

## 黄柏不同炮制品中生物碱类成分在肾小管上皮细胞中的摄入差异考察

葛修通<sup>1</sup>, 赵佳慧<sup>1</sup>, 任文静<sup>1</sup>, 周悦<sup>1</sup>, 张凡<sup>1,2\*</sup>

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116000

2. 辽宁省中药炮制专业技术创新中心, 辽宁 大连 116000

**摘要:** **目的** 探讨人肾小管上皮 HK-2 细胞摄取黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex* 中生物碱类成分的情况, 以及 HK-2 细胞摄取黄柏中生物碱类成分的途径, 从细胞层面验证黄柏“盐炙入肾”理论。**方法** 利用 UPLC-QqQ-MS 技术分析 HK-2 细胞摄取生黄柏、盐黄柏和酒黄柏中的黄柏碱、木兰花碱、药根碱、小檗红碱和小檗碱 5 种成分差异, 黄柏及其炮制品中 5 种生物碱类成分随着给药时间的含量变化; 以及分析有机阴离子转运蛋白 (organic anion transporters, OATs) 抑制剂丙磺舒和有机阳离子转运蛋白 (organic cation transporters, OCTs) 抑制剂四乙基氯化铵对 HK-2 细胞摄取黄柏及其炮制品中 5 种生物碱类成分的影响。**结果** HK-2 细胞对黄柏不同炮制品摄取差异表现为盐黄柏组 > 生黄柏组 > 酒黄柏组。抑制剂组 HK-2 细胞摄取差异主要表现为丙磺舒 (OATs 抑制剂) 组 > 四乙基氯化铵 (OCTs 抑制剂) 组。**结论** 黄柏中生物碱成分可以被 HK-2 细胞摄取, 其转运机制主要是 OCTs 介导的结果。盐炙品生物碱摄取较高, 可能是盐炙提高了肾脏摄取型转运蛋白的活性。**关键词:** 黄柏; 盐炙; 肾小管上皮细胞; UPLC-QqQ-MS; 黄柏碱; 木兰花碱; 药根碱; 小檗红碱; 小檗碱; 有机阴离子转运蛋白; 有机阳离子转运蛋白

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)18-5993-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.017

## Difference of intake of alkaloids in renal tubular epithelial cells from different kinds of processed products of *Phellodendri Chinensis Cortex*

GE Xiu-tong<sup>1</sup>, ZHAO Jia-hui<sup>1</sup>, REN Wen-jing<sup>1</sup>, ZHOU Yue<sup>1</sup>, ZHANG Fan<sup>1,2</sup>

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116000, China

2. Liaoning TCM Processing Technology Innovation Center, Dalian 116000, China

**Abstract: Objective** To investigate the uptake of alkaloids from Huangbo (*Phellodendri Chinensis Cortex*) by human renal tubular epithelial HK-2 cells and the pathway of alkaloid uptake by HK-2 cells, so as to verify the theory of “entering into kidney through salt-water processing” from *Phellodendri Chinensis Cortex* at the cellular level. **Methods** UPLC-QqQ-MS technique was used to analyze the differences of phellodendrine, magnoflorine, jatrorrhizine, berberrubine and berberine uptake by HK-2 cells in raw *Phellodendri Chinensis Cortex*, salt-water processed of *Phellodendri Chinensis Cortex* and wine processed of *Phellodendri Chinensis Cortex*. The contents of five alkaloids in *Phellodendri Chinensis Cortex* and its processed products changed with the time of administration. The effects of organic anion transporters (organic anion transporters, OATs) inhibitor probenecid and organic cationic transporters (organic cation transporters, OCTs) inhibitor tetraethyl ammonium chloride on uptake of five alkaloids from *Phellodendri Chinensis Cortex* and its processed products by HK-2 cells were analyzed. **Results** The difference of HK-2 cell uptake of different processed products of *Phellodendri Chinensis Cortex* was as follows: salt-water processed group > raw group > wine processed group. The difference in uptake of HK-2 cells in the inhibitor group was mainly manifested as that of the probenecid (OATs inhibitor) group > tetraethyl ammonium chloride (OCTs inhibitor) group. **Conclusion** The alkaloids in *Phellodendri Chinensis Cortex* can be taken up by HK-2 cells, and their transport mechanism is mainly mediated by OCTs. The higher intake of alkaloids in salt-water processed group may be due to the increased activity of kidney uptake transporters.

收稿日期: 2023-03-30

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81903801); 辽宁省自然科学基金面上项目 (2022-MS-287); 沈阳市中青年科技创新人才项目 (RC210192)

作者简介: 葛修通, 男, 硕士研究生, 从事炮制所致药性变化研究。Tel: 13555958392 E-mail: gexiutong@126.com

\*通信作者: 张凡, 副教授, 硕士生导师, 从事炮制所致药性变化的科学内涵研究。Tel: 13804094590 E-mail: fantcm@163.com

**Key words:** *Phellodendri Chinensis Cortex*; salt-water processing; renal tubular epithelial cells; UPLC-QqQ-MS; phellodendrine; magnoflorine; jatrorrhizine; berberrubine; berberine; organic anion transporters; organic cationic transporters

黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex* 为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 味苦、性寒, 归肾、膀胱经, 具有清热燥湿、泻火解毒、消肿祛腐等功效<sup>[1]</sup>。《本草纲目》提出: “黄檗性寒而沉, 生用则降实火, 熟用则不伤胃, 酒炙则治上, 盐炙则治下, 蜜炙则治中。”对黄柏的炮制方法进行了总体的概括。黄柏目前的主流炮制品种为生黄柏、盐黄柏、酒黄柏, 在不同炮制方法下, 黄柏的化学成分、含量以及药理作用也会产生变化<sup>[2-4]</sup>。生黄柏多用于湿热泻痢、湿热黄疸、小便淋沥涩痛以及湿疹等症; 盐炙可引药下行入肾, 治阴虚火旺、潮热盗汗、咳嗽咯血以及耳鸣遗精等症; 酒炙又引药上行头目, 清上焦湿热, 用于头晕目眩、口舌生疮以及耳痛耳鸣等症<sup>[5]</sup>。

“盐炙入肾”这一理论为历代医家所认可, 经考证, 《本草蒙筌》第一次系统地概括了炮制的辅药作用论, 提出“入盐走肾脏, 仍仗软坚”; 《本草纲目》也曾记载: “故服补肾药用盐汤者, 咸归肾, 引药气入本脏也”。目前对于黄柏“盐炙入肾”的机制并未得到全面且深入的阐释, 仍缺乏现代系统研究。因此探寻黄柏不同炮制品在肾脏中的摄取差异, 以及肾脏摄入黄柏不同炮制品中生物碱类成分的可能途径具有重要意义。

药物转运体介导药物在体内的吸收和外排, 肾脏的药物转运体主要表达于肾小管近端的上皮细胞中, 其中吸收型药物转运体主要为有机阳离子转运蛋白 (organic cation transporters, OCTs) 和有机阴离子转运蛋白 (organic anion transporters, OATs), 同时肾小管上皮细胞也是参与药物跨膜转运的最主要细胞<sup>[6-8]</sup>。目前对于黄柏“盐炙入肾”的机制探究, 多采用体内药动学变化以及组织分布等方面来进行阐述。本研究运用体外细胞培养的方法, 通过 UPLC-QqQ-MS 技术对黄柏不同炮制品中生物碱成分在人近端肾小管上皮 HK-2 细胞的吸收率, 以及 OATs 抑制剂丙磺舒<sup>[9]</sup>和 OCTs 抑制剂四乙基氯化铵<sup>[10]</sup>对 HK-2 细胞摄取黄柏不同炮制品中生物碱的情况 2 方面来探究黄柏内生物碱类成分在肾中吸收转运机制。

## 1 材料

### 1.1 药材

黄柏购自四川雅安, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为芸香科植物黄皮树 *P. chinense* Schneid.

的干燥树皮。

### 1.2 细胞

HK-2 细胞购自大连美仑生物科技有限公司, 批号为 20210527A2。

### 1.3 药品与试剂

DMEM/f12 培养基 (批号 8122311)、PBS 缓冲液 (批号 20210927) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (批号 ST200913) 购自德国 PAN 公司; 青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合三抗液 (批号 20220519JH)、二甲基亚砜 (批号 710N0310) 购自北京索莱宝科技有限公司; 胰蛋白酶 (批号 MA0233-Jul-05G2)、CCK-8 试剂盒 (批号 MA0218-5-Sep-27H1)、小檗碱对照品 (批号 A1107AS)、黄柏碱对照品 (批号 M0107AS) 购自大连美仑生物科技有限公司; 木兰花碱对照品 (批号 wkq16050801) 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 盐酸小檗碱对照品 (批号 MUST-16040702)、盐酸药根碱对照品 (批号 MUST-16040702) 购自成都曼思特生物科技有限公司, 以上对照品质量分数均大于 98%; 丙磺舒 (批号 C14488578)、四乙基氯化铵 (批号 C13917729) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 质谱级甲醇、乙腈均购自美国 Sigma 公司。

### 1.4 仪器

Waters Acquity UPLC/Xevo TQD 超高效液相色谱串联飞行质谱仪 (美国 Waters 公司); ZHJH-C1112B 型超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司); MCO-15AC 型二氧化碳恒温培养箱 (日本三洋公司); NIB-100 型倒置显微镜 (宁波永新光学股份有限公司); Multiskan MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LX-800 型调速型迷你离心机 (上海生工生物工程股份有限公司); 手动移液器 (艾本德上海国际贸易有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 炮制品制备

**2.1.1 生黄柏制备** 取黄柏原药材, 除去杂质, 喷淋清水, 润透, 干燥。

**2.1.2 盐黄柏制备** 取净黄柏丝, 用盐水拌匀, 闷润 2 h, 待盐水被吸尽后, 置炒制容器内, 用文火加热至 160 °C 时炒至焦黄, 取出晾凉。每 100 克黄柏丝, 用食盐 2 g。

**2.1.3 酒黄柏制备** 取净黄柏丝,用黄酒拌匀,闷润2h,待黄酒被吸尽后,置炒制容器内,用文火加热至160℃时炒至焦黄,取出晾凉。每100克黄柏丝,用黄酒20mL。

**2.1.4 黄柏冻干粉制备** 取生黄柏、盐黄柏和酒黄柏,加入10倍量蒸馏水,浸泡30min,强火加热煮沸后调整至文火煎煮60min,搅拌,滤过;药渣再加入8倍量蒸馏水,按上法煎熬、滤过;合并2次药液并浓缩后放入-80℃冷藏过夜,置于冻干机真空冻干24h,制备成相应黄柏及炮制品的冻干粉。

## 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品溶液** 分别精密称取黄柏碱、木兰花碱、药根碱、小檗红碱、小檗碱对照品适量,置于50mL量瓶中,加甲醇溶解定容,制成质量浓度分别为0.0656、0.0800、0.0656、0.0652、0.0660mg/mL的混合对照品储备液。

**2.2.2 黄柏不同炮制品给药液** 分别精密称取生黄柏、盐黄柏、酒黄柏冻干粉适量,加入含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素-两性霉素B混合三抗液的DMEM/f12培养基,经0.22μm微孔滤膜滤过配制成3200、1600、800、400、200、100、50、25μg/mL的黄柏及不同炮制品给药液。

## 2.3 细胞培养

HK-2细胞用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素-两性霉素B混合三抗液的DMEM/f12培养基,培养于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中。每2~3天换1次完全培养基。显微镜下观察,待细胞融合度为80%~90%时用胰蛋白酶消化,将细胞悬液收集于15mL离心管中,1500r/min离心5min,弃去上清,加入完全培养基,混匀后按1:2比例进行传代。

## 2.4 黄柏给药液对HK-2细胞的最大安全浓度的测定

取对数生长期的第5代HK-2细胞,调整密度为5×10<sup>4</sup>/mL,吸取100μL细胞悬液接种于96孔板中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。在实验孔中加入100μL不同质量浓度的黄柏炮制品给药液处理细胞,对照组加入100μL不含药物的培养基,另设置未接种细胞的空白孔,每个质量浓度设置3个平行孔。于培养箱中培养24h后,再加入CCK-8溶液10μL,移至培养箱孵育4h取出,在酶标仪450nm处检测各孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率,以三者相对最大存活率浓度作为后期细胞给药浓度。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

## 2.5 HK-2细胞内黄柏不同炮制品中生物碱含量检测

实验分为空白对照组、生黄柏、盐黄柏和酒黄柏给药组,每组3个平行孔。将HK-2细胞接种至24孔板内,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育24h后,分别在生黄柏、盐黄柏和酒黄柏给药组加入对应的400μL黄柏不同炮制品给药液,空白对照组加入400μL完全培养基,分别作用1、4、6、9h后弃去上清液,PBS清洗3次,留取第3次洗液500μL待检<sup>[11]</sup>。加500μL纯水于24孔板,-80℃保存。细胞反复冻融破碎后,测定细胞中各成分的含量。

## 2.6 黄柏生物碱进入HK-2细胞途径考察

实验分为空白对照组、生黄柏、盐黄柏和酒黄柏给药组,丙磺舒、四乙基氯化铵生黄柏给药组,丙磺舒、四乙基氯化铵盐黄柏给药组和丙磺舒、四乙基氯化铵酒黄柏给药组,每组3个平行孔。抑制剂组分别用1mmol/L对应分组抑制剂处理30min<sup>[12-13]</sup>,其余操作与“2.5”项下相同。

## 2.7 HK-2细胞样品前处理

取“2.5”项以及“2.6”项下细胞,于-80℃反复冻融3次破坏细胞膜,在破碎的细胞液中加入1mL甲醇沉淀蛋白,吸出孔内液体,12000r/min离心20min,收集上清液并以氮气吹干。将吹干处理后的第3次洗液和细胞破碎液加入500μL甲醇复溶,涡旋2min混匀后,12000r/min离心10min,取上清液作为待测样品进行UPLC-QqQ-MS检测。

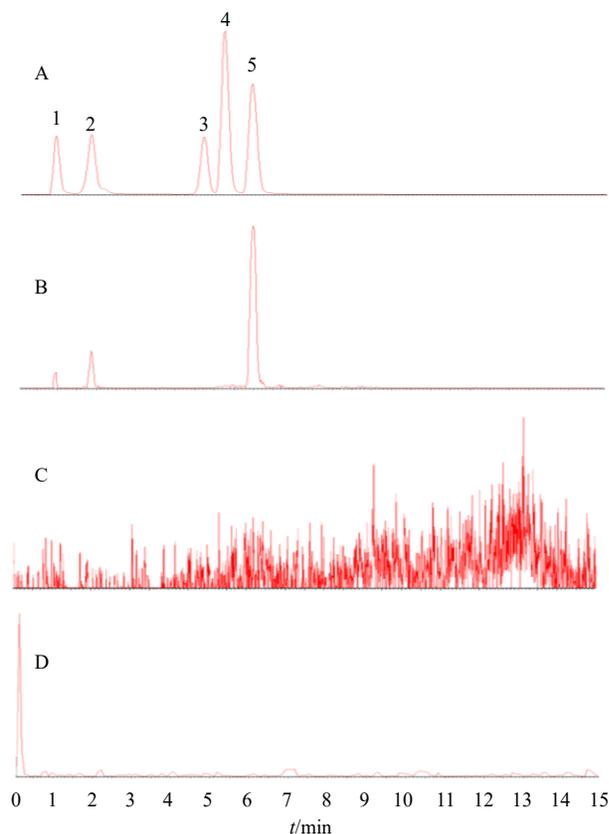
## 2.8 采用UPLC-QqQ-MS对生物碱的含量测定

**2.8.1 色谱条件** Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(100mm×2.1mm,1.7μm),流动相为0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~2.5min,15%~25%A;2.5~6.0min,25%~30%A;6.0~6.9min,30%~34%A;6.9~7.0min,34%A;7.0~8.0min,34%~100%A;8.0~10.0min,100%A。体积流量0.25mL/min;柱温35℃;进样量3μL。

**2.8.2 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI源),正离子扫描模式,离子扫描范围m/z 50~1000,毛细管电离电压2.0kV,源温度150℃,脱溶剂温度450℃,脱溶剂气体体积流量900L/h,锥孔气体体积流量50L/h,多反应监测模式(multiple reaction monitoring,MRM)。5种生物碱成分的质谱参数信息见表1,MRM模式下的混合生物碱对照品总离子流图、给药后HK-2细胞破碎液总离子流图、空白对照组细胞破碎液总离子流图、第3次洗液总离子流图见图1。

表 1 黄柏中 5 种生物碱成分质谱 MRM 模式下参数  
Table 1 Parameters of five alkaloid components in *Phellodendri Chinensis Cortex* in MRM mode

成分	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
黄柏碱	342.18	192.09	30	24
木兰花碱	342.18	265.12	40	18
药根碱	338.15	322.22	40	26
小檗红碱	332.12	307.10	30	28
小檗碱	336.13	320.14	40	30



A-混合生物碱对照品 B-盐黄柏给药组 C-空白组 D-第3次洗液  
1-黄柏碱 2-木兰花碱 3-药根碱 4-小檗红碱 5-小檗碱  
A-mixed alkaloids reference substance B-salt-water processed of *Phellodendri Chinensis Cortex* administration group C-blank control group D-third washing  
1-phellodendrine 2-magnoflorine 3-jatrorrhizine 4-berberrubine 5-berberine

图 1 MRM 模式下对照品及各样品总离子流图  
Fig. 1 Total ions chromatogram of standard and each sample in MRM mode

## 2.9 方法学考察

**2.9.1 专属性** 取空白细胞破碎液、空白细胞破碎液加混合对照品溶液和含药细胞样品 500 μL, 按“2.7”项下方法操作, 通过比较空白组细胞破碎液、空白细胞破碎液加混合对照品溶液和含药细胞样品的色谱图, 排除潜在的相同 MRM 通道的内源性物质的干扰, 考察分析方法的特异性。实验结果表明, 黄柏 5 种生物碱类成分的分离度良好, 组织中内源性物质对所测定成分无干扰。

**2.9.2 标准曲线和线性范围** 取空白细胞破碎液 500 μL, 依次加入混合对照品溶液向下稀释, 制备成 8 个质量浓度梯度的混合对照品溶液, 按“2.8”项下条件测定, 并记录各测定成分峰面积, 以对照品的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到回归方程, 结果见表 2。

**2.9.3 准确度和精密度** 取空白细胞破碎液 500 μL, 按“2.9.2”项下方法分别配制 5 种生物碱成分空白细胞破碎液低、中、高 3 个质量浓度的质控样品, 质量浓度分别为黄柏碱 (0.004 7、2.329 5、815.340 9 ng/mL)、木兰花碱 (0.005 7、2.840 9、994.318 2 ng/mL)、药根碱 (0.004 7、2.329 5、815.340 9 ng/mL)、小檗红碱 (0.004 6、2.315 4、810.377 3 ng/mL)、小檗碱 (0.004 7、2.343 7、820.304 5 ng/mL), 每个质量浓度平行分析 6 份, 连续测定 3 d, 根据质量控制样品测定的结果考察本方法的准确度与精密度。结果表明, 黄柏 5 种生物碱成分低、中、高 3 个质量浓度日内精密度 RSD 为 2.31%~11.68%, 准确度为 89.31%~113.66%; 日间精密度 RSD 为 1.89%~11.66%, 准确度为 87.86%~109.47%, 表明该方法准确度与精密度良好。

**2.9.4 提取回收率和基质效应** 同“2.9.2”项下操作得 A 样品; 另取空白细胞破碎液 500 μL, 与“2.9.2”项下操作相比, 在加入对照品溶液的先后顺序上做调整, 此样品为离心后向获得的上清液中加入上述相应浓度的对照品溶液作为 B 样品; 除不加空白细胞破碎液外, 按“2.9.2”项下方法操作得 C 样品。

表 2 各生物碱成分线性关系

Table 2 Linear relationships of various alkaloids

成分	回归方程	r	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )	定量限/(ng·mL <sup>-1</sup> )
黄柏碱	Y=33 141.1 X+91.427 6	0.999 153	0.002 33~820.000 00	0.002 33
木兰花碱	Y=3 642.70 X+14.527 7	0.997 513	0.002 84~1 000.000 00	0.002 84
药根碱	Y=46 177.9 X+47.925 1	0.998 995	0.002 33~820.000 00	0.002 33
小檗红碱	Y=162 709 X+102.301 0	0.999 538	0.002 32~815.000 00	0.002 32
小檗碱	Y=116 717 X+179.964 0	0.999 074	0.002 34~825.000 00	0.002 34

上述样品每个浓度设6个平行样品。提取回收率为A样品与B样品色谱峰面积之比,基质效应为B样品与C样品的色谱峰面积之比。结果表明,黄柏5种生物碱成分低、中、高3个质量浓度的质控样品基质效应为86.31%~105.28%,提取回收率为88.69%~106.37%,提示提取回收率良好,无明显基质效应干扰。

**2.9.5 样品稳定性** 同“2.7”项下方法样品处理后仪器进样盘中放置12 h;样品处理后放置4℃储存24 h;细胞破碎液样品反复冻融3次后按“2.7”项下方法处理。考察细胞破碎液中黄柏生物碱类成分在进样器放置以及4℃储存条件下稳定性。结果表明,黄柏5种生物碱成分低、中、高3个质量浓度的质控样品在进样盘放置12 h精密度RSD为0.98%~13.89%、准确度为88.68%~112.85%,4℃冷藏24 h精密度RSD为1.37%~11.45%、准确度为89.13%~109.52%,各成分均较稳定。

**2.10 统计学分析**

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,GraphPad Prism 8作图。正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行各组间差异比较。

**3 结果**

**3.1 CCK-8法检测药物毒性结果**

通过CCK-8法定测定黄柏给药液对HK-2细胞的毒性作用,并确定黄柏给药液的给药浓度。实验结果表明,黄柏给药液在质量浓度为400 μg/mL时,生黄柏、盐黄柏和酒黄柏组HK-2细胞存活率分别为93.73%、103.29%和93.68%,均大于90%,说明

该药物浓度对HK-2细胞细胞增殖没有明显影响,无细胞毒性,随着给药液浓度的提高其对细胞增殖也存在抑制作用。因此,本研究最终选择400 μg/mL作为给药浓度进行后续实验。

**3.2 正常给药组HK-2细胞中黄柏不同炮制品生物碱类成分摄取差异考察**

空白对照组细胞破碎液总离子色谱图(图1-C)未检测到黄柏中生物碱类成分所对应的离子峰,提示空白对照组细胞破碎液中无黄柏生物碱类成分,细胞破碎液不干扰样品检测。第3次洗液(图1-D)无明显黄柏生物碱响应强度,可以忽略不计,说明3次的洗涤已经把物理吸附细胞膜上的成分清洗干净,在加药的细胞破碎液中的成分应为与细胞膜有相互作用的成分。通过MassLynx 4.1工作站计算HK-2细胞破碎液中黄柏生物碱含量变化趋势(图2)。

从黄柏不同炮制品中生物碱类成分摄入差异来看,各给药组在给药前期的1 h内,黄柏碱、木兰花碱、药根碱和小檗碱在HK-2细胞内的摄入含量差异比较为盐黄柏组>生黄柏组>酒黄柏组。各给药组小檗红碱含量则为盐黄柏组>酒黄柏组>生黄柏组。

从HK-2细胞给药后孵育时间来看,黄柏碱、木兰花碱、药根碱、小檗碱在HK-2细胞内的含量变化,随着给药时间的推移,1、4、6、9 h含量整体呈现逐渐降低的趋势。小檗红碱的药时曲线略有不同,生黄柏、酒黄柏小檗红碱含量在6 h达到峰值,盐黄柏则在4 h到达峰值,随后整体呈现逐渐降低的趋势。

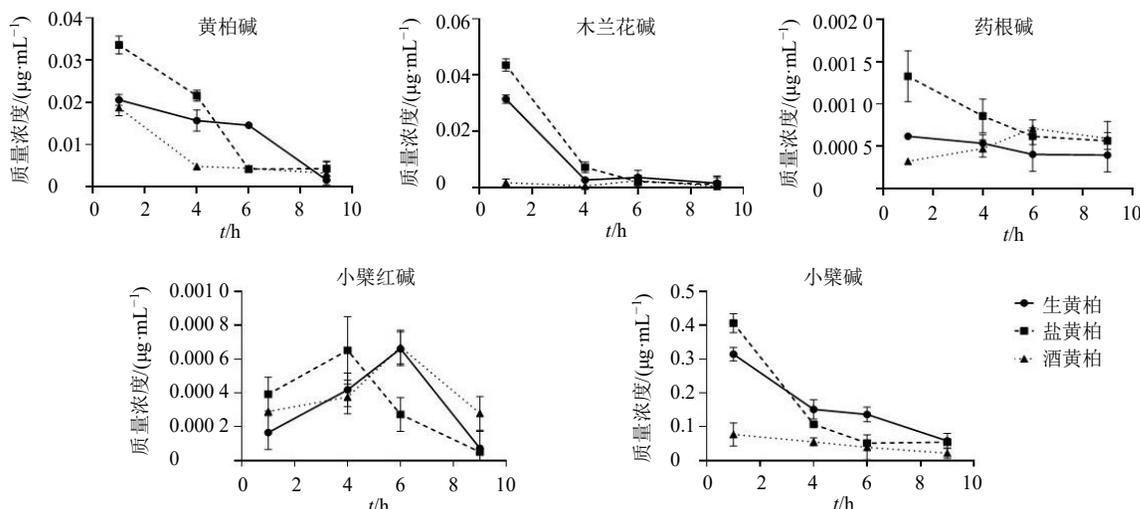


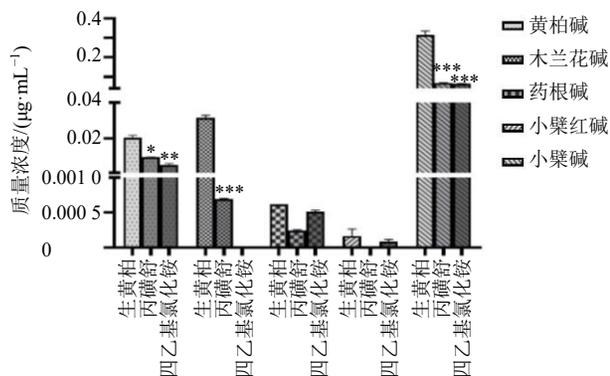
图2 黄柏不同炮制品5种生物碱成分在HK-2细胞中含量变化趋势

Fig. 2 Trends in contents of five alkaloids of different kinds of processed products of *Phellodendri Chinensis Cortex* in HK-2 cells

### 3.3 抑制剂给药组 HK-2 细胞中黄柏不同炮制品生物碱类成分摄取差异考察

在给药的 HK-2 细胞破碎液中所检测到的黄柏生物碱类成分均未在空白对照组和给药细胞的第 3 次洗液中检测出,提示该检测结果应为 HK-2 细胞所摄取的生物碱类成分。抑制剂干预后 HK-2 细胞破碎液中黄柏生物碱含量均小于无抑制剂干预组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),提示转运蛋白抑制剂对 HK-2 细胞摄取生物碱成分发挥作用。不同转运蛋白抑制剂对 HK-2 细胞摄取生黄柏生物碱的影响结果见图 3,加入不同抑制剂后,黄柏中生物碱在 HK-2 细胞摄取情况出现不同程度地下降,其中部分指标有显著的下降差异。不同抑制剂干预后 HK-2 细胞破碎液中黄柏生物碱含量变化趋势图见图 4。

从转运蛋白抑制剂对不同生物碱摄取情况来



与生黄柏组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs raw *Phellodendri Chinensis* Cortex group

图 3 不同转运蛋白抑制剂作用 1 h 后对 HK-2 细胞摄取生黄柏生物碱的影响

Fig. 3 Effects of different transporter inhibitors on uptake of raw *Phellodendri Chinensis* Cortex alkaloids by HK-2 cells after 1 h treatment

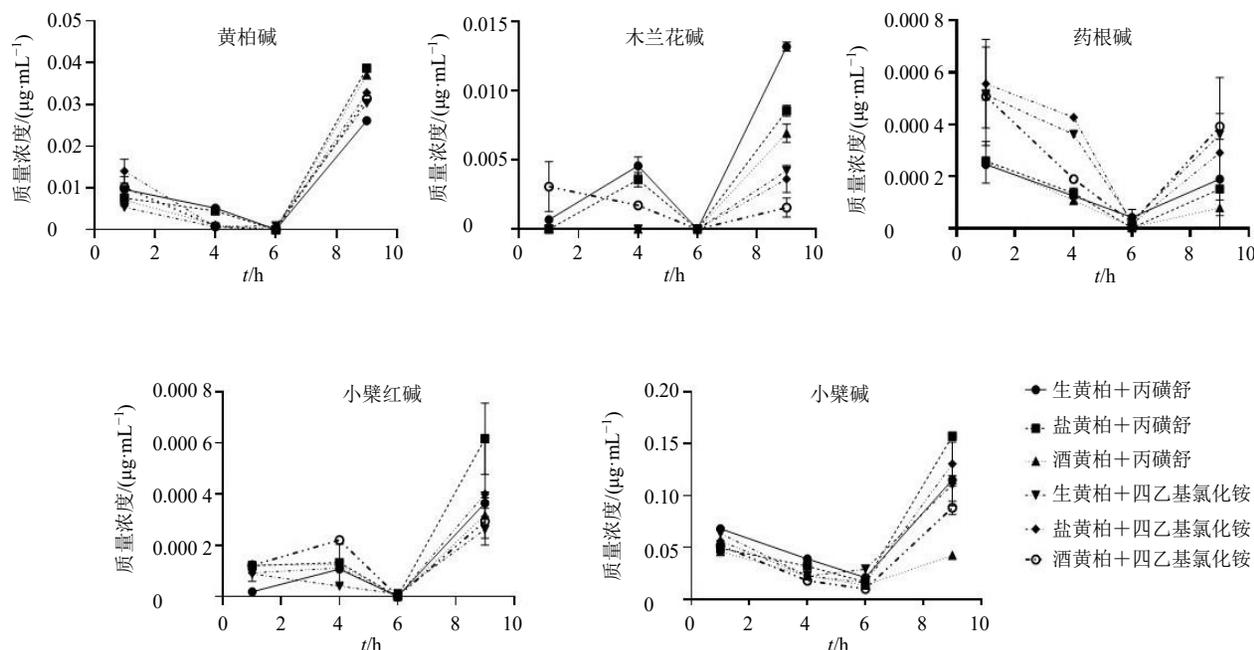


图 4 不同抑制剂干预后 HK-2 细胞中黄柏不同炮制品 5 种生物碱含量变化趋势

Fig. 4 Contents trend of five alkaloids of different kinds of processed products of *Phellodendri Chinensis* Cortex in HK-2 cells after intervention of different inhibitors

看,黄柏碱、木兰花碱含量差异为丙磺舒(OATs 抑制剂)组>四乙基氯化铵(OCTs 抑制剂)组;药根碱的含量比较结果为四乙基氯化铵(OCTs 抑制剂)组>丙磺舒(OATs 抑制剂)组,但差异并不明显。

小檗红碱的含量比较结果为各时间段丙磺舒(OATs 抑制剂)组≈四乙基氯化铵(OCTs 抑制剂)组;小檗碱的含量比较结果为给药后 1 h 内丙磺舒

(OATs 抑制剂)组≈四乙基氯化铵(OCTs 抑制剂)组,4~9 h 的实验结果为丙磺舒(OATs 抑制剂)组>四乙基氯化铵(OCTs 抑制剂)组。

从抑制剂组的 HK-2 细胞给药孵育时间来看, HK-2 细胞对黄柏各生物碱摄取变化趋势相似,生物碱含量变化趋势整体呈现为 1~6 h 先下降,6~9 h 有所上升。

## 4 讨论

肾小管作为肾脏的重要功能单位,主要由近端小管、远端小管、集合管3部分组成。其中发挥重要功能的是近端小管,负责血液和尿液之间的物质吸收、交换、排泄等功能,在这一过程中肾小管上皮细胞可以通过转运蛋白摄取葡萄糖、无机盐、药物成分等<sup>[14-17]</sup>。OATs家族和OCTs家族作为肾小管上皮细胞上分布最为广泛的转运体,发挥着药物重吸收和体内分布的重要作用<sup>[18-19]</sup>。

黄柏作为传统清热燥湿药,味苦、性寒,归肾、膀胱经。现代药理学研究表明,黄柏具有多种生物碱、柠檬苦素类、酚酸类等成分,其中主要的活性成分为生物碱类成分。黄柏的传统炮制方法主要有盐制、酒制等<sup>[20-21]</sup>。通过炮制可以改变中药的作用趋势,如入盐则走肾脏。现代药理学研究也表明,黄柏经盐炙后,其生物碱类成分更趋向于肾组织脏器的分布<sup>[22-24]</sup>。

### 4.1 HK-2细胞对黄柏不同炮制品生物碱类成分摄取差异

本实验使用体外细胞培养的方法,通过UPLC-QqQ-MS技术对黄柏“盐炙入肾”的机制进行探究。实验结果显示实验组HK-2细胞破碎液中生物碱类成分含量总体呈现盐黄柏组>生黄柏组>酒黄柏组,表明了黄柏经过盐炙后,其生物碱成分更容易被肾小管上皮细胞吸收,从而在一定程度上进一步验证了黄柏“盐炙入肾”的炮制理论。

### 4.2 HK-2细胞给药孵育时间对黄柏生物碱类成分含量变化的影响

随着黄柏不同炮制品对HK-2细胞孵育时间的推移,1、4、6、9h正常给药组HK-2细胞内生物碱类成分含量总体呈下降趋势,其主要原因是肾脏作为体内代谢的重要器官,发挥着药物排泄的功能。抑制剂组HK-2细胞内生物碱成分的含量总体呈现先下降后上升的趋势,提示可能是抑制剂抑制效果随时间逐渐减弱。

### 4.3 黄柏生物碱类成分进入HK-2细胞途径的考察

实验结果显示表明,黄柏碱、木兰花碱可能是通过OCTs运输至细胞内,而药根碱、小檗红碱和小檗碱的转运则是OATs和OCTs共同介导的结果。其中抑制剂组HK-2细胞内药根碱含量差异表现为OATs摄取效果较好于OCTs,而小檗碱则是有机阳离子摄取效果较好,从化合物结构上来看,相对于小檗碱,药根碱更容易生成负电荷。

与黄柏正常给药组相比,抑制剂组生物碱成分含量具有显著性差异,提示相应转运蛋白抑制剂发挥了抑制HK-2细胞转运蛋白活性的作用。空白组无生物碱类成分检出,第3次洗液几乎无生物碱响应强度,提示实验组所检测的生物碱含量即为HK-2细胞摄取生物碱含量。

实验中对OATs和OCTs共同抑制HK-2细胞摄取进行了考察,其生物碱成分含量变化很小,抑制HK-2细胞摄取能力与单个抑制剂组相比,双重抑制剂组生物碱含量>单个抑制剂组,其具体机制尚不清晰,有待后续实验继续考察。实验中对于黄柏内酯类成分同时也进行了检测,几乎无响应强度,初步推测可能黄柏内酯类成分含量过少,亦或是很难被HK-2细胞吸收。因此本实验主要就黄柏生物碱类成分摄取情况进行探究。

综上,本实验通过体外细胞实验和UPLC-QqQ-MS技术证实了黄柏中生物碱类成分能够被肾小管上皮细胞摄取,肾小管上皮细胞对黄柏不同炮制品中生物碱类成分摄取差异,也进一步佐证了黄柏“盐炙则治下”的炮制理论。实验初步表明黄柏中生物碱类成分的摄取主要是OCTs介导的结果,具体是哪种亚型转运蛋白发挥作用,本实验后期将用化学转染试剂将带荧光蛋白报告基因系统的质粒DNA导入HK-2细胞中进行转染,通过构建OCT2、OAT1和OAT3稳定高表达的细胞,再分别以Western blotting、qRT-PCR法测定黄柏不同炮制品对HK-2细胞中相应转运蛋白及mRNA表达的影响,进一步分析转运蛋白高表达状态下,肾脏各转运体与黄柏盐炙前后效应成分的关系。从而精确分析出黄柏盐炙前后效应物质入肾过程与肾中药物转运体的关联性,并以“载体转运”的角度解析黄柏“盐炙入肾”的机制。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 侯小涛,戴航,周江煜. 黄柏的药理研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 498-500.
- [2] 明·李时珍. 本草纲目: 点校本 [M]. 北京: 北京燕山出版社, 2007: 120-121.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 318.
- [4] 祁东利,贾天柱,廉莲. 黄柏炮制后化学成分转化研究 [J]. 中成药, 2010, 32(3): 443-447.
- [5] 贾天柱. 中药炮制学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 195-197.
- [6] 徐庆翰,刘克辛. 肾脏转运体及其研究方法 [J]. 药品

- 评价, 2013, 10(14): 40-45.
- [7] 师少军, 张玉. 肾脏转运体和/或代谢酶介导药物排泄及药物相互作用的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(15): 1600-1606.
- [8] 隋森芳. 膜分子生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 1-45.
- [9] Hagos F T, Daoood M J, Ocque J A, *et al.* Probenecid, an organic anion transporter 1 and 3 inhibitor, increases plasma and brain exposure of *N*-acetylcysteine [J]. *Xenobiotica*, 2017, 47(4): 346-353.
- [10] Engel K, Wang J. Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(5): 1397-1407.
- [11] 董倩倩, 李萍, 宋越, 等. 靶细胞提取和高效液相飞行时间质谱联用分析预测丹参中的活性成分 [J]. 分析化学, 2007, 35(5): 648-652.
- [12] Kang D H, Han L, Ouyang X S, *et al.* Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter [J]. *Am J Nephrol*, 2005, 25(5): 425-433.
- [13] Endo T, Kimura O, Sakata M. Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line [J]. *Toxicology*, 2000, 146(2/3): 187-195.
- [14] 李云, 尹娟娟, 尹登科. 肾小管靶向给药系统研究进展 [J]. 中国药师, 2013, 16(9): 1417-1420.
- [15] Saito A, Sato H, Iino N, *et al.* Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 403272.
- [16] 李珍, 刘宏宝. 纳米粒子肾靶向的影响因素及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(3): 453-460.
- [17] Sweet D H. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 204(3): 198-215.
- [18] 陆汝江, 李玲, 高丽辉. 有机阴离子转运蛋白在肾脏尿酸排泄中的作用研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(6): 405-410.
- [19] 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.
- [20] 张冠英, 董瑞娟, 廉莲. 川黄柏、关黄柏的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(10): 812-821.
- [21] 代琪, 胡宇, 雷蕾, 等. 黄柏炮制品的考证、化学成分和药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(10): 205-208.
- [22] 张凡, 孟莉, 刘蓬蓬, 等. 黄柏生品与盐炙品中生物碱类成分在大鼠肾组织脏器中的吸收差异 [J]. 中成药, 2020, 42(11): 2954-2959.
- [23] Lei X F, Shan G S, Zhang F, *et al.* Determination and comparison of alkaloids and triterpenes among tissues after oral administration of crude and processed *Phellodendri Chinensis Cortex* by UPLC-QqQ-MS [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(9): 1337-1340.
- [24] Zhang F, Li L, Zhao J H, *et al.* The effects of salt-water processing of *Phellodendri Chinensis Cortex* on the enhancement of kidney absorption of the main alkaloids [J]. *Nat Prod Commun*, 2022, 17(2): 1-10.

[责任编辑 李亚楠]