

## • 药理与临床 •

## 6 个线型呋喃香豆素类化合物在人源肠 Caco-2 细胞模型的吸收转运研究

李苏宁, 杨秀伟\*

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 研究花椒毒酚(1)、花椒毒素(2)、欧前胡素(3)、异欧前胡素(4)、8-甲氧基异欧前胡素(蛇床灵, 5)和异茴芹素(6) 6 个线型呋喃香豆素类化合物在人源肠 Caco-2 细胞单层模型的吸收特性。方法 应用人源结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞单层模型测试 6 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 6 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。根据 1~6、补骨脂素(7)、佛手酚(8)、佛手酚葡萄糖苷(9)、佛手内酯(10)、紫花前胡苷(11)、紫花前胡苷元(12)、前胡苷 V(13)、伞形花内酯(14)、甲氧基欧芹素(15)、当归醇-A(16)、当归醇-B(17) 在 Caco-2 细胞单层模型的吸收特性, 总结这些香豆素类化合物结构、亲脂性与吸收的规律。结果 6 个香豆素类化合物双向转运的  $P_{app}$  值皆在  $10^{-5}$  cm/s 数量级, 与在 Caco-2 细胞单层模型上呈良好吸收的普萘洛尔的  $P_{app}$  值在同一数量级, 且皆通过被动吸收机制通过 Caco-2 细胞单层。结论 6 个香豆素皆属于吸收良好的化合物。香豆素 1~17 的  $\lg P_{app AP \rightarrow BL}$  与  $\lg D$  (pH 7.35) 呈显著 S 型相关, 主要通过被动扩散机制吸收转运。

**关键词:** 香豆素; Caco-2 细胞; 肠吸收; 花椒毒酚; 花椒毒素; 欧前胡素; 异欧前胡素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0096-07

## Absorption and transportation characteristic of six linear furocoumarins in a model of Caco-2 cell monolayer in human intestine

LI Su-ning, YANG Xiu-wei

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 xanthotoxol (1), xanthotoxin (2), imperatorin (3), isoimperatorin (4), cnidilin (5), and isopimpinellin (6), which were classified as the linear type furocoumarins, in a model of Caco-2 cell monolayers in human intestinal epithelium. **Methods** Caco-2 (the human colon adenocarcinoma cell lines) cell monolayer was used as an intestinal epithelial cell model. The permeability of the six coumarins from apical side (AP side) to basolateral side (BL side) or from BL side to AP side was evaluated. The concentration of the six 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. Based on the absorption and transportation characteristic of coumarins 1—6, and psoralen (7), bergaptol (8), bergaptol-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside (9), bergaptin (10), nodakenin (11), nodakenetin (12), decuroside V (13), umbelliferone (14), osthole (15), angelol-A (16), and angelol-B (17) in a model of Caco-2 cell monolayer, the relationship of absorption and transportation with diversified chemical structures and lipophilicity was reviewed. **Results** In the Caco-2 cell monolayer model, the  $P_{app}$  magnitudes of the linear furocoumarins 1—6 were  $10^{-5}$  cm/s in the bi-directional transport, which was identical with Propranolol. And the permeability of Caco-2 cell monolayer is mainly *via* passive absorption. **Conclusion** The above-mentioned linear furocoumarins 1—6 are well-absorbed compounds. The results show that a significant Sigmoid dependence of permeability on  $\lg P_{app AP \rightarrow BL}$  and  $\lg D$  at pH 7.35 of all 1—17 furocoumarins can be absorbed across intestinal epithelial cells by passive diffusion mechanism.

**Key words:** coumarin; Caco-2 cell; intestinal absorption; xanthotoxol; xanthotoxin; imperatorin; isoimperatorin

收稿日期: 2010-04-25

基金项目: 科技部“863”资助项目(2002AA2Z343C, 2004AA2Z3783); 北京市科委资助项目(Z0004105040311); 国家自然科学基金(30672609); “十一五”国家科技支撑计划(2006BAI06A01-02); 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: 李苏宁(1984—), 女, 江苏人, 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室、北京大学药学院硕士研究生, 硕士学位, 主要研究方向为天然药物化学和药物的 ADMET/Act 研究。Tel: (010) 82801569 Fax: (010) 82802724 E-mail: lisuning@yahoo.cn

\*通讯作者 杨秀伟 Tel: (010) 82805106 Fax: (010) 82802724 E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

香豆素类化合物是一个重要的天然产物类群, 在伞形科和芸香科植物中最为常见。香豆素有多种药理活性, 主要包括抗菌、抗癌、抗 HIV、抗凝血、止血、平喘、祛痰、保护血管、治疗心绞痛和抗氧化等。传统中药补骨脂、蛇床子、白芷、前胡、独活等的主要药效成分皆是香豆素或其衍生物。中药多以口服形式应用, 其药效成分能否被人肠道吸收, 是决定其能否发挥生物学活性的重要因素之一<sup>[1]</sup>。在对中药不同结构类型化学成分肠吸收的系统性评价研究中, 本课题组研究了倍半萜<sup>[2]</sup>、三萜<sup>[3-4]</sup>、黄酮<sup>[5]</sup>、蒽醌<sup>[6]</sup>、生物碱<sup>[7-10]</sup>、含硫化合物<sup>[11]</sup>、柠檬苦素<sup>[12]</sup>等类型化合物在人源肠 Caco-2 细胞单层模型<sup>[13]</sup>的吸收转运, 本研究选择花椒毒酚 (xanthotoxol, **1**)、花椒毒素 (xanthotoxin, **2**)、欧前胡素 (imperatorin, **3**)、

异欧前胡素 (isoimperatorin, **4**)、8-甲氧基异欧前胡素 (蛇床灵, cnidilin, **5**)、异茴芹素 (isopimpinellin, **6**) 6 个线型呋喃香豆素类化合物, 应用 Caco-2 细胞单层模型研究其吸收转运特性, 并结合已报道的补骨脂素 (psoralen, **7**)、佛手酚 (bergaptol, **8**)、佛手酚葡萄糖苷 (bergaptol-O-β-D- glucopyranoside, **9**)、佛手内酯 (bergapten, **10**)<sup>[14]</sup>、紫花前胡苷 (nodakenin, **11**)、紫花前胡苷元 (nodakenetin, **12**)、前胡苷 V (decuroside V, **13**)<sup>[15]</sup>、伞形花内酯 (umbelliferone, **14**)、甲氧基欧芹素 (osthole, **15**)、当归醇-A (angelol-A, **16**)、当归醇-B (angelol-B, **17**)<sup>[16]</sup>在 Caco-2 细胞单层模型吸收转运的特性, 总结这些香豆素类化合物结构、亲脂性与吸收的规律。化合物 **1**~**17** 结构见图 1。

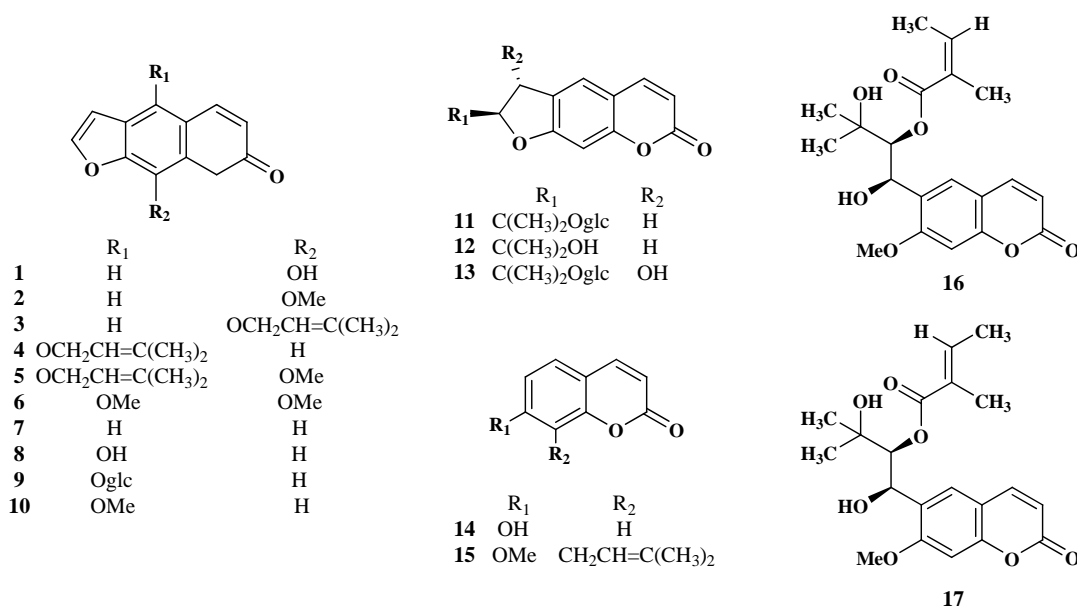


图 1 化合物 1~17 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—17

## 1 材料

### 1.1 细胞

Caco-2 细胞株 (ATCC#HTB-37) 购自美国 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)。

### 1.2 药品及主要试剂

受试化合物 **1**~**6** 皆由本课题组从木橘 *Aegle marmelos* (L.) Corrèr<sup>[17]</sup>、独活 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan<sup>[18]</sup>、大活 *Angelica dahurica* (Fisch.) Benth. et Hook.f.、朝鲜当归 *Angelica gigas* Nakai<sup>[19]</sup>、羌活 *Notopterygium incisum*

Ting ex H. T. Chang<sup>[20]</sup>中分离得到, HPLC 检测其质量分数皆 >99%。DMEM 培养基、Hank's 缓冲溶液 (HBSS)、普萘洛尔、阿替洛尔、二甲基亚砜 (DMSO) 均购自 Sigma 公司, 胎牛血清 (FBS)、非必需氨基酸购自 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、链霉素购自华北制药集团, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、D-(+)-葡萄糖、乙二胺四乙酸 (EDTA) 购自北京化学试剂公司, 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 甲醇 (色谱纯) 购自天津西华特种试剂厂, 实验用三蒸水, 12 孔聚碳

酯膜转运板 (Transwell) 和 25、75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶购自 Corning Costar 公司 (Cambridge, MA, 美国)。

### 1.3 仪器

GALAXYB 型 CO<sub>2</sub> 气体培养箱 (英国 RS Biotech 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 (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™ C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 偶联 Dikma Easy Guard C<sub>18</sub> 保护柱 (20 mm×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<sup>[21]</sup>。

### 2.2 细胞培养和种板

按文献方法<sup>[20]</sup>标准操作规程, Caco-2 细胞生长到汇合率 80% 后传代, 用 DMEM 悬浮细胞使最终浓度为 1×10<sup>5</sup>/mL; 向 Transwell 的底端 (basolateral, BL) 加入 1.5 mL 完全 DMEM-10 培养基, 向顶端 (apical, AP) 加入 0.5 mL 已充分混合的细胞混悬液, 放入 37 °C 恒温 CO<sub>2</sub> 气体培养箱中培养; 第 2 天换 AP 端和 BL 端的培养液, 分别为 0.5、1.5 mL; 第 3~7 天隔天换 AP 端和 BL 端的培养液, 分别为 0.5、1.5 mL; 第 8~17 天每天换 AP 端培养液 0.5 mL, 隔天换 BL 端培养液 1.5 mL; 第 18 天以后每天换 AP 端和 BL 端的培养液, 分别为 0.5、1.5 mL。为避免种板初期死细胞堵塞膜表面, 种板后第 1、3 天换液时先换 AP 端的培养液; 第 5 天以后为避免细胞单层暴露在空气中时间过长, 换液时先换 BL 端的培养液。本实验使用 Caco-2 细胞代数为 42~58 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<sup>[19]</sup>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。接种的 Caco-2 细胞, 分别在培养的第 6、11、16、21 天用 HBSS 缓冲液洗细胞单层 2 次, 用含钙 1.0 mmol/L、镁 0.5 mmol/L 和 0.5% Triton-100 的 PBS 溶解细胞, 置冰浴上 1 h, 12 000×g 离心 10 min, 取上清液, 按 Lowry 法测定蛋白质的量。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 条件

受试化合物 1~6 的 HPLC 分析用 Dikma Diamonsil™ C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为室温; 进样量 20 μL; 流动相为甲醇-水 (80:20), 体积流量 1 mL/min; 受试化合物 1~4 的检测波长 245 nm; 化合物 5 和 6 的检测波长为 322 nm。

### 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 (150 μmol/L) 受试香豆素化合物溶液, 于 37 °C 水浴摇床上按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 6 个受试香豆素化合物溶于 DMSO 中配制成 10 mmol/L 储备液, 用 HBSS 缓冲液稀释至实验所设计浓度。选取细胞跨膜电阻 >500 Ω/cm<sup>2</sup> 的 Caco-2 细胞单层, 根据实验设计, 分别在细胞单层两侧加入受试化合物和 HBSS 溶液 (AP 端 0.5 mL, BL 端 1.5 mL), 于 37 °C 恒温摇床 (50 r/min) 上温育。6 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 端的溶液, 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试验; BL 端给药、AP 端取样分析为外流试验。当 AP 端给药时, 给药侧 AP 端取样 0.40 mL, 接受侧 BL 端取样 1.3 mL; 当 BL 端给药时, 给药侧和接受侧分别取样 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”、“2.6”项制得冷冻干燥样品从 -20 °C 冰箱中取出, 分别加入不同量的甲醇, 漩涡混匀后超声溶解 20 min; 在 12 000×g 条件下离心 10 min, 取上清液, 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

溶液,以冷的 HBSS 缓冲液洗涤 3 次,放置在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  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,将附着在聚碳酸酯膜上的 Caco-2 细胞取出,放在适量甲醇-水(70:30)混合溶液中,漩涡混匀后超声溶解 30 min, $8\ 000\times g$  条件下离心 10 min,取上清,即得 Caco-2 细胞摄入分析样品,注入 HPLC 仪进行分析测定,计算受试香豆素在 Caco-2 细胞中的摄入量。转运试验结束时 AP 端、BL 端和 Caco-2 细胞中的摄入量之和为总回收量;总回收量与加入的初始量之比为总回收率。

### 2.9 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  $Q$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) 是累积转运量,代表化合物在接收室出现的总量; $dQ/dt$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) 是速率; $C_0$  是化合物在给予室的初始浓度,单位为 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-3}$ );  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) 是聚碳酸酯膜的表面积。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

分别精密称取化合物 **1** (1.9 mg)、**2** (2.5 mg)、**3** (2.6 mg)、**4** (2.6 mg)、**5** (2.9 mg)、**6** (2.3 mg),用 DMSO 溶解,并配成 10 mmol/L 浓度的储备液。精密吸取 40  $\mu\text{L}$  储备液,用最后 1 次洗涤 Caco-2 细胞单层的 HBSS 稀释至 4 mL,充分混匀后依次吸取 20、50、100、200、300、400、500、600、800、1 000  $\mu\text{L}$ ,分别用 HBSS 定容至 1 mL,制成浓度为 2、5、10、20、30、40、50、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$  的系列溶液。冷冻干燥后,加甲醇定容至 1 mL, $15\ 000\times g$  离心 10 min,取上清液,进样 20  $\mu\text{L}$ ,按“2.4”项条件进行分析测定,以峰面积积分值( $y$ )为纵坐标,样品摩尔浓度( $x$ )为横坐标,得线性回归方程:化合物 **1** 为  $y=3.640\ 5x-0.04$  ( $r^2=0.999\ 4$ ,  $n=3$ ); 化合物 **2** 为  $y=2.707\ 3x+0.976\ 7$  ( $r^2=0.999\ 1$ ,  $n=3$ ); 化合物 **3** 为  $y=3.738\ 4x+2.698\ 2$  ( $r^2=0.999\ 1$ ,  $n=3$ ); 化合物 **4** 为  $y=4.573\ 6x+0.455\ 2$  ( $r^2=0.999\ 2$ ,  $n=3$ ); 化合物 **5** 为  $y=6.152\ 5x+2.998\ 3$  ( $r^2=0.999\ 2$ ,  $n=3$ ); 化合物 **6** 为  $y=6.927\ 9x+2.362\ 2$  ( $r^2=0.999\ 1$ ,  $n=3$ )。线性范围皆为  $2.00\times 10^{-3}\sim 0.1\ \text{mmol/L}$ 。在“2.4”项色谱条件下,6 个香豆素的保留时间( $t_R$ )见表 1。

### 3.2 回收率试验

AP 端给药,6 个香豆素给药浓度皆为 50

$\mu\text{mol/L}$ 。给药后 90 min,分别取 AP 端和 BL 端液,按“2.6”项和“2.7”项方法处理,按“2.4”项条件分析测定,计算回收率,化合物 **1**~**6** 的回收率分别为 80.20%、98.10%、70.77%、87.54%、116.29%、89.29%。除化合物 **3** 外,其他 5 个化合物在转运过程中基本没有代谢转化、损失或吸附在细胞上,对实验结果分析不会产生影响。在化合物 **3** 的分析检测中发现在保留时间小于化合物 **3** 的时间处出现一个小峰,是否为其代谢产物还需进一步实验确定。

### 3.3 最低检测限和定量限

按“2.4”项条件进行分析测定,得化合物 **1**~**6** 的最低检测限( $\mu\text{mol}$ )分别为:0.27、1.09、3.00、0.44、3.70、2.77;最低定量限( $\mu\text{mol}$ )分别为:0.27、1.34、3.65、0.85、5.36、4.06。

### 3.4 稳定性试验

HPLC 定量测定结果表明,所有 6 个受试香豆素在 HBSS 缓冲液、在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下皆稳定;重复冻融 3 次,皆稳定。

### 3.5 Caco-2 细胞单层完整性与转运能力

本实验条件下,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  $(2.46\pm 0.28)\times 10^{-5}\ \text{cm/s}$ ,符合文献报道值  $2.75\times 10^{-5}\ \text{cm/s}$  数量级<sup>[21]</sup>;呈难转运的阳性对照药阿替洛尔的  $P_{app}$  值为  $(2.34\pm 0.09)\times 10^{-7}\ \text{cm/s}$ ,符合文献报道值  $1.0\times 10^{-7}\ \text{cm/s}$  数量级<sup>[21]</sup>。按试剂盒说明测定 ALP 活性,发现 Caco-2 细胞未完全汇合时不能水解 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;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。本实验所用 Caco-2 细胞培养 21 d 具有 ALP 活性,说明细胞分化已经成熟。基于以上结果,判断所用 Caco-2 细胞单层具有良好的紧密性、完整性和转运能力。

### 3.6 吸收转运试验

从 Transwell 的 AP 端或 BL 端给药,6 个香豆素的给药浓度皆为 50  $\mu\text{mol/L}$ 。温育 90 min,分别从给药端和接受端取液,从 AP 端到 BL 端和从 BL 端到 AP 端的  $P_{app}$  值见表 1。

### 3.7 时间动力学试验

6 个香豆素在给药浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时,AP 端给药,每 30 min 取样,共取至 180 min,各香豆素的转运率见图 2;随时间变化吸收转运和外流的  $P_{app}$  值见图 3 和 4。

3.8 浓度与吸收转运关系的研究

在 6 个香豆素中选择 4 个典型的化合物 1~4 进行浓度与吸收转运关系研究, 10、25、50、100、

150  $\mu\text{mol/L}$  浓度的转运速率曲线见图 5 和 6。

3.9 香豆素 1~17 结构、极性与吸收关系的研究

根据本研究结果, 并结合其他 11 个香豆素 (7~

表 1 6 个香豆素在 Caco-2 细胞单层模型双向转运的  $P_{\text{app}}$  值及其保留时间 ( $n=3$ )

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

化合物	$P_{\text{app AP}\rightarrow\text{BL}}/(\times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	$P_{\text{app BL}\rightarrow\text{AP}}/(\times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	$P_{\text{app AP}\rightarrow\text{BL}}/P_{\text{app BL}\rightarrow\text{AP}}$	lg D (pH 7.35)	$t_{\text{R}}/\text{min}$
1	$2.65 \pm 0.14$	$2.63 \pm 0.13$	1.01	1.48	4.26
2	$3.43 \pm 0.24$	$3.97 \pm 0.18$	0.86	2.17	4.93
3	$2.38 \pm 0.07$	$2.14 \pm 0.13$	1.11	3.70	8.27
4	$3.43 \pm 0.22$	$3.44 \pm 0.12$	1.00	3.70	5.82
5	$1.75 \pm 0.10$	$1.22 \pm 0.05$	1.43	2.07	9.88
6	$1.41 \pm 0.01$	$1.20 \pm 0.07$	1.18	2.82	11.85

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

lg D (pH 7.35): apparent partition coefficient of test coumarins at pH 7.35

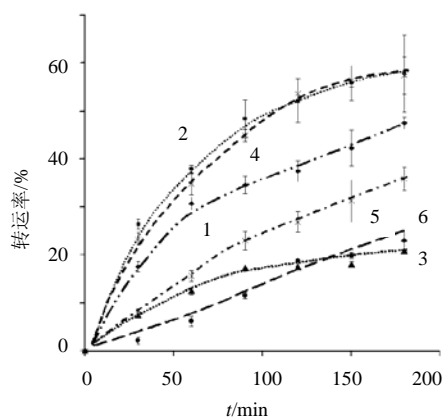


图 2 6 个香豆素从 Caco-2 细胞单层模型 AP 端到 BL 端的转运率 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Kinetic curve of six coumarins transportation rate in Caco-2 cell monolayer from AP to BL side ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

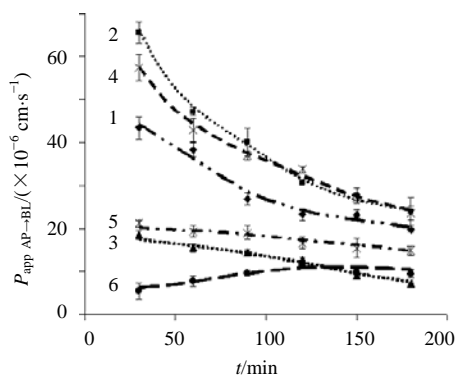


图 3 6 个香豆素的  $P_{\text{app AP}\rightarrow\text{BL}}$  值随时间变化曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Relationship of  $P_{\text{app AP}\rightarrow\text{BL}}$  vs retention time for six coumarins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

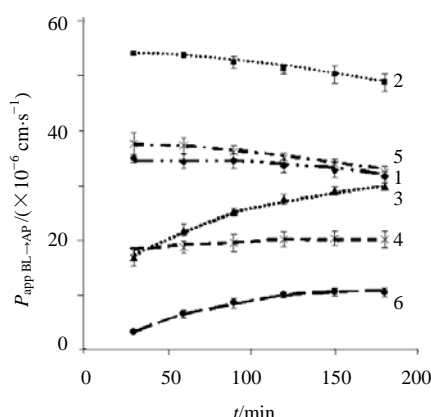


图 4 6 个香豆素的  $P_{\text{app BL}\rightarrow\text{AP}}$  值随时间变化曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Relationship of  $P_{\text{app BL}\rightarrow\text{AP}}$  vs  $t_{\text{R}}$  for six coumarins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

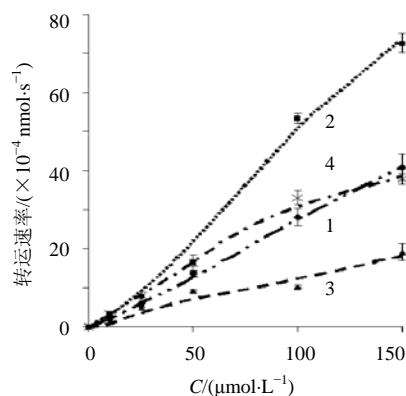


图 5 4 个香豆素在不同浓度从 AP 到 BL 端的转运速率 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 5 Transportation rate of four coumarins with different concentrations from AP to BL side ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

17) [14-16] 在 Caco-2 细胞单层模型的吸收转运, 判断它们的吸收转运机制主要为跨细胞被动扩散, 这些香豆素的生物膜通透性应仅与其本身的物理化学特性, 如亲脂性、分子大小等相关。亲脂性主要衡量指标是表观分配系数  $\lg D$  (pH 7.35)。以  $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  的对数值对  $\lg D$  (pH 7.35) 作图, 得图 7。

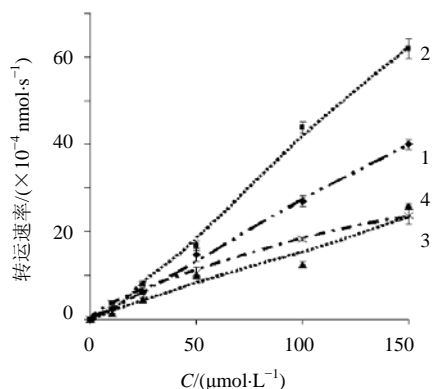


图 6 4 个香豆素在不同浓度从 BL 到 AP 端的转运速率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Transportation rate of four coumarins with different Concentrations from BL to AP side ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

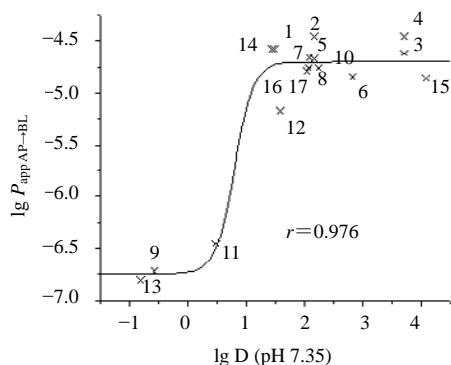


图 7 香豆素 1~17 的吸收与极性的关系

Fig. 7 Relationship of  $\lg P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  vs  $\lg D$  (at pH 7.35) for coumarins 1—17

#### 4 讨论

本研究探讨了花椒毒酚、花椒毒素、欧前胡素、异欧前胡素、8-甲氧基异欧前胡素以及异茴芹素 6 个线型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。吸收转运和外流试验结果表明, 6 个香豆素的  $P_{app}$  值皆在  $10^{-5}$  cm/s 数量级, 与阳性对照药普萘洛尔比较可判断其皆为吸收良好的化合物<sup>[21]</sup>。根据文献报道<sup>[22]</sup>可预测它们在人体的口服吸收顺序为: 花椒毒素、异欧前胡素 > 花椒毒酚、欧前胡素 > 8-甲氧基异欧前胡素、异茴芹素。

化合物透过 Caco-2 细胞单层时主要受分子亲脂性、亲水性以及分子大小等因素影响, 花椒毒酚比花椒毒素少一个甲基, 花椒毒素又比欧前胡素侧链碳链短, 所以它们的极性逐渐减小, 吸收渐好。异欧前胡素与欧前胡素相对分子质量大小相等, 有相同的取代基, 但在母核上的连接位置不同, 所以可能因为空间结构的关系, 异欧前胡素的肠吸收能力较好。8-甲氧基异欧前胡素比异欧前胡素多一个甲氧基, 极性减小, 吸收更好。

6 个香豆素类化合物双向转运的  $P_{app}$  值比值皆在 0.8~1.5, 提示它们的吸收和外流能力相近, 可推测它们在 Caco-2 细胞模型中的吸收没有载体转运参与, 即此系列香豆素在 Caco-2 细胞模型中的转运途径可能主要为单纯的透细胞被动转运。

在各化合物时间-转运率图中, 6 个化合物在 120 min 后皆出现了曲线斜率的轻微下降, 这是由于随着吸收转运时间增加、药物的不断透过, Caco-2 细胞单层两侧的浓度差不断减小, 使以浓度梯度为动力的被动扩散有所减弱。

从图 3 和 4 可以看出, 6 个香豆素类化合物在时间动力学研究中的  $P_{app}$  值顺序是花椒毒素、异欧前胡素 > 花椒毒酚 > 8-甲氧基异欧前胡素 > 欧前胡素 > 异茴芹素, 与单点单浓度实验中测定的结果基本一致。花椒毒酚、花椒毒素和异欧前胡素的  $P_{app}$  值皆随温孵时间的增加而呈减小趋势, 说明它们的转运速率随时间降低。这种情况可能因为在转运初期, Caco-2 细胞单层两端化合物的浓度差异较大, 随着温育时间的增加, 化合物的透过量增加, 使得膜两侧的浓度差降低, 因此以浓度梯度为动力的跨膜过程减慢。这个结果亦可以说明受试香豆素是通过被动扩散机制进行转运的。而欧前胡素、8-甲氧基异欧前胡素和异茴芹素的  $P_{app}$  数值相对较小, 转运速率较低, 可认为它们的转运速率基本未发生变化。因为转运速率低的缘故, 双向浓度差的变化亦不会太大, 所以仍可判断其为被动扩散。

在 6 个香豆素中选择其中 4 个化学结构比较典型的进行浓度与吸收转运关系的研究, 发现它们随浓度增加, 吸收和外流速率皆呈线性增加, 没有出现饱和现象。进一步证明这 4 个香豆素在双向透过肠壁细胞时皆无载体介导, 转运方式为浓度梯度驱动的被动扩散。

从图 7 结果可以判断,  $\lg D$  值从 -1.0~4.0 内, 香豆素 1~17 的  $\lg P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  与  $\lg D$  呈显著的 S 型

相关 ( $r=0.976$ ), 完全符合文献报道的 S 型依赖关系 (Sigmoid dependence) [23]。对于被动扩散机制转运的化合物和 (或) 药物而言, 只要亲脂性为中等程度以上即  $\lg D(\text{pH } 7.35) > 1.5$ , 其渗透性即可达到渗透性良好的平台区。这提示在筛选类药化合物时, 可以选择脂溶性中等的化合物, 在满足较好渗透性的同时还可兼顾溶解度。因为脂溶性越大其溶解度越小, 同样会影响化合物在体内的吸收。

从结构角度考虑, 吸收较差的 3 个化合物皆为香豆素的葡萄糖苷。由于引入了葡萄糖基导致了其亲水性较强而亲脂性较差, 因此它们的生物膜通透性较差亦在意料之中。但是考虑到这些香豆素葡萄糖苷类化合物的水溶性较好, 加上口服之后它们会被肠上皮细胞或者肠内菌所分泌的葡萄糖苷水解酶水解而释放出香豆素苷元, 同样可以被很好的吸收而发挥药效。

总之, 通过本研究, 明确了受试的 6 个线型呋喃香豆素皆属于良好吸收的化合物, 预测其主要通过小肠上皮细胞被动吸收进入体内。结合本课题组已有的研究成果, 总结出 17 个香豆素物化参数与吸收的关系, 以上结论将进一步完善香豆素类化合物结构与吸收关系的研究, 并为构建相关的预测模型和计算机高通量预测其体内吸收提供了科学依据。

#### 参考文献

- [1] 祝诚诚, 何新. 药物肠道的吸收研究方法 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 222-227.
- [2] Yang X W, Guo Q M, Wang Y, *et al.* Intestinal permeability of antiviral constituents from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. in Caco-2 cell model [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(4): 1107-1111.
- [3] Zheng Y, Yang X W. Absorption and transport of pachymic acid in the human intestinal cell line Caco-2 monolayers [J]. *J Chin Integr Med*, 2008, 6(7): 704-710.
- [4] 郑艳, 杨秀伟. 茯苓三萜类化合物在人源 Caco-2 细胞单层模型中的吸收研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(13): 1596-1601.
- [5] Tian X J, Yang X W, Yang X D, *et al.* Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model [J]. *Int J Pharm*, 2009, 367(1): 58-64.
- [6] Wang Y, Yang X W. Intestinal transport of free anthraquinones in Caco-2 cell model [J]. *Chin J Nat Med*, 2008, 6(3): 141-145.
- [7] Yang X W, Teng J, Xu W, *et al.* The permeability and the efflux of alkaloids of the *Evodiae Fructus* in the Caco-2 model [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(1): 56-60.
- [8] Ma L, Yang X W, Xu W, *et al.* Intestinal permeability of antitumor alkaloids from the processed seeds of *Strychnos nux-vomica* in a Caco-2 cell model [J]. *Planta Med*, 2009, 75(6): 631-634.
- [9] 马莲, 杨秀伟. 利用人源 Caco-2 细胞单层模型研究罂粟碱、N-甲基四氢罂粟碱和头花千金藤碱在小肠的吸收 [J]. 药学学报, 2008, 43(2): 202-207.
- [10] 马莲, 杨秀伟. 利用 Caco-2 细胞单层模型预测柯楠碱、育亨宾、阿马碱、萝芙木碱的人肠吸收 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2373-2377.
- [11] 田莉, 杨秀伟, 王莹, 等. 顺式-和反式-阿霍烯在 Caco-2 细胞模型中的体外摄取、转运和外排特性 [J]. 药学学报, 2007, 42(1): 87-92.
- [12] Yang X W, Teng J, Zhao B, *et al.* Studies on absorption and transport of limoninoids from *Fructus Evodiae* in Caco-2 cell monolayer model [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 53-58.
- [13] 谭晓斌, 贾晓斌, 陈彦, 等. 从肠吸收屏障网络进行中药基础研究的思路及探索 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1520-1524.
- [14] 龙捷, 李苏宁, 杨秀伟. 线型呋喃香豆素类化合物在人源肠 Caco-2 细胞模型中的吸收特性 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(19): 1865-1871.
- [15] 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.
- [16] 杨秀伟, 郭庆梅, 王莹. 独活中 6 种香豆素类成分在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收转运研究 [J]. 中西医结合学报, 2008, 6(4): 392-398.
- [17] Yang X W, Hattori M, Namba T. Two new coumarins from the roots of *Aegle marmelos* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1996, 5(2): 68-73.
- [18] 张才煜, 张本刚, 杨秀伟. 独活化学成分的研究 [J]. 解放军药学报, 2007, 23(4): 241-245.
- [19] 杨秀伟, 王继彦, 严仲铠, 等. 四种长白山产当归属药用植物化学成分的研究 [J]. 中药材, 1994, 17(4): 30-32.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Artursson S, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(123): 27-43.
- [23] van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, *et al.* Estimation of Caco-2 cell permeability using calculated molecular descriptors [J]. *Quant Struct-Act Relat*, 1996, 15: 480-490.