

## 外排转运蛋白对异萜萆亭体内处置的调控机制研究

应梦迪, 谢雨珊, 朱丽君, 王立萍, 区晓君, 刘中秋\*

广州中医药大学中药学院, 国际中医药转化医学研究所, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 采用外排转运蛋白基因敲除小鼠模型, 探讨乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 和多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2) 对异萜萆亭及其代谢物异萜萆亭-6-*O*- $\beta$ -葡萄糖醛酸苷 (isoscopoletin-6-*O*- $\beta$ -glucuronide, I-6-G) 体内处置的影响及调控机制。方法 野生型 FVB 小鼠、*Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠分别 ig 异萜萆亭 (2 mg/kg) 或尾 iv 异萜萆亭 (1 mg/kg), 采用超高效液相色谱与质谱联用 (UHPLC-MS/MS) 法测定小鼠血浆中异萜萆亭及 I-6-G 的浓度, 分析外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 对异萜萆亭及 I-6-G 药动学特征的影响; 采用小鼠在体肠灌注模型研究 BCRP 和 MRP2 对异萜萆亭及 I-6-G 肠道处置的调控作用; 采用小鼠肝微粒体和小肠微粒体考察异萜萆亭在野生型 FVB 小鼠、*Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠体内的葡萄糖醛酸化代谢特征。结果 异萜萆亭在野生型 FVB 小鼠、*Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠体内的生物利用度分别为 7.85%、3.54%、5.76%、10.27%。ig 异萜萆亭后, 与野生型 FVB 小鼠相比, *Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠体内异萜萆亭的 AUC<sub>0-t</sub> 分别增加了 2.8、5.6 倍 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), *Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠体内 I-6-G 的 AUC<sub>0-t</sub> 分别增加了 0.6、1.0、8.2 倍 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。尾 iv 异萜萆亭后, 与野生型 FVB 小鼠相比, *Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠体内异萜萆亭的 AUC<sub>0-t</sub> 分别增加了 4.0、3.8 倍 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), *Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠体内 I-6-G 的 AUC<sub>0-t</sub> 分别增加了 2.1、9.1 倍 ( $P < 0.01$ )。与野生型 FVB 小鼠相比, *Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠体内 I-6-G 外排入十二指肠肠腔和胆汁中的量均减少了 55.7%~90.1% ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 缺失后, 对小鼠肝微粒体和小肠微粒体中异萜萆亭葡萄糖醛酸化代谢物 I-6-G 的清除率影响较小。结论 外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 参与调控异萜萆亭及其代谢物 I-6-G 的体内处置。

**关键词:** 异萜萆亭; 异萜萆亭-6-*O*- $\beta$ -葡萄糖醛酸苷; 乳腺癌耐药蛋白; 多药耐药相关蛋白 2; 肝肠处置

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4232-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.014

## Effect of efflux transporters on disposition of isoscopoletin *in vivo*

YING Meng-di, XIE Yu-shan, ZHU Li-jun, WANG Li-ping, OU Xiao-jun, LIU Zhong-qiu

International Institute for Translational Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) on disposition of isoscopoletin and isoscopoletin-6-*O*- $\beta$ -glucuronide (I-6-G) *in vivo* based on efflux transporter gene knockout mouse models. **Methods** Wild-type FVB, *Bcrp1*<sup>-/-</sup>, *Mrp2*<sup>-/-</sup> and *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> mice were ig isoscopoletin (2 mg/kg) or tail iv isoscopoletin (1 mg/kg), UHPLC-MS/MS method was used to quantify isoscopoletin and I-6-G in plasma of mice to evaluate the role of BCRP and MRP2 on pharmacokinetics of isoscopoletin and I-6-G. Single-pass intestinal perfusion model was established to investigate the role of BCRP and MRP2 on intestinal disposition of isoscopoletin and I-6-G. Enzyme kinetics of isoscopoletin glucuronidation by liver microsomes and small intestine microsomes were characterized in wild-type FVB, *Bcrp1*<sup>-/-</sup>, *Mrp2*<sup>-/-</sup> and *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> mice. **Results** Bioavailability of isoscopoletin in wild-type FVB, *Bcrp1*<sup>-/-</sup>, *Mrp2*<sup>-/-</sup> and *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> mice were respectively 7.85%, 3.54%, 5.76% and 10.27%. After ig isoscopoletin, AUC<sub>0-t</sub> of isoscopoletin in *Mrp2*<sup>-/-</sup> and *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> mice were 2.8 and 5.6-fold higher than those of in wild-type FVB mice ( $P < 0.01$ ,  $0.001$ ); AUC<sub>0-t</sub> of I-6-G in *Bcrp1*<sup>-/-</sup>, *Mrp2*<sup>-/-</sup> and *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> mice were 0.6, 1.0 and 8.2-fold higher than those of in wild-type FVB mice ( $P < 0.05$ ,  $0.001$ ). After iv isoscopoletin,

收稿日期: 2020-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603379); 国家自然科学基金资助项目 (81720108033)

作者简介: 应梦迪, 硕士研究生, 研究方向为药物代谢。E-mail: yingmengdi2018@163.com

\*通信作者: 刘中秋, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物代谢及调控。Tel: (020)39358061 E-mail: liuzq@gzucm.edu.cn

AUC<sub>0-t</sub> of isoscooletin in *Mrp2*<sup>-/-</sup> and *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> mice showed 4.0 and 3.8-fold higher than those of in wild-type FVB mice ( $P < 0.05, 0.01$ ); AUC<sub>0-t</sub> of I-6-G in *Bcrp1*<sup>-/-</sup> and *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> mice showed 2.1 and 9.1-fold higher than those of in wild-type FVB mice ( $P < 0.01$ ). Compared with wild-type FVB mice, amounts of I-6-G excreted in duodenum and bile in *Bcrp1*<sup>-/-</sup>, *Mrp2*<sup>-/-</sup> and *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> mice were significantly decreased by 55.7%—90.1% ( $P < 0.05, 0.01$ ). The absence of efflux transporters BCRP and MRP2 had little effect on clearance rate of isoscooletin glucuronide metabolite I-6-G in mouse liver microsomes and intestinal microsomes. **Conclusion** BCRP and MRP2 are involved in the disposition of isoscooletin and I-6-G in mice.

**Key words:** isoscooletin; isoscooletin-6-*O*- $\beta$ -glucuronide; breast cancer resistance protein; multidrug resistance-associated protein 2; disposition in liver and intestine

异菝菪亭, 又名 6-羟基-7-甲氧基香豆素, 主要分布于木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance、白蜡树 *F. chinensis* Roxb.、尖叶白蜡树 *F. szaboana* Lingelsh. 的树皮中, 是中药秦皮的主要活性成分之一<sup>[1-2]</sup>。异菝菪亭具有较好的抗氧化、抗炎、抗癌和抗病毒等活性<sup>[3-6]</sup>, 易被葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyltransferases, UGTs) 如 UGT1A10、UGT1A9 和 UGT1A6 等催化代谢生成异菝菪亭葡萄糖醛酸苷<sup>[7]</sup>, 但异菝菪亭在体内的暴露形式、处置特征及相关调控机制鲜有研究, 其成药性数据及特征尚不清晰。乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 和多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2) 是三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合盒转运蛋白家族成员, 是影响药物体内处置以及药理作用的关键因素<sup>[8-9]</sup>。目前 BCRP 和 MRP2 对异菝菪亭体内处置的影响及调控机制尚不清楚。因此, 本研究采用外排转运蛋白基因敲除小鼠模型, 探讨 BCRP 和 MRP2 对异菝菪亭及其葡萄糖醛酸化代谢产物体内处置的影响及调控机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

雄性 FVB 背景 *Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠购自上海南方模式生物科技有限公司, 动物合格证号分别为 99612800000279、99612800000278。雄性野生型 FVB 小鼠来源于杂合 *Bcrp1*<sup>+/-</sup> 小鼠或 *Mrp2*<sup>+/-</sup> 小鼠亲代的野生型子代, *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠由纯合 *Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠杂交获得, 采用 PCR-STR 技术对实验动物进行基因分型。实验动物周龄为 6~8 周, 饲养于温度 (25±2) °C、相对湿度 50%~60% 的 SPF 级动物房中。动物实验经广州中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 2020R0005、2020R0006)。

### 1.2 药品与试剂

异菝菪亭 (质量分数 ≥98%, 批号 3620) 购自

上海诗丹德标准技术服务有限公司, 其化学结构见图 1; 内标华法林 (质量分数 ≥98%, 批号 012801MT-AC) 购自美国 AccuStandard 公司; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 (批号 SLBW7477)、 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (批号 069M4017V)、葡萄糖二酸单内酯 (批号 0000028759)、丙甲菌素 (批号 118M4018V)、Hank's 平衡溶液 (HBSS, 批号 SLBL7680V)、HEPES 缓冲液 (批号 SLCF4739) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 乙腈、甲醇、甲酸购自德国 Merck 公司。

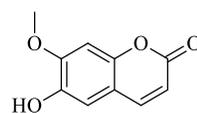


图 1 异菝菪亭化学结构

Fig. 1 Structure of isoscooletin

## 1.3 仪器

6460 超高效液相色谱与质谱联用仪 (UHPLC-MS/MS)、6540 超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱 (UHPLC-Q-TOF/MS)、1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 5810R 冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); WS27-2 型恒温水浴摇床、真空干燥仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); XW-80A 型涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器厂); Benchmark Plus 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 异菝菪亭-6-*O*- $\beta$ -葡萄糖醛酸苷 (isoscooletin-6-*O*- $\beta$ -glucuronide, I-6-G) 的制备与鉴定

由于无 I-6-G 商业化对照品, 本研究采用酶催化法合成代谢物 I-6-G, 其化学结构见图 2<sup>[10]</sup>。葡萄糖醛酸化孵育体系含 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液、5 mmol/L 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸、5 mmol/L 氯化镁溶液、25  $\mu$ g/mL 丙甲菌素、10 mmol/L 葡萄糖二酸单内酯、1 mg/mL 肝微粒体及 80 mmol/L 异菝菪亭, 将以上试剂混合均匀, 于 37 °C 水浴中孵育 18 h,

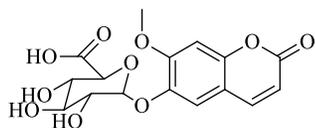


图2 I-6-G的化学结构

Fig. 2 Structure of I-6-G

加入 100  $\mu\text{L}$  乙腈溶液, 涡旋 3 min, 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 经 HPLC 分离收集 I-6-G。采用 UHPLC-Q-TOF/MS 鉴定 I-6-G, 并通过转换因子确定 I-6-G 的浓度。

## 2.2 UHPLC-MS/MS 分析方法

**2.2.1 色谱条件** Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm $\times$ 3 mm, 1.8 mm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~1.5 min, 10% B; 1.5~3.0 min, 10%~50% B; 3.0~4.0 min, 50%~100% B; 4.0~5.0 min, 100%~10% B。柱温为 37  $^{\circ}\text{C}$ ; 体积流量为 0.4 mL/min; 进样量为 2  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 质谱条件** 电喷雾离子源正离子模式 (ESI<sup>+</sup>); 多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式扫描; 毛细管电压为 4.0 kV; 干燥气温度为 300  $^{\circ}\text{C}$ ; 喷嘴电压为 500 V; 鞘气温度为 350  $^{\circ}\text{C}$ ; 氮气体积流量为 5 mL/min; 鞘气体积流量为 12 mL/min; 用于定量分析的离子对和碰撞能分别为异芫蓉亭 ( $m/z$  193.0 $\rightarrow$ 133.0, 20 eV)、I-6-G ( $m/z$  369.0 $\rightarrow$ 193.0, 15 eV)、华法林 ( $m/z$  309.0 $\rightarrow$ 163.2, 20 eV)。

## 2.3 方法学考察

根据文献方法<sup>[11]</sup>, 对小鼠血浆中异芫蓉亭和 I-6-G 的定量分析方法进行专属性、线性范围、准确度和精密度、提取回收率和基质效应、稳定性考察。

**2.3.1 样品处理** 小鼠断尾采血, 收集于肝素钠离心管中, 6000 r/min 离心 8 min, 取上层血浆, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。取 10  $\mu\text{L}$  血浆样品加入 10  $\mu\text{L}$  50% 乙腈, 再加入 180  $\mu\text{L}$  含 20 nmol/L 华法林的乙腈溶液, 涡旋 3 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清于真空干燥仪干燥; 加入 80  $\mu\text{L}$  50% 乙腈复溶, 涡旋 3 min, 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清进行 UHPLC-MS/MS 分析。

**2.3.2 专属性** 异芫蓉亭、I-6-G 和华法林的总离子流图见图 3, I-6-G、异芫蓉亭和华法林的出峰时间分别为 3.5、4.1、5.0 min。待测组分及内标之间的分离效果较好, 峰形理想且不受内源性物质等其他成分的干扰。

**2.3.3 线性范围** 配制一系列浓度的异芫蓉亭和 I-6-G 混合对照品溶液, 取 10  $\mu\text{L}$ , 加入 10  $\mu\text{L}$  空白血浆, 按“2.3.1”项下方法处理。以各成分与内标峰面积比值为横坐标 ( $Y$ ), 各成分浓度为纵坐标 ( $X$ ), 进行线性回归分析, 求得的回归方程即为标准曲线, 根据信噪比为 10 计算各成分的定量限。异芫蓉亭与 I-6-G 的标准曲线、相关系数、线性范围及定量限见表 1。

**2.3.4 精密度与准确度** 取 10  $\mu\text{L}$  空白血浆, 分别制备浓度为 5 000.00、625.00、39.06 nmol/L 的异芫蓉亭和浓度为 2 000.000、250.000、15.625 nmol/L 的 I-6-G 混合对照品溶液作为高、中、低浓度的质控样品, 按“2.3.1”项下方法处理, 各浓度样品平行制备 6 份, 样品分别在 1 d 内测定 3 次和连续测定 3 d, 考察日内、日间精密度及准确度。如表 2 所示, 高、

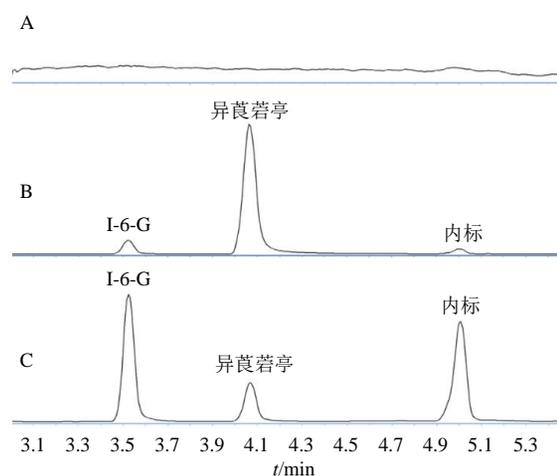


图3 空白血浆 (A), 空白血浆加入异芫蓉亭、I-6-G 和华法林 (B), ig 异芫蓉亭后的血浆样品 (C) 的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of blank plasma (A), blank plasma spiked with isoscoipoletin, I-6-G and warfarin (B) and mouse plasma sample after ig isoscoipoletin (C)

表1 异芫蓉亭和 I-6-G 在小鼠空白血浆中的标准曲线、相关系数、线性范围和定量限

Table 1 Standard curves, correlation coefficients, linear ranges, and limit of quantitation of isoscoipoletin and I-6-G in plasma of mice

成分	标准曲线	$r^2$	线性范围/(nmol·L <sup>-1</sup> )	定量限/(nmol·L <sup>-1</sup> )
异芫蓉亭	$Y=0.004\ 973\ X+1.869\ 666\times 10^{-4}$	0.994	9.76~5 000.00	9.76
I-6-G	$Y=0.028\ 323\ X-1.593\ 281\times 10^{-5}$	0.994	3.91~2 000.00	3.91

表 2 异菝葜亭和 I-6-G 的日内、日间精密度和准确度 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Precision and accuracy of intra-day and inter-day of isoscoipoletin and I-6-G ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

成分	浓度/(nmol·L <sup>-1</sup> )	日内			日间		
		实测浓度/(nmol·L <sup>-1</sup> )	精密度的 RSD/%	准确度的 RE/%	实测浓度/(nmol·L <sup>-1</sup> )	精密度的 RSD/%	准确度的 RE/%
异菝葜亭	39.06	38.33±1.52	6.98	106.58	36.08±2.42	7.01	111.33
	625.00	667.14±4.59	2.22	93.05	679.40±35.51	5.23	91.30
	5 000.00	5 162.16±26.83	0.86	94.82	5 264.43±28.51	5.42	94.71
I-6-G	15.625	16.29±0.54	3.31	95.76	17.04±0.85	4.97	90.92
	250.000	230.91±4.08	1.76	107.99	246.85±12.88	5.23	103.00
	2 000.000	2 169.23±36.84	1.69	91.54	2 231.27±65.29	2.92	88.44

中、低浓度质控样品的日内、日间精密度的均小于 7%，准确度为 88%~111%，符合生物样品测定要求。

**2.3.5 提取回收率与基质效应** 取高、中、低浓度质控样品，按“2.3.1”项下方法处理，各浓度样品平行制备 6 份，进样得到各成分与内标峰面积比值 (P<sub>1</sub>)；取 10 μL 空白血浆，加入 180 μL 含 20 nmol/L 华法林的乙腈溶液，涡旋 3 min，再加入 10 μL 高、中、低浓度混合对照品溶液，按“2.3.1”项下方法处理，进样得到各成分与内标峰面积比值 (P<sub>2</sub>)；取 10 μL 高、中、低浓度混合对照品溶液，加入 10 μL 50% 乙腈溶液，按“2.3.1”项下方法处理，进样得到各成分与内标峰面积比值 (P<sub>3</sub>)。以 P<sub>1</sub> 与 P<sub>2</sub> 比值

计算提取回收率，P<sub>1</sub> 与 P<sub>3</sub> 比值计算基质效应。如表 3 所示，异菝葜亭和 I-6-G 的测定受生物基质干扰较小，提取回收率稳定，符合样品测定要求。

**2.3.6 稳定性** 取高、中、低浓度质控样品，分别按“2.3.1”项下方法处理，每份样品平行制备 6 份，分别于室温放置 4 h 后考察短期稳定性，于 -20 °C 冰箱放置 14 d 后考察长期稳定性，从 -20 °C 至室温反复冻融 3 次考察冻融稳定性。小鼠血浆中的异菝葜亭和 I-6-G 在不同处理条件下的稳定性数据见表 4，表明本实验中的生物样品短期稳定性、长期稳定性和冻融稳定性良好，满足生物样品分析条件。

表 3 异菝葜亭和 I-6-G 在小鼠血浆中的提取回收率和基质效应 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Recovery and matrix effect of isoscoipoletin and I-6-G in plasma of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

成分	浓度/(nmol·L <sup>-1</sup> )	提取回收率		基质效应	
		平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%
异菝葜亭	39.06	82.67	6.02	111.58	1.40
	625.00	82.31	10.21	107.09	1.89
	5 000.00	94.38	6.25	107.49	2.13
I-6-G	15.625	81.36	5.74	105.76	4.44
	250.000	87.56	6.40	103.61	3.65
	2 000.000	102.41	3.22	109.76	2.57

表 4 小鼠血浆中异菝葜亭和 I-6-G 的稳定性 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Stability of isoscoipoletin and I-6-G in plasma of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

成分	浓度/(nmol·L <sup>-1</sup> )	室温放置 4 h		-20 °C 放置 14 d		-20 °C 至室温反复冻融 3 次	
		RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%
异菝葜亭	39.06	4.77	109.85	7.48	106.88	3.48	109.93
	625.00	5.02	97.27	4.14	92.36	4.19	90.30
	5 000.00	7.19	105.53	2.16	92.27	4.15	92.68
I-6-G	15.625	1.59	96.39	7.36	90.84	2.37	94.37
	250.000	1.98	109.34	1.85	95.26	7.92	103.30
	2 000.000	7.72	103.17	1.33	87.93	2.20	91.09

**2.4 异菝葜亭在小鼠体内的药动学研究**

野生型 FVB 小鼠、*Bcrp1*<sup>-/-</sup> 小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup> 小鼠分别 ig 异菝葜亭 (2 mg/kg) 或尾 iv 异菝葜亭 (1 mg/kg)，分别于给药后 0、3、5、10、15、20、30、60、120、240、360、480 min

断尾采血收集于肝素钠离心管中，按“2.3.1”项下方法处理，取上清进行 UHPLC-MS/MS 分析。药动学参数采用 WinNonlin®3.3 非房室模型拟合。

**2.5 异菝葜亭在体肠灌流研究**

采用小鼠在体单向肠灌流模型，模拟异菝葜亭

的肠道处置过程。小鼠在体单向肠灌注手术操作参照本课题组前期研究<sup>[12]</sup>。含 40  $\mu\text{mol/L}$  异萜萜亭的 HBSS 缓冲液以 10 mL/h 恒速灌注十二指肠和结肠, 预灌注 30 min 后, 每 15 分钟于十二指肠和结肠出口处收集灌流液。实验结束后测量每个肠段的长度, 并收集血浆和胆汁。取 50  $\mu\text{L}$  灌流液样品加入 450  $\mu\text{L}$  含 20 nmol/L 华法林的乙腈溶液, 涡旋 3 min 后, 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清进样 UHPLC-MS/MS 分析。采用重量法计算异萜萜亭在小肠和结肠的表观渗透系数 ( $P_{\text{eff}}^*$ )。

$$P_{\text{eff}}^* = (1 - C_m/C_o) / 4G_z$$

其中  $C_m$  和  $C_o$  分别代表肠腔入口和出口药物浓度,  $G_z$  是与流量、肠道的长度和扩散系数有关的转换参数

## 2.6 异萜萜亭在小鼠肝微粒体和小肠微粒体中的酶动力学研究

小鼠肝微粒体和小肠微粒体的制备及浓度测定参照本课题组前期研究<sup>[13]</sup>。肝微粒体质量浓度为 0.025 mg/mL, 小肠微粒体质量浓度为 0.05 mg/mL, 底物异萜萜亭浓度为 0.1~5.2  $\mu\text{mol/L}$ 。底物分别与肝微粒体和小肠微粒体于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅恒温孵育 10 min 后, 加入 100  $\mu\text{L}$  含 20 nmol/L 华法林的乙腈溶液, 涡旋 3 min, 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清进行 UHPLC-MS/MS 分析。使用 GraphPad Prism 5 软件计算异萜萜亭的酶动力学参数, 以代谢速率与底物浓度的比值 ( $V/C$ ) 为横坐标, 代谢速率 ( $V$ ) 为纵坐标, 做 Eadie-Hofstee 图, 判断异萜萜亭在小鼠肝微粒体和小肠微粒体中的代谢动力学模型。

## 3 结果

### 3.1 I-6-G 的鉴定

异萜萜亭经肝微粒体代谢后, 可检测到 1 个单葡萄糖醛酸化代谢物。如图 4 所示, 通过 UHPLC-Q-TOF/MS 负离子模式检测, 发现该代谢

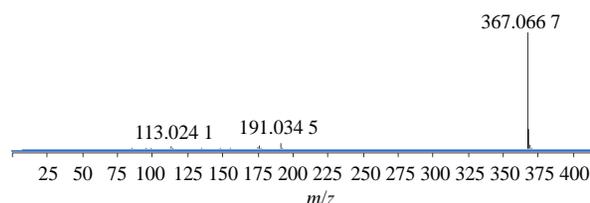


图 4 I-6-G 的提取离子流质谱图

Fig. 4 Extracted ion chromatogram of I-6-G

物的准分子离子峰为  $m/z$  367.066 7 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ , 伴有特征碎片离子  $m/z$  191.034 5, 即丢失 1 分子葡萄糖醛酸残基 (-176), 与理论  $m/z$  367.067 1 的误差为 1.09, 推测该代谢物为 I-6-G。

### 3.2 异萜萜亭和 I-6-G 在小鼠体内的药动学

ig 异萜萜亭 (2 mg/kg) 后, 异萜萜亭和 I-6-G 在野生型 FVB 小鼠、 $Bcrp1^{-/-}$  小鼠、 $Mrp2^{-/-}$  小鼠和  $Bcrp1^{-/-}/Mrp2^{-/-}$  小鼠体内的药-时曲线见图 5, 药动学参数见表 5。异萜萜亭在体内吸收迅速, 吸收后被快速代谢成 I-6-G, 在血浆中主要以 I-6-G 的形式暴露。异萜萜亭在野生型 FVB 小鼠、 $Bcrp1^{-/-}$  小鼠、 $Mrp2^{-/-}$  小鼠和  $Bcrp1^{-/-}/Mrp2^{-/-}$  小鼠的生物利用度分别为 7.85%、3.54%、5.76%、10.27%。与野生型 FVB 小鼠相比,  $Bcrp1^{-/-}$  小鼠体内异萜萜亭的表观分布容积 ( $V_d$ ) 和清除率 ( $\text{CL}/F$ ) 分别下降了 67.02%、58.54% ( $P < 0.05$ );  $Mrp2^{-/-}$  小鼠体内异萜萜亭的药-时曲线下面积 ( $\text{AUC}_{0-t}$ ) 和达峰浓度 ( $C_{\text{max}}$ ) 分别增加了 2.8、3.0 倍,  $\text{CL}/F$  下降了 78.8% ( $P < 0.05$ , 0.001);  $Bcrp1^{-/-}/Mrp2^{-/-}$  小鼠体内异萜萜亭的  $\text{AUC}_{0-t}$  增加了 5.6 倍,  $\text{CL}/F$  下降了 86.8% ( $P < 0.05$ , 0.01)。与野生型 FVB 小鼠相比,  $Bcrp1^{-/-}$  小鼠体内 I-6-G 的  $\text{AUC}_{0-t}$  和半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 分别增加了 0.6、4.1 倍 ( $P < 0.05$ );  $Mrp2^{-/-}$  小鼠体内 I-6-G 的  $\text{AUC}_{0-t}$  和  $C_{\text{max}}$  分别增加了 1.0、1.2 倍 ( $P < 0.001$ );  $Bcrp1^{-/-}$

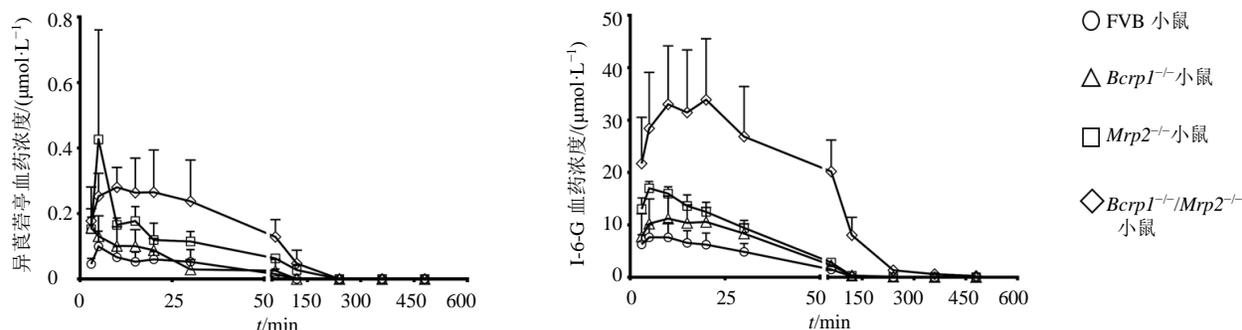


图 5 小鼠 ig 异萜萜亭后, 异萜萜亭及 I-6-G 的血药浓度-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 5 Plasma drug concentration-time curve of isoscoipoletin and I-6-G in mice after ig isoscoipoletin ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

表 5 小鼠 ig 异萜萜亭后异萜萜亭及 I-6-G 的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Pharmacokinetic parameters of isoscoipoletin and I-6-G in mice after ig isoscoipoletin ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

参数	单位	异萜萜亭				I-6-G			
		FVB	<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>	FVB	<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>
<i>C</i> <sub>max</sub>	μmol·L <sup>-1</sup>	0.12±0.05	0.21±0.10	0.48±0.29*	0.32±0.09**	8.16±2.60	12.19±3.86	17.67±1.01***	36.99±10.44**
<i>t</i> <sub>max</sub>	min	8.33±5.53	7.60±4.36	8.00±5.00	16.00±8.60*	8.67±2.36	12.00±6.78	8.00±4.00	25.00±17.89**
AUC <sub>0-t</sub>	min·μmol·L <sup>-1</sup>	2.73±1.58	3.40±1.37	10.44±1.82***	18.00±5.85**	340.92±112.05	565.08±103.43*	698.03±92.38***	3 145.45±549.34***
<i>t</i> <sub>1/2</sub>	min	21.00±11.08	17.16±9.92	44.72±17.01*	40.32±22.83	28.32±3.84	144.43±20.10*	48.51±34.51	74.09±17.35**
MRT <sub>0-t</sub>	min	19.00±6.29	17.66±6.80	37.54±6.86**	41.59±7.16**	33.13±3.50	44.87±17.65	35.05±5.80	76.95±20.51*
<i>V</i> <sub>d</sub>	L·kg <sup>-1</sup>	10.34±4.25	3.41±1.53*	5.42±2.08*	2.97±1.78*	—	—	—	—
CL/F	mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	0.41±0.23	0.17±0.11*	0.09±0.01*	0.05±0.01*	—	—	—	—

与 FVB 野生型小鼠比较: \**P*<0.05 \*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001

\**P*<0.05 \*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001 vs FVB mice

*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内 I-6-G 的 AUC<sub>0-t</sub>、*C*<sub>max</sub> 和 *t*<sub>1/2</sub> 分别增加了 8.2、3.5、1.6 倍 (*P*<0.01、0.001)。

尾 iv 异萜萜亭 (1 mg/kg) 后, 异萜萜亭和 I-6-G 在野生型 FVB 小鼠、*Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内的药-时曲线见图 6, 药动学参数见表 6。与野生型 FVB 小鼠相比, *Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠体内异萜萜亭的 *V*<sub>d</sub> 下降了 75% (*P*<0.05); *Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内异萜萜亭的 AUC<sub>0-t</sub> 和 CL/F 分别增加了 4.0、1.5 倍 (*P*<0.01、0.001); *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内异萜萜亭的 AUC<sub>0-t</sub> 和 CL/F 分别增加了 3.8、2.5 倍 (*P*<0.05、0.001)。与野生型 FVB 小鼠相比, *Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠体内 I-6-G 的 AUC<sub>0-t</sub> 增加了 2.1

倍 (*P*<0.01); *Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内 I-6-G 的 *t*<sub>1/2</sub> 增加了 0.2 倍 (*P*<0.001); *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内 I-6-G 的 AUC<sub>0-t</sub> 增加了 9.1 倍 (*P*<0.01)。

### 3.3 异萜萜亭在体肠灌流研究

异萜萜亭在小鼠十二指肠段和结肠段吸收和代谢特征如图 7 所示, 异萜萜亭在野生型 FVB 小鼠、*Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠十二指肠段和结肠段的 *P*<sub>eff</sub><sup>\*</sup> 均高于 1, 表明异萜萜亭小鼠肠道内的吸收较好。异萜萜亭在十二指肠段的 *P*<sub>eff</sub><sup>\*</sup> 高于结肠段, 表明异萜萜亭在十二指肠段的吸收优于结肠段。相比于野生型 FVB 小鼠, *Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠

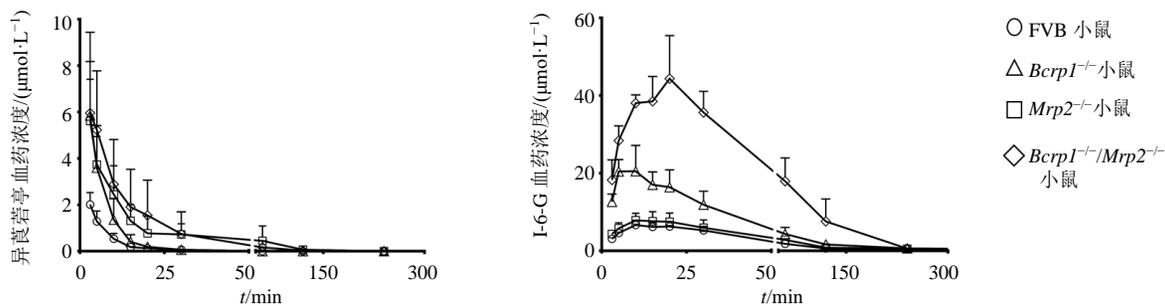


图 6 小鼠 iv 异萜萜亭, 异萜萜亭及 I-6-G 的血药浓度-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 Plasma drug concentration-time curve of isoscoipoletin and I-6-G in mice after iv isoscoipoletin ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 6 小鼠 iv 异萜萜亭后异萜萜亭及 I-6-G 的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Pharmacokinetic parameters of isoscoipoletin and I-6-G in mice after iv isoscoipoletin ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

参数	单位	异萜萜亭				I-6-G			
		FVB	<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>	FVB	<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>
AUC <sub>0-t</sub>	min·μmol·L <sup>-1</sup>	21.21±5.80	56.60±36.74	105.85±39.22**	103.06±74.10*	296.45±65.97	934.68±256.56**	326.83±59.37	3 006.22±944.97**
<i>t</i> <sub>1/2</sub>	min	12.93±8.32	5.38±4.12	25.16±8.06*	12.76±5.01	25.27±0.87	32.28±5.41*	30.85±2.07***	24.39±1.96
MRT <sub>0-t</sub>	min	5.10±1.31	4.16±1.09	26.64±9.63*	12.74±5.52*	33.17±1.53	37.98±6.73	41.33±4.83**	49.30±10.36*
<i>V</i> <sub>d</sub>	L·kg <sup>-1</sup>	0.44±0.25	0.11±0.11*	0.20±0.10	0.14±0.10*	—	—	—	—
CL/F	mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	0.002±0.001	0.013±0.008	0.005±0.002***	0.007±0.004***	—	—	—	—

与 FVB 野生型小鼠比较: \**P*<0.05 \*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001

\**P*<0.05 \*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001 vs FVB mice

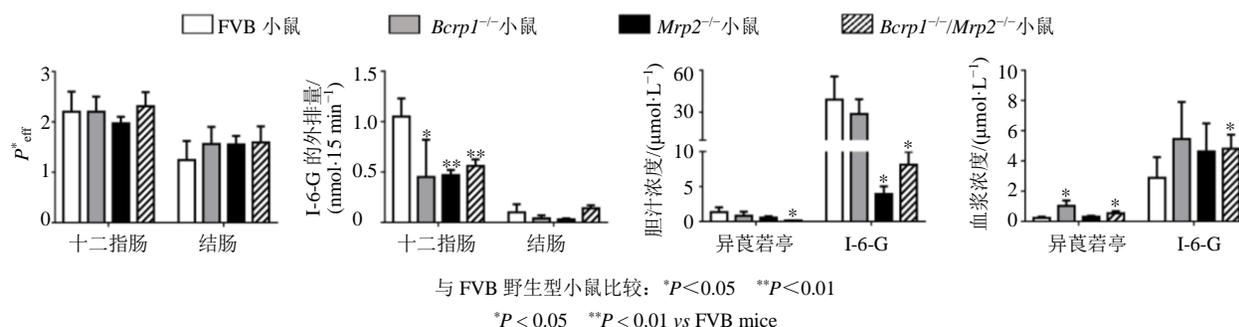


图7 异萜萜亭在小鼠肠灌注模型的吸收与代谢的特征 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 7 Absorption and metabolism of isoscoepoletin in mouse intestinal perfusion model ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

体内 I-6-G 外排入十二指肠肠腔的量下降了 55.7%~58.4% ( $P < 0.05, 0.01$ );  $Bcrp1^{-/-}/Mrp2^{-/-}$  小鼠胆汁中异萜萜亭和 I-6-G 的累积量分别降低了 90.3%、79.1%,  $Mrp2^{-/-}$  小鼠胆汁中 I-6-G 的累积量下降了 90.1% ( $P < 0.05$ );  $Bcrp1^{-/-}$  小鼠血浆中异萜萜亭的暴露量增加了 3.5 倍;  $Bcrp1^{-/-}/Mrp2^{-/-}$  小鼠血浆中异萜萜亭和 I-6-G 的暴露量分别增加了 1.3、0.7 倍 ( $P < 0.05$ )。

### 3.4 异萜萜亭在小鼠肝微粒体和小肠微粒体中的葡萄糖醛酸化代谢特征

异萜萜亭经野生型 FVB 小鼠、 $Bcrp1^{-/-}$  小鼠、

$Mrp2^{-/-}$  小鼠和  $Bcrp1^{-/-}/Mrp2^{-/-}$  小鼠肝微粒体和小肠微粒体孵育后, 代谢生成 I-6-G。如图 8 所示, 野生型 FVB 小鼠、 $Bcrp1^{-/-}$  小鼠、 $Mrp2^{-/-}$  小鼠和  $Bcrp1^{-/-}/Mrp2^{-/-}$  小鼠肝微粒体介导的异萜萜亭葡萄糖醛酸化反应均符合米氏方程, 由小肠微粒体介导的异萜萜亭葡萄糖醛酸化反应均符合底物抑制方程。如表 7 所示, 相比于野生型 FVB 小鼠,  $Bcrp1^{-/-}$  小鼠、 $Mrp2^{-/-}$  小鼠和  $Bcrp1^{-/-}/Mrp2^{-/-}$  小鼠肝微粒体中 I-6-G 的清除率 ( $CL_{int}$ ) 均无统计学差异, 小肠微粒体中 I-6-G 的  $CL_{int}$  均增加了 0.8 倍 ( $P < 0.05$ ), 表明外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 的缺失对异萜萜

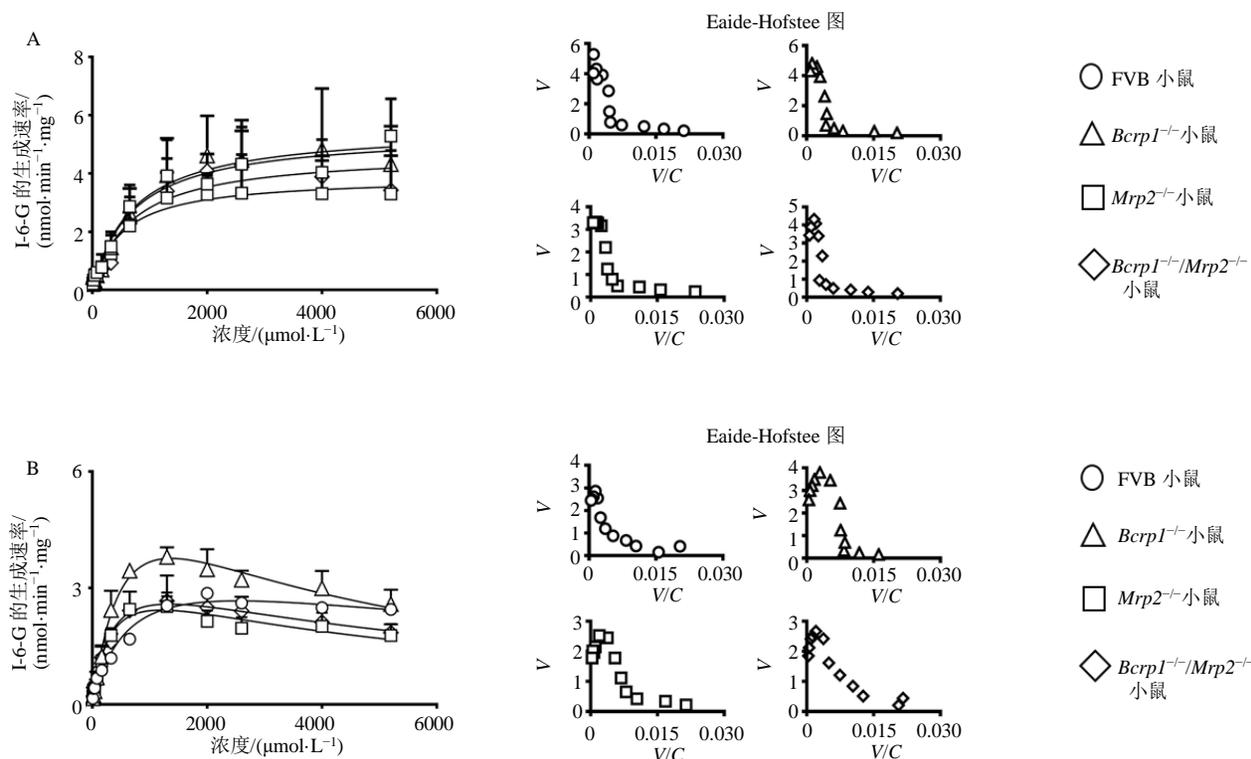


图8 异萜萜亭在小鼠肝微粒体 (A) 和小肠微粒体 (B) 中的酶动力学曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Enzyme kinetics of isoscoepoletin in mouse liver microsomes (A) and intestinal microsomes (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

表 7 异萜萜亭在小鼠肝微粒体和小肠微粒体中的酶动力学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Enzyme kinetics parameters of isoscooletin in mouse liver microsomes and intestine microsomes ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	肝微粒体			小肠微粒体		
	$V_{max}/(\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	$K_m/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$CL_{int}/(\mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	$V_{max}/(\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	$K_m/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$CL_{int}/(\mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$
FVB	5.48±1.42	721.30±195.50	7.90±2.37	4.06±0.19	659.32±69.28	6.20±0.62
<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup>	5.60±2.04	672.34±168.56	8.12±1.40	7.70±0.77	714.68±140.02	11.04±1.41*
<i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>	3.86±1.39	521.03±95.32	8.05±3.74	3.83±0.37	346.19±74.10	11.44±2.17*
<i>Bcrp1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Mrp2</i> <sup>-/-</sup>	4.74±1.18	664.63±102.01	7.04±0.66	4.21±1.24	381.21±101.63	11.07±1.81*

与 FVB 野生型小鼠比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs FVB mice

亭在小鼠体内的葡萄糖醛酸化反应速率影响较小。

#### 4 讨论

异萜萜亭是中药秦皮的主要活性成分之一, 具有多种药理活性, 目前关于异萜萜亭在体内的处置特征及调控机制尚不清楚。本研究开展了小鼠药动学实验、在体肠灌注实验和酶动力学实验, 发现异萜萜亭在小鼠血浆中主要以葡萄糖醛酸化代谢产物 I-6-G 的形式暴露, 外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 对异萜萜亭及 I-6-G 的体内处置具有调控作用。

ig 异萜萜亭后在体内吸收迅速,  $t_{max}$  且消除半衰期短, 在野生型 FVB 小鼠、*Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠血浆中 I-6-G 的  $AUC_{0-t}$  显著高于异萜萜亭的  $AUC_{0-t}$ , 表明异萜萜亭可以以原型形式透过细胞膜, 进而在体内发生广泛的葡萄糖醛酸化代谢。ig 或尾 iv 异萜萜亭后, 与野生型 FVB 小鼠相比, *Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内异萜萜亭的  $AUC_{0-t}$  显著增加 ( $P < 0.01, 0.001$ ), 而 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠体内异萜萜亭的  $AUC_{0-t}$  无显著性差异, 表明异萜萜亭的体内暴露主要由 MRP2 介导; *Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠和 *Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内 I-6-G 的  $AUC_{0-t}$  与野生型 FVB 小鼠相比均显著增加 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), 表明 I-6-G 的外排受 BCRP 和 MRP2 调控, 且 BCRP 和 MRP2 对 I-6-G 的外排作用相当。在 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠体内, 异萜萜亭和 I-6-G 的  $AUC_{0-t}$  与野生型 FVB 小鼠相比均显著增加 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), 且增加倍数远大于单敲除小鼠与野生型 FVB 小鼠的差异。以上结果表明, BCRP 和 MRP2 对异萜萜亭及其代谢物 I-6-G 药动学特征的影响呈协同互补的关系。外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 在肠和肝细胞的顶侧面均有表达, 对底物的外排呈相互协调和合作互补的作用<sup>[14-16]</sup>。当 BCRP 和 MRP2 同时敲除后, 他们之间的协同互补关系被打破, 与 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠和 *Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠相比, 异萜萜亭和 I-6-G 受到的外排作用更小。

小鼠灌注异萜萜亭后, 异萜萜亭在十二指肠段和结肠段的吸收程度较好 ( $P_{eff}^* > 1$ ), 且不受外排转运蛋白 BCRP 或 MRP2 的影响, 表明被动转运可能是异萜萜亭通过细胞膜的主要形式。小鼠肠上皮细胞中 I-6-G 外排入十二指肠肠腔的量高于外排入结肠肠腔的量, 可能是由于十二指肠上皮细胞和结肠上皮细胞中 UGT 酶和外排转运蛋白 (BCRP 和 MRP2) 表达程度的不同引起的<sup>[17-18]</sup>。与野生型 FVB 小鼠相比, 敲除外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 后, I-6-G 外排入十二指肠肠腔和胆汁的量均显著下降 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 表明外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 参与 I-6-G 的外排。异萜萜亭酶动力学结果显示, 与野生型 FVB 小鼠相比, *Bcrp1*<sup>-/-</sup>小鼠、*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠和 *Bcrp1*<sup>-/-</sup>/*Mrp2*<sup>-/-</sup>小鼠肝微粒体中 I-6-G 的  $CL_{int}$  无统计学差异, 小肠微粒体中 I-6-G 的  $CL_{int}$  均增加了 0.8 倍 ( $P < 0.05$ ), 表明外排转运蛋白 BCRP 和 MRP2 的缺失对异萜萜亭在小鼠体内的葡萄糖醛酸化反应速率影响较小。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 271.
- [2] Kostova I, Dinchev D, Mikhova B, et al. Epoxyconiferly alcohol from *Fraxinus oxycarpa* bark [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(3): 801-802.
- [3] Bai X L, Pan R, Li M Z, et al. HPLC profile of longan (cv. Shixia) pericarp-sourced phenolics and their antioxidant and cytotoxic effects [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 619.
- [4] Deng S X, Palu K, West B J, et al. Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(5): 859-862.
- [5] Zhao D D, Zhao Q S, Liu L, et al. Compounds from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott with cytotoxic activity [J]. *Molecules*, 2014, 19(3): 3345-3355.
- [6] Li H B, Zhou C X, Pan Y X, et al. Evaluation of antiviral

- activity of compounds isolated from *Ranunculus sieboldii* and *Ranunculus sceleratus* [J]. *Planta Med*, 2005, 71(12): 1128-1133.
- [7] Juvonen R O, Novák F, Emmanouilidou E, *et al.* Metabolism of scoparone in experimental animals and humans [J]. *Planta Med*, 2019, 85(6): 453-464.
- [8] Álvarez A I, Vallejo F, Barrera B, *et al.* Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in breast cancer resistance protein 1 knockout mice [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(11): 2008-2012.
- [9] Jiang W, Xu B B, Wu B J, *et al.* UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9-overexpressing HeLa cells is an appropriate tool to delineate the kinetic interplay between breast cancer resistance protein (BRCP) and UGT and to rapidly identify the glucuronide substrates of BCRP [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(2): 336-345.
- [10] Zheng L, Zhu L J, Zhao M, *et al.* *In vivo* exposure of kaempferol is driven by phase II metabolic enzymes and efflux transporters [J]. *AAPS J*, 2016, 18(5): 1289-1299.
- [11] Sun R J, Zeng M, Du T, *et al.* Simultaneous determinations of 17 marker compounds in Xiao-Chai-Hu-Tang by LC-MS/MS: Application to its pharmacokinetic studies in mice [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 1003: 12-21.
- [12] Yu J, Zhu L J, Zheng H H, *et al.* Sulfotransferases and breast cancer resistance protein determine the disposition of calycosin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(9): 2917-2929.
- [13] Tang L, Zhou J, Yang C H, *et al.* Systematic studies of sulfation and glucuronidation of 12 flavonoids in the mouse liver S9 fraction reveal both unique and shared positional preferences [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(12): 3223-3233.
- [14] Müller J, Keiser M, Drozdik M, *et al.* Expression, regulation and function of intestinal drug transporters: An update [J]. *Biol Chem*, 2017, 398(2): 175-192.
- [15] Patel M, Taskar K S, Zamek-Gliszczyński M J. Importance of hepatic transporters in clinical disposition of drugs and their metabolites [J]. *J Clin Pharmacol*, 2016, 56(Suppl 7): S23-S39.
- [16] Pan G Y. Roles of hepatic drug transporters in drug disposition and liver toxicity [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141: 293-340.
- [17] Court M H, Zhang X, Ding X, *et al.* Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42(3): 266-277.
- [18] Grandvoinet A S, Vestergaard H T, Rapin N, *et al.* Intestinal transporters for endogenous and pharmaceutical organic anions: The challenges of deriving *in-vitro* kinetic parameters for the prediction of clinically relevant drug-drug interactions [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(11): 1523-1548.

[责任编辑 李亚楠]