

甘草与甘遂的配伍对大鼠肠黏膜 P-gp 的影响

孙亚彬¹, 李国锋^{1*}, 唐中昆², 吴炳义³

(南方医科大学 1. 南方医院药学部, 2. 药学院药物化学系, 3. 南方医院中心实验室, 广东 广州 510515)

摘要: 评价甘草与甘遂配伍对大鼠肠黏膜 P 糖蛋白 (P-glycoprotein) 的影响。通过对大鼠口服甘草煎液、甘遂煎液、甘草甘遂合煎液及其合并液 1 周后, 使用垂直型扩散池 (ussing chamber) 技术, 体外评价罗丹明 123 (rhodamine123, R123) 和荧光素钠 (fluorescein sodium, CF) 经大鼠空肠黏膜的经时吸收方向和分泌方向的透过量和表观渗透系数。R123 和 CF 在接受室的浓度用荧光分光光度计检测。应用实时荧光定量聚合酶链式反应技术 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction) 检测 *mdr1a* 基因在肠黏膜中的表达。在 ussing chamber 实验中, 4 种药液除甘草外均具有增加 R123 经吸收方向 (mucosa to serosa, M-S) 透过性和减少分泌方向 (serosa to mucosa, S-M) 透过性的趋势。甘草只增加了 R123 吸收方向的透过, 但对分泌方向影响不大, 且均无统计学意义; 甘遂组与合煎组均使 R123 S-M 透过明显减少 ($P < 0.01$); 合并组明显增加了 R123 M-S 的透过 ($P < 0.05$)。各组的泵出比均明显降低 ($P < 0.05$)。而 rt-pcr 实验中, 评价甘遂对肠黏膜的 P-gp 活性的影响时, 发现大鼠灌胃 7 d 和 14 d 甘遂后, 与对照组相比都有下调 *mdr1a* 表达的趋势, 但是没有统计学意义。另外, 在评价甘草与甘遂对旁细胞转运 CF 影响的实验中, 甘遂组、合煎组和合并组均明显减少了 CF S-M 的透过 ($P < 0.01$); 甘遂组、合煎组和合并组则均明显减少了 CF M-S 的透过 ($P < 0.05$), 但甘草对 CF 转运的影响没有统计学意义。甘遂可能是一种 P-gp 抑制剂, 而甘草与甘遂合用后对 R123 透过的影响与单用甘遂相似, 可能是甘草与甘遂有协同作用, 使其毒性成分吸收增加, 这可能是两者配伍产生毒性的机制之一。

关键词: 甘遂; 甘草; 扩散池; 实时荧光定量聚合酶链式反应技术; P-糖蛋白

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 04-0510-07

Modulation on the P-glycoprotein in the jejunum by combined use of *Glycyrrhiza inflata* and *Kansui*

SUN Ya-bin¹, LI Guo-feng^{1*}, TANG Zhong-kun², WU Bing-yi³

(1. Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, 2. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, 3. Central Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: To investigate the modulation on the P-glycoprotein in the jejunum by combined use of *Glycyrrhiza inflata* and *Kansui* with ussing chamber and rt-pcr, Rhodamine 123(R123), a P-gp substrate and fluorescein sodium (CF), a model drug of non-P-gp substrate transported by a passive diffusion were taken as investigational drugs. Because these two drugs can be easily assayed and widely used in various research fields. The permeability of R123 or CF via Wistar rat jejunum membranes was evaluated by in vitro ussing chamber after oral administration of four different decoctions of *Glycyrrhiza inflata* and *Kansui* for 1 week. And the concentration of R123 or CF was determined by the fluorospectrophotometry in the receiving solution. Meanwhile the expression of *mdr1a* in P-glycoprotein was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. After oral administration of combine decoction of the single drug, the absorptive directed permeability of R123 increased significantly ($P < 0.01$). On the other hand, *Kansui* and combine decoction of the two drugs also decrease the permeability of secretory

收稿日期: 2009-11-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (C03050205); 2006 年钲川医学奖学金同学会科研启动基金资助项目 (101 号).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-62787724, E-mail: lgfnf@fimmu.com

directed transport ($P < 0.05$). No action of *Glycyrrhiza inflata* was found on the secretory transport of R123 [$P_{app} = (2.56 \pm 0.38) \times 10^{-5}$, $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$] across the jejunum tissues, while P_{app} of control group was found [$P_{app} = (2.35 \pm 0.27) \times 10^{-5}$, $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]. After oral administration of *Kansui* decoction for 1 week and 2 weeks, the levels of *mdr1a* expression in Wistar rats were lower than that of the control group, but there were no significant difference in the results. Meanwhile, *Glycyrrhiza inflata* had no effect on transport of CF across the jejunum tissues, though the other three groups could decrease the permeability of CF, as compared with control group. *Kansui* may slightly inhibit P-glycoprotein function in the intestinal membrane. For another, some compositions in *Kansui* inhibit P-glycoprotein function, and some others strengthen the tight junction between cells in the intestinal membrane to decrease permeability of CF. As the inhibitory action to P-glycoprotein was enhanced by combination of *Glycyrrhiza inflata* and *Kansui*, based on the results, it may be one of the mechanisms of creating toxicity once co-administration of *Glycyrrhiza inflata* and *Kansui*.

Key words: *Kansui*; *Glycyrrhiza inflata*; ussing chamber; rt-PCR; P-glycoprotein

甘草与甘遂的配伍属于传统中药的十八反药对。何益军等^[1]研究了甘草、甘遂合用对小鼠肝脏细胞色素 P450 1A2 酶活性的影响。结果表明, 单用甘草诱导 CYP1A2 的酶活性; 单用甘遂抑制 CYP1A2 的酶活性; 甘草与甘遂合用后抑制了 CYP1A2 的酶活性。说明甘草与甘遂合用对 CYP1A2 酶活性的抑制作用主要是甘遂引起的。而甘草与甘遂在一定比例下的配伍, 能显著提高小鼠肝匀浆 P450 含量, 提示甘草对肝药酶有诱导作用, 至于如何影响甘遂代谢, 有毒成分增多还是有效成分减少, 有待于进一步研究。由于多药耐药蛋白 P-糖蛋白 (P-glycoprotein) 的底物特异性很大程度上与细胞色素 P450 相似^[2], 二者有很多重叠的底物, 推测甘草与甘遂药对合用后有可能对肠黏膜 P-gp 产生影响。

本文采用 ussing chamber 实验技术与实时荧光定量聚合酶链式反应技术 (real-time fluorescent polymerase chain reaction) 分析甘草与甘遂合用前后对肠黏膜 P-gp 的影响。一方面, 期望能间接地说明反药合用前后对 P-gp 影响的规律性; 另一方面, 希望从口服药物生物转运的第 1 个阶段来阐明甘草和反药合用引起毒性增加的可能机制之一。此外, 通过本研究, 也希望能为进一步研究对 P-gp 有抑制作用的药剂辅料, 为提高口服药物生物利用度及临床用药的有效性、安全性等提供启示。

材料与方法

药物 甘草与甘遂购自广东广弘药材有限公司, 经南方医科大学中医药学院张宏伟副教授鉴定, 甘草为豆科植物 *Glycyrrhiza inflata* 的干燥根及根茎, 产自内蒙古; 甘遂为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T.N.Liou ex T.P.Wang 的干燥块根, 产自河南。

试剂 罗丹明 123 (Rhodamine123, R123, 批号

046K3688), 荧光素钠 (fluorescein sodium, CF, 批号 047K0676), HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine] ethane sulfonic acid, 批号 016K54331), Trizma base[Tris (hydroxyethyl aminomethane), 批号 103K5411], 以上试剂均购自美国 Sigma 公司。溴化乙锭 (ethidium bromide), 琼脂糖 (西班牙) 购自普博欣公司。二甲基亚砜购自广州化学试剂厂, 戊巴比妥钠购自中国医药 (集团) 上海化学试剂厂, 其余试剂为国产分析纯。dH₂O, RNA 提取试剂盒 (RNAiso Plus, code: D9108B), RNA 荧光定量试剂盒 (SYBR PrimeScript RT-PCR Kit, code: DRRO63M) 购自 Takara 公司。

仪器 荧光分光光度计 (美国 Waters 公司, 型号为 474); 7 mL 垂直型扩散池 (ussing chamber) 装置 (Harvard, 美国); ABI9700 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); MX3005P 荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦); ND-1000 分光光度计 (美国 NanoDrop)。

动物 Wistar 雄性大鼠, 体重 (250 ± 20) g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK 粤 2006-0015。动物实验的方法符合南方医科大学实验动物伦理委员会的有关规定和要求。

中药提取液 甘草称重后加入 15 倍量的蒸馏水, 浸泡 90 min 后煎煮, 以煮沸后 60 min 作为提取时间, 药液冷却后用布氏漏斗过滤, 再将提取液浓缩至 1 L, 相当于原生药 500 g, 即为甘草水煎液。甘遂水煎液制备同上, 质量浓度也为 500 g·L⁻¹。甘草、甘遂合煎液按 1:1 称重混合后制备方法同上, 药物生药含量为 1 kg·L⁻¹。甘草、甘遂合并液则先分别制备 1 kg·L⁻¹ 甘草水煎液和甘遂水煎液, 再将两水煎液 1:1 混合, 得到甘草、甘遂合并液。合煎液与合并液中甘草、甘遂的含量均为 500 g·L⁻¹。

HEPES 缓冲液的配制 取 HEPES 6 g, 溶于 800 mL 蒸馏水中, 使之完全溶解。通入混合气体 (95%

O₂: 5% CO₂) 10 min 后, 加入 3 mol·L⁻¹ KCl 1.8 mL, 1 mol·L⁻¹ CaCl₂ 1.8 mL, 1 mol·L⁻¹ MgSO₄ 0.8 mL, NaCl 8.18 g, 完全溶解后用 1 mol·L⁻¹ Tris 溶液调节 pH 至 7.4, 再加入 1 mol·L⁻¹ 葡萄糖溶液 5 mL, 用蒸馏水稀释至 1 L, 混匀即得。

实验溶液配制 分别将 R123 或 CF 溶解在 pH 7.4 的 O₂/CO₂ 气体饱和的 HEPES 缓冲液中, 这种 HEPES 溶液每天制备, 实验用 R123 或 CF 的最终浓度均为 4 mg·L⁻¹。

动物模型制备 雄性 Wistar 大鼠随机分成 5 组: 甘草组、甘遂组、合煎组、合并组以及生理盐水组。灌胃给药 (20 mL·kg⁻¹), 每日两次, 连续 7 d。

Ussing chamber 实验 R123 组: 使用 ussing chamber 实验法, 取离体大鼠肠黏膜, 观察灌胃给药 1 周后, 120 min 内 R123 经大鼠空肠黏膜的经时透过量。实验大鼠给予药品 1 周后, 禁食 16~18 h, 3%戊巴比妥钠腹腔注射 (32 mg·kg⁻¹) 麻醉, 延腹中线将腹部切开 2.5 cm 左右, 胃下 5 cm 处为空肠 (空肠约 10 cm), 在空肠前端插入硅胶管 (内径 2 mm) 结扎, 空肠末端剪开一小口后, 轻缓地用 0.9%生理盐水冲洗肠段两次、通入空气 4 次, 分离空肠置 HEPES 缓冲液中, 冰浴培养 5 min, 剪取肠段 3~4 cm, 迅速分离除去筋膜层, 将肠黏膜固定于扩散池上。吸收方向实验时 (从黏膜侧到浆膜侧的转运, M-S), 黏膜侧加入 R123-HEPES 溶液 7 mL, 浆膜侧加入 HEPES 缓冲液 7 mL; 分泌方向实验时 (从浆膜侧到黏膜侧的转运, S-M), 浆膜侧加入 R123-HEPES 溶液 7 mL, 黏膜侧加入 HEPES 缓冲液 7 mL。在混合气体 (95% O₂: 5% CO₂) 的作用以及 37.5 °C 水浴保温下, 分别于 15、30、45、60、75、90 和 120 min 在接收侧取样 0.5 mL, 同时补充 37.5 °C HEPES 缓冲液 0.5 mL。各份取样后的样品于冰箱中保存。

CF 组: 使用 ussing chamber 实验法, 取离体大鼠肠黏膜, 观察灌胃给药 1 周后, 120 min 内 CF 经大鼠空肠黏膜的经时透过量。

R123 和 CF 的测定方法学考察 R123 的激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm, 可在此波长下测定 R123 的荧光强度。R123 在 10~200 μg·L⁻¹, 荧光强度对浓度进行回归, 回归方程为 $Y = 0.223\ 7X + 2.565\ 8$ ($r^2 = 0.999\ 3$), 线性关系良好, 回收率和日内精密性分别为 99.9%和 0.9%。

CF 的激发波长为 480 nm, 发射波长为 520 nm, 可在此波长下测定 CF 的荧光强度。CF 在 200~2 000

μg·L⁻¹, 荧光强度对浓度进行回归, 回归方程为 $Y = 0.638\ 6X + 0.067\ 9$ ($r^2 = 1$), 线性关系良好, 回收率和日内精密性分别为 99.8%和 2.3%。

累计渗透量及表观渗透系数的测定 将荧光分析法测定的每个样品的数据处理, 得到给定时间浆膜侧 (吸收方向) 药物浓度 C_{m1} 和黏膜侧 (分泌方向) 药物浓度 C_{m2} , 用下列公式计算累计透过量 (Q_m):

$$Q_m = \sum 0.5C_{t(n-1)} + 7C_{t_n}$$

其中 0.5 和 7 分别表示取样体积 (mL) 和加入药液量 (mL)。根据给药剂量 D , 计算累计透过百分率 ($Q_m/D \times 100\%$)。另一方面, 表观渗透系数 (P_{app}) 是表示药物经黏膜透过能力的重要指标, 其计算公式为: $P_{app} = (dQ/dt) \times (1/AC_0)$, 单位: cm·s⁻¹, 其中 dQ/dt 表示稳态时时间-累计透过量线性回归所得的斜率, A 为有效渗透面积 (1.78 cm²), C_0 为加入药液侧初始药物浓度。在本实验中, 泵出比 (efflux ratios, ER) 用于评价对 P-gp 的抑制作用效果, 其计算公式为: $ER = P_{appsm}/P_{appms}$, 其中 P_{appsm} 是分泌方向的平均渗透系数, P_{appms} 是吸收方向的平均渗透系数。

RT-PCR 法检测 P-gp 在大鼠肠黏膜中的表达

动物组织制备 取灌胃生理盐水 7 d, 甘遂水煎液 7 d, 甘遂水煎液 14 d 的大鼠 ($n = 5$) 空肠 50~100 mg, 放入冻存管中, 迅速于液氮中速冻, 再转移至 -70 °C 冰箱中保存。

小肠组织中 RNA 提取 按 RNA 提取试剂盒说明书操作进行。将处理后的大鼠空肠放入研钵中, 用液氮研磨。待磨制粉末状, 加入 RNAiso reagent 1 mL, 将样品完全覆盖, 室温静置 5 min。12 000×g 离心 (4 °C) 5 min。取上层 1 mL 加入氯仿 (RNAiso reagent 的 1/5 体积量) 震荡。再室温静置 5 min。12 000×g 离心 (4 °C) 15 min。吸取上清液 (切忌吸出白色中间层) 加入等体积的异丙醇, 静置 10 min。12 000×g 离心 (4 °C) 10 min。离心后小心弃去上清液, 加 75%乙醇 1 mL, 12 000×g 离心 (4 °C) 5 min 后弃去乙醇。室温干燥沉淀 2~5 min, 加入适量的 TE 缓冲液溶解沉淀, 完全溶解后于 -80 °C 保存。

RNA 纯度及浓度检测 制备 2%的琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性, 28 S 和 18 S 条带清晰可见, 表明 RNA 无降解。用紫外分光光度计测量 RNA 浓度以及 A_{260}/A_{280} 来判断 RNA 的纯度。测量可知 A_{260}/A_{280} 在 1.9~2.1, 可知 RNA 纯度良好。

反转录反应 按说明书步骤配制反转录反应液。10 μL 的反应体系可最大使用 500 ng 的 Total RNA,

其中, 含有 5×PrimeScript Buffer (for real time) 2 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL, 100 μmol·L⁻¹ Random 6 mers 0.5 μL, 50 μmol·L⁻¹ Oligo dT Primer 0.5 μL, 最后用 Rnase Free dH₂O 补足至 10 μL。在 37 °C 15 min, 85 °C 5 s 条件下合成 cDNA, 之后终止反应。于 -20 °C 保存。

SYBR Green I 实时定量 PCR 检测 设计两对引物 (由 Takara 公司设计并合成), *mdr1a* 基因: 上游 5'-CCTGAAATCCAGCGGCAGA-3', 下游 5'-GAGTAATT CGCTGAGGCTATGTA-3', 扩增片段 140 bp; β -actin: 上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 下游 5'-GTCGTTCTGTCCTCATGCTACTCAG-3', 扩增片段 150 bp。

按说明书步骤配制 PCR 反应液 25 μL, 其中 SYBR Premix Ex Taq (2×) 12.5 μL, PCR Forward Primer (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.5 μL, 模板 cDNA 溶液 2 μL, dH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 10 s 1 Cycle, 95 °C 5 s 40 Cycle, 60 °C 20 s 40 Cycle, 72 °C 10 s 40 Cycle。实验中每份样品均做 3 个复孔, 另加 2 个无模板的阴性对照。将所扩增的 PCR 反应进行融解曲线分析, 验证 PCR 反应的特异性。融解曲线生成的程序为: 95 °C 1 min, 55 °C 30 s, 95 °C 30 s。整个过程中收集荧光。反应结束后, 记录每份样品 cDNA 分别加入目的基因及管家基因进行 PCR 扩增时达到阈值时的 C_t 值, 再转换成 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 用于数据分析。

统计学方法 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有实验数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行显著性检验 (双样本 t 检验), 显著性标准为 $P < 0.05$ 。

结果

1 R123 体外 ussing chamber 实验透过特性

大鼠空腹灌胃生理盐水 1 周后, R123 经大鼠空肠黏膜吸收方向和分泌方向的经时曲线 (图 1A) 表明分泌方向 R123 的透过能力强于吸收方向, 计算得到表观渗透系数 P_{app} 分别为 $(2.35 \pm 0.27) \times 10^{-5}$ 和 $(0.64 \pm 0.03) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 分泌是透过的 3.67 倍, 验证了 R123 受 P-gp 转运介导。

2 CF 体外 ussing chamber 实验透过特性

大鼠空腹灌胃生理盐水 1 周后, CF 经大鼠空肠黏膜吸收方向 (M-S) 和分泌方向 (S-M) 的经时曲线 (图 1B) 无显著差异, 计算得到表观渗透系数 P_{app} 分别为 $(1.5 \pm 0.16) \times 10^{-5}$ 和 $(1.39 \pm 0.27) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,

表明分泌方向 CF 的透过能力同吸收方向无统计学意义, 验证了 CF 不受 P-gp 转运介导。

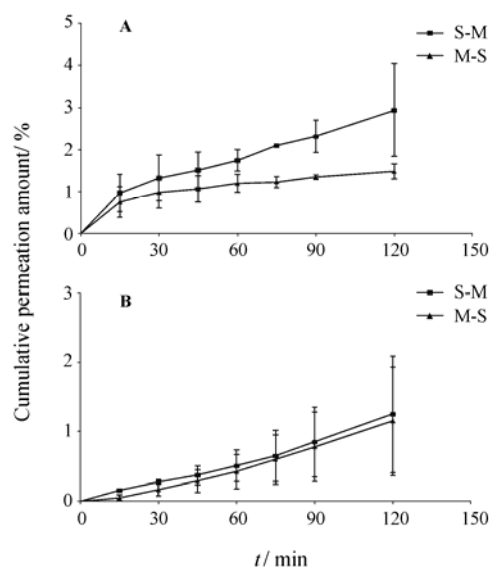


Figure 1 *In vitro* ussing chamber permeation profiles ($n = 5$) of rhodamine 123 (A) and CF (B). S-M: Secretory transport, M-S: Absorptive transport

3 甘草和甘遂对 R123 经空肠黏膜转运的 P_{app} 的影响

考察甘草、甘遂及其合用后对 R123 经空肠黏膜 M-S 方向和 S-M 方向的影响。500 g·L⁻¹ 甘草对 R123 吸收方向及分泌方向的转运都有增加趋势, 但无统计学意义 (图 2A, 表 1)。同浓度的甘遂可显著降低 R123 分泌方向的转运, P_{app} 为 $(1.07 \pm 0.76) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 而对照组为 $(2.35 \pm 0.27) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 对其吸收方向转运虽有增加趋势, 但无统计学意义 (图 2B, 表 1)。甘草与甘遂合并后, 使 R123 经空肠黏膜的分泌方向转运减少和吸收方向转运增加, 其中, 合煎组对 R123 的分泌方向转运与对照组相比有显著减少, P_{app} 为 $(1.42 \pm 0.40) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 而合并组对 R123 的吸收方向转运与对照组相比有显著增加, P_{app} 为 $(1.25 \pm 0.47) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

Table 1 Effect of different decoctions on the P_{app} of Rhodamine 123 across the rat jejunal membranes ($\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

Group	M-S	S-M	ER
Control	0.64 ± 0.03	2.35 ± 0.27	3.67
<i>Glycyrrhiza inflata</i>	0.92 ± 0.27	2.56 ± 0.38	2.78*
<i>Kansui</i>	0.66 ± 0.40	1.07 ± 0.76**	3.01*
Combine decoction of the two drugs	0.88 ± 0.06	1.42 ± 0.40**	1.62*
Combine decoction of the single drug	1.25 ± 0.47*	1.90 ± 0.34	1.52**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

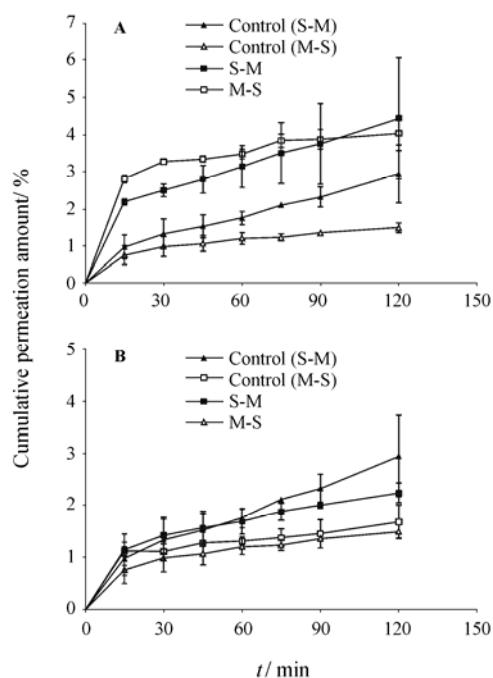


Figure 2 Time course of *Glycyrrhiza inflata*'s (A) and *Kansui*'s (B) effect on the absorptive transport (M-S) and time course of *Glycyrrhiza inflata*'s (A) and *Kansui*'s (B) effect on the secretory transport (S-M) of Rhodamine123 across the jejunum tissues ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

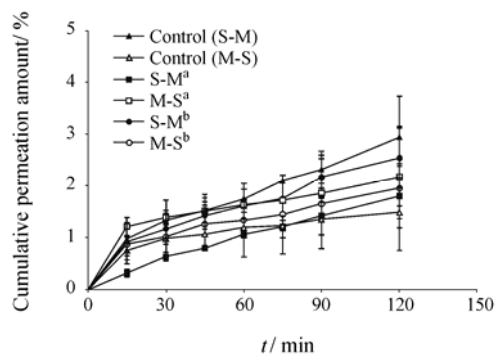


Figure 3 Time course of combination's (*Glycyrrhiza inflata* and *Kansui*) effect on the absorptive transport (M-S) and the secretory transport (S-M) of Rhodamine123 across the jejunum tissues ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$). a: Combine decoction of the two drugs; b: Combine decoction of the single drug

$0.47) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 而对照组为 $(0.64 \pm 0.03) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (图 3, 表 1)。

4 甘草和甘遂对 CF 经空肠黏膜转运的 P_{app} 的影响

考察甘草、甘遂及其合用后对 CF 经空肠黏膜 M-S 方向和 S-M 方向的影响。甘草对 CF 经空肠黏膜吸收和分泌方向的透过性均无显著性影响；而大鼠灌胃甘遂、合煎液和合并液后，CF 分泌和吸收方向透过率都呈显著降低趋势，说明甘遂、合煎液和合并液可以显著降低 CF 的透过性 (图 4, 表 2)。

5 *mdr1a* 基因相对表达分析

考察大鼠灌胃甘遂 7 d 和 14 d 后对大鼠空肠 P-gp 的影响。两组都有降低 *mdr1a* 基因表达的趋势，但是与对照组相比较，没有显著性差异 (图 5)。

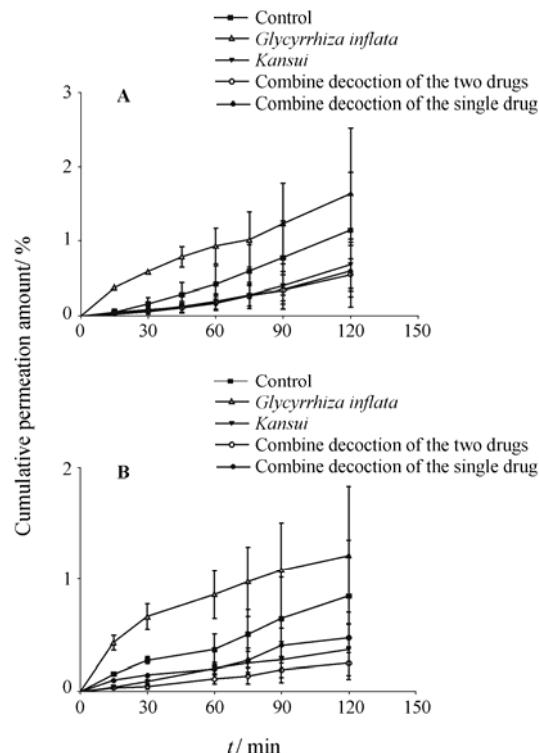


Figure 4 Time course of combination's (*Glycyrrhiza inflata* and *Kansui*) effect on the absorptive transport (M-S, A) and secretory transport (S-M, B) of fluorescein sodium across the jejunum tissues ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of different decoctions on the P_{app} of fluorescein sodium across the rat jejunal membranes ($\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

Group	M-S	S-M	ER
Control	1.39 ± 0.27	1.5 ± 0.16	1.08
<i>Glycyrrhiza inflata</i>	1.52 ± 0.53	1.46 ± 0.22	0.96
<i>Kansui</i>	$0.81 \pm 0.28^*$	$0.76 \pm 0.11^{**}$	0.94
Combine decoction of the two drugs	$0.77 \pm 0.07^{**}$	$0.71 \pm 0.30^{**}$	0.92
Combine decoction of the single drug	$0.75 \pm 0.21^{**}$	$0.82 \pm 0.26^{**}$	1.09

ER: Efflux ratios. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs control group. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

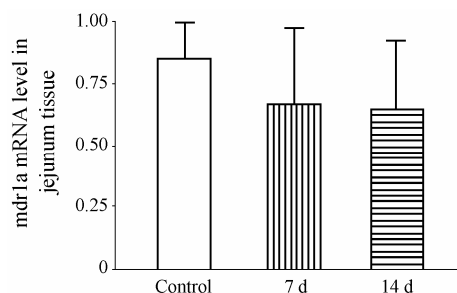


Figure 5 *mdr1a* mRNA level in jejunum tissue ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

讨论

现已证实,许多药物均为肠黏膜 P-gp 的底物或抑制剂。除了化学药物外,一些常用的中草药,制剂辅料和食物等,均具有调节 P-gp 活性的作用或是 P-gp 的底物^[3-5]。目前只有少数体外实验用于预测药物在体的吸收能力。Caco-2 单层一般认为是药物转运研究的一种合适的体外模型^[6],但 Caco-2 单层中转运体的表达量通常有变化,是评价受转运体调控影响药物的主要缺点之一。Ussing chamber 技术是建立在大鼠肠黏膜基础上的预测药物在人体吸收的另一个有效的手段。Watanabe 等^[7]通过扩散室实验获得了 15 种水溶性和脂溶性药物的表观渗透系数 (P_{app}),并比较了与人吸收系数 (F_a) 的相关性。结果发现实验药物的 P_{app} 与 F_a 存在良好的相关性。因此,本文的体外实验方法采用 ussing chamber 技术来研究甘遂与甘草的配伍对大鼠空肠黏膜 P-gp 的影响。Ussing chamber 实验法^[8,9]具有模拟胃肠道环境的特点,操作简单,成本较低,易于推广,该方法作为生物药剂学研究的新方法,近年在国外应用较多。由于肠黏膜中的毛细血管位于黏膜层和浆膜层组织之间,因此为了更好地模拟体内吸收的实际情况,需要将肠黏膜中浆膜层的组织分离除去,这是 ussing chamber 实验法的难点及技术关键。

R123 是 P-gp 的典型底物,由于其检测方便,在细胞模型中评价 P-gp 中已有广泛应用,现在国际上也用于口服药物吸收利用度研究中,特别是在评价 P-gp 对口服药物的吸收和分泌的影响。很多学者利用 *in vitro* 和 *in situ* 实验,以 R123 为底物进行研究^[10,11]。本实验通过体外 ussing chamber 实验,测得 R123 在空肠中的转运渗透系数分泌方向大于吸收方向 (泵出比为 3.67),与国际上研究的结果一致,表明其在小肠中的转运以分泌为主,说明泵出系统的存在。这也表明以 R123 为底物研究口服药物在肠内转运与 P-gp 的关系是可行的。与 R123 主动转运机制不同,CF 为细胞旁途径转运药物。这两种药物作为各自转运机制的典型药物被广泛用于各种药理实验中,都具有可见光范围的荧光,检测灵敏度高。用 CF 作为对照,使实验内容更加完整全面,更具说服力。

在大鼠体内表达 P-gp 的基因有 *mdr1a* 和 *mdr1b*,一般多用 *mdr1a* 进行分析。在 RT-PCR 定量方法中采用相对定量的方法,需要用内参基因进行相对比较。所以选择所有细胞均有恒定表达的 β -actin 为对照。

本文利用 rt-PCR 技术直接检测大鼠空肠黏膜中

mdr1a 的表达。目前尚未见探讨肠黏膜 P-gp 同中药配伍合理性之间的研究,文献仅报告了日本学者曾做过小柴胡汤对 P-gp 表达影响的研究^[12],因此探讨中药反药对合用后毒性增加是否同 P-gp 基因表达的改变等研究具有较高的学术价值。

在本文的体外 ussing chamber 实验中,4 种药液除甘草外均具有增加 R123 经吸收方向透过性和减少分泌方向透过性的趋势。在评价甘草与甘遂对 R123 影响的实验中,甘草增加了 R123 M-S 方向的透过,但对 S-M 方向影响不大,且均不具有统计学意义;甘遂组与合煎组均使 R123 S-M 方向透过明显减少 ($P < 0.01$)。合并组明显增加了 R123 M-S 方向的透过 ($P < 0.05$)。各组的泵出比均明显降低 ($P < 0.05$)。而 rt-PCR 实验中,评价甘遂对肠黏膜的 P-gp 活性的影响时,将大鼠分为灌胃甘遂 7 天组与 14 天组,主要针对甘遂可能为 P-gp 抑制剂考虑,发现大鼠灌胃 7 天和 14 天的甘遂后与对照组相比都有下调 *mdr1a* 表达的趋势,但是没有统计学意义。表明甘遂可能是一种 P-gp 抑制剂,而甘草与甘遂合用后对 R123 透过的影响与单用甘遂相似,可能甘草与甘遂有协同作用,使其毒性成分吸收增加,这可能是两者配伍产生毒性的机制之一。

在评价甘草与甘遂对旁细胞转运药物 CF 影响的实验中,甘遂组、合煎组和合并组均明显减少了 CF S-M 方向的透过 ($P < 0.01$);甘遂组、合煎组和合并组则均明显减少了 CF M-S 方向的透过 ($P < 0.05$),但甘草对 CF 转运的影响没有统计学意义,因此甘草与甘遂合用后对底物药物 R123 吸收是通过抑制存在于肠黏膜的 P-gp 活性产生的。而甘遂组 CF 分泌和吸收都减少,可能与甘遂使细胞之间紧密连接加强,引起旁细胞途径药物渗透的降低有关。但各组的泵出比与生理盐水组没有显著性差异,说明这可能不是甘草与甘遂合用产生毒性的原因。

通过以上实验分析可知:甘遂可能为一种 P-gp 抑制剂。甘遂与甘草合用后对 P-gp 产生一定的抑制作用,这可能是甘遂与甘草合用产生毒性的一种机制。但本实验中只有一个浓度的药液,需要增加浓度进行相关实验;另外,肠道内空肠、回肠以及结肠药物对它的渗透能力的影响也存在差异,而在本实验中只观察了空肠部位的透过性。设计 p-gp 的选择性抑制剂组和诱导剂组作为模型药物的对照组也将更有利于阐明甘草与甘遂对 P-gp 影响的机制。有关甘草与甘遂合用前后对 R123 吸收的 *in situ* 大鼠实验正

在进行中。

致谢: 感谢日本京都药科大学药剂系山本昌教授对本实验中 *ussing chamber* 实验方法和技术给予帮助和指导。

References

- [1] He YJ, Shi SY, Jin KT, et al. The modulation effect of Glycyrrhiza in combination with *Euphorbia pekinensis*, *Euphorbia kansui*, and *Daphne genkwa* on the enzyme activity of CYP1A2 in rat livers [J]. *Chin Remed Clin (中国药物与临床)*, 2007, 7: 278–280.
- [2] Miu HJ, Liu GL. P-glycoprotein and pharmacokinetics [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2002, 13: 49–50.
- [3] Zhou S, Lim LY, Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein [J]. *Drug Metab Rev*, 2004, 36: 57–104.
- [4] Shono Y, Nishihara H, Matsuda Y, et al. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by Cremophor EL and other surfactants by an *in vitro* diffusion chamber method using the isolated rat intestinal membranes [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93: 877–885.
- [5] Kamath AV, Yao M, Zhang Y, et al. Effect of fruit juices on the oral bioavailability of fexofenadine in rats [J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94: 233–239.
- [6] Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa [J]. *Pharm Res*, 1990, 7: 902–910.
- [7] Watanabe E, Takahashi M, Hayashi M. A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an *in vitro* chamber method [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58: 659–665.
- [8] Wallon C, Braaf Y, Wolving M, et al. Endoscopic biopsies in *ussing chambers* evaluated for studies of macromolecular permeability in the human colon [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2005, 40: 586–595.
- [9] Yang H, Finaly R, Daniel H. Alteration in epithelial permeability and ion transport in a mouse model of total parenteral nutrition [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31: 1118–1125.
- [10] Lin Y, Shen Q, Katsumi H, et al. Effects of labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of Rhodamine123, a P-glycoprotein substrate, in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30: 1301–1307.
- [11] Shen Q, Lin YL, Handa T, et al. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by *in vitro* transport and *in situ* absorption studies [J]. *Int J Pharm*, 2006, 313: 49–56.
- [12] Nishimura N. Effect of Chinese herbal medicines on intestinal drug absorption [J]. *Pharm Soc Japan*, 2005, 125: 363.