

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

曹世国 戴琼 黄梦雪 屈柳芳 许建明 张卫平

摘要 目的 探讨中脑胶质细胞神经营养因子(MANF)在利福平(RFP)诱导的人肝癌细胞(HepG2)胆汁酸转运体的适应性表达中的作用。方法 使用慢病毒稳转构建对照组细胞株(Y07)和敲减组细胞株(Y25),于对数生长期的Y07和Y25细胞中加入RFP 200 $\mu\text{mol/L}$ 处理48 h。利用qRT-PCR和Western blot检测MANF、胆盐输出泵(BSEP)、多药耐药相关蛋白2/3/4(MRP2、MRP3、MRP4)、多药耐药蛋白1(MDR1)、有机溶质转运体 α/β (OST α/β)、有机阴离子转运蛋白(OATP2B1)的蛋白和基因表达程度。检测增殖细胞核抗原(PCNA)、增殖细胞标志物Ki67蛋白和基因表达程度评价各组细胞增殖水平变化;检测C/EBP同源蛋白(CHOP)、天冬氨酸半胱氨酸特异性蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白和基因表达程度变化评估各组细胞凋亡情况。用试剂盒检测各组细胞培养液上清中的损伤标志物丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、总胆汁酸(TBA)的水平。结果 在蛋白和基因水平,RFP可诱导HepG2细胞的MANF、BSEP、MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、OST α 、OST β 、OATP2B1的上升($P < 0.05$),而MANF敲减后BSEP、MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、OST α 、OST β 、OATP2B1的蛋白和基因表达水平均下降($P < 0.05$)。在RFP作用下,敲减MANF后PCNA、Ki67的蛋白表达相对较高,CHOP、Caspase-3蛋白和基因表达上升($P < 0.05$),肝细胞损伤标志物水平上升($P < 0.05$)。结论 RFP可诱导HepG2细胞胆汁酸转运体的表达上升($P < 0.05$),而敲减MANF后的HepG2在RFP诱导下胆汁酸转运体的表达会明显下降($P < 0.05$),同时细胞损伤加重,提示MANF在RFP诱导的适应性反应中起保护作用。

关键词 中脑胶质细胞神经营养因子;利福平;胆汁酸转运体;适应性反应;细胞增殖;细胞凋亡;细胞损伤

中图分类号 R 595.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0665-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.024

抗结核药物引起的药物性肝损伤是目前一个亟待解决的临床问题,抗结核药物引起的肝适应性反应是研究的一个热门方向,有研究^[1]表明利福平(rifampicin,RFP)可诱导人肝癌细胞(human hepatocellular carcinomas,HepG2)的胆盐输出泵(bile salt export pump,BSEP)、多药耐药蛋白1(multidrug resistance protein 1,MDR1)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-related protein,MRP)2、有机阴离子转运蛋白2(organic anion transporting protein2,OATP2)、有机溶质转运体(organic solute transporter,OST) β 在蛋白和基因水平表达上调。另有研究^[2-3]表明RFP可诱导中脑胶质细胞神经营养因子(mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor,MANF)在蛋白和基因水平上调,而敲减MANF后这种表达上调相对减弱。但MANF是否在RFP诱导的肝适应性反应中对胆汁酸转运体(bile acid transporter,BAT)有调控作用,尚未见文献报道。此次研究通过敲减HepG2细胞的MANF基因,观察敲减MANF后BAT表达的变化,以及RFP对HepG2细胞增殖、凋亡和损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 HepG2细胞购自中科院上海分院细胞库;慢病毒(携带敲减序列敲减组慢病毒及携带NC序列空白组慢病毒)购自和元生物技术(上海)股份有限公司;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)、Bradford蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物公司;PVDF膜、ECL显影液购自美国Millipore公司;蛋白Marker、TRIzol购自美国Thermo scientific公司;MANF、OATP2B1、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)抗体购自美国Abcam公司;BSEP抗体购自美国Santa Cruz公司;MRP2、MRP3、OST α 、OST β 抗体购自美国Novus抗体公司;MDR1、MRP4抗体购自武汉Proteintech公司;增殖细胞标志物Ki67抗体购自武汉Abclonal公司;C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein,

2023-02-10 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:曹世国,男,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

CHOP)、天冬氨酸半胱氨酸特异性蛋白酶-3(cysteiny l aspartate specific proteinase-3 ,Caspase-3) 抗体购自美国 CST 抗体公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ,GADPH)、β-肌动蛋白(beta-actin ,β-actin) 抗体及二抗(山羊抗小鼠、山羊抗兔) 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; β-actin、MANF、BSEP、MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、OSTα/β、OATP2B1、PCNA、Ki67、CHOP、Caspase-3 引物购自上海生工生物公司; RFP 购自北京索莱宝科技有限公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide ,DMSO) 购于美国 Sigma 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)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ,ALP)、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; qRT-PCR 仪(型号: 9700) 购自美国 ABI 公司; 电泳仪(型号: EPS-300)、电泳槽(型号: VE-186) 购自上海天能公司; 酶标仪(型号: MQX200) 购自美国 Bio-Tek 公司。

1.2 慢病毒转染构建稳定表达株 HepG2 细胞用完全培养基(含 10% 的胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基), 在培养箱(37 °C、5% CO₂) 中生长至对数期, 将细胞接种在 24 孔板中, 细胞数约 (5 ~ 10) × 10⁴ /孔, 24 h 后细胞密度大约为 30% ~ 40%, 此时每孔加入 500 μl 含 5 μg/ml 聚凝胺、5 μl 携带 MANF 敲减序列的慢病毒或携带空白序列慢病毒的 DMEM 培养基。12 ~ 20 h 后换完全培养基(含 10% 的胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基) 培养。培养 48 ~ 72 h 后将加携带 MANF 敲减序列的慢病毒和携带空白序列慢病毒的两组细胞换液, 并对应分组为 Y25 细胞和 Y07 细胞, 并分别在其新鲜培养液中加入嘌呤霉素 2 μg/ml, 持续 2 周, 筛选出成功转染的稳转细胞株。即为敲减组 Y25 细胞株和对照组 Y07 细胞株。

1.3 细胞分组和培养 细胞稳转株构建成功后, 按是否敲减 MANF 基因和培养液中是否加 RFP 刺激, 将细胞分为 Y07 + DMSO、Y07 + RFP、Y25 + DMSO、Y25 + RFP 四组, 用完全培养基(含有 10% 的胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基), 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 12 h 换液 1 次, 生长至对数期后, 按细胞数 3.0 × 10⁵ /孔接种在 6 孔板中, 24 h 后细胞密度约 70% ~ 80%, 给予 200 μmol/L

48 h RFP 处理细胞。

1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测 MANF 及 BAT 在基因水平的变化 分别收集各组细胞, 用 TRIzol 提取各组细胞中的总 RNA。分别测 RNA 浓度, 用 DEPC 水将各组 RNA 浓度调成一致后用金属浴 37 °C、15 min(逆转录反应), 85 °C、15 s(逆转录酶失活), 然后用 qRT-PCR 仪, 通过变性(95 °C、5 s)、退火(60 °C、30 s)、延伸(60 °C、30 s), 共 40 个循环扩增 PCR。读取每个 Ct 值, 应用 2^{-ΔΔCt} 法计算各组基因相对定量。各基因 qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
β-actin	F: GCCAACACAGTGCTGTCTGG R: CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG
GADPH	F: CCACTCCTCCACCTTTG R: CACCACCCTGTTGCTGT
MANF	F: TCACATTCTACCAGCCACT R: CAGGTCGATCTGCTGTGCATAC
BSEP	F: AGCCACACAGACCAGGATGTTG R: CAATGAACCCCTCTCCTTTCC
MRP2	F: GTTGGCCAGTTATCCGTGCCCTTTG R: GATGTCATCCTCACCAGCCAGTTC
MRP3	F: CGCTTCACCACCTTCTACATCCAC R: GCCTTGTGTCGTGCCGTCTG
MRP4	F: TCACAGTGCTGTCTCGAAAATAG R: GGATCCAAGAAGTATGATGAGTTAAT
MDR1	F: GCCATAGCTCGTGCCTTGTAG R: CGTGCCATGCTCCTTGACTCTG
OSTα	F: TCCCACAGCAGCCCAACTCC R: ACCAAAGCAGCACAGCACAGAC
OSTβ	F: AGCTGCTGGAAGAGATGCTTTGG R: CTGTTGTGATCCTTGGCCTCATCC
OATP2B1	F: AGCTGCTGGAAGAGATGCTTTGG R: AGTTGGCCTAGGAGGCTGTG
PCNA	F: GTCTGCAGATGTACCCTTGTGTAG R: TCCTCGATCTTGGGAGCCAACTAG
Ki67	F: ACGAGACGCCTGGTTACTATCA R: CTGTTTTGCTGCATTCTGTGC
CHOP	F: TCTTCTCCTCTCTCCTCCTG R: CACTCTTGACCCTGCTTCTC
Caspase-3	F: CTCGGTCTGGTACAGATGTGCAT R: GGTTAACCCGGTAAGAATGTGCA

1.5 Western blot 检测蛋白水平变化 将 6 孔板的细胞用胰酶消化后离心, 弃上清液, 收集细胞沉淀后用 PBS 缓冲液重悬后再次离心, 弃上清液, 加入混有 2% 蛋白酶抑制剂、2% 磷酸酶抑制剂、1%

PMSF 的 RIPA 裂解液,按 150 ~ 250 μl /孔的比例稀释细胞,然后置于冰上,摇床 40 min,离心后收集上清液,用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量,于 SDS-PAGE 凝胶上电泳,结束后用 PVDF 膜上转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 ~ 4 h,用 TBST 洗膜 3 次,8 min/次,再分别加入 GAPDH (1 : 5 000)、MANF (1 : 1 000)、BSEP (1 : 1 000)、MRP2 (1 : 500)、MRP3 (1 : 1 000)、MRP4 (1 : 5 000)、MDR1 (1 : 500)、OST α (1 : 1 000)、OST β (1 : 1 000)、OATP2B1 (1 : 1 000)、PCNA (1 : 1 000)、Ki67 (1 : 500)、CHOP (1 : 1 000)、Caspase-3 (1 : 1 000) 一抗抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 ~ 18 h, PVDF 膜复温后用 TBST 洗膜 5 次,8 min/次,洗膜后分别加入二抗 (1 : 5 000),于室温孵育 1 h,再次用 TBST 洗膜 5 次,8 min/次,洗膜结束后加 ECL 显影液显影。以 GAPDH 作为内参,用 Image J 软件分析结果。蛋白表达量以目的蛋白与内参比值的平均灰度值来表示。

1.6 细胞损伤标志物水平测定 检测收集的各组细胞培养上清液 (约 1 ~ 2 ml),根据 ALT、AST 的试剂盒说明书,制作标准曲线,得到函数公式,然后按说明书设定测定孔和对照孔,按操作步骤分别加入试剂,反应结束后,在波长 510 nm,用酶标仪测定吸光度值,再用函数公式计算出结果。按照 ALP 试剂盒说明书,设定空白孔、标准孔、测定孔,加入试剂于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 30 min,加入显色剂后轻轻震荡混匀,于波长 520 nm,用酶标仪测定吸光度值,根据说明书中的计算公式计算出结果。根据 TBIL、DBIL 试剂盒说明书,设定空白孔、标准孔、测定孔,加入试剂于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 5 min,波长 450 nm,用酶标仪测定吸光度值,根据说明书中的计算公式计算出结果。根据 TBA 试剂盒说明书,设定标准孔和测定孔,按说明书加入试剂于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 1.5 min,然后在波长 405 nm,酶标仪检测吸光度,再用说明书中的计算公式计算出结果。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行分析,实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间的比较采用单因素方差分析。每组实验均重复 3 次及以上。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MANF 敲减的验证 与 Y07 + DMSO 组比较, Y25 + DMSO 组 MANF 蛋白水平下降约 70% ($F = 59.842, P < 0.001$),基因水平表达下降约 90% (F

$= 872.806, P < 0.001$)。与 Y07 + DMSO 组比较, Y07 + RFP 组的 MANF 在蛋白水平 ($F = 59.842, P < 0.001$) 和基因水平 ($F = 872.806, P < 0.001$) 的表达均有上升;与 Y25 + DMSO 组比较, Y25 + RFP 组的 MANF 在蛋白水平 ($F = 59.842, P < 0.01$) 表达上升。提示 MANF 敲减稳转细胞株构建成功,并且 RFP 可诱导 Y07 和 Y25 细胞株的 MANF 表达上调。见图 1。

2.2 MANF 敲减对 BAT 的影响 与 Y07 + DMSO 组相比,加 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 RFP 刺激后, Y07 + RFP 组 BSEP ($F = 938.833, P < 0.05$)、MRP2 ($F = 401.315, P < 0.001$)、MRP3 ($F = 2 270.160, P < 0.001$)、MRP4 ($F = 47.927, P < 0.001$)、MDR1 ($F = 53.215, P < 0.001$)、OST α ($F = 181.078, P < 0.01$)、OST β ($F = 193.823, P < 0.001$)、OATP2B1 ($F = 20.921, P < 0.001$) 蛋白表达上调,见图 1B; BSEP ($F = 8712.81, P < 0.001$)、MRP2 ($F = 133.113, P < 0.001$)、MRP3 ($F = 70.16, P < 0.01$)、MRP4 ($F = 109.742, P < 0.001$)、MDR1 ($F = 30.140, P < 0.001$)、OST α ($F = 90.406, P < 0.001$)、OST β ($F = 49.536, P < 0.001$)、OATP2B1 ($F = 46.338, P < 0.001$) 在基因水平表达上调,见图 1C。与 Y25 + DMSO 组相比,加 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 RFP 刺激后, Y25 + RFP 组 MRP2 ($F = 401.315, P < 0.01$)、MRP4 ($F = 47.927, P < 0.001$)、MDR1 ($F = 53.215, P < 0.001$) 蛋白表达上调,见图 1B; BSEP ($F = 8712.81, P < 0.001$)、MRP2 ($F = 133.113, P < 0.01$)、MRP3 ($F = 70.16, P < 0.01$)、MRP4 ($F = 109.742, P < 0.001$)、MDR1 ($F = 30.140, P < 0.01$)、OST α ($F = 90.406, P < 0.001$)、OATP2B1 ($F = 46.338, P < 0.001$) 在基因水平表达上调,见图 1C。与 Y07 + RFP 组相比, Y25 + RFP 组 BSEP ($F = 938.833, P < 0.001$)、MRP2 ($F = 401.315, P < 0.001$)、MRP3 ($F = 2 270.160, P < 0.001$)、MRP4 ($F = 47.927, P < 0.05$)、MDR1 ($F = 53.215, P < 0.01$)、OST α ($F = 181.078, P < 0.001$)、OST β ($F = 193.823, P < 0.001$)、OATP2B1 ($F = 20.921, P < 0.05$) 蛋白表达下调,见图 1B; BSEP ($F = 8 712.81, P < 0.001$)、MRP2 ($F = 133.113, P < 0.001$)、MRP3 ($F = 70.16, P < 0.01$)、MRP4 ($F = 109.742, P < 0.001$)、MDR1 ($F = 30.140, P < 0.01$)、OST α ($F = 90.406, P < 0.05$)、OST β ($F = 49.536, P < 0.001$)、OATP2B1 ($F = 46.338, P < 0.01$) 在基因水平表达下调,见图 1C。

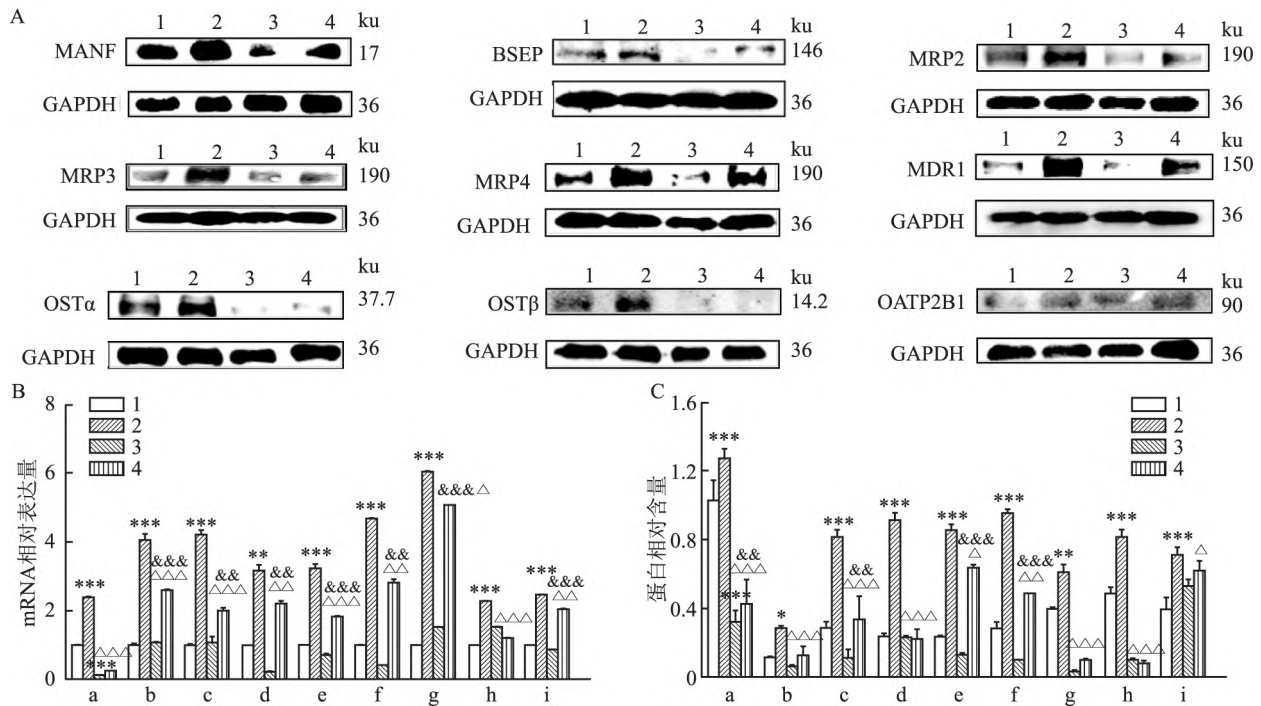


图1 MANF 在 HepG2 细胞中特异性敲减的验证以及敲减 MANF 对 RFP 诱导的 BAT 表达的影响

A: MANF 及 BAT (BSEP、MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、OST α 、OST β 、OATP2B1) 的蛋白条带; B、C: 在 MANF 敲减前后在基因水平和蛋白水平表达量的变化; 1: Y07 + DMSO 组; 2: Y07 + RFP 组; 3: Y25 + DMSO 组; 4: Y25 + RFP 组; a: MANF; b: BSEP; c: MRP2; d: MRP3; e: MRP4; f: MDR1; g: OST α ; h: OST β ; i: OATP2B1; 与 Y07 + DMSO 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 Y25 + DMSO 组比较: && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$; 与 Y07 + RFP 组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

2.3 敲减 MANF 对 RFP 诱导 HepG2 细胞增殖、细胞凋亡及损伤的影响 与 Y07 + DMSO 组相比, 加 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 RFP 刺激后, Y07 + RFP 组的 PCNA ($F = 57.646, P < 0.001$)、Ki67 ($F = 39.544, P < 0.001$) 蛋白表达下调, CHOP ($F = 43.469, P < 0.001$)、Caspase-3 ($F = 172.745, P < 0.05$) 蛋白表达上调, 见图 2B; CHOP ($F = 219.025, P < 0.001$)、Caspase-3 ($F = 187.376, P < 0.001$) 在基因水平表达上调, 见图 2C。与 Y25 + DMSO 组相比, 加 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 RFP 刺激后, Y25 + RFP 组 PCNA ($F = 57.646, P < 0.001$)、Ki67 ($F = 39.544, P < 0.001$) 蛋白表达下调, CHOP ($F = 43.469, P < 0.001$)、Caspase-3 ($F = 172.745, P < 0.001$) 蛋白表达上调, 见图 2B; PCNA ($F = 6.919, P < 0.01$)、Ki67 ($F = 6.483, P < 0.01$) 在基因水平表达下调, CHOP ($F = 219.025, P < 0.001$)、Caspase-3 ($F = 187.376, P < 0.001$) 在基因水平表达上调, 见图 2C。与 Y07 + RFP 组相比, Y25 + RFP 组 PCNA ($F = 57.646, P < 0.001$)、Ki67 ($F = 39.544, P < 0.01$)、CHOP ($F = 43.469, P < 0.01$)、Caspase-3 ($F = 172.745, P < 0.001$) 蛋白表达上调, 见图 2B; CHOP ($F =$

219.025, $P < 0.01$)、Caspase-3 ($F = 187.376, P < 0.001$) 在基因水平表达上调, 见图 2C。与 Y07 + RFP 组上清液中细胞损伤标志物 ALT (44.37 ± 7.42) U/L、AST (70.88 ± 3.88) U/L、ALP (3.95 ± 0.16) King Unit/gprot、TBIL (48.22 ± 8.15) $\mu\text{mol/L}$ 、DBIL (22.89 ± 0.68) $\mu\text{mol/L}$ 、TBA (16.03 ± 2.72) $\mu\text{mol/L}$ 相比; Y25 + RFP 组上清液中细胞损伤标志物 ALT [(70.87 ± 0.51) U/L] ($F = 236.078, P < 0.001$)、AST [(93.89 ± 14.55) U/L] ($F = 88.484, P < 0.01$)、ALP [(4.69 ± 0.25) King Unit/gprot] ($F = 101.182, P < 0.01$)、TBIL [(67.71 ± 6.79) $\mu\text{mol/L}$] ($F = 107.173, P < 0.01$)、DBIL [(35.72 ± 0.64) $\mu\text{mol/L}$] ($F = 30.851, P < 0.01$)、TBA [(23.57 ± 3.00) $\mu\text{mol/L}$] ($F = 40.551, P < 0.01$) 水平增高。见图 3A ~ F。说明 RFP 诱导 HepG2 细胞增殖能力下降, 凋亡增加, 细胞损伤加重。敲减 MANF 后, RFP 诱导 HepG2 细胞增殖下降的程度减弱, 细胞凋亡增强, 细胞损伤加重。

3 讨论

肝细胞的适应性反应包括清除受损的细胞, 改

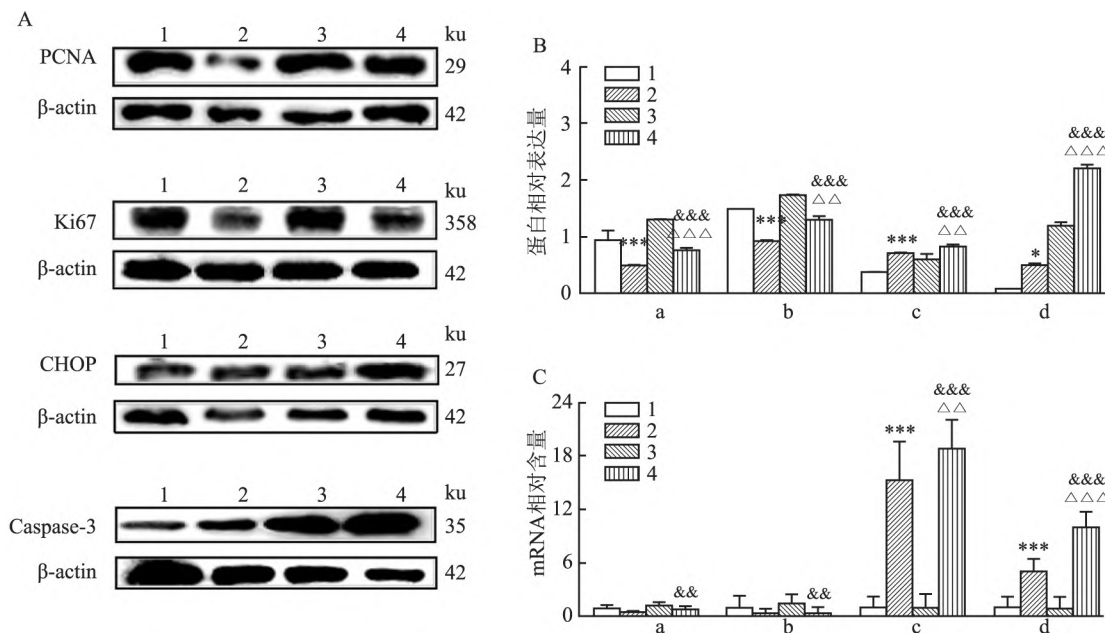


图2 敲减MANF对PCNA、Ki67、CHOP、Caspase-3在RFP诱导的HepG2细胞中表达的影响

A: PCNA、Ki67、CHOP、Caspase-3 蛋白条带; B、C: MANF 敲减前后在蛋白水平和基因水平表达量的变化; 1: Y07 + DMSO 组; 2: Y07 + RFP 组; 3: Y25 + DMSO 组; 4: Y25 + RFP 组; a: PCNA; b: Ki67; c: CHOP; d: Caspase-3; 与 Y07 + DMSO 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与 Y25 + DMSO 组比较: && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$; 与 Y07 + RFP 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

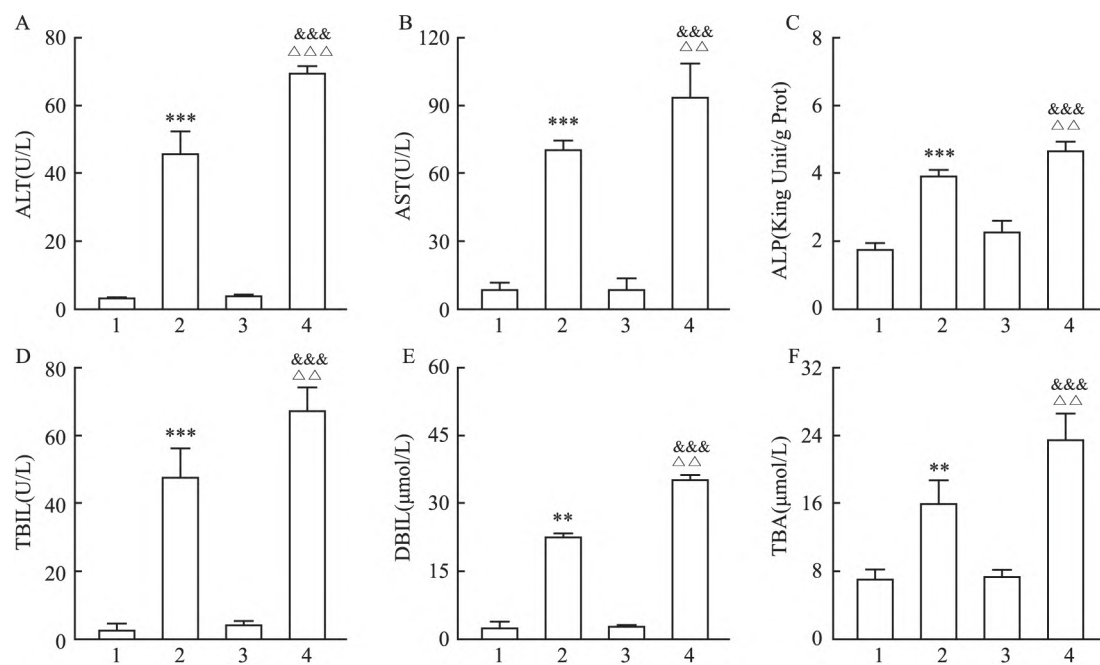


图3 MANF 敲减对 RFP 诱导 HepG2 细胞损伤的影响

A ~ F: 细胞培养液上清液中的细胞损伤标志物 ALT、AST、ALP、TBIL、DBIL、TBA 的含量; 1: Y07 + DMSO; 2: Y07 + RFP; 3: Y25 + DMSO; 4: Y25 + RFP; 与 Y07 + DMSO 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 Y25 + DMSO 组比较: &&& $P < 0.001$; 与 Y07 + RFP 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

善微环境的“稳态”调节细胞的基因表达和应激反应,调节免疫耐受等^[4]。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^[5]。

本研究体外实验结果显示, HepG2 细胞在 RFP 的刺激下 BSEP、MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、OST α/β 、OATP2B1 在蛋白和基因水平表达会上调。MRP2、MRP3、MRP4、OST α/β 、OATP2B1 主要分布在肝细胞基侧膜, BSEP、MDR1 主要分布在肝细胞毛细胆管侧膜, 这些 BAT 的上调, 有助于细胞胆汁酸的排泄, 避免胆汁淤积性肝损伤。可认为 HepG2 细胞在 RFP 的刺激下 BSEP、MRP2、MRP3、MRP4、MDR1、OST α/β 、OATP2B1 在蛋白和基因水平表达上调是 RFP 诱导肝细胞适应性反应的表现。HepG2 细胞敲减 MANF 基因后, 在 RFP 的作用下, 肝细胞基侧膜和毛细胆管侧膜的 BAT 的表达较未敲减组明显下降, 细胞损伤和细胞凋亡也会明显加重, 提示 MANF 参与 RFP 诱导的 HepG2 细胞 BAT 的适应性反应, 并发挥细胞保护作用。可能的机制是 RFP 作用于 HepG2 细胞时, MANF 参与调控 BAT 的表达上调, 促进肝细胞对胆汁酸外排增加, 在肝细胞适应性反应中发挥保护作用。

目前发现多种核受体如法尼醇受体 (FXR)、肝受体同系物-1 (LRH-1)、小分子异源二聚体伴侣 (SHP)、肝 X 受体等, 与胆汁酸代谢和 BAT 的表达密切相关, 而 MANF 是否与这些核受体有关联, MANF 是否充当上游信号分子, 参与调控部分核受体从而参与调控 BAT 的表达, 因限于实验条件, 暂未能进一步探究。

研究^[6-7]表明, 在大鼠胆汁淤积性肝损伤模型中, MRP2、MRP4、BSEP、阴离子交换蛋白 2 (AE2) 表达增加, 钠离子-牛磺胆酸钠共转运多肽 (NTCP) 表达减少。另有研究^[8]表明, RFP 通过增加 MRP4、BSEP 的表达, 减少 NTCP 的表达发挥细胞保护作用。Guo et al^[9]报道大鼠给予 RFP (200 mg/kg) 连续灌胃 14 d 后引起胆汁淤积性肝损伤, 可能与 NTCP 和 BSEP 表达下降有关。RFP 减少 NTCP 表达在胆汁淤积中发挥适应性保护作用, 抑制 BSEP 则引起胆汁淤积性肝损伤^[10]。此外, 研究^[11]表明丹参酮 II a 通过激活核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 调控 BSEP/NTCP 表达而预防 RFP 诱导的肝损伤。以上研究结果与本研究相符。

临床上肝损伤适应性反应表现为用药期间患者转氨酶及胆红素升高而没有临床症状, 继续用药后增高的指标会恢复正常^[12]。研究 RFP 引起的肝适应性反应, 有助于进一步探究抗结核药物引起的药物性肝损伤的机制, 同时有潜在的临床价值, 如能在临床上能精准识别适应性反应, 对避免不必要的停

药而影响原发病的治疗具有重要意义。

本实验结果显示, 相比于 Y07 + DMSO、Y25 + DMSO 组, 加 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 RFP 刺激后, Y07 + RFP 组、Y25 + RFP 组的 PCNA 和 Ki67 在蛋白水平表达下降, 然而 Y25 + RFP 组较 Y07 + RFP 组 PCNA 和 Ki67 蛋白水平相对较高; 此结果提示 RFP 抑制 HepG2 增殖, 可能与 RFP 的细胞毒性有关, 而 MANF 对 HepG2 细胞增殖有抑制作用^[13], 敲减 MANF 后 RFP 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用减弱。Y07 + RFP 组较 Y07 + DMSO 组 CHOP 和 Caspase-3 表达增加, 提示 RFP 会诱导肝细胞凋亡增加; 而 Y25 + RFP 组较 Y07 + RFP 组的 CHOP、Caspase-3 表达明显增加, 提示敲减 MANF 后 RFP 诱导的肝细胞凋亡会进一步加重。肝细胞损伤标志物 (ALT、AST、ALP、TBIL、DBIL、TBA) 的水平在 MANF 敲减后明显增加, 提示 MANF 敲减后 RFP 对 HepG2 细胞的损伤加重。这些结果均支持 MANF 在 RFP 诱导的肝适应性反应中发挥细胞保护性作用。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 戴琼, 张卫平, 陈刚等. 敲低 MANF 对利福平诱导 HepG2 细胞损伤的影响及机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(10): 1541-9.
- [3] Wang P, Yang Y, Pang G, et al. Hepatocyte-derived MANF is protective for rifampicin-induced cholestatic hepatic injury via inhibiting ATF4-CHOP signal activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 162: 283-297.
- [4] 刘鸿凌. 药物再激危险性及其肝细胞适应性研究进展 [J]. *肝脏* 2016, 21(9): 768-70.
- [5] 柴进. 人阻塞性胆汁淤积肝适应反应及 MRP2 转录后下调的分子机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- [6] 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.
- [7] Wang W, Ren X, Cai Y, et al. Rifampicin induces bicarbonate-rich choleresis in rats: involvement of Anion Exchanger 2 [J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(1): 126-36.
- [8] González R, Cruz A, Ferrín G, et al. Cytoprotective properties of rifampicin are related to the regulation of detoxification system and bile acid transporters expression during hepatocellular injury induced by hydrophobic bile acids [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2011, 18(5): 740-50.
- [9] Guo Y X, Xu X F, Zhang Q Z, et al. The inhibition of hepatic

- bile acids transporters Ntcp and Bsep is involved in the pathogenesis of isoniazid/ rifampicin - induced hepatotoxicity [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2015, 25(5): 382 - 7.
- [10] Mita S, Suzuki H, Akita H, et al. Inhibition of bile acid transport across Na⁺/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.
- [11] 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.
- [12] Watkins P B, Seeff L B. Drug-induced liver injury: summary of a single topic clinical research conference [J]. *Hepatology* 2006, 43(3): 618 - 31.
- [13] Liu J, Wu Z, Han D, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor inhibits liver cancer through small ubiquitin-related modifier (SUMO)ylation-related suppression of NF- κ B/snail signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Hepatology* 2020, 71(4): 1262 - 78.

Effects of knockdown of MANF on adaptive expression of bile acid transporter in HepG2 cells induced by rifampicin

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

Abstract Objective To investigate the effect of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) on the adaptive expression of bile acid transporter in human hepatocellular carcinomas (HepG2) induced by rifampicin (RFP). **Methods** The control group cell line (Y07) and the knockdown group cell line (Y25) were constructed by lentiviral stable transfection technology. The Y07 and Y25 cells were treated with RFP of 200 μ mol/L for 48 h, and qRT-PCR and Western blot were used to detect the protein and gene expression levels of MANF, bile salt export pump (BSEP), multidrug resistance-related proteins 2/3/4 (MRP2, MRP3, MRP4), multidrug resistance protein 1 (MDR1), organic solute transporter α/β (OST α/β), organic anion transporter (OATP2B1). The protein and gene expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), proliferating cell marker Ki67 were used to evaluate the proliferation of cells in each group changes in levels. Changes in the protein and gene expression levels of C/EBP homologous protein (CHOP) and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) were used to evaluate the apoptosis of cells in each group. The relative contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), 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 could induce the protein and gene expression of MANF, BSEP, MRP2, MRP3, MRP4, MDR1, OST α , OST β , OATP2B1 in HepG2 cells ($P < 0.05$), while the protein and gene expression levels of BSEP, MRP2, MRP3, MRP4, MDR1, OST α , OST β , OATP2B1 decreased after MANF knockdown ($P < 0.05$). Moreover, under the action of RFP, the protein expression of PCNA and Ki67 in the knockdown group was still higher. The protein and gene levels of CHOP and Caspase-3 significantly increased after MANF knockdown ($P < 0.05$). The levels of the hepatic cell injury markers in the cell supernatant increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** RFP can induce the expression of bile acid transporter such as BSEP, MRP2, MRP3, MRP4, MDR1, OST α , OST β and OATP2B1 to increase in HepG2 cells ($P < 0.05$), but the expression of bile acid transporter of HepG2 after MANF knockdown will significantly decrease under the induction of rifampicin ($P < 0.05$) and cell injury is aggravated, indicating that MANF plays a protective role in RFP-induced adaptive responses by regulating the bile acid transporter. **Key words** mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor; rifampicin; bile acid transporter; adaptive response; cell proliferation; cell apoptosis; cell injury