DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.005
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1429-03

论著

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

陈应果,别 平,祝建勇 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究梗阻性黄疸大鼠肝细胞毛细胆管面排泄胆红素的转运蛋白Mrp2的改变。方法 采用RT-PCR和免疫荧光技术测得肝细胞Mrp2基因的转录和蛋白表达水平,并与血清胆红素和肿瘤坏死因子-α作相关分析。结果 大鼠胆总管结扎术后,Mrp2基因的转录和蛋白表达明显降低。并与血清胆红素和TNF-α等存在线性负相关。结论 梗阻性黄疸大鼠其胆红素主要转运子Mrp2在转录和蛋白表达水平明显降低,可能是由TNF-α等炎症介质的高表达引起的。Mrp2基因的转录和蛋白表达降低,肝细胞对胆红素的排泄障碍,导致或进一步加重机体的高胆红素血症。

关键词:多药耐药相关蛋白2;胆红素;肿瘤坏死因子-α
中图法分类号:R333.4;R394.3;R575.02 文献标识码:A

Expression of bilirubin transporter Mrp2 in liver of obstructive jaundice rats and the significance

CHEN Ying-guo, BIE Ping, ZHU Jian-yong (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the changes of transport protein Mrp2 excreting bilirubin across the canalicular membrane in obstructive jaundice rats. **Methods** The Mrp2 transcription and protein levels of hepatocytes was measured by RT-PCR and immunofluorescence microscopy in obstructive jaundice rats. A correlation analysis of the transcription and protein levels with TNF-α and serum bilirubin was conducted. **Results** The Mrp2 transcription and protein levels were significantly lower in hepatocytes following bile duct obstruction and negatively correlated with TNF-α and bilirubin in rat serum. **Conclusion** Overexpression of inflammatory factor TNF-α may cause downregulation of transcription and protein levels of Mrp2 gene in obstructive jaundice rats. Bilirubin secretion across canalicular membrane can be inhibited. These may lead to or exaggerate hyperbilirubinemia.

Key words: Mrp2; bilirubin; TNF-α

梗阻性黄疸(obstructive jaundice)是临床上常见的病症。胆汁肝肠流向的中断,可引起复杂而严重的病理生理改变,是导致梗阻性黄疸患者高并发症和高病死率的主要原因。多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance associated protein-2, Mrp2)主要在肝细胞表达,排他性地定位于毛细胆管面,负责胆红素和其它胆汁成分的排泄。先天或后天因素导致其缺陷可引起高胆红素血症和胆汁流的障碍。但胆道梗阻时Mrp2表达改变的机制仍有待进一步阐明。

实验拟采用RT-PCR和免疫荧光技术研究在梗阻性黄疸大鼠肝细胞Mrp2基因的转录和蛋白表达水平。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Tripure试剂(Sigma Company, 美国),RT-PCR试剂盒(Promega Company, 美国),MRP2一抗(兔抗鼠Mrp2多克隆抗体血清EAG15,由德国Keppler教授馈赠,免疫荧光检查时稀释为1/200),FITC山羊抗兔荧光二抗(武汉博士德),TNF-α放免试剂盒(解放军总医院),DEPC水(武汉博士德),APES防脱片剂(北京中山生物试剂公司),丙酮异丙醇,氯仿,Tris-HCl等(重庆医药化学试剂公司),正常山羊血清(武汉博士德),琼脂糖(北京中山生物试剂公司),TAE缓冲液(北京中山生物试剂公司),MRP2扩增的上、下游引物和内参照GAPDH扩增的上、下游引物(上海基康公司合成)。

1.2 实验动物分组及模型制作

实验动物,健康雄性Wistar大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),体质量200~250 g,共48只。数字表法随机分为2组,每组24只。① SHAM组(假手术组);② CBDL组(胆总管结扎组)。观察时相点为术后1、3、7和14 d。每一时相点大鼠为6只。

手术模型制作:SHAM组:乙醚麻醉成功后,正中切口入腹,解剖肝蒂,游离胆总管,但不结扎,关腹。CBDL组:按照文献[1]方法,乙醚麻醉成功后,正中切口入腹,解剖肝蒂,游离胆总管,近十二指肠系膜处8-0尼龙线双重结扎胆总管,在结扎线间切断胆总管制成胆道梗阻模型,关腹。

1.3 观察指标和方法

1.3.1 肝组织Mrp2转运蛋白免疫荧光显微镜检查 组织

作者简介:陈应果(1969-),男,四川省蓬安县人,硕士,主治医师,主要从事梗阻性黄疸的病理生理方面的研究。电话:(023)68835342

收稿日期:2003-08-23;修回日期:2003-11-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的处理，各时相点液氮保存的肝脏标本行冰冻切片，室温放置30 min后，－20 ℃丙酮固定10 min，风干，然后用PBS冲洗，5 min×3次。检查步骤：①先封闭，用正常山羊血清-PBS稀释液室温孵育20 min，倾去血清，勿洗，置于室温编号入湿盒；②加封闭液稀释的一抗，4℃过夜；③未结合的抗体用0.01 mol/L pH 7.2的PBS轻震荡洗涤，10 min×2次；④以下步骤注意避光，加封闭液稀释的二抗，室温下孵育30～60 min；PBS洗涤，最后用蒸馏水洗1次，风干；⑤甘油-PBS封片，镜检。

1.3.2 肝组织Mrp2基因的RT-PCR逆转录扩增 ①总RNA的提取按Tripure试剂盒说明书进行。②RT-PCR逆转录扩增按PROMEGA试剂说明书进行。

Mrp2逆转录扩增的上、下游引物序列如下：

Sense Primer: 5′-AAGGTCGGCATTGTGGGCGGA-3′(base 4 160～4 181)

Anti-sense Primer: 5′-AGCTGTCGCTGCCCTACTCT-3′(base 4 506～4 487)

预计逆转录扩增产物大小为347 bp。

GAPDH逆转录扩增的上、下游引物序列如下：

Sense primer: 5′-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3′

Anti-sense primer: 5′-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3′

预计逆转录扩增产物大小为576 bp。

①RT-PCR反应的各成分：AMV/TfL5×反应Buffer 10 μl、核苷酸混合物1 μl、上、下游引物各50 pmol/L、25 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl、AMV逆转录酶1 μl、TfiDNA多聚酶1 μl、总RNA 1pg-1 μg，最后加去RNA酶水到50 μl。②RT-PCR反应的条件：按48 ℃ 45 min，94 ℃ 2 min。94 ℃ 45 s，60 ℃ 45 s，72 ℃ 1.5 s，循环40次。72 ℃ 7 min，4 ℃温育。③扩增产物电泳。④凝胶成像。

1.3.3 放射免疫法测肝组织匀浆TNF-α 取各时相点液氮保存之肝组织，按试剂盒说明书在FT-608放免测定仪上测定。利用均相竞争抑制原理，采用饱和法测定待测物的含量。

1.3.4 肝功能的测定 各时相点的血清统一送本院检验科测定血清白蛋白、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)。

1.4 统计学处理

利用SPSS 10.0统计软件行方差分析及均数间多重比较；Mrp2与TNFα、Tbil指标间作相关分析。

2 结果

2.1 肝功能变化

大鼠胆总管结扎术后肉眼符合梗阻性黄疸改变，皮肤黄染、尿色深黄。SHAM组术后肝功能各项指标无明显变化；CBDL组术后Tbil、Dbil逐渐增高，Alb降低。第7天Tbil、Dbil达峰值，14 d Tbil、Dbil与7 d相比有所降低(表1)。

表1 CBDL术后肝功能的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Liver function of rats following CBDL ($\bar{x}\pm s$)

Group	PST	Tbil(μmol/L)	Dbil(μmol/L)	ALB(g/L)
SHAM	PST01	6.40±1.35	2.73±0.84	53.25±6.01
	PST03	5.54±1.13	2.61±0.75	55.24±4.07
	PST07	5.85±1.15	2.67±0.97	56.37±5.54
	PST14	5.50±1.04	2.63±0.81	59.37±5.54
CBDL	PST01	72.09±15.34 **	58.12±11.98 **	51.23±7.02
	PST03	143.01±11.01 **	109.21±13.02 **	45.34±5.04 **
	PST07	187.49±19.06 **	148.10±14.79 **	40.59±5.62 **
	PST14	116.51±12.29 **	85.78±7.12 **	29.31±4.14 **
F		267.600	365.732	18.822
P		0.000	0.000	0.000

#: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* SHAM group; PST: postoperative days

2.2 肝组织匀浆TNF-α的变化

如表2所示，SHAM组术后3、7、14 d肝组织匀浆TNF-α的水平与术前相比无明显改变。CBDL组术后，肝组织匀浆TNF-α逐渐增高，7 d即明显增高，14 d约为对照组的7～8倍。

表2 肝组织匀浆TNFα的变化(ng/g liver tissue，$\bar{x}\pm s$)

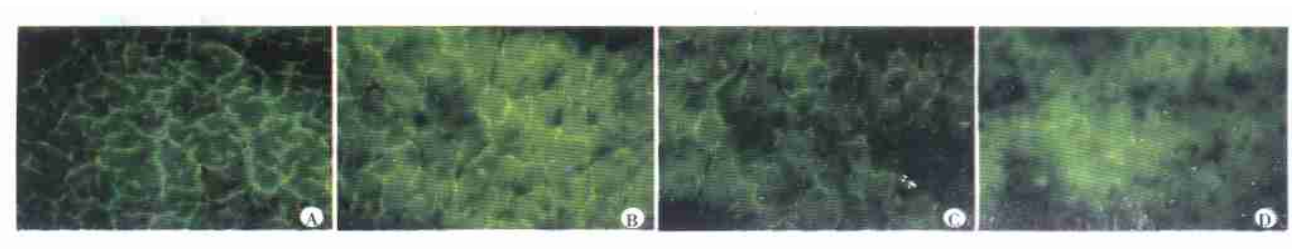
Tab 2 Changes of TNFα level in homogenate liver tissue (ng/g liver tissue，$\bar{x}\pm s$)

Group	PST01	PST03	PST07	PST14
SHAM	1.030±0.174	0.951±0.134	0.892±0.216	0.924±0.147
CBDL	1.040±0.587	1.458±0.874 **	4.147±0.513 **	6.261±0.876 **

$F=15.636$，$P=0.000$ **: $P<0.01$，*vs* SHAM group

2.3 肝组织Mrp2转运蛋白的免疫荧光显微镜检查

免疫荧光染色结果显示Mrp2特异性定位于肝细胞膜的毛细胆管面(图1)，SHAM组中Mrp2的荧光染色强，呈线条形勾勒出毛细胆管轮廓(图1A)；CBDL组术后1 d Mrp2变化不明显(图1B)；3 d时线性荧光染色强度有所减弱(图1C)；7 d时荧光染色明显减弱，线条形特征消失，而呈点状分布于毛细胆管周围区域，且定位较弥散(图1D)；14 d时未见特异性荧光染色。



A: Normal rats; B, C and D: 1, 3 and 7 d after CBDL

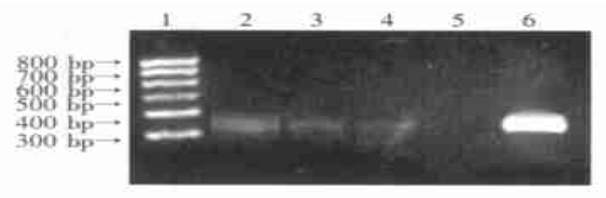
图1 CBDL术后肝组织Mrp2转运蛋白的变化 (×400)

Fig 1 Changes of Mrp2 level in liver tissues of CBDL rats (×400)

2.4 肝组织Mrp2基因的RT-PCR逆转录扩增

Mrp2mRNA经过逆转录和PCR扩增，扩增产物行电泳其结果(图2)，扩增产物为347 bp，CBDL组术后，肝细胞Mrp2基因表达逐渐降低，1 d就有明显差异，7 d基本消失。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



1: Marker; 2—5: 1, 3, 7 and 14 d after CBDL; 6: Normal

图 2　胆道梗阻术后 **Mrp2** 基因的表达变化

Fig 2　Changes of Mrp2 gene expression in liver tissues of CBDL rats

2.5　肝组织 Mrp2 的表达与 TNF-α、Tbil 的相关性检验　肝组织 Mrp2 基因的表达与 TNF-α 存在负相关, $r=-0.9064$ ($P<0.05$); 与血清总胆红素存在负相关, $r=-0.8897$ ($P<0.05$)。

3　讨论

肝细胞毛细胆管面的排泄是内源性和异种物质从哺乳动物器官中消除的决定性步骤。在肝细胞中的转移酶催化这些物质与谷胱甘肽, 葡萄糖酸和硫酸结合形成双亲阴离子结合物, 这些结合物排泄到胆汁中由需 ATP 的结合物输出泵(Mrp2)负责。实验研究表明胆总管结扎术后胆红素明显上升, 7 d 达峰值, 相关性检验发现Mrp2 基因的表达水平与血清总胆红素存在负相关性, 这进一步证实了 Mrp2 作为胆红素排泄的主要转运子[2~4]。在人类 Mrp2 的缺乏是 Dubin-Johnson 综合征的病因[5~7]。Mrp2 基因编码的蛋白作为胆汁流的重要推动力, 结合物输出泵(Mrp2)的表达下调将导致胆汁流障碍(胆汁淤积)[5]。因此从临床角度出发, 了解胆汁淤积时胆红素转运障碍的分子机制和促进 Mrp2 基因表达的方案具有重要的理论意义和临床实用价值。

本组实验研究表明胆总管结扎术后肝细胞毛细胆管面的 Mrp2 mRNA 水平和蛋白水平逐渐下降, 第 3 天就十分显著, 7 d 基本消失。这与国外的研究提示在内毒素、雌激素诱导以及胆总管结扎建立的肝内、肝外性郁胆大鼠模型中均表明 Mrp2 在转录水平、蛋白表达以及膜上分布都有明显下调是一致的。

梗阻性黄疸大鼠机体中 TNF-α 升高的原因是胆汁胆肠流向的中断可导致肠道菌群失调, 肠粘膜屏障受损, Kupffer 细胞吞噬功能下降, 内毒素的产生和吸收增多, 刺激肝内 Kupffer 细胞、胆管上皮细胞、中央静脉内皮细胞等产生、释放大量的 IL-1、IL-6、TNF-α 等炎症介质[8,9], 导致全身炎性反应和机体高分解代谢状态[10]。血浆中 TNF-α 水平影响因素较多, 波动很大; 而肝组织匀浆的胆 TNF-α 水平可较为准确的反映机体内毒素的吸收和炎症介质的释放, 实验中检测肝组织 TNF-α 水平表明, 在胆道梗阻时显著增高, 并随着黄疸程度的加深而进一步升高。同时证实了肝组织匀浆 TNF-α 水平与 Mrp2 基因的表达存在负相关。提示梗阻性黄疸时 TNF-α 异常高表达可能降低 Mrp2 基因的表达。已有实验研究证实 Mrp2 基因启动子有视黄醛反应元件, 炎症介质如白细胞介素-1β 可下调它[8,11]。IL—1β、肿瘤坏死因子-α 和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎症因子的过量表达、释放, 通过抑制 Mrp2 基因启动子的视黄醛反应元件, 肝细胞毛细胆管面的 Mrp2 表达下降, 胆红素及其它胆汁成分排泄发生障碍, 在梗阻基础上进一步加重胆汁淤积, 使病情急剧恶化。

因此 Mrp2 作为肝细胞毛细胆管面上的转运子, 主要负责胆红素和其它胆汁成分的排泄, 如果由于先天和后天原因导致其表达或功能受损将引起胆红素排泄障碍, 而胆红素排泄障碍又引起一系列的变化如营养障碍, 高胆红素血症, 细胞内胆盐蓄积, 炎症介质过量释放, 抑制 Mrp2 基因的表达, 从而进一步加重胆汁淤积, 造成恶性循环。阻断这一恶性循环对那些梗阻已解除而黄疸难以消退, 甚至上升的危重病人有极为现实的临床意义。

参考文献:

[1] 李　锐, 钟光汉, 左声鹤. 实验性阻塞性黄疸时枯锋氏细胞吞噬功能及病理学变化的研究[J]. 第三军医大学学报, 1990, 12(2): 84—87.

[2] Ishikawa T, Muller M, Klunemann C, *et al*. ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. Role of the ATP-dependent transport system for glutathione S-conjugates [J]. J Biol Chem, 1990, 265(31): 19279—19286.

[3] Akerboom T P, Narayanaswami V, Kunst M, *et al*. ATP-dependent S-(2, 4-dinitrophenyl) glutathione transport in canalicular plasma membrane vesicles from rat liver[J]. J Biol Chem, 1991, 266(20): 13147—13152.

[4] Fernandez-Checa J C, Takikawa H, Horie T, *et al*. Canalicular transport of reduced glutathione in normal and mutant Eisai hyperbilirubinemic rats [J]. J Biol Chem, 1992, 267(3): 1667—1673.

[5] Keppler D, and Kartenbeck J. The canalicular conjugate export pump encoded by the cmrp/cmoat gene [A]. In: Boyer J L, Ocker R K. Progress in Liver Diseases[M]. Saunders: Philadelphia, 1996. 55—67.

[6] Mayer R, Kartenbeck J, Buchler M, *et al*. Expression of the Mrp gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes[J]. J Cell Biol, 1995, 131(1): 137—150.

[7] Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, *et al*. Absence of the canalicular isoform of the Mrp gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome[J]. Hepatology, 1996, 23(5): 1061—1066.

[8] Clements W D, Erwin P, McCaigue M D, *et al*. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction[J]. Gut, 1998, 42(2): 293—299.

[9] Kennedy J A, Clements W D, Kirk S J, *et al*. Characterization of the Kupffer cell response to exogenous endotoxin in a rodent model of obstructive jaundice[J]. Br J Surg, 1999, 86(5): 628—633.

[10] Denson L A, Auld K L, Schiek D S, *et al*. Interleukin-β suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(12): 8835—8843.

[11] Kubitz R, Huth C, Schmitt M, *et al*. Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human hepG2 cells[J]. Heptaology, 2001, 34(2): 340—350.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net