

应用药物转运体的药代动力学评价

伊秀林^{1,2*}, 司端运², 刘昌孝²

1 スギ生物科学研究所, 日本 山梨県 408-0044

2 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要 药物转运体在药代动力学方面起到非常重要的作用, 它与药物的吸收、分布、排泄、药效发挥、以及药物毒性作用等密切相关。基于转运体的药物间相互作用, 还能影响到临床合并治疗药物之间的药代动力学关系。本研究室已经建立了一整套的适用于药代动力学研究和药物间相互作用评价, 高效表达人药物转运体蛋白的体外筛选系统, 并已将其应用于新药的筛选研究。此方法的特点在于, 以表达人药物转运体蛋白的宿主培养细胞为研究对象, 在临床前期提供与临床试验相似的研究结果, 今后必将成为药物研发领域有用的评价方法。

关键词 药物转运体; 药代动力学; 药物筛选; 体外评价

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2010)05-0341-06

Pharmacokinetics evaluation on applications of human drug transporter

YI Xiu-lin^{1,2}, SI Duan-yun², LIU Chang-xiao²

1 SUGI Institute of Biological Science Co., Ltd. Yamanashi 408-0044, Japan;

2 State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract Drug transporters play an important role in the pharmacokinetics. It is closely related to drug absorption, distribution, elimination, efficacy, and toxicity. And it can also affect the clinical pharmacokinetics by transporter-based drug interactions in the clinical combination therapy. In our laboratory, the high throughput drug transporter screening systems for estimation of human pharmacokinetics and drug-drug interaction were established and have been already applied to the study on drug discovery. In which, cultured cell models expressing human transporter genes are mainly used and should be very useful in the field of drug discovery and development.

Key words drug transporter; pharmacokinetics; drug screening; *in vitro* evaluation

药物转运体是一系列以药物为基质的, 存在于组织、器官细胞膜表面, 担当药物跨膜转运功能的蛋白质的总称。它的主要作用包括将药物向生物体内的能转移(吸收), 并通过毛细血管内皮细胞和各脏器细胞膜表面转运体的介导, 实现药物在生物体内向标的脏器的有效分布(distribution), 最后, 经肝脏和肾脏完成药物及其代谢产物的体外排泄(elimination)。大多数低脂溶性、小分子量的药物, 其分子成分可以通过单纯扩散形式透过细胞的双层磷脂膜, 而脂溶性低、分子量较大, 分子内部存在极性的药物, 通常都是以药物转运体作为媒介, 实现药物的透细胞膜转运。

药物的研发, 通常是以大量的候选化合物为基

础, 经过漫长的临床前筛选阶段, 得到具有临床安全性数据的候选化合物应用于临床试验研究。很多的候选化合物, 尽管在临床前期的动物实验中已经证明具有良好的药代动力学参数, 但由于可能存在的种属之间的差异, 在进入临床期后仍然有很大比例被发现不具备合适的人体药代动力学参数而遭淘汰。由此可见, 在研发初期, 特别是临床前期对候选化合物的人体药代动力学参数进行的早期预测至关重要, 它不仅可以提高新药研发成功率, 缩短研发时间, 并能为企业节约大量的研发经费。

从药物研发和临床的观点上看, 药物转运体的重要性在于其与药物有效性和安全性密切相关。因为它不仅直接干预药物的药代动力学(pharmacokinetics)

收稿日期: 2010-05-16

作者简介: 伊秀林(1964—), 男, 天津人, 主要从事药物转运体方面研究。Tel: 022-23006807 E-mail: koyasu_cn@yahoo.com.cn

中的吸收、分布和排泄等过程, 同时也能影响到药物在靶脏器的浓度, 进而影响药物的药效发挥, 甚或导致药物在体内的蓄积产生毒副作用。分析、了解并适当调控候选药物与药物转运体之间的亲合性关系, 可以最大程度的提高药物的有效性和安全性, 因此转运体的评价方法已经被国际上很多国家的药物研发机构视为重要的药代动力学评价方法之一。

近年, 随着药物转运体研究的深入, 转运体在研发药物评价方面的应用也越来越受到发达国家新药研发机构和政府监管部门的重视。日本厚生省医药管理局早在 2001 年就在公布的有关新药审批的文件中, 肯定了在药物间相互作用研究中所采用的药物转运体的研究方法, 并明确指出了药物转运体在药物研发早期应用的重要性^[1]。美国食品和药品管理局 (FDA) 也在 2006 年公布的 Guidance 中阐述了基于药物转运体的研究内容, 还针对不同转运体的特点, 规范了相关的评价基准, 使用的基质和抑制剂, 并重点推荐了 25 种与人体药代动力学密切相关的转运体^[2]。

1 药物转运体的分类

1.1 溶质转运体 (solute carrier, SLC)

SLC 转运体最初是在 1987 年由美国洛杉矶大学的 Hediger 研究小组在科学杂志上报道^[3], 得到了各国的药学研究者的认可, 以药物转运体为课题的研究也倍受关注。进入 90 年代后期, 转运体的研究达到了巅峰, 并陆续报道了大量与之相关研究成果。到目前为止, 已经报道了 362 种 SLC 转运体基因, 并根据 Human Genome Organization (HUGO) 的分类和命名方法, 按照输送基质种类和输送方式的不同, 分成了 47 大类 (SLC1~SLC47)。

SLC 主要存在于脑、肝脏、小肠和肾脏, 承担药物和营养物质向细胞内转运, 其识别的输送基质非常广泛, 包括糖、氨基酸、核酸等小分子化合物, 也包括肽、胆汁酸、维生素、脂肪酸等大分子化合物。SLC 的输送方式主要包括依赖于细胞膜内外电位差的促进扩散 (facilitated diffusion) 和借助于细胞内外离子浓度差的二次性能动输送 (secondary active transport)。在众多的 SLC 转运体中, 主要以药物为转运基质, 并能直接影响到药物在人体内的药代动力学参数的转运体仅占全部 SLC 转运体的 1/10, 主要包括寡肽转运体 (oligopeptide transporter, OPTs), 有机阳离子转运体 (organic

cation transporter, OCTs), 有机阴离子转运体 (organic anion transporter, OATs), L-型氨基酸转运体 (L-type amino acid transporter, LATs) 等。

1.2 ABC (ATP-binding cassette) 转运体

ABC 转运体是依赖于 ATP 水解作为能量供给, 以低分子化合物为基质的一类转运体。主要分布于脑、肝脏和小肠, 功能上与药物和生物体内异物的排出密切相关。从分子结构上看, ABC 转运体在其细胞膜结合领域内嵌入了一个 ATP 结合部位, 因此可以直接利用 ATP 分解产生的能量, 实现药物的能动转运。其中具有代表性的 ABC 转运体是 MDR1, Akiyama 的研究小组于 1985 年在癌细胞对抗癌药耐受性的机制研究中成功分离并报道了该基因, 并因其多药耐受 (multidrug resistance) 的特点, 将其命名为 MDR1^[4]。MDR1 转运体属于 P-糖蛋白质, 除了存在于人体正常组织外, 在癌细胞的表面具有非常高的蛋白表达。在功能上, MDR1 主要承担细胞内异物和药物向细胞外的转运, 属于排出型转运体, 因此在药物屏障、药物排泄和癌细胞对抗癌药耐受性的研究中备受关注。除此之外, ABC 转运体还包括 multidrug resistance-associated protein (MRPs), breast cancer resistance protein (BCRP) 和 bile salt export pump (BSEP) 等。

2 利用药物转运体评价方法的特点

2.1 使用高效表达药物转运体蛋白的培养细胞, 实现蛋白分子水平的药代动力学机制解析

传统的药代动力学评价方法通常是以动物做为实验对象, 通过给药、采样和对样品的分析, 得出药物在某种动物体内的吸收、分布和排泄过程。动物的饲养、管理, 以及各种精密仪器的分析过程, 都将需要繁杂的劳动、巨额的经费和漫长的时间。药物转运体研究使用了高效表达药物转运体蛋白的培养细胞, 不但省去了使用动物带来的饲养、管理上的繁琐, 而且能够实现分子水平药代动力学机制预测的一步到位。

2.2 通过靶点转运体实现对药物的筛选

多数的药物转运体, 尤其是 ABC 转运体主要以恶性肿瘤细胞表面的高发现为特点, 并以其对抗癌药的多剂耐受而得名。此类转运体的应用研究, 有助于对抗癌药物的筛选。除此之外, SLC 转运体中的 LAT1 是以药物靶点而著名的转运体。LAT1 通常存在于人的血脑屏障和胎盘屏障, 输送氨基酸

和含有氨基酸结构类药物透过血脑屏障和胎盘屏障。同时, LAT1 的特点是其在泌尿系统癌细胞表面有非常特异的高发现率, 它主要以中性氨基酸为转运基质, 向癌细胞内大量运输合成蛋白质所必须氨基酸, 保证癌细胞增殖过程中所需的蛋白合成原料的供给^[5-6]。目前, 以 LAT1 为检测指标的癌诊断试剂的研发, 和应用 LAT1 转运体的抗癌药物的筛选倍受关注。

2.3 早期预测人体内的药代动力学参数

药物在人体内的动力学参数通常是在进入临床期后, 以健康志愿者为研究对象得到的研究数据。为数很多的研发药物也正是在进入这一阶段后, 常常因为不具备合适的人体动力学参数而遭淘汰。而本研究室所采用的药物转运体的评价方法, 主要使用了表达人药物转运体基因的培养细胞, 宿主细胞表面表达蛋白在功能上也与人体内的转运体蛋白非常相似, 因此, 可以用于在药物的早期研发阶段提供与临床试验近似的药代动力学数据, 快速筛选不具药代动力学参数的候选化合物, 缩短研发周期, 将不必要的研发成本减少到最低水平。

3 高效表达药物转运体筛选系统的确立

应用 *in vitro* 的研究技术, 实现生物体内药物透膜转运机制的准确预测, 建立稳定、高效, 并与人体内转运体蛋白具有相同功能的药物转运体筛选系统至关重要。为了实现转运体基因在宿主细胞表面的高效表达, 获得与生物体内蛋白质具有相似功能的细胞模型, 同时结合研究目的、具体的研究方法和所表达转运体基因种类和功能的差异, 分别采用了不同的宿主细胞。在转运体研究中常用的宿主细胞主要包括昆虫 Sf9 细胞、非洲爪蟾卵母细胞 (*Xenopus laevis* Oocyte) 和各种来源于哺乳类动物的克隆化培养细胞。哺乳类动物培养细胞又可分为非极性细胞 (HEK293, S2 和 CHO) 和极性细胞 (MDCK, Caco-2 和 LLC-PK1) 2 类。非极性细胞通常用于药物向细胞内的摄入研究, 而极性细胞多用于药物的排出研究, 或者双基因的极性表达, 用于药物的透膜转运。

在确立转运体表达细胞的过程中, 通常采用多种细胞表达的方法。即将克隆化的含有转运体靶基因的载体 DNA 分别转染到不同种类的宿主细胞中, 并通过对转染后的克隆化细胞与转运体代表基质之间的亲和性关系分析、筛选出具有高转运能力的细

胞株, 并对该培养细胞株, 采用 RT-PCR 和 Western blotting 方法, 确认细胞内靶基因 mRNA 和细胞膜表面转运体蛋白的表达纯度 (图 1、2)。

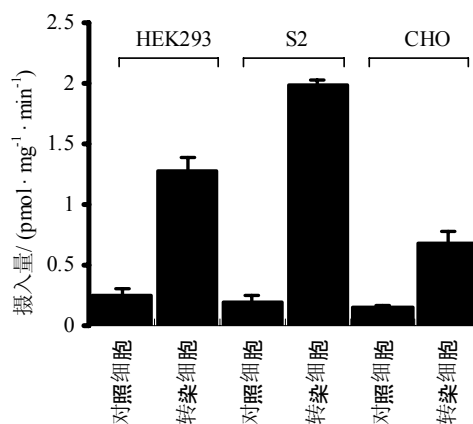


图 1 表达药物转运体基因的不同宿主细胞间药物亲和性的筛选。³H 标记的硫酸雌酮用于阴离子转运体 3 在宿主细胞 HEK293, S2 和 CHO 的摄入研究

Fig.1 Affinity-based screening between different host cells expressing human transporter gene. [³H]estrone sulfate was used for uptake study by HEK293, S2 and CHO cells expressing human organic anion transporter 3.

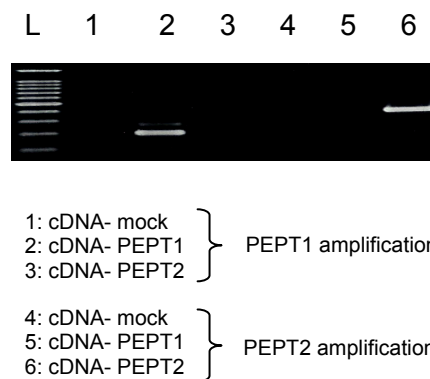


图 2 PCR 方法对转运体基因 (PEPT1, PEPT2) 表达的确证, cDNA 来源于宿主细胞 mRNA 的反转录

Fig.2 Confirmation of transporter gene (PEPT1, PEPT2) by PCR amplification, cDNA was obtained from host cells by reverse transcription from mRNA

4 药物输送机制和相互作用的评价

4.1 药物的小肠吸收

与小肠吸收相关的转运体主要分布在小肠粘膜上皮细胞表面, 并根据其转运功能的不同分为 2 类, 即与氨基酸、寡肽、维生素等营养物质的体内摄取相关的吸收型转运体, 和与异物向体外的排除相关,

对机体起到保护作用的排出型转运体。大多数的水溶性营养物质借助于吸收型转运体的输送作用被摄入到血液中，其中 histidine peptide transporters (PHT1 和 PHT2) 以输送组氨酸类的氨基酸为主，而 PEPT1 则主要参与小肠内氨基酸分解产物寡肽的吸收过程。在小肠内，含有寡肽结构的药物分子，或者含有氨基酸结构的药物，在小肠内经分解产生的寡肽结构产物，都有可能成为 PEPT1 的转运基质。

与生物体内药物转运活性所需条件相同，PEPT1 在体外对寡肽的转运能力也很大程度上受到反应缓冲液酸碱度的影响。研究表明，中性或弱酸性 (pH6) 条件最适合 PEPT1 对基质的转运活性。由此可以推测，增加小肠内酸性聚合物的量，适当调整肠管内的酸碱度，能够提高媒介于 PEPT1 的药物小肠吸收率。与此同时，小肠粘膜上皮细胞表面也存在 MDR1 和 MRP2 等排出功能的药物转运体，这些排出型转运体对药物的肠管吸收起到抑制和屏障作用，降低机体对基质药物的吸收率。

4.2 药物的肾脏排泄

药物在尿中的排泄过程包括肾小球滤过、肾小管分泌和肾小管再吸收。小分子的化合物可以顺利经肾小球滤过，而相对分子质量大并带有负电核的分子则很难通过肾小球。尽管临床治疗药物的相对分子质量一般都相对较小，但在血液中与血浆蛋白结合后，通常也很难经肾小球滤过。因此，这些相对分子质量大，极性高，并形成蛋白结合物的药物向尿中的排泄，通常是以药物转运体为媒介，完成向内皮细胞的摄入和向管腔侧的排泄过程。

参与肾脏排泄过程的转运体主要分布在肾小管上皮细胞的基底膜侧和管腔侧。其主要功能在于识别并输送多样性化合物的有机离子，并依据其转运

基质所带电荷的不同分为有机阴离子转运体和有机阳离子转运体(图 3)。有机阴离子转运体主要以抗生素、抗病毒类药物、H2 受体拮抗剂、利尿剂等为转运基质;有机阳离子转运体则以口服糖尿病治疗药、抗病毒类药物和 H2 受体拮抗剂等为转运基质^[7-10]。

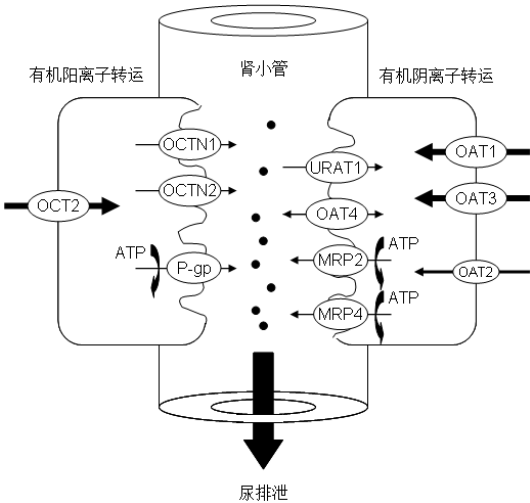


图 3 药物转运体在肾小管上皮细胞的分布

Fig.3 Distribution of drug transporters on renal tubular epithelial

4.3 药物的肝脏排泄

肝脏是重要的解毒器官，口服药物吸收后经门脉到达肝脏，在肝细胞内经 P450 等药物代谢酶分解，并形成各种共轭体，最后经通过肝胆管在胆汁中排泄。众多的转运体参与药物的肝脏内摄入和胆汁排泄过程（表 1）。其中，Influx 转运体分布于血管基底膜侧，负责药物向肝细胞内的摄取，而 efflux 转运体则同时分布于基底膜侧和肝胆管侧，通过向细胞外的药物排出，实现对肝细胞的屏障保护，和药物的胆汁排泄作用。

表 1 肝脏的药物转运体及其转运基质

Fig. 1 Human drug transporters and its substrates in liver

转运体		转运基质
流入转运体	OATP1B1	E-17beta-G, estrone 3-sulfate, bilirubin glucuronide, pravastatin, leukotriene C4
	OATP1B3	E-17beta-G, taurocholate, digoxin, cholate etc.
	OATP2B1	estrone 3-sulfate, benzylpenicilline, DHEAS etc.
	OAT2	PAH, salicylate, methotrexate etc.
	OCT1	MPP ⁺ , tetraethylammonium, cimetidine, dopamine etc.
	NTCP	taurocholate, glycocholate, cholate etc.
流出转运体	MDR1	CPT-11, doxorubicin, vinblastine, digoxin, loperamide etc.
	MRP2	DNP-SG, leukotriene C4, bilirubin, E-17beta-G, pravastatin etc.
	BSEP	taurocholate, glycocholate etc.
	BCRP	DHEAS, estrone 3-sulfate, mitoxantrone, topotecan etc.

4.4 药物之间的相互作用 (drug-drug interaction)

在临床治疗过程中,与单一药物治疗相比,多药剂的复合治疗方法更为常见。药物转运体在承担药物的透膜转运过程中最重要的特征之一是广泛的基质选择性,即同一种转运体可以同时识别和输送不同种类的药物分子,而且转运体与被输送的不同药物之间存在亲和性的差异,这就不同程度地影响到药物的透膜转运,造成各药物在体内的动力学改变。这种药物之间的相互影响存在于药物向细胞内的流入和流出过程,表现为药物之间的相互抑制,相互促进,或两者同时存在。

笔者分析了奎尼丁对表达 hOCT2 转运体的 S2 宿主细胞介导的 ^{14}C 标记二甲双胍转运的抑制作用 (图 4.5)。结果显示,奎尼丁能够有效地抑制 hOCT2 转运体向肾小管上皮细胞转运二甲双胍的能力,其 IC_{50} 和 K_i 值分别为 70.8 和 $30.7 \mu\text{mol/L}$,因此可以证明,在临床上治疗中,合并使用奎尼丁和二甲双胍能够降低二甲双胍在肾脏的清除率。

可以看出,在多药剂同时存在的情况下,能够被同一转运体识别的不同药物之间,由于与转运体间亲和性的差异,会产生被转运药物与转运体间的竞争作用。而这种竞争作用又会影响到药物在生物体内的吸收、分布和排泄,导致血液和标的器官中有效药物浓度的变化,影响药效的发挥;或者抑制药物的排泄过程,导致药物在体内的蓄积,严重的会因过量的蓄积产生毒副作用。

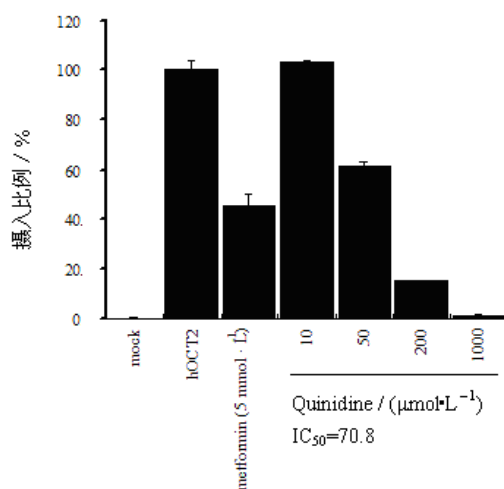


图4 奎尼丁对 hOCT2 介导的 ^{14}C 标记二甲双胍转运的抑制作用

Fig.4 Inhibition of hOCT2-mediated ^{14}C -metformin ($10 \mu\text{mol/L}$) uptake by quinidine as determined in S2 cells

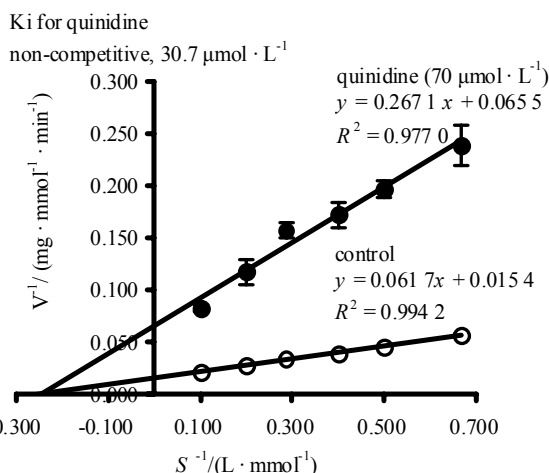


图5 Lineweaver-Burk 分析奎尼丁对 hOCT2 介导的 ^{14}C 标记二甲双胍转运的抑制作用

Fig.5 Lineweaver-Burk analysis of inhibitory effect of quinidine on hOCT2 mediated ^{14}C -metformin uptake in S2 cells.

5 结语

随着转运体研究的不断深入,基于转运体的生物膜药物转运机制在药代动力学的新药研发方面的应用也越来越广泛。最新的研究表明,药物转运体除了在动力学方面发挥其重要的作用,很多具有靶点功能的转运体,与疾病的诊断和治疗也密切相关。如肾小管上皮细胞的尿酸转运体 URAT1 是尿酸再吸收的重要途径,对 URAT1 转运活性的抑制,可以减少尿酸的再吸收,加速尿酸的排泄,降低血液中尿酸的量,对高尿酸血症起到治疗作用;氨基酸转运体 LAT1 关系到癌细胞繁殖所需营养物质的供给,已经被应用到恶性肿瘤的诊断和癌症治疗药的研发;胆汁酸转运体功能的异常可以导致肝脏内的胆汁淤滞;谷氨酰胺和血清素转运体则与精神神经疾病密切相关。此外,药物转运体的个体差异,种族差异,以及基因多态性都将是今后具有实际应用价值的重要研究课题。

参考文献

- [1] 日本厚生労働省. 医薬審発第 813 号: 薬物相互作用の検討方法について [S], 2001. http://www.who.int/go.jp/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EF SNO=3951
- [2] FDA. Guidance for Industry: Drug interaction studies-

- study design, data analysis, and implications for dosing and labeling [S], 2006. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072101.pdf>
- [3] Hediger M A, Coady M J, *et al.* Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter [J]. *Nature*, 1987, 330: 379-381.
- [4] Akiyama S, Fojo A, *et al.* Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs [J]. *Somatic Cell Mol Genet*, 1985, 11: 117-126.
- [5] Kanai Y, Fukasawa Y, *et al.* Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter [J]. *Biol. Chem.* 2000, 275(27): 20787-20793.
- [6] Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, *et al.* L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors [J]. *Int j Cancer*. 2006, 119:484-492.
- [7] Anzai N, Kanai Y, Endou H. Organic anion transporter family: current knowledge [J]. *Pharmacol Sci*, 2006, 100: 411-426.
- [8] Robertson E E, Rankin G O. Human renal organic anion transporters: characteristics and contributions to drug and drug metabolite excretion [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 109: 399-412.
- [9] Sweet D H. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 204: 198-215.
- [10] Wright S H. Role of organic cation transporters in the renal handling of therapeutic agents and xenobiotics [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 204: 309-319.

《中国药学杂志》2011 年征订启事

《中国药学杂志》是我国药学界创刊最早、发行量较大、反映我国药理学各学科进展和动态的最具权威性和影响的综合性学术核心期刊之一。读者群为高、中级药学工作者以及其他医药卫生人员。内容包括药理学各学科，辟有院士笔谈、专家笔谈、综述、论著（内容包括：重大新药创制、生物技术、中药及天然药物、药理学、药剂、临床药理学、药品质量及检验、药物化学）、药物与临床、新药述评、药学史、药理学人物、药事管理、学术讨论、科研简报等栏目。创刊 57 年来在医药卫生界享有很高声誉。连续 3 次荣获国家期刊奖，三次荣获中国科协优秀科技期刊一等奖。2007 年获“百种杰出学术期刊”称号。2006 - 2010 年连续 5 年被评为“中国科协精品期刊工程项目资助期刊”。被美国《化学文摘》（CA）、荷兰《医学文摘》（EM）、《国际药理学文摘》（IPA）收录，加入中国学术期刊光盘版，进入北大中文科技期刊目录（核心版，排名第 2）。欢迎广大医药工作者积极订阅。

地址：北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1803 室，100022。

电话 010-58699280/75/76/78/79。传真：010-58699295。

网址 www.zgyxzz.com.cn。E-mail zgyxzz@cpa.org.cn。

半月刊。定价：每期 30 元，全年 720 元。