



氧化槐果碱在 Caco-2 细胞模型中的吸收机制研究

冯志强^{1,2}, 谢智勇¹, 廖琼峰², 谭晓婧², 姚美村¹, 张蕾^{2*}

(1. 中山大学药学院, 广东广州 510006;

2. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006)

[摘要] 目的:研究氧化槐果碱在 Caco-2 细胞模型中的吸收机制。方法:MTT 实验考察氧化槐果碱在 Caco-2 细胞中的安全浓度范围,再利用 Caco-2 细胞单层模型研究氧化槐果碱的双向转运机制,以转运量及表观渗透系数(P_{app})为观测指标,考察时间、浓度、pH 和 P-gp 抑制剂维拉帕米对其吸收的影响。结果:氧化槐果碱在 Caco-2 细胞模型中的转运与时间和浓度呈正相关,并受 pH 影响;P-gp 抑制剂维拉帕米对其转运无影响,从单层细胞层顶端(AP)到基底端(BL)的转运与基底端到顶端的转运大致相同。结论:氧化槐果碱在 Caco-2 细胞模型中的吸收是被动转运。

[关键词] 氧化槐果碱;Caco-2 细胞模型;HPLC;被动转运

口服用药是中医治疗的主要手段,吸收是药物进入机体发挥作用的首要环节,所以自杨奎等首次提出“中药胃肠药动学”概念以来^[1],已有医药学者陆续引进多种体内、外模型研究中草药效成分的吸收特征及机制。其中,由于 Caco-2 细胞模型来源于人类结肠癌细胞,可在体外培养条件下自发进行上皮样分化且可形成紧密连接,在形态学、标志酶的功能表达及渗透性等方面与小肠上皮细胞相似,具有很好的同源性,因而成为进行药物吸收研究较理想的体外模型^[2-4]。

氧化槐果碱(oxyphocarpine, Osp)是广泛分布于苦参 *Sophora flavescens* Ait.、苦豆子 *S. alopecuroides* L. 和广豆根 *S. subprostrata* Chun et T. Chen 等豆科槐属植物中的一种喹诺里西啉类生物碱^[5],具有镇痛、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、免疫抑制、抗菌杀虫等作用^[6]。目前,国内外文献报道中尚未见氧化槐果碱在体外模型中的吸收特征及其机制研究。因此,本研究建立了 Caco-2 细胞模型,研究氧化槐果碱在小肠中的转运机制,探讨时间、药物浓度、pH 和

P-gp 抑制剂维拉帕米(verapamil, Ver)对细胞转运药物的影响规律,为后续研究含氧化槐果碱的中药复方的吸收机制提供基础数据和参考。

1 材料

1.1 仪器 IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Millicell-ERS 跨膜电阻仪(美国 Millipore 公司);CO-150 型 CO₂ 培养箱(美国 NBS 公司);SW-CJ-2F 双人双面超净工作台(苏州净化设备有限公司);飞鸽高速离心机(上海安亭科学仪器厂);CU-600 电热恒温水槽(上海齐欣科学仪器有限公司);RT-2100C 酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份公司);天美 T2000P 高效液相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司)。96 孔普通培养板、12 孔聚碳酸酯膜 Transwell 细胞培养板和 25 cm² 卡式细胞培养瓶购自 Corning 公司。

1.2 试剂 DMEM 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和非必需氨基酸(nonessential amino acids, NEAA)购自美国 Hyclone 公司;L-谷氨酰胺(L-glutamine)购自 Mechem 公司;0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 溶液以及青霉素(penicillin)和链霉素(streptomycin)购自美国 Gibco 公司;Hanks 缓冲溶液(Hanks balanced salt solution, HBSS, 自制);DMSO(天津市福晨化学试剂厂);MTT(Ameresco 公司,纯度大于 99.5%,批号 2497B516);氧化槐果碱(中国药品生物制品检定所,批号 111652-200301);

[稿件编号] 20101019004

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30901953);国家教育部新教师基金项目(20094425120001);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09304-003,2009ZX09501-017)

[通信作者] *张蕾,副教授,主要从事中药药效物质基础和药代动力学研究, Tel: (020) 39358081, E-mail: zhanglei261291@yahoo.com.cn



盐酸维拉帕米(中国药品生物制品检定所,批号100223-200102);色谱甲醇(Merk公司)。

1.3 细胞 Caco-2细胞株购自中国医学科学院上海细胞库(原代来源于美国典型菌种保藏中心ATCC, American Type Culture Collection),实验中所用细胞代数数为35~45代。

2 方法

2.1 溶液的配置 DMEM完全培养液:DMEM高糖培养基1 L,加3.71 g Na₂CO₃, pH 7.4,再加10% FBS,1% NEAA,1% L-glu,1%双抗,4℃保存,临用前制备。HBSS平衡盐溶液:称取NaCl 8.0 g, KCl 0.4 g, CaCl₂ 0.14 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.06 g, NaHCO₃ 0.35 g, glucose 1.0 g, KH₂PO₄ 0.06 g,加适量超纯水溶解并定容至1.0 L,用HCl/NaOH调节pH 7.4(或所需其他pH),0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,4℃保存备用。PBS平衡盐溶液:NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, NaHPO₄·H₂O 1.56 g, KH₂PO₄ 0.2 g,加纯化水至1 000 mL,调节pH 7.4,高压灭菌。MTT溶液:称取5 mg MTT溶于10 mL PBS溶液中,搅拌溶解后,0.22 μm微孔滤膜过滤,4℃避光保存,1周内使用。Osp对照品储备液:精密称取Osp对照品13.12 mg,用水溶解并稀释至50 mL,制备成1 000 μmol·L⁻¹的储备液,临用前配置并用HBSS稀释至所需摩尔浓度。

2.2 细胞培养 将冻存的细胞复苏以后,用DMEM完全培养液将其培养在25 cm²卡式细胞培养瓶中,置于37℃培养箱中,通入5% CO₂,相对湿度在90%。隔天换培养液,当细胞融合达80%后,用0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA消化液进行消化,按1:3的比例传代。取对数生长期的细胞,调节密度为8×10⁴~2×10⁵个/cm²接种到12孔Transwell板(或96孔板),AP侧加0.5 mL, BL侧加1.5 mL培养液。接种后隔天换液,1周后每天换液,培养至21 d。检测碱性磷酸酶活性和各孔跨膜电阻(均大于500 Ω·cm⁻²),细胞形成紧密单层后即可用于转运试验。

2.3 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)和C₁₈保护柱(4.6 mm×20 mm, 5 μm);流动相甲醇-0.2%磷酸水(15:85);流速1.0 mL·min⁻¹;检测波长210 nm;柱温室温;进样量20 μL。

2.4 专属性试验 分别进样空白基质(在细胞转

运试验给药前,用HBSS缓冲液将接种于12孔板、培养了21 d的Caco-2细胞冲洗3次,最后一次置于37℃培养箱温孵30 min,然后收集AP侧和BL侧的温孵液)、系列标准溶液(5.0 μmol·L⁻¹)和样品溶液以考察分析方法的专属性。

2.5 标准曲线的绘制 精密移取Osp对照品的储备液,用空白HBSS缓冲液配制成浓度分别为0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 25.0 μmol·L⁻¹系列标准溶液,在上述色谱条件下进样分析,以摩尔浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,采用加权最小二乘法(权重为1/W²)进行线性回归,绘制标准曲线。

2.6 精密度和准确性试验 用空白HBSS缓冲液以及空白基质(在细胞转运试验给药前,用HBSS缓冲液将接种于12孔板、培养了21 d的Caco-2细胞冲洗3次,最后一次置于37℃培养箱温孵30 min,然后收集AP侧和BL侧的温孵液)分别配置0.2, 1.0, 10.0 μmol·L⁻¹3个浓度的Osp溶液各5份进行HPLC测定,根据标准曲线计算样品中Osp的浓度并计算RE和RSD,考察方法的精密度和准确度。

2.7 稳定性试验 用空白HBSS配置0.2, 1.0, 10.0 μmol·L⁻¹3个浓度的Osp溶液,分别于0, 0.5, 1, 2, 4, 10 h进行HPLC测定,并根据标准曲线计算样品中Osp的浓度,以考察Osp样品在10 h内是否稳定。

2.8 MTT毒性试验和转运试验 取对数生长期的细胞,调节密度为1×10⁵个/cm²,每孔加200 μL细胞悬液接种到96孔板(4周加空白培养液,避免边缘效应),培养24 h后换液,试验组加含Osp药物浓度分别为10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μmol·L⁻¹的培养液,对照组及空白组只加培养液,每组设6个复孔,继续培养24 h后弃去,每孔加入0.5 g·L⁻¹的MTT 100 μL,再培养4 h后弃去孔内MTT,每孔加100 μL DMSO,将96孔板置于双层空气恒温振荡器中,50 r·min⁻¹震荡10 min,使结晶物充分溶解,在酶标仪上选择波长570 nm处,空白孔调零,测定各孔吸光度。

转运试验:取符合转运试验的Transwell板,于试验前缓慢吸弃旧培养液,加入37℃预热的HBSS荡洗3次,最后一次置培养箱温孵30 min,吸弃HBSS。在Apical侧(AP,又称黏膜侧)到Basolatera侧(BL,又称基底面侧)的转运试验中,将用pH 6.5 HBSS缓冲盐溶液配制浓度为25, 50, 100 μmol·

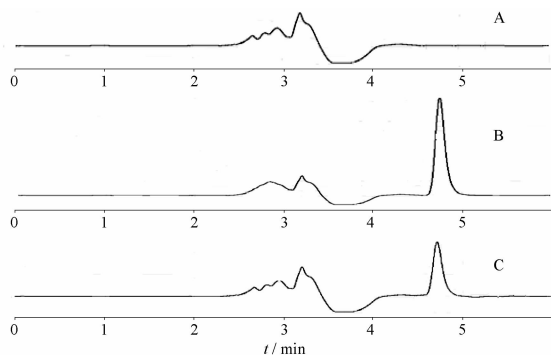
L^{-1} 的Osp溶液加0.5 mL到AP面做为供给池,BL面加入空白pH 7.4 HBSS 1.5 mL作为接收池,每个浓度组设3个平行孔;在BL到AP转运试验中,将3个浓度的药物分别加1.5 mL到BL面作为供给池,0.5 mL空白HBSS到AP面作为接收池;考察P-gp抑制剂Ver对Osp转运的影响时,在 $50 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 的Osp溶液中加入 $50 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ Ver;考察不同pH对Osp转运的影响时,设置5.5,6.5,7.4,8.0等4个pH;给药后将Transwell板置 37°C 培养箱温孵,分别于15,30,60,90,180,240 min从接收池吸取 $100 \mu\text{L}$ 转运液,同时用空白HBSS补足,按色谱条件进行测定。

细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$

$P_{\text{app}} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$, 其中, dQ/dt 为单位时间药物转运量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$), A 为转运膜的面积, 此时 A 为 1.12 cm^2 , C_0 为药物的初始浓度 ($\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$)。

3 结果

3.1 分析方法的建立 Osp的保留时间为4.7 min, 峰形良好, 空白基质无干扰; Osp在 $0.1 \sim 25.0 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 呈良好线性关系, 回归方程 $Y = 15.059X - 123$, $r = 0.9995$; 精密度和重复性良好, RSD均小于3%; 方法回收率为94.0%~106.0% ($n=5$); 样品在10 h内稳定; 色谱图见图1。



A. 空白; B. 对照品; C. 样品。

图1 氧化槐果碱含量测定 HPLC 图

3.2 MTT 毒性试验 随着Osp浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降, 细胞抑制开始增强, 呈现剂量依赖性, Osp浓度在 $10 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$, 细胞存活率在80%以上, 提示此浓度范围是Caco-2细胞的安全浓

度范围^[7]。

3.3 Osp 转运与时间和浓度的关系 Osp从AP到BL及BL到AP侧转运量随浓度和时间的变化见图2,3, P_{app} 结果见表1。实验结果显示, 从AP侧到BL侧的表观渗透系数 P_{app} 在 $6 \times 10^{-6} \sim 9 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $> 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 说明Osp的吸收良好, 预测药物口服生物利用度较好^[3,4,8]。25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ Osp从AP侧到BL侧的转运量和从BL侧到AP侧的转运量在3 h内都随着浓度及转运时间的增加而增加, 其转运具有浓度及时间依赖性; 经统计学处理发现, 在整个质量浓度范围内, 由BL~AP测得的各质量浓度的 $P_{\text{app B} \sim \text{A}}$ 和由AP~BL测得的各质量浓度的 $P_{\text{app A} \sim \text{B}}$ 均无显著性差异, 基本保持恒定; 并且, 二者的比值小于1.5, 故推断Osp在Caco-2细胞模型中的转运机制为被动扩散。

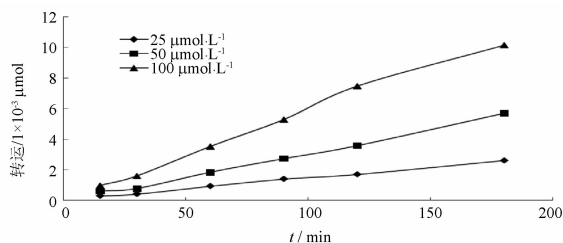


图2 时间和浓度对氧化槐果碱的转运量的影响 (AP~BL, $n=3$)

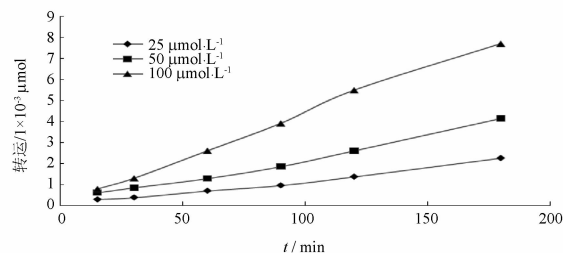


图3 时间和浓度对氧化槐果碱的转运量的影响 (BL~AP, $n=3$)

表1 不同浓度氧化槐果碱双向转运的渗透系数 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度 $/\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$	$P_{\text{app}} / \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$		$P_{\text{app B} \sim \text{A}} / P_{\text{app A} \sim \text{B}}$
	A~B	B~A	
25	8.41 ± 0.278	7.01 ± 0.411	0.80
50	8.72 ± 0.354	6.86 ± 0.434	0.77
100	8.83 ± 0.269	6.72 ± 0.206	0.76



3.4 pH对Osp转运的影响 分别在接收池为pH 5.5, 6.5, 7.4, 8.0 HBSS条件下,测定给药3h后Osp的转运量,经统计学处理发现,不同pH环境中Osp的转运量有显著性差异($P < 0.05$),偏碱性环境有利于Caco-2细胞对Osp的吸收,Osp在偏碱性环境中转运量较大。被动吸收与药物在细胞膜上的穿透性及其脂质膜的亲和力有关,一般情况下,被动吸收的药物脂溶性好,易分布于小肠上皮细胞膜,油水分配系数大^[9]。Osp为四环的喹诺里西啉生物碱,呈弱碱性,当环境为弱碱性时,Osp以分子形式存在,脂溶性增大,有利于其吸收。

3.5 P-gp抑制剂Ver对Osp转运的影响 Caco-2细胞单层顶层膜上有丰富的P-gp的表达,它可使药物外排。Ver为P-gp抑制剂,在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Osp溶液中加入 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Ver后,所测得的 P_{app} 与未加Ver的对照组 P_{app} 无显著性差异,结果见表2,故Osp在Caco-2细胞中的转运不存在P-gp的外排作用。

表2 维拉帕米对氧化槐果碱双向转运的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	转运方向	$P_{\text{app}} / \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Osp	AP ~ BL	8.72 ± 0.354
	BL ~ AP	6.86 ± 0.434
Osp + Ver	AP ~ BL	8.64 ± 0.108
	BL ~ AP	6.70 ± 0.108

4 讨论

氧化槐果碱具有一定的杀鼠作用,Caco-2细胞来源于人的结肠癌细胞,用Caco-2模型研究其吸收前首先要考虑其对细胞是否有毒性作用。用经典的MTT毒性试验确定了Osp的安全浓度范围,以免药物毒性所致的细胞损伤而造成吸收假相。

在Caco-2细胞模型中,通过测定药物不同浓度下在细胞内的转运量及渗透系数 P_{app} ,可以确定药物的转运机制。若药物的 P_{app} 不随药物的浓度和时间的变化而变化,则提示被动扩散为主要转运机制;若AP~BL的 P_{app} 与BL~AP的 P_{app} 大致相同,也可确定被动扩散为药物的主要转运机制;若二者比值大于1.5,则提示药物可能存在主动转运。另外,药物的表观渗透系数 $P_{\text{app}} > 1 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$,则提示药物的吸收良好;若 $P_{\text{app}} < 1 \times 10^{-7} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$,则提示药物的吸收较差(吸收 $< 1\%$)。Osp从AP侧到BL

侧的表观渗透系数 P_{app} 在 $6 \times 10^{-6} \sim 9 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $> 1 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$,说明Osp的吸收良好,预测药物口服生物利用度较好;Osp的转运量呈现一定的时间依赖性及浓度依赖性,提示Osp是以被动扩散为主要转运机制,在不同浓度条件下Osp表观渗透系数 P_{app} 无显著性差异,双向转运试验中 P_{app} 的比值 R 小于1.5,这些都进一步验证了Osp的被动扩散机制。

P-gp是由多药耐药基因编码的膜蛋白,是一种能量依赖性的药物外排泵。它存在于Caco-2细胞的AP侧,它可以将细胞内的底物排出细胞外,进而降低药物从AP侧到BL侧的转运速率,加快药物从BL侧到AP侧的转运。Ver是P-gp专属抑制剂,在本试验中,Ver的加入并没有使得Osp从AP侧到BL侧的转运速率加快,也没有减慢Osp从BL侧到AP侧的转运,说明Osp的转运不受P-gp抑制剂的影响,并无P-糖蛋白外排。

Caco-2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、预测体内吸收以及进行高通量筛选的良好工具^[10]。但是考虑到Caco-2细胞的来源为结肠,缺乏分泌黏液的功能,不似小肠上皮能够形成黏液层;缺少或低表达某些药物代谢酶和转运体;缺少细胞异质性(由单一细胞构成)等因素对药物吸收的影响。所以,该试验有待与在体及整体动物试验相结合,阐明Osp在大鼠体内吸收,以验证体内外结果是否相关,为进一步研究含有Osp的中药复方的吸收机制提供参考依据。

[参考文献]

- [1] 杨奎,蒲旭峰.论“中药胃肠药动力学研究”的意义及对策[J].中国实验方剂学杂志,1998,4(1):36.
- [2] 关溯,毕惠嫦,黄民,等.隐丹参酮在Caco-2细胞模型中的吸收机制[J].中国临床药理学杂志,2005,21(4):268.
- [3] 杨秀伟,杨晓达,王莹,等.中药化学成分肠吸收研究中Caco-2细胞模型和标准操作规程的建立[J].中西医结合学报,2007,5(6):634.
- [4] 杨海涛,王广基.Caco-2单层细胞模型及其在药学中的应用[J].药学报,2000,35(10):797.
- [5] 杨清娥,张宏利,韩崇选,等.氧化槐果碱的提取分离工艺及其毒性研究[J].西北林学院学报,2006,21(3):111.
- [6] 赵晨光,李逐波.苦参碱类生物碱的现代药理研究[J].兽医导刊,2009,28(10):50.
- [7] 姚媛.穿心莲二萜内酯类化合物跨膜转运机制研究[D].广州:广州中医药大学,2010.
- [8] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man--fact or myth



- [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763.
- [9] 杨敏, 王广基, 徐宇平, 等. 23-羟基白桦酸在 Caco-2 细胞模型中的吸收特性研究[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(5): 349.
- [10] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175(3): 880.

Absorption mechanism of oxysophocarpine across Caco-2 cell monolayer mode

FENG Zhiqiang^{1,2}, XIE Zhiyong¹, LIAO Qiongfeng², TAN Xiaojing², YAO Meicun¹, ZHANG Lei^{2*}

(1. *School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;*

2. *Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the absorption mechanism of oxysophocarpine across Caco-2 cell monolayer model.

Method: The safety concentration of oxysophocarpine in Caco-2 cell was first selected by using MTT method. Then the Caco-2 cell monolayers drug transport model was assigned to study the bi-direction transport mechanism of oxysophocarpine by evaluating the influent factors such as time, concentration, pH, P-gp inhibitor of verapamil, on its absorption characterization. **Result:** In the Caco-2 cell monolayer model, the transport volume was correlated positively with the time and concentration of oxysophocarpine, and affected by pH value. Verapamil had no influence on its transport since the transport of oxysophocarpine from apical (AP) to basolateral (BL) was similar to the transport from basolateral to apical. **Conclusion:** The intestinal absorption mechanism of oxysophocarpine was deduced as passive transference by Caco-2 cell monolayer model.

[Key words] oxysophocarpine; Caco-2 cell monolayer model; HPLC; passive transference

doi:10.4268/cjcmm20111720

[责任编辑 张宁宁]