

千金子甾醇在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收研究

段飞鹏¹, 王英姿^{1*}, 李韶菁^{2*}, 文丽梅³, 王军玲⁴, 黄志英⁵, 李彩霞¹, 张秀婷¹, 王 晴¹,
冯艾灵¹, 孙秀玉¹, 张胜海¹

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102
2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700
3. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031
4. 河北大学药学院, 河北 保定 071002
5. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009

摘要:目的 研究千金子甾醇在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收和转运。方法 用 Caco-2 细胞模型研究千金子甾醇在 Caco-2 细胞模型中的双向转运, 考察时间、药物浓度和 P-糖蛋白抑制剂对千金子甾醇跨膜转运的影响。采用 UPLC-MS/MS 法测定药物浓度, 计算表观渗透系数 (P_{app}) 以及表观渗透率 (PDR)。结果 在 Caco-2 细胞中的转运过程中, 不同浓度千金子甾醇的 P_{app} 值介于 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$, 其累积转运量随时间和浓度的增加而增加, 具有浓度依赖性。10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 千金子甾醇的 PDR 分别为 1.35、0.83、0.65。盐酸维拉帕米可以促进千金子甾醇由 AP 侧→BL 侧的转运。结论 千金子甾醇在肠道中的吸收中等, 以被动转运为主, 可能存在肠道转运蛋白的外排机制。

关键词: 千金子; 千金子甾醇; Caco-2; 肠吸收; 转运; 外排

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)21-3136-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.018

Absorption of euphobiasteroid across Caco-2 cell monolayer model

DUAN Fei-peng¹, WANG Ying-zi¹, LI Shao-jing², WEN Li-mei³, WANG Jun-ling⁴, HUANG Zhi-ying⁵,
LI Cai-xia¹, ZHANG Xiu-ting¹, WANG Qing¹, FENG Ai-ling¹, SUN Xiu-yu¹, ZHANG Sheng-hai¹

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
3. Life Science & Engineering College of South-west Jiao-tong University, Chengdu 610031, China
4. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China
5. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To study the absorption and transportation of euphobiasteroid in Caco-2 cell monolayer model. **Methods** Caco-2 cell monolayer model was used to study the process of bi-direction transport of euphobiasteroid, and the effects of time, drug concentration, and inhibitors on the process were investigated. The concentration of euphobiasteroid was detected by UPLC-MS/MS, and the apparent permeability coefficient (P_{app}) and apparent permeability (PDR) were calculated. **Results** During the transport process of euphobiasteroid in Caco-2 cells, the P_{app} values of variety concentration were from 1×10^{-6} to 1×10^{-5} . The cumulative transshipment volume was increased with time and concentration, which presented concentration-dependent manner. The PDR values of 10, 30, and 50 $\mu\text{mol/L}$ euphobiasteroid were 1.35, 0.83, and 0.65, respectively. Verapamil hydrochloride could promote the transportation of euphobiasteroid from AP side to BL side. **Conclusion** The absorption of euphobiasteroid in intestine is moderate and mainly through passive transport. There may be excretion mechanism of intestinal transport protein in the intestine absorption of euphobiasteroid.

Key words: *Euphorbia lathyris* L.; euphobiasteroid; Caco-2; intestinal absorption; transport; excretion

收稿日期: 2014-03-04

基金项目: 北京中医药大学复方中药制药研究创新团队项目资助 (2011-CXTD-13); 国家自然科学基金资助项目 (81274082); 北京市优秀人才培养资助 D 类项目 (2012D009999000002); 北京市自然科学基金资助项目 (7122093)

作者简介: 段飞鹏, 男, 在读硕士研究生, 从事中药制剂研究。E-mail: dfphunan111@126.com

*通信作者 王英姿, 女, 教授, 研究方向为中药制剂新技术研究。E-mail: wangyzi@sina.com

李韶菁, 女, 副教授, 研究方向为中药组效关系和分子药理学。E-mail: shaolingli2004@126.com

千金子为大戟科植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子, 具有泻下逐水、破血消癥的功效; 用于二便不通、水肿、痰饮、积滞胀满、血瘀经闭; 外治顽癣、赘疣等症^[1]。现代研究表明千金子的药理作用主要有利尿、致泻、抗肿瘤、抗菌、镇痛、抗炎等作用^[2]。千金子有小毒, 对胃肠道有很强的刺激作用, 可以产生峻泻, 强度为蓖麻油的3倍, 致泻成分为千金子甾醇^[3], 《中国药典》2010年版将千金子甾醇作为其定量测定指标^[1], 但其在肠道内的吸收和转运机制尚不明确, 极大地限制了千金子在临床上的应用。

Caco-2 细胞来源于人结肠癌上皮细胞, 当其生长达到融合后细胞可自发分化形成极性, 形成了具有紧密连接细胞单层, 形态学上类似小肠吸收细胞。近几十年来, Caco-2 细胞模型广泛用于研究药物在肠道中的吸收, 是研究外源性化合物肠道吸收和毒性很好的体外模型^[4]。本实验首次采用 Caco-2 细胞模型研究千金子甾醇的吸收机制, 并研究时间、浓度、抑制剂对千金子甾醇转运的影响。

1 材料

1.1 细胞

Caco-2 细胞购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.2 试药与试剂

MEM/EBSS 培养液、0.25%胰蛋白酶 (含 EDTA)、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲盐 (PBS)、胎牛血清 (FBS)、非必需氨基酸 (NEAA), 均来源于 Cellgro (美国 Mediatech 公司), 青霉素-链霉素 (Amresco, 美国), 二甲基亚砜 (DMSO, Sigma, 美国); 碱性磷酸酶检测试剂盒 (碧云天生物技术研究); 盐酸维拉帕米 (中国食品药品检定研究院, 批号 100223-200102); 千金子甾醇对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 111789-200901); 汉黄芩素 (质量分数 > 98%, 上海源叶生物科技有限公司, 批号 YS0925SA13), 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司, 美国); 甲醇、乙腈为质谱纯; 醋酸乙酯为分析纯, 千金子甾醇样品 (自提, 质量分数 > 95%)。

1.3 仪器

3111 CO₂ 培养箱 (Thermo 公司, 美国); HFease 1800 生物安全柜 (上海力康医疗设备有限公司); IX71 倒置荧光显微镜 (Olympus 公司, 日本), Eppendorf 5810R 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 德国); Millicell-ERS 跨膜电阻仪 (Millipore 公司,

美国); M5 多功能酶标仪 (SpectraMax 公司, 美国), Transwell 板 3460 (Corning 公司, 美国); DW-86L728 医用低温保存箱 (青岛海尔特种电器有限公司); UPLC-MS/MS (Waters 公司, 美国), Milli-Q 纯水机 (Millipore 公司, 美国)。

2 方法

2.1 细胞培养

Caco-2 细胞接种于 25 cm² 的细胞培养瓶中, 加入 5 mL MEM/EBSS 培养基, 含 10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1%青霉素-链霉素 (100 U/mL) 双抗液。于 37 °C 的 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。隔 3 天换 1 次液, 每 4~7 天用胰蛋白酶消化传代。

2.2 千金子甾醇细胞毒性实验

采用 MTT 法检测不同浓度千金子甾醇对 Caco-2 细胞的毒性。取对数生长期的 Caco-2 细胞以 1×10^5 /mL 的密度接种于 96 孔培养板, 每孔体积为 200 μ L, 按“2.1”项培养条件培养 3 d。细胞分为实验组、阴性对照组和空白组, 实验组加入不同浓度的千金子甾醇, 使其终浓度为 10、20、50、80、100、150、200 μ mol/L (DMSO 终体积分数 < 1%), 空白组不加细胞仅加培养基, 阴性对照组加入细胞、培养基和 DMSO (终体积分数 1%)。按“2.1”项下培养条件培养 4 h 后, 每孔加入 MTT (5 g/L) 溶液 20 μ L, PBS 溶液 180 μ L, 37 °C 继续培养 4 h, 终止培养, 小心吸弃上清液, 每孔加入 100 μ L DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物溶解。用酶标仪在 570 nm 和 630 nm 处测定各组吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次。选取细胞存活率 $\geq 90\%$ 的药物浓度作为非细胞毒剂量, 确定剂量范围, 用于下一步实验^[5]。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

2.3 Caco-2 细胞单层模型的制备

将消化后的 Caco-2 细胞混悬液接种于 Transwell 培养板的多聚碳酸酯膜中, 细胞种植密度为 4×10^4 /mL, 单层细胞于 21~23 d 分化形成, 用跨膜电阻仪检测跨膜电阻, 各孔跨膜电阻值均大于 700 $\Omega \cdot \text{cm}^{2[6]}$, 符合实验要求。

2.4 千金子甾醇的跨膜转运实验

2.4.1 样品溶液的配制 精密称取样品千金子甾醇 5.5 mg, 用 DMSO 溶解至 1 mL, 配制成 10 mmol/L 的千金子甾醇储备液。用空白培养液稀释, 配制成浓度为 10、20、30、40、50 μ mol/L (DMSO 终体积分数 < 1%) 的千金子甾醇溶液。

2.4.2 跨膜转运实验 实验前测定每孔跨膜电阻值, 弃去电阻值不符合要求的孔。对于药物从细胞绒毛面 (AP) 侧到基底 (BL) 侧的转运: 移取含药培养液 0.5 mL 加入 AP 侧作为供给池, 同时 BL 侧加入 1.5 mL 空白培养液作为接收池; 对于药物从 BL 侧到 AP 侧的转运: 将含药培养液 1.5 mL 加入 BL 侧作为供给池, 空白培养液 0.5 mL 加入 AP 侧作为接收池。分别用 10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 的千金子甾醇作为供试药物, 将加好药物溶液和空白接收液的 Transwell 板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 5% CO_2 恒温培养箱中培养, 分别在 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 从接收池中吸取 200 μL 接收液, 同时补足相同体积的空白培养液, 转运完后, 测量各孔电阻, 各孔跨膜电阻值均无明显差异, 实验平行 3 次。

取接收液 200 μL , 加入 5 $\mu\text{g/L}$ 汉黄芩素内标溶液 50 μL , 涡旋混匀 3 min, 加入 500 μL 醋酸乙酯涡旋 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层醋酸乙酯 400 μL , 再加入 500 μL 醋酸乙酯涡旋 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层醋酸乙酯 500 μL , 合并 2 次萃取液, 氮气吹干, 加 200 μL 流动相复溶, 12 000 r/min 离心 15 min, 用 UPLC-MS/MS 进行分析, 计算表观渗透系数 (P_{app})。

2.4.3 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂盐酸维拉帕米对千金子甾醇跨膜转运的影响 实验前测定每孔跨膜电阻值, 弃去电阻值不符合要求的孔。将含 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸维拉帕米的培养液 0.5 mL 加入 AP 侧孵育 30 min, 弃去盐酸维拉帕米溶液。AP 侧加入药物浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液 0.5 mL 作为供给池, BL 侧加入 1.5 mL 空白培养液作为接收池。其余操作同“2.4.2”项。

2.5 UPLC-MS/MS 分析方法的建立

2.5.1 色谱条件 ACQUITY UPLCTM BEH C_{18} 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇(A)-0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 30% A; 0.5~0.8 min, 30%~80% A; 0.8~2.5 min, 80% A; 2.5~3.0 min, 80%~30% A; 体积流量 0.4 mL/min, 检测波长为 275 nm, 检测柱温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样室温度 4 $^{\circ}\text{C}$, 色谱图见图 1。

2.5.2 质谱条件 离子源为电喷雾电离源 (ESI); 离子化方式为正离子模式; 扫描方式为多离子反应检测 (MRM); 千金子甾醇用于定量分析离子对为 m/z 553 $\rightarrow$ 297, 内标汉黄芩素定量分析离子对为 m/z 285 $\rightarrow$ 270。

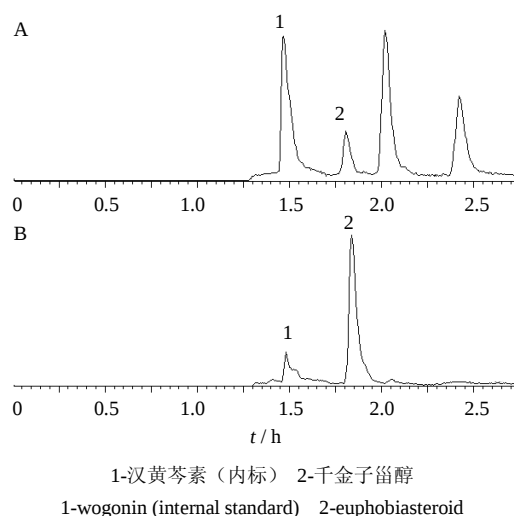


图1 对照品+内标 (A) 和样品+内标 (B) 的总离子流图
Fig.1 Total ion chromatogram of reference substance + internal standard (A) and sample + internal standard (B)

2.5.3 对照品储备液的配制 精密称取千金子甾醇对照品 5.5 mg, 用 DMSO 溶解至 1 mL, 配制成 10 mmol/L 的千金子甾醇对照品储备液。

2.5.4 汉黄芩素内标溶液的配制 精密称取汉黄芩素 5.0 mg, 用 DMSO 溶解至 1 mL, 配制成 5 mg/mL 储备液。精密吸取 10 μL 储备液, 于 10 mL 量瓶中用甲醇定容至刻度, 得 5 mg/L 内标溶液。吸取 5 mg/L 内标溶液 10 μL , 于 10 mL 量瓶中用甲醇定容至刻度, 得 5 $\mu\text{g/L}$ 内标溶液, 备用。

2.5.5 线性关系考察 取千金子甾醇对照品储备液适量, 用细胞培养液稀释至 10、100、200、400、600、800、1 000 nmol/L (DMSO 终体积分数 $<1\%$), 取上述溶液 200 μL 与 50 μL 内标溶液混匀, 按“2.4.1”项下处理。以浓度为横坐标, 对照品与内标峰面积比为纵坐标, 计算得线性方程 $Y=49.609X-10.469$, $r=0.9955$; 结果表明千金子甾醇在 10~1 000 nmol/L 线性关系良好。

2.5.6 精密度、重复性试验 分别配制 10、400、1 000 nmol/L 低、中、高浓度对照品溶液, 重复进样 6 次, 结果浓度的 RSD 值分别为 2.8%、3.4%、2.1%。分别配制低、中、高浓度样品溶液各 6 份, 进样测定, 结果浓度的 RSD 值分别为 5.2%、3.5%、8.7%。

2.5.7 稳定性试验 分别制备低、中、高浓度样品溶液各 3 份, 在 0、2、4、8、24 h 进样测定, 结果 RSD 值均在 15% 以内, 表明千金子甾醇溶液在 24 h 内稳定^[7]。

2.5.8 回收率和基质效应考察 取空白培养液, 用

醋酸乙酯萃取, 得醋酸乙酯萃取液, 分别配制加有 5 $\mu\text{g/L}$ 汉黄芩素内标的低、中、高浓度千金子甾醇样品 ($n=6$), 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹仪下吹干, 加入流动相 200 μL 涡旋溶解, 12 000 r/min 离心 10 min , 取上清液进样测定, 根据标准曲线获得浓度 C_1 。用培养液分别配制低、中、高浓度千金子甾醇样品 ($n=6$), 按“2.4.2”项下方法处理, 进样测定, 根据标准曲线获得浓度 C_2 。另取流动相配制低、中、高浓度的千金子甾醇溶液, 按“2.4.2”项下方法处理, 进样测定, 根据标准曲线获得浓度 C_3 。计算基质效应 (C_1/C_3) 和回收率 (C_2/C_1)。低、中、高浓度千金子甾醇样品基质效应分别为 109.0%、105.9%、102.1%, 回收率分别为 88.1%、89.2%、90.7%。

2.6 数据分析

Caco-2 细胞模型 P_{app} 值越大, 通透率越高, 按以下公式计算 P_{app} 和表观渗透率 (PDR) [8]。

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

$$\text{PDR} = P_{\text{app}} (\text{BL} \rightarrow \text{AP}) / P_{\text{app}} (\text{AP} \rightarrow \text{BL})$$

dQ/dt (nmol/s) 为单位时间内药物的累积透过量, A 为膜面积 (1.13 cm^2), C_0 ($\mu\text{mol/L}$) 为供给池药物的初始浓度

采取 SPSS 软件进行数据处理, 用 t 检验对两组数据进行处理比较, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 千金子甾醇实验浓度的筛选

千金子甾醇浓度为 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 培养 4 h 后细胞存活率均大于 90%, 表明千金子甾醇的安全浓度是 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.2 不同浓度千金子甾醇在 Caco-2 细胞模型上的吸收

不同浓度千金子甾醇在 Caco-2 细胞模型上累积透过量随时间变化曲线见图 2 和 3。由 AP 侧 $\rightarrow$ BL 侧转运的变化曲线可以看出, 千金子甾醇的初始浓度越高转运时间越长, 其转运量也越高, 即千金子甾醇的转运量与初始浓度和时间呈正相关, 具有浓度和时间依赖性, 表明千金子甾醇的跨膜转运机制至少有被动转运的存在。图 3 为低、中、高浓度千金子甾醇由 BL 侧 $\rightarrow$ AP 侧转运的变化曲线, 可以看出千金子甾醇 10、30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 随时间的增加, 累积透过量增加, 而浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 在 1.5 h 后有趋于饱和的趋势, 表明在由 BL 侧 $\rightarrow$ AP 侧转运的外排过程中可能有主动转运的参与。分别计算 10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的 P_{app} 值和 PDR 值, 见表 1。结果表明 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 PDR 值为 1.35,

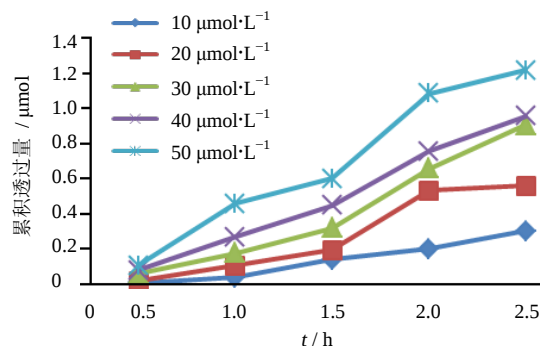


图 2 时间和浓度对千金子甾醇从 AP 侧到 BL 侧转运的影响 ($n=3$)

Fig. 2 Effects of time and concentration on transport of euphobiasteroid from AP side to BL side ($n=3$)

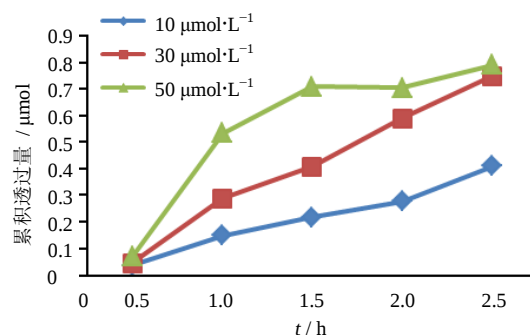


图 3 不同浓度千金子甾醇从 BL 侧到 AP 侧透过量随时间变化趋势 ($n=3$)

Fig. 3 Trends of euphobiasteroid with different concentration from BL side to AP side over time ($n=3$)

表 1 千金子甾醇 P_{app} 和 PDR 测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Determination of P_{app} and PDR values of euphobiasteroid ($\bar{x} \pm s, n=3$)

千金子甾醇 / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		PDR
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
10	30.03 ± 6.27	40.42 ± 0.55	1.35
30	29.85 ± 3.93	24.66 ± 0.78	0.83
50	23.99 ± 1.86	15.61 ± 0.36	0.65

小于 1.5, 而在 30 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 PDR 值均小于 1, 表明此时以被动转运为主。综合上述结果千金子甾醇在 Caco-2 细胞模型中的转运以被动转运为主, 并且可能有载体介导的药物外排。

3.3 盐酸维拉帕米对千金子甾醇在 Caco-2 细胞上跨膜转运的影响

图 4 为加入 P-gp 抑制剂盐酸维拉帕米后 30 $\mu\text{mol/L}$ 千金子甾醇的累积透过量随时间变化的曲

线,加入盐酸维拉帕米后,千金子甾醇跨膜转运速率和转运量明显上升,表明在 P-gp 抑制剂盐酸维拉帕米的作用下, P-gp 的外排功能受到了抑制,外排作用减弱,千金子甾醇由 AP 侧→BL 侧转运增加,表明千金子甾醇可能为 P-gp 的底物。表 2 为 2 种情况下在 150 min 内整个转运过程的 P_{app} 值和 PDR 值,统计分析表明 2 种情况下 PDR 值无明显差异。

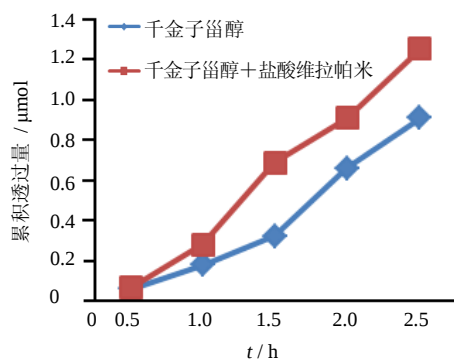


图 4 盐酸维拉帕米对千金子甾醇累积透过量的影响

Fig. 4 Effects of verapamil hydrochloride on cumulative permeation volume of euphobiasteroid

表 2 盐酸维拉帕米对千金子甾醇 P_{app} 和 PDR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of verapamil hydrochloride on P_{app} and PDR values of euphobiasteroid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$P_{app} / (\times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		PDR
	AB→BL	BL→AB	
千金子甾醇	29.85 ± 3.93	24.66 ± 0.78	0.83
盐酸维拉帕米 + 千金子甾醇	41.13 ± 1.27	31.19 ± 0.03	0.76

4 讨论

吸收是药物发挥药效和产生毒性的关键环节, Caco-2 细胞模型是目前国内外公认的研究药物肠吸收较理想的体外模型,该模型上存在多种药物代谢酶和部分主动转运蛋白,其中 P-gp 被普遍认为是药物转运的生化屏障,在药物的体内处置过程中发挥着重要的作用,可以更可靠真实地反映药物的吸收情况^[9-11]。因此本实验通过 Caco-2 细胞模型研究千金子甾醇的吸收机制,对全面阐释千金子肠道毒性的作用机制有一定的借鉴意义。

不同浓度千金子甾醇的 P_{app} 均介于 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-6}$, 表明其在肠道中的吸收为中等吸收^[12]。随着浓度的增加由 AP 侧→BL 侧的转运量也增加,具有浓度依赖性。而对于由 BL 侧→AP 侧的转运,低

浓度时 $PDR > 1$, 较高浓度时 $PDR < 1$, 可以推测在千金子甾醇的转运过程中有主动转运的参与,此时主动转运和被动转运同时影响着千金子甾醇的吸收,随着浓度的增大,主动转运逐渐趋于饱和,此时千金子甾醇的吸收主要以被动转运主导。在加入外排转运蛋白 P-gp 抑制剂盐酸维拉帕米后,由 AP 侧→BL 侧转运的 P_{app} 明显增加,进一步证实了千金子甾醇转运过程中主动转运的存在,而且这种主动转运的载体可能为 P-gp。因而千金子甾醇在肠道中的吸收转运以被动转运为主,一定程度上又受到主动转运体的外排作用,但其主动转运机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 孙洪峰. 千金子化学成分研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [4] Sambuy Y, Feruzza S, Ranaldi G, et al. Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2001, 17(4/5): 301-317.
- [5] 陈秀峰, 黄洁丽, 马 骏. 呋塞米在 Caco-2 细胞单层模型中的跨膜转运研究 [J]. *临床药学*, 2008, 18(2): 59-61.
- [6] Guan M, Zhu Q L, Liu Y, et al. Uptake and transport of a novel anticancer drug-delivery system: lactosyl-norcantharidin-associated N-trimethyl chitosan nanoparticles across intestinal Caco-2 cell monolayers [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 1921-1929.
- [7] 付洪瑜. 续随二萜酯药代动力学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [8] 高 坤, 孙 进, 何仲贵. Caco-2 细胞模型在口服药物吸收研究中的应用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(6): 469-474.
- [9] 杨秀伟, 郭 洁, 徐 隼. 芍药苷类化合物在人源肠 Caco-2 细胞单层模型中的吸收转运研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(15): 2097-2104.
- [10] 戚 娟, 郭 涛, 李海燕, 等. 黄连多组分在 Caco-2 细胞单层模型的吸收及其相互作用 [J]. *中草药*, 2013, 44(13): 1801-1806.
- [11] 刘 薇, 杨 珂, 王一飞, 等. UPLC 法检测染料木黄酮在 Caco-2 单细胞层模型上的吸收特征 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(2): 127-131.
- [12] 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.