

体外研究孕激素对糖蛋白-P 活性的影响

A STUDY OF INFLUENCE OF PROGESTERONE ON ACTIVITY OF GLYCOPROTEIN-P IN VITRO

研究现实性。糖蛋白-P (Pgp, ABCB1) 是一种参与药物药代动力学和肿瘤细胞化疗耐药发展的转运蛋白。

目的：目的：研究黄体酮对体外培养的人小肠上皮细胞模型中 Pgp 活性的影响。

材料与方法：对 Caco-2 细胞系进行了研究。在特殊的 Transwell 体系中，通过非索非那定转运评价 Pgp 的活性。高效液相色谱法测定非索非那定的浓度。采用免疫酶测定法测定 Pgp 的含量。我们进行了四个系列的实验：对照组细胞在不添加任何物质的清洁运输介质中孵育；预孵育 3 天，10 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 浓度利福平对 Pgp 活性及合成的影响（诱导控制）；孕酮在 1、10 和 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 预潜伏 30 分钟时对 Pgp 活性的影响；孕酮在 1、10、100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 预潜伏 3 天后对 Pgp 活性及合成的影响。

结果：黄体酮与细胞潜伏 30 分钟时，浓度为 1 和 10 的孕酮对 Pgp 的活性没有显著影响，但浓度为 100 的孕酮会降低转运蛋白的活性。

将 Caco-2 细胞与孕酮浓度分别为 1、10 和 100 μM 的水杨酸潜伏 3 天后，Pgp 的活性没有变化。与对照指标相比，孕酮在潜伏 3 天后，浓度为 100 μM 的孕酮可显著提高肠上皮细胞 Pgp 的合成，提高 114.3%，但在剩余的使用浓度（1 和 10 μM ）中效果不显著。

结论：体外实验中，在 Caco-2 细胞系细胞中，孕酮浓度为 100 μM 时，对 Pgp 活性有直接抑制作用，但在潜伏 3 天后，孕酮增加了转运蛋白的合成，使其抑制活性减弱。

关键词：糖蛋白-P; Caco-2 细胞系; 孕酮

Background. Glycoprotein-P (Pgp, ABCB1) is a transporter protein participating in pharmacokinetics of medical drugs, and also in development of resistance of tumor cells to chemotherapy.

Aim. To study the influence of progesterone on the activity of Pgp *in vitro* on a cell model of human small intestinal epithelium.

Materials and Methods. The work was conducted on Caco-2 cells. The activity of Pgp was evaluated by transport of fexofenadine in a special transwell-system. Concentration of fexofenadine was analyzed by HPLC method. The amount of Pgp was determined by EIA method. Four series of experiments were conducted: control – cells preincubated with clean transport medium without addition of any substances; influence of rifampicin on the activity and synthesis of Pgp in the concentration 10 $\mu\text{mol}/\text{l}$ in preincubation for 3 days (induction control); influence of progesterone on the activity of Pgp in concentrations 1, 10 and 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$ in preincubation for 30 min; influence of progesterone on the activity and synthesis of Pgp in concentrations 1, 10 and 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$ in preincubation for 3 days.

Results. Progesterone in the concentrations 1 and 10 μM in incubation with cells within 30 minutes did not show any reliable influence on the activity of Pgp, however, in concentration 100 μM it reduced the activity of the transporter protein.

In incubation of Caco-2 cells with progesterone in concentrations 1, 10 and 100 μM within 3 days the activity of Pgp remained unchanged. Progesterone in concentration 100 μM in incubation within 3 days significantly increased synthesis of Pgp in enterocytes by 114.3% as compared to control, and in other used concentrations (1 and 10 μM) it produced no reliable effect.

Conclusion. In *in vitro* experiments on Caco-2 cells progesterone in concentration 100 μM produces a direct inhibiting effect on the activity of Pgp; however, in incubation within 3 days it increases synthesis of the transporter protein, which cancels out its inhibitory activity.

Keywords: glycoprotein-P; Caco-2 cells; progesterone.

糖蛋白-P (Pgp, ABCB1) 是细胞磷脂膜中表达的一种转运蛋白。Pgp 保护器官和组织不受作为其基质的排外微量元素的伤害, 将它们从细胞中清除到细胞外空间和体液中。例如, 当表达的肿瘤细胞, 这形式的发展他们的抵抗化疗, 肠肠上皮细胞的抑制物质的吸收, 在肝细胞和肾小管的上皮细胞, 它消除了物质的胆汁和尿液, 分别的内皮细胞血流结缔组织屏障障碍阻止了物质的器官[1]。

结果表明, 某些物质能够影响 Pgp 的功能。诱导剂 (利福平) 增加转运蛋白的活性, 而抑制剂 (维拉帕米, 奎尼丁) 降低[2]。

性激素对Pgp功能的调节作用已被证实[3,4]。在研究孕酮对Pgp活性和合成的影响时, 得到了相互矛盾的结果。

在含有大量孕酮受体的人卵巢癌细胞株 (NCI-ADR-RES) 上, 我们发现孕酮浓度为 10⁻⁷ M 潜伏 8 小时后, MDR1 基因表达增加。孕酮对低孕酮受体的人胎盘癌细胞株 (JAR) 的影响并没有增加 MDR1 基因的表达。此外, 孕酮的使用 24 和 72 小时 (浓度大于 10⁻⁸ M) 剂量依赖性增加了 NCI-ADR-RES 和 JAR 细胞中 Pgp 蛋白的表达。转运蛋白表达的增加伴随着其活性的增加, 这可以通过细胞积累的 Pgp 底物-沙奎那韦和紫杉醇来评估[5]。

的由L-MDR1细胞系转染猪肾行LLC-PK1人类凋亡基因和多柔比星-抵抗力单核细胞的小鼠白血病细胞系增加表达mdr1a / 1 b (P388/dx), 发现孕酮降低Pgp活动集13、3±3.2微米 L-MDR1细胞系和浓度为30.2±9.8微米P388/dx细胞系[6]。

文献分析表明, 对药物药代动力学主要器官 (肠肾上皮、肝细胞、组织 血流结缔组织屏障内皮细胞) 细胞系的研究几乎未开展。

早前, 我们在家兔体内实验中发现, 黄体酮可增加肠肠细胞中 Pgp 的活性和合成[4]。本研究旨在探讨孕酮对体外培养的人小肠上皮细胞模型中 Pgp 活性的影响。

材料与方法

对人结肠癌细胞株 Caco-2 进行了体外研究, 该细胞株来自圣彼得堡俄罗斯科学院联邦预算机构科学中心。

Caco-2 细胞系培养在 37°C 和 5%的二氧化碳杜尔贝科修改针的介质 (DMEM) 含有葡萄糖 (4500 毫克 /公升) (Sigma-Aldrich, 德国)、谷酰胺 (4 毫米) (Sigma-Aldrich, 德国), 15%牛血清 (Sigma-Aldrich, 德国), 100 单位/毫升的青霉素 (Sigma-Aldrich, 德国) 和 100 年微克 /毫升的链霉素。当达到 70-90%合流时, 加入胰酶-乙二胺四乙酸溶液 (0.25%胰酶和 0.2%乙二胺四乙酸, Sigma-Aldrich, 德国) 从瓶中取出细胞, 并将其置于 Transwell 系统中以评估 Pgp 活性, 或置于 6 孔板中以确定孕酮对转运蛋白合成的影响。培养 21 天, 细胞自然分化为类似肠上皮的细胞[7]。

Transwell 系统由顶腔 (a) 和基底外侧腔 (b) 组成。顶端腔的底部是半透膜, 细胞密度为 105/平方厘米 (33.000 个细胞/细胞)。本研究使用了带有半透膜的 12 孔板 (12 mm Transwell® with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, Corning, 美国)。当跨皮电阻达到 500 兆欧*平方厘米以上时, 进行输运实验。同一 Transwell 系统输运实验间隔至少为 7 天。

Pgp 的功能通过其标记底物非索非那定 (Sigma-Aldrich, 德国) 在 Transwell 系统中的转运来评估。为此, 用转运培养基 Hanks 溶液 (Sigma-Aldrich, 德国) 代替营养培养基, 缓冲 25mm Hepes pH 7.4 (Sigma-Aldrich, 德国), 含 1%二甲亚砷 (PanEco, 俄罗斯)。接下来, 盐酸非索非那定是添加到顶端商会在 150 年最终浓度微米[7], 而 1, 2, 3 小时, 传输介质 (50 微升) 样本来自基底外侧室确定的内容标记底物 (a-b 运输, 由于被动扩散对 Pgp 功能)。

然后, 在其他 Transwell 系统中, 非索非那定从基底外侧腔室到根尖的转运被评估 (由于被动扩散和转运蛋白的 b-a 转运)。为此, 在基底外侧腔室中加入浓度为 150 微米的非索非那定, 在 1、2、3 小时后, 从根尖腔中提取运输介质样本 (50 微升), 以确定标记物底物的浓度。

根据公式计算非索非那定从 a 室到 b 室和从 b 室到 a 室的转运情况[8]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{(A \times C_0)}$$

P_{app} 为表观渗透系数 (apparent permeability coefficient), dQ/dt 为培养时间内受体腔内底物浓度的变化, A 为 Transwell 体系中培养细胞的半透井膜面积; C_0 是供腔内底物的初始浓度。

然后确定表观渗透率系数的比值为 P_{app}^{ba} 与 P_{app}^{ab} 。

这个参数, 作为积分, 显示了 Pgp 转运蛋白对标记物底物非索非那定通过胆脂膜转移的总贡献。

采用高效液相色谱-紫外分光光度法测定转运介质中非索非那定的含量用 Stayer 色谱仪上 (俄罗斯), 根据我们开发的方法[2]。将得到的含非索非那定的输运介质样品 (50 微升) 用 150 微升的流动相稀释, 将得到的溶液 100 微升引入色谱仪。

为了评估黄体酮在体外对 Pgp 活性的影响, 无论非索非那定的转运方向如何, 黄体酮都被添加到两个腔体 (根尖和基底外侧)。

为了研究孕酮对 Pgp 合成的影响, 我们在 6 孔板上加入胰蛋白酶-乙二胺四乙酸溶液 (0.25% 胰蛋白酶和 0.2% 乙二胺四乙酸, Sigma-Aldrich, 德国) 从孔中取出细胞。得到的细胞经三次冻融循环裂解。用 Human Permeability glycoprotein ELISA kit (Blue gene, 中国) 测定裂解液中 Pgp 的含量用免疫酶测定。样品蛋白含量采用 Bradford 法 (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, USA) 分析。

在研究过程中, 我们进行了以下一系列实验:

- 1) 对照-细胞在不添加任何物质的清洁运输培养基中孵育;
- 2) 预潜伏 3 天, 10 微摩尔/升浓度利福平对 Pgp 活性及合成的影响-诱导控制;
- 3) 孕酮在 1、10、100 微摩尔/升预潜伏 30 分钟时对 Pgp 活性的影响;
- 4) 孕酮在 1、10、100 mol / L 预潜伏 3 天后对 Pgp 活性及合成的影响。

使用 Stat Soft Statistica 13.0 程序 (美国, 专利 JPZ811152 1319AR25ACD-W) 和 Microsoft Excel 对结果进行处理 16.24 (ID02984-001-000001)。为评估差异的统计学意义, 采用方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 Newman-Keuls 检验。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果与讨论

实验结果如表 1 和图 1 所示。

在 10 个利福平培养 Caco-2 细胞 3 天后, Pgp 活性增加, 表现为 P_{app}^{ab} 下降 31.7% ($p < 0.05$), P_{app}^{ba} 与 P_{app}^{ab} 比值增加 93.2% ($p < 0.05$)。

与 Caco-2 细胞潜伏 30 分钟后, 孕酮浓度分别为 1 和 10 微米, 对 Pgp 的活性没有显著影响。与此同时, 在 100 个蛋白浓度下, P_{app}^{ba} 和 P_{app}^{ab} 的比值下降了 26.2% ($p < 0.05$), 表明转运蛋白活性下降。

将 Caco-2 细胞与孕酮在 1、10 和 100 的浓度下潜伏 3 天, 与对照组相比, 研究参数 P_{app}^{ba} 、 P_{app}^{ab} 及其比值无显著变化。

在接下来的一系列实验中, 我们研究孕酮和利福平对 Caco-2 细胞中 Pgp 转运蛋白合成的影响。

利福平浓度 10 微米潜伏后 3 天在肠上皮细胞引起 Pgp 的数量增加了 52.7% ($p < 0.05$), 证实了实验的正确性, 因为利福平是一个经典的转运蛋白的诱导物, 增加其活动由于增加合成[2]。

与对照指标相比, 孕激素在潜伏 3 天后, 浓度为 100 微米的孕激素可使肠上皮细胞 Pgp 的合成增加 114.3% ($p = 0.018$, 但对其他浓度 (1 微米和 10 微米) 无显著影响 (图 1)。

结果表明, 孕酮是 Pgp 的直接抑制剂, 即与 Pgp 的分子直接相互作用可以抑制其活性, 这一点在实验中得到了证实, 即孕酮与 Caco-2 细胞在浓度为 100 微米的条件下孵育 30 分钟。

与此同时，孕酮延长潜伏（3天）可增加细胞培养中转运蛋白的合成。同时，Pgp的活性与对照指数并无明显差异，这显然是由于激素对激素Pgp的直接抑制，弥补了转运体的合成。

孕酮对Pgp活性的直接抑制作用，同时增加转运蛋白的合成能力可能是导致文献中所述结果矛盾的基础。

在孕酮的作用下，Pgp合成增加的机制可能与编码转运蛋白的MDR1基因表达的影响有关，这些基因与特定的孕酮受体或转录因子相互作用，孕烷-x受体（PXR）或构成性雄甾烷受体（CAR）[5,9]。

Caco-2细胞系中的孕酮受体尚未被描述，尽管在人类肠道中已经发现了它们的表达[10]。因此，孕酮作用下活化Pgp合成的机制需要进一步研究和细化。

结论

体外实验中，在Caco-2细胞系细胞中，孕激素浓度为100微米时，对Pgp活性有直接抑制作用，但在潜伏3天后，孕酮增加了转运蛋白的合成，使其抑制活性减弱。显然，孕酮对肠上皮细胞Pgp活性的直接抑制作用伴随着对其合成的代偿性激活。

表 1

孕酮对非索非那定通过Caco-2细胞脂膜转运的影响（MSD，10⁻⁶公分/秒）

	Papp ba	Papp ab	Papp ba/ Papp ab
检查, n=5	2.32±0.66	0.82±0.15	2.79±0.36
利福平 10 微米, 3 天, n=3	2.9±0.31	0.56±0.09*	5.39±1.24*
孕酮 1 微米, 30 分钟, n=3	1.96±0.18	0.72±0.17	2.83±0.76
孕酮 10 微米, 30 分钟, n=3	2.4±0.24	0.89±0.25	2.93±1.23
孕酮 100 微米, 30 分钟, n=3	2.03±0.42	0.99±0.19	2.06±0.17*
孕酮 1 微米, 30 天, n=3	1.95±0.46	0.63±0.31	3.36±0.83
孕酮 10 微米, 30 天, n=3	2.13±0.18	0.71±0.15	3.1±0.71
孕酮 100 微米, 30 天, n=3	2.32±0.42	0.76±0.66	3.1±0.84

注：* —p<0.05—与对照指标比较差异有统计学意义

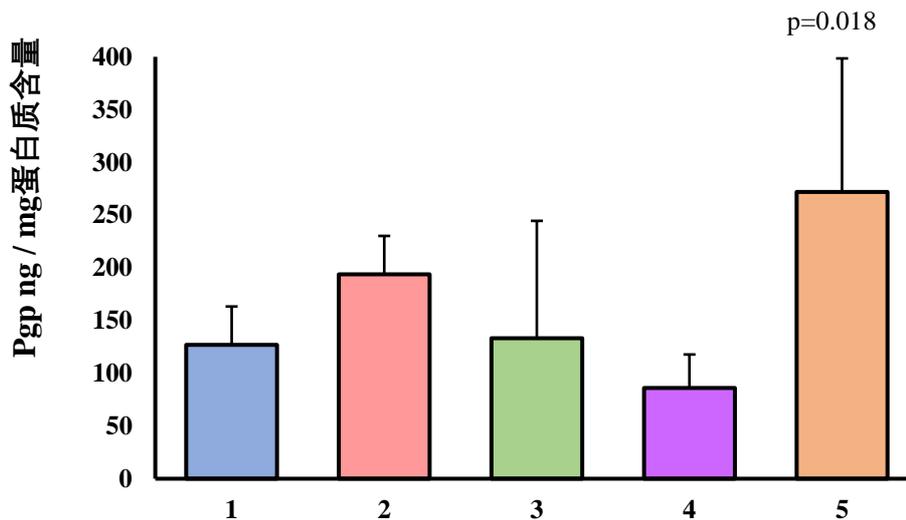


图 1 孕酮（MSD，纳克/毫克蛋白）对Caco-2细胞系细胞中Pgp含量的影响。

注：1—对照（n=7），2—利福平10微米3天（n=4），3—孕酮1微米3天（n=3），4—孕酮10微米3天（n=3），5—孕酮100微米3天（n=3）