

• 药理与临床 •

芍药苷类化合物在人源肠 Caco-2 细胞单层模型中的吸收转运研究

杨秀伟, 郭洁, 徐巍

北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室 北京大学药学院天然药物学系, 北京 100191

摘要: **目的** 研究芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、四乙酰芍药苷、五乙酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷在人源结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞单层模型中的吸收特性。**方法** 利用 Caco-2 细胞单层模型检测上述 6 个化合物从孔板顶端 (AP) → 底端 (BL)、BL → AP 的双向转运过程。应用偶联紫外检测器的 HPLC 法测定上述 6 个化合物, 计算转运参数和表观渗透系数 (P_{app}), 并与阳性对照药普萘洛尔和阿替洛尔进行比较。**结果** 芍药苷双向转运的 P_{app} 值与阿替洛尔的 P_{app} 值皆在 10^{-7} cm/s 数量级; 其他 5 个化合物的 P_{app} 值介于在 Caco-2 细胞单层模型中吸收良好的普萘洛尔与难以吸收的阿替洛尔的 P_{app} 值之间。芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷浓度为 10~200 μ mol/L, 四乙酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷浓度为 10~150 μ mol/L, 五乙酰芍药苷浓度为 10~100 μ mol/L 时, 其转运效率与浓度呈正相关。**结论** 6 个受试化合物可以通过小肠上皮细胞被动吸收进入体内, 芍药苷属于难吸收的化合物, 羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、四乙酰芍药苷、五乙酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷属于中等吸收的化合物; 苯甲酰芍药苷具有促进阿替洛尔在 Caco-2 细胞单层模型吸收转运的作用。

关键词: 芍药苷; 羟基芍药苷; 苯甲酰芍药苷; 四乙酰基芍药苷; 五乙酰基芍药苷; 五乙酰基芍药内酯苷; Caco-2 细胞单层; 表观渗透系数

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)15-2097-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.014

Absorption and transport characteristic of paeoniflorin and its derivatives in model of Caco-2 cell monolayers

YANG Xiu-wei, GUO Jie, XU Wei

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Natural Medicines, College of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: **Objective** To study the absorption and transport characteristic of paeoniflorin (PF), oxypaeoniflorin (OP), benzoylpaeoniflorin (BP), tetraacetylpaeoniflorin (TP), pentaacetylpaeoniflorin (PP), and pentacacetylalbiflorin (PA) in human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 cell monolayer model. **Methods** The Caco-2 cell monolayers were used as an intestinal epithelial cell model. The permeability of the tested compounds from apical (AP) side to basolateral (BL) side or from BL side to AP side was evaluated. The concentration of the tested compounds was measured by HPLC coupled with UV detector. The transport parameters and apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated, and the P_{app} values were compared with the reported values for model compounds, Propranolol and Atenolol. **Results** The P_{app} values of PF in the bi-directional transport and atenolol were at the quantitative degree of 10^{-7} cm/s. Whereas those of OP, BP, TP, PP, and PA were between atenolol and propranolol used as a control substance for low and high permeability, respectively. The absorption and transport of the tested compounds were concentration-dependent at the concentration range of 10—200 μ mol/L for PF, OP, and BP, 10—150 μ mol/L for TP and PA, and 10—100 μ mol/L for PP. **Conclusion** The six tested compounds could be absorbed across the intestinal epithelial cells by passive diffusion mechanism. PF is poorly absorbed compound and OP, BP, TP, PP, and PA are moderately absorbed compounds. BP has a role to promote atenolol uptake transporters in Caco-2 cell monolayer model.

Key words: paeoniflorin; oxypaeoniflorin; benzoylpaeoniflorin; tetraacetylpaeoniflorin; pentaacetylpaeoniflorin; pentacacetyl-albiflorin; Caco-2 cell monolayers; apparent permeability coefficients

收稿日期: 2012-10-04

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划资助项目 (2011BAI07B08)

作者简介: 杨秀伟 (1958—), 男, 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室、北京大学药学院教授, 博士研究生导师。主要从事天然药物化学和药物的ADMET/Act. 研究平台建设。Tel: (010)82805106 Fax: (010)82802724 E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

芍药苷 (paeoniflorin, PF)、羟基芍药苷 (oxypaeoniflorin, OP)、苯甲酰芍药苷 (benzoylpaeoniflorin, BP) 系白芍 *Paeoniae Alba Radix*^[1-2]、赤芍 *Paeoniae Rubra Radix*^[3]、牡丹皮 *Moutan Cortex*^[4]等含有的单萜类化合物, 尤其在白芍及其饮片中的量较高^[5]。这些化合物在离体实验中呈现出许多有意义的生物学活性, 如芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷抑制大鼠腹腔肥大细胞释放组胺^[6-7], 芍药苷和羟基芍药苷减弱透明质酸酶活性^[8], 苯甲酰芍药苷减弱脂氧合酶-1 活性^[9]等。为预测口服白芍、赤芍和牡丹皮提取物或含有这3味药材的中成药后能够进入体循环的化学成分及进一步确定有效成分^[10], 本实验采用国际公认且在药物吸收研究中广泛使用的人源结肠腺癌 Caco-2 细胞单层体外培养模型^[11-12], 研究芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷的肠吸收转运特性。为探讨增加分子脂溶性是否影响化合物的吸收转运, 将芍药苷衍生化为四乙酰芍药苷 (tetraacetylpaeoniflorin, TP) 和五乙酰芍药苷 (pentaacetylpaeoniflorin, PP), 在同样条件下进行吸收转运研究, 并与五乙酰基芍药内酯苷 (pentacacetylalbiflorin, PA) 进行比较。同时探讨苯甲酰芍药苷对在 Caco-2 细胞单层模型上难以吸收

的阿替洛尔吸收转运的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

芍药苷、羟基芍药苷和苯甲酰芍药苷, 均由本课题组从白芍中分得^[1]。按常规方法乙酰化, 将芍药苷衍生化分别得到四乙酰芍药苷和五乙酰芍药苷, 将芍药内酯苷 (albiflorin) 衍生化得到五乙酰芍药内酯苷。HPLC 法检测上述6个化合物的质量分数皆>98%, 结构见图1。DMEM 培养基、MEM 培养基, 美国 Gibco 公司; Hank's 缓冲溶液 (HBSS)、普蔡洛尔、阿替洛尔、二甲亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS)、非必需氨基酸, 美国 Hyclone 公司; 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES), 北京赛尔曼生物公司; 胰蛋白酶 (trypsin), 北京华美生物工程公司; 青霉素钠 (80 万单位, 批号 D0801320)、硫酸链霉素 (100 万单位, 批号 0912101), 华北制药集团; Na₂CO₃、D-(+)-葡萄糖和乙二胺四乙酸 (EDTA), 北京化学试剂公司。12 孔聚碳酸酯膜转运板 (Transwell)、25 cm² 与 75 cm² 细胞培养瓶, 美国 Corning Costar 公司; 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。色谱纯甲醇, 天津市西化特种试剂厂; 三蒸水。

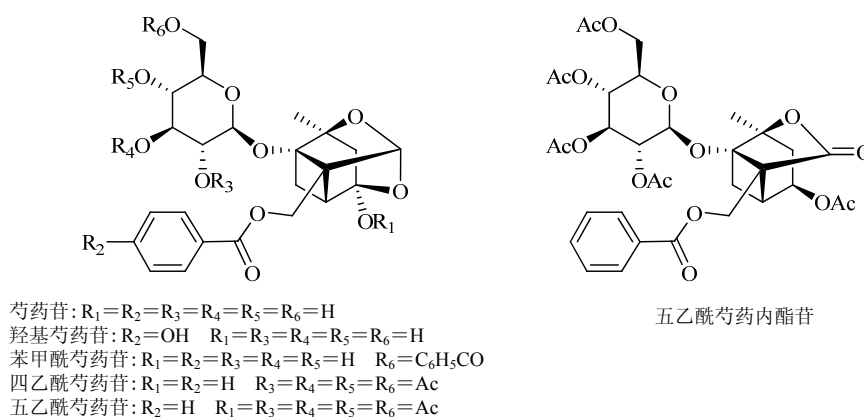


图1 芍药苷类化合物的结构

Fig. 1 Chemical structures of paeoniflorin and its derivatives

1.2 细胞

Caco-2 细胞株 (ATCC#HTB-37), 购自 ATCC (Rockville, MD, 美国)。

1.3 仪器

Galaxy B 型 CO₂ 气体培养箱, 英国 RS Biotech 公司; JJT-1300 型超净工作台, 北京昌平长城空气净化公司; Evom 细胞电阻仪, 美国 World Precision

Instrument 公司; XDS-1 倒置显微镜, 重庆光电仪器总公司; GRX-9051B 型热空气消毒箱, 上海福玛实验设备有限公司; 座式蒸汽压力灭菌锅, 上海龙杰机械装备有限公司; HZS-H 型恒温水浴振荡器, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; TGL-16C 型高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂。Dionex 高效液相色谱仪 (HPLC, 包括 Dionex P680

型泵, UVD 170 U 型检测器, Chromeleon Version 6.50 数据处理工作站), 德国 Dionex 公司; Dikma Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、偶联 Dikma EasyGuard C₁₈ 保护柱 (20 mm×4.6 mm, 5 μm), 北京 Dikma 科技有限公司; Pallas 3.3.2.6 ADME/Tox 预测软件, CompuDrug International 公司。

2 方法

2.1 细胞培养液和缓冲液的制备

不完全 DMEM 培养液、完全 DMEM 培养液-10 和-20、HBSS 平衡盐溶液、PBS 缓冲溶液、0.01% EDTA/PBS 溶液和 0.25% 胰蛋白酶/PBS 溶液的制备参考文献方法^[11]。

2.2 细胞培养和种板^[11]

取冻存复苏的第 35 代 Caco-2 细胞, 先用 DMEM-20 培养 2 代, 再转用 DMEM-15^[11]培养 3 代。当细胞生长速度正常 (培养 4~5 d 后细胞汇合率达到 80%), 再转用 DMEM-10 培养。除培养第 2 天外, 每天换液, 4~5 d 传代 1 次, 传代比例 1:5。本实验使用 41~60 代细胞。

细胞达到 80% 汇合率后代, 向孔板的顶端 (AP) 加入密度为 2.5×10^5 /孔的细胞悬液 0.5 mL, 向孔板的底端 (BL) 加入完全 DMEM-10 培养液 1.5 mL, 放入培养箱内培养。种板后第 1~7 天隔天更换 AP 和 BL 的培养液 (分别为 0.5、1.5 mL); 第 8~16 天每天更换 AP 培养液 0.5 mL, 从第 9 天起隔天更换 BL 培养液 1.5 mL; 第 17 天后每天换 AP 和 BL 的培养液 (分别为 0.5、1.5 mL)。

2.3 Caco-2 细胞单层完整性与转运能力实验

在 Caco-2 细胞单层模型中吸收转运良好的阳性对照药普萘洛尔和难以吸收转运的阳性对照药阿替洛尔的吸收转运实验按照文献方法^[11]进行; 按 ALP 试剂盒说明书检测 Caco-2 细胞 ALP 活性, 验证 Caco-2 细胞单层完整性与转运能力。

2.4 色谱条件

Dikma Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为室温, 进样量为 20 μL, 体积流量 1.0 mL/min。检测波长: 芍药苷、苯甲酰芍药苷、四乙酰芍药苷、五乙酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷皆为 230 nm; 羟基芍药苷为 248 nm。流动相: 芍药苷为甲醇-水 (50:50), 羟基芍药苷为甲醇-水-磷酸 (60:40:0.15), 苯甲酰芍药苷和四乙酰芍药苷为甲醇-水 (70:30), 五乙酰芍药苷为甲醇-水 (80:20), 五乙酰芍药内酯苷为甲醇-水-磷酸 (75:

25:0.15)。

2.5 实验条件下受试化合物稳定性实验

按照实验设计, 配制最大浓度的受试化合物溶液, 于 37 °C 水浴摇床上, 按实验设计的最长温育时间 (180 min) 温育, 取出后冷冻干燥, -20 °C 冰箱中保存 24 h, 待处理。

2.6 吸收转运实验

实验前分别将 6 个受试化合物用 DMSO 配成 10 mmol/L 储备液, 用 HBSS 稀释至所设计浓度, 漩涡混匀。取在 12 孔转运板上培养到第 20~23 天、已完全汇合并分化的 Caco-2 细胞单层, 测定细胞单层电阻 $>500 \Omega/\text{cm}^2$, 符合要求^[11], 可用于实验。研究 AP→BL 吸收转运, AP 端给予受试化合物溶液 0.5 mL, BL 端加空白 HBSS 1.5 mL; 外流实验, 即 BL→AP, BL 端给予受试化合物溶液 1.5 mL, AP 端加空白 HBSS 0.5 mL, 6 个受试化合物吸收转运实验的终浓度皆为 50 μmol/L (DMSO 终浓度小于 0.5%)。给予受试化合物溶液后开始计时, 并立即将 12 孔转运板置于恒温摇床上 (37 °C, 50 r/min) 温育 90 min。研究 AP→BL 转运时, AP 端取样 400 μL, BL 端取样 1 300 μL; 研究 BL→AP 时, BL 端取样 450 μL, AP 端取样 450 μL, 测试液每次取 500 μL 留样, 单孔取点, 每点平行 3 个孔。取样结束后再次测定细胞单层电阻值 (应不下降)。所有样品置 -20 °C 冷冻保存, 待处理后分析测定。在吸收转运的时效和量效关系研究中, 由于溶解度的问题, 芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷均各配制成 10、25、50、100、150、200 μmol/L; 五乙酰芍药内酯苷配制成 10、25、50、100、150 μmol/L; 五乙酰芍药苷配制成 10、25、50、100 μmol/L。分析测定时, 按“2.9”项下方法处理样品; 按“2.4”项下色谱条件分析; 按“2.10”项下方法计算表观渗透系数 (P_{app}); 使用 Pallas 软件, 根据受试化合物各个基团的物化参数拟合计算得出表观油/水分配系数 (log D 值)。

2.7 细胞摄入实验

“2.6”项下取样全部结束后, 小心移走转运孔中的溶液, 以冷 HBSS 洗涤 3 次, 置 -20 °C 冰箱中冷冻保存 24 h, 室温复融、放置 24 h, 如此重复冻融 3 次, 将附着细胞的聚碳酸酯膜取出, 置 200 μL 70% 甲醇中, 漩涡混匀后超声溶解 20 min, 于 $15\,000 \times g$ 条件下离心 10 min, 取上清液, 即得细胞摄入分析样品, 待处理后分析测定受试化合物在细胞中的蓄积和总回收率。

2.8 苯甲酰芍药苷促阿替洛尔吸收实验

用 DMSO 溶解阿替洛尔, 用 HBSS 稀释至 50 $\mu\text{mol/L}$ 。同法配制阿替洛尔与苯甲酰芍药苷的混合溶液 (均为 50 $\mu\text{mol/L}$)。按“2.7”项下方法操作、检测。

2.9 样品分析

将“2.5”和“2.6”项下冷冻干燥样品取出, 加入甲醇, 涡旋混匀后超声溶解 20 min, 15 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液, 进样 20 μL , 按“2.4”项下 HPLC 条件进行测定。

2.10 P_{app} 值计算与数据处理

受试化合物在 Caco-2 细胞模型中的 P_{app} 值按下式计算。每数据点为平行 3 孔的均值, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

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

P_{app} 单位为 cm/s ; Q 为累积转运量, 代表化合物在接收室的总量 (μmol), dQ/dt 为转运速率 ($\mu\text{mol/s}$); C_0 为化合物在供给室的初始浓度 ($\mu\text{mol/mL}$); A 为聚碳酸酯膜的表面积 (cm^2)

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 线性关系考察 分别精密称取 4.3 mg 芍药苷、4.2 mg 羟基芍药苷、5.3 mg 苯甲酰芍药苷、0.90 mg 四乙酰芍药苷、5.3 mg 五乙酰芍药苷、3.1 mg 五乙酰芍药内酯苷, 用 DMSO 溶解, 并配成 10 mmol/L 的储备液, 再用最后 1 次洗涤 Caco-2 细胞单层的 HBSS 配制成系列浓度 (5、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$) 的对照品溶液。将其冷冻干燥, 加入甲醇溶解并定容至 1.0 mL, 在 15 000 $\times g$ 条件下离心 10 min, 取上清液, 进样 20 μL , 按“2.4”项下条件测定。以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 对照品浓度为横坐标 (X), 得线性回归方程: 芍药苷 $Y = 6.990 X - 1.160$ ($r^2 = 0.999 0$), 羟基芍药苷 $Y = 1.563 4 X - 0.645 2$ ($r^2 = 0.999 2$), 苯甲酰芍药苷 $Y = 4.003 9 X - 0.181 6$ ($r^2 = 0.999 8$), 四乙酰芍药苷 $Y = 14.353 X - 0.428$ ($r^2 = 0.998 3$), 五乙酰芍药苷 $Y = 8.204 6 X - 2.173 7$ ($r^2 = 0.998 1$), 五乙酰芍药内酯苷 $Y = 2.854 X + 2.070$ ($r^2 = 0.999 0$), 线性范围皆为 5~100 $\mu\text{mol/L}$ 。在“2.4”项色谱条件下, 芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、四乙酰芍药苷、五乙酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷的保留时间分别为 3.554、3.518、4.492、5.282、8.762、5.865 min。

3.1.2 精密度及方法回收率试验 用 HBSS 分别将芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、四乙酰芍药苷、五乙酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷均配制成

20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的样品溶液, 冷冻干燥后加入相同体积的 MeOH, 漩涡混匀后超声溶解 15 min, 在 12 000 $\times g$ 条件下离心 10 min, 取上清液, 进样、HPLC 测定。1 d 内测定 3 次, 计算日内精密度, 结果 RSD 为 0.50%~9.54%; 1 周内测定 3 d, 计算日间精密度, RSD 为 0.26%~9.82%。从工作曲线方程求得其浓度, 以测定浓度与实际浓度相比较, 求得方法回收率为 89.38%~118.16%。

3.2 稳定性试验

HPLC 定量测定结果表明, 6 个受试化合物在 HBSS 中及 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下皆稳定; 重复冻融 3 次, 皆稳定。

3.3 Caco-2 细胞单层完整性与转运能力

在 Caco-2 细胞单层模型呈良好吸收转运的阳性对照药普萘洛尔的 P_{app} 值为 $2.46 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, 与文献报道的 $2.75 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 数量级相符^[11]; 在该细胞模型中呈难转运的阳性对照药阿替洛尔的 P_{app} 值为 $2.34 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$, 与文献报道的 $1.0 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 数量级也相符^[11]。

Caco-2 细胞在接种第 3 天, 细胞未完全汇合, 不能水解 ALP 底物对硝基苯磷酸盐生成对硝基苯酚, 表明 Caco-2 细胞无 ALP 活性。接种第 14 天后, 细胞完全汇合, 可水解对硝基苯磷酸盐生成对硝基苯酚, 具有 ALP 活性, 表明 Caco-2 细胞分化已基本完成, 可进行吸收转运实验。

3.4 吸收转运实验

6 个受试化合物浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 从 AP $\rightarrow$ BL 及从 BL $\rightarrow$ AP 的 P_{app} 值和 log D 值 (pH 7.35) 见表 1。按吸收难易的判断标准^[11], 芍药苷属于难吸收的化合物, 羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、四乙酰芍药苷、五乙酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷属于中等吸收的化合物。

3.5 吸收转运的量效和时效关系

6 个受试化合物的 $\log (P_{\text{app AP} \rightarrow \text{BL}}^* \text{MW}^{0.5})$ 值与其在 pH 7.35 的 log D 之间的关系见图 2。

受试化合物浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 每 30 min 取样, 共取到 180 min, 芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷和五乙酰芍药苷随温育时间延长, AP $\rightarrow$ BL 和 BL $\rightarrow$ AP 的转运率基本呈增加趋势。结果见图 3。

AP 端或 BL 端给药, 转运 90 min 取样, 芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、五乙酰芍药内酯苷和五乙酰芍药苷 AP $\rightarrow$ BL 或 BL $\rightarrow$ AP 的转运速率也基本呈增加趋势。结果见图 4。

表 1 6 个芍药苷类化合物在 Caco-2 细胞单层模型中双向转运 P_{app} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 P_{app} values of six tested compounds in Caco-2 cell monolayer model by bidirectional transport ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$P_{app} \text{ AP} \rightarrow \text{BL} /$ ($\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	$P_{app} \text{ BL} \rightarrow \text{AP} /$ ($\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	$P_{app} \text{ AP} \rightarrow \text{BL} /$ $P_{app} \text{ BL} \rightarrow \text{AP}$	log D (pH 7.35)
芍药苷	0.86 ± 0.13	0.51 ± 0.08	1.690	-0.75
羟基芍药苷	1.98 ± 0.14	1.85 ± 0.21	1.070	-0.92
苯甲酰芍药苷	1.57 ± 0.17	3.28 ± 0.20	0.489	0.59
四乙酰芍药苷	3.63 ± 0.23	13.9 ± 1.40	0.261	1.32
五乙酰芍药苷	4.36 ± 0.63	3.29 ± 0.56	1.330	1.75
五乙酰芍药内酯苷	8.01 ± 0.71	15.8 ± 17.0	0.507	1.67

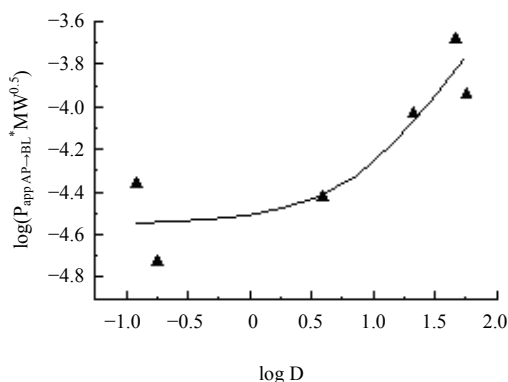


图 2 6 个芍药苷类化合物的 $\log(P_{app} \text{ AP} \rightarrow \text{BL} \cdot \text{MW}^{0.5})$ 值与其 $\log D$ 值的关系图

Fig. 2 Curve of $\log(P_{app} \text{ AP} \rightarrow \text{BL} \cdot \text{MW}^{0.5})$ and $\log D$ for six tested compounds

3.6 蓄积和回收率

无论 AP→BL 还是 BL→AP 转运, 6 个受试化合物在 Caco-2 细胞中的蓄积都非常少, 总体回收率在 90% 以上, 吸收转运过程中基本没有发生代谢转

化现象。结果见表 2。

3.7 苯甲酰芍药苷促阿替洛尔吸收实验

苯甲酰芍药苷与阿替洛尔合用, 能增加阿替洛尔的吸收性, 即苯甲酰芍药苷可能通过增加 Caco-2 细胞单层的通透性, 从而提高对阿替洛尔的吸收。结果见图 5。

4 讨论

本项研究探讨了芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷及其衍生物四乙酰芍药苷、五乙酰芍药内酯苷和五乙酰芍药苷等 6 个芍药苷类单萜糖苷在人源肠 Caco-2 细胞单层模型的双向转运。所用 Caco-2 细胞单层满足标准化实验要求^[11]。经方法学验证, 所建立样品分析方法具有良好的精密度和准确度(方法回收率), 符合 FDA 生物样品分析要求^[13]。转运和外流实验结果显示, 芍药苷的 P_{app} 值在 10^{-7} cm/s 数量级, 预测为吸收不良的化合物; 其他 5 个芍药苷类化合物的 P_{app} 值均在 10^{-6} cm/s 数量级, 预测为吸收中等的化合物。以 P_{app} 值的大小, 判断 6

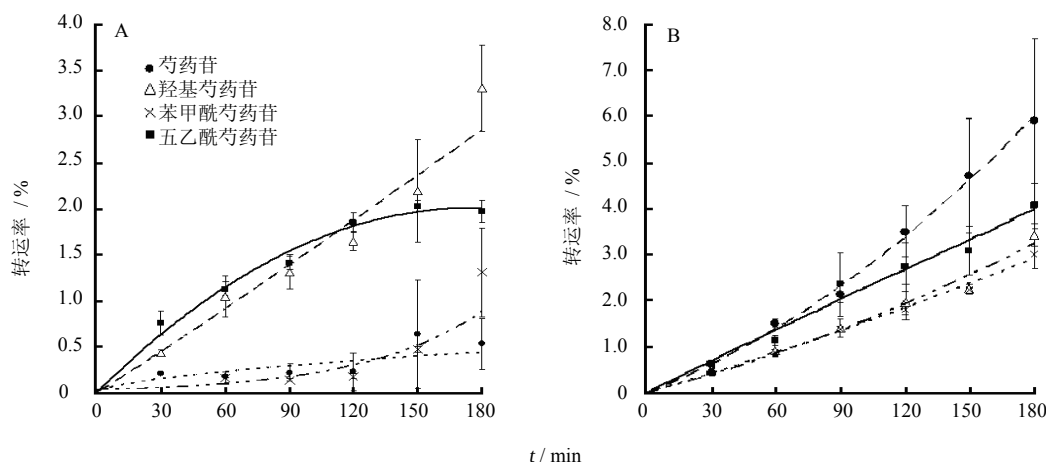


图 3 芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、五乙酰芍药苷 AP→BL (A) 和 BL→AP (B) 的转运率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Transport rates of PF, OP, BP, and PP from AP to BL sides (A) and from BL to AP sides (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

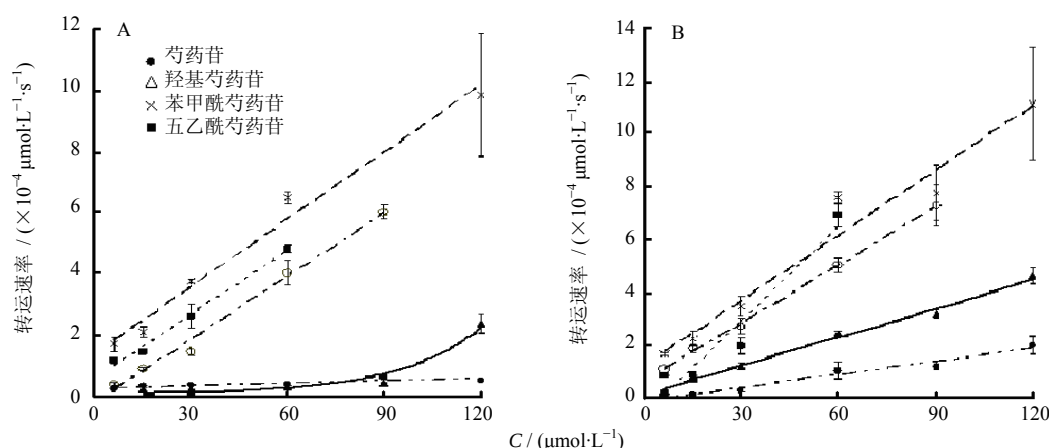


图4 羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、五乙酰芍药苷、五乙酰芍药内酯苷和芍药苷 AP→BL (A) 和 BL→AP (B) 的转运速率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Transport rates of OP, BP, PP, PA, and PF from AP to BL sides (A) and from BL to AP sides (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表2 6个芍药苷类化合物在Caco-2细胞单层中的蓄积及其回收率

Table 2 Intracellular accumulation and coefficient of recovery of six tested compounds in Caco-2 cell monolayer

化合物	AP→BL		BL→AP	
	胞内摄入 / 总回收率*		胞内摄入 / 总回收率*	
	%	%	%	%
芍药苷	10.86	106.43	6.36	101.54
羟基芍药苷	1.00	100.26	0.61	95.61
苯甲酰芍药苷	—	94.88	—	107.55
四乙酰芍药苷	5.11	88.07	1.59	111.92
五乙酰芍药苷	—	75.64	—	95.00
五乙酰芍药内酯苷	—	104.67	—	91.38

*总回收率为转运结束时在AP端和BL端溶液中的、以及蓄积在Caco-2细胞单层中的受试化合物总量占转运初始时加入受试化合物总量的百分率；“—”：未检测到

*Total recovery rate is defined as total amount of test compound of collections recovered from AP and BL chambers, and intracellular accumulation in Caco-2 cell monolayer as a percent of amount of initially given test compound after transport assays; “—”: not detected

个受试化合物经人口服吸收程度的大小顺序为五乙酰芍药内酯苷>五乙酰芍药苷>四乙酰芍药苷>羟基芍药苷>苯甲酰芍药苷>芍药苷。 $P_{app\ AP \rightarrow BL} / P_{app\ BL \rightarrow AP}$ 比值提示, 芍药苷、羟基芍药苷和五乙酰芍药苷的 $P_{app\ AP \rightarrow BL}$ 吸收转运占主导优势, 以被动扩散吸收为主; 苯甲酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷双向转运比值在 0.5 左右, 四乙酰芍药苷双向转运的为 0.26, 提示可能存在外排机制, 需要进一步验证其吸收转运机制。

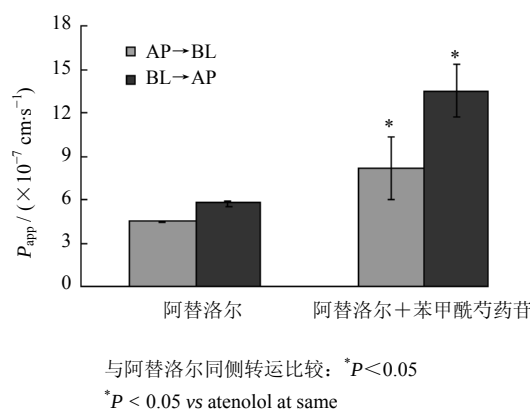


图5 阿替洛尔在苯甲酰芍药苷存在下双向转运的 P_{app} 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 P_{app} values in bidirectional transport of atenolol in presence of BP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

以芍药苷为基本母核的化合物, 经酰化成为苯甲酰芍药苷、四乙酰芍药苷、五乙酰芍药苷和五乙酰芍药内酯苷, 吸收由不良转为中等。总的趋势是芍药苷类单萜糖苷化合物酰化苷的吸收转运比相应的苷要强, 进一步说明肠对中药成分的被动扩散吸收与其极性密切相关。已知药物分子通过肠上皮细胞转运的途径主要有被动扩散和载体介导的主动转运。在被动扩散情况下, 影响药物分子扩散难易的因素包括分子的亲脂性、氢键形成能力以及分子大小等, 通常认为油/水 (O/W) 分配系数是关键因素。O/W 分配系数可通过取代基的疏水常数 (π) 计算得到, 但由于立体因素的影响, 往往缺乏准确性; 也可以通过摇瓶实验测定, 但需要花费大量的时间和样品。鉴于直接得到 O/W 分配系数比较困难,

HPLC 测定中的保留因子（即保留时间）以及通过药物分子各基团的物化参数拟合计算得出的表观 O/W 分配系数（用 $\log D$ 表示）在构效关系研究时常被用作 O/W 分配系数的间接指标，用于预测及评价药物分子的吸收。化合物的物化参数，如 $\log D$ 、 $\log P$ 、极性表面积等，已经广泛用于预测膜渗透性，本实验选用 $\log D$ 作为亲脂性参数，采用 Pallas 3.3.2.6 ADME/Tox 软件计算而得。将 $P_{app\ AP \rightarrow BL}$ 扣除相对分子质量的影响并作对数转换^[14]，以 $\log (P_{app\ AP \rightarrow BL} \cdot MW^{0.5})$ 对 $\log D$ (pH 7.35) 作图（图 2）。在 $\log D$ 值 -1.0~2.0 范围内，该曲线符合文献报道的正 S 型关系在低亲脂性区间的趋势^[15]。前期研究还发现^[16]，在中等亲脂性区间 ($\log D$ 3.0~4.0)，化合物的膜渗透性较高；而当 $\log D$ 值进一步增大至高亲脂性区间时 ($\log D$ 4.5~5.5)，化合物膜渗透性反而急剧下降，呈反 S 型关系。结合本实验的结果，认为从非亲脂性到亲脂性的整个区间，化合物的膜渗透性不是简单的随着亲脂性线性增加，而是类似于一种“正 S 型-反 S 型”曲线的关系。由此提示，在药物设计时，化合物的亲脂性并非越高其透膜吸收越好，而是有一个适中的亲脂性范围^[14]。药物的极性过大，不能穿过脂质膜；但脂溶性过强，很难从细胞另一侧的膜释放出来，进入附近的血管或淋巴管。

由吸收转运的时效关系（图 3）可见，4 个代表性化合物芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷和五乙酰芍药苷的转运率随温育时间延长而增加，温育 60~150 min，转运率近似线性增加；五乙酰芍药苷在 120 min 以后出现平台，可能是由于化合物透过造成浓度梯度减小而引起的平台区域，单浓度下这 2 个区间的非线性关系无法说明化合物转运过程中有受体饱和现象。苯甲酰芍药苷在 120 min 以后转运率曲线出现上扬趋势，可能是该化合物增加了 Caco-2 细胞单层的通透性，因而也增加了自身的吸收，苯甲酰芍药苷能够促进阿替洛尔吸收转运的实验结果进一步证实了这个推断。BL→AP 的转运优于 AP→BL（图 3），是由于在 BL→AP 端的外排过程中，不断地取走 AP 端溶液并补充空白 HBSS，保证了浓度梯度的存在，所以在 180 min 内受试化合物保持平稳速率转运，亦表明 Caco-2 细胞单层模型在实验过程中稳定性良好。图 3 中 4 个受试化合物在 0~60 min 出现的非线性区域是给药时所引起的迟滞区间，在 60~120 min，吸收和外流均呈线性增加，因此选择 90 min 为后续浓度与吸收关系实

验的取样时间点。在浓度与转运效率关系研究中，芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、五乙酰芍药内酯苷和五乙酰芍药苷随着浓度的增加，转运/外流速率皆呈线性增加，未出现饱和现象（图 4），提示它们在双向透过肠细胞时可能均无载体介导，是依靠浓度差驱动的被动扩散穿过细胞。苯甲酰芍药苷在转运实验中，浓度高于 150 $\mu\text{mol/L}$ 时，曲线出现明显上扬，显示高浓度下苯甲酰芍药苷自身的吸收速率增加，这与吸收转运实验的结果一致。

为了考察 6 个受试化合物在 Caco-2 细胞单层模型吸收转运过程中的代谢稳定性，进行了其在 Caco-2 细胞中蓄积和回收率实验，结果表明 6 个受试化合物在 Caco-2 细胞中的蓄积非常少，在吸收转运过程中基本没有发生代谢转化和/或在 Caco-2 细胞中没有蓄积。

芍药苷浓度在 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 时，在 Caco-2 细胞单层模型中属中等吸收^[17]；而本实验结果表明其属难吸收化合物，这与 ig 给予大鼠芍药苷的生物利用度（7%~21%）的结果^[18-19]基本一致。由于前一实验未对 Caco-2 细胞单层模型标准化参数进行报道，难以进行差别讨论；而 Caco-2 细胞来源可能也是一个重要因素。

近年来，白芍总苷用于抑郁症、自身免疫性等疾病治疗的研究日渐增多^[20-21]。而白芍总苷主要成分包括芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷和芍药内酯苷，白芍总苷胶囊中芍药苷、五乙酰芍药苷和芍药内酯苷的平均质量分数分别约为 38%、2%、9%^[22]。因此芍药苷吸收不良，将影响白芍总苷的生物利用度。本实验结果显示，将芍药苷衍生化为其乙酰化物，能够提高其肠吸收性，如果两者具有生物等效性，白芍总苷乙酰化物有可能成为新的先导药物。在 Caco-2 细胞单层模型中，柴胡皂苷-a 和-d 能够促进芍药苷的吸收转运^[23]；在大鼠外翻肠囊模型中，青藤碱能够显著增加芍药苷的吸收^[24]，但甘草酸降低芍药苷的吸收^[19]。这些药物的相互作用对芍药苷的科学应用是很好的启迪。苯甲酰芍药苷与阿替洛尔并用能增加阿替洛尔的吸收性，提示苯甲酰芍药苷能增加 Caco-2 细胞单层的通透性，预测其可能具有促进药物吸收从而提高其生物利用度的作用。笔者将进一步探讨芍药苷类单萜糖苷的肠吸收特性与生物活性的关系，为确定白芍、赤芍、牡丹皮的有效成分和/或效应物质^[10,25]提供肠吸收方面的科学依据。

参考文献

- [1] 杨秀伟, 白云鹏, 严仲铠. 卵叶芍药化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(4): 234-235.
- [2] He X Y, Han L, Huang X S. A new phenolic glucoside from *Paeonia lactiflora* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(2): 84-86.
- [3] 吴少华, 陈有为, 杨丽源, 等. 川赤芍的化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 13-15.
- [4] Lin H C, Ding H Y, Wu T S, et al. Monoterpene glycosides from *Paeonia suffruticosa* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 237-242.
- [5] 葛志伟, 贺庆, 林云径, 等. RP-HPLC 法测定杭白芍及其饮片芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 378-380.
- [6] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2): 100-103.
- [7] Kubo M, Matsuda H, Tani T, et al. Studies on moutan cortex (VII). Inhibitory effects on histamine release from rat peritoneal mast cells *in vitro* [J]. *Shoyakugaku Zasshi*, 1984, 38(3): 276-278.
- [8] Jeong S J, Ahn N H, Kim Y C. Hyaluronidase inhibitors from *Moutan Cortex Radicis* [J]. *Saengyak Hakhoechi*, 1998, 29(1): 44-47.
- [9] Ha D T, Trung T N, Thuan N D, et al. Lipoxigenase inhibitory and antioxidant activities of isolated compounds from *Moutan Cortex* [J]. *Nat Prod Sci*, 2010, 16(2): 68-74.
- [10] 杨秀伟. 基于体内过程的中药有效成分和有效效应物质的发现策略 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 365-370.
- [11] 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程序的建立 [J]. 中西医结合学报, 2007, 5(6): 634-641.
- [12] 杨秀伟, 张鹏, 吴琦. 羌活中二氢呋喃香豆素在人源肠 Caco-2 细胞单层模型的吸收转运研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 748-753.
- [13] US. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) & Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation [S]. 2001.
- [14] Wils P, Warnery A, Phung-Ba V, et al. High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells [J]. *J Pharm Exp Ther*, 1994, 269(2): 654-658.
- [15] Camenisch G, Folkers G, van de Waterbeemd H. Review of theoretical passive drug absorption models: historical background, recent developments and limitations [J]. *Pharm Acta Helv*, 1996, 71(5): 309-327.
- [16] Yang X W, Huang X, Ma L, et al. The intestinal permeability of neolignans from the seeds of *Myristica fragrans* in the Caco-2 cell monolayer model [J]. *Planta Med*, 2010, 76(14): 1587-1591.
- [17] 宋丽, 张宁, 徐德生. 芍药苷在 Caco-2 细胞模型中吸收机制的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 41-44.
- [18] 丁光超, 王芳芳, 叶肖栗. 芍药苷在大鼠体内的药动学和生物利用度研究 [J]. 西北药学杂志, 2009, 24(2): 124-125.
- [19] 李娜, 陈西敬, 吴磊, 等. 甘草酸对芍药苷大鼠肠吸收的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2908-2909.
- [20] 肖堃. 白芍总苷在自身免疫性疾病中的应用 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2008, 2(1): 55-60.
- [21] 郑琳颖, 潘竞锋, 吕俊华, 等. 白芍总苷药理作用研究 [J]. 广州医药, 2011, 42(3): 66-69.
- [22] 王巧, 刘荣霞, 毕开顺, 等. HPLC 法测定白芍总苷胶囊中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1630-1632.
- [23] 陈彦, 王晋艳, 辛然, 等. 柴胡皂苷对芍药苷在 Caco-2 细胞模型中吸收转运的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1850-1854.
- [24] Chan K, Liu Z Q, Jiang Z H, et al. The effects of sinomenine on intestinal absorption of paeoniflorin by the everted rat gut sac model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103(3): 425-432.
- [25] 杨秀伟. 中草药化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 961-969.