

# 吗替麦考酚酸酯及其活性代谢物麦考酚酸的跨膜转运机制研究

余自成<sup>1</sup>, 田薇薇<sup>1</sup>, 马明华<sup>1</sup>, 刘霞<sup>1</sup>, 陈红君<sup>1</sup>, 陈红专<sup>2</sup> (1. 同济大学附属杨浦医院临床药理学和药理学研究室, 上海 200090; 2. 上海交通大学医学院药理学教研室, 上海 200025)

**摘要:**目的 研究吗替麦考酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF)及其活性代谢物麦考酚酸(mycophenolic acid, MPA)的跨膜转运机制。方法 建立Caco-2细胞单层模型,进行吗替麦考酚酸酯及麦考酚酸转运实验,用LC-MS/MS方法测定转运实验样品中吗替麦考酚酸酯和麦考酚酸浓度,计算表观通透系数 $P_{app}$ 和外排率 $P_{ratio}$ ,评价药物转运及外排作用,P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)抑制剂维拉帕米用于评价P-gp在吗替麦考酚酸酯和麦考酚酸肠道吸收转运中的作用。结果 麦考酚酸在10、50和100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双向转运的表观通透系数 $P_{app,ab}$  [和 $P_{app,ba}$ ]分别为 $(9.70 \pm 0.40) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  [ $(13.52 \pm 0.28) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ]、 $(9.35 \pm 0.62) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  [ $(11.38 \pm 0.59) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ]和 $(8.69 \pm 0.69) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  [ $(10.53 \pm 0.64) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ];外排率 $P_{ratio}$ 分别为1.39、1.22和1.22,维拉帕米明显降低了外排率。吗替麦考酚酸酯在穿过Caco-2细胞单层转运过程中大部分被水解为麦考酚酸,麦考酚酸转运的量随转运时间延长而不断增加,而吗替麦考酚酸酯转运的量随时间无明显变化。维拉帕米对吗替麦考酚酸酯转运无明显影响。结论 麦考酚酸的跨膜转运受到由转运载体介导的主动转运外排作用影响,P-gp参与了麦考酚酸的跨膜转运。吗替麦考酚酸酯的跨膜转运不存在P-gp的作用,为被动转运。

**关键词:**吗替麦考酚酸酯;麦考酚酸;跨膜转运;机制;P-糖蛋白

**doi:**10.11669/epj.2014.03.015 **中图分类号:**R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-2494(2014)04-0322-07

## Investigation on the Mechanism of Transmembrane Transport of Mycophenolate Mofetil and Its Active Metabolite Mycophenolic Acid

YU Zi-cheng<sup>1</sup>, TIAN Wei-wei<sup>1</sup>, MA Ming-hua<sup>1</sup>, LIU Xia<sup>1</sup>, CHEN Hong-jun<sup>1</sup>, CHEN Hong-zhuan<sup>2</sup> (1. Institute of Clinical Pharmacy and Pharmacology, Yangpu Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200090, China; 2. Department of Pharmacology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the mechanism of transmembrane transport of mycophenolate mofetil (MMF) and its active metabolite mycophenolic acid (MPA). **METHODS** Caco-2 cell monolayer model was developed for MMF and MPA transport experiment, and the LC-MS/MS method was used for the determination of MMF and MPA concentration in transport medium. The apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) and efflux ratio ( $P_{ratio}$ ) were calculated and used for the evaluation of the ability of drug transport and drug efflux across Caco-2 cell monolayer. **RESULTS** The  $P_{app}$  of MPA in two-way transport experiment ( $P_{app,ab}$  and  $P_{app,ba}$ ) at 10, 50 and 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  were  $(9.70 \pm 0.40) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  [ $(13.52 \pm 0.28) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ],  $(9.35 \pm 0.62) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  [ $(11.38 \pm 0.59) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ],  $(8.69 \pm 0.69) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  [ $(10.53 \pm 0.64) \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ], respectively.  $P_{ratio}$  were 1.39, 1.22 and 1.22, respectively.  $P_{ratio}$  of MPA was reduced by verapamil, a well-known P-glycoprotein inhibitor. MMF was mostly hydrolyzed to MPA during the transport process across the Caco-2 cell monolayer. The amount of MPA transported increased with time, but the amount of MMF transported changed not significantly over time and no significant effect of verapamil was observed. **CONCLUSION** The transmembrane transport of MPA is affected by active transport efflux mediated by transporter with P-gp involved. No effect of P-gp is found in MMF transmembrane transport, which is passive transport.

**KEY WORDS:** mycophenolate mofetil; mycophenolic acid; transmembrane transport; mechanism; P-glycoprotein

吗替麦考酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF)是一种重要的免疫抑制药物,已获批准用于肾脏、肝脏和心脏移植预防器官排异反应,该

药物现已成为首选抗代谢增殖类免疫抑制药物,在各种免疫抑制方案中广泛应用<sup>[1-2]</sup>。MMF为前体药物,口服给药后转变为其活性产物麦考酚

作者简介:余自成,男,博士,主任药师 研究方向:临床药理学和临床药理学 Tel/Fax:(021)65690520-361 E-mail:yzcheng666@hot-mail.com

酸(mycophenolic acid, MPA)发挥其免疫抑制作用。MMF口服给药后其活性产物MPA药动学在患者个体间及个体内存在显著变异性,剂量归一化的MPA-AUC变异幅度达十倍以上<sup>[3-5]</sup>。MPA药动学与药效学的相关关系在临床上已得到广泛确认,MPA药动学变异会导致不同的临床结果<sup>[6-7]</sup>。了解MMF和MPA的跨膜转运机制,评价P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)在二者肠道吸收转运中的作用,对于进一步研究药物吸收转运过程中药物相互作用,为临床合理用药可提供科学依据。本实验阐明了MMF和MPA跨膜转运机制,现将研究结果进行报道。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1200系列高效液相色谱系统,包括Quat Pump G1311A四元泵、G1329A自动进样器、G1314B可变波长紫外检测器、G1322A在线真空脱气机、G1316A柱温箱(安捷伦科技公司,USA);Agilent 6410 Triple Quad LC/MS,Agilent Mass Hunter Workstation软件(安捷伦科技公司,USA)。Centrifuge 5804R型低温高速离心机(Eppendorf公司,Germany),Varioskan Flash全波长多功能读数仪(Thermo Scientific公司),NUAIRE生物安全柜(Class II)(NUAIRE公司,USA),水套式恒温CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo Electron公司,USA),荧光倒置显微镜(OLYMPUS IX70)(OLYMPUS公司,Japan),Millicell®-ERS细胞电位仪(Millipore公司,USA),STX-100M电极(World Precision Instruments公司,Sarasota,FL),Bio-Rad 680型酶标仪(Bio-Rad, Hercules公司,CA,USA),Milli-Q超纯水系统(Millipore公司,USA)。

### 1.2 药品、试剂与材料

MMF对照品(纯度99.0%,批号:CC00020011,Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany);MPA对照品(纯度99.8%,批号:1150383,Roche Bioscience, Palo Alto, CA);内标吡喹酮对照品(IND,纯度99.2%,批号:115K0689,Sigma-Aldrich公司,USA);维拉帕米对照品(VER,纯度99.1%,批号:100223-200102,中国药品生物制品检定所);Caco-2细胞(上海细胞库);胰蛋白酶-EDTA(Gibco公司,USA);磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol·L<sup>-1</sup>,pH 7.25)(Gibco公司,USA);胎牛血清(FBS,Gibco公司,Invitrogen,USA);10 000 u·mL<sup>-1</sup>青-链霉素双

抗(吉诺生物医药技术公司);非必需氨基酸(Gibco公司,Invitrogen,USA);Dulbecco's Modified Eagle's Medium培养基(DMEM/HIGH,SH30022.01B)(HyClone公司,USA);50 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶(Corning Costar公司,USA);24孔细胞培养板(Corning Costar公司,USA);Millicell悬挂式细胞培养小室(PIRP12R48,1.0 μm,Millipore公司,USA)。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 实验方法

### 2.1 溶液配制

**2.1.1 Hank's平衡盐溶液(HBSS)配制** 精密称取CaCl<sub>2</sub> 140 mg、KCl 400 mg、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mg、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 100 mg、NaCl 8 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 100 mg、NaHCO<sub>3</sub> 350 mg、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 48 mg、D-glucose 4.5 g、HEPES 5.95 g加超纯水溶解并稀释至1 000 mL,用1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH调pH至7.4,经0.22 μm微孔滤器过滤除菌,分装,置于4℃冰箱贮存备用。

**2.1.2 MMF、MPA及VER工作液配制** 精密称取MMF对照品8.67 mg和MPA对照品6.41 mg分别于2 mL量瓶中用适量DMSO溶解后用HBSS液稀释至刻度,摇匀,即得浓度均为10 mmol·L<sup>-1</sup>的MMF和MPA贮备液,将此贮备液分别用HBSS液稀释成浓度均为10、50及100 μmol·L<sup>-1</sup>的工作液(DMSO体积比<1%)备用。另外,精密称取VER对照品11.36 mg于5 mL量瓶中用适量DMSO溶解后用HBSS液稀释至刻度,摇匀,即得浓度均为5 mmol·L<sup>-1</sup>的VER贮备液,将此贮备液用HBSS液稀释成浓度为25 μmol·L<sup>-1</sup>的工作液(DMSO体积比<1%)备用。

**2.1.3 含VER的MMF、MPA工作液配制** 精密称取MMF、MPA对照品,按照“2.1.2”项下方法操作,用VER工作液(含VER 25 μmol·L<sup>-1</sup>)替代HBSS液配制MMF及MPA浓度均为10、50和100 μmol·L<sup>-1</sup>的工作液备用。

### 2.2 Caco-2细胞单层模型的建立<sup>[8]</sup>

将Caco-2细胞接种于50 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶(corning)中,培养液为DMEM培养基(含FBS浓度为10%,青-链霉素双抗浓度为100 U·mL<sup>-1</sup>,非必需氨基酸浓度为1%),置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞接种24 h后更换培养液,以后隔天换液,约4~5 d细胞融合达90%后传代,用经37℃预热的消化液(0.25%胰蛋白酶)在室温下消化1~3 min,传代比率为1:3。取对数生长期细胞,用胰蛋

白酶消化制成细胞悬液,接种到 Millicell 小室内(细胞接种密度  $1 \times 10^5$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>),每个小室内加细胞悬液 0.2 mL, Millicell 小室外 24 孔 Corning 细胞培养板每孔加培养液 1.25 mL;第一周隔天换液,之后两周每天换液;接种 5 d 后用细胞电位仪测定跨上皮细胞电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER),以后每 3 d 测 1 次(一般约 21 d 模型建成)。

### 2.3 药物转运实验

#### 2.3.1 MMF、MPA 在 Caco-2 细胞单层的双向转运

将已建成 Caco-2 细胞单层模型的 Millicell 细胞培养小室弃去培养基,加 HBSS 液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内共浴 20 min,然后用 HBSS 液温和冲洗 3 次。首先,进行 A→B 池转运实验,A 池加入 MMF 或 MPA 工作液 0.2 mL,B 池加入空白 HBSS 液 1.25 mL,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,分别于 30、60、90、120 和 180 min 在 B 池中取样 100 μL,每次取样后补加等量空白 HBSS 液,实验过程中及实验后测定 TEER 值;然后,进行 B→A 池转运实验,A 池加入空白 HBSS 液 0.2 mL,B 池加入 MMF 或 MPA 工作液 1.25 mL,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,分别于 30、60、90、120 和 180 min 在 A 池中取样 100 μL,每次取样后补加等量空白 HBSS 液,实验过程中及实验后测定 TEER 值。转运实验样品中 MMF 和 MPA 浓度用 LC-MS/MS 方法测定<sup>[9]</sup>。

#### 2.3.2 VER 对 MMF、MPA 双向转运的影响

将已建成 Caco-2 细胞单层模型的 Millicell 细胞培养小室弃去培养基,加 HBSS 液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内共浴 20 min,然后用 HBSS 液温和冲洗 3 次,再将 VER 工作液加入 A 池和 B 池中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 20 min,弃去。首先,进行 A→B 池转运实验,A 池加入 MMF 或 MPA 工作液(含 VER) 0.2 mL,B 池加入 VER 工作液 1.25 mL,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,分别于 30、60、90、120 和 180 min 在 B 池中取样 100 μL,每次取样后补加等量 VER 工作液,实验过程中及实验后测定 TEER 值;然后,进行 B→A 池转运实验,A 池加入 VER 工作液 0.2 mL,B 池加入 MMF 或 MPA 工作液(含 VER) 1.25 mL,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,分别于 30、60、90、120 和 180 min 在 A 池中取样 100 μL,每次取样后补加等量 VER 工作液,实验过程中及实验后测定 TEER 值;转运实验样品中 MMF 和 MPA 浓度用 LC-MS/MS 方法测定<sup>[9]</sup>。

### 3 数据处理

表观通透系数  $P_{app}$  和外排率  $P_{ratio}$  分别按照式(1)和(2)计算<sup>[10-12]</sup>:

$$P_{app} = (dQ/dt) / (A \times c_0) \quad (1)$$

其中, $P_{app}$  反映药物转运能力的大小, $dQ$  为  $dt$  时间内的药物转运量, $A$  为表面积(此实验中为 0.33 cm<sup>2</sup>), $c_0$  为供给池中 MMF 或 MPA 的初始浓度。 $P_{app}$  单位为距离/时间(cm  $\cdot$  s<sup>-1</sup>)。

$$P_{ratio} = P_{app,ba} / P_{app,ab} \quad (2)$$

其中, $P_{ratio}$  代表药物净外排能力大小,同时可以预测外排作用引起的药物口服吸收减弱的程度。 $P_{app,ba}$  为分泌表观通透系数, $P_{app,ab}$  为吸收表观通透系数。

各组间差异显著性判定采用  $t$  检验。

### 4 结果

#### 4.1 MPA 在 Caco-2 细胞单层的双向转运实验

MPA 在 10、50 和 100 μmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 浓度进行转运实验,MPA 穿过 Caco-2 细胞单层从 A 侧向 B 侧转运  $P_{app,ab}$  经时变化见图 1。从图 1 中可以看出, $P_{app,ab}$  在 90 min 之前随时间有较大幅度增加,此后增幅变小。

转运 180 min 时,MPA 穿过 Caco-2 细胞单层从 A 侧向 B 侧转运  $P_{app,ab}$  和从 B 侧向 A 侧转运  $P_{app,ba}$  随浓度变化见图 2。从图 2 中可以看出, $P_{app,ba}$  随浓度增加明显降低,而  $P_{app,ab}$  随浓度增加降低不明显,在 3 个不同浓度 MPA 从 B 侧向 A 侧转运均明显快于从 A 侧向 B 侧转运,见表 1。在 VER 存在情况下,MPA 从 A 侧向 B 侧的吸收转运均有明显增加,而从 B 侧向 A 侧的分泌转运中、低浓度时明显减少,在高浓度时降低不明显,转运 180 min 时,MPA 穿过 Caco-2 细胞单层的吸收和分泌表观通透系数  $P_{app}$  改变情况见图 3。在 VER 存在情况下的外排率  $P_{ratio}$  有明显降低,见表 1。

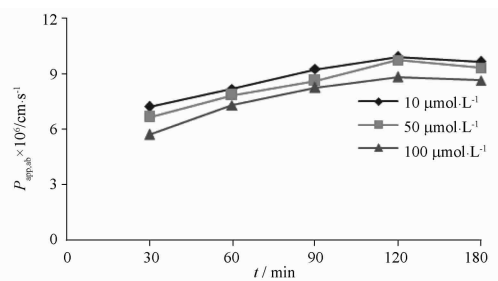


图 1 MPA 的  $P_{app,ab}$  经时变化图.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Time-dependent change of MPA  $P_{app,ab}$ .  $n = 3, \bar{x} \pm s$

## 4.2 MMF 在 Caco-2 细胞单层的双向转运实验

**4.2.1** MMF、MPA 穿过 Caco-2 细胞单层转运量的经时变化 在将 MMF 加入到 Caco-2 细胞单层模型 A 侧或 B 侧供池进行转运实验时,发现转运到对侧 (B 侧或 A 侧)接收池中的化合物主要是 MPA 而不是 MMF,此结果提示 MMF 在穿过 Caco-2 细胞单层转运过程中大部分被水解为 MPA。MMF 和 MPA 穿过 Caco-2 细胞单层转运的量随时间变化见图 4。由图 4 中可以看出,在 MMF 双向转运过程中,转运到对侧接收池中 MPA 的量随转运时间延长而不断增加,而转运到对侧接收池中 MMF 的量随时间无明显变化。

**4.2.2** 转运实验 180 min 后 MMF、MPA 在供池和接收池中量的差异 在 MMF 由 A 侧向 B 侧转运实验时,在 MMF 的 3 个不同浓度 (10, 50 和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),转运实验 180 min 后 A 侧供池中 MMF 量均为 B 侧接收池中量的 8 倍左右;而在由 B 侧向 A 侧转运实验时,转运实验 180 min 后 B 侧供池中 MMF 量与 A 侧接收池量的比例均在 30 倍左右。转运实验 180 min 后 MMF 存在于 A 池及 B 池的量在 VER 存在情况下无明显差异,A 池与 B 池中 MMF 量的比例亦无明显差异 ( $P > 0.05$ ),见表 2。

在 MMF 转运实验过程中发现,MPA 不仅存在于接收池,而且在供池中也存在。在 VER 存在情况下,MPA 由 A 侧向 B 侧转运量增加,而由 B 侧向 A 侧转运量减少。在 MMF 由 A 侧向 B 侧转运实验

时,转运实验 180 min 后 A 池中 MPA 量显著高于 B 池中量,在 MMF 低浓度 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时,A 池中 MPA 量与 B 池中量比例近于 30 倍,VER 存在情况下 B 侧接收池中 MPA 量有明显增加,此比例明显下降 ( $P < 0.05$ ),而在中、高浓度 (50 和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时,A 池中 MPA 量与 B 池中量比例近于 20 倍,VER 存在情况下 B 侧接收池中 MPA 量增加不明显,此比例亦无明显改变 ( $P > 0.05$ );在 MMF 由 B 侧向 A 侧转运实验时,转运实验 180 min 后 B 池中 MPA 量与在 A 池中量无明显差异,而在 VER 存在情况下 B 池中 MPA 量均有明显增加,B 池中 MPA 量均明显高于 A 池中量 ( $P < 0.05$ ),A 池与 B 池中 MPA 量比例下降,均有极显著差异 ( $P < 0.01$ ),见表 3。

## 5 讨论

本实验首次对 MMF 及其活性代谢物 MPA 穿过

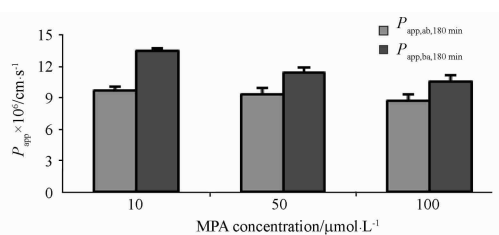


图 2 MPA 转运随浓度变化图.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Concentration-dependent change of MPA transported through Caco-2 cell monolayer.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

表 1 VER 对 MPA  $P_{app}$  的影响.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 1  $P_{app,ab} (\times 10^6)$  and  $P_{app,ba} (\times 10^6)$  of MPA without and with VER.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

$c$ / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MPA			MPA + VER		
	$P_{app,ab} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{app,ba} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{ratio}$	$P_{app,ab} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{app,ba} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{ratio}$
10	9.70 ± 0.40	13.52 ± 0.28	1.39	11.79 ± 1.96	8.82 ± 0.36	0.76 <sup>1)</sup>
50	9.35 ± 0.62	11.38 ± 0.59	1.22	10.71 ± 0.47	8.18 ± 0.27	0.77 <sup>1)</sup>
100	8.69 ± 0.69	10.53 ± 0.64	1.22	11.38 ± 0.25	9.68 ± 0.63	0.85 <sup>1)</sup>

注:与 MPA 组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$

Note: vs MPA, <sup>1)</sup> $P < 0.01$  very significant difference

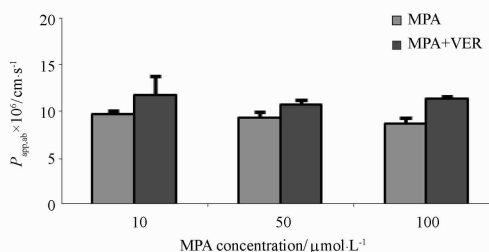
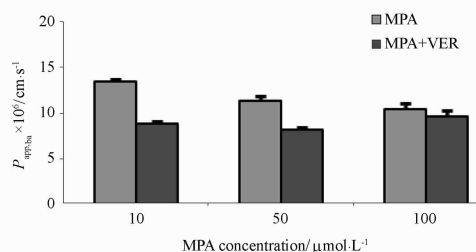


图 3 VER 对 MPA 双向转运的影响

Fig. 3 Influence of VER on MPA transport through Caco-2 cell monolayer



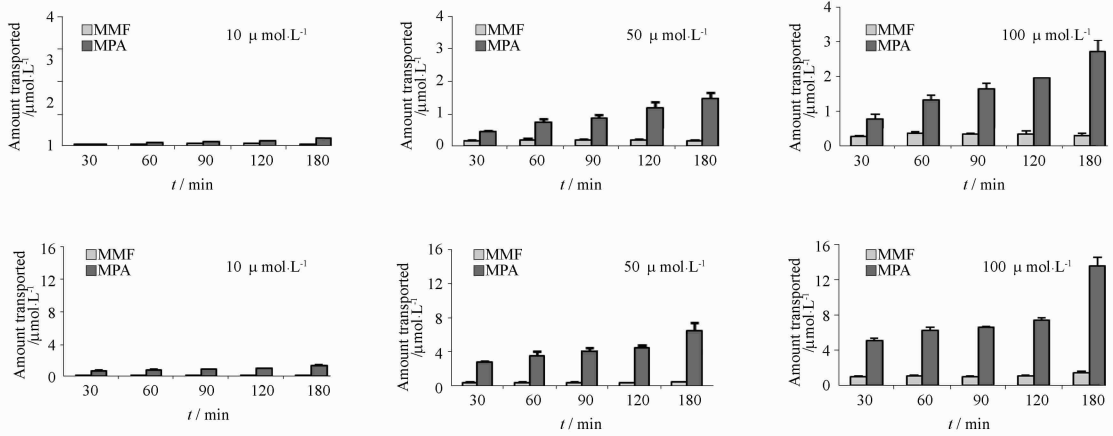


图4 MMF 转运过程中 MMF、MPA 穿过 Caco-2 细胞单层转运量随时间变化  
A - A→B 方向; B - B→A 方向

Fig. 4 Time-dependent change of MMF and MPA transported through Caco-2 cell monolayer during MMF transportation experiment  
A - Apical-to-basolateral transport; B - Basolateral-to-apical transport

表2 MMF 双向转运 180 min 后 A 池和 B 池中 MMF 的量.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Amounts of MMF in apical and basolateral side after two-way transport of MMF for 180 min through Caco-2 cell monolayer.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Initial conc. of MMF $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Analyte	Apical-to-basolateral transport			Basolateral -to-apical transport		
		A side	B side	Ratio (A to B)	A side	B side	Ratio (B to A)
10	MMF	0.70 ± 0.01	0.08 ± 0.01	8.80	0.13 ± 0.01	4.61 ± 0.21	34.82
	MMF + VER	0.72 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.09 ± 0.005 <sup>1)</sup>	8.02 <sup>1)</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>1)</sup>	5.12 ± 0.35 <sup>1)</sup>	33.94 <sup>1)</sup>
50	MMF	1.30 ± 0.09	0.17 ± 0.02	7.62	0.54 ± 0.02	20.37 ± 1.01	37.40
	MMF + VER	1.60 ± 0.18 <sup>1)</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>1)</sup>	8.28 <sup>1)</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>1)</sup>	25.15 ± 4.18 <sup>1)</sup>	43.50 <sup>1)</sup>
100	MMF	2.49 ± 0.11	0.31 ± 0.06	8.30	1.47 ± 0.15	36.54 ± 0.50	25.06
	MMF + VER	2.50 ± 0.22 <sup>1)</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>1)</sup>	8.49 <sup>1)</sup>	1.55 ± 0.05 <sup>1)</sup>	38.17 ± 4.30 <sup>1)</sup>	24.56 <sup>1)</sup>

注:与 MMF 组比较,<sup>1)</sup> $P > 0.05$

Note: vs MMF, <sup>1)</sup> $P > 0.05$  no significant difference

表3 MMF 双向转运 180 min 后 A 池和 B 池中 MPA 的量.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 3 Amounts of MPA in apical and basolateral side after two-way transport of MMF for 180 min through Caco-2 cell monolayer.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Initial conc. of MMF $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Analyte	apical-to-basolateral transport			basolateral -to-apical transport		
		A side	B side	Ratio (A to B)	A side	B side	Ratio (B to A)
10	MMF	6.66 ± 0.23	0.25 ± 0.02	26.28	1.39 ± 0.09	1.53 ± 0.03 <sup>4)</sup>	1.10
	MMF + VER	6.28 ± 0.14	0.31 ± 0.02 <sup>2)</sup>	20.66 <sup>3)</sup>	1.24 ± 0.02	1.90 ± 0.08 <sup>3), 5)</sup>	1.53 <sup>2)</sup>
50	MMF	25.43 ± 1.94	1.47 ± 0.19	17.53	6.56 ± 0.95	7.50 ± 0.36 <sup>4)</sup>	1.14
	MMF + VER	31.68 ± 1.20	1.80 ± 0.10 <sup>1)</sup>	17.59 <sup>1)</sup>	6.29 ± 0.10	10.78 ± 0.33 <sup>3), 5)</sup>	1.71 <sup>2)</sup>
100	MMF	48.27 ± 1.15	2.72 ± 0.31	17.95	13.89 ± 1.09	13.59 ± 1.33 <sup>4)</sup>	0.98
	MMF + VER	53.26 ± 1.48	3.44 ± 0.07 <sup>1)</sup>	15.50 <sup>1)</sup>	10.92 ± 0.28	19.06 ± 0.74 <sup>3), 5)</sup>	1.75 <sup>2)</sup>

注:与 MMF 组比较,<sup>1)</sup> $P > 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;与 A 侧比较,<sup>4)</sup> $P > 0.05$ , <sup>5)</sup> $P < 0.05$

Note: vs MMF, <sup>1)</sup> $P > 0.05$  no significant different, <sup>2)</sup> $P < 0.05$  significant difference, <sup>3)</sup> $P < 0.01$  very significant difference vs MPA, <sup>4)</sup> $P > 0.05$  no significant difference, <sup>5)</sup> $P < 0.05$  significant difference

Caco-2 细胞单层的跨膜转运机制进行了研究。实验 MPA 转运时发现,  $P_{app,ba}$  及  $P_{app,ab}$  均随浓度增加而降低, 但  $P_{app,ba}$  随浓度降低相比  $P_{app,ab}$  更加明显, 此结

果说明 MPA 穿过 Caco-2 细胞单层的跨膜转运存在转运载体介导的主动转运机制。在 MPA 浓度由  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  增加到  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $P_{app,ba}$  由

13.52 × 10<sup>-6</sup> cm · s<sup>-1</sup>降低到 11.38 × 10<sup>-6</sup> cm · s<sup>-1</sup>, 有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 而在浓度由 50 μmol · L<sup>-1</sup>增加到 100 μmol · L<sup>-1</sup>时,  $P_{app,ba}$  由 11.38 × 10<sup>-6</sup> cm · s<sup>-1</sup>降低到 10.53 × 10<sup>-6</sup> cm · s<sup>-1</sup>, 无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 这说明在高浓度时转运载体接近饱和, 由转运载体介导的主动转运外排作用影响变小, 表明 MPA 从 B 侧向 A 侧主动转运的转运载体具有可饱和性。

在不同浓度情况下, MPA 由 A 侧向 B 侧的吸收转运速度均明显慢于 B 侧向 A 侧的分泌转运速度, 说明 MPA 的吸收转运受 P-gp 等转运载体介导的主动转运外排作用的影响。极化的 Caco-2 细胞在 A 侧细胞膜大量表达 P-gp, MPA 在由 A 侧向 B 侧的吸收转运过程中与之结合而被逆向外排至 A 侧, 结果使得吸收转运速度小于分泌转运速度。

实验发现, MMF 在穿过 Caco-2 细胞单层转运过程中大部分被水解为 MPA, 根据样品稳定性实验结果, MMF 在 37 °C, 于 pH 7.4 HBSS 液中至少在 4 h 内保持稳定, 没有水解发生, 说明 MMF 在转运过程中可能是受存在于 Caco-2 细胞的细胞膜及/或细胞质中酶的作用水解成为 MPA。有文献<sup>[13-15]</sup>报道, 一些前体药物在穿过 Caco-2 细胞单层转运过程中被水解为活性药物产物, Caco-2 细胞中存在大量羧酸酯酶 (carboxylesterases, CESs), 主要是 1 型羧酸酯酶 (carboxylesterase-1, hCE-1) 表达, 推测 MMF 在穿过 Caco-2 细胞单层转运过程中发生的水解可能与该酶的作用有关, 但有待进一步研究确认。

在 MMF 由 A 侧向 B 侧的转运过程中, MPA 不仅存在于 B 侧接收池, 也存在于 A 侧供池, 提示 MMF 在被摄取进入 Caco-2 细胞后大部分被水解为 MPA, 然后, MPA 被外流至 A 池和 B 池。理论上说, MMF 水解生成的 MPA 在细胞内浓度相比 A 池和 B 池中浓度来说为最高, 因此, MPA 应该以相同的浓度扩散进入 A 池和 B 池。可是, 转运实验 180 min 后 MPA 存在于 A 池的量明显高于在 B 池的量, MMF 在低浓度 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 时为 30 倍左右, 在中、高浓度 (50 和 100 μmol · L<sup>-1</sup>) 时均接近 20 倍。MMF 在 Caco-2 细胞内被水解生成的 MPA 可能受 P-gp 作用被优先转运进入 A 池而不是 B 池。此结果也说明 MPA 的跨膜转运受到由转运载体介导的主动转运外排作用影响, 而且, 主动转运的转运载体具有可饱和性。

在 MMF 双向转运过程中, 转运到对侧接收池中 MMF 的量随时间无明显变化, 在 MMF 的 3 个不

同浓度 (10, 50 和 100 μmol · L<sup>-1</sup>), 转运实验 180 min 后供池与接收池中 MMF 量比例基本恒定, 此结果说明 MMF 的跨膜转运为被动转运。

维拉帕米 (VER) 是目前普遍采用的一种专属性较强的 P-gp 抑制剂, 广泛用于涉及 P-gp 的药物转运相关研究<sup>[16-18]</sup>。为了研究 P-gp 是否参与了 MMF 及 MPA 的肠道摄取, 阐明二者肠道转运机制, 本实验评价了其对于 MMF 及 MPA 跨膜转运的影响。在 MPA 转运实验中, 加入 VER 后, 分泌转运速度明显降低, 吸收转运速度明显增加, 在低、中浓度 (10 和 50 μmol · L<sup>-1</sup>) 时外排率  $P_{ratio}$  分别由 1.39 和 1.22 降低到 0.76 和 0.77, 前后存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ); 在高浓度 (100 μmol · L<sup>-1</sup>) 时外排率  $P_{ratio}$  由 1.22 降低到 0.85, 差异亦具有显著性 ( $P < 0.05$ )。此结果表明, P-gp 参与了 MPA 的肠道转运。

在 MMF 由 A 侧向 B 侧转运时, 低浓度情况下, 加入 VER 后转运实验 180 min 时 B 侧接收池中 MPA 量明显增加, A 池与 B 池中 MPA 量的比例明显降低; 在中、高浓度时, 转运实验 180 min 时 B 侧接收池中 MPA 量的增加及 A 池与 B 池中 MPA 量比例的降低受 VER 影响不明显。此结果说明, 在 MMF 低浓度时 MPA 的吸收转运以主动转运为主, 高浓度时以被动扩散为主。在低、中和高 3 个不同浓度 MMF 由 B 侧向 A 侧转运时, 转运实验 180 min 后存在于 B 池中 MPA 的量与在 A 池中的量无明显差异, 加入 VER 后 B 侧接收池中 MPA 量均明显增加, A 池与 B 池中 MPA 量的比例均明显降低, 说明 P-gp 参与了 MPA 的跨膜转运。

本实验结果表明, P-gp 参与了 MPA 的跨膜转运, 表明 MPA 肠道转运存在载体介导的主动转运及被动扩散 2 种机制, 低浓度时以主动转运为主, 而高浓度时则以被动扩散为主。MMF 在 Caco-2 细胞模型中的转运不存在 P-gp 的作用, 表明其肠道转运机制为被动扩散。MPA 药动学受多种因素的复杂影响, 在患者个体间和个体内存在广泛变异性<sup>[19]</sup>。本课题研究证明了 P-gp 在 MPA 跨膜转运中的作用, 临床用药时应考虑 P-gp 介导的药物相互作用。

## REFERENCES

- [1] ALLISON A G, EUGUI E M. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection [J]. *Transplantation*, 2005, 80 (suppl 2): 181-190.
- [2] STAATZ C E, TETT S E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2007, 46 (1): 13-58.
- [3] PAWINSKI T, DURLIK M, SZLASKA I, et al. Comparison of

- mycophenolic acid pharmacokinetic parameters in kidney transplant patients within the first 3 months post-transplant [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2006, 31(1): 27-34.
- [ 4 ] VAN HEST R M, MATHOT R A, VULTO A G, *et al.* Within-patient variability of mycophenolic acid exposure: Therapeutic drug monitoring from a clinical point of view [J]. *Ther Drug Monit*, 2006, 28(1): 31-34.
- [ 5 ] YU Z C, ZHOU P J, XU D, *et al.* Investigation on pharmacokinetics of mycophenolic acid in Chinese adult renal transplant patients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2006, 62(4): 446-452.
- [ 6 ] MICHEL M, JACQUES M, DJAMILA C E, *et al.* Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil [J]. *Clin Chem*, 2001; 47(1): 88-94.
- [ 7 ] HALE M D, NICHOLLS A J, BULLINGHAM R E, *et al.* The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1998, 64(6): 672-683.
- [ 8 ] YU Z C, GAO Y, TIAN W W, *et al.* Development and validation of Caco-2 cell monolayers-model of intestinal transport [J]. *Chin J Clin Pharm* (中国临床药理学杂志), 2012, 21(4): 218-221.
- [ 9 ] YU Z C, JIANG T, QU J Y, *et al.* Simultaneous determination of mycophenolate mofetil and mycophenolic acid in transport medium of Caco-2 cell monolayers by HPLC-MS/MS [J]. *Pharm Care Res* (药学服务与研究), 2012, 12(6): 423-426.
- [ 10 ] ZHOU S, FENG X, KESTELL P, *et al.* Transport of the investigational anti-cancer drug 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid and its acyl glucuronide by human intestinal Caco-2 cells [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 24(5): 513-524.
- [ 11 ] CHENG C, BAHADDURI P M, POLLI J E, *et al.* Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(12): 1976-1984.
- [ 12 ] WANG Q, STRAB R, KARDOS P, *et al.* Application and limitation of inhibitors in drug-transporter interactions studies [J]. *Int J Pharm*, 2008, 356(1-2): 12-18.
- [ 13 ] IMAI T, IMOTO M, SAKAMOTO H, *et al.* Identification of esterases expressed in Caco-2 cells and effects of their hydrolyzing activity in predicting human intestinal absorption [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(8): 1185-1190.
- [ 14 ] WILLIAMS E T, JONES K O, PONSLER G D, *et al.* The biotransformation of prasugrel, a new thienopyridine prodrug, by the human carboxylesterases 1 and 2 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(7): 1227-1232.
- [ 15 ] IMAI T. Human carboxylesterase isozymes: Catalytic properties and rational drug design [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006, 21(3): 173-185.
- [ 16 ] SHA X Y, FANG X L, WU Y J. The *in vitro* kinetics of uptake, transport and efflux of 9-nitrocamptothecin in Caco-2 cell model [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2004, 39(10): 839-843.
- [ 17 ] PERLOFF M D, STORMER E, VON MOLTKE L L, *et al.* Rapid assessment of P-glycoprotein inhibition and induction *in vitro* [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(8): 1177-1183.
- [ 18 ] LI H, JIN H E, KIM W, *et al.* Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(11): 2601-2612.
- [ 19 ] JIAO Z, ZHAN G M, LIANG H Q, *et al.* Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in Chinese adult renal transplant patients [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2007, 42(1): 57-61.

(收稿日期: 2013-02-20)

## 国际药物经济学会 (ISPOR) 第六届亚太年会即将召开

国际药物经济学会 (International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research, ISPOR) 是目前全球医药卫生经济研究领域规模最大的组织, 其宗旨在于促进药物经济学, 卫生经济学, 以及健康结果研究的发展, 评估卫生医疗干预手段在临床、经济等领域的成本效果, 为政策制定者提供有科学价值的参考信息。

ISPOR 目前拥有来自 100 多个国家的 7000 多正式会员, 此外在全球还有 65 个地区分会, 分会成员超过 6 000 多人。ISPOR 每年有三次国际年会, 包括北美年会、欧洲年会和拉丁美洲/亚太年会, ISPOR 通过其每年举办的国际年会促进全球药物经济学和结果研究的交流, 每年在 ISPOR 国际年会汇报的研究成果总计达到 3 300 多篇。

2014 年 ISPOR 第六届亚太年会将于 9 月 6~9 日在北京国际会议中心召开, 由 ISPOR 亚太联合会, 中国药学会药物经济学专业委员会, 北大中国卫生经济研究中心等机构联合举办。

ISPOR 网站: [www.ispor.org](http://www.ispor.org)

ISPOR 北京分会: [http://www.ispor.org/regional\\_chapters/Beijing/index.asp](http://www.ispor.org/regional_chapters/Beijing/index.asp)

doi: 10.11669/cpj.2014.04.016

[ 本刊讯 ]