

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

石琳¹, 王泽^{2,3}, 崔涛^{4,5}, 慈小燕^{4,5}, 闫凤英^{4,5}, 伊秀林^{1,4,5*}, 武卫党^{2,4,5*}

1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

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 300450

3. 天津中医药大学, 天津 300193

4. 天津药物研究院 生物技术中心, 天津 300450

5. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 北京 100050

摘要: 目的 研究肉碱/有机阳离子转运体 (carnitine/organic cation transporter) N1、N2 (OCTN1、OCTN2) 对元胡止痛方中主要药性成分的跨膜转运机制, 预测 OCTN1 和 OCTN2 在各药性成分跨膜转运过程中的作用。方法 应用 OCTN1、OCTN2 高表达细胞株 S2-OCTN1、S2-OCTN2, 测定元胡止痛方中主要苦味药性成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱和辛味药性成分欧前胡素、异欧前胡素对 OCTN1、OCTN2 的抑制作用及半数抑制浓度 (IC_{50})。通过测定 OCTN1、OCTN2 及空白载体转染细胞 Mock 对不同药性成分的摄取能力, 判断各药性成分是否为 OCTN1 和 OCTN2 的底物, 进一步测定延胡索乙素在 OCTN1 和 OCTN2 中的米氏常数 (K_m) 和细胞摄取底物最大转运速率 (V_{max})。结果 苦味药性成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱和辛味药性成分欧前胡素、异欧前胡素对 OCTN1 和 OCTN2 的转运活性有显著抑制作用, 对 OCTN1 的 IC_{50} 分别是 15.43、14.06、21.23、4.91、23.29 $\mu\text{mol/L}$; 对 OCTN2 的 IC_{50} 分别是 19.08、14.24、8.90、17.06、13.98 $\mu\text{mol/L}$ 。OCTN1 对延胡索乙素、巴马汀和原阿片碱的摄取活性分别是 Mock 的 3.46、8.72 和 2.88 倍, OCTN2 对延胡索乙素、巴马汀和原阿片碱的摄取活性分别是 Mock 的 2.58、5.86 和 9.75 倍, OCTN1 和 OCTN2 对欧前胡素和异欧前胡素的摄取活性与 Mock 均无显著差异。转运动力学实验结果显示, 延胡索乙素在 OCTN1 上的 K_m 和 V_{max} 为 6.39 $\mu\text{mol/L}$ 、120.92 $\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 在 OCTN2 上的 K_m 和 V_{max} 为 25.66 $\mu\text{mol/L}$ 、637.03 $\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。结论 元胡止痛方中的药性成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素对 OCTN1 和 OCTN2 的转运活性具有较强的抑制作用, 其中延胡索乙素、巴马汀和原阿片碱是 OCTN1 和 OCTN2 的底物, 因此在不同药性成分跨膜转运过程中存在由 OCTN1 和 OCTN2 介导的药物-药物相互作用。

关键词: 元胡止痛方; 肉碱/有机阳离子转运体 N1; 肉碱/有机阳离子转运体 N2; 药物-药物相互作用; 药物转运; 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: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)08-2384-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.022

Mechanism of transmembrane transport of main medicinal components in Yuanhu Zhitong Prescription by OCTNs

SHI Lin¹, WANG Ze^{2,3}, CUI Tao^{4,5}, CI Xiao-yan^{4,5}, YAN Feng-ying^{4,5}, YI Xiu-lin^{1,4,5}, WU Wei-dang^{2,4,5}

1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300450, China

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

4. Biotechnology Center, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300450, China

5. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

收稿日期: 2020-12-17

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); 药物一致性评价关键技术与标准研究项目 (2017zx09101001-004)

作者简介: 石琳 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: (022)84478813 E-mail: shilin9503@163.com

*通信作者: 伊秀林, 研究员, 硕士生导师。Tel: (022)84478812 E-mail: yixl@tjipr.com

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

Abstract: Objective To study the transmembrane transport mechanism of carnitine / organic cation transporters 1 and 2 (OCTN1 and OCTN2) on the main medicinal components of Yuanhu Zhitong Prescription (元胡止痛方), and predict the role of OCTN1 and OCTN2 in the transmembrane transport of various medicinal components. **Methods** The OCTN1, OCTN2 highly expressed cell lines S2-OCTN1, S2-OCTN2 were used to detect the inhibitory effects and half inhibitory concentrations (IC_{50}) of main bitter medicinal components tetrahydropalmatine, palmatine, protopine and pungent medicinal components imperatorin and isoimperatorin on OCTN1 and OCTN2 in Yuanhu Zhitong Prescription. By measuring the uptake ability of OCTN1, OCTN2 and blank vector transfected cell Mock to different drug components, it was judged whether the drug components were the substrate of OCTN1 and OCTN2. The michaelis constant (K_m) and the maximum transport rate (V_{max}) of the substrate uptake by the cell of tetrahydropalmatine in OCTN1 and OCTN2 were further determined. **Results** Bitter medicinal components tetrahydropalmatine, palmatine, and protopine and pungent medicinal components imperatorin and isoimperatorin significantly inhibited the transport activity of OCTN1 and OCTN2, the IC_{50} of inhibitory effect of which on OCTN1 was 15.43, 14.06, 21.23, 4.91, and 23.29 $\mu\text{mol/L}$, respectively; And the IC_{50} of inhibitory effect on OCTN2 was 19.08, 14.24, 8.90, 17.06, and 13.98 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The uptake activity of OCTN1 to tetrahydropalmatine, palmatine and protopine was 3.46, 8.72, and 2.88 times higher than that of Mock, and the uptake activity of OCTN2 to tetrahydropalmatine, palmatine and protopine was 2.58, 5.86, and 9.75 times higher than that of Mock, respectively. The uptake activity of OCTN1 and OCTN2 on imperatorin and isoimperatorin was not significantly different from Mock. The K_m and V_{max} of tetrahydropalmatine on OCTN1 were 6.39 $\mu\text{mol/L}$ and 120.92 pmol/mg protein/min, on OCTN2 were 25.66 $\mu\text{mol/L}$ and 637.03 pmol/mg protein/min. **Conclusion** Tetrahydropalmatine, palmatine, protopine, imperatorin, and isoimperatorin in Yuanhu Zhitong Prescription have strong inhibitory effects on the transport activity of OCTN1 and OCTN2, in which tetrahydropalmatine, palmatine and protopine are the substrates of OCTN1 and OCTN2, so there is drug-drug interaction mediated by OCTN1 and OCTN2 in the process of transmembrane transport of different medicinal components.

Key words: Yuanhu Zhitong Prescription; OCTN1; OCTN2; drug-drug interaction; drug transport; tetrahydropalmatine; palmatine; protopine; imperatorin; isoimperatorin

五味药性理论是中药药性理论的核心组成部分,主要包括酸、苦、甘、辛和咸 5 类不同的药味,五味不仅反映中药自身的功效属性,更在临床配伍应用中得到了充分的体现,用现代科学技术手段和方法可对五味相应物质基础进行辨识和化学生物学表征研究,根据辨识和表征结果确定不同药性成分的物质基础^[1]。利用现代科学理论和先进技术手段对经典名方中的关键化学成分进行分析和确定,并结合现代药效学、药理学及生物信息学研究方法,阐明经典名方的体内过程、作用机制、配伍机制,不仅是实现中药现代化的重要研究方向,也对更大程度地发挥经典名方的临床价值、指导临床安全用药具有重要意义^[2]。

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^[3]。延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎,味苦、辛,性温,归肝、脾经,具有镇痛、镇静和催眠作用,对冠心病、心律失常、胃溃疡等多种疾病有较好的临床效果;主要药效组分为延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱等生物碱类成分^[4-5]。白芷为伞形科当归属植物白芷 *Angelica dahurica*

(Fisch.ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 或杭白芷 *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根,味辛,性温,归肺、胃经,具有祛风散寒、通窍止痛的功效;主要药效组分为欧前胡素和异欧前胡素等香豆素类成分^[6-7]。张铁军等^[6]通过对元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究,将延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素等确定为元胡止痛方中主要药效成分,并将其定义为“质量标志物 (quality marker, Q-Marker)”。研究人员还通过电子鼻和药理学研究明确了延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱为延胡索中的苦味成分,欧前胡素和异欧前胡素为辛味成分^[8-9]。

药物转运体是药物跨膜转运的载体,可通过影响中药及其有效成分的吸收、分布、代谢和排泄等动力学过程,进而影响临床疗效和安全性。中药复方中化学成分复杂,由药物转运体介导药物-药物相互作用对复方中各成分的体内过程具有重要影响^[10-11]。研究发现中药及其有效成分在体内对药物转运体的功能和表达起到调节作用,通过对药物转运体的诱导或抑制作用,从而影响这些转运体底物在体内的处置过程^[12]。前期研究发现,元胡止痛方中各种药性成分与

药物转运体之间存在广泛的相互作用,一些重要的转运体对各药性成分的归经以及配伍有重要影响^[2,13]。为进一步阐明药物转运体在元胡止痛方中不同药性成分跨膜转运过程及配伍中的作用,本研究选择了有机阳离子转运体家族(organic cation transporters, OCT)中的 2 个重要成员 OCTN1 和 OCTN2,研究药物转运体对各药性成分的转运活性。OCTN1 和 OCTN2 为双向转运体,在体内分布较广泛,在肾小管和肝脏中有较高表达,可介导内源性物质和外源性物质的分泌和重吸收^[14]。本实验通过 OCTN1 和 OCTN2 对元胡止痛方不同药性成分跨膜转运活性的研究,明确 OCTN1 和 OCTN2 与不同药性成分的关系,为阐明元胡止痛方不同药性成分的体内动力学过程,以及由药物转运体 OCTN1 和 OCTN2 引起的药物相互作用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

药物转运体高表达单克隆细胞株(S2-OCTN1、S2-OCTN2)、空白载体转染细胞 S2-Mock,均由天津药物研究院有限公司生物技术中心提供。

1.2 药物与试剂

DMEM(批号 8120029)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 1966174C), Gibco 公司; 100×青链霉素混合液(批号 20200429), Solarbio 公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 WXBD2695V), VETEC 公司; 延胡索乙素(质量分数≥98%, 批号 J140303), 上海将来试剂有限公司; 巴马汀(质量分数≥98%, 批号 110732-200506), 中国食品药品检定研究院; 原阿片碱(质量分数≥99.46%, 批号 MUST-15032410)、欧前胡素(质量分数≥98%, 批号 MUST-15030910)、异欧前胡素(质量分数≥98%, 批号 MUST-15040214), 成都曼思特生物科技有限公司; ¹⁴C-溴化四乙胺(¹⁴C-tetraethylammonium bromide, ¹⁴C-TEA, 批号 130311)、¹⁴C-盐酸左旋肉碱(¹⁴C-carnitine hydrochloride, ¹⁴C-Car, 批号 685178), ARC 公司; 奎尼丁(质量分数≥98%, 批号 10138583), Sigma 公司; Watsons 屈臣氏蒸馏水, 屈臣氏公司; 细胞孵育液(uptake buffer, UpB, 含 NaCl 125 mmol/L、KCl 4.8 mmol/L、葡萄糖 5.6 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、CaCl₂ 1.2 mmol/L、MgSO₄ 1.2 mmol/L、HEPES 25 mmol/L, KOH 调至 pH 7.4)^[15]由实验室自制。

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; Tri-Carb 2910 TR 放射性液体闪烁仪, 美国 PerKin Elmer 公司; TMK-2K 水浴锅, 日本亚速旺株式会社; Acquity H-Class 超高效液相色谱仪、Xevo TQD 三重四级杆质谱仪, 美国 Waters 公司; ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 反相色谱柱, Agilent 公司; 单人超净生物安全柜, 青岛海尔生物医疗控股有限公司; ZHWY-上海智诚恒温振荡器, 北京华威兴业科技有限公司; 细胞培养板, Corning Costar 公司。

2 方法

2.1 药性成分液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%甲酸的乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B); 梯度洗脱: 0~1 min, 10% A; 1~4 min, 10%~35% A; 4~7 min, 35%~80% A; 7~8 min, 80% A。体积流量 0.3 mL/min; 进样量 5 μL; 柱温 35 °C。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源, 以多反应监测模式方式扫描, 正离子模式检测, 用于定量分析的离子对分别为 m/z 356.50→192.20(延胡索乙素)、 m/z 352.2→336.1(巴马汀)、 m/z 354.2→188.1(原阿片碱)、 m/z 271.1→202.9(欧前胡素)、 m/z 271.1→203.0(异欧前胡素)和 m/z 256.2→167.10(内标苯海拉明)。毛细管电压 3000 V, 锥孔电压 30 V, 去溶剂化温度 350 °C, 源温度 150 °C。

2.1.3 对照品溶液和内标溶液的制备 精密称取延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素、异欧前胡素对照品及内标苯海拉明适量, 分别用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 制备延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素、异欧前胡素和苯海拉明质量浓度为 100 μg/mL 的储备液和苯海拉明内标储备液。

2.1.4 供试品溶液的制备 取 50 μL 细胞样品上清液, 加入 150 μL 内标甲醇溶液(10 ng/mL)涡旋混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液为供试品溶液。

2.1.5 方法学考察

(1) 线性关系考察: 精密吸取延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素、异欧前胡素和苯海拉明储备液适量, 用甲醇梯度稀释成含有各药性成分的混合对照品溶液和 10 ng/mL 的苯海拉明内标工

作液, 其中巴马汀和原阿片碱的终质量浓度为 5、10、50、200、1000、4000、5000 ng/mL, 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、2000、8000、10 000 ng/mL。取适量混合对照品溶液, 按照“2.1.1”和“2.1.2”项下条件,

测定对延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素、异欧前胡素和内标的峰面积。以待测成分与内标峰面积比值为纵坐标 (Y), 待测成分质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 进行回归分析, 得到回归方程, 结果见表 1。

表 1 元胡止痛方中主要药性成分的回归方程

Table 1 Linear regression equation of main medicinal components in Yuanhu Zhitong Prescription

药性成分	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	回归方程	相关系数
延胡索乙素	10~10 000	$Y=0.873\ 3\ X+327.147$	0.999 2
巴马汀	5~5000	$Y=0.571\ 4\ X+243.725$	0.998 1
原阿片碱	5~5000	$Y=0.107\ 6\ X+174.358$	0.995 3
欧前胡素	10~10 000	$Y=0.197\ 1\ X+113.649$	0.997 3
异欧前胡素	10~10 000	$Y=0.138\ 1\ X+62.713$	0.996 8

(2) 准确度和精密度: 精密吸取延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素、异欧前胡素和苯海拉明储备液适量, 用甲醇梯度稀释成含有各药性成分的质控样品溶液。取低、中、高质量浓度 (巴马汀和原阿片碱为 12.5、150、3750 ng/mL, 延胡索乙素、欧前胡素和异欧前胡素为 25、300、7500 ng/mL) 的质控样品, 连续进样 6 次, 连做 3 批。结果显示, 延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素准确度在-3.52%~6.17%, 批间精密度 RSD 为 2.16%~8.57%, 批内精密度 RSD 为 0.12%~5.63%。结果表明该方法准确度、精密度良好, 符合生物制品分析方法验证要求。

(3) 回收率试验: 取低、中、高质量浓度 (巴马汀和原阿片碱为 12.5、150、3750 ng/mL, 延胡索乙素、欧前胡素和异欧前胡素为 25、300、7500 ng/mL) 的质控样品, 每个浓度平行 6 份, 进样测定峰面积, 根据标准曲线计算得各药性成分的质量浓度, 计算回收率。回收试验结果表明, 各药性成分在低、中、高 3 个浓度水平上回收率在 98.24%~100.87%, RSD 为 1.36%~5.37%, 回收率良好。

(4) 稳定性考察: 将处理好的同一批样品溶液, 分别经长期冻存 (-20 °C, 30 d)、反复冻融 3 次和室温放置 12 h 测定各药性成分的峰面积, 不同条件下各成分峰面积的 RSD 均小于 12%, 结果表明样品溶液中各成分稳定性良好。

2.2 不同药性成分对 OCTN1 和 OCTN2 转运活性的影响

S2-OCTN1、S2-OCTN2 及 S2-Mock 细胞经过复苏和传代培养, 处于对数生长期时用胰酶消化使

其分散为单细胞悬液, 用培养基稀释至 2×10^5 个/mL, 接种于 24 孔细胞培养板 1 mL/孔, 33 °C、5% CO₂ 培养 2~3 d 至细胞长满各孔。将细胞置于 37 °C 水浴槽中, 弃去培养基, 用 37 °C 的 UpB 清洗细胞 2 次, 加入 1 mL UpB, 37 °C 温浴 10 min。吸弃 UpB, 给药组加入以 UpB 为溶剂配制的含放射性标记的探针底物 ¹⁴C-TEA (OCTN1)、¹⁴C-Car (OCTN2) 和 100 μmol/L 各药性成分 (延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素) 预热的 5 μmol/L 混合溶液 500 μL。以 100 μmol/L 奎尼丁为阳性对照, 与探针底物同时加入。对照组为 S2-Mock 细胞, 模型组和给药组为 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞, 对照组、模型组只添加含放射性标记的探针底物。各组设置 3 复孔。给药时间 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞分别为 3 min 和 5 min, 相应的对照组 S2-Mock 细胞给药时间分别为 3 min 和 5 min。吸弃工作液, 加入 1 mL 冰浴的 UpB 洗涤细胞 2 遍, 终止反应。然后每孔添加 400 μL 0.1 mol/L NaOH 裂解细胞; 取细胞裂解液于上样瓶中, 添加 3 mL 的闪烁液, 并用 Tri-Carb 2910 TR 放射性液体闪烁仪测定样品中的放射性强度。

在不同药性成分对 OCTN1 和 OCTN2 的转运活性半数抑制浓度 (IC₅₀) 测定中, 分别添加不同浓度 (0、1、3、10、30 和 100 μmol/L) 各药性成分, 每个浓度设置 3 复孔。

2.3 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞对不同药性成分的摄取

细胞培养、接种方法和给药时间同“2.2”项。实验设 S2-Mock 组、S2-OCTN1 组、S2-OCTN2 组,

分别加入 500 μL 预热含 10 $\mu\text{mol/L}$ 各药性成分或 10 $\mu\text{mol/L}$ 各药性成分+100 $\mu\text{mol/L}$ 奎尼丁的 UpB 溶液。每组设置 3 复孔。吸弃工作液, 加入 1 mL 冰浴的 UpB 洗涤细胞 2 遍, 终止反应。用细胞刮下细胞, 每孔添加 200 μL 甲醇, 超声 10 min, 提取细胞中摄取的化合物; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min, 取上清 50 μL 通过“2.1”项方法测定样品中各药性成分的含量。以 BCA 法测定的蛋白浓度加以校正。

2.4 延胡索乙素在 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞中的转运动力学

《中国药典》2020 年版^[16]规定元胡止痛方中指标性成分为延胡索乙素, 因此进一步研究 OCTN1 和 OCTN2 对延胡索乙素转运动力学的影响。细胞培养、接种方法和给药时间同“2.2”项。给予含不同浓度 (0.3、1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$) 延胡索乙素的 UpB 溶液 500 μL , 样品处理同“2.3”项。采用“2.1”项方法测定样品中延胡索乙素的含量。

2.5 数据处理与分析

将仅含放射性标记的探针底物 ^{14}C -TEA 和 ^{14}C -Car 的 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞的转运值设为 U_c (单位为 DPM), 扣除本底组即 S2-Mock 细胞的转运值 (U_0), 将 $U_c - U_0$ 定义为 100%。以此为标准计算, 对照组、模型组、给药组的转运值设为 U , 相对转运活性 = $(U - U_0) / (U_c - U_0)$ 。每个数值代表一个实验组的平均值, 用 Microsoft Excel 2013 软件中统计学公式计算。通过 GraphPad Prism 8.0 软件计算不同药性成分对 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞转运活性的 IC_{50} 。各数值间的差异性分析采用 t 检验。

摄取底物实验中将 LC-MS/MS 法测定的细胞

裂解液中待测物浓度利用测得的蛋白浓度进行校正。分别计算 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞摄取量与 S2-Mock 摄取量的比值, 当比值大于 2 时, 可认为有主动转运发生。摄取动力学参数采用米氏方程进行拟合计算。

$$V = V_{\max} / (K_m / [S])$$

V 为底物的转运速率, K_m 为米氏常数, $V_{\max}$ 为细胞摄取底物最大转运速率, S 为底物浓度

3 结果

3.1 不同药性成分对 OCTN1 和 OCTN2 转运活性的抑制作用

元胡止痛方中不同药性成分对 OCTN1 和 OCTN2 的跨膜转运活性有不同程度的抑制作用, 见图 1。结果显示苦味成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱和辛味成分欧前胡素、异欧前胡素对 OCTN1 的转运活性具有较强的抑制作用, 分别能将 OCTN1 介导的 ^{14}C -TEA 跨膜转运活性抑制至 $(48.59 \pm 2.17)\%$ 、 $(38.75 \pm 0.54)\%$ 、 $(43.35 \pm 0.87)\%$ 、 $(36.45 \pm 2.03)\%$ 和 $(33.25 \pm 1.89)\%$ 。延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素对 OCTN2 的转运活性具有较强的抑制作用, 分别能将 OCTN2 介导的 ^{14}C -Car 跨膜转运活性抑制至 $(39.13 \pm 2.87)\%$ 、 $(36.33 \pm 2.28)\%$ 、 $(35.25 \pm 1.46)\%$ 、 $(15.09 \pm 1.38)\%$ 和 $(25.21 \pm 1.24)\%$ 。

苦味药性成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱和辛味药性成分欧前胡素、异欧前胡素对 OCTN1 转运活性抑制作用的 IC_{50} 分别是 15.43、14.06、21.23、4.91、23.29 $\mu\text{mol/L}$; 延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素对 OCTN2 转运活性抑制作用的 IC_{50} 分别是 19.08、14.24、8.90、

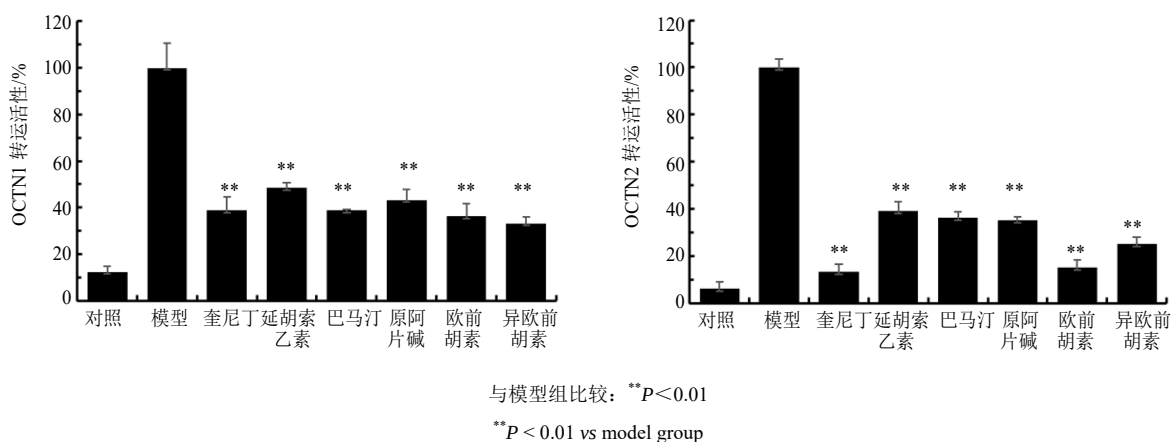


图 1 各药性成分对 OCTN1 和 OCTN2 转运活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of different medicinal components on transport activity of OCTN1 and OCTN2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

17.06、13.98 $\mu\text{mol/L}$ 。结果表明延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱、欧前胡素和异欧前胡素对 OCTN1 和 OCTN2 的转运活性均有抑制作用。

3.2 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞对不同药性成分的摄取情况

S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞对各药性成分的摄取结果如图 2 所示。结果表明 OCTN1 和 OCTN2 高表达细胞对苦味成分延胡索乙素、巴马汀和原阿片碱的摄取能力与 S2-Mock 细胞有显著差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)，且能被 OCTN1 和 OCTN2 的抑制剂奎尼丁显著抑制。延胡索乙素、巴马汀和原阿片碱 S2-OCTN1 细胞摄取量分别是细胞 S2-Mock 的 3.46、8.72 和 2.88 倍，S2-OCTN2 细胞摄取量分别是 S2-Mock 细胞的 2.58、5.86 和 9.75 倍。S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞对欧前胡素和异欧前胡素的摄取量与 S2-Mock 细胞的比值均小于 2。表明苦味成分

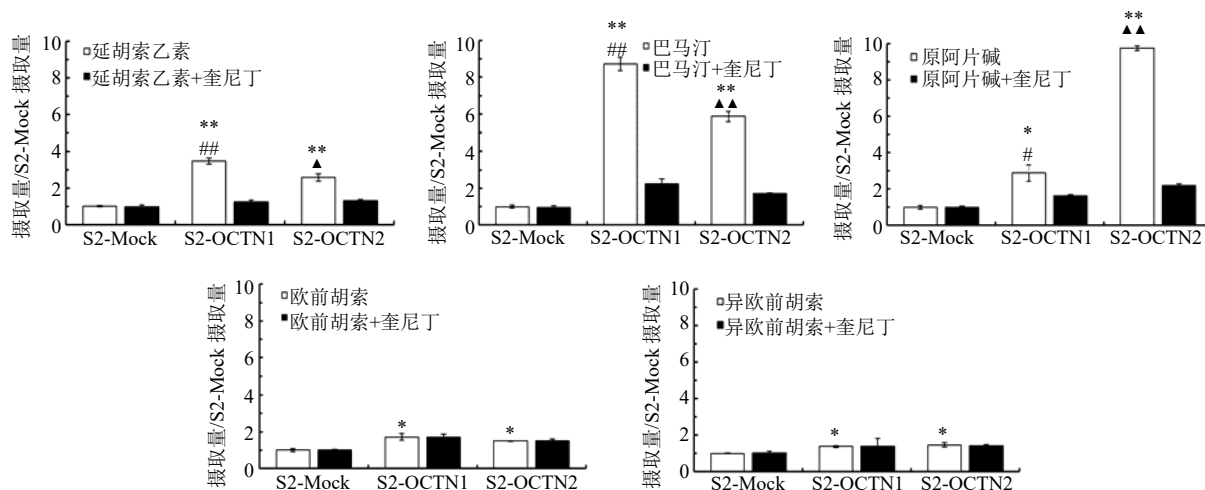
延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱是 OCTN1 和 OCTN2 的底物，可在 OCTN1 和 OCTN2 的协助下完成跨膜转运。

3.3 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞对延胡索乙素的转运动力学

S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞对延胡索乙素转运动力学结果见图 3、4。结果显示 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 细胞对延胡索乙素的摄取呈剂量相关性，符合米氏方程。OCTN1 和 OCTN2 对延胡索乙素转运的动力学参数 K_m 和 $V_{\max}$ 分别为 6.39 $\mu\text{mol/L}$ 、120.92 $\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 和 25.66 $\mu\text{mol/L}$ 、637.03 $\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。

4 讨论

近年来关于药物转运体引起的药物-药物相互作用的研究已经成为热点^[17-20]，转运体不仅能够影响药物体内药动学过程，更是与药物发生相互作用



与 S2-Mock 组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与 S2-OCTN1 的药性成分+奎尼丁组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与 S2-OCTN2 的药性成分+奎尼丁组比较：^ $P < 0.05$ ^^ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs S2-Mock group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs medicinal composition + quinidine of S2-OCTN1 group; ^ $P < 0.05$ ^^ $P < 0.01$ vs medicinal composition + quinidine of S2-OCTN2 group

图 2 S2-OCTN1 和 S2-OCTN2 对各药性成分的摄取情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Uptake of different medicinal components by S2-OCTN1 and S2-OCTN2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

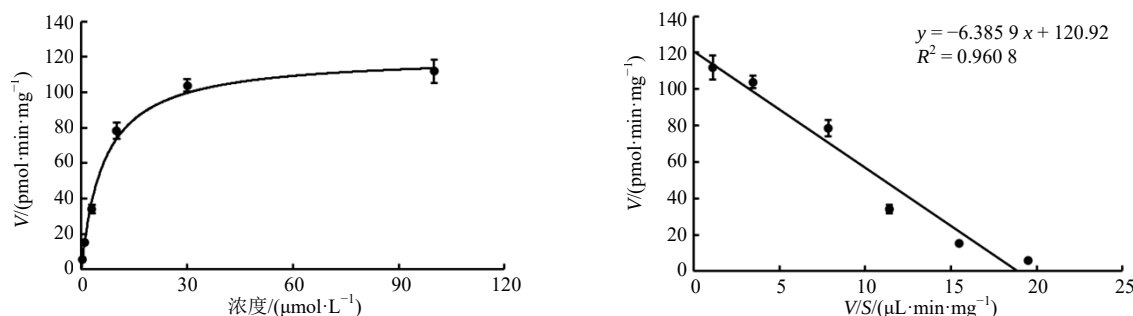
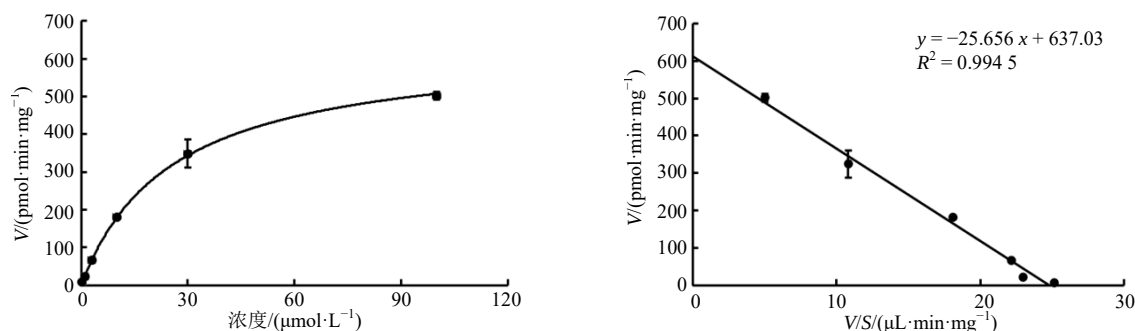


图 3 OCTN1 对延胡索乙素的转运动力学 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Transport kinetics of tetrahydropalmatine by OCTN1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 4 OCTN2 对延胡索乙素的转运动力学 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Transport kinetics of tetrahydropalmatine by OCTN2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

和疾病相关联,使其成为重要的药物靶点,这对新药的研发、提高药物生物利用度和疾病的治疗作用提供了新的思路 and 理论依据。中药复方化学成分复杂,各药性成分在体内传递过程中发生药物-药物相互作用的概率也相对较高,因此以药物转运体介导的药物-药物相互作用为切入点,通过研究药物转运体在各药性成分跨膜转运过程中的作用机制,进而从药物转运体的角度推测各药对在宏观层面的作用规律,对阐明中药复方中不同药性成分的配伍机制具有重要意义^[2]。

OCTN1 和 OCTN2 广泛存在于肾脏、肝脏、心脏、骨骼肌、大脑、胎盘、小肠和骨骼肌等组织中^[21],尤其在肾脏和肝脏中表达量较高,因此是一些主要在肾脏和肝脏进行消除的药物进入肾脏和肝脏的重要途径。本研究结果显示,元胡止痛方中苦味成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱和辛味成分欧前胡素、异欧前胡素对 OCTN1 和 OCTN2 具有较强的抑制作用,延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱是 OCTN1 和 OCTN2 的底物,因此预测元胡止痛方不同药性成分之间很可能会发生由 OCTN1 和 OCTN2 介导的药物-药物相互作用。欧前胡素和异欧前胡素通过抑制 OCTN1、OCTN2 影响延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱跨膜转运,减少苦味药成分延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱在肾脏和肝脏的摄入,从而减慢其在肾脏和肝脏的消除过程,进而使延胡索乙素、巴马汀、原阿片碱等成分血药浓度的增加,苦味药性成分血药浓度的升高有利于更多的苦味药性成分跨过血脑屏障进入中枢神经系统,增强其镇痛作用。本研究结果表明,元胡止痛方中不同药性成分之间在体内传递过程中存在较为复杂的相互作用,并且在一定程度上可以从药物转运体的角度进行阐释,这对阐明元胡止痛方中延胡索和白芷配伍机

制的科学内涵具有重要的启发意义。但中药及中药复方药理活性成分复杂,可能一种活性成分同时作用于多种转运体,而不同转运体介导的底物又存在一定的交叉重叠,因此药物-药物相互作用机制还需做进一步探索和挖掘。另外,本研究从药物转运体引起的药物-药物相互作用的角度揭示元胡止痛方中各药性成分的配伍机制,也为阐明其他中药复方的配伍机制提供了一定的参考,同时也丰富了中药配伍理论研究的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张铁军,刘昌孝. 中药五味药性理论辨识及其化学生物学实质表征路径 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 1-6.
- [2] 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.
- [3] Chen Y T, Cao Y, Xie Y H, et al. Traditional Chinese medicine for the treatment of primary dysmenorrhea: How do Yuanhu painkillers effectively treat dysmenorrhea? [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(12): 1095-1104.
- [4] 贺凯, 高建莉, 赵光树. 延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1909-1912.
- [5] 高攀, 王津燕, 吴环宇, 等. HPLC-CAD 法测定元胡止痛胶囊中生物碱和香豆素 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(2): 299-303.
- [6] 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.
- [7] 韩彦琪, 许浚, 龚苏晓, 等. 基于味觉、嗅觉受体分子对接技术的中药性味物质基础研究的路径和方法 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 14-19.

- [8] 韩彦琪, 许浚, 龚苏晓, 等. 基于 HPLC-QTOF/MS 及 G 蛋白偶联受体分析的延胡索物质基础及作用机制研究 [J]. 药学学报, 2016, 51(8): 1302-1308.
- [9] 孙玉平. 头痛滴丸处方药材药味分析和提取工艺研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2015.
- [10] 董仁超, 孟强. 转运体介导的中药和药物间相互作用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(2): 215-219.
- [11] 韩向晖, 马越鸣. 中药调控药物代谢酶和转运体活性及表达研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(1): 103-106.
- [12] 杨世磊, 刘克辛. 药物转运体介导的中药及单体药物相互作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(1): 194-203.
- [13] 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.
- [14] 陈佳音, 卢杨, 赵娣, 等. 肉碱/有机阳离子转运体 (OCTNs) 的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(10): 1185-1190.
- [15] Nakamura T, Yoshida K, Yabuuchi H, *et al.* Functional characterization of ergothioneine transport by rat organic cation/carnitine transporter Octn1 (slc22a4) [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(8): 1580-1584.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 630-633.
- [17] 武卫党, 崔涛, 张星艳, 等. 小檗碱对有机阳离子药物转运体抑制作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(5): 633-637.
- [18] 武卫党, 张星艳, 魏滋鸿, 等. 小檗碱对有机阴离子转运体抑制作用及双向跨膜转运研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(6): 778-782.
- [19] Yin J, Wagner D J, Prasad B, *et al.* Renal secretion of hydrochlorothiazide involves organic anion transporter 1/3, organic cation transporter 2, and multidrug and toxin extrusion protein 2-K [J]. *Am J Physiol Ren Physiol*, 2019, 317(4): F805-F814.
- [20] Koepsell H. Organic cation transporters in health and disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2020, 72(1): 253-319.
- [21] Tamai I. Pharmacological and pathophysiological roles of carnitine/organic cation transporters (OCTNs: SLC22A4, SLC22A5 and Slc22a21) [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2013, 34(1): 29-44.

[责任编辑 潘明佳]