

连翘脂苷 A 抑制 Caco-2 细胞膜上 P-糖蛋白的外排功能及作用机制探讨

孟祥乐^{1,2,3}, 郭艳丽², 苏成福², 黄海英^{2*}, 桂新景^{1,2}, 李学林^{1,2*}

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 河南中医学院, 郑州 450046;
3. 济源市农业科学院, 河南济源 459002)

[摘要] **目的:**探讨连翘脂苷 A 对人克隆结肠癌细胞(Caco-2)细胞膜上 P-糖蛋白(P-gp)的外排功能及作用机制。**方法:**采用刃天青法检测不同质量浓度连翘脂苷 A 对 Caco-2 的细胞毒性作用。以 P-gp 底物罗丹明 123(Rh-123)为荧光探针,采用流式细胞术评价不同质量浓度连翘脂苷 A 对 Rh-123 细胞蓄积的影响,考察不同质量浓度连翘脂苷 A 对 P-gp 三磷酸腺苷(ATP)酶活性的影响。**结果:**连翘脂苷 A 在 1~80 mg·L⁻¹时,与阴性组比较,差异无统计学意义,细胞存活率>90%,对 Caco-2 细胞形态无影响。连翘脂苷 A 的荧光强度较空白组显著增加,其中 80 mg·L⁻¹连翘脂苷 A 荧光强度(223.43±5.6)%增加最多。连翘脂苷 A 不同质量浓度均有抑制 P-gp ATP 酶耗能的作用。**结论:**连翘脂苷 A 可通过抑制 P-gp ATP 酶产生抑制 P-gp 外排的作用。

[关键词] 连翘脂苷 A; P-糖蛋白; 罗丹明-123; 流式细胞术; 三磷酸腺苷酶; 金银花

[中图分类号] R945;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150713.1507.014.html>

[网络出版时间] 2015-07-13 15:07

Discussion of Inhibitory of Forsythoside A on Efflux Function and Mechanism of P-glycoprotein in Caco-2 Cell Membrane MENG Xiang-le^{1,2,3}, GUO Yan-li², SU Cheng-fu², HUANG Hai-ying^{2*}, GUI Xin-jing^{1,2}, LI Xue-lin^{1,2*} (1. *The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450000, China*; 2. *Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China*; 3. *Jiyuan Academy of Agricultural Sciences, Jiyuan 459002, China*)

[Abstract] **Objective:** To discuss effect of forsythoside A (FTA) on efflux function and mechanism of P-glycoprotein (P-gp) in Caco-2 cell membrane. **Method:** Caco-2 cell viability was measured by resazurin assay in the presence of FTA at different concentrations. Effects of FTA and verapamil (inhibitor of P-gp) on cellular drug accumulation in caco-2 cells were investigated, rhodamine 123 (R-123) measured by flowcytometer, was selected as fluorescent probe. Caco-2 cell membrane were exposed to FTA with different concentrations and then ATPase activity of P-gp was assayed. **Result:** Viability of cells treated by FTA (1-80 mg·L⁻¹) was above 90%, difference was not statistically significant by compared with the negative group, which suggested that Caco-2 cells could maintain their viability under these experiment conditions. Fluorescence intensity of FTA significantly increased by comparing with the blank group, Rh-123 accumulation reached maximum levels of (223.43±5.6)% when the concentration of FTA was 80 mg·L⁻¹. FTA treatments decreased P-gp ATPase activity in Caco-2 cell membranes expressing P-gp. **Conclusion:** FTA can modulate drug efflux by inhibiting P-gp activity in Caco-2 cell

[收稿日期] 20150327(004)

[基金项目] 国家自然科学基金-河南联合基金项目(U1304824);河南中医学院第一附属医院博士科研基金项目(2012KJ30);河南中医学院苗圃工程项目(MP2013-15)

[第一作者] 孟祥乐,博士,主管药师,从事临床中药学研究,Tel:0371-66233562, E-mail:leleminsk@126.com

[通讯作者] * 黄海英,博士,副教授,从事中药药剂学研究,Tel:0371-66233562, E-mail:huang.haiying@126.com;

* 李学林,主任药师,博士生导师,从事临床中药学研究,Tel:0371-66245142, E-mail:lixuelin450000@163.com

membrane.

[Key words] forsythoside A; P-glycoprotein; rhodamine-123; Caco-2 cell; flow cytometry; ATPase; Lonicerae Japonicae Flos

金银花又名忍冬、银花、双花等,为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带开的花,能宣散风热、清热解毒,临床用于各种热性病,如身热、发疹、发斑、热毒疮痍、咽喉肿痛等。连翘又名旱连子、大翘子、空壳,为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,功效清热解毒、消肿散结、疏散风热,主治痈肿疮毒、痰核瘰疬、外感风热、温病初起、热淋涩痛等。金银花、连翘为中药配伍中最常用的药对。研究发现金银花单用时,咖啡酰类物质口服生物利用度均较差,肠吸收较弱,而与连翘配伍使用后,金银花中主要有效成分(新绿原酸,3,4-二咖啡酰奎宁酸)的肠吸收渗透系数显著高于单用时,推测原因可能是由于连翘脂苷A抑制了肠道P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的外排功能,而导致药物吸收增加^[1]。

连翘脂苷A是迄今为止从连翘中发现的药理活性最强的活性成分之一^[2,4],对黄色葡萄球菌等11种致病菌均有极强的抑制作用,并具有抗病毒、抗炎、解热、抗氧化等作用。Zhou等^[5]通过体外细胞实验研究发现,连翘脂苷A可能与体内P-gp转运蛋白有关。人克隆结肠癌细胞(Caco-2)细胞模型被认为是进行药物吸收研究最好的体外模型之一,重复性好,与药物体内吸收具有良好相关性,且能过度表达P-gp,可用于研究P-gp外排转运体对药物肠道吸收的影响。本实验选用Caco-2细胞,采用罗丹明123(Rh-123)为P-gp探针药物考察连翘脂苷A对Rh-123细胞蓄积的影响,并通过P-gp三磷酸腺苷(ATP)酶活性试验验证其对P-gp的作用机制,阐明连翘脂苷A对P-gp功能的影响,揭示其抑制P-gp外排功能的机制。

1 材料

150L型二氧化碳培养箱(美国Thermo公司),G2-88B型涡旋混合器(海门其林贝尔公司),800型离心机(上海厚街器械厂),FACSVantage SE型流式细胞仪(美国BD公司),Pgp-Glo型测试系统(美国Promega公司)。胰蛋白酶,罗丹明123(Rh-123),刃天青,二甲基亚砜(DMSO),噻唑蓝(MTT)和维拉帕米均购自美国Sigma公司;连翘脂苷A对照品(中国食品药品检定研究院,批号13060108),达尔伯克必需基本培养基(DMEM培养基,北京Solarbio),胎

牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),P-糖蛋白(P-gp)ATP酶试剂盒(美国Promega公司),Caco-2细胞株(中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,33~45代)。

2 方法与结果

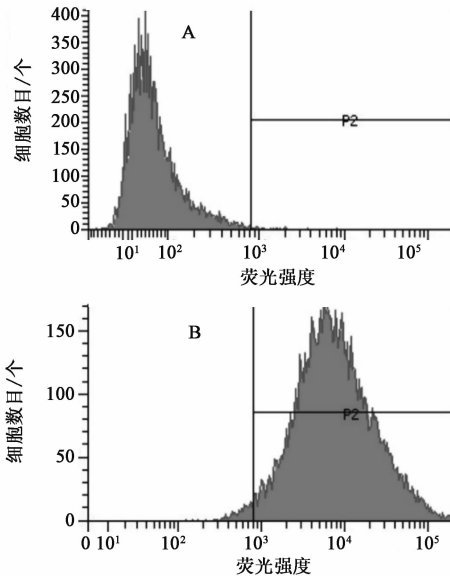
2.1 细胞培养 Caco-2细胞在37℃,5% CO₂的环境中培养,采用DMEM培养基(含10%胎牛血清)。细胞按2×10⁴个/mL接种于25 cm²培养皿中,培养至80%~90%融合,用于药物的细胞试验。

2.2 药物对Caco-2细胞毒性的检测 采用刃天青法。将Caco-2细胞接种于96孔板,100 μL/孔,每1 mL含8×10⁴个细胞,加入含药培养基100 μL,分为空白组(无细胞),阴性组(无药物)和试验组,每种浓度设6个平行孔。在二氧化碳培养箱中孵育24 h后,加入0.1 mol·L⁻¹刃天青溶液22 μL孵育3 h后,震荡10 min。在全波长酶标仪上读取570 nm和600 nm处吸光度A的差值(A_{570 nm} - A_{600 nm}),计算细胞存活率。结果显示连翘脂苷A在1~80 mg·L⁻¹时,与阴性组比较,试验组差异无统计学意义,细胞存活率>90%,表明在此质量浓度范围内,药物对细胞无毒性;>80 mg·L⁻¹时,差异有统计学意义,细胞存活率<90%,表明在此质量浓度范围内,药物对细胞有毒性。故在流式细胞术中,采取1~80 mg·L⁻¹给药对Caco-2细胞形态无影响。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{试验组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.3 时间对Rh-123摄取时间的影响 消化、收集单层Caco-2细胞,制成单细胞悬液,离心(1 500 r·min⁻¹,3 min),弃去上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS)分散成细胞密度5×10⁵个/mL的细胞悬液,接种至1.5 mL离心管中(1 mL/管)。加入500 μmol·L⁻¹ Rh-123溶液(10 μL/管),轻轻震荡混匀,空白管加水(10 μL/管),于37℃,5% CO₂培养不同时间(15,30,45,60,75,90 min)。每到1个时间点,随机取出1批细胞,置冰上终止转运,4℃离心(2 500 r·min⁻¹,5 min,下同)后弃去上清液,冰冷的PBS液洗2次,4℃离心,弃去上清液,加PBS 0.5 mL轻轻吹打,制成单细胞悬液,利用流式细胞仪进行检测。流式细胞术为选择异硫氰酸荧光素(FITC)通道检测并收集此处Rh-123的荧光进行分析,激发波长488 nm,发射波长530 nm。分析时设门以除去细胞碎片

和细胞团块对测定的干扰,以上试验重复 5 次,见图 1。结果显示 Rh-123 可进入细胞产生荧光,较空白组荧光细胞数量明显增多,由于 Rh-123 是 P-gp 的底物,随着时间的延长,P-gp 将细胞内的 Rh-123 排出细胞外,在 90 min 时吸收和泵出达到平衡。



A. 未加入罗丹明-123; B. 加入罗丹明-123

图 1 时间对 Rh-123 摄取的影响

Fig. 1 Effect of time on uptake of Rh-123

2.4 连翘脂苷 A 对 Rh-123 外排的影响 消化、收集 Caco-2 细胞,方法同 2.3 项,用冰冷的 PBS 洗涤 2 次,加入不同质量浓度的连翘脂苷 A 含药培养基或空白培养基,于 37 °C,5% CO₂ 分别培养 90 min 后,置冰上终止孵育。4 °C 离心,弃去上清液,加冰冷的 PBS 洗涤 2 次,4 °C 离心,弃去上清液,加 PBS 0.5 mL 轻轻吹打,制成单个细胞悬液,利用流式细胞仪进行检测 ($n = 6$)。结果发现不同质量浓度的连翘脂苷 A (20, 40, 60, 80 mg · L⁻¹) 的荧光强度分别为 (125.42 ± 3.4)%, (167.42 ± 3.9)%, (207.98 ± 4.2)%, (223.43 ± 5.6)%, 较空白组的荧光强度 (100%) 显著增加 ($P < 0.05$)。不同质量浓度的连翘脂苷 A 对 P-gp 均有一定抑制作用,且具有浓度依赖性,随质量浓度增加,其抑制作用越强。

2.5 连翘脂苷 A 的 P-gp ATP 酶活性测定 通过测定酶促反应释放的无机磷 (Pi) 的含量来确定 ATP 酶的活性改变情况。反应在 96 孔板中加入 P-gp-发光 (Pgp-Glo) 缓冲液 20 μL 作为空白组,加入 0.25 mmol · L⁻¹ 钒酸钠 20 μL 作为 P-gp 抑制剂组,加入 0.5 mmol · L⁻¹ 维拉帕米 20 μL 作为 P-gp 底物组,加入以 Pgp-Glo 缓冲液配置的药物连翘脂苷 A 组 (50,

80, 100, 200 mg · L⁻¹), 每组设置 4 个副孔。每孔均加入重组人的 P-gp 细胞膜片段 20 μL, 置于 37 °C 生化培养箱中孵育 5 min。每孔加入 25 mmol · L⁻¹ MgATP 10 μL, 轻轻振荡混匀,以激发使反应开始,在 37 °C 反应 40 min,使药物与 P-gp 蛋白充分反应。停止反应后加入 ATP 检测溶液 50 μL,混匀,终止反应,室温继续孵育 20 min,使反应产物生成荧光信号,利用 Pgp-Glo 测试系统进行荧光强度检测。结果显示钒酸钠作为 P-gp 抑制剂组的荧光强度 (4.27×10^6) 较空白组 (4.15×10^6) 有所增加,提示其可以抑制试剂中可能的 P-gp 底物所激发的 P-gp 耗能反应。P-gp 底物组维拉帕米的荧光强度 (3.87×10^6) 较空白组荧光强度降低,具有显著性差异 ($P < 0.05$),提示其可以激发 P-gp 蛋白消耗 ATP 能量。不同质量浓度连翘脂苷 A 组的荧光强度分别为 3.56×10^6 , 3.93×10^6 , 3.99×10^6 , 4.09×10^6 , 均有抑制 P-gp 耗能的作用。

3 讨论

P-gp 是一种相对分子质量 170 kDa 的跨膜糖蛋白,主要分布于细胞膜上,是 ABC-B1 基因 (MDR1) 编码产物。早期 P-gp 转运机制及其抑制剂的研究较多,现已拓展为研究新药筛选、新药评价和药物相互作用 (drug-drug interaction, DDI) 等方面^[6], Zhang 等^[7] 研究附子-甘草药对时发现,有 P-gp 抑制剂存在时,主要有效成分在体内浓度显著增高。提示基于药物对 P-gp 的作用是研究中药联用规律的发展趋势。

Rh-123 是经典的 P-gp 功能探针药物,可用于快速检测药物是否为 P-gp 的底物或抑制剂^[8]。本文以 Rh-123 为探针底物,检测连翘脂苷 A 对 P-gp 的外排作用,结果发现不同质量浓度连翘脂苷 A 均可抑制 P-gp 对 Rh-123 的外排,对 P-gp 有一定抑制作用,且与浓度呈正相关。证实连翘脂苷 A 是 P-gp 的抑制剂。这可能是连翘脂苷 A 增加金银花中咖啡酰类成分吸收的主要原因。

P-gp 作为一种能量依赖性药物外排泵,P-gp 外排的机制为 P-gp 底物可通过和其中的氨基酸位点结合,激活 P-gp ATP 酶,释放出 ATP 分子,导致药物结合口袋周围 TM 域(如 TM1 和 TM2)的重排,引起药物的外排^[9]。P-gp 抑制剂主要通过抑制 P-gp ATP 酶,降低 P-gp 对药物外排,增加药物的吸收。通过观察连翘脂苷 A 对 P-gp ATP 酶活性发现,不同质量浓度连翘脂苷 A 对 P-gp ATP 酶活性均有抑制作用,但抑制作用与浓度呈反比,质量浓度越低,抑

制 P-gp ATP 酶的作用越强。

通过研究连翘脂苷 A 对 P-gp 外排功能发现,连翘脂苷 A 主要是通过抑制 P-gp ATP 酶活性,对 P-gp 的外排有抑制作用,从而减少对咖啡酰类药物的外排,增加后者在体内吸收。该结果从分子学角度提示金银花-连翘药对联用增效的机制与 P-gp 蛋白外排功能有关,且二者在量的配比上非常重要。

[参考文献]

[1] 周伟. 基于“银翘”药对的中药制剂生物有效性综合评价体系的构建与应用[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.

[2] 冯淑怡, 李先荣, 孙建宁. 连翘酯苷抗感染、解热作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(10): 73-75.

[3] 胡克杰, 徐凯建, 王跃红, 等. 连翘酯苷体外抗病毒作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2001, 8(2): 89-93.

[4] 曲正义, 金银萍, 孙成贺, 等. RP-HPLC 同时测定向日葵当中苯乙醇苷类化合物 crenatoside 和类叶升麻苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 87-89.

[5] Zhou W, Di L Q, Wang J, et al. Intestinal absorption of forsythoside A in *in situ* single-pass intestinal perfusion and *in vitro* Caco-2 cell models[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(8): 1069-1079.

[6] Pal D, Mitra A K. MDR-and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions [J]. Life Sci, 2006, 78(18): 2131-2145.

[7] Zhang J M, Liao W, He Y X, et al. Study on intestinal absorption and pharmacokinetic characterization of diester diterpenoid alkaloids in precipitation derived from Fuzigancao herb-pair decoction for its potential interaction mechanism investigation[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(1): 128-135.

[8] Schwab D, Fischer H, Tabatabaei A, et al. Comparison of *in vitro* P-glycoprotein screening assays: recommendations for their use in drug discovery[J]. J Med Chem, 2003, 46(9): 1716-1725.

[9] Aller S G, Yu J, Ward A, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding [J]. Science, 2009, 323(5922): 1718-1722.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种, 其中中国出版的英文期刊 194 种, 中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记); 扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点, 自提供使用以来, 深受用户好评, 被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库, 曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。