

聚合物辅料对 P-糖蛋白抑制机制的研究进展

黄雷鸣¹, 赵锦花², 王国成², 周建平^{1*}

(1. 中国药科大学药剂学教研室, 江苏 南京 210009; 2. 天津天士力集团化学药物研究所, 天津 300402)

摘要: P-糖蛋白 (P-gp) 是一种能量依赖型的跨膜转运蛋白, 其介导的外排效应是药物传输和癌症治疗中的一个主要障碍。近年来的研究显示, 常用的聚合物辅料如 Pluronic 和 TPGS 等, 都对 P-gp 具有良好的抑制作用。由于此类抑制剂在提高药物生物利用度的同时不良反应极低, 因此研究其作用机制和构效关系对制剂研发具有重要意义。与传统小分子化合物的竞争性抑制机制不同, 聚合物辅料主要通过改变细胞膜流动性、抑制 P-gp ATP 酶活性、降低细胞内 ATP 水平或下调 P-gp 基因表达等方式影响 P-gp 的功能。本文综述了聚合物辅料对 P-gp 抑制作用的机制和构效关系, 并对研究方法进行了简单介绍。

关键词: P-糖蛋白; 抑制剂; 药用辅料; 抑制机制; 构效关系

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1224-08

Recent advance in the mechanism study of polymeric inhibitors of P-glycoprotein

HUANG Lei-ming¹, ZHAO Jin-hua², WANG Guo-cheng², ZHOU Jian-ping^{1*}

(1. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Chemical Drug R&D Center, Tasly Co., Ltd., Tianjin 300402, China)

Abstract: P-glycoprotein(P-gp) is an ATP-dependent multidrug efflux pump that acts as a major obstacle for oral drug delivery and cancer therapy. Recent reports have provided evidence that excipients often used in pharmaceutical formulations, such as Pluronic and TPGS, also have inhibitory effects on P-glycoprotein. Because inhibition of efflux transporters by polymeric inhibitors may dramatically increase the bioavailability of P-gp substrates with negligible side effects, identification of the mechanism and their structure activity relationship is therefore of significant importance for pharmaceutical development. Other than competitive inhibition for traditional inhibitors, polymeric inhibitors may modify P-gp function through alterations on membrane fluidity, inhibition of P-gp ATPase, depletion of intracellular ATP and down-regulating of P-gp expression. In the present review, the inhibition mechanism of potential polymeric inhibitors and their structure activity relationship will be discussed along with a brief introduction to the established methodologies.

Key words: P-glycoprotein; inhibitor; excipient; inhibition mechanism; structure activity relationship

P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 广泛分布于人体组织器官的上皮细胞以及血脑屏障中, 并在肿瘤细胞中过量表达。通过消耗 ATP 水解释放的能量, P-gp 能将药物从细胞膜中泵出, 阻止药物进入组织

器官, 从而降低药物的口服生物利用度或影响组织分布, 同时也是肿瘤细胞产生多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 的重要原因之一^[1, 2]。在过去的几十年间, 采用小分子化合物对 P-gp 的抑制研究已取得了长足的进步, 使得这些抑制剂的选择性不断提高, 毒性不断降低。然而, 这些抑制剂与药物的相互作用以及在体内的活性仍然是限制其临床运用的主要问题^[3, 4]。经典的 P-gp 抑制剂诸如维拉帕米 (verapamil)

收稿日期: 2010-05-20.

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项资助项目 (2009ZX09310-004).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271272, Fax: 86-25-83301606,

E-mail: zhoujianping60@163.com

和环孢素 (cyclosporin A) 等, 由于其明显的抑制效果, 仍在大量研究中作为阳性对照使用。而自从 Tween 和 Pluronic 等系列聚合物被确证具有抑制 P-gp 的功能后, 高分子聚合物用作 P-gp 抑制剂受到了广泛关注, 更多聚合物辅料对 P-gp 的抑制活性在体内外得到证实。由于其不良反应极低, 与传统的小分子抑制剂相比, 聚合物抑制剂在用药安全性方面具有独特的优势。目前, 将 P-gp 聚合物抑制剂 Pluronic 加入到抗癌药多柔比星 (doxorubicin) 处方中的新制剂 SP1049C 已进入 II 期临床试验阶段, 与多柔比星普通制剂相比, 显示了更加优越的抗癌效果^[5, 6]。这些聚合物抑制剂有望在将来的临床试验中大大提高生物药剂学分类系统 (biopharmaceutics classification system, BCS) III~IV 类药物的生物利用度。近年来, 对 P-gp 聚合物抑制剂的研究已经从简单筛选转向对其作用机制的深入研究, 本文将着重对这些机制进行介绍, 并对聚合物抑制剂的构效关系进行探讨。

1 P-糖蛋白的结构和作用机制

P-gp 本质上是一种 ATP 酶, 最早由 Juliano 等^[7]在中国仓鼠体内发现。它属于膜 ABC 转运结合盒 (ATP-binding cassette transporter) 超家族的一员, 由 MDR1 基因编码, 分子质量大约为 170 kDa。P-gp 由 1 280 个氨基酸组成一条分为两个半区的单链, 每个半区包含 6 个跨膜 (transmembrane, TM) 结构域和一个位于胞浆内的核苷酸结合 (nucleotide-binding, NB) 结构域。其中 TM 结构域识别底物并与之结合, 而 NB 结构域则与 ATP 结合, 两个部分由线性多肽易变区隔开^[8, 9]。

目前存在 3 种模型用以解释 P-糖蛋白的外排作用机制, 分别是经典泵模型 (classical pump model)、翻转酶模型 (flippase model) 以及疏水吸尘器模型 (hydrophobic vacuum cleaner model, HVC), 其中 HVC 模型是被普遍接受的一种假设。在 HVC 模型中, 亲脂性的底物首先通过分配机制进入细胞膜的磷脂双分子层中, 并积累到高浓度。当达到细胞内水相浓度的 300~2 000 倍时, 细胞膜中的底物将被 P-gp 识别, 并与 TM 结构域相结合。与此同时, 细胞内 ATP 开始水解释放能量, 生成的核苷酸与 P-gp 的 NB 结构域相互作用, 使 P-gp 的构象发生改变, 原先关闭的通道被打开, 从而将底物泵出细胞外^[10, 11]。通过此途径, P-gp 能够降低底物药物的口服生物利用度和组织分布, 并在肿瘤细胞中产生 MDR 效应, 限制了药物的疗效。

2 聚合物辅料对 P-gp 的抑制机制

对 P-gp 有抑制作用的聚合物辅料大多数为非离子表面活性剂, 除此之外, 还有聚乙二醇 [poly(ethylene glycol), PEG] 类、 β -环糊精衍生物 (β -cyclodextrins derivative)、树形聚合物 (dendrimers) 以及巯基聚合物 (thiomers) 等^[12, 13]。早期的研究主要集中在已上市的药用辅料, 如 Tween、Cremophor EL、PEG 和 Pluronic 等^[14-17], 随着研究的深入, 一些非药用级别的辅料以及实验室新合成的聚合物也被运用到体内外实验中并取得了较好的效果^[18-20]。目前 Pluronic P85 和聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸脂 [*D*- α -tocopheryl poly (ethylene glycol) 1000 succinate, TPGS 1000] 的研究最多, 同时被认为是最有潜力的两种聚合物抑制剂。

传统的 P-gp 抑制剂通常也是 P-gp 的底物, 通过竞争性抑制 (competitive inhibition) 来调节 P-gp 的活性, 而聚合物辅料则主要通过以下途径对 P-gp 产生抑制作用: ① 改变细胞膜的流动性; ② 抑制 P-gp ATP 酶的活性; ③ 降低细胞内 ATP 的水平; ④ 下调 P-gp 的基因表达^[12]。

2.1 细胞膜流动性的改变 在已发现的对 P-gp 有抑制作用的聚合物辅料中, 几乎所有的非离子表面活性剂都能够改变细胞膜的流动性 (增加或者降低), 因此细胞膜流动性的改变被认为是 P-gp 抑制机制中不可缺少的一部分。由于 P-gp 底物主要是疏水性物质, 其脂水分配系数 (lipid/water partition coefficient, P_{lip}) 较高, 因此容易从细胞内的水相中分布到细胞膜脂质环境中并积累到较高水平, 从而为跨膜转运提供物质基础, 该过程是整个跨膜转运的限速步骤^[21]。当细胞膜流动性改变时, 脂质环境的变化使 P_{lip} 降低, 进入细胞膜中的底物量减少, 导致转运速率下降^[22]。此外, 由于细胞膜上脂质运输和代谢与 P-gp 密切相关, 因此 P-gp 对其周围的脂质环境非常敏感, 膜流动性的改变将进一步影响 P-gp 在催化循环中的三维构象变化, 使得聚合物辅料更易与 P-gp 发生直接相互作用, 从而改变正常生理条件下 P-gp 与底物的结合和转运^[23, 24]。

在耐药性人表皮样癌细胞 (human epidermoid carcinoma drug-resistant cell line) KB8-5-11 中, 具有逆转 MDR 活性的辅料如 Solutol HS-15、Tween 40 和 Cremophor EL 等都能够降低细胞膜的流动性, 而无活性的辅料如辛基葡萄糖苷 (*N*-octyl glucoside) 对细胞膜流动性没有影响^[25]。Rege 等^[17]在比较 Tween 80、Cremophor EL 和 TPGS 1000 对 P-gp 活性影响

时发现, 3 种辅料均能够减少底物罗丹明 123 (rhodamine123) 在 Caco-2 单层膜中的外排。不同的是, Tween 80 和 Cremophor EL 增加了细胞膜的流动性, 而 TPGS 1000 降低了细胞膜流动性。通过荧光偏振 (fluorescence polarization) 分析, 类似的结果在 Labrasol 和 Pluronic 等辅料上得到证实。Koga 等^[26]发现 Labrasol (25%, v/v) 提高硫酸庆大霉素在大鼠回肠中渗透性的同时, 明显降低了细胞膜的流动性, 而 Batrakova 等^[27]观察到 Pluronic P85 (0.01%, w/v) 能显著提高罗丹明 123 在牛脑微血管内皮细胞 (bovine brain microvessel endothelial cell, BBMEC) 中的积累, 并认为细胞膜流动性的增加影响了 P-gp 构象的改变, 从而降低了其与 ATP 的结合能力。另有研究发现, 非表面活性剂 PEG 类辅料同样能够降低细胞膜流动性。在人结肠癌细胞 (human colon carcinoma cell line, Caco-2) 单层膜、耐药性犬肾细胞 (MDR1 transfected Madin-Darby canine kidney, MDR1-MDCK) 单层膜以及离体大鼠小肠膜的穿透性试验中, 0.1%~20% (v/v) PEG 类辅料能有效提高罗丹明 123 的膜穿透率, 并降低细胞膜极性头部区域的流动性^[16, 28]。以上实验数据充分揭示了 P-gp 被抑制与细胞膜流动性改变的紧密联系。

然而膜流动性的改变作为抑制机制仍然存在局限性, 如 Zastre 等^[19, 29]通过对甲氧基聚乙二醇-聚己酸内酯两亲嵌段共聚物 (methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers, MePEG-b-PCL) 中的 MePEG₁₇-b-PCL₅ 研究发现, 当 P-gp 活性受到抑制时, 细胞膜流动性的降低伴随着 ATP 酶活性的增高。而通常酶活性的增高意味着 P-gp 转运效果的增加, 因此, 细胞膜流动性的改变或许并不足以解释所有非离子表面活性剂的抑制机制。

2.2 P-gp ATP 酶活性的抑制 由于 P-gp 本身是一种 ATP 酶, 因此对其活性的抑制会直接影响 P-gp 的外排功能。一些非离子表面活性剂, 如 Myrj 52^[30]、Cremophor EL、Tween 80^[23]、Pluronic P85^[31, 32]和 TPGS 1000^[33]等都会在减少 P-gp 底物外排的同时降低 ATP 酶的活性。体外实验中通过对无机磷的分析, Batrakova 等^[27]证实了 Pluronic P85 对 ATP 酶活性的影响, 与对照组相比, 无论是基础的 ATP 酶活性还是经 P-gp 底物维拉帕米诱导增加的 ATP 酶活性, 在低浓度 Pluronic P85 (0.001%, w/v) 的存在下, 都将会明显降低。进一步对 P-gp 酶促动力学的分析发现, 低浓度的 Pluronic P85 还会降低最大反应速率 (maximal reaction rates, $V_{\max}$), 并使表观米氏常数 (apparent

Michaelis constant, K_m) 升高, 提示 Pluronic P85 的存在降低了 ATP 与 P-gp 的亲合力^[32]。

这种聚合物辅料与 ATP 酶的相互作用, 通常被认为与细胞膜的流动性改变有关。由于辅料一般不是 P-gp 的底物, 因此不会抢占底物与 P-gp 的结合位点, 而更可能是融合在细胞膜中影响 P-gp 蛋白的构象和移动, 也有可能是通过对其他非跨膜转运结合产生变构调节作用, 或是大分子聚合物的空间位阻作用影响了底物与 P-gp 的结合。Regev 等^[23]曾尝试用各种细胞膜助流剂, 包括乙醚、二氯甲烷、Tween 20、Triton-X100 和 Nonidet P-40 等对 P-gp 高表达的中国仓鼠细胞进行处理, 发现细胞膜流动性增加的同时都伴随着 ATP 酶活性的下降, 而导致 ATP 酶活性下降的浓度与提高底物多柔比星吸收速率的浓度相吻合, 该实验很好地解释了细胞膜流动性与 ATP 酶活性的相关性。

但 Collnot 等^[33]的研究发现上述相关性却不能解释 TPGS 1000 对 P-gp 的抑制作用。电子自旋共振波谱 (electron spin resonance spectroscopy, ESR) 的扫描结果显示只有当 TPGS 1000 的浓度超过有效抑制浓度 100 倍时, 细胞膜流动性才略有升高, 因而排除了细胞膜流动性改变的作用。更深入的研究采用 P-gp 单克隆抗体对 P-gp 反应过程进行了分析。结果发现, TPGS 1000 对 P-gp 的抑制作用既不是通过抢占底物转运结合位点, 也并非通过变构调节和空间位阻来发挥抑制作用。而更可能是到达细胞膜基顶后, 与 P-gp 直接相互作用的结果^[34]。综上所述, ATP 酶活性的抑制是影响 P-gp 外排功能的一个重要因素, 它既可能源于辅料聚合物通过改变细胞膜流动性造成的间接影响 (改变构象、变构调节或者空间位阻等), 也可能源于辅料与 P-gp 的直接相互作用。

2.3 细胞内 ATP 水平的降低 由于 P-gp 是能量依赖型的转运蛋白, 因此细胞内的 ATP 水平对于 P-gp 功能的维持至关重要。研究发现, 如果采用代谢抑制剂降低细胞中 ATP 的含量, 将会显著提高 P-gp 底物在细胞中的积累, 说明 P-gp 的外排功能受到了影响^[35]。Batrakova 等^[27]测定了加入 Pluronic P85 后 BBMEC 细胞中 ATP 的含量, 与对照组相比, Pluronic P85 能显著降低细胞中 ATP 的水平, 并增加罗丹明 123 的细胞内累积。如果加入 Pluronic P85 的同时补充 ATP, 则发现细胞内罗丹明 123 的浓度显著下降, 这说明补充的 ATP 恢复了 P-gp 的外排功能。采用不同的细胞株, 如耐药性人口腔表皮癌细胞 (multidrug resistant human oral epidermoid carcinoma, KBv) 和耐药性肺

癌细胞 (mdr-1 transfected Lewis lung carcinoma cell, LLC-MDR1), 以及不同的 P-gp 底物, 如多柔比星, 均得到了类似的结果^[35], 这充分说明聚合物辅料导致的细胞内 ATP 水平下降是 P-gp 被抑制的一个重要机制。

Pluronic 系列辅料对细胞内 ATP 含量的降低, 可能是由于其影响了细胞内的一系列能量代谢过程。如作为 K^+ 载体或者参与对氧化磷酸化的解耦联作用, 还有可能在线粒体膜中直接抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (reduced coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 脱氢酶, 并降低线粒体中电子传递链的活性。这种对活体细胞的呼吸抑制作用表明以 Pluronic 为代表的聚合物分子能在细胞内转移并最终到达线粒体。这一观点被共聚焦显微镜 (confocal microscopy) 观察证实, 实验发现 Pluronic P85 能穿过细胞膜并在细胞内扩散, 与包括线粒体在内的细胞器相互作用^[27]。由此可见, 聚合物辅料在细胞内产生线粒体毒性, 并导致 ATP 缺失也是影响 P-gp 功能的一个重要原因, 而且该现象并不局限于表面活性剂, PEG 类辅料在较高浓度下同样可能通过类似机制发挥作用^[36]。

2.4 P-gp 基因表达下调的影响 药用辅料对基因表达的影响已经有广泛的报道^[37, 38]。最近的研究表明, 一些表面活性剂还可能通过下调 P-gp 的表达来限制底物的外排。Sachs-Barrable 等^[39]发现亲脂性辅料 Peceol 能在增加两性霉素 B (amphotericin B) 吸收的同时, 降低肠道细胞中 MDR1 mRNA 的含量以及 P-gp 的表达。之后又以罗丹明 123 为探针药物, 考察了 Peceol 和 Gelucire 44/14 对于 Caco-2 细胞中 P-gp 的抑制作用, 结果发现两种辅料都能有效减少药物的外排, 细胞中罗丹明 123 的含量较对照组提高了 3 倍。与此同时, 经 Peceol 和 Gelucire 44/14 24 h 处理后的 Caco-2 细胞中 P-gp 含量明显减少, 分别降低了 68.4% 和 64.5%, 而通过跨膜阻抗 (TEER) 的测定显示, 细胞膜并未受到其他损伤, 未发生旁路转运, 这说明下调的基因表达可能是 Peceol 和 Gelucire 44/14 减少 P-gp 底物外排的原因之一^[40]。虽然类似的 P-gp 抑制机制尚未见其他报道, 然而聚合物辅料对 P-gp 表达下调的影响依然是值得深入研究的机制, 因为它可能在药物治疗过程中产生持续的作用。

2.5 其他机制 根据 Yan 等^[13]对 P-gp 聚合物抑制剂的分类, 表 1 总结了这些聚合物可能存在的抑制机制。可以看出, 非离子表面活性剂以及 PEG 类聚合物对 P-gp 的抑制可能为单一或者多种机制并存。而

Table 1 Identified inhibition mechanism of polymeric inhibitors of P-glycoprotein

Class	Excipient	Inhibition mechanism
Nonionic surfactant	Tween 80, Tween 40, Tween 20	Membrane fluidization ^[17, 25]
	Cremophor EL, Labrasol, Solutol HS-15, Myrij 52, Brij 30, Brij 78	ATPase inhibition ^[23, 30, 41]
	TPGS 1000	ATPase inhibition ^[34, 42]
	Peceol, Gelucire 44/14	Down-regulation of P-gp ^[40]
	Pluronic	Membrane fluidization ^[27] , ATPase inhibition ^[32] , ATP depletion ^[35]
Poly(ethylene glycol)	PEG 300, PEG 400, PEG 20000	Membrane fluidization ^[16] , ATP depletion ^[36]

另外一些辅料如 β -环糊精衍生物、树形聚合物以及巯基聚合物等对 P-gp 的抑制机制尚无定论, 可能包括对 P-gp 的释放作用、脱胆固醇作用以及细胞旁路途径等。

Arima 等^[43]认为, (2, 6-二-O-甲基)- β -环糊精 [heptakis (2, 6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin, DIMEB] 能降低底物在 Caco-2 和长春碱耐药 Caco-2 细胞 (vinblastine-resistant Caco-2 cell, Caco-2R) 中的外排, 是由于 DIMEB 的作用导致细胞膜中 P-gp 释放到细胞外, 从而降低了细胞膜中 P-gp 水平引起的。进一步研究发现, 存在于细胞膜竹筏样区域和小穴中的胆固醇含量对于维持 P-gp 的功能非常重要, 胆固醇的减少或饱和都会抑制跨膜转运活性^[44]。Fenyvesi 等^[45]尝试了分别用含有胆固醇的环糊精 Chol-DIMEB 和不含胆固醇的环糊精 DIMEB 来改变细胞膜中胆固醇的含量 (减少或饱和), 发现均能增加细胞膜对底物的通透性, 所以 β -环糊精也可能通过对细胞膜胆固醇含量的影响来抑制 P-gp 的功能。

除了巯基基团对 ATP 酶的影响, 巯基化壳聚糖类抑制剂被证明也会通过细胞旁路途径来转运 P-gp 底物, 其巯基化的结构以及谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 能有效打开细胞紧密连接, 从而绕过 P-gp 介导的转运途径^[46, 47]。

目前树形聚合物对 P-gp 的抑制机制尚不清楚, 它被用在抗癌药物和基因药物制剂中, 但在离体肠段和 Caco-2 细胞中也被证明能有效提高 P-gp 底物的吸收^[48, 49]。有猜测是其通过胞吞作用进入细胞内部, 然后对 ATP 以及 ATP 酶的影响来抑制 P-gp^[12]。

值得注意的是, 大多数非离子表面活性剂都只能在临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 以下发挥抑制作用, 这可能是因为非离子表面活性剂在 CMC 以下以单聚体 (unimer) 形式存在,

而单聚体更易透过细胞膜发挥作用。高浓度的辅料在溶液中形成胶束,一方面难以进入细胞,另一方面还可将药物包裹起来,减少游离药物的量,从而阻碍了吸收。如 Pluronic P85 的 CMC 值为 0.03% (w/v),在细胞穿透性试验中,它只能在 0.001%~0.1% 内抑制底物的外排,在 0.1% 浓度则基本没有 P-gp 抑制活性^[50]。相比之下,PEG 系列辅料由于不会形成胶束,因此在较高浓度 (20%, v/v) 下依然有稳定的 P-gp 抑制活性^[28]。类似地,表面活性剂 Labrasol 在较高浓度下抑制活性依然显著^[26],这说明 Labrasol 还可能通过其他机制促进 P-gp 底物的吸收。

根据近十年来对两类最具代表性的聚合物抑制剂 Pluronic 和 TPGS 的研究中采用的探针药物、生物模型以及监测技术 (表 2) 可知,目前对 P-gp 抑制机制的研究已经逐渐趋于系统化。利用电子自旋共振波谱或荧光偏振分析 (fluorescence polarization measurement) 监测细胞膜流动性的变化、利用荧光素/荧光素酶分析 (luciferin/luciferase assay) 测定细胞中 ATP 含量、通过监测无机磷释放测定 ATP 酶活性 (ATPase assay) 等方法成为常用技术运用到机制

研究中。此外药物细胞内积累 (cell accumulation)、小肠和细胞单层膜穿透性实验 (transport assay) 以及大鼠体内药动力学分析等方法在考察聚合物辅料对 P-gp 的抑制效果时,依然发挥着重要作用。随着生物模型和分析技术的进一步标准化,对 P-gp 聚合物抑制剂的高通量筛选有望早日实现。

3 P-糖蛋白聚合物抑制剂的构效关系

大多数的非离子表面活性剂可以描述成“亲水部分-连接部分-亲脂部分”或者“亲水部分-亲脂部分”的结构,研究发现通过对其亲水亲脂部分的修饰,辅料的抑制活性得到不同程度的改变。

Batrakova 等^[53]对 Pluronic 系列产品的 P-gp 抑制活性做了大量研究,考察了 4 种不同类型的 Pluronic 产品对细胞膜流动性、ATP 酶活性和细胞内 ATP 水平的影响。结果发现,像 Pluronic F38、Pluronic F88、Pluronic F108 和 Pluronic F127 这些 HLB<20 的亲水性嵌段共聚物在 BBMEC 细胞中对于 P-gp 的抑制作用最弱。这类共聚物由于很难与细胞膜双分子层融合,不容易进入细胞,对于 P-gp 的活性影响很小。而 HLB<20、具有中等长度聚氧丙烯链的亲脂性共聚物

Table 2 Substrates, models and analytical techniques used in the study of polymeric inhibitors of P-glycoprotein. UIC2: A mouse monoclonal antibody directed against the extracellular conformational epitope of P-gp; LLC-PK1 cell: Lewis lung carcinoma porcine kidney-1 cell; MTT: 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

Excipient	Substrate	Model	Analytical technique
TPGS	Rhodamine 123	Caco-2 cell	Luciferin/luciferase assay ^[34] , UIC2 shift assay ^[34] , ESR spectroscopy ^[33] , ATPase assay ^[34] , Monolayer transport assay ^[34,41,51]
		Excised rat ileum	Transport assay ^[51]
		<i>In situ</i> single-pass perfusion	Transport assay ^[51]
		Rat	<i>In vivo</i> PK study ^[41,51]
		Artificial human MDR1 enriched membrane	ATPase assay ^[33]
	Verapamil	Caco-2 cell	Monolayer transport assay ^[34]
	Digoxin	Rat jejunal tissue	Diffusion chambers ^[36]
	Celiprolol	Caco-2 cell	Monolayer transport assay ^[52]
		Everted gut sac	Transport assay ^[52]
		MDCKII cell, LLC-PK1 cell	Cell accumulation ^[31]
Pluronic	Saquinavir	Artificial human MDR1 enriched membrane	ATPase assay ^[32]
	Vinblastine	BBMEC cell	Cell accumulation ^[27,35,53]
	Rhodamine 123	BBMEC cell	ATPase assay ^[27,35,53]
		KBv cell, Caco-2 cell	Fluorescence polarization ^[27,35,53]
		Cell accumulation ^[35]	
		ATP assay ^[54]	
		MTT assay ^[54]	
	Doxorubicin	Cell accumulation ^[55]	
		Diffusion chambers ^[36]	
		Cell accumulation ^[55]	
	Digoxin	LLC-PK1-MDR1 cell	
		Rat jejunal tissue	
		LLC-PK1-MDR1 cell	
		Cell accumulation ^[55]	

能迅速与细胞膜融合,从而增加细胞膜流动性,并进入细胞质、细胞器乃至细胞核中,产生双重效应:①通过改变细胞膜的流动性降低 ATP 酶的活性;②通过改变线粒体电子传递途径抑制 ATP 的合成^[27]。HLB<20、具有较短聚氧丙烯链长度的亲脂性共聚物同样会引起细胞膜的流动性降低,并增加 ATP 酶的活性。虽然它们能够迅速通过细胞膜进入细胞质,但却不会影响到细胞内 ATP 水平,这可能是由于无法提高细胞膜流动性尤其是线粒体膜流动性的结果。HLB<20、具有较长聚氧丙烯链的亲脂性共聚物具有最高的膜融合性,能有效地增加细胞膜流动性并抑制 ATP 酶的活性,但在细胞膜中停留时间较长,使之不能有效进入细胞内发挥作用,因此对 P-gp 的抑制作用有限。另外,该类嵌段共聚物的 CMC 值很低,使得溶液中很容易形成胶束,而 Pluronic 的抑制作用主要是通过单聚体实现的。总之,具有中等亲水亲脂特性、中等 CMC 值的 Pluronic 嵌段共聚物在提高 P-gp 底物跨膜转运方面效果最好,而 Pluronic P85 是最具代表性的辅料。以上结果同时说明,聚氧丙烯和聚氧乙烯基团对抑制 P-gp 活性有着不可忽视的作用,如 Rege 等^[17]曾证实,含有聚氧乙烯基团的非离子表面活性剂 Tween 80、Cremophor EL 和 TPGS 1000 都能影响细胞膜的流动性,而不含聚氧乙烯基团的 N-octyl glucoside 几乎对 P-gp 功能没有影响。

另外,Collnot 等^[56]比较了不同 PEG 链长的 TPGS 同系物 (TPGS 200/238/400/600/1000/2000/3400/3500/4000/6000) 对于 Caco-2 细胞中 P-gp 的抑制作用,将这些同系物的实验结果进行韦布尔分布 (Weibull distribution) 拟合发现,PEG 链长在 24~33 个链节,分子质量为 1 100~1 500 Da 的 TPGS 抑制活性最强。现有上市的产品中,TPGS 1000 无疑是最佳的,它能使底物罗丹明 123 的吸收提高 82%,外排降低 77%。在此基础上,Wempe 等^[42]对 TPGS 同系物的亲水部分和亲脂部分分别进行了修饰,结果发现,①亲脂部分:用胆固醇 (cholesterol) 或色原烷醇 (chromanol) 替换 α -生育酚 (α -tocopherol),抑制作用均得到明显加强,分别从 33%提高到了 62%和 59%。而去掉中间连接部分的琥珀酸 (succinate),直接用胆酸 (cholic acid) 或去氧胆酸 (deoxycholic acid) 作为亲脂部分,抑制活性也能分别提高到 54%和 63%。②亲水部分:如果仅仅修饰聚乙二醇头部的基团,如接上一个油酸脂 (oleate ester) 基团,抑制活性不会增加。但如果将聚乙二醇换成等链长的聚乙二醇-聚丙二醇 (polypropylene glycol, PPG) 共聚物,则抑

制活性提高到 66%,而如果将聚乙二醇链完全替换成等分子量的聚丙二醇,则达到最大的抑制活性 (92%)。进一步的实验发现,虽然 TPGS 400 对于非 P-gp 底物泰莫西芬 (tamoxifen) 的体内外增溶效果都要优于 TPGS 1000,然而在细胞穿透性试验中对 P-gp 底物罗丹明 123 的外排抑制效果却微乎其微。这些结果说明,表面活性剂亲水亲脂部分的改变对于 P-gp 抑制效果有着决定性的作用。

4 结论与展望

迄今为止,已经有多种常用的药用辅料被证实具有调节 P-gp 的外排功能,在促进口服药物的胃肠道吸收、提高药物脑组织分布以及逆转肿瘤多药耐药性等方面,有着巨大的潜在功效。目前对于 P-gp 抑制机制的研究主要集中在少数几种已上市的辅料 (如 Pluronic 和 TPGS),对其构效关系的探索使得一批具有更强 P-gp 抑制活性的聚合物在实验室被合成。然而根据现有的文献报道,这些聚合物抑制剂对 P-gp 的抑制活性仍然很难超越经典的小分子抑制剂,因此对 P-gp 底物生物利用度和靶向性的提高依然有待于药物载体系统的发展以及良好的处方设计。如近年来基于 P-gp 抑制剂 MePEG-b-PCL 设计的聚合物胶束^[29, 57],基于 Cremophor EL 或 Tween 的微乳制剂^[58, 59]以及基于 Brij 78 设计的纳米粒载药系统^[41]等。在逆转 P-gp 介导的药物转运中,聚合物抑制剂可以与新的载药系统发挥协同抑制作用,促进低渗透性药物的吸收。未来的工作可能会在以下领域展开:①更完善的构效关系探索;②体内生物利用度提高的有效确证;③高通量筛选的实现以及聚合物抑制剂联用的考察;④基于 P-gp 聚合物抑制剂的载体系统开发等。

References

- [1] Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications [J]. Clin Pharmacokinet, 2003, 42: 59-98.
- [2] Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs [J]. Eur J Pharm Sci, 2000, 11: 265-283.
- [3] Baumert C, Hilgeroth A. Recent advances in the development of P-gp inhibitors [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2009, 9: 415-436.
- [4] Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS, et al. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement [J]. Pharmacol Res, 2003, 48: 347-359.

- [5] Danson S, Ferry D, Alakhov V, et al. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90: 2085–2091.
- [6] Valle JW, Armstrong A, Newman C, et al. A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction [J]. *Invest New Drugs*, 2010, 28: 91–97.
- [7] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455: 152–162.
- [8] Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 385–427.
- [9] Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, et al. Genetic analysis of the multidrug transporter [J]. *Annu Rev Genet*, 1995, 29: 607–649.
- [10] Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, et al. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 8294–8299.
- [11] Sharom FJ. Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1) [J]. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84: 979–992.
- [12] Werle M. Natural and synthetic polymers as inhibitors of drug efflux pumps [J]. *Pharm Res*, 2008, 25: 500–511.
- [13] Yan F, Si LQ, Huang JG, et al. Advances in the study of excipient inhibitors of intestinal P-glycoprotein [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008: 1071–1076.
- [14] Cornaire G, Woodley JF, Saivin S, et al. Effect of polyoxyl 35 castor oil and Polysorbate 80 on the intestinal absorption of digoxin *in vitro* [J]. *Arzneimittel-Forschung*, 2000, 50: 576–579.
- [15] Seeballuck F, Ashford MB, O'Driscoll CM. The effects of pluronics block copolymers and Cremophor EL on intestinal lipoprotein processing and the potential link with P-glycoprotein in Caco-2 cells [J]. *Pharm Res*, 2003, 20: 1085–1092.
- [16] Shen Q, Lin Y, Handa T, et al. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by *in vitro* transport and *in situ* absorption studies [J]. *Int J Pharm*, 2006, 313: 49–56.
- [17] Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 16: 237–246.
- [18] Foger F, Schmitz T, Bernkop-Schnurch A. *In vivo* evaluation of an oral delivery system for P-gp substrates based on thiolated chitosan [J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 4250–4255.
- [19] Zastre J, Jackson JK, Wong W, et al. Methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers reduce P-glycoprotein efflux in the absence of a membrane fluidization effect while stimulating P-glycoprotein ATPase activity [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96: 864–875.
- [20] Zhao HZ, Tan EC, Yung LY. Potential use of cholecalciferol polyethylene glycol succinate as a novel pharmaceutical additive [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84: 954–964.
- [21] Omote H, Al-Shawi MK. Interaction of transported drugs with the lipid bilayer and P-glycoprotein through a solvation exchange mechanism [J]. *Biophys J*, 2006, 90: 4046–4059.
- [22] Lu P, Liu R, Sharom FJ. Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 1687–1697.
- [23] Regev R, Assaraf YG, Eytan GD. Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 259: 18–24.
- [24] Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 277–294.
- [25] Dudeja PK, Anderson KM, Harris JS, et al. Reversal of multidrug resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 319: 309–315.
- [26] Koga K, Kusawake Y, Ito Y, et al. Enhancing mechanism of Labrasol on intestinal membrane permeability of the hydrophilic drug gentamicin sulfate [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 64: 82–91.
- [27] Batrakova EV, Li S, Vinogradov SV, et al. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299: 483–493.
- [28] Hugger ED, Novak BL, Burton PS, et al. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity *in vitro* [J]. *J Pharm Sci*, 2002, 91: 1991–2002.
- [29] Zastre J, Jackson J, Burt H. Evidence for modulation of P-glycoprotein-mediated efflux by methoxypolyethylene glycol-block-Polycaprolactone amphiphilic diblock copolymers [J]. *Pharm Res*, 2004, 21: 1489–1497.
- [30] Zhu S, Huang R, Hong M, et al. Effects of polyoxyethylene (40) stearate on the activity of P-glycoprotein and cytochrome P450 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37: 573–580.
- [31] Shaik N, Pan G, Elmquist WF. Interactions of pluronic block copolymers on P-gp efflux activity: experience with HIV-1 protease inhibitors [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97: 5421–5433.
- [32] Batrakova EV, Li S, Li Y, et al. Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters [J]. *Pharm Res*, 2004, 21: 2226–2233.

- [33] Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, et al. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4: 465–474.
- [34] Collnot EM, Baldes C, Schaefer UF, et al. Vitamin E TPGS P-glycoprotein inhibition mechanism: influence on conformational flexibility, intracellular ATP levels, and role of time and site of access [J]. *Mol Pharm*, 2010, 7: 642–651.
- [35] Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, et al. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: selective energy depletion [J]. *Br J Cancer*, 2001, 85: 1987–1997.
- [36] Johnson BM, Charman WN, Porter CJ. An *in vitro* examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine [J]. *AAPS PharmSci*, 2002, 4: E40.
- [37] Batrakova EV, Kelly DL, Li S, et al. Alteration of genomic responses to doxorubicin and prevention of MDR in breast cancer cells by a polymer excipient: pluronic P85 [J]. *Mol Pharm*, 2006, 3: 113–123.
- [38] Sriadibhatla S, Yang Z, Gebhart C, et al. Transcriptional activation of gene expression by pluronic block copolymers in stably and transiently transfected cells [J]. *Mol Ther*, 2006, 13: 804–813.
- [39] Risovic V, Sachs-Barrable K, Boyd M, et al. Potential mechanisms by which Peceol increases the gastrointestinal absorption of amphotericin B [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2004, 30: 767–774.
- [40] Sachs-Barrable K, Thamboo A, Lee SD, et al. Lipid excipients Peceol and Gelucire 44/14 decrease P-glycoprotein mediated efflux of rhodamine 123 partially due to modifying P-glycoprotein protein expression within Caco-2 cells [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2007, 10: 319–331.
- [41] Dong X, Mattingly CA, Tseng MT, et al. Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 3918–3926.
- [42] Wempe MF, Wright C, Little JL, et al. Inhibiting efflux with novel non-ionic surfactants: rational design based on vitamin E TPGS [J]. *Int J Pharm*, 2009, 370: 93–102.
- [43] Arima H, Yunomae K, Hirayama F, et al. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297: 547–555.
- [44] Modok S, Heyward C, Callaghan R. P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment [J]. *J Lipid Res*, 2004, 45: 1910–1918.
- [45] Fenyvesi F, Fenyvesi E, Szenté L, et al. P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 34: 236–242.
- [46] Bernkop-Schnurch A, Hornof M, Guggi D. Thiolated chitosans [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57: 9–17.
- [47] Clausen AE, Kast CE, Bernkop-Schnurch A. The role of glutathione in the permeation enhancing effect of thiolated polymers [J]. *Pharm Res*, 2002, 19: 602–608.
- [48] D'Emanuele A, Jevprasesphant R, Penny J, et al. The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability [J]. *J Control Release*, 2004, 95: 447–453.
- [49] Begona C. Compositions with enhanced oral bioavailability: US, 20020181513 [P]. 2002-11-07.
- [50] Kozlov MY, Melik-Nubarov NS, Batrakova EV, et al. Relationship between Pluronic block copolymer structure, critical micellization concentration and partitioning coefficients of low molecular mass solutes [J]. *Macromolecules*, 2000, 33: 3305–3313.
- [51] Varma MV, Panchagnula R. Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS: effect on solubility and permeability *in vitro*, *in situ* and *in vivo* [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 25: 445–453.
- [52] Huang J, Si L, Jiang L, et al. Effect of pluronic F68 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A4 metabolism [J]. *Int J Pharm*, 2008, 356: 351–353.
- [53] Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, et al. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 304: 845–854.
- [54] Kabanov AV, Batrakova EV, Li S, et al. Selective energy depletion and sensitization of multiple drug-resistant cancer cells by pluronic block copolymer [J]. *Macromol Symp*, 2001, 172: 103–112.
- [55] Batrakova EV, Miller DW, Li S, et al. Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296: 551–557.
- [56] Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, et al. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers [J]. *J Control Release*, 2006, 111: 35–40.
- [57] Elamanchili P, McEachern C, Burt H. Reversal of multidrug resistance by methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers through the inhibition of P-glycoprotein function [J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98: 945–958.
- [58] Fatouros DG, Karpf DM, Nielsen FS, et al. Clinical studies with oral lipid based formulations of poorly soluble compounds [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2007, 3: 591–604.
- [59] Nornoo AO, Zheng H, Lopes LB, et al. Oral microemulsions of paclitaxel: *in situ* and pharmacokinetic studies [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 71: 310–317.