

新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制研究

姚媛^{1*}, 廖琼峰², 谢智勇³, 曾元儿²

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006;
3. 中山大学药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制。方法:通过研究新穿心莲内酯在模型中的双向转运,考察时间、药物浓度(50,75,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、温度(4,25,37 $^{\circ}\text{C}$)和抑制剂(碘乙酰胺、维拉帕米和 MK-571)对新穿心莲内酯吸收的影响。用 LC-MS-MS 检测药物浓度,计算其表观渗透系数(P_{app})。结果:新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞模型中,随时间和浓度的增加,药物吸收呈线性增加。 $P_{\text{BA}}/P_{\text{AB}} \approx 1.0$;温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, P_{app} 为 $(2.02 \pm 0.31) \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$,与 4 $^{\circ}\text{C}$ [$(5.97 \pm 0.11) \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$],25 $^{\circ}\text{C}$ [$(9.17 \pm 0.50) \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$] 比较有显著性差异 ($P < 0.05$);受抑制剂碘乙酰胺影响, P_{app} 为 $(4.79 \pm 0.42) \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 与对照组新穿心莲内酯 P_{app} [$(1.28 \pm 0.69) \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$] 比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论:新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞中的吸收方式主要是被动转运和载体介导的主动转运。

[关键词] 新穿心莲内酯; Caco-2 细胞模型; 被动转运; 主动转运

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0113-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140113

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1508.009.html>

[网络出版时间] 2014-05-13 15:08

Absorption Mechanism of Neoandrographolide in Human Caco-2 Cell Monolayer Model

YAO Yuan^{1*}, LIAO Qiong-feng², XIE Zhi-yong³, ZENG Yuan-er²

[收稿日期] 20130623(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600823); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09304-003, 2009ZX09501-017)

[通讯作者] *姚媛, 硕士, 从事中药药代动力学研究, Tel:020-36591443, E-mail: flyaoyuan@qq.com

[参考文献]

- [1] 姚稚明, 姚平. 蒲黄抗动脉粥样硬化作用[J]. 中草药, 1994, 25(6):324.
- [2] Qin F, Sun H X. Immunosuppressive activity of pollen Typhae, ethanol extract on the immune responses in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 102(3):424.
- [3] 刘斌, 陆蕴如, 孙建宁. 蒲黄不同炮制品药理活性的比较研究[J]. 中成药, 1998, 20(3):25.
- [4] Lee B C, Park H M, Sims H S, et al. Biological activity and chemical analysis of cattail pollens[J]. J Agric Sci, 2009, 36(7):185.
- [5] Gescher K, Deters A M. Typha latifolia L. fruit polysaccharides induce the differentiation and stimulate the proliferation of human keratinocytes *in vitro*[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1):352.
- [6] Tao W W, Yang N Y, Duan J A, et al. Simultaneous determination of eleven major flavonoids in the pollen of Typha angustifolia by HPLC-PDA-MS[J]. Phytochem Anal, 2011, 22(5):455.
- [7] Zhao J, Zhang C Y, Xu D M, et al. The antiatherogenic effects of components isolated from Pollen Typhae[J]. Thromb Res, 1990, 57(6):957.
- [8] Zhao J, Zhang C Y, Xu D M, et al. Further study of Pollen Typhae's effects on the production of tPA and PGI_2 by cultured endothelial cells[J]. Thromb Res, 1989, 56(6):677.
- [9] 陈嫵, 方圣鼎, 顾云龙, 等. 水烛香蒲花粉中的活性成分[J]. 中草药, 1990, 21(2):2.
- [10] 刘睿, 谢跃生, 张伯礼, 等. 药物血浆蛋白结合率测定方法的研究进展[J]. 天津中医药, 2007, 24(6):526.
- [11] 童成亮, 吴小英. 牡荆素血浆蛋白结合率的测定[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14):2168.

[责任编辑 邹晓翠]

- (1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
3. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** This paper was to study absorption of neoandrographolide in human Caco-2 cell monolayer model. **Method:** Caco-2 cell monolayer model was applied to investigate the bidirectional transport of neoandrographolide. The effect of time, drug concentration, temperature and inhibitor on the absorption of neoandrographolide was observed. Drug concentration was measured by LC-MS-MS and the apparent permeability coefficients (P_{app}) was calculated. **Result:** No time or concentration saturation were observed for the transport of neoandrographolide across Caco-2 monolayers, $P_{BA}/P_{AB} \approx 1.0$. For the comparison of the temperature influence, the P_{app} [$(2.02 \pm 0.31) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$] at 37 °C was higher than the P_{app} at 4 °C [$(5.97 \pm 0.11) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$] and 25 °C [$(9.17 \pm 0.50) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$] ($P < 0.05$). With the presence of iodoacetamide, the P_{app} was $(4.79 \pm 0.42) \times 10^{-6}$, deferred significantly from the P_{app} [$(1.28 \pm 0.69) \times 10^{-6}$] without iodoacetamide. **Conclusion:** The absorption of neoandrographolide in Caco-2 cell monolayers are passive diffusion and active transportation.

[Key words] neoandrographolide; Caco-2 cell monolayer model; passive diffusion; active transport

新穿心莲内酯是常用中药穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 中的二萜内酯类有效成分之一。现代药理研究表明^[1-2], 新穿心莲内酯具有免疫抗炎活性, 在穿心莲的抗炎作用中起关键性作用。但目前有关新穿心莲内酯的药代力动学的报道较少, 尤其关于新穿心莲内酯的吸收机制研究目前未见报道。Caco-2 (the human colon carcinoma cell line) 细胞模型作为研究小肠上皮细胞药物转运和代谢的体外模型, 已广泛应用于口服药物的筛选和研究药物肠吸收的过程, 成为了研究药物吸收较适合的模型^[3-6]。本实验用 Caco-2 细胞单层模型研究新穿心莲内酯的吸收机制, 考察时间、药物浓度、双向转运、温度和抑制剂对新穿心莲内酯转运的影响, 为今后关于穿心莲二萜内酯类成分的药代动力学研究提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂 新穿心莲内酯(南京替斯艾么中药研究所, 纯度 > 98%, 批号 TCM005-070826), 碘乙酰胺 (Ameresco 公司, 纯度 > 99%, 批号 3217B043), 盐酸维拉帕米(中国药品生物制品检定所, 批号 100223-200102), MK-571 (Enzo Life Sciences 公司), 甲醇(色谱纯, Merck 公司), DMEM 培养基(Gibico 公司), 胎牛血清(Excell 公司), 非必需氨基酸(Hyclone 公司), L-谷氨酰胺(MBchem 公司), 胰蛋白酶-0.25% EDTA (Sigma 公司), 水为 Milli-Q 超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 96 孔普通培养板, 12 孔 Transwell 板

(Corning 公司), TGL-16C 型飞鸽高速离心机(上海安亭科学仪器厂), CU-600 型电热恒温水槽(上海齐欣科学仪器有限公司), CO-150 型 INNOVA CO₂ 培养箱(美国 NBS 公司), Millicell-ERS 型跨膜电阻仪(美国 Millipore 公司), IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), LC-MS 系统: Surveyor MS Pump 液相色谱输液泵, Surveyor Autosampler 自动进样器, Xcalibur 1.3 数据采集软件(美国 Finnigan 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 Caco-2 细胞培养于 DMEM 培养液中, 培养基中含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸及 100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 U·mL⁻¹ 链霉素双抗液, 于 37 °C, 含 5% 的 CO₂ 环境中培养。细胞接种在 12 孔 Transwell (Coming Costar, Cambridge, MA, USA) 板上, 接种密度为每孔 1×10^5 个/mL, 培养约 21 d 后, 细胞形成紧密单层, 可用于实验。

2.2 MTT 法检测新穿心莲内酯对 Caco-2 细胞的抑制作用 本实验设空白组, 对照组和实验组, 其中空白组为不加细胞悬液, 并用不含新穿心莲内酯药物的培养液培养。而对照组和实验组, 加入 200 μL 细胞悬液接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后换液, 换液时, 实验组加入含新穿心莲内酯药物浓度分别为 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液, 对照组加不含新穿心莲内酯药物的培养液, 空白组也加不含新穿心莲内酯药物的培养液。每组设 4 个复孔, 继续培养 24 h 后每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 20 μL , 再培养 4 h 后吸弃孔内培养液, 每孔加 150 μL

DMSO 溶液,将 96 孔板置于双层空气恒温振荡器中,以转速为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 10 min,使结晶物 Formazan 充分溶解,在酶标仪上选择波长 570 nm 处,空白孔调零,测定各孔吸光度(A)。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

2.3 转运实验 用 pH 6.5 HBSS 溶液配制浓度为 50, 75, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新穿心莲内酯溶液,经过滤除菌,取符合转运条件且细胞生长形态完好的 Transwell 孔,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 空白 pH 7.4 HBSS 溶液冲洗 3 遍,最后一次于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min。对于从 Apical(AP 侧)到 Basolateral(BL 侧)转运:将药物溶液 0.5 mL 加到 AP 侧作为供给池,同时 BL 侧加入空白 pH 7.4 HBSS 1.5 mL 作为接收池;对于从 BL 到 AP 转运:将药物溶液 1.5 mL 加到 BL 侧作为供给池,空白 HBSS 0.5 mL 加到 AP 侧作为接收池。分别在 30, 60, 90, 120 min 吸取接收液 0.1 mL,同时补加 37 $^{\circ}\text{C}$ 空白 pH 7.4 HBSS 0.1 mL。试验平行做 3 份。

2.4 分析方法

2.4.1 色谱条件 预柱为 C_{18} 保护柱, 2.0 mm \times 4 mm I. D. (美国 Phenomenex 公司); 分析为 Aquasil- C_{18} 色谱柱, 5 μm 粒径, 2.1 mm \times 150 mm I. D. (美国热电公司), 流动相为甲醇-1% 甲酸 (70:30), 流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 10 μL , 柱温为室温。

2.4.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (ESI 源), 喷雾电压为 4 000 V, 加热毛细管温度为 350 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气 (N_2) 压力 50 psi, 辅助气 (N_2) 压力 12 psi; 正离子方式检测; 扫描方式为选择反应监测 (SRM); 用于定量分析的离子为新穿心莲内酯 m/z 503.4。

2.4.3 样品处理 样品 30 μL , 加入甲醇 60 μL , 涡流 1 min, 静置 10 min, 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 吸取上清液进样。

2.5 数据分析 药物透过 Caco-2 细胞单层的表观渗透系数 P_{app} (apparent permeability coefficients) 值作为参考, 进行数据处理。

$$P_{\text{app}} = \Delta Q / (\Delta t \cdot A \cdot C_0) \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$$

其中 ΔQ (mol) 为 Δt (s) 内的转运量, A (cm^2) 为膜面积, C_0 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为在 Caco-2 单层细胞的顶侧或肠腔侧的药物初浓度。对两组的比较用 t 检验, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 新穿心莲内酯对 Caco-2 细胞的抑制作用

MTT 检测结果表明, 随着新穿心莲内酯浓度在 6.25 ~ 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率无突然下降, 细胞存活率均在 80% 以上, 是 Caco-2 细胞的安全浓度范围。

3.2 双向转运 新穿心莲内酯 AP \rightarrow BL 及 BL \rightarrow AP 转运的量随时间的变化见图 1~2。

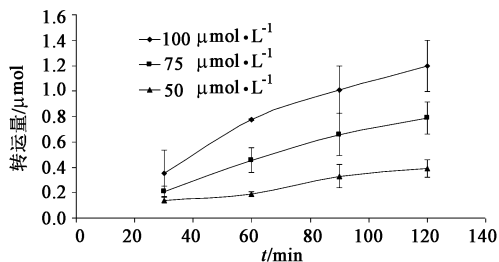


图 1 时间、浓度对新穿心莲内酯 AP \rightarrow BL 转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

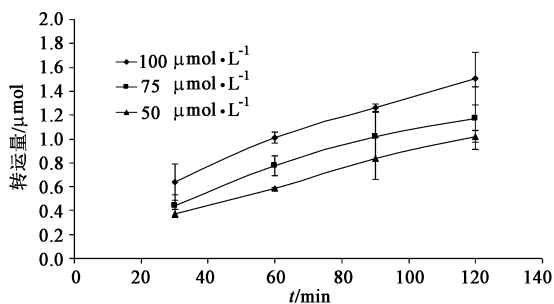


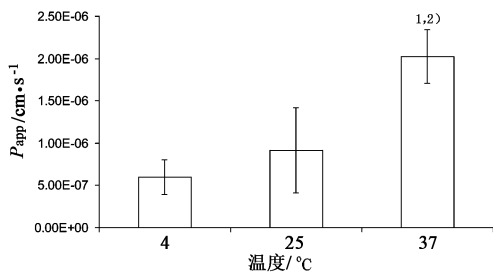
图 2 时间、浓度对新穿心莲内酯 BL \rightarrow AP 转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 1 新穿心莲内酯双向转运表观渗透系数测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$P_{\text{app}} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$		
	AP \rightarrow BL	BL \rightarrow AP	$P_{\text{BA}}/P_{\text{AB}}$
100	$(2.22 \pm 0.37) \times 10^{-6}$	$(1.87 \pm 0.27) \times 10^{-6}$	0.83
75	$(1.96 \pm 0.32) \times 10^{-6}$	$(1.96 \pm 0.43) \times 10^{-6}$	0.99
50	$(1.45 \pm 0.41) \times 10^{-6}$	$(1.50 \pm 0.43) \times 10^{-6}$	1.04

3.3 温度对新穿心莲内酯转运的影响 固定新穿心莲内酯浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别在 4, 25, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下考察新穿心莲内酯 AP \rightarrow BL 的转运, 结果见图 3。结果显示温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, Caco-2 细胞对新穿心莲内酯的转运渗透系数为 $(2.02 \pm 0.31) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 与 4 $^{\circ}\text{C}$ [$(5.97 \pm 0.11) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$], 25 $^{\circ}\text{C}$ [$(9.17 \pm 0.50) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$] 比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 提示新穿心莲内酯的跨膜转运受温度影响, 可能有载体介导。

3.4 抑制剂对新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞转运的影响 在考察抑制剂影响中, 笔者发现碘乙酰胺存



37 °C 与 4 °C 比较¹⁾ $P < 0.01$;
37 °C 与 25 °C 比较²⁾ $P < 0.05$

图 3 温度对新穿心莲内酯转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

在下的新穿心莲内酯与对照组新穿心莲内酯从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 有统计学意义 ($P < 0.05$), 而外排抑制剂维拉帕米和 MK-571 的存在对新穿心莲内酯的转运皆没有影响。

表 2 碘乙酰胺对新穿心莲内酯转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

条件	转运方向	$P_{app}/\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
新穿心莲内酯	AP→BL	$(1.28 \pm 0.69) \times 10^{-6}$
	BL→AP	$(1.83 \pm 0.29) \times 10^{-6}$
新穿心莲内酯 + 碘乙酰胺	AP→BL	$(4.79 \pm 0.42) \times 10^{-6(1)}$
	BL→AP	$(1.72 \pm 0.64) \times 10^{-6}$

注: 与新穿心莲内酯从 AP→BL 转运比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层中, 高、中、低 3 个浓度 AP→BL 方向的吸收转运, 随着浓度的增加和时间的延长, 转运量呈线性增加; 两个方向各浓度的 P_{app} 值并无显著性差异, 基本保持恒定, $P_{BA}/P_{AB} \approx 1.0$, 表明新穿心莲内酯的吸收转运可能是以被动扩散为主。对温度敏感是载体介导主动转运的共同特征, 当温度下降时, 载体活性逐渐减弱或者失活。在考察温度对新穿心莲内酯影响中, 实验结果表明温度对新穿心莲内酯有影响。此外, 已知烷基化试剂碘乙酰胺具有抑制能量代谢并且耗竭细胞内储存的 ATP 的作用, 在 Caco-2 细胞单层用 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碘乙酰胺处理实验中, 新穿心莲内酯在 AP→BL 方向的转运受到影响, 而 BL→AP 方向的转运未受到影响, 提示其转运需消耗能量, 是由载体介导的转运, 且该载体可能位于 AP 侧。P-糖蛋白 (P-gp) 和多药耐药相关蛋白 (MRP) 是影响药物转运通过细胞膜的一个重要因素, 二者主要功能是外排各种外来异物, 保护机体不受外来异物的侵扰。已知维拉帕米是 P-gp 外排抑制剂, MK-571 是 MRP-2 外排抑

制剂, 实验结果显示二者对新穿心莲内酯的转运皆没有影响。因此, 提示新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层的主要转运机制可能是被动转运和主动转运共同参与的过程, 不受 P-gp 和 MRP-2 的外排转运影响。

新穿心莲内酯的表观渗透系数在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 属于吸收中等的化合物, 推断其吸收率为 20% ~ 70%^[7]。与前期报道的穿心莲内酯^[8]、脱水穿心莲内酯^[9]比较, 脱水穿心莲内酯的表观渗透系数 > 穿心莲内酯的表观渗透系数 > 新穿心莲内酯的表观渗透系数, 推测其原因可能与化学结构的非极性大小有关。

由于 Caco-2 细胞来源于结肠缺乏分泌黏液的杯状细胞, 因而缺乏小肠上皮中的黏液层; 而且由于缺乏肠道菌群代谢酶, Caco-2 细胞模型也不能完全模拟药物在小肠中的吸收过程。所以, 今后研究过程中应与整体动物实验数据相结合, 探讨新穿心莲内酯在体内的吸收过程。

[参考文献]

- [1] 刘峻, 唐庆九, 王峥涛. 新穿心莲内酯对小鼠巨噬细胞呼吸爆发及淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(3):206.
- [2] 刘峻, 王峥涛. 新穿心莲内酯对体外活化小鼠巨噬细胞的影响[J]. 中国天然药物, 2005, 3(5):308.
- [3] 杨海涛, 王广基. Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用[J]. 药学报, 2000, 35(10):797.
- [4] 祝茵晨, 何新. 药物肠道吸收研究方法[J]. 药物评价研究, 2010, 33(3):222.
- [5] 戴文芸, 石森林. 中药有效成分小肠吸收的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(8):697.
- [6] 朱容慧, 赵军宁, 毕岳琦, 等. 中药肠吸收动力学的研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(1):25.
- [7] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-fact or myth[J]. Pharm Res, 1997, 14(6):763.
- [8] 廖琼峰, 姚媛, 谢智勇, 等. 穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制[J]. 中草药, 2011, 42(7):1363.
- [9] 姚媛, 廖琼峰, 谢智勇, 等. 脱水穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制[J]. 中草药, 2011, 42(6):1154.

[责任编辑 邹晓翠]