基于药物转运体抑制的麝香通心滴丸–药物相互作用预测研究

赵洁平[1], 卢双慧[1,2], 袁略翔[1], 张恒斌[1], 陈 秀[1], 周 慧[1*], 蒋惠娣[1*]

(1. 浙江大学药学院, 药物代谢和药物分析研究所, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江省肿瘤医院药剂科, 浙江 杭州 310022)

摘要: 麝香通心滴丸 (Shexiang Tongxin Dropping Pill, STDP) 为中药复方口服制剂, 具有改善心肌缺血、缓解胸闷胸痛的疗效, 临床上多与治疗心血管疾病的化药联合使用。本研究首先应用17种过表达人源转运体的转基因细胞模型, 包括肠道 (PEPT1、OATP2B1、MDR1、BCRP)、肝脏 (OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OAT2)、肾脏 (OAT1、OAT3、OAT4、OCT2、MATE1、MATE2-K) 和心脏 (OCTN1、OCTN2、OCT3) 重要转运体, 通过细胞积聚实验探究STDP对转运体的抑制作用。结果发现, STDP可抑制肾脏阳离子转运系统 (OCT2、MATE1/2-K), 对其余14种转运体无明显抑制。因常与STDP联用的药物并非OCT2、MATE1/2-K底物, 本研究选择潜在联用的底物药物阿替洛尔和普鲁卡因胺进一步研究, 发现STDP可抑制MATE1介导的阿替洛尔和普鲁卡因胺, 以及MATE2-K介导的阿替洛尔转运。进一步考察小鼠灌胃STDP后的血浆、肝、肾提取液对MATE1/2-K的抑制, 发现即使10倍临床剂量灌胃后的小鼠血浆、肝、肾提取液, 也仅对MATE1转运阿替洛尔有较弱的抑制, 抑制率为20%。推测临床剂量下, STDP对上述两药肾排泄产生明显影响的可能性不大。上述结果提示, 临床剂量的STDP因对上述转运体的抑制而产生有临床意义药物–药物相互作用 (DDI) 的可能性不大。动物实验获得浙江大学动物伦理委员会批准 (批准号: ZJU20230086)。

关键词: 麝香通心滴丸; 转运体; 积聚; 抑制; 药物–药物相互作用; 预测

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)12-3764-11

Predication study on Shexiang Tongxin Dropping Pills-drug interactions mediated by transporter inhibition

ZHAO Jie-ping[1], LU Shuang-hui[1,2], YUAN Lüe-xiang[1], ZHANG Heng-bin[1], CHEN Xiu[1], ZHOU Hui[1*], JIANG Hui-di[1*]

(*1. Institute of Drug Metabolism and Pharmaceutical Analysis, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Department of Pharmacy, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China*)

Abstract: Shexiang Tongxin Dropping Pill (STDP), a compound oral preparation of traditional Chinese medicine, has the therapeutic effects of improving myocardial ischemia and relieving chest tightness and pain. It is often used in combination with chemical drugs for cardiovascular diseases in clinical practice. In this paper, the inhibitory effects of STDP on 17 human transporters were studied by cellular accumulation experiments using overexpressing transgenic cell models, including important transporters in the intestine (PEPT1, OATP2B1, MDR1, BCRP), liver (OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OAT2), kidney (OAT1, OAT3, OAT4, OCT2, MATE1, MATE2-K), and heart (OCTN1, OCTN2, OCT3). The results showed that STDP inhibited the renal cation transport system (OCT2, MATE1/2-K), but had no significant inhibitory effect on the other 14 transporters. Since the commonly co-administered drugs are not substrates of OCT2 and MATE1/2-K, atenolol and procainamide, the potential co-administered drugs of STDP, were selected as substrates for further study. The results reveled that STDP inhibited the transport of atenolol mediated by MATE1 and MATE2-K, as well as the transport of procainamide

收稿日期: 2025-07-15; 修回日期: 2025-09-27.

基金项目: 内蒙古自治区科学技术厅中央引导地方科技发展资金项目 (2022ZY00).

*通讯作者 E-mail: zhouhui@zju.edu.cn; hdjiang@zju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0822

mediated by MATE1. Further study showed that the extracts of plasma, liver, and kidney from mice orally administered with STDP, even at 10-folds of clinical dose, merely inhibited MATE1-mediad transport of atenolol by 20%, without inhibiting MATE2-K-meidated transport of atenolol and MATE1/2-K-mediated transport of procainamide. It is speculated that at the clinical dose, STDP is unlikely to significantly affect the renal excretion of the two drugs. The above results suggest that at the clinical dose, STDP is unlikely to induce significant drug-drug interactions (DDIs) due to the inhibition of the above transporters. The animal experiments have been approved by the Animal Ethics Committee of Zhejiang University (approval number: ZJU20230086).

Key words: Shexiang Tongxin Dropping Pill; transporter; accumulation; inhibition; drug-drug interaction; prediction

麝香通心滴丸 (Shexiang Tongxin Dropping Pill, STDP) 组方源自宋代《太平惠民和剂局方》“至宝丹”, 由经方加减化裁而来, 具有芳香益气通脉、活血化瘀止痛之功效[1], 不仅可以稳定易损斑块、延缓动脉粥样硬化进展[2], 还能全面改善心肌缺血、有效缓解胸闷胸痛[3,4], 已于2017年被列入国家中药保护品种。临床应用中, STDP主要作为辅助治疗药物, 常与治疗心血管疾病的化药联合使用, 如联合β-受体阻滞剂美托洛尔[5,6]、硝酸酯类药物尼可地尔[7], 控制心绞痛症状; 联合窦房结电流抑制剂伊伐布雷定[7], 抗心律失常和心力衰竭; 联合降血脂药瑞舒伐他汀钙[8], 延缓动脉粥样硬化进展; 联合钙离子通道抑制剂氨氯地平[9], 改善心肌纤维化程度和血液流变学指标; 联合血小板聚集抑制剂阿司匹林[10]或氯吡格雷[11], 预防血栓形成、改善心肌损伤。总之, STDP与目前治疗冠心病心绞痛的常规化药联合使用, 既能缓解症状又能改善预后[12,13]。

虽然临床未有STDP与化药合用的不良反应案例报道, 但联合用药时药物–药物相互作用 (drug-drug interaction, DDI) 发生的可能性尚无系统研究。尽管基于细胞色素P450 (CYPs) 抑制和诱导是临床上代谢性DDI的主要原因, 但药物转运体介导的DDI仍不可避免[14]。CYPs主要表达于肝脏和小肠, 而转运体在全身各个器官中普遍表达, 可介导底物药物的吸收、分布、排泄, 以及通过介导底物药物的肝脏分布而间接影响药物代谢。药物可通过影响转运体的活性和表达, 从而影响内源性和外源性物质, 包括合用药物的体内处置[15]。

本文聚焦于转运体介导的DDI, 重点考察STDP对重要组织 (肠、肝、肾、心) 重要药物转运体的抑制作用, 以预测STDP通过抑制转运体而引起DDI的可能性。

材料与方法

试药和试剂 麝香通心滴丸 (STDP) 粉末 (过100目筛, 批号: 210410) 由内蒙古康恩贝药业有限公司提供; 甘氨酰肌氨酸 (Gly-Sar, 批号: G2416229)、*L*-肌肽 (*L*-carnosine, *L*-Car, 批号: D2403140)、Hoechst 33342 (批号: H2117214)、Rhodamine 123 (批号: F2411426)、依克立达 (批号: F2217258)、环孢素A (批号: C2429249)、瑞舒伐他汀钙 (批号: F2129357)、4-Di-1-ASP (批号: D2109163)、维拉帕米 (批号: F23271472)、吲哚美辛 (批号: C1624098)、6-羧基纤维素 (批号: G2222137)、丙磺舒 (批号: G2220920)、西咪替丁 (批号: G1912154)、阿替洛尔 (批号: A2305243)、普鲁卡因胺 (批号: B2428214)、奎尼丁 (批号: G2227342)、米屈肼 (批号: H2203494)、麦角硫因 (批号: E2421048)、环磷酸鸟苷 (批号: C2504190) 购自上海阿拉丁生化科技公司; 利福平 (批号: MKCR0642)、*N*-甲基-4-苯基吡啶鎓碘化物 (MPP^+, 批号: CUGR0645) 购自美国Sigma-Aldrich公司; 氘代左旋肉碱 (批号: S395901, > 98%) 购自Cambridge Isotope Laboratories; DMEM培养基、RPMI-1640培养基、DMEM-F12培养基购自上海逍鹏生物科技有限公司; 胎牛血清购自美国Gibco公司; Triton X-100购自碧云天生物技术研究所; 其余试剂均为国产色谱纯或分析纯。

主要仪器 液质联用仪 (Agilent1290/6460 Triple Quad), 美国Agilent公司; 离心浓缩系统 (Centri Vap-E111201), 美国Labconco公司; 倒置显微镜 (DMil), 德国Leica公司。

细胞与动物 本研究所用转基因细胞 (表1) 及各自的对照细胞模型pcDNA3.1(+) (以下简称“mock”) 均由本实验室构建[16-21]或保存。人结直肠腺癌细胞系 (Caco-2, 目录号: TCHu146) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。Caco-2、MDCK、HEK293细胞使用DMEM完全培养基 (含10%胎牛血清和1%青–链霉素, 下同), LLC-PK1细胞使用RPMI-1640完全培养基, CHO细胞使用DMEM/F-12完全培养基, 细胞置37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱中培养, 当细胞密度达到约90%时, 以0.25%胰酶消化传代。

雄性ICR小鼠, 体重约25 g, 购自杭州医学院实验

动物中心 [SPF 级, 动物许可证号: SCXK (浙) 2019-0002]。饲养环境温度 20～25 ℃, 湿度 50%～60%, 12 h 昼夜循环。小鼠适应饲养 3 天, 实验前禁食 12 h, 自由饮水。动物实验经浙江大学动物伦理委员会批准 (批件号: ZJU20230086)。

溶液配制 STDP 储备液: 称取 STDP 细粉 100 mg, 加入 1 mL DMSO 超声溶解, 配制为 100 mg·mL^{-1} STDP 储备液, 冻存于−20 ℃, 临用前用相应孵育液稀释至适当浓度。磷酸盐等渗缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS): 称取 NaCl、$Na_2HPO_4·12H_2O$、KCl、KH_2PO_4 适量, 加入超纯水超声溶解, 并定容至 1 L, 调节 pH 值至 7.4。Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS): 配方为 NaCl、$NaHCO_3$、$Na_2HPO_4·12H_2O$、KCl、KH_2PO_4、$MgSO_4·7H_2O$、$CaCl_2$、HEPES、glucose。MES 缓冲液 (2-morpholinoethanesulphonic acid, MES): 在 HBSS 配方基础上, 用 MES 代替 HEPES, 并用 NaOH 调节 pH 值至 6.0。KRH 缓冲液 (Krebs-Ringer-Henseleit buffer solution, KRH): 配方为 NaCl、KCl、KH_2PO_4、$MgSO_4·7H_2O$、$CaCl_2$、HEPES、glucose。人工摄取缓冲液 (artificial uptake buffer, AUB): 配方为 KCl、KH_2PO_4、$MgSO_4·7H_2O$、$CaCl_2$、HEPES、glucose。在 1 L AUB 体系基础上加入 NH_4Cl 混匀即得含有 30 mmol·L^{-1} NH_4Cl 的 AUB。上述溶液配制后均以 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 4 ℃保存。

STDP 对转运体的抑制研究 通过细胞对转运体经典底物的积聚实验, 评估 STDP 对转运体的抑制作用。将 Caco-2 细胞、稳定表达人源转运体的转基因细胞及各自的 mock 细胞, 以每孔 $1×10^5$ 密度接种于 24 孔板, 继续培养 48 h 后进行积聚抑制实验。主要信息见表 1, 具体过程如下: 吸弃培养基, 细胞以 37 ℃预热的孵育液清洗两遍后, 加入孵育液, 37 ℃预孵育数分钟后, 对照组替换为 200 μL 含底物的孵育液, 抑制剂组替换为 200 μL 含底物和经典抑制剂或 STDP 的孵育液, 再孵育一定时间。孵育结束后迅速吸弃含药孵育液, 以冰冷的 PBS 清洗三遍。各孔加适量细胞裂解液, 轻轻摇匀使裂解液充分覆盖细胞, −80℃冻存待测。

MATE1 和 MATE2-K 为外排转运体, 在 MDCK-hMATE1、MDCK-hMATE2-K 细胞积聚实验过程中, 先加入 200 μL 含 30 mmol·L^{-1} NH_4Cl 的 AUB 溶液预孵育 20 min, 可逆转转运方向, 随后替换为 200 μL 常规 AUB 预孵育, 最后以对应的含药孵育液进行积聚实验。

荧光底物的测定 细胞裂解液中的荧光底物采用荧光法测定。将转基因细胞及各自的 mock 细胞裂解液室温解冻后, 反复吹打使细胞充分裂解, 13 000 r·min^{-1} 离心 5 min 去除泡沫。分别吸取各细胞裂解液 150 μL, 在相应的激发波长 (λ_{ex}) 和发射波长 (λ_{em}) 下测定荧光强度: Hoechst 33342 (λ_{ex} 355 nm、λ_{em} 460 nm); Rhodamine 123 (λ_{ex} 485 nm、λ_{em} 535 nm); ASP^+ (λ_{ex} 475 nm、λ_{em} 605 nm); 6-CFL (λ_{ex} 492 nm、λ_{em} 525 nm)。同时以 BCA 法测定各孔蛋白浓度, 以荧光强度与蛋白浓度的比值评估各转基因细胞的底物积聚。

非荧光底物的测定 将 Caco-2、转基因细胞及各自的 mock 细胞裂解液室温解冻后, 反复吹打使细胞充分裂解, 13 000 r·min^{-1} 离心 5 min 去除泡沫。分别吸取 50 μL 裂解液, 加入 250 μL 乙腈溶液 (含内标, 具体内标列于表 2), 涡旋振荡 5 min, 于 4 ℃、13 000 r·min^{-1} 离心 10 min, 取上清 150 μL 进行 UPLC-MS/MS 测定, 同时以 BCA 法测定各孔蛋白浓度。测定甘氨酰肌氨酸、环磷酸鸟苷、MPP^+、阿替洛尔、普鲁卡因胺、麦角硫因和 d_3-*L*-Car

Table 1 The specific accumulation mode of genetically modified cells. d_3-*L*-Car: Deuterated *L*-carnitine

Cell/transporter	Incubation medium	Substrate/μmol·L^{-1}	Inhibitor/μmol·L^{-1}	Pre-incubation/ incubation time/min	Lysate agent
PEPT1 (Caco-2)	HBSS	Gly-Sar/20	*L*-Carnosine/500	15/20	0.1% SDS 100 μL
OATP2B1 (Caco-2)	HBSS	Rosuvastatin/2	Rifampicin/200	5/5	0.1% SDS 100 μL
MDCK-hBCRP	HBSS	Hoechst 33342/10	Elacridar/10	30/90	0.5 mol·L^{-1} NaOH 200 μL
LLC-PK1-hMDR1	HBSS	Rhodamine 123/5	Ciclosporin A/100	30/90	0.5 mol·L^{-1} NaOH 200 μL
CHO-hOATP1B1	HBSS	Rosuvastatin/2	Rifampicin/200	5/5	0.1% SDS 100 μL
CHO-hOATP1B3	HBSS	Rosuvastatin/2	Rifampicin/200	5/5	0.1% SDS 100 μL
HEK293-hOCT1	HBSS	ASP^+/10	Verapamil/200	5/5	0.5 mol·L^{-1} NaOH 200 μL
MDCK-hOAT2	HBSS	cGMP/20	Indomethacin/200	15/5	0.1% SDS 100 μL
HEK293-hOCT2	HBSS	ASP^+/10	Verapamil/200	5/5	0.5 mol·L^{-1} NaOH 200 μL
MDCK-hOAT1	HBSS	6-CFL/5	Probenecid/200	10/3	0.5 mol·L^{-1} NaOH 200 μL
HEK293-hOAT3	HBSS	6-CFL/5	Probenecid/200	10/3	0.5 mol·L^{-1} NaOH 200 μL
CHO-OAT4	MES	6-CFL/5	Probenecid/200	10/3	0.5 mol·L^{-1} NaOH 200 μL
MDCK-hMATE1	AUB	MPP^+/10	Cimetidine/100	5/3	0.1% SDS 100 μL
MDCK-hMATE2-K	AUB	MPP^+/10	Cimetidine/100	5/3	0.1% SDS 100 μL
MDCK-hOCTN1	KRH	Ergothioneine/3	Quinidine/500	10/2	0.1% SDS 100 μL
MDCK-hOCTN2	KRH	d_3-*L*-Car/2	Mildronate/200	10/2	0.1% SDS 100 μL
MDCK-hOCT3	HBSS	ASP^+/10	Verapamil/200	5/5	0.5 mol·L^{-1} NaOH 200 μL

的色谱柱为Waters X-Bridge™ BEH HILIC柱 (50 mm × 2.1 mm, 2.5 μm); 测定瑞舒伐他汀的色谱柱为Agilent ZORBAX Extend-C_{18}柱 (50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); 柱温30 ℃; 流动相A (含0.1%甲酸的10 mmol·L^{-1}甲酸铵水溶液), B (含0.1%甲酸的乙腈); 流速0.2 mL·min^{-1}; 进样量2 μL, ESI+, 其他质谱参数列于表2。

Table 2 Mass spectrum parameters of substrates and internal standard

Substrate	Internal standard	*m/z*	Fragmentor voltage/V	Collision energy/eV
Gly-Sar	MPP^+	146.9/90.0	75	8
Rosuvastatin	Loratadine	482.1/258.2	135	35
cGMP	MPP^+	346.0/152.0	110	16
MPP^+	Loratadine	170.0/128.0	100	30
Atenolol	Loratadine	267.2/145.0	100	22
Procainamide	Loratadine	236.1/163.1	80	15
Eergothioneine	MPP^+	230.2/127.0	95	16
d_3-*L*-Car	MPP^+	165.2/63.2	115	15
MPP^+ (IS-a)	/	170.0/128.0	100	30
Loratadine (IS-b)	/	383.1/337.1	170	20

小鼠灌胃STDP后的血浆、肝肾提取液对临床联用底物药物的抑制 小鼠禁食12 h后, 以0.064和0.32 g·kg^{-1}剂量灌胃STDP (约临床2倍和10倍日等效剂量), 采集给药后5 min的血液 (肝素抗凝)、肝和肾组织。称取肝和肾各200 mg, 分别加入AUB缓冲液1 mL, 制成匀浆。分别取肝、肾匀浆和血浆200 μL, 加400 μL乙腈沉淀蛋白, 13 000 r·min^{-1}离心10 min后, 取上清以离心浓缩仪挥干溶剂。残渣加200 μL AUB缓冲液复溶, 涡旋振荡5 min, 4 ℃、13 000 r·min^{-1}离心15 min, 上清液即为2倍和10倍临床等效剂量的血浆、肝脏、肾脏提取液。阿替洛尔和普鲁卡因胺底物的浓度为10 μmol·L^{-1}。

数据处理 实验数据使用GraphPad Prism 8.0.2统计分析和作图, 以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间的差异分析采用One-way ANOVA (Dunnett's多重比较检验) 统计方法进行。$P < 0.05$时, 认为差异有统计意义。

结果

1 STDP对肠道重要转运体的抑制作用

摄取转运体PEPT1、OATP2B1、OCT1和外排转运体MDR1、BCRP等是肠道上皮细胞表达较高的转运体 (图1A), 可介导底物药物的摄取和外排, 从而影响其口服吸收。Caco-2细胞上表达多种转运体, 由于无法获得PEPT1和OATP2B1的转基因细胞模型, 本研究以Caco-2细胞为PEPT1和OATP2B1研究模型[22,23]。OCT1为肝细胞表达最高的转运体, 将在“STDP对肝脏重要转运体的抑制研究”中介绍。

如图2所示, PEPT1的经典底物/抑制剂*L*-肌肽显

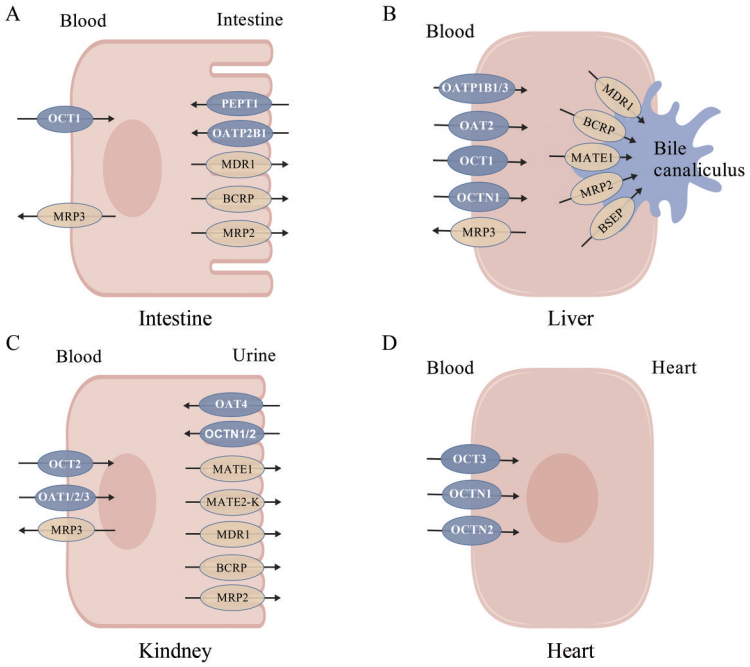


Figure 1 Transporters with relatively high expression levels in human intestinal epithelial cells (A), hepatocytes (B), renal tubular cells (C) and cardiomyocytes (D). OCT: Organic cation transporter; MRP: Multidrug resistance protein; PEPT1: Oligopeptide transporter 1; OATP: Organic anion transporting polypeptide; MDR1: Multidrug resistance protein 1; BCRP: Breast cancer resistance protein; OAT: Organic anion transporter; OCTN: Carnitine/organic cation transporters; MATE: Multidrug and toxin extrusion protein; BSEP: Bile salt export pump

著抑制 Caco-2 细胞对 PEPT1 工具底物甘氨酰肌氨酸的摄取, OATP2B1 的经典抑制剂利福平显著抑制 Caco-2 细胞对 OATP2B1 底物瑞舒伐他汀的摄取, 而 STDP 8～1 000 μg·mL^{-1}未明显抑制 PEPT1 和 OATP2B1 对底物药物的摄取。MDCK-hBCRP、LLC-PK1-hMDR1 细胞功能验证良好, 其对各自经典底物 Hoechst 33342、罗丹明 123 的积聚量分别是相应 mock 细胞的 30% 和 20%, 且各自经典抑制剂 GF120918、环孢素 A 可显著增加经典底物细胞内积聚, 但 STDP 8～1 000 μg·mL^{-1}未明显增加 BCRP 和 MDR1 经典底物的细胞内积聚。上述结果提示, STDP 对 PEPT1、OATP2B1、BCRP 和 MDR1 未产生明显抑制。

2 STDP 对肝脏重要转运体的抑制作用

摄取转运体 OATP1B1/1B3、OAT2、OCT1、OCTN1 和外排转运体 MDR1、BCRP、MATE1 等是肝细胞中表达量较高的转运体 (图 1B), 可介导底物药物摄取至肝细胞和外排至胆小管/血液。MDR1 和 BCRP 已在“STDP 对肠道重要转运体的抑制作用”中考察。此外, 因 OCTN1 和 MATE1 分别是心脏和肾脏表达较高的转运体, 分别在肾脏和心脏转运体抑制中进行考察。

如图 3 所示, CHO-hOATP1B1、CHO-hOATP1B3、HEK293-hOCT1、MDCK-hOAT2 细胞功能验证良好, 其对各自经典底物 (OATP1B1/3 底物瑞舒伐他汀; OCT1 底物 ASP$^+$; OAT2 底物 cGMP) 的摄取能力分别约为相应 mock 细胞的 1.5、1.5、15、70 倍, 给予各转运体的经典抑制剂 (OATP1B1/3 抑制剂利福平; OCT1 抑制剂维拉帕米; OAT2 抑制剂吲哚美辛) 可使转基因细胞中底物积聚量降低至 mock 细胞水平。STDP 8、40 μg·mL^{-1}对 OATP1B1、OATP1B3 经典底物的摄取未产生明显抑制, STDP 200 μg·mL^{-1}产生微弱的抑制 (抑制率约为 25%); STDP 8～200 μg·mL^{-1}对 OCT1、OAT2 的经典底物摄取未显示抑制。上述结果提示, STDP 对肝脏重要摄取型转运体 OATP1B1/3、OCT1、OAT2 未产生明显抑制。

3 STDP 对肾脏重要转运体的抑制作用

摄取转运体 OCT2、OAT1/2/3、OAT4、OCTN1/2 和外排转运体 MATE1/2-K、MDR1、BCRP 等是肾小管上皮细胞表达较高的转运体 (图 1C), 可介导底物药物的主动分泌和重吸收。MDR1 和 BCRP 已在“STDP 对肠道重要转运体的抑制作用”项下考察, OAT2 已在“STDP 对肝脏重要转运体的抑制作用”项下考察, OCTN1/2 在后续“STDP 对心脏重要转运体的抑制作用”项下考察。

如图 4 所示, HEK293-hOCT2、MDCK-hOAT1、HEK293-hOAT3、CHO-hOAT4、MDCK-hMATE1、MDCK-hMATE2-K (经预处理逆转为摄取) 细胞功能良好, 其对经典底物 (OCT2 底物 ASP$^+$; OATs 底物 6-CFL; MATEs 底物 MPP$^+$) 的摄取能力分别约是 mock 细胞的 5、40、

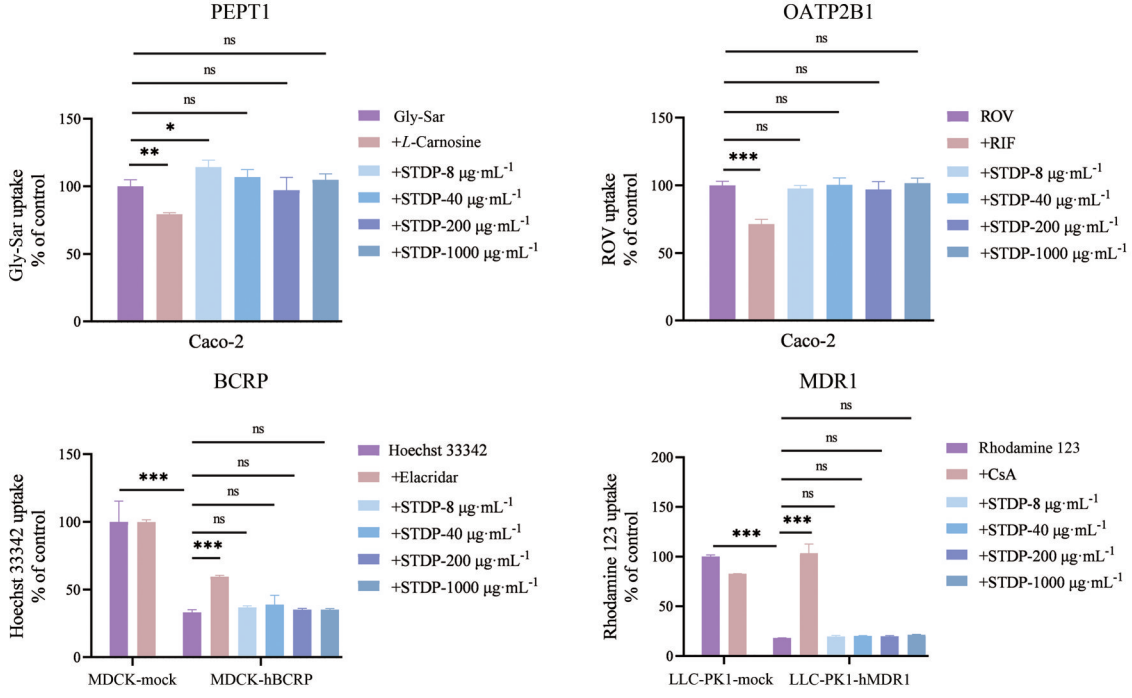


Figure 2 Effects of Shexiang Tongxin Dropping Pill (STDP) on the cellular accumulation of typical substrates of PEPT1, OATP2B1, BCRP and MDR1 transporters. Data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. ROV: Rosuvastatin; RIF: Rifampicin; CsA: Cyclosporin A; ns: Not significant

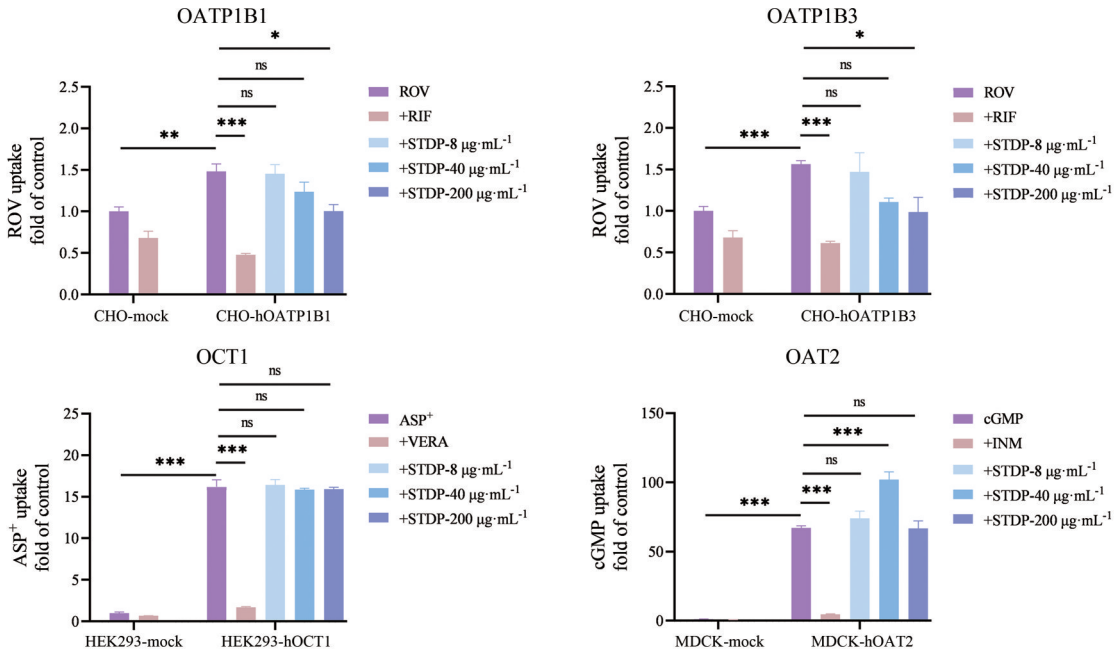


Figure 3 Effects of STDP on the cellular accumulation of typical substrates of OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OAT2 transporters. Data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. VERA: Verapamil; cGMP: Cyclic guanosine monophosphate; INM: Indomethacin

6、8、20、4倍, 给予各自的经典抑制剂 (OCT2: 维拉帕米; OATs: 丙磺舒; MATEs: 西咪替丁) 可使转基因细胞中的底物积聚量降低至mock细胞水平。STDP 40 μg·mL^{-1}可抑制OCT2、OAT3、MATE1、MATE2-K转基因细胞对经典底物的摄取, 抑制率分别约为20%、50%、50%、25%, STDP 200 μg·mL^{-1}抑制率增加; STDP 8～200 μg·mL^{-1}对OAT1、OAT4的底物积聚无明显抑制。上述结果提示, STDP对肾脏转运体OCT2、OAT3、MATE1/2-K有一定程度的抑制。

虽然STDP对某些转运体有一定程度抑制, 但临床常与其联用的药物, 如美托洛尔、尼可地尔、伊伐布雷定、瑞舒伐他汀钙等均非这些转运体底物, 为进一步探究STDP对临床潜在合用药物肾排泄的影响, 本研究选择阿替洛尔和普鲁卡因胺进行研究。阿替洛尔为治疗高血压的β-受体阻滞剂, 不经肝脏代谢, 大部分以原型经肾排泄。阿替洛尔为hOCT2、hMATE1和hMATE2-K亲和力较高的底物, K_m值分别为280 ± 4、32 ± 5和76 ± 14 μmol·L^{-1} [24,25]。普鲁卡因胺为抗心律失常药物, 约50%～60%以原型经肾排泄。普鲁卡因胺为hOCT2、hMATE1和hMATE2-K的底物, 但K_m均大于1 000 μmol·L^{-1} [24,26]。阿替洛尔的肾小管分泌占总清除率的28.6%, 普鲁卡因胺的肾小管分泌占总清除率的30%以上, 均超过《ICH协调指导原则M12: 药物相互作用研究》要求的25%, 因此进一步考察OCT2、MATE1/2-K肾小管分泌转运体对阿替洛尔和普鲁卡因胺转运及STDP的抑制作用。STDP临床联用药物中少有OAT3的优良底物, 因此本研究未考察STDP对OAT3摄取底物药物的抑制。

如图5所示, 阿替洛尔在HEK293-hOCT2、MDCK-hMATE1、MDCK-hMATE2-K细胞中的积聚分别约是mock细胞的6、70、25倍; 普鲁卡因胺在上述细胞中的积聚分别约为mock细胞的2、2、2倍, 各转运体的经典抑制剂可使转基因细胞中两者的积聚量降低至mock细胞水平。STDP 40 μg·mL^{-1} (按临床日等效剂量换算) 未明显抑制OCT2对阿替洛尔、OCT2对普鲁卡因胺、MATE2-K对普鲁卡因胺的摄取, 但可抑制MATE1对阿替洛尔、MATE1对普鲁卡因胺、MATE2-K对阿替洛尔的摄取, 抑制率分别约为40%、40%、25%。

口服STDP后, 需经肠道吸收/代谢、肝脏代谢等一系列过程, 因此其在体内成分和STDP本身会有很大的差异。为综合考察体内STDP多成分及其可能的代谢物对MATE1/2-K转运体的抑制作用, 本研究探究小鼠灌胃STDP后血浆和肝、肾提取液对MATE1/2-K的抑制作用。

经前期预实验, 小鼠灌胃SDTP后5 min多数成分在血浆和肝脏中即可达C_{max}, 故选择5 min为血浆和肝肾组织的采集时间。如图6所示, 小鼠灌胃2倍日等效剂量后的血浆、肝、肾提取液, 均未明显抑制MATE1、MATE2-K对阿替洛尔、普鲁卡因胺的摄取 (肝组织无MAET2-K表达, 故未考察肝提取液的影响); 10倍等效

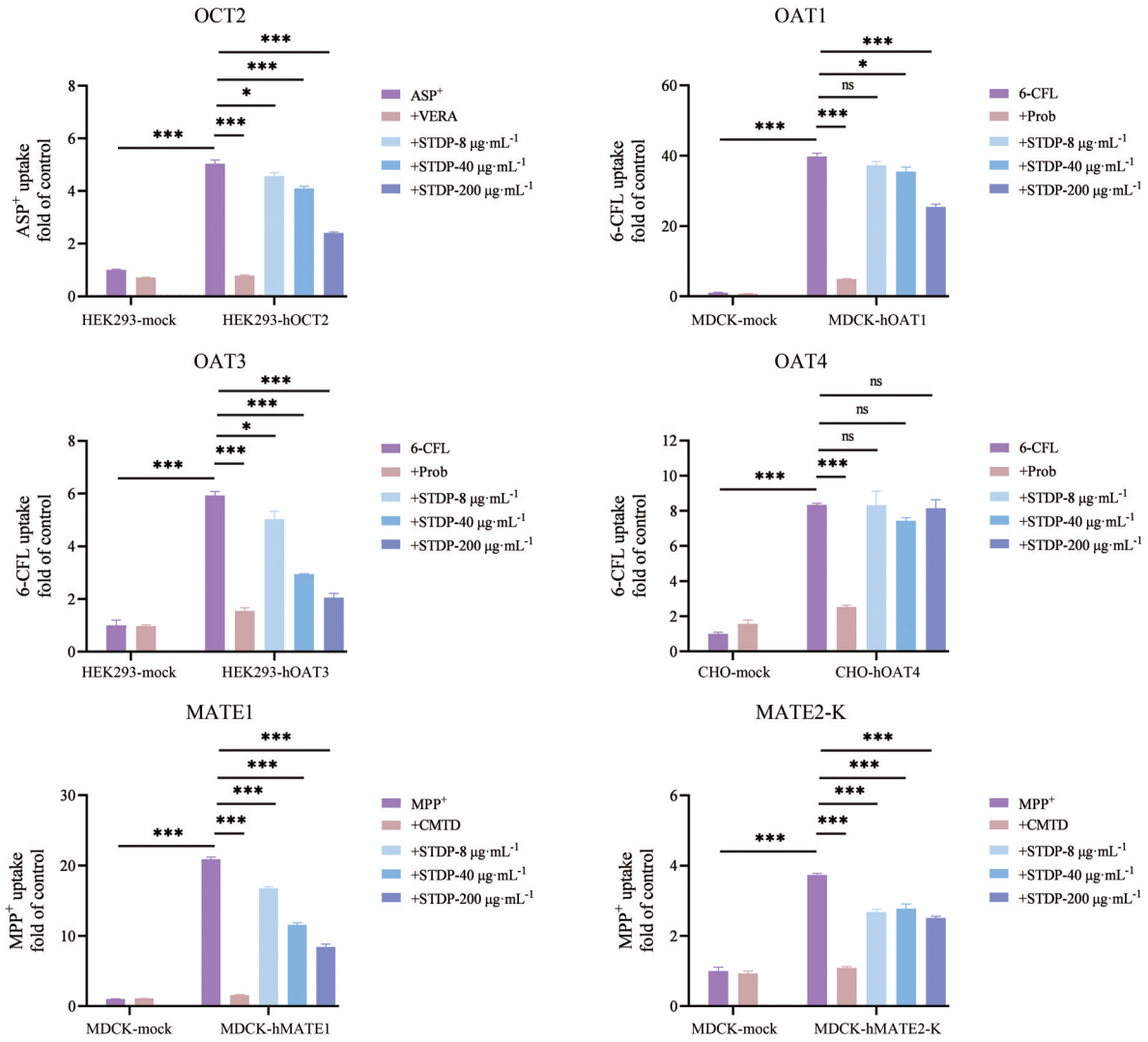


Figure 4 Effects of STDP on the cellular accumulation of typical substrates of OCT2, OAT1, OAT3, OAT4, MATE1 and MATE2-K transporters. Data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$. 6-CFL: 6-Carboxyfluorescein; Prob: Probenecid; CMTD: Cimetidine

剂量灌胃后的小鼠肝、肾提取液对MDCK-hMATE1细胞摄取阿替洛尔有一定程度的抑制, 但抑制率也仅约20%。因此, 推测临床剂量下, STDP影响阿替洛尔和普鲁卡因胺肾排泄的可能性不大。

4 STDP对心脏重要转运体的抑制研究

OCTN1、OCTN2和OCT3是心肌细胞中表达量较高的转运体 (图1D), 可将底物药物摄取入心肌细胞。因STDP常与心血管系统药物联用, 本研究考察STDP对OCTN1、OCTN2和OCT3的抑制作用。

如图7示, MDCK-hOCTN1、MDCK-hOCTN2和MDCK-hOCT3细胞功能良好, 其对经典底物麦角硫因、左旋肉碱和ASP^+的摄取分别约是相应mock细胞的120、60、10倍, 各自的经典抑制剂可明显抑制底物摄取。STDP 8和40 μg·mL^{-1}对OCTN1、OCTN2、OCT3的底物摄取未显示明显抑制, STDP 200 μg·mL^{-1}可抑制OCTN2对左旋肉碱、OCT3对ASP^+的摄取, 但抑制率仅分别约50%、20%。

讨论

本研究系统考察了STDP对肠道、肝脏、肾脏和心脏共17种细胞膜转运体的抑制作用, 发现STDP 40 μg·mL^{-1}可抑制肾脏阳离子转运系统 (OCT2、MATE1/2-K) 对经典底物的摄取和外排, 对其余14种转运体无明显抑制。因临床常与STDP联用的药物并非OCT2、MATE1/2-K底物, 选择了可能与其联用, 且经肾脏阳离子系统主动分泌的阿替洛尔和普鲁卡因胺进行研究, 发现STDP仅抑制MATE1摄取阿替洛尔和普鲁卡因胺, 以及MATE2-K摄取阿替洛尔, 对OCT2

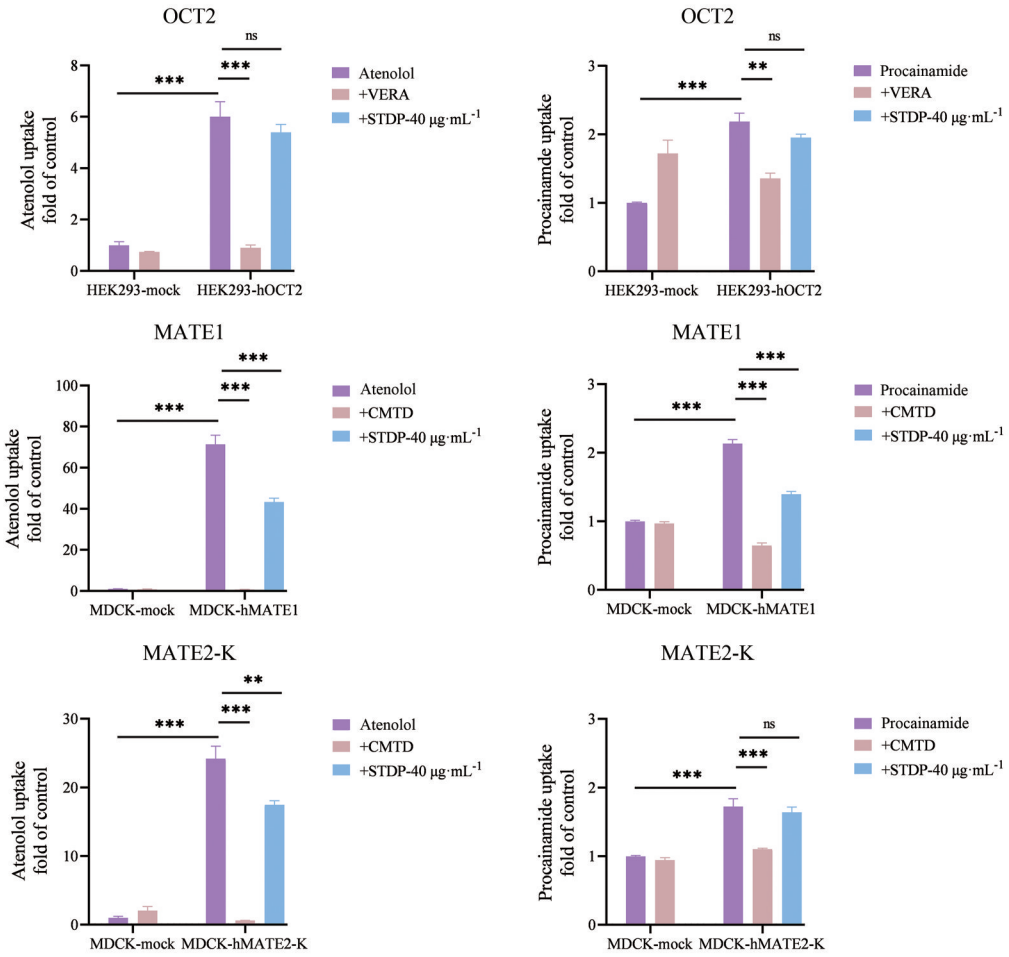


Figure 5 Effects of STDP 40 μg·mL^{-1} on the cellular accumulation of atenolol and procainamide mediated by OCT2, MATE1 and MATE2-K transporters. Data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

介导的上述两药物摄取无明显抑制; 最后研究发现, 小鼠灌胃 2 倍日等效剂量 STDP 后的血浆、肝、肾提取液对 MATE1/2 转运上述两药无明显抑制, 10 倍剂量时最高也仅显示 20% 的抑制。本研究结果提示, 临床剂量下, STDP 通过抑制肠、肝、肾和心脏的重要转运体, 而产生有临床意义 DDI 的可能性不大。

尽管 CYPs 介导的 DDI 是临床代谢性 DDI 的主要原因, 但转运体介导的 DDI 仍不可忽视[27,28], 因而各国药品监管部门要求创新药物研发时需研究转运体介导的 DDI。因转运体种类多, 美国 FDA 和中国 NMPA 要求重点考察的转运体有 P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 和 MATE2-K。本研究围绕与药物吸收、代谢和排泄相关的肠、肝、肾重要转运体, 以及和可能联用的心血管系统药物心脏分布相关的重要转运体展开研究。

中药成分复杂, 很难对每一成分进行研究, 而且即便进行了单一成分研究, 也不可能说明整体情况, 因而本研究首先探究了 STDP 制剂对重要转运体对经典底物转运的抑制作用, 进而探究其对相关转运体介导的潜在联用的底物药物处置的影响。由于 STDP 为口服制剂, 口服后需经吸收、代谢, 因此前述以 STDP 制剂进行体外研究有较大的局限性, 因而本研究以小鼠灌胃 2 倍和 10 倍临床日等效剂量后的血浆、肝、肾提取液进行体外抑制研究。

本研究按《ICH 协调指导原则 M12: 药物相互作用研究》(2024 年版) 要求, 设置 STDP 浓度。在肠道转运体考察中[29], 按 STDP 日口服剂量 210 mg 估算, 肠腔内的最大理论浓度 C_{gut} = [210 mg] / [250 mL] = 840 μg·mL^{-1}, 即 IC_{50} < 84 μg·mL^{-1} (C_{gut} / IC_{50} > 10) 时, 认为 STDP 对 P-gp、BCRP 等肠道转运体产生抑制, 因此设置 STDP 的系列浓度为 8、40、200、1 000 μg·mL^{-1}。在肝脏转运体考察中, 按成人全身总循环血量约 5 L 估算, 如 STDP 完全吸收, 血浆中的最大浓度 C_{max} = [210 mg] / [5L] = 42 μg·mL^{-1}, 将 C_{max} 作为进入肝门静脉处最大浓度 $C_{max,in}$, 设置 STDP 的系列浓度为 8、40、200 μg·mL^{-1}。STDP 在体内对 OAT、OCT 和 MATE 转运体产生抑制作用, 设

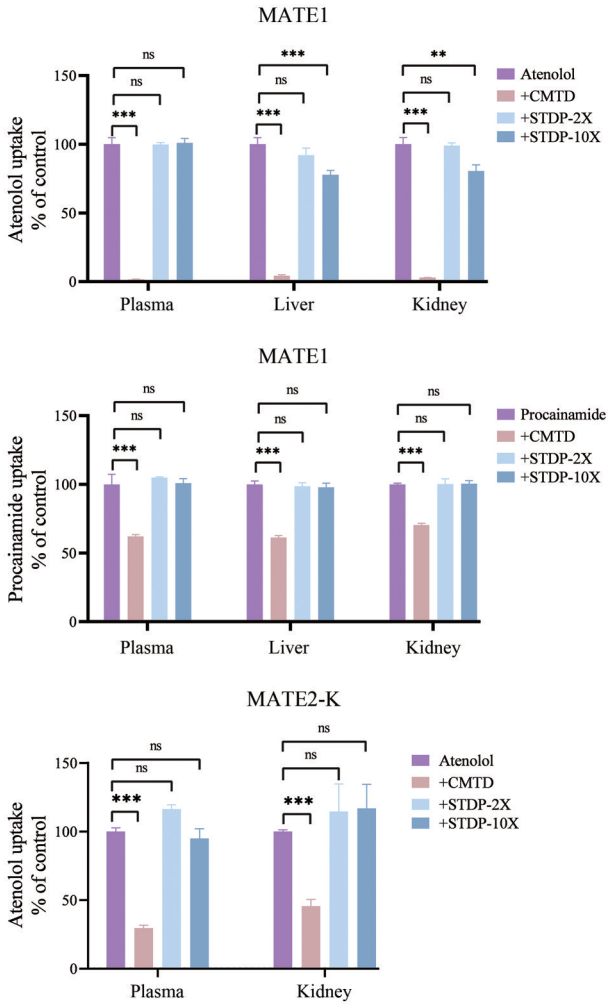


Figure 6 Effects of extracts from plasma, liver and kidney of mice given with STDP on the cellular accumulation of atenolol and procainamide, substrate drugs of MATE1 and MATE2-K transporters. Mice were orally administered with 2- or 10-folds clinical equivalent doses of STDP. The effect of liver extract on MATE2-K was not studied due to no MATE2-K in liver. Data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

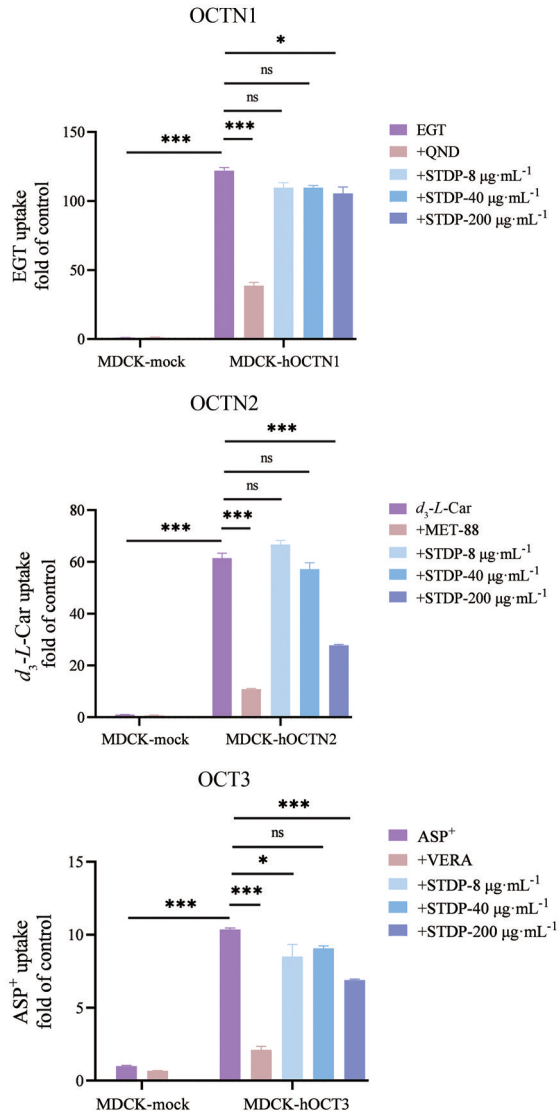


Figure 7 Effects of STDP on the cellular accumulation of typical substrates of OCTN1, OCTN2 and OCT3 transporters. Data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$. EGT: Ergothioneine; QND: Quinidine; MET-88: Mildronate

置STDP的系列指导原则外的转运体研究亦参考上述浓度。与大鼠比较, 小鼠代谢酶 (如CYP3A、UGT) 与人类更接近, 故选择小鼠血浆和肝肾提取液进行后续研究。本研究使用含STDP的小鼠血浆及肝肾提取液作为体内−体外关联研究, 以改善传统中药DDI研究仅针对单一成分或提取物的局限性。

由于P-gp分布广、底物多, 因此临床上以P-gp介导的DDI更为常见。因肠道中P-gp高表达, 且STDP为口服制剂, 其在肠道中浓度高, 但即使STDP高达1 000 μg·mL^{-1}, 对P-gp仍未显示明显抑制。虽然MRP2/3在肠道等组织也有较高表达, 但由于本实验室目前尚缺相应的转基因细胞模型, Caco-2等细胞系上MRP2/3的表达低, 不适合研究, 故本文未进行考察。

药物的体内相互作用是一个复杂的过程, 尤其是中药复方制剂, 体外实验较难模拟人体复杂内环境对转运体功能的动态调节网络[30]。因此, 在体外实验预测STDP可能发生的转运体抑制基础上, 仍需要临床上长期监测与持续评估STDP与药物联用的相互作用。

作者贡献: 赵洁平负责实验设计、实施, 数据分析整理及论文撰写; 卢双慧、袁略翔负责部分实验操作; 陈秀参与数据分析; 张恒斌参与统计分析等; 周慧对研究思路及论文修改

提供了宝贵意见; 蒋惠娣提出课题思路和研究方案, 并进行论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol IV. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 1896.

[2] Xiong M, Jia C, Cui J, et al. Shexiang Tongxin Dropping Pill attenuates atherosclerotic lesions in ApoE deficient mouse model [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 159: 84-92.

[3] Wang Y, Wang T, Ma T, et al. Shexiang Tongxin Dropping Pill alleviates myocardial injury induced by coronary microembolization by down-regulating APOC1 to inhibit STAT3 signaling pathway [J]. Aging (Albany NY), 2024, 16: 8484-8496.

[4] Yan J, Liu H, Shang J, et al. Protective effects of Shexiang-Tongxin Dropping Pill against acute myocardial infarction in rats through inhibition of apoptosis and ERK/MAPK signaling pathways [J]. Heliyon, 2024, 10: e39939.

[5] Han Y, Tie C, Shen N. Effect of Shexiang Tongxin Dripping Pills on coronary flow reserve in patients with coronary slow flow phenomenon [J]. Chin J Gen Pract (中华全科医学), 2024, 22: 1530-1532.

[6] Pan Y, Wang Z. A study on the effect of the combination of Shexiang Tongxin Dropping Pills and metoprolol in the treatment of coronary heart disease with angina pectoris in the elderly [J]. Chin J Mod Drug Appl (中国现代药物应用), 2024, 18: 130-132.

[7] Zheng W, Wu R. Efficacy of Shexiang Tongxin Dripping Pills in the treatment of microvascular angina pectoris and its clinical safety [J]. Chin Heal Stand Manag (中国卫生标准管理), 2024, 15: 160-163.

[8] Yang Y, Ma W, Zhang C. Effect of Shexiang Tongxin Diwan combined with rosuvastatin in the treatment of coronary heart disease complicated with hypercholesterolemia and its influence on liver function [J]. Med Innov China (中国医学创新), 2024, 21: 24-28.

[9] Cai Y. Analysis of the efficacy of dynamic guidance of Shexiang Tongxin Diwan combined with amlodipine besylate tablets in patients with hypertension and coronary heart disease under the concept of general practice [J]. Chin Foreign Med Treat (中外医疗), 2024, 43: 80-83.

[10] Wu Y, Lin Y, Fu H. Impact of adipokine metabolism on coronary microvascular dysfunction and clinical application value of Shexiang Tongxin Dropping Pills [J]. Acad J Nav Med Univ (海军军医大学学报), 2024, 45: 1250-1258.

[11] Tong Y. The influence of musk heart-passing dropping pills combined with clopidogrel bisulfate tablets on the efficacy and safety of patients with acute coronary syndrome after PCI surgery [J]. Chin J Clin Ration Drug Use (临床合理用药), 2024, 17: 55-58.

[12] Pan J, Wang Z, Wang X. Pharmacoeconomic evaluation of Shexiang Tongxin Dropping Pills combined with conventional Western medicine treatment for coronary heart disease by Markov model [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 1832-1838.

[13] Pan J, Zhou J, Wang X. Meta-analysis of efficacy and safety of Shexiang Tongxin Dripping Pills combined with conventional therapy of coronary heart disease [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 2325-2332.

[14] Saravanakumar A, Sadighi A, Ryu R, et al. Physicochemical properties, biotransformation, and transport pathways of established and newly approved medications: a systematic review of the top 200 most prescribed drugs *vs*. the FDA-approved drugs between 2005 and 2016 [J]. Clin Pharmacokinet, 2019, 58: 1281-1294.

[15] Schroeter T, Lapham K, Varma MVS, et al. Positioning enzyme- and transporter-based precipitant drug-drug interaction studies in drug design [J]. J Med Chem, 2025, 68: 1021-1032.

[16] Sun S, Wang K, Lei H, 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.

[17] Yang X, Ma Z, Zhou S, et al. Multiple drug transporters are involved in renal secretion of entecavir [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60: 6260-6270.

[18] Bai M, Ma Z, Sun D, et al. Multiple drug transporters mediate the placental transport of sulpiride [J]. Arch Toxicol, 2017, 91: 3873-3884.

[19] Talap J, Shen Z, Nie J, et al. The characterisation of the *in vitro* metabolism and transport of 6-hydroxykynurenic acid, an important constituent of *Ginkgo biloba* extracts [J]. Xenobiotica, 2021, 51: 513-521.

[20] Zhang Y, Chen Y, Dai B, et al. Bilirubin reduces the uptake of estrogen precursors and the followed synthesis of estradiol in human placental syncytiotrophoblasts *via* inhibition and down-regulation of organic anion transporter 4 [J]. Drug Metab Dispos, 2022, 50: 341-350.

[21] Wang Y, Wang Y, Fang Y, et al. SND1 regulates organic anion transporter 2 protein expression and sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil [J]. Drug Metab Dispos, 2024, 52: 997-1008.

[22] Kabeya T, Mima S, Imakura Y, et al. Pharmacokinetic functions of human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2020, 35: 374-382.

[23] Ci X, Wang Z, Li Y, et al. Expression of drug transporters mRNA in Caco-2 cells and its viability evaluation [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2018, 41: 980-985.

[24] Nies AT, Damme K, Kruck S, et al. Structure and function of

multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) and their relevance to drug therapy and personalized medicine [J]. Arch Toxicol, 2016, 90: 1555-1584.

[25] Tsang YP, Rodriguez AG, Warren MS, et al. Identification of selective substrates and inhibitors of the major human renal uptake transporters [J]. Drug Metab Dispos, 2025, 53: 100046.

[26] Sato T, Masuda S, Yonezawa A, et al. Transcellular transport of organic cations in double-transfected MDCK cells expressing human organic cation transporters hOCT1/hMATE1 and hOCT2/hMATE1 [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76: 894-903.

[27] Zhou Y, Wu X, Deng Y. Effect of cooperation between transporters and metabolic enzymes on drug disposition by intestine and liver [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2020, 55: 1762-1767.

[28] Zhou Q, Yu LS, Zeng S. Personalized dosing from perspective of pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2017, 52: 1-7.

[29] Dong ML, Luo J, Jiang HD, et al. Research progress on the changes and mechanism of intestinal drug transporters in inflammatory bowel disease [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 943-951.

[30] Wu X, Ma J, Ye Y, et al. Transporter modulation by Chinese herbal medicines and its mediated pharmacokinetic herb-drug interactions [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1026: 236-253.