论著

DOT:10.16016/j.1000-5404.201411061

川西獐牙菜单体齐墩果酸上调阻塞性胆汁淤积大鼠肝脏核受体 Lrh-1 和胆酸转运蛋白 Mrp3 的表达

张樑君,封欣婵,李绍雪,高 宇,程 英,陈文生,柴 进 (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** 建立胆道结扎的大鼠模型,观察川西獐牙菜活性单体齐墩果酸(oleanolic acid, OA)对胆道结扎所致的肝外胆汁淤积的保护作用,及其对多药耐药相关蛋白3(multidrug resistance-associated protein 3, Mrp3)、核受体 Lrh-1 的调控作用。**方法** 采用随机数字表法将15只SD大鼠分为3组:假结扎组(Sham组)、胆道结扎组(BDL组)、齐墩果酸组(BDL+OA组),每组5只。分别用生理盐水、齐墩果酸处理7 d后,收集组织标本,HE染色检测肝脏损伤程度,Western blot及RT-PCR检测Mrp3和Lrh-1在蛋白及mRNA水平的变化。**结果** HE染色结果显示BDL+OA组肝脏损伤程度较胆道结扎组明显减轻;Western blot结果表明BDL+OA组Mrp3表达较Sham组增加2.4倍,Lrh-1表达增加1.8倍;RT-PCR结果显示BDL+OA组Mrp3表达较Sham组增加3.2倍,Lrh-1表达升高2.2倍。**结论** 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具有保护作用,而这种保护作用可能与Lrh-1、Mrp3有关。

[关键词] 胆汁淤积;齐墩果酸;多药耐药相关蛋白3;转录因子
[中图法分类号] R-332;R285.6;R657.43 [文献标志码] A

Oleanolic acid of *Swertia mussotii* up-regulates liver nuclear receptor Lrh-1 and bile acid transporter Mrp3 in rat obstructive cholestatic model

Zhang Liangjun, Feng Xinchan, Li Shaoxue, Gao Yu, Cheng Ying, Chen Wensheng, Chai Jin (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether oleanolic acid (OA) of *Swertia mussotii* up-regulates multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3) and liver receptor homolog-1 (Lrh-1) in rats with obstructive cholestasis. **Methods** The rats were randomly divided into 3 groups (5 rats per group): sham group, bile duct ligation group (BDL group), and bile duct ligation plus oleanolic acid group (BDL+OA group). After bile duct ligation surgery, the rats were treated with saline or OA and sacrificed after 7 d. The expression of bile acid transporter Mrp3 and nuclear receptor Lrh-1 was detected by Western blotting and real-time RT-PCR. **Results** HE staining results showed that the liver injury of the BDL+OA group was alleviated significantly as compared with the BDL group. Western blot results showed the Mrp3 protein expression of the BDL+OA group was increased by 2.4 times while Lrh-1 protein expression was increased by 1.8 times as compared with the sham group. RT-PCR results showed that Mrp3 mRNA expression of the BDL+OA group was increased by 3.2 times while Lrh-1 mRNA expression was increased by 2.2 times as compared with the sham group. **Conclusion** OA of *Swertia mussotii* can protect liver of the rats with obstructive cholestasis caused by bile duct ligation, and the protective effect may be related with up-regulation of bile acid transporter Mrp3 and nuclear receptor Lrh-1.

[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] 陈文生,E-mail: wenshengchen@hotmail.com
柴 进,E-mail: janhic11@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.1336.009.html(2014-12-08)

[**Key words**] cholestasis; oleanolic acid; multidrug resistance-asociated protein 3; liver receptor homolog-1

Supported by the National Science Foundation for Young Scholars of China (81100280) and the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjB10033). Corresponding author: Chen Wensheng, E-mail: wenshengchen@hotmail.com; Chai Jin, E-mail: janhic11@163.com

胆汁淤积是常见的临床综合征,能够直接导致肝细胞损伤、肝功能衰竭[1-3]。研究表明,胆汁淤积的发生与肝细胞和胆管膜表面膜转运蛋的表达及功能异常相关[4]。多药耐药相关蛋白3(multidrug resistance-asociated protein 3, MRP3/Mrp3)位于肝细胞基底侧膜,属于ABC超家族(adenosine triphosphate-binding cassette transporter superfamily, ABC superfamily),主要排泌胆汁酸、结合胆红素、雌激素、白三烯和各种药物[5]。正常条件下,MRP3在肝细胞表面不表达或低表达,而在胆汁淤积患者的肝组织及胆汁淤积的大鼠模型中显著高表达[6-7]。唯一得到公认且用于临床治疗胆汁淤积的药物——熊脱氧胆酸便是通过NRⅡ核受体家族的FXR和PXR诱导MRP3高表达[8],促进胆汁分泌从而减轻胆汁酸在肝细胞内的淤积,但其效果有限,且个体差异性较大。而其他临床常用药物,如利福平、苯巴比妥等都具有不同程度的限制性,效果不理想,而新药6α-乙基-鹅脱氧胆酸尚处于临床Ⅲ期实验。因此,临床亟需有效的治疗胆汁淤积的新药物。

川西獐牙菜为我国传统中草药,更是藏药八宝之一——藏茵陈的主要的原生植物,具有清热、利胆退黄之功效,能够促进肝细胞再生、降低谷丙转氨酶。其主要成分为獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、齐墩果酸(oleanolic acid, OA)、芒果苷等。多种药物成分共同作用于肝脏往往增加肝脏负荷,加重肝脏损伤,不利于肝脏功能的恢复。因此,本研究对川西獐牙菜进行提纯并用其中的有效成分——齐墩果酸干预胆道结扎的大鼠胆汁淤积模型,观察其对肝脏组织的保护作用,检测大鼠Mrp3及核受体Lrh-1的表达变化,进一步评价齐墩果酸对胆汁淤积的肝脏的保护功能,从而为临床治疗胆汁淤积提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 主要材料

15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。川西獐牙菜活性单体齐墩果酸由重庆市中药研究提供,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、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 胆道结扎的大鼠胆汁淤积模型的建立及处理

15只成年雄性SD大鼠,采用随机数字表法分为Sham组、BDL组、BDL+OA组。每100 g体质量给予1.5 mL 0.3%戊巴比妥钠进行麻醉。75%酒精消毒后,沿腹正中线开腹,暴露胆总管,用4-0手术线结扎胆总管3次后关腹。灭菌的生理盐水溶解齐墩果酸。BDL+OA组采用连续灌胃7 d,Sham组和BDL组采用相同剂量的生理盐水连续灌胃7 d。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 HE染色

新鲜肝脏组织置于冰上,剪成黄豆粒大小后用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片。依次用二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ、95%乙醇、80%乙醇脱蜡5 min。苏木精染色5 min,1%盐酸酒精分化20 s后稀氨水返蓝30 s。伊红染色5 min。再先后用95%乙醇、无水乙醇处理,紧接着用二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ、二甲苯Ⅲ分别处理2 min。切片用中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.3 RT-PCR

按TRIzol说明书提取肝脏组织RNA。将其逆转录为cDNA后进行RT-PCR扩增。PCR反应体系:20 μL体系中5′端和3′端引物各0.4 μL(10 μmol/L)、dNTPs 1.6 μL(2.5 μmol/L)、Template 1 μL(10 ng/μL)、*Taq* polymerase 0.2 μL、5×*Taq* Buffer 4 μL、ddH_2O 12.4 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:Mrp3,上游5′-CACCATCATCGTCATTCCTCT-3′,下游5′-TAACTGGCAAACCTGATAC-GG-3′,产物长度149 bp;Lrh-1,上游5′- ATGGGAAGGAAGGGACAATC-3′,下游5′- CAAACCTGAAGGGA-ACGGAGGC-3′,产物长度166 bp;GAPDH,上游5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游5′- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,产物长度452 bp。

1.2.4 Western blot

按照RIPA Lysis Buffer说明书提取大鼠肝脏蛋白,BCA法进行蛋白定量,SDS-PAGE电泳,常规湿法转膜80 min,室温封闭2 h,4 ℃孵育过夜,加入相应的二抗(1∶50 000)后室温孵育1 h。ECL化学发光,凝胶成像系统显影。

1.2.5 免疫荧光染色 新鲜肝脏组织样品进行石蜡包埋切片,脱蜡后进行抗原修复。PBS液漂洗3次,5 min/次。10% BSA封闭30 min后,1∶100 Mrp3抗体染片,37 ℃孵育30 min。PBS液洗片3次,5 min/次,洗去多余的抗体。甘油封片后进行荧光显微镜下观察。

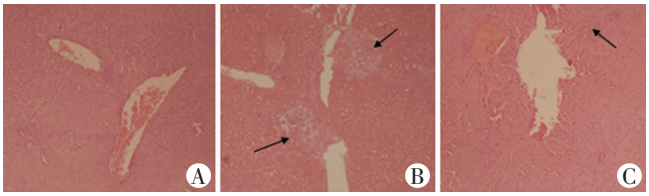
1.3 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

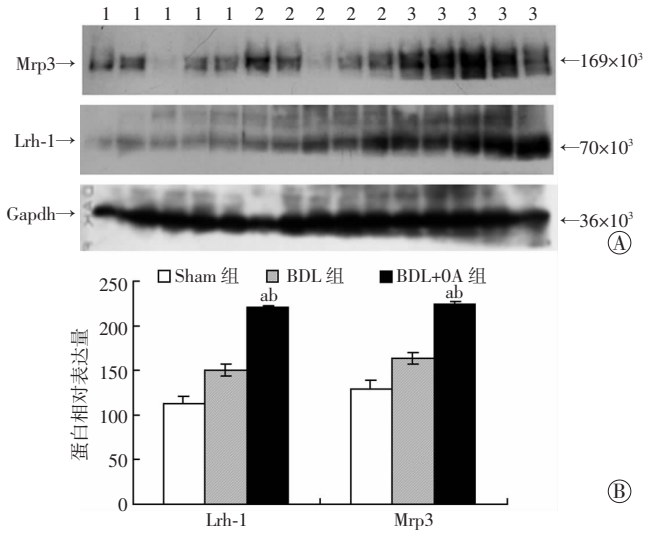
2.1 齐墩果酸对胆道结扎所致的大鼠胆汁淤积肝脏组织具有保护作用

Sham组与BDL+OA组大鼠肝脏组织切片可见清晰的小叶结构及排列较为整齐的细胞索,无明显坏死。而BDL组小叶结构尚清晰,但可见部分坏死病灶(图1)。



A:Sham组;B:BDL组;C:BDL+OA组 箭头示坏死病灶

图1 各组大鼠肝脏组织病理变化 (HE ×100)

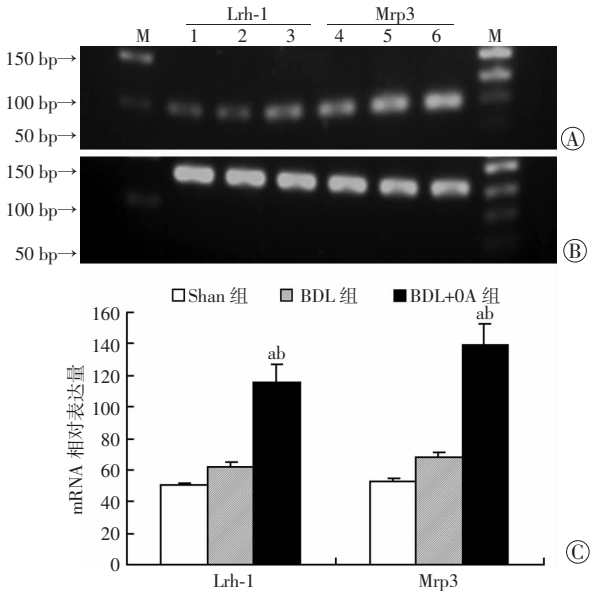


A:Western blot检测结果 1:Sham组;2:BDL组;3:BDL+OA组;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与Sham组比较;b:$P<0.05$,与BDL组比较

图2 Western blot检测各组肝脏组织中Mrp3、Lrh-1的蛋白表达

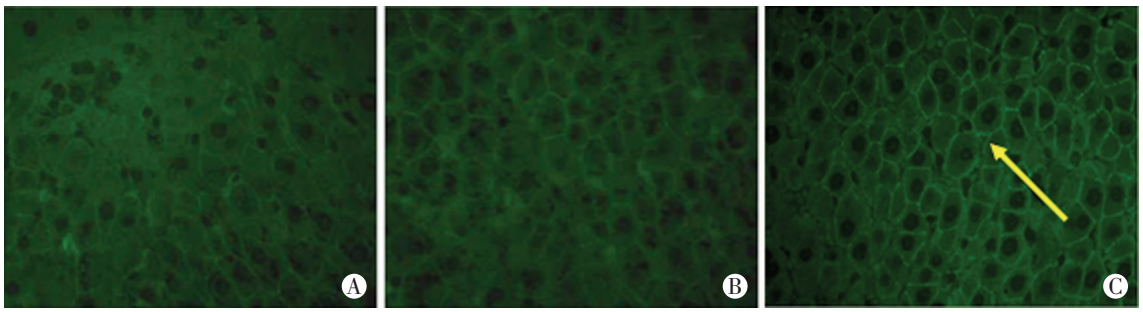
2.2 齐墩果酸促进胆汁淤积大鼠肝细胞Lrh-1、Mrp3表达上调

在mRNA和蛋白水平,BDL+OA组和BDL组Mrp3、Lrh-1表达均较Sham组升高,且BDL+OA组较BDL组差异具有统计学意义($P<0.05$,图2、3)。而免疫荧光染色则进一步证实了齐墩果酸能促进Mrp3在肝细胞表面的表达(图4)。



M:标准;1、4:Sham组;2、5:BDL组;3、6:BDL+OA组 A:Mrp3、Lrh-1PCR产物凝胶电泳结果;B:GAPDH产物凝胶电泳结果;C:半定量分析 a:$P<0.05$,与Sham组比较;b:$P<0.05$,与BDL组比较

图3 RT-PCR检测各组肝脏组织中Mrp3、Lrh-1的mRNA表达



A:Sham组;B:BDL组;C:BDL+OA组 箭头示Mrp3

图4 免疫荧光染色观察齐墩果酸促进膜转运蛋白Mrp3在肝细胞表面的表达 (×100)

3 讨论

胆汁淤积是各种肝病时常见的一种临床综合征，目前，临床治疗胆汁淤积缺乏有效的药物，唯一得到国际认可的UDCA具有较大的副作用且个体差异显著，因此，寻找治疗胆汁淤积的有效药物成为临床亟待解决的问题。川西獐牙菜是我国传统中草药，广泛地用于“肝胆湿热症”的治疗，而我们的前期研究表明川西獐牙菜对胆汁淤积的肝脏具有保护作用[9-10]。但川西獐牙菜成分复杂，多种药物成分作用于已处于病理状态的肝脏，增加肝脏负荷，不利于肝功能的恢复。胆道结扎的大鼠是最常用的研究胆汁淤积的模型，通过此模型，我们能够直观地观察到给药前后大鼠肝脏损伤的恢复情况。因此，我们建立了胆道结扎的大鼠胆汁淤积模型，利用此模型对川西獐牙菜单体齐墩果酸进行研究。

MRP3/Mrp3位于肝细胞基底侧膜，属于MRPs家族，其底物范围广，主要包括胆汁酸、结合胆红素以及各种药物等。研究表明，生理状态下，MRP3不表达或低表达，但胆汁淤积时MRP3表达明显增高[7,11-12]。因此，研究认为，MRP3在梗阻性黄疸中表达上调是肝脏自我保护性的增加胆红素外清除的代偿机制，能够增加结合性胆红素及胆汁中的其他成分向血液中排出，减轻对肝细胞的损伤[13]。而李琼等[14]的研究也表明，在胆道结扎的大鼠胆汁淤积的大鼠肝脏中，Mrp2的表达明显下降，Mrp3则显著增高，这可能有利于胆汁酸从肝细胞的排出，减轻胆汁酸对肝细胞的损害。

本研究中，我们通过HE染色观察到：齐墩果酸对胆汁淤积的大鼠肝脏具有保护作用，提示齐墩果酸可能能够调控肝细胞表面的胆酸转运蛋白。采用RT-PCR、Western blot分别在mRNA和蛋白水平对肝细胞表面的胆酸转运蛋白进行检测，发现BDL和BDL+OA组的Mrp3蛋白表达增加，特别是BDL+OA组不仅较Sham组增高明显，且与BDL组相比也差异显著。该结果提示：胆汁淤积时，齐墩果酸能调控Mrp3的表达增高。同时，免疫荧光检测结果进一步证实了这一结果。而受熊脱氧胆酸对胆酸转运蛋白调节机制的启发，我们推测，齐墩果酸对Mrp3的调控可能是通过转录因子或核受体进行。Western blot和RT-PCR结果表明，BDL组和BDL+OA组中转录因子Lrh-1的表达较Sham组增高，且与Mrp3的变化相一致，提示齐墩果酸可能通过Lrh-1调控肝细胞表面Mrp3的表达上调。此研究结果为临床治疗胆汁淤积提供新的用药线索，同时对我国传统中草药的开发与保护具有重要意义。

参考文献：

[1] Trauner M, Boyer J L. Cholestatic syndromes[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2002, 18(3): 314-329.

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

[3] Boyer J L. New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically [J]. J Hepatol, 2007, 46(3): 365-371.

[4] Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis[J]. J Hepatol, 2009, 51(3): 565-580.

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

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

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

[8] Neuschwander-Tetri B A. Farnesoid x receptor agonists: what they are and how they might be used in treating liver disease [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2012, 14(1): 55-62.

[9] 高宇，柴进，李绍雪，等. 川西獐牙菜醇提物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.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

（**收稿**：2014-11-07；**修回**：2014-12-12）

（编辑 王 红）