

小分子药物跨膜转运与作用靶点* ——对中药小分子药理研究的思考

赵 爽^{1,2}, 姜敬非¹, 王雪莉¹, 谢伟东³, 余 焯¹, 杜力军^{1**}

(1. 清华大学生命科学学院药物药理实验室 北京 100084; 2. 加拿大阿尔伯塔大学化学系 埃德蒙顿 T6G2G2; 3. 清华大学深圳研究生院生命与健康学部 深圳 518055)

摘 要: 本文以中药小分子为例对小分子药物的跨膜转运研究进展及方法进行了综述,并结合作者研究成果,对小分子药物跨膜转运与作用靶点进行了分析和探讨。目前,研究小分子转运的检测方法有 HPLC、LC/MS,还可以借助其荧光成像利用共聚焦技术进行观测。在研究过程中,确定小分子的转运方式的同时,也要探讨其外排方式,并要确定其有无代谢及其可能的代谢产物。对小分子药物的细胞跨膜转运研究将有助于确定小分子作用的靶点,有助于对其药理作用的探讨和阐释。

关键词: 小分子药物 跨膜转运 神经细胞 天然小分子

doi:10.11842/wst.2016.06.015 中图分类号:R965.1 文献标识码:A

对小分子在细胞水平的跨膜转运研究,最早开始于对神经递质在突触传递过程中的性质研究^[1]。多种内源性小分子的跨膜转运和代谢过程已被报道^[2,3]。外源性药物分子在细胞水平的运输、代谢行为是发挥药效的基础^[4]。因此,药物的跨膜转运及代谢过程研究,对确定药物作用靶点,阐明药理活性的分子机制以及理解其药效物质基础十分重要^[5,6]。本文结合作者的研究成果,对小分子尤其是天然小分子的跨膜转运进行了综述和分析,旨在对这一命题进行交流,以促进天然小分子的新药研发。

1 小分子跨膜转运入胞特点

几种小分子跨膜转运的机制模型已被研究证实,包括不借助载体的简单扩散、载体介导的易化扩散、主动运输等^[7]。其中,易化扩散与主动运输需要转运蛋白的协助,表现出底物特异性的特点;主动运

输依靠 ATP 或者离子势能提供能量,可以逆浓度梯度跨细胞膜运输物质。药物分子根据其大小、化学结构、在胞外环境中电荷性质等因素会有不同的跨膜运输入胞的行为(Uptake into Cells)。一般而言,非离子型、亲脂性的药物分子更容易通过细胞膜的脂双层进入胞内;而亲水性的药物则较难通过简单扩散进入细胞,它们的跨膜转运需要借助载体的辅助,一些体积较大的分子则有可能通过胞吞的方式进入细胞^[8]。因此,小分子药物电荷、极性/非极性功能团的改变,能显著影响其跨膜运输的方式,进而影响其作用靶点^[9,10]。例如,麻黄碱与甲基苯丙胺是肾上腺素的结构类似物,其去除了肾上腺素苯环上的极性羟基基团(图1)。因此,与肾上腺素相比,它们更容易穿过细胞膜进入细胞,这促进了它们在肠道的吸收与在大脑的分布^[11]。同时,结构上的改变也影响它们在细胞水平的作用方式。尽管麻黄碱与肾上腺素一样,可以与甲基苯丙胺都能够直接刺激神经突触,作用于细胞表面的肾上腺素受体,但它们

收稿日期 2016-05-24

修回日期 2016-06-14

* 科学技术部“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102-201-008) 国家一类中药新药巴西苏木红素注射剂的研究,负责人:杜力军,清华大学创新基金(LF20103579) 小分子药物跨膜转运的研究,负责人:杜力军。

** 通讯作者:杜力军,本刊编委,教授,主要研究方向:药理学。

的主要作用于胞内靶点,促进去甲肾上腺素的释放^[12,13]。因此,药物分子在细胞水平跨膜转运的研究对理解其作用靶点与作用方式有重要意义。

2 研究跨膜转运与作用靶点的新方法

2.1 高效液相色谱-质谱联用

研究细胞内外药物分子含量变化及代谢产物,阐述药物分子跨细胞膜转运的可能性与方式(简单扩散、易化扩散、主动运输等)常用高效液相色谱-质谱联用法(High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS)。该方法主要通过液相色谱定量分析细胞内外药物分子的含量与给药剂量、能量需求以及时间等的关系,来判断其转运方式^[14]。而质谱作为检测器,具有高灵敏度、低检测限、可进行结构分析的特点。HPLC-MS技术可以准确测定胞内外低浓度的药物分子。此外,进入胞内的原型药物分子可能会在胞内代谢酶的作用下发生结构转变,而结合靶点、发挥其药效功能的也可能是其结构类似物。因此,利用HPLC-MS技术探索其所有可能结构类似物,能够帮助我们了解其发挥药效的物质基础^[15,16]。

2.2 荧光成像定量

荧光成像定量法主要研究细胞内外药物分子含量变化及区域分布。一些含有共轭结构或刚性平面结构的药物分子具有荧光性质,利用激光扫描共聚焦显微镜等高分辨率、高灵敏度的显微成像手段,可以直接观察该类药物跨膜转运进入细胞的过程,甚至可以进一步描述其在胞内分布的情况,例如观察其是否可进入细胞核发挥药效功能,以此判断其作用靶点是否位于细胞核内^[17]。同时,基于荧光强度的定量分析也可以描述其跨膜转运、胞内分布的动力学特点^[14]。

2.3 谱学分析技术

谱学分析技术主要利用小分子化合物与细胞膜不同区域结合后相关谱信号(如核磁共振波谱NMR、电子自旋共振谱ESR等)产生的变化研究转运过程的细节。例如,由于药物分子在不同化学环境中NMR谱特征峰会发生迁移,根据谱图可以判断在跨膜转运过程中与药物分子结合的细胞膜化学成分(例如膜脂质组成),进而推断其转运方式与相关机制^[18]。此外,通过对细胞膜不同区域进行自旋标记,利用ESR谱也可以判断药物分子与细胞膜相互作用的

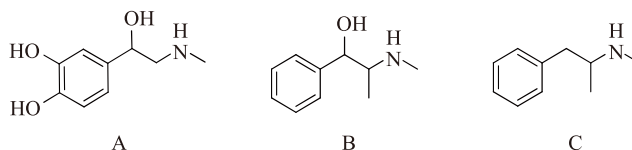


图1 肾上腺素(A)、麻黄碱(B)与甲基苯丙胺(C)的结构式

具体机制^[19]。

2.4 转运蛋白研究技术

转运蛋白研究技术可以明确参与转运过程的其他成分,尤其是转运蛋白的信息。目前,最主要的两类转运蛋白是ABC转运蛋白超家族(ATP-Binding Cassette Superfamily)^[20]和SLC转运蛋白超家族(Solute Carrier Superfamily)^[21]。ABC转运蛋白(从ATP水解过程获得能量,一般发挥着药物外排的功能,例如P-糖蛋白(P-glycoprotein),而SLC转运蛋白(如有机阴离子转运体)则主要参与吸收小分子进入细胞的过程。了解药物分子进入细胞与外排的过程,能从时间、空间等多种角度理解其在细胞水平的作用机制,同时对研究药物间相互作用也有指导意义。这方面的实验思路包括在药物作用情况下的蛋白定量^[22],通过蛋白表达调控观察药物转运的变化、采用特定转运体抑制剂等^[23]。

另外,除了直接实验研究转运蛋白与药物分子的相互作用,利用计算机模拟,也可以通过化学结构角度判断药物-蛋白结合的可能性,推断其转运机制。计算机辅助分子对接技术就是基于转运蛋白与分子结构,虚拟研究其可能的转运方式。鉴于其低成本、迅速方便的特点,在初期筛选可能转运蛋白的过程中发挥重要作用^[24]。

3 研究跨膜转运与作用靶点的新思路

众所周知,转运蛋白对手性药物具有立体选择性。现阶段的研究要求药物小分子化学结构与跨膜转运机制的关系被更全面、更细致的理解^[25]。其中很重要的发现是转运蛋白对药物的手性异构体具有立体选择性的作用,而同时药物分子的手性结构也与其作用机理、靶点相关联^[26]。

“单转运体”(Carrier-Mediated Transport)理论对“共同存在”(Transmembrane-Diffusion Transport)理论转运的冲击。在定量研究的基础上,药物跨膜转运的基本观点也得到了客观的讨论^[8]。传统观点中,载体介导的转运与被动扩散共同构成了分子跨膜转

运的主要机制。近年来,有研究报道认为,相比较载体介导的转运,跨细胞膜脂双层的被动扩散在分子转运过程中没有显著的重要性。这两种观点(即“共同存在”理论与“单转运体”理论)引发了多方面的讨论与研究^[27,28]。尽管目前没有形成统一的定论,但这样的思辨与讨论将显著促进药物跨膜转运与作用靶点的研究。

在调控药物跨膜转运过程方面,除对药物跨膜转运机制理解研究外,越来越多的研究开始关注如何促进药物跨膜转运的过程,以此提高药物的生物利用度。其中,细胞穿透肽引起广泛关注,这种短肽链可以帮助携带多种结构的分子进入细胞,包括小分子化合物、大分子蛋白、病毒颗粒等^[29]。如何利用该技术,在不影响药物作用靶点的情况下促进其跨膜转运,成为研究热点^[30,31]。

4 天然小分子跨膜转运的研究

我们曾经对小檗碱(Berberine)这一具有多种药理活性的天然小分子进行了研究。小檗碱作为一个经典的抗肠道感染药物,能够作用于中枢神经,具有调节脑功能的作用。除了药理研究之外,对其在脑内的分布及其神经元跨膜转运的研究,则是从物质上提供了小檗碱能否作用于中枢神经系统的直接证据。首先,我们在脑内组织分布和脑脊液等相关实验中,在脑内检测出小檗碱,证明其可以在脑内分布。随后,我们对其在神经细胞跨膜转运方面进行了研究,表明小檗碱可以跨细胞转运,其转运方式为主动转运,且有易化扩散的特点,其向胞内转运需要阳离子转运体介入。进入到细胞内小檗碱则由分布于细胞膜上的逆转运蛋白p-糖蛋白(p-glycoprotein, p-GP)转运出细胞。由此表明,小檗碱可以进入细胞内,直接作用于胞内或核内相关靶点而起到相应的药理作用,为小檗碱可以作用于中枢神经系统提供了实验证据^[32,33]。

此外,针对小檗碱抗肿瘤作用,且不同组织源瘤细胞对小檗碱耐受量差异明显的现象,我们从跨膜转运角度、选择了3种报道最多的瘤细胞(人源肝癌HepG2,人源宫颈癌HeLa,人源小胶质SY5Y)进行小檗碱跨膜转运的研究。结果表明,小檗碱均可

跨膜转入这3种细胞,并经细胞膜上的逆转运蛋白p-GP转出。但是,其中的HeLa和SY5Y细胞中小檗碱胞内浓度在达峰后很快下降,而HepG2细胞中小檗碱浓度持续维持在高浓度水平。由此说明,不同瘤组织源细胞对小檗碱耐药量的差异与维持细胞内有效浓度有关。进一步观察发现,HeLa和SY5Y细胞中p-GP表达上调,而HepG2细胞的p-GP表达则下调,由此也就解释了HepG2细胞内小檗碱浓度维持在较高水平与其逆转运蛋白表达受到抑制有关。对这3种细胞构建启动子的质粒的实验结果表明,小檗碱对这3种细胞的基因转录表达均无明显作用。这提示不同瘤源细胞胞内的复杂性^[34]。

巴西苏木红素(Brazilein)具有防治脑缺血损伤的作用,我们对其进行了神经细胞的跨膜转运实验。观察结果表明,巴西苏木红素以被动扩散的方式进入细胞,也经逆转运蛋白p-PG转出。同时,巴西苏木红素在神经细胞内经儿茶酚氧位甲基转移酶(Catechins Oxygen Methyl Transferase, COMT)催化,生成新的代谢产物10-O-甲基巴西苏木红素。该研究首次发现并报道了神经元内COMT催化天然小分子的现象^[14]。

对黄芩苷(Baicalin)的神经元跨膜转运研究表明,黄芩苷跨膜进入神经细胞呈浓度依赖性,且受到钙离子拮抗剂和p-GP抑制剂的影响。进入细胞内的黄芩苷可以产生代谢产物6-甲氧基-黄芩苷,这一代谢产物在给药小鼠的外周血内也可以检测到。由此也更正了以往认为的6-甲氧基-黄芩苷为体内(肝)代谢产物的认识。而且,这一代谢产物很可能来自于中枢神经系统^[35]。

5 小结

由于小分子药物作用的最终靶位在细胞,包括细胞膜受体、细胞内的亚细胞器或细胞因子、细胞核等。因此,小分子细胞跨膜转运研究,将有助于快速找到小分子的作用靶点,对及时区分和确定其作用靶点位置具有一定的参考价值。同时,小分子的跨膜转运方式、排除机制及胞内代谢产物的检测与分析等,都有助于发现和解释小分子复杂的药理作用机制。

参考文献

- Iversen L L. In biochemistry of biogenic amines. Boston: Springer US, 1975: 381–442.
- Amara S G, Kuhar M J. Neurotransmitter transporters—recent progress. *Annu Rev Neurosci*, 1993, 16: 73–93.
- Masson J, Sagne C, Hamon M, *et al.* Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, 1999, 51 (3): 439–464.
- Delmas D, Lin H Y. Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: Consequences in bioavailability and activities. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55 (8): 1142–1153.
- Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36 (7): 829–837.
- Huber-Ruano I, Pastor-Anglada, M. Transport of nucleoside analogs across the plasma membrane: A clue to understanding drug-induced cytotoxicity. *Curr Drug Metab*, 2009, 10 (4): 347–358.
- Cooper G M, Hausman R E. The cell: a molecular approach. Washington: ASM Press, 2009: 515–557.
- Kell D B, Dobson P D, Oliver S G. Pharmaceutical drug transport: the issues and the implications that it is essentially carrier-mediated only. *Drug Dis Today*, 2011, 16 (15–16): 704–714.
- Palmer M, Chan A, Dieckmann T, *et al.* Notes to Biochemical Pharmacology. Wiley, 2013: 31–55.
- Kell D B, Oliver S G. How drugs get into cells: tested and testable predictions to help discriminate between transporter-mediated uptake and lipoidal bilayer diffusion. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 231.
- Cannon J G. Pharmacology for chemists. Oxford Oxford University Press, 2007: 120.
- Andersen T W, Gravenstein J S. Mephentermine and ephedrine in man: A comparative study on cardiovascular effects. *Clin Pharmacol Therapeut*, 1964, 5 (3): 281–285.
- Kobayashi S, Endou M, Sakuraya F, *et al.* The sympathomimetic actions of l-ephedrine and d-pseudoephedrine: direct receptor activation or norepinephrine release? *Anesth Analg*, 2003, 97 (5): 1239–1245.
- Zhao S, Wang X P, Jiang J F, *et al.* Transport and metabolism behavior of brazilein during its entrance into neural cells. *PLoS One*, 2014, 9 (10): e108000.
- Southam A D, Khanim F, Hayden R E, *et al.* Mass spectrometry metabolomics analysis of acute myeloid leukaemia cell responses to bezafibrate and medroxyprogesterone acetate. *Exp Hematol*, 2011, 39 (8): S89–S90.
- Chen C, Gonzalez F J, Idle J R. LC–MS–based metabolomics in drug metabolism. *Drug Metab Rev*, 2007, 39 (2–3): 581–597.
- Wang Y G, Kheir M M, Chai Y S, *et al.* Comprehensive study in the inhibitory effect of berberine on gene transcription, including TATA box. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23495
- Matam Y, Ray B D, Petrache H I. Direct affinity of dopamine to lipid membranes investigated by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Neurosci Lett*, 2016, 618: 104–109.
- Wyse J W, Blank M E, Maynard C L, *et al.* Electron–spin resonance investigation of the interaction of the anion and glucose–transport inhibitor, p-azidobenzylphlorizin, with the human red-cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 979 (1): 127–131.
- Borst P, Elferink R O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 537–592.
- Lin L, Yee S W, Kim R B, *et al.* SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14 (8): 543–560.
- Kamiie J. Progress of drug transport study based on absolute quantitative method for membrane transporter proteins. *Yakugaku Zasshi J Pharm Soc Jpn*, 2008, 128 (4): 507–512.
- Jeong H S, Ryoo I G, Kwak M K. Regulation of the expression of renal drug transporters in KEAP1-knockdown human tubular cells. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29 (5): 884–892.
- Schlessinger A, Khuri N, Giacomini K M, *et al.* Molecular modeling and ligand docking for Solute Carrier (SLC) transporters. *Current Topics Med Chem*, 2013, 13 (7): 843–856.
- Reboul E. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: Focus on transport proteins. *Nutrients*, 2013, 5 (9): 3563–3581.
- Zhou Q, Yu L S, Zeng S. Stereoselectivity of chiral drug transport: a focus on enantiomer–transporter interaction. *Drug Metab Rev*, 2014, 46 (3): 283–290.
- Kell D B. What would be the observable consequences if phospholipid bilayer diffusion of drugs into cells is negligible? *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36 (1): 15–21.
- Matsson P, Fenu L A, Lundquist P, *et al.* Quantifying the impact of transporters on cellular drug permeability. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36 (5): 255–262.
- Ramsey J D, Flynn N H. Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol Ther*, 2015, 154: 78–86.
- Randhawa H K, Gautam A, Sharma M, *et al.* Cell-penetrating peptide and antibiotic combination therapy: a potential alternative to combat drug resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100 (9): 4073–4083.
- Szabo I, Orban E, Schlosser G, *et al.* Cell-penetrating conjugates of pentaglutamylated methotrexate as potential anticancer drugs against resistant tumor cells. *Eur J Med Chem*, 2016, 115: 361–368.
- Wang X L, Wang R F, Xing D M, *et al.* Kinetic Difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of Coptidis rhizome extract. *Life Sci*, 2005, 77(24): 33058–33067
- Chen Y Y, Wang X L, Sun H, *et al.* Characterization of the transportation of berberine in Coptidis rhizoma extract through rat primary cultured cortical neurons. *Biomed Chrom*, 2008, 22: 28–33.
- Pang Y N, Liang Y W, Feng T S, *et al.* Transportation of berberine into

HepG2, HeLa and SY5Y cells: A correlation to its anti-cancer effect.
PLoS One, 2014, 9 (11): e112937.

35 赵爽,雷帆,李慧颖,等.黄芩苷 PC12 细胞跨膜转运的实验研究.中国药理学通报,2012,28(6): 839-842.

Cell Membrane Transport and Targets of Small Molecules--Thinking over Pharmacological Researches on Small Molecules from Extracts of Chinese Materia Medica

Zhao Shuang^{1,2}, Jiang Jingfei¹, Wang Xueli¹, Xie Weidong³, Yu Xuan¹, Du Lijun¹

(1. Laboratory of Molecular Pharmacology and Pharmaceutical Science, School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton T6G2G2, Canada;

3. Division of Life Science & Health, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)

Abstract: In this paper, a research progress on the transmembrane transport of small-molecular drugs, especially natural small-molecular drugs, was summarized. Combined with previous studies in our group, the details in transmembrane transport of small molecules were explained and discussed. Detection methods of transport of small molecules involved HPLC and LC / MS, and fluorescence imaging via confocal observation techniques. During the studies, transportations of small molecules needed to be determined, while efflux means also should be explored to confirm whether accompanying with metabolism and related metabolites. In conclusion, the studies of cell membrane transport of small-molecular drugs may help determine the targets of small molecules and elucidate their pharmacological actions.

Keywords: Small molecules, transmembrane transport, neurons, natural small molecule

(责任编辑 :马雅静 ,责任译审 :朱黎婷)