

P-糖蛋白及多药耐药相关蛋白 1 抑制剂促进天麻素跨膜转运作用机制研究

郑琴¹, 刘丹¹, 胡鹏翼^{1,2}, 王佳¹, 唐宇¹, 郭园园¹, 杨明^{1*}

1. 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

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 目的 体外细胞模型法及分子对接法研究 P-糖蛋白 (P-gp) 及多药耐药相关蛋白 1 (MRP1) 抑制剂促进天麻素跨膜转运的作用机制。方法 MTT 法考察天麻素对多药耐药基因 1 (MDR1) 基因转染马丁达比犬肾上皮细胞 (MDCK-MDR1) 细胞的毒性, 采用分子对接法预测天麻素与 P-gp、MRP1 结合方式及作用能力的强弱, MDCK-MDR1 细胞模型分析天麻素的跨膜转运, 以及 P-gp 抑制剂维拉帕米、MRP1 抑制剂丙磺舒对天麻素跨膜转运的影响。结果 天麻素在 100~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度内对细胞无毒性; 天麻素与 P-gp 通过氢键及疏水作用形成稳定的复合物, 与 MRP1 通过氢键、疏水作用及静电作用形成稳定的复合物, LibDock Score 表明 P-gp-维拉帕米、MRP1-丙磺舒复合物的稳定性强于 P-gp-天麻素和 MRP1-天麻素; 天麻素基底侧 (BL)→顶端侧 (AP) 的表观渗透系数 ($P_{\text{app BL} \rightarrow \text{AP}}$) 大于 $P_{\text{app AP} \rightarrow \text{BL}}$, 外排率 (ER) 为 1.5 左右, 提示天麻素在 MDCK-MDR1 细胞为被动转运, 且转运过程可能存在蛋白外排现象; 天麻素配伍维拉帕米 P_{app} 显著增大 ($P < 0.05$), ER 值显著减小 ($P < 0.05$), 天麻素配伍丙磺舒后 P_{app} 有所增大, ER 有所减小, 但无显著性差异。结论 天麻素为 P-gp 底物, 天麻素是否是 MRP1 的底物有待进一步考证, 但维拉帕米及丙磺舒可通过竞争性结合 P-gp 和 MRP1 不同程度促进天麻素跨膜转运。

关键词: 天麻素; P-糖蛋白; MRP1 蛋白; MDCK-MDR1 细胞模型; 分子对接; 跨膜转运

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)21-3840-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.21.015

Studies on effects and mechanisms of P-gp and MRP1 inhibitor on transportation of gastrodin

ZHENG Qin¹, LIU Dan¹, HU Peng-yi^{1,2}, WANG Jia¹, TANG Yu¹, GUO Yuan-yuan¹, YANG Ming¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

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

Abstract: Objective To study the effects and mechanisms of p-glycoprotein (P-gp) inhibitor and MRP1 inhibitor on the transportation of gastrodin (GAS). **Methods** Cell toxicity of GAS was detected by MTT assay, molecular Docking was employed to predicted binding mode and effect ability of GAS with P-gp and MRP1. MDCK-MDR1 cell model was employed to study the influences of Ver, a P-gp inhibitor, and Probenecid, a MRP1 inhibitor, on the transportation of GAS. **Results** There was no cell cytotoxicity of GAS between the concentration of 100 to 1 000 $\mu\text{g/mL}$. There was hydrogen-bond and hydrophobic interaction between P-gp and GAS, and hydrogen-bond, hydrophobic interaction and electrostatic-interaction between MRP1 and GAS. LibDock Score indicated that both P-gp-verapamil (Ver) and MRP1-Probenecid were more stable than P-gp-GAS and MRP1-GAS. The P_{app} of GAS BL→AP was greater than that of AP→BL. Efflux ratio (ER) of GAS was about 1.5, which indicated the efflux pump protein might involve the transportation of GAS. The P_{app} of GAS was significant increased but the ER of GAS was significant decreased when co-administrated with Ver ($P < 0.05$). The P_{app} of GAS was slightly increased and the ER of GAS was slightly decreased when co-administrated with Probenecid, while there was no significance. **Conclusion** The results indicate that GAS is the substrate of P-gp. However, whether GAS is the substrate of MRP1 needs further research. Both Ver and Probenecid could enhance the transportation of GAS by competitive binding with P-gp and MRP1.

Key words: gastrodin; p-glycoprotein; MRP1; MDCK-MDR1; molecular docking; transmembrane transportation

收稿日期: 2016-03-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360645); 江西省青年科学家项目 (20122BCB23021); 江西省自然科学基金项目 (20142BAB205088); 江西省教育厅项目 (GJJ13606)

作者简介: 郑琴 (1973—), 女, 江西九江人, 教授, 博士, 主要从事中药新型给药系统的设计研究。

Tel: (0791)87118658 E-mail: zhengqin912006@163.com

*通信作者 杨明 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型与新技术、中药复方释药系统研究。

Tel: (0791)87118658 E-mail: yangming16@126.com

天麻素为兰科 (Orchidaceae) 天麻属 *Gastrodia* R. Br. 植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎中的活性成分, 具有镇静、镇痛、安眠作用, 亦能抗惊厥、抗焦虑, 能增加脑血流量、减少血管阻力、改善椎-基底动脉供血不足, 具有神经保护作用^[1-2], 临床上广泛应用于眩晕、前庭神经元炎、椎-基底动脉供血不足、头痛、神经衰弱及高血压等疾病的治疗^[3]。脑是天麻素的作用靶器官, 由于其为水溶性药物, 透过血脑屏障 (BBB) 比较困难。天麻素注射后入脑的量比较少, 临床上为达到治疗效果, 给药量比较大^[4]。

多药转运体是一类三磷酸腺苷 (ATP) 结合蛋白质超家族, 能够识别多种作用机制不同的治疗脑部疾病的药物, 主动将药物泵出到 BBB 以外。P-糖蛋白 (P-gp) 和多药耐药相关蛋白 1 (MRP1) 是被人们研究最早的 2 种多药转运体^[5-6], 可通过加入 P-gp 和 MRP1 的特异性拮抗剂干预来提高药物在脑内的浓度。关于 P-gp 及其底物或抑制剂的机制研究已经持续许多年, 也形成了一些关于它们之间相互作用的分子机制假说。P-gp 上至少有 4 个药物结合位点, 包括介导药物在细胞膜转运的转运位点、改变 P-gp 功能的调节位点^[7], 一些药物会减少细胞内 ATP 的量, 从而抑制 P-gp ATPase 活性^[8]。此外, 一些药物可能通过竞争结合位点来发挥 P-gp 抑制作用。刘瑶^[9]研究发现, 天麻素由于 P-gp 介导的外排机制, 使其中枢神经系统 (CNS) 透过量受到很大的限制, 难透过 BBB, 大脑摄取量非常低, 但是二者之间的作用机制尚无相关研究报道。

在多药耐药相关蛋白 (MRP) 家族的 9 个成员 (MRP1~MRP9) 中, MRP1 被研究得最多。MRP1 属于 ABC 转运载体蛋白家族, 具有广泛的生物学功能。MRP1 研究较多的是在肿瘤细胞中的表达情况及其与抗肿瘤药物的耐药性的关系。MRP1 在肿瘤细胞中的作用与 P-gp 相似, 是依赖 ATP 的药物外排泵^[10]。近年来, MRP1 与耐药性癫痫的关系也越来越受到关注^[11]。MRP1 多数位于上皮细胞, 在正常脑组织内 MRP1 分布于脉络丛上皮细胞和室管膜上皮细胞, 参与 BBB 和血-脑脊液屏障 (blood-cerebrospinal fluid barrier, BCB) 的保护功能, 阻止有害物质或药物进入脑组织。目前, MRP1 抑制剂结合的部位和作用机制还不明确, 天麻素的转运与 MRP1 是否有关及其机制尚未见报道。

MDCK-MDR1 细胞系是以人多药耐药基因 1

(MDR1) 转染马丁达比犬肾上皮细胞 (MDCK) 而成, 在极性细胞顶端侧特异性高表达 P-gp 的细胞系, 相对于其他细胞系而言, 它具有较高的跨膜电阻值 (TEER), TEER 可达 $1\ 000\ \Omega/\text{cm}^2$ 甚至更高, 细胞之间连接紧密, 且其用于药物跨膜转运模型时, 实验周期短, 一般 5~7 d 便可用于实验, 该细胞系是研究脑部疾病药物跨膜转运及机制的理想模型^[12-14]。本实验采用 MDCK-MDR1 建立体外 BBB 细胞模型, 研究天麻素跨 BBB 的转运特征; 通过 P-gp 抑制剂维拉帕米、MRP1 抑制剂丙磺舒对天麻素跨膜转运特性的影响, 并结合 Discovery Studio (DS) 阐释其跨 BBB 转运的可能机制。

1 材料

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Sartorius BT25S 十万分之一电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); 3-18K 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); SW-CJ-2F 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); Forma 3111 二氧化碳恒温培养箱 (Thermo Electron Corporation); Eclipse TS100 倒置显微镜 (Nikon 公司); HHS 型恒温水浴锅 (上海博迅实业有限公司); TDZ4A-WS 型台式低速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 02270113 血球计数板 (上海求精生化试剂仪器有限公司); MERS00002 跨膜电阻仪 (美国 Millipore 公司); ELX800 酶标仪 (Biotek 公司)。

1.2 药物与试剂

天麻素 (成都瑞芬思生物科技有限公司, 批号 130618, 质量分数 >98%); 维拉帕米 (中国食品药品检定研究院, 批号 10023-200102, 质量分数 >98%); 丙磺舒 (北京燕京药业有限公司, 批号 030507, 质量分数 >98%); Transwell Permeable Supports (美国 Costar 公司, 3460 型, 孔径 $0.4\ \mu\text{m}$, 直径 12 mm, 底面积 $1.12\ \text{cm}^2$); 培养瓶 (美国 Costar 公司); DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone, 货号 SH30022.01B); 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司, 货号 10099-141); 非必需氨基酸 (美国 Gibco 公司, 货号 11140-050); 双抗 (Solarbio 公司, 货号 P1400-100); 0.25% 胰酶-0.02% EDTA (美国 Gibco, 货号 25200-056); HBSS (Solarbio, 含钙离子、镁离子, 不含酚红, 货号 H1025); 乙腈为色谱级; 水为双蒸水。

1.3 细胞

细胞株 MDCK-MDR1 细胞由浙江大学惠赠, 实验所用为 35~55 代。

2 方法

2.1 细胞培养

MDCK-MDR1 细胞培养于含 10% FBS、1% 非必需氨基酸和 1% 双抗的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂、湿度 95% 的培养箱中培养。隔天更换培养基, 当细胞达到 80%~90% 融合时, 吸弃旧培养液, 用 37 °C 的新鲜 HBSS 清洗 2 遍, 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化, 按 1:3 传代。

2.2 MTT 法评价天麻素的细胞毒性

调整 MDCK-MDR1 细胞密度在 5×10^4 个/mL, 每孔 200 μ L 接种于 96 孔板上, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h, 用 HBSS 液清洗细胞, 排除培养基的干扰, 加不同质量浓度 (100、200、300、600、800、1 000 μ g/mL) 的天麻素, 对照组加 HBSS 液, 置培养箱中作用 4 h, 弃去药液并用 HBSS 液清洗细胞 1 次; 各孔加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液; 置培养箱内再作用 4 h, 弃去孔内的 MTT, 加入 150 μ L DMSO, 摇床作用 15 min 溶解蓝紫色甲臜结晶; 立即置酶标仪下测定 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率 (药物组 *A* 值/对照组 *A* 值)。

2.3 分子对接

靶蛋白三维结构从蛋白质数据库 PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 中搜索下载, 确定 PDB 代码分别为 3G60 (P-gp 受体分子, pH 7.8)^[15-16]、2CBZ (MRP1 受体分子, pH 7.8) 的蛋白质结构文件作为分子对接研究的载体^[17-18]。利用 DS 4.0 中的 Clean Protein 工具对蛋白结构进行以下操作: 删去配体分子和水分子、补全不完整残基、删除多余蛋白质构象、加氢和分配相关电荷。并保留 3G60 的 B 链用于分子对接。配体天麻素、维拉帕米、丙磺舒分子结构为从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) 中搜索下载

的 sdf 格式文件, 在 DS 中赋予 CHARMM 力场并按 pH 7.8 质子化, 用于与蛋白结构的分子对接。

查阅文献确定 P-gp 残基 MET68、LEU300、TYR303、PHE332、LEU335、ILE336、PHE339、GLN721、PHE724、PHE728、LEU758、PHE833、TYR949、PHE974、SER975、VAL978、ALA981、MET982、GLY985、GLN986、SER989 为 P-gp 蛋白药物结合位点氨基酸残基, MRP1 残基 LYS684、GLY683、SER685、SER686、TRP653、ASP793、GLN713、ASP792、HIS827 为 MRP1 蛋白药物结合位点氨基酸残基, 在 DS 中用以上氨基酸残基定义活性口袋。将配体在 DS 中赋予 CHARMM 力场并按 pH 7.8 质子化, 用于与蛋白结构的分子对接。利用 LibDock 工具, Conformation Method 参数设置为 “BEST”, Docking Preferences 参数设置为 “High Quality”, 其余参数为默认, 分别将配体对接到原蛋白的活性口袋中, 记录配体在此口袋的打分值 LibDock Score。

2.4 HPLC-UV 法测定天麻素

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (4:96); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 221 nm; 进样量 20 μ L。

2.4.2 供试品溶液的制备 从顶端侧 (AP) → 基底侧 (BL) 转运时, 在 BL 侧取转运液 500 μ L, 从 BL → AP 侧时, 在 AP 侧取转运液 200 μ L, 涡旋 1 min, 4 °C、16 000 r/min 离心 15 min, 待测。

2.4.3 专属性考察 在 “2.4.1” 项色谱条件下, 空白 HBSS 溶液、对照品溶液以及跨膜转运实验样品的色谱图见图 1, 天麻素的保留时间约为 7.0 min。

2.4.4 标准曲线的制备 用 HBSS 液配制质量浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μ g/mL 的天麻素对照品溶液, 涡旋 1 min, 4 °C、16 000 r/min 离心 15 min, 取上清液进行分析。以待测物质峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得标

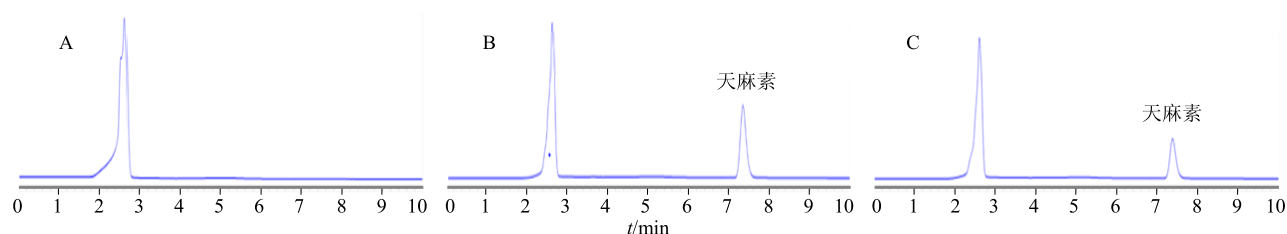


图 1 空白介质 HBSS 液 (A)、对照品溶液 (B) 和转运实验样品 (C) 的 HPLC-UV 图

Fig. 1 HPLC-UV of blank HBSS (A), reference solution (B), and sample after transportation of GAS (C)

准曲线方程 $Y=37.791X+1.2514$, $r=1.0000$ 。结果表明, 天麻素在 $0.2\sim 10.0\ \mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

2.4.5 回收率考察 用 HBSS 液配制质量浓度为 0.209 、 1.045 、 $10.45\ \mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质量浓度天麻素溶液, 按“2.4.1”项色谱条件进样测定, 以测得的质量浓度与配制质量浓度的比值计算回收率, 低、中、高 3 个质量浓度的回收率分别为 114.1% 、 95.5% 、 96.4% 。

2.4.6 精密度考察 用 HBSS 液配制质量浓度为 0.209 、 1.045 、 $10.45\ \mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质量浓度天麻素溶液, 每个质量浓度平行测定 6 次, 低、中、高 3 个质量浓度样品峰面积的 RSD 值分别为 1.64% 、 0.62% 、 0.36% 。

2.4.7 重复性考察 用 HBSS 液配制质量浓度为 0.209 、 1.045 、 $10.45\ \mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质量浓度天麻素溶液, 同一质量浓度平行 6 份, 测定峰面积, 低、中、高 3 个质量浓度样品峰面积的 RSD 值分别为 1.08% 、 0.43% 、 0.59% 。

2.4.8 稳定性考察 用 HBSS 液配制质量浓度为 0.209 、 1.045 、 $10.45\ \mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质量浓度天麻素溶液, 将样品 $4\ ^\circ\text{C}$ 放置 $48\ \text{h}$, 并分别于 0 、 4 、 8 、 24 、 36 、 $48\ \text{h}$ 取样, 涡旋 $1\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $16\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $15\ \text{min}$, 取上清液进行测定。结果显示, 低、中、高 3 个质量浓度的样品在 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $48\ \text{h}$ 内测定结果的 RSD 值均小于 5% , 说明样品在 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $48\ \text{h}$ 内稳定性良好。

2.5 天麻素体外转运实验

取 MDCK-MDR1 对数生长期的细胞, 消化, 吹打均匀后计数, 调整细胞密度 1×10^5 个/mL, 每孔 $0.5\ \text{mL}$ 的密度接种在 Transwell 内培养 $7\ \text{d}$ 左右, 每天换液, 给药前测定模型的 TEER, 当 TEER 为 $300\sim 500\ \Omega/\text{cm}^2$ 时, 细胞模型构建成功, 可以开始给药。给药前先用 $37\ ^\circ\text{C}$ 的 HBSS 液清洗各孔 3 次, 最后 1 次置于培养箱内预孵育 $30\ \text{min}$ 。吸收实验是分别向各孔 AP 侧加入 400 、 600 、 $800\ \mu\text{g/mL}$ 天麻素溶液 $0.5\ \text{mL}$, BL 侧加入 HBSS 液 $1.5\ \text{mL}$, 置于培养箱中培养, 分别于 30 、 60 、 90 、 120 、 $150\ \text{min}$ 由 BL 侧取样 $0.5\ \text{mL}$, 并补加同温 HBSS 液 $0.5\ \text{mL}$; 外排实验时向 BL 侧加入 400 、 600 、 $800\ \mu\text{g/mL}$ 天麻素溶液 $1.5\ \text{mL}$, AP 侧加入 HBSS 液 $0.5\ \text{mL}$, 由 AP 侧取样 $0.2\ \text{mL}$, 并补足同体积 HBSS 液, 其余步骤相同。样品溶液在 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $16\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $15\ \text{min}$, 取上清液进行 HPLC 检测。

2.6 维拉帕米和丙磺舒对天麻素转运的影响

按“2.5”项方法构建 MDCK-MDR1 细胞模型, 吸收实验时向各孔 AP 侧加入 $400\ \mu\text{g/mL}$ 天麻素 + $100\ \mu\text{g/mL}$ 维拉帕米或 $400\ \mu\text{g/mL}$ 天麻素 + $100\ \mu\text{g/mL}$ 丙磺舒的混合溶液各 $0.5\ \text{mL}$, BL 侧加入 HBSS 液 $1.5\ \text{mL}$, 置于培养箱中培养, 于 $120\ \text{min}$ 由 BL 侧取样; 外排实验时向各孔 BL 侧加入 $400\ \mu\text{g/mL}$ 天麻素 + $100\ \mu\text{g/mL}$ 维拉帕米或 $400\ \mu\text{g/mL}$ 天麻素 + $100\ \mu\text{g/mL}$ 丙磺舒的混合溶液各 $1.5\ \text{mL}$, AP 侧加入 HBSS 液 $0.5\ \text{mL}$, 置于培养箱中培养, 于 $120\ \text{min}$ 由 AP 侧取样。其余操作同“2.5”项。

2.7 数据处理

表观渗透系数 (P_{app}) 采用如下公式计算。外排率 (ER, $\text{ER}=P_{\text{app BL}\rightarrow\text{AP}}/P_{\text{app AP}\rightarrow\text{BL}}$)。实验数据采用 SPSS 13.0 软件进行处理, t 检验进行统计分析。

$$P_{\text{app}} = \frac{V}{C_0} \times \frac{1}{S} \times \frac{\text{d}C}{\text{d}t}$$

V 代表加药对侧体积 (mL), C_0 代表初始药物质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), S 代表单层膜表面积 (cm^2), $\text{d}C/\text{d}t$ 代表待测药物转运的速率

3 结果

3.1 细胞形态学观察

细胞状态良好, 清晰透亮, 呈“铺路石”状, 规则, 多边形, 排列紧密, 结果见图 2。

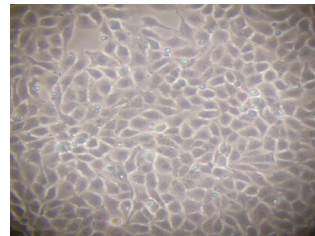


图2 倒置显微镜下 MDCK-MDR1 细胞形态

Fig.2 MDCK-MDR1 cell morphology observed by inverted microscope

3.2 MTT 实验结果

天麻素在 $100\sim 1\ 000\ \mu\text{g/mL}$ 内作用于 MDCK-MDR1 细胞 $4\ \text{h}$ 后, 细胞存活率均 $>95\%$, 结果见图 3。表明天麻素质量浓度在 $1\ 000\ \mu\text{g/mL}$ 以下时对 MDCK-MDR1 细胞的活性无明显影响。

3.3 分子对接结果

天麻素与 P-gp 的氨基酸残基 SER729 产生氢键相互作用, 与 VAL978 发生疏水作用; 维拉帕米与 P-gp 的氨基酸残基发生 GLN721 氢键作用, 与 TYR303、TYR306、LEU335、PHE332、PHE724、

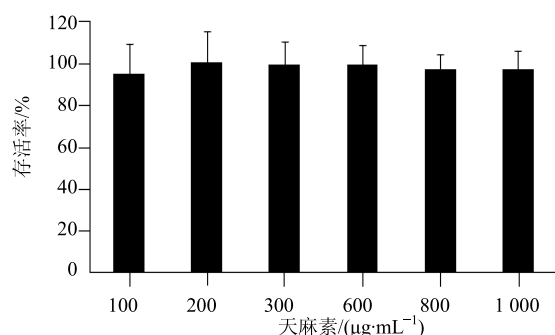


图 3 天麻素对 MDCK-MDR1 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 3 Effect of GAS on viability of MDCK-MDR1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

MET982、VAL978、PHE728 发生疏水作用。天麻素、维拉帕米的 LibDock Score 分别为 111、138。天麻素、维拉帕米与 P-gp 相互作用结果见图 4。

天麻素与 MRP1 的 SER685、ASP792 氨基酸结合位点有氢键相互作用，另外与 VAL680、HIS827 有疏水作用，与 ASP793 有静电作用，通过这 3 种作用力，形成稳定的复合物。丙磺舒与 MRP1 的 LEU795、SER828 氨基酸结合位点有氢键相互作用，与 TYR831、LEU795、VAL798 有疏水作用，与 TYR831 有静电作用。天麻素、丙磺舒的 LibDock Score 分别为 93、95。天麻素、丙磺舒与 MRP1 相互作用结果见图 5。

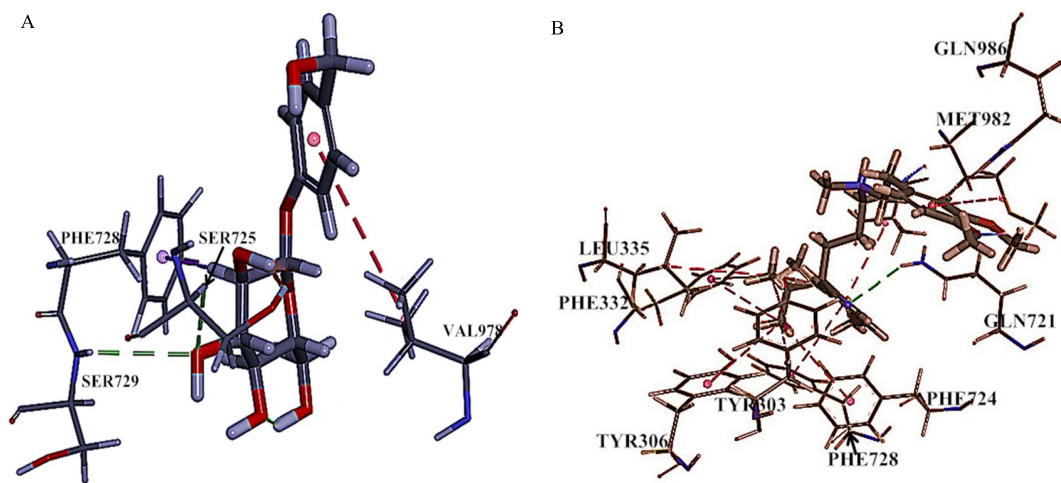


图 4 天麻素 (A)、维拉帕米 (B) 与 P-gp 的相互作用
Fig. 4 Interaction between GAS (A), Ver (B), and P-gp

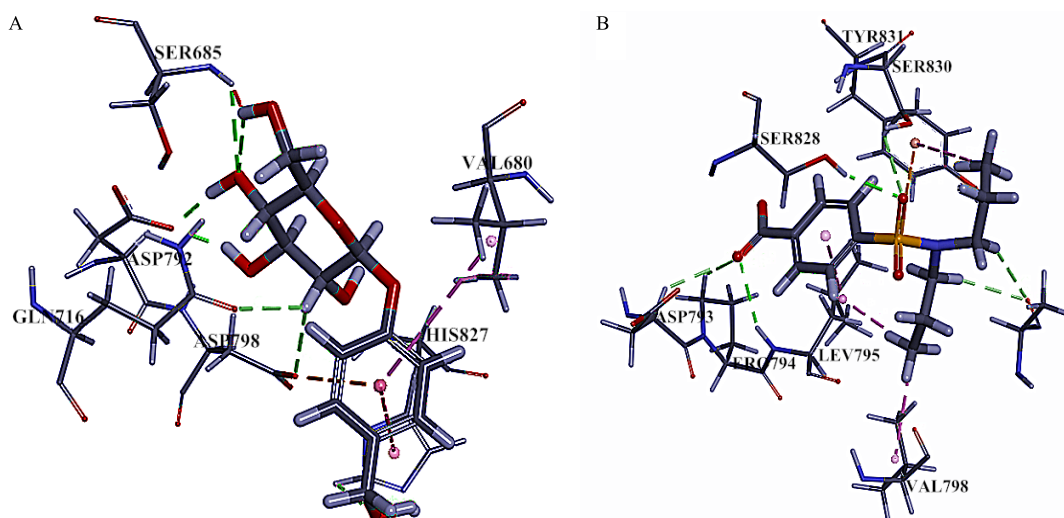


图 5 天麻素 (A)、丙磺舒 (B) 与 MRP1 的相互作用
Fig. 5 Interaction between GAS (A), Probenecid (B), and MRP1

3.4 不同质量浓度天麻素转运特性

不同质量浓度天麻素双向转运 P_{app} 见表 1, 不同质量浓度天麻素的 $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$ 值差异不显著 ($P>0.05$), 且均小于 $1\times 10^{-6}\text{ cm/s}$, 表明其口服吸收差, 生物利用度低。 $P_{app\ BL\rightarrow\ AP}$ 明显高于 $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$, ER 均为 1.5 左右, 表明其转运可能受外排蛋白的参与; 天麻素不同质量浓度、不同时间点双侧转运量见图 6。结果显示在 150 min 内双侧转运量随着质量浓度增加而增大, 随孵育时间延长而增大。

3.5 维拉帕米和丙磺舒对天麻素转运的影响

400 $\mu\text{g/mL}$ 天麻素与 100 $\mu\text{g/mL}$ 维拉帕米配伍后 P_{app} 显著增大 ($P<0.05$), ER 显著减少; 400 $\mu\text{g/mL}$ 天麻素与 100 $\mu\text{g/mL}$ 丙磺舒配伍后 P_{app} 有所

增加, ER 有所减少(表 2), 表明天麻素可能是 P-gp 蛋白的底物, 但天麻素可能不是 MRP1 蛋白的底物。

表 1 不同质量浓度天麻素在 MDCK-MDR1 细胞上的转运 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Transportation of GAS at different concentration across MDCK-MDR1 cell ($\bar{x}\pm s, n=3$)

天麻素/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$P_{app}/(\times 10^{-6}\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		ER
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
400	0.416 $\pm$ 0.025	0.620 $\pm$ 0.006**	1.49
600	0.452 $\pm$ 0.027	0.699 $\pm$ 0.009**	1.55
800	0.425 $\pm$ 0.009	0.696 $\pm$ 0.024**	1.63

与 AP $\rightarrow$ BL 侧比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs AP $\rightarrow$ BL

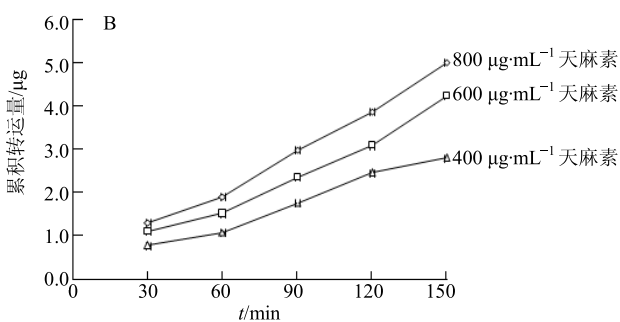
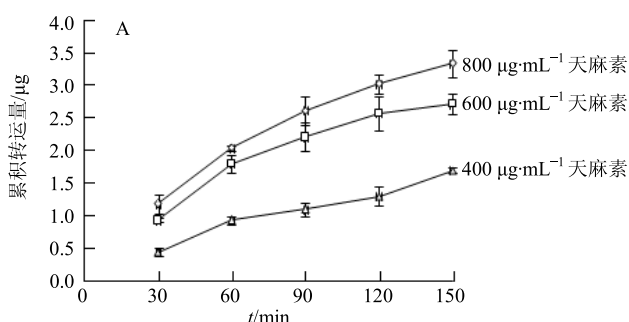


图 6 不同质量浓度天麻素 AP $\rightarrow$ BL 侧 (A) 和 BL $\rightarrow$ AP 侧 (B) 的累积转运量 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 Accumulated transportation amount of GAS at different concentration in AP $\rightarrow$ BL side (A) and BL $\rightarrow$ AP side (B) ($\bar{x}\pm s, n=3$)

表 2 维拉帕米、丙磺舒对天麻素 P_{app} 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effects of Ver and Probenecid on P_{app} of GAS ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	$P_{app}/(\times 10^{-6}\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		ER
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
天麻素	0.42 $\pm$ 0.24	0.54 $\pm$ 0.17	1.29
天麻素+维拉帕米	1.08 $\pm$ 0.23*	0.85 $\pm$ 0.14	0.79*
天麻素+丙磺舒	0.55 $\pm$ 0.19	0.64 $\pm$ 0.21	1.16

与天麻素组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs GAS group

4 讨论

天麻素 $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}<1\times 10^{-6}\text{ cm/s}$, 按 P_{app} 吸收难易的评判标准^[19], 可判断其吸收量为 0~20%, 难吸收, 说明其口服吸收差, 生物利用度低。通过对天麻素的双向转运行为进行研究, 结果天麻素各质量浓度 P_{app} 无显著性差异, 由 $P_{app}=(dQ/dt)/(A\times C_0)$ 得出转运速率与浓度之比为定值, 与被动转运公式 $-dC/dt=kC_0$ 相一致; 天麻素的累积转运量与

给药质量浓度呈正相关, 无饱和现象, 符合被动转运特征, 故确定天麻素以被动转运为主, 该结论与文献报道一致^[20-21]。

关于药物转运机制的判断还可以通过 ER 得出, ER 为 1 时, 药物以被动转运为主, 是否存在载体参与需要进一步验证; ER 为 1.5 时, 则可能在外排蛋白参与; ER 小于 0.5 时, 则可能是正向的载体蛋白参与的主动转运。结果表明天麻素 ER 接近 1.5, 很可能存在外排蛋白的参与。BBB 中主要的外排蛋白有 P-gp 和 MRP1, 能将底物泵出细胞外, 因此, 天麻素的转运很可能受 P-gp 和 MRP 调控。

分子对接依据配体与受体作用的“锁-钥原理”(lock and key principle), 模拟小分子配体与受体生物大分子相互作用。配体与受体相互作用是分子识别的过程, 主要包括静电作用、氢键作用、疏水作用、范德华力作用等。通过计算, 可以预测两者间的结合模式和亲和力, 从而进行药物的虚拟筛选^[22]。本实验采用 Discovery Studio 软件^[23]对天麻素与

P-gp 蛋白、天麻素与 MRP1 蛋白进行分子对接, 研究发现天麻素可以与 P-gp、MRP1 蛋白通过分子间的氢键、疏水作用等产生结合, 而维拉帕米能与 P-gp 的多个活性氨基酸位点产生氢键、疏水作用等多个作用力, 因此 LibDock Score 值较天麻素大。丙磺舒与 MRP1 的结合方式与天麻素类似, LibDock Score 值略高于天麻素。当天麻素和维拉帕米同时使用时, 由于维拉帕米竞争性 with P-gp 相结合, 从而使得天麻素 $P_{app\ AP-BL}$ 由 0.42×10^{-6} cm/s 显著增加到 1.08×10^{-6} cm/s, ER 从 1.29 显著减小到 0.79。当天麻素和丙磺舒同时使用时, 丙磺舒竞争性 with MRP1 相结合, 从而使得天麻素 $P_{app\ AP-BL}$ 由 0.42×10^{-6} cm/s 增加到 0.55×10^{-6} cm/s, ER 减小到 1.16。

有大量文献报道天麻素与其他药物联用时可以提高天麻素的吸收。Ge 等^[24]研究发现天麻素与不同处方的益智片联用时天麻素的 C_{max} 与 $AUC_{0-\infty}$ 具有显著性差异。姜丽等^[25]研究发现天麻素和葛根素联用相对于葛根素和天麻素单用具有更低的清除率, 更长的平均滞留时间及更高的生物利用度, 葛根素联用时的相对生物利用度是单用时的 10.7 倍, 天麻素联用时的相对生物利用度是单用时的 1.5 倍, 两者联用可以相互促进吸收。Hu 等^[26]研究发现阿魏酸、大川芎制剂中的总酚酸、总生物碱能够显著提高天麻素的 $AUC_{0-\infty}$ 。王强等^[27]研究发现川芎与天麻配伍后, 天麻素可能与川芎中主要活性成分竞争性或非竞争性结合代谢酶而使天麻素代谢减慢, 肾排泄率降低, 平均滞留时间明显高于其他剂量组。彭尹宣等^[28]研究发现天麻多糖对天麻钩藤药对中的天麻素的吸收具有促进作用, 这可能与天麻多糖对 P450 酶系及肠道、肝脏转运蛋白有诱导或促进作用有关。虽然目前天麻素联合用药的研究较多, 但大部分都只停留在药效学研究及药动学研究方面, 对促进天麻素吸收的机制研究较少, 其他成分促进天麻素吸收的可能机制: (1) 发挥外排蛋白抑制剂的作用, 通过抑制天麻素的外排而增强其吸收作用; (2) 通过影响相关转运蛋白的表达, 通过增加转运蛋白对天麻素的转运而增加天麻素的吸收; (3) 通过竞争性结合代谢酶, 减少天麻素的代谢而增加天麻素的吸收; (4) 通过对细胞间的紧密连接、细胞膜的流动性等结构的影响而增加天麻素的吸收; (5) 改变天麻素油水分配系数和溶解性而增加天麻素的吸收。本研究仅从 P-gp 抑制剂及 MRP1 抑制剂的角度说明了 P-gp 抑制剂及 MRP1

抑制剂可以增加天麻素跨膜转运, 但是是否可以通过其他机制增加其转运量还需进一步研究。

参考文献

- [1] 鞠桂春. 天麻及其制剂的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中国药业, 2008, 17(1): 64-66.
- [2] 张媛元, 毛瑞阳, 杜晓红, 等. 天麻素对终末糖基化产物诱导神经小胶质细胞炎症因子表达的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 330-334.
- [3] 王军玲, 周本宏. 天麻素的药理作用和临床应用研究 [J]. 武汉生物工程学院学报, 2009, 5(4): 309-313.
- [4] 王 俏. 天麻素和天麻昔元的体内外代谢和脑靶向性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [5] Lee G, Bendayan R. Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(8): 1313-1330.
- [6] Loscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family [J]. *J Am Soc Exp Neuro Ther*, 2005, 31(2): 86-98.
- [7] Martin C, Berridge G, Higgins C F, et al. Conununication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58(3): 624-632.
- [8] Batrakova E V, Li S, Vinogradov S V, et al. Methanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(2): 483-493.
- [9] 刘 瑶. MDCK 转染 MDR1 作为血脑屏障药物透过的快速筛选模型的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [10] 朱俊芳, 马海珍, 刘 蓓, 等. MRP1 和 XIAP 基因在急性髓系白血病及细胞株中的表达及临床意义 [J]. 兰州大学学报: 医学版, 2014, 40(4): 31-36.
- [11] 颜 博, 李国良. miR-133a/b 和 MRP1 在耐药性癫痫患者外周血含量的观察 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(4): 680-684.
- [12] Chen Z Z, Lu Y, Du S Y, et al. Influence of borneol and muscone on geniposide transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Int J Pharm*, 2013, 456(1): 73-79.
- [13] 刘 强, 高小玲, 柴逸峰, 等. 四氢帕马丁在 MDCK-MDR1 细胞系中的跨膜转运机制 [J]. 药学服务与研究, 2012, 12(1): 34-37.
- [14] 刘 瑶, 曾 苏. MDCK-MDR1 细胞模型及其在药物透过研究中的应用进展 [J]. 药学学报, 2008, 43(6): 559-564.
- [15] 梅 梅, 张 翼, 任金红, 等. 新型紫杉烷化合物 NPB304 及其协同维拉帕米逆转耐药的研究 [J]. 药学

- 学报, 2014, 49(9): 1279-1288.
- [16] Aller S G, Yu J, Ward A, *et al.* Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding [J]. *Science*, 2009(323): 1718-1722.
- [17] Ramaen O, Leulliot N, Sizun C, *et al.* Structure of the human multidrug resistance protein 1 nucleotide binding domain 1 bound to Mg^{2+} /ATP reveals a non-productive catalytic site [J]. *J Mol Biol*, 2006, 359(4): 940-949.
- [18] 何其. 伪石榴碱的提取及其相关衍生物的合成与应用 [D]. 成都: 西华大学, 2014.
- [19] 孙敏捷, 盛星, 胡一桥. Caco-2 细胞单层模型的建立与验证 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(18): 1431-1434.
- [20] 王晓丹, 曾苏. 天麻素在 Caco-2 细胞及 Bcap37、Bcap37/MDR1 细胞模型中的转运和摄取 [J]. 药理学报, 2010, 45(12): 1497-1502.
- [21] 黄娟, 罗辉, 龚耘, 等. 天麻苷元肠吸收特性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(6): 858-861.
- [22] 朱志远, 张燕, 李征, 等. 受体蛋白与药物分子对接的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(11): 1308-1313.
- [23] 禹菡冰. 高喜树碱类化合物三维定量构效关系及其与拓扑异构酶 I 分子对接研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [24] Ge Z H, Xie Y Y, Liang Q L, *et al.* Pharmacokinetic comparative study of GAS and rhynchophylline after oral administration of different prescriptions of *Yizhi* tablets in rats by an HPLC-ESI/MS method [J]. *Evid-Based Complement Alternat Med*, 2014, (2014): 167253-167263.
- [25] 姜丽, 余兰彬, 徐国良, 等. 天麻素和葛根素在大鼠体内联合应用的药动学研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1179-1184.
- [26] Hu P Y, Yue P F, Zheng Q, *et al.* Pharmacokinetic comparative study of GAS after oral administration of *Gastrodia elata* Bl. extract and its compatibility with the different indigents of *Ligusticum chuan-xiong* Hort. to Rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 6(7): 1016-1017.
- [27] 王强, 沈岚, 马诗瑜, 等. 不同剂量川芎对天麻有效成分在大鼠体内药动学影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2): 103-109.
- [28] 彭尹宣, 王兴, 杨娟, 等. 天麻多糖对天麻钩藤药对效应成分吸收的影响 [J]. 环球中医药, 2015, 8(12): 1452-1454.