

• 药效与代谢 •

微乳对葛根素在 MDCK-MDR1 细胞的转运影响及机制研究

杨 冰, 张紫薇, 赵 博, 吴娅丽, 谭 丽, 李鹏跃*, 杜守颖*

北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 探讨微乳制剂对葛根素在血脑屏障 (BBB) 细胞模型 MDCK-MDR1 的转运影响以及机制。方法 采用 MTT 法评价葛根素微乳与溶液的细胞毒性浓度范围, 确定适宜给药质量浓度, 考察葛根素溶液及微乳在 MDCK-MDR1 单层的双侧转运特性, 通过免疫组化染色研究细胞紧密连接蛋白的表达, 荧光漂白恢复法测定细胞膜流动性的变化以及阴离子探针结合流式细胞技术研究细胞膜电位的改变, 进而阐明微乳对葛根素转运影响的作用机制。结果 葛根素溶液质量浓度 50~300 $\mu\text{g/mL}$, 微乳稀释 500 倍以上对 MDCK-MDR1 无显著毒性。溶液中葛根素在 MDCK-MDR1 单层的吸收方向转运表观渗透系数 (P_{app}) 为 $1.04 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 外排方向转运 P_{app} 值为 $1.05 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 微乳中葛根素双侧转运 P_{app} 值均较溶液中葛根素显著增加 ($P < 0.05$)。微乳作用可以减少 MDCK-MDR1 紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin、ZO-1、F-actin 的表达, 促进细胞膜流动, 降低细胞膜电位。结论 微乳制剂可以促进葛根素在 BBB 细胞模型 MDCK-MDR1 的双侧转运, 其作用机制与打开细胞间紧密连接, 增加细胞膜流动性, 使细胞去极化, 降低膜电位进而增大葛根素细胞旁路渗透有关。

关键词: 葛根素; 微乳; MDCK-MDR1; 表观渗透系数; 紧密连接; 细胞膜流动性; 细胞膜电位

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2890-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.023

Effects of microemulsion on transport and mechanism of puerarin in MDCK-MDR1 cells

YANG Bing, ZHANG Zi-wei, ZHAO Bo, WU Ya-li, TAN Li, LI Peng-yue, DU Shou-ying

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of microemulsion on the transport and mechanism of puerarin in blood brain barrier (BBB) cell model MDCK-MDR1. **Methods** MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of puerarin microemulsion and solution, and determine the appropriate concentration of administration. The bilateral transport characteristics of puerarin solution-microemulsion was investigated in MDCK-MDR1 monolayer. Immunohistochemical staining was used to study the expression of tight junction proteins, and the changes in cell membrane fluidity was studied by fluorescence bleaching recovery, and the changes of membrane potential was measured by anion probe combined with flow cytometry. The mechanism of the effect of microemulsion on puerarin transport was clarified. **Results** The MDCK-MDR1 showed no significant toxicity when the mass concentration of puerarin solution ranged from 50 to 300 $\mu\text{g/mL}$ and the microemulsion dilution was over 500 times. The P_{app} value in absorption direction of puerarin solution on MDCK-MDR1 monolayer was $1.04 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, and the P_{app} value of excretion direction was $1.05 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. The P_{app} value of puerarin in microemulsion was significantly increased compared with that in solution ($P < 0.05$). Microemulsification could reduce the expression of Claudin-1, Occludin, ZO-1, and F-actin in MDCK-MDR1, promote cell membrane flow, and decrease cell membrane potential. **Conclusion** Microemulsion can promote the bilateral transport of puerarin in the BBB cell model MDCK-MDR1. The mechanism is closely connected with the opening of tight junctions, increasing the cell membrane fluidity, making the cell depolarizing and reducing membrane potential, and increasing the permeation of paracellular.

Key words: puerarin; microemulsion; MDCK-MDR1; P_{app} ; tight junctions; cell membrane fluidity; cell membrane potential

血脑屏障 (BBB) 是介于血液与脑脊液间的微血管系统, 其存在一方面对维持中枢神经系统的环

境稳定起重要作用, 另一方面也阻碍了 95% 的药物跨 BBB 进入脑实质^[1]。根据相似相溶原理, 脂溶性

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473363)

作者简介: 杨 冰 (1989—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药药剂新技术与新方法。Tel: 18010108178 E-mail: yangbing1028@163.com

*通信作者 杜守颖, 博士生导师, 主要从事中药药剂研究。E-mail: dushouying@263.net

李鹏跃, 主要从事中药药剂研究。E-mail: pengyuelee@126.com

小分子更易于透过 BBB^[2], 大分子或大极性物质很难透过 BBB, 使得治疗中枢神经系统疾病的药物开发面临巨大挑战。体外细胞模型具有重复性强、差异小且便于机制研究的特点。MDCK-MDR1 为转染 MDR1 基因的犬肾上皮细胞, 代与代之间形状稳定、连接紧密, 可形成致密的细胞单层, 同时高表达 P-糖蛋白 (P-gp), 适宜作为模拟 BBB 的体外细胞模型, 用于研究药物的跨 BBB 转运。

葛根素 (puerarinon) 是从葛根中提取的一种异黄酮碳苷, 葛根素药理作用广泛, 尤其对于心血管系统疾病疗效显著^[3], 但由于其存在体内半衰期短、生物利用度低等问题, 限制其临床应用, 故对葛根素进行剂型改造具有积极的意义^[4]。课题组前期研究发现葛根素较难跨膜转运吸收, 其转运特性为被动扩散, 无主动蛋白参与^[5]。本研究将葛根素制备成微乳, 进一步考察微乳制剂对葛根素跨 BBB 细胞模型的影响, 进而对影响机制进行探讨和阐释。

1 材料

1.1 药品与试剂

葛根素对照品 (批号 110752-200912, 质量分数 >98%, 中国食品药品检定研究院); 葛根提取物 (含葛根素 >96%, 北京普博欣生物科技有限公司); 甲醇 (美国 Merck 公司, 色谱纯); 醋酸 (美国 Merck 公司, 色谱纯); HBSS 缓冲液 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS, 澳洲血源, 美国 Gibco 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2~7.4, 美国 Gibco 公司); 青霉素-链霉素 (双抗, 美国 Gibco 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 0.25% 胰蛋白酶含 1% EDTA (美国 Gibco 公司); 冰冻 4% 多聚甲醛溶液 (北京索莱宝科技有限公司); 山羊血清工作液 (北京康为世纪生物科技有限公司); 兔抗 Occludin 抗体 (货号 ab31721, 英国 Abcam 公司); 兔抗 Claudin-1 抗体 (货号 374900, 美国 Invitrogen Corporation 公司); 兔抗 ZO-1 抗体 (货号 61-7300, 美国 Invitrogen Corporation 公司); Acti-stain 488 phalloidin 荧光标记鬼笔环肽 (美国 Cytoskeleton 公司); 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记山羊抗兔 IgG (武汉谷歌生物科技有限公司); DAPI 工作液 (1 mg/mL, 北京索莱宝科技有限公司); NBD-C6-HPC (美国 Life Technologies 公司); DiBAC4 (3) (美国 Life Technologies 公司); 肉豆蔻酸异丙酯 (IPM)、蓖麻油聚氧乙烯 35 (EL35)、1,2-丙二醇均购于北京化工厂; Transwell 聚碳酸酯 12 孔板 (美国 Corning 公司)。

1.2 仪器

Series II 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); Heal Force 生物安全柜 (上海力华科技公司); RiOs-DI3UV 型纯水器 (美国 Millipore 公司); FV1000 型激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司); BDFACSCanto II 型流式细胞分析仪 (美国 BD 公司); 307057 型空气浴震荡摇床 (江苏太仓豪诚实验仪器制造有限公司)。

1.3 细胞

细胞株 MDCK-MDR1 由浙江大学惠赠, 实验所用为 25~40 代。

2 方法

2.1 葛根素微乳的制备

根据实验室前期研究, 设计空白基质微乳处方总量为 10 g, IPM 0.519 g、1,2-丙二醇 2.923 g、EL35 2.923 g、水 3.635 g; 按处方比例依次加入 1,2-丙二醇、EL35、IPM, 25 °C 恒温搅拌, 充分溶解作为 A 相, 相应纯净水作为 B 相, 将 B 相加入 A 相中, 缓慢搅拌既得。同法制备含药微乳, 微乳载葛根素 700 mg, 载葛根素微乳 pH 为 5.31, 平均粒径 17.86 nm, Zeta 电位为 -4.90 mV, 微乳室温放置 3 个月稳定性良好。

2.2 细胞培养

MDCK-MDR1 细胞置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养, 培养液为高糖 DMEM (含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)。细胞贴壁生长后, 隔天更换培养基, 当细胞达 90% 融合时, 用 0.25% 胰酶 (含 0.02% EDTA) 消化, 按 1:3 传代。

2.3 MTT 实验

MDCK-MDR1 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL, 细胞培养板放入 CO₂ 培养箱, 培养 24 h。待细胞贴壁生长后, 弃去原培养基, 加入含有不同稀释倍数的空白微乳、葛根素微乳和不同质量浓度的葛根提取物, 对照组加入 HBSS, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下, 继续培养 24 h, 每孔加入 MTT 溶液 20 μL, 孵育 4 h, 弃去孔内培养上清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解沉淀。在酶联免疫检测仪上于 490 nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

细胞存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值

2.4 葛根素溶液及微乳在 MDCK-MDR1 单层的双侧转运实验

MDCK-MDR1 细胞接种于 Transwell 聚碳酸酯 12 孔板上 (1.12 cm², 0.4 μm), 接种密度 2.0×10^5

个/cm²。使用细胞电阻仪测定 MDCK-MDR1 细胞单层的跨膜电阻 (TEER), 当 TEER 达到 250~350 Ω·cm² 时分别从顶端侧 (AP) → 基底侧 (BL)、BL→AP 考察葛根素溶液及微乳在 MDCK-MDR1 单层细胞模型中的跨膜转运。AP→BL 方向转运: 葛根素溶液 (140 μg/mL) 或 HBSS 500 倍稀释葛根素微乳 (葛根素质量浓度 140 μg/mL) 0.5 mL, 加于 AP 侧, 作为供给池; 同时取空白 HBSS 缓冲液 1.5 mL, 加于 BL 侧, 作为接收池。BL→AP 方向转运: 葛根素溶液 (140 μg/mL) 或 HBSS 500 倍稀释葛根素微乳 (葛根素质量浓度 140 μg/mL) 1.5 mL, 加于 BL 侧, 作为供给池; 同时取空白 HBSS 缓冲液 0.5 mL, 加于 AP 侧, 作为接收池。于实验开始后 30、60、90、120、150、180 min 时, 从接收池中取样 (AP 侧 200 μL、BL 侧 600 μL), 并补充相同体积的 37 °C 空白转运介质 HBSS 缓冲液, 样品离心 (10 000 r/min × 10 min) 后取上清液, 以 HPLC 法检测葛根素含量^[6], 绘制葛根素的累积透过量-时间曲线。计算表观渗透系数 (P_{app}) 和外排率 (R_e)。

$$P_{app} = (dQ/dt)/AC$$

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

P_{app} 为表观渗透系数, dQ/dt 为药物转运速率, A 为聚碳酸酯膜面积, C 为葛根素在供给池中的初始质量浓度

2.5 微乳对葛根素在 MDCK-MDR1 转运影响的机制探讨

2.5.1 免疫组化染色检测紧密连接蛋白的表达

MDCK-MDR1 接种于激光共聚焦培养皿中, 常规培养至融合成细胞单层, 根据转运实验设置如下分组: 葛根素溶液组 (葛根素 140 μg/mL); 空白微乳 500 倍 HBSS 稀释组; 葛根素微乳 500 倍 HBSS 稀释组 (葛根素 140 μg/mL), 分别给药 3 h, 弃去药液, 再加入冰冻 4% 多聚甲醛 1.0 mL, 4 °C 条件下固定 30 min, 培养皿中加入 100 μL 山羊血清工作液, 室温封闭 60 min; 弃去封闭液, 将一抗 (兔抗 Claudin-1 抗体、兔抗 Occludin 抗体、兔抗 ZO-1 抗体) 按照 1:100 稀释, 每皿加 100 μL, 4 °C 孵育过夜。分别在每皿中加入 80 μL 稀释度为 1:150 的 FITC 标记山羊抗兔 IgG (二抗), 室温孵育 2 h。F-actin 蛋白染色固定方法同上, 1% Triton X-100 室温孵育 10 min 进行细胞打孔, Acti-stain 488 phalloidin 荧光标记鬼笔环肽 1:100 稀释, 室温孵育 30 min。紧密连接蛋白染色后每皿滴加 100 μL DAPI 工作液 (10 μg/mL), 室温染色 10 min, 每步操作之间 PBS 溶

液清洗 3 次, 染色细胞单层保存在 0.5 mL PBS 中。

2.5.2 荧光漂白恢复技术检测细胞膜流动性

分组及加药同“2.5.1 项”, 药物作用细胞单层 3 h 后, 每皿加入 1 mL 荧光探针 NBD-C6-HPC (2 μg/mL) 室温避光染色 30 min, PBS 小心冲洗细胞单层 3 次。最后细胞单层保存在 0.5 mL PBS 中, 于激光共聚焦显微镜下观察, 进行激光漂白, 记录漂白前后各时间点的荧光强度曲线图。漂白参数设定: 激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm, 漂白激光能量 100%, 漂白时间 700 ms, 扫描频率 1.65 s, 扫描时间约 200 s。计算荧光恢复率 (R)。

$$R = (F_2 - F_0)/(F_1 - F_0)$$

F_2 为漂白恢复后的荧光强度, F_1 为漂白前的荧光强度, F_0 为漂白后即刻荧光强度

2.5.3 对 MDCK-MDR1 细胞膜电位的影响

MDCK-MDR1 细胞经各组药物 (分组及加药同“2.5.1 项”) 孵育 3 h, 胰酶消化, 离心 (800 r/min × 5 min) 收集细胞, 弃去上清, 以 PBS 重悬并洗涤细胞 2 次, 离心收集细胞, 5 μg/mL 的荧光染料探针 DiBAC4 (3) 1 mL 重悬, 室温避光孵育 30 min 染色, 最终 PBS 调整细胞密度约为 1×10^6 个/mL。流式细胞仪检测胞内荧光强度, 设未标记荧光染料探针的空白细胞管用于调零。仪器参数: 激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm。

2.6 数据统计

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件处理, 各组样本与对照组间比较采用独立样本 t 检验分析。

3 结果

3.1 MTT 法检测葛根素溶液及微乳对 MDCK-MDR1 的毒性

与对照组比较, 葛根素溶液质量浓度在 50~300 μg/mL 给药组细胞存活率差异无显著性 ($P > 0.05$); 不同稀释倍数的空白微乳与葛根素微乳对 MDCK-MDR1 细胞均有一定毒性, 细胞毒性取决于微乳稀释倍数, 且呈现出一定的量效关系, HBSS 500 倍以上稀释对 MDCK-MDR1 细胞没有毒性 ($P > 0.05$)。相同稀释倍数空白微乳和载药微乳组间差异无显著性, 提示微乳对细胞的毒性主要来源于微乳基质, 与包载的药物无明显关系, 见图 1。

3.2 葛根素溶液及微乳在 MDCK-MDR1 单层双侧转运特征

葛根素溶液在 MDCK-MDR1 吸收方向 (AP→BL) 的 P_{app} 值为 1.04×10^{-6} cm/s, 提示葛根素为较难吸收药物; 外排方向 (BL→AP) 的 P_{app}

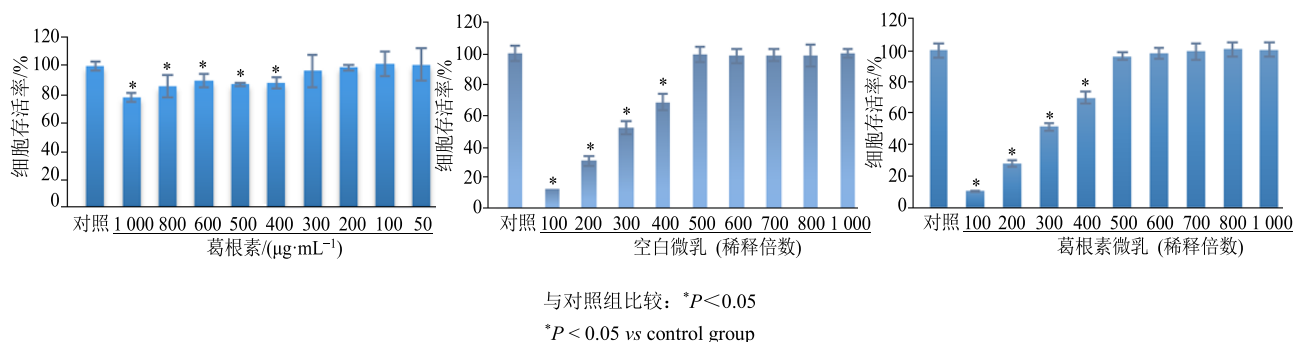


图 1 葛根素溶液及微乳对 MDCK-MDR1 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effects of puerarin solution and microemulsion on survival rate of MDCK-MDR1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

值为 1.05×10^{-6} cm/s, R_e 为 1.01, 小于 2, 提示葛根素跨膜转运不具有方向性, 为被动转运, 葛根素不是 P-gp 底物。对比葛根素溶液, 葛根素微乳双侧 (AP→BL, BL→AP) 转运 P_{app} 值均显著增加 ($P < 0.05$), 结果见表 1, 提示微乳对葛根素具有显著的促吸收作用, 这可能与微乳基质成分有关。

3.3 微乳制剂促进葛根素在 MDCK-MDR1 转运机制

3.3.1 微乳对 MDCK-MDR1 紧密连接蛋白的作用 葛根素溶液作用前后 4 种紧密连接蛋白表达相比于对照组差异无显著性, 稀释空白微乳与稀释葛根素微乳作用后, 细胞间紧密连接打开, 4 种紧密连接蛋白表达不同程度减少, 见图 2。

对照组 Claudin-1 蛋白呈环状分布于细胞周围, 荧光明亮; Occludin 蛋白呈明亮绿色荧光, 分布于细胞核周围; ZO-1 蛋白形态完整, 轮廓清晰明亮; 骨架肌动蛋白形态完整, F-actin 呈环状分布于细胞周围, 条带清晰。葛根素溶液组作用后 4 种紧密连接形态、分布、荧光强度均与对照组无显著差异。空白微乳与葛根素微乳作用后 Claudin-1 蛋白荧光暗淡, 条带断裂, 点状分布; Occludin 蛋白荧光分布区域面积减小, 结构模糊; ZO-1 蛋白点状分布, 荧光强度降低; F-actin 蛋白重新聚合形成张力丝, 发生重排, 荧光强度暗淡。以上结果提示微乳可以

下调上述紧密连接蛋白的表达, 进而增加葛根素 MDCK-MDR1 细胞旁路被动转运。

3.3.2 微乳对 MDCK-MDR1 细胞膜流动性的影响 荧光漂白前, 漂白即时与荧光恢复图像见图 3。葛根素溶液与稀释葛根素微乳作用 MDCK-MDR1 后 R 结果见表 2。

相比于 HBSS 对照组, 葛根素溶液 (140 µg/mL) 作用 MDCK-MDR1 细胞, R 无显著差异, 葛根素溶液作用于细胞膜未显著改变细胞膜流动性。微乳作用后, MDCK-MDR1 细胞膜荧光漂白后 R 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 可达对照组 2 倍, 提示微乳基质可以提高细胞膜流动性, 进而促进药物的细胞渗透性。葛根素溶液及微乳作用后, 光漂白处荧光恢复实时相对强度见图 4。与对照组比较, MDCK-MDR1 细胞经葛根素溶液作用后, 荧光恢复时间缩短, 但恢复率无显著差异。细胞经微乳作用后, 荧光恢复率及恢复速率均显著提高, 各微乳组间荧光恢复率无显著性差异, 提示微乳作用细胞后细胞膜流动性增强主要与微乳中基质成分相关。

3.3.3 微乳对 MDCK-MDR1 细胞膜电位的影响 用荧光探针标记技术与流式细胞术检测相结合, 考察微乳对 MDCK-MDR1 细胞膜电位的影响。结果见表 3。

表 1 葛根素溶液及微乳在 MDCK-MDR1 细胞正常模型转运参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Transport parameters of puerarin solution and microemulsion in normal MDCK-MDR1 cell monolayer ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		R_e
		AP→BL	BL→AP	
葛根素溶液	138.20	1.040 ± 0.138	1.050 ± 0.052	1.01
葛根素微乳	136.70	$1.200 \pm 0.026^*$	$1.210 \pm 0.032^*$	1.01

与葛根素溶液组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs puerarin solution group

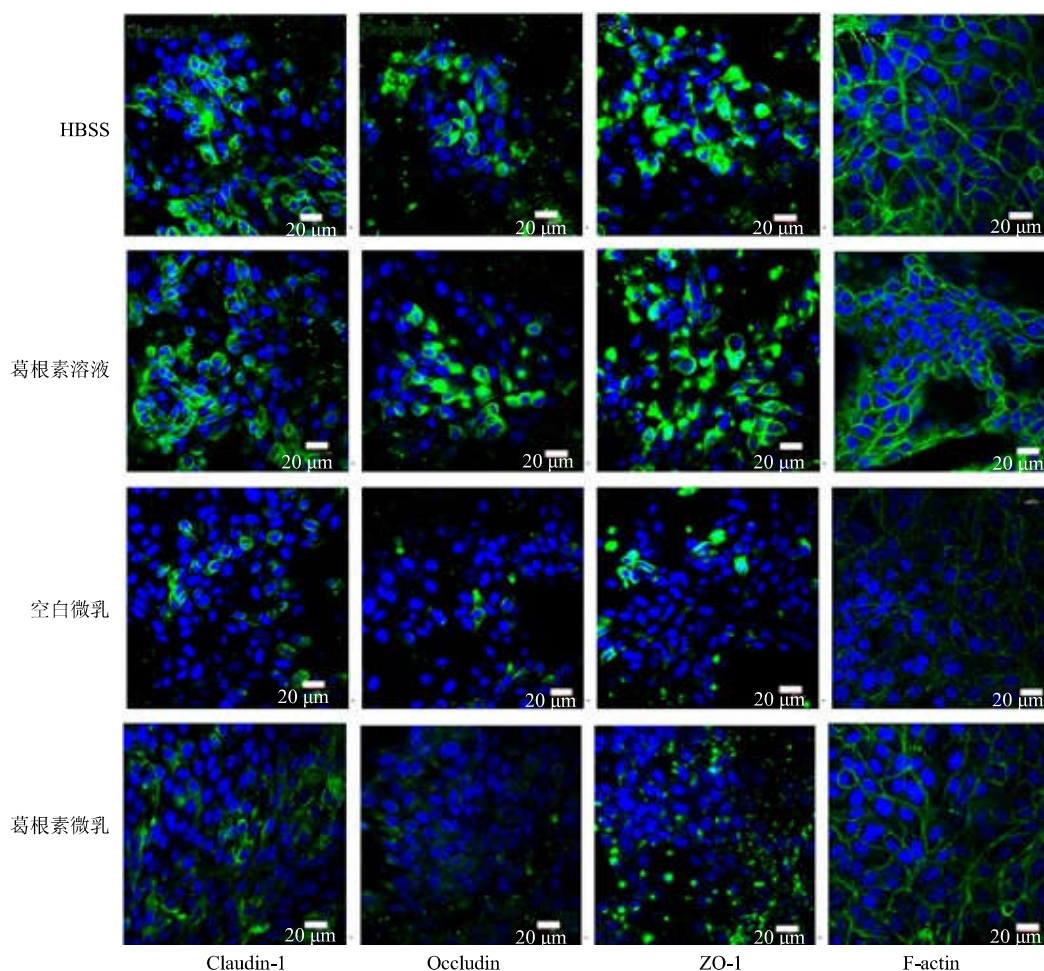


图 2 葛根素溶液及微乳对 MDCK-MDR1 细胞紧密连接蛋白 (Claudin-1、Occludin、ZO-1、F-actin) 表达的影响
Fig. 2 Effects of puerarin solution and microemulsion on expression of tight junction proteins (Claudin-1, Occludin, ZO-1, and F-actin) in MDCK-MDR1 cell monolayers

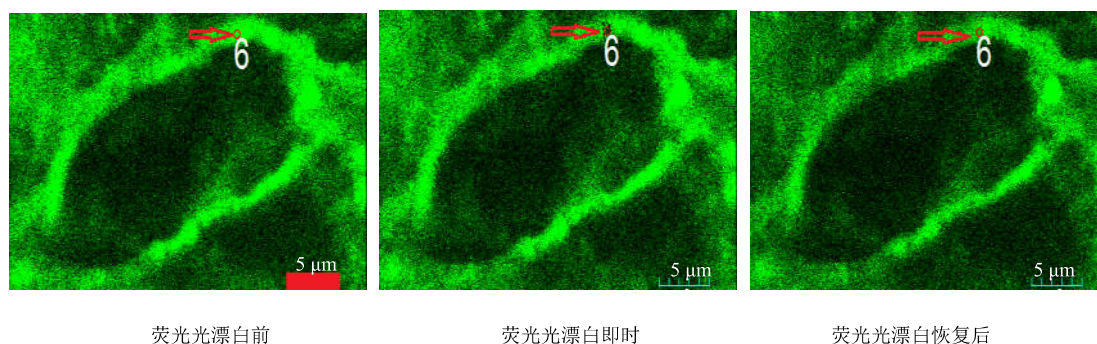


图 3 MDCK-MDR1 细胞荧光光漂白恢复
Fig. 3 MDCK-MDR1 cells fluorescence bleaching recovery

与对照 HBSS 溶液比较, 葛根素溶液作用后 MDCK-MDR1 细胞内荧光强度显著降低 ($P < 0.05$), 细胞膜电位增加, 膜黏滞性增大, 不利于药物穿细胞途径转运和吸收。葛根素微乳作用后, 相较于葛根素

溶液组细胞内荧光强度显著增加, 提示微乳可以逆转葛根素溶液导致的细胞去极化过程, 降低细胞膜电位, 进而降低细胞膜黏滞性并增加细胞膜流动性和通透性, 促进葛根素细胞旁路途径的被动转运吸收。

表 2 葛根素溶液及微乳作用 MDCK-MDR1 细胞后荧光恢复率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Fluorescence recovery rate of MDCK-MDR1 cells treated by puerarin solution and microemulsion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$R/\%$
对照	—	32.78 ± 2.37
葛根素溶液	140	36.89 ± 2.61
空白微乳	—	$59.55 \pm 1.59^*$
葛根素微乳	140	$61.45 \pm 2.41^*$

与对照组比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group

4 讨论

实验室自制微乳空白处方选择 IPM 为油相, EL35 为乳化剂, 1,2 丙二醇为助乳化剂。载药微乳处方载葛根素 700 mg。空白微乳、葛根素微乳粒径约为 10 nm, 微乳 HBSS 稀释 10、500、1 000 倍后, 粒径峰位均未见改变, 粒径分布仍然集中, 提示 2 种微乳 1 000 倍以内 HBSS 稀释后没有破乳。转运实验与机制研究实验选择 HBSS 500 倍稀释微乳。

葛根素在 MDCK-MDR1 细胞渗透途径为细胞旁路途径, 为被动转运。根据葛根素为分子结构推测葛根素集中分散于微乳油相与水相交界面, 结合

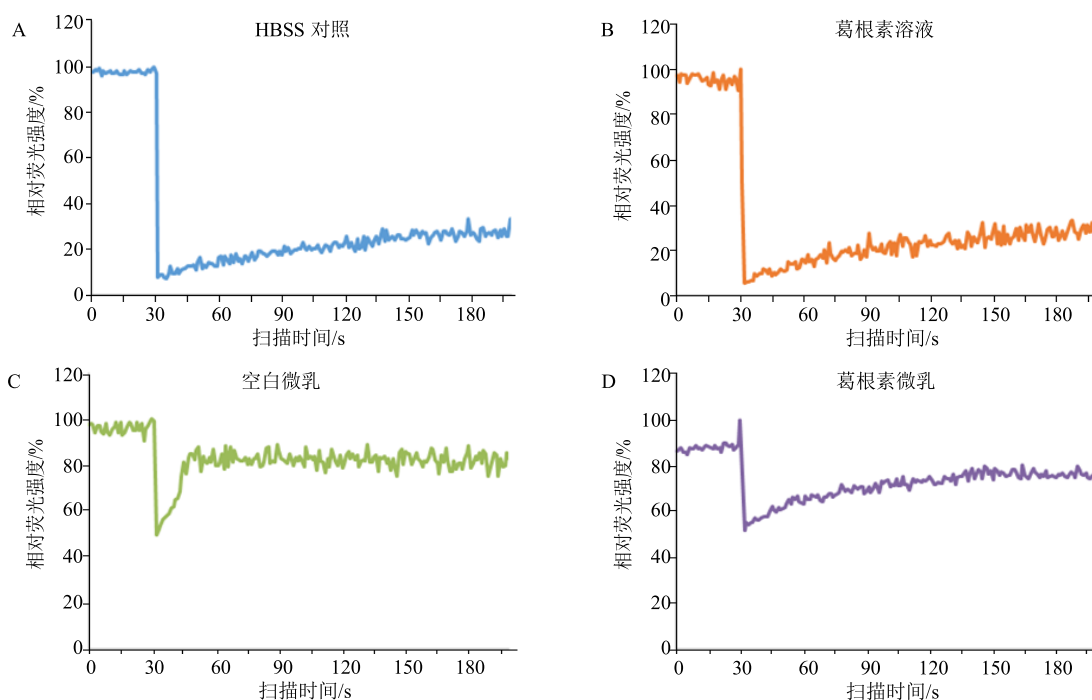


图 4 葛根素溶液及微乳作用 MDCK-MDR1 细胞荧光恢复情况

Fig. 4 Fluorescence recovery of MDCK-MDR1 cells treated by puerarin solution and microemulsion

表 3 葛根素溶液及微乳对 MDCK-MDR1 细胞膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of puerarin solution and microemulsion on MDCK-MDR1 membrane potential ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	膜电位 (相对荧光强度)
对照	—	$6\ 263.7 \pm 198.1$
葛根素溶液	140	$2\ 177.0 \pm 138.0^*$
空白微乳	—	$4\ 750.0 \pm 538.3^{*#}$
葛根素微乳	140	$4\ 315.0 \pm 196.8^{*#}$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与葛根素溶液组比较: $^{\#}P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs puerarin solution group

相似相溶原理, 微乳内集中分散的葛根素更易透过细胞单层。另一方面, 微乳基质成分如丙二醇等对细胞单层的作用可促进葛根素的跨膜转运。

紧密连接蛋白是调控细胞旁路的主要载体, 调控水、离子和大分子物质的跨膜转运^[7]。紧密连接蛋白表达的改变可导致单层膜通透性的变化, 影响药物细胞旁路转运^[8-9]。微乳作用后, MDCK-MDR1 中封闭细胞间隙的闭合蛋白 Claudins^[10]表达下调, 细胞间隙增大; 咬合蛋白 Occludin^[11]点状分布, 荧光暗淡, 细胞单层屏障功能和栅栏功能下降; 胞质附着蛋白 ZO-1^[12]条带断裂, 紧密连接打开; 细胞

骨架蛋白 F-actin^[13-14]聚合重排形成张力丝。上述结果提示微乳可以下调 MDCK-MDR1 紧密连接蛋白的表达, 增加细胞通透性, 进而促进葛根素的吸收。

细胞膜流动性影响细胞通透性并参与物质运输、分化、免疫等过程^[15-16]。本研究采用荧光漂白后恢复技术探讨微乳对 MDCK-MDR1 细胞膜流动性的影响, 漂白后荧光恢复的速度越快、荧光恢复率越大则细胞膜流动性越高, 微乳作用后, 漂白处荧光恢复率更高, 恢复速度加快, 其促进葛根素被动转运于增大细胞膜流动性有关。

细胞膜电位是细胞膜重要的生物物理特征之一, 是由各种存在于细胞膜上的离子泵维持各自胞内外离子浓度所形成的。膜电位的改变通常伴随膜脂质结构变化和膜流动性动力变化, 例如导致细胞膜厚度、黏滞性、通透性改变和膜蛋白结构变化, 进而影响药物的跨膜转运^[17-18]。DiBAC4 (3) 是一种膜电位敏感的脂溶性阴离子荧光染料, 其本身无荧光, 进入细胞与胞内蛋白结合后发出荧光。DiBAC4 (3) 进入细胞, 胞内荧光强度增加, 细胞去极化, 降低膜电位, 增加细胞旁路途径转运。葛根素微乳可以逆转葛根素对细胞的极化, 增加细胞膜的通透性, 促进葛根素的吸收转运。

本实验考察葛根素溶液与微乳在 BBB 体外细胞模型 MDCK-MDR1 的转运特性, 研究微乳对葛根素双侧转运的影响并阐明微乳促进葛根素转运机制与打开 MDCK-MDR1 紧密连接、促进细胞膜流动和降低细胞膜电位有关, 为开发治疗脑病的微乳制剂奠定实验基础。

参考文献

- [1] 张珉, 张俊钰, 钟武. 血脑屏障开放方法研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(2): 126-131.
- [2] Bicker J, Alves G, Fortuna A, *et al.* Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 87(3): 409-432.
- [3] 万小敏, 丁宇翔, 赵兵杰, 等. 载葛根素的 PEG 修饰介孔硅纳米粒的制备及其对急性心肌梗死大鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1789-1795.
- [4] 赵庭, 贾运涛, 张良珂. 载葛根素聚乙炔亚胺/海藻酸钠自组装纳米粒的制备及性能研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3523-3528.
- [5] Yang B, Du S, Lu Y, *et al.* Influence of paeoniflorin and menthol on puerarin transport across MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70(3): 349-360.
- [6] Yang B, Du S, Lu Y, *et al.* Nose-to-brain delivery: Puerarin uptake on olfactory ensheathing cells and transport on Calu-3 cells [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 2161-2167.
- [7] Dominique D, Gilles P. Drug develop [J]. *Indus Pharmacy*, 1993, 19(1): 101-122.
- [8] Gabriele V, Ronnet L, Hester D, *et al.* Primary culture of neonatal rat olfactory neurons [J]. *J Neurosci*, 1991, 11(5): 1243-1255.
- [9] Gluckman P, Klempt N, Guan J, *et al.* A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 182(31): 593-599.
- [10] Cunningham A M, Manis P B, Reed R R, *et al.* Olfactory receptor neurons exist as distinct subclasses of immature and mature cells in primary culture [J]. *Neuroscience*, 1999, 93(4): 1301-1312.
- [11] Liu N, Shields C B, Roisen F J. Primary culture of adult mouse olfactory receptor neurons [J]. *Exp Neurol*, 1998, 151(2): 173-183.
- [12] Kou K, Mittanck D W, Fu C, *et al.* Structure and function of the mouse insulin-like growth factor binding protein 5 gene promoter [J]. *DNA Cell Biol*, 1994, 24(14): 241-249.
- [13] Allander S V, Larsson C, Ehrenborg E, *et al.* Characterization of the chromosomal gene and promoter for human insulin like growth factor binding protein-5 [J]. *Biol Chem*, 1994, 269(8): 10891-10898.
- [14] Shimasaki S, Shimonaka M, Ling N. Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human [J]. *Biol Chem*, 1991, 266(5): 10646-10653.
- [15] Leitner D M, Brown F L H, Wilson K R. Regulation of protein mobility in cell membranes: A dynamic corral model [J]. *Biophys J*, 2000, 78(1): 125-135.
- [16] Chen L, Zhu J, Li Y, *et al.* Enhanced nasal mucosal delivery and immunogenicity of anti-carries DNA vaccine through incorporation of anionic liposomes in Chitosan/DNA Complexes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71953.
- [17] Zbytovska J, Raudenkolb S, Wartewig S. Phase behavior of transkarbam 12 [J]. *Chem Phys Lipids*, 2004, 129(1), 97-109.
- [18] Thanou M M, Florea B I, Langemeyer M W, *et al.* N-trimethylated chitosan chloride (TMC) improves the intestinal permeation of the peptide drug buserelin *in vitro* (Caco-2) and *in vivo* (rats) [J]. *Pharm Res*, 2000, 17(1): 27-31.