·配伍·

钩吻配伍玉叶金花对外排转运蛋白BCRP和药物代谢酶CYP3A11的影响

朱翠萍，高汉云，赵茜茜，刘翔翔，黄美霞*，王英豪*
（福建中医药大学，福州 350122）

［摘要］ **目的：**钩吻配伍玉叶金花对外排转运蛋白乳腺癌耐药蛋白(BCRP)和细胞色素P450 3A11(CYP3A11)的影响，探讨其配伍减毒的机制；同时添加核受体激活剂干预探讨核受体是否在该过程中有调节作用。**方法：**将C57BL/6小鼠分为空白组，钩吻组(GE组，0.25 g·kg^{-1})，钩吻配伍玉叶金花组(GE+MP组，0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1})，钩吻+孕烷X受体(PXR)激活剂(利福平)组(GE+Rif组，0.25 g·kg^{-1}+50 mg·kg^{-1})，配伍+利福平组(GE+MP+Rif组，0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1}+50 mg·kg^{-1})，钩吻+组成型雄甾烷受体(CAR)激活剂｛1，4-双［2-(3，5-二氯吡啶氧)］苯，TCPOBOP｝组(GE+TCP组，0.25 g·kg^{-1}+0.5 mg·kg^{-1})，配伍+CAR激活剂组(GE+MP+TCP组，0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1}+0.5 mg·kg^{-1})。连续给药14 d，末次给药1 h后脱颈处死小鼠，取肝组织。左肝组织采用苏木素-伊红(HE)染色观察其病理学变化；右肝组织采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)，蛋白免疫印迹法(Western blot)对其进行mRNA及蛋白水平的检测，检测其对BCRP，CYP3A11基因和蛋白的影响。**结果：**GE+Rif组小鼠存活率25%，存活率最低，GE组存活率40%，GE+MP组存活率为80%，其他组均存活未见死亡。GE组小鼠肝脏细胞出现明显病变，与GE组比较，GE+MP组肝细胞病理状态都有所缓解；GE+Rif组小鼠肝脏细胞病理状态严重，与GE+Rif组比较，GE+MP+Rif组小鼠肝脏细胞肝细胞病变有所缓解；GE+TCP组小鼠肝脏出现轻微病变，GE+MP+TCP组小鼠肝脏细胞病变不明显；与GE+MP组比较，GE+MP+TCP组病变程度有轻微缓解但差异不大。与空白组比较，GE组BCRP蛋白及mRNA表达明显下调(P<0.05，P<0.01)；GE组CYP3A11蛋白表达显著下调(P<0.01)，mRNA表达有下调趋势但差异无统计学意义。与GE组比较，GE+MP组BCRP蛋白及mRNA表达均明显上调(P<0.05，P<0.01)；CYP3A11蛋白及mRNA表达有上调趋势，但差异无统计学意义。与GE组比较，GE+Rif组BCRP蛋白表达明显下调(P<0.05)；与GE+MP组比较，GE+MP+Rif组BCRP蛋白及mRNA表达明显下调(P<0.05，P<0.01)；PXR激活剂利福平在钩吻配伍前后均对BCRP产生调节。与GE组比较，GE+TCP组CYP3A11蛋白和mRNA表达明显上调(P<0.05，P<0.01)；与GE+MP组比较，GE+MP+TCP组CYP3A11蛋白和mRNA表达明显上调(P<0.05，P<0.01)；CAR激活剂TCPOBOP在钩吻配伍前后对CYP3A11也存在调节作用。**结论：**钩吻配伍玉叶金花毒性降低与外排转运蛋白BCRP和药物代谢酶CYP3A11密切相关。

［关键词］ 钩吻；玉叶金花；乳腺癌耐药蛋白(BCRP)；细胞色素P450 3A11(CYP3A11)；核受体
［中图分类号］ R22；R242；R285.5；R2-031 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2022)01-0058-07
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.20220192
［网络出版地址］ https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211105.1539.003.html
［网络出版日期］ 2021-11-08 9:39

Effects of *Gelsemium elegans* Combined with *Mussaenda pubescens* on Transporter BCRP and Drug-metabolizing Enzyme CYP3A11

ZHU Cui-ping，GAO Han-yun，ZHAO Qian-qian，LIU Xiang-xiang，HUANG Mei-xia*，WANG Ying-hao*
（*Fujian University of Traditional Chinese Medicine*，*Fuzhou* 350122，*China*）

［**Abstract**］ **Objective：** To explore the effect of *Gelsemium elegans* combined with *Mussaenda*

［收稿日期］ 20210329(031)
［基金项目］ 国家自然科学基金项目(81773921)，福建省自然科学基金项目(2019J01343)
［第一作者］ 朱翠萍，在读硕士，从事中药药理与毒理研究工作，E-mail：2692817505@qq. com
［通信作者］ * 黄美霞，博士，副教授，从事中药药理与临床研究工作，E-mail：2008009@fjtcm. edu. cn；
* 王英豪，博士，教授，从事中药药理与毒理研究工作，E-mail：39887219@qq. com

pubescens on efflux transporter breast cancer resistance protein (BCRP) and cytochrome P450 3A11 (CYP3A11) and their attenuation mechanism, and to investigate whether the nuclear receptors were involved in such regulation by intervening it with nuclear receptor activators. **Method:** C57BL/6 mice were divided into the blank group, *G. elegans* (GE, 0.25 g·kg^{-1}) group, GE + *M. pubescens* (MP) (0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1}) group, GE + pregnane X receptor (PXR) activator (rifampicin) (GE + Rif, 0.25 g·kg^{-1}+50 mg·kg^{-1}) group, GE + MP + Rif (0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1}+50 mg·kg^{-1}) group, GE + constitutive androstane receptor (CAR) activator (1, 4-Bis [2-(3, 5-Dichloropyridyloxy)] benzene, TCPOBOP) (GE + TCP, 0.25 g·kg^{-1}+0.5 mg·kg^{-1}) group, and GE + MP + TCP (0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1}+0.5 mg·kg^{-1}) group. The medication lasted for 14 successive days. One hour after the last administration, the mice were sacrificed by cervical dislocation and the liver tissue was harvested. The left liver tissue was stained with hematoxylin- eosin (HE) for observing the pathological changes. The right liver tissue was used for BCRP and CYP3A11 mRNA and protein expression detection by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** The survival rates of mice in the GE + Rif group, GE group, and GE + MP group were 25% (the lowest), 40%, and 80%, respectively, and no death was observed in the other groups. Compared with the obvious lesions in the liver cells of the GE group, the pathological changes in liver cells of the GE + MP group were alleviated, while those in the GE + Rif group were worsened. Compared with the GE + Rif group, the GE + MP + Rif group exhibited relieved pathological changes in liver cells. Both the GE + TCP group and the GE + MP + TCP group showed mild liver lesions. The comparison with the GE + MP group revealed that the pathological changes in the GE + MP + TCP group were slightly relieved. Compared with the blank group, the expression of BCRP protein and mRNA in GE group were significantly decreased (P<0.05, P<0.01). The expression of CYP3A11 protein in GE group were significantly decreased (P<0.01). Compared with the GE group, the GE + MP group displayed remarkably up-regulated BCRP protein and mRNA expression (P<0.05, P<0.01) and CYP3A11 protein expression (P<0.05), but slightly up-regulated CYP3A11 mRNA expression. Compared with the GE group, the GE + Rif group exhibited down-regulated BCRP protein expression (P < 0.05). The protein and mRNA expression levels of BCRP were lower in the GE + MP + Rif group than in the GE + MP group (P<0.05, P<0.01). The PXR activator rifampicin regulated BCRP before and after the combination of *G. elegans* with *M. pubescens*. The CYP3A11 protein and mRNA expression levels in the GE + TCP group were higher than those in the GE group (P<0.05, P<0.01). Compared with the GE + MP group, the GE + MP + TCP group showed up-regulated CYP3A11 protein and mRNA expression (P<0.05, P<0.01). CAR activator TCPOBOP also had a regulatory effect on CYP3A11 before and after the compatibility of *G. elegans* with *M. pubescens*. **Conclusion:** The attenuated toxin after the combination of *G. elegans* with *M. pubescens* is closely related to the efflux transporter BCRP and the drug-metabolizing enzyme CYP3A11.

[**Keywords**] *Gelsemium elegans*; *Mussaenda pubescens*; breast cancer resistance protein (BCRP); cytochrome P450 3A11 (CYP3A11); nuclear receptor

钩吻 *Gelsemium elegans* 为马钱科胡蔓藤属植物，是著名的剧毒药物[1]。民间长期使用钩吻治疗疔疮等恶性疾病，近些年相关研究表明，钩吻具有抗肿瘤、镇痛等作用[2]。但钩吻的治疗量和中毒量相近，制约了钩吻的安全合理应用，有关钩吻毒性机制的内容也极其稀少。本课题组前期研究表明，玉叶金花 *Mussaenda pubescens* 可降低钩吻毒性的同时保留镇痛药效，且配伍后钩吻吲哚类生物碱在人克隆结肠腺癌细胞(Caco-2细胞)细胞模型中的吸收减少，代谢外排增加，达到减毒目的[3]，故推测钩吻减毒机制可能与外排蛋白及药物代谢酶有关。

乳腺癌耐药蛋白(BCRP)为三磷酸腺苷(ATP)结合盒转运蛋白(ABC)家族外排转运体的一类，其在肝脏、肠上皮细胞、血脑屏障、胎盘和各种干细胞均有表达，在药物的转运过程中起着非常重要的作用[4]。现已证实多种中药的毒性成分是外排转运蛋白的底物，由肠壁细胞吸收后可能又被外排转运蛋白重新转运回肠腔，从而影响其在生物体内的转运

过程，降低毒副作用。细胞色素P450(CYP)的抑制或诱导会改变药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄[5]。CYP3A4(小鼠体内为CYP3A11)是CYP酶系中最重要的成员之一，主要分布于人体的肝脏和肠道，能够代谢50%以上的不同结构性质的临床药物[6]。

故本文通过研究钩吻配伍玉叶金花前后对BCRP，CYP3A11表达的影响，探讨钩吻毒性机制及钩吻配伍玉叶金花减毒的机制，阐明其配伍减毒的机理，为钩吻在临床应用的安全性及合理性、钩吻中毒的解救等提供实验基础及理论依据。

1 实验材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6小鼠，雄性，体质量18~22 g，6~8周龄，由福建中医药大学动物中心提供，购自杭州医学院，合格证号SCXK(浙)2019-0002，饲养于实验动物中心SPF级实验室[许可证号SYXK(闽)2019-0007]。

1.2 药品与试剂 玉叶金花采自福建省福州市闽侯县，经福建中医药大学药学院黄泽豪教授鉴定为茜草科植物玉叶金花*Mussaenda pubescens*的干燥茎叶；钩吻采自福建省龙岩市胡蔓藤种植基地，经福建中医药大学药学院黄泽豪教授鉴定为马钱科植物胡蔓藤*Gelsemium elegans*的全株。

利福平(Rif，上海麦克林生化科技有限公司，批号C11358910)；1，4-双[2-(3，5-二氯吡啶氧)]苯(TCPOBOP，美国Sigma公司，批号T1443)；4%多聚甲醛通用型组织固定液(武汉博士德生物工程有限公司，批号70085400)；苏木素染色液，伊红染色液，十二烷基硫酸钠-聚丙烯氨酰凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司，批号分别为20191106，20191015，20190605)；TRIzol试剂，实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司，批号分别为7E480F0，7E410L0)；逆转录试剂盒，预染蛋白Marker(赛默飞世尔科技公司，批号分别为00906776，00924042)；BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司，批号1127202012223)；CYP3A11，BCRP抗体(美国Abcam公司，批号分别为GR3249408-4，GR3229567-5)；β-肌动蛋白(β-actin)抗体，山羊抗兔二抗，山羊抗小鼠二抗(Proteintech中国公司，批号分别为10004156，20000164，20000175)；0.45 μm聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司，批号R0EB70106)。

1.3 仪器 PowerPac Basic型小型垂直电泳系统(美国Bio-Rad公司)；7900HT Fast型Real-time PCR仪(中国赛默飞世尔科技公司)；C1000 Thermal Cycler型逆转录仪，Universal Hood Ⅱ型凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)；ND2000C型RNA浓度测试仪(美国Thermo公司)；INFINITE 200 PRO型酶标仪(中国帝肯贸易有限公司)；生物ZT-14S型组织自动脱水机(湖北孝感市亚光医用电子技术有限公司)；JY-BMC型生物组织石蜡包埋机(湖北锦源医疗科技有限公司)；RM2235型切片机(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 药物制备 钩吻总碱及玉叶金花水部位的制备参照参考文献[3]，根据前期课题组小鼠急性毒性实验研究，选取小鼠存活率为95%的钩吻给药剂量，所得钩吻剂量为0.25 g·kg^{-1}(以生药质量计，下同)，前期实验研究得知钩吻配伍玉叶金花最佳配比为1∶40，故玉叶金花剂量为10g·kg^{-1}。

2.2 动物分组及给药 将62只C57BL/6小鼠随机分为空白组(n=10)，钩吻组(GE组，0.25 g·kg^{-1}，n=10)，钩吻配伍玉叶金花组(GE+MP组，0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1}，n=10)，钩吻+孕烷X受体(PXR)激活剂(利福平)组(GE+Rif组，0.25 g·kg^{-1}+50 mg·kg^{-1}，n=8)，配伍+利福平组(GE+MP+Rif组，0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1}+50 mg·kg^{-1}，n=8)，钩吻+组成型雄甾烷受体(CAR)激活剂(TCPOBOP)组(GE+TCP组，0.25 g·kg^{-1}+0.5 mg·kg^{-1}，n=8)，配伍+CAR激活剂组(GE+MP+ TCP组，0.25 g·kg^{-1}+10 g·kg^{-1}+0.5 mg·kg^{-1}，n=8)共7组，激活剂组每日腹腔注射激活剂，钩吻组及配伍组每日腹腔注射生理盐水，1 h后灌胃给药。给药后观察1 h，观察期间中毒致死者立即解剖取肝脏，连续给药14 d，记录小鼠生存情况，计算死亡率。

末次给药1 h后脱颈处死，摘取左肝，迅速置于液氮冷冻后转移入-80 ℃冰箱；摘取右肝，迅速放入4%多聚甲醛溶液中固定，备用。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察病理学改变 将固定好的右肝取出进行脱水包埋，将包埋好的蜡块切成薄片。常规脱蜡水化控干后，将切片放入苏木素染液染5 min，用水冲洗，加入分化液分化，自来水冲洗，返蓝液返蓝，流水冲洗。再将切片依次入梯度乙醇脱水各5 min，入伊红染液中染色5 min。切片依次放入无水乙醇Ⅰ 5 min，无水乙醇Ⅱ 5 min，二甲苯Ⅰ 5 min，二甲苯Ⅱ 5 min透明脱水，中性树胶

封片。普通电镜下观察。

2.4 Real-time PCR测定小鼠肝组织中基因BCRP, CYP3A11 mRNA表达 采用TRIzol法提取小鼠肝脏中总RNA,以总RNA 2 μg为模板,按说明书将总RNA逆转录为cDNA,冰浴条件下进行操作,逆转录完成后置于−20 ℃保存,备用。按试剂盒说明书进行操作,冰浴条件下进行操作,反应条件为95 ℃预变性30 s;95 ℃变性10 s,60 ℃退火延伸30 s,循环40次。测定目标基因(BCRP,CYP3A11)和内参基因(β-actin)的C_t值,采用$2^{-\Delta\Delta C_t}$表示各指标相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	序列	长度/bp
BCRP	上游5′-GCCTCTTGGTGAATCTCAGAAC-3′	145
	下游5′-CTGTTGTCCGTTACATTGAATCCT-3′	
CYP3A11	上游5′-CCTGGGTGCTCCTAGCAAT-3′	200
	下游5′-ACCATCAAACAACCCCCATGT-3′	
β-actin	上游5′-TGTCCACCTTCCAGCAGATGT-3′	101
	下游5′-AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG-3′	

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定小鼠肝组织中BCRP,CYP3A11蛋白表达 称取少量组织,加入预冷的含PMSF的裂解液于冰上研磨,4 ℃,14 000×g离心20 min。取上清即为蛋白样品。采用BCA法测定蛋白浓度,总蛋白质20 μg在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,PVDF膜转膜,5%牛血清白蛋白(BSA)溶液封闭后,加入相应一抗,置于冰上摇床孵育过夜。次日用TBST洗膜,而后室温孵育二抗,用TBST洗膜。凝胶成像仪预热15 min,按照ECL化学发光试剂盒说明书,添加显影液均匀覆盖在膜。放到暗箱中利用凝胶图像处理系统Image Lab软件分析目标条带灰度值,计算各组蛋白相对表达量。其中一抗浓度β-actin(1∶5 000),BCRP(1∶1 000),CYP3A11(1∶2 000);二抗浓度为鼠二抗(1∶5 000),兔二抗(1∶6 000)。

2.6 统计学方法 实验数据采用SPSS 22.0统计软件进行数据统计分析处理,结果以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较若符合正态性且方差齐性,采用最小显著性差异法(LSD),否则采用独立样本非参数检验。以$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠存活率的影响 给药14 d后,空白组小鼠无死亡;GE组小鼠存活率仅为40%,GE+MP组小鼠死亡现象有所缓解,存活率为80%,GE+Rif组小鼠存活率为25%,且此3组存活小鼠在观察期间也出现了精神萎靡、轻微抽搐的轻微中毒现象;GE+MP+Rif组,GE+TCP组及GE+MP+TCP组,此3组小鼠均无死亡(钩吻中毒现象发生于钩吻给药后1 h,若在观察期1 h内未出现中毒现象或死亡则不会再因为钩吻中毒而死,本实验中死亡小鼠均于观察期死亡,死亡后均被立即处理取材)。见表2。

表2 钩吻配伍玉叶金花对给药14 d后各组小鼠存活情况的影响

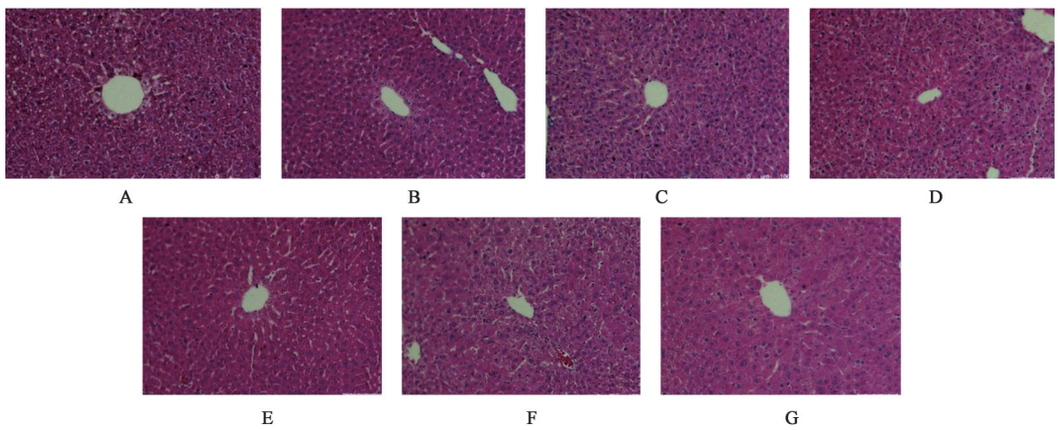
Table 2 Effect of *Gelsemium elegans* combined with *Mussaenda pubescens* on survival of mice in each group after 14 days of administration

组别	剂量/mg·kg^{-1}	总数/例	存活数/例	死亡数/例	存活率/%
空白		10	10	0	100
GE	250	10	4	6	40
GE+MP	250+1万	10	8	2	80
GE+Rif	250+50	8	2	6	25
GE+MP+Rif	250+1万+50	8	8	0	100
GE+TCP	250+0.5	8	8	0	100
GE+MP+TCP	250+1万+0.5	8	8	0	100

3.2 对小鼠肝组织病理的影响 空白组肝细胞呈放射状排列整齐,无明显病理变化,细胞形态规则,肝小叶结构完整,无肝细胞坏死和炎性细胞浸润;GE组小鼠肝脏细胞排列发生改变,细胞排列疏松,出现少量细胞坏死,胞质流失出现裂隙,产生空泡结构;GE+MP组肝细胞排列较为紧密,与GE组比较有所改善,整体状态与空白组相近;GE+Rif组小鼠肝脏细胞排列发生改变,细胞排列疏松,胞质流失严重,出现裂隙,产生大量空泡结构,出现少量细胞坏死,且出现肝细胞肿大;GE+MP+Rif组小鼠肝脏细胞肝细胞较为排列整齐,胞质部分流失,与GE+Rif组比较空泡结构与细胞裂隙明显减少,与GE+MP组比较细胞裂隙明显减少;GE+TCP组小鼠肝脏细胞出现明显肿大,细胞间出现少量裂隙,可见中心静脉充血;GE+MP+TCP组小鼠肝脏细胞肝细胞排列整齐,肝细胞出现明显肿大,与GE+TCP组比较其中心静脉充血现象已有缓解,与GE+MP组比较,肝细胞细胞裂隙减少但出现细胞肿大现象。见图1。

3.3 对小鼠肝组织中外排蛋白BCRP表达的影响

3.3.1 对小鼠肝组织中外排蛋白BCRP mRNA表达的影响 研究结果显示,与空白组比较,GE组小鼠BCRP mRNA相对表达量明显下调($P<0.05$)。与



A. 空白组；B. GE组；C. GE+MP组；D. GE+Rif组；E. GE+MP+Rif组；F. GE+TCP组；G. GE+MP+TCP组（图2，3同）

图1 钩吻配伍玉叶金花对小鼠肝组织病理的影响（HE，×200）

Fig. 1 Effect of *Gelsemium elegans* combined with *Mussaenda pubescens* on liver tissue of mice（HE，×200）

GE组比较，GE+MP组小鼠BCRP mRNA表达显著上调（P<0.01），玉叶金花配伍钩吻后相较于钩吻单独给药，其可有效上调BCRP mRNA表达。给予核受体激活剂后，与GE组比较，GE+Rif组小鼠BCRP mRNA有下调趋势，但差异无统计学意义；GE+MP+Rif组小鼠后BCRP mRNA明显上调（P<0.05），差异具有统计学意义。与GE+MP组比较，GE+Rif组，GE+MP+Rif组BCRP mRNA显著下调（P<0.01）。与GE+Rif组比较，GE+MP+Rif组显著上调（P<0.01）。配伍后组别均呈现上调趋势，再次证明钩吻配伍减毒机制与转运蛋白BCRP密不可分。见表3。

表3 钩吻配伍玉叶金花对C57BL/6小鼠肝细胞中BCRP mRNA表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 3 Effect of *G. elegans* combined with *M. pubescens* on BCRP mRNA expression in C57BL/6 mouse liver cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	剂量/mg·kg^{-1}	BCRP mRNA
空白		1.01±0.01
GE	250	0.75±0.05[1)]
GE+MP	250+1万	1.46±0.20[4)]
GE+Rif	250+50	0.66±0.14[6)]
GE+MP+Rif	250+1万+50	1.03±0.08[3,6,8)]

注：与空白组比较[1)]P<0.05，[2)]P<0.01；与GE组比较[3)]P<0.05，[4)]P<0.01；与GE+MP组比较[5)]P<0.05，[6)]P<0.01；与GE+Rif组比较[7)]P<0.05，[8)]P<0.01（表4同）。

3.3.2 对小鼠肝组织中BCRP蛋白表达的影响 与空白组比较，GE组BCRP蛋白表达显著下调（P<0.01）。与GE组比较，GE+MP组蛋白表达明显上调（P<0.05），GE+Rif组蛋白表达明显下调（P<0.05）。与GE+MP组比较，GE+MP+Rif组蛋白表达明显下调（P<0.05）。以上结果与mRNA检测的趋势一致。见图2，表4。

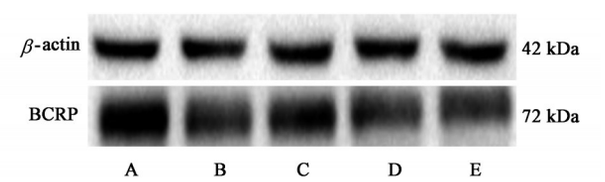


图2 C57BL/6小鼠肝细胞中BCRP蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of BCRP in C57BL/6 mouse hepatocytes

表4 钩吻配伍玉叶金花对C57BL/6小鼠肝细胞中BCRP蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 4 Effect of *G. elegans* combined with *M. pubescens* on BCRP protein expression in C57BL/6 mouse hepatocytes（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	剂量/mg·kg^{-1}	BCRP/β-actin
GE	250	0.76+0.07[2)]
GE+MP	250+1万	0.86+0.08[3)]
GE+Rif	250+50	0.66+0.02[3,6)]
GE+MP+Rif	250+1万+50	0.73+0.06[3,5)]

注：设空白组BCRP蛋白表达为1。

3.4 对小鼠肝组织中CYP3A11表达的影响

3.4.1 对小鼠肝组织中药物代谢酶CYP3A11 mRNA表达的影响 研究结果显示，与空白组比较，GE组小鼠CYP3A11 mRNA相对表达量有下调趋势。与GE组比较，GE+MP组CYP3A11 mRNA表达上调，但差异无统计学意义。与GE组比较，GE+TCP组CYP3A11 mRNA表达明显上调（P<0.05）；GE+MP+TCP组明显上调（P<0.05），差异具有统计学意义。与GE+MP组比较，GE+MP+TCP组CYP3A11 mRNA表达明显上调（P<0.05）。见表5。

表5 钩吻配伍玉叶金花对C57BL/6小鼠肝细胞中CYP3A11基因表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 5 Effect of *G. elegans* combined with *M. pubescens* on CYP3A11 gene expression in C57BL/6 mouse hepatocytes（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	剂量/mg·kg^{-1}	CYP3A11 mRNA
空白		1.00±0.00
GE	250	0.44+0.20
GE+MP	250+1万	0.70+0.18
GE+TCP	250+50	3.39+2.00[3)]
GE+MP+TCP	250+1万+50	3.58+2.17[3,5)]

注：与空白组比较[1)]P<0.05，[2)]P<0.01；与GE组比较[3)]P<0.05，[4)]P<0.01；与GE+MP组比较[5)]P<0.05，[6)]P<0.01；与GE+TCP组比较[7)]P<0.05，[8)]P<0.01（表6同）。

3.4.2 对小鼠肝组织中CYP3A11蛋白表达的影响

研究结果显示，与空白组比较，GE组CYP3A11蛋白表达显著下调（P<0.01）。与GE组比较，GE+MP组CYP3A11蛋白表达有上调趋势，但差异无统计学意义。与GE组比较，GE+TCP组，GE+MP+TCP组CYP3A11蛋白表达显著上调（P<0.01）。与GE+MP组比较，GE+TCP组，GE+MP+TCP组CYP3A11蛋白表达显著上调（P<0.01）。与GE+TCP组比较，GE+MP+TCP组CYP3A11蛋白表达明显上调（P<0.05）。以上结果与mRNA检测的趋势一致。见图3，表6。

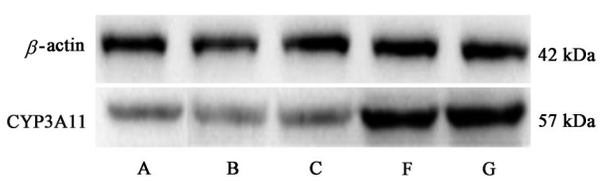


图3 C57BL/6小鼠肝细胞中CYP3A11蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of CYP3A11 in C57BL/6 mouse hepatocytes

表6 钩吻配伍玉叶金花对C57BL/6小鼠肝细胞中CYP3A11蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 6 Effect of *G. elegans* combined with *M. pubescens* on CYP3A11 protein expression in C57BL/6 mouse liver cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	剂量/mg·kg^{-1}	CYP3A11/β-actin
GE	250	0.69±0.05[2)]
GE+MP	250+1万	0.81±0.04
GE+TCP	250+50	1.54±0.12[4,6)]
GE+MP+TCP	250+1万+50	1.74±0.20[4,6,7)]

注：设空白组CYP3A11蛋白表达为1。

4 讨论

本实验发现，钩吻对于BCRP基因在转录及翻译水平上均有调节，对于CYP3A11基因在翻译水平存在调节，均表现为下调作用，致使外排蛋白BCRP，药物代谢酶CYP3A11表达减少，使毒性成分在体内积累的同时还抑制毒性成分的代谢从而中毒；配伍后，其对BCRP基因在转录及翻译水平上均有调节作用，对于CYP3A11基因调节作用不显著，二者均表现为上调，即配伍后外排蛋白BCRP，药物代谢酶CYP3A11表达的增多，加速了钩吻毒性成分的外排及代谢，从而减少毒性成分的积累达到减毒的效果。以此有效解释了本课题组前期研究表明玉叶金花配伍钩吻可有效抑制钩吻的毒性，降低死亡率的实验结果[3]。由此得知钩吻的中毒及解毒机制都与外排蛋白BCRP及药物代谢酶CYP3A11息息相关。

同时PXR和CAR在钩吻配伍玉叶金花前后，均存在调节作用。其中利福平与钩吻可能存在协同作用，致使BCRP表达减少，减少毒物外排加重毒物积累，从而加重毒性升高死亡率；而核受体CAR对此应存在一定的调节作用，其可一定程度上的上调CYP3A11的表达，加速毒物代谢从而减轻毒性。

ABC外排转运蛋白家族除去本文提到的BCRP外，还有P-糖蛋白（P-gp），多药耐药相关蛋白2（MRP2），也是目前的研究热点。后期实验也可检测钩吻对此两个指标的影响来进一步探讨确认其与外排蛋白的相关性。

核受体是配体激活转录因子，可调节一系列基因的表达，包括内源性物质，天然产物，药物和其他外源性物质等的代谢酶和转运体。其中核受体PXR和CAR是重要的组成成员，在调控体内转运蛋白（P-gp，MRP2和BCRP等）和代谢酶（CYP286，CYP3A4和CYP3A5等）过程中发挥着重要作用[7]。

代谢性核受体，特别是PXR，也称孕烷活化受体类固醇及外源性物质受体，是目前研究药物相互作用的研究热点，在肝脏、小肠等组织和器官中广泛表达。其主要参与外源性物质的代谢清除过程[8-9]。其众多靶基因中就包括ABC转运体家族的成员多药耐药基因1（MDR1，P-gp编码基因），BCRP，MRP2。而本实验中PXR激活剂利福平可上调PXR的表达，而在本次实验与钩吻连用后却增强了对BCRP表现为下调作用，推测其可能原因为①PXR对其下游BCRP可能存在下调作用；②利福平与钩吻连用产生药物相互作用致使钩吻毒性

增强;③钩吻对BCRP的下调的作用通过多条通路,与利福平连用后加强了其他通路致使其毒性增强。作用了临床更好的应用钩吻,后续实验中对于钩吻中毒及解毒的具体通路机制研究显得尤为重要。由此后续实验可以通过对BCRP的上游包括PXR在内的其他核受体的研究,进一部研究其可能的通路。

CAR也是核受体超家族中的重要一员,具有核受体家族类似的结构特征。CAR主要在肝脏和肠道表达,其他部位表达较少[10]。CAR参与调控多种药物代谢酶。CAR调控的Ⅰ相代谢酶包括CYP3A,CYP2B,CYP2C和CYP1A等[11]。本实验中加入核受体CAR激活剂后,相较于未加之前可明显看出上调CYP3A11的表达,其证明CAR对配伍前后的CYP3A11的表达存在调节作用,推测钩吻配伍前后对CYP3A11的影响可能与CAR有关。

除了PXR和CAR受体外,核受体家族中的其他成员在调控药物代谢酶和转运蛋白方面也发挥着重要作用。例如,芳香烃受体(AhR)可参与调控CYP1A1,CYP1B1,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(UGT1A1),UGT1A6及MDR1/3和MRP2/3的基因表达[12]。由此为了得知钩吻中毒及解毒的具体通路机制也可从此几个受体下手进一步研究。

同时本实验仅证明了钩吻在小鼠体内对BCRP,CYP3A11的影响,仅为体内实验的结果,后续可通过体外细胞实验研究其对外排转运体及药物代谢酶的影响,来增强整个实验体系的完整性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 许豪然,廖华军,王河山,等. 钩吻的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2016,25(10):37-38.
[2] 张华,吴水生,王英豪. 钩吻化学成分及临床应用研究进展[J]. 医药前沿,2015,5(19):9-11.
[3] 王英豪. 毒性中药钩吻配伍玉叶金花减毒机制研究[D]. 福州:福建中医药大学,2016.
[4] AYRTON A, MORGAN P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion [J]. Xenobiotica,2001,31(829):469-497.
[5] MIZUNO K, KATOH M, OKUMURA H, et al. Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4 [J]. Drug Metab Dispo,2009,37(2):195-217.
[6] PLANT N. The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation inter-individual variation and interaction networks[J]. Biochim Biophys Acta,2007,1770(3):478-488.
[7] MC KENNA N J , LANZ R B, O'MALLEY B W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology[J]. Endocr Rev,1999,20(3):321-344.
[8] CHEN Y K, TANG Y, GUO C X, et al. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug. metabolizing enzymes and drug transporters [J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83 (8): 1112-1126.
[9] HE L, ZHOU X, HUANG N, et al. Functions of pregnane X recepotor in self. detoxification[J]. Amino Acids,2017,49(12):1999-2007.
[10] BAES M,GULICK T,CHOI H S,et a1. A new orphan member of the nuclear hormone receptor Superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements[J]. Mol Cell Biol,1994,14(3):1544-1552.
[11] YOSHINARI K, YODA N, TORIYABE T, et al. Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5'-flanking region [J]. Biochemicalpharmacology, 2010, 79 (2): 261-269.
[12] HANADA K,NAKAI K,TANAKA H,et al. Effect of nuclear receptor downregulation on hepatic expression of cytochrome P450 and transporters in chronic hepatitis C in association with fibrosis development [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 27 (3): 301-306.

[责任编辑 王鑫]