

基于 PXR/CAR 调控通路探讨土的宁对 UGT1A4 的作用

刘若轩, 邓志军, 李阿荣, 郭洁文, 李丽明(广州医科大学附属中医医院, 广东 广州 510130)

摘要: **目的** 研究土的宁对人肝细胞 HL-7702 中葡萄糖醛酸转移酶 1A4(UGT1A4)表达的影响及其与孕烷 X 受体(PXR)/组成型雄烷受体(CAR)调控通路的关系, 明确 UGT1A4 与土的宁的关系及作用机制, 为进一步研究土的宁代谢及合成或改造相似结构药物提供一定的实验依据。**方法** 以人肝细胞株 HL-7702 为研究对象, 不同浓度的土的宁(10、20、40 pmol·L⁻¹)干预 24 h 后, RT-qPCR 和 Western Blot 法检测土的宁对 HL-7702 细胞中 UGT1A4、PXR 和 CAR mRNA 和蛋白表达水平的影响。通过双荧光素酶报告基因法以及脂质体瞬时转染方法, 分析 UGT1A4 报告基因(来自于瞬时共转染 hCAR 或者是 hPXR 之后的 HL-7702 细胞)的活性在各浓度土的宁(10、20、40 pmol·L⁻¹)干预下的影响。利用 siRNA 干扰技术, 探究土的宁对 hPXR 基因沉默后 HL-7702 细胞中 UGT1A4 蛋白表达水平的影响。**结果** 与对照组比, 20、40 pmol·L⁻¹ 土的宁干预后明显上调 UGT1A4、PXR 的 mRNA 和蛋白的表达水平, 呈浓度依赖性($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); 但对 CAR mRNA 和蛋白的表达无明显的影响, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。在瞬时共转染 hPXR 的 HL-7702 细胞中, 20、40 pmol·L⁻¹ 土的宁干预 24 h 后能明显上调 PXR 介导 UGT1A4 的转录活性, 呈浓度依赖性($P < 0.01$, $P < 0.001$); 在瞬时共转染 hCAR 的 HL-7702 细胞中, 各浓度土的宁干预 24 h 后对 CAR 介导的 UGT1A4 转录活性无明显影响, 与对照组比, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。土的宁对沉默 hPXR 的 HL-7702 细胞中 UGT1A4 蛋白的诱导作用明显减弱, 与对照组比, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 土的宁对 HL-7702 中 UGT1A4 和 PXR 在转录和蛋白水平有明显的上调作用, 对 CAR 在转录和蛋白水平没有明显影响。土的宁对 HL-7702 细胞中 UGT1A4 的诱导作用主要通过 PXR 调控通路实现。

关键词: 土的宁; UGT1A4; PXR; CAR; 人肝细胞株 HL-7702

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)07-0925-07

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.07.004

Explore the Effect of Strychnine on UGT1A4 Based on the PXR/CAR Regulatory Pathway

LIU Ruoxuan, DENG Zhijun, LI Arong, GUO Jiewen, LI Liming (The Affiliated TCM Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510130 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of strychnine on the expression of UDP-glucuronosyltransferase 1A4 (UGT1A4) in HL-7702 cells and its relationship with the PXR/CAR regulatory pathway, and to clarify the relationship between UGT1A4 and strychnine and its mechanism, and provide certain experimental evidence for further research on the metabolism and synthesis or modification of drugs with similar structures. **Methods** Human hepatocellular carcinoma cell line HL-7702 was used for the research object, different concentrations strychnine(10、20、40 pmol·L⁻¹) was intervened for 24 h, RT-qPCR and Western Blot were used to detect the effect of strychnine on UGT1A4, PXR and CAR mRNA and protein in HL-7702. Liposome transient transfection and dual luciferase reporter gene method were used to investigate the effect of different concentrations of strychnine(10、20、40 pmol·L⁻¹) on the UGT1A4 reporter gene in HL-7702 cells which co-transfected with hPXR or hCAR. Using siRNA interference technology, we explored the effect of strychnine on the expression levels of UGT1A4 protein in HL-7702 cells after hPXR gene-silenced. **Results** Compared with the control group, 20, 40 pmol·L⁻¹ strychnine significantly

收稿日期: 2020-11-04

作者简介: 刘若轩, 男, 副主任药师, 副教授, 硕士, 研究方向: 院内制剂与天然药物开发。Email: lrx1221@163.com。通信作者: 郭洁文, 女, 主任药师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 天然药物开发。Email: guo774@sina.com。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A030313998); 广东省中医药局科研项目(20191245); 广州市中医药和中西医结合科技项目(20192A011007); 广州市卫生健康科技一般引导项目(20191A010019); 广东省药学会研究基金项目(2018A11、2020A01)。

increased the mRNA and protein levels of UGT1A4 and PXR, which showed concentration-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), but had no significant effect on the mRNA and protein levels of CAR, there is no statistical difference ($P > 0.05$). In the HL-7702 cells transiently co-transfected with hPXR, strychnine at 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ can significantly up-regulate the PXR-mediated transcriptional activity of UGT1A4 after 24 h intervention, which showed concentration-dependent manner ($P < 0.01$, $P < 0.001$). In the HL-7702 cells transiently co-transfected with hCAR, strychnine at various concentrations had no significant effect on CAR-mediated UGT1A4 transcriptional activity after 24h intervention ($P > 0.05$). Compared with normal HL-7702 cells, strychnine significantly weakened the induction of UGT1A4 mRNA in hPXR-silenced HL-7702 cells. There is no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Strychnine can significantly up-regulate the expression of UGT1A4 and PXR mRNA and protein in HL-7702 cells, but has no obvious effect on the expression of CAR mRNA and protein. The effect of strychnine on UGT1A4 in HL-7702 cells is mainly related to the PXR regulatory pathway.

Keywords: Strychnine; UGT1A4; PXR; CAR; HL-7702 cells

马钱子是马钱子科植物马钱(*Strychnos nux-vomica* L.)的干燥成熟种子,又名番木鳖,有着良好的通络止痛、散结消肿的功效,因其毒性强烈严重影响临床使用;而土的宁是马钱子的主要有效成分和毒性成分,在血液中代谢最快,在肝脏中代谢最慢^[1],研究其生物代谢对其临床合理和安全运用具有重要意义。

作为生物体内Ⅱ相代谢过程中主要的结合酶,葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)在维持内源性代谢物(如胆红素和类固醇)的平衡和去除外源代谢物(如各类化学药物和食物)方面发挥着至关重要的作用^[2-3]。本课题组前期研究^[4-5]指出,在弱碱性下土的宁可逐渐地代谢成为一种葡萄糖醛酸代谢产物,其较为重要的一种代谢亚酶就是葡萄糖醛酸转移酶 1A4(UGT1A4),而肝脏则是较为重要的代谢部位。UGTs 的表达受各种转录调控因子调控,组成型雄烷受体(CAR)、孕烷 X 受体(PXR)和芳香烃受体在调控下游 UGTs 靶基因的表达中起着非常关键的作用^[6]。但土的宁是否影响正常人肝细胞中 UGT1A4 的表达,且这种调控是否与 PXR 和 CAR 信号通路相关尚不明晰。

本研究主要通过双荧光素酶报告基因法以及脂质体瞬时转染方法,分析 UGT1A4 报告基因的活性在各浓度土的宁干预下的影响及机制,明确 UGT1A4 与土的宁的关系及作用机制,为进一步研究土的宁代谢及合成临床用药提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及质粒 正常人肝细胞株 HL-7702,购自武汉博士德生物公司; pcDNA3.1(+)-hPXR 高表达质

粒、pcDNA3.1(+)-hCAR 高表达质粒、pGL3-UGT1A4-luc 报告基因质粒、pRL-TK 内参质粒,均由上海吉凯基因生物公司提供。

1.2 药物及试剂 土的宁(10 mg, 0.1%DMSO 配置成不同浓度),成都瑞芬思生物科技有限公司,批号: 100756; 利福平(10 mg, 0.1%DMSO 配置成 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),美国 Sigma 公司,批号: 1604009; 组成性雄烷受体激动剂(CITCO, 10 mg, 0.1%DMSO 配置成 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),美国 APEX BIO 公司,批号: 3689; DMEM 培养基(批号: 1338043)、胎牛血清(批号: 10099-141),美国 Gibco 公司; RNA 提取试剂(批号: 15596026)和 lipotransfection3000(批号: 123564),美国 Invitrogen 公司; ReverTra Ace qPCR RT Kit(批号: 135600)、SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix(批号: 26200),日本 TOYOBO 公司; 兔抗人 PXR(批号: 4223)、CAR(批号: 5023)一抗,美国 Proteintech 公司; Anti-UGT1A4 一抗,美国 Abcam 公司,批号: ab192424; hPXR siRNA(批号: sc-1689)和 scramble siRNA(批号: sc-1567),美国 Santa cruz 公司; UGT1A4、PXR、CAR、 β -actin 引物由日本 TaKaRa 公司设计合成; ECL 检测试剂盒,美国 Thermo 公司,批号: 32019; 其他国产分析纯试剂均购于广州浩玛生物有限公司。

1.3 仪器 Synergy HT 多功能酶标分析仪,美国 BioTek 公司; 7500 荧光定量 PCR 分析仪,美国 ABI 公司; CO175 CO₂ 培养箱,日本 SANYON 公司; 超净工作台、POWER/PAC 1000 电泳仪、POWER/PAC Universal 电转装置、GS-800 光密度扫描仪,美国 BIO-RAD 公司。

1.4 细胞培养 HL-7702 细胞采用 DMEM 培养液(其中含有 10%胎牛血清,青、链霉素各 100 U·mL⁻¹)培养,培养环境为 37 ℃、5% CO₂,当细胞逐渐生长接近 90%左右的瓶底后,采用 0.25%的胰酶进行消化传代处理。

1.5 士的宁对 HL-7702 细胞活力的影响 HL-7702 细胞经胰酶消化后,以每毫升 2×10⁵个细胞接种在 6 孔培养板中,各个孔均为 2 mL,24 h 后将培养液去掉,进行 PBS 洗涤处理后,再将新鲜的培养液添加进去。细胞随机分为对照组(0 pmol·L⁻¹士的宁)、不同浓度士的宁组(10、20、40、80、160、320 pmol·L⁻¹),药物干预 24、48 h 后,参照 CCK8 试剂盒说明书测定细胞活性。实验重复 3 次。

1.6 荧光定量 RT-PCR 法检测 HL-7702 细胞中 UGT1A4、PXR、CAR mRNA 的表达 采用胰酶消化之后,以每毫升 2×10⁵个细胞接种在 6 孔培养板中,各个孔均为 2 mL,24 h 后将培养液去掉,进行 PBS 洗涤处理后,再将新鲜的培养液添加进去。细胞随机分为对照组及士的宁高(40 pmol·L⁻¹)、中(20 pmol·L⁻¹)、低(10 pmol·L⁻¹)剂量组,药物干预 24 h 后收集细胞。通过 Trizol 法来进行细胞总 RNA 的提取处理, RNA 纯度通过紫外分光光度分析计来进行实验测定, RNA 完整性则是利用 1.5%琼脂糖凝胶电泳的方法来准确测定。通过逆转录反应来对 RNA 样品进行处理,最终实现 cDNA 模板的合成,进而根据试剂盒的说明内容来展开 PCR:在 95 ℃的温度下进行 30 s 的预变性,然后在 95 ℃下进行 5 s 的变性,再于 60 ℃下进行 30 s 的退火处理。该过程的循环共计 40 次,在各个循环中均进行 GAPDH 扩增设置以得到相应的内参对照。进行标准曲线的绘制,且选择 2^{-ΔΔCt}法来进行 CAR、PXR 以及 UGT1A4 的相对表达量的计算。扩增产物的大小和引物序列等方面的信息详见表 1。实验重复 3 次。

表 1 引物序列及扩增产物大小

Table 1 Primer sequences and the size of the amplification products

基因名称	引物序列	扩增产物/bp
UGT1A4	Forward: 5'- CCTGCTGTGTTTTTTGGAGGT-3'	208
	Reversed: 5'- ATTGATCCCAAGAGAAAACCAC-3'	
PXR	Forward: 5'- TGTTCAAAGGCATCATCAGC-3'	125
	Reversed: 5'- CACTCCCAGGTTCCAGTCTC-3'	
CAR	Forward: 5'- GCTGGCATGAGAAAGACAT-3'	134
	Reversed: 5'- CGGATCAGCTCTTCTTGTCTC-3'	
GAPDH	Forward: 5'- CAGGAGCCATTGCTGATGAT-3'	199
	Reversed: 5'- GAAGGCTGGGCTCATT-3'	

1.7 Western Blot 法检测 HL-7702 细胞中 UGT1A4、PXR、CAR 蛋白的表达 细胞种板同“1.6”项下。随机分为对照组及士的宁高(40 pmol·L⁻¹)、中(20 pmol·L⁻¹)、低(10 pmol·L⁻¹)剂量组及阳性对照利福平组(10 μmol·L⁻¹)。在完成了细胞的收集之后,再根据说明书的内容进行蛋白的提取,然后进行浓度的实验测定。对于各个孔,均进行 50 μg 的上样,通过 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法进行样品有效分离,然后转移蛋白到 PVDF 膜上。在室温的条件下,采用 5%脱脂奶粉进行 2 h 的封闭;再将一抗溶液(UGT1A4 1:1 000, PXR 1:2 000, CAR 1:2 000)加入进去,4 ℃孵育过夜;TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次均为 10 min;在室温条件下用已经进行 HRP 标记的 1:15 000 二抗溶液进行时长为 2 h 的孵育,洗膜之后,再添加 ECL 液进行显色曝光。实验重复 3 次。

1.8 士的宁对瞬时共转染 hPXR 的 HL-7702 细胞中 UGT1A4 的影响 在 24 孔板中接种正处于生长对数期的细胞,每孔 1×10⁵个。那些已经进行了纯化而且经过鉴定的内参质粒、报告质粒以及表达质粒等,将会被转入 HL-7702 细胞之中。采用 OPTI-MEM 培养基稀释质粒,对各孔而言,具体比例如下: pRL-TK 20 μg、pGL3-UGT1A4-luc 160 μg、pcDNA3.1(+)-hPXR 320 μg,稀释后的质粒与脂质体充分混匀,室温静置 20 min,形成所需的脂质体-DNA 复合物。以每孔 50 μL 的量将 DNA-脂质体复合物加入 24 孔板,5% CO₂、37 ℃培养 6 h 后,将细胞与利福平(10 μmol·L⁻¹)及士的宁高(40 pmol·L⁻¹)、中(20 pmol·L⁻¹)、低剂量(10 pmol·L⁻¹)孵育 24 h,进行荧光素酶测定。利福平为阳性对照。实验重复 3 次。

1.9 士的宁对瞬时共转染 hCAR 的 HL-7702 细胞中 UGT1A4 的影响 种板及转染操作同“1.8”项下。每孔具体比例如下: pRL-TK 20 μg、pGL3-UGT1A4-luc 96 μg、pcDNA3.1(+)-hCAR 384 μg,以每孔 50 μL 的量将 DNA-脂质体复合物加入 24 孔板,5% CO₂、37 ℃培养 6 h 后,将细胞分别与 CITCO(10 μmol·L⁻¹)及士的宁高(40 pmol·L⁻¹)、中(20 pmol·L⁻¹)、低(10 pmol·L⁻¹)剂量孵育 24 h,进行荧光素酶测定。CITCO 为阳性对照。实验重复 3 次。

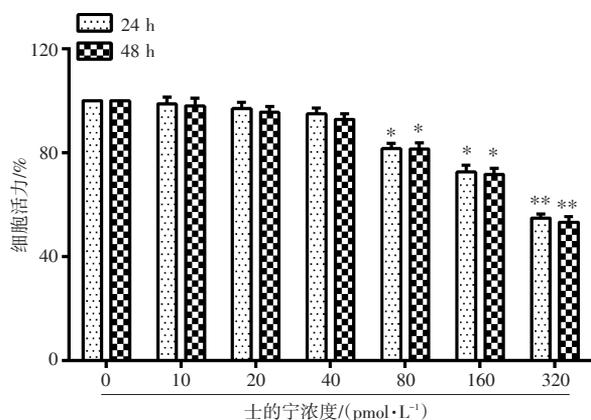
1.10 报告基因检测 收集“1.8”和“1.9”项下的细胞,参考有关研究^[7]进行 UGT1A4 报告基因活性的检测及计算。

1.11 土的宁对 hPXR 沉默后 HL-7702 细胞中 UGT1A4 蛋白的影响 HL-7702 细胞经胰酶消化后接种于 6 孔培养板中, 每孔 1×10^5 个细胞。待细胞生长融合至 40%, 每孔加入 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ siRNA(hPXR 或 scramble)和 $3 \mu\text{L}$ 转染试剂, 培养 6 h 后更换正常培养基, 继续培养 48 h 后加入不同浓度土的宁(10、20、40 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)继续培养 24 h, 收集细胞检测 UGT1A4 蛋白表达水平。利福平为阳性对照。实验重复 3 次。

1.12 统计学处理方法 将收集到的具体数据输入 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 土的宁对 HL-7702 细胞活力的影响 结果见图 1。与对照组比, 10、20、40 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 土的宁干预 24、48 h 后对细胞活力基本没有影响($P > 0.05$), 毒性较小。80、160 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 土的宁干预 24、48 h 后对细胞活力有一定影响($P < 0.05$), 320 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 土的宁干预 24、48 h 后对细胞活力影响比较明显($P < 0.01$)。



注: 与对照组($0 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
 图 1 土的宁对 HL-7702 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Figure 1 Effect of strychnin on cell viability in HL-7702($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2 土的宁对 HL-7702 细胞中 UGT1A4、PXR、CAR mRNA 表达的影响 结果见表 2。与对照组比, 20 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 土的宁干预 24 h 后, UGT1A4、PXR mRNA 表达上调, 差异具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$); 40 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 土的宁干预 24 h 后, UGT1A4、PXR mRNA 的表达明显上调, 差异具有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$); 10 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 土的宁

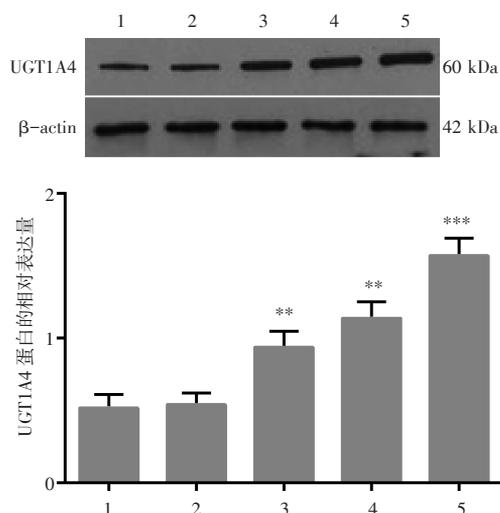
对 UGT1A4、PXR mRNA 的表达没有明显影响($P > 0.05$)。与对照组比, 10、20、40 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 土的宁干预 24 h 后对 CAR mRNA 的表达没有明显影响($P > 0.05$)。

表 2 土的宁对 HL-7702 细胞中 UGT1A4、PXR、CAR mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Table 2 The impact of strychnine on UGT1A4, PXR, CAR mRNA in HL-7702 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 / ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	UGT1A4	PXR	CAR
对照组	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
土的宁低剂量组	10	1.21 ± 0.13	1.13 ± 0.11	1.12 ± 0.12
土的宁中剂量组	20	$1.51 \pm 0.29^*$	$1.83 \pm 0.37^{**}$	1.19 ± 0.17
土的宁高剂量组	40	$1.78 \pm 0.35^{**}$	$2.45 \pm 0.43^{***}$	1.21 ± 0.15

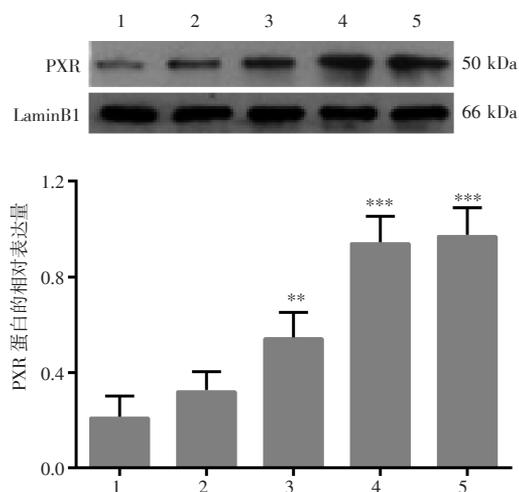
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 土的宁对 HL-7702 细胞中 UGT1A4、PXR、CAR 蛋白表达的影响 见图 2~4。与对照组比, 中、高剂量(20、40 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)土的宁干预 24 h 后对 UGT1A4 蛋白、PXR 蛋白表达有上调作用, 差异具有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$); 低剂量(10 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 土的宁对 PXR 以及 UGT1A4 蛋白的表达没有明显影响($P > 0.05$)。与对照组比, 低、中、高剂量(10、20、40 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)土的宁干预 24 h 后对 CAR 蛋白表达没有明显影响($P > 0.05$)。



注: 1. 对照组; 2. 土的宁低剂量组; 3. 土的宁中剂量组; 4. 土的宁高剂量组; 5. 利福平组。与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$
 图 2 土的宁对 HL-7702 中 UGT1A4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

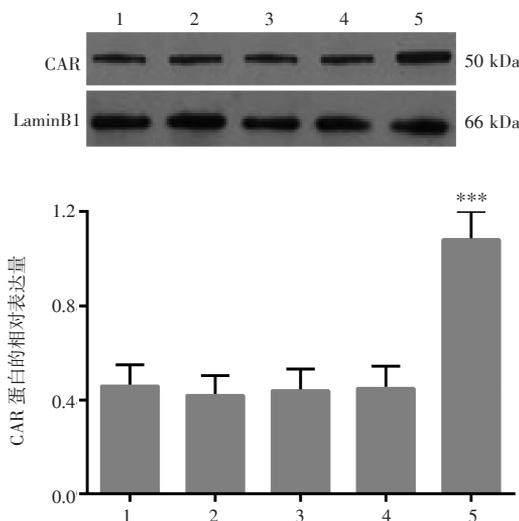
Figure 2 Effect of strychnin on UGT1A4 expression in HL-7702 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注：1. 对照组；2. 土的宁低剂量组；3. 土的宁中剂量组；4. 土的宁高剂量组；5. 利福平组。与对照组比较，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

图 3 土的宁对 HL-7702 中 PXR 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 3 Effect of strychnine on PXR expression in HL-7702 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：1. 对照组；2. 土的宁低剂量组；3. 土的宁中剂量组；4. 土的宁高剂量组；5. CITCO 组。与对照组比较，*** $P < 0.001$

图 4 土的宁对 HL-7702 中 CAR 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 Effect of strychnine on CAR expression in HL-7702 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

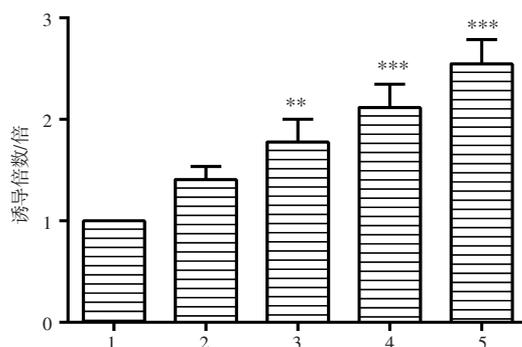
2.4 土的宁对瞬时共转染 hPXR 或 hCAR 的 HL-7702 中 UGT1A4 报告基因的影响

结果见图 5、6。与对照组比，中、高剂量(20、40 pmol·L⁻¹)土的宁干预 24 h 后，可通过激活 hPXR 明显增加对 UGT1A4 报告基因活性的诱导，呈浓度依赖性，差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$)；低剂量(10 pmol·L⁻¹)土

的宁干预 24 h 后对 UGT1A4 报告基因活性的诱导也有增加，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比，低、中、高剂量(10、20、40 pmol·L⁻¹)土的宁干预 24 h 后对 hCAR 介导的 UGT1A4 报告基因活性无明显诱导效应($P > 0.05$)。

2.5 土的宁对 hPXR 沉默后 HL-7702 细胞中 UGT1A4 蛋白的影响

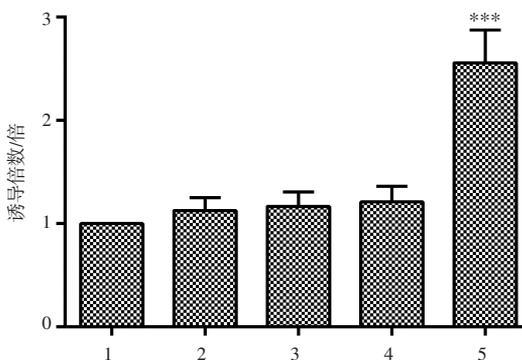
从图 7 可知，与 scramble siRNA 相比，hPXR siRNA 干扰后，PXR 蛋白水平明显下调($P < 0.001$)，说明 PXR 沉默成功。从图 8 可知，沉默 PXR 后，中、高剂量(20、40 pmol·L⁻¹)土的宁干预 24 h 后对 UGT1A4 蛋白表达没有上调作用，与对照组比差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注：1. 对照组；2. 土的宁低剂量组；3. 土的宁中剂量组；4. 土的宁高剂量组；5. 利福平组。与对照组比较，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

图 5 土的宁对 hPXR 介导的 UGT1A4 的诱导作用($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

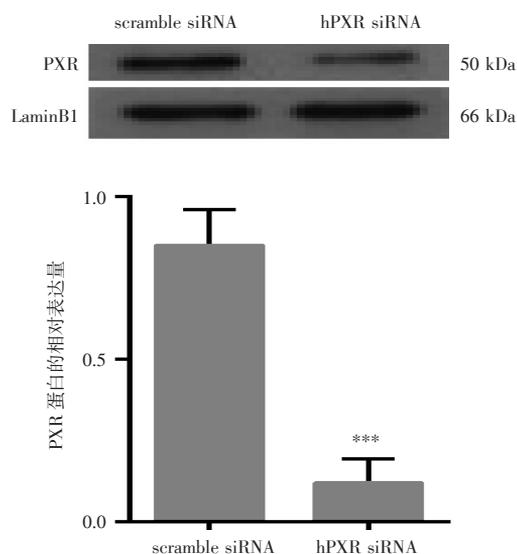
Figure 5 Induction of hPXR-mediated UGT1A4 by strychnine ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：1. 对照组；2. 土的宁低剂量组；3. 土的宁中剂量组；4. 土的宁高剂量组；5. CITCO 组。与对照组比较，*** $P < 0.001$

图 6 土的宁对 hCAR 介导的 UGT1A4 的诱导作用($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

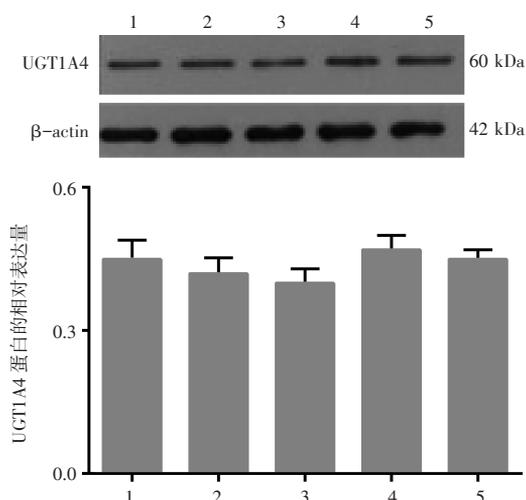
Figure 6 Induction of hCAR-mediated UGT1A4 by strychnine ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：与 scramble siRNA 组比较，****P* < 0.001

图 7 hPXR siRNA 对 PXR 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 7 Effect of hPXR siRNA on PXR expression($\bar{x} \pm s, n=3$)



1. 对照组；2. 土的宁低剂量组；3. 土的宁中剂量组；4. 土的宁高剂量组；5. 利福平组

图 8 土的宁对 hPXR 沉默后 HL-7702 中 UGT1A4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 8 Effect of strychnin on UGT1A4 expression in hPXR-silencing HL-7702($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

作为卫生行政部门明确指出的一类毒性药品，马钱子具有较强的毒性，其有效成分主要是马钱子碱与土的宁，亦是其毒性成分。尽管已有较多的文献^[8]报道了它们的代谢问题，然而却未涉及葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)所参与的Ⅱ相代谢。对于机体而言，Ⅱ相代谢起到了非常关键的解毒作用^[9]。因此深入探

讨这两种毒性成分的Ⅱ相代谢，明确影响其代谢的具体酶及机制，对减轻其临床不良反应发生和合理运用意义重大。

研究^[10-11]表明，药物在生物体内进行Ⅱ相代谢时，UGTs 可将大约 35% 的药物进行催化进而产生葡萄糖醛酸化反应。UGTs 根据基因序列分为 UGT1 家族和 UGT2 家族，UGT1A4 是 UGT1 中的一个亚族，参与含有一级胺和二级胺结构药物的体内代谢^[12]。目前发现的 UGT 单酶中，只有 UGT1A4 具有催化土的宁葡萄糖醛酸化代谢反应的能力^[13]，但具体机制不明。本研究以 HL-7702 细胞为研究对象，考察土的宁对 UGT1A4 表达的作用并探讨其影响机制。人正常肝细胞株与原代肝细胞相比，较易获取，因此在药物代谢酶方面的科研工作中被大量地应用。

本研究结果可见，低剂量土的宁对 UGT1A4 在转录和蛋白水平的表达均无影响，中剂量及高剂量土的宁对 UGT1A4 在转录和蛋白水平的表达均有上调作用。UGT1A4 是葡萄糖醛酸代谢反应的关键代谢酶，随着土的宁的剂量的升高，UGT1A4 的表达升高，表明该酶的代谢作用强，有利于降低土的宁的毒性。

UGT1A4 表达受多种核因子的调控，CAR、PXR 和芳香烃受体在调控下游 UGTs 靶基因的表达中起着非常关键的作用^[6]。为了研究土的宁是否通过 PXR、CAR 影响 UGT1A4 的表达，本研究选用 PXR 激动剂利福平和 CAR 激动剂 CITCO 作为阳性对照^[14]。研究结果可见，低剂量土的宁对 PXR 在转录和蛋白水平的表达均无影响，中剂量及高剂量土的宁对 PXR 在转录和蛋白水平的表达均有上调作用，但各剂量的土的宁对 CAR 在转录和蛋白水平均无影响，提示核受体 PXR 对 UGT1A4 表达起关键调节作用。

作为超基因中的重要核受体，在对转运蛋白以及药物代谢酶的表达进行有效调节的基础上，PXR/CAR 参与对异生源物质解毒，由此降解内源性代谢物以及各类外源性物质并排泄出去，核受体 PXR 和 CAR 在调控下游 UGTs 靶基因的表达中起着非常关键的作用^[15]。此外，在 HL-7702 之中，hCAR 与 hPXR 有相对较低的表达量，然而却能够利用瞬时转染的突进，来达到外源性 PXR 及 CAR 高表达的效果^[6]。本研究通过瞬时共转染法以及质粒构建方法，对 HL-7702 细胞进行 UGT1A4 报告质粒，以及 hCAR 表达质粒、hPXR 表达质粒等的转染，对 HL-7702 在受到土的宁干预之后相关的 hPXR/hCAR-UGT1A4

信号通路方面的生物学机制展开深入系统的探讨。以转入 pRL-TK 报告质粒作为内参,能有效降低因质粒转染效率的不同而导致的相关误差^[7]。研究结果可见,土的宁中、高剂量通过 PXR 诱导 UGT1A4 报告基因的活性,而土的宁各剂量对 CAR 介导的 UGT1A4 报告基因无活性;此外,UGT1A4 是 hPXR 的靶基因,土的宁主要通过 PXR 通路来调控 UGT1A4 靶基因的表达。在此基础上,本研究进一步利用 siRNA 干扰技术沉默 PXR,观察沉默 PXR 基因后,土的宁对 UGT1A4 蛋白表达的上调作用是否有影响,从结果来看,沉默 PXR 后,中、高剂量土的宁对 UGT1A4 表达的上调作用被明显减弱,进一步明确了土的宁通过激活核受体 PXR 影响 UGT1A4 表达。

综上所述,土的宁主要通过激活核受体 PXR,上调 II 相代谢酶 UGT1A4 的转录和蛋白水平,核受体 CAR 几乎不参与其中。下一步本课题组将深入研究土的宁在动物模型中对 UGT1A4 的作用是否符合本研究结果,并进一步探讨其对核受体 PXR 和 CAR 的差异效应机制。

参考文献:

- [1] 屈艳格,陈军,蔡宝昌.土的宁的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(34):247-251.
- [2] STREET C M, ZHU Z H, FINEL M, et al. Bisphenol-A glucuronidation in human liver and breast: identification of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and influence of genetic polymorphisms[J]. Xenobiotica, 2017, 47(1): 1-10.
- [3] CHO P J, PAUDEL S, LEE D, et al. Characterization of CYPs and UGTs involved in human liver microsomal metabolism of ostheno[J]. Pharmaceutics, 2018, 10(3): 141.
- [4] 李阿荣,李丽明,邓志军,等.马钱子碱和土的宁在人肝微粒体和 UGT1A4 重组酶中的体外酶动力学研究[J].广东药科大学学报,2018,34(5):541-546.
- [5] 李阿荣,刘若轩,邓志军,等.人尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶参与马钱子碱和土的宁体外代谢研究[J].中药新药与临床药理,2018,29(6):780-784.
- [6] LI X P, LI S Y, CHEN M, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) inhibits starch digestion and improves glucose homeostasis through direct or indirect activation of PXR/CAR-mediated phase II metabolism in diabetic mice[J]. Food Func, 2018, 9(9): 4651-4663.
- [7] 夏延哲,韦炳华,陈杰,等.早莲草单体对人孕烷X受体调控 CYP3A4 转录表达的调节作用[J].今日药学,2012,22(3):129-133.
- [8] 林昌松,邓健.马钱子的炮制、毒理和防治中毒的研究进展[J].河南中医,2008,28(4):80-83.
- [9] RITTER J K. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions[J]. Chemo Biological Interactions, 2000, 129: 171-193.
- [10] SONG Y, JIA M X, YANG G, et al. Association of CYP2C19 and UGT1A4 polymorphisms with voriconazole-induced liver injury[J]. Per Med, 2020, 17(1): 15-22.
- [11] EDAVANA V K, DHAKAL I B, WILLIAMS S, et al. Potential role of UGT1A4 promoter SNPs in anastrozole pharmacogenomics [J]. Drug Metab and Dispos, 2013, 41(4): 870-877.
- [12] GREEN M D, BISHOP W P, TEPHLY T R. Expressed human UGT1A4 protein catalyzes the formation of quaternary ammonium-linked glucuronides [J]. Drug Metab dispos, 1995, 23: 299-302.
- [13] TUKEY R H, STRASSBURG C P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression and disease[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000, 40: 581-616.
- [14] 姚娜.基于PXR/CAR调控通路眼睛就齐墩果酸及熊果酸对UGT1A1的诱导机制[D].南昌:南昌大学,2019.
- [15] WANG Y M, CHAI S C, LIN W W, et al. Serine 350 of human pregnane X receptor is crucial for its heterodimerization with retinoid X receptor alpha and transactivation of target genes in vitro and in vivo[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 96(4): 357-368.
- [16] OMASA T, KIM K, HIRAMATSU S, et al. Construction and evaluation of drug-metabolizing cell line for bioartificial liver support system[J]. Biotechnology progress, 2005, 21(1): 161-167.
- [17] THAVATHIRU E, DAS G M. Activation of pRL-TK by 12S E1A oncoprotein: drawbacks of using an internal reference reporter in transcription assays[J]. Biotechniques, 2001, 31(3): 528-530, 532.

(编辑:修春)