香兰素与乙基香兰素对大鼠肝脏中转运蛋白 mRNA 表达的影响

孟沫然², 魏敏¹, 王玲², 罗诚浩¹, 陈义坤¹, 陈勇^{2*}

1. 湖北中烟工业有限责任公司 技术中心, 湖北 武汉 430040

2. 湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430040

摘要:目的 研究香兰素、乙基香兰素对大鼠肝脏中多药耐药基因 Mdr1、多药耐药相关蛋白 Mrp2、阴离子转运蛋白 Oatp1A1 和阳离子转运蛋白 Oct1 mRNA 表达水平的影响。方法 大鼠 ig 香兰素或乙基香兰素 3、15、75 mg/(kg·d), 连续给药 7 d, 提取肝脏总 RNA, 逆转录后荧光定量 PCR 检测细胞膜 Mdr1、Mrp2、Oatp1A1 和 Oct1 mRNA 的表达。结果 香兰素、乙基香兰素均能显著上调 Mdr1 mRNA 的表达, 下调 Oatp1A1、Oct1 mRNA 的表达, 对 Mrp2 mRNA 的表达无显著影响。结论 香兰素、乙基香兰素给药后能提高肝细胞 Mdr1 对药物的外排作用, 减弱 Oatp1A1、Oct1 对药物的摄取能力, 当香兰素和乙基香兰素与上述转运体底物药物共用时, 可能会发生药物相互作用。

关键词: 香兰素; 乙基香兰素; Mdr1; Mrp2; Oatp1A1; Oct1; 转运蛋白

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)11-2232-04

Effects of vanillin and ethyl vanillin on mRNA expression of transport proteins in liver of rats

MENG Mo-ran², WEI Min¹, WANG Ling², LUO Cheng-hao¹, CHEN Yi-kun¹, CHEN Yong²

1. Technology Center, China Tobacco Hubei Industry Co. Ltd., Wuhan 430040, China

2. Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Materia Medica, Hubei University, Wuhan 430040, China

Abstract: Objective To study the effects of vanillin and ethyl vanillin on the mRNA expression levels of multidrug resistance gene Mdr1, multidrug resistance-associated protein Mrp2, organic anion transporter Oatp1A1, and organic cation transporter Oct1 in liver of rats. **Methods** Wistar rats were ig administered with vanillin or ethyl vanillin at three dosage levels [3, 15, and 75 mg/(kg·d)] for consecutive 7 d, then the mRNA expression levels of Mdr1, Mrp2, Oatp1A1, and Oct1 in liver tissue of rats were detected by reverse-transcriptase fluorescence quantitative PCR. **Results** Both vanillin and ethyl vanillin had no significant effect on the mRNA expressions of Mrp2, but up-regulated mRNA expression of Mdr1 and down-regulated those of Oatp1A1 and Oct1 markedly. **Conclusion** Vanillin and ethyl vanillin could increase the drug excretion by Mdr1 in hepatocyte, and attenuate the drug intake capacity by Oatp1A1 and Oct1. The drug interaction is possible when vanillin and ethyl vanillin are used combined with the above transporter substrates.

Key words: vanillin; ethyl vanillin; Mdr1; Mrp2; Oatp1A1; Oct1; transporter protein

肝脏是机体物质代谢的中心, 决定药物的分布、代谢水平及经胆汁的排泄。根据底物跨膜转运方向, 转运蛋白可分为外排转运蛋白和摄取转运蛋白^[1]。外排转运蛋白主要包括 ATP 结合盒式转运蛋白家族成员, 摄取转运蛋白主要包括有机阴离子转运蛋白 (organic anion transporters, Oatps)、有机阳离子转运蛋白 (organic cation transporters, Octs)、二肽转运蛋白、核苷酸转运蛋白等。研究外源化合物对

肝细胞主要转运蛋白表达的影响, 对预测药物吸收和相互作用具有重要指导作用。

香草兰 *Vanilla planifolia* Andr., 别名香荚兰豆, 是现今使用最为广泛的天然食用香精之一, 香兰素是其提取物中重要的香味成分。近年来香兰素及其衍生物乙基香兰素广泛用作食品、饮料、烟酒、化妆品和药品的香料。香兰素及乙基香兰素是否会影响肝脏主要代谢酶和转运体的表达, 目前尚无文献

收稿日期: 2012-03-10

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (20107DB07301)

作者简介: 孟沫然 (1983—), 女, 湖北黄石人, 实验员, 主要从事实验动物研究。

*通讯作者 陈勇 Tel/Fax: (027)88663590 E-mail: cy101610@yahoo.cn

报道。本实验研究了香兰素、乙基香兰素 ig 给予大鼠后,对大鼠肝脏中多药耐药基因 Mdr1、多药耐药相关蛋白 Mrp2、阴离子转运蛋白 Oatp1A1 和阳离子转运蛋白 Oct1 等主要转运体表达的影响,为进一步研究这 2 个化合物的肝细胞吸收与转运机制,预测其作为添加剂与其他药物间可能存在的药物相互作用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

香兰素与乙基香兰素,质量分数≥98%,美国 Acros Organics 公司; Trizol 试剂盒、SuperScriptTM III 逆转录试剂盒,美国 Invitrogen 公司; TransStart Green qPCR SuperMix,日本 Toyobo 公司; 焦碳酸二乙酯 (DEPC),美国 Sigma 公司; 琼脂糖,上海基因技术有限公司。

1.2 动物

SPF 级 Wistar 大鼠,6 周龄,雄性,体质量 150~200 g,购于湖北省武汉疾病预防控制中心,合格证号 SCXK (鄂) 2008-0005。

1.3 主要仪器

MiniOpticon 荧光定量 PCR 仪,MyCycler PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司; WD-9413B 凝胶成像分析系统,DYY-4 型稳压稳流电泳仪,北京六一仪器厂。

2 方法

2.1 分组与给药

Wistar 大鼠随机分为香兰素低、中、高剂量 (3、15、75 mg/kg) 组,乙基香兰素低、中、高剂量 (3、15、75 mg/kg) 组,对照组,每组 3 只。6 个给药

组每天 ig 给予相应药物 1 次,连续给药 7 d,对照组 ig 等体积 0.5% CMC 溶液。第 8 天上午处死大鼠,迅速取出肝脏并称质量, -80 °C 保存备用。

2.2 对大鼠肝脏 4 种转运蛋白 mRNA 表达的影响

称取 50 mg 冰冻的肝脏组织,按 Trizol 试剂盒说明书提取各组大鼠肝总 RNA。总 RNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性;紫外分光光度计测定总 RNA A_{260}/A_{280} 的值,以检测 RNA 的纯度;分光光度计测定总 RNA 浓度;总 RNA 按逆转录试剂盒说明稀释后逆转录成 cDNA, -20 °C 保存备用。

肝脏细胞转运蛋白基因序列根据基因库并用 Primer 5.0 分析软件设计得来。采用同一软件设计内参基因 β -actin 与各目标基因。定量 PCR 引物序列及反应条件见表 1。定量 PCR 实验条件为: 95 °C, 1 min; 94 °C, 15 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 30 s, 读板; 从第 2 步开始 42 个循环,反应体系为 20 μ L。实时荧光定量 PCR 溶解曲线均为单一特异性峰,无杂带干扰。采用相对定量法用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因的差异表达倍数。

2.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件对各组进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 且差异表达倍数在 2 倍以上有统计学差异。

3 结果

3.1 总 RNA 的完整性、纯度与浓度

总 RNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见出现 5 S、18 S 和 28 S 3 条泳带,其中 28 S 条带亮度约为 18 S 的 2 倍,说明总 RNA 没被降解。经紫外

表 1 基因引物序列及反应条件

Table 1 Sequence of gene primers and reaction conditions

基因名称	引物序列	产物片段 / bp	退火温度 / °C
β -actin	正向: CCACAGTCCATGCCATCACTGC	292	54~59
	反向: CCAGGCGGCATGTCAGATCC		
Mdr1	正向: TCAGGGTTTGGAGTGGAAG	120	59
	反向: CGCTCGCTGACGAAGTATG		
Mrp2	正向: CTGGTTGGAAACTTGGTC	173	55
	反向: TCAACTGCCACAATGTTGGT		
Oatp1A1	正向: AGAGGGTAGATTGTTTTCC	381	54
	反向: TGTGTTCCGGTTCCTCCATA		
Oct1	正向: ACAGAAGAACGGGAAGGTG	221	59
	反向: AGAAGTCCAGGTAGAGGTT		

分光光度计检测,总 RNA A_{260}/A_{280} 的值在 1.8~2.0,表明总 RNA 纯度较高,均可用于 PCR 实验。

3.2 香兰素对大鼠肝脏 4 种转运蛋白 mRNA 表达的影响

与对照组相比,香兰素低剂量能抑制 Mrp2、

Oct1、Oatp1A1 mRNA 的相对表达量,抑制率近 50%;随着给药剂量的增加,Mrp2、Oct1 mRNA 的相对表达量增加,而 Oatp1A1 mRNA 的相对表达量继续降低 ($P<0.01$); Mdr1 mRNA 的相对表达量随香兰素给药剂量的增加而增加 ($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 香兰素和乙基香兰素对大鼠肝脏 Mdr1、Mrp2、Oct1 和 Oatp1A1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of vanillin and ethyl vanillin on mRNA expressions of Mdr1, Mrp2, Oct1, and Oatp1A1 in rat liver ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	Mdr1	Mrp2	Oct1	Oatp1A1
对照	—	1.00±0.09	1.00±0.13	1.00±0.20	1.00±0.63
香兰素	3	1.69±0.10	0.54±0.05	0.51±0.03	0.58±0.02
	15	3.25±0.28**	0.78±0.03	0.68±0.07	0.31±0.03**
	75	4.39±0.69**	0.88±0.33	0.83±0.12	0.25±0.09**
乙基香兰素	3	6.81±2.23*	0.80±0.19	0.72±0.18	2.31±0.58*
	15	4.03±0.47**	1.38±0.20	0.91±0.02	0.83±0.20
	75	3.45±0.45**	1.07±0.21	0.90±0.09	0.56±0.07

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

3.3 乙基香兰素对大鼠肝脏 4 种转运蛋白 mRNA 表达的影响

与对照组相比,乙基香兰素低、中、高剂量对 Mrp2、Oct1 mRNA 的表达无显著影响,但能显著诱导 Mdr1 mRNA 的相对表达量上调 ($P<0.05$ 、 0.01),在低剂量时还能显著诱导 Oatp1A1 mRNA 的表达量上调 ($P<0.05$),但随着给药剂量的增加,Oatp1A1 mRNA 的相对表达量却逐渐降低,与对照组相比无显著差异。结果见表 2。

4 讨论

P-糖蛋白 (P-gp) 与 Mrp2 都是有 ATP 结合域的载体蛋白家族中 MRP 亚家族的成员。P-gp 是由 Mdr1 编码的转运蛋白,广泛存在于各种器官中,能将底物直接从质膜双分子层泵出或使底物从胞浆中跨膜外流,从而发挥重要的生理功能,如减少细胞内积聚的毒物、阻断毒素和细胞应激诱发的细胞凋亡途径以及导致多药耐药性^[2]。Mrp2 是结合型胆红素、谷胱甘肽、白三烯以及多种有机阴离子药物排泄的主要载体蛋白,也是将胆红素排泄到胆汁中的主要转运子^[3],其部分转运底物与 P-gp 相同^[4]。Oatp 与 Oct1 均为摄取性转运蛋白,Oatp 主要负责大量两性内外源小分子物质在肝脏的摄取和清除,对肝脏的首过清除起到至关重要的作用^[5]; Oct1 是分布在人类肝脏的主要有机阳离子转运体,介导了许多有机阳离子底物和药物的转运^[6],主要负责将内外

源小分子亲水性化合物(相对分子质量介于 60~350,在生理环境下至少含有一个正电荷)转运进入肝细胞进行代谢^[7-8]。

本实验结果表明,香兰素、乙基香兰素能显著上调大鼠肝脏中 Mdr1 mRNA 的表达,对 Oatp1A1 mRNA 的表达也有一定的影响,表明香兰素、乙基香兰素给药后能提高肝细胞 Mdr1 对药物的外排作用,影响 Oatp1A1 对药物的摄取能力,提示当香兰素、乙基香兰素与上述转运体底物药物合用时,可能产生药物相互作用,临床用药应给予足够的重视。

由于上述 4 种转运体均为多次跨膜的膜蛋白^[9-12],对其进行蛋白定量有很大困难,因此本实验未测定药物对上述 4 种转运体蛋白表达量的影响。

参考文献

- [1] 栾家杰,宋建国. 药物转运体与药物体内过程 [J]. 安徽医药, 2005, 9(10): 721-723.
- [2] 黄慧雅,于明,张卫光. 多药耐药与肝细胞保护的研究进展 [J]. 解剖科学进展, 2009, 15(3): 333-337.
- [3] Chandra P, Brouwer K L. The complexities of hepatic drug transport: Current knowledge and emerging concepts [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(5): 719-735.
- [4] Takikawa H. Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2002, 9(4): 443-447.
- [5] 谭玮,李燕. 有机阴离子转运肽在药物转运中的作用 [J]. 国际药学研究杂志, 2007, 34(5): 364-368.

- [6] 苑晋艳. 有机阳离子转运体 OCT1 的遗传药理学研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(2): 160-164.
- [7] Umehara K I, Iwatsubo T, Noguchi K, *et al.* Functional involvement of organic cation transporter1 (OCT1/Oct1) in the hepatic up take of organic cations in humans and rats [J]. *Xenobiotica*, 2007, 7(8): 818-831.
- [8] Jonker J W, Schinkel A H. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2 and 3 (LC22A1-3) [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(1): 2-9.
- [9] 苏成业. P-糖蛋白在药物代谢动力学中的作用及其临床意义 [J]. 药学报, 2005, 40(8): 673-679.
- [10] Kullak-Ublick G A, Hagenbuch B, Stieger B, *et al.* Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide (OATP) cloned from human liver [J]. *Gastroenterology*, 1995, 109: 1274-1282.
- [11] Terashita S, Dresser M J, Zhang L, *et al.* Molecular cloning and functional expression of a rabbit renal organic cation transporter [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1369(1): 1-6.
- [12] Geier A, Wagner M, Dietrich C G, *et al.* Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(3): 283-308.

欢迎订阅《中草药》杂志1996—2009年增刊

为了扩大学术交流,提高新药研究水平,经国家新闻出版主管部门批准,我部从1996年起,每年出版增刊一册。

1996年增刊: 特邀了国内知名专家就中药新药研究的方向、法规及如何与国际接轨等热点问题撰文阐述。

1997年增刊: 包括紫杉醇的化学成分、提取工艺及组织培养等方面的科研论文,并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家撰写综述文章,充分反映了紫杉醇研究方面的新成果、新进展和新动态。

1998年增刊: 以当今国际研究的热点银杏叶为专论重点,包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面,充分反映了国内银杏叶开发研究方面的新成果、新进展和新动态。

1999年增刊: 为“庆祝《中草药》杂志创刊30周年”会议论文集,特邀中国工程院院士、国家药品监督管理局药品评审中心及知名专家就中药新药研究热点问题撰写了综述文章。

2000年增刊: 以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容。

2001年增刊: 特邀了中国工程院院士、专家就加快中药现代化的进程,我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章。

2002年增刊: 以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容。

2003—2008年增刊: 包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。

2009年增刊: 为庆祝“《中草药》杂志创刊40周年”和“《中草药》英文版(*Chinese Herbal Medicines*, CHM)创刊”,以中药创新药物开发的思路和方法、活性天然产物的发现及其作用机制研究、中药代谢组学研究、生药学研究、中药的安全性评价和不良反应监控、中药新药审评法规的最新进展、中药知识产权保护和专利的申请、民族药研究为主要内容;学术水平高,内容丰富,信息量大。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性高,欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行,邮局订阅《中草药》不含增刊,但能提供订阅凭证者,购买增刊7折优惠,款到寄刊。

地址:天津市南开区鞍山西道308号

邮编:300193

网址:www.tiprpress.com; www.中草药杂志社.中国

电话:(022)27474913 23006821

传真:(022)23006821

E-mail: zcy@tiprpress.com

《中草药》杂志编辑部