



防己诺林碱调控紫杉醇在MDR1-MDCK II细胞模型中的跨膜转运研究

何丽¹, 杨俊毅², 胡丽娜^{1*}

(1. 四川大学华西第二医院, 四川成都610041; 2. 四川大学华西药学院, 四川成都610041)

[摘要] 目的:研究防己诺林碱对紫杉醇在MDR1-MDCK II细胞跨膜转运的调控作用。方法:以外排转运蛋白P-gp底物紫杉醇为模型药物,盐酸维拉帕米为对照,考察防己诺林碱调控紫杉醇在MDR1-MDCK II细胞模型的跨膜转运作用。采用RP-HPLC检测紫杉醇在转运介质中的药物浓度,计算其表观渗透系数。结果:紫杉醇在P-gp高表达的MDR1-MDCK II细胞模型中外排的速率明显快于吸收的速率。与紫杉醇单用相比,紫杉醇分别联用盐酸维拉帕米及防己诺林碱后,紫杉醇吸收速率均显著增加,而外排速率均显著降低,相同浓度的防己诺林碱抑制转运作用强于对照盐酸维拉帕米。结论:防己诺林碱能够明显降低紫杉醇在MDR1-MDCK II细胞的外排作用,抑制由P-gp介导的多药耐药。

[关键词] 紫杉醇;防己诺林碱;MDR1-MDCK II细胞;P-糖蛋白

防己诺林碱(fangchinoline, Fan)是防己科植物粉防己的干燥根中所含的主要生物碱活性成分之一,其毒性较低,具有镇痛、抗风湿、利尿消肿之功效。同时它也是一种双苄基异喹啉生物碱,近年来研究发现该类生物碱中的某些单体成分具有抗肿瘤增敏作用,在对抗肿瘤化疗过程中产生的多药耐药具有潜在活性^[1]。P-糖蛋白(P-gp)是目前已知的外排转运蛋白介导的多药耐药的主要原因,它是MDR1基因表达的产物,紫杉醇(paclitaxel, Pac)在化疗过程中存在多药耐药的现象^[2],研究发现Pac是P-gp的外排底物^[3],本研究采用MDR1特异性转染的犬肾近曲小管上皮细胞MDR1-MDCK II细胞模型,研究Fan调控Pac由P-gp介导的跨膜转运作用的影响^[4]。

1 材料

1.1 仪器 Lab Alliance 高效液相色谱仪(Model 500 UV/Vis 检测器, Series III 泵);Anastar 色谱工作站;CP225D 电子天平(Sartorius, 德国);BS 210s 电子天平(Sartorius, 德国);Vortex Genius 3 旋涡混合仪(IKA, 德国);TGL-16C 台式高速离心机(上海市安

亭科技仪器厂);倒置相差显微镜(Olympus, 日本);Millicell-ERS 电位仪(Millipore, 美国);Transwell 6 孔板系统(Costar, 美国);二氧化碳孵箱(Heraeus, 德国);超净工作台(苏州净化设备总厂);隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 试剂 MDR1-MDCK II 细胞(荷兰肿瘤研究所);Pac 对照品(中国药品生物制品检定所);Pac ($\geq 99\%$, 成都科杰高新技术发展有限公司);地西洋对照品(中国药品生物制品检定所);Fan(成都曼思特生物科技有限公司);盐酸维拉帕米(verapamil hydrochloride, Ver, 上海禾丰制药有限公司);DMEM (Gibco-BRL, 美国);FBS (Hyclone, 美国);青霉素(华北制药股份有限公司);链霉素(大连美罗大药厂);DMSO, 胰蛋白酶, EDTA (Sigma)。

2 方法与结果

2.1 MDR1-MDCK II 单层细胞的培养及评价 MDR1-MDCK II 细胞培养于 DMEM 完全培养基中,含 DMEM 培养基、10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素双抗液,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。隔天更换 1 次细胞培养基,每次换液将细胞稀释约 5 倍。连续稳定传代 3 代细胞后,取对数生长期细胞,用空白培养基将其制成每毫升约含 2×10^5 个细胞的混悬液。接种于 Transwell 6 孔板,置 37°C 、5% CO_2 培养箱静置培养,每天更换 1 次培养基,直至细胞形成完全致密的单层膜。分别于第 2, 3, 4, 5 天测定 2 种细胞的跨膜电阻值,电阻

[稿件编号] 20100118010

[通信作者] * 胡丽娜, 博士生导师, 教授, Tel: (028) 85501322, E-mail: cqhulina@126.com

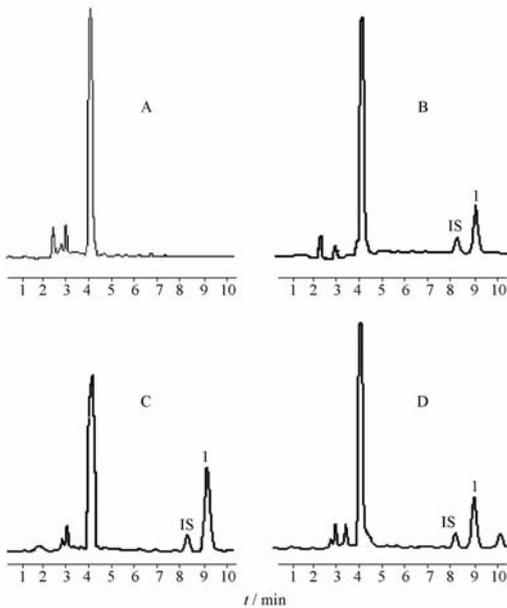
[作者简介] 何丽, 硕士研究生, Tel: (028) 85501322, E-mail: helisc@163.com

值 $>500 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ 并保持稳定符合要求。

2.2 色谱条件 AichromBond-AQ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-10 mmol KH₂PO₄ 缓冲液 (pH3.0) (75:25); 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 227 nm; 进样量 20 μL 。

2.3 样品处理方法 精密吸取样品 200 μL , 加入 5.0 mg \cdot L⁻¹ 内标地西洋溶液 20 μL 、乙酸乙酯 2 mL, 旋涡混合 3 min, 1 万 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 分离有机层, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 干浴氮气挥干, 残渣用 100 μL 流动相溶解, 进样 20 μL , 在选定色谱条件下分离测定, 记录 Pac 峰面积 (A_s) 及内标峰面积 (A_i), 内标法计算血浆中的 Pac 浓度。

2.4 方法专属性考察 用所选定的色谱条件对 Pac 在样品中的测定进行专属性考察, 考察了空白培养基中的物质及调控药物对模型 Pac 及内标的测定是否存在干扰, 结果见图 1, 可见 Pac 及内标峰保留时间分别为 9.2, 8.1 min, 分离度 $R > 1.5$, 样品体系中的物质对 Pac 的测定无干扰, 所选定的色谱条件专属性较好。



A. 空白介质; B. 空白介质中加入 Pac 及内标对照溶液;
C. Fan 调控 Pac 试验样品; D. Ver 调控 Pac 试验样品; I. Pac。

图 1 Pac 专属性试验高效液相色谱图

2.5 标准曲线的制备 精密称定 Pac 工作对照品约 10.0 mg, 用甲醇稀释为质量浓度分别为 505, 303, 101, 50.5, 30.3, 10.1, 5.05, 1.01 mg \cdot L⁻¹ 的 Pac 标准工作液。取空白培养基 (含 0.1% DMSO)

200 μL , 加入内标 20 μL 及系列工作溶液 20 μL , 照标准样品处理方法处理后, 于拟定的色谱条件下进样分析, 以 Pac 峰面积与内标峰面积之比 Y 对药物浓度 C 进行线性回归。得到标准曲线方程 $Y = 1.2306C + 0.0896$, $r = 0.9997$, 样品在 0.101 ~ 50.5 mg \cdot L⁻¹ 线性关系良好。

2.6 准确度试验 取空白培养基 (含 0.1% DMSO) 200 μL , 不同浓度 Pac 工作溶液 20 μL , 得到 0.505, 3.03, 30.3 mg \cdot L⁻¹ 的 Pac 含药标准样品, 每个浓度 5 份样品, 照标准样品处理方法处理后, 于拟定的色谱条件下进样分析, 记录 Pac 和内标峰面积, 代入标准曲线计算浓度, 并求算回收率, 低、中、高回收率分别为 (113.3 \pm 8.6)%, (104.0 \pm 5.3)%, (106.9 \pm 8.7)%, 方法准确度良好。

2.7 精密度试验 按准确度试验项下配制浓度分别为 0.505, 3.03, 30.3 mg \cdot L⁻¹ 的 Pac 含药标准样品, 每个浓度 5 份样品, 连续测定 3 个分析批。照样品处理方法处理后, 于拟定的色谱条件下进样分析, 记录 Pac 和内标峰面积, 代入标准曲线计算浓度, 计算批内与批间 RSD。批内 RSD $\leq 7.5\%$, 批间 RSD $\leq 11.2\%$, 方法精密度良好。

2.8 稳定性考察 配制 Pac 标准样品, 分别于室温放置、冰冻及冻融条件下, 进行考察样品稳定性, 结果表明样品于室温下放置至少 24 h 内可保持稳定, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻条件下放置至少 8 周内可保持稳定, 样品经过 3 次冻融后可保持稳定。

2.9 Pac 单用及联用 Fan 在 MDR1-MDCK II 细胞模型中的跨膜转运试验 Pac 单用组, 取已接种 MDR1-MDCK II 细胞的且符合转运条件的 Transwell 6 孔板, 于 A 室 (顶侧室) 中分别加入 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pac 含药供试液, B 室 (基底侧室) 中加入空白转运介质 ($n = 3$), 每隔 30 min 从 B 室精确取样 200 μL , 并补加相同体积空白转运介质于 B 室, 120 min 后中止试验, 依法测定 B 侧室样品中的 Pac 浓度, 计算转运药量; 同法于 A 室中加入空白转运介质, B 室中分别加入系列浓度的含 Pac 供试液, 每隔 30 min 从 A 室精确取样 200 μL , 并补加相同体积空白转运介质于 A 室, 120 min 后中止试验, 依法测定 A 侧室样品中的 Pac 浓度, 计算转运药量。

Pac 联用 Fan 组, 取已接种 MDR1-MDCK II 细胞的且符合转运条件的 Transwell 6 孔板, A 室 (供给室) 加入中浓度 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Pac 含药供试液, B



室(接收室)加入空白转运介质($n=3$),同时于 A, B 室分别加入低、中、高不同浓度的 Fan, 使 Fan 终浓度分别为 2, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 阳性对照则加入低、中、高不同浓度的 Ver, 使 Ver 终浓度分别为 2, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 同法于 A 室(接收室)加入空白转运介质, B 室(供给室)加入系列浓度的含 Pac 供试液, 同时于 A, B 室分别加入使其终浓度一致的 Fan 或阳性对照 Ver, 以加入空白转运介质为阴性对照, 每隔 30 min 从接收室精确取样 200 μL , 并补加相同体积空白转运介质, 120 min 后中止试验, 依法测定接收室样品中的 Pac 浓度, 计算转运药量。

根据试验结果按下式计算表观渗透系数 $P_{\text{app}}^{[5]}$, 其中 $\frac{dQ}{dt}$ 为接受室药物转运量变化的表观线性速率; C_0 为药物在给予端的初始浓度; A 为聚碳酸酯

膜的表面积。采用 t 检验进行统计学分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

由表 1 可见, 单用 Pac, 在 P-gp 高表达的 MDR1-MDCK II 细胞模型中外排的速率明显快于吸收的速率 ($P < 0.05$), Pac 在 MDR1-MDCK II 细胞中具有明显的外排, 表明 Pac 是 P-gp 底物。与 Pac 单用相比, Pac 分别联用 Fan 及 Ver 后, 在 MDR1-MDCK II 细胞模型中, A-B 吸收转运速率均显著增加 ($P < 0.05$), B-A 外排转运速率均显著降低 ($P < 0.05$), 二者的比值升高, 表明 Fan 及 Ver 均可显著抑制 Pac 在 MDR1-MDCK II 细胞中的外排。

表 1 Pac 单用及联用 Fan 在 MDR1-MDCK II 细胞模型中的表观渗透系数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$P_{\text{app(A-B)}} / \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{\text{app(B-A)}} / \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{\text{app(A-B)}} / P_{\text{app(B-A)}}$
Pac 10	1.28 \pm 0.51	7.38 \pm 0.34	0.17
Pac 20	1.29 \pm 0.18	8.67 \pm 0.40	0.15
Pac 40	1.05 \pm 0.16	7.06 \pm 0.46	0.15
Pac 20 + Fan 2	3.46 \pm 0.32	6.62 \pm 0.35	0.52
Pac 20 + Fan 10	4.23 \pm 0.72	2.95 \pm 0.31	1.43
Pac 20 + Fan 20	5.26 \pm 0.88	2.71 \pm 0.13	1.94
Pac 20 + Ver 2	3.16 \pm 0.50	4.15 \pm 0.71	0.76
Pac 20 + Ver 10	2.95 \pm 0.53	3.55 \pm 0.14	0.83
Pac 20 + Ver 20	2.95 \pm 0.89	3.58 \pm 0.18	0.82

3 讨论

MDCK 细胞为犬肾近曲小管上皮细胞, 该细胞可以在聚碳酸酯膜上生长分化为类似小肠上皮细胞的单层膜结构。经人 MDR1 基因转染 MDCK II 后得 MDR1-MDCK II 细胞, 具有高度特异性表达人 MDR1 基因编码的 P-gp 的特性, 该细胞在聚碳酸酯膜上培养为单层膜细胞后, 细胞膜亦具有小肠上皮细胞的结构特征, 其顶侧膜高度表达外排转运蛋白 P-gp, 而几乎没有其他类似外排型转运体的表达, 因此 MDR1-MDCK II 细胞是一种很好的人小肠上皮细胞的模型, 可用于 P-gp 底物与 P-gp 抑制剂活性的筛选, 及可能存在的 P-gp 介导的药物相互作用评价。

Ver 为经典的 P-gp 抑制剂^[6], 试验发现, 中、高浓度的 Fan 逆转 Pac 外排作用强于对照 Ver ($P < 0.05$)。Fan 浓度与药物从 A-B 转运速率呈明显正相关, 而与 B-A 转运速率呈负相关, 浓度增加, 其抑制外排的作用显著增强, 且呈浓度依赖性。提示

Pac 临床化疗过程中, 联合使用 Fan 可能降低外排转运蛋白介导的多药耐药的发生几率及其程度, 研究结果将为临床药物合理应用提供依据。

[参考文献]

- [1] Fu L W, Deng Z A, Pan Q C, et al. Screening and discovery of novel MDR modifiers from naturally occurring bisbenzylisoquinoline alkaloids[J]. Anticancer Res, 2001, 21(4A):2273.
- [2] Li Q Q, Cao X X, Xu J D, et al. The role of P-glycoprotein/cellular prion protein interaction in multidrug-resistant breast cancer cells treated with paclitaxel[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(3):504.
- [3] Chan K F, Zhao Y, Burkett B A, et al. Flavonoid dimers as bivalent modulators for P-glycoprotein-based multidrug resistance: Synthetic apigenin homodimers linked with defined-length poly(ethylene glycol) spacers increase drug retention and enhance chemosensitivity in resistant cancer cells[J]. J Med Chem, 2006, 49(23):6742.
- [4] 刘瑶, 曾苏. MDCK-MDR1 细胞模型及其在药物透过研究中的进展[J]. 药学学报, 2008, 43(6):559.
- [5] 马莲, 杨秀伟. 利用人源 Caco-2 细胞单层模型研究罂粟碱、N-甲基四氢罂粟碱和头花千金藤碱在人肠道的吸收[J]. 药学



学报,2008,43(2):202.

[6] ulová Z, Macejová D, Seres M, et al. Combined treatment of P-gp-positive L1210/VCR cells by verapamil and all-trans retinoic

acid induces down-regulation of P-glycoprotein expression and transport activity[J]. *Toxicol In Vitro*, 2008,22(1):96.

Transmembrane transport activity of paclitaxel regulated by fangchinoline in MDR1-MDCK II cells

HE Li¹, YANG Junyi², HU Li'na^{1*}

(1. *West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;*

2. *School of pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To research the regulation of transmembrane transport activity of paclitaxel influenced by fangchinoline in MDR1-MDCK II cells. **Method:** Paclitaxel, one of the substrate of P-gp, was selected as the model drug. Verapamil hydrochloride was adopted as the active control to investigate the bilateral transport activity of paclitaxel regulated by fangchinoline in MDR1-MDCK II cells. RP-HPLC was applied to determine the concentration of paclitaxel in the transporting medium, which was used to calculate apparent permeability coefficient of paclitaxel across MDR1-MDCK II monolayer cells. **Result:** The efflux rate of paclitaxel was faster than the absorption rates across the MDR1-MDCK II monolayer cells with highly expressed P-gp. The absorption rates of paclitaxel combined with fangchinoline and verapamil hydrochloride respectively were remarkably increased and the efflux rate was decreased. The reversal effect of the fangchinoline was stronger than the verapamil hydrochloride with the same molar concentration. **Conclusion:** Fangchinoline can apparently decrease the efflux of paclitaxel and inhibit the multidrug resistance of antitumor drug mediated by P-gp.

[**Key words**] paclitaxel; fangchinoline; MDR1-MDCK II cell; P-gp

doi: 10.4268/cjcmm20101126

[责任编辑 张宁宁]