

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.022

胆石患者术后胆盐转运子 BSEP、MRP2、NTCP 的水平变化及意义 *

陈 坚¹ 肖吓鹏¹ 陈先达¹ 李翰城¹ 王长森²

(1 福建医科大学附属宁德市医院 福建 宁德 352100; 2 大连医科大学第一临床学院 辽宁 大连 116011)

摘要 目的:探讨腹腔镜联合胆道镜微创手术对胆囊结石患者胆盐转运因子胆盐输出泵(BSEP)、多重耐药蛋白 2(MRP2)和牛黄胆酸钠转运蛋白(NTCP)水平的影响。**方法:**选取我院普外科收治的胆囊结石患者 20 例排除手术和麻醉禁忌症,予腹腔镜联合胆道镜微创手术治疗。治疗结束后,对比治疗前后患者 BSEP、MRP2、NTCP 水平变化。**结果:**①治疗后患者肝脏组织中 BSEP、MRP2 水平明显比治疗前升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);②治疗后患者肝组织中 NTCP 水平与治疗前水平无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**腹腔镜联合胆道镜微创手术治疗胆囊结石能升高患者胆盐转运因子 BSEP、MRP2 水平,提高患者术后对胆盐的转运和胆汁酸的代谢,降低胆囊结石复发率,对临床具有指导意义,值得临床推广。

关键词:腹腔镜;胆道镜;胆囊结石;胆盐转运因子

中图分类号 R657.42 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)36-7083-04

Expression and Significance of Bile Salt Transporter Factors BSEP, MRP2, NTCP in Patients with Gallbladder Stone after Laparoscopic Joint Choledochoscope Surgery *

CHEN Jian¹, XIAO Xia-peng¹, CHEN Xian-da¹, LI Han-cheng¹, WANG Chang-miao²

(1 Ningde Hospital of Fujian Medical University, Ningde, Fujian, 352100, China;

2 First Clinical Hospital of Dalian Medical University, Dalin, Liaoning, 116011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the change of bile salt transporter factors bile salt export pump (BSEP), multiple drug-resistant proteins 2 (MRP2) and cow bile acid sodium transporters (NTCP) levels in patients with gallbladder stone after laparoscopic joint choledochoscope minimally invasive surgery. **Methods:** 20 patients with gallbladder stones without surgery and anesthesia contraindications were selected from department of general surgery. Then the joint choledochoscope to laparoscopic minimally invasive surgery was performed. The change of BSEP, MRP2, NTCP levels in liver tissues of patients was detected and compared before and after treatment. **Results:** (1) After treatment, the transcript and protein level of BSEP, MRP2 was significantly higher than before treatment, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); (2) Before and after treatment, no obvious change in NTCP mRNA level was detected ($P > 0.05$). **Conclusion:** Laparoscopic joint choledochoscope minimally invasive surgery can increase bile salt transfer factors BSEP, MRP2 level in patients with gallbladder stone, improve postoperative transport of bile salt and metabolism of bile acid, and reduce the recurrence rate of gall bladder calculi, which is worthy of clinical promotion.

Key words: Laparoscopic; Choledochoscope; Gallbladder stones; Bile salts transporter factors

Chinese Library Classification(CLC):R657.42 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)36-7083-04

前言

胆囊结石(cholecystolithiasis)主要为胆固醇结石或者以胆固醇为主的混合型结石和黑色胆色素结石,是临床最为常见的胆道性疾病^[1]。引起胆囊结石的病因很多而且复杂,研究表明^[2],胆汁酸的代谢紊乱是导致该病的重要原因。本病临床表现为饱餐后、进食油腻食物后或者睡眠中体位改变出现的胆绞痛、上腹部隐痛,也可出现胆汁积液、黄疸或者 Mirizzi 综合征。本病多发于成年人,发病率在 40 岁后随年龄增长而增高,好发于女性,据调查统计,我国胆囊结石收治率占普外科住院人数的

11.5%,并有逐年上升趋势^[3]。随着医疗技术的发展,人们更加重视疾病防治及预后。现代医学多采取胆囊切除手术治疗,但是传统开腹手术创面大、术后恢复慢、并发症多、病人痛苦^[4]。研究发现^[5],腹腔镜联合胆道镜微创手术对治疗胆囊结石取得良好的疗效,且手术切口小,术后恢复快,患者耐受较好,是目前临床治疗胆囊结石首选方法。但是对于术后患者胆盐转运因子的影响如何,目前国内研究较少^[6],为探讨腹腔镜联合胆道镜微创手术对胆囊结石患者术后胆盐转运因子的水平变化如何,我们做了有关研究。通过观察 BSEP、MRP2、NTCP 水平变化,来探究腹腔镜联合胆道镜微创手术对胆囊结石患者术后胆盐

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81273922)

作者简介:陈坚(1972-),副主任医师,主要从事肝胆、腔镜等普外科工作

(收稿日期:2014-06-12 接受日期:2014-07-10)

转运因子影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 6 月至 2013 年 12 月与我院以胆囊结石为诊断而收入院患者者 20 例,其中男 8 例,女 12 例,平均年龄 43.57 ± 18.63 岁,患者病程 3 个月 -8 年,平均 (3.42 ± 0.34) 年。

1.2 诊断标准

① 症状:右上腹胆绞痛、上腹部隐痛、黄疸、Mirizzi 综合征等;② 静脉胆道造影:胆囊内砂粒结石在显影的胆囊中显示砂粒样负性透亮影;③ 超声表现:胆囊内高回声光团,后方伴有声影;④ 影像表现:CT 表现:胆道结石绝大部分都显示为高密度均匀或不均匀的阴影;MRI 表现:显示胆道系统内低信号强度的结石影^[7]。

1.3 纳入标准

符合胆囊结石的诊断标准;年龄 23-60 岁;患者自愿参与本实验,并签署知情同意书;经所在单位伦理学相关机构的批准。

1.4 排除标准

心、肝、肾严重疾病;恶性肿瘤;患有艾滋病、病毒性肝炎等传染病患者;神志异常的患者。

1.5 治疗方法

排除手术和麻醉禁忌症,于术前行静脉胆道造影,确定胆囊内结石的位置,大小,数目。进入手术室后,监测患者生命体征、血氧、心电图,然后行全身麻醉,气管插管;完全麻醉后按照腹腔镜常规方法进入腹腔,即脐旁切口 10 mm,穿刺气腹针建立气腹,从切口中插入 TROCAR 并置入腹腔镜探查腹腔情况,然后于剑突下插入 TROCAR,置入纤维胆道镜和右上腹胆囊底部位置插入 TROCAR,在腹腔镜的辅助下,确定胆总管,解剖胆囊三角,游离胆囊,切开胆总管壁;胆道镜探查肝内总管和胆总管,并由胆道进入胆囊取出结石,结石取净后冲洗,留置引流管,缝合切口。分别于手术开始和取出结石结束后切取患者肝组织标本,所有标本采集后立即保存在 -70°C 深低温冰箱中。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 PCR 扩增产物相对定量分析 PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,溴化乙啶染色,通过成像分析 scion 软件计算和比较 BSEP、MRP2 和 NTCP 产物条带的吸光度值,并与 β -actin 条带光密度值比较,计算出 BSEP、MRP2 和 NTCP 在肝组织中 mRNA 表达含量。

1.6.2 Western blot 分析 将准备好的组织匀浆加入裂解液中,提取胞浆蛋白和膜蛋白进行电泳,电转移到 PVDF 膜后依次加入 BSEP (BA1570 ABCB11, 武汉博士德生物公司,0.2 ml/L)、MRP2 (BA1667, 武汉博士德生物公司,0.2ml/L)多克隆抗体与二抗,洗膜,放射自显影后,洗像。用图像采集和分析系统采集分析图片,测定两者的吸光密度。

1.7 统计学方法

采用统计学软件 SPSS19.0 进行统计学分析,计量资料采用 t 检验,计数资料采用卡方检验处理,以 $P < 0.05$ 为差异显著,有统计学意义。

2 结果

2.1 手术前后患者肝脏 BSEP、MRP2、NTCP mRNA 表达比较

RT-PCR 结果示:手术后患者肝组织中的 BSEP、MRP2、NTCP mRNA 表达较术前肝组织中增加,手术前光密度值分别为 0.44 ± 0.17 、 1.13 ± 0.38 、 0.57 ± 0.32 ;术后患者肝组织中相应条带吸收光密度值分别为 0.91 ± 0.47 、 2.49 ± 0.90 、 0.71 ± 0.26 。统计学分析得出,治疗前后 BSEP、MRP2 mRNA 在肝组织内表达比较存在差异,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而治疗前后 NTCP mRNA 表达无统计学意义 ($P > 0.05$),详见图 1,图 2,图 3 和表 1。

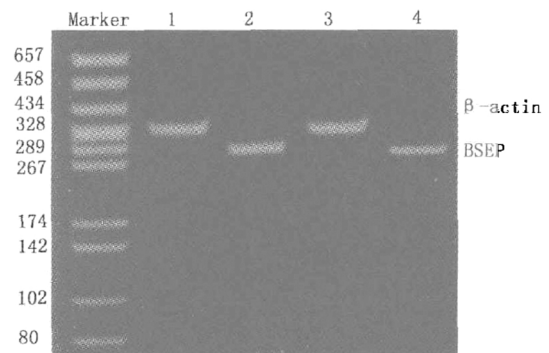


图 1 肝组织标本中 BSEP mRNA 表达

Fig.1 Expression of BSEP mRNA in liver tissues

注:1.2 为治疗后;3.4 为治疗前。

Note: 1, 2 represent after treatment; 3,4 represent the pretreatment.

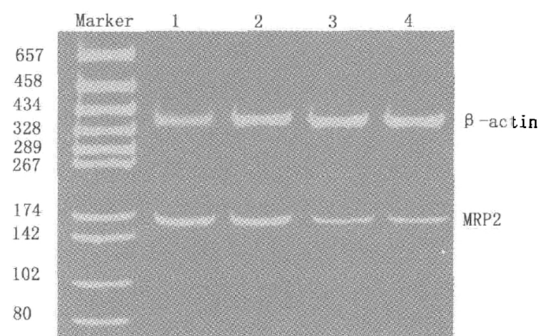


图 2 肝组织标本中 MRP2 mRNA 表达

Fig.2 Expression of MRP2 mRNA in liver tissues

注:1.2 为治疗后;3.4 为治疗前。

Note: 1, 2 represent after treatment; 3,4 represent the pretreatment.



图 3 肝组织标本中 NTCP mRNA 表达

Fig.3 Expression of NTCP mRNA in liver tissues

注:1.2 为治疗前;3.4 为治疗后。

Note: 1, 2 represent the pretreatment; 3,4 represent after treatment.

表 1 各组分光密度值比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of the optical density of each component($\bar{x} \pm s$)

	BSEP	MRP2	NTCP
Before treatment	0.44 $\pm$ 0.17	1.13 $\pm$ 0.38	0.57 $\pm$ 0.12
After treatment	0.91 $\pm$ 0.17*	2.49 $\pm$ 0.90*	0.71 $\pm$ 0.26

注:与手术治疗前比较,* $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$, compared with before treatment.

2.2 治疗前后患者肝脏组织中 BSEP、MRP2 蛋白表达

Western blot 分析结果示,手术前后 BSEP、MRP2 均有蛋

白表达,手术后患者肝组织中 BSEP、MRP2 蛋白表达明显高于手术治疗前,与 RT-PCR 结果一致。如图 4,图 5。

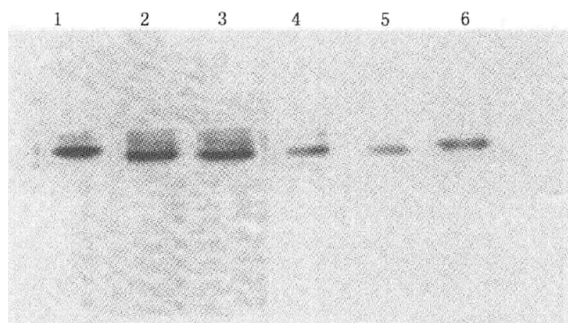


图 4 肝组织中 BSEP Western blot 分析结果

Fig.4 Western blot analysis results of BSEP in liver tissues

注:1,2,3 为治疗后,4,5 为治疗前,6 为内参。

Note: 1,2,3 represent the pretreatment; 4,5 represent after treatment, 6 represent β -action

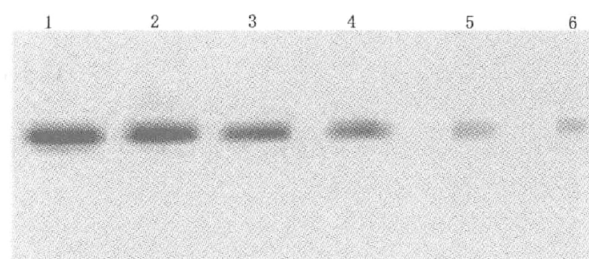


图 5 肝组织中 MRP2 Western blot 分析结果

Fig.5 Western blot analysis results of MRP2 in liver tissues

注:1,2,3 为治疗后;4,5 为治疗前,6 为内参。

Note: 1,2,3 represent the pretreatment; 4,5 represent after treatment. 6 represent β -action.

3 讨论

胆囊结石为常见的消化道疾病,以胆绞痛、山腹部隐痛为主要症状,严重影响患者日常生活^[6]。随着人民生活水平的提高,人民饮食习惯发生了很大的变化,油腻荤腥的饮食增加肝细胞分泌胆汁的负担,胆盐与胆固醇比例失调,从而提高胆囊结石患病率。据流行病学调查资料显示,目前我国胆囊结石的发病率呈上升趋势,与胆管结石的比例从十年前的 1.5:1 增至 7.36:1,并趋向年轻化。目前治疗本病主要以手术切除胆囊为主,但是传统开腹术对患者恢复和预后都不理想,腹腔镜联合胆道镜微创手术治疗胆囊结石,不仅保留了患者的胆囊,并且还具有创伤小、恢复快、并发症少等优点,为目前临床治疗胆囊结石的主要方式^[9-11]。

胆囊结石的形成医学界中还没有完全明了^[12]。相关研究证实^[13-16],胆囊结石的形成与胆固醇和胆汁酸浓度比例的改变有关系,与导致胆汁淤积的原因亦有关系。目前国内外学者研究发现^[17],肝脏胆汁的分泌异常是导致胆囊结石的首要原因,而肝脏胆汁分泌与肝细胞上的胆盐转运因子 BSEP、MRP2、NTCP 关系密切。本研究中通过 RT-PCR 分析胆囊结石患者手术前后肝脏组织标本中 BSEP、MRP2、NTCP mRNA 表达定量,得出患者术后肝脏组织 BSEP、MRP2 mRNA 表达明显高于术前,差异有统计学意义($P < 0.05$);利用 Western blot 分析手术前后 BSEP、MRP2 均有蛋白表达,手术前患者肝组织中 BSEP、MRP2 蛋白表达明显低于手术治疗后,差异有统计学意义($P < 0.05$)。本实验结果证明,胆盐转运因子 BSEP、MRP2 与胆囊结

石形成有关。BSEP、MRP2 是肝细胞胆管膜侧重要的胆盐转运因子,能分别转运一价胆盐和二价胆盐,当 BSEP、MRP2 mRNA 表达下降时,则肝细胞转运胆盐的能力就会下降,进而肝细胞减少分泌胆盐,胆盐减少,导致胆固醇和胆汁酸浓度比改变,胆固醇饱和和结晶,结晶瘀滞于胆囊内而成为结石^[18]。腹腔镜联合胆道镜微创手术取出胆囊内结石,使胆囊内胆盐与胆固醇的比例恢复正常,逆向作用于肝细胞 BSEP、MRP2 蛋白表达,从而恢复 BSEP、MRP2 mRNA 表达^[19]。本实验结果中 NTCP mRNA 表达,在手术前后无明显差异,无统计学意义($P > 0.05$),提示胆盐转运因子 NTCP 可能与胆囊结石形成没有关系,可能与胆盐转运因子 NTCP 位于肝细胞的基底膜侧,是将胆盐从血中转运至肝细胞中,不参与胆盐至胆汁转运。关于 NTCP 与胆囊结石的关系,有学者研究证明胆盐转运因子 NTCP 与胆石形成存在密切关系^[20],也有相关研究证明 NTCP 与胆囊结石的形成没有关系^[21],与本研究结果一致。

综上所述,腹腔镜联合胆道镜微创手术治疗胆囊结石能够升高患者胆盐转运因子 BSEP、MRP2 水平,恢复患者肝细胞分泌胆盐功能,提高患者术后对胆盐的转运和胆汁酸的代谢,平衡胆盐与胆固醇比例,降低胆囊结石复发率,但腹腔镜联合胆道镜微创手术对胆盐转运因子 NTCP 影响不大。

参考文献(References)

- [1] 骆建美. 腹腔镜联合胆道镜胆管切开取石术在治疗肝内外胆管结石中的微创治疗价值[J]. 中国医学创新, 2014, 14(6): 47-49
Luo Jian-mei. Combined laparoscopic bile duct lithotomy mirror minimally invasive therapeutic value in the treatment of extrahepatic

- bile duct stones [J]. China medical innovation, 2014, 14(6): 47-49
- [2] 张燕良, 曾娟娟. 腹腔镜联合胆道镜治疗胆囊结石合并胆总管结石 30 例临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2014, 10(2): 88-89
Zhang Yan-liang, Zeng Shu-juan. Clinical observation of 30 cases of laparoscopic treatment of gallstones combined choledochoscope merger choledocholithiasis[J]. Chinese folk medicine, 2014, 10(2): 88-89
 - [3] 刘洲宇. 联合应用腹腔镜与胆道镜对 63 例胆总管结石患者进行微创治疗的临床研究[J]. 当代医药论丛, 2014, 07(1): 292-293
Liu Zhou-yu. Laparoscopy combined clinical study of 63 cases with biliary mirror choledocholithiasis minimally invasive treatment of patients[J]. Modern medicine, 2014, 07(1): 292-293
 - [4] 张利平, 刘建, 黄楠. 雌孕激素对孕鼠肝脏、胎盘组织 FXR/BSEP 受体系统表达的影响研究[J]. 中国医药指南, 2013, 27(16): 9-12
Zhang Li-ping, Liu Jian, Huang Nan. Effects of estrogen and progesterone to pregnant rats liver, placenta FXR / BSEP expression of receptor systems[J]. Chinese medicine guide, 2013, 27(16): 9-12
 - [5] 王召华. 鼠肝缺血再灌注损伤后胆汁酸转运体 Bsep 与 Mrp2 的表达及意义[D]. 安徽医科大学, 2011
Wang Zhao-hua. Expression and significance of ischemic rat liver bile acid transporter Bsep and Mrp2 after reperfusion [D]. Medical University of Anhui, 2011
 - [6] 周利婷, 周燕, 张国强, 等. 异烟肼对小鼠肝细胞膜转运体 Mrp2, Bsep, P-gp 和 Ntcp 表达的影响[J]. 中国药理学杂志, 2014, 04(5): 298-302
Zhou Li-ting, Zhou Yan, Zhang Guo-qiang, et al. Isoniazid on mice liver cell affect the expression of P-gp and Ntcp membrane transporter Mrp2, Bsep[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2014, 04(5): 298-302
 - [7] 赵海军. 腹腔镜联合胆道镜微创保胆取石术治疗胆囊结石的临床疗效探讨[J]. 微创医学, 2014, 03(4): 384-385, 364
Zhao Hai-jun. The clinical curative effect of laparoscope combined with choledochoscope for preservation of gallbladder in the treatment of gallbladder calculi [J]. Minimally invasive medicine, 2014, 03(4): 384-385, 364
 - [8] 张国强, 周燕, 魏玉辉, 等. 茵栀黄颗粒对胆管结扎大鼠肝细胞膜转运体 Mrp2、Ntcp 及 Bsep 表达的影响[J]. 中成药, 2012, 09(1): 164-168
Zhang Guo-qiang, Zhou Yan, Wei Yu-hui, et al. Yinzhihuang granules effect on the liver cell membrane in rats after bile duct ligation transporter Mrp2, Ntcp and Bsep expression of [J]. Chinese traditional patent medicine, 2012, 09(1): 164-168
 - [9] 许坚吉. HO-1 在大鼠胆道缺血再灌注损伤中对胆盐转运蛋白的影响及机制研究[D]. 昆明医科大学, 2012
Xu Jian-ji. Study of effect on bile salt transporter HO-1 in biliary ischemia-reperfusion injury in rats and the mechanism [D]. Kunming Medical University, 2012
 - [10] 李苏萍. PDTC 对乙炔雌二醇诱导孕鼠胆汁淤积肝脏 Bsep/Ntcp 表达的影响及分子机制[D]. 中南大学, 2012
Li Su-ping. PDTC on ethinyl estradiol -induced cholestasis in pregnant rats and the molecular mechanisms affecting liver Bsep / Ntcp expression[D]. Central South University, 2012
 - [11] 陈秋玲. JNK 选择性抑制剂对雌激素诱导的 ICP 孕鼠肝细胞 Bsep、Ntcp 表达的影响[D]. 中南大学, 2012
Chen Qiu-ling. Effect of a selective JNK inhibitor on the Bsep, Ntcp expression in pregnant rats with ethinylestradiol induced intrahepatic cholestasis[D]. Central South University, 2012
 - [12] 王火平. 肝硬化大鼠肝缺血再灌注后 Bsep、Mrp2 表达变化与胆汁淤积的关系[D]. 宁波大学, 2012
Wang Huo-ping. Bsep, Mrp2 Expression changes in cholestatic rat liver cirrhosis ischemia after reperfusion[D]. Ningbo University, 2012
 - [13] 韩今朝. 梗阻性黄疸对肝胆运输系统影响的实验研究[D]. 天津医科大学, 2013
Han Jin-zhao. Experimental study of obstructive jaundice impact on hepatobiliary transport systems[D]. Tianjin Medical University, 2013
 - [14] 叶少华, 苋景. FXR、BSEP、MRP2 在阻塞性黄疸中的作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 02(6): 147-149
Ye Shao-hua, Rui Jing. FXR, BSEP, MRP2 role in obstructive jaundice [J]. Journal of clinical and experimental medicine, 2011, 02(6): 147-149
 - [15] 荆宏生, 杨瑞琦. NTCP 在去迷走神经大鼠肝细胞中的表达及临床意义[J]. 心血管病防治知识(学术版), 2011, 03(4): 35-37
Jing Hong-sheng, Yang Rui-qi. Rat hepatocytes nerve expression and clinical significance of NTCP in to the vagus [J]. Cardiovascular disease prevention knowledge (SCIENCE EDITION), 2011, 03(4): 35-37
 - [16] 朱明明. 胆道梗阻及再通术后 MRP2 蛋白的表达变化及对器官功能影响的研究[D]. 昆明医科大学, 2013
Zhu Ming-ming. Research biliary obstruction and recanalization after MRP2 expression and protein effects on organ function[D]. Kunming Medical University, 2013
 - [17] Fang C, Liu W, Fan Y. Applied rigid choledochoscope and pneumatic lithotripsy in targeting treatment of hepatolithiasis guided by three-dimensional visualization technology [J]. Chinese Journal of Surgery, 2014, 52(2): 117-121
 - [18] Sahoo MR, Thimmegowda AK, Behera SS. Use of rigid tubal ligation scope: Serendipity in laparoscopic common bile duct exploration[J]. J Minim Access Surg, 2014, 10(2): 76-79
 - [19] Chuang SH, Chen PH. Single-incision laparoscopic common bile duct exploration with conventional instruments: an innovative technique and a comparative study [J]. J Gastrointest Surg, 2014, 18(4): 737-743
 - [20] 祝建勇. Stat5 通路调控胆盐转运子 Ntcp 和 Bsep 表达及促胆盐转运的实验研究[D]. 第三军医大学, 2006
Zhu Jian-yong. Stat5 pathway in regulation of bile salt transporters Ntcp and Bsep expression and experimental study on promotion of bile salt transporters[D]. The Third Military Medical University, 2006
 - [21] 唐清. 肝细胞转运蛋白的表达及 ABCB4 基因突变在婴儿胆汁淤积性肝炎发病机制中的探讨[D]. 广西医科大学, 2011
Tang Qing. Expression of Hepatocyte Transporters and ABCB4 Gene Mutation in Infant with Cholestatic Hepatitis [D]. Guangxi Medical University, 2011