

复方脑忆源片主要成分淫羊藿苷 在 Caco-2 细胞模型上的转运研究

周改莲¹, 单桂芝², 林励^{3*}, 王莲婧³

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 2. 河南省水利水电学校, 河南周口 466001;
3. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 对复方脑忆源片中主要成分淫羊藿苷进行转运研究, 阐明吸收特点。方法: 利用 Caco-2 细胞模型, 对复方脑忆源片中主要成分淫羊藿苷(ICA)进行体外转运, 并通过高效液相(Luna Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈: 水(30:70); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 270 nm;)测定单体、药材及复方中的淫羊藿苷转运后的含量。结果: 淫羊藿苷在小肠吸收转运过程随时间增长而增加, 可能会被 Caco-2 细胞中的 P-gp 转运蛋白外排。与淫羊藿单体和淫羊藿提取物中的淫羊藿苷比较, 脑忆源片可显著提高淫羊藿苷的转运, 同时可降低淫羊藿苷的外排作用。结论: 在脑忆源片中, 由于淫羊藿苷外排减少, 可认为通过复方配伍后, 方中的其他药物抑制了淫羊藿苷的外排, 使其可以更好的发挥药理作用。

[关键词] 脑忆源片; Caco-2 细胞模型; 转运; 淫羊藿苷

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0178-04

[doi] 10.11653/syfy2013130178

Membrane Transport of the Icariin, which is Main Component of Naoyiyuan Tables Across the Caco-2 Monolayer

ZHOU Gai-lian¹, SHAN Gui-zhi², LIN Li^{3*}, WANG Lian-jing³

(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical (TCM) University, Nanning 530001, China;
2. Henan Water Conservancy and Hydroelectric Power School, Zhoukou 466001, China;
3. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

[收稿日期] 20121017(009)

[基金项目] 海南省重点科技计划项目(090603)

[第一作者] 周改莲, 副教授, 从事中药炮制与新药研究工作, Tel:13877103164, E-mail:zhgllhw@126.com

[通讯作者] * 林励, 研究员, 从事资源开发与新药研究工作, Tel:020-39358270, E-mail:LL766@126.com

- [4] Deng Y T, Liao Q F, Li S H, et al. Simultaneous determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study after oral administration of coptis-evodia herb couple [J]. J Chromatogr B, 2008, 863(2): 195.
- [5] 鲍天冬, 李玉洁, 杨庆, 等. LC/MS 测定大鼠灌胃黄连提取物后血浆中小檗碱、巴马汀及其药物动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 186.
- [6] 李艺, 蒋建东. LC-MS/MS 方法快速检测血浆中小檗碱的浓度[J]. 化学通报, 2010, 73(8): 757.
- [7] 盛美萍, 孙淇, 王宏. 盐酸小檗碱在 Beagle 狗静脉注射和口服药理学研究[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(1): 64.
- [8] 李宝馨, 杨宝峰, 郝晓敏, 等. 黄连素单用及合用谷维素在家兔及健康者体内的药代动力学研究[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(1): 33.
- [9] Zuo F, Nakamura N, Akao T, et al. Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudogerm-free rats determined by liquid chromatography ion trap mass spectrometry [J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(12): 2064.
- [10] 孙冬梅, 黄雪君, 罗文汇. 黄连与吴茱萸不同配比中黄连主要生物碱在家兔体内药动学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 170.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] Objective: The absorption characteristic of the icariin (ICA), which is the main component of Naoyiyuan tables, was clarified by the membrane transport study. **Method:** The Caco-2 monolayer was used to study the transport of the ICA in monomer, herbs, and compounds *in vitro*. For the determination of the content of ICA, the HPLC method was operated with acetonitrile-water (30:70) as mobile phase, with Luna Kromasil C₁₈ column. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, detection wavelength was at 270 nm. **Result:** ICA exhibited time-dependent permeation with apparent permeability coefficient P-gp values in the range 1 × 10⁻⁵-1 × 10⁻⁶ cm · s⁻¹, suggesting transcellular diffusion pathways. P-glycoprotein may play a role in the intestinal efflux of icariin. However compared with the icariin in monomer and herbs, the transport of ICA in Naoyiyuan tables is higher. **Conclusion:** The intestinal efflux of ICA in Naoyiyuan tables was reduced. So we can considered that the other ingredients in Naoyiyuan tables inhibited the efflux of icariin. It is profit for the pharmacological actions.

[Key words] Naoyiyuan tables; Caco-2 cell; transport; icariin

脑忆源片是本项目组研制的一种纯中药配方制剂,主要由淫羊藿、巴戟天、枸杞子及山药 4 味药物组成。经初步药效学试验表明,具辅助改善记忆、缓解疲劳等功能。课题组前期研究已经用本试验室改进的外翻肠囊法对该复方在小肠内的吸收机制进行了研究,本试验将利用 Caco-2 细胞模型,对脑忆源片中主要成分淫羊藿苷(icariin, ICA)的肠吸收特征做进一步研究,以更好地阐明其吸收特征,为筛选剂型及改进工艺提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞来源 人结肠腺癌细胞 Caco-2 细胞(ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)。

1.2 仪器 SW-CJ-2F 双人双面超净工作台,苏州净化设备公司;上皮细胞电阻仪 Millieell-ERS,美国 Millipore 公司;MCO-15AC 二氧化碳培养箱,日本 SANYO 公司;XSZ-DZ 倒置显微镜,日本 Olympus 公司;80-2 台式离心机,上海医疗器械公司;数显恒温水浴锅,京津金坛市正基仪器有限公司;YX-280D 型手提式蒸气消毒锅,上海三申医疗器械有限公司;BS110S 电子天平,德国 Sartorius 公司;TDX-1 旋涡混合器;DGX-91438B-1 电热鼓风干燥箱;680 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基(不含丙酮酸),必需氨基酸(NEAA,美国 Hyclon 公司),特级胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司),链霉素、青霉素双抗液,谷氨酰胺,PBS 缓冲液,Hank's 缓冲液(杭州吉诺生物医药技术有限公司),胰酶溶液 0.25% (含酚红 + EDTA,美国 Bioind 公司),鼠尾胶原蛋白 I 型(生友生物技术有限公司),二甲基亚砜(DMSO,法国 MP 公司)。ICA 对照品购买自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 药物溶液的配制

2.1.1 淫羊藿苷(ICA)溶液的配制 精密称取 ICA 2 mg,溶解于 300 μL DMSO,200 μL 无水乙醇稀释,1 500 μL Hank's 平衡盐溶液溶解得到 1 g · L⁻¹母液。

2.1.2 淫羊藿药材黄酮类成分提取物 精密称取淫羊藿提取物 71.53 mg,溶解于 300 μL DMSO,200 μL 无水乙醇稀释,1 500 μL Hank's 平衡盐溶液溶解得到相当于 ICA 1 g · L⁻¹母液。

2.1.3 复方脑忆源片提取物 取脑忆源片打粉,精密称取 243.3 mg,溶解于 300 μL DMSO 后,200 μL 无水乙醇稀释,1 500 μL Hank's 平衡盐溶液溶解得到相当于 ICA 1 g · L⁻¹母液。

2.2 Caco-2 细胞模型的验证^[1-4]

2.2.1 跨膜电阻测定 Caco-2 细胞模型完整性 在细胞接种后的 2,4,8,12,16,21 d 利用 Millicell-ERS 数字电导仪测定其 TEER 值,观察 Caco-2 细胞的融合与紧密连接的形成,记录电阻值,TEER 测定结果见图 1。Caco-2 细胞单层的紧密性随培养时间逐渐增高,到第 21 天到达(1 544 ± 39) Ω · cm⁻²,表明已形成完整紧密的单层结构。

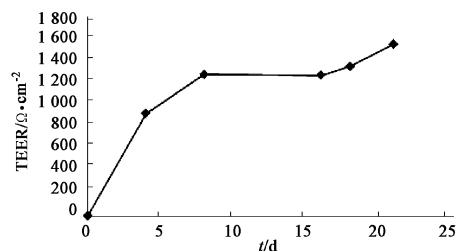


图 1 Caco-2 细胞单层 TEER 值经时变化($\bar{x} \pm s, n = 12$)

2.2.2 荧光素通透量检测 用 HBSS 溶液将荧光素 100 mg · L⁻¹的母液梯度稀释为 10,5,2.5,1.25,

0.625, 0.312 5 mg·L⁻¹ 的溶液。采用荧光分光光度法分析。以荧光强度为纵坐标, 荧光黄浓度为横坐标作图, 绘制荧光素标准曲线。Caco-2 细胞在 Transwell 板上培养 21 d 后, 在 AP 侧加入 0.5 mL HBSS 平衡盐溶液, 在 BL 侧加入 1.5 mL HBSS 平衡盐溶液, 轻轻振荡洗涤细胞层 3 次, 最后 1 次将 Transwell 培养板置于 5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱中培养, 30 min 后去除, 吸除 AP 侧和 BL 侧的 HBSS 平衡盐溶液。将 100 mmol·L⁻¹ 的荧光素溶液 0.5 mL 加入 AP 侧, BL 侧加入 1.5 mL HBSS 平衡盐溶液, 将培养板放入 37 °C 恒温摇床中培养 2 h 后, 从 BL 侧取出溶液, 用荧光分光光度计测定其荧光强度。

根据荧光分光光度法测定荧光素的含量, 以测得的荧光强度 (Y) 对荧光素溶液浓度 (μmol·L⁻¹) (X) 进行线性回归, 得回归方程: Y = 703.38X - 254.61, R² = 0.997 7, 表明荧光素在浓度范围为 0.625 ~ 10 μmol·L⁻¹ 呈良好线性关系。

结果表明, 荧光素在该 Caco-2 细胞单层模型中的表观渗透系数 (P_{app}) < 1.0 × 10⁻⁶ cm·s⁻¹, 符合荧光素的吸收特征, 证明该模型的细胞旁完整性和通透性良好。

2.3 单体、药材及复方中的 ICA 在 Caco-2 细胞模型上的转运试验及转运后的含量^[5]测定 吸去顶端 (AP 侧) 和底端 (BL 侧) 的培养液, 在 AP 侧加入 0.5 mL HBSS 平衡盐溶液, 在 BL 侧加入 1.5 mL HBSS 平衡盐溶液, 轻轻振荡洗涤细胞层 3 次, 最后一次将 Transwell 培养板置于 5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱中培养, 30 min 后去除, 吸除 AP 侧和 BL 侧的 HBSS 平衡盐溶液。

对于从细胞绒毛面 (AP 侧) 向基底面 (BL 侧) 的转运: 将 3 个浓度含药 HBSS 平衡盐溶液各 0.5 mL 分别加到 AP 侧作为供给池, 同时在 BL 侧加入空白的 pH 7.4 的 HBSS 平衡盐溶液各 1.5 mL 作为接受池。

对于从 BL 侧到 AP 侧转运: 将 10 mg·L⁻¹ 含药 HBSS 平衡盐溶液各 1.5 mL 分别加到 BL 侧作为供给池, 同时在 AP 侧加入空白的 pH 7.4 的 HBSS 平衡盐溶液各 0.5 mL 作为接受池, 把 Transwell 培养板置于 37 °C, 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中, 分别在给药后 30, 60, 90, 120 min 吸取接受池的转运液 100 μL 置于离心管中, 同时补加等量的 37 °C 空白 pH 7.4 的 HBSS 平衡盐溶液。表观渗透系数的计算^[6]:

药物在 Caco-2 细胞单层模型^[7] 中表观渗透系数 (即 apparent drug permeability coefficient, P_{app}) 的计算公式为:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

P_{app} 单位为 “cm·s⁻¹”。Q 是累积转运量, 代表化合物在接收端 (receiver) 出现的总量, 单位为 “μg”; dQ/dt 是在接受端 (receiver) 受试药物出现的速率 “μg·s⁻¹”; C₀ 是受试药物所在端 (donor) 的初始浓度, 单位为 “μg·L⁻¹”; A 是转运膜的表面积, 单位为 “cm²”。

取接收端样品 100 μL, 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样, 用峰面积进行定量分析。按照已经建立的高效液相测定方法 (色谱柱 Luna Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈: 水 (30: 70); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 270 nm), 测定单体、药材及复方中的 ICA 在 Caco-2 细胞模型上转运后的含量。试验结果如下:

2.3.1 单体 ICA Caco-2 细胞转运试验 选取 40 mg·L⁻¹ ICA 溶液通过 Caco-2 细胞单层模型, ICA 由 AP-BL 和 BL-AP 转运量随时间变化, 结果见图 2。ICA 在 Caco-2 细胞中由 AP-BL 和 BL-AP 转运量随时间增长而增加, 渗透系数随时间增长而有所降低, ICA 在 120 min 的 P_{app} (6.625 ± 0.046) × 10⁻⁶ cm·s⁻¹, 属于中等吸收水平^[8]。

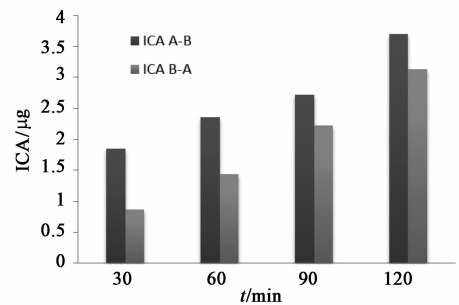


图 2 单体 ICA 在 120 min 内跨膜转运量 (x̄ ± s, n = 12)

2.3.2 淫羊藿提取物 Caco-2 细胞转运试验 选取含 40 mg·L⁻¹ ICA 的淫羊藿提取物溶液通过 Caco-2 细胞单层模型, ICA 从 AP-BL 侧及从 BL-AP 侧转运的量随时间变化, 结果见图 3。淫羊藿提取物中的 ICA 在 Caco-2 细胞中由 AP-BL 和 BL-AP 转运量随时间增长而增加, 渗透系数随时间增长而有所降低, 与 ICA 单体具有相同趋势。淫羊藿提取物中的 ICA 在 120 min AP-BL 侧的表观渗透系数为 (7.428 ± 0.293) × 10⁻⁶ cm·s⁻¹, 较 ICA 单体稍有增加, 但由于 BL-AP 侧系数也有增加, 故整体外排率增大。

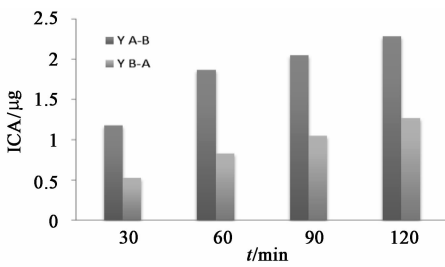


图3 淫羊藿提取物中 ICA 在 120 min 内跨膜转运量($\bar{x} \pm s, n = 12$)

2.3.3 脑忆源片提取物 Caco-2 细胞转运试验

选取含 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ICA 的脑忆源片提取物溶液通过 Caco-2 细胞单层模型, ICA 从 A 侧到 B 侧及从 B 侧到 A 侧转运的量随时间变化, 结果见图 4。脑忆源片提取物中的 ICA 在 Caco-2 细胞中由 AP-BL 和 BL-AP 转运量随时间增长而增加, 渗透系数随时间增长而有所降低, 与 ICA 单体具有相同趋势。脑忆源片提取物中 ICA 在 30 min AP-BL 侧的 P_{app} (17.018 ± 0.294) $\times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 较 ICA 单体和淫羊藿提取物均有增加; 120 min 时 AP-BL 侧的 P_{app} (6.307 ± 0.541) $\times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 由于其 BL-AP 侧系数较 ICA 也减小, 所以外排率降低, 提示复方配伍后可降低 ICA 的外排。

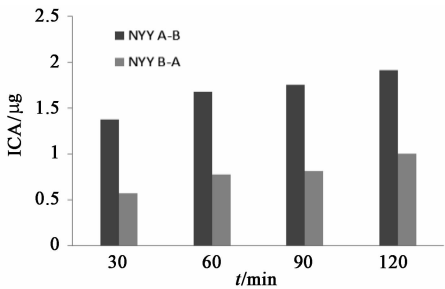


图4 脑忆源片提取物中 ICA 在 120 min 内跨膜转运量($\bar{x} \pm s, n = 12$)

4 讨论

Caco-2 可自发形成于小肠上皮细胞相类似的细胞极性和致密的细胞单层组织, 其形态与功能均与小肠上皮细胞极为相似。通过对分化出绒毛面的肠腔 AP 侧 (apical) 和基底面 BL 侧 (basolateral) 的药物转运测定, 可判断药物的吸收机制。药物通过肠道的吸收作用可以通过药物透过肠壁的渗透性来评价^[9], 在 Caco-2 细胞模型中, 通过计算 P_{app} 表观渗透系数, 可以评价药物的吸收。

ICA 在小肠吸收转运过程中可能会被 Caco-2 细胞中的 P-gp 转运蛋白外排, 因此 ICA 的吸收利用并不充分。对于吸收不良的药物来说, Caco-2 细胞模型给出的多数为定性判断^[10]。按照目标国际上对于药物吸收的公认标准来评价, ICA 单体和淫羊

藿提取物属于中等吸收 (P_{app} 在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 吸收率在 0% ~ 20%)。

试验结果表明, ICA 质量浓度在 $80 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下对 Caco-2 细胞的抑制率小于 20%, 淫羊藿提取物浓度在相当于 ICA 含量 $40 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下对 Caco-2 细胞的抑制率小于 20%, 复方脑忆源片提取物浓度在相当于 ICA 含量 $40 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下对 Caco-2 细胞的抑制率小于 20%, 可以在此范围内选择浓度进行试验。综合考虑, 选用 $40 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为浓度进行 Caco-2 细胞的转运试验。

与淫羊藿单体和淫羊藿提取物中 ICA 比较, 脑忆源片可显著提高 ICA 的转运, 同时可降低 ICA 的外排作用。可认为通过复方配伍后, 方中的其他药物抑制了 ICA 的外排, 使其可以更好的发挥药理作用。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] Motz S A, Schaefer U F, Balbach S, et al. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 66(2):286.
- [3] 高秀蓉, 蒋学华, 杜青青. 基于 Caco-2 细胞模型研究蝙蝠葛碱的跨膜吸收机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):139.
- [4] 谢社平, 谭晓婧, 毕开顺, 等. 盐酸巴马汀在 Caco-2 细胞中的吸收机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):209.
- [5] 张溪, 齐炼文, 李萍, 等. 体外细胞模型和高效液相色谱联用分析预测黄芪中的活性成分[J]. 分析化学, 2008, 36(6):745.
- [6] 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]. 中国药学杂志, 2008, 43(24):1871.
- [7] Yan Z Y, Gary W. Optimization in drug discovery *in vitro* methods[M]. Humana Press Inc, 2004:19.
- [8] 蒋学华, 贾运涛, 袁媛, 等. Caco-2 细胞模型在口服药物吸收过程研究中的应用[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(5):325.
- [9] Hilgers A R, Conradi R A, Burton P S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa[J]. Pharmaceutical Research, 1990, 7(9):902.
- [10] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46(13):27.

[责任编辑 聂淑琴]