



田蓯苁在 Caco-2 细胞模型中的吸收特性研究

黄志巧^{1,2}, 邢建国³, 王新春^{1,2*}, 王盛², 袁勇²

(1. 石河子大学医学院第一附属医院, 新疆石河子 832008;

2. 石河子大学药学院, 新疆石河子 832002; 3. 新疆自治区药物研究所, 新疆乌鲁木齐 830004)

[摘要] 目的:研究田蓯苁在 Caco-2 细胞模型中的吸收特性。方法:体外培养的人小肠上皮细胞模型 Caco-2, 高效液相色谱法测定田蓯苁含量, 进行田蓯苁在小肠上皮细胞的摄取、跨膜转运及外排研究。探讨时间、pH、药物浓度及抑制剂维拉帕米、叠氮化钠、2,4-二硝基酚、根皮苷和乳糖对 Caco-2 细胞摄取田蓯苁的影响。结果:田蓯苁在 Caco-2 细胞中的摄取呈时间依赖性;在 4~16 mg·L⁻¹, 摄取呈浓度依赖性, 符合被动扩散过程;在 pH 5.0~8.0, 酸性条件下有利于药物吸收;加入维拉帕米后, 田蓯苁的细胞摄取量为(1.545±0.010) mg·g⁻¹, 与对照组相比, 显著增高(P<0.05);加入叠氮化钠、2,4-二硝基酚以及根皮苷后, 田蓯苁的细胞摄取量分别为(0.994±0.003), (1.174±0.030), (1.098±0.021) mg·g⁻¹, 与对照组相比, 显著降低(P<0.05);加入乳糖后, 田蓯苁的细胞摄取量为(1.470±0.025) mg·g⁻¹, 与对照组相比, 差异无显著性;药物从 basolateral (B, 基底面) 到 apical (A, 肠腔面) 的渗透系数 P_{app} 大于 A 到 B (1.10 倍)。结论: P-gp 以及 Na⁺ 依赖葡萄糖转运载体 1 (SGLT1) 参与田蓯苁的转运过程;田蓯苁的吸收与乳糖酶根皮苷水解酶 (LPH) 无关;被动扩散和载体媒介转运共同参与田蓯苁细胞吸收过程。

[关键词] 田蓯苁; Caco-2 细胞; 摄取; 转运; 外排

香青兰 *Dracocephalum moldavica* L. 为唇形科青兰属植物, 又名巴迪然吉布亚。味甘、苦, 性凉, 归肝、脾经, 有泻火、清热、止血的功能。它在维吾尔医和民间广泛用于治疗冠心病及血液质旺盛(高血压)、寒性神经性头疼、寒性感冒、气管炎等疾病。主要含有挥发油、萜类、黄酮类、氨基酸、微量元素等化学成分。香青兰总黄酮是香青兰中保护心肌的主要活性成分^[1-4], 其中, 田蓯苁^[5]是香青兰总黄酮中的主要有效成分^[5], 具有较好的研发价值。

田蓯苁在 Caco-2 细胞模型中的吸收特性尚未见文献报道。本实验旨在运用细胞模型从细胞水平预测人的吸收情况, 研究田蓯苁的吸收机制, 探讨时间、温度、药物浓度及各种抑制剂对细胞摄取药物及转运的影响, 以期从细胞水平阐明田蓯苁的吸收特性, 为其给药剂型的合理设计提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 Caco-2 细胞株购自于美国菌种保藏中心(American type culture collection, ATCC), 实验

中所用细胞代数在 50 代以内。

1.2 仪器与试剂 LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津); 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司); 多功能酶标仪(Thermo3001 VARIOSKAN FLASH); Thanswell 24 孔板(美国 Costar 公司); 电子分析天平(奥豪斯国际贸易有限公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); CO₂ 恒温培养箱(美国 SHEL-LAB 公司); Millicell-ERS 电位仪(美国 Millipore 公司); 超净工作台(苏州净化设备厂)。田蓯苁对照品(实验室自制, 经¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, IR 等方法鉴定结构。经 HPLC 测定, 纯度大于 98%); DMEM 培养基(Gibco); 胎牛血清(Hyclone); 非必需氨基酸(Sigma); 胰蛋白酶(Trypsin, Sigma); 考马斯亮蓝(G-250, 碧云天生物有限公司); HBSS 缓冲液, DMSO, 根皮苷(Sigma), 乳糖(Sigma), 其余试剂为色谱纯(Sigma)。

2 方法

2.1 田蓯苁的 HPLC 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 31:69; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL; 检测波长 327 nm。

2.2 标准曲线的制备 精密称取田蓯苁对照品适量, 以乙腈-空白细胞裂解液 2:1 混合液稀释得分别为 0.078, 0.312, 0.624, 1.248, 4.992, 9.984, 19.968

[稿件编号] 20110624015

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102201-009)

[通信作者] *王新春, 主任药师, 博士, 主要从事中西药物新制剂及新剂型的研究, Tel: (0993)2855827, E-mail: cwjwxc@163.com



mg · L⁻¹一系列标准工作液。按 2.1 项下色谱条件进行分析,以田蓯昔峰面积(A)对质量浓度(C)进行回归,制备标准曲线。

2.3 田蓯昔培养液的配制 精密称取田蓯昔对照品适量,用空白 PBS 溶液制成 4, 8, 12, 16, 20 mg · L⁻¹对照品溶液。精密称取 MTT 用 PBS 缓冲液配成 5 g · L⁻¹ MTT 溶液,用时配制,避光保存。

2.4 MTT 法测定田蓯昔的细胞毒活性 用培养液将 Caco-2 细胞配制成细胞密度为 3 × 10⁴/mL 的悬液,按 200 μL/孔接种于 96 孔培养板,培养 24 h 后,分别更换含有不同浓度田蓯昔的培养液,调零组和对照组加入等体积的培养液(均含 1% DMSO, 3% 乙醇)。继续培养 44 h 后,每孔加入 5 g · L⁻¹ MTT 20 μL,培养 4 h,弃上清,加 DMSO 150 μL/孔,震荡 10 min。待 Formazan 溶解后,酶标仪 490 nm 处调零后读取吸光度。判断田蓯昔对 Caco-2 细胞的毒性。细胞存活率 = $A_{\text{实验孔}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

2.5 细胞培养 Caco-2 细胞生长在 T-25 培养瓶中,培养液为 DMEM(含 10% FBS,青霉素-链霉素,非必需氨基酸等),于 CO₂ 孵育箱中培养。待细胞生长融合约 80% 贴壁时,采用 0.25% 胰蛋白酶消化,将消化下来的细胞按 8 × 10⁴个/mL 接种于 24 孔板内,接种 24 h 后更换培养液,1 周内隔天换液,1 周后每天换液,细胞培养 14 d 后用于药物的细胞摄取试验。另以 8 × 10⁴个/mL 接种于 Transwell 培养板上,培养至 21 d,满足跨膜电阻大于 600 Ω · cm⁻² 的膜用于药物的跨膜转运实验。

2.6 药物摄取实验 细胞培养 14 d 后,吸去培养液,用 37 °C HBSS 洗涤 3 次,然后置 37 °C 细胞培养箱中孵育 0.5 h,以清除细胞表面对测定有干扰的物质。将待测药物加入到细胞表面,置于 37 °C 恒温箱中吸收一定时间后,迅速吸出药物,并用 4 °C 的 HBSS 迅速洗涤 3 次。然后超声破碎细胞,HPLC 测定药物的吸收量。该部分实验分别考察培养时间(15, 30, 60, 120 min)、培养介质 pH(5.0, 6.0, 7.0, 8.0)、质量浓度(4, 8, 16 mg · L⁻¹)和抑制剂(P-gp 抑制剂维拉帕米、SGLT1 抑制剂根皮苷、LPH 抑制剂乳糖、代谢抑制剂 2,4-二硝基酚和叠氮化钠)对田蓯昔细胞吸收的影响。

2.7 药物转运实验 Caco-2 细胞培养 21 d 后,取符合实验要求的 Transwell 培养板,首先用 HBSS 溶液洗细胞单层 3 次,然后置 37 °C 细胞培养箱

中孵育 10 min 左右,吸弃 HBSS 溶液。取 0.4 mL 溶有药物的 HBSS 溶液,加入 Transwell 培养板的 apical(肠腔侧, A) 或 basolateral(基底侧, B) 作为供给池,其对应的 B 侧或 A 侧加入 0.6 mL 空白 HBSS 作为接收池,置 37 °C 培养箱中培养,分别在 30, 60, 90, 120 min 时吸取接收池溶液各 200 μL,同时补足同体积预热至 37 °C 的 HBSS 溶液。实验平行做 3 份。

2.8 样品处理 将细胞培养板从培养箱内取出,先用缓冲液冲洗 3 次,除去细胞表面残留的废渣。再向孔内加入 1 mL 水。在 -72, 37 °C 条件下反复冻融 3 次,取出细胞 250 W 探头超声 2 min,得细胞裂解液,取其中一部分考马斯亮蓝法测定蛋白含量,另一部分加入 2 倍体积乙腈,涡旋离心,取上清液上样测定,结果以 mg(药物)/g(蛋白)表示。

2.9 数据分析 表观渗透系数 P_{app} (cm · s⁻¹) 的计算: $P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(A \times C_0)$, 其中 dQ/dt 为单位时间药物转运量(mg · L⁻¹ · min⁻¹); A 转运膜的面积(0.33 cm²); C₀ 为田蓯昔初始质量浓度(mg · L⁻¹)。

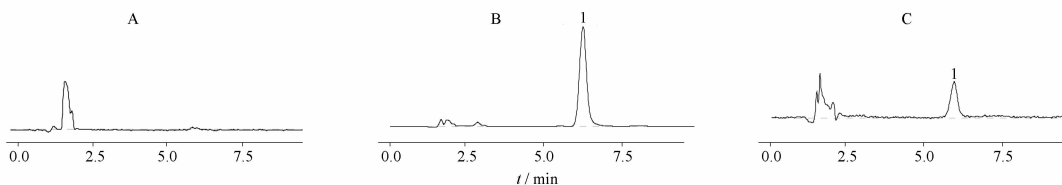
3 结果

3.1 田蓯昔的 HPLC 分析方法的建立 建立了田蓯昔的 HPLC 分析方法,标准曲线方程为 $Y = 32\ 672.403X + 2\ 702.96$, $r = 0.999\ 8$, 田蓯昔质量浓度在 4 ~ 16 mg · L⁻¹ 线性关系良好。日内、日间精密密度及回收率符合要求,空白样品无干扰。田蓯昔细胞样品色谱图见图 1。

3.2 田蓯昔细胞毒性研究 田蓯昔在 4 ~ 20 mg · L⁻¹, 对 Caco-2 细胞无明显的细胞毒作用,细胞存活率大于 85% 左右,因此在此质量浓度范围内给药,对 Caco-2 细胞没有毒性。此范围作为试验中给药质量浓度的参考范围。

3.3 培养时间对细胞摄取田蓯昔的影响 Caco-2 细胞对田蓯昔的摄取随培养时间的增加而变化,前 30 min 田蓯昔的摄取量逐渐增加,30 min 后趋于饱和。因此,在考察其它影响因素时,取样时间固定在 30 min。

3.4 田蓯昔浓度对 Caco-2 细胞摄取的影响 Caco-2 细胞分别与不同质量浓度(4, 8, 16 mg · L⁻¹) 的田蓯昔供试液培养 30 min,考察药物浓度对细胞摄取的影响。结果,田蓯昔在 4 ~ 16 mg · L⁻¹ 细胞对田蓯昔的摄取呈浓度依赖性,表明被动扩散可能参与田蓯昔的吸收。



A. 细胞空白液; B. 对照品溶液; C. 细胞样品; 1. 田蓯苣。

图1 田蓯苣细胞样品的 HPLC 图

Fig. 1 The chromatogram of tiliani in the Caco-2 cell

3.5 pH 对田蓯苣摄取的影响 取田蓯苣供试液分别在 pH 5, 6, 7, 8 的条件下, 测定加药 30 min 后细胞对药液的吸收量, 考察 pH 对细胞吸收药物的影响, 结果田蓯苣在酸性条件吸收较好。

3.6 抑制剂对田蓯苣摄取的影响 按药物摄取方法操作, 分别在加药 30 min 后测定有无抑制剂存在时, 细胞对田蓯苣摄取的变化, 见表 1。

表 1 抑制剂对 Caco-2 细胞摄取田蓯苣的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effects of inhibitor on Caco-2 cell uptake of tiliani

药名	浓度	摄取量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (pro)
Verapamil	$100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.545 \pm 0.010^{(1)}$
Phloridzin	$0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.098 \pm 0.021^{(1)}$
Lactose	$75 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.470 ± 0.025
Sodium azide	$10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.994 \pm 0.012^{(1)}$
2,4-dinitrophenol	$0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.174 \pm 0.031^{(1)}$
HBSS without inhibitor		1.482 ± 0.027

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.7 Caco-2 细胞的转运试验 取田蓯苣供试液 ($16 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别加入 Transwell 的 AP 侧和 BL 侧, 分别测定 AP-BL 及 BL-AP 的 P_{app} , 结果, BL-AP 的 P_{app} 大于 AP-BL 的 P_{app} , BL-AP 的 P_{app} 是 AP-BL 的 1.10 倍, 介于 1.00 与 1.50 之间, 可以进一步证明被动转运和载体媒介转运可能共同参与田蓯苣的细胞吸收过程。

4 讨论

Caco-2 细胞来源于人的结肠癌细胞, 体外培养一定时间后能够分化具有小肠微绒毛结构, 可以表达多种药物载体和酶, 目前被广泛应用于药物吸收机制的研究。本文田蓯苣的 Caco-2 细胞摄取结果表明, 药物摄取受时间、浓度、pH、抑制剂的影响。药物的摄取存在时间依赖性, 前 30 min 吸收逐渐增加, 在 30 min 以后吸收趋于饱和, 达峰时间为 30 min。在酸性环境下有利于田蓯苣的摄取, 在偏碱性

条件下, 药物的摄取明显降低。可能是因为在偏碱性条件下, 药物水解生成盐, 使药物的水溶性增强, 脂溶性降低, 从而导致药物的膜渗透性降低。在 $4 \sim 16 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 田蓯苣的摄取存在浓度依赖性, 符合被动扩散特点, 主要以被动转运吸收。

P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是多药耐药基因 (MDR1) 调控的外排蛋白, 主要功能是与底物结合后将其从细胞浆中排出细胞。本实验结果表明当加入 P-gp 专属抑制剂维拉帕米后, 田蓯苣的细胞摄取显著增加, 表明 P-gp 外排泵参与了田蓯苣的细胞摄取过程, 田蓯苣是 P-gp 的底物^[5]。

关于黄酮苷类化合物的吸收机制, 现在有 2 种可能的机制引起人们的关注。一种机制是存在于小肠肠壁上皮细胞细胞膜的 Na^+ 依赖葡萄糖转运载体 1 (SGLT1) 可能参与黄酮苷类化合物的转运^[7]。根皮苷是 SGLT1 的底物, 可竞争性抑制药物的吸收, 本试验通过加入 SGLT1 抑制剂根皮苷, 田蓯苣的吸收明显降低, 说明根皮苷竞争性抑制田蓯苣的吸收, 田蓯苣是 SGLT1 的底物。另一种机制是存在于哺乳动物小肠绒毛边缘的乳糖酶-根皮苷水解酶 (LPH) 参与水解至少一部分黄酮苷类化合物^[8]。乳糖是 LPH 酶的抑制剂, 加入乳糖后田蓯苣的吸收无明显变化, 说明田蓯苣不受 LPH 酶的影响, 不是 LPH 酶的底物。

叠氮化钠及 2,4-二硝基酚 (NDP) 均为通过影响细胞能量代谢来非选择性地抑制药物吸收的能量抑制剂。本试验结果表明与对照组相比, 加入叠氮化钠及 2,4-二硝基酚, 田蓯苣在 Caco-2 细胞的摄取降低。说明田蓯苣的吸收消耗能量, 即田蓯苣的吸收不单纯是被动转运, 还存在载体媒介转运。

人体完全吸收的药物的 $P_{\text{app}} > 1\text{E}-06$; 吸收在 10% 者 P_{app} 介于 $1\text{E}-06$ 与 $1\text{E}-07$ 之间; 吸收 1% 者 $< 1\text{E}-07$ 。本实验通过 Caco-2 细胞转运实验得出田蓯



昔的 AP-BL 侧的 P_{app} 为 $(2.58 \pm 0.91) E-06 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, BL-AP 侧的 P_{app} 为 $(2.83 \pm 0.45) E-06 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 表明田蓟昔的口服吸收较差。据文献报道,若 BL-AP 侧的 P_{app} 与 AP-BL 侧的 P_{app} 相同,可确定被动扩散为主要转运机制,若 BL-AP 侧 P_{app} 与 AP-BL 侧 P_{app} 的比值大于 1.5 则提示可能存在载体媒介转运。本实验田蓟昔单体 BL-AP 侧的 P_{app} 与 AP-BL 侧的 P_{app} 的比值为 1.10, 香青兰总黄酮中田蓟昔 BL-AP 侧的 P_{app} 与 AP-BL 侧的 P_{app} 的比值为 1.19, 均介于 1.00 与 1.50 之间,进一步证明即田蓟昔的吸收不单纯是被动转运,还存在载体媒介转运^[9-10]。

[参考文献]

[1] 冯长根, 李琼. 香青兰化学成分研究 [J]. 中成药, 2006, 28 (1): 94.
[2] 吴华, 李景清, 安文源, 等. 香青兰药材 HPLC 特征图谱的研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (7): 1178.
[3] 阿布力米提, 艾来提, 穆赫塔尔, 等. 香青兰中黄酮类化合物的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28 (8): 384.

[4] 古海锋, 陈若芸, 孙玉华. 香青兰化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (9): 677.
[5] Ki-Hoan Nam, Jae-Hoon Choi. Inhibitory effects of tilianin on the expression of inducible nitric oxide synthase in low density lipoprotein receptor deficiency mice [J]. Exp Mol Med, 2006, 38 (4): 445.
[6] 沙先谊, 方晓玲, 吴云娟. 9-硝基喜树碱在 Caco-2 细胞模型中的体外摄取、转运及外排动力学 [J]. 药学学报, 2004, 39 (10): 839.
[7] WALGRENN A, LIN J, KINNE R, et al. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1 [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294 (3): 837.
[8] 陈彦, 谭晓斌, 范晨怡. 大鼠肠道水解酶对淫羊藿黄酮苷的处置影响 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45 (7): 516.
[9] 赵静, 梁爱华. Caco-2 细胞模型及其在中药吸收转运研究中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (5): 79.
[10] 孟胜男, 张懋璠, 王欣, 等. 卡莫氟在 Caco-2 细胞模型中的吸收和转运特性 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44 (21): 1637.

Intestinal absorption and mechanism of tiliani in Caco-2 cell model

HUANG Zhiqia¹, XING Jianguo², WANG Xinchun^{1,2*}, WANG Sheng¹, YUAN Yong¹

(1. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832008, China ;

2. First affiliated hospital of medical college, Shihezi University, Xinjiang 832002, China;

3. Xinjiang Institute of Meteria Medica, Urumchi 830004, China)

[Abstracts] **Objective:** To observe the uptake of tiliani in Caco-2 Cell. **Method:** A human intestinal epithelial cell model Caco-2 cell *in vitro* cultured was applied to study the kinetics of uptake, transport and efflux kinetics of tiliani at small intestine. The effect of time, pH, drug concentration and inhibitors on the uptake of tiliani were investigated. The determination of tiliani was performed by HPLC. **Result:** Tiliani in Caco-2 cell uptake was time-dependent. tiliani in Caco-2 cell uptake was concentration-dependent at 4-16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ consistent with passive diffusion process. The acid condition was good for the uptake of tiliani at pH 5-8. Compared with the control group, tiliani cell uptake was significantly higher after additional treatment with verapamil (1.545 ± 0.010) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, ($P < 0.05$), and tiliani cell uptake was significantly lower after additional treatment with sodium azide (0.994 ± 0.003) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$), with 2,4-dinitrophenol (1.174 ± 0.030) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$), and with phloridzin (1.098 ± 0.021) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$). Compared with the control group, tiliani cell uptake was not significantly after additional treatment with lactose (1.470 ± 0.025) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, P_{app} of Basolateral to Apical was much more than that of Apical to Basolateral (1.10 Fold). **Conclusion:** P-glycoproteins and SGLT1 participate in the conveying process of tiliani in Caco-2 cells. The uptake of tiliani has no relationship to LPH. passive transport and carrier-mediated transport participate in the uptake process of tiliani in Caco-2 cells.

[Key words] tiliani; Caco-2 cells; uptake; transport; efflux

doi:10.4268/cjmm20120930

[责任编辑 陈玲]