

脱水穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制

姚媛^{1,2}, 廖琼峰^{1*}, 谢智勇³, 曾元儿¹, 马燕¹

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

3. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究脱水穿心莲内酯(DAL)在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制。方法 观察 DAL 在 Caco-2 细胞单层模型中的双向转运, 考察时间、DAL 浓度、温度和 *P*-糖蛋白(*P*-gp)抑制剂维拉帕米对 DAL 吸收的影响。采用 LC/MS/MS 方法检测 DAL 浓度, 计算其表观渗透系数(P_{app})。结果 DAL 在 Caco-2 细胞模型中的双向转运, 随时间和浓度的增加, DAL 的吸收具有时间、浓度依赖性, 未出现饱和趋势; 不受温度和 *P*-gp 抑制剂维拉帕米的影响。结论 DAL 在 Caco-2 细胞模型中的吸收主要是靠浓度扩散的被动转运。

关键词: 脱水穿心莲内酯; Caco-2 细胞模型; 被动转运; 维拉帕米; LC/MS/MS

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1154-04

Absorption mechanism of dehydroandrographolide in human Caco-2 cell monolayer model

YAO Yuan^{1,2}, LIAO Qiong-feng¹, XIE Zhi-yong³, ZENG Yuan-er¹, MA Yan¹

1. College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

3. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To study the absorption mechanism of dehydroandrographolide (DAL) in human Caco-2 cell monolayer model. **Methods** Caco-2 cell monolayer model was applied to investigate the bidirectional transport of DAL. The effects of time, drug concentration, temperature, and *P*-gp inhibitor (Verapamil) on the absorption of DAL were observed. Drug concentration was measured by LC/MS/MS and the apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated. **Results** With the time and concentration increasing, the bidirectional transport of DAL in Caco-2 cell monolayer model was of time and concentration dependence, without saturation. And it was not influenced by the change of temperature and the presence of Verapamil. **Conclusion** The absorption and transport of DAL are passive diffusion as the dominating process in Caco-2 cell monolayer model.

Key word: dehydroandrographolide (DAL); Caco-2 cell monolayer model; passive diffusion; Verapamil; LC/MS/MS

脱水穿心莲内酯(dehydroandrographolide, DAL)是常用中药穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的主要有效成分。现代药理研究表明^[1-2], DAL 及其衍生物具有抗炎、抗菌、抗心血管疾病等药理作用。但目前有关 DAL 药动学的报道大多是关于药材或制剂中 DAL 药动学的, 结果不尽相同^[3-6], 有文献报道指出 DAL 单体在大鼠体内比穿心莲片中 DAL 的吸收慢、消除快、生物利用度低。而关于 DAL 的吸收机制研究并未见报道,

在一定程度上限制了 DAL 的开发。Caco-2 (human colon androcarcinoma cell line) 细胞单层模型是目前国内外广泛应用的体外吸收模型, 已迅速发展成为研究药物吸收的可靠手段^[7-10], 并已获美国 FDA 批准用作药物吸收筛选模型。本实验用 Caco-2 细胞单层模型研究 DAL 的吸收机制, 考察时间、DAL 浓度、双向转运、温度和 *P*-糖蛋白(*P*-gp)抑制剂维拉帕米对 DAL 转运的影响, 旨在为穿心莲二萜内酯类成分的药动学研究提供参考。

收稿日期: 2010-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30600823)

作者简介: 姚媛(1984—), 女, 广东汕头人, 硕士, 研究方向为中药质量标准研究及中药药动学。E-mail: flyaoyuan_1984@126.com

*通讯作者 廖琼峰 Tel: (020)39358081 E-mail: liaoqf2075@yahoo.com

1 材料

1.1 药品与试剂

DAL (中国药品生物制品检定所, 批号 110854-200306, 质量分数大于 98%), 甲醇 (色谱纯, Merck 公司), DMEM 培养基 (Gibico 公司), 胎牛血清 (Excell), 非必需氨基酸 (Hyclone)、L-谷氨酰胺 (MBchem 公司), 胰蛋白酶-0.25% EDTA (Sigma 公司), 水为 Milli-Q 超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

96 孔普通培养板、12 孔 Transwell 板 (Corning 公司)。TGL—16B 飞鸽高速离心机 (上海安亭科学仪器厂), CU—600 电热恒温水槽 (上海齐欣科学仪器有限公司), CO—150 型 INNOVA CO₂ 培养箱 (美国 NBS 公司), Millicell-ERS 跨膜电阻仪 (美国 Millipore 公司), IX51 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), LC-MS 系统 (美国 Finnigan 公司): Surveyor MS Pump 液相色谱输液泵、Surveyor Autosampler 自动进样器、Xcalibur 1.3 数据采集软件。

2 方法

2.1 细胞培养

Caco-2 细胞 (美国 ATCC) 培养于 DMEM 培养液中, 培养基含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸及 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素双抗液, 于 37 °C、5% CO₂ 环境中培养。细胞接种在 12 孔 Transwell 板上, 接种密度为每孔 1×10^5 个/mL, 培养约 21 d 后, 细胞形成紧密单层, 可用于实验^[1]。

2.2 MTT 法检测 DAL 对 Caco-2 细胞的抑制作用

取对数生长期的 Caco-2 细胞, 调整细胞密度至 1×10^5 个/mL, 每孔加 200 μL 细胞悬液接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后换液, 实验组加入含 DAL (浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100、200 μmol/L) 的培养液, 对照组以及空白组只加培养液, 每组设 4 个复孔, 继续培养 24 h 后每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 再培养 4 h 后吸弃孔内培养液, 每孔加 150 μL DMSO 溶液, 将 96 孔板置于双层空气恒温振荡器中, 以转速 50 r/min 振荡 10 min, 使结晶物 Formazan 充分溶解, 在酶标仪上选择波长 570 nm 处, 空白孔调零, 测定吸光度 (*A*) 值。计算细胞存活率 (细胞存活率 = 实验组 *A* 值 / 对照组 *A* 值)。

2.3 转运试验

用 pH 6.5 HBSS 溶液配制浓度为 25、50、75、100 μmol/L 的 DAL 溶液, 滤过除菌, 取符合转运条件且细胞生长形态完好的 Transwell 孔, 用 37 °C

空白 pH 7.4 HBSS 溶液冲洗 3 遍, 最后一次于 37 °C 培养箱中孵育 30 min。对于从顶端 (apical side, AP 侧) 到底端 (basolateral side, BL 侧) 转运: 将 DAL 溶液 0.5 mL 加到 AP 侧作为供给池, 同时 BL 侧加入空白 pH 7.4 HBSS 1.5 mL 作为接收池; 对于从 BL 到 AP 转运: 将 DAL 溶液 1.5 mL 加到 BL 侧作为供给池, 空白 HBSS 0.5 mL 加到 AP 侧作为接收池。分别在 30、60、90、120 min 吸取接收液 0.1 mL, 同时补加 37 °C 空白 pH 7.4 HBSS 0.1 mL。每组平行 3 个孔。

2.4 分析方法

2.4.1 色谱条件 预柱为 C₁₈ 保护柱 (2.0 mm×4 mm, 美国 Phenomenex 公司), 分析柱为 Aquasil-C₁₈ 柱 (150 mm×2.1 mm, 5 μm, 美国热电公司), 流动相为甲醇-1% 甲酸 (70:30), 体积流量 0.5 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温为室温。

2.4.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (ESI 源), 喷雾电压为 4 000 V, 加热毛细管温度为 350 °C, 鞘气 (N₂) 压力 3.45×10^5 Pa, 辅助气 (N₂) 压力 8.27×10^4 Pa; 正离子方式检测, 扫描方式为选择反应监测 (SRM), 用于定量分析的离子为 DAL *m/z* 355.2。

2.4.3 样品处理 样品 30 μL, 加入甲醇 60 μL, 涡流 1 min, 静置 10 min, 5 000 r/min 离心 3 min, 吸取上清液进样。

2.5 数据分析

DAL 透过 Caco-2 细胞单层的表观渗透系数 P_{app} (apparent permeability coefficients) 值作为参考, 进行数据处理。两组间比较采用 *t* 检验, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

$$P_{app} = \Delta Q / (\Delta t \times A \times C_0)$$

其中 ΔQ (μmol) 为 Δt (s) 内的转运量, *A* (cm²) 为转运孔膜表面积, *C*₀ (μmol/L) 为在 Caco-2 单层细胞的 AP 或 BL 侧 DAL 的初始浓度

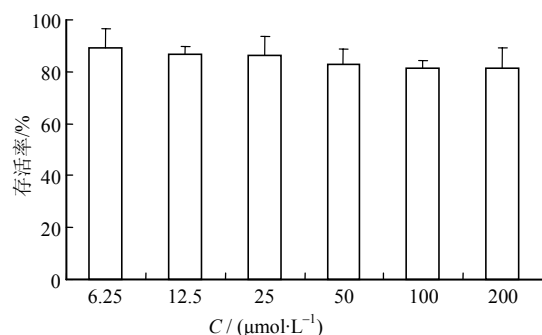
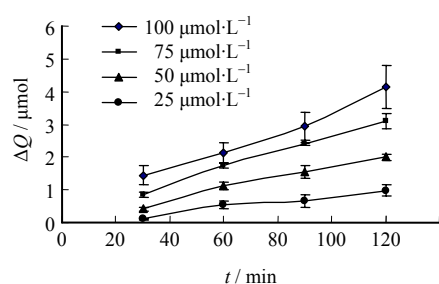
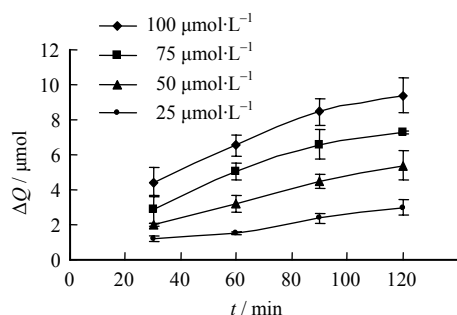
3 结果

3.1 DAL 对 Caco-2 细胞的抑制作用

MTT 检测结果表明 DAL 浓度在 6.25~200 μmol/L 时, 细胞存活率未出现突然下降的情况, 细胞存活率均在 80% 以上, 对于 Caco-2 细胞而言是安全浓度范围, 结果见图 1。

3.2 双向转运

DAL 从 AP 到 BL 及从 BL 到 AP 的转运量随时间的变化趋势见图 2、3。实验结果表明, 25、50、

图 1 DAL 对 Caco-2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 1 Effect of DAL on survival rate of Caco-2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 4$)图 2 DAL 从 AP 到 BL 的跨膜转运量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Caco-2 cell transport of DAL from AP to BL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 3 DAL 从 BL 到 AP 的跨膜转运量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Caco-2 cell transport of DAL from BL to AP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

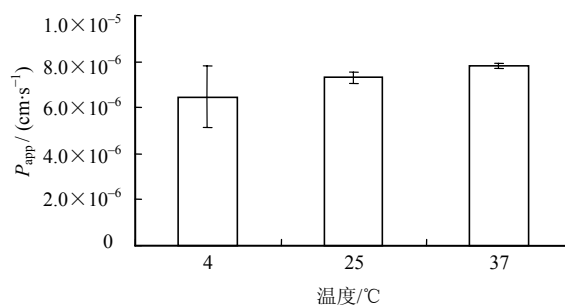
75、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DAL 从 AP 到 BL 的转运量及从 BL 到 AP 的转运量在 2 h 内都随着时间的增加呈近线性增长。随着 DAL 浓度的增加, DAL 的 P_{app} 值变化不大, 差异无统计学意义, 见表 1。

3.3 温度对 DAL 转运的影响

固定 DAL 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 分别在 4、25、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下考察 DAL 的从 AP 到 BL 的转运, 结果见图 4。结果表明 4、25、37 $^{\circ}\text{C}$ 下, DAL 的 P_{app} 值无统计学意义, 说明 DAL 的转运不受温度影响。

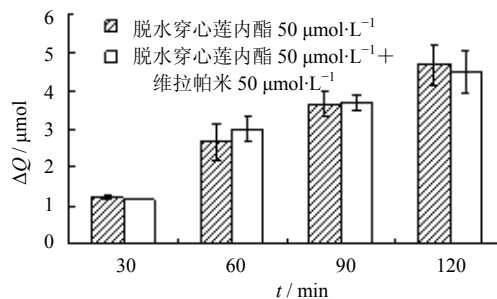
表 1 不同浓度 DAL 的双向 P_{app} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 P_{app} values of DAL from bidirections at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$C/$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$		$P_{\text{app BL}\rightarrow\text{AP}} /$ $P_{\text{app AP}\rightarrow\text{BL}}$
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
100	7.71 ± 0.22	6.06 ± 0.60	0.79
75	7.70 ± 0.56	6.01 ± 0.05	0.78
50	7.45 ± 0.38	6.69 ± 0.96	0.90
25	7.27 ± 0.53	6.85 ± 0.69	0.94

图 4 温度对 DAL 转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of temperature on Caco-2 cell transport of DAL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 维拉帕米对 DAL 转运的影响

Caco-2 细胞单层顶侧膜上有丰富的 P -gp 表达, P -gp 可以把药物从细胞中外排至细胞外, 而维拉帕米是 P -gp 抑制剂。在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 DAL 溶液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的维拉帕米后, DAL 的转运量与未加维拉帕米的对照组比较, 并没有显著差异, 说明 DAL 的转运不受 P -gp 影响, 结果见图 5。

图 5 维拉帕米对 DAL 转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of Verapamil on Caco-2 cell transport of DAL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

DAL 是穿心莲的主要有效成分之一, 具有多种药理活性, 为了对其更好地开发利用, 本研究通过 Caco-2 细胞模型, 研究 DAL 跨膜转运机制, 从而

探讨其小肠吸收转运的机制,为今后临床研究提供参考依据。

在本实验中,25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DAL 从 AP 到 BL 及从 BL 到 AP 的转运量随时间增加而近线性增长,且随浓度的增加, DAL 的 P_{app} 值变化不大,可以推断 DAL 主要是通过被动扩散吸收转运。此外,对温度敏感是载体介导转运的共同特征^[12]。当温度下降时,载体活性逐渐减弱或者失活。实验中发现温度的改变对 DAL 的 P_{app} 并没有显著影响,说明 DAL 的吸收转运没有载体介导。在转运机制探讨方面,已知维拉帕米抑制由 P -gp 介导的药物外排作用,本实验观察了维拉帕米对 DAL 转运的影响,结果发现在维拉帕米存在下, DAL 的转运量与未加维拉帕米的对照组比较,没有显著不同。综上,提示本研究中的 DAL 的转运主要靠浓度驱动的被动扩散。

实验结果表明 DAL 的 P_{app} 在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$, 属于中等吸收的化合物,推断其在人体的吸收率为 20%~70%^[13]。

肠吸收实验方法主要有在体灌注法、在体回流法、在体肠断结扎法和离体 Ussing chamber 体系法、外翻肠囊法,以及 Caco-2 细胞模型^[14-16]。与动物实验相比, Caco-2 细胞模型有着显著的优点: 同源性好,培养省时经济,可以从不同方向进行转运实验,提供细胞水平的肠吸收和代谢信息,观察药物对肠黏膜的毒性作用。Caco-2 细胞模型在中药吸收研究中的应用近年才见报道。由于大部分中药成分的吸收过程和机制还未明确,因此 Caco-2 细胞模型在中药口服吸收研究方面具有广泛应用。

参考文献

- [1] 王琳, 杨静伟, 宋凤平. 穿心莲的药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2003, 20(6): 27-29.
- [2] 陈国祥, 丁伯平, 徐瑶, 等. 穿心莲胶囊的抗炎作用研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2000, 10(11): 1004.
- [3] 韩凤梅, 蔡文涛, 夏启松, 等. 穿心莲片中脱水穿心莲内酯在大鼠血浆中的药代动力学 [J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(4): 206-210.
- [4] 蔡文涛, 韩凤梅. RP-HPLC 测定穿心莲、路边青配伍药液中脱水穿心莲内酯在小鼠血浆中的浓度 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2005, 27(1): 74-77.
- [5] 李克梅, 刘文清, 朱治本. 脱水穿心莲内酯在大鼠体内的药物动力学特征 [J]. 中国药理与临床, 1990, 6(1): 38-40.
- [6] 魏存芳, 姚媛, 廖琼峰, 等. 穿心莲片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的药代动力学研究 [J]. 中成药, 2009, 31(5): 724-727.
- [7] 卢智玲, 冯怡, 徐德生, 等. Caco-2 细胞模型在中药口服吸收及机制研究中的应用 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 616-619.
- [8] Artursson S, 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] 李苏宁, 杨秀伟. 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 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 96-102.
- [10] 朱容慧, 赵军宁, 毕岳琦, 等. 中药肠吸收动力学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 25-29.
- [11] Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, *et al.* Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 10(3): 195-204.
- [12] Zhu Z B, Makhija S K, Lu B, *et al.* Transport across a polarized monolayer of Caco-2 cells by transferrin receptor-mediated adenovirus transcytosis [J]. *Virology*, 2004, 325(1): 116-128.
- [13] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man—fact or myth [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763-766.
- [14] 管敏, 贝永燕, 周奕, 等. 乳糖化-去甲斑蝥素及其纳米粒在 Caco-2 细胞模型中的跨膜转运机制 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 722-727.
- [15] 兰建国, 尹东锋, 王玉亮. 研究药物肠吸收的实验方法和进展 [J]. 中华综合医学杂志, 2003, 5(11): 87-88.
- [16] 杨秀伟, 张鹏, 吴琦. 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 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 748-753.