

• 药理与临床 •

维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯对 Caco-2 细胞模型转运宝藿苷 I 的影响

金鑫^{1,2}, 张振海¹, 陈玲玲¹, 贾晓斌^{1,2*}, 谭晓斌¹, 陈彦¹

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 考察非离子表面活性剂维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (TPGS) 对宝藿苷 I 在 Caco-2 细胞模型转运的影响。方法 采用 Caco-2 细胞模型研究不同浓度的 TPGS 对宝藿苷 I 细胞转运行为的影响, 以超高压液相色谱 (UPLC) 法测定细胞样品溶液中宝藿苷 I 的浓度, 计算表观渗透系数 (P_{app})。结果 在应用 TPGS 后, 宝藿苷 I 从细胞绒毛面供给侧 (AP) → 基底面外侧 (BL) 的跨膜转运量明显增高 ($P < 0.05$), 外排比率显著下降 ($P < 0.05$)。当宝藿苷 I 与 TPGS 比例分别为 1:1、1:3、1:9 时, 宝藿苷 I 的外排比率分别为 1.978 8、1.779 8、1.609 0, 与仅用宝藿苷 I 相比分别下降了 73%、76%、78%。结论 在 Caco-2 细胞模型上, TPGS 可显著促进宝藿苷 I 的吸收。

关键词: 宝藿苷 I; Caco-2 细胞模型; 维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯; 跨膜转运; 肠道吸收

中图分类号: R282.710.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)12-2474-05

Influence of vitamin E tocopherol polyethylene glycol succinate 1000 on baohuoside I across membrane transport of Caco-2 monolayer model

JIN Xin^{1,2}, ZHANG Zhen-hai¹, CHEN Ling-ling¹, JIA Xiao-bin^{1,2}, TAN Xiao-bin¹, CHEN Yan¹

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of non-ionic surfactant vitamin E tocopherol polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS) on the intestinal absorption of baohuoside I across membrane transport of Caco-2 monolayer model. **Methods** The membrane transport of Caco-2 monolayer model was carried out to examine the effects of TPGS on the intestinal absorption of baohuoside I. The baohuoside I was determined by UPLC and the apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated. **Results** P_{app} values of membrane transport capacity from the apical (AP) to basolateral (BL) of baohuoside I were significantly increased ($P < 0.05$) and its efflux ratios were markedly reduced ($P < 0.05$) in the presence of the TPGS. The efflux of baohuoside I was 1.978 8, 1.779 8, and 1.609 0, respectively, when the proportion of baohuoside I and TPGS was 1:1, 1:3, and 1:9. The ratio decreased 73%, 76%, and 78% by using baohuoside I only. **Conclusion** TPGS could obviously promote the absorption of baohuoside I on Caco-2 monolayer model.

Key words: baohuoside I; Caco-2 cell model; vitamin E tocopherol polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS); membrane transport; intestinal absorption

宝藿苷 I (baohuoside I) 是淫羊藿中重要的活性物质^[1], 在 Caco-2 细胞转运实验中存在外排现象, 提示宝藿苷 I 在肠道的转运吸收受到影响^[2]。维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (TPGS) 是维生素 E 的水溶性衍生物, 由维生素 E 琥珀酸酯 (VES) 的

羧基与聚乙二醇 (PEG) 1000 酯化而成, 相对分子质量约 1 513。由于 TPGS 的两亲性质和良好的水溶性, 因此对亲脂性物质是良好的非离子型表面活性剂。国外已有以 TPGS 为辅料的药品上市, 如安普那韦 (GeneraseTM) 口服液和胶囊^[3], 也有文献报道

收稿日期: 2011-06-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973944)

作者简介: 金鑫 (1987—), 男, 江苏南通人, 硕士研究生, 研究方向为药剂学。Tel: (025)85608672 E-mail: jinxin871211@163.com

*通讯作者 贾晓斌 Tel: (025)85608672 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

TPGS 可用作某些药物的促吸收剂、P-糖蛋白(P-gp)抑制剂等^[4-5]。Caco-2 细胞模型有类似于小肠上皮的顶侧膜和基底侧膜,且能够过度表达 P-gp 等外排蛋白,是研究药物分泌或外排的较好模型,已广泛应用于药物肠吸收特性的研究^[6-7]。本实验采用 Caco-2 模型研究 TPGS 对宝藿苣 I 吸收转运的影响,为宝藿苣 I 剂型、处方的合理设计与研发提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

宝藿苣 I (自制,质量分数>98%),染料木素(质量分数>98%,西安小草科技有限公司),DMEM 培养基(南京凯基生物科技发展有限公司),胎牛血清(Equitech-BioInc 公司),非必需氨基酸、HEPES 粉末、谷氨酰胺、胰蛋白酶、Hank's 平衡盐粉末(Sigma 公司),甲醇、乙腈为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Waters AcquityTM 超高压液相色谱(UPLC)仪(美国 Waters 公司),Mettler Toledo 320 型 pH 计(Mettler-Toledo 公司),TGL—16G 型 Anke 离心机(上海安亭科学仪器厂),数显气浴恒温振荡器(金坛市双捷实验仪器厂),Mettler AL204 十万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),二氧化碳培养箱(美国 Nuair 公司),XDS—1B 型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司),Millicell—ERS 跨膜电阻仪(美国 Millipore 公司),Transwell 培养板(丹麦 NUNC 公司),微孔滤膜(江苏汉邦公司)。

1.3 细胞

Caco-2 TC7 细胞株,由法国 Moniqué Rousset 博士馈赠。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 宝藿苣 I 储备液的制备 精密称取宝藿苣 I 10.28 mg 至 10 mL 量瓶中,加二甲基亚砷溶解并定容,摇匀,得 2 mmol/L 宝藿苣 I 对照品储备液。

2.1.2 染料木素内标溶液的制备 精密称取染料木素 6.76 mg,加乙腈溶解定容至 5 mL,配制成 5 mmol/L 的储备液。精密吸取染料木素储备液 0.1 mL,加入乙腈定容至 10 mL,混匀,即得 50 μ mol/L 内标溶液。

2.1.3 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)的制备 称取 NaHCO_3 0.37 g、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)5.96 g、D-葡萄糖 4.5 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.185 g、 MgSO_4 0.1 g、

KCl 0.4 g、NaCl 18 g、 KH_2PO_4 0.06 g、 Na_2HPO_4 0.05 g,加水稀释至 1 000 mL,用 5 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.4。过 0.22 μ m 滤膜,取续滤液,4 $^\circ\text{C}$ 贮藏备用。

2.1.4 试药溶液的配制 精密吸取宝藿苣 I 储备液 150 μ L,分别加入不同质量的 TPGS,加 HBSS 溶液溶解稀释至 30 mL,最终使溶液中宝藿苣 I 的浓度为 10 μ mol/L,TPGS 的浓度分别为 0、10、30、90 μ mol/L。

2.2 稳定性试验

分别配制宝藿苣 I 浓度为 10 μ mol/L,TPGS 浓度分别为 0、10、30、90 μ mol/L 的溶液,置 37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴 8 h,用 UPLC 法测定宝藿苣 I 的浓度,考察宝藿苣 I 溶液的稳定性。

2.3 宝藿苣 I Caco-2 细胞转运试验

用 37 $^\circ\text{C}$ 预热的 HBSS 溶液(pH 7.4)洗涤细胞单层 3 次,测定跨膜电阻,弃去跨膜电阻值小于 250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 的部分。余下的细胞再加入预热的 HBSS 溶液,于 37 $^\circ\text{C}$ 摇床中孵育 30 min,吸弃 HBSS 溶液。对于药物从细胞绒毛面供给侧(AP)→基底面外侧(BL)的转运:将试药溶液 2.9 mL 加到 AP(供给池),同时 BL(接收池)加入空白的 HBSS 溶液(pH 7.4) 2.5 mL;对于药物从 BL→AP 的转运:将试药溶液 2.9 mL 加到 BL(供给池),空白 HBSS 溶液 2.5 mL 加到 AP(接收池)。将加入药液和空白 HBSS 溶液的 Transwell 培养板置于转速为 50 r/min、37 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床中,分别在 0、1、2、3、4 h 时吸取供给池、接收池溶液各 400 μ L,同时补足相应的溶液。实验结束后测定其电阻值,设平行操作 3 次。

2.4 细胞内药物的测定

转运试验结束后,用生理盐水快速、轻轻地洗涤聚碳酸酯多孔膜 3 次,轻轻撕下多孔膜,放入塑料离心管中,加入 1 mL HBSS 溶液,冰水浴超声处理 30 min,加入 1 mL 甲醇,涡旋振荡 30 s,13 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液 400 μ L,待测。

2.5 宝藿苣 I 分析

吸取供给池或接收池中的样品溶液 400 μ L,立刻加入 100 μ L 染料木素(50 μ mol/L)内标溶液,13 000 r/min 离心 15 min,用 UPLC 仪分析宝藿苣 I。色谱条件:BEH C_{18} 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μ m),流动相为乙腈-0.1%冰醋酸水溶液,梯度洗脱(0~0.9 min,25%乙腈;1.0~2.0 min,60%乙腈;2.0~2.5 min,60%~25%乙腈;2.5~3.0 min,25%乙腈),

体积流量 0.4 mL/min, 柱温 35 ℃, 进样量 8 μL, 检测波长 270 nm。

2.6 数据分析

计算药物透过 Caco-2 细胞单层的表观渗透系数 (P_{app})。两组数据的比较用 t 检验, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

$$P_{app} = (dQ/dt) / (S \times C)$$

dQ/dt 为接收池药物出现的速率, S 为膜面积 (4.2 cm²), C 为药物的初始浓度

3 结果

3.1 宝藿苣 I 分析的方法学考察

3.1.1 线性关系考察 将宝藿苣 I 贮备液用乙醇分别稀释成 2.50、5.00、10.00、20.00、25.00、40.00 μmol/L 的系列浓度, 取上述各浓度溶液 400 μL, 与 100 μL 内标溶液混匀、离心后取上清液进样, 记录峰面积。以进样浓度为横坐标 (X), 宝藿苣 I 与内标峰面积比为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 0.2842X - 0.3018$, $r = 0.9996$, 表明宝藿苣 I 在 2.50~40.00 μmol/L 呈良好的线性关系。

3.1.2 专属性试验 在上述色谱条件下, 宝藿苣 I 贮备液和转运实验细胞样品溶液中宝藿苣 I 及内标均分离较好, 峰形良好。见图 1。

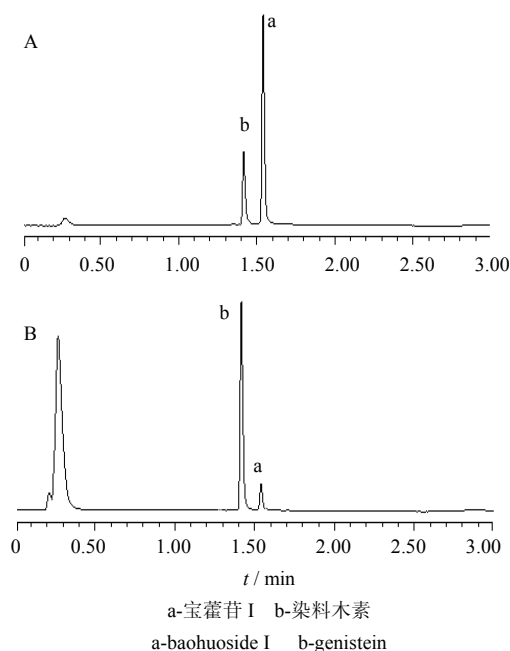


图1 宝藿苣 I 储备液 (A) 和细胞样品 (B) UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of baohuoside I stock solution (A) and cell sample (B)

3.1.3 回收率试验 精密吸取宝藿苣 I 贮备液适量, 用 HBSS 溶液 (pH 7.4) 分别配制成低、中、高 (2.50、5.00、10.00 μmol/L) 3 个浓度, 取上述

各浓度溶液 400 μL, 与 100 μL 内标溶液混匀, 离心后取上清液 40 μL 进样, 按上述色谱条件进行测定, 记录峰面积。以回归方程计算浓度, 以测定浓度与加入浓度之比计算回收率。结果宝藿苣 I 低、中、高浓度的回收率 (96.38%、97.16%、98.45%) 的 RSD 分别为 2.45%、2.01%、1.56%。

3.1.4 精密度试验 取“3.1.3”项下 3 个浓度的待测溶液, 以 1 d 内测定同一样品 5 次的结果计算日内精密度, 以连续 5 d 测定同一样品的结果计算日间精密度。结果宝藿苣 I 低、中、高浓度的日内精密度 RSD 分别为 1.26%、2.47%、1.95%, 日间精密度 RSD 分别为 2.27%、2.64%、2.43%。

3.1.5 稳定性试验 分别配制宝藿苣 I 浓度为 10 μmol/L, TPGS 浓度分别为 0、10、30、90 μmol/L 的溶液, 置于 37 ℃ 恒温水浴 8 h, 用 UPLC 法测定宝藿苣 I 的浓度, 考察宝藿苣 I 溶液的稳定性。结果在 37 ℃ 条件下各组宝藿苣 I 溶液在 8 h 内保持稳定, 宝藿苣 I 没有发生降解或沉淀。

3.2 细胞样品溶液对 Caco-2 细胞电阻的影响

检测结果显示, 实验前后 Caco-2 细胞的电阻未发生明显变化, 测得各细胞样品溶液中跨膜电阻值 RSD 均小于 5%, 表明样品和 TPGS 不影响 Caco-2 的紧密连接。

3.3 TPGS 对宝藿苣 I 在 Caco-2 细胞转运量的影响

加入不同比例的 TPGS 后, 宝藿苣 I 从 AP→BL 的跨膜转运量及给药 4 h 后各侧细胞中宝藿苣 I 的量明显增加 ($P < 0.05$), 给药 1~4 h 宝藿苣 I 从 BL→AP 侧的跨膜转运量明显减少 ($P < 0.05$)。在较低的浓度时, TPGS 即有促进宝藿苣 I 吸收的作用。结果见表 1 和图 2。

表 1 不同比例 TPGS 下 Caco-2 细胞 AP 和 BL 侧宝藿苣 I 的量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Accumulation of baohuoside I in AP and BL of Caco-2 cells at different proportion of TPGS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

测试物	细胞内宝藿苣 I 的量/nmol	
	AP→BL	BL→AP
宝藿苣 I	2.829 9 ± 0.091 5	3.866 0 ± 0.050 3
宝藿苣 I-TPGS (1:1)	5.695 7 ± 0.782 1*	5.710 6 ± 0.593 1*
宝藿苣 I-TPGS (1:3)	5.711 5 ± 0.946 2*	5.963 9 ± 0.312 3*
宝藿苣 I-TPGS (1:9)	6.023 3 ± 0.733 8*	6.205 8 ± 0.406 5*

与宝藿苣 I 组比较: * $P < 0.05$; 下同

* $P < 0.05$ vs baohuoside I group; same as below

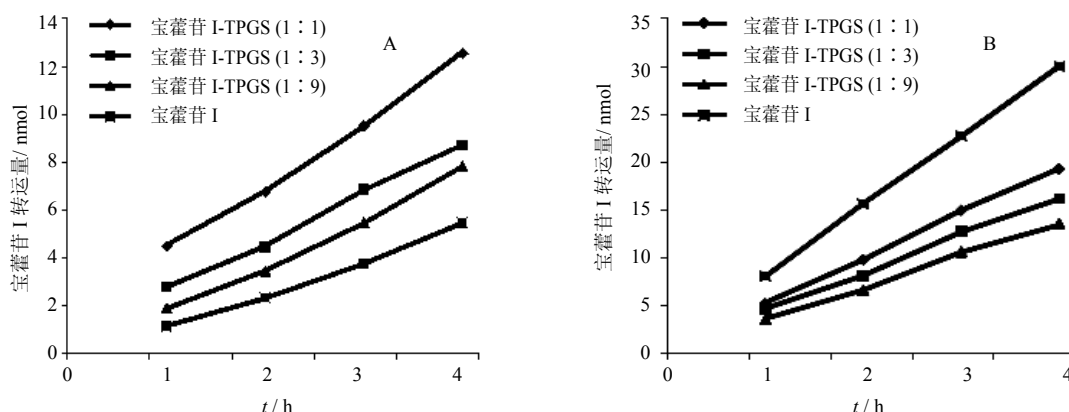


图 2 TPGS 对宝藿苣 I 在给药 1~4 h AP→BL (A) 和 BL→AP (B) Caco-2 细胞跨膜转运量的影响
Fig. 2 Effect of TPGS on baohuoside I across membrane transport of Caco-2 cells at different concentration from AP to BL (A) and BL to AP (B) during 1-4 h

3.4 TPGS 对宝藿 I P_{app} 的影响

计算给药 4 h 时不同比例的 TPGS 对宝藿苣 I P_{app} 的影响。结果显示, 加入 TPGS 后, 宝藿苣 I 从 AP→BL 的 P_{app} 显著增大 ($P<0.05$), 从 BL→AP 的 P_{app} 显著减小 ($P<0.05$), 外排比率 ($P_{app(BL\rightarrow AP)}/P_{app(AP\rightarrow BL)}$) 从 7.433 5 降至 1.609 0。宝藿苣 I 与 TPGS

的比例为 1:1 时, 外排比率下降了 73%, 表明 TPGS 在低浓度时即有显著抑制外排的作用, 且随着 TPGS 比例的增加, 外排比率有所降低。比较宝藿苣 I 转运前后细胞电阻值发现, 转运前后电阻值无明显变化, RSD 小于 5%, 表明 TPGS 在各浓度下对膜的通透性没有显著影响。结果见表 2。

表 2 TPGS 对宝藿苣 I 在 Caco-2 细胞渗透性的影响

Table 2 Effect of TPGS at different concentration on permeability of baohuoside I in Caco-2 cells

测试物	$P_{app} / (\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		$P_{app(BL\rightarrow AP)} / P_{app(AP\rightarrow BL)}$
	AP→BL	BL→AP	
宝藿苣 I	2.058 7±0.136 0	15.303 0±0.515 4	7.433 5
宝藿苣 I-TPGS (1:1)	5.393 1±0.066 6*	10.672 0±0.234 6*	1.978 8*
宝藿苣 I-TPGS (1:3)	4.357 1±0.105 3*	7.754 6±0.117 2*	1.779 8*
宝藿苣 I-TPGS (1:9)	3.016 9±0.124 6*	4.854 3±0.235 2*	1.609 1*

4 讨论

本实验建立了在 Caco-2 细胞模型中宝藿苣 I 的 UPLC 分析方法, 经方法学验证该方法准确、可靠。实验结果表明, 10 $\mu\text{mol/L}$ 宝藿苣 I 在 Caco-2 细胞的转运有明显的外排, 加入 TPGS 后, 宝藿苣 I 从 AP→BL 的跨膜转运量及给药 4 h 后在各侧细胞中的量明显增高, 而在给药 1~4 h, 宝藿苣 I 从 BL→AP 的跨膜转运量明显减少; 加入 TPGS 后, 宝藿苣 I 从 AP→BL 的 P_{app} 显著增大, 而从 BL→AP 侧的 P_{app} 显著减小, 外排比率从 7.433 5 下降到 1.609 0, 在宝藿苣 I 与 TPGS 的比例为 1:1 时外排比率下降了 73%, 且随着 TPGS 的增加外排比率有所降低, 表明 TPGS 在低浓度时即具有显著的抑制外排和促

进宝藿苣 I 吸收的作用。

对 TPGS 抑制 P-gp 的机制研究显示, TPGS 并不是 P-gp 的底物, 也不是 P-gp 的竞争抑制剂, 其主要是通过抑制 ATP-酶而抑制 ATP-酶介导的 P-gp 糖蛋白外排^[8-9], 但高浓度的 TPGS 则与大多数非离子表面活性剂一样是通过影响细胞膜的流动性而影响 P-gp 功能。TPGS 在体内可生物降解, 比一般的非离子表面活性剂更安全^[2]。本研究结果表明, 在 Caco-2 细胞模型上, TPGS 可显著促进宝藿苣 I 的吸收, 为宝藿苣 I 制剂处方的合理设计以及新药开发提供了理论依据, TPGS 最终能否提高宝藿苣 I 的口服生物利用度, 尚需进一步的整体动物模型研究。随着研究的不断深入, TPGS 作为外排

抑制剂和吸收促进剂在中药学领域将有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 刘晓霞, 张永泽, 李振红, 等. 宝藿甘-I 对人食管癌细胞 Eca-109 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 124-126.
- [2] 陈彦, 贾晓斌, Hu M. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 220-224.
- [3] 于永新, 俞红凯, 王中彦, 等. 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯应用进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(6): 407-412.
- [4] 金朝辉, 徐珽, 马音, 等. 口服吸收促进剂研究进展概述 [J]. 华西医学, 2008, 23(4): 940-942.
- [5] Dintaman J M, Sliverman J A. Inhibition of P-glycoprotein by D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) [J]. *Pharm Res*, 1999, 16(10): 1550-1556.
- [6] 李苏宁, 杨秀伟. 6 个线型呋喃香豆素类化合物在人结肠 Caco-2 细胞模型的吸收转运研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 96-102.
- [7] 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.
- [8] Collnot E M, Baldes C, Wempe M F, *et al.* Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(3): 465-474.
- [9] Collnot E M, Baldes C, Schaefer U F, *et al.* Vitamin E TPGS P-glycoprotein inhibition mechanism: influence on conformational flexibility, intracellular ATP levels, and role of time and site of access [J]. *Mol Pharm*, 2010, 7(3): 642-651.

欢迎订阅

Chinese Herbal Medicines (CHM, 中草药英文版)

我国第一份中药专业的英文期刊——*Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版) 经国家新闻出版总署批准, 已于 2009 年 10 月正式创刊, 国内统一连续出版号为: CN12—1410/R。

CHM 由天津药物研究院和中国医学科学院药用植物研究所主办, 天津中草药杂志社出版。中国工程院院士、中国医学科学院药用植物研究所名誉所长肖培根教授担任主编; 中国工程院院士、天津药物研究院刘昌孝研究员, 天津药物研究院院长汤立达研究员, 中国医学科学院药用植物研究所所长陈士林研究员共同担任副主编; 天津药物研究院医药信息中心主任、《中草药》杂志执行主编陈常青研究员担任编辑部主任。

办刊宗旨 以高起点、国际化为特点, 继承和发扬祖国医药学遗产, 报道和反映中草药研究最新进展, 宣扬我国中草药的传统特色, 加强与世界各国在传统药物研究的经验交流, 在中医和西医、传统与现代、东方与西方之间架起一座理解和沟通的桥梁, 促进中药现代化、国际化。

主要栏目 综述与述评、论著、快报、简报、文摘、信息和国际动态、人物介绍、来信、书评等栏目。

读者对象 国内外从事中医药研究、管理、监督、检验和临床的专业技术人员。

CHM 邀请相关领域的院士和国内外知名专家加盟, 组建一支国际化、高水平、精干的编委会队伍 (第一届编辑委员会由 49 位专家组成, 其中院士 10 名, 国际编委 19 名)。吸引国内外高质量的稿件, 提高期刊的学术质量; 坚持按照国际标准编排, 加强刊物规范化和标准化, 充分利用计算机、网络技术和英语, 加强与国际知名科技期刊的交流合作; 充分发挥中医药特色, 争取在较短时间内进入国际最著名的检索系统——美国科学引文索引 (SCI), 把 CHM 办成国际知名期刊之一。

欢迎广大作者踊跃投稿! 欢迎广大读者积极订阅! 自办发行, 直接与编辑部订阅!

本刊已正式开通网上在线投稿系统。欢迎投稿、欢迎订阅! 网址: www.tiprpress.com

Chinese Herbal Medicines (CHM, 中草药英文版) 编辑部

天津编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编: 300193

E-mail: chm@tiprpress.com

Tel: (022)23006901

Fax: (022)23006821

开户银行: 兴业银行天津南开支行

北京编辑部

地址: 北京市海淀区马连洼北路 151 号

邮编: 100193

E-mail: bjchm@tiprpress.com

Tel: (010)57833035

Fax: (010)57833035

账号: 44114010010081504

户名: 天津中草药杂志社