

## • 药理与临床 •

## 马钱子生物碱类成分在 MDCK-MDR1 单层细胞模型中的转运机制研究

胡 亚, 刘运锋, 朱卫丰, 陈丽华\*, 管咏梅, 金 晨

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

**摘 要:** 目的 研究马钱子碱、土的宁在 MDCK-MDR1 单层细胞模型中的双向转运机制。方法 MTT 法确定马钱子碱、土的宁对 MDCK-MDR1 单层细胞毒性范围, 以 MDCK-MDR1 单层细胞为体外研究模型, 考察转运时间、药物作用质量浓度、P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂维拉帕米对马钱子碱、土的宁的累积吸收浓度 ( $C_{cum}$ ) 和表观渗透系数 ( $P_{app}$ ) 的影响。结果 马钱子碱和土的宁  $P_{app}$  均  $>1 \times 10^{-5}$  cm/s,  $P_{app}(BL \rightarrow AP)/P_{app}(AP \rightarrow BL)$  均  $<2$ 。马钱子碱、土的宁与维拉帕米合用, 显著降低了  $P_{app}(BL \rightarrow AP)/P_{app}(AP \rightarrow BL)$  值。结论 马钱子碱、土的宁以被动转运为主, P-gp 抑制剂维拉帕米对其吸收有明显抑制作用, 马钱子碱、土的宁可能是 P-gp 底物。

**关键词:** 马钱子碱; 土的宁; MDCK-MDR1 单层细胞模型; 双向转运; P-糖蛋白

**中图分类号:** R285.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)12-2876-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.020

## Study on transport mechanism of brucine and strychnine in MDCK-MDR1 cell monolayer model

HU Ya, LIU Yun-feng, ZHU Wei-feng, CHEN Li-hua, GUAN Yong-mei, JIN Chen

Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

**Abstract:** **Objective** To study the bi-direction transport behavior of brucine and strychnine in the MDCK-MDR1 cell monolayer model. **Methods** MTT method was employed to confirm the safe concentration of brucine and strychnine towards MDCK-MDR1 cells. The effects of transport time, drug concentration, and P-glycoprotein inhibitor verapamil on cumulative absorption concentration ( $C_{cum}$ ) and apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) of brucine and strychnine in MDCK-MDR1 monolayer cells were studied. **Results** The  $P_{app}$  value of brucine and strychnine was larger than  $1 \times 10^{-5}$  cm/s and the ratio of  $P_{app}(BL \rightarrow AP)$  vs  $P_{app}(AP \rightarrow BL)$  was less than 2. Brucine/strychnine combined with verapamil decreased the ratio of  $P_{app}(BL \rightarrow AP)$  vs  $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ . **Conclusion** The absorption of brucine and strychnine in MDCK-MDR1 cell monolayer model was well and the passive transference was its main intestinal absorption mechanism. The P-gp inhibitor verapamil has a significant inhibitory effect on brucine and strychnine absorption. Brucine and strychnine may be a substrate of P-glycoprotein.

**Key words:** brucine; strychnine; MDCK-MDR1 cell monolayer model; bi-direction transport; P-glycoprotein

马钱子为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子, 马钱子碱和土的宁是马钱子中主要的有效成分, 同时也有较强的毒副作用<sup>[1]</sup>, 且马钱子的治疗剂量与中毒剂量较接近, 治疗窗较为狭窄, 限制了马钱子的广泛使用。本研究以 MDCK-MDR1 细胞为模型, 该模型是将人类的 MDR1 (multidrug resistance gene 1) 基因转染到 MDCK

(Madin-Darby canine kidney) 细胞上产生的<sup>[2-3]</sup>。多药耐药蛋白 (MDR1), 也称为 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 或 ATP 结合盒亚家族 B 成员 (ABCB1), 是一种外排运输系统, 可选择性地将基质从脑脊液转运至血液, 因此限制了血液中的物质进入脑部。MDCK-MDR1 细胞可作为血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 药物快速筛选模型<sup>[4]</sup>,

收稿日期: 2018-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760717); 国家自然科学基金资助项目 (81460606); 江西省中药学一流学科专项科研基金项目 (JXSJLXK-ZHYA0048)

作者简介: 胡 亚 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术研究。Tel: 18720913389 E-mail: 2353629677@qq.com

\*通信作者 陈丽华 (1972—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术研究。

Tel: (0791)87118658 E-mail: Chilly98@163.com

该细胞系可以用来快速筛选 P-gp 的底物和抑制剂。P-gp 是一种能量依赖性药物外排泵,将许多药物外排到细胞外,从而影响药物疗效,通过文献查阅,马钱子碱和土的宁表现出较高的脑渗透性<sup>[5-6]</sup>。BBB 是脑毛细血管壁与神经胶质细胞形成的血浆与脑细胞之间的屏障和由脉络丛形成的血浆和脑脊液之间的屏障<sup>[7-9]</sup>。因此,本研究采用 P-gp 高表达的 MDCK-MDR1 的细胞模型来研究马钱子碱、土的宁的双向跨膜转运特性,明确马钱子中主要活性成分马钱子碱和土的宁的吸收转运机制,为临床的合理用药提供依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

MDCK-MDR1 细胞购自上海中亚生物基因研究所,实验中所用的细胞代数均为 16~22 代。

### 1.2 药物

马钱子碱(批号 20171204)、土的宁(批号 20171204),质量分数均 $\geq 98\%$ ,中药固体制剂制造技术国家工程研究中心;苦参碱(批号 110805-200508,质量分数 $\geq 98\%$ ),中国食品药品检定研究院。

### 1.3 试剂

MTT、非必需氨基酸、0.25%EDTA-胰酶、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)、高糖型 DMEM 培养液、二甲基亚砜(北京索来宝有限公司);胎牛血清(Excell Bio 公司);维拉帕米(中国食品药品检定研究院);色谱级乙腈(美国 TEDIA 公司);甲酸(阿拉丁公司)。

### 1.4 仪器

倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);Thermo Forma 3111 细胞培养箱、酶标仪(美国 Thermo 公司);高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);T-75 培养瓶、3460transwell 板(美国 Corning 公司);BSA124S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);IKA genius3 旋涡混合器(德国 IKA 集团);KQ-500VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HHS 型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 马钱子碱和土的宁的测定

**2.1.1 对照品溶液的配制** 精密称定马钱子碱对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容;精密称定土的宁对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容。

**2.1.2 色谱及质谱条件** 色谱柱为 ACE UltraCore

Super C<sub>18</sub> 100A (100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.5  $\mu$ m),流动相为 10 mmol/L 醋酸铵+0.04%甲酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~0.01 min, 95% A;0.01~1 min, 95%~87% A;1.0~2.5 min, 87%~85% A;2.5~4.1 min, 85% A;4.1~5.0 min, 85%~60% A;5.0~5.1 min, 60%~40% A;5.1~7.1 min, 40% A;7.1~7.2 min, 40%~95% A;体积流量 0.35 mL/min,进样量 5  $\mu$ L,柱温 30  $^{\circ}$ C。正离子检测,MRM 模式,用于定量的离子对为马钱子碱  $m/z$  395.3/324.4, DP 为 130 V, CE 为 43 eV;土的宁  $m/z$  335.2/184.2, DP 为 140 V, CE 为 51 eV;苦参碱  $m/z$  249.3/148.3, DP 为 140 V, CE 为 48 eV。色谱图见图 1。

**2.1.3 样品处理方法** 在 150  $\mu$ L 转运分析样品中加入 30  $\mu$ L 苦参碱甲醇溶液(40 ng/mL,内标),再加入 120  $\mu$ L 甲醇,涡旋 2 min,以 16 000 r/min 转速离心 20 min,取上清液用于进样分析。

**2.1.4 标准曲线的绘制** 按“2.1.1”项下配制的马钱子碱和土的宁对照品母液分别用 HBSS 稀释成 124.00、62.00、31.00、15.50、7.75、3.88、1.94、0.97、0.48 ng/mL 系列溶液,按照“2.1.3”项下的样品处理方法处理后进行液质检测。得到回归方程,马钱子碱:  $Y=0.0623X+0.012$ ,  $r^2=0.9951$ ;土的宁:  $Y=0.146X+0.0945$ ,  $r^2=0.9979$ 。

**2.1.5 专属性考察** 将空白 HBSS 液加入内标、空白 HBSS 液加入马钱子碱、空白 HBSS 液加入土的宁、空白转运液、给药后加入内标的转运液按照“2.1.3”项下的样品处理方法处理后进行液质检测。结果表明,HBSS、细胞代谢物、维拉帕米对马钱子碱与土的宁的检测无干扰,本方法专属性良好。

**2.1.6 精密度与准确度** “2.1.1”项下配制的马钱子碱和土的宁对照品母液分别用 HBSS 稀释成 3 种不同质量浓度马钱子碱(62.00、15.50、3.88 ng/mL)、土的宁(62.00、15.50、3.88 ng/mL)对照品溶液,每一质量浓度测定 6 个样本,根据标准曲线计算马钱子碱和土的宁含量,计算日内精密度和准确度[ $RE=(测得质量浓度-加入质量浓度)/加入质量浓度$ ],一周内连续 3 d 测定,5 次/d,根据标准曲线计算马钱子碱和土的宁的含量,计算日间精密度和准确度。结果精密度和准确度均符合生物样品分析要求。结果见表 1。

**2.1.7 稳定性考察** “2.1.1”项下配制的马钱子碱和土的宁对照品母液分别用 HBSS 稀释成质量浓度为 62.00、15.50、3.88 ng/mL 的马钱子碱、土的宁对照品溶液,考察样品室温放置 48 h、-20  $^{\circ}$ C 放

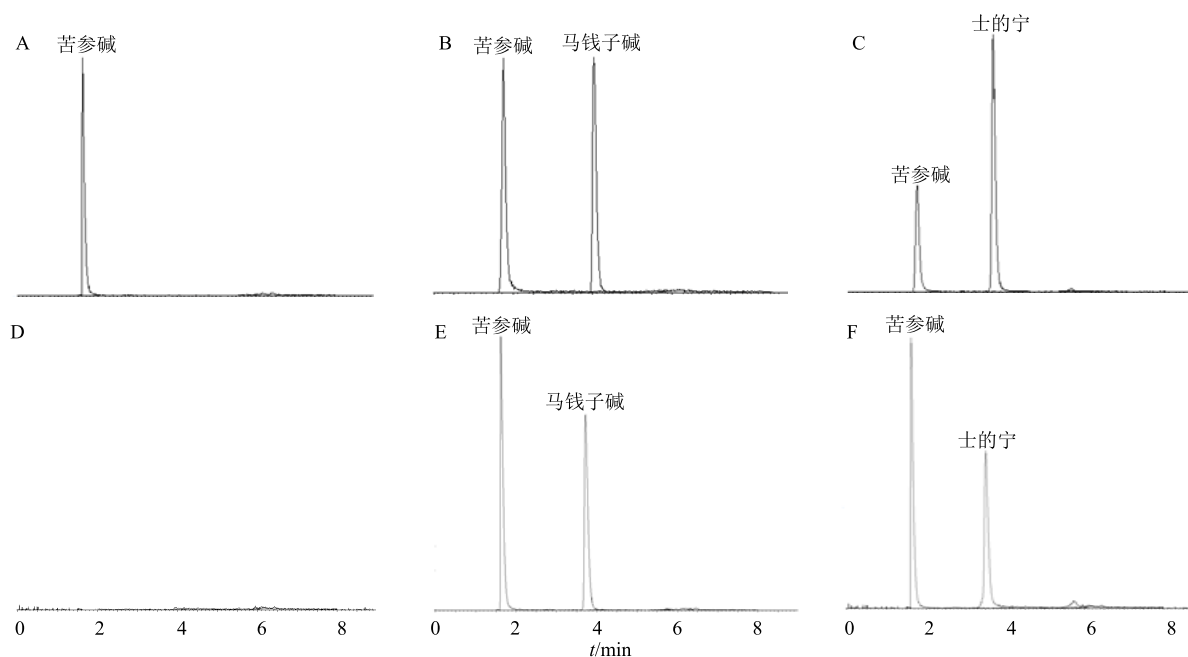


图 1 空白 HBSS 液加内标苦参碱 (A)、空白 HBSS 液加马钱子碱和内标苦参碱 (B)、空白 HBSS 液加土的宁和内标苦参碱 (C)、空白细胞转运液样品 (D)、维拉帕米加马钱子碱细胞转运液样品 (E)、维拉帕米加土的宁细胞转运液样品 (F) 的 LC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of internal standard matrine in blank HBSS solution (A), brucine and internal standard matrine in blank HBSS solution (B), strychnine and internal standard matrine in blank HBSS solution (C), blank transporter sample (D), brucine and Verapamil in samples (E), and strychnine and Verapamil in samples (F)

表 1 精密度和准确度测定结果

Table 1 Accuracy and precision for analysis of brucine and strychnine samples

| 成分   | $\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ |                  | RSD/% |       | RE/%  |
|------|---------------------------------------|------------------|-------|-------|-------|
|      | 加入值                                   | 测定值              | 日内精密度 | 日间精密度 |       |
| 马钱子碱 | 3.88                                  | $3.93 \pm 0.08$  | 2.01  | 7.50  | 1.29  |
|      | 15.50                                 | $14.95 \pm 0.71$ | 4.72  | 5.54  | -3.55 |
|      | 62.00                                 | $63.27 \pm 1.30$ | 2.05  | 6.04  | -2.05 |
| 土的宁  | 3.88                                  | $3.93 \pm 0.06$  | 1.56  | 7.89  | 1.29  |
|      | 15.50                                 | $16.04 \pm 0.64$ | 4.00  | 7.72  | 3.48  |
|      | 62.00                                 | $58.43 \pm 0.79$ | 1.35  | 5.85  | -5.76 |

置 30 d 的稳定性, 每一质量浓度 6 个样本, 按照“2.1.3”项下的样品处理方法处理后进行液质检测。结果测得马钱子碱、土的宁室温放置 48 h、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 30 d 均稳定, 符合生物样品分析要求。结果见表 2。

**2.1.8 基质效应** 精密称取马钱子碱、土的宁对照品, 用空白细胞转运液稀释为高、中、低质量浓度 (62.00、15.50、3.88  $\text{ng/mL}$ ) 的马钱子碱、土的宁对照品溶液, 按照“2.1.3”项下的样品处理方法处理后进行液质检测, 记录峰面积为 A; “2.1.1”项下配制的马钱子碱、土的宁对照品母液, 用空白 HBSS 溶液稀释为质量浓度 62.00、15.50、3.88  $\text{ng/mL}$  的

马钱子碱、土的宁对照品溶液, 按照“2.1.3”项下的样品处理方法处理后进行液质检测, 记录峰面积为 B。以上操作每个质量浓度平行制备 6 份。基质效应 =  $A/B$ , 结果 3.88、15.50、62.00  $\text{ng/mL}$  马钱子碱的基质效应分别为 95.44%、101.22%、107.44%, 3.88、15.50、62.00  $\text{ng/mL}$  土的宁的基质效应分别为 106.66%、93.78%、107.02%, 符合生物样品分析要求。

**2.1.9 回收率** 分别精密量取马钱子碱、土的宁对照品溶液, 用空白 HBSS 液稀释为质量浓度 62.00、15.50、3.88  $\text{ng/mL}$  的马钱子碱、土的宁对照品溶液, 每个质量浓度平行测定 6 次, 根据标准曲线计算质量浓度。以测定质量浓度与配制质量浓度的比值计

表 2 马钱子碱、士的宁的稳定性考察结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 2 Stability data of brucine and strychnine samples ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 放置条件           | 成分   | $\rho/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ |              | RSD/% | RE/%   |
|----------------|------|-----------------------------------------|--------------|-------|--------|
|                |      | 加入值                                     | 测定值          |       |        |
| 25 °C 放置 48 h  | 马钱子碱 | 3.88                                    | 3.88 ± 0.07  | 1.79  | -0.26  |
|                |      | 15.50                                   | 14.10 ± 0.37 | 2.65  | -9.03  |
|                |      | 62.00                                   | 58.43 ± 0.39 | 0.67  | -5.80  |
|                | 士的宁  | 3.88                                    | 3.39 ± 0.05  | 1.50  | -12.68 |
|                |      | 15.50                                   | 14.83 ± 0.43 | 2.88  | -4.32  |
|                |      | 62.00                                   | 59.75 ± 1.88 | 3.14  | -3.63  |
| -20 °C 放置 30 d | 马钱子碱 | 3.88                                    | 4.06 ± 0.11  | 2.79  | 4.38   |
|                |      | 15.50                                   | 16.70 ± 0.19 | 1.14  | 7.74   |
|                |      | 62.00                                   | 63.50 ± 1.55 | 2.43  | 2.42   |
|                | 士的宁  | 3.88                                    | 3.76 ± 0.16  | 4.14  | -3.09  |
|                |      | 15.50                                   | 15.15 ± 0.34 | 2.24  | -2.26  |
|                |      | 62.00                                   | 62.35 ± 0.80 | 1.28  | 0.56   |

算方法回收率。结果马钱子碱的回收率为 96.77%~101.93%，RSD 为 1.21%~4.69%；士的宁的回收率为 94.19%~103.87%，RSD 为 0.66%~4.36%。

**2.1.10 定量限与检测限** 精密量取一定量的马钱子碱、士的宁，将其逐级稀释，当测定的信噪比为 10 时，其对应对照品的质量浓度即为最低定量限；当测定的信噪比为 3 时，其对应混合对照品的质量浓度即为最低检限。结果表明，马钱子碱定量限为 0.24 ng/mL，士的宁定量限为 0.06 ng/mL，马钱子碱检测限为 0.03 ng/mL，士的宁检测限为 0.03 ng/mL。

## 2.2 MDCK-MDR1 细胞单层转运模型的建立与评价

**2.2.1 统计学处理** 数据采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析。

**2.2.2 MTT 比色法测定马钱子碱、士的宁对 MDCK-MDR1 细胞的安全毒性范围** 取对数生长期的 MDCK-MDR1 细胞，用 0.25% EDTA-胰酶消化，完全培养液洗涤离心 (1 000 r/min, 5 min)，调

整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/L，接种于 96 孔细胞培养板，每孔中加入 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液，培养 24 h 使细胞贴壁后，分别加入 200  $\mu\text{L}$  不同质量浓度的马钱子碱和士的宁药液 (药液现配现用，称取适量对照品，加入体积分数小于 0.1% 的 DMSO，用高糖型 DMEM 培养液稀释)。每个样品设 6 个复孔。另设含细胞不加药物的培养液作为对照组，不含细胞的培养液作为空白对照组。给药培养 4 h 后，每孔加入含 5 mg/mL MTT 的工作液 20  $\mu\text{L}$ ；培养 4 h 后，除去 MTT 工作液，每孔加 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ，摇床摇匀，室温、避光孵育 10 min，在波长 490 nm 处用酶标仪测定吸光度 ( $A$ ) 值。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

MTT 比色法测定结果见表 3，马钱子碱对 MDCK-MDR1 细胞无毒质量浓度为 0~0.10  $\mu\text{g/mL}$ ，士的宁对 MDCK-MDR1 细胞的无毒质量范围为 0~0.04  $\mu\text{g/mL}$ ，故分别在无毒质量浓度范围内进行转运实验。

表 3 马钱子碱和士的宁对 MDCK-MDR1 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 3 Toxic influence of brucine and strychnine on MDCK-MDR1 cell line ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ | $A$ 值          | 细胞存活率/% | 组别   | $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ | $A$ 值          | 细胞存活率/% |
|------|-------------------------------------------|----------------|---------|------|-------------------------------------------|----------------|---------|
| 空白对照 | —                                         | 0.072 ± 0.008  | —       | 空白对照 | —                                         | 0.097 ± 0.013  | —       |
| 对照   | —                                         | 0.345 ± 0.020  | 100.00  | 对照   | —                                         | 0.560 ± 0.048  | 100.00  |
| 马钱子碱 | 0.10                                      | 0.321 ± 0.039* | 91.21   | 士的宁  | 0.04                                      | 0.553 ± 0.033  | 98.49   |
|      | 0.20                                      | 0.315 ± 0.034* | 89.09   |      | 0.06                                      | 0.471 ± 0.038* | 80.78   |
|      | 0.40                                      | 0.302 ± 0.020* | 84.24   |      | 0.08                                      | 0.502 ± 0.019* | 87.47   |
|      | 0.60                                      | 0.294 ± 0.010* | 81.32   |      | 0.10                                      | 0.493 ± 0.022* | 85.53   |
|      | 0.80                                      | 0.293 ± 0.015* | 80.95   |      | 0.20                                      | 0.477 ± 0.016* | 82.07   |
|      | 1.00                                      | 0.281 ± 0.023* | 76.56   |      | 0.40                                      | 0.470 ± 0.017* | 80.56   |

与对照组比较：\* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

**2.2.3 MDCK-MDR1 细胞单层模型的制备** MDCK-MDR1 细胞接种在 T-75 培养瓶中, 培养液为高糖型 DMEM, 当细胞生长融合至 80%~90% 时, 用 0.25% EDTA 胰酶消化, 离心, 用新鲜培养液制备成混合均匀的细胞悬液, 并用细胞计数器计数, 调节细胞密度为  $2.0 \times 10^5$  个/mL, 接种在 12 孔 Transwell 培养皿中。在每孔绒毛面 (AP 侧) 加入 0.5 mL 细胞悬液, 基底面 (BL 侧) 加入 1.5 mL 空白培养液, 置于培养箱中培养 48 h 后, 在 AP 和 BL 两侧均更换新鲜培养液, 每天换液, 连续培养 9 d。本实验采用荧光素钠渗漏和跨膜电阻值来评价细胞模型的紧密性和完整性, 当跨膜电阻 (TEER) 值大于  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  时, 可认为该状态下的细胞单层是致密完整的<sup>[10-12]</sup>。TEER 值越高, 表示细胞单层连接得越紧密。当荧光素钠在 MDCK-MDR1 单层细胞的透过量小于 1.0%, 可认为 MDCK-MDR1 单层细胞的紧密型和完整性良好, 细胞模型建立成功。MDCK-MDR1 单层细胞的 TEER 值计算公式如下:  $\text{TEER} = (R - R_b) \times A$ , 其中  $R$  为接种了细胞的 Transwell 孔测量电阻值,  $R_b$  为没有接种细胞的空白 Transwell 孔测量电阻值,  $A$  为多聚碳酸酯膜的膜面积。本实验测定结果见图 2、3。连续培养 9 d 后, TEER 大于  $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , 空白 Transwell 孔的荧光素钠透过量在 150 min 时累积透过率为 52.45%, 接种 MDCK-MDR1 细胞的荧光素钠在 150 min 时累积透过率为 0.68%, 小于 1%, 表明该细胞模型的紧密性和完整性良好, 可用于评价药物的转运情况。

**2.2.4 双向转运实验** 进行转运实验前, 用  $37^\circ\text{C}$  空白 HBSS 溶液清洗细胞单层膜 3 次, 再放入  $\text{CO}_2$  培养箱, 于  $37^\circ\text{C}$  用 HBSS 溶液平衡 30 min。(1) AP→BL 侧的转运: 将 0.5 mL 各质量浓度的供试液 (供试液现配现用, 称取适量对照品, 加入体积分数

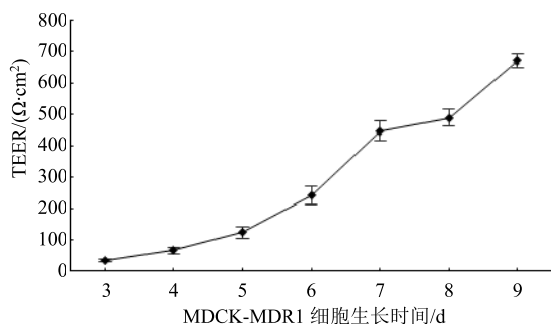


图 2 MDCK-MDR1 细胞单层随生长时间 TEER 的变化  
Fig. 2 TEER changes of MDCK-MDR1 monolayer cell at Different growth stages

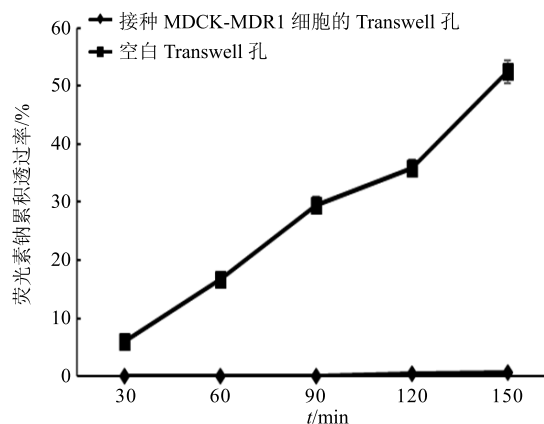


图 3 荧光素钠透过空白聚碳酸酯膜和生长 9 d 的 MDCK-MDR1 细胞单层的累积透过率

Fig. 3 Fluorescein sodium permeation percentage through blank polycarbonate membrane and 9 d MDCK-MDR1 cell monolayers

小于 0.1% 的 DMSO, 用空白 HBSS 溶液稀释) 加到 AP 侧作为供给池, 同时 BL 侧加入 1.5 mL 空白 HBSS 溶液作为接收池。待取样时在 BL 侧取样 0.3 mL 于离心管中, 取样后在 BL 侧加入 0.3 mL 空白 HBSS, 转运样品用甲醇沉淀蛋白后用于 LC-MS 检测。(2) BL→AP 侧的转运: 将 1.5 mL 各质量浓度的供试液加到 BL 侧作为供给池, 同时 AP 侧加入 0.5 mL 空白 HBSS 溶液作为接收池。待取样时在 AP 侧取样 0.3 mL 于离心管中, 取样后在 AP 侧加入 0.3 mL 空白 HBSS, 转运样品用甲醇沉淀蛋白后用于 LC-MS 检测。(3) 用 LC-MS/MS 测定药物的吸收量。分别考察转运时间、质量浓度以及 P-gp 抑制剂维拉帕米对马钱子碱、土的宁双向转运吸收的影响。

**2.2.5 数据处理** 由于每次取样后都要补液, 对药物的通透产生了稀释作用, 因而要对药物的累积吸收浓度 ( $C_{\text{cum}}$ ) 进行校正。按公式计算  $C_{\text{cum}}$ 、药物累积转运量、累积转运率、表观渗透系数 ( $P_{\text{app}}$ )、外排率 (ER)。

$$C_{\text{cum}} = A_n + \frac{V_{\text{sn}}}{V} \sum_{i=0}^{n-1} (A_i)$$

$$\text{药物累积转运量} = C_{\text{cum}} \times V_{\text{sn}}$$

$$\text{累积转运率} = 120 \text{ min 累积转运量} / \text{实际给药量}$$

$$P_{\text{app}} = \Delta Q / (\Delta t \times A \times C_0)$$

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

$C_{\text{cum}}$  为药物的累积吸收浓度,  $A_n$  为第  $n$  个样品渗透浓度,  $V_{\text{sn}}$  为第  $n$  个样品的采集体积,  $V$  为接收池的体积,  $\Delta Q$  表示

转运时间  $\Delta t$  内的药物转运速率,  $C_0$  为取样所在面的初始质量浓度,  $A$  为聚碳酸酯膜的表面积

**2.2.6 转运实验结果** 高、中、低不同质量浓度的马钱子碱和士的宁 AP→BL 侧、BL→AP 侧的累积转运量随质量浓度和时间的增加而增加, 结果见图 4。累积转运率结果见表 4, 在 120 min 时马钱子碱、士的宁在 AP→BL 方向的累积转运量与 BL→AP 方向累积转运量相比几乎一致, 但在 120 min 时马钱子碱、士的宁在 AP→BL 方向的累积转运率均大于 33%, BL→AP 方向的累积转运率均大于 11%, AP→BL、

BL→AP 方向累积转运率存在差异的原因可能与 AP→BL、BL→AP 方向给药量不同相关。如表 5 所示, 马钱子碱、士的宁在 AP→BL 方向的转运明显弱于 BL→AP 方向的转运,  $C_{cum}$  (AP→BL、BL→AP) 均随马钱子碱、士的宁转运时间的延长而逐渐增加。如表 6 所示, 加入 P-gp 抑制剂维拉帕米后, 相对于未加维拉帕米的药物组, 马钱子碱  $P_{app}(BL→AP)$  显著减小, ER 显著减小; 士的宁  $P_{app}(AP→BL)$  显著增加,  $P_{app}(BL→AP)$  显著减小, ER 显著减小; 表明马钱子碱、士的宁均有可能是 P-gp 底物<sup>[13-16]</sup>。

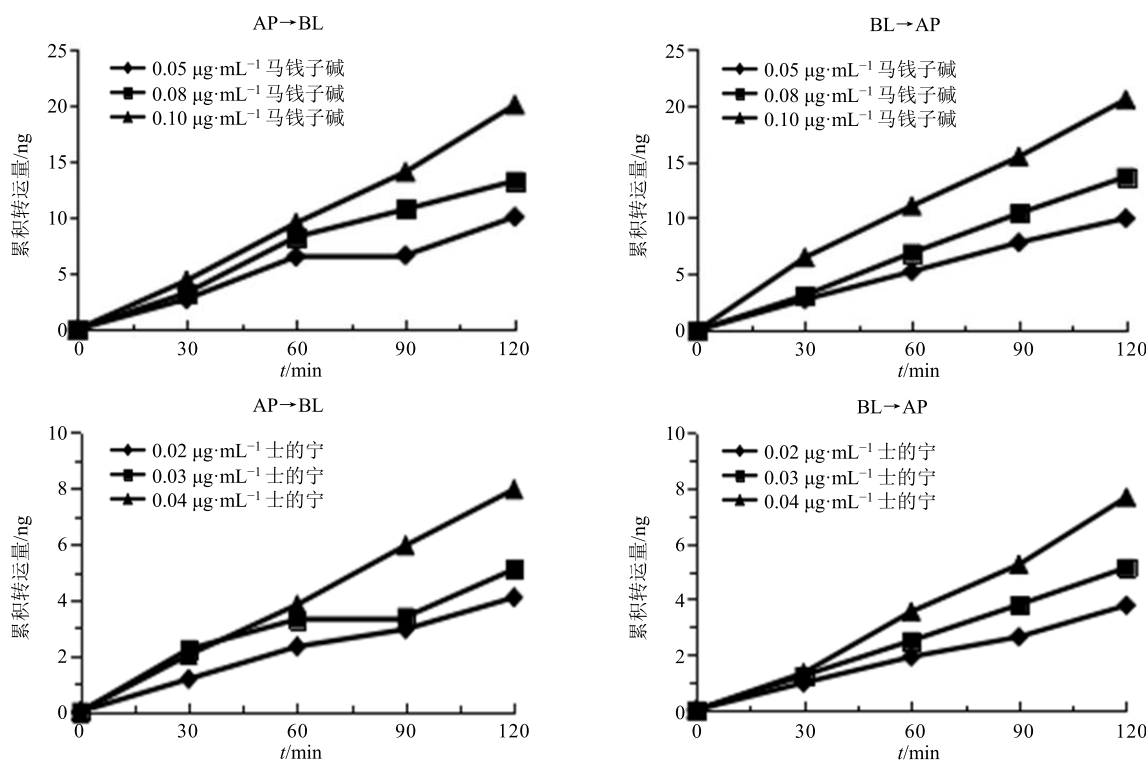


图 4 马钱子碱、士的宁在 AP→BL 方向和 BL→AP 方向的累积转运量

Fig. 4 Accumulated transport amount of brucine and strychnine direction of in AP→BL and BL→AP

表 4 120 min 时马钱子碱、士的宁在 AP→BL 方向和 BL→AP 方向的累积转运量和累积转运率

Table 4 Accumulated transport amount and rate of brucine and strychnine in AP→BL and BL→AP at different concentrations at 120 min

| 成分   | $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 累积转运量/ng |       | 累积转运率/% |       |
|------|-----------------------------------------|----------|-------|---------|-------|
|      |                                         | AP→BL    | BL→AP | AP→BL   | BL→AP |
| 马钱子碱 | 0.05                                    | 10.01    | 9.96  | 40.04   | 13.28 |
|      | 0.08                                    | 13.21    | 13.66 | 33.03   | 11.38 |
|      | 0.10                                    | 19.97    | 20.54 | 39.94   | 13.69 |
| 士的宁  | 0.02                                    | 4.09     | 3.78  | 40.90   | 12.60 |
|      | 0.03                                    | 5.10     | 5.14  | 34.00   | 11.42 |
|      | 0.04                                    | 7.96     | 7.68  | 39.80   | 12.80 |

表 5 马钱子碱、土的宁  $C_{cum}$  随时间的变化结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 5 Cumulative absorption concentration of strychnine and brucine with time ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 成分   | $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 方向    | $C_{cum}/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ |                  |                  |                  |
|------|-----------------------------------------|-------|------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
|      |                                         |       | 30 min                                   | 60 min           | 90 min           | 120 min          |
| 马钱子碱 | 0.10                                    | AP→BL | $2.90 \pm 0.50$                          | $5.73 \pm 0.12$  | $7.61 \pm 0.34$  | $10.06 \pm 0.66$ |
|      | 0.10                                    | BL→AP | $12.93 \pm 1.15$                         | $14.37 \pm 0.15$ | $14.50 \pm 0.20$ | $16.00 \pm 1.06$ |
| 土的宁  | 0.04                                    | AP→BL | $1.35 \pm 0.29$                          | $2.28 \pm 0.35$  | $3.24 \pm 0.22$  | $3.94 \pm 0.02$  |
|      | 0.04                                    | BL→AP | $2.68 \pm 0.03$                          | $5.50 \pm 0.16$  | $5.59 \pm 0.35$  | $7.11 \pm 0.29$  |

表 6 维拉帕米对马钱子碱、土的宁在 MDCK-MDR1 细胞单层模型中转运的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 6 Effect of Verapamil on MDCK-MDR1 cell monolayer transport of brucine and strychnine ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别                                                                                      | $P_{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})/(\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$ | $P_{app}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})/(\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$ | ER              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 马钱子碱 $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$                                              | $24.76 \pm 1.14$                                                                         | $25.47 \pm 0.67$                                                                         | $1.03 \pm 0.02$ |
| 土的宁 $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$                                               | $24.69 \pm 0.87$                                                                         | $23.82 \pm 0.39$                                                                         | $0.95 \pm 0.06$ |
| 马钱子碱 $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 维拉帕米 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $24.73 \pm 0.30$                                                                         | $19.95 \pm 0.40^{\#}$                                                                    | $0.81 \pm 0.01$ |
| 土的宁 $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 维拉帕米 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  | $31.28 \pm 2.08^{\#}$                                                                    | $21.93 \pm 0.03^{\#}$                                                                    | $0.69 \pm 0.05$ |

与马钱子碱或土的宁组比较:  $^{\#}P < 0.05$  $^{\#}P < 0.05$  vs brucine or strychnine group

### 3 讨论

本研究发现, 马钱子碱与土的宁对 MDCK-MDR1 细胞的毒性都呈质量浓度依赖性, 马钱子碱的细胞无毒范围  $0 \sim 0.10 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 土的宁的细胞无毒范围  $0 \sim 0.04 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。在质量浓度为  $0.10$ 、 $0.20$ 、 $0.40 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 土的宁对 MDCK-MDR1 细胞的毒性大于马钱子碱对 MDCK-MDR1 细胞的毒性。陈海波等<sup>[17]</sup>研究的马钱子组分对人 HaCaT 细胞毒性作用的比较, 实验结果表明马钱子生物碱组分均对 HaCaT 细胞存在细胞毒性作用, 呈剂量依赖关系, 但马钱子碱的细胞毒性明显小于土的宁。本实验的 MTT 实验结果与文献报道<sup>[17]</sup>中的实验结果相符合。

本课题组前期 Liu 等<sup>[18]</sup>对马钱子提取物配伍白芍提取物 P-gp 调节机制进行了研究, 研究表明马钱子碱和土的宁可能是 P-gp 的底物, 白芍提取物配伍马钱子提取物能上调 P-gp 表达, 活化了 P-gp 功能, 增加了马钱子碱的外排。本实验在此研究的基础上, 以马钱子碱与土的宁单一成分为研究对象, 进一步阐明马钱子碱与土的宁的转运机制。

口服吸收较差的药物, 其  $P_{app}$  小于  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ; 口服吸收中等的药物, 其  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s} < P_{app} < 1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ ; 口服吸收良好的药物, 其  $P_{app}$  大于  $1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ <sup>[19]</sup>。在 MDCK-MDR1 体外模型中, 若 ER 小于 2, 则药物的跨膜转运不具方向性, 为被动转

运<sup>[20]</sup>。本实验考察马钱子碱和土的宁在体外细胞膜型 MDCK-MDR1 的转运特性, 研究马钱子碱与土的宁双侧的转运机制, 结果表明, 马钱子碱、土的宁的  $P_{app}$  值均大于  $1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ , 说明马钱子碱、土的宁口服吸收良好。马钱子碱、土的宁的 ER 均小于 2, 说明马钱子碱、土的宁主要转运机制为被动扩散。马钱子碱、土的宁在 AP→BL 侧累积转运率都大于 33% 和 BL→AP 侧 120 min 时累积转运率都大于 11%, 表明马钱子碱、土的宁吸收良好, 口服生物利用度较高<sup>[21]</sup>。维拉帕米能抑制 P-gp 对马钱子碱、土的宁的外排, 综上所述, 表明马钱子碱、土的宁吸收良好, 主要转运方式为被动扩散且可能有外排蛋白 p-gp 参与。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Pastan I, Gottesman M M, Ueda K, *et al.* A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of p-glycoprotein in MDCK cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 85(12): 4486-4490.
- [3] Horio M, Chin K V, Currier S J, *et al.* Transepithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby canine kidney cell epithelia [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(25): 14880-14884.
- [4] Hong L, Xu C, O'Neal S, *et al.* Roles of P-glycoprotein and multidrug resistance protein in transporting

- para-aminosalicylic acid and its *N*-acetylated metabolite in mice brain [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(12): 1577-1585.
- [5] Hu P Y, Liu D, Qing Q Z, *et al*. Elucidation of transport mechanism of paeoniflorin and the influence of ligustilide, senkyunolide I and senkyunolide A on paeoniflorin transport through MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Molecules*, 2016, doi: 10.3390/molecules21030300.
- [6] Xu D H, Yan M, Li H D, *et al*. Influence of P-glycoprotein on brucine transport at the *in vitro* blood-brain barrier [J]. *Europ J Pharmacol*, 2012, 690(1/3): 68-76.
- [7] Ren T K, Li M L, Zheng H, *et al*. Microdialysis combined with RRLC-MS/MS for the pharmacokinetics of two major alkaloids of Bi qi capsule and the potential roles of P-gp and BCRP on their penetration [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1092(15): 72-81.
- [8] Lécuyer M A, Kebir H, Prat A, *et al*. Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Disease*, 2016, 1862(3): 472-482.
- [9] Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, *et al*. *In vitro* discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes [J]. *Brain Res*, 2015, 1594(12): 15-26.
- [10] 朱狄峰. 丹参素及芍药苷在 Caco-2 细胞模型中转运的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [11] 杨 冰, 张紫薇, 赵 博, 等. 微乳对葛根素在 MDCK-MDR1 细胞的转运影响及机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2890-2896.
- [12] 刘 强, 高小玲, 柴逸峰, 等. 四氢帕马丁在 MDCK-MDR1 细胞系中的跨膜转运机制 [J]. *药学服务与研究*, 2012, 12(1): 34-37.
- [13] Marilene G, Renata S, Carolina R P, *et al*. Cellular models and *in vitro* assays for the screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22040600.
- [14] Yang B, Du S 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.
- [15] 王俊俊, 廖晓欢, 叶 敏, 等. Caco-2 单层细胞模型上士的宁的体外吸收机制及其与甘草苷的转运相互作用 [J]. *药学学报*, 2010, 45(9): 1160-1164.
- [16] 叶 敏. 马钱子碱、次乌头碱的体外吸收机制及其他分别分别与甘草苷的转运相互作用研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2012.
- [17] 陈海波, 马凤森, 方剑乔, 等. 马钱子组分对人 HaCaT 细胞毒性作用的比较 [J]. *中成药*, 2015, 37(1): 16-21.
- [18] Liu L L, Guan Y M, Lu X P, *et al*. Mechanisms of P-glycoprotein modulation by *Semen Strychni* combined with *Radix Paeoniae Alba* [J]. *Evidence-Based Compl Altern Med*, 2017, doi: 10.1155/2017/1743870.
- [19] Li H, Jin H E, Kim W, *et al*. Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells [J]. *Res Paper*, 2008, 25(11): 2601-2612.
- [20] Chen Z Z, Lu Y, Du S Y, *et al*. Influence of borneol and muscone on geniposide transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Int J Pharm*, 2013, 456(1): 73-79.
- [21] 郑 琴, 周 欢, 熊文海, 等. 乌头碱在 Caco-2 细胞模型上的转运行为 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(20): 121-124.