

## 厚朴水提物在 Caco-2 细胞模型中的转运特征研究

费巧玲<sup>1</sup>, 王建<sup>2</sup>, 侯睿<sup>1</sup>, 刘芬<sup>1</sup>, 高源<sup>1</sup>, 蔡润兰<sup>1</sup>, 齐云<sup>1\*</sup>

1. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

**摘要:** 目的 研究厚朴水提物经 Caco-2 单层细胞模型双向转运的特征及对细胞膜上 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 活性的影响。方法 在经验证的 Caco-2 细胞单层模型中进行厚朴水提物双向转运实验, 根据水提物总抗氧化能力标准曲线计算其转运量, 并计算表观渗透系数 ( $P'_{app}$ ) 及溢流率 (ER)。以 P-gp 底物罗丹明 123 (Rh123) 在细胞内的蓄积与外排实验来判断厚朴水提物对 Caco-2 细胞膜上 P-gp 活性的影响。结果 厚朴水提物  $P'_{app(AP\rightarrow BL)}$  值在  $1 \times 10^{-5}$  cm/s 左右, 与质量浓度呈正相关, ER 值远小于 2, 对 Rh123 的蓄积和外排均没有影响。结论 厚朴水提物中与抗氧化作用有关的活性成分群可被较好地吸收, 以被动扩散形式转运, 不是 P-gp 底物, 也不影响 P-gp 活性。建立了一种考察厚朴水提物转运特征的新方法, 为临床安全合理使用厚朴提供了药动学研究基础。

**关键词:** 厚朴; Caco-2 细胞模型; 双向转运; 抗氧化能力; P-糖蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)13-2313-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.13.018

## Transport research on water extract from *Magnoliae Officinalis Cortex* across Caco-2 monolayer model

FEI Qiao-ling<sup>1</sup>, WANG Jian<sup>2</sup>, HOU Rui<sup>1</sup>, LIU Fen<sup>1</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>, CAI Run-lan<sup>1</sup>, QI Yun<sup>1</sup>

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Department of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

**Abstract: Objective** To evaluate the transport property of water extract from *Magnoliae Officinalis Cortex* (WEMOC) across Caco-2 monolayer model by bioactivity method and observe the influence on the activity of P-glycoprotein (P-gp) in cell membrane. **Methods** The validated Caco-2 cell monolayer model was used to observe the bidirection transportation of WEMOC; The amount of WEMOC in the receiver compartment, apparent permeability coefficient ( $P'_{app}$ ), and efflux ratio (ER) value could be determined according to the standard curve of total anti-oxidant capacity. The accumulation and efflux of rhodamine123 (Rh123), which is the substrate of P-gp, were determined to evaluate the influence of WEMOC on P-gp. **Results**  $P'_{app(AP\rightarrow BL)}$  of WEMOC was around  $1 \times 10^{-5}$  cm/s, and positively related to concentration; ER was far less than 2; It had no impact on the accumulation and efflux of Rh123. **Conclusion** The active ingredient groups of WEMOC with anti-oxidant activity can be well absorbed by passive diffusion down a concentration gradient. Neither is it the substrate of P-gp, nor does it have influence on P-gp activity. Our research establishes a novel method to evaluate the transport characteristics of WEMOC, which provides the pharmacokinetic basis for the clinical application of *Magnoliae Officinalis Cortex*.

**Key words:** *Magnoliae Officinalis Cortex*; Caco-2 monolayer model; bidirection transport; anti-oxidant capacity; P-glycoprotein

Caco-2 细胞来源于人结肠腺癌细胞 (human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2), 具有类似于肠上皮细胞的特征。正常情况下, Caco-2 细胞能自发分化为成熟细胞并形成完整的单分子膜<sup>[1]</sup>, 从而

可以考察药物跨膜转运方式<sup>[2]</sup>。由于在形态学和生物化学方面与肠上皮细胞具有相似性, Caco-2 细胞常作为药物肠吸收和转运特征研究的体外模型<sup>[3-5]</sup>。

目前, 中药提取物在 Caco-2 细胞中跨膜转运特

收稿日期: 2015-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173567, 811173645)

作者简介: 费巧玲 (1992—), 女, 硕士在读, 研究方向为抗炎与免疫药理学。Tel: (010)57833511 E-mail: 1554368105@qq.com

\*通信作者 齐云, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事抗炎与免疫药理学研究。Tel: (010)57833225 E-mail: yqi@implad.ac.cn

征的研究常采用化学方法测定其流通量,如 HPLC、LC-MS 等<sup>[6-7]</sup>。马丽等<sup>[8]</sup>研究了板蓝根中有效成分在 Caco-2 细胞模型中的吸收转运特征,以精氨酸和腺苷为指标成分,采用 HPLC 检测,计算其表观渗透系数( $P_{app}$ )与外排率。然而,与成分单一且明确的化学药物不同,中药提取物是混合物,其活性成分十分复杂。化学测定法只能考察有限数量成分的转运特征,且当所测成分呈现的转运特征不一致时<sup>[9-10]</sup>,难以反映提取物的整体特征。Yang 等<sup>[11]</sup>考察肉豆蔻中新木脂素类成分的转运特征时测定了其中 10 个单体成分的  $P_{app}$ ,不同成分之间转运特征既有强吸收,也有弱吸收,既有被动扩散,也有主动转运。可见,要评估含有这些成分的提取物总体的转运特征,单一成分的化学测定法显然难以达成目的。因此,要获得中药提取物整体的转运特征需要建立一种全新的方法,这种方法必须跳出单一成分测定的窠臼。

厚朴 *Magnoliae officinalis* Cortex 为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮。具有燥湿消痰、下气除满的功效,主要用于治疗湿滞伤中、脘痞吐泻、食积气滞、腹胀便秘、痰饮喘咳等<sup>[12]</sup>,是传统中医及日本汉方医学广泛使用的药材。其化学成分包括木脂素类、生物碱类、挥发油及多糖等。近年从厚朴药材中分离最多的是木脂素类化合物,包括厚朴酚和厚朴酚等,具有抗氧化,抗炎及抗菌作用<sup>[13]</sup>。中医临床使用厚朴以水煎内服为主,最近牛晓晨等<sup>[14]</sup>研究了厚朴的 *Kreb-Ringer's* 超声提取液中厚朴酚与和厚朴酚在大鼠肠道的吸收,结果显示 2 种成分在小肠上段有较好的吸收,属被动转运。但对厚朴水煎剂整体的体外吸收特性的研究迄今未见。考虑到厚朴富含多酚类成分(木脂素属多酚中的一类),而这类成分抗氧化作用突出。本实验拟以厚朴水提物总抗氧化能力来判断提取物在 Caco-2 细胞中的肠转运特征,并观察提取物对 Caco-2 细胞膜上 P-糖蛋白(P-gp)活性的影响,为厚朴的临床应用提供初步的药动学研究基础。

## 1 材料

### 1.1 Caco-2 细胞株

源于 ATCC (American Typeculture Collection, Rockville, MD, 美国)。

### 1.2 药材

厚朴购于西南药都中药材市场,经成都中医药

大学卢先明教授鉴定为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 的干皮、根皮及枝皮,为《中国药典》2015 年版收录品种<sup>[12]</sup>。

### 1.3 主要试剂

DMEM 培养基、非必需氨基酸(Gibco 公司);胎牛血清(Hyclone 公司);鼠尾胶原、非索非拉定、罗丹明 123 (rhodamine 123, Rh123)、2,4,6-三吡啶基三嗪(tripyridyltriazine, TPTZ),均来源于 Sigma-Aldrich 公司;L-谷氨酰胺(北京欣经科生物技术有限公司);碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);维拉帕米、普萘洛尔(中国食品药品检定研究院);青霉素、链霉素、胰蛋白酶、Hank's 平衡盐液(Hank's balance salt solution, HBSS)、荧光黄等;实验用水为三蒸水。

### 1.4 主要仪器

Multiskan Ascent 酶标仪、微孔板恒温振荡器(美国 Thermo Electron 公司);Napco 5410 二氧化碳孵箱(美国 NAPCO 公司);BCN-1360 型超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司);EVOM 细胞电阻仪(美国 WPI 公司)、Transwell™ 培养板(0.4  $\mu\text{mol}$  pore size, 美国 Corning 公司);CKX41 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);雷磁 PHS-3B 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 厚朴水提物的制备

取厚朴 20 g,置于圆底烧瓶中,200 mL 水浸泡 30 min 后冷凝回流煎煮。先武火至煮沸,沸后文火续煎 15 min,滤过,60 °C 减压浓缩至 100 mL,相当于厚朴原生药量为 0.2 g/mL<sup>[15]</sup>,4 °C 冷藏备用。经 HPLC 测定水提物中厚朴酚与和厚朴酚总量为 2.63%。

### 2.2 Caco-2 细胞单层模型的建立及验证<sup>[16]</sup>

取对数生长期的 Caco-2 细胞,按  $8 \times 10^4/\text{cm}^2$  接种于涂有鼠尾胶原的 Transwell™ 培养板上,接种后第 1 周隔天更换培养液,后 2 周每天换液,并于接种后每间隔 2~4 d 用细胞电阻仪测定单层细胞的跨上皮细胞电阻(TEER)。各孔中 TEER 值随时间逐渐升高,于 19~21 d 分化形成,TEER > 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ,两侧 ALP 比值为 1:2.8,与 Sussman 等<sup>[17]</sup>报道接近,经验证<sup>[18]</sup>符合实验要求。

### 2.3 厚朴水提物对 Caco-2 细胞毒性实验

#### 2.3.1 厚朴水提物对 Caco-2 细胞活力的影响 取

对数生长期的 Caco-2 细胞, 按每孔  $5 \times 10^4$  个接种于 96 孔培养板, 于  $37^\circ\text{C}$ 、含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h 后, 给药组每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含不同质量浓度 (终质量浓度为 15.625、31.25、62.5、125、250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 厚朴水提物的培养基, 并设药液对照孔 (只加含药培养基, 不加细胞), 对照组加入等体积的培养基, 并设空白孔 (只加培养基, 不加细胞), 各组 3 个复孔, 各组细胞于  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 22 h 后, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  的 MTS/PMS 混合溶液孵育 2 h, 于酶标仪 492 nm 处测定吸光度 ( $A$ ) 值。计算活力抑制率, 并以活力抑制率为因变量 ( $Y$ ), 药物质量浓度为自变量 ( $X$ ) 进行线性回归, 通过回归方程计算药物作用 24 h 对细胞半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 值。

活力抑制率 =  $1 - (\text{给药孔 } A \text{ 值} - \text{给药对照孔 } A \text{ 值}) / (\text{对照孔 } A \text{ 值} - \text{空白孔 } A \text{ 值})$

**2.3.2 厚朴水提物对 Caco-2 细胞单层模型 TEER 值的影响** 取经验证符合要求的 Caco-2 细胞单层, 于黏膜侧或肠腔侧 (AP 侧) 每孔加入 0.5 mL 含厚朴水提物 (终质量浓度 0、40、70、100、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的培养基, 对照组每孔加入等体积的培养基; 于浆膜侧或肠内壁侧 (BL 侧) 每孔加入 1.5 mL 培养基; 分别于给药后 30 min 和 150 min 在恒温热板上测定 TEER 值, 计算转运前后自身 TEER 变化率。

TEER 变化率 =  $(\text{给药后 } 150 \text{ min TEER 值} - \text{给药后 } 30 \text{ min TEER 值}) / \text{给药后 } 30 \text{ min TEER 值}$

**2.4 厚朴水提物在 Caco-2 细胞单层模型中双向转运实验**

**2.4.1 厚朴水提物总抗氧化能力测定** 采用亚铁离子还原能力 (FRAP) 实验测定其总抗氧化能力<sup>[19]</sup>。取各质量浓度厚朴水提物 100  $\mu\text{L}$  (空白孔为 100  $\mu\text{L}$  HBSS), 加入 96 孔酶标板中, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TPTZ 工作液, 微型振荡器上振荡 30 s 后, 在微孔板恒温振荡器上  $37^\circ\text{C}$  避光孵育 20 min。酶标仪 540 nm 处测定  $A$  值, 以  $A$  值对质量浓度进行回归, 绘制厚朴水提物总抗氧化能力标准曲线。

**2.4.2 厚朴水提物双向跨膜转运实验** 取经验证符合转运条件的 Transwell<sup>TM</sup> 12 孔培养板, 用 HBSS 清洗 3 次, 分别进行 AP 侧 (供侧) 向 BL 侧 (受侧) 转运, 以及 BL 侧 (供侧) 向 AP 侧 (受侧) 转运实验。于供侧每孔加入 0.5 mL 含厚朴水提物 (终质量浓度 50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 HBSS, 受侧每孔加入 1 mL HBSS,  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 2 h 后, 取受侧液进行总抗氧化能力测定。

**2.5 厚朴水提物对 Caco-2 细胞 P-gp 活性的影响<sup>[20]</sup>**

**2.5.1 蓄积测定** 将不同质量浓度的厚朴水提物与 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Rh123 在 Caco-2 细胞中避光共孵育 2 h, 以 30  $\mu\text{mol}/\text{L}$  维拉帕米 (P-gp 抑制剂) 作阳性对照, 对照组每孔加入相同体积的培养基。随后以无酚红 HBSS 洗涤 3 次, 溶胞后在  $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm、 $\lambda_{\text{em}}$  530 nm 处测定胞内荧光强度。

**2.5.2 外排测定** 将 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Rh123 与 Caco-2 细胞避光孵育 1 h, 替换为不含 Rh123 的受试药物与 Caco-2 细胞避光孵育 1 h; 以 30  $\mu\text{mol}/\text{L}$  维拉帕米作阳性对照, 对照组每孔加入相同体积的培养基。随后以无酚红 HBSS 洗涤 3 次, 加入溶胞液后在  $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm、 $\lambda_{\text{em}}$  530 nm 处测定胞内荧光强度。

**2.6 参数计算与统计学分析**

TEER、 $P_{\text{app}}$  以及溢流率 [ER 值, ER 值 =  $P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP})} / P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL})}$ ] 计算方法参考文献报道<sup>[21]</sup>。为有别于经典化学测定法计算的  $P_{\text{app}}$ , 本实验条件下通过生物测定法计算出的表观渗透系数值称为  $P'_{\text{app}}$ 。两组间样本均数差异比较采用  $t$  检验, 多组间比较应该用单因素方差分析。

### 3 结果

**3.1 厚朴水提物对 Caco-2 细胞的毒性**

**3.1.1 厚朴水提物对 Caco-2 细胞活力的影响** 结果表明随着厚朴水提物质量浓度的升高, 对 Caco-2 细胞活力的抑制作用逐渐增强, 见图 1。回归方程为  $Y = 0.432X - 0.027$ ,  $R^2 = 0.978$ , 作用 24 h 的  $\text{IC}_{50}$  为 116  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据课题组前期研究<sup>[22]</sup>, 跨膜浓度选择在 24 h  $\text{IC}_{50}$  的 1 倍之内为相对安全剂量, 一般不会损伤细胞单层完整性。

**3.1.2 厚朴水提物对 Caco-2 细胞单层模型 TEER 值的影响** 给药 150 min 后, 对照组及给药组 Caco-2 细胞单层模型 TEER 值均有所上升。与对照组比较, 在误差允许范围内, 厚朴水提物给药 150 min 后, 40~150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内不会对 Caco-2 细胞单层模型的完整性造成损伤。结果见表 1。

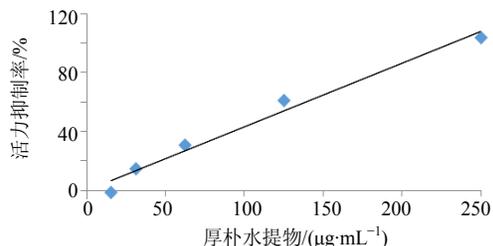


图 1 厚朴水提物对 Caco-2 细胞活力的影响  
Fig. 1 Effect of WEMOC on vitality of Caco-2 cells

表 1 厚朴水提取物对 Caco-2 细胞单层模型 TEER 值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of WEMOC on TEER value in Caco-2 cell monolayer model ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	给药后 TEER 值/ $(\Omega\cdot\text{cm}^2)$		TEER 变化率/%
		30 min	150 min	
对照	0	1 315 ± 37	1 349 ± 40	2.59
厚朴水提取物	40	1 317 ± 59	1 355 ± 59	2.89
	70	1 326 ± 51	1 353 ± 65	2.04
	100	1 325 ± 61	1 359 ± 40	2.57
	150	1 320 ± 40	1 335 ± 34	1.14

### 3.2 厚朴水提取物在 Caco-2 细胞单层模型中的双向转运

**3.2.1 厚朴水提取物总抗氧化能力标准曲线** 厚朴水提取物在 0~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内其总抗氧化能力与质量浓度呈良好线性关系, 标准曲线回归方程为  $Y=0.133X+0.1026$ ,  $R^2=0.9987$ 。

**3.2.2 厚朴水提取物在 Caco-2 细胞单层模型中的双向转运** 厚朴水提取物受侧质量浓度随着供侧质量浓度的增大而增加, 从 AP 侧到 BL 侧时, 供侧质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 受侧质量浓度为  $(5.51 \pm 0.51)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 供侧质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 受侧质量浓度为  $(6.78 \pm 0.75)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 提示其为被动扩散,  $P'_{\text{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})}$  值在  $1 \times 10^{-5}$   $\text{cm}/\text{s}$  左右; 从 BL 侧到 AP 侧时, 供侧质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 受侧质量浓度为  $(9.19 \pm 0.62)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 供侧质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 受侧质量浓度为  $(11.76 \pm 0.46)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。口服给药生物利用度大于 70%<sup>[3]</sup>, 显示其吸收较好; ER 值在 0.8~0.9, 小于 2, 说明没有外排, 不是 P-gp 底物<sup>[23]</sup>。具体数据见表 2。

### 3.3 厚朴水提取物对 P-gp 活性的影响

**3.3.1 厚朴水提取物对 Rh123 蓄积的影响** 共设置 5 个厚朴水提取物质量浓度, 从 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  开始, 以 0.4 倍递减, 范围内包含双向转运实验中的 2 个质量浓度。由表 3 可见, P-gp 抑制剂维拉帕米浓度为 30  $\mu\text{mol}/\text{L}$  即可显著增加 P-gp 底物 Rh123 在 Caco-2 细胞内的蓄积。而不同质量浓度的厚朴水提取物对 Rh123 的蓄积几乎没有影响。

**3.3.2 厚朴水提取物对 Rh123 外排的影响** 移除培养基中 Rh123 后, 30  $\mu\text{mol}/\text{L}$  维拉帕米即可显著抑制已进入 Caco-2 细胞内的 Rh123 的外排。而不同质量浓度的厚朴水提取物对 Rh123 的外排均无明显影

响。因此无论蓄积实验还是外排实验均显示厚朴水提取物对 P-gp 活性没有影响。结果见表 4。

表 2 厚朴水提取物转运 2 h 的  $P'_{\text{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})}$ 、 $P'_{\text{app}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})}$  及 ER 值 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2  $P'_{\text{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})}$ ,  $P'_{\text{app}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})}$ , and ER value of WEMOC after 2 h transportation ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

供侧 $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$P'_{\text{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})}/(\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$	$P'_{\text{app}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})}/(\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$	ER 值
50	$1.35 \times 10^{-5}$	$1.13 \times 10^{-5}$	0.83
100	$8.34 \times 10^{-6}$	$7.23 \times 10^{-6}$	0.87

表 3 厚朴水提取物对 Rh123 在 Caco-2 细胞内蓄积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of WEMOC on accumulation of Rh123 in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	荧光强度
对照	0	2 328 ± 115
维拉帕米	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3 858 ± 105**
厚朴水提取物	5.12	2 494 ± 119
	12.80	2 432 ± 128
	32.00	2 256 ± 140
	80.00	2 288 ± 124
	200.00	2 327 ± 115

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ , 下同

\*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below

表 4 厚朴水提取物对 Rh123 从 Caco-2 细胞外排的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of WEMOC on efflux of Rh123 from Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	荧光强度
对照	0	2 350 ± 125
维拉帕米	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3 193 ± 113**
厚朴水提取物	5.12	2 562 ± 72
	12.80	2 571 ± 103
	32.00	2 466 ± 120
	80.00	2 438 ± 78
	200.00	2 448 ± 65

## 4 讨论

Caco-2 细胞模型是常用的研究口服药物吸收的体外细胞模型<sup>[4]</sup>, 建模后需经过单层完整性、细胞分化极性、膜通透性以及 P-gp 表达等方面验证后, 才能进行后续的研究<sup>[18]</sup>。具体到正式的转运研究, 还应当选择对细胞单层无损的指标, 如 TEER

值（完整性）及 ALP 比值（极性）。本实验研究采用的是符合条件的 Caco-2 细胞单层模型。

以 Caco-2 细胞单层模型研究受试物转运特征，经典的方法是采用 HPLC 或 LC-MS 测定转运成分的量并计算出相应的  $P_{app}$ 、ER 等值来判断该化合物的转运特征。这些化学方法虽然灵敏、准确、可靠，但其只适合于已知成分。对包含大量未知成分的中药提取物，采用经典方法来研究并反映中药提取物整体转运特征显然是不适合的，其原因有二。首先，化学测定无法穷尽提取物中所有成分；更重要的是，当同一提取物中不同成分显示出截然不同的转运特征时，用哪种成分的转运代表提取物整体是无法判断的。因此，为评价中药提取物整体的转运特征，需建立一种有别于传统的新的研究方法。本实验采用了生物测定法来评价厚朴水提物的肠转运特征。由于厚朴含有多种酚类物质，具有显著的抗氧化活性<sup>[24]</sup>。因此，可通过选择此生物活性的量效曲线来判断厚朴水提物在 Caco-2 细胞单层的转运量。结果显示，厚朴水提物转运具有浓度依赖性，为被动扩散； $P'_{app(AP-BL)}$  值在  $1 \times 10^{-5}$  cm/s 左右 ( $1.35 \times 10^{-5} \sim 8.34 \times 10^{-6}$  cm/s)，大于判断吸收不良的临界值<sup>[3]</sup> ( $P'_{app(AP-BL)}$  值为  $1 \times 10^{-6}$  cm/s，生物利用度为 20%)，说明与抗氧化作用有关的活性成分群吸收较好。ER 值在 0.8~0.9，表明这类成分总体上不存在外排<sup>[25]</sup>现象。

P-gp 是肠上皮细胞中主要的外排蛋白，由于厚朴水提物不具外排特征，自然不可能是 P-gp 等外排蛋白的底物，但厚朴水提物是否对 P-gp 活性有影响却不明确。有文献报道，厚朴能抑制远志中细叶远志皂苷、远志吡啶 III 在空肠和结肠的吸收<sup>[26]</sup>，提示厚朴水提物对肠上皮细胞中的外排蛋白活性似乎有兴奋作用。对此，聚焦于肠道中最主要的外排蛋白 P-gp，通过它的底物 Rh123 在 Caco-2 细胞中的蓄积和外排实验来评价厚朴水提物对其活性的影响。结果显示，厚朴水提物对 Rh123 的蓄积和外排均无明显影响，说明厚朴水提物并不影响 P-gp 活性。当然，在肠上皮细胞中，具有促外排的蛋白并不只有 P-gp，厚朴水提物对肠上皮细胞中多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance related protein 2, MRP2) 或乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 等外排蛋白<sup>[27]</sup> 是否有兴奋作用尚待研究。

需要说明的是，通过本实验条件计算出的  $P'_{app}$

值与经典化学测定法计算的  $P_{app}$  值是有区别的。前者是针对混合物的整体，而后者针对的是特定的成分；如果以成分来比较两者区别， $P'_{app}$  不仅反映了成分的原型，也包括这些成分的代谢物、降解物甚至还包括细胞单层分泌的因子等<sup>[28]</sup>，这些物质均可能影响到所具有的生物活性，而  $P_{app}$  却只能代表原型成分。从这个角度来看， $P'_{app}$  值可能与体内实际作用更为吻合<sup>[29]</sup>。当然， $P'_{app}$  所代表的转运特征是与该生物活性相关的成分群的总和，它不能反映提取物中与该生物活性无关的成分群。因此，准确地说，这里所谓的“整体”，也只是与该生物活性相关的成分集合。同时，采用生物测定法进行转运特征研究是有条件的。首先，选择的生物测定指标要足够灵敏，至少能从 2 h 或 4 h 的受侧液中检测出明确的生物活性，并能通过量效曲线进行有效计算。其次，该生物活性检测体系要与转运介质兼容，即转运介质与生物活性测定的反应介质不能相冲突；最后，该生物活性能够反映中药提取物中足够多的成分，这才有可能代表这个集合的整体情况。

由于采用生物活性的量效曲线来判断提取物的转运量，其灵敏度往往低于化学方法。为了进行有效测定，常常需要在受侧加入尽量多的受试物，但前提是不破坏细胞单层的完整性。对此，在实验中首先进行了厚朴水提物对 Caco-2 细胞 24 h 毒性实验，并计算出其  $IC_{50}$  为 116  $\mu$ g/mL。根据前期研究结果<sup>[22]</sup>， $IC_{50}$  的 1~1.5 倍用于转运研究可能是安全的。事实上，本实验显示 150  $\mu$ g/mL 及以下厚朴水提物不破坏细胞单层的完整性。当然，考虑到生物活性的灵敏度，最终选择了 50 和 100  $\mu$ g/mL 2 个质量浓度进行转运实验。

综上，本研究为评价多成分的厚朴水提物在 Caco-2 细胞中的肠转运特征，建立了一种全新的方法。实验结果表明，厚朴水提物吸收较好，以被动扩散方式转运，无外排，且不影响 P-gp 活性，这为临床合理使用厚朴提供了药动学基础。同时提示，只要能找到合适的生物活性指标，生物测定法同样适用于其他中药提取物转运特征的研究。

#### 参考文献

- [1] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175(3): 880-885.
- [2] Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, et al. Optimized

- conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 10(3): 195-204.
- [3] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cell (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-fact or myth [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763-766.
- [4] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1/3): 27-43.
- [5] 朱容慧, 赵军宁, 毕岳琦, 等. 中药肠吸收动力学的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(1): 25-29.
- [6] 吴安国, 曾 宝, 王春玲, 等. HPLC 考察小檗碱和黄连提取物中小檗碱在 Caco-2 细胞模型的转运 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(7): 1007-1011.
- [7] 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.
- [8] 马 丽, 何茂秋, 骆瀚超, 等. 板蓝根提取液中有效成分的吸收转运特性分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(24): 5-9.
- [9] Li N, Tsao R, Sui Z, *et al.* Intestinal transport of pure diester-type alkaloids from an aconite extract across the Caco-2 cell monolayer model [J]. *Planta Med*, 2012, 78(7): 692-697.
- [10] Zhao B, Yang X B, Yang X W, *et al.* Intestinal permeability of the constituents from the roots of *Saposhnikovia divaricata* in the human Caco-2 cell monolayer model [J]. *Planta Med*, 2011, 77(13): 1531-1535.
- [11] Yang X W, Huang X, Ma L, *et al.* The Intestinal Permeability of Neolignans from the Seeds of *Myristica fragrans* in the Caco-2 cell monolayer model [J]. *Planta Med*, 2010, 76(14): 1587-1591.
- [12] 中国药典 [S] 一部. 2015.
- [13] 秦 洁, 李晓庆, 赵春娟, 等. 厚朴酚与和厚朴酚抗鼻咽癌作用机制研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(2): 226-230.
- [14] 牛晓晨, 程林忠, 李 青. 厚朴酚与和厚朴酚在大鼠不同肠道中的吸收情况及与药物浓度关系 [J]. *中药材*, 2015, 38(4): 817-820.
- [15] 傅 勇, 肖 武, 李 达, 等. 远志与厚朴不同配比水煎液的 HPLC 指纹图谱比较研究 [J]. *中国药房*, 2012, 23(43): 4072-4074.
- [16] Artursson P. Epithelial Transport of drugs in cell culture: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells [J]. *J Pharm Sci*, 1990, 79(6): 476-482.
- [17] 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): G14-23.
- [18] 蔡润兰, 王 敏, 齐 云, 等. Caco-2 细胞模型验证指标的选择与评判 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(24): 1871-1875.
- [19] Wang M, Xie C, Cai R L, *et al.* Studies on antioxidant activities of breviscapine in the cell-free system [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36(6): 1199-1207.
- [20] Anuchapreeda S, Leechanachai P, Smith M M, *et al.* Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(4): 573-582.
- [21] 齐 云, 王 敏, 蔡润兰, 等. 两种方法测定灯盏花素经 Caco-2 细胞模型的转运 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(6): 831-833.
- [22] 蔡润兰, 代 勇, 王 敏, 等. 9 种中药提取物细胞毒性及其与人结肠腺癌细胞系单层细胞旁通透性的相关性研究 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(10): 1418-1421.
- [23] Polli J W, Wring S A, Humphreys J E, *et al.* Rational use of *in vitro* P-glycoprotein assays in drug discovery [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(2): 620-628.
- [24] 李清华, 翁新楚. 厚朴抗氧化活性的研究 [J]. *中国油脂*, 2005, 30(9): 37-40.
- [25] Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for Industry: Drug Interaction Studies-Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations* [M]. Silver Spring: Food and drug Administration, 2012.
- [26] 黄立华, 王 建, 吴明权, 等. 远志、厚朴配伍对其活性成分在大鼠肠段吸收的影响 [J]. *中成药*, 2015, 37(4): 739-745.
- [27] Alvarez A I, Real R, Pérez M, *et al.* Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(2): 598-617.
- [28] Eguchi A, Murakami A, Ohigashi H. Novel bioassay system for evaluating anti-oxidative activities of food items: use of basolateral media from differentiated Caco-2 cells [J]. *Free Radic Res*, 2005, 39(12): 1367-1375.
- [29] Gao Y, Zong C, Liu F, *et al.* Evaluation of the intestinal transport of a phenylethanoid glycoside-rich extract from *Cistanche deserticola* across the Caco-2 cell monolayer model [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e011649.