

# 齐墩果酸对 OATP1B1 介导药物转运功能的关联性影响

杨茗钊<sup>a</sup>, 钱霞<sup>b</sup>, 徐文炜<sup>c</sup>, 刘婧<sup>a</sup>, 程晓华<sup>a\*</sup> (南昌大学, a.第一附属医院; b.第三附属医院; c.临床药理研究所, 南昌 330006)

**摘要:** 目的 探讨齐墩果酸对有机阴离子转运多肽 1B1(organic anion transporting polypeptide1B1, OATP1B1)转运功能的关联性影响。方法 利用稳定表达人 OATP1B1 的人胚胎肾 293(human embryonic kidney293, HEK293)细胞株, 以氟伐他汀为底物进行 OATP1B1 摄取反应, 观察齐墩果酸对 OATP1B1 摄取功能的影响。结果 齐墩果酸对 OATP1B1 摄取氟伐他汀的功能有竞争性抑制作用, 抑制常数  $K_i$  值为  $(20.3 \pm 2.1) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 齐墩果酸对肝脏药物转运体 OATP1B1 转运抑制作用可诱导中西药相互作用。

**关键词:** 齐墩果酸; 氟伐他汀; 有机阴离子转运多肽 1B1; 药物相互作用

中图分类号: R963 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)07-1016-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.016

引用本文: 杨茗钊, 钱霞, 徐文炜, 等. 齐墩果酸对 OATP1B1 介导药物转运功能的关联性影响[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1016-1019.

## Association Effect of Oleanolic Acid on the Function of OATP1B1

YANG Mingfang<sup>a</sup>, QIAN Xia<sup>b</sup>, XU Wenwei<sup>c</sup>, LIU Jing<sup>a</sup>, CHENG Xiaohua<sup>a\*</sup> (Nanchang University, a.The First Hospital; b.The Third Hospital; c.Institute of Clinical Pharmacology, Nanchang 330006, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the association effect of oleanolic acid(OA) on organic anion transporting polypeptide1B1(OATP1B1) transport function. **METHODS** Using human embryonic kidney 293(HEK293) cells stably expressing OATP1B1, to observe the effect of OA on OATP1B1-mediated uptake of fluvastatin(FV). **RESULTS** OA could competitively inhibit the OATP1B1-mediated uptake of FV, with the  $K_i$  values of  $(20.3 \pm 2.1) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . **CONCLUSION** Inhibitory effect of OA on transporter function of liver drug transporter OATP1B1 can induce herb-drug interactions.

**KEY WORDS:** oleanolic acid; fluvastatin; OATP1B1; drug interaction

近年来, 中草药以其药效缓和、不良反应较少等特点, 在临床治疗中常与化学药联合用于慢性疾病的治疗。中草药中含有的多种生物活性成分可能在与化学药合用时改变合用药物的药动学特征, 导致药物不良反应的发生。齐墩果酸为五环三萜类化合物代表药物, 以游离体和配糖体的形式广泛分布于青叶胆、女贞子等双子叶植物中, 具有保肝抗炎、抗肿瘤等诸多药理学活性。同时, 由于齐墩果酸在抗动脉粥样硬化、降血脂等方面的药理作用<sup>[1-2]</sup>以及强化阿托伐他汀对高血脂患者的降脂效果<sup>[3]</sup>, 使得其联合他汀类降血脂药在治疗慢性心血管疾病领域变得日益广泛。

前期研究发现<sup>[4]</sup>, 齐墩果酸与他汀类降脂药物氟伐他汀联用后可显著改变氟伐他汀的大鼠体内药动学特征, 显著提高氟伐他汀体内药物达峰浓

度( $C_{\max}$ )和曲线下面积( $\text{AUC}_{0-t}$ )。诸多研究也表明, 转运蛋白和药物代谢酶基因多态性是两物合用时产生药物相互作用影响药动学特征的关键因素之一<sup>[5]</sup>, 而有机阴离子转运多肽 1B1(organic anion transporting polypeptide1B1, OATP1B1)基因多态性在药动学以及药效学的研究已日渐得到国内外研究者的广泛关注。OATP1B1 是一种肝脏摄入型转运蛋白, 可特异性地表达于肝脏, 将其底物转运进入肝细胞进行代谢和清除。而且他汀类药物体内过程与 OATP1B1 关系密切, 氟伐他汀作为 OATP1B1 的经典底物之一<sup>[6]</sup>, 齐墩果酸与氟伐他汀是否为 OATP1B1 的共同底物影响转运蛋白功能导致药动学特征的改变值得深入探讨。因此, 本研究以齐墩果酸为研究对象, 利用 OATP1B1 稳定表达细胞系探讨齐墩果酸基于 OATP1B1 转运

**基金项目:** “重大新药创制”国家科技重大专项(2011ZX09302-007-03); 江西省青年科学基金项目(20142BA215019); 江西省卫生计生委科技计划项目(20175136)

**作者简介:** 杨茗钊, 女, 硕士, 主治医师, 讲师 Tel: (0791)88692250 E-mail: 649479518@qq.com \*通信作者: 程晓华, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0791)88695051 E-mail: cxh0204032@163.com

功能对氟伐他汀摄取的影响, 以期为临床合理应用齐墩果酸与 OATP1B1 底物药物时提供实施依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试药与试剂

实验细胞株(HEK293 细胞、OATP1B1 稳定转染的 HEK293)均来源于南昌大学第一附属医院泌尿外科研究所; 齐墩果酸对照品(批号: 110709-201206, 纯度>98%)、氟伐他汀对照品(批号: 1006003, 含量>99.6%)、瑞舒伐他汀对照品(批号: 20051101RS, 含量>99.5%)、利福平对照品(批号: 130496-200702, 含量>99%)均购自中国药品生物制品检定所; 丁酸钠(Sigma 公司, 批号: B5887); 二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)均为美国 Amresco 公司产品; DMEM 培养基(Hyclone 公司); 胎牛血清(杭州四季青公司); 甲醇(Merck 公司, 色谱纯); 乙酸乙酯及其余试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

高效液相色谱-质谱联用仪(LC-MS-2010EV)、LC-MS solution 色谱工作站(日本岛津); XW-80A 旋涡混匀器(上海驰唐电子有限公司); Anke LXJ-II 大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂); Sigma3K30 台式超高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); BP61S 电子天平(德国 Sartorius 公司); MDF-382E 超低温冰箱(日本三洋公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞内氟伐他汀药物浓度测定方法** Shim-Pack ODS C<sub>18</sub> 分析柱(250 mm×2.0mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%醋酸溶液(65:35), 流速: 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温: 35 °C; 选择性离子检测(SIM); 电喷雾离子化(ESI); 离子极性: 负离子; 检测对象: 氟伐他汀(*m/z*410.2)、瑞舒伐他汀(*m/z*480); 雾化气流速: 1.5 L·min<sup>-1</sup>; 干燥气流量: 4.0 L·min<sup>-1</sup>, 检测电压 1.60 kV; 曲形脱溶剂装置温度: 250 °C; 加热块温度: 200 °C; 干燥气流速: 2.0 L·min<sup>-1</sup>。

**1.3.2 实验细胞株的培养** 将 HEK293 细胞、稳定转染 OATP1B1 的 HEK293 细胞分别以每孔  $2 \times 10^5$  个的密度接种于 96 孔培养板, 于 DMEM 完全培养液(含 1%青霉素、链霉素、10%胎牛血清), 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下进行培养。HEK293 细胞用于细胞增殖抑制实验, 稳定转染 OATP1B1 的 HEK293 细胞实验前 24 h 加入

10 mmol·L<sup>-1</sup>丁酸钠诱导 OATP1B1 表达。

**1.3.3 MTT 细胞毒性实验** 取对数生长期 HEK293 细胞, 调整细胞密度至每毫升  $5 \times 10^4$  个接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后换液, 分别加入系列浓度含药培养基 200 μL, 其中实验组分别加入系列浓度的齐墩果酸(5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 μmol·L<sup>-1</sup>), 氟伐他汀(10, 20, 40, 80, 160, 240, 320 μmol·L<sup>-1</sup>)和利福平(5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 μmol·L<sup>-1</sup>), 空白组为含 0.5% DMSO 的培养基, 每组设 5 个复孔, 移至细胞培养箱中继续培养, 培养 24 h 后每孔各加入 20 μL MTT 试剂, 继续培养 4 h 后吸弃孔内的培养液, 每孔加二甲亚砜(DMSO)溶液 150 μL, 空气恒温振荡器振荡 10 min, 待结晶物充分溶解, 用酶标仪检测各孔在 490 nm 的吸光度值, 计算细胞存活率: 细胞存活率(%)=(*A*<sub>实验组</sub>-*A*<sub>空白组</sub>)/(*A*<sub>对照组</sub>-*A*<sub>空白组</sub>)×100%。

**1.3.4 摄取时间对氟伐他汀摄取的影响** 取对数生长期 HEK293 细胞, 调整细胞密度至每毫升  $5 \times 10^4$  个接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后换液, 加入 200 μL 氟伐他汀(160 μmol·L<sup>-1</sup>)的摄取缓冲液, 置细胞培养箱分别孵育 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60 min, 每组设置 5 个复孔, 定时吸弃上层含药摄取缓冲液, 以 4 °C 摄取缓冲液清洗 3 次后加 400 μL 无菌水, -80 °C 超低温反复冻融 3 次, 取上层细胞裂解液 200 μL 进样 LC-MS 法测定细胞中氟伐他汀的药物浓度, 另 200 μL 采用 BCA 法测定细胞蛋白含量, 摄取量以每毫克蛋白计。

**1.3.5 OATP1B1 稳定转染细胞株对氟伐他汀的摄取实验** 取稳定转染 OATP1B1 的 HEK293 (HEK239-OATP1B1) 细胞及未转染质粒的 HEK293 细胞, 调整细胞密度至每毫升  $5 \times 10^4$  个接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后换液, 实验前 2 h 缓慢吸弃原细胞培养液, 实验组每孔分别加入氟伐他汀(160 μmol·L<sup>-1</sup>)与齐墩果酸(160 μmol·L<sup>-1</sup>)合用系列浓度(10, 40, 80 μg·mL<sup>-1</sup>)的齐墩果酸组缓冲液, 以未转染质粒的 HEK293 细胞为空白对照组、经典的 OATP1B1 抑制剂利福平作为阳性对照组, 各组置 37 °C 细胞培养箱中温孵进行摄取反应, 每组设 5 个复孔。摄取反应进行 10 min, 缓慢吸弃上层含药摄取缓冲液, 以 4 °C 摄取缓冲液清洗 3 次后加 400 μL 无菌水, -80 °C 超低温反复冻融 3 次, 取上层细胞裂解液 200 μL 进样 LC-MS 法测定细胞中氟伐他汀的药物浓度, 另 200 μL 采用

BCA 法测定细胞蛋白含量, 摄取量以每毫克蛋白计。

**1.3.6 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 分析软件, 所有计量资料均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验或单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 药物对细胞增殖抑制的影响

MTT 法检测细胞增殖结果显示, 各组随着药物浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降, 呈现剂量依赖性。在药物处理 24 h 后, 齐墩果酸组、氟伐他汀组、利福平组对细胞存活率均  $> 80\%$  时, 其最大药物浓度分别为 80, 160, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随着药物浓度继续增大, 可见部分细胞出现细胞毒作用并伴随细胞形态学的改变。因此, 本实验时均选择以存活率  $> 80\%$  以上的系列药物浓度作为实验用药物浓度。

### 2.2 摄取时间对氟伐他汀摄取的影响

摄取实验结果显示, 细胞对氟伐他汀摄取量随摄取反应的时间增加而上升, 在 1~10 min 内细胞对其摄取呈线性, 10 min 后逐渐趋于平缓, 细胞摄取量无显著性增加。结果见图 1。可能是由于开始时细胞内外的浓度差比较大, 药液被细胞快速摄取, 10 min 后随着细胞内外液浓度达到相对平衡, 摄取量趋于平缓。因此, 在细胞摄取试验中, 将摄取时间定为 10 min。

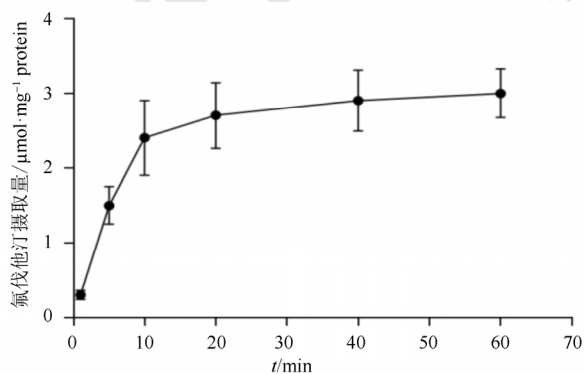


图 1 时间对氟伐他汀摄取量的影响( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Effects of time on uptake of fluvastatin ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 HEK239-OATP1B1 细胞对氟伐他汀的摄取

摄取液中加入 160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氟伐他汀, 摄取反应进行 10 min, HEK239-OATP1B1 细胞对氟伐他汀的摄取量  $[(8.57 \pm 1.31) \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}]$  约为

未转染质粒的 HEK293 细胞的摄取量  $[(2.56 \pm 0.38) \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}]$  的 3.35 倍, 2 组比较差异具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。而作为 HEK239-OATP1B1 的经典抑制剂利福平 (100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可显著抑制 OATP1B1 对氟伐他汀的摄取, 摄取液中加入 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平后氟伐他汀摄取量为  $(3.02 \pm 0.65) \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$  ( $P < 0.01$ ), 可使 HEK239-OATP1B1 细胞摄取氟伐他汀的能力降低 65%。结果见图 2。

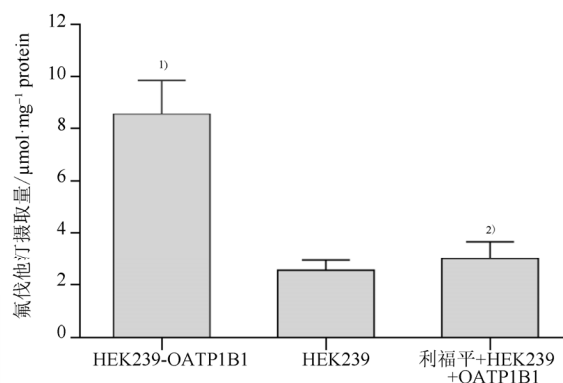


图 2 HEK239-OATP1B1 细胞对氟伐他汀摄取量的影响 ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

与 HEK239 比较,  $^1P < 0.01$ ; 与 HEK239-OATP1B1 比较,  $^2P < 0.01$ 。

Fig. 2 The effect of fluvastatin uptake by OATP1B1 ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compared with HEK239,  $^1P < 0.01$ ; compared with HEK239-OATP1B1,  $^2P < 0.01$ .

### 2.4 齐墩果酸对 HEK239-OATP1B1 细胞摄取氟伐他汀的抑制作用

摄取液中加入不同浓度 (10, 40, 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的齐墩果酸, 摄取反应进行 10 min 后。结果见图 3。由图 3 可知, 齐墩果酸对 OATP1B1 摄取氟伐他汀 (160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 具有抑制效应, 且具明显的浓度依赖性。与对照组比较, 齐墩果酸 (10, 40, 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可致氟伐他汀摄取量分别减少 11.7%, 50.4 % 和 63.9%, 齐墩果酸 (40, 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组与对照组比较差异具有显著的统计学意义 ( $P < 0.01$ )。为进一步描述齐墩果酸对 OATP1B1 摄取氟伐他汀的抑制方式, 考察不同浓度 (10, 20, 40, 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 齐墩果酸对 HEK239-OATP1B1 细胞摄取 40, 80, 160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氟伐他汀的抑制作用, 并计算抑制常数  $K_i$ 。结果表明, 齐墩果酸对 OATP1B1 摄取氟伐他汀的抑制呈现竞争性抑制作用,  $K_i$  值为  $(20.3 \pm 2.1) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

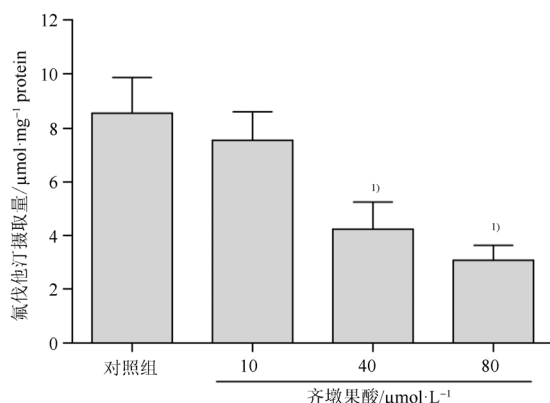


图3 齐墩果酸对 HEK239-OATP1B1 细胞摄取氟伐他汀的影响( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

与对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 3 The effect of oleanolic acid on fluvastatin uptake by HEK239-OATP1B1 cell( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ .

### 3 讨论

OATP1B1 作为一种位于肝细胞基底膜上重要的吸收转运体, 由人类 SLCO1B1 基因编码, 现已研究证实其底物广泛, 除靶向转运胆汁酸、甲状腺激素等多种内源性物质外, 还介导多种具有重要临床意义的药物的肝脏跨膜转运<sup>[7-9]</sup>, 与药物在体内药动学过程密切相关, 可能导致药物疗效的改变、甚至不良反应的产生。中药活性成分齐墩果酸具有的保肝、抗动脉粥样硬化、降血脂等方面的药理学效应以及强化阿托伐他汀对高血脂患者的降脂效果, 使其在临床治疗中联合他汀类降血脂药治疗心血管疾病变得日益广泛。而临床常用的他汀类降血脂药物多经由 OATP1B1 转运, 其在肝脏富集程度可能决定其调脂效果, 而外周血药浓度决定其不良反应。大量研究表明, 他汀类药物的疗效及不良反应的产生可能与 OATP1B1 关系密切。因此, 齐墩果酸等诸多中药活性药物或化学药物在与他汀类药物联合应用时, 须重点关注其与他汀类药物共同通过 OATP1B1 转运后可能影响他汀类药物的临床疗效和导致的不良反应。

有研究表明中药活性成分丹参素可显著影响瑞舒伐他汀在大鼠体内的药动学特征, 并与竞争抑制 OATP1B1 介导瑞舒伐他汀的转运密切相关<sup>[8]</sup>, Wen 等<sup>[9]</sup>报道熊果酸可以通过抑制 OATP1B1 影响肝细胞中瑞舒伐他汀的转运摄取, OATP1B1 的基因突变可能对其转运瑞舒伐他汀有不同的影响。与熊果酸一样, 同为五环三萜类化合物经典化合物的齐墩果酸是否同样可以通过抑制 OATP1B1

影响肝细胞对他汀类药物的摄取值得深入探讨。HEK239-OATP1B1 稳定转染细胞株早已被证明是研究 OATP1B1 功能的良好工具, 本研究利用 HEK239-OATP1B1 稳定转染细胞株, 并在实验前检测细胞株为 OATP1B1 高表达, 从细胞水平探讨了齐墩果酸对 OATP1B1 介导氟伐他汀转运的影响机制及其关联性影响。结果表明, 在建立的高表达 OATP1B1 的 HEK239-OATP1B1 细胞研究中, 以经典抑制剂利福平为对照确认了氟伐他汀是 OATP1B1 的作用底物, 齐墩果酸(40, 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对 OATP1B1 基因介导的氟伐他汀转运存在竞争性抑制作用, 并呈现剂量依赖性。因此, 齐墩果酸可能为潜在的 OATP1B1 转运功能的抑制剂, 在临床使用过程中应密切关注其与他汀类底物发生的药物相互作用。

### REFERENCES

- [1] WANG X, LIU R, ZHANG W, et al. Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 376(1/2): 70-80.
- [2] BUUS N H, HANSSON N C, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ R, et al. Antiatherogenic effects of oleanolic acid in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(2/3): 519-526.
- [3] YANG H X, GONG H Q, JIANG H B. Clinical observation and preliminary mechanism of oleanolic acid strengthening atorvastatin statin lipid-lowering effect [J]. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 2013, 21(6): 537-540.
- [4] YANG M F, XU W W, CHENG X H. Effect of oleanolic acid on the pharmacokinetics of fluvastatin in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2017, 34(6): 811-814.
- [5] YAN Z, LI X H, HUANG S B, et al. The molecular mechanism of actin of OATP1B1 and CYP3A4 genetic polymorphism on the metabolism and transport of atorvastatin [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2013, 33(13): 1035-1041.
- [6] LIU J, JIN G F, Hu J F, et al. Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 and cytochrome P2C9 genetic polymorphism on the transportation of fluvastatin [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2014, 30(9): 794-796.
- [7] NIEMI M, PASANEN M K, NEUVONEN P J. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(1): 157-81.
- [8] WEN J H, WEI X H, CHENG X H, et al. OATP1B1 in drug-drug interactions between traditional Chinese medicine Danshensu and rosuvastatin [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2016, 51(1): 75-79.
- [9] WEN J H, WEI X H, FU Y N, et al. The influence of herbal medicine ursolic acid on the uptake of rosuvastatin mediated by OATP1B1\*1a and \*5 [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2014, 39(3): 221-230.

收稿日期: 2017-10-31

(本文责编: 曹粤锋)