

苦参总生物碱及其单体在 Caco-2 细胞模型的吸收特征研究

张 蕾¹, 冯志强², 陈孝健¹, 谢智勇³

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 第三军医大学药学院, 重庆 400038

3. 中山大学药学院, 广东 广州 510080

摘要:目的 建立同时测定 Caco-2 细胞模型中苦参碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱的 HPLC 方法, 探讨苦参总生物碱在 Caco-2 细胞模型的吸收机制。方法 利用人源结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞单层模型, 研究苦参碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱由细胞绒毛膜面供给侧 (AP) → 基底外侧 (BL) 和 BL → AP 侧两个方向的转运过程; HPLC-UV 法测定上述 3 个生物碱的量; 计算转运参数和表观渗透系数 (P_{app})。结果 苦参总碱给药后, 苦参碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱由 AP → BL 侧的 P_{app} 分别为 $(1.098 \pm 0.092) \times 10^{-5}$ 、 $(1.434 \pm 0.098) \times 10^{-5}$ 、 $(3.87 \pm 0.64) \times 10^{-6}$ cm/s, 由 BL → AP 侧的 P_{app} 分别为 $(1.104 \pm 0.098) \times 10^{-5}$ 、 $(1.034 \pm 0.079) \times 10^{-5}$ 、 $(2.75 \pm 0.33) \times 10^{-6}$ cm/s, 与文献报道的单体化合物给药相比, 氧化槐果碱和氧化苦参碱双向转运的 P_{app} 明显增大。苦参碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱的表观渗透率值分别为 1.01、0.72、0.71。结论 苦参总生物碱中苦参碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱仍主要以被动吸收方式进入体内, 但比各单体给药吸收更好。

关键词: 苦参总生物碱; 苦参碱; 氧化槐果碱; 氧化苦参碱; Caco-2 细胞; 吸收特性

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2464-04

Absorption characteristic of total alkaloids from *Sophora flavescens* and their monomers in Caco-2 cell model

ZHANG Lei¹, FENG Zhi-qiang^{1,2}, CHEN Xiao-jian¹, XIE Zhi-yong²

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

2. College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

3. School of Pharmaceutical Sciences, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous quantification of matrine (M), oxysophocarpine (OSP), and oxymatrine (OM), and to investigate the absorption mechanism of the total alkaloids from *Sophora flavescens* (TASF) in Caco-2 cell model. **Methods** By using Caco-2 cell monolayer model as an intestinal epithelial cell model, the transport processes of M, OSP, and OM from the apical (AP) side to the basolateral (BL) side or from BL side to AP side were studied. The contents of the three alkaloids were measured by HPLC-UV method. Transport parameters and apparent permeability coefficients (P_{app}) were then calculated. **Results** After TASF treatment, the P_{app} values of M, OSP, and OM were $(1.098 \pm 0.092) \times 10^{-5}$, $(1.434 \pm 0.098) \times 10^{-5}$, and $(3.87 \pm 0.64) \times 10^{-6}$ cm/s from AP side to BL side, and $(1.104 \pm 0.098) \times 10^{-5}$, $(1.034 \pm 0.079) \times 10^{-5}$, and $(2.75 \pm 0.33) \times 10^{-6}$ cm/s from BL side to AP side, respectively. Compared with those of monomeric compound reported by literature, the P_{app} values of OSP and OM in bi-direction were increased obviously. The apparent permeability rates of M, OSP, and OM were 1.01, 0.72, and 0.71, respectively. **Conclusion** The M, OSP, and OM in TASF could still be absorbed across intestinal epithelial cells in passive transference forms, but could obtained the better absorption than in monomeric forms.

Key words: total alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. (TASF); matrine (M); oxysophocarpine (OSP); oxymatrine (OM); Caco-2 cell; absorption characteristic

探讨并明确中药有效成分口服吸收部位、吸收机制和配伍药物相互作用的规律是提高中药口服给

药生物利用度、开发口服给药制剂的重要环节。Caco-2 细胞体外模型是近十几年来国内外广泛采

收稿日期: 2012-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901953); 国家教育部新教师基金项目 (20094425120001); 中山大学青年教师培育项目

作者简介: 张 蕾 (1978—), 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: zhanglei261291@yahoo.com.cn

用的一种研究药物吸收的模型,在药物研发早期,对药物高通量筛选和先导化合物的发现具有重要意义^[1-2]。在中医药研究领域应用该模型,可以在分子细胞水平阐明中药化学成分的吸收机制;通过比较药效单体成分、单味药或复方给药后的表观渗透系数(P_{app}),预测中药配伍的相互作用^[3-4]。

苦参总生物碱是苦参的主要药效部位,具有抗心律失常、抗肿瘤、抗过敏、平喘、抑菌、杀虫等作用^[5],已开发的产品主要有心律宁片、吗特灵注射液、苦参栓等。苦参总生物碱中单体成分最高的是苦参碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱。在上述单体成分在人源Caco-2细胞单层模型吸收报道的基础上^[6-7],本实验建立同时检测细胞液中苦参碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱的HPLC法,研究苦参总生物碱的吸收机制,为其制剂的研发和中药配伍规律研究提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

苦参总生物碱,自制(喷雾干燥),RP-HPLC法测定苦参碱、氧化槐果碱、氧化苦参碱质量分数分别为2.93%、5.55%、13.7%;苦参碱(批号805-200005)、氧化槐果碱(批号111652-200301)、氧化苦参碱(批号0780-200004)对照品,中国食品药品检定研究院。DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA溶液、青霉素、链霉素,美国Gibco公司;胎牛血清和必需氨基酸,美国Hyclone公司;L-谷氨酰胺, Mbchem公司;Hanks缓冲溶液(HBSS),自制;色谱醇甲醇, Merck公司。

1.2 仪器

IX51型倒置显微镜,日本Olympus公司;Milli-cell—ERS跨膜电阻仪,美国Millipore公司;CO—150型CO₂培养箱,美国NBS公司;SW—CJ—2F双人双面超净工作台,苏州净化设备有限公司;飞鸽高速离心机,上海安亭科学仪器厂;Precisa

XS225A万分之一分析天平,瑞士Precisa公司;Dionex P680高效液相色谱仪, UVD170U检测器,美国戴安公司。

1.3 细胞

Caco-2细胞株购自中国医学科学院上海细胞库(原来源于美国典型菌种保藏中心),实验中所用细胞为35~45代。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品储备液制备 分别精密称取苦参碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱对照品适量,用甲醇配制成浓度分别为372、396、392 μmol/L的对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取苦参总生物碱喷雾干燥粉末适量,用HBSS(pH 6.5)溶解并稀释成400 μg/mL,临用前配制,用于Caco-2细胞转运实验。

2.2 分析方法与方法学考察

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Phenomenex Gemini C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液(6:94);体积流量1.0 mL/min;检测波长210 nm;柱温为室温;进样量20 μL。

2.2.2 专属性试验 分别进样空白基质[在细胞转运实验给药前,用HBSS将接种于12孔板、培养21 d的Caco-2细胞冲洗3次,最后1次置于37℃培养箱温孵30 min,然后收集细胞绒毛膜面供给侧(AP)和基底外侧(BL)的温孵液作为空白基质]、混合对照品溶液和供试品溶液。结果各待测成分与相邻色谱峰分离度良好,空白基质在相应保留时间处无杂质干扰。色谱图见图1。

2.2.3 线性关系考察 分别精密量取苦参碱、氧化槐果碱、氧化苦参碱对照储备液适量,用HBSS配制成不同浓度的混合对照品溶液,使其含苦参碱分别为0.186、0.465、0.93、1.86、4.65、9.30、18.6、37.2 μmol/L,氧化槐果碱分别为0.198、0.495、0.99、1.98、4.95、9.90、19.8、39.6 μmol/L,氧化苦参碱

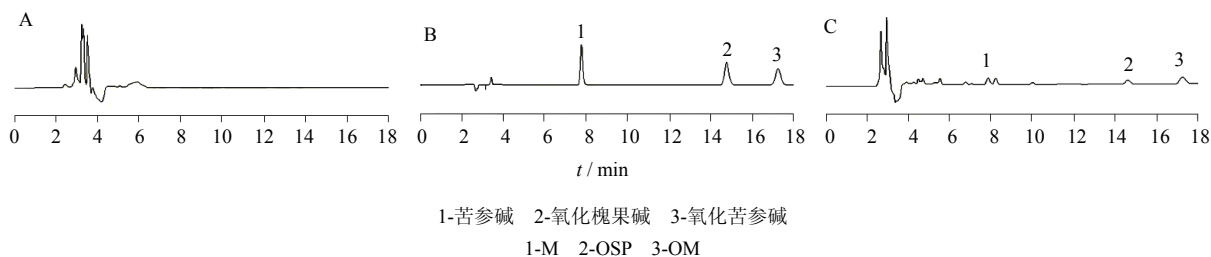


图1 空白基质(A)、混合对照品溶液(B)和供试品溶液(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank matrix (A), mixed reference solution (B), and sample solution (C)

分别为 0.392、0.98、1.96、3.92、9.80、19.6、39.2、78.4 $\mu\text{mol/L}$ ，在上述色谱条件下进样分析。以待测物的浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，采用加权最小二乘法 (权重为 $1/X^2$) 进行线性回归，得回归方程为苦参碱: $Y=0.1075X+0.00437$ ($r=0.9929$)，氧化槐果碱: $Y=0.0936X+0.00288$ ($r=0.9918$)，氧化苦参碱: $Y=0.0785X+0.00362$ ($r=0.9975$)。

2.2.4 准确度和精密度试验 用 HBSS 与空白基质分别配制苦参碱浓度分别为 0.465、4.65、18.6 $\mu\text{mol/L}$ ，氧化槐果碱浓度分别为 0.495、4.95、19.8 $\mu\text{mol/L}$ ，氧化苦参碱浓度分别为 0.98、9.80、39.2 $\mu\text{mol/L}$ 的质量控制 (QC) 样本，每一浓度设 3 样本进行分析。根据标准曲线计算 QC 样本浓度，计算方法精密度 (RSD) 和准确度 (RE)。结果表明，RE 为 -7.9%~3.8%，RSD 为 1.9%~5.7%，符合方法的验证要求。

2.2.5 稳定性试验 按“2.2.4”项下方法配制低、中、高 3 个浓度的 QC 样本，每一浓度设 3 样本分析，考察处理后室温下放置 24 h 和冻存 14 d 内的稳性，结果表明 RE<15%，稳定性良好。

2.3 Caco-2 细胞转运实验

2.3.1 细胞培养 冻存的细胞复苏后，放入卡式细胞培养瓶中用 DMEM 完全培养液、置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 (5% CO_2 ，相对湿度 90%) 培养。隔天换培养液，当细胞融合达 80% 后，用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液消化，按 1:3 的比例传代。取对数生长期的细胞，调细胞密度为 $8\times 10^4\sim 2\times 10^5/\text{cm}^2$ ，接种到 12 孔 Transwell 板，AP 侧加 0.5 mL、BL 侧加 1.5 mL 培养液。接种后隔天换液，1 周后每天换液，培养 21 d 后检测碱性磷酸酶活性和各孔跨膜电阻 (均大于 500 Ω/cm^2)，细胞形成紧密单层后即可用于转运实验。

2.3.2 转运实验 取符合转运实验的 Transwell 板，缓慢吸弃旧培养液，加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 HBSS 荡洗 3 次，最后 1 次置培养箱温孵 30 min，吸弃 HBSS。在 AP $\rightarrow$ BL 侧的转运实验中，将供试品溶液 0.5 mL 加到 AP 面作为供给池，HBSS (pH 7.4) 1.5 mL 加到 BL 面作为接收池；在 BL $\rightarrow$ AP 侧转运实验中，将供试品溶液 1.5 mL 加到 BL 面作为供给池，HBSS 0.5 mL 加到 AP 面作为接收池。置于 CO_2 培养箱中，分别于 15、30、60、90、120、180 min 从接收池吸取 100 μL 转运液，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液进行 HPLC 分析，用 HBSS 补足，每个时间点设

3 个平行孔。计算表观渗透系数 (P_{app}) 和表观渗透率。结果见图 2 和表 1。

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt) \times 1/A \times 1/C_0$$

$$\text{表观渗透率} = P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP}) / P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$$

dQ/dt 为单位时间药物转运量 ($\mu\text{mol/s}$)，A 为转运膜的面积，此时 A 为 1.12 cm^2 ， C_0 为药物的初始浓度 ($\mu\text{mol/L}$)

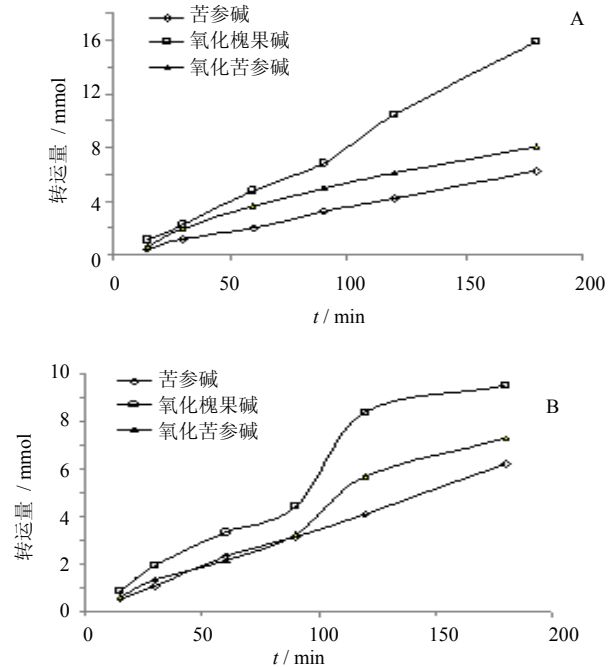


图 2 苦参碱、氧化槐果碱、氧化苦参碱在 Caco-2 细胞 AP $\rightarrow$ BL (A) 和 BL $\rightarrow$ AP (B) 的转运量 ($n=3$)

Fig. 2 AP $\rightarrow$ BL (A) and BL $\rightarrow$ AP (B) transports of M, OSP, and OM in Caco-2 cells ($n=3$)

表 1 苦参总生物碱给药后苦参碱、氧化槐果碱、氧化苦参碱在 Caco-2 细胞中双向转运的 P_{app} 及表观渗透率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 P_{app} and apparent permeability rates of M, OSP, and OM from bi-direction in Caco-2 cells after TASf treatment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

待测物	$P_{\text{app}} (\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1})$		表观渗透率
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
苦参碱	1.098 ± 0.092	1.104 ± 0.098	1.01
氧化槐果碱	1.434 ± 0.098	1.034 ± 0.079	0.72
氧化苦参碱	0.387 ± 0.064	0.275 ± 0.033	0.71

苦参总生物碱给药后，各单体生物碱从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 值分别为苦参碱 $1.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、氧化槐果碱 $1.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、氧化苦参碱 $3.87 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。与各单体给药相比，氧化槐果碱和氧化苦参碱从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 值明显增大，提示总生

物碱部位的其他成分有促进这 2 个生物碱吸收的作用。促吸收机制可能是：(1) 提高膜的流动性；(2) 影响细胞膜脂质双分子层通透性；(3) 影响载体蛋白的表达。总生物碱组和单体给药组的表观渗透率值均为 0.7~1.0，表明总生物碱给药后，3 种生物碱类成分仍以被动转运为主，其他组分的促吸收作用无方向性。

3 讨论

Caco-2 细胞单层模型是目前广泛用于快速评估新药及其天然产物的膜渗透性，阐明药物转运途径等的较理想的体外模型。采用该模型对苦参碱、氧化槐果碱、氧化苦参碱单体给药的吸收机制进行研究，结果显示 3 个生物碱分别给药后，AP→BL 侧的 P_{app} 分别为 $(1.511 \pm 0.157) \times 10^{-5}$ 、 $(8.41 \pm 0.28) \times 10^{-6}$ 、 $(2.48 \pm 0.36) \times 10^{-6}$ cm/s，而由 BL→AP 侧的 P_{app} 分别为 $(1.233 \pm 0.203) \times 10^{-6}$ 、 $(7.01 \pm 0.41) \times 10^{-7}$ 、 $(2.00 \pm 0.24) \times 10^{-6}$ cm/s^[6-7]。与本实验中总生物碱给药相比，其他成分可促进氧化槐果碱和氧化苦参碱的吸收，但促吸收作用无方向性。

苦参生物碱单体、单味药及其复方在临床上有广泛的应用，并且存在着广泛的配伍相互作用。利

用 Caco-2 细胞单层模型来研究单体及复合物给药后主要药效成分的肠吸收，为在胃肠道介导的药物相互作用的系统性深入研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 王彦荣, 何 应. Caco-2 细胞模型在天然药物吸收研究中的应用 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 66-69.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 李 莉, 袁 媛, 蒋学华. 丹参脂溶性成分在 Caco-2 细胞模型中吸收机制研究 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(2): 108-112.
- [5] 张丽华, 陈邦恩, 潘明佳. 苦参碱药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 1000-1003.
- [6] 刘晓红. 氧化苦参碱生物药剂学与药物动力学基础研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [7] 冯志强, 谢智勇, 廖琼峰, 等. 氧化槐果碱在 Caco-2 细胞模型中的吸收机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2399-2403.

《中草药》杂志获国家自然科学基金出版基金资助

8 月 17 日，2012 年度国家自然科学基金申请项目评审结果公布，《中草药》杂志喜获重点学术期刊项目资助。

国家自然科学基金委员会在 2012 年度项目申请集中接收期间共接收各类项目申请 170 792 项，经初步审查受理 165 651 项。根据《国家自然科学基金条例》、国家自然科学基金相关类型项目管理办法的规定和专家评审意见，决定资助面上项目、重点项目、优秀青年科学基金项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目、海外及港澳学者合作研究基金项目、国家基础科学人才培养基金项目、重大国际（地区）合作研究项目、科学仪器基础研究专款项目、国家重大科研仪器设备研制专项自由申请项目、部分联合基金项目和重点学术期刊项目合计 34 779 项。

《中草药》杂志以“新”——选题新、发表成果创新性强，“快”——编辑出版速度快，“高”——刊文学术水平和编辑质量高为办刊特色，载文覆盖面广、信息量大、学术水平高，近年屡获大奖，如中国出版政府奖期刊奖、国家期刊奖、新中国 60 年有影响力的期刊及期刊人、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等。《中草药》杂志将以此为契机，进一步提高期刊的学术水平，扩大影响力，并带动中草药杂志社的整体发展，走集团化道路，把中草药杂志社做大做强。同时，将竭力打造中草药英文版——*Chinese Herbal Medicines*，积极推进其国际化进程，为中药现代化、国际化做出更大的贡献！