

• 论著 •

茵陈水提物对多药耐药蛋白 3 基因突变致新生儿肠外营养相关性胆汁淤积的保护作用

杨秀芳^{1,2} 宾淑铭^{1,2} 李丹^{1,2} 梁慧英³ 陈康⁴ 郑铠军⁵丁俊彩¹ 朱侨伟¹ 施尚文¹ 陈桂灵⁶¹ 中山市人民医院新生儿科, 广东中山 528403; ² 广东医科大学, 广东湛江 524023; 中山市人民医院³ 中医科,⁴ 检验中心, ⁵ 儿科, 广东中山 528403; ⁶ 广东医科大学附属东莞第一医院儿科, 广东东莞 523710

通信作者: 杨秀芳, Email: yxf8787@163.com

【摘要】 目的 探讨茵陈水提物对多药耐药蛋白 3 (MDR3) 基因突变导致的新生儿肠外营养相关性胆汁淤积 (PNAC) 的保护作用及可能机制。**方法** ① 将人原代培养肝细胞应用体外细胞培养、CRISPR/Cas9 慢病毒感染、MDR3 突变基因导入等技术处理后, 比较 1% 脂肪乳诱导处理前 (0) 和处理后 16、32、48 h 不同时间点肝细胞上清液中肝胆生化指标 [丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBil)、直接胆红素 (DBil)、间接胆红素 (IBil)、总胆汁酸 (TBA)] 的水平, 确定构建 MDR3 基因突变 PNAC 肝细胞模型脂肪乳诱导所需的时间。② 将人原代培养肝细胞株按随机数字表法分为空白对照组、MDR3 基因野生型组、MDR3 基因突变组、茵陈水提物干预组。空白对照组只用培养液处理, MDR3 基因野生型组应用慢病毒感染融入野生型 MDR3 基因和培养液培养, MDR3 基因突变组应用慢病毒感染慢病毒导入 MDR3 (c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A、c.3347G>A) 突变基因和培养液培养, 茵陈水提物干预组应用慢病毒感染导入 MDR3 突变基因和培养液培养的基础上, 加入 100 g/L 茵陈水提物预处理, 然后将 4 组肝细胞分别加入 1% 脂肪乳诱导处理, 处理时间为构建 MDR3 基因突变 PNAC 肝细胞模型脂肪乳诱导所需时间。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定 4 组肝细胞上清液中肝胆生化 (ALT、AST、TBil、DBil、IBil、TBA) 水平, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 4 组肝细胞编码 MDR3、胆盐输出泵 (BSEP)、多药耐药相关蛋白 (MRP) 2~4 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的三磷酸腺苷结合盒蛋白 (ABCB4、ABCB11、ABCC2、ABCC3、ABCC4) 和 TNF 基因 mRNA 的表达丰度。**结果** 与空白对照组和 MDR3 基因野生型组比较, MDR3 基因突变组在经 1% 脂肪乳诱导处理前和处理后 16 h 肝细胞上清液中肝胆生化指标 (ALT、AST、TBil、DBil、IBil、TBA) 水平比较差异无统计学意义, 经 1% 脂肪乳诱导处理 32 h 和 48 h MDR3 基因突变组肝细胞上清液肝胆生化指标 (ALT、AST、TBil、DBil、IBil、TBA) 水平均明显升高 (均 $P<0.05$), 确定构建 MDR3 基因突变 PNAC 肝细胞模型脂肪乳诱导所需的时间为 32 h。与 MDR3 基因突变组比较, 茵陈水提物干预组肝细胞在脂肪乳处理后 32 h 肝细胞上清液中肝胆生化指标 (ALT、AST、TBil、DBil、TBA) 水平均明显降低 [ALT (ng/L): 148.3 $\pm$ 2.3 比 164.9 $\pm$ 7.0, AST (ng/L): 2 767.4 $\pm$ 78.8 比 3 239.4 $\pm$ 107.1, TBil (μ mol/L): 7.6 $\pm$ 0.2 比 13.6 $\pm$ 0.3, DBil (μ mol/L): 1.8 $\pm$ 0.1 比 5.7 $\pm$ 0.2, TBA (μ mol/L): 3.4 $\pm$ 0.2 比 6.7 $\pm$ 0.1, 均 $P<0.05$]; 空白对照组、MDR3 基因野生型组、MDR3 基因突变组和茵陈水提物干预组肝细胞编码 MDR3、MRP2、MRP3、MRP4 的 ABCB4、ABCC2、ABCC3、ABCC4 基因 mRNA 表达丰度差异无统计学意义; TNF 基因 mRNA 在 MDR3 基因突变组呈高表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.258 $\pm$ 0.200 比 1.001 $\pm$ 0.052), 茵陈水提物干预组呈低表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.387 $\pm$ 0.247 比 1.258 $\pm$ 0.200), 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 MDR3 基因突变组比较, 茵陈水提取物干预组肝细胞编码 BSEP 的 ABCB11 基因 mRNA 的表达丰度明显增高 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 2.955 $\pm$ 0.479 比 1.333 $\pm$ 0.529, $P<0.05$)。**结论** 茵陈水提物对 MDR3 基因突变导致的 PNAC 有一定保护作用, 可能与拮抗炎症反应, 降低 TNF 基因的 mRNA 表达和改善编码 BSEP 的 ABCB11 基因的 mRNA 表达有关。

【关键词】 茵陈水提物; 多药耐药蛋白 3 基因; 肠外营养相关性胆汁淤积; 新生儿**基金项目:** 广东省中医药局项目 (20202257)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.03.011

Protective effect of herba artemisiae scopariae aqueous extract on neonatal parenteral nutrition-associated cholestasis induced by multidrug resistance protein 3 gene mutation

Yang Xiufang^{1,2}, Bin Shuming^{1,2}, Li Dan^{1,2}, Liang Huiying³, Chen Kang⁴, Zheng Kaijun⁵, Ding Juncai¹, Zhu Qiaowei¹, Shi Shangwen¹, Chen Guilin⁶¹Department of Neonatology, Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan 528403, Guangdong, China; ²Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China; ³Department of Traditional Chinese Medicine, ⁴Inspection Centre, ⁵Department of Pediatrics, Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan 528403, Guangdong, China; ⁶Department of Pediatrics, the First Dongguan Hospital, Affiliated Guangdong Medical University, Dongguan 523710, Guangdong, China

Corresponding author: Yang Xiufang, Email: yxf8787@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of herba artemisiae scopariae extract on multidrug resistance protein 3 (MDR3) gene mutation-induced neonatal parenteral nutrition-associated cholestasis (PNAC) and its possible mechanism. **Methods** ① Human primary hepatocytes were treated with cell culture *in vitro*, CRISPR/Cas9 lentivirus infection and MDR3 mutant gene lead-in. The levels of hepatic and biliary biochemical indexes [alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total bilirubin (TBil), direct bilirubin (DBil), indirect bilirubin (IBil), total bile acid (TBA)] in the supernatant of hepatocytes before and after 16, 32, 48 hours were compared to determine the time required for fatty acid induction of PNAC hepatocyte model with MDR3 gene mutation. ② Human primary hepatocytes were divided into blank control group, MDR3 gene wild type group, MDR3 gene mutation group, and herba artemisiae scopariae extract intervention group according to random number table method. The blank control group was treated with culture medium only, the MDR3 gene wild type group was infected with lentivirus and mixed with wild type MDR3 gene and culture medium, the MDR3 gene mutation group was infected with lentivirus and cultured in culture medium with the mutant genes lead-in of LV-MDR3KI (c.485T > A, c.2793insA, c.1031G > A, c.3347G > A) mutation, while the MDR3 mutant gene was lead-in by lentivirus infection and cultured in culture medium, and then pretreated with 100 g/L herba artemisiae scopariae extract in the herba artemisiae scopariae extract intervention group, then the four groups of hepatocytes were induced with 1% fat emulsion, and the treatment time was the time needed to construct the PNAC hepatocytes model with MDR3 gene mutation. The levels of ALT, AST, TBil, DBil, IBil and TBA in the supernatant of hepatocytes were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression abundance of adenosine triphosphate binding cassette proteins (ABCB4, ABCB11, ABCC2, ABCC3, ABCC4) encoding MDR3, bile salt export pump (BSEP), multidrug resistance associated protein (MRP) 2-4, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) genes were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** Compared to the blank control group and MDR3 gene wild type group, there was no significant difference in the levels of ALT, AST, TBil, DBil, IBil, TBA in the supernatant of MDR3 gene mutant group before and 16 hours after induction with 1% fat emulsion, however after treated with 1% fat emulsion for 32 hours and 48 hours, the levels of ALT, AST, TBil, DBil, IBil, TBA in the supernatant of MDR3 mutant hepatocytes were significantly increased ($P < 0.05$), consequently the time required for fatty acid induction of PNAC hepatocyte model was 32 hours. At 32 hours after treatment with fat emulsion, the levels of ALT, AST, TBil, DBil, TBA in the supernatant of hepatocytes in the herba artemisiae scopariae extract intervention group were significantly decreased [ALT (ng/L): 148.3 ± 2.3 vs. 164.9 ± 7.0 , AST (ng/L): $2\ 767.4 \pm 78.8$ vs. $3\ 239.4 \pm 107.1$, TBil ($\mu\text{mol/L}$): 7.6 ± 0.2 vs. 13.6 ± 0.3 , DBil ($\mu\text{mol/L}$): 1.8 ± 0.1 vs. 5.7 ± 0.2 , TBA ($\mu\text{mol/L}$): 3.4 ± 0.2 vs. 6.7 ± 0.1 , all $P < 0.05$]. The ABCB4, ABCC2, ABCC3, ABCC4 mRNA expression of MDR3, MRP2, MRP3, MRP4 in the blank control group, MDR3 wild type group, MDR3 gene mutation group and the herba artemisiae scopariae extract intervention group had no significant difference. The expression of TNF gene mRNA was highly expressed in MDR3 gene mutation group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.258 ± 0.200 vs. 1.001 ± 0.052), and was low expressed in the herba artemisiae scopariae extract intervention group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.387 ± 0.247 vs. 1.258 ± 0.200), and there was a significant difference between the two groups (both $P < 0.05$). Compared to the MDR3 gene mutation group, the ABCB11 gene encoding BSEP mRNA expression in the herba artemisiae scopariae extract intervention group was significantly increased ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 2.955 ± 0.479 vs. 1.333 ± 0.529 , $P < 0.05$). **Conclusion** The herba artemisiae scopariae extract has a protective effect on PNAC induced by MDR3 gene mutation, which may be related to antagonizing inflammatory reaction, decreasing the expression of TNF mRNA and improving the expression of ABCB11 gene encoding BSEP.

【Key words】 Herba artemisiae scopariae aqueous extract; Multidrug resistance protein 3 gene; Parenteral nutrition-associated cholestasis; Neonate

Fund program: Guangdong Provincial Bureau of Traditional Chinese Medicine Project (20202257)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.03.011

随着医学发展和肠外营养的应用,许多极低、超低出生体质量早产儿得以存活,但长期肠外营养导致胆汁淤积的发病率随之增高。部分肠外营养相关性胆汁淤积症(parenteral nutrition-associated cholestasis, PNAC)患儿出现胆汁淤积性肝衰竭或肝硬化,甚至死亡^[1]。既往有研究证实,多药耐药蛋白 3/三磷酸腺苷结合盒蛋白 B4 [multidrug resistance protein 3/adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette protein B4, MDR3/ABCB4]、胆盐输出泵/三磷酸腺苷结合盒蛋白 B11 (bile salt export pump/ATP-binding cassette protein B11, BSEP/ABCB11)、多耐药相关蛋白/三磷酸腺苷结合盒蛋白(multidrug resistance associated proteins/ATP-binding cassette

proteins, MRP2/ABCC2、MRP3/ABCC3、MRP4/ABCC4)的表达降低会导致卵磷脂分泌障碍,造成胆盐和胆固醇沉积,引起胆汁淤积^[2-4],其中编码MDR3糖蛋白(MDR3 glycoprotein, MDR3 P-gp)的MDR3基因突变与多种胆汁淤积性疾病有关^[5-6]。本课题组前期研究表明,MDR3 c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A和c.3347G>A基因突变与PNAC密切相关,且伴外周血细胞MDR3 mRNA和肝MDR3 P-gp表达水平明显下调,与胆汁淤积严重程度有关,黄疸持续时间更长,因此,寻找有效治疗MDR3基因突变致PNAC的方法,值得人们深入研究^[7-8]。

茵陈蒿汤由茵陈、栀子、大黄组成,具有清热解毒,利湿退黄等功效,常用于治疗肝胆湿热、面目悉

黄、急慢性肝炎等^[9]。方剂中茵陈为君药,具有利胆护肝降血脂的作用。本研究通过建立肝细胞模型,利用体外细胞培养、CRISPR/Cas9 慢病毒感染和导入 MDR3 c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A 和 c.3347G>A 突变基因、脂肪乳诱导、茵陈水提取物干预等方法,探讨茵陈水提取物对 MDR3 基因突变导致 PNAC 的保护作用及可能机制,为下一步 PNAC 防治的深入研究提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 慢病毒的制备和慢病毒载体的构建

1.1.1 慢病毒的制备:制定一种针对携带慢病毒基因组中保守区域 a 的质粒参照物 A,以及另一种针对含有 293T 工具细胞基因组特有单拷贝基因 b 的质粒参照物 B 的检测引物,并将其配制成浓度为 10 μmol 的溶解液。启动慢病毒感染程序,运用天根细胞及血液遗传物质分离套件,分离并收集细胞内基因物质。将质粒标准品 A 和 B 按照 10 倍梯度稀释法稀释,浓度为 1×10^{10} 拷贝数/ μL ,并保存于 -80°C 冰箱备用。

1.1.2 过表达慢病毒载体的构建和慢病毒包装:应用限制性内切酶消化获得线性化目的质粒载体,以 pHelper1.0 质粒和 pHelper 2.0 质粒作为载体,构建一套反应混合物以线性处理该载体及放大所需基因片段,接着开展重组过程,以达到将线性化载体与特定基因片段在体外闭合成环的目的,然后转染至 293T 细胞,并进行培养、抽提,获得高纯度质粒。提取细胞上清液收获病毒,通过离心浓缩去除杂质,将慢病毒浓缩、纯化,进行质量检测,检测合格后立即包装待用。

1.2 MDR3 基因突变 PNAC 肝细胞模型复制:将人原代培养的肝细胞用 CRISPR/Cas9 慢病毒感染导入 MDR3 c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A 和 c.3347G>A 突变基因后,用含 10% 的胎牛血清、100 kU/L 的青霉素及 100 ng/L 链霉素的 DMEM 培养液置于 37°C 、5% 二氧化碳(carbon dioxide, CO_2) 的高湿度孵育器内进行孵化。此外,处理细胞时采用无脂肪的注射用乳液进行稀释,确保脂肪含量维持在 1%。采用细胞增殖与毒性检测试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 于处理前(0)和处理后 16、32、48 h 检测细胞增殖情况,并通过油红 O 染色法着色。同时,采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定肝细胞上清液中丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨

酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBil)、直接胆红素(direct bilirubin, DBil)、间接胆红素(indirect bilirubin, IBil)和总胆汁酸(total bile acid, TBA)水平,评价在用 1% 脂肪乳处理不同阶段对肝胆系统生化指标的影响。以此建立 MDR3 基因突变后的 PNAC 肝细胞模型,并确认制模所需的诱导周期。

1.3 细胞培养与分组:按随机数字表法将人原代培养的肝细胞株分为空白对照组、MDR3 基因突变组、MDR3 基因野生型组和茵陈水提取物干预组。

① MDR3 基因突变组(慢病毒感染导入 MDR3 c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A、c.3347G>A):先用 CRISPR/Cas9 慢病毒感染导入 MDR3 c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A 和 c.3347G>A 突变基因,然后在含 10% 胎牛血清、1 000 U/L 青霉素及 100 ng/L 链霉素的 DMEM 培养液中置于 37°C 、5% CO_2 相对湿度孵育器中培养。② 茵陈水提取物干预组:首用 CRISPR/Cas9 慢病毒感染导入 MDR3 c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A 和 c.3347G>A 的突变基因,然后应用培养液培养的基础上,加入 100 g/L 茵陈水提取物预处理 2 d。③ MDR3 基因野生型组:应用 CRISPR/Cas9 慢病毒感染敲入野生型 MDR3 基因和培养液培养。④ 空白对照组:仅用培养液培养,不进行其他处理。然后将 4 组肝细胞分别加入 1% 脂肪乳诱导,处理时间为构建 MDR3 基因突变 PNAC 肝细胞模型脂肪酸诱导所需时间。

1.4 茵陈水提取物的制备:茵陈经过 3 次煮沸后取 80 g,利用负压技术过滤,随后在电磁加热器中浓缩至 100 mL。然后使用旋转蒸发装置继续浓缩为 40 mL 的溶液,并通过真空干燥设备干燥成浸膏。以 100% 的效果比率计算产量。在制作茵陈水提取物原汁方面,先将 1 g 茵陈水提取物与 10 mL 超纯水混合溶解,高速离心分离取上清液,用 0.22 μm 的微滤膜过滤去除细菌,最终获得浓度为 100 g/L 的茵陈水提取物育种液,并置于 -20°C 的水箱保存备用。

1.5 肝细胞上清液中肝胆生化指标测定:采用 ELISA 检测体外培养液培养和脂肪乳诱导处理的 4 组肝细胞上清液中 AST、ALT、TBil、DBil 和 TBA 水平,观察不同处理方法各组肝细胞肝功能的变化。试剂盒购自北京达科为生物技术有限公司。

1.6 肝细胞目的基因 mRNA 表达水平测定:提取 4 组肝细胞总 RNA,采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain

reaction, RT-qPCR) 检测编码肝细胞转运蛋白相关基因 ABCB4 (5244 NM_018849 人类 MDR3), ABCC4 (10257NM_005845 人类 MRP4), ABCC3 (8714 NM_003786 人类 MRP3)、ABCC2 (1244 NNM_000392 人类 MRP2)、ABCB11 (6847 NM_003742.4 人类 BSEP) 以及 TNF (7124 NM_000594 人类) 的 mRNA 表达水平。RT-qPCR^[10] 采用内标或外标法对目标样本内特定的 DNA 链进行量化检测, 所使用的 PCR 扩增设备为美国 Applied Biosystems 集团生产的 70 Thermal Cycler 型, 序列测定仪为上海美季生物科技有限公司供应的 ABI3730 型。内参基因 (ACTB) 和目的基因 (ABCB4、ABCC4、ABCC3、ABCC2、ABCB11 和 TNF) 引物序列和扩增片段大小见表 1。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法作为实时荧光定量 RT-qPCR 测定各样本目标基因 mRNA 的相对表达水平。

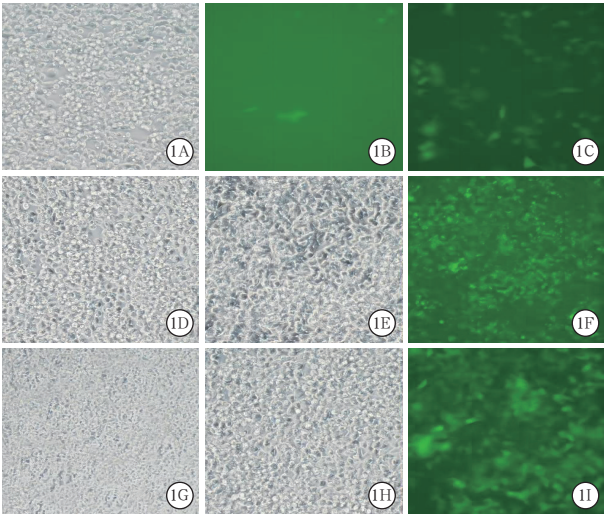
表 1 内参基因和目的基因的引物序列及扩增片段大小			
基因	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')	扩增片段 大小(bp)
ACTB	CGCTGACATTAAAGGAGAAGC	CCACGTCACACTTCATGATGG	236
ABCB4	AACTCGGAATCGTGTCTCA	CCCTTATCTCCACTCTTTGT	184
ABCC4	GAGAGCCAAGATACAGAG AATG	AATGAAGACAATCCAG TGAGC	123
ABCC3	GACCCAGGAGGAGAAAAGC	CCAGCCTCAGGGAAGTGT	209
ABCC2	GACAATTCTAATCTAGCC TACTCC	CATCAACTTCCAGACATCC	220
ABCB11	GCCGCAGCTCGTCAGATAC	GAATTGCAGTCAAACCA CCCTAT	86
TNF	TCCAGGCGGTGCTTGTTTC	CCAGAGGGCTGATTAGAGAG	142

1.7 统计学分析: 使用 SPSS 22.0 统计软件分析数据, 采用 Kolmogorov-Smirno 法对计量资料进行正态性检验, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时两两比较采用 LSD 法检验, 方差不齐时采用 Tamhane T_2 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢病毒的制备 (图 1): 通过一代测序检测质粒序列为 ABCB4 目标基因点突变 (c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A 和 c.3347G>A), 同时包装好的慢病毒感染细胞 48~72 h 后在荧光显微镜下可见绿色荧光, RT-qPCR 检测证实慢病毒成功感染目的细胞并表达, 表明慢病毒感染成功。

2.2 蛋白编码基因 mRNA 的扩增曲线和溶解曲线: 标准 ACTB 和 TNF、ABCC4、ABCC3、ABCC2、ABCB11、ABCB4 mRNA PCR 熔解曲线和扩增曲线显示熔解曲线较均一, 扩增效果较好。



注: A 为空白细胞 (未加病毒), B 为绿色荧光视野 (加病毒 0.10 μL 中倍放大), C 为绿色荧光视野 (加病毒 10 μL 中倍放大), D 为明场视野 (加病毒 0.10 μL 中倍放大), E 为明场视野 (加病毒 10 μL 中倍放大), F 为绿色荧光视野 (加病毒 10 μL 低倍放大), G 为明场视野 (加病毒 0.10 μL 低倍放大), H 为明场视野 (加病毒 1 μL 中倍放大), I 为绿色荧光视野 (加病毒 1 μL 中倍放大)

图 1 慢病毒感染视野图片

2.3 制备 MDR3 基因突变致 PNAC 肝细胞模型: 3 组肝细胞经 1% 脂肪乳处理前和处理 16 h 肝细胞上清液中 AST、ALT、TBil、DBil、IBil 和 TBA 水平比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。在脂肪乳处理 32 h 和 48 h 后 MDR3 基因突变组肝细胞上清液中 AST、ALT、TBil、DBil、IBil 和 TBA 出现明显上升的趋势, 且明显高于空白对照组和 MDR3 基因野生型组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$; 表 2; 图 2)。根据研究结果确定构建 MDR3 基因突变 PNAC 肝细胞模型脂肪酸诱导所需时间为 32 h。

2.4 茵陈水提取物干预组与 MDR3 基因突变组脂肪乳处理后肝胆生化指标的比较 (表 3): 与 MDR3 基因突变组比较, 茵陈水提取物干预组在脂肪乳处理后 32 h 肝细胞上清液中肝胆生化指标 ALT、AST、TBil、DBil、TBA 均明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.5 肝细胞转运蛋白和 TNF 编码基因 mRNA 的表达情况比较 (表 4): 与空白对照组比较, MDR3 基因野生型组、MDR3 基因突变组和茵陈水提取物干预组 ABCC4、ABCC3、ABCC2 基因 mRNA 的表达丰度差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), MDR3 基因突变组 ABCB11 基因 mRNA 的表达丰度差异亦均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。而 MDR3 基因野生型组、MDR3 基因突变组和茵陈水提取物干预组 ABCB4 基因

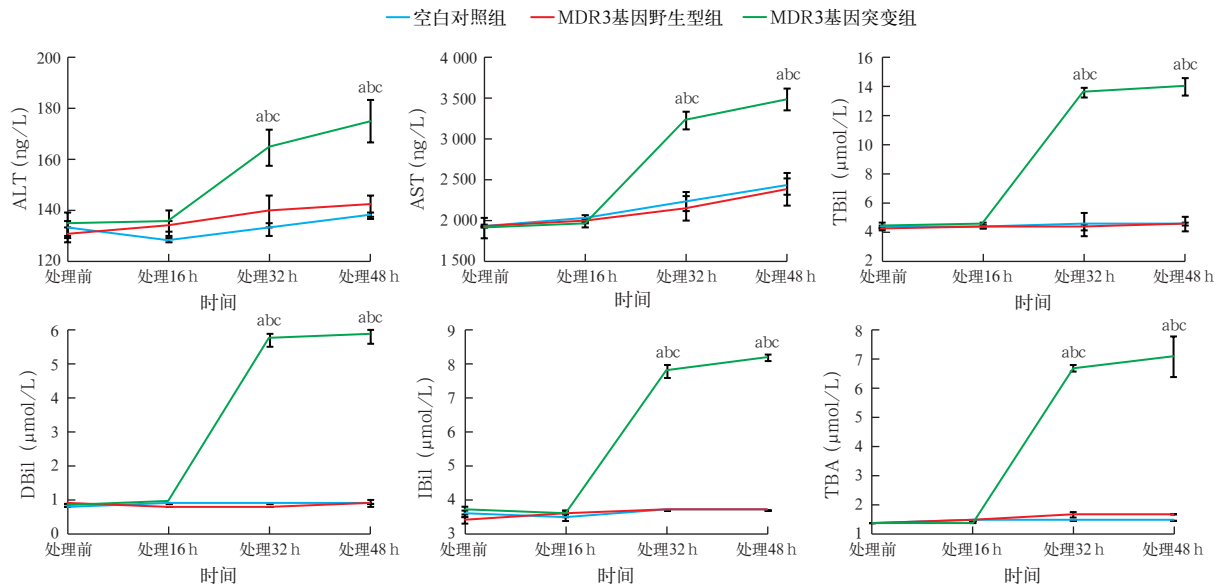
表 2 3 组肝细胞经脂肪乳处理后不同时间点肝胆生化指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	ALT (ng/L)				AST (ng/L)			
		处理前	处理 16 h	处理 32 h	处理 48 h	处理前	处理 16 h	处理 32 h	处理 48 h
空白对照组	3	133.5±2.6	128.9±1.0	133.4±2.6	138.6±1.1	1 936.6± 9.8	2 030.7±39.8	2 240.4±114.4	2 431.7±103.9
MDR3 基因野生型组	3	130.9±3.0	134.4±2.3	140.0±6.2	142.5±4.2	1 942.6± 17.5	2 001.6±21.4	2 156.7±153.2	2 389.1±201.5
MDR3 基因突变组	3	134.9±5.1	135.7±4.7	164.9±7.0 ^a	175.5±8.4 ^a	1 923.6±126.9	1 975.4±43.4	3 239.4±107.1 ^a	3 492.9±138.3 ^a
F 值		0.88	4.14	26.15	41.75	0.05	1.75	68.00	49.90
P 值		0.46	0.07	0.00	0.00	0.95	0.25	0.00	0.00

组别	样本数 (孔)	TBil (μmol/L)				DBil (μmol/L)			
		处理前	处理 16 h	处理 32 h	处理 48 h	处理前	处理 16 h	处理 32 h	处理 48 h
空白对照组	3	4.4±0.1	4.4±0.1	4.6±0.8	4.6±0.5	0.8±0.0	0.9±0.0	0.9±0.0	0.9±0.1
MDR3 基因野生型组	3	4.3±0.1	4.4±0.1	4.4±0.2	4.6±0.1	0.9±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0
MDR3 基因突变组	3	4.5±0.2	4.6±0.1	13.6±0.3 ^a	14.0±0.6 ^a	0.8±0.0	0.9±0.0	5.7±0.2 ^a	5.8±0.2 ^a
F 值		3.82	2.95	726.75	424.79	1.48	2.14	2 263.47	2 879.66
P 值		0.09	0.13	0.00	0.00	0.30	0.20	0.00	0.00

组别	样本数 (孔)	IBil (μmol/L)				TBA (μmol/L)			
		处理前	处理 16 h	处理 32 h	处理 48 h	处理前	处理 16 h	处理 32 h	处理 48 h
空白对照组	3	3.6±0.1	3.5±0.1	3.7±0.0	3.7±0.0	1.4±0.0	1.5±0.0	1.5±0.0	1.5±0.0
MDR3 基因野生型组	3	3.4±0.1	3.6±0.1	3.7±0.0	3.7±0.0	1.4±0.0	1.5±0.0	1.7±0.1	1.7±0.0
MDR3 基因突变组	3	3.7±0.1	3.6±0.1	7.8±0.2 ^a	8.2±0.1 ^a	1.4±0.0	1.4±0.0	6.7±0.1 ^a	7.1±0.7 ^a
F 值		5.01	2.38	2 115.20	5 892.37	0.18	3.71	3 439.11	236.10
P 值		0.06	0.17	0.00	0.00	0.84	0.09	0.00	0.00

注：与本组处理前比较，^a $P<0.05$



注：与本组处理前比较，^a $P<0.05$ ；与空白对照组比较，^b $P<0.05$ ；与 MDR3 基因野生型比较，^c $P<0.05$

图 2 3 组肝细胞上清液中肝胆生化指标在脂肪乳处理后不同时间点的动态变化

表 3 茵陈水提取物干预组与 MDR3 基因突变组脂肪乳处理 32 h 后肝胆生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	ALT (ng/L)	AST (ng/L)	TBil (μmol/L)	DBil (μmol/L)	TBA (μmol/L)
MDR3 基因突变组	3	164.9±7.0	2 239.4±107.1	13.6±0.3	5.7±0.2	6.7±0.1
茵陈水提取物干预组	3	148.3±2.3	2 767.4± 78.8	7.6±0.2	1.8±0.1	3.4±0.2
t 值		3.89	6.15	29.55	35.83	36.43
P 值		0.02	0.00	0.00	0.00	0.00

mRNA 的表达丰度均明显升高(均 $P<0.05$), MDR3 基因野生型组和茵陈水提取物干预组 ABCB11、TNF

基因 mRNA 的表达丰度均明显升高(均 $P<0.05$)。与 MDR3 基因突变组比较,茵陈水提取物干预组 ABCB4、ABCC4、ABCC3、ABCC2 基因 mRNA 的表达丰度差异均无统计学意义(均 $P>0.05$), ABCB11 基因 mRNA 的表达丰度明显升高, TNF 基因 mRNA 的表达丰度明显降低(均 $P<0.05$)。可见茵陈水提取物对 MDR3 基因突变导致的 PNAC 有保护作用,可减轻胆汁淤积状况,同时伴 TNF 基因 mRNA 的表达丰度下降和 ABCB11 基因 mRNA 表达丰度增强。

表 4 4 组肝细胞 ABCB4、ABCC4、ABCC3、ABCC2、ABCB11 和 TNF mRNA 表达水平比较(与 ACTB 的比值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)					
		ABCB4	ABCC4	ABCC3	ABCC2	ABCB11	TNF
空白对照组	3	1.007 ± 0.147	1.047 ± 0.361	1.018 ± 0.246	1.003 ± 0.096	1.015 ± 0.219	1.001 ± 0.052
MDR3 基因野生型组	3	71.779 ± 13.757 ^a	0.993 ± 0.265	0.612 ± 0.077	1.064 ± 0.122	2.202 ± 0.637 ^a	0.550 ± 0.106
MDR3 基因突变组	3	35.596 ± 4.184 ^a	1.139 ± 0.239	0.626 ± 0.166	1.048 ± 0.041	1.333 ± 0.529	1.258 ± 0.200 ^a
茵陈水提取物干预组	3	48.334 ± 8.303 ^a	1.244 ± 0.346	0.954 ± 0.321	1.087 ± 0.266	2.955 ± 0.479 ^{ab}	0.387 ± 0.247 ^{ab}

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 MDR3 基因突变组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

虽然 PNAC 的研究由来已久,但其确切发病机制目前尚未明确,有研究者认为,PNAC 的发病机制可能与以下因素有关^[11]:静脉营养时间和禁食时间延长、早产儿、感染、静脉营养液成分失衡以及微量元素缺乏等均会引起肝脏损害、肝细胞脂肪变性和胆汁淤积^[12-13]。已有研究证实,早产儿,尤其是极低或超低出生体质量早产儿肝脏转运功能和摄取合成胆盐的能力不足,容易引起胆红素肠肝循环发生障碍;此外,胆汁在肠道中滞留时间延长,导致胆结石酸大量产生,随后这些酸质又流回肝脏,对肝细胞造成损害^[14-15]。同时,早产儿胃肠道保护屏障及其免疫机制尚未发育完全,在不得不禁食并依赖静脉输注营养液的情况下,肠道微生物群极易发生失调。这种失调可能引发肝脏中库普弗细胞释放炎症介质,从而损害肝细胞和肝胆管,导致胆汁淤积发生。

MDR3 负责合成涉及胆酸输送和排泄过程中肝细胞及肝内细小胆管的磷脂质运输蛋白。有研究表明,健康人体组织中普遍可以检测到 MDR3 基因的 mRNA 表达。在胆汁淤积患者中,有一部分表现为基因活性减弱或表达水平降低,而另一部分则表现为表达水平升高。表明 MDR3 基因表达量的变化可能是导致胆汁淤积的一个因素,亦可能是对胆汁淤积现象的一种生理补偿作用,或者可能源于 MDR3 基因突变造成肝脏中 MDR3 蛋白生成降低,进而引起肝内胆汁积聚^[16-19]。苏亚非等^[20]研究 MDR3 基因在胆囊胆固醇结石形成中的作用中发现,MDR3 基因的 mRNA 在胆囊胆固醇结石患者中呈明显低表达,提示在胆囊胆固醇结石的形成过程中 MDR3 基因的表达水平起到其重要作用。多项研究显示,家族性进行性肝内胆汁积聚症Ⅲ型和低磷脂性胆汁淤积症的发病与 MDR3 基因发生变异有密切关系,同时这种变异还会导致外周血液 MDR3 基因的 mRNA 水平降低^[21-24]。以上文献结论均证实 MDR3 基因突变与胆汁淤积症密切相关。

本课题组前期的研究也显示,MDR3 c.485T>A、

c.2793insA、c.1031G>A 和 c.3347G>A 基因突变与 PNAC 密切相关,且患儿胆汁淤积严重,病程长^[7-8]。本研究通过体外肝细胞模型,利用细胞培养、CRISPR/Cas9 慢病毒感染和导入 MDR3 c.485T>A、c.2793insA、c.1031G>A 和 c.3347G>A 突变基因、脂肪乳诱导等方法探讨治疗 MDR3 基因突变致 PNAC 患儿的方法。

《伤寒论》中最早记载了茵陈蒿汤的疗效,此方在保障肝脏健康、激发胆汁生成和清除黄疸方面表现出显著效果,常作为治疗湿热内蕴所致肝胆疾病的首选方案。方中茵陈蒿为主药,其维系肝功能的原理与其中的活性成分最近成为研究的热点^[25]。现代药理学研究表明,茵陈能保障肝细胞膜的稳定性和通透性,抑制肝细胞凋亡,促进肝细胞复原,优化肝脏微循环系统,并强化肝脏的解毒作用;茵陈中提炼出的活性成分可明显提升血中丙二醛、羟脯氨酸,以及谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶水平,降低肝细胞内 TNF- α 、转化生长因子- β 、乙醛脱氢酶、乙醇脱氢酶含量,从而发挥保肝和抗肝纤维化的作用^[26-27]。易巍等^[28]采用以茵陈为主药的利胆合剂治疗胆汁淤积性肝纤维化,结果显示,利胆合剂能有效改善患儿的胆汁淤积、肝纤维化、氧化应激指标及临床症状。易纪杰等^[29]通过 Meta 分析显示,茵陈蒿汤加减治疗对急性重症胆管炎胆道减压引流术后肝功能恢复有一定作用。从以上研究可见,茵陈对肝脏有保护作用。

新生儿是有别于成人的特殊人群,如发生 PNAC 未能得到及时有效治疗,将会出现严重不良后果。本研究探讨茵陈水提取物对 MDR3 基因突变导致的 PNAC 是否存在肝脏保护作用,结果显示,MDR3 基因突变组肝细胞经脂肪乳处理 32 h 后出现肝胆生化异常,胆汁淤积,伴 TNF 基因 mRNA 高表达;茵陈水提取物干预组经提前应用茵陈水提取物预处理后肝细胞胆汁淤积程度减轻,且 TNF 基因 mRNA 表达水平降低,结果表明,茵陈水提取物对 MDR3 基因突变导致的 PNAC 有保护作用,可减轻胆汁淤积和降

低 TNF 基因的 mRNA 表达水平。李菁^[30]、Li 等^[31]研究显示, TNF- α 及其受体可能通过调控 MDR、MDR2 与 MDR3 基因的表达水平促进 PNAC 的发展, 抗 TNF- α 单克隆抗体(英夫利昔)可通过上调肝细胞 MDR3 基因表达改善 PNAC 病变。国外研究结果显示, 长时间静脉营养可引起机体的慢性炎症状态, 而持续高浓度的 TNF- α 等炎症因子水平与 PNAC 等的并发症密切相关^[32]。本研究结果显示, MDR3 基因突变组 TNF 基因 mRNA 表达水平增高与这些学者的研究结果相符。本研究还显示, 茵陈水提取物干预组编码 BSEP 蛋白的 ABCB11 基因 mRNA 表达丰度高于 MDR3 基因突变组, 茵陈水提取物的肝保护作用是否与改善其表达有关, 仍需进一步研究探讨。

综上所述, 茵陈水提取物对 MDR3 基因突变导致的 PNAC 有保护作用, 其作用机制可能与拮抗炎症反应, 降低 TNF 基因的 mRNA 表达丰度和改善编码 BSEP 的 ABCB11 基因 mRNA 表达, 从而预防胆汁淤积的发生发展有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Alkharfy TM, Ba-Abbad R, Hadi A, et al. Total parenteral nutrition associated cholestasis and risk factors in preterm infants [J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2014, 20 (5): 293–296. DOI: 10.4103/1319–3767.141688.
- [2] Lu XY, Liu L, Shan WY, et al. The role of the sodium–taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) and bile salt export pump (BSEP) in related liver disease [J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20 (5): 377–389. DOI: 10.2174/1389200220666190426152830.
- [3] Oude Elferink RP, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 p-glycoprotein) [J]. *Pflügers Arch*, 2007, 453 (5): 601–610. DOI: 10.1007/s00424–006–0062–9.
- [4] Fujikura K, Yamasaki T, Otani K, et al. BSEP and MDR3: useful immunohistochemical markers to discriminate hepatocellular carcinomas from intrahepatic cholangiocarcinomas and hepatoid carcinomas [J]. *Am J Surg Pathol*, 2016, 40 (5): 689–696. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000585.
- [5] Gordo-Gilart R, Hierro L, Andueza S, et al. Heterozygous ABCB4 mutations in children with cholestatic liver disease [J]. *Liver Int*, 2016, 36 (2): 258–267. DOI: 10.1111/liv.12910.
- [6] Yang XF, Liu GS, Li MX. Analysis of mutations of MDR3 exons 9 and 23 in infants with parenteral nutrition-associated cholestasis [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10 (6): 2361–2365. DOI: 10.3892/etm.2015.2800.
- [7] Yang XF, Liu GS, Yi B. Mdr3 gene mutation in preterm infants with parenteral nutrition-associated cholestasis [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2022, 10 (3): e1875. DOI: 10.1002/mgg3.1875.
- [8] 杨秀芳, 柳国胜, 陈玉兰, 等. 胃肠外营养相关性胆汁淤积症早产儿血 MDR3 基因 mRNA 表达 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2019, 21 (2): 125–130. DOI: 10.7499/j.issn.1008–8830.2019.02.004.
- [9] 陈荣添, 黄蕾, 熊文生. 茵陈蒿汤治疗黄疸性肝病概述 [J]. *江西中医学院学报*, 2013, 25 (3): 90–92. DOI: 10.3969/j.issn.1005–9431.2013.03.030.
- [10] 李书轻, 刘丹, 王亚, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应对乙型肝炎病毒 DNA 的检验效果 [J]. *实用检验医师杂志*, 2023, 15 (2): 159–162. DOI: 10.3969/j.issn.1674–7151.2023.02.012.
- [11] Kim AY, Lim RK, Han YM, et al. Parenteral nutrition-associated cholestasis in very low birth weight infants: a single center experience [J]. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2016, 19 (1): 61–70. DOI: 10.5223/pghn.2016.19.1.61.
- [12] 乔立兴, 郑意楠, 钱钻好, 等. 长期肠外营养与胆汁淤积症相关性因素的临床分析 [J]. *肠外与肠内营养*, 2008, 15 (1): 36–38. DOI: 10.3969/j.issn.1007–810X.2008.01.011.
- [13] Baserga MC, Sola A. Intrauterine growth restriction impacts tolerance to total parenteral nutrition in extremely low birth weight infants [J]. *J Perinatol*, 2004, 24 (8): 476–481. DOI: 10.1038/sj.jp.7211137.
- [14] 胡和平, 周华邦, 周东勋. 胆汁形成与胆汁淤积性疾病发生的机制 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2008, 16 (8): 571–573. DOI: 10.3321/j.issn:1007–3418.2008.08.003.
- [15] Klein CJ, Revenis M, Kusenda C, et al. Parenteral nutrition associated conjugated hyperbilirubinemia in hospitalized infants [J]. *J Am Diet Assoc*, 2010, 110 (11): 1684–1695. DOI: 10.1016/j.jada.2010.08.012.
- [16] Zhao GL, Xu DQ, Yuan ZQ, et al. 8-Methoxypsoralen disrupts MDR3-mediated phospholipids efflux and bile acid homeostasis and its relevance to hepatotoxicity [J]. *Toxicology*, 2017, 386: 40–48. DOI: 10.1016/j.tox.2017.05.011.
- [17] Zollner G, Thueringer A, Lackner C, et al. Alterations of canalicular ATP-binding cassette transporter expression in drug-induced liver injury [J]. *Digestion*, 2014, 90 (2): 81–88. DOI: 10.1159/000365003.
- [18] Khabou B, Durand-Schneider AM, Delaunay JL, et al. Comparison of in silico, prediction and experimental assessment of ABCB4 variants identified in patients with biliary diseases [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 89: 101–109. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.05.028.
- [19] Morita SY, Terada T. Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 954781. DOI: 10.1155/2014/954781.
- [20] 苏亚非, 宋敏, 周蓉蓉, 等. Mucin-3 和 MDR3 在胆固醇结石形成中的作用 [J]. *齐鲁医学杂志*, 2011, 26 (1): 46–48.
- [21] Park HJ, Kim TH, Kim SW, et al. Functional characterization of ABCB4 mutations found in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26872. DOI: 10.1038/srep26872.
- [22] Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Dossier C, et al. A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 [J]. *Hepatology*, 2016, 63 (5): 1620–1631. DOI: 10.1002/hep.28300.
- [23] Schatz SB, Jüngst C, Keitel-Anselmo V, et al. Phenotypic spectrum and diagnostic pitfalls of ABCB4 deficiency depending on age of onset [J]. *Hepatol Commun*, 2018, 2 (5): 504–514. DOI: 10.1002/hep4.1149.
- [24] Cardoso MF, E Branco JC, Anapaz V, et al. A complex case of cholestasis in a patient with ABCB4 and ABCB11 mutations [J]. *GE Port J Gastroenterol*, 2018, 25 (4): 189–194. DOI: 10.1159/000484612.
- [25] 刘玉萍, 邱小玉, 刘烨, 等. 茵陈的药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50 (9): 2235–2241. DOI: 10.7501/j.issn.0253–2670.2019.09.033.
- [26] Han JM, Kim HG, Choi MK, et al. Artemisia capillaris extract protects against bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65 (6): 837–844. DOI: 10.1016/j.etp.2012.12.002.
- [27] Choi MK, Han JM, Kim HG, et al. Aqueous extract of artemisia capillaris exerts hepatoprotective action in alcohol-pyrazole-fed rat model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147 (3): 662–670. DOI: 10.1016/j.jep.2013.03.065.
- [28] 易巍, 鄢素琪, 汤建桥, 等. 中药利胆剂调节氧化应激拮抗婴儿胆汁淤积性肝纤维化的临床观察 [J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35 (7): 741–745. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430–20230316–00186.
- [29] 易纪杰, 胡仕祥, 赵哲, 等. 茵陈蒿汤加减治疗急性重症胆管炎胆道减压引流术后疗效的 Meta 分析 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2021, 28 (2): 178–183. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2021.02.012.
- [30] 李菁. Tnfr 基因敲除小鼠 Mdr 和 Mrp2 表达对肠外营养肝损害的影响 [D]. 上海: 上海交通大学, 2010.
- [31] Li J, Gong YM, Wu J, et al. Anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody alleviates parenteral nutrition-associated liver disease in mice [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2012, 36 (2): 219–225. DOI: 10.1177/0148607111424412.
- [32] Ott P, Bangert K, Bisgaard HC, et al. Endotoxin and turpentine both produce cholestasis but have different effects on mRNA for TNF- α , IL-6, and Mdr1b [J]. *J Hepatol*, 2000, 32 (2): 118. DOI: 10.1016/S0168–8278(00)80788–6.

(收稿日期: 2023–11–13)

(责任编辑: 邸美仙)