

· 药剂与炮制 ·

大黄有效成分与附子有效成分配伍在 Caco-2 细胞模型上的转运分析

党珏, 李燕, 刘美辰, 罗林, 龚小红, 周忆梦, 汤韵秋, 郑立, 全云云, 李芸霞*, 彭成*
(成都中医药大学药学院, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室
——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的:研究大黄中大黄酸、大黄素,附子中去甲乌药碱,以及大黄酸、大黄素与去甲乌药碱分别配伍后在 Caco-2 细胞模型上的转运过程。方法:以大黄酸、大黄素、去甲乌药碱的累积转运量及表观渗透系数(P_{app})为指标,采用 HPLC 对大黄酸、大黄素、去甲乌药碱的含量进行检测,考察大黄酸、大黄素、去甲乌药碱在 Caco-2 细胞上的转运行为,以及大黄素、大黄酸分别配伍去甲乌药碱后转运行为的变化情况。结果:不同浓度去甲乌药碱的 P_{app} 均 $>1 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 外排与吸收比值接近 1.5, 配伍大黄酸、大黄素后去甲乌药碱的 P_{app} 显著上升 ($P < 0.05$)。大黄酸、大黄素配伍去甲乌药碱后前二者的 P_{app} 显著下降 ($P < 0.05$)。结论:去甲乌药碱是 1 个中等吸收的药物,其吸收方式主要为被动转运。大黄中大黄酸、大黄素可促进附子中去甲乌药碱的在肠吸收,而去甲乌药碱却会抑制大黄酸、大黄素的在肠吸收。

[关键词] 去甲乌药碱; 大黄酸; 大黄素; Caco-2 细胞; 大黄; 附子; 大黄附子汤

[中图分类号] R22; R289; R283.6; R945; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180706

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180110.1619.003.html>

[网络出版时间] 2018-01-11 16:18

Transport Analysis of Active Ingredients Compatibility Between Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Rhei Radix et Rhizoma in Caco-2 Cell Model

DANG Jue, LI Yan, LIU Mei-chen, LUO Lin, GONG Xiao-hong, ZHOU Yi-meng, TANG Yun-qiu, ZHENG Li, QUAN Yun-yun, LI Yun-xia*, PENG Cheng*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** Transport behaviors of rhein and emodin in Rhei Radix et Rhizoma and higenamine in Aconiti Lateralis Radix Praeparata were studied on Caco-2 cell model, and the change of transport behaviors after the compatibility of rhein, emodin with higenamine was inspected. **Method:** HPLC was used to analyzed the concentration of rhein, emodin and higenamine, then apparent permeability coefficients (P_{app}) and cumulative transport amounts were calculated. So as to investigate the bi-directional transport behavior of rhein,

[收稿日期] 20170813(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373943,81573583,81630101);四川省杰出青年基金项目(2013JQ0018);四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项(2017TD0001,2016TD0006)

[第一作者] 党珏,在读硕士,从事中药药效物质基础及其作用、配伍机制研究,E-mail:798377286@qq.com

[通信作者] *李芸霞,研究员,博士生导师,从事中药药效物质基础及其作用、配伍机制研究,E-mail:lyxcdutcm@126.com;

*彭成,研究员,博士生导师,从事疾病动物模型与中药复方研究,E-mail:pengchengsub@126.com

emodin and higenamine on Caco-2 cell, as well as the change of the transport behaviors of emodin and rhein. **Result:** P_{app} of higenamine with different concentrations was $> 1 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, the ratio of permeability in the basolateral to apical direction was about 1.5 times that of the apical to basolateral direction. The transport amount of higenamine was significantly ($P < 0.05$) increase in the presence of rhein and emodin. Whereas the transport amount of rhein and emodin was significantly ($P < 0.05$) decrease in the presence of higenamine. **Conclusion:** Higenamine can be mediumly absorbed on the Caco-2 monolayer model by a passive transportation. Rhein and emodin can promote the intestinal absorption of higenamine, but higenamine can inhibit the intestinal absorption of rhein and emodin.

[**Key words**] higenamine; rhein; emodin; Caco-2 cell; Rhei Radix et Rhizoma; Aconiti Lateralis Radix Praeparata; Dahuang Fuzitang

附子与大黄配伍最早来源于大黄附子汤,始载于东汉张仲景《金匮要略》^[1],二者在方剂中经常配伍使用,如附子鳖甲汤、附子泻心汤、温脾汤等。从古至今,两者配伍的临床应用范围不断扩大,大多根据两者“寒热并用、补泻兼施、去性存用”的配伍特点进行运用,采取加减化裁、病证结合的方法,主要治疗消化系统、肾脏、痛证、妇科等方面的疾病。附子中主要含有酯型生物碱,其次为水溶性生物碱。大黄中主要含有蒽醌类成分。

有文献研究了附子与大黄合煎后对双方主要化学成分的影响^[2-3],还有学者研究了两者配伍的药代动力学^[4],这些文献都是围绕附子中酯型生物碱展开的,但尚未进行附子中水溶性生物碱与大黄中蒽醌类成分配伍的研究。去甲乌药碱作为附子中主要的水溶性治疗成分,具有强心^[5]、平喘^[6]、抗炎^[7]等药理作用。大黄素、大黄酸作为大黄中 2 个典型的大黄素型蒽醌类成分,都具有广泛而相似的药理活性^[8-9],例如抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗氧化等。基于课题组前期研究发现大黄与附子配伍后大黄酸、大黄素的吸收速率降低,本实验拟从成分配伍的层次入手,以人结肠癌细胞(Caco-2)为模型细胞,将大黄酸、大黄素、去甲乌药碱在各自安全剂量范围下联合使用,考察配伍对这些成分转运情况的影响,以期为大黄与附子的临床联合用药提供一定依据。

1 材料

Forma 3111 型二氧化碳培养箱和 Varioskan flash-3001 型酶联免疫检测仪(美国 Thermo Scientific 公司),SW-CJ-2FD 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),AE2000 型相差倒置显微镜(Motic 公司),3460 型 Transwell 培养板(美国 Costar 公司,孔径 $0.4 \mu\text{m}$,直径 12 mm,底面积 1.12 cm^2)。

DMEM 高糖培养基,非必需氨基酸(NEAA),双抗,Hank's 平衡盐溶液(HBSS)和 0.25% 胰酶-

0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH40007.01,AAK207016,J160032,SH40007.01 和 J160036);胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技股份有限公司,批号 20161202),大黄素、大黄酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 518-82-1,478-43-3,纯度均 $> 98\%$),去甲乌药碱对照品(北京盛世康普化工技术研究院,批号 5843-65-2,纯度 $> 98\%$),盐酸普萘洛尔(大连美仑生物技术有限公司,批号 318-98-9,纯度 $> 98\%$),对乙酰氨基酚对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号 103-90-2,纯度 $> 98\%$),1,8-二羟基蒽醌对照品(中国食品药品检定研究院,批号 0829-9702,纯度 $> 98\%$),Caco-2 细胞(中国科学院上海细胞库,传代数 35~50 代),甲醇、乙腈、甲酸为色谱级,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $20 \mu\text{L}$ 。去甲乌药碱、对乙酰氨基酚(内标)检测条件为流动相甲醇-0.1% 磷酸(15:85),检测波长 280 nm。大黄素、大黄酸和 1,8-二羟基蒽醌(内标)检测条件为流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~8 min,70%~80% B;8~20 min,80%~85% B),检测波长 254 nm。

2.2 储备液的配置 精密称取上述对照品适量,用二甲亚砜(DMSO)将去甲乌药碱、大黄酸、大黄素和 1,8-二羟基蒽醌、对乙酰氨基酚都溶解成浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,分别作为储备液 I,II,III,IV,V,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.3 样品的处理 转运试验后,取出的样品立即于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液 $100 \mu\text{L}$,加入内标溶液 $50 \mu\text{L}$,密封后置 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,24 h 内检测完毕。

2.4 标准曲线、线性范围及定量下限 将 2.2 项下配制的对照品储备液用 HBSS 依次稀释成质量浓度分别为 0.781 25, 1.562 5, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列溶液, 涡旋混匀 1 min 后按 2.3 项下方法操作, 以待测物质量浓度为纵坐标, 待测物峰面积与内标峰面积的比值为横坐标, 进行线性回归运算, 得标准曲线。以 $S/N = 10$ 为定量下限。分别取高、中、低浓度 (25, 6.25, 1.562 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的有效成分溶液进行精密度考察。

2.5 Caco-2 单层细胞模型的建立与验证 取含 10% FBS, 1% NEAA, 1% 双抗的 DMEM 高糖培养液。将 Caco-2 细胞悬液调至密度约 1×10^5 个/mL, 按每孔 0.5 mL 接种在 Transwell 培养板内培养 21 d 左右, 前 1 周隔天换液, 1 周后每天换液。在模型建立的同时, 通过其跨膜电阻值^[10]及阳性药物盐酸普萘洛尔^[11]的表观渗透系数 (P_{app}) 来判断模型是否达到转运试验要求。

2.6 噻唑蓝 (MTT) 法考察药物对 Caco-2 细胞活度的影响

2.6.1 供试药物的配制 取储备液 I, II, III 适量, 分别用 HBSS 稀释至浓度为 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。取储备液 I 和 II 稀释得去甲乌药碱和大黄酸浓度均为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药对溶液, 并依次稀释得二者浓度均为 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药对溶液。取储备液 I 和储备液 III 稀释得去甲乌药碱和大黄素浓度均为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药对溶液, 并依次稀释得二者浓度均为 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药对溶液。取储备液 IV 适量, 用 HBSS 稀释得 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,8-二羟基蒽醌溶液。取储备液 V 适量, 用 HBSS 稀释得 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对乙酰氨基酚溶液。

2.6.2 MTT 试验 将细胞悬液以 1×10^4 个/孔移至 96 孔板 (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 清洗细胞 1 次后加入不同药液及助溶剂 1% DMSO, 对照组加空白 HBSS, 置培养箱中作用 4 h, 弃去药液; 各孔加入 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL , 置培养箱内再作用 4 h, 弃去孔内的 MTT, 加入 DMSO 150 μL , 溶解蓝紫色 MTT-甲臞结晶, 立即置酶标仪中于 570 nm 处测定吸光度 A , 每组平行 6 个孔。

2.7 去甲乌药碱在 Caco-2 细胞上的转运分析

2.7.1 不同浓度去甲乌药碱在 Caco-2 细胞模型上的转运 实验前先用 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 HBSS 清洗各孔 3 次, 最后 1 次置于培养箱内培养 30 min, 同时洗去细胞

表面的杂质; 吸去 HBSS, 重新加入预热的 HBSS, 测定跨膜电阻值; 使用空白载体重复上述步骤以获得空白值。研究吸收时, 分别向各孔肠腔侧 (AP) 侧加入浓度为 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的去甲乌药碱溶液 0.5 mL, 基底侧 (BL) 加入 HBSS 1.5 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 由 BL 取样 0.5 mL, 并在取样侧补加同温空白 HBSS 0.5 mL。研究外排时, 分别向各孔 BL 加入浓度为 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的去甲乌药碱溶液 1.5 mL, AP 加入 HBSS 0.5 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 由 AP 取样 0.25 mL, 并在取样侧补加同温空白 HBSS 0.25 mL^[12]。每组平行 3 个孔, 样品按 2.3 项下方法处理, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 待分析。

2.7.2 去甲乌药碱 1:1 配伍大黄素、大黄酸后的转运行为研究 分别向各孔 AP 加 1:1 配伍的大黄酸-去甲乌药碱、大黄素-去甲乌药碱混合药液 0.5 mL, BL 加 HBSS 1.5 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 后由 BL 取样 0.5 mL 进行分析。

2.8 大黄素、大黄酸在 Caco-2 细胞上的转运分析

2.8.1 大黄素、大黄酸在 Caco-2 细胞模型上的转运 研究吸收时, 分别向各孔 AP 加入 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 大黄素、大黄酸溶液 0.5 mL, BL 加入 HBSS 1.5 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 由 BL 取样 0.5 mL, 并在取样侧补加同温空白 HBSS 0.5 mL。研究外排时, 分别向各孔 BL 加入 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 大黄素、大黄酸溶液 1.5 mL, AP 加入 HBSS 0.5 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 由 AP 取样 0.25 mL, 并在取样侧补加同温空白 HBSS 0.25 mL, 待分析。

2.8.2 大黄素、大黄酸 1:1 配伍去甲乌药碱后的转运行为研究 分别向各孔 AP 加大黄酸-去甲乌药碱、大黄素-去甲乌药碱混合药液 0.25 mL, BL 加 HBSS 1.5 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 由 BL 取样 0.5 mL 进行分析。

2.9 数据处理 每个数据点均为平行 3 个孔的均值, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。按公式跨膜电阻 = $(R_{\text{样品}} - R_{\text{空白}}) \times$ 膜面积计算, 式中跨膜电阻即单位面积电阻值, $R_{\text{样品}}$ 为电阻仪读数, $R_{\text{空白}}$ 为 Transwell 内未接种细胞只加入新鲜完全培养液的测定电阻值, 膜面积 1.12 cm^2 。按公式细胞存活

率 = $(A_{\text{给药孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 计算。 P_{app} 和累积转运量的计算参考文献[13]。

3 结果

3.1 方法学结果 去甲乌药碱的保留时间为 9.2 min, 线性范围 $0.78 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 得回归方程 $Y = 12.873X + 0.0526$ ($R^2 = 0.999$); 定量下限 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 高、中、低 3 个浓度 6 次测定的日内精密度 RSD 分别为 0.4%, 0.6% 和 2.5%; 连续 3 d 的日间精密度 RSD 分别为 4.9%, 8.9% 和 7.9%; 准确度均在 $\pm 5\%$ 之内。大黄酸保留时间为 7.1 min, 线性范围 $0.78 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 得回归方程 $Y = 11.016X - 0.0428$ ($R^2 = 0.999$); 定量下限 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 高、中、低 3 个浓度 6 次测定的精密度 RSD 分别为 5%, 1.4% 和 0.9%; 连续 3 d 的日间精密度 RSD 分别为 7.3%, 4.7% 和 2.5%; 准确度均在 $\pm 5\%$ 之内。大黄素保留时间为 10.6 min, 线性范围 $0.78 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 得回归方程 $Y = 17.084X + 0.1939$ ($R^2 = 0.999$), 定量下限 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 高、中、低 3 个浓度 6 次测定的精密度 RSD 分别为 3.2%, 0.3% 和 0.2%; 连续 3 d 的日间精密度 RSD 分别为 8.8%, 3.0% 和 1.8%; 准确度均在 $\pm 5\%$ 之内。

3.2 Caco-2 单层细胞模型建立与评价 在设定条件下, 空白电阻值约 210 Ω , 各孔电阻值均 $> 800 \Omega$ 。盐酸普萘洛尔的 $P_{\text{app}} = 20.11 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 高于参考值 $10 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 表明细胞单层通透性符合实验要求^[11]。

3.3 去甲乌药碱、大黄酸、大黄素及其配伍的安全浓度范围 去甲乌药碱浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 相应 Caco-2 细胞的存活率 95.9%; 大黄酸浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 相应 Caco-2 细胞的存活率 101.6%; 大黄素浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 相应 Caco-2 细胞的存活率 101.8%; 去甲乌药碱与大黄酸均为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 配伍时相应 Caco-2 细胞的存活率 96.7%; 去甲乌药碱与大黄素浓度均为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 配伍时相应 Caco-2 细胞的存活率 101.1%。上述情况下细胞的存活率均 $> 95\%$, 说明此时药物浓度对细胞的生长无显著影响, 提示可在此浓度范围内进行 Caco-2 单层细胞模型的转运试验。

3.4 去甲乌药碱在 Caco-2 细胞模型的转运 不同浓度、不同方向去甲乌药碱在 Caco-2 细胞上的累积转运量分别见图 1, 2, P_{app} 见表 1。按比例 1:1 配伍大黄酸、大黄素后的累积转运量和 P_{app} 见表 2。结果显示去甲乌药碱两侧转运 P_{app} 均 $> 1 \times 10^{-7} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

其双侧累积转运量, 在 180 min 内随着浓度及孵育时间的增加而增加, 外排与吸收比值接近 1.5。配伍大黄酸、大黄素后, 去甲乌药碱的累积转运量呈上升趋势, 2.5 ~ 3.0 h 的上升量有显著性差异 ($P < 0.05$)。配伍后去甲乌药碱的 P_{app} 显著增加 ($P < 0.05$)。

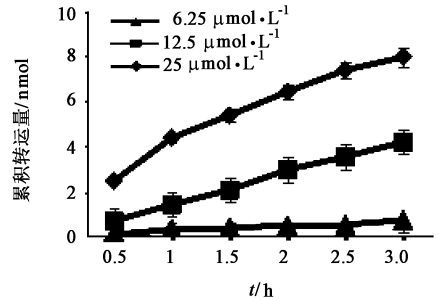


图 1 不同浓度去甲乌药碱 AP→BL 累积转运量随时间的变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Changes of cumulative transport amount of higenamine with different concentrations in AP→BL side over time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

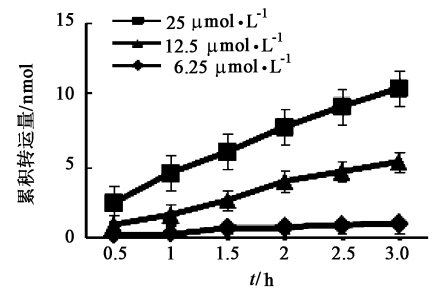


图 2 不同浓度去甲乌药碱 BL→AP 累积转运量随时间的变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Changes of cumulative transport amount of higenamine with different concentrations in BL→AP side over time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 不同浓度去甲乌药碱双向转运的表现渗透系数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 P_{app} of higenamine with different concentrations in bi-directional transport ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

浓度 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ $/\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ $/\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ $/P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$
25.00	$(0.26 \pm 0.01) \times 10^{-6}$	$(0.34 \pm 0.04) \times 10^{-6}$	1.31
12.50	$(0.28 \pm 0.06) \times 10^{-6}$	$(0.38 \pm 0.08) \times 10^{-6}$	1.38
6.25	$(0.10 \pm 0.01) \times 10^{-6}$	$(0.13 \pm 0.01) \times 10^{-6}$	1.31

3.5 大黄酸、大黄素在 Caco-2 细胞模型中的转运情况 大黄酸不同方向累积转运量及配伍去甲乌药碱后的累积转运量见表 3。大黄酸 AP→BL 的 $P_{\text{app}} = (0.27 \pm 0) \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, BL→AP 的 $P_{\text{app}} = (0.34 \pm 0.08) \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 比值为 1.30, 按 1:1 比例配伍去甲乌药碱后计算大黄酸的 $P_{\text{app}} = (0.13 \pm 0) \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。配伍后大黄酸的累积转运量和 P_{app} 均

表 2 配伍前后去甲乌药碱 AP→BL 的累积转运量和表观渗透系数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Cumulative transport amounts and P_{app} of higenamine in AP→BL side before and after compatibility ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	累积转运量/nmol						$P_{app}/\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	
去甲乌药碱	2.49 ± 0.88	4.39 ± 0.68	5.38 ± 0.51	6.42 ± 0.60	7.37 ± 0.19	7.94 ± 0.27	(0.26 ± 0.01) × 10 ⁻⁶
去甲乌药碱-大黄酸(1:1)	2.80 ± 1.41	5.35 ± 1.02	6.84 ± 0.88	8.03 ± 1.10	8.87 ± 0.51 ¹⁾	9.83 ± 0.84 ¹⁾	(0.33 ± 0.03) × 10 ⁻⁶ ¹⁾
去甲乌药碱-大黄素(1:1)	2.76 ± 1.61	5.50 ± 1.10	7.39 ± 2.15	8.93 ± 1.24	9.20 ± 0.90 ¹⁾	10.70 ± 0.64 ¹⁾	(0.35 ± 0.02) × 10 ⁻⁶ ¹⁾

注:去甲乌药碱、大黄素和大黄酸的浓度均为 25 μmol·L⁻¹(表 3 同)。与去甲乌药碱组比较¹⁾ P < 0.05。

显著下降,提示去甲乌药碱可抑制大黄酸的在肠吸收。大黄素不同方向的累积转运量见表 3。结果计算大黄素 AP→BL 的 $P_{app} = (0.13 \pm 0.01) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,

BL→AP 的 $P_{app} = (0.20 \pm 0.08) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,配伍去甲乌药碱后未检测到大黄素,提示去甲乌药碱可抑制大黄素的吸收。

表 3 大黄酸、大黄素在不同时间点的累积转运量及大黄酸-去甲乌药碱在不同时间点的大黄酸累积转运量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Cumulative transport amounts of rhein and emodin at different time points and cumulative transport amounts of higenamine at different time points after compatibility with rhein ($\bar{x} \pm s, n = 3$) nmol

组别	方向	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h
大黄酸	AP→BL	2.71 ± 0.08	4.71 ± 0.46	5.74 ± 0.30	6.47 ± 0.82	7.42 ± 0.41	8.01 ± 0.24
	BL→AP	2.30 ± 0.26	4.00 ± 0.72	5.56 ± 1.06	7.13 ± 1.43	8.70 ± 1.82	10.40 ± 2.32
大黄酸-去甲乌药碱(1:1)	AP→BL	1.09 ± 0.68 ¹⁾	2.20 ± 0.36 ¹⁾	2.80 ± 0.24 ¹⁾	3.25 ± 0.38 ¹⁾	3.57 ± 0.16 ¹⁾	3.96 ± 0.20 ¹⁾
大黄素	AP→BL	1.09 ± 0.10	1.73 ± 0.13	2.4 ± 0.19	3.07 ± 0.26	3.37 ± 0.28	3.92 ± 0.33
	BL→AP	1.08 ± 0.09	1.99 ± 0.20	3.27 ± 0.40	4.20 ± 0.40	5.19 ± 0.36	6.11 ± 0.33

注:与大黄酸组比较¹⁾ P < 0.05。

4 讨论

Caco-2 细胞来源于人的结肠癌细胞,由于形态学及生化性质都与小肠上皮很相似,被广泛用于体外药物分子肠吸收的研究。而用 Caco-2 细胞研究药物吸收前需考虑药物毒性对其的影响,本实验采用经典的 MTT 毒性试验确定了药物的安全浓度范围,选取了安全浓度范围以下的浓度用于实验。

王岚等^[14]分析《中医方剂大辞典》所记载的 266 首方剂时,对以攻下积滞为主的含大黄-附子药对的 59 首方剂作进一步分析。结果发现在这 59 首方剂中,大黄-附子配伍比例为 1:1 的有 24 首,占 41%;药物药性强弱各有不同,不能认为 1:1 比例就是相对平衡的比例,但对于同一药对,尤其是具有相互增效减毒作用的药对,针对某一病证却存在 1 个相对的“平衡比例”,偏离这一比例将会导致方剂作用性质的改变,偏离越多,药物的偏性在全方中的体现就越多。因此,通过预试验后确定附子与大黄中有效成分的配伍比例为 1:1。

林敏婷等^[15]研究了去甲乌药碱在 Caco-2 细胞上的代谢产物,但尚无文献研究去甲乌药碱在该细胞上的吸收转运情况,故本文选取了 3 个浓度的去

甲乌药碱进行研究。目前,运用 Caco-2 细胞判断药物吸收难易程度时,一般以 P_{app} 为指标, $P_{app} < 1 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 药物吸收率 0 ~ 20%, 表示药物难吸收; $1 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} < P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 药物吸收率 20% ~ 70%, 表示药物吸收中等; $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 药物吸收率 70% ~ 100%, 表示药物吸收良好。本研究结果表明去甲乌药碱的 P_{app} 在 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 是 1 个吸收中等的药物,而其 $P_{app}(\text{BL} \rightarrow \text{AP}) > P_{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$, 说明双向转运的表观渗透性存在方向性差异,其 $P_{app}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})/P_{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 接近 1.5, 提示去甲乌药碱的吸收方式主要为被动转运,但外排蛋白也可能参与了其吸收。配伍大黄酸、大黄素后其 P_{app} 显著增加,说明大黄酸、大黄素可促进去甲乌药碱的吸收。大黄与附子配伍后常用于治疗阳虚便秘,阳虚时会出现副交感神经-M 受体-环磷酸鸟苷(cGMP)系统功能偏亢、心率失常等表现,有研究证实去甲乌药碱^[16]不仅对 M 受体有下调作用,且具有强心作用,纠正阳虚。本实验从纠正阳虚方面为 大黄-附子治疗阳虚便秘提供了一定的实验参考依据。

大黄酸、大黄素配伍去甲乌药碱后,累积转运量

和 P_{app} 都显著减少。提示附子中的去甲乌药碱可抑制大黄中大黄酸、大黄素的在肠吸收。大黄与附子配伍用于治疗寒积便秘时,要改变大黄寒凉的药性而保留其泻下的作用,是“去性存用”之法,一般大黄要后下以保留其泻下成分。曾有学者提出大黄总蒽醌可能是大黄寒性的物质基础^[3],并证明了此假设。而本研究发现附子中的去甲乌药碱可降低大黄酸、大黄素的在肠吸收,结合去甲乌药碱可以治疗阳虚,进一步解释了附子-大黄配伍治疗阳虚便秘时遵循中医用药的“去性存用”,为两者配伍治疗阳虚便秘的临床应用提供了有力的分子学依据。

药物的吸收除了受药物制剂本身理化性质的影响外,还受多种生理屏障的影响,例如细胞的紧密连接、代谢酶和外排转运体等^[17]。大黄酸可能通过上调 Caco-2 细胞多耐药相关蛋白 3 (MRP3) 的 mRNA 表达和下调 MRP5 的 mRNA 表达来影响其口服药物的生物利用度^[18]。大黄素可能是乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 较弱的底物。而外排转运蛋白 P-糖蛋白 (P-gp), BCRP 和 MRP2 均介导了酯型生物碱乌头生物碱的吸收转运^[19],也有可能介导了去甲乌药碱的吸收转运,但这些内容均有待下一步实验来验证。

[参考文献]

[1] 张仲景. 金匱要略[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1997: 39.
[2] 梁佳佳, 杨丽娜, 郑卫华, 等. 附子炮制及与大黄配伍后酯型生物碱的含量变化研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(1): 38-44.
[3] 叶强. 附子配伍大黄调控药性物质基础研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.
[4] 任常谕. 附子配伍大黄主要成分的药代动力学研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2015.
[5] 周运鹏, 江京莉. 附子的研究 V. 附子的强心有效成分之一——去甲乌药碱的实验及临床研究概况[J]. 中药药理与临床, 1992, 8(3): 43-46.
[6] 黄燮南, 石京山, 陆卫群, 等. 去甲乌药碱的平喘作用

[J]. 中国药学杂志, 1985, 20(8): 462-464.
[7] 张家俊, 陈文为. 去甲乌药碱对关节液的保护作用[J]. 药学学报, 1985, 29(6): 423-426.
[8] 陈秋荷, 皮荣标, 陈景考. 大黄酸及其衍生物: 合成与药理作用研究进展[J]. 药学研究, 2016, 35(3): 161-167.
[9] 刘静, 王丽. 大黄素的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(35): 3351-3354.
[10] 杨秀伟, 杨晓达, 王莹, 等. 中药化学成分肠吸收研究中 Caco-2 细胞模型和标准操作规程的建立[J]. 结合医学学报(英文), 2007, 5(6): 634-641.
[11] YANG X W, YANG X D, WANG Y, et al. Establishment of Caco-2 cell monolayer model and standard operation procedure for assessing intestinal absorption of chemical components of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Integr Med, 2007, 5(6): 634-641.
[12] 孟祥乐, 郭艳丽, 苏成福, 等. 连翘脂苷 A 抑制 Caco-2 细胞膜上 P-糖蛋白的外排功能及作用机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 5-8.
[13] 郑琴, 周欢, 熊文海, 等. 芍药苷对乌头碱在 Caco-2 细胞模型上转运行为的影响研究[J]. 世界中医药, 2015, 10(3): 322-326.
[14] 王岚, 彭成. 附子与大黄配伍源流的研究[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(2): 100-103.
[15] 林敏婷, 张超, 唐思丽, 等. LC/MS/MS 鉴定莲子心生物碱在 Caco-2 细胞中的代谢产物[J]. 中药材, 2015, 38(12): 2531-2534.
[16] 易宁育, 胡雅儿, 何路明, 等. 去甲乌药碱对脑 M 受体的调节作用[J]. 中药药理与临床, 1992, 8(5): 18-21.
[17] 顾玲玲, 陈志祥, 陆伟根. ABC 跨膜转运蛋白外排抑制促进药物肠吸收的研究进展[J]. 世界临床药物, 2012, 33(3): 176-182.
[18] 杨娜, 隋峰, 李沧海, 等. 大黄酸对 Caco-2 细胞多耐药蛋白转运体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 133-136.
[19] 周静波. 附子配伍甘草、大黄、干姜调控药性物质基础研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.

[责任编辑 刘德文]