

穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制

廖琼峰^{1*}, 姚媛¹, 谢智勇², 张蕾¹, 曾元儿¹

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 研究穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制。**方法** 观察穿心莲内酯在 Caco-2 细胞模型中的双向转运, 考察时间、药物浓度、温度和抑制剂对穿心莲内酯吸收的影响。用 LC/MS/MS 检测药物浓度, 计算其表观渗透系数 (P_{app})。**结果** 穿心莲内酯在 Caco-2 细胞模型中, 随时间和浓度的增加, 药物吸收呈饱和趋势, 且受温度和碘乙酰胺影响, 但不受外排抑制剂维拉帕米和 MK-571 的影响。**结论** 穿心莲内酯在 Caco-2 细胞中的吸收主要是由载体介导的主动转运。

关键词: 穿心莲内酯; Caco-2 细胞模型; 主动转运; LC/MS/MS; 载体介导

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1363-04

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

LIAO Qiong-feng¹, YAO Yuan¹, XIE Zhi-yong², ZHANG Lei¹, ZENG Yuan-er¹

1. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

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

Abstract: Objective To study the absorption of andrographolide in human Caco-2 cell monolayer model. **Methods** Caco-2 cell monolayer model was applied to investigating the bidirectional transport of andrographolide. The effects of time, drug concentration, temperature, and inhibitor on the absorption of andrographolide were observed. Drug concentration was measured by LC/MS/MS and the apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated. **Results** Time and concentration saturation were observed for the absorptive transport of andrographolide across Caco-2 monolayers. The transport of andrographolide was influenced by the change of temperature and the presence of iodoacetamide, but not Verapamil or MK-571. **Conclusion** The absorption and transport mechanism of andrographolide in Caco-2 cell monolayers are active transportation mediated by transporter.

Key words: andrographolide; Caco-2 cell monolayer model; active transport; LC/MS/MS; mediated

穿心莲内酯是常用中药穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 中量最高的二萜内酯类有效成分。现代药理研究表明^[1-2], 其具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节、治疗心脑血管疾病、保肝利胆等作用。目前有关穿心莲内酯的药动学已有研究, 但结果参差不齐^[3-6]。然而关于穿心莲内酯吸收机制的研究未见报道。Caco-2 细胞 (human colon androcarcinoma cell line) 模型是目前国内外广泛应用的体外吸收模型, 已迅速发展为研究药物吸收的必备手段^[7-11], 并已获美国 FDA 批准用作药物吸收筛选模型。本课题组应用 Caco-2 模型对脱水穿心莲内酯的吸收机制进行了研究^[12], 本实验继续利用 Caco-2 细胞单层模型研究穿心莲内酯的吸收机

制, 考察时间、药物浓度、双向转运、温度和抑制剂对穿心莲内酯转运的影响, 旨在为穿心莲二萜内酯类成分的药动学研究提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

穿心莲内酯 (中国药品生物制品检定所, 批号 110797-200307, 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 公司), 非必需氨基酸 (Hyclone 公司), 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

收稿日期: 2010-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600823); “重大新药创制” 国家科技重大专项 (2009ZX09304-003, 2009ZX09501-017)

作者简介: 廖琼峰, 女, 副教授, 研究方向为中药药效物质基础和药动学研究。Tel: (020)39358081 E-mail: liaoqf2075@yahoo.com

96孔普通培养板、12孔Transwell板(Corning公司), 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培养基, 其中含10%胎牛血清、1%非必需氨基酸及100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素双抗液, 于37℃、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 /mL, 培养约21 d后, 细胞形成紧密单层, 可用于实验。

2.2 MTT法检测穿心莲内酯对Caco-2细胞的抑制

取对数生长期Caco-2细胞, 调整细胞密度至 1×10^5 /mL, 每孔加200 μ L细胞悬液接种于96孔培养板, 培养24 h后换液, 实验组加入含穿心莲内酯(浓度分别为6.25、12.5、25、50、100、200 μ mol/L)培养液, 对照组加不含穿心莲内酯的培养液, 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5 mg/mL MTT 20 μ L, 再培养4 h后吸弃孔内培养液, 每孔加150 μ L DMSO溶液, 将96孔板置于双层空气恒温振荡器中, 以转速为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, 测定各孔吸光度(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50、75、100 μ mol/L穿心莲内酯溶液, 经滤过除菌, 取符合转运条件且细胞生长形态完好的Transwell孔, 用37℃、pH 7.4空白HBSS溶液冲洗3遍, 最后一次于37℃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: 将药物溶液0.5 mL加到AP侧作为供给池, 同时BL侧加入pH 7.4空白HBSS 1.5 mL作为接收池; 对于从BL到AP转运: 将药物溶液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℃、pH 7.4空白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(4 mm $\times$ 2.0 mm, 美国Phenomenex公司); 分析柱为Aquasil-C₁₈柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m, 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 μ L; 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℃, 鞘气(N₂)压力 3.44×10^5 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); 由于穿心莲内酯的[M+H]⁺ m/z: 373.4的二级碎片中无主要的碎片离子, 且所有碎片信号强度极不稳定, 无法找到一对合适的母离子与子离子用于定量分析, 但是当充分利用串联质谱的优势, 用选择反应监测模式分析, 即三重四极杆的Q1和Q3都选用373.4时(此为一种极端化的SRM模式), 比只利用Q1的选择离子检测模式(此时Q3为全扫描方式)进行监测的灵敏度和抗干扰能力都大为改善, 因而本实验用SRM模式进行分析, 用于定量反应的离子对为一对特殊的离子对, 即m/z: 373.4 $\rightarrow$ 373.4(此反应中的子离子为未经打碎的与母离子相同的离子)。

2.4.3 样品处理 样品30 μ L, 加入甲醇60 μ L, 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

药物透过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。

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

dQ/dt为接收池待测药物浓度变化的表观线性速率, 以吸收药量对时间作线性回归, 回归曲线斜率即为表观线性速率; A为Caco-2单层细胞膜的表面积; C₀为在Caco-2单层细胞的AP侧或BL侧的药物初始浓度

3 结果

3.1 穿心莲内酯对Caco-2细胞的抑制作用

MTT检测结果表明, 穿心莲内酯浓度在6.25~200 μ mol/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, 是Caco-2细胞的安全浓度范围。结果见图1。

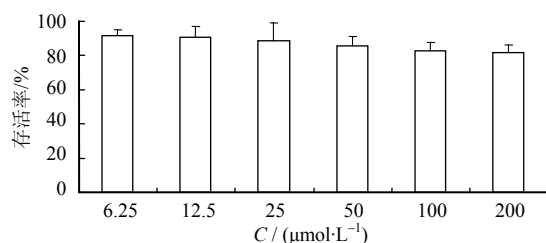


图 1 穿心莲内酯对 Caco-2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effect of andrographolide on survival rate of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 时间、浓度对穿心莲内酯转运的影响

从 30~120 min, 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 值随时间的增加趋向饱和, 前 90 min 近似线性增加, 随浓度增大, 线性部分斜率变小, 即转运速率变小, 提示穿心莲内酯随浓度增加有饱和趋势。结果见图 2。

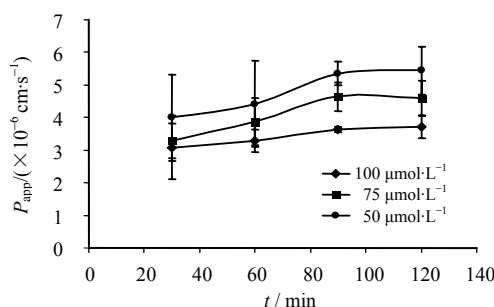


图 2 时间、浓度对穿心莲内酯从 AP 侧到 BL 侧转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of time and concentration on transport of andrographolide from AP to BL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 温度对穿心莲内酯转运的影响

固定穿心莲内酯浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 分别在 4、25、37 $^{\circ}\text{C}$ 考察穿心莲内酯从 AP 侧到 BL 侧的转运, 结果见图 3。结果表明, 在 4、25、37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 穿心莲内酯的 P_{app} 值差异非常显著, 说明穿心莲内酯的转运受温度的影响。

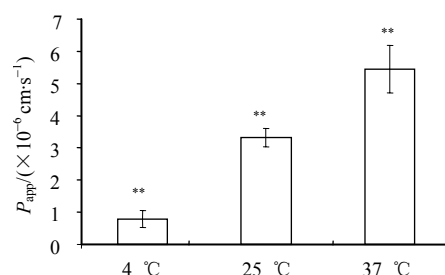
3.4 双向转运

穿心莲内酯从 BL 侧到 AP 侧的 P_{app} 比从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 大 ($P < 0.05$), 且两者比值 ≥ 1.5 , 提示穿心莲内酯的跨膜转运可能存在载体介导机制。结果见表 1。

3.5 抑制剂对穿心莲内酯的影响

在考察抑制剂的影响中, 发现在碘乙酰胺 (5 mmol/L) 存在下, 穿心莲内酯 (50 $\mu\text{mol/L}$) 从 AP 侧到 BL 侧转运的 P_{app} 经 t 检验比较差异有统计学

意义 ($P < 0.05$), 而外排抑制剂维拉帕米 (50 $\mu\text{mol/L}$) 和 MK-571 (50 $\mu\text{mol/L}$) 的存在对穿心莲内酯的转运均无影响。结果见表 2、3。



4 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 两两比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ comparison between each two of 4 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, and 37 $^{\circ}\text{C}$

图 3 温度对穿心莲内酯转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of temperature on Caco-2 cell transport of andrographolide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 穿心莲内酯在不同浓度时双向转运 P_{app} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 P_{app} values of andrographolide from bidirection at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

C/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$		$P_{\text{appBL}\rightarrow\text{AP}}/$ $P_{\text{appAP}\rightarrow\text{BL}}$
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
100	3.30 ± 0.35	6.14 ± 0.26	1.86
75	3.88 ± 0.71	6.21 ± 0.35	1.50
50	4.42 ± 1.32	6.31 ± 1.01	1.52

表 2 碘乙酰胺对穿心莲内酯转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of iodoacetamide on Caco-2 cell transport of andrographolide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$	
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP
穿心莲内酯	4.42 ± 1.32	6.31 ± 1.01
穿心莲内酯+碘乙酰胺	$9.39 \pm 1.04^*$	7.57 ± 0.21

与穿心莲内酯组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs andrographolide group

表 3 维拉帕米和 MK-571 对穿心莲内酯转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Verapamil and MMK-571 on Caco-2 cell transport of andrographolide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$	
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP
穿心莲内酯	4.20 ± 0.07	4.99 ± 0.78
穿心莲内酯+维拉帕米	3.95 ± 0.33	4.68 ± 0.32
穿心莲内酯+MK-571	4.05 ± 0.11	4.94 ± 0.62

4 讨论

穿心莲内酯是中药穿心莲的主要有效成分之

一,具有多种药理活性,为了更好地开发利用穿心莲内酯,本研究通过 Caco-2 细胞模型,研究穿心莲内酯跨膜转运机制,从而探讨穿心莲内酯小肠吸收转运的机制,为今后临床研究提供参考依据。

穿心莲内酯在 Caco-2 细胞中,高、中、低3个浓度结果均为 $P_{appBL \rightarrow AP}/P_{appAP \rightarrow BL} \geq 1.5$,且从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 值随浓度增加而下降,说明穿心莲内酯跨 Caco-2 细胞单层转运不依赖化合物浓度;在 Caco-2 细胞对穿心莲内酯转运的经时曲线上,随着穿心莲内酯浓度增大,曲线线性部分的斜率变小,即转运速率在底物浓度低时增加快,随着底物浓度的升高,转运速率的逐渐减慢。对温度敏感是载体介导主动转运的共同特征^[13-14],当温度下降时,载体活性逐渐减弱或者失活。而本实验结果表明温度对于穿心莲内酯从 AP 侧到 BL 侧的转运有非常显著的影响 ($P < 0.01$),该结果也预示着 Caco-2 细胞对穿心莲内酯的转运受到主动运载体介导。此外,已知烷基化试剂碘乙酰胺具有抑制能量代谢并且耗竭细胞内储存的 ATP 的作用^[15],在 Caco-2 细胞单层用 5 mmol/L 的碘乙酰胺处理实验中,穿心莲内酯从 AP 侧到 BL 侧的转运受到影响,而从 BL 侧到 AP 侧的转运未受影响,提示其转运需消耗能量,是由载体介导的转运,且该载体可能位于 AP 侧。

肠吸收实验方法主要有在体灌注法、在体回流法、在体肠段结扎法和离体 Ussing chamber 体系法、外翻肠囊法,以及 Caco-2 细胞模型^[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更是近年才见报道。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阔的应用前景。

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] 刘国利,刘永琼.穿心莲内酯的研究进展[J]. 医药导报, 2006, 25(1): 48-50.
- [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: 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] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 姚媛,廖琼峰,谢智勇,等.脱水穿心莲在 Caco 细胞单层模型中的吸收机制[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1154-1157.
- [13] Dokladny K, Moseley P L, Ma T Y. Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(2): 204-212.
- [14] 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.
- [15] Bartels H, Korsiak E, Daniel H. Transport activity of the MDR1-gene product in monolayers of Caco-2 cells[J]. *Z Gastroenterol*, 1994, 32: 15-18.
- [16] 兰建国,尹东峰,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.