论著

文章编号:1000-5404(2014)10-1008-04

川西獐牙菜醇提物上调 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3、核转录因子 SP1 及核受体 CPF、PXR 表达

刘 畅,李绍雪,高 宇,柴 进,张 全,陈文生 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 体外培养 HepG2 细胞观察川西獐牙菜醇提物(*Swertia mussitii Franch*)对多药耐药相关蛋白 3(multidrug resistance protein 3, MRP3)、核转录因子 SP1(specificity protein 1 transcription factor, SP1)及核受体孕烷 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 MTT 比色法检测川西獐牙菜醇提物的最佳作用浓度,再分别于 0、12、24、48、72h 刺激 HepG2 细胞,抽提细胞的 RNA、总蛋白和核蛋白,采用荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹技术检测膜转运蛋白 MRP3、转录因子 SP1 及核受体 PXR、CPF 在转录与蛋白水平的表达变化。每个时间点设立阴性对照 DMSO 组和阳性对照熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid,UDCA)组。**结果** 川西獐牙菜醇提物可显著诱导 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 的 mRNA 和蛋白水平的高表达,其作用强于 UDCA($P<0.05$)。川西獐牙菜醇提物也可明显上调核转录因子 SP1 及核受体 PXR 的 mRNA 和蛋白表达水平,作用强于 UDCA。对 CPF 表达的上调作用与 UDCA 相当($P<0.05$)。**结论** 川西獐牙菜醇提物可刺激 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 上调,且有可能是通过核转录因子 SP1 及核受体 PXR、CPF 上调其表达。

[关键词] 熊去氧胆酸;川西獐牙菜醇提物;多药耐药相关蛋白 3;核转录因子 SP1;CYP7A 启动子结合因子;核受体孕烷 X 受体

[中图法分类号] R282.71;R322.47;R394.3 [文献标志码] A

Alcohol extract of *Swertia mussitii Franch* upregulates membrane protein MRP3, nuclear transcription factor SP1 and nuclear receptors PXR and CPF in HepG2 cells

Liu Chang, Li Shaoxue, Gao Yu, Chai Jin, Zhang Quan, Chen Wensheng (Institute of Gastroenterology of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[**Abstract**] Objective To observe the impact of alcohol extract *Swertia mussitii Franch* on the expression of multidrug resistance protein 3 (MRP3), specificity protein 1 transcription factor (SP1), pregnane X receptor (PXR) and CYP7A promoter-binding factor (CPF) in HepG2 cells. Methods The optimal concentration of the alcohol extract used to stimulate HepG2 cells was determined by MTT assay. Then, total RNA, membrane protein and nuclear protein were extracted from HepG2 cells at 0, 12, 24, 48 and 72 h after co-cultured with the alcohol extract. The expression of MRP3, SP1, PXR and CPF at mRNA and protein levels were detected using real-time PCR and Western blotting, respectively. Results The upregulation of MRP3 was significantly induced by the alcohol extract at mRNA and protein levels, which was more efficient than that by ursodeoxycholic acid (UDCA). The expression of SP1 and PXR at mRNA and protein levels was elevated by the alcohol extract, which was also more efficient than that by UDCA. The expression of CPF was also increased by the alcohol extract at mRNA and protein levels, which was similar to that of UDCA. Conclusion Our alcohol extract upregulates the expression of MRP3 in HepG2 cells, possibly involving the activities of SP1, PXR and CPF.

[**Key words**] ursodeoxycholic acid; *Swertia mussotii Franch*; specificity protein 1 transcription factor; CYP7A promoter-binding factor; pregnane X receptor; multidrug resistance protein 3

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81100280), the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing of Science and Technology (CSTC2012jjB0079) and the Tackling Project of Chongqing Commission (CSTC2010AB5068). Corresponding author: Chen Wensheng, Tel:86-23-68765183, E-mail:yy630917@126.com.

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81100280);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2012jjB0079);重庆市科委攻关课题(CSTC2010AB5068)

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

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0953.009.html(2014-03-28)

川西獐牙菜(*Swertia mussitii Franch*)是传统藏药之一,系龙胆科獐牙菜属植物,亦称"藏茵陈",主要分布于青海、西藏、云南和四川西部1 900~3 800 m的高原地区,2年生草本植物,全草入药,有利胆退黄的奇效,临床上用于治疗急慢性黄疸性肝炎等胆汁淤积性疾病[1]。前期我们在胆汁淤积动物模型中发现,川西獐牙菜可显著减轻肝损伤,降低胆汁酸、总胆红素、碱性磷酸酶、门冬氨酸氨基转移酶和丙氨酸氨基转移酶等指标,但其调节机制尚不明确[2]。多药耐药相关蛋白3(multidrug resistance protein 3,MRP3)是有ATP结合域的MRP(ABCC)超家族中的一员是位于肝细胞基底外侧膜面最重要的胆汁酸转运蛋白,当肝脏出现胆汁淤积时MRP3代偿性增高,有利于胆汁酸、胆红素等有毒物质及时排出肝细胞,在胆汁淤积状态下对保护肝细胞起关键作用[3-4]。MRP3基因敲除的胆道结扎小鼠中,肝细胞胆汁酸含量和肝损伤程度明显高于正常的胆道结扎小鼠[3]。研究表明,MRP3的上调可能与核转录因子SP1(specificity protein 1 transcription factor,SP1)及核受体孕烷X受体(pregnane X receptor,PXR)、CYP7A启动子结合因子(CYP7A promoter-binding factor,CPF)表达增高有关[5-8]。所以,MRP3强大的促进胆汁酸排泌的作用及其继发性的调控机制使其可成为治疗胆汁淤积的药物靶标。本研究运用Western blot和荧光定量PCR等实验技术,观察川西獐牙菜醇提物对HepG2细胞膜转运蛋白MRP3表达情况,以及与其调控密切相关的SP1、PXR、CPF等表达的影响,探讨川西獐牙菜醇提物对胆汁淤积的临床治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人肝癌细胞HepG2细胞(中科院上海细胞库),胎牛血清(FBS)、1640培养基(HyClone,美国),川西獐牙菜醇提物(川西獐牙菜采自青海省玉树藏族自治州,醇提物由重庆市中药研究所提供)提取方法见文献[1],MTT(碧云天生物科技研究所),UDCA(Sigma,美国),Trizol试剂(Invitrogen,美国),反转录和荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa,美国),MRP3抗体(ABCAM,美国),PXR、CPF、SP1、SH-PTP1抗体均购自Santa Cruz公司,GAPDH抗体(碧云天生物技术研究所),山羊抗兔、山羊抗鼠二抗(北京中杉新桥科技有限公司),BCA蛋白定量试剂盒(Thermo,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞存活率实验 细胞悬液接种于96孔板,每孔200 μL,细胞数为3 000~5 000/孔,每组设6个复孔。待细胞贴壁后加入等体积含有不同浓度药物浓度分别为(25、50、75、100、125、150、175 mol/L)的培养基。设立阴性对照组外,同时设空白对照组(无细胞组),目的是除外药物本身对光密度值的影响。分别培养0、12、24、48、72 h后加入浓度为5 mg/mL的无菌MTT(20 μL/孔),继续培养4 h后弃去培养基,每孔各加150 μL DMSO,振荡10 min后在自动酶联免疫分析仪上测定490 nm波长处的光密度值[$D(490)$]。运用计算公式抑制率=$1-D(490)_{加药组}/D(490)_{对照组}$得出每组的抑制率。

1.2.2 细胞培养及药物处理 在37 ℃含5% CO_2孵箱中,用10%胎牛血清的1640培养基培养HepG2细胞。待细胞生长密度达到60%~70%时,用2%低血清的培养液饥饿处理12 h,再加入川西獐牙菜醇提物(终浓度50 mol/L),孵育0、12、24、48、72 h。阴性对照组加入终浓度为0.1%的DMSO。阳性对照组加入终浓度为100 mol/L(含DMSO 0.1%)的UDCA。提取总蛋白及核蛋白的方法参照文献[4]。

1.2.3 Real-time PCR检测各指标mRNA水平表达情况 先按照Trizol试剂说明书提取总RNA,再将总RNA按PrimeScript™ RT reagent Kit with cDNA Eraser说明书(TaKaRa,美国)反转录成cDNA。荧光定量PCR按SYBR® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ说明书(TaKaRa,美国)操作。参照文献[4]的方法设置反应体系及循环条件,设计引物序列参照文献[4,9]。引物序列:MRP3(157 bp)上游:5′-AAAAGCAGACGGCACGACA-3′,下游:5′-GCAGGCACTGATGAGGAAGC-3′;SP1(821 bp)上游:5′-GCGTGGAGGAAGGAATAAGT-3′,下游5′-GTCAGGTCAGAGGGCATAGC-3′;PXR(117 bp)上游:5′-AGAGCGGCATGAAGAAGGAGATG-3′,下游:5′-GAAATGGGAGAAGGTAGTGTCAAAGG-3′;CPF(149 bp)上游:5′-GCGTCCAGGAAGGAATAAGT-3′,CPF下游:5′-GTCAGGTCAGAGGGCATAGC-3′;GAPDH(224 bp)上游:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。

1.2.4 Western blot检测各指标蛋白表达情况 按文献[4]的方法提取细胞总蛋白以及核蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品与5×SDS上样缓冲液按4∶1的比例充分混匀。核蛋白样品100 ℃加热变性5 min,10 000 r/min离心1 min后使用。总蛋白样品不必变性,直接上样。核蛋白30 μL和总蛋白50 μL用10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,电湿转至PVDF膜。用5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,然后加入一抗(MRP3 1∶2 000,SP1 1∶1 600,PxP 1∶1 200,CPF 1∶1 200)4 ℃孵育过夜。TBST洗膜后,加入相应二抗1∶500室温封闭2 h,TBST洗膜4次,每次20 min。条带上的免疫复合物经化学发光显色,凝胶成像仪成像。采用Quantity-One软件对条带的光密度值进行分析,蛋白的相对定量结果以实验条带光密度值/GAPDH或SHPTP1条带光密度值表示。

1.3 统计学方法

用SPSS 13.0统计软件进行数据处理。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,各组间组内比较采多因素方差分析。

2 结果

2.1 浓度为50 mol/L的川西獐牙菜醇提物对HepG2细胞增殖无明显影响

如图1所示,川西獐牙菜醇提物在浓度为25~50 mol/L时,对细胞生存率影响不大,所以我们选取浓度为50 mol/L的药物来处理细胞。

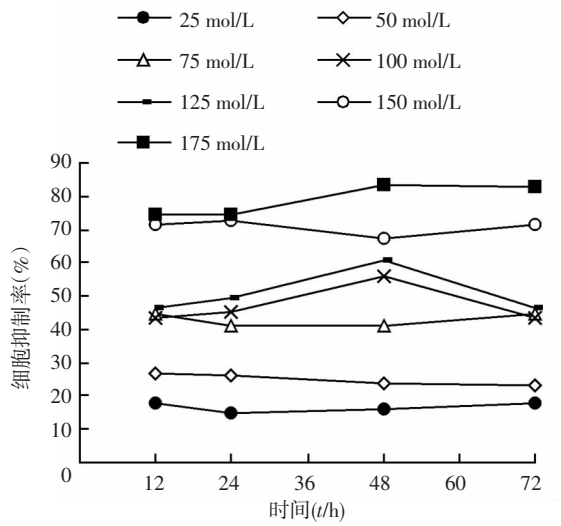
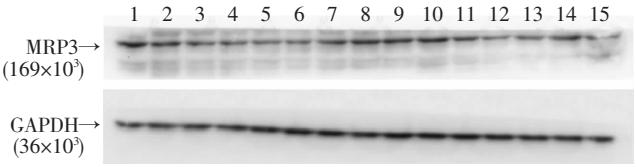


图1 不同浓度的川西獐牙菜醇提物对 HepG2 细胞的抑制率比较 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

2.2 川西獐牙菜醇提物可显著上调 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 的表达

结果见图2。与阴性对照组相比,川西獐牙菜醇提物使MRP3 mRNA(24、48、72 h 分别增高 0.68、1.46、2.10 倍,$P<0.05$)和蛋白水平(24、48、72 h 分别增高 1.20、1.19、1.55 倍,$P<0.05$)的表达显著上调且有时间依赖性,其对 HepG2 细胞 MRP3 表达的诱导作用明显强于利胆药熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)。提示川西獐牙菜醇提物能显著诱导 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 的表达,作用明显强于 UDCA。



1~5:DMSO 处理组;6~10:川西獐牙菜醇提物处理组;11~15:UDCA 处理组;1、6、11:0 h;2、7、12:12 h;3、8、13:24 h;4、9、14:48 h;5、10、15:72 h

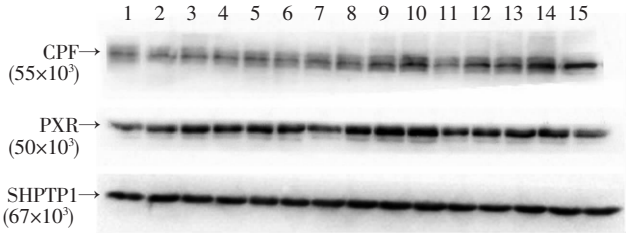
图2 Western blot 检测川西獐牙菜醇提物及利胆药 UDCA 各时间点对 HepG2 膜转运蛋白 MRP3 表达的影响

2.3 川西獐牙菜醇提物可明显上调核受体 PXR 和 CPF 的表达

结果见图3。与阴性对照组相比,川西獐牙菜醇可刺激核受体 PXR 的 mRNA(24、48、72 h 分别增高 1.00、2.12、2.13 倍,$P<0.05$)和蛋白(24、48、72 h 分别提高 0.59、0.79、0.61 倍,$P<0.05$)水平高表达,而且其作用强于 UDCA 组。川西獐牙菜醇提物也可上调核受体 CPF 表达(mRNA 在 72 h 增高 0.75 倍,蛋白水平在 48、72 h 分别增高 0.99、0.89 倍,$P<0.05$),但其作用略低于 UDCA。提示川西獐牙菜醇提物可使核受体 PXR、CPF 表达明显增加,且对 PXR 的刺激作用高于 UDCA。

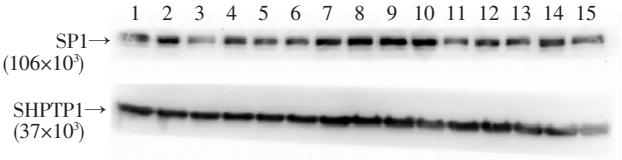
2.4 川西獐牙菜醇提物可显著刺激 HepG2 细胞核转录因子 SP1 的表达

结果见图4。Real-time PCR 与 Western blot 结果显示,与 DMSO 处理组相比,川西獐牙菜醇提物可显著诱导 SP1 mRNA(24、48、72 h 分别增高 1.31、1.32、1.13 倍,$P<0.05$)和蛋白(24、48、72 h 分别增高 0.74、0.79、1.1 倍,$P<0.05$)水平高表达,且作用明显强于 UDCA。



1~5:DMSO 处理组;6~10:川西獐牙菜醇提物处理组;11~15:UDCA 处理组;1、6、11:0 h;2、7、12:12 h;3、8、13:24 h;4、9、14:48 h;5、10、15:72 h

图3 Western blot 检测川西獐牙菜醇提物及利胆药 UDCA 各时间点对 HepG2 细胞核受体 PXR、CPF 表达的影响



1~5:DMSO 处理组;6~10:川西獐牙菜醇提物处理组;11~15:UDCA 处理组;1、6、11:0 h;2、7、12:12 h;3、8、13:24 h;4、9、14:48 h;5、10、15:72 h

图4 Western blot 检测川西獐牙菜醇提物及利胆药 UDCA 各时间点对 HepG2 细胞核转录因子 SP1 表达的影响

3 讨论

胆汁淤积是由胆汁生成障碍或/和胆汁流动障碍所致的一组疾病共同的临床症状,是导致肝细胞损伤、肝功能衰竭的主要因素。目前临床上治疗胆汁淤积的药物非常有限,UDCA 虽然被广泛使用,但疗效个体差异大,总体疗效并不理想,且副作用较大。因此,寻求一种更为有效且安全的治疗胆汁淤积的药物成为亟待解决的难题。川西獐牙菜是传统的珍稀藏药,长期用于缓解肝损伤,近年来发现对胆汁淤积症也有疗效,但其作用机制尚未明确。

MRP3 是一种诱导型有机阴离子转运蛋白,大部分位于肝细胞基底侧膜,是运送胆红素、胆盐和雌激素等物质的重要载体,在胆汁淤积时对保护肝细胞起关键作用[9]。正常生理状态下,MRP3 表达量很低,但在胆汁淤积的状况下, MRP3 发生适应性代偿性增高,可使毒性的胆酸从肝细胞基底侧膜向血液中排泄,减轻胆酸聚集造成的肝细胞损伤[10]。前期我们在胆汁淤积大鼠模型中发现,川西獐牙菜醇提物可以使血清肝损伤指标 ALT、AST 水平下降,降低胆汁酸水平,缓解肝脏损伤,但是其调节机制尚不明确[2]。为此,本研究选用经典的被公认的 HepG2 细胞系,并以目前临床

治疗淤胆的常用药物 UDCA 为阳性对照组,发现川西獐牙菜醇提物能显著提高 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 mRNA 和蛋白表达水平,且效果明显优于 UDCA。提示川西獐牙菜醇提物是 MRP3 激动剂,且作用强于 UDCA。

目前,MRP3 表达的调控机制尚不十分明确。研究表明,核受体 PXR、CPF 和核转录因子 SP1 参与诱导 MRP3 的表达[11-12]。转录因子 SP1 是一种 DNA 结合蛋白,可与 MRP3 启动子区 GC/TC 盒特异性结合,使 MRP3 表达增高[13]。核受体超家族是一组配体激活的转录因子家族,对肝脏的转录调控和内外源物质的新陈代谢起重要作用。PXR 是调控内源性胆汁酸和外源性药物的经典核受体之一,参与多种内外源化学物的解毒酶类、代谢转运体的调节和胆汁酸的排泄,PXR 表达增高在诱导 MRP3 表达中起重要作用,同时与 SP1 表达呈正相关[12-14]。CPF 是 MRP3 的启动子,可上调 MRP3 的表达[14]。同时 CPF 可作为 SP1 的配体,增高其表达[15]。胆道结扎大鼠模型中,炎症因子 TNF-α 可刺激核受体 CPF(大鼠 LRH-1)表达而上调 MRP3/Mrp3 的表达[4,15]。

本研究发现川西獐牙菜醇提物可显著诱导核受体 CPF、PXR 和核转录因子 SP1 mRNA 和蛋白水平高表达。川西獐牙菜醇提物对核受体 PXR 和核转录因子 SP1 的上调作用明显强于 UDCA。核受体 CPF、PXR 及核转录因子 SP1 增高的同时,MRP3 表达明显上调,这也与文献[4,8]报道一致,提示 MRP3 增高可能是通过 SP1、PXR、CPF 的表达上调起作用。但是,川西獐牙菜醇提物上调 MRP3 表达是否通过增高 CPF、PXR、SP1 而实现还有待进一步研究。川西獐牙菜醇提物是否还通过其他途径参与胆汁酸的调节也有待深层次的发现。虽然川西獐牙菜醇提物可在体外培养细胞中刺激 CPF、PXR、SP1 高表达,但动物水平的作用还有待进一步的探索。但可以确定的是,在细胞水平,川西獐牙菜醇提物可有效促进转运蛋白 MRP3、核转录因子 SP1、核受体 CPF 及 PXR 的表达,这些因子均可参与肝脏对胆汁淤积的解毒作用,诱导淤积的毒性胆汁酸从肝细胞内向胆小管排泄,汇入肝的左右胆管,进入肝肠循环或直接进入肾脏排出体外,从而减轻毒性胆汁酸积聚肝细胞而造成的肝损伤。

综上所述,川西獐牙菜醇提物可显著诱导 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3、核转录因子 SP1、核受体 PXR 及 CPF 表达增高,且 MRP3 表达增高可能与 SP1、CPF、PXR 上调有关。本研究为中药川西獐牙菜在临床治疗胆汁淤积提供理论依据,为发掘我国珍贵中草药提供重要线索,同时对发掘治疗胆汁淤积的药物有重大意义。

参考文献:

[1] 孟宪华, 陈德道, 张樱山, 等. 川西獐牙菜的化学成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2): 176-179.

[2] 高宇, 柴进, 李绍雪, 等. 川西獐牙菜对内毒素所致大鼠胆汁淤积性肝损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(8): 769-773.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Soroka C J, Lee J M, Azzaroli F, *et al*. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver[J]. Hepatology, 2001, 33(4): 783-791.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Wagner M, Zollner G, Trauner M. Beyond PXR and CAR, Regulation of Xenobiotic Metabolism by other Nuclear Receptors[M]//. Xie W ed. Nuclear Receptors in Drug Metabolism. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2008: 275-300.

[9] 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.

[10] Chen W, Cai S Y, 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.

[11] Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond[J]. J Hepatol, 2013 58(1): 155-168.

[12] Flynn J M, O'Leary M N, Zambataro C A, *et al*. Late-life rapamycin treatment reverses age-related heart dysfunction[J]. Aging cell, 2013, 12(5): 851-862.

[13] Tzeng S J, Chang W C, Huang J D. Transcriptional regulation of the rat Mrp3 gene promotor by the specificity protein (Sp) family members and CCAAT/enhancer binding proteins[J]. J Biomed Sci, 2005, 12(5): 741-761.

[14] 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.

[15] 吴晓平, 柴进, 何宇, 等. 阻塞性胆汁淤积大鼠肝细胞MRP3与Lrh-1蛋白表达的关系[J]. 肝胆胰外科杂志, 2008, 20(4): 232-234.

(**收稿**:2014-01-08;**修回**:2014-03-04)

(编辑 王 红)