

网络出版时间: 2020-5-8 15:43 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.001.html>

◇基础医学研究◇

## 芍药苷-6-O'-苯磺酸酯对 Caco-2 细胞中 P-gp 表达和功能的调控

王斌<sup>1</sup>, 王剑<sup>1</sup>, 汤浩<sup>1</sup>, 孙伟<sup>1</sup>, 王勇<sup>1</sup>, 肖峰<sup>1</sup>, 王春<sup>1</sup>, 姜玲<sup>1,2</sup>, 魏伟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨芍药苷-6-O'-苯磺酸酯(CP-25)对Caco-2细胞中P-糖蛋白(P-gp)表达和功能的调控作用。方法 体外培养人结肠癌细胞Caco-2,以表观渗透系数( $P_{app}$ )为指标,研究pH对CP-25转运的影响;流式细胞术检测CP-25对P-gp的表达和活性的影响;Western blot法检测Caco-2细胞中的Phospho-NF- $\kappa$ B p65和P-gp表达;激光共聚焦法检测Caco-2细胞中Phospho-NF- $\kappa$ B p65的表达。结果  $P_{app}$ 值表明CP-25在结肠中的吸收高于Pae;流式细胞术检测结果显示,CP-25可增加细胞内RHO 123的积累,下调P-gp表达;Western blot结果显示CP-25作用后Phospho-NF- $\kappa$ B p65和P-gp的表达下调;激光共聚焦检测结果显示CP-25可使Phospho-NF- $\kappa$ B p65表达下调。结论 CP-25能够下调Caco-2细胞中P-gp的表达,抑制其转运活性,其作用机制可能与阻断NF- $\kappa$ B信号通路激活有关。

**关键词** CP-25; P-糖蛋白; NF- $\kappa$ B信号通路; Caco-2细胞

中图分类号 R 965.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)05-0653-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.001

芍药苷-6-O'-苯磺酸酯(benzene sulfonyl paeoniflorin, CP-25)是芍药苷(paeoniflorin, Pae)的结构修饰产物,具有较强的抗炎免疫调节活性。研究<sup>[1]</sup>显示CP-25的生物利用度和吸收能力优于Pae。单次肠灌流大鼠模型的研究表明CP-25的肠吸收优于Pae。结果表明,Pae的吸收弱是由于渗透性差,P-糖

蛋白(P-glycoprotein, P-gp)外流和肠道降解<sup>[2]</sup>引起的。P-gp是ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运体家族中重要的外排转运蛋白<sup>[3]</sup>。P-gp在人和其他哺乳动物的肠上皮细胞的基顶侧表面、胆小管和肾近端小管表达量很高,其生理功能是转运内源性代谢产物或外源性异物。很多临床上常用的免疫抑制药物都是P-gp的底物包括甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、糖皮质激素等,患者长期使用而引起P-gp的表达增加,因此降低药物疗效,产生耐药性。CP-25是抗炎免疫调节药物,能够降低关节炎大鼠滑膜组织中P-gp的表达,对Caco-2细胞是否具有调控作用尚不清楚。因此,该研究旨在探讨CP-25对Caco-2细胞中P-gp的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 药物与试剂** CP-25(白色粉末、纯度>98%)购自安徽医科大学临床药理研究所;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和DMEM培养基购自美国Hyclone公司;青霉素和链霉素溶液以及Hank's平衡盐溶液(HBSS)购自北京Solarbio公司;十二孔细胞培养板购自美国Costar公司;罗丹明123(RHO 123)购自美国Sigma公司;P-gp单克隆抗体(克隆UIC2)购自英国Abcam公司;流式细胞术试剂购自美国Becton Dickinson公司;P-gp抗体购自美国Santa公司;Phospho-NF- $\kappa$ B p65抗体购自美国CST公司。CoraLite594-缀合的山羊抗兔IgG(H+L)购自武汉ptgen公司。牛血清白蛋白(BSA)和Triton X-100购自上海Beyotime公司。

**1.1.2 实验细胞株** Caco-2细胞购自American Type Cell Culture 储存库(Manassas, VA)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞极性研究** 将细胞接种在75 cm<sup>2</sup>的培养瓶中并在DMEM培养基中培养。15 d后,在光学显微镜下观察细胞并拍照。将Caco-2细胞在12孔Transwell室中培养9、15、21 d,并用平衡的盐溶性HBSS溶液(pH=7.4)在37℃条件下洗涤单层细胞

2019-12-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81330081);安徽省转化医学研究院科研基金(编号:2017zhyx33);安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号:gxycqZD2019017);安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2018A0163)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥230032

<sup>2</sup>中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)药剂科,合肥230001

作者简介:王斌,男,硕士研究生;

姜玲,女,主任药师,硕士生导师,责任作者,E-mail: ah-slyyj@126.com;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

2~3次。孵育20 min后,将孔中的溶液吸干,并根据试剂盒的方法测定单层细胞肠腔(AP)和基底侧(BL)的碱性磷酸酶的活性。

**1.2.2 转运实验** 为了检测pH对CP-25和Pae转运的影响,用HBSS培养基稀释CP-25和Pae并用HCl调节以得到一系列pH值(pH 5.0、pH 6.0和pH 7.4)。处理所有样品并计算CP-25和Pae的 $P_{app}$ 。

**1.2.3 P-gp表达和活性分析** 将细胞以 $6.0 \times 10^4$ 个细胞/ $\text{cm}^2$ 的密度接种到24孔板上。在实验当天,用PBS缓冲液(pH 7.4)洗涤细胞2次,并用不同浓度CP-25和Pae(0、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )及空白对照组、维拉帕米阴性对照组处理48 h后,用PBS洗涤细胞两次,用胰酶消化,得到细胞悬浮液。然后将细胞分成2个约 $2.5 \times 10^5$ 个细胞的等分试样,分别用于检测P-gp活性和表达。

研究CP-25对P-gp表达的影响:将细胞离心并悬浮在含有10% FBS与FITC缀合的P-gp抗体(UIC2)的PBS缓冲液(pH 7.4)中,通过与对照组比较,考察CP-25对Caco-2细胞中P-gp表达的影响。

研究CP-25对P-gp活性的影响:胰蛋白酶消化后,使用含有FBS的DMEM将处于对数生长期的Caco-2细胞分散为单细胞悬浮液,将细胞分别以 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/ $\text{cm}^2$ 的密度接种到磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的2.0 ml EP管(300  $\mu\text{l}/\text{管}$ )中,后将细胞在37  $^{\circ}\text{C}$ 下与不含或含有各种浓度的药物(维拉帕米、CP-25和Pae)的 $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L RHO 123一起孵育40 min。孵育后用PBS洗涤细胞3次,然后离心5 min。之后,将细胞用含有10% FBS的PBS洗涤2次,悬浮于冰冷的PBS中,立即检测P-gp的表达。通过(530  $\pm$  15) nm带通滤波器(FL1)检测RHO 123的绿色细胞内荧光。通过与空白对照比较,考察CP-25对Caco-2细胞中RHO 123积累的影响。

**1.2.4 Phospho-NF- $\kappa$ Bp65和P-gp表达分析** 将Caco-2细胞以 $6.0 \times 10^4$ 个细胞/ $\text{cm}^2$ 的密度接种到六孔板上。然后加入不同浓度的CP-25和Pae(0、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )及空白对照组处理48 h后,用PBS洗涤细胞2次,加入含有磷酸酶抑制剂和PMSF的裂解缓冲液,冰上裂解30 min。将细胞刮下,12 000 r/min离心15 min,取上清液,采用BCA法对蛋白进行定量。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法将蛋白转移至PVDF上,用5%的脱脂牛奶封闭2 h,

一抗孵育4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜,与二抗结合2 h后,显影。

**1.2.5 Phospho-NF- $\kappa$ Bp65的表达** 将圆形盖玻片用75%乙醇浸泡过夜,夹入24孔板,加入无菌PBS冲洗2次。待细胞贴壁后,更换成不含血清的培养基,并用不同浓度CP-25(0、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )及空白对照组处理48 h后,吸弃培养基,加入4%固定液(用PBS制备4%多聚甲醛和4%蔗糖),室温固定15 min后,用PBS洗涤3次。加入0.2% Triton-X 100,室温放置10 min。再加入5%的BSA封闭30 min后加入PBS洗涤3次。孵一抗并4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜后,加入PBS洗涤3次。然后加入荧光标记二抗避光孵育1.5 h, PBS洗涤玻片3次。最后加入DAPI工作液染色,避光孵育5 min, PBS洗涤玻片3次。滴上1小滴防淬灭封片剂于载玻片上,取出盖玻片,用吸水纸吸干盖玻片上残余的液体,细胞朝下,轻轻叩于封片剂上,4  $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

**1.2.6 数据分析** 表观渗透系数 $P_{app}$ 按以下方程进行计算: $P_{app} = (\Delta Q/\Delta t) * [1/(A * C_0)]^{[4]}$ ,其中 $\Delta Q/\Delta t$ 是接收侧化合物的累积传输速率,A是细胞单层的表面积( $\text{cm}^2$ ), $C_0$ 是供体室中的初始浓度。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 16.0软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 进行表示,多组间资料采用单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时,两组间差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞形态学检查和极性研究** 在光学倒置显微镜下,Caco-2细胞在第6天和第7天缓慢融合生长,第15天逐渐变得均匀,致密和透明,如图1所示。



图1 Caco-2细胞显微镜照片(第15天)  $\times 200$

不同生长阶段的细胞单层碱性磷酸酶活性的结果如图2所示。从图中可以看出,碱性磷酸酶活性比(AP/BL)随时间迅速增加( $0.2 \pm 0.1$ 、 $0.7 \pm$

0.1、1.1 ± 0.2) ( $F = 6.283, 14.93, 38.77; P < 0.05, P < 0.01$ ) ,第 21 天的活性比第 9 天高约 5 倍 ,表明碱性磷酸酶的分布非常不对称。其中大部分都局限于刷状缘一侧 ,细胞生长是具有极性的。

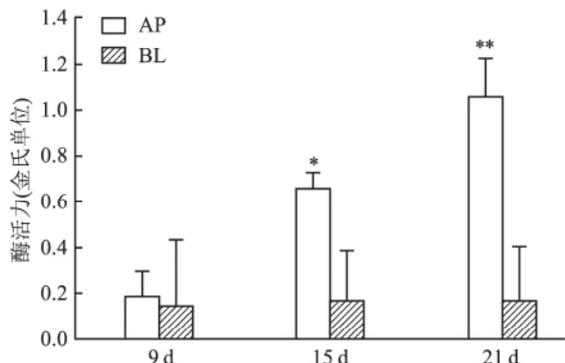


图 2 Caco-2 细胞的碱性磷酸酶活性  
与同一时间 BL 比较: \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

**2.2 pH 对 CP-25 和 Pae 转运的影响** pH 对 CP-25 和 Pae 转运的影响如图 3A 和图 3B 所示。与 pH 7.4 相比 ,CP-25 和 Pae 的膜渗透在 pH 4.0 和 pH 6.0 下升高 ( $F_A = 26.88, F_B = 33.43, P < 0.01$ ) 。这些数据表明 CP-25 和 Pae 在 pH 4.0 和 pH 6.0 环境中具有很强的渗透性。当  $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  时 ,药物的吸收率较低。因此 CP-25 吸收高于 pH 7.4 时的 Pae。

**2.3 CP-25 对 Caco-2 细胞中 P-gp 表达的影响** 结果如图 4 所示 ,与空白对照组相比较 ,CP-25 组和维拉帕米组的 P-gp 表达较低 ,差异具有统计学意义 ( $F = 47.54, 15.14; P < 0.05$ ) 。结果提示 CP-25 对 P-gp 表达有下调作用。

**2.4 CP-25 对 Caco-2 细胞中 P-gp 转运活性的影响** 如图 5 中所示 ,CP-25 和维拉帕米在浓度为 10.0  $\mu\text{g/ml}$  和 20.0  $\mu\text{g/ml}$  时可以增加 Caco-2 细胞对 RHO123 的摄取 ,提高细胞内荧光强度 ,差异具有统计学意义 ( $F = 29.65, 14.11, P < 0.05$ ) 。此外 ,Pae 在浓度为 10.0  $\mu\text{g/ml}$  和 20.0  $\mu\text{g/ml}$  时也能够增加 Caco-2 细胞对 RHO123 的摄取。结果提示 ,Pae 的 RHO123 的细胞内积累低于 CP-25 ,说明

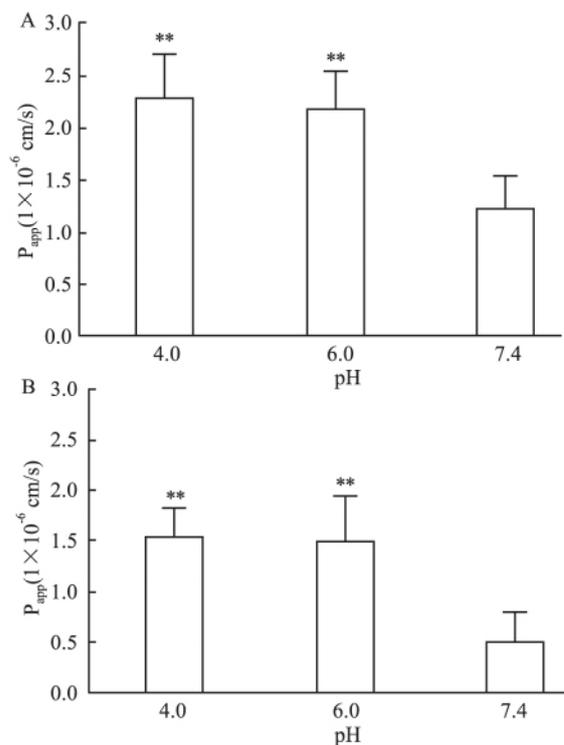


图 3 pH 对 Caco-2 细胞单层 CP-25 和 Pae 转运的影响  
A: CP-25; B: Pae; 与 pH 7.4 组比较: \*\*  $P < 0.01$

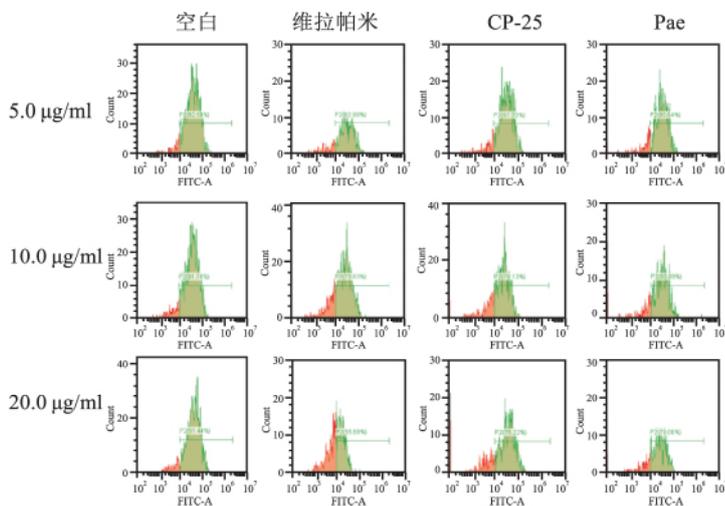
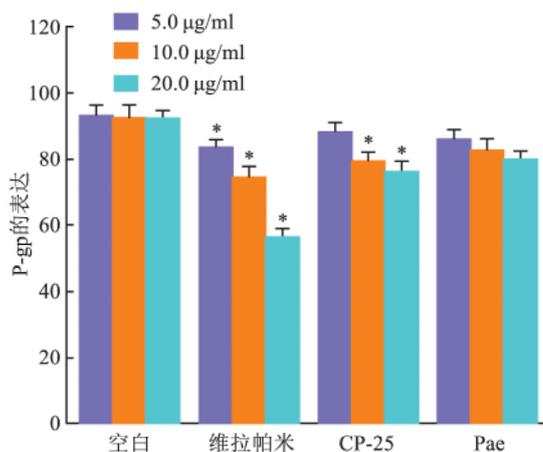


图 4 Caco-2 细胞中 P-gp 表达水平的流式细胞术分析  
与空白组比较: \*  $P < 0.05$



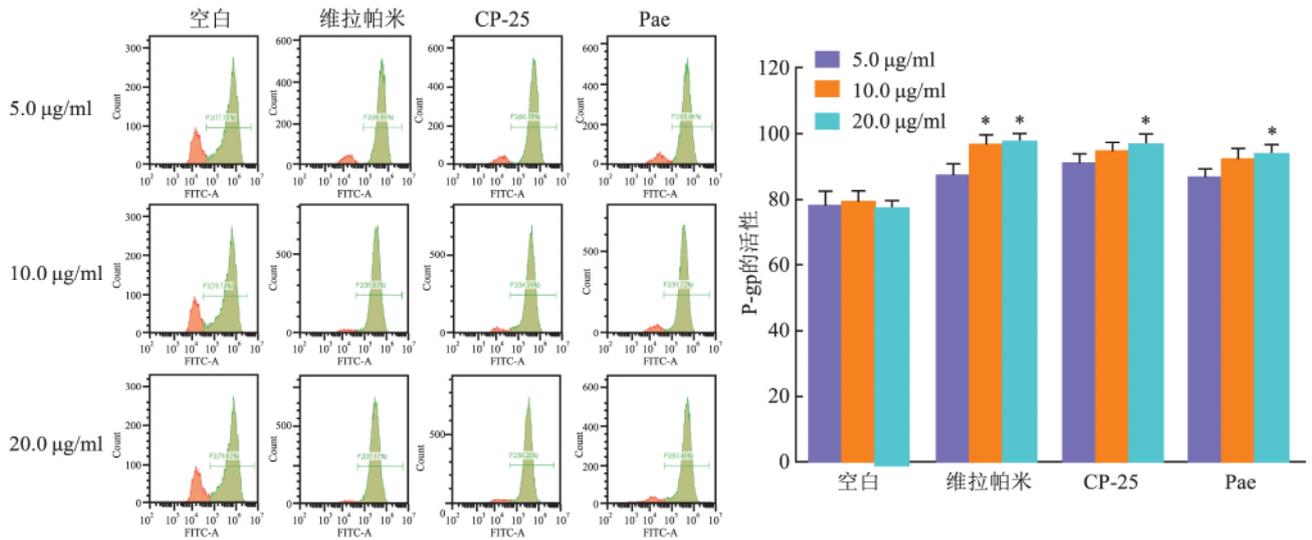


图5 CP-25对Caco-2细胞中P-gp转运活性的影响  
与空白组比较: \* P < 0.05

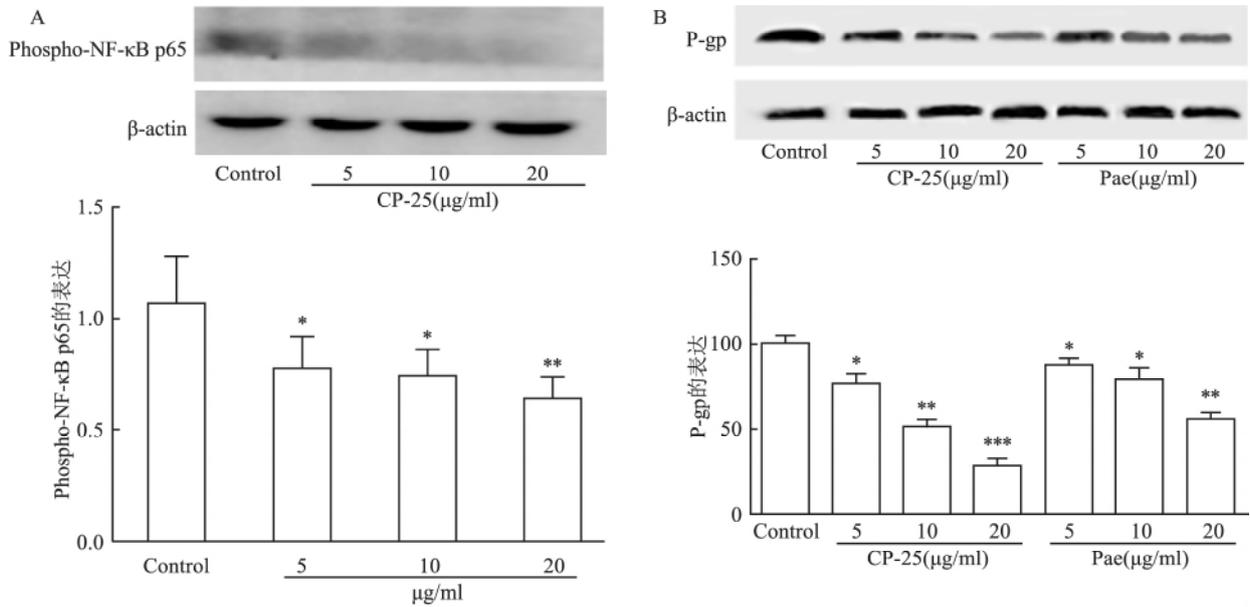


图6 CP-25对Caco-2细胞中Phospho-NF-κBp65和P-gp表达的影响  
与Control比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

CP-25对P-gp的抑制作用强于Pae。

**2.5 CP-25对Caco-2细胞中Phospho-NF-κBp65和P-gp表达的影响** 如图6所示,不同浓度的CP-25(5、10、20 µg/ml)处理48h后,Caco-2细胞中Phospho-NF-κBp65和P-gp表达水平随着药物浓度的增加而减少( $F_A = 5.041, F_B = 152.6; P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ )。提示CP-25可以降低Phospho-NF-κBp65和P-gp的表达。

**2.6 CP-25对Caco-2细胞中Phospho-NF-κBp65表达的影响** 如图7所示,不同浓度的CP-25(5、

10、20 µg/ml)处理Caco-2细胞48h后,通过共聚焦显微镜观察CP-25对Caco-2细胞中Phospho-NF-κBp65表达的影响。与Control组比较,5、10、20 µg/ml组荧光表达降低( $0.6 \pm 0.1, 0.6 \pm 0.1, 0.5 \pm 0.1$ ) ( $F = 9.573, P < 0.01$ ),提示CP-25可降低Caco-2细胞中Phospho-NF-κBp65表达。

### 3 讨论

Caco-2细胞来源于人类结肠直肠癌并且与小肠的肠细胞非常相似<sup>[5]</sup>,在培养的过程中融合,之后

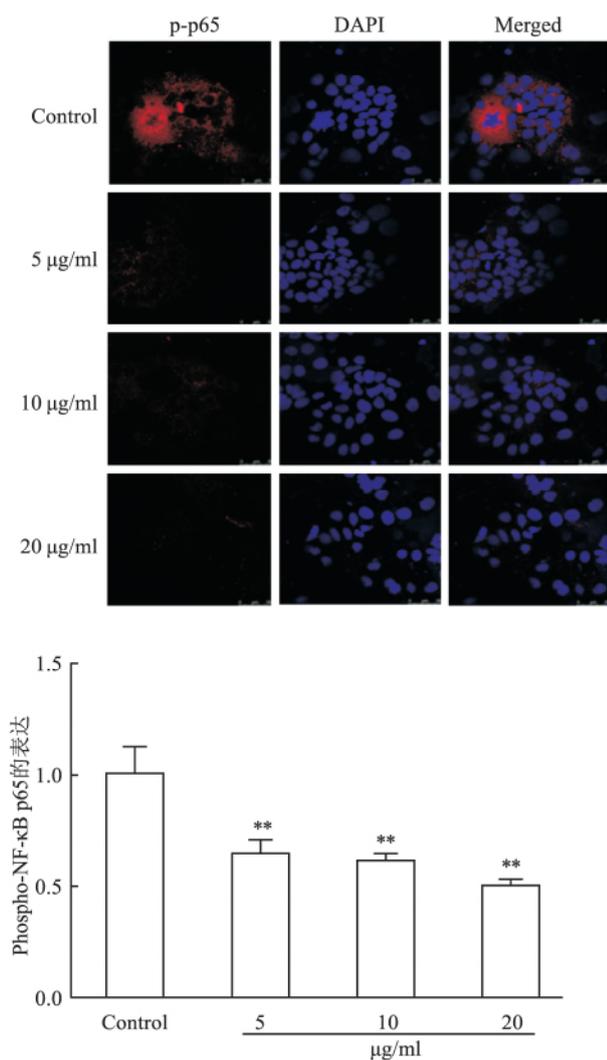


图7 CP-25对Caco-2细胞中Phospho-NF-κBp65表达的影响  
与Control比较: \*\*  $P < 0.01$

表现出自发的形态和生化的肠细胞分化<sup>[6]</sup>。在Caco-2细胞中所表达的P-gp<sup>[7-9]</sup>水平与正常人空肠<sup>[10]</sup>相同。此外,P-gp存在于Caco-2细胞的顶膜中也证实了其在该肠细胞系中的极化表达<sup>[11]</sup>。在实验性Caco-2细胞模型中,随着时间的延长,碱性磷酸酶活性比(AP/BL)迅速增加。碱性磷酸酶活性高于培养后第9~21天,增加约5倍,表明此时碱性磷酸酶的分布非常不对称,其中大部分集中在刷状缘一侧,细胞生长极性且完全分化,符合转运实验要求。

在Caco-2细胞模型中,通常表现渗透系数 $P_{app}$ 被用来评估药物摄取的生物利用度。通过研究各种化合物的转运机制,Artursson et al<sup>[12]</sup>发现 $P_{app}$ 大于 $1.0 \times 10^{-6}$  cm/s时,认为该化合物能够被很好地吸收,而 $P_{app}$ 小于 $1.0 \times 10^{-6}$  cm/s时,该化合物被认为

吸收一般。据报道,在pH为7.4<sup>[13]</sup>的环境中,Pae在结肠中被吸收较低。实际上,本研究证实在pH为7.4的环境中,Pae转运渗透率最低,原因可能是Pae中的单酯基团会水解,从而降低其吸收率。另外,在pH值为7.4时,CP-25的转运渗透率低于4.0的pH值和6.0的pH值。但根据 $P_{app}$ 值,当 $P_{app}$ 小于 $1 \times 10^{-6}$  cm/s时,药物吸收性差。因此CP-25吸收大于pH为7.4时的Pae。

在该实验中,选择RHO123作为P-gp底物。RHO123是P-gp的经典底物,其经常作为工具药物用于研究P-gp在肠细胞膜中的功能。细胞中RHO123累积量的变化可以准确地代表P-gp<sup>[14]</sup>的功能。维拉帕米是P-gp的抑制剂,可以增加Caco-2细胞中RHO123的积累<sup>[15]</sup>,用作阳性对照药。与对照组相比,维拉帕米可显著增加RHO123细胞内积累量。这一结果证明,通过测定RHO123积累量的变化来研究被测药物对P-gp活性的影响,实验方法是可行的,其结果表明CP-25可显著增加RHO123的细胞积累。Western blot和共聚焦显微镜观察结果显示,CP-25可显著下调P-gp和Phospho-NF-κBp65的表达。核转录因子-κB(nuclear factor κB, NF-κB)是由p65和p50组成的二聚体转录因子。当受到外界刺激时,κB蛋白被磷酸化,释放出的NF-κB转移至细胞核并激活下游目的基因。以上说明CP-25是影响P-gp活性和表达的有效成分,可能是P-gp的抑制剂。

综上所述,CP-25能够下调Caco-2细胞中P-gp的表达,其分子机制可能与阻断NF-κB信号通路激活有关。

## 参考文献

- [1] Wang C, Yuan J, Zhang L L, et al. Pharmacokinetic comparisons of paeoniflorin and paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate in rats via different routes of administration [J]. Xenobiotica, 2016, 46(12): 1142-50.
- [2] Liu Z Q, Jiang Z H, Liu L, et al. Mechanisms responsible for poor oral bioavailability of paeoniflorin: Role of intestinal disposition and interactions with sinomenine [J]. Pharm Res, 2006, 23(12): 2768-80.
- [3] 许悦, 陈根富, 熊涛, 等. P-糖蛋白诱导作用的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(1): 26-33.
- [4] 宋丽, 张宁, 徐德生. 芍药苷在Caco-2细胞模型中吸收机制的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 41-4.
- [5] Barta C A, Sachs-Barrable K, Feng F, et al. Effects of monoglycerides on P-glycoprotein: modulation of the activity and expression in Caco-2 cell monolayers [J]. Mol Pharm, 2008, 5(5): 863-

- 75.
- [6] Huynh-Delerme C, Huet H, Noel L, et al. Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium [J]. *Toxicol In Vitro* 2005, 19(4): 439 - 47.
- [7] Linn Y C, Wang S M, Hui K M. Comparative gene expression profiling of cytokine-induced killer cells in response to acute myeloid leukemic and acute lymphoblastic leukemic stimulators using oligonucleotide arrays [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(6): 671 - 81.
- [8] Vauleon E, Avril T, Collet B, et al. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma [J]. *Clin Dev Immunol*, 2010: 689171
- [9] Introna M, Borleri G, Conti E, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study [J]. *Haematologica* 2007, 92(7): 952 - 9.
- [10] Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, et al. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(1): 164 - 70.
- [11] Qiu Y, Xu M B, Yun M M, et al. Hepatocellular carcinoma-specific immunotherapy with synthesized alpha1 3-galactosyl epitope-pulsed dendritic cells and cytokine-induced killer cells [J]. *World J Gastroenterol* 2011, 17(48): 5260 - 6.
- [12] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficient in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175(3): 880 - 5.
- [13] Li Y, Lu Y, Hu J, et al. Pharmacokinetic comparison of scutellarin and paeoniflorin in sham-operated and middle cerebral artery occlusion ischemia and reperfusion injury rats after intravenous administration of Xin-Shao formula [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): e1191
- [14] Zhu H J, Wang J S, Markowitz J S, et al. Characterization of P-glycoprotein inhibition by major cannabinoids from marijuana [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 317(2): 850 - 7.
- [15] Perloff M D, Stormer E, von Moltke L L, et al. Rapid assessment of P-glycoprotein inhibition and induction *in vitro* [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(8): 1177 - 83.

## Regulation of paeoniflorin-6-O'-benzene sulfonate( CP-25) on expression and function of P-glycoprotein in Caco-2 cells

Wang Bin, Wang Jian, Tang Hao, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine in Anhui Province, Hefei 230032*)

**Abstract** *Objective* To study the regulation of CP-25 on P-glycoprotein (P-gp) expression and function in Caco-2 cells. *Methods* Human colon cancer cell line Caco-2 was cultured *in vitro*. The apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) was used as an indicator to study the effect of pH on the transport of CP-25. Flow cytometry was used to detect the expression and activity of CP-25 on P-gp. The expression of Phospho-NF- $\kappa$ B p65 and P-gp in Caco-2 cells was detected by Western blot. The expression of Phospho-NF- $\kappa$ B p65 in Caco-2 cells was detected by laser confocal microscopy. *Results* The  $P_{app}$  value indicated that CP-25 was higher in the colon than in Pae. The results of flow cytometry showed that CP-25 significantly increased the accumulation of RHO123 in cells and down-regulated the expression of P-gp. Western blot results showed that CP-25 could significantly down-regulate the expression of Phospho-NF- $\kappa$ B p65 and P-gp after treatment. Laser confocal assay showed that CP-25 could down-regulate the expression of Phospho-NF- $\kappa$ B p65. *Conclusion* CP-25 can down-regulate the expression of P-gp in Caco-2 cells and inhibit its transport activity, which may be related to the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words** CP-25; P-glycoprotein; NF- $\kappa$ B signaling pathway; Caco-2 cells