

## 肠道药物转运体及其研究方法

刘志浩, 刘克辛\*

(大连医科大学药学院临床药理教研室, 辽宁 大连 116044)

**摘要:** 口服药物在肠道中的吸收是决定药物生物利用度的重要因素。肠道中有许多药物膜转运蛋白介导药物的吸收、分布、排泄及药物相互作用等。明确其转运机制有利于提高药物的安全性和有效性, 从而指导临床合理用药。通过体内外方法预测药物经转运体在肠道中的转运情况。本文介绍了肠道内转运药物的主要膜转运蛋白, 阐述了口服药物经肠道转运机制, 概括了研究肠道药物转运体的主要研究方法, 并对多种体内外转运体研究方法的优缺点进行了比较。

**关键词:** 肠; 膜转运蛋白类; 药物吸收

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 04-0370-07

## The transporters of intestinal tract and their study methods

LIU Zhi-hao, LIU Ke-xin\*

(Department of Clinical Pharmacology, College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

**Abstract:** The absorption of oral drug in the intestine is an important factor to determine the drug bioavailability. There are many intestinal transporters mediating drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interaction. Understanding the transport mechanism can improve the effectiveness and safety of drug and guide clinical rational use of drugs. The *in vivo* and *in vitro* methods are used to predict the transport mechanism of drugs by intestinal transporters in the intestine. The purposes of this article are to introduce the main transporters in the intestinal tract, to explain the transport mechanism and to summarize the advantages and disadvantages of the research methods of them.

**Key words:** intestine; membrane transport protein; drug absorption

20 世纪 80 年代以来, 随着分子生物学的发展, 肠道药物转运体的研究取得了飞速的进步, 使人们认识到了更多的肠道药物转运体。药物在肠道的吸收不只是经过简单被动扩散, 有些药物是经过肠道上皮细胞黏膜的转运体所介导。主要的肠道药物转运体包括寡肽转运体、ATP 结合盒式膜转运体家族 (ABC 转运体) 及有机离子转运体超家族 (表 1)。这些转运体是内源性物质, 能够识别外源性物质及药物。利用一些体内及体外方法可阐明这些药物转运体在药物转运过程中的作用。对这些转运体的探讨有助于

提高药物安全性和有效性, 对了解药物的毒性和药物间相互作用发挥重要的作用, 同时也为提高药物的靶向性提供了理论依据。

### 1 肠道主要转运体

#### 1.1 寡肽转运体 ( $H^+$ /peptide cotransporter, PEPT1)

$H^+$ 偶联 PEPT1 是目前研究比较深入、应用较广泛的转运体之一。其 cDNA 最早是从家兔小肠 cDNA 文库中通过表达克隆鉴定出来的, 具有 707~710 个氨基酸序列, 12 个跨膜多肽链以及 5 个 N-糖基化位点。PEPT1 mRNA 主要在小肠表达, 同时在肝肾中也有少量表达。研究表明, PEPT1 主要表达于小肠上皮细胞刷状缘膜基顶侧<sup>[1]</sup>, 从小肠近端至远端表达逐渐增加, 是一种低亲和力高容量的转运体。

收稿日期: 2010-12-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873118, 81072694).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-411-86110407, E-mail: kexinliu@dlmedu.edu.cn

表 1 主要的肠道药物转运体

肠道转运体	基因编码	上皮细胞中位置	典型底物	抑制剂
<b>ABC 家族</b>				
MDR1 (P-gp)	ABCB	刷状缘顶侧	抗癌药、疏水化合物、免疫抑制剂、西咪替丁、地高辛、罗丹明 123	维拉帕米、环孢素、GF120918、胺碘酮
MRP1, MRP2	ABCC	刷状缘顶侧	依托泊苷、长春新碱、多柔比星、甲氨蝶呤、利托那韦、17 $\beta$ -雌二醇葡萄糖醛酸苷	环孢素、吡喹酮、丙磺舒
MRP3	ABCC	基底侧	与 MRP1、MRP2 交叉, 葡萄糖醛酸结合物	苯溴马隆、吡喹酮、丙磺舒
BCRP		基底侧	米托蒽醌、多柔比星、柔红霉素、喜树碱类、依托泊苷、雌酮	GF120918、潘托拉唑 Fumitremorgin
<b>OCT 家族</b>				
OCT1	SLC22	基底侧	四乙胺、阿昔洛韦、N-甲基烟酰胺	胆碱、孕酮、西咪替丁
OCT3		刷状缘顶侧	5-羟色胺、四乙胺	皮质酮、孕酮、可乐定
OCTN1, OCTN2		刷状缘顶侧	四乙胺、奎尼丁、维拉帕米、胆碱	尼古丁、可乐定、奎宁
<b>OAT 家族</b>				
OATP2B, D, E	SLC21	(尚不明确)	牛磺胆酸盐、普伐他汀、雌酮、非索非那定	
<b>MCT 家族</b>				
MCT1	SLC16	刷状缘顶侧、基底侧	2-丙基戊酸乙酸、苯甲酸、乳酸、水杨酸	
<b>PEPT 家族</b>				
PEPT1	SLC15	刷状缘顶侧	二肽和三肽、甘氨酸肌氨酸、 $\beta$ -内酰胺类抗生素、依那普利、苯丙氨酸	贝他定、缙氨酸、血管紧张素转换酶抑制剂

在体内 PEPT1 主要是通过  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  离子交换产生的、向质子梯度差为驱动力介导寡肽的转运, 属于继发性主动转运。它能够识别二肽和三肽, 但不能识别多于三个肽键的肽类以及游离氨基酸。一般认为肽键是 PEPT1 识别底物的重要条件, 但是研究证明一些拟肽类以及非肽类也能被 PEPT1 介导。如伐昔洛韦没有肽键和羧基端, 但是也能被 PEPT1 识别<sup>[2]</sup>。这说明 PEPT1 具有广泛的底物专属性。一些临床常用药已经被证实是 PEPT1 的底物, 主要有  $\beta$ -内酰胺类 ( $\beta$ -lactam) 抗生素、沙坦类和血管紧张素转化酶抑制剂 (ACE inhibitor) 等<sup>[3]</sup>。

在小肠基底侧也有一定的 PEPT1 表达, 但是其转运机制尚不十分明确。有文献<sup>[4]</sup>报道 PEPT1 在基底侧对药物的吸收是经易化扩散而且没有 pH 依赖性。但是也有报道揭示基底侧转运过程是由主动转运介导<sup>[5]</sup>。

肠道转运体 PEPT1 的活性受很多因素影响, 包括饮食、激素、生长因子和昼夜节律等。Caco-2 细胞用胰岛素、可乐定、瘦素等处理后可以提高 PEPT1 的活性, 但是不改变 mRNA 的表达水平<sup>[3, 6, 7]</sup>。当在 Caco-2 细胞中给予硝苯地平或维拉帕米钙离子通道阻断剂后, 可降低细胞间  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度, 进而影响了 pH 值的调控机制, 增加了头孢克肟的摄取<sup>[8]</sup>。

通过药物拟肽化修饰、利用 PEPT1 靶点来提高口服药物吸收效率是一种很有前景的策略。将抗病毒

核苷酸阿昔洛韦经 L-缬氨酰酯修饰后成为前药伐昔洛韦可以使其生物利用度提高 3~5 倍<sup>[9, 10]</sup>。

## 1.2 ATP 结合盒式膜转运体家族 (ABC 转运体)

### 1.2.1 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp, MDR1)

P-糖蛋白最早从癌细胞中分离, 并将抗癌药物从细胞中排出从而产生多药耐药性。P-gp 基因位于人第 7 号染色体长臂 21 区, 具有 28 个外显子。有 1 280 个氨基酸序列, 分子质量为 170~180 kDa。在 N 端第一个细胞外环上有 3 个糖基化位点。在肠道中, P-gp 主要分布于绒毛端肠上皮细胞刷状缘膜侧, 沿肠道方向从近端至远端逐渐增加<sup>[11]</sup>。

ATP 水解是 P-gp 介导药物外排的驱动力, 为原发性主动转运体。P-gp 底物主要为高脂溶性阳离子药物, 包括抗癌药 (柔红霉素)、抗生素 (喹诺酮类格帕沙星)、长春花生物碱 (长春新碱) 和免疫抑制剂 (环孢素) 等。P-gp 也受一些药物的影响, 如利福平就是 P-gp 的诱导剂。服用利福平后, 静脉注射 30 mg 或口服 100 mg 他林洛尔, 他林洛尔的 AUC 与对照组相比分别降低 21% 和 35%<sup>[12]</sup>。

在前药设计中, 许多水溶性药物由于溶解性差被设计成亲脂性药物。由于亲脂性药物很多都是 P-gp 底物, P-gp 的外排作用导致这些药物的生物利用度降低。所以在前药设计过程中应该考虑此因素的影响。

### 1.2.2 多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)

MRP 转运体是 ABC

家族中重要的一族, 同样 MRP2 是 MRP 转运体家族中重要一员。人 MRP2 cDNA 于 1996 年被克隆, 目前小鼠、大鼠、兔和犬的 MRP2 均已成功被克隆。人 MRP2 位于染色体 10q23-24, 由 32 个外显子组成。MRP2 由 1 541 个氨基酸构成, 与 MRP1 有 49% 的同源性。其主要表达于肠上皮细胞的基顶膜侧, 表达水平从肠近端到远端逐渐降低。

MRP2 的转运体的底物包括许多阴离子化合物和共轭代谢产物, 谷胱甘肽结合物, 如 2, 4-二硝基苯-S-谷胱甘肽结合物; 葡萄糖醛酸结合物以及非共轭结合的有机阴离子, 如普伐他汀、BQ-123、替莫普利、甲氨蝶呤、HIV 蛋白酶抑制剂和喹诺酮类化合物等<sup>[13]</sup>。很多情况下, MRP2 与药物代谢酶共同参与药物的代谢<sup>[14]</sup>。Xu 等<sup>[15]</sup>用大鼠外翻转肠实验证明, MRP2 和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 UGT 共同介导柚皮素的外排, 减少药物蓄积。肿瘤细胞可以通过这种途径来保护自身不受化疗药物伤害, 这也是肿瘤产生多药耐药的重要机制之一。MRP2 的抑制剂为 MK571 和丙磺舒。

**1.2.3 乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP)** 人 BCRP 转运体基因位于 4q22, 由 16 个外显子构成, 有 633 个氨基酸序列。在肠道有高水平表达。底物主要是多种抗癌药物甲氨蝶呤和多柔比星等。

### 1.3 有机离子转运体

**1.3.1 有机阳离子转运体 (organic cation transporter, OCTs)** 1994 年, OCT1 首先从大鼠肾脏中被克隆。人 OCT1 和 OCT2 的同源体目前也已经被克隆。OCT 转运体含有 12 个跨膜多肽链, 主要分布在肝脏、肾脏、肠道、脑部及胎盘中, 而且具有种属差别。OCTs 的底物有四乙基铵、三丁基甲基胺、普鲁卡因胺、筒箭毒碱、维库溴铵和罗库溴铵等<sup>[16]</sup>。

**1.3.2 新型有机阳离子转运体 (novel organic cation transporter, OCTNs)** OCTN1-3 是 OCT 族转运体家族中的新成员。OCTN1 由 551 个氨基酸残基构成, 共有 12 个跨膜多肽链。与 OCT 转运体有 30% 氨基酸序列同源性。OCTN1 可以介导四乙胺、奎尼丁、维拉帕米和美吡拉敏等。OCTN2 的底物有卡尼汀衍生物、头孢噻啉、依米丁、美吡拉敏、甜菜碱、奎尼丁、2-丙戊酸钠和维拉帕米。OCTN2 缺失会造成全身性卡尼汀缺乏症<sup>[16]</sup>。

**1.3.3 有机阴离子转运多肽 (organic anion-transporting polypeptide, OATP)** 有机阴离子多肽家族

最早从大鼠体内分离出来, 为 Na<sup>+</sup>非依赖性转运体。OATPs 转运体家族由 12 个跨膜多肽链构成, 氨基酸残基数量在 643~722, 分子质量为 80~90 kDa。目前已经分离出 11 种啮齿动物的 OATPs 以及 9 种人 OATPs。虽然大多数有机阴离子转运多肽分布于肝肾, 参与药物的肝肾消除。但是 OATP-B 在肠道上皮细胞顶侧有广泛分布, 以 pH 依赖性而介导药物的肠吸收。

人 OATPs 具有广泛底物专属性, 包括 BSP、肝胆酸盐、牛磺胆酸盐、E<sub>2</sub>17G、硫酸雌酮、硫酸脱氢异雄甾酮、N-甲基-奎尼丁、毒毛花苷 G、前列腺素 G<sub>2</sub>、碘塞罗宁、甲状腺素、 $\delta$ -啡肽 II、BQ-123、脑啡肽、青霉胺、罗库溴铵、奎尼丁、利福平、非索非那定、白细胞三烯 C<sub>4</sub>、甲氨蝶呤、普伐他汀、缩胆囊素和地高辛等。研究表明, OATP 是介导非索非那定小肠吸收的主要转运体, 葡萄柚汁中的某些成分可以有效抑制 OATP 的活性, 从而抑制非索非那定的吸收, 降低其生物利用度<sup>[17]</sup>。

## 2 研究药物转运体的实验方法

### 2.1 体内方法

**2.1.1 大鼠在体空肠灌流法** 将禁食大鼠称重麻醉后固定于手术台板上, 沿腹中线切开腹部, 结扎胆管分离出 6~8 cm 的空肠, 将插管与空肠相连并结扎, 然后将硅灌流管与这些插管相连; 用在体的肠段模型进行灌流, 流速为 0.4 mL·min<sup>-1</sup>。先用生理盐水将肠道内容物冲净, 然后用含有药液的克氏液进行灌流。在适当的时间点于肝门静脉取血测定药物浓度。

空肠灌流可保持肠道神经、内分泌输入的完好性以及肠酶的活性, 同时也保证了血液和淋巴液供应不变, 能够综合反映生理条件下药物在肠道吸收的真实情况。通过多药联合应用与单独用药的比较, 证实合用药物可以竞争同一转运体从而影响药物的吸收<sup>[18]</sup>。

**2.1.2 基因敲除小鼠** Schinkel 等<sup>[19]</sup>用转基因技术构建了 *mdr1 a* (近似于人 *MDR1*) 基因缺失小鼠。相对于野生型小鼠, 这种方法得到的小鼠没有明显的生理缺陷, 并且可以进行繁殖, 称为 *mdr1 a* (-/-) 小鼠。这种小鼠在实验中无需抑制剂就能证实转运体对药物的作用。基因敲除小鼠是研究药物转运体底物及抑制剂以及转运体对药动学过程影响的最佳、最符合体内真实环境的动物模型。

基因敲除和先天性基因缺陷动物模型在药物跨膜转运研究中发挥较大的作用。尽管该方法优点诸多,

但目前由于所建模型较少、动物间存在较大差异、来源有限和价格昂贵等问题,尚不能普遍用于药物转运体底物或抑制剂的高通量筛选。随着人们对膜转运体作用的深入认识,将会有更多类型的药物转运体基因缺失动物模型问世,从而加速药物转运体领域的研究进展。

## 2.2 体外方法

### 2.2.1 刷状缘膜囊泡 (brush border membrane vesicles, BBMV)

将禁食动物处死,取出小肠,用氯化钙沉淀法离心处理肠细胞匀浆液。最后得到的沉淀物具有载体活性和刷状缘酶。将这些沉淀物重新置于混悬液中,然后得到囊泡,继而测定由囊泡摄取的药物含量。本研究组 Liu 等<sup>[20]</sup>采用家兔 BBMV 法证实口服化学合成抗肝炎药 JBP485 及其衍生物 JBP923 均能抑制 PEPT1 的典型底物甘氨酸肌氨酸,进而证实它们在肠道是由 PEPT1 所介导。

BBMV 的缺点是这个过程仅仅能够分离得到刷状缘成分,并且只能测定肠道顶侧的跨膜转运。但是这个方法对于研究药物的转运机制还是很有意义的,尤其适合化合物早期的高通量筛选。

### 2.2.2 外翻转肠法

大鼠禁食过夜,麻醉后打开腹腔,取出约 10 cm 小肠,置于冰浴的克氏液中,通入 O<sub>2</sub>,去除肠系膜、肌肉和脂肪。继而用小玻璃棒轻柔的将肠段翻转,令小肠黏膜侧向外,浆膜面向内,结扎底部,将小肠上端固定在取样口上。将小肠内注入 37 °C 克氏液,作为接收池。然后将肠囊放入含药物的试管中,通入 O<sub>2</sub> 后置于 37 °C 水浴体系中进行实验。一般在供氧条件下,肠囊活性可以维持 2 h 左右。外翻转肠法是从体外水平研究药物肠道吸收相互作用的较好手段。本研究组 Zhang 等<sup>[18]</sup>通过大鼠外翻转肠方法证实了 JBP485 可以与头孢氨苄竞争 PEPT1 从而导致彼此生物利用度下降。

由于接收池体积较小,药物进入接收池后浓度较高,容易被检测,而且实验周期短,技术上也不复杂。小肠上有大量 P-gp 表达,因此这个模型是考察 P-gp 对药物吸收转运的一个简单易行的模型。

### 2.2.3 Caco-2 细胞法

人结肠癌细胞 Caco-2 是用来研究药物转运体的常用模型。Caco-2 细胞具有与小肠上皮细胞相同的微绒毛结构和紧密连接。由于形态学及生化性质都与小肠上皮细胞很相似,Caco-2 细胞模型已广泛用于体外药物分子肠吸收的研究。实验证实,在 Caco-2 细胞中 PEPT1、MDR1、MRP2 和 OATP-B 均有较高水平表达<sup>[21]</sup>。

将状态良好的细胞接种于培养板,培养 15 天,待细胞形成良好单层后用 37 °C HBSS 洗去细胞表面培养液及杂质,然后孵育 15 min 后弃去 HBSS,给药后将培养板置于 37 °C 恒温振荡箱中进行摄取实验。在适当的时间点取出培养板,弃去药物,用 4 °C 的 HBSS 洗去细胞表面药物,加入细胞裂解液,使药物游离出来。然后测定药物含量以及蛋白含量。Ogihara 等<sup>[22]</sup>用 Caco-2 细胞模型,证实了抗病毒药奥塞米韦 (oseltamivir) 是寡肽转运体 PEPT1 的底物。同样本研究组 Cang 等<sup>[23]</sup>也以 Caco-2 细胞为模型证实了二肽 JBP485 是 PEPT1 的底物。Zhang 等<sup>[24]</sup>研究了黄酮类化合物鹰嘴豆芽素 A 与水飞蓟素对 P-gp 底物地高辛和长春碱小肠吸收的影响,表明鹰嘴豆芽素 A 和水飞蓟素可显著抑制 P-gp 介导的药物外排,说明它们与 P-gp 底物联合应用可以提高后者的药效。

Caco-2 细胞不仅能够反映肠道对药物的吸收,同时也能够反映药物经肠道跨膜转运的渗透性<sup>[25]</sup>。用 Transwell 小室可以比较容易的测定药物经过细胞的跨膜转运情况。将状态良好的细胞接种于 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上(图 1),培养 21 天。待细胞形成单层后,用下列方法检查细胞的通透性和完整性:① 用电子显微镜或者光学倒置显微镜进行形态学检查;② 在单细胞层培养的不同阶段,测定碱性磷酸酶的活性,该酶是小肠刷状缘细胞的标志酶;③ 测量细胞层的电阻值 (TEER),如细胞膜被破坏,TEER 将降低;④ 标志物被动扩散的跨膜通量,通常用甘露醇作为标志物;⑤ 用辣根过氧化物酶测定胞饮功能。待各项指标合格后进行药物跨膜转运实验。测定渗透系数 ( $P_{app}$ ) 值,  $P_{app} (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}) = (dQ/dt) \times 1 / (A \times C_0)$ , 其中:  $dQ/dt$  为渗透速率 ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ ),  $C_0$  为供药室中被测药物的初始浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $A$  为单层细胞的表面积 ( $\text{cm}^2$ )。一般认为,吸收良好的药物,其表观渗透系数为  $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 吸收为 1%~100% 的药物表观渗透系数  $P_{app}$  为  $0.1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 而吸收较差的药物 (<1%), 其  $P_{app} < 1 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

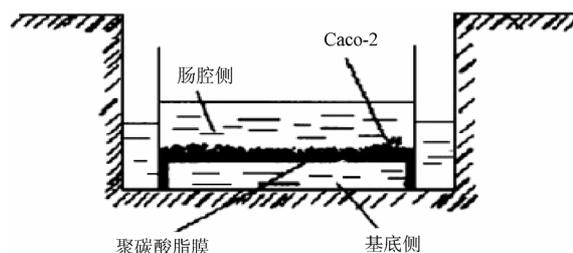


图 1 体外跨膜转运实验装置

**2.2.4 转染细胞** 由于 Caco-2 细胞中含有多种转运体, 不利于研究某一转运体对于药物的影响。某转运体基因转染细胞可以使该细胞高表达某单一转运体。这种方法可以更直观的分析转运体对药物转运的影响。

将含有目的基因片段的质粒用大肠杆菌转化扩增后, 提取质粒。采用脂质体 2000 将质粒导入不含血清的细胞中, 用 G418 反复进行筛选, 筛选后采用免疫荧光显微镜、Western Blot 和 PCR 等方法检测转染细胞是否被构建成功, 然后用该转染细胞进行药物转运摄取实验, 以判断其功能。Knutter 等<sup>[26]</sup>将 PEPT1 转染入人视网膜色素上皮细胞后, 证实了 14 种不同血管转换酶抑制剂类药物对 PEPT1 的亲合力。

双转染细胞是一种鉴别药物转运体底物及其诱导剂的有效方法, 用来分析转运体对于底物的矢量转运, 同时也可以进行新药筛选。Cui 等<sup>[27]</sup>建立了 OATP1B1/BCRP 以及 OATP1B1/MDR1 等双转染细胞模型, 用来观察雌二醇-17 $\beta$ -葡萄糖醛酸、HMG-CoA 还原酶抑制剂 (普伐他汀、西立伐他汀) 和雌酮-3-硫酸盐的转运情况。Hirouchi 等<sup>[28]</sup>成功构建了 OATP1B1/MRP2/MRP3 和 OATP1B1/MRP2/MRP4 三转染细胞来研究药物经过转运体的矢量转运情况。

**2.2.5 非洲爪蛙卵母细胞 (*xenopus laevis* oocytes)** 将转运体的 cRNA 导入非洲爪蛙卵母细胞, 通过两极电压钳技术观察加入底物后电流的变化。表达有转运体的非洲爪蟾卵母细胞可购置 (transportocytes, BD Gentest, <http://www.bdbiosciences.com>)。Knutter 等<sup>[29]</sup>使用转染 PEPT1 的非洲爪蟾卵母细胞证明沙坦类药物对于 PEPT1 有较高的亲和力。

**2.2.6 正电子发射断层显像 (positron emission tomography, PET)** 从 20 世纪 90 年代起, PET 的使用很大程度地改进了传统核医学影像的分辨率, 可以在体内定量评价生物学进程, 并且应用分子探针标记探测生物学特征。PET 由探头、图像显示、数据处理系统及检查床构成, 使用正电子示踪剂, 并能够在两个方向上放置两个探测器。当探测器同时收到两个光子信号并加入到符合电路中判断, 只要两个信号的时间差小于一个很短的特定时间, 则被确认为有效信号, 可形成断层示踪剂分布图像。凡代谢率高的组织以及病变组织, 在 PET 上呈现明确的高代谢亮信号, 凡代谢率低的组织以及病变组织在 PET 上呈现低代谢暗信号<sup>[30]</sup>。

由于 PET 的灵敏性和精确性高, 近些年 PET 技术已经逐渐应用于药物转运体的研究<sup>[31]</sup>。Yamasakia 等<sup>[32]</sup>将高表达 P-gp 和 BCRP 的 Caco-2 细胞导入小鼠体内, PET 结果显示 P-gp 和 Caco-2 的共同底物 [<sup>11</sup>C]GF120918 的摄取与空白组相比显著降低。当给予未标记的 GF120918 时, [<sup>11</sup>C]GF120918 的摄取显著升高。从而证实了 PET 方法是研究 GF120918 在肿瘤细胞中经由 P-gp 和 BCRP 转运体介导的良好工具。

**2.2.7 免疫组化及免疫荧光技术** 免疫组化技术是利用抗原与抗体特异性结合的原理, 通过化学反应使标记抗体的显色剂显色来确定组织细胞内的转运体, 并对其定位、定性及定量的研究。有些实验将免疫学方法与荧光标记技术结合起来研究转运体在细胞内分布。由于荧光素所发的荧光可在荧光显微镜下检出, 从而可对转运体进行细胞定位。目前这种方法已经广泛应用于药物转运体的研究。Glaeser 等<sup>[33]</sup>用免疫组化实验证实了 OATP1A2 及 MDR1 转运体在小肠刷状缘膜顶侧有大量表达。

**2.2.8 ATP 活性筛选法** 通过 ATP 酶活性筛选方法可以确定药物与转运体之间可能的相互作用。在 ATP 水解的驱动下, P-gp 转运体介导药物从细胞内排出, 从而了解某种化合物是否为 P-gp 的底物或者抑制剂。这种方法一般应用于判断未知待测物的转运是否由 P-gp 介导的情况。观察 ATP 转运时酶的活性变化, 即可鉴定化合物是否具有 P-gp 抑制功能。

但是这种研究方法通常只能间接研究 P-gp 的转运与转运抑制, 不能提供具体的药理学的相关信息。同时 P-gp 与底物或抑制剂之间的作用存在多种机制, 有的化合物与 P-gp 作用可能不改变 ATP 酶的活性。所以该法一般不单独应用于 P-gp 底物或抑制剂的筛选<sup>[34]</sup>。

### 3 结语

口服给药是比较方便的给药途径之一, 了解肠道转运体机制有助于获得药物在肠道的吸收动力学、吸收机制、有效吸收部位及影响吸收的因素等信息。作者将常用于研究肠道转运体的技术及其优缺点进行了总结 (表 2), 旨在一目了然该领域的研究现状。相信不久的将来, 会有更多、更好的转运体研究方法接踵问世, 通过转运体介导的底物之间相互作用、对药物进行结构修饰等方式, 降低药物不良反应、提高目标药物的生物利用度及疗效, 为临床合理用药提供更科学的理论依据。

表 2 肠道转运体的研究技术及其优缺点比较

实验方法	优点	缺点
大鼠在体空肠灌注法	保持神经完好无损, 酶活性高	只限于溶液状态给药, 影响测定稳定性
基因敲除法	符合体内真实环境	模型建立复杂, 价格昂贵, 不适合高通量筛选
刷状缘膜囊泡法	适合高通量筛选	只能测定肠道顶侧的跨膜转运, 成活率低
外翻转肠法	黏膜细胞可得到充足氧气, 浆膜侧液体少, 浓度高, 易于检测, 节省动物, 周期短	对小肠活性要求严格
Caco-2 细胞法	与小肠上皮细胞接近, 同源性好, 具有较好的体外实验重现性, 条件易控制, 经济, 省时	缺少肠壁的黏液层以及某些代谢酶。培养条件的差别, 使结果缺乏可比性
转染细胞法	特异性载体转运, 适于调节	缺乏调控途径
非洲爪蛙卵母细胞法	内源性转运体活性低, 检测灵敏	不能调节蛋白的表达水平
正电子发射断层显像技术	高分辨率, 高精确性	仪器操作复杂, 价格昂贵
免疫组化/免疫荧光法	特异性强, 敏感性高, 定位准确	交叉反应, 可出现假阳性
ATP 酶活性法	易于操作, 省时	间接研究, 不能提供动力学信息

References

[1] Brandsch M, Knutter I, Bosse-Doenecke E. Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60: 543-585.

[2] Katragadda S, Jain R, Kwatra D et al. Pharmacokinetics of amino acid ester prodrugs of acyclovir after oral administration: interaction with the transporters on Caco-2 cells [J]. *Int J Pharm*, 2008, 362: 93-101.

[3] Zhang QH, Liu Q, Wu JJ, et al. PEPT1 involved in the uptake and transepithelial transport of cefditoren *in vivo* and *in vitro* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 612: 9-14.

[4] Dupuy J, Larrieu G, Sutra JF, et al. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin [J]. *Vet Parasitol*, 2003, 112: 337-347.

[5] Sawada K, Terada T, Saito H, et al. Distinct transport characteristics of basolateral peptide transporters between MDCK and Caco-2 cells [J]. *Pflugers Arch*, 2001, 443: 31-37.

[6] Watanabe K, Terada K, Jinriki T, et al. Effect of insulin on cephalixin uptake and transepithelial transport in the human intestinal cell line Caco-2 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 21: 87-95.

[7] Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, et al. PEPT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108: 1483-1494.

[8] Wenzel U, Kuntz S, Diestel S, et al. PEPT1-mediated cefixime uptake into human intestinal epithelial cells is increased by Ca<sup>2+</sup> channel blockers [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46: 1375-1380.

[9] Landowski CP, Sun DX, Foster DR, et al. Gene expression in the human intestine and correlation with oral valacyclovir pharmacokinetic parameters [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 306: 778-786.

[10] MacDougall C, Guglielmo BJ. Pharmacokinetics of valacyclovir [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 53: 899-901.

[11] Wei N, Sun H, Liu GT. Advances in the targeting ATP-binding cassette transporters to overcome tumor multi-drug resistance [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1205-1211.

[12] Westphal K, Weinbrenner A, Zschiesche M, et al. Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, 68: 345-355.

[13] Franke RM, Gardner ER, Sparreboom A. Pharmacogenetics of drug transporters [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 220-230.

[14] Nakatsuma A, Fukami T, Suzuki T, et al. Effects of kaempferol on the mechanisms of drug resistance in the human glioblastoma cell line T98G [J]. *Pharmazie*, 2010, 65: 379-383.

[15] Xu H, Kulkarni KH, Singh R, et al. Disposition of naringenin *via* glucuronidation pathway is affected by compensating efflux transporters of hydrophilic glucuronides [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6: 1703-1715.

[16] Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy [J]. *Curr Top Med Chem*, 2004, 4: 1385-1398.

[17] Boddu SP, Yamsani MR, Potharaju S, et al. Influence of grapefruit juice on the pharmacokinetics of diltiazem in Wistar rats upon single and multiple dosage regimens [J]. *Pharmazie*, 2009, 64: 525-531.

[18] Zhang J, Wang CY, Liu Q, et al. Pharmacokinetic interaction between JBP485 and cephalixin in rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38: 930-938.

[19] Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in

- the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs [J]. *Cell*, 1994, 77: 491–502.
- [20] Liu KX, Kato Y, Kaku T, et al. Hydroxyprolylserine derivatives JBP923 and JBP485 exhibit the antihepatitis activities after gastrointestinal absorption in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 294: 510–515.
- [21] Hayashi R, Hilgendorf C, Artursson P, et al. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 35: 383–396.
- [22] Ogihara T, Kano T, Wagatsuma T, et al. Oseltamivir (Tamiflu) is a substrate of peptide transporter 1 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37: 1676–1681.
- [23] Cang J, Zhang J, Wang CY, et al. Pharmacokinetics and mechanism of intestinal absorption of JBP485 in rats [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2010, 25: 500–507.
- [24] Zhang S, Morris ME. Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the P-glycoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastine in human intestinal Caco-2 cells [J]. *Pharm Res*, 2003, 20: 1184–1191.
- [25] Wang JJ, Liao XH, Ye M, et al. *In vitro* absorption mechanism of strychnine and the transport interaction with liquiritin in Caco-2 cell monolayer model [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1160–1164.
- [26] Knutter I, Wollesky C, Kottra G, et al. Transport of angiotensin-converting enzyme inhibitors by H<sup>+</sup>/peptide transporters revisited [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 327: 432–441.
- [27] Cui Y, Konig J, Keppler D. Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2 [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60: 934–943.
- [28] Hirouchi M, Kusuha H, Onuki R, et al. Construction of triple-transfected cells [organic anion-transporting polypeptide (OATP) 1B1/multidrug resistance-associated protein (MRP) 2/MRP3 and OATP1B1/MRP2/MRP4] for analysis of the sinusoidal function of MRP3 and MRP4 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37: 2103–2111.
- [29] Knutter I, Kottra G, Fischer W, et al. High-affinity interaction of sartans with H<sup>+</sup>/peptide transporters [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37: 143–149.
- [30] Wang JF. The principle of PET/CT and its application in the tumor [J]. *Asia-Pacific Tradit Med (亚太传统医药)*, 2010, 6: 174.
- [31] Sugiyama Y. Effective use of microdosing and positron emission tomography (PET) studies on new drug discovery and development [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2009, 24: 127–130.
- [32] Yamasaki T, Kawamura K, Hatori A, et al. PET study on mice bearing human colon adenocarcinoma cells using [<sup>11</sup>C]GF120918, a dual radioligand for P-glycoprotein and breast cancer resistance protein [J]. *Nucl Med Commun*, 2010, 31: 985–993.
- [33] Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, et al. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81: 362–370.
- [34] Sun J. Absorption and Transport of Oral Drugs (口服药物吸收与转运) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 199.