

• 实验研究 •

钩藤碱在 Caco-2 细胞模型中吸收规律研究

孟杰^{1,2}, 苏瑞², 廖赞², 袁波², 李玲²

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 上海交通大学医学院附属同仁医院, 上海 200336)

[摘要]目的 建立体外模拟体内肠道细胞——人结肠癌上皮细胞(the human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2)的 Transwell 模型, 以此研究钩藤碱在 Caco-2 细胞模型上的跨膜转运特征。方法 采用聚酯碳酸酯膜连续培养 Caco-2 细胞 21 d, 形成致密的单层细胞模型。然后对影响钩藤碱在 Caco-2 细胞模型上转运特征的因素(包括浓度、时间及跨膜转运蛋白 P-糖蛋白)进行考察; 同时采用液相色谱-质谱法对溶液中钩藤碱的含量进行测定。结果 钩藤碱在 Millicell 系统上的转运量具有一定的浓度-时间依赖性, 主要以主动转运的方式进行吸收, 且随着时间和药物浓度的增加, 转运量明显增加。不同浓度钩藤碱从细胞基底侧(basolateral, BL)到细胞刷状缘侧(apical, AP)的表观渗透系数(apparent permeability coefficient, Papp)与 AP 侧到 BL 侧的 Papp 比值均在 1.5 以上, 且钩藤碱从 BL 侧到 AP 侧的外排速率明显高于从 AP 侧到 BL 侧的吸收速率。当加入 P-糖蛋白抑制剂后, 药物由 BL 侧向 AP 侧的转运量显著减少, 而由 AP 侧到 BL 侧的转运量显著增加。结论 钩藤碱在 Caco-2 细胞上转运存在一定的浓度及时间依赖性, 且 P-糖蛋白介导钩藤碱在 Caco-2 细胞上转运。

[关键词]钩藤碱; Caco-2 细胞; P-糖蛋白; 液相色谱-质谱法; 吸收

[中图分类号]R969.1 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2020.05.016

钩藤(*Uncaria rhynchophylla*)作为传统中药在中国已有悠久的历史, 为茜草科钩藤属^[1]。钩藤具有清热平肝、息风定惊的功效, 主要用于治疗癫痫及头痛眩晕等症^[2]。钩藤中主要的活性成分为吲哚类生物碱, 约占钩藤含量的 0.2%, 而在这些生物碱中以钩藤碱含量最高, 占 28%~50%, 其余生物碱还包括去氢钩藤碱、异钩藤碱、柯诺辛碱等^[3-4]。现代中药药理学研究表明, 钩藤碱主要作用于中枢神经系统和心血管系统, 有抗焦虑、镇静、降压及保护脑缺血等作用^[5-8], 具有广阔的开发前景。

人结肠癌上皮细胞(the human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2)单层模型中, 培养成熟的细胞可形成细胞极性和致密单层。Caco-2 细胞单层模型的结构和功能与机体小肠上皮细胞十分相近, 还有微绒毛、紧密连接等结构, 并含有与小肠刷状缘上皮相关的转运体和酶系^[9]。完全分化的 Caco-2 细胞单层已经被广泛地确定为一种可以使用的体外模型, 经常用来评价药物的跨膜吸收、胞旁转运及受体介导的转运^[10-11]。

为了对钩藤碱作进一步的开发, 本实验首次采

用液相色谱-质谱法对钩藤碱在 Caco-2 细胞上的转运特性进行研究。

1 材料

1.1 药物与试剂 钩藤碱(纯度 98.0%, 批号 ST07840120): 上海诗丹德生物科技有限公司; 胎牛清(fetal bovine serum, FBS): 美国 Gibco 公司; 维拉帕米(批号 HY-A0064)、普萘洛尔(批号 HY-B0573): MCE 中国公司; 乙腈(批号 10965929833)、甲醇(批号 109993335909): 德国 Merck 公司。

1.2 主要仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪、SPD 型紫外检测器: 美国安捷伦科技有限公司; XS205DU 型十万分之一电子天平: 德国 Mettler Toledo 公司; KQ-300DB 数控超声仪: 江苏省昆山市超声仪器有限公司; Milli-Q 超纯水系统: 美国 Millipore 公司。

2 方法

2.1 Caco-2 细胞模型的建立 按照文献[12]方法建立 Caco-2 细胞模型。采用 DMEM 培养基(含 10% FBS、1% 非必需氨基酸、1% L-谷氨酰胺以及 1% 青链霉素)于 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养。当细胞密度达到 80% 时, 加入 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 调整 Caco-2 细胞密度为 5×10⁴/mL。将细胞接种在 Transwell 小室进行生长, 细胞刷状缘侧(apical, AP)加容积为 0.4 mL 的悬浮液, 细胞基底侧(basolateral, BL)加入 0.6 mL 培养液, 在第 1 周内, 隔天换液, 从第 2 周开始, 每日换液, 在第 21 天

基金项目:上海市同仁医院院级课题(TRYJ(LC)201807);

上海市药学会资助项目(2018-YY-12)

作者简介:孟杰(1989-), 女, 硕士研究生

通信作者:李玲(1961-), 女, 教授, LL2699@shtrhospital.

时,即可进行相关转运实验。在这一过程中测定跨上皮电阻值(trans epithelial electrical resistance, TEER)。观测 Caco-2 细胞形态学变化,测定 Caco-2 细胞单层 TEER 值以及肠刷状缘细胞标志酶——碱性磷酸酶的活性,建立并验证 Caco-2 细胞模型。

2.2 细胞毒性实验 取对数生长的 Caco-2 细胞,设置为每孔 1 000 个细胞,放入 96 孔板中进行培养,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中孵育。培养 24 h 后,使用 Hank 平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)润洗细胞,加入不同剂量的药物,每个剂量设置 3 个复孔,培养 4 h。结束孵育后,每孔加入 CCK8 10 μL,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h,在酶标仪上测定吸光度,其测定吸收波长为 490 nm。实验中另设不加细胞的空白对照组,以及只加细胞不加任何药物样品溶液的阴性对照组。根据测得的吸光度,计算细胞存活率。

2.3 钩藤碱溶液的配制 精密称取 3.56 mg 的钩藤碱样品于 1.5 mL EP 管中,之后添加 185.2 μL DMSO 溶剂溶解,涡旋 3 min,1 000 r/min 离心 3 min,配置成浓度 50 mmol/L 的储存液,溶液中 DMSO 浓度低于 0.1%,−20 ℃ 保存。实验操作当日,从 50 mmol/L 中取 10 μL,加入 10 μL 100% DMSO,然后用 HBSS 稀释成 500、250、125、62.5、31.25、15.63 μmol/L 钩藤碱溶液。

2.4 分析样品处理 精密量取钩藤碱跨膜转运液 100 μL,加甲醇 900 μL 稀释,超声 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液。

2.5 液相色谱-质谱分析

2.5.1 液相色谱条件 Waters SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.8 μm),流动相乙腈(A)−0.1%甲酸(B)梯度洗脱(0~2 min,15%~15% A;2~5 min,15%~50% A;5~5.1 min,50%~90% A;5.1~6.5 min,90%~90% A;6.5~7 min,90%~15% A;7~9 min,15%~15% A);运行时间:9 min;流速:0.4 mL/min;进样量:1 μL;柱温:4 ℃。

2.5.2 质谱检测参数 电喷雾电离(ESI 源),正离子模式,多反应检测扫描,离子源温度 500 ℃,离子化电压 5 000 V,雾化气(GS1)345 kPa,辅助气(GS2)345 kPa,用于定量分析的化合物为钩藤碱检测离子对, m/z 为 385.21→178.1。

2.6 药物转运实验 用 HBSS 缓冲液将培养 21 d 的 Caco-2 单层细胞膜冲洗 3 次,最后 1 次在 37 ℃ 培养箱中平衡 20 min。①AP→BL 侧的转运。将各浓度的钩藤碱溶液 0.4 mL 加到细胞 AP 侧作为供给池,同时 BL 侧加入空白的 HBSS 溶液 0.6 mL 作为

接受池。②BL→AP 侧的转运。将各浓度的钩藤碱溶液 0.6 mL 加到 BL 侧作为供给池,同时 AP 侧加入空白 HBSS 溶液 0.4 mL 作为接受池。置于 37 ℃,55 r/min 的恒温摇床上孵育,分别于载药后 30、60、90、120 min 于接收液侧采样 100 μL,同时补加相同容积 HBSS 缓冲液,每组平行 3 个孔,计算钩藤碱在 Caco-2 细胞单层累积转运量(ΔQ)及表观渗透系数(apparent permeability coefficient, Papp)。③P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)抑制剂(维拉帕米)对转运的影响。抑制剂溶液与药物溶液采用 HBSS 溶液同时进行配制,其中钩藤碱浓度为 125 mol/L,抑制剂溶液浓度为 200 μmol/L。然后分别加入到 AP 侧(0.4 mL)和 BL 侧(0.6 mL),分别在 30、60、90、120 min 于接受池取样 100 μL,并加入 100 μL 空白 HBSS 溶液补足液体。样品于−40 ℃ 条件下保存。

Papp 大小反映药物透过单层细胞的能力以及药物吸收的速度、程度。它可由以下公式计算:

$$Papp = \Delta Q / (\Delta t \times A \times c_0)$$

式中 Papp 的计量单位是 cm/s;Q 是累积转运量,代表化合物在接收端出现的总量,计量单位是 μmol; $\Delta Q/\Delta t$ 是接受端药物出现的速率(ΔQ 为 Δt 内的转运量),计量单位是 μmol/s; c_0 是化合物在供给端的初始浓度,计量单位是 mmol/L;A 是聚碳酸酯膜的表面积,计量单位是 cm²。

2.7 统计学方法 每组实验重复 3 次,取平均值。采用“均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”对数据进行统计学描述,采用多因素方差分析对均数的差异进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Caco-2 细胞模型的建立和验证 依照正常细胞的培养顺序培养 Caco-2 细胞单层,细胞生长状态良好,培养第 3 周后,在显微镜下观察细胞生长速度较为均匀,边界十分明显,细胞之间出现很好的连接状态。选择种板后第 3、6、9、12、15、18、20、21 天测量电阻值。Caco-2 细胞单层的完整程度使用 TEER 进行测评,通常高于 500 Ω·cm² 就能够看做单层致密较为完整^[13]。至第 21 天,TEER 值升至(984.45±55.15)Ω·cm²。在第 3 周时,两侧碱性磷酸酶活力达到 5.10±0.07,通过 AP 与 BL 比值看出,碱性磷酸酶在 AP 侧的活性显著高于 BL 侧,即产生了极化现象^[13]。15 d 后趋势变缓,AP 侧与 BL 侧细胞分化明显,达到转运实验的需求。

3.2 细胞毒性实验 125 μmol/L 钩藤碱处理 Caco-2 细胞 24 h 后,细胞存活率为 95%,说明钩藤碱对 Caco-2 细胞无明显杀伤作用。因此本实验采

用31.25、62.5、125 $\mu\text{mol/L}$ 钩藤碱溶液进行转运研究。

3.3 方法学研究

3.3.1 标准曲线的建立 选取钩藤碱对照品,精密测量,放置在容积为 25 mL 容量瓶内,用甲醇溶解,定容至刻度,配置成浓度为 1 000、500、200、100、50 ng/mL 的溶液,取 10 μL 进样,依照“2.5”项下色谱条件进行测定。以钩藤碱浓度(ρ)对峰面积(A)进行线性回归,得标准曲线的回归方程: $A = 2\,360.132\,71\rho + 3.488\,56 \times 10^5$ ($r = 0.999\,59$),线性范围为 57.816~1 156.32 ng/mL,线性关系良好。

3.3.2 精密度考察 测定钩藤碱高、中、低 3 种不同浓度的对照品溶液,日内精密密度为 2.12%~4.21%;日间精密密度为 2.74%~5.66%,均小于 15%,符合生物样品检测要求。

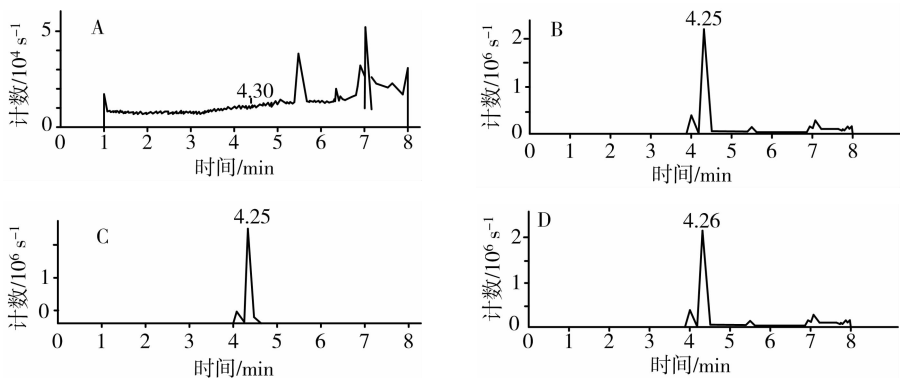
3.3.3 回收率试验 取钩藤碱对照品溶液,使用甲醇稀释成浓度为 1 000、400、100 ng/mL 的对照品溶液,在设定好的色谱条件下进行检测,并代入标准曲线计算出钩藤碱浓度。以检测浓度与配制浓度之间的比例,计算回收率。钩藤碱方法低浓度(115.632 ng/mL)的回收率为 $100.71\% \pm 7.05\%$,中浓度(462.528 ng/mL)的回收率为 $104.34\% \pm 3.32\%$,高浓度(1 156.32 ng/mL)的回收率为 $106.21\% \pm 2.05\%$,均满足生物样本分析要求。用乙腈配制浓度分别为 115.632、462.528、1 156.32 ng/mL 的钩藤碱溶液,记为 Set1;空白 HBSS 溶液经过前处理

后,配制浓度为 115.632、462.528、1156.32 ng/mL 的钩藤碱溶液,记为 Set2;含有钩藤碱浓度分别为 115.632、462.528、1 156.32 ng/mL 的 HBSS 溶液,经过前处理后,得到钩藤碱溶液,记为 Set3。提取回收率采用 Set3/Set2 进行计算,基质效应采用 Set2/Set1 进行计算。结果显示,低、中、高浓度组样品的提取回收率分别为 98.21%、97.28%、95.46%,而基质效应分别为 94.5%、93.7%、95.4%,并且前 1 min 不进色谱系统,对本实验无影响。结果均满足生物样本测定的条件。

3.3.4 稳定性考察 使用 400 ng/mL 钩藤碱对照品溶液,在 0 h 进样分析后,分别于第 1、2、4、6、12、24 小时进行测定,计算各时间点待测成分峰面积回收率及峰面积 RSD,每次进样 1 L,钩藤碱峰面积 $\text{RSD} < 15\%$,表明样品在 24 h 内稳定。同时对低、中、高浓度组样品的室温稳定性(25 $^{\circ}\text{C}$ 保存 24 h)、长期稳定性(-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 个月)及反复 3 次冻融(-40 $^{\circ}\text{C}$)进行了考察,结果均显示 $\text{RSD} < 15\%$ 。符合生物样品检测要求。

3.3.5 定量限考察 采用逐级稀释法,测定其钩藤碱定量限为 2 ng($S/N = 10.3$)。

3.3.6 专属性考察 依照“2.5”项下色谱条件进行测定,得到色谱图(见图 1)。结果表明,空白甲醇溶液、含有钩藤碱的 Caco-2 细胞转运液、钩藤碱对照品、加有盐酸维拉帕米和钩藤碱的 Caco-2 细胞转运液的检测结果均无干扰,表明本方法的专属性良好。



注:A.空白甲醇溶液;B.含有钩藤碱的 Caco-2 细胞转运液;C.钩藤碱对照品;
D.加有盐酸维拉帕米和钩藤碱的 Caco-2 细胞转运液

图 1 钩藤碱在 Caco-2 细胞模型上的高效液相色谱图

3.4 转运方向、时间和浓度对钩藤碱转运的影响 转运方向、钩藤碱浓度、转运时间对钩藤碱转运量的影响见表 1。采用 SPSS 19.0 软件进行三因素一元定量资料的方差分析,分析结果见表 2。结果表明转运方向、钩藤碱浓度及转运时间对钩藤碱转运的影响具有统计学意义($P < 0.05$)。组间比较

显示,随着时间的延长,转运量逐渐趋于饱和,其中从 30 min 到 60 min,转运量差异不具有统计学意义($P > 0.05$),而从 60 min 到 120 min 时,转运量差异具有统计学意义($P < 0.05$);随着浓度的增加,转运量增加,其中从 31.25 $\mu\text{mol/L}$ 至 125 $\mu\text{mol/L}$ 浓度,转运量差异有统计学意义($P < 0.05$),说明随着

浓度的升高,转运量逐渐趋于饱和。从表 3 可知,钩藤碱从 BL 侧到 AP 侧的外排速率明显高于从 AP 侧到 BL 侧的吸收速率。

表 1 不同浓度、不同孵育时间及不同给药部位下钩藤碱转运量($\bar{x}\pm s,n=3$)

转运方向	孵育时间/ min	转运量/nmol		
		31.25 $\mu\text{mol/L}$	62.5 $\mu\text{mol/L}$	125 $\mu\text{mol/L}$
AP→BL	30	0.002±0.001	0.059±0.039	0.097±0.038
	60	0.008±0.003	0.146±0.067	0.326±0.062
	90	0.020±0.001	0.307±0.09	0.645±0.027
	120	0.141±0.030	0.586±0.008	1.114±0.029
BL→AP	30	0.010±0.001	0.069±0.024	0.199±0.052
	60	0.072±0.012	0.215±0.088	0.692±0.034
	90	0.203±0.018	0.550±0.002	1.313±0.142
	120	0.307±0.070	0.765±0.353	1.868±0.133

表 2 钩藤碱浓度、孵育时间及给药部位对钩藤碱转运量影响的三因素方差分析结果

差异来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
钩藤碱浓度	0.909	1	0.909	18.005	0.000
孵育时间	4.323	3	1.441	28.542	0.000
转运方向	3.413	2	1.707	33.805	0.000
误差	2.070	41	0.050		

表 3 不同浓度及转运方向状态下钩藤碱的 Papp 值($\bar{x}\pm s,n=3$)

钩藤碱浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	Papp _(AP→BL) / (10^{-6} cm/s)	Papp _(BL→AP) / (10^{-6} cm/s)	Papp _(BL→AP) / Papp _(AP→BL)
31.25	0.101±0.010	1.001±0.091	10.002
62.50	3.041±0.942	5.423±0.031	1.781
125.00	12.741±0.540	25.942±2.801	2.040

3.5 蛋白抑制剂对钩藤碱转运的影响 钩藤碱

表 4 蛋白酶抑制剂维拉帕米、孵育时间、给药部位对钩藤碱转运量的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

转运方向	蛋白酶抑制剂	转运量/nmol			
		孵育 30 min	孵育 60 min	孵育 90 min	孵育 120 min
AP→BL	维拉帕米	0.547±0.037	0.781±0.023	1.051±0.086	1.504±0.104
BL→AP	维拉帕米	0.092±0.036	0.369±0.021	0.888±0.060	1.247±0.273

表 5 孵育时间及转运方向对钩藤碱转运量影响的两因素方差分析结果

差异来源	Ⅲ 类平方和	自由度	均方	F 值	P 值
修正模型	3.028*	4	0.757	15.669	0.000
截距	10.399	1	10.399	215.276	0.000
转运方向	0.435	1	0.435	8.997	0.012
孵育时间	2.593	3	0.864	17.893	0.000
误差	0.531	11	0.048		
总计	13.958	16			
修正后总计	3.559	15			

注: * $R^2=0.851$ (调整后 $R^2=0.796$)

3.6 阳性对照药普萘洛尔和阿替洛尔的转运 在本实验环境下,Caco-2 细胞单层模型中呈良好吸收转运的阳性对照药普萘洛尔的 Papp 为 $(2.69\pm0.43)\times$

$(125\ \mu\text{mol/L})$ 跨膜转运的 $\text{Papp}_{(\text{BL}\rightarrow\text{AP})}$ 显著高于 $\text{Papp}_{(\text{AP}\rightarrow\text{BL})}$ 值,且外流比为 2.040,说明钩藤碱主要以主动转运的方式跨膜吸收,且外排转运体可能参与药物在 Caco-2 细胞的转运。当 P-gp 抑制剂维拉帕米 $(100\ \mu\text{mol/L})$ 与钩藤碱 $(125\ \mu\text{mol/L})$ 共存时,钩藤碱转运量的变化见表 4。当加入 P-gp 抑制剂之后,药物由 BL 侧向 AP 侧的转运量显著减少,而由 AP 侧到 BL 侧的转运量显著增加,说明 P-gp 参与了药物的外排作用。对上述数据进行两因素方差分析(见表 5),结果显示 P-gp 抑制剂维拉帕米对钩藤碱转运的影响具有统计学意义($P<0.05$)。这表明 P-gp 参与了药物在 Caco-2 细胞中的吸收转运。加入抑制剂后,钩藤碱的 Papp 见表 6。

10^{-5} cm/s ,吸收良好,呈难转运的阳性对照药阿替洛尔的 Papp 值为 $(2.58\pm0.14)\times10^{-7}\text{ cm/s}$,与文献[14-15]的结果一致。钩藤碱在 31.25、62.5、125 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下 Papp 为 10^{-6} cm/s 。

表 6 蛋白抑制剂对钩藤碱 Papp 的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	Papp _(AP→BL) / (10^{-6} cm/s)	Papp _(BL→AP) / (10^{-6} cm/s)	Papp _(BL→AP) / Papp _(AP→BL)
钩藤碱 125 $\mu\text{mol/L}$	12.741±0.540	25.942±2.801	2.040
钩藤碱 125 $\mu\text{mol/L}$ + 维拉帕米 100 $\mu\text{mol/L}$	20.760±2.274*	17.540±2.362*	0.845*

注:与钩藤碱 125 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,* $P<0.05$

4 讨论

对钩藤中钩藤碱及其他系列生物碱含量测定时,色谱条件的选择可以使用内标法和外标法。预实验发现对照品质谱响应和待分析物差异较大,且稳定性也欠佳,对照品和内标物的分离度不理想,故采用外标法。

转运蛋白在 Caco-2 细胞膜上,可以探究载体所提供的药物摄取以及排泄机制。Caco-2 细胞所表达的 P-gp^[16]、多药耐药蛋白-2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)^[17] 和乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP)^[18] 浓度和正常人体空肠所表现出来的浓度一致^[19]。除此之外,在 Caco-2 细胞顶膜中也有所表达,这也证实了在 Caco-2 细胞系中的极化表达^[20]。

确立快速准确的检测分析手段是确保该实验可以如期完成的前提条件。本实验运用高效液相色谱法检测 Caco-2 细胞模型 HBSS 液中钩藤碱,出峰时间达到了 4.25 min,无显著的 Caco-2 模型内溶液干扰。钩藤碱在 57.816~1156.32 ng/mL 范围内,其标准曲线方程的线性关系良好,回收率达到 90% 以上,日内以及日间 RSD 均小于 6%,并且在温度为 (37±1)℃ 的实验条件下稳定,满足样品实验的需要。这一检测手段具有灵敏度高、检测速度快的优势。

钩藤碱 (31.25、62.5、125 μmol/L) 在 Caco-2 细胞双向转运中的 $P_{app(BL \rightarrow AP)} / P_{app(AP \rightarrow BL)}$ 值均大于 1.5^[21-22],说明钩藤碱的转运规律中有外排蛋白的参与。在 ATP 结合盒转运蛋白家族中,P-gp、MRP2、BCRP 是被研究最深入的几种外排转运蛋白^[23]。通常情况下,口服药物需要经过小肠这一器官代谢达到血液以及组织中,上述所提到的转运蛋白具有屏障作用,能够将药物外排入肠腔。

在 Caco-2 细胞模型中,经常运用 P_{app} 来测评药物口服吸收的程度。目前以 P_{app} 评价药物吸收程度的标准^[24]: $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/s,吸收率为 0~20%,难吸收; 10^{-6} cm/s $< P_{app} < 10^{-5}$ cm/s,吸收率为 20%~70%,吸收中等; $P_{app} > 10^{-5}$ cm/s,吸收率为 70%~100%,吸收良好。因此,钩藤碱的吸收良好,可以开发成口服制剂,值得进行深入研究。通过设定不同时间点 (0、30、60、90、120 min) 的研究发现,钩藤碱的转运量随着时间的增加而增加,于 60 min 时吸收显著增强, $P_{app(BL \rightarrow AP)}$ 均显著高于 $P_{app(AP \rightarrow BL)}$ 。此外,不同浓度 (31.25、62.5、125 μmol/L) 钩藤碱的双向转运程度随浓度升高而增加,且 $P_{app(BL \rightarrow AP)}$ 显著高于 $P_{app(AP \rightarrow BL)}$,说明药物在吸收过程中以主动转运为主,且一定有外排蛋白的

参与。P-gp 蛋白抑制剂维拉帕米可显著降低钩藤碱从 BL 侧至 AP 侧的 P_{app} 值,增加从 AP 侧至 BL 侧的 P_{app} 值,钩藤碱的转运规律中有外排蛋白的参与,提示钩藤碱为外排转运蛋白 P-gp 的底物。

参考文献:

- [1] 姜伟,张丽. 钩藤的药理作用研究[J]. 现代中西医结合杂志,2006,15(21):3013-3015.
- [2] 江芳,郭娜,童文琴,等. 钩藤属植物研究进展[J]. 海峡药学,2017,29(4):5-13.
- [3] YAMANAKA E, KIMIZUKA Y, AIMI N, et al. Studies of plants containing indole alkaloids. IX. Quantitative analysis of tertiary alkaloids in various parts of *uncaria rhynchophylla* miq [J]. Yakugaku Zasshi, 1983, 103 (10):1028-1033.
- [4] 高晓宇,丁茹,王道平,等. 钩藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 天津医科大学学报,2017,23(4):380-382.
- [5] HSIEH C L, HO T Y, SU S Y, et al. *Uncaria rhynchophylla* and rhynchophylline inhibit c-jun n-terminal kinase phosphorylation and nuclear factor-kappa B activity in kainic acid-treated rats [J]. Am J Chin Med, 2009,37(2):351-360.
- [6] HO T Y, TANG N Y, HSIANG C Y, et al. *Uncaria rhynchophylla* and rhynchophylline improved kainic acid-induced epileptic seizures via IL-1 beta and brain-derived neurotrophic factor [J]. Phytomedicine, 2014, 21(6):893-900.
- [7] WU L Z, XIAO X M. Evaluation of the effects of *uncaria rhynchophylla* alkaloid extract on LPS-induced preeclampsia symptoms and inflammation in a pregnant rat model [J]. Braz J Med Biol Res, 2019,52(6):e8273.
- [8] YANG W, IP S P, LIU L, et al. *Uncaria rhynchophylla* and its major constituents on central nervous system: a review on their pharmacological actions [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2019,17:1-12.
- [9] FREDLUND L, WINIWARTER S, HILGENDORF C. *In vitro* intrinsic permeability: a transporter-independent measure of caco-2 cell permeability in drug design and development [J]. Mol Pharm, 2017,14(5):1601-1609.
- [10] 兰燕宇,刘跃,曹旭,等. 杜仲提取物中 4 种主要成分在 Caco-2 细胞的摄取特性研究 [J]. 中国药理学通报, 2014,30(9):1306-1311.
- [11] 徐小昆,陈志永,李卓清,等. 新补骨脂异黄酮在 Caco-2 细胞模型中的吸收机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15):2922-2926.
- [12] KAMIYA Y, TAKAKU H, YAMADA R, et al. Determination and prediction of permeability across intestinal epithelial cell monolayer of a diverse range of industrial chemicals/drugs for estimation of oral absorption as a putative marker of hepatotoxicity [J]. Toxicol

Rep,2020,7:149-154.

[13] 吕晓君,曹易丹,何开勇. Caco-2 细胞体外吸收模型的建立及验证[J]. 医药导报,2018,37(11):1311-1315.

[14] XIANG D, FAN L, HOU X L, et al. Uptake and transport mechanism of dihydromyricetin across human intestinal caco-2 cells[J]. J Food Sci, 2018, 83(7): 1941-1947.

[15] ZHANG Y N, YANG Y F, XU W, et al. The blood-brain barrier permeability of six indole alkaloids from *Uncaria ramulus cum uncis* in the MDCK-pHaMDR cell monolayer model[J]. Molecules, 2017,22(11):1-12.

[16] 李素云,李峥,高蔚娜,等. P-糖蛋白对槲皮苷跨膜吸收及代谢的影响[J]. 国际药学研究杂志,2017,44(12): 1150-1154.

[17] TOCCHETTI G N, DOMINGUEZ C J, ZECCHINA-TI F, et al. Inhibition of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) activity by the contraceptive norgestrel acetate in HepG2 and Caco-2 cells[J]. Eur J Pharm Sci,2018,122:205-213.

[18] KAWAHARA I, NISHIKAWA S, YAMAMOTO A, et al. The impact of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) on drug transport across Caco-2 cell monolayers[J]. Drug Metab Dispos,2020,48(6):491-498.

[19] YANG H, ZHAI B, FAN Y, et al. Intestinal absorption mechanisms of araloside A *in situ* single-pass intestinal perfusion and *in vitro* Caco-2 cell model[J]. Biomed Pharmacother,2018,106:1563-1569.

[20] MEASE K, SANE R, PODILA L, et al. , Differential selectivity of efflux transporter inhibitors in Caco-2 and MDCK-MDR1 monolayers: a strategy to assess the interaction of a new chemical entity with P-gp, BCRP, and MRP2[J]. J Pharm Sci,2012,101(5):1888-1897.

[21] 王剑,王春,肖峰,等. 芍药苷-6-O'-苯磺酸酯在 Caco-2 细胞模型中吸收机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018,53(11):1751-1756.

[22] 马颖林,周一平,周昱,等. 7,4'-二羟基黄酮在 Caco-2 细胞模型中的代谢及转运[J]. 医药导报,2017,36(2): 127-131.

[23] AMAWI H, SIM H M, TIWARI A K, et al. ABC transporter-mediated multidrug-resistant cancer [J]. Adv Exp Med Biol,2019,1141:549-580.

[24] 王素军,王广基,李晓天,等. LC-MS 法测定槐果碱及其在 Caco-2 细胞上的转运特征[J]. 中国中药杂志, 2007,32(1):57-60.

(收稿日期:2020-04-23;编辑:姚实林)

Absorption Mechanism of Rhynchophylline in the Caco-2 Cell Model

MENG Jie^{1,2}, SU Rui², LIAO Yun², YUAN Bo², LI Ling²

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Tongren Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336, China)

[Abstract] **Objective** To establish an *in vitro* Transwell model of intestinal Caco-2 cells, and to investigate the transmembrane transport characteristics of rhynchophylline in the Caco-2 cell model. **Methods** Caco-2 cells were cultured with polycarbonate membrane for 21 consecutive days to form a dense monolayer cell model, and then the factors affecting the transport characteristics of rhynchophylline in Caco-2 cell model were assessed, including concentration, time, and the transmembrane transporter P-glycoprotein. Liquid chromatography-mass spectrometry was used to measure the content of rhynchophylline in solution. **Results** The amount of transport of rhynchophylline in the Millicell system showed a concentration-time-dependent manner to a certain degree, and rhynchophylline was mainly absorbed by active transport. The amount of transport increased significantly with the increase in time and drug concentration. Different concentrations of rhynchophylline had an apparent permeability coefficient of above 1.5 from basolateral(BL) side to apical(AP) side and from AP side to BL side, and the efflux rate of rhynchophylline from BL side to AP side was significantly higher than the absorption rate of rhynchophylline from AP side to BL side. After a P-glycoprotein inhibitor was added, there was a significant reduction in the amount of transport of rhynchophylline from BL side to AP side and a significant increase in the amount of transport of rhynchophylline from AP side to BL side. **Conclusion** The transport of rhynchophylline in Caco-2 cells shows a concentration-time-dependent manner, and P-glycoprotein mediates the transport of rhynchophylline in Caco-2 cells.

[Key words] Rhynchophylline; Caco-2 cells; P-glycoprotein; Liquid chromatography-mass spectrometry; Absorption