

川陈皮素对 P-糖蛋白的体内外抑制作用及分子机制研究

白 洁, 赵晟宇, 范小庆, 姜剑伟, 王 蕊, 邹小文, 扈金萍*, 李 燕*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所,
创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 川陈皮素 (nobiletin) 是一种多甲氧基黄酮, 具有抗炎和抗氧化等药理作用。本文探讨川陈皮素对 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 调控的生物学效应及分子机制。在 MDR1-MDCK II 细胞中川陈皮素对地高辛双向转运具有明显的抑制作用, 其 IC_{50} 为 $2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。体外细胞毒实验研究发现, 川陈皮素可通过抑制 P-gp 的活性增加百草枯的细胞毒性。大鼠体内药代动力学结果表明, 川陈皮素可使地高辛的 AUC_{0-t} 和 C_{max} 增加 2.02 倍和 3.29 倍。川陈皮素与 P-gp 分子对接的结果提示, 川陈皮素与 P-gp 的 Phe974 形成较强的 Pi-Pi 键, 这可能是产生抑制作用的重要因素。本研究从细胞、体内动物水平研究川陈皮素对 P-gp 的调控作用, 并应用分子对接进行机制探讨, 为预测临床潜在的药物相互作用提供科学的实验依据。

关键词: 川陈皮素; P-糖蛋白; 抑制作用; 分子机制

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 05-0754-06

The inhibitory effects of nobiletin on P-glycoprotein and the study of molecular mechanism

BAI Jie, ZHAO Sheng-yu, FAN Xiao-qing, JIANG Jian-wei, WANG Rui, ZOU Xiao-wen,
HU Jin-ping*, LI Yan*

(Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Institute of Materia Medica,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Nobiletin is a kind of polymethoxyflavonoid with many pharmacological effects, such as anti-inflammatory and antioxidation activities. This study was carried out to investigate the inhibitory effects of nobiletin on P-glycoprotein (P-gp) *in vitro and in vivo*. The molecular mechanism for structure-inhibition relationships of nobiletin with P-gp was investigated. Nobiletin exhibited significant inhibition ($IC_{50} = 2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on P-gp in MDR1-MDCK II cells. In the cell toxicity test, the paraquat-treated cell viability was decreased with nobiletin by inhibiting P-gp activity. In the rats PK study, the AUC_{0-t} of digoxin was increased 2.02 folds while the C_{max} of digoxin was increased 3.29 folds, when nobiletin was used in the pretreatment of SD rats. Molecular docking analysis elucidated that the formation of Pi-Pi bonds with Phe974 was the key factor for P-gp inhibition. The research findings provide important guideline for prediction of potential interaction between nobiletin and P-gp.

Key words: nobiletin; P-glycoprotein; inhibition; molecular mechanism

收稿日期: 2018-01-26; 修回日期: 2018-03-13.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81302847).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165185,

E-mail: hujp@imm.ac.cn; yanli@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0097

川陈皮素又称川皮亭、蜜橘黄素, 是一种多甲氧基黄酮, 富含于柑橘属植物的果皮中, 具有抗炎、抗氧化和抗血栓形成等药理作用^[1, 2]。川陈皮素与人类生活密切相关, 在饮食或药物配伍中经常使用, 这将增加药物-食物或药物-药物相互作用 (DDI) 发生的

可能性, 从而改变药物的疗效和安全性。黄酮类化合物通过调控药物代谢酶介导的 DDI 已有文献报道, 如高血压患者服用二氢吡啶类钙拮抗剂同服葡萄柚汁后, 通过抑制细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) 的酶活性, 引起血药浓度显著升高, 可能导致低血压等不良反应^[3], 而通过调控药物转运体介导 DDI 的研究相对较少, 但近年来也已引起人们极大关注。

P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是人体主要的外排蛋白, 属于 ABC 转运蛋白超家族, 主要表达于小肠、肝脏、肾脏和血脑屏障的毛细血管内皮细胞上, 并在肿瘤细胞中高表达^[4]。P-gp 的主要功能是将细胞内的有毒物质和外源物如药物等通过胃肠道、胆汁或尿液排出体外, 发挥抵抗外来物质侵袭的作用。由于 P-gp 的外排作用可影响药物的血药浓度、生物利用度、组织分布和肝肾外排率等^[5]。因此, 在联合用药过程中, 某些药物可作为 P-gp 的底物或抑制剂/诱导剂, 引起合用药物血药浓度的改变从而产生 DDI。如利托那韦通过抑制 P-gp, 使地高辛的药时曲线下面积 (AUC) 上升 86%, 分布容积上升 77%, 肾及肾外清除率分别下降 48% 及 35%, 增加地高辛中毒的危险^[6]。

以往研究报道, 川陈皮素的转运主要以浓度差为势能的被动扩散作用为主, P-gp 蛋白外排作用参与很少^[7], Nabekura 等^[8]研究发现, 在 KB-C2 细胞中川陈皮素可通过抑制 P-gp 的活性增加柔红霉素的胞内积聚, 但川陈皮素通过调控 P-gp 的活性在体内外的生物学效应并未阐明。本研究应用自建人源化 P-gp 高表达 MDR1-MDCK II 细胞模型, 通过细胞双向转运实验研究发现川陈皮素具有较强的 P-gp 抑制作用, 并从细胞和整体动物水平探讨川陈皮素对 P-gp 调控的生物学效应, 应用分子对接模型进一步阐明抑制作用的分子机制, 为预测临床潜在的药物相互作用提供科学的实验依据。

材料与方法

试剂与动物 地高辛、洋地黄毒苷、普萘洛尔、阿替洛尔、PSC833 均购自 Sigma 公司。川陈皮素购自四川成都曼斯特生物科技有限公司。百草枯购自百灵威公司产品。维拉帕米购自中国食品药品检定研究院。MTT 购自 Amresco 公司。DMEM 高糖培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶-EDTA、青霉素、链霉素购自 Invitrogen 公司。细胞培养板、0.4 μm 孔径聚碳酸酯膜细胞培养小室购自 Millipore 公司。甲醇和乙腈为色谱纯, 购自德国 Merck 公司, 其他试剂均为分析纯。主要仪器有 Bio-Tek μQuant 酶标仪, Termo

Finigan LC-MS/MS 液质联用分析仪。

清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 200~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [合格证号: SCXK (京) 2016-0006], 于 SPF 级标准饲养, 自由饮水, 室温 20~25 °C, 湿度 50%~60%, 光照 12 h 明暗交替, 换气次数为 10~20 次/小时, 鼠盒每周换洗 2 次, 所有换洗的笼具清洗后均采用高压灭菌。

细胞培养 MDR1-MDCK II 细胞为本实验室自建细胞模型, 培养于 DMEM 高糖培养基中 (含 10% 胎牛血清、100 g·L⁻¹ 青霉素和 100 g·L⁻¹ 链霉素), 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养, 细胞生长对数期进行传代备用。

川陈皮素对 P-gp 转运活性的影响 MDR1-MDCK II 细胞以每平方厘米 2×10⁵ 个接种于孔径 0.4 μm、直径 12 mm 的 Transwell TM 多聚碳酸酯膜上, 置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养。用 EVOM 检测跨细胞电阻 (transepithelial electric resistance, TEER) 以监测细胞生长状态。待培养 6~7 天, 细胞 TEER ≥ 120 Ω·cm² 时, 方可用于细胞转运实验。所有转运实验均在 37 °C 的摇床中进行 (50 r·min⁻¹)。实验前用 37 °C 的 HBSS 溶液清洗细胞 2 次, 清除细胞表面的干扰物质, 并在 37 °C 用含不同浓度川陈皮素 (0.2、1、5、10、15、20 和 50 μmol·L⁻¹) 的 HBSS 预温孵 30 min。实验时在供给室加入含不同浓度川陈皮素的地高辛 (5 μmol·L⁻¹) 溶液孵育, 每隔 30 min 从接收室取样 50 μL 检测, 并用含不同浓度的川陈皮素的 HBSS 补足原体积, 孵育 2 h。实验中同时设定高渗 (10 μmol·L⁻¹ 普萘洛尔)、低渗 (50 μmol·L⁻¹ 阿替洛尔) 和阳性抑制剂 (5 μmol·L⁻¹ PSC833) 组, 监测细胞膜的完整性、通透性和实验结果的可靠性。

化合物从 A 到 B 和从 B 到 A 的表观渗透系数 (P_{app}) 值计算公式为: $P_{app} = (\Delta Q / \Delta t) / (A \cdot C_0)$, 其中, Q 为累积转运量, 与转运时间 t 满足线性方程 $Q = at + b$, 其斜率 $a = \Delta Q / \Delta t$, A 为聚碳酸酯膜的面积, C_0 为初始浓度。

P-gp 抑制率计算公式^[9]: inhibition (%) = [1 - (BA_i - AB_i) / (BA - AB)] × 100, 其中, BA 和 AB 分别是地高辛 $P_{app(BL-AP)}$ 和 $P_{app(AP-BL)}$, BA_i 和 AB_i 分别是在抑制剂条件下地高辛 $P_{app(BL-AP)}$ 和 $P_{app(AP-BL)}$ 。

川陈皮素对百草枯细胞毒性的影响 取对数生长期的 MDR1-MDCK II 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化并计数后, 以每平方厘米 2×10⁵ 个接种于 96 孔板, 细胞贴壁后, 弃去 DMEM 培养基, 设置空白对照组 (不含血清的培养基)、百草枯组和百草枯+川陈皮素组, 其中百草枯浓度为 10、50、100、500、750 和 1 000 μmol·L⁻¹, 川陈皮素浓度根据大鼠体内血药浓度选择

为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [10]。37℃、5% CO_2 孵箱培养 24 h, 加入 MTT 溶液, 4 h 后加入 DMSO, 490 nm 测定吸光度值。细胞存活率 = 吸光度值_{含药培养基} / 吸光度值_{空白培养基} × 100%。

川陈皮素对地高辛大鼠体内药代动力学影响 雄性 SD 大鼠 15 只, 平均分为 3 组, 每组 5 只。实验前禁食 12 h, 自由饮水。实验动物分别口服给予 $25 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 川陈皮素^[11] (0.5% 羧甲基纤维素钠), $25 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 维拉帕米^[12] (生理盐水) 或者同等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠。30 min 后, 口服给予各组动物 $0.25 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 地高辛。给药后 5、15、30 min、1、2、3、4、6、8、12 h 各时间点于眼眶静脉丛连续取血, 肝素抗凝离心后, 分离血浆备用。

川陈皮素与 P-gp 的分子对接 分子对接应用 Discovery Studio 2016 中的 CDocker 模式, P-gp 结构数据来源于 Protein Data Bank (PDB 编号 3G60^[13,14])。对接前对蛋白晶体结构进行预处理, 选择自带配体周围 5 Å 之内的所有氨基酸作为 P-gp 活性位点。分别将地高辛、川陈皮素和维拉帕米作为配体分子, 赋予 CHARMm 立场后进行对接。对接时, 设置 Top Hit 为 10, 在 Pose Cluster Radius 参数内输入值 0.5, 其余参数为默认值, 与 CDocker 最低能量值对应的构象视为化合物和受体结合的最可能作用模式。

LC/MS-MS 测定

标准曲线制备 取空白 HBSS 或空白血浆 50 μL , 分别加入不同浓度地高辛 (1、5、10、50、100、500 和 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 标准品各 50 μL , 再加入内标洋地黄毒苷 (100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的乙腈 50 μL , 振荡混匀, 高速离心 (14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min) 两次, 取上清 5 μL 进行 LC/MS-MS 分析。

样品处理 取细胞或血浆样品 50 μL , 分别加入含内标洋地黄毒苷 (50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的乙腈 100 μL , 振荡混匀, 高速离心 (14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min) 两次, 取上清 5 μL 进行 LC/MS-MS 分析。

色谱柱为 Eclipse Plus C18 (3.5 μm , 2.1 mm × 50 mm, 美国 Agilent 公司), 流动相为甲醇/水 (0.1% 甲酸), 梯度洗脱; 流速为 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 地高辛: m/z 825.3→779.4 CE: 26 eV; 洋地黄毒苷: m/z 809.4→763.4 (CE: 25 eV)。

结果

1 川陈皮素对 P-gp 转运活性的影响

在 MDR1-MDCK II 细胞地高辛双向转运实验中, 阳性药 PSC833 的抑制率为 98%, 高渗、低渗对照药

及阳性底物地高辛的结果与文献报道^[15]基本一致, 提示细胞模型可靠。不同浓度的川陈皮素通过地高辛双向转运实验, 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制率为 11%, 随浓度逐渐增大, 抑制率升高, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制率为 97%, 经 Prism 软件做图分析, $\text{IC}_{50} = 2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。川陈皮素对 P-gp 的剂量依赖性抑制作用结果如表 1。

2 川陈皮素对百草枯细胞毒性的影响

百草枯是典型的 P-gp 转运体底物, 具有很强的细胞毒性, 因此 P-gp 活性的改变会影响百草枯对 MDR1-MDCK II 的细胞毒性。与百草枯组相比, 同时给予川陈皮素后, 细胞存活率降低, 在百草枯 500、750 和 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最为显著, 分别从 71%、37% 和 26% 降低至 57% ($P < 0.05$)、27% 和 13% ($P < 0.01$)。实验结果表明, 川陈皮素通过抑制 MDR1-MDCK II 细胞表面的 P-gp 活性, 减少了细胞毒药物百草枯的外排, 从而使细胞毒性增大, 存活率降低 (图 1)。

3 川陈皮素对地高辛大鼠体内药代动力学影响

大鼠体内地高辛血药浓度-时间曲线和药代动力学参数见图 2 和表 2 所示, 大鼠提前给予川陈皮素后,

Table 1 Inhibition effects of nobiletin on P-gp in MDR1-MDCK II

| Compound | Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $P_{\text{app}}(\text{AP-BL})/10^{-6} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ | $P_{\text{app}}(\text{BL-AP})/10^{-6} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ | Inhibition /% |
|-------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------|
| Digoxin | 5 | 0.24 ± 0.05 | 20.61 ± 0.27 | — |
| Atenolol | 5 | 0.43 ± 0.25 | 0.32 ± 0.07 | — |
| Propranolol | 10 | 28.9 ± 1.52 | 31.2 ± 4.13 | — |
| Psc833 | 50 | 1.11 ± 0.09 | 2.47 ± 0.12 | 93.29 |
| Nobiletin | 0.2 | 0.22 ± 0.04 | 18.35 ± 0.18 | 11.07 |
| | 1 | 0.35 ± 0.08 | 12.87 ± 0.17 | 38.54 |
| | 5 | 0.73 ± 0.08 | 7.82 ± 1.12 | 65.19 |
| | 10 | 1.19 ± 0.22 | 6.12 ± 0.55 | 75.78 |
| | 15 | 1.38 ± 0.20 | 5.19 ± 0.25 | 81.29 |
| | 20 | 1.58 ± 0.23 | 4.96 ± 0.56 | 83.44 |
| | 50 | 3.93 ± 0.98 | 3.37 ± 0.35 | 97.87 |

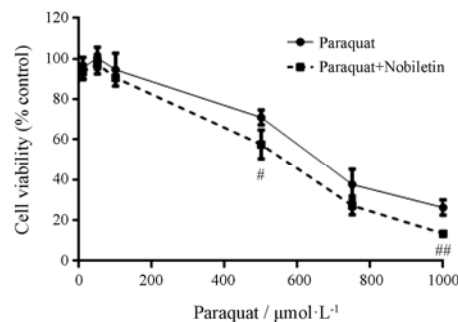


Figure 1 Paraquat concentration-response (cell viability) curves in the absence (paraquat) or in the presence of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nobiletin (paraquat + nobiletin). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs paraquat group

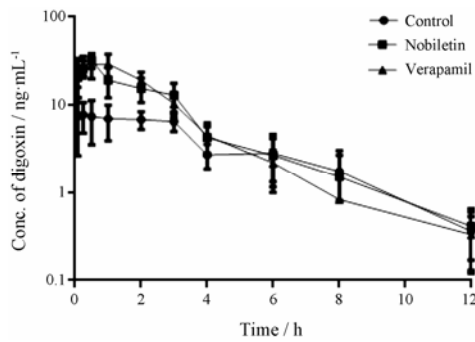


Figure 2 Plasma concentration-time curves in semilog scale of digoxin in control and herbal inhibitor-pretreated male SD rats. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

地高辛的 AUC_{0-t} 和 C_{max} 与空白对照组相比, 分别增加 2.02 倍和 3.29 倍, V_d/F 和 CL/F 分别减小 43.1% 和 50%, $t_{1/2}$ 无明显变化, 与阳性抑制剂维拉帕米结果相近, 以上结果提示, 川陈皮素和地高辛合用时, 可增加地高辛中毒的风险。

4 川陈皮素与 P-gp 的分子对接

抑制剂川陈皮素和维拉帕米与 P-gp 对接后的空间构象与底物地高辛不同, 且结合的氨基酸种类和数量以及相互作用力存在差异, 地高辛与 Tyr303、Ala981 和 Tyr110 形成 3 个氢键, 与 Phe974 形成 1 个

Table 2 Pharmacokinetic parameters of digoxin in control and nobiletin-pretreated male SD rats. $n=5$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control

| Parameter | Control | Verapamil | Nobiletin |
|-------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------------|
| $AUC_{0-t}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$ | 39.67 ± 8.32 | $85.55 \pm 13.25^{**}$ | $80.13 \pm 15.49^{**}$ |
| $AUC_{0-\infty}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$ | 40.91 ± 7.75 | $86.37 \pm 13^{**}$ | $81.27 \pm 16.12^{**}$ |
| $T_{1/2}/h$ | 2.06 ± 0.73 | 1.61 ± 0.23 | 1.86 ± 0.26 |
| T_{max}/h | 1.27 ± 1.23 | 0.65 ± 0.34 | 0.45 ± 0.11 |
| $C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$ | 9.85 ± 3.2 | $33.92 \pm 8.13^{**}$ | $32.38 \pm 5.87^{**}$ |
| $V_d/F/L \cdot kg^{-1}$ | 19.6 ± 10.41 | $6.89 \pm 1.56^*$ | $8.44 \pm 1.59^*$ |
| $CL/F/L \cdot h \cdot kg^{-1}$ | 6.33 ± 1.48 | $2.94 \pm 0.38^{**}$ | $3.16 \pm 0.56^{**}$ |

Pi-Sigma 键。阳性抑制剂维拉帕米与 Phe974 和 Phe728 形成 2 个 Pi-Pi 键。川陈皮素与维拉帕米相似, 除了可与 Phe974 形成 2 个 Pi-Pi 键之外, 还可与 Phe332 形成 2 个 Pi-Pi 键。与地高辛相比, 维拉帕米和川陈皮素均无氢键形成。对接结果提示, P-gp 的 Phe974 与小分子化合物形成较强的 Pi-Pi 键可能是产生抑制作用的重要因素。地高辛、川陈皮素、维拉帕米与 P-gp 的分子对接结果如图 3 所示。

讨论

黄酮类化合物是植物经光合作用产生的一类低

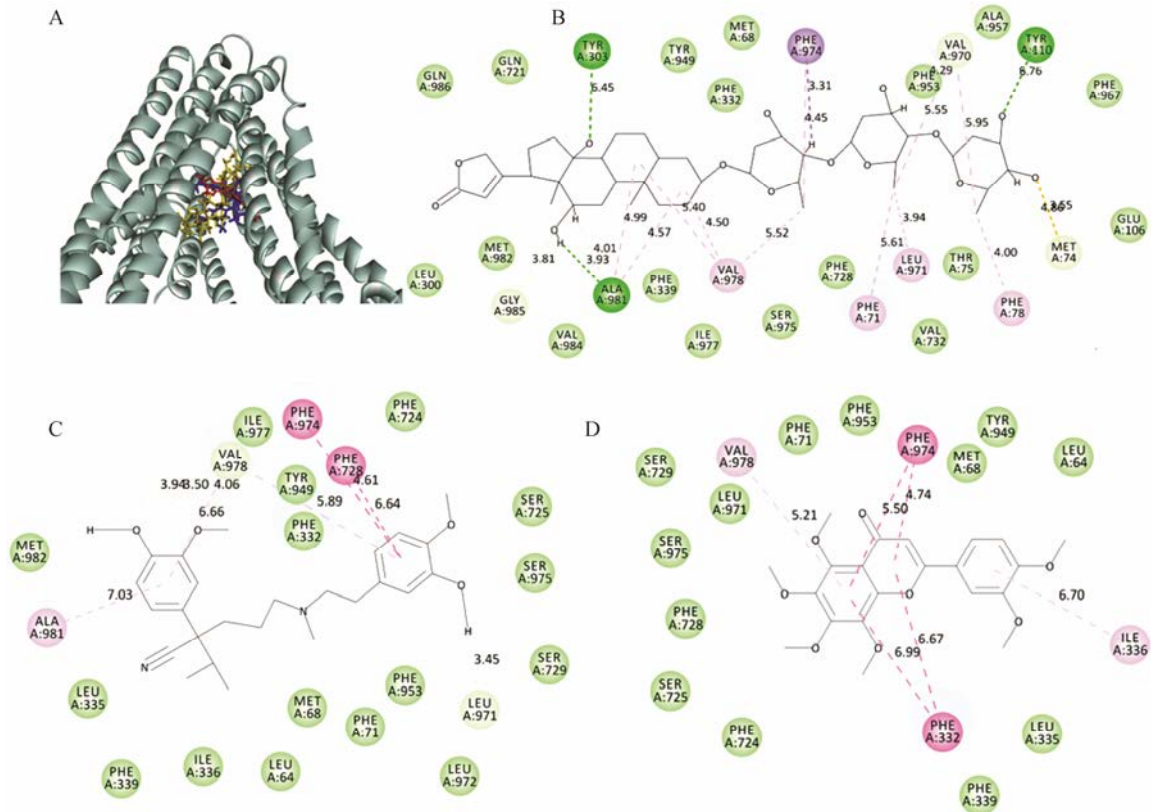


Figure 3 The three-dimensional diagrams (A) showed the binding conformation of digoxin (yellow), verapamil (blue) and nobiletin (red). Molecular docking (CDOCKER) of digoxin (B), verapamil (C) and nobiletin (D) to P-gp. The residue colors represent the types of interactions as follows: green (Van der Waals); purple (Pi interaction); green arrows (hydrogen bond)

分子质量的化合物, 具有二苯基色元酮的基本结构, 在蔬菜、水果和中草药中均有分布, 具有广泛的药理活性, 如抗氧化、降血脂、调节心脑血管系统和清除自由基等^[16]。近年来, 随着现代医学的发展, 黄酮类化合物由于广泛的药理活性引起了药物研究者的广泛关注, 它们与药物合用的现象越来越普遍, 这就大大增加了药物相互作用的可能性。

P-gp 作为人体主要的外排转运体, 在参与药物吸收、转运和排泄的同时也有可能被中药某些有效成分抑制或诱导, 当与 P-gp 底物药物合用时存在 DDI 的可能性。以往研究报道黄酮类化合物如金丝桃素、山柰酚和槲皮素等可调节 P-gp 活性, 提高利托那韦和红霉素在 Caco-2 细胞中的摄取^[17]。部分多甲氧基黄酮类化合物在 Caco-2 细胞中可降低他林洛尔的外排作用^[18], 增加食物-药物相互作用发生的几率。黄酮类化合物对 P-gp 的调控不仅可影响到合用药物的吸收、转运和排泄的药代动力学特征, 在肿瘤治疗过程中还可影响到 P-gp 介导的肿瘤细胞的多药耐药。Ma 等^[19]研究发现在 A2780/T 和 A549/T 细胞中, 川陈皮素可通过抑制 P-gp 的活性提高化疗药物多柔比星、多西他赛等的敏感性; Wang 等^[20]研究发现川陈皮素与临床常用化疗药物紫杉醇、丝裂霉素等具有协同作用, 可有效抑制实验性肿瘤转移。

本研究首先在 MDR1-MDCK II 细胞中鉴定出川陈皮素是 P-gp 的抑制剂 (IC_{50} 为 $2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 然后从细胞和整体动物水平评价川陈皮素对 P-gp 调控的生物学效应, 研究结果表明川陈皮素可增加百草枯的细胞毒性, 使大鼠体内地高辛的血药浓度显著升高, 同时结合分子对接技术阐明川陈皮素与 P-gp 结构-抑制关系的分子机制, 以上研究结果将为川陈皮素的临床合理应用及预测临床潜在的药物相互作用提供科学的实验依据。

References

- [1] Xiong Y, Chen D, Yu C, et al. Citrus nobiletin ameliorates experimental colitis by reducing inflammation and restoring impaired intestinal barrier function [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59: 829–842.
- [2] Yang S, Yu B, Zhang YF, et al. The activation effect of nobiletin on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 848–854.
- [3] Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, et al. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48: 429–435.
- [4] Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada, H, et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84: 7735–7738.
- [5] Herfindal L, Myhren L, Kleppe R, et al. Nostocyclopeptide-M1: a potent, nontoxic inhibitor of the hepatocyte drug transporters OATP1B3 and 1B1 [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8: 360–367.
- [6] Ding R, Tayrouz Y, Riedel KD, et al. Substantial pharmacokinetic interaction between digoxin and ritonavir in healthy volunteers [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 76: 73–84.
- [7] Niu JL, Li L, Yuan CG, et al. The transport mechanism research of nobiletin in Caco-2 cells across membrane [J]. *Chin Tradit Patent Med (中成药)*, 2011, 33: 1336–1339.
- [8] Nabekura T, Yamaki T, Kitagawa S. Effects of chemopreventive citrus phytochemicals on human P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 600: 45–49.
- [9] Balimane PV, Marino A, Chong S. P-gp inhibition potential in cell-based models: which “calculation” method is the most accurate? [J]. *AAPS J*, 2008, 10: 577–586.
- [10] Yuan HQ. Pharmacokinetic Studies on the Nobiletin and Tangeretin of Citrus Reticulate ‘Chachi’ Peel Extracts (茶枝柑皮提取物中川陈皮素和桔皮素的药代动力学及肠吸收研究) [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2014.
- [11] Zhang L, Zhang XJ, Zhang C, et al. Nobiletin promotes antioxidant and anti-inflammatory responses and elicits protection against ischemic stroke *in vivo* [J]. *Brain Res*, 2016, 1636: 130–141.
- [12] Vavricka SR, Van Montfoort J, Ha HR, et al. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver [J]. *Hepatology*, 2002, 36: 164–172.
- [13] Hirano M, Maeda K, Shitara Y, et al. Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs *via* OATP1B1 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 1229–1236.
- [14] Seithel A, Eberl S, Singer K, et al. The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic ions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 779–786.
- [15] Li X, Hu JP, Wang BL, et al. Inhibitory effects of herbal constituents on P-glycoprotein *in vitro* and *in vivo*: herb-drug interactions mediated *via* P-gp [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 275: 163–175.
- [16] Zhou X, Li HJ. Bioactivities and clinical applications of flavonoids [J]. *Chin J New Drug (中国新药杂志)*, 2007, 16:

350–355.

- [17] Pal D, Mitra AK. MDR- and CYP3A4-mediated drug–herbal interactions [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 2131–2145.
- [18] Mertens-Talcott SU, De Castro WV, Manthey JA, et al. Poly-methoxylated flavones and other phenolic derivatives from citrus in their inhibitory effects on P-glycoprotein-mediated transport of talinolol in Caco-2 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 2563–2568.
- [19] Ma WZ, Feng SL, Yao XJ, et al. Nobiletin enhances the efficacy of chemotherapeutic agents in ABCB1 overexpression cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18789–18804.
- [20] Wang GF, Wang XC, Xiao L, et al. Anti-tumor effects of citrus flavonoid nobiletin [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs (中草药)*, 2007, 38: 1694–1697.