论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0246-04

芒果苷上调 HepG2 细胞膜蛋白 MRP3 和核受体 PXR、CPF 表达

张艳梅[1],柴 进[1],阳 勇[2],张 婷[1],罗维早[2],钟国跃[2],陈文生[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所[1];400065 重庆,重庆市中药研究院[2])

【摘要】 目的 体外 HepG2 细胞培养观察芒果苷(mangiferin)对多耐药相关蛋白 3(multidrug resistance-associate protein 3, MRP3)和核受体孕烷 X 受体(pregnane X receptor, PXR)、CYP7A 启动子结合因子(CYP7A promoter-binding factor, CPF)表达的影响。**方法** 用芒果苷刺激 HepG2 细胞 72 h 后,分别抽提细胞 RNA、膜蛋白及核蛋白,采用半定量 RT-PCR 和蛋白免疫印迹检测膜转运蛋白 MRP3 和核受体 PXR、CPF 在转录与蛋白水平的表达变化。熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)处理的 HepG2 细胞作为阳性对照、DMSO 处理细胞为阴性对照。**结果** 芒果苷可显著刺激 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 的 mRNA(比阴性对照组高 3.0 倍,$P<0.05$)和蛋白(比阴性对照组高 3.3 倍,$P<0.05$)表达,其作用强于 UDCA。芒果苷也可明显上调核受体 PXR [mRNA 水平增高 1.7 倍($P<0.05$),蛋白水平增高 3.7 倍($P<0.01$)]、CPF[mRNA 水平增高 2.1 倍($P<0.05$),蛋白水平增高 4.9 倍($P<0.05$)]的表达。**结论** 芒果苷刺激肝癌细胞 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 的表达上调可能与核受体 PXR、CPF 途径相关。

【关键词】 芒果苷;UDCA;MRP3;PXR;CPF

【中图法分类号】 R394.2;R730.23;R735.7 **【文献标志码】** A

Mangiferin up-regulates expression of membrane protein MRP3 and nuclear receptors PXR and CPF in HepG2 cells

Zhang Yanmei[1], Chai Jin[1], Yang Yong[2], Zhang Ting[1], Luo Weizhao[2], Zhong Guoyue[2], Chen Wensheng[1] ([1]Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, [2]Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing, 400065, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of mangiferin on expressions of multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3), nuclear pregnane X receptor (PXR), and CYP7A promoter-binding factor (CPF) in HepG2 cells. **Methods** Total RNA and membrane or nuclear protein were extracted from HepG2 cells 72 h after treated with mangiferin. Expressions of PXR and CPF at transcription and protein levels were detected by semi-quantitative RT PCR and Western blotting, respectively. HepG2 cells treated with ursodeoxycholic acid (UDCA) and DMSO served as positive and negative controls, respectively. **Results** Mangiferin could significantly up-regulate the mRNA and protein expression of MRP3 in HepG2 cells. The mRNA and protein expression levels of MRP3 were 3-fold and 3.3-fold higher, respectively, in positive controls than in negative controls ($P<0.05$). The effect of mangiferin was stronger than that of UDCA on the expression of MRP3 ($P<0.05$). Mangiferin up-regulated the expression levels of PXR and CPF (1.7-fold), mRNA of MRP3 (3.7-fold), CPF (2.1-fold), and protein of MRP3 (4.9-fold), respectively, in HepG2 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Mangiferin can up-regulate the expression of MRP3 in HepG2 cells, which may be related with PXR and PXR.

【Key words】 mangiferin; ursodeoxycholic acid; multidrug resistance-associated protein 3; pregnane X receptor; CYP7A promoter-binding factor

Supporyed by the National Natural Science Foundation of China (30570842, 30900678, 81070320), the National Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BA5030), Chongqing Municipal Science and Technology Commission Special Foundation of Chinese Medicine Industry of "Restruction and Enhancement" (CSTC2010AB5068). Corresponding author: Chen Wensheng, Tel: 86-23-68765183, E-mail: wenshengchen@hotmail.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30570842, 30900678, 81070320);重庆市自然科学基金(CSTC2007BA5030);重庆市科委中药产业"重构提升"行动专项(CSTC2010AB5068)

【通信作者】 陈文生,电话:(023)68765183,E-mail:wenshengchen@hotmail.com

多耐药相关蛋白3(multidrug resistance-associate protein 3, MRP3)为MRP家族的成员,属于ABCC超家族,广泛分布于人和啮齿类动物的肝、胆道、肾脏、肠等组织,定位于极性化细胞的基底侧膜[1-3]。MRP3是一种有机阴离子排泄泵,包含跨膜区和核甘酸结合域,主要转运胆汁酸、GSH、硫酸盐以及某些抗癌药物[4-6]。在胆汁淤积性疾病(胆道梗阻、原发性毛细胆管性肝硬化、Dubin-Johnson综合征等)发生时,MRP3在肝细胞膜基底侧面表达量显著增加,使胆汁酸经由胆酸转运蛋白MRP3排泄至血液,减少肝细胞内有毒物质(如胆汁酸)的积聚,发挥保护肝细胞的作用[7-9]。MRP3是治疗胆汁郁积症非常重要的药物靶点。目前MRP3表达的调控机制尚不清楚。研究表明,核受体PXR(pregnane X receptor)、CPF(CYP7A promoter-binding factor)在调控肝细胞膜胆酸转运蛋白MRP3的表达中起非常重要的作用[8-10]。利胆药UDCA(ursodeoxycholic acid)就是通过核受体PXR、CPF等核受体上调MRP3等胆酸转运蛋白的表达,以达到减轻肝脏损伤以及消除病人的黄疸症状[11-12]。中药藏茵陈,具有利胆护肝的作用,长期以来用于治疗急、慢性黄疸等胆汁淤积性疾病疗效显著。芒果苷是藏茵陈的主要的活性成分之一,具有利胆消黄的功效。本研究利用半定量RT-PCR和Western blot技术手段,观察芒果苷对HepG2细胞膜转运蛋白MRP3表达,以及与其调控密切相关的核受体PXR、CPF表达的影响,旨在为临床治疗胆汁淤积提供重要线索。

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,芒果苷单体由重庆市中药研究院提供,利胆药物UDCA购于Sigma公司,Trizol试剂购于Invitrogen公司,逆转录试剂盒购于Fermantas公司,PCR试剂盒购于TIANGEN公司,MRP3、PXR、CPF、SH-PTP1、GAPDH抗体购于Santa Cruz公司,兔抗羊、鼠或兔IgG-HRP二抗购自Pierce Biotechnology公司,BCA蛋白定量试剂盒购和Supersingnal West Femto maximum sensitivity substrate Kit购于Pierce Biotechnology公司,RevertAid™ First strand cDNA Syntesis Kit购于Fermantas公司,2×*Taq* PCR MasterMix购于天根公司。MRP3、PXR、CPF、GAPDH由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和化合物诱导 HepG2细胞加入DMEM培养基和10%胎牛血清后,置37 ℃(含5% CO_2)孵箱培养,细胞贴壁85%~90%融合时用EDTA-胰酶(每1 000 ml含EDTA Na_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,以台盼蓝拒染试验测定细胞活率90%以上进行传代。当细胞融合生长至60%~80%密度时,用终浓度70 μmol/L的芒果苷(含DMSO 0.1%)加入含血清的培养液与HepG2细胞孵育72 h。冰冷PBS洗细胞2次后,收集HepG2细胞用于总RNA、总膜蛋白以及核蛋白的提取。阴性对照组用终浓度0.1%的DMSO处理HepG2细胞。阳性对照组用100 μmol/L UCDA(含DMSO 0.1%)处理细胞。

1.2.2 半定量RT-PCR 按Trizol试剂说明书提取HepG2细胞的总RNA。取1 μg总RNA按RevertAid™ First strand cDNA Syntesis Kit(Fermantas)说明书逆转录生成cDNA。PCR依照2×*Taq* PCR MasterMix(TIANGEN)说明书操作。MRP3上游引物5′-GATACGCTCGCCACAGTCC-3′,下游引物5′-CAGTTGCCGTGATGTGGCTG-3′;PXR上游引物:5′-AGAGCGGCATGAAGAAGGAGATG-3′,下游引物:5′-GAAATGGGAGAAGGTAGTGTCAAAGG-3′;CPF上游引物:5′-GCGTGGAGGAAGGAATAAGT-3′,下游引物:5′-GTCAGGTCAGAGGGCATAGC-3′;GAPDH上游引物:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游引物5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。实验重复3次。

1.2.3 Western blot检测 按照文献[8,13,14]方法提取细胞总膜蛋白以及核蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白样品与5×SDS上样缓冲液体(凯基公司)充分混匀。核蛋白样品100 ℃加热变性5 min,10 000×*g*离心1 min后使用。膜蛋白样品则不变性直接上样。核蛋白50 μg或总膜蛋白100 μg分别用12%或7.5% SDS-PAGE凝胶电泳分离,然后电湿转至PVDF膜(Millipore),用丽春红染色确定上样的均一性和电转移效率。用5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,然后加入一抗(MRP3 1∶1 000,PXR 1∶1 600,CPF 1∶1 200)4 ℃孵育过夜。TBST洗膜后,加入相应二抗(1∶50 000)于室温孵育1 h。TBST洗膜3次,每次10 min。最后PVDF膜与Supersingnal West Femto maximum sensitivity substrate于室温孵育反应5 min后,暗室用X线片压片。核受体PXR和CPF免疫印迹所用的同一PVDF膜上的免疫复合物经过洗脱(Stripped)以后,再与另外核蛋白SH-PTP1(酪氨酸磷酸酯酶)抗体孵育后Western blot检测,并以此条带作为内参照以确定上样量。X线扫描后,用Quntity-one图像分析软件测定目的条带的光密度值。实验重复3次。

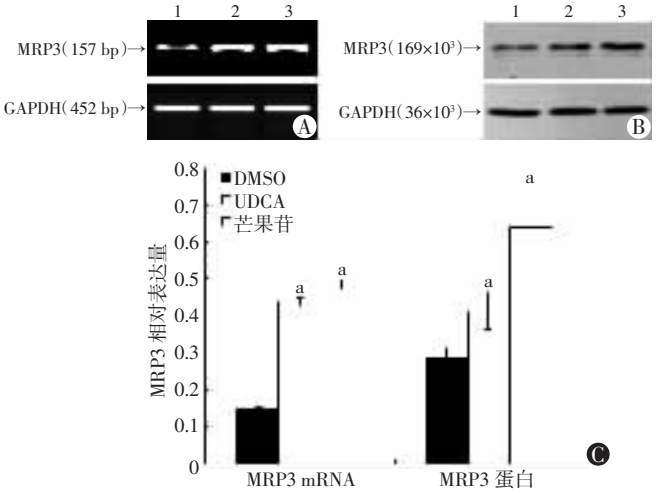
1.3 统计学方法

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

2 结果

2.1 芒果苷诱导HepG2肝癌细胞膜转运蛋白MRP3的表达

与DMSO对照组相比,芒果苷使MRP3 mRNA(3.0倍,$P<0.05$)和蛋白水平(3.3倍,$P<0.05$)的表达显著增高,且其对HepG2细胞MRP3表达的诱导作用明显强于利胆药物UDCA。Wesern blot检测发现MRP3条带为双带,是由于不同糖基化的原因。提示芒果苷能够显著诱导HepG2细胞膜转运蛋白MRP3的表达。见图1。



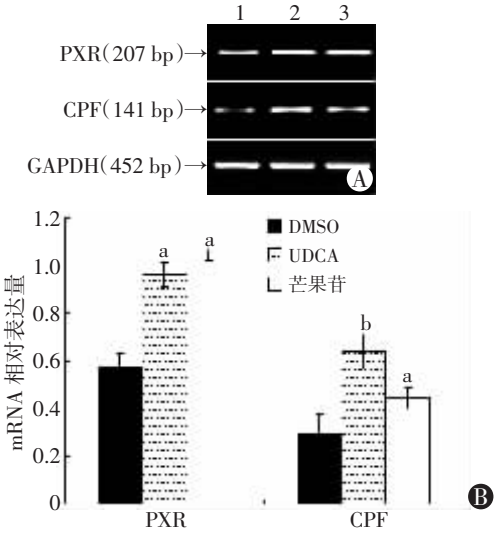
1:DMSO;2:UDCA;3:芒果苷

A:RT-PCR 检测 MRP3 mRNA 表达 B:Western blot 检测 MRP3 蛋白表达 C:MRP3 mRNA 蛋白半定量分析 a:$P<0.05$,与 DMSO 组比较

图1 RT-PCR 和 Western blot 检测芒果苷以及利胆药 UDCA 对 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 表达的影响

2.2 芒果苷上调 HepG2 细胞核受体 PXR 及 CPF 的表达

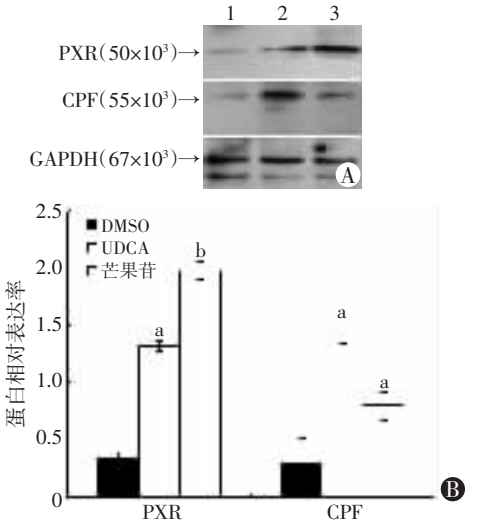
和阴性对照组相比,芒果苷可刺激核受体 PXR 显著增高(mRNA 水平增高 1.7 倍和蛋白水平增高 3.7 倍),而且其作用强于 UDCA 处理组。芒果苷也可显著上调 HepG2 细胞核受体 CPF 的表达(mRNA 水平增高 2.1 倍和蛋白水平增高 4.9 倍),但是其诱导核受体 CPF 表达的作用弱于 UDCA。提示芒果苷可使核受体 PXR、CPF 表达明显增加。见图 2、3。



1:DMSO;2:UDCA;3:芒果苷

A:RT-PCR 检测 PXR、CPF mRNA 表达 B:PXR、CPF mRNA 半定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 DMSO 比较

图2 RT-PCR 检测芒果苷以及利胆药 UDCA 对 HepG2 细胞核受体 PXR、CPF 表达的影响



1:DMSO;2:UDCA;3:芒果苷

A:Western blot 检测 PXR、CPF 蛋白表达 B:PXR、CPF 蛋白半定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 DMSO 比较

图3 Western blot 检测芒果苷以及利胆药 UDCA 对 HepG2 细胞核受体 PXR、CPF 表达的影响

3 讨论

MRP3(multidrug resistance protein3,ABCC3)为一种有机阴离子转运蛋白,分布于极性化肝细胞的基底侧,主要以胆汁酸、结合胆红素以及某些抗癌药物为底物[1-2,4-6]。在胆汁淤积状态下,MRP3 表达缺乏,则肝脏损伤明显加重[8]。因此,MRP3 在胆汁淤积性疾病中对保护肝细胞起极其重要的角色,其作用机制可能与 MRP3 将细胞内淤积的胆汁酸排泄至细胞外有关[7-9]。且有大量研究[4-6]发现,在正常生理情况下 MRP3 不表达或低表达。当胆汁淤积发生时,胆汁酸排泄的正常通路受阻,蓄积的胆酸盐可对肝细胞产生毒性作用。MRP3 表达上调,可使胆酸盐从肝细胞基底侧膜排到血液中,经肾脏排出体外,从而减少有毒物质的蓄积起到保护肝脏的作用。因此有效上调 MRP3 的表达成为胆汁淤积治疗的策略之一。利胆药物 UDCA 的作用靶点之一就是 MRP3[11-12]。我国特有珍稀药材藏茵陈长期用于治疗胆汁淤积性疾病(如急慢性黄疸肝炎)效果独特,芒果苷为其主要活性成分之一。其是否与 UDCA 一样,能有效刺激 MRP3 表达,从而发挥治疗胆汁淤积的作用成为本实验研究的重点。为此,本研究通过半定量 RT-PCR 以及 Western-blot 技术手段,探讨芒果苷对 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 表达的影响发现,芒果苷可显著刺激 HepG2 细胞膜 MRP3 蛋白的表达,其作用明显强于 UDCA。这可能为

寻求比UDCA更为有效的、用于治疗胆汁郁积症的临床药物的研究提供了重要线索。

目前，MRP3表达的调控机制尚不明确。研究发现多种核受体可能参与其调控[8-10,13-17]。核受体是一个复杂的超家族受体群体。在配体介导的转录和基因表达调节中起着十分重要作用。CPF是核受体超家族Ftz-Fl亚家族的成员，在肝脏和胰腺中高表达。胆道结扎的胆汁淤积动物模型研究表明，依赖肿瘤坏死因子上调的核受体CPF能够使MRP3的表达显著增加[8]。PXR是经典的激素和外来物质核受体，PXR在肝高表达，在肠和肾低表达。它可促进CYP3A基因表达，参与外来物质的解毒，激活MRP2，MRP3[8-10,14,17]等基因表达。亲水性胆汁酸盐UDCA和它的转化产物牛磺熊去氧胆酸（TUDCA）是PXR和CYP3A4的强刺激物。本研究用芒果苷刺激HepG2细胞，结果表明，核受体PXR、CPF表达也显著增加。本研究发现核受体PXR、CPF途径可能也参与了芒果苷上调MRP3表达。在MRP3表达增高的同时，核受体PXR、CPF表达也发生显著增加，与文献[8-10,14,17]报道的变化趋势一致。但是，芒果苷是否真通过PXR、CPF核受体途径刺激MRP3的表达，以及具体如何调控MRP3的表达有待进一步研究。本研究仅对芒果苷刺激HepG2细胞膜胆酸转运蛋白MRP3的表达做了初步探讨，其在原代肝细胞及动物体内的作用还有待于进一步研究。

本研究表明，芒果苷能够显著刺激HepG2细胞膜胆酸转运蛋白MRP3的表达，且MRP3的表达上调可能与核受体PXR、CPF途径相关。为芒果苷单体利胆退黄的功效提供一定理论支撑，并对开发和利用我国特有珍稀药材藏茵陈提供了重要线索。

参考文献：

[1] 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.

[2] Akita H, Suzuki H, Hirohashi T, *et al*. Transport activity of human MRP3 expressed in Sf9 cells: comparative studies with rat MRP3[J]. Pharm Res, 2002, 19(1): 34-41.

[3] Rau S, Autschbach F, Riedel H D, *et al*. Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human cholangiocellular carcinomas[J]. Eur J Clin Invest, 2008, 38(2): 134-142.

[4] Hasegawa Y, Kishimoto S, Takahashi H, *et al*. Altered expression of MRP2, MRP3 and UGT2B1 in the liver affects the disposition of morphine and its glucuronide conjugate in a rat model of cholestasis[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(9): 1205-1210.

[5] Csanaky I L, Aleksunes L M, Tanaka Y, *et al*. Role of hepatic transporters in prevention of bile acid toxicity after partial hepatectomy in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297(3): G419-G433.

[6] Liu Y H, Di Y M, Zhou Z W, *et al*. Multidrug resistance-associated proteins and implications in drug development[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(1): 115-120.

[7] Csanaky I L, Aleksunes L M, Tanaka Y, *et al*. Role of hepatic transporters in prevention of bile acid toxicity after partial hepatectomy in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297(3): G419-G433.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Teng S, Piquette-Miller M. Hepatoprotective role of PXR activation and MRP3 in cholic acid-induced cholestasis[J]. Br J Pharmacol, 2007, 151(3): 367-376.

[11] Corpechot C, Abenavoli L, Rabahi N, *et al*. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 2008, 48(3): 871-877.

[12] Lindor K D, Kowdley K V, Luketic V A, *et al*. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis [J]. Hepatology, 2009, 50(3): 808-814.

[13] Jiang H, Chen K, He J, *et al*. Association of pregnane X receptor with multidrug resistance-related protein 3 and its role in human colon cancer chemoresistance[J]. J Gastrointest Surg, 2009, 13(10): 1831-1838.

[14] Harmsen S, Meijerman I, Beijnen J H, *et al*. Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64(1): 35-43.

[15] 李琼，陈文生，罗东林，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2006，28(12)：1298-1301.

[16] 柴进，吴晓平，夏锋，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2009，31(2)：101-104.

[17] Stedman C A, Liddle C, Coulter S A, *et al*. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(6): 2063-2068.

（收稿：2010-09-21 修回：2010-10-22）
（编辑 龙 亮）