

· 药剂与炮制 ·

# 黄诺马昔在 MDCK 单层细胞模型上的转运机制分析

冉峥<sup>1</sup>, 郭艳丽<sup>1</sup>, 王丽凤<sup>2</sup>, 张永威<sup>1</sup>, 李琳琳<sup>1</sup>, 骆新<sup>1</sup>, 毛新民<sup>1,2\*</sup>

(1. 新疆医科大学 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室, 乌鲁木齐 830054;  
2. 新疆医科大学 基础医学院, 中医学院, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** **目的:**研究黄诺马昔在马丁达比犬肾上皮(MDCK)单层细胞模型上的吸收转运特性。**方法:**利用噻唑蓝(MTT)比色法考察黄诺马昔对 MDCK 细胞的毒性,使用 Millicell-ERS-2 型细胞电阻仪检测 MDCK 单层细胞模型的电阻值,考察黄诺马昔的质量浓度、给药时间以及钠-葡萄糖协同转运蛋白(SGLTs)抑制剂和葡萄糖转运蛋白 2(GLUT2)抑制剂对其跨膜转运的影响,采用 UPLC-MS/MS 测定黄诺马昔的含量,计算表观渗透系数( $P_{app}$ )及外排比(ER)。**结果:**黄诺马昔质量浓度为 5.625 ~ 120 mg·L<sup>-1</sup>时对 MDCK 细胞无明显毒性作用,黄诺马昔在 MDCK 单层细胞模型上的转运具有时间、浓度依赖性,且  $P_{app}$  基本处于  $1 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在 60 min 和 90 min 时,与空白组相比,根皮苷组中黄诺马昔在 MDCK 单层细胞模型上的转运量显著减少。**结论:**黄诺马昔在肠道中属于中等吸收的药物,其跨膜转运机制以被动转运为主,兼有主动转运存在,且 SGLTs 转运体可能参与介导了黄诺马昔在 MDCK 单层细胞模型上的转运。

**[关键词]** 黄诺马昔; 马丁达比犬肾上皮细胞; 单层细胞模型; 跨膜转运; 根皮苷; 根皮素; 外排比

**[中图分类号]** R22;R28;R94;Q952;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0155-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190852

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190101.1045.005.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-03 16:20

## Analysis of Transport Mechanism of Flavanomarein in MDCK Monolayer Cell Model

RAN Zheng<sup>1</sup>, GUO Yan-li<sup>1</sup>, WANG Li-feng<sup>2</sup>, ZHANG Yong-wei<sup>1</sup>, LI Lin-lin<sup>1</sup>,  
LUO Xin<sup>1</sup>, MAO Xin-min<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of Central Asian High Incidence Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;  
2. Basic Medical College, Institute of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the absorption and transport properties of flavanomarein in the Madin-Darby canine kidney (MDCK) monolayer cell model. **Method:** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to investigate the toxicity of flavanomarein in MDCK cells. The resistance value of MDCK monolayer cell model was detected by Millicell-ERS-2 cell resistometer. The effects of mass concentration of flavanomarein, administration time, sodium-glucose cotransporter (SGLTs) inhibitor and glucose transporter 2 (GLUT2) inhibitor on the transmembrane transport of flavanomarein were investigated. The concentration of flavanomarein was determined by UPLC-MS/MS, and the apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) and the efflux ratio (ER) were

**[收稿日期]** 20181115(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(U1303223)

**[第一作者]** 冉峥,在读硕士,从事糖尿病及其并发症的新药研究,E-mail:1562404499@qq.com

**[通信作者]** \*毛新民,博士生导师,教授,从事糖尿病及其并发症的发病机制及药理作用研究,Tel:0991-4363822,E-mail:13565843968@139.com

calculated. **Result:** When the concentration of flavanomarein was  $5.625\text{-}120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , there was no significant toxic effect on MDCK cells. The transport of flavanomarein in MDCK monolayer cell model was time-dependent and concentration-dependent. The  $P_{\text{app}}$  values of flavanomarein were basically between  $1 \times 10^{-6}\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  to  $10 \times 10^{-6}\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Compared with the blank group, the phlorizin group significantly reduced the transport of flavanomarein on the MDCK monolayer cell model at 60 min and 90 min. **Conclusion:** Flavanomarein is a moderately absorbed drug in the intestine, its transmembrane transport mechanism is dominated by passive transport along with active transport. SGLTs may be involved in mediating the transport of flavanomarein on the MDCK monolayer cell model.

[**Key words**] flavanomarein; Madin-Darby canine kidney cells; monolayer cell model; transmembrane transport; phlorizin; phloretin; efflux ratio

机体肠道上皮细胞膜转运蛋白及酶系统是影响药物吸收的主要影响因素之一,药物在肠道内的跨膜转运是药物体内过程的开端,也是其发挥药理活性作用的前提,跨膜转运贯穿药物体内过程的全部,研究药物的跨膜转运对提高药物的生物利用度和药效具有重要意义<sup>[1]</sup>。MDCK 细胞的全称为马丁达比犬肾上皮细胞,由于其细胞间的连接十分紧密,容易形成致密的单层细胞膜,同时在蛋白质组成、遗传学、细胞脂质等方面与上皮组织细胞类似,因而被广泛应用于构建肠道上皮吸收模型。MDCK 单层细胞模型和 Caco-2 单层细胞模型是当前应用最广泛的体外药物吸收模型<sup>[2-3]</sup>,这 2 种模型在研究药物的吸收特性等方面具有很好的相关性,同时相对于 Caco-2 单层细胞,MDCK 单层细胞还具有生长速度快、细胞亚型少、形成完整致密的单层膜时间短等优点,因此常用于药物的肠道吸收及转运机制研究<sup>[4]</sup>。

两色金鸡菊 (*Coreopsis tinctoria*) 又名昆仑雪菊,为菊科金鸡菊属的野生草本植物,始载于《新华本草纲要》<sup>[5]</sup>。其头状花序在维吾尔医医院常作为一种民族药材进行使用,具有活血化瘀、和胃健脾、降压降脂等作用<sup>[6]</sup>。现代药理学研究发现,两色金鸡菊的主要活性成分为黄酮类化合物,对其黄酮类化合物的研究现已从最初的提取物研究阶段深入到具体的单体成分研究阶段<sup>[7]</sup>。黄诺马苷全称为异奥卡宁 7-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷,是从两色金鸡菊乙醇提取物中分离得到的一种二氢黄酮类化合物<sup>[8]</sup>,被认为是该药材的有效成分之一,其药理作用广泛,但目前关于黄诺马苷单体的体内外药代动力学研究并不多见。为了探究影响黄诺马苷在肠道转运的因素,本实验通过建立 MDCK 单层细胞转运模型,采用 UPLC-MS/MS 技术考察黄诺马苷在 MDCK 单层细胞模型上的转运特性,并研究钠-葡萄糖协同转运蛋白 (SGLTs) 抑制剂根皮苷及葡萄糖转运蛋白 2

(GLUT2) 抑制剂根皮素对黄诺马苷吸收转运的影响。

## 1 材料

ACQUIT UPLC I-Class/Xevo TQ-D IVD 型超高效液相串联质谱联用仪 (美国 Waters 公司), 3543IR 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司), Benchmark Plus 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), IX71-12FL/PH 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), 苏净安泰 SW-CJ-2F 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), MR23i 型低温离心机 (法国 Jouan 公司), HGC-12A 型氮吹仪 (天津恒奥科技发展有限公司), Millicell-ERS-2 型细胞电阻仪和 Milli-Q 型超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

Transwell 板 (12 孔, 孔径 0.4  $\mu\text{m}$ , 聚碳酸酯膜, 美国 Corning 公司, 批号 20117010), 黄诺马苷 (法国 Extrasynthese 公司, 批号 577388, 纯度  $\geq 99\%$ ), 根皮苷、根皮素对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为 X05M7C10458, X05M7C10459, 纯度均  $\geq 98\%$ ), 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司, 批号 EXP201712), 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号 101962812), DMEM 高糖培养基、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶、胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司, 批号分别为 8118156, 15140122, 2200056, 16000044), 磷酸盐缓冲液 (PBS, 美国 Hyclone 公司, 批号 0021517), Hank's 平衡盐溶液 (HBSS, 北京索莱宝生物科技有限公司, 批号 20180118), 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

马丁达比犬肾上皮 (MDCK) 细胞系购于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 批号 337866。

## 2 方法

### 2.1 黄诺马苷检测方法的建立

#### 2.1.1 色谱条件 ACQUITY-UPLC-BEH-C<sub>18</sub> 色谱

柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min, 85%~20% A; 3~4 min, 20%~85% A; 4~5 min, 85% A), 柱温 30 ℃, 样品室温度 10 ℃, 进样量 1 μL。

**2.1.2 质谱条件** 电离方式为电喷雾离子源(ESI), 多反应监测扫描(MRM), 毛细管电压设定 3.0 kV, 离子源温度 120 ℃, 去溶剂温度 350 ℃, 去溶剂化气流 500 L·h<sup>-1</sup>, 锥孔气流 50 L·h<sup>-1</sup>。黄诺马苷的母离子为  $m/z$  449, 3 个子离子分别为  $m/z$  135.11, 151.07, 287.16, 锥孔电压 46 V, 3 个子离子的碰撞能量依次为 44, 36, 22 V。由于黄诺马苷的子离子  $m/z$  135 丰度较高, 因此选择其作为定量离子。

**2.1.3 溶液的制备** 精密称取黄诺马苷 10 mg, 加 DMSO 278 μL 使其溶解, 得 36 g·L<sup>-1</sup> 母液, 置于 -20 ℃ 储存备用; 临用前使用 HBSS 将该母液稀释为不同质量浓度的黄诺马苷溶液。

**2.2 细胞毒性试验** 胰蛋白酶消化处于对数生长期的 MDCK 细胞, 离心(1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min, 下同)后用完全培养基(DMEM 高糖培养基, 10% FBS, 1% 青霉素-链霉素混合液)制成细胞悬液, 利用细胞计数器计数后将细胞密度调整至 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL, 以 100 μL/孔接种于 96 孔板, 每组设置 6 个复孔, 边缘孔用无菌 PBS 100 μL 填充, 置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 ℃ 培养箱进行孵育培养。培养细胞 24 h 后, 小心吸去细胞上清液, 依次加入含不同质量浓度(5.625, 11.25, 22.5, 45, 90, 120 mg·L<sup>-1</sup>)黄诺马苷的培养基溶液 100 μL, 并设置没有 MDCK 细胞的空白组以及不给药物的阴性组。置于培养箱继续培养 24 h, 使用倒置荧光显微镜观察细胞的形态, 小心吸去细胞上清液, 用 PBS 100 μL 清洗 2 遍, 各孔加入无血清培养基 100 μL 和 MTT 溶液 10 μL, 置于培养箱继续孵育培养 4 h, 小心吸去细胞上层培养基, 每孔加入 DMSO 150 μL, 置摇床上低速振荡 3 min, 使紫色结晶物充分溶解, 使用酶标仪检测各孔在 490 nm 处的吸光度 A, 实验重复 3 次。

**2.3 MDCK 单层细胞模型的建立** 胰蛋白酶消化处于对数生长期的 MDCK 细胞, 离心后用完全培养基制成细胞悬液, 利用细胞计数器计数后将细胞密度调整至 8 × 10<sup>5</sup> 个/mL, 以 500 μL/孔均匀接种于 12 孔 transwell 板细胞培养小室的顶端(AP)侧, 基底(BL)侧培养室中加入完全培养基 1.5 mL。立即将细胞培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱进行培养, 每天更换培养基, 使用倒置荧光显微镜对细胞状态进行观察,

测定 MDCK 单层细胞模型的电阻值, 计算公式为细胞跨膜电阻值(TEER) = (细胞模型电阻值 - 空白组电阻值) × 单层细胞膜面积, 于 37 ℃ 测得 TEER ≥ 300 Ω·cm<sup>2</sup> 的模型才能用于转运试验<sup>[9]</sup>。

## 2.4 黄诺马苷的跨膜转运研究

**2.4.1 黄诺马苷的双向跨膜转运** 选取满足要求的 MDCK 细胞模型, 先用预热至 37 ℃ 的空白 HBSS 清洗 transwell 小室内外侧 3 次, 加入空白 HBSS 并置于培养箱平衡 30 min, 小心吸去 HBSS 后给药。吸收实验(AP 侧→BL 侧转运)为向 transwell 细胞培养小室 AP 侧加入含药 HBSS 0.5 mL, BL 侧加入空白 HBSS 1.5 mL, 设置 3 个复孔, 并分别于 15, 30, 60, 90 min 后从 BL 侧取样 200 μL, 同时补加等量的 37 ℃ 空白 HBSS。外排实验(BL 侧→AP 侧转运)为向 transwell 细胞培养小室 BL 侧加含药 HBSS 1.5 mL, AP 侧加入空白 HBSS 0.5 mL, 与吸收实验相同时间点于 AP 侧取样 200 μL, 并补加等量的 37 ℃ 空白 HBSS。收集后的样品各加入 3 倍量甲醇, 涡旋 3 min, 离心(12 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min)取上清置于氮吹仪上吹干, 加甲醇 100 μL 复溶, 离心(15 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min), 取上清再离心 1 次, 取上清进样分析。根据制备的标准曲线求出黄诺马苷跨 MDCK 单层细胞膜的转运量, 计算黄诺马苷的表观渗透系数( $P_{app}$ )以及外排比(ER)。

$$P_{app} = (dQ/dt)/(A \times C)$$

$$ER = P_{app}(BL-AP)/P_{app}(AP-BL)$$

式中 A 为膜面积, C 为初始给药浓度, dQ 为 dt 时间内药物的转运量, dQ/dt 为药物转运速率,  $P_{app}(AP-BL)$  为药物从细胞膜 AP 侧到 BL 侧的表观渗透系数,  $P_{app}(BL-AP)$  为药物从细胞膜 BL 侧到 AP 侧的表观渗透系数。

**2.4.2 根皮苷和根皮素对黄诺马苷跨膜转运的影响** 使用 HBSS 配制质量浓度为 45 mg·L<sup>-1</sup> 的根皮苷药液和 22.5 mg·L<sup>-1</sup> 的根皮素药液, 空白组、根皮苷组、根皮素组各设置 3 个复孔, 空白组各孔 AP 侧加入空白 HBSS 500 μL, 根皮苷组各孔 AP 侧加入根皮苷药液 500 μL, 根皮素组各孔 AP 侧加入根皮素药液 500 μL, 各组每孔 BL 侧均加空白 HBSS 1.5 mL, 将各组同时置于 37 ℃ 培养箱摇床孵育 30 min。孵育后小心吸去各组 AP 侧空白 HBSS, 根皮苷药液以及根皮素药液, 每孔用 HBSS 500 μL 清洗单层膜表面 3 次, 各组每孔加入 45 mg·L<sup>-1</sup> 黄诺马苷溶液于 AP 侧, BL 侧均加入空白 HBSS 1.5 mL, 分别于 15, 30, 60, 90 min 从 BL 侧取样, 取样操作和

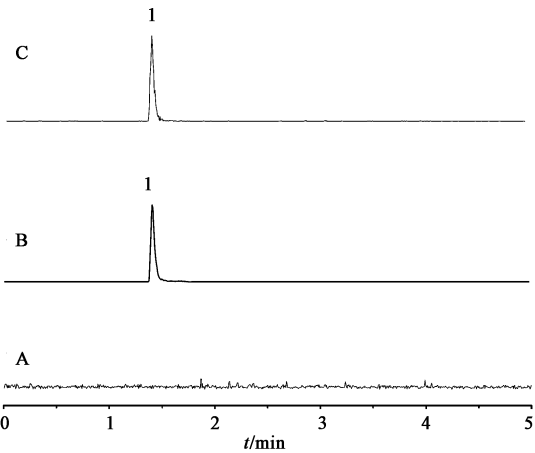
样品处理同 2.4.1 项下方法。

**2.5 统计学分析** 使用 GraphPad Prism 5 软件对实验数据进行分析处理,测定结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 UPLC-MS/MS 方法学考察

**3.1.1 专属性试验** 见图 1。结果显示黄诺马苷的保留时间 1.46 min,HBSS 和跨细胞转运体系不干扰黄诺马苷的测定,表明该方法专属性良好。



A. 空白 HBSS; B. 对照品; C. 供试品; 1. 黄诺马苷

图 1 黄诺马苷转运样品的 UPLC-MS/MS

Fig.1 UPLC-MS/MS of flavanomarein transport sample

**3.1.2 线性关系考察** 取适量黄诺马苷母液,用 HBSS 配制质量浓度分别为 3.906 25, 15.625, 62.5, 250, 1 000, 2 000, 4 000  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的系列黄诺马苷溶液,按 2.4.1 项下方法检测。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程  $Y = 2\,706.6X + 65.427$  ( $R^2 = 0.998\,6$ ),线性范围 3.906 25 ~ 4 000  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.1.3 精密度、准确度、回收率及稳定性试验** 取适量黄诺马苷母液,用 HBSS 配制成质量浓度分别为 1 000, 125, 15.625  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的黄诺马苷溶液,按 2.4.1 项下方法进样分析,结果表明该方法的精密度、准确度、回收率及稳定性均符合相关要求。见表 1。

**3.2 黄诺马苷细胞毒性试验** 当黄诺马苷质量浓度为 5.625, 11.25, 22.5, 45, 90, 120  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,MTT 试验结果显示 MDCK 细胞的存活率处于 118% ~ 155%,其中黄诺马苷质量浓度为 11.25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时促进细胞增殖作用最强,表明黄诺马苷溶液在该质量浓度范围内对 MDCK 细胞不仅无毒性作用,还表

表 1 不同质量浓度黄诺马苷的精密度、准确度、回收率和稳定性考察

Table 1 Investigation of precision, accuracy, recovery and stability of flavanomarein with different concentrations %

质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	精密度 RSD	准确度	回收率	稳定性 RSD
15.625	4.9	93.57	103.31	3.3
125	5.0	94.41	96.69	2.7
1 000	4.3	98.87	100.41	3.2

现出良好的细胞保护<sup>[10]</sup>作用。故选择质量浓度分别为 11.25, 22.5, 45, 90  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的黄诺马苷溶液进行后续双向转运试验,选择 45  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度用于考察根皮苷和根皮素对黄诺马苷转运的影响。

#### 3.3 黄诺马苷在 MDCK 单层细胞模型上的跨膜转运

**3.3.1 黄诺马苷的双向转运与时间、质量浓度的关系** 不同质量浓度的黄诺马苷在 MDCK 单层细胞模型上吸收(AP 侧  $\rightarrow$  BL 侧)和外排(BL 侧  $\rightarrow$  AP 侧)情况见图 2。结果发现随时间的逐渐延长,黄诺马苷跨 MDCK 单层细胞膜的累积透过药量不断增加,同时累积透过药量与其初始给药量呈正比关系,表明黄诺马苷在质量浓度为 11.25 ~ 90  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时的转运量具有时间和浓度依赖性,提示在该质量浓度范围内黄诺马苷的转运方式以被动扩散为主。

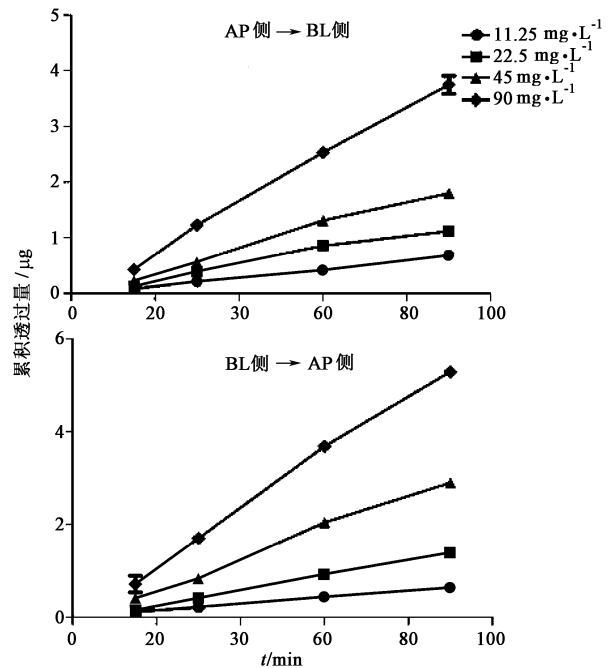


图 2 黄诺马苷在 MDCK 细胞模型上的转运量-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig.2 Transport amount-time curves of flavanomarein in MDCK cell model ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

**3.3.2 系列质量浓度黄诺马苷的转运参数** 不同质量浓度黄诺马苷吸收试验的  $P_{app}$  基本处于  $1 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 可将黄诺马苷归属于中等吸收的药物。黄诺马苷的 ER 随着给药剂量的增加逐渐升高, 当黄诺马苷溶液质量浓度为  $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $ER > 1.5$ , 提示黄诺马苷的转运可能有主动转运的参与, 见表 2。

表 2 黄诺马苷在 MDCK 单层细胞模型双向转运的表现渗透系数及外排比 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

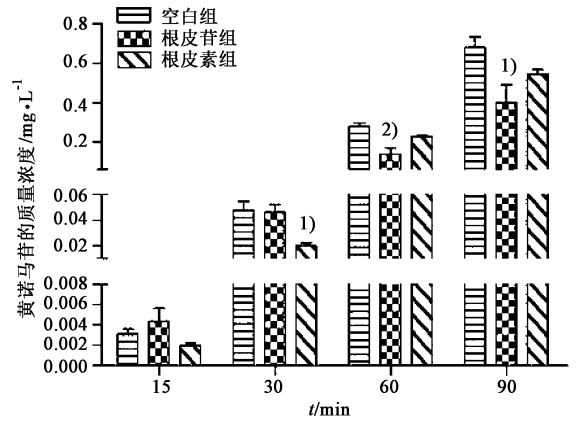
Table 2 Apparent permeability coefficients and efflux ratios of flavanomarein in bidirectional transport of MDCK monolayer cell model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$P_{app} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$		ER
	AP 侧 → BL 侧	BL 侧 → AP 侧	
11.25	$(1.00 \pm 0.02) \times 10^{-5}$	$(0.93 \pm 0.08) \times 10^{-5}$	0.93
22.5	$(0.82 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	$(1.02 \pm 0.04) \times 10^{-5}$	1.24
45	$(0.66 \pm 0.02) \times 10^{-5}$	$(1.06 \pm 0.04) \times 10^{-5}$	1.61
90	$(0.69 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	$(0.97 \pm 0.01) \times 10^{-5}$	1.41

**3.3.3 根皮苷和根皮素对黄诺马苷转运吸收的影响** 见图 3。结果发现在空白组中, 黄诺马苷从 AP 侧转运至 BL 侧隔室的含量在 15 ~ 90 min 间显著增加。在给予黄诺马苷 60 min 时, 根皮苷组的黄诺马苷转运量显著低于空白组 ( $P < 0.01$ ); 90 min 时, 根皮苷抑制黄诺马苷转运的作用依然显著 ( $P < 0.05$ ), 表明 SGLTs 抑制剂根皮苷能减少黄诺马苷在 MDCK 单层细胞模型上的转运吸收。与空白组相比, 尽管根皮素组黄诺马苷的转运量在 30 min 时显著减少 ( $P < 0.05$ ), 但其他各时间点两组的黄诺马苷转运量并无显著性差异。说明 SGLTs 可能介导了黄诺马苷的跨膜转运吸收过程。

#### 4 讨论

迄今为止, 国内外学者对两色金鸡菊的研究开展了大量的工作, 但主要集中在化学成分的分鉴定及各种溶剂提取物的药理作用研究, 鲜有两色金鸡菊黄酮类单体成分生物活性的报道。鉴于黄诺马苷是该药材的主要化学成分之一, 进一步了解黄诺马苷的吸收作用机制非常重要。研究发现, 大多数黄酮类成分在肠道中会被水解为苷元, 最终以被动扩散的方式跨过肠道上皮细胞膜而被吸收, 只有少数的糖苷类是以原型形式通过转运体的介导吸收进入体内<sup>[11]</sup>。本课题组前期使用尤斯灌流模型研究了两色金鸡菊提取物的吸收情况, 结果显示黄诺马



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 3 根皮苷和根皮素对黄诺马苷转运吸收的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of phlorizin and phloretin on transport and absorption of flavanomarein ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

苷透过肠壁后以原型形式存在<sup>[12]</sup>, 这与基于动物模型的两色金鸡菊血清药物化学研究发现黄诺马苷以原型入血<sup>[13]</sup>的结果吻合, 但该成分在肠道吸收转运的详细机制仍不清楚。

相比易受其他复杂因素影响的人体和动物模型, 体外细胞模型更易控制, 且具有重复性强、便于机制研究等特点<sup>[14]</sup>。由于成熟的 MDCK 细胞间连接非常紧密, 使处于培养介质上部的 MDCK 细胞表面可以发展成为类似于肠腔的刷状缘膜, 而依附于渗透膜生长和面向底部的 MDCK 细胞表面可以形成基底膜<sup>[15]</sup>, 这是一种公认的可用于药物肠道吸收研究的模型。被动扩散和载体介导的主动转运是药物通过肠道吸收的主要方式, 亲脂性药物能以被动扩散的方式跨过细胞膜, 而亲水性药物可经细胞旁途径被动扩散或通过转运蛋白介导的主动摄取进入细胞<sup>[16]</sup>。葡萄糖转运体主要有两类, 分别为葡萄糖转运蛋白 (GLUTs) 和 SGLTs<sup>[17]</sup>, SGLT1 和 GLUT2 在小肠上皮细胞大量表达, 其中 SGLT1 为能量和钠依赖性的转运体, 其主要表达在小肠上皮细胞的顶端膜以负责葡萄糖的转运, 而 GLUT2 不仅存在于小肠的基底膜, 且当肠腔存在大量葡萄糖时, GLUT2 会转移至小肠上皮细胞的顶端膜参与对葡萄糖的摄取<sup>[18]</sup>。根皮素作为根皮苷的苷元可以减少 GLUT2 底物葡萄糖的吸收, 而根皮苷作为 SGLTs 特异性抑制剂可以减少 SGLT1 底物的吸收。据报道, 黄酮类化合物的单糖苷可通过 SGLT1 或 GLUT2 的主动转运通过肠细胞的顶端膜<sup>[19-20]</sup>, 由于该类黄酮化合物结构中具有完整的配糖基, 因此能够通过葡萄糖转运体被肠细胞主动摄取。本研究结果显示, 黄诺马

苷以完整的配糖基形式转运通过 MDCK 单层细胞模型。

目前判断药物吸收难易的标准为吸收不良的药物  $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 吸收率  $< 20\%$ ; 中等程度吸收的药物  $P_{app}$  处于  $1 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 吸收率  $20\% \sim 70\%$ ; 吸收良好的药物  $P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 吸收率  $70\% \sim 100\%$  [21-22]。本研究发现不同质量浓度黄诺马苷溶液的  $P_{app}$  基本处于  $1 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 说明黄诺马苷可归属于中等程度吸收的化合物。黄诺马苷的相对分子质量 450.396, 微溶于水, 易溶于甲醇, 其油水分配系数 ( $\log P$ )  $-0.3$ , 属于低溶解度、高渗透性的生物药剂学分类系统 (BCS) II 类药物。由于黄诺马苷在质量浓度为  $11.25 \sim 90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时的跨膜转运具有时间、浓度依赖性, 提示黄诺马苷的转运方式以被动扩散为主。当黄诺马苷溶液的质量浓度为  $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $ER > 1.5$ , 表明黄诺马苷的跨膜转运除了被动扩散外, 还可能有经载体介导的主动转运。此外, 根皮苷和根皮素对黄诺马苷转运影响的结果表明, SGLTs 可能作为载体介导了黄诺马苷的跨细胞膜转运。因此, 推测黄诺马苷以被动扩散和主动转运 2 种方式跨过小肠上皮细胞, 但还需动物实验模型进一步验证。

#### [参考文献]

[1] 韩静文, 李俊, 黄成, 等. 梔子苷与梔子柏皮汤中梔子苷在 MDCK 细胞跨膜转运模型上的转运研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 468-472.

[2] Artursson P, Borchardt R T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond[J]. Pharm Res, 1997, 14(12): 1655-1658.

[3] Cho M J, Thompson D P, Cramer C T, et al. The Madin Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier[J]. Pharm Res, 1989, 6(1): 71-77.

[4] Fogh J, Fogh J M, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice[J]. JNCI, 1977, 59(1): 221-226.

[5] 张媛, 屠鹏飞. 两色金鸡菊头状花序的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3581-3584.

[6] 毛新民, 卢伟, 李琳琳, 等. 两色金鸡菊化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(4): 235-239.

[7] 姜保平, 许利嘉, 贾晓光, 等. 两色金鸡菊的化学成分和药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 567-573.

[8] 赵军, 孙玉华, 徐芳, 等. 昆仑雪菊黄酮类成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(1): 50-52.

[9] 胡鹏翼, 刘丹, 郑琴, 等. 川芎活性成分对天麻素在 MDCK-MDR1 细胞上跨膜转运的影响及机制[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(14): 1234-1240.

[10] Dias T, LIU B, Jones P, et al. Cytoprotective effect of *Coreopsis tinctoria* extracts and flavonoids on tBHP and cytokine-induced cell injury in pancreatic MIN6 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(2): 485-492.

[11] 周乐, 赵晓莉, 狄留庆, 等. 黄酮类化合物口服吸收与代谢特征及其规律分析[J]. 中草药, 2013, 44(16): 2313-2320.

[12] WANG J, Guzhaliuer A, LI X X, et al. Testing the absorption of the extracts of *Coreopsis tinctoria* Nutt. in the intestinal canal in rats using an Ussing chamber[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 186: 73-83.

[13] 陈瑶, 李新霞, 李琳琳, 等. 两色金鸡菊血清药物化学研究[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(4): 420-424, 432.

[14] 王华, 胡佳慧, 刘翠钗, 等. 运用细胞代谢组学策略探究薯蓣皂苷元的抗肿瘤作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20): 134-139.

[15] 慈小燕, 夏媛媛, 曾勇, 等. 3-乙酰基-11-羰基- $\beta$ -乙酰乳香酸在 Caco-2 和 MDCK 细胞模型中的吸收研究[J]. 中草药, 2013, 44(9): 1162-1167.

[16] 刘瑶, 曾苏. MDCK-MDR1 细胞模型及其在药物透过研究中的应用进展[J]. 药科学报, 2008, 43(6): 559-564.

[17] Wright E M, Loo D D, Hirayama B A. Biology of human sodium glucose transporters[J]. Physiol Rev, 2011, 91(2): 733-794.

[18] Kellett G L, Brotlaroche E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption[J]. Diabetes, 2005, 54(10): 3056-3062.

[19] Walgren R A, LIN J T, Kinne R K, et al. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- $\beta$ -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294(3): 837-843.

[20] Kwon O, Eck P, CHEN S, et al. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids[J]. FASEB J, 2007, 21(2): 366-377.

[21] 党珏, 李燕, 刘美辰, 等. 大黄有效成分与附子有效成分在 Caco-2 细胞模型上的转运分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 1-6.

[22] 杨海涛, 王广基. Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用[J]. 药科学报, 2000, 35(10): 797-800.

[责任编辑 刘德文]