

PKC/NF- κ B-PXR 信号通路对 P-糖蛋白基因表达的调控研究

黎玉华^{1,2}, 黄凌³, 魏筱华¹, 温金华¹, 钟国平², 黄民², 毕惠嫦^{2*}

(1. 南昌大学第一附属医院, 江西 南昌 330006; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;
3. 海南医学院药学院, 海南 海口 571199)

摘要: P-糖蛋白 (P-gp) 是 ABC (ATP binding cassette) 转运体家族重要成员, 也是药物在机体内转运的重要载体。本文考察 PKC/NF- κ B-PXR 信号途径对 LS174T 细胞中 P-gp 基因表达的调控作用。运用孕甾烷 X 受体 (PXR)-MDR1 双荧光报告基因实验探究 PKC 激动剂佛波酯 (PMA) 对 LS174T 细胞中 MDR1 荧光素酶活性的影响; 分别采用 real-time qPCR 和 Western blot 检测 PMA 对 LS174T 细胞中 P-gp mRNA 表达、蛋白表达及 NF- κ B 通路相关蛋白的影响。结果表明, PKC 激动剂 PMA 能明显抑制 PXR 介导的 P-gp 荧光素酶活性、mRNA 和蛋白表达, 并能显著性增加胞内 RelA/p65 的核转位。此外, siRNA 干扰实验结果显示, PKC α siRNA、RelA siRNA 或 PXR siRNA 干扰均可显著削弱 PMA 对 P-gp 基因表达的下调作用。因此, PKC 激动剂能显著抑制 PXR 介导的 P-gp 基因表达并伴随 NF- κ B 激活, 提示 PKC/NF- κ B-PXR 信号通路对 P-gp 基因表达具有重要的调控作用。

关键词: 蛋白激酶 C; 核因子 κ B; 孕甾烷 X 受体; P-糖蛋白; 基因表达

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0051-07

Regulation of P-glycoprotein gene expression by PKC/NF- κ B-PXR signaling pathway

LI Yu-hua^{1,2}, HUANG Ling³, WEI Xiao-hua¹, WEN Jin-hua¹, ZHONG Guo-ping²,
HUANG Min², BI Hui-chang^{2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

Abstract: P-glycoprotein (P-gp), an ATP binding cassette protein, plays a major role in efflux transport of drugs and xenobiotics due to its abundant expression on several barriers. This study aimed to investigate the potential role of PKC/NF- κ B-PXR signaling pathway in modulation of P-gp gene expression in human colon adenocarcinoma LS174T. The effect of PMA on MDR1 luciferase activity was investigated by PXR-MDR1 dual luciferase reporter gene assay. Real-time qPCR assay and Western blot analysis were used to study the gene expression of P-gp and NF- κ B, respectively. Compared to the vehicle-treated group, PMA statistically decreased P-gp luciferase activity, mRNA expression and protein expression. Moreover, PMA treatment yielded a significant and dose-dependent increase in RelA/p65 translocation to nucleus. Meanwhile, a remarkable increase of the p65-I κ B status was observed in LS174T cells after treatment with PMA (1–100 nmol·L⁻¹). In addition, knockdown of PKC α , NF- κ B or PXR can significantly attenuate PMA-induced P-gp suppression.

收稿日期: 2016-10-17; 修回日期: 2016-11-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660618).

*通讯作者 Tel: 86-20-39943470, Fax: 86-20-39943000, E-mail: bihchang@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1003

These results suggested that PKC/NF- κ B-PXR signaling pathway might play crucial roles in modulation of P-gp gene expression.

Key words: protein kinase C; nuclear factor κ B; pregnane X receptor; p-glycoprotein; gene expression

P-糖蛋白 (P-gp) 是 ABC (ATP binding cassette) 转运体家族重要成员,也是药物在机体内转运的重要载体,参与药物代谢动力学过程并介导了临床上许多药物相互作用。P-gp 是在正常组织分布广泛的血浆膜结合药物外排转运蛋白,存在于肠道上皮、肾小管、肝小管、血脑屏障和胎盘屏障。P-gp 主要表达在上皮细胞内腔侧表面、顶端和黏膜侧,它的功能主要是与其底物结合后,将底物从细胞浆中排出细胞^[1,2]。近年来,由于 P-gp 在药物转运和药物相互作用中发挥的重要作用,对 P-gp 表达和功能的调控研究受到有关学者的广泛关注。

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一类通过磷酸化蛋白质上的丝氨酸和苏氨酸残基进而调控其功能的蛋白激酶家族^[3]。佛波醇二酯类的佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 是一种肿瘤促进剂,在生物医学研究中常作为 PKC 激动剂,用来激活 PKC 信号传导通路,进而产生一系列细胞反应^[4]。研究表明,PKC 可以通过激活下游的细胞核因子 kappa B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 途径进而调控下游靶基因转录^[5]。NF- κ B 存在于多种组织细胞中,具有广泛的生物学活性,参与多种生理和病理过程的基因调控^[6]。作为炎症过程中的关键性因子,NF- κ B 对药物代谢领域中的代谢酶和转运体的潜在影响逐渐受到关注。NF- κ B 已被报道在抑制细胞色素 P450 3A (cytochrome P450 3A, CYP3A) 的基因表达中发挥重要作用,其对 CYP3A 的抑制是基于与孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR)-维甲酸 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 复合物的相互作用^[7]。配体依赖型转录因子 PXR 是人体对外源性异物产生适应性反应的主要的调节器,其作用的发挥主要通过诱导药物代谢酶和转运体的基因表达实现。据报道,PXR 也是调控 P-gp 基因表达的关键核受体^[8,9]。

截止目前,PKC 信号途径在 P-gp 表达和功能调控中的作用尚不明确,其潜在机制亦有待研究,尤其是 NF- κ B 和 PXR 是否在 PKC 对 P-gp 的表达调控中发挥作用尚不清楚。因此,本研究通过细胞、分子水平考察 PKC/NF- κ B-PXR 信号途径对 P-糖蛋白基因表达的影响,深入阐明 P-gp 基因表达调控的分子机制。

材料与方法

实验材料 人结肠癌 LS174T 细胞购自中国科学院上海细胞库。

实验试剂 佛波酯 (PMA)、4 α -佛波酯 (4 α -PMA)、利福平购自美国 Sigma 公司; RT-PCR 试剂盒和 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; GAPDH、P-gp、hPXR、RelA、NFKB1 上下游引物购自日本 TaKaRa 公司; RPMI-1640 培养基、非必需氨基酸、青霉素/链霉素溶液、BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 有限公司; RIPA 裂解液、细胞浆/核蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究; 人 GAPDH、RelA/p65、p-I κ B α 、I κ B α 、p-IKK α / β 一抗、鼠二抗、兔二抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Trizol 试剂、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶-EDTA、LipofectaminTM 2000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司。E. coli Competent Cells DH5 α 和 PRL-TK 质粒购自日本 TaKaRa 公司; TK-MDR1-luc 报告质粒由美国匹兹堡大学谢文教授惠赠; pSG5-hPXR 表达质粒由美国德克萨斯大学 Dr. Steven A. Kliewer 惠赠; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司; PKC α siRNA、hRelA siRNA、hPXR siRNA 购自广州市锐博生物科技有限公司。

实验仪器 5417-R 低温高速离心机、普通 PCR 仪、微量取样器购自德国 Eppendorf 公司; 多功能酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司; 7500 型实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems (ABI) 公司; Mini-PROTEAN3 电泳系统和 Mini Trans-Blot 转移系统购自美国 Bio-Rad 公司; ImageQuant LAS 4000 曝光成像仪购自美国 General Electric 公司; 微量定量仪 Nanodrop2000 购自美国 Thermofisher 公司; 超灵敏管式发光仪购自广州云星科学仪器有限公司。

LS174T 细胞的培养 LS174T 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素双抗溶液的 RPMI-1640 培养基中,于 37 °C、5% CO₂、90% 湿度的细胞培养箱中培养。

细胞转染与报告基因实验 选取处于对数生长期的 LS174T 细胞,用含 10% FBS 的 1640 培养液制

作成单细胞悬液,以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于 96 孔板中,于培养箱中培养 24 h。使用 Lipofectamine 2000 进行质粒转染,3 种质粒转染细胞时每孔的量分别为 tk-MDR1-luc: 80 ng, pSG5-hPXR: 80 ng, pRL-TK: 10 ng。pSG5-Empty 空载体对照组中各质粒用量分别为 tk-MDR1-luc: 80 ng, pSG5-empty vectors: 80 ng, pRL-TK: 10 ng。待质粒转染 5 h 后,已转染质粒的细胞分别与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平 (rifampicin, Rif), PMA 或 4α -PMA ($1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及空白培养基孵育 24 h。采用化学发光仪进行萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶荧光数值测定,其中空白培养基作为空白对照,Rif 组作为阳性对照。每孔的荧光素酶活性值用海肾荧光素酶的活性进行校正,每个样品孔校正后的荧光素酶活性值 = 萤火虫荧光素酶的活性值/海肾荧光素酶的活性值。每一个剂量水平都有 3 个以上样品量,空白对照组的荧光素酶活性值作为基础表达,其他待测组的荧光素酶活性与空白组荧光素酶活性值相比,以倍数表示荧光素酶表达量的高低。

实时荧光定量 PCR 实验 选取处于对数生长期的 LS174T 细胞,用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液制作成单细胞悬液,以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于 12 孔板中,于培养箱中培养 24 h 后。分别与 PMA (1 、 10 、 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 4α -PMA ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及空白培养基 (含有 1% DMSO) 孵育 48 h,按照操作说明书使用 Trizol 试剂提取总 RNA 并定量。采用 PremeScript RT Reagent Kit 试剂盒进行逆转录得到 cDNA,实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 P-gp 的基因表达水平,选取 GAPDH 作为内参对照。P-gp 的上游引物: 5'-CCATAGCTCGTGCCCTTGTTAGA-3', P-gp 的下游引物: 5'-CCATAGCTCGTGCCCTTGTTAGA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', GAPDH 下游引物: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。使用 SYBR Premix Ex Taq Kit 试剂盒按下列条件在 PCR 扩增仪上进行扩增: $94 \text{ }^\circ\text{C} \times 1 \text{ min} \rightarrow 95 \text{ }^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$, $58 \text{ }^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$, $72 \text{ }^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$ (共 45 个循环) $\rightarrow 95 \text{ }^\circ\text{C} \times 10 \text{ s} \rightarrow 65 \text{ }^\circ\text{C} \times 45 \text{ s} \rightarrow 40 \text{ }^\circ\text{C} \times 60 \text{ s}$ 。采用相对 C_t 值 (ΔC_t) 的方法对 P-gp 基因的表达进行定量,以 GAPDH 为内参,药物处理细胞后 P-gp 基因的表达相对于对照组的倍数变化为: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 倍^[10]。

Western blot 检测实验 选取处于对数生长期的 LS174T 细胞,用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液制作成单细胞悬液,以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于 6 孔板中,于培养箱中培养 24 h 后。分别与 PMA (1 、

10 、 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 4α -PMA ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及空白培养基 (含有 1% DMSO) 孵育 48 h 后,裂解细胞 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $20\ 000 \times g$ 离心 30 min 得蛋白溶液;NF- κ B 通路相关蛋白的提取按照细胞浆/核蛋白抽提试剂盒说明书进行。按照 BCA Protein Assay Kit 试剂盒操作说明书采用 BCA 法测定蛋白浓度。提取的蛋白溶液与上样缓冲液混合于沸水中煮沸变性 10 min 后冷却上样。蛋白溶液上样至 8% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,经 70 V 电泳浓缩 30 min、130 V 电泳分离 70 min 后再经 250 mA 恒流 90 min 使蛋白电转至 PVDF 膜中。PVDF 膜浸入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液中,置于水平摇床上室温震荡孵育 2 h。封闭好的 PVDF 膜与一抗溶液 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜后再与二抗溶液室温孵育 1 h。取出 PVDF 膜,用 $1 \times$ TBST 洗 3 次,每次 10 min;蛋白印迹经 Engreen ECL 发光液显影后放置于 ImageQuant LAS4000 mini 曝光成像仪中分析^[11]。以 GAPDH 为内参对照,采用 Image J 1.38 软件分析定量蛋白印迹信号。

siRNA 干扰实验 选取处于对数生长期的 LS174T 细胞,用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液制作成单细胞悬液,以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于 12 孔板中。细胞在培养箱中培养 24 h 后,参照本报告基因实验部分进行 PKC α siRNA, RelA siRNA 或 hPXR siRNA 转染,浓度为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,转染 5 h 后,分别与 PMA (1 、 10 、 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 4α -PMA ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及空白培养基 (含有 1% DMSO) 孵育 48 h,采用上述实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测实验的方法考察 LS174T 细胞中 P-gp 基因表达及 NF- κ B 通路相关蛋白的表达,其中空白培养基 (含有 1% DMSO) 作为空白对照。

数据处理 各实验组数据均以 Mean \pm S.D. 表示,并根据资料性质分别进行方差分析,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析,Dunnett's 两两比较法比较各组之间的统计学差异, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

结果

1 PMA 对 PXR 介导的 P-gp 转录作用的影响

转染后的 LS174T 细胞与 PXR 的诱导阳性药物 Rif 共同孵育 24 h 后,Rif 能显著增加 MDR1 荧光素酶表达约 2.2 倍,证明 PXR-MDR1 报告基因检测体系成功建立。如图 1 所示,蛋白激酶 C 激动剂 PMA 能明显抑制 LS174T 细胞中 PXR 介导的 MDR1 荧光素酶活性;PMA ($1 \sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 Rif 共同给药至转染

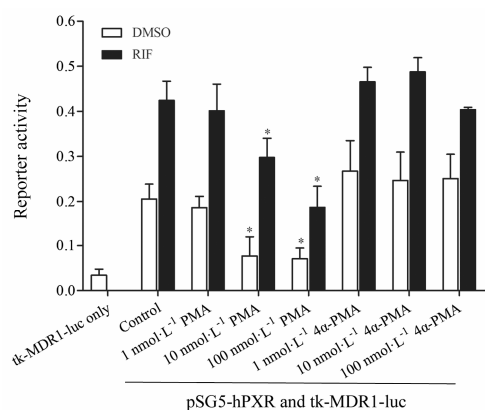


Figure 1 Activation of endogenous phorbol ester-dependent PKC signaling induces tk-MDR1-Luc reporter gene activity in LS174T cells. Five hour post-transfection, LS174T cells were treated with the indicated concentrations (nmol·L⁻¹) of PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) or PKC-inactive 4α-PMA in the presence and absence of rifampicin (Rif, 10 μmol·L⁻¹) for 24 h. The data presented are the mean ± S.D. of triplicates (n=3) and are expressed as reporter gene activity; *P<0.05 vs Control

质粒的 LS174T 细胞孵育 24 h 后, 10 和 100 nmol·L⁻¹ PMA 能使 LS174T 细胞中的 MDR1 荧光素酶活性分别下降约 29.7% 和 55.9%。单独将 PMA (1~100 nmol·L⁻¹) 与转染质粒的 LS174T 细胞孵育 24 h 后, 10 和 100 nmol·L⁻¹ PMA 能使 LS174T 细胞中的 MDR1 荧光素酶活性分别下降约 62.4% 和 65.4%。而阴性对照 4α-PMA 对 MDR1 荧光素酶报告基因表达无影响, 提示 PKC 通路在其中发挥着重要作用。

2 PMA 对 LS174T 细胞中 P-gp 基因表达及蛋白表达的影响

如图 2 所示, 蛋白激酶 C 激动剂 PMA 能显著降低 LS74T 细胞中 P-gp mRNA 表达水平, 与对照组相比, 10 与 100 nmol·L⁻¹ 分别可以使 P-gp mRNA 水平下降 46.9% 和 57.0% (图 2A); 同时 Western blot 结果显示 PMA 可以显著地下调 LS74T 细胞中 P-gp 的蛋白表达 (图 2B), 进一步确证了 PMA 对 P-gp 表达调控的下调作用。

3 PMA 对 LS174T 细胞中 NF-κB 通路相关蛋白的影响

本研究进一步探究 PMA 对 LS174T 细胞中 NF-κB 信号通路的影响。如图 3 所示, LS174T 细胞与蛋白激酶 C 激动剂 PMA (1~500 nmol·L⁻¹) 孵育 48 h 后, 能明显检测到 p65 (RelA) 蛋白的核转位增加, 提示 PMA 可以激活 NF-κB 通路; 同时可以观察到胞浆中 p-IκBα 水平明显增加, 而 IκBα 水平剂量依赖性下降; 实验进一步考察了 PMA 对 NF-κB 上游蛋白 p-IKKα/β 的影响, 结果显示 PMA (1~500 nmol·L⁻¹)

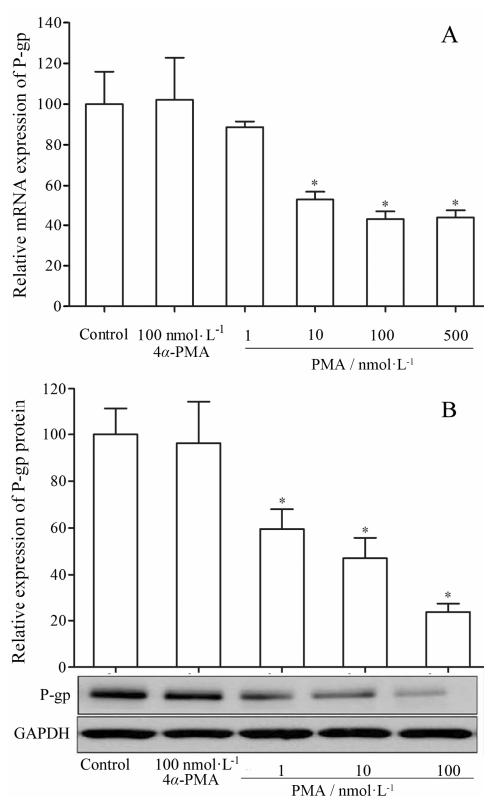


Figure 2 The effect of 4α-PMA and PMA on the mRNA expression (A) and protein expression (B) of P-gp in LS174T cell. The cells were treated with vehicle controls (0.1% DMSO); 100 nmol·L⁻¹ 4α-PMA; 1, 10, 100, 500 nmol·L⁻¹ PMA for 48 h, respectively. Total RNA and proteins were harvested. P-gp mRNA levels were analyzed by real-time PCR. Proteins were analyzed by Western blot. Expression of tested genes was normalized against that of GAPDH. The effect of PMA on the P-gp expression levels is presented as percentage expression compared to the vehicle group. The data presented are the mean ± S.D. of triplicates (n=3); *P<0.05 vs Control

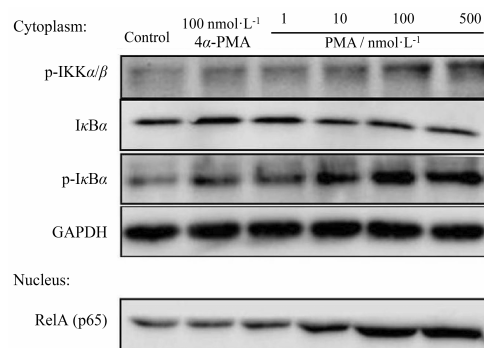


Figure 3 Effect of PMA on the NF-κB signaling pathway in LS174T cells. The cells were treated with vehicle control (0.1% DMSO) or PMA at concentrations of 1, 10, 100, 500 nmol·L⁻¹ for 48 h. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared. The levels of NF-κB (p65/RelA) in the nucleus, the phosphorylation of IKKα/β, and the phosphorylation of IκBα and the cytosolic IκBα levels were determined by Western blot. Immunoreactive proteins were visualized using an ECL method. The data that are shown represented three independent experiments

可以增加胞浆中 p-IKK α / β 水平。

4 siRNA 干扰对 PMA 调控 P-gp 基因表达的影响

本研究考察干扰 PKC α 、RelA/p65 或 PXR 后 PMA 对 LS174T 细胞中 P-gp 表达的影响。结果显示干扰 PKC α 可以消除 PMA 对 P-gp 蛋白的下调作用 (图 4A), 同时还发现 PMA 所致的 NF- κ B 通路的激活作用消失 (图 4B, 4C); 干扰 RelA 后 PMA 对 P-gp mRNA 及蛋白表达的影响如图 5A 和图 5B 所示, 结果表明干扰 RelA 可以显著削弱 PMA 对 P-gp mRNA 及蛋白的下调作用; 进一步采取 hPXR siRNA 法确证 hPXR 在 PMA 对 P-gp 的表达调控中的作用, 如图 5C 和图 5D 所示, 干扰 hPXR 也可以显著削弱 PMA 对 P-gp mRNA 及蛋白的下调作用。

讨论

P-gp 在药物吸收、药物相互作用和肿瘤的耐药方面扮演着重要角色, 国内关于 P-gp 调控的研究越

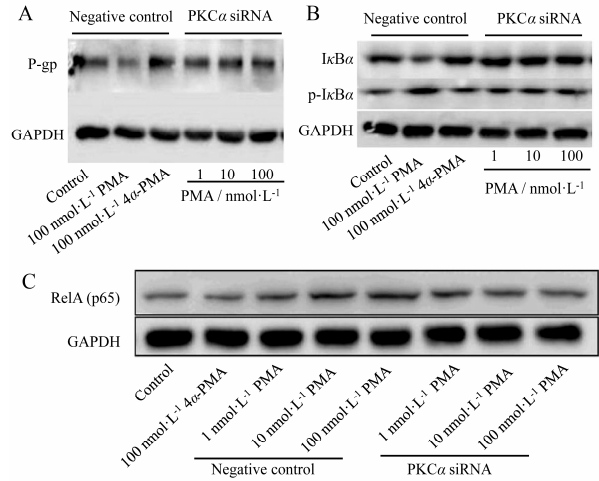


Figure 4 The role of PKC α in the regulation of P-gp (A) and NF- κ B (B, C) due to activation of the PKC. LS174T cells were transfected with PKC α siRNA for 5 h. The cells were treated with vehicle control (0.1% DMSO); 100 nmol \cdot L $^{-1}$ 4 α -PMA; 1, 10 and 100 nmol \cdot L $^{-1}$ PMA for 48 h, respectively. Proteins were harvested and fractionated through 8% SDS-PAGE, transferred to PVDF filters, and incubated with primary antibodies. Immuno-reactive proteins were visualized using an ECL method

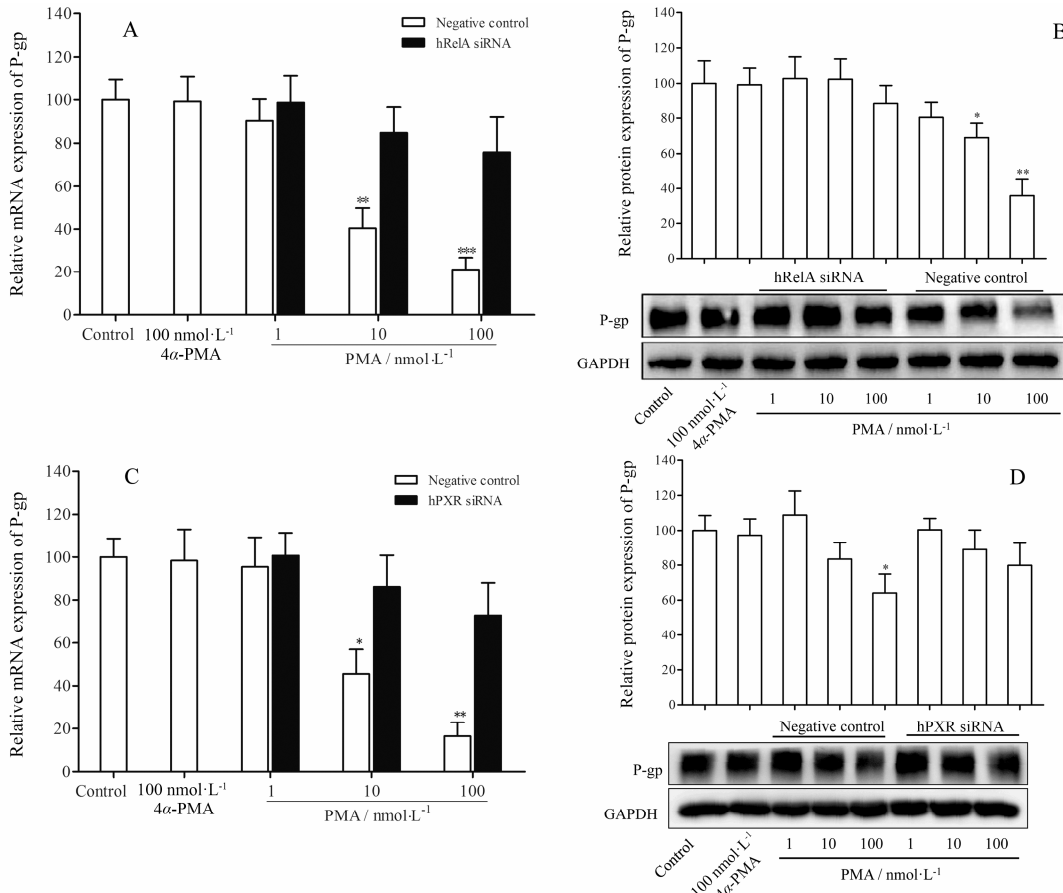


Figure 5 The roles of RelA (A, B) and PXR (C, D) in the regulation of P-gp due to activation of the PKC. LS174T cells were transfected with RelA siRNA or PXR siRNA for 5 h. The cells were treated with vehicle control (0.1% DMSO); 100 nmol \cdot L $^{-1}$ 4 α -PMA; 1, 10 and 100 nmol \cdot L $^{-1}$ PMA for 48 h, respectively. Total RNA and proteins were harvested. P-gp mRNA levels were analyzed by real-time PCR. Proteins were analyzed by Western blot. Expression of tested genes was normalized against that of GAPDH. The effect of PMA on the P-gp expression levels is presented as percentage expression compared to control vehicle-treated cells. The data presented are the mean \pm S.D. of triplicates ($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Control

来越多,但这些文献报道均仅限于对 P-gp 蛋白表达及功能的影响^[12–14],尚未见对 P-gp 调控的确切分子机制的报道。目前 PKC 信号途径对 P-gp 表达、活性的影响及其机制尚不明确,可能是 PKC 参与了细胞核内某些基因的表达调控,其中 PKC 与核受体(PXR、CAR 等)的相互作用可能发挥了重要作用。本研究考察 PKC/NF- κ B-PXR 信号途径对 LS174T 细胞中 P-gp 基因表达的调控作用。首先考察了蛋白激酶 C 激动剂 PMA 对 PXR 介导的 P-gp 转录调节作用,结果表明 PMA 不论是否与 PXR 激动剂 Rif 共同给药均能显著抑制细胞中的 P-gp 荧光素酶报告基因表达,提示 PKC 的激活可能会进一步影响下游通路从而干扰 PXR-RXR 异二聚体与 P-gp 基因序列的上游调节元件的结合,最终下调 P-gp 的基因表达;而阴性对照 4 α -PMA 对 P-gp 荧光素酶报告基因表达无影响,提示 PKC 信号通路在 PMA 对 MDR1 荧光素酶报告基因表达调控中发挥关键作用。PXR 在 P-gp 表达调控中的作用的报道也开始见于国内外学者的研究中^[15–19],但尚未见 PXR 介导的 P-gp 表达调控在 PKC 途径对 P-gp 影响中发挥作用的报道。因此本研究结果为 PKC 途径对 P-gp 调控提供了新解释的可能。

基于报告基因实验结果,本研究进一步考察 PMA 对 LS174T 细胞中 P-gp mRNA 和蛋白表达水平的影响,结果显示 PMA 可以显著地下调 LS174T 细胞中 P-gp 的 mRNA 和蛋白表达,上述结果与报告基因实验结果相一致同时也进一步确证了 PMA 对 P-gp 表达的下调作用。有研究表明,PKC 可以磷酸化 NF- κ B 的抑制因子 I κ B α ,随后激活 NF- κ B 通路,增强 p65 的核转位^[20,21],进而调控下游靶基因的表达。因此本研究继续考察了 PMA 对 LS174T 细胞中 NF- κ B 通路的影响,结果表明 PMA 能明显增加细胞中 p65 (RelA) 蛋白的核转位,同时观察到胞浆中 p-IKK α / β 和 p-I κ B α 水平明显增加,而 I κ B α 水平剂量依赖性下降,上述结果提示 PMA 可以通过磷酸化 IKK α / β 和 I κ B α 进而激活 NF- κ B 通路;结合 PMA 对 PXR 介导的 MDR1 荧光素酶报告基因和对细胞中 P-gp 表达的影响结果,推测 PMA 激活 PKC 信号途径后,随后激活 NF- κ B 通路,使得 p65 的核转位增加,核内的 p65 结合至 PXR 与 RXR 形成的复合物上,最终阻碍该复合物与调控序列结合进而下调 P-gp 的表达。

为深入阐明 PKC/NF- κ B-PXR 信号途径对 P-gp 表达的调控作用,本研究采取 siRNA 干扰法确证 PKC、RelA/p65、hPXR 在 PMA 对 P-gp 的表达调控中的作用。首先利用 real-time qPCR 和 Western blot

技术对以上几种信号分子的 siRNA 干扰沉默效率进行了考察,结果显示在将 siRNA 转染进入细胞的处理时间为 5 h,然后给药孵育 48 h 的条件下,PKC、RelA/p65、hPXR 的干扰效率均非常理想(结果未显示)。进一步的结果表明干扰 PKC α 、RelA/p65、hPXR 均能显著削弱 PMA 对 P-gp mRNA 及蛋白的下调作用,同时发现干扰 PKC α 后 PMA 对 NF- κ B 通路的激活作用消失,提示 PKC α 、RelA、hPXR 在 PMA 对 P-gp 表达的下调作用中发挥至关重要的作用。

综上所述,本研究证实 PKC 通路激活后可以进一步通过激活下游 NF- κ B 信号通路下调 PXR 介导的 P-gp 基因及蛋白表达。本研究发现了一条调控 P-gp 基因表达新颖的潜在信号通路 (PKC/NF- κ B-PXR),为阐明和完善 P-gp 基因表达的调控机制提供理论依据,同时为药物经该途径调控 P-gp 功能提供科学解释,进一步为研究 P-gp 介导的药物相互作用以及耐药性等提供新思路。

References

- [1] Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man [J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1992, 8: 67–113.
- [2] Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, et al. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development [J]. *Pharmacol Rev*, 2003, 55: 425–461.
- [3] Mellorand H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily [J]. *Biochem J*, 1998, 332: 281–292.
- [4] Li YH, Bi HC, Huang L, et al. Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits P-glycoprotein-mediated efflux of digoxin in MDCKII-MDR1 and Caco-2 cell monolayer models [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35: 283–291.
- [5] Diaz-Meco MT, Moscat J. The atypical PKCs in inflammation: NF- κ B and beyond [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246: 154–167.
- [6] Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, et al. Requirement for NF- κ B signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2009, 462: 104–107.
- [7] Gu X. Role of NF- κ B in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 17882–17889.
- [8] Holmstock N, Gonzalez FJ, Baes M, et al. PXR/CYP3A4-humanized mice for studying drug-drug interactions involving intestinal P-glycoprotein [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10: 1056–1062.
- [9] Lichti-Kaiser K, Staudinger JL. The traditional Chinese herbal remedy tian xian activates pregnane X receptor and

- induces CYP3A gene expression in hepatocytes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36: 1538–1545.
- [10] Huang L, Bi HC, Liu YH, et al. CAR-mediated up-regulation of CYP3A4 expression in LS174T cells by Chinese herbal compounds [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26: 331–340.
- [11] Li YH, Bi HC, Zhong GP, et al. Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate on function and gene expression of P-glycoprotein in adriamycin-resistant K562/ADM cells [J]. *Pharmacology*, 2013, 92: 121–130.
- [12] Sun YB, Li GF, Tang ZH, et al. Modulation on the P-glycoprotein in the jejunum by combined use of *Glycyrrhiza inflata* and Kansui [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 510–516.
- [13] Sun LR, Zhong JL, Cui SX, et al. Modulation of P-glycoprotein activity by the substituted quinoxalinone compound QA3 in adriamycin-resistant K562/A02 cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62: 333–342.
- [14] Ferreira MJ, Gyemant N, Madureira AM, et al. Inhibition of P-glycoprotein transport activity in a resistant mouse lymphoma cell line by diterpenic lactones [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25: 3259–3262.
- [15] Zhang Y, Lu M, Sun X, et al. Expression and activity of p-glycoprotein elevated by dexamethasone in cultured retinal pigment epithelium involve glucocorticoid receptor and pregnane X receptor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 3508–3515.
- [16] Qiang F, Kang KW, Han HK. Repeated dosing of piperine induced gene expression of P-glycoprotein *via* stimulated pregnane-X-receptor activity and altered pharmacokinetics of diltiazem in rats [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2012, 33: 446–454.
- [17] Rigalli JP, Ruiz ML, Perdomo VG, et al. Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells [J]. *Toxicology*, 2011, 285: 18–24.
- [18] Kota BP, Tran VH, Allen J, et al. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 62: 426–431.
- [19] Harmsen S, Meijerman I, Febus CL, et al. PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66: 765–771.
- [20] Ding X, Staudinger JL. Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69: 867–873.
- [21] Rochette-Egly C. Nuclear receptors: integration of multiple signaling pathways through phosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2003, 15: 355–366.