

连翘苷经血脑屏障体外透过机制研究[△]

黄海英^{1,2*}, 苏成福², 郭艳丽², 魏永恒¹, 张北月¹, 石晋丽^{1#}(1.北京中医药大学中药学院, 北京 100029; 2.河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3049-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.08

摘要 目的:研究连翘苷经血脑屏障的体外透过机制。方法:以0(阴性对照)、10、25、50、75、100 μg/ml连翘苷溶液培养大肠癌MDR1基因转染的马丁达比犬肾上皮(MDCK-MDR1)细胞24 h,刃天青法检测细胞活力并计算细胞生存率。以10、25、50、75、100 μg/ml连翘苷溶液培养MDCK-MDR1细胞10 min后,检测胞内连翘苷含量并绘制质量浓度-摄取速率曲线;0(阴性对照)、50、100 μg/ml连翘苷溶液培养MDCK-MDR1细胞3 h后,倒置荧光显微镜下观察细胞紧密连接蛋白结构。结果:与阴性对照比较,10~100 μg/ml连翘苷溶液培养细胞24 h后细胞存活率无明显改变。在10~100 μg/ml质量浓度范围内,MDCK-MDR1细胞摄取速率与连翘苷的质量浓度不呈线性关系,有逐渐饱和趋势。50、100 μg/ml连翘苷溶液培养细胞3 h后,细胞紧密连接蛋白完整。结论:在透过模拟血脑屏障时,连翘苷的吸收可能为被动转运结合主动转运,其质量浓度对细胞紧密连接蛋白有影响。

关键词 MDR1基因转染;马丁达比犬肾上皮细胞;血脑屏障;连翘苷;细胞紧密连接蛋白;体外试验

Study of Mechanism on *in vitro* Permeation of Phillyrin through Blood-brain Barrier

HUANG Hai-ying^{1,2}, SU Cheng-fu², GUO Yan-li², WEI Yong-heng¹, ZHANG Bei-yue¹, SHI Jin-li¹(1.School of TCM, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2.School of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To research the mechanism of *in vitro* permeation of phillyrin through blood-brain barrier. METHODS: After Madin-Darby canine kidney epithelial cells transfected with colorectal cancer MDR1 gene (MDCK-MDR1) were cultured with phillyrin solution of 0 (negative control), 10, 25, 50, 75 and 100 μg/ml for 24 h, cell viability was determined by resazurin method and cell survival rate was calculated. After MDCK-MDR1 cells were cultured with phillyrin solution of 10, 25, 50, 75 and 100 μg/ml for 10 min, the content of phillyrin in the cells was determined, and concentration-uptake rate curve was drawn. Following 3 h culture of MDCK-MDR1 cells with phillyrin solution of 0 (negative control), 50 and 100 μg/ml, the structure of cell tight junction protein was observed under the inverted microscope. RESULTS: Compared to the negative control group, after 24 h cell culture with phillyrin solution of 10-100 μg/ml, no obvious change in cell survival rate occurred. MDCK-MDR1 cells cultured with the phillyrin at a mass concentration of 10-100 μg/ml demonstrated a nonlinear relationship with concentration of phillyrin and a gradual saturation trend. After the cells were cultured with phillyrin of 50 and 100 μg/ml for 3 h, cell tight junction protein was intact. CONCLUSIONS: The absorption of phillyrin through the simulated blood-brain barrier may be in the form of passive transportation combined with active transportation, the concentration has effect on cell tight junction protein.

KEYWORDS MDR1 transfection; Madin-Darby canine kidney epithelial cell; Blood-brain barrier; Phillyrin; Cell tight junction protein; *in vitro* test

tic efficiency of neural stem cells-based therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124(1):54.

[6] Takarada-Iemata M, Kezuka D, Takeichi T, *et al*. Deletion of N-myc downstream-regulated gene 2 attenuates reactive astrogliosis and inflammatory response in a mouse model of cortical stab injury[J]. *J Neurochem*, 2014, 130(3):374.

[7] Ji HJ, Hu JF, Wang YH, *et al*. Osthole improves chronic

△ 基金项目:国家重大新药创制(No.2012ZX09102201-18);河南中医药大学科研苗圃工程(No.MP2013-15)

* 副教授。研究方向:中药新药。电话:0371-65962746。E-mail: 81737597@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药创制新药。电话:010-84738623。E-mail:shijl@vip.sina.com

cerebral hypoperfusion induced cognitive deficits and neuronal damage in hippocampus[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 636(1/2/3):96.

[8] Chen J, Li Y, Wang L, *et al*. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4):1 005.

[9] Tu XK, Yang WZ, Shi SS, *et al*. Neuroprotective effect of baicalin in rat model of permanent focal cerebral ischemia[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(9):1 626.

[10] Chao X, Zhou J, Chen T, *et al*. Neuroprotective effect of osthole against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats[J]. *Brain Res*, 2010(1 363): 206.

(收稿日期:2014-11-21 修回日期:2015-01-13)

(编辑:张静)

MDCK (Madin-Darby canine kidney) 细胞系是由马丁达比犬肾上皮细胞发展的一种细胞间连接非常紧密的细胞系,其许多生理特性与血脑屏障相似^[1]。MDCK-MDR1 细胞系是以人 MDR1 基因转染 MDCK 细胞而成,在极性细胞顶端特异性高表达 P 糖蛋白 (Permeability-glycoprotein, P-gp) 的一种细胞系,是研究中枢神经系统药物跨血脑屏障特性的理想工具^[2]。

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia Suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,具有清热解毒、消肿散结的功效。其中连翘苷 (Phillyrin) 是其有效成分,具有抗炎^[3]、抗氧化、抗衰老^[4]及降血脂等多种作用。近年来,体外研究结果发现连翘苷对神经细胞有一定的保护作用^[5-6]。但 Li YX 等^[7]通过体外细胞试验研究后发现,连翘苷的胃肠吸收率与透过血脑屏障的吸收率均较低,且其吸收可能与 P-gp 有关。为了探求上述问题,本研究采用大肠癌 MDR1 基因转染的 MDCK-MDR1 细胞模型考察连翘苷经血脑屏障的通透性,以期为后续研究提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

1510 型酶标仪、3111 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); G2-88B 型涡旋混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 5430R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); IX-71 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。

1.2 药品与试剂

连翘苷 (中国生物成都普菲德生物技术有限公司, 批号: MUST-13080301, 纯度: $\geq 98\%$); DMEM 培养基 (北京索莱宝科技有限公司); 抗体 Acti-stain™ 488 phalloidin (美国 Cytoskeleton 公司); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司); 胰蛋白酶、二甲亚砜 (DMSO)、刃天青 (美国 Sigma 公司)。

1.3 细胞

MDCK-MDR1 细胞株由浙江大学曾苏教授惠赠, 传代至 16~33 代。

2 方法

2.1 细胞培养^[8]

MDCK-MDR1 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的环境中培养, 采用 DMEM 培养基, 培养基中含 10% 胎牛血清。细胞按 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 密度接种于培养皿中, 培养至 80%~90% 融合, 用于试验。

2.2 细胞生存率测定

将 MDCK-MDR1 细胞接种于 96 孔板, 每孔 100 μl , 细胞密度为 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$, 加入含药培养基 100 μl 。以 0 (阴性对照)、10、25、50、75、100 $\mu\text{g/ml}$ 连翘苷溶液于二氧化碳培养箱中培养 MDCK-MDR1 细胞 24 h 后, 加入 0.1 mol/L 刃天青溶液 (刃天青钠盐用蒸馏水溶解, 制备成 1 mol/L 的贮备液, 用 0.22 μm 滤膜滤过后置 4 °C 保存, 临用前稀释) 22 μl 孵育 3 h 后, 振荡 10 min。经酶标仪在 570~600 nm 波长处测定细胞光密度 (OD) 差值 ($\text{OD}_{570 \text{ nm}} - \text{OD}_{600 \text{ nm}}$), 以此作为细胞相对活力并计算细胞存活率。每个质量浓度设 6 个平行孔。

2.3 细胞摄取试验

MDCK-MDR1 细胞培养 3 d 后, 吸去培养液, 每孔加入 37 °C 的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 1 ml, 温孵 30 min 后再弃去 HBSS, 重复 3 次。以 10、25、50、75、100 $\mu\text{g/ml}$ 连翘苷溶液培养

细胞 10 min 后, 用细胞刮取器刮出细胞, 用细胞破碎机破碎细胞, 以离心半径为 7.5 cm、15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液以高效液相色谱法测定连翘苷含量; 另一部分用考马斯亮蓝方法测定蛋白含量, 以连翘苷含量除以相应蛋白含量及作用时间, 即为摄取速率。

2.4 细胞紧密连接结构观察

室温下孵育 MDCK-MDR1 细胞, 以 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 密度接种于 24 孔板上, 培养 3 d 至融合, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞; 以 1 ml 0 (阴性对照)、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 连翘苷溶液孵育细胞 12 h 后, 以 4 °C PBS 洗 3 次, 每次 500 μl ; 加 200 μl 4 °C 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次, 每孔加入 200 μl 100 nmol/L Acti-stain™ 488 phalloidin, 室温避光孵育 30 min, 进行 F-actin 染色, 然后以 PBS 清洗 3 次; 重新加入新鲜的 PBS, 在倒置荧光显微镜下观察紧密连接蛋白结构并拍照 (激发波长: 488 nm, 发射波长: 530 nm)。

3 结果

3.1 细胞生存率测定结果

与阴性对照比较, 连翘苷质量浓度在 10~100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 细胞活力变化不大, 细胞存活率均 $> 90\%$ 。这表明在此质量浓度范围内, 药物对细胞无毒性, 所以在后续试验中, 选用 10~100 $\mu\text{g/ml}$ 连翘苷溶液。细胞生存率测定结果见表 1。

表 1 细胞生存率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Determination results of cell survival rates ($\bar{x} \pm s, n=6$)

连翘苷溶液质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	$\bar{x} \pm s$	细胞生存率, %
0 (阴性对照)	0.357 1 \pm 0.009 3	100.00
100	0.296 2 \pm 0.008 8	90.54
75	0.308 2 \pm 0.014 8	94.21
50	0.309 5 \pm 0.021 6	94.63
25	0.311 9 \pm 0.060 3	95.35
10	0.324 5 \pm 0.021 8	99.22

3.2 细胞摄取试验结果

不同质量浓度连翘苷在 MDCK-MDR1 细胞的摄取时, 其摄取速率与质量浓度不成线性。连翘苷在较低质量浓度时其吸收可能以被动转运为主; 在较高质量浓度时, 其摄取速率逐渐达到恒定值, 推测原因可能是受到 MDCK-MDR1 细胞中 P-gp 外排蛋白的影响。连翘苷质量浓度-摄取速度曲线见图 1。

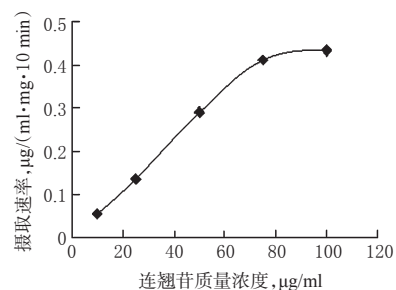


图 1 连翘苷质量浓度-摄取速度曲线

Fig 1 Phillyrin concentration-uptake rate curve

3.3 细胞紧密连接蛋白结构观察结果

正常培养条件下, 紧密连接蛋白主要分布在细胞膜及细胞核周边, 形成肌动蛋白丝带, 细胞间连接紧密。给药后, MDCK-MDR1 细胞周边肌动蛋白丝带正常, 且连翘苷质量浓

度达到 100 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞密度明显增加。细胞紧密联接蛋白结构观察结果见图 2。

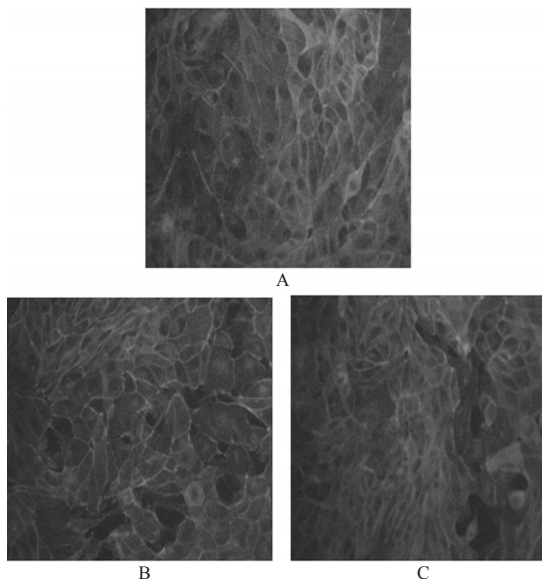


图 2 细胞紧密联接蛋白结构观察结果($\times 200$)

A. 0 $\mu\text{g/ml}$; B. 50 $\mu\text{g/ml}$; C. 100 $\mu\text{g/ml}$

Fig 2 Results of the structure of cell tight junction protein($\times 200$)

A. 0 $\mu\text{g/ml}$; B. 50 $\mu\text{g/ml}$; C. 100 $\mu\text{g/ml}$

4 讨论

在新药开发中,体外血脑屏障(BBB)模型的使用既可以较好地反映药物在体内 BBB 的处置情况,又可以弥补体内模型的一些缺陷^[9],是理想的预测药物通过 BBB 能力的工具。目前较常见的是利用脑微血管内皮细胞(BMECs)与星形胶质(TIA)细胞体外共培养建立 BBB 体外模型^[10],但其具有脑微血管内皮细胞在体外很容易丢失部分甚至全部的生理学特性,并且生存时间短、传代次数少;而 MDCK-MDR1 单层细胞与 BBB 的基本特性相似,是研究中枢神经系统药物跨血脑屏障特性的理想工具,已被越来越多地使用。

血脑屏障细胞骨架包含 3 种结构:微丝、微管和中间丝,维持着细胞的形态和运动功能,以微丝在维持血脑屏障细胞形态和完整性中所起的作用最重要。微丝主要由肌动蛋白(Actin)组成,Actin 在细胞连接和细胞屏障功能上发挥着重要的作用,细胞紧密连接的完整性取决于 Actin 结构组装和功能状态。Actin 由跨膜蛋白和胞质附着蛋白组成的连接复合物固定在细胞内,维持细胞紧密连接的完整和稳定。本研究结果发现,在连翘苷的作用下,MDCK-MDR1 细胞骨架蛋白 Actin 结构无显著差异,这意味着该药物不能通过细胞旁路途径被转运吸收^[11]。同时,本研究发现,不同质量浓度的连翘苷给药后,骨架蛋白 Actin 并没有明显地增加。根据文献推测,连翘苷可能会引起 Actin 发生重排^[12],还待进一步研究。

细胞毒性研究中,采用噻唑蓝法较多,但据文献报道,刃天青法与噻唑蓝有效性相似^[13],且刃天青试剂法操作程序简单、成本低,故本研究采用了刃天青来检测药物的细胞毒性。

在对连翘苷的摄取研究中,发现连翘苷质量浓度在 10~100 $\mu\text{g/ml}$ 时,连翘苷的摄取存在饱和现象。结合细胞紧密联接蛋白结构,推测连翘苷的吸收主要为被动转运结合主动转运:低质量浓度时,转运蛋白未有饱和现象,故呈线性吸收;但质量浓度较高时,转运蛋白达到饱和,故吸收速率减慢。但其具体转运机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Pastan I, Gottesman MM, Ueda K, *et al.* A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cell[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(12): 4 486.
- [2] 刘瑶,曾苏. MDCK-MDR1 细胞模型及其在药物透过研究中的应用进展[J]. *药学学报*, 2008, 43(6): 559.
- [3] Diaz Lanza AM, Abad Martinez MJ, Fernandez Matellano L, *et al.* Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Phillyrea latifolia* and their in vitro anti-inflammatory activity[J]. *Planta Med*, 2001, 67(3): 219.
- [4] 颜礼有,刘明娟,闫慧如,等.连翘苷抗小鼠衰老作用的研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(1): 37.
- [5] Wei T, Tian W, Yan H, *et al.* Protective effects of phillyrin on H_2O_2 -induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(8): 1 165.
- [6] 张美蓉,魏守蓉,吴燕川,等.连翘苷对 MPP⁺ 诱导人神经母细胞株 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用[J]. *神经药理学报*, 2011, 1(4): 12.
- [7] Li YX, Ye LH, Jiang XH, *et al.* Assessment and modulation of phillyrin absorption by P-gp using Caco-2 cells and MDR1-MDCK II cells[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*, 2011, 36(1): 41.
- [8] 刘瑶,俞春娜,曾苏. P-糖蛋白高表达马丁达比狗肾上皮细胞的建立[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(21): 1 608.
- [9] Loescher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases[J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 76(1): 22.
- [10] Hosoya K, Sumio O, Tetsuya T, *et al.* Recent advances in the brain-blood efflux transport across the blood-brain barrier[J]. *Int J Pharm*, 2002, 248(1/2): 15.
- [11] 陈振振. 醒脑静中芳香开窍药促进栀子有效成分经鼻入脑转运机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [12] 廖华宁,汪宁,王艳. 紧密连接蛋白与血脑屏障[J]. *安徽医药*, 2012, 16(3): 377.
- [13] Martin A, Morcillo N, Lemus D, *et al.* 用 MTT 和 resazurin 对一线抗结核药物进行药物敏感性检测的多中心研究[J]. *国际结核病与肺部疾病杂志: 中文版*, 2005, 12(30): 171.

(收稿日期:2015-03-10 修回日期:2015-05-10)

(编辑:张 静)