DOI:10.16016/j.1000-5404.201501038

论著

川西獐牙菜醇提物对大鼠胆汁酸转运蛋白 Mrp4、转录因子 Nrf2 表达的影响

杜晓煌[1],柴 进[2],封欣婵[2],张樑君[2],程 英[2],陈文生[2],方勇飞[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:中西医结合科[1],全军消化病研究所[2])

[摘要] **目的** 观察川西獐牙菜醇提物对肝细胞胆汁酸转运蛋白 Mrp4 (multidrug resistance-associated protein 4,Mrp4)、转录因子 Nrf2 的调控作用。**方法** 将 14 只 SD 大鼠分为 2 组:正常对照组、川西獐牙菜醇提物组,每组 7 只。分别用生理盐水、川西獐牙菜醇提物处理 7 d 后,收集组织标本,免疫组化检测 Mrp3、Mrp4 在肝脏的表达变化,Western blot 及 RT-PCR 检测胆汁酸转运蛋白 Mrp3、Mrp4 和转录因子 Nrf2、核受体 Lrh-1 在蛋白及 mRNA 水平的变化。**结果** 在 mRNA 水平,RT-qPCR 结果显示川西獐牙菜醇提物组肝脏胆汁酸转运蛋白 Mrp4 表达较正常对照组增加 2.1 倍,同时,Mrp3 表达增加 1.7,转录因子 Nrf2 表达增高 1.8 倍,核受体 Lrh-1 表达增高 1.4 倍;在蛋白水平,Western blot 结果表明川西獐牙菜醇提物组肝脏胆汁酸转运蛋白 Mrp4 表达较正常对照组组增加 2.5 倍,同时,Mrp3 表达增高 3.0 倍,转录因子 Nrf2 表达增高 2.3 倍,核受体 Lrh-1 表达增高 1.3 倍,而免疫荧光结果则进一步证实了 RT-qPCR 与 Western blot 的结果,显示川西獐牙菜醇提物组 Mrp3、Mrp4 的表达较正常对照组组明显增强。**结论** 川西獐牙菜醇提物能够刺激肝细胞表面胆汁酸转运蛋白 Mrp4 表达增高,这种调控作用可能与 Nrf2 相关。

[关键词] 胆汁淤积;川西獐牙菜醇提物;多药耐药相关蛋白 4;转录因子
[中图法分类号] R285.5;R322.47;R394.3 [文献标志码] A

Effect of alcohol extract of *Swertia mussotii Franch* on expression of hepatic bile acid transporter Mrp4 and transcriptional factor Nrf2 in rats

Du Xiaohuang[1], Chai Jin[2], Feng Xinchan[2], Zhang Liangjun[2], Cheng Ying[2], Chen Wensheng[2], Fang Yongfei[1] ([1]Department of Integrated Chinese and Western Medicine, [2]Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of alcohol extract of *Swertia mussotii Franch* on regulating hepatic bile acid transporter Mrp4 and transcriptional factor Nrf2. **Methods** Total 14 SD rats were randomly divided into 2 groups ($n=7$): a control group treated with normal saline, and a treatment group treated with alcohol extract of *Swertia mussotii Franch*. After treatment for 7 d, liver samples were collected. The expression levels of bile acid transporters Mrp3 and Mrp4, transcriptional factor Nrf2 and nuclear receptor Lrh-1 were measured by immunofluorescence assay, Western blotting and RT-qPCR. **Results** Compared with the control group, the mRNA expression levels of Mrp4, Mrp3, Nrf2 and Lrh-1 in the treatment group were increased by 2.1 times, 1.7 times, 1.8 times and 1.4 times, respectively, while the protein expression levels of Mrp4, Mrp3, Nrf2 and Lrh-1 were increased by 2.5 times, 3 times, 2.3 times and 1.3 times, respectively. Furthermore, there was significant positive correlation between the Mrp4 mRNA expression and the Nrf2 mRNA expression in the treatment group. **Conclusion** The alcohol extract of *Swertia mussotii Franch* promotes hepatic bile acid transporter Mrp4 expression in rats, which may be mediated by transcriptional factor Nrf2.

[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(CSTC2012jjB10033)
[通信作者] 方勇飞,电话:(023)68754131,E-mail:fangyoufei@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1426.025.html(2015-03-27)

[**Key words**] cholestasis; alcohol extract of *Swertia mussotii Franch*; Mrp4; Nrf2

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81100280) and the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjB10033). Corresponding author: Fang Yongfei, Tel: 86-23-68754131, E-mail: fangyongfei@qq.com

胆汁淤积(cholestasis)是指胆汁的生成和/或胆汁内溶质排除障碍,一些正常从胆汁中排出的物质,如胆酸、胆红素和胆固醇在血液内不断堆积,导致肝细胞的损伤而致一系列的临床症候群[1-2],其典型特点为碱性磷酸酶的升高,随着病情的不断发展会出现肝纤维化、肝硬化最终导致肝功能衰竭[3]。近年来研究发现肝细胞膜上分布着一群与胆酸转运相关的重要的转运蛋白系统,维持着肝细胞胆酸正常的摄取和排泄功能,这些转运蛋白主要包括 MRPs、OATPs、NTCP、BSEP 等[4-6]。它们的异常表达可导致家族性遗传性胆汁淤积、妊娠性胆汁淤积、内毒素性胆汁淤积、Dubin-Johnson 综合征、药物性肝损伤等,严重危害人类的健康。然而除梗阻性胆汁淤积可采取外科手术外,绝大多数胆汁淤积的临床治疗缺乏有效的药物。川西獐牙菜为龙胆科獐牙菜属植物,性寒味苦,大多具有清热利胆、除湿,平肝风、舒肝健胃、强心养血、解毒等作用,为我国珍贵的传统藏药,始载于藏医药书《四部医典》[7-8],是我国治疗胆汁淤积的传统用药,但其治疗胆汁淤积的具体分子机制并未引起国内外同行的重视,临床鲜有研究。多药耐药相关蛋白 3 (multidrug resistance-associated protein 3, Mrp3)和 Mrp4 均为位于肝细胞基底侧模的胆汁酸转运蛋白。我们及国外同行前期在动物实验和人体标本研究发现,Mrp3、Mrp4 分子在胆汁淤积中对保护肝细胞起到了关键作用。在胆汁淤积的大鼠模型、梗阻性黄疸及 Dubin-Johnson 综合征患者的肝脏组织标本中,均发现了 MRP3/Mrp3 蛋白的高表达[9-10]。而 Mrp4 基因敲除的大鼠胆汁淤积的模型中发现其肝损伤的程度明显严重于野生型大鼠胆汁淤积模型[11]。结合我们前期实验结果及受熊脱氧胆酸对胆汁淤积治疗的分子机制的启发,在本研究中,我们对川西獐牙菜进行提纯并用其醇提物干预大鼠模型,通过 RT-qPCR、Western blot 检测大鼠肝脏细胞膜转运蛋白 Mrp4、Mrp3 及相关核受体在 mRNA 和蛋白水平的表达变化,并通过免疫荧光反应在细胞水平明确 Mrp3、Mrp4 的变化,从而初步确定川西獐牙菜治疗胆汁淤积的分子机制,为临床治疗胆汁淤积提供新的线索并为保护祖国传统医学做贡献。

1 材料与方法

1.1 主要材料

14 只雄性 SD 大鼠,6~7 周龄,体质量 200~220 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。川西獐牙菜醇提物由重庆市中药研究所提供,为 75% 乙醇提取后的浸膏,有效终浓度为 50%,使用时用灭菌的生理盐水溶解。RIPA Lysis Buffer 购自 Sigma 公司;蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自 Roche 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、Supersingnal West Femto maximum sensitivity substrate Kit 购自 Pierce Biotechnology 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒、蛋白标准品购自 Fermentus 公司;PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;Mrp3、Mrp4、Nrf2、Lrh-1 抗体购自 Abcam 公司;GAPDH 购自 Epitomics 公司;山羊抗兔、兔抗山羊二抗购自 Pierce 公司。引物设计、合成、测序有上海吉凯基因化学技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠模型的建立及处理 14 只成年雄性 SD 大鼠,购买后在实验使用之前正常饲养 1 周。使用预先贴标签的方式,分为 2 组,具体参考文献[12]报道的方法。实验分为:①正常对照组:0.9% 的生理盐水连续灌喂 7 d,每天 1 次;②川西獐牙菜醇提物组:川西獐牙菜醇提物 100 mg/kg 溶于 0.9% 的生理盐水,连续灌喂 7 d,每天 1 次。7 d 后处死大鼠,收集血清、肝脏组织、肾脏组织,-80 ℃保存,备用。

1.2.2 免疫荧光反应 将新鲜肝组织用 OCT 包埋后制作成 6~8 μm 冰冻切片。冰丙酮固定 30 min。PBS 漂洗 3 次,0.4% Triton X-100/0.01 mol/L PBS 浸泡 30 min。PBS 漂洗 3 次,加山羊血清封闭 30 min。PBS 漂洗后,加入 Mrp3 1∶100、Mrp4 1∶150 抗体染片,4 ℃过夜。后加入 FITC 标记的相对应的荧光二抗,37 ℃ 孵育 60 min。中性树胶封片后镜检。

1.2.3 蛋白免疫印迹 参照文献[13]报道的方法提取大鼠肝脏蛋白,BCA 法进行蛋白定量,进行 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶 SDS-PAGE 电泳,每孔上样量为 80 μg 总蛋白。浓缩胶 60 V 电泳 1 h,分离胶 100 V 电泳 2 h,常规湿法转膜 80 min,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,加一抗(Mrp4 1∶1 000,Mrp3 1∶1 000,Nrf2 1∶2 500, GAPDH 1∶50 000),4 ℃孵育过夜,用 TBST 洗去一抗后加入相应的二抗(1∶50 000),室温孵育 1 h。ECL 化学发光,凝胶成像系统显影。

1.2.4 RT-qPCR 参照文献[14]报道的方法提取肝脏组织 RNA。将其逆转录为 cDNA 后进行 RT-qPCR 扩增。PCR 反应体系:25 μL 体系中上游和下游引物各 1 μL(10 μmol/L)、模板 cDNA 1 μg、2 × *Taq* polymerase 12.5 μL、ddH_2O 9.5 μL,反应条件:94 ℃

5 min,94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min 30 个循环,72 ℃ 10 min。引物序列如表 1。

表 1　PCR 引物序列与长度

大鼠基因	引物	序列(5′→3′)	长度(bp)
Mrp3	上游	CGGCGACACAGACTAAAGAGACT	139
	下游	GCATACAGGAGGCAGATAAACAGC	
Mrp4	上游	AGAAGCCGCTGCCCTCACTG	296
	下游	AATGCCTTCGGAACGGACTTGAC	
Nrf2	上游	CTTTTGGCGAGACATTCCC	151
	下游	GACTGGGCTCTCGATGTGAC	
Lrh-1	上游	ATGGGAAGGAAGGGACAATC	166
	下游	CAAACCTGAAGGGAACGGAGGC	
GAPDH	上游	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	下游	TTTGAGGGTGCAGAGAACTT	

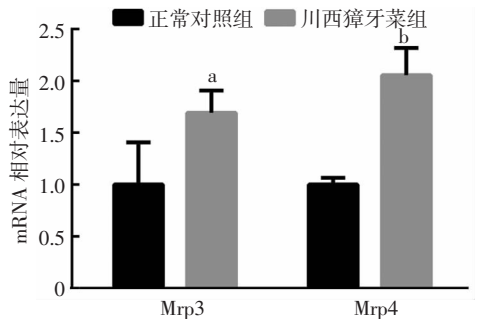
1.3　统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。线性回归分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2　结果

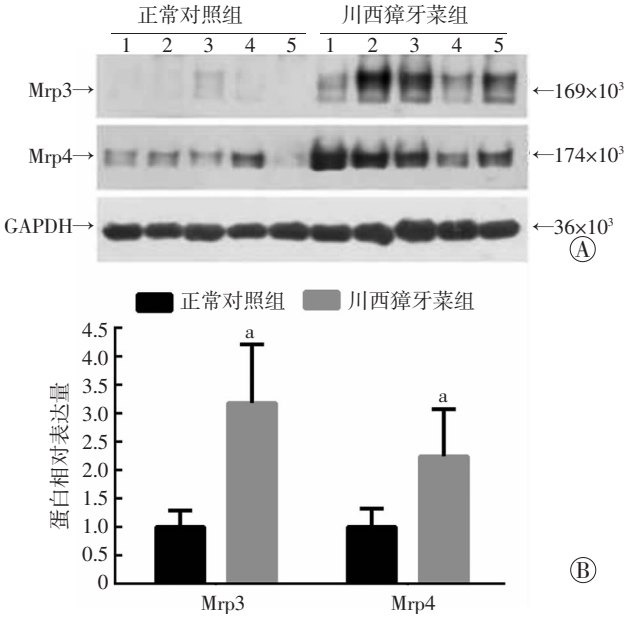
2.1　川西獐牙菜醇提物上调正常大鼠肝细胞膜表面胆汁酸转运蛋白 Mrp4、Mrp3 的表达

川西獐牙菜醇提物连续灌喂大鼠 7 d,取肝脏组织标本,提取肝脏组织样本 RNA 和蛋白,检测 Mrp4、Mrp3 在 mRNA 和蛋白水平的表达变化,结果发现:在 mRNA 水平,与正常对照组相较,Mrp4、Mrp3 表达明显增高,统计学分析显示:Mrp4 表达增高 2.1 倍,Mrp3 表达增高 1.7 倍,结果显著,具有统计学意义(图 1);在蛋白水平,川西獐牙菜组 Mrp4、Mrp3 表达亦增高,其中 Mrp4 表达增高 2.5 倍,Mrp3 表达增高 3.0 倍,结果显著,具有统计学意义(图 2)。石蜡包埋后做免疫荧光反应,结果发现:川西獐牙菜醇提物组其样本 Mrp4、Mrp3 的表达明显强于正常对照组(图 3)。以上结果表明:川西獐牙菜醇提物能够刺激肝细胞表面膜转运蛋白 Mrp4、Mrp3 使其表达增高。



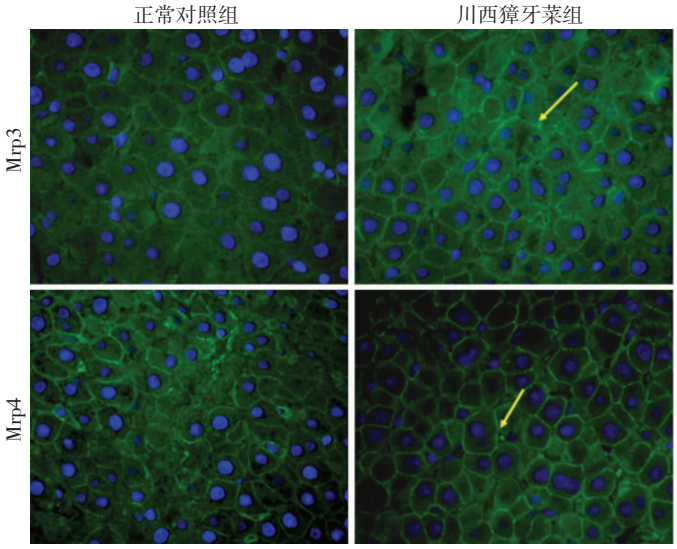
a:$P<0.05$, b: $P<0.01$, 与正常对照组比较

图 1　川西獐牙菜醇提物刺激正常大鼠后 Mrp4、Mrp3 在 mRNA 水平的表达情况



A: Western blot 检测结果;B: 半定量分析结果　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较

图 2　Western blot 检测川西獐牙菜醇提物刺激正常大鼠后 Mrp4、Mrp3 蛋白水平的表达



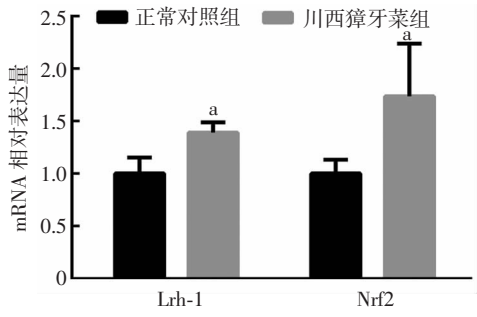
黄色箭头示 Mrp3、Mrp4 表达

图 3　免疫荧光观察川西獐牙菜醇提物刺激肝细胞表面膜转运蛋白 Mrp4、Mrp3 的表达　(×400)

2.2　川西獐牙菜醇提物上调正常大鼠转录因子 Nrf2、核受体 Lrh-1 的表达

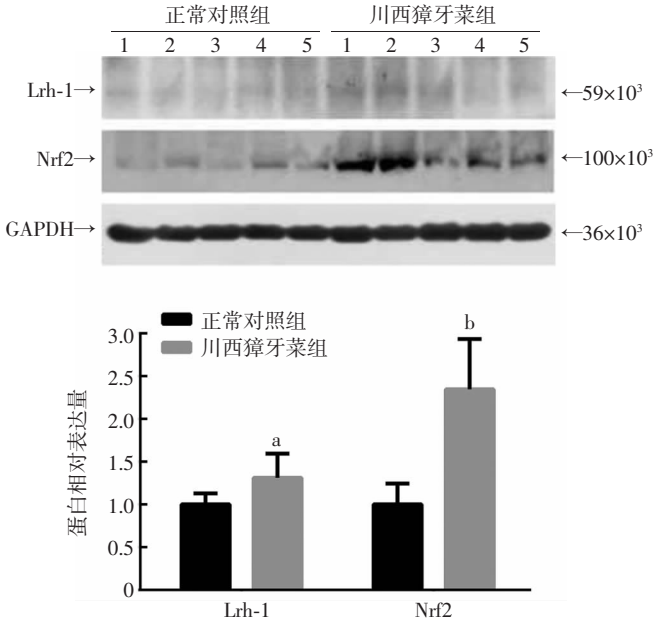
RT-qPCR 检测结果显示:与正常对照组相比,川西獐牙菜醇提物组 Nrf2 和 Lrh-1 表达显著增高,其中 Nrf2 表达增高 1.8 倍,Lrh-1 表达增高 1.4 倍(图 4);同时,蛋白免疫印迹实验证实:在蛋白水平,与正常对照组相比,川西獐牙菜醇提物组 Nrf2 表达增高 2.3 倍,

Lrh-1 表达增高 1.3 倍,结果显著,具有统计学意义(图5)。



a:$P<0.05$,与正常对照组比较

图4 RT-qPCR 检测川西獐牙菜醇提物刺激正常大鼠后 Lrh-1、Nrf2 的 mRNA 水平表达



A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较

图5 Western blot 检测川西獐牙菜醇提物刺激正常大鼠后 Lrh-1、Nrf2 蛋白水平的表达

2.3 川西獐牙菜醇提物刺激正常大鼠 Nrf2 表达上调与 Mrp4 表达的相关性分析

无论在蛋白水平还是 mRNA 水平,川西獐牙菜醇提物均能刺激肝细胞膜表面胆汁酸转运蛋白 Mrp4、Mrp3 核受体 Lrh-1、转录因子 Nrf2,使其表达增高。经线性回归分析发现:川西獐牙菜醇提物刺激 Nrf2 表达上调与 Mrp4 表达增高呈正相关($r^2=0.694$, $P=0.019$),而与 Mrp3 无关($r^2=0.048$, $P=0.636$)。

3 讨论

胆汁淤积是多种疾病所引起的常见临床综合征,直接导致肝细胞损伤、肝功能衰竭[15]。但其临床治疗缺乏有效的药物,唯一应用于临床并得到广泛认可的 UDCA 副作用大且个体差异显著,INT747、GW4064 等 FXR 的激动剂尚处于临床试验阶段,因此,寻找治疗胆汁淤积的特效药物成为临床亟待解决的问题。川西獐牙菜是我国的传统藏药,长年生长于海拔 3 800 ~ 5 000 m 的高寒地区,全草入药,具有清热、利胆退黄之功效[16],能够促进肝细胞再生、降低谷丙转氨酶的功效,且无毒副作用,用药范围广,疗效显著,具有极大地开发利用价值。其主要成分有龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、芒果苷、齐墩果酸、当药醇苷[17]等,由于受到产地、加工方法、用药途径的影响,使得其药理机制非常复杂。目前,临床对其"利胆退黄"的分子机制并不清楚,这就很大程度地限制了胆汁淤积治疗的用药。因此,研究川西獐牙菜治疗胆汁淤积的分子机制十分重要,所以,我们首先对其醇提物进行研究,在动物水平寻找其减轻胆汁淤积的具体分子机制,同时也为进一步研究其单体成分,寻找更加单一有效地治疗胆汁淤积的药物作用靶点提供依据。

目前,关于胆汁淤积发病机制的研究有很多,绝大部分研究认为:肝细胞表面胆汁酸转运蛋白的异常表达是引起胆汁淤积的主要分子发生机制[4-6]。Mrp4 广泛分布在机体的各个组织器官,包括脑、肝脏、胰腺、肾脏、红细胞等细胞表面等[18],属于 MRPs 家族,是不依赖 ATP 的有机阴离子转运体。与 Mrp3 相似,在胆汁淤积时 Mrp4 表达的上调被看作是肝细胞对阻塞性胆汁淤积的适应性反应,以保护肝细胞自身不受胆汁酸毒性的损害,使更多的胆汁酸分泌入血液。受 UDCA、INT747 及 GW4064 等药物治疗胆汁淤积的机制的启发,我们认为,川西獐牙菜的"利胆退黄"作用也与肝细胞表面胆汁酸转运蛋白密切相关且离不开转录因子、核受体的调节。因此,本研究对川西獐牙菜进行醇提,将川西獐牙菜醇提物连续灌喂大鼠 7 d 后,取其肝脏组织进行研究,发现:不论在 mRNA 水平还是蛋白水平,川西獐牙菜醇提物灌喂大鼠后,其肝细胞表面 Mrp4、Mrp3 及转录因子 Nrf2、核受体 Lrh-1 表达均增高,经过线性回归分析发现,转录因子 Nrf2 的表达上调与胆汁酸转运蛋白 Mrp4 增高呈正相关。由此,我们初步确定:川西獐牙菜能够通过转录因子 Nrf2 调控胆汁酸转运蛋白 Mrp4 从而对肝脏产生影响。以期为后续研究川西獐牙菜在胆汁淤积时的作用和功能奠定基础,同时也对保护祖国传统医药及自主知识产权做出贡献。

参考文献：

[1] Pauli-Magnus C, Meier P J. Hepatocellular transporters and cholestasis[J]. J Clin Gastroenterol, 2005, 39(4 Suppl 2): S103 – S110.

[2] Padda M S, Sanchez M, Akhtar A J, *et al*. Drug-induced cholestasis[J]. Hepatology, 2011, 53(4): 1377 – 1387.

[3] Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors in liver disease[J]. Hepatology, 2011, 53(3): 1023 – 1034.

[4] Traauner M, Boyer J L. Cholestatic syndromes[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2002, 18(3): 314 – 329.

[5] Chiang J Y. Bile acids: regulation of synthesis[J]. J Lipid Res, 2009, 50(10): 1955 – 1966.

[6] Claudel T, Zollner G, Wagner M, *et al*. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(8): 867 – 878.

[7] 徐敏. 藏药川西獐牙菜抗小鼠免疫性肝损伤的研究[J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版, 2013, 41(5): 32 – 36.

[8] 游海青. 川西獐牙菜对小鼠肝损伤的治疗作用[J]. 家庭医药：医药论坛, 2010, 2(9): 617 – 619, 616.

[9] 刘畅, 李绍雪, 高宇, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(10): 1008 – 1011.

[10] 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.

[11] Chai J1, Luo D, Wu X, *et al*. Changes of organic anion transporter MRP4 and related nuclear receptors in human obstructive cholestasis[J]. J Gastrointest Surg, 2011, 15(6): 996 – 1004.

[12] 张樑君, 李绍雪, 封欣婵, 等. 川西獐牙菜单体齐墩果酸对胆道结扎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, 2015,37(8): 778 – 781.

[13] 封欣婵, 柴进, 程英, 等. Radixin定点突变过表达对HepG2细胞膜转运蛋白Bsep的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(10): 1002 – 1007.

[14] 何孝崇, 柴进, 何宇, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(24): 2474 – 2478.

[15] Sampath J, Adachi M, Hatse S, *et al*. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy[J]. AAPS PharmSci, 2002, 4(3): E14.

[16] 高宇, 柴进, 李绍雪, 等. 川西獐牙菜醇提物对内毒素所致的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.

[17] 杨慧玲, 刘建全. 9种"藏茵陈"原植物中的7种有效化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1233 – 1237.

[18] Aleksunes L M, Klaassen C D. Coordinated regulation of hepatic phase Ⅰ and Ⅱ drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARα-, and Nrf2-null mice[J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(7): 1366 – 1379.

（**收稿**:2015-01-06;**修回**:2015-01-29）

（编辑 王 红）