右旋龙脑促进姜黄素类化合物在 HepG2 细胞中吸收的效果研究

罗晶晶[1]，陈建平[2]，黄滟波[3]，苏健裕[1]

（1.华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2.广东海洋大学食品科技学院，广东湛江 524088）

（3.制浆造纸工程国家重点实验室，广东广州 510640）

摘要：本文运用 Western blot 技术来研究右旋龙脑对细胞膜上 ABC 转运蛋白 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 表达量的影响，并进一步运用流式细胞仪考察右旋龙脑对肝癌细胞 HepG2 细胞膜通透性的影响，探讨其可能作用的物理模型。结果表明：右旋龙脑能够显著下调转运蛋白 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 的表达量，增加 HepG2 细胞的细胞膜通透性，从而提高姜黄素类化合物在 HepG2 细胞内的含量。当用 20 μg/mL NB 前处理 HepG2 细胞 12 h 后再用 20 μM Cur、40 μM DCur 和 40 μM BDCur 分别处理 24 h，细胞内 ABCB1 的蛋白表达量从 0.7、0.9 和 0.7 降低到 0.4、0.6 和 0.5。当用 20 μg/mL NB 前处理 HepG2 细胞 12 h 后再用 40 μM BDCur 处理 24 h，细胞内 ABCC1 和 ABCG2 的蛋白表达量从 1.0 和 0.7 分别降低到 0.5 和 0.3。进一步的流式结果表明，右旋龙脑能够提高 HepG2 细胞的细胞膜通透性，当用 20 μg/mL NB 处理 HepG2 细胞 12h 后，细胞内 YO-PRO-1 的荧光强度从对照组的 20.79 升高到 45.51，同时其荧光强度与 NB 呈浓度依赖性。

关键词：右旋龙脑；姜黄素类化合物；细胞膜通透性；物理模型

文章篇号：1673-9078(2016)11-48-55 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.008

Effect of d-Borneol on Promoting the Absorption of Curcuminoids in HepG2 Cells

LUO Jing-jing[1], CHEN Jian-ping[2], HUANG Yan-bo[3], SU Jian-yu[1]

(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

(3. state key laboratory of pulp and paper engineering, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Western blotting was used to study the impact of d-borneol on the expression of ABC transporter proteins ABCB1, ABCC1, and ABCG2 in the cell membrane. Furthermore, flow cytometry was used to examine the impact of d-borneol on the membrane permeability of HepG2 cells, and a possible physical model for the action of d-borneol was investigated. The results showed that d-borneol significantly downregulated the expression levels of the transport proteins ABCB1, ABCC1, and ABCG2, and increased HepG2 cell membrane permeability, thus improving the absorption of curcuminoids. When HepG2 cells were pretreated with 20 μg/mL d-borneol for 12 h, followed by 24-h treatment using 20 μM curcumin (Cur), 40 μM demethoxycurcumin (DCur), and 40 μM bisdemethoxycurcumin (BDCur), respectively, the expression levels of ABCB1 in cells reduced from 0.7, 0.9, and 0.7 to 0.4, 0.6, and 0.5, respectively. When HepG2 cells were pretreated with 20 μg/mL d-borneol for 12 h, followed by 24-h treatment using 40 μM BDCur, the expression levels of ABCC1 and ABCG2 in the cells were reduced from 1.0 to 0.7 and from 0.5 to 0.3, respectively. Further flow cytometric analysis indicated that d-borneol could improve the membrane permeability of the HepG2 cell. When HepG2 cells were pretreated with 20 μg/mL d-borneol for 12 h, the fluorescence intensity of YO-PRO-1 in the cells increased from 20.79 (control group) to 45.51, and the fluorescence intensity was positively correlated with the concentration of d-borneol.

Key words: d-borneol; curcuminoids; membrane permeability; physical mode

收稿日期：2015-12-11

基金项目：广东省自然科学基金面上项目(2014A030313265)；广东省扬帆计划项目（201312H05)；广东省科技计划项目(2015A020209020，2015A020209036)；华南理工大学中央高校基本科研业务费资助。作者简介：罗晶晶(1992-)，女，硕士研究生，研究方向：糖类物质及其药物制备与生物利用；通讯作者：苏健裕(1979-)，男，副研究员，博导，研究方向：糖类物质及其药物制备与生物利用

原发性肝癌，俗称“肝癌”，是世界上第五大常见的恶性肿瘤，其死亡率高居所有癌症中第三位[1]。据统计，全世界每年新增肝癌患者人数超过 100 万，居恶性肿瘤第五位。目前，针对肝癌的治疗手段仍然很匮乏，因此，寻找和开发一种行之有效的药物和方法来有效的预防和控制癌症成为全球公共问题，天然植物中的天然活性物质由于其具有良好的抗肿瘤作用，因而成为抗肿瘤药物研究的一个重要领域。

右旋龙脑（Natural borneol，NB）是从龙脑樟树中提取出来的一种单萜类天然小分子化合物，作为一种食用香料和较高价值的医用原料，其广泛应用于食品和药品工业中[2]。研究表明，右旋龙脑具有较强的抗氧化、抗炎和抗肿瘤功效，是一种有效的渗透促进剂，能有效的提高药物透过皮肤、消化道黏膜、鼻粘膜和眼角膜，提高药物的生物利用率[3]，成为近年来研究的热点。ABC 转运蛋白是一大类跨膜蛋白，其主要功能是利用 ATP 水解产生的能量将与其结合的底物转出质膜，目前研究较多的 ABC 药物转运蛋白主要包括 P-糖蛋白（P-glycoprotine，P-gp 或 ABCB1）、多药耐药蛋白 1（multidrug resistance protine，MRP 或 ABCC1）和米拖蒽醌耐药蛋白（mitoxantrone resistance protein，MXR 或 ABCG2）三种。研究表明，肿瘤细胞的多药耐药性（Multidrug resistance，MDR）是化疗失败的主要原因，其中，MDR 与细胞膜上 P-糖蛋白的表达密切相关[4]。陈艳明等发现右旋龙脑可以通过抑制多药耐药性（MDR）基因的表达来影响 P-糖蛋白的转运功能，促进药物的吸收和提高生物利用度[5]。樊岚岚等认为其主要的促透作用机理是它能使角膜上皮细胞的细胞膜上的磷脂双分子层运动更加有序，从而有效的改善皮肤角膜上皮细胞的细胞膜通透性，促使药物通过生物膜[6]。

姜黄素类化合物是一种从姜黄中提取出来的多酚类化合物，是一种常用的天然色素和调味品，研究表明，它具有较强的抗肿瘤活性[7]。然而，姜黄素类化合物难溶于水，且存在于食品中的姜黄素类化合物被人体吸收后生物利用度较低，因此其应用范围及应用价值受到极大的限制，难以发挥应有的抗肿瘤作用。Zhou 等人报道 0.2 mg/mL 右旋龙脑能使木通皂苷 D 回肠渗透率提高 1.54 倍[8]。Lu 等人报道 200 μg/mL 右旋龙脑可以促进京尼平苷（geniposide）在鼻腔中的吸收提高 1.4 倍并呈浓度依赖性[9]。然而，目前对于右旋龙脑促进抗癌药物吸收效果的研究仍少有报道。因此，本文选取了在食品中作为食用香精的右旋龙脑作为增敏剂，考察其与姜黄素类化合物共同作用时对肿瘤细胞生长状态的影响，阐明右旋龙脑促进姜黄素类化合物吸收的作用机理，进一步的丰富右旋龙脑促进药物吸收的理论。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

姜黄素（Cur）标准品，去甲氧基姜黄素（DCur）标准品，双去甲氧基姜黄素（BDCur）标准品和胰蛋白酶（Trypsin）均购自 Sigma 公司；右旋龙脑（NB）标准品购自广东嘉应制药股份有限公司；DMEM，胎牛血清，青霉素和链霉素均购于美国 Hyclone 公司；ECL 发光液购自美国 Millipore 公司；YO-PRO-1 购自美国 Molecular Probes 公司；PBS 分析纯购自广州齐云生物技术有限公司；Trition X-100 分析纯购自美国 Sigma 公司；细胞裂解液 RIPA 购自美国 Cell Signaling Technology 公司；HepG2 肝癌细胞株购自美国 American Type Culture Collection (Manassas，VA)公司。

1.2 仪器与设备

PowerPac 系列 BIO-RAD 电泳仪和 Mini Protean Tetra System BIO-RAD 电泳槽，美国 Bio-Rad 公司；AX-II X-暗盒，广东粤华医疗器械有限公司；ELX800 荧光酶标仪，美国 Bio-Tek 公司；TS100 倒置显微镜，日本 Nikon 公司；Beckman Gallios 流式细胞仪，美国 Beckman Coulter 公司；BP301S 电子天平，德国 Sartorius 公司；细胞刮刀，广州洁特生物过滤制品有限公司。

1.3 细胞培养

HepG2复苏后培养在含10%胎牛血清，100 U/mL 青霉素和50 U/mL链霉素的DMEM完全培养基中。细胞置于培养箱中培养(37 ℃，5% CO_2)，根据细胞的生长状态传代，取对数生长期细胞用于以下的各个实验。

1.4 细胞内姜黄素类化合物含量的测定

1.4.1 溶液的配制

（1）NB 储备液的配制：用电子天平称取 0.032 g NB 于 EP 管中，加入 1 mL DMSO，配成浓度为 0.032 g/mL 的 NB 储备液，用锡纸包好，放于 4 ℃冰箱。

（2）Cur 储备液的配制：用电子天平称取 0.0118 g Cur 于 EP 管中，加入 1 mL DMSO，配成浓度为 0.032 mol/L 的 Cur 储备液，用锡纸包好，放于 4 ℃冰箱。

（3）DCur 储备液的配制：用电子天平称取 0.0108 g DCur 于 EP 管中，加入 1 mL DMSO，配成浓度为 0.032 mol/L 的 DCur 储备液，用锡纸包好，放于 4 ℃

冰箱。

（4）BDCur 储备液的配制：用电子天平称取 0.0099 g BDCur 于 EP 管中，加入 1 mL DMSO，配成浓度为 0.032 mol/L 的 BDCur 储备液，用锡纸包好，放于 4 ℃冰箱。

1.4.2 姜黄素化合物的标准曲线测定

将 Cur 储备液，DCur 储备液和 BDCur 储备液用蒸馏水稀释到浓度分别为 1.25、2.5、5、10、20、40、80 μM 的 Cur、DCur 和 BDCur。然后，分别取上述不同浓度的 Cur、DCur 和 BDCur 溶液以每孔 100 μL 加入 96 孔板中，再加入含 1% Trition X-100 的 0.1M NaOH 溶液 100 μL，振荡 10 min 后，在荧光酶标仪（激发波长为 425 nm，发射波长为 545 nm）下进行测定[10]。以姜黄素类化合物的浓度为横坐标，姜黄素类化合物在上述波长下的吸光值为纵坐标作图，经线性拟合后，得到相应的姜黄素类化合物标准曲线。

1.4.3 姜黄素化合物的含量测定

将 NB 储备液、Cur 储备液、DCur 储备液和 BDCur 储备液用细胞培养工作液稀释到浓度分别为 20 μg/mL NB 工作液、20 μM Cur 工作液、40 μM DCur 工作液和 40 μM BDCur 工作液。参考 Huang 等人的方法进行操作[11]。取对数生长期的 HepG2 细胞，经胰酶消化、计数，以 8×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔培养板，置于培养箱中（37 ℃，5% CO_2）培养 24 h 后。分别加入 20 μg/mL NB 工作液、20 μM Cur 工作液、40 μM DCur 工作液、40 μM BDCur 工作液、20 μg/mL NB 工作液+20 μM Cur 工作液、20 μg/mL NB 工作液+40 μM DCur 工作液和 20 μg/mL NB 工作液+40 μM BDCur 工作液分别处理 0.5 h、1 h、2 h 和 4 h，抽去细胞培养工作液，加入 1 mL PBS 清洗细胞 3 次除去细胞外的 NB 和姜黄素类化合物，然后，加入 200 μL 含 1% Trition X-100 的 0.1M NaOH 溶液裂解细胞，振荡 10 min 后，在荧光酶标仪（激发波长为 425 nm，发射波长为 545 nm）下进行姜黄素类化合物含量的测定。进行三次重复实验，将所得到的吸光度值代入到相应的标准曲线中得出相应的浓度，根据公式（1）计算单个细胞内姜黄素类化合物的含量。

$$m=(C\times W\times 0.2\times 10^{-3})\div 8\times 10^4 \quad (1)$$

其中，m 代表姜黄素类化合物的含量（μg/10^7）；C 代表姜黄素类化合物的浓度；W 为姜黄素类化合物的相对分子质量。

说明：NB 工作液+Cur/DCur/BDCur 工作液表示先加 NB 工作液培养 12 h 后再分别加 Cur 或 DCur 或 BDCur 工作液。

1.5 蛋白质样品的准备

（1）收蛋白：取对数生长期的 HepG2 细胞进行计数，以 10×10^4 的细胞密度接种于 10 mL 培养皿中，培养 24 h 后，进行加药操作。其中对照组不加药，NB 组加 NB 储备液使其终浓度为 20 μg/mL NB，Cur 组加 Cur 储备液使其终浓度为 20 μM Cur，DCur 组加 DCur 储备液使其终浓度为 40 μM DCur，BDCur 组加 BDCur 储备液使其终浓度为 40 μM BDCur，NB+Cur 组先加 NB 储备液使其终浓度为 20 μg/mL NB 处理 12 h 后再加 Cur 储备液使其终浓度为 20 μM Cur，NB+DCur 组先加 NB 储备液使其终浓度为 20 μg/mL NB 处理 12 h 后再加 DCur 储备液使其终浓度为 40 μM DCur，NB+BDCur 组先加 NB 储备液使其终浓度为 20 μg/mL NB 处理 12 h 后再加 BDCur 储备液使其终浓度为 40 μM BDCur。加药后，将培养皿放入培养箱中培养 24 h，然后抽掉细胞培养工作液，用 PBS 洗二次，抽掉 PBS，将培养皿放入 4 ℃冰箱斜立着静置 5 min 后，抽掉剩余的 PBS，加入一定量的细胞裂解液 RIPA（视细胞数量而定），放入 4 ℃冰箱中静置 15 min，取出培养皿置于碎冰上，然后用刮刀将细胞从培养皿中刮下，放于 ep 管中，在-20 ℃冰箱中过夜。

（2）振蛋白：次日，从-20 ℃冰箱中取出盛有细胞的 ep 管，插入碎冰中，在振荡器上每隔 5 min 振荡一次，连续振荡 2 h，然后将 ep 管放入预先预冷至 4 ℃的离心机中进行离心，转速为 12000 r/min，离心时间为 12 min。离心后取上清液放入新的 ep 管中，做好标记。

（3）蛋白质浓度的测定：本实验采用 BCA 蛋白浓度试剂盒来测定样品的蛋白浓度，用细胞裂解液来调整各样品的蛋白浓度。

（4）煮蛋白：测定后的蛋白样品补加等体积的 loading buffer，置于 95 ℃的微孔振荡器上加热 5 min，冷却至室温，在-20 ℃冰箱中保存备用。

1.6 Western blot 检测 ABC 家族蛋白

Western blot的原理是：Western blotting是将获得的蛋白质样品通过SDS-PAGE聚丙酰胺凝胶电泳对不同分子量的蛋白质进行分离，并通过转移电泳将凝胶上分离得到的蛋白质转印到固相支持物上，用抗靶蛋白的非标记抗体（一抗）与转印后膜进行杂交，使其与膜上的靶蛋白特异性结合，再与辣根过氧化物酶标记过的二抗结合，然后和ECL试剂反应，经X-光片曝光，显影等一系列反应后，检测蛋白质等生物大分子。其具体步骤如下：

（1）电泳前的准备工作：首先，在玻璃板上喷适量的无水乙醇，用干净的擦镜纸擦拭玻璃板，然后将

玻璃板组装到电泳装置上，用已经配制好的10%分离胶，在两玻璃板之间进行灌胶，最后用1 mL异丙醇压平液面30 min，待分离胶凝固后，倒掉异丙醇，并用虑纸吸干残余的异丙醇，用已经配制好的4%浓缩胶，在两玻璃板之间进行灌胶，然后快速插入梳子，待浓缩胶凝固后，用湿的卫生纸盖好，在4 ℃冰箱中保存备用。

（2）SDS-PAGE：取出电泳装置，放入电泳槽中，拔去梳子，向电泳槽内加入适量的电泳缓冲液（Running buffer），按每孔上样量为40 μg计算上样体积，将已变性蛋白样品加入凝胶孔道，以蛋白maker为标记。擦好电源线，开启电泳仪，先设置电压为70 V，跑40 min的浓缩胶，待浓缩胶压平到一条线时，再将电压调为110 V，跑75 min的分离胶。

（3）转膜：截取面积为6×9 cm^2大小的PVDF膜，将PVDF膜放于冰甲醇中浸泡5 min使其活化。将跑完SDS-PAGE电泳的胶从玻璃板上刮下来，除去浓缩胶，将剩余的分离胶放于转移缓冲液(Trans buffer)中，再将黑板、海绵、滤纸等放入Trans buffer中浸泡，在Trans buffer中，按照在黑板上依次放入海绵、两层滤纸、分离胶、PVDF膜（正面贴胶，凹面为正面）、两层滤纸、海绵和白板的顺序叠好，赶走气泡后夹好，然后放入电泳装置中，加入Trans buffer，再放入冰袋以防温度过高。设置转膜电压为110 V，转膜时间为75 min。

（4）抗体孵育：转膜结束后，拆卸电泳装置，取出PVDF膜，用丽春红染色5 min，观察是否有蛋白条带，然后用蒸馏水洗3次，将PVDF膜放入5%脱脂牛奶封闭液中封闭2 h后，用TBST洗膜3次，每次5 min，除去封闭液。根据maker的分子量，将膜剪成不同分子量的条带放入到已标记到相应抗体的盒子中，加入相应的目的蛋白抗体（一抗），振荡过夜12 h。次日，回收一抗，用TBST洗3次，每次振荡5 min。然后加入辣根过氧化物酶（二抗）孵育2 h后，回收二抗，用TBST洗3次，每次振荡5 min。

（5）显色反应：将除去二抗的PVDF膜，贴在透明薄膜上，并做好相应的标记，在PVDF膜上加入适量的发光液（发光液由ELC发光试剂盒中的A液与B液以1:1的比例混合得到）。反应一定时间后，将多余的发光液回收，然后将薄膜放于暗盒中，其上覆盖X光胶片，在暗盒中反应一段时间后，取出胶片放入洗片机中进行显影。用MPNavigator EX 2.0扫描仪扫描胶片，并保存图片。用Quantity One软件计算其条带的灰度值。以*β*-actin为内参。

1.7 YO-PRO-1 染色检测细胞膜通透性

取对数生长期的HepG2细胞，经胰蛋白酶消化后计数，以2×10^4个细胞/孔接种于6 cm皿中，置于培养箱中(37 ℃，5% CO_2)培养24 h后取出，在对照组中不加右旋龙脑，在右旋龙脑组中分别加入不同浓度的右旋龙脑（20 μg/mL和80 μg/mL），再在培养箱中培养12 h，然后消化收集各组细胞，PBS洗2次，加入荧光探针YO-PRO-1使其终浓度为0.5 μg/mL，室温避光染色15 min后，用流式细胞仪检测细胞内YO-PRO-1荧光强度的变化。其中激发波长为488 nm，发射波长为530 nm，流式细胞仪中每次计数约10^4个细胞。

1.8 数据分析

以上各项指标均重复 3 次，取其平均值，数据采用 origin 8.0 进行方差分析。与空白对照组相比，p<0.05 用*表示，p<0.01 用**表示。

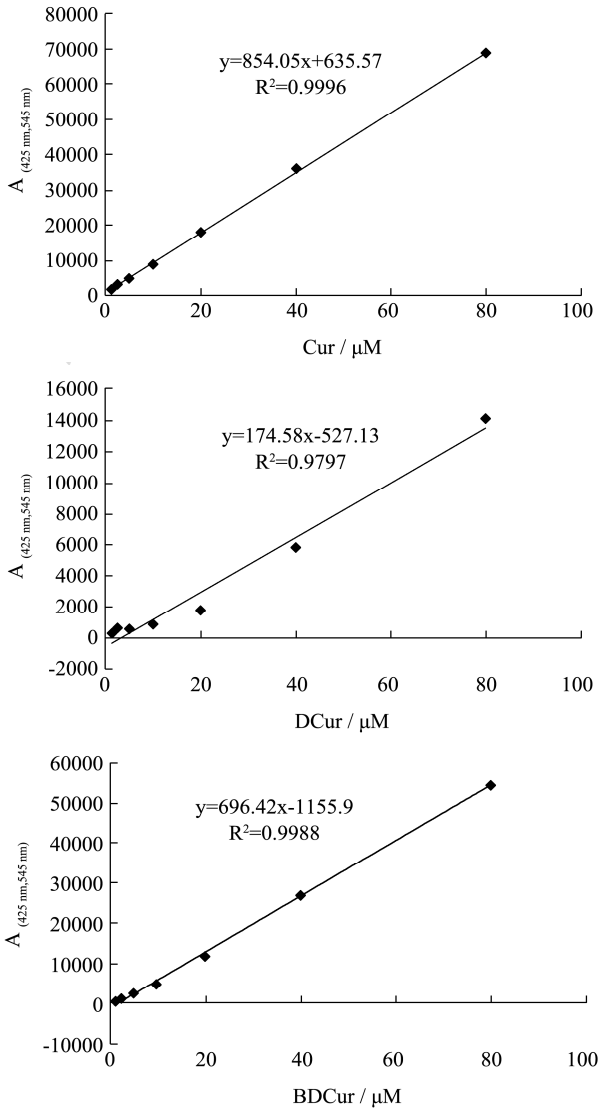


图1 姜黄素类化合物的标准曲线

Fig.1 Standard curve of curcuminoids

2 结果与讨论

2.1 姜黄素类化合物的标准曲线

为了测定姜黄素类化合物在细胞内的含量，首先建立姜黄素类化合物的标准曲线，如图1所示。由图1可知，姜黄素类化合物的标准曲线分别为：

Cur：y=854.05x+635.57，R=0.9998 （2）

DCur：y=174.58x-527.13，R=0.9898 （3）

BDCur：y=696.42x-1155.9，R=0.9994 （4）

其中，y表示姜黄素类化合物的吸光值，x表示姜黄素类化合物的浓度。

由上述三个标准方程（2）、（3）、（4）的R值可知，姜黄素类化合物标准曲线的线性关系良好。

2.2 细胞内姜黄素类化合物的含量测定

细胞吸收速率是判定抗癌药物活性的一个重要指标[12]。因此，本文通过荧光光谱法和荧光显微镜对细胞内姜黄素类化合物的含量进行了定量和定性分析。为了考察不同处理方式下 HepG2 细胞中姜黄素类化合物的吸收情况，用单独的 NB、单独的姜黄素类化合物和NB联合姜黄素类化合物对HepG2细胞分别孵育0.5 h、1 h、2 h和4 h后，在荧光显微镜下进行观察，然后运用 Trixton-X 裂解液裂解细胞，在激发波长为425 nm和发射波长为545 nm处对姜黄素类化合物进行荧光定量检测。

实验结果（见图 2）表明，相比对照组，用单独的NB处理HepG2细胞后，其细胞内姜黄素类化合物的含量随时间的增加没有出现明显的变化（见图2中的A、B和C）；用单独的姜黄素类化合物处理HepG2细胞后，其细胞内姜黄素类化合物的含量随时间的增加出现一定程度的提高（见图2中的a、b和c）。然而，相比单独的姜黄素类化合物处理，NB 联合姜黄素类化合物处理HepG2细胞后，其细胞内姜黄素类化合物的含量随处理时间的增加出现显著的提高。例如，相比单独的Cur处理，NB与Cur联合处理0.5 h、1 h、2 h和4 h后，其细胞内Cur的含量分别为0.21、0.92、4.15、4.67 μg/(10^7个)，是单独Cur处理[0.19、0.55、1.13、3.02 μg/(10^7个)]的1.2、1.6、3.5和1.5倍（见图2中的a）；相比单独的DCur处理，NB与DCur联合处理0.5 h、1 h、2 h和4 h后，其细胞内DCur的含量分别为0.45、0.40、1.39、1.68 μg/(10^8个)，是单独DCur处理[0.34、0.35、0.76、1.39 μg/(10^8个)]的1.3、1.1、1.8和1.2倍（见图2中的b）；相比单独的BDCur处理，NB与BDCur联合处理0.5 h、1 h、2 h和4 h后，其细胞内BDCur的含量分别为0.53、0.59、0.68、0.74 μg/(10^8个)，是单独BDCur处理[0.41、0.36、0.48、0.57 μg/(10^8个)]的1.3、1.6、1.4和1.3倍（见图2中的c）。这可能与NB前处理HepG2细胞后能提高细胞膜的通透性和抑制流出泵的运输有关[13]。因此，运用NB前处理 HepG2 细胞能够显著增强姜黄素类化合物的细胞吸收，从而增强其抗肿瘤活性。

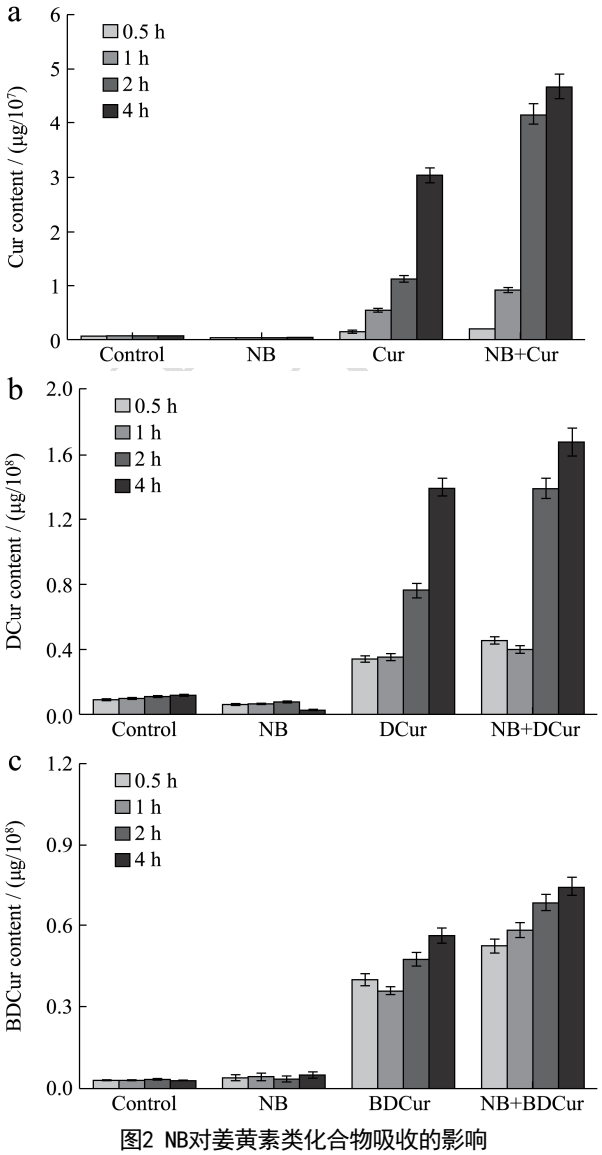


图2 NB对姜黄素类化合物吸收的影响

Fig.2 Effect of d-borneol on the cellular uptake of curcuminoids

2.3 右旋龙脑联合姜黄素类化合物对ABCB1耐药蛋白的影响

ABCB1，又称P-糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp），最早是由Juliano和Ling等在1976年研究MDR表型的中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO）时发现的[14]。研究表明，ABCB1具有ATP依赖性的药物外排泵功能，可以将药物泵出细胞膜外而降低胞内药物浓度，从而形

成耐药现象[15]。目前，ABCB1 是一种研究最多、最早和最深入的耐药基因表达蛋白。研究发现，80%的肿瘤耐药性发生是由 ABCB1 介导。

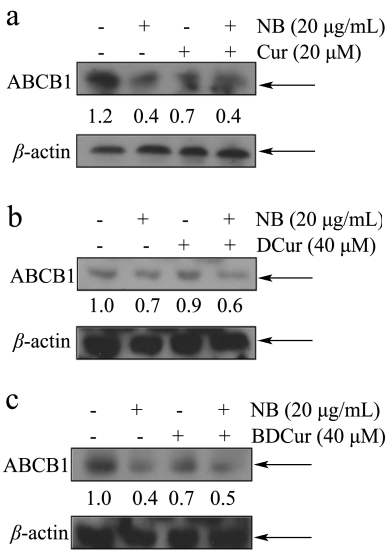


图3 NB联合姜黄素类化合物对ABCB1蛋白表达量的影响

Fig.3 Effect of a combination of d-borneol and curcuminoids on ABCB1 protein expression

由图 3 可知，添加单独的 Cur、DCur 和 BDCur 后，ABCB1 的蛋白表达量均出现下降，从对照组的 1.0 分别下降到 0.7、0.9 和 0.7，说明姜黄素类化合物能够抑制 ABCB1 蛋白的表达。但是相比单独的姜黄素类化合物处理，当用 20 μg/mL NB 前处理 HepG2 细胞 12 h 后再用 20 μM Cur、40 μM DCur 和 40 μM BDCur 分别处理 24 h，细胞内 ABCB1 的蛋白表达量从单独的姜黄素类化合物处理时的 0.7、0.9 和 0.7 分别降低到 0.4、0.6 和 0.5。实验结果表明，NB 预处理后能显著抑制 HepG2 细胞中 ABCB1 的蛋白表达量。

2.4 右旋龙脑联合姜黄素类化合物对ABCC1和ABCG2耐药蛋白的影响

ABCC1 是 ABC 超家族转运蛋白中的另一个重要转运蛋白，其最早是从耐多柔比星(阿霉素)小细胞肺癌细胞系 H69/AR 中发现的[16]。ABCG2 蛋白，又称乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein，BCRP)，最早是由 Doyle 等在 1998 年首次从耐药的乳腺癌细胞中分离出来的[17]。

由图 4 可知，添加单独的 BDCur 后，ABCC1 的蛋白表达量出现上升，从对照组的 0.6 提高到 1.0，而 ABCG2 的蛋白表达量出现下降，从对照组的 1.0 下降到 0.7。但是相比单独的 BDCur 处理，当用 20 μg/mL NB 前处理 HepG2 细胞 12 h 后再用 40 μM BDCur 处理 24 h，细胞内 ABCC1 和 ABCG2 的蛋白表达量从单独 BDCur 处理的 1.0 和 0.7 分别降低到 0.5 和 0.3。实验结果表明，NB 预处理后能显著抑制 HepG2 细胞中 ABCC1 和 ABCG2 的蛋白表达量。

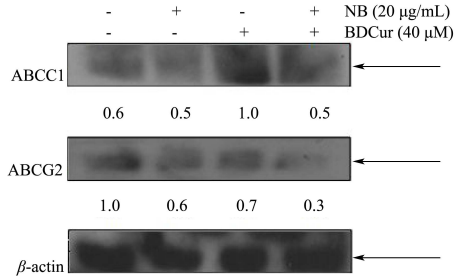


图4 右旋龙脑联合姜黄素类化合物对ABCC1和ABCG2蛋白表达量的影响

Fig.4 Effect of a combination of d-borneol and curcuminoids on ABCC1 and ABCG2 protein expressions

2.5 右旋龙脑对细胞通透性的影响

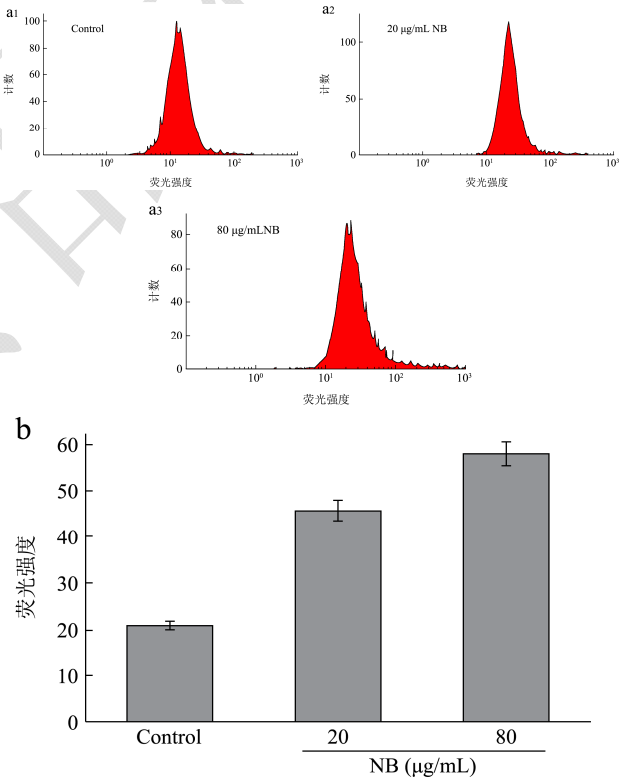


图5 NB对HepG2细胞YO-PRO-1染色荧光强度的影响

Fig.5 Effect of d-borneol on the fluorescence intensity of YO-PRO-1 in HepG2 cells

注：a，流式细胞仪检测YO-PRO-1荧光强度；b，NB对YO-PRO-1荧光强度的影响。

YO-PRO-1 是一种检测细胞受损时细胞膜通透性变化的荧光探针，当细胞是活细胞时，YO-PRO-1 无法穿过细胞膜进入细胞。当细胞处于早期凋亡或坏死状态时，其细胞膜通透性增加，允许 YO-PRO-1 进入

细胞，与核酸结合，发出较强的绿色荧光。研究表明，NB 作用于 HepG2 细胞后，细胞并未出现明显的损伤，可以认为细胞仍然是正常的活细胞[18]，因此其细胞膜是完整的。如果 NB 对细胞膜通透性没有影响，由于细胞是活细胞，YO-PRO-1 无法穿过，其荧光强度与空白对照组的荧光强度相近；如果 NB 能够提高细胞膜的通透性，允许 YO-PRO-1 进入 HepG2 细胞，其荧光强度则会升高。因此，YO-PRO-1 可以作为荧光染料来考察 NB 对细胞膜通透性的影响。

由图 5 的 a 和 b 可知，相比对照组而言，当用 20 μg/mL NB 处理 HepG2 细胞 12 h 后，细胞内 YO-PRO-1 的荧光强度从对照组的 20.79 升高到 45.51，当 NB 的处理浓度升高到 80 μg/mL 时，细胞内 YO-PRO-1 的荧光强度也进一步的增强，从 45.51 提高到 57.68。实验结果表明，NB 可以提高 HepG2 细胞膜的通透性，促使 YO-PRO-1 进入细胞。

2.6 右旋龙脑促进姜黄素类化合物吸收的物理模型

根据上述的研究结果，本文提出了一种 NB 促进药物吸收作用的物理模型。由图 6 可知，姜黄素类化合物虽然能够降低 ABCB1 耐药蛋白的表达，却不能阻止其被其他耐药蛋白泵出。然而，NB 能够显著的抑制 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 三种耐药蛋白的表达，提高细胞膜的通透性，促进姜黄素类化合物在 HepG2 细胞中的吸收，增强姜黄素类化合物的抗肿瘤效应。

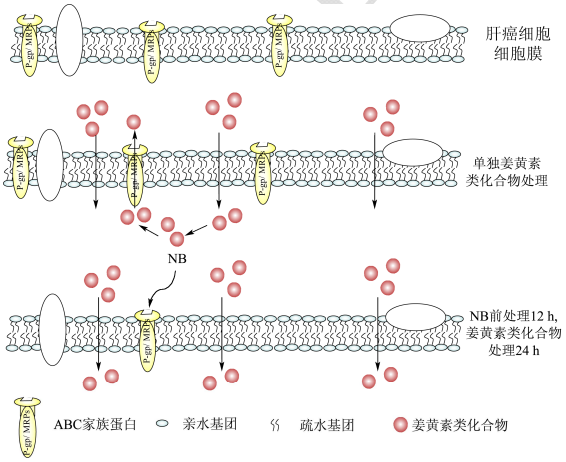


图6 NB促进姜黄素类化合物吸收的物理模型

Fig.6 Physical model for the effect of d-borneol on promoting the cellular uptake of curcuminoids

3 结论

NB 能显著提高姜黄素类化合物在 HepG2 细胞内的吸收，进一步的机理研究表明，右旋龙脑是通过下调 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 的表达量，减少姜黄素类化合物从细胞内流出，和提高 HepG2 细胞的细胞膜通透性，使得更多的姜黄素类化合物进入细胞，这两个方面共同作用来提高姜黄素类化合物在细胞内的含量。

参考文献

[1] Zhou S F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition [J]. Xenobiotica, 2008, 38(7-8): 802-832

[2] Chen J, Su J Y, Li L, et al. A new source of natural d-borneol and its characteristic [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(15): 3440-3447

[3] Zhou Y, Li W, Chen L, et al. Enhancement of intestinal absorption of akebia saponind by borneol and probenecid in situ and *in vitro* [J]. Environ. Toxicol. Pharmacol., 2010, 29(3): 229-234

[4] 马云芳,梁国鲁,裴得胜,等.ABC 转运蛋白研究的新进展[J].生物技术通报,2008,5:35-41
MA Yun-fang, LIANG Guo-lu, PEI De-sheng, et al. The new progress in the study of ABC transporters [J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 5: 35-41

[5] 陈艳明,王宁生.冰片对 P-糖蛋白的影响[J].中药新药与临床药理,2003,2:96-99
CHEN Yan-ming, WANG Ning-sheng. Synthetic borneol on the effect of p-glycoprotein [J]. Chinese Herbal Medicine and Clinical Pharmacology, 2003, 2: 96-99

[6] 樊岚岚,唐由之,卢景,等.冰片对兔角膜上皮细胞膜促渗透作用的实验研究[J].中国中医眼科杂志,1998,8(2):67-69
FAN Lan-lan, TANG You-zhi, LU Jing, et al. Borneol on rabbit corneal epithelial cell membranes and promote osmosis experiment research [J]. Journal of Traditional Chinese Ophthalmology, 1998, 8(2): 67-69

[7] 陈建平,李琳,苏健裕.姜黄素的抗氧化及抗肿瘤活性研究[J].现代食品科技,2014,30(12):11-15
CHEN Jian-ping, LI Lin, SU Jian-yu. Study on antioxidant and antiproliferative activities of curcumin [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 11-15

[8] Zhou Y, Li W, Chen L, et al. Enhancement of intestinal absorption of akebia saponin D by borneol and probenecid in situ and *in vitro* [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2010, 29(3): 229-234

[9] Lu Y, Chen X, Du S, et al. The in situ and *in vivo* study on enhancing effect of borneol in nasal absorption of Geniposide

in rats [J]. Arch Pharm. Res., 2010, 33(5): 691-696

[10] Chen J, Li L, Su J Y, et al. Synergistic apoptosis-inducing effects on A375 human melanoma cells of natural borneol and curcumin [J]. Plos One, 2014, 9(6): e101277

[11] Chuah L H, Roberts C J, Billa N, et al. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014, 116: 228-236

[12] He L, Huang Y, Zhu H, et al. Cancer-Targeted monodisperse mesoporous silica nanoparticles as carrier of ruthenium polypyridyl complexes to enhance theranostic effects [J]. Advanced Functional Materials, 2014, 24(19): 2754-2763

[13] Shen Q, Li X, Li W, et al. Enhanced intestinal absorption of daidzein by borneol/menthol eutectic mixture and microemulsion [J]. AAPS Pharm. Sci. Tech., 2011, 12(4): 1044-1049

[14] Juliano R L, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 455(1): 152-162

[15] Zhou S F. Structure, function and regulation of p-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition [J]. Xenobiotica, 2008, 38(7-8): 802-832

[16] Loe D W, Deeley R G, Cole S P. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP [J]. European Journal of Cancer, 1996, 32A(6): 945-957

[17] Doyle L A, Yang W D, Abruzzo L V, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, 1998, 95(26): 15665-15670

[18] Chen J, Li L, Su J Y, et al. Proteomic analysis of G2/M arrest triggered by natural *Borneol/Curcumin* in HepG2 cells, the importance of the reactive oxygen species-p53 pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(28): 6440-6449

现代食品科技