

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.09.011

论著·临床研究

## 熊去氧胆酸对婴儿胆汁淤积性肝炎多药耐药蛋白3及法尼醇受体基因表达的影响和意义

唐清 王琳琳 单庆文 云翔 陈秀奇 邓亚楠

(广西医科大学第一附属医院儿二科, 广西南宁 530021)

**[摘要]** 目的 分析婴儿胆汁淤积性肝炎患儿应用熊去氧胆酸(UDCA)治疗前后多药耐药蛋白3(MDR3)及法尼醇受体(FXR)的基因表达。方法 选择2008年7月至2010年7月确诊为婴儿胆汁淤积性肝炎患儿28例,予以UDCA治疗。应用SYBR Green I实时荧光定量RT-PCR的方法检测UDCA治疗前、后患儿MDR3、FXR mRNA表达。结果 婴儿胆汁淤积性肝炎患儿应用UDCA治疗后肝功能指标血清总胆红素(TBIL)、结合胆红素(DBIL)、丙氨酸转氨酶(ALT)和 $\gamma$ -谷氨酰基转移酶( $\gamma$ -GT)显著降低( $P<0.05$ )。UDCA治疗后婴儿胆汁淤积性肝炎患儿MDR3 mRNA表达水平显著增加( $P<0.05$ ),而FXR mRNA的表达水平与治疗前比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 UDCA能改善肝功能指标,其机制可能与UDCA上调MDR3 mRNA的表达有关。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(9): 756-758]

**[关键词]** 熊去氧胆酸;胆汁淤积;肝炎;婴儿

### Effects of ursodeoxycholic acid on mRNA expression of MDR3 and FXR in infants with cholestatic hepatitis

TANG Qing, WANG Lin-Lin, SHAN Qing-Wen, YUN Xiang, CHEN Xiu-Qi, DENG Ya-Nan. Second Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Email: peiqing55@foxmail.com)

**Abstract: Objective** To analyze the effects of ursodeoxycholic acid (UDCA) on the mRNA expression of multidrug resistance protein 3 (MDR3) and farnesoid X receptor (FXR) in infants with cholestatic hepatitis. **Methods** Twenty-eight infants who were diagnosed with cholestatic hepatitis between July 2008 and July 2010 were included in the study. These patients received treatment with UDCA. The mRNA expression levels of MDR3 and FXR were measured by real-time quantitative RT-PCR with SYBR Green I, before and after treatment with UDCA. **Results** After treatment with UDCA, the infants with cholestatic hepatitis had significantly decreased serum levels of total bilirubin, direct bilirubin, alanine aminotransferase, and gamma-glutamyltransferase ( $P<0.05$ ) and significantly increased mRNA expression of MDR3 ( $P<0.05$ ). No significant change in mRNA expression of FXR was observed, however ( $P>0.05$ ). **Conclusions** UDCA improves liver function indices in infants with cholestatic hepatitis, which may be related to up-regulated mRNA expression of MDR3.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(9): 756-758]

**Key words:** Ursodeoxycholic acid; Cholestasis; Hepatitis; Infant

婴儿胆汁淤积性肝炎是婴儿期常见的肝病之一,治疗不及时,部分进展为肝纤维化甚至肝硬化,预后不良。如何促进胆汁排出,减少胆汁对肝细胞的损害为治疗的关键。熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)是治疗胆汁淤积性疾病最常用的药物,具有利胆、抗凋亡及抗纤维化等作用<sup>[1]</sup>。动物实验证实UDCA可上调多药耐药蛋白3(multiple drug

resistance 3, MDR3)的表达<sup>[2]</sup>,MDR3作为磷脂载体可以促进胆汁磷脂分泌,乳化胆汁中的胆盐,从而保护胆管上皮细胞免受胆盐的损伤。法尼醇受体(farnesoid X receptor, FXR)为MDR3的转录调节因子,可转录激活MDR3基因,增加MDR3的表达<sup>[3]</sup>。目前UDCA对人体MDR3及FXR的影响相关的研究少见。本研究通过检测28例婴儿胆

[收稿日期] 2013-01-17; [修回日期] 2013-02-27

[基金项目] 广西卫生厅基金(编号: Z2010357)。

[作者简介] 唐清,女,博士,副主任医师。

胆汁淤积性肝炎患儿应用 UDCA 治疗前、后 MDR3 和 FXR mRNA 的表达情况, 阐明 UDCA 是否能上调 MDR3 mRNA 的表达, 调控机制是否通过上调 FXR 起作用, 从而初步探讨 UDCA 的作用机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

2008年7月至2010年7月在本院住院诊断为婴儿胆汁淤积性肝炎患儿28例, 男20例, 女8例, 男女比例为2.5:1, 平均年龄为 $2.9 \pm 1.8$ 个月, 应用UDCA口服治疗(优思弗, 生产批号: 11G271922, 德国福克大药厂), 每日15~20 mg/kg, 疗程2周。病例入选标准参考文献<sup>[4-5]</sup>: (1) 黄疸发病在2月龄以内; (2) 血清总胆红素 $>85.5 \mu\text{mol/L}$ , 结合胆红素占总胆红素的比例 $>20\%$ ; 或血清总胆红素 $<85.5 \mu\text{mol/L}$ , 结合胆红素 $>17.1 \mu\text{mol/L}$ ; (3) 大便颜色变浅; (4) 肝脏增大 $>2.0\sim 2.5 \text{ cm}$ 和(或)肝脏质地变硬; (5) 血清丙氨酸转氨酶(ALT)升高。

### 1.2 样本的采集和处理

在家长知情同意的情况下, 采集UDCA治疗前、后外周血1 mL, 置ACD管, 4 h内提取外周血总RNA, 按逆转录试剂盒要求逆转录为cDNA。本研究获医院伦理委员会批准。

### 1.3 实时荧光定量检测

1.3.1 引物序列 引物序列使用Primer Premier 5.0软件设计引物, 所有引物序列均用NCBI BLAST验证。MDR3和FXR为目的基因,  $\beta$ -actin为内参基因, PCR引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 并经PAGE胶纯化, 用适量双蒸水溶解, 终浓度为 $10 \mu\text{M}$ 。引物见表1。

表1 MDR3、FXR和 $\beta$ -actin的引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
MDR3	F: TGGCCCTGGTTGGAAGTAGTG	391
	R: AGAAGGATCTTGGGGTTGCCAA	
FXR	F: TTCCTCGTATCCTATTATTC AAC	213
	R: TCTCCACAAACAACACACAGCTC	
$\beta$ -actin	F: AGTTGCGTTACACCCTTTCTTG	149
	R: CACCTTCACCGTTCCAGTTTT	

1.3.2 反应体系  $2.5 \times \text{RealtMasterMix}$  (SYBR Green)  $9 \mu\text{L}$ , 上下游引物( $10 \mu\text{M}$ )各 $0.4 \mu\text{L}$ , cDNA  $2 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $8.2 \mu\text{L}$ , 共 $20 \mu\text{L}$ 。

1.3.3 荧光定量RT-PCR反应条件  $95^\circ\text{C}$ 预变性2 min;  $95^\circ\text{C}$ 变性20 s,  $60^\circ\text{C}$ 退火20 s,  $68^\circ\text{C}$ 延伸45 s, 共40个循环; 收集溶解曲线阶段(为仪器程序自带步骤)。

### 1.4 结果判断

测定各样品的CT值, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析MDR3和FXR基因在UDCA治疗前、后的mRNA水平的相对表达量变化。每个样本重复反应3次, 取平均CT值作为每个样品的CT值。CT值是指每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值所需循环数, CT值与mRNA的表达水平呈负相关, 即CT值越高, MDR3和FXR mRNA的表达水平越低。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 16.0统计学软件进行统计学分析, 所有数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 非正态分布数据进行对数转换, 使之符合正态分布。组间比较采用两样本均数比较和配对设计的t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 UDCA治疗前后肝功能指标的比较

UDCA治疗后总胆红素(TBIL)、结合胆红素(DBIL)、ALT和 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -GT)与治疗前比较显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 婴儿胆汁淤积性肝炎UDCA治疗前后肝功能的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	TBIL ( $\mu\text{mol/L}$ )	DBIL ( $\mu\text{mol/L}$ )	ALT (U/L)	$\gamma$ -GT (U/L)
UDCA 治疗前	28	$191 \pm 93$	$108 \pm 48$	$136 \pm 15$	$2.3 \pm 0.6$
UDCA 治疗后	28	$142 \pm 68$	$81 \pm 35$	$79 \pm 63$	$2.2 \pm 0.6$
t值		5.96	5.86	3.92	-2.73
P值		$<0.01$	$<0.01$	$<0.01$	0.01

注: TBIL为总胆红素; DBIL为结合胆红素; ALT为丙氨酸转氨酶;  $\gamma$ -GT为谷氨酰转肽酶, 且数据已经过对数转换

### 2.2 UDCA治疗前后MDR3及FXR mRNA相对表达量的比较

UDCA治疗后MDR3 mRNA的相对表达量较治疗前明显增加( $P=0.03$ ); FXR mRNA的相对表达量较UDCA治疗前略增加, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表3。

表3 UDCA 治疗组治疗前、后 MDR3 及 FXR mRNA 的  $\Delta$ CT 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	MDR3 mRNA	FXR mRNA
UDCA 治疗前	28	7.9 ± 2.9	12.6 ± 3.2
UDCA 治疗后	28	6.9 ± 2.8	12.3 ± 3.1
<i>t</i> 值		2.18	0.35
<i>P</i> 值		0.03	0.73

### 3 讨论

胆汁淤积是由感染、药物、自身免疫、代谢或家族遗传性疾病引起的肝细胞功能缺陷或是胆管阻塞减少胆汁流。胆汁淤积导致胆盐及其他胆汁毒性成分在全身尤其蓄积在肝细胞，加速肝细胞损害，随着病程发展，逐渐发展为肝纤维化和肝硬化。所以如何选择有效的药物早期治疗胆汁淤积性肝病显得尤为重要。

UDCA 能拮抗胆汁中疏水性胆酸的细胞毒性作用。UDCA 通过增加亲水性胆汁酸，减少疏水性胆汁酸，来降低胆汁酸毒性，当 UDCA 推荐剂量为 13~15 mg/kg 时，UDCA 可升至总胆盐的 50%，比值随着剂量的增加而增高<sup>[6]</sup>，结果胆汁成分中疏水性胆盐减少，毒性更小。也有研究认为高剂量和低剂量 UDCA 疗效相近，但低剂量副作用更小<sup>[7]</sup>。UDCA 能刺激胆管相关转运蛋白促进胆汁分泌<sup>[8]</sup>，诱导转运蛋白的表达，既能增加胆盐依赖性胆汁流，又能增加非胆盐依赖性胆汁流，冲洗毛细胆管，溶解胆盐 UDCA 还通过增加 MDR3 的表达而增加磷脂的分泌，分泌的磷脂与胆盐形成混合微粒，从而减轻对胆管细胞的毒性作用。FXR 是核受体超家族的成员，为配体激活的转录因子，MDR3 基因是 FXR 的靶基因，FXR 基因的变化可以调控 MDR3 mRNA 的表达<sup>[3]</sup>。

本研究对婴儿胆汁淤积性肝炎患儿选用 UDCA (每日 10~20 mg/kg) 口服治疗 2 周，其肝功能指标 TBIL、DBIL 及 ALT 显著降低， $\gamma$ -GT 也下降，说明 UDCA 治疗婴儿胆汁淤积性肝炎有效，能明显改善肝功能指标。

UDCA 治疗婴儿胆汁淤积性肝炎是否通过诱导 MDR3 mRNA 的表达起作用？本研究对婴儿胆汁淤积性肝炎的患儿应用 UDCA 治疗前、后进行 MDR3 和 FXR mRNA 的相对表达量的测定，结果显示应用 UDCA 治疗后婴儿胆汁淤积性肝炎 MDR3 mRNA 的相对表达量显著增高，而 FXR mRNA 的相对表达量无改变，表明 UDCA 可以上调 MDR3 mRNA 的表达，从而增强了 MDR3 的表达，这与小鼠的研究结果一致<sup>[8]</sup>。但 UDCA 对 FXR mRNA

表达无影响，可见在婴儿胆汁淤积性肝炎 UDCA 上调 MDR3 mRNA 并非依赖核受体 FXR<sup>[9]</sup>。UDCA 是孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR) 的激动剂，可以通过激活 PXR 诱导细胞色素 P4503A4 活化<sup>[10]</sup>，细胞色素 P4503A4 能激活胆汁酸和类固醇激素的羟化作用，通过对胆汁酸形成羟化和共轭环来降低其疏水性，从而有效地解除胆汁酸的细胞毒性作用，并使其易接触到转运蛋白，从而间接增强了 MDR3 等肝胆管膜转运蛋白的表达和功能<sup>[8]</sup>。

总之，本研究发现 UDCA 有较好的利胆护肝的作用，可以改善婴儿胆汁淤积性肝炎的肝功能指标；UDCA 的作用之一可能通过上调 MDR3 mRNA 保护肝胆管细胞。以上研究结果为临床应用 UDCA 治疗婴儿胆汁淤积性肝炎提供了一定的理论依据。

#### [参 考 文 献]

- Paumgartner G, Pusch T. Medical treatment of cholestatic liver disease[J]. Clin Liver Dis, 2008, 12(1): 53-80.
- Fickert P, Zollner G, Fuchsichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R, et al. Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver[J]. Gastroenterology, 2001, 121(1): 170-183.
- Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, et al. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3[J]. J Biol Chem, 2003, 278(51): 51085-51090.
- Benchimol EI, Walsh CM, Ling SC. Early diagnosis of neonatal cholestatic jaundice: test at 2 weeks[J]. Can Fam Physician, 2009, 55(12): 1184-1192.
- 黄志华, 刘艳. 婴儿胆汁淤积症的诊断与治疗 [J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(7): 481-483.
- Rost D, Rudolph G, Kloeters-Plachky P, Stiehl A. Effect of high dose ursodeoxycholic acid on its biliary enrichment in primary sclerosing cholangitis[J]. Hepatology, 2004, 40(3): 693-698.
- Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VA, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, et al. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis[J]. Hepatology, 2009, 50(3): 808-814.
- Marschall HU, Wagner M, Zollner G, Fickert P, Diczfalussy U, Gumhold J, et al. Complementary stimulation of hepatobiliary transport and detoxification systems by rifampicin and ursodeoxycholic acid in humans[J]. Gastroenterology, 2005, 129(2): 476-485.
- Poupon R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action[J]. Clin Res Hepatol Gastroentero, 2012, 36(3): 70015-70013.
- Stedman C, Robertson G, Coulter S, Liddle C. Feed-forward regulation of bile acid detoxification by CYP3A4: studies in humanized transgenic mice[J]. J Biol Chem, 2004, 279(12): 11336-11343.

(本文编辑: 王庆红)