

· 药物代谢 ·

乌头碱在 Caco-2 细胞模型上的转运行为

郑琴, 周欢, 熊文海, 胡双, 薛鑫, 胡鹏翼, 杨明*

(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] **目的:** 研究乌头碱在 Caco-2 细胞模型上的转运行为。**方法:** 采用 MTT 法确定乌头碱在 Caco-2 细胞转运过程中的安全浓度范围, 以乌头碱累积转运量及表观渗透系数 P_{app} 为指标, 采用高效液相色谱法对成分进行检测, 考察不同浓度、不同孵育时间乌头碱在 Caco-2 细胞模型上的双向转运。**结果:** 乌头碱累积转运量与孵育时间、给药浓度呈正相关, 不同浓度乌头碱 P_{app} 保持恒定, 无统计学差异, 且外排作用明显强于吸收, 外排比接近 1.5, P_{app} 约为 $1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。**结论:** 乌头碱以被动转运为主, 且可能存在外排蛋白的参与, 为吸收良好的一类药物。

[关键词] 乌头碱; Caco-2 细胞模型; 吸收; 外排

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0121-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200121

Transport Behavior of Aconitine in Caco-2 Cell Monolayer Model

ZHENG Qin, ZHOU Huan, XIONG Wen-hai, HU Shuang, XUE Xin, HU Peng-yi, YANG Ming*

(Key Lab of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education,

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the transport behavior of aconitine in the Caco-2 cell monolayer model.

Method: MTT method was employed to confirm the safe concentration of aconitine towards Caco-2 cell. Aconitine concentrations in the samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The apparent permeability (P_{app}) value and the total amount of transport were calculated. Bi-direction transport behavior of aconitine by incubating in different concentration and time were studied. **Result:** The transport amount of aconitine was positively correlated with the incubation time and drug concentration on the Caco-2 monolayer model. The P_{app} values in both apical to basal (AP-BL) and basal to apical (BL-AP) directions were stable with no significant differences in selected concentrations. The BL-AP flux of aconitine was more than 1.5-fold higher than AP-BL flux ($P_{app} 1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$). **Conclusion:** The results suggested that the aconitine is well absorbed through the Caco-2 monolayer model by a passive transportation. Besides, efflux protein may be involved in the transport process.

[Key words] aconitine; Caco-2 monolayer model; absorption; effluxion

Caco-2 细胞是一种来源人结肠腺癌细胞, 结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞, 具有微绒毛, 紧密连接等结构, 并含有与小肠刷状缘上皮相关的酶系和一定程度的蛋白表达, 用来模拟体内肠转运情

况。Caco-2 细胞模型方法起始于 20 世纪 90 年代, 作为一种新的, 能够快速对活性化合物的口服特性进行筛选的体外模型, 经过 20 多年的发展已被大多数实验室认可, 迅速成为研究药物吸收的可靠手段,

[收稿日期] 20130916(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060347); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ08333)

[第一作者] 郑琴, 博士, 副教授, 从事中药新型给药系统设计与评价研究, Tel: 0791-87119010, E-mail: zhengqin912006@163.com

[通讯作者] * 杨明, 博士, 教授, 从事中药新剂型、新技术及新工艺的研究, Tel/Fax: 0791-87118658, E-mail: yangming16@126.com

并已获美国 FDA 批准用作药物吸收筛选模型^[1-3]。

乌头碱主要存在于川乌、草乌、附子等植物中。现代药理学证明,双酯型乌头类生物碱具有镇痛、麻醉、抗炎、降压等作用^[4-5],但毒性极强,成人口服 0.2 mg 即产生中毒反应,2~4 mg 可致人死亡。乌头类生物碱既是有效成分也是主要的毒性成分,其安全剂量和中毒剂量较近,安全治疗范围狭窄,如果用量略有不适,就会造成中毒^[6]。研究表明,其毒性产生快,原因与乌头类生物碱在食道和胃就开始有吸收,且在肠道吸收较好有关^[7-8]。本研究利用 Caco-2 细胞模型研究乌头碱的转运行为,以期为含乌头碱类中药合理、安全用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器 SW-CJ-2F 型超净工作台(苏净集团安泰公司), Forma 3111 型二氧化碳恒温培养箱(Thermo electron corporation), Eclipse TS100 型倒置显微镜(Nikon 公司),血细胞计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司,02270113),培养瓶(美国 Costar 公司,430639),20~200,100~1 000 μL 移液器(Thermo Fisher Scientific, Finnpiptette F1),1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Sartorius BT25S 型 1/10 万电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),3-18K 型高速冷冻离心机(德国 SIGMA),96 孔板(美国 Costar 公司,3599),Elx800 型酶标仪(基因有限公司),MERS00002 型跨膜电阻仪(美国 Millipore 公司),3460 型 Transwell Permeable Supports(美国 Costar 公司,孔径 0.4 μm ,直径 12 mm,底面积 1.12 cm^2)。

1.2 试剂 DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone,批号 SH30022.01B),胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司,批号 10099-141),非必须氨基酸 NEAA(美国 Gibco 公司,批号 11140-050),双抗(Solarbio 公司,批号 P1400-100),0.25% 胰酶-0.02% EDTA(美国 Gibco,批号 25200-056),HBSS(Solarbio 公司,H1025 型),乌头碱(成都瑞芬思生物科技有限公司,HPLC >98%),无水乙醇(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,分析纯,批号 20130216),乙酸铵(西陇化工股份有限公司,分析纯,批号 1304011),氨水(国药集团化学试剂有限公司,分析纯,批号 T20111207),甲醇(TEDIA 公司,色谱纯,批号 12080085),DMSO(Solarbio, Amresco 0231, ACS 级别),MTT(Sigma 公司,M2128,纯度 >98%),碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20130419),水为双蒸水。

1.3 细胞 Caco-2 细胞株购自中国科学院上海生科院细胞资源中心(来源于美国典型菌种保藏中心 ATCC, American Type Culture Collection),实验中所用细胞代数为 35~45 代。

2 方法

2.1 乌头碱对照品溶液的配制 精密称取置干燥器恒重的乌头碱对照品适量于 10 mL 棕色量瓶中,加 100 μL 无水乙醇溶解,再用 HBSS 平衡盐溶液稀释至刻度,制得 10 mL 母液($214 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),密封,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮藏待用。

2.2 色谱条件 Phenomenex Gemini C_{18} 色谱柱(4.60 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-40 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵(氨水调 pH 10) 80:20,流速(F) 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长(λ) 230 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 样品处理方法 转运实验后,取出的样品立即使用高速冷冻离心机 4 $^{\circ}\text{C}$, 23 469 $\times g$ 离心 15 min,取上清液,密封后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待分析,24 h 内检测完毕。

2.4 专属性考察 分别将乌头碱对照品溶液、溶剂无水乙醇、空白介质 HBSS 液、空白 HBSS 液加入乌头碱对照品溶液、给药后含有乌头碱的样品按照 2.3 项下的操作处理后检测。

2.5 标准曲线、线性范围及定量下限 将 2.1 项下配制的乌头碱对照品母液用 HBSS 液依次稀释制成分别含乌头碱为 0.834, 1.67, 3.34, 13.4, 26.7, 53.4, 214 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HBSS 液样品,涡旋 1 min 混匀后按 2.3 项下操作测定($n=7$),建立标准曲线。以待测物浓度为纵坐标(Y),待测物的峰面积为横坐标(X),进行线性回归运算,求得 HBSS 液中乌头碱的标准曲线。以信噪比的 10 倍为定量下限。

2.6 准确度与精密度考察 按 2.5 项下的方法制备乌头碱 0.84, 13.4, 214 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 低、中、高 3 个浓度的样品,每个浓度进行 6 样本分析,连续测定,并与标准曲线同时进行,求算方法的准确度和精密度。

2.7 稳定性考察 按 2.5 项下的方法制备乌头碱 0.84, 13.4, 214 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 低、中、高 3 个浓度的样品,将样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h,并分别与 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 取样,按照 2.3 项下操作,测定药物浓度变化。

2.8 Caco-2 细胞模型的建立与评价 以 DMEM 高糖培养液培养,含 10% 胎牛血清,1% 非必须氨基酸,1% 双抗。隔天换液,3~5 d 传代。以 1×10^5 个/孔的密度接种在 Transwell 上。前 1 周隔天换液,1 周后每天换液,培养至 21 d 左右进行转运实验。本实验采用跨膜电阻值以及碱性磷酸酶活性两项指标来评价细胞模型的紧密性和完整性。

2.9 MTT 法确定乌头碱安全浓度范围 调节细胞密度至 1×10^5 个/mL;将细胞悬液移至 96 孔板内各孔(不包括周边 36 孔,边缘效应严重),置于二氧化碳培养箱中培养 48 h,用 HBSS 液清洗细胞 1 次后加入不同浓度药液及助溶剂 1% 无水乙醇,对照组加空白 HBSS 液,置培养箱中作用 3 h,弃去药液并用 HBSS 液清洗细胞 1 次;各孔加入 200 μL , $1.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液;置培养箱内再作用 4 h,弃去孔内的 MTT,加入 100 μL DMSO,溶解蓝紫色 MTT-甲臜结晶;立即置酶标仪中测定在 490 nm 的吸光度(A),每组平行 6 个孔^[9]。

2.10 转运试验 实验前先用 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 HBSS 液清洗各孔 3 次,最后一次置于培养箱内培养 30 min,收集两侧孵育液。研究吸收时,分别向各孔 AP 侧加入 180,135,90 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高、中、低 3 个浓度药液 0.5 mL,BL 侧加入 HBSS 液 1.5 mL,置于培养箱中培养,分别于 15,30,45,60,90,120 min 由 BL 侧取样 0.5 mL,并补加同温 HBSS 液 0.5 mL。研究外排时,分别向各孔 BL 侧加入高、中、低不同浓度药液 1.5 mL,AP 侧加入 HBSS 液 0.5 mL,由 AP 侧取样 0.2 mL,并补加同温 HBSS 液 0.2 mL。每组平行 3 个孔,样品按 2.3 项下操作后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待分析^[10-13]。

2.11 数据处理 数据分析采用 SPSS 19.0.0 软件。每个数据点为平行 3 孔的均值,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

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

$$\text{跨膜电阻} = (R_{\text{样品}} - R_{\text{空白}}) \times \text{膜面积}$$

$$P_{\text{app}} = (d_Q / d_t) / (A \times C_0)$$

其中 d_Q / d_t 为单位时间药物转运量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$), A 为 Transwell 膜面积 1.12 cm^2 , C_0 为初始药物浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

$$\text{外排比 (PDR)} = P_{\text{app}}(\text{BL} - \text{AP}) / P_{\text{app}}(\text{AP} - \text{BL})$$

由于在每次取样后都要进行补液,对药物的浓度产生了稀释作用,因而对药物的累积转运浓度 TR_{cum} ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行校正:

$$TR_{\text{cum}} = C_n + (V_n / V_R) \times \sum_{i=0}^{n-1} C_i$$

$$\text{累积转运量} = TR_{\text{cum}} \times V_R$$

$$\text{累积转运率} = \text{累积转运量} / \text{实际给药量} \times 100\%$$

其中 C_n ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为第 n 个样品浓度的测定值; V_n (mL) 为第 n 个样品的取样体积; V_R (mL) 为接收侧的体积。

3 结果

3.1 分析方法的建立 乌头碱保留时间为 6.6 min,峰形良好,空白介质及助溶剂无干扰;乌头

碱在 $0.84 \sim 214 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系,得回归方程为 $Y = 0.0847X - 0.2991$, $r = 0.9999$;定量下限为 $0.84 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;准确度和精密度良好,高、中、低 3 个浓度 6 次测定的 RSD 分别为 4.34%, 2.50%, 3.98%;方法回收率为 94.70%, 85.55%, 83.29%;样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h 内稳定。

3.2 Caco-2 细胞模型的建立与评价 培养 21 d 跨膜电阻值 $> 700 \Omega \cdot \text{cm}^2$,碱性磷酸酶在 AP 侧表达较 BL 侧丰富,表明在本实验条件下建立的 Caco-2 细胞模型紧密性和完整性均达到实验要求,21 d 内跨膜电阻值随培养时间变化结果见图 1。

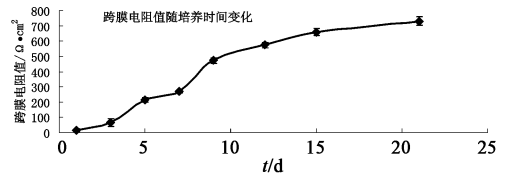
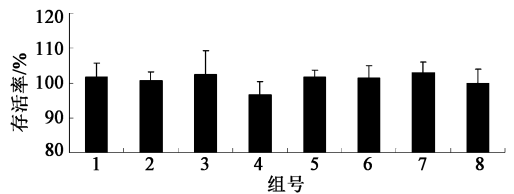


图 1 跨膜电阻值随不同培养时间的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.3 乌头碱安全浓度范围 实验结果见图 2,各组结果无显著性差异。1% 的无水乙醇对细胞活性无显著影响,可用于增加难溶性乌头碱在 HBSS 液中的溶解度;乌头碱在 $207 \sim 6.48 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 Caco-2 细胞的存活率无显著影响,即可确定在此浓度范围内进行 Caco-2 单层细胞模型的转运实验。



1~6 组分别为 207,103,51.9,25.9,13.0, 6.48 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乌头碱;7 组为 1% 无水乙醇;8 组为空白对照

图 2 不同浓度乌头碱对细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.4 转运试验 乌头碱从 AP-BL 侧及 BL-AP 侧累积转运量随浓度和时间变化见图 3,4。实验结果显示,乌头碱由 AP-BL 侧转运表观渗透系数 P_{app} 约 $1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。高、中、低不同浓度乌头碱 AP-BL 及 BL-AP 侧累积转运量,在 120 min 内随着浓度及孵育时间增加而增加;在整个浓度范围内,表观渗透系数无显著性差异,但外排与吸收有显著性差异,外排与吸收比值接近 1.5,故推断乌头碱在 Caco-2 细胞模型中的转运以被动转运为主,同时可能兼有外排蛋白的参与。

4 讨论

由于乌头碱具有较强毒性,而 Caco-2 细胞来源

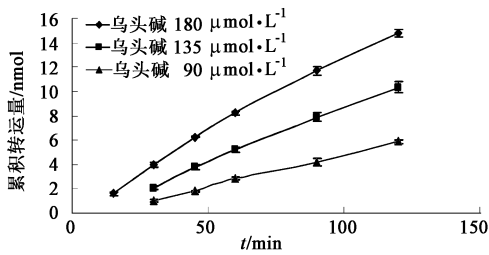


图 3 不同浓度乌头碱 AP-BL 侧转运累积转运量
随时间变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

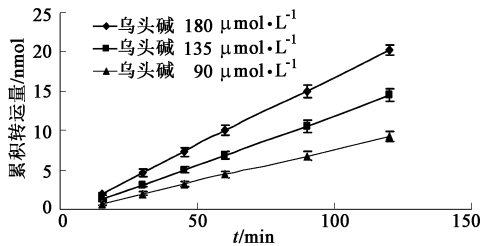


图 4 不同浓度乌头碱 BL-AP 侧转运累积转运量
随时间变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

人的结肠癌细胞,用 Caco-2 细胞模型研究其吸收前首先要考虑其对细胞是否有毒性,本研究采用经典的 MTT 毒性试验确定了乌头碱在转运过程中的安全浓度范围,避免药物毒性致细胞损伤所造成的吸收假象。

目前,以表观渗透系数 P_{app} 值来判断药物吸收难易程度的一般标准为: $P_{app} < 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 吸收 0% ~ 20%, 难吸收; $10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} < P_{app} < 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 吸收 20% ~ 70%, 吸收中等; $P_{app} > 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 吸收 70% ~ 100%, 吸收良好^[14]。乌头碱由 AP-BL 侧转运表观渗透系数 P_{app} 约 $1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 120 min 内累积转运率达 16%, 说明乌头碱吸收良好,口服生物利用度较高。本研究应用 Caco-2 细胞模型研究乌头碱的双向转运行为,从两个不同角度证实乌头碱以被动转运为主导:一是在相同孵育时间下给药浓度与乌头碱累积转运量呈现正相关,并且未出现饱和现象;二是各浓度之间表观渗透系数无显著性差异,根据公式即得转运速率与初始浓度之比为定值,这与被动转运速率公式 $-d_c/d_i = kC_0$ 表达的转运速率取决于初始浓度的特征相一致。

然而,研究结果表明乌头碱的 BL-AP 侧转运明显高于 AP-BL 侧,外排比接近 1.5,很可能存在排外

蛋白的参与。Caco-2 细胞中主要表达的两种外排蛋白分别是 P-gp 和 MRP,都能将细胞内的底物逆浓度梯度转运至细胞外,具体是受到哪种外排蛋白的影响还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 曾宝,王春玲,吴安国,等. Caco-2 细胞模型的建立及其在中药吸收研究中的应用探讨[J]. 中国新药与临床药理, 2010,21(6):570.
- [2] 蔡润兰,王敏,齐云,等. Caco-2 细胞模型验证指标的选择与评判[J]. 中国中药杂志, 2008,43(24):1871.
- [3] 余自成,高瑜,田薇薇,等. 肠道转运 Caco-2 细胞单层模型的建立及验证评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2012,21(4):218.
- [4] 孙虎,王平. 乌头碱经皮给药的急性毒性及相关的镇痛作用研究[J]. 中成药, 2012,34(11):2064.
- [5] 黄衍民,李成韶,张祚建,等. 乌头注射液的抗炎作用及其药效动力学研究[J]. 中国药理学杂志, 2006,41(16):1249.
- [6] 黎明. 附子的毒性与临床应用[J]. 中国医药指南, 2011,9(14):116.
- [7] 李建荣,高晓山. 乌头碱上消化道吸收实验研究[J]. 中国中药杂志, 1991,16(1):46.
- [8] 吕昌. 附子毒动力学及乌头碱吸收与代谢特征研究[D]. 广州:南方医科大学, 2011.
- [9] 阎祖炜,朱欣,李闻文. MTT 法、CPE 观察法用于药物细胞毒性实验的比较与分析[J]. 实用预防医学, 2007,14(5):1552.
- [10] 冯志强,谢志勇,廖琼峰,等. 氧化槐果碱 Caco-2 细胞模型中吸收机制研究[J]. 中国中药杂志, 2011,36(17):2399.
- [11] 苑振亭,王可,高培平,等. 蛇床子在 Caco-2 细胞模型中的转运机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2011,46(4):278.
- [12] 李娜. 乌头碱有效部位中双酯型生物碱吸收转运及机制的体外研究[D]. 长春:吉林大学, 2009.
- [13] 王莹,杨秀伟. 游离蒽醌在人肠 Caco-2 细胞模型的转运[J]. 中国天然药物, 2008,6(2):141.
- [14] Shiyin Yee. *In vitro* permeability across Caco-2 cell (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-fact or myth [J]. *Pharmaceut Res*, 1997, 14(6):763.

[责任编辑 邹晓翠]