

UPLC 法检测染料木黄酮在 Caco-2 单细胞层模型上的吸收特征

刘 薇¹, 杨 珂¹, 王一飞^{1*}, 胡 明², 刘中秋²

1. 广州暨南生物医药开发研究基地有限公司, 广东 广州 510632

2. 南方医科大学 药学院, 广东 广州 510515

摘 要: **目的** 研究染料木黄酮在 Caco-2 单细胞层模型上的吸收特征。**方法** 将染料木黄酮的细胞样品经高速离心后取上清液, 以乙腈-醋酸铵水溶液为流动相, 以睾酮为内标, 采用超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 法检测。考察时间、pH 值等因素对染料木黄酮吸收的影响, 测定透过 Caco-2 单细胞层的染料木黄酮浓度并计算其表观渗透系数 (P_{app})。**结果** Caco-2 细胞对染料木黄酮的吸收在 1 h 内呈线性, 药物摄取时间定为 1 h; pH 值对染料木黄酮的吸收没有显著影响。染料木黄酮的线性范围为 0.625~40 $\mu\text{mol/L}$, 日间、日内精密度均小于 15%。 P_{app} 从基顶侧 (apical, AP) 到基底侧 (basolateral, BL) 为 $1.51 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, 从 BL 侧到 AP 侧为 $1.84 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, 其渗透系数 $P_{app}(\text{BL-AP})/P_{app}(\text{AP-BL})$ 为 1.22。**结论** 染料木黄酮在肠道的吸收主要以被动扩散为主, UPLC 检测方法简单、灵敏度高, 可用于研究染料木黄酮在 Caco-2 单细胞层模型上的吸收特征。

关键词: 染料木黄酮; 超高效液相色谱; Caco-2 单细胞层模型; 吸收

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2013) 02-0127-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.02.012

Detection of absorptive characteristics of genistein in Caco-2 cell monolayer model by UPLC

LIU Wei¹, YANG Ke¹, WANG Yi-fei¹, HU Ming², LIU Zhong-qiu²

1. Guangzhou Jinan Biomedicine Research and Development Center, Guangzhou 510632, China

2. School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.

Abstract: Objective To study the absorptive characteristics of genistein in Caco-2 cell monolayer model. **Methods** The genistein cell samples underwent high speed centrifugation, then the supernatant was collected and detected by UPLC method with acetonitrile and ammonium acetate water solution as mobile phase and testosterone as internal standard. The effects of time and pH value on genistein were investigated. The concentration of genistein across the Caco-2 cell monolayer model was determined and the apparent permeability coefficient (P_{app}) of genistein was calculated. **Results** The uptake of genistein in Caco-2 cells showed a linear range in 1 h and the uptake time was fixed at 1 h. pH value showed no significant influence on the absorption of genistein. The linear range of genistein was 0.625—40 $\mu\text{mol/L}$, with intra- and inter-day precision less than 15%. $P_{app}(\text{AP-BL})$ from apical side (AP) to basolateral side (BL) was $1.51 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, whereas $P_{app}(\text{BL-AP})$ from BL to AP was $1.84 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, and the efflux ratio of $P_{app}(\text{BL-AP})/P_{app}(\text{AP-BL})$ was 1.22. **Conclusion** Passive diffusion is the major process for the transport of genistein across the intestine. The UPLC method is simple and sensitive, and it is applicable for the study on absorptive characteristics of genistein in Caco-2 cell monolayer model.

Key words: genistein; UPLC; Caco-2 cell monolayer model; absorption

染料木黄酮 (genistein) 是大豆异黄酮的主要活性成分之一, 又称为植物雌激素^[1]。染料木黄酮对预防心血管疾病^[2]、骨质疏松^[3]、乳腺癌以及调节生殖功能^[4]等具有明显的作用。近 20 年通过对亚

洲地区的普查发现以黄豆和大豆等为主要食物的国家患以上癌症的几率比欧美人群少很多, 因此引起了欧美学者的广泛关注, 这一化合物已成为营养学家及药理学家研究的热点^[5]。

收稿日期: 2012-10-25

作者简介: 刘 薇 (1980—), 女, 讲师, 研究方向为中药有效成分的吸收和代谢研究。Tel: 13580323015 E-mail: lipmanliz@126.com

*通信作者 王一飞, 研究员。Tel: (020)85220908 E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

染料木黄酮主要通过小肠直接吸收,也有认为染料木黄酮在小肠的吸收是通过主动转运^[6]。Mancolon carcinoma cell lines (Caco-2) 细胞模型来源于人类结肠癌细胞,其结构和生化特性类似于人小肠上皮细胞,能表达小肠上皮细胞中的转运体和代谢酶^[7-8]。因此本研究采用 Caco-2 模型, UPLC 法研究其在 Caco-2 单细胞层模型上的吸收特征,为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 原料与试剂

DMEM 高糖培养基、胰蛋白-EDTA 购自美国 Gibco 公司;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、非必需氨基酸 (non-essential amino acid, NEAA) 购自美国 Hyclone 公司;谷氨酰胺、青-链霉素双抗溶液、睾丸酮、Hank's 液 (Hank's balanced salt solution, HBSS)、维拉帕米 (verapamil)、LTC-4 等购自美国 Sigma 公司;G418 购自美国 Genetec 公司;染料木黄酮 (色谱纯,质量分数>98%) 购自成都曼思特生物科技有限公司,批号 20100411。水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.2 主要设备和仪器

高效液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司), 色谱系统: Waters (premier XE, Waters Corp., Milford, MA, USA) acquity UPLC with photodiode array detector and Empower software。Gradient A10 型超纯水系统、Millicell—ERS 型跨膜电阻仪 (美国 Millipore 公司);Forma Series II 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo electron 公司);TS100—F 型倒置显微镜 (日本 Nikon 公司);Eppendorf 5810R 型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司);MS 3D 型涡旋混匀器 (德国 IKA 公司);插入式细胞培养仪 (丹麦 Nunc 公司);SI4—2 型空气摇床 (美国 Shellab 公司)。

1.3 细胞株

基因工程细胞株 Caco-2 TC7, 由美国休斯敦大学胡明教授馈赠。

2 方法

2.1 细胞培养

Caco-2 TC7 细胞培养于 DMEM 培养液中, 含 FBS 10%, 非必需氨基酸 1%, 谷氨酰胺 1% (以上均为体积分数), 青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 mg/L) 双抗液, 在 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。隔天换 1 次培养液, 当细胞长满培养瓶底 90%~95% 时, 用胰蛋白酶消化传代。种板时按 2×10^5

个/mL 接种于预先以鼠尾胶原 (4.36 mg/mL) 涂布的含有聚碳酸酯膜的内衬皿上。种板后第 2 天换液, 之后隔天换液, 19~21 d 可进行跨膜转运实验, 实验前测其跨膜电阻, 当电阻值 $>420 \Omega/\text{cm}^2$ 时, 表明细胞分化完全并已形成致密的单细胞层, 符合要求, 可用于药物转运试验。

2.2 方法学验证

2.2.1 染料木黄酮在 HBSS 溶液中标准曲线的制备 取空白 HBSS 溶液 100 μL , 精密加入不同浓度的染料木黄酮对照品溶液 100 μL , 使其终浓度分别为 0.625、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00 $\mu\text{mol/L}$, 标准溶液各取 100 μL , 加入睾丸酮乙腈溶液 50 μL , 混匀, 13 000 r/min 离心 30 min, 取上清液 10 μL 进样。

2.2.2 回收率实验 按“2.2.1”项下方法操作, 配制样品浓度分别为 1.25、10、80 $\mu\text{mol/L}$, 测定 HBSS 溶液中染料木黄酮的回收率, 每个浓度重复 6 次。

2.2.3 精密度实验 按“2.2.1”项下方法操作, 配制样品浓度分别为 1.25、10、80 $\mu\text{mol/L}$, 每天进行 6 样本测定作为日内 RSD, 连续测定 3 d, 计算日间 RSD, 测定日内和日间变异情况。

2.3 药物的摄取实验

培养良好的 Caco-2 细胞, 实验前先用 37 °C HBSS 洗涤 3 次, 最后 1 次置于 37 °C 细胞培养箱中浸泡 0.5 h, 以清除细胞表面对测定有干扰的物质。将染料木黄酮 HBSS 液 (10 $\mu\text{mol/L}$ 、pH 7.4) 加入到细胞表面, 置于 37 °C 恒温箱中吸收一定时间后, 迅速吸出药物, 并用 4 °C HBSS 迅速洗涤 3 次。超声破碎细胞, UPLC 测定药物的吸收量。该部分实验将进行时间相关性 (0、10、20、30、60 min) 和 pH 值相关性 (6.5、7.4) 的考察。

2.4 药物的跨膜转运实验

从培养箱中取出细胞, 以 37 °C HBSS 溶液轻轻荡洗细胞单层 2 次, 在内衬皿内外侧各加入 3 mL HBSS 液, 测其跨膜电阻, 若符合试验要求, 则置于空气摇床上孵育 1 h, 转速 50 r/min, 弃去 HBSS 液。药物从绒毛面 (AP) 侧至基底面 (BL) 侧 (A-B) 的转运试验操作为: 于 AP 侧加入 2.5 mL 染料木黄酮 HBSS 液 (10 $\mu\text{mol/L}$, pH 7.4), BL 侧仅加入空白 HBSS 液 (pH 7.4) 2.5 mL。置于 37 °C 转速为 50 r/min 的空气摇床上, 分别于 0、1、2、3、4 h 于 AP、BL 侧采样 0.5 mL, 并及时补充等体积空白 HBSS 液至 BL 侧, 等体积的染料木黄酮 HBSS 液

于 AP 侧, 试验平行 3 份。药物从 BL 侧至 AP 侧 (B-A) 的转运则将药物加入 BL 侧, AP 侧加入空白 HBSS 液, 其他步骤同 AP 侧至 BL 侧的转运试验操作。

2.5 细胞样品处理

取上述细胞样品 200 μL , 精密加入内标溶液 (5 $\mu\text{mol/L}$ 鞣花酮乙腈溶液) 100 μL , 涡旋混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 13 000 r/min 离心 30 min, 取上清液 10 μL 进样, 以样品与内标峰面积比进行定量分析。

2.6 细胞蛋白质测定

用 Lowry 法^[9]测定每孔细胞的蛋白浓度, 将染料木黄酮的含量用所对应的蛋白浓度进行校正, 计算每 mg 蛋白中药物的量。

2.7 色谱条件

色谱柱为 BEH C_{18} (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈(B)与 2.5 mmol/L 醋酸铵水溶液(A), pH 7.4; 梯度洗脱: 0~0.1 min, 85% A; 0.1~1.8 min, 85%~60% A; 1.8~2.2 min, 60%~40% A; 2.2~2.8 min, 40%~85% A; 2.8~3.2 min, 85% A; 体积流量 0.4 mL/min; 检测波长 254 nm; 进样体积 10 μL 。

2.8 数据处理与分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS16.0 软件进行统计分析和 t 检验。

3 结果与分析

3.1 染料木黄酮在 HBSS 溶液中的稳定性和溶解度等方法学的验证

3.1.1 标准曲线的测定 以样品浓度 (C) 为横坐标, 样品与内标峰面积之比 (R) 为纵坐标, 进行线性回归。得回归方程 $R = 0.320\ 1C - 0.023$ ($r = 0.993\ 8$)。结果表明, 染料木黄酮检测浓度在 0.625~40 $\mu\text{mol/L}$ 与样品和内标峰面积之比呈良好线性关系。最低检测限为 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.1.2 方法的专属性 在本试验条件下, UPLC 图谱见图 1, 从图谱可见细胞中的杂质不干扰染料木黄酮以及内标鞣花酮的检测, 基线噪声小, 染料木黄酮以及内标鞣花酮的保留时间分别为 2.19、2.78 min。本法具有较好的专属性。

3.1.3 方法回收率 在染料木黄酮在 HBSS 溶液中的回收率试验结果见表 1。

3.1.4 方法精密度 分别考察了日间精密度和日内精密度, 用 RSD (%) 表示, 见表 2。日内和日间精密度的 RSD 值均小于 10%, 符合生物分析方法

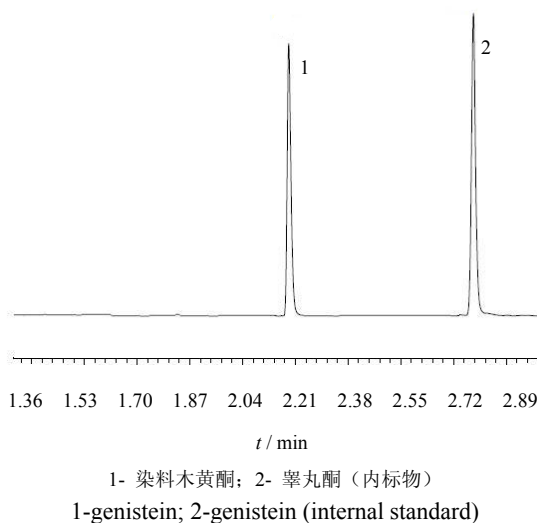


图 1 染料木黄酮及其内标物在 HBSS 溶液中的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatogram of genistein and internal standard in HBSS solution

表 1 染料木黄酮在 HBSS 溶液中的回收率试验结果 ($n=6$)

Table 1 Recovery of genistein in HBSS solution ($n=6$)

加入浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	实测浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
1.25	1.17 ± 0.13	93.60 ± 2.54	2.71
10.0	9.76 ± 0.07	97.60 ± 1.68	1.72
80.0	78.92 ± 1.24	98.65 ± 4.31	4.37

表 2 大黄素在 HBSS 中的日内精密度和日间精密度的实验结果 ($n=6$)

Table 2 Intra- and inter-day precision of emodin in HBSS solution ($n=6$)

浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	日内 RSD / %	日间 RSD / %
1.25	7.8	7.5
10.0	5.3	6.4
80.0	4.2	5.8

的要求。

3.2 时间依赖性实验

考察了染料木黄酮 (10 $\mu\text{mol/L}$) 分别在 0、10、20、30、60、120 min 时在 Caco-2 细胞中的吸收状态。结果显示 Caco-2 细胞对染料木黄酮的吸收在 0~60 min 内呈线性。根据细胞和药物的特性, 随后的各摄取实验中的吸收时间确定为 60 min, 见图 2。

3.3 pH 值相关性实验

为了确定 pH 值是否干扰染料木黄酮的吸收,

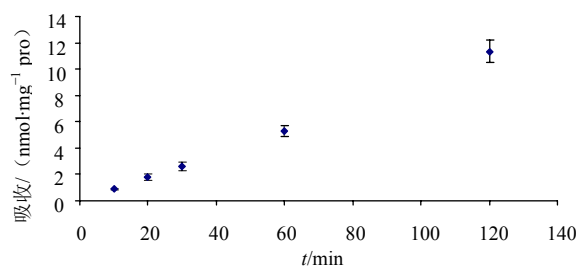


图2 染料木黄酮被 Caco-2 细胞摄取的时间进程
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Time course of genistein uptake
by Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分别调节 HBSS 的 pH 值为 6.5 和 7.4, 加药 (10 $\mu\text{mol/L}$) 后在 30 min 时 Caco-2 细胞对染料木黄酮的吸收情况。结果显示, Caco-2 细胞对染料木黄酮的吸收在介质 pH 值为 6.5 时比 pH 值为 7.4 时稍强, pH 值对染料木黄酮的吸收差异没有显著性 ($P > 0.05$)。因此, 染料木黄酮摄取实验的介质的 pH 值仍控制在常用的 7.4。

3.4 跨膜转运实验

3.4.1 细胞模型的验证 测定的 TEER 值维持在 420 Ω/cm^2 以上。表明细胞在 transwell 小室的底部融合形成了致密的单层细胞膜, 且其紧密性和转运功能良好。

3.4.2 双向转运 考察在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.4 的 HBSS 中, 药物跨膜转运的特性。染料木黄酮从 AP 侧到 BL 侧及从 BL 侧到 AP 侧的转运率随时间变化的情况见图 3, 实验结果显示, 染料木黄酮双向跨膜转运速率均随时间而增加, 且从 BL 侧到 AP 侧的转运强于从 AP 侧到 BL 侧的转运。依据公式分别计算表观透过系数在染料木黄酮浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,

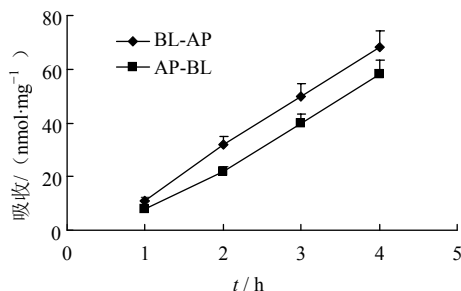


图3 染料木黄酮 (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 Caco-2 细胞单层的双向跨膜转运 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Bidirectional transmembrane transport
of genistein (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) across Caco-2
cell monolayer ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

从 AP 侧至 BL 侧的 P_{app} 为 $1.51 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, 从 BL 侧到 AP 侧为 $1.84 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, $P_{\text{app}}(\text{BL-AP})/P_{\text{app}}(\text{AP-BL})$ 为 1.22。

4 讨论

关于染料木黄酮在肠道的吸收机制研究国内尚未见详细文献报道, 对其在肠道的吸收和代谢会出现的一系列的情况也研究的并不深入, 笔者通过利用 Caco-2 细胞模型首先对染料木黄酮摄取的最佳时间进行了分析, 药物的摄取时间只能确定在对其有线性吸收的范围内, 才能保证有最佳的吸收速率。在时间-摄取进程实验中, 染料木黄酮的摄取在 60 min 内呈线性, 摄取时间 10、30 min 均可选择, 综合细胞特性、药物性质等因素, 本实验确定染料木黄酮的最佳摄取时间为 60 min。

染料木黄酮的检测方法, 文献多以 HPLC-UV 法为主, 这些方法进样速度慢、耗时、耗人力物力, 灵敏度不高, 分离度不强, 无法满足细胞转运研究定量的要求。因此, 笔者建立 UPLC 法测定染料木黄酮及其代谢产物, 在流动相中添加 2.5 mmol/L 醋酸铵, 能够改善样品的峰形、提高进样的响应值和重现性。

本研究采用 Caco-2 单细胞层模型进一步研究染料木黄酮透过单细胞层的双向转运特征, 结果显示, 药物从 AP 侧至 BL 侧以及 BL 侧至 AP 侧的转运量均随时间的增加呈线性升高。其双向转运 P_{app} 值均在 10^{-5} 数量级, 表明其经肠道吸收较好。 $P_{\text{app}}(\text{BL-AP})/P_{\text{app}}(\text{AP-BL})$ 为 1.22, 外排略大于吸收, 提示染料木黄酮的吸收以被动扩散为主。而 A 面和 B 面观察到的染料木黄酮的代谢产物则需要外排蛋白的作用才能排出, 因此染料木黄酮的代谢产物受外排蛋白的影响。在肠道中存在 P-糖蛋白 (P-gp)、多药抗药性相关蛋白 (MRPs) 等外排转运蛋白, 这些转运蛋白可以将进入 BL 侧的药物外排至 AP 侧, 使吸收减少^[10]。为考察染料木黄酮的转运是否有外排转运蛋白参与, 本研究选用较低浓度的染料木黄酮 (10 $\mu\text{mol/L}$) 为研究对象, 考察其在 Caco-2 单细胞层模型上的双向转运特征, 避免了可能存在的外排蛋白被饱和现象的影响。结果表明, 染料木黄酮外排略大于吸收, 是否由外排转运蛋白的参与, 且哪种转运蛋白主导了染料木黄酮代谢物的外排, 有待继续深入研究。

参考文献

- [1] Binhgma S A, Atkinson C, Liggis J, *et al.* Phytoestrogens: where are we now [J]. *Br J Nutr*, 1998, 79(5): 393-406.

- [2] Heortg M G, Feskens E J, Klomhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study [J]. *Lancet*, 1993, 3429(8878): 1007-1011.
- [3] Ajimnadi B H, Smit B J. Soy isoflavones' osteoprotective role in postmenopausal women: Mechanism of action [J]. *J Nutr Biochem*, 2002, 13(3): 130-137.
- [4] Mithell J H, Cwaoood E, Knnibugrh D, *et al.* Effect of a Phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males [J]. *Clin Sci*, 2001, 1006(6): 659-659.
- [5] Misar R R, Hursting S D, Pekrins S N, *et al.* Genotoxicity and carcinogenicity studies of soy isoflavones [J]. *Int J Toxicol*, 2002, 21(4): 277-285.
- [6] Seothell K D, Zimmer-Nechemias L, Cai J, *et al.* Exposure of infants to Phyto-estrogens from soy-based infant formula [J]. *Lancet*, 1997, 350(9097): 23-27.
- [7] Shsh P, Jorgani V, Bagchi T, *et al.* Role of Caco-2 cell monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(1): 186-189.
- [8] 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.
- [9] Lampern A, Bader A, Bestmann T, *et al.* Catalytic activities, protein- and mRNA-expression of cytochrome P450 isoenzymes in intestinal cell lines [J]. *Xenobiotica*, 1998, 28(5): 429-441.
- [10] Patel J, Buddha B, Dey S, *et al.* *In vitro* interaction of the HIV protease inhibitor ritonavir with herbal constituents: changes in P-gp and CYP3A4 activity [J]. *Am J Ther*, 2004, 11(4): 262-277.

国家食品药品监督管理局提醒关注碘普罗胺注射液的严重过敏反应

碘普罗胺注射液是一种非离子型低渗性造影剂，适用于血管造影、脑和腹部 CT 扫描以及尿道造影。2012 年，国家药品不良反应监测数据库共收到怀疑为碘普罗胺注射液的不良反应/事件报告 709 例，其中严重报告 157 例。严重不良反应/事件累及系统排名前 3 位的依次为全身性损害、呼吸系统损害、心血管系统损害。碘普罗胺注射液严重病例中，严重过敏反应突出，主要表现为过敏性休克（39.49%）、喉水肿（5.15%）、过敏样反应（4.72%）和呼吸困难（4.72%）等。

国家药品不良反应监测数据库资料显示，碘普罗胺注射液的严重过敏反应具有一定的特点，具体表现为：1. 发生不良反应与用药时间间隔较短。157 例严重报告中，94.27% 的病例用药与不良反应发生间隔在 1 h 以内，提示碘普罗胺注射液严重不良反应的发生比较迅速。2. 碘过敏试验假阴性。157 例严重报告中，有 9.74% 的病例明确标注碘过敏试验阴性后用药发生严重不良反应，提示部分患者存在碘过敏试验假阴性的情况。

鉴于碘普罗胺注射液易发生严重过敏反应，建议医务人员在用药前应详细询问患者的过敏史，对本品所含成份过敏者禁用，过敏体质者慎用。在给药期间应对患者密切观察，一旦出现过敏症状，则应立即停药并进行救治。医务人员应严格掌握碘普罗胺注射液的适应症、禁忌症及使用注意事项，权衡利弊，谨慎用药；应加强发生不良反应后的快速抢救技能、抢救流程的培训，配备抢救设备及药品，争取抢救时间，避免严重后果的发生。建议生产企业更新产品说明书，完善 [禁忌]、[警告]、[注意事项] 等安全性内容，强调使用风险。建议生产企业加强相关医疗机构关于碘普罗胺注射液安全性问题以及针对严重过敏反应抢救技能的宣传和培训工作，减少严重不良后果的发生。

（本刊讯）