

· 药剂与炮制 ·

# 香附烯酮在 Caco-2 细胞模型中的转运机制分析

郭慧玲<sup>1</sup>, 胡强<sup>1</sup>, 胡律江<sup>1\*</sup>, 高文军<sup>1</sup>, 胡志方<sup>2</sup>, 赵晓娟<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 江西中医药高等专科学校, 江西抚州 344000)

**[摘要]** 目的: 考察香附烯酮在 Caco-2 细胞模型中的转运机制, 为香附的临床应用提供实验依据。方法: 通过噻唑蓝 (MTT) 比色法考察不同质量浓度香附烯酮对 Caco-2 细胞的毒性, 以确定转运试验的给药浓度。以香附烯酮表观渗透系数 ( $P_{app}$ ) 和累积转运量为评价指标, 采用液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 测定香附烯酮的含量, 色谱条件为流动相乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱 (0~1.5 min, 35% A; 1.5~2 min, 35%~90% A; 2~4 min, 90% A; 4~4.1 min, 90%~35% A; 4.1~8 min, 35% A), 流速  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样量  $1 \mu\text{L}$ , 柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 质谱条件为电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式, 香附烯酮及内标物蛇床子素的检测离子分别为  $m/z$  219.2~110.9,  $m/z$  245.0~189.0。探讨了香附烯酮质量浓度、给药时间、乙二胺四乙酸 (EDTA) 及 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂对香附烯酮在体外细胞模型上跨膜转运的影响。结果: 香附烯酮质量浓度处于  $3\sim 90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 孵育 4 h 内对 Caco-2 细胞没有明显毒性。香附烯酮在 Caco-2 细胞模型中的转运存在一定的浓度及时间依赖性, 其  $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , 说明药物吸收良好, 外排率处于 0.5~1.5; 加入细胞旁路转运抑制剂 EDTA 及 P-gp 转运体抑制剂维拉帕米后, 双向  $P_{app}$  没有显著性差异。结论: 香附烯酮在 Caco-2 细胞模型转运机制主要是被动扩散, 细胞旁路转运及 P-gp 不参与其转运。

**[关键词]** 香附烯酮; Caco-2 细胞; 转运机制; 香附; P-糖蛋白; 乙二胺四乙酸; 蛇床子素

**[中图分类号]** R22; Q2; R28; C37; R945; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0110-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191547

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190410.2149.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-04-15 8:55

## Analysis of Transport Mechanism of Cyperotundone in Caco-2 Cell Model

GUO Hui-ling<sup>1</sup>, HU Qiang<sup>1</sup>, HU Lyu-jiang<sup>1\*</sup>, GAO Wen-jun<sup>1</sup>, HU Zhi-fang<sup>2</sup>, ZHAO Xiao-juan<sup>1</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;

2. Jiangxi College of TCM, Fuzhou 344000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate transport mechanism of cyperotundone in Caco-2 cell model and provide experimental basis for clinical application of Cyperi Rhizoma. **Method:** The toxicity of cyperotundone with different concentrations to Caco-2 cells was investigated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry, in order to determine the concentration of administration in transport test. The content of cyperotundone was determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) with apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) and cumulative transport capacity as indexes. The chromatographic conditions were as following: mobile phase of acetonitrile (A) -water (B) for gradient elution (0-1.5 min, 35% A; 1.5-2 min, 35%-90% A; 2-4 min, 90% A; 4-4.1, 90%-35% A; 4.1-8 min, 35% A), the flow rate at  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , injection volume of  $1 \mu\text{L}$ , and temperature of column at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . The mass spectrometric conditions was electrospray ionization (ESI) and positive ion mode, the detection ions of cyperotundone and osthole (internal standard substance) were  $m/z$  219.2-110.9 and  $m/z$  245.0-189.0, respectively. Effect of concentration of cyperotundone, administration time, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and P-glycoprotein (P-gp) inhibitor on the transmembrane transport of

**[收稿日期]** 20181229(012)

**[基金项目]** 江西省科技厅项目(20161BBG70072); 江西省高校落地计划产学研项目(KJLD14057); 江西省教育厅科技项目(170721)

**[第一作者]** 郭慧玲, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新剂型与新技术研究, E-mail: ghl6262@126.com

**[通信作者]** \* 胡律江, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事中药炮制与中药制剂研究, Tel: 0791-86363831, E-mail: 380085581@qq.com

cyperotundone on *in vitro* cell model were investigated. **Result:** Cyperotundone didn't have significant toxicity to Caco-2 cells at 3-90 mg·L<sup>-1</sup> after incubation for 4 h. The transportation of cyperotundone in Caco-2 cell model was related to the concentration and time to a certain extent, its  $P_{app}$  was higher than  $1 \times 10^{-6}$  cm·s<sup>-1</sup>, which indicated that absorption of cyperotundone was good, the efflux rate (ER) of cyperotundone was 0.5-1.5. There was no significant difference in bidirectional  $P_{app}$  of cyperotundone after the addition of cell bypass transport inhibitor (EDTA) and P-gp transport inhibitor (verapamil). **Conclusion:** The transport mechanism of cyperotundone in Caco-2 cell model is mainly passive diffusion, and cell bypass transport and P-gp are not involved in its transport.

**[Key words]** cyperotundone; Caco-2 cells; transport mechanism; Cyperi Rhizoma; P-glycoprotein; ethylenediamine tetraacetic acid; osthole

Caco-2 细胞来源于人体结肠腺癌细胞,经培养分化后可形成与人体小肠上皮细胞一致的形态及功能,含有广泛存在于人体小肠上皮细胞的药物代谢酶及各种转运体<sup>[1]</sup>。目前,该模型已被广泛用于分析药物吸收转运特性。

《本草纲目》称香附为“气病之总司,女科之主帅”,该药材具有理气解郁、调经止痛等功效<sup>[2]</sup>,主要含挥发油类成分,而香附烯酮及  $\alpha$ -香附酮是其挥发油类的主要成分<sup>[3-4]</sup>。本课题组前期研究发现四制香附的石油醚部位具有显著的抗痛经作用<sup>[5-6]</sup>,香附烯酮及  $\alpha$ -香附酮是其抗痛经作用的主要活性成分<sup>[7]</sup>, $\alpha$ -香附酮在 Caco-2 细胞模型中的转运特性为被动扩散转运方式<sup>[8]</sup>。目前,关于香附烯酮体内吸收的研究尚未见报道,本实验拟采用 Caco-2 细胞模型对香附烯酮的转运机制进行分析,以期对香附的临床应用提供更多实验依据。

## 1 材料

Triple Quad 4500 型液质联用仪(美国 AB Sciex 公司), Multiskan MK3 型酶标仪(芬兰 Thermo Labsystems 公司), Forma 3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Electron 公司), MERS00002 型跨膜电阻仪(美国 Millipore 公司), H-1650 型台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司), Eclipse TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司), 3460 型 Transwell 培养板(美国 Costar 公司,孔径 0.4  $\mu$ m,直径 12 mm,底面积 1.12 cm<sup>2</sup>)。

非必须氨基酸,青霉素-链霉素混合溶液(100  $\times$  双抗), L-谷氨酰胺, 0.25% 胰蛋白酶(trypsin)-乙二胺四乙酸(EDTA), Hank's 平衡溶液(HBSS), 二甲基亚砜(DMSO), 噻唑蓝(MTT), 荧光素钠(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 N1250, CA0075, G8230, T1300, H1025, D8371, M8180 和 F8140), DMEM 高糖培养液(美国 HyClone 公司,批号 SH30022.01), 胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号

10099-141), 碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20180108), 盐酸维拉帕米、蛇床子素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 100224-201603, 110822-201608, 纯度分别为 >99% 和  $\geq$ 98%), 香附烯酮对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号 17101605, 纯度 >95%), Caco-2 细胞株(上海中桥舟生物科技有限公司,实验所用的代数在 21~45 代之间), 乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液及内标溶液的配制** 精密称取香附烯酮对照品适量,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 2 g·L<sup>-1</sup> 储备液;精密吸取该储备液适量,加入空白 HBSS 稀释成香附烯酮质量浓度分别为 3, 15, 30, 60, 90, 120 mg·L<sup>-1</sup> 的系列溶液,备用。精密称取蛇床子素对照品适量,置于量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成 192 mg·L<sup>-1</sup> 内标储备液;精密吸取该储备液适量,加甲醇制成质量浓度为 3.84 mg·L<sup>-1</sup> 的内标溶液,备用。

**2.2 供试品溶液的制备** 精密量取香附烯酮跨膜转运液 200  $\mu$ L, 加入内标溶液 10  $\mu$ L, 加入甲醇 190  $\mu$ L, 涡旋 3 min, 混合均匀,于 4  $^{\circ}$ C, 16 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液进样分析。

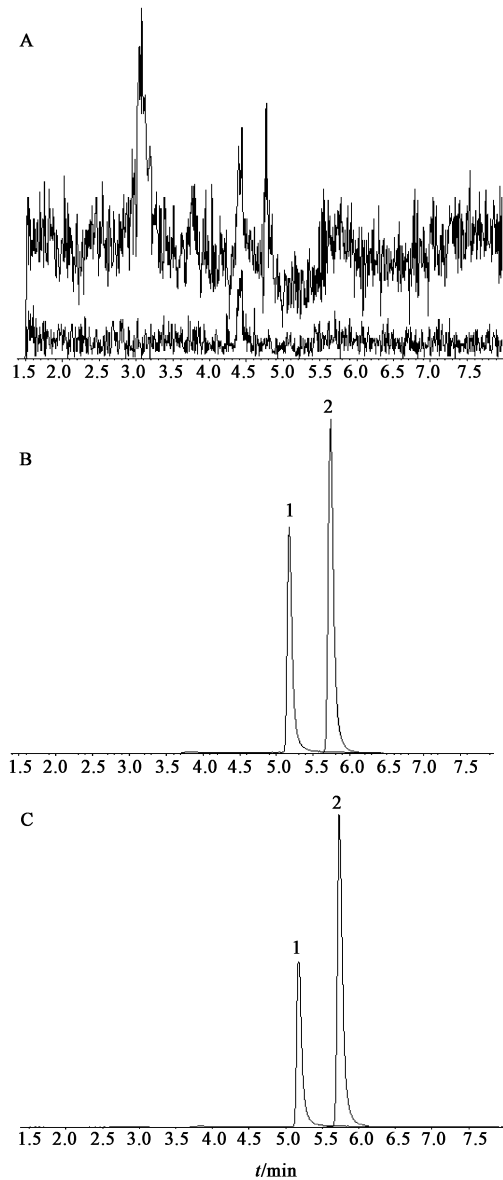
**2.3 色谱条件** Phenomenex C<sub>18</sub> 色谱柱(2.0 mm  $\times$  150 mm, 3  $\mu$ m), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~1.5 min, 35% A; 1.5~2 min, 35%~90% A; 2~4 min, 90% A; 4~4.1 min, 90%~35% A; 4.1~8 min, 35% A), 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 1  $\mu$ L, 柱温 30  $^{\circ}$ C。

**2.4 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 气帘气压力 0.241 MPa, 碰撞气压力 0.062 MPa, 喷雾电压 5.5 kV, 雾化温度 600  $^{\circ}$ C, 雾化器、辅助气压力均为 0.345 MPa, 采用多反应监测模式(MRM)。香附烯酮及内标物蛇床子素检测离子

分别为  $m/z$  219.2 ~ 110.9,  $m/z$  245.0 ~ 189.0, 去簇电压分别为 100, 80 V, 碰撞能量分别为 30, 35 eV。

## 2.5 方法学考察<sup>[9-10]</sup>

**2.5.1 专属性考察** 精密吸取适量供试品溶液、空白 HBSS 以及对照品 + 内标溶液, 按 2.3 和 2.4 项下条件测定, 以考察空白介质及内标物蛇床子素对指标成分的测定是否存在干扰, 见图 1。结果发现内标物及香附烯酮的保留时间 ( $t_R$ ) 分别为 5.15, 5.74 min。空白 HBSS 基质对香附烯酮的测定无干扰, 说明该方法专属性良好。



A. 空白 HBSS; B. 对照品 + 内标; C. 供试品; 1. 蛇床子素; 2. 香附烯酮

图 1 香附烯酮转运样品的 LC-MS

Fig.1 LC-MS chromatograms of cyperotundone transport sample

**2.5.2 标准曲线的建立** 取适量香附烯酮对照品

储备液于 10 mL 量瓶中, 用空白 HBSS 稀释至刻度, 制成质量浓度分别为 20, 10, 5, 0.1, 0.01  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的系列对照品溶液, 按 2.2 项下方法处理, 得到 10, 5, 2.5, 0.05, 0.005  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  系列标准曲线样品, 按 2.3 和 2.4 项下条件进样分析。以待测物香附烯酮的质量浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 进行线性回归, 利用加权最小二乘法 ( $W = 1/X^2$ ) 进行运算, 得回归方程  $Y = 4.31X + 0.0312$  ( $r = 0.9978$ ), 线性范围 0.005 ~ 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 定量限 0.005  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.5.3 精密度试验** 按 2.5.2 项下方法制备质量浓度分别为 0.005, 0.05, 0.5, 2.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的香附烯酮质控样品, 每个质量浓度样品平行制备 6 份, 按 2.3 和 2.4 项下条件测定, 连续测定 3 d, 计算日内及日间精密度。结果日内精密度的 RSD 分别为 2.8%, 3.0%, 3.3% 和 1.2%, 日间精密度的 RSD 分别为 7.1%, 1.9%, 1.6% 和 0.6%, 均符合生物样品分析方法的要求。

**2.5.4 稳定性实验** 按 2.5.2 项下方法制备质量浓度分别为 0.05, 0.5, 2.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的香附烯酮质控样品, 每个质量浓度样品平行制备 6 份, 分别考察样品于室温 (25  $^{\circ}\text{C}$ ) 放置 24 h, 反复冻融 3 次, 长期冻存 (15 d, -80  $^{\circ}\text{C}$ ) 的稳定性, 按 2.3 和 2.4 项下条件测定, 计算室温放置 24 h 后样品中待测物与内标物的峰面积比值的 RSD 分别为 0.7%, 1.5%, 0.4%; 反复冻融 3 次后 RSD 分别为 5.5%, 5.4%, 2.3%; 长期冻存后 RSD 分别为 5.0%, 3.0%, 3.8%。

**2.5.5 回收率试验** 按 2.5.2 项下方法制备质量浓度分别为 0.05, 0.5, 2.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的香附烯酮质控样品, 每个质量浓度样品平行制备 6 份, 按 2.3 和 2.4 项下条件测定, 将获得的峰面积代入标准曲线计算香附烯酮的质量浓度, 计算回收率分别为 93.28%, 96.93%, 96.46%, RSD 分别为 2.2%, 2.2%, 1.3%。

**2.6 香附烯酮细胞毒性试验** 取对数生长期的 Caco-2 细胞, 消化离心 ( $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 5 min) 后加入一定量的培养液, 调节密度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液, 每孔 200  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中 (4 周加空白 HBSS, 避免边缘效应), 置 5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养。24 h 细胞贴壁并长满后, 吸尽培养液, 用 HBSS 轻轻润洗 1 次, 吸尽 HBSS, 分别加入空白 HBSS 和不同质量浓度 (3, 15, 30, 60, 90, 120  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 香附烯酮对照品溶液 200  $\mu\text{L}$  ( $n = 6$ ),

置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养,培养期间以及 MTT 给药前通过光学显微镜观察细胞状态及有无脱落。4 h 后吸干孔内溶液,HBSS 轻轻润洗 2 次,吸尽 HBSS,加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 溶液 20 μL 继续培养 4 h。小心吸干孔内溶液,加入 DMSO 150 μL 将各个孔中 MTT 的代谢产物甲臜溶解,在微型振荡器振荡 10 min,充分溶解甲臜。用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度(A),计算细胞存活率。细胞存活率计算公式为细胞存活率 = (A<sub>实验组</sub> - A<sub>空白组</sub>) / (A<sub>阴性组</sub> - A<sub>空白组</sub>) × 100%, 式中 A<sub>实验组</sub> 为给药组的吸光度; A<sub>阴性组</sub> 为只加细胞不加药物溶液的阴性组的吸光度; A<sub>空白组</sub> 为不加细胞的空白组的吸光度。结果发现香附烯酮质量浓度分别为 60, 90 mg·L<sup>-1</sup> 时, Caco-2 细胞存活率依次为 94.5%, 91.7%; 之后随着香附烯酮质量浓度的增加, Caco-2 细胞存活率降低, 至 120 mg·L<sup>-1</sup> 时细胞存活率仅 35.1%, 对 Caco-2 细胞具有生长抑制作用, 但不适合进行转运试验, 故选择香附烯酮质量浓度 3 ~ 90 mg·L<sup>-1</sup> 进行后续试验。

**2.7 Caco-2 细胞模型的建立** Caco-2 细胞生长在 T-25 培养瓶中, 培养液为 DMEM (含 10% 胎牛血清, 1% 青霉素-链霉素, 1% 非必需氨基酸和 1% L-谷氨酰胺), 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 (相对湿度 90%)。3 ~ 4 d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞接种于 12 孔 transwell 培养板上, 每孔接种密度为 2.0 × 10<sup>5</sup> 个/mL, 培养板内加入细胞悬液 500 μL, 基底侧加入培养液 1.5 mL, 接种 24 h 后更换培养液, 2 周内隔天换液, 2 周后每日换液。细胞培养 21 d 后对细胞模型进行验证, 选取跨膜电阻 > 600 Ω·cm<sup>2</sup> 及碱性磷酸酶分布不对称出现明显极化性的细胞进行药物转运试验<sup>[11]</sup>。

**2.8 香附烯酮的转运试验**

**2.8.1 给药时间及香附烯酮质量浓度对香附烯酮转运的影响** 用 HBSS 将培养 21 d 的 Caco-2 单层细胞膜冲洗 3 次, 最后 1 次在 37 °C 培养箱中平衡 30 min。根据 2.6 项下香附烯酮细胞毒性试验结果, 分别精密吸取质量浓度分别为 30, 60, 90 mg·L<sup>-1</sup> 的香附烯酮对照品溶液各 500 μL, 加入顶端侧 (AP 侧) 作为供给池, 同时基底侧 (BL 侧) 加入 pH 7.4 的空白 HBSS 1.5 mL 作为接收池; 药物从 BL 侧至 AP 侧转运试验中, 分别吸取质量浓度分别为 30, 60, 90 mg·L<sup>-1</sup> 的香附烯酮对照品溶液各 1.5 mL, 加入 BL 侧作为供给池, 同时 AP 侧加入 pH 7.4 的空白 HBSS 500 μL 作为接收池。置于 37 °C, 55 r·min<sup>-1</sup> 的恒温摇床上孵育, 分别于给药后 30, 60, 90, 120,

150 min 于接收液侧采样 200 μL, 同时补加相同体积 HBSS, 每组平行 3 个孔, 计算香附烯酮在 Caco-2 细胞单层的累积转运量 (Q), 表观渗透系数 (P<sub>app</sub>) 与外排率 (ER)。

$$P_{app} = \Delta Q / (\Delta t \times A \times C_0);$$

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

式中 ΔQ/Δt 表示转运时间 Δt 内的药物转运速率 (μg·s<sup>-1</sup>); A 为聚碳酸酯膜的表面积 (1.12 cm<sup>2</sup>), C<sub>0</sub> 为药物所在面的初始给药质量浓度 (mg·L<sup>-1</sup>), P<sub>app(BL→AP)</sub> 是药物从 BL 侧至 AP 侧的表观渗透系数, P<sub>app(AP→BL)</sub> 是药物从 AP 侧至 BL 侧的表观渗透系数。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 结果用 SPSS 21.0 软件处理, 利用单因素方差分析比较组间差异, P < 0.05 表示差异具有统计学意义。香附烯酮从 AP 侧→BL 侧及 BL 侧→AP 侧的累积转运量随质量浓度和时间变化趋势见图 2。结果显示香附烯酮在 Caco-2 细胞模型中转运量随着时间和质量浓度的增加而增加; 不同质量浓度及转运方向下香附烯酮的 P<sub>app</sub> 见表 1。结果表明 ER 均处于 0.5 ~ 1.5, 香附烯酮双向 P<sub>app</sub> 无显著性差异, 推测香附烯酮在 Caco-2 细胞模型中的转运机制以被动扩散为主。

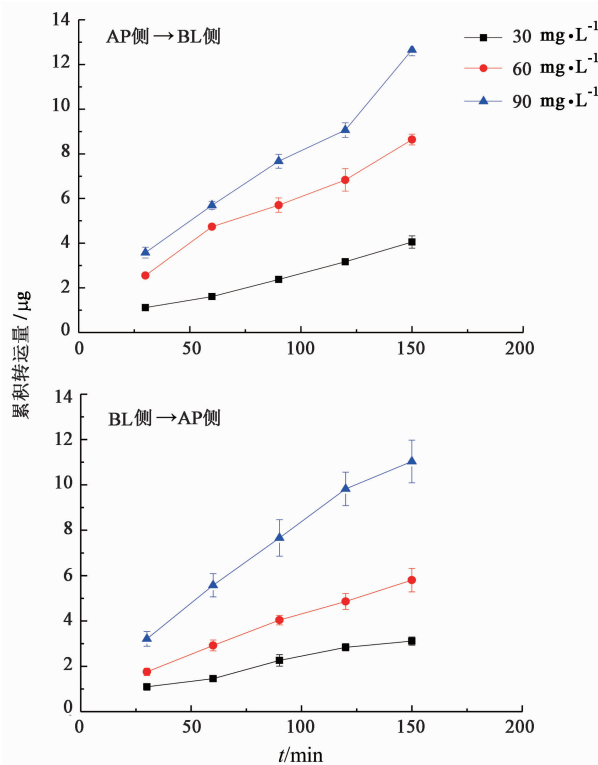


图 2 香附烯酮的双向跨膜转运量分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Analysis of bidirectional transmembrane transport of cyperotundone ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**2.8.2 EDTA 对香附烯酮转运的影响** EDTA 可使

表 1 不同质量浓度香附烯酮在 Caco-2 细胞的双向转运表现渗透系数及外排率 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1  $P_{app}$  and ER of bidirectional transport of cyperotundone at different concentrations in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	$P_{app}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		ER
	AP 侧→BL 侧	BL 侧→AP 侧	
30	$(1.340 \pm 0.091) \times 10^{-5}$	$(1.030 \pm 0.060) \times 10^{-5}$	0.769
60	$(1.214 \pm 0.099) \times 10^{-5}$	$(0.934 \pm 0.020) \times 10^{-5}$	0.770
90	$(1.396 \pm 0.030) \times 10^{-5}$	$(1.216 \pm 0.104) \times 10^{-5}$	0.871

表 2 EDTA 对香附烯酮转运的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of EDTA on transport of cyperotundone ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	$P_{app}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		ER
	AP 侧→BL 侧	BL 侧→AP 侧	
60 mg·L <sup>-1</sup> 香附烯酮	$(1.214 \pm 0.099) \times 10^{-5}$	$(0.934 \pm 0.020) \times 10^{-5}$	0.770
60 mg·L <sup>-1</sup> 香附烯酮 + 2.5 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA 溶液	$(1.301 \pm 0.050) \times 10^{-5}$	$(1.025 \pm 0.013) \times 10^{-5}$	0.788

### 2.8.3 P-糖蛋白抑制剂对香附烯酮转运的影响

维拉帕米是 P-糖蛋白的典型抑制剂,故而考察药物转运是否受 P-糖蛋白的影响可选择维拉帕米为研究对象。配制 60 mg·L<sup>-1</sup> 香附烯酮 + 100 μmol·L<sup>-1</sup> 维拉帕米溶液,转运试验时按 2.8.1 项下方法进行

表 3 维拉帕米对香附烯酮转运的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of verapamil on transport of cyperotundone ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	$P_{app}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		ER
	AP 侧→BL 侧	BL 侧→AP 侧	
60 mg·L <sup>-1</sup> 香附烯酮	$(1.214 \pm 0.099) \times 10^{-5}$	$(0.934 \pm 0.020) \times 10^{-5}$	0.770
60 mg·L <sup>-1</sup> 香附烯酮 + 100 μmol·L <sup>-1</sup> 维拉帕米	$(1.453 \pm 0.050) \times 10^{-5}$	$(1.053 \pm 0.012) \times 10^{-5}$	0.725

## 3 讨论

Caco-2 细胞形态学、标志酶的功能表达与人小肠上皮细胞类似,可用于研究药物吸收转运特性<sup>[12-13]</sup>。在传统培养条件下,Caco-2 单层细胞模型形成需要 21 d,繁琐的实验步骤对细胞模型的制备造成了一定难度。目前,一般通过测定跨上皮细胞膜电阻 (TEER),比较膜两侧碱性磷酸酶 (ALP) 活性,计算几种公认的标记物在单层模型的转运参数等方式来对 Caco-2 细胞单层模型进行评价。

香附烯酮细胞毒性试验结果发现香附烯酮质量浓度分别为 60,90 mg·L<sup>-1</sup> 时,Caco-2 细胞存活率很高;之后随着香附烯酮质量浓度的增加,Caco-2 细胞存活率明显降低,且对 Caco-2 细胞具有生长抑制

细胞间的紧密连接分离,故考察药物是否经细胞旁路转运可选择 EDTA 为研究对象。配制 60 mg·L<sup>-1</sup> 香附烯酮 + 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 溶液,转运试验时按 2.8.1 项下方法进行给药,于 150 min 时取样,采用 LC-MS 检测香附烯酮含量,计算  $P_{app}$  与 ER,见表 2。结果显示与单独香附烯酮给药相比,加入 EDTA 与香附烯酮共孵育后,两者的  $P_{app}$  和 ER 没有显著性差异,表明细胞旁路转运途径不参与香附烯酮在 Caco-2 细胞模型的跨膜转运。

给药,于 150 min 时取样,利用 LC-MS 检测香附烯酮的含量,计算  $P_{app}$  与 ER,见表 3。结果显示加入 P-糖蛋白抑制剂维拉帕米后, $P_{app}$  无显著性变化,ER 几乎没有变化,故推测 P-糖蛋白并未参与香附烯酮的转运过程。

作用,故应注意选择实验安全质量浓度范围。

在 Caco-2 细胞单层模型中,常选择  $P_{app}$  来评价药物在肠道的吸收情况, $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  时,说明药物吸收良好; $P_{app} < 1 \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  时,说明药物吸收较差<sup>[14]</sup>。研究表明 ER 处于 0.5 ~ 1.5 且双向  $P_{app}$  无显著性差异时,药物以被动转运为主;ER > 1.5 时,则可能存在主动转运,有外排蛋白的参与<sup>[14-15]</sup>。目前,香附中香附烯酮在 Caco-2 细胞模型的转运机制研究尚未见报道,故本研究考察了给药时间,香附烯酮质量浓度,EDTA 及 P-糖蛋白抑制剂对香附烯酮在 Caco-2 细胞模型转运情况的影响,结果表明香附烯酮在 Caco-2 细胞模型中的转运存在一定的浓度及时间依赖性,其  $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ,说明药物吸收良好,ER 处于 0.5 ~ 1.5 且双向  $P_{app}$  差异

不大,提示香附烯酮在 Caco-2 细胞模型的转运机制主要是被动扩散。

[参考文献]

[1] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1/3): 27-43.

[2] 慈倩倩, 李英霞, 张文, 等. 香附的本草考证[J]. *四川中医*, 2010, 28(4): 50-51.

[3] LIN X S, WU H Q, HUANG F. Analysis of essential oils from *Cyperus rotundus* by GC/MS [J]. *J Chin Mass Spectrometr Soc*, 2006, 27(1): 40-44.

[4] FENG Y F, GUO X L, MENG Q, et al. Study on the chemical substrates of SFE extract from *Rhizoma Cyperi* [J]. *J Chin Med Mater*, 2006, 29(3): 232-235.

[5] 郭慧玲, 董能峰, 胡律江, 等. 基于成分敲出策略辨识四制香附抗痛经的主要效应成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10): 7-11.

[6] 郭慧玲, 骆云霞, 胡律江, 等. 四制香附贴膏灸剂在大鼠体内的血液流变性与体外透皮特性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(11): 29-33.

[7] 胡律江, 许茜茜, 赵晓娟, 等. 混料均匀设计优化四制香附活性成分配伍[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(14): 1-3.

[8] 胡律江, 郭慧玲, 胡志方, 等. LC-MS 考察  $\alpha$ -香附酮在

Caco-2 细胞模型中转运特性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(5): 35-38.

[9] 李雪, 李翠, 崔学军, 等. HPLC-MS/MS 测定人血浆中青藤碱浓度及芪麝丸在人体内的药代动力学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9): 85-89.

[10] 陈腾飞, 刘建勋, 姚明江, 等. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 脑、血液微透析探针的体内外回收率分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(15): 35-40.

[11] Kigen G, Edwards G. Drug-transporter mediated interactions between anthelmintic and antiretroviral drugs across the Caco-2 cell monolayers [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2017, 18(1): 20.

[12] 廖沙, 谢剑炜. Caco-2 细胞模型在药物体外研究中的应用[J]. *中国新药杂志*, 2005, 14(4): 416-419.

[13] 孔令提, 刘冬, 宋春丽, 等. 采用 Caco-2 细胞转运模型研究胺碘酮转运机制及阿托伐他汀对其转运的影响[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2016, 16(11): 1472-1474.

[14] 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]. *中西医结合学报*, 2007, 5(6): 634-641.

[15] 高坤, 孙进, 何仲贵. Caco-2 细胞模型在口服药物吸收研究中的应用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(6): 73-78.

[责任编辑 刘德文]