基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000691

# 丹皮酚对 HepG2 细胞 MRP2 表达和功能的影响

王莉莉，于　超
（重庆医科大学生命科学研究院，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究丹皮酚对人肝细胞株 HepG2 细胞中多药耐药相关蛋白 2（multidrug resistance-associated protein 2，MRP2）表达及功能的影响，以探讨丹皮酚消退黄疸的作用机制。**方法**：采用 CCK8 法检测丹皮酚对 HepG2 细胞存活率的影响；qPCR 法测定丹皮酚对 HepG2 细胞 MRP2 和 PXR mRNA 表达水平的影响；流式细胞术测定丹皮酚干预后细胞内 CDFDA 的荧光强度。**结果**：丹皮酚（2 μg/ml）对 HepG2 细胞存活率影响较小；丹皮酚在实验条件下明显上调 MRP2 药物转运体和 PXR 在转录水平的表达，并增加其对 MRP2 特异性荧光底物的转运效率（$P$=0.000）。**结论**：丹皮酚可能通过上调 PXR 诱导 HepG2 细胞药物转运体 MRP2 基因表达，从而促进其底物的跨膜转运。提示丹皮酚上调 MRP2 转运体表达而起到降黄的临床作用可能与核受体PXR 途径相关。

【关键词】丹皮酚；HepG2 细胞；多药耐药相关蛋白 2
【中文分类号】R966　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-04-20

# Effects of Paeonol on expression and function of drug transporters MRP2 in HepG2 cells

*Wang Lili, Yu Chao*
(*Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate influences of Paeonol on mRNA expression and function of drug transporters multidrug resistance-associated protein 2(MRP2) in HepG2 cell. ***Methods***: Cell counting Kit-8 assay was used to detect the viability of HepG2 cells. Real-time fluorescent quantitative PCR(qPCR) was performed to measure the expressions of MRP2 and PXR. Flow cytometry was applied to determine the transport function of MRP2. ***Results***: Paeonol(2 μg/ml)did not decrease HepG2 cell survival rate. Paeonol(2 μg/ml) markedly induced the expression and function of drug transporters MRP2($P$=0.000) and the expression of PXR. ***Conclusion***: Paeonol can up-regulate the expression of MRP2 mRNA through the PXR, which may be one of processes of eliminating jaundice.

【Key words】Paeonol; HepG2 cells; multidrug resistance-associated protein 2(MRP2)

**作者介绍**：王莉莉，Email：wanglili1020@sina.cn，
研究方向：药物代谢动力学。
**通信作者**：于　超，Email：yuchaom@163.com。
**基金项目**：国家自然科学基金资助项目（编号：NSFC，81370403）。
**优先出版**：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150708.2331.018.html（2015-07-08）

[16] Filardo EJ, Quinn JA, Jr Frackelton AR, et al. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis[J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(1): 70-84.

[17] Scaling AL, Prossnitz ER, Hathaway HJ. GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal and malignant breast[J]. Horm Cancer, 2014, 5(3): 146-160.

[18] Ohshiro K, Schwartz AM, Levine PH, et al. Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells via non-genomic signaling[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30725.

[19] Ge X, Guo R, Qiao Y, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the nontranscriptional effect of estrogen on the activation of PI3K/Akt pathway in endometrial cancer cells[J]. Int J Gynecol Cancer, 2013, 23(1): 52-59.

[20] Yu LL, Qu T, Zhang SM, et al. GPR30 Mediates the fast effect of estrogen on mouse blastocyst and its role in implantation[J]. Reprod Sci, 2015. [Epub ahead of print].

[21] Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease[J]. Dis Model Mech, 2012, 5(1): 9-18.

[22] Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, et al. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy[J]. Placenta, 2009, 30(6): 473-482.

[23] Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 187(1-2): 233-238.

（责任编辑：冉明会）

据文献报道，在淤胆型高胆红素血症中多药耐药相关蛋白 2(multidrug resistance-associated protein 2，MRP2)的表达下降。MRP2 主要表达于肝细胞，负责将胆红素和其他胆汁成分排出至肝外，若先天缺陷或后天因素导致其功能障碍均可引起高胆红素血症和胆汁流的障碍[1-2]。迪约综合征(Dubin-Johnson syndrome，DJS)患者就是肝细胞胆管侧膜上 MRP2 蛋白出现缺失或基因变异导致全部或部分功能丧失，这些患者所共有的一个明显的临床表现即高结合型胆红素血症[3]。而 MRP2 的基因表达是与核受体 PXR 途径相关的。研究表明，PXR 缺陷型小鼠中，PXR 激动剂无诱导 MRP2 mRNA 表达的作用[4]。目前，市售的治疗胆淤的中成药物中都含有牡丹皮，其主要成份丹皮酚为毛茛科植物牡丹 Paeonia suffrutlcosa Andr 根皮及萝藦科植物徐长卿Cynanchum paniculatum(Bge.)Kitag 的干燥根和根茎中的主要活性成分之一。丹皮酚药理作用广泛，具有抗炎、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等作用[5]。所以本实验通过丹皮酚对 MRP2 mRNA 表达和功能影响的研究，以探讨其降黄的可能作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide，DMSO)购自 Sigma。丹皮酚(纯度：99%)购自南京泽朗植提。5(6)-羧基-2'，7'-二氯荧光素二乙酸盐(5-(and)-6-Carboxy-2'，7'-dichlorofluoresceind，CDFDA)购自重庆禾宝生物技术有限公司。TaKaRa RNAiso Plus 及 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)购自宝生物工程(大连)有限公司；引物用 Primer Premier 5.0 软件设计，委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成；DMEM 培养基购自 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季青；CCK8 试剂盒购自碧云天。细胞培养板购自 Costar 公司。

### 1.2 细胞培养

细胞株人肝癌细胞 HepG2 为本实验室保存。HepG2 细胞接种于含灭活胎牛血清(体积分数为 10%)、抗生素(100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)的 DMEM 高糖培养基中。HepG2 细胞培养于 37 ℃、5%$CO_2$ 的饱和湿度培养箱中。0.25%胰酶消化、传代，取对数生长期细胞进行实验。

### 1.3 主要溶液配制

丹皮酚溶液的配制。称取 2 mg 丹皮酚溶于 1 ml DMSO 中，超声震荡，以 0.22 μm 过滤膜滤过，终浓度为 2 μg/μl，4 ℃冰箱保存；CDFDA 溶液的配制。称取 1.058 mg CDFDA，溶于 1 ml DMSO 溶液中，超声震荡，以 0.22 μm 过滤膜滤过，终浓度为 1.058 μg/μl，4 ℃冰箱保存。

### 1.4 实验分组与处理实验分组如下

①对照组：含 0.1%DMSO 培养基组；②丹皮酚处理组：加入丹皮酚溶液，使丹皮酚终浓度为 2 μg/ml，同时，DMSO 终浓度为 0.1%。实验处理：细胞接种约 36 h 后，处理组加入丹皮酚溶液、对照组加同体积的 DMSO 处理 24 h。

### 1.5 CCK8 法

取对数生长期细胞，调整细胞密度为 $5\times10^4$ 个/ml 接种于 96 孔板中，每孔 200 μl。约 18 h 后，按分组培养处理，每个组分别设置 5 个复孔，同时设置空白对照组。药物作用一段时间后，每孔加入 100 μl 比例为 1:10 的 CCK8 与 DMEM 的混合液，继续培养 2.5 h 后，在酶联免疫检测分析仪上测定 $A_{450\,nm}$ 值。按以下公式计算药物对细胞存活率的影响，实验以 3 次平行实验数据为最终结果：细胞存活率=$(A_{处理}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})\times100\%$。

### 1.6 Real-time qPCR 法检测 MRP2 转运体 mRNA 的表达

采用 Trizol 法提取总 RNA；用 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒按说明书操作反转录成 cDNA。荧光定量 PCR 检测 MRP2(227 bp)转运体基因产物，以 GAPDH(226 bp)做内参。反应体系：SYBR green mix 10 μl、上下游引物各 0.6 μl、cDNA 2 μl、R Nase-free 水 6.8 μl；反应条件：95 ℃ 3 min；95 ℃ 10 s，63 ℃ 30 s(MRP2)/60℃ 30 s(GAPDH)，40 次循环，于 65 ℃~95 ℃条件下检测熔解曲线。MRP2 序列上游引物：5'-ACAGAGGCTGGTGGCAACC-3'，下游引物：5'-ACCATTACCTTGTCACTGTCCATGA-3'；PXR 序列上游引物：5'-GCTGGAACCATGCTGACTTT-3'，下游引物：5'-CACATACACGGCAGATTTGG-3'；GAPDH 引物序列上游：5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACGG-3'，下游引物：5'-CCTGGAAGATGGTGATGGGAT-3'。

### 1.7 流式细胞仪检测 MRP2 转运体功能

流式细胞仪检测 MRP2 转运体功能的原理为：荧光标记的细胞或颗粒在激光激发下发出散射光和荧光的发射波，散射光和发射光被检测器获取，再经一系列滤光片、光栅处理去除干扰并将光信号经光电转换和放大后输入计算机，并由软件分析处理。而 CDFDA 为 MRP2 的特异性荧光底物，所以可以利用其荧光强度的变化对 MRP2 的转运功能进行研究。

取对数生长期细胞，调整细胞密度为 $4\times10^5$ 个/ml 接种于 6 孔板中，每孔接种细胞悬液 1 ml。约 36 h 后，向对照组、丹皮酚(2 μg/ml)组中分别加入 1 μl DMSO、1 μl 2 μg/μl 丹皮酚溶液，按分组培养处理 24 h，加入转运体特异性荧光底物 1 μl CDFDA(1.058 μg/μl)，于 37 ℃、5%$CO_2$ 的饱和湿度培养箱内培养 30 min，按照细胞培养传代方式处理后，预冷 PBS 悬浮后流式细胞仪分析。同时设置空白组，空白组为 0.1% DMSO 处理组细胞，不加特异性荧光底物。

### 1.8 统计学分析

所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析，每组实验至少重复 3 次。计量资料的结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，如数据符合正态性与方差齐性，则采用 $t$ 检验比较 2 组间差异，

否则采用 Wilcoxon 秩和检验比较两组间差异。检验水准 $\alpha$=0.05 表示统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 丹皮酚对 HepG2 细胞存活率的影响

为了确保丹皮酚(2 μg/ml)不会对 HepG2 细胞的增殖效应产生影响，采用 CCK8 法对丹皮酚的细胞增殖效应进行分析，结果显示：与对照组(0.591 ± 0.165)相比，丹皮酚(2 μg/ml)组(0.591 ± 0.190)并不降低细胞增殖效应($t$=-0.004，$P$=0.997)(表 1)。提示丹皮酚(2 μg/ml)对 HepG2 细胞增殖效应无影响，故本实验采用该丹皮酚浓度。

**表 1 丹皮酚对 HepG2 细胞存活率的影响($n$=3)**

Tab.1 Effect of Paeonol on viability of HepG2 cells($n$=3)

| 分组 | 浓度(μg/ml) | $A_{490nm}$ | 存活率(%) |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0 | 0.591 ± 0.165 | 100.00 |
| 丹皮酚组 | 2 | 0.591 ± 0.190 | 99.33 |
| $t$ 值 | | -0.004 | |
| $P$ 值 | | 0.997 | |

### 2.2 丹皮酚对 HepG2 细胞中 MRP2 mRNA 表达的影响

为了分析丹皮酚对细胞转运体 MRP2 在转录水平上的影响，将培养的 HepG2 细胞以丹皮酚(2 μg/ml)作用 24 h。结果显示：与对照组(1.000 ± 0.024)相比，丹皮酚组(3.594± 0.342)显著上调细胞中 MRP2 mRNA 的表达($Z$=-2.640，$P$=0.008)(表 2)。结果提示丹皮酚可能通过诱导 HepG2 细胞的药物转运体 MRP2 表达影响其对底物的转运效率。

**表 2 丹皮酚孵育 HepG2 细胞后 MRP2 转运体转录水平的变化($n$=3)**

Tab.2 Expression levels of transporters MRP2 after the incubation of Paeonol($n$=3)

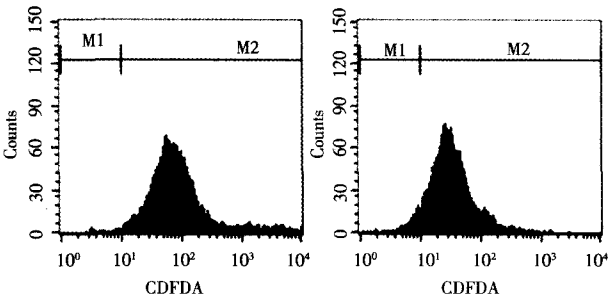
| 分组 | 浓度(μg/ml) | MRP2 mRNA 水平表达值 |
|---|---|---|
| 对照组 | 0 | 1.000 ± 0.024 |
| 丹皮酚组 | 2 | 3.594 ± 0.342 |
| $Z$ 值 | | -2.640 |
| $P$ 值 | | 0.008 |

### 2.3 丹皮酚对 HepG2 细胞 MRP2 转运功能的影响

为了观察丹皮酚是否影响 MRP2 转运体的转运效率，用流式细胞技术检测丹皮酚作用细胞 24 h 后对特异性荧光底物的转运效率。结果显示：与对照组(137.3 ± 23.56)比较，丹皮酚(2 μg/ml)处理组(45.04 ± 7.297)的荧光强度值明显降低($Z$=-17.981，$P$=0.000)(图 1、表 3)。结果提示，丹皮酚可能增强 HepG2 细胞 MRP2 对底物的外排功能。

### 2.4 丹皮酚对 HepG2 细胞 PXR mRNA 表达的影响

Real-time PCR 法检测丹皮酚对 HepG2 细胞膜核受体 PXR mRNA 表达的影响。与对照组(1.000 ± 0.165)相比有统计学意义(1.830 ± 0.181，$t$=3.393，$P$=0.028)(表 4)。提示丹皮酚(2 μg/ml)可能通过诱导 PXR 调控转运体的表达。




A. 对照组；B. 丹皮酚处理组(2 μg/ml)。 $n$=3

**图 1 丹皮酚对 HePG2 细胞 MRP2 转运特异性底物 CDFDA 的影响**

Fig.1 Increased efflux of MRP2-mediated CDFDA after the incubation of Paeonol

**表 3 丹皮酚对 HePG2 细胞 MRP2 转运特异性底物 CDFDA 的影响($n$=3)**

Tab.3 Increased efflux of MRP2-mediated CDFDA after the incubation of Paeonol($n$=3)

| 分组 | 浓度(μg/ml) | CDFDA荧光强度值 |
|---|---|---|
| 对照组 | 0 | 137.30 ± 23.56 |
| 丹皮酚组 | 2 | 45.04 ± 7.30 |
| $Z$ 值 | | -17.981 |
| $P$ 值 | | 0.000 |

**表 4 丹皮酚对 HepG2 细胞 PXR mRNA 表达的影响($n$=3)**

Tab.4 Expression levels of PXR after the incubation of Paeonol in HepG2 cells($n$=3)

| 分组 | 浓度(μg/ml) | PXR mRNA 水平表达值 |
|---|---|---|
| 对照组 | 0 | 1.000 ± 0.165 |
| 丹皮酚组 | 2 | 1.830 ± 0.181 |
| $Z$ 值 | | 3.393 |
| $P$ 值 | | 0.028 |

## 3 讨 论

内、外源性物质从哺乳动物器官中消除需通过肝细胞胆管侧膜排泄至胆汁，这一过程主要由MRP2负责。如胆汁淤积时胆红素转运障碍，促进 MRP2 表达的手段就具有重要的理论意义和临床实用价值。研究表明：诸多中药都能通过上调 MRP2 表达，诱导其活性，促进胆汁外排，起到保肝利胆作用。如中药黄芩的主要活性成分黄芩素能诱导 MRP2 的表达，从而发挥治疗胆淤性疾病及黄疸性疾病的作用[6]；除此之外，中药栀子的主要活性成分京尼平苷

能通过调节 MRP2 的表达水平而起到利胆、改善胆汁淤积病症的作用[7]。牡丹皮广泛的应用于临床上诸多清胆方剂中[8]，本研究旨在考察牡丹皮的主要活性成分丹皮酚对 HepG2 细胞转运体 MRP2 表达的影响。据文献报道，丹皮酚制剂在犬体内的最大血药浓度仅为 2 μg/ml 左右[9]，且丹皮酚与化疗药物相互作用对人肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制作用研究时采用的孵育时间为 24 h[10]。本研究采用 CCK8 法检测了丹皮酚 2 μg/ml 孵育 24 h 对 HepG2 细胞存活率的影响，结果显示，丹皮酚 2 μg/ml 孵育 24 h 对 HepG2 细胞存活率无显著性影响。故本研究将采用 2 μg/ml 丹皮酚孵育 HepG2 细胞 24 h 为模型进行实验。在后续实验中，本实验采用荧光定量PCR 和流式细胞术的方法分别检测了丹皮酚（2 μg/ml）对 HepG2 细胞 MRP2 mRNA 表达和对特异性荧光底物 CDFDA[11-12]转运效率的影响。实验结果表明，丹皮酚可明显诱导 HepG2 细胞 MRP2 mRNA 的表达（$P$=0.008）；且对 HepG2 细胞中 MRP2 的转运效率也有明显影响（$P$=0.000）。在本研究中，HepG2 细胞中 MRP2 mRNA 表达量及转运效率均被上调，说明丹皮酚具有诱导 MRP2 表达的作用，增强内、外源性物质的排泄，减少胆汁中有害成分的蓄积，这很可能是市售清胆中成药中牡丹皮发挥作用的机制。

孕烷 X 受体（pregnane X receptor，PXR）也称孕烷活化受体、类固醇及外源性物质受体，是核受体亚家族的成员之一，其主要表达于肝脏，少部分表达于结肠和小肠，参与大量内、外源性物质在机体的生物转化、亦在药物转运体的调节中起着重要的作用[13]。MRP2 基因突变可引起 DJS，DJS 是一种遗传性结合胆红素高血症，临床上可用利福平治疗该病，其机制可能是通过激活核受体 PXR 通路增加了 MRP2 的表达[14]。螺内酯亦可以通过启动 PXR 增加 MRP2 的 mRNA 表达，这种作用可被核受体 PXR的拮抗剂酮康唑抑制[15]。本研究以 HepG2 细胞为研究对象，将其用丹皮酚（2 μg/ml）处理 24 h 后提取细胞总 RNA 后，用 qRT-PCR 的方法检测 PXR mRNA 水平的表达变化。结果显示，丹皮酚对 PXR mRNA 水平上调（$P$=0.028）。说明丹皮酚上调 MRP2 表达与功能可能与核受体 PXR 途径有关，这可能也是丹皮酚调控 HepG2 细胞 MRP2 表达及功能的分子机制之一。

综上所述，丹皮酚通过诱导 MRP2 转录水平的表达，增加结合型胆红素的运输而消退黄疸，可能与核受体途径 PXR 相关。这也是临床治疗高结合型胆红素血症病人的实验依据之一。

## 参 考 文 献


[1] Shoda J，Miura T，Utsunomiya H，et al.Genipin enhances Mrp2（Abcc2）-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver[J].Hepatology，2004，39(1)：167-178.

[2] 陈应果，别 平，和祝建勇. 胆红素主要转运子 Mrp2 在大鼠梗阻性黄疸肝脏中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2004，26(16)：1429-1431.

[3] Tsujii H，König J，Rost D，et al.Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2(MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome[J].Gastroenterology，1999，117(3)：653-660.

[4] Aleksunes LM，Klaassen CD.Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-，CAR-，PXR-，PPARα-，and Nrf2-null mice[J].Drug Metabolism & Disposition，2012，40(7)：1366-1379.

[5] 胡云飞，徐国兵.牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J].安徽医药，2014，18(4)：589-592.

[6] 牛 璐，金 晶，陈 馨，等.黄芩素对胆汁外排转运体 MRP2 和 BSEP 的影响[J].中国药理学通报，2015，31(1)：147-148.

[7] 彭 婕，钱之玉，刘同征，等.京尼平苷和西红花酸保肝利胆作用的比较[J].中国新药杂志，2003，12(2)：105-108.

[8] 严 桐，李佳川.丹黄保肝颗粒保肝利胆研究[J].中药药理与临床，2012，28(3)：87-88.

[9] 智红英，孙丽芳，宋吉伦，等.HPLC 法测定丹皮酚制剂在犬体内血药浓度及生物利用度[J].中草药，2009，40(5)：731-734.

[10] 徐淑萍.丹皮酚增强化疗药物对人肝癌细胞的增殖抑制作用及其可能机制[D].合肥：安徽医科大学，2006.

[11] Laupeze B，Amiot L，Courtois A，et al.Use of the anionic dye carboxy-2'，7'-dichlorofluorescein for sensitive flow cytometric detection of multidrug resistance-associated protein activity[J].International Journal of Oncology，1999，15：571-577(7).

[12] Zamek-Gliszczynski MJ，Xiong H，Patel NJ，et al.Pharmacokinetics of 5(and 6)-carboxy-2'，7'-dichlorofluorescein and its diacetate promoiety in the liver[J].J Pharmacol Exp Ther，2003，304(2)：801-809.

[13] 温金华.孕烷受体与药物代谢酶及药物转运蛋白相关性的研究进展[J].中国临床药理学杂志，2014，30(1)：66-69.

[14] 陆伦根.肝药物代谢的调节：核受体 PXR 和 CAR 的作用[J].肝脏，2002，7(4)：259-260.

[15] Ruiz ML，Villanueva SS，Luquita MG，et al.Induction of intestinal multidrug resistance-associated protein 2(Mrp2) by spironolactone in rats[J].Eur J Pharmacol，2009，623(1-3)：103-106.


（责任编辑：冉明会）