

白芷香豆素类化合物与 P-糖蛋白体外亲和作用研究

董 伟, 管雪静, 廖正根, 卢雪萍, 梁新丽*, 朱卫丰

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘 要: **目的** 研究白芷香豆素类化合物(欧前胡素、异欧前胡素、佛手柑内酯、氧化前胡素)在体外对 P-糖蛋白(P-gp)三磷酸腺苷(ATP)酶活性的影响,进而探讨白芷香豆素类成分影响 P-gp 介导药物转运的机制。**方法** 采用 ATP 酶活性测试法判断白芷香豆素类化合物是否为 P-gp 的底物。**结果** 欧前胡素和氧化前胡素各质量浓度组平均荧光强度值($\Delta\text{RLU}_{\text{TC}}$)均大于基础平均荧光强度值($\Delta\text{RLU}_{\text{basal}}$);异欧前胡素中、低质量浓度组及佛手柑内酯高、低质量浓度组 $\Delta\text{RLU}_{\text{TC}}$ 小于 $\Delta\text{RLU}_{\text{basal}}$ 。**结论** 欧前胡素和氧化前胡素为非浓度依赖的 P-gp ATP 酶抑制剂,异欧前胡素、佛手柑内酯在低质量浓度时可抑制 ATP 酶活性,对 P-gp 具有抑制作用;在高质量浓度时可诱导 ATP 酶活性,对 P-gp 具有诱导作用。

关键词: 白芷;香豆素类;P-糖蛋白;亲和力;欧前胡素;异欧前胡素;佛手柑内酯;氧化前胡素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)16-2893-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.020

In vitro study on affinity of coumarins in *Angelicae Dahuricae Radix* and P-gp

DONG Wei, GUAN Xue-jing, LIAO Zheng-gen, LU Xue-ping, LIANG Xin-li, ZHU Wei-feng

Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To study the effects of coumarins in *Angelicae Dahuricae Radix* (imperatorin, isoimperatorin, bergapten, and oxypeucedanin) on the activities of adenosine triphosphate (ATPase) in P-glycoprotein (P-gp) *in vitro* and to investigate the P-gp mediated mechanism in transport of drug. **Methods** The ATPase activity assay was used to identify whether the coumarins in *Angelicae Dahuricae Radix* were P-gp substrates or not. **Results** The average fluorescent values ($\Delta\text{RLU}_{\text{TC}}$) of imperatorin and oxypeucedanin at each concentration were greater than average basic fluorescence value ($\Delta\text{RLU}_{\text{basal}}$). The average fluorescent values ($\Delta\text{RLU}_{\text{TC}}$) in medium and low concentration of isoimperatorin and bergapten groups were lower than average basic fluorescence value ($\Delta\text{RLU}_{\text{basal}}$). **Conclusion** Imperatorin and oxypeucedanin are non-concentration dependent P-gp ATP inhibitors. Isoimperatorin and bergapten lactones could inhibit the ATPase activity at low concentration and have the inhibitory effect on P-gp. At high concentration, the activity of ATPase can be induced so as to induce P-gp.

Key words: *Angelicae Dahuricae Radix*; coumarins; P-glycoprotein; affinity; imperatorin; isoimperatorin; bergapten; oxypeucedanin

P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)为20世纪80年代发现的由人体多药耐药基因1(MDR1)基因编码的跨膜转运蛋白^[1],其能在ATP酶水解释放出能量的驱动下将异源性物质“泵”出细胞外(外排功能),从而降低细胞内的药物浓度^[2-3]。白芷为我国大宗常用中药材品种之一,具有祛风散寒、燥湿排脓、止痛等功效^[4]。而其中含有的香豆素类化合物是一类重要的有效成分,具有抗肿瘤、抗病毒、

抗凝血、止血、平喘、保护血管和抗骨质疏松等作用^[5]。本课题组前期研究了白芷香豆素类化合物(欧前胡素、异欧前胡素、佛手柑内酯、氧化前胡素)在Caco-2细胞的跨膜转运,结果表明欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素能促进长春新碱透过Caco-2细胞单层转运,佛手柑内酯对长春新碱透过Caco-2细胞单层转运有抑制作用^[6]。本研究通过研究白芷香豆素类化合物对ATP酶活性的影响,进而探讨

收稿日期: 2016-03-29

基金项目: 江西省青年科学基金资助项目(20161ACB21020);江西省青年科学家培养对象资助项目(20153BCB23019);国家青年自然科学基金资助项目(81303237);中国博士后基金(2016M590606)

作者简介 董 伟,讲师,主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: sober96@foxmail.com

*通信作者 梁新丽 Tel: (0791)87118 658 E-mail: paln7@163.com

其对 P-gp 功能的影响,为阐明白芷香豆素类化合物与其他药物的相互作用提供依据。

1 材料

多功能酶标仪 (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, 美国); 未经处理的 96 孔板 (美国 Corning 公司); P-gp-Glo™ 检测体系 (由 P-gp 膜、ATP 检测基质、ATP 检测缓冲液、P-gp 检测缓冲液、维拉帕米、Mg-ATP、硫酸钠等组成,均来自美国 Promega 公司); 二甲基亚砜 (北京索来宝科技有限公司); 佛手柑内酯对照品 (上海亿欣生物科技有限公司, 批号 10042131); 氧化前胡素对照品 (上海融禾医药科技发展有限公司, 批号 100420); 欧前胡素对照品 (批号 110826-200712)、异欧前胡素对照品 (批号 110827-200407), 中国食品药品检定研究院, 以上各对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。

2 方法

2.1 ATP 酶标准曲线的建立

制备 Mg-ATP 标准液,将 Mg-ATP 溶解于 P-gp 检测缓冲液中,使 Mg-ATP 标准液系列浓度分别为 30、15、7.5、3.75 mmol/L,各取 10 μ L 加入 96 孔板。在检测前加入 ATP 酶检测液,使终浓度分别为 3、1.5、0.75、0.375 mmol/L。最后用多功能酶标仪测得其荧光强度值,将荧光强度值与 ATP 浓度进行线性回归分析,绘制 ATP 标准曲线。

2.2 工作液的制备

用 P-gp 检测缓冲液稀释维拉帕米、硫酸钠、Mg-ATP 与 P-gp 膜,使最终浓度分别为 0.5、0.25、25、1.25 mmol/L。

将待测药物溶解于 P-gp 检测缓冲液中,制备 2.5 倍浓度。在检测荧光前加入 ATP 检测液,使各药物终质量浓度分别为欧前胡素 10、5、1 μ g/mL; 异欧前胡素 10、5、1 μ g/mL; 佛手柑内酯 10、5、1 μ g/mL; 氧化前胡素 20、5、1 μ g/mL; 以上药物质量浓度均依据 MTT 实验结果确定。

2.3 ATP 活性检测

(1) 添加 20 μ L P-gp 检测缓冲液到标有“NT”的孔中 (空白); (2) 添加 20 μ L 0.5 mmol/L 硫酸钠到标有“硫酸钠”和“ATP 标准”的孔中; (3) 将 0.25 mmol/L 维拉帕米添加到标有“Ver”的孔中; (4) 添加 2.5 倍浓度的各测试化合物 20 μ L 至标有“TC”的孔中; (5) 添加 1.25 mmol/L P-gp 膜 20 μ L 至各孔,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min; (6) 除“ATP 标准”孔外,其他孔加入 25 mmol/L Mg-ATP 各 10 μ L,

37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min; (7) 在下一步操作的 2 min 前,添加 Mg-ATP 标准液至“ATP 标准”相应的孔中; (8) 从 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中取出 96 孔板,停止反应,每孔添加 ATP 检测试剂各 50 μ L; (9) 将 96 孔板放在振动筛上混合,在室温孵育 20 min,使之产生荧光信号; (10) 使用酶标仪检测,读取荧光强度值。

2.4 数据处理^[7]

计算硫酸钠组平均荧光强度值 ($RLU_{\text{硫酸钠}}$) 与空白组平均荧光强度值 (RLU_{NT}) 的差值,得到 $\Delta RLU_{\text{basal}}$,反映基础 P-gp ATP 酶活性。计算 $RLU_{\text{硫酸钠}}$ 与测试化合物组平均荧光强度值 (RLU_{TC}) 的差值,得到 ΔRLU_{TC} ,反映存在受试化合物的情况下 P-gp ATP 酶的活性。

如果 $RLU_{\text{TC}} < RLU_{\text{NT}}$,则受试化合物可诱导 P-gp ATP 酶活性; 如果 $RLU_{\text{NT}} < RLU_{\text{TC}} \leq RLU_{\text{硫酸钠}}$,则受试化合物可抑制 P-gp ATP 酶活性; 如果 $RLU_{\text{TC}} = RLU_{\text{NT}}$,则受试化合物对 P-gp ATP 酶无作用。

如果 $\Delta RLU_{\text{TC}} > \Delta RLU_{\text{basal}}$,则受试化合物为 P-gp ATP 酶活性刺激物; 如果 $\Delta RLU_{\text{TC}} = \Delta RLU_{\text{basal}}$,则受试化合物对 P-gp ATP 酶活性无影响; 如果 $\Delta RLU_{\text{TC}} < \Delta RLU_{\text{basal}}$,则受试化合物是 P-gp ATP 酶活性抑制剂。

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以荧光强度值表示,组间采用配对样本 t 检验分析。

3 结果

3.1 ATP 标准曲线

ATP 标准曲线为 $Y = 5.665\ 847\ 11 \times 10^6 X + 1.75 \times 10^6$, $R^2 = 0.993\ 2$ 。结果表明,荧光强度值与 ATP 浓度呈线性关系,且相关性较好。如果反应消耗 ATP,将会产生较弱的信号,反映 ATP 的浓度相对较低; 如果不消耗 ATP,荧光信号将相对较强。

3.2 各对照组荧光强度

本实验的空白组、阳性对照组 (维拉帕米) 及阴性对照组 (硫酸钠) 的荧光强度值如图 1 所示。空白组的荧光强度比硫酸钠组的低,反映了 P-gp ATP 酶活性的基础水平。硫酸钠是一种 P-gp 选择性抑制剂,经硫酸钠处理的样品没有 P-gp ATP 酶活性,所以硫酸钠处理组被选为阴性对照。维拉帕米是 P-gp 的底物,可以激活 P-gp ATP 酶活性,所以被选为阳性对照底物。维拉帕米组的荧光强度值小于硫酸钠组,即维拉帕米可激活 P-gp ATP 酶活性。

3.3 测试药物组的荧光强度

不同质量浓度测试药物组的荧光强度值结果见表 1。

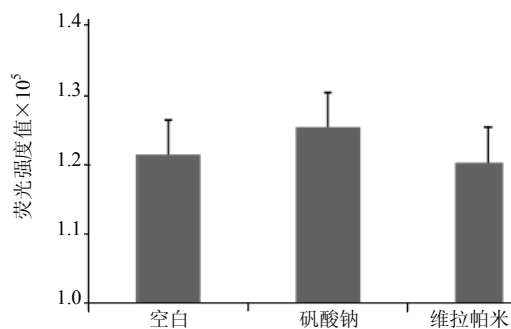


图 1 各对照组的荧光强度值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Fluorescence intensity of each control group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 受试物对 P-gp ATP 酶活性的影响以及与基础荧光强度值的比较

各受试物对 P-gp ATP 酶活性的影响通过 ΔRLU_{TC} 与 ΔRLU_{basal} 的比较来反映, 结果见图 2。欧前胡素和氧化前胡素 ΔRLU_{TC} 均大于 ΔRLU_{basal} , 推测这 2 种化合物对 P-gp 有诱导作用; 且这 2 组的 RLU 值都小于维拉帕米组, 由此推测在反应过程中消耗的 ATP 较少, 与 P-gp 的亲和力较弱; 每种化合物的高、中、低 3 个质量浓度的 RLU 值均无明显差异, 可推测其对 P-gp 的诱导作用无浓度依赖性。中、低质量浓度异欧前胡素及高、低质量浓度佛手柑内酯 ΔRLU_{TC} 均小于 ΔRLU_{basal} , 推测其可能是 ATP 酶抑制剂, 能够抑制 P-gp 的活性; 可推测其对 P-gp 的抑制作用为浓度依赖型。经典的 P-gp 抑制剂维拉帕米与

表 1 不同质量浓度测试化合物的荧光强度值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Fluorescence intensity of tested compounds at different concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	荧光强度值
空白	—	1 214 386 ± 51 511
砷酸钠	35.5	1 253 684 ± 92 967
维拉帕米	227.3	1 203 105 ± 81 863
欧前胡素	10	1 165 897 ± 97 342
	5	1 196 193 ± 104 735
	1	1 186 906 ± 105 541
异欧前胡素	10	1 048 454 ± 88 899**
	5	1 234 199 ± 52 311
	1	1 335 866 ± 47 809
佛手柑内酯	10	1 214 204 ± 67 440
	5	1 189 106 ± 80 124
	1	1 323 520 ± 119 697
氧化前胡素	20	1 194 671 ± 93 275
	5	1 248 320 ± 102 735
	1	1 192 608 ± 84 344

与空白组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank group

P-gp 的亲和力较高, 与 P-gp 结合时消耗 ATP, 所以使得剩余 ATP 的量较少, 测得荧光强度较弱。另外, 高质量浓度的异欧前胡素、中质量浓度的佛手柑内酯, 其 ΔRLU_{TC} 大于 ΔRLU_{basal} , 由此可推测出这 2 种化合物在此质量浓度时对 P-gp 有诱导作用。

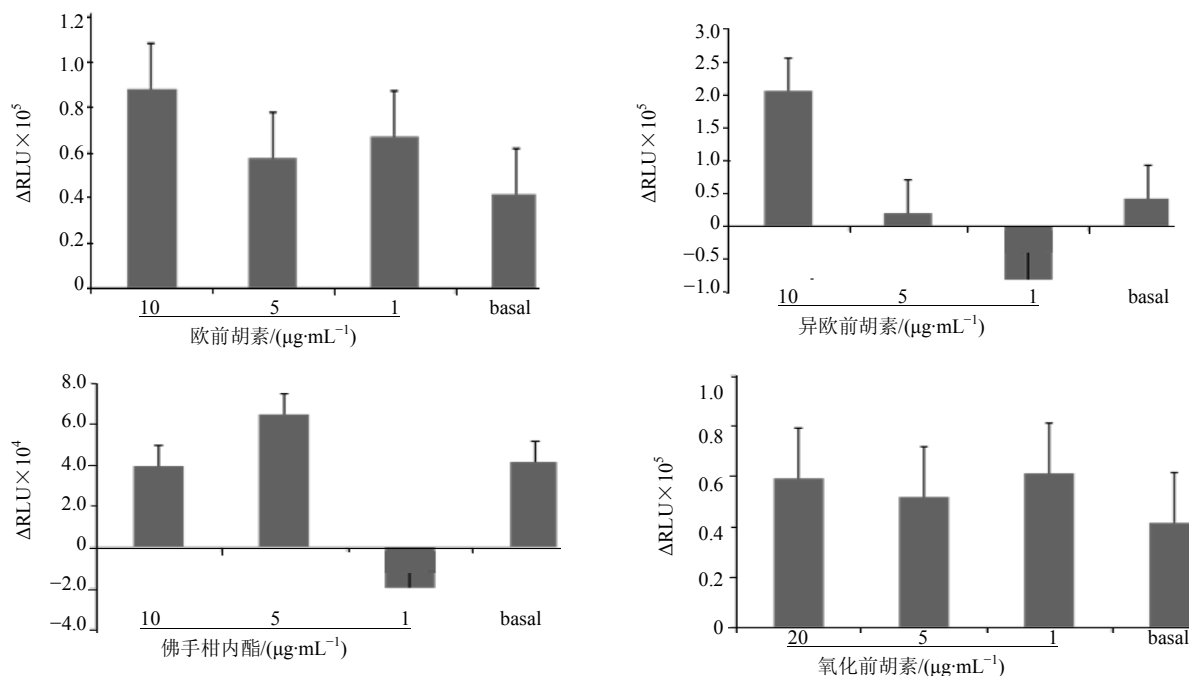


图 2 各待测化合物对 P-gp ATP 酶活性的影响及与基础荧光值的比较

Fig. 2 Effects of tested compounds on P-gp ATPase activity and their comparison with basal fluorescence value

4 讨论

P-gp 是一种能量依赖性转运蛋白,能利用 ATP 水解释放的能量主动地将疏水亲脂性药物转运至细胞外,分布于人体很多正常组织,如肠道、肝、肾、胎盘屏障的上皮细胞,其对药物的吸收、分布、代谢、排泄均有重要影响。在药物的相互作用和多药耐药的产生中发挥着重要作用。

P-gp 可使细胞内药物浓度低于起效浓度而产生多药耐药,降低药物疗效。为了逆转 P-gp 引起的多药耐药,目前已开发出许多 P-gp 调节剂(如维拉帕米、环孢菌素 A、他莫昔芬等)。而中医临床及实验研究表明,中医方药可增加化疗的治疗效果,中药及其单体成分可逆转肿瘤的多药耐药性,如广泛存在于植物中的黄酮类成分槲皮素是 P-gp 的底物,可竞争 P-gp,从而影响 ATP 发挥作用,进而抑制 P-gp 的外排功能^[8]。因此,充分了解药物之间在 P-gp 环节可能产生的相互作用,对于寻找促进药物的转运和吸收的手段,提高药物疗效具有重要意义。

在本实验中,采用 ATP 酶活性测试法,基于 ATP 产生的荧光信号强度,通过考察待测试药物对 ATP 酶的活性的影响来确定其是否通过干扰 ATP 酶活性而阻断了 P-gp 的功能。P-gp 依赖的荧光信号的降低反映了 P-gp 对 ATP 的消耗,信号强度降低的程度越大,P-gp 的活性越强。

体外实验显示,P-gp 介导的底物转运需要依靠 ATP 水解释放能量形成底物的浓度梯度。P-gp 与底物结合后,ATP 酶的活性可提高 3~4 倍,甚至 20 倍^[9]。底物所致 ATP 酶活性的改变是双向性的,有一些物质在高浓度时起抑制作用,却在低浓度时可以增强 ATP 酶的活性,而另一些药物对 ATP 酶的增强作用存在浓度依赖性。对 P-gp ATP 酶活性的诱导与抑制作用都是化合物与 P-gp 相互作用的指标。本研究结果表明,欧前胡素、异欧前胡素、佛手柑内酯和氧化前胡素均为 P-gp 底物,其中,欧前胡素

及氧化前胡素为非浓度依赖性的 ATP 酶诱导剂;异欧前胡素和佛手柑内酯为浓度依赖的 ATP 酶双向调节因子,高质量浓度的异欧前胡素、中质量浓度的佛手柑内酯可诱导 ATP 酶活性,对 P-gp 具有诱导作用,中、低质量浓度的异欧前胡素及高、低质量浓度的佛手柑内酯对 P-gp 具有抑制作用。

参考文献

- [1] Chan L M, Lowes S, Hirst B H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 21(1): 25-51.
- [2] Pleban K, Kopp S, Csaszar E, *et al.* P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(2): 365-374.
- [3] Gottesman M M, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 385-427.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 李苏宁, 杨秀伟. 6 个线型呋喃香豆素类化合物在人源肠 Caco-2 细胞模型的吸收转运研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 96-102.
- [6] 管雪静, 余世平, 廖正根, 等. 白芷中 10 种呋喃型香豆素对长春新碱肠道转运的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2117-2121.
- [7] 戴立波, 方平飞, 蔡骅琳, 等. P-糖蛋白与中枢抑制药物相互作用的体外研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(12): 919-923.
- [8] Wang X, Morris M E. Effect of the flavonoid chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics in rats; potential involvement of ABCG2 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(2): 268-274.
- [9] Al-Shawi M K, Polar M K, Omote H, *et al.* Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52629-52640.