

· 论 著 ·

婴儿肝外胆道闭锁肝组织 MRP2 及 FXR 蛋白的表达及其意义*

唐 清¹, 王琳琳¹, 王 华², 单庆文¹, 董淳强¹, 谢湘芝¹

(广西医科大学第一附属医院: 1. 儿二科; 2. 病理科, 广西南宁 530021)

摘要:目的 探讨肝外胆道闭锁(EHBA)婴儿肝组织中多药耐药相关蛋白 2(MRP2)、法尼醇受体(FXR)蛋白的表达及其与胆汁淤积的关系。方法 将临床和病理诊断为 EHBA 的 20 例患儿肝组织作为 EHBA 组, 肝移植手术中成人供体的肝组织 10 例作为对照组, 比较两组患者肝功能指标; 采用免疫组织化学法检测肝组织中 MRP2、FXR 的表达情况, 并进行病理图像分析。结果 EHBA 组患儿血清总胆红素、直接胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶及 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)浓度明显高于对照组($P < 0.05$)。对照组和 EHBA 组肝组织 MRP2 蛋白吸光度(A)值分别为 0.16 ± 0.04 和 0.10 ± 0.02 , 对照组和 EHBA 组肝组织 FXR A 值分别为 0.15 ± 0.06 和 0.06 ± 0.02 , EHBA 组肝组织 MRP2、FXR 表达水平明显低于对照组($P < 0.05$), MRP2 A 值与血清 γ -GT 浓度呈负相关($r = -0.415, P < 0.05$)。FXR 与 MRP2 的表达呈正相关($r = 0.468, P < 0.05$)。结论 EHBA 患儿肝组织 MRP2 表达降低可减少胆汁流, 加重胆汁淤积, MRP2 的下调可能与 FXR 相关。

关键词:多药耐药相关蛋白质类; 胆道闭锁; 法尼醇受体; 婴儿

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.08.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)08-0735-03

The expression of MRP2 and FXR protein in liver tissue of infants with extrahepatic biliary atresia and their significance*

Tang Qing¹, Wang Linlin¹, Wang Hua², Shan Qingwen¹, Dong Chunqiang¹, Xie Xiangzhi¹

(1. the Second Department of Pediatrics; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To explore multidrug resistance associated protein2(MRP2) and farnesoid X receptor(FXR) protein expression in liver tissue of infants with extrahepatic biliary atresia (EHBA) and their relationship with cholestasis. **Methods** 20 samples of liver tissue of infants with clinically and pathologically confirmed EHBA were served as EHBA group, and 10 samples of liver tissue of adult liver transplant donors as control group. Liver function indexes of patients in the two groups were compared, and immunohistochemistry was conducted to detect the protein expression of MRP2 and FXR in liver tissue. **Results** Serum concentration of total bilirubin, direct bilirubin, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase(γ -GT) of infants in EHBA group were significantly higher than those in control group($P < 0.05$). The absorbance(A) values of MRP2 protein in liver tissue in control and EHBA group were $0.16 \pm 0.04, 0.10 \pm 0.02$, respectively, and those of FXR protein in control and EHBA group were $0.15 \pm 0.06, 0.06 \pm 0.02$, respectively. The expression levels of MRP2 and FXR in liver tissue in EHBA group were significantly lower than those in control group($P < 0.05$). The A value of MRP2 showed negative correlation with serum concentration of γ -GT($r = -0.415, P < 0.05$), while FXR and MRP2 expression was positively correlated($r = -0.415, P < 0.05$). **Conclusion** The down-regulation of MRP2 expression may reduce the bile flow and increase cholestasis which was associated with FXR.

Key words: multidrug resistance-associated proteins; biliary atresia; farnesoid X receptor; infants

研究表明胆汁的形成和分泌与肝细胞毛细胆管膜上的一些转运子密切相关。胆汁淤积症多药耐药相关蛋白 2(multidrug resistance associated protein2, MRP2)主要表达于肝细胞, 定位于毛细胆管, 负责胆红素和其他胆汁成分的排泄^[1]。先天或后天因素引起的该蛋白缺陷可导致高胆红素血症和胆汁流障碍。法尼醇受体(farnesoid X receptor, FXR)为 MRP2 的转录调节因子, 可转录激活 MRP2 基因, 增加 MRP2 的表达^[2]。肝外胆道闭锁(extrahepatic biliary atresia, EHBA)为肝外胆管中断, 管腔部分或全部闭锁, 呈条索状, 临床表现为进行性阻塞性黄疸、胆汁性肝硬化和门静脉高压, 甚至肝功能衰竭, 是婴儿持续阻塞性黄疸最常见的病因之一。目前, 人们对 EHBA 患儿肝组织中 MRP2 及 FXR 表达情况的报道较少。本研究采用免疫组织化学法检测 EHBA 婴儿肝组织中 MRP2、FXR 蛋白的表达, 以探讨二者与婴儿 EHBA 发病的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2000 年 1 月至 2009 年 10 月经临

床和病理检查诊断为 EHBA 的患儿 20 例作为 EHBA 组, 其中, 男 12 例, 女 8 例; 平均年龄(2.21 ± 0.59)个月。将 10 例肝移植手术中成人供体的肝组织蜡块作为对照组, 其中, 男 8 例, 女 2 例; 平均年龄(30.00 ± 5.85)岁, 肝功能检测指标及病理组织学检查提示正常。EHBA 诊断标准参考文献^[3]。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂为即用型快捷免疫组织化学 MaxVision™ 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司), MRP2(M₂ III-6)鼠单克隆抗体及 FXR(H-130)兔多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; 主要仪器为高清晰彩色病理图像分析系统(德国 DMR+Q550)。

1.3 肝功能指标的检测 EHBA 组患儿及对照组成人均抽取空腹静脉血 2 mL 进行肝功能指标检测, 包括: 血清总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)及 γ -谷氨酰转肽酶(gamma-glutamyl transpeptidase, γ -GT)的测定。

1.4 标本采集 EHBA 患儿行肝组织活检, 将活检肝组织立

* 基金项目: 广西自然科学基金(桂科青 0832028); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0816004-6)。

表 1 EHBA 组与对照组血清 TBIL、DBIL、ALT、AST 及 γ -GT 浓度的比较

组别	n	TBIL(μ mol/L)	DBIL(μ mol/L)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	γ -GT(IU/L)
对照组	10	9.21 \pm 2.85	3.29 \pm 1.66	23.09 \pm 6.09	24.17 \pm 6.35	20.63 \pm 5.11
EHBA 组	20	208.30 \pm 59.77*	121.00 \pm 36.48*	119.15 \pm 104.95*	245.33 \pm 112.67*	680.05 \pm 501.90*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

即置 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,切片,分别行苏木素-伊红染色和免疫组织化学染色。

1.5 肝组织 MRP2、FXR 的免疫组织化学检测 石蜡切片常规脱蜡水化,高压修复抗原,30 mL/L 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,分别采用 MRP2 鼠单克隆抗体、FXR 兔多克隆抗体作为第一抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h(工作浓度 1:50),磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)冲洗,滴加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的第二抗体孵育 20 min,二氨基联苯胺显色,苏木素复染,中性树胶封片,PBS 代替第一抗体作为阴性对照。染色结果进行病理图像分析,每张切片在高倍显微镜下随机选取 5 个视野进行分析,MRP2、FXR 表达量以吸光度(absorbance, A)值表示, A 值越高表示 MRP2、FXR 表达水平越高。

1.6 统计学处理 应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本非参数检验,组间相关性分析采用 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝功能指标的检测结果 EHBA 组患儿血清 TBIL、DBIL、ALT、AST 及 γ -GT 浓度明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 肝组织 MRP2 和 FXR 的表达 MRP2 表达位于肝细胞膜,呈颗粒状,对照组和 EHBA 组肝组织 MRP2 蛋白 A 值分别为 0.16 \pm 0.04 和 0.10 \pm 0.02, EHBA 组肝组织 MRP2 表达水平明显低于对照组($P < 0.05$),MRP2 A 值与 γ -GT 浓度呈负相关($r = -0.415, P < 0.05$)。FXR 表达位于肝细胞核,呈棕黄色,对照组和 EHBA 组肝组织 FXR A 值分别为 0.15 \pm 0.06 和 0.06 \pm 0.02, EHBA 组肝组织 FXR 的表达显著低于对照组($P < 0.05$),FXR 与 MRP2 的表达呈正相关($r = 0.468, P < 0.05$),见图 2 图 1、2。

3 讨论

遗传性突变或胆汁淤积损害都会导致肝转运系统的表达和功能改变。一些转运蛋白可能促进或维持胆汁淤积,另一些则可能随胆汁淤积的持续出现适应性改变而缓解胆汁淤积所致的肝损害。所以当机体出现胆汁淤积的时候,了解肝细胞转运蛋白的表达情况有助于认识胆汁淤积的分子机制,也有助于针对这些转运蛋白的改变制订治疗策略。

MRP2 是三磷酸核苷结合盒(ATP-binding cassette, ABC)载体蛋白家族中的一员,主要表达在人体肝细胞的毛细胆管面(顶端面)。MRP2 是介导结合型胆红素向毛细胆管排泄的主要转运子^[4]。Kamisako 等^[5]通过转染 MRP2 细胞的膜囊泡证明双价葡萄糖醛酸结合胆红素和单价葡萄糖醛酸结合胆红素是 MRP2 的底物,并发现黄疸肝色素沉着综合征患者的肝细胞毛细胆管面上存在 MRP2 缺失,这表明 MRP2 的缺失可能与该综合征的发生有关。

研究发现,在胆总管-肝胆管结扎的动物淤胆实验模型、原发性胆汁性肝硬化及原发性硬化性胆管炎患者的肝组织中 MRP2 蛋白及 mRNA 的表达水平下降^[6-7],梗阻解除后,MRP2 的表达水平缓慢恢复^[8]。由于婴儿的正常肝脏组织来源极少,本研究采用肝移植手术中成人供体的正常肝组织作为

正常对照。Chen 等^[9]曾对婴儿和成人正常肝组织的肝转运蛋白及核受体 FXR 进行了免疫荧光染色及荧光定量 PCR 检测,结果无论是从蛋白水平还是转录水平,肝转运蛋白和核受体 FXR 在婴儿及成人正常肝组织中的表达均没有差异,所以采用成人正常肝组织作为对照具有可比性。Chen 等^[9]发现 MRP2 蛋白的表达在 EHBA 早期及晚期均处于低水平。本研究显示,相对于正常肝细胞膜上的 MRP2 蛋白表达水平, EHBA 组患儿肝细胞膜 MRP2 蛋白低表达,表明在婴儿 EHBA 早期,机体即出现 MRP2 蛋白的表达下降。

γ -GT 主要来源于肝脏,由肝细胞线粒体产生,主要位于 Kupffer 细胞、门静脉周围血管及胆管内皮细胞,是反映肝细胞受损程度的重要指标。 γ -GT 可作为反映淤胆型肝炎综合征患儿胆汁淤积及判断预后的敏感指标^[10]。本研究发现在 EHBA 婴儿的肝组织中,MRP2 蛋白水平与 γ -GT 呈负相关, γ -GT 越高,胆汁淤积越重,MRP2 蛋白水平越低。淤胆时 MRP2 的改变减轻了胆汁成分蓄积对机体的毒性损害,但同时又导致胆汁流减少,加重胆汁淤积。

FXR 是一种孤儿核受体,为配体依赖的转录因子,它可与视黄醛 X 受体(retinoid X receptor, RXR)形成 FXR/RXR 二聚体,后者结合到相应的 DNA 反应元件上,通过调节靶基因的表达来实现其生理功能。MRP2 基因是 FXR 的靶基因,靶基因启动子上的一个高度保守反向重复序列(inverted repeat sequence, IR-1)为 FXR 的反应元件。FXR 通过 FXR/RXR 二聚体结合到靶基因的启动子(即 IR-1)上,转录激活靶基因启动子,增加靶基因的表达水平^[11],从而降低肝细胞内的胆汁酸浓度。如果 IR-1 突变或缺失,FXR 对靶基因的调节作用消失。

本研究显示正常肝细胞核有一定量的 FXR 表达。相对于正常肝细胞核的 FXR 表达水平, EHBA 早期肝细胞核 FXR 蛋白的表达量即显著降低,且 MRP2 蛋白与 FXR 蛋白表达水平均下调,二者呈正相关。因此,MRP2 表达下调可能与 FXR 表达抑制有关。吴晓平等^[12]在梗阻性大鼠的肝细胞中也观察到 MRP2 和 FXR 表达下调的同步性,推测 FXR 蛋白对 MRP2 的表达具有正性调控作用。

胆汁淤积最显著的特点是引起肝细胞损害,胆盐持续存在引起肝细胞损害和肝细胞增殖,持续的炎症反应导致慢性门静脉炎症和胆管增生^[13],同时促炎症细胞因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 和白细胞介素 1- β (interleukin 1- β , IL1- β) 增加并维持病变的分泌反应^[14],这些炎症反应可以导致大胆管的闭塞,从而继发性胆汁流障碍。另外 TNF- α 和 IL1- β 的增高也可导致核受体的表达缺失^[15],胆汁淤积患者肝组织 FXR 的表达降低可能为细胞因子介导途径的继发反应,但具体机制还需进一步阐明。FXR 蛋白为转运蛋白 MRP2 的主要转录调节因子,FXR 的下调可进一步降低 MRP2 蛋白的表达,使胆汁淤积加重。

总之, EHBA 患儿的肝细胞由于受胆汁淤积的持续损害,其肝特异性转运蛋白的表达及功能均发生改变,MRP2 蛋白水平的降低可减轻胆汁成分蓄积对机体的毒性损害,但同时却造成胆汁流减少而加重胆汁淤积。MRP2 表达下调可能与 FXR 表达抑制有关。在梗阻解除后,应用 FXR 激动剂促 FXR 的表达,将有利于转录调节 MRP2 蛋白的表达,增加胆汁流,降低

血清胆红素水平;同时 FXR 在脂代谢和糖代谢中均发挥重要作用,这有利于正常肝细胞再生^[16]。但由于肝组织取材困难,婴儿 EHBA 在梗阻解除后以及在疾病晚期,其肝组织 MRP2、FXR 表达情况的跟踪检测难以实现,二者在 EHBA 患儿肝组织中表达的远期意义还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABC2 (MRP2)[J]. *Pflugers Arch*, 2007, 453(5): 643-659.
- [2] Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(4): 2908-2915.
- [3] 覃肇源, 黄鑫薪, 李剑波. 婴儿淤胆型巨细胞病毒性肝炎临床研究展望[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(15): 2401-2404.
- [4] Kruh GD, Belinsky MG, Gallo JM, et al. Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1): 5-14.
- [5] Kamisako T, Leier I, Cui Y, et al. Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2[J]. *Hepatology*, 1999, 30(2): 485-490.
- [6] Kanno K, Tazuma S, Niida S, et al. Unique reciprocal changes of hepatocellular membrane transporter expression and fluidity in rats with selective biliary obstruction [J]. *Hepatol Res*, 2003, 26(2): 157-163.
- [7] Kullak-Ublick GA, Baretton GB, Oswald M, et al. Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatol Res*, 2002, 23(1): 78-82.
- [8] 陈应果, 别平, 祝建勇. 转运蛋白多药耐药相关蛋白 2 在胆道再通大鼠肝脏中的表达及意义[J]. *中华实用外科杂志*, 2005, 22(11): 1301-1303.
- [9] Chen HL, Liu YJ, Chen HL, et al. Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia[J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(6): 667-673.
- [10] 刘志峰, 郝理华, 何祖惠, 等. 淤胆型婴儿肝炎综合征患儿治疗前后血清 γ -谷氨酰转氨酶水平变化[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(7): 490-491.
- [11] Van Mil SW, Milona A, Dixon PH, et al. Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2): 507-516.
- [12] 吴晓平, 柴进, 何宇. 梗阻性黄疸大鼠肝细胞 MRP2 和 FXR 蛋白表达变化及意义分析[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2008, 17(9): 765-767.
- [13] Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5): 1565-1577.
- [14] Geier A, Dietrich CG, Voigt S, et al. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis[J]. *Hepatology*, 2003, 38(2): 345-354.
- [15] Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, et al. Interleukin 1 β inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance[J]. *Hepatology*, 2004, 40(4): 951-960.
- [16] Huang W, Ma K, Zhang J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration[J]. *Science*, 2006, 312(5771): 233-236.

(收稿日期: 2011-11-23 修回日期: 2011-12-06)

(上接第 734 页)

- of Ca²⁺ inflow[J]. *Biochem J*, 1987, 245(1): 41-47.
- [12] Narayanan N, Su N, Bedard P. Inhibitory and stimulatory effects of fluoride on the calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1070(1): 83-91.
- [13] Davies SA, Terhaz S. Organellar calcium signalling mechanisms in Drosophila epithelial function[J]. *J Exp Biol*, 2009, 212(Pt 3): 387-400.
- [14] Caverzasio J, Bonjour JP. Characteristics and regulation of Pi transport in osteogenic cells for bone metabolism[J]. *Kidney Int*, 1996, 49(4): 975-980.
- [15] Peerce BE. Effect of substrates and pH on the intestinal Na⁺/phosphate cotransporter; evidence for an intervesicular divalent phosphate allosteric regulatory site[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1239(1): 1-10.
- [16] Murphy AJ, Hoover JC. Inhibition of the Na, K-ATPase by fluoride. Parallels with its inhibition of the sarcoplasmic reticulum CaATPase[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(24): 16995-17000.
- [17] Suketa Y, Suzuki K, Taki T, et al. Effect of fluoride on the activities of the Na⁺/glucose cotransporter and Na⁺/K(+) -ATPase in brush border and basolateral membranes of rat kidney (in vitro and in vivo)[J]. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18(2): 273-278.
- [18] Cittanova ML, Estepa L, Bourbouze R, et al. Fluoride ion toxicity in rabbit kidney thick ascending limb cells[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2002, 19(5): 341-349.

(收稿日期: 2011-12-06 修回日期: 2012-01-30)