

小檗碱对有机阳离子药物转运体抑制作用研究

武卫党¹, 崔涛², 张星艳^{1,3}, 魏滋鸿¹, 慈小燕¹, 路江杰⁴, 江立新⁴, 刘昌孝^{1*}, 伊秀林^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 释药技术及药代动力学国家重点实验室 天津 300031

2. 天津中医药大学, 天津 300031

3. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

4. 合肥天麦生物科技发展有限公司, 安徽 合肥 230000

摘要:目的 研究小檗碱对有机阳离子转运蛋白(OCTs)—OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1和OCTN2的抑制作用。方法 应用由转染试剂Lipo 3000介导的动物细胞转基因方法、经筛选得到各药物转运体过表达细胞株S2-OCT1、S2-OCT2、S2-OCT3、S2-OCTN1和S2-OCTN2;通过检测OCTs介导的放射性探针底物的跨膜转运,建立OCTs体外评价模型;以野生型(WT)细胞为对照组,应用各转运体抑制剂验证其活性;应用上述方法观察小檗碱对各转运体的抑制作用,并计算小檗碱对各药物转运体活性的半数抑制浓度(IC₅₀)。结果 各转运体细胞组与各自WT细胞株比较,转运活性均提高了5倍多,加入抑制剂后,转运活性均明显下降;小檗碱对OCT1、OCT2、OCT3和OCTN1抑制作用较强,对OCTN2的抑制作用相对较弱,IC₅₀分别为7.63、6.80、2.25、4.66和210.34 μmol/L。结论 小檗碱对这5种有机阳离子转运体均有抑制作用,其中对OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1的抑制作用较强,发生由其介导的DDI的可能性较大,对OCTN2的抑制作用相对较弱。

关键词: 小檗碱;有机阳离子转运体;药物-药物相互作用;同位素标记

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)05-0-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.05.

Inhibition of berberine on organ cation transporters

WU Wei-dang¹, CUI Tao², ZHANG Xing-yan^{1,3}, WEI Zi-hong¹, CI Xiao-yan¹, LU Jiang-jie⁴, JIANG Li-xin⁴, LIU Chang-xiao¹, YI Xiu-lin¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Research Co. LTD, State key laboratory of drug release technology and pharmacokinetics Tianjin, 300031, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei, 230032, China

4. Hefei Tianmai Biotechnology Development Co., Ltd., Hefei, 230000, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effects of berberine on human organic cation transporter (OCTs) including OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1 and OCTN2. **Methods** Using animal cell transgenic method mediated by transporter Lipo 3000, the drug transporters over expression cell lines S2-OCT1, S2-OCT2, S2-OCT3, S2-OCTN1 and S2-OCTN2 were obtained by selective medium culture. The OCTs evaluation model was established by detecting the trans-membrane transport of radioactive substrate *in vitro*. Wild type (WT) cells were used as control group, activity of OCTs was verified by adding its inhibitor. The inhibition of berberine on the transporters was investigated *in vitro*. The IC₅₀ of inhibitory effect of berberine on various drug transporters was also calculated. **Result** The transport activity of transporter cell lines was increased by more than 5 times compared to the WT cell line respectively, what's more, their transport activity decreased significantly by their corresponding inhibitor. The IC₅₀ of berberine to OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1 and OCTN2 were respectively 7.63, 6.80, 2.25, 4.66 and 210.34 μmol/L. **Conclusion** Berberine significant inhibition to OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1 and OCTN2. The inhibition on OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1 is stronger compared to OCTN2.

Key words: berberine; organ cation transporter; drug-drug interference; isotopic label

收稿日期: 2017-01-03

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81430096)

作者简介: 武卫党, 助理研究员, 博士。Tel: (022) 84845243 E-mail: wuweidang1985@126.com

*通信作者 伊秀林, 研究员。Tel: (022) 84845242 E-mail: yixl@tjipr.com

刘昌孝, 中国工程院院士。Tel: (022) 23006860 E-mail: liuchangxiao@163.com

小檗碱 (berberine) 又名黄连素, 是从传统中药黄连、黄柏和三颗针等植物中分离得的一种生物碱。随着中药药理学的发展, 小檗碱在心血管疾病 (心律失常、心力衰竭、高血压等)、糖尿病和抗肿瘤方面的药理活性被不断发现和阐明^[1-3], 使得其用途也更加广泛。

药物转运体是一类存在于细胞膜上的、对药物的跨细胞膜运输起重要作用的跨膜蛋白^[3-4]。由于药物转运体广泛地分布于肝脏、肾脏、小肠、血脑屏障、胎盘屏障等各种器官和组织, 对药物的吸收、分布、排泄等动力学过程具有重要作用。人有机阳离子转运蛋白 (organ cation transporters, OCTs) 包括 OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1 和 OCTN2 等在小肠和肝脏有较高表达, 对药物的吸收和排泄有重要影响。本课题组通过研究小檗碱对各药物转运体的抑制作用, 为阐明小檗碱药动学特点以及可能发生的由药物转运体引起的药物-药物相互作用 (drug-drug interaction, DDI) 提供理论依据。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

杜氏磷酸缓冲液 (DPBS, Gibco 公司, 批号 070M8306); 二甲基亚砜 (DMSO, Solarbio 公司, 批号 1065C241); 100×青霉素混合液 (Solarbio 公司, 批号 20160624); DMEM (Hyclone 公司, 批号 AB10137517); 胎牛血清 (FBS, Gibco 公司, 批号 1739463); ³H-盐酸组胺 (³H-Histamine, ³H-HT, 批号 675321)、¹⁴C-氨基马尿酸 (¹⁴C-Aminohippuric acid, ¹⁴C-PAH, 批号 1558673)、¹⁴C-盐酸左旋肉碱 (¹⁴C-Carnitine hydrochloride, ¹⁴C-Car, 批号 685178)、UTIMA Gold 闪烁液 (批号 77-15481), PerkinElmer 公司; ¹⁴C-溴化四乙胺 (¹⁴C-Tetraethylammonium bromide, ¹⁴C-TEA, ARC 公司, 批号 130311); 小檗碱 (Berberine, 批号 329823423)、西咪替丁 (批号 BCBC1229)、奎尼丁 (批号 10138583) 和维拉帕米 (批号 021M1429V), Sigma 公司。

1.2 细胞

小鼠肾小管 S2 段分离细胞 (S2 细胞株, 日本富士生物医学有限公司赠送)。

1.3 主要仪器

BS124S 分析天平: 瑞士 Sartorius 公司; HERAccl 150i 二氧化碳培养箱: 美国 Thermo Scientific 公司; Tri-Carb 2910 TR 放射性液体闪烁仪: 美国 Perkin Elmer 公司; TR-2AR Thermal Robo:

日本亚速旺株式会社; FLE712AA 多孔滤器: 日本 Advantec 公司; 单人超净生物安全柜: 力康生物医疗科技控股有限公司; 跨膜电阻测试系统: Inno-Alliance Biotech。

2 方法

2.1 有机阳离子药物转运体转运活性验证

通过由转运试剂 Lipo 3000 介导动物细胞转基因方法^[5]、经过筛选培养得到了各药物转运体过表达细胞株 S2-OCT1、S2-OCT2、S2-OCT3、S2-OCTN1 和 S2-OCTN2。各过表达人药物转运体的细胞株及各自野生型 (wild type, WT) 细胞株, 经过复苏和传代培养后, 选取生长良好的贴壁细胞用胰酶消化使其分散为单细胞悬液, 之后用培养基调节细胞密度至 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$, 将细胞悬液以 1 mL/孔的量接种至 24 孔细胞培养板, 在 37 °C、5% CO₂、饱和空气湿度的培养箱内培养 2~3 d 使细胞长满各孔。

先移去培养板内培养液, 用 DPBS 清洗 1 次, 每孔加入 37 °C DPBS 缓冲液孵育 10 min, 以 500 μL 含放射性标记的探针底物溶液置换 DPBS, OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1 和 OCTN2 转运体的探针底物分别选择 10 μmol/L ¹⁴C-TEA、5 μmol/L ¹⁴C-TEA、50 μmol/L ³H-HT、5 μmol/L ¹⁴C-TEA 和 5 μmol/L ¹⁴C-Car; 给药时间分别为 15、5、5、3 和 5 min^[6]; 给药结束后, 用冷 DPBS 缓冲液终止反应, 并清洗细胞 3 次^[6]; 然后每孔添加 400 μL 0.1 mmol/L NaOH 裂解细胞; 取细胞裂解液于闪烁瓶中, 添加 3 mL 的 Aquasol-2 闪烁液, 并用 Tri-Carb 2910TR 液闪仪测定样品中的放射性强度。

每个转运体细胞株及抑制剂组、阴性对照组设置 3 复孔, 其中阴性对照为 WT 细胞株, 抑制剂组为在各转运体细胞株的探针底物混合液中添加了相应的抑制剂 (OCT1, 60 μmol/L 奎尼丁; OCT2, 600 μmol/L 西咪替丁; OCT3, 60 μmol/L 奎尼丁; OCTN1, 10 μmol/L 维拉帕米; OCTN2, 600 μmol/L 西咪替丁)^[6-7]。

2.2 体外抑制试验

各过表达人药物转运体的细胞株 (S2-OCT1、S2-OCT2、S2-OCT3、S2-OCTN1 和 S2-OCTN2) 及野生型 (wild type, WT) 细胞株, 经过复苏和传代培养后, 接种至 24 孔细胞培养板中 ($2.0 \times 10^5/\text{mL}$, 1 mL/孔), 在 37 °C、5% CO₂、饱和空气湿度的培养箱内培养 2~3 d 使细胞长满各孔。

将细胞放置在 37 °C 水浴锅中, 先移去培养板

内培养液,用 DPBS 清洗 1 次,之后每孔加入 37 °C DPBS 缓冲液孵育 10 min,然后以 500 μ L 含放射性标记的探针底物(同“2.1”项)和 100 μ mol/L 小檗碱的给药混合溶液置换 DPBS,分别反应 15、5、5、3 和 5 min^[8];给药结束后,用冷 DPBS 缓冲液终止反应,并清洗细胞 3 次;然后每孔添加 400 μ L 0.1 mol/L NaOH 裂解细胞;取细胞裂解液于闪烁瓶中,添加 3 mL 的 ULTIMA Gold 闪烁液,并用 Tri-Carb 2910TR 液闪仪测定样品中的放射性强度。

IC₅₀ 的测定实验中,以 500 μ L 含放射性标记的探针底物(同“2.1”项)和不同浓度(0、0.3、1、3、10、30、100 和 300 μ mol/L)小檗碱的给药混合溶液置换 DPBS,每个浓度设置 3 复孔。

2.3 数据处理

将仅含放射性标记探针底物的转运体细胞的转运值设为 U_C (单位为 DPM),扣除本底组即 Mock 细胞的转运值 U_0 ,即 $(U_C - U_0)$ 定义为 100%。以此为标准计算:①阴性对照组或抑制组的转运值设

为 U ,相对转运活性 = $(U - U_0) / (U_C - U_0)$ 。②加入待测化合物组的转运值为 U ,以抑制率表征化合物对转运体抑制作用的强弱。抑制率 = $1 - (U - U_0) / (U_C - U_0)$

每个数值代表一个实验组的平均值,用 Microsoft Excel 2010 软件中统计学公式计算。通过 Prism 5.0 软件计算小檗碱对各转运体转运活性的半数抑制浓度(IC₅₀)。各数值间的差异性分析采用 t -test。

3 结果

3.1 各阳离子药物转运体转基因细胞株功能验证

各药物转运体功能验证结果见图 1。由 OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1 和 OCTN2 分别介导的 ¹⁴C-TEA、¹⁴C-TEA、³H-HT、¹⁴C-TEA 和 ¹⁴C-Car 的跨膜转运活性,各转运体细胞组与各自 WT 细胞株比较,均提高了 5 倍多,且加入各药物转运蛋白的抑制剂后,转运活性均明显下降,表明各药物转运体功能良好。

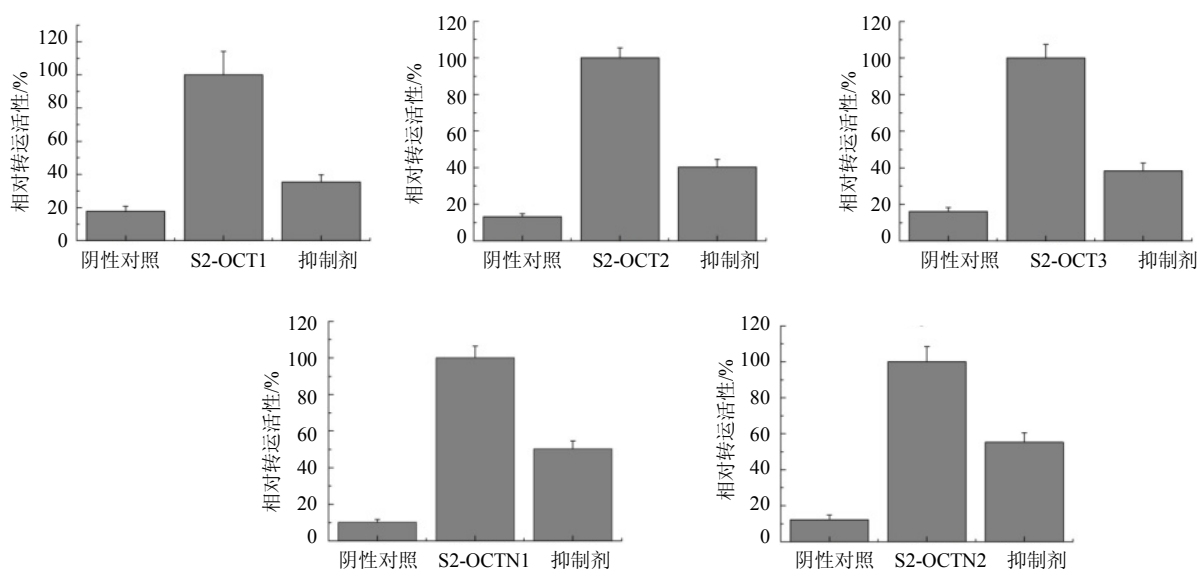


图 1 药物转运体过表达细胞株的功能验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Activity test of transporter over expressing cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 小檗碱对各药物转运体的抑制作用

100 μ mol/L 小檗碱对 OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1 和 OCTN2 各自介导的放标底物的跨膜转运活性的抑制作用见表 1。结果表明 100 μ mol/L 小檗碱对 OCT1、OCT2、OCT3 和 OCTN1 具有较强的抑制作用,抑制率分别为 $(79.55 \pm 3.48)\%$ 、 $(51.42 \pm 3.20)\%$ 、 $(77.98 \pm 1.91)\%$ 和 $(63.19 \pm 5.41)\%$;

100 μ mol/L 小檗碱对 OCTN2 的抑制作用相对较弱,抑制率为 $(33.87 \pm 6.52)\%$ 。

为了进一步明确小檗碱对 OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1 和 OCTN2 的抑制作用强度,本研究测定了不同浓度的小檗碱对各药物转运体的抑制作用及 IC₅₀,测定结果见图 2 和表 2。小檗碱对分别由 OCT1 介导的 ¹⁴C-TEA、OCT2 介导的 ¹⁴C-TEA、

表1 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱对各转运体活性抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Inhibitory rate of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ berberine to different transporters ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

转运体	底物	抑制率/%
OCT1	^{14}C -TEA	79.55 $\pm$ 3.48
OCT2	^{14}C -TEA	51.42 $\pm$ 3.20
OCT3	^3H -HT	77.98 $\pm$ 1.91
OCTN1	^{14}C -TEA	63.19 $\pm$ 5.41
OCTN2	^3H -Car	33.87 $\pm$ 6.52

OCT3 介导的 ^3H -HT、OCTN1 介导的 ^{14}C -TEA 和 OCTN2 介导的 ^{14}C -Car 转运活性抑制作用的 IC_{50} 分别为 7.63、6.80、2.25、4.66、210.34 $\mu\text{mol/L}$ 。由小檗碱对各药物转运体转运活性抑制作用的 IC_{50} 可知,小檗碱发生由 OCT1、OCT2、OCT3 和 OCTN1 引起的 DDI 可能性较大。

4 讨论

近年来随着小檗碱在治疗糖尿病、高血压、抗肿瘤、心律失常等方面的研究深入,其机制也不断

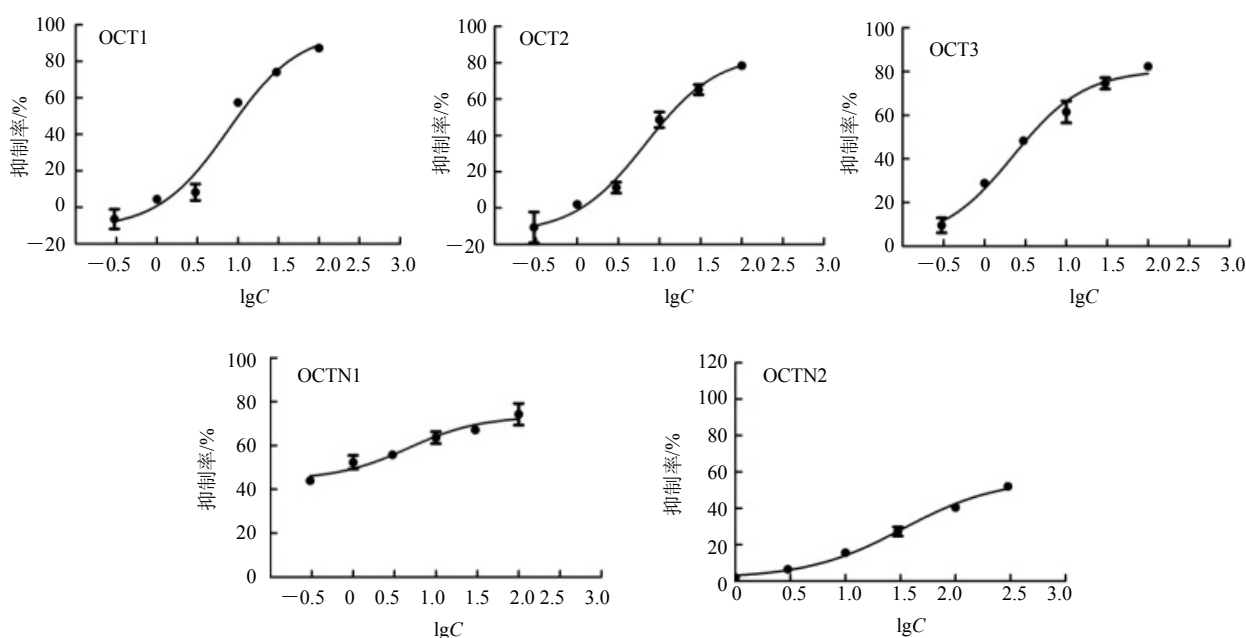


图2 小檗碱对各药物转运体的转运活性的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Inhibition of berberine with different concentration to various transporters ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表2 小檗碱对各药物转运体抑制作用的 IC_{50} 计算结果
Table 2 Computation on IC_{50} of berberine to different transporters

转运体	底物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
OCT1	^{14}C -TEA	7.63
OCT2	^{14}C -TEA	6.80
OCT3	^3H -HT	2.25
OCTN1	^{14}C -TEA	4.66
OCTN2	^3H -Car	210.34

被阐明^[7-8],因此小檗碱与其他治疗药物联合用药的可能性也越来越大。小檗碱在体液环境下以阳离子的形式存在,不仅是 OCT1、OCT2 和 OCT3 底物^[4],也是 3 种有机阳离子转运体的竞争性抑制剂 (表 2 和图 2)。小檗碱对 OCT1、OCT2、OCT3 和 OCTN1

具有较强的抑制作用 (表 1),这预示着小檗碱发生由 OCT1、OCT2、OCT3 和 OCTN1 介导的 DDI 的可能性较大,因此小檗碱在同这些转运体的底物联合用药时,应考虑发生 DDI 的可能性。OCT1、OCT2 和 OCT3 在肾脏中表达量相对较高,从一定程度上解释了小檗碱经肠道吸收后在肾脏中分布较高的现象^[9-12]。OCTN1 和 OCTN2 广泛存在于肾脏、肝脏、结肠、大脑、胎盘、骨骼肌、皮肤、肿瘤等组织中,对人体中 *L*-Carnitine 和 Ergothioneine 的分布和排泄具有重要作用,在脂肪酸的运输和维持中枢神经系统功能方面也具有重要意义^[9-10],本研究发现,小檗碱对 OCTN1 和 OCTN2 各自介导的 ^{14}C -TEA 和 ^{14}C -Car 转运活性都具有明显的抑制作用,尤其是对 OCTN1 具有较强的抑制作用 ($\text{IC}_{50}=4.66 \mu\text{mol/L}$),这预示了小檗碱在一些中枢神经系统疾病的治疗上

将会发挥一定的作用。

参考文献

- [1] Hu J, Che L, Li L, et al. Co-activation of AKT and c-Met triggers rapid hepatocellular carcinoma development via the mTORC1/FASN pathway in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(20484): 1-12.
- [2] 黄兴, 李艳芬, 寇冠军, 等. 小檗碱抗动脉粥样硬化作用机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(3): 469-473.
- [3] 丁阳平, 叶小利, 周洁, 等. 小檗碱降糖作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 763-769.
- [4] Wu W D, Yi X L, Jiang L X, et al. The targeted-liposome delivery system of antitumor drugs [J]. *Curr Drug Metab*, 2015, 16(10): 894-910.
- [5] 董艳, 武卫党, 慈小燕, 等. L-型氨基酸转运体 1 在肿瘤诊断和治疗中的研究进展 [J]. *天津医药*, 2015, 57(12): 1456-1459.
- [6] Sun S, Kai W, Lei H, et al. Inhibition of organic cation transporter 2 and 3 may be involved in the mechanism of the antidepressant-like action of berberine [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 49(1437): 1-6.
- [7] Ahlin G, Chen L, Lazorova L, et al. Genotype-dependent effects of inhibitors of the organic cation transporter, OCT1: predictions of metformin interactions [J]. *Pharmacogenomics J*, 2011, 11(6): 400-11.
- [8] Okuda M, Urakami Y, Saito H, et al. Molecular mechanisms of organic cation transport in OCT2-expressing *Xenopus* oocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1417(2): 224-231.
- [9] Pochini L, Scalise M, Silvestre S D, et al. Acetylcholine and acetylcarnitine transport in peritoneum: Role of the SLC22A4 (OCTN1) transporter [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858(4): 653-660.
- [10] Geng F H, Li G H, Zhang X, et al. Berberine improves mesenteric artery insulin sensitivity through up-regulating insulin receptor-mediated signaling in diabetic rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(10): 1569-1579.
- [11] Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, et al. Discovery of the ergothioneine transporter [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(14): 5256-5261.
- [12] 张杨, 张振秋, 孙兆姝, 等. 黄柏、苍术药对提取物中盐酸小檗碱在大鼠体内的药代动力学研究 [J]. *中成药*, 2009, 31(9): 1351-1354.
- (上接第 611 页)
- [8] Srinivasan S. Granulation techniques and technologies: recent progresses [J]. *BioImpacts*, 2015, 5(1): 55-63.
- [9] Chang C S, Peter K. Mini review: Mechanisms to the loss of tabletability by drygranulation [J/OL]. (2016-5-3) [2016-6-4]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.04.003>.
- [10] Barbara D, April C B, Dale P C, et al. International Guidelines for Bioequivalence of Systemically Available Orally Administered Generic Drug Products: A Survey of Similarities and Differences [J]. *AAPS*, 2013, 10(15): 974-990.
- [11] Chris S, Helen S, Elizabeth S, et al. Comparison of the In Vivo Pharmacokinetics and In Vitro Dissolution of Branded Versus Generic Efavirenz Formulation in HIV-Infected Patients [J]. *Ther Drug Monit*, 2016, 38(3): 420-422.