

## 滨蒿内酯在 BeWo 细胞模型上的摄取转运特性分析

曹慧敏<sup>1,2</sup>, 董迎<sup>1,2</sup>, 狄留庆<sup>1,2</sup>, 赵晓莉<sup>1,2\*</sup>

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

**摘要:** 目的 研究茵陈活性成分滨蒿内酯在 BeWo 细胞模型上的跨胎盘摄取转运特性。方法 建立滨蒿内酯及内标物质双氯芬酸钠在细胞裂解液、Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 中的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 分析方法, 并进行了方法学验证; MTT 法考察滨蒿内酯 (1、5、20、50、100、200、400、800、1 000  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 4 h 对 BeWo 细胞活性的影响; 应用建立的 UPLC-MS/MS 法考察给药时间、药物浓度、温度、pH 值、转运蛋白抑制剂对 BeWo 细胞摄取滨蒿内酯的影响; 以 BeWo 单层细胞为体外模型, 应用 Transwell 孔板, 考察给药时间、药物浓度、转运蛋白抑制剂对滨蒿内酯的跨胎盘转运的影响。结果 建立的 UPLC-MS/MS 分析方法专属性强, 灵敏度高, 重现性好, 提取回收率、基质效应和样品稳定性等均符合生物样品药物含量的分析测定要求。滨蒿内酯在浓度为 1~800  $\mu\text{mol/L}$  时对 BeWo 细胞无明显毒性作用。滨蒿内酯在 BeWo 细胞上的摄取随时间和浓度变化呈线性增加, 在所选取的浓度范围内无饱和趋势, 不符合米氏方程; 滨蒿内酯在 BeWo 细胞上的摄取量在 4  $^{\circ}\text{C}$  和 37  $^{\circ}\text{C}$  条件无显著性差异, 表明摄取转运过程不受温度的影响; 与生理条件下 (pH 7.4) 比较, 在酸性条件下 (pH 5.0 或 6.5), 摄取量略有降低, 无显著性差异; 碱性条件下 (pH 8.6), 摄取量显著减少 ( $P < 0.001$ ); 滨蒿内酯在细胞膜刷状缘侧的摄取不受各类膜转运蛋白底物或抑制剂的影响。滨蒿内酯在 BeWo 细胞上的 2 个方向的转运速率无显著差异; 二者表观渗透系数 ( $P_{\text{app}}$ ) 值极为接近, 药物外排率 ( $P_{\text{ratio}}$ ) 约为 1; 在考察的浓度范围 (5、50、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ ) 内, 滨蒿内酯在母-胎和胎-母 2 个方向上转运均呈线性增加, 且无饱和趋势; 滨蒿内酯在 BeWo 单层细胞的转运不受各类膜转运蛋白底物或抑制剂的影响。结论 滨蒿内酯在 BeWo 细胞上的摄取及跨膜转运机制为非载体蛋白介导的被动转运。

**关键词:** 茵陈; 滨蒿内酯; 妊娠期胆汁淤积; BeWo 细胞; 胎盘屏障; 摄取; 被动转运; 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS);

中图分类号: R945

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2021) 06-1181-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.06.007

## Uptake and transport characteristics analysis of scoparolide in BeWo cell model

CAO Huimin<sup>1,2</sup>, DONG Ying<sup>1,2</sup>, DI Liuqing<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiaoli<sup>1,2</sup>

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

**Abstract: Objective** To explore the transplacental uptake and transport properties of scoparone, the active ingredient of Artemisiae Scopariae Herba, in BeWo cell model. **Methods** A method for the determination of scoparolide and diclofenac sodium in cell lysate and Hank's balanced salt solution (HBSS) by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established and validated; MTT method was used to determine the effect of scoparolide (1, 5, 20, 50, 100, 200, 400, 800 and 1 000)  $\mu\text{mol/L}$  on activity of BeWo cells after 4 h treatment. The effects of administration time, drug concentration, temperature, pH and transporter inhibitor on the uptake of scoparolide by BeWo cells were investigated by UPLC-MS/MS. The Transwell plate was used to investigate the effects of administration time, drug concentration and transporter inhibitor on the transplacental transport of scoparolide. **Results** The established UPLC-MS/MS method has strong specificity, high sensitivity and good reproducibility. The

收稿日期: 2021-01-28

基金项目: 江苏省研究生创新实践项目 (SJCX20-0557)

第一作者: 曹慧敏, 女, 硕士研究生。Tel: 18260027653 E-mail: huimincao@126.com

\*通信作者: 赵晓莉, 女, 博士, 副研究员。Tel: 13851436150 E-mail: xlee\_zhao@163.com

extraction recovery, matrix effect and sample stability all meet the requirements for the determination of drug content in biological samples. When the concentration of scoparolide was 1 - 800  $\mu\text{mol/L}$ , there was no obvious toxic effect on BeWo cells. The uptake of scoparolide in BeWo cells increased linearly with time and concentration, and there was no saturation trend in the selected concentration range, which did not conform to Michaelis Menten equation. There was no significant difference in the uptake of scoparolide in BeWo cells at 4  $^{\circ}\text{C}$  and 37  $^{\circ}\text{C}$ , indicating that the uptake and transport of scoparolide were not affected by temperature; Compared with physiological conditions (pH 7.4), the intake decreased slightly under acid condition (pH 5.0 or 6.5), and there was no significant difference. Under the alkaline condition (pH 8.6), the uptake was significantly reduced ( $P < 0.001$ ). The uptake of scoparolide on the brush edge of cell membrane was not affected by various membrane transporter substrates or inhibitors. There was no significant difference in the transport rate of scoparolide between the two directions in BeWo cells; The apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) of the two drugs were very close, and the drug efflux rate (pratio) was about 1; In the investigated concentration range (5, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{mol/L}$ ), the transport of scoparolide increased linearly in both maternal fetal and fetal maternal directions, and there was no saturation trend. The transport of scoparolide in BeWo monolayer cells was not affected by various membrane transporter substrates or inhibitors. **Conclusions** The uptake and transmembrane transport of scoparone in BeWo cells is probably passive diffusion.

**Key words:** *Artemisiae Scopariae Herba*; scoparone; intrahepatic cholestasis of pregnancy; BeWo cells; placental barrier; uptake; passive diffusion; Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS);

茵陈为菊科植物滨蒿 *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. 或茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 的干燥地上部分, 具有清利湿热、利胆退黄的功效<sup>[1]</sup>, 主要分布在中国、日本、朝鲜等国家, 临床具有清热安胎的功效, 为治疗妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)的常用药, 并取得较好疗效<sup>[2]</sup>。滨蒿内酯作为茵陈中的有效单体, 被认为是茵陈发挥利胆退黄治疗妊娠胆汁淤积的主要成分<sup>[3]</sup>。但是, 妊娠期间服药是否会使得滨蒿内酯穿过胎盘屏障进入胎儿循环对胎儿产生影响, 及穿过胎盘屏障的机制仍然未知。

BeWo细胞是来源于绒毛膜癌的原始人类滋养层细胞, 具有与人类胎盘滋养层细胞相似的结构、酶和内分泌功能<sup>[4]</sup>。其上分布着溶质载体(SLC)转运体和ATP结合盒(ABC)转运体等多种转运蛋白, 介导着母体-胎儿间的物质交换, 已被广泛应用于模拟胎盘屏障, 研究药物在胎盘屏障的摄取、转运<sup>[5]</sup>, 指导临床合理用药。

为确保滨蒿内酯在妊娠期的用药安全, 本实验通过建立细胞样品中滨蒿内酯的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法, 采用BeWo细胞单层转运模型模拟胎盘屏障研究滨蒿内酯的摄取转运特性, 预测妊娠期用药风险。

## 1 材料

### 1.1 细胞

BeWo细胞, 购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。

### 1.2 药物与主要试剂

滨蒿内酯(批号B20110)、双氯芬酸钠(批号

B25406)、磺溴酚酞钠(BSP, 批号A043878)、非索非那定(批号S26614)、胆酸(批号S20274-100 mg)、利福霉素(批号S31663)、四乙基氯化铵TEAC(批号S30318)、左旋肉碱(批号S13031)、根皮苷(批号S20449)、L-乳酸(批号S11076)、苯甲酸(批号S31662)、4-氨基马尿酸钠(批号S20203)、甲氨蝶呤(批号S20274)、丙磺舒(批号S24877)、维拉帕米(批号S17125-1g)、环孢素A(批号S17068)、米托蒽醌(批号S26889)、槲皮素(批号B20527)均购自上海源叶生物科技公司, 且质量分数 $\geq 98\%$ ; DIDs(批号D3514)、MK571(批号M7571-25 mg)、Ko143(批号K2144-1 mg)、Hank's平衡盐溶液(HBSS, 批号H8264), 购自SIGMA公司, 质量分数 $\geq 95\%$ ; 普伐他汀(质量分数 $\geq 98\%$ , 批号P107388-25 mg)、MPP<sup>+</sup> iodide(质量分数 $\geq 98\%$ , 批号H1830044-100 mg), Aladin公司; 倍他米隆(质量分数 $\geq 98\%$ , 批号B0099, 上海TCI化成工业有限公司); 地高辛(质量分数 $\geq 96\%$ , 批号D1828-100 mg, Tokyo chemical industry); F-12K细胞培养液(批号21127-022)、胎牛血清(FBS, 批号10099-141), 美国Gibco公司; 青霉素-链霉素溶液(批号SV30010-100 mL)、0.25%胰酶-EDTA(批号SH30042.01-100 mL), 美国Hyclone公司; 噻唑蓝(批号SBJ-SS2152; 南京森贝伽生物科技有限公司); BCA蛋白定量测定试剂盒(货号P0009)、免疫沉淀(immunol precipitation, IP)细胞裂解液(批号P0013-100 mL), 上海碧云天生物技术有限公司; 水为超纯水; 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯。

### 1.3 主要仪器

超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(UPLC/ZEVO-TQD/QCA138液质联用仪)(Acquity系统,美国Waters公司),配以Masslynx V4.1工作站、在线脱气装置、二元梯度泵、自动进样装置、柱温箱和PDA检测器等;Bio-Tek ELX800多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);Millicell-ERS2电阻仪(美国Millicell公司);IL-196CI二氧化碳培养箱(上海施都凯仪器设备有限公司);TS100-F倒置显微镜(日本NIKON公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 滨蒿内酯检测方法的建立

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相为0.2%甲酸水(A)-甲醇(B);梯度洗脱程序为:0~1 min,85%~15%A;1~3 min,15%A;3.0~3.5 min,15%~85%A;3.5~5.0 min,85%A;体积流量为0.2 mL/min;柱温为40℃;进样量为10 μL。

**2.1.2 质谱条件** 电离方式为电喷雾离子源正离子检测(ESI<sup>+</sup>),扫描方式为多反应离子监测模式(MRM)。主要质谱参数为:毛细管电压2.42 kV,离子源温度150℃,锥孔气体体积流量50 L/h,脱溶剂温度400℃,脱溶剂气体体积流量800 L/h。以双氯芬酸钠作为内标物质,滨蒿内酯锥孔电压60 V,碰撞电压22 V;双氯芬酸钠锥孔电压18 V,碰撞电压20 V。用于定量分析的离子对分别为  $m/z$  206.97→151.03(滨蒿内酯)、 $m/z$  295.84→214.81(双

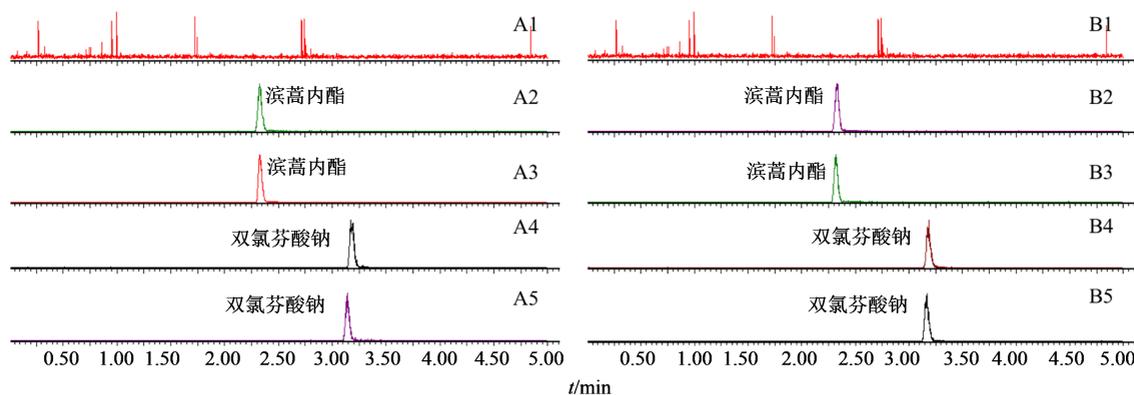
氯芬酸钠,内标)。

**2.1.3 溶液的配制** 精密称取滨蒿内酯对照品适量,加甲醇稀释制成0.25 mg/mL的对照品储备液;精密称取内标双氯芬酸钠10.0 mg,用甲醇稀释成质量浓度为2.0 mg/mL的内标储备液,临用前加甲醇稀释成200 ng/mL的内标溶液。

**2.1.4 样品处理** 取细胞裂解样品或HBSS转运样品适量,分别加入等体积甲醇溶液和等体积的双氯芬酸钠甲醇溶液(200 ng/mL,内标),涡旋混匀,4℃、13 000 r/min离心10 min,吸取上清液10 μL注入UPLC-MS/MS系统检测。

**2.1.5 专属性考察** 分别取空白IP细胞裂解液或空白HBSS、加入内标的空白IP细胞裂解液或空白HBSS、加入滨蒿内酯的空白IP细胞裂解液或空白HBSS、加入内标的含药IP细胞裂解液样品或HBSS样品,按照“2.1.4”项下的样品处理方法处理后进行液质检测。结果见图1,IP细胞裂解液或HBSS液对滨蒿内酯或内标双氯芬酸钠的测定均无干扰,二者出峰时间适中,专属性良好。

**2.1.6 标准曲线和线性范围** 取对照品储备液适量,用空白IP细胞裂解液或空白HBSS逐级稀释配制9.766~5 000 ng/mL的10个不同质量浓度的对照品溶液,按照“2.1.4”项下方法处理。以滨蒿内酯的质量浓度为横坐标,滨蒿内酯与内标双氯芬酸钠峰面积比值为纵坐标,用最小二乘法进行线性回归,绘制标准曲线。滨蒿内酯质量浓度为9.766~5 000 ng/mL,在IP细胞裂解液中,回归方程为  $Y=4.3368 X+8$



空白IP细胞裂解液(A1);加入滨蒿内酯的空白IP细胞裂解液(A2);细胞摄取实验IP细胞裂解液样品(A3);加入内标的空白IP细胞裂解液(A4);加入内标的含药IP细胞裂解液(A5);空白HBSS(B1);加入滨蒿内酯的空白HBSS(B2);HBSS样品(B3);加入内标的空白HBSS(B4);加入内标的HBSS样品(B5)

blank IP cell lysis buffer (A1); cell lysis buffer spiked with references of scopolamine (A2); cell sample in drug uptake test (A3); cell lysis buffer spiked with internal standard (A4); cell sample in drug uptake test (A5); blank HBSS (B1); scopolamine in blank HBSS (B2); transporter sample (B3); diclofenac sodium in blank HBSS solution (B4); diclofenac sodium in transporter sample (B5)

图1 专属性试验色谱图

Fig. 1 Specific test chromatograms

0.0974,  $r=0.9998$ ; 在 HBSS 转运液中, 回归方程为  $Y=6.5952X+0.7819$ ,  $r=0.9960$ 。在 2 种基质中均线性关系良好。

**2.1.7 精密度与准确度试验** 取“2.1.6”项中质量浓度分别为 19.53、312.50、5 000.00 ng/mL 的对照品溶液作为质控样品, 按照“2.1.4”项下方法处理后于 24 h 内平行进样 6 次, 计算日内精密度; 同法连续测量 3 d, 计算日间精密度; 将进样后所得峰面积与内标峰面积的比值代入相同基质对应的标准曲线中, 所得质量浓度与实际质量浓度的比值即为准确度。实验结果见表 1, 结果表明该方法精密度、准确度良好。

表 1 滨蒿内酯在 2 种基质中的准确度和精密度 ( $n=6$ )

Table 1 Accuracy and precision for analysis of scoarone ( $n=6$ )

基质	质量浓度/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	准确度/%	精密度 RSD/%	
			日内	日间
IP 裂解液	19.53	95.62±7.3	7.62	9.05
	312.50	106.6±5.4	5.08	4.98
	5 000.00	89.00±6.2	7.01	5.08
HBSS	19.53	96.16±9.3	9.66	10.35
	312.50	114.0±9.2	8.03	5.81
	5 000.00	97.41±2.9	2.87	3.57

**2.1.8 提取回收率与基质效应考察** 取空白 IP 细胞裂解液或 HBSS 转运液适量, 加滨蒿内酯配成质量浓度分别为 19.53、312.50、5 000.00 ng/mL 的对照品溶液, 按照“2.1.4”项下操作进行处理, 记作样品 A; 取空白 IP 细胞裂解液或 HBSS 转运液, 经“2.1.4”样品处理方法处理后, 再加入滨蒿内酯对照品储备液配制成质量浓度为 19.53、312.50、5 000.00 ng/mL 的溶液, 作为样品 B; 同时精密吸取滨蒿内酯对照品储备液适量, 用初始流动相稀释至质量浓度为 19.53、312.50、5 000.00 ng/mL, 记为样品 C。进样测定, 以

同一浓度样品 A 中滨蒿内酯测得峰面积与样品 B 峰面积之比计算提取回收率; 以样品 B 中滨蒿内酯测得峰面积与样品 C 峰面积之比计算基质效应。结果见表 2, 方法回收率良好, 无明显基质效应。

表 2 滨蒿内酯在 2 种基质中的提取回收率和基质效应 ( $n=6$ )

Table 2 Extraction recovery and matrix effect for analysis of scoarone in two kinds of matrix ( $n=6$ )

基质	质量浓度/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	提取回收率		基质效应(%)	
		均值	RSD/%	均值	RSD/%
IP 裂解液	19.53	101.0±2.1	12.97	110.32±10.7	12.87
	312.50	97.69±5.3	6.97	102.17±7.5	9.61
	5 000.00	89.87±4.2	2.19	98.59±3.7	6.74
HBSS	19.53	92.70±3.8	10.17	103.94±9.4	9.98
	312.50	109.3±8.2	10.27	100.89±4.8	3.87
	5 000.00	100.5±7.5	5.25	100.45±4.4	5.81

**2.1.9 稳定性考察** 取空白 IP 细胞裂解液或 HBSS 转运液适量, 加滨蒿内酯配成质量浓度分别为 19.53、312.50、5 000.00 ng/mL 的对照品溶液, 每一浓度平行 6 份, 按照“2.1.4”项下方法处理后室温放置 12 h, -20 °C 冷冻环境下存放 30 d, 3 次冷冻-解冻循环, 进样测定, 以处理后峰面积与初始峰面积比值计算稳定性。结果见表 3, 滨蒿内酯在 2 种基质中均能保证良好的稳定性。

**2.2 滨蒿内酯在 BeWo 细胞的摄取转运研究**

**2.2.1 溶液的配制** 各药物先经 DMSO 溶解得到储备液, 临用前再用空白 HBSS 或基础培养基稀释为不同浓度, 且 DMSO 体积分数低于 0.5%。具体终浓度见表 4。

**2.2.2 MTT 法评价 4 h 内滨蒿内酯对 BeWo 细胞的毒性作用** BeWo 细胞培养在含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 F-12K 培养基中。取处于对数生长期的 BeWo 细胞, 经 0.25% EDTA-胰酶消化离心后, 调整密度至  $5 \times 10^4$  /mL, 每

表 3 滨蒿内酯在 2 种基质中的稳定性 ( $n=6$ )

Table 3 Stability for analysis of scoarone in two kinds of matrix ( $n=6$ )

基质	质量浓度/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	室温放置 12 h		-80 °C 放置 30 d		反复冻融 3 次	
		稳定性/%	RSD/%	稳定性/%	RSD/%	稳定性/%	RSD/%
IP 裂解液	19.53	105.5±4.6	4.39	106.0±13.2	12.43	99.0±7.3	7.36
	312.50	106.8±8.9	8.31	110.2±6.6	6.03	114.9±3.4	2.95
	5 000.00	94.4±3.0	3.21	100.5±2.2	2.14	102.6±5.2	5.09
HBSS	19.53	101.3±8.3	8.20	88.6±5.3	5.94	98.7±4.4	4.46
	312.50	101.7±3.6	3.53	109.0±0.5	0.46	103.0±5.8	5.66
	5 000.00	98.6±5.2	5.31	87.61±3.9	4.44	83.5±5.5	6.64

表4 摄取型转运体抑制剂配制浓度

类型	抑制剂	浓度
有机阴离子转运多肽(OATP)抑制剂	DIDS	1 mmol·L <sup>-1</sup>
	BSP	200 μmol·L <sup>-1</sup>
	非索非那定	1 mmol·L <sup>-1</sup>
	胆酸	100 μmol·L <sup>-1</sup>
	利福霉素	100 μmol·L <sup>-1</sup>
肉碱/有机阳离子转运体(OCT/OCTN)抑制剂	四乙基氯化铵	2 mmol·L <sup>-1</sup>
	左旋肉碱	100 μmol·L <sup>-1</sup>
浓度型核苷转运体(CNT)抑制剂	根皮苷	200 μmol·L <sup>-1</sup>
一元羧酸转运体(MCTs)抑制剂	L-乳酸	5 mmol·L <sup>-1</sup>
	苯甲酸	5 mmol·L <sup>-1</sup>
有机阴离子转运体(OAT)抑制剂	4-氨基马尿酸钠	2 mmol·L <sup>-1</sup>
	甲氨蝶呤	100 μmol·L <sup>-1</sup>
	普伐他汀	200 μmol·L <sup>-1</sup>
	倍他米隆	100 μmol·L <sup>-1</sup>
	丙磺舒	2 mmol·L <sup>-1</sup>
P-糖蛋白(P-gp)转运体抑制剂	维拉帕米	100 μmol·L <sup>-1</sup>
	环孢素A	100 μmol·L <sup>-1</sup>
	地高辛	100 μmol·L <sup>-1</sup>
乳腺癌耐药蛋白(BCRP)转运体抑制剂	Ko143	25 μmol·L <sup>-1</sup>
	米托蒽醌	10 μmol·L <sup>-1</sup>
多药耐药相关蛋白2(MRP2)转运体抑制剂	MK571	50 μmol·L <sup>-1</sup>
	槲皮素	50 μmol·L <sup>-1</sup>

孔200 μL接种于96孔细胞培养板中,置37℃恒温二氧化碳培养箱中培养24 h后,加入滨蒿内酯质量浓度分别为1、5、20、50、100、200、400、800和1 000 μmol/L的培养基,对照组加入基础培养基,每个浓度设置6个复孔。于二氧化碳培养箱中培养4 h后每孔加入5 mg/mL的MTT溶液20 μL继续培养4 h。吸弃孔内培养液后每孔加入DMSO 200 μL,低速振荡10 min,用酶标仪在波长490 nm条件下读取各孔吸光度(A)值,计算细胞存活率。

细胞存活率=(给药组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)

结果如图2所示,使用1~800 μmol/L的滨蒿内酯系列药物溶液孵育细胞4 h,测得细胞存活率均在90%以上,表明在所选取的浓度范围内均无明显的细胞毒性作用,不会对BeWo细胞活性或生长状态产生影响,此浓度范围可以用于进行摄取及转运实验。

### 2.2.3 细胞摄取特性考察

(1)浓度及时间相关性 取处于对数生长期的BeWo细胞接种在24孔培养板3~4 d,使得细胞融

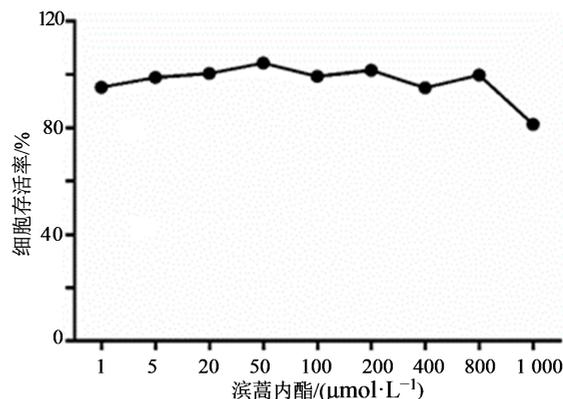


图2 滨蒿内酯对BeWo细胞存活率的影响

Fig. 2 Toxic influence of scopolamine on BeWo cells

合度达到85%以上,用HBSS清洗2~3次并于37℃孵育20 min,而后弃去孵育液,分别加入pH 7.4的HBSS配制的浓度为5、50、100、200、400、800 μmol/L的滨蒿内酯溶液作摄取液,于37℃摄取30 min,依次吸弃药物摄取液,加入4℃预冷HBSS溶液终止摄取并清洗细胞2~3次,每孔加入50 μL的IP细胞裂解液裂解细胞,取5 μL进行BCA蛋白定量测定,剩余样品经“2.1.4”项下样品处理方法处理后进行UPLC-MS/MS测定,细胞中药物摄取量表示为样品中药物浓度(μmol)/样品蛋白含量(mg)。同法使用pH 7.4的HBSS配制的400 μmol/L的滨蒿内酯溶液作为摄取液,于37℃孵育,考察不同摄取时间(1、3、5、15、30、60 min)药物的吸收量。实验数据通过GraphPad Prime5.0按米氏方程进行拟合<sup>[4]</sup>。

结果如图3所示,滨蒿内酯在BeWo细胞上的摄取随时间和浓度变化呈线性增加,在所选取的浓度范围内无饱和趋势,不符合米氏方程。

(2)温度相关性 参考(1)中操作方法,分别在4、37℃条件下研究使用pH 7.4的HBSS配制的400、800 μmol/L的滨蒿内酯溶液在30 min时的摄取情况,4℃实验于冰箱中进行,37℃实验于恒温振荡器上进行。结果见图4,2种温度条件下,滨蒿内酯摄取量无显著差异,表明不同浓度滨蒿内酯的摄取不受温度的干扰。

(3)pH值相关性 参考(1)中操作方法,分别用不同pH的HBSS(pH 5.0、6.5、7.4、8.6)于37℃清洗并孵育细胞,加入相应pH的HBSS液配制的滨蒿内酯摄取液摄取30 min,计算相对摄取量,即各pH条件下摄取量相对pH 7.4条件下的比值。结果见图5,与生理条件下(pH 7.4)比较,在酸性条件下(pH 5.0或6.5),摄取量略有降低,无显著性差异;碱性条

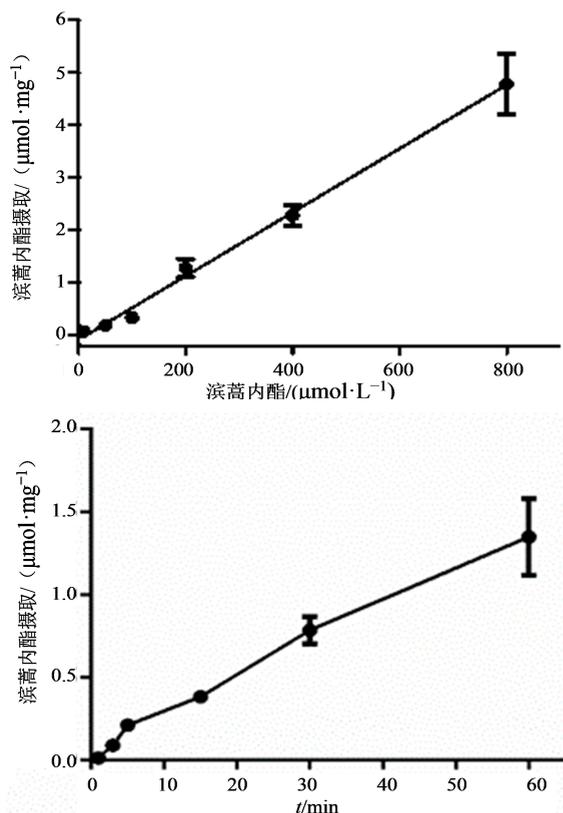


图3 滨蒿内酯在 BeWo 细胞上的浓度-时间相关性摄取 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )  
Fig. 3 Concentration or time-dependent uptake of scoparone in BeWo cells ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

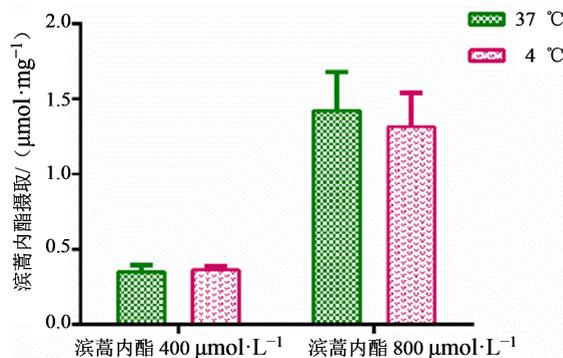


图4 温度对 BeWo 细胞摄取滨蒿内酯的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )  
Fig. 4 Effects of temperature on uptake of scoparone in BeWo cells ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

件下 (pH 8.6), 摄取量显著减少 ( $P < 0.001$ )。

(4) 转运蛋白抑制剂对摄取行为的影响按“2.2.1”项方法配制多种转运体抑制剂孵育液, 并用含抑制剂孵育液分别配制滨蒿内酯摄取液。取符合摄取实验要求的细胞培养板, 同(1)中方法用预热 HBSS 液清洗后, 加入已配制的转运体抑制剂孵育液孵育细胞 20 min (对照组不加抑制剂), 以含有 400 μmol/L 滨蒿内酯及各抑制剂的摄取液代替

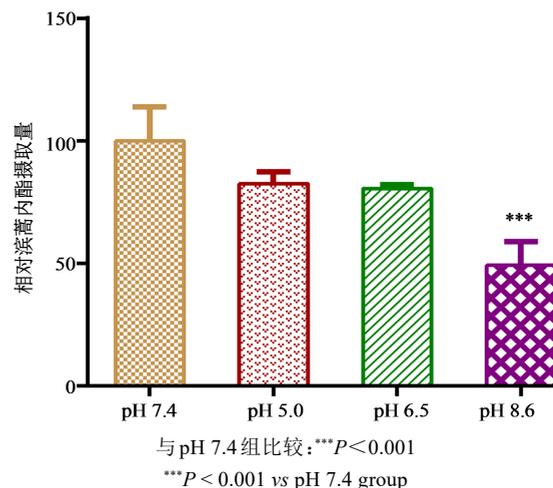


图5 pH 值对 BeWo 细胞摄取滨蒿内酯的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )  
Fig. 5 Effects of pH values on scoparone uptake in BeWo cells ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

预孵液 (对照组不加抑制剂), 摄取 30 min 后弃摄取液加入预冷 HBSS 终止摄取并清洗细胞 2~3 次。每孔加入 50 μL IP 细胞裂解液裂解细胞, 取 5 μL 进行蛋白定量测定, 剩余样品经处理后至 UPLC-MS/MS 测定。如图 6 所示, 滨蒿内酯在细胞膜刷状缘侧的摄取并不受各类膜转运蛋白底物或抑制剂的影响。

2.2.4 BeWo 单层细胞模型的建立 如图 7 所示, 取对数生长期 BeWo 细胞消化离心后制成细胞悬液, 利用细胞计数器计数后将细胞密度调整至  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ /孔, 均匀接种于 Transwell 12 孔板细胞培养小室的顶端 (AP) 侧, 基底 (BL) 侧培养室中加入 1.5 mL 的完全培养基, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱进行培养, 每天换液并使用电阻仪测定跨膜电阻 (TEER), 待生长至规定天数, 使用倒置荧光显微镜观察细胞状态, 当 TEER 大于  $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$  后, 可认为该状态下的细胞单层是致密完整的, 即可用于模拟胎盘屏障, 研究母婴间物质转运。

#### 2.2.5 细胞转运特性考察

(1) 时间与浓度相关性 选取满足要求的 Transwell 孔板, 向小室内外分别加入 500 μL 和 1.5 mL 预热的 HBSS 液清洗 2~3 遍, 而后向两侧加入空白 HBSS 孵育细胞 20 min, 弃孵育液, 加入药物转运液进行转运, AP-BL 转运实验在小室内 (AP 端) 加入 500 μL 已配制的 400 μmol/L 的滨蒿内酯 HBSS 转运液作为供给池, 小室外 (BL 端) 加入 1.5 mL 空白 HBSS 液作为接收池; BL-AP 转运与上述方向相反。将 Transwell 孔板放置于 37 °C 恒温振荡器中进行转运, 分别在 15、30、60、90、120、150、180 min 从接收

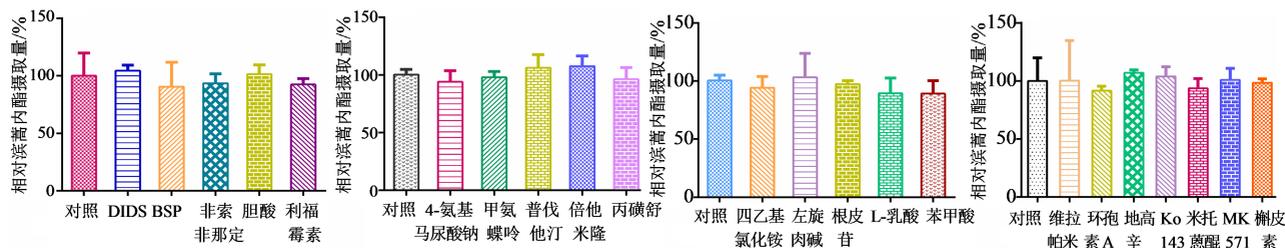


图6 不同转运体抑制剂对BeWo细胞摄取滨蒿内酯的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 6 Effect of several transporters inhibitors on scopolamine uptake by BeWo cells ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

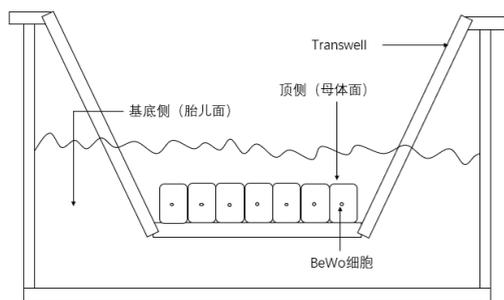


图7 Transwell示意图

Fig. 7 Diagram of Transwell

池中吸取50 μL,并以等体积空白HBSS补足,将吸取的转运液样品按照“2.1.4”项中细胞转运样品处理方法处理后进行UPLC-MS/MS定量测定。同法考察不同浓度(5、50、100、200、400 μmol/L)药物转运情况,计算药物表观渗透系数( $P_{app}$ )和外排率( $P_{ratio}$ )。

如图8所示,研究不同时间滨蒿内酯在BeWo细胞上的双向转运实验中,其在两个方向的转运速率无显著差异;二者 $P_{app}$ 值极为接近,经计算药物 $P_{ratio}$ 约为1。浓度相关性双向转运实验也显示,在考察的浓度范围内,滨蒿内酯在母-胎(AP-BL)和胎-母(BL-AP)2个方向上转运均呈线性增加,且无饱和和趋势,推测其转运过程为无转运蛋白参与的被动转运。

(2) 转运体抑制剂对其转运行为的影响 参考(1)操作方法,将符合转运要求的孔板取出,经HBSS清洗后,将所配制的转运体抑制剂孵育液加入至每孔,AP-BL转运方向:将500 μL不同抑制剂孵育液加入至AP端,1.5 mL空白HBSS液加至BL端;BL-AP转运方向与之相反,孵育细胞20 min(对照组不加抑制剂)。吸弃孵育液,以等体积含400 μmol/L滨蒿内酯及相应抑制剂的转运液代替孵育液,另一侧同样以等体积的空白HBSS液代替,作为药物接收池(对照组不加抑制剂)。将Transwell孔板进行37 °C恒温震荡转运,作用30 min

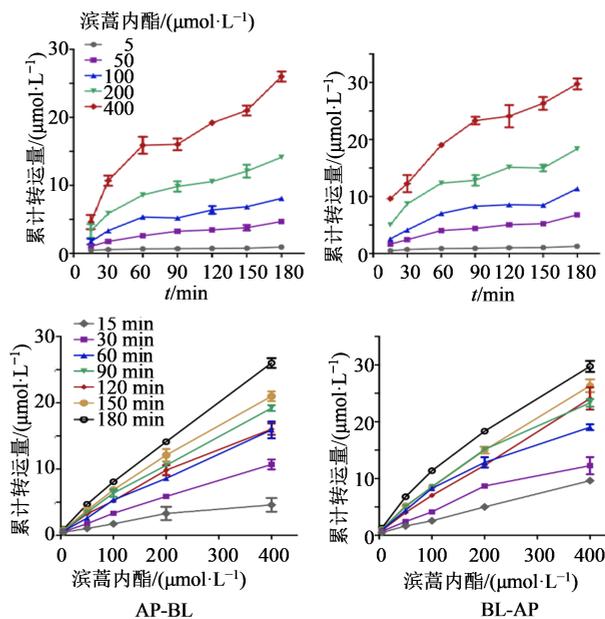


图8 滨蒿内酯在BeWo细胞上的时间与浓度相关性转运 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 8 Concentration and time-dependent transport of scopolamine in BeWo cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

后从接收池中吸取50 μL,并以等体积空白HBSS液补足,所得转运样品进行处理后采用UPLC-MS/MS测定药物的转运量。如图9所示,实验考察多种转运体抑制剂对滨蒿内酯在双侧转运的影响,发现OATP摄取型转运体底物非索非那定和抑制剂利福霉素、外排转运体P-gp抑制剂维拉帕米、BCRP抑制剂Ko143和MRP2抑制剂MK571对2个方向上的转运均无影响,且经计算药物 $P_{ratio}$ 与对照组比较无显著性差异。

2.2.6 数据处理 使用GraphPad Prism 5.0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)。

$P_{app}$  计算公式如下:

$$P_{app} = \left( \frac{d_Q}{d_t} \right) / AC_0$$

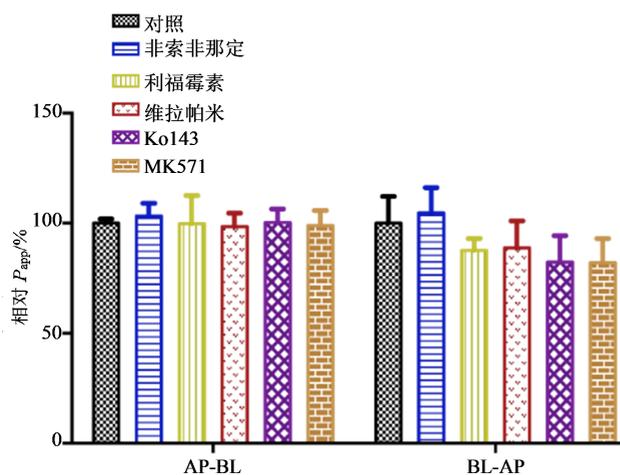


图9 转运体抑制剂对滨蒿内酯在BeWo细胞转运的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 9 Effects of transporter inhibitors on scoparone transport by BeWo cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

$d_0/d_t$ 为单位时间的药物通过率(mass/s); $A$ 为聚碳酸酯膜表面积( $\text{cm}^2$ ); $C_0$ 表示加入时受试物在供体侧的初始浓度( $\text{mass}/\text{cm}^3$ )。

药物 $P_{\text{ratio}}$ 计算公式如下:

$$P_{\text{ratio}} = \frac{P_{\text{app}}(\text{BL-AP})}{P_{\text{app}}(\text{AP-BL})}$$

$P_{\text{app}}(\text{AP-BL})$ 为AP-BL方向 $P_{\text{app}}$ ;  $P_{\text{app}}(\text{BL-AP})$ 为BL-AP方向 $P_{\text{app}}$

数据通过GraphPad Prime5.0按以下米氏方程拟合:

$$V = \frac{V_{\text{max}} \times [S]}{K_m + [S]}$$

$V$ 为BeWo细胞的摄取速率;  $[S]$ 代表底物浓度,  $K_m$ 代表摄取速率为最大速率一半时的底物浓度。米氏方程拟合结果若

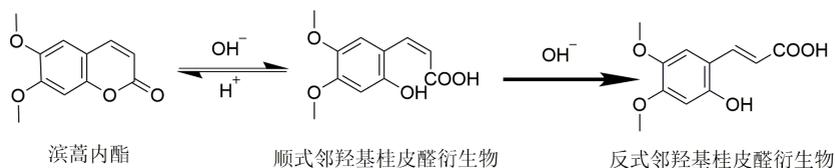


图10 滨蒿内酯的碱水解示意图

Fig. 10 Schematic diagram of alkali hydrolysis of scoparone

目前评价妊娠期用药安全性的关键性指标是药物的胎儿宫内暴露量,即药物经胎盘转运的程度。相比于西药如对乙酰氨基酚、左氧氟沙星<sup>[6]</sup>等在胎盘屏障透过性研究,中药活性成分尤其是妊娠期常用中药的跨胎盘特性研究不足。孕妇ICP在我国发病率较高,茵陈作为妊娠期治疗ICP的常用药物,其有效成分滨蒿内酯是否可以透过胎盘屏障,对胎儿产生影响仍未可知,为达到治疗效果的同时降低用药风险,研究胎盘转运体及转运机制、转运体介导的药物相互作用对药物疗效、药动学研究及

符合则该药物在细胞上的摄取具有饱和特性,推测摄取过程可能有转运蛋白参与

### 3 讨论

本研究首先建立了滨蒿内酯及内标物质双氯芬酸钠在细胞裂解液、HBSS中的UPLC-MS/MS分析方法,并进行了方法学验证,结果表明该分析方法专属性强,灵敏度高,重现性好,提取回收率、基质效应和样品稳定性等均符合生物样品药物含量的分析测定要求。接着研究了滨蒿内酯的摄取转运特性,滨蒿内酯摄取转运实验表明,BeWo细胞对其的摄取转运具有浓度和时间的相关性,在所选取的作用范围内,呈线性增加,且无饱和趋势,两侧的转运速率无显著性差异,  $P_{\text{ratio}}$ 约为1,推测其跨膜过程无转运蛋白的参与。4℃环境下,细胞膜上的转运蛋白处于低温环境休眠,几乎不发挥其转运功能,但其摄取量在4℃和37℃条件无显著性差异,表明摄取转运过程不受温度的影响,是以无载体介导的被动方式进出细胞。pH相关性研究发现,酸性条件对滨蒿内酯的摄取无影响,而碱性条件下,其摄取量明显降低;结合以上实验结果,提示滨蒿内酯为香豆素类成分,具有内酯结构,碱性条件下结构不稳定,易水解开环生成顺式邻羟基桂皮酸衍生物,并进一步双键异构化生成不可逆反式衍生物,如图10所示,而并非是通过作用转运蛋白产生影响。由此确定滨蒿内酯跨膜方式是无转运蛋白介导的被动扩散,该结论也符合滨蒿内酯相对分子质量小、亲脂性适中物理特性。

指导妇产科临床用药、保护胎儿等方面具有重要意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

[1] 刘玉萍, 邱小玉, 刘 烨, 等. 茵陈的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(9): 2235-2241.  
Liu Y P, Qiu X Y, Liu Y, et al. Research progress on pharmacological effect of Artemisiae Scopariae Herba [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(9): 2235-2241.

[2] 汪 芬, 杨春玲, 金彩凤, 等. 茵陈加味汤联合基础西药

- 治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的临床疗效 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 3038-1041.
- Wang F, Yang C L, Jin C F, et al. Effect of modified Yinchen Decoction and basic western medicine on intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. China Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(12): 3038-3041.
- [3] 周岐鸣, 徐姣雅, 季光, 等. 滨蒿内酯治疗非酒精性脂肪性肝病的作用及机制研究进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(2): 188-190.
- Zhou Q M, Xu J Y, Ji G, et al. Research progress on the effect and mechanism of Scoparone in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2019, 29(2): 188-190.
- [4] 李婷婷, 刘海燕, 谢建忠, 等. 人胎盘的体外研究模型及其应用进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(6): 1038-1042.
- Li T T, Liu H Y, Xie J Z, et al. Progress of research model *in vitro* of human placenta and its application [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2013, 27(6): 1038-1042.
- [5] Guo J, Song D, Han F, et al. *In vitro* transport mechanism of psoralen in a human placental cell line (BeWo cells) [J]. Planta Med, 2015, 81(2): 138-144.
- [6] Polachek H, Debotton N, Feinshtein V, et al. The role of various transporters in the placental uptake of ofloxacin in an *in vitro* model of human villous trophoblasts [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 4129-4138.

[责任编辑 兰新新]

· 公益广告 ·

**不应接种新冠疫苗的情况**

- ① 对疫苗的活性成分、任何一种非活性成分、生产工艺中使用的物质过敏者，或以前接种同类疫苗时出现过敏者；
- ② 既往发生过疫苗严重过敏反应者（如急性过敏反应、血管神经性水肿、呼吸困难等）；
- ③ 患有未控制的癫痫和其他严重神经系统疾病者（如横贯性脊髓炎、格林巴利综合征、脱髓鞘疾病等）；
- ④ 正在发热者，或患急性疾病，或慢性疾病的急性发作期，或未控制的严重慢性病患者；
- ⑤ 妊娠期妇女。

● 有些禁忌，比如正在发热等是暂时的，当导致禁忌的情况不再存在时，可以在晚些时候接种疫苗。