

3-乙酰基-11-羧基- β -乙酰乳香酸在 Caco-2 和 MDCK 细胞模型中的吸收研究

慈小燕¹, 夏媛媛², 曾 勇², 伊秀林², 司端运²

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 研究乳香提取物中 3-乙酰基-11-羧基- β -乙酰乳香酸 (AKBA) 在 Caco-2、MDCK-MDR1 和 MDCK-Wild 细胞模型中的吸收转运机制。方法 利用 Caco-2、MDCK-MDR1 和 MDCK-Wild 细胞模型, 研究 AKBA 由细胞层顶端 (AP) → 基底端 (BL) 和 BL → AP 的双向转运过程; 采用 LC-MS/MS 法测定 AKBA 的量, 计算表观渗透系数 (P_{app})。结果 在 Caco-2 细胞模型中, 50 $\mu\text{mol/L}$ AKBA 由 AP → BL、BL → AP 的 P_{app} 分别为 7.9×10^{-7} 、 1.5×10^{-7} cm/s, 在 MDCK-MDR1 细胞模型中, 50 $\mu\text{mol/L}$ AKBA 由 AP → BL、BL → AP 的 P_{app} 分别为 2.6×10^{-7} 、 0.8×10^{-7} cm/s, 在 MDCK-Wild 细胞模型中, 50 $\mu\text{mol/L}$ AKBA 由 AP → BL、BL → AP 的 P_{app} 分别为 2.4×10^{-7} 、 0.6×10^{-7} cm/s, 3 种细胞模型中外排率均小于 2。结论 AKBA 在肠道中吸收不良, 不是 P-糖蛋白的底物, 推测其通过摄入型主动转运和被动扩散两种机制透过小肠上皮细胞。

关键词: 乳香; 3-乙酰基-11-羧基- β -乙酰乳香酸; Caco-2 细胞; MDCK-MDR1; MDCK-Wild; 转运机制; 吸收特性; P-糖蛋白
中图分类号: R286.3; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)09-1162-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.018

Absorption of 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid in Caco-2 cells and MDCK cell models

CI Xiao-yan¹, XIA Yuan-yuan², ZENG Yong², YI Xiu-lin², SI Duan-yun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the mechanisms of absorption and transport of 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) from *Boswellia carterif* in Caco-2 cell, MDCK-MDR1, and MDCK-Wild cell models. **Methods** The Caco-2, MDCK-MDR1, and MDCK-Wild cell monolayer models were used to study the bi-directional transport of AKBA in apical (AP) → basal (BL) or BL → AP; The concentration of AKBA was measured by LC-MS/MS and apparent permeability coefficient (P_{app}) was calculated. **Results** P_{app} (AP → BL) and P_{app} (BL → AP) values of AKBA (50 $\mu\text{mol/L}$) in Caco-2 cell model were 7.9×10^{-7} and 1.5×10^{-7} cm/s, respectively; P_{app} (AP → BL) and P_{app} (BL → AP) values of AKBA (50 $\mu\text{mol/L}$) in MDCK-MDR1 cell model were 2.6×10^{-7} and 0.8×10^{-7} cm/s, respectively; P_{app} (AP → BL) and P_{app} (BL → AP) of AKBA (50 $\mu\text{mol/L}$) in MDCK-Wild cell model was 2.4×10^{-7} and 0.6×10^{-7} cm/s, respectively; The rates of efflux (R_E) for AKBA in Caco-2 and MDCK-MDR1 cell monolayers were both smaller than 2. **Conclusion** AKBA is not the substrate of P-gp and its absorption rate is low. AKBA is absorbed through the intestinal epithelial cells by active transport absorption and passive diffusion possibly.

Key words: *Boswellia carterif* Birdw; 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid; Caco-2 cell; MDCK-MDR1; MDCK-Wild; transport mechanism; absorption characteristics; P-gp

中药给药多以口服形式, 其药效成分能否被人体肠道吸收是决定其能否发挥生物活性的重要因素之一^[1]。目前广泛用于研究药物的肠吸收过程的模

型主要是 Caco-2 和 MDCK 细胞模型^[2-3]。乳香为橄榄科植物卡氏乳香树 *Boswellia carterif* Birdw 树皮渗出的胶状树脂^[4], 性温, 味苦、辛, 入心、肝、

收稿日期: 2012-07-01

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项—新药临床前药物代谢动力学技术平台建设(2012ZX09304002); 国家“973”项目(2010CB735602)

作者简介: 慈小燕 (1987—), 女, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为药代动力学。Tel: 13622099172 E-mail: cxy871005@yeah.net

*通信作者 曾 勇 Tel: (022)84845243 E-mail: zengy@tjipr.com

脾经,具有调气、活血、定痛、追毒等功效。 β -乳香酸为乳香中的五环三萜类化合物,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等作用^[5-6]。在研究乳香酸构效关系的过程中发现,3-乙酰基-11-羰基- β -乙酰乳香酸(AKBA)与其他衍生物相比,显示更强的药理活性^[7]。本实验利用Caco-2、MDCK-MDR1和MDCK-Wild 3种细胞模型,研究AKBA在小肠吸收和转运机制,采用LC-MS/MS法测定Hank平衡盐溶液(HBSS)中AKBA的浓度。

1 材料

1.1 药品与试剂

AKBA对照品(批号20100301),质量分数99.5%,AKBA供试品(批号20100921),质量分数94.2%,山东省生物药物研究院;甘草次酸(内标,批号110723-200612),质量分数99.5%,中国药品生物药品检定院;罗丹明123、DPBS(不含钙和镁的平衡盐溶液)粉末,Sigma公司;甲酸铵,分析纯,上海润捷化学试剂有限公司;咖啡因(批号TC2003200),质量分数99.6%,天津中安药业有限公司生产;DMSO,分析纯,天津市凯信化学工业有限公司;甲醇、乙腈、醋酸乙酯,色谱纯,天津康科德科技有限公司;DMEM高糖培养基,Hyclone公司;0.5% Trypsin-EDTA、胎牛血清(FBS)、细胞冻存液,Gibco公司;超纯水、HBSS,实验室自制。

1.2 仪器

API4000Q—Trap型液相色谱-质谱联用仪以及Analyst数据处理系统,美国Applied Biosystems公司;Shimadzu—10A HPLC-UV系统、Shimadzu—12A HPLC-FLD系统,日本Shimadzu公司;科诺纯水制备系统,北京中盛茂源科技发展有限公司;CO₂培养箱,Thermo Scientific公司;ZHWY-上海智诚恒温振荡器,北京华威兴业科技有限公司;Millcell ERS—2跨上皮电阻仪,Millipore公司;Transwell®12孔聚碳酸酯膜转运板、细胞培养皿、离心管、移液管,Corning Costar公司。

1.3 细胞

Caco-2细胞,购于中国医学科学院基础医学细胞中心;MDCK-MDR1和MDCK-Wild细胞,由日本富士生物医药研究所提供。

2 方法

2.1 细胞培养

2.1.1 Caco-2细胞 将Caco-2细胞至于常规培养

皿内,以高糖DMEM培养基(含10% FBS)、在37℃、5% CO₂和相对湿度90%的培养箱内培养,培养基隔天更换,4~5 d达到融合。当细胞覆盖盘底80%~90%时,用含0.25% EDTA的胰酶消化,用新鲜培养基调细胞密度至 2×10^5 /mL并接种于Transwell聚碳酸酯膜12孔板中。在细胞层顶端(AP),每孔加0.5 mL细胞悬液,基底端(BL)每孔加1.5 mL新鲜培养基,前2周每隔1天换液1次,以后每天换液1次,连续培养21 d,得到完全分化的细胞单层。本实验所用Caco-2细胞为45~50代。

2.1.2 MDCK细胞 将MDCK-Wild和MDCK-MDR1细胞至于常规培养皿内,以高糖DMEM培养基(含10% FBS)、在37℃、5% CO₂和相对湿度90%的培养箱内培养,培养基隔天更换,2~3 d达到融合。当细胞覆盖盘底80%~90%时,用含0.25% EDTA的胰酶消化,用新鲜培养基调整细胞密度至 2×10^5 /mL并接种于Transwell聚碳酸酯膜12孔板中,在AP侧每孔加0.5 mL细胞悬液,BL侧每孔加1.5 mL新鲜培养基。每天换液,连续培养6~7 d,得到完全分化的细胞单层。本实验所用MDCK-Wild细胞为15~20代,MDCK-MDR1细胞为25~28代。

2.2 Caco-2单层细胞跨膜电阻值测定

将电极放入预热至37℃的HBSS中,平衡20 min。移走培养板中的培养基,在AP侧每孔加预热的HBSS 0.5 mL,BL侧每孔加1.5 mL,37℃平衡20 min,同时洗去细胞表面的杂质。移走HBSS,重新加入预热的HBSS,测定跨膜电阻值(TEER),用1个空白载体重复上述步骤以获得空白值。

$$TEER = (\text{测定电阻值} - \text{空白值}) \times \text{单层表面积}$$

2.3 转运实验

检测10 μ mol/L咖啡因在Caco-2、MDCK-Wild、MDCK-MDR1细胞单层AP→BL的转运(验证Caco-2细胞单层完整性),10 μ mol/L罗丹明123 AP→BL和BL→AP的转运[验证Caco-2细胞单层P-糖蛋白(P-gp)功能],50 μ mol/L AKBA由AP→BL和BL→AP的转运。配制上述药物HBSS,移走培养板中的培养基,加入37℃预热的HBSS,37℃平衡20 min,移走HBSS。检测AP→BL转运:在AP侧加0.5 mL预热的含药HBSS,BL侧加1.5 mL HBSS;检测BL→AP转运:在AP加0.5 mL HBSS,BL侧加1.5 mL预热的含药HBSS。之后在恒温振荡器中37℃培养1.5 h,转速60 r/min;检测AP→

BL 转运时取 BL 侧转运液, 检测 BL→AP 转运时取 AP 侧的转运液, 测定转运液中的药物浓度。计算表观渗透系数 (P_{app}) 和外排率 (R_E)。

$$P_{app} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$$

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

其中, dQ/dt 为接受池单位时间药物转运量, A 为转运膜的表面积, C_0 为药物初始浓度 (cm/s)

2.4 HPLC-UV 法测定转运液中咖啡因

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (含 1% 乙酸)-三乙胺 (30:70:0.2), 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 1.0 mL/min, 内标为 2 $\mu\text{g/mL}$ 茶碱甲醇溶液, 检测波长 272 nm, 进样量 20 μL 。

2.4.2 供试品溶液制备 取 BL 侧转运液 100 μL , 准确加入内标 10 μL 、甲醇 150 μL , 涡旋 45 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min。

2.4.3 方法学考察 分别采用低、中、高 3 种质量浓度 (0.25、1、5 ng/mL) 的咖啡因标准 Hanks 液, 对方法的精密度、准确度、回收率及稳定性进行考察, 结果符合生物样品分析要求。

2.5 HPLC-FLD 法测定转运液中罗丹明 123

2.5.1 测定条件 色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为含 1% 三乙胺的乙腈-水 (28:72), 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 1.0 mL/min,

内标为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 荧光黄 CH 甲醇溶液, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 545 nm; 进样量 20 μL 。

2.5.2 供试品溶液制备 取 AP 侧和 BL 侧转运液 100 μL , 准确加入内标 20 μL 、乙腈 150 μL , 涡旋 45 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min。

2.5.3 方法学考察 分别采用低、中、高 3 种质量浓度 (5、100、1 000 ng/mL) 的罗丹明 123 标准 Hanks 液, 对方法的精密度、准确度、回收率及稳定性进行考察, 结果符合生物样品分析要求。

2.6 HPLC-MS/MS 法测定转运液中 AKBA

2.6.1 色谱条件 色谱柱为 Symmetry C_8 柱 (100 mm×4.7 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-10 mmol/L 甲酸铵水溶液 (43:44:13), 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量为 0.6 mL/min, 内标为 4 $\mu\text{g/mL}$ 甘草次酸乙腈溶液, 进样量 10 μL 。

2.6.2 质谱条件 ESI 电喷雾离子源, 负离子检测; 离子喷雾电压-4 500 V; 离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$; 气帘气 82.74 kPa; 雾化气 413.69 kPa; 辅助加热气 275.97 kPa; 去簇电压-80 V; 入口电压-10 V; 碰撞出口电压-12 V; 碰撞能-40 eV; 气帘气、雾化气、辅助气、碰撞气均为氮气。检测结果见图 1。

2.6.3 对照品溶液制备 AKBA 对照品 85 μL 与内标 85 μL 混匀后, 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干, 测定时加 100 μL 流动相复溶。

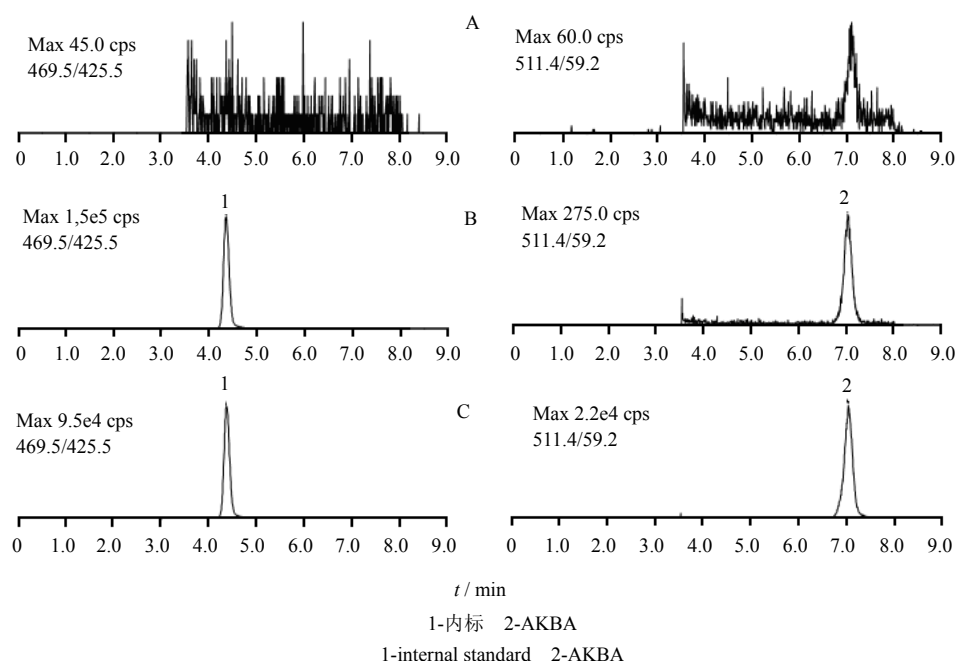


图1 空白 HBSS (A)、空白 HBSS+内标+AKBA (B)、BL 侧样品+内标 (C) 质谱图
Fig. 1 MS of blank HBSS (A), blank HBSS + IS + AKBA (B), and BL sample + IS (C)

2.6.4 内标溶液制备 精密称取 2.5 mg 甘草次酸于 25 mL 容量瓶,乙腈定容至刻度,即得 100 $\mu\text{g/mL}$ 储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。精密吸取该储备液 4 mL 至 100 mL 容量瓶中,乙腈定容至刻度,即得 4 $\mu\text{g/mL}$ 内标溶液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.6.5 供试品溶液制备 取 AP 侧和 BL 侧转运液 100 μL ,准确加入 100 μL 内标、100 μL 乙腈和 2 mL 醋酸乙酯,涡旋 2 min,2 000 r/min 离心 10 min,吸取有机相 1.7 mL, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,用 100 μL 流动相涡旋 60 s 复溶, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min,进样 10 μL 。

2.6.6 方法学考察

(1) 标准曲线绘制:向 100 μL 空白 HBSS 中加入不同质量浓度的 AKBA 对照品溶液 100 μL 、4 $\mu\text{g/mL}$ 的内标 100 μL ,使 HBSS 含 AKBA 的质量浓度分别为 5、10、50、200、500、2 000、5 000 ng/mL。按照“2.6.3”项下方法操作后进样。以待测物与内标峰面积比为纵坐标 (Y),质量浓度为横坐标 (X) 进行加权线性回归,得标准曲线 $Y=0.002\ 87X+0.000\ 219$, $r=0.999\ 2$ 。结果表明 AKBA 质量浓度在 5~5 000 ng/mL 内线性关系良好。

(2) 回收率试验:选用 AKBA 质量浓度分别为 10、200、1 000 ng/mL 的 HBSS,以 AKBA 从 HBSS 中提取后的测定值与未经提取的对照品溶液的测定值比较,计算回收率,得绝对回收率均 $>70\%$ 。

(3) 稳定性试验:取供试品溶液,室温分别放置 12、24 h, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存放置 20 d 后进行测定。以峰面积为考察指标,6 次测定结果的 $\text{RSD}<15\%$ 。

(4) 重复性试验:经相同处理方法的供试品(同一质量浓度)6 份,10 μL 进样,测定 AKBA 峰面积,6 次测定结果的 RSD 为 7.6%。

(5) 精密度试验:准确吸取供试品溶液 10 μL ,重复进样 6 次,测定 AKBA 峰面积,6 次测定结果的 RSD 为 6.2%。

2.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 Caco-2、MDCK-Wild、MDCK-MDR1 细胞完整性验证^[8-9]

3.1.1 TEER 测定 Caco-2 细胞单层培养 21 d 后细胞分化完成,形成紧密单层,TEER 为 $(450\pm 15)\ \Omega\cdot\text{cm}^2$; MDCK-Wild 细胞单层在培养 4 d 后 TEER 值达到最大值 $(240\pm 12)\ \Omega\cdot\text{cm}^2$; MDCK-MDR1

细胞单层在培养 4 d 后 TEER 值达到最大值 $(230\pm 12)\ \Omega\cdot\text{cm}^2$,7 d 后细胞分化完成,形成紧密单层,TEER 值为 $(230\pm 13)\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ 。表明 3 个细胞单层的致密性与完整性均良好。

3.1.2 咖啡因在 Caco-2、MDCK-Wild、MDCK-MDR1 细胞的单向转运 咖啡因在 3 种细胞单层中的 P_{app} 值 (AP $\rightarrow$ BL) 表明,3 种细胞单层致密性良好,3 个 P_{app} 值相近说明 MDCK 细胞与 Caco-2 细胞的单层致密性接近。结果见表 1。

3.2 Caco-2、MDCK-Wild、MDCK-MDR1 细胞单层 P-gp 功能的验证

罗丹明 123 10 $\mu\text{mol/L}$,在 Caco-2 和 MDCK-MDR1 细胞单层中双向转运的 P_{app} 值表明,细胞中 P-gp 功能良好,具有较强的外排能力;结果还表明 P-gp 在 MDCK-MDR1 细胞中的专一性过表达。结果见表 2。

表 1 咖啡因在 3 种细胞单层中 AP $\rightarrow$ BL 的 P_{app} 值 ($n=3$)

Table 1 P_{app} value (AP $\rightarrow$ BL) of caffeine in three cell monolayers ($n=3$)

细 胞	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$
Caco-2	16.46 ± 2.01
MDCK-MDR1	18.65 ± 1.94
MDCK-Wild	12.86 ± 3.15

表 2 罗丹明 123 在 3 种细胞单层中双向转运的 P_{app} 值 ($n=3$)

Table 2 P_{app} value of Rhodamine 123 in three cell monolayers by bi-directional transport ($n=3$)

细 胞	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$		R_E
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
Caco-2	0.3 ± 0.06	1.5 ± 0.08	4.55
MDCK-MDR1	0.1 ± 0.05	1.9 ± 0.21	19.96
MDCK-Wild	0.9 ± 0.04	1.0 ± 0.10	1.08

3.3 AKBA 在 Caco-2、MDCK-Wild、MDCK-MDR1 细胞的双向转运

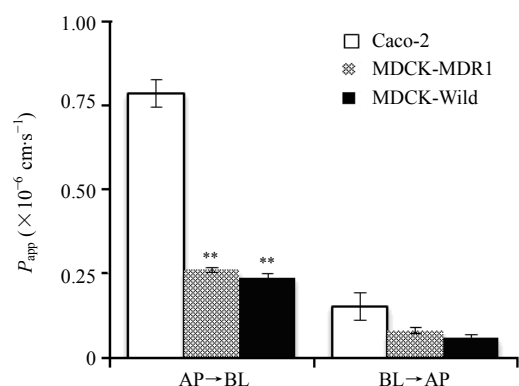
AKBA 50 $\mu\text{mol/L}$ 给药,在 3 种细胞单层中双向转运的 P_{app} 值和 R_E 见表 3、图 2。

4 讨论

人类结肠腺癌 Caco-2 细胞系^[10],具有与小肠上皮细胞相似的形态和功能,在透性支持物上,培养 21 d 可完成自动分化,形成具微绒毛以及紧密连接等类似于小肠上皮细胞刷状缘侧的分化特征的单细胞层。Caco-2 细胞作为新药筛选模型,已用于筛选

表3 AKBA在3种细胞中双向转运的 P_{app} 值($n=3$)Table 3 P_{app} value of AKBA in three cell monolayers by bi-directional transport ($n=3$)

细胞	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		R_E
	AP→BL	BL→AP	
Caco-2 细胞	0.79 ± 0.040	0.15 ± 0.04	0.19
MDCK-MDR1 细胞	$0.26 \pm 0.006^{**}$	0.08 ± 0.008	0.31
MDCK-Wild 细胞	$0.24 \pm 0.013^{**}$	0.06 ± 0.009	0.24

与Caco-2细胞比较: ** $P < 0.01$, 下同** $P < 0.01$ vs Caco-2 cells, same as below图2 AKBA在两细胞中双向转运的 P_{app} 值($n=3$)Fig. 2 P_{app} value of AKBA in two cell monolayers by bi-directional transport ($n=3$)

药物肠道渗透性和预测新药口服吸收利用度^[11]。MDCK细胞系是由马丁达比犬肾上皮细胞发展的一种细胞间连接非常紧密的细胞系,有两种亚克隆株,II型亚克隆细胞株的TEER值较低,约为 $200 \sim 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$,与人正常小肠的TEER相接近,常用于研究药物的吸收。MDCK-MDR1细胞是用mdr1基因稳定转染MDCK细胞建立的专一过表达P-gp的细胞系,培养周期短,3~7 d就可以形成分化良好的单细胞层,代与代间的均一性较好,可用于研究P-gp介导的药物转运实验,所获得的结果重现性较在Caco-2细胞的高^[12-13]。药物在MDCK细胞和Caco-2细胞中的渗透系数有较好的相关性,因此MDCK-MDR1细胞也可作为肠道黏膜的快速筛选模型^[9]。

药物在胃肠道的吸收性可通过药物透过胃肠道壁的渗透性评价,此外肠壁细胞内存在药物外排泵,可以把已经摄入细胞内的药物外排出去,从而影响药物的吸收与药物的生物利用度^[14]。Yee^[15]利用Caco-2细胞模型研究在人体具有不同吸收程度的35种各类化合物,结果发现 $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 、 $(1 \sim 10) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 、 $> 10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 时,分别相

当于其在人小肠内吸收不良(0%~20%)、中等吸收(20%~70%)和吸收良好(70%~100%)。

在本实验中,由Caco-2细胞模型测得AKBA的 P_{app} (AP→BL)为 $7.9 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$,表明AKBA在小肠内吸收不良(10%~20%),这与本实验通过动物实验测得的AKBA的生物利用度数据相符合。当所测药物的 $R_E \geq 2$ 时,表示该药物可能为P-gp的底物,当 $R_E \leq 0.5$ 时,表示该药物可能为肠道摄入型转运体的底物,需要做进一步研究^[7]。在MDCK-MDR1细胞模型中,测得AKBA纯外排率小于2,表明AKBA不是P-gp底物,不存在P-gp介导的主动外排机制,用MDCK-Wild细胞测得的结果验证了这一点。因此,在临床上联合用药时,AKBA与P-gp底物或抑制剂类药物联用时不存在P-gp外排过程的相互影响。

在验证单层细胞模型完整性时,咖啡因的转运数据表明MDCK细胞与Caco-2细胞单层致密性接近,在相同条件下给药,药物如果只是通过被动扩散吸收,那么由两种细胞模型测得的 P_{app} 值应该是相近的。而AKBA在Caco-2细胞模型中测得的 P_{app} 值约是MDCK-MDR1细胞模型的3倍,因此推测AKBA除通过被动扩散透过Caco-2细胞模型外,还可能不存在其他吸收机制。AKBA在Caco-2细胞模型中的 R_E 为0.19(< 0.5),吸收方向的 P_{app} 值约为外排方向 P_{app} 值的5倍,提示在Caco-2细胞模型中存在由摄入型转运体介导的主动吸收机制。

Constanze等^[16]测定了人36种转运体在Caco-2细胞中的mRNA表达量,发现在Caco-2细胞中存在有机阴离子转运体有机阴离子转运体(OATP)家族的表达,其中OATP-B的表达量相对较多。带有羧基的药物大部分存在有机阴离子的载体转运机制,且AKBA的结构中存在羧基,故AKBA在Caco-2细胞中可能存在由OATP家族介导的主动转运机制,但需要进一步实验验证。

参考文献

- [1] 祝诚诚,何新. 药物肠道吸收的研究方法[J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 222-227.
- [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] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1977.
- [5] 党允平, 韩英梅, 张俊艳. 乳香的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 52-59.
- [6] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 第三册. 北京: 学苑出版社, 1997.
- [7] Sailer E R, Subramanian L R, Rall B, *et al.* Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity [J]. *Br J Pharmacol*, 1996, 117(4): 615-618.
- [8] 魏敏吉, 赵明. 创新药物药代动力学研究与评价 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2008.
- [9] Irvine J D, Takahashi L, Lockhard K, *et al.* MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening [J]. *Pharm Sci*, 1999, 88(1): 28-33.
- [10] Fogh J D, Fogh J M, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1977, 59(1): 221-226.
- [11] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cell [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175(3): 880-885.
- [12] Pastan I, Gottesman M M, Ueda K, *et al.* A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cell [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(12): 4486-4490.
- [13] Polli J W, Wring S A, Humphreys J E, *et al.* Rational use of *in vitro* P-glycoprotein assays in drug discovery [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(2): 620-628.
- [14] Eun J J, Liu X, Jia X B, *et al.* Coupling of conjugating enzymes and efflux transporters: impact on bioavailability and drug interactions [J]. *Curr Drug Metabol*, 2005, 5(6): 455-468.
- [15] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man: fact or myth [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763-766.
- [16] Constanze H, Gustav A, Annick S, *et al.* Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 8(35): 1333-1340.