



HPLC 考察和厚朴酚在 Caco-2 细胞模型的转运特征

曾宝^{1,2}, 吴安国^{1,2}, 陈建南¹, 赖小平^{1,2*}

(1. 东莞广州中医药大学 中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808;
2. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的:研究和厚朴酚在 Caco-2 细胞模型中的转运机制。方法:Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.5 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(70:30),检测波长 203 nm。以 Caco-2 细胞模型研究和厚朴酚的双向转运,考察时间、药物浓度、抑制剂、pH、温度对和厚朴酚转运的影响。运用 HPLC 检测药物浓度,计算其表观渗透系数。结果:和厚朴酚标准曲线为 $Y = 24\ 044 X - 3\ 763.6$ ($r = 0.999\ 8$),检测限 0.04 μmol · L⁻¹。和厚朴酚在 Caco-2 细胞模型中,从细胞层底端到顶端的转运量小于顶端到底端的转运,在相同浓度条件下和厚朴酚在 AP→BP 和 BP→AP 方向的转运量随时间呈增长趋势;维拉帕米可以显著提高和厚朴酚 AP→BL 的转运量;pH 对和厚朴酚在 AP→BL 方向的转运影响不明显;和厚朴酚在 AP→BL 和 BL→AP 方向对温度有依赖性。结论:和厚朴酚在 Caco-2 细胞模型中的转运主要为被动转运,兼有载体介导的主动转运,同时还受到 P-gp 糖蛋白的外排作用。

[关键词] 和厚朴酚;Caco-2;HPLC;表观渗透系数;P-gp 糖蛋白;被动转运

厚朴作为常用中药,具有燥湿消痰、下气除满等功效,常用于湿滞伤中、脘痞吐泻、食积气滞、腹胀便秘、痰饮喘咳^[1]。和厚朴酚(honokiol)是从中药厚朴中分离提纯的含有酚羟基类化合物,药理研究表明和厚朴酚具有扩张血管、抗炎、抗菌、抑制血小板聚集和抗心律失常等多种作用^[2]。动物实验研究表明,和厚朴酚口服和注射剂给药的生物利用度都较低,只有少量原型药物的吸收^[3-4]。国内外近 20 年来已广泛采用 Caco-2(the human colon adenocarcinoma cell lines)细胞模型作为体外模型来进行药物吸收研究^[5],该模型与药物在体内吸收有良好的相关性。关于和厚朴酚在 Caco-2 细胞模型中的吸收机制在国内外文献中未见报道。本实验采用 Caco-2 细胞模型研究和厚朴酚的吸收机制,探讨时间、药物浓度、抑制剂、pH、温度对和厚朴酚转运的影响,以期通过与整体实验数据相结合,阐明和厚朴酚生物利用度低的原因,为剂型改进提供理论依据。

1 材料

液氮罐(35 L, LS750);CU600 型电热恒温水箱

(上海一恒科学仪器有限公司);D2251 电子天平(1/10 万)(广州市正一科技有限公司);CO-150 CO₂ 培养箱(北京五洲东方科技发展有限公司);HHS21.25 电热恒温水浴锅(上海跃进医用光学仪器厂);SW-CJ-2JD 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);Olympus IX2-SP 倒置显微镜(日本);TGL-16C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司);SZ1-2 恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);超声波清洗剂(广州市华南超声设备有限公司);YX-280 手提式蒸汽消毒器(江阴滨江医疗设备厂);DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津);细胞电阻仪(Millicell-ERS,美国)。

Caco-2 细胞株(中科院上海细胞库,细胞所传代数 40~50 代);和厚朴酚(中国药品生物制品检定所,批号 110730-200609);甲醇、乙腈为色谱纯(德国默克公司);水为超纯水;12 孔 Tmawsell 培养板、75 cm² 培养瓶(Corning-Costar 公司, Cambridge, MA, USA);DMEM 培养基(Dulbecco S Modified Eagle's medium, Gibico);胎牛血清(Fetal bovine serum, Hyclone);非必需氨基酸(nonessential amino acids, NEAA, Hyclone);L-谷氨酰胺(L-glutamine, Sigma);青霉素-链霉素双抗液(Sigma);胰蛋白酶(trypsin, Sigma)。

2 方法

2.1 样品配制

[稿件编号] 20101121007

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI11B08-04)

[通信作者] *赖小平,研究员,研究方向中药新药研究,Tel:(020) 39358054, E-mail: lxp88@gzhtcm.edu.cn

[作者简介] 曾宝,博士后,研究方向中药新药与药代动力学,Tel:(020) 39358103, E-mail: zb-101@tom.com



2.1.1 和厚朴酚储备液 精密称取和厚朴酚对照品适量,加甲醇溶解定容至1 mL,配制成 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的和厚朴酚储备液。

2.1.2 1% 聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(吐温-80) 精密吸取吐温-80 1 mL至100 mL量瓶中,加适量pH 7.4的Hark's平衡盐溶液(HBSS)加热超声溶解,用pH 7.4的HBSS定容至刻度,体积分数为1%。

2.1.3 维拉帕米溶液 精密称取维拉帕米适量,加甲醇溶解定容至10 mL,配制成 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维拉帕米溶液,精密吸取维拉帕米甲醇溶液适量,用pH 7.4的HBSS定容至50 mL量瓶中,最终浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,作为维拉帕米储备液。

2.1.4 和厚朴酚于HBSS中的样品 精密吸取和厚朴酚储备液适量于10 mL量瓶中,加入1 mL 1%吐温-80,并用pH 7.4的HBSS定容至刻度,配制成10, 20, 50, 80, 100, 150, 200, 300, 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品,甲醇最终浓度不超过2%,吐温-80的含量为0.1%。

2.1.5 含维拉帕米的样品 精密吸取5 mL维拉帕米储备液,1 mL 1%吐温-80,50 μL 和厚朴酚储备液于10 mL量瓶中,加pH 7.4的HBSS定容至10 mL。

2.1.6 不同pH的和厚朴酚溶液 将1%吐温-80溶液和pH 7.4的HBSS溶液用HCl,NaOH溶液分别调节pH为5,9,按2.1.4项的样品配制法配制不同pH的样品。

2.2 细胞毒性试验

将Caco-2细胞悬液接种于灭菌处理的96孔板中,每孔加100 μL ,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养,然后加入2.1项下的9个梯度浓度的和厚朴酚HBSS样品溶液,并设对照孔,孵育4 h后吸出溶液加入MTT,再培养4 h,吸掉上清液,加入二甲基亚砜(DMSO),用酶标仪测定每孔值。记录结果,得到细胞的安全浓度。

2.3 双向转运实验

利用实验室建立的Caco-2细胞模型^[6],待Transwell板培养至第21天,各份溶液除菌后,用预热的pH 7.4的HBSS洗生长有Caco-2的Transwell板,再加入预热的HBSS, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养20 min,吸弃HBSS,再加入预热的HBSS, $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 条件下培养20 min,吸弃HBSS。AP侧到BL侧的转运:将0.5 mL样品加到AP侧作为供给池,同时在BL侧加入1.5 mL空白HBSS作为接受池;从BL侧到

AP侧转运:将1.5 mL样品加到BL侧作为供给池,同时在AP侧加入0.5 mL空白HBSS作为接受池,把Transwell培养板置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 的培养箱中,分别在30,60,90,120 min吸取接收室的转运液0.5 mL(AP→BL),0.25 mL(BL→AP),同时补加相应的空白HBSS。收集样品冷藏备用。

2.4 分析方法的建立

2.4.1 和厚朴酚的分析方法的建立 Kromasil 100-5C₁₈色谱柱(4.5 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(70:30),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长203 nm。

2.4.2 检测波长的选择 《中国药典》中和厚朴酚的检测波长为294 nm,由于本实验样品量的限制,因此对检测限提出了很高的要求,实验结果表明和厚朴酚在203 nm的检测限为 $0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,在294 nm的检测限为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,因此选择203 nm作为本实验的检测波长。

2.4.3 样品处理 取样品溶液 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,吸取上清液,进样分析。

2.4.4 标准曲线的建立 精密量取储备液适量,按2.1.3项样品配制方法配成摩尔浓度为200,100,80,40,20,2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,样品溶液按2.4.3项样品处理项操作后进样。标准曲线为 $Y=24044X-3763.6$ ($r=0.9998$)。HPLC色谱图见图1。

2.4.5 精密度、稳定性试验 本实验考察了和厚朴酚200,100,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3个不同浓度的精密度和稳定性,精密度RSD分别为1.7%,0.20%,1.4%;稳定性RSD分别为0.25%,0.10%,0.41%,表明此方法适合于和厚朴酚的含量测定。

2.5 P_{app}

药物透过Caco-2细胞单层的表观渗透系数用 P_{app} 作为参考,按下式药物计算转运率:

$$P_{\text{app}} = dQ / (dt \cdot A \cdot C_0) \text{ cm/s}$$

式中 dQ (nmol)为 dt (s)内的转运量, A (cm^2)为膜面积, C_0 ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)为在Caco-2单层细胞的顶侧或肠腔侧的药物初浓度。

两侧转运率比值 P_{ratio} 按下式计算:

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

式中 $P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP)}}$ 和 $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL)}}$ 分别为双向表观渗透系数。

运用Microsoft Excel 2003进行数据处理。

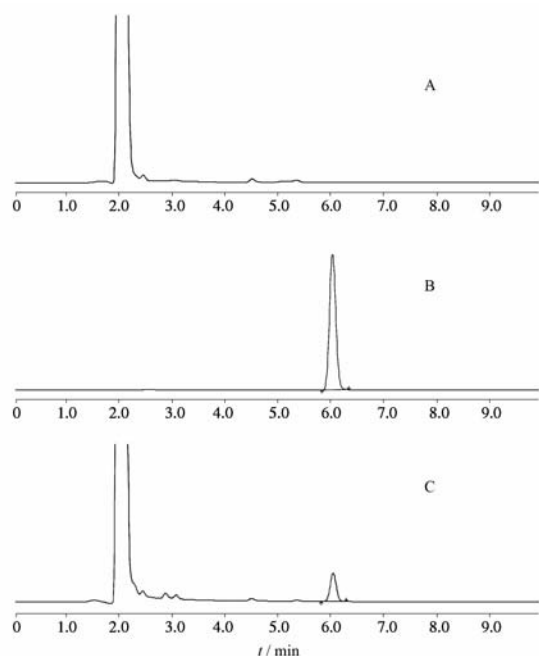


图 1 空白转运液(A)、和厚朴酚标准品(B)、和厚朴酚转运液(C)的 HPLC 图

3 结果

3.1 时间及浓度对和厚朴酚转运的影响

不同浓度的和厚朴酚溶液在 Caco-2 细胞模型中从 AP 侧到 BL 侧与从 BL 侧到 AP 侧的转运量随时间的变化见图 2,3。

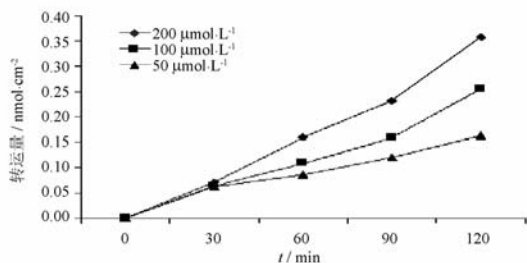


图 2 时间对和厚朴酚转运的影响 (AP 侧到 BL 侧)

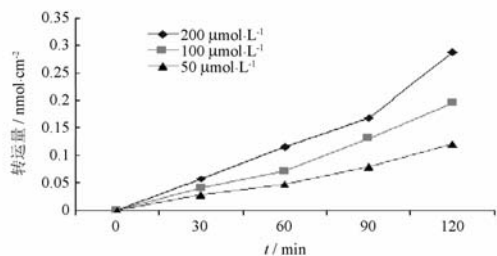


图 3 时间对和厚朴酚转运的影响 (BL 侧到 AP 侧)

在相同浓度条件下,和厚朴酚的转运量呈增长趋势;和厚朴酚从 AP 侧到 BL 侧的转运速率随浓度的增高而加快,说明其转运速率主要受浓度驱使,见图 4;和厚朴酚 AP→BL 的转运量要大于 BP 面到 AP 面的转运量,说明和厚朴酚的转运有一定的方向性,见图 5;和厚朴酚的 $P_{app(BL \rightarrow AP)}$ 与 $P_{app(AP \rightarrow BL)}$ 之间的比值 P_{ratio} 在不同浓度条件下均保持在 0.5 ~ 1,见表 1。上述结果表明和厚朴酚在 AP→BL 方向的转运方式主要为被动转运,同时兼有载体介导的主动转运。

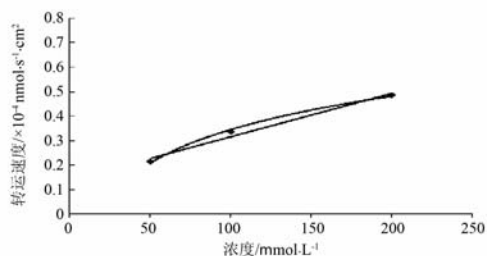


图 4 不同浓度的和厚朴酚的转运速率 (AP 侧到 BL 侧)

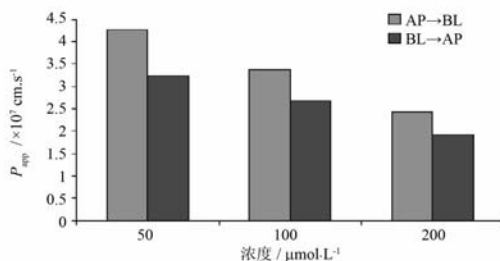


图 5 不同浓度条件下和厚朴酚 P_{app} 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 不同浓度的和厚朴酚溶液的 P_{app} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

和厚朴酚 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$P_{app} / \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$		$P_{ratio(BL \rightarrow AP/AP \rightarrow BL)}$
	AP→BL	BL→AP	
50	4.27 ± 0.12	3.24 ± 0.13	0.76
100	3.36 ± 0.24	2.67 ± 0.13	0.79
200	2.43 ± 0.12	1.91 ± 0.02	0.79

3.2 抑制剂维拉帕米对和厚朴酚转运的影响

维拉帕米可以显著提高和厚朴酚 AP→BL 的转运量,但是对 BL→AP 没有显著的影响,表明和厚朴酚在 AP 侧受到 P-gp 蛋白的外排作用,见图 6,表 2。

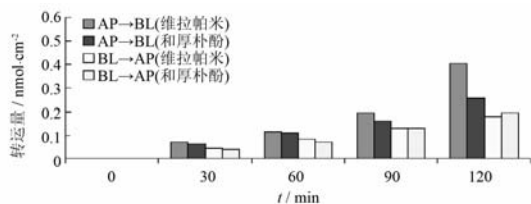


图6 维拉帕米对和厚朴酚转运的影响

表2 维拉帕米对和厚朴酚转运的 P_{app} 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	$P_{app} / \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$		$P_{ratio}(\text{BL} \rightarrow \text{AP} / \text{AP} \rightarrow \text{BL})$
	AP→BL	BL→AP	
和厚朴酚	3.36 ± 0.24	2.67 ± 0.13	0.79
维拉帕米 + 和厚朴酚	5.14 ± 0.26	2.45 ± 0.56	0.48

3.3 温度对和厚朴酚转运的影响

温度在药物的跨膜转运中起着重要的作用,其影响细胞膜上的转运蛋白的活性,对药物在 Caco-2 细胞膜上的转运产生重要的影响。在 4 °C 下,和厚朴酚在 60 min 时在 AP→BL 和 BL→AP 方向的转运速率急剧下降,在 120 min 后其转运量降低了 2~3 倍,见图 7,表 3。

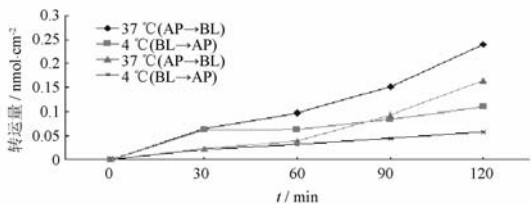


图7 温度对和厚朴酚跨膜转运的影响

表3 不同温度下和厚朴酚转运的 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度 / °C	$P_{app} / \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$		$P_{ratio}(\text{BL} \rightarrow \text{AP} / \text{AP} \rightarrow \text{BL})$
	AP→BL	BL→AP	
37	3.14 ± 0.09	1.34 ± 0.01	0.70
4	1.34 ± 0.01	2.21 ± 0.03	0.57

3.4 pH 对和厚朴酚转运的影响

pH 对药物的肠吸收有重要的影响,环境的 pH 和药物自身性质影响其在 Caco-2 细胞膜上的转运,合适的 pH 有助于药物的肠吸收。和厚朴酚在偏碱的 HBSS 中的转运量较多,但总体来说 pH 对和厚朴酚的转运没有显著的影响,见图 8,表 4。

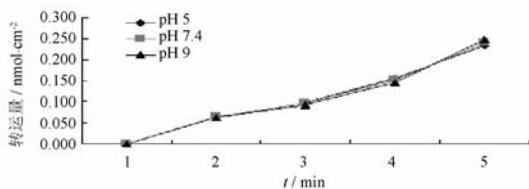


图8 PH 对和厚朴酚跨膜转运到影响 (AP 侧到 BL 侧)

表4 不同 pH 下和厚朴酚的 $P_{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH	$P_{app} / \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$
5	2.99 ± 0.10
7.4	3.14 ± 0.09
9	3.20 ± 0.12

4 讨论

Caco-2 细胞来源于人类结肠癌细胞,其结构和生化特点类似于人类小肠皮细胞,含有与小肠刷状缘皮相关的酶,能够在细胞水平提供关于药物分子通过小肠黏膜的吸收、代谢、转运信息^[7]。实际上,在 transwell 系统中,转运过程中的 2 个方向的浓度梯度改变并不是完全对等的,实验中 AP→BL 的 P_{app} 值要大于 BL→AP,这样的差别是由于 Caco-2 细胞单层 AP 侧分化出绒毛,其褶皱总面积大大高于 BL 侧面积,这使得 Caco-2 细胞单层 AP 侧具有更大的吸收面积。这样导致 AP→BL 的 P_{app} 偏大,从图可以看出和厚朴酚的转运速率随浓度的增大没有出现过度饱和的现象,说明其可能是受浓度驱使的被动扩散。同时兼有载体介导的主动转运。维拉帕米的加入可以显著提高和厚朴酚 AP→BL 的转运量,说明其转运受 P-gp 蛋白的外排作用。

温度对药物的转运的影响是很复杂的^[8],包括细胞膜上的载体的活性、细胞的本身的生长活性、细胞之间的间隙、AP 侧的绒毛的运动的快慢以及药物的溶解性等都受到温度的影响,低温会使以上的因素出现不利于药物的转运。和厚朴酚在 4 °C 下的转运量相对 37 °C 要低很多。很多药物对 pH 有很大的依赖性,而本文中 pH 对和厚朴酚在 Caco-2 的影响不是很大。

许多研究表明^[9-10],细胞模型与整体吸收有良好的相关性。是研究药物吸收机制,预测口服药物的体内吸收、生物利用度及安全性,新药剂型设计的良好工具。但是,细胞来源于结肠,缺乏分泌黏液的杯状细胞,因而缺乏小肠上皮的黏液层^[11]、且缺乏



肠道的蠕动等因素对药物吸收的影响。所以,实验结果还需进一步与整体动物实验数据相结合,为新剂型的设计提供理论依据。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 1995: 218.
[2] Pyo M K, Lee Y, Yun-Choi H S. Anti-platelet effect of the constituents isolated from the barks and fruits of *Magnolia obovata* [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25 (3): 325.
[3] 袁成, 梁爱君, 曾林. 厚朴酚与和厚朴酚在大鼠体内的药代动力学[J]. 解放军药理学学报, 2003, 19(4): 258.
[4] 谭毓治, 吕武精. 厚朴直肠给药的研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(1): 30.
[5] Yang H T, Wang G J. Transport and uptake characteristics of a new derivative of berberine (CPU-86017) by human intestinal epithelial cell line; Caco-2[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 1185.
[6] 曾宝, 王春玲, 吴宝国. Caco-2 细胞模型的建立及其在中药吸

收研究中应用探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21 (6): 570.
[7] 关溯, 陈孝, 黄民. Caco-2 细胞模型-药物吸收研究的有效“工具”[J]. 中国药理学通报, 2004, 20: 609.
[8] Zhu Z B, Makhija S K, Lu B, et al. Transport across a polarized monolayer of Caco-2 cells by transferrin receptor-mediated adenovirus transcytosis[J]. Virology, 2004, 325: 116.
[9] Hilgers A R, Smith D P, Biermacher J J, et al. Predicting oral absorption of drugs: a case study with a novel class of antimicrobial agents[J]. Pharm Res, 2003, 20: 1149.
[10] Artursson P, Borchardt R T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond [J]. Pharm Res, 1997, 14: 1655.
[11] Karlsson J, Wikman A, Artursson P. The mucus layer as a barrier to drug absorption in monolayers of human intestinal epithelial HT29-H goblet cells[J]. Int J Pharm, 1993, 99: 209.

Study on transport characteristics of honokiol in Caco-2 cell model by HPLC

ZENG Bao^{1,2}, WU Anguo^{1,2}, CHEN Jiannan¹, LAI Xiaping^{1,2*}

(1. *Research Institute of Mathematical Engineering of Guangzhou University of Chinese Medicine in Dongguan, Dongguan 523808, China;*
2. *Research Center of New Drug Development, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the transport mechanism of honokiol in Caco-2 cell model. **Method:** The analysis was performed on a Kromasil 100-5 C₁₈ column (4.5 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with acetonitrile-water (70:30) as mobile phase. The detection wavelength was set at 203 nm. Two-way transport of honokiol was studied by using Caco-2 cell model, and the effects of time, drug concentration, inhibitor, pH, temperature on the transport of honokiol was investigated. The drug concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and used to calculate the apparent permeability coefficient. **Result:** The standard curve of honokiol was $Y = 24\ 044X - 3\ 763.6$ ($r = 0.999\ 8$), and the detection limit was $0.04\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In Caco-2 cell model, the transport amounts from the top side to the base side of were more than that from the base side to the top side under the same concentration. The transport amounts increased with time both in AP→BL and BL→AP directions. Verapamil could improve the transport amounts of AP→BL. There were no effects of pH on the transport of AP→BL. Both in AP→BL and BL→AP directions, the transport showed temperature dependence. **Conclusion:** Honokiol is transported through the intestinal mucosa via a passive diffusion mechanism primarily, coexisting with a carrier-mediated transport, at the same time effected by P-gp.

[Key words] honokiol; Caco-2; HPLC; apparent permeability coefficient; P-gp glycoprotein; passive transport

doi:10.4268/cjcm20111007

[责任编辑 马超一]