

三种肝转运蛋白在原发性胆汁性胆管炎患者肝组织中的表达特点

钟青梅, 刘文丽, 章萍, 肖影群 (南昌市第九医院 病理科, 南昌 330002)

摘要: 目的 探讨胆汁酸盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP)、多药耐药相关蛋白2 (multidrug resistant protein 2, MRP2) 和多药耐药糖蛋白3 (multidrug resistance associated protein 3, MDR3) 在原发性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis, PBC) 患者肝组织中的表达特点。方法 收集2009年1月至2019年12月于南昌市第九医院住院且经肝组织病理诊断为PBC的46例患者临床资料, 根据PBC严重程度分为PBC早期组 (I~II期, 31例) 和PBC晚期组 (III~IV期, 15例), 比较两组患者血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA)、总胆红素 (total bilirubin, TBil)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBil)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰转移酶 (gamma-glutamyltransferase, GGT)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 等的差异。选取10例慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 携带者作为对照组。对所有入选病例肝组织进行BSEP、MDR3、MRP2免疫组织化学标记, 观察各组肝组织病理形态及3种转运蛋白表达差异。结果 PBC晚期组患者血清ALP (中位数: 404 U/L vs 281 U/L)、GGT (中位数: 437 U/L vs 245 U/L)、TC (中位数: 6.58 mg/L vs 4.50 mg/L)、TG (中位数: 1.72 mg/L vs 1.24 mg/L)、LDL (中位数: 3.61 mg/L vs 2.27 mg/L) 水平均显著低于PBC早期组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。两组患者年龄、性别、血清ALT、AST、TBA、TBil、DBil、HDL水平及AMA阳性率差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。与PBC早期组相比, PBC晚期组患者炎症活动度和纤维化程度均较重, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.71, P = 0.0006; \chi^2 = 20.57, P < 0.001$)。PBC早期组与PBC晚期组患者肝细胞CK7和CK19染色阳性率无统计学差异 [54.84% (17/31) vs 46.67% (7/15), $\chi^2 = 0.271, P = 0.755$; 74.19% (23/31) vs 86.67% (13/15), 连续校正 $\chi^2 = 0.337, P = 0.562$]。PBC组患者肝组织中BSEP高表达率显著低于对照组 [54.76% (23/42) vs 100.00% (10/10); $\chi^2 = 5.311, P = 0.021$], MDR3和MRP2高表达率差异无统计学意义 [91.18% (31/34) vs 100.00% (10/10), $P = 1.000$; 69.7% (23/33) vs 100.00% (10/10); $\chi^2 = 2.433, P = 0.119$]。PBC晚期组患者BSEP高表达率显著低于PBC早期组 [68.97% (20/29) vs 23.08% (3/13); $\chi^2 = 7.630, P = 0.008$], MDR3和MRP2阳性高表达率差异无统计学意义 [91.30% (21/23) vs 90.91% (10/11), $P = 1.000$; 68.18% (15/22) vs 72.73% (8/11), $P = 1.000$]。BSEP、MRP2、MDR3在胆汁淤积区阳性表达减少越显著, 肝细胞胆汁淤积肿胀及羽毛样变性越明显。结论 BSEP在PBC患者肝组织中表达降低, 且在PBC晚期组患者肝组织表达率显著降低, 提示PBC胆汁淤积与毛细胆管膜侧BSEP蛋白表达缺陷有关, 并且PBC疾病进展可能与BSEP表达减少有关。

关键词: 肝转运蛋白; 原发性胆汁性胆管炎; 胆汁酸盐输出泵; 多药耐药相关蛋白2; 多药耐药糖蛋白3

Expression characteristics of three hepatic transporters in patients with primary biliary cholangitis

Zhong Qingmei, Liu Wenli, Zhang Ping, Xiao Yingqun (*Department of Pathology, the Ninth Hospital of Nanchang, Nanchang 330002, China*)

Abstract: Objective To investigate the expression characteristics of bile salt export pump (BSEP), multidrug resistant protein 2 (MRP2) and multidrug resistance associated protein 3 (MDR3) in liver tissue of patients with primary biliary cholangitis (PBC). **Methods** The clinical data of 46 patients who were admitted to the Ninth Hospital of Nanchang from January 2009 to December 2019 and diagnosed with PBC by liver histopathology were collected. The patients were divided into PBC early stage group (stage I ~ II, 31 cases) and PBC advanced stage group (stage III ~ IV, 15 cases) according to the severity of PBC. The differences of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), total bile acid (TBA), total bilirubin (TBil), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (GGT), direct bilirubin (DBil), high-density lipoprotein (HDL), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low-density lipoprotein (LDL) of patients between the two groups were compared. Another 10 cases of chronic hepatitis B virus (HBV) carriers were selected as control group. Liver tissues from all patients were immunohistochemically labeled for BSEP, MDR3, and MRP2 to observe the differences of liver histopathology and the expression of three transporters of each group. **Results** The serum ALP (median: 404 U/L vs 281 U/L), GGT (median: 437 U/L vs 245 U/L), TC (median: 6.58 mg/L vs 4.50 mg/L), TG (median: 1.72 mg/L vs 1.24 mg/L) and LDL (median: 3.61 mg/L vs 2.27 mg/L) levels of patients in PBC advanced stage group were significantly lower than those in PBC early stage group. There were no significant differences in age, gender, ALT, AST, TBA, TBil, DBil, HDL and AMA positivity rate of patients between the two groups (all $P > 0.05$). There were no statistical differences in the positive rates of CK7 and CK19 staining in hepatocytes between PBC early stage group and PBC advanced stage group [54.84% (17/31) vs 46.67% (7/15), $\chi^2 = 0.271$, $P = 0.755$; 74.19% (23/31) vs 86.67% (13/15), $\chi^2 = 0.337$, $P = 0.562$]. The high expression rate of BSEP in liver tissues of patients in PBC group was significantly lower than that in control group [54.76% (23/42) vs 100.00% (10/10); $\chi^2 = 5.311$, $P = 0.021$], and there were no significant differences in MDR3 and MRP2 high expression rates between the two groups [91.18% (31/34) vs 100.00% (10/10), $P = 1.000$; 69.7% (23/33) vs 100.00% (10/10); $\chi^2 = 2.433$, $P = 0.119$]. The high BSEP expression rate of patients in PBC advanced stage group was significantly lower than that in PBC early stage group [68.97% (20/29) vs 23.08% (3/13); $\chi^2 = 7.630$, $P = 0.008$], and there were no significant differences in MDR3 and MRP2 high expression rates between the two groups [91.30% (21/23) vs 90.91% (10/11), $P = 1.000$; 68.18% (15/22) vs 72.73% (8/11), $P = 1.000$]. The more significant the reduction of BSEP, MRP2 and MDR3 positive expression in the cholestasis area, the more serious the swelling and feathering degeneration of hepatocytes. **Conclusions** The expression of BSEP decreased in PBC liver tissue, and significantly decreased in PBC advanced stage group, suggesting that PBC cholestasis was related to the defect of BSEP protein expression in the capillary bile duct side, and the progression of PBC disease may be related to the decreased expression of BSEP.

Key words: Hepatic transporter, Primary biliary cholangitis; Bile salt export pump; Multidrug resistant protein 2; Multidrug resistance associated protein 3

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)以前被称为原发性胆汁性肝硬化,是一种自身免疫介导的慢性肝内胆汁淤积性疾病,以肝内细小胆管进行性炎性破坏为特征,并逐渐进展为肝纤维化及肝硬化^[1,2]。近年来,PBC发病率逐渐增加,好发于中

年女性,男女发病比例为1:(9~10),全球发病率为(0.84~2.75)/10万^[3]。本病在临床早期无明显症状,大多数患者以乏力和皮肤瘙痒为首发症状^[4]。该病主要与遗传、环境等因素有关^[5,6],发病机制尚不明确。胆汁形成和分泌是一个复杂的过程,其排流障

碍是导致胆汁淤积的主要机制,其中肝细胞胆汁分泌异常是胆汁淤积发生的重要机制之一^[7]。位于肝细胞毛细胆管膜侧上的3种主要跨膜转运蛋白胆汁酸盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)、多药耐药相关蛋白2(multidrug resistant protein 2, MRP2)和多药耐药糖蛋白3(multidrug resistance associated protein 3, MDR3)在胆汁经肝细胞分泌到毛细胆管的过程中发挥重要作用^[8-10]。BSEP、MRP2和MDR3蛋白表达异常与多种胆汁淤积性疾病相关,其在PBC中的表达特点尚无定论。因此,本研究通过对PBC患者肝组织进行BSEP、MRP2、MDR3免疫组织化学及病理形态观察以探讨这3种转运蛋白在PBC肝组织中的表达特点及意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集2009年1月至2019年12月于南昌市第九医院住院且经肝组织病理诊断为PBC的46例患者的临床资料,同时选取10例肝组织无炎症和纤维化的慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者作为对照组。所有患者均签订知情同意书,本研究已通过医院医学伦理委员会审查,批件文号:[2019]伦简审字(05)号。

1.2 纳入排除标准 病例组纳入标准:参照2021年中华医学会肝病学分会制定的《原发性胆汁性胆管炎的诊断和治疗指南(2021)》^[11],根据临床表现、血清学检测、影像学检查和肝组织病理学检查,符合以下3条标准中的2条即可诊断为PBC:

①反映胆汁淤积的生物化学指标异常,如血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和 γ -谷氨酰转氨酶(γ -glutamyltransferase, GGT)升高,且影像学检查排除肝外或肝内大胆管梗阻;②血清抗线粒体抗体(anti-mitochondrial antibody, AMA)/AMAM2阳性,或其他PBC特异性自身抗体如抗gp210抗体、抗sp100抗体阳性;③肝组织活检有非化脓性破坏性胆管炎和小胆管破坏的组织学证据。排除标准:①合并其他肝脏疾病,如酒精性肝病、病毒性肝炎、自身免疫性肝炎、药物性肝损伤、遗传代谢性肝病、血吸虫肝病等;②有肝内外胆道梗阻或肝肿瘤病史。根据PBC严重程度将患者分为PBC早期组(I期和II期称为PBC早期,31例)和PBC晚期组(III期和IV期称为PBC晚期组,15例)。对照组纳入标准:①肝功能生物化学指标正常;②肝组织炎症和纤维化程度为G0~I和S0~1。对照组排除标准:排除有遗传代谢性肝病、感染性疾病、自身免疫性疾病、药物性肝炎、胆肝内外胆道梗阻和肿瘤病史等患者。

1.3 主要试剂与仪器 BSEP(ABCB11)鼠单克隆抗体、MRP2(ABCC2)兔单克隆抗体、MDR3(ABCB4)兔多克隆抗体均购自美国Abcam公司,细胞角蛋白7(cytokeratin7, CK7)、细胞角蛋白19(cytokeratin19, CK19)及癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)多克隆抗体、免疫组化试剂盒(PV-6000)、PBS、DAB显色液、抗体稀释液购自北京中杉金桥试剂公司,网状纤维染色及Masson染色试剂盒购自上海睿铂赛生物科技有限公司。主要仪器为OLYMPUS BX53显微镜。

1.4 研究方法

1.4.1 肝组织病理检测 对所有肝组织标本进行苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色、网状纤维染色、Masson三色染色及CK7、CK19、CEA-pan、BSEP、MRP2、MDR3免疫组织化学染色,病理观察由2名经验丰富的病理医师共同阅片并进行病理评分。HE染色:4 μ m石蜡切片脱蜡至水,使用苏木精染色5 min,1%盐酸乙醇分化数秒,1%氨水返蓝2 min,水洗后伊红染色1 min,切片经脱水、透明和封固后在光镜下观察。网状纤维染色及Masson染色按照说明书,由全自动特殊染色机完成。免疫组织化学染色采用En Vision二步法,①切片、烤片、脱蜡:常规石蜡组织切片,每片组织厚度4 μ m,65 $^{\circ}$ C烤片1 h,二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,自来水洗;②PBS缓冲液冲洗3次;③高温高压抗原修复;④3% H_2O_2 溶液5 min,去除内源性过氧化物酶;⑤滴加一抗,4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜;⑥滴加二抗,室温孵育20 min;⑦DAB显色、苏木精染液复染;⑧梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。根据Scheuer评分系统进行慢性肝炎炎症活动度分级(G1~4级)及纤维化程度分期(S1~4期):G1、G2为轻度炎症,G3为中度炎症,G4为重度炎症;S1、S2为轻度纤维化,S3为中度纤维化,S4为重度纤维化。

1.4.2 肝组织免疫组织化学检测及半定量分析 所选病例肝组织均切取3张连续石蜡切片用于3种抗体的标记。一抗BSEP、MDR3、MRP2以适当比例(BSEP 1:200,MDR3 1:50,MRP2 1:200)稀释,一抗CK7、CK19及CEA-pan为即用型抗体,直接滴加一抗,PBS代替第一抗体作为阴性对照。由于BSEP、MDR3、MRP2、CEA均表达于肝细胞毛细胆管膜侧,CK7、CK19表达于胆管细胞胞浆,因此免疫组织化学结果判读:以在肝细胞胆管膜上或胆管细胞胞浆出现棕黄色为阳性表达,无着色为阴性表达。根据阳性细胞数百分比与染色强度

的乘积进行评分, 染色强度: 无着色, 0分; 棕黄色, 1分; 棕色, 2分; 棕褐色, 3分。阳性细胞百分比: 阴性, 0分; 1%~5%, 1分; 6%~25%, 2分; 25%~50%, 3分; 50%以上, 4分。将阳性细胞百分比与染色强度得分乘积 ≥ 2 分作为阳性, < 2 分作为阴性, 得分按从低到高的顺序排列, 中位数以下判定为低表达, 中位数以上判定为高表达。

1.4.3 观察指标 收集病例组患者的年龄、性别、血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA)、总胆红素 (total bilirubin, TBil)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBil)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 等资料。所有肝组织标本均进行连续切片, 观察病例组织切片的病理特点如肝细胞肿胀、羽毛样变性、毛细胆管淤胆及BSEP、MRP2、MDR3、CK7、CK19及CEA免疫组织化学阳性表达的变化, 并与对照组进行对比分析。

1.5 统计学处理 采用SPSS 20.0统计软件进行统计学分析。年龄、ALT、AST、TBil、TBA及DBil等血清学指标为非正态分布的计量资料, 以 $M(p_{25}, p_{75})$ 表示, 两组间比较采用Mann-Whitney U 检验。性别、CK7、CK19染色阳性率, BSEP、MDR3、MRP2高表达率为计数资料, 以例数或百分数表示, 采用Pearson χ^2 检验、连续校正 χ^2 检验或Fisher确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 46例PBC患者中男性4例, 女性42例, 年龄30~68岁, 平均 (48.00 ± 9.61) 岁。PBC早期组和PBC晚期组患者的年龄、性别、血清ALT、AST、TBA、TBil、DBil、HDL水平及AMA阳性率差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。PBC晚期组血清ALP、GGT、TC、TG、LDL水平均显著低于PBC早期组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05), 见表1。

2.2 肝组织常规病理学结果 常规HE染色示PBC早期汇管区小叶间胆管水肿、变性, 伴小叶间胆管数目减少, 汇管区周围胆管反应性增生, 胆管周围淋巴细胞、浆细胞及中性粒细胞浸润, 部分伴有肉芽肿形成; 汇管区周围肝细胞明显肿胀, 胞浆疏松、淡染, 部分可见肝细胞及毛细胆管内胆汁淤积。PBC晚期小叶间胆管缺失, 汇管区纤维化, 纤维间隔形成, 并进展为肝硬化, 汇管区及其纤维间隔内炎症细胞浸润, 汇管区及肝硬化结节周围肝细胞肿胀, 胞浆疏松、淡染, 呈羽毛状变性, 肝细胞及毛细胆管内胆汁淤积 (图1)。病理组织学分析显示46例PBC患者中, PBC I期17例, II期14例, III期7例, IV期8例; 炎症程度分级: 轻度炎症25例, 中度炎症17例, 重度炎症4例; 纤维化程度分期: 轻度纤维化32例, 中度纤维化5例, 重度纤维化9例。与PBC早期组相比, PBC晚期组炎症活动度和纤维化程度均较重, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.71$, $P = 0.0006$; $\chi^2 = 20.57$, $P < 0.001$), 见表2。

2.3 CK7、CK19、CEA-pan免疫组织化学染色 CK7和CK19均表达于胆管细胞浆, CK7还表达于部分肝细胞胞浆。CK7及CK19染色均显示PBC早期组

表1 PBC早期组与PBC晚期组患者一般临床资料和实验室指标

项目	PBC早期组 (31例)	PBC晚期组 (15例)	统计量值	P 值
男/女 (例)	2/29	2/13	$\chi^2 = 0.048^*$	0.827
年龄 [$M(p_{25}, p_{75})$, 岁]	47 (39, 57)	49 (38, 58)	$U = 216.5$	0.715
ALT [$M(p_{25}, p_{75})$, U/L]	67 (51, 106)	51 (37, 70)	$U = 155.0$	0.070
AST [$M(p_{25}, p_{75})$, U/L]	83 (67, 145)	86 (54, 136)	$U = 229.0$	0.940
ALP [$M(p_{25}, p_{75})$, U/L]	404 (270, 607)	281 (176, 373)	$U = 122.5$	0.020
GGT [$M(p_{25}, p_{75})$, U/L]	437 (248, 698)	245 (61, 341)	$U = 135.0$	0.044
TBA [$M(p_{25}, p_{75})$, $\mu\text{mol/L}$]	33 (16, 95)	56 (17, 107)	$U = 124.0$	0.258
TC [$M(p_{25}, p_{75})$, mg/L]	6.58 (4.93, 8.16)	4.50 (2.67, 6.63)	$U = 43.5$	0.014
TG [$M(p_{25}, p_{75})$, mg/L]	1.72 (1.49, 2.63)	1.24 (0.86, 1.82)	$U = 63.0$	0.041
HDL [$M(p_{25}, p_{75})$, mg/L]	1.87 (1.05, 2.32)	1.19 (0.42, 2.02)	$U = 34.0$	0.085
LDL [$M(p_{25}, p_{75})$, mg/L]	3.61 (2.68, 4.48)	2.27 (1.75, 2.56)	$U = 9.0$	0.004
TBil [$M(p_{25}, p_{75})$, $\mu\text{mol/L}$]	27 (14, 43)	42 (22, 109)	$U = 132.0$	0.065
DBil [$M(p_{25}, p_{75})$, $\mu\text{mol/L}$]	13 (6, 35)	24 (10, 135)	$U = 130.0$	0.143
AMA阳性 [例 (%)]	21 (67.74)	7 (46.67)	$\chi^2 = 1.885$	0.208

注: *为连续校正 χ^2 检验。

小叶间胆管变性，胆管数目减少，汇管区周围轻度细胆管增生；PBC晚期组小叶间胆管缺失，汇管区周围细胆管反应性增生明显。PBC早期组和PBC晚期组均可见汇管区周围肝细胞CK7染色阳性。CEA-pan表达于肝细胞毛细胆管膜，呈线状、分支状分布，部分毛细胆管扩张。见图2。PBC早期组与PBC晚期组肝细胞CK7和CK19染色阳性率无统计学差异 [54.84% (17/31) vs 46.67% (7/15), $\chi^2 = 0.271$, $P = 0.755$; 74.19% (23/31) vs 86.67% (13/15), 连续校正 $\chi^2 = 0.337$, $P = 0.562$]。

2.4 BSEP、MDR3、MRP2免疫组织化学染色
BSEP、MDR3与MRP2均表达于肝细胞毛细胆管

膜，呈点状、线状分布（图3），对照组肝组织中3种蛋白均强表达于肝细胞毛细胆管膜上。因肝组织样本较细少及免疫组织化学染色过程中出现掉片现象导致样本数量减少，46例PBC样本中BSEP、MDR3及MRP2蛋白免疫组织化学染色最终样本数分别为42例、34例和33例。PBC组患者肝组织中BSEP高表达率显著低于对照组 ($\chi^2 = 5.311$, $P = 0.021$)，MDR3和MRP2高表达率差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。PBC晚期组患者BSEP高表达率显著低于PBC早期组 ($\chi^2 = 7.630$, $P = 0.008$)，MDR3和MRP2阳性高表达率差异无统计学意义 ($P = 1.000$)，见表4。

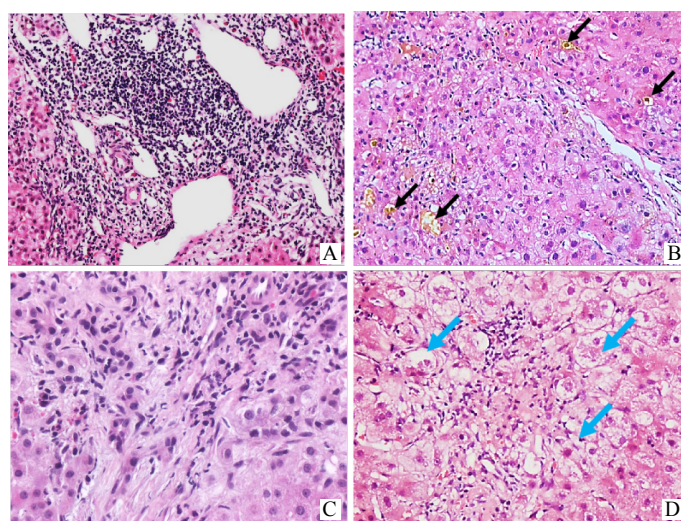


图1 PBC早期组与PBC晚期组肝组织HE染色(×400)

注：A为PBC早期组汇管区小叶间胆管减少，周围淋巴细胞、浆细胞浸润；B为肝细胞及毛细胆管内胆汁淤积（黑色箭头所示）；C为PBC晚期组汇管区胆管消失，汇管区纤维化，纤维间隔形成；D为肝细胞明显肿胀，胞浆疏松、淡染，呈羽毛状变性（蓝色箭头所示）。

表2 PBC早期组与PBC晚期组患者炎症和纤维化程度（例）

组别	例数	炎症程度			纤维化程度		
		轻度	中度	重度	轻度	中度	重度
PBC早期组	31	22	9	0	28	2	1
PBC晚期组	15	3	8	4	4	3	8
χ^2 值			14.71			20.57	
P 值			0.0006			< 0.001	

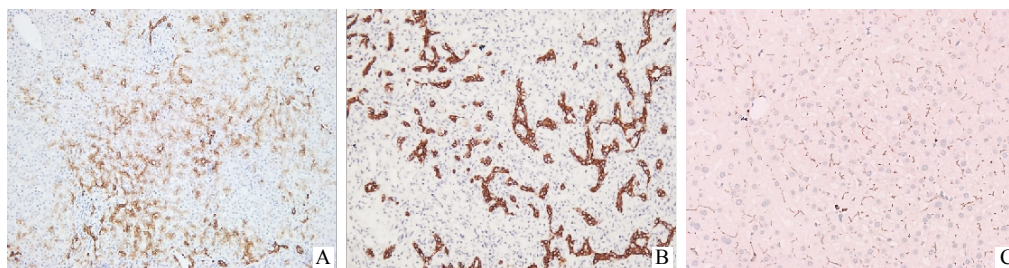


图2 肝组织免疫组织化学CK7、CK19及CEApan染色(×200)

注：A为CK7染色显示汇管区周围大量肝细胞阳性，B为CK19显示汇管区细胆管反应性增生，C为CEA-pan染色显示肝细胞毛细胆管膜阳性，呈线状、分支状分布。

表 4 病例组与对照组 BSEP、MDR3、MRP2 免疫组化染色表达 [例 (%)]

组别	BSEP		MDR3		MRP2	
	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达	高表达
PBC组	19 (45.24)	23 (54.76)	3 (8.82)	31 (91.18)	10 (30.3)	23 (69.7)
PBC早期组	9 (31.03)	20 (68.97)	2 (8.70)	21 (91.30)	7 (31.82)	15 (68.18)
PBC晚期组	10 (76.92)	3 (23.08)	1 (9.09)	10 (90.91)	3 (27.27)	8 (72.73)
χ^2 值	7.630		-		-	
P值	0.008		1.000		1.000	
对照组	0 (0)	10 (100)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	10 (100)
χ^2 值	5.311*		-		2.433*	
P值	0.021		1.000		0.119	

注：*为连续校正 χ^2 值，“-”为采用 Fisher 确切概率法。

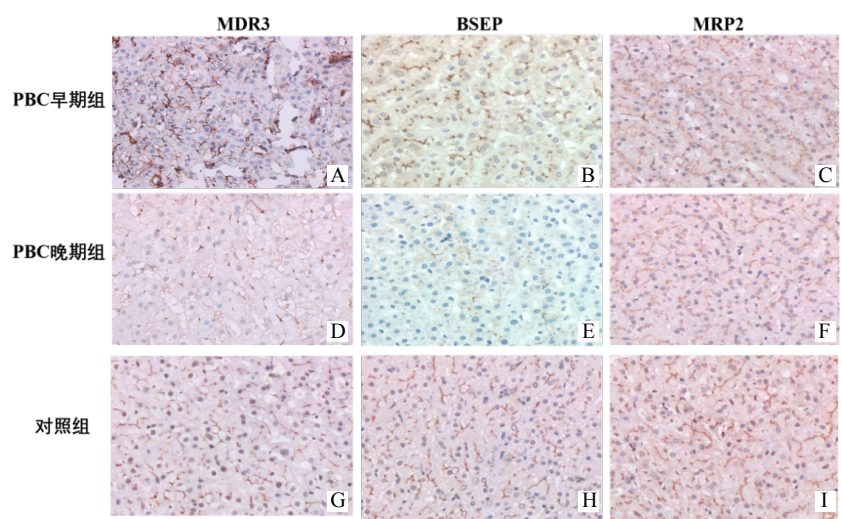


图 3 病例组与对照组肝组织免疫组织化学 MDR3、BSEP 及 MRP2 染色 (× 400)

注：A ~ C 分别为 PBC 早期组 MDR3、BSEP、MRP2 染色；D ~ F 分别为 PBC 晚期组 MDR3、BSEP、MRP2 染色；G ~ I 分别为对照组 MDR3、BSEP、MRP2 染色。

3 讨论

PBC是一种以自身免疫介导的胆汁淤积性肝病，主要发生于中老年女性，发病高峰为40~60岁^[1]。本研究46例PBC患者中42例（91.3%）为女性，男女比为1：10.5，中位年龄48岁，其中40岁以上患者占78.3%，与国内文献报道^[12,13]基本一致。PBC患者血清生物化学指标以胆汁淤积相关指标升高为主，本研究中46例PBC患者血清TBil和DBil均升高，血清ALP和GGT水平也显著升高，ALT和AST正常或轻度升高，PBC早期组血清TC、TG、LDL水平均较PBC晚期组高。PBC晚期患者血清ALP水平显著低于早期组，可能与PBC晚期患者胆汁排泄代偿性增加有关。

肝组织病理检查是诊断PBC的重要手段，尤其是AMA阴性患者，需通过肝组织病理检查才能确诊。本研究中肝组织病理示PBC早期患者汇管区小

胆管水肿、变性，甚至胆管缺失，淋巴细胞浸润，部分伴有肉芽肿形成，表明PBC患者早期肝组织表现为非特异性胆管炎性损伤。PBC晚期患者汇管区小胆管数目减少或消失，汇管区周围细胆管反应性增生。PBC晚期患者炎症程度较PBC早期严重，表明PBC患者肝组织的炎症程度可随着疾病进展逐渐加重。网状纤维染色及Masson三色染色示PBC早期患者汇管区无或轻度纤维化，局灶性窦周纤维化，汇管区及窦周轻度胶原纤维沉积；PBC晚期患者汇管区周围显著纤维化，纤维间隔或肝硬化形成，纤维间隔内大量胶原纤维形成，提示随着疾病进展，PBC晚期患者可逐渐进展为肝纤维化及肝硬化。本研究中CK7及CK19染色均显示PBC早期组小叶间胆管变性，胆管数目减少，汇管区周围轻度细胆管增生；PBC晚期组小叶间胆管缺失，汇管区周围细胆管反应性增生明显。本研究还发现PBC患者肝组织

中CK7及CK19不仅表达于胆管细胞及反应性增生胆管,还表达于部分肝细胞。早在1989年已有研究证实肝细胞CK7的这种异常表达在多种胆汁淤积性疾病中存在,证明肝细胞可表达胆管型细胞角蛋白,而CK7表达比CK9表达更为敏感,这一结果支持了肝细胞向胆管细胞转化的概念^[14]。

虽然PBC晚期患者可发生肝纤维化及肝硬化,但其临床表现、病理变化及生物化学指标的典型特征均为肝内胆管淤积,2021年中华医学会推荐的PBC诊断标准中也强调了胆汁淤积的证据^[11]。因此从胆汁形成、分泌和排流障碍角度入手,有望加深对PBC发病机制的认识。目前认为,肝细胞毛细胆管上多种跨膜转运蛋白异常改变是胆汁淤积发生、发展的重要分子机制^[15,16],其中BSEP、MDR3和MRP2是肝细胞毛细胆管膜上参与胆汁排泄的3种转运蛋白,这3种蛋白的表达缺陷及功能障碍与多种胆汁淤积性疾病有关。

BSEP为胆盐输出泵,主要存在于肝脏,属于ABC转运蛋白家族成员,其编码基因为*ABCB11*。BSEP通过水解ATP,将胆汁酸盐逆浓度梯度泵入毛细胆管,是形成毛细胆管内胆汁酸盐依赖性胆汁流的主要驱动力。研究表明,BSEP表达降低可引起胆汁酸转运、分泌降低,从而导致肝细胞胆汁酸蓄积,进而对肝细胞造成损伤,血清中胆汁酸水平升高^[17]。大量研究表明,胆汁酸盐转运体BSEP的遗传变异与多种胆汁淤积性疾病有关,如2型进行性家族性肝内胆管淤积^[18]、2型良性复发性肝内胆管淤积^[19,20]、药物性胆汁淤积^[21]、避孕药诱导的胆汁淤积及妊娠期肝内胆管淤积^[22,23]等,然而目前尚无确切证据表明PBC的发生发展是否与BSEP有关。本研究采用免疫组织化学染色法检测了46例PBC患者肝组织中BSEP的表达与分布,结果发现BSEP表达于肝细胞毛细胆管膜,呈点状、线状分布,与CEA-pan的表达模式相同,但PBC患者肝组织中BSEP表达减少,与PBC早期组患者相比,PBC晚期组患者BSEP表达率较低,表明PBC患者肝组织中BSEP表达减少,随着疾病进展,BSEP表达减少更加严重。然而日本一项研究表明终末期PBC患者BSEP的mRNA水平持续上调^[24],这与本研究结果不同,提示BSEP的蛋白表达减少可能与BSEP的转录后蛋白修饰异常有关。

MDR3为卵磷脂转运蛋白,负责磷脂的转运。胆汁中的胆汁酸盐、磷脂和胆固醇等主要有机溶质常形成混合微粒,MDR3能有效地将肝细胞内的磷脂从双分子层膜内侧移至外侧膜,使胆管内胆汁中

的胆盐和胆固醇易于形成混合微粒。MDR3表达水平降低会减少卵磷脂的转运,使胆汁中卵磷脂含量下降,胆盐不形成微胶粒,胆盐游离引起胆管细胞损伤,导致胆汁淤积。本研究表明,与对照组相比,PBC患者肝组织中MDR3表达不变,PBC早期与PBC晚期患者肝组织中MDR3表达无显著差异。而ENJOJI等^[25]研究则表明,与正常肝组织相比,PBC早期患者肝组织中MDR3表达明显增高,与本研究结果不同。其原因可能有以下几点:第一,方法不同,本研究采用石蜡组织标本进行免疫组织化学染色,而上述研究采用快速冰冻切片进行免疫组织化学染色;第二,对照组不同,本研究对照组为慢性HBV携带者肝组织标本,且MDR3强表达,而上述研究对照组为正常肝组织标本,且MDR3表达稀少;第三,病例数不同,上述研究病例数较少,仅有8例,此外其病例只限于PBC早期(PBC I~II期),而本研究还包含PBC晚期(PBC III~IV期),病例更多、更全面,结果更可靠。

MRP2为有机阴离子的重要转运体,属于C亚族成员,又称ABCC2,主要分布肝细胞、肾小管及小肠等处,依靠ATP水解产生活性,将有机阴离子(如胆红素双葡萄糖醛酸脂、硫酸盐、谷胱甘肽结合物)转运至胆汁,并借助谷胱甘肽转运形成非胆汁酸盐依赖性胆流,是非胆汁酸盐依赖性胆汁流形成的重要因素,也是将结合胆红素从肝细胞转运至毛细胆管的唯一转运蛋白。MRP2表达减少会导致胆红素分泌障碍、血清结合胆红素明显升高及胆汁淤积、胆栓形成。本研究中PBC患者血清胆红素水平呈不同程度升高,与对照组相比,PBC患者肝组织中MRP2蛋白表达减少,与Kullak-Ublick等^[26]研究一致。但PBC早期组(PBC I~II期)与PBC晚期组(PBC III~IV期)患者肝组织中MRP2表达无显著差异,而Kojima等^[27]和Zollner等^[28]研究结果均显示在PBC I患者期肝组织中MRP2的表达无变化,不同的是,Kojima等发现PBC III期患者肝组织中MRP2蛋白免疫染色强度和mRNA水平均下降,而Zollner等^[29]另一项研究发现PBC III期患者肝组织中MRP2蛋白表达轻度升高,PBC IV期患者肝组织中MRP2蛋白和mRNA水平则保持不变。Zollner等认为在PBC晚期患者肝组织中MRP2蛋白表达轻度或保持不变可能是肝细胞在胆汁淤积过程中的一种适应性反应机制,而本研究显示PBC早期与PBC晚期患者肝组织中MRP2表达无显著差异,原因可能与个体差异或肝组织胆汁淤积程度不同有关。

本研究通过免疫组织化学染色方法检测

BSEP、MDR3和MRP2在PBC患者肝组织中的表达,与对照组比较,BSEP和MRP2在PBC患者肝组织阳性表达降低,以胆汁淤积肿胀区阳性表达减少更明显,在毛细胆管胆栓形成的肝细胞胆管膜侧两者呈弱表达或缺失,表明3种转运蛋白中BSEP和MRP2的表达均受到抑制,从而推测PBC中胆汁淤积的发生与BSEP和MRP2蛋白功能或结构受损密切相关。

综上,3种跨膜转运蛋白中BSEP和MRP2在PBC患者肝组织中均呈现不同程度表达降低,且在PBC晚期组患者肝组织BSEP表达率显著降低,提示PBC胆汁淤积与毛细胆管膜侧BSEP蛋白表达缺陷有关,PBC疾病进展可能与BSEP表达减少有关。PBC患者伴血清胆红素水平升高可能与其肝组织中MRP2表达减少有关。

参考文献

- [1] SHIMODA S, TANAKA A. It is time to change primary biliary cirrhosis (PBC): new nomenclature from "cirrhosis" to "cholangitis", and upcoming treatment based on unveiling pathology[J]. *Hepatol Res*,2016,46(5):407-415.
- [2] YOUNOSSE Z M, BERNSTEIN D, SHIFFMAN M L, et al. Diagnosis and management of primary biliary cholangitis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2019,114(1):48-63.
- [3] TANAKA A, LEUNG P S C, GERSHWIN M E. The genetics of primary biliary cholangitis[J]. *Curr Opin Gastroenterol*,2019,35(2):93-98.
- [4] TRIVEDI P J, HIRSCHFIELD G M. Recent advances in clinical practice: epidemiology of autoimmune liver diseases[J]. *Gut*,2021,70(10):1989-2003.
- [5] LLEO A, LEUNG P S C, HIRSCHFIELD G M, et al. The pathogenesis of primary biliary cholangitis: a comprehensive review[J]. *Semin Liver Dis*,2020,40(1):34-48.
- [6] FUKUI H. Role of gut dysbiosis in liver diseases: what have we learned so far?[J]. *Diseases*,2019,7(4):58.
- [7] 叶立红,郑欢伟,黄肖雨,等. 3种跨膜转运蛋白在胆管细胞损伤型药物性肝损伤患者肝组织中的表达特点及意义[J]. *临床肝胆病杂志*,2020,36(7):1562-1566.
- [8] REN T, PANG L, DAI W, et al. Regulatory mechanisms of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) and its role in related diseases[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*,2021,45(6):101641.
- [9] JETTER A, KULLAK-UBLICK G A. Drugs and hepatic transporters: a review[J]. *Pharmacol Res*,2020,154:104234.
- [10] MILLER G C, CLOUSTON A D. Adult onset of genetic disorders in bile acid transport in the liver[J]. *Hum Pathol*,2020,96:2-7.
- [11] 中华医学会肝病学分会. 原发性胆汁性胆管炎的诊断和治疗指南(2021)[J]. *中华内科杂志*,2021,60(12):1024-1037.
- [12] 熊静平,张跃新. 110例原发性胆汁性胆管炎的临床特点[J]. *肝脏*,2020,25(1):36-39.
- [13] 曹红艳,陈冻伢,厉有名. 188例原发性胆汁性肝硬化的临床分析[J]. *中华消化杂志*,2014,34(12):845-846.
- [14] SAKELLARIOU S, MICHAELIDES C, VOULGARIS T, et al. Keratin 7 expression in hepatic cholestatic diseases[J]. *Virchows Arch*,2021,479(4):815-824.
- [15] 沈斐斐,陆伦根. 胆汁淤积中多耐药相关蛋白作用[J]. *肝脏*,2016,21(7):592-593.
- [16] BOYER J L. Bile formation and secretion[J]. *Compr Physiol*,2013, 3(3):1035-1078.
- [17] ROMA M G, BAROSSO I R, MISZCZUK G S, et al. Dynamic localization of hepatocellular transporters: role in biliary excretion and impairment in cholestasis[J]. *Curr Med Chem*,2019,26(7):1113-1154.
- [18] IMAGAWA K, HAYASHI H, SABU Y, et al. Clinical phenotype and molecular analysis of a homozygous ABCB11 mutation responsible for progressive infantile cholestasis[J]. *J Hum Genet*,2018,63(5):569-577.
- [19] WAISBOURD-ZINMAN O, SURREY L F, SCHWARTZ A E, et al. A rare BSEP mutation associated with a mild form of progressive familial intrahepatic cholestasis type 2[J]. *Ann Hepatol*,2017,16(3):465-468.
- [20] DRÖGE C, BONUS M, BAUMANN U, et al. Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants[J]. *J Hepatol*,2017,67(6):1253-1264.
- [21] STRAUTNIEKS S S, BYRNE J A, PAWLIKOWSKA L, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families[J]. *Gastroenterology*,2008,134(4):1203-1214.
- [22] LIU X, LAI H, XIN S, et al. Whole-exome sequencing identifies novel mutations in ABC transporter genes associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy disease: a case-control study[J]. *BMC pregnancy and childbirth*,2021,21(1):110.
- [23] YEAP S P, HARLEY H, THOMPSON R, et al. Biliary transporter gene mutations in severe intrahepatic cholestasis of pregnancy: Diagnostic and management implications[J]. *J Gastroenterol Hepatology*,2019,34(2):425-435.
- [24] TAKEYAMA Y, KANEGAE K, INOMATA S, et al. Sustained upregulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and bile salt export pump and downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver of patients with end-stage primary biliary cirrhosis[J]. *Med Mol Morphol*,2010,43(3):134-138.
- [25] ENJOJI M, YADA R, FUJINO T, et al. The state of cholesterol metabolism in the liver of patients with primary biliary cirrhosis: the role of MDR3 expression[J]. *Hepatol Int*,2009,3(3):490-496.
- [26] KULLAK-UBLICK G A, BARETTON G B, OSWALD M, et al. Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatol Res*,2002,23(1):78-82.
- [27] KOJIMA H, NIES A T, KÖNIG J, et al. Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*,2003,39(5):693-702.
- [28] ZOLLNER G, FICKERT P, ZENZ R, et al. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases[J]. *Hepatology*,2001,33(3):633-646.
- [29] ZOLLNER G, FICKERT P, SILBERT D, et al. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*,2003,38(6):717-727.

收稿日期: 2021-10-11

钟青梅,刘文丽,章萍,等. 三种肝转运蛋白在原发性胆汁性胆管炎患者肝组织中的表达特点[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2022,14(3):53-60.