

苔黑酚葡萄糖苷对 L02 细胞肝药酶 CYP3A 的调控作用研究

李敏¹, 张冰^{2*}, 刘小青²

1. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 目的 观察苔黑酚葡萄糖苷对体外培养的正常肝细胞株 L02 中 CYP3A 的影响, 探讨苔黑酚葡萄糖苷是否通过 cAMP-PKA 信号通路调控 CYP3A 的活性。方法 分别用 cAMP-PKA 信号通路中蛋白激酶 A(PKA)激动剂环腺苷酸(cAMP)类似物 8-溴-环腺苷酸(8-Br-cAMP)及其抑制剂 H-89、苔黑酚葡萄糖苷干预 L02 细胞, MTT 法检测细胞活力, 完整细胞免疫组化法检测 PKA 蛋白表达, 红霉素-N-脱甲基法检测 CYP3A 活性, Western blotting 检测细胞中孕烷 X 受体(PXR)蛋白表达。结果 与对照组(加入不含药的无血清培养基)相比, 苔黑酚葡萄糖苷处理后的细胞 CYP3A 的活性增强, PKA、PXR 蛋白表达增强, 与 8-Br-cAMP 的作用相似。结论 苔黑酚葡萄糖苷可通过 cAMP-PKA 信号通路调控 CYP3A 的表达, 表明其可能是仙茅表现出辛热药性的主要成分之一。

关键词: 苔黑酚葡萄糖苷; 仙茅; 肝 L02 细胞; cAMP-PKA 信号通路; CYP3A

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)06-1147-04

Regulation of orcinol glucoside on CYP3A of L02 cells

LI Min¹, ZHANG Bing², LIU Xiao-qing²

1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To study the regulative effects of orcinol glucoside on cytochrome P4503A (CYP3A) of L02 cells and to investigate whether orcinol glucoside regulates the CYP3A activity through cAMP-PKA signal pathway. **Methods** The L02 cells were treated with 8-Br-cAMP, an analogue of protein kinase A (PKA) agonist (cyclic adenosine monophosphate, cAMP), its inhibitor (H-89), and orcinol glucoside; MTT method was used to detect the cell vitality. The expression of pregnane X receptor (PXR) and PKA protein was detected by Western-blotting and immunohistochemistry, respectively; The activity of CYP3A was detected by erythromycin-N-demethylase. **Results** Compared with the control group, the activity of CYP3A was increased, the expression of PXR and PKA was increased in L02 cells treated with orcinol glucoside. **Conclusion** These data support that orcinol glucoside which is a singery effective component in the rhizoma of *Curculigo orchioides* could regulate CYP3A in L02 cells through cAMP-PKA signal pathway.

Key words: orcinol glucoside; *Curculigo orchioides* Gaertn.; liver L02 cell; cAMP-PKA signal pathway; CYP3A

仙茅为石蒜科植物仙茅 *Curculigo orchioides* Gaertn. 的根茎, 性味辛热, 归肾肝经, 具有温肾壮阳, 祛寒除湿功效, 为临床上常用的辛热药之一, 主要用于治疗肾阳不足, 命门火衰、阳痿精冷、小便频数、腰膝冷痛、筋骨痿软等虚寒症状。前期研究表明, 仙茅水提取物可影响 cAMP-PKA 信号通路调控药物代谢酶 CYP3A^[1-2]。研究显示, 仙茅主要成分仙茅苷进入大鼠体内很快代谢为苔黑酚葡萄糖

苷, 苔黑酚葡萄糖苷是仙茅的主要入血成分^[3], 可能是仙茅的主要有效成分。然而该成分是否通过影响 cAMP-PKA 信号通路来调控 CYP3A 的表达尚不清楚。本实验在前期研究基础上, 进一步观察苔黑酚葡萄糖苷作用于肝 L02 细胞后, cAMP-PKA 信号通路及药物代谢酶相关指标 CYP3A、蛋白激酶 A (PKA)、孕烷 X 受体 (PXR) 的变化, 探讨苔黑酚葡萄糖苷是否通过 cAMP-PKA 信号通路对 CYP3A

收稿日期: 2011-10-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2007CB512605); 陕西省教育厅课题(2010JK493)

作者简介: 李敏, 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药基础理论研究。Tel: (029)38185170 E-mail: liminsweet@126.com

*通讯作者 张冰 E-mail: zhangbing6@263.net

产生影响,进而揭示仙茅辛热性效的物质基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

苕黑酚葡萄糖苷(质量分数 90.6%)由北京中医药大学中药学院化学教研室黄健梅副教授提供。台盼蓝、MTT、环腺苷酸(cAMP)类似物 8-溴-环腺苷酸(8-Br-cAMP)、cAMP 抑制剂 H-89,美国 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基(干粉)、胎牛血清(FCS)、D-Hanks 液、胰酶、青霉素、链霉素,美国 Gibco 公司;兔抗 PKA 抗体稀释液,武汉博士德公司;二抗羊抗兔 IgG,北京中杉试剂公司;无水甲醇、磷酸二氢钾、磷酸、异丙醇均为分析纯,北京化学试剂公司。

1.2 细胞

L02 细胞为体外培养的正常人肝细胞株,由北京中医药大学中药学院生物技术系王春梅副教授惠赠。

1.3 仪器

超净工作台,天津医药净化设备厂;CO₂ 细胞培养箱,美国 Nap-co 公司;Bio-Rad-550 酶标仪,美国 Metertech 公司;低温高速离心机,美国 Beckman 公司;Nikon 生物显微镜,NIS-Elements Basic Research 图像采集分析系统,日本 Nikon 公司;电泳仪,转膜机,美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

液氮罐中取出冻存的 L02 细胞株,复苏,置 RPMI 1640 培养基(含 10% FCS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)中,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,24 h 后更换培养基,细胞为单层贴壁生长,当细胞贴壁大于 85%时(对数生长期)可传代培养。

2.2 对 L02 细胞活力的影响

细胞传代至第 4 或 5 代时,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,约 1×10^4 个细胞。常规培养 12 h 后,大于 85%的细胞贴壁,吸出原培养基,对照组加入无血清培养基,苕黑酚葡萄糖苷组给予不同浓度(1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} mol/L)的苕黑酚葡萄糖苷含药无血清培养基,每孔 100 μ L,每个浓度设 5 个复孔,培养 48 h 后,每孔加质量浓度为 5 mg/mL MTT 溶液(用 PBS 配制,pH 值为 7.4) 20 μ L,继续培养 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加 150 μ L DMSO,微量振

荡器振荡 10 min,使结晶物充分溶解,酶标仪于 570 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值。

2.3 对 L02 细胞药物代谢酶相关指标的影响

细胞传代至第 4 代或 5 代时,调整细胞浓度为 4×10^5 /mL,接种于 5 mL 培养瓶培养 12 h。大于 85%细胞贴壁时,弃原培养基,对照组加入无血清培养基,8-Br-cAMP 组加入终浓度为 1×10^{-5} mol/L^[4]的 8-Br-cAMP(用无血清培养基配制),H-89 组加入终浓度为 1×10^{-5} mol/L^[4]的 H-89(用无血清培养基配制),苕黑酚葡萄糖苷组加入终浓度为 1×10^{-5} mol/L 的苕黑酚葡萄糖苷(用无血清培养基配制)。培养 48 h 后收集细胞,检测相关指标,每组设 3 个平行复孔,实验重复 3 次。检测 PKA 蛋白表达的培养孔中放入圆形盖玻片,细胞爬片后进行免疫组化检测。

2.3.1 对 L02 细胞 PKA 蛋白表达的影响 小心吸去有盖玻片的培养孔中的培养液,加入 4%多聚甲醛,4 °C 固定 24 h。取出盖玻片,依次用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,用 3% H₂O₂ 漂洗 20 min。用兔抗 PKA 抗体稀释液(1:100)在 4 °C 培养 24 h,37 °C 复温 40 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;用二抗羊抗兔 IgG 在 37 °C 培养 40 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色,常规脱水、透明、封固,光镜(400 \times)下观察并拍照。采用 NIS2 Elements BR 2130 图像分析系统测定 PKA 阳性免疫反应产物的积分灰度值(着色深者灰度值低)进行分析。

2.3.2 对 L02 细胞 PXR 蛋白表达的影响 小心倾去培养液,用 PBS 洗 2 次,0.25%胰酶消化,收集细胞,126 \times g 离心 5 min,吸出上清液,加入 PBS 再清洗,126 \times g 离心 5 min,倒净 PBS,加入 200 μ L 裂解液(1.4 mL 单去污剂裂解液和 20 μ L 苯甲基磺酰氟)冰上裂解 30 min,4 °C、13 427 \times g 离心 8 min,吸取约 170 μ L,-80 °C 保存待测。采用考马斯亮蓝法测定蛋白的量。每孔加 40 μ L 蛋白,采用 SDS-PAGE 电泳,13%分离胶,5%的浓缩胶,半干转膜法将蛋白转至 PVDF 膜上,0.5%脱脂奶粉封闭 1 h 后加入 β -actin 一抗(1:2 000)于 4 °C 过夜。用含聚山梨酯-20 的 PBS(PBST)洗涤 3 次,每次 5 min,加入二抗,密封,室温放置 1 h,PBST 洗 3 次,加入 PXR 一抗(1:150),室温放置 1 h,PBST 洗 3 次,加二抗,PBST 洗 3 次,加显色剂 2 min,在暗室内压胶片曝光,观察结果并扫描,用 Bio-Rad Quantity one 软件进行分析。PXR 蛋白表达水平用

目的条带灰度与内参 β -actin 条带灰度的比值定量表示。

2.3.3 对 L02 细胞 CYP3A 活性的影响 小心倾去培养液, 用 PBS 洗 2 次, 0.25% 胰酶消化, 收集细胞, $4\ 023\times g$ 离心 10 min, 小心吸出上清液, 每管加入甘油磷酸缓冲液 (pH 值为 7.4) 0.2 mL 重悬细胞, 用超声破碎仪破碎细胞, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $1\ 450\times g$ 离心 15 min, 取上清液, 按红霉素-N-脱甲基法^[5]检测 CYP3A 活性。

2.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 软件, 多样本的组间比较采用单因素方差分析, 并进行 SNK-Q 检验。

3 结果

3.1 对 L02 细胞活力的影响

苔黑酚葡萄糖苷浓度为 1×10^{-3} mol/L 时, 对 L02 细胞活力有抑制作用 ($P<0.05$), 但随着给药浓度降低, 影响减弱。结果见表 1。

3.2 对 L02 细胞 PKA 蛋白表达的影响

8-Br-cAMP、苔黑酚葡萄糖苷作用于 L02 细胞, 可增强 PKA 蛋白表达; 而 H-89 可减少 PKA 蛋白表达, 与对照组比较差异显著 ($P<0.05$)。结果见表 2、图 1。

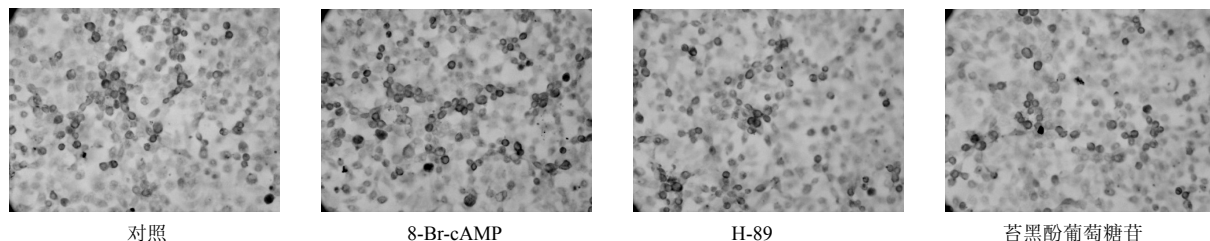


图 1 苔黑酚葡萄糖苷对 L02 细胞 PKA 蛋白表达影响

Fig. 1 Effect of orcinol glucoside on expression of PKA protein in L02 cells

3.3 对 L02 细胞 PXR 蛋白表达的影响

8-Br-cAMP、苔黑酚葡萄糖苷作用于 L02 细胞, 可增强 PXR 蛋白表达, 与对照组比较差异显著 ($P<0.05$)。结果见表 3 和图 2。

3.4 对 L02 细胞 CYP3A 活性的影响

8-Br-cAMP、苔黑酚葡萄糖苷作用于 L02 细胞, 可增强 CYP3A 的活性, 与对照组比较差异显著 ($P<0.05$)。结果见表 4。

4 讨论

仙茅具辛热药性, 可改善虚寒状态, 其性效在

表 1 苔黑酚葡萄糖苷对 L02 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Effect of orcinol glucoside on L02 cell vitality ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	C / (mol·L ⁻¹)	细胞活力 (A)
对照	—	0.74±0.10
苔黑酚葡萄糖苷	1×10^{-3}	0.53±0.02*
	1×10^{-4}	0.70±0.06
	1×10^{-5}	0.77±0.07
	1×10^{-6}	0.74±0.06
	1×10^{-7}	0.75±0.06
	1×10^{-8}	0.76±0.06
	1×10^{-9}	0.70±0.07

与对照组比较: * $P<0.05$; 下表同

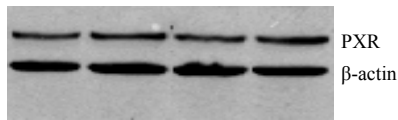
* $P<0.05$ vs control group; same as below

表 2 苔黑酚葡萄糖苷对 L02 细胞 PKA 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 Effect of orcinol glucoside on expression of PKA protein in L02 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	C / (mol·L ⁻¹)	PKA 阳性面积	灰度值
对照	—	185.68±46.92	243.80±27.59
8-Br-cAMP	1×10^{-5}	249.74±47.59*	277.46±32.29*
H-89	1×10^{-5}	160.69±38.42*	216.09±37.51*
苔黑酚葡萄糖苷	1×10^{-5}	239.54±29.15*	277.91±28.61*

表 3 苔黑酚葡萄糖苷对 L02 细胞 PXR 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Effect of orcinol glucoside on expression of PXR protein in L02 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	C / (mol·L ⁻¹)	PXR
对照	—	0.55±0.15
8-Br-cAMP	1×10^{-5}	0.74±0.17*
H-89	1×10^{-5}	0.61±0.14
苔黑酚葡萄糖苷	1×10^{-5}	0.87±0.34*



对照 8-Br-cAMP H-89 苔黑酚葡萄糖苷

图 2 苔黑酚葡萄糖苷对 L02 细胞 PXR 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of orcinol glucoside on expression of PXR protein in L02 cells

表 4 苔黑酚葡萄糖苷对 L02 细胞 CYP3A 活性的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Effect of orcinol glucoside on activity of CYP3A in L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / (mol·L ⁻¹)	CYP3A / (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
对照	—	0.38 ± 0.02
8-Br-cAMP	1 × 10 ⁻⁵	0.45 ± 0.01*
H-89	1 × 10 ⁻⁵	0.37 ± 0.01
苔黑酚葡萄糖苷	1 × 10 ⁻⁵	0.65 ± 0.01*

一定程度上通过 cAMP-PKA 信号通路调控肝药酶 CYP3A 表达^[1]。体外实验也表明, 仙茅水提物可通过上调 L02 细胞的 cAMP-PKA 信号通路, 增强 CYP3A 上游调控因子 PXR 表达, 从而提高 CYP3A 的活性^[2], 但其具体物质基础不明确。目前对仙茅化学成分分析及相关的药理作用探讨较多, 尚缺少仙茅入血成分的研究。前期研究发现苔黑酚葡萄糖苷是仙茅的主要入血成分^[3], 该成分可能是仙茅药性表达的物质基础之一。

本实验观察苔黑酚葡萄糖苷对 L02 细胞 cAMP-PKA 信号通路及药物代谢酶相关指标 PKA、PXR、CYP3A 的影响, 并以 cAMP-PKA 信号通路激动剂 8-Br-cAMP、cAMP-PKA 信号通路抑制剂 H-89 作阳性对照^[6-7], 进一步探讨仙茅作用于 cAMP-PKA 信号通路的物质基础。结果显示, 苔黑

酚葡萄糖苷浓度为 1 × 10⁻³ mol/L 时, 有一定的细胞毒性, 但随着浓度的降低, 对细胞的损害减轻, 1 × 10⁻⁵ mol/L 及其以下浓度对细胞基本无损害, 细胞活力与对照组接近。与对照组比较, 苔黑酚葡萄糖苷可显著提高 L02 细胞 cAMP-PKA 信号通路中关键酶 PKA 蛋白、PXR 蛋白表达, 增强 CYP3A 的活性 ($P < 0.05$), 与 8-Br-cAMP 的作用相当, 表明其可通过调节 cAMP-PKA 信号通路, 影响药物代谢酶 CYP3A 水平, 与仙茅水提物的效应一致。故推测苔黑酚葡萄糖苷是仙茅改善虚寒状态的有效成分之一, 也是仙茅表达辛热药性的物质基础之一。

参考文献

- [1] 李敏, 张冰, 刘小青, 等. 辛热药仙茅调控药物代谢酶 CYP3A 的药性表达研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(11): 745-748.
- [2] 李敏, 张冰, 刘小青, 等. 基于 L02 细胞 CYP3A 变化的辛热药附子、仙茅药性表研究 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2351-2355.
- [3] 霍秀颖. 仙茅入血成分的检测及其在不同机体状态大鼠体内药代动力学差异研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2009.
- [4] 李敏, 张冰, 刘小青. cAMP-PKA 信号通路对 L02 细胞药物代谢酶 CYP3A 调控的研究 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(4): 354-357.
- [5] 张均田. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [6] Lo K W, Ashe K M, Kan H M, *et al.* Activation of cyclic amp/protein kinase: A signaling pathway enhances osteoblast cell adhesion on biomaterials for regenerative engineering [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(4): 602-608.
- [7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.