

生理病理状态下苈草活性物质对转运体表达的影响

罗秋芸^{1a,1b,2}, 孙佳^{1a}, 刘东辉^{1a,1b}, 李勇军^{1a}, 薛维娜^{1a,1b,1c*}

(1. 贵州医科大学 a. 药学院 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室; b. 贵州省现代中药创制全省重点实验室民族药与中药开发应用教育部工程研究中心; c. 医药卫生管理学院, 贵州 贵安新区 561113;
2. 贵州省第三人民医院药剂科, 贵州 贵阳 550008)

摘要: 苈草具有明确的抗心肌缺血作用, 且其活性成分在生理和病理状态下的代谢过程存在显著差异, 鉴于转运体在心肌缺血病理过程和外源物代谢中的作用, 本研究拟探讨苈草活性物质在生理及病理状态下对大鼠肝脏转运体表达的影响。采用网络药理学筛选心肌缺血相关靶点, 利用蛋白质相互作用(PPI)分析、基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 结合文献调研, 筛选与心肌缺血相关的肝脏转运体及通路; 运用分子对接技术预测苈草活性成分与转运体调控蛋白的结合; 并建立大鼠心肌缺血模型, 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测苈草提取物对肝脏转运体表达的影响。结果显示, 网络药理学分析发现428个心肌缺血与转运蛋白的共同靶基因; PPI分析筛选出36个节点, GO和KEGG分析表明这些靶点显著富集于炎症反应、ABC转运蛋白及PPAR信号通路等, 结合文献调研, 发现BCRP、MRP、P-gp等7个肝脏转运体与心肌缺血相关; 分子对接提示苈草活性成分与转运体上游调控蛋白具有较高亲和力。动物实验表明, 在正常大鼠中苈草提取物可上调MRP1、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2和P-gp的表达, 而在心肌缺血模型大鼠中则下调BCRP、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2和P-gp的蛋白表达。结果表明, 在生理病理状态下, 苈草活性成分具有调控肝脏转运体的能力, 其机制可能与活性成分结合肝脏转运体上游调控蛋白有关。

关键词: 苈草; 心肌缺血; 转运体; 网络药理学; 分子对接; 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应; 蛋白免疫印迹法

中图分类号: R96 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-4026(2026)05-0009-12

开放科学(资源服务)标志码(OSID):



Effects of active constituents from *Polygonum orientale* L. on the expression of transporters under physiological and pathological conditions

LUO Qiuyun^{1a,1b,2}, SUN Jia^{1a}, LIU Donghui^{1a,1b}, LI Yongjun^{1a}, XUE Weina^{1a,1b,1c*}

(1. a. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, School of Pharmacy; b. Guizhou Provincial Key Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicine Creation, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine (Ministry of Education); c. School of Pharmaceutical and Health Administration, Guizhou Medical University, Gui'an New Area 561113, China; 2. Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550008, China)

收稿日期: 2025-08-29 修回日期: 2025-11-05

基金项目: 贵州省科技重大专项项目(黔科合重大专项字[2024]015); 贵州省现代中药创制全省重点实验室(黔科合平台 ZSYS[2025]019)

作者简介: 罗秋芸(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: luoqiuyun817@163.com

* 通信作者, 薛维娜, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药理学。E-mail: xwn824@126.com

Abstract : *Polygonum orientale* L. has an anti-myocardial ischemia effect, and the metabolic processes of its active constituents exhibits considerable differences under physiological and pathological conditions. Considering the role of transporters in the pathological process of myocardial ischemia and the metabolism of xenobiotics, this study aims to investigate the effects of the active constituents in *Polygonum orientale* L. on the expressions of liver transporters in rats under physiological and pathological conditions. Network pharmacology was used to screen myocardial ischemia-related targets, followed by protein-protein interaction (PPI) analysis, Gene Ontology (GO), and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses. Based on a literature review, hepatic transporters and pathways related to myocardial ischemia were identified. Moreover, molecular docking was used to predict the binding affinity between the active constituents of *Polygonum orientale* L. and regulatory proteins of transporters. A rat model of myocardial ischemia was established, and the effects of *Polygonum orientale* L. extract on the expressions of hepatic transporters were detected using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and western blot. Results revealed that network pharmacology analysis identified 428 common target genes associated with myocardial ischemia and transport proteins. PPI analysis yielded 36 key nodes, and GO and KEGG analyses revealed substantial enrichment of these targets in inflammatory responses, ABC transporters, PPAR signaling pathway, among others. Based on the literature review, seven hepatic transporters, including BCRP, MRP, and P-gp, were observed to be associated with myocardial ischemia. Molecular docking suggested high binding affinity between active constituents of *Polygonum orientale* L. and upstream regulatory proteins of transporters. Furthermore, animal experiments revealed that *Polygonum orientale* L. extract upregulated the expressions of MRP1, MRP2, OATP2, OCT1, OCT2, and P-gp in normal rats, and downregulated the protein expressions of BCRP, MRP2, OATP2, OCT1, OCT2, and P-gp in rats with myocardial ischemia. These results indicate that the active constituents of *Polygonum orientale* L. can regulate hepatic transporters under physiological and pathological conditions, and their mechanism may be related to their binding to upstream regulatory proteins of hepatic transporters.

Key words : *Polygonum orientale* L.; myocardial ischemia; transporters; network pharmacology; molecular docking; qRT-PCR; Western blot

心肌缺血(myocardial ischemia, MI)是指心脏的血液灌注减少,导致心肌氧气供应不足,心肌能量代谢不正常,无法维持心脏正常工作的一种病理状态^[1-2]。MI 可导致心肌细胞坏死或凋亡,可引起心肌功能障碍,甚至诱发心绞痛与心力衰竭等凶险病症,是心血管疾病的关键诱发因素之一,时刻威胁着人类的生命健康^[3-4]。

荭草为蓼科植物荭草(*Polygonum orientale* L.)的干燥果穗及带叶茎枝,民间常用于胸痛、胸闷、气短、中风偏瘫(嘴角歪斜)等疾病的治疗^[5]。现代药理学研究表明,荭草具有抗心肌缺血、抗氧化和增加心肌血流量等药理作用^[6]。课题组围绕荭草展开了一系列探索,初步阐明了其抗心肌缺血药效及其物质基础^[7],并且以心肌缺血(MI)病理状态为切入点,阐释了荭草主要活性成分(荭草素、异荭草素、牡荆素、原儿茶酸、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮素)在生理与病理条件下在肠道的吸收及排泄特征。研究表明,荭草活性成分的肠道吸收部位、各肠段的累积吸收量以及尿液、粪便及胆汁中的排泄/累积排泄率在生理和心肌缺血病理状态下具有明显差异。转运体在外源成分的吸收与排泄中起到了重要作用^[8-10],前期预实验也提示荭草活性成分是各转运体底物,且荭草提取物具有调控转运体活性的作用。此外,转运体通过调控脂质代谢、炎症反应、血小板功能、血管内皮稳态及细胞死亡信号通路等,显著影响心肌缺血的病理进展^[11-12]。因此,我们推测荭草活性成分在生理和病理状态下对转运体的表达可能产生不同影响,对其影响的转运体进行研究,可促进荭草抗心肌缺血作用机制的研究。

本研究首先运用网络药理学方法,从数据库中筛选心肌缺血相关靶点,初步揭示了其与转运体之间的潜在关联。然后,通过文献调研与分子对接分析,预测了荭草活性成分与转运体调控蛋白的结合。最后,通过构建心肌缺血动物模型,采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和免疫印迹法(western blot)技术,在生理和病理状态下验证了荭草对肝脏转运体表达的影响。系统阐明了荭草活性成分在心肌缺血病理模型中对转运体的调控作用,不仅为解析荭草药效物质在特定病理条件下的作用机制提供了重要依据,也为荭草的深度开发利用奠定了理论基础。

1 仪器与材料

1.1 实验动物

SPF级 sprague dawley (SD)大鼠 32只,雄性,体质量为 (160 ± 20) g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[动物许可证号 SCXK(京)2023-0001]。大鼠在温度 $(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $(60\pm 10)\%$ 的环境中饲养,饲养条件均严格按照实验动物的要求及规则,实验前适应性饲养1周。动物实验方案经贵州医科大学伦理委员会批准(批件号 2201021)。

1.2 主要药品与试剂

荭草药材购买自贵州省六盘水市,由贵州医科大学刘春花研究员鉴定为蓼科植物荭草的干燥全草。盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)购于上海禾丰制药有限公司(批号 100203),RNAStore 样本保存液购于北京天根生化科技有限公司(批号 DP408-02),Easstep® Super 总 RNA 提取试剂盒购于普洛麦格生物技术有限公司(批号 0000197548),PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(批号 RR047A)、SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂(批号 AK7005)均购于 TaKaRa, PBS 磷酸盐缓冲液(批号 P1003)、甘氨酸(批号 G8200)、SDS(十二烷基硫酸钠,批号 S8010)、Tris(三羟甲基氨基甲烷,批号 T8060)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 PC0020)均购于北京索莱宝科技有限公司,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购于上海生工生物技术有限公司(批号 C631100-0200),PMSF 和 RIPA 裂解液购于大连美仑生物技术有限公司(批号 MA0151),ECL 检测试剂购于上海碧云天生物技术有限公司(批号 P0018S)。

1.3 主要仪器

荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad, 型号 CFX96), Power Pac Basic 型垂直电泳仪(美国 Bio-rad, 型号 1658025), Trans-Blot 型蛋白快速湿转印仪(美国 Bio-rad, 型号 1704150)及 G:BOX 凝胶成像系统(英国 Syngene 公司, 型号 GBOX-Chemi-XL-1.4), 超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司, 型号 WP-UP-LH-10)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

利用 GeneCards、DisGeNET、TTD、OMIM 数据库获取心肌缺血及转运体靶点,将相关靶点输入到 Jvenn (<https://jvenn.toulouse.inra.fr/app/index.html>)以绘制维恩图。随后,将心肌缺血和转运体的重叠靶点上传到 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,用于探究这些重叠靶点之间的关系,分析结果导入到 Cytoscape3.8.2 软件中以可视化关键核心靶点网络。将重叠的目标输入到 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)中进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)。

2.2 分子对接

将荭草活性成分(小分子配体)原儿茶酸、异荭草素、荭草素、牡荆素、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮素等关键词英文名称输入到 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)以获取二维结构。采用密度泛函理论(DFT)计算来优化活性成分的化学结构,并使用 Chem3D 软件将其转换为三维结构。从文献中获得了转运蛋白(BCRP、MRP1、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2 和 P-gp)的上游调控蛋白靶点 HNF4 α 、PPAR α 和 Notch1,从 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心靶点的三维结构。用 AutoDock 软件进行分子对接后,利用 Pymol 软件可视化对接结果。

2.3 荭草提取物的制备

将干燥荭草全株置于 10 倍量水中煎煮 1 h,重复 3 次并合并煎煮液,过滤后浓缩至相对密度为 1.0,后加入无水乙醇调节浓缩液乙醇含量至 65%,搅拌 0.5 h 后静置 12 h,抽滤,收集滤液,浓缩至每 1 mL 含生药 1 g,用水饱和正丁醇萃取 4 次,收集正丁醇层,合并,减压回收正丁醇;正丁醇提取物加 80%乙醇溶解,上聚酰胺

柱,用 8 倍柱体积的 80%乙醇洗脱,收集洗脱液,减压回收乙醇,干燥,得荳草提取物。

2.4 动物分组与造模

32 只 SD 大鼠随机分为正常对照组(正常)、正常给药组(正常 HC-3d)、模型对照组(模型)和模型给药组(模型 HC-3d)。通过皮下注射盐酸异丙肾上腺素建立心肌缺血模型,剂量为 50 mg/kg,每天一次,持续 2 天,正常组大鼠注射等体积的 0.9%氯化钠溶液。模型建立后,正常 HC-3d 组和模型 HC-3d 组给予 3.2 g/kg(高浓度)荳草提取物灌胃,每天两次,连续 3 天;正常组和模型组连续 3 天灌胃等体积 0.9%氯化钠溶液。

2.5 肝脏转运体 RNA 和蛋白的提取

大鼠禁食一夜,术前麻醉后,分离腹腔内脏,采用两步灌流法^[13]清洗肝脏内血液,快速摘除肝脏后,取 50 mg 肝大叶组织放入 RNAStore 样本保存液中,总 RNA 使用 Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒,根据其中的说明书进行提取。另取 50 mg 肝大叶组织,加入 RIPA 裂解液和 PMSF,冰上匀浆,将其放入 4 ℃离心机离心,12 000 r/min 离心 30 min,取上清,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。

2.6 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)分析

特异性引物序列设计见表 1。逆转录反应体系见表 2,采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒,在冰浴上于 1.5 mL 离心管中配置反应体系,轻弹离心管混匀反应体系,低温离心约 5 s 后,置于恒温金属浴上进行反应,程序如下:37 ℃ 15 min;85 ℃ 5 s。反应完毕后,将合成好的 cDNA 于-20 ℃保存备用。使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂,根据表 3 的反应体系,在冰上配制荧光定量 PCR 反应体系 20 μL,加入到专用的八联 PCR 管,每个样品的基因进行 3 个重复反应孔,在 CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行反应。PCR 扩增程序见表 4。

表 1 引物的序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	正向引物	反向引物
<i>BCRP</i>	AGAGAGAAGCCAATAATAGA	CACCAATAATCAGTCCCAGTAT
<i>MRP1</i>	CGACGGGAAGACAAGTTCAT	AGGTTTCCTCTGGTCTCGGT
<i>MRP2</i>	TTGACAGAGAGCGGATTCCT	GGCATCCCTGATGAAGAACT
<i>OATP2</i>	TGAACAACAGCACTCACCA	GTTGTTGAACCAGGCAAAGGC
<i>OCT1</i>	TCCTGCGAAACCTCAGTGAT	TGCTGCTTCCTGGTCTCTAAA
<i>OCT2</i>	CATCGGTGCTATGATGATTGGC	AGCCCAACAAATTCTGTAATCA
<i>P-gp</i>	CAACGGCACAGTCAAGGGCAAAGTT	CTCAGCACCCCATCAGCATCAC
<i>GAPDH</i>	TATGCCAACACCCTCAGTGC	CTGCTTGCTGGTACTCATCC

表 2 逆转录反应体系

Table 2 Reverse transcription reaction system

RT 反应体系	用量
5×gDNA Eraser Buffer	2.0 μL
gDNA Eraser	1.0 μL
total RNA	1.0 μg
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 μL
RT Primer Mix	1.0 μL
5×PrimeScript Buffer 2(for Real Time)	4.0 μL
RNase Free ddH ₂ O	up to 20.0 μL
Total	20.0 μL

表 3 PCR 反应体系

Table 3 PCR reaction system

PCR 反应体系	用量/ μL
cDNA	2.0
SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$)	10.0
PCR Forward Primer(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
PCR Reverse Primer(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
ddH ₂ O	7.2
Total	20.0

表 4 PCR 扩增程序

Table 4 PCR amplification program

	过程	温度	时间	循环次数
Stage 1	预变性	95 ℃	30 s	循环 1 次
		95 ℃	5 s	
Stage 2	PCR 反应	60 ℃	30 s	循环 40 次
		72 ℃	30 s	
		Plate read		
Stage 3		Melt Curve Stage		

2.7 免疫印迹法(western blot)分析

所需材料均按照说明书配置,蛋白质与 5 $\times$ Buffer 混合后置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,取各组蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。恒压 25 V 转膜 30 min,BSA 封闭 3 h,加入一抗 BCRP、MRP1、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2、P-gp(稀释比 1:1 000);GAPDH 抗体(稀释比 1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 层析柜中孵育 12 h,回收一抗,1 $\times$ TBST 洗膜 5 次,5 min/次,室温孵育二抗(稀释比 1:2 000)2 h;1 $\times$ TBST 洗膜 5 次,5 min/次;于 PVDF 膜上均匀滴加 ECL Plus 超敏曝光液,显影,Quantity 分析蛋白灰度值。

2.8 数据统计分析

数据统计分析采用 SPSS 26.0 软件,以(均数 $\pm$ 标准差)表示各组数据,单因素方差分析(one-way ANOVA)比较数据组间内差异,两组间数据比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

在合并数据库并删除重复靶点后,从 GeneCards、DisGeNET、TTD 和 OMIM 共获取了 3 537 个心肌缺血相关靶点,从 GeneCards 和 OMIM 获取了 848 个转运蛋白靶点。如图 1 所示,经过筛选靶点的交叉比对后,获得了 428 个心肌缺血与转运蛋白的共同靶基因。如图 2 所示,将上述 428 个靶点输入到 STRING 数据库中获取 PPI 网络,使用 Cytoscape3.8.2 软件中 Analyze Network 插件筛选出 36 个相关节点,结合文献调研^[12,14-15]分析发现与心肌缺血相关的有 BCRP、MRP、P-gp 等 7 个肝脏转运体,并对其进行了可视化分析。说明心肌缺血与肝脏转运蛋白之间存在一定的关联性。

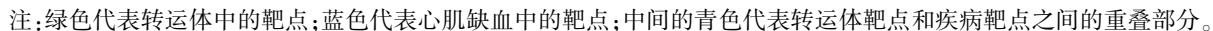


Fig.1 Overlapping target between transporters and myocardial ischemia



GO 富集分析以 $P < 0.05$ 且富集因子(enrichment factor) > 1.5 作为显著性阈值。如图 3 所示,BP 主要包括缺氧反应、炎症反应、脂多糖反应以及血管生成的阳性调节等;CC 主要包括膜筏、凹陷和质膜;MF 主要包括 DNA 结合转录因子结合、酶结合、相同蛋白结合、RNA 聚合酶 II 序列特异性 DNA 结合、转录因子结合、转录共激活因子结合等。如图 4 所示,KEGG 富集分析鉴定出 195 条通路,进一步以 $P < 0.05$ 及错误发现率(FDR) < 0.1 作为筛选条件,筛选并绘制了前 20 条通路,包括糖尿病心肌病、ABC 转运蛋白、血脂和动脉粥样硬化、心肌细胞中的肾上腺素信号通路、PPAR 信号通路等。

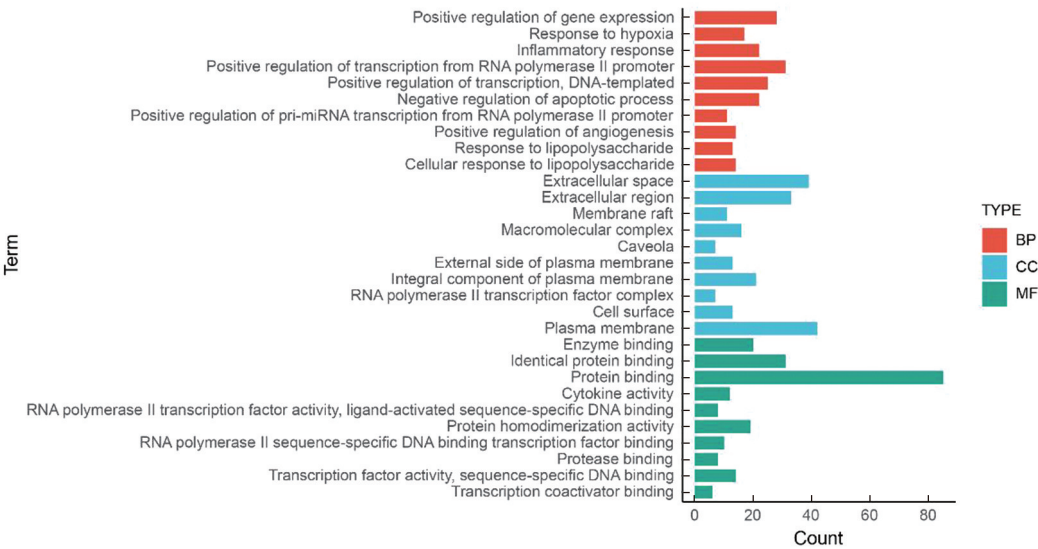


图 3 GO 富集分析

Fig.3 GO enrichment analysis

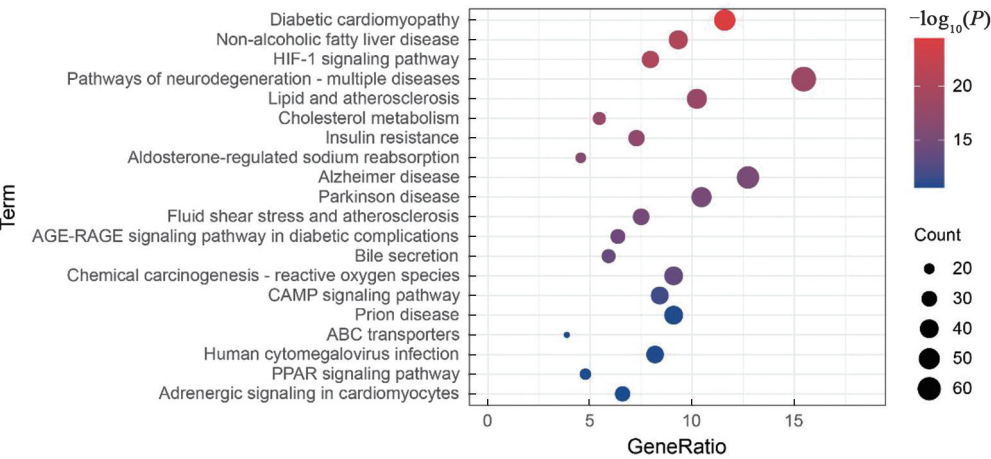


图 4 KEGG 通路富集分析

Fig.4 Enrichment analysis of the KEGG pathway

3.2 分子对接分析

前期课题组发现荳草的水溶性部位有较好的抗心肌缺血作用,其含量较高的活性成分主要为原儿茶酸、异荳草素、荳草素、牡荆素、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷和槲皮素^[16-17]。根据文献筛选,HNF4 α 为 BCRP、P-gp 和 OATP 的常见调控蛋白,PPAR α 为 OCT1 的调控蛋白,Notch1 为 MRP 家族的调控蛋白^[18-22],因此,将这 3 种蛋白选为受体,分别与前述 6 种活性成分进行分子对接,预测荳草有效成分与转运体相关调控蛋白之间的结合。结合能越小,靶蛋白和小分子之间的亲和性越好,结合能力越强^[23]。对接结果见表 5 和图 5,3 个靶蛋白与 6 个活性成分的结合能均小于-5 kcal/mol(1 kcal/mol = 4.184 kJ/mol),表明这些活性成分与靶蛋白之间存在较强的结合活性与稳定的相互作用。其中,荳草素与 HNF4 α ,槲皮素与 PPAR α ,异荳草素与 Notch1 的结合能最小,且这 3 种成分具有抗氧化,抗炎和抗凋亡等作用^[24-26],推测它们可能通过对应的调控蛋白紧密结合,进而调节相关转运体的表达。

表 5 葎草提取物 6 种活性成分与调控蛋白的结合能

Table 5 Binding energies of six active constituents in *Polygonum orientale* L. extract with regulatory proteins

活性成分	调控蛋白结合能/(kcal · mol ⁻¹)		
	Notch1	HNF4α	PPARα
原儿茶酸	-5.01	-5.08	-6.88
异葎草素	-8.54	-6.82	-7.25
葎草素	-5.85	-7.25	-7.87
牡荆素	-6.32	-5.43	-6.67
山柰素-3-O-β-D-葡萄糖苷	-7.21	-6.88	-7.63
槲皮素	-6.87	-6.42	-8.18

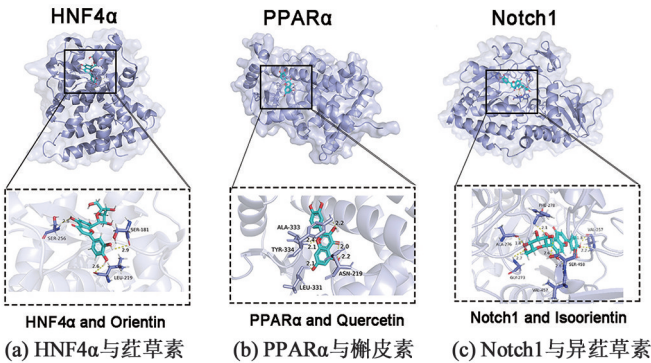
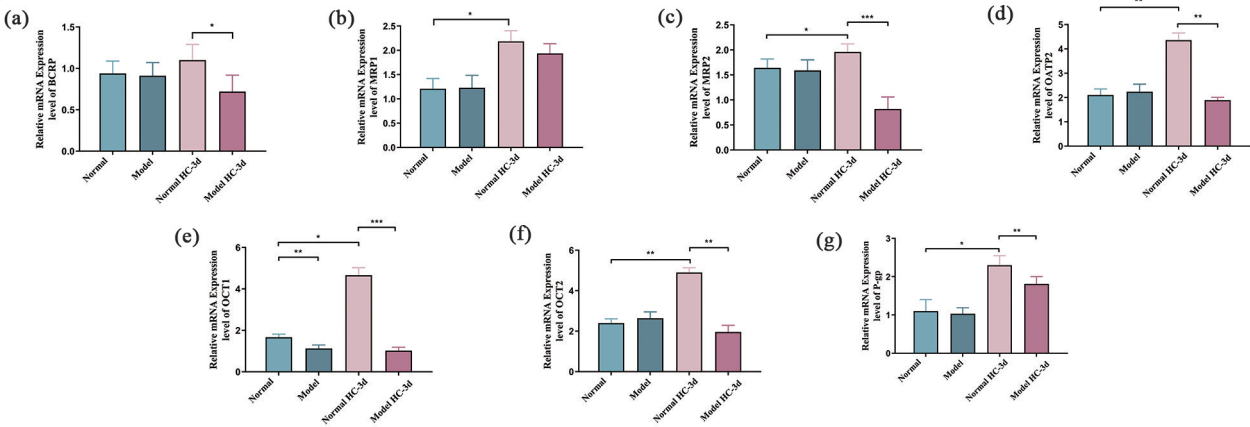


图 5 活性成分与靶点的对接情况

Fig.5 Docking of active constituents with targets

3.3 葎草提取物对肝脏转运体 mRNA 表达的影响

采用 qRT-PCR 法检测生理与病理状态下肝脏转运体 mRNA 表达差异以及给予葎草提取物后的变化情况。如图 6 所示,与正常组相比,模型组 OCT1 表达下调($P<0.01$),BCRP、MRP1、MRP2、OATP2、OCT2 和 P-gp 的 mRNA 表达无显著性差异($P>0.05$)。给予葎草提取物后,正常组大鼠的 MRP1、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2 和 P-gp 的表达均有所上调($P<0.05$),其中 BCRP 的表达无显著性差异($P>0.05$)。与此相反,模型组给予葎草提取物后,BCRP、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2 和 P-gp 表达均有所下调,其中 MRP2 和 OCT1 的表达差异显著($P<0.001$),MRP1 的表达无显著性差异($P>0.05$)。这些结果表明,葎草提取物在生理状态下对转运体 MRP1、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2 和 P-gp 的调控作用与病理状态下呈现相反趋势。



注: (a)~(g)分别为 BCRP、MRP1、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2 和 P-gp 的 mRNA 表达(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

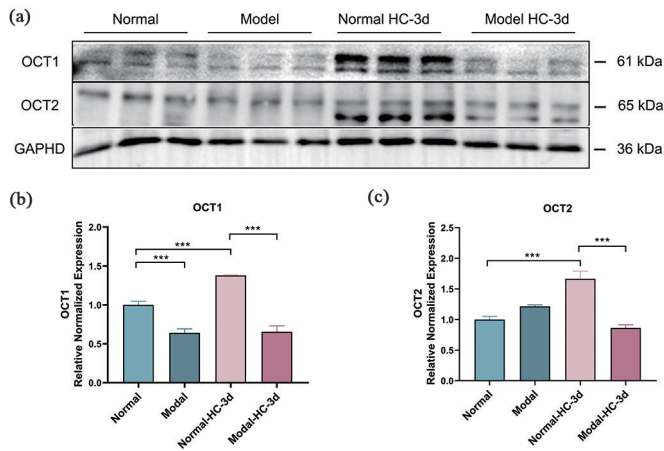
图 6 各组转运体 mRNA 表达

Fig.6 mRNA expressions of transporters in each group

3.4 茛菪草提取物对肝脏转运体蛋白表达的影响

3.4.1 茛菪草提取物对转运体 OCT1 和 OCT2 蛋白表达的影响

采用 western blot 法检测正常与心肌缺血病理状态下大鼠肝脏转运体 OCT1 和 OCT2 的表达差异,并观察茛菪草提取物的干预效应。结果见图 7,由图 7 可以看出,与正常组相比,模型组 OCT1 蛋白表达显著降低 ($P<0.001$),表明心肌缺血病理状态可影响肝脏 OCT1 的转运体功能。给予茛菪草提取物后,正常组大鼠肝脏中 OCT1 和 OCT2 的表达均显著上调($P<0.001$);而在模型组中,茛菪草提取物则显著下调 OCT1 和 OCT2 的表达水平($P<0.001$)。这些结果表明,心肌缺血病理状态会抑制肝脏 OCT1 蛋白表达,茛菪草提取物对 OCT1 与 OCT2 的调控作用,在生理与病理状态下呈现相反趋势,结果与 mRNA 水平一致。



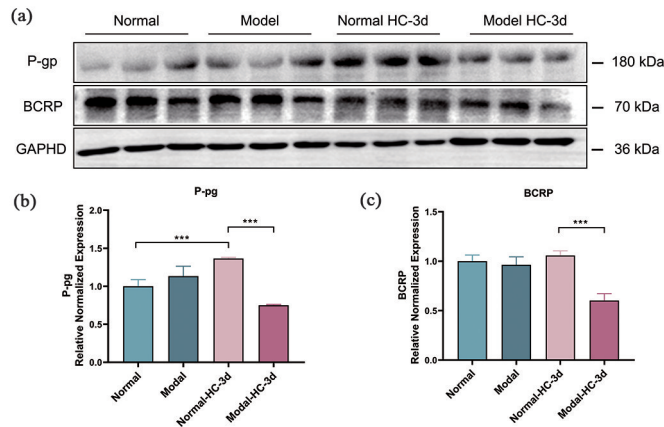
注:(a)为 OCT1 和 OCT2 的蛋白电泳结果;(b)为 OCT1 的蛋白表达;(c)为 OCT2 的蛋白表达(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

图 7 转运体 OCT1 和 OCT2 的蛋白表达

Fig.7 Protein expression of transporters OCT1 and OCT2

3.4.2 茛菪草提取物对转运体 P-gp 和 BCRP 蛋白表达的影响

采用 western blot 法检测正常与病理状态下大鼠肝脏转运体 P-gp 及 BCRP 的表达差异,并评估茛菪草提取物的干预效应。结果见图 8,由图 8 可以看出,与正常组相比,模型组 P-gp 和 BCRP 蛋白表达水平均无显著差异($P>0.05$)。给予茛菪草提取物干预后,正常组大鼠肝脏中 P-gp 表达显著上调($P<0.001$),而 BCRP 表达未见明显改变($P>0.05$);在模型组中,茛菪草提取物则显著下调 P-gp 和 BCRP 的表达($P<0.001$)。这些结果表明,病理状态本身不影响肝脏 P-gp 和 BCRP 表达,但茛菪草提取物在病理状态下可显著抑制二者的表达,而在正常状态下仅上调 P-gp 的表达。



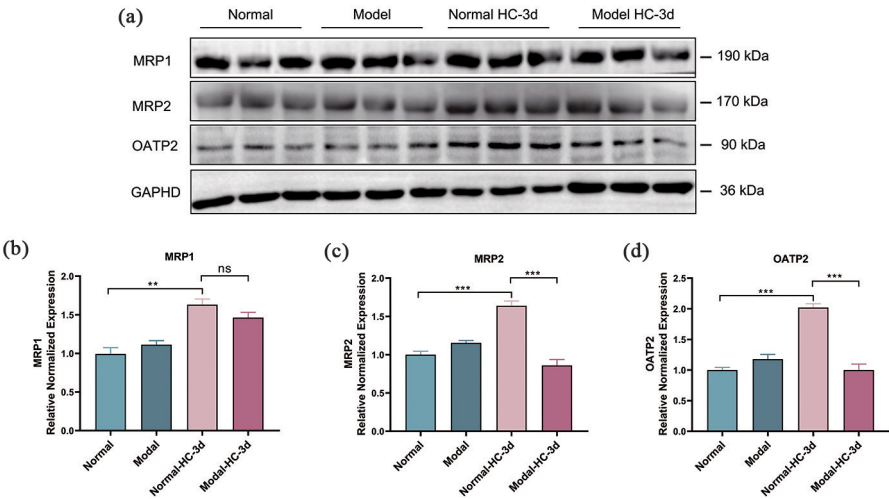
注:(a)为 P-gp 和 BCRP 的蛋白电泳结果;(b)为 P-gp 的蛋白表达;(c)为 BCRP 的蛋白表达(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

图 8 转运体 P-gp 和 BCRP 的蛋白表达

Fig.8 Protein expression of transporters P-gp and BCRP

3.4.3 荳草提取物对转运体 MRP1、MRP2 和 OATP2 蛋白表达的影响

采用 western blot 法检测正常与病理状态下大鼠肝脏转运体 MRP1、MRP2 及 OATP2 的表达差异,并分析荳草提取物的干预效应。如图 9 所示,与正常组相比,模型组 MRP1、MRP2 和 OATP2 蛋白表达均未见显著改变($P>0.05$)。给予荳草提取物后,正常组大鼠肝脏中 MRP1 表达上调($P<0.01$),MRP2 和 OATP2 表达均显著上调($P<0.001$);而在模型组中,荳草提取物显著下调 MRP2 和 OATP2 的表达水平($P<0.001$),但 MRP1 表达未发生明显变化($P>0.05$)。这些结果表明,病理状态本身不改变肝脏 MRP1、MRP2 和 OATP2 的蛋白表达,但荳草提取物在正常状态下全面上调 MRP1、MRP2 和 OATP2 的蛋白表达,而在病理状态下则可逆转 MRP2 和 OATP2 的异常表达,但对 MRP1 的调控作用不显著,与 mRNA 水平一致。以上结果表明,荳草提取物在生理和病理状态下,对各转运体有不同的调控,提示荳草改善心肌缺血状态可能与转运体调控相关。



注:(a)为 MRP1、MRP2 和 OATP2 的蛋白电泳结果;(b)为 MRP1 的蛋白表达;(c)为 MRP2 的蛋白表达;
(d)为 OATP2 的蛋白表达(* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$)。

图 9 转运体 MRP1、MRP2 和 OATP2 的蛋白表达

Fig.9 Protein expression of transporters MRP1, MRP2, and OATP2

4 讨论

肝脏转运体是细胞膜上具有重要功能的膜蛋白或多肽,在物质转运、代谢调节等诸多生理过程中发挥着关键作用^[27]。根据基因序列与功能,可将其分为两大类:SLC(solute carrier)转运体与 ABC(ATP-binding cassette)转运体,两者共同参与内源性与外源性化合物的吸收、消除和分布过程,维持生物体正常功能^[28-29]。在病理状态下,转运体的功能缺失或抑制是引起某些疾病的重要原因之一^[30-31]。值得注意的是,转运体在调控心肌细胞代谢与功能方面同样具有重要意义,其表达或功能异常可增加心肌细胞对缺血再灌注损伤的易感性^[11]。因此,我们推测心肌缺血的发生发展进程可能与肝脏转运体功能相关。

本课题组前期研究证实,荳草活性成分在生理状态与心肌缺血病理状态下的肠道吸收及排泄存在显著差异,该差异可能与心肌缺血时转运体的表达或活性变化相关,这提示荳草活性成分对转运体表达的影响在生理和病理状态下有所不同,但其具体机制尚待阐明。因此,本研究首先进行了网络药理学分析,分析结果揭示了心肌缺血与多种肝脏转运体之间存在关联。研究共筛选出 428 个心肌缺血与转运蛋白的共同靶基因,并从中获得包括 BCRP、P-gp 等在内的 7 个与心肌缺血密切相关的肝脏转运体。GO 和 KEGG 富集分析显示,这些靶点主要富集于缺氧反应、炎症反应等生物学过程,以及糖尿病心肌病、ABC 转运蛋白、PPAR 信号通路等。这表明心肌缺血的病理进程涉及多种复杂的机制,而肝脏转运体可能通过参与调控这些关键过程和信号通路,在心肌缺血的发生、发展中扮演重要角色。

进一步的分子对接分析预测了荳草主要活性成分与转运体上游调控蛋白的结合,为其潜在的调控作用提供了分子层面依据。结果显示,荳草中的主要活性成分(如荳草素、槲皮素、异荳草素等)与转运体上游调控蛋白表现出较高的结合亲和力(结合能均 <-5 kcal/mol)。其中,荳草素与 HNF4 α 、槲皮素与 PPAR α 、异荳草素与 Notch1 的结合能最低,鉴于这些活性成分兼具抗氧化、抗炎和抗凋亡等特性,我们推测荳草活性成分可能通过特异性结合并影响其相应的调控蛋白,进而调节下游相关转运体的功能,最终改善心肌缺血状况。

为了验证网络药理学和分子对接的预测结果,本研究构建了心肌缺血动物模型,采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和免疫印迹法(Western blot)进行检测。结果表明,在心肌缺血状态下,转运体 OCT1 的表达下调,这一发现提示心肌缺血的病理状态可影响部分肝脏转运体的表达水平。给予荳草提取物后,正常组大鼠的 MRP1($P<0.01$),MRP2、OATP2、OCT1、OCT2 和 P-gp 的表达有显著上调($P<0.001$)。模型组大鼠在给予荳草提取物后可使部分转运体的表达呈现下调趋势,其中 BCRP、MRP2、OATP2、OCT1、OCT2 和 P-gp 的蛋白表达全部下调且差异显著($P<0.001$)。这充分表明荳草具有调控肝脏转运体表达的能力。

综上所述,这些研究结果表明,荳草活性物质对肝脏转运体的表达,在生理状态下可促进表达上调,病理状态下介导表达下调,其机制可能与活性成分特异性结合转运体上游调控蛋白,进而调控下游转运体功能相关。

本研究仍存在一定局限性。在机制研究方面,虽然明确了荳草对肝脏转运体表达的影响及活性成分与转运体调控蛋白的结合活性,但对具体的信号传导通路及下游分子机制尚未深入探究;在研究模型上,仅采用动物模型模拟心肌缺血病理状态,缺乏临床样本验证,后续研究可结合临床数据进一步验证结论的可靠性。尽管如此,本研究系统阐明了荳草活性成分在生理病理状态下对转运体的调控作用,为解析荳草药效成分在心肌缺血病理状态下的作用机制提供了重要依据,也为荳草的深层次开发利用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1]王皎.室性期前收缩性心脏病诊疗进展[J].心血管病学进展,2020,41(6):563-566. DOI:10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.06.001.
- [2]Sagris M, Apostolos A, Theofilis P, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury: Unraveling pathophysiology, clinical manifestations, and emerging prevention strategies[J]. Biomedicines, 2024, 12(4): 802. DOI:10.3390/biomedicines12040802.
- [3]Duan Xuewen, Hu Meiling, Yang Linshan, et al. IRG1 prevents excessive inflammatory responses and cardiac dysfunction after myocardial injury[J]. Biochemical Pharmacology, 2023, 213: 115614. DOI:10.1016/j.bcp.2023.115614.
- [4]Bhatt A S, Ambrosy A P, Velazquez E J. Adverse remodeling and reverse remodeling after myocardial infarction[J]. Current Cardiology Reports, 2017, 19(8): 71. DOI:10.1007/s11886-017-0876-4.
- [5]贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科学技术出版社,2003.
- [6]Liu Chunhua, He Yu, Wang Mingjin, et al. Regulation of the SIRT3/SOD2 signaling pathway by a compound mixture from *Polygonum orientale* L. for myocardial damage[J]. Pharmaceuticals, 2024, 17(10): 1288. DOI:10.3390/ph17101288.
- [7]Fu Changli, Wang Mingjin, Lu Yuan, et al. *Polygonum orientale* L. alleviates myocardial ischemia-induced injury via activation of MAPK/ERK signaling pathway[J]. Molecules, 2023, 28(9): 3687. DOI:10.3390/molecules28093687.
- [8]刘春花,王明金,杨淑婷,等.基于外翻肠囊模型研究荳草提取物在正常和心肌缺血模型大鼠中的肠吸收特征[J].中国中药杂志,2021,46(1):196-205. DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20201010.201.
- [9]陆苑,黎娜,刘春花,等.基于在体肠袢模型研究荳草活性成分在正常及心肌缺血模型大鼠的肠吸收特性[J].中国药理学通报,2020,36(8):1146-1151. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2020.08.021.
- [10]Lu Yuan, Li Na, Zhu Xiaoqin, et al. Comparative analysis of excretion of six major compounds of *Polygonum orientale* L. extract in urine, feces and bile under physiological and myocardial ischemia conditions in rats using UPLC-MS/MS[J]. Biomedical Chromatography, 2021, 35(10): e5174. DOI:10.1002/bmc.5174.
- [11]Du Bingxin, Fu Qiang, Yang Qin, et al. Different types of cell death and their interactions in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Cell Death Discovery, 2025, 11: 87. DOI:10.1038/s41420-025-02372-5.

- [12] Schumacher T, Benndorf R A. ABC transport proteins in cardiovascular disease-a brief summary[J]. *Molecules*, 2017, 22(4): 589. DOI:10.3390/molecules22040589.
- [13] Tiriticco V, Codotto G, Blarasin B, et al. Rat liver perfusion and primary hepatocytes isolation: An old procedure crucial for cutting-edge 3D organoids culture[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2024(213): e66857. DOI:10.3791/66857.
- [14] Morris M E, Rodriguez-Cruz V, Felmlee M A. SLC and ABC transporters: Expression, localization, and species differences at the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers[J]. *The AAPS Journal*, 2017, 19(5): 1317-1331. DOI:10.1208/s12248-017-0110-8.
- [15] Meissner K, Heydrich B, Jedlitschky G, et al. The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006, 54(2): 215-221. DOI:10.1369/jhc.5a6750.2005.
- [16] 陆苑, 黎娜, 吕婷, 等. UPLC-MS/MS 研究荳蔻提取物的 H9c2 细胞药代动力学[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(18): 4833-4840. DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20210618.202.
- [17] 王明金, 刘春花, 孙佳, 等. UHPLC-PDA 法同时测定荳蔻药材中不同类型化学成分的含量[J]. *中药材*, 2022, 45(2): 392-396. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2022.02.023.
- [18] Yang Jianxin, Bai Xue, Liu Guiqin, et al. A transcriptional regulatory network of HNF4 α and HNF1 α involved in human diseases and drug metabolism[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2022, 54(4): 361-385. DOI:10.1080/03602532.2022.2103146.
- [19] Tajiri A, Hirota T, Kawano S, et al. Regulation of organic anion transporting polypeptide 2B1 expression by microRNA in the human liver[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2020, 17(8): 2821-2830. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.0c00193.
- [20] Arruda A C, Perilhão M S, Santos W A, et al. PPAR α -dependent modulation by metformin of the expression of OCT-2 and MATE-1 in the kidney of mice[J]. *Molecules*, 2020, 25(2): 392. DOI:10.3390/molecules25020392.
- [21] Zhang Xinyue, Su Tianhong, Wu Yifan, et al. N6-methyladenosine reader YTHDF1 promotes stemness and therapeutic resistance in hepatocellular carcinoma by enhancing NOTCH1 expression[J]. *Cancer Research*, 2024, 84(6): 827-840. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-23-1916.
- [22] Mo Dongqing, Liu Chenglin, Chen Yao, et al. The mitochondrial ribosomal protein mRpL4 regulates Notch signaling[J]. *EMBO Reports*, 2023, 24(6): EMBR202255764. DOI:10.15252/embr.202255764.
- [23] Paggi J M, Pandit A, Dror R O. The art and science of molecular docking[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2024, 93(1): 389-410. DOI:10.1146/annurev-biochem-030222-120000.
- [24] Alizadeh S R, Ali Ebrahimzadeh M. Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 229: 114068. DOI:10.1016/j.ejmech.2021.114068.
- [25] Long Qiu, Ma Ting, Wang Ye, et al. Orientin alleviates the inflammatory response in psoriasis like dermatitis in BALB/c mice by inhibiting the MAPK signaling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 134: 112261. DOI:10.1016/j.intimp.2024.112261.
- [26] Li Hao, Yuan Li, Li Xueyi, et al. Isoorientin attenuated the pyroptotic hepatocyte damage induced by benzo [a] pyrene *via* ROS/NF- κ B/NLRP3/caspase-1 signaling pathway[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(8): 1275. DOI:10.3390/antiox10081275.
- [27] Shi Shaojun, Li Yunqiao. Interplay of drug-metabolizing enzymes and transporters in drug absorption and disposition[J]. *Current Drug Metabolism*, 2014, 15(10): 915-941. DOI:10.2174/1389200216666150401110610.
- [28] 杨玉洁, 刘蕾, 徐苗, 等. 调控肝脏转运体对肝脏疾病防治的意义[J]. *华西药学杂志*, 2020, 35(3): 316-324. DOI:10.13375/j.cnki.wjps.2020.03.018.
- [29] 师少军. 肝脏“代谢-转运互作”及其对药物药代动力学、疗效和毒性影响的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(5): 579-585. DOI:10.13286/j.1001-5213.2020.05.21.
- [30] 孟强, 刘克辛. 转运体介导药物相互作用的研究现状及展望[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(8): 876-888. DOI:10.12092/j.issn.1009-2501.2021.08.004.
- [31] 武新安. 药物转运体基础与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2017.