

# 醋柴胡及其不同提取部位对 OCT2、MRP2 高表达细胞摄取顺铂的影响及作用机制分析

冯丽敏<sup>1</sup>,张娴<sup>2</sup>,赵瑞芝<sup>1,2</sup>

(1. 广州中医药大学第二附属医院省部共建中医湿证国家重点实验室,广东 广州 510006;2. 广东省中医院,广东 广州 510006)

**摘要:**目的 考察醋柴胡及其不同提取部位对有机阳离子转运蛋白 2(OCT)高表达细胞 hOCT2-HEK293 和多药耐药相关蛋白 2(MRP2)高表达细胞 hMRP2-HEK293 摄取顺铂的影响,并初步探讨其机制;为临床使用醋柴胡辅助逆转肿瘤细胞中顺铂多药耐药作用机制探讨提供数据支撑。方法 hOCT2-HEK293 和 hMRP2-HEK293 细胞与醋柴胡及其不同部位共孵育 24 h,后加入顺铂(DDP)继续孵育 4 h,HPLC 法分别测定两种细胞内顺铂含量;另以 Western Blot 法及实时定量 PCR 法(RT-PCR)分别测定两种细胞中的有机阳离子转运蛋白(OCT2)、多药耐药相关蛋白 2(MRP2)蛋白和基因表达。结果 在 hOCT2-HEK293 细胞中,醋柴胡总提液、多糖部位及小分子水溶性部位可显著促进顺铂的摄取,且均促进 OCT2 的蛋白和基因表达;而在 hMRP2-HEK293 细胞中,醋柴胡总提液、多糖部位及小分子水溶性部位也显著促进顺铂的摄取,但仅有总提液能显著降低 MRP2 蛋白的表达。结论 在肿瘤细胞中,醋柴胡逆转抗肿瘤药物的多药耐药性可能与多糖部位和小分子水溶性部位上调 OCT2 蛋白及 mRNA 表达或与醋柴胡总提液下调 MRP2 蛋白表达有关;初步推测影响 OCT2 和 MRP2 功能是醋柴胡引经增效的作用机制之一。

**关键词:**醋柴胡;顺铂;OCT2;MRP2;多药耐药;引经增效

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2025)12-0167-05

## Effect of Vinegar-processed Chaihu(Radix Bupleuri) and Its Extracts on OCT2 and MRP2 Over-Expression Cells and Its Mechanism

FENG Limin<sup>1</sup>,ZHANG Xian<sup>2</sup>,ZHAO Ruizhi<sup>1,2</sup>

**基金项目:**国家自然科学基金项目(81073063,81573612,82173931)

**作者简介:**冯丽敏(1987-),女,广东云浮人,助理研究员,研究方向:中药作用机制。

**通讯作者:**赵瑞芝(1968-),女,陕西西平人,研究员,博士研究生导师,研究方向:中药药性理论。E-mail:13610241754@163.com。

- [9] 郭美彤,赵佳奇,韩诚,等. 石菖蒲药效物质基础和作用机制研究进展[J]. 中药药理与临床,2019,35(2): 179-184.
- [10] 吴佳莹,吴威,杜佳蓉,等. 石菖蒲本草考证[J]. 辽宁中医药大学学报,2022,24(5): 148-156.
- [11] 骆航,黄仕芳,孙兴力,等. 4种菖蒲属植物的生药学鉴别研究[J]. 山西中医药大学学报,2022,23(1): 25-30,35.
- [12] 曾晓艳,李芳,谭朝阳,等. 石菖蒲和茵香菖蒲的生药学及 GC-MS 比较分析研究[J]. 时珍国医国药,2021,32(10): 2432-2436.
- [13] 李娟,刘清茹,肖兰,等. 湖南产石菖蒲和水菖蒲挥发油成分分析和抑菌活性检测[J]. 中成药,2015,37(12): 2778-2782.
- [14] 朱平,刘效栓,王红丽,等. 三种菖蒲的比较研究进展[J]. 中国民族民间医药,2021,30(2): 59-62.
- [15] 易春,艾伟霞. 浅谈石菖蒲、水菖蒲、九节菖蒲的鉴别[J]. 北方药学,2012,9(8): 104.
- [16] 孙传伯,李道远,刘枫,等. 藏菖蒲药材的特异性 PCR 鉴别[J]. 时珍国医国药,2021,32(4): 886-890.
- [17] 翁倩倩,赵佳琛,张悦,等. 经典名方中石菖蒲药材的考证[J]. 中国中药杂志,2019,44(23): 5256-5261.
- [18] 崔国静,徐亚,贺蕾. 石菖蒲与水菖蒲的鉴别[J]. 首都医药,2011,18(9): 46.
- [19] 陈佳妮. 民间药随手香的生药学研究[D]. 成都: 成都中医药大学,2012.
- [20] 王雪萍,赵翔,荆淑芹,等. 石菖蒲与水菖蒲的鉴别研究[J]. 中国民族民间医药,2016,25(12): 17-18,21.
- [21] 李欢欢,陈龙梗,王元媛,等. 不同产地、不同部位的石菖蒲与伪品水菖蒲的红外光谱鉴别研究[J]. 化学世界,2017,58(3): 159-164.
- [22] 马莎莎. 石菖蒲的化学指纹图谱及易混滑品化学成分比较研究[D]. 昆明: 昆明理工大学,2018.
- [23] LAM K Y, KU C F, WANG H Y, et al. Authentication of *Acori Tatarinowii* Rhizoma (*Shi Chang Pu*) and its adulterants by morphological distinction, chemical composition and ITS sequencing[J]. Chin Med, 2016, 11: 41.
- [24] 蔡铁全,王文斌,程华春,等. RNaseH 依赖性 PCR 扩增结合熔解曲线法鉴别石菖蒲与藏菖蒲掺杂[J]. 医药导报,2023,42(3): 328-333.
- [25] 刘丽,聂平,肖炳燧,等. 基于 DNA 条形码序列分析的 5 种菖蒲属药用植物鉴定[J]. 中南药学,2015,13(4): 388-392.
- [26] ZHANG X J, YI L Z, DENG B C, et al. Discrimination of *Acori Tatarinowii* Rhizoma and *Acori Calami* Rhizoma based on quantitative gas chromatographic fingerprints and chemometric methods[J]. J Sep Sci, 2015, 38(23): 4078-4085.

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China;

2. Guangdong Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

**Abstract:** *Objective* To investigate the effects of vinegar - processed Chaihu (Radix Bupleuri) and its different extraction parts on the uptake of cisplatin (DDP) by cells with high expression of organic cation transporter 2 (OCT) (hOCT2 - HEK293) and cells with high expression of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) (hMRP2 - HEK293) and to preliminarily explore their mechanisms so as to provide data support for the exploration of the mechanism of using vinegar - processed Chaihu (Radix Bupleuri) to assist in reversing DDP multidrug resistance in tumor cells in clinical practice. *Methods* The hOCT2 - HEK293 and hMRP2 - HEK293 cells were co - incubated with vinegar - processed Chaihu (Radix Bupleuri) and its different parts for 24 hours, and then DDP was added to continue incubation for 4 hours. The intracellular DDP content of the two types of cells was measured by HPLC. Western Blot and real - time quantitative PCR (RT - PCR) were used to measure the protein and gene expressions of OCT2 and MRP2 in two types of cells, respectively. *Results* In hOCT2 - HEK293 cells, the total extract, polysaccharide fraction and small molecule water - soluble fraction of vinegar - processed Chaihu (Radix Bupleuri) can significantly promote the uptake of DDP, and all promote the protein and gene expressions of OCT2. In hMRP2 - HEK293 cells, the total extract, polysaccharide fraction and small molecule water - soluble fraction of vinegar - processed Chaihu (Radix Bupleuri) also significantly promoted the uptake of DDP, but only the total extract could significantly reduce the expression of MRP2 protein. *Conclusion* In tumor cells, the reversal of multidrug resistance to anti - tumor drugs by vinegar - processed Chaihu (Radix Bupleuri) may be related to the up - regulation of OCT2 protein and mRNA expressions in polysaccharide and small molecule water - soluble sites, or the down - regulation of MRP2 protein expression in vinegar - processed Chaihu (Radix Bupleuri) total extract. Preliminary speculation suggests that affecting the functions of OCT2 and MRP2 is one of the mechanisms by which vinegar - processed Chaihu (Radix Bupleuri) enhances the meridian stimulation.

**Keywords:** vinegar - processed Radix Bupleuri (VBRB); cisplatin; OCT2; MRP2; multidrug resistance; enhancing meridian stimulation

转运蛋白通常位于细胞膜或组织器如线粒体、溶酶体膜上,肩负细胞内外物质交流的重任,维持细胞稳态。按照转运方向的不同,转运蛋白常简单分为摄入型转运蛋白和外排型转运蛋白。根据转运物质性质的不同,前者通常包含有机阳离子转运蛋白(OCT),有机阴离子转运蛋白和有机阴离子多肽转运蛋白,后者的发现与耐药作用研究有关,根据蛋白结构分为多药耐药蛋白、多药耐药相关蛋白(MRP)、乳腺癌多药耐药蛋白等。不同组织器官的转运蛋白种类和含量不同,多种蛋白共同维持机体内环境稳态,一旦表达异常,常常与疾病的发生、发展有关<sup>[1-2]</sup>。

与正常细胞不同,肿瘤细胞膜上往往存在多种药物转运蛋白异常表达。其中,MRP高表达是肿瘤细胞发生多药耐药的原因之一<sup>[3-4]</sup>。临床上顺铂可用于多种实体瘤的治疗,且效果显著<sup>[5-8]</sup>;然而由于多药耐药的产生,常常导致治疗失败<sup>[9-11]</sup>。对顺铂耐药机制研究显示,肿瘤组织中MRP2高表达和OCT2低表达是其产生耐药性的原因,上调OCT2和下调MRP2转活性均可增加细胞对顺铂的摄取,进而提高其疗效<sup>[12-15]</sup>。醋柴胡有增强抗肿瘤药物的肝靶向作用<sup>[16-19]</sup>,其作用机制在于抑制多药耐药蛋白和促进摄入型蛋白的活性<sup>[20-22]</sup>。为探讨醋柴胡是否可增敏顺铂及其作用的可能途径,我们分别构建了OCT2和MRP2高表达细胞模型;模拟进行了多药耐药情况下,醋柴胡及其不同部位对细胞摄取顺铂的活性以及对OCT2、MRP2蛋白及mRNA表达影响的研究,期望为醋柴胡合理应用和进一步开发奠定基础。

## 1 材料与设备

1.1 药物 醋柴胡(广东康美药业有限公司,批号120100341);醋柴胡水提液及其不同部位制备方法参见文献<sup>[19]</sup>,醋柴胡粗碎,加10倍量水浸泡0.5 h,加10倍量水提取2次,每次0.5 h,提取液浓缩至1 g/mL时分成2份,1份为水提取液(VBRB),另一份加95%乙醇使醇浓度为80%,静置24 h,过滤,滤渣以80%乙醇洗涤至无色,冷冻干燥为多糖部位(PSS);上清液合并洗涤液回收乙醇,水溶液加水饱和正丁醇萃取,萃取液回收正丁醇,残渣冻干为皂苷部位(Buf),水层除正丁醇后冻干为小分子水溶性部位(MHE)。质控参照文献<sup>[23]</sup>。VBRB由30.4%的PSS、18.3% Buf和51.3MHE组成,其中Buf部位含柴胡皂苷a, b, c, d含量分别为0.09%, 0.16%, 0.02%和0.09%。

1.2 细胞与试剂 人胚肾HEK293细胞购自American Type Culture Collection(ATCC);OCT2 - pCMV6 - AC - GFP质粒、MRP2 - pCMV6 - AC - GFP质粒、pCMV6 - AC - GFP载体质粒、Mega Tran1.0转染试剂均购自OriGene Technologies公司;LB培养基、琼脂粉、氨苄青霉素粉末均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;Wizard® Plus Midipreps DNA纯化系统购自Promega Corporation;大肠杆菌DH5α感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;G418硫酸盐粉末购自广州学友生物科技有限公司。顺铂对照品(日本TGI公司),氯化镍和DDTC(天津希恩思公司);TRIzol试剂(Invitrogen公司),RevertAid Frist Strand cDNA合成试剂盒,Power SYBR® Green PCR

Master Mix 荧光定量 PCR 试剂盒, DNase/RNase - free H<sub>2</sub>O 均为 Thermo Scientific 公司产品; 1.5 M Tris - HCl (pH 8.8) 缓冲液、0.5 M Tris - HCl (pH 6.8) 缓冲液、Acrylamide/Bis 溶液、10 × Tris /Glycine/SDS Buffer、10 × Tris/Glycine Buffer、10 × Tris - Buffered Saline、TEMED、脱脂奶粉、过硫酸铵粉末以及 ECL 工作液均为 Bio - rad Laboratories 公司产品; Tween - 20 购自 Amresco 公司; 蛋白上样缓冲液及还原剂、HiMark™ 预染蛋白质标准品为 invitrogen 公司产品; 家兔抗 OCT2 多克隆抗体购自 Aviva systems Biology 公司; 抗家兔 GAPDH 一抗、抗家兔二抗购自 Cell Signal Technology 公司; 山羊抗小鼠 MRP2 单克隆一抗、山羊抗小鼠二抗购自 Abcam 公司; 10% (w/v) SDS 购自北京鼎国生物技术有限公司; 色谱甲醇购自天津四友精细化学有限公司, 色谱乙腈购自 Fisher 公司; 氯仿、异丙醇、无水乙醇均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

1.3 耗材与设备 PVDF 膜购自 Millipore Corporation 公司; X - ray 胶片购自柯达公司; Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (迪马公司); 1200 系列 HPLC 仪为 Agilent 公司产品; 垂直电泳及转印电泳系统和 Bio - rad Gel Doc XR 成像系统均为 Bio - Rad 公司产品; 7500 型荧光实时定量 PCR 仪为 ABI 公司产品。

## 2 实验方法

2.1 hOCT2 - HEK293 和 hMRP2 - HEK293 细胞的构建 hOCT2 - HEK293 和 hMRP2 - HEK293 细胞的构建方法见文献<sup>[20-21]</sup>。HEK293 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞汇合度达 80% 时, 每孔加入 Opti - MEM 培养基稀释的质粒 (OCT2 和 MRP2 质粒分别按 6 μg/孔和 4 μg/孔比例加入), 按质粒: 转染试剂 (W/V) = 1:3 比例加入转染试剂 Mega Tran 1.0 室温孵育 10 min; 反应 10 h 后换液为完全培养基。细胞转染 72 h 后, 加入 400 μg · mL<sup>-1</sup> 的 G418 溶液 (氨基糖苷类抗生素) 筛选 8 周。空白对照组细胞以空载体质粒 (pCMV6 - AC - GFP, 4 μg/孔) 平行操作进行转染。

2.2 醋柴胡及其组分对细胞摄取顺铂的影响 hOCT2 - HEK293 和 hMRP2 - HEK293 细胞分别接种于 100 mm 的培养皿中, 待融合度约为 70% ~ 80% 时, 将细胞分为对照组 (CTRL) 和不同给药组。各给药组加入相应药物与细胞孵育 24 h, 移除药液, PBS 缓冲液清洗 1 次, 加入顺铂 (DDP) 继续孵育 4 h; 收集细胞, PBS 清洗 3 次, 除去细胞外沾染的顺铂。然后加入细胞裂解液 (Tris 100 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, NaCl 200 mmol/L, SDS 0.2%, pH 8) 反复冻融 3 次, 离心取上清为样品溶液。精密吸取顺铂标准品或经超滤的细胞裂解液的样品溶液 175 μL, 加入内标液 (10 μg 的 NiCl<sub>2</sub>) 和 DDTC 溶液 (0.25 mol · L<sup>-1</sup>, 由 0.1 mol/L NaOH 配制) 20 μL, 摇匀, 37 °C 水浴孵育 15 min; 放至室温后, 再加入 175 μL 氯仿, 涡旋震荡 1 min 进行抽提, 10 000 r/min 离心 5 min, 吸取下层溶液 10 μL 进样。其中, 色谱条件为: Diamonsil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水 - 甲醇 - 乙腈 (23:46:31), 流速为 1.5 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 254 nm, 进样量为 10 μL。

由于摄取率以每毫克蛋白质中含有顺铂的微克数表示, 故需检测样品溶液中蛋白质的浓度。细胞裂解液中蛋白质的浓度按照 BCA 法检测。具体操作如下: 按试剂盒操作说明将

BSA 标准品用水溶液稀释成系列标准品溶液 (1000、500、250、125、25、0 μg/mL), 精密吸收各浓度溶液 25 μL 加入 96 孔板中, 每一浓度重复 2 孔; 往每孔加入按 1:50 比例预先混合的硫酸铜 - BCA 工作液 200 μL, 置于 37 °C 环境下反应 30 min。取出后放冷至室温, 振荡器上混匀, 于酶标仪 570 nm 处测定各孔 OD 值。以浓度 (X, μg/mL) 对 OD 值 (Y) 进行线性回归, 求出回归方程。样品处理同上, 将其 OD 值代入上述回归方程求出样品的平均蛋白浓度即可。实验重复 3 次。

2.3 醋柴胡及其组分对细胞中 OCT2 和 MRP2 蛋白表达的影响 细胞分组如 2.2 项下。hOCT2 - HEK293 和 MRP2 - HEK293 细胞分别接种六孔板中, 在对数生长期加入醋柴胡及其不同部位与细胞共孵育, 24 h 后收集细胞, 用预冷的 PBS 缓冲液清洗细胞 3 次, 后收集细胞、转移至 EP 管中。细胞总蛋白的提取、定量, 上样样品的制备以及 Western Blot 实验按文献<sup>[20]</sup>操作; 测定细胞中 OCT2 和 MRP2 的相对表达量。其中, OCT2 一抗、MRP2 一抗、GAPDH 一抗、兔二抗及小鼠二抗的比例依次为: 1:500、1:500、1:1000、1:1000 和 1:3000。另选用 GAPDH 蛋白作为内参对照。实验重复 3 次。以 Bio - rad Gel Doc XR 成像系统得出蛋白的灰度值, 计算相对表达量。

2.4 醋柴胡及其组分对细胞中 OCT2 和 MRP2 mRNA 表达的影响 细胞接种于六孔板中, 待细胞融合度达 70% ~ 80% 时, 移除旧培养基, 加入醋柴胡及其不同部位培养 24 h; 加入 TRIzol 试剂提取细胞总 mRNA; 进行浓度、纯度和完整性的检测后, 按照逆转录试剂盒说明书将 mRNA 逆转录为 cDNA; 以荧光实时定量 PCR 法将 cDNA 进行扩增<sup>[20]</sup>。扩增结束后计算扩增效率, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 OCT2 和 MRP2 基因的相对表达量。实验重复 3 次。

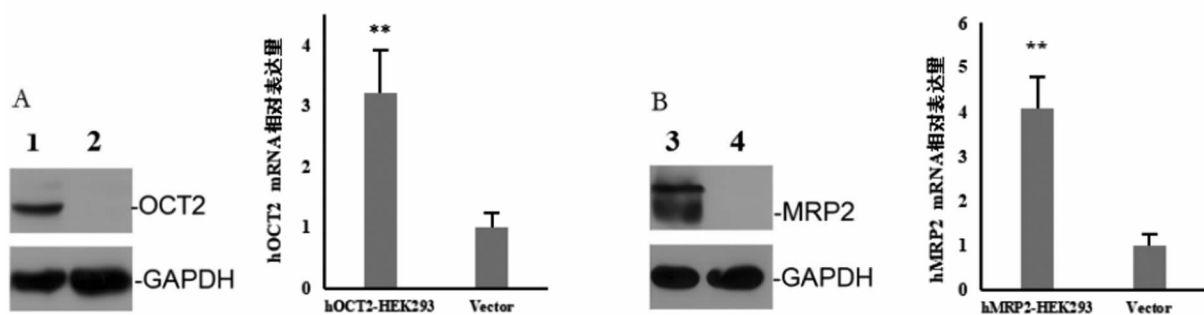
其中, 实验所用引物序列如下: 人 OCT2 基因正向引物: 5' - TGCAGCTGGAGTTCATCG - 3', 反向引物: 5' - CTC - CGATATCTCCGCCAAC - 3'; 人 MRP2 基因正向引物: 5' - ACAGTCCGAGATGTGAACCTG - 3', 反向引物: 5' - TGAATC - CAGGACTGCTGTGG - 3'; 人 GAPDH 基因正向引物: 5' - GATCATCAGCAATGCCTCCTGCACC - 3', 反向引物: 5' - ACT - TGTCACAATGCAGACAGCAGG - 3'。

2.5 数据处理 采用 SPSS 17.0 统计分析软件处理, 实验结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两两比较采用独立样本 *t* 检验分析; 多组资料比较, 方差齐性时采用最小显著差异法 (LSD) 分析, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 法分析, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义, *P* < 0.01 为存在显著统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 Western blot 和 RT - PCR 法检测转染结果

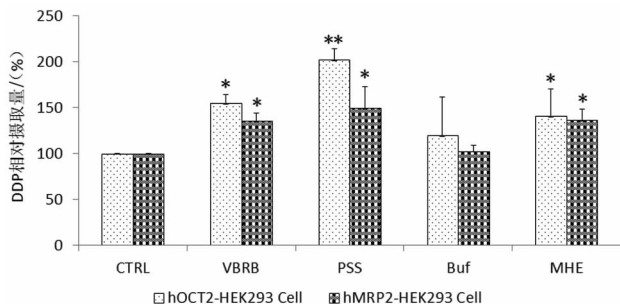
结果见图 1。由图 1 可见, 空白对照组 (Vector) 细胞中几乎不表达 OCT2、MRP2 蛋白; 而转染后的 hOCT2 - HEK293、hMRP2 - HEK293 则呈现 OCT2、MRP2 蛋白高表达。而与 Vector 组细胞中相应的 mRNA 表达量相比, hOCT2 - HEK293、hMRP2 - HEK293 细胞中的 mRNA 相对表达量依次为 Vector 组的 3.21、4.07 倍。由此说明稳定高表达细胞构建成功, 可用于下一步的实验。



注:1,3 依次为 hOCT2 - HEK293、hMRP2 - HEK293;2,4 均为 Vector; \* \* 与 Vector 组相比,差异有统计学意义,  $P < 0.01$ 。

图1 转染细胞的蛋白及 mRNA 表达

### 3.2 醋柴胡及其不同部位对两种转染细胞摄取顺铂的影响 结果见图2。



注:样品中药物浓度/等体积样品中蛋白含量即为摄取率,相对摄取率为不同组别样品摄取率除以 CTRL 组摄取率。CTRL 为不含药物的转运蛋白高表达细胞组。\* 与对照组比较,  $P < 0.05$ , \*\* 与对照组比较,  $P < 0.01$ 。

图2 醋柴胡及其不同部位作用 24 h 后对 hOCT2 - HEK293 和 hMRP2 - HEK293 细胞摄取顺铂的影响 ( $n = 3$ )

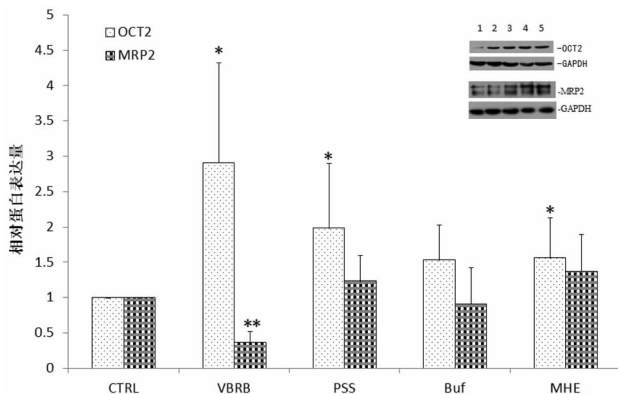
由图 2 可知,与对照组相比,hOCT2 - HEK293 细胞经 VBRB ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), PSS ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 MHE ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 作用 24 h 后,细胞对顺铂的相对摄取量均增加,其中 VBRB 和 MHE 组分别增加了 54.7% 和 40.8% ( $P < 0.05$ ), PSS 组增加了 101.9% ( $P < 0.01$ )。而 hMRP2 - HEK293 细胞经 VBRB ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), PSS ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 MHE ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 作用 24 h 后,细胞对顺铂的相对摄取均增加,依次增加了 35.7%、49.9% 和 36.2% ( $P < 0.05$ ), Buf 在两个细胞株上均对顺铂摄取影响不大。

### 3.3 醋柴胡及其不同部位对 hOCT2 细胞中 OCT2 及 hMRP2 - HEK293 细胞中 MRP2 蛋白表达的影响 结果见图3。

如图 3 所示,与对照组相比,hOCT2 - HEK293 细胞经 VBRB ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), PSS ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), Buf ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 MHE ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 作用 24 h 后,均增加细胞 OCT2 的蛋白表达,幅度分别为 190.9%、98.3%、53.2% 和 56.4% ( $P < 0.05$ )。而 hMRP2 - HEK293 细胞经 VBRB ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 MK571 ( $50 \mu\text{M}$ ) 作用 24 h 后,细胞 MRP2 蛋白表达降低,依次降低 63.8% 和 51.3% ( $P < 0.05$ ), PSS、Buf 和 MTE 对 MRP2 无显著影响。

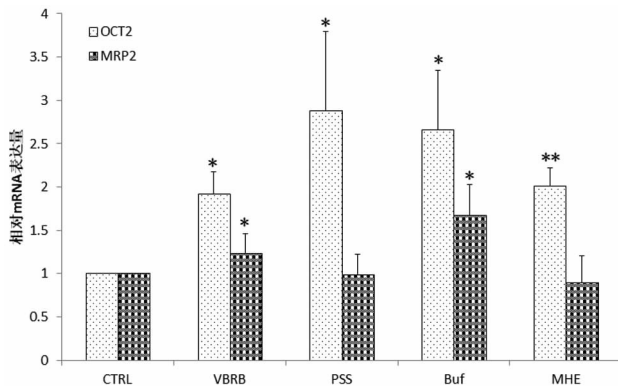
### 3.4 醋柴胡及其不同部位对 hOCT2 细胞中 OCT2 及 hMRP2 - HEK293 细胞中 MRP2 mRNA 表达的影响 结果见图4。

如图 4 所示,与对照组相比,hMRP2 - HEK293 细胞经



注: \* 与对照组比较,  $P < 0.05$ , \*\* 与对照组比较,  $P < 0.01$ 。

图3 醋柴胡及其不同部位作用 24 h 后对 hOCT2 - HEK293 中 OCT2 及 hMRP2 - HEK293 细胞中 MRP2 蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )



注: \* 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; \*\* 与对照组比较,  $P < 0.01$ 。

图4 醋柴胡及其不同部位作用 24 h 后对 hOCT2 - HEK293 中 OCT2 及 hMRP2 - HEK293 细胞中 MRP2 蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )

VBRB ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), PSS ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), Buf ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 MHE ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 作用 24 h 后,细胞 OCT2 mRNA 均增加;其中, VBRB、PSS 和 Buf 组分别增加了 91.8%、188.1% 和 166.0% ( $P < 0.05$ ), MHE 组增加了 101.3% ( $P < 0.01$ )。而药物与 hMRP2 - HEK293 细胞作用 24 h 后,除 Buf ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 细胞上调了 67.0% ( $P < 0.05$ ) 的 MRP2 mRNA 表达外;其他部位对 MRP2 mRNA 的影响均无生物学意义。

## 4 讨论

肿瘤治疗过程中伴随产生的 MRP2 高表达是引起顺铂疗效降低的原因之一。而顺铂作为 MRP2 和 OCT2 的共转运底物<sup>[12]</sup>, 促进细胞 OCT2 或抑制 MRP2 功能均可逆转顺铂的多药

耐药现象,提高疗效<sup>[24-25]</sup>。摄取实验结果显示:作用24 h后,醋柴胡水提液可增加 hOCT2 - HEK293 和 hMRP2 - HEK293 细胞对顺铂的摄取,醋柴胡多糖部位和小分子水溶性部位作用趋势与之相同,提示醋柴胡临床可用于增敏因 OCT2 低表达和 MRP2 高表达所导致的耐药,提高其临床疗效。

比较各组摄取率发现,多糖部位和小分子水溶性部位与总提取物作用一致,提示二者可能是醋柴胡增加顺铂摄取的有效部位。由于顺铂主要是 MRP2 和 OCT2 的底物,接下来考察了醋柴胡及其不同部位对这两种转运蛋白表达的影响。结果显示,醋柴胡及其 PSS 部位、MTE 部位可显著促进 OCT2 的蛋白和基因表达,与其摄取结果一致,说明促进 OCT2 表达可能是醋柴胡增效抗癌作用的靶点之一。而对于 hMRP2 - HEK293 细胞而言,除醋柴胡水提液下调细胞 MRP2 蛋白表达与摄取结果趋势相同外;其他部位对 MRP2 的蛋白表达均无显著影响;醋柴胡及其不同部位对 MRP2 基因的表达均与蛋白和摄取结果均不一致,结合基因和蛋白表达结果,提示抑制 MRP2 表达不是 PSS 和 MHE 促进 hMRP2 - HEK293 促进顺铂摄取的原因。由于蛋白为基因表达的后续环节,蛋白表达水平不仅受基因控制,还受核因子、谷胱甘肽、ATP 酶等影响<sup>[26-28]</sup>,因此其详细机制还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] MOUNIA LAKLI, MARION ONNÉE, THOMAS CARREZ, et al. ABC transporters involved in respiratory and cholestatic diseases: From rare to very rare monogenic diseases[J]. *Biochemical pharmacology*, 2024(11):116468.
- [2] GRANADOS J C, NIGAM S K. Organic anion transporters in remote sensing and organ crosstalk[J]. *Pharmacol Ther*, 2024, 263:108723.
- [3] ZHANG LEI, YE BIWEI, CHEN ZHUO, et al. Progress in the studies on the molecular mechanisms associated with multidrug resistance in cancers[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2023(3):982-997.
- [4] XIA WEN, BRIAN BUCKLEY, ELIZABETH MCCANDLISH, et al. Transgenic expression of the human mrp2 transporter reduces cisplatin accumulation and nephrotoxicity in Mrp2 - null mice[J]. *The American Journal of Pathology*, 2014(5):1299-1308.
- [5] 周晓艳. 真武汤加味联合顺铂灌注治疗肝癌癌性腹水的临床效果[J]. *临床合理用药杂志*, 2022, 15(10):76.
- [6] 刘志霞, 祝婧, 王晓娟. 紫杉醇联合顺铂治疗宫颈癌的临床效果[J]. *中华医院感染学杂志* 2024, 34(2):248-252.
- [7] 刘宏根, 赵林林, 杨佩颖, 等. 顺铂联合重组 5 型腺病毒腹腔灌注治疗胃癌合并恶性腹腔液临床效果[J]. *癌症进展*, 2024, 22(5):520-523, 539.
- [8] 胡蓉, 赵怡, 康乐, 等. 吉西他滨联合顺铂治疗耐药性晚期乳腺癌临床效果[J]. *中国医药指南*, 2024, 22(22):97-99.
- [9] 朱玲, 丁美钱. 消肿散结汤结合紫杉醇化疗方案对乳腺癌患者临床疗效、肿瘤标志物及复发率影响研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2021, 48(8):133-136.
- [10] GOTTESMAN MICHAEL M, ROBEY ROBERT W, AMBUDKAR SURESH V. New mechanisms of multidrug resistance: an introduction to the Cancer Drug Resistance special collection[J]. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 2023(3):590-595.
- [11] GUPTA SONU KUMAR, SINGH PRIYANKA, ALI VILLAYAT, et al. Role of membrane - embedded drug efflux ABC transporters in the cancer chemotherapy[J]. *Oncology reviews*, 2020(2):448.
- [12] 曲晓宁, 翟婧卉, 高欢, 等. OCT2/MRP2 在黄芪甲苷联合顺铂的减毒增效作用中的机制研究[J]. *药学学报*, 2021, 56(9):2536-2543.
- [13] 全雷, 王丽君, 袁磊. 藤黄酸增强人胃癌 SGC7901DDP 细胞对顺铂的敏感性[J]. *解剖学报* 2018, 49(3):337-341.
- [14] YU MING WANG, RUOBING ZHENG, XIANZHE JIA, et al. Reply to Comment by Lamy et al. on "Locating the source field lines of Jovian decametric radio emissions"[J]. *Earth and Planetary Physics*, 2022, 6(1):13-17.
- [15] EL READI MAHMOUD ZAKI, AL ABD AHMED M., ALTHUBITI MOHAMMAD A., et al. Multiple Molecular Mechanisms to Overcome Multidrug Resistance in Cancer by Natural Secondary Metabolites[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021:658513.
- [16] RUI ZHI ZHAO, DONG YUAN, SHAO JUN LIU, et al. Liver targeting effect of Vinegar - processed Radix Bupleuri on rhein in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010(2):421-428.
- [17] RUIZHI ZHAO, SHAOJUN LIU, SHIRUI MAO, et al. Study on liver targeting effect of Vinegar - processed Radix Bupleuri on resveratrol in mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009(3):415-420.
- [18] 赵莹, 赵瑞芝, 陈有军, 等. 醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内分布的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(17):71-74.
- [19] 赵亚, 王锦秋, 刘丽娟, 等. 醋柴胡水提液不同部位对大黄酸单次给药体内分布影响及其作用机制初探[J]. *中草药*, 2024, 22(7):1812-1816.
- [20] FENG LIMIN, LIU LIJUAN, ZHAO YA, et al. Saikosaponins A, C and D enhance liver - targeting effects of anticancer drugs by modulating drug transporters [J]. *Oncotarget*, 2017 (66):110092-110102.
- [21] YA ZHAO, LIMIN FENG, LIJUAN LIU, et al. Saikosaponin b2 enhances the hepatotargeting effect of anticancer drugs through inhibition of multidrug resistance - associated drug transporters[J]. *Life Sciences*, 2019(11):6557.
- [22] WU Y Y, LIU L J, ZHAO Y, et al. Polysaccharides of Vinegar - processed radix bupleuri promote the hepatic targeting effect of oxymatrine by regulating the protein expression of HNF4 $\alpha$ , Mrp2, and OCT1 [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020 (prepublish):113471.
- [23] ZHAO Y A, WANG Y J, ZHAO R Z, et al. Vinegar amount in the process affected the components of Vinegar - processed Radix Bupleuri and its hepatoprotective effect[J]. *BMC complementary and alternative medicine*, 2016(1):346.
- [24] 徐虹云, 吴春玉, 吴林霖, 等. 基于 OCT2、MRP2 探讨加味生脉饮对 Lewis 肺癌小鼠顺铂化疗的增效减毒机制[J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(12):3138-3146.
- [25] 黄倩, 蒋虎刚, 王新强, 等. 黄芪甲苷防治心肌纤维化研究进展[J]. *实用中医内科杂志*, 2024, 38(4):37-39.
- [26] 周雅倩, 刘晓东. 疾病状态下血脑屏障 ATP 结合盒转运体功能与表达改变及其临床意义[J]. *药学进展*, 2018, 42(8):574-580.
- [27] 王欣, 史磊磊, 张雨涵, 等. 多药耐药相关蛋白转运体在药物性肝损伤中的作用研究进展[J]. *中国药物警戒*, 2024, 21(2):229-234.
- [28] 刘彦娟, 曹雨虹, 匡荣. 肿瘤多药耐药发生机制及中药逆转研究现状[J/OL]. *中国药理学杂志*, 1-19[2025-06-17]. <https://link.cnki.net/urlid/11.2162.R.20240223.1302.004>.