

· 论著 ·

基于基因芯片技术研究生物黏附材料促进三七皂苷吸收的机制

黎 迎, 朱春燕 (中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] **目的** 采用基因芯片技术研究3种生物黏附材料——壳聚糖、卡波姆和羟丙基甲基纤维素(HPMC)促进三七皂苷(PNS)吸收的机制。**方法** 将药物分为4组,分别是PNS组、PNS-壳聚糖组、PNS-卡波姆组和PNS-HPMC组,各组药物经Caco-2细胞转运后,通过基因芯片分析发生显著性变化的溶质运载蛋白(the solute carrier, SLC)和ABC家族转运蛋白(ATP-binding cassette transporters, ABC)基因,从而探索生物黏附材料对PNS吸收的影响机制。**结果** 与PNS组相比,壳聚糖和卡波姆均提高了SLC基因的表达水平。壳聚糖降低了多药耐药基因和P-gp外排基因的表达水平。HPMC对SLC和ABC两大蛋白家族基因表达无显著影响。**结论** 壳聚糖和卡波姆提高PNS的口服生物利用度与SLC和ABC转运蛋白有关。而HPMC对基因变化影响较小,其作用机制可能与延长吸收部位滞留时间有关。

[关键词] 三七皂苷;生物黏附材料;吸收机制;基因芯片技术

[中图分类号] R283 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)03-0215-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.005

Study on effect mechanism of bioadhesive polymers on panax notoginseng saponins' absorption by microarray technology

LI Ying, ZHU Chunyan (Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of bioadhesive materials (Chitosan, Carbomer and hydroxypropyl methyl cellulose(HPMC)) on promoting panax notoginseng saponins(PNS)'s oral absorption by microarray. **Methods** The study was divided into four groups .PNS, PNS-chitosan, PNS-carbomer and PNS-HPMC, microarray were used to investigate the change of genes expression level affiliated to the solute carrier transporter (SLC) and the ATP-binding cassette (ABC) after transporting across Caco-2 cell monolayer, to explore the mechanism of bioadhesive materials' effect on PNS's absorption. **Results** Comparing with PNS group, chitosan and carbomer could significantly increase gene expression level affiliated to SLC transporter, chitosan could decrease multi-resistant genes and P-gp efflux genes expression level affiliated to ABC transporter. HPMC had no obvious effect on SLC and ABC transporter. **Conclusion** Chitosan and carbomer increase PNS's oral due to genes change affiliated to SLC and ABC transporter that could promote absorption and inhibit efflux. The promotion mechanism of HPMC absorption was that it could prolong retention time on absorption site.

[Key words] panax notoginseng saponins; bioadhesive polymers; absorption mechanism; microarray technology

三七皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)是三七中的主要成分,PNS具有明显的抗心脑血管缺血的作用,广谱抗心律失常作用,有改善血液流变学和微循环的作用,有抗血小板聚集和抗血栓形成作用等^[1-5]。但PNS易溶于水,分子量大,口服吸收差。本课题组一直致力于采用生物黏附材料提高PNS口服生物利用度的研究^[6-8],结果发现,生物黏

附材料如壳聚糖(CS)、卡波姆(Car)和羟丙基甲基纤维素(HPMC)均可以提高PNS的口服生物利用度。本实验目的是更加全面、深入地研究生物黏附材料促进PNS透膜吸收的机制。

研究药物吸收机制的方法通常有体外Caco-2细胞转运、在体肠灌流和体内药动学,但这些技术不可能测定所有成分的吸收特性,选取已知的指标成分是有限的,而PNS成分复杂,各成分的吸收部位和吸收机制大相径庭,并且用主要有效成分来表征有效部位的整体吸收特性,显然也是不全面的。本研究尝试引入基因芯片技术^[9,10],从整体水平对吸收机制进行一些探索性研究。

[基金项目] 重大协同创新项目重大前沿研究(2016-I2M-1-012)

[作者简介] 黎迎,助理研究员,博士,研究方向:中药新剂型与新技术, Tel: (010)57833263, Email: yli@implad.ac.cn

[通讯作者] 朱春燕,研究员,博士生导师,研究方向:中药新剂型与新技术, Tel: (010)57833276

溶质运载蛋白(the solute carrier, SLC)和 ABC(ATP-binding cassette transporters, ABC)家族转运蛋白在药物吸收和运输过程中均显现出重要的功能^[11-13],本研究选择 SLC 和 ABC 两大转运蛋白家族,考察药物和生物黏附材料作用细胞后,其相关蛋白基因的变化,寻找 PNS 吸收中参与的转运蛋白和影响机制,从转运蛋白基因的变化角度,更加全面和宏观地对 PNS 的透膜吸收机制和生物黏附材料的促吸收机制进行初步探索。

1 仪器与试剂

Caco-2 细胞(北京协和医学院基础所细胞中心);胎牛血清(Gibco, NY, USA);双抗(InvitrogenTM, UK);RNA 提取试剂盒(Trizol, InvitrogenTM, UK);胰蛋白酶(0.25%, InvitrogenTM, UK);MEM 培养基(HyClone, Thermo);细胞培养池(0.4 μm, Coning Costar, Cambridge, MA, USA);Agilent mRNA 表达谱芯片(博奥生物有限公司),NucleoSpin[®] PCR 纯化试剂盒(MACHEREY-NAGEL, 德国)。

三七皂苷(云南文山康舟生物科技有限公司,批号:201304,其中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的含量分别为 2.30%、15.02%、26.80%);壳聚糖(Mw19000-31000,脱乙酰度 75%~85%,Sigma, St Louis, MO, USA);卡波姆 934p(批号:0101471786, Lubrizol, USA);HPMC K4M(上海卡乐康包衣技术有限公司,批号:PD423850)。

2 方法

2.1 细胞培养及 RNA 提取

将 Caco-2 细胞转移到细胞培养池后,培养 18~21 d,电阻值大于 500 Ω 时,用于 DNA 微阵列实验。用 Hank's[®]平衡盐溶液(HBSS)洗涤细胞 3 次,弃去,加入含药溶液,放入 37℃培养箱内孵育,2 h 后取出,吸出含药溶液,弃去,加入 PBS 洗涤 3 次,轻轻振荡后弃去,每孔中加入 Trizol 试剂,用移液器

反复吹打细胞,使细胞充分裂解,在细胞刚溶解时,可以发现丝状物出现,这是细胞的基因组 RNA 释放出来了,吹打几次后,丝状物消失,液体黏稠性下降,将溶解了细胞 RNA 的 Trizol 在室温下静置后,转移到离心管中-80℃冰箱保存待用。

2.2 样品溶液配制及给药

精密称取 PNS 适量,用培养基将其配制成 PNS 浓度为 1 mg/ml 的含药溶液,为 PNS 组;精密称取 PNS 和壳聚糖,配制成含 PNS 浓度为 1 mg/ml,壳聚糖浓度为 1.5 mg/ml 的含药混悬液,为 PNS-CS 组;精密称取 PNS 和卡波姆,配制成含 PNS 浓度为 1 mg/ml,卡波姆浓度为 1.5 mg/ml 的含药混悬液,为 PNS-Car 组;精密称取 PNS 和 HPMC,配制成含 PNS 浓度为 1 mg/ml,HPMC 浓度为 1.5 mg/ml 的含药混悬液,为 PNS-HPMC 组。将 4 组含药溶液分别加入到细胞培养池的 Caco-2 细胞膜的顶端一侧,另一侧加入 PBS;设置空白对照组(blank),将培养基加入 Caco-2 顶端侧,另一侧加入 PBS。将细胞培养池放入 37℃培养箱内孵育,作用 2 h 后,提取细胞 RNA,待测。微阵列芯片对比方式分为 4 组,1 组为 PNS 对比 blank;2 组为 PNS-CS 对比 blank;3 组为 PNS-Car 对比 blank;4 组为 PNS-HPMC 对比 blank(图 1)。

2.3 RNA 提取

通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,并进一步采用 NucleoSpin[®] RNA 提取试剂盒(MACHEREY-NAGEL, 德国)对总 RNA 进行过柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检 RNA 质量和纯度。

2.4 荧光标记

对样品 RNA 进行荧光标记(晶芯[®] cRNA 扩增标记试剂盒)。

2.4.1 反转录合成第一链 cDNA

以总 RNA 或 mRNA 起始,含有 T7 启动子序列的 T7 Oligo(dT)为引物,使用 CbcScript 酶合成第一链 cDNA。

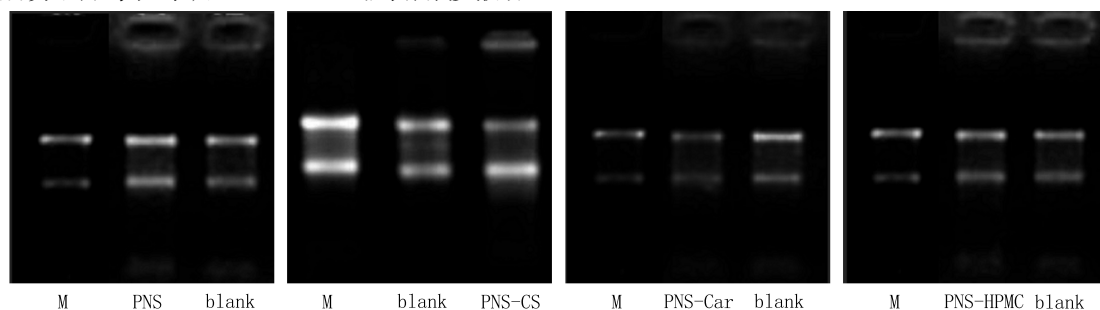


图 1 空白对照、PNS、PNS-CS、PNS-Car、PNS-HPMC 组的 RNA 电泳图

2.4.2 合成第二链 cDNA

用核糖核酸酶将杂合链中的 RNA 切成短片段, DNA 聚合酶以 RNA 短片为引物延伸, 合成第二链 cDNA, 并纯化双链 cDNA。

2.4.3 体外转录合成 cRNA

以 cDNA 为模板, 利用 T7 Enzyme Mix 合成 cRNA; 然后用 RNA 提取试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, 德国) 纯化。

2.4.4 随机引物反转录

取 5 μ g cRNA, 用 CbcScript II 酶, 随机引物进行反转录, 反转录产物用 NucleoSpin[®] PCR 纯化试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, 德国) 纯化。

2.4.5 cDNA

用 KLENOW 酶标记取上述反转录产物, 以随机引物为引物进行克列诺酶标记, 标记产物用 NucleoSpin[®] PCR 纯化试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, 德国) 纯化, 纯化后抽干。

2.5 杂交与清洗

标记的 DNA 溶于杂交液中 [$2\times$ GEx 杂交缓冲液 (HI-RPM), 25% 甲酰胺], 于 45 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交结束后, 先在 42 $^{\circ}$ C 左右含 0.2% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 $2\times$ 柠檬酸钠盐 (SSC) 的液体中洗 5 min, 而后在 $0.2\times$ SSC 中室温洗 5 min。玻片甩干后即可用于扫描。

2.6 芯片扫描

芯片用 G2565CA 微阵列芯片扫描仪 (安捷伦) 进行扫描, 得到杂交图片。

2.7 芯片图像的采集和数据分析

2.7.1 提取荧光信号值

采用特征提取图像分析软件对芯片图像进行分析, 将图像信号转化为数字信号。

2.7.2 差异基因筛选

对原始数据先用局部加权回归散点平滑法对信号值进行归一化处理^[14], 以 ratio > 2 倍或 < -2 倍的标准进行差异基因筛选。

3 结果

将得到的基因变化结果进行分析, ratio > 2 的认为是显著上调的基因, ratio < -2 的认为是显著下调的基因, 从而找到发生显著变化的 SLC 和 ABC 家族基因。

3.1 PNS 作用后基因表达的变化

图 2A 显示的是 PNS 作用细胞后, 与空白对照组相比, 其上调和下调的基因散点图。红色为上调基因, 绿色为下调基因。结果显示, PNS 经 Caco-2

细胞转运过程中, 共有 3 个 SLC 家族基因发生了显著性上调, 分别为钠依赖有机阴离子跨膜转运体 (SLC22A23)、有机阳离子转运体 (SLC47A1) 和鸟氨酸转运体 (SLC25A2)。

3.2 CS 作用后基因表达的变化

图 2B 显示的是 PNS 与 CS 共同作用 Caco-2 细胞后, 与 PNS 组相比, 其上调和下调的基因散点图。红色为上调基因, 绿色为下调基因。结果显示, 与 PNS 组相比, 加入 CS 后, 使 PNS 在 Caco-2 细胞转运过程中, 共有 13 个 SLC 家族基因发生了显著性上调。共有 5 个 ABC 家族基因发生了显著性下调。

发生显著性上调的 SLC 家族基因编码的转运体分别为: 神经递质转运体 (SLC6A13), Na^+ 偶联的中性氨基酸转运蛋白的编码基因 (SLC38A2), 丙二酰缩合酶编码基因 (SLC35G5), 有机阴离子转运体 (SLC04C1, 其涉及到胆酸、共轭类固醇、甲状腺激素、二十烷类和多肽类的转运), Na^+ 和 Cl^- 偶联的转运家族 (SLC6A20), 钠离子依赖的二元羧酸盐转运体 (SLC13A3), 神经递质转运体 (SLC6A4), 线粒体载体蛋白 (SLC25A51), 核苷转运体 (SLC28A1), 钠/磷酸盐协同转运蛋白 (SLC17A4), 核苷酸糖转运体 (SLC35A1), $5'$ -单磷酸胞苷-唾液酸转运体 (SLC24A1)。

发生显著性下调的 ABC 家族基因编码的转运体可以转运各种分子排出细胞膜外, 这些蛋白是 MRP 亚族, 与多药耐药有关, 分别为 ABCA17P、ABCC5、ABCD4、ABCC2、ABCB8。

3.3 Car 作用后基因表达的变化

图 2C 显示的是 PNS 与 Car 共同作用 Caco-2 细胞后, 与 PNS 组相比, 其上调和下调的基因散点图。红色为上调基因, 绿色为下调基因。结果显示, 与 PNS 组相比, 加入 Car 后, 使 PNS 在 Caco-2 细胞转运过程中, 共有 12 个 SLC 家族基因发生了显著性上调。这些基因编码的转运体分别为碳水化合物转运体 (SLC35D3), 硫酸/阴离子转运体 (SLC26A9), 阴离子转运体 (SLC4A1), 核苷转运体 (SLC28A2), 硫酸盐转运体 (SLC26A10), L-谷氨酸跨膜转运体 (SLC7A11), 钠依赖有机阴离子跨膜转运体 (SLC22A24), 硼酸盐转运体 (SLC4A11), 磷酸盐转运体 (SLC20A1), 锌转运蛋白体 (SLC39A12-AS1), 神经递质转运体 (SLC6A9), pH 敏感的钠依赖的磷酸盐转运体 (SLC34A2)。结果表明在 PNS/Car 透膜吸收中, 这些基因的含量明显高于 PNS, 推测应是 PNS/Car 作用 Caco-2 细胞后, 转运 PNS 进入细胞内的转运蛋白量增多, 促进了药物的吸收。

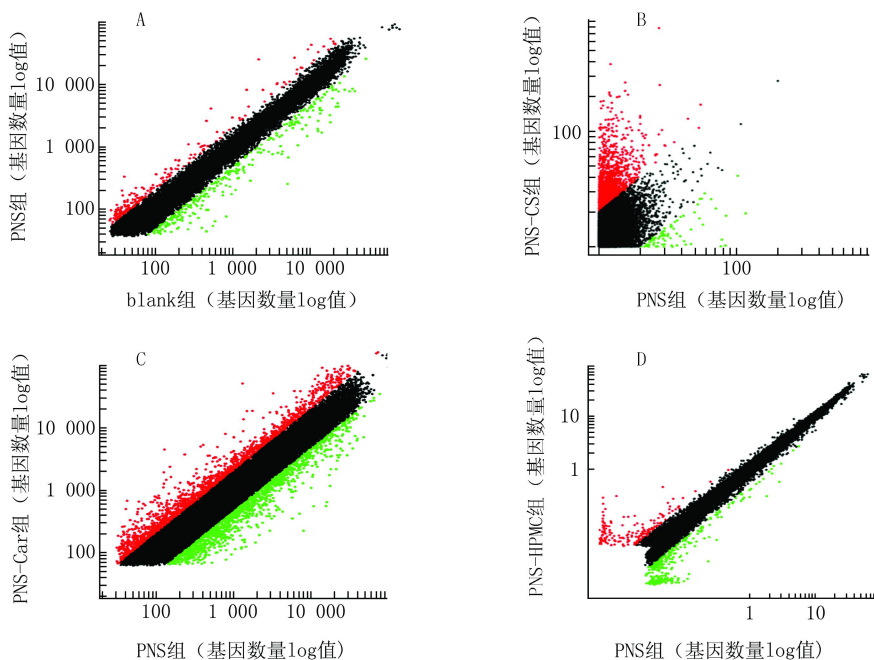


图2 基因变化散点图

A. PNS组对比blank组; B. PNS-CS组对比PNS组;
C. PNS-Car组对比PNS组; D. PNS-HPMC组对比PNS组

3.4 HPMC作用后基因表达的变化

图2D显示的是PNS与HPMC共同作用Caco-2细胞后,与PNS组相比,其上调和下调的基因散点图。红色为上调基因,绿色为下调基因。结果显示,与PNS组相比,加入HPMC后,使PNS在Caco-2细胞转运过程中,SLC家族基因和ABC家族基因均无显著性上调或下调。

表1和表2分别显示了各组显著性上调或下调(ratio>2或ratio<-2)的SLC家族基因和ABC家族基因。

表1 显著变化的SLC家族基因

PNS-Car对比PNS		PNS-CS对比PNS		PNS对比blank	
基因	ratio	基因	ratio	基因	ratio
SLC35D3	2.06	SLC6A13	4.27	SLC47A1	2.39
SLC26A9	4.71	SLC35E3	2.13	SLC25A2	2.93
SLC4A1	3.25	SLC35G5	4.39	SLC22A23	2.37
SLC28A2	3.53	SLC04C1	3.70		
SLC26A10	4.65	SLC6A20	2.46		
SLC7A11	2.23	SLC38A2	5.06		
SLC22A24	3.80	SLC13A3	2.11		
SLC4A11	2.12	SLC6A4	2.53		
SLC20A1	2.25	SLC25A51	2.40		
SLC39A12-AS1	2.06	SLC28A1	2.11		
SLC6A9	3.17	SLC17A4	2.04		
SLC34A2	2.33	SLC35A1	2.29		
		SLC24A1	5.36		

表2 显著变化的ABC家族基因

PNS-CS对比PNS	
基因	ratio
ABCA17P	-2.85
ABCC5	-2.47
ABCB8	-2.61
ABCC2	-2.05
ABCD4	-2.27

4 讨论

在PNS吸收过程中共有3个SLC家族基因表达水平发生了显著性上调,在Car吸收过程中,共有12个SLC家族基因发生了显著性上调,在CS吸收过程中,共有13个SLC家族基因发生了显著上调,Car和CS均能促进核苷转运体(SLC28)和神经递质转运体(SLC6)的表达。在HPMC吸收过程中,SLC家族基因均未发生显著性上调。结果表明,PNS经Caco-2细胞透膜吸收过程中,CS和Car影响某些基因表达蛋白,这些转运蛋白参与了PNS吸收。HPMC对基因变化影响较小,其提高生物利用度的原因主要与延长吸收部位滞留时间有关,或其吸水后形成凝胶屏障,延缓药物释放,提高药物在胃肠道的稳定性。

ABC转运蛋白家族在脂质物质的运输中起着非常重要的作用,是一些多药耐药蛋白,可以将进入

(下转第223页)

- complex I[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89(1): 486.
- [9] Gerhäuser C. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(9): 827.
- [10] 翟远坤,牛银波,潘亚磊,等. 柚皮苷对体外培养乳鼠颅骨成骨细胞增殖和分化成熟的影响[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(1): 105-111.
- [11] 张乃丹. 基于分子对接策略的熟地黄防治糖尿病性骨质疏松症有效成分及其作用机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [12] Carson JA, Manolagas SC. Effects of sex steroids on bones and muscles: similarities, parallels, and putative interactions in health and disease[J]. *Bone*, 2015, 80(1): 67-78.
- [13] 童安莉,陈璐璐,丁桂芝. 成骨细胞骨形成机制研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 1999(3): 63-67.
- [14] Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions [J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 343(2): 289-302.
- [收稿日期] 2018-03-20 [修回日期] 2018-04-27
[本文编辑] 李睿旻

(上接第218页)

细胞的药物泵出,从而影响药物的吸收。将CS组作用后的细胞中ABC家族转运蛋白表达基因的变化与PNS组比较,共有5个ABC家族基因发生了显著下调。而对于其他组,ABC家族基因均未发生显著变化。在PNS透膜吸收过程中,CS对ABC家族蛋白基因的表达有较为显著的影响,能够抑制ABC蛋白的表达,CS能够抑制PNS吸收中的外排作用,从而促进其吸收,而HPMC和Car对PNS外排作用无显著抑制效果。

在对ABC和SLC两大转运蛋白编码基因的变化进行分析时发现,CS和Car在提高PNS的透膜吸收的过程中改变了SLC转运蛋白编码基因的表达,HPMC对SLC家族基因表达无显著影响。分析作用后的ABC家族基因的变化,Car和HPMC对PNS吸收过程中ABC家族基因表达无显著影响,CS能使ABC家族基因发生显著下调,因此,CS促吸收另一个原因可能为抑制PNS吸收过程中的外排作用。通过基因芯片实验,得到了很多转运蛋白基因变化趋势,但是这些蛋白的表达变化也存在相互调控,还需进一步设计实验对本研究结果进行完善。

【参考文献】

- [1] Liu L, Ning B, Cui J, et al. miR-29c is implicated in the cardioprotective activity of Panax notoginseng saponins against isoproterenol-induced myocardial fibrogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 1-4.
- [2] Wu JH, Leung GPH, Kwan YW, et al. Suppression of diet-induced hypercholesterolaemia by saponins from Panax notoginseng in rats[J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(3): 1159-1169.
- [3] Zhou N, Tang Y, Keep RF, et al. Antioxidative effects of Panax notoginseng saponins in brain cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(10): 1189-1195.
- [4] Fan JS, Liu DN, Huang G, et al. Panax notoginseng saponins attenuate atherosclerosis via reciprocal regulation of lipid metabolism and inflammation by inducing liver X receptor alpha expression[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3): 732-738.
- [5] Xu L, Liu JT, Liu N, et al. Effects of Panax notoginseng saponins on proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 226-230.
- [6] Li Y, Zhang Y, Zhu CY. Pharmacokinetics and correlation between in vitro release and in vivo absorption of bio-adhesive pellets of panax notoginseng saponins [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(2): 142-151.
- [7] 张运,朱春燕. 生物黏附材料对三七总皂苷肠吸收的影响[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(14): 1215-1220.
- [8] Feng H, Chen W, Zhu C. Pharmacokinetics study of bio-adhesive tablet of Panax notoginseng saponins [J]. *Int Arch Med*, 2011, 4(1): 18.
- [9] 黄聪. 微阵列技术在基因表达分析中的应用[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2010, 13(3): 475-476.
- [10] 廖晓波,周新民,杨进福,等. 应用基因微阵列初步研究风湿性心脏病所致心力衰竭的基因表达谱[J]. *中国循环杂志*, 2009, 24(3): 217-220.
- [11] Khan S, Elshaer A, Rahman AS, et al. Genomic evaluation during permeability of indomethacin and its solid dispersion [J]. *J Drug Target*, 2011, 19(8): 615-623.
- [12] Khan S, Elshaer A, Rahman AS, et al. Systems biology approach to study permeability of paracetamol and its solid dispersion [J]. *Int J Pharm*, 2011, 417(1-2): 272-279.
- [13] Schlessinger A, Matsson P, Shima JE, et al. Comparison of human solute carriers [J]. *Protein Sci*, 2010, 19(3): 412-428.
- [14] Yang YH, Dudoit S, Luu P, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(4): e15.
- [收稿日期] 2017-06-26 [修回日期] 2018-01-20
[本文编辑] 陈盛新