内参 GAPDH 引物和探针均购自于 ABI(Applied Biosystems),每一样品测定 3 孔,实验至少重复 3 次。

1.2.3 细胞总膜蛋白、核蛋白提取 分别抽提 HepG2 细胞总膜蛋白和核蛋白,按照 NE-PER 核蛋白提取试剂盒和 Mem-PER 真核膜蛋白提取试剂盒操作说明书操作。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 分别提取核蛋白 20 μg 或膜蛋白 100 μg 与等体积上样缓冲液体混匀,其中核蛋白 100 ℃加热 5 min 变性,冷却后上样。而膜蛋白不需要加热变性,直接上样。核蛋白或膜蛋白分别用 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 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,加一抗(1∶100)4 ℃孵育过夜,用 TBST 洗去一抗后加入相应二抗(1∶4 000),室温孵育 1 h。MRP3 或 FTF 免疫印迹所用的同一硝酸纤维素膜上的免疫复合物经过洗脱(Stripped)以后,再与另外一胞浆蛋白甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体或核蛋白酪氨酸磷酸酯酶(SH-PTP1)抗体孵育后,Western blot 检测 GAPDH、SH-PTP1 的表达,以此条带为内参照确定上样量。ECL 显影定影后,凝胶成像系统上成像记录,然后用 Quantity 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。

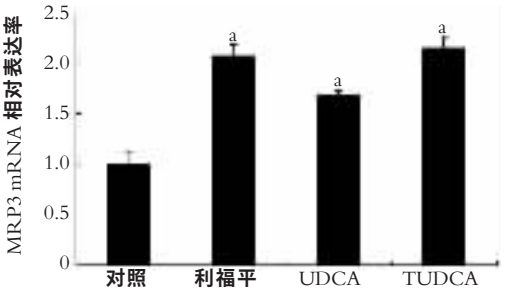
1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

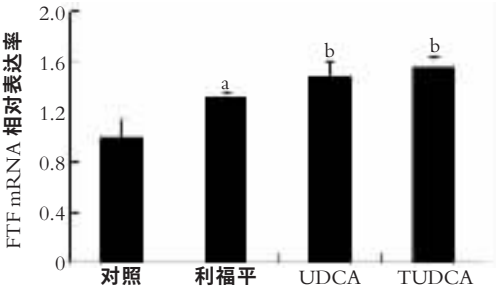
2.1 利胆药物 UDCA、TUDCA 和 Rif 诱导肝癌细胞 HepG2 后 MRP3 与 FTF mRNA 表达水平

统计结果见图 1、2。图 1 统计结果显示:用 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 诱导处理的 HepG2 细胞后,MRP3 mRNA 表达水平与对照组相比均有显著差异($P<0.01$)。其中,UDCA 衍生物 TUDCA 诱导作用最强。图 2 统计结果表明:在 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 处理组和对照组间 FTF mRNA 的表达均有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$)。其中 UDCA 衍生物 TUDCA 诱导作用最强。



a: $P<0.01$,与对照组比较

图 1 TaqMan real-time Quantitative PCR 检测 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 对 HepG2 细胞 MRP3 mRNA 表达的影响



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

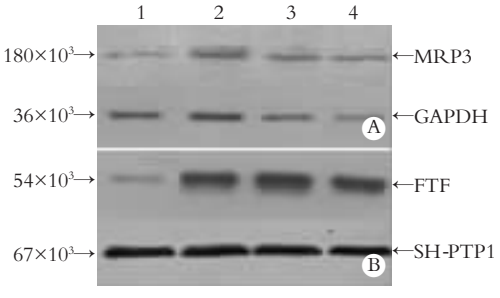
图 2　TaqMan real-time Quantitative PCR 检测 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 对 HepG2 细胞 FTF mRNA 表达的影响

2.2　利胆药物 UDCA、TUDCA 和 Rif 诱导肝癌细胞 HepG2 后 MRP3 与 FTF 蛋白水平的表达

在提取各组 HepG2 细胞的总膜蛋白和核蛋白后进行 Western blot。MRP3 FTF 抗体免疫迹所用的同一硝酸纤维素膜上免疫复合物经洗脱以后,再与胞浆蛋白 GAPDH 或核蛋白 SH-PTP1 抗体孵育后,Western blot 检测 GAPDH 的相对分子质量为 36×10^3(图 3A),SH-PTP1 相对分子质量为 67×10^3(图 3B),以 GAPDH、SH-PTP1 的条带分别为 MRP3、FTF 内参照,确定其上样量,以排除因不同上样量所导致的实验误差。

相对分子质量为 180×10^3 处可见 2 条条带(图 3A),均为 MRP3 蛋白,原因为该蛋白不同程度的糖基化结果所致,其中糖基化的程度以及均一程度决定第 2 条条带的强弱,通常人的 MRP3 均可见此二条带。光密度定量分析提示,在 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 处理组和对照组间 MRP3 表达均有显著差异($P<0.01$)。利胆药物 UDCA 及衍生物 TUDCA 和 Rif 均可诱导 MRP3 的表达。其中,UDCA 衍生物 TUDCA 诱导作用最强。结果表明蛋白水平的总体变化趋势同于 mRNA 水平。

核蛋白 FTF 表达于 54×10^3 处(图 3B)。光密度定量分析提示,在 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 处理组和对照组间 FTF 蛋白表达均有显著差异($P<0.01$)。3 种均能诱导 FTF 的表达,其中以 UDCA 的衍生物 TUDCA 诱导作用最强,这与 mRNA水平变化相一致。



A: 细胞总膜蛋白; B: 细胞核蛋白

1: 对照组;2: TUDCA 组;3: UDCA 组;4: Rif 组

图 3　Western blot 检测 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 对 HepG2 细胞 MRP3 与 FTF 蛋白表达的影响

3　讨论

MRP3 是一种含有 ATP 结合域的转运蛋白基因,分布于肝细胞、肠黏膜上皮细胞和肾小管上皮细胞上。MRP3 位于极性化的肝细胞基底侧膜(basolateral membrane),可以将肝细胞内的物质转运出细胞膜[5]。它的底物包括胆酸、葡萄糖醛酸甙结合物、17β-雌二醇和一些临床常见的有机阴离子抗癌药(如顺铂和氨甲蝶呤等)。在正常生理情况下,MRP3 在人和鼠的肝脏中不表达或低表达,而在胆汁淤积病理状态下或肝细胞膜的小管顶端面转运蛋白 MRP2 或 BSEP 功能缺失时其表达量明显增高。由于 MRP3 是重要的胆酸和药物外运泵,MRP3 可以将物质泵出到血液中,MRP3 可能参与胆汁淤积时肝细胞的代偿反应机制和化疗的细胞耐药机制。对 MRP3 基因敲除的小鼠实施 BDL(bile duct ligation)发现,淤胆对小鼠肝细胞的损害要远比野生型 BDL 的小鼠严重[3,6]。因此人们普遍认为 MRP3 表达的增高是在胆汁淤积病理状态下肝细胞的一种代偿性自我保护反应。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,而肝细胞将寻求另外的通道排泄细胞内聚积的胆酸盐,即血管面的 MRP3 表达上调,将细胞内积聚的胆酸排泌到血液中,最后通过肾脏排出体外,减轻胆酸盐对肝细胞的毒性损伤[7]。

UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 是临床上常用的利胆药物,对肝细胞具有保护作用,而其利胆的作用机制十分复杂。已有研究表明,利胆药物可诱导膜转运蛋白 MRP2 和 Bsep 表达的上调,从而减轻淤胆[4]。但是利胆药物是否同时可以诱导 MRP3 的表达上调还少见有文献报道。因此本研究通过利胆药物诱导体外肝癌细胞 HepG2 的实验,初步检测核受体 FTF 和膜转运蛋白 MRP3 的表达变化,能够有利于了解 MRP3 调控机制和探索利胆药物利胆作用机制。

FTF 是一种孤儿细胞核受体,是具有组织特异性的感受态因子。与许多核受体不同的是,它不与 RXRα 形成异源二聚体,而是以单体形式直接结合在目的基因的启动子序列发挥作用[4,8]。FTF 主要分布于肝脏、胰腺外分泌部和肠道。已经有研究证实,肠道的胆盐可以诱导 FTF 表达上调,与 MRP3 启动子上游的调控序列结合,从而使 MRP3 表达增加[9]。而在肝脏中,FTF 亦可上调 MRP3 的表达[3]。其他因素如 TNFα 和 IL-1β 等也可诱导 FTF 表达上调,从而使 MRP3 的表达增加[3]。而利胆药物是否也通过诱导 FTF 表达上调来使 MRP3 表达增加,目前少有研究报

道。本实验研究表明,利胆药物 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 均可诱导 FTF 和 MRP3 mRNA 和蛋白水平表达的增高,这就说明了利胆药物 UDCA 及其衍生物 TUDCA 和 Rif 诱导 MRP3 表达的增高,可能与核受体 FTF 途径相关。至于利胆药物是否通过上调 FTF,从而增高 MRP3 的表达,减轻淤胆,尚需进一步研究和探索。

参考文献:

[1] Inokuchi A, Hinoshita E, Iwamoto Y, *et al*. Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. A transcriptional control of plausible bile acid transporter[J]. J Biol Chem, 2001, 276(50): 46822 - 46829.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(28): 4445 - 4451.

[5] Lang T, Hitzl M, Burk O, *et al*. Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3(ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver[J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(3): 155 - 164.

[6] Chen J, Raymond K. Nuclear receptors, bile-acid detoxification, and cholestasis[J]. Lancet, 2006, 367(9509): 454 - 456.

[7] Zollner G, Wagner M, Fickert P, *et al*. Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2005, 25(2): 367 - 379.

[8] Francis G A, Fayard E, Picard F, *et al*. Nuclear receptors and the control of metabolism[J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65: 261 - 311.

[9] Sakamoto S, Suzuki H, Kusuhara H, *et al*. Efflux mechanism of taurocholate across the rat intestinal basolateral membrane[J]. Mol Pharm, 2006, 3(3): 275 - 281.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)02-0104-01

肝源性溃疡83例临床分析

廖化禹,房殿春,陈 磊,孙永刚 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

肝硬化合并消化性溃疡被称为肝源性溃疡(hepatogenic ulcer, HU),是肝硬化患者上消化道出血的常见原因之一。其发病率是正常人群的2~3倍。因肝硬化症状突出,溃疡的表现常被掩盖,以致漏诊率较高,延误治疗[1,2]。2002 - 2007年我科收治的312例肝炎后肝硬化患者曾行胃镜检查,其中83例存在HU。现对其进行回顾性分析,结合文献对病因和临床特点进行讨论。

1 临床资料

1.1 一般资料

83例肝源性溃疡患者,男性57例,女性26例,年龄36~74岁,平均54.3岁。通过临床表现、超声、CT和生化检查等明确诊断为肝炎后肝硬化。溃疡均经内镜检查证实,并通过病理检查排除恶性溃疡。

1.2 诊断标准

肝炎后肝硬化的诊断标准按照1995年(北京)全国传染病与寄生虫学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》,门静脉高压的诊断根据B超下门脉直径>14 mm和(或)脾静脉直径>10 mm,食道静脉曲张按照Soehendra的分法分为Ⅰ度、Ⅱ度和Ⅲ度,312例肝炎后肝硬化患者中,Ⅰ度69例,Ⅱ度102例,Ⅲ度141例。肝功能的分级按照Child分级方法分为A、B、C级,分别为58、97例和157例。

1.3 内镜下溃疡情况及特点

83例肝源性溃疡患者中,胃溃疡28例,十二指肠溃疡50例,复合溃疡5例。其中多发性溃疡7例,胃中有3个以上溃疡者3例。镜下最小的溃疡直径约0.2 cm,最大的直径约1.5 cm,都有白苔或浓苔覆着,周边黏膜充血水肿明显。

1.4 统计学方法

采用SPSS 11.0统计软件行χ^2检验。

2 结果

2.1 主要临床表现

HU的症状以上腹痛最为常见,其次为嗳气、反酸等。24例患者有呕血、黑便等出血表现,大多数患者有上腹部压痛的体征,出血的患者可有贫血的表现。因存在肝病的基础,患者都有肝硬化的临床表现。

2.2 HU与食道静脉曲张程度的关系

69例食道静脉曲张Ⅰ度患者中,有7例诊断为HU(10.1%),而102例食道静脉曲张Ⅱ度和141例食道静脉曲张Ⅲ度的患者中诊断HU分别25例(24.5%)和51例(36.2%)。经统计学处理,HU的发生率与食道静脉曲张程度不同的组间有统计学差异($P<0.05$),说明食道静脉曲张程度越重,HU的发生率越高。

(下转112页)

作者简介:廖化禹,女,重庆市人,技师,主要从事消化系统疾病发病机制方面的研究。电话:(023)68765191,E-mail:liaohy0206@sina.com
通信作者:房殿春,电话:(023)68754480
收稿日期:2008-09-17;修回日期:2008-10-20