

甘草苷体内暴露特征及体外跨膜转运机制研究

张爱杰^{1,2}, 李 偲³, 刘羽康³, 张英华⁴, 谷伟玲⁴, 董世奇^{1,2*}, 樊慧蓉^{1,2*}, 谷 元⁵, 司端运⁵

1. 中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192

2. 中国医学科学院创新药物放射性药代研究重点实验室, 天津 300192

3. 天津中医药大学, 天津 301617

4. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 132012

5. 天津药物研究院, 天津 300462

摘要: **目的** 总甘草素是甘草苷在体内的主要暴露形式, 对两者在大鼠体内暴露特征及体外跨膜转运机制进行研究, 为以甘草苷单体为新药的进一步开发提供依据。 **方法** 采用 LC-MS/MS 分析方法测定大鼠给药后不同时间点血浆样品中的总甘草素浓度, 并应用 WinNonlin.6.3 软件采用非房室模型的统计矩法计算药代动力学参数; 同时测定大鼠 ig 给药后组织匀浆中的浓度, 考察不同类型甘草素在各组织中的暴露特征; 应用体外 MDCK-MDR1 细胞模型, 研究甘草苷、甘草素的跨膜转运能力及其机制。 **结果** ig 给药后在大鼠体内, 甘草苷不呈线性动力学特征; 血浆和大部分组织中主要以甘草素的 II 相结合产物存在, 肝、子宫、卵巢、胃和肠组织中主要为游离甘草素; 总甘草素暴露量排序为肠>血浆>肝>肾>肺>胃>子宫>卵巢>脂肪>心>脾>肌肉>睾丸, 且不易产生组织蓄积现象; 甘草素跨膜转运能力较甘草苷良好, 且均不是 P-gp 转运体的底物。 **结论** 甘草苷不呈线性动力学吸收特征; 甘草素在组织中暴露特征表现为不同组织中甘草素的存在形式和分布程度差异较大, 总甘草素不易产生组织蓄积现象; 两者均为被动扩散跨膜转运方式。

关键词: 甘草苷; 甘草素; 暴露特征; 吸收动力学; 组织分布; 跨膜转运机制

中图分类号: R283 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)07-2053-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.022

In vivo exposure characteristic and *in vitro* transport mechanism of liquiritin

ZHANG Ai-jie^{1,2}, LI Cai³, LIU Yu-kang³, ZHANG Ying-hua⁴, GU Wei-ling⁴, DONG Shi-qi^{1,2}, FAN Hui-rong^{1,2}, GU Yuan⁵, SI Duan-yun⁵

1. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

2. Key Laboratory of Radiopharmacokinetics for Innovative Drugs, Chinese Academy of Medical Sciences, and Institute of Radiation Medicine, Tianjin 300192, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

4. Jilin Academy of Chinese Medicine Sciences, Changchun 132012, China

5. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

Abstract: Objective The total aglycone liquiritigenin represents the primary exposure of liquiritin *in vivo* in rats. The objective of this study was to investigate the characteristics of exposure and transport mechanism of liquiritin *in vivo* in rats and *in vitro*. The results could provide the evidence of liquiritin for its further development as a new drug. **Methods** The concentration of total aglycone liquiritigenin at different timing points in rat plasma and tissue distribution samples was determined by LC-MS/MS method after an oral administration of liquiritin in rats. The pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin software using Rosenbluth method of non-compartment model. The exposure of total aglycone liquiritigenin and free liquiritigenin in rat tissues was

收稿日期: 2020-08-28

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1708203); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2018PT35031); 内蒙古自治区科技重大专项 (2019ZD004); 天津市自然科学基金青年基金项目 (20JCQNJC00320)

作者简介: 张爱杰, 男, 助理研究员, 研究方向为药理学。E-mail: zhangaijie1986@163.com

***通信作者:** 董世奇, 男, 博士, 研究方向为药理学。E-mail: dongsq1314@126.com

樊慧蓉, 女, 研究员, 硕士导师, 研究方向为药理学。E-mail: fanhr99@163.com

investigated. And the transport mechanism of liquiritin and liquiritigenin was clarified using the MDCK-MDR1 cells *in vitro*. **Results** Liquiritin did not undergo linear pharmacokinetic characteristic after a single oral dose in rats. The phase II conjugation metabolites of liquiritigenin were the major exposure in plasma and most rat tissues. However, free liquiritigenin was primarily distributed in the tissue of rat liver, uterus, ovary, stomach and intestine. The exposure of total aglycone liquiritigenin in rat tissues did not show any accumulation trends. And the sequence of exposure was: intestine>plasma>liver>kidney>lung>stomach>uterus>ovary>fat>heart>spleen>muscle>testicle. The transport results indicated that both liquiritin and liquiritigenin were not the substrate of P-gp. And the transcellular transport of liquiritigenin from apical to basolateral membrane was higher than that of liquiritin in MDCK-MDR1 cells. **Conclusion** Liquiritin did not show linear pharmacokinetic characteristic after a single oral dose in rats. The characteristics of exposure of liquiritigenin in rat tissues indicated that the extent of distribution and type of liquiritigenin were different among tissues. The exposure of total aglycone liquiritigenin in rat tissues did not show any accumulation trends. The transcellular transport of liquiritin and liquiritigenin was mediated by passive diffusion.

Key words: liquiritin, liquiritigenin, exposure characteristic, absorption kinetics, tissue distribution, transcellular transport mechanism

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 及光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根茎；其性味甘平，归心、肺、脾、胃经，具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效^[1]。甘草的现代药理研究显示其具有抗炎、抗菌、保肝、抗氧化、抗癌、降糖、免疫调节等多种药理作用^[2-3]。甘草的主要活性成分有三萜类、黄酮类、多糖类^[4]，具有广泛的生物活性。目前，甘草属中分离得到的黄酮类化合物及其衍生物有 300 多种^[5]，具有抗菌、抗病毒、保肝、抗肿瘤等药理作用。甘草苷是甘草中主要的黄酮类化合物，本课题组前期研究发现大鼠单次 ig 30、100 mg/kg 甘草苷后具有显著的抗垂体后叶素诱导的心肌缺血作用，表现为抑制心电图 J 点变化。因此，甘草苷拟作为抗心肌缺血 I 类新药进行开发研究。

通过药物代谢和药动学研究药物的体内处置和动力学过程，将药物在血循环和靶器官的暴露水平与关键的临床表现（药效和不良反应）相关联，为了解动物或人体服用药物后的生物学和物理化学过程及机制提供科学依据^[6]。已有文献报道提示，甘草素是甘草苷在体内的代谢产物之一，甘草苷进入体内主要是以甘草素的形式被吸收^[7-10]。为了确定甘草苷经口给药后在体内的主要暴露形式，本研究首先进行了一系列预实验。结合药效学的给药方式和有效剂量，大鼠单次 ig 给予 30 mg/kg 甘草苷后大鼠血浆中检测到少量甘草苷（最高血药浓度约为 50 ng/mL），而血浆中总甘草素平均最高浓度为 $(3.166 \pm 1.616) \mu\text{g/mL}$ ，研究结果提示甘草苷原型不是甘草苷胃肠道给药后在体内的主要存在形式^[10]，同时血浆中总甘草素（包括游离甘草素、甘草素硫

酸结合物、甘草素葡萄糖醛酸结合物）的暴露量远远大于游离甘草素的暴露量。吸收和分布是药物进入机体到达作用部位的重要过程，药物吸收的多少及快慢直接影响到药物在体内发挥的作用^[11]。其中药物的吸收过程与转运密切相关，且甘草有“解百药毒”的特性^[12]，其机制之一为延缓和减少药物吸收，目前也有研究表明甘草这一特性与其跨膜转运功能有关^[13]。基于此，本研究以含有葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶的 H-2 型水解酶，测定未经水解及酶水解后样品中甘草素的含量表征游离甘草素和总甘草素，定量分析两者在大鼠体内的吸收动力学、组织分布速度和程度及消除特点，总结归纳暴露特征，从而间接表征甘草苷在大鼠体内的动态变化；以甘草苷和甘草素为待测物分别评价其跨膜转运能力、探究跨膜转运机制等，为甘草苷的进一步研究开发提供参考数据。

1 材料

1.1 药品与试剂

甘草苷（批号 20121211，质量分数为 98.23%）、甘草素（批号 20120401，质量分数为 100%），吉林省中医药科学院；柚皮素（批号 071100023，质量分数为 99.2%），河南天方药业有限公司；羧甲基纤维素钠（分析纯）、N-甲基-吡咯烷酮（分析纯）、甲酸（色谱纯）、甲酸铵（分析纯），天津市光复精细化工研究所；无水乙醇（分析纯），天津市化学试剂供销公司；甲醇（色谱纯）、冰乙酸（色谱纯），天津康科德科技有限公司； β -葡萄糖醛酸酶（Type H-2 From *Helix Pomatia*，批号 011M7405），SIGMA-ALDRICH 公司；磷酸二氢铵（分析纯），天津市化学试剂三厂；肝素钠注射液（批号 20111006），天津市生物化学制药厂；DMEM 培养基（批号 NYM1045），美国 Hyclone 公司，使用前

4 ℃ 保存; 胎牛血清 (批号 1227693), 美国 Gibco 公司, 使用前 -25 ℃ 保存; Trypsin-EDTA (批号 1155732), 美国 Gibco 公司, 使用前 4 ℃ 保存; 超纯水, 实验室自制。

1.2 实验动物

SPF 级健康 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 7~10 周龄, 体质量 200~300 g。北京市维通利华实验动物科技有限公司提供, 生产单位许可证编号: SCXK (京) 2012-0001, 动物质量合格证编号: No.11400700015112、No.11400700018465。本研究的动物使用方案已经获得天津市新药安全评价研究中心 IACUC 批准, IACUC 号为 2013071901。

1.3 仪器

液相色谱系统 (配备 LC-20AD 型输液泵、DGU-20A3 型脱气机、CTO-20A 型柱温箱、SIL-20A 型自动进样器、CBM-20A 系统控制), 日本 Shimadzu 公司; Diamonsil[®]C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), Dikma 科技公司; 质谱系统 (配备 API 4000 Q-TRAP 质谱仪, ESI (电喷雾离子化) 离子化源和 Analyst 1.5.2 分析数据处理系统工作站), 美国 Applied Biosystems 公司; 17R 台式高速冷冻离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; Turbo Vap LV 型样品浓缩仪, 美国 Caliper 公司; 700E 型全自动均质器, 美国 TOMTEC 公司; BM-40 型纯水制备系统, 北京中盛茂源科技发展有限公司; Eppendorf 手动单道加样器, 德国 Eppendorf 公司; ZHWY-110X50 型恒温水浴震荡仪, 上海智城分析仪器制造有限公司; IMS-40 全自动雪花制冰机制冰机, 常熟市雪科电器有限公司; Olympus-CKX41 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司; Millcell ERS-2 跨上皮电阻仪, 美国 Millipore 公司; 12 孔聚碳酸酯膜转运 (Transwell[®]), 美国 Corning 公司; 单人超净工作台及生物安全柜, 力康生物医疗有限公司。

2 方法

2.1 LC-MS/MS 条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil[®]C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 40 ℃; 流动相为甲醇 (A) -0.5 mmol/L 甲酸铵溶液 (含 0.2% 甲酸和 10% 甲醇, B) (52.5:47.5); 体积流量 0.6 mL/min; 进样体积为 3 μL; 运行时间为 10 min (5~9.8 min 切换进入质谱)。

2.1.2 质谱条件 ESI 电喷雾离子源, 离子喷雾电

压 -3000 V; 温度 500 ℃; 喷雾气 344.74 kPa (50 psi); 加热气 551.60 kPa (80 psi); 卷帘气 68.95 kPa (10 psi); 碰撞气 55.16 kPa (8 psi); 负离子方式检测, 扫描模式为多反应监测 (MRM); 甘草素碰撞能量为 -40 V, 内标物柚皮素碰撞能量为 -25 V; 甘草素 m/z 为 255.0~119.0; 内标物柚皮素 m/z 为 271.0~151.0。

2.2 吸收动力学

2.2.1 给药溶液的配制 单次 ig 给药: 准确称量甘草苷 120、240、480 mg, 在乳钵中研磨状态下缓缓加入 0.5% 羧甲基纤维素钠 20 mL, 分别制成 6、12、24 mg/mL 的药液。iv 给药: 准确称量甘草苷 150 mg, 在乳钵中研磨状态下缓缓加入 2 mL *N*-甲基吡咯烷酮, 再加 1 mL 无水乙醇, 完全溶解后, 加入 7 mL 生理盐水, 混匀, 制成 15 mg/mL 的药液。

2.2.2 动物给药 单次 ig 给药: 健康 Wistar 大鼠 18 只, 体质量 (245±25) g, 雌雄各半, 给药前禁食 16 h, 实验期间自由进食与饮水。按 30、60、120 mg/kg 的剂量单次 ig 给药, 给药容积为 5 mL/kg, 每个剂量组 6 只。iv 给药: 健康 Wistar 大鼠 6 只, 雌雄各半, 体质量 (272±40) g, 给药前不禁食, 试验期间自由进食与饮水。按 30 mg/kg 的剂量经尾 iv, 给药容积为 2 mL/kg。

2.2.3 血浆样品的采集 单次 ig 给药: 单次 ig 给药后 0.167、0.5、1、2、3、4、6、9、12、17、24、30 h, 分别自眼眶后静脉丛采血 200 μL, 肝素抗凝, 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 10 min, 分离血浆, 分装于 EP 试管中, -80 ℃ 冷冻保存。iv 给药: iv 给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、9、12、17、24 和 30 h, 分别自眼眶后静脉丛采血 200 μL, 肝素抗凝, 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 10 min, 分离血浆, 分装于 EP 试管中, -80 ℃ 冷冻保存。

2.2.4 血浆样品处理与分析 精密吸取 50 μL 大鼠给药后的血浆样品, 置于已加入 10 μL 乙酸工作液 (0.56 mol/L) 的玻璃管中, 轻摇混匀, 加入 25 μL β-葡萄糖醛酸酶溶液 (100 U), 涡旋 30 s 混匀, 置于 37 ℃ 恒温水浴 1 h; 从水浴中取出后, 加入内标柚皮素溶液 (2 μg/mL, 甲醇配制) 50 μL, 涡旋 30 s 混匀, 再加入 2.5 mL 乙酸乙酯, 涡旋 2 min, 3000 r/min 离心 10 min (4 ℃); 取上清液 2 mL, 40 ℃ 下氮气吹干, 用 100 μL 50% 甲醇水溶液复溶, 12 000 r/min 离心 5 min (4 ℃), 上清进样 3 μL, 进行 LC-MS/MS 分析。

2.2.5 药动学参数计算 采用 WinNonlin 6.3 软件的非房室模型统计矩法计算药动学参数, 其中血药浓度-时间曲线下面积 (AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$) 采用梯形法计算, 消除半衰期 ($t_{1/2}$) 采用 Best Fit 法计算, 5 min 时药物浓度 (C_{5min})、峰浓度 (C_{max})、达峰时间 (T_{max}) 采用实测值。

2.3 组织分布研究

组织分布实验采用 ig 给药方式 (与药效学实验一致), 研究甘草苷的分布特征。

2.3.1 给药溶液的配制 精密称取甘草苷 300 mg, 加入 0.5% 羧甲基纤维素钠 25 mL 研匀至混悬, 临用现配, 即得质量浓度为 12 mg/mL 的 ig 药液。

2.3.2 动物给药 健康 Wistar 大鼠 18 只, 雌雄各半, 体质量 180~238 g。进行 3 个时间点 (2、6、17 h) 的组织分布实验, 每个时间点 6 只, 雌雄各半。给药前大鼠禁食 16 h, 给药后 4 h 进食, 实验期间自由饮水。按 60 mg/kg 的剂量 ig 给药, 给药容积为 5 mL/kg。

2.3.3 生物样品的采集 分别于给药后 2、6、17 h 乙醚吸入麻醉手术剪断颈动脉取血至肝素化试管中, 于 10 min 内置于离心机中离心 (4 °C、3000 r/min, 离心 5 min), 分装于 EP 试管中, -80 °C 冷冻保存; 取血后乙醚过量麻醉脱颈处死动物, 分别剖取脑、肌肉、脂肪、睾丸、卵巢、子宫、肝、脾、肾、肺、心、胃、小肠, 纯水冲洗, 滤纸吸干水分, 称定质量, 剪刀剪碎, 放入 EP 试管中。将 EP 试管置于全自动匀浆机中, 按照 5 mL/g 对应体积加入纯水进行匀浆, 将各组织匀浆置于 -80 °C 冷冻保存, 待测。

2.3.4 组织样品处理与分析 除脏器组织样品以大鼠各组织匀浆代替血浆外, 其他实验操作同“2.2.4”项。上述处理过程用于组织样品中总甘草素浓度的测定。应用于游离甘草素的浓度测定时, 不加入乙酸工作液和 β -葡萄糖醛酸酶进行孵育, 其余处理过程与总甘草素的浓度测定一致。

2.3.5 数据处理

(1) 组织含量计算: 由 LC-MS/MS 法测定并经 Analyst1.5.2 数据处理软件计算获得的各组织样品的质量浓度单位为 ng/mL, 换算成各组织含量 (ng/g) 需乘以匀浆体积与各组织质量的比值 (5 mL/g), 具体公式如下。

组织含量 = 组织匀浆测定浓度 $\times$ 5

(2) 组织暴露量计算: 采用梯形法计算总甘草

素和游离甘草素在各组织中的 AUC_{0-17h} , 以考察药物在各组织中的分布程度。

2.4 跨膜转运机制研究

2.4.1 无血清细胞培养基-多药耐药蛋白 1 (MDCK-MDR1) 细胞模型的建立 Madin-Darby canine kidney (MDCK)-MDR1 细胞是将人类的 MDR1 基因转染到 MDCK 细胞上产生的^[14-15], 多药耐药蛋白 (MDR1) 也称为 P-糖蛋白 (P-gp)^[16]。MDCK-MDR1 细胞广泛应用于 P-gp 底物和抑制剂的体外快速筛选研究。该细胞株由日本富士生物医药研究所友情赠送。细胞培养方法如下^[17]: MDCK-mock 和 MDCK-MDR1 细胞于常规培养皿内, 以高糖 DMEM 培养液 (含 10% FBS) 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养, 用含 0.25% EDTA 的胰酶消化, 用新鲜培养液调细胞密度至 2×10^5 /mL 接种于 Transwell 聚碳酸酯膜 12 孔板中 (膜面积为 1.13 cm²)。在顶端侧 (AP) 每孔加 0.5 mL 细胞悬液, 基底侧 (BL) 每孔加 1.5 mL 新鲜培养基, 每天换液, 连续培养 6 d, 得到完全分化的细胞单层。

本实验所用 MDCK-mock 和 MDCK-MDR1 细胞均为 25~30 代。

2.4.2 MDCK-mock 和 MDCK-MDR1 单层细胞电阻 (TEER) 测定 MDCK-mock 和 MDCK-MDR1 细胞接种于 Transwell 膜上培养 6 d; 将 Millcell ERS-2 电阻仪的电极放入含有 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 的烧杯中, 预平衡 20 min; 移去培养板中的培养液, AP 侧每孔加预热的 HBSS 0.5 mL, BL 侧每孔加预热的 HBSS 1.5 mL, 37 °C 平衡 20 min, 洗去细胞表面的杂质; 移走 HBSS, 重新加入预热的 HBSS, 测定跨膜电阻值; 用 1 个空白载体重复上述步骤以获得空白值。

2.4.3 细胞单层的双向转运实验^[17]

(1) AP→BL 方向的转运试验: 吸去 Transwell 小室 AP 和 BL 端的培养基, 加入 37 °C 预热的 HBSS 溶液, 37 °C 平衡 20 min; 吸去 HBSS, 在 AP 端加入 0.5 mL 预热的含有甘草苷/甘草素的 HBSS 溶液, BL 端加入 1.5 mL 空白 HBSS 溶液; 37 °C 恒温振荡器培养 1.0 h, 振荡器转速为 80 r/min; 吸取 BL 端的转运液, 测定转运液中的甘草苷/甘草素浓度。

(2) BL→AP 方向的转运试验: 吸去 Transwell 小室 AP 和 BL 端的培养基, 加入 37 °C 预热的 HBSS 溶液, 37 °C 平衡 20 min; 吸去 HBSS, 在 AP 端加

入 0.5 mL 空白 HBSS 溶液, BL 端加入 1.5 mL 预热的含有甘草苷/甘草素的 HBSS 溶液; 37 °C 恒温振荡器培养 1.0 h, 振荡器转速为 80 r/min; 吸取 AP 端的转运液, 测定转运液中的甘草苷/甘草素浓度。

2.4.4 数据的处理与分析

(1) TEER 的计算: 采用 TEER 值表征细胞间紧密连接的完整性, 并按照公式计算。

$$TEER = (\text{测定电阻值} - \text{空白值}) \times \text{单层表面积}$$

(2) 表观渗透系数 (P_{app}) 的计算: 采用 P_{app} 值的大小表征药物透过单层细胞的能力和药物吸收的速度以及程度。研究表明药物在 Caco-2 细胞模型的 P_{app} 与药物人体口服吸收程度相关性良好, 且与药物在 MDCK 细胞和 Caco-2 细胞中的渗透性有良好相关性。

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/A \times 1/C_0$$

dQ 为药物在 dt 时间内的透过量, A 为膜的表面积, C_0 为初始浓度。

(3) 外排率 (R_E) 的计算 R_E 值的大小反映药物外排的能力, 通过 R_E 值可以推测药物是否为 P-糖蛋白的底物。当待测药物的 $R_E \geq 2$ 时, 表明药物可能为肠道外排转运体的底物, 当 $R_E \leq 0.5$ 时, 表示该药物可能为肠道摄入型转运蛋白的底物, 需要做进一步研究。

$$R_E = P_{app}(BL - AP)/P_{app}(AP - BL)$$

3 结果

3.1 吸收动力学

3.1.1 大鼠单次 ig 给药的血浆总甘草素浓度-时间曲线 大鼠 ig 给药后, 3 个剂量组动物不同时间平均血浆总甘草素浓度-时间曲线比较见图 1。

3.1.2 大鼠 iv 给药的血浆总甘草素浓度-时间数据在 30 mg/kg 剂量下大鼠 ig 与 iv 给予甘草苷后, 不同时间相应的平均血浆总甘草素浓度-时间曲线比较见图 2。

3.1.3 大鼠单次 ig、iv 后血浆总甘草素药动学参数比较 大鼠单次 ig、iv 后血浆总甘草素药动学参数见表 1。在大鼠单次 ig 甘草苷后, 在 30~120 mg/kg 剂量内, 与体内暴露量密切相关的药动学参数 $AUC_{0-30 h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 随剂量增加而增加, 增加的比例小于剂量比; 与分布、消除过程密切相关的 $t_{1/2}$ 、清除率 (CL)、分布表观容积 (V_d) 等参数与给药剂量不相关, 不随给药剂量增加而呈明显变化。上述情况均表明大鼠单次 ig 甘草苷后, 在 30~120 mg/kg 剂量内不呈线性动力学特征。根据大鼠

ig 给予甘草苷后总甘草素的 $AUC_{0-30 h}$ 均值与同剂量下 iv 给予甘草苷后总甘草素的 $AUC_{0-30 h}$ 均值进行计算, 大鼠 ig 甘草苷后的绝对生物利用度为 80.6%。

3.2 组织分布研究

3.2.1 甘草苷的组织分布特点 大鼠 ig 60 mg/kg 甘草苷后在 2、6、17 h 这 3 个时间点平均总甘草素和游离甘草素在各组织/血浆的分布见表 2。对各组织/血浆中总甘草素和游离甘草素含量进行分析比较, 结果表明: (1) 大鼠 ig 给予甘草苷后, 血浆中 2 h 和 17 h 时间点检测不到游离甘草素, 6 h 时游离甘草素也非常少, 而水解后的总甘草素浓度较高, 表明大鼠血浆主要以甘草素的 II 相结合产物形式存在。(2) 大鼠 ig 给予甘草苷后, 各组织中甘草素分

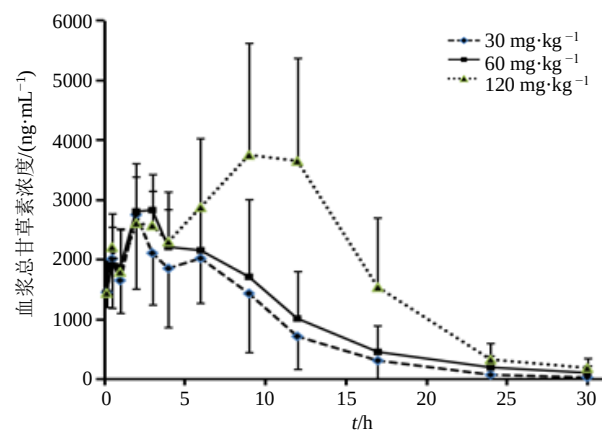


图 1 大鼠 ig 给予 3 剂量甘草苷后的平均血浆总甘草素浓度-时间曲线 ($n = 6$)

Fig. 1 Fig. 1 Comparison of average total aglycone liquiritigenin concentration-time curve in rats plasma after given three doses of liquiritin by gavage ($n = 6$)

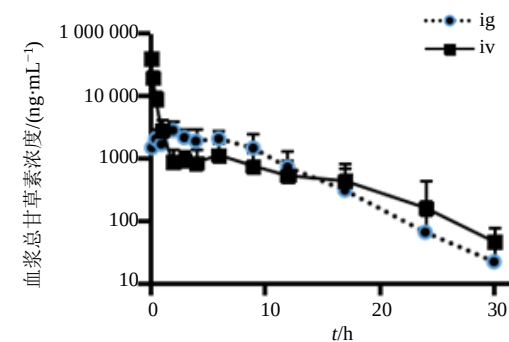


图 2 大鼠 ig 与 iv 给予 30 mg/kg 甘草苷后平均血浆总甘草素浓度-时间曲线比较 (半对数坐标, $n = 6$)

Fig. 2 Comparison of mean total aglycone liquiritigenin concentration-time curve after gavage and intravenous administration of 30 mg/kg of liquiritin in rats plasma (semi-logarithmic coordinates, $n = 6$)

表 1 大鼠单次 ig、iv 后总甘草素药动学参数比较 (n = 6)

Table 1 Comparison of pharmacokinetic parameters of total aglycone liquiritigenin after single gavage and single intravenous injection in rats (n = 6)

药动学参数	单位	ig			iv
		30 mg·kg ⁻¹	60 mg·kg ⁻¹	120 mg·kg ⁻¹	30 mg·kg ⁻¹
C _{5min}	ng·mL ⁻¹	/	/	/	39 433 ± 8 202
C _{max}	ng·mL ⁻¹	2870 ± 1166	3060 ± 721	4585 ± 2263	/
T _{max}	h	2.08 ± 1.11	3.83 ± 2.64	9.67 ± 3.14	/
AUC _{0-30 h}	h·ng·mL ⁻¹	24 482 ± 12 764	30 173 ± 14 220	58 021 ± 27 611	30 391 ± 12 800
AUC _{0-∞}	h·ng·mL ⁻¹	24 632 ± 12 765	31 107 ± 15 199	59 174 ± 28 517	30 750 ± 13 068
MRT	h	6.53 ± 1.32	7.31 ± 1.90	9.80 ± 1.33	4.31 ± 2.01
V _d	L·kg ⁻¹	11.6 ± 13.4	24.4 ± 21.0	12.2 ± 4.16	8.25 ± 4.81
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	1.520 ± 0.720	2.270 ± 0.903	2.490 ± 1.160	1.160 ± 0.534
t _{1/2}	h	4.65 ± 5.47	6.77 ± 3.62	3.69 ± 1.20	4.98 ± 1.55

表 2 大鼠 ig 甘草苷后各组织中总甘草素和游离甘草素分布比较 (n = 6)

Table 2 Comparison of total aglycone liquiritigenin and free liquiritigenin distribution in each tissue after gavage of liquiritin in rats (n = 6)

组织/血浆	组织中甘草素含量/(组织 ng·g ⁻¹ , 血浆 ng·mL ⁻¹)					
	2 h		6 h		17 h	
	总甘草素	游离甘草素	总甘草素	游离甘草素	总甘草素	游离甘草素
脑	0	0	0	0	0	0
肌肉	59.20 ± 8.88	12.80 ± 20.30	125.00 ± 33.70	61.90 ± 29.00	49.50 ± 60.50	0
肺	326.0 ± 132.0	153.0 ± 77.8	1046.0 ± 482.0	595.0 ± 255.0	43.7 ± 29.1	22.8 ± 28.4
脂肪	120.0 ± 72.9	35.9 ± 53.0	427.0 ± 200.0	204.0 ± 127.0	0	0
脾	90.3 ± 21.1	79.9 ± 22.4	226.0 ± 123.0	206.0 ± 112.0	21.5 ± 17.0	9.49 ± 14.7
睾丸*	42.3 ± 10.6	11.5 ± 19.9	116.0 ± 29.6	28.5 ± 30.1	0	0
子宫*	260.0 ± 118.0	227.0 ± 118.0	457.0 ± 81.8	454.0 ± 72.4	0	30.9 ± 28.1
卵巢*	143.0 ± 47.3	94.2 ± 36.8	386.0 ± 100.0	334.0 ± 89.7	129.0 ± 87.9	147.0 ± 125.0
肾	933 ± 678	553 ± 287	1598 ± 710	732 ± 398	237 ± 142	77.5 ± 116
心	103.0 ± 34.0	11.3 ± 17.6	230.0 ± 61.3	98.3 ± 56.7	88.2 ± 44.1	63.3 ± 44.8
肝	1181 ± 792	1135 ± 775	2823 ± 761	2618 ± 738	94.7 ± 76.6	54.5 ± 60.7
胃	754 ± 254	742 ± 187	577 ± 440	466 ± 427	204 ± 214	174 ± 180
肠	1378 ± 1315	711 ± 291	6992 ± 2551	5890 ± 2228	454 ± 257	261 ± 128
血浆	1446 ± 572	0	2903 ± 1058	28.8 ± 18.4	142.0 ± 70.5	0

*n = 3

布的存在形式和组织暴露量不同, 大鼠血浆主要以甘草素的 II 相结合产物形式存在; 脾、子宫、卵巢、肝、胃和肠组织中直接测得游离甘草素的含量与组织样品经酶水解后测得总甘草素含量相似, 提示上述组织中游离甘草素为主要暴露物质; 其余组织结合型甘草素与游离甘草素共存。ig 给药后 6 h 药效靶器官心组织中总甘草素的含量较游离甘草素高 1 倍, 至给药后 17 h 总甘草素与游离甘草素含量相似,

且游离甘草素含量下降缓慢, 表明结合型甘草素在心组织中可能逐渐全部转化为游离甘草素。(3) 除胃中甘草素的含量在给予甘草苷 2 h 后最高外, 其余组织均在 6 h 达到分布峰值, 之后随着时间的延长呈迅速下降趋势。大鼠 ig 给药 17 h, 即约 3 个半衰期后, 大部分组织中已检测不到甘草素或含量已降至分布峰值的 1/10~1/20, 表明不会产生组织蓄积趋势。

3.2.2 甘草苷的组织分布程度 按“2.3.5”项下方法计算的各组织/血浆中总甘草素和游离甘草素的分布程度 AUC_{0-17h} 和游离甘草素占总甘草素的比例 (AUC_F/AUC_T) 结果见表 3。

表 3 大鼠 ig 给予甘草苷后各组织和血浆中总甘草素和游离甘草素的 AUC_{0-17h} 比较

Table 3 Comparison of AUC_{0-17h} of total aglycone liquiritigenin and free liquiritigenin in tissues and plasma after gavage of liquiritin in rats

AUC _{0-17 h}			
组织/血浆	(组织 ng·h·g ⁻¹ , 血浆 ng·h·mL ⁻¹)		AUC _F /AUC _T
	总甘草素	游离甘草素	
脑	0	0	/
肌肉	1358	464	0.342
肺	8895	5065	0.569
脂肪	3504	1621	0.463
脾	2042	1794	0.878
睾丸*	974	214	0.219
子宫*	4081	3972	0.973
卵巢*	3964	3551	0.896
肾	15 622	7297	0.467
心	2470	1086	0.440
肝	24 641	22 774	0.924
胃	7336	6308	0.860
肠	58 376	47 399	0.812
血浆	25 709	998	0.038 8

AUC_F 为游离甘草素的 AUC_{0-17h} ; AUC_T 为总甘草素的 AUC_{0-17h} ;

* $n = 3$

AUC_F is the value of AUC_{0-17h} for free liquiritigenin; AUC_T is the value of AUC_{0-17h} for total aglycone liquiritigenin; * $n = 3$

根据各组织中总甘草素和游离甘草素的组织暴露量 AUC_{0-17h} 结果可知, 总甘草素分布程度肠>血浆>肝>肾>肺>胃>子宫>卵巢>脂肪>心>脾>肌肉>睾丸; 游离甘草素分布程度: 肠>肝>肾>胃>肺>子宫>卵巢>脾>脂肪>心>血浆>肌肉>睾丸。总甘草素在肠、肝、肾、胃、肺分布相对较高; 在雌性生殖器官卵巢、子宫中的分布相对高于雄性生殖器官睾丸; 在心、脾、脂肪、肌肉中分布相对较少; 无论结合型的还是游离型甘草素均不能到达脑组织, 因此脑中检测不到甘草素。

3.2.3 总甘草素的组织含量/血浆浓度比 各时间点组织样品中总甘草素平均含量与同时点血浆的平均浓度比值见表 4。

肺、肝的总甘草素组织/血浆比随时间变化基本

表 4 组织样品中总甘草素平均含量与同时时间点的平均血浆浓度比值 ($n = 6$)

Table 4 Ratio of average total aglycone liquiritigenin content in tissue samples to average plasma concentration at same time point ($n = 6$)

组织/血浆	组织含量与血浆浓度比		
	2 h	6 h	17 h
脑	0	0	0
肌肉	0.041	0.043	0.348
肺	0.225	0.360	0.308
脂肪	0.083	0.147	0
脾	0.062	0.078	0.151
睾丸*	0.029	0.040	0
子宫*	0.180	0.158	0
卵巢*	0.099	0.133	0.908
肾	0.645	0.551	1.670
心	0.071	0.079	0.621
肝	0.816	0.972	0.667
胃	0.521	0.199	1.440
肠	0.950	2.410	3.190
血浆	1.000	1.000	1.000

* $n = 3$

维持一致; 肌肉、脾、卵巢、肾、心、胃和肠的总甘草素组织/血浆比随时间推进迅速增加, 结果表明, 除肺和肝外, 总甘草素在其余组织的消除过程和血浆的消除过程不一致。

3.3 跨膜转运机制研究

3.3.1 MDCK-MDR1 细胞模型的验证 MDCK-mock 细胞单层的 TEER 值到第 6 天达到 $(245 \pm 13) \Omega \cdot cm^2 > 150 \Omega \cdot cm^2$, MDCK-MDR1 细胞单层的 TEER 值到第 6 天达到 $(242 \pm 10) \Omega \cdot cm^2 > 150 \Omega \cdot cm^2$, 表明 MDCK-mock 和 MDCK-MDR1 细胞单层的致密性与完整性均良好, 符合实验要求。

3.3.2 甘草苷和甘草素在 MDCK-MDR1 细胞的双向转运 MDCK-MDR1 细胞模型, 甘草苷 $5 \mu mol/L$ 给药, 甘草素 $10 \mu mol/L$ 给药, 得到的双向转运 P_{app} 和 R_E 值, 见表 5。

本研究中甘草苷在 MDCK-MDR1 细胞模型摄入方向的 P_{app} 约为 $2 \times 10^{-6} cm/s$, 说明甘草苷跨膜转运能力中等; 甘草素的 P_{app} 约为 $17.0 \times 10^{-6} cm/s$, 说明甘草素跨膜转运能力良好。甘草苷和甘草素在 MDCK-MDR1 细胞模型中 $R_E < 2$, 提示甘草苷和甘草素主要以被动扩散形式跨膜转运, 均不存在 P-糖蛋白外排转运蛋白介导的跨膜转运机制。

表 5 甘草苷和甘草素在 MDCK-MDR1 细胞模型的 P_{app} 值和 R_E

Table 5 P_{app} value and efflux rate R_E of liquiritin and liquiritigenin in MDCK-MDR1 cell model

药物	$P_{app} (\times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$		R_E
	AP→BL	BL→AP	
甘草苷	1.98 ± 0.58	1.32 ± 0.47	0.67
甘草素	17.0 ± 1.63	10.4 ± 0.95	0.61

4 讨论

本研究根据文献报道的黄酮类化合物吸收和代谢特点^[18], 针对性地对大鼠体内甘草苷、总甘草素和游离甘草素暴露量进行预实验研究, 研究结果表明甘草苷在血浆中的主要存在形式为甘草素的 II 相结合产物, 因此本实验采取 β -葡萄糖醛酸酶水解总苷的方式定量分析总甘草素和游离甘草在体内吸收分布中的暴露特征从而间接表征甘草苷在体内的动态变化。另外, 采用 MDCK-MDR1 细胞模型研究甘草苷和甘草素各自的跨膜转运能力和转运方式, 为进一步阐明药物吸收机制提供了依据。

本实验中甘草苷在大鼠体内的吸收不呈线性动力学特征, 这需要进一步阐明其饱和机制, 再根据非线性动力学的规律, 指导临床试验的用药方案和剂量调整。药物不呈现线性动力学特征的主要原因是体内的某些系统达到饱和, 如酶和转运体、血浆蛋白结合的饱和、肾小管重吸收的饱和等^[19]。在当前甘草苷临床前药动学研究中, 大鼠的药动学参数 AUC_{0-t} 、 C_{max} 随剂量增加而增加, 但增加的比例均小于剂量比, 说明体内可能存在某种饱和机制, 但机制的阐明还需进一步的试验, 这种非比例化剂量反应关系给预测人体安全有效的剂量范围带来复杂性^[19]。此外, 本实验发现血浆中总甘草素的药-时曲线存在双峰现象, 进一步研究了甘草苷 (60 mg/kg) 单次 ig 给药后胆汁排泄情况, 结果发现胆汁中总甘草素 0~48 h 累积排泄分数为 (32.1 ± 10.7) %, 提示 ig 给药后总甘草素存在肝肠循环现象, 可能是药时曲线出现双峰的原因。

在组织分布中, 相对于其他组织, 心脏中的游离甘草素浓度在 6 h 和 17 h 差别不大, 而其他组织 17 h 时的游离甘草素的浓度比 6 h 显著降低, 推测心脏组织中的甘草素消除较慢, 从现有数据分析这一结果可能会导致两方面作用, 一是延长药效作用, 二是可能会引起心脏组织的蓄积。前期预实验

采集给药后 24 h 组织样本并进行测定, 结果表明大部分组织已检测不到甘草素, 其中有一半的大鼠心脏组织中检测不到甘草素, 排除个体差异的因素, 这一结果表明甘草素在体内 24 h 即可大部分消除, 不会引起心脏组织的蓄积。因此, 心脏组织比较其他组织消除较慢这一现象可能会使药物作用延长, 这一点应该是支持其心血管系统临床应用的依据。甘草苷拟作为抗心肌缺血类 I 类新药进行开发研究, 理论上, 心脏是甘草苷 (甘草素) 发挥其抗心肌缺血作用的靶器官之一, 但绝不是唯一发挥药效作用的关键因素, 单纯地从药物在心脏组织的分布量来衡量其心血管系统作用是不全面的, 其更全面深刻的作用机制还需进行进一步的试验研究。

药物吸收、分布、排泄仅是发生空间位置上的迁移, 统称为转运^[20]。药物的体内动态就是其在体内一系列跨膜转运的综合效果。转运体的初步研究表明甘草苷和甘草素主要以被动扩散形式跨膜转运, 均不存在 P-gp 外排转运蛋白介导的跨膜转运机制。因此, 不需关注基于 P-gp 的药物-药物相互作用, 而且不呈线性动力学的原因也可基本排除这一因素。大多数药物对于机体来说是外源性物质, 且具有一定的脂溶性, 推测甘草苷和甘草素的跨膜转运机制主要是被动扩散中的溶解扩散^[21-22], 是否是通过膜上含水孔道转运的限制扩散还需更进一步的研究。药物的跨膜转运是相当复杂的过程, 药物的跨膜转运不仅直接参与药物的吸收、分布、排泄等药动学行为, 同时与分布于靶器官的有效药物浓度密切相关, 因此明确药物的跨膜转运能力、机制以及对药物体内动力学的调控作用^[23], 对于新药研发和评价意义重大。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 80-81.
- [2] Asl M N, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(6): 709-724.
- [3] 任玲. 甘草有效成分的药理活性研究 [J]. *生物技术世界*, 2016, 13(5): 227.
- [4] 乔湜, 李清艳, 孙瑞芳, 等. 复方甘草口服溶液中 7 种成分的 UPLC-MS/MS 分段离子切换法测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 2014, 45(5): 470-473.
- [5] 黄雨婷, 迟宗良, 王姝梅, 等. 甘草中的黄酮类成分及其抗肿瘤活性研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(13): 1532-1537.

- [6] 李桦, 庄笑梅. 药代动力学人体预测及其在新药研发中的应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 611-615.
- [7] Kitagawa I, Chen W Z, Taniyama T, *et al.* Quantitative determination of constituents in various licorice roots by means of high performance liquid chromatography [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1998, 118(11): 519-528.
- [8] Zuo F, Zhou Z M, Yan M Z, *et al.* Metabolism of constituents in Huangqin-tang, a prescription in traditional Chinese medicine, by human intestinal flora [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(5): 558-563.
- [9] Dong S Q, Fan H R, Li Q S, *et al.* LC-MS/MS method for quantification of liquiritigenin in rat plasma: Application to pharmacokinetic study of liquiritin [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(1): 53-60.
- [10] 董世奇, 樊慧蓉, 李全胜, 等. 甘草苷在大鼠体内的代谢途径研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2499-2505.
- [11] 李志华, 颜苗, 张毕奎, 等. 基于药动学的甘草配伍减毒机制研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3611-3616.
- [12] 覃一枫, 魏巍, 杭晓敏, 等. 基于 GC-MS 技术的甘草总黄酮对伊立替康致肠炎小鼠的血浆代谢组学的影响研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5836-5842.
- [13] 何丹, 颜苗, 李焕德, 等. 甘草提取物及其主要成分对 Caco-2 细胞膜上 P-gp 功能和表达的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(10): 751-755.
- [14] 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*, 1988, 85(12): 4486-4490.
- [15] 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.
- [16] 胡亚, 刘运锋, 朱卫丰, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2876-2883.
- [17] 慈小燕, 夏媛媛, 曾勇, 等. 应用 MDCK-MDR1 细胞模型研究 3-乙酰基-11-羰基-b-乙酰乳香酸经血脑屏障的通透性 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(10): 1125-1129.
- [18] 周乐, 赵晓莉, 狄留庆, 等. 黄酮类化合物口服吸收与代谢特征及其规律分析 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2313-2320.
- [19] 张志伟, 李正, 庄笑梅. 小分子药物非线性药代动力学特征、机制与预测评估研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(11): 805-812.
- [20] 伊秀林, 司端运, 刘昌孝. 应用药物转运体的药代动力学评价 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 341-346.
- [21] Dobson P D, Kell D B. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: An exception or the rule? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(3): 205-220.
- [22] Sugano K, Kansy M, Artursson P, *et al.* Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(8): 597-614.
- [23] 慈小燕, 崔涛, 武卫党, 等. 药物的跨膜转运机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(6): 973-979.

[责任编辑 王文倩]