

# 敲低 PRDX6 对利福平诱导 HepG2 细胞胆汁酸转运体适应性表达的影响

屈柳芳,黄梦雪,曹世国,陈刚,许建明,张卫平

**摘要** 目的 探讨敲低过氧化物还原酶-6 (PRDX6) 在利福平 (RFP) 诱导人肝癌细胞 (HepG2) 损伤及胆汁酸转运体适应性表达中的作用。方法 将处于对数生长期的细胞均匀接种于 6 孔板中,使用特异 PRDX6-siRNA、control-siRNA 分别转染 HepG2 细胞构建敲低组及对照组。给予细胞 100  $\mu\text{mol/L}$  RFP 诱导 24 h 后,Western blot 和 qRT-PCR 检测各组细胞 PRDX6、多药耐药蛋白 1 (MDR1)、多药耐药相关蛋白 2、3、4 (MRP2、MRP3、MRP4)、 $\text{Na}^+$ /牛磺胆酸协同转运蛋白 (NTCP) 的蛋白及基因表达水平;Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组细胞凋亡率;CCK-8 法检测各组细胞增殖变化;试剂盒检测各组细胞培养上清液中细胞损伤标志物丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、总胆汁酸 (TBA) 相对含量变化。结果 RFP 可诱导 HepG2 细胞 MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、NTCP 及 PRDX6 的蛋白和基因表达水平升高 ( $P < 0.05$ ),而敲低 PRDX6 后,MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、NTCP 的蛋白和基因表达水平均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$ )。此外,PRDX6 敲低后 HepG2 细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ ),细胞增殖能力下降 ( $P < 0.05$ ),细胞培养上清液中细胞损伤标志物 (ALT、AST、TBIL、DBIL、TBA) 水平升高 ( $P < 0.05$ )。结论 RFP 可增加 HepG2 细胞胆汁酸转运体及 PRDX6 的蛋白和基因表达量,敲低 PRDX6 并用 RFP 诱导后胆汁酸转运体的蛋白及基因表达量降低,同时细胞损伤加重,表明 PRDX6 在 RFP 诱导的 HepG2 细胞适应性反应中发挥保护作用。

**关键词** 过氧化物还原酶-6;利福平;胆汁酸转运体;适应性反应;细胞损伤;凋亡

**中图分类号** R 595.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0660-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.016

抗结核药是导致药物性肝损伤的常见药物,胆汁淤积适应性反应是药物性肝损伤领域中的重要研

究方向。过氧化物还原酶-6 (peroxiredoxin-6, PRDX6) 具有过氧化物酶活性和磷脂酶 A2 酶活性,通过减少  $\text{H}_2\text{O}_2$  和各种脂质过氧化物来保护细胞免受氧化损伤<sup>[1]</sup>。此外,PRDX6 是 PRDX 家族中唯一在其基因启动子中具有转录因子核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid2-related factor 2, Nrf2) 结合位点的成员<sup>[2]</sup>,而 Nrf2 介导的适应性反应在药物性肝损伤的发生过程中发挥重要的保护作用。有研究<sup>[3]</sup>表明利福平 (rifampicin, RFP) 可诱导胆盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP)、多药耐药蛋白 1 (multidrug resistant protein 1, MDR1)、多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-related protein 2, MRP2)、钠离子-牛磺胆酸钠共转运多肽 ( $\text{Na}^+$ /taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)、有机阴离子转运蛋白 2 (organic anion transporting protein 2, OATP2)、有机溶质转运体 (organic solute transporter  $\beta$ , OST $\beta$ ) 和 Nrf2 的蛋白和基因表达适应性增加,从而减轻 HepG2 细胞损伤。此外,PRDX6 磷脂酶 A2 活性与 Nrf2 之间的关系已在多项研究中得到证实<sup>[4-5]</sup>。因此,在胆汁淤积时,PRDX6 是否参与胆汁酸转运体适应性表达的调节还需进一步研究。该研究通过敲低 HepG2 细胞的 PRDX6 基因,观察敲低 PRDX6 后对 RFP 诱导 HepG2 细胞损伤及胆汁酸转运体表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** HepG2 细胞购自中科院上海分院细胞库;PRDX6-siRNA 购自上海吉玛制药公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自以色列 BI 生物公司;胰酶细胞消化液、双抗 (青链霉素混合液) 购自上海碧云天生物公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;ECL 显影液购自苏州新赛美生物公司;蛋白 Marker、TRIzol 购自美国 Thermo scientific 公司;PRDX6、MRP4 购自美国 CST 公司;MRP3、NTCP 购自美国 Immunoway 公司;MDR1 购自武汉 Proteintech 公司;MRP2 购自美国 Novus 抗体公司; $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体及二抗 (山羊抗小鼠、山羊抗

2024-02-23 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81700521)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

作者简介:屈柳芳,女,硕士研究生;

张卫平,男,副教授,主治医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zwp0202@163.com

兔)购自北京中杉金桥生物公司;PCR 逆转录及扩增试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR 引物均购自上海生物工程有限公司;RFP、二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)试剂盒购于南京建成生物工程研究所;CCK-8 试剂盒购自安徽白鲨生物技术有限公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物公司;流式细胞仪(CytoFLEX)购于美国贝克曼公司;酶标仪(型号:MQX200)购自美国 Bio-Tek 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞分组及培养** 使用特异 PRDX6-siRNA 和 control-siRNA 分别转染 HepG2 细胞构建敲减细胞株和对照细胞株,再根据是否加 RFP 刺激,将实验分为 5 组:空白对照组、阴性对照 control-siRNA + DMSO 组、control-siRNA + RFP 组、PRDX6-siRNA + DMSO 组、PRDX6-siRNA + RFP 组。HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基进行培养。细胞放置在 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,每 12 h 换液 1 次,取对数生长期的细胞用于实验。

**1.2.2 细胞转染** 取对数生长期的细胞以每孔  $2.0 \times 10^5$  个细胞的密度均匀接种在 6 孔板上,当细胞生长密度达到 50% ~ 60% 时,按照 Lipofectamine2000 试剂说明书进行瞬时转染。转染采用不含血清及双抗的 DMEM 高糖培养基培养,培养 6 ~ 8 h 后更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)** 收集各组细胞,用 TRIzol 提取各组细胞中的总 RNA,分光光度仪检测 RNA 浓度及纯度,根据 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA,逆转录条件:37 °C 15 min、85 °C 5 s、4 °C。按照 PCR 扩增试剂说明书配好反应体系,反应条件:95 °C 5 s、60 °C 30 s、60 °C 30 s,共 40 个循环。每个样本设置 3 个复孔,数据采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行统计处理,计算各组 PRDX6、MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、NTCP 的相对表达量。所用 qRT-PCR 引物序列见表 1。

**1.2.4 蛋白质免疫印迹(Western blot)** 收集 6 孔板中各组细胞样本,加入混有 2% 蛋白酶抑制剂、

表 1 qRT-PCR 引物序列

| 引物名称           | 引物序列(5'-3')   |
|----------------|---|
| $\beta$ -actin | F: GCCAACACAGTGCTGTCTGG<br>R: CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG        |
| PRDX6          | F: ACCACTGGCAGGAACCTTTGATGAG<br>R: GGCTTCTTCTTCAGGGATGGTTGG |
| MRP2           | F: GACAACCTCATTTCAGACGACCATCC<br>R: GGCTGCCGACTCTATAATCTTCC |
| MRP3           | F: AAGCAGGTGGAGGGCATCAGG<br>R: GTGAAGGTGGTGTGGTGTGGAG       |
| MRP4           | F: GTGGGAGCAGGGAAGTCATC<br>R: GAGTTCCCGAGAACCACCCAG         |
| MDR1           | F: CCGCTGTTTCGTTTCTTTAG<br>R: CTTCTTTGCTCCTCCATTGC          |
| NTCP           | F: CTGAAGGACAAGGTGCCCTA<br>R: TGTGGCCGTTTGGATTTGAG          |

2% 磷酸酶抑制剂、1% PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞,将其置于冰上,摇床 40 min,于 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。加入上样 buffer 后 99 °C 煮 10 min,于 SDS-PAGE 凝胶电泳分离总蛋白,再转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,再分别加入 PRDX6(1 : 5 000)、MRP2(1 : 500)、MRP3(1 : 1 500)、MRP4(1 : 1 000)、MDR1(1 : 1 000)、NTCP(1 : 1 500)一抗抗体,4 °C 孵育过夜,用 TBST 洗膜 3 次,10 min /次,洗膜后分别加入二抗(1 : 5 000),于室温孵育 1 h,再次 TBST 洗膜 3 次,10 min /次,将 ECL 显影液均匀滴于 PVDF 膜上蛋白的位置进行显影,Image J 图像软件分析各目的蛋白的表达水平。

**1.2.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡** 将对数生长期的细胞以每孔  $2.0 \times 10^5$  个细胞的密度均匀接种在 6 孔板上,转染 24 h 后给予 100  $\mu$ mol/L RFP 诱导 24 h。用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞沉淀,预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,800 r/min 离心 5 min,弃掉上清液,加入 400  $\mu$ l Annexin 结合液重悬细胞,再加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 染色液和 5  $\mu$ l PI 混匀后在避光条件下孵育 15 min,用流式细胞仪检测。

**1.2.6 CCK-8 法检测细胞增殖** 按照前述的分组,将已转染好的细胞及未处理的对数生长期的细胞按每  $1 \times 10^4$  个细胞的密度均匀接种于 96 孔板中,边缘孔用无菌 PBS 填充。当细胞生长密度达到 60% ~ 70% 时,给予 100  $\mu$ mol/L RFP 诱导 24 h 后每孔分别加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂和 90  $\mu$ l DMEM 纯培养基,于 37 °C 培养箱中避光孵育 1 ~ 2 h 后置于酶标仪中检测 450 nm 处吸光度值(OD<sub>450 nm</sub>),各孔的

OD<sub>450 nm</sub> 值代表每孔的增殖活性,实验重复 3 次。

**1.2.7 测定细胞培养上清液中细胞损伤标志物的含量** 收集各组细胞培养上清液 1 ml,检测各组细胞损伤标志物水平变化,如 ALT、AST、TBIL、DBIL、TBA。根据检测试剂盒的操作说明,设定标准孔、样品孔、对照孔和空白孔,按要求加入一定量的样本和试剂,轻轻敲击 96 孔板使之混匀,于 37 °C 培养箱中避光孵育一定时间,按照各自所要求的检测波长,用酶标仪测定吸光度值,根据计算公式或者标准曲线计算出各组细胞损伤标志物的相对含量。

**1.3 统计学处理** 所有数据均使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较使用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RFP 对 PRDX6 表达的影响及 PRDX6 基因敲低验证** 为了解 RFP 诱导的肝损伤如何影响 PRDX6 的表达,给予 100  $\mu\text{mol/L}$  RFP 诱导 HepG2 细胞 24 h,与 control-siRNA + DMSO 组比较,control-siRNA + RFP 组 PRDX6 的蛋白( $F = 71.21, P < 0.001$ )及基因( $F = 89.13, P < 0.001$ )表达水平均上升,结果表明 RFP 可诱导 HepG2 细胞 PRDX6 蛋白及基因表达上调。使用特异 PRDX6-siRNA 转染 HepG2 细胞敲低 PRDX6 基因,并通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测敲低效率,结果显示,与 control-siRNA + DMSO 组比较,PRDX6-siRNA + DMSO 组 PRDX6 的基因表达水平降低约 80% ( $F = 89.13, P < 0.001$ ),蛋白表达量降低约 50% ( $F = 71.21, P < 0.01$ ),提示 HepG2 细胞中的 PRDX6 基因敲低成功。见图 1。

**2.2 敲低 PRDX6 后对 RFP 诱导胆汁酸转运体表达的影响** 与 control-siRNA + DMSO 组比较,control-siRNA + RFP 组 MRP2 ( $F = 86.87, P < 0.05$ )、MRP3 ( $F = 44.32, P < 0.05$ )、MRP4 ( $F = 55.51, P < 0.05$ )、MDR1 ( $F = 86.88, P < 0.05$ )、NTCP ( $F = 19.47, P < 0.05$ ) 基因表达水平均有不同程度的升高,见图 2C;MRP2 ( $F = 93.07, P < 0.05$ )、MRP3 ( $F = 45.52, P < 0.05$ )、MRP4 ( $F = 106.8, P < 0.05$ )、MDR1 ( $F = 26.77, P < 0.05$ )、NTCP ( $F = 169.1, P < 0.05$ ) 的蛋白表达量也有不同程度的升高,见图 2A、2B。敲低 PRDX6 并给予 100  $\mu\text{mol/L}$  RFP 诱导 24 h 后,与 control-siRNA + RFP 组相比,PRDX6-siRNA + RFP 组 MRP2 ( $F = 86.87, P < 0.05$ )、MRP3 ( $F = 44.32, P < 0.05$ )、MRP4 ( $F = 55.51, P < 0.05$ )、MDR1 ( $F = 86.88, P < 0.05$ )、NTCP ( $F = 19.47, P < 0.05$ ) 的基因表达水平均有不同程度的降低,并且 MRP2 ( $F = 93.07, P < 0.05$ )、MRP3 ( $F = 45.52, P < 0.05$ )、MRP4 ( $F = 106.8, P < 0.05$ )、MDR1 ( $F = 26.77, P < 0.05$ )、NTCP ( $F = 169.1, P < 0.05$ ) 的蛋白表达水平也有不同程度的降低,见图 2。表明 PRDX6 在 RFP 诱导的 HepG2 细胞损伤中可适应性上调胆汁酸转运体的表达水平。

**2.3 敲低 PRDX6 对 RFP 诱导 HepG2 细胞损伤的影响** Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡结果显示:与 control-siRNA + RFP 组比较,PRDX6-siRNA + RFP 组的凋亡率上升 ( $F = 125.7, P < 0.05$ ),见图 3A;CCK-8 增殖实验结果显示:PRDX6-siRNA + RFP 组的 OD 值较 control-siRNA + RFP 组的 OD 值低 ( $F = 30.51, P < 0.01$ ),HepG2 细胞的增殖能力减弱,见图 3B;细胞培养上清液检测结果显示:与 control-siRNA + RFP 组上清液标志物 ALT、AST、

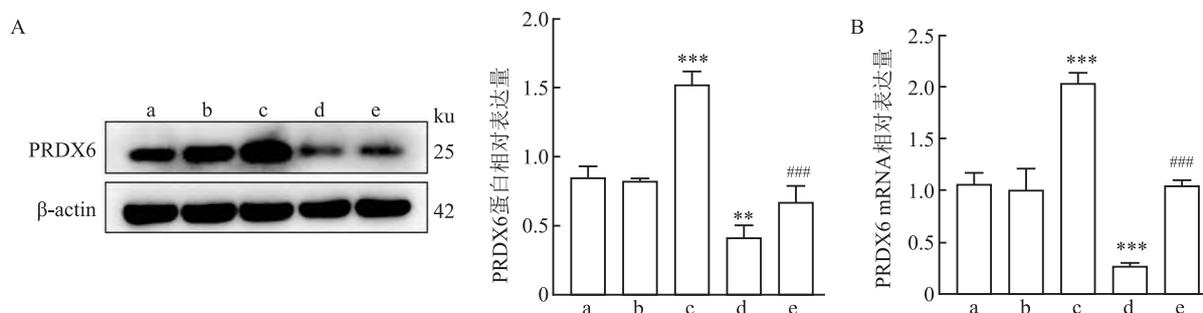


图 1 PRDX6 在 HepG2 细胞中的表达及 PRDX6 敲低验证

A: 各组 PRDX6 蛋白表达水平; B: 各组 PRDX6 基因表达水平; a: 空白对照组; b: control-siRNA + DMSO 组; c: control-siRNA + RFP 组; d: PRDX6-siRNA + DMSO 组; e: PRDX6-siRNA + RFP 组; 与 control-siRNA + DMSO 组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 control-siRNA + RFP 组比较: ###  $P < 0.001$

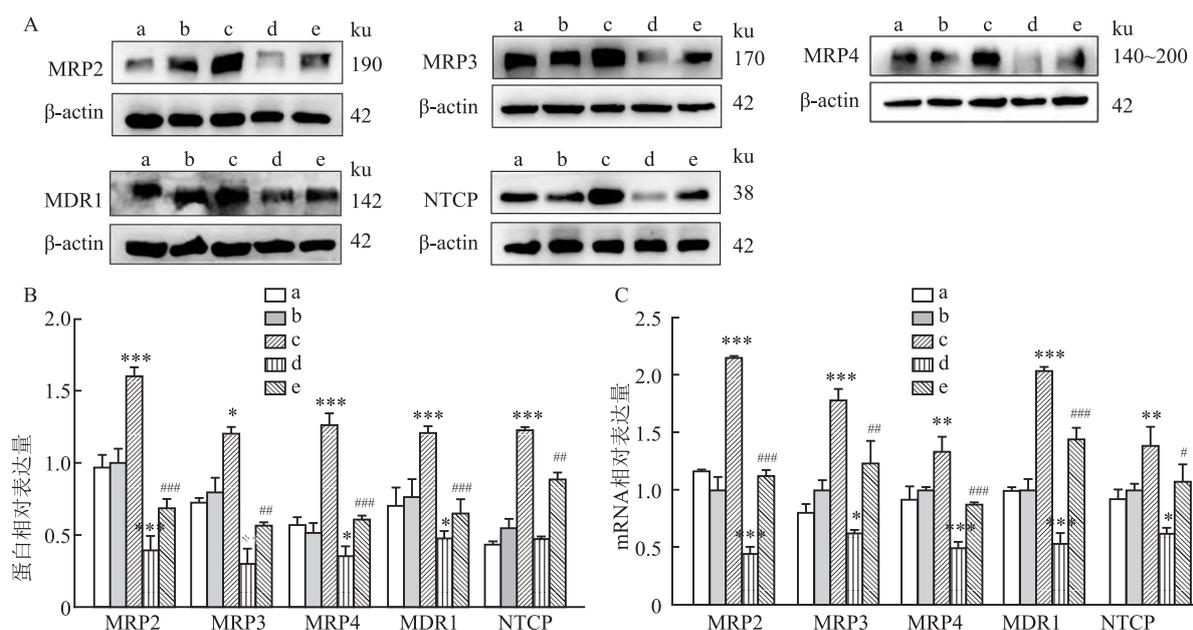


图2 敲低 PRDX6 对胆汁酸转运体表达的影响

A:MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、NTCP 蛋白条带;B、C:PRDX6 敲低后胆汁酸转运体蛋白及基因表达水平;a:空白对照组;b:control-siRNA + DMSO 组;c:control-siRNA + RFP 组;d:PRDX6-siRNA + DMSO 组;e:PRDX6-siRNA + RFP 组;与 control-siRNA + DMSO 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 control-siRNA + RFP 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

TBIL、DBIL、TBA 比较,PRDX6-siRNA + RFP 组细胞培养上清液损伤标志物 ALT ( $F = 307.3$ ,  $P < 0.001$ )、AST ( $F = 278.2$ ,  $P < 0.001$ )、TBIL ( $F = 155.5$ ,  $P < 0.01$ )、DBIL ( $F = 671.8$ ,  $P < 0.05$ )、TBA ( $F = 64.45$ ,  $P < 0.001$ )的水平均较高,见图 3C-3G。这些结果表明敲低 PRDX6 后,RFP 诱导的 HepG2 细胞损伤进一步加重。

### 3 讨论

肝毒性是一线抗结核药物的重要副作用之一,而抗结核药所致药物性肝损伤的确切机制尚不清楚。研究<sup>[6-8]</sup>表明肝脏在发生胆汁淤积时通过增加肝细胞基底外侧胆汁酸排泄和减少基底外侧胆汁酸摄取被认为是胆汁淤积的适应性反应。有研究<sup>[9]</sup>表明 PRDX6 是 Nrf2 通路的抗氧化基因下游分子,在调节活性氧稳态中发挥作用,轻至中等强度的氧化应激会诱导 Nrf2 和 Nrf2-prdx6 介导的细胞保护的激活。此外,其他研究<sup>[10]</sup>显示丹参酮 II a 通过激活 Nrf2 调控 BSEP/NTCP 表达而预防 RFP 诱导的肝损伤。本研究在体外实验结果显示,RFP 可诱导 HepG2 细胞中 MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、NTCP 蛋白及基因表达水平升高,通过上调胆汁酸转运体的表达水平,减轻 RFP 诱导的肝细胞损伤,这一结果与先前的研究<sup>[3,11]</sup>结果一致。HepG2 细胞敲低

PRDX6 基因后,MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、NTCP 的表达水平较未敲低组下降,细胞损伤明显加重。这表明 PRDX6 可能在 RFP 诱导的 HepG2 细胞损伤中参与胆汁酸转运体表达的调控,并在胆汁淤积中发挥适应性保护作用。推测 RFP 诱导机体应激时,通过上调保护性分子 Nrf2 的表达,增加 PRDX6 的转录,进而增加胆汁酸转运体的表达,恢复胆汁酸代谢的稳态,促进肝脏对损伤的适应。

PRDX6 是广泛存在的过氧化物酶家族中的特殊一员,参与细胞内和细胞间信号转导,抑制由多种因素引起的细胞凋亡。有研究<sup>[12]</sup>表明 PRDX6 在缺血再灌注引起的氧化应激刺激时转运至线粒体中,发挥对抗肝细胞损伤的作用。此外,López-Grueso et al<sup>[13]</sup>在研究中发现 HepG2 细胞的 PRDX6 基因缺失会导致细胞内的线粒体功能和完整性丧失,活性氧增加,细胞数量和增殖减少。本研究结果显示敲低 PRDX6 基因后,HepG2 细胞的凋亡率升高,增殖能力降低。这可能与 PRDX6 有抗凋亡及抗氧化应激的作用有关。

本研究表明,在 RFP 的作用下,肝细胞损伤标志物(ALT、AST、TBIL、DBIL、TBA)的水平升高,在临床上这些指标是反映肝功能状态的重要指标。敲低 PRDX6 基因后,这些损伤标志物进一步升高。综合以上结果,表明 PRDX6 在 RFP 诱导的 HepG2 细

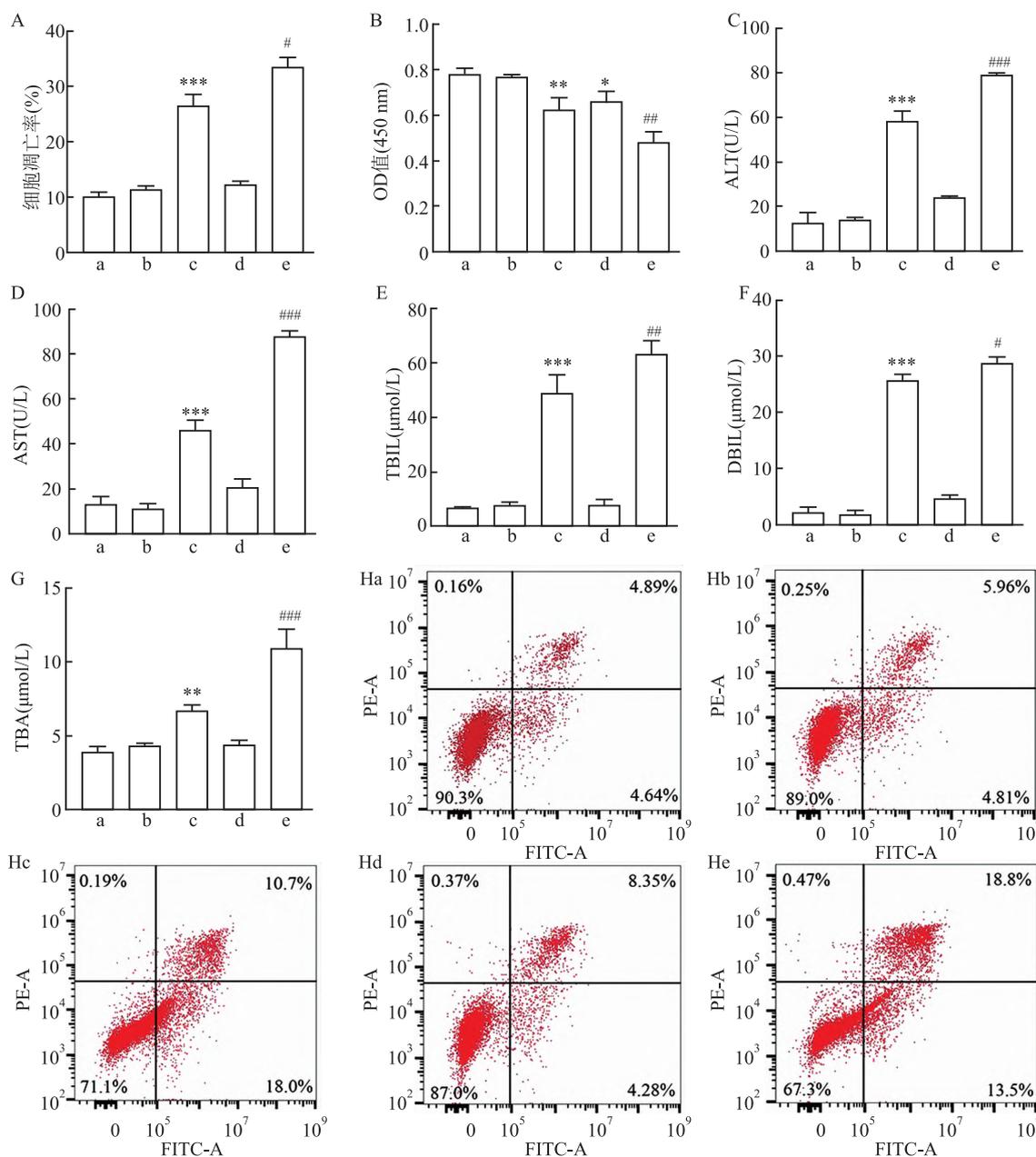


图3 PRDX6 敲低后对 HepG2 细胞损伤的影响

A: PRDX6 敲低后对 HepG2 细胞凋亡的影响; B: PRDX6 敲低后对 HepG2 细胞增殖的影响; C - G: PRDX6 敲低后各组细胞培养上清液中细胞损伤标志物 (ALT、AST、TBIL、DBIL、TBA) 的变化水平; Ha - He: 各组 HepG2 细胞凋亡流式图; a: 空白对照组; b: control-siRNA + DMSO 组; c: control-siRNA + RFP 组; d: PRDX6-siRNA + DMSO 组; e: PRDX6-siRNA + RFP 组; 与 control-siRNA + DMSO 组比较: \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$ ; 与 control-siRNA + RFP 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

胞适应性反应中发挥保护作用。本研究将有助于更进一步认识 RFP 诱导胆汁淤积适应现象的分子机制, 为临床实践提供参考。

参考文献

[1] Fisher A B. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling [J]. Arch Biochem Biophys, 2017, 617:68 - 83.  
 [2] Hawkes H J, Karlenius T C, Tonissen K F. Regulation of the hu-

man thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(1):303 - 14.  
 [3] Zhang W, Chen L, Feng H, et al. Rifampicin-induced injury in HepG2 cells is alleviated by TUDCA via increasing bile acid transporters expression and enhancing the Nrf2-mediated adaptive response [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 112:24 - 35.  
 [4] Ishii T. Close teamwork between Nrf2 and peroxiredoxins 1 and 6 for the regulation of prostaglandin D2 and E2 production in macrophages in acute inflammation [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88

- (Pt B):189–98.
- [5] Kuda O, Brezinova M, Silhavy J, et al. Nrf2-mediated antioxidant defense and peroxiredoxin 6 are linked to biosynthesis of palmitic acid ester of 9-hydroxystearic acid[J]. Diabetes, 2018, 67(6): 1190–9.
- [6] González R, Cruz A, Ferrín G, et al. Cytoprotective properties of rifampicin are related to the regulation of detoxification system and bile acid transporter expression during hepatocellular injury induced by hydrophobic bile acids[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2011, 18(5):740–50.
- [7] Mita S, Suzuki H, Akita H, et al. Inhibition of bile acid transport across Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs[J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(9):1575–81.
- [8] Ren X, Wang W, Chen L, et al. Regulation of hepatobiliary transporters during cholestasis may mediate the phenomenon of adaptation to cholestasis induced by rifampicin in rats[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2016, 9(4): 4473–81.
- [9] Chhunchha B, Kubo E, Singh D P. Switching of redox signaling by Prdx6 expression decides cellular fate by hormetic phenomena involving Nrf2 and reactive oxygen species[J]. Cells, 2022, 11(8):1266.
- [10] Yang Y, Liu L, Zhang X, et al. Tanshinone IIA prevents rifampicin-induced liver injury by regulating BSEP/NTCP expression via epigenetic activation of NRF2[J]. Liver Int, 2020, 40(1):141–54.
- [11] 曹世国,戴琼,黄梦雪,等. 敲减 MANF 对利福平诱导的 HepG2 细胞中胆汁酸转运体适应性表达的影响[J]. 安徽医科大学学报,2023,58(4):665–71.
- [12] Eismann T, Huber N, Shin T, et al. Peroxiredoxin-6 protects against mitochondrial dysfunction and liver injury during ischemia-reperfusion in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(2):G266–74.
- [13] López-Gueso M J, Lagal D J, García-Jiménez F, et al. Knockout of PRDX6 induces mitochondrial dysfunction and cell cycle arrest at G2/M in HepG2 hepatocarcinoma cell[J]. Redox Biol, 2020, 37:101737.

## Effect of knockdown of PRDX6 on adaptive expression of bile acid transporter in HepG2 cells induced by rifampicin

Qu Liufang, Huang Mengxue, Cao Shiguo, Chen Gang, Xu Jianming, Zhang Weiping  
(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the role of knockdown of peroxiredoxin-6 (PRDX6) in injury and adaptive expression of bile acid transporter in human hepatocellular carcinomas (HepG2) cells induced by rifampicin (RFP). **Methods** Cells in logarithmic growth phase were uniformly inoculated in six-well plates, and HepG2 cells were transiently transfected with specific PRDX6-siRNA and control-siRNA to construct the knockdown group and control group. After 24 h of induction with 100 μmol/L RFP, Western blot and qRT-PCR were performed to detect the protein and gene expression levels of PRDX6, multidrug resistance protein 1 (MDR1), multidrug resistance-associated proteins 2, 3 and 4 (MRP2, MRP3 and MRP4), and Na<sup>+</sup>/taurine taurocholate cotransporter protein (NTCP). Annexin V-FITC/PI double staining assay was used to detect the apoptosis rate of cells in each group; CCK-8 assay was used to detect the changes of cell proliferation in each group; The relative contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), indirect bilirubin (IBIL) and total bile acid (TBA) in the supernatant of cell culture medium of each group were detected by kits. **Results** RFP increased the protein and gene expression levels of MRP2, MRP3, MRP4, MDR1, NTCP and PRDX6 in HepG2 cells ( $P < 0.05$ ), while the protein and gene expression levels of MRP2, MRP3, MRP4, MDR1 and NTCP decreased to different degrees after PRDX6 knockdown ( $P < 0.05$ ). In addition, PRDX6 knockdown resulted in increased apoptosis rate of HepG2 cells ( $P < 0.05$ ), decreased cell proliferation ability ( $P < 0.05$ ), and increased levels of cell injury markers (ALT, AST, TBIL, DBIL, TBA) in cell culture supernatants ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** RFP increased the protein and gene expression of bile acid transporter and PRDX6 to increase in HepG2 cells. However, following knockdown of PRDX6 and treatment with RFP, the protein and gene expression levels of the bile acid transporter decreased and cell injury was aggravated, suggesting that PRDX6 played a protective role in RFP-induced adaptive response in HepG2 cells.

**Key words** peroxiredoxin-6; rifampicin; bile acid transporter; adaptive response; cell injury; apoptosis