

艳山姜挥发油自乳化释药系统的毒性及对 Caco-2 细胞单层细胞旁转运与 P-糖蛋白的影响

吴朝花¹, 何 丽^{2,3}, 肖 婷^{2,3}, 陈 英^{2,3}, 甘诗泉^{2,3}, 沈祥春^{2,3*}, 陶 玲^{2,3*}

1. 贵州医科大学第二附属医院, 贵州 凯里 556000

2. 贵州医科大学药学院 药用植物功能与应用国家重点实验室, 贵州省天然药用资源高效利用工程中心, 贵州 贵安新区 550025

3. 贵州医科大学药学院 药物药理教研室, 贵州省天然药物药理与可药性高等教育重点实验室, 贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优化利用重点实验室, 贵州 贵安新区 550025

摘要:目的 考察艳山姜挥发油自乳化释药系统(essential oil of *Fructus Alpinia zerumbet*-self-emulsifying drug delivery system, EOFAZ-SEDDS)的毒性及其对人结直肠腺癌 Caco-2 细胞单层通透性和 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的影响。方法 采用 MTT 法和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)法测定 EOFAZ-SEDDS 的细胞毒性; 荧光黄渗透率实验考察 EOFAZ-SEDDS 对 Caco-2 单层通透性的影响; Western blotting 考察 EOFAZ-SEDDS 对 P-gp 蛋白表达的影响; 流式细胞仪检测 EOFAZ-SEDDS 对 P-gp 功能的影响。小鼠 ig 不同剂量 EOFAZ-SEDDS, 连续观察 14 d, 考察 EOFAZ-SEDDS 对小鼠的急性毒性作用。结果 与 EOFAZ 组比较, EOFAZ-SEDDS 处理培养 1、3、5 d 的 Caco-2 细胞 24 h 后细胞存活率均显著升高($P<0.05$ 、 0.01), LDH 外漏率显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。与对照组比较, EOFAZ-SEDDS、单独的 EOFAZ 均能够显著增加荧光黄透率($P<0.01$); EOFAZ 处理 Caco-2 细胞 24 h 后, P-gp 蛋白表达显著降低($P<0.05$), EOFAZ-SEDDS 处理后 P-gp 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01); 10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的 EOFAZ-SEDDS 对 P-gp 外排功能没有影响, 40 $\mu\text{g/mL}$ EOFAZ-SEDDS 显著增加细胞内罗丹明的荧光强度($P<0.05$)。小鼠口服制剂的半数致死剂量(median lethal dose, LD_{50})为 5.291 5 g/kg, 95%置信限为 4.927 8~5.682 1 g/kg。根据急性毒性分级标准, EOFAZ-SEDDS 对小鼠实际无毒。结论 EOFAZ-SEDDS 可以降低 EOFAZ 的细胞毒性, 对小鼠实际无毒, 但改变了 Caco-2 细胞单层屏障功能, 同时诱导 P-gp 表达, 在一定浓度范围内对其功能没有影响, 为 EOFAZ 新剂型的研究提供了一定的实验基础。

关键词: 艳山姜挥发油; 自乳化释药系统; Caco-2 细胞; 细胞毒性; P-糖蛋白; 急性毒性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)11-3568-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.018

Toxicity and effects of essential oil of *Fructus Alpinia zerumbet*-self-emulsifying drug delivery system on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer and P-glycoprotein

WU Chao-hua¹, HE Li^{2,3}, XIAO Ting^{2,3}, CHEN Ying^{2,3}, GAN Shi-quan^{2,3}, SHEN Xiang-chun^{2,3}, TAO Ling^{2,3}

1. The Second Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Kaili 556000, China

2. High Efficacy Application of Natural Medicinal Resources Engineering Center of Guizhou Province, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Gui'an 550025, China

3. Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Drug Resources, Guiyang Joint Key Laboratory, Guizhou Provincial Key

收稿日期: 2023-01-28

基金项目: 贵州省科技厅自然科学基金项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 380, 黔科合基础[2020]1Y210, 黔科合基础-ZK[2023]一般 303); 贵州医科大学国家自然科学基金培育项目(20NSP053); 贵州医科大学药学院国际科技合作基地(黔科合平台人才[2017]5802); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2021-072); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwmkj2022-478)

作者简介: 吴朝花, 女, 硕士, 从事中药民族药新药研发和药物新剂型及新技术研究。Tel: 18685709495 E-mail: 425350152@qq.com

***通信作者:** 沈祥春, 男, 博士, 教授, 从事心血管药物药理、功能天然产物化学生物学研究。

Tel: (0851)88416149 E-mail: shenxiangchun@126.com

陶 玲, 女, 硕士, 教授, 从事中药民族药和药物新剂型及新技术研究。Tel: (0851)6908568 E-mail: 649511230@qq.com

Laboratory of Pharmacology and Pharmacology of Natural Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Gui'an 550025, China

Abstract: Objective To evaluate the toxicity and effects of essential oil of *Fructus Alpinia zerumbet*-self-emulsifying drug delivery system (EOFAZ-SEDDS) on Caco-2 cell monolayer permeability and P-glycoprotein (P-gp). **Methods** Cytotoxicity of EOFAZ-SEDDS on Caco-2 cell monolayers were detected by MTT and lactate dehydrogenase (LDH) methods. The effect of EOFAZ-SEDDS on Caco-2 cell monolayer permeability was investigated by fluorescence yellow permeability experiment. Western blotting was used to investigate the effect of EOFAZ-SEDDS on P-gp protein expression; The effect of EOFAZ-SEDDS on P-gp function was detected by flow cytometry. Mice were ig different doses of EOFAZ-SEDDS for 14 d, and the acute toxicity of EOFAZ-SEDDS on mice was investigated. **Results** Compared with EOFAZ group, survival rate of Caco-2 cells cultured for 1, 3, 5 d after EOFAZ-SEDDS treatment were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), and LDH leakage rate was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with control group, EOFAZ-SEDDS and EOFAZ alone significantly increased the fluorescence yellow transmittance ($P < 0.01$). After EOFAZ treated Caco-2 cells for 24 h, P-gp protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$); After EOFAZ-SEDDS treatment, P-gp protein expression was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ of EOFAZ-SEDDS had no effect on the efflux function of P-gp, while 40 $\mu\text{g/mL}$ of EOFAZ-SEDDS significantly increased the fluorescence intensity of rhodamine in cells ($P < 0.05$). The median lethal dose (LD_{50}) of oral preparations in mice was 5.291 5 g/kg, and the 95% confidence limit was 4.927 8—5.682 1 g/kg. According to the acute toxicity grading standard, EOFAZ-SEDDS was actually non-toxic to mice. **Conclusion** EOFAZ-SEDDS can reduce the cytotoxicity of EOFAZ, which is actually non-toxic to mice, but it changes the monolayer barrier function of Caco-2 cells and induces the expression of P-gp, which has no effect on its function in a certain concentration range, providing a certain experimental basis for the study of new dosage forms of EOFAZ.

Key words: essential oil of *Fructus Alpinia zerumbet*; self-emulsifying drug delivery system; Caco-2 cells; cytotoxicity; P-glycoprotein; acute toxicity

艳山姜为姜科山姜属植物艳山姜 *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith 的干燥成熟果实, 其主要化学成分为挥发油类、黄酮类、二萜类和有机酸类等化合物。课题组前期对艳山姜主要活性部位进行了考察, 结果表明, 艳山姜挥发油 (essential oil of *Fructus Alpinia zerumbet*, EOFAZ) 为主要活性部位, 具有抗心肌缺氧、抗动脉粥样硬化、降压作用和抗心肌缺血等药理作用^[1-7]。EOFAZ 作为治疗心血管疾病的潜在药物, 具有较大的开发和利用价值。但 EOFAZ 为油状液体, 水溶性差, 易挥发, 传统剂型严重限制了其在临床应用的发展。

自乳化释药系统 (self-emulsifying drug delivery system, SEDDS) 是由油相、乳化剂和助乳化剂以及药物组成, 在胃肠道内通过胃肠道蠕动可自发乳化形成粒径透明、动力学稳定的药物传递系统^[8], 其具有增加药物表面积和溶解度, 提高溶出度和渗透率, 提高药物生物利用度, 因而成为提高难溶药物溶出度和生物利用度方面的研究热点^[9-12]。在前期研究中, 课题组将 EOFAZ 成功制备成 EOFAZ-SEDDS^[13]。然而 SEDDS 处方中含有大量乳化剂, 乳化剂可能会刺激胃肠道^[14-17], 同时乳化剂及其代谢产物在机体内引起的生物学变化, 亦对机体可能

造成的毒副作用包括急性毒性、亚急性毒性、慢性毒性等^[18], 另一方面, 大剂量乳化剂可引起膜损伤和细胞死亡^[19], 此外, 乳化剂还可通过改变肠黏膜屏障通透性等来影响药物渗透性^[20], 且本研究所用乳化剂 Kolliphor HS 15 的安全剂量、耐受剂量其对肠黏膜屏障通透性的影响未见报道。因此, 对 EOFAZ-SEDDS 的安全性及其对肠黏膜屏障通透性的影响进行考察具有一定的必要性。

人结直肠癌 Caco-2 细胞在培养条件下可形成完整致密的极性单细胞层, 该细胞层的形态和功能类似人体小肠上皮层。已有研究证实 Caco-2 细胞保留了 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 高表达的特性, 可在有代谢状况下测定药物的跨膜转运^[21-22], 并且药物透过 Caco-2 细胞的体外过程与药物口服后在体内的吸收和代谢有良好的相关性^[23]。因此, Caco-2 细胞是快速筛选肠吸收和细胞毒性研究的可靠且广泛使用的体外模型。

P-gp 是由多药耐药基因 1 (multi-drug resistance gene 1, *MDR1*) 基因编码的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 能量依赖的多药耐药外排泵。肠道内的 P-gp 可将其底物从肠上皮细胞泵回到肠腔而限制药物的吸收, 因此 P-gp 的功能和 (或) 表达的

变化,可能影响药物的药动学参数,导致其生物利用度的改变,从而会影响其吸收、分布、代谢、排泄和毒性,也会影响化合物与药物、药物与药物、食物与药物、草药与药物、草药与草药的相互作用^[24-26]。

本研究在前期基础上进一步采用 Caco-2 细胞考察 EOFaz-SEDDS 的细胞毒性,及其对 Caco-2 细胞单层通透性和 P-gp 表达及功能的影响;采用 KM 小鼠考察 EOFaz-SEDDS 的体内毒性,为 EOFaz-SEDDS 进一步开发和合理应用提供参考,为更好地合理利用艳山姜资源从而发挥贵州民族医药产业奠定一定的实验基础。

1 材料

1.1 动物和细胞

SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g, 6~8 周龄,购自贵州医科大学动物中心,动物合格证号 SCXK(黔)2017-0001,实验动物使用许可证号 SYXK(黔)2017-0001。所有小鼠均自由摄食和饮水,适应性喂养 7 d,室温保持在 20~23 ℃,相对湿度保持在 40%~70%。动物实验得到贵州医科大学伦理委员会批准(批准号 No.1800459)。

Caco-2 细胞购自中国上海富恒细胞中心。

1.2 药材

艳山姜购自贵州省黔西南州贞丰县连环乡巧岩村,经贵州医科大学张旭副教授鉴定为艳山姜 *A. zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith 的成熟果实,凭证标本编号 20150930,保存于贵州医科大学药学院天然药物资源优化利用重点实验室(贵阳)。

1.3 药品与试剂

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(批号 A020-2)购自南京建成生物工程研究所;MTT(批号 911L051)、罗丹明 123(批号 1214E051)购自北京索莱宝科技有限公司;P-gp 抗体(批号 ab170904)购自英国 Abcam 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 60004-1-g)、二抗(批号 SA00001-2)购自美国 Proteintech 公司。

1.4 仪器

700-SERIES 型超低温冰箱、3020-426 型多功能全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);HF240 型 CO₂ 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);CFX 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);5810R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);SIM-F140AY65 型制冰机(日本 SANYO 电子有限责任公司);

NovoCyte 流式细胞仪(艾森生物杭州有限公司)。

2 方法

2.1 艳山姜挥发油的提取制备

将艳山姜干燥果实破碎至种子破裂,按《中国药典》2020 年版要求均匀取样,精密称取 500 g,加 12 倍蒸馏水浸泡 1 h,按《中国药典》2020 年版四部通则 2204 挥发油测定法提取 7 h,收集挥发油,经无水硫酸钠干燥后,-20 ℃冰箱储存备用。艳山姜挥发油经 GC-MS 检测,其主要化学成分为 β-蒎烯、α-蒎烯、苾烯及 1,8-桉叶油醇等,相对质量分数分别为 29.549%、9.861%、3.112%、0.248%^[27]。

2.2 EOFaz-SEDDS 的制备

将 EOFaz 与表面活性剂 Kolliphor HS 15、乙醇以 6:2:2 的质量比混合,轻轻摇匀^[13]。

2.3 细胞培养

将 Caco-2 细胞于含有完全 DMEM 培养液(含 20%热灭活的胎牛血清、1%非必需氨基酸、1% L-谷氨酰胺、1%青霉素-链霉素)的塑料细胞培养瓶中培养。培养瓶置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养,每隔 1 d 更换 1 次培养液。当细胞融合度达到 80%时,加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA 混合消化液,轻轻摇晃培养瓶,放于培养箱中消化 1 min,按 1:2 进行细胞传代。使用第 20~40 代的细胞进行细胞毒性和转运实验。

2.4 细胞毒性实验

2.4.1 MTT 细胞活力实验 设置空白组(无细胞无药物)、对照组(无药物),EOFaz(24、36、48、60、72、84 μg/mL)组,EOFaz-SEDDS 组(40、60、80、100、120、140 μg/mL,分别含 24、36、48、60、72、84 μg/mL 的 EOFaz),Kolliphor HS 15+无水乙醇组(16、24、32、40、48、56 μg/mL,相当于 EOFaz-SEDDS 各剂量组中 Kolliphor HS 15 和无水乙醇混合物含量)。分别将各组与不同培养天数(1、3、5 d)的 Caco-2 细胞温育,每个质量浓度设 6 个平行孔,培养 24 h。每孔加 20 μL MTT(5 mg/mL)溶液,孵育 4 h。吸弃各孔液体,加入 150 μL 二甲基亚砷,低速振摇 10 min,用酶标仪于 490 nm 处测定吸光度(A)值,计算细胞存活率。

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

2.4.2 LDH 活力实验 设置对照组(无药物),EOFaz(24、36、48、60、72、84 μg/mL)组,EOFaz-SEDDS 组(40、60、80、100、120、140 μg/mL),Kolliphor HS 15+无水乙醇组(16、24、32、40、48、

56 $\mu\text{g/mL}$)。收集对数生长期细胞,以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 培养箱中培养 5 d。分别将各组与 Caco-2 细胞温育 24 h。按照试剂盒说明书测定各样品的 A 值。

2.5 药物对 Caco-2 细胞单层通透性的影响

2.5.1 Caco-2 单层细胞模型的建立 将 0.012 mg/mL 的鼠尾胶原蛋白加入 12 孔 Transwell 小室中,开盖在超净工作台中过夜晾干,或室温放置 1 h 后,用 PBS 洗 3~4 次后直接使用。取处于对数生长期的 Caco-2 细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 12 孔 Transwell 培养板中。在 12 孔 Transwell 培养板的细胞内侧 (apical, AP) 每孔加入 0.5 mL DMEM 完全培养基,基底侧 (basolateral, BL) 每孔加入 1.5 mL DMEM 培养基,在接种后的第 1 周内隔天更换培养基,1 周后每天更换培养基,直至第 21 天,用细胞电阻仪测定 Caco-2 细胞的跨内皮细胞电阻 (trans-epithelium electrical resistant, TEER) 值。

2.5.2 EOFaz-SEDs 对荧光黄渗透性的影响 根据 MTT 和 LDH 活力实验结果,用培养基稀释 EOFaz、EOFaz-SEDs、无水乙醇和 Kolliphor HS 15 混合物、Kolliphor HS 15、无水乙醇,得到无毒浓度的 EOFaz (24 $\mu\text{g/mL}$)、EOFaz-SEDs (40 $\mu\text{g/mL}$)、无水乙醇和 Kolliphor HS 15 混合物 (16 $\mu\text{g/mL}$)、Kolliphor HS 15 (8 $\mu\text{g/mL}$)、乙醇 (8 $\mu\text{g/mL}$)。取建模成功的 Caco-2 单层细胞模型小心吸去培养基,细胞单层用 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 Hank's 缓冲液洗细胞表面 3 次,每次 5 min,以除去残余的培养基。洗涤后,AP 侧分别加入含受试样品的 Hank's 缓冲液,并加入荧光黄 (40 $\mu\text{g/mL}$),将 1.5 mL 新鲜 Hank's 缓冲液 (pH 7.4、37 $^{\circ}\text{C}$) 加到 BL 侧中。在 15、30、45、60、120 min 从 BL 侧取出 0.5 mL 样品,并同时补充同温同体积的空白 Hank's 缓冲液。用酶标仪在 450 nm 的激发波长和 520 nm 的发射波长下测量样品的荧光值,并计算荧光黄渗透量。

2.6 Western blotting 考察 EOFaz-SEDs 对 P-gp 蛋白表达的影响

Caco-2 细胞以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养,细胞融合度达到 80%~90%后分别加入环孢素 A (1 $\mu\text{mol/L}$, 阴性对照),维拉帕米 (80 $\mu\text{mol/L}$, 阳性对照) 以及不同质量浓度的 EOFaz (6、12、24 $\mu\text{g/mL}$)、EOFaz-SEDs (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)、单一表面活性剂 (2、4、8 $\mu\text{g/mL}$)、表面活性剂混合物 (4、8、16 $\mu\text{g/mL}$),另设置不含药物的对照组。

温育 24 h 后,吸去培养液,用预冷的 PBS 润洗 3 次,加入细胞裂解缓冲液,置于摇床上振摇 20 min,收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5% 牛血清白蛋白的 TBST 溶液,封闭 1 h。分别加入 P-gp (1:1000)、GADPH (1:10 000) 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;漂洗 3 次,每次 10 min,加入二抗 (1:7000),孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次,使用 ECL 化学发光试剂盒进行显色,然后将膜置于凝胶成像系统进行曝光,随后用 Image-Lab 软件对数字图像进行量化。

2.7 罗丹明 123 摄取法考察 EOFaz-SEDs 对 P-gp 功能的影响

精密称取 0.2 mg 罗丹明 123,用超纯水配成质量浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的罗丹明 123 溶液。将处于对数生长期的 Caco-2 细胞用胰酶消化,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 重悬为单个细胞,计数,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1500 r/min 离心 5 min,弃去上清,用 PBS 分散成细胞密度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,取 0.5 mL 至 1.5 mL EP 管中,1500 r/min 离心 5 min,弃上清,分别加入 0.5 mL 维拉帕米 (50 $\mu\text{mol/L}$, 阳性对照) 以及不同质量浓度的 EOFaz (6、12、24 $\mu\text{g/mL}$)、EOFaz-SEDs (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)、单一表面活性剂 (2、4、8 $\mu\text{g/mL}$)、表面活性剂混合物 (4、8、16 $\mu\text{g/mL}$),另设置不含药物的对照组。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 60 min,置冰上终止转运,4 $^{\circ}\text{C}$ 、2500 r/min 离心 5 min,弃上清,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,离心后弃上清。加入罗丹明 123,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 60 min,置冰上终止作用,4 $^{\circ}\text{C}$ 、2500 r/min 离心 5 min,弃上清,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,离心后弃上清,加入 0.5 mL PBS 轻轻吹打,制成单个细胞悬液 (1×10^4 个细胞)。采用流式细胞术测定检测胞内罗丹明 123 平均荧光强度 (激发波长为 488 nm、发射波长为 535 nm)。

2.8 EOFaz-SEDs 的小鼠急性毒性试验

2.8.1 最高致死量和最低致死量的试验研究 预试验目的是为了找出引起动物 LD_{50} 和 100% (LD_{100}) 死亡的剂量,以便安排正式实验。取小鼠 20 只,体重 18~22 g,每个试验组 4 只动物,雌雄各半,进行预试验^[28]。给药前小鼠禁食不禁水过夜,一次性口服不同剂量的 EOFaz-SEDs,测定最大耐受剂量 (LD_{50})、绝对致死量 (LD_{100})。预试验结果表明,小鼠口服制剂的 LD_{50} 和 LD_{100} 分别为 4 g/kg 和 7

g/kg, 组间剂量比为 1:1.150 1。

2.8.2 小鼠急性毒性试验研究 根据预试验获得的最高致死量和最低致死量对正式试验进行分组, 共 5 组, 每组试验动物 10 只, 雌雄各半。给药最高剂量为 7 g/kg, 给药前小鼠禁食不禁水过夜, 给药后立刻观察小鼠的外观体征、饮食欲、行为活动、大小便、中枢神经系统症状、呼吸系统等情况, 死亡情况, 给药后连续观察 14 d。对在试验中死亡的动物以及试验结束时处死的动物进行解剖, 对组织器官出现的体积、颜色等改变进行详细记录。根据每组药物各剂量动物的死亡数, 用按 Bliss 机率单位法计算半数致死剂量 (median lethal dose, LD₅₀) 及其 95% 可信限评估 EOFZA-SEDDS 制剂对小鼠的急性毒性。给药后逐日观察并记录中毒反应、死亡率和死亡情况。给药后连续观察 14 d。对在试验中死亡的动物以及试验结束时处死的动物进行解剖, 对组织器官出现的体积、颜色等改变进行详细记录。

2.9 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据均是从 3 个及以上独立的实验中获得, 使用 *t* 检验统计分析数据。

3 结果

3.1 细胞毒性实验

3.1.1 MTT 细胞活力实验 如图 1 所示, 与对照组比较, 无水乙醇与 Kolliphor HS 15 混合物在 16~56 $\mu\text{g/mL}$ (相当于 60~140 $\mu\text{g/mL}$ 的 EOFAZ-SEDDS 中所含混合乳化剂的量) 对培养 5 d Caco-2 细胞存活率没有影响, 但显著增加培养 1、3 d 的 Caco-2 细胞存活率 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与 EOFAZ 组比较, EOFAZ-SEDDS 处理培养 1、3、5 d 的 Caco-2 细胞 24 h 后细胞存活率均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明 EOFAZ 的细胞毒性比含有等量 EOFAZ 的 SEDDS 的细胞毒性大, 说明将 EOFAZ 制备成 SEDDS 后降低了 EOFAZ 的细胞毒性, 乳化剂混合物对细胞活力没有影响。

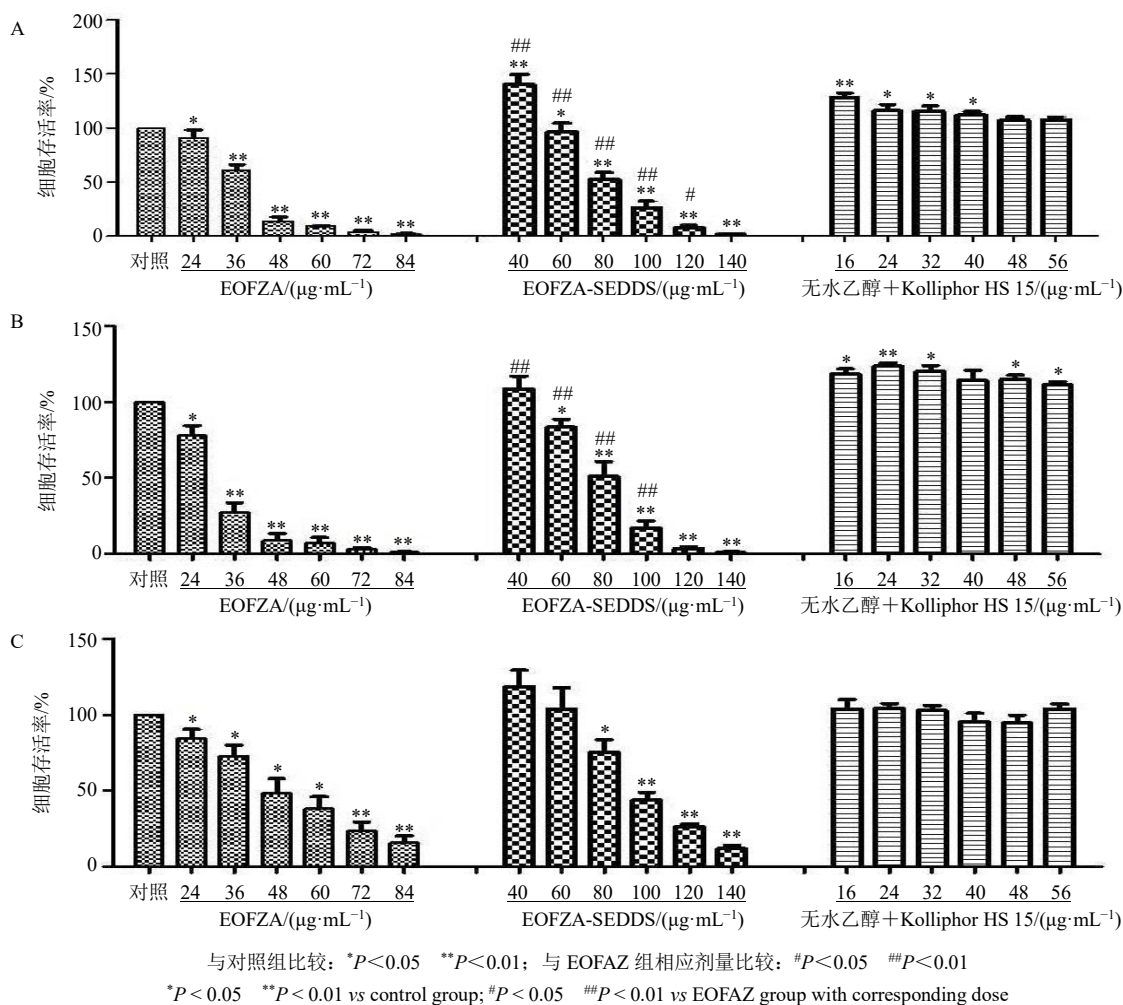
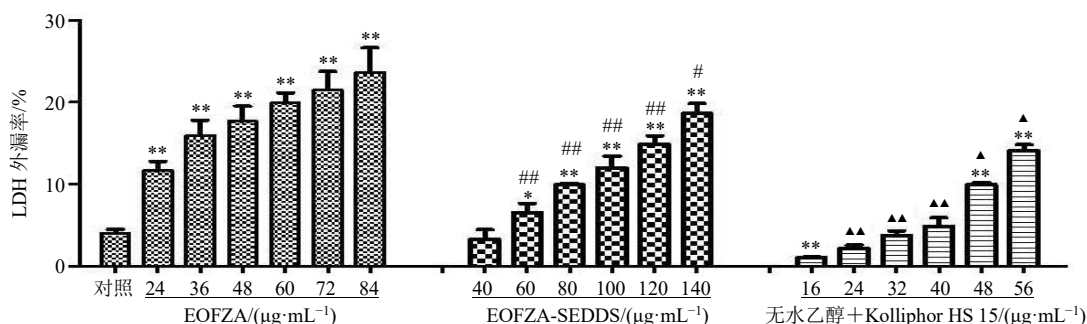


图 1 EOFAZ-SEDDS 对培养 1 (A)、3 (B)、5 d (C) 的 Caco-2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of EOFAZ-SEDDS on cell viability of Caco-2 cells cultured for 1 (A), 3 (B), 5 d (C) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.1.2 LDH 活力实验 如图 2 所示, 与对照组比较, EOFAZ (24~84 $\mu\text{g/mL}$)、EOFAZ-SEDDS (60~140 $\mu\text{g/mL}$)、乳化剂混合物 (48~56 $\mu\text{g/mL}$) 显著升高细胞 LDH 外漏率 ($P<0.05$ 、0.01)。与 EOFAZ 组比较, EOFAZ-SEDDS (60~140 $\mu\text{g/mL}$) 组 LDH

外漏率显著降低 ($P<0.05$ 、0.01); 与 EOFAZ-SEDDS 组比较, 乳化剂混合物 (24~56 $\mu\text{g/mL}$) 组 LDH 外漏率显著降低 ($P<0.05$ 、0.01)。表明高浓度乳化剂混合物可损伤细胞膜, 将 EOFAZ 制备成 EOFAZ-SEDDS 降低了 EOFAZ 的细胞毒性。



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 EOFAZ 组相应剂量比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与 EOFAZ-SEDDS 组相应剂量比较: ^ $P<0.05$ ^^ $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs EOFAZ group with corresponding dose; ^ $P<0.05$ ^^ $P<0.01$ vs EOFAZ-SEDDS group with corresponding dose

图 2 EOFAZ-SEDDS 对 Caco-2 细胞 LDH 外漏率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of EOFAZ-SEDDS on leakage rate of LDH in Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 药物对 Caco-2 细胞单层通透性的影响

3.2.1 Caco-2 单层细胞模型的建立 培养 21 d 后 Caco-2 细胞的 TEER 值 $>1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 细胞单层膜的 AP 侧和 BL 侧培养基中碱性磷酸酶的活力比大于 3:1, 荧光黄由细胞膜单层 AP 侧的表观渗透系数 (apparent permeability coefficient, P_{app}) 值为 $(3.57 \pm 1.75) \times 10^{-7} \text{ cm/s}$, 说明细胞单层的紧密性良好, 满足实验要求。

3.2.2 EOFAZ-SEDDS 对荧光黄渗透性的影响 如图 3 所示, EOFAZ、EOFAZ-SEDDS、无水乙醇和 Kolliphor HS 15 混合物、Kolliphor HS 15 和无水乙

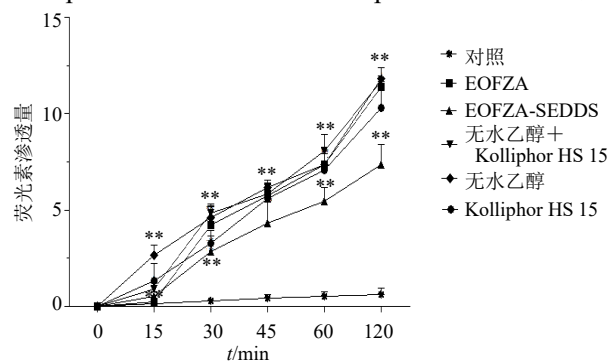
醇可以影响细胞旁通透性, 进而影响肠吸收。

3.3 Western blotting 考察 EOFAZ-SEDDS 对 P-gp 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, EOFAZ (12、24 $\mu\text{g/mL}$) 组 Caco-2 细胞中 P-gp 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), EOFAZ-SEDDS (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 组、Kolliphor HS 15 (8 $\mu\text{g/mL}$) 组、无水乙醇 (2、4、8 $\mu\text{g/mL}$) 组、Kolliphor HS 15+无水乙醇混合物 (8 $\mu\text{g/mL}$) 组 P-gp 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、0.01)。表明 EOFAZ 可抑制 P-gp 的表达, 而 EOFAZ-SEDDS、Kolliphor HS 15、无水乙醇、Kolliphor HS 15 和无水乙醇混合物均可诱导 P-gp 的表达。

3.4 罗丹明 123 摄取法考察 EOFAZ-SEDDS 对 P-gp 功能的影响

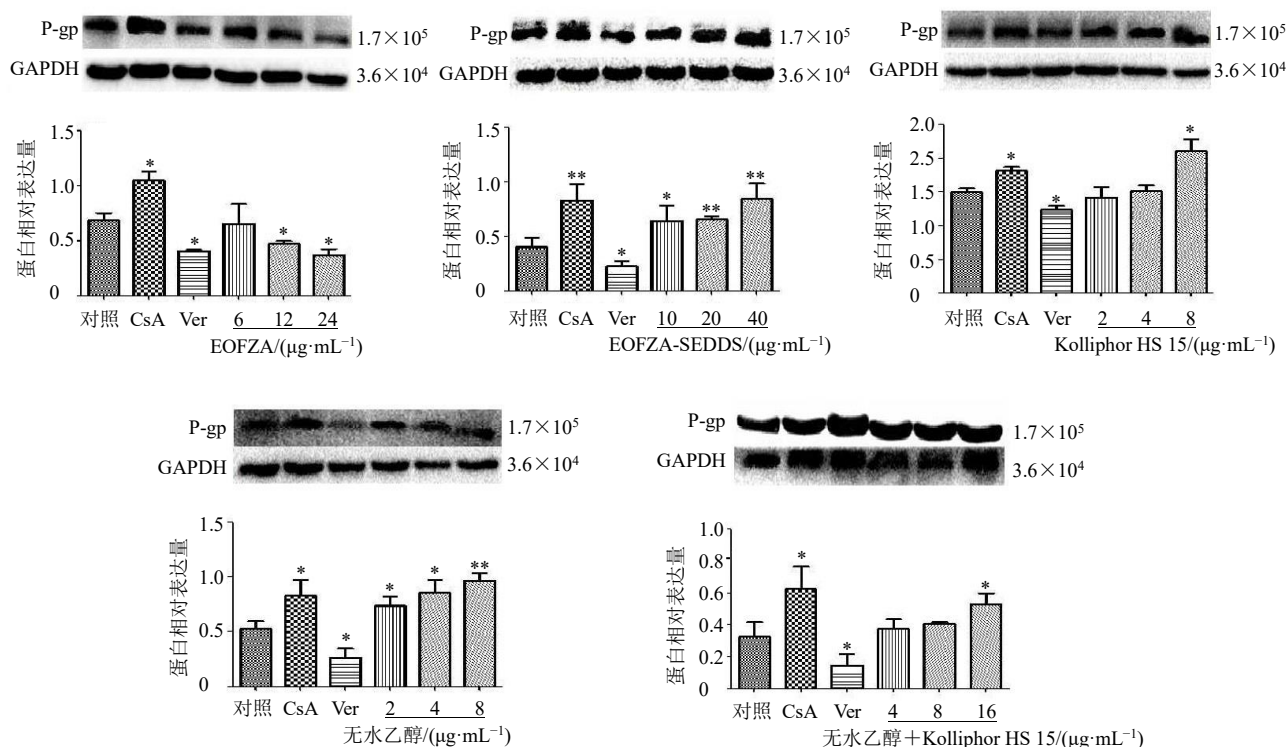
如图 5 所示, 与对照组比较, EOFAZ (6、12、24 $\mu\text{g/mL}$) 组、EOFAZ-SEDDS (40 $\mu\text{g/mL}$) 组细胞内罗丹明 123 荧光强度显著增加 ($P<0.05$), Kolliphor HS 15、无水乙醇、Kolliphor HS 15+无水乙醇混合物在所考察浓度范围内对细胞内罗丹明 123 的荧光强度增强作用与对照组比较无显著性差异。表明 EOFAZ 和高剂量的 EOFAZ-SEDDS 均对 P-gp 外排功能具有抑制作用, 低、中剂量的 EOFAZ-SEDDS、Kolliphor HS 15 与无水乙醇混合物、单独 Kolliphor HS 15 和无水乙醇对 P-gp 外排功能没有影响。



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下图同
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group, same as below figures

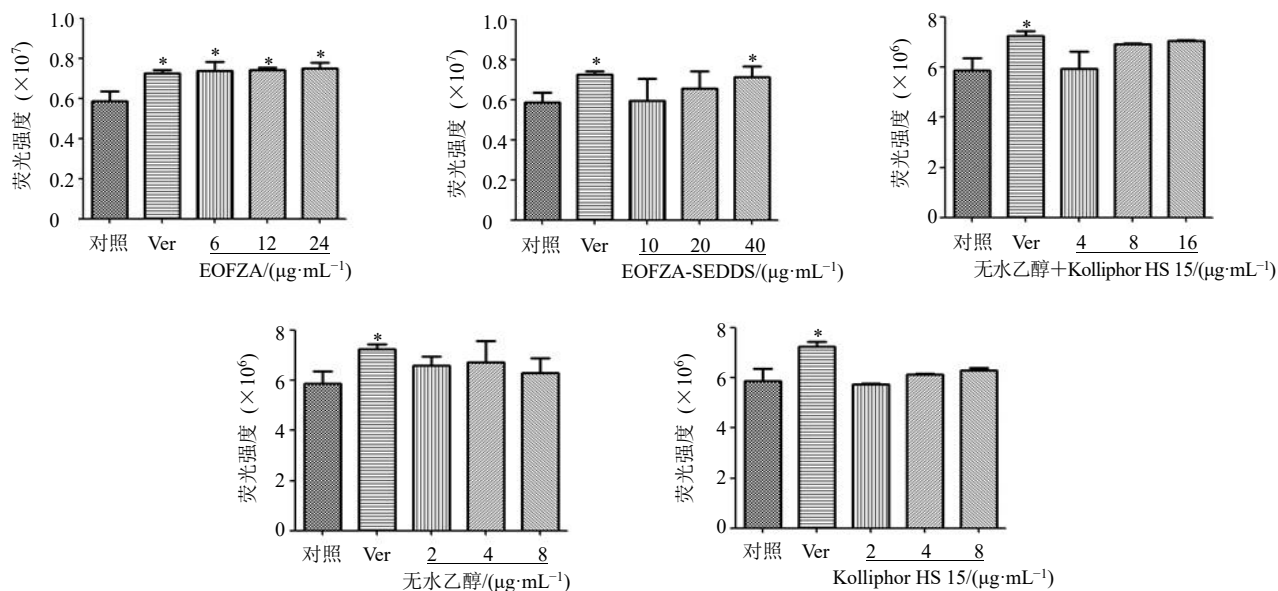
图 3 药物对 Caco-2 单层的荧光黄渗透性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of samples on Lucifer yellow permeability of Caco-2 monolayer ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



CsA-环孢素 A Ver-维拉帕米, 图 5 同

CsA-cyclosporine A Ver-verapamil, same as fig. 5

图 4 EOFAZ-SEDDS 对 P-gp 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of EOFAZ-SEDDS on P-gp protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 5 EOFAZ-SEDDS 对 P-gp 功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of EOFAZ-SEDDS on P-gp function ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 EOFAZ-SEDDS 的小鼠急性毒性试验

小鼠口服 EOFAZ-SEDDS 制剂正式试验结果发现, 小鼠口服制剂的 LD₅₀ 为 5.291 5 g/kg, LD₅₀ 的 95% 可信限为 4.927 8~5.682 1 g/kg (表 1)。在小鼠口服 EOFAZ-SEDDS 制剂给药后, 出现自主活动、

探究、梳理、运动减少, 同时出现嗜睡、僵住、强直性惊厥、震颤、俯卧、共济失调、呼吸急促、呼吸困难、呼吸暂停、食欲下降、水样便、尿失禁、流泪等症状, 但停药后恢复正常。将死亡后小鼠剖检可见心、肝、脾、肺、肾的体积和颜色未发现任

表 1 EOFaz-SEDDS 对小鼠的急性毒性试验结果
Table 1 Acute toxicity test results of EOFaz-SEDDS in mice

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数/只	死亡数/只	死亡率/%
对照	—	10	0	0.00
EOFaz-SEDDS	4	10	0	0.00
	4.600 7	10	2	20.00
	5.261 5	10	5	50.00
	6.086 1	10	8	80.00
	7	10	10	100.00

何异常改变。

4 讨论

Caco-2 细胞广泛用作研究药物肠道渗透和评价细胞毒性的体外模型，但在报道的细胞培养方案中仍存在相当大的差异。关键细胞培养参数的变化如培养持续时间，对 Caco-2 细胞群的形态和功能特性有直接影响^[29-30]。对于在细胞毒性和渗透试验中使用的细胞的成熟度也没有统一标准。Bu 等^[31]证明具有不同融合度和成熟度的 Caco-2 细胞对相同的药物表现出不同的敏感性。故在本研究 MTT 实验中建立了一系列具有相同初始接种密度但不同培养持续时间的 Caco-2 细胞。结果表明 EOFaz 处理培养不同天数的 Caco-2 细胞 24 h 后细胞存活率均显著低于 EOFaz-SEDDS。与 EOFaz 相比，Caco-2 细胞对 EOFaz-SEDDS 产生显著耐受性，推测可能是由于 EOFaz 留在胃肠道中形成的微乳液的乳滴中，从而限制其与肠细胞膜的接触，从而降低其细胞毒性。MTT 结果表明，与对照组比较，16~56 μg/mL 表面活性剂对 Caco-2 细胞没有显示出任何毒性作用；而 LDH 实验结果表明，48~56 μg/mL 表面活性剂对细胞的毒性具有显著性统计学意义。导致 MTT 和 LDH 测定结果差异的原因可能是两者测定原理不同所致。

LDH 渗漏是细胞膜损伤的细胞毒性研究的经典生物标志物，当细胞损伤时，发生细胞凋亡或坏死而造成细胞膜结构破坏，导致细胞膜通透性改变，导致细胞质内的 LDH 释放到培养液中，因此 LDH 法通过检测从细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性，对细胞毒性进行定量分析^[32]。MTT 检测原理主要基于在线粒体中 MTT 的酶促转化，活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓖并沉积在细胞中，而死细胞无此功能，在一定细胞数范围内，MTT 结晶形成的

量与存活细胞数呈正相关。Sambuy 等^[33]证明表面活性剂的细胞毒性机制不是线粒体呼吸的抑制，而是通过影响膜完整性导致膜组分的溶解，进而产生细胞毒性。因此本研究 LDH 结果显示乳化剂混合物可损伤细胞膜，而 MTT 检测结果显示乳化剂混合物对细胞线粒体没有影响。

本研采用 Caco-2 细胞单层模型考察 EOFaz、EOFaz-SEDDS、Kolliphor HS 15、无水乙醇、无水乙醇和 Kolliphor HS 15 混合物对细胞旁通透性的影响，结果表明，EOFaz、EOFaz-SEDDS、无水乙醇和 Kolliphor HS 15 混合物、单独的 Kolliphor HS 15 和无水乙醇均可显著增加细胞旁通透性。而用于荧光黄渗透性实验的 EOFaz、赋形剂或 SEDDS 的浓度均为安全浓度，表明 EOFaz、赋形剂或 SEDDS 的渗透增强作用可能不是由细胞毒性引起的，即 EOFaz、赋形剂、SEDDS 改变细胞单层屏障功能可能是由于损伤细胞间紧密连接所致。已有研究表明乙醇作用后肠上皮屏障通透性增加达到峰值后又逐渐恢复，乙醇是通过短暂性破坏细胞紧密连接的完整性进而增加肠上皮屏障通透性^[34]。然而对于 EOFaz、Kolliphor HS 15 或 SEDDS 的渗透增强作用是否可逆有待进一步研究。因此，当 EOFaz、EOFaz-SEDDS 与被动转运药物（如阿昔莫司）联合用药时，可能会增加被动转运药物的生物利用度。

本研究使用 Caco-2 单层作为小肠模型评估了 EOFaz、EOFaz-SEDDS 或赋形剂对肠 P-gp 表达和功能的影响。结果表明 EOFaz 可抑制 P-gp 的功能和表达，EOFaz-SEDDS 诱导 P-gp 的表达，低、中剂量的 EOFaz-SEDDS 对 P-gp 的功能没有影响，只有高剂量的 EOFaz-SEDDS 抑制 P-gp 外排功能；乳化剂虽然诱导了 P-gp 的表达但对其功能没有影响。由此可见，在一定的浓度范围内 EOFaz-SEDDS 虽然诱导了 P-gp 的表达但其外排功能并没有增加，这可能与 Caco-2 细胞表面新近表达的 P-gp 功能缺失有关，研究表明新表达的 P-gp 需要大约 10 d 的时间才能发挥其全部功能^[35]。另一方面可能是因为 EOFaz 停留在形成的微乳液的乳滴中，因此减弱了 EOFaz 对 P-gp 功能的抑制作用，当浓度较高时，乳液中游离的 EOFaz 达到一定浓度才发挥了其对 P-gp 功能的抑制作用。因此 EOFaz 或较大剂量的 EOFaz-SEDDS 抑制 P-gp 的功能增强 P-gp 底物的口服吸收，长期应用 EOFaz 或较大剂量的 EOFaz-SEDDS 可能通过抑制肠道以及其他器官 P-gp 的功

能而降低 P-gp 的活性, 改变其他 P-gp 底物的生物利用度。

小鼠口服 EOFAZ-SEDDS 制剂正式试验结果发现 EOFAZ-SEDDS 对小鼠实际无毒。在急性毒性实验中, 受试物的给药容量受试验动物胃的内容物的影响, 若给药途径为口服给药, 小鼠和大鼠在给药前须禁食, 可自由饮水。啮齿动物禁食时间的长短也会影响药物代谢酶的活性以及受试物在肠道中的吸收, 所以小鼠和大鼠在给药前须严格禁食 12 h, 给药时间最好在上午。在口服药品的急性毒性试验中, 给药体积也会影响受试药物的吸收, 从而影响动物死亡率, 故本研究选择适宜的给药体积, 使每只动物在给药容量上相等。

综上, EOFAZ-SEDDS 对小鼠实际无毒, 此外制备所得的 EOFAZ-SEDDS 可以降低 EOFAZ 的细胞毒性, 但改变 Caco-2 细胞单层屏障功能, 同时诱导 P-gp 表达, 在一定浓度范围内对 P-gp 功能没有影响。本研究有待于进一步观察 EOFAZ-SEDDS 作用后, P-gp 表达程度与其活性之间的相关性是否与 Caco-2 细胞表面新近表达的 P-gp 功能缺失有关, 以为临床合理用药提供实验性参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张彦燕, 文波, 陶玲, 等. 艳山姜挥发油对脂多糖诱导损伤的血管内皮细胞保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4): 66-68.
- [2] 文波, 令狐克刚, 徐旖旎, 等. 艳山姜挥发油抑制 JNK1/2/3 磷酸化对 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 112-115.
- [3] 沈祥春, 李万奎, 陶玲. 艳山姜挥发油对氧化低密度脂蛋白诱导人脐静脉血管内皮细胞损伤及一氧化氮合酶-一氧化氮的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(24): 1937-1940.
- [4] 张彦燕, 沈祥春. 艳山姜化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 179-181.
- [5] Tao L, Hu H S, Shen X C. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from *Fructus Alpiniae zerumbet* (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings *in vitro* [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(5): 387-393.
- [6] Shen X C, Tao L, Li W K, *et al.* Evidence-based antioxidant activity of the essential oil from *Fructus A. zerumbet* on cultured human umbilical vein endothelial cells' injury induced by ox-LDL [J]. *BMC Complementary Altern Med*, 2012, 12(1): 1-10.
- [7] Chen Y, Li D, Xu Y N, *et al.* Essential oils from fructus A. zerumbet protect human aortic endothelial cells from apoptosis induced by ox-LDL *in vitro* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 956824.
- [8] 柯秀梅, 杨荣平, 郭响香, 等. 自乳化释药系统 (SEDDS) 对姜黄素类组分增溶作用的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 935-941.
- [9] Lahlou S, Leal Interaminense L F, Leal-Cardoso J H, *et al.* Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003, 17(3): 323-330.
- [10] Huang W, Chen Z Y, Wang Q D, *et al.* Piperine potentiates the antidepressant-like effect of *trans*-resveratrol: Involvement of monoaminergic system [J]. *Metab Brain Dis*, 2013, 28(4): 585-595.
- [11] Johnson J J, Nihal M, Siddiqui I A, *et al.* Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(8): 1169-1176.
- [12] 杨志欣, 张蕾, 王鑫, 等. 自乳化药物递送系统研究概述 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 563-569.
- [13] 吴朝花, 严俊丽, 王益, 等. 艳山姜挥发油自乳化释药系统的优化及评价 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 3970-3976.
- [14] 蒋金萍, 廖青, 王晓宁, 等. 2 类表面活性剂对细胞增殖抑制的对比研究 [J]. 纺织学报, 2012, 33(7): 77-81.
- [15] 胡大裕, 李高. 几种乳化剂的细胞毒性研究 [J]. 中国药师, 2006, 9(4): 294-296.
- [16] 吴懿, 朱容慧, 赵军宁, 等. 3 种表面活性剂对 Caco-2 细胞的细胞毒性研究 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 157-158.
- [17] Han Y, Tan T M, Lim L Y. Effects of capsaicin on P-gp function and expression in Caco-2 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(12): 1727-1734.
- [18] 王雁, 安秋凤. 乳化剂的安全性问题 [J]. 日用化学品科学, 2008, 31(1): 28-31.
- [19] Miller J M, Beig A, Krieg B J, *et al.* The solubility-permeability interplay: Mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2011, 8(5): 1848-1856.
- [20] Fischer S M, Brandl M, Fricker G. Effect of the non-ionic surfactant Poloxamer 188 on passive permeability of poorly soluble drugs across Caco-2 cell monolayers [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 79(2): 416-422.
- [21] Kim S W, Kwon H Y, Chi D W, *et al.* Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg₃ [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65(1): 75-82.
- [22] Yamashita S, Tanaka Y, Endoh Y, *et al.* Analysis of drug

- permeation across Caco-2 monolayer: Implication for predicting *in vivo* drug absorption [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(4): 486-491.
- [23] Zupančič O, Griebinger J A, Rohrer J, *et al.* Development, *in vitro* and *in vivo* evaluation of a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for oral enoxaparin administration [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 109: 113-121.
- [24] 彭燕, 谭晓斌, 贾晓斌. 甘草黄酮类成分对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白功能和表达的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2703-2709.
- [25] 宋娟, 刘晓磊, 何娟, 等. 川芎嗪和人参皂苷 Rg₁ 对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白功能和表达的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(13): 987-991.
- [26] 柳睿, 金晶, 苟晓莉, 等. 野黄芩苷对 Caco-2 细胞中 P-gp 蛋白表达及活性的影响 [J]. 中国药师, 2015, 18(4): 529-532.
- [27] 吴林菁, 姜丰, 苏菊, 等. 艳山姜挥发油提取工艺优选及化学成分 GC-MS 分析 [J]. 贵州医科大学学报, 2017, 6(42): 655-660.
- [28] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1-3.
- [29] Dimitrijevic D, Shaw A J, Florence A T. Effects of some non-ionic surfactants on transepithelial permeability in Caco-2 cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52(2): 157-162.
- [30] Natoli M, Leoni B D, D'Agnano I, *et al.* Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(6): 1531-1543.
- [31] Bu P L, Ji Y, Narayanan S, *et al.* Assessment of cell viability and permeation enhancement in presence of lipid-based self-emulsifying drug delivery systems using Caco-2 cell model: Polysorbate 80 as the surfactant [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 99: 350-360.
- [32] 包汇慧, 毛伟峰, 雍凌, 等. 双酚 A 对 Caco-2 细胞的细胞毒性及氧化应激研究 [J]. 毒理学杂志, 2016, 30(2): 96-101.
- [33] Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, *et al.* The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2005, 21(1): 1-26.
- [34] 佟静, 王颖, 王炳元. 乙醇对肠黏膜屏障功能的影响及作用机制 [J]. 山西医药杂志: 下半月刊, 2012, 41(7): 667-669.
- [35] Hosoya K I, Kim K J, Lee V H L. Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers [J]. *Pharm Res*, 1996, 13: 885-890.

[责任编辑 李亚楠]