

· 研究论文 ·

普伐他汀对灯盏乙素小鼠肝脏转运的作用及机制初探

刘建明, 熊玉卿*

(南昌大学医学院临床药理研究所, 江西 南昌 330006)

摘要: 从整体动物及细胞水平考察灯盏乙素在小鼠肝脏中的摄取转运, 研究其可能的跨膜转运机制。应用高效液相色谱法测定比较不同剂量普伐他汀预处理组小鼠及空白组小鼠间灯盏乙素的血药浓度、肝脏药物浓度等药动学性质的改变; 使用高效液相色谱法测定比较空白组肝细胞、oatp2 高表达组肝细胞以及普伐他汀处理的 oatp2 高表达组肝细胞对灯盏乙素的摄取情况。结果发现, 普伐他汀灌胃能影响灯盏乙素的药动学特征, 灯盏乙素的血浆清除率 CL 降低, 而 AUC 增加; PCN 诱导组肝细胞对灯盏乙素的摄取较空白组增加, 在同时加入普伐他汀时, 小鼠肝细胞对灯盏乙素的摄取减少。目前的研究认为普伐他汀和灯盏乙素之间可能存在潜在的药物相互作用, 可能是通过相互竞争 oatp2 介导的转运通路而发生, 这种通路存在于肝脏对灯盏乙素的摄取中。

关键词: 灯盏乙素; 普伐他汀; 摄取; 肝细胞; 有机阴离子转运多肽 2

中图分类号: R969.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 03-0269-05

Effect of pravastatin on transportation of scutellarin in mouse liver and its mechanism

LIU Jian-ming, XIONG Yu-qing*

(Institute of Clinical Pharmacology, Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: This study is to investigate the transportation of scutellarin in cell and live models and study on mechanism of absorption and transport of scutellarin in mouse liver. The concentration of scutellarin in plasma and liver from control and pretreated groups was determined by high performance liquid chromatography. The uptake of scutellarin was examined in control hepatocytes group, induced hepatocytes group and induced hepatocytes plus pravastatin group. Pravastatin can affect the pharmacokinetics of scutellarin in mouse: CL is decreased while AUC is increased. The scutellarin absorption of hepatocyte induced group was higher than that of control group, but was decreased in the group with pravastatin added. The research showed that there was potential drug interaction between pravastatin and scutellarin. The drugs may compete for oatp2 mediated transport pathway consisted in the uptake of scutellarin in liver.

Key words: scutellarin; pravastatin; absorption; hepatocyte; organic anion transporting polypeptide 2

灯盏乙素 (scutellarin, SCU) 是灯盏花素 (breviscapine, BRE) 中的主要药效成分, 占灯盏花素含量的 90% 以上^[1]。灯盏乙素临床应用广泛, 主要用于心脑血管疾病, 如冠心病、心绞痛等^[2]。灯盏乙素

的药动学也得到较全面的研究, 研究发现其存在被动吸收形式^[3, 4], 并且在肝组织中浓度较高, 因此在肝脏可能还存在其他转运形式。但目前灯盏乙素在肝脏摄取方面的研究鲜见报道, 而肝脏的摄取直接影响其药动学特性, 有必要对此进行研究。此外, 临床上灯盏乙素多与他汀类药物合用^[5, 6], 而多数他汀类药物是 oatp2 的底物, 其中普伐他汀 (pravastatin, PRA) 是 oatp2 的特异性底物^[7]。目前灯盏乙素的肝脏摄取

收稿日期: 2010-08-24.

基金项目: 江西省重大科技支撑计划重点项目(2007BS12804).

*通讯作者 Tel: 86-791-6360654, Fax: 86-791-6361195,

E-mail: xyq1126@yahoo.com.cn

是否与 *oatp2* 有关未见报道, 普伐他汀与灯盏乙素联合使用是否产生相互作用值得深入探讨。因此, 本研究初步探讨了灯盏乙素肝脏可能的摄取形式, 考察了两药合用后灯盏乙素药动学特征的改变是否与 *oatp2* 介导药物转运相关。

材料与方 法

药品及试剂 灯盏乙素标准品: 中国药品生物制品检定所, 含量 > 97.0%, 批号 110842-200605; 灯盏乙素注射液: 山西银湖制药有限公司, 批号 20080816, 规格 20 mg/5 mL; 普伐他汀药品: 上海中美施贵宝制药有限公司, 批号 20080224, 规格 20 mg/片; 地西洋 (*diazepam*, DIZ) 内标: 中国药品生物制品检定所, 含量 > 99.7%, 批号 171225-200706。孕烷烯酮 16 α -腈 (*pregnenolone-16 α -carbonitrile*, PCN) 和胰岛素 (美国 *Sigma* 公司); 氢化可的松 (广东阳江制药厂); 二甲基亚砜 (*dimethylsulfoxide*, DMSO) 和 MTT (四甲基偶氮唑蓝) 为美国 *Amresco* 公司产品; DMEM 培养基及非必需氨基酸 (美国 *Gibco* 公司); EDTA 溶液 (武汉中健公司)。其余试剂为分析纯。

实验仪器 高效液相色谱仪 (LC-10AD) 与紫外检测器 (SPD-10Avp), 日本 *Shimadzu* 公司; 高效液相色谱柱: *Diamonsil C₁₈* 柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm), 迪马公司。

实验动物 雄性昆明种小鼠, 体重 20~25 g, 南昌大学医学院实验动物中心提供 (合格证号: 医动字第 090316-02 号)。

溶液配制 在体实验灯盏乙素标准液配制: 取灯盏乙素标准品约 4 mg, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解至刻度, 摇匀, 得到 0.4 mg·mL⁻¹ 灯盏乙素标准储备液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。离体实验普伐他汀对照品贮备液的配制: 取普伐他汀对照品约 10.5 mg, 精密称定, 以 25% DMSO 配制成 10 mmol·L⁻¹ 的贮备液, -20 $^{\circ}$ C 保存, 临用前以温孵液进行稀释。离体实验灯盏乙素对照品贮备液的配制: 取灯盏乙素对照品约 15.0 mg, 精密称定, 以 25% DMSO 配制成 10 mmol·L⁻¹ 的贮备液, -20 $^{\circ}$ C 保存, 临用前以温孵液进行稀释。依据文献^[8]配制消化液 I 及消化液 II。

实验分组及给药方案

在体实验分组 将 180 只雄性小鼠, 随机分成 A、B、C 组, 每组 60 只。再将各组小鼠随机分配到 10 个时间点, 即静脉给药前 0 min 及给药后 5、10、

15、20、30、45、60、90 及 120 min, 每个时间点 6 只小鼠。A 组小鼠连续 5 天按 50 mg·kg⁻¹ 每天 1 次灌胃给予普伐他汀, B 组小鼠连续 5 天按 10 mg·kg⁻¹ 每天 1 次灌胃给予普伐他汀, C 组为空白对照组, 其他条件各组相同。实验前禁食 12 h, 实验当天早上称体重, 分别尾静脉注射灯盏乙素注射液 50 mg·kg⁻¹。

原代肝细胞实验分组及给药方案 a 组: 空白肝细胞悬液组, b 组: 经 PCN 诱导的空白肝细胞悬液组, c 组: 经 PCN 诱导的肝细胞悬液加入 5 μ g·mL⁻¹ 普伐他汀组, d 组: 经 PCN 诱导的肝细胞悬液加入 10 μ g·mL⁻¹ 普伐他汀组。4 组肝细胞悬液中分别加入不同量的灯盏乙素, 使各组肝细胞悬液中灯盏乙素的初始浓度分别为 12 及 24 μ g·mL⁻¹。通过不同组新鲜肝细胞实验, 考察灯盏乙素的肝脏摄取情况。

生物样本处理

在体血浆样品处理^[9] 于 10 mL 离心管中精密加入血浆样品 0.2 mL, 加内标 (地西洋 50 μ g·mL⁻¹) 20 μ L, 再加 1 mol·L⁻¹ 磷酸 100 μ L, 旋涡 30 s, 加乙酸乙酯 3 mL, 旋涡 3 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 吸取上清液 2 mL 转移至另一离心管中, 35 $^{\circ}$ C 氮气吹干, 加流动相 100 μ L, 旋涡 3 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清液进行 HPLC 分析。

在体肝脏样品处理^[10] 称取肝脏组织 0.5 g, 精密量取加入甲醇 1.5 mL, 用匀浆机制备组织匀浆。组织匀浆超声 5 min 后, 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上层液 200 μ L, 加入内标溶液 (地西洋 50 μ g·mL⁻¹) 20 μ L, 再加 1 mol·L⁻¹ 磷酸 100 μ L, 旋涡 30 s, 加乙酸乙酯 3 mL, 旋涡 3 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 吸取上清液 2 mL 转移至另一离心管中, 35 $^{\circ}$ C 氮气吹干, 加流动相 100 μ L, 旋涡 3 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清液进行 HPLC 分析。

原代肝细胞样品处理 采取沉淀法处理样品。药物在温孵液中孵育后, 于孵育 5 min 时, 吸取温孵液 200 μ L 置于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中止反应后, 旋涡振荡 3 min, 800 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 100 μ L 经 12 000 r·min⁻¹ 离心, 再取上清液 20 μ L 进样, 进行 HPLC 分析, 测定细胞外液剩余药物浓度。

肝细胞体外温孵条件 参考文献^[11], 用肝细胞温孵液稀释肝细胞, 置于 6 孔培养板中 (4 mL/孔), 放入空气浴振荡器中, 80 r·min⁻¹、37 $^{\circ}$ C 连续振荡孵育。样品按“生物样本处理”项下肝细胞样品处理后, HPLC 测定未转运的药物含量。

肝细胞分离与测定 分离方法参照文献^[8]。采用非灌流改良组织消化法分离得到原代新鲜小鼠肝细胞。本实验取新鲜分离的小鼠肝细胞进行 MTT 法测定, 用肝细胞温孵液接种于 96 孔培养板中 (细胞数为 4×10^3 /孔), 每孔 200 μL 。设普伐他汀实验组、灯盏乙素实验组、DMSO 组和对对照组, 每组各设 6 个复孔。普伐他汀实验组: 加入普伐他汀, 终质量浓度分别为 1.25、2.5、5、10 及 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (DMSO 终浓度小于 0.1%); 灯盏乙素实验组: 加入灯盏乙素, 终质量浓度分别为 3、6、12、24 及 48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (DMSO 终浓度小于 0.1%); DMSO 组则加入 0.1% DMSO; 对照组为未经处理的肝细胞悬液。将培养板放入 CO_2 培养箱中, 并在 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养 2 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 20 μL , 继续孵育 4 h; 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 振荡 10 min, 选择波长为 490 nm, 在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸收度值, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (实验组吸收度值 / DMSO 组吸收度值) $\times 100\%$ 。

PCN 诱导小鼠肝脏中 oatp2 高表达 称取 PCN 49.8 mg, 加至 10 mL 的容量瓶中, 用玉米油溶解至刻度。连续 4 天给雄性小鼠腹腔内注射 PCN ($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 诱导小鼠在体肝脏细胞高表达 oatp2^[12, 13]。

生物样本分析方法

灯盏乙素分析方法 流动相: 甲醇-水 (磷酸二氢钾 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为 73 : 27 (v/v); 流速: $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$); 检测波长: 335 nm; AUFS: 0.004; 柱温: 室温。

普伐他汀分析方法 流动相: 甲醇- $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵 (55 : 45, v/v); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$); 检测波长: 238 nm; AUFS: 0.004; 柱温: 室温。

统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 DAS1.0 统计软件及 SPSS13.0 统计软件对数据进行 t 检验和方差分析。

结果

1 在体药动学研究

A、B、C 组小鼠静脉注射灯盏乙素 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后, 平均血药浓度-时间曲线见图 1, 平均肝药浓度-时间曲线见图 2。通过采用 DAS1.0 统计软件分析表明, 灯盏乙素平均药时曲线符合二室模型, 以二室模型计算的血药浓度主要药动学参数见表 1, 肝药浓度

主要药动学参数见表 2。

对上述结果运用 SPSS13.0 统计软件进行检验分析: A 组 (预先给予高剂量普伐他汀处理组) 各时间点的平均灯盏乙素血药浓度高于 C 组, 差别有统计学意义。B 组各对应时间点血药浓度较 C 组有增加的趋势。

对上述结果运用 SPSS13.0 统计软件进行检验分析: A、B、C 组的灯盏乙素血浆 $t_{1/2\beta}$ 没有统计学差异, 而 A 组血浆 CL 显著小于 C 组、 $\text{AUC}_{(0-2 \text{ h})}$ 及 $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ 显著高于 C 组。A、B、C 组的灯盏乙素肝脏 $t_{1/2\beta}$ 亦没有统计学差异, 而 A 组的肝脏 CL 较 C 组有增加的趋势、 $\text{AUC}_{(0-2 \text{ h})}$ 及 $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ 较 C 组有降低的趋势。

2 药物对小鼠原代肝细胞的抑制作用

分别考察不同浓度的普伐他汀及灯盏乙素对小鼠原代肝细胞的抑制作用, MTT 检测结果表明: 普伐他汀及灯盏乙素的药物浓度分别在 $1.25 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \sim 24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率在 80% 以上; 当药物浓度超出此浓度范围时, 部分细胞则出现细胞毒作用并伴随细胞形态学的改变。

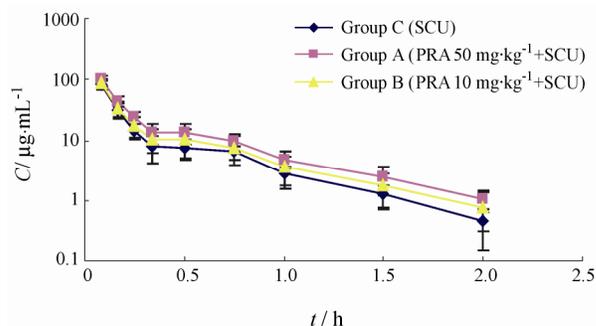


Figure 1 Plasma concentration-time curves of group A, group B and group C. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. SCU: Scutellarin $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; PRA: Pravastatin

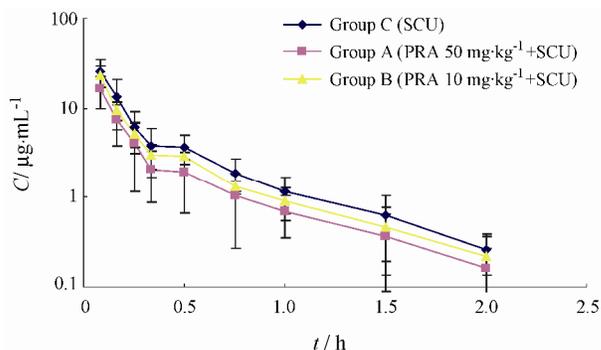


Figure 2 Liver drug concentration-time curves of group A, group B and group C. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. SCU: Scutellarin $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; PRA: Pravastatin

Table 1 Effect of coadministration of pravastatin on plasma pharmacokinetic parameters of scutellarin. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. SCU: Scutellarin 50 mg·kg⁻¹; PRA: Pravastatin. * $P < 0.05$ vs group C

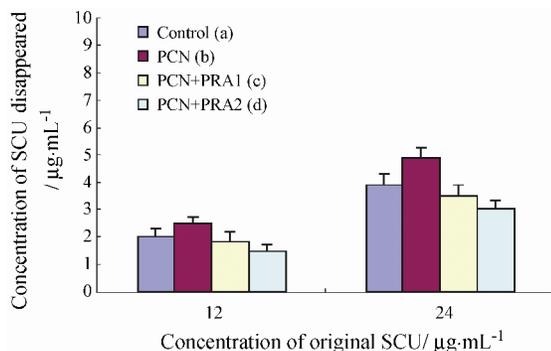
Parameter	Group A (PRA 50 mg·kg ⁻¹ + SCU)	Group B (PRA 10 mg·kg ⁻¹ + SCU)	Group C (SCU)
$t_{1/2\beta}$ /h	0.439 ± 0.013	0.426 ± 0.021	0.435 ± 0.015
CL/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	2.005 ± 0.104*	2.546 ± 0.245	3.045 ± 0.112
AUC _(0-2h) /mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	24.290 ± 1.894*	19.197 ± 2.053	16.169 ± 1.968
AUC _(0-∞) /mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	24.931 ± 1.936*	19.635 ± 2.187	16.420 ± 1.994

Table 2 Effect of coadministration of pravastatin on liver pharmacokinetic parameters of scutellarin. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. SCU: Scutellarin 50 mg·kg⁻¹; PRA: Pravastatin. * $P < 0.05$ vs group C

Parameter	Group A (PRA 50 mg·kg ⁻¹ + SCU)	Group B (PRA 10 mg·kg ⁻¹ + SCU)	Group C (SCU)
$t_{1/2\beta}$ /h	0.532 ± 0.020	0.496 ± 0.019	0.502 ± 0.023
CL/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	1.556 ± 0.108*	1.235 ± 0.223	0.935 ± 0.096
AUC _(0-2h) /mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	3.695 ± 0.239*	5.027 ± 0.207	6.184 ± 0.312
AUC _(0-∞) /mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	3.795 ± 0.212*	5.169 ± 0.199	6.333 ± 0.451

3 灯盏乙素在新鲜小鼠肝细胞中摄取转运

在 a、b、c、d 组中, 每组加入灯盏乙素的浓度分别为 12 和 24 μg·mL⁻¹, 每个浓度 6 个复孔。置于 37 °C 空气浴振荡器中振荡孵育 5 min, 测定结果见图 3。

**Figure 3** Concentration of SCU remained in differently treated hepatocyte incubation solution, compared with corresponding control group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. SCU: Scutellarin; PRA1: Pravastatin (5 μg·mL⁻¹); PRA2: Pravastatin (10 μg·mL⁻¹); PCN: Pregnenolone-16 α -carbonitrile

对上述结果运用 SPSS13.0 统计软件进行检验分析: b 组肝细胞对灯盏乙素的摄取较 a 组增加, 差异有统计学意义; 当诱导肝细胞悬液中同时加入普伐他汀时, 肝细胞对灯盏乙素的摄取减少, 且加入普伐他汀高浓度组较较低浓度组摄取率小。

讨论

根据测定的血药浓度数据, 计算并统计其主要

药动学参数, 小鼠尾静脉给予灯盏乙素药动学符合二室模型。A 组即预先连续每天 50 mg·kg⁻¹ 灌胃给予普伐他汀组, 对应时间点血药浓度及肝药浓度分别与 C 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), A 组小鼠的灯盏乙素血药浓度升高, 而在肝脏中的药物浓度下降。

原代肝细胞培养作为一种体外模型, 有其突出的优点^[14]: ① 能与体内情况保持较好的一致性, 酶量和辅助因子的水平都是正常的生理浓度, 可以在接近生理状态的情况下研究药物的代谢及毒性; ② 能较好地保留和维持肝细胞的完整形态及肝细胞体外代谢活性, 真实反映了体内的代谢情况。本实验运用悬浮培养法, 实验过程需要在 10 min 内完成, 细胞内酶活性相对维持在较高的水平。分离得到的细胞活性满足实验要求。本实验使用 PCN 成功诱导小鼠肝脏细胞, 使细胞高表达 *oatp2*, 通过运用 *oatp2* 特异性底物普伐他汀进行验证实验, 结果发现: 诱导组肝细胞悬液对灯盏乙素的摄取较空白组高。

以上研究结果可得出如下结论: 高剂量普伐他汀对灯盏乙素的 AUC 有增高作用, 因为灯盏乙素可以被肝脏较快代谢, 所以可能的原因之一是普伐他汀通过与灯盏乙素竞争 *oatp2* 的转运, 抑制了肝血窦面 *oatp2* 对灯盏乙素的摄取, 从而限制了肝药酶对灯盏乙素的暴露, 使得其代谢转化下降。普伐他汀对灯盏乙素的肝脏水平有一定的降低趋势, 可能原因是前者对后者的作用不如个体间的差异显著。目前的研究认为普伐他汀和灯盏乙素之间可能存在潜在的药物相互作用, 可能是通过相互竞争 *oatp2* 介导的转运

通路而发生的, 这种通路存在于肝脏对灯盏乙素的摄取中。但是作者在体外肝细胞实验中仅应用了 *oatp2* 诱导剂 PCN, 因此为了明确普伐他汀对灯盏乙素在肝脏转运过程中的影响就是通过 *oatp2* 通路, 还有待于进一步研究。

References

- [1] Zhang CX, Kang LY, Hu LM, et al. Advances in pharmacologically active components of *Erigeron breviscapus* (Vant) Hand Mazz [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2008, 17: 110–113.
- [2] Liu H, Liao WJ, Wei L, et al. Effects of Dengzhan Xixin on blood-brain barrier permeability and metabolites after cerebral ischemia-reperfusion injuries [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2009, 34: 208–211.
- [3] Ding JS, Zhang JS. Absorption of breviscapine in small intestine of rat [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2003, 34: 65–69.
- [4] Zhang HY, Ping QN. Effects of drug transporters on intestinal absorption of breviscapine [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2007, 38: 60–64.
- [5] Liu YM, Lin AH, Chen H, et al. Study on pharmacokinetics of scutellarin in rabbits [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2003, 38: 775–778.
- [6] Zhang XD, Liu J, Zhang WB, et al. Research advance on cardiovascular pharmacological and clinical application of breviscapinum [J]. Chin Pharm (中国药业), 2007, 21: 4–6.
- [7] Shitara Y, Hirano M, Sato H, et al. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide2 (OATP2/OATP1B1)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 311: 228–236.
- [8] Niu XC, Fang F. An improved method for the primary culture of murine hepatocytes [J]. Acta Univ Med Tongji (同济医科大学学报), 2000, 29: 160–162.
- [9] Ding CG, Ge QH. Study on the Pharmacokinetics of Scutellarin and an Unknown Metabolite in Animals (灯盏乙素及其未知代谢物的动物体内药物动力学研究) [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, 2006: 5.
- [10] You HS, Dong YL, Xing JF, et al. Pharmacokinetic and tissue distribution study of scutellarin in rats [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1688–1690.
- [11] SiTu ZQ, Wu JZ. Cell Culture (细胞培养) [M]. Beijing: The World Publishing Company, 2007: 137–138.
- [12] Staudinger J, Liu YP, Magan A, et al. Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor [J]. Am Soc Pharmacol Exp Ther, 2001, 29: 1467–1472.
- [13] Tanino T, Nawa A, Nakao M, et al. Organic anion transporting polypeptide 2-mediated uptake of paclitaxel and 2'-ethylcarbonate-linked paclitaxel in freshly isolated rat hepatocytes [J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61: 1029–1035.
- [14] Deng Y, Chen J, Bi HC, et al. Primary hepatocyte culture and its application in drug metabolism and toxicology research and evaluation [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2006, 22: 900–903.