芍药苷在Caco-2细胞模型中吸收机制的研究

宋丽, 张宁*, 徐德生

(上海中医药大学, 上海201203)

摘要:目的 研究芍药苷在Caco-2细胞模型中的吸收机制。方法 用Caco-2细胞单层模型研究芍药苷的双向转运, 考察时间、药物质量浓度对芍药苷吸收的影响。采用高效液相色谱法检测芍药苷质量浓度, 计算其表观渗透系数(P_{app})。结果 芍药苷在Caco-2细胞模型中, 从单层细胞层顶端到基底端的转运与基底端到顶端的转运大致相同; 随着芍药苷质量浓度的增加, 顶端到基底端方向的吸收量近似线性增加, 基底端到顶端方向的分泌量近似线性增加。结论 芍药苷在Caco-2细胞模型中吸收主要是被动转运。

关键词: 芍药苷; Caco-2细胞模型; 吸收; 转运

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0041-04

Absorption mechanism of paeoniflorin across Caco-2 monolayer model

SONG Li, ZHANG Ning, XU De-sheng

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective To research the absorption mechanism of paeoniflorin across Caco-2 monolayer model. **Methods** Depending on the Caco-2 cell monolayers drug transport model to study the double transport mechanism of paeoniflorin. To explore the effect of paeoniflorin absorption by time and drug concentration, the drug concentration was determined through the use of HPLC instrument and the P_{app} was calculated. **Results** In the Caco-2 monolayer model, the transport of paeoniflorin from Apical (AP) to Basolateral (BL) is similar to the transport from BL to AP. **Conclusion** The main mechanism of the paeoniflorin intestinal absorption in the Caco-2 monolayer model is passive transference.

Key words: paeoniflorin; Caco-2 cell model; intestinal absorption; transport

白芍为毛茛科植物芍药的干燥根, 具有益气、养血、止痹、通络的作用。芍药苷是白芍中的主要成分, 在临床上用于治疗类风湿性关节炎、肝炎、老年性疾病等^[1]。目前药物肠吸收的研究方法被广泛采用的有3种: 大鼠原位单次灌注、大鼠外翻肠囊法和体外人结肠腺癌(human colon carcinoma cell line, Caco-2)细胞系^[2], 其中Caco-2细胞系更适合高通量筛选, 并已经成为一种预测药物在人体小肠吸收以及药物转运机制研究的标准体外筛选工具^[3]。Caco-2来源于人类结肠癌细胞, Caco-2细胞模型由于具有体内肠上皮的许多形态和功能上的性质, 可作为研究小肠表皮细胞药物转运和代谢的体外模型, 广泛用于药物的吸收、分布、代谢、排泄以及毒性研究^[3,4]。本实验建立Caco-2细胞模型用于研究芍药苷在小肠中的转运机制, 通过HPLC法测定转运前后的药物吸收情况以阐述芍药苷的吸收机制, 以期含有芍药苷的中药复方吸收机制研究提供参考。

1 仪器及试剂

Agilent 1100系列高效液相色谱仪, HF safe 1500生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司), 跨膜电阻仪和Millipore™膜(Millipore Corporation), Bio-Rad Model 550酶标仪。

Caco-2细胞购于中国医学科学院基础医学细胞中心; 芍药苷购于中国药品生物制品检定所(批号: 110736-200320, 定量测定用)。

DMEM培养基(Dulbecco's Modified Eagle's medium), Gibco cat.NO 12800-058 lot.NO 1313804 Invitrogen corporation; 非必需氨基酸: cat.NO 11140-050 lot NO 1316287; 胎牛血清(FBS); 胰蛋白酶: 1523B 70 Amresco; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均由国药集团化学试剂有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 Caco-2细胞模型的建立: Caco-2细胞在37℃, 含5% CO₂, 相对湿度为90%培养箱中培养。采用

* 收稿日期: 2007-05-23

基金项目: 上海市教委资助项目(T0301)

作者简介: 宋丽(1981—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新技术及新剂型。Tel: (021)51322388

* 通讯作者 张宁 Tel: (021)51322392 Email: ningzh18@126.com

DMEM 培养基, 培养基中含 10% FBS、1% 非必需氨基酸、1% 丙酮酸钠、1% 谷氨酰胺和 1% 青-链霉素。将细胞按 50 000 个/cm² 接种到 24 孔板上, 培养 21 d^[3]。经过验证, 细胞形成紧密的单层后即可用于实验^[5]。

2.2 细胞样品中芍药苷的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱为 Thermo Hypersil-Keystone ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (30 : 70); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 室温。

2.2.2 线性关系的考察: 精密称取芍药苷对照品适量, 用空白 HBSS 溶液制成质量浓度分别为 0.545、1.09、5.45、27.2、54.5、109、218 μg/mL 对照品溶液, 分别精密吸取 10 μL, 进样, 测定峰面积。以质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 用加权最小二乘法进行回归计算, 得直线回归方程 $Y = 13.19587X + 1.156508$, $R^2 = 0.9999$, 线性范围为 0.545~218 μg/mL。

2.2.3 检测限和定量限的测定: 按 3 倍基线噪音计算, 测得芍药苷检测限为 0.5 ng。按 10 倍极限噪音计算, 测得芍药苷定量限为 1.5 ng。

2.2.4 方法专属性试验: 考察空白 HBSS 对芍药苷的检测是否有干扰。结果表明, 本色谱条件下, 空白 HBSS 对芍药苷的测定无干扰, 专属性良好。

2.2.5 精密度试验: 取芍药苷对照品贮备液, 用空白 HBSS 配制成质量浓度为 1.09、27.2、218 μg/mL 的稀释液各 5 份, 于 1 d 内连续进行测定, 根据标准曲线方程计算样品中芍药苷的质量浓度, 计算 RSD 分别为 2.58%、0.80%、0.33%。连续 4 d 取芍药苷对照品贮备液用空白 HBSS 配制成质量浓度为 1.09、27.2、218 μg/mL 稀释液各 5 份, 进行测定, 根据标准曲线方程计算样品中芍药苷的质量浓度, 计算 RSD 分别为 2.26%、1.17%、1.49% (n = 20)。

2.2.6 方法回收率试验: 配制芍药苷的低、中、高质量浓度的 HBSS 溶液, 分别进样测定峰面积, 计算药物质量浓度, 以测得的质量浓度与实际质量浓度相比较, 求得方法回收率, 见表 1。

表 1 方法回收率试验 (n = 5)

Table 1 Test of recovery (n = 5)

$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
1.09	99.03 ± 2.55	2.58
27.25	104.57 ± 0.83	0.80
218	102.69 ± 0.34	0.33

2.3 芍药苷细胞毒性的研究

2.3.1 溶液的配制: 精密称取芍药苷对照品适量, 用空白 HBSS 溶液制成质量浓度分别为 0.25、2.5、

25、250、2 500 μg/mL 对照品溶液。精密称取 MTT 用 PBS 缓冲液配成质量浓度为 5 mg/mL MTT 溶液, 用时配制, 避光保存。

2.3.2 MTT 法测定芍药苷的细胞毒活性: 于 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液 (调细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$), 置于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加芍药苷对照品溶液 50 μL, 每个实验组设 3 个复孔, 空白 (无细胞, 不加药) 与阴性 (只有细胞, 不加药) 各 3~5 孔。37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 结束培养前 4~5 h 每孔加入 MTT 20 μL。培养结束时, 加入溶解液 DM SO (二甲基亚砷) 150 μL, 放置 6~7 h, 用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度 (A) 值。通过对 A 值的观察与分析来判断芍药苷对 Caco-2 细胞的毒性, 结果见表 2。可以看出, 芍药苷在 0.25~2 500 μg/mL 时, A 值无突然下降的现象, 所以在此质量浓度范围内给药, 对 Caco-2 细胞没有毒性。此范围作为试验中给药质量浓度的参考范围。

表 2 芍药苷溶液的 MTT 测定结果 (n = 3)

Table 2 Results of MTT for paeoniflorin solution (n = 3)

$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A
芍药苷 0.25	1.254 0 ± 0.101 9
2.5	1.138 2 ± 0.153 2
25	1.254 2 ± 0.077 6
250	1.271 2 ± 0.093 7
2 500	1.299 1 ± 0.086 1
空白 —	0.239 2 ± 0.009 4
阴性 —	0.216 1 ± 0.004 2

2.4 芍药苷的转运试验

2.4.1 芍药苷溶液的制备: 用 HBSS 缓冲液配制 25~200 μg/mL 芍药苷溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌。

2.4.2 试验装备的调试: 取符合转运条件且细胞生长形态完好的 Millicell™ 膜, 试验前用空白 HBSS 等渗溶液 37 ℃ 培养 20 min, 培养结束后用 HBSS 清洗 3 遍, 洗去细胞单分子层表面的杂质。然后用跨膜电阻仪测定跨膜电阻值, 以确定细胞单层的紧密性与完整性。

2.4.3 从 Apical (AP, 又称黏膜侧或肠腔侧) 侧到 Basolateral (BL, 又称浆膜侧或肠内壁侧) 侧的转运: 将 0.4 mL 芍药苷溶液加到 AP 侧作为供给液, 同时在 BL 侧加入 0.6 mL 空白 HBSS 作为接收液。

2.4.4 从 BL 侧到 AP 侧的转运: 将 0.6 mL 芍药苷溶液加到 BL 侧作为供给液, 同时在 AP 侧加入 0.4 mL 空白 Hanks 平衡盐溶液作为接收液。

2.4.5 试验结果: 将 Millicell™ 膜置于 37 ℃、5% CO₂ (相对湿度 90%) 培养箱中, 分别在不同时间吸

取0.2 mL 接收液,同时补加空白HBSS 0.2 mL。采用HPLC 法测定样品中芍药苷的质量浓度,计算表观渗透系数(P_{app})。

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

其中 dQ/dt 为单位时间药物转运量($\mu\text{g}/\text{min}$), A 为转运膜的面积,此时 A 为 1.13 cm^2 ; C_0 为芍药苷的初始质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)

由于每次取样后都要补液,对药物的通透产生了稀释作用,因而药物的累积吸收浓度 TR_{cum} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)进行公式校正。

$$TR_{cum} = A_n + \frac{V_{S_n}}{V_R} \sum_{i=0}^{n-1} A_i$$

其中 A_n 为第 n 个样品通透量的测定值; V_{S_n} 为第 n 个样品的采样体积; V_R 为接收池的体积。

芍药苷从AP 侧到BL 侧转运时芍药苷累积吸收的结果见表3,以芍药苷转运速率对质量浓度作图,得方程 $Y = 0.3666X + 0.9890, R^2 = 0.9990$ 。

芍药苷从BL 侧到AP 侧转运时芍药苷累积吸收结果见表4,以芍药苷转运速率与质量浓度作图,

表5 芍药苷双向转运的 P_{app} 和吸收率($n=3$)

Table 5 P_{app} and permeation of paeoniflorin at different concentration in Caco-2 cell by double direction transport ($n=3$)

芍药苷溶液/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$P_{app}/(1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		比率	AP BL 吸收率/%		BL AP 吸收率/%	
	AP	BL		AP	BL	AP	BL
25	6.6 ± 0.1	5.1 ± 0.6	0.8	13.2 ± 0.3	16.1 ± 1.6		
50	7.4 ± 2.5	5.7 ± 0.8	0.8	15.0 ± 4.1	17.8 ± 2.5		
100	6.7 ± 1.0	5.6 ± 0.2	0.8	13.5 ± 2.2	17.3 ± 0.6		
200	7.0 ± 1.3	5.9 ± 0.3	0.8	13.8 ± 3.0	18.4 ± 1.1		

(20% ~ 70%)^[6]。

在整个质量浓度范围内(于漏槽条件下),由BL AP 测得的 P_{app1} ,经统计学处理发现各质量浓度的 P_{app1} 值并无显著性差异,基本保持恒定;由AP BL 测得的 P_{app2} ,经统计学处理发现各质量浓度的 P_{app2} 值并无显著性差异,基本保持恒定;二者的比值(P_{app1}/P_{app2})为0.8,小于1.5;各方向不同质量浓度的吸收率也基本恒定,差异无显著性。表明被动扩散为主要转运机制。

3 讨论
Caco-2 细胞模型应用在药物吸收机制研究中时,若在整个质量浓度范围内(于漏槽条件下)测得的 P_{app} 值保持恒定,则被动扩散为主要转运机制。 P_{app} 值可由BL AP 测得(P_{app1}),也可由AP BL 方向测得(P_{app2}),若 P_{app1} 与 P_{app2} 相同也可确定被动扩散为主要转运机制,若 $P_{app1}/P_{app2} > 1.5$ 则提示可能存在主动转运机制:P-糖蛋白和多药耐药蛋白是Caco-2 细胞中两种主要的转运蛋白。两者均能发挥外排泵作用,能将细胞内的化合物逆浓度梯度运至

得方程 $Y = 0.3636X + 0.4753, R^2 = 0.9993$ 。 P_{app} 的计算结果和吸收率见表5。

表3 AP 侧到BL 侧的累积吸收质量浓度($n=3$)

Table 3 AP to BL cumulative transport concentration ($n=3$)

芍药苷溶液/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2 h 内累积吸收/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
25	3.4974 ± 0.0213
50	8.3459 ± 0.2752
100	13.9687 ± 0.1644
200	28.7190 ± 0.2186

表4 BL 侧到AP 侧的累积吸收质量浓度($n=3$)

Table 4 BL to AP cumulative transport concentration ($n=3$)

芍药苷溶液/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2 h 内累积吸收/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
25	4.2726 ± 0.0996
50	9.2356 ± 0.1403
100	17.9409 ± 0.0323
200	38.2575 ± 0.0596

可见芍药苷在25~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AP BL 的 P_{app} 在 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ cm}/\text{s}$,相当于人小肠中等吸收

细胞外。

由于Caco-2 细胞来源于结肠,缺乏分泌黏液的杯状细胞,因而缺乏小肠上皮中的黏液层;而且由于缺乏肠道菌群代谢酶,Caco-2 细胞模型也不能完全模拟药物在小肠中的吸收过程。所以,与整体动物实验数据相结合,研究芍药苷在体内的吸收过程从而为新剂型的设计提供更完善的理论依据是有必要的。

Caco-2 细胞模型作为药物吸收研究的体外模型,是一种快速的筛选工具,可以阐明药物分子的转运机制以及确定某些影响药物转运特性的结构特征,为药物的体外药物动力学提供了广阔的前景,同时也有助于改善药物的转运特性,以便增加其吸收。特别是在中国传统药物的研究方面,由于大部分中药的具体吸收成分和机制还未明确,因此本实验建立的Caco-2 细胞模型在中药口服吸收研究方面具有广泛的应用前景,对中药现代化具有重要意义。

参考文献:

- [1] 陈崇宏,张源,陈光亮. 芍药甙药物动力学的研究[J]. 中国药理学通报, 1990, 6(5): 299-302.
- [2] 林晓,徐德生,冯怡. 药物的肠吸收与处置研究进展[J].

中国临床药理学杂志, 2004, 20(1): 72-75.

[3] 牟永平, 吴刚, 周立社, 等. Caco-2 细胞模型在药物研究中的应用 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(5): 536-539.

[4] Meunier V, Bourrie M, Berger Y. The human intestinal epithelial cell line Caco-2: pharmacological and pharmacokinetic applications [J]. *Cell Biol Toxicol*, 1995, 11(3-4): 187-194.

[5] Gan L L, Dhiren R T. Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23(1): 77.

[6] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (clonic) can predict *in vivo* (small intestinal, absorption in man) or myth [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763-766.

泡沫分离法分离重楼中重楼皂苷的工艺研究

兰洁, 李锐, 韩丽, 杨明*, 王瑾

(成都中医药大学药学院, 四川 成都 611130)

摘要:目的 研究泡沫分离法分离重楼皂苷的半间歇式操作工艺。方法 以富集比、回收率、纯度比为评价指标, 对操作方式、气流速度、进料浓度、pH 值、进料体积、温度进行单因素考察, 研究其对泡沫分离效果的影响。结果 在气流速度为400 mL/m in, 进料质量浓度约为0.3 mg/mL, pH 7, 液相高度维持在30 cm, 温度为40 时, 重楼皂苷泡沫分离的富集比为25.7, 回收率为42.1%, 泡沫液总皂苷纯度为41.4%, 相比原料液纯度提高4.5倍。结论 泡沫分离技术可较好地用于重楼中皂苷的分离。

关键词: 重楼皂苷; 泡沫分离; 富集比; 回收率; 纯度比

中图分类号: R 286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)01-0044-04

Separation of polyphyllin from Rhizoma Parisidis by foam fractionation technique

LAN Jie, LI Rui, HAN Li, YANG Ming, WANG Jin

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China)

Abstract Objective To study the process of foam fractionation of polyphyllin in semi-batch mode. **Methods** Taking enrichment ratio, recovery rate of polyphyllin, and purity ratio as the performance criteria and using single examining method to examine the operational parameters, i.e. operation mode, air flow rate, initial feed concentration, solution pH value, initial feed height and temperature on separation performance. The optimal conditions of the process were obtained finally. **Results** The separation performance is good when gas flow rate is 400 mL/m in, initial feed concentration (polyphyllin's content) is 0.3 mg/mL, pH value is 7, feed height is 30 cm, and feed temperature is 40 . The enrichment ratio is 25.7, recovery ratio is 42.1%, and the foam liquid's purity of total polyphyllin is 41.4%, which is 4.5 times higher than that in feed purity. **Conclusion** Foam fractionation technique could be applied to separate polyphyllin.

Key words: polyphyllin; foam fractionation; enrichment ratio; recovery rate; purity ratio

重楼为百合科植物云南重楼或七叶一枝花的干燥根茎, 主要有效成分是甙体皂苷。甙体皂苷按苷元的不同分为两类: 一类为薯蓣皂苷元(diosgenin)的糖苷, 另一类为偏诺皂苷元(pennogenin)的糖苷, 连接的糖主要有D-葡萄糖、L-鼠李糖和L-呋喃阿拉伯糖3种^[1]。重楼皂苷具备了两亲性分子结构, 具有表面活性, 其水提液轻微振荡即可产生丰富的泡沫。泡沫分离技术是根据表面吸附原理, 基于溶液中溶质

(或颗粒)间表面活性的差异, 表面活性强的物质优先吸附于分散相与连续相的界面处, 通过鼓泡使溶质选择性的聚集在气-液界面并借助浮力上升至溶液主体上方形成泡沫层, 从而分离、浓缩溶质或净化液相主体的过程^[2]。中药中皂苷类成分具有亲水性的糖体和疏水性的皂苷元, 是一种优良的天然表面活性成分, 在强烈搅拌或沸腾时就能产生稳定的泡沫, 并且泡沫反应也是鉴别中药皂苷类成分常用的

* 收稿日期: 2007-02-25

基金项目: 国家“十五”科技攻关重点项目(2004BA 721A 43)

作者简介: 兰洁(1982—), 女, 四川崇州人, 在读硕士生, 研究方向: 中药新制剂和新剂型的研究。E-mail: jane_blue77@yahoo.com.cn

* 通讯作者 杨明 Tel: (028)61800456 E-mail: yangning16@126.com