

花旗松素在 Caco-2 细胞模型中吸收转运机制及其抗炎活性研究

赵鑫^{1,2}, 杨冰², 周福军², 华洁², 单淇², 张然^{1,2}, 周钰通², 侯文彬^{3*}, 张铁军^{2*}

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462

3. 中国医学科学院 放射医学研究所, 天津 300192

摘要: 目的 制备花旗松素单体并测定花旗松素在不同介质中的表观油水分配系数, 研究其在结肠癌 Caco-2 细胞模型中吸收转运机制。方法 酶解法制备花旗松素, 采用高效液相色谱法测定花旗松素在 37 °C、不同 pH 值缓冲盐溶液和水中的饱和溶解度, 通过油水分配系数计算公式得花旗松素表观油水分配系数; CCK-8 实验考察花旗松素在 Caco-2 细胞中的安全浓度范围, 再利用 Caco-2 细胞单层模型研究其双侧跨膜吸收转运机制; CCK-8 实验考察花旗松素在人脐血管内皮细胞 HDMEC 细胞中的安全浓度范围, 采用脂多糖诱导的 HDMEC 细胞建立炎症模型, 用花旗松素进行干预, 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒检测 LDH 的活力。结果 花旗松素在不同溶剂中的 $\lg P$ 分别为 0.29 (0.1 mol/L 盐酸)、0.48 (pH 2.0)、0.46 (pH 5.8)、0.34 (pH 6.8)、0.26 (pH 7.4)、0.38 (水); 花旗松素质量浓度在 50~500 $\mu\text{g/mL}$ 对 Caco-2 细胞无明显毒性作用; 不同质量浓度花旗松素在 Caco-2 单层细胞模型中的转运具有时间依赖性, 不同质量浓度花旗松素双侧转运 P_{app} 值无显著性差异, 且均小于 $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 外排率 (ER) 均小于 2。花旗松素在 50~300 $\mu\text{g/mL}$ 对 HDMEC 细胞无明显毒性作用, 给予花旗松素干预后, 与单独给予脂多糖 (LPS) 刺激组相比, 花旗松素各用药组均能明显降低 LDH 活力 ($P < 0.05$), 花旗松素在 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 明显降低 LDH 活力, 100~250 $\mu\text{g/mL}$ 趋于平稳。结论 花旗松素在肠道中属于难吸收药物, 其跨膜转运机制为被动转运, 其对 LPS 致 HDMEC 细胞炎症有抑制作用, 具有抗炎活性。

关键词: 花旗松素; 表观油水分配系数; Caco-2 细胞; 吸收转运; 抗炎; 油水分配系数; 酶解法; 饱和溶解度; CCK-8 实验; HDMEC 细胞; 乳酸脱氢酶

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)16-4266-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.021

Study on oil-water distribution of taxifolin and its absorption and transport mechanism in Caco-2 cell model

ZHAO Xin^{1,2}, YANG Bing², ZHOU Fu-jun², HUA Jie², SHAN Qi², ZHANG Ran^{1,2}, ZHOU Yu-tong², Hou Wen-bin³, ZHANG Tie-jun²

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Pharmaceutical Research Institute, Tianjin Key Laboratory of Quality Markers of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300462, China

3. Institute of Radiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To prepare the taxifolin and determine its apparent oil-water partition coefficient in different media, and to study the mechanism of absorption and transport of taxifolin in Caco-2 cell model. **Methods** Taxifolin was prepared by enzymolysis. HPLC was used to determine the saturated solubility of taxifolin in 37 °C, different pH buffer solution and water, apparent oil-water distribution coefficient of taxifolin obtained by calculation formula of oil-water distribution coefficient; CCK-8 experiment was used to investigate the safe concentration range of taxifolin in Caco-2 cells, and then the single-layer model of Caco-2 cells was used to study the mechanism of bilateral transmembrane absorption and transport. CCK-8 experiment was used to investigate the safe concentration range of taxifolin in HDMEC cells. The inflammatory model of HDMEC cells induced by lipopolysaccharide was established, and the

收稿日期: 2019-12-11

基金项目: 国家新药创新项目 (2017ZX09301062)

作者简介: 赵鑫 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药发现与质量研究。Tel: 13821551722 E-mail: zx13821551722@163.com

*通信作者 侯文彬 E-mail: houwb@tjpr.com

张铁军 E-mail: zhangtj@tjpr.com

activity of lactic dehydrogenase was detected by the intervention of floxacin. The activity of lactic dehydrogenase was detected by lactic dehydrogenase kit. **Results** The $\lg P$ values of taxifolin in the following solvents were 0.29 (0.1 mol/L hydrochloric acid), 0.48 (pH 2.0), 0.46 (pH 5.8), 0.34 (pH 6.8), 0.26 (pH 7.4), and 0.38 (water), respectively; There was no significant toxic effect on Caco-2 cells in the range of 50—500 $\mu\text{g/mL}$; There was no significant difference in P_{app} value of bilateral transport between different concentrations of taxifolin in Caco-2 monolayer cell model, and it was less than 1×10^{-6} cm/s and ER was less than 2. There was no significant toxic effect on HDMEC cells in the range of 50—300 $\mu\text{g/mL}$; After treatment with taxifolin, compared with LPS stimulation group, the activity of LDH in each treatment group was decreased significantly ($P < 0.05$), and the activity of LDH was decreased significantly in the range of 50—100 $\mu\text{g/mL}$, and tended to be stable in the range of 100—250 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Taxifolin is a kind of drug which is difficult to absorb in the intestine. The mechanism of transmembrane transport is passive transport. It can inhibit the inflammation of hdmeC cells induced by LPS and has anti-inflammatory activity.

Key words: taxifolin; apparent oil-water partition coefficient; Caco-2 cells; absorption and transport; anti-inflammatory; oil-water partition coefficient; enzymatic hydrolysis; saturated solubility; CCK-8 experiment; HDMEC cells; lactate dehydrogenase

花旗松素(taxifolin)又名二氢槲皮素、紫杉叶素、黄杉素,是一种生物类黄酮准维生素P,是一种化学名为5,7,3,4-四羟基二氢黄酮类化合物。日本学者 Fukui 首先从针叶树叶中分离出了花旗松素,其生物活性随后被发现并证实^[1]。研究表明花旗松素具有抗氧化性、抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗辐射等多种药理活性,且无毒、无致畸、无突变^[2]。近年来,花旗松素的成药性已成为药剂学的研究热点。

Caco-2 细胞来源于人类结肠癌细胞,具有与小肠上皮细胞相同的细胞极性与紧密连接。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,从而可以考察药物跨膜转运方式^[3]。是研究药物吸收机制,预测口服药物体内吸收、生物利用度、安全性以及新剂型的良好工具^[4]。

本实验采用酶解法获得花旗松素单体,测定了花旗松素的表观油水分配系数,并利用了 Caco-2 单层细胞模型研究了花旗松素的吸收转运机制,利用了脂多糖(LPS)诱导的 HDMEC 细胞建立炎症模型,用花旗松素进行干预,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测 LDH 的释放水平,研究其抗炎活性,为其制剂的开发及临床用药指导提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞株

Caco-2, 天津药物研究院新药评价有限公司惠赠; HDMEC 细胞, 北京中医药大学惠赠。

1.2 试剂

落新妇苷, 实验室自制, 质量分数>90%; 花旗松素对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 111816-201102, 质量分数为 98%; 糖苷酶, 天津诺奥科技有限公司; 甲醇、乙腈, 天津市康科德科技有限公司; 冰醋酸、磷酸, 天津市科密欧有限公司; 磷酸二氢钾, 天津恒兴化学试剂制造有限公司; 屈

臣氏纯净水; DMEM 培养基、血管内皮细胞完全培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素-链霉素、HBSS 缓冲液, 美国 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS), Macgene 公司; 二甲基亚砜(DMSO), 美国 Sigma 公司; Cell Counting Kit-8, 美国 Amersco 公司; LDH 活力定量测定试剂盒, 普利莱基因技术有限公司。

1.3 仪器

HPLC Agilent 1260 液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; THZ-92C 气浴恒温振荡器, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; Series II 型二氧化碳培养箱, Thermo 公司; 超净工作台, Heal Force 公司; CKX-41 型倒置显微镜, Olympus 公司; BS224S 型电子天平, Sartorius 公司; 细胞计数板, 上海市求精生化试剂仪器有限公司; Millicell-ERS 细胞电阻仪, Millipore 公司; TDL80-2B 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; Multiskan Go 全自动酶标仪, 美国 Thermo 公司; 12 孔 transwell 细胞培养板、96 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司。

2 方法

2.1 花旗松素的制备

取一定量的落新妇苷于三角瓶, 加入 50 倍量水, 调节 pH 值为 5.0, 加入的糖苷酶的量为原料量的 40%, 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 温度下水浴酶解 4 h, 反应终止后, 酶解液离心, 上清液减压浓缩至一定体积, 静置析出沉淀物, 抽滤, 取沉淀物结晶, 冻干得花旗松素单体, 质量分数>90%。

2.2 不同 pH 值缓冲盐溶液中花旗松素油水分配系数(P)测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil Plus C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-1%冰醋酸水溶液; 梯度洗脱: 0~30 min, 10%~20%乙腈; 30~40 min, 20%~30%乙腈; 40~50 min, 30%~

90%乙腈;检测波长 290 nm;柱温 30 ℃;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液配制 精密量取适量花旗松素对照品,用甲醇溶解配制成质量浓度为 30 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液配制 精密量取适量花旗松素原料药,用甲醇溶解配制成质量浓度为 30 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.4 线性关系考察 取适量花旗松素对照品于 100 mL 量瓶,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到对照品储备液。分别吸取上述对照品储备液 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 mL 于 10 mL 量瓶中,用 80%甲醇水稀释至刻度,摇匀,分别得到质量浓度为 4.08、10.20、20.40、30.60、40.80、81.60 μg/mL 的系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),进行线性回归。得到回归方程 $Y=3\,612.9X+4.728\,2$, $r=0.999\,9$,结果表明花旗松素在 4.08~81.60 μg/mL 线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 取花旗松素对照品溶液(质量浓度为 30.60 μg/mL),按“2.2.1”项色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,计算 RSD,得到 RSD 为 0.45%,小于 3%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 精密吸取“2.2.3”项制备的供试品溶液分别于 0、4、8、12、24 h 各进样 10 μL,测定峰面积,测定样品溶液中花旗松素的质量浓度,计算 RSD 值, RSD 为 0.5%,小于 3%,表明花旗松素在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 不同 pH 值缓冲盐溶液中花旗松素 P 的测定 取花旗松素原料药适量,溶解于水饱和正辛醇,配制成质量浓度为 40.2 μg/mL 的正辛醇溶液。精密量取该溶液 1 mL 于具塞塑料管内,再分别加入正辛醇饱和的 0.1 mol/L 盐酸, pH 2.0、5.8、6.8、7.4 的 PBS,水各 1 mL,放入气浴恒温振荡器中振摇 24 h,控制温度在 37 ℃,振摇至平衡。再以 3 500 r/min 离心 10 min,将上层正辛醇相移至 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度后滤过,按照上述色谱条件进样 10 μL 进行测定,记录峰面积,外标法计算其质量浓度。

2.3 Caco-2 细胞单层模型的建立

取对数生长期的 Caco-2 细胞,调节细胞密度为 5×10^5 个/mL 种于 Transwell 培养板,接种后第 1 周

隔天更换培养液,后 2 周每天换液,培养 21 d。使用倒置显微镜对细胞形态进行观察,测定 Caco-2 单层细胞模型的电阻值,检测各孔跨膜电阻值,均大于 $1\,000\,\Omega\cdot\text{cm}^2$,细胞形成紧密单层后即可用于转运实验。

2.4 CCK-8 实验

Caco-2 细胞以 $2\times 10^6\sim 3\times 10^6$ 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板,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,加入含有不同质量浓度的花旗松素培养液,对照组只加培养液,继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 液,再培养 4 h,在酶标仪上于 450 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.5 花旗松素跨膜转运样品含量测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil Plus C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-1%冰醋酸水溶液 (20:80);检测波长 290 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 ℃。

2.5.2 线性关系考察 精密称取适量花旗松素对照品于 10 mL 量瓶中,用 HBSS 溶解,得到质量浓度为 507 μg/mL 的花旗松素标准品母液;用 HBSS 稀释配制成质量浓度分别为 0.507、0.761、1.014、1.521、2.282、5.070 μg/mL 的对照品溶液,分别进样 50 μL,测定并记录峰面积。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程为 $Y=116.02X+41.871$, $r^2=0.999\,6$,结果表明花旗松素在 0.507~5.07 μg/mL 线性关系良好。

2.5.3 精密度试验 配制质量浓度为 2.281 5 μg/mL 花旗松素对照品溶液,进样 6 次,进样 50 μL,测定并记录峰面积,计算峰面积 RSD 为 1.38%,小于 3%,表明精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 配制质量浓度为 2.281 5 μg/mL 的花旗松素供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,进样 50 μL,测定并记录峰面积,计算得峰面积的 RSD 为 1.69%,小于 3%,表明花旗松素供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 花旗松素在 Caco-2 单层的双侧转运实验

选取汇成单层细胞的 Caco-2 细胞(培养 21 d,跨膜电阻值 $>1\,000\,\Omega\cdot\text{cm}^2$),加入 HBSS 置于 37 ℃培养箱孵育 20 min,再用 HBSS 清洗 Transwell 小室内外侧 3 遍。

顶端侧到基底侧 (AP→BL) 方向转运: 弃去 HBSS 液, 向 Transwll 细胞培养小室 AP 侧加入含不同质量浓度花旗松素的 HBSS 0.5 mL, 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。置于 37 ℃, 转速 50 r/min 的气浴恒温振荡器振荡, 并分别于 30、60、90、120、150、180 min 从 BL 侧取样 600 μL。同时补加等量的 37 ℃空白 HBSS, 设置 3 个复孔。

基底侧到顶端侧 (BL→AP) 方向转运: 含不同质量浓度花旗松素的 HBSS 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。置于 37 ℃, 转速 50 r/min 的气浴恒温振荡器振荡, 并分别于 30、60、90、120、150、180 min 从 AP 侧取样 200 μL。同时补加等量的 37 ℃空白 HBSS, 设置 3 个复孔。

样品离心 (10 000 r/min, 10 min) 后取上清液, 以 HPLC 法检测花旗松素含量, 绘制花旗松素的累积透过量 (Q)-时间 (t) 曲线。计算表观渗透系数 (P_{app}) 和外排率 (ER)。

$$P_{app} = dQ/(dtAC)$$

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

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 为花旗松素在供给池中的初始质量浓度

2.7 花旗松素抗炎活性研究

2.7.1 不同质量浓度花旗松素对 HDMEC 生长的影响 HDMEC 细胞以 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板, 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, 加入含有不同质量浓度的花旗松素培养液, 对照组只加培养液, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 液, 再培养 4 h, 在酶标仪上于 450 nm 波长处测定各孔 A 值, 计算细胞存活率。

2.7.2 不同质量浓度花旗松素对 LPS 诱导的损伤 HDMEC 细胞中 LDH 活性的影响 将 HDMEC 细胞以密度 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板, 置于培养箱培养, 细胞贴壁后, 更换新的培养基, 对其分组, 对照组: LPS 刺激, 实验组: 10 μg/mL LPS 刺激^[5], 再用花旗松素 (花旗松素最终质量浓度为 50、100、150、200、250 μg/mL) 处理, 设置 3 个复孔。培养箱培养 24 h, 消化, 加入 PBS 超声, 收集裂解液按 LDH 试剂盒说明书用酶标仪测定 LDH 活力。

2.8 数据分析

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采用独立样本 t 检验分析, 各组间样本比较采用 F 检验分析。

3 结果

3.1 不同溶液中花旗松素 P 值测定

实验结果显示, 花旗松素在 0.1 mol/L 盐酸, pH 2.0、5.8、6.8、7.4 的 PBS, 水中的 $\lg P$ 值均大于 0, 且小于 1, 表明其在体内难吸收^[6-7], 结果见表 1。

表 1 37 ℃下花旗松素在不同介质中的 $\lg P$

Table 1 $\lg P$ value of taxifolin in different media at 37 ℃

介质	正辛醇相($C_{油}$) / (mg·mL ⁻¹)	水相($C_0 - C_{油}$) / (mg·mL ⁻¹)	P 值	$\lg P$
0.1 mol·L ⁻¹ 盐酸	0.264 8	0.137 2	1.93	0.29
pH 2.0	0.302 0	0.100 0	3.02	0.48
pH 5.8	0.298 4	0.103 6	2.88	0.46
pH 6.8	0.276 3	0.125 7	2.20	0.34
pH 7.4	0.258 8	0.143 2	1.81	0.26
水	0.283 4	0.118 6	2.39	0.38

3.2 Caco-2 单层细胞模型的建立

Caco-2 细胞按 5×10^5 个/mL 密度接种于 Transwll 板后, 21 d 内测定 TEER 值, 结果见图 1。接种后的 Caco-2 细胞培养 21 d, Caco-2 细胞跨膜电阻值是呈增大的趋势, 在 21 d 左右跨膜电阻值大于 1 000 Ω·cm² 且处于稳定趋势, 此时的 Caco-2 细胞单层模型可用于转运实验。

3.3 CCK-8 法检测花旗松素对 Caco-2 细胞的毒性

花旗松素在 50~500 μg/mL 给药 24 h 细胞存活率影响和对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。不同质量浓度花旗松素与对 Caco-2 细胞安全剂量关系如图 2 所示。

3.4 花旗松素在 Caco-2 单层细胞双侧转运特征

不同质量浓度花旗松素在 Caco-2 细胞模型中

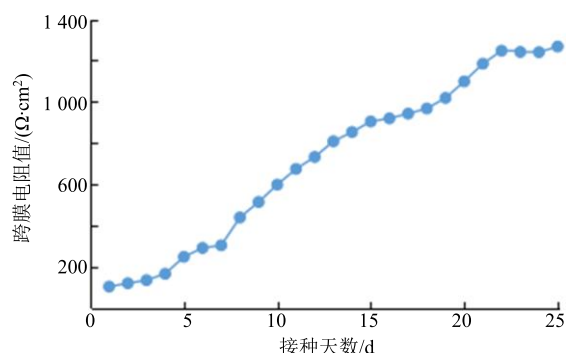
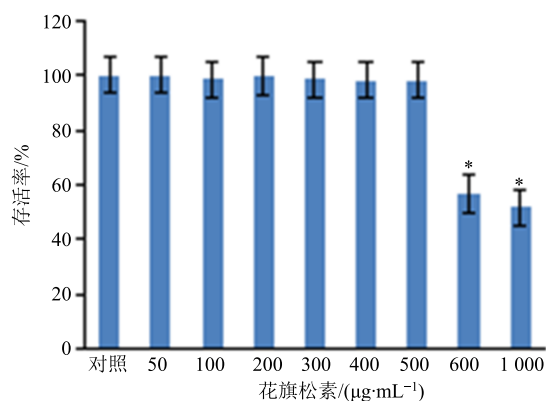


图 1 接种 Caco-2 细胞的跨膜电阻值

Fig. 1 Transmembrane resistance value of Caco-2 cells

与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group图2 花旗松素对 Caco-2 细胞的毒性实验研究结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Fig. 2 Results of experimental study on toxicity of taxifolin to Caco-2 Cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

吸收转运结果如表 2 所示。用药质量浓度为 300、400、500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 花旗松素在 Caco-2 吸收方向 (AP $\rightarrow$ BL) 的 P_{app} 值分别为 0.834 ± 0.047 、 0.834 ± 0.037 、 0.830 ± 0.051 , 结果提示花旗松素为难吸收药物^[8]。花旗松素在 Caco-2 外排方向 (BL $\rightarrow$ AP) 的 P_{app} 值分别为 0.859 ± 0.097 、 0.835 ± 0.043 、 0.828 ± 0.057 ; ER 分别为 1.029、1.001、0.998, 均小于 2, 提示花旗松素为难吸收的药物。不同质量浓度花旗松素在细胞单层模型的 P_{app} 均无显著性差异, 且 ER 小于 2, 提示其转运不受浓度影响, P-gp 不参与花旗松素外排, 属于被动扩散方式转运^[9]。

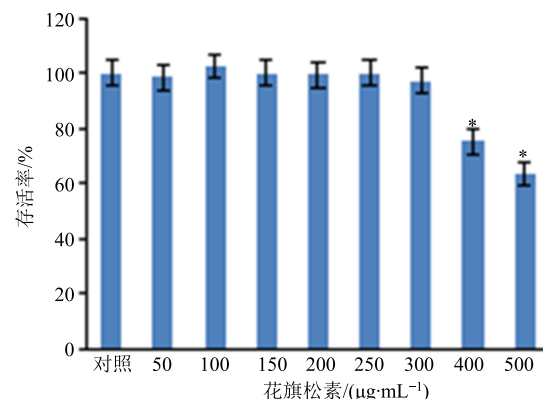
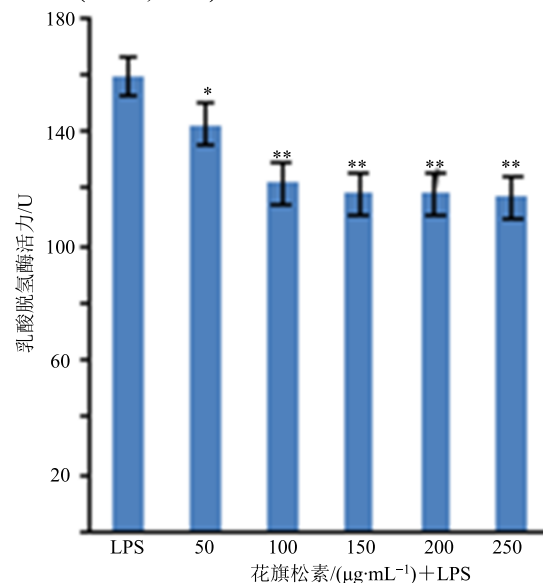
3.5 花旗松素抗炎活性研究

3.5.1 不同质量浓度花旗松素对 HDMEC 细胞的毒性实验 花旗松素在 50~300 $\mu\text{g/mL}$ 给药 24 h 细胞存活率和对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 结果见图 3。

3.5.2 不同质量浓度花旗松素对 LPS 诱导的损伤 HDMEC 细胞中 LDH 的活性影响 如图 4 所示, 与表 2 不同质量浓度花旗松素在 Caco-2 细胞模型中转运试验的表观渗透系数及外排率 ($n = 3$)

Table 2 Apparent permeability coefficient and efflux ratio of different mass concentrations of Douglasin transport test in Caco-2 cell model ($n = 3$)

花旗松素/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$P_{\text{app}}/(1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		ER
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
300	0.834 ± 0.047	0.859 ± 0.097	1.029
400	0.834 ± 0.037	0.835 ± 0.043	1.001
500	0.830 ± 0.051	0.828 ± 0.057	0.998

图3 花旗松素对 HDMEC 细胞毒性实验研究 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Fig. 3 Experimental study on cytotoxicity of taxifolin on HDMEC ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)与单独给予 LPS 刺激组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs the LPS stimulation group alone图4 花旗松素对 LPS 诱导的损伤 HDMEC 细胞中 LDH 的活性影响 ($n = 3$)Fig. 4 Effect of taxifolin on LDH-induced LDH activity in injured HDMEC cells ($n = 3$)

HDMEC 细胞只加 LPS 刺激 (模型组) 相比, 给药质量浓度超过 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, LDH 活力即明显降低, 并具有显著性差异 ($P < 0.05$), 并且随着给药质量浓度增加, LDH 活力降低, 提示花旗松素对 HDMEC 细胞具有抗炎作用, 且花旗松素在 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 时抗炎作用明显, 在 100~250 $\mu\text{g/mL}$ 时抗炎作用趋于平稳。

4 讨论

药物在细胞单层的透过能力与其自身性质有关, 脂溶性小分子易于通过细胞单层, 水溶性药物则由于亲水基团的存在, 与细胞膜亲和力低, 很难

透过细胞单层。 P_{app} 值对于药物渗透性分类非常重要,生物药剂学运用药物 P_{app} 值的大小预测药物的吸收^[10]。 P_{app} 值小于 1×10^{-6} 为难吸收的药物(生物利用度在 0~20%), P_{app} 值介于 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ 为中等吸收药物(生物利用度在 20%~70%), P_{app} 值大于 1×10^{-5} 为易吸收药物(生物利用度在 70%~100%)^[11]。不同质量浓度花旗松素在 Caco-2 细胞模型的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值在 $0.830 \times 10^{-6} \sim 0.834 \times 10^{-6}$ cm/s, $P_{app}(BL \rightarrow AP)$ 值在 $0.828 \times 10^{-6} \sim 0.859 \times 10^{-6}$ cm/s,提示花旗松素为难吸收的药物。不同质量浓度花旗松素吸收方向的 P_{app} 均无显著性差异,且 ER 小于 2,提示其转运不受质量浓度影响, P_{gp} 不参与花旗松素外排,属于被动扩散方式。

油水分配系数是表达药物在吸收阶段的跨膜吸收能力的一种参数,表观油水分配系数(P)越大,则生物膜的渗透性越高,越有利于药物在体内的吸收^[12]。 $\lg P$ 值均大于 0,且小于 1, $\lg P > 0$ 属亲脂性化合物,且其数值绝对值越大亲脂性越强, $\lg P < 0$ 属亲水性化合物,其数值绝对值越大,亲水性越强, $\lg P$ 较小的化合物吸收差,而 $\lg P > 1$ 的化合物吸收较好^[13-14]。本实验测定了花旗松素在 0.1 mol/L 酸, pH 2.0、5.8、6.8、7.4 的 PBS,水中的 P 值,计算结果显示其在上述溶液中 $\lg P$ 值分别为 0.29、0.48、0.46、0.34、0.26、0.38,表明花旗松素属于难吸收药物,这与细胞转运实验研究结果互相印证。

LDH 是存在于细胞浆内的一种转换酶,参与糖酵解代谢,在细胞遭受损伤的情况下,会泄漏至胞外^[15]。因此,通过检测细胞液中 LDH 的活力研究花旗松素的抗炎活性。本实验通过 LPS 诱导 HDMEC 细胞发炎,花旗松素进行干预,检测乳酸脱氢酶的活力。与 LPS 刺激组相比,花旗松素各用药组均能明显降低 LDH 活力($P < 0.05$),提示花旗松素具有抑制脂多糖诱导的 HDMEC 细胞发炎的作用,表明花旗松素具有抗炎活性。

花旗松素具有良好的抗炎药理作用,具有开发为抗类风湿性关节炎新药的前景,本研究对其油水分配系数及吸收转运特点,抗炎活性进行初步研究,为后续剂型开发和临床用药预测奠定基础。

参考文献

[1] Fukui Y, Nakadome K, Ariyoshi H. Isolation of a new

taxifolin glucoside from the leaves of *Chamaecyparis obtuse* Endlicher [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1966, 86(3): 184-187.

- [2] 杨松霖,杜姣姣,赵丽娟,等. 花旗松素的研究进展及展望 [J]. 化工管理, 2018(22): 54-55.
- [3] 费巧玲,王健,侯瑞,等. 厚朴水提物在 Caco-2 细胞模型中的转运特征研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2313-2318.
- [4] 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.
- [5] 倪文澎,王海丹,朱萱萱,等. 黄静多糖对脂多糖(LPS)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤的保护机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(12): 2644-2646.
- [6] 管咏梅,孙振,张文秀,等. 白头翁总皂苷提取物的基本理化性质考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 42-44.
- [7] 张慧慧,施洋,张晓霞,等. 安石榴苷平衡溶解度与油水分配系数的测定 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(2): 225-228.
- [8] 党钰,李燕,刘美辰,等. 大黄有效成分与附子有效成分在 Caco-2 细胞模型上的转运分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 1-6.
- [9] 杨海涛,王广基. Caco-2 单层细胞模型及其在药理学中的应用 [J]. 药学报, 2000, 35(10): 797-800.
- [10] Amidon G L, Lennernas H, Shah V P, et al. A theoretical basis for biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability [J]. *Pharm Res*, 1995, 12(3): 413-420.
- [11] 曾珍. 姜黄素及其类似物在 Caco-2 细胞模型中的吸收转运研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.
- [12] 孙启文,陈军,陈明磊,等. 高车前苷油水分配系数的测定及大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 194-197.
- [13] 朱伊婷,陈英杰,夏媛媛,等. 甲磺酸普依司他油水分配系数的测定 [J]. 广东化工, 2018, 45(10): 36-37.
- [14] 张慧慧,施洋,张晓霞,等. 安石榴苷平衡溶解度与油水分配系数的测定 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(2): 225-228.
- [15] 刘昊,赵自冰,王新. 黄芩苷对大肠埃希菌的抗菌活性及其作用机制 [J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(9): 983-985.