

基于药物转运体的元胡止痛方药效成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素跨血脑屏障机制研究

文蕊鑫^{1,2}, 王泽^{2,3,4}, 陈玥雯^{2,4}, 慈小燕^{2,4}, 董艳⁵, 崔涛^{2,3,4}, 闫凤英^{2,4}, 伊秀林^{1,2,3}, 梁士民^{2,4}, 傅鹏^{1*}, 武卫党^{2,4*}

1. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032
2. 天津药物研究院 释药技术与药代国家重点实验室, 天津 300301
3. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 北京 100730
4. 天津和创生物技术有限公司, 天津 300301
5. 天津医科大学朱宪彝纪念医院 天津市内分泌研究所, 天津 300134

摘要: 目的 基于药物转运体研究元胡止痛方药效成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素跨血脑屏障转运机制。方法 建立hCMEC/D3-U87双层细胞模型研究延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素的跨血脑屏障吸收情况; 通过实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 法测定hCMEC/D3细胞中相关转运体蛋白多药耐药蛋白1 (MDR1)、乳腺癌耐药蛋白 (BCRP)、有机阳离子转运体1 (OCT1)、OCT2、OCT3、有机阴离子转运体1 (OCTN1)、OCTN2、OATP1A2、OATP2B1的mRNA表达水平; 使用6株过表达人转运体的细胞株 (S2-OCT1、S2-OCT3、S2-OCTN1、S2-OCTN2、HEK293-OATP1A2、HEK293-OATP2B1) 进行摄取实验, 判断各药物成分是否为转运体蛋白的底物。结果 各成分均可以一定程度地跨越血脑屏障, 延胡索乙素、欧前胡素、异欧前胡素具有更好的跨血脑屏障特性, 巴马汀和原阿片碱的跨血脑屏障能力较弱。外排型转运蛋白MDR1、BCRP和摄入型转运蛋白OCTN1、OATP2B1、OATP1A2在hCMEC/D3细胞中有相对高的mRNA表达水平。延胡索乙素是OCT1、OCTN1和OATP1A2的底物; 巴马汀是OCT1、OCT3、OCTN1、OCTN2和OATP2B1的底物; 原阿片碱是OCT1、OCTN1和OCTN2的底物; 欧前胡素、异欧前胡素是OCT3的底物。结论 延胡索乙素可能通过转运体OATP1A2、OCT1、OCTN1跨越血脑屏障进入脑组织细胞; 巴马汀可能通过OATP2B1、OCT1、OCT3、OCTN1、OCTN2传递进入脑组织细胞; 原阿片碱可能通过OCT1、OCTN1和OCTN2传递进入脑组织细胞; 欧前胡素、异欧前胡素可能通过OCT3传递进入脑组织细胞。

关键词: 元胡止痛方; 血脑屏障; 药物转运体; 延胡索乙素; 巴马汀; 原阿片碱; 欧前胡素; 异欧前胡素

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 03-0552-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.011

Study on mechanism of tetrahydropalmatine, palmatine, protoopiate, imperatorin and isoimperatorin in Yuanhu Zhitong Formula across blood-brain barrier based on drug transporter

WEN Ruixin^{1,2}, WANG Ze^{2,3,4}, CHEN Yuewen^{2,4}, CI Xiaoyan^{2,4}, DONG Yan⁵, CUI Tao^{2,3,4}, YAN Fengying^{2,4}, YI Xiulin^{1,2,3}, LIANG Shimin^{2,4}, FU Peng¹, WU Weidang^{2,4}

1. Anhui Medical University, Hefei 230032, China
2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China
3. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

收稿日期: 2023-01-12

基金项目: 释药技术与药代动力学国家重点实验室(天津药物研究院)自主研究课题资助(010161002); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2019-I2M-5-020); 天津市“项目+团队”重点培养专项(创新类)(XC202030)

第一作者: 文蕊鑫(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物学。Tel: (022)84478813 E-mail: wenruixin2020@163.com

*共同通信作者: 傅鹏, 研究员, 硕士生导师。E-mail: fupeng1228@126.com

武卫党, 副研究员, 博士。Tel: (022)84478813 E-mail: wuwd@tjipr.com

4. Tianjin Hechuang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300301, China

5. Chu Hsien-I Memorial Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China

Abstract: Objective To explore the trans-blood-brain barrier (BBB) transport mechanism of different medicinal components of Yuanhu Zhitong Prescription: tetrahydropalmatine, palmatine, fumarine, imperatorin and isoimperatorin based on drug transporter. **Methods** A bilayer cell model of hCMEC/D3-U87 was developed to study the cross-BBB absorption of different components of the drug. The mRNA expression levels of related transporter proteins multidrug resistance protein 1 (*MDR1*), breast cancer resistance protein (*BCRP*), organic cation transporter 1 (*OCT1*), *OCT2*, *OCT3*, organic anion transporter 1 (*OCTN1*), *OCTN2*, *OATP1A2*, *OATP2B1* in hCMEC/D3 cells were measured by real-time fluorescence quantitative PCR. Six cell lines overexpressing human transporters (S2-OCT1, S2-OCT3, S2-OCTN1, S2-OCTN2, HEK293-OATP1A2, HEK293-OATP2B1) were used for the uptake test to determine whether the drug components were substrates of transporter protein. **Results** All components could cross the blood-brain barrier to a certain extent, tetrahydropalmatine, imperatorin and isoimperatorin had better characteristics of crossing the blood-brain barrier, while palmatine and protooipate had weaker ability of crossing the blood-brain barrier. The efflux transporter *MDR1*, *BCRP* and the uptake transporter *OCTN1*, *OATP2B1*, *OATP1A2* had relatively high mRNA expression levels in hCMEC/D3 cells. Tetrahydropalmatine was the substrate of *OCT1*, *OCTN1* and *OATP1A2*. Palmatine was the substrate of *OCT1*, *OCT3*, *OCTN1*, *OCTN2* and *OATP2B1*. Protopine was the substrate of *OCT1*, *OCTN1* and *OCTN2*. Imperatorin and isoimperatorin were the substrates of *OCT3*. **Conclusion** Tetrahydropalmatine enters the BBB via *OATP1A2*, *OCT1*, and *OCTN1*. Palmatine enters the BBB via *OATP2B1*, *OCT1*, *OCT3*, *OCTN1*, and *OCTN2*. Protopine enters the BBB via *OCT1*, *OCTN1*, and *OCTN2*. Imperatorin and isoimperatorin enters the BBB via *OCT3*.

Key words: Yuanhu Zhitong Prescription; blood-brain barrier; drug transporter; tetrahydropalmatine; palmatine; fumarine; imperatorin; isoimperatorin

元胡止痛方由延胡索、白芷2味中药组成,具有理气、活血、止痛之功效,用于气滞血瘀的胃痛、胁痛、头痛及痛经等的治疗^[1-4]。研究表明延胡索主要质量标志物为延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱等生物碱类成分,白芷主要质量标志物为欧前胡素、异欧前胡素等香豆素类成分^[5-6]。元胡止痛方常被用作中枢镇痛类药物来治疗头痛。中枢镇痛类药物需要跨过血脑屏障(BBB)才能发挥作用^[7-8]。前期研究表明,大鼠 ig 给药元胡止痛方后,延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱等生物碱和欧前胡素、异欧前胡素等香豆素类成分均能在血液和脑组织中检测到^[9],但其跨 BBB 的机制尚未明确。

药物转运体是存在于生物膜上的对药物的跨膜转运有重要作用的通道蛋白,广泛表达于人体的各个组织和器官,是研究药物跨膜转运机制的有力工具。研究药物成分与不同器官或组织中药物转运体的相互作用关系,对阐明药物的吸收、分布、清除等体内过程具有重要作用^[10-11]。药物转运体按照功能类型主要分为外排型转运体和摄入型转运体。外排型转运体包括乳腺癌耐药蛋白(*BCRP*)、多药耐药蛋白(*MDR*)、胆酸盐外排泵(*BSEP*)等^[12-14];摄入型转运体包括有机阴离子转运体(*OAT*)、有机阳离子转运体(*OCT*)和寡肽转运蛋白(*PEPT*)等^[15-16]。

永生化人脑微血管内皮细胞系(hCMEC/D3)通

过分离技术和基因工程技术改造后,被广泛用于体外 BBB 模型的构建^[17]和药物跨 BBB 转运机制的研究。hCMEC/D3 在体外能够很好地维持 BBB 的生理屏障特性,表达典型的内皮标志物,能够较好地模拟药物的跨 BBB 特性,对研究药物的跨 BBB 机制有重要意义^[18-19]。

本研究采用 hCMEC/D3 细胞和脑胶质瘤细胞 U87 共培养建立体外 BBB 模型,研究元胡止痛方中不同药物成分跨 BBB 转运机制,使用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 hCMEC/D3 细胞中相关药物转运体的表达水平,结果提示从药物转运体蛋白角度研究药物成分跨膜运输。使用 hCMEC/D3 细胞中较高表达的药物转运体的体外过表达单克隆细胞模型,研究单个转运体对元胡止痛方中不同药物成分的转运作用,分析不同药物成分跨 BBB 跨膜运输的具体机制。本研究旨在解释元胡止痛方中主要药物成分跨 BBB 运输机制,为元胡止痛方在中枢镇痛治疗方面提供理论支撑,为中药传统处方临床应用及药物相互作用提供数据支持及依据。

1 材料

1.1 细胞

转运体过表达单克隆细胞株[小鼠肾小管 S2 端表皮细胞(S2)-*OCT1*、S2-*OCT2*、S2-*OCT3*、S2-有机阴离子转运体 1(*OCTN1*)、S2-*OCTN2*、HEK293-

OATP1A2、HEK293-OATP2B1]、空白载体转染细胞(HEK-Mock、S2-Mock)、hCMEC/D3细胞、U87细胞均由天津药物研究院新药评价有限公司、国家释药技术及药理学重点实验室提供。

1.2 药物及主要试剂

延胡索乙素(上海将来试剂有限公司,批号J140303,质量分数 $\geq 98\%$);巴马汀(中国药品生物制品检定所,批号110732-200506,质量分数 $\geq 98\%$);原阿片碱(中国药品生物制品检定所,批号MUST-15032410,质量分数 $\geq 99.46\%$);欧前胡素(中国药品生物制品检定所,批号MUST-15030910,质量分数 $\geq 98\%$);异欧前胡素(中国药品生物制品检定所,批号MUST-15040214,质量分数 $\geq 98\%$)。

磷酸缓冲液(PBS,Gibco公司,批号070M8306);二甲基亚砜(DMSO,Solarbio公司,批号1065C241);100 \times 青链霉素混合液(Solarbio公司,批号20170624);DMEM(Hyclone公司,批号AB10137517);聚酯膜(PET,0.4 μm ,12孔,Becton Dickinson);胎牛血清(FBS,Gibco公司,批号1739463);本研究PCR反应所用引物均由北京六合

华大基因科技有限公司合成。

1.3 主要仪器

BS124S分析天平,瑞士Sartorius公司;HERAcell 150i二氧化碳培养箱,美国Thermo Scientific公司;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;ZHWHY-上海智诚恒温振荡器,北京华威兴业科技有限公司;MillcellERS-2跨上皮电阻仪,Millipore公司;Acquity H-Class超高效液相色谱仪,美国Waters公司;Transwell[®]12孔聚碳酸酯膜转运板、细胞培养皿、离心管、移液管等实验耗材均购自Corning公司。

2 方法与结果

2.1 各药物成分HPLC检测方法的建立

各药物成分HPLC分析条件参考本课题组前期研究进行建立^[20],同时进行方法学验证,以评估HPLC分析方法在本研究中的适用性。

2.1.1 HPLC条件 使用Diamosil C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm ,迪马公司),各药物成分色谱流动相比、柱温及检测波长见表1,采用等度洗脱,体积流量为0.3 mL $\cdot\text{kg}^{-1}$,进样量10 μL 。

表1 各中药成分色谱条件及标准曲线

Table 1 HPLC conditions and standard curves of different components

成分	流动相	波长/nm	柱温/ $^{\circ}\text{C}$	回归方程	<i>r</i>
延胡索乙素	乙腈-0.34% KH ₂ PO ₄ (25:75)	280	30	$y=12.9854x-0.1240$	0.9983
巴马汀	乙腈-0.34% KH ₂ PO ₄ (30:70)	345	30	$y=111.0856x+2.7300$	0.9989
原阿片碱	乙腈-0.34% KH ₂ PO ₄ (25:75)	280	30	$y=15.9819x-0.2104$	0.9991
欧前胡素	乙腈-H ₂ O(60:40)	248	30	$y=70.0239x+1.2989$	0.9988
异欧前胡素	乙腈-H ₂ O(60:40)	248	30	$y=53.2259x+0.1991$	0.9986

2.1.2 方法学验证

药物对照品储备液配制:精密称取延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素、异欧前胡素对照品适量,使用甲醇分别溶解后定容至10 mL,配制成质量浓度为100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。

线性关系与范围考察:精密吸取各药物储备液,使用甲醇梯度稀释,其中延胡索乙素、欧前胡素和异欧前胡素终质量浓度为10、20、100、400、2 000、8 000、10 000 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$,线性范围为10~10 000 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$;巴马汀和原阿片碱的终质量浓度为5、10、50、200、1 000、4 000、5 000 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$,线性范围为5~5 000 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按照HPLC检测条件进行检测,以待测成分峰面积为纵坐标,待测成分质量浓度为横坐标绘制标准曲线,进行回归分析。各成分回归方程见表1。

准确度和精密度考察:精密吸取各药物储备液,使用甲醇梯度稀释。取低、中、高质量浓度的各药物溶液(延胡索乙素、欧前胡素和异欧前胡素终质量浓度为20、400、8 000 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$,巴马汀和原阿片碱的终质量浓度为10、200、4 000 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$),连续进样6次,进样3批。各药物峰面积准确度范围在3.82%~6.55%,批内精密度RSD为0.22%~5.73%,批间精密度RSD为0.54%~6.05%,结果表明该方法准确度、精密度良好。

回收率测定:精密吸取各药物储备液,使用甲醇梯度稀释为100 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。样品平行6份,进样测定峰面积,根据标准曲线计算得各药物成分的质量浓度,计算回收率。回收试验结果表明,各成分回收率在95.24%~100.97%,RSD为1.42%~5.29%,

回收率良好。

稳定性考察:取“2.4”项中处理好的同一批次实验样品溶液,分别于室温下放置0、4、6、8、12、24 h后,按照“2.1.1”项条件上样,测定各成分的出峰时间与峰面积。样品在不同条件下各成分出峰时间无明显变化,峰面积的RSD均小于12%,结果表明样品溶液中各成分稳定性良好。建立的不同药物成分的HPLC分析方法,经方法学考察后均达到生物样品分析要求。

2.2 各药物成分体外跨BBB转运实验

2.2.1 体外跨BBB模型的建立

将PET膜两侧涂鼠尾胶,以 $1.0 \times 10^6 \cdot \text{cm}^{-2}$ 的密度吸取0.1 mL U87单细胞悬液接种于PET膜底面,每组实验设置3复孔,同时以只涂鼠尾胶的PET膜为空白对照组;倒置于培养皿内培养;4 h后翻转Transwell小室,按正常位置置于12孔培养板中,加入培养液至1.5 mL,每2天换液1次。待U87融合达80%后接种第2~5代经原代培养后的hCMEC/D3细胞($1.0 \times 10^6 \cdot \text{cm}^{-2}$)于PET膜的正面,加培养液0.5 mL,放入37 °C、5% CO₂、相对湿度90%的培养箱中连续培养10 d,每天换液1次。

每天用倒置相差显微镜下观察hCMEC/D3与U87在PET膜上的生长情况并用跨膜电阻检测仪测定共培养组和空白对照组跨膜电阻值(TEER),用来评价体外跨BBB模型。测定TEER值:弃培养液,PBS洗3遍,将Transwell小室置于PBS缓冲液中测定电阻值。

倒置显微镜下观察,hCMEC/D3细胞呈短梭形,涡旋状分布;U87细胞具有许多分支和突起,呈星形。2种细胞共培养后能够在膜上下两侧正常生长。TEER值是用于检测细胞旁屏障特性的变化,体现细胞与细胞之间紧密连接完整性。共培养10 d后测得跨内皮细胞间电阻可达到 $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$,可初步判断hCMEC/D3和U87细胞间的致密性良好,建立的体外BBB模型符合实验要求。

2.2.2 各药物成分跨体外BBB模型实验

用Hank's平衡盐溶液(HBSS)配制受试药物,终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,移走培养板中的培养基,加入37 °C预热的HBSS缓冲液,37 °C平衡20 min,移走HBSS缓冲液。在滤膜顶侧(AP)加0.5 mL预热的含不同药物成分的HBSS,基底侧(BL)加1.5 mL HBSS;之后在恒温振荡器中37 °C培养1.5 h,转速 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$;检测AP→BL转运时取BL侧转运液,将取出的转运液立即加入100 μL色谱甲醇,超声10 min,于

4 °C、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液通过HPLC法测定转运液中药物成分浓度,计算表观渗透系数(P_{app})。

$$P_{\text{app}} = dQ/dt / (A \times C_0)$$

dQ/dt 为接收池单位时间药物转运量; A 为转运膜的表面积; C_0 为药物初始浓度

元胡止痛方中不同中药成分跨BBB实验结果见表2。由于 $P_{\text{app}} > 1.0 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 的成分更易透过BBB,因此延胡索乙素、欧前胡素、异欧前胡素具有更好的跨BBB特性,巴马汀和原阿片碱的跨BBB能力较弱,表明各中药药物成分均可以一定程度地跨越BBB。

表2 不同药物成分在体外跨BBB转运结果

Table 2 *In vitro* transport results of different components across blood-brain barrier

成分	AP-BL $P_{\text{app}} / (\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$
延胡索乙素	12.98±0.24
巴马汀	8.42±0.54
原阿片碱	6.21±0.80
欧前胡素	10.83±1.88
异欧前胡素	11.51±2.39

2.3 qRT-PCR检测hCMEC/D3细胞转运蛋白的mRNA表达水平

使用RNA提取试剂盒(Trizol)提取hCMEC/D3细胞总RNA,鉴定RNA的纯度及完整性。使用RNA逆转录试剂盒(Roche)逆转录成cDNA,而后以cDNA为模板,将内参基因GAPDH分别与MDR1、BCRP、OCT1、OCT3、OCTN1、OCTN2、OATP2B1、OAT1A2的基因同时扩增,基因引物序列见表3。扩增条件均为95 °C预变性2 min;95 °C变性5 s,55 °C退火15 s,65 °C延伸20 s,循环40次。

hCMECD/3细胞中部分转运蛋白基因表达结果见图1。结果表明,外排型转运蛋白MDR1、BCRP和摄入型转运蛋白OCTN1、OATP2B1、OATP1A2在hCMECD/3细胞中有相对高的表达。该结果表明使用该hCMECD/3细胞系构建药物转运体的体外BBB模型满足本实验需求,同时明确各转运体蛋白的相对表达水平,提示可以从转运体蛋白的角度研究跨膜运输机制。

2.4 过表达人转运体细胞株摄取实验

根据hCMEC/D3细胞转运蛋白的表达水平和各药物成分体外跨BBB实验,使用6株过表达人转

表3 qRT-PCR引物序列
Table 3 Primers for qRT-PCR

引物	序列(5'→3')
GAPDH	正向 GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	反向 ACCACCTGTGCTGTAGCCAA
OCT1	正向 CGCACCTTCATCCTGATGTACC
	反向 GAGCGGAGTAAAGGAAATCCAGG
OCT2	正向 GAGATAGTCTGCCTGGTCAATGC
	反向 GTAGACCAGGAATGGCGTGATG
OCT3	正向 CCTTGTCTGTGTCAATGCGTGG
	反向 CCAACACCAAGGCAGGATAGCA
OCTN1	正向 TGGACCTGTTCAAGACTCGGAA
	反向 TAGGAGCATCCAGAGACAGAGC
OCTN2	正向 GCTACATGGTGTGCCACTGTT
	反向 CTGCCTCTCAAATCGTCCCTG
OATP2B1	正向 GTTTCGCGCAAAGGTCTTAGCAG
	反向 CCATCCTGCTTCTCGTGGACT
OATP1A2	正向 GTGAGACATCCATTGGAACGGG
	反向 GGAGCATCAAGGAACAGTCAGG
BCRP	正向 GTTCTCAGCAGCTCTTCGGCTT
	反向 TCCTCCAGACACACCACGGATA
MDR1	正向 GCTGTCAAGGAAGCCAATGCCT
	反向 TGCAATGGCGATCCTCTGCTTC

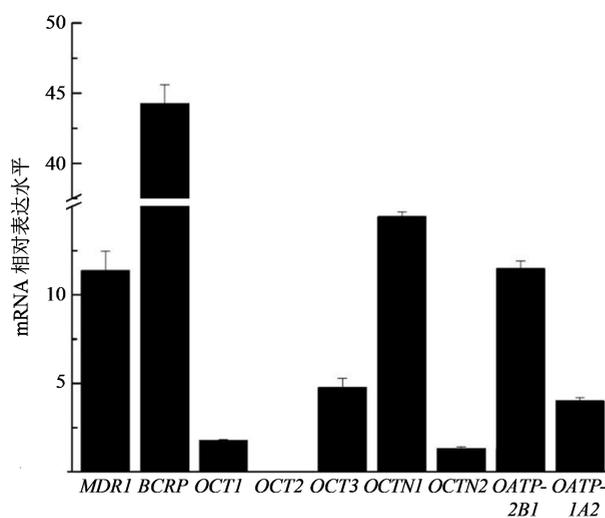


图1 hCMECD/3细胞中转运体的mRNA表达水平

Fig. 1 mRNA expression levels of different transporters in hCMECD/3 cells

运体的细胞株(S2-OCT1、S2-OCT3、S2-OCTN1、S2-OCTN2、HEK293-OATP1A2、HEK293-OATP2B1)及空白载体转染细胞(HEK293-Mock、S2-Mock)进行过表达人转运体的细胞株摄取实验。细胞经过复苏和传代培养后,用胰酶消化使其分散为单细胞悬液,用培养基稀释至 $1.5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 后将细胞悬液以

每孔1 mL的量接种至24孔细胞培养板,在 37°C 、5% CO_2 、饱和空气湿度(95%)的培养箱内培养2~3 d使细胞长满各孔。

移去培养板内培养液,用PBS缓冲液清洗1次后,每孔加入 37°C PBS缓冲液水浴孵育10 min,以含 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 各成分的PBS置换旧PBS开始给药(每孔500 μL),每组实验设置3个复孔。2 min后,用1 mL冷PBS缓冲液终止反应,并清洗细胞3次,弃上清,用细胞刮刮下细胞,每孔添加200 μL 色谱甲醇,超声10 min,于 4°C 、 $10000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,提取细胞中摄入的化合物,分别取50 μL 上清通过所建立的HPLC法测定样品中各成分的含量。

结果如图2所示,结果表明延胡索乙素能被OCT1、OCTN1和OATP1A2主动转运摄入,摄入量分别是Mock组的9.25、3.51和4.58倍,这表明延胡索乙素是OCT1、OCTN1和OATP1A2的底物,可在其协助下完成跨膜转运;巴马汀能被OCT1、OCT3、OCTN1、OCTN2和OATP2B1主动转运摄入,摄入量分别是Mock组的14.0、2.4、9.1、5.5和13.8倍,表明巴马汀是药物转运体OCT1、OCT3、OCTN1、OCTN2和OATP2B1的转运底物,可在其协助下完成跨膜转运;原阿片碱能被OCT1、OCTN1和OCTN2主动转运摄入,摄入量分别是Mock组的8.7、2.8和10.8倍,表明原阿片碱是药物转运体OCT1、OCTN1和OCTN2的转运底物,可在其协助下完成跨膜转运;欧前胡素、异欧前胡素能被OCT3主动转运摄入,摄入量分别是Mock组的2.7、2.4倍,表明欧前胡素、异欧前胡素是OCT3的底物,可在OCT3的协助下完成跨膜转运。结果表明元胡止痛方中的主要药物成分在相应的转运体蛋白的帮助下完成跨BBB转运。

2.5 数据处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间差异采用t检验分析,通过GraphPad Prism 8.0软件计算结果。

3 讨论

近年来,对于药物转运体的研究已成为热点,药物转运体协助药物跨膜运输,实现药物在体内的有效分布,影响着药物的体内动力学过程,对临床上安全、有效、合理用药起着至关重要的作用。目前,在发展的多种永生人脑内皮细胞系构建体外BBB模型中,有报道称hCMEC/D3细胞系具有明显的优点^[21]。本研究使用hCMEC/D3细胞系模型研究了元胡止痛方中不同药物成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素、异欧前胡素的跨BBB运输

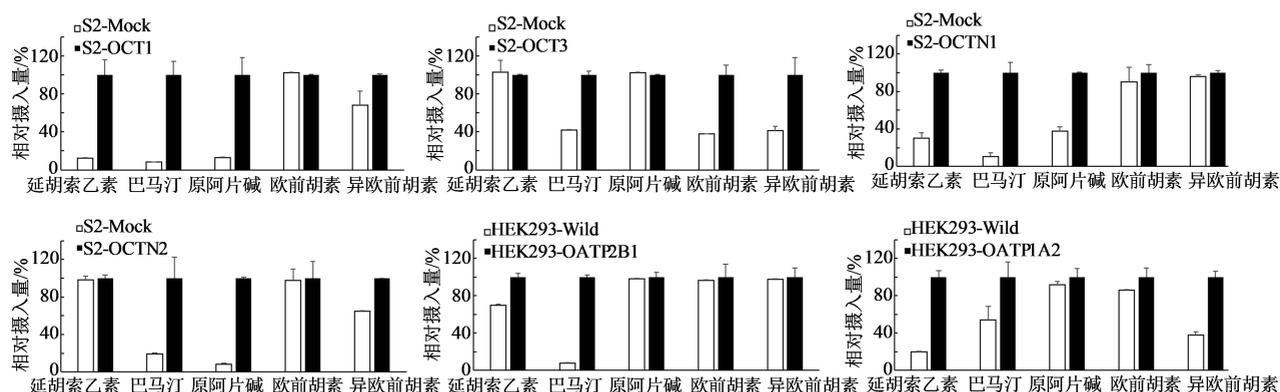


图2 不同药物成分在转运体细胞株中的摄入情况

Fig. 2 Uptake of different components into transporter cell strains

能力。结果表明5种主要成分均具有一定程度的跨越BBB的能力。随后对hCMC/D3细胞系进行了各药物转运体蛋白的qRT-PCR分析,结果表明,hCMC/D3细胞系中药物转运体BCRP、MDR1、OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1、OCTN2、OATP1A2和OATP2B1等有较高表达,提示可以从转运体蛋白的角度进行药物的跨膜转运研究,所以使用单个药物转运体过表达细胞模型,进行单一药物成分的转运体转运研究,明确各成分的具体跨BBB转运机制。

OATP1A2、OATP2B1等药物转运体主要在人脑微血管内皮细胞的AP侧(血管侧)表达,而OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1和OCTN2则主要在BL侧(脑组织间隙侧)表达^[22-23],因此药物转运体是药物由血液进入脑组织的重要通道。结合本研究中药物转运体过表达细胞模型对不同药物成分的摄取作用的结果,表明元胡止痛方中延胡索乙素可能通过OATP1A2、OCT1、OCTN1的传递跨越BBB而发挥镇痛作用;巴马汀则可能通过OATP2B1、OCT1、OCT3、OCTN1、OCTN2等跨越BBB;原阿片碱可能通过OCT1、OCTN1和OCTN2跨越BBB;欧前胡素、异欧前胡素可能通过OCT3传递跨越BBB。

本研究从转运体蛋白角度研究了元胡止痛方中主要药效成分的跨BBB运输机制,明确多种药效成分的跨BBB运输通道,为元胡止痛方在中枢镇痛方面的临床应用提供了一定的理论支持,同时为药物跨膜转运机制研究提供新的角度。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 许海玉, 侯文彬, 李珂, 等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 1-8.

Xu H Y, Hou W B, Li K, et al. Discovery and application of quality marker of traditional Chinese medicine based on integrative pharmacology [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(6): 1-8.

[2] 曹煌, 张铁军, 张静雅, 等. 基于电子鼻和电子舌技术的辛味中药气-味的表征研究[J]. 中草药, 2016, 47(11): 1962-1967.

Cao H, Zhang T J, Zhang J Y, et al. Characterization of smell and taste of pungent-taste herbs based on electronic nose and electronic tongue [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(11): 1962-1967.

[3] 冯玥, 朱振娜, 胡金芳, 等. 元胡止痛滴丸对痛经模型镇痛作用的配伍合理性和比较优势研究[J]. 药物评价研究, 2017, 40(7): 917-921.

Feng Y, Zhu Z N, Hu J F, et al. Study on compatibility rationality and comparative advantage of analgesic effect of Yuanhu Zhitong Dropping Pills on dysmenorrhea model [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(7): 917-921.

[4] 张沛, 冯亮群, 李利霞, 等. 元胡止痛片联合普瑞巴林治疗带状疱疹后遗神经痛的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(12): 2516-2521.

Zhang P, Feng L Q, Li L X, et al. Clinical study of Yuanhu Zhitong Tablets combined with pregabalin in treatment of postherpetic neuralgia [J]. Drug Clin, 2021, 36(12): 2516-2521.

[5] 张铁军, 许浚, 申秀萍, 等. 基于中药质量标志物(Q-Marker)的元胡止痛滴丸的"性-效-物"三元关系和作用机制研究[J]. 中草药, 2016, 47(13): 2199-2211.

Zhang T J, Xu J, Shen X P, et al. Relation of "property-response-component" and action mechanism of Yuanhu Zhitong Dropping Pills based on quality marker (Q-Marker) [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(13): 2199-2211.

[6] 韩彦琪, 许浚, 张喜民, 等. 基于网络药理学的元胡止痛滴丸治疗原发性痛经的作用机制研究[J]. 药理学报, 2017, 38(12): 1962-1967.

- 2016, 51(3): 380-387.
- Han Y Q, Xu J, Zhang X M, et al. Network pharmacology-based study on mechanism of Yuanhu Zhitong Dropping Pills in the treatment of primary dysmenorrhea [J]. *Acta Pharm Sin*, 2016, 51(3): 380-387.
- [7] 张笑恺. 元胡止痛方治疗偏头痛的功效成分分析和作用机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- Zhang X K. The effective ingredients and mechanism study of Yuanhu Zhitong prescription in treating migraine [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2015.
- [8] 钟凯龙, 王永胜, 陈方, 等. 基于血脑屏障转运体的中枢神经系统疾病治疗策略探讨与展望 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25(8): 953-960.
- Zhong K L, Wang Y S, Chen F, et al. Exploration and expectation on treatment strategies of central nervous system diseases based on transporters at blood-brain barrier [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2020, 25(8): 953-960.
- [9] Wang Z, Shang H H, Li Y Z, et al. Transporters (OATs and OATPs) contribute to illustrate the mechanism of medicinal compatibility of ingredients with different properties in Yuanhuzhitong prescription [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(9): 1646-1657.
- [10] Chothe P P, Nakakariya M, Rotter C J, et al. Recent advances in drug transporter sciences: Highlights from the year 2020 [J]. *Drug Metab Rev*, 2021, 53(3): 321-349.
- [11] Wang Z, Cui T, Ci X Y, et al. The effect of polymorphism of uric acid transporters on uric acid transport [J]. *J Nephrol*, 2019, 32(2): 177-187.
- [12] Gorczyca L, Aleksunes L M. Transcription factor-mediated regulation of the BCRP/ABCG2 efflux transporter: A review across tissues and species [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2020, 16(3): 239-253.
- [13] Hanssen K M, Haber M, Fletcher J I. Targeting multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) -expressing cancers: Beyond pharmacological inhibition [J]. *Drug Resist Updat*, 2021, 59: 100795.
- [14] van Wessel D B E, Thompson R J, Gonzales E, et al. Genotype correlates with the natural history of severe bile salt export pump deficiency [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 84-93.
- [15] Marada V V V R, Florl S, Kuhne A, et al. Interaction of human organic anion transporter 2 (OAT2) and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) with antineoplastic drugs [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 91: 78-87.
- [16] 石琳, 王泽, 崔涛, 等. 肉碱/有机阳离子转运体对元胡止痛方中主要药性成分的转运机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(8): 2384-2391.
- Shi L, Wang Z, Cui T, et al. Mechanism of transmembrane transport of main medicinal components in Yuanhu Zhitong Prescription by OCTNs [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(8): 2384-2391.
- [17] Vu K, Weksler B, Romero I, et al. Immortalized human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates *in vitro* studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans* [J]. *Eukaryot Cell*, 2009, 8(11): 1803-1807.
- [18] 丁怡丹. 基于hCMEC/D₃细胞单层膜作为血脑屏障模型的地西洋低氧转运研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- Ding Y D. Transport of diazepam in hypoxia based on hCMEC/D₃ cell monolayer as a blood brain barrier model [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2020.
- [19] 申杰, 徐桂华. 血脑屏障体外模型及相关实验方法的研究进展 [J]. *中华神经医学杂志*, 2021, 20(9): 963-966.
- Shen J, Xu G H. Recent advance in *in vitro* blood-brain barrier models and their related experimental methods [J]. *Chin J Neuromed*, 2021, 20(9): 963-966.
- [20] 王泽, 武卫党, 慈小燕, 等. 有机阴离子转运体1和3在不同药性中药成分跨膜转运中的作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(4): 372-376.
- Wang Z, Wu W D, Ci X Y, et al. Role of organic anion transporters 1 and 3 in the transmembrane transport of Chinese herb components with different property [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2019, 35(4): 372-376.
- [21] Sánchez-Dengra B, González-Álvarez I, Sousa F, et al. *In vitro* model for predicting the access and distribution of drugs in the brain using hCMEC/D3 cells [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, 163: 120-126.
- [22] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies [J]. *Drug Metab Pharmacokin*, 2005, 20(6): 452-477.
- [23] 慈小燕, 崔涛, 武卫党, 等. 药物的跨膜转运机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(6): 973-979.
- Ci X Y, Cui T, Wu W D, et al. Research progress on drug transmembrane transport mechanism [J]. *Drug Eval Res*, 2018, 41(6): 973-979.