

· 基础研究 ·

巴戟天中有效成分在Caco-2细胞模型中的吸收转运[△]

张超, 华悦, 李喆, 史辑*

辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

[摘要] 目的: 研究巴戟天中的有效成分水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖在人源结肠癌细胞 Caco-2 单层模型中的吸收特性。方法: 通过细胞培养技术建立 Caco-2 细胞单层模型, 以细胞形态学特征、细胞跨膜电阻等指标验证和筛选模型。考察不同 pH、不同质量浓度的水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖对 Caco-2 细胞活力的影响, 以确定给药 pH 和质量浓度。通过 Caco-2 细胞转运实验探究药物质量浓度、作用时间与 P-糖蛋白抑制剂维拉帕米对水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖吸收转运的影响。采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖的累积转运量。结果: 水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖在 Caco-2 细胞单层模型中吸收良好, 三者低质量浓度的双侧表观渗透系数 (P_{app}) 明显大于中、高质量浓度; 加入盐酸维拉帕米后, 三者的 P_{app} 变化不大, 说明这 3 个成分的小肠吸收不需要载体。去乙酰车叶草苷酸的液相色谱图中存在少量水晶兰苷, 说明去乙酰车叶草苷酸存在首过效应。结论: 巴戟天中水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖 3 个特征性成分在跨膜转运过程中均以被动转运为主, 且 3 个成分都存在自身质量浓度抑制现象。

[关键词] 巴戟天; 水晶兰苷; 去乙酰车叶草苷酸; 耐斯糖; Caco-2 细胞单层模型; 跨膜转运; 被动转运

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)05-0837-08

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20210511001

Absorption and Transport Characteristics of Effective Components of *Morinda officinalis* in Caco-2 Cell Model

ZHANG Chao, HUA Yue, LI Zhe, SHI Ji*

School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the absorption characteristics of monotropein, desacetyl asperulosidic acid, and nystose of *Morinda officinalis* How. in the monolayer of human colon cancer cell line Caco-2 cells. **Methods:** The Caco-2 cell monolayer models were prepared by cell culture technique, verified, and screened out with cell morphological characteristics, transepithelial electrical resistance, and other indicators. The effects of pH values and concentrations of monotropein, desacetyl asperulosidic acid, and nystose on Caco-2 cell viability were examined to determine the proper pH and concentrations of dosage in the experiment. The effects of drug concentration, action time, and P-glycoprotein inhibitor verapamil on the absorption and transport of monotropein, desacetyl asperulosidic acid, and nystose were investigated by the Caco-2 cell transport experiment. The cumulative transport of monotropein, desacetyl asperulosidic acid, and nystose was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** Monotropein, desacetyl asperulosidic acid, and nystose were well absorbed in the Caco-2 cell monolayer model, and the bilateral apparent permeability coefficients (P_{app}) at low concentrations were significantly greater than those at medium and high concentrations. After the addition of verapamil hydrochloride, the P_{app} of the three components changed slightly, indicating that the carrier was not required in the intestinal absorption of these three components. A small amount of monotropein presented in the liquid chromatogram of desacetyl asperulosidic acid, indicating that desacetyl asperulosidic acid showed the first-pass effect. **Conclusion:** The three characteristic components of *M. officinalis*, monotropein, desacetyl asperulosidic acid, and nystose were mainly passively transported in the transmembrane transport, and all the three components showed inhibition of their own concentrations.

[Keywords] *Morinda officinalis* How.; monotropein; desacetyl asperulosidic acid; nystose; Caco-2 cell monolayer model; transmembrane transport; passive transport

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目 (81874345, 81473350); 道地中药材炮制技术与标准研究项目 (辽卫办发〔2019〕169号)

* [通信作者] 史辑, 教授, 研究方向: 中药炮制化学; Tel: 0411-85890157, E-mail: lnshiji@163.com

巴戟天是茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的干燥根,味甘、辛,性微温,归肾、肝经,是我国著名的“四大南药”之一。其主要作用是补肾阳、强筋骨、祛风湿,常用于阳痿遗精、宫冷不孕、少腹冷痛、筋骨萎软等证^[1]。《中华人民共和国药典》2020年版巴戟天含量测定项选用耐斯糖为定量指标成分^[1]。巴戟天还含有以水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸为代表的环烯醚萜类成分,具有抗衰老、抗肿瘤、抗骨质疏松等多方面的药理作用^[2-6]。

中药大多经口服吸收,小肠为口服给药的主要吸收部位,吸收效果易受到药物浓度、跨膜转运方式、转运蛋白等多种因素影响。由于人结肠癌细胞 Caco-2 与人体小肠上皮细胞有相似的形态、细胞极性及连接方式,且拥有小肠上皮细胞中的碱性磷酸酶、P-糖蛋白(P-gp)、糖类、谷氨酰转氨酶、维生素等代谢酶及转运体,因此 Caco-2 细胞单层模型被广泛应用于药物在肠道中的吸收、转运、代谢的体外研究^[7-10]。因此,本实验采用 Caco-2 细胞单层模型对巴戟天中水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖 3 个特征性成分的肠吸收特性进行研究,明确其吸收转运机制,以期为巴戟天有效成分的进一步开发提供参考。

1 材料

1.1 细胞

Caco-2 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试药

DMEM 高糖培养基、无酚红 DMEM 高糖培养基、非必需氨基酸、胰蛋白酶、Hank's 平衡盐溶液(HBSS)均购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS,美国 PAN 公司);青-链霉素双抗(美国 Hyclone 公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、二甲基亚砜(DMSO)、苯酚红均购自北京索莱宝科技有限公司;CCK-8 细胞活力检测试剂盒、碱性磷酸酶(AKP)试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司;水晶兰苷(批号:O0605AS,纯度≥98.0%)、去乙酰车叶草苷酸(批号:J0329AS,纯度≥98.0%)、盐酸普萘洛尔(批号:318-98-9,纯度>98%)均购自大连美仑生物技术有限公司;耐斯糖(批号:292-64121,纯度≥99.0%,日本 Wako 公司);盐酸维拉帕米(批号:S420204,纯度>99%,美国 Selleck Chemicals 公司);

甲醇、乙腈等试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.3 仪器

H-Class/Xevo TQD 型三重四级杆液相色谱-质谱联用仪(配有 Masslynx 4.1 色谱工作站)、ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱仪、Ulyimate UHPLC AQ-C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)均购于美国 Waters 公司;AE240 型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);XW-80A 型涡旋混合器(上海青浦沪西仪器厂);Multiskan MK3 型酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);YXQ-LS-75S11 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯科学仪器有限公司);DCMC510 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱(日本三洋公司);DW-86W100 型卧式超低温保存箱(青岛海尔医疗设备股份有限公司);Millicell-ERS 型跨膜细胞电阻仪(美国 Millipore 公司);SHA-C 型恒温振荡器(常州国华电器有限公司)。

2 方法

2.1 Caco-2 细胞单层模型制备

Caco-2 细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶中,采用 DMEM 完全培养基(DMEM 高糖培养基 41.5 mL 加入青-链霉素双抗 0.5 mL、非必需氨基酸 0.5 mL、FBS 7.5 mL),于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。取第 6~10 代 Caco-2 细胞制成悬液,控制细胞密度为 5×10³ 个/mL,接种于 24 孔 Transwell 中,于肠腔(AP)侧加入细胞悬液 0.5 mL,于基底(BL)侧加入完全培养液 1.5 mL,在 CO₂ 培养箱中培养,前 10 d 隔天换液,10 d 后每天换液,培养至 21 d 待用。

2.2 Caco-2 细胞单层模型验证

2.2.1 细胞形态学验证 将细胞以 2.1 项下相同密度接种于 24 孔板中,培养 21 d,于光学显微镜下拍照,观察细胞形态^[11]。

2.2.2 跨膜电阻 (TEER) 考察 细胞接种于 Transwell 小室中后,于第 0、3、6、9、12、15、18、21 天分别测定 TEER,待 TEER>300 Ω·cm⁻² 时,说明此单层细胞模型已致密、完整^[12-13]。

2.2.3 酚红透过率考察 酚红是一种水溶性小分子物质,不易被 Caco-2 细胞代谢及过膜转运,因此选

取酚红作为泄露标志物进行考察。于接种后第3、6、9、12、15、18、21天分别测定细胞中酚红透过率。弃去细胞原有培养基,加入预热至37℃的无酚红完全培养基,放置于CO₂培养箱中平衡30 min,弃去培养基,于AP侧加入含酚红5 μg·mL⁻¹的HBSS 0.5 mL, BL侧加入HBSS 1.5 mL,培养3 h。3 h后于BL侧取培养基0.3 mL,在波长为560 nm处测定吸光度(A),按照公式(1)计算BL侧酚红透过量,并按照公式(2)计算表观渗透系数(P_{app})^[14]。

$$Q_{BL} = V_{BL} \cdot C_0 \cdot \frac{A_{BL} - A_{空白组}}{A_0 - A_{空白组}} \quad (1)$$

$$P_{app} = (dQ/dt) / (S \cdot C_0) \quad (2)$$

(1) 式中Q为透过药物的总质量(μg); V_{BL}为BL侧培养基总体积(1.5 mL); A_{BL}为BL侧培养基吸光度; A_{空白组}为空白HBSS的吸光度; A₀为酚红初始浓度吸光度; C₀为药物初始质量浓度(μg·mL⁻¹)。

(2) 式中dQ/dt为dt时间段中透过的药物质量(μg·s⁻¹); S为单层细胞表面积(cm²),本实验中为0.3 cm²。

2.2.4 AKP活性考察 AKP是小肠进行消化活动时的必需酶,其主要集中于Transwell AP侧,且其含量随细胞的分化而增加。分别取Transwell中培养了7、14、21 d的细胞,吸弃旧培养基,用已预热至37℃的HBSS冲洗2~3次,在AP侧加入HBSS 0.5 mL, BL侧加入HBSS 1.5 mL,置于培养箱中孵育20 min,取AP侧和BL侧培养基,离心(70×g, 5 min),取上清液用试剂盒测定AKP活性,操作参照说明书。

2.3 化合物给药质量浓度筛选

精密称取水晶兰苷5.062 mg、去乙酰车叶草苷酸20.003 mg、耐斯糖100.225 mg,分别用HBSS溶解并进行稀释,配制成含水晶兰苷5.062、2.531、1.266、0.633、0.316、0.158 mg·mL⁻¹,去乙酰车叶草苷酸20.003、10.001、5.000、2.500、1.250、0.625 mg·mL⁻¹,耐斯糖100.225、50.113、25.056、12.528、6.264、3.132 mg·mL⁻¹的溶液。

将消化后的Caco-2细胞以1×10⁵个/cm²接种于96孔板中,每孔100 μL,培养24 h。弃去上清液,各加入完全培养基90 μL和各质量浓度的药物10 μL,每个质量浓度设3个复孔,同时设立3个对照孔(不加药)和3个空白孔(无细胞)。培养24 h后,各孔加入CCK-8溶液10 μL,培养1 h,在450 nm下用酶

标仪测定A,按照公式(3)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\% \quad (3)$$

2.4 化合物给药pH筛选

经2.3项下质量浓度筛选,采用HBSS分别配制水晶兰苷(0.127 2 mg·mL⁻¹)、去乙酰车叶草苷酸(0.064 8 mg·mL⁻¹)、耐斯糖(1.250 2 mg·mL⁻¹)溶液,均采用HCl和NaOH调节pH为5.8、6.8、7.4,按2.3项下方法测定A,计算细胞存活率。

2.5 转运实验

2.5.1 化合物不同质量浓度对转运的影响 用HBSS稀释各化合物达到所需质量浓度,与完全培养基1:9混合得样品溶液,终质量浓度分别为水晶兰苷0.127 2、0.063 6、0.031 8 mg·mL⁻¹,去乙酰车叶草苷酸0.064 8、0.032 4、0.016 2 mg·mL⁻¹,耐斯糖1.250 2、0.625 1、0.312 5 mg·mL⁻¹;取符合转运条件的Caco-2细胞单层模型,用HBSS清洗3次,于AP侧加入HBSS 0.5 mL, BL侧加入HBSS 1.5 mL,于CO₂培养箱中平衡30 min,弃去HBSS进行实验。AP-BL实验时,于AP侧加入样品溶液0.5 mL,于BL侧加入HBSS 1.5 mL。BL-AP实验时,向AP侧加入HBSS 0.5 mL,向BL侧加入样品溶液1.5 mL。将小室置于37℃恒温水浴振荡器中,于90 min吸取接受端样品,AP侧取0.3 mL, BL侧取0.6 mL,备用,每个样品设置3个复孔。

同时设立P-gp抑制剂盐酸维拉帕米对照组,两侧的转运溶媒都加入盐酸维拉帕米,使其终浓度为1×10⁻⁴ mol·L⁻¹,计算90 min后药物的累积透过量 and P_{app},操作同上。

2.5.2 化合物不同作用时间对转运的影响 用HBSS稀释各化合物,加入Caco-2细胞单层模型,操作同2.5.1项下。将小室置于37℃恒温水浴振荡器中,分别于30、60、90、120、150、180 min吸取接受端样品,AP侧取0.3 mL, BL侧取0.6 mL,备用,每个样品设置3个平行复孔。

2.6 含量测定

2.6.1 供试品溶液制备 精密吸取跨膜转运液,于4℃离心(10 142×g, 10 min),取上清液过0.22 μm微孔滤膜,即得。

2.6.2 对照品溶液制备 用HBSS配制含水晶兰苷5.090 mg·mL⁻¹、去乙酰车叶草苷酸6.475 mg·mL⁻¹、

耐斯糖 $3.170 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 备用。

2.6.3 色谱与质谱条件 水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸色谱条件: Ulyimate UHPLC AQ- C_{18} 色谱柱 ($50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$); 流动相为甲醇 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~8 min, 2%~15%A); 检测波长为 235 nm; 流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样体积为 $2 \mu\text{L}$; 柱温为 25°C 。

耐斯糖色谱及质谱条件: ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$); 流动相为 0.1% 甲酸乙腈溶液 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~13 min, 35%~45%A); 流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样体积为 $1 \mu\text{L}$ 。采用电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式扫描; 离子扫描范围为 m/z 50~1000; 毛细管电离电压为 3.0 kV; 源温度为 150°C ; 脱溶剂温度为 500°C ; 脱溶剂气流速为 $1000 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 锥孔气流速为 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 多反应监测模式 (MRM); 锥孔电压为 100 V; 碰撞能量为 42 eV, 母离子与子离子分别为 m/z 665.095 8、89.025 1。

2.6.4 线性范围考察 用 HBSS 稀释各对照品溶液, 得到水晶兰苷质量浓度为 0.127、0.636、1.273、3.818、5.090 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 去乙酰车叶草苷酸质量浓度为 0.064 8、0.324 0、0.648 0、1.295 0、3.238 0、6.475 0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 耐斯糖质量浓度为 0.159、0.793、1.585、2.378、3.170 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液, 按 2.6.3 项下色谱、质谱条件测定, 以各成分质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 计算各成分的回归方程和线性范围。

2.6.5 专属性考察 比较各成分及 HBSS 色谱图, 确认各成分之间是否存在干扰、HBSS 有无杂质干扰、HBSS 对各成分是否存在干扰。

2.6.6 精密度试验 精密吸取各对照品溶液, 按 2.6.3 项下色谱条件, 于 1 d 内分别进样 5 次, 再将其于 5 d 中每日进样 1 次, 计算水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸、耐斯糖峰面积的 RSD。

2.6.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 照 2.6.3 项下方法, 于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样, 计算水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸、耐斯糖峰面积的 RSD。

2.6.8 重复性试验 精密吸取同一小室 BL 侧溶液 6 次, 每次 $100 \mu\text{L}$, 按 2.6.1 项下方法制成供试品溶液, 进样, 计算水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸、耐

斯糖含量的 RSD。

2.6.9 加样回收率试验 精密吸取同一小室 BL 侧溶液 6 次, 每次 0.1 mL , 按照比例 (对照品加入量-样品中含量 1:1) 加入混合对照品溶液, 照 2.6.1 项下方法制备供试品溶液, 分别测定。计算水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸、耐斯糖的平均加样回收率及 RSD。

2.6.10 透过量测定 采用 P_{app} 作为评价指标, 测定各化合物透过量。

3 结果

3.1 Caco-2 细胞单层模型验证

3.1.1 细胞形态学考察 于倒置显微镜下观察培养了 21 d 的 Caco-2 细胞, 发现细胞整体呈铺路石样形态, 细胞之间紧密连接 (图 1)。

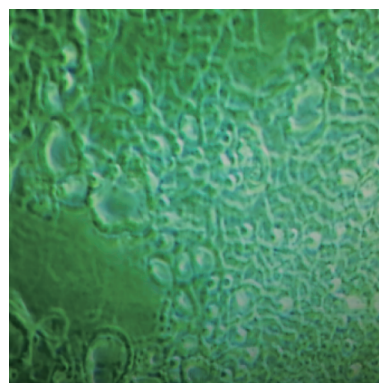


图1 培养 21 d 后 Transwell 中 Caco-2 细胞形态

3.1.2 TEER 考察 在培养 21 d 内, Caco-2 细胞 TEER 变化趋势为先上升然后小幅度下降, 最后保持平稳, 第 21 天, Caco-2 细胞 TEER 为 $(418.8 \pm 10.1) \Omega \cdot \text{cm}^2$, 说明单层细胞模型制备成功 (图 2)。

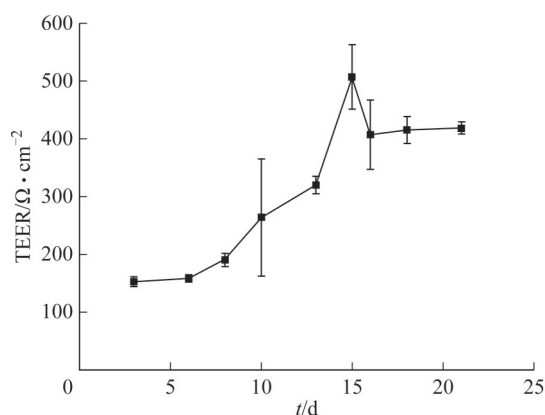


图2 Transwell 中 Caco-2 细胞 TEER 变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.1.3 酚红透过率考察 结果见表1,发现第18天开始,Caco-2细胞中酚红的 P_{app} 低于转运实验规定的 $1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,说明单细胞层完整性符合转运实验要求^[15]。

表1 Caco-2细胞单层模型的酚红 P_{app} ($n=3$)

t/d	$P_{app} (\times 10^{-6}) / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
3	2.777
6	2.160
9	1.543
12	1.512
18	0.370
21	0.324

3.1.4 碱性磷酸酶活性考察 培养7、14、21 d Transwell 两侧培养基中 AKP 活性见表2。第14、21天,AP侧AKP活性分别是BL侧的3.4、6.4倍,表明在AP侧已发生了明显、稳定的极化现象,Caco-2细胞单层模型制备成功^[16]。

表2 Caco-2细胞单层模型AKP活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

金氏单位/100 mL		
t/d	AP	BL
7	0.21±0.09	0.25±0.11
14	0.67±0.15**	0.20±0.12
21	1.72±0.40**	0.27±0.19

注:与BL侧比较,** $P<0.01$;1金氏单位=7.14 U·L⁻¹。

3.2 不同质量浓度化合物对Caco-2细胞活性的影响

结果表明,水晶兰苷质量浓度 $\leq 0.1266 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、去乙酰车叶草苷酸质量浓度 $\leq 0.0625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,Caco-2细胞存活率 $>98\%$,可在此质量浓度范围内进行实验;在各质量浓度耐斯糖作用下,Caco-2细胞存活率均大于98%,且质量浓度越小细胞存活率越高(表3),故选取 $0.3125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为其最小质量浓度进行实验。

3.3 不同pH化合物对Caco-2细胞活性的影响

在pH为7.4时,3种成分对Caco-2细胞活性影响均最小(表4),因此选择pH 7.4进行后续实验。

3.4 方法学考察结果

巴戟天中3个化合物的回归方程及线性范围见表5。比较HBSS,水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸、耐斯糖对照品溶液和经细胞膜透过后各化合物色谱图。结果表明,HBSS无杂质干扰,HBSS对各成分无干扰(图3~4)。

表3 不同质量浓度化合物作用下Caco-2细胞存活率 ($n=3$)

化合物	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞存活率/%
水晶兰苷	0.506 2	64.2
	0.253 1	57.2
	0.126 6	132.8
	0.063 3	132.5
	0.031 6	145.2
	0.015 8	126.3
去乙酰车叶草苷酸	2.000 3	73.8
	1.000 1	77.1
	0.500 0	74.4
	0.250 0	44.5
	0.125 0	64.3
	0.062 5	120.3
耐斯糖	10.001 2	111.3
	5.000 6	129.6
	2.500 3	136.3
	1.250 2	121.7
	0.625 1	132.9
	0.312 5	139.7

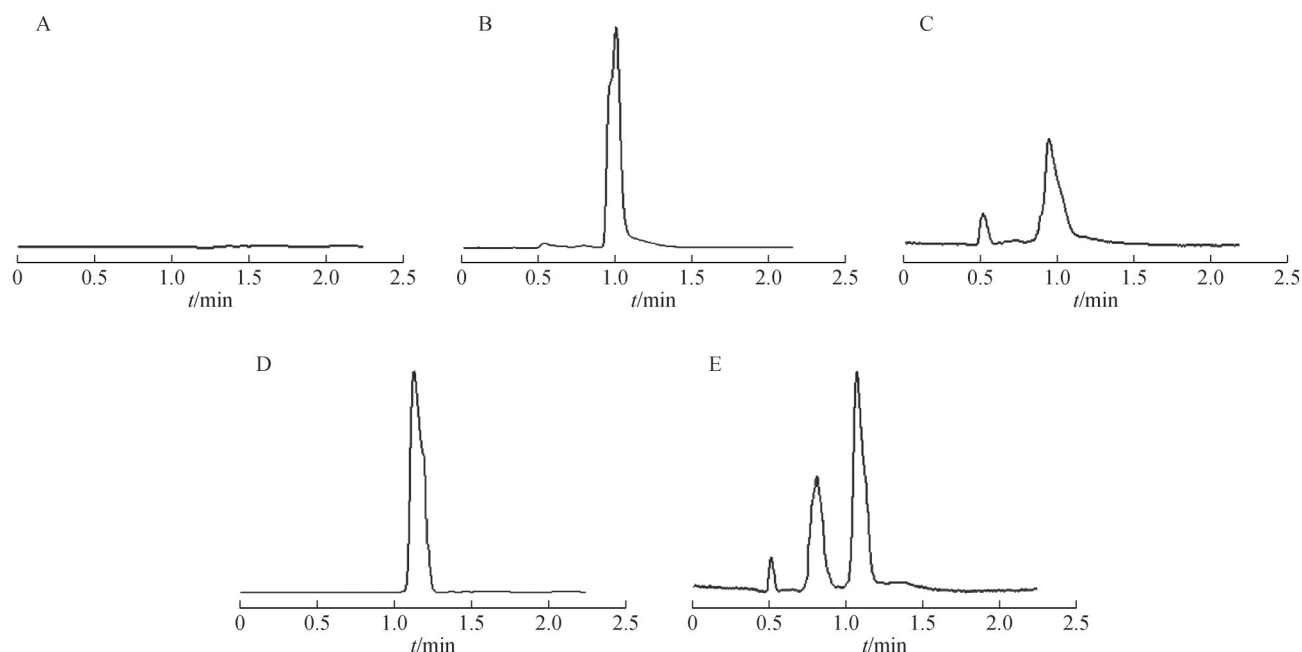
表4 不同pH化合物作用下Caco-2细胞存活率 ($n=3$)

化合物	pH	细胞存活率/%
水晶兰苷	5.8	78
	6.8	96
	7.4	101
去乙酰车叶草苷酸	5.8	84
	6.8	98
	7.4	99
耐斯糖	5.8	95
	6.8	122
	7.4	141

表5 巴戟天中3个化合物的回归方程及线性范围

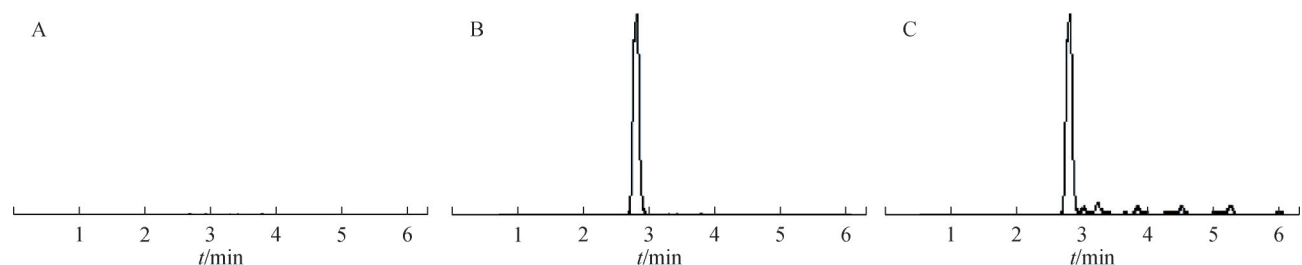
化合物	回归方程	r	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
水晶兰苷	$Y=69450669.26X-3786.68$	0.999 9	0.127~5.090
去乙酰车叶草苷酸	$Y=49244936.55X-2445.23$	0.999 8	0.065~6.475
耐斯糖	$Y=19296.2X-11.9911$	0.999 1	0.159~3.170

精密度试验结果表明,水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸、耐斯糖日内精密度的RSD分别为1.71%、1.88%、1.97%,日间精密度RSD分别为1.74%、1.70%、1.91%,表明方法精密度良好。重复性试验结果表明,水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖含量RSD的分别为1.12%、1.60%、1.05%,表明该方法重复性较好。稳定性结果表明,水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸、耐斯糖峰面积RSD分别为1.80%、



注: A. HBSS; B. 水晶兰苷对照品; C. 经Caco-2细胞透过后水晶兰苷样品; D. 去乙酰车叶草苷酸对照品; E. 经细胞透过后去乙酰车叶草苷酸样品。

图3 HBSS、水晶兰苷与去乙酰车叶草苷酸对照品溶液及经细胞单层模型透过后各化合物HPLC图



注: A. HBSS; B. 耐斯糖对照品; C. 经细胞透过后耐斯糖样品。

图4 HBSS、耐斯糖对照品溶液及经细胞单层模型透过后耐斯糖HPLC图

1.90%、1.78%，说明仪器在此实验条件下12 h内稳定。加样回收率试验结果表明，水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖的平均加样回收率分别为98.09%、101.14%、100.49%，RSD分别为0.97%、1.54%、1.59%，见表6。

3.5 跨膜转运实验

3.5.1 化合物不同质量浓度对转运的影响 90 min内，3个质量浓度水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖的 P_{app} 均大于 $1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ，说明三者体内吸收均良好。相比于高渗透性对照药盐酸普萘洛尔 [P_{app} 为 $(0.423 0 \pm 0.056 9) \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$]，三者均为高渗透性化合物。在90 min时间内， P_{app} AP-BL与 P_{app} BL-AP的比值均接近1，说明这3个成分在转运此过程中无方向性。加入P-gp抑制剂维拉帕米后 P_{app} 变化不大，说明水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和

耐斯糖的小肠吸收不需要载体，其吸收机制可能是被动吸收（表7）。

3.5.2 化合物作用不同时间对转运的影响 如图5所示，随着时间的延长，3个化合物双侧 P_{app} 均呈增加趋势，且低质量浓度组双侧 P_{app} 明显大于中、高质量浓度组，说明三者的小肠吸收可能存在自身质量浓度抑制现象。

4 讨论

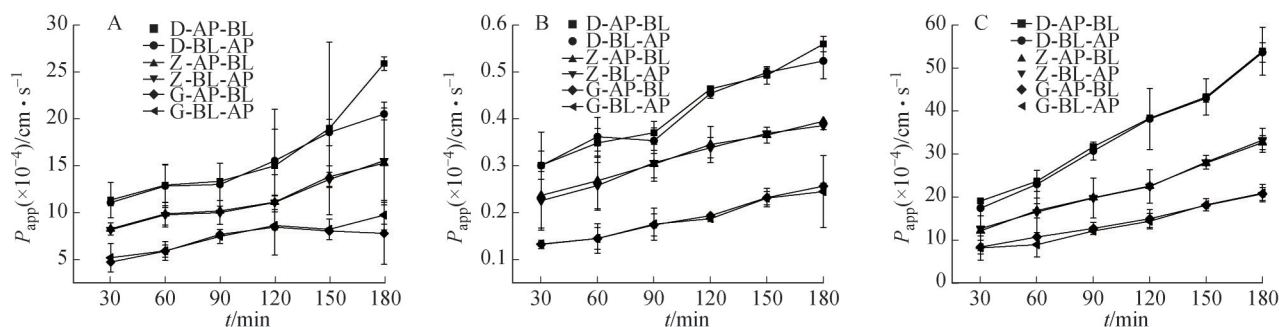
本实验中筛选化合物质量浓度时发现，即使最大质量浓度的耐斯糖也未对Caco-2细胞活性造成影响，这可能是由于此细胞营养液中需要大量糖分供给，耐斯糖作为营养物质不会对细胞活性产生影响。在水晶兰苷的液相色谱图中无其他物质的明显色谱峰出现，而在去乙酰车叶草苷酸的液相色谱图中可

表6 巴戟天中3个化合物的加样回收率试验结果

化合物	样品中含量/ μg	对照品加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
水晶兰苷	34.401	34.357	67.951	98.83	98.09	0.97
	34.401	34.357	66.537	96.77		
	34.401	34.357	68.319	99.36		
	34.401	34.357	68.007	98.91		
	34.401	34.357	66.917	97.32		
	34.401	34.357	66.938	97.35		
去乙酰车叶草苷酸	0.672	0.648	1.301	98.58	101.14	1.54
	0.672	0.648	1.315	99.64		
	0.672	0.648	1.351	102.36		
	0.672	0.648	1.358	102.89		
	0.672	0.648	1.337	101.30		
	0.672	0.648	1.347	102.06		
耐斯糖	186.629	187.030	372.370	99.66	100.49	1.59
	186.629	187.030	370.700	99.21		
	186.629	187.030	374.910	100.33		
	186.629	187.030	386.280	103.38		
	186.629	187.030	368.900	98.73		
	186.629	187.030	379.830	101.65		

注：取样量均为100 μL 。表7 水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖在Caco-2细胞单层模型中的 P_{app} ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

化合物	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$P_{\text{app}}^{\text{AP-BL}} (\times 10^{-4}) / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{\text{app}}^{\text{BL-AP}} (\times 10^{-4}) / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$P_{\text{app}}^{\text{AP-BL}} / P_{\text{app}}^{\text{BL-AP}}$	$P_{\text{app}}^{\text{V}} (\times 10^{-4}) / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
水晶兰苷	0.127 2	6.170 $\pm$ 0.283	6.266 $\pm$ 1.124	0.98	5.556 $\pm$ 0.618
	0.063 6	9.617 $\pm$ 0.650	9.481 $\pm$ 0.900	1.01	8.929 $\pm$ 2.032
	0.031 8	12.816 $\pm$ 1.511	12.563 $\pm$ 1.676	1.02	12.533 $\pm$ 1.128
去乙酰车叶草苷酸	0.064 8	0.152 $\pm$ 0.018	0.015 $\pm$ 0.024	0.99	0.146 $\pm$ 0.031
	0.032 4	0.271 $\pm$ 0.054	0.265 $\pm$ 0.051	1.02	0.265 $\pm$ 0.046
	0.016 2	0.342 $\pm$ 0.028	0.340 $\pm$ 0.046	1.01	0.315 $\pm$ 0.005
耐斯糖	1.250 2	1.056 $\pm$ 0.113	0.971 $\pm$ 0.194	1.09	0.914 $\pm$ 0.174
	0.625 1	1.620 $\pm$ 0.081	1.625 $\pm$ 0.480	1.00	1.602 $\pm$ 0.298
	0.312 5	2.469 $\pm$ 0.034	2.356 $\pm$ 0.235	1.05	2.210 $\pm$ 0.219

注： $P_{\text{app}}^{\text{V}}$ 为加入维拉帕米后的 P_{app} 。

注：A. 水晶兰苷；B. 去乙酰车叶草苷酸；C. 耐斯糖；D. 低质量浓度组；Z. 中质量浓度组；G. 高质量浓度组。

图5 不同质量浓度水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖的 P_{app} 随时间变化情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

见少量水晶兰苷的色谱峰，可见在跨膜转运过程中可能有少量的去乙酰车叶草苷酸转化成水晶兰苷，推测去乙酰车叶草苷酸可能存在首过代谢。

在Caco-2细胞单层模型中，通常认为吸收完全的药物 P_{app} 高 ($>1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)，吸收不完全的药物 P_{app} 低 ($0.1 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)^[17]。本实验中水

晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖3个成分的 P_{app} 均大于 $10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,说明这3个成分在小肠内的吸收均良好。可以通过计算药物在小室双侧 P_{app} 的比值判断药物的吸收机制^[18-19],在加入维拉帕米后,若得到几乎不变的 P_{app} ,则说明药物为被动吸收机制。本研究考察了水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖质量浓度、时间、pH与P-gp抑制剂维拉帕米在水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸和耐斯糖吸收转运况的影响,在90 min内,不同质量浓度的化合物双侧 P_{app} 比值均接近1,且加入维拉帕米后不同质量浓度药液 P_{app} 差异无统计学意义,进一步证实这3个成分在小肠内主要以被动转运为主。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:83-84.
- [2] 梁丽敏,徐勇. 南药巴戟天多糖的研究进展[J]. 食品工业科技,2011,32(8):478-480.
- [3] 何玉琼. 巴戟天环烯醚萜苷及萜醌类成分调节骨代谢的作用及机制研究[D]. 上海:中国人民解放军海军军医大学,2019.
- [4] 沈佳雯,金冠钦,王梦超. 巴戟天属植物中环烯醚萜类化合物研究进展[J]. 中国药师,2020,23(6):1160-1165.
- [5] 詹积. 巴戟天抗抑郁和抗疲劳的活性成分研究[D]. 无锡:江南大学,2019.
- [6] 王玉磊. 巴戟天中主要环烯醚萜苷的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2011.
- [7] 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(12): 1185-1191.
- [8] 刘阳芷. 基于Caco-2细胞模型对苍术中三种单体化合物的吸收研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2017.
- [9] 党珏,李燕,刘美辰,等. 大黄有效成分与附子有效成分配伍在Caco-2细胞模型上的转运分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(7):1-6.
- [10] 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):634-641.
- [11] 高坤,孙进,何仲贵. Caco-2细胞模型在口服药物吸收研究中的应用[J]. 沈阳药科大学学报,2005,22(6):469-474.
- [12] 杨海涛,王广基. Caco-2单层细胞模型及其在药学中的应用[J]. 药学学报,2000,35(10):797-800.
- [13] 关溯,陈孝,黄氏. 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(6):609-614.
- [14] 徐刚. 酒狗脊工艺及炮制原理研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2014.
- [15] 周政莲,单桂芝,林励,等. 复方脑忆源片主要成分淫羊藿苷在Caco-2细胞模型上的转运研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):178-181.
- [16] 孙敏捷,盛星,胡一桥. Caco-2细胞单层模型的建立与验证[J]. 中国药理学杂志,2006,41(18):1431-1434.
- [17] 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):880-885.
- [18] 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):763-766.
- [19] 黄荳,胡炜华,黄伟,等. Caco-2细胞模型在中药转运机制及相互作用机制中的研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版),2016,56(2):96-98.

(收稿日期:2021-05-11 编辑:田苗)