

· 药理与临床 ·

羌活中二氢呋喃类香豆素在人源肠 Caco-2 细胞
单层模型的吸收转运研究

杨秀伟, 张 鹏, 吴 琦*

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

摘要:目的 研究紫花前胡苷元(NANI)、紫花前胡苷(ND)、前胡苷 V(DEV)和羌活苷(FDE) 4 个线型二氢呋喃香豆素类化合物在人源肠 Caco-2 细胞单层模型中的吸收特性。方法 利用人源结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞单层模型测试 4 个香豆素类化合物从绒毛面(AP 端)到基底面(BL 端)、BL 端到 AP 端 2 个方向的转运过程。应用偶联紫外检测器的高效液相色谱法对上述 4 个香豆素进行定量分析,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 NANI 双向转运的 P_{app} 值在 1×10^{-6} cm/s 数量级,介于在 Caco-2 细胞单层模型上呈良好吸收的普萘洛尔和难吸收的阿替洛尔的 P_{app} 值之间。ND、DEV 和 FDE 的 P_{app} 值与阿替洛尔的 P_{app} 值皆在 1×10^{-7} cm/s 数量级。4 个香豆素在 25~400 μ mol/L 的转运效率与浓度呈正相关。结论 4 个线型二氢呋喃类香豆素可以通过小肠上皮细胞被动吸收进入体内,NANI 属于中等吸收的化合物;ND、DEV 和 FDE 属于难吸收的化合物。

关键词: Caco-2 细胞单层; 羌活; 紫花前胡苷元; 紫花前胡苷; 前胡苷 V; 羌活苷; 肠吸收

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)05-0748-06

Absorption and transportation characteristic of dihydrofurocoumarins from Rhizome
et Radix Notopterygii in a model of Caco-2 cell monolayers

YANG Xiu-wei, ZHANG Peng, WU Qi

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

Abstract: **Objective** To study the absorption and transportation characteristic of nodakenetin (NANI), nodakenin (ND), decuroside V (DEV), and forbeside [6-*O*-(*trans*-feruloyl)-nodakenin, FDE] isolated from *Rhizome et Radix Notopterygii*, which were classified four linear dihydrofurocoumarins, in human intestinal epithelium. **Methods** Caco-2 (the human colon adenocarcinoma cell lines) cell monolayers were used as an intestinal epithelial cell model. The permeability of the four coumarins from apical side (AP side) to basolateral side (BL side) or from BL side to AP side was evaluated. The concentration of the four coumarins was measured by HPLC coupled with UV detector. Transportation parameters and permeability coefficients (P_{app}) were then calculated, and P_{app} values were compared with the reported values for model compounds, propranolol, and atenolol. **Results** The P_{app} values of NANI in the bi-directional transportation were quantitative degree of 1×10^{-6} cm/s, which laid between propranolol often used as a control substance for high permeability and Atenolol often used as a control substance for poor permeability. Whereas P_{app} values of ND, DEV, and FDE were quantitative degree of 1×10^{-7} cm/s, which was comparable with the P_{app} values of atenolol. The absorption and transportation of four coumarins were positive correlation to the concentration of 25—400 μ mol/L. **Conclusion** Four linear dihydrofurocoumarins can be absorbed across intestinal epithelial cells by passive diffusion mechanism. The NANI is moderately, while ND, DEV, and FDE are poorly absorbed compounds.

Key words: Caco-2 cell monolayers; *Phizome et Radix Notopterygii*; nodakenetin (NANI), nodakenin (ND), decuroside V (DEV), forbeside (FDE); intestinal absorption

* 收稿日期: 2008-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672609); “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BA106A01-02); 天然药物及仿生药物国家重点实验室开放课题资助项目

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

羌活系伞形科 (Umbelliferae) 植物裂叶羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 和宽叶羌活 *N. forbesii* Boiss. 的根和根茎,为历版《中国药典》记载的传统中药之一,临床多配伍使用,是散寒、祛风、除湿、止痛的频用中药之一。在对羌活质量系统性评价研究中,先后研究了羌活的挥发性^[1,2]和非挥发性化学成分^[3-6]以及羌活甲醇提取物在体试验中抗小鼠肝脏脂质过氧化^[7]、其香豆素类成分离体试验中抑制肿瘤细胞生长的细胞毒作用^[8,9],为预测口服羌活能够进入体循环的化学成分,并为进一步确定其有效成分^[10]提供科学依据。本研究用国际公认且在药物吸收研究上广泛应用的人源结肠腺癌 Caco-2 细胞 (human colonic adenocarcinoma cell line) 单层体外培养模型^[11]研究羌活中紫花前胡苷元 (nodakenetin, NANI)、紫花前胡苷 (nodakenin, ND)、前胡苷 V (decuroside V, DEV) 和羌活苷 [forbesoside; 6-*O*-(*trans*-feruloyl)-nodakenin, FDE]的肠吸收转运特性。

1 材料与仪器

1.1 细胞: Caco-2 细胞株 (ATCC # HTB-37) 购

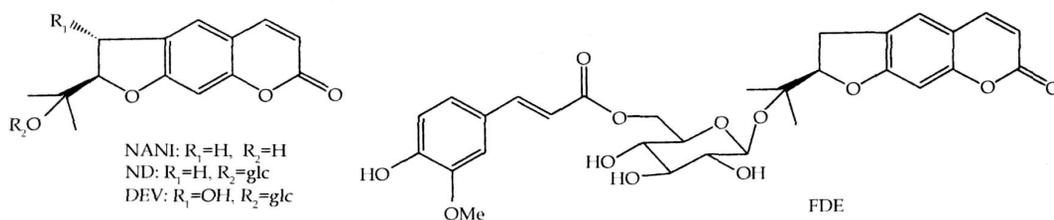


图 1 NANI、ND、DEV 和 FDE 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of NANI, ND, DEV, and FDE

RS Biotech 公司), JJ T-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 (World Precision Instrument, Sarasota, FL, 美国), 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 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 系统 (DIONEX Co., München, 德国), 包括 DIONEX P680 型泵, UVD 170U 型检测器, Chromeleon Version 6.50 数据处理工作站。Dikma Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 偶联 Dikma EasyGuard C₁₈ 保护柱 (20 mm ×

自美国 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)。

1.2 药品及主要试剂: 受试化合物 NANI、ND、DEV 和 FDE 均由本研究组从羌活中分离得到^[3-6], 化学结构如图 1, HPLC 检测其质量分数 > 98%。DMEM 培养基和 MEM 培养基购自美国 Gibco 公司; Hank's 缓冲溶液 (HBSS)、普萘洛尔、阿替洛尔和二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS) 和非必需氨基酸购自美国 Hyclone 公司; 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 购自北京赛尔曼生物公司; 胰蛋白酶购自北京华美生物工程公司; 青霉素和链霉素购自华北制药集团; Na₂CO₃、D-(+)-葡萄糖和乙二胺四乙酸 (EDTA) 购自北京化学试剂公司。甲醇 (色谱纯) 购自天津市彪奇商贸有限公司。实验用三蒸水。12 孔聚碳酸酯膜转运板 (Transwell) 和 25 cm² 及 75 cm² 细胞培养瓶购自美国 Corning Costar (Cambridge, MA) 公司。碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (批号 20070627) 购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器: GALAXY B 型 CO₂ 气体培养箱 (英国

4.6 mm)。PALLAS 3.3.2.6 ADME/Tox 预测软件 (CompuDrug Chemistry Ltd.)。

2 方法

2.1 培养液和缓冲溶液的配制: 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 溶液的配制见文献方法^[12]。

2.2 细胞培养和种板: 取复苏冻存的第 35 代 Caco-2 细胞用 DMEM-20 培养 2 代, 待生长速度正常再转为 DMEM-10 培养 3 代。复苏好的 Caco-2 细胞用 DMEM-10 培养, 隔天换液, 每 4~5 d 传代, 传代比例为 1:5。细胞达到 80% 汇合率后代, 用 DMEM-10 悬浮细胞使最终浓度为 6.25 × 10⁴ 个/孔。向孔板的底端 (basolateral side, BL) 加入 1.5 mL 完全 DMEM-10 培养液, 向孔板的顶端

(apical side, AP) 加入 0.5 mL 已充分混合的细胞悬液,第 2 天换 AP 端和 BL 端液,分别为 0.5 mL 和 1.5 mL;第 3~7 天隔天换 AP 端和 BL 端液,分别为 0.5 mL 和 1.5 mL;第 8~17 天每天换 AP 端液 0.5 mL,隔天换 BL 端液 1.5 mL;第 18 天以后每天换 AP 端和 BL 端液,分别为 0.5 mL 和 1.5 mL。本试验使用 Caco-2 细胞代数 43~60 代。

2.3 Caco-2 细胞单层完整性与转运能力试验:按标准操作规程^[11]进行在 Caco-2 细胞单层模型上呈良好吸收转运的阳性对照药普萘洛尔和难吸收转运阳性对照药阿替洛尔的吸收转运试验;按 ALP 试剂盒说明书进行 Caco-2 细胞 ALP 活性试验,验证 Caco-2 细胞单层完整性与转运能力。

2.4 HPLC 色谱条件:NANI、ND、DEV 和 FDE 的 HPLC 分析皆用 Dikma Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温为室温,进样量为 20 μL,检测波长为 330 nm。流动相为甲醇-水, NANI 和 FDE 为甲醇-水 (60:40);ND 和 DEV 为甲醇-水 (50:50),体积流量为 1 mL/min。

2.5 受试香豆素稳定性试验:按照实验设计,配制实验中最大浓度 (400 μmol/L) 的受试香豆素化合物溶液,于 37 °C 水浴摇床上按实验中所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 吸收转运和外流试验:实验前分别将 4 个香豆素溶于 DMSO 中配制成 10 mmol/L 储备液,用 HBSS 缓冲液稀释至所设计浓度。选取细胞跨膜电阻 >600 Ω/cm² 的 Caco-2 细胞单层,按实验设计,分别在细胞两侧加入受试化合物和 HBSS 溶液 (AP 端 0.5 mL, BL 端 1.5 mL),于恒温摇床上 (37 °C, 50 r/min) 温育。4 个香豆素吸收转运试验的终浓度皆为 50 μmol/L (DMSO 终体积分数小于 0.5%),按实验设计时间点收集 BL 端或 AP 端溶液,单孔取点,每点平行 3 个孔。AP 端给药、BL 端取样分析为吸收转运 (AP-BL) 试验;BL 端给药、AP 端取样分析为外流转运 (BL-AP) 试验。当 AP 端给药时,给药端 AP 室取样 0.45 mL,接受端 BL 室取样 1.4 mL;当 BL 端给药时,给药端 BL 室取样 1.40 mL,接受端 AP 室取样 0.45 mL。所取样品冷冻干燥,于 -20 °C 冰箱中保存,待处理。

2.7 样品处理:将 2.5 和 2.6 项冷冻干燥样品从 -20 °C 冰箱中取出,加入 80 μL 甲醇,涡旋混匀后超声溶解 20 min,再经 15 000 ×g 离心 10 min,取上清液,进样 HPLC 仪 20 μL,按 2.4 项 HPLC

条件进行分析测定。

2.8 细胞摄入试验:2.6 项取样全部结束后,小心移走转运孔中的溶液,以冷的 HBSS 溶液洗涤 3 次,放置在 -20 °C 冰箱中冷冻保存 24 h 后,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,置于 0.2 mL 70% 甲醇中,漩涡混匀后超声溶解 20 min,再经 15 000 ×g 离心 10 min,取上清液,即得细胞摄入分析样品,待处理。

2.9 转运表观渗透系数 (P_{app}) 值计算和数据处理:受试香豆素在 Caco-2 细胞模型中的 P_{app} 值按公式计算: $P_{app} = dQ/dt \times 1/A \times 1/C_0$ 式中, P_{app} 单位为 cm/s; Q 是累积转运量,代表化合物在接收室出现的总量,单位为 μmol/L, dQ/dt 是速率,单位为 μmol/(L·s); C_0 是化合物在给予室的初始浓度,单位为 μmol/(L·cm³); A 是聚碳酸酯膜的表面积,单位为 cm²。每数据点为平行 3 孔的平均值,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 分析方法的建立:分别精密称取 2.30 mg NANI、4.20 mg ND、3.70 mg DEV 和 7.01 mg FDE,用 DMSO 溶解,并配成 10 mmol/L 浓度的储备液。再用最后 1 次洗涤 Caco-2 细胞单层的 HBSS 配制系列浓度对照品溶液, NANI 为 2、20、50、150、200、400 μmol/L;ND、DEV 和 FDE 分别为 2.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 μmol/L。将其冷冻干燥,加入甲醇溶解并定容至 1 mL, 15 000 ×g 离心 10 min,取上清液,进样 HPLC 仪 20 μL,按 2.4 项条件进行分析测定,以峰面积积分为纵坐标,对照品摩尔浓度为横坐标,得线性回归方程, NANI 为 $Y = 7.4304X - 34.418$ ($r = 0.9999$, $n = 3$);ND 为 $Y = 3.6923X - 7.456$ ($r = 0.9993$, $n = 3$);DEV 为 $Y = 3.6616X - 7.8279$ ($r = 0.9994$, $n = 3$);FDE 为 $Y = 2.2785X - 3.0338$ ($r = 0.9998$, $n = 3$)。NANI 的线性范围为 $2.00 \times 10^{-6} \sim 4.00 \times 10^{-4}$ mol/L;ND、DEV 和 FDE 的线性范围皆为 $2.5 \times 10^{-6} \sim 4.0 \times 10^{-4}$ mol/L。在 2.4 项色谱条件下, NANI、ND、DEV 和 FDE 的保留时间分别为 7.74、6.50、5.22、9.12 min。

3.2 稳定性试验:HPLC 定量测定结果表明,所有 4 个受试香豆素在 HBSS 缓冲液中在 37 °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:本试验条件下,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 6.23×10^{-5} cm/s,符合文献报道值 2.75×10^{-5} cm/s 数量级^[11];呈难转

运的阳性对照药阿替洛尔的 P_{app} 值为 1.48×10^{-7} cm/s,符合文献报道值 1.0×10^{-7} cm/s 数量级^[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,显示 Caco-2 细胞没有 ALP 活性。接种第 14 天的细胞完全汇合,可水解对-硝基苯磷酸盐生成对-硝基苯酚,具有 ALP 活性,显示 Caco-2 细胞分化已基本完成。

3.4 吸收转运试验:AP 端或 BL 端给药,4 个香豆素的给予浓度皆为 $50 \mu\text{mol/L}$ 。温育 90 min 后,分别取 AP 端或 BL 端和 BL 端或 AP 端液,按 2.7 项方法处理、2.4 项条件分析和 2.9 项方法计算,4 个香豆素从 AP 端到 BL 端和从 BL 端到 AP 端的 P_{app} 值见表 1。

4 个香豆素吸收转运 $P_{app \text{ AP-BL}}$ 值与在相同反相柱 HPLC 条件下的保留时间 (t_R) 之间的关系如图 2-A, $r=0.2919$;DEV、ND 和 FDE 单独作图,见图 2-B, $r=0.9989$ 。由于其 $P_{app \text{ BL-AP}}$ 值与 t_R 之间的关

表 1 4 个香豆素在 Caco-2 细胞单层模型双向转运的 P_{app} 值及其保留时间 ($n=3$)

Table 1 Bilateral P_{app} values of four coumarins in a model of Caco-2 cell monolayer model and their retention times ($n=3$)

化合物	$P_{app \text{ AP-BL}}$ ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	$P_{app \text{ BL-AP}}$ ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	$P_{app \text{ AP-BL}}/P_{app \text{ BL-AP}}$	t_R min	LogD (pH 7.35)
NANI	$(6.58 \pm 1.53) \times 10^{-6}$	$(2.45 \pm 0.47) \times 10^{-6}$	2.56	7.74	1.59
ND	$(3.50 \pm 1.47) \times 10^{-7}$	$(0.86 \pm 0.14) \times 10^{-7}$	4.07	6.50	0.48
DEV	$(1.93 \pm 0.89) \times 10^{-7}$	$(0.37 \pm 0.11) \times 10^{-7}$	5.23	5.22	-0.57
FDE	$(6.18 \pm 2.44) \times 10^{-7}$	$(5.76 \pm 1.26) \times 10^{-7}$	1.07	9.12	1.78

Log D (pH 7.35) 为受试香豆素在 pH 7.35 时的表观分配系数

Log D (pH 7.35) was apparent distribution coefficient of test coumarin at pH 7.35

系总体趋势与 AP-BL 方向的一致,图略。

4 个香豆素 $P_{app \text{ AP-BL}}$ 值与其在 pH 7.35 的 Log D 之间的关系如图 3-A, $r=0.5200$;DEV、ND 和 FDE 单独作图,如图 3-B, $r=0.9961$ 。由于 $P_{app \text{ BL-AP}}$ 值与 Log D 值之间的关系总体趋势与 AP-BL 方向的一致,图略。

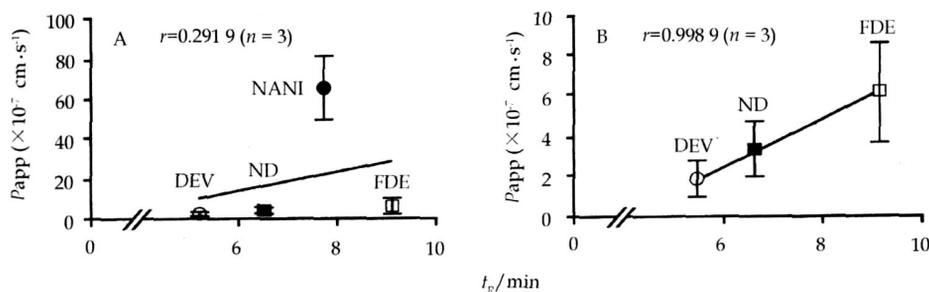


图 2 受试香豆素 $P_{app \text{ AP-BL}}$ 与其在反相柱 HPLC 中保留时间的关系图

Fig. 2 Relationship of $P_{app \text{ AP-BL}}$ vs retention time on reversed-phase HPLC column for test coumarins

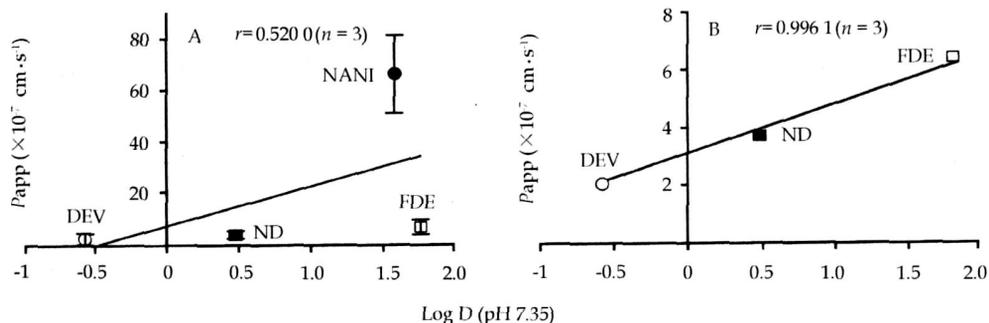


图 3 受试香豆素 $P_{app \text{ AP-BL}}$ 与其在 Log D 值的关系图

Fig. 3 Relationship of $P_{app \text{ AP-BL}}$ vs Log D for test coumarins

3.5 吸收转运的时效和量效关系:NANI 在 $50 \mu\text{mol/L}$ 浓度的动力学曲线如图 4-A,显示了 AP 端给药随时间在 AP 端和 BL 端的量变;由于 ND、DEV 和 FDE 的变化较小,图未给出。NANI 在 $50 \mu\text{mol/L}$,ND、DEV 和 FDE 在 $100 \mu\text{mol/L}$ 浓度,

AP 端分别给予 4 个香豆素,每 30 min 取样,共取到 180 min。吸收转运率与转运时间关系如图 4-B。

NANI 在 $10, 20, 50, 100, 200, 400 \mu\text{mol/L}$, ND,DEV 和 FDE 在 $25, 50, 100, 150, 200, 400 \mu\text{mol/L}$ 浓度的量效关系如图 5-A,B。

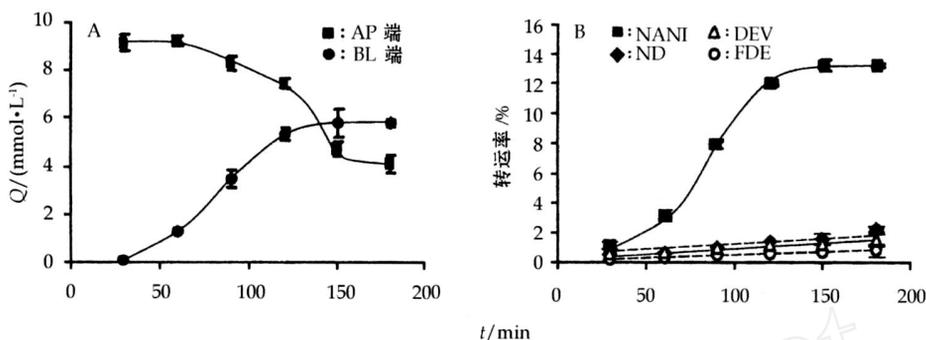


图 4 NANI 的转运动力学曲线 (A) 和 4 个香豆素不同时间点由 AP 端向 BL 端的转运率 (B)
Fig. 4 Kinetic curves of NANI transportation (A) and transportation percentage of four coumarins at different time points from AP to BL side (B)

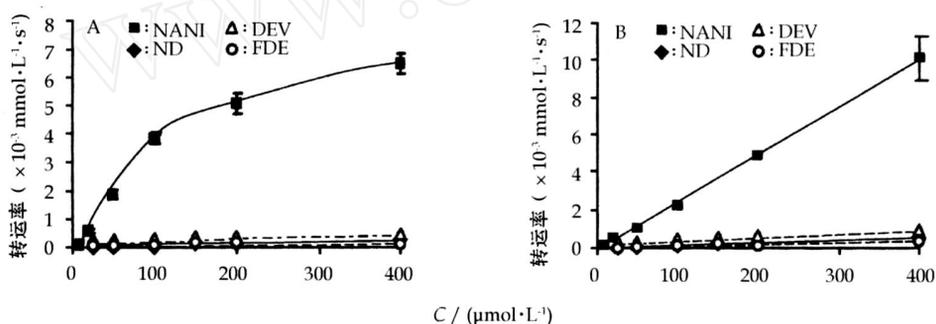


图 5 不同浓度的 4 个香豆素 AP→BL (A) 和 BL→AP (B) 的转运速率
Fig. 5 Transportation rate of four coumarins with different concentration from AP to BL side (A) and from BL to AP side (B)

3. 6 蓄积和香豆素回收率: 4 个香豆素在转运实验结束时在 Caco-2 细胞单层中的蓄积率和总回收率研究结果如表 2。

表 2 4 个香豆素在 Caco-2 细胞单层中的蓄积及其回收率

Table 2 Intracellular accumulation and total recovery rate of four coumarins from Caco-2 cell monolayer in transportation period

化合物	AP BL		AP BL	
	胞内摄入 / %	总回收率 * / %	胞内摄入 / %	总回收率 * / %
NANI	5.89	102.56	5.36	96.52
ND	7.32	99.26	6.25	101.50
DEV	7.46	97.65	7.77	100.98
FDE	9.12	100.25	9.21	103.54

* 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

* 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 transportation assays

4 讨论

本研究探讨了羌活中 NANI、ND、DEV 和 FDE 等 4 个线型二氢呋喃类香豆素在人源肠

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试验要求^[11]。

由转运和外流试验结果并与普萘洛尔和阿替洛尔比较, 除 NANI 外, 其他 3 个香豆素的 P_{app} 值均在 10^{-7} 数量级, 预测为吸收不良的化合物^[11], 但 FDE 好于 ND 和 DEV, 从分子结构判断与它的极性弱于后二者直接相关; NANI 的 P_{app} 值在 10^{-6} 数量级, 预测为吸收中等的化合物^[11]。从 $P_{app, AP \rightarrow BL} / P_{app, BL \rightarrow AP}$ 比值, 提示 NANI、ND 和 DEV 的 $P_{app, AP \rightarrow BL}$ 吸收转运占主导优势, 以被动扩散吸收为主。以 NANI 为母核, 糖苷化成为 ND 由吸收中等转为吸收不良; ND 进一步羟基化转为 DEV, 吸收更不良。而当 ND 糖基 C₆-OH 与阿魏酸成酯结合为 FDE 后, 由于分子增大, 吸收仍不良。总的趋势是同母核类型化合物, 苷元的吸收转运比相应的苷强, 进一步说明肠对中药成分的被动扩散吸收与其极性和分子大小密切相关。

进一步研究肠吸收与化合物结构的关系, 将 4 个香豆素吸收转运的 $P_{app, AP \rightarrow BL}$ 值与其在反相柱 HPLC 的保留时间进行相关性分析, 虽然它们都具有 NANI 母核结构, 但在 AP → BL 方向转运上, $r =$

0.291 9;在 BL AP 方向转运(图未给出)上, $r=0.433 8$;相关性不佳。将3个香豆素苷 DEV、ND 和 FDE 一起进行相关性分析,在 AP BL 方向转运上, $r=0.998 9$;在 BL AP 方向转运(图未给出)上, $r=0.970 1$;相关性良好。提示糖基结合对它们的吸收转运产生了重要影响。

已知药物分子通过肠上皮转运的途径主要有被动扩散和载体介导的主动转运。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 分配系数可以通过取代基的疏水常数(σ)计算得到,但由于立体因素的影响,往往缺乏准确性;也可以通过摇瓶试验测定,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 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,可用来预测及评价药物分子的吸收。将4个香豆素一起进行相关性分析,在 AP BL 方向转运上, $r=0.520 0$;在 BL AP 方向转运(图未给出)上, $r=0.635 7$;相关性不佳。将糖苷化的 DEV、ND 和 FDE 一起进行相关性分析,在 AP BL 方向转运上, $r=0.996 1$;在 BL AP 方向转运(图未给出)上, $r=0.970 1$;相关性良好。总体趋势是 Log D 值越大,油水分配系数越大,极性越小, P_{app} 值越大。DEV 的 Log D 值很低,仅为 -0.57,说明该化合物在 pH=7.35 的环境中极性较大。同时,实验结果亦提示 NANI 的转运机制可能主要为旁细胞被动转运,3个香豆素苷的转运机制主要为穿细胞连接被动转运。

在吸收转运的时效关系研究中,苷元 NANI 浓度在 AP 端逐渐减小,而在 BL 端逐渐升高。3个糖苷化的 ND、DEV 和 FDE 随着温育时间的延长,转运速率近似线性增加,但趋势非常缓慢;NANI 的转运速率较快,在 120 min 后速率明显减慢,有近似平台区的出现。转运速率从大到小的顺序为: NANI>ND>FDE>DEV。在吸收转运的量效关系研究中,ND、DEV 和 FDE 随着浓度的增加转运/外流速率皆呈线性增加,没有出现饱和现象,提示它们在双向透过肠细胞时可能均无载体介导,是依靠浓度差驱动被动扩散穿过细胞的。NANI 在 AP

BL 方向转运,当浓度小于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时的转运速率呈线性增加;而当浓度高于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,随着浓度的增加,转运速率增加的幅度大幅变小,出现近似平台区。提示可能有载体参与其转运吸收。但在 BL AP 方向转运,可能没有载体参与其吸收转运。

为了考察4个香豆素在 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试验,结果证明4个香豆素在 Caco-2 细胞中的蓄积非常少,总回收率在 90%~110%,说明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。

总之,由双向转运结果来判断:NANI 为吸收中等的化合物,其他3个化合物为不易吸收的化合物,其吸收转运具有被动扩散特性;初步预测它们皆能进入体循环,发挥生物学活性,但苷元与其苷在吸收程度上存在较大差异。以上述结果为基础,本课题组将探讨4个香豆素在人源肠 Caco-2 细胞单层模型中吸收转运相互作用,为确定羌活的有效成分^[10,13] 提供肠吸收方面的科学依据。

参考文献:

- [1] Yang X W, Zhang P, Tao H Y, et al. GC-MS Analysis of essential oil constituents from rhizome and root of *Notopterygium incisum* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2006, 15(3): 172-177.
- [2] Yang X W, Zhang P, Tao H Y, et al. GC-MS Analysis of essential oil constituents from rhizome and root of *Notopterygium forbesii* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2006, 15(4): 200-205.
- [3] 张鹏,杨秀伟.羌活化学成分的进一步研究[J].中国中药杂志,2008,33(24):2918-2921.
- [4] 杨秀伟,严仲铠,顾哲明,等.宽叶羌活化学成分的研究[J].中国药学杂志,1994,29(3):141-143.
- [5] 杨秀伟,严仲铠,顾哲明,等.羌活化学成分的研究[J].中草药,1993,24(10):507-511.
- [6] 杨秀伟.应用2D NMR技术研究羌活苷的结构[J].波谱学杂志,2006,23(4):429-442.
- [7] Yang X W, Gu Z M, Wang B X, et al. Comparison of anti-lipid peroxidative effects of the underground parts of *Notopterygium incisum* and *N. forbesii* in mice [J]. *Planta Med*, 1991, 57(5): 399-401.
- [8] 杨秀伟,徐波,冉福香,等.11种香豆素类化合物对人膀胱癌细胞系 E-J 细胞株生长抑制活性的筛选[J].中西医结合学报,2007,5(1):56-60.
- [9] 杨秀伟,徐波,冉福香,等.40种香豆素类化合物对人表皮癌细胞系 A432 细胞株和人乳腺癌细胞系 BCAP 细胞株增殖抑制活性的筛选[J].中国现代中药,2006,8(12):9-10.
- [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] 马莲,杨秀伟.盐酸黄连碱和小檗碱在人源 Caco-2 细胞单层模型中的吸收研究[J].中国中药杂志,2007,32(23):2523-2527.
- [13] 杨秀伟.中草药化学成分的研究[J].中草药,2007,38(7):961-969.