论著

文章编号:1000-5404(2012)24-2474-05

阻塞性肝胆汁淤积下转录因子NR5A2和SP1、胆酸转运蛋白MRP3与肝脏损伤的相关性

何孝崇[1],柴 进[2],何 宇[3],王槐志[3],陈文生[2] (400038 重庆,第三军医大学:护理系护理管理学教研室[1],西南医院全军消化病研究所[2],西南医院全军肝胆外科研究所[3])

[摘要] **目的** 研究阻塞性胆汁淤积下肝脏中转录因子NR5A2、SP1表达是否上调,以及其表达上调与胆酸转运蛋白MRP3基因的表达是否密切相关;MRP3表达上调是否具有减轻阻塞性胆汁淤积肝脏损伤的作用。**方法** 收集阻塞性胆汁淤积组(胆结石或肝内胆管结石引起的黄疸患者手术切除的肝脏)和正常对照组(排除肝脏疾病的活检肝组织及肝转移癌无黄疸的患者肝脏)肝脏样品各15例。采用半定量PCR和免疫荧光方法检测NR5A2、SP1基因的表达,利用独立样品t检验和线性回归分析阻塞性胆汁淤积肝组织样品中MRP3 mRNA表达上调是否与NR5A2或SP1呈正相关,以及MRP3表达上调与反映肝脏损伤的指标ALT、AST是否存在负相关性。HE染色观察胆汁淤积组肝细胞坏死程度和MRP3蛋白表达高低的关系。**结果** 阻塞性胆汁淤积肝脏中NR5A2和SP1 mRNA表达显著上调,其中NR5A2 mRNA增高3.7倍($P<0.01$),SP1 mRNA上升3.2倍($P<0.01$)。免疫荧光结果表明,阻塞性胆汁淤积组NR5A2和SP1蛋白表达也显著增加,NR5A2或SP1蛋白与胆酸转运蛋白MRP3 mRNA表达呈显著正相关(分别为$r^2=0.47$,$P<0.05$和$r^2=0.51$,$P<0.01$);MRP3蛋白表达与肝细胞坏死程度存在密切相关,并且MRP3蛋白表达量与ALT和AST均呈显著负相关(分别为$r^2=0.52$,$P<0.01$和$r^2=0.39$,$P<0.05$)。**结论** 人阻塞性胆汁淤积下NR5A2和SP1表达上调,可诱导胆酸转运蛋白MRP3的表达,而MRP3表达上调可能有减轻肝脏损伤的作用。

[关键词] 转录因子; NR5A2; SP1; MRP3; 胆汁淤积

[中图法分类号] R363;R394.2;R575 [文献标志码] A

Correlation of transcriptional factors NR5A2 and SP1, bile acids transporter MRP3 with liver injury in human obstructive cholestasis

He Xiaochong[1], Chai Jin[2], He Yu[3], Wang Huaizhi[3], Chen Wensheng[2] ([1]Department of Nursing Management, School of Nursing, [2]Institute of Gastroenterology, [3]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of transcriptional factors liver receptor homolog 1 (NR5A2) and specificity protein 1 (SP1) in obstructive cholestasis, explore their expression levels with that of multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3), and investigate the role of MRP3 in liver injury from the accumulation of toxic bile acids under cholestatic condition. **Methods** Live tissue samples from 15 patients with identified obstructive cholestasis and 15 control patients excluded liver diseases were collected. The expression of NR5A2 and SP1 was detected with RT-PCR and immunofluorescence staining. The correlation of the expression of MRP3 mRNA with the levels of NR5A2 and SP1, and with serum levels of ALT and AST were analyzed by liner regression. The correlation of the expression level of MRP3 protein and hepatic necrosis in human cholestasis (HE staining) was also studied. **Results** The expression levels of NR5A2 and SP1 were extremely increased in human cholestatic tissues, compared with normal controls (3.7-fold, $P<0.01$, and 3.2-flod, $P<0.01$, respectively). NR5A2 and SP1 were predominately expressed in the nucleus of cholestatic

[基金项目] 国家自然科学基金(30570842, 81100280)

[通信作者] 陈文生,电话:(023)68773055,E-mail:wenshengchen@hotmail.com

hepatocytes but not in that of normal controls. There was a significantly positive correlation of the expression levels of NR5A2 and SP1 proteins with hepatic MRP3 mRNA level in cholestatic tissues ($r^2 = 0.47$, $P < 0.05$, and $r^2 = 0.51$, $P < 0.01$, respectively). HE staining also indicated that hepatic necrosis was more severe in the tissue samples with elevated expression of MRP3 protein under cholestatic condition. There was a markedly negative correlation between MRP3 protein expression and serum ALT and AST levels ($r^2 = 0.52$, $P < 0.01$, and $r^2 = 0.39$, $P < 0.05$). **Conclusion** Hepatic NR5A2 and SP1 are upregulated in the liver tissue under cholestatic condition, which are positively correlated with the expression of MRP3. Meanwhile, the elevated MRP3 expression may alleviate the liver injury caused by the accumulation of toxic bile acids under cholestatic condition.

[**Key words**] transcriptional factors; NR5A2; SP1; MRP3; cholestasis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570842,81100280). Corresponding author: Chen Wensheng, Tel: 86-23-68773055, E-mail: wenshengchen@hotmail.com

多耐药相关蛋白3(multidrug resistance-associated protein 3, MRP3)属于ABC超家族(adenosine triphosphate-binding cassette transporter superfamily, ABC superfamily),广泛分布于人类和啮齿类动物的肝脏、肾脏、胆囊、肠道、肾上腺等器官或组织的极性化细胞,主要排泌胆汁酸、结合胆红素、雌激素、白三烯和各种药物[1-3]。胆酸转运蛋白MRP3是一种有机阴离子排泌泵,包含跨膜区和核甘酸结合域[1-3]。正常生理条件下,MRP3在极性化的肝细胞基底侧膜上低表达或不表达;而在肝内外胆管结石或胰头癌导致的梗阻性黄疸、Dubin-Johnson综合征、原发性毛细胆管性肝硬化等胆汁淤积疾病以及内毒素或四氯化碳诱导的胆汁淤积大鼠模型等肝脏中显著高表达,被认为是机体对抗肝细胞内毒性胆汁酸的极其重要的适应性反应之一[4-8]。HepG2细胞和动物实验的前期研究表明,转录因子NR5A2(liver receptor homolog 1/cytochrome P450 7A promoter-binding factor, LRH-1/CPF/NR5A2)和刺激蛋白SP1(stimulatory protein 1)能够上调胆酸转运蛋白MRP3表达[5,8-9]。研究还发现在阻塞性胆汁淤积肝脏NR5A2、SP1可能参与诱导MRP3的表达[8]。但是,在人阻塞性胆汁淤积状态下,MRP3 mRNA高表达是否通过NR5A2、SP1的上调来实现,以及高表达的MRP3蛋白是否具有减轻肝脏损伤的作用呢?本实验选取人肝组织样品各15例(对照组和阻塞性胆汁淤积组),半定量PCR和免疫荧光证明NR5A2和SP1是否在胆汁淤积肝脏中表达上调,线性回归统计分析阻塞性胆汁淤积肝脏中MRP3 mRNA表达上调与NR5A2或SP1蛋白是否存在正相关性,以及阻塞性胆汁淤积情况下MRP3蛋白的表达量是否与反应肝脏损伤的血清学指标ALT、AST水平存在负相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

肝组织样品来自2006年4月至2011年6月第三军医大学西南医院肝胆外科,其中阻塞性胆汁淤积组(15例)选取胆结石或肝内胆管结石引起的黄疸患者手术中切除的肝脏;对照组(15例)为肝组织活检无异常的肝脏和无黄疸的肝转移癌患者所分离的肝脏(表1)。本研究获得医院伦理委员会的同意,患者签署知情同意书。Trizol试剂、琼脂糖等购于Sigma公司,cDNA合成的逆转录试剂盒购于MBI公司,2×*Taq* PCR master mix购于天根公司,NR5A2/LRH-1、SP1、GAPDH引物于上海生工公司合成,NR5A2/LRH-1抗体购买于Abcam公司,SP1抗体、兔抗人或小鼠抗人的荧光二抗均购自Stanta Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 半定量聚合酶链反应 按Trizol试剂说明书提取正常对照组和阻塞性胆汁淤积组($n = 15$)肝组织总RNA,分光光度计(Bio-Rad公司)和甲醛变性琼脂糖电泳分别测定其浓度和纯化。取1 μg的总RNA按RevertAid first-strand cDNA synthesis Kit试剂盒说明书进行逆转录,将获得的cDNA样品冻于-20 ℃保存或用于半定量PCR检测。半定量PCR按照2×*Taq* PCR master mix操作说明书进行,用2%的琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物,最后用凝胶成像仪(Bio-Rad公司)观察和拍照。GAPDH上游引物:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游引物:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,片段大小452 bp。NR5A2上游引物:5′-GCGTGGAGGAAGGAATAAGT-3′,下游引物:5′-GTCAGGTCAGAGGGCATAGC-3′,片段大小141 bp;MRP3、SP1引物见参考文献[8],MRP3上游引物:5′-AAAAGCAGACGGCACGACA-3′,下游引物:5′-GCAGGCACTGATGAGGAAGC-3′,片段大小158 bp;SP1上游引物:5′-GCCGCTCCCAACTTACAGAA-3′,下游引物:5′-CCCATCAACGGTCTGGAACT-3′,片段大小102 bp。Quantity-one图像分析软件测定目的条带的光密度值。实验至少重复3次。

表1 研究对象的临床资料

组别	n	(男/女)	年龄(岁)	总胆红素(μmol/L)	直接胆红素(μmol/L)	间接胆红素(μmol/L)	总胆汁酸(μmol/L)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
对照组	15	15(9/6)	51±10	13.5±1.4	4.6±1.5	8.9±4.2	3.7±2.8	27.3±11.0	25.7±8.1
阻塞性胆汁淤积组	15	15(5/10)	50±11	197.2±151.1[a]	108.9±99.0[a]	88.3±69.6[a]	77.9±68.5[a]	208.4±277.6[b]	229.3±318.5[b]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与对照组比较

1.2.2 免疫荧光检测 将新鲜正常对照组与阻塞性胆汁淤积组肝脏组织样品制作成6~8 μm冰冻切片,立即使用或放入-80 ℃冰箱保存备用。取出切片,冰丙酮固定肝组织冰冻切片30 min后,0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗3次,每次10 min。然后使用0.4% Triton X-100/0.01 mol/L PBS浸泡30 min。0.01 mol/L PBS漂洗3次(每次10 min)后,加山羊血清封闭30 min。待0.01 mol/L PBS洗涤10 min后,分别加入一抗NR5A2(1∶50)或SP1(1∶100)于4 ℃过夜(18~24 h),对照只加一抗稀释液,省略一抗。最后用0.01 mol/L PBS漂洗3次,并加入FITC标记的相对应的荧光二抗,37 ℃孵育60 min。待0.01 mol/L PBS漂洗3次(每次10 min)后,中性树胶封片,并于激光共聚焦下观察。

1.3 HE染色

肝脏新鲜样品剪成小块,用4%多聚甲醛固定后,用石蜡包埋切片。二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ先后脱蜡5 min,再分别用95%酒精、80%乙醇处理。苏木精染色5 min后,用1%盐酸酒精分化20 s、稀氨水反蓝30 s。伊红染色5 min。95%乙醇、无水乙醇处理后,用二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ、二甲苯Ⅲ分别处理2 min。切片用中性树胶封片,然后显微镜下照相。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件行独立样本的 t 检验和线性回归分析。

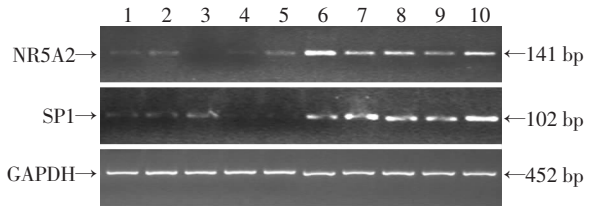
2 结果

2.1 转录因子NR5A2和SP1在人阻塞性胆汁淤积肝脏样品中表达上调

通过半定量聚合酶链反应检测发现,与对照组相比,阻塞性胆汁淤积组NR5A2和SP1 mRNA的表达均显著增加。其中,NR5A2 mRNA在阻塞性胆汁淤积组表达量为(1.27±0.51),与对照组表达量(0.34±0.14)比较,上调约3.7倍($P<0.01$,图1);SP1 mRNA在阻塞性胆汁淤积组表达量为(1.51±0.45),和对照组表达量(0.47±0.12)相比,增加约3.2倍($P<0.01$,图1)。同时,免疫荧光检测发现,NR5A2蛋白在阻塞性胆汁淤积组肝细胞核内表达的荧光强度要比对照组显著(图2A、B),SP1蛋白表达也显著增加(图2C、D)。提示,人阻塞性胆汁淤积情况下肝脏NR5A2和SP1基因表达显著上调。

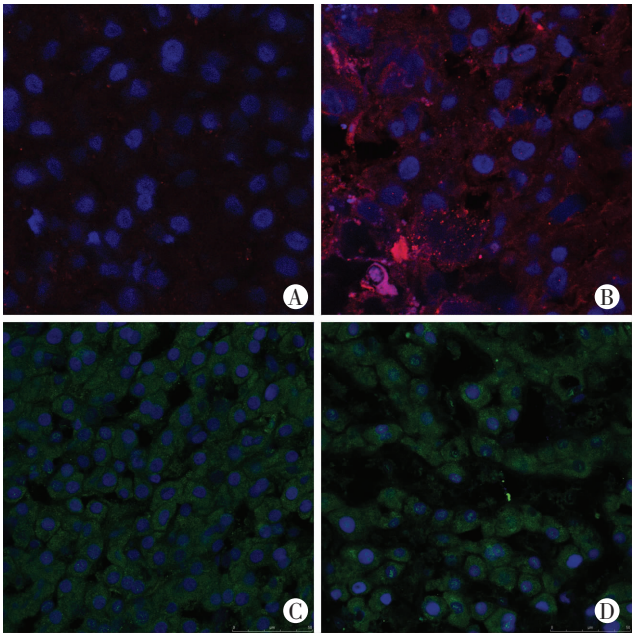
2.2 人阻塞性胆汁淤积肝脏中胆酸转运蛋白MRP3 mRNA表达上调与转录因子NR5A2、SP1的表达呈显著正相关

半定量聚合酶链反应发现,MRP3 mRNA在阻塞性胆汁淤积组表达量为(1.89±0.47),与对照组表达量(0.48±0.18)比较,增加约3.9倍(图3)。经统计学分析,阻塞性胆汁淤积组中,转录因子NR5A2蛋白与胆酸转运蛋白MRP3 mRNA表达呈显著正相关($r^2=0.47$, $P<0.05$,图4A)。同时,阻塞性胆汁淤积肝组织SP1蛋白与胆酸转运蛋白MRP3 mRNA表达也存在显著正相关($r^2=0.51$, $P<0.01$,图4B)。说明人阻塞性胆汁淤积组肝脏NR5A2、SP1的上调可能诱导胆酸转运蛋白MRP3基因的表达。



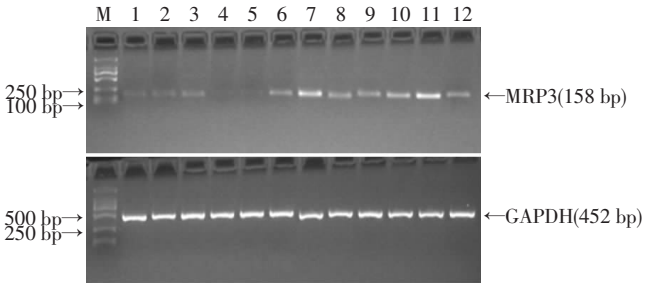
1~10:阻塞性胆汁淤积组肝脏样本

图1 RT-PCR检测肝脏中转录因子NR5A2和SP1基因的表达



A、C:对照组NR5A2、SP1蛋白表达;B、D:阻塞性胆汁淤积组NR5A2、SP1蛋白表达

图2 免疫荧光检测肝脏中转录因子NR5A2和SP1基因表达 (×400)



M:DNA标准;1~6:对照组;7~12:阻塞性胆汁淤积组

图3 RT-PCR检测肝脏肝组织胆酸转运蛋白MRP3基因的表达

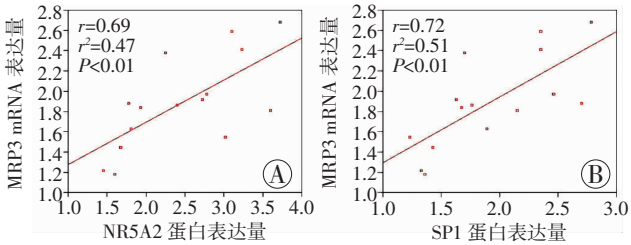


图 4　转录因子 NR5A2(A)、SP1(B)蛋白表达与胆酸转运蛋白 MRP3 mRNA 表达的线性回归分析

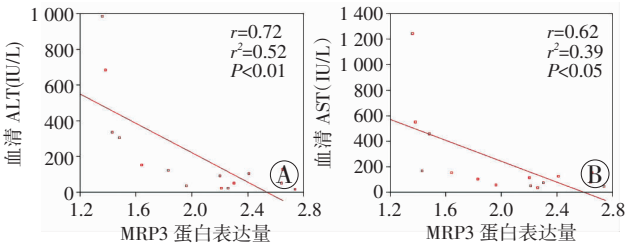
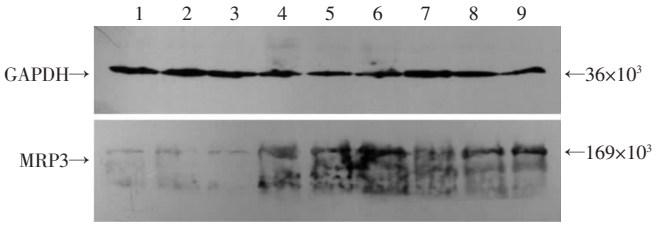


图 7　肝脏胆酸转运蛋白 MRP3 表达与血清学指标 ALT(A)、AST(B)的线性回归分析

2.3　胆酸转运蛋白 MRP3 表达上调减轻肝脏损伤

在胆汁淤积情况下 MRP3 表达虽然均显著增高，但是存在一定的个体差异(图 5)，同时发现胆汁淤积情况下肝脏坏死的情况也存在差异。对肝脏组织进行 Western blot 和 HE 染色后发现，MRP3 蛋白高表达的胆汁淤积肝脏损伤情况要远轻于 MRP3 表达相对较低的胆汁淤积肝脏(图 6)。这说明胆汁淤积情况下，MRP3 表达的高低可能与胆汁淤积下肝脏损伤密切相关。



1～4：对照组；5～9：阻塞性胆汁淤积组

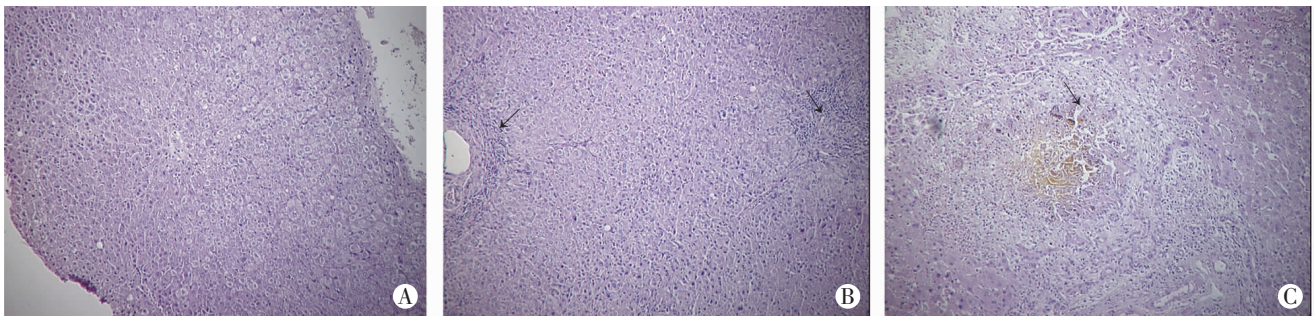
图 5　Western blot 检测肝脏肝组织胆酸转运蛋白 MRP3 蛋白的表达

对肝脏 MRP3 蛋白表达量与阻塞性胆汁淤积患者中反应肝脏损伤的血清指标 ALT、AST 的水平进行线性回归统计学分析，结果表明，在阻塞性胆汁淤积患者中，血清学指标 ALT 水平与肝脏 MRP3 蛋白表达量呈显著负相关($r^2 = 0.52$，$P < 0.01$，图 7A)。血清学指标 AST 也与肝脏 MRP3 蛋白表达量呈明显负相关($r^2 = 0.39$，$P < 0.05$，图 7B)。说明在人阻塞性胆汁淤积状态下肝脏 MRP3 的高表达可能具有减轻肝脏损伤的作用。

3　讨论

MRP3 属于 MRPs 家族，是一种含有 ATP 结合域的胆酸转运蛋白，以胆汁酸、结合胆红素等为底物，广泛分布于肝细胞、肠黏膜上皮细胞和肾小管上皮细胞等极性化细胞膜[1-3]。在肝脏，胆酸转运蛋白 MRP3 定位于极性化肝细胞的基底侧膜，生理状态下低表达或不表达，而在胆汁淤积状态下高表达，被认为是保护肝脏的自我适应[4-7]。我们前期已报道，胆酸转运蛋白 MRP3 在人阻塞性胆汁淤积肝脏表达显著增高，其表达上调可能与 NR5A2 和 SP1 的表达上调有关[5,8-9]。为此，本实验首先证明 NR5A2 和 SP1 在人阻塞性胆汁淤积肝脏中表达上调，然后统计分析其表达上调与 MRP3 基因表达之间的关系，以进一步阐释人胆汁淤积下 MRP3 表达上调的分子机制。

本研究半定量 PCR 结果表明，NR5A2 和 SP1 mRNA 在胆汁淤积肝脏中显著增加。免疫荧光结果也表明，与对照组比较，NR5A2 和 SP1 蛋白在胆汁淤积肝细胞核内显著增加。说明人阻塞性胆汁淤积下，NR5A2 和 SP1 表达显著增加，这与我们前期的研究结果一致[8]。为了验证在胆汁淤积状态下 NR5A2 和 SP1 表达上调是否与肝脏胆酸转运蛋白 MRP3 mRNA 表达密切相关，我们利用线性回归统计学方法分析肝脏 NR5A2 或



A：对照组；B：MRP3 高表达胆汁淤积组　↑：肝细胞坏死区域；C：MRP3 相对低表达胆汁淤积组　↑：肝细胞坏死区域

图 6　HE 染色观察各组肝脏肝细胞坏死的病理变化　(×200)

SP1蛋白与胆酸转运蛋白MRP3 mRNA之间的相关性。结果发现,在阻塞性胆汁淤积组肝脏样品中,不仅NR5A2蛋白与胆酸转运蛋白MRP3 mRNA表达呈显著正相关,而且SP1蛋白亦与胆酸转运蛋白MRP3 mRNA表达明显正相关。这些统计分析结果说明,在阻塞性胆汁淤积状态下,肝脏NR5A2和SP1基因的上调可能诱导胆酸转运蛋白MRP3 mRNA的表达。此实验结果为人阻塞性胆汁淤积下MRP3表达上调的分子机制提供了一定的理论依据。新近动物实验或细胞水平的研究也表明,核受体蛋白PXR(pregnane X receptor)、CAR(constitutiveactive/androstane receptor)、Nrf2(nuclear factor-like 2)等也具有上调MRP3基因表达的作用[10-14],但是其结果是否也适用于人阻塞性胆汁淤积疾病仍需进一步研究。

动物实验研究表明,在胆汁淤积状态下,MRP3的高表达被普遍认为是机体自我产生的、起保护作用的适应性反应机制,可能具有减轻肝脏损伤的作用[8]。但是,此论点在人类胆汁淤积疾病中尚缺乏相关证据。据此,我们利用线性回归统计学方法分析阻塞性胆汁淤积病人肝脏MRP3蛋白的表达量与反应肝脏损伤的血清学重要指标ALT、AST之间是否具有相关性。结果表明,在胆汁淤积状态下,肝脏MRP3蛋白的表达量不但与血清指标ALT水平存在显著负相关,而且也与AST水平存在显著负相关。换言之,在胆汁淤积状态下,肝脏MRP3表达量越高,则血清肝损伤指标ALT、AST水平越低,即肝脏损伤程度越轻。同时,免疫组织化学实验结果也证明,在人阻塞性胆汁淤积状态下MRP3表达量与肝细胞坏死程度密切相关。以上结果说明,阻塞性胆汁淤积状态下肝脏MRP3的高表达可能具有减轻肝脏损伤的作用,其机制可能为肝细胞基底侧膜MRP3蛋白的高表达有利于将胆汁淤积肝细胞内积聚的胆汁酸排泌至血液,最后经由肾脏排泄至体外,以减少毒性胆汁酸在肝细胞内的积聚,从而达到减轻肝脏损伤的作用[1-8]。

总之,目前的实验结果表明,人阻塞性胆汁淤积下肝脏NR5A2和SP1表达显著增加,并可能参与了MRP3基因的高表达的调控。同时还发现,MRP3的高表达与肝细胞坏死程度存在负相关,说明MRP3高表达可能在阻塞性胆汁淤积条件下具有减轻肝脏损伤的作用,这为以后临床治疗胆汁淤积疾病提供了新的治疗靶点和重要线索。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] Keppler D. Cholestasis and the role of basolateral efflux pumps[J]. Z Gastroenterol, 2011, 49(12): 1553-1557.

[4] Schaap F G, van-der-Gaag N A, Gouma D J, *et al*. High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis[J]. Hepatology, 2009, 49(4): 1228-1235.

[5] 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.

[6] Zollner G, Fickert P, Silbert D, *et al*. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis[J]. J Hepatol, 2003, 38(6): 717-727.

[7] Donner M G, Warskulat U, Saha N, *et al*. Enhanced expression of basolateral multidrug resistance protein isoforms Mrp3 and Mrp5 in rat liver by LPS[J]. Biol Chem, 2004, 385(3/4): 331-339.

[8] Chai J, He Y, Cai S Y, *et al*. Elevated hepatic multidrug resistance-associated protein 3/ATP-binding cassette subfamily C 3 expression in human obstructive cholestasis is mediated through tumor necrosis factor alpha and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase-signaling pathway[J]. Hepatology, 2012, 55(5): 1485-1494.

[9] Chen W, Cai SY, Xu S, *et al*. Nuclear receptors RXRalpha: RARalpha are repressors for human MRP3 expression[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(5): G1221-G1227.

[10] Jigorel E, Le-Vee M, Boursier-Neyret C, *et al*. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes[J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(10): 1756-1763.

[11] Mennone A, Soroka C J, Harry K M, *et al*. Role of breast cancer resistance protein in the adaptive response to cholestasis[J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38(10): 1673-1678.

[12] 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.

[13] 江恒, 陈健, 陈克力, 等. 沉默孕烷X受体增强结肠癌LS174T细胞对奥沙利铂敏感性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(1): 5-8.

[14] 张艳梅, 柴进, 阳勇, 等. 芒果苷上调HepG2细胞膜蛋白MRP3和核受体PXR、CPF表达[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(3): 246-249.

(**收稿**:2012-08-24;**修回**:2012-11-06)

(编辑 王 红)