

# 慢性肝损伤对大鼠脑内 P-GP 及 MRP2 功能和表达的影响

金 实, 姚 丹, 刘 灿, 王新廷, 张璐璐, 刘晓东\*

(中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 研究硫代乙酰胺(TAA)诱导的慢性肝损伤(CLF)对大鼠脑内 P-糖蛋白(P-GP)和多药耐药蛋白 2(MRP2)的功能和表达的影响。大鼠腹腔注射 TAA(200 mg/kg), 每周两次, 连续给药 12 周诱导慢性肝损伤模型。最后 1 次给药后 24 h, 静脉注射 P-GP 底物罗丹明 123(Rho 123)和长春新碱(VCR), 以及 MRP2 底物溴磺酞钠(BSP), S-(2,4 二硝基苯基)-谷胱甘肽(DNP-SG), 测定大脑皮层、海马和血浆中底物浓度, 计算其脑组织/血浆浓度比; 用 Western blot 测定脑内 P-GP 和 MRP2 的蛋白表达。结果显示 CLF 显著升高 Rho123 和 VCR 的脑组织/血浆浓度比, 显著降低 BSP 和 DNP-SG 脑组织/血浆浓度比。Western blot 结果表明 CLF 显著下调脑内 P-GP 的蛋白水平, 显著上调脑内 MRP2 的蛋白水平。实验结果表明, 慢性肝损伤下调大鼠脑内 P-GP 的功能和表达, 上调 MRP2 的功能和表达。

**关键词** P-糖蛋白; 多药耐药蛋白 2; 慢性肝损伤; 血-脑脊液屏障

**中图分类号** R965 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2012)01-0064-06

## Effect of chronic liver failure on the function and expression of P-GP and MRP2 in rat brain

JIN Shi, YAO Dan, LIU Can, WANG Xin-ting, ZHANG Lu-lu, LIU Xiao-dong\*

Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** The purpose of the study was to investigate whether chronic liver failure (CLF) induced by thioacetamide (TAA) affected the function and expression of P-glycoprotein (P-GP) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in rat brain. CLF was induced by ip injection of TAA (200 mg/kg) twice per week for 12 weeks. The rats were used for further experiments 24 h after the last administration. The function of P-GP and MRP2 in rat brain was determined using the brain-to-plasma ratios of corresponding substrates (rhodamine 123, Rho123 and vincristine, VCR for P-GP; Sulfobromophthalein, BSP and dinitrophenyl-S-glutathione, DNP-SG for MRP2); Western blot was applied to determine the expression of P-GP and MRP2 proteins. The results suggested that CLF increased the brain-to-plasma ratios of Rho 123 and VCR, while decreasing those of BSP and DNP-SG. Western blot results showed that CLF decreased brain P-GP levels, while increasing MRP2 levels. In conclusion, CLF may decrease the function and expression of P-GP, while increasing the function and expression of MRP2.

**Key words** P-glycoprotein; multidrug resistance-associated protein 2; chronic liver failure; blood-brain barrier

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072693, No. 30873123) and Fund for Outstanding Scientific and Technological Innovation Team in College and University of Jiangsu Province

慢性肝损伤(chronic liver failure, CLF)往往会伴随并发症肝性脑病, 尽管其发病机制尚未完全明确, 但是脑内神经毒性或活性物质的累积是引起肝性脑病的重要原因之一<sup>[1]</sup>。已知脑部环境的稳态是由血-脑脊液屏障(blood-brain barrier, BBB)调控

的, 有文献报道肝损伤会因破坏紧密连接而增加 BBB 通透性<sup>[2]</sup>。除紧密连接外<sup>[3]</sup>, BBB 上的许多转运体如 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-GP)、多药耐药蛋白(multidrug resistance-associated proteins, MRPs)及乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance

\* 收稿日期 2011-10-24 \* 通讯作者 Tel: 025-83271006 E-mail: xdlu@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81072693, No. 30873123); 江苏省高等学校优秀科技创新团队资助项目

protein,BCRP)等也会影响物质在 BBB 上的通透性<sup>[4]</sup>。

P-GP 在 BBB 上的表达被认为是机体限制毒素进入脑内的一种重要的保护机制<sup>[5]</sup>。BBB 上 P-GP 功能的改变会影响许多药物在脑内的分布,从而影响其中枢活性,甚至产生毒性<sup>[6]</sup>。虽然关于 MRP2 调控药物在 BBB 上转运的文献报道相对有限,但是其在 BBB 上发挥的调节药物脑内分布的作用也不容忽视<sup>[7]</sup>。越来越多的文献报道一些疾病会改变 BBB 上 P-GP 和 MRP2 的功能与表达<sup>[7-10]</sup>。近来,有文献报道<sup>[11-12]</sup>急性肝损伤会改变脑内 P-GP 和外周组织 MRP2 的功能。以上结果表明慢性肝损伤可能会引起脑内 P-GP 和 MRP2 功能的改变,从而改变其底物在脑内的分布。

本文研究硫代乙酰胺(thioacetamide,TAA)诱导的慢性肝损伤对大鼠脑内 P-GP 和 MRP2 的功能和表达的影响。

## 1 材 料

### 1.1 试 剂

TAA 和罗丹明 123 (rhodamine 123, Rho 123) 购自美国 Sigma 公司;长春新碱(vincristine, VCR, 杭州民生药业集团有限公司);溴磺酞钠(sulfobromophthalein, BSP, 天津阿法埃莎化学有限公司);四溴酚蓝(tetrabromophenol blue, BB, 北京精益精化工有限公司);S-(2,4 二硝基苯基)-谷胱甘肽(dinitrophenyl-S-glutathione, DNP-SG, 加拿大 Toronto Research Chemicals 公司);1-氯-2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB, 上海阿达玛斯试剂公司);伊文思蓝(Evans blue, EB, 上海化学试剂有限公司);实验用水为超纯水;其他试剂均为市售分析纯。

丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素,结合胆红素和羟脯氨酸(HYP)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);P-GP 单克隆抗体 C219(美国 Calbiochem-Novabiochem 公司);MRP2 单克隆抗体 M2III-6(美国 ABCam 公司)。

### 1.2 仪 器

Milli-Q Gradient A10 超纯水器(美国 Millipore 公司);台式冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司);GENIE® VORTEX-2 涡旋混合装置(美国

Scientific Industries 公司);超声破碎仪(日本三洋公司);垂直板电泳转移装置(上海天能公司);JY300C 电泳仪(北京君意公司);万分之一电子天平,LC-20A HPLC 系统;LCMS2020 LC-MS 系统(日本岛津公司)。

### 1.3 动 物

雄性 SD 大鼠,体重 150 ~ 170 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,合格证编号:SCXK(沪)2008-0016。

## 2 方 法

### 2.1 动物实验

2.1.1 大鼠慢性肝损伤模型的建立 大鼠适应性饲养 5 d 后,腹腔注射 TAA (200 mg/kg),每周两次,连续给药 12 周诱导慢性肝损伤模型<sup>[13]</sup>,正常对照组大鼠腹腔注射生理盐水。所有大鼠均于最后 1 次给药后 24 h 进行后续实验。

2.1.2 肝功能指标及肝脏组织学检查 为了确证大鼠慢性肝损伤模型,取全血分取血清测定 ALT, AST, ALP, 总胆红素和结合胆红素。处死后称取肝重及脾重,并且取肝脏组织测定 HYP 含量。以上所有指标均依照试剂盒说明书测定。取肝脏组织进行组织学检查,将慢性肝损伤和正常大鼠肝脏在同一部位切取组织块(1 cm × 1 cm × 0.5 cm),用 10% 的福尔马林溶液固定,酒精脱色后包埋于固体石蜡,制成 4 μm 厚切片,用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光学显微镜下检查,摄片。

2.1.3 大鼠脑内 P-GP 和 MRP2 功能的测定 用 P-GP 底物 Rho123 和 VCR 作为工具药,通过测定其在脑组织和血浆中的浓度比评价 P-GP 的功能<sup>[9]</sup>。分别于大鼠尾静脉注射 Rho123 (0.2 mg/kg) 和 VCR (3 mg/kg), 45 min 和 1 h 后处死,取大脑皮层、海马和全血,离心分取血浆低温保存用于测定药物浓度。

用 MRP2 底物 BSP<sup>[14]</sup> 和 DNP-SG<sup>[15]</sup> 作为工具药,通过测定其脑组织/血浆浓度比评价 MRP2 的功能。分别于大鼠尾静脉注射 BSP (37.7 mg/kg) 和 CDNB (6 mg/kg, DNP-SG 的前体), 30 min 和 15 min 后处死,取大脑皮层、海马和全血,离心分取血浆低温保存用于测定药物浓度。

2.1.4 大鼠 BBB 完整性的测定 用 EB 作为工具药,评价慢性肝损伤大鼠 BBB 的完整性。给予大

鼠尾静脉注射 EB (80 mg/kg), 24 h 后处死, 取大脑皮层和海马, 用荧光分光光度法测定脑组织中 EB 浓度<sup>[9]</sup>。

### 2.1.5 大鼠脑内 P-GP 和 MRP2 蛋白表达的测定

应用 Western blot 测定大脑皮层和海马 P-GP 和 MRP2 蛋白表达<sup>[8]</sup>, 步骤简述如下: 精密称取脑组织样本, 加入裂解液匀浆离心抽提膜蛋白及内参蛋白, 应用考马斯亮蓝法测定蛋白含量。两蛋白的上样量均为 70  $\mu\text{g}$ , 经过 SDS-PAGE 分离而后转至纤维素膜上封闭过夜, 分别用 P-GP 单克隆抗体 C219 (1:100) 和 MRP2 单克隆抗体 M2III-6 (1:100) 孵育过夜, 然后用辣根过氧化物酶结合的二抗孵育。增强化学发光显色, 用 X 线底片曝光, 摄片。进行灰度扫描后, 经  $\beta$ -actin 校正, 并与对照组比较得到 P-GP 和 MRP2 相对表达量。

### 2.2 分析测定

大鼠大脑皮层, 海马和血浆样本中 Rho123 和 VCR 的浓度分别采用 HPLC-FLU 和 LC-MS 方法进行测定<sup>[9]</sup>。Rho123 在脑组织和血浆中最低检测限分别为 0.3 ng/g 和 3.9 ng/mL, 回收率均大于 85%, 日间差和日内差均小于 10%, 在脑组织和血浆中线性范围分别为 0.3 ~ 10 ng/g 和 3.9 ~ 100 ng/mL。VCR 在脑组织和血浆中最低检测限分别为 1.25 ng/g 和 31.25 ng/mL, 回收率均大于 85%, 日间差和日内差均小于 10%, 在脑组织和血浆中线性范围分别为 1.25 ~ 20 ng/g 和 31.25 ~ 1 000 ng/mL。

样本中 BSP 的浓度采用 LC-MS 方法进行测定。精密称取大脑皮层 0.3 g 和海马 0.06 g, 分别加超纯水 1 mL 和 200  $\mu\text{L}$  制匀浆。取血浆和脑匀浆各 200  $\mu\text{L}$ , 分别加入内标 BB (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 10  $\mu\text{L}$  振荡 10 s 混匀, 加入乙腈 600  $\mu\text{L}$  涡旋振荡 10 min, 两次高速离心 (18 000 r/min, 5 min), 取上清 500  $\mu\text{L}$  真空旋转挥干。稀氨水 (0.05%) 100  $\mu\text{L}$  复溶, 两次高速离心 (18 000 r/min, 5 min), 取上清液 80  $\mu\text{L}$  待进样。质谱条件如下: 离子化方式为电喷雾离子化 (ESI); 离子极性 Negative; 选择性离子监测; 典型脱溶剂装置温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ; CDL 电压: 20 V; 加热块温度 200  $^{\circ}\text{C}$ ; 离子源电压 -4.5 kV; 检测电压: 1.6 kV; 检测离子: BSP  $m/z$  395.85 [M - 2H]<sup>2-</sup>, BB  $m/z$  668.75 [M - H]<sup>-</sup>; 雾化气流速 1.5 L/min; 干燥气流速 5.0 L/min。色谱条件如下: 色谱柱为 Shim-pack ODS C<sub>18</sub> (150 mm  $\times$  2.0 mm,

5.0  $\mu\text{m}$ ), 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ 。流动相 A 为 0.05% 氨水, 流动相 B 为乙腈; 流速 0.2 mL/min; 进样量 5  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱程序如下: 0 ~ 1.0 min, B: 10%; 1.0 ~ 5.0 min, B: 10% 升高至 60%; 5.0 ~ 6.0 min, B: 60% 下降至 10%; 6.0 ~ 10 min, B: 10%。BSP 在脑组织和血浆中最低检测限分别为 15.6 ng/g 和 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 回收率均大于 85%, 日间差和日内差均小于 10%, 在脑组织和血浆中线性范围分别为 15.6 ~ 1 000 ng/g 和 6.25 ~ 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

样本中 DNP-SG 的浓度采用 HPLC-UV 方法进行测定<sup>[16]</sup>。精密称取大脑皮层 0.3 g 和海马 0.06 g, 分别加超纯水 1 mL 和 200  $\mu\text{L}$  制匀浆。取血浆 200  $\mu\text{L}$  和脑匀浆 200  $\mu\text{L}$ , 加入 1 mol/L 磷酸 60  $\mu\text{L}$  酸化 30 s, 再加入乙腈 400  $\mu\text{L}$  涡旋振荡 10 min, 两次高速离心 (18 000 r/min, 5 min), 取上清 500  $\mu\text{L}$  真空旋转挥干。流动相 100  $\mu\text{L}$  复溶, 两次高速离心 (18 000 r/min, 5 min), 取上清液 80  $\mu\text{L}$  待进样。色谱条件如下: 色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub> column (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5.0  $\mu\text{m}$ ); 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ 。流动相 A 为 0.1% 磷酸水溶液, 流动相 B 为乙腈; 流速 1 mL/min; 进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱程序如下: 0 ~ 6.5 min, B: 17%; 6.5 ~ 8 min, B: 17% 升高至 85%; 8.0 ~ 12.0 min, B: 17%; 12.0 ~ 13.5 min, B: 85% 下降至 17%; 13.5 ~ 20 min, B: 17%。检测波长为 365 nm; 灵敏度 0.01 AUFS。DNP-SG 在脑组织和血浆中最低检测限分别为 0.31  $\mu\text{g}/\text{g}$  和 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 回收率均大于 85%, 日间差和日内差均小于 10%, 在脑组织和血浆中线性范围分别为 0.31 ~ 5  $\mu\text{g}/\text{g}$  和 1.56 ~ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.3 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Student's *t*-test 进行方差分析。P < 0.05 或 P < 0.01 代表数据差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 肝功能指标及肝脏组织学检查

为了确证大鼠慢性肝损伤模型是否成功, 测定了肝功能相关指标 (表 1), 结果显示慢性肝损伤组的肝重和脾重显著高于对照组; 各项血清生化指标如 ALT, AST, ALP, 总胆红素及结合型胆红素水平在疾病状态下也显著升高; 慢性肝损伤组肝脏中 HYP 的含量也明显高于对照组, 结合肝脏组织学

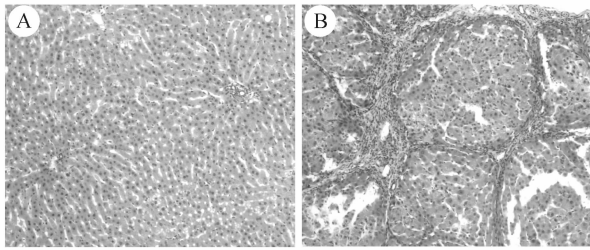
检查结果(图 1),可以确证肝纤维化形成,确证大鼠慢性肝损伤模型成功。

**Table 1** Physiological and biochemical parameters of the rats with chronic liver failure (CLF) ( $\bar{x} \pm s$ )

Parameter	Control( $n=5$ )	CLF( $n=8$ )
Initial body weight/g	193 $\pm$ 4	195 $\pm$ 5
Final body weight/g	515 $\pm$ 21	357 $\pm$ 24 **
Liver weight index <sup>a</sup> /%	2.42 $\pm$ 0.17	3.78 $\pm$ 0.13 **
Spleen weight index <sup>b</sup> /%	0.30 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.06 **
HYP content <sup>c</sup> /( $\mu\text{g/g}$ )	169.75 $\pm$ 23.28	456.83 $\pm$ 110.04 **
ALT/(IU/L)	9.78 $\pm$ 1.13	22.92 $\pm$ 7.21 **
AST/(IU/L)	13.38 $\pm$ 2.56	29.48 $\pm$ 7.92 **
ALP/(IU/L)	162.03 $\pm$ 24.59	569.50 $\pm$ 85.23 **
Total bilirubin/( $\mu\text{mol/L}$ )	13.49 $\pm$ 1.71	25.69 $\pm$ 14.13 *
Conjugated bilirubin/( $\mu\text{mol/L}$ )	2.39 $\pm$ 0.52	4.48 $\pm$ 0.49 **

<sup>a</sup>Percentage of liver weight to total body weight; <sup>b</sup>Percentage of spleen weight to total body weight; <sup>c</sup>Hydroxyproline to liver weight; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; ALP: Alkaline phosphatase

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group



**Figure 1** Liver histology of rat in control group (A) and thioacetamide-induced group (B) ( $\times 100$ )

### 3.2 慢性肝损伤对大鼠脑内 P-GP 功能的影响

给予大鼠尾静脉注射 Rho123 (0.2 mg/kg), 45 min 后处死,测得血浆和脑组织中 Rho123 浓度列于表 2。结果表明尽管两组的 Rho123 的血浆浓度无显著性差异,但慢性肝损伤组大鼠大脑皮层中 Rho123 浓度显著升高 ( $P = 0.039$ ), Rho123 的皮

层/血浆浓度比(图 2)也显著高于对照组 ( $P = 0.004$ )。海马中 Rho123 的结果与大脑皮层类似。给予大鼠尾静脉注射 VCR (3 mg/kg), 1 h 后测得血浆和脑组织中 VCR 与 Rho123 的结果趋势一致。上述结果显示 P-GP 两个典型底物 Rho123 和 VCR 在慢性肝损伤大鼠中脑/血浆浓度比显著增加,提示慢性肝损伤大鼠脑部 P-GP 的功能可能下调。

除 BBB 上转运体功能下调,其完整性受损也会引起底物脑内浓度增加。本实验通过测定 EB 在大脑皮层和海马的含量来衡量 BBB 完整性,结果(表 2)显示慢性肝损伤组大鼠大脑皮层和海马中 EB 浓度显著高于对照组 ( $P = 0.002$ ;  $P = 0.014$ )。上述结果表明慢性肝损伤影响了 BBB 的完整性,所以这也是底物脑内浓度增加的原因之一。

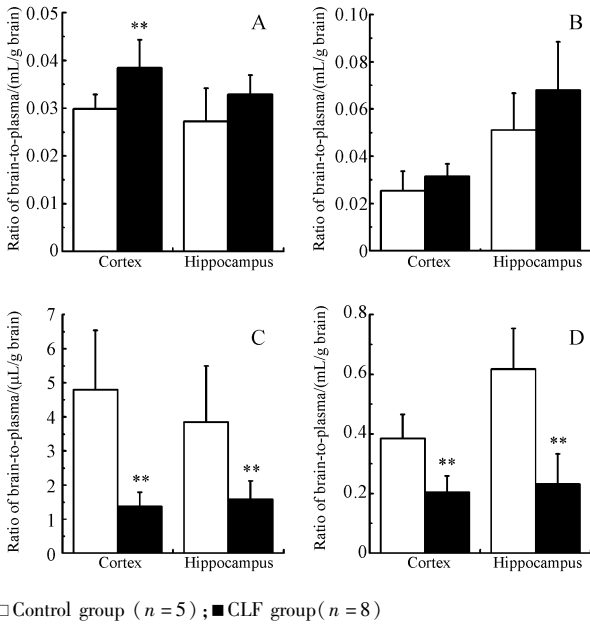
### 3.3 慢性肝损伤对大鼠脑内 MRP2 功能的影响

给予大鼠尾静脉注射 BSP (37.7 mg/kg), 30 min 后测得血浆和脑组织中 BSP 浓度列于表 2。结果表明慢性肝损伤 BSP 的血浆和脑组织浓度显著升高,但是由于脑内浓度升高的程度不及血浆,所以导致 BSP 的皮层/血浆浓度比及海马/血浆浓度比(图 2)显著低于对照组 ( $P = 0.005$ ;  $P = 0.018$ )。给予尾静脉注射 CDNB (6 mg/kg), 15 min 后处死,测得血浆和脑组织中 DNP-SG 浓度列于表 2。结果表明尽管两组的 DNP-SG 的血浆浓度无显著性差异,但是慢性肝损伤组大鼠脑组织中 DNP-SG 浓度显著降低 ( $P = 0.039$ ),导致 DNP-SG 的皮层/血浆浓度比(图 2)也显著低于对照组 ( $P = 0.004$ ;  $P = 0.001$ )。上述结果显示慢性肝损伤大鼠 BSP 和 DNP-SG 脑/血浆浓度比显著降低,提示慢性肝损伤大鼠脑内 MRP2 的功能可能上调。

**Table 2** Effect of CLF on distribution of rhodamine 123 (Rho123), vincristine (VCR), sulfobromophthalein (BSP), dinitrophenyl-S-glutathione (DNP-SG) and Evans blue (EB) in plasma, cerebral cortex and hippocampus

Compound	Group	n	c(plasma)/(ng/mL)	c(cortex)/(ng/g brain)	c(hippocampus)/(ng/g brain)
Rho123	Control	5	50.35 $\pm$ 5.67	1.49 $\pm$ 0.07	1.36 $\pm$ 0.32
	CLF	8	44.30 $\pm$ 3.98	1.69 $\pm$ 0.22 *	1.46 $\pm$ 0.26
VCR	Control	5	150.16 $\pm$ 24.42	3.66 $\pm$ 0.74	7.40 $\pm$ 1.32
	CLF	8	156.96 $\pm$ 27.72	4.89 $\pm$ 0.79 *	10.42 $\pm$ 2.88 *
BSP	Control	5	(2.80 $\pm$ 1.62) $\times 10^4$	116.44 $\pm$ 40.38	96.44 $\pm$ 44.49
	CLF	8	(2.89 $\pm$ 1.07) $\times 10^5$ **	374.34 $\pm$ 120.25 **	427.07 $\pm$ 141.14 **
DNP-SG	Control	5	(9.01 $\pm$ 1.73) $\times 10^3$	(3.42 $\pm$ 0.81) $\times 10^3$	(5.42 $\pm$ 0.75) $\times 10^3$
	CLF	8	(9.53 $\pm$ 2.68) $\times 10^3$	(1.87 $\pm$ 0.48) $\times 10^3$ **	(2.04 $\pm$ 0.67) $\times 10^3$ **
EB	Control	5	-	(1.84 $\pm$ 0.39) $\times 10^3$	(1.43 $\pm$ 0.53) $\times 10^3$
	CLF	8	-	(3.13 $\pm$ 0.42) $\times 10^3$ **	(2.60 $\pm$ 0.38) $\times 10^3$ **

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group



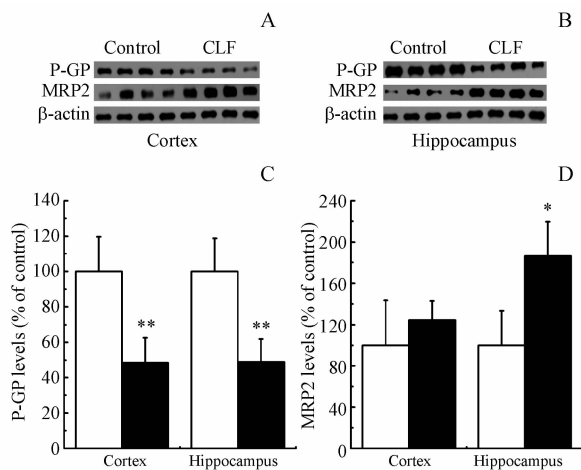
□ Control group (n = 5); ■ CLF group (n = 8)

**Figure 2** Effect of CLF on distribution of Rho123 (A), VCR (B), BSP (C) and DNP-SG (D) in cerebral cortex and hippocampus of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 3.4 慢性肝损伤对大鼠脑部 P-GP 及 MRP2 蛋白表达的影响

为了研究慢性肝损伤大鼠脑部蛋白表达改变是否为 P-GP 和 MRP2 功能改变的原因之一,用 Western blot 实验测定大鼠大脑皮层及海马上 P-GP 和 MRP2 的蛋白表达(图 3)。



□ Control group; ■ CLF group

**Figure 3** Changes of P-GP and MRP2 expression in rat brain ( $\bar{x} \pm s$ , n = 4)

A, B: Western blot of P-GP and MRP2 in cerebral cortex and hippocampus; C: Changes of P-GP expression in CLF group; D: Changes of MRP2 expression in CLF group

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

结果显示慢性肝损伤大鼠皮层和海马的 P-GP 表达显著降低,分别为对照组表达量的 48.57% 和 49.04%;而慢性肝损伤大鼠大脑皮层和海马的 MRP2 表达量都高于正常对照组,分别增加了 24.48% 和 86.33%。结果说明 TAA 诱导的慢性肝损伤状态下大鼠脑部 P-GP 的表达下调,而 MRP2 的表达上调,和转运体的功能改变趋势一致,说明慢性肝损伤大鼠脑部蛋白表达改变是 P-GP 和 MRP2 功能的改变的原因之一。

## 4 讨论

关于慢性肝损伤导致脑内 P-GP 和 MRP2 功能改变的机制尚未明确。Huang 等<sup>[17]</sup>发现  $\text{CCl}_4$  诱导的急性肝损伤下调脑内 P-GP 功能,但是脑内 P-GP 的表达水平并未发生变化。另外, Yamauchi 等<sup>[11]</sup>应用肝切除的小鼠血清培养小鼠脑微血管内皮细胞,同样发现 P-GP 功能下调,但是 *mdr1a* 和 *mdr1b* mRNA 表达水平也未发生变化。上述结果提示除了转运体的蛋白或 mRNA 表达水平外,还有其他因素可以影响其功能。在肝损伤状态下,大鼠脑内前炎症因子(包括 IL-1b, IL-6 和 TNF- $\alpha$ )的蛋白表达水平升高<sup>[18]</sup>,而据文献报道这些细胞因子会抑制 P-GP 的功能<sup>[19]</sup>。因此,肝损伤状态下脑内升高的前炎症因子可能是下调 P-GP 功能的原因之一。本实验结果显示慢性肝损伤大鼠血清肝功能指标结合型胆红素显著高于正常对照,据文献报道在离体水平上结合型胆红素可以在蛋白和 mRNA 水平上调 MRP2<sup>[20]</sup>,所以,疾病状态下升高的结合型胆红素也可能成为调控 MRP2 功能的原因之一。

P-GP 和 MRP2 都在 BBB 外排转运系统上发挥着重要的作用,二者功能的改变会引起底物药物或者内源性底物在脑内的分布发生改变。本实验结果显示大鼠脑内 P-GP 和 MRP2 这两个外排转运体在慢性肝损伤状态下功能的改变是相反的,类似的现象在慢性肾损伤大鼠的肝脏和肾脏也有发现<sup>[21]</sup>。MRP2 和 P-GP 在组织分布上有着广泛的重叠,尽管二者转运的底物类型有所不同,但是二者在发挥药理和毒理保护作用上可能会有交叉重叠<sup>[22]</sup>。Hoffmann 等<sup>[23]</sup>报道在 MRP2 缺陷的大鼠脑微血管内皮细胞上 P-GP 会代偿性的上调,所以在慢性肝损伤状态下大鼠脑内 P-GP 功能下调而 MRP2 功能上调可能也是机体一种重要的代偿性

保护措施。

本研究表明慢性肝损伤导致大鼠脑内 P-GP 的功能和表达下调,而使得 MRP2 功能和表达上调。该研究结果为肝脏疾病状态时的脑部用药,以及研究肝脏疾病脑部并发症的病理机制提供了一定的理论参考。

### 参 考 文 献

- [1] Butterworth RF. Role of circulating neurotoxins in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: potential for improvement following their removal by liver assist devices[J]. *Liver Int*, 2003, **23**( Suppl 3): 5 - 9.
- [2] Lv S, Song H, Zhou Y, *et al*. Tumour necrosis factor- $\alpha$  affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure[J]. *Liver Int*, 2010, **30**(8): 1 198 - 1 210.
- [3] Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, **57**(2): 173 - 185.
- [4] Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases [J]. *Prog Neurobiol*, 2005, **76**(1): 22 - 76.
- [5] Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, **25**(8): 423 - 429.
- [6] Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, **36**(2/3): 179 - 194.
- [7] Potschka H, Fedorowicz M, Löscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, **306**(1): 124 - 131.
- [8] Jing X, Liu X, Wen T, *et al*. Combined effects of epileptic seizure and phenobarbital induced overexpression of P-glycoprotein in brain of chemically kindled rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, **159**(7): 1 511 - 1 522.
- [9] Liu H, Xu X, Yang Z, *et al*. Impaired function and expression of P-glycoprotein in blood-brain barrier of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Brain Res*, 2006, **1 123**(1): 245 - 252.
- [10] Liu XD, Pan GY, Xie L, *et al*. Cyclosporin A enhanced protection of nimodipine against brain damage induced by hypoxia-ischemia in mice and rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23**(3): 225 - 229.
- [11] Yamauchi A, Dohgu S, Takata F, *et al*. Partial hepatectomy aggravates cyclosporin A-induced neurotoxicity by lowering the function of the blood-brain barrier in mice [J]. *Life Sci*, 2011, **88**(11/12): 529 - 534.
- [12] Yokooji T, Murakami T, Yumoto R, *et al*. Function of multidrug resistance-associated protein 2 in acute hepatic failure rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, **546**(1/3): 152 - 160.
- [13] Patsenker E, Popov Y, Stickele F, *et al*. Pharmacological inhibition of integrin  $\alpha\beta 3$  aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis [J]. *Hepatology*, 2009, **50**(5): 1 501 - 1 511.
- [14] Fujiyama N, Shitara Y, Ito K, *et al*. Down-regulation of hepatic transporters for BSP in rats with indomethacin-induced intestinal injury [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**(3): 556 - 561.
- [15] Villanueva SSM, Ruiz ML, Luquita MG, *et al*. Involvement of Mrp2 in hepatic and intestinal disposition of dinitrophenyl-S-glutathione in partially hepatectomized rats [J]. *Toxicol Sci*, 2005, **84**(1): 4 - 11.
- [16] Hinchman C, Matsumoto H, Simmons T, *et al*. Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers [J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**(33): 22 179 - 22 185.
- [17] Huang ZH, Murakami T, Okochi A, *et al*. Expression and function of P-glycoprotein in rats with carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, **53**(6): 873 - 881.
- [18] Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline [J]. *J Neurochem*, 2009, **109**(2): 485 - 493.
- [19] Théron D, Barraud de Lagerie S, Tardivel S, *et al*. Influence of tumor necrosis factor- $\alpha$  on the expression and function of P-glycoprotein in an immortalised rat brain capillary endothelial cell line, GPNT [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, **66**(4): 579 - 587.
- [20] Nomura M, Matsunami T, Kobayashi K, *et al*. Involvement of ABC transporters in chemosensitivity of human renal cell carcinoma, and regulation of MRP2 expression by conjugated bilirubin [J]. *Anticancer Res*, 2005, **25**(4): 2 729 - 2 735.
- [21] Laouari D, Yang R, Veau C, *et al*. Two apical multidrug transporters, P-gp and MRP2, are differently altered in chronic renal failure [J]. *Am J Physiol-Renal Physiol*, 2001, **280**(4): 636 - 645.
- [22] Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, **55**(1): 3 - 29.
- [23] Hoffmann K, Löscher W. Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR-rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats [J]. *Epilepsia*, 2007, **48**(4): 631 - 645.