

山豆根中主要成分在 Caco-2 细胞模型上的转运特性

陈江华, 杨林, 邓中平*

(上海中医药大学 药物安全评价研究中心, 上海 201203)

[摘要] **目的:**考察山豆根水提取物中主要成分在 Caco-2 细胞模型上的转运特性,为山豆根的体内吸收特性研究提供参考。**方法:**以 Caco-2 细胞模型研究山豆根中主要成分从给药端向吸收端的转运透过情况,采用 UPLC-MS 考察主要药效成分苦参碱和氧化苦参碱的吸收透过情况,流动相 0.1% 甲酸-乙腈梯度洗脱,流速 0.4 mL·min⁻¹。质谱条件采用正离子选择性离子进行检测,扫描测定氧化苦参碱($m/z \pm H$)265.1,苦参碱($m/z \pm H$)249.1,计算二者的表观渗透系数。**结果:**在给药 120 min 时,苦参碱、氧化苦参碱的表观渗透系数分别为 $(11.43 \pm 0.41) \times 10^{-6}$, $(3.91 \pm 0.70) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。山豆根水提取物中可检测到 20 种成分,包括苦参碱在内的 5 个主要组分(P2,P4,P6,P7,P25)有较高的透过率,6 种组分(P3,P5,P9,P11,P14,P27)具有中等透过率,包括氧化苦参碱在内的其他组分透过率较低或不能透过细胞模型。**结论:**山豆根的主要成分中约 55% 易透过细胞模型,其中苦参碱在体外模型中极易被吸收,而氧化苦参碱在体外模型中具有低透过率,提示苦参碱是山豆根吸收进入体内的主要有效成分之一。

[关键词] 山豆根; Caco-2 细胞模型; 苦参碱; 氧化苦参碱; 表观渗透系数

[中图分类号] R283.6;R284.1;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150512.1119.008.html>

[网络出版时间] 2015-05-12 11:19

Transport Characteristics of Main Ingredients from Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma in Caco-2 Cell Model CHEN Jiang-hua, YANG Lin, DENG Zhong-ping* (Center for Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate transport characteristics of main ingredients from Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma in Caco-2 cell model and provide a reference for further studies on its *in vivo* absorption characteristics. **Method:** Transport of main ingredients in Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma from apical side to basolateral side was studied by Caco-2 cell monolayer model. Permeability of oxymatrine and matrine from these two sides was determined by UPLC-MS, mobile phase was 0.1% formic acid-acetonitrile by gradient elution at flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. Mass spectrum was operated in positive mode with oxymatrine ($m/z \pm H$) 265.1 and matrine ($m/z \pm H$) 249.1, their apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated. **Result:** At 120 min after dosing, P_{app} of matrine was $(11.43 \pm 0.41) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, indicating that transmittance of matrine was high; while P_{app} of oxymatrine was $(3.91 \pm 0.70) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, indicating that transmittance of oxymatrine was lower. Twenty constituents were detected in aqueous extract of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma, five constituents of them (P2, P4, P6, P7, P25) including matrine had high levels of transmittance, six constituents (P3, P5, P9, P11, P14, P27) had medium levels of transmittance, these other substances had low levels of transmittance or had no transmittance at all, which included oxymatrine. **Conclusion:** Fifty-five percent of main components are easily transported through monolayer. Among all components, matrine can be absorbed easily *in vitro* cell model, however, permeability of oxymatrine is poorer than matrine *in vitro*. This study suggests that matrine may be one of major components that was absorbed *in vivo* of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma.

[收稿日期] 20141220(004)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09505001-002,2011ZX09301-009)

[第一作者] 陈江华,在读硕士,从事中药毒理学研究,Tel:021-51323053,E-mail:chenjh8809@163.com

[通讯作者] * 邓中平,研究员,博士生导师,从事中药新药及其安全性评价研究,Tel:021-51322401,E-mail:dzp@shutcm.edu.cn

[Key words] Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma; Caco-2 cell monolayer model; matrine; oxyamatrine; apparent permeability coefficient

山豆根味苦、性寒,有毒,归肺、胃经,功效清热解毒、消肿利咽,临床用于治疗乳蛾喉痹、咽喉肿痛、口舌生疮等^[1]。现代药理学研究表明山豆根具有保肝降酶^[2]、抗炎、抑菌^[3]、提高免疫功能^[4]等作用。研究报道称其有一定肝脏毒性^[5-6],这点在本课题组前期研究已得以证实^[7-8]。但山豆根的活性成分与毒性成分均尚不清楚,关于山豆根的吸收转运亦无相关报道。人结肠腺癌细胞(Caco-2)系分离自人类结、直肠癌细胞,培养成熟的Caco-2细胞可形成与小肠上皮细胞相同的细胞极性和致密的单细胞层组织,且形态和功能与人体的小肠上皮细胞相似,已被广泛用于体外物质分子肠吸收的研究^[9]。研究认为可利用Caco-2细胞模型研究毒性中药,以确定毒性中药的肠道吸收成分、肠道吸收的机制、配伍等因素对吸收成分的影响等^[10]。本实验选择山豆根浸膏粉为受试物,利用完整性良好的Caco-2细胞模型对山豆根中主要成分的吸收特性进行定性分析,定量分析主要药效组分——苦参碱和氧化苦参碱的吸收情况。

1 材料

Acquity型超高效液相色谱仪-Micromass ZQ 2000型单级四级杆质量分析仪(美国沃特世公司),XS105DU型1/10万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),AE21型倒置显微镜(麦克奥迪公司),3111型二氧化碳培养箱(上海热电仪器有限公司),SW-II-A/B3型生物安全柜超净台(上海谱振生物科技有限公司),Millicell ERS型细胞电阻仪(美国密理博公司),CX21FS1型生物显微镜(美国奥林巴斯公司),MULTISKAN MK3型酶标仪(热电上海仪器有限公司)。

Caco-2细胞株(美国模式培养物集存库,细胞代数20~30),苦参碱、氧化苦参碱、盐酸罂粟碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110805201007,110780201007,171214200404,纯度均 $\geq 98\%$),山豆根饮片(四川新荷花饮片有限公司,产地广西,批号1207070,经上海中医药大学教学实验中心李俊松高级实验师鉴定为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* 的干燥根茎),山豆根浸膏粉(自制,批号20131127),12孔Transwell培养板和25cm²培养瓶(美国康宁公司),DMEM培养基(dulbecco's modified eagle's medium,美国生命技术

公司),HBSS缓冲液(Hank's balanced salt solution,上海碧云天生物技术有限公司),噻唑蓝(MTT,美国西格玛公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 内标溶液 精密称取盐酸罂粟碱对照品适量,用HBSS缓冲液定量配成50 mg·L⁻¹内标溶液,4℃保存。

2.1.2 苦参碱和氧化苦参碱对照品溶液 精密称取苦参碱和氧化苦参碱适量,用HBSS缓冲液定量配成质量浓度均为0.2,0.4,0.8,4,8,20,40,80 mg·L⁻¹的混合对照品溶液,4℃保存。

2.1.3 山豆根水提浸膏粉受试物 精密称量山豆根浸膏粉800 mg,溶于HBSS缓冲液4 mL中,涡旋1 min,于5 000 × g离心5 min,取上清液用0.22 μm滤膜滤过,得山豆根浸膏粉受试物原液。

2.1.4 跨膜转运供试品溶液 精密称取适量山豆根浸膏粉,用HBSS缓冲液配成10 g·L⁻¹的山豆根混悬液,经0.22 μm滤膜滤过,4℃保存。

2.2 指标成分的检测

2.2.1 苦参碱和氧化苦参碱 色谱条件为Waters C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm),柱温40℃,流动相0.1%甲酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~0.5 min,95% A;0.5~3 min,95%~65% A;3~3.1 min,65%~35% A;3.1~4 min,35% A;4~4.5 min,35%~5% A;4.5~5 min,5% A),流速0.4 mL·min⁻¹。质谱条件为电喷雾离子化模式,检测离子类型正离子,脱溶剂气流644 L·h⁻¹,锥空气流49 L·h⁻¹,脱溶剂温度350℃,离子化温度120℃,毛细管电压3.5 kV,锥空电压38 V,提取电压3 V,射频镜头电压0.5 V,选择性离子检测,氧化苦参碱(*m/z* ± H)265.1,苦参碱(*m/z* ± H)249.1,内标(盐酸罂粟碱)(*m/z* ± H)340.2。

2.2.2 其他主要成分 色谱条件为Waters C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm),柱温40℃,流动相0.1%甲酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1.5 min,3% A;1.5~3 min,3%~10% A;3~6 min,10%~30% A;6~8 min,30%~50% A;8~9 min,50%~70% A;9~11 min,70%~90% A),流速0.4 mL·min⁻¹。质谱条件为电喷雾离子化模式,检测离子类型正离子,

扫描模式 m/z 100 ~ 1 000, 脱溶剂气流 $644 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 锥空气流 $49 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 脱溶剂温度 $350 \text{ }^\circ\text{C}$, 离子化温度 $120 \text{ }^\circ\text{C}$, 毛细管电压 3.5 kV , 锥空电压 38 V , 提取电压 3 V , 射频镜头电压 0.5 V 。

2.3 细胞毒性试验 将 1.0×10^6 个/mL 单细胞悬液接种至无菌的 96 孔板中, 每孔加入培养液 $100 \mu\text{L}$, 放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱培养 24 h , 移除原培养液, 给药组加入培养液 $100 \mu\text{L}$ 和不同质量浓度 ($10, 12, 14, 16, 18, 200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的山豆根浸膏粉溶液 $50 \mu\text{L}$; 阴性组和空白组各加入培养液 $150 \mu\text{L}$, 继续培养 24 h 。吸弃培养基, 用 HBSS 缓冲液润洗 2 次, 加入完全培养基 $100 \mu\text{L}$ 。每孔加入 MTT $20 \mu\text{L}$, 继续培养 4 h 。吸弃孔内培养液, 加入二甲基亚砜 $150 \mu\text{L}$, 震荡混匀 15 min , 于 490 nm 处测定吸光度, 计算细胞的安全浓度。

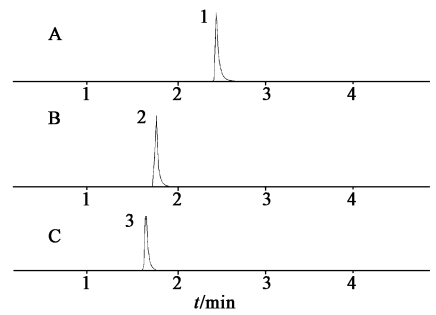
2.4 细胞转运试验 将 Caco-2 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于聚碳酸酯膜镶嵌套上, 培养 21 d , 细胞分化, 测量跨膜电阻 (trans-epithelial electrical resistance, TEER), 当 $\text{TEER} > 500 \Omega\cdot\text{cm}^2$ 时, 说明模型具有良好的紧密性和完整性, 可用于转运试验。试验前用 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 HBSS 缓冲液荡洗各个 Caco-2 细胞模型 3 次, 第 3 次加入 HBSS 后, 置于细胞培养箱孵育 20 min , 吸弃顶室 (apical chamber, AP 侧) 和基底室 (basolateral chamber, BL 侧) 的 HBSS 缓冲液; AP 侧加入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的供试品溶液 0.5 mL 作为给药端; BL 侧加入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 HBSS 缓冲液 1.5 mL 作为吸收端; 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡器 ($50 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 中开始转运, 分别于 $15, 30, 60, 120 \text{ min}$ 取样 (AP 侧 $50 \mu\text{L}$, BL 侧 $100 \mu\text{L}$), 同时补充等量 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} 7.4$ 的 HBSS 缓冲液。按 $P_{\text{app}} = dQ / (dt \times A \times C_0)$ 计算表观渗透系数 (P_{app}), 式中 dQ 为 dt 内的转运量, A 为膜面积, C_0 为给药侧的初始质量浓度。

2.5 样品预处理 山豆根水提浸膏粉受试物原液和 AP 侧样品用 HBSS 缓冲液稀释 20 倍, BL 侧样品不处理, 各取 $80 \mu\text{L}$, 加入内标溶液 $20 \mu\text{L}$, 涡旋 1 min , 精密量取 $2 \mu\text{L}$ 进行 LC-MS 分析。

2.6 样品测定方法的验证

2.6.1 标准曲线及定量下限 吸取系列对照品溶液各 $80 \mu\text{L}$, 置于含有 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标溶液 $20 \mu\text{L}$ 的 1.5 mL 离心管中, 得 $80, 40, 20, 4, 0.8, 0.4, 0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液, 涡旋 1 min , 取 $2 \mu\text{L}$ 进行 LC-MS 分析。利用样品峰面积与内标峰面积之比与质量浓度进行回归计算, 得苦参碱、氧化苦参碱的回归方程分别为 $Y = 0.029 \ 8X - 0.002 \ 2 (R^2 = 0.999 \ 2)$, $Y =$

$0.024 \ 3X - 0.004 \ 4 (R^2 = 0.999 \ 0)$, 二者的定量下限均为 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 见图 1。



1. 盐酸罂粟碱; 2. 氧化苦参碱; 3. 苦参碱

图1 内标物(A)及对对照品(B, C)的 UPLC

Fig.1 UPLC chromatograms of standards (B, C) and internal standard (A)

2.6.2 准确度、精密度和稳定性试验 吸取苦参碱与氧化苦参碱混合对照品溶液适量, 用 HBSS 缓冲液将其稀释成二者质量浓度均分别为 $0.4, 8, 40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 各精密量取 $80 \mu\text{L}$, 加入含有内标溶液 $20 \mu\text{L}$ 的 1.5 mL 离心管中, 涡旋 1 min , 每个质量浓度制备 5 份, 按 2.2 项下条件连续测定 3 d , 计算 3 种不同质量浓度样品的日内、日间精密度 RSD 均 $< 5.0\%$, 准确度均为 $95\% \sim 105\%$ 。分别测定不同 pH 条件 ($\text{pH} 5.5, 6, 7, 8, 8.5$)、室温和 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置时间对苦参碱和氧化苦参碱稳定性的影响。结果显示在 $\text{pH} 6 \sim 8$ 时, 二者均较稳定; 在室温和 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下放置 15 d 后, 2 个成分含量保留率均在 $85\% \sim 115\%$ 。

2.7 基于 Caco-2 模型转运的山豆根浓度考察 山豆根浸膏粉对于 Caco-2 细胞的毒性在质量浓度 $10 \sim 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内逐步上升, 当质量浓度 $\geq 14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率 80% , 与空白组的存活率 98% 比较, 差异有极显著性。当质量浓度为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 Caco-2 细胞存活率 97% , 与空白组的存活率相比, 差异不显著, 故选择 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为跨膜转运的给药浓度。

2.8 山豆根中主要成分的透过性 共检测到 20 个物质的离子峰。物质定性检测见图 2, 其中色谱峰 P1, P2, P3, P4, P5, P6 (苦参碱), P7, P8 (氧化苦参碱), P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P25 和 P27 的 P_{app} 分别为 $4.94 \times 10^{-6}, 29.78 \times 10^{-6}, 8.95 \times 10^{-6}, 22.13 \times 10^{-6}, 5.78 \times 10^{-6}, 11.43 \times 10^{-6}, 14.83 \times 10^{-6}, 3.91 \times 10^{-6}, 8.63 \times 10^{-6}, 1.96 \times 10^{-6}, 8.48 \times 10^{-6}, 0, 0, 5.60 \times 10^{-6}, 0, 3.17 \times 10^{-6}, 2.09 \times 10^{-6}, 1.85 \times 10^{-6}, 100.35 \times 10^{-6}, 7.59 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。结果显示 P2, P4, P6, P7,

P25 有较高透过率 ($P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$), P3, P5, P9, P11, P14 和 P27 有中等透过率 ($5 < P_{app} < 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$), 其他物质透过率较低或不能透过细胞模型; $P_{app} > 5.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 的成分占总成分的 55%。

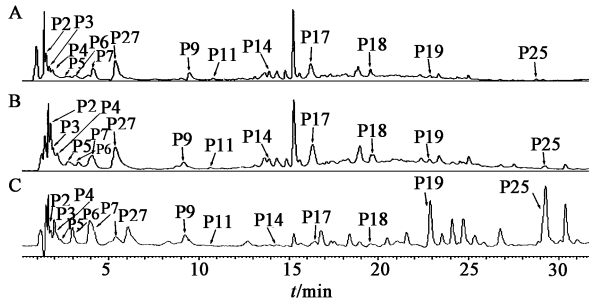


图 2 山豆根跨膜转运供试品溶液 (A) 及 Caco-2 细胞模型 120 min 取样的顶侧 (B) 及基底侧 (C) 物质 UPLC

Fig. 2 UPLC of sample solutions of transmembrane transport of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* (A), sampling from apical chamber (B) and basolateral chamber (C) of Caco-2 model at 120 min

2.9 山豆根中苦参碱和氧化苦参碱透过性 用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 山豆根浸膏粉进行 Caco-2 细胞模型转运, 研究苦参碱和氧化苦参碱的吸收特性。山豆根跨膜转运供试品溶液中苦参碱、氧化苦参碱质量浓度分别为 (1577.64 ± 22.31) , $(554.18 \pm 6.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在转运 15, 30, 60, 120 min 时, 苦参碱透过量分别为 (28.12 ± 2.03) , (46.86 ± 0.69) , (69.42 ± 4.66) , $(109.25 \pm 6.28) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氧化苦参碱透过量依次为 (1.93 ± 0.72) , (3.87 ± 1.01) , (7.14 ± 2.31) , $(13.46 \pm 2.82) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果显示山豆根提取物中苦参碱和氧化苦参碱在 Caco-2 单层细胞模型上的 P_{app} 分别为 $(11.43 \pm 0.41) \times 10^{-6}$, $(3.91 \pm 0.70) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。表明苦参碱在 Caco-2 细胞模型中透过性良好, 而氧化苦参碱透过率极低。

3 讨论

Caco-2 细胞来源于人体直肠、结肠癌细胞, 其结构和生化特点与人类小肠上皮细胞相似, 故可用于筛选评价药物离体口服吸收特性, 现已被广泛用于评价化学药物在小肠的吸收特性和转运机制研究, 关于其在中药复杂成分吸收特性中的应用报道较少。由于细胞模型样本中药物成分复杂且浓度较低, 为提高检测的准确度及灵敏度, 本文采用 UPLC-MS 技术对细胞培养液中主要成分进行定性测定, 并对苦参碱、氧化苦参碱进行定量分析, 操作简便、灵敏度高、准确度高, 满足样品的分析需求。

文献报道山豆根中苦参碱在体内极易被吸

收^[11], 而本文表明其在体外也较易被吸收, 两者结果相一致, 说明山豆根中苦参碱在体内外均较易被吸收。但本文测得的 P_{app} 比文献报道的以苦参总碱给药时从 AP→BL 侧的 P_{app} 高^[12], 此差异可能是由于山豆根中其他组分促进了苦参碱在 Caco-2 细胞模型上的转运吸收所致。氧化苦参碱透过率较低, 与氧化苦参碱对大鼠在体灌流的小肠部位极易被吸收的结果不一致^[13], 导致此差异的原因可能是山豆根水提物中其他组分对氧化苦参碱在小肠部位的吸收产生了抑制作用。另外, 在细胞模型两侧的样本中均检出新成分, 说明经细胞代谢产生了山豆根中原本没有的代谢产物。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 25-26.
- [2] 尹龙萍. 中药山豆根降酶护肝活性部位研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2007: 16-21.
- [3] 戴五好, 钱利武, 杨士友, 等. 苦参、山豆根生物碱及其总碱的抑菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 177-180.
- [4] 张媛媛. 山豆根非生物碱部位的活性研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2008: 37-48.
- [5] 李峰杰, 姚广涛, 金若敏, 等. 山豆根致大鼠肝毒性机制研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1821-1825.
- [6] 李素君, 钱晓路, 李晓宇, 等. 山豆根不同组分多次给药肝毒性损伤实验研究[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(10): 577-580.
- [7] 陈龙, 吴谦, 耿娅, 等. 山豆根水煎液致大鼠亚急性肝脏毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 293-297.
- [8] 盛云华, 金若敏, 姚广涛, 等. 山豆根致大鼠肝损伤外周血 microRNA 早期变化特征研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(3): 385-391.
- [9] 赵静, 梁爱华. Caco-2 细胞模型及其在中药吸收转运研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(5): 79-83.
- [10] 罗明媚, 刘树民, 索晴. 应用 Caco-2 细胞模型进行毒性中药研究的思路[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2007, 9(1): 25-27.
- [11] 王平全, 陈曙霞, 周贤飙, 等. 苦参碱在大鼠体内的药物动力学[J]. 上海第二医科大学学报, 1996, 16(4): 250-253.
- [12] 张蕾, 冯志强, 陈孝健, 等. 苦参总生物碱及其单体在 Caco-2 细胞模型的吸收特征研究[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2464-2467.
- [13] 王素军, 王广基, 李晓天, 等. 氧化苦参碱大鼠肠道吸收机理及吸收部位的研究[J]. 中国临床药理学及治疗学, 2005, 10(12): 1326-1329.

[责任编辑 刘德文]