

· 药理 ·

大黄酸对 Caco-2 细胞多药耐药蛋白转运体表达的影响

杨娜¹, 隋峰², 李沧海², 李兰芳², 张畅斌³, 郭淑英², 朱晓新^{1,2*}, 姜廷良^{2*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069;

2. 中国中医科学院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700;

3. 南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的: 探讨大黄酸对人结肠腺癌上皮细胞 (Caco-2) 多药耐药蛋白 mRNA 表达的影响。方法: 用大黄酸作用于 Caco-2 细胞, 采用荧光定量 PCR (real time PCR) 法检测转运体 MRP1-5 mRNA 的表达量, 数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。结果: 高 (5.00 mg·L⁻¹) 低 (2.50 mg·L⁻¹) 质量浓度大黄酸均可以显著上调 Caco-2 细胞 MRP3 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 低浓度大黄酸可以显著下调 Caco-2 细胞 MRP5 mRNA 表达 ($P < 0.05$); 大黄酸对 MRP1, MRP2 和 MRP4 mRNA 的表达没有显著影响。结论: 大黄酸可能通过上调 Caco-2 细胞 MRP3 mRNA 的表达和下调 MRP5 mRNA 的表达而影响其口服药物的生物利用度。

[关键词] Caco-2 细胞; 大黄酸; 荧光定量聚合酶链反应; 多药耐药蛋白

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)09-0133-04

Effects of Rhein on Expression of Multi-drug Resistance Protein in Caco-2 Cells

YANG Na¹, SUI Feng², LI Cang-hai², LI Lan-fang², ZHANG Chang-bin³,
GUO Shu-ying², ZHU Xiao-xin^{1,2*}, JIANG Ting-liang^{2*}

(1. The School of Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of rhein on the expression of multi-drug resistance protein (MRP)1-5 in Caco-2 cells. **Method:** Caco-2 cell line was stimulated with rhein. Then the expression levels of MRP1-5 were detected by the method of real-time PCR; the data were processed by the method of $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Result:** Both the high (5.00 mg·L⁻¹) and the low (2.50 mg·L⁻¹) concentrations of rhein could up-regulate the expression level of MRP3 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the low concentration of rhein can down-regulate the expression level of MRP5 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Up-regulating the expression level of MRP3 mRNA or down-regulating the expression level of MRP5 mRNA in Caco-2 cells may be part of the molecular mechanisms for rhein to exert its affect on the bioavailability of other oral drugs.

[Key words] Caco-2 cell; rhein; real-time PCR; multi-drug resistance protein

[收稿日期] 2011-01-30

[基金项目] 国家“十一五”科技重大专项综合性中药新药研究开发技术大平台 (2009ZX09301-005)

[第一作者] 杨娜, 硕士, 从事中药药理, Tel: 13810117843, E-mail: yona.yangna@gmail.com

[通讯作者] *朱晓新, 研究员, 博士生导师, 从事中药复方药代动力学, Tel: 010-64056154, E-mail: zhuxiaoxin@mail.cintem.ac.cn

*姜廷良, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理与新药开发, Tel: 010-64041008, E-mail: jiangt2005@sohu.com

转运体是存在于多种组织的一类跨膜转运蛋白。研究表明:药物的体内过程,包括吸收、分布、代谢、排泄等均涉及到药物对生物膜的穿透性。在这些过程中,转运体对其特定的药物底物发挥着关键性的介导作用。多药耐药蛋白(multi-drug resistance protein, MRP)是转运体家族的重要成员,其依赖于 ATP 供能,可将胞内底物转出胞外^[1]。大黄酸(rhein)既是中医临床常用中药—大黄的主要活性成分之一,又广泛分布于何首乌、虎杖等蓼科植物中,具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、调解肾功能等多种药理活性^[2]。

为进一步探讨和研究中药口服和中西药合用后在吸收环节上的相互作用和可能的分子作用机制,本研究在以往工作的基础上,以人结肠腺癌上皮细胞(Caco-2 细胞)为研究平台,在体外以 MRP 转运体 5 个亚型——MRP1-5 为主要观察对象,采用荧光定量 PCR(real-time PCR)的方法,研究了不同剂量的大黄酸对 MRP 各亚型基因表达的干预和调节作用。

1 材料

1.1 细胞 人结肠腺癌上皮细胞 Caco-2 细胞(ATCC, american type culture collection, rockville, MD, USA)。

1.2 药物与试剂 大黄酸对照品(纯度 $\geq 98\%$),购自北京嘉信众义科技有限公司;DMEM($\times 500$ mL),批号 8109084, Invitrogen, USA;非必需氨基酸(non-essential amino acids, NEAA),批号 AUG35260, Hyclone, USA;特级胎牛血清(FBS),批号 619559, Invitrogen, USA;胰蛋白酶 EDTA 消化液(0.25% Trypsin-EDTA),批号 833117, Invitrogen, Canada;MRP1-5 和内参 GAPDH 的引物均由上海英骏生物技术有限公司合成;TRIZOL,批号 1382739, Invitrogen, USA;总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、Real Master Mix(SYBR Green)均购自北京天根生物科技有限公司;其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 BB16 型 CO₂ 培养箱,德国 Heraeus 公司;Olympus-CK 光学显微镜,日本 Olympus 公司;RT-6000 酶标仪,美国 Rayto 雷杜公司;5417C/R 型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;NanoDrop ND-1000 核酸蛋白分析仪, Thermo Scientific 公司;Applied Biosystems 7500 型荧光定量 PCR 仪,

Applied Biosystems, USA;一次性细胞培养瓶及 6 孔、96 孔培养板,美国 Coster 公司;医用净化工作台,北京半导体设备一厂。

2 方法

2.1 人结肠腺癌上皮细胞 Caco-2 的培养 取冻存的 Caco-2 细胞,在 37 °C 水浴中快速解冻,时间控制在 1 ~ 2 min。复苏后的细胞加入含 20% FBS 的 DMEM-NEAA 完全培养基中,在 37 °C, 5% CO₂ 相对湿度 90% 的培养箱中培养,隔天更换培养基。生长 4 ~ 5 d 细胞融合后,用胰蛋白酶(0.25%)-EDTA(0.02%)混合消化液在 37 °C 条件下消化,按一定比例传代培养。

2.2 大黄酸对 Caco-2 细胞活度的影响 采用 MTT 法检测不同浓度大黄酸对 Caco-2 细胞活度的影响,确定大黄酸对 Caco-2 细胞的安全浓度范围。实验分为空白对照组、溶剂对照组和不同剂量组(终质量浓度分别为 1.25, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 40.00 mg·L⁻¹)。EDTA 胰酶消化对数期细胞,消化终止后离心收集,制成细胞悬液,细胞计数调整其密度为 1.5×10^5 个/mL,接种于 96 孔平底细胞培养板中,每孔加入细胞混悬液 180 μ L, 37 °C, 含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后,空白对照组加入 20 μ L DMEM,溶剂对照组加入 20 μ L 0.5% DMSO 溶液,不同剂量组分别加入不同质量浓度的大黄酸溶液 20 μ L,继续放入培养箱中分别培养 12, 24 h 后,加入 MTT(5 g·L⁻¹)溶液 20 μ L,再培养 4 h,小心吸去上清液,每孔加入 DMSO 200 μ L,于振荡器上振荡 10 min 至蓝色晶体完全溶解为止,用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度(A)。计算细胞存活率,存活率达到 90% 以上可认为该药物浓度对细胞生长没有影响。

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

2.3 大黄酸对 Caco-2 细胞 MRP1-5 mRNA 表达的影响

2.3.1 实验分组及体外药物处理 根据 MTT 实验结果,在对 Caco-2 细胞无毒的浓度范围内,选择大黄酸的实验浓度。细胞随机分为空白对照组,大黄酸高、低 2 个浓度组。取对数生长期细胞,消化悬浮于 DMEM(含 10% 血清)中,细胞密度为 5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板中,每孔 2 mL。铺板后在培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后,大黄酸组加入不同浓度的大黄酸培养 12 h,作用结束后将含有药物的培

养液吸除,提取总 RNA,制备 cDNA,并采用实时荧光定量 PCR 方法进行基因表达的检测。

2.3.2 引物的设计与合成 根据参考文献[3-4]获取人相关检测指标的引物序列,见表 1。

表 1 Real-time PCR 所用引物序列(5'3')

Gene	先导链	后滞链	扩增长度/bp
GAPDH	CCTCAAGATCATCAGCAATGCCT	GATGGCATGGACTGTGGTCAT	115
MRP1	GGGCTGCGGAAAGTCGT	AGCCCTTGATAGCCACGTG	80
MRP2	TGAGCAAGTTTGAACGCACAT	AGCTCTTCTCCTGCCGTCTCT	78
MRP3	GTCCGCAGAATGGACTTGAT	TCACCACTTGGGGATCATT	120
MRP4	GCTCAGGTTGCCTATGTGCT	CGGTTACATTTCCTCCTCCA	100
MRP5	CCAAGCTGACCCCAAAATGAAAA	TGGATGTGCTTGCCTTCTCCTCTTC	175

2.3.3 总 RNA 提取与纯度和含量测定 采用北京天根生物技术有限公司的离心柱型总 RNA 提取试剂盒,操作步骤按说明书。利用 ND-1000 核酸蛋白分析仪测定 RNA 的纯度及含量。

2.3.4 cDNA 制备 在冰浴的无核酸酶的离心管中加入如下反应混合物:1 μg 总 RNA; 2 μL Oligo 和 2 μL dNTP; 补 RNase-free ddH₂O 定容至 14.5 μL。70 °C 加热 5 min 后迅速在冰上冷却 2 min,简短离心收集反应液后,加入 4 μL 5 × First-Strand Buffer 和 0.5 μL RNasin; 然后再加入 1 μL (200 U) TIANScript M-MLV,用移液器轻轻混匀,42 °C 温浴 50 min,95 °C 加热 5 min 终止反应,冰浴 10 min, -20 °C 冰箱保存备用。

2.3.5 荧光定量 PCR 操作方法 20 μL PCR 反应体系如下:2.5 × Real Master Mix/20 × SYBR solution 9 μL; 先导链 (100 nmol · L⁻¹) 1 μL; 后滞链 (100 nmol · L⁻¹) 1 μL; DNA 模板 2 μL; RNase-free H₂O 补足 20 μL。

同时以 GAPDH 作为内参平行对照。Applied Biosystems 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行扩增,扩增条件为 94 °C 2 min 变性,(94 °C 15 s,58 °C 20 s,68 °C 35 s) × 40 个循环,并做熔点曲线。

2.3.6 荧光定量 PCR 数据处理及统计方法^[5-6]

本实验采用荧光定量相对定量的方法,并以 2^{-ΔΔCt} 表示实验结果,该方法是经过处理的样品和未经处理的样品目标转录之间的表达差异(倍数关系),是实时定量 PCR 实验中分析基因表达相对变化的一种简便方法,在目的基因和内参的扩增效率相同或接近相同时,可用本方法进行数据分析。本实验已对目的基因和内参基因的扩增效率进行了对比,其效率基本一致,故本研究中采用此相对定量法进行数据处理和分析,其计算公式如下:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH})_X - (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH})_{Control}$$

X 表示任意组,Control 表示经 GAPDH 校正后 1 倍量的目标基因表达。

2.4 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间差异分析采用 t 检验,P < 0.05 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 大黄酸对 Caco-2 细胞活度的影响 表 2 显示,随着大黄酸浓度的增高,Caco-2 细胞活度逐渐下降;12 h 作用条件下,大黄酸质量浓度 0 ~ 10.00 mg · L⁻¹ 不会降低细胞活度,对细胞无损伤作用。因此实验时我们在此区间内选择用药剂剂量。

表 2 大黄酸对 Caco-2 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	剂量 /mg · L ⁻¹	12 h		24 h	
		A	细胞存活率/%	A	细胞存活率/%
空白对照	-	1.75 ± 0.09	-	1.72 ± 0.16	-
溶剂对照	-	1.80 ± 0.06	102.5	1.76 ± 0.12	102.7
大黄酸	1.25	1.72 ± 0.08	97.9	1.63 ± 0.14	94.8
	2.50	1.73 ± 0.14	98.6	1.54 ± 0.14	89.7
	5.00	1.64 ± 0.12	93.2	1.63 ± 0.10	94.6
	10.00	1.59 ± 0.24	90.4	1.46 ± 0.29	84.6
	20.00	1.01 ± 0.163 ²⁾	57.3	0.92 ± 0.23 ²⁾	53.5
	40.00	0.84 ± 0.05 ²⁾	48.0	0.70 ± 0.03 ²⁾	40.7

注:与空白对照组比较¹⁾P < 0.05,²⁾P < 0.01。

3.2 大黄酸对 Caco-2 细胞 MRP1-5 mRNA 表达的影响 表 3 显示,大黄酸剂量在 2.50,5.00 mg · L⁻¹ 时,可显著上调 MRP3 mRNA 的表达(P < 0.05, P < 0.01);剂量在 2.50 mg · L⁻¹ 时,可显著下调 MRP5 mRNA 的表达(P < 0.05)。大黄酸对 MRP1,MRP2,MRP4 mRNA 的表达均没有显著影响。

4 讨论

多药耐药蛋白为 ATP 依赖性功能性膜蛋白,现已先后发现 9 个家族成员——MRP1,MRP2,MRP3,MRP4,MRP5,MRP6,MRP7,MRP8,MRP9。MRP 能

将细胞内的特定物质作为底物逆浓度梯度运至细胞外,发挥外排泵作用,属于转运体亚家族成员。研究发现肠上皮细胞主要表达 MRP1-5 亚型,影响药物吸收的主要是 MRP1,MRP2,MRP3^[7]。Caco-2 细胞属于人类结肠腺癌上皮细胞系,是体外研究药物转

运吸收和药物相互作用的重要载体和工具,在 Caco-2 细胞中 MRP1-5 亚型均有表达^[8]。本实验研究结果发现,MRP1-5 在 Caco-2 细胞上均呈一定丰度的表达,与已有的相关文献报道一致。

表 3 大黄酸对 Caco-2 细胞 MRP1,MRP2,MRP3,MRP4,MRP5 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	剂量 /mg·L ⁻¹	2 ^{-ΔΔCt}				
		MRP1	MRP2	MRP3	MRP4	MRP5
正常对照	-	1.05 ± 0.31	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.14	1.12 ± 0.56
大黄酸	2.50	0.40 ± 0.68	1.11 ± 0.38	1.21 ± 0.17 ¹⁾	0.70 ± 0.53	0.32 ± 0.58 ¹⁾
	5.00	0.45 ± 0.86	0.96 ± 0.43	1.52 ± 0.20 ²⁾	1.04 ± 1.00	2.06 ± 1.34

注:与正常对照组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

近年的研究表明,以多成分为化学实体特征的中药复方或中西药合用口服后,各成分之间主要通过 2 种模式在吸收环节上相互抑制和影响:①一种成分可以通过竞争位于肠上皮细胞顶部特定的转运体(OCT 等)而影响该转运体对其他成分的摄取入胞转运;②一种成分亦可通过上调位于肠上皮细胞顶部具外排作用的转运体(MRP 等)或下调摄取入胞的转运体(OCT 等)的基因表达和(或)活性而最终影响该转运体对其特定的药物底物的转运^[9]。

本研究结果发现,高低浓度的大黄酸均可上调 MRP3 mRNA 的表达,低浓度的大黄酸可下调 MRP5 mRNA 的表达。鉴于位于肠上皮细胞顶端(腔面)的 MRP3 和 MRP5 可将其特定的底物——化学成分转运出胞外,大黄酸作用后,Caco-2 细胞上 MRP3 mRNA 表达升高,提示大黄酸可通过上调 MRP3 的表达降低作为 MRP3 转运体底物的化学成分的吸收和生物利用度;而大黄酸作用后,Caco-2 细胞上 MRP5 mRNA 表达下降,提示大黄酸亦可通过下调 MRP5 的表达升高作为 MRP5 转运体底物的化学成分的吸收和生物利用度。相信随着 MRP3 和 MRP5 外源性底物的逐渐被揭示,该研究结果将为中药复方应用以及中西药合用提供重要的指导作用,该研究亦为在吸收环节上深入探讨和研究药物之间的相互作用和作用机制提供了一种可行的研究方法和研究模式。

[参考文献]

[1] Curtis D Klaassen, Lauren M Aleksunes. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation[J]. Pharmacol, Rev, 2010, 62: 1.

[2] 金汝城,谢伟雪,逢艳,等.大黄的化学成分及药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2007,19:548.
 [3] Gabor Horvath,Nathalie Schmid,Miryam A Frago, et al. Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2007,36:53.
 [4] Romanovsky A A. Thermoregulation: Some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007,292:37.
 [5] 隋峰,杨娜,张畅斌,等.寒热性中药成分对 TRPV1 和 TRPM8 通道蛋白基因表达的影响[J].中国中药杂志,2010,35(12):1594.
 [6] Feng Sui, Chang-Bin Zhang, Na Yang, et al. Antinociceptive mechanism of baicalin involved in intervention of TRPV1 in DRG neurons *in vitro* [J]. J Ethnopharmacol, 2010,129(3):361.
 [7] Caroline Prouillac, Sylvaine Lecoer. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: Importance of membrane transporters and human models for transfer studies [J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38: 1623.
 [8] Hannah M Prime-Chapman, Richard A Fearn, Anne E Cooper, et al. Differential multidrug resistance-associated protein 1 through 6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 311: 476.
 [9] Zhou S F, Wang L L, Di Y M, et al. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(20):1981.

[责任编辑 何伟]