

附子水提物对大鼠十二指肠外排转运蛋白和紧密连接蛋白表达的影响[△]

季苗苗^{1*}, 梁新丽¹, 钟友宝², 陈来², 廖正根^{1#} (1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学实验动物科技中心, 南昌 330004)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)20-2813-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.20.15

摘要 目的: 研究附子水提物对大鼠十二指肠组织中3种外排转运蛋白和3种紧密连接蛋白及其基因表达的影响。方法: 取32只SD雄性大鼠, 随机分为正常组和附子水提物低、中、高剂量组[0.45、0.9、1.8 g/(kg·d), 以生药量计算], 每组8只, 分别灌胃水和相应药液0.1 mL/kg, 连续给药7 d。末次给药后, 取大鼠十二指肠肠段, 采用Western blotting法检测肠组织中P-糖蛋白(P-gp)、乳腺癌耐药蛋白(Bcrp)、多药耐药蛋白2(Mrp2)为代表的外排转运蛋白和密封蛋白(Claudin-1)、闭合蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白(ZO-1)为代表的紧密连接蛋白的表达水平; 采用实时定量聚合酶链式反应法测定上述6种蛋白对应基因的mRNA表达水平。结果: 与正常组比较, 附子水提物各剂量组大鼠十二指肠组织中P-gp、Mrp2、Bcrp、Claudin-1、Occludin、ZO-1的蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$); 附子水提物各剂量组P-gp的mRNA表达水平, 附子水提物低、高剂量组Bcrp的mRNA表达水平以及附子水提物中、高剂量组Claudin-1的mRNA表达水平均显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其余基因的mRNA表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 附子水提物可从mRNA和/或蛋白水平上调3种外排转运蛋白和3种紧密连接蛋白的表达, 从而可能与上述外排转运蛋白的其他底物类药物以及以细胞旁途径为主要转运通道的药物发生相互作用, 在临床上联合用药时可考虑对用药剂量作相应调整。

关键词 附子; 水提物; 十二指肠; 外排转运蛋白; 紧密连接蛋白; 细胞旁路; 药物相互作用; 大鼠

Effects of *Aconitum carmichaelii* Water Extract on the Expression of Efflux Transporters and Tight Junction Proteins in Duodenum of Rats

Ji Miaomiao¹, Liang Xinli¹, Zhong Youbao², Chen Lai², Liao Zhenggen¹ (1. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Meteria Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. Laboratory Animal Research Center for Science and Technology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Aconitum carmichaelii* water extract on the expression of 3 kinds of efflux transporters and 3 kinds of tight junction proteins as well as their genes in duodenum tissues of rats. METHODS: Thirty-two SD male rats were randomly divided into normal group, *A. carmichaelii* water extract low-dose, medium-dose and high-dose groups [0.45, 0.9, 1.8 g/(kg·d), by crude drug], with 8 rats in each group. They were given water and relevant liquid 0.1 mL/kg intragastrically for consecutive 7 d. After last administration, the duodenal segments of rats were collected. Western blotting assay was used to detect the expression of efflux transporters as P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (Bcrp), multidrug resistance protein 2 (Mrp2) as well as tight junction proteins as Claudin-1, Occludin and ZO-1. mRNA expression of 6 kinds of proteins relevant gene were determined by qRT-PCR respectively. RESULTS: Compared with normal group, the protein expression of P-gp, Mrp2, Bcrp, Claudin-1, Occludin and ZO-1 in duodenum of rats were increased significantly in *A. carmichaelii* water extract groups ($P < 0.01$). mRNA expression of P-gp in *A. carmichaelii* water extract groups, mRNA expression of Bcrp in *A. carmichaelii* water extract low-dose and high-dose groups as well as mRNA expression of Claudin-1 in *A. carmichaelii* water extract medium-dose and high-dose groups were increased significantly, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no statistical significance in mRNA expression of other genes ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: *A. carmichaelii* water extract can up-regulate the expression of 3 kinds of efflux transporters and 3 kinds of tight junction proteins at the level of mRNA

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81660757、81760434); 江西省主要学科学术和技术带头人资助计划(No.20162BCB22015)

* 硕士研究生。研究方向: 生物药剂学。E-mail: jmlv110@163.com

通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 药物新剂型和新技术。电话: 0791-7119011。E-mail: lyzlyg@163.com

and/or protein, thus may interact with other substrates of the aforementioned efflux transporters and drugs with cell bypass pathway as the main transport pathway. In clinical practice, adjustment of dosage may be considered in drug combination.

KEYWORDS *Aconitum carmichaelii*; Water extract; Duodenum; Efflux transporter; Tight junction protein; Cell bypass pathway; Drug interaction; Rat

附子为毛茛科乌头属植物乌头(*Aconitum carmichaeli* Debx.)的子根及其加工品,有补火助阳、散寒止痛之功效,具有扩张血管、抗炎、抗肿瘤等药理作用^[1],在临床上广泛用于治疗心血管和消化系统疾病^[2-3]。在临床应用时,附子常与其他中药和/或化学药联用^[3-5],因此增加了药物相互作用的机会。药物相互作用会影响药物的吸收,导致药物血药浓度发生变化,进而对药物的疗效及毒性产生一定影响^[6-7],因此从吸收环节研究药物的相互作用具有重要意义。

近年来,越来越多的研究表明,外排转运蛋白和紧密连接蛋白在药物吸收方面有着重要的地位^[8]。以P-糖蛋白(P-gp)、乳腺癌耐药蛋白(Bcrp)和多药耐药蛋白2(Mrp2)为代表的外排转运蛋白广泛分布于小肠、肝脏、肾脏及血脑屏障中,其能抑制相应底物的吸收,在药物相互作用中起重要作用^[9-11]。紧密连接是溶质通过旁细胞途径扩散的主要屏障^[12],主要由跨膜蛋白[如密封蛋白(Claudin-1)、闭合蛋白(Occludin)]和细胞质蛋白[如闭锁小带蛋白(ZO-1)]等组成^[13]。紧密连接蛋白表达的变化会导致细胞通透性的改变,而通透性的改变又会影响到相应药物的吸收^[14]。已有研究报道,附子活性成分对上述3种外排转运蛋白表达有影响^[15],但由于临床上附子通常以水提取物形式使用,而附子提取物对上述转运蛋白的影响鲜见报道;同时,尚未见相关研究报道附子或其提取物对上述3种紧密连接蛋白表达的影响。基于此,本课题组以大鼠为研究对象,考察附子水提取物对其十二指肠组织中上述3种外排转运蛋白和3种紧密连接蛋白及其对应基因表达的影响,以探讨附子水提取物能否通过调控外排转运和旁细胞吸收途径等机制影响药物吸收,为附子与其他药物在临床的合理联用提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

BS124S型电子分析天平(德国Sartorius公司);R3002型旋转蒸发器(郑州瑞涵仪器有限公司);1260型高效液相色谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司];3-18K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);HHS型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司);QYC-Z00型恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司);ELX800型酶标仪(美国BioTek公司);ChemiDoc™凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);Bis-Tris Mini Gels型电泳槽、Mini Gel Tank型转印槽(美国NuPAGE公司);LightCycler®96型实时定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Roche公司)。

1.2 药品与试剂

兔源多克隆P-gp抗体、鼠源单克隆Mrp2抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab170904、ab15603);兔源多克隆Bcrp抗体、兔源单克隆GAPDH抗体(武汉博士德生物技术有限公司,批号分别为BA3746-2、M00227-5);兔源多克隆Claudin-1抗体、兔源多克隆ZO-1抗体(美国Omnimabs公司,批号分别为OM247267、OM296184);兔源多克隆Occludin抗体(杭州华安生物技术有限公

司,批号:ET1701-76);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔多克隆IgG(H+L)(二抗,上海碧云天生物技术有限公司,批号:A0208);Trizol LS试剂(美国Invitrogen公司,批号:10296010);逆转录试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号:AT341-02);SYBR Green试剂(北京聚合美生物科技有限公司);PVDF膜(0.22 μm,美国Millipore公司);BCA蛋白浓度试剂盒(批号:PC0020-500)、彩虹180广谱蛋白Marker(11~180 kDa,批号:PR1910)、总RNA提取试剂盒(批号:R1200-50T)、RT-PCR试剂盒(批号:RP1100)、RIPA裂解液、ECL Plus超敏发光液等均购自北京索莱宝生物技术有限公司;上样缓冲液、电泳液、转膜液等均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;水为色谱级。

1.3 药材

附子黑顺片(批号:20150601)购自江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学药学院张寿文教授鉴定为毛茛科乌头属植物乌头(*A. carmichaeli* Debx.)的子根加工饮片。

1.4 动物

SPF级SD大鼠32只,雄性,体质量为(200±20)g,饲养于江西中医药大学实验动物科技中心屏障系统,动物使用许可证号:SYXK(赣)2017-0004。动物在环境温度、湿度适宜的条件下进行实验,期间自由饮食。

2 方法

2.1 附子水提取物浸膏的制备

取黑顺片400 g,先后加入10、8倍量水(mL/g),分别加热回流提取1 h,过滤;合并滤液,在40℃条件下高压水浴旋蒸浓缩,冷冻干燥,制得附子水提取物冻干粉浸膏(得率为3.4%),保存备用。采用高效液相色谱法^[16]检测,所得浸膏中双酯型生物碱含量(以次乌头碱、新乌头碱、乌头碱含量合计)为0.4%,单酯型生物碱含量(以苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱含量合计)为4.56%。

2.2 分组及给药

取大鼠32只,随机分为正常组和附子水提取物低、中、高剂量组[0.45、0.9、1.8 g/(kg·d)],以生药量计算;参照2015年版《中国药典》(一部)中附子的服用剂量^[17],按等效剂量折算方法^[18]计算并制定大鼠给药剂量,每组8只。除正常组大鼠灌胃相应体积的水外,附子水提取物各剂量组大鼠均灌胃相应附子水提取物浸膏药液(以水为溶剂配制),给药体积均为0.1 mL/kg,连续给药7 d。

2.3 生物样本采集

给药结束后,断颈处死大鼠,在距其胃幽门部1 cm处量取十二指肠肠段10 cm,以液氮速冻后,立即于-80℃条件下保存,备测。

2.4 大鼠十二指肠组织中外排转运蛋白和紧密连接蛋白的表达水平检测

采用Western blotting法检测目标蛋白。取“2.3”项下采集的十二指肠肠段组织,以RIPA裂解液裂解后,

12 000×g 冷冻离心 10 min, 取上清液, 采用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。取蛋白样品适量, 煮沸变性, 在 200 V 恒压下经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 再以 300 mA 恒流电转印至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉于室温封闭 2 h; 然后分别加入 P-gp 抗体 (1:1 000)、Mrp2 抗体 (1:20)、Bcrp 抗体 (1:100)、Claudin-1 抗体 (1:500)、Occludin 抗体 (1:1 000)、ZO-1 抗体 (1:500)、GAPDH 抗体 (1:1 000), 4 °C 下孵育过夜; 次日以 TBST 缓冲液洗涤 10 min×3 次, 然后加入 HRP 标记的二抗 (1:3 000), 室温孵育 1 h 后, 以 TBST 洗涤 10 min×3 次; 以 ECL 超敏化学发光液反应后, 采用凝胶成像仪检测。采用 Image J 1.8.0 软件对蛋白条带进行图像分析, 以 GAPDH 为内参, 计算各目标蛋白的相对灰度值, 用以表示蛋白表达水平。

2.5 大鼠十二指肠组织中外排转运蛋白和紧密连接蛋白相应基因的 mRNA 表达水平检测

采用实时定量 PCR 法检测目标基因 mRNA。取“2.3”项下采集的大鼠十二指肠肠段组织, 剪碎, 以 Trizol LS 试剂盒提取总 RNA, 采用酶标仪在 260、280 nm 波长处检测吸光度并计算两者比值 (1.8~2.0 即可) 以考察 RNA 纯度。取总 RNA 适量, 在 1×TAE 缓冲液中进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 然后在紫外光下观察 (可见清晰无拖带的 28 S、18 S、5 S 等条带即可)。取总 RNA 5 μg, 采用反转录试剂盒制备 cDNA 并适当稀释后, 进行 PCR 反应。总反应体系 (共 10 μL): cDNA 2 μL、2×SYBR 5 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、超纯水 1 μL。反应条件: 95 °C 热激变性 10 min, 95 °C 复性 5 s, 60 °C 延伸 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 共 45 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[9] 计算 P-gp、Mrp2、Bcrp、Claudin-1、Occludin、ZO-1 的 mRNA 表达水平。引物序列列表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因名称	引物序列(5'-3')	基因名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	正向: TGGGTTCCCGTTGATGA	Claudin-1	正向: CTCACAGAGAGGGTCGTTG
	反向: AGGGCTGCCTTCTCTGT		反向: ACTGTTAGCGGAGTTTGGT
P-gp	正向: GCAGGTTGGCTGGACAGATT	Occludin	正向: GGGGTGATTCGGATCCTGTC
	反向: GGAGCGCAATTCATGGATA		反向: TCCTCCAAAGATGCCCGTTC
Mrp2	正向: TGATCGGTTTCGTGAAGAGCT	ZO-1	正向: CCTTACCTTTCGCCTGAAAC
	反向: ACGCACATTCACACACAAA		反向: CCTTCGTCTCTGAGCATCGT
Bcrp	正向: GTTTGGACTCAAGCACAGCA		
	反向: TGAGTTTCCAGAAGCCAGT		

2.6 统计学方法

所有试验至少独立重复 3 次。采用 GraphPad 7.0 软件对试验数据进行统计学分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 附子水提取物对大鼠十二指肠组织中外排转运蛋白表达的影响

与正常组比较, 附子水提取物各剂量组大鼠十二指肠

组织中 P-gp、Mrp2、Bcrp 蛋白表达水平显著升高, 差异均有统计学意义 (P<0.01)。各组大鼠十二指肠组织中 3 种外排转运蛋白电泳图见图 1, 蛋白表达水平检测结果见表 2。

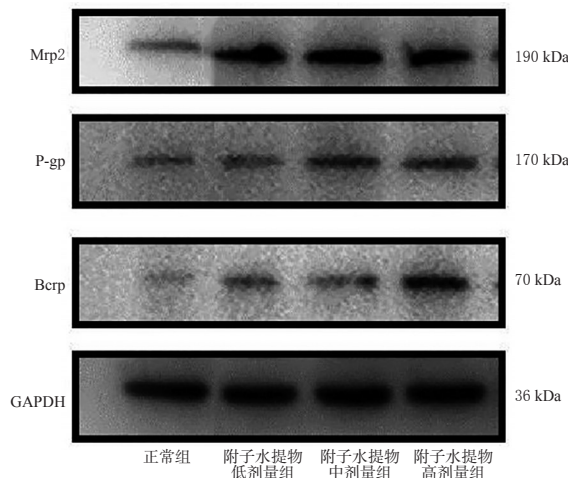


图 1 各组大鼠十二指肠组织中 P-gp、Mrp2、Bcrp 蛋白电泳图

Fig 1 Electrophoresis of P-gp, Mrp2 and Bcrp proteins in duodenum of rats in each group

表 2 各组大鼠十二指肠组织中外排转运蛋白和紧密连接蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Protein expression levels of efflux transporters and tight junction proteins in duodenum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	P-gp	Mrp2	Bcrp	Claudin-1	Occludin	ZO-1
正常组	0.273 ± 0.001	0.258 ± 0.002	0.110 ± 0.001	0.125 ± 0.005	0.033 ± 0.005	0.351 ± 0.033
附子水提取物低剂量组	0.305 ± 0.009 ^{##}	0.796 ± 0.022 ^{##}	0.236 ± 0.007 ^{##}	0.361 ± 0.018 ^{##}	0.152 ± 0.006 ^{##}	0.573 ± 0.011 ^{##}
附子水提取物中剂量组	0.385 ± 0.019 ^{##}	0.798 ± 0.077 ^{##}	0.193 ± 0.009 ^{##}	0.659 ± 0.071 ^{##}	0.143 ± 0.036 ^{##}	0.581 ± 0.010 ^{##}
附子水提取物高剂量组	0.346 ± 0.019 ^{##}	0.688 ± 0.035 ^{##}	0.343 ± 0.026 ^{##}	1.019 ± 0.109 ^{##}	0.198 ± 0.003 ^{##}	0.601 ± 0.022 ^{##}

注: 与正常组比较, ^{##}P<0.01

Note: vs. normal group, ^{##}P<0.01

3.2 附子水提取物对大鼠十二指肠中 3 种紧密连接蛋白表达的影响

与正常组比较, 附子水提取物各剂量组大鼠十二指肠组织中 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达水平均显著升高, 差异均有统计学意义 (P<0.01)。各组大鼠十二指肠组织中 3 种紧密连接蛋白电泳图见图 2, 蛋白表达水平检测结果见表 2。

3.3 附子水提取物对大鼠十二指肠组织中外排转运蛋白对应基因 mRNA 表达的影响

与正常组比较, 附子水提取物各剂量组大鼠十二指肠组织中 P-gp 的 mRNA 表达水平, 附子水提取物低、高剂量组 Bcrp 的 mRNA 表达水平均显著升高, 差异均有统计学意义 (P<0.05); 其余基因的 mRNA 表达水平差异均无统计学意义 (P>0.05)。各组大鼠十二指肠组织中外排转运蛋白对应基因的 mRNA 表达水平检测结果见表 3。

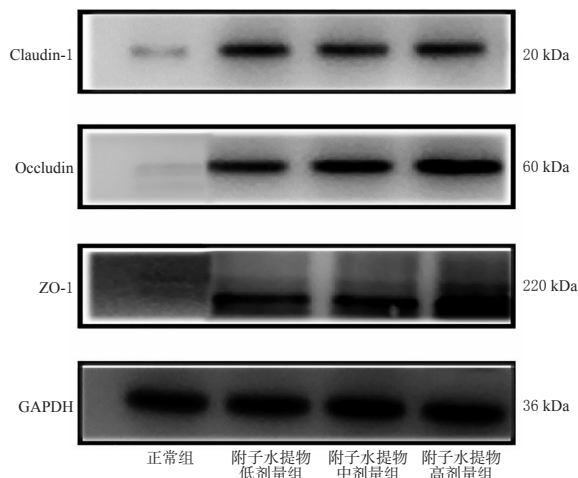


图2 各组大鼠十二指肠组织中 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白电泳图

Fig 2 Electrophoresis of Claudin-1, Occludin and ZO-1 in duodenum of rats in each group

表3 各组大鼠十二指肠组织中外排转运蛋白和紧密连接蛋白对应基因的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 mRNA expression levels of efflux transporters and tight junction proteins in duodenum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	P-gp	Mrp2	Bcrp	Claudin-1	Occludin	ZO-1
正常组	0.286 ± 0.038	0.200 ± 0.048	7.379 ± 0.552	0.509 ± 0.157	1.892 ± 0.366	0.560 ± 0.155
附子水提取物低剂量组	0.363 ± 0.043 [*]	0.249 ± 0.057	14.259 ± 4.615 [*]	0.584 ± 0.103	2.031 ± 0.481	0.658 ± 0.440
附子水提取物中剂量组	0.444 ± 0.087 [*]	0.269 ± 0.168	12.653 ± 4.138	1.545 ± 0.709 [*]	1.958 ± 0.169	0.660 ± 0.317
附子水提取物高剂量组	0.391 ± 0.038 [*]	0.264 ± 0.127	30.943 ± 15.816 [*]	2.304 ± 0.749 ^{**}	2.288 ± 0.592	0.660 ± 0.206

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

3.4 附子水提取物对大鼠十二指肠组织中紧密连接蛋白对应基因 mRNA 表达的影响

与正常组比较,附子水提取物中、高剂量组大鼠十二指肠组织中 Claudin-1 的 mRNA 表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其余基因的 mRNA 表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠十二指肠组织中紧密连接蛋白对应基因的 mRNA 表达水平检测结果见表3。

4 讨论

中药通常与其他中药或/和化学药物联合使用,因此不同中药之间或其与化学药物间可能发生相互作用,并可能对临床治疗产生不同的影响^[19-20]。外排转运蛋白和紧密连接蛋白在口服药物吸收途径中均有很高的参与度^[6],因此其表达水平的变化对研究药物间的相互作用十分重要。

本研究考察了附子水提取物对大鼠十二指肠组织中外排转运蛋白 P-gp、Mrp2、Bcrp 和紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin、ZO-1 的蛋白及其对应基因表达的影响,旨在预测附子水提取物与外排转运蛋白的其他相关底物类药物,以及以旁细胞转运途径为主要吸收通路的药物

之间的相互作用。

P-gp、Mrp2、Bcrp 这3种外排转运蛋白的表达及活性变化可直接影响药物在肠道环境中吸收情况^[21]。据文献报道,附子中的3种代表性乌头类生物碱(乌头碱、苯甲酰乌头碱、乌头原碱)可明显上调人结肠腺癌 LS174T 细胞、Caco-2 细胞以及 FVB 小鼠小肠组织中 P-gp、Mrp2 和 Bcrp 的表达,其中除乌头原碱能明显降低结肠段中 Bcrp 的 mRNA 表达水平,但对其蛋白影响不显著之外,上述3种生物碱对其他外排转运蛋白及其 mRNA 的调控作用基本一致,并认为乌头类生物碱与 P-gp、Mrp2、Bcrp 其他底物类药物联用时可能发生相互作用^[22-24]。本研究结果显示,不同剂量的附子水提取物均可明显上调大鼠十二指肠组织中上述3种外排转运蛋白,其中对 P-gp、Bcrp 蛋白表达水平的影响与其对应基因的影响具有一致性,与附子中的3种代表性生物碱在不同生物样本上的影响总体上保持一致,因此推测附子水提取物与上述3种外排转运蛋白的其他底物类药物也可能发生相互作用。附子作为一种具有抗肿瘤活性的中药,当与紫杉醇、阿霉素、长春新碱等同属于 P-gp 底物的抗肿瘤药物^[25-26]联合应用时,其对外排转运蛋白的上调作用可能导致上述药物血药浓度降低,从而降低上述药物的疗效。因此,当临床上将附子水提取物与其他外排转运蛋白底物类药物联用时应注意外排转运蛋白表达的变化,并可能需要相应增大临床给药剂量,但具体剂量调整情况还需临床研究进行验证。

紧密连接是许多非载体介导的水溶性成分的重要吸收途径之一,其上皮细胞吸收主要是通过旁细胞途径,该结构十分致密,而上调 Claudin-1、Occludin、ZO-1 的表达可明显影响旁细胞途径对药物的吸收^[27]。本研究结果显示,附子水提取物可明显上调 Claudin-1、Occludin、ZO-1 等紧密连接相关蛋白的表达,推测其与以细胞旁途径为主要转运通道的药物可能在吸收环节发生相互作用。例如,有研究报道,阿司匹林和水杨酸可以通过破坏紧密连接蛋白、打开细胞间隙,从而增加三七皂苷的吸收^[28];化疗药物如西莫替尼可通过破坏紧密连接、打开细胞间隙来增加联用药物的吸收,从而提高头孢克洛、瓦拉昔洛韦和阿昔洛韦的细胞旁路吸收^[7]。附子作为一种具有抗炎和抗肿瘤药理活性的中药,当与上述抗炎或抗肿瘤药物联用时,也应当注意其对配伍药物吸收的影响。本研究还发现,附子水提取物对 Claudin-1 的 mRNA 表达水平的显著上调作用与其对相应蛋白的影响基本一致,但是对 Occludin、ZO-1 的 mRNA 表达水平无显著上调作用,与其对相应蛋白的显著上调作用并不完全一致。这提示,附子水提取物可能是通过促进上述2种蛋白相应基因的 mRNA 翻译或者提高其蛋白的稳定性,而不是通过促进其基因的转录来发挥作用。

综上所述,附子水提取物可从 mRNA 和/或蛋白水平上调3种外排转运蛋白和3种紧密连接蛋白相应基因的

表达,从而与上述外排转运蛋白的其他底物类药物以及以细胞旁途径为主要转运通道的药物发生相互作用,继而影响上述药物的血药浓度乃至药效。在临床上联合用药时有必要考虑这种相互作用,并可考虑对用药剂量作相应调整。关于外排转运蛋白和紧密连接相关蛋白基因表达水平的变化具体如何反映药物联用时血药浓度及药物效应的变化,尚待后续研究进一步探讨。

参考文献

[1] 唐梅,赵立春,徐敏,等.附子化学成分和药理作用研究进展[J].广西植物,2017,37(12):1614-1627.

[2] 宋恩峰,孙文连,张珏,等.附子临床应用及安全性评价研究[J].中华中医药杂志,2013,28(4):895-901.

[3] 汪瑶.附子理中汤在消化系统疾病中的应用[J].世界华人消化杂志,2017,25(8):716-721.

[4] 尚坤,杨明慧,张凤瑞.4种中成药联合西药治疗消化系统疾病研究[J].吉林中医药,2017,37(3):285-287.

[5] 程旭锋,张新峰,刘琦,等.白术附子汤加味联合唑来膦酸注射液治疗乳腺癌骨转移临床观察[J].中医学报,2018,33(4):533-535.

[6] ZHANG G, OU R, LI F, et al. Regulation of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters by Astragali radix decoction and its main bioactive compounds: implication for clinical drug-drug interactions[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 180: 104-113.

[7] ZHU Q, LIU Z, LI P, et al. Drug interaction studies reveal that simotinin upregulates intestinal absorption by increasing the paracellular permeability of intestinal epithelial cells[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014, 29(4): 317-324.

[8] CLAIRET AL, BOITEUX-JURAIN M, CURTIT E, et al. Interaction between phytotherapy and oral anticancer agents: prospective study and literature review[J]. *Med Oncol*, 2019. DOI:10.1007/s12032-019-1267-z.

[9] SAABY L, BRODIN B. A critical view on in vitro analysis of P-glycoprotein (P-gp) transport kinetics[J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106(9): 2257-2264.

[10] SUNDELL KS, SUNDH H. Intestinal fluid absorption in anadromous salmonids: importance of tight junctions and aquaporins[J]. *Front Physiol*, 2012. DOI: 10.3389/fphys.2012.00388.

[11] ARIAS A, RIGALLI JP, VILLANUEVA SS, et al. Regulation of expression and activity of multidrug resistance proteins MRP2 and MDR1 by estrogenic compounds in Caco-2 cells: role in prevention of xenobiotic-induced cytotoxicity[J]. *Toxicology*, 2014, 320: 46-55.

[12] BENET LZ, CUMMINS CL, WU CY. Transporter-enzyme interactions: implications for predicting drug-drug interactions from in vitro data[J]. *Curr Drug Metab*, 2003, 4(5): 393-398.

[13] DAHAN A, ALTMAN H. Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability: mechanism, extent and relevance[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2004, 58(1): 1-9.

[14] LIN JH. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003,

55(2):53-81.

[15] CHEN Z, SHI T, ZHANG L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette(ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade[J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1): 153-164.

[16] 孔小强,蒋且英,罗云,等.基于外翻肠囊模型的黄芪-附子配伍对附子6种生物碱肠吸收的影响研究[J].中草药,2017,48(23):4928-4934.

[17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:191-193.

[18] 徐叔云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1982:1861.

[19] KIM HJ, KIM N, KIM YS, et al. Changes in the interstitial cells of Cajal and neuronal nitric oxide synthase positive neuronal cells with aging in the esophagus of F344 rats[J]. *PLoS One*, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0186322.

[20] ZHU L, YANG X, ZHOU J, et al. The exposure of highly toxic aconitine does not significantly impact the activity and expression of cytochrome P450 3A in rats determined by a novel ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method of a specific probe buspirone[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51: 396-403.

[21] IVANOVA L, FÆSTE CK, SOLHAUG A. Role of P-glycoprotein in deoxynivalenol-mediated in vitro toxicity[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 284: 21-28.

[22] BORRELLI F, IZZO AA. Herb-drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations[J]. *AAPS J*, 2009, 11(4): 710-727.

[23] IZZO AA, ERNST DE. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs[J]. *Drugs*, 2001, 61(15): 2163-2175.

[24] WU JJ, ZHU YF, GUO ZZ, et al. Aconitum alkaloids, the major components of Aconitum species, affect expression of multidrug resistance-associated protein 2 and breast cancer resistance protein by activating the Nrf2-mediated signalling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 87-97.

[25] GAO JD, LI YJ, CHEN JL, et al. Effects of compound Aconitum polysaccharide on glycosylation of tumor cells[J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2016, 36(9): 1103-1106.

[26] DONG LF, ZHANG YJ, LIU JS, et al. Anti-tumor effect of monkshood polysaccharide with adriamycin long circulating temperature-sensitive liposome and its mechanism[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2006, 22(4): 458-462.

[27] LI W, SUN K, JI Y, et al. Glycine regulates expression and distribution of Claudin-7 and ZO-3 proteins in intestinal porcine epithelial cells[J]. *J Nutr*, 2016, 146(5): 964-969.

[28] TIAN Z, PANG H, ZHANG Q, et al. Effect of aspirin on the pharmacokinetics and absorption of Panax notoginseng saponins[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 25(33): 1074-1075.

(收稿日期:2019-03-18 修回日期:2019-08-29)
(编辑:段思怡)