

• 药理与临床 •

羟基红花黄色素 A 在 Caco-2 细胞单层模型的转运研究

周 鹏, 周惠芬, 何 昱, 张宇燕, 杨洁红, 戴柳玲, 汪兴宇, 王泽锋, 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 研究丹红注射液中主要成分羟基红花黄色素 A (HSYA) 在 Caco-2 细胞单层模型的转运特征。方法 MTT 法确定 HSYA 对 Caco-2 细胞单层模型作用的安全浓度范围; 采用 Caco-2 细胞单层模型考察转运时间、药物质量浓度、温度、pH 值以及 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂维拉帕米和能量代谢抑制剂叠氮化钠对 HSYA 转运的影响; RT-PCR 法检测 HSYA 及维拉帕米对多药耐药基因 (MDR1) 表达的影响。结果 从顶侧 (AP) 到底侧 (BL) (AP→BL), HSYA 的表现渗透系数 (P_{app}) 在 $2 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-6}$ cm/s, 表明其吸收性中等; HSYA 的转运与其质量浓度和时间呈正相关, 37 °C 下 HSYA 的 P_{app} 与 4、25 °C 下的 P_{app} 有显著差异 ($P < 0.01$), pH 值为 9.0 时的 P_{app} 与 pH 值为 5.0、7.4 时的 P_{app} 值也有明显差异 ($P < 0.01$)。维拉帕米能明显下调 MDR1 基因的表达, 但 HSYA 的转运不受维拉帕米的影响; 叠氮化钠影响细胞能量代谢, 但 HSYA 的转运不受能量代谢异常的影响, 且 $P_{app(BL \rightarrow AP)}/P_{app(AP \rightarrow BL)}$ 在 1~1.5, HSYA 的吸收过程基本符合被动扩散。结论 HSYA 在 Caco-2 细胞模型的转运方式为被动扩散, 且不受 P-gp 和能量代谢的影响, 低温和碱性环境下不利于 HSYA 的吸收。

关键词: 丹红注射液; 羟基红花黄色素 A; 吸收机制; Caco-2 细胞单层模型; 被动扩散

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)14-2030-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.014

Transport characteristics of hydroxysafflor yellow A across Caco-2 cell monolayer model

ZHOU Peng, ZHOU Hui-fen, HE Yu, ZHANG Yu-yan, YANG Jie-hong, DAI Liu-ling, WANG Xing-yu, WANG Ze-feng, WAN Hai-tong

Institute of Cardiovascular-Cranial Disease, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To investigate the transport characteristics of hydroxysafflor yellow A (HSYA) in Danhong Injection across Caco-2 cell monolayer. **Methods** Safe concentration range of HSYA against Caco-2 cell monolayer model was selected by MTT method; The effects of time, drug concentration, temperature, pH, P-gp inhibitor (Verapamil), and energy metabolism inhibitor (sodium azide) on the absorption of HSYA were observed by Caco-2 cell monolayer model; The multidrug resistance (MDR1) gene expression in Caco-2 cells was analyzed by the RT-PCR method. **Results** The P_{app} of HSYA transport from apical (AP) side to basolateral (BL) side was in $2 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-6}$ cm/s, which showed a medium absorption. The transport of HSYA was positively correlated with time and concentration. The P_{app} of HSYA transport at 37 °C has significant differences with those at 4 and 25 °C ($P < 0.01$). The P_{app} of HSYA transport under pH 9.0 has significant differences with those under pH 5.0 and 7.4 ($P < 0.01$). The gene expression of MDR1 was significantly reduced by Verapamil, but the transport of HSYA was not influenced by Verapamil and sodium azide, the number of $P_{app(BL \rightarrow AP)}/P_{app(AP \rightarrow BL)}$ was between 1 and 1.5, so the absorption of HSYA was basically in line with the passive diffusion. **Conclusion** The transport of HSYA across Caco-2 cell monolayer model is passive diffusion, and is not influenced by the change of P-gp and energy metabolism. Low temperature and alkaline environment are not conducive to the absorption of HSYA.

Key words: Danhong Injection; hydroxysafflor yellow A; absorption mechanism; Caco-2 cell monolayer model; passive diffusion

收稿日期: 2013-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373898, 81173647, 81202636, 81274176); 浙江省自然科学基金资助项目 (LR12H27001); 浙江省科技厅项目 (2013C33244); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目; 浙江省中医药 (中西医结合) 重点学科项目 (2012-XK-A06); 浙江省教育厅科研资助项目 (Y201329166)

作者简介: 周 鹏, 男, 从事中药有效成分分离及药理学研究。Tel: (0571)86633179 E-mail: zz198966@163.com

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

丹红注射液为由丹参、红花组成的复方制剂,近年来临床上应用丹红注射液治疗瘀血闭阻所致的胸痹及中风获得肯定疗效^[1]。羟基红花黄色素 A (HSYA) 是存在于红花中的主要有效成分,是红花药理功效的最有效水溶性部位,具有抑制血小板激活因子诱发的小血小板聚集与释放、扩张血管、改善心脑血管供血不足等作用。目前临床上主要有丹红注射液注射给药和中药复方口服给药 2 种方式,对心血管疾病都有明显的治疗效果;且 HSYA 具有热不稳定性,体内半衰期较短^[2],故其药动学研究至关重要。Caco-2 细胞单层模型是目前国内外广泛应用的体外吸收模型,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,已迅速发展成为研究药物吸收的可靠手段,并已获美国 FDA 批准用作药物吸收筛选模型^[3-4]。本实验重建了本课题组研究过的 Caco-2 细胞单层模型,从时间、浓度、pH 值、温度、抑制剂等角度考察丹红注射液中主要成分 HSYA 在 Caco-2 细胞单层模型的转运特征,为 HSYA 药动学特征研究提供实验依据,为现代中药复方中成药剂型的选择提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

HSYA (质量分数 98%,天津马克生物技术有限公司,批号 120829);维拉帕米(中国食品药品检定研究院,批号 100223-200102);二甲基亚砜(DMSO),美国 Sigma 公司;DMEM 培养基、非必需氨基酸,美国 Gibco 公司;胎牛血清,杭州四季青公司;L-谷氨酰胺、青霉素-链霉素双抗液,中国医学科学院生物医学工程研究所;0.25%胰蛋白酶-0.2% EDTA 消化液、MTT、叠氮化钠、cDNA 第一链合成试剂盒、SYBR Green PCR Premix HS Taq,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂,宝生物工程(大连)有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯;水为超纯水。

1.2 仪器

Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪(德国 Agilent 公司);倒置相差荧光显微镜(日本 Nikon 公司);LDZ5-2 型低速自动平衡离心机(北京京立离心机有限公司);3111 CO₂ 细胞培养箱(Thermo 公司);赛多利斯(Sartorius)BS110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);全自动酶标仪(BIO-RAD);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(美国 Corning 公司);24 孔 Millicell 转运孔(0.4 μm,美国 Millipore Corporation 公司);荧光定量 PCR 仪(Biorad)。

1.3 细胞

Caco-2 细胞,购自中国科学院上海细胞库,传至第 30 代。

2 方法

2.1 Caco-2 细胞单层模型建立^[5]

将 Caco-2 细胞置于含 20%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1%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,用胰酶消化且传代。取对数生长期的细胞以 1×10⁵/mL 的密度接种于 Transwell 小室中,顶侧(AP)与底侧(BL)分别加 0.5、1.5 mL 培养基,隔天换液,7 d 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 Ω/cm²时,表明 Caco-2 细胞单层已形成,可以用于转运实验。

2.2 MTT 法筛选药物实验质量浓度

将处于对数生长期的 Caco-2 细胞以 1×10⁵/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,加入质量浓度分别为 40、80、120、160、200、300、400 mg/L 的 HSYA 溶液,空白孔仅含培养液,对照组加入细胞和培养液,在培养箱中继续培养 72 h 后,每孔加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,37 °C 下继续孵育 4 h。终止培养后小心吸弃上清液,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,空白孔调零,计算细胞存活率。选取细胞存活率≥90%的药物质量浓度作为非细胞毒浓度,确定为适宜浓度。

2.3 转运实验

取符合“2.1”项下条件的转运孔,在实验前用 37 °C 预热的 D-Hanks 液荡洗 3 次,最后 1 次在 37 °C 培养箱中温孵 30 min,吸去废液。用 D-Hanks 液配制 60、120、180 mg/L 的 HSYA 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。给药后将 24 孔板置于 37 °C、50 r/min 的恒温摇床中, 分别于 30、60、90、120、150、180 min 从接收池内取样 200 μ L, 同时用空白 D-Hanks 液补足, HPLC 检测。

考察维拉帕米和叠氮化钠对 HSYA 转运的影响时, 分别先用含维拉帕米(45 mg/L)和叠氮化钠(600 mg/L)的 D-Hanks 液孵育细胞 30 min, 吸去废液后, 两侧都加入 120 mg/L HSYA 药液, 其余操作同上。

考察 pH 值对 HSYA 转运的影响时, D-Hanks 液荡洗转运孔后, 在 AP 侧加入 pH 值分别为 5.0、7.4、9.0 的 120 mg/L HSYA 药液, 其余操作同上。

考察温度对 HSYA 转运的影响时, D-Hanks 液荡洗转运孔后, 两侧都加 120 mg/L HSYA 药液后, 将 24 孔板分别置于 4、25、37 °C 摇床中进行转运, 其余操作同上。

2.4 样品处理

取样品溶液 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 进行 HPLC 分析。

2.5 HSYA 定量测定

色谱条件: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m) 和 C₁₈ 保护柱(20 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液(11:89); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 403 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μ L。

2.6 实时定量 PCR 检测 Caco-2 细胞 MDR1 mRNA 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(45 mg/L)阳性对照组、HSYA(120 mg/L)组, 加药后继续培养箱培养 72 h。按 Trizol 试剂盒说明书方法提取各组细胞总 RNA, 溶解于 DEPC 处理水中; 合成 cDNA: 以总 RNA 5 μ L 为模板, 分别加入 Oligo(dT)₁₈ 引物 1 μ L、dNTP_s 1 μ L、5×第一条链合成缓冲液 4 μ L、Super M-MLV 逆转录酶 1 μ L、RNA 酶抑制剂 2 μ L, 加 RNase-free ddH₂O 至终体积 20 μ L, 混匀, 逆转录条件为 42 °C、1 h, 92 °C、5 min, 4 °C、5 min 合成第 1 条 cDNA 链; 实时定量 PCR 反应: 取逆转录产物 2 μ L 作为 PCR 反应模板, 加入上下游引物(表 1) 10 μ mol/L 各 1 μ L、SYBR Green PCR Premix HS Taq 12.5 μ L, 补充 DEPC 水至终体积 25 μ L, 混匀, PCR 条件: 起始 94 °C、3 min, 扩增时 94 °C、30 s, 61 °C、

表 1 用于实时定量 PCR 扩增的引物

Table 1 Primers of real-time amplification

基因	引物序列
β -actin	正向引物 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3' 反向引物 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'
MDR1	正向引物 5'-GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATAC-3' 反向引物 5'-ATGGCCAAAATCACAAGGGTTAGC-3'

30 s, 72 °C、30 s, 扩增 35 个循环, 并在 65~95 °C 绘制溶解曲线。以 β -actin 作为内参, 根据 Bio-rad 检测系统提供的 Ct 值, 通过相对定量法($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)计算 MDR1 mRNA 表达水平, 进行 PCR 扩增产物的实时定量分析。

2.7 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计算药物透过 Caco-2 细胞单层的表观渗透系数 [P_{app} , $P_{app} = (dQ/dt) / (A \cdot C_0)$], 其中 dQ/dt 为单位时间药物转运量; A 为 Caco-2 单层细胞膜的表面积 0.33 cm²; C_0 为在 Caco-2 单层细胞的 AP 侧或 BL 侧的药物初始质量浓度], 不同组间两两比较采用最小显著性法(LSD)单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

3 结果

3.1 HSYA 对 Caco-2 细胞的抑制作用

MTT 检测结果表明, HSYA 质量浓度在 40~200 mg/L 时, 细胞存活率未出现突然下降的情况, 细胞存活率均在 90%以上, 是 Caco-2 细胞的安全质量浓度范围。

3.2 HSYA 转运与时间和质量浓度的关系

在相同质量浓度下, 随时间延长, AP→BL 转运 HSYA 转运量呈增长趋势, 具有时间相关性; 在同一时间, HSYA 质量浓度越大转运量也越大, 故与质量浓度也呈正相关。 $P_{app(AP \rightarrow BL)}$ 在 $2 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-6}$ cm/s, 表明 HSYA 的吸收度中等。结果见图 1 和表 2。在整个质量浓度范围内, 经统计学处理发现各质量浓度的 $P_{app(BL \rightarrow AP)}$ 与 $P_{app(AP \rightarrow BL)}$ 并无显著性差异, 二者的比值均小于 1.5, 由此可以推断 HSYA 在 Caco-2 细胞模型上的转运机制以被动扩散为主。HSYA 质量浓度为 120 mg/L 时 AP→BL 与 BL→AP 转运量比较见图 2。

3.3 pH 值对 HSYA 转运的影响

pH 值对 HSYA 转运影响实验结果发现, pH 值为 5.0、7.4、9.0 的条件下, $P_{app(AP \rightarrow BL)}$ 值分别为 $(3.60 \pm 0.45) \times 10^{-6}$ 、 $(3.10 \pm 0.31) \times 10^{-6}$ 、 $(1.61 \pm 0.17) \times$

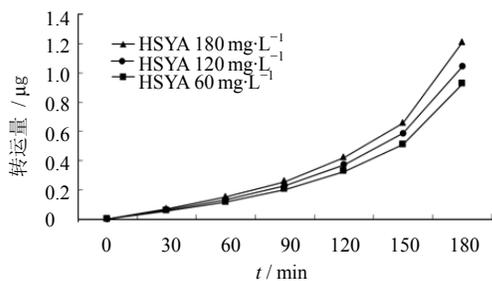


图1 时间与质量浓度对 HSYA AP→BL 转运的影响 (n=3)

Fig. 1 Effects of time and concentration on AP→BL transport of HSYA (n=3)

表2 HSYA 在 Caco-2 细胞模型转运特性 (x̄ ± s, n = 3)

Table 2 Transport characteristics of HSYA in Caco-2 cell model (x̄ ± s, n = 3)

HSYA / (mg·L ⁻¹)	$P_{app} / (\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		$P_{app(BL\rightarrow AP)} / P_{app(AP\rightarrow BL)}$
	AP→BL	BL→AP	
60	2.10 ± 0.49	2.87 ± 0.72	1.37
120	3.08 ± 0.76	3.78 ± 0.99	1.23
180	4.30 ± 0.93	4.93 ± 1.13	1.15

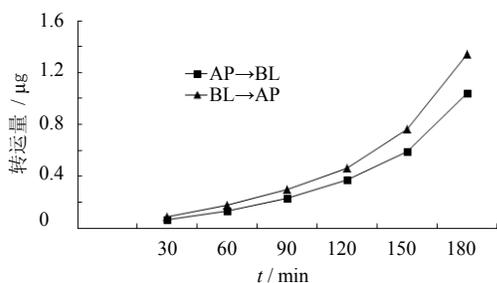


图2 HSYA (120 mg/L) AP→BL 与 BL→AP 转运量比较 (n=3)

Fig. 2 Comparison on transport of HSYA (120 mg/L) between AP→BL and BL→AP (n=3)

10⁻⁶ cm/s, 其中 pH 值为 5.0 时吸收较好 (P<0.01), pH 值为 9.0 时吸收最差 (P<0.01)。结果显示碱性环境不利于 Caco-2 细胞对 HSYA 的吸收, 而弱酸环境下吸收较好。

3.4 温度对 HSYA 转运的影响

细胞膜上转运蛋白的活性, 细胞本身的生长活性以及药物的溶解性等均受到温度的影响, 在 4、25、37 °C 下, HSYA 的 P_{app} 值差异显著 (P<0.01), 说明 HSYA 的转运受温度的影响, 见表 3。

3.5 维拉帕米与叠氮化钠对 HSYA 转运的影响

Caco-2 细胞单层顶侧膜上有丰富的 P-糖蛋白 (P-gp) 表达, P-gp 是多药耐药基因调控的外排蛋

白, 而维拉帕米是 P-gp 抑制剂。叠氮化钠可以通过影响细胞能量代谢非选择性地抑制药物吸收。在分别加入维拉帕米和叠氮化钠孵育 30 min 后, HSYA 的 P_{app} 与未加抑制剂孵育的对照组比较, 并没有显著差异, 说明 HSYA 的转运不受 P-gp 和能量消耗的影响, 结果见表 4。

表3 温度对 HSYA 转运的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Table 3 Effect of temperature on Caco-2 cell transport of HSYA (x̄ ± s, n = 3)

温度 / °C	$P_{app} / (\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		$P_{app(BL\rightarrow AP)} / P_{app(AP\rightarrow BL)}$
	AP→BL	BL→AP	
4	0.92 ± 0.07 ^{▲▲}	1.06 ± 0.14 ^{▲▲}	1.15
25	1.29 ± 0.15 ^{▲▲}	1.67 ± 0.24 ^{▲▲}	1.29
37	3.10 ± 0.35 ^{▲▲}	3.96 ± 0.68 ^{▲▲}	1.27

4、25、37 °C 两两比较: ▲▲P<0.01

▲▲P<0.01 between each two of 4, 25, and 37 °C

表4 抑制剂对 HSYA 转运的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Table 4 Effect of inhibitor on Caco-2 cell transport of HSYA (x̄ ± s, n = 3)

组别	$P_{app} / (\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		$P_{app(BL\rightarrow AP)} / P_{app(AP\rightarrow BL)}$
	AP→BL	BL→AP	
HSYA	3.08 ± 0.76	3.78 ± 0.99	1.23
HSYA+维拉帕米	2.88 ± 0.17	3.56 ± 0.24	1.24
HSYA+叠氮化钠	2.98 ± 0.15	3.64 ± 0.42	1.22

3.6 HSYA 对 MDR1 基因表达的影响

实时定量 PCR 结果表明, 目的基因 MDR1 和内参基因 β-actin 扩增良好。实验各组相对表达量见表 5, 与对照组比较, 45 mg/L 维拉帕米对 MDR1 表达有明显的下调作用 (P<0.01), HSYA 对 MDR1 表达没有明显影响, 证实 HSYA 的转运不受 P-gp 的影响。

表5 HSYA 对 MDR1 基因表达的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Table 5 Effect of HSYA on expression of MDR1 gene (x̄ ± s, n = 3)

组别	$\rho / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	MDR1 相对表达量
对照	—	1.46 ± 0.25
维拉帕米	45	0.54 ± 0.09 ^{**}
HSYA	120	1.35 ± 0.15

与对照组比较: **P<0.01

**P<0.01 vs control group

4 讨论

丹红注射液具有抗心肌缺血、抑制血小板聚集、抗氧化、改善神经系统障碍等作用^[6], HSYA 是丹红注射液的主要成分, 具有改善心脑血管供血不足、缓解急性肺损伤、抑制炎症因子的激活、保护血管内皮细胞等多种药理活性^[7-8], 为了更好地研究口服给药的吸收效果, 本实验通过 Caco-2 细胞模型, 研究 HSYA 跨膜转运机制, 探讨其小肠吸收转运的机制, 为今后临床研究和中成药剂型选择提供参考依据。

采用 MTT 法测定药物的安全浓度可避免因药物浓度过高造成细胞死亡导致的吸收假象。本实验中, HSYA 从 AP→BL 及从 BL→AP 的转运量与时间和浓度呈正相关增加, HSYA 的 $P_{app(AP→BL)}$ 为 $2 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-6}$ cm/s, 属于中等吸收的化合物, 且 $P_{app(BL→AP)}/P_{app(AP→BL)}$ 为 1~1.5, 初步判定 HSYA 的转运方式为被动扩散^[9]。

一般来说对温度敏感是载体介导转运的共同特征^[10], 但温度对药物的转运影响是很复杂的, 不仅细胞膜上载体的活性会受到影响, 而且细胞本身的生长活性、AP 侧绒毛的运动快慢以及药物的溶解性等均受到温度的影响^[11]。被动扩散包括协助扩散和自由扩散, 一般温度越高, 自由扩散越快; 在协助扩散中, 有特异的膜转运蛋白协助物质转运使转运速度增加, 温度影响其蛋白活性。低温可能导致以上因素出现, 所以含有酚羟基类化合物 HSYA 及和厚朴酚^[11]在 4 °C 下的转运量相对 37 °C 低很多。说明 HSYA 的吸收仍受到温度的影响。

肠道内不同部位的 pH 值影响某些离子化药物的存在状态, 从而影响药物的溶解性能及其胃肠吸收^[2]。HSYA 属于黄酮中的查尔酮类物质, 在酸性环境下均有利于它们吸收, 在碱性环境下, 药物的吸收都明显降低。这可能是由于 HSYA 含有酚羟基结构, 显弱酸性, 当介质呈酸性时, 以分子形式存在, 脂溶性增大, 有利于吸收, 但碱性条件下水解为盐的形式, 从而导致吸收降低^[12]。这在 Caco-2 细胞的转运实验中得到了证实。

叠氮化钠是通过影响细胞能量代谢来非选择性的抑制药物吸收的能量抑制剂。本实验结果表明与对照组相比, 加入叠氮化钠后 HSYA 的转运量并无明显变化。说明 HSYA 的吸收不消耗能量, 以被动扩散为主。

P-gp 和多药耐药蛋白 (multi-drug resistance

protein, MRP) 是 Caco-2 细胞中 2 种主要的转运蛋白, 两者均为能量依赖性膜蛋白, 发挥外排泵作用, 将胞内药物逆转运至胞外^[13]。其中 MRP2 调节许多药物的药物代谢动力学, 但与肿瘤耐药密切相关, 在药物性肝损伤中扮演重要角色^[14], 且 P-gp 和 MRP 的表达具有相关性, 所以本实验仅考察 HSYA 对 P-gp 影响。P-gp 是多药耐药基因 MDR1 调控的外排蛋白, 与底物结合后将其从细胞浆中排出细胞。本实验结果表明维拉帕米能下调 MDR1 基因的表达, 降低了细胞上 P-gp 的表达, 但加入维拉帕米孵育后, HSYA 的转运与对照组比较并无明显差异, 说明 HSYA 的转运不受 P-gp 的外排作用。

本实验利用 Caco-2 细胞单层模型对 HSYA 体外吸收机制进行研究, HSYA 的吸收过程基本符合被动扩散, 低温和碱性环境不利于 HSYA 的吸收, 且不受能量代谢和 P-gp 的外排作用的影响。然而体外实验存在一定的局限性, Caco-2 细胞来源于结肠, 缺乏分泌黏液的杯状细胞, 因而缺乏小肠上皮的黏液层, 且缺乏肠道的蠕动等因素的影响, 所以实验结果需进一步与动物体内实验相结合, 验证体内实验口服给药的吸收效果, 为 HSYA 复方配伍研究奠定基础。

参考文献

- [1] 章庆红. 丹红注射液临床应用研究 [J]. 河北医药, 2010, 32(20): 2909-2911.
- [2] 王 刚, 李晴宇, 方秋黎, 等. 羟基红花黄色素 A 的 Caco-2 细胞摄取转运研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(5): 353-357.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 杨 雯, 周惠芬, 杨洁红, 等. 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 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 581-585.
- [6] 周 鹏, 周惠芬, 何 昱, 等. 丹红注射液对乳鼠脑微血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2727-2731.
- [7] 王 天, 傅风华, 韩 冰, 等. 羟基红花黄色素 A 对实验性心肌梗死大鼠的保护作用及机制 [J]. 中草药,

- 2007, 38(12): 1853-1856.
- [8] 张 岭, 宋 艳, 李长龄, 等. 羟基红花黄色素 A 对常氧/低氧犬胸主动脉内皮细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 90-93.
- [9] 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.
- [10] Zhu Z B, Makhija S K, Lu B, *et al*. Transport across a polarized monolayer of Caco-2 cells by transferrin receptor-mediated adenovim stranscytosis [J]. *Virology*, 2004, 325(1): 116-128.
- [11] 曾 宝, 吴安国, 陈建南, 等. HPLC 考察和厚朴酚在 Caco-2 细胞模型的转运特征 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1286-1290.
- [12] 陈丙奎, 李松林, 李 萍, 等. 黄酮类化合物在 Caco-2 细胞模型中的吸收规律 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(4): 299-302.
- [13] 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.
- [14] 刘 涛, 金超智, 张翠莉, 等. 应用酵母双杂交系统筛选 MRP2 胞内区相互作用蛋白 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 296-299.