

氯化两面针碱在大鼠心脏中的积聚及其机制研究

李翠^{1,2}, 陈迎春², 曾清泉², 雷少伟^{1,2}, 周慧², 蒋惠娣², 李丽萍^{2*}

(1. 浙江工业大学长三角绿色制药协同创新中心, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江大学药学院药物代谢与分析实验室, 浙江省抗肿瘤药物重点实验室, 浙江 杭州 310058)

摘要: 氯化两面针碱 (nitidine chloride, NC) 为抗肿瘤候选化合物。本研究考察其在大鼠心脏的分布及其机制, 为其潜在的心脏毒性提供依据。动物实验获得了浙江大学医学中心动物保护和和使用委员会的批准 (2015-380-01), 符合中国动物福利标准。大鼠单次静脉注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NC 后 0.25、0.5 和 2 h, 心脏中 NC 浓度分别为 47.7、71.1 和 $63.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 与相同时间点血浆中的浓度比分别为 576、1 352 和 1 212。大鼠连续静脉注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NC 20 天, 末次给药后 2 h, 心脏中 NC 浓度为 $458.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 与血浆中的浓度比为 7 336。NC 在 MDCK-hOCT1、MDCK-hOCT3 中的积聚分别为 mock 细胞的 16.1、4.99 倍, 但在 MDCK-hOCTN1、MDCK-hOCTN2、MDCK-hPMAT 中的积聚与 mock 细胞未显示明显差异。此外, OCTs 的抑制剂奎尼丁、左旋延胡索乙素、Decynium 22 可显著降低 NC 在原代培养的乳大鼠心肌细胞和成纤维细胞中的积聚。MTT 结果显示, NC 在心肌细胞和成纤维细胞上的 LC_{50} 分别为 10.9 和 $10.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, 不同浓度的 NC 可显著增加原代心肌细胞和成纤维细胞中 LDH 酶渗漏。上述结果表明, NC 在大鼠心脏积聚和蓄积, 对原代心肌细胞和成纤维细胞具有一定的毒性; OCT1 和 OCT3 可介导 NC 的心脏积聚。

关键词: 氯化两面针碱; 心脏积聚; OCT1 和 OCT3 转运体; 心脏毒性

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)05-0913-06

Accumulation of nitidine chloride in rat heart and the underlying mechanism

LI Cui^{1,2}, CHEN Ying-chun², ZENG Qing-quan², LEI Shao-wei^{1,2}, ZHOU Hui²,
JIANG Hui-di², LI Li-ping^{2*}

(1. Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Laboratory of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, Zhejiang Province Key Laboratory of Anti-Cancer Drug Research, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Nitidine chloride (NC) is a compound with prominent anti-tumor activity. To determine potential cardiotoxicity of NC, this study was designed to investigate the distribution of NC in rat heart and the underlying mechanism. The animal studies were approved by Institutional Animal Care and Use Committee of Zhejiang University Medical Center (2015-380-01) and complied with the standards of animal welfare in China. At 0.25, 0.5 and 2 h after a single intravenous injection (iv) of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NC, the concentrations of NC in rat heart were 47.7, 71.1 and $63.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively, which were 576, 1 352 and 1 212 folds of that in plasma. This study also revealed that the NC concentration in heart was $458.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (7 336 folds of that in plasma) at 2 h after the last dose in rats, after daily iv administration of NC at $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ for successive 20 days. Further studies showed that the accumulations of NC in MDCK-hOCT1 and MDCK-hOCT3 cells were 16.1 and 4.99 folds higher than that of the mock cells, respectively. There is no significant difference between the accumulations of NC in MDCK cells

收稿日期: 2019-01-02; 修回日期: 2019-01-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872929); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY19H310005).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-571-88208417, E-mail: lillylp@zju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0001

transfected with hOCTN1, hOCTN2 or hPMAT and the mock cells. Additionally, quinidine, *L*-tetrahydropalmatine and Decynium 22, the inhibitors of OCTs, clearly reduced the accumulations of NC in primary cardiomyocytes and cardiac fibroblasts from neonatal rats. MTT assay showed that the LC_{50} of NC on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts were 10.9 and 10.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Moreover, treatment of the primary cardiomyocytes and cardiac fibroblasts with NC (1~15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 48 h resulted in significantly increased LDH enzyme leakage. These results indicated that NC can be highly accumulated in the heart, and accumulation is mediated by OCT1 and OCT3, but not by OCTN1, OCTN2 and PMAT. The accumulated NC has potential cytotoxicity as shown in the results from primary cardiomyocytes and cardiac fibroblasts.

Key words: nitidine chloride; cardiac accumulation; organic cation transporter 1 and 3 (OCT1, OCT3); cardiotoxicity

氯化两面针碱 (nitidine chloride, NC, 图1) 是从芸香科花椒属藤本植物两面针 *Radix Zanthoxyli* 的干燥根中提取分离得到的一种苯并菲啶类生物碱, 是传统中药两面针的主要活性成分之一, 且是两面针镇痛片、三九胃泰颗粒等中药制剂的有效成分^[1]。研究表明, NC具有抗肿瘤、抗炎、抗疟及镇痛等多种生物活性^[2], 近年来在卵巢癌、肝癌等抗肿瘤^[3,4]方面显示出较强的作用, 是良好的抗肿瘤候选化合物。但有文献报道, NC可致斑马鱼心率降低并诱发心脏毒性^[5], 而心脏毒性是早期成药性评价的重要指标之一, NC是否会在哺乳动物心脏蓄积及其相关机制尚不清楚。

NC为季铵类生物碱, 被动透过性差, 需细胞膜转运体介导其跨细胞转运。人、鼠心脏上表达多种跨膜转运蛋白, 如有机阳离子转运体1和3 (OCT1、OCT3)、新型有机阳离子转运体1和2 (OCTN1、OCTN2) 以及质膜单胺转运体 (PMAT) 等摄取型转运体^[6,7], 它们共同参与内源性和外源性物质由细胞外进入细胞内。

本研究首先考察NC在大鼠心脏的分布, 进一步应用多种稳定表达转运体的转基因细胞模型、原代心肌细胞和成纤维细胞, 研究NC的心脏积聚机制及毒性, 为NC的心脏毒性及成药性评价提供参考。

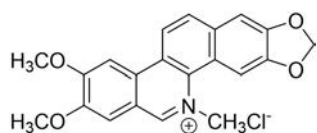


Figure 1 Chemical structure of nitidine chloride (NC)

材料与方法

药品和试剂 氯化两面针碱 (NC, 纯度>98%, 批号: GR-134-170706)、左旋延胡索乙素 (*L*-tetrahydropalmatine, *L*-THP, 纯度: 98%, 批号: ZL1612200426-LTD) (南京广润生物制品有限公司); 奎尼丁 (quinidine, 纯度: 98%, 批号: G1705030)、左旋肉碱 (*L*-carnitine, 纯度: 98%, 批号: J1423007)、氯雷他定 (loratadine, 纯度

>98%, 批号: H1527108) (阿拉丁公司); Decynium 22 (纯度>97%, 批号: 323764)、5-溴脱氧尿嘧啶 (5-bromo-2'-deoxyuridine, 纯度≥99%, 批号: HMBF8725V)、胶原酶 I (批号: SLBW6959)、DMSO (纯度≥99.5%, 批号: SHBJ7919) (美国 Sigma 公司); 胰酶 (批号: 1910485)、青-链霉素溶液 (双抗, 批号: 2018052503)、胎牛血清 (批号: 1908121) (美国 Gibco 公司); DMEM 培养基 (批号: 0024518)、DMEM/F-12 培养基 (批号: 0011518) (以色列 Biological Industries 公司); MTT (纯度≥98%, 批号: EZ2411A401, 德国 Biofrox 公司); 乳酸脱氢酶试剂盒 (批号: 07672403, 瑞士 Roche 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: P0011, 碧云天生物技术研究); 乙腈 (色谱纯, 批号: 18095192, 美国 Tedia 公司); 其他试剂均为分析纯或更高级别。

实验所用 mock 细胞及 MDCK-hOCT1、MDCK-hOCT3、MDCK-hOCTN1、MDCK-hOCTN2、MDCK-hPMAT 为本课题组构建^[8-11]。

实验动物 新生 P₀ 代 SD 乳鼠; 8 周龄 SD 大鼠 ($n = 30$), 雌雄各半, 体重 220 ± 20 g, 均由浙江省医学科学院动物中心提供 (许可证号: SCXK (浙) 2015-0001, 清洁二级), 饲养于温度 (22 ± 2) °C 和湿度 (55 ± 5) %, 自由饮水进食。所有实验过程均获得了浙江大学医学中心动物保护和委员会的批准 (2015-380-01), 符合中国动物福利标准。

动物给药与样品收集 将 30 只 SD 大鼠, 雌雄各半, 随机分成 4 组, 其中单次给药组每组 6 只, 连续给药组每组 12 只。大鼠单次静脉注射 (iv) 5 mg·kg⁻¹ NC, 其中 3 组分别于给药后 0.25、0.5 及 2 h 取全血 (肝素抗凝)、麻醉后处死取心脏组织; 另 1 组连续 iv 20 天, 末次给药后 2 h 取全血、心脏组织。4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血浆; 心脏组织以溶剂 (水-乙腈=1:1) 制成 125 mg·mL⁻¹ 组织匀浆液, -80 °C 保存, 以 LC-MS/MS 测定 NC 浓度。

细胞培养 MDCK-hOCT1、MDCK-hOCT3、MDCK-

hOCTN1、MDCK-hOCTN2、MDCK-hPMAT 及 mock 细胞于含 1% 双抗、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。待细胞生长至 80%~90% 融合度时, 用 0.25% 胰酶消化传代, 并采用经典底物和抑制剂验证细胞功能。

细胞积聚 将各转基因细胞及 mock 细胞按密度 2×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 生长 3 天后, 进行 NC 在细胞上的积聚实验。吸弃细胞培养液, 用 37 °C HBSS (MDCK-hOCT1、MDCK-hOCT3 细胞) 或 KRH (MDCK-hOCTN1、MDCK-hOCTN2、MDCK-hPMAT 细胞) 洗两遍, 预孵育 10 min 后, 加 NC, 使终浓度为 $0.5 \sim 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 或 NC 及各种转运体的经典抑制剂 (OCT1、OCT3、OCTN1: 奎尼丁, OCTN2: 左旋肉碱, PMAT: Decynium 22; 各抑制剂的浓度为 $4 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 共孵育, 孵育一定时间后迅速弃去孵育液, 用冰冷的 PBS 洗 3 遍终止积聚, 加 100 μL 0.1% SDS 裂解细胞, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存, 以 LC-MS/MS 测定裂解液中 NC 浓度, 并以 BCA 法测定蛋白浓度进行校正。

乳鼠原代心肌细胞和成纤维细胞的分离 根据文献^[12]进行改良: 取乳鼠心脏, 清洗剪碎, 加入含 0.05% 胶原酶 I 和 0.03% 胰酶进行消化, 所得细胞培养于含 1% 双抗、10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 1.5 h 后, 将未贴壁的心肌细胞转移至新的培养皿中, 加入终浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-溴脱氧尿嘧啶抑制成纤维细胞的增殖, 48 h 后换液, 成纤维细胞因生长迅速, 2 天即呈融合状态可用于传代, 其细胞排列紧密、平坦, 胞质薄而透明; 心肌细胞则逐渐伸出伪足, 变为三角形、多边形等不规则形态, 并交织成网。

OCT1、OCT3 抑制剂对 NC 在原代心肌细胞和成纤维细胞中积聚的影响 将心肌细胞按密度 5×10^5 个/孔接种于 12 孔板, 成纤维细胞按密度 2×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 48 h 后, 进行 NC 的细胞积聚研究。吸弃细胞培养液, 用 37 °C HBSS 洗两遍, 预孵育 10 min 后, 心肌细胞、成纤维细胞对照组加入含 NC 的 HBSS 溶液, 使 NC 终浓度分别为 $4、2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑制剂组加入含 OCT1、OCT3 阳性抑制剂 ($250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奎尼丁, $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左旋肉碱, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Decynium 22) 的同等浓度 NC 溶液。37 °C 孵育 10 min, 迅速弃去孵育液, 按“细胞积聚”项下操作。

样品处理与 LC-MS/MS 分析 取血浆、组织匀浆液各 100、50 μL , 分别加入 200、400 μL 乙腈 (含内标氯雷他定 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 沉淀蛋白; 细胞样品解冻后吹打收集裂解液 80 μL , 加入乙腈 160 μL (含内标氯雷他定 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 沉淀蛋白, 旋涡振荡 5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、

$13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清进行 LC-MS/MS 分析, 样品检测参考文献方法^[13]。

MTT 法细胞存活率和培养液中 LDH 检测 将原代心肌细胞和成纤维细胞分别以 1×10^5 个/孔和 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板, 贴壁后, 进行 NC 对细胞的毒性实验。细胞以含 $0.1 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NC 的培养液培养 24 h 后, 以同等 NC 浓度换液继续培养 24 h, 同时设置 DMSO 空白对照组。以 MTT 法检测细胞存活率。同法选择 $2.5 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NC 给药刺激 48 h 后, 收集细胞培养液, 以 LDH 试剂盒测定 LDH 活力。

数据分析 以 GraphPad Prism 5.0 对实验数据进行作图分析, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 体外实验均至少重复 2 次, 每次至少平行 3 份。两组间差异采用 Unpaired Two-tailed Student's *t*-test; 多组间差异采用 One-way ANOVA (Dunnett 或 Tukey) 分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结果

1 NC 在大鼠心脏中的积聚

图 2 显示, 大鼠单次 iv $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NC 后 0.25、0.5 和 2 h, 心脏中 NC 的平均浓度分别为 47.7、71.1 和 $63.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 与相同时间点血浆中的浓度比分别为 576、1 352 和 1 212。大鼠连续 iv $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NC 20 天, 末次给药后 2 h, 心脏中 NC 平均浓度为 $458.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 为血浆中 NC 浓度的 7 336 倍, 单次给药后 2 h 浓度的 7.3 倍。上述结果提示, NC 可在心脏组织中浓集和蓄积。

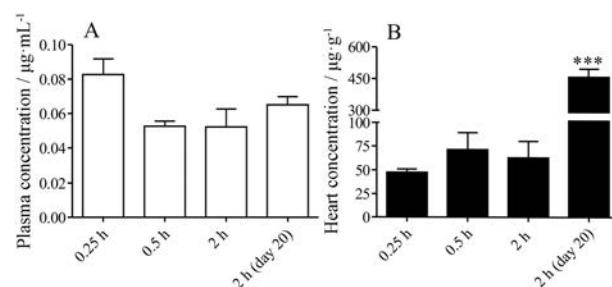


Figure 2 The concentration of NC in rat plasma (A) and heart (B) after single ($n = 6$) and successive intravenous administration of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NC for 20-days. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs 2 h group

2 不同阳离子转运体在 NC 细胞积聚中的作用

为探讨 NC 在心脏中的积聚机制, 本研究应用转基因细胞模型, 考察心脏上可能与 NC 积聚有关的转运体对 NC 的摄取作用。结果显示 (图 3): NC 在 MDCK-hOCT1 和 MDCK-hOCT3 细胞中的积聚分别是 mock 细胞的 16.1 和 4.99 倍, 提示 NC 为 OCT1、OCT3

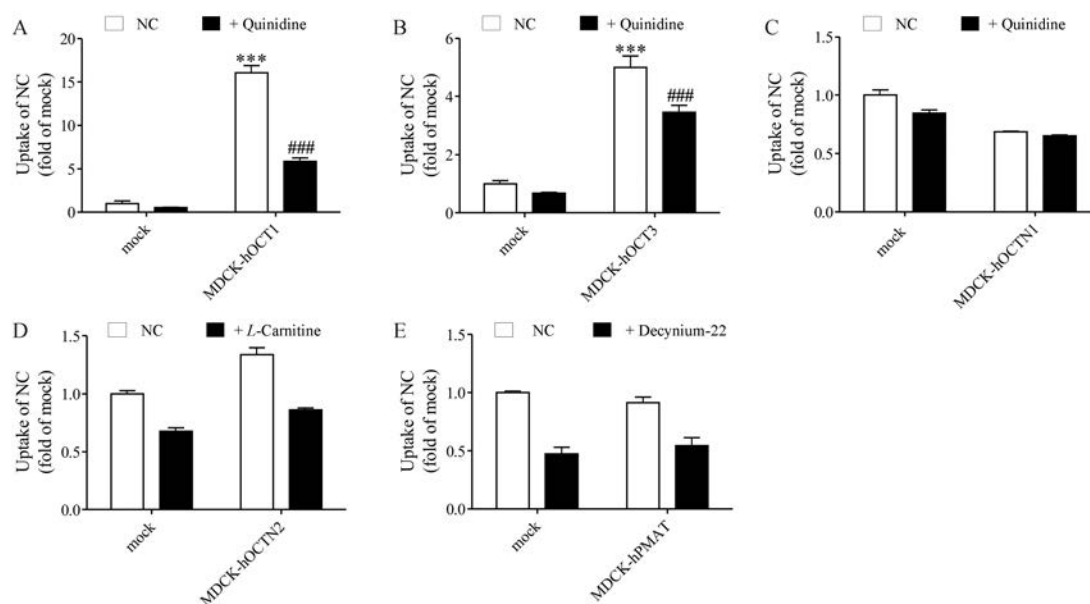


Figure 3 The cellular accumulation of NC in MDCK-hOCT1 (A), MDCK-hOCT3 (B), MDCK-hOCTN1 (C), MDCK-hOCTN2 (D), MDCK-hPMAT (E) and mock cells. Cells were incubated with $0.5\text{--}2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NC in the absence or presence of $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ quinidine, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ *L*-carnitine or $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Decynium-22 in uptake buffer for 2 min. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs mock group, ### $P < 0.001$ vs incubated without inhibitor group

的底物; 而 NC 在 MDCK-hOCTN1、MDCK-hOCTN2、MDCK-hPMAT 细胞中的积聚与 mock 细胞无明显差异 ($P > 0.05$), 提示 NC 不是 OCTN1、OCTN2、PMAT 的底物。上述结果提示, NC 可能通过 OCT1 和 OCT3 摄取进入心脏。

3 OCT1 和 OCT3 抑制剂减少 NC 在原代心肌细胞和成纤维细胞中的积聚

为进一步阐明 OCT1、OCT3 在 NC 大鼠心脏摄取中的作用, 本研究考察了 OCT1、OCT3 抑制剂奎尼丁、左旋延胡索乙素、Decynium 22 对 NC 在乳大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞中积聚的抑制。结果显示, OCT1、OCT3 抑制剂均能明显降低 NC 在细胞中的积聚 (图 4), 提示 OCT1、OCT3 参与 NC 在大鼠心脏的浓集和蓄积。

4 NC 对心脏原代心肌细胞和成纤维细胞毒性研究

鉴于 NC 在大鼠心脏积聚现象, 以及乳大鼠心脏原代细胞可通过 OCT1 和 OCT3 介导 NC 的摄取, 本研究对 NC 是否引起原代心肌细胞和成纤维细胞的毒性进行了考察。

4.1 NC 对细胞生长的影响 乳大鼠心肌细胞和成纤维细胞以不同浓度 NC 处理 48 h 后, 置显微镜下观察形态变化, 典型图片见图 5A 和 5B。由图可见, 经 1、5 和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NC 处理后, 心肌细胞和成纤维细胞形态逐渐萎缩、脱落、死亡, 细胞密度随 NC 浓度的增加逐渐降低。

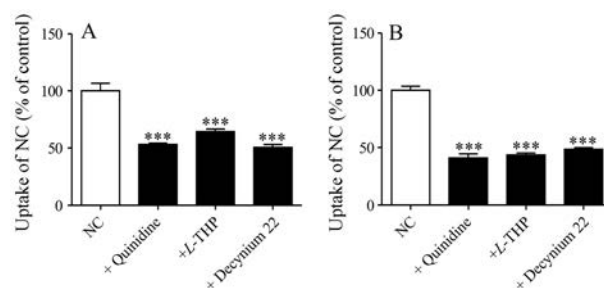


Figure 4 The accumulation of NC in primary cultured rat cardiomyocytes (A) and cardiac fibroblasts (B). Cells were incubated with 4 or $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NC in the absence or presence of OCT inhibitors, $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ quinidine, $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ *L*-tetrahydropalmitate (*L*-THP) and $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Decynium 22 for 10 min. $n > 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs NC group

4.2 NC 对细胞存活率和细胞 LDH 渗漏的影响

为进一步考察 NC 潜在的毒性, 本研究考察了 NC 对心肌细胞和成纤维细胞存活率及细胞培养液中 LDH 活性的影响, 结果显示: $0.01\text{--}50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NC 能降低心肌细胞和成纤维细胞的存活率, 且细胞毒性呈明显的浓度依赖性, LC_{50} 值分别为 10.9 和 $10.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 6A, B)。此外, $2.5\text{--}10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NC 显著增加细胞培养液中 LDH 的活性 (图 6C, D), 提示 NC 处理增加细胞释放 LDH。上述结果提示, NC 对大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞具有潜在的毒性。

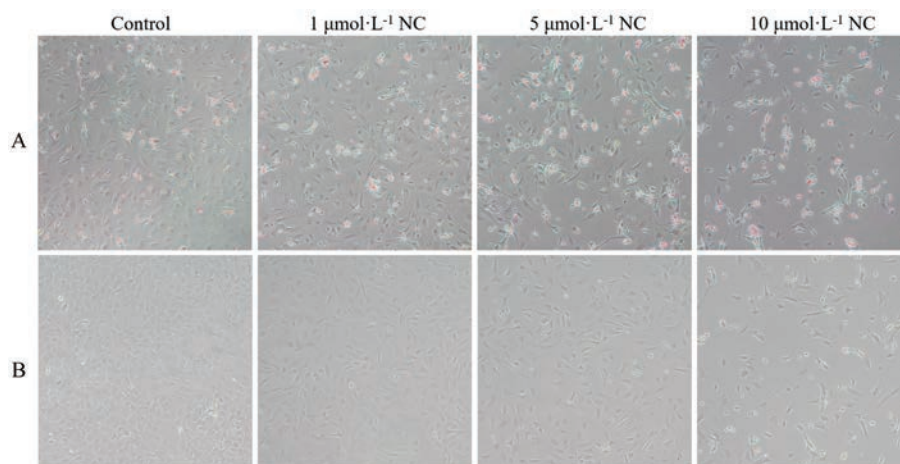


Figure 5 The morphology change of primary cardiomyocytes (A) and cardiac fibroblasts (B) after treatment with vehicle control (0.2% DMSO), 1, 5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NC for 48 h ($\times 100$)

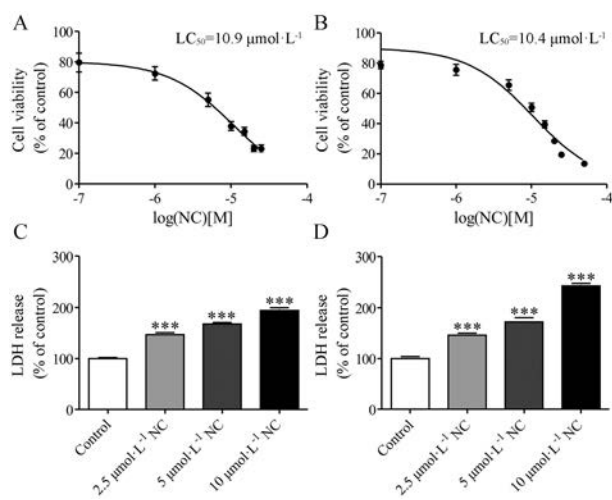


Figure 6 Cell viability of primary cardiomyocytes (A) and cardiac fibroblasts (B) treated with 0.01–50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NC for 48 h. Values were calculated as percentage of the control group (0.2% DMSO). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. LDH released in the culture medium of primary cardiomyocytes (C) and cardiac fibroblasts (D) treated with 2.5–10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NC for 48 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group (0.2% DMSO)

讨论

NC为抗肿瘤候选化合物,具有抗癌谱广、作用强等特点,但也发现其具有肝脏、肾脏及心脏毒性^[2,5,13]。本研究在NC的组织分布中发现,NC在大鼠心脏中高度浓集。为探讨NC在心脏中的积聚机制,根据NC的结构特征及心脏转运体分布^[14,15],首先应用稳定表达有机阳离子类转运体的细胞模型,考察了NC的细胞积聚,发现NC是OCT1和OCT3的底物,但不是OCTN1、OCTN2以及PMAT的底物。基于心肌细胞是心脏的基本功能单位,成纤维细胞占非心肌细胞90%,是构成心脏的主要细胞,为更好地阐明NC的心脏积

聚机制,本研究进一步考察了在有或无OCT1和OCT3抑制剂存在下,NC在大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞中的积聚情况。结果发现,多种OCT1、OCT3抑制剂均能显著降低NC在心肌细胞和成纤维细胞中的积聚^[13,16,17],进一步提示OCT1、OCT3参与了NC在心脏中的积聚。此外,心脏上也表达MDR1、MRP5、MATE1等外排转运体^[6,18,19],但本研究发现NC并不是MDR1、MRP5的底物,而NC虽为MATE1的底物,但其对NC的转运能力($\text{Clint}: 20.6 \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1} \text{pro}\cdot\text{min}^{-1}$)远低于OCT1($\text{Clint}: 311 \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1} \text{pro}\cdot\text{min}^{-1}$)^[13]。同时,也不能排除心脏上其他外排转运体参与NC的转运,但其对NC的外排可能弱于OCT1或OCT3对NC的摄取。

本研究发现10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NC可导致大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞存活率显著降低及LDH显著升高,且大鼠单次iv 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NC后0.25~2 h,心脏中NC浓度为47.7~71.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (约124.3~185.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),连续iv 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NC 20天,末次给药后2 h,心脏中NC浓度为458.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (约1194.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。因此,NC在心脏中的高浓度积聚对心脏具有潜在的毒性。实验室前期相关研究也表明^[13],NC是OCT2高亲和力的底物,而OCT2介导NC进入肾脏产生蓄积。大鼠连续20天iv 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NC,末次给药后2 h,NC在肾脏中的浓度为145.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,同时也观察到NC引起的肾脏损伤。但值得说明的是,尽管本研究发现了NC在大鼠心脏蓄积,却未发现心脏组织相关生化指标和组织病理上的显著变化。这一现象可能与心脏自身的抗氧化酶防御系统有关^[20,21],研究表明^[22],成纤维生长因子21以自分泌方式调节抗氧化基因参与心脏的保护作用。此外,已有文献表明,心肌细胞上OCT1和OCT3的表达,且其功能可被奎尼丁显著抑制^[23],但尚未有文

献报道成纤维细胞上 OCT1、OCT3 的表达。在原代细胞的 NC 积聚实验中, 本研究发现 OCT1、OCT3 的抑制剂既能显著抑制 NC 在心肌细胞中的积聚, 同时也能抑制其在成纤维细胞中的积聚, 推测成纤维细胞上可能也有 OCT1 和 OCT3 表达并参与 NC 的心脏积聚。

综上, 本研究结果提示, NC 可在大鼠心脏高度浓集, 且 OCT1、OCT3 可介导 NC 在心脏积聚, 同时本研究还显示, NC 对原代心肌细胞和成纤维细胞具有一定的毒性。因此, 本研究为 NC 在心脏中的积聚及潜在毒性提供了依据。

References

- [1] Yang XF, Lu XS. Using HPLC method to determine the content of the two side of chloride in the tri-ninth gastric granules [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2017, 26: 25-27.
- [2] Li LP, Tu MJ, Yang X, et al. The contribution of human OCT1, OCT3, and CYP3A4 to nitidine chloride-induced hepatocellular toxicity [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42: 1227-1234.
- [3] Chen SP, Yang L, Feng J. Nitidine chloride inhibits proliferation and induces apoptosis in ovarian cancer cells by activating the Fas signalling pathway [J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70: 778-786.
- [4] Liu LM, Xiong DD, Lin P, et al. DNA topoisomerase 1 and 2 A function as oncogenes in liver cancer and may be direct targets of nitidine chloride [J]. Int J Oncol, 2018, 53: 1897-1912.
- [5] Huan HL, Liu HG, Meng Y, et al. Effect of nitidine chloride on the heart development of zebra fish embryos [J]. Guangxi Med J (广西医学), 2011, 33: 546-548.
- [6] Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications [J]. Pharm Res, 2007, 24: 1227-1251.
- [7] Barnes K, Dobrzynski H, Foppolo S, et al. Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH [J]. Circ Res, 2006, 99: 510-519.
- [8] Tu MJ, Sun SY, Wang K, et al. Organic cation transporter 1 mediates the uptake of monocrotaline and plays a key role in its hepatotoxicity [J]. Toxicology, 2013, 311: 225-230.
- [9] Sun SY, Wang K, Lei HM, et al. Inhibition of organic cation transporter 2 and 3 may be involved in the mechanism of the antidepressant-like action of berberine [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2014, 49: 1-6.
- [10] Weng YY, Jin LS, Wang YQ, et al. Establishment and application of cell models with stable expression of hOCTN1/2 [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 931-937.
- [11] Sun SY, Zhou SS, Lei SW, et al. Jatrorrhizine reduces 5-HT and NE uptake via inhibition of uptake-2 transporters and produces antidepressant-like action in mice [J]. Xenobiotica, 2018. DOI: 10.1080/00498254.2018.1542188.
- [12] Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51: 288-298.
- [13] Li LP, Song FF, Weng YY, et al. Role of OCT2 and MATE1 in renal disposition and toxicity of nitidine chloride [J]. Br J Pharmacol, 2016, 173: 2543-2554.
- [14] Wagner DJ, Hu T, Wang J. Polyspecific organic cation transporters and their impact on drug intracellular levels and pharmacodynamics [J]. Pharmacol Res, 2016, 111: 237-246.
- [15] Grube M, Ameling S, Noutsias M, et al. Selective regulation of cardiac organic cation transporter novel type 2 (OCTN2) in dilated cardiomyopathy [J]. Am J Pathol, 2011, 178: 2547-2559.
- [16] Bourdet DL, Pritchard JB, Thakker DR. Differential substrate and inhibitory activities of ranitidine and famotidine toward human organic cation transporter 1 (hOCT1; SLC22A1), hOCT2 (SLC22A2), and hOCT3 (SLC22A3) [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 315: 1288-1297.
- [17] Hayer-Zillgen M, Brüß M, Bönisch H. Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3 [J]. Br J Pharmacol, 2002, 136: 829-836.
- [18] Krishnamurthy K, Vedam K, Kanagasabai R, et al. Heat shock factor-1 knockout induces multidrug resistance gene, MDR1b, and enhances P-glycoprotein (ABCB1)-based drug extrusion in the heart [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109: 9023-9028.
- [19] Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, et al. Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5 / ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart [J]. Am J Pathol, 2003, 163: 1567-1577.
- [20] Doherty KR, Wappel RL, Talbert DR, et al. Multi-parameter *in vitro* toxicity testing of crizotinib, sunitinib, erlotinib, and nilotinib in human cardiomyocytes [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 272: 245-255.
- [21] Li XH, Tang NF, Li YQ, et al. Cytoprotective effect of p62/Nrf2 signaling pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1995-2005.
- [22] Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress [J]. Cardiovasc Res, 2015, 106: 19-31.
- [23] Rossato LG, Costa VM, de Pinho PG, et al. Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat-isolated cardiomyocytes [J]. Arch Toxicol, 2011, 85: 929-939.