

黄柏粗提物及其含药血清对K562/A02细胞P-gp表达和活性的影响^Δ

徐宋瑶*,王春梅#,刘华凤(北京中医药大学中药学院生物制药系,北京 100102)

中图分类号 R285;R282.75 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0586-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.04

摘要 目的:研究黄柏粗提物及其含药血清对K562/A02细胞P-糖蛋白(gp)的影响。方法:用黄柏粗提物(2.1 mg/ml)及含药血清(10%)培养K562/A02细胞,收集细胞提取蛋白,以Western blot法检测P-gp的表达;以流式细胞仪测定罗丹明123的泵出检测P-gp的活性。结果:高、低浓度黄柏粗提物作用于K562/A02细胞后,P-gp表达量和活性与空白血清组比较无显著性差异;黄柏含药血清作用于K562/A02细胞后,P-gp表达量和活性降低。结论:黄柏含药血清可抑制P-gp的活性和表达。

关键词 黄柏;含药血清;P-糖蛋白

Effect of Crude Extract of *Phellodendron chinese* and Drug Serum on the P-gp Expression and Activity of K562/A02 Cells

XU Song-yao, WANG Chun-mei, LIU Hua-feng (Dept. of Biological Pharmaceutics, School of TCM, Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effect of crude extract of *Phellodendron on chinese* and drug serum on the P-gp expression and activity. METHODS: The crude extracts of *P. chinese* or drug serum were used to treat the K562/A02 cells. The P-gp protein expression level was detected by Western blot and the pump output of Rho123 were measured by flow cytometry to determine P-gp activity of the cells. RESULTS: After treated with high concentration, low concentration crude extracts of *P. chinese*, the P-gp protein expression or its activity had no significant difference. The serum containing *P. chinese* decreased the P-gp protein expression and its activity. CONCLUSION: The serum containing *P. chinese* could inhibit P-gp expression and activity.

KEY WORDS *Phellodendron chinese*; Drug serum; P-gp

黄柏是一味具有良好清热泻火作用的常用中药,广泛用于复方制剂^[1-2]。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是与肿瘤多药耐药密切相关的糖蛋白,属于能量依赖型药物外排泵。P-gp首先在肿瘤细胞中被发现,后来发现P-gp可在许多组织中表达,P-gp能将药物泵出到细胞外,使细胞内药物浓度降低,影响药物治疗效果^[3]。为了解黄柏是否可通过调节P-gp的活性或表达间接起作用,笔者以白血病多药耐药细胞株K562/A02为研究对象,研究黄柏粗提物及其含药血清对P-gp的活性和表达的影响,为其临床用药提供指导。

1 材料

1.1 仪器

BS323S型电子天平(德国赛多利斯股份公司);Power-Pac300型电泳仪、Trans-Blot型转印槽(美国Bio Rad公司);Spectra Max 190型酶标仪(美国MD公司);Neofuge23R型高速冷冻台式离心机(上海力新仪器有限公司);MILLI-Q型超纯水纯化系统(美国Millipore公司);ULT1386-3-V30型超低温冰箱(日本三洋电器公司);Epics-XL型流式细胞仪(美国Beckman公司);玻璃匀浆器(上海博通化学科技有限公司)。

1.2 药材

黄柏饮片,购自王府井同仁堂药店,由北京中医药大学中药学院郑虎占教授鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110713-200208);考马斯亮蓝试剂盒(美国Bio Rad公司);PVDF膜(美国Amersham Biosciences公司);MTT(美国Amresco公司);通用显影粉、定影粉(天津世纪奥博商贸有限公司);RPMI 1640培养液、胎牛血清(美国Gibco公司);罗丹明123(Rho123,美国Sigma公司);P-gp抗兔血清D-11、 β -actin抗体、二抗HRP-Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)、一抗HRP-Goat Anti-Mouse IgG(H+L)均购自美国Protein Tech Group公司。

1.4 动物与细胞

健康SD大鼠, δ ,体质量240~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[动物使用合格证号:SCXK(京)2007-2001];K562/A02细胞由中国医学科学院提供。

2 方法

2.1 药物的制备

2.1.1 黄柏粗提物的制备 称取黄柏适量,浸泡0.5 h,水提2次,分别加10倍和8倍量水,均煎煮0.5 h,8层纱布过滤,合并滤液,水浴蒸干,置干燥器中贮藏,备用。

2.1.2 黄柏含药血清的制备 ig大鼠黄柏粗提物30 mg/kg,每天1次,连续3 d。实验第3天晚上大鼠禁食不禁水,次日使用

^Δ 基金项目:国家重点基础研究发展计划资助(No.2007CB512605)

* 硕士研究生。研究方向:中药对代谢酶的干预。E-mail: laishuo1983okk@163.com

通信作者:副教授。研究方向:中药对代谢酶的干预。电话:010-84738646。E-mail: wchunmei@126.com

2%戊巴比妥钠溶液ip麻醉大鼠,腹主动脉取血,3 000 r/min离心15 min,分离血清(EDTA-Na抗凝),56 °C灭活30 min,过滤除菌,分装,备用。

2.2 MTT法确定黄柏粗提物及其含药血清作用浓度^[4]

为了确定黄柏粗提物及其含药血清的作用浓度,首先对其细胞毒性进行研究。分别将黄柏粗提物及其含药血清稀释成不同浓度,用MTT法确定血清最佳作用浓度。取生长状态良好的K562/A02细胞,收集细胞,计数,调整细胞分子浓度至 1×10^5 /ml,设空白孔。加黄柏粗提物培养48 h后,于酶标仪570 nm波长处测吸光度(OD)值。黄柏粗提物组K562/A02细胞的培养使用含正常牛血清的培养基,黄柏含药血清组细胞的培养基中以大鼠血清替代牛血清。

2.3 细胞培养及蛋白提取

正常培养的K562/A02细胞在不含阿霉素的RPMI1640完全培养基中培养满10 d后收集细胞,调整细胞分子浓度,计数后接种到25 ml培养瓶中,每瓶4 ml,细胞分子浓度为 2×10^5 /ml。按照计算好的浓度分别加入黄柏粗提物或黄柏含药血清,置37 °C、5% CO₂饱和湿度的培养箱中进行培养,48 h后离心收集细胞,用预冷灭菌的PBS洗不同处理过的细胞2次,1 000 r/min离心10 min,收集细胞,加入120 μl单剂裂解液,充分吹打,在冰上裂解45 min,期间吹打几次,12 000 r/min离心10 min,取上清液即为蛋白提取液。以Bradford法^[9]进行浓度测定后用于电泳上样。

2.4 电泳与转膜

蛋白上样量为40 μg,分离胶和积层胶分别为8%和5%,初始电压设为80 V,进入分离胶后电压设为150 V,200 mA转膜2 h;5%脱脂奶封闭1 h后一抗(1:150, V/V)孵育4 °C过夜;次日,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗脱5 min,3次,二抗(1:2 000, V/V)孵育1 h;再次用磷酸盐吐温缓冲液洗脱5 min,3次;内参β-Actin蛋白操作步骤与上述相同,然后进入暗室显影。曝光后得到胶片,以Quantity one软件分析条带光密度曲线下面积,计算平均值。

2.5 流式细胞仪检测K562/A02细胞对Rho123外排试验

取生长状态良好的K562/A02细胞,接种于25 ml细胞培养瓶中,使细胞分子浓度为 2×10^5 /ml,4 ml/瓶,分为空白牛血清、空白大鼠血清、黄柏含药血清与黄柏粗提物高、低浓度组,10%含药血清进行给药,处理48 h后收集细胞,用冰冷的PBS洗2次,以完全培养基悬浮各试验组细胞,以 2×10^5 /ml的分子浓度接种于6孔板,每组两孔平行,每孔含3 ml RPMI 1640完全培养基,加入20 μl Rho123,在37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养1 h后,用冰冷的PBS洗涤细胞2次,重悬于RPMI 1640完全培养基中,在37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱中继续培养1 h后,用冰冷的PBS洗涤细胞2次,合并平行孔细胞,重悬于1 ml冰冷的PBS中,立刻用流式细胞仪检测细胞内Rho123的泵出,每组检测20 000个细胞。得出细胞内Rho123荧光强度峰图。

2.6 统计学方法

数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析用t检验。 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄柏粗提物及其含药血清对K562/A02细胞毒性的影响

黄柏粗提物进行了4、2、1、0.5、0.25、0.125 mg/ml 6个浓度试验,发现各个浓度均不影响K562/A02细胞的增殖,结合文献^[3]及前期试验,最终选择黄柏粗提物的试验作用浓度为2、1 mg/ml。黄柏含药血清,设置7个浓度进行试验:2%、5%、8%、10%、15%、20%、25%。培养48 h后,MTT法测定细胞抑制率,发现各个浓度均不抑制K562/A02细胞的增殖,血清浓度>10%时,对细胞生长有促进作用。最后选取10%的黄柏含药血清作用浓度为后续试验的作用浓度。

3.2 黄柏粗提物及其含药血清对K562/A02细胞P-gp表达的影响

正常K562/A02细胞培养使用胎牛血清,以ig生理盐水的大鼠血清作为对照。高、低浓度黄柏粗提物作用于K562/A02细胞后,Western blot法检测出P-gp表达量增高,但与空白牛血清组比较无显著性差异($P > 0.05$);黄柏含药血清作用于细胞后,P-gp表达量较空白大鼠血清组显著降低($P < 0.05$)。黄柏粗提物及其含药血清对P-gp表达的影响分别见图1、表1。

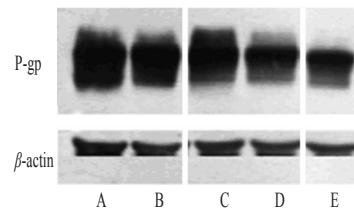


图1 黄柏粗提物及其含药血清对P-gp表达的影响

A.空白牛血清组;B.空白大鼠血清组;C.黄柏粗提物高浓度组;D.黄柏粗提物低浓度组;E.黄柏含药血清组

Fig 1 Effects of crude extract of *P. chinense* and drug serum on the P-gp expression

A.blank bovine serum group; B.blank rat serum group; C.crude extract of *P. chinense* high concentration group; D.crude extract of *P. chinense* low concentration group; E. serum containing *P. chinense* group

表1 黄柏粗提物及其含药血清对P-gp表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of crude extract of *P. chinense* and drug serum on the P-gp expression($\bar{x} \pm s$)

组别	P-gp/β-actin
空白牛血清组	2.934 2 ± 0.773 4
黄柏粗提物低浓度组	3.130 7 ± 0.886 7
黄柏粗提物高浓度组	3.417 5 ± 1.136 9
空白大鼠血清组	2.880 5 ± 0.751 4
黄柏含药血清组	2.397 1 ± 0.310 0*

与空白大鼠血清组比较: * $P < 0.05$

vs.blank rat serum group: * $P < 0.05$

3.3 黄柏粗提物及其含药血清对K562/A02细胞P-gp活性的影响

高、低浓度黄柏粗提物作用于细胞后,平均荧光强度值分别为(9.54 ± 0.9)和(9.97 ± 0.76),与空白牛血清组比较略升高,但无显著性差异($P > 0.05$),且与剂量无明显相关性。黄柏

含药血清作用于细胞后,平均荧光强度值升高为(11.34 ± 2.05),空白大鼠血清组的平均荧光强度为(7.82 ± 1.42),说明黄柏含药血清组的P-gp活性较空白大鼠血清组显著降低($P < 0.05$)。黄柏粗提物对P-gp活性的影响见图2;黄柏含药血清对P-gp活性的影响见图3。

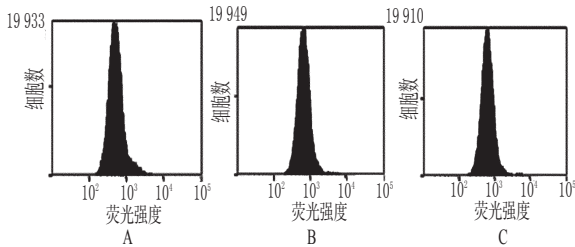


图2 黄柏粗提物对P-gp活性的影响

A.空白牛血清组;B.黄柏粗提物高浓度组;C.黄柏粗提物低浓度组

Fig 2 Effect of crude extract of *P. chinese* on the P-gp activity

A. blank bovine serum group; B. crude extract of *P. chinese* high concentration group; C. crude extract of *P. chinese* low concentration group

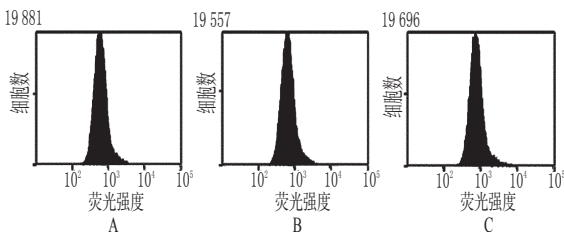


图3 黄柏含药血清对P-gp活性的影响

A.空白牛血清组;B.空白大鼠血清组;C.黄柏含药血清组

Fig 3 Effect of serum containing *P. chinese* on the P-gp activity

A. blank bovine serum group; B. blank rat serum group; C. serum containing *P. chinese* group

4 讨论

目前,复方研究常借鉴现代药理的方法,体外试验采用的方法有间接添加法(血清药理学方法)和直接添加法。由于血清药理学方法既能防止中药本身理化性质对体外试验的干扰,又能反映中药在胃肠道消化吸收,再经生物转化,最后产生药理效应的过程,故代表了药物在体内产生作用的有效成分^[6]。本研究发现,黄柏粗提物并不能影响P-gp的活性和表达,而黄柏含药血清却能抑制P-gp的表达和活性。推测黄柏粗提物中对P-gp的活性和表达既有抑制的物质,也有促进物质,最终与对照比较表现出没有差异的结果;而含药血清是黄柏的入血成分,更能反映出黄柏的最终作用效果。因此,本研究认为黄柏粗提物口服后能抑制P-gp的活性和表达。

有学者曾研究黄柏的单体和复方对P-gp活性的影响,发

现均表现出抑制作用。黄柏的主要成分之一是盐酸小檗碱,研究发现盐酸小檗碱与环孢素A合用可明显抑制小鼠和大鼠两个编码P-gp基因mdr1a、mdr1b的表达,从而减低环孢素A在肝和小肠的代谢及消除^[7]。ig含有黄柏的复方——黄连解毒汤后,大鼠的脑微血管内皮细胞P-gp表达减少^[8]。但是,本课题组前期曾经检测过黄柏提取物及其含药血清中盐酸小檗碱的含量,发现黄柏粗提物中含盐酸小檗碱2.03%,而含药血清中几乎检测不到盐酸小檗碱。故黄柏含药血清对P-gp的抑制作用是否是盐酸小檗碱引起的有待进一步研究。

在肝脏中,P-gp是一种清除装置,与代谢过程相竞争;而在肠道中,P-gp的功能在于降低药物的吸收。曾有研究发现,引经药黄柏的含药血清能增强长春新碱所致Hela细胞和MDCK细胞毒性^[1],间接说明了黄柏可能影响P-gp活性。本研究发现,黄柏的代谢入血成分对P-gp活性有抑制作用,从而减弱了P-gp对药物的外排和消除作用,黄柏的引经作用可能与对P-gp活性的抑制有关系。根据此结果推测,黄柏与药物联用可减少药物用药剂量,增强药效。

参考文献

- [1] 都日娜,乌日娜.黄柏的研究进展[J].中国民族医药杂志,2008,14(3):75.
- [2] 伍倩.引经药对P-糖蛋白的影响[J].现代预防医学,2005,32(7):855.
- [3] Sauna ZE, Kim IW, Ambudkar SV. Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1)[J]. *J Bioenerg Bio-membr*,2007,39(5/6):481.
- [4] Stowe RP, Koenig DW, Mishra SK, et al. Nondestructive and continuous spectrophotometric measurement of cell respiration using a tetrazolium-formazan microemulsion[J]. *J Microbiol Methods*,1995,22(3):283.
- [5] Dryer RL, Lata GF. *Experimental Biochemistry*[M]. New York: Oxford University Press, 1989:346.
- [6] 许炜茹,林洪生,陈信义,等.中药复方体外药理研究的思考[J].中华中医药学刊,2011,29(1):55.
- [7] 余爱荣,辛华雯,吴笑春.环孢素与小檗碱合用抑制肝CYP3A1、CYP2E1、mdr1基因表达的实验研究[J].医药导报,2004,23(6):368.
- [8] Zhang DM, He ZW, Liu XD, et al. In-vivo and in-vitro studies on the effect of Huang-Lian-Jie-Du-Tang on nimodipine transport across rat blood-brain barrier [J]. *Pharm Pharmacol*,2007,59(12):1 733.

(收稿日期:2012-04-06 修回日期:2012-07-25)