

网络出版时间: 2021-9-7 16:00 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1359.002.html>

芍药苷-6-O'-苯磺酸酯对摄取性转运蛋白表达的影响

孙伟, 王斌, 汤浩, 王勇, Asenso James, 高锦, 张肖, 宁王, 春魏, 伟

摘要 目的 研究芍药苷-6-O'-苯磺酸酯(CP-25)对摄取性转运蛋白在大鼠成纤维样滑膜细胞(Rat-FLS)中表达的影响。方法 体外分离培养 Rat-FLS 并通过倒置显微镜观察细胞状态;流式细胞术和 CCK-8 法分别用于检测 Rat-FLS 的纯度和生长曲线; qRT-PCR 检测 CP-25 对 Rat-FLS 中转运蛋白 mRNA 水平的影响; Western blot 检测 CP-25 对 Rat-FLS 中转运蛋白表达的影响。结果 从大鼠滑膜组织中分离培养的 Rat-FLS 增殖活跃、生长情况良好;流式细胞术结果显示 Rat-FLS 纯度高达 96% 以上; CCK-8 结果显示 1~7 d 的 Rat-FLS 具有较好的增殖活性; qRT-PCR 结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ CP-25 能上调有机阴离子转运蛋白(OAT) 1/3、有机阳离子转运蛋白(OCT) 1/3、葡萄糖转运蛋白(GLUT) 4、寡肽转运蛋白(PEPT) 1 的 mRNA 水平,同时 CP-25 能下调 GLUT1 和单羧酸盐转运蛋白(MCT) 1/2 的 mRNA 水平; Western blot 结果显示 CP-25 能上调转运蛋白 OAT1/3、OCT1/3、GLUT4、PEPT1 的蛋白表达,同时 CP-25 能下调转运蛋白 GLUT1 和 MCT1/2 的蛋白表达。结论 CP-25 能不同程度地调节摄取性转运蛋白,为研究 CP-25 与其他药物之间的相互作用提供了参考。

关键词 CP-25; 转运蛋白; 成纤维样滑膜细胞

中图分类号 R 965.2; R 977.6; R 332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)11-1687-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.002

转运蛋白是负责药物及其代谢产物跨细胞膜转运的膜蛋白,它们通过影响药物的吸收、分布、代谢和排泄,进而通过控制作用部位的药物浓度来影响药物的药动学和药效学^[1]。摄取性转运蛋白充当细胞的“代谢门”,主要利用电化学势差或活性转运蛋白产生的离子梯度将其底物转运通过生物膜参与

药物的吸收^[2]。摄取性转运蛋白主要包括:有机阴离子转运蛋白(organic anion transporter, OAT)、有机阳离子转运蛋白(organic cation transporter, OCT)、葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)、单羧酸盐转运蛋白(monocarboxylate transporter, MCT)和寡肽转运蛋白(oligopeptide transporter, PEPT)。芍药苷-6-O'-苯磺酸酯(paeoniflorin-6'-O-benzenesulfonate, CP-25)是通过修饰芍药苷(paeoniflorin, Pae)得到的活性单体,具有良好的抗炎免疫调节活性。前期研究^[3]显示 CP-25 能通过下调 P-糖蛋白表达,抑制其转运活性。然而 CP-25 对摄取性转运蛋白的调控作用尚不清楚,因此进行了 CP-25 对摄取性转运蛋白调控作用的初步研究,为进一步考察 CP-25 药物相互作用提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体质量(180 $\pm$ 20) g,购自安徽医科大学实验动物中心; CP-25(白色粉末、纯度 > 98%) 获自安徽医科大学临床药理研究所药物化学实验室;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 DMEM 培养基购自加拿大 Wisent 公司;青霉素和链霉素溶液、磷酸盐缓冲溶液(PBS)购自北京 Solarbio 公司;CD68 和 vimentin 流式抗体分别购自美国 Biosciences 和 Cell Signaling Technology 公司;BCA 蛋白含量检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司;OAT1/3、OCT1/3、MCT1/2、GLUT1/4 和 PEPT1 抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司;CCK-8、qPCR 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;qRT-PCR 引物购自上海生工生物股份有限公司。

1.2 仪器 Olympus 显微成像系统(日本 Olympus 公司);BioTek Elx $\times$ 808 酶标仪(美国 BioTek 公司);FC500 型贝克曼流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);Image Quant Las 4000 mini 型化学发光成像分析仪(美国 GEHealthcare Life Sciences)。

1.3 方法

1.3.1 FLS 的分离培养 无菌分离大鼠滑膜组织,采取组织块贴壁法分离培养大鼠成纤维样滑膜细胞

2021-06-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81973332);安徽省自然科学基金(编号:2008085QH402)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 孙伟,男,硕士研究生;

王春,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: wangchun533@126.com;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

(rat fibroblast-like synoviocytes, Rat-FLS)。先用 75% 乙醇溶液清洗 1 次,再用含青霉素和链霉素的 PBS 反复洗涤 3 次,然后置于培养皿中加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基,将滑膜组织剪成 $1 \sim 2 \text{ mm}^2$ 的小碎块,用巴氏吸管将组织小碎块均匀分布在细胞瓶的生长面,瓶口朝上放于细胞培养箱中(37°C 、5% CO_2) 培养 4 h,待组织贴壁后,缓慢放平培养瓶,每隔 3 d 更换新鲜培养基进行细胞培养。待有大量成纤维样细胞从组织中长出后去除组织块,并将细胞用胰酶消化吹打均匀,更换新瓶继续培养,取第 4~7 代的 Rat-FLS 用于下一步实验。

1.3.2 细胞形态观察 在倒置显微镜下观察原代 Rat-FLS 和传代后 Rat-FLS 的形态以及生长状态。

1.3.3 流式细胞术鉴定 FLS 纯度 将第 4 代 Rat-FLS 消化后计数 1×10^6 个转移至 1.5 ml EP 管内,加 300 μl 的 PBS 清洗细胞,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,依次固定、破膜,随后向 EP 管内加入 100 μl 含 5 μl 标记抗鼠 CD68 抗体和 1 μl 标记抗鼠 vimentin 抗体的 PBS,轻轻吹打混匀,4 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min,随后加入 300 μl PBS 清洗细胞,2 000 r/min,4 $^\circ\text{C}$ 离心 5 min,弃上清液,加入 300 μl PBS 重悬细胞,转移至流式管上机检测。

1.3.4 细胞生长曲线测定 取第 4 代 Rat-FLS 按 1×10^3 /孔接种到 96 孔培养板内,每孔加 100 μl 细胞悬液,每组设 3 个复孔,共设 7 组,随后于细胞培养箱中(37°C 、5% CO_2) 培养,分别于接种后的第 1~7 天用 CCK-8 法于 450 nm 检测细胞吸光度值,绘制细胞生长曲线。

1.3.5 qRT-PCR 检测 CP-25 对转运蛋白 mRNA 的影响 将第 4 代 Rat-FLS 以 1.0×10^6 个接种到 6 孔板上,分为对照组、实验组,待细胞贴壁融合达到 80%,实验组更换 2 ml 含 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CP-25 新鲜培养基,对照组更换 2 ml 新鲜培养基,随后于细胞培养箱中(37°C 、5% CO_2) 培养 24 h。根据 TRIzol 法提取总 RNA,测定纯度及浓度后用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA,再以其为模板进行 PCR 扩增。本研究以 GAPDH 为内标,逆转录的 cDNA 为模板,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算转运蛋白 mRNA 的相对量。

1.3.6 Western blot 检测 CP-25 对转运蛋白表达的影响 将第 4 代 Rat-FLS 以 1.0×10^6 个接种到 6 孔板上。实验分为对照组、加药组,待细胞贴壁融合达到 80%,更换 2 ml 分别含 0、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CP-25 新鲜培养基在细胞培养箱中(37°C 、5% CO_2) 培养 24 h。然后提取总蛋白,用 PBS 洗涤细胞

2 次,加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂,冰上裂解 30 min。将细胞刮下,4 $^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用 BCA 法对蛋白进行定量。所提取的蛋白在上清液中加入蛋白上样缓冲液煮沸后得到蛋白样本。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法将蛋白转移至 PVDF 上,用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h,与相应一抗(1:500) 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,与二抗(1:10 000) 结合 2 h 后,通过发光成像分析仪显影。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism7 软件对结果进行统计学分析,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态生长情况 贴壁的滑膜组织培养 3 d 后细胞爬出,绝大部分为梭形(图 1A),圆形、椭圆形较少。随着培养时间的延长,细胞逐渐增多,培养至第 7 天,细胞融合度达 70%~80%,贴壁生长,多为梭形,但仍有极少的圆形、椭圆形细胞(图 1B)。经消化传代培养第 1 代的滑膜细胞形态基本上全为梭形,圆形、椭圆形等其他形状基本消失(图 1C)。滑膜细胞传代培养至第 4 代,增殖活跃,生长情况良好(图 1D)。

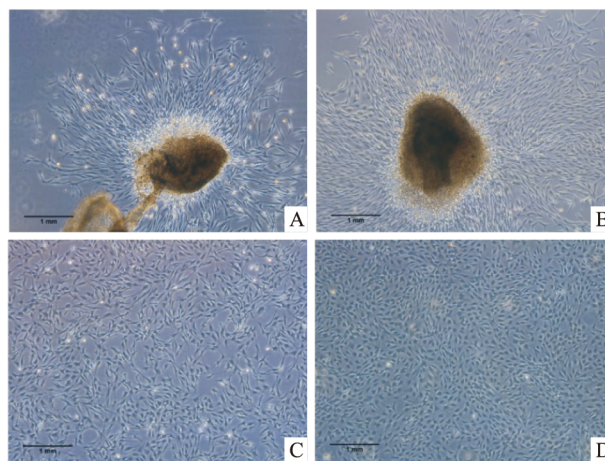


图 1 原代 Rat-FLS 形态学观察 $\times 10$

A: 第 3 天原代 Rat-FLS; B: 第 7 天原代 Rat-FLS; C: 第 1 代 Rat-FLS; D: 第 4 代 Rat-FLS

2.2 流式细胞术鉴定滑膜细胞纯度 传代培养第 4 代的 Rat-FLS 分别用抗鼠 Vimentin 和抗鼠 CD68 抗体标记后,通过流式细胞术鉴定 Rat-FLS 的纯度。结果显示所得细胞中 Vimentin 成阳性且 CD68 呈阴性的细胞比率达 96% 以上(图 2),即 96% 以上的细胞为 FLS。

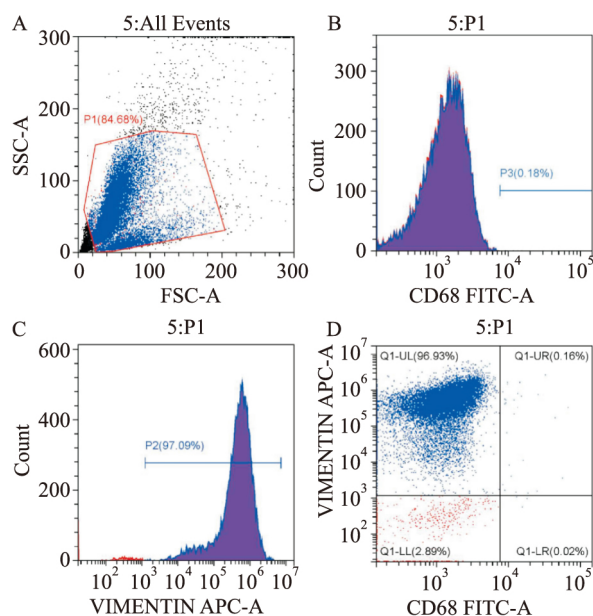
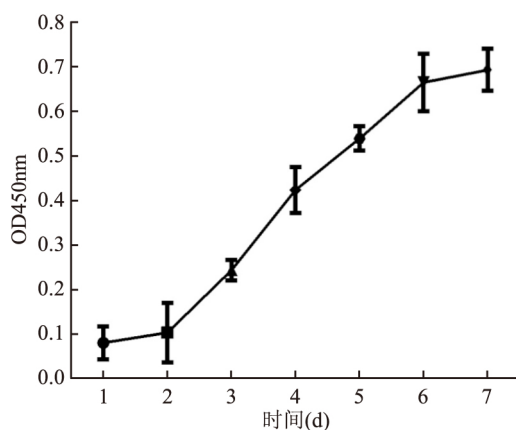


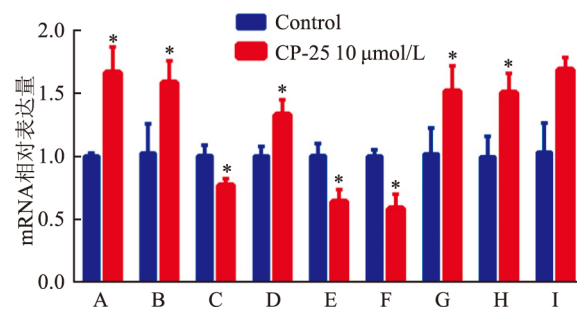
图2 第4代 Rat-FLS 纯度鉴定

A: 细胞分群; B: CD68 标记; C: Vimentin 标记; D: CD68 和 Vimentin 共同标记

2.3 Rat-FLS 生长曲线 用 CCK-8 法检测 Rat-FLS 增殖能力,结果显示:培养出来的细胞增殖能力均较强,经过 2 d 迟缓期后 Rat-FLS 进入对数生长期,在第 7 天进入平台期,在 1~7 d 内 Rat-FLS 具有较好的增殖活性(图 3)。

图3 Rat-FLS 生长曲线($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 CP-25 对转运蛋白 mRNA 的影响 qRT-PCR 结果显示 Rat-FLS 经 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CP-25 孵育 24 h 后,CP-25 能够上调转运蛋白 OAT1/3 ($t=5.286$, $P=3.314$)、OCT1/3 ($t=3.487$, $P=3.449$)、GLUT4 ($t=3.575$)、PEPT1 ($t=3.698$) 的 mRNA 水平;同时能下调 GLUT1 ($t=4.361$) 和 MCT1/2 ($t=3.516$, $t=4.528$) 转运蛋白的 mRNA 水平(图 4)。

图4 CP-25 对 Rat-FLS 转运蛋白 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

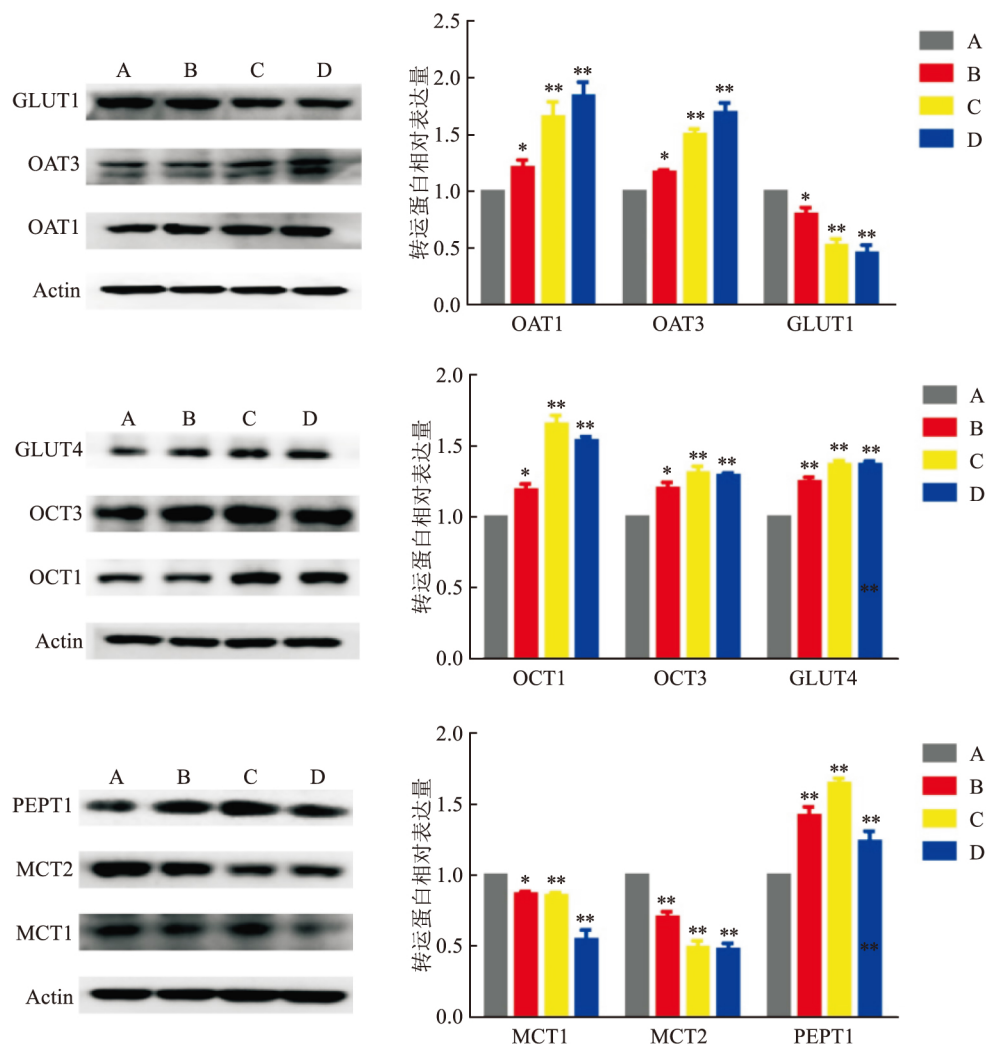
A: OAT1; B: OAT3; C: GLUT1; D: GLUT4; E: MCT1; F: MCT2; G: OCT1; H: OCT3; I: PEPT1; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

2.5 CP-25 对转运蛋白表达的影响 Western blot 结果显示经 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CP-25 孵育 24 h 后,不同浓度的 CP-25 能不同程度上调转运蛋白 OAT1/3 ($F=33.397$, $F=78.245$)、OCT1/3 ($F=104.176$, $F=36.564$)、GLUT4 ($F=90.172$) 和 PEPT1 ($F=58.158$) 的表达;同时 CP-25 能不同程度地下调转运蛋白 GLUT1 ($F=39.191$) 和 MCT1/2 ($F=52.24$, $F=81.689$) 的表达(图 5)。

3 讨论

药物的生物活性是由作用部位的浓度决定的,而作用部位通常是细胞内的靶点。转运蛋白是细胞的“看门人”,在促进或阻碍药物跨膜转运方面发挥着至关重要的作用。转运蛋白的表达和活性发生改变,将改变治疗药物的吸收、分布、代谢和排泄属性,可能会增加不良反应的发生,降低药物的治疗效果^[4-5]。甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是抗代谢药物,通常用于癌症、类风湿性关节炎和银屑病。MTX 在临床治疗中常诱发耐药性,其耐药性和肾毒性与多药耐药相关蛋白 2、P-糖蛋白、OAT1/3 等有关,通过转运蛋白的药物相互作用可能会改变 MTX 的药代动力学和药效动力学,从而导致患者之间存在疗效差异^[6-7]。转运蛋白不仅参与药物的转运,近年也成为治疗疾病的靶点被研究。研究^[8]表明,与正常人相比,类风湿性关节炎患者滑膜组织的乳酸水平升高,GLUT1 被上调,并发现使用 GLUT1 抑制剂可改善类风湿性关节炎动物模型的表型。另一项研究^[9]表明,类风湿性关节炎患者关节滑液酸化、pH 值降低可能与 MCT4 异常表达增高有关,沉默 MCT4 能诱导类风湿性关节炎患者 FLS 凋亡,并降低胶原诱导性关节炎小鼠的严重程度,表明 MCT4 是类风湿性关节炎的潜在治疗靶标。

CP-25 在多种自身免疫病动物模型中表现出良

图5 CP-25 对 Rat-FLS 转运蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

A: Control 组; B: CP-25 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; C: CP-25 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; D: CP-25 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

好的抗炎免疫调节作用,包括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和干燥综合征^[10-12]。前期药代动力学研究^[13-14]表明,CP-25 相对于 Pae 在大鼠体内主要组织中浓度更高、具有更好的吸收和生物利用度。进一步研究^[15]显示,CP-25 对外排转运蛋白调节方面表现出了抑制作用,在佐剂诱发的关节炎大鼠体内 CP-25 与 MTX 联合应用,CP-25 能通过抑制外排转运蛋白 P-糖蛋白的功能,从而降低 MTX 的耐药性。

OAT 和 OCT 分别负责阴离子和阳离子药物的吸收; GLUT 主要负责调节全身葡萄糖稳态; MCT 主要负责代谢产物乳酸的转运; PEPT 负责类似肽类药物的吸收。本研究通过分离大鼠的滑膜组织培养得到的 Rat-FLS 纯度较高、活性较好,进一步研究了 CP-25 对摄取性转运蛋白的调控。qRT-PCR 结果显示 CP-25 能够上调转运蛋白 OAT1/3、OCT1/3、

GLUT4 和 PEPT1 的 mRNA 水平;并能下调转运蛋白 GLUT1 和 MCT1/2 的 mRNA 水平。Western blot 结果显示 CP-25 能够上调转运蛋白 OAT1/3、OCT1/3、GLUT4 和 PEPT1 的表达;与此同时,CP-25 能够下调转运蛋白 GLUT1 和 MCT1/2 的表达。qRT-PCR 结果和 Western blot 结果相一致,表明 CP-25 对 Rat-FLS 中摄取性转运蛋白 OAT1/3、OCT1/3、GLUT4/1、MCT1/2 和 PEPT1 具有调节作用。因此,当 CP-25 与上述摄取性转运蛋白底物药物联合用药时,需注意彼此之间的药物相互作用,CP-25 可能会改变摄取性转运蛋白表达,进而影响药物的吸收、分布、代谢和排泄,对药物的药代动力学和药效动力学产生影响。

综上所述,CP-25 能不同程度地调节摄取性转运蛋白,为研究 CP-25 与其他药物之间的相互作用提供参考。

参考文献

- [1] Zhang Y, Hagenbuch B. Protein-protein interactions of drug uptake transporters that are important for liver and kidney [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 168: 384–91.
- [2] Rives M L, Javitch J A, Wickenden A D. Potentiating SLC transporter activity: Emerging drug discovery opportunities [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 135: 1–11.
- [3] 王 斌, 王 剑, 汤 浩, 等. 芍药苷-6-O'-苯磺酸酯对 Caco-2 细胞中 P-gp 表达和功能的调控 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(5): 653–8.
- [4] Hanafy S, El-Kadi A O, Jamali F. Effect of inflammation on molecular targets and drug transporters [J]. J Pharm Pharm Sci, 2012, 15(3): 361–75.
- [5] Kawase A. Alterations in expression and function of ABC transporters and ERM proteins in inflammation [J]. Yakugaku Zasshi, 2014, 134(9): 925–9.
- [6] Jaramillo A C, Cloos J, Lemos C, et al. Ex vivo resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: Correlations between BCRP, MRP1, MRP4 and MRP5 ABC transporter expression and intracellular methotrexate polyglutamate accumulation [J]. Leuk Res, 2019, 79: 45–51.
- [7] 王 佳, 毛 妮, 谢 希, 等. 多药耐药基因-1 高表达可加重类风湿关节炎患者对甲氨蝶呤的耐药性 [J]. 中国医学科学院学报, 2019, 41(5): 595–600.
- [8] Garcia-Carbonell R, Divakaruni A S, Lodi A, et al. Critical role of glucose metabolism in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(7): 1614–26.
- [9] Fujii W, Kawahito Y, Nagahara H, et al. Monocarboxylate transporter 4, associated with the acidification of synovial fluid, is a novel therapeutic target for inflammatory arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(11): 2888–96.
- [10] Yang X, Zhao Y, Jia X, et al. CP-25 combined with MTX/LEF ameliorates the progression of adjuvant-induced arthritis by the inhibition on GRK2 translocation [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 110: 834–43.
- [11] Wu H, Chen X, Gu F, et al. CP-25 alleviates antigen-induced experimental Sjogren's syndrome in mice by inhibiting JAK1-STAT1/2-CXCL13 signaling and interfering with B-cell migration [J]. Lab Invest, 2021, 101(8): 1084–97.
- [12] 汤小雨, 王 琛, 韩 乐, 等. CP-25 通过调控 T 细胞亚群治疗大鼠胶原性关节炎 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(7): 1001–8.
- [13] Wang C, Yuan J, Zhang L L, et al. Pharmacokinetic comparisons of paeoniflorin and paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate in rats via different routes of administration [J]. Xenobiotica, 2016, 46(12): 1142–50.
- [14] Zhao M, Zhou P, Yu J, et al. The tissue distribution and excretion study of paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate (CP-25) in rats [J]. Inflammopharmacology, 2019, 27(5): 969–74.
- [15] Yang X Z, Wei W. CP-25, a compound derived from paeoniflorin: research advance on its pharmacological actions and mechanisms in the treatment of inflammation and immune diseases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(11): 1387–94.

The effect of CP-25 on the expression of uptake transporter

Sun Wei, Wang Bin, Tang Hao, et al

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University; Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education; Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of paeoniflorin-6-O'-benzenesulfonate (CP-25) on the expression of uptake transporter in rat fibroblast-like synoviocytes (Rat-FLS). **Methods** Rat-FLS were isolated and cultured *in vitro* and the cell state was observed by an inverted microscope. Flow cytometry and CCK-8 were used to detect the purity and growth curve of FLS, respectively. qRT-PCR was used to detect the effects of CP-25 on mRNA levels of transporters in Rat-FLS. Western blot was chosen to study the effect of CP-25 on the expression of transporters in Rat-FLS. **Results** Rat-FLS isolated and cultured from synovial tissue of rats showed active proliferation and favorable growth. The results of flow cytometry showed that Rat-FLS purity was over 96%. CCK-8 showed that Rat-FLS had better proliferation activity for 1–7 days. The results of qRT-PCR showed that 10 $\mu\text{mol/L}$ CP-25 up-regulated organic anion transporter (OAT) 1/3, organic cation transporter (OCT) 1/3, glucose transporter (GLUT) 4 and oligopeptide transporter (PEPT) 1 mRNA levels, while CP-25 down-regulated GLUT1 and monocarboxylate transporter (MCT) 1/2 mRNA levels. Western blot showed that the expression of transporters OAT1/3, OCT1/3, GLUT4, and PEPT1 were up-regulated by CP-25. At the same time, the expression of transporters GLUT1 and MCT1/2 were down-regulated by CP-25. **Conclusion** CP-25 can regulate the uptake transporters to varying degrees, which provides a reference for the study of the interaction between CP-25 and other drugs.

Key words CP-25; transporter; fibroblast-like synoviocytes