

# 板蓝根提取液中有效成分的吸收转运特性分析

马丽, 何茂秋, 骆瀚超, 张晓燕\*

(贵州医科大学药学院, 基础医学院, 贵阳 550025)

**[摘要]** **目的:**研究板蓝根中有效成分在 Caco-2 细胞模型中的吸收转运特征。**方法:**建立 Caco-2 细胞摄取、转运模型, 考察受试化合物对该细胞的安全性, 以跨膜电阻值、碱性磷酸酶活性和荧光素钠通透性 3 个指标检验细胞模型, 考察浓度、时间、温度、抑制剂及 pH 对受试化合物吸收的影响。采用 HPLC 检测受试化合物, 计算其表观渗透系数( $P_{app}$ )与外排率。**结果:**板蓝根样品中精氨酸、腺苷能被小肠吸收细胞较好吸收, 精氨酸  $P_{app}$  在  $1.01 \times 10^{-6} \sim 1.35 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 腺苷  $P_{app}$  在  $0.40 \times 10^{-6} \sim 0.71 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。2 种成分在 Caco-2 细胞中膜通透性良好; 精氨酸被吸收程度优于腺苷, 精氨酸吸收率 > 50%。板蓝根提取液中精氨酸、腺苷成分外排率(ER)均在 1.0~2.0, 存在 P-糖蛋白(P-gp)外排转运蛋白介导两者的吸收转运, 板蓝根样品中存在其他成分促进精氨酸、腺苷的 P-gp 外排作用。**结论:**板蓝根药材中精氨酸和腺苷能够被小肠细胞较好地吸收, 存在吸收转运方向差异性, 且都受到 P-gp 外排作用。

**[关键词]** 板蓝根; 中药; Caco-2 细胞; 精氨酸; 腺苷

**[中图分类号]** R945; R283.6; R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0005-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240005

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151028.1051.012.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-28 10:51

## Absorption and Transport Characteristics Analysis of Effective Components from Isatidis Radix in Caco-2

Cell MA Li, HE Mao-qi, LUO Han-chao, ZHANG Xiao-yan\* (School of Basic Medical Sciences, School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study absorption and transport characteristics of effective components from Isatidis Radix in Caco-2 cell. **Method:** Safety of drug candidates from Isatidis Radix was evaluated by establishing absorption and transport model of Caco-2 cells, which were qualified beforehand with three indexes including trans-epithelial electrical resistance (TEER), alkaline phosphatase activity and permeability of sodium fluorescein. Several influential factors for absorption and transport process of effective components from Isatidis Radix had been investigated, such as concentration, time, temperature, pH value and inhibitors. HPLC was set up for determination of these compounds, their apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) and efflux rates were calculated. **Result:** Arginine and adenosine from Isatidis Radix could be absorbed well by absorptive cells of small intestine with  $P_{app}$  of  $1.01 \times 10^{-6} \sim 1.35 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  and  $0.40 \times 10^{-6} \sim 0.71 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , respectively. Two kinds of ingredients show good permeability in Caco-2 cell, following by absorbed degree of arginine with rate of > 50%, better than that of adenosine. Efflux rates (ER) of arginine and adenosine from Isatidis Radix extract were between 1.0~2.0, indicating P-glycoprotein (P-gp) efflux effect existed in absorption and transport process of these two compounds. And other compounds from Isatidis Radix could enhance efflux effect of P-gp on absorption of arginine and adenosine. **Conclusion:** Arginine and adenosine from Isatidis Radix can be absorbed well by absorptive cells of small intestine, and directional differences of absorption and transport process in Caco-2 cells are found out with P-gp efflux effect.

**[Key words]** Isatidis Radix; traditional Chinese medicine; Caco-2 cell; arginine; adenosine

**[收稿日期]** 20150427(010)

**[基金项目]** 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J-2013-2052); 贵州省中医药管理局基金项目(QZYY2013-90); 贵州医科大学博士基金项目(2013-03, J-2014-006)

**[第一作者]** 马丽, 在读硕士, 从事中药有效成分检测研究, Tel:18110919063, E-mail:377471757@qq.com

**[通讯作者]** \* 张晓燕, 博士, 讲师, 从事抗肿瘤药理与新药开发研究, Tel:0851-88174012, E-mail:drxyzhang@126.com

板蓝根具有抗病毒、抗菌、抗癌、免疫调节活性。研究表明精氨酸和腺苷是板蓝根药材有效成分之一<sup>[1-2]</sup>。目前有关板蓝根活性成分吸收机制的研究报道较少。Caco-2细胞是体外培养的肠上皮单层细胞株,其形态学、标志酶的功能表达及渗透特征与小肠上皮细胞类似,被广泛应用到药物吸收转运研究中<sup>[3-5]</sup>。本实验运用Caco-2细胞模型研究板蓝根中精氨酸、腺苷在小肠中的吸收转运机制,借助HPLC测定药物吸收情况以阐述该药物成分的吸收机制,为含精氨酸和腺苷的中药材、中药制剂吸收机制研究提供参考。

## 1 材料

600型高效液相色谱仪(美国Waters公司),TS-100F型拍照系统(日本Nikon公司),EL-204型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),8000系列水套式CO<sub>2</sub>细胞培养箱(Thermo公司),680型酶标仪(美国Bio-Rad公司),Allegra 64R型高速冷冻台式离心机(美国贝克曼库尔特有限公司),YDS-50B型液氮生物容器(成都金凤液氮容器有限公司),YXQ-LS-75G型数显立式压力蒸气灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗仪器厂),Millicell-ERS II型细胞电阻仪(美国Millipore公司)。

板蓝根药材(贵州省太升药材市场,批号201309,经贵州医科大学药学院生药学教研室刘绍欢讲师鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* 的干燥根),精氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,纯度>95%,批号024-201304),腺苷对照品(国药集团化学试剂有限公司,纯度>95%,批号A108808),维拉帕米、荧光素钠(美国Sigma公司,批号分别为V111249, F105615),胎牛血清(英国Biochrom公司,批号10099-141),氨基酸测定试剂盒(上海Waters科技有限公司,批号S117547),碱性磷酸酶试剂盒(南京建成科技有限公司,批号20140423),链霉素、青霉素双抗液(华北制药股份有限公司,批号P113150),二甲基亚砷、甲醇及乙腈为色谱纯,水为超纯水。0.25%胰蛋白酶-0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化液,Hank's缓冲溶液(HBSS)和DMEM高糖培养基均购自美国Gibco公司;人结直肠腺癌细胞细胞株(Caco-2)由中国医学科学院医药生物技术研究所提供,实验中所用细胞代数为35~45代。

## 2 方法

### 2.1 板蓝根样品的吸收转运试验

**2.1.1 细胞培养** 将Caco-2细胞接种于培养瓶,

高糖DMEM培养基中含10%胎牛血清,3.7 g·L<sup>-1</sup>碳酸氢钠,1% L-谷氨酰胺,100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素和100 U·mL<sup>-1</sup>链霉素双抗液,置于含有5% CO<sub>2</sub>,37℃培养箱中(相对湿度90%)培养。

**2.1.2 样品制备** 称取板蓝根药材适量,加8倍量50%乙醇冷浸24 h,煎煮2 h,过滤;药渣再加入6倍量50%乙醇煎煮2 h,重复提取2次;合并3次煎液,减压浓缩至稠膏,真空干燥,粉碎,得浸膏粉末,放入冰箱备用。细胞实验前使用HBSS溶液稀释储备液得到一定质量浓度的供试液。

**2.1.3 药物摄取试验** 取对数生长期的Caco-2细胞,按10×10<sup>4</sup>个/mL的密度接种到6孔板中,每孔2 mL。接种后,每2 d换液1次,1周后每日换液。培养至15 d后(细胞单层膜铺满),取细胞裂解液200 μL,加入含2%甲酸的甲醇溶液600 μL,沉淀蛋白,超声,离心(15 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min,下同)取上清液进行分析。

**2.1.4 药物转运试验** 将对数生长期细胞按密度10×10<sup>4</sup>个/mL每孔400 μL接种到Millicell™膜顶端膜侧(AP),并在基底膜侧(BL)加入DMEM培养液600 μL,接种液每隔2 d换液1次,1周后每日换液。培养至21 d后,取AP侧或BL侧缓冲液50 μL,加入含2%甲酸的甲醇溶液3.9 μL稀释,离心,取上清液进行分析<sup>[6]</sup>。

### 2.2 板蓝根样品的LC测定

**2.2.1 精氨酸** 取衍生管1支,加入经0.45 μm微孔滤膜滤过的待测样品10 μL,加入AccQ·Fluor硼酸盐缓冲液70 μL,涡旋混匀,加入AccQ·Fluor衍生试剂20 μL,涡旋10 s,室温放置1 min,石蜡封口膜封口,在55℃预热烘箱中加热10 min,冷却,微孔滤膜滤过,进样分析。

AccQ·Tag氨基酸分析柱(3.9 mm×150 mm,4 μm),荧光激发波长250 nm,发射波长395 nm,流动相乙腈(A)-10%乙酸盐-磷酸盐缓冲溶液(B)梯度洗脱(0~17 min,5%~8% A;17~24 min,8%~20% A;24~32 min,20%~32% A;32~37 min,32% A),柱温35℃,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量10 μL。

**2.2.2 腺苷** Diamonsil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(pH 4.0)(B)梯度洗脱(0~4 min,8% A;4~32 min,8%~21% A;32~38 min,21%~29% A;38~40 min,29%~90% A),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长254 nm,柱温25℃,进样量10 μL。

### 3 结果与分析

#### 3.1 样品中指标成分的含量测定

**3.1.1 精氨酸** 精氨酸的保留时间 27.2 min, 峰形良好, 空白介质及助溶剂无干扰; 线性范围  $0.50 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 回归方程  $Y = 9\,446.00X + 57.51$  ( $r = 0.999\,6$ ), 定量限  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 准确度和精密度良好, 高、中、低浓度 ( $0.5, 5, 50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 样品 6 次测定的 RSD 分别为 3.4%, 2.5%, 4.0%; 样品在  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  下 24 h 内稳定性良好, RSD 均  $< 5\%$ ; 回收率分别为 95.43%, 96.32%, 95.12%。

**3.1.2 腺苷** 腺苷的保留时间 19.5 min, 峰形良好, 空白介质及助溶剂无干扰; 线性范围  $0.50 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 回归方程  $Y = 12\,349.00X - 610.23$ , ( $r = 0.999\,8$ ), 定量限  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。准确度和精密度良好, 高、中、低浓度 ( $0.5, 5, 50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 样品 6 次测定的 RSD 分别为 2.5%, 1.3%, 2.7%; 样品在  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  下 24 h 内稳定性良好, RSD 均  $< 5\%$ ; 回收率依次为 97.41%, 98.14%, 97.32%。

#### 3.2 药物摄取试验

**3.2.1 Caco-2 细胞的安全性考察** 受试化合物是由二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配制, 为消除空白溶剂干扰, 需进行空白溶剂细胞毒性的考察。选取对数生长期 Caco-2 细胞, 以每孔  $100 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $20 \sim 30 \times 10^4$  个/mL 铺于 96 孔培养板中, 将培养板置  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 24 h。实验分为正常组和 DMSO 组。酶标仪检测 490 nm 处每孔吸光度  $A$ , 计算细胞存活率。采用噻唑蓝法 (MTT) 检测, 结果表明 DMSO 在  $2.5 \sim 40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 细胞存活率均  $> 80\%$ , 说明 DMSO 对该细胞毒性可以忽略。选取对数生长期 Caco-2 细胞, 以每孔  $100 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $10 \sim 20 \times 10^4$  个/mL 种植于 96 孔培养板中, 将培养板置  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 24 h。实验分为正常组和受试药物组。正常组每孔加入 DMEM 培养液  $100 \text{ } \mu\text{L}$ ; 将药物稀释至不同质量浓度 ( $25, 50, 100, 200, 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每孔加入  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , 作用 Caco-2 细胞 4 h 后采用 MTT 检测。结果表明受试化合物质量浓度  $< 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对 Caco-2 细胞未体现出毒性作用。

**3.2.2 不同浓度受试化合物对细胞摄取的影响** 选取质量浓度分别为 25, 50, 100, 200,  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的受试化合物, 介质 pH 7.4, 孵化时间 60 min。结果显示待测样品溶液中精氨酸、腺苷和两者对照品的摄取量随质量浓度的增加呈线性增加; 其中腺苷对照品的摄取量较其他溶液显著增加, 在  $25 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时与质量浓度成正比,  $> 200 \text{ mg} \cdot$

$\text{L}^{-1}$  摄取量急剧增加, 可能是因为高质量浓度时化合物对细胞膜产生了影响, 细胞膜通透性增加。见图 1。

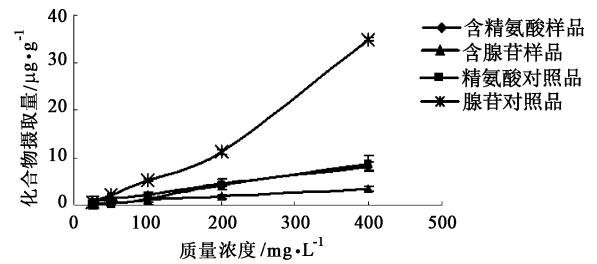


图 1 不同质量浓度受试化合物对 Caco-2 细胞摄取的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 1 Effect of test compounds with different concentrations on uptake of ingredients in Caco-2 cell ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

**3.2.3 不同时间对受试化合物细胞摄取的影响** 分别考察  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  受试化合物作用 15, 30, 60, 90, 120 min 时在 Caco-2 细胞中的吸收状态, 见图 2。结果显示 4 种受试溶液中精氨酸、腺苷的摄取量均随时间延长而增加; 且摄取量在 60 min 前随时间增加摄取量增加, 60 min 后时间延长摄取量增加较少, 逐渐趋向饱和。故摄取试验吸收时间选择 60 min。

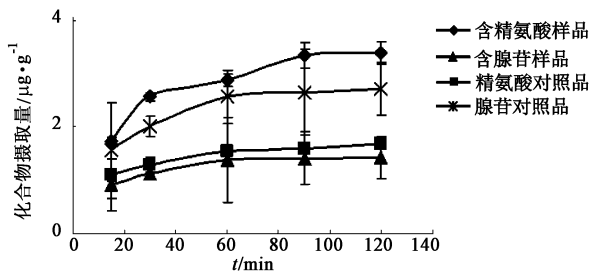
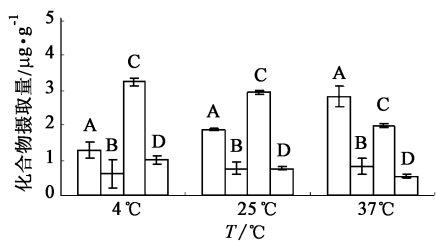


图 2 不同时间对受试化合物摄取的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 2 Effect of different times on uptake of test compounds in Caco-2 cell ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

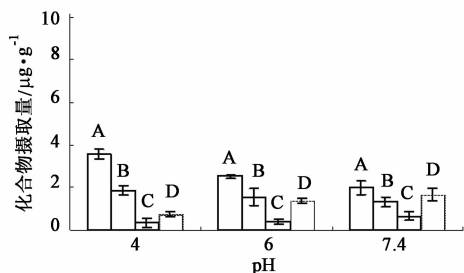
**3.2.4 不同温度对受试化合物细胞摄取的影响** 固定受试化合物质量浓度  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 介质 pH 7.4, 孵化时间 60 min。分别在 4, 25,  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$  条件下考察受试化合物的摄取量, 见图 3。结果显示板蓝根提取液中精氨酸、腺苷被 Caco-2 细胞摄取均受到温度影响, 故选择温度  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 。

**3.2.5 不同 pH 对受试化合物细胞摄取的影响** 介质 pH 分别为 4.0, 6.0, 7.4, 加入  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  受试化合物后 Caco-2 细胞对精氨酸和腺苷的摄取情况, 见图 4。结果显示板蓝根提取液中精氨酸的摄取量最大, 但随着 pH 的升高, 精氨酸成分的摄取量降低; 这可能与在碱性条件下不稳定, 有代谢产生



A. 含精氨酸样品; B. 精氨酸对照品; C. 含腺苷样品; D. 腺苷对照品  
图 3 不同温度对 Caco-2 细胞摄取受试化合物的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 3 Effect of different temperatures on uptake of test compounds in Caco-2 cell ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

的结果。板蓝根提取液中腺苷的摄取量随着 pH 的升高反而增大,因为在酸性环境下,腺苷成分易跨膜吸收,化合物的电性和空间结构有所改变,影响其与载体蛋白的相互作用。



A. 含精氨酸样品; B. 精氨酸对照品; C. 含腺苷样品; D. 腺苷对照品  
图 4 不同 pH 对 Caco-2 细胞摄取受试化合物的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 4 Effect of different pH values on uptake of test compounds in Caco-2 cell ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.2.6 抑制剂对摄取的影响** 考察介质 pH 7.4 条件下 P-糖蛋白(P-gp)抑制剂维拉帕米对  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  受试化合物在 60 min 内摄取的影响,结果含精氨酸样品、含精氨酸样品 + 抑制剂、精氨酸对照品、精氨酸对照品 + 抑制剂中精氨酸摄取量分别为  $(6.89 \pm 0.22)$ ,  $(8.53 \pm 0.08)$ ,  $(5.43 \pm 0.14)$ ,  $(7.63 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,含腺苷样品、含腺苷样品 + 抑制剂、腺苷对照品、腺苷对照品 + 抑制剂中腺苷的摄取量分别为  $(9.34 \pm 0.10)$ ,  $(10.67 \pm 0.18)$ ,  $(4.70 \pm 0.11)$ ,  $(5.20 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明维拉帕米能促进 Caco-2 细胞对受试化合物摄取,提示 P-gp 对受试化合物的吸收过程可能存在外排作用。

### 3.3 细胞转运模型的验证

**3.3.1 跨膜电阻值的测定** 跨膜电阻值 (TEER) 可用于确定 Caco-2 细胞单层膜的完整性,一般  $> 200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  即可视为单层致密完整。TEER 越高,表示单层越致密,一般不超过  $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。在 Caco-2 细胞接种不同天数后,采用 Millicell® -ERS II 测定 Millicell™ 膜的 TEER,  $\text{TEER} = (\text{细胞跨膜电阻值} -$

空白载体电阻值)  $\times$  单层表面积。以接种当日为 0 天,0 d 时测定的电阻值为培养所用膜加入培养液时所形成的电阻本底,当计算接种细胞后形成的 TEER 时,需扣除该本底值。结果表明 TEER 第 1 周增长迅速,细胞开始融合,1 周后,达  $600 \Omega \cdot \text{cm}^2$  以上,随后增长缓慢,TEER 较为平稳,细胞已经形成了紧密的单层结构,故可用于细胞转运试验的研究。

**3.3.2 碱性磷酸酶活性的测定** 碱性磷酸酶作为小肠刷状缘细胞的一种标志酶,是一种极性的标志酶,该酶的分布与细胞的极性一致,可通过刷状缘的标志酶来判断细胞分化的具体情况。在 Caco-2 细胞接种不同天数后,利用碱性磷酸酶试剂盒测定 AP 及 BL 侧的碱性磷酸酶活性,见图 5。结果发现从第 4 天起,细胞两侧 (AP, BL) 的碱性磷酸酶极化特征已经初步出现;至第 19 ~ 21 天时,两侧酶的活性比已经扩大到 3:1。说明建立的细胞模型具备碱性磷酸酶活性,细胞的分化已足够,具备了药物转运试验所需的各种载体和酶。

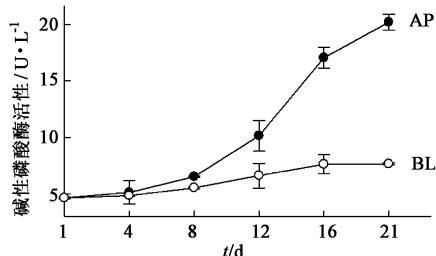


图 5 Caco-2 细胞单层不同时间的碱性磷酸酶活性测定 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 5 Determination of alkaline phosphatase activity in Caco-2 cells at different times ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.3.3 荧光素钠转运量的测定** 利用 HBSS 缓冲液分别配制  $0.0006, 0.012, 0.24, 2.48, 5.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  荧光素对照品溶液,激发光 491 nm,发射光 512 nm 条件下检测荧光强度,以荧光强度为纵坐标,质量浓度为横坐标,得标准曲线  $Y = 1.8265X + 0.1428$  ( $R^2 = 0.9996$ ),线性范围  $0.0006 \sim 5.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Caco-2 细胞在 Millicell™ 膜上生长到第 21 天后,吸弃培养液,在 AP 侧和 BL 侧均加入  $37^\circ\text{C}$  的 HBSS 培养液  $600 \mu\text{L}$ ,培养 20 min;吸弃培养液后,加入预热至  $37^\circ\text{C}$  的 HBSS 缓冲液,培养 20 min;吸弃 HBSS 缓冲溶液,在 AP 侧加  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  荧光素钠溶液  $400 \mu\text{L}$ ,BL 侧加 HBSS 缓冲液  $600 \mu\text{L}$ ,在  $37^\circ\text{C}, 5\% \text{ CO}_2$  于 60 min 吸取 BL 侧的转运液。检测荧光强度,根据标准曲线计算荧光素钠在 AP-BL 侧转运液的浓度,计算表观分配系数 [ $P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(A \times C_0)$ ],式

中  $Q$  表示化合物转运量,  $A$  表示聚碳酸酯膜的表面积,  $C_0$  表示化合物在给予端的初始浓度,  $t$  表示转运时间,  $dQ/dt$  表示转运速率。空白组采用未生长细胞的 Millicell 膜。结果空白组、荧光素钠组的  $P_{app}$  分别为  $4.87 \times 10^{-5}$ ,  $0.14 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 后者的  $P_{app}$  小于通透试验规定的  $0.5 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 说明 Caco-2 细胞通透性良好。

根据细胞转运模型的验证结果, Caco-2 细胞经过 21 d 培养分化后, 在形态上与小肠上皮细胞相似; 荧光素每小时通透量  $< 0.5\%$ , TEER  $> 200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , 细胞产生极性分化。说明在本实验室条件下培养建立的 Caco-2 细胞模型符合药物转运试验的要求。

**3.4 板蓝根样品的转运试验** 取符合转运试验条件的 Millicell™ 膜, 在实验开始前, 用空白的 HBSS 等渗缓冲溶液 (pH 7.4) 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养 20 min; 随后用 HBSS 溶液清洗 3 遍, 洗去细胞单分子层表面的杂质。对于从 AP 侧到 BL 侧转运: 将受试化合物溶液 400  $\mu\text{L}$  加到 AP 侧作为供给液, 同时在 BL 侧, 加入空白的 HBSS 等渗缓冲液 600  $\mu\text{L}$  作为接收液。对于从 BL 侧到 AP 侧转运: 将受试化合物溶液 600  $\mu\text{L}$  加到 BL 侧作为供给液, 空白 HBSS 等渗缓冲液 400  $\mu\text{L}$  加到 AP 侧作为接收液。在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱环境下培养 100 min, 吸取接收液 60  $\mu\text{L}$ 。按 2.1.4 项下的方法进行样品处理, 测定受试化合物转运量, 结果见表 1。

表 1 受试化合物不同侧表现渗透系数及外排率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Apparent permeability coefficients and efflux rates of test compounds in different sides of Caco-2 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	$P_{app \text{ AP to BL}} \times 10^{-6} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{app \text{ BL to AP}} \times 10^{-6} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	ER ( $P_{app \text{ BL to AP}} / P_{app \text{ AP to BL}}$ )
含精氨酸	$1.04 \pm 0.24$	$1.35 \pm 0.15$	1.30
精氨酸对照品	$1.01 \pm 0.16$	$1.23 \pm 0.28$	1.22
含腺苷	$0.54 \pm 0.30$	$0.71 \pm 0.25$	1.31
腺苷对照品	$0.40 \pm 0.43$	$0.50 \pm 0.26$	1.25

药物  $P_{app}$  大小反映了药物透过单层细胞的能力以及药物吸收的速度和程度。吸收良好的药物  $P_{app} > 1.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 吸收程度中等的药物  $P_{app}$  在  $0.1 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 而吸收差的药物  $P_{app} < 0.1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。外排率 (ER) 用于评价

待测药物与 P-gp 之间是否存在底物关系。板蓝根提取液中精氨酸  $P_{app}$  均  $> 1.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 板蓝根提取液中腺苷  $P_{app}$  约  $0.50 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。2 种成分在 Caco-2 细胞中膜通透性较好; 板蓝根提取液中的精氨酸、腺苷成分 ER 均在  $1.0 \sim 2.0$ , 也都略大于对应单一对照品成分的 ER, 提示从 AP 侧到 BL 的转运量少于 BL 侧到 AP 侧, 可能存在方向性差异; 结合 Caco-2 细胞摄取试验, 显示板蓝根提取液中 2 种成分的吸收转移受到 P-gp 外排作用影响。

#### 4 讨论

Caco-2 细胞来自人结肠腺癌细胞株, 具有极性的、紧密连结的柱状细胞单层和刷状缘结构, 能够表达多种吸收所需的转运蛋白和功能酶, 所以被广泛用于药物吸收与转运研究。精氨酸、腺苷是目前已知的板蓝根药材中含量比较大的有效成分, 具有多种药理活性, 本文通过 Caco-2 细胞模型研究其各自的吸收转运情况, 初步探讨板蓝根药材中精氨酸、腺苷的小肠吸收转运机制。结果表明板蓝根提取液中精氨酸、腺苷能被 Caco-2 细胞较好吸收, 精氨酸被吸收程度优于腺苷, 精氨酸吸收率  $> 50\%$ , 腺苷吸收率约  $20\%$ 。板蓝根提取液中精氨酸、腺苷成分的 ER 都大于对应单一对照品成分的 ER, 外排作用大于摄取作用, 存在 P-gp 外排转运蛋白介导这 2 种成分的吸收转运, 同时也提示板蓝根提取物中存在其他成分促进精氨酸、腺苷的 P-gp 外排作用。

#### [参考文献]

[1] 刘思贞, 祝希娴, 邵玉芹, 等. 板蓝根抗流感病毒有效部位的筛选 [J]. 中草药, 1999, 30(9): 650-652.

[2] 肖慧, 刘清飞, 王义明, 等. 高效液相法测定板蓝根药材中三种核苷的含量 [J]. 中成药, 2008, 30(11): 1654-1657.

[3] 马燕, 李沛波, 苏薇薇, 等. 药理实验中 Caco-2 细胞模型建立的评价指标 [J]. 中药材, 2006, 29(9): 946-948.

[4] 孙敏捷, 盛星, 胡一桥. Caco-2 细胞单层模型的建立与验证 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(18): 1431-1434.

[5] 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]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6): 570-573.

[6] 郑琴, 周欢, 熊文海, 等. 乌头碱在 Caco-2 细胞模型上的转运行为 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 121-124.

[责任编辑 刘德文]