

川芎嗪在 Caco-2 细胞单层模型的转运特征及对 P-糖蛋白表达的影响

杨 雯, 周惠芬, 杨洁红, 张宇燕, 来丽丽, 万海同*

浙江中医药大学 心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 研究川芎嗪在 Caco-2 细胞单层模型的转运特征以及对 P-糖蛋白 (P-gp) 表达的影响。方法 MTT 法确定川芎嗪对 Caco-2 细胞单层模型作用的安全浓度范围; 以 Caco-2 细胞单层模型研究川芎嗪的双向转运机制, 以表观渗透系数 (P_{app}) 为检测指标, 考察时间、药物浓度以及 P-gp 抑制剂维拉帕米对川芎嗪转运的影响; Western blotting 法检测川芎嗪对 P-gp 表达的影响。结果 从顶侧 (AP) 到底侧 (BL) (AP→BL), 川芎嗪的 $P_{app} > 10^{-6}$ cm/s, 表明其吸收性良好; 川芎嗪的转运量与其浓度和时间呈正相关, 且川芎嗪 AP→BL 的转运量明显大于 BL→AP 的转运量; 川芎嗪不仅受到 P-gp 的外排作用, 同时也抑制 P-gp 表达。结论 川芎嗪在 Caco-2 细胞模型的转运方式为被动转运, 且受到 P-gp 的外排作用, 并对 P-gp 的表达有抑制作用。

关键词: 川芎嗪; 吸收机制; Caco-2 细胞单层模型; P-糖蛋白; 被动转运

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)05-0581-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.016

Transport characteristics of ligustrazine across Caco-2 cell monolayer model and its effect on P-glycoprotein expression

YANG Wen, ZHOU Hui-fen, YANG Jie-hong, ZHANG Yu-yan, LAI Li-li, WAN Hai-tong

Institute of Heart Brain Vessel Disease, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To investigate the transport characteristics of ligustrazine across Caco-2 cell monolayer and the effect on P-glycoprotein (P-gp) expression. **Methods** Safe concentration range of ligustrazine against Caco-2 cell monolayer model was selected by the MTT method. The mechanism of ligustrazine bidirectional transport was investigated by Caco-2 cell monolayer model. The influences of time, concentration, and P-gp inhibitor Verapamil on the transport of ligustrazine were studied using apparent permeability coefficient (P_{app}) as index. P-gp expression in Caco-2 cells was analyzed by the Western blotting method. **Results** The P_{app} of transport from apical (AP) side to basolateral (BL) side was over 10^{-6} cm/s, which showed a good absorption. In the Caco-2 cell model, the transport amount of ligustrazine was positively correlated with time and concentration, and the transport amount from AP side to BL side was higher than that from BL to AP. The absorption of ligustrazine was not only rejected by P-gp, but also the P-gp expression was inhibited by ligustrazine. **Conclusion** The transport of ligustrazine across Caco-2 cell monolayer model is deduced as passive transport, ligustrazine is rejected by P-gp, and there is an inhibition of ligustrazine on the expression of P-gp.

Key words: ligustrazine; absorption mechanism; Caco-2 cell monolayer model; P-glycoprotein; passive transport

人结肠腺癌细胞系 Caco-2 模型作为研究药物吸收的一种快速筛选工具, 可在细胞水平上提供药物分子透过小肠黏膜的吸收、分布、代谢、转运以及毒性等综合信息^[1-5]。在适当的体外培养条件下, Caco-2 细胞结构与小肠细胞类似, 且具有某些相

同的酶系, 其中 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是 Caco-2 细胞单层模型的一个主要外排蛋白。当药物经细胞转运途径被吸收时, P-gp 泵把进入细胞内的药物泵出, 从而减少了药物的吸收^[6], 因此 P-gp 成为口服药物生物利用度低、波动大的一个重要因

收稿日期: 2012-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202636, 81274176, 30973933); 浙江省自然科学基金资助项目 (Z2101201, LR12H27001); 浙江省科技厅项目 (2011C23039); 浙江省中医重点学科 (2012-XK-A06); 浙江省卫生高层次创新人才培养项目

作者简介: 杨 雯 (1988—), 女, 江苏无锡人, 硕士, 主要从事生物化工、中药有效成分分离及药动学研究。

Tel: (0571)86613716 E-mail: yangwen7788@126.com

*通信作者 万海同 Tel: (0571)86613711 E-mail: wanhaitong@zjtcn.net

素。川芎嗪 (ligustrazine), 又名四甲基吡嗪, 为川芎的主要有效成分之一。研究表明川芎嗪具有扩张血管、增加冠脉及脑血流、抑制血小板聚集和降低血小板活性等作用, 其类似于钙离子拮抗剂, 对血液系统及肾、心、脑、肺、肝等组织疾病有治疗和保护作用, 故其药动学研究至关重要^[7-12]。本实验研究川芎嗪在 Caco-2 细胞单层模型的转运特征以及对 P-gp 表达的影响, 以期对川芎嗪药动学特征研究提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

川芎嗪, 中国药品生物制品检定所, 批号 110817-200305。MTT, Biosharp 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司; 细胞专用裂解液, 实验室配制; 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、BCA 蛋白定量试剂盒, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; Prestained Protein Ladder, Fermentas 公司; PVDF 转印膜, Pall 公司; sc-9104Tubulin 抗体 (H-235), Santa cruz biotech 公司; anti-P-gp 小鼠单抗 (ab3366), Abcam 公司; 辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG, Jackson 公司; Tris Buffered saline 缓冲液 (TBST, pH 8.0), 用聚山梨酯-20 配制; ECL 化学发光试剂盒, Pierce 公司; DMEM 培养基、非必需氨基酸, Gibco 公司; 胎牛血清, 杭州四季青公司; L-谷氨酰胺, 中国医学科学院生物医学工程研究所; 青-链霉素双抗液, 中国医学科学院生物医学工程研究所; 胰蛋白酶 (含 EDTA), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 水为超纯水。

1.2 仪器

倒置相差荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; JEM—1230 型透射电镜, 日本 Jeol 公司; SW—CF—IFD 超净工作台, 上海博迅设备有限公司; LDZ5—2 低温离心机, 北京医用离心机厂; 3111 CO₂ 细胞培养箱, Thermo 公司; YXQSG41.280 手提电热压力蒸气消毒器, 上海医用核子仪器厂; Millipore Simplicity 纯水仪, 美国 Millipore 公司; Millicell-ERS 电阻仪, 美国 Millipore Corporation 公司; 6、24、96 孔细胞培养板、培养瓶, 美国 Corning 公司; 24 孔 Millicell 转运孔 (0.4 μm), 美国 Millipore Corporation 公司。

1.3 细胞

Caco-2 细胞, 购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 川芎嗪测定

2.1.1 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 C₁₈ 保护柱 (20 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.5%醋酸水溶液 (32:68); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.1.2 方法学考察

(1) 标准曲线的绘制: 精密移取川芎嗪对照品储备液 (将 13.6 mg 川芎嗪对照品溶于超纯水中, 容量瓶定容至 10 mL), 用空白 D-Hanks 液配制浓度分别为 4、8、16、32、64、80 μmol/L 的对照品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 以浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 采用加权最小二乘法进行线性回归, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=3.9722X+5.6634$ ($r=0.9995$), 川芎嗪在 4~80 μmol/L 呈现良好的线性关系。

(2) 精密度和准确性试验: 用空白 D-Hanks 缓冲液分别配制浓度为 80、160、240、400 μmol/L 的川芎嗪溶液, 每个浓度各制备 5 份, 进行 HPLC 测定, 根据标准曲线计算川芎嗪浓度, 并计算方法精密密度 (RSD), 结果精密密度与重复性均良好, RSD 均小于 3%, 方法回收率为 95%~105%。

(3) 稳定性试验: 用空白 D-Hanks 液配制浓度为 80、160、320、400 μmol/L 的川芎嗪溶液, 分别于 0、2、4、10 h 进行 HPLC 测定, 并根据标准曲线计算样品中川芎嗪的浓度, 结果样品在 10 h 内稳定。

(4) 专属性试验: 分别吸取空白 D-Hanks 液、川芎嗪对照品溶液以及转运后样品溶液进行 HPLC 分析, 结果见图 1。川芎嗪色谱峰与相邻色谱峰分离度大于 1.5, 理论塔板数不低于 3 500, 且空白对照在相应位置上未见色谱峰, 方法专属性良好。

2.2 细胞培养

将 Caco-2 细胞置于含 20%胎牛血清、1%非必需氨基酸、青霉素-链霉素双抗液的 DMEM 高糖培养基中, 接种于 6 孔板上, 在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱环境下培养, 隔天换液。当细胞生长至孔面积的 80%左右, 用胰酶消化并且传代。

2.3 MTT 法筛选药物实验浓度

将处于对数生长期的 Caco-2 细胞以 2×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板, 每孔终体积 200 μL, 培养 24 h。小心吸尽每孔培养液, 加入浓度分别为 100、200、400、800、1 200 μmol/L 的川芎嗪溶液, 空白对照孔仅含培养液, 对照组加入细胞和培养液。按照“2.2”项条件培养 72 h 后, 每孔加质量浓度为 5 g/L 的 MTT 液 20 μL, 37 °C 下继续孵育 4 h。终止培养

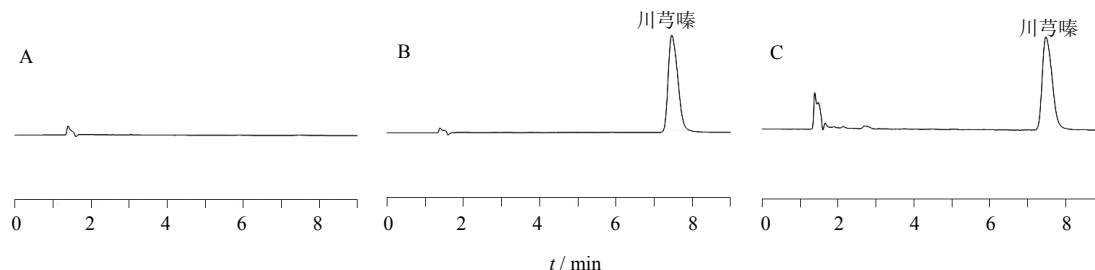


图1 空白对照 (A)、川芎嗪对照品溶液 (B) 和样品溶液 (C) 的 HPLC 图

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

后小心吸弃上清液，每孔加 DMSO 150 μL ，振荡 10 min 使结晶物充分溶解，酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (A) 值，空白调零，计算细胞存活率 (细胞存活率 = 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值)。选取细胞存活率 $\geq 80\%$ 的药物浓度作为非细胞毒浓度，确定为适宜浓度。

2.4 Caco-2 细胞单层模型制备

将对数生长期的细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于转运孔中，顶侧 (AP) 与底侧 (BL) 分别加 0.5、1.5 mL 培养基，隔天换液，1 周后每天换液，培养至 21 d，测定两侧培养液的碱性磷酸酶活性以及各孔跨膜电阻，当 AP 侧与 BL 侧的碱性磷酸酶活性比值接近 3:1 以及各孔跨膜电阻大于 $500 \Omega/\text{cm}^2$ 时^[5,8]，表明 Caco-2 细胞单层已形成，可以用于转运实验。

2.5 转运实验

取符合“2.4”项下条件的转运孔，在实验前用预热的 D-Hanks 液荡洗 3 次，最后 1 次在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中温孵 30 min，吸去废液。用 D-Hanks 液配制浓度为 80、160、240、320、400 $\mu\text{mol/L}$ 的川芎嗪药液。在 AP 侧至 BL 侧的转运实验中，AP 侧加药液 0.5 mL，BL 侧加空白 D-Hanks 液 1.5 mL，设置 3 个复孔；在 BL 侧至 AP 侧的转运中，AP 侧加空白 D-Hanks 液 0.5 mL，BL 侧加药液 1.5 mL，设置 3 个复孔。考察 P-gp 抑制剂维拉帕米对川芎嗪转运的影响时，先用含维拉帕米 (50 $\mu\text{mol/L}$) 的 D-Hanks 液将细胞孵育 30 min，吸去废液，AP 侧加川芎嗪药液 160 $\mu\text{mol/L}$ ，BL 侧作为接收池，给药后将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 r/min 的恒温摇床中，分别于 30、60、90、120 min 从接收池内取样 200 μL ，同时用空白 D-Hanks 液补足，HPLC 检测。计算药物的表观渗透系数 [P_{app} , $P_{\text{app}} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$]，其中 dQ/dt 为接收池单位时间药物转运量， A 为转运膜的面积 (0.33 cm^2)， C_0 为药物的初始浓度]。

2.6 Western blotting 法检测 P-gp 的表达

将对数生长期的 Caco-2 细胞分为对照组 (不加药物)，维拉帕米 (80 $\mu\text{mol/L}$) 阳性对照组，川芎嗪 (80 $\mu\text{mol/L}$) 组，加药后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱培养 72 h，用裂解液裂解细胞，提取总蛋白，按试剂盒方法操作，绘制标准曲线并计算各样品中蛋白的量。SDS-PAGE 蛋白质电泳，每个样品取含蛋白 60 μg 的体积，进行电泳，转膜，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，anti-P-gp 小鼠单抗 (一抗) 孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG (二抗) 孵育 2 h，TBST 洗涤 3 次，使用 ECL 试剂盒至 PVDF 膜上显出清晰的条带，X 光胶片曝光，胶片扫描，用 Quantity One 图像分析软件分析目标条带的吸光度值。

2.7 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 药物实验浓度筛选

川芎嗪浓度为 100~400 $\mu\text{mol/L}$ 时，培养 4 h 后的细胞存活率大于 80%，表明川芎嗪的安全浓度是 0~400 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.2 川芎嗪转运与时间和浓度的关系

在相同浓度下，随时间延长，AP $\rightarrow$ BL 川芎嗪转运量呈增长趋势，具有时间相关性；在同一时间，川芎嗪浓度越大转运量也越大，故与浓度也呈正相关。AP $\rightarrow$ BL 川芎嗪 P_{app} 为 $7.5 \times 10^{-6} \sim 9.5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ，表明川芎嗪的吸收度中等，推测其口服生物利用度中等。结果见图 2 和表 1。

在相同浓度下，对比 AP $\rightarrow$ BL 与 BL $\rightarrow$ AP 川芎嗪转运量可见，AP $\rightarrow$ BL 川芎嗪的转运量明显大于 BL $\rightarrow$ AP 转运量 ($P < 0.05$)，初步判定川芎嗪在 AP $\rightarrow$ BL 转运方式为被动转运，且可能兼有载体介导的药物外排。川芎嗪浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$ 时 AP $\rightarrow$ BL 与 BL $\rightarrow$ AP 转运量比较见图 3。

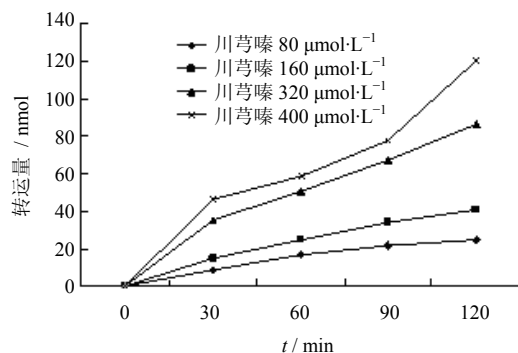
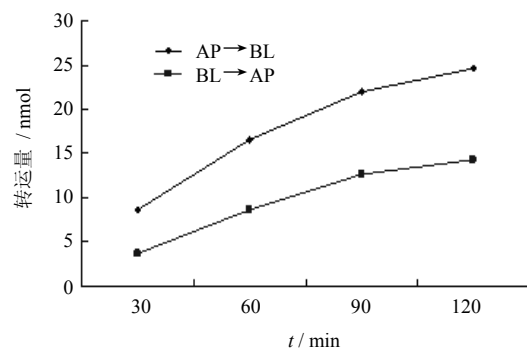
图2 时间与浓度对川芎嗪 AP→BL 转运的影响 ($n=3$)Fig. 2 Effects of time and concentration on AP→BL transport of ligustrazine ($n=3$)

表1 川芎嗪在 Caco-2 细胞模型转运特性

Table 1 Transport characteristics of ligustrazine in Caco-2 cell model

川芎嗪 / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		$P_{\text{app}}(\text{BL}\rightarrow\text{AP}) /$ $P_{\text{app}}(\text{AP}\rightarrow\text{BL})$
	AP→BL	BL→AP	
80	9.33 ± 0.75	$4.99 \pm 0.46^*$	0.54
160	7.70 ± 0.44	$5.03 \pm 0.52^*$	0.65
320	8.22 ± 0.46	$4.78 \pm 0.47^*$	0.58
400	8.30 ± 0.49	$4.90 \pm 0.50^*$	0.59

与 AP→BL 比较: $^*P<0.05$ $^*P < 0.05$ vs AP→BL图3 川芎嗪 ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) AP→BL 与 BL→AP 转运比较 ($n=3$)Fig. 3 Comparison on transport of ligustrazine ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) between AP→BL and BL→AP ($n=3$)

3.3 维拉帕米对川芎嗪转运的影响

与川芎嗪 $160 \mu\text{mol/L}$ 给药组相比, 加入维拉帕米 ($50 \mu\text{mol/L}$) 可显著提高川芎嗪 AP→BL 的转运量, P_{app} 分别为 $(5.13 \pm 0.44) \times 10^{-6}$ 、 $(9.46 \pm 0.64) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 差异显著 ($P<0.05$), 表明川芎嗪转运量受到 P-gp 的外排影响。维拉帕米对川芎嗪 ($160 \mu\text{mol/L}$) 转运的影响见图 4。

3.4 川芎嗪对 P-gp 表达的影响

与对照组相比, 川芎嗪 $80 \mu\text{mol/L}$ 组 P-gp 的表达显著降低 ($P<0.05$); 但作用明显弱于维拉帕米 ($P<0.05$)。结果见图 5。

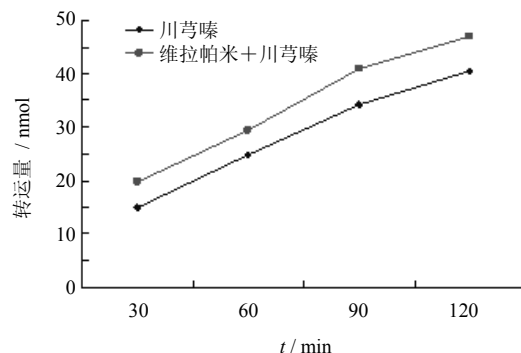
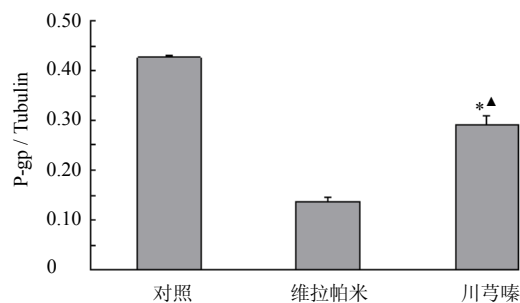
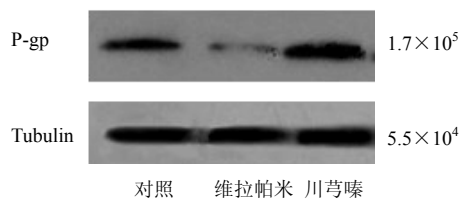
图4 维拉帕米对川芎嗪 AP→BL 转运的影响 ($n=3$)Fig. 4 Effect of Verapamil on AP→BL transport of ligustrazine ($n=3$)与对照组比较: $^*P<0.05$; 与维拉帕米组比较: $^{\Delta}P<0.05$ $^*P < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs Verapamil group

图5 川芎嗪对 P-gp 表达的影响

Fig. 5 Effect of ligustrazine on expression of P-gp

4 讨论

Caco-2 细胞模型与人体吸收机制有良好的相似性, 是预测体内吸收、研究药物吸收机制的良好工具^[13-14]。采用 MTT 法测定药物的安全浓度可避免药物浓度过高造成细胞死亡导致的吸收假象。本实验中, 川芎嗪 AP→BL 的 P_{app} 大于 $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 表明川芎嗪的吸收度良好, 推测其口服生物利用度较好, 转运量与浓度和时间呈正相关, 且 $P_{\text{app}}(\text{BL}\rightarrow\text{AP})$ 与 $P_{\text{app}}(\text{AP}\rightarrow\text{BL})$ 的比值为 $0.5\sim 1$, 初步判定川芎嗪在

AP→BL 侧的转运方式为被动转运, 并可能兼有载体介导的药物外排。曾有研究显示, 川芎嗪能够显著降低 Caco-2 细胞上 P-gp 表达^[15]。本实验结果也表明, 川芎嗪能明显抑制 P-gp 表达; 而且经 P-gp 抑制剂维拉帕米预处理后的 Caco-2 单层细胞, 川芎嗪的转运量明显提高, 表明川芎嗪在 Caco-2 单层细胞中的转运受到 P-gp 的外排作用。由此可见川芎嗪不仅抑制 P-gp 的表达, 同时自身也受到 P-gp 的外排作用。

本实验利用 Caco-2 细胞单层模型对川芎嗪体外吸收机制进行研究, 然而体外实验存在一定的局限性, 所以本实验有待于与动物体内实验相结合, 阐明川芎嗪在体内吸收机制, 验证体内与体外实验的相关性, 为川芎嗪复方配伍药动力学研究奠定基础。

参考文献

- [1] Silva R, Carmo H, Dinis-Oliveira R. *In vitro* study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells [J]. *Mol Toxicol*, 2011, 85(4): 315-326.
- [2] Li Y, Fawcett J P, Zhang H, *et al.* Transport and metabolism of some cationic ubiquinone antioxidants (MitoQn) in Caco-2 cell monolayers [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2008, 33(4): 199-204.
- [3] Paine M F, Hart H L, Ludington S S, *et al.* The human intestinal cytochrome P450 "Pie" [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(5): 880-886.
- [4] 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.
- [5] 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规程的建立 [J]. *中西医结合学报*, 2007, 5(6): 634-641.
- [6] 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..
- [7] Xiao Y Y, Ping Q N, Chen Z P. The enhancing effect of synthetical borneol on the absorption of tetra-methyl pyrazine phosphate in mouse [J]. *Int J Pharm*, 2007, 337 (1/2): 74-79.
- [8] Sussman N L, Eliakim R, Rubin D, *et al.* Intestinal alkaline phosphatase is secreted bidirectionally from villous enterocytes [J]. *Am J Physiol*, 1989, 257(1): 14-23.
- [9] 黄 熙, 任 平, 文爱东, 等. 脾虚大鼠的川芎嗪药物动力学特征与血液流变学 [J]. *第四军医大学学报*, 1994, 15(1): 71-72.
- [10] 王利胜, 郭 琦, 韩 坚, 等. 川芎嗪在小鼠血、脑和肝中的药动力学研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(6): 935-938.
- [11] 晏亦林, 刘宏伟, 周莉玲. 磷酸川芎嗪鼻用 pH 敏感型原位凝胶大鼠血液和脑部药动力学研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(2): 119-121.
- [12] 肖衍宇, 陈志鹏, 刘 雯. 磷酸川芎嗪缓释制剂在比格犬体内的药动力学和生物等效性研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(17): 1344-1348.
- [13] 颜 苗, 李兰芳, 李焕德. 甘草次酸 18 位差向异构体对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白功能和表达的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(1): 8-12.
- [14] 苑振亭, 王 可, 高培平. 蛇床子素在 Caco-2 细胞模型中的转运机制研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(4): 278-282.
- [15] 宋 娟, 唐 靖, 何 娟. 川芎嗪对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白功能和表达的影响 [J]. *中南药学*, 2007, 5(5): 440-443.