

香附醋制前后对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白功能和表达的影响

李淑雯*, 胡志方

(江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 334000)

[摘要] **目的:**通过研究香附醋制前后对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白(P-gp)功能和表达的影响,初步阐明“香附醋制增效”理论的机制。**方法:**采用 Caco-2 细胞模型,细胞以 2×10^5 /mL 的密度接种于 Trenswell 6 孔板,加入体积分数分别为 5%、10%、20% 的香附生品及醋制品含药血清培养 24 h,流式细胞仪检测香附醋制前后对 Caco-2 细胞 Pgp 功能的影响;免疫组化法检测 P-糖蛋白的表达。**结果:**香附生品低、中、高浓度可使细胞内地高辛累积增加 8.25%、9.57%、16.84%,醋制品低、中、高浓度可使细胞内地高辛累积增加 22.44%、29.12%、33.09%。二者均可使细胞内地高辛累积增加,并使 P-gp 表达的阳性率降低,对 P-gp 功能和表达均呈现出抑制作用,且醋制品作用更加明显。**结论:**香附醋制后可增加其抑制 Caco-2 细胞 P-gp 功能和表达的作用,从而促进 P-gp 底物的吸收。

[关键词] 香附;醋制;Caco-2 细胞;P-糖蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0217-03

[doi] 10.11653/syjf2013160217

Effects of Vinegar Processing *Cyperus rotundus* on the Expression and Function of P-glycoprotein in Caco-2 Cells

LI Shu-wen*, HU Zhi-fang

(Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 334000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of vinegar processing *Cyperus rotundus* on the expression and function of P-glycoprotein (P-gp) in Caco-2 cells. **Method:** The function of P-gp in Caco-2 cells was measured by FCM and the expression was by immunohistochemistry after the interaction between the cell (2×10^5 /mL) and the medicine of concentration (5%, 10%, 20%). **Result:** The low, medium, high concentration of crude *C. rotundus* could increased 8.25%, 9.57%, 16.84% of the accumulation of digaoxi, vinegar processing *C. rotundus* could increase 22.44%, 29.12%, 33.09% of the accumulation of digaoxi. Serum containing crude and vinegar processing *C. rotundus* could remarkably increase the accumulation of digaoxi and decrease the positive rate of P-gp's expression. **Conclusion:** *C. rotundus* after vinegar processed can promote the function of inhibiting the expression and function of P-gp in Caco-2 cells.

[Key words] *Cyperus rotundus*; vinegar processing; Caco-2; P-gp

P-糖蛋白(P-gp)是三磷酸腺苷(ATP)依赖性转运蛋白,为外排型转运体,能减少药物的跨膜转运,成为药物吸收的障碍。P-gp 可在许多组织中表达,这些组织大多位于药物吸收、分布、代谢与排泄的关

键部位,它在药物的细胞摄取、细胞内分布、代谢与排泄过程中发挥重要作用。P-gp 与底物及调节子之间的相互作用能影响药物的吸收、分布、代谢、排泄^[1]。研究表明,许多中药或提取物可通过各种机制抑制 P-gp 对其他药物的外排,从而增加药物浓度,提高药效^[2]。香附始载于《名医别录》,具有疏肝理气、调经止痛的功效,为妇科调经止痛的要药,素有“气病之总司,女科之主帅”之美称^[3-4]。醋制是香附的主要炮制法之一,香附醋制能增强疏肝理气、止痛作用,醋制后不仅化学成分发生了显著的变

[收稿日期] 20130128(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160520);江西省自然科学基金项目(20122BAB205076)

[通讯作者] *李淑雯,博士,副教授,从事中药药理研究工作, Tel:15879846716, E-mail:709339664@qq.com

化,且镇痛作用均有所增强^[5]。本研究采用人类结肠癌细胞系 Caco-2 细胞模型,研究了香附醋制前后对人类肠道 P-gp 功能和表达的影响,以期初步阐明“香附醋制增效”理论的作用机制与 P-gp 的相关性,为中药炮制增效机制的研究提供依据。

1 材料

1.1 动物与细胞 SD 大鼠 30 只,体重 180~200 g,雌雄各半,SPF 级,由湖南省实验动物中心提供,批号湘监证字 2012A016。

1.2 药物与试剂 实验用药材来源于江西省药材公司,经鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎;地高辛(Sigma 公司);维拉帕米(Sigma 公司,批号 v4629)。碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 A0592)。

1.3 仪器 3000 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Revco 公司);超净工作台(苏州净化设备厂),TGLL-16B 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),MODEL 680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),流式细胞仪(美国 Bio-Rad 公司),电子天平[(梅特勒-托利多(上海)公司)],PE15-55 荧光分光光度计(美国 PE 公司)。

2 方法

2.1 样品制备 香附为莎草科植物莎草的干燥根茎香附生品。原药材,拣去杂质,备测;醋制香附:取净香附 400 g,加 20% 醋拌匀,闷透,置锅内炒干,取出放凉。

2.2 含药血清的制备 大鼠 30 只,随机分为 3 组,分别为生品组、醋制品组、空白对照组。给药组分别 ig 香附生品与醋制品水提取液,提取液质量浓度为 1 g·mL,空白组 ig 生理盐水,ig 容量均为 20 mL·kg⁻¹,每日给药 2 次,早晚各 1 次,连续给药 1 周,于末次给药后 1 h 取血,采集的全血于 4 °C 静置 2 h 后,低温离心机离心,3 500 r·min⁻¹,离心 15 min,分离血清,经 56 °C 恒温灭活 30 min 处理后,在超净台上用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20 °C 保存备用,实验分为 5%,10%,20 含药血清 3 个剂量组。

2.3 细胞培养

2.3.1 Caco-2 单层细胞模型 将处于对数生长期的 Caco-2 细胞以 2 × 10⁵/mL 的密度接种于 Trewswell 6 孔板,每个孔由聚碳酸酯膜分隔成为上、下两个室(上侧室为肠腔侧,下侧室为基底侧),置 37 °C 5% CO₂ 孵箱静置培养,每天更换 1 次培养液,直至细胞形成完全致密的单层膜。

2.3.2 Caco-2 细胞毒性测定 采用 MTT 法检测细

胞活力。将生长良好的细胞以 2 × 10⁵/mL 密度接种于一块 96 孔板中,每孔 150 μL,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h,置于 37 °C 培养箱中过夜,待细胞完全贴壁后,每孔加液 150 μL,分别为 10% 体积分数的香附醋制品及生品含药血清培养液、空白血清培养液,置于 37 °C 培养箱中培养 24 h。各孔加入 20 μL MTT(5 g·L⁻¹),在培养箱中 37 °C 孵育 4 h。吸去上清,每孔加入 DMSO 150 μL,微孔振荡器上振荡 10 min,酶标仪检测 550 nm 波长的吸光度(A)。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (\text{实验孔 } A / \text{空白对照孔 } A) \times 100\%$$

2.4 与地高辛相互作用的研究 将处于对数生长期的 Caco-2 细胞用 PBS 冲洗 2 次,0.25% 胰酶消化,终止消化后 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。弃上清,用 PBS 反复洗涤、悬浮、高速离心制作细胞悬液,接种于 EP 管中,离心去上清。将细胞孔分为对照组,维拉帕米组,生品组、醋制品组,每组加入地高辛培养,PBS 冲洗,离心去上清,用流式细胞仪测定荧光强度。

2.5 对 P-gp 表达的影响 将 Caco-2 细胞用胰酶消化,接种于细胞培养板内 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养后,加入生品与醋制品含药血清培养 24 h。用免疫细胞化学 SP 法染色,光学正置显微镜下观察,记录表达阳性细胞数和总细胞数,分别计算阳性率和抑制率。

$$\text{阳性率} = \text{阳性细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = (\text{空白组阳性率} - \text{药物组阳性率}) / \text{空白组阳性率} \times 100\%$$

2.6 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的显著性检验运用 SPSS 13.0 软件提供的非参数检验和单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对细胞毒性的影响 表 1 结果显示,与空白血清相比,生品与醋制品含药血清细胞存活率均在 98% 以上。

表 1 香附生品和香附醋制品含药血清对细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	体积分数	A	存活率/%
空白血清	10	0.301 ± 0.008	100 ± 8.26
香附生品血清	10	0.289 ± 0.007	98.15 ± 10.23
香附醋制品血清	10	0.303 ± 0.005	101.14 ± 13.25

3.2 与地高辛相互作用 表 2 结果表明,阳性对照组细胞内荧光强度显著高于空白对照组($P < 0.05$),说明维拉帕米对地高辛的外排有明显抑制

作用;各给药组荧光强度均强于空白对照组($P < 0.05$),说明香附生品与醋制品对 P-gp 的功能均有一定抑制作用;与生品组相比,醋制品中、高剂量作用更强($P < 0.05$)。

表 2 香附生品和香附醋制品含药血清对 Caco-2 细胞中地高辛摄取的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞内荧光强度	荧光强度 增加率/%
空白对照	-	109.09 ± 5.70	0
维拉帕米 ³⁾	50	159.12 ± 3.70 ¹⁾	45.23
香附生品 ⁴⁾	20	119.17 ± 3.20	8.25
	40	120.22 ± 2.71	9.57
	80	127.41 ± 4.13 ¹⁾	16.84
香附醋制品 ⁴⁾	20	133.14 ± 2.17 ¹⁾	22.44
	40	141.21 ± 5.31 ^{1,2)}	29.12
	80	145.01 ± 4.44 ^{1,2)}	33.09

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$;与香附生品组相比²⁾ $P < 0.05$;³⁾维拉帕米浓度为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ⁴⁾20,40,80 mg·L⁻¹ 相当于含药血清体积分数为 5%,10%,20%(表 3 同)。

3.3 对 P-gp 表达的影响 表 3 结果显示,香附生品及醋制品均能抑制 Caco-2 细胞上 P-gp 表达($P < 0.05$),且醋制品中、高剂量作用更强($P < 0.05$)。

表 3 香附生品和香附醋制品含药血清对 Caco-2 细胞中 P-gp 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	阳性率 /%	抑制率 /%
空白对照	-	88.9 ± 5.70	-
香附生品 ⁴⁾	20	82.07 ± 2.20	7.7
	40	77.11 ± 2.71	13.26
	80	70.54 ± 3.57 ¹⁾	20.65
香附醋制品 ⁴⁾	20	73.41 ± 3.13	17.42
	40	69.09 ± 5.04 ¹⁾	22.28
	80	53.51 ± 3.49 ^{1,2)}	29.69

4 讨论

P-gp 是由 MDRI 基因编码的能量(ATP)依赖性膜蛋白,在 ATP 供应充足的条件下,P-gp 将与之结合的药物从细胞内泵出。许多中药成分可以从转录和翻译水平抑制 P-gp 的表达而抑制 P-gp 的功能,从而提高药效^[6-7]。目前,国内、外已普遍采用组织细胞模型作为 P-gp 介导的药物相互作用的研究工具,Caco-2 细胞保留了 P-gp 高表达特性。目前,Caco-2 细胞模型可在细胞水平上提供药物分子透过小肠黏膜的吸收、分布、代谢、转运以及毒性的综合信息,已成为研究药物吸收机制和药物相互作用等的重要手段^[8-9]。Caco-2 细胞的外排现象,可初步判断药物是否存在与外排型转运体,包括 P-gp 等^[10]。醋制是香附的主要制法之一,自宋代以来记载有醋汤煎、醋盐煮、酒醋炒、醋炒、醋煮等方法^[11]。香附醋制能增强疏肝理气止痛作用。本研究以 P-gp

为切入点,观察了香附醋制后对 P-gp 功能的影响。本实验采用 Caco-2 细胞模型,MTT 法检测细胞活力,结果符合要求。地高辛是 P-gp 的特异性经典底物,常被用作细胞膜上 P-gp 功能研究的工具药物,其外排量和转运量的变化能较好的代表 P-gp 功能的改变,本实验结果显示,香附生品与醋制品均可使细胞内地高辛的累积增加,并使 P-gp 的阳性率减少,抑制了细胞膜上 P-gp 的功能和表达,且醋制品作用更为明显。实验结果初步表明,香附醋制后对 P-gp 的功能和表达呈现出抑制作用,其醋制增效的机制可能为抑制 P-gp 对药物的外排,从而增加药物浓度,提高药效有关。

[参考文献]

- [1] 邹亮,冷静,胡慧玲,等. P-糖蛋白方法用于中药药性理论研究的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):319.
- [2] Lagas J S, van Waterschoot R A B, Sparidans R W, et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation [J]. Mol Cancer Ther,2010,9(2):319.
- [3] 刘艳红,张晓燕. 香附的炮制方法及理论研究概况[J]. 山西医药杂志,2011,40(1):71.
- [4] 周中流,刘永辉. 香附提取物的抗抑郁活性及其作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):191.
- [5] 孙昌云,潘小毛. 香附的炮炙与临床应用[J]. 中医药临床杂志,2008,20(1):69.
- [6] 高秀蓉,蒋学华,王凌,等. 基于大鼠在体单向肠灌注模型研究 P-糖蛋白抑制剂对蝙蝠葛碱肠吸收的影响[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(1):1016.
- [7] Colabufo N A, Berardi F, Perrone M G, et al. Substrates, inhibitors and activators of P-glycoprotein: candidates for radiolabeling and imaging perspectives [J]. Curr Top Med Chem, 2010, 10(17):1703.
- [8] Hellinger E, Bakk M L, Pocza P, et al. Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures [J]. Eur J Pharm Sci,2010,41(1):96.
- [9] Schrickx J, Fink gremmels J. P-glycoprotein-mediated transport of oxytetracycline in the Caco-2 cell model [J]. J Vet Pharmacol Ther,2007(30):25.
- [10] 蔡润兰,王敏,齐云,等. Caco-2 细胞模型验证指标的选择与评判 [J]. 中国药学杂志,2008,43(24):1871.
- [11] 王静,毛春芹,陆兔林. 中药醋制法研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(1):99.

[责任编辑 聂淑琴]