

维生素 D 缺乏和过剩对大鼠脑内 P-糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白表达的影响

黄 陈, 杨海峰*

江苏农牧科技职业学院 动物药学院, 江苏 泰州 225300

摘要: 目的 研究维生素 D 缺乏和过剩对大鼠脑内 P-糖蛋白 (P-gp) 和乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 功能和表达的影响。方法 18 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、去维生素 D (NVD) 组和高维生素 D (HVD) 组, 分别使用标准饲料 (1 000 IU/kg 维生素 D)、去维生素 D (0 IU/kg 维生素 D) 饲料和高维生素 D (20 000 IU/kg 维生素 D) 饲料饲养 12 周, 诱导维生素 D 缺乏和过剩模型, 测定大鼠血清中 25-羟基维生素 D₃[25(OH)D₃]、1 α ,25 二羟基维生素 D₃[1 α ,25(OH)₂D₃]水平以确证模型。造模成功后, 尾 iv 含罗丹明 123 (0.2 mg/kg)、哌唑嗪 (1 mg/kg) 和荧光素钠 (2 mg/kg) 的混合探针, 采用 LC-FLU 或 LC-MS 法分别测定大鼠脑皮层、海马和血浆中罗丹明 123、哌唑嗪和荧光素钠的浓度, 计算脑血比, 评价 P-gp、BCRP 功能和血脑屏障完整性; 采用 Western blotting 法测定大鼠脑皮层和海马 P-gp 和 BCRP 的相对表达量。用 25(OH)D₃、1 α ,25(OH)₂D₃ 分别温孵人微血管内皮细胞 (hCMEC/D3), 以罗丹明 123、哌唑嗪为探针评价细胞中 P-gp 和 BCRP 的功能。结果 维生素 D 缺乏大鼠脑内 P-gp 功能和表达下调, 而维生素 D 过剩大鼠脑内 P-gp 功能和表达上调, 维生素 D 缺乏和过剩均不影响大鼠脑内 BCRP 的功能和表达。25(OH)D₃ 不影响 hCMEC/D3 细胞 P-gp 和 BCRP 的功能, 而 1 α ,25(OH)₂D₃ 上调 hCMEC/D3 细胞中 P-gp 的功能。结论 维生素 D 缺乏导致的体内 1 α ,25(OH)₂D₃ 水平降低可能是下调大鼠脑内 P-gp 的功能和表达的原因之一, 而维生素 D 过剩导致的体内 1 α ,25(OH)₂D₃ 水平升高可能是上调大鼠脑内 P-gp 的功能和表达的原因之一。

关键词: 维生素 D; 25-羟基维生素 D₃; P-糖蛋白; 乳腺癌耐药蛋白

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)12-2495-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.12.005

Effects of vitamin D deficiency and excess on expression of brain P-gp and BCRP in rats

HUANG Chen, YANG Hai-feng

Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China

Abstract: Objective To study the effect of vitamin D deficiency and excess on the function and expression of brain P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP) in rats. **Methods** Eighteen male SD rats were randomly divided into control group, no vitamin D (NVD) group, and high vitamin D group (HVD). The rats were fed with standard diet (1 000 IU/kg vitamin D), no vitamin D diet (0 IU/kg vitamin D), and high vitamin D diet (20 000 IU/kg vitamin D) for 12 weeks, respectively. The serum concentrations of 25(OH)D₃ and 1 α ,25(OH)₂D₃ were determined to confirm the successful establishment of the rat model of vitamin D deficiency and vitamin D excess. A mixed probe containing rhodamine 123 (0.2 mg/kg), prazosin (1 mg/kg), and fluorescein sodium (2 mg/kg) was injected into the tail vein of the rats. The concentrations of rhodamine 123, prazosin, and fluorescein sodium in rat cerebral cortex, hippocampus, and plasma were measured. The ratios of brain probe concentration to plasma probe concentration were calculated to evaluate the function of P-gp, BCRP, and the integrity of blood brain barrier. The relative protein expression of P-gp and BCRP in cortex and hippocampus was also measured by Western blotting. hCMEC/D3 cells were used to document the effects of 25(OH)D₃ and 1 α ,25(OH)₂D₃ on the function of P-gp and BCRP. **Results** Function and expression of P-gp in the brain of vitamin D deficient rats were down-regulated, while the function and expression of P-gp in the brain of vitamin D excess rats were up-regulated. Vitamin D deficiency and excess did not affect the function and expression of BCRP in the brain of rats. 25(OH)D₃ did not affect the function of P-gp and BCRP in hCMEC/D3 cells, while 1 α ,25(OH)₂D₃ up-regulated the function of P-gp in hCMEC/D3 cells.

收稿日期: 2021-08-21

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20161368)

作者简介: 黄 陈, 男, 讲师, 主要从事药学研究。E-mail: brightblade1999@sina.com

*通信作者: 杨海峰, 男, 副教授, 主要从事药学研究。E-mail: yhf8142@sina.com

Conclusion The decreased levels of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ caused by vitamin D deficiency may be one of the reasons for down-regulating the function and expression of brain P-gp in rats, while the increased levels of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ caused by vitamin D excess may be one of the reasons for up-regulating the function and expression of brain P-gp in rats.

Key words: vitamin D; $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; p-glycoprotein; breast cancer resistance protein

维生素 D 作为维持机体生理功能所必需的营养元素之一,具有广泛的生理功能,包括调节骨代谢、调节动脉血压、调节免疫反应等^[1]。维生素 D 的缺乏与很多疾病如心血管疾病、免疫系统疾病、肿瘤、糖尿病、佝偻病、软骨病等密切相关^[2-4]。维生素 D 缺乏已经成为全球性公共健康问题,目前全球有近 10 亿人缺乏维生素 D,且人数呈逐年上升趋势,这极大地影响人们的生活质量^[5]。维生素 D 是一类脂溶性类固醇化合物,包括维生素 $\text{D}_1 \sim \text{D}_5$ 共 5 种类型。在人体中,皮肤中的 7-脱氢胆固醇在紫外线照射下形成维生素 D_3 。维生素 D_3 经过血液循环进入肝脏,在肝脏线粒体的 25-羟化酶(CYP2R1、CYP27A1)作用下转化为 25 羟基维生素 D_3 [$25(\text{OH})\text{D}_3$],随后被运输至肾脏,在肾脏 1α -羟化酶的催化下生成具有生物活性的代谢产物 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在靶组织细胞中通过与维生素 D 受体(VDR)结合,诱导靶基因表达^[6]。近年来的研究表明,维生素 D 在调节体内药物代谢酶和转运体的功能和表达方面也发挥着重要作用,如 Quach 等^[7]报道维生素 D 缺乏可下调小鼠肝脏中 Cyp7a1 和肾脏中 Oat3 的表达。Chow 等^[8]报道 VDR 激活可以上调小鼠肝脏中 Cyp7a1 的表达。P-糖蛋白(P-gp)和乳腺癌耐药蛋白(BCRP)是脑内重要的外排转运体,主要表达在血脑屏障微血管内皮细胞的腔面侧,可以将其底物药物外排至血液循环,从而维持脑内的稳态^[9]。多项研究表明维生素 D 水平和 VDR 激活与 P-gp 和 BCRP 表达有着密切的关系^[10]。本实验通过建立维生素 D 缺乏和过剩的大鼠模型,研究维生素 D 的缺乏和过剩对大鼠脑内 P-gp 和 BCRP 功能和表达的影响。

1 材料

1.1 试剂

哌啶嗪(质量分数 99.9%,货号 100164)、瑞格列奈(质量分数 99.8%,货号 100753)、格列吡嗪(质量分数 99.9%,货号 100281)均购自中国食品药品检定研究院;罗丹明 123(质量分数 85%,货号 83702)、荧光素钠(质量分数 98%,货号 46960)、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ (质量分数 99.0%,货号 17938)均购自

西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;hCMC/D3 购自美国菌种保藏中心; $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 试剂盒(货号 YS03698B)购自上海雅吉生物科技有限公司;P-gp 单克隆抗体(货号 13978S)、BCRP 单克隆抗体(货号 4477S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;实验用水为超纯水;甲醇和乙腈(色谱纯)购自德国 Merck 公司;其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Milli-Q Gradient A10 超纯水器(美国 Millipore 公司);台式冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Sorvall RL6+超高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);MS105 十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);超声破碎仪(日本三洋公司);LC20A HPLC 系统(日本岛津公司);LCMS2020 单四级杆质谱系统(日本岛津公司)。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠(SPF 级,4 周龄),体质量 90~100 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,合格证编号 SCXK(沪)20080016。大鼠饲料由南通特洛菲饲料科技有限公司提供,标准饲料含 1 000 IU/kg 维生素 D,高维生素 D 饲料含 20 000 IU/kg 维生素 D,低维生素 D 饲料不含维生素 D。动物实验由江苏农牧科技职业学院动物伦理委员会批准实施。

2 方法

2.1 大鼠维生素 D 缺乏和过剩模型的建立

18 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、高维生素 D 组(HVD)、去维生素 D 组(NVD),每组 6 只。适应性喂养 3 d 后分别使用标准饲料(含 1 000 IU/kg 维生素 D)、高维生素 D 饲料(含 20 000 IU/kg 维生素 D)、去维生素 D 饲料(不含维生素 D)饲养 12 周,诱导维生素 D 过剩和缺乏模型。3 组大鼠的饮用水均为超纯水,每日以 12 h 光照/黑暗循环饲养,每周记录大鼠的体质量。造模 12 周后从眼底丛静脉取血,静置后 5 000 r/min 离心 5 min 分离血清,采用 LC-MS 法测定血清中 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 浓度,按说明书采用 ELISA 试剂盒测定血清中 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓

度。血清中 25(OH)D₃ 浓度低于 8 ng/mL^[11]或高于 30 ng/mL^[12]被认为维生素 D 缺乏或过剩模型成功。

2.2 大鼠脑内 P-gp 和 BCRP 功能和血脑屏障完整性的评价

给予大鼠尾 iv 混合工具药 (0.2 mg/kg 罗丹明 123+1 mg/kg 哌唑嗪+2 mg/kg 荧光素钠), 给药 45 min 后乙醚麻醉, 股动脉放血处死大鼠, 收集血液于含有肝素钠的 EP 管, 5 000 r/min 离心 5 min 后分离血浆。于冰板上取大鼠脑, 分离出皮层和海马, 精密称定质量, 分别加入 600、300 μL 超纯水进行匀浆, 制备脑组织匀浆液。测定血浆、脑组织匀浆液中罗丹明 123、哌唑嗪、荧光素钠的浓度, 根据不同脑区中罗丹明 123、哌唑嗪、荧光素钠的浓度与血浆浓度的比值(脑血比)评价 P-gp 和 BCRP 功能和血脑屏障完整性。

2.3 大鼠脑内 P-gp 和 BCRP 蛋白表达量的测定

采用 Western blotting 技术测定大鼠大脑皮层和海马中 P-gp 和 BCRP 蛋白表达。称取适量脑组织样本, 每 100 毫克脑组织加 1 mL 裂解液匀浆, 提取总蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白的含量, 并进行校正。两种蛋白的上样量均为 80 μg, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 湿转至 PVDF 膜上, 脱脂牛奶封闭 2 h, 分别用 P-gp 单克隆抗体 (1:2 000)、BCRP 单克隆抗体 (1:1 500) 孵育过夜, 膜清洗 3 遍, 再与辣根过氧化物酶结合的二抗 (羊抗兔) 室温下孵育 1.5 h。使用凝胶成像仪避光显色, 采用 Gel Imaging System 软件进行灰度值半定量, 经 β-actin 校正, 得大鼠 P-gp 和 BCRP 的相对表达量。

2.4 25(OH)D₃、1α,25(OH)₂D₃ 对人微血管内皮细胞 (hCMEC/D3) 中 P-gp 和 BCRP 功能的影响

通过测定 hCMEC/D3 细胞 (一种永生化的大鼠微血管内皮细胞) 对罗丹明 123 和哌唑嗪的摄取量来评价 P-gp 和 BCRP 的功能。hCMEC/D3 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 待培养瓶中的细胞长至 90% 融合时, 用胰蛋白酶消化, 按 1×10⁶ 个的密度接种在 24 孔培养板上。待细胞长至约 80% 融合时, 吸出原培养基, 分别加入含有浓度为 0、25、50、100 nmol/L 25(OH)D₃ 或浓度为 0、2.5、5、10 nmol/L 1α,25(OH)₂D₃ 的无血清培养基培养 72 h, 然后吸出培养基, 分别给予 0.5 mL 含 100 ng/mL 罗丹明 123、200 ng/mL 哌唑嗪的 Hanks 溶液。37 °C 温孵 2 h 后, 吸出培养板中含药的 Hanks 溶液, 用冰 Hanks 快速清洗 3 遍, 再每孔加入 0.3

mL 超纯水, 使用超声破碎仪破碎细胞得到细胞悬液, 测定细胞悬液中罗丹明 123、哌唑嗪的浓度, 并测定每孔细胞中的蛋白量, 结果以 hCMEC/D3 细胞中每毫克蛋白摄取的罗丹明 123 或哌唑嗪量分别表征 P-gp 和 BCRP 功能。

2.5 各成分的测定方法

2.5.1 大鼠血清中 25(OH)D₃ 的测定

参照文献报道^[13-14], 采用 LC-MS 法测定大鼠血清中 25(OH)D₃ 的浓度。

取血清 100 μL, 加 100 μL 甲醇, 涡旋 10 s 混匀, 加 1 mL 正己烷, 涡旋震荡 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取 900 μL 上清液于氮气下吹干, 加 10 μL 内标瑞格列奈 (100 ng/mL) 溶液和 90% 甲醇 90 μL 复溶, 涡旋震荡 10 min, 18 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样。

色谱条件: 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (150 mm×2.1 mm, 5 μm), 柱温 40 °C, 流动相为 0.1% 甲酸溶液-甲醇 (12:88), 体积流量 0.2 mL/min, 进样体积 5 μL。

质谱条件: 离子化方式为 ESI; 扫描方式为 SIM; 离子模式为正离子; 检测离子 25(OH)D₃ [M+H-H₂O]⁺ 为 383, 内标瑞格列奈 [M+H]⁺ 为 453; 加热块温度 350 °C; 脱溶剂管温度 250 °C; 干燥气流速 10.0 L/min; 雾化气体积流量 1.5 L/min, 接口电压 -4.5 kV。

血清中 25(OH)D₃ 标准曲线的线性范围为 0.5~100 ng/mL, 定量限为 0.5 ng/mL。定量下限 (0.5 ng/mL)、低 (1 ng/mL)、中 (25 ng/mL)、高 (80 ng/mL) 4 个质量浓度的批内、批间精密度 RSD 值均小于 10%, 准确度 RSD 值为 98.4%~107.2%, 25(OH)D₃ 在低、高质量浓度 (1、80 ng/mL) 的提取回收率分别为 (75.30±7.38)%、(78.50±5.46)%, 回收率符合要求且稳定。

2.5.2 大鼠血浆、脑组织和细胞悬液中罗丹明 123 和哌唑嗪质量浓度的测定

参照文献报道^[15-16]方法采用液相-荧光光谱 (LC-FLU) 法测定大鼠血浆、脑组织和细胞悬液中罗丹明 123 和哌唑嗪质量浓度。

罗丹明 123: 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 10 mmol/L 乙酸铵溶液 (含 0.5% 乙酸)-乙腈 (72:28), 柱温 40 °C, 体积流量 1 mL/min, 进样体积为 20 μL, 荧光检测器激发波长为 485 nm, 发射波长 546 nm。

哌唑嗪: 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 10 mmol/L 乙酸铵溶液 (含 0.5% 乙酸) - 乙腈 (80 : 20), 柱温 40 °C, 体积流量 1 mL/min, 进样体积为 20 μL, 荧光检测器激发波长为 250 nm, 发射波长为 390 nm。

取大鼠血浆、大鼠脑组织匀浆液、细胞悬液各 50 μL, 分别加入 150 μL 甲醇, 涡旋振荡 10 min, 18 000 r/min 离心 10 min, 分别取 100 μL 上清液, 18 000 r/min 再次离心 10 min, 取上清液 80 μL 于进样瓶中待分析。

2.5.3 大鼠血浆和脑组织中荧光素钠浓度的测定 参考文献报道^[17], 采用 LC-MS 法测定大鼠血浆、脑组织中荧光素钠的质量浓度。

色谱条件: 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 柱 (150 mm×2 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸溶液 - 乙腈 (60 : 40), 柱温 40 °C, 体积流量 1 mL/min, 进样体积为 5 μL。

质谱条件: 离子化方式为 ESI, 扫描方式为 SIM, 离子模式为正离子, 检测离子荧光素钠 [M+H]⁺ 为 333, 内标格列吡嗪 [M+H]⁺ 为 446, 加热块温度 350 °C, 脱溶剂管温度 300 °C, 干燥气体积流量 15.0 L/min, 雾化气体积流量 1.5 L/min, 接口电压 -4.0 kV。

取 50 μL 大鼠血浆、脑组织匀浆液, 加入 10 μL 内标格列吡嗪 (200 ng/mL) 溶液混匀, 加入 1 mL 醋酸乙酯涡旋振荡 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 800 μL 上清液于氮气下吹干, 加 40% 乙腈 100 μL 复溶液, 涡旋震荡 10 min, 18 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样。

2.6 统计分析

本实验所有的实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计软件为 GraphPad Prism 8.0, 采用单因素分析方法 (ANOVA) 进行组间差异分析, 用 Student's *t* test 进行显著性检验, 当 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示数据差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠血清中 25(OH)D₃ 和 1α,25(OH)₂D₃ 水平

在造模的第 12 周测定大鼠血清内的 25(OH)D₃ 和 1α,25(OH)₂D₃ 水平, 见表 1。结果表明, NVD 组大鼠血清中 25(OH)D₃、1α,25(OH)₂D₃ 水平显著低于对照组 ($P < 0.01$), HVD 组大鼠血清中 25(OH)D₃、1α,25(OH)₂D₃ 水平显著高于对照大鼠 ($P < 0.01$)。提示维生素 D 体内缺乏和过剩模型的建立。

表 1 大鼠血清中 25(OH)D₃ 和 1α,25(OH)₂D₃ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Serum concentrations of 25(OH)D₃ and 1α,25(OH)₂D₃ in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	25(OH)D ₃ /(ng·mL ⁻¹)	1α,25(OH) ₂ D ₃ /(pg·mL ⁻¹)
对照	15.41 ± 3.48	84.26 ± 6.31
NVD	0.86 ± 0.13**	25.69 ± 5.52**
HVD	81.35 ± 13.27**	149.08 ± 13.56**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3.2 维生素 D 缺乏和过剩对大鼠脑内 P-gp 和 BCRP 功能和血脑屏障完整性的影响

各组大鼠脑组织中罗丹明 123、哌唑嗪和荧光素钠浓度与血浆浓度的比值 (脑血比) 结果见图 1。

结果显示, P-gp 的探针底物罗丹明 123 在 NVD 组大鼠脑皮层和海马中脑血比均显著高于对照组

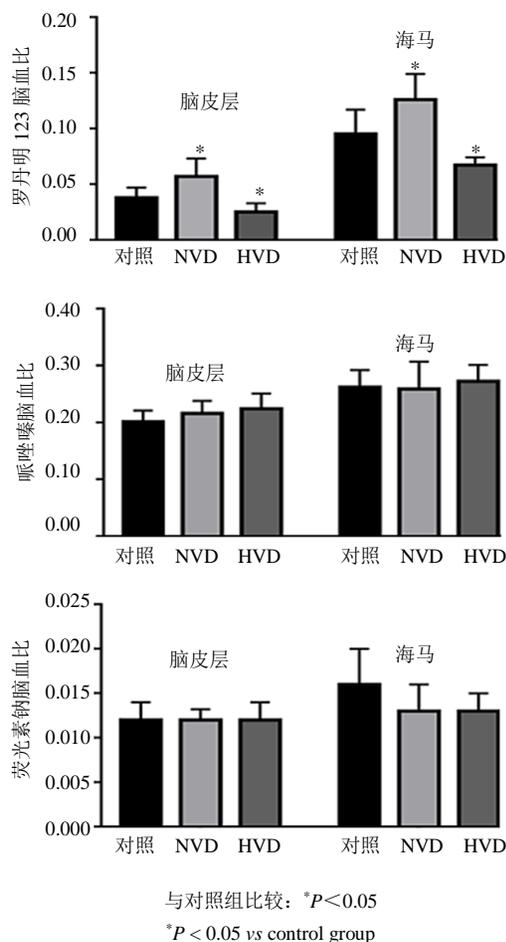


图 1 罗丹明 123、哌唑嗪和荧光素钠在各组大鼠中的脑血比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Brain-to-plasma concentration ratios of rhodamine 123, prazosin, and fluorescein in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

($P < 0.05$), 而罗丹明 123 在 HVD 组大鼠脑皮层和海马中脑血比显著低于对照组 ($P < 0.05$)。提示维生素 D 缺乏可能下调大鼠脑皮层和海马中 P-gp 的功能, 而维生素 D 过剩可能上调大鼠脑皮层和海马中 P-gp 的功能。

对于 BCRP 的探针底物哌唑嗪, NVD 和 HVD 组大鼠血浆和脑组织中哌唑嗪的脑血比与对照组相比均无显著改变, 提示维生素 D 缺乏和过剩对大鼠脑内 BCRP 的功能无影响。本实验还测定荧光素钠在血浆、大脑皮层和海马中的浓度, 并计算其脑血比以评价血脑屏障完整性。结果显示, 3 组大鼠血浆和脑组织中荧光素钠的脑血比均无统计学差异, 提示维生素 D 缺乏和过剩可能不影响血脑屏障的完整性。

3.3 维生素 D 缺乏和过剩对大鼠脑内 P-gp 和 BCRP 蛋白表达的影响

维生素 D 缺乏和过剩对大鼠脑内 P-gp 和 BCRP 蛋白表达的影响见图 2。

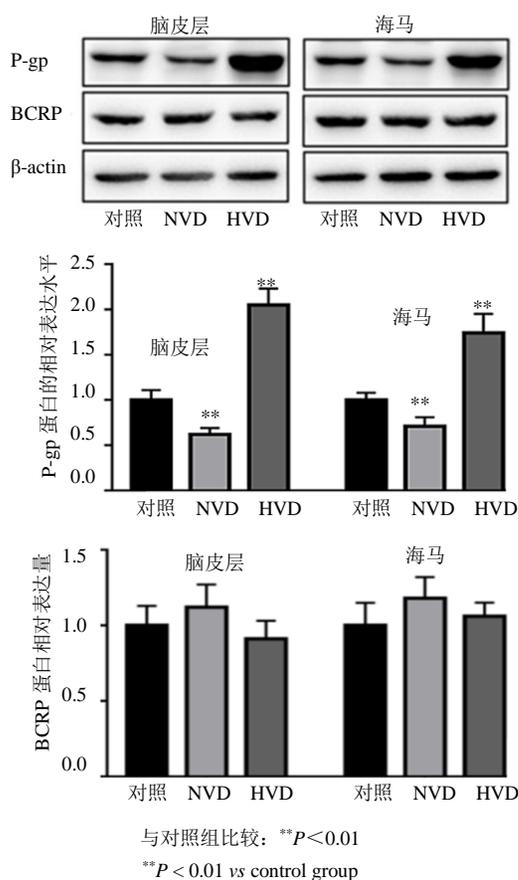


图 2 各组大鼠皮层和海马中 P-gp 和 BCRP 的相对蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Relative expression of P-gp and BCRP of cortex and hippocampus in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

可见 NVD 组大鼠皮层、海马中 P-gp 表达量与对照组大鼠相比显著降低 ($P < 0.01$), 而 HVD 组大鼠皮层、海马中 P-gp 表达量与对照组大鼠相比显著升高 ($P < 0.01$), 这与 P-gp 转运体功能改变的趋势一致。表明维生素 D 缺乏和过剩对大鼠脑内 P-gp 的表达水平有显著影响, 即维生素 D 缺乏降低脑内 P-gp 表达水平, 而维生素 D 过剩升高脑内 P-gp 表达水平。

3.4 25(OH)D₃ 和 1 α ,25(OH)₂D₃ 对 hCMEC/D3 细胞中 P-gp 和 BCRP 功能影响

25(OH)D₃ 或 1 α ,25(OH)₂D₃ 培养 hCMEC/D3 细胞 72 h 后, 测定细胞对 P-gp 底物罗丹明 123 和 BCRP 底物哌唑嗪的摄取情况, 结果见图 3。25(OH)D₃ 培养 72 h 后对 hCMEC/D3 细胞摄取罗丹明 123、哌唑嗪无影响, 但 1 α ,25(OH)₂D₃ 可以浓度相关性地降低 hCMEC/D3 细胞对罗丹明 123 的摄取, 而不影响 hCMEC/D3 细胞对哌唑嗪的摄取。提示 25(OH)D₃ 对 hCMEC/D3 细胞中 P-gp 和 BCRP 功能无影响, 然而 1 α ,25(OH)₂D₃ 可以上调 hCMEC/D3 细胞中 P-gp 的功能, 但不影响 BCRP 的功能。

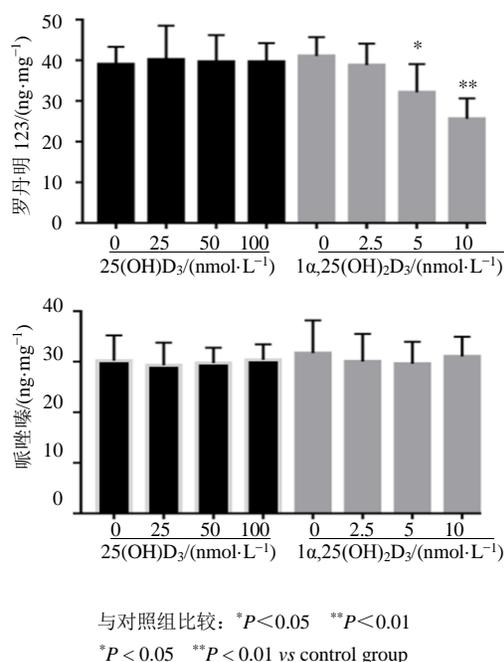


图 3 不同浓度 25(OH)D₃、1 α ,25(OH)₂D₃ 对 hCMEC/D3 细胞摄取罗丹明 123 和哌唑嗪的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Uptake of rhodamine 123 and prazosin in hCMEC/D3 cells after treatment with 25(OH)D₃ and 1 α ,25(OH)₂D₃ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

本研究发现大鼠给予去维生素 D (0 IU/kg 维生素 D) 饲料、高维生素 D (20 000 IU/kg 维生素 D) 饲料饲养 12 周后, 其体内 25(OH)D₃、1 α ,25(OH)₂D₃ 水平发生显著改变, 表现为 NVD 组大鼠血清中 25(OH)D₃、1 α ,25(OH)₂D₃ 水平显著低于对照组大鼠, HVD 组大鼠血清中 25(OH)D₃、1 α ,25(OH)₂D₃ 水平显著高于对照组大鼠, 表明维生素 D 缺乏和过剩的大鼠模型造模成功。

进一步的研究发现 NVD 组大鼠脑内 P-gp 功能和表达下调, 而 HVD 组大鼠脑内 P-gp 功能和表达上调, 维生素 D 缺乏和过剩均不影响大鼠脑内 BCRP 的功能和表达, 也不影响血脑屏障的完整性。体外细胞研究发现 1 α ,25(OH)₂D₃ 上调 hCMEC/D3 细胞中 P-gp 的功能, 但不影响 BCRP 的功能, 而 25(OH)D₃ 对 hCMEC/D3 细胞中 P-gp 和 BCRP 功能均无影响。以上结果与文献报道一致, 如文献报道小鼠连续 8 d 给予 1 α ,25(OH)₂D₃ 后, 脑内 P-gp 的功能和表达均上调, 限制 P-gp 底物奎尼丁进入脑内^[18]。又如文献报道给予 RBE4 和 hCMEC/D3 细胞 1 α ,25(OH)₂D₃ 培养 72 h 后 P-gp 的蛋白表达上调^[19]。Chow 等^[20]研究结果表明, 1 α ,25(OH)₂D₃ 激活 VDR 上调肾脏内 P-gp 蛋白表达, 增加地高辛的肾外排。Tachibana 等^[21]发现使用 VDR 激动剂 1 α ,25(OH)₂D₃ 或石胆酸可上调人结肠腺癌细胞株 LS174T 中 P-gp 的表达, 而敲除 VDR 基因可逆转上述作用, 这表明 P-gp 表达诱导与 VDR 的激活密切相关。

P-gp 有广泛结构类型的底物包括长春属生物碱、钙拮抗剂, 环孢素类、他汀类药物和 HIV 蛋白酶抑制剂以及一些内源性底物如 beta-amyloid、甾体类固醇激素和谷氨酸等。P-gp 主要表达一些特殊组织如肠、肾、肝、脑血管内皮、睾丸、视网膜和胎盘等, 成为血脑屏障、血睾屏障, 血视网膜屏障、肠屏障和胎盘屏障等生理性屏障的重要组成部分, 是限制药物分布的重要因素之一。在血脑屏障中, P-gp 是多数药物难以进入脑内的重要原因之一^[22]。其功能和表达下调可能导致 P-gp 底物药物在脑内分布增加以及活性/毒性增加。如文献报道在肝损伤大鼠脑内 P-gp 的表达下调, 进而导致底物药物苯巴比妥的脑内浓度增加和药效增强^[23]。也有文献报道阿尔茨海默病患者脑内 beta-amyloid 沉积与血脑屏障上 P-gp 的表达下调相关^[24]。本研究发现维生素 D 缺乏的大鼠脑内 P-gp 的功能和表达下调,

鉴于维生素 D 缺乏在所有年龄段的人群中时常发生^[5], 这提示对于维生素 D 缺乏的人群其脑内 P-gp 的功能和表达也可能下调, 进而可能导致 P-gp 底物药物和内源性底物在脑内分布增加以及活性/毒性增加, 其临床意义值得进一步关注。

综上所述, 维生素 D 缺乏导致的体内 1 α ,25(OH)₂D₃ 水平降低可能是下调大鼠脑内 P-gp 的功能和表达的原因之一, 而维生素 D 过剩导致的体内 1 α ,25(OH)₂D₃ 水平升高可能是上调大鼠脑内 P-gp 的功能和表达的原因之一, 但维生素 D 缺乏和过剩均不影响脑内 BCRP 的功能和表达。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Urena-Torres P, Souberbielle J C. Pharmacologic role of vitamin D natural products [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2014, 12(2): 278-285.
- [2] Forman J P, Scott J B, Ng K, *et al*. Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks [J]. *Hypertension*, 2013, 61(4): 779-785.
- [3] Holick M F, Binkley N C, Bischoff-Ferrari H A, *et al*. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(7): 1911-1130.
- [4] Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 144(Pt A): 138-145.
- [5] Amrein K, Scherkl M, Hoffmann M, *et al*. Vitamin D deficiency 2.0: An update on the current status worldwide [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2020, 74(11): 1498-1513.
- [6] Lin L, Zhang L, Li C, *et al*. Vitamin D and vitamin D receptor: New insights in the treatment of hypertension [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(10): 984-995.
- [7] Quach H P, Noh K, Hoi S Y, *et al*. Alterations in gene expression in vitamin D-deficiency: Down-regulation of liver Cyp7a1 and renal Oat3 in mice [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2018, 39(2): 99-115.
- [8] Chow E C, Magomedova L, Quach H P, *et al*. Vitamin D receptor activation down-regulates the small heterodimer partner and increases CYP7A1 to lower cholesterol [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(4): 1048-1059.
- [9] Liu L, Liu X D. Alterations in function and expression of ABC transporters at blood-brain barrier under diabetes and the clinical significances [J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 273.
- [10] Pavsek P, Smutny T. Nuclear receptors in regulation of

- biotransformation enzymes and drug transporters in the placental barrier [J]. *Drug Metab Rev*, 2014, 46(1): 19-32.
- [11] Durup D, Diaz-delCastillo M, Morgenlykke J, *et al.* Hypophosphatemic hypovitaminosis D induces osteomalacia in the adult female rat [J]. *Endocrinology*, 2020, 161(8): bqaa100.
- [12] Vieth R, Chan P C, MacFarlane G D. Efficacy and safety of vitamin D3 intake exceeding the lowest observed adverse effect level [J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73(2): 288-294.
- [13] Lin Y C, Lee H H, Tseng S C, *et al.* Quantitation of serum 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ concentrations by liquid chromatography tandem mass spectrometry in patients with diabetes mellitus [J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(2): 510-517.
- [14] Carlow D C, Schofield R C, Denburg M. Quantitation of 25-OH-vitamin-D₂ and 25-OH-vitamin-D₃ in urine using LC-MS/MS [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1378: 321-329.
- [15] Liu H, Xu X, Yang Z, *et al.* Impaired function and expression of P-glycoprotein in blood-brain barrier of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Brain Res*, 2006, 1123(1): 245-252.
- [16] Liu Y C, Liu H Y, Yang H W, *et al.* Impaired expression and function of breast cancer resistance protein (Bcrp) in brain cortex of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(12): 1766-1772.
- [17] Zhou Y, Zhou J, Li P, *et al.* Increase in P-glycoprotein levels in the blood-brain barrier of partial portal vein ligation /chronic hyperammonemia rats is mediated by ammonia/reactive oxygen species/ERK1/2 activation: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 846: 119-127.
- [18] Durk M R, Fan J, Sun H, *et al.* Vitamin D receptor activation induces P-glycoprotein and increases brain efflux of quinidine: an intracerebral microdialysis study in conscious rats [J]. *Pharm Res*, 2015, 32(3): 1128-1140.
- [19] Durk M R, Chan G N, Campos C R, *et al.* 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃-liganded vitamin D receptor increases expression and transport activity of P-glycoprotein in isolated rat brain capillaries and human and rat brain microvessel endothelial cells [J]. *J Neurochem*, 2012, 123(6): 944-953.
- [20] Chow E C, Durk M R, Cummins C L, *et al.* 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ up-regulates P-glycoprotein via the vitamin D receptor and not farnesoid X receptor in both *fxr(-/-)* and *fxr(+/+)* mice and increased renal and brain efflux of digoxin in mice *in vivo* [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 337(3): 846-859.
- [21] Tachibana S, Yoshinari K, Chikada T, *et al.* Involvement of vitamin D receptor in the intestinal induction of human ABCB1 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(8): 1604-1610.
- [22] Liu X. ABC family transporters [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141: 13-100.
- [23] Liu L, Miao M, Chen Y, *et al.* Altered function and expression of ABC transporters at the blood-brain barrier and increased brain distribution of phenobarbital in acute liver failure mice [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 190.
- [24] Chai A B, Leung G K F, Callaghan R, *et al.* P-glycoprotein: a role in the export of amyloid-beta in Alzheimer's disease? [J]. *FEBS J*, 2020, 287(4): 612-625.

[责任编辑 解学星]