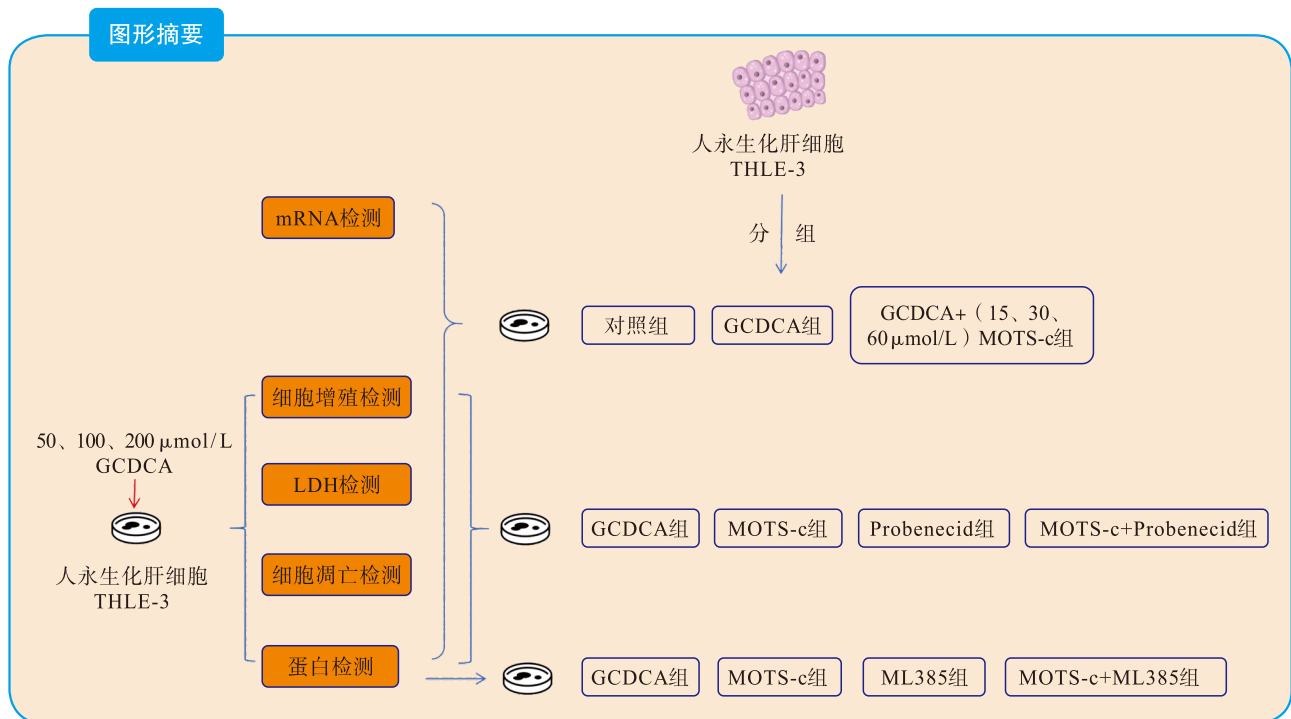


· 论著 ·

MOTS-c 通过调节转运体 MRP2 表达对甘氨酸鹅脱氧胆酸诱导的肝细胞损伤的影响

敖宇 张旭阳 唐聃 刘公伟 黄丹 蔡治方



【摘要】 目的 探讨线粒体衍生肽 MOTS-c 对甘氨酸鹅脱氧胆酸 (GCDCA) 诱导的人肝细胞 THLE-3 损伤的影响及相关机制。**方法** 体外培养 THLE-3 细胞, 采用不同浓度的 GCDCA 和 MOTS-c 干预 THLE-3 细胞, 通过细胞计数试剂盒 (CCK-8) 法筛选出 GCDCA 和 MOTS-c 的处理浓度。再采用 GCDCA (200 $\mu\text{mol/L}$)、MOTS-c (15、30、60 $\mu\text{mol/L}$)、多药耐药蛋白 2 (MRP2) 抑制剂 Probenecid (500 $\mu\text{mol/L}$) 和核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 抑制剂 ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$) 对 THLE-3 细胞进行处理或预处理, 采用 CCK-8 法检测各组细胞增殖率; 生化法检测各组细胞培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 水平; 流式细胞术检测各组细胞凋亡率; 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 法检测细胞中 MRP2 信使 RNA (mRNA) 水平; 蛋白质印迹法检测细胞中 MRP2 和 Nrf2 蛋白表达水平。**结果** 随着 GCDCA 处理浓度的升高, THLE-3 细胞增殖活性逐渐降低, 细胞培养液中 LDH 活性及细胞凋亡水平逐渐升高, 细胞中 MRP2 表达水平均逐渐降低 (均为 $P < 0.05$)。30、60 $\mu\text{mol/L}$ MOTS-c 干预均可提高 GCDCA 暴露下 THLE-3 细胞增殖活性, 上调细胞中 MRP2 和 Nrf2 表达水平, 而降低细胞培养液中 LDH 活

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2024278

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (WJW-2021-014)

作者单位: 563000 贵州遵义, 遵义医科大学第二附属医院肝胆外科

作者简介: 敖宇 (ORCID 0009-0003-9291-7536), 硕士, 主治医师, 研究方向为肝胆胰疾病, Email: 907030759@qq.com

通信作者: 蔡治方 (ORCID 0009-0005-1961-3805), 硕士, 主任医师, 研究方向为肝胆胰疾病, Email: 2128985306@qq.com

性及细胞凋亡水平（均为 $P < 0.05$ ）。联合 Probenecid 干预可部分逆转 MOTS-c 对 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞损伤的改善作用，联合 ML385 干预则可部分抑制 MOTS-c 干预对 GCDCA 暴露下 THLE-3 细胞中 MRP2 表达的诱导作用。**结论** MOTS-c 可减轻 GCDCA 诱导的人肝细胞 THLE-3 损伤，其作用机制可能与促进 Nrf2 介导的 MRP2 表达上调有关。

【关键词】胆汁淤积；缺血-再灌注损伤；肝移植；肝损伤；甘氨酸鹅脱氧胆酸；MOTS-c；核因子 E2 相关因子 2；多药耐药蛋白 2

【中图分类号】R617, R657.3 【文献标志码】A 【文章编号】1674-7445 (2025) 03-0011-10

Effect of MOTS-c on hepatocyte injury induced by glycochenodeoxycholic acid by regulating transporter MRP2 expression

Ao Yu, Zhang Xuyang, Tang Dan, Liu Gongwei, Huang Dan, Cai Zhifang. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Corresponding author: Cai Zhifang, Email: 2128985306@qq.com

【Abstract】**Objective** To investigate the effects and related mechanisms of mitochondrial-derived peptide MOTS-c on glycochenodeoxycholic acid (GCDCA)-induced injury in human hepatocytes (THLE-3 cells). **Methods** THLE-3 cells were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of GCDCA and MOTS-c. The optimal concentrations of GCDCA and MOTS-c were determined by cell counting kit (CCK)-8 method. Subsequently, THLE-3 cells were treated or pre-treated with GCDCA (200 $\mu\text{mol/L}$), MOTS-c (15, 30, 60 $\mu\text{mol/L}$), the multidrug resistance protein 2 (MRP2) inhibitor Probenecid (500 $\mu\text{mol/L}$), and the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$). Cell proliferation was assessed by CCK-8 method. Lactate dehydrogenase (LDH) levels in the culture medium were measured by biochemical method. Cell apoptosis rates were determined by flow cytometry. MRP2 messenger RNA (mRNA) levels were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). MRP2 and Nrf2 protein expression levels were analyzed by Western blotting. **Results** As the concentration of GCDCA increased, the proliferation activity of THLE-3 cells gradually decreased, while LDH activity in the culture medium and apoptosis levels increased, and the expression levels of MRP2 in the cells decreased (all $P < 0.05$). Treatment with 30 and 60 $\mu\text{mol/L}$ MOTS-c significantly enhanced the proliferation activity of THLE-3 cells exposed to GCDCA, upregulated the expression of MRP2 and Nrf2, and reduced LDH activity and apoptosis levels (all $P < 0.05$). Co-treatment with Probenecid partially reversed the protective effects of MOTS-c on GCDCA-induced THLE-3 cells injury, while co-treatment with ML385 partially inhibited the induction of MRP2 expression by MOTS-c in THLE-3 cells exposed to GCDCA. **Conclusions** MOTS-c may alleviate GCDCA-induced injury in human hepatocytes (THLE-3 cells), and its mechanism may be related to the upregulation of MRP2 expression mediated by Nrf2.

【Key words】Cholestasis; Ischemia-reperfusion injury; Liver transplantation; Hepatocyte injury; Glycochenodeoxycholic acid; MOTS-c; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Multidrug resistance protein 2

缺血-再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 相关性肝内胆汁淤积是肝移植术后的常见现象，患者早期主要表现为黄疸、血清总胆红素升高，其发生机制可能与胆汁转运障碍有关。胆汁的转运需要线粒体供能，并由细胞膜上相关转运蛋白完成转运。研究证实，IRI 可导致肝细胞线粒体功能障碍，形成能量代谢障碍，引起能量供应不足^[1-3]。同时，IRI 也可导致肝细胞膜上相关转运蛋白表达下调^[4-5]。因此，IRI 介导的胆汁转运障碍可能是导致肝移植术后胆汁淤积的重要原因。多药耐药蛋白 2 (multidrug resistance protein 2, MRP2) 是一种位于

细胞膜上的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 依赖性外排转运蛋白，需要线粒体供能，参与细胞内外多种复合物包括胆汁的转运。研究显示，MRP2 在 IRI 及阻塞性胆汁淤积患者肝组织中低表达^[5-6]，而上调 MRP2 表达可以增加胆汁的外排，进而改善动物胆汁淤积性肝损伤^[7-9]，提示胆汁转运障碍可能是由 IRI 介导的 MRP2 低表达所致。

MOTS-c 是一种线粒体基因组编码的线粒体衍生肽，含有 16 个氨基酸，参与多种应激条件下代谢功能障碍的调节，对 IRI 有明显的改善作用^[10-11]。有研究显示，MOTS-c 可直接与核因子 E2 相关因子 2

(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 相互作用来激活 Nrf2 信号通路, 从而改善线粒体功能障碍^[12-13]。而且激活 Nrf2 可减少肝脏中胆汁酸的合成, 上调 MRP2 的表达, 从而调节胆汁酸代谢平衡^[14-15]。然而, MOTS-c 是否可通过调节 MRP2 表达改善胆汁淤积进而减轻肝损伤目前尚不明确。甘氨酸脱氧胆酸 (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA) 是一种疏水性胆汁酸, 在肝组织中能与甘氨酸作用产生一种有细胞毒性的胆汁盐, 其也是胆汁淤积性肝病患者血清中主要的胆汁酸成份。本研究采用 GCDCA 处理人肝细胞 THLE-3 建立体外胆汁淤积性肝损伤细胞模型, 探讨 MOTS-c 对胆汁淤积性肝细胞损伤及 MRP2 表达的影响, 并简要阐明其作用机制, 以期为肝移植后胆汁淤积的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

人永生化肝细胞 THLE-3 购自中国科学院分子细胞科学卓越创新中心。GCDCA (纯度 $\geq 98.0\%$)、MRP2 抑制剂 Probenecid (纯度 99.8%) 和 Nrf2 抑制剂 ML385 (纯度 99.96%) (美国 MedChemExpress 公司), DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), 细胞计数试剂盒 (cell counting kit, CCK)-8、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) Annexin V/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (北京索莱宝科技有限公司), 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), RNA 提取试剂盒、互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 第一链合成试剂盒和实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒 (武汉爱博泰克生物科技有限公司), 兔抗人 MRP2 单克隆抗体、兔抗人 Nrf2 多克隆抗体和兔抗人 GAPDH 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司)。CO₂ 培养箱、酶标仪 (美国 Thermo 公司), 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司), RT-qPCR 仪 (瑞士 Roche 公司), 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。本研究已通过遵义医科大学第二附属医院医学伦理审查委员会审批, 豁免患者知情同意 (批号: KYLL-2025-001)。

1.2 CCK-8 检测各组细胞增殖率

THLE-3 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 于 37 °C, 5%CO₂ 的培养箱中培养。收集对数生长期的

THLE-3 细胞, 调整细胞密度 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 并接种于 96 孔细胞培养板中。待细胞融合度达到 90% 左右时, 采用不同浓度 (25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$) GCDCA 或不同浓度 (7.5、15、30、60、120、240 $\mu\text{mol/L}$) MOTS-c 分别处理 THLE-3 细胞, 每个浓度设置 3 个复孔, 以 0 $\mu\text{mol/L}$ GCDCA 或 MOTS-c 干预组作为对照组。孵育 6 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 2 h 后在酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率。细胞增殖率 = $(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。筛选出 GCDCA 诱导浓度和 MOTS-c 干预浓度。

1.3 实验分组

根据筛选出的 GCDCA 诱导浓度, 将 THLE-3 细胞分为: 对照组和 (50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) GCDCA 组, 检测各组细胞增殖率、细胞凋亡率、培养液中 LDH 活性及 MRP2 蛋白表达量。

根据筛选出的 MOTS-c 的干预浓度, 将 THLE-3 细胞分组: 对照组、GCDCA 组和 15、30、60 $\mu\text{mol/L}$ MOTS-c 组。对照组不处理, 剩余组均采用 200 $\mu\text{mol/L}$ GCDCA 诱导 THLE-3 细胞损伤, MOTS-c 组在 GCDCA 诱导的基础上同时加入相应浓度的 MOTS-c 进行处理, 6 h 后收集细胞, 检测各组细胞增殖率、细胞凋亡率、培养液中 LDH 活性、细胞中 MRP2 信使 RNA (messenger RNA, mRNA)、MRP2 及 Nrf2 蛋白表达水平。

根据预处理实验结果, (1) 将 THLE-3 细胞分为 4 组: GCDCA 组、MOTS-c 组、Probenecid 组和 MOTS-c+Probenecid 组。所有组采用 200 $\mu\text{mol/L}$ GCDCA 诱导 THLE-3 细胞损伤, MOTS-c 干预浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$, 在 GCDCA 诱导前 20 min, 加入 500 $\mu\text{mol/L}$ Probenecid 进行预处理^[16], 6 h 后收集细胞, 检测各组细胞增殖率、细胞凋亡率、培养液中 LDH 活性和细胞中 MRP2 蛋白表达水平。(2) 将 THLE-3 细胞分为 4 组: GCDCA 组、MOTS-c 组、ML385 组和 MOTS-c+ML385 组。所有组采用 200 $\mu\text{mol/L}$ GCDCA 诱导 THLE-3 细胞损伤, MOTS-c 干预浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$, 在 GCDCA 诱导前 20 min, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ ML385 进行预处理^[17], 6 h 后收集细胞, 检测各组细胞中 MRP2 和 Nrf2 蛋白表达水平。

1.4 检测细胞培养液中 LDH 水平

收集细胞培养液, 离心取上清, 按照 LDH 测定试剂盒说明书进行操作, 检测各组细胞培养液中

LDH 活性。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡水平

收集 THLE-3 细胞, 调整细胞密度并以每孔 3×10^5 个细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 每组设置 3 个复孔。待细胞贴壁后, 按照上述分组处理细胞。6 h 后, 离心弃上清, 收集细胞。加入 100 μL 结合缓冲液重悬细胞, 再分别加入 5 μL FITC Annexin V 和 PI 避光孵育 20 min。加入 400 μL 结合缓冲液混匀后, 在流式细胞仪上检测各组细胞凋亡率。

1.6 RT-qPCR 检测细胞中 MRP2 mRNA 表达水平

收集 THLE-3 细胞, 采用吸附柱法提取细胞中的总 RNA, 根据试剂盒说明书操作合成 cDNA。再以 cDNA 为模板, 通过 SYBR Green fast qPCR Mix 进行扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列为: MRP2 上游引物 5'-AGCAGGTATTCGTTGGTTTTCT-3', 下游引物 5'-AACCAGGAGCCATGTGCCTA-3'; GAPDH 上游引物 5'-CCCTTAAGAGGGATGCTGCC-3', 下游引物 5'-TACGGCCAAATCCGTTTACA-3'。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达水平。

1.7 蛋白质印迹法检测细胞中 MRP2 和 Nrf2 蛋白表达水平

收集 THLE-3 细胞, 裂解提取总蛋白。测定蛋白浓度后以 25 μg 蛋白上样量进行电泳。电泳结束后移膜, 室温封闭 2 h, 之后置于一抗 (MRP2 抗体 1:2000, Nrf2 抗体 1:1000, GAPDH 抗体 1:2500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜后二抗室温孵育 1 h。洗膜后滴加化学发光试剂显影曝光, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算蛋白表达水平。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析及事后 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GCDCA 对 THLE-3 细胞损伤及 MRP2 表达的影响

随着 GCDCA 干预浓度的升高, THLE-3 细胞增殖率逐渐降低 (均为 $P < 0.05$, 图 1A)。不同浓度 GCDCA 干预后, THLE-3 细胞培养液中 LDH 活性和细胞凋亡率均逐渐升高 (均为 $P < 0.05$, 图 1B、C); 细胞

中 MRP2 蛋白表达水平逐渐降低 (均为 $P < 0.05$, 图 1D), 故选择 200 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验中 GCDCA 诱导 THLE-3 细胞损伤的干预浓度。

2.2 MOTS-c 对 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞损伤的影响

低浓度 MOTS-c 对细胞增殖率无影响, 高浓度 (120、240 $\mu\text{mol/L}$) 干预会抑制细胞增殖 (图 2A)。与对照组比较, GCDCA 组细胞增殖率降低, 细胞培养液中 LDH 活性和细胞凋亡率升高; 与 GCDCA 组比较, 30、60 $\mu\text{mol/L}$ MOTS-c 干预组细胞增殖率升高, 细胞培养液中 LDH 活性和细胞凋亡率降低 (均为 $P < 0.05$, 图 2B~D)。

2.3 MOTS-c 对 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞中 MRP2 表达的影响

与对照组比较, GCDCA 组细胞中 MRP2 mRNA 和蛋白表达水平降低, Nrf2 蛋白表达水平降低; 与 GCDCA 组比较, 30、60 $\mu\text{mol/L}$ MOTS-c 组细胞中 MRP2 mRNA 和蛋白表达水平升高, Nrf2 蛋白表达水平升高 (均为 $P < 0.05$, 图 3)。

2.4 MOTS-c 通过调节 MRP2 表达对 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞损伤的影响

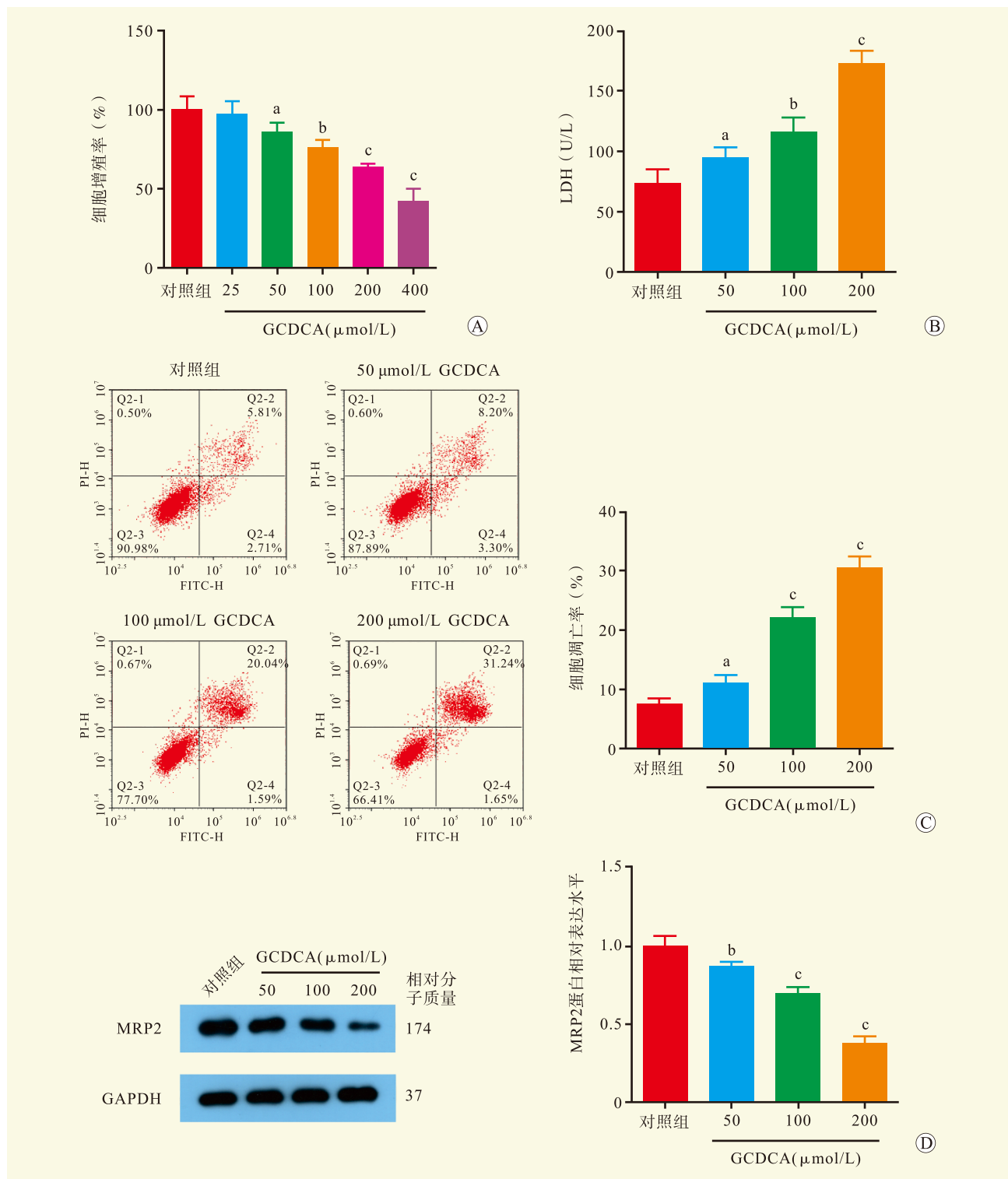
与 GCDCA 组比较, MOTS-c 组细胞中 MRP2 蛋白表达水平和细胞增殖率升高, 细胞培养液中 LDH 活性及细胞凋亡率降低, Probenecid 组细胞中 MRP2 蛋白表达水平和细胞增殖率降低, 细胞培养液中 LDH 活性及细胞凋亡率升高; 与 MOTS-c 组比较, MOTS-c+Probenecid 组细胞中 MRP2 蛋白表达水平和细胞增殖率降低, 细胞培养液中 LDH 活性及细胞凋亡率升高 (均为 $P < 0.05$, 图 4)。

2.5 抑制 Nrf2 部分逆转 MOTS-c 对 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞中 MRP2 表达的促进作用

与 GCDCA 组比较, MOTS-s 组 Nrf2 和 MRP2 蛋白表达水平升高, ML385 组细胞中 Nrf2 和 MRP2 蛋白表达水平降低; 与 MOTS-c 组比较, MOTS-c+ML385 组细胞中 Nrf2 和 MRP2 蛋白表达水平降低 (均为 $P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

胆汁淤积是一种常见的临床事件, 由胆汁形成异常或排泄受阻导致胆汁酸或胆汁盐滞留^[18]。长期持续的胆汁淤积会发展为胆汁淤积性肝炎、肝纤维化、肝硬化, 甚至是肝衰竭^[19-20]。胆汁酸由肝脏中的胆固醇



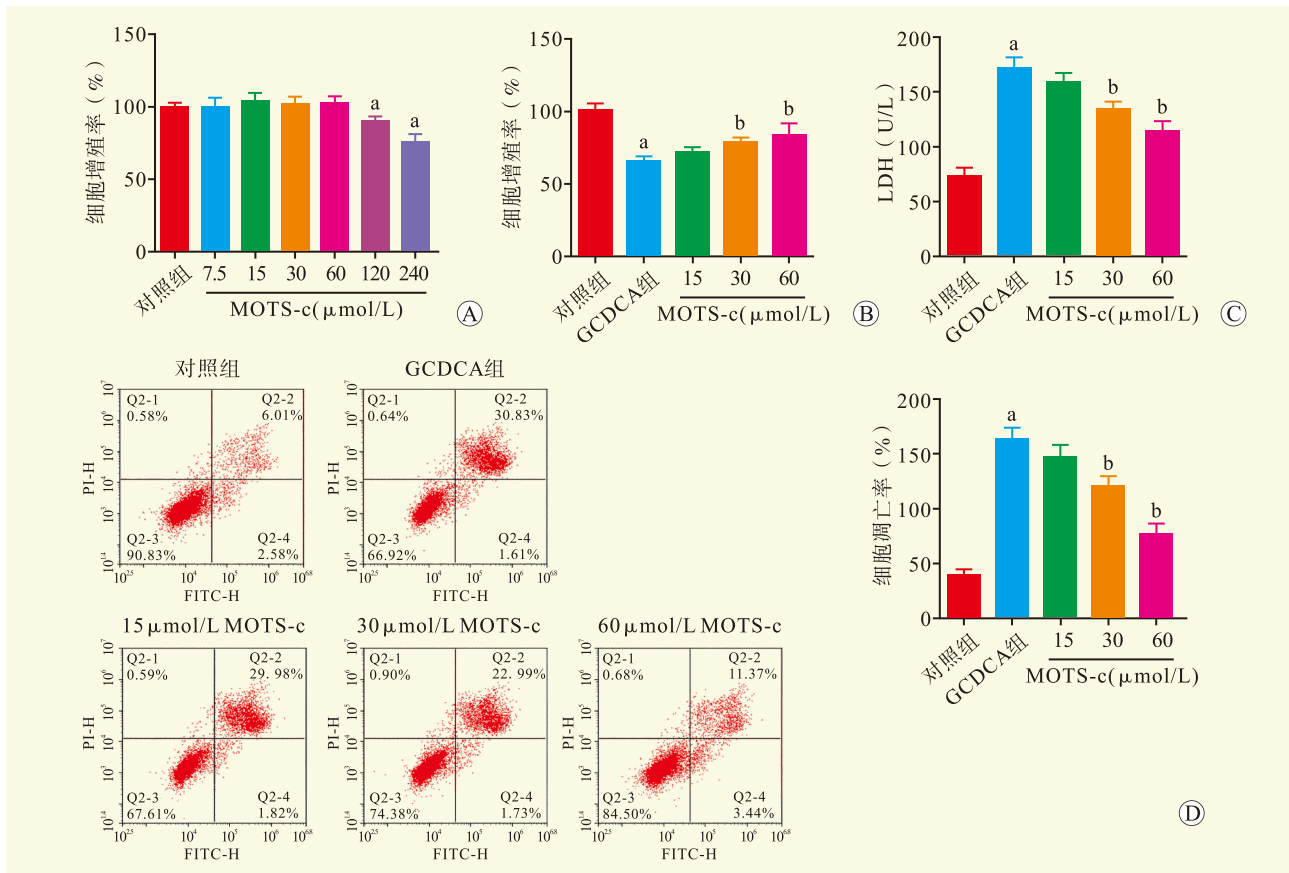
注：A 图为细胞增殖率；B 图为细胞培养液中 LDH 水平；C 图为细胞凋亡率；D 图为细胞中 MRP2 蛋白相对表达水平。与对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ，^c $P < 0.001$ 。

图 1 GCDCA 诱导 THLE-3 细胞损伤并抑制 MRP2 蛋白表达

Figure 1 GCDCA induced THLE-3 cells injury and inhibited MRP2 protein expression

合成，是一种生理性的洗涤分子，因此具有高度的细胞毒性。在胆汁淤积中，胆汁流动障碍导致胆汁酸在

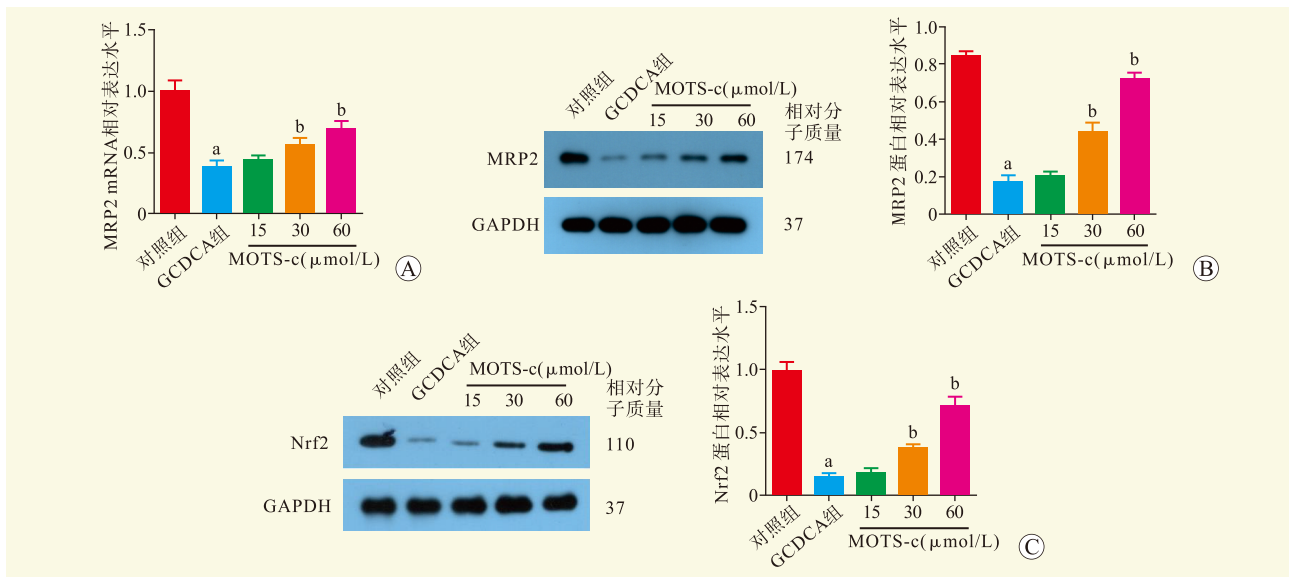
肝脏中蓄积，进而导致肝细胞损伤^[21]。此外，胆汁酸还可以刺激胆管细胞和星状细胞增殖，从而导致胆管



注：A~B 图为细胞增殖率；C 图为细胞培养液中 LDH 水平；D 图为细胞凋亡率。与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与 GCDCA 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 2 MOTS-c 改善 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞损伤和凋亡

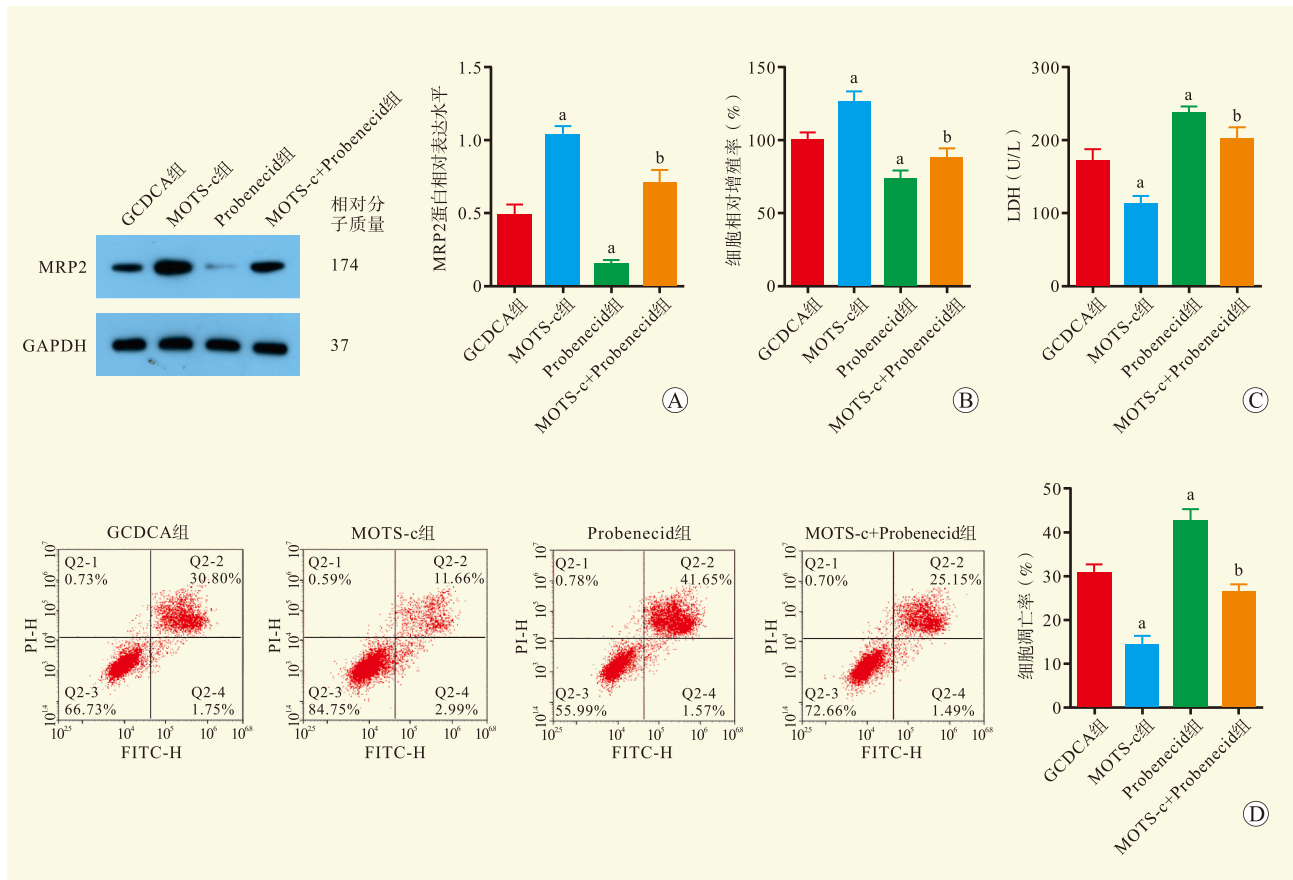
Figure 2 MOTS-c ameliorated GCDCA-induced THLE-3 cells injury and apoptosis



注：A 图为细胞中 MRP2 mRNA 表达水平；B 图为细胞中 MRP2 蛋白表达水平；C 图为细胞中 Nrf2 蛋白表达水平。与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与 GCDCA 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 3 MOTS-c 促进 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞中 MRP2 的表达水平

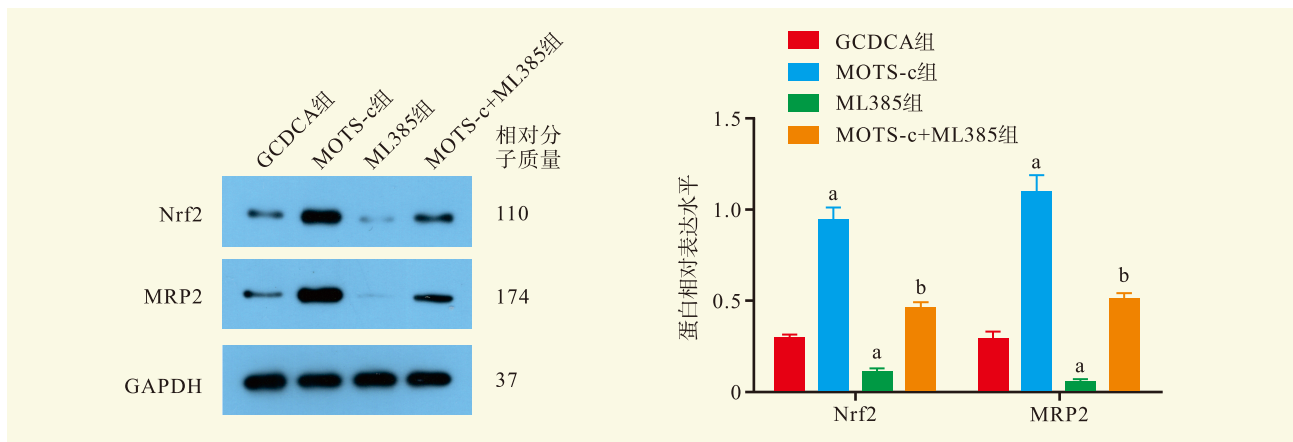
Figure 3 MOTS-c promoted the expression of MRP2 in THLE-3 cells induced by GCDCA



注：A 图为细胞中 MRP2 蛋白表达水平；B 图为细胞增殖率；C 图为细胞培养液中 LDH 水平；D 图为细胞凋亡率。与 GCDCA 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 MOTS-c 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 4 Probenecid 部分逆转 MOTS-c 对 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞损伤和凋亡的影响

Figure 4 Probenecid partially reversed the effects of MOTS-c on GCDCA-induced injury and apoptosis in THLE-3 cells



注：与 GCDCA 组比较，^a $P < 0.05$ ，与 MOTS-c 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 5 ML385 部分逆转 MOTS-c 对 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞中 Nrf2 和 MRP2 蛋白表达水平的影响

Figure 5 ML385 partially reversed the effects of MOTS-c on the expression levels of Nrf2 and MRP2 proteins in GCDCA-induced THLE-3 cells

增殖和肝纤维化^[22]。GCDCA 作为病理性肝细胞凋亡的诱导剂在血清中的积累具有临床意义，可损坏肝功能^[23]。研究显示，外源性补充 GCDCA 可促进肝脏胆

汁淤积型小鼠发生肝纤维化^[24]。王文杰等^[25]采用 GCDCA 刺激人肝细胞 L-O2，结果显示细胞中促炎因子水平显著升高，炎症相关通路也被激活。因此，

GCDCA 体外诱导肝细胞可模拟胆汁淤积肝细胞病理状态^[26]。本研究采用 GCDCA 处理人肝细胞 THLE-3, 发现细胞增殖活性降低, 细胞凋亡率和 LDH 释放增加, 表明 GCDCA 诱导下的 THLE-3 细胞损伤严重。

MRP2 是一种有机阴离子的特异性外排转运蛋白, 在肝细胞小管膜上表达, 其在谷胱甘肽、胆红素或葡萄糖醛酸酯的胆汁排泄过程中起关键作用^[27-28]。MRP2 介导的肝胆转运被中断是胆汁淤积导致的主要肝细胞功能障碍之一^[29]。有研究显示, 恢复 MRP2 介导的转运功能可通过改善谷胱甘肽的排泄而使胆汁流量恢复正常^[30]。MRP2 在胆汁淤积大鼠肝组织中表达下调, 上调 MRP2 表达有助于恢复大鼠肝功能^[31]。Chen 等^[28]的研究也发现, 抑制 MRP2 泛素化降解可减轻胆汁淤积性肝损伤。同样, 本研究也发现 MRP2 在 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞中的表达水平降低, 说明 MRP2 表达缺乏可能参与 GCDCA 诱导 THLE-3 细胞损伤的病理过程。

MOTS-c 是线粒体衍生肽家族的主要成员, 其对线粒体功能、基因表达和代谢稳态的调节作用受到广泛关注^[32-33]。在胆汁淤积过程中, 线粒体是胆汁酸等细胞毒性分子作用的主要靶点之一, 从而引起细胞能量危机和细胞死亡介质的释放^[34]。本研究中, MOTS-c 的干预显著减轻了 GCDCA 诱导的 THLE-3 细胞损伤, 降低其凋亡率, 提示 MOTS-c 可有效改善胆汁淤积肝细胞损伤。此外, 本研究结果还显示, MOTS-c 可上调 GCDCA 暴露下 THLE-3 细胞中 MRP2 和 Nrf2 蛋白表达水平。据报道, MOTS-c 可与多种转录因子相互作用, 包括 Nrf2、叉头蛋白 F1 和转录激活因子 3 等^[13,35-36]。在应激状态下, MOTS-c 转移至细胞核, 然后调节一系列基因表达以响应代谢功能障碍^[37]。而 Nrf2 可直接调控 MRP2 在小鼠肝细胞中的表达水平, 且激活 Nrf2/MRP 通路可减弱胆管结扎小鼠的阻塞性胆汁淤积^[38]。Wang 等^[39]的研究结果也证实, 激活 Nrf2 介导的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶和胆盐输出泵/MRP2 信号通路可显著减轻茶异硫氰酸酯诱导的大鼠胆汁淤积性肝损伤。结合本研究结果及上述他人研究, 推测 MOTS-c 减轻 GCDCA 对 THLE-3 细胞毒性作用的机制可能与激活 Nrf2/MRP2 通路有关。为验证此推测, 本研究引入 MRP2 抑制剂 Probenecid 与 MOTS-c 联合干预 GCDCA 诱导下的 THLE-3 细胞, 发现细胞损伤加重, 凋亡率升高; 而 Nrf2 抑制剂 ML385 与 MOTS-c 的联合干预使 THLE-3

细胞中 MRP2 表达下调, 提示抑制 Nrf2/MRP2 信号传导可部分逆转 MOTS-c 对 GCDCA 诱导 THLE-3 细胞损伤的改善作用。

综上所述, MOTS-c 可通过促进 Nrf2 的表达以上调 MRP2 在肝细胞中的表达水平, 从而减轻 GCDCA 诱导的胆汁淤积性肝细胞损伤。虽然 MOTS-c 在氧化应激和线粒体功能障碍方面的研究较多, 但其对胆汁淤积线粒体损伤的影响尚不明确, 这将在后续研究中进一步探讨。

参考文献:

- [1] HOU J, TOLBERT E, BIRKENBACH M, et al. Treprostinil alleviates hepatic mitochondrial injury during rat renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 143: 112172. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112172.
- [2] KOC S, DOGAN H O, KARATAS O, et al. Mitochondrial homeostasis and mast cells in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury of rats[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2022, 33(9): 777-784. DOI: 10.5152/tjg.2022.21911.
- [3] WANG L, FENG Z J, MA X, et al. Mitochondrial quality control in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Heliyon*, 2023, 9(7): e17702. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e17702.
- [4] MONTI C, AUDI S H, WOMACK J, et al. Physiologically-based pharmacokinetic modeling of blood clearance of liver fluorescent markers for the assessment of the degree of hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2023: 1-6. DOI: 10.1109/EMBC40787.2023.10340273.
- [5] 徐王刚, 曾仲, 段键, 等. 缺血再灌注损伤介导 MRP2 表达下调对 DCD 供体肝移植术后胆红素代谢的影响[J]. *昆明医科大学学报*, 2020, 41(10): 96-100. XU W G, ZENG Z, DUAN J, et al. Downregulation of MRP2 expression on bilirubin metabolism after liver transplantation from DCD donors[J]. *J Kunming Med Univ*, 2020, 41(10): 96-100.
- [6] 吴晓平, 张保新, 张晓娟, 等. 多耐药相关蛋白 MRP2 与核受体 RXR α 、RAR α 在人阻塞性胆汁淤积肝组织中的表达变化[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2011, 20(8): 769-770. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2011.08.026. WU X P, ZHANG B X, ZHANG X J, et al. Changes of MRP2, RXR α and RAR α expression in liver tissues of patients with obstructive cholestasis[J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 20(8): 769-770. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2011.08.026.
- [7] WANG R, YUAN T, SUN J, et al. Paeoniflorin alleviates 17 α -ethinylestradiol-induced cholestasis via the farnesoid X receptor-mediated bile acid homeostasis signaling pathway in rats[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:

1064653. DOI: 10.3389/fphar.2022.1064653.
- [8] ZU Y, LIU Y, LAN L, et al. Consecutive baicalin treatment relieves its accumulation in rats with intrahepatic cholestasis by increasing MRP2 expression[J]. *Heliyon*, 2023, 9(1): e12689. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12689.
- [9] HUA W, ZHANG S, LU Q, et al. Protective effects of n-butanol extract and iridoid glycosides of *Veronica ciliata* Fisch. against ANIT-induced cholestatic liver injury in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113432. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113432.
- [10] 王毓, 彭建业, 朱明燕. MOTS-c 肽对心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(8): 1405-1410. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.017.
- WANG Y, PENG J Y, ZHU M Y. Protective effect of MOTS-c peptide on myocardial injury in rats with myocardial ischemia reperfusion[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(8): 1405-1410. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.017.
- [11] LU P, LI X, LI B, et al. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c suppresses ferroptosis and alleviates acute lung injury induced by myocardial ischemia reperfusion via PPAR γ signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 953: 175835. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175835.
- [12] ZHANG Y, HUANG J, ZHANG Y, et al. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c alleviates radiation pneumonitis via an Nrf2-dependent mechanism[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(5): 613. DOI: 10.3390/antiox13050613.
- [13] XIAO J, ZHANG Q, SHAN Y, et al. The mitochondrial-derived peptide (MOTS-c) interacted with Nrf2 to defend the antioxidant system to protect dopaminergic neurons against rotenone exposure[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(10): 5915-5930. DOI: 10.1007/s12035-023-03443-3.
- [14] LIU J, LICKTEIG A J, ZHANG Y, et al. Activation of Nrf2 decreases bile acid concentrations in livers of female mice[J]. *Xenobiotica*, 2021, 51(5): 605-615. DOI: 10.1080/00498254.2021.1880033.
- [15] ZHANG Y, LICKTEIG A J, LIU J, et al. Effects of ablation and activation of Nrf2 on bile acid homeostasis in male mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 403: 115170. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115170.
- [16] JEMNITZ K, VERES Z, TUGYI R, et al. Biliary efflux transporters involved in the clearance of rosuvastatin in sandwich culture of primary rat hepatocytes[J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(2): 605-610. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.10.009.
- [17] XIONG Y, WANG Y, ZHANG J, et al. hPMSCs protects against D-galactose-induced oxidative damage of CD4⁺ T cells through activating Akt-mediated Nrf2 antioxidant signaling[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 468. DOI: 10.1186/s13287-020-01993-0.
- [18] 李其泽, 樊程, 赵晓松, 等. 婴儿胆汁淤积症的病因及临床指标分析[J]. *中华肝脏病杂志*, 2024, 32(9): 813-819. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20230905-00091.
- LI Q Z, FAN C, ZHAO X S, et al. Analysis of the etiology and clinical indicators of infantile cholestasis[J]. *Chin J Hepatol*, 2024, 32(9): 813-819. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20230905-00091.
- [19] 张继平. 胆汁淤积性肝病的病理学诊断[J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(6): 1093-1099. DOI: 10.12449/JCH240605.
- ZHANG J P. Pathological diagnosis of cholestatic liver disease[J]. *J Clin Hepatol*, 2024, 40(6): 1093-1099. DOI: 10.12449/JCH240605.
- [20] ZHOU C, PAN X, HUANG L, et al. Fibroblast growth factor 21 ameliorates cholestatic liver injury via a hepatic FGFR4-JNK pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(1): 166870. DOI: 10.1016/j.bbadis.2023.166870.
- [21] HUANG L, LI Y, TANG R, et al. Bile acids metabolism in the gut-liver axis mediates liver injury during lactation[J]. *Life Sci*, 2024, 338: 122380. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.122380.
- [22] CAI S Y, BOYER J L. The role of bile acids in cholestatic liver injury[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 737. DOI: 10.21037/atm-20-5110.
- [23] DOTAN M, FRIED S, HAR-ZAHAV A, et al. Periductal bile acid exposure causes cholangiocyte injury and fibrosis[J]. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0265418. DOI: 10.1371/journal.pone.0265418.
- [24] HOHENESTER S, KANITZ V, KREMER A E, et al. Glycochenodeoxycholate promotes liver fibrosis in mice with hepatocellular cholestasis[J]. *Cells*, 2020, 9(2): 281. DOI: 10.3390/cells9020281.
- [25] 王文杰, 解达伟, 黄通, 等. 核因子- κ B 信号通路在胆汁淤积性肝损伤中的作用及其机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(10): 1819-1822. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20200324-01106.
- WANG W J, XIE D W, HUANG T, et al. The role of nuclear factor- κ B signaling in bile acid-induced liver injury in cholestasis[J]. *Chin J Exp Surg*, 2020, 37(10): 1819-1822. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20200324-01106.
- [26] 陈思. 纳米 NAD⁺通过 SIRT1/PGC-1 α /TFAM 通路治疗胆汁淤积的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.
- [27] MAZZA T, ROUMELIOTIS T I, GARITTA E, et al. Structural basis for the modulation of MRP2 activity by phosphorylation and drugs[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1983. DOI: 10.1038/s41467-024-46392-8.
- [28] CHEN J, WU H, TANG X, et al. 4-Phenylbutyrate protects against rifampin-induced liver injury via regulating MRP2 ubiquitination through inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 2866-2877. DOI: 10.1080/21655979.2021.2024970.

- [29] BEER A J, HERTZ D, SEEMANN E, et al. Reduced MRP2 surface availability as PI3K γ -mediated hepatocytic dysfunction reflecting a hallmark of cholestasis in sepsis[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13110. DOI: 10.1038/s41598-020-69901-3.
- [30] RAZORI M V, MARTÍN P L, MAIDAGAN P M, et al. Spironolactone ameliorates lipopolysaccharide-induced cholestasis in rats by improving MRP2 function: role of transcriptional and post-transcriptional mechanisms[J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118352. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118352.
- [31] KIM M J, KANG Y J, KWON M, et al. Ursodeoxycholate restores biliary excretion of methotrexate in rats with ethinyl estradiol induced-cholestasis by restoring canalicular MRP2 expression[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1120. DOI: 10.3390/ijms19041120.
- [32] GAO Y, WEI X, WEI P, et al. MOTs-c functionally prevents metabolic disorders[J]. *Metabolites*, 2023, 13(1): 125. DOI: 10.3390/metabo13010125.
- [33] ZHENG Y, WEI Z, WANG T. MOTs-c: a promising mitochondrial-derived peptide for therapeutic exploitation[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1120533. DOI: 10.3389/fendo.2023.1120533.
- [34] HEIDARI R, NIKNAHAD H. The role and study of mitochondrial impairment and oxidative stress in cholestasis[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1981: 117-132. DOI: 10.1007/978-1-4939-9420-5_8.
- [35] WENG F B, ZHU L F, ZHOU J X, et al. MOTs-c accelerates bone fracture healing by stimulating osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells via positively regulating FOXF1 to activate the TGF- β pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(6): 2459. DOI: 10.26355/eurrev_202103_25396.
- [36] ZHAI D, YE Z, JIANG Y, et al. MOTs-c peptide increases survival and decreases bacterial load in mice infected with MRSA[J]. *Mol Immunol*, 2017, 92: 151-160. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.10.017.
- [37] MOHTASHAMI Z, SINGH M K, SALIMIAGHDAM N, et al. MOTs-c, the most recent mitochondrial derived peptide in human aging and age-related diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11991. DOI: 10.3390/ijms231911991.
- [38] CHEN P, LI J, FAN X, et al. Oleanolic acid attenuates obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice, possibly via activation of NRF2-MRPs and FXR antagonism[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 765: 131-139. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.08.029.
- [39] WANG X, XIONG W, WANG X, et al. Ursolic acid attenuates cholestasis through Nrf2-mediated regulation of UGT2B7 and BSEP/MRP2[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2024, 397(4): 2257-2267. DOI: 10.1007/s00210-023-02733-w.

(收稿日期: 2024-12-17)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)