

## 中药多糖对葛根素口服生物利用度及其跨膜转运机制的影响

何佳莹<sup>1</sup>, 袁芳英<sup>1</sup>, 刘 湾<sup>1</sup>, 程 勳<sup>1,2</sup>, 刘 美<sup>4</sup>, 金 一<sup>1</sup>, 奉建芳<sup>1,3</sup>, 涂亮星<sup>1\*</sup>

1. 江西中医药大学 中药固体制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330000

2. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006

3. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

4. 四川省食品检验研究院, 四川 成都 611731

**摘要:** 目的 通过研究 6 种中药多糖(人参多糖、白芨多糖、茶多糖、大豆多糖、枸杞多糖、葛根多糖)对葛根素在大鼠体内的药动学变化, 探讨中药多糖对葛根素口服吸收的影响, 并采用犬肾 MDCK 细胞单层模型研究了中药多糖的促口服吸收机制。方法 大鼠 ig 葛根素及不同中药多糖-葛根素混悬液后, 于不同时间点采集血样, 经适当处理后, 采用高效液相色谱(HPLC)测定血浆中葛根素的质量浓度, 并以此计算和比较药动学参数。采用 MDCK 细胞单层模型考察中药多糖借助葡萄糖转运提高葛根素跨膜吸收的能力。结果 与中药多糖联合给药后, 葛根素的主要药动学参数有不同程度的变化, 主要呈现出促进葛根素口服吸收的趋势, 其中以人参多糖的促吸收效果最为卓越, 人参多糖可将葛根素的达峰浓度( $C_{max}$ )及曲线下面积( $AUC_{0-\infty}$ )分别提高 1.77 及 3.14 倍。CCK-8 实验表明药物质量浓度为 5~1000  $\mu\text{g/mL}$ 、人参多糖质量浓度为 20~10 000  $\mu\text{g/mL}$  时, 药物及多糖无明显细胞毒性。在 50~1000  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度内, 葛根素的表观渗透系数(apparent permeability coefficient,  $P_{app}$ )无明显变化; 人参多糖可将葛根素的  $P_{app}$  显著升高( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 加入葡萄糖转运抑制剂(根皮素、根皮苷)后, 葛根素组的  $P_{app}$  无明显变化, 而人参多糖组的  $P_{app}$  显著下降( $P<0.001$ )。结论 中药多糖会通过葡萄糖转运途径提高葛根素的口服吸收, 提示利用中药多糖作为递药系统修饰剂, 或许成为一种有潜力的提高难吸收药物口服吸收的技术手段。

**关键词:** 人参多糖; 白芨多糖; 茶多糖; 大豆多糖; 枸杞多糖; 葛根多糖; 葛根素; 药动学; MDCK 细胞单层; 转运机制; 葡萄糖转运途径

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)15-4738-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.017

## Effect of Chinese medicine polysaccharide on pharmacokinetic behaviors and transmembrane mechanisms of puerarin

HE Jia-ying<sup>1</sup>, YUAN Fang-ying<sup>1</sup>, LIU Wan<sup>1</sup>, CHENG Meng<sup>1,2</sup>, LIU Mei<sup>4</sup>, JIN Yi<sup>1</sup>, FENG Jian-fang<sup>1,3</sup>, TU Liang-xing<sup>1</sup>

1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000, China

2. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

3. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

4. Sichuan Institute of Food Inspection, Chengdu 611731, China

**Abstract: Objective** To explore the effect of traditional Chinese medicine polysaccharide on oral absorption of puerarin by studying the effect of six kinds of traditional Chinese medicine polysaccharide (ginseng polysaccharide, *Bletilla striata* polysaccharide, tea polysaccharide, soybean polysaccharide, *Lycium barbarum* polysaccharide, *Pueraria lobata* polysaccharide) on pharmacokinetic changes of puerarin in rats. And to study the mechanism of promoting oral absorption of traditional Chinese medicine polysaccharides by using canine kidney MDCK cell monolayer model. **Methods** After ig puerarin and different traditional Chinese medicine

收稿日期: 2022-04-14

基金项目: 江西省主要学科科学技术带头人培养计划项目(20212BCJL23060); 江西中医药大学“1050”青年人才工程项目(5142001012); 江西中医药大学博士启动项目(2018BSZR018)

作者简介: 何佳莹, 女, 硕士研究生, 从事新型递药系统研究。E-mail: hejiaying0511@163.com

\*通信作者: 涂亮星, 男, 博士, 副教授, 从事新型递药系统研究。E-mail: tufankie@163.com

polysaccharide-puerarin suspensions, blood samples were collected at different time points. After appropriate treatment, concentration of puerarin in plasma was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), pharmacokinetic parameters were calculated and compared. MDCK cells monolayer model was used to investigate the ability of traditional Chinese medicine polysaccharides to enhance the transmembrane absorption of puerarin through glucose transport. **Results** After co-administration with traditional Chinese medicine polysaccharides, main pharmacokinetic parameters of puerarin were changed to varying degrees, mainly showing a trend of promoting oral absorption of puerarin. Among them, ginseng polysaccharide had the most excellent absorption promoting effect. Peak concentration ( $C_{max}$ ) and area under the curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) were increased by 1.77 and 3.14 times. CCK-8 experiment showed that when the concentration of drug was 5—1000  $\mu\text{g/mL}$  and concentration of ginseng polysaccharide was 20—10 000  $\mu\text{g/mL}$ , drug and polysaccharide had no obvious cytotoxicity. Within the concentration of 50—1000  $\mu\text{g/mL}$ , apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) of puerarin had no significantly changed; Ginseng polysaccharide significantly increased  $P_{app}$  of puerarin ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ); After adding glucose transport inhibitors (phloretin, phlorizin),  $P_{app}$  in puerarin group had no significant changed, while  $P_{app}$  in ginseng polysaccharide group was significantly decreased ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Traditional Chinese medicine polysaccharides can improve the oral absorption of puerarin through the glucose transport pathway, suggesting that the use of traditional Chinese medicine polysaccharides as drug delivery system modifiers may become a potential technical means to improve the oral absorption of refractory drugs.

**Key words:** ginseng polysaccharide; *Bletilla striata* polysaccharide; tea polysaccharide; soybean polysaccharide; *Lycium barbarum* polysaccharide; *Pueraria lobata* polysaccharide; puerarin; pharmacokinetics; MDCK cells monolayer; transport mechanism; glucose transport pathway

多糖也称多聚糖,是 10 个以上单糖通过糖苷键聚合而成的生物大分子,存在于动植物和微生物中。中药多糖是用现代科技方法从中药中提取的有效多糖<sup>[1]</sup>,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、免疫调节<sup>[2]</sup>等生物活性。多糖为天然产物,具有较好的生物相容性<sup>[3-4]</sup>及免疫原性,且多糖分子含有大量的活性基团,可以进行化学修饰或结构改造<sup>[5-7]</sup>。近年来,基于多糖直接构建递药系统<sup>[8]</sup>或者以多糖作为靶向基团提高纳米颗粒递药精准度<sup>[9]</sup>的研究常有报道,中药多糖可作为递药载体递送难溶性药物,增加其生物利用度。同时也有研究证实中药多糖可直接影响其他药物的吸收,如天麻去除多糖后,其有效成分天麻素在体内的含量明显减少,天麻多糖可以提高天麻素生物利用度<sup>[10-11]</sup>;麦冬的多糖含量较高<sup>[12]</sup>,五味子与麦冬合用后五味子的入血成分显著提高;大豆多糖能够增强染料木黄酮的生物利用度。因此中药多糖可以被设计为药物载体应用于新型递药系统中,也可以直接与药物联合给药,提高药物生物利用度<sup>[13]</sup>。目前有部分学者认为中药多糖可能通过抑制 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 外排<sup>[14-17]</sup>、调节肠道菌群<sup>[18-19]</sup>等途径促进药物的口服吸收。考虑到胃肠道中葡萄糖转运途径可高效递送糖类物质,中药多糖是否能借助葡萄糖转运途径提高难溶性中药活性成分的口服吸收目前尚无相关研究。

葛根素是从豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 中提取的一种异黄酮类衍生物,是

中药葛根的主要药效物质,具有抑制动脉硬化、抗心肌缺血、抗心律失常等作用<sup>[20]</sup>。葛根素溶解性较差<sup>[21-22]</sup>,肠道渗透性低,被归为生物药剂学分类系统 (biopharmaceutics classification system, BCS) IV 类药物<sup>[23]</sup>。因此,尽管葛根素具有广泛的药理活性,但其临床应用受到限制,主要以 iv 为主。且由于体内消除半衰期短,故需频繁或大剂量给药,可能导致严重的不良反应,目前如何提高以葛根素为代表的难溶性药物的口服生物利用度是目前药剂研究中的重点方向。

本研究拟使用中药多糖作为修饰剂,将 6 种中药多糖与葛根素联合给药,探索中药多糖对难吸收药物葛根素在大鼠体内口服吸收的影响;并使用犬肾 MDCK 细胞跨膜转运模型来探索葡萄糖转运途径在其促葛根素口服吸收中的作用,验证其是否能够成为一种有潜力的提高难吸收药物口服生物利用度的技术手段,也为中药多糖在递药系统中的应用提供一种新的思路与方法。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只,7~8 周龄,体质量 200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。大鼠饲养于温度 ( $23 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 ( $55 \pm 5$ ) % 的江西中医药大学中药固体制剂制造技术工程研究中心动物房中,实验动物使用许可证号 SYXK (赣) 2018-

0002。动物实验遵循江西中医药大学实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

## 1.2 细胞

MDCK 细胞株由中国科学院干细胞库提供。

## 1.3 药品与试剂

葛根素(质量分数为 98%,批号 20190105)购自南京欣厚生物科技有限公司;葛根素对照品(质量分数为 95.4%,批号 110752-201816)购自中国食品药品检定研究院;人参多糖、茶多糖、白芨多糖、枸杞多糖、大豆多糖(质量分数为 98%,批号分别为 BCSW200928-3、BCSW200927-3、BCSW200805-2、BCSW200814-2、BCSW200901-1)购自西安百川生物科技有限公司;葛根多糖(质量分数为 85%,批号 20200617412)购自武汉泽山成生物医药技术有限公司;枸橼酸(质量分数为 100%,批号 20200204)购自成都华邑药用辅料制造有限责任公司;对羟基苯甲酸(质量分数为 99.5%,批号 H108509)、根皮苷(质量分数为 98%,批号 P139206)、根皮素(质量分数为 98%,批号 P127748)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;CCK-8 试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;DMEM 高糖培养基、非必需氨基酸、0.25%胰酶-0.02% EDTA、PBS 溶液购自北京索莱宝科技有限公司;高氯酸、甲醇、乙醇均为分析纯。

## 1.4 仪器

Transwell 小室(孔径 0.4  $\mu\text{m}$ ,直径 12 mm,底面积 1.12  $\text{cm}^2$ )、培养瓶购自美国 Costar 公司;XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司);高效液相色谱仪(HPLC,日本岛津公司);TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂);KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BSA124S 型分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);H2T-A3000 型电子天平(美国 HZ 公司);细胞电压电阻仪(美国 Millipore 公司)。

## 2 方法

### 2.1 血浆样品测定方法学建立

**2.1.1 内标溶液的配制** 精密称取一定量对羟基苯甲酸,用甲醇配制成 30  $\mu\text{g/mL}$  的内标溶液。

**2.1.2 葛根素对照品溶液的配制** 精密称取葛根素对照品 10.00 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解后,定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为 1.00  $\text{mg/mL}$  的葛根素储备液。逐级稀释得到质量浓度为 0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10  $\mu\text{g/mL}$  的系列葛根素

对照品溶液。

**2.1.3 质控样品的配制** 向大鼠空白血浆中分别加入低、中、高 3 个质量浓度的葛根素对照品溶液,配制成不同质量浓度的质控样品,于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.1.4 血浆样品处理方法** 精密吸取 50  $\mu\text{L}$  血浆置于 1.5 mL EP 管中,依次加入 10  $\mu\text{L}$  内标溶液、50  $\mu\text{L}$  高氯酸甲醇溶液,涡旋 3 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进样检测,记录峰面积并计算血药浓度。

**2.1.5 液相条件** Welch Ultimate XB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为甲醇-0.1%枸橼酸溶液(27:73);柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长为 250 nm;体积流量为 1 mL/min;进样体积为 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.1.6 专属性** 分别处理空白血浆、空白血浆+内标溶液、空白血浆+内标溶液+葛根素溶液、含药血浆,处理后,注入液相系统,按“2.1.5”项下条件分析并记录图谱。

**2.1.7 标准曲线** 向大鼠空白血浆中分别加入不同质量浓度的葛根素对照品溶液,每个质量浓度各取 3 份,按照“2.1.4”项进行处理,注入液相分析。此时,该标准溶液中葛根素的质量浓度分别为 0.023、0.045、0.114、0.227、0.454、1.136、2.273、4.545  $\mu\text{g/mL}$ 。数据处理时,以葛根素峰面积与内标峰面积比值( $Y$ )对质量浓度( $X$ )建立标准曲线。

**2.1.8 精密度** 分别取“2.1.3”项配制的质控样品,按照“2.1.4”项进行处理,得到含葛根素质量浓度分别为 0.114、0.454、4.545  $\mu\text{g/mL}$  的低、中、高质量浓度溶液,在一天内不同的时间进样 5 次,记为日内精密度;每日配制样品,共测定 5 d,记为日间精密度。

**2.1.9 提取回收率** 分别取“2.1.3”项配制的质控样品,每个质量浓度各取 3 份,按照“2.1.4”项进行处理,进样分析,得样品中葛根素的峰面积。取空白血浆,按“2.1.4”项方法沉淀蛋白后,取上清液,分别加入相对应的低、中、高质量浓度葛根素对照品溶液,进样分析,得到未经提取的葛根素的峰面积。以 2 次峰面积的比值计算提取回收率。

**2.1.10 定量限** 分别按照“2.1.3”项配制出不同质量浓度的质控样品,每个质量浓度各取 3 份,按照“2.1.4”项进行处理,注入液相分析,考察该方法的定量限。

**2.1.11 稳定性** 分别取“2.1.3”项配制的质控样品,

按照“2.1.4”项进行处理,得到含葛根素质量浓度分别为 0.114、0.454、4.545  $\mu\text{g/mL}$  的低、中、高质量浓度溶液,分别在进样器放置 12 h 后,进液相分析,检测进样器放置稳定性。将空白血浆从  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱拿出,室温放置 4 h,再进行样品处理,进液相分析,考察血浆样品在室温短期放置后再处理,葛根素的稳定性。将未处理的血浆样品在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱和室温间反复冻融 3 次,再进行样品处理,测定其含量,检测样品的冻融稳定性。

## 2.2 中药多糖对葛根素口服药动学的影响

**2.2.1 药动学实验** 实验前将动物禁食不禁水饲养 12 h,给药前根据动物体质量,分别 ig 葛根素原料药(100 mg/kg)及人参多糖-葛根素溶液、白芨多糖-葛根素溶液、枸杞多糖-葛根素溶液、茶多糖-葛根素溶液、葛根多糖-葛根素溶液、大豆多糖-葛根素溶液(葛根素 100 mg/kg,多糖 1 g/kg)。

分别于 5、15、30 及 1、2、4、6、8、12、24 h 从眼眶静脉丛中取血 300  $\mu\text{L}$ (给药 4 h 后,大鼠适当补水,保持良好的生理状态),将血液置于离心机中以 3000 r/min 离心 10 min,取上清液,置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中,待测。

**2.2.2 数据处理** 将血药浓度、给药剂量、给药途径等参数输入 DAS 3.2 中进行药动学分析和参数计算,并根据软件所得的曲线下面积(AUC)计算葛根素原料药、各种多糖葛根素溶液的相对生物利用度(Fr)。

## 2.3 细胞毒性研究

**2.3.1 细胞培养** MDCK 细胞接种于常规培养瓶中,用含 10%胎牛血清、1%非必需氨基酸的 DMEM 培养基,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。隔天更换培养基,当细胞达到 80%~90%融合时,吸弃旧培养液,用  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  的 PBS 溶液清洗 2 遍,0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化,传代。

**2.3.2 CCK-8 法评价细胞毒性** 调整 MDCK 细胞密度为  $8\times 10^4$  个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,保留 3 个孔不接种细胞用于排除培养液吸光度(A)的干扰,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h,用 PBS 溶液清洗细胞,排除培养基的干扰,加入用 DMEM 培养基稀释的不同质量浓度(5、10、20、50、100、500、1000  $\mu\text{g/mL}$ )的葛根素和不同质量浓度(20、50、100、200、500、1000、2000、5000、10 000  $\mu\text{g/mL}$ )的人参多糖,对照组和 3 个没有接种细胞的孔加入不含药物的 DMEM 培养基,

分别培养 2、24 h,弃去药液并用 PBS 清洗细胞 2 次;各孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,摇匀;放入培养箱孵育 2 h 后,取出;采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值,计算细胞存活率。

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

采用 GraphPad Prism 5 软件和 SPSS 23.0 软件进行数据的处理及统计分析。所得结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验进行两组均数比较。

## 2.4 多糖对葛根素跨 MDCK 细胞单层转运的影响

**2.4.1 葛根素质量浓度对葛根素转运的影响** 当细胞生长至覆盖瓶底的 80%~90%时,胰酶消化,将细胞以  $4\times 10^5$  个/mL 接种于 Transwell 的聚碳酸酯膜上,每孔 0.5 mL,在 Transwell 接受池(BL)加入 1.5 mL 培养液,接种 24 h 后更换培养液,培养约 1 周,定时测定跨膜电阻(TEER)值,并用电子显微镜观察细胞生长情况,当 TEER 值  $>200\text{ }\Omega/\text{cm}^2$  时,用于转运实验。用 DMEM 培养基洗去黏附在细胞表面的代谢物。分别将 0.5 mL 不同质量浓度(50、200、500、1000  $\mu\text{g/mL}$ )的葛根素溶液加入到供给池(AP),同时在 BL 加入 1.5 mL DMEM 培养基,将 Transwell 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育,于 90 min 从 BL 池吸取接收液 0.5 mL。收集样品于  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存待测。样品按 1:4 比例加入甲醇进行稀释,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按“2.1.5”项下条件进行 HPLC 测定,计算表观渗透系数(apparent permeability coefficient,  $P_{\text{app}}$ )<sup>[24]</sup>。

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

$dQ/dt$  为单位时间内转运量,  $A$  为转运膜的表面积( $1.12\text{ cm}^2$ ),  $C_0$  为 AP 中葛根素的初始质量浓度

**2.4.2 人参多糖质量浓度对葛根素转运的影响** 用 DMEM 培养基配制葛根素(500  $\mu\text{g/mL}$ )与人参多糖质量浓度比分别为 1:0、1:1、1:5、1:10、1:20 的药液。构建 MDCK 细胞模型,将 0.5 mL 药液加入到 AP,其余操作同“2.4.1”项。

**2.4.3 葡萄糖转运体抑制剂<sup>[25-28]</sup>对葛根素转运的影响** 根据文献调研发现根皮素可以有效抑制葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, GLUT1),并且对 GLUT 其他亚型也有一定的抑制作用;根皮苷能够抑制钠-葡萄糖共转运蛋白(sodium-glucose co-transporter, SGLT),特别是 SGLT1 这个亚型。考察根皮素(1 mmol/L)、根皮苷(1 mmol/L)对葛根素(500  $\mu\text{g/mL}$ )及葛根素(500  $\mu\text{g/mL}$ ) + 人参多糖(5 mg/mL)的影响。构建 MDCK 细胞模型,将 0.5 mL

药液加入到 AP, 其余操作同“2.4.1”项。

### 3 结果

#### 3.1 血药浓度方法学考察

**3.1.1 专属性考察结果** 如图 1 所示, 内标峰及葛根素峰形较好, 且大鼠血浆中内源性物质对内标峰及葛根素峰没有干扰, 内标峰的保留时间在 10.2 min 左右, 葛根素保留时间在 12.2 min 左右。实验结果表明专属性良好, 符合方法学要求。

**3.1.2 标准曲线** 以质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 葛根素与内标峰面积比值为纵坐标 ( $Y$ ), 得到葛根素的回归方程为  $Y=0.3593X-0.0048$  ( $R^2=0.9998$ )。结果显示, 体内葛根素质量浓度在  $0.023\sim4.545\mu\text{g/mL}$  线性关系良好, 符合方法学要求。

**3.1.3 精密度考察结果** 如表 1 所示, 葛根素低质量浓度日内和日间精密度的 RSD 均小于 15%, 中、高质量浓度日内和日间精密度的 RSD 均小于 5%, 见表 1。实验结果表明精密度良好, 符合生物样品精密度要求。

**3.1.4 提取回收率考察结果** 结果显示, 在低、中、高质量浓度下葛根素提取回收率分别为 ( $91.49\pm$

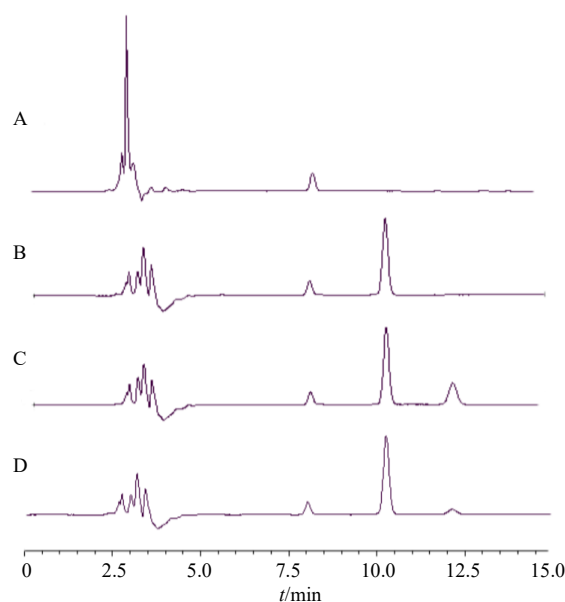


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆+内标溶液 (B)、空白血浆+内标溶液+葛根素溶液 (C) 和含药血浆 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagrams of blank plasma (A), blank plasma + internal standard solution (B), blank plasma + internal standard solution + puerarin solution (C) and drug-containing plasma (D)

表 1 葛根素的日内和日间精密度

Table 1 Within-day and between-day precisions of puerarin

| 质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 日内 ( $n=5$ )                              |       | 日间 ( $n=5$ )                              |       |
|------------------------------------------|-------------------------------------------|-------|-------------------------------------------|-------|
|                                          | 平均精密度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | RSD/% | 平均精密度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | RSD/% |
| 0.114                                    | $0.109\pm0.014$                           | 12.8  | $0.110\pm0.007$                           | 6.4   |
| 0.454                                    | $0.460\pm0.012$                           | 2.6   | $0.461\pm0.007$                           | 1.5   |
| 4.545                                    | $4.411\pm0.088$                           | 1.9   | $4.359\pm0.019$                           | 0.4   |

3.6) %、( $90.22\pm2.7$ ) %和 ( $91.04\pm3.4$ ) %。

**3.1.5 定量限** 当体内样品中葛根素的质量浓度为  $0.016\mu\text{g/mL}$  时为定量限, 信噪比大于 10, RSD% 为 8.1%, 均符合方法学要求。

**3.1.6 稳定性** 如表 2 所示, 血浆样品制备好在室温放置 12 h 内质量浓度不会有所变化, 未处理的血浆样品在室温 4 h 内短期放置和  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱到室温反复冻融 3 次后处理, 其质量浓度无明显的变化, 所有 RSD 均小于 15%, 符合方法学要求。

表 2 葛根素血浆样品的稳定性

Table 2 Stability of puerarin plasma sample

| 质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | RSD/%          |               |          |
|------------------------------------------|----------------|---------------|----------|
|                                          | 已处理样品室温放置 12 h | 未处理样品室温放置 4 h | 反复冻融 3 次 |
| 0.114                                    | 8.3            | 4.2           | 6.9      |
| 0.454                                    | 2.1            | 3.3           | 8.0      |
| 4.545                                    | 3.9            | 1.4           | 2.1      |

#### 3.2 药动力学结果

大鼠分别 ig 葛根素和多糖葛根素后, 采用上述所建立的方法测定各时间点的血药浓度, 以大鼠血药浓度作为纵坐标, 时间作为横坐标作图, 得到平均血药浓度-时间曲线, 见图 2。采用 DAS 3.2 软件进行非房室模型拟合, 计算达峰时间 ( $T_{\text{max}}$ )、达峰浓度 ( $C_{\text{max}}$ )、AUC 及半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 等药动力学参数, 并用 SPSS 23.0 软件分别对各参数进行独立样本  $t$  检验, 见表 3。葛根素单独给药后  $T_{\text{max}}$  小于 30 min, 吸收迅速, 血药浓度达峰时间较快。与 6 种中药多糖联合给药后, 葛根素的主要药动力学参数  $C_{\text{max}}$ 、 $\text{AUC}_{0\sim24}$ 、 $\text{AUC}_{0\sim\infty}$  均有不同程度的变化。其中葛根素与葛根多糖联用后  $\text{AUC}_{0\sim24}$  为对照组的 0.89 倍; 与枸杞多糖联用后  $\text{AUC}_{0\sim24}$  为对照组的 1.21 倍; 与白芨多糖联用后  $\text{AUC}_{0\sim24}$  为对照组的 1.40 倍; 与茶多糖联用后  $\text{AUC}_{0\sim24}$  为对照组的 1.72 倍; 与大豆多

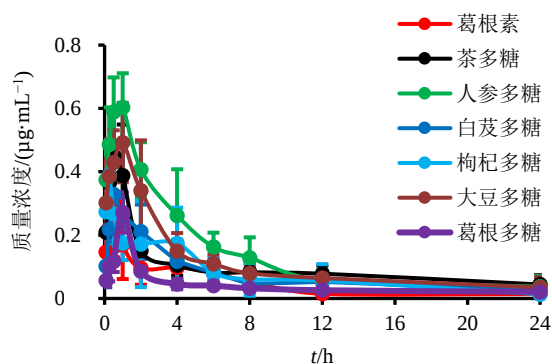


图 2 ig 不同制剂后大鼠体内平均血药浓度-时间曲线 ( $n = 5$ )  
Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves on rats after ig different formulations ( $n = 5$ )

表 3 不同制剂的主要药动学参数 ( $n = 5$ )

Table 3 Main pharmacokinetic parameters of different formulations ( $n = 5$ )

| 参数                   | 单位                                              | 葛根素                 | 葛根素+多糖              |                      |                       |                     |                    |                       |
|----------------------|-------------------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
|                      |                                                 |                     | 葛根多糖                | 茶多糖                  | 人参多糖                  | 白芨多糖                | 枸杞多糖               | 大豆多糖                  |
| $C_{max}$            | $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$                | $0.35 \pm 0.14$     | $0.27 \pm 0.06$     | $0.49 \pm 0.14^*$    | $0.62 \pm 0.11^{**}$  | $0.38 \pm 0.101$    | $0.39 \pm 0.09$    | $0.50 \pm 0.13^*$     |
| $T_{max}$            | h                                               | $0.40 \pm 0.14$     | $0.71 \pm 0.27^*$   | $0.70 \pm 0.27^{**}$ | $0.75 \pm 0.35^{**}$  | $0.55 \pm 0.27$     | $0.25 \pm 0.01$    | $0.90 \pm 0.22^{***}$ |
| $V_{z/F}$            | $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$                   | $523.12 \pm 303.07$ | $379.54 \pm 222.32$ | $604.77 \pm 57.21$   | $360.72 \pm 145.06$   | $612.85 \pm 289.43$ | $239.61 \pm 96.72$ | $410.48 \pm 47.02$    |
| $CL_{z/F}$           | $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ | $85.24 \pm 46.44$   | $12.35 \pm 15.11$   | $41.84 \pm 9.52$     | $23.86 \pm 6.02$      | $50.69 \pm 8.17$    | $63.66 \pm 23.41$  | $37.18 \pm 11.32$     |
| $t_{1/2}$            | h                                               | $5.36 \pm 5.34$     | $5.03 \pm 4.12$     | $9.76 \pm 1.09$      | $11.90 \pm 7.37$      | $8.21 \pm 2.96$     | $2.60 \pm 0.29$    | $8.13 \pm 2.06$       |
| $AUC_{0-24\text{h}}$ | $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ | $1.29 \pm 0.50$     | $1.16 \pm 0.18$     | $2.20 \pm 0.57^*$    | $3.68 \pm 0.59^{***}$ | $1.81 \pm 0.41$     | $1.75 \pm 0.59$    | $2.60 \pm 0.51^*$     |
| $AUC_{0-\infty}$     | $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ | $1.45 \pm 0.70$     | $1.29 \pm 0.28$     | $2.49 \pm 0.53^*$    | $4.56 \pm 1.16^{***}$ | $2.03 \pm 0.37^*$   | $1.76 \pm 0.59$    | $2.88 \pm 0.66^{**}$  |
| Fr                   | %                                               | 100                 | 89                  | 172 <sup>*</sup>     | 314 <sup>***</sup>    | 140 <sup>*</sup>    | 121                | 198 <sup>**</sup>     |

与葛根素组比较:  $^*P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$   $^{***}P < 0.001$

$^*P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$   $^{***}P < 0.001$  vs puerarin group

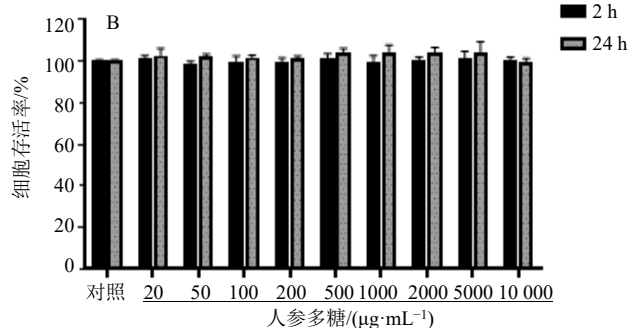
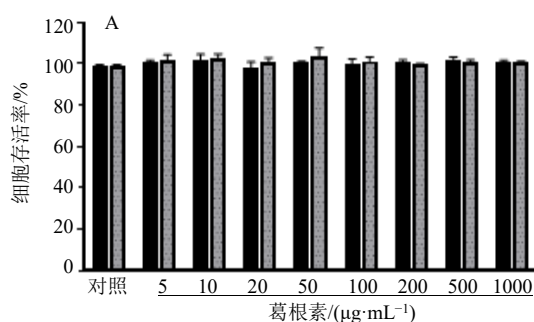


图 3 葛根素 (A) 及人参多糖 (B) 对 MDCK 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of puerarin (A) and ginseng polysaccharide (B) on viability of MDCK cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

如图 4-B 所示,加入人参多糖后,葛根素的  $P_{app}$  均有显著升高 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ),且随着二者比例增高  $P_{app}$  值有上升的趋势,并在 1:10 时达到最高。葛根素的  $P_{app}$  值在质量浓度比为 1:20 时开始降低,表明人参多糖在促进葛根素的跨膜转运方面具有一定的阈值。

如图 4-C 所示,加入根皮素和根皮苷后,葛根素组中葛根素的  $P_{app}$  值无明显变化,表明葡萄糖转

糖联用后  $AUC_{0-24}$  为对照组的 1.98 倍;与 人参多糖联用后  $AUC_{0-24}$  为对照组的 3.14 倍。

### 3.3 CCK-8 实验结果

如图 3 所示,葛根素在 5~1000  $\mu\text{g/mL}$ 、人参多糖在 20~10 000  $\mu\text{g/mL}$  作用于 MDCK 细胞 2、24 h 后,细胞存活率均大于 95%,表明在此质量浓度范围内葛根素和人参多糖对细胞无明显毒性。

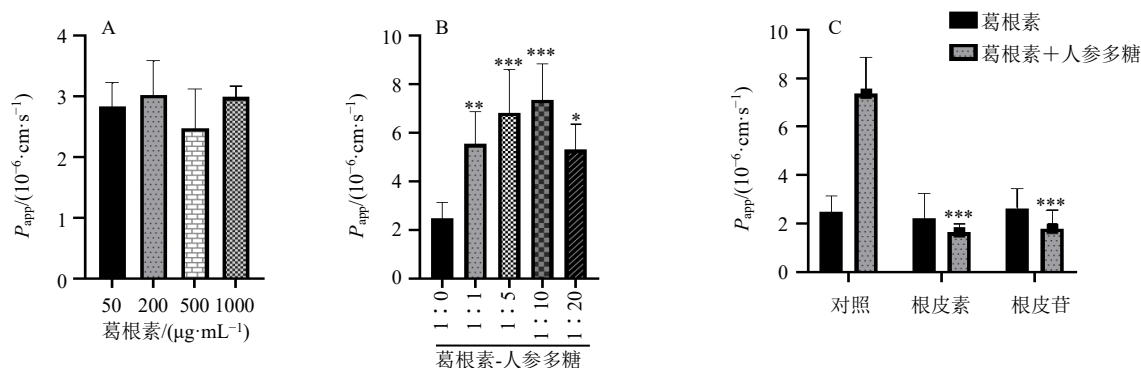
### 3.4 多糖对葛根素跨 MDCK 细胞单层转运的影响

如图 4-A 所示,各质量浓度葛根素的  $P_{app}$  值无显著差异,说明质量浓度对葛根素转运无影响;且  $P_{app}$  值均小于  $4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,表明其渗透性差,可能导致其口服生物利用度低。

运体不参与葛根素的跨膜转运。但在葛根素+人参多糖组,加入抑制剂根皮素和根皮苷后,葛根素的  $P_{app}$  均显著降低 ( $P < 0.001$ ),表明人参多糖促吸收机制与葡萄糖转运体有关。

### 4 讨论

关于中药多糖促进难溶性药物口服吸收的相关机制,目前部分研究者已经进行了相关研究,认为中药多糖可能通过以下途径影响药物吸收:①中药



A-不同质量浓度葛根素的  $P_{app}$  B-葛根素与人参多糖的不同质量浓度比对葛根素  $P_{app}$  的影响 C-葛根素在葡萄糖转运体抑制剂（根皮素、根皮苷）作用下的  $P_{app}$  与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

A- $P_{app}$  of puerarin with different concentrations B-effect of concentrations of ginseng polysaccharide on  $P_{app}$  of puerarin C-effect of glucose transporter inhibitors (phloretin, phloridzin) on  $P_{app}$  of puerarin \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

图 4 多糖对葛根素跨 MDCK 细胞单层转运的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 4 Effect of polysaccharides on puerarin transport across MDCK cell monolayers ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

多糖可以抑制外排蛋白活性,成日华、吴芬等<sup>[14-16]</sup>发现枸杞多糖和灵芝多糖肽可以将 P-gp 特异性底物 Rh-123 的外排率减低 25.6%及 33%;②中药多糖可以调节肠道菌群种类及数量,李瑞刚、Shen 等<sup>[18-19]</sup>发现人参多糖可以显著提高肠道中乳杆菌和拟杆菌的丰度,从而提高人参皂苷的肠内代谢,进一步提高活性更强的次生苷吸收入血发挥药效;③中药多糖可以影响药物代谢酶活性,夏雪雁等<sup>[29]</sup>发现当归总多糖使正常小鼠肝微粒体及线粒体谷胱甘肽 S-转移酶活性分别升高 152%和 12%。张国伟等<sup>[30]</sup>发现猪苓多糖可以使样本中细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶活性降低 21.12%。对于人参多糖是否可通过其他途径促进难溶性药物的口服吸收暂未见其他报道。

Wu 等<sup>[31]</sup>发现小分子果糖可以通过营养吸收途径促进纳米口服给药的单向上皮转运。根据这一实验结果推测:①中药多糖中含有丰富的糖类物质;②葡萄糖转运途径为人体中高效的能量转运途径,其可有效地吸收以葡萄糖为代表的糖类物质。因此,推测中药多糖是否可以通过葡萄糖转运途径提高药物的跨膜转运,从而提高其口服生物利用度。本研究结果表明,加入人参多糖后葛根素的  $P_{app}$  有所提高,且随着多糖质量浓度升高,  $P_{app}$  值有上升的趋势,加入葡萄糖转运抑制剂(根皮素、根皮苷)后葛根素组的  $P_{app}$  无明显变化,而人参多糖组的  $P_{app}$  显著下降。证实人参多糖促进葛根素吸收过程与葡萄糖转运体有密切关系。并发现,在一定质量浓度范围内(0.5~5 mg/mL),人参多糖促进葛根素跨膜

转运的速率与质量浓度呈正相关关系,人参多糖质量浓度越高,葛根素的  $P_{app}$  越大。但当人参多糖质量浓度达到 10 mg/mL 时,葛根素的  $P_{app}$  开始下降,可能与高质量浓度的人参多糖阻碍药物与细胞的接触,从而影响药物的跨膜转运有关。

本研究前期使用的其他多糖:葛根多糖和枸杞多糖对葛根素的口服生物利用度无明显影响;白芨多糖、大豆多糖和茶多糖能够提高葛根素在大鼠体内的口服吸收,但本研究暂未对其促吸收机制进行考察。因此,是否其他中药多糖也可通过葡萄糖转运途径影响葛根素的口服吸收暂未得到证实,后续本课题组也将对此进行更加深入的研究。

综上所述,人参多糖可能会通过葡萄糖转运途径提高葛根素的口服吸收,提示利用人参多糖作为递药系统修饰剂,或许可成为一种有潜力的提高难吸收药物口服吸收的技术手段,也为中药多糖在递药系统中的应用提供一种新的思路与方法。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 李翠丽, 王伟, 张英, 等. 中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(19): 2700-2703.
- [2] 刘淑贞, 周文果, 叶伟建, 等. 活性多糖的生物活性及构效关系研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(18): 211-218.
- [3] Basu A, Kunduru K R, Abtew E, et al. Polysaccharide-based conjugates for biomedical applications [J]. Bioconjug Chem, 2015, 26(8): 1396-1412.
- [4] Torres, Troncoso, Pisani, et al. Natural polysaccharide nanomaterials: An overview of their immunological

- properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5092.
- [5] Hu Q B, Lu Y J, Luo Y C. Recent advances in dextran-based drug delivery systems: From fabrication strategies to applications [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 264: 117999.
- [6] Luo M C, Zhang X Y, Wu J, *et al.* Modifications of polysaccharide-based biomaterials under structure-property relationship for biomedical applications [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 266: 118097.
- [7] Muxika A, Etxabide A, Uranga J, *et al.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105(Pt 2): 1358-1368.
- [8] Barclay T G, Day C M, Petrovsky N, *et al.* Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 221: 94-112.
- [9] Zhang Y, Cui Z, Mei H, *et al.* *Angelica sinensis* polysaccharide nanoparticles as a targeted drug delivery system for enhanced therapy of liver cancer [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 219: 143-154.
- [10] 彭尹宣, 王兴, 杨娟, 等. 天麻多糖对天麻钩藤药对效应成分吸收的影响 [J]. 环球中医药, 2015, 8(12): 1452-1454.
- [11] 吴向东, 王兴, 杨娟, 等. 天麻多糖对天麻素吸收的影响 [J]. 成都医学院学报, 2012, 7(4): 551-553.
- [12] 彭婉, 马骁, 王建, 等. 麦冬化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 477-488.
- [13] Lu Y L, Zhao A Q, Wu Y M, *et al.* Soybean soluble polysaccharides enhance bioavailability of genistein and its prevention against obesity and metabolic syndrome of mice with chronic high fat consumption [J]. *Food Funct*, 2019, 10(7): 4153-4165.
- [14] 成日华. 枸杞多糖对 P-糖蛋白影响的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [15] 吴芬. 灵芝多糖对 P-糖蛋白影响的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [16] 成日华, 吴芬, 李焕德. 枸杞多糖对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白作用的影响 [J]. 中南药学, 2012, 10(7): 500-504.
- [17] 陈琳瑶, 阮丹, 王跃鑫, 等. 黄芪多糖对 Caco-2 细胞 P-gp 功能、表达的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2015, 25(9): 825-828.
- [18] 李瑞刚, 朱娜, 赵幻希, 等. 人参多糖对人参皂苷 Re 体内代谢和体外转化的影响 [J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(10): 2192-2197.
- [19] Shen H, Gao X J, Li T, *et al.* Ginseng polysaccharides enhanced ginsenoside Rb<sub>1</sub> and microbial metabolites exposure through enhancing intestinal absorption and affecting gut microbial metabolism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 216: 47-56.
- [20] 刘相勇, 董平栓, 汪砚雨, 等. 葛根素注射液联合阿托伐他汀钙治疗颈动脉粥样硬化斑块的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(4): 796-800.
- [21] 胡芳晓, 杨传华. 葛根素注射剂杂质研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(7): 1246-1250.
- [22] 王成, 刘玉玲, 谷士杰. 葛根素的溶解性及其络合助溶的研究 [J]. 中国药理学杂志, 1993, 28(5): 294-296.
- [23] Li H W, Dong L, Liu Y, *et al.* Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats [J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1/2): 133-138.
- [24] 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.
- [25] Martin H J, Kornmann F, Fuhrmann G F. The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes [J]. *Chem Biol Interact*, 2003, 146(3): 225-235.
- [26] Wang Y Z, Xu Q, Wu W, *et al.* Brain transport profiles of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by glucose transporter 1: *In vitro* and *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 398.
- [27] Panayotova-Heiermann M, Loo D D, Wright E M. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(45): 27099-27105.
- [28] Yoon S Y, Yu J S, Hwang J Y, *et al.* Phloridzin acts as an inhibitor of protein-tyrosine phosphatase MEG2 relevant to insulin resistance [J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1612.
- [29] 夏雪雁, 彭仁琇, 孔锐, 等. 当归总多糖对小鼠肝脏药物代谢酶活性具有调节作用 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(2): 149-152.
- [30] 张国伟, 李彩霞, 王艳峰, 等. 猪苓及猪苓多糖对 BBN 联合糖精作用 Fisher-344 大鼠肝脏代谢酶的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(5): 923-926.
- [31] Wu L, Bai Y L, Wang L L, *et al.* Promoting apical-to-basolateral unidirectional transport of nanoformulations by manipulating the nutrient-absorption pathway [J]. *J Control Release*, 2020, 323: 151-160.

[责任编辑 李亚楠]