维普资讯 http://www.cqvip.com

鹅去氧胆酸和苯巴比妥对 HepG2 细胞 MRP3 与核受体 RXRα 蛋白表达的影响

李 琼[1a]，陈文生[1b]，罗东林[2]，房殿春[1b]（1. 第三军医大学：a. 基础医学部计算机教研室；b. 附属西南医院全军消化内科中心，重庆 400038；2. 第三军医大学附属大坪医院普通外科，重庆 400042）

［摘 要］ **目的** 通过诱导剂刺激体外培养的人肝癌细胞 HepG2，观察多耐药相关蛋白 MRP3（multidrug resistance-associated protein 3，MRP3）和核受体 RXRα（retinoid-X receptor alpha，RXRα）蛋白的表达变化。**方法** 用鹅去氧胆酸（chenodeoxycholic acid，CDCA）或苯巴比妥（phenobarbital，PB）分别刺激培养的肝癌细胞 HepG2 后，抽提 HepG2 细胞总蛋白和核蛋白，Western blot 方法检测 MRP3 和 RXRα 蛋白表达水平的变化。**结果** CDCA 和 PB 可诱导 HepG2 细胞膜 MRP3 蛋白表达增高，并抑制细胞核受体 RXRα 蛋白表达。**结论** HepG2 细胞中膜转运蛋白 MRP3 表达的上调可能与核受体 RXRα 表达抑制相关。

［关键词］ MRP3；RXRα；HepG2 细胞
［中图分类号］ R735.7 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672－5042(2006)03－0148－03

Effects of chenodeoxycholic acid or phenobarbital on the protein expression of MRP3 and RXRα in HepG2 cells

LI Qiong, CHEN Wen-sheng, LUO Dong-lin, FANG Dian-chun (Department of Computer, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of protein expression of membrane transporter MRP3 (multidrug resistance-associated protein 3, MRP3) and nuclear receptor RXRα (retinoid-X receptor alpha, RXRα) in HepG2 cells induced by CDCA (chenodeoxycholic acid, CDCA) or PB (phenobarbital). **Methods** Both total cellular protein and nuclear protein were isolated from HepG2 cells after 48h treatment of CDCA or PB. The protein expressions of MRP3 and RXRα were determined by Western blot. **Results** The membrane protein MRP3 expression was significantly increased and the nuclear receptor RXRα expression was suppressed by CDCA or PB in HepG2 cells. **Conclusion** The up-regulation of hepatic transporter MRP3 may be associated with down-regulation of nuclear receptor RXRα in HepG2 cells.

Keywords: MRP3; RXRα; HepG2 cell

MRP3 是存在于肝细胞膜上的一种有机阴离子排泌泵转运蛋白，在极性化的正常肝细胞的基底侧膜上表达量很低或甚至不表达[1]。但在病理状态下 MRP3 在肝细胞膜基底侧面表达量大为增加[2]。目前 MRP3 高表达的分子机制尚不清楚。近来研究显示：核受体 RXRa 可调控多种转运蛋白基因的表达，是机体对胆汁淤积病理应激状态产生适应性改变的关键核转录因子[3]，该转运蛋白是否为 RXRa 的效应靶基因是值得研究的课题。为此，本实验在培养的肝癌细胞 HepG2 中化学诱导 MRP3 蛋白表达，检测核受体 RXRa 蛋白表达变化，为进一步研究 MRP3 基因转录调控分子机制提供线索。

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。DMEM 培养基购自 GIBCO 公司，鹅脱氧胆酸（chenodeoxycholic acid；CDCA）和苯巴比妥（phenobarbital，PB）均为 Sigma 公司产品。MRP3 所有抗体（MRP3、GAPDH、RXRα、SH-PTP1 及兔抗羊和鼠 IgG-HRP）均购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和化合物诱导 HepG2 细胞用 DMEM 培养基（每 1 000 ml 含 DMEM 培养基干粉 10.4 g、Hepes 3.57 g、$NaHCO_3$ 2.0～2.2 g、青霉素 0.0625 g、链霉素 0.1 g）加入 10% 胎牛血清培养，置 37 ℃ 5% CO_2 培养箱培养，细胞贴壁 85%～90% 融合时用 EDTA-胰酶（每 1 000 ml 含 $EDTANa_2$ 0.2 g、Trypsin 2.5 g、NaCl 8 g、KCl 0.4 g、$NaHCO_3$ 0.58 g、Dextrose 1 g）消化，以台盼兰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，以终浓度 50 μl CDCA 或 2 mmol/L PB 加入无血清 DMEM 培养液与 HepG2 细胞孵育 48 h，弃上清，用冰冷的 PBS 液清洗细胞 3 次后收获细胞。对照组以无血清 DMEM 培养 HepG2 细胞 48 h。

1.2.2 细胞总蛋白、核蛋白和膜蛋白提取 分别抽提 HepG2 细胞总蛋白和核蛋白，方法按 NE-PER 核蛋白抽提试剂盒（Pierce Biotechnology）操作说明书进行。用 BioRad 核酸蛋白仪测定提取液的蛋白浓度，用细胞裂解液将膜蛋白和核蛋白液稀释成相同浓度，－70 ℃保存备用。

1.2.3 Western blot 检测 分别取核蛋白 20 μg 或细胞总蛋白 200 μg 与等体积上样缓冲液混匀，其中核蛋白行 100 ℃加热 5 min 变性，冷却后上样，而细胞总蛋白不需加热直接上样，分别使用 12% 或 7.5% SDS-PAGE 电泳胶进行电泳分离，然后电

［基金项目］ 国家自然科学基金资助项目（30570842）
［作者简介］ 李 琼（1974－），女，重庆市人，助理实验师，学士，主要从事基因表达调控方面的研究。电话：（023）68754313
［通讯作者］ 陈文生，电话：（023）68754678
［收稿日期］ 2006－03－16 ［修回日期］ 2006－04－16

维普资讯 http://www.cqvip.com

转移至硝酸纤维素膜，丽春红染色确定上样的均一性和电转移效率，含1%脱脂奶粉的PBST室温封闭2 h，加一抗(1∶100)室温孵育过夜，用PBST洗去一抗后加入相应二抗(1∶2 000)，室温孵育2 h，DAB显色后于凝胶成像系统上成像记录，然后用Quntity one图像分析软件测定所采集图像目的条带的负相光密度。实验重复3次，蛋白表达定量水平用目的条带的负相光密度值表示。

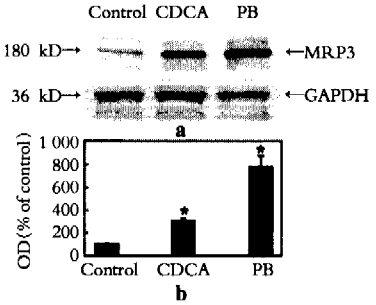
1.3 统计学处理

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示，用SPSS 10.0统计学分析软件对各组数据进行分析，t检验比较各组间的差异。

2 结果

2.1 CDCA和PB诱导后MRP3的表达水平

HepG2细胞在抽提各组细胞总蛋白后行Western blot，结果见图1a。膜蛋白MRP3位于约180 KD处，并可见二条带，均为MRP3蛋白，其原因可能为该蛋白不同程度的糖基化结果所致，通常人的MRP3都可见此二条带。胆酸CDCA和PB均可诱导MRP3的表达，而PB更强。MRP3免疫印迹所用的同一硝酸纤维素膜上免疫复合物经洗脱以后，再与另一胞浆蛋白GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)抗体孵育后，Western blot检测GAPDH位于36 KD的位置，如图1a所示，以此条带为内参照确定上样量，以除外不同上样量所致的实验误差。光密度扫描分析各表达条带与对照组相比有非常明显的差异性，CDCA组细胞MRP3表达增加约为对照组的(304±21)%，PB组为(784±88)%(图1b)。

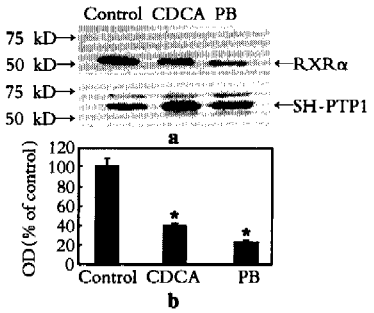


a:Western blot检测HepG2细胞MRP3蛋白表达；b:光密度扫描分析各组MRP3蛋白的表达量(*:与对照组比较，$P<0.01$)

图1 Western blot检测MRP3表达和光密度扫描分析

2.1 CDCA和PB诱导后RXRα的表达水平

在抽提各组HepG2细胞核蛋白后行Western blot，结果见图2a。核蛋白RXRα表达于52 KD位置，CDCA和PB均抑制其表达，尤以PB较强，这与MRP3蛋白表达的变化趋势相反。RXRα免疫印迹所用的同一硝酸纤维素膜上免疫复合物经洗脱以后，再与另一核蛋白SH-PTP1(酪氨酸磷酸酯酶)抗体孵育后，Western blot检测SH-PTP1位于约67 KD的位置，以此条带为内参照确定上样量，结果见图2a。CDCA对HepG2细胞RXRα的抑制程度约为对照组的(40±3)%，PB组细胞约为(23±2)%，各组间RXRα的表达量均存在非常显著的差异(图2b)。



a:Western blot检测HepG2细胞RXRα蛋白表达；b:光密度扫描分析各组RXRα蛋白的表达量(*:与对照组比较，$P<0.01$)

图2 Western blot检测RXRα表达和光密度扫描分析

3 讨论

多耐药相关蛋白MRP3是一种含有ATP结合域的转运蛋白基因，表达于肝细胞、胆管上皮、肠粘膜上皮和肾小管上皮细胞，在极性化的肝细胞MRP3位于的基底侧膜(basolateral membrane)，可以将肝细胞内的物质转运出细胞膜[3]。它的底物包括胆酸、葡萄糖醛酸甙结合物、17β-雌二醇和一些临床常见的有机阴离子抗癌药(如：顺铂和氨甲蝶呤等)。在正常生理情况下，MRP3在人和鼠的肝脏中表达量很低，而在胆汁淤积病理状态下或肝细胞膜的小管顶端面(canalicular or apical membrane)转运蛋白MRP2或BSEP功能缺失时其表达量明显增高，由于MRP3是重要的胆酸和药物外运泵，MRP3可将物质排出到血液中，MRP3可能参与胆汁淤积时肝细胞的代偿反应机制和化疗的细胞耐药机制。人们普遍认为在胆汁淤积状态下MRP3表达的升高是肝细胞自身的一种保护机制，当胆汁淤积出现时肝细胞向毛细胆管排泌胆酸的正常通道受阻，而肝细胞将寻求另外的通路排泌细胞内聚积的胆酸盐，即血管面的MRP3表达上调，将胞内聚积的胆酸排泌到血液中，最后通过肾脏排出体外，减轻胆酸盐对肝细胞的毒性损伤[4]。本研究结果发现，CDCA能中等程度地诱导HepG2细胞MRP3蛋白表达的增高约3倍于对照组细胞，而PB刺激细胞MRP3升高的作用更明显，达到刺激前的7倍，这与先前的报道一致[3-5]。但在胆汁淤积动物模型肝脏中MRP3的升高体外细胞更明显，可达14倍[5]。在体的实验中影响MRP3升高的因素远较体外细胞培养时的单一因素复杂，可能是多因素作用的结果，CDCA可能是这些因素中的一种。

已有研究发现CDCA为核受体FXR和FTF的配体，尚无研究发现FXR调控MRP3基因的转录，但在肠粘膜上皮和肝细胞中CDCA可能通过FTF核受体途径上调MRP3的转录。这一途径仍难以完全解释胆汁淤积时MRP3急剧高表达的机制，因为FTF对基因

维普资讯 http://www.cqvip.com

转录的影响较弱。PB 的核受体为 CAR，已有间接证据显示 PB 诱导 MRP3 表达可能与 CAR 有关，但我们曾行体外转录活性试验并未发现 CAR 可以直接上调 MRP3 基因启动子的体外转录活性（未发表的研究结果）。这些结果提示，除 FXR 和 CAR，其他核受体途径可能还参与 MRP3 的转录调控。

核受体为一个转录因子超家族，在结构上其氨基酸（N 端）都含有一个 DNA 结合结构域（DBD）和羧基端（C 端）有配体结合结构域（LBD），可与其配体和靶基因上游 DNA 调控序列结合，参与靶基因的转录活化或抑制。RXRα 是维生素 A 类核受体之一，广泛参与多种基因转录活性调控，包括许多转运蛋白基因。RXRα 可以与其伙伴核受体 FXR、CAR 结合形成的异源二聚体，同时 RXRα 也可形成同源二聚体调控基因转录。CDCA 和 PB 分别是 FXR 和 CAR 核受体的配体[4-6]，而 PB 是目前发现的最强的 MRP3 诱导剂，本实验结果显示 PB 在 HepG2 细胞中刺激 MRP3 的表达，并强于 CDCA。令人感兴趣的是 CDCA 和 PB 在诱导 MRP3 表达的同时，明显抑制核受体 RXRα 的蛋白表达，与诱导 MRP3 的表达呈相反的趋势。RXRα 广泛表达于正常机体的多种组织细胞，尤其是肝脏，而 MRP3 在正常肝脏中的表达很低，但在胆汁淤积时 RXRα 表达受抑制，MRP3 的表达急剧增加，这与本试验在体外培养肝癌细胞中的结果一致。RXRα 与 MRP3 的表达存在负性相关现象，是否提示 RXRα 对 MRP3 的表达具有负性调控作用，尚待进一步的研究证实。

[参考文献]

[1] Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, et al. cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3) [J]. FEBS Lett, 1998, 433(1-2): 149-152.

[2] Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 322-342.

[3] Lang T, Hitzl M, Burk O, et al. Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver[J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(3): 155-164.

[4] Zollner G, Wagner M, Fickert P, et al. Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2005, 25(2): 367-379.

[5] Chen J, Raymond K. Nuclear receptors, bile-acid detoxification, and cholestasis[J]. Lancet, 2006, 367(9509): 454-456.

[6] Metivier R, Reid G, Gannon F. Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression[J]. EMBO Rep, 2006, 7(2): 161-167.

（编辑：郭光金）

·个案与短篇·

胫骨开放骨折术后伤口及骨折不愈合治疗分析

赵 俊，周洪伦 （1. 沈阳医学院手术学教研室，辽宁 沈阳 110034；2. 西丰县人民医院，辽宁 西丰 112400）

[关键词] 胫骨骨折；不愈合；治疗
[中图分类号] R683.42 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2006)03-0150-01

胫骨骨折不愈合、延迟愈合是常见的骨折后期并发症，主要原因是严重创伤、感染、骨折固定不良。我院 1998 年至 2003 年共接收和治疗胫骨开放性骨折伤口及骨折不愈合病例 15 例，采取内固定、病灶清除、伤口灌洗、植骨、创面修复、外固定架固定等治疗，取得了良好效果。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组患者 15 例，其中男 10 例，女 5 例，年龄 20～52 岁；其中车祸肇事 11 例，砸伤 4 例；病程最短 2 个月，最长 4 年；软组织缺损、骨及钢板外露 12 例，有骨缺损 3 例。

1.2 治疗方法

先行手术取出内固定物，彻底清除病灶，刮涂骨髓腔炎性肉芽组织，修整骨折端，刮除组织做细菌敏感试验及药敏试验，直视下复位，髓腔内植骨，取半环槽式外固定架，闭合伤口。本组直接减张闭合 5 例，带血管蒂皮瓣转移 6 例，取小腿腓肠肌皮瓣转移 4 例，关闭伤口前均留置灌洗导管，术后以敏感抗生素灌洗 2 周。

2 结果

本组病例伤口Ⅱ期愈合 11 例，4 例经换药 1～2 个月伤口愈合；骨折 3～6 个月愈合 8 例，6～12 个月愈合 5 例，2 例 18 个月愈合。

3 讨论

胫骨骨折术后不愈合，软组织及骨缺损，内固定物及骨质外露，大多是由于损伤严重，皮肤条件不好造成。传统治疗多采取分期手术，先控制感染、修复创面后再行骨不连治疗，此法患者承受手术痛苦重，疗程长费用高。我院采取内固定取出，病灶清除，植骨，关闭伤口，外固定架固定，灌洗同时治疗，缩短了疗程，减少了病人费用及痛苦，取得了较好疗效。

[收稿日期] 2005-11-15 [修回日期] 2006-02-28

（编辑：朱志立）