

淫羊藿苷元的肠道跨膜转运机制研究

慈小燕^{1,2,3}, 孙英辉^{1,2}, 武卫党^{1,2}, 曾 勇^{1,2}, 刘昌孝^{1,2}, 伊秀林^{1,2*}, 闫凤英^{1,2,3*}

1. 天津药物研究院 释药技术与药代国家重点实验室, 天津 300462

2. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 北京 100730

3. 天津和创生物技术有限公司, 天津 300301

摘要: **目的** 探讨淫羊藿苷元 (icaritin, ICT) 在肠道内的转运机制, 并阐明 ICT 生物利用度低的主要原因。**方法** 采用体外细胞模型人结肠癌 Caco-2 细胞及小肠癌 LS-180 细胞和人药物转运蛋白细胞系 [P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp, 又名 MDR1)、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) 过表达的狗肾细胞系 MDCK-MDR1、MDCK-BCRP、MDCK-MRP2 及空白转染的狗肾细胞系 MDCK-mock; 有机阴离子转运多肽 2B1 (organic anion transporting polypeptides 2B1, OATP2B1) 过表达的人胚胎肾细胞 HEK293-OATP2B1 及空白转染的人胚胎肾细胞 HEK293-mock], 应用实时定量荧光 PCR、LC-MS/MS 联用、放射性同位素示踪等技术, 共同研究淫羊藿苷元在肠道的跨膜转运机制。**结果** Caco-2 细胞研究中, ICT 在低浓度给药时摄入方向表观渗透系数 (P_{app}) 较小, 渗透性较弱, 存在明显外排, 且外排可被 BCRP 抑制剂明显抑制, 不能被 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 抑制剂明显抑制, 随着给药浓度的增加, 外排逐渐减弱, 摄入方向 P_{app} 逐渐增加, 渗透性逐渐增强。通过人药物转运蛋白细胞系研究, ICT 可显著抑制 BCRP 和 OATP2B1 的转运, 对 BCRP 和 OATP2B1 转运蛋白的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 6.33、31.8 $\mu\text{mol/L}$; 同时, ICT 是 BCRP 和 OATP2B1 的底物。通过 LS-180 细胞诱导研究表明, ICT 不能诱导肠道外排蛋白 P-gp、BCRP 的表达上调。**结论** ICT 在肠内通过被动扩散和主动转运 2 种机制吸收, 其中被动扩散能力弱, 主动转运包括外排转运蛋白 BCRP 的外排和摄入转运蛋白 OATP2B1 摄入共同介导, 且对肠道外排转运蛋白无诱导表达功能。BCRP 的外排对 ICT 吸收影响有限, 这可能与 ICT 的给药浓度及 BCRP 的饱和浓度有关。

关键词: 淫羊藿苷元; 肠道吸收; 转运机制; Caco-2 细胞; LS-180 细胞; P-糖蛋白; 乳腺癌耐药蛋白; 多药耐药相关蛋白 2; 有机阴离子转运多肽 2B1

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)09-2747-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.018

Study on transmembrane transport mechanism of icariin in intestine

CI Xiao-yan^{1,2,3}, SUN Ying-hui^{1,2}, WU Wei-dang^{1,2}, ZENG Yong^{1,2}, LIU Chang-xiao^{1,2}, YI Xiu-lin^{1,2}, YAN Feng-ying^{1,2,3}

1. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

2. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

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

Abstract: Objective To explore the transport mechanism of icaritin (ICT) in the intestine and clarify the main reasons for the low bioavailability of ICT. **Methods** *In vitro* cell models including Caco-2 and LS-180 cells and human drug transporter-transfected cell models including P-glycoprotein (P-gp, also known as MDR1), breast cancer resistance protein (BCRP), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) overexpressed in canine kidney cell lines MDCK-MDR1, MDCK-BCRP, MDCK-MRP2, and blank transfected canine kidney cell line MDCK-mock; organic anion transporting polypeptides 2B1 (OATP2B1) overexpressed human

收稿日期: 2021-10-12

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2019-I2M-5-020)

作者简介: 慈小燕 (1987—), 副研究员, 主要从事药理学及细胞质控研究。Tel: 13622099172 E-mail: cixy@tjpr.com.cn

*通信作者: 伊秀林 (1964—), 研究员, 主要从事药理学研究工作。E-mail: yixl@tjpr.com.cn

闫凤英 (1963—), 高级工程师, 主要从事生物技术药物研究与产业化工作。E-mail: yanfy@tjpr.com

embryonic kidney cells HEK293-OATP2B1 and blank transfected human embryonic kidney cells HEK293-mock were used. Real-time quantitative fluorescence PCR, LC-MS/MS, radioisotope tracer and other techniques were used to study the transmembrane transport mechanism of ICT in intestinal tract. **Results** In the study of Caco-2 cell, the apparent permeability coefficient (P_{app}) of ICT in the direction of intake was small and the permeability was weak at low concentrations, and its efflux could be significantly inhibited by BCRP inhibitors, but not by P-gp inhibitors. With the increase of the concentration of administration, the efflux gradually weakened, the intake direction of P_{app} gradually increased, and the permeability gradually increased. Through the study of the human drug transporter cell line, ICT could significantly inhibit the transport of BCRP and OATP2B1, with IC_{50} values of 6.33 and 31.8 $\mu\text{mol/L}$, respectively. ICT was the substrate of BCRP and OATP2B1. LS-180 cell induction study showed that ICT could not induce up-regulation of the expression of intestinal efflux protein P-gp and BCRP. **Conclusion** ICT is absorbed in intestine through passive diffusion and active transport, of which passive diffusion capacity is weak. The active transport is mediated by efflux of BCRP and uptake of uptake transporter OATP2B1, and has no induction expression function for intestinal efflux transporter. The efflux of BCRP has a limited effect on ICT absorption, which may be related to the dose concentration of ICT and the saturation concentration of BCRP. **Key words:** icaritin; intestinal absorption; transport mechanism; Caco-2 cells; LS-180 cells; P-glycoprotein; breast cancer resistance protein; multidrug resistance-associated protein 2; organic anion transporting polypeptides 2B1

淫羊藿苷元 (icaritin, ICT) 是从小檗科淫羊藿属植物淫羊藿中提取的一种多羟基黄酮类化合物, 为淫羊藿苷水解物。ICT 是一种毒性较低且高效的癌症治疗剂^[1], 对急性髓系白血病、恶性淋巴瘤、肝癌、肺癌、乳腺癌等具有明显的抗肿瘤作用^[2-7]。但 ICT 的溶解性差, 口服生物利用度低, 且对其肠道吸收机制尚无全面报道。

药物吸收转运的方式主要包括细胞间转运 (paracellular transport) 和跨膜转运 (transcellular transport); 跨膜转运又可分为被动扩散和转运体介导的跨膜转运 (transporter mediated transport)。药物的转运可能采取单一转运机制吸收, 也可兼有几种转运方式。大多数药物通常首先采取被动扩散, 其次采取转运蛋白介导的跨膜转运。肠道细胞膜上的转运蛋白在肠道吸收中起着重要甚至决定性的作用^[8-9]。在人体肠道中表达的药物转运蛋白主要包括外排转运蛋白 [如 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp, 又名 MDR1)、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)] 和摄取转运蛋白 2B1 [如有机阴离子转运多肽 (organic anion transporting polypeptides 2B1, OATP2B1) 和寡肽转运蛋白 1 (peptide transporter 1, PEPT1)]^[10]。ICT 是一种多羟基黄酮类化合物, 不具有 PEPT1 的底物结构特性 (含有肽样结构)。因此, 本研究仅探讨 ICT 与 P-gp、BCRP、MRP2 和 OATP2B1 之间的关系。

本研究采用体外细胞模型结肠癌 Caco-2 细胞和人转运蛋白转染细胞系 (MDR1、BCRP、MRP2

过表达的狗肾细胞系 MDCK-MDR1、MDCK-BCRP、MDCK-MRP2 和 OATP2B1 过表达的人胚胎肾细胞 HEK293-OATP2B1 及空白转染的人胚胎肾细胞 HEK293-mock), 共同研究 ICT 的吸收机制。此外, 还使用小肠癌 LS-180 细胞系研究 ICT 对外排转运蛋白的诱导, 以确认是否存在由外排转运蛋白的表达上调引起的生物利用度降低机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

ICT (中国食品药品检定研究院, 质量分数 99.7%, 批号 16052601), 内标乙氧苯柳胺 (中国食品药品检定研究院, 质量分数 98.6%, 批号 100680-200901); ^3H -普萘洛尔、 ^3H -地高辛、 ^3H -硫酸雌酮 (estrone sulfate, ES)、 ^3H -雌二醇葡萄糖苷酸 (estradiol glucuronide, EG) (美国 ARC 公司, 批号分别为 160721、160624、140331、141231); ^{14}C -PEG4000 (Perkin Elmer 公司, 批号 2195563), 维拉帕米、BCRP 抑制剂 Ko143、利福平、波生坦、沙奎那韦、环孢素 A (美国 MCE 公司, 批号分别为 18578、03621、11246、15327、160708、11724); DMEM 高糖培养基、青链霉素混合液 (100 $\times$)、Phosphate Buffered Saline (PBS, 1 $\times$)、HBSS (含钙镁)、含 EDTA 的 0.25%胰酶、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); Transwell 12 孔聚碳酸酯膜转运板、胶原蛋白包被板 (美国 Corning 公司)。

1.2 仪器

Olympus-CKX41 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司; Millcell ERS-2 跨上皮电阻仪, 美国 Millipore 公司; Tri-Carb

2910 TR 放射性液体闪烁仪, PerKinElmer 公司; ZHWY-上海智诚恒温振荡器, 北京华威兴业科技有限公司; Sorvall Legend Micro 17R 台式高速冷冻离心机, 美国 Thermo 公司; Agilent1100 HPLC-UV 系统, 日本安捷伦公司; LCMS-8060 超快速三重四极杆液质联用仪, 配有 LC-30AD 二元输送泵、SIL-30AC 自动进样器、DGU-20A5R 真空脱气机和 CTO-20A 柱温箱, 日本 Shimadzu 公司; Mastercycler ep Realplex² 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪, 德国 Eppendorf 公司。

1.3 细胞株

Caco-2 细胞及 LS-180 细胞购自国家实验细胞资源共享平台。药物转运蛋白细胞株 MDCK-MDR1、MDCK-BCRP、MDCK-mock、HEK293-OATP2B1 和 HEK293-mock 由日本富士生物医药研究所赠予; MDCK-MRP2 细胞由大连医科大学刘克辛教授团队赠予。

2 方法

2.1 细胞培养

所有细胞系均于培养皿内, 以 DMEM 为培养基 (含 10% FBS、1% 青链霉素), 在 37 °C、5% CO₂ 和相对湿度 90% 的培养箱内培养, 当细胞覆盖盘底 80%~90% 时, 用含 0.25% EDTA 的胰酶消化。本实验所用的 Caco-2 细胞为 32~35 代, LS-180 细胞为 22~25 代, MDCK-MDR1 细胞为 29~30 代、MDCK-BCRP 细胞为 19~20 代、MDCK-MRP2 细胞为 22~24 代, HEK293-mock 细胞为 24~25 代, HEK293-OATP2B1 细胞为 26~28 代。

2.2 MTT 测定

将细胞接种于 96 孔板上, 在无药物培养基中培养 24 h。Caco-2、LS-180、MDCK、HEK293 细胞接种密度分别为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 、 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 、 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$ 、 $8 \times 10^4/\text{mL}$ 。之后, 加入一系列的 ICT, 终浓度分别为 0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$, 与细胞再孵育 48 h。随后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL , 孵育 20~30 min。最后, 在酶标仪上测量反应液在 490 nm 波长处的吸光度。每个浓度 6 次重复。使用 GraphPad Prism 计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

2.3 LC-MS/MS 分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 InertSustain Bio C₁₈ HP (50 mm×2.1 mm, 3 μm), 柱温 40 °C, 流动相为甲醇-10% 甲醇水溶液 (含有 0.09% 甲酸) (7:3), 等度洗脱, 体积流量为 0.3 mL/min, 进样温度 6 °C。

2.3.2 质谱条件 ESI 正离子源, 喷雾气体流量 3 L/min, 加热气体流量 10 L/min, 干燥气体流量 10 L/min, 源温 300 °C, 去溶剂气温度 250 °C, 加热模块温度 400 °C; 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描方式: 淫羊藿苷元 $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 369.1→ m/z 313.1, 碰撞能-30 eV; 内标乙氧苯柳胺 $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 258.1→ m/z 121.1, 碰撞能-22 eV。

2.4 样品制备及处理

精密称取 ICT 对照品适量, 用甲醇溶液超声溶解配制质量浓度为 1 mg/mL 的储备液, 精密吸取储备液适量, 用甲醇稀释配制含 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 ICT 甲醇溶液 A, 用甲醇梯度稀释得质量浓度分别为 0.5、1、5、25、100、500、1000 ng/mL 的标准曲线溶液; 同时, 用甲醇稀释配制含 1 $\mu\text{g/mL}$ ICT 的甲醇溶液 B, 用甲醇梯度稀释得质量浓度分别为 1、25、800 ng/mL 的质控溶液。取各样品溶液 50 μL , 加入 IS 100 μL (乙氧苯柳胺 10 ng/mL 甲醇溶液), 再加入 50 μL 水, 涡旋混匀, 取 100 μL 溶液于内插管中, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液进样 2 μL , 进行 LC-MS/MS 定量分析。

2.5 方法学验证

细胞样品中 ICT 的 LC-MS/MS 定量分析方法经过了完整的方法学验证, 在该分析方法下, 细胞中的其余物质不会干扰待测物和内标的测定, ICT 的线性范围分别为 0.5~1000 ng/mL, 曲线斜率的 RSD 均小于 0.205%, 相关系数大于 0.999, 表明在该范围浓度内线性良好。定量下限为 0.5 ng/mL, 准确度在 90.0%~107%, 精密度小于 5.52%。低、高 2 个质量浓度水平的基质效应在 91%~106%, RSD 小于 10.5%。

2.6 Caco-2 细胞吸收转运研究

用新鲜培养基调细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 Transwell 聚碳酸酯膜 12 孔板中。在 Caco-2 细胞层顶端 (AP) 每孔加 0.5 mL 细胞悬液, 基底端 (BL) 每孔加 1.5 mL 新鲜培养基, 连续培养 21 d, 得到完全分化的细胞单层。

用 3 种已知特性的工具药 [³H-普萘洛尔 (高渗)、¹⁴C-聚乙二醇 4000 (零渗) 和 ³H-地高辛 (外排基质)] 验证 Caco-2 细胞单层的完整性和功能性。此外, 通过使用 Millicell-ERS 电阻仪测量跨单层的跨上皮电阻 (trans epithelial electric resistance, TEER) 来评估单层的完整性。实验中仅使用 TEER 值高于 350 Ω/cm^2 的细胞单层。

样品处理: 取细胞液 50 μL , 加入内标乙氧苯柳胺 10 ng/mL 甲醇溶液 100 μL , 再加入 50 μL 甲醇溶液, 涡旋混匀, 取 100 μL 溶液于内插管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液进样 2 μL , 进行 LC-MS/MS 定量分析。

2.6.1 ICT 在 Caco-2 细胞中摄入方向的转运 吸去 Transwell 小室 AP 和 BL 端的培养基, 加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 HBSS 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 20 min; 吸去 HBSS, 在 AP 端加入 0.5 mL 预热的含有不同浓度 (1、5、25 $\mu\text{mol/L}$) ICT 的 HBSS 溶液, BL 端加入 1.5 mL 空白 HBSS 溶液; 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器孵育, 在 30 min 吸取 BL 端的转运液, LC-MS/MS 测定转运液中的 ICT 浓度。按以下公式计算表观渗透系数 (apparent permeation coefficient, P_{app}) 和外排率 (efflux ratio, R_{E})。

$$P_{\text{app}} = V \times (dC/dt) \times 1/A \times 1/C_0$$

V 表示接收室的溶液体积 (AP 端为 0.5 cm^3 、BL 端为 1.5 cm^3), A 表示膜的面积 (1.13 cm^2), C_0 表示药物的起始浓度, dC/dt 表示接收室在单位时间获得的药物浓度, 即接收室的最终浓度除以转运时间

$$R_{\text{E}} = P_{\text{app}}(B-A)/P_{\text{app}}(A-B)$$

A-B 代表 AP $\rightarrow$ BL, B-A 代表 BL $\rightarrow$ AP, 当所测药物的 $R_{\text{E}} \geq 2$ 时, 表示药物可能为肠道外排转运蛋白的底物, 当所测药物的 $R_{\text{E}} \leq 0.5$ 时, 表示该药物可能为肠道摄入转运蛋白的底物

2.6.2 ICT 在 Caco-2 细胞中外排方向的转运 吸去 Transwell 小室 AP 和 BL 端的培养基, 加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 HBSS 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 20 min; 吸去 HBSS, 在 AP 端加入 0.5 mL 空白 HBSS 溶液, BL 端加入预热的含有不同浓度 (1、5、25 $\mu\text{mol/L}$) ICT 的 HBSS 溶液; 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器孵育一段时间; 吸取 AP 端的转运液, LC-MS/MS 测定转运液中的 ICT 浓度。计算 P_{app} 和 R_{E} 。

2.6.3 P-gp 抑制剂维拉帕米及 BCRP 抑制剂 Ko143 对 ICT 在 Caco-2 细胞转运的影响 用同时含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 维拉帕米或 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ko143 和 ICT 的给药液代替只含 ICT 的给药液即可, 其他操作相同。计算 P_{app} 和 R_{E} 。

2.7 ICT 对人体肠道中表达的药物转运蛋白的抑制研究

2.7.1 摄入转运蛋白 用新鲜 DMEM 培养基调细胞密度至 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 24 孔板中, 连续培养 2~3 d 后, 用于抑制实验。去除培养板内 DMEM, 将 HEK293-OATP2B1 和 HEK293-mock 细胞置于

DPBS 缓冲液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 10 min。将含放射性标记的探针底物 ^3H -ES (0.05 $\mu\text{mol/L}$) 的阳性抑制剂利福平或不同浓度 (0、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) ICT 的给药混合溶液置换 DPBS, 每个浓度设置 3 个复孔, 在各细胞中反应 2 min。另设对照组, 给药液换成只含放射性底物不含抑制剂的溶液。用冷 DPBS 洗涤 3 次将抑制实验终止。然后, 将细胞溶解在 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中, 提取后在每个样品中加入 3.5 mL 闪烁液, 混匀, 用液体闪烁分析仪进行定量测定。计算抑制率, 以表征 ICT 对转运体的抑制作用的强弱。

$$\text{抑制率} = (U - U_0)/(U_c - U_0)$$

U_c 表示对照组的 DPM (每分钟衰变数) 值, U_0 表示 mock 细胞的 DPM 值, U 表示各给药组的 DPM 值

2.7.2 外排转运蛋白 用培养基调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 Transwell 12 孔板中。连续培养 7 d, 得到完全分化的细胞单层。实验中仅使用 TEER 值高于 150 Ω/cm^2 的细胞单层。去除培养板内 DMEM, 将 MDCK-MDR1、MDCK-BCRP、MDCK-MRP2 和 MDCK-mock 细胞置于 DPBS 缓冲液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 10 min。MDR1、BCRP 及 MRP2 转运蛋白使用的底物分别为 ^3H -地高辛 (1 $\mu\text{Ci/mL}$)、 ^3H -ES (1 $\mu\text{Ci/mL}$) 及 ^3H -EG (1 $\mu\text{Ci/mL}$); 抑制剂分别为维拉帕米 (100 $\mu\text{mol/L}$)、Ko143 (1 $\mu\text{mol/L}$) 及环孢素 A (30 $\mu\text{mol/L}$)。将含放射性标记探针底物的阳性抑制剂或不同浓度 ICT (0、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 的给药混合溶液置换 DPBS, 每个浓度设置 3 个复孔, 在各细胞中反应 15 min。另设对照组, 给药液换成只含放射性底物不含抑制剂的溶液。取 100 μL 转运液, 分别加入 3.5 mL 闪烁液, 混匀, 用液体闪烁分析仪进行定量测定。计算抑制率。

2.8 底物研究

2.8.1 摄入转运蛋白 考察摄入转运蛋白细胞对 ICT 的吸收转运的影响。实验操作同“2.7.1”项, 将不同浓度 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) ICT 的给药混合溶液置换 DPBS, 每个浓度设置 3 复孔, 在 HEK293-OATP2B1 和 HEK293-mock 细胞中反应 2 min。用冷 DPBS 洗涤 3 次将抑制实验终止, 然后吸去 DPBS 后向 24 孔板的每孔中加入 300 μL 甲醇。样品处理同“2.4”项。

2.8.2 外排转运蛋白 分别用 MDCK-MDR1、MDCK-BCRP 细胞研究不同浓度 (1、5、25 $\mu\text{mol/L}$) ICT 的吸收转运情况, 实验操作同“2.6”项。

2.9 LS-180 细胞诱导研究

LS-180 细胞以每孔 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 12 孔板中, 在不含药物的培养基中培养 24 h。然后, 用含 ICT (1、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基与 LS-180 细胞 72 h 共培养, 以添加 P-gp、BCRP 和 MRP2 诱导剂利福平 (10 $\mu\text{mol/L}$)、波生坦 (10 $\mu\text{mol/L}$)^[11] 和沙奎那韦 (10 $\mu\text{mol/L}$)^[12] 的细胞分别作为阳性对照组, 而在未添加药物的培养基中生长的细胞作为对照组。然后用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒收集细胞, 提取 RNA, 并逆转录为 cDNA, 用 qRT-PCR 进行扩增检测。

以逆转录的 cDNA 为模板, qRT-PCR 反应体系为 Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) 12.5 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.75 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.75 μL , 水 (PCR-grade) 9 μL , cDNA 模板 2 μL , 总体积 25 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 40 个循环, 60~95 $^{\circ}\text{C}$ 进行熔解曲线分析。引物序列见表 1。

2.10 数据处理

本实验中每个数据点为平行 3 孔的平均值, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 MTT 检测

结果显示, ICT 对 Caco-2 细胞的 IC_{50} 超过 30 $\mu\text{mol/L}$, 表明 ICT 在 0.1~30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对细胞无损伤; 同样, ICT 在相同浓度范围内对 LS-180、MDCK 和 HEK293 细胞未表现出毒性。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers used for qRT-PCR analysis

引物	序列 (5'-3')	来源
β -actin-F	GGCATCCTCACCTGAAGTA	BGI
β -actin-R	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA	BGI
ABCB1-F	CCCATCATTGCAATAGCAGG	BGI
ABCB1-R	TGTTCAAACCTCTGCTCCTGA	BGI
ABCG2-F	AGATGGGTTTCCAAGCGTTCAT	BGI
ABCG2-R	CCAGTCCCAGTACGACTGTGACA	BGI
ABCC2-F	ACAGAGGCTGGTGGCAACC	BGI
ABCC2-R	ACCATTACCTTGCTACTGTCCATGA	BGI

BGI 代表深圳华大基因股份有限公司

BGI stands for Shenzhen BGI Co., Ltd.

3.2 Caco-2 细胞吸收转运研究

Caco-2 细胞模型中 ICT 双向转运的 P_{app} 和 R_{E} 值如表 2 所示。ICT 摄取的 P_{app} 值逐渐升高, ICT 有明显的外排现象, 且随着浓度的升高, 外排现象逐渐消失。当 ICT 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, Ko143 可显著抑制 ICT 的外排, 当 ICT 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, R_{E} 小于 0.5, 表明 ICT 在肠道通过被动扩散及主动转运共同吸收入血, 其中主动转运可能同时包括外排和摄入 2 种形式。

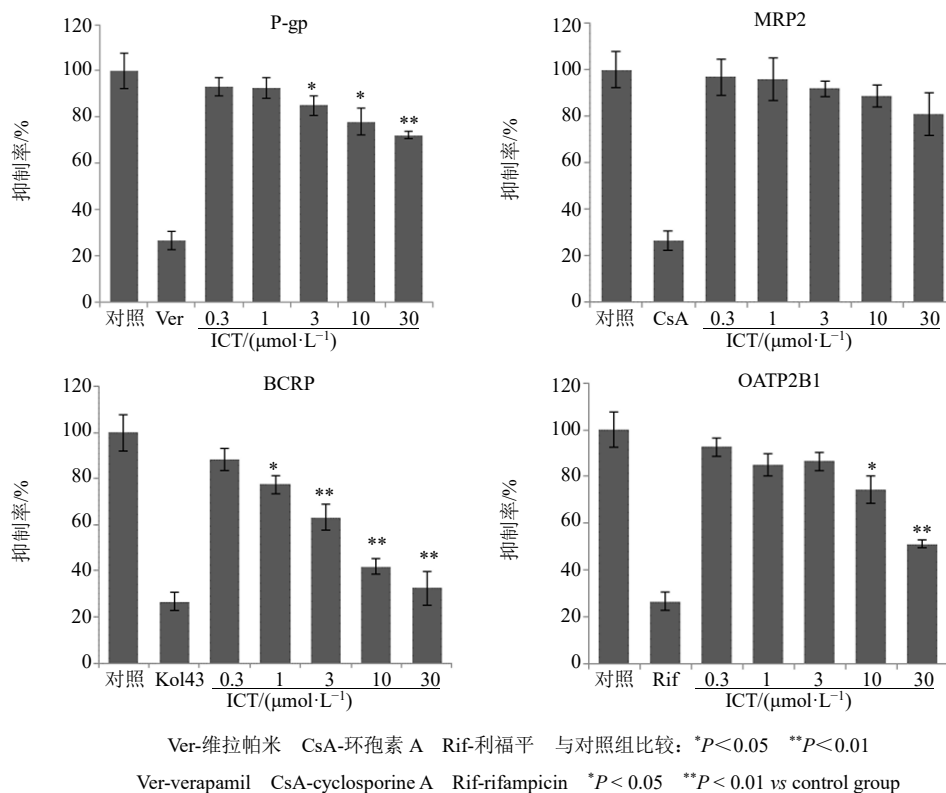
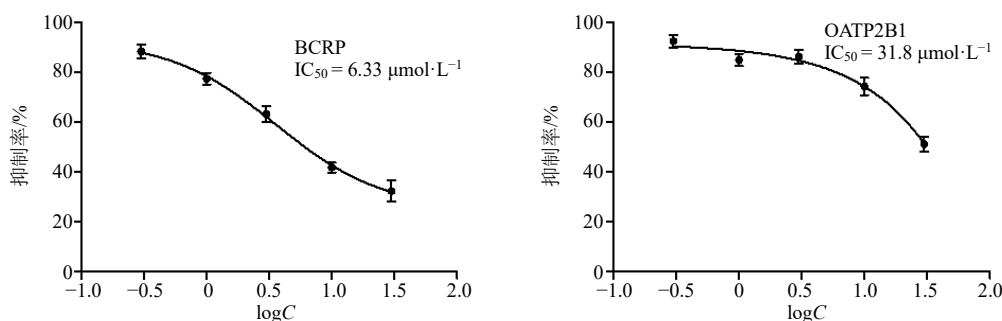
3.3 ICT 对药物转运蛋白的抑制研究

结果见图 2、3。ICT (0.3~30 $\mu\text{mol/L}$) 对 MRP2 介导的 ^3H -EG 转运活性无明显抑制作用。在 3~30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, ICT 对 P-gp 介导的 ^3H -地高辛转运活性具有显著抑制作用 ($P < 0.05$ 、0.01), 但 $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{mol/L}$ 。在 1~30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, ICT 可显著抑

表 2 淫羊藿苷元在 Caco-2 细胞中双向转运的 P_{app} 值和 R_{E} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 P_{app} and R_{E} of ICT bi-directional transport in Caco-2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		R_{E}
		AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
ICT	1	0.175 ± 0.021	0.730 ± 0.046	4.16
	5	0.547 ± 0.074	0.639 ± 0.033	1.17
	25	0.874 ± 0.043	0.410 ± 0.008	0.47
ICT+维拉帕米	1+50	0.177 ± 0.019	0.576 ± 0.028	3.26
	5+50	0.613 ± 0.096	0.755 ± 0.062	1.23
	25+50	1.040 ± 0.117	0.475 ± 0.038	0.46
ICT+Ko143	1+0.5	0.212 ± 0.020	0.419 ± 0.016	1.98
	5+0.5	0.598 ± 0.082	0.613 ± 0.053	1.03
	25+0.5	1.160 ± 0.096	0.428 ± 0.030	0.38

图2 不同浓度的淫羊藿苷元对肠道中表达的转运蛋白的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 2 Inhibition of different concentrations of ICT on transporters expressed in intestine ($\bar{x} \pm s, n=3$)图3 淫羊藿苷元对 BCRP 和 OATP2B1 的转运抑制作用的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 IC_{50} values of ICT on BCRP and OATP2B1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制 BCRP 介导的 3H -ES 的转运 ($P<0.05$ 、 0.01)， IC_{50} 为 $6.63 \mu\text{mol/L}$ 。当 ICT 浓度为 10 、 $30 \mu\text{mol/L}$ 时，OATP2B1 介导的 3H -EG 转运活性受到显著抑制 ($P<0.05$ 、 0.01)， IC_{50} 约为 $30 \mu\text{mol/L}$ 。

3.4 底物研究

3.4.1 外排转运蛋白 MDCK-MDR1/BCRP 细胞中 ICT 双向转运的 P_{app} 和 R_E 值见表 3。MDCK-BCRP 中有明显的 ICT 外排，随着 ICT 浓度的增加而逐渐减少，且 Ko143 能显著抑制 ICT 的外排。MDCK-MDR1 中没有显著的 ICT 外排，加入维拉帕

米后也没有显著变化。结果表明 ICT 是 BCRP 的转运底物。

3.4.2 摄取转运蛋白 HEK293-OATP2B1 和 HEK293-mock 细胞中的 ICT 转运的结果如图 4 所示。当 ICT 浓度为 $30 \mu\text{mol/L}$ 时，OATP2B1 介导的 ICT 摄取是 mock 细胞的 2.67 倍，ES 可显著抑制 HEK293-OATP2B1 细胞对 ICT 的摄取。结果表明 ICT 是 OATP2B1 的底物。

3.5 LS-180 细胞诱导研究

阳性对照利福平、波生坦、沙奎那韦均可分别

表3 淫羊藿苷元在 MDCK-MDR1 细胞及 MDCK-BCRP 细胞中双向转运的 P_{app} 值和 R_E 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 P_{app} and R_E of ICT bi-directional transport in MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		R_E
			AP→BL	BL→AP	
ICT	1	MDCK-MDR1	0.415±0.022	0.522±0.041	1.260
	5		0.547±0.062	0.539±0.032	0.985
	25		0.574±0.043	0.510±0.042	0.889
ICT+维拉帕米	1+50	MDCK-MDR1	0.437±0.016	0.506±0.032	1.160
	5+50		0.513±0.091	0.475±0.069	0.926
	25+50		0.484±0.032	0.478±0.037	0.988
ICT	1	MDCK-BCRP	0.156±0.033	0.925±0.125	5.930
	5		0.352±0.063	0.806±0.047	2.290
	25		0.433±0.054	0.450±0.067	1.040
ICT+Ko143	1+0.5	MDCK-BCRP	0.205±0.012	0.517±0.028	2.520
	5+0.5		0.347±0.077	0.718±0.050	2.070
	25+0.5		0.571±0.076	0.477±0.036	0.835

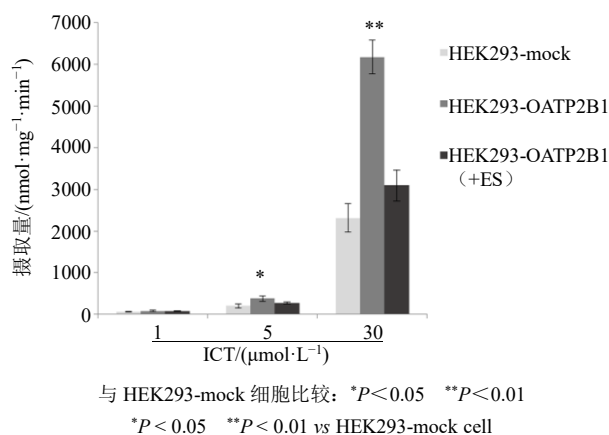


图4 淫羊藿苷元经 HEK293-OATP2B1 及 HEK293-mock 细胞介导的摄取情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Uptake of ICT mediated by HEK293-OATP2B1 and HEK293-mock cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

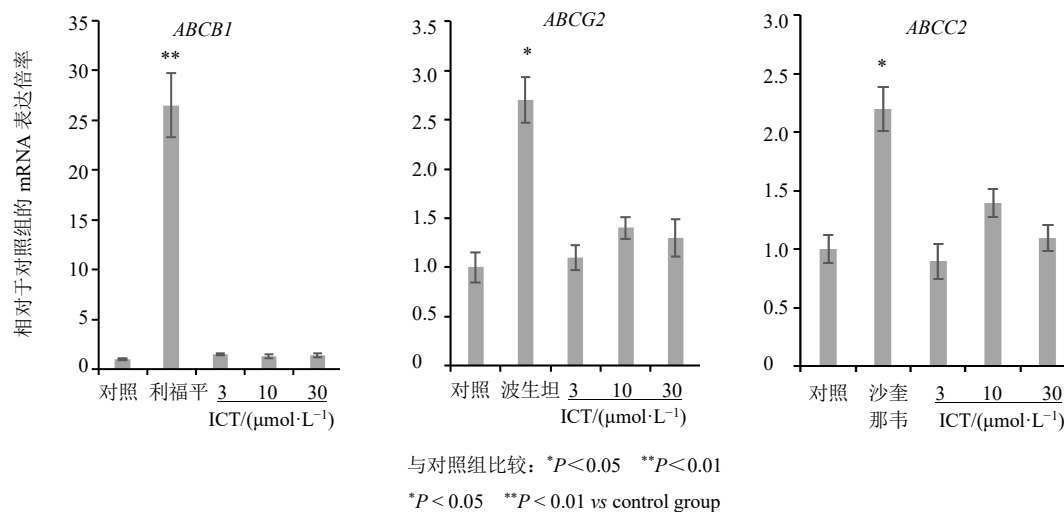


图5 淫羊藿苷元对 $ABCB1$ 、 $ABCG2$ 和 $ABCC2$ 的 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Determination of $ABCB1$, $ABCG2$ and $ABCC2$ mRNA expression level after treatment of ICT ($\bar{x} \pm s, n=3$)

显著上调 $ABCB1$ (P -gp)、 $ABCG2$ ($BCRP$) 和 $ABCC2$ ($MRP2$) 的 mRNA 表达水平, 但 ICT 不上调 $ABCB1$ 、 $ABCG2$ 和 $ABCC2$ 的 mRNA 表达水平, 即不诱导 P -gp、 $BCRP$ 或 $MRP2$ 表达 (图5)。

4 讨论

目前研究药物肠道跨膜转运机制的方法主要有体内法、在体法和体外法3种, 体内法能够真实反映药物的总体吸收情况, 但难以从细胞和分子水平探讨药物的跨膜转运机制; 在体法保证了肠道神经和血管的完整性, 常用于研究药物的渗透和吸收动力学, 但该方法技术难度大, 干扰因素较多^[13-14]; 体外法简便易行, 实验条件容易控制, 主要用于研究药物的肠道跨膜转运机制^[15-16]。

Caco-2 细胞在形态和功能上与肠上皮细胞相似, 可以表达多种刷状缘酶、一些细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶和一些内源性活性转运蛋白和药物转运蛋白^[17-18]。因为 Caco-2 细胞含有多重转运蛋白^[19], 不利于研究单个转运蛋白对药物的影响。人转运蛋白转染细胞系是特异性过度表达人类转运蛋白基因并被目标转运蛋白稳定转染的细胞系。Caco-2 与转运蛋白转染细胞的联合使用, 可更直观、更准确地分析转运蛋白在药物吸收中的作用与贡献度。但 Caco-2 因为缺乏典型的人孕烷受体 (pregnane X receptor, PXR) 和类固醇外源异物受体 (steroid and xenobiotic receptor, SXR), 因此其不是评价转运蛋白诱导的好模型。SXR 的配体如利福平可增加小肠癌 LS-180 细胞上 P-gp 和 CYP3A4 的表达, 因此, 业内一般用 LS-180 细胞系来评价 P-gp 等的诱导^[20-21]。

本研究结果表明, ICT 可显著抑制 P-gp、BCRP 和 OATP2B1 的转运活性, 且 ICT 也是 BCRP 和 OATP2B1 的转运底物。因此, ICT 在肠道可通过被动扩散和主动转运吸收入血。其中, 主动转运包括 BCRP 介导的外排和 OATP2B1 介导的摄取。当 ICT 在低浓度时外排明显, 在高浓度时外排出现饱和, 且同时出现 OATP2B1 介导的摄入。但是, ICT 不诱导 LS-180 细胞中 P-gp、BCRP 和 MRP2 的表达, 推测不会通过诱导 BCRP 的表达来降低 ICT 的生物利用度。随着药物浓度的增加, ICT 的吸收增强, 但结果显示 ICT 是低渗透性化合物, 这可能是导致其生物利用度低的主要原因。本研究首次系统地研究了淫羊藿苷在肠道内的吸收机制和可能的转运蛋白介导的药物相互作用, 为临床开发和应用提供可靠的支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] He Y F, Ci X Y, Xie Y, *et al.* Potential detoxification effect of active ingredients in liquorice by upregulating efflux transporter [J]. *Phytomedicine*, 2019, 56: 175-182.
- [2] Dobson P D, Kell D B. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: An exception or the rule? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(3): 205-220.
- [3] Du Q, di L Q, Shan J J, *et al.* Intestinal absorption of daphnetin by rats single pass perfusion *in situ* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44(8): 922-926.
- [4] Fei Y J, Kanai Y, Nussberger S, *et al.* Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter [J]. *Nature*, 1994, 368(6471): 563-566.
- [5] Guo Y M, Zhang X T, Meng J, *et al.* An anticancer agent icaritin induces sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway and inhibits growth of breast cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 658(2/3): 114-122.
- [6] He J, Wang Y, Duan F, *et al.* Icaritin induces apoptosis of HepG2 cells via the JNK1 signaling pathway independent of the estrogen receptor [J]. *Planta Med*, 2010, 76(16): 1834-1839.
- [7] Wang T, Feng X C, Ding L Q, *et al.* Metabolic profiling of icaritin in rats using UHPLC-Q/TOF-MS [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 185-191.
- [8] Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, *et al.* Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(8): 1333-1340.
- [9] König S K, Herzog M, Theile D, *et al.* Impact of drug transporters on cellular resistance towards saquinavir and darunavir [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(11): 2319-2328.
- [10] Consortium I T, Giacomini K M, Huang S M, *et al.* Membrane transporters in drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(3): 215-236.
- [11] Lee J B, Zgair A, Taha D A, *et al.* Quantitative analysis of lab-to-lab variability in Caco-2 permeability assays [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 114: 38-42.
- [12] Lennernäs H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery *in vivo* [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(11): 1103-1120.
- [13] Li Q H, Huai L, Zhang C P, *et al.* Icaritin induces AML cell apoptosis via the MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways [J]. *Int J Hematol*, 2013, 97(5): 617-623.
- [14] Li Q, Sai Y, Kato Y, *et al.* Influence of drugs and nutrients on transporter gene expression levels in Caco-2 and LS180 intestinal epithelial cell lines [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(8): 1119-1124.
- [15] Li Z J, Yao C, Liu S F, *et al.* Cytotoxic effect of icaritin and its mechanisms in inducing apoptosis in human Burkitt lymphoma cell line [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 391512.
- [16] Sai Y, Tsuji A. Transporter-mediated drug delivery: Recent

- progress and experimental approaches [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9(16): 712-720.
- [17] Shah P, Jogani V, Bagchi T, *et al.* Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption [J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(1): 186-198.
- [18] Sugano K, Kansy M, Artursson P, *et al.* Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(8): 597-614.
- [19] Walsh K R, Failla M L. Transport and metabolism of equol by Caco-2 human intestinal cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(18): 8297-8302.
- [20] Weiss J, Herzog M, Haefeli W E. Differential modulation of the expression of important drug metabolising enzymes and transporters by endothelin-1 receptor antagonists ambrisentan and bosentan *in vitro* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660(2/3): 298-304.
- [21] Zhao H, Guo Y M, Li S, *et al.* A novel anti-cancer agent Icaritin suppresses hepatocellular carcinoma initiation and malignant growth through the IL-6/Jak2/Stat3 pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31927-31943.

[责任编辑 潘明佳]