

基于药物转运体的小白菊内酯衍生物 ACT001 的跨膜转运机制和耐药性研究

孙英辉^{1,2}, 尚海花³, 慈小燕^{2,4,5*}, 武卫党^{1,2,5}, 王泽⁶, 崔涛^{1,2,5}, 曾勇^{2,5}, 闫凤英^{1,2,4,5}, 伊秀林^{1,2,4,5*}

1. 天津药物研究院有限公司 生物技术中心, 天津 300301
2. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 天津 300301
3. 北京协和医学院&中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192
4. 天津和创生物技术有限公司, 天津 300301
5. 天津药物研究院有限公司 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300301
6. 天津中医药大学研究生院, 天津 301617

摘要: **目的** 从药物转运体角度探讨小白菊内酯衍生物 ACT001 的跨膜转运机制, 并阐明 ACT001 可能产生的耐药性机制。**方法** 采用人药物转运体高表达单克隆细胞株/囊泡、人结肠腺癌细胞(Caco-2、LS-180), 使用 qRT-PCR、Western blotting、LC-MS/MS 放射性同位素示踪等技术手段, 共同研究 ACT001 的跨膜转运机制和耐药性。**结果** 小白菊内酯衍生物 ACT001 能够抑制外排转运体 BCRP 的转运活性, 其半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)为 48.6 μmol/L。ACT001 在 Caco-2 细胞单层上的外排率为 2.95, 添加乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)抑制剂 Ko143 可使外排率降至 0.807; 添加 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)抑制剂盐酸维拉帕米对 ACT001 的外排率没有影响。在 LS-180 细胞中添加 10 μmol/L 的 ACT001 诱导 72 h, 可使 P-gp 和 BCRP 的 mRNA 表达水平分别提高 8.89、8.21 倍, 蛋白相对表达量分别提高 3.76、2.92 倍, 表明 ACT001 能诱导 BCRP 和 P-gp 的表达。**结论** 小白菊内酯衍生物 ACT001 是外排转运体 BCRP 的底物, BCRP 在血脑屏障和肿瘤细胞中高表达, ACT001 到达血脑屏障时, 会被 BCRP 识别外排, 导致跨血脑屏障能力下降, 不能在靶点位置达到有效的血药浓度从而药效降低。ACT001 是 BCRP 和 P-gp 的诱导剂, 能上调 LS-180 细胞中 2 种转运体的 mRNA 和蛋白表达水平; BCRP 和 P-gp 在血脑屏障和肿瘤组织高表达, 对 2 种蛋白的诱导作用会进一步导致药效下降并产生耐药性, 使治疗失败。另外, BCRP 和 P-gp 在体内分布广泛, 当 ACT001 与 2 种蛋白的抑制剂或底物联用时, 由于竞争和诱导作用, 会对其他药物的转运产生影响, 发生药物-药物相互作用。

关键词: 小白菊内酯衍生物 ACT001; 药物转运体; 抑制作用; 诱导作用; 耐药性; 药物-药物相互作用

中图分类号: R285.62 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)12-3711-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.017

Transmembrane transport mechanism and drug resistance of parthenolide derivative ACT001 based on drug transporters

SUN Ying-hui^{1,2}, SHANG Hai-hua³, CI Xiao-yan^{2,4,5}, WU Wei-dang^{1,2,5}, WANG Ze⁶, CUI Tao^{1,2,5}, ZENG Yong^{2,5}, YAN Feng-ying^{1,2,4,5}, YI Xiu-lin^{1,2,4,5}

1. Biotechnology Center, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China
2. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300301, China
3. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China
4. Tianjin Hechuang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300301, China
5. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin

收稿日期: 2022-02-17

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); 天津市“项目+团队”重点培养专项(创新类)(XC202030)

作者简介: 孙英辉(1993—), 实习研究员, 主要从事药理学及基因编辑技术研究。Tel: 18222901679 E-mail: sunyinghui@tipr.com.cn

*通信作者: 慈小燕(1987—), 副研究员, 主要从事药理学及细胞质控研究。E-mail: cixy@tipr.com.cn

伊秀林(1964—), 研究员, 主要从事药理学研究。E-mail: yixl@tipr.com.cn

300301, China

6. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To explore the transmembrane transport mechanism of parthenolide derivative ACT001 from perspective of drug transporters and clarify the possible drug resistance mechanism of it. **Methods** *In vitro* human transporter-transfected cell models/vesicles and Caco-2, LS-180 cells, combined with qRT-PCR, Western blotting, LC-MS/MS and radioisotope tracing techniques were used to study the transmembrane transport mechanism and drug resistance of ACT001. **Results** Parthenolide derivative ACT001 could inhibit the transport activity of efflux transporter breast cancer resistance protein (BCRP) with half inhibitory concentration (IC_{50}) of 48.6 $\mu\text{mol/L}$. The efflux rate of ACT001 on monolayer of Caco-2 cells was 2.95, and was reduced to 0.807 by addition of BCRP inhibitor Ko143. P-glycoprotein (P-gp) inhibitor verapamil hydrochloride had no effect on efflux rate. In LS-180 cells, 10 $\mu\text{mol/L}$ ACT001 increased mRNA expression levels of P-gp and BCRP by 8.89-fold and 8.21-fold after induction for 72 h, respectively. Under the same conditions, protein amount of two transporters was increased by 3.76-fold and 2.92-fold, respectively, indicating ACT001 could induce the expressions of BCRP and P-gp. **Conclusion** Parthenolide derivative ACT001 is a substrate of BCRP. BCRP is highly expressed in blood-brain barrier and tumor cells. When ACT001 reaches the blood-brain barrier, it will be recognized by BCRP for efflux, resulting in a decrease in ability to cross the blood-brain barrier. The effective blood drug concentration cannot be reached at the target site and drug effect is reduced. ACT001 is an inducer of BCRP and P-gp, which can up-regulate mRNA and protein expression levels of two transporters in LS-180 cells; BCRP and P-gp are highly expressed in blood brain barrier and tumor tissues, and induction of two proteins will further lead to the decline of drug efficacy and development of drug resistance, making the treatment fail. In addition, BCRP and P-gp are widely distributed. When ACT001 is used in combination with inhibitors or substrates of the two proteins, it will affect the transport of other drugs and cause drug-drug interactions due to competition and induction.

Key words: parthenolide derivative ACT001; drug transporter; inhibition; induction; drug resistance; drug-drug interaction

银胶菊属银胶菊 *Parthenium hysterophorus* L. 是一年生草本，具主根，径直立，叶变化多样，头状花序小，放射状。民间多用银胶菊治疗偏头痛、风湿病等。银胶菊的乙醇提取物经萃取分离得到小白菊内酯。小白菊内酯（图 1-A）是一种倍半萜烯内酯类（sesquiterpene lactones, SLs）化合物^[1]。研究表明，小白菊内酯具有明显的抗肿瘤作用，对恶性胶质瘤、急性髓细胞白血病、前列腺癌等多种癌症具有治疗作用^[2-4]。然而，小白菊内酯水溶性较差，限制了其临床研究和应用。小白菊内酯衍生物 ACT001（图 1-B）为 11 β H,13-二甲基氨基含笑内酯的富马酸盐，母核为愈创木烷型倍半萜烯内酯。ACT001 是一个抗肿瘤高活性化合物，现作为抗脑胶质瘤 I 类新药正在进行临床研究阶段^[5-7]。脑胶质

瘤是胶质瘤的最恶性变体，约占所有固有脑瘤的一半。当前的治疗方案为切除、放射治疗合并化学治疗^[8-11]。但是，胶质瘤是浸润式生长的，手术很难完全切除，迫切需要一种安全有效的药物来治疗脑胶质瘤。因此，ACT001 作为抗脑胶质瘤 I 类新药具有明显的临床价值和广阔的应用前景。

药物转运体是一类存在于细胞膜上对药物跨膜转运起重要作用的膜蛋白，可分为摄入型转运体和外排型转运体。摄入型转运体主要包括有机阳离子转运体（organic cation transporters, OCTs）、有机阴离子转运体（organic anion transporters, OATs）、有机阴离子转运多肽（organic anion transport peptides, OATPs）等；外排型转运体以 P 糖蛋白（P-glycoprotein, P-gp, 又名 MDR1）和乳腺癌耐药蛋白（breast cancer

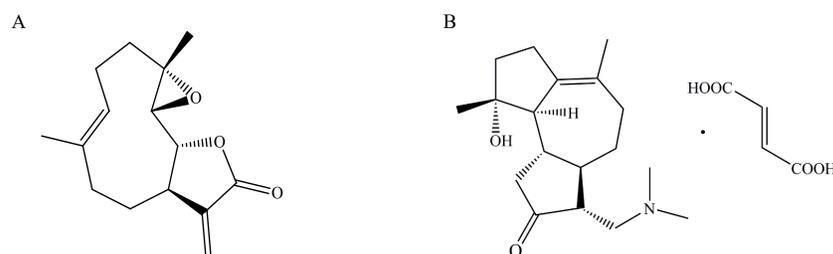


图 1 小白菊内酯 (A) 和 ACT001 (B) 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of parthenolide (A) and ACT001 (B)

resistance protein, BCRP) 为代表^[12-13]。外排转运体在血脑屏障、肠上皮细胞壁膜、肝和肾小管细胞中高表达,可调节药物的吸收、分布和排泄等药动学过程^[14-15],且与抗肿瘤药物的耐药性密切相关。

小白菊内酯衍生物 ACT001 作为抗脑胶质瘤 I 类新药,目前尚未报道其与药物转运体作用的关系。本研究应用人药物转运体基因转染细胞/囊泡、人结肠腺癌细胞 (Caco-2、LS-180),较为全面地研究了 ACT001 对药物转运体的抑制作用、底物亲和性和诱导作用,从药物转运体角度阐明了 ACT001 的跨膜转运及可能发生的药物-药物相互作用和耐药性。

1 材料

1.1 药品与试剂

ACT001 (批号 20120704,质量分数>99%) 购自尚德药缘科技有限公司; ¹⁴C-氨基马尿酸 (批号 1558673)、³H-硫酸雌酮 (批号 140331)、³H-地高辛 (批号 160624)、¹⁴C-溴化四乙胺 (批号 130311)、³H-牛磺胆酸 (批号 140403) 购自美国 ARC 公司; UTIMA Gold 闪烁液 (批号 77-15481) 购自美国 PerkinElmer 公司; 奎尼丁 (批号 10138583,质量分数≥98%) 购自美国 Sigma 公司; 丙磺舒 (批号 15327,质量分数>99%)、利福平 (批号 11246,质量分数>98%)、维拉帕米 (批号 18578,质量分数>99%)、BCRP 抑制剂 Ko143 (质量分数>99%) 购自美国 MCE 公司; 异甘草素 (质量分数>98%) 购自国家药品和生物制品控制研究所; DMEM 培养基 (批号 8117283)、胎牛血清 (批号 1912660C)、0.25% 胰酶-EDTA (批号 1919590) 购自美国 Gibco 公司; 100×青链霉素混合液 (批号 20180624)、PBS 缓冲液 (批号 P1010)、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 520C032)、DEPC 水购自北京索莱宝科技有限公司; Transwell®12 孔聚碳酸酯膜转运板 (批号 20917020) 购自美国 Corning 公司; P-gp 抗体、BCRP 抗体购自 ABclonal Technology 公司; β-actin 抗体购自英国 Abcam 公司; 山羊抗兔 IgG 抗体购自 Abkkin 公司; TRNzol Reagent 购自北京天根生化科技有限公司; 逆转录试剂盒、实时定量试剂盒购自 Roche 公司; MTS 细胞增殖检测试剂盒购自天津厚普生物技术开发有限公司。

1.2 仪器

CKX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); BS124S 型分析天平 (德国 Sartorius 公司); CO₂ 培

养箱、台式高速冷冻离心机、Varioskan Flash 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Tri-Carb 2910 TR 型放射性液体闪烁仪 (美国 PerkinElmer 公司); FLE712AA 型多孔滤器 (日本 Advantec 公司); Millcell ERS-2 型跨上皮电阻仪 (美国 Millipore 公司); ZHWY 型上海智诚恒温振荡器 (北京华威兴业科技有限公司); LCMS-8060 型三重四极杆液质联用仪 (日本岛津公司); Life ECO PCR 基因扩增仪 (杭州博日科技有限公司); Mastercycler ep Realplex² qRT-PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司)。

1.3 细胞株

药物转运体过表达单克隆细胞株 MDCK-OAT1、S2-OAT3、HEK293-OATP1B1、HEK293-OATP1B3、S2-OCT1、S2-OCT2、MDCK-MDR1 及空白载体转染细胞 (MDCK-Mock、S2-Mock、HEK293-Mock) 均由日本富士生物医药研究所赠予; BCRP/胆盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP) / mock 基因表达 inside-out vesicles 购自日本 GenoMembrane 公司; Caco-2 细胞及 LS-180 细胞购自国家实验细胞资源共享平台。

2 方法

2.1 细胞培养

所有细胞系均于培养皿内,用含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 DMEM 培养基,于 37 °C (S₂ 细胞在 33 °C)、5% CO₂ 和相对湿度 90%的培养箱内培养,当细胞融合度为 80%~90%时,用胰酶消化成细胞悬液。本实验所用的 Caco-2 细胞为 35~38 代,LS-180 细胞为 26~30 代,MDCK-MDR1 细胞为 25~28 代、MDCK-BCRP 细胞为 26~29 代,转运体细胞为 26~35 代。

2.2 MTS 测试

将 MDCK 细胞 (2.5×10⁴/mL)、HEK293 细胞 (8×10⁴/mL)、S2 细胞 (8×10⁴/mL)、Caco-2 细胞 (5×10⁴/mL)、LS-180 细胞 (5×10⁴/mL) 分别接种于 96 孔板中培养 24 h 后,加入新鲜培养基配制系列浓度为 1~100 μmol/L 的 ACT001 的含药培养基孵育 48 h。随后加入 MTS 溶液孵育,每隔一定时间取出,采用多功能酶标仪测定每孔在 492 nm 处的吸光度 (A) 值。每个浓度设置 6 个复孔。半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 使用 GraphPad Prism 软件计算。

2.3 ACT001 对转运体的抑制作用

2.3.1 摄入转运体 将细胞悬液用培养基稀释至

1.5×10⁵/mL 接种至 24 孔板 (OATP1B1、OATP1B3 基因表达细胞接种于 D-聚赖氨酸包被的 24 孔板) 培养至各孔细胞长满。将 24 孔板置于 37 °C 水浴中移去培养液, 添加 37 °C 缓冲液孵育 10 min 后移去缓冲液, 添加含放射性标记的探针底物和各浓度 ACT001 (0.3~100 μmol/L) 的混合溶液, 在设定

间移去探针底物溶液, 加入 1 mL 冰浴缓冲液终止反应。各转运体的放标底物及浓度、阳性抑制剂及浓度和给药时间见表 1, 每个浓度设置 3 个复孔。每孔添加 0.1 mmol/L NaOH 裂解细胞, 将细胞裂解液转移至 EP 管中, 加入闪烁液, 用闪烁仪测定样品中的放射性强度。

表 1 各转运体给药实验条件

Table 1 Test conditions for each transporter administration

转运体	放标底物 (浓度)	阳性抑制剂 (浓度)	给药时间/min
OAT1	¹⁴ C-氨基马尿酸 (5 μmol·L ⁻¹)	丙磺舒 (30 μmol·L ⁻¹)	2
OAT3	³ H-硫酸雌酮 (50 nmol·L ⁻¹)	丙磺舒 (30 μmol·L ⁻¹)	2
OATP1B1	³ H-硫酸雌酮 (50 nmol·L ⁻¹)	利福平 (30 μmol·L ⁻¹)	2
OATP1B3	³ H-硫酸雌酮 (50 nmol·L ⁻¹)	利福平 (30 μmol·L ⁻¹)	2
OCT1	¹⁴ C-溴化四乙胺 (5 μmol·L ⁻¹)	西米替丁 (30 μmol·L ⁻¹)	15
OCT2	¹⁴ C-溴化四乙胺 (5 μmol·L ⁻¹)	奎尼丁 (300 μmol·L ⁻¹)	5
P-gp	³ H-地高辛 (70 nmol·L ⁻¹)	维拉帕米 (200 μmol·L ⁻¹)	15
BCRP	³ H-硫酸雌酮 (1 μmol·L ⁻¹)	硫酸雌酮 (200 μmol·L ⁻¹)	5
BSEP	³ H-牛磺胆酸 (100 μmol·L ⁻¹)	利福平 (300 μmol·L ⁻¹)	5

2.3.2 外排转运体 P-gp 取 MDCK-MDR1 细胞悬液调整密度至 1×10⁵/mL, 接种于 Transwell 12 孔板中, 在细胞层顶端 (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。培养 6 d, 得到完全分化的细胞单层。弃去 Transwell 小室两端的培养基, 在两侧均按比例加入 37 °C 预热的 HBSS 溶液, 置于 37 °C 细胞培养箱中平衡 20 min; 弃去 HBSS, 在 BL 加入 1.5 mL 预热的添加含 ³H-地高辛和各浓度 ACT001 (0.3~100 μmol/L) 的 HBSS 溶液, 在 AP 加入预热的 0.5 mL 空白 HBSS 溶液; 置于 37 °C 振荡器孵育 15 min; 取 100 μL 细胞 AP 的转运液加入闪烁液, 充分混匀后测定转运液中的 ³H-地高辛浓度。

2.3.3 外排转运体 BCRP、BSEP ACT001 对 2 种转运体的抑制作用通过囊泡实验测定。分别配制 2 种转运体所用缓冲液和反应体系后, 将 inside-out vesicle 放置于 37 °C 水浴孵育 5 min, 加入混合液反应 5 min 后加终止液终止反应。将反应液和终止液混合置于滤膜上滤掉液体并用冰缓冲液清洗后取下滤膜, 转移至 EP 管中, 加入闪烁液, 用闪烁仪测定样品中的放射性强度。放射性标记底物、阳性抑制剂、给药时间见表 1。

计算抑制率, 以抑制率代表抑制作用强度。使用 Prism 5.0 软件计算 ACT001 抑制各转运体转运活性的 IC₅₀。各数值间的差异性分析采用 *t* 检验。

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

U_c 表示对照组的 DPM (每分钟衰变数) 值, *U₀* 表示 Mock 细胞的 DPM 值, *U* 表示各给药组的 DPM 值

2.4 LC-MS/MS 检测

2.4.1 色谱条件 Acquity UPLC® BEH C₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为甲醇-乙腈 (1:1), 流动相 B 为 5 mmol/L 甲酸胺-10% 甲醇水溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 90% B; 3~4 min, 90%~10% B; 4~5 min, 10%~90% B; 1.5~2.8 min 切入质谱仪。体积流量为 0.3 mL/min; 进样量 2 μL; 柱温 40 °C; 内标 (IS) 为吡达帕胺。

2.4.2 质谱条件 ESI 离子源, 正离子模式; 雾化气体体积流量为 3 L/min; 加热气体体积流量为 10 L/min; 接口温度为 300 °C; 去溶剂气温度为 250 °C; 热块温度为 400 °C; 干燥气体体积流量为 10 L/min; 扫描方式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)。

2.4.3 样品处理 配制梯度标曲及质控样品, 线性范围为 0.5~25 μmol/L (用 50% 甲醇溶液配制)。取 50 μL 50% Hanks 液, 分别加入 50 μL 甲醇和 50 μL 内标溶液 (含 1 μg/mL 吡达帕胺的甲醇溶液), 再加入 50 μL 标液/样品, 涡旋 1 min; 取出 50 μL 溶液, 分别加入 450 μL 50% 甲醇稀释, 涡旋混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min; 再取 100 μL 溶液于内插管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 进样 2 μL, 进行 LC-MS/MS 定量分析。

2.4.4 方法学验证 ACT001 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,ACT001的线性范围为0.5~25.0 μmol/L,ACT001保留时间为2.13 min。配制低、中、高浓度(0.5、10、50 μmol/L)的ACT001溶液,分别测定化合物的稳定性、方法的准确度和精密度。结果显示,ACT001稳定性的RSD<15%,精密度的RSD为4.9%,准确度的RSD为5.7%。

2.5 底物研究

取Caco-2细胞悬液调整密度至 2×10^5 /mL接种于Transwell 12孔板中。连续培养21 d,得到完全分化的细胞单层。弃去Transwell旧培养基,加入37℃预热的HBSS溶液平衡20 min;取出板子后,在细胞AP加入0.5 mL预热的含有ACT001的HBSS溶液,BL加入1.5 mL预热的HBSS,以此检测细胞AP到BL的转运;在细胞AP加入0.5 mL预热的HBSS,BL加入1.5 mL预热的含有ACT001的HBSS溶液检测BL到AP的转运。37℃恒温振荡器孵育15 min后吸取转运液,测定其中ACT001浓度。在检测外排转运蛋白BCRP抑制剂Ko143(5 μmol/L)对ACT001在MDCK-BCRP/Caco-2细胞单层上转运的影响和P-gp抑制剂维拉帕米(30 μmol/L)对ACT001在MDCK-MDR1/Caco-2细胞单层上转运的影响时,用同时含有抑制剂和药物的给药液代替只含药物的给药液即可。ACT001的给药浓度为3、30 μmol/L。每个浓度重复3次。用LC-MS/MS测定ACT001在转运液中的浓度。

以表观渗透系数(apparent permeation coefficient, P_{app})的大小反映药物透过单层细胞的能力以及药物吸收的速度。

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

V 表示接收室的溶液体积(AP端为0.5 cm³、BL端为1.5 cm³), A 表示膜的面积(1.13 cm²), 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

以外排率(efflux ratio, R_E)代表药物外排能力的大小,通过 R_E 可以预测药物在肠吸收是否存在药物转运蛋白介导的外排或摄入。

$$R_E = P_{app}(B-A)/P_{app}(A-B)$$

A-B代表AP→BL,B-A代表BL→AP,当所测药物的 $R_E \geq 2$ 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 $R_E \leq 0.5$ 时,表示该药物可能为肠道摄入转运蛋白的底物

2.6 诱导研究

LS-180细胞以 1.5×10^5 /mL接种于24孔板中,于37℃、5% CO₂的培养箱中培养24 h,每孔加入1 mL含诱导剂和待测药的培养基。其中分为空白组:含0.1% DMSO的培养基;阳性药组:分别为含10 μmol/L利福平、1 μmol/L异甘草素的培养基;给药组:含3、10、20 μmol/L ACT001的培养基;每组设置3个复孔。每24小时更换1次相同的培养基,设置不同诱导时间组,细胞与诱导剂作用时间分别为48、72、96 h。诱导完成后用TRNzol总RNA提取试剂处理细胞,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 μmol/L) 0.75 μL、下游引物(10 μmol/L) 0.75 μL、水9 μL、cDNA模板2 μL,总体积25 μL。反应条件为95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火1 min,40个循环,60~95℃熔解曲线分析。引物序列见表2。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,测定样品中P-gp、BCRP目的基因和β-actin内参基因的 C_t 值,计算给药组细胞基因与空白组细胞基因相比较的表达倍数。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	序列(5'-3')
<i>β-actin</i>	F: GGCATCCTCACCTGAAGTA R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA
<i>P-gp</i>	F: CCCATCATTGCAATAGCAGG R: TGTTCAAACCTTCTGCTCCTGA
<i>BCRP</i>	F: AGATGGGTTTCCAAGCGTTCAT R: CCAGTCCCAGTACGACTGTGACA

另取诱导完成后的样品用RIPA试剂处理提取总蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白后进行Western blotting检测。使用Gel-Pro Analyzer 4软件对结果进行灰度分析;使用GraphPad Prism 5软件对结果进行绘制柱形图。

3 结果

3.1 MTS检测

MTS实验考察化合物对细胞的毒性作用,LS-180细胞实验结果显示,ACT001对LS-180细胞的IC₅₀大于40 μmol/L;以相同的方法处理实验使用的其他细胞,结果表明ACT001对Caco-2、S₂、MDCK和HEK293细胞的IC₅₀均大于100 μmol/L,说明本研究所使用的浓度在细胞安全合理范围内,对细胞没有毒性。

3.2 ACT001 对转运体的抑制作用研究

转运活性抑制实验中 ACT001 的给药浓度为 0.3~100 μmol/L, 结果见图 2, ACT001 对 OAT1 介导的 ¹⁴C-氨基马尿酸、OAT3 介导的 ³H-硫酸雌酮、OCT1 介导的 ¹⁴C-溴化四乙胺、OCT2 介导的 ¹⁴C-溴化四乙胺、OATP1B1 介导的 ³H-硫酸雌酮、P-gp 介导的 ³H-地高辛、BSEP 介导的 ³H-牛磺胆酸的转运活性无影响或影响较弱, IC₅₀ 均大于 100 μmol/L;

对 BCRP 介导的 ³H-硫酸雌酮转运活性有明显抑制作用, 即对 BCRP 的转运活性有显著影响, IC₅₀ 为 48.6 μmol/L。

3.3 底物研究

预试实验结果表明, 30 μmol/L ACT001 给药 15 min 时 P_{app} 值最佳。如表 3 所示, ACT001 在 30 μmol/L 浓度下, 摄入方向的 P_{app} 值为 2~4, 有外排现象, 添加 BCRP 抑制剂 Ko143 后外排被明显抑制。

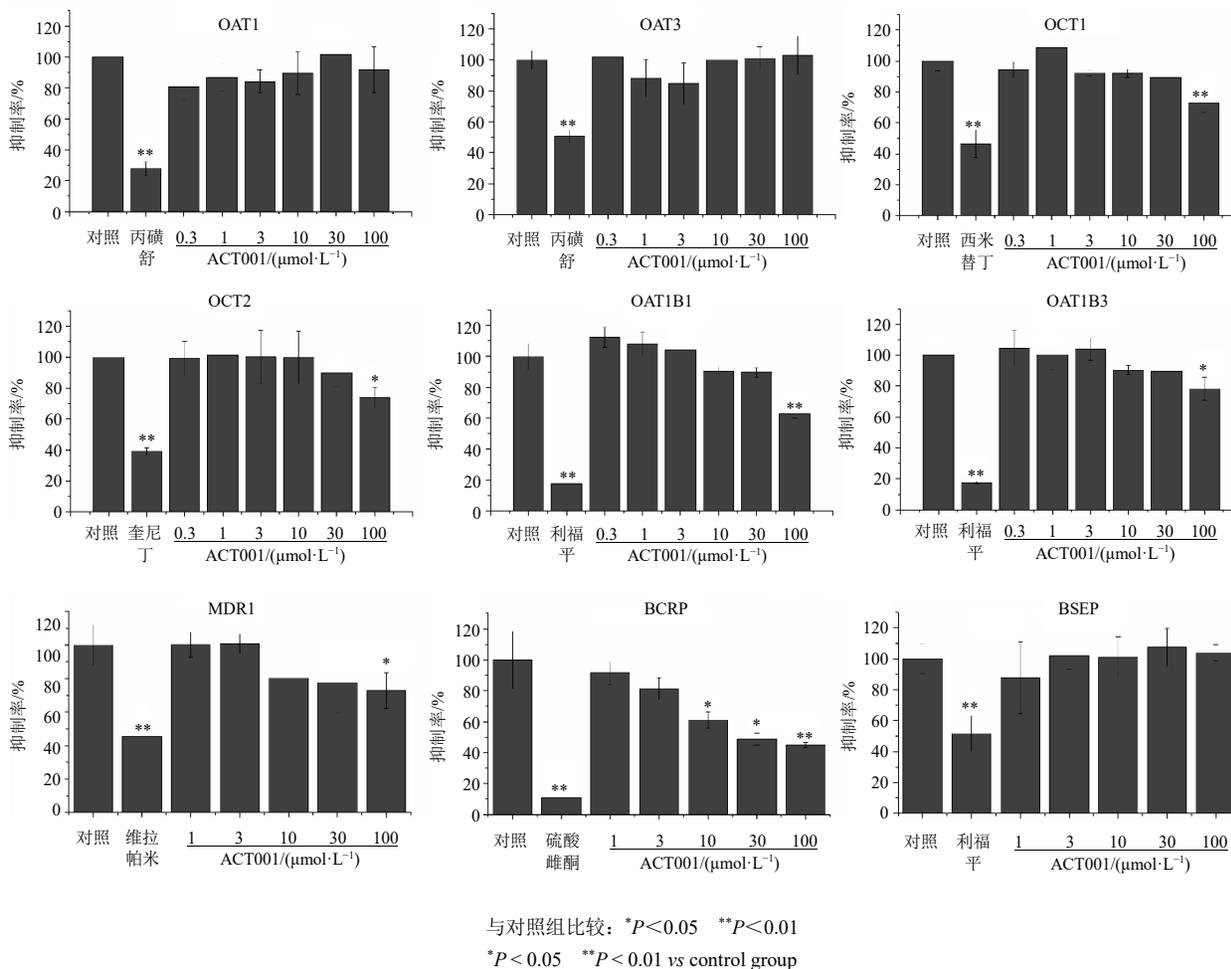


图 2 ACT001 对临床关键转运体的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Inhibitory effect of ACT001 on clinical key transporters ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 ACT001 在 Caco-2、MDCK-BCRP 和 MDCK-MDR1 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 ACT001 bi-directional transport in Caco-2, MDCK-BCRP and MDCK-MDR1 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

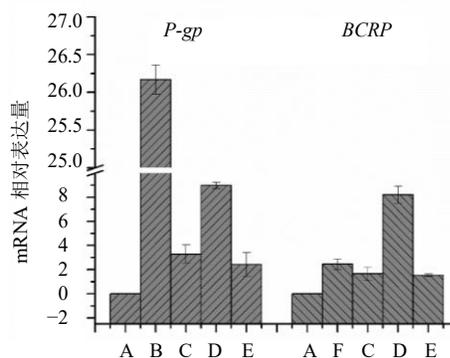
细胞	组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	P _{app} /(×10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹)		R _E
			AP→BL	BL→AP	
Caco-2	ACT001	30	1.08±0.33	3.18±0.64	2.95
	ACT001+Ko143	30	1.17±0.64	0.94±0.07	0.80
	ACT001+维拉帕米	30	1.10±0.07	2.67±0.02	2.43
MDCK-BCRP	ACT001	30	4.40±3.28	30.13±10.40	6.84
	ACT001+Ko143	30	24.72±6.12	43.90±18.72	1.78
MDCK-MDR1	ACT001	30	30.42±7.09	22.57±3.01	0.74
	ACT001+维拉帕米	30	39.40±6.73	40.14±5.38	1.02

以上数据说明 ACT001 在 Caco-2 细胞中跨膜能力中等,存在外排转运体 BCRP 参与的主动转运,在较高浓度时外排更强,且加入 BCRP 抑制剂后 ACT001 的跨膜能力达到良好。在 MDCK-BCRP 细胞中,ACT001 在 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下给药,摄入方向的 P_{app} 值随着给药浓度的增大而降低,在 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,外排现象明显,添加 BCRP 抑制剂 Ko143 后外排被明显抑制;在 MDCK-MDR1 细胞中,ACT001 没有表现出外排现象,添加 P-gp 抑制剂也不产生影响。说明 ACT001 为外排转运体 BCRP 的底物。

3.4 诱导研究

如图 3 所示,ACT001 孵育 72 h 可不同程度地上调 LS-180 细胞外排转运体 P-gp、BCRP 的 mRNA 表达水平,诱导 96 h 及以上会造成 LS-180 细胞的脱落,因此本研究只讨论诱导 72 h 时的结果。

利福平作为常用的 P-gp 诱导剂,对 P-gp 的诱导作用显著,诱导倍数达到 26.2 倍。10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ACT001 孵育 72 h 可分别上调 P-gp 和 BCRP 的 mRNA 表达水平 8.98、8.21 倍,而 3、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 ACT001 孵育 72 h 可使 P-gp mRNA 表达水平上调 3.28、1.66 倍;相同条件下,使 BCRP mRNA 表达



A-对照 B-利福平 C-ACT001 (3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) D-ACT001 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) E-ACT001 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) F-异甘草素, 下图同
A-control B-rifampicin C-ACT001 (3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) D-ACT001 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) E-ACT001 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) F-isiquiritin, same as below figures

图 3 ACT001 对 LS-180 细胞 P-gp 和 BCRP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of ACT001 on P-gp and BCRP mRNA expressions in LS-180 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水平上调 2.43、1.54 倍。蛋白诱导结果见图 4, 3、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 ACT001 使 P-gp 蛋白表达水平分别上调 3.06、3.76、1.44 倍;相同条件下,使 BCRP 蛋白表达水平分别上调 3.95、2.92、0.26 倍。

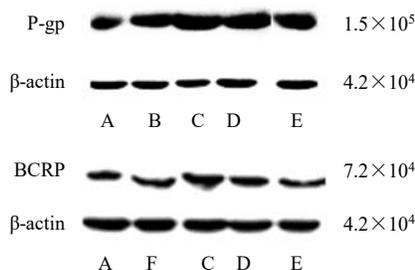


图 4 ACT001 对 LS-180 细胞 P-gp 和 BCRP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of ACT001 on P-gp and BCRP protein expressions in LS-180 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

Caco-2 细胞系来源于人结肠腺癌细胞,同源性好,在体外培养条件可自发进行肠道上皮样分化形成微绒毛结构,生成细胞间紧密连接蛋白,且表达各种蛋白载体和酶,与小肠上皮细胞结构类似^[16]。应用 Caco-2 细胞模型得到的数据与体内数据基本一致,条件可控,重复性好,且相比于动物模型,实验成本低,国内外广泛应用于药物跨膜转运能力和跨膜转运机制进行评价。与 Caco-2 细胞模型相比,LS-180 细胞模型中参与外排转运体表达调控过

程的人孕烷受体 (pregnane X receptor, PXR) 和类固醇外源异物受体 (steroid and xenobiotic receptor, SXR) 表达水平较高^[17-18],因此诱导效果更为显著,是转运体体外细胞诱导试验中的常见模型^[19]。

脑胶质瘤具有很高的发病率和死亡率。ACT001 是针对胶质瘤的 I 类新药,具有明显的临床价值。先前文献报道大鼠组织分布研究中在脑组织检测到 ACT001 的存在,但本研究首次证明 ACT001 是 BCRP 的底物,BCRP 在血脑屏障和肿瘤细胞中高表达^[20-21],ACT001 虽跨膜能力良好,但因是 BCRP

的底物,可被外排导致其生物利用度受到影响。

前期研究基于ACT001的结构特征和PBPK/PD模拟结果显示ACT001具有较高的血脑屏障渗透性,并未报道ACT001与药物转运体的具体作用关系。本研究首次从转运体角度证明ACT001是BCRP的底物以及BCRP和P-gp的诱导剂。BCRP和P-gp在血脑屏障中高表达,因此,ACT001在实际应用中可能会因BCRP和P-gp的外排作用而使药效受到一定影响。

ACT001的临床前药动学研究表明,大鼠(雄鼠)单次 po ACT001(20、100、500 mg/kg)体内血药浓度分别可以达到约5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ ^[22],因此本研究选择3、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 3个浓度作为底物研究和诱导作用研究的给药浓度,不会对细胞生长增殖造成影响;该研究结果对ACT001的实际临床应用具有参考价值。

本研究表明,ACT001对P-gp和BCRP蛋白具有诱导表达的作用,P-gp、BCRP二者与代谢酶具有较高的底物重叠率,对P-gp和BCRP表达水平产生诱导时,由于竞争和诱导作用,极有可能会出 现转运体和代谢酶^[23-24]介导的药物-药物相互作用^[25-27],这为正确理解ACT001可能存在的药物相互作用提供了新的思路。另外,肿瘤细胞中P-gp和BCRP过表达会使肿瘤细胞产生耐药性,导致治疗效果不理想。提示ACT001在临床上应与BCRP抑制剂联合使用,这可能会增加ACT001在脑组织和肿瘤细胞内的暴露量,从而提高疗效。本研究为ACT001与药物转运蛋白之间的关联提供了新的见解,并为其临床试验和应用提供了合理、有效的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li C J, Guo S F, Shi T M. Culture supernatants of breast cancer cell line MDA-MB-231 treated with parthenolide inhibit the proliferation, migration, and lumen formation capacity of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin Med J*, 2012, 125(12): 2195-2199.
- [2] Wang W J, Meng Z L, Mo Y C, et al. Unloading the infarcted heart affect MMPs-TIMPs axis in a rat cardiac heterotopic transplantation model [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1): 277-283.
- [3] Holcomb B K, Yip-Schneider M T, Waters J A, et al. Dimethylamino parthenolide enhances the inhibitory effects of gemcitabine in human pancreatic cancer cells [J]. *J Gastrointest Surg*, 2012, 16(7): 1333-1340.
- [4] Czyz M, Lesiak-Mieczkowska K, Koprowska K, et al. Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(5): 1144-1157.
- [5] Ge W Z, Hao X, Han F Z, et al. Synthesis and structure-activity relationship studies of parthenolide derivatives as potential anti-triple negative breast cancer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 166: 445-469.
- [6] Zhang Q, Lu Y X, Ding Y H, et al. Guaianolide sesquiterpene lactones, a source to discover agents that selectively inhibit acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(20): 8757-8769.
- [7] Australian New Zealand Clinical Trials Registry. Trial registered on ANZCTR [EB/OL]. [2018-04-05]. <https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?ACTRN=12616000228482p&from=singlemes sage&isappinstalled=0>.
- [8] Zhao S G, Yu M G, Spratt D E, et al. Xenograft-based, platform-independent gene signatures to predict response to alkylating chemotherapy, radiation, and combination therapy for glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2019, 21(9): 1141-1149.
- [9] Weller M, van den Bent M, Hopkins K, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(9): e395-e403.
- [10] Ferguson M, Rodrigues G, Cao J, et al. Management of high-grade gliomas in the elderly [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2014, 24(4): 279-288.
- [11] Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: The NOA-08 randomised, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(7): 707-715.
- [12] Ingoglia F, Visigalli R, Rotoli B M, et al. Functional characterization of the organic cation transporters (OCTs) in human airway pulmonary epithelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848(7): 1563-1572.
- [13] Zhang H B, Wu X, Xu J, et al. The comparative pharmacokinetic study of Yuanhu Zhitong Prescription based on five quality-markers [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 148-154.
- [14] Marquez B, van Bambeke F. ABC multidrug transporters: Target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(5): 600-620.
- [15] Haimeur A, Conseil G, Deeley R G, et al. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: Biology,

- substrate specificity and regulation [J]. *Curr Drug Metab*, 2004, 5(1): 21-53.
- [16] Ueda K. ABC proteins protect the human body and maintain optimal health [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(3): 401-409.
- [17] 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.
- [18] Perloff M D, von Moltke L L, Störmer E, *et al*. Saint John's wort: An *in vitro* analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(8): 1601-1608.
- [19] 慈小燕, 孙英辉, 武卫党, 等. 淫羊藿苷元的肠道跨膜转运机制研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(9): 2747-2755.
- [20] Liang X L, Tang T, Zhao G W, *et al*. Mechanism underlying bergapten-mediated regulation of vincristine transport in MDCK-MDR1 cells [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(3): 255-262.
- [21] Maliapaard M, Scheffer G L, Faneyte I F, *et al*. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3458-3464.
- [22] Xi X N, Liu N, Wang Q Q, *et al*. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of ACT001 in Sprague-Dawley rats and metabolism of ACT001 [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1104: 29-39.
- [23] Whyte-Allman S K, Hoque M T, Jenabian M A, *et al*. Xenobiotic nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate antiretroviral drug efflux transporters at the blood-testis barrier [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 363(3): 324-335.
- [24] Tan H S, Xu C S, Zeng H, *et al*. SUMOylation of pregnane X receptor suppresses rifampicin-induced CYP3A4 and P-gp expression and activity in LS174T cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2016, 130(2): 66-71.
- [25] Yasuda K, Ganguly S, Schuetz E G. Pheophorbide A: Fluorescent bcrp substrate to measure oral drug-drug interactions in real-time *in vivo* [J]. *Drug Metab Dispos*, 2018, 46(11): 1725-1733.
- [26] Lee C A, O'Connor M A, Ritchie T K, *et al*. Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: Practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(4): 490-509.
- [27] Hua W J, Hua W X, Fang H J. The role of OATP1B1 and BCRP in pharmacokinetics and DDI of novel statins [J]. *Cardiovasc Ther*, 2012, 30(5): e234-e241.

[责任编辑 李亚楠]