

Caco-2 单层细胞模型上土的宁的体外吸收机制及其与甘草苷的转运相互作用

王俊俊, 廖晓欢, 叶敏, 陈勇*

(湖北大学中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要: 利用人结肠癌细胞系 Caco-2 细胞单层模型, 分别考察了转运时间、药物作用浓度、P-糖蛋白抑制剂维拉帕米、溶液 pH 值对土的宁表观渗透系数 (P_{app}) 和累积转运浓度 (TR_{cum}) 的影响, 探讨了土的宁的体外肠吸收机制及甘草苷对土的宁吸收与转运的影响。结果表明, 土的宁在 Caco-2 细胞中的转运主要为被动转运, 吸收较好。甘草苷能显著促进土的宁的吸收, 且当土的宁与甘草苷的配伍比例为 1:1 时, 对土的宁吸收的促进作用最强。同时实验还发现, 土的宁可能是 P-糖蛋白的作用底物, 环境 pH 值对土的宁的外排作用有重要影响。

关键词: 土的宁; 甘草苷; Caco-2 单层细胞模型; 转运

中图分类号: R964 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2010) 09-1160-05

In vitro absorption mechanism of strychnine and the transport interaction with liquiritin in Caco-2 cell monolayer model

WANG Jun-jun, LIAO Xiao-huan, YE Min, CHEN Yong*

(Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: To study the effect of liquiritin (Liq) on the transport of strychnine (Str) in Caco-2 cell monolayer model, the transport parameters of Str, such as apparent permeability coefficient ($P_{app(B \rightarrow A)}$ and $P_{app(A \rightarrow B)}$) and cumulative transport amount (TR_{cum}), were determined and comparatively analyzed when Str was used solely and co-used with Liq. The effect of drug concentrations, conveying times, P-glycoprotein (P-gp) inhibitor verapamil and conveying liquor pH values on the transport of Str were also investigated. The results indicated that the absorption of Str in Caco-2 cell monolayer model was well and the passive transference was the main intestinal absorption mechanism of Str in the Caco-2 monolayer model, along with the excretion action mediated by P-gp. Liq enhanced the absorption of Str. Meanwhile, conveying liquor pH value had significant influence on the excretion transport of Str.

Key words: strychnine; liquiritin; Caco-2 cell monolayer model; transport

马钱子为马钱科植物马钱 (*Strychnos nux-vomica* L.) 或云南马钱 (*Strychnos pierriana* A.W.Hill) 的干燥成熟种子, 具有通络止痛, 散结消肿之功, 目前多用于治疗脊柱关节病^[1]。马钱子主要含吲哚类生物碱, 其中土的宁 (番木鳖碱) 既是其重要活性成分, 又是其主要毒性成分^[2]。由于马钱子及土的宁的有效剂量

与中毒剂量比较接近, 使用不当容易引起中毒反应。因此, 临床上马钱子常与其他中药, 如甘草配伍使用, 以达到减毒增效的作用。目前, 关于马钱子总碱及土的宁在动物体内的药动学已有文献^[3-5]报道, 但甘草与马钱子配伍使用对土的宁吸收的影响尚无报道。本文以马钱子药材主要毒性成分土的宁和甘草主要活性成分甘草苷为研究对象, 在 Caco-2 细胞 (human colon adenocarcinoma cell lines) 模型上研究了甘草苷对土的宁体外吸收与转运的影响, 以探讨甘草苷

收稿日期: 2010-03-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30630075).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-27-88663590, E-mail: cy101610@yahoo.cn

在吸收环节对土的宁的影响,为深入研究甘草与土的宁的吸收相互作用提供一定的理论依据。

材料与方法

药品与试剂 盐酸土的宁 (strychnine, Str, 纯度 >98%) 购于 Sigma 公司; 甘草苷 (liquiritin, Liq, 纯度 >98%) 购于四川省维克奇生物科技有限公司; 维拉帕米 (verapamil, Ver, 批号 100223-200102, 纯度 >98%) 购于中国药品生物制品检定所; DMEM 培养基购于 Gibco 公司; 胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司; 非必需氨基酸购于 Sigma 公司; 胰酶、青霉素-链霉素购于吉诺生物有限公司; 碱性磷酸酶试剂盒购于南京建成生物有限公司; 色谱纯甲醇购于美国 Fisher 公司; Caco-2 细胞株购自中国典型培养物保藏中心。

仪器 Olympus XDS-1B 型倒置显微镜, Sigma 公司 2K15C 型低温高速离心机, 上海迅达医疗仪器公司 XD-711 型酶标仪, 岛津 UV-1601 紫外分光光度计, Heal Forse CO₂ 培养箱, Millipore 公司 Millicell-ERS 型跨膜电阻仪, Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪 (包括 DAD 二极管阵列检测器; Agilent ChemStation 色谱工作站), 韩国 Biotron 公司真空离心浓缩机, 美国 Costar 公司 Transwell 细胞培养板, 和 Millipore 公司 millicell 膜。

细胞培养条件^[6-8] 25~40 代的 Caco-2 细胞培养于 37 °C、含 5% CO₂ 的环境中, 培养基为 DMEM (其中含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 谷氨酰胺以及青霉素-链霉素双抗液), 隔天换一次培养液, 每 3 天按 1:3 的比例传代。将对数生长期细胞按 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种到 12 孔 Transwell 板上, 接种后隔天换液, 7 天后每日换液, 培养至 21 天。检测碱性磷酸酶活性和各孔跨膜电阻, 选择 Caco-2 细胞单层生长状态完好、符合转运条件 (跨膜电阻大于 $400 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$) 的 Millicell 膜用于转运实验。

溶液配制 将受试药物分别溶于 DMSO, 实验前用相应 pH 的 HBSS 溶液稀释至所需浓度, 其中 DMSO 最终浓度低于 1%。

转运实验 A→B 侧的转运: 将各浓度的药物溶液 0.5 mL 加到细胞绒毛面 (apical, A) 侧作为供给池, 同时基底面 (basolateral, B) 侧加入空白的 HBSS 溶液 1.5 mL 作为接受池。B→A 侧的转运: 将各浓度的药物溶液 1.5 mL 加到 B 侧作为供给池, 同时 A 侧加入空白 HBSS 溶液 0.5 mL 作为接受池。分别于 30、

60、90 和 120 min 从接受池中取样 0.5 mL (A→B 侧的转运) 或 0.2 mL (B→A 侧的转运), 同时补加等量空白 HBSS 溶液。用 HPLC 测定药物的吸收量。分别考察转运时间、药物浓度、P-gp 抑制剂 Ver、pH 值对 Str 吸收与转运的影响。

色谱检测条件 采用 Phenomenex-ODS (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-水 (30:70; 每 100 mL 中加入三乙胺 1 mL、磷酸 0.6 mL 调至 pH 3.0), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 254 nm, 进样量 20 μL, 柱温 25 °C。

样品前处理方法 转运样品在 4 °C、 $12\ 000 \times g$ 条件下离心 10 min, 取上清液于 37 °C 真空离心浓缩挥发干, 用流动相 50 μL 复溶后, 再于 4 °C、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进样检测。

数据分析 口服药物透过 Caco-2 单层细胞模型的表现渗透系数 P_{app} 可以代表药物转运能力的大小^[9], $P_{\text{app}} (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}) = (dQ/dt) / (A \times C_0)$ 。其中, dQ/dt 为单位时间药物转运量 ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$), A 为聚碳酸酯膜的表面积 (本实验中为 1.13 cm^2), C_0 为 Str 的初始浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。由于每次取样后都要补液, 稀释了药物的通透作用, 因而要对药物的累积转运浓度 TR_{cum} 进行校正^[10], $\text{TR}_{\text{cum}} = A_n + \frac{V_{S_n}}{V_R} \sum_{i=0}^{n-1} A_i$ 。其中, A_n 为第 n 个样品通透量的测定值, V_{S_n} 为第 n 个样品的采样体积, V_R 为接受池体积。

结果

1 Str 的色谱分析方法

空白 HBSS 溶液以及 Liq 均对 Str 的色谱检测无干扰, 见图 1。精密称取 Str 对照品适量, 用空白 HBSS 溶液配制 0.01、0.1、1、5、10 和 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Str 溶液, 按“样品前处理方法”项操作后进样分析。以 Str 色谱峰面积为横坐标, 浓度为纵坐标进行线性回归, 标准曲线为 $y = 280.52x - 15.759$, $r = 0.999\ 6$, 线性范围为 $0.01 \sim 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限为 $0.007 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

用空白 HBSS 溶液配制 0.01、5.0 和 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个浓度的 Str 质控样品, 分别进样分析, 用测得的浓度与实际浓度相比较, 求得方法回收率为 99.6%~101.4%。每样本测定 6 次, 连续测定 3 天, Str 的日内精密度和日间精密度均小于 5%。上述质控样品分别于室温下保存 1 天和 -20 °C 保存 3 天后处理并测定 ($n = 6$), 测得结果分别与零时测定值进行比较, RSD

值均小于 2%，表明质控样品稳定性良好。

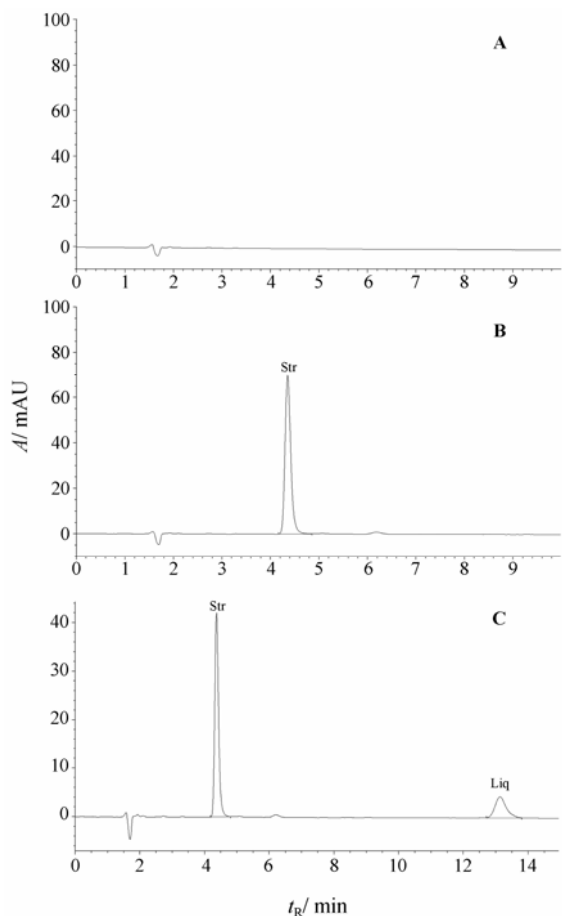


Figure 1 HPLC chromatogram of strychnine (Str) in HBSS. A: Blank HBSS; B: Blank HBSS spiked with Str; C: Blank HBSS spiked with Str and liquiritin (Liq)

2 浓度及时间对 Str 吸收与转运的影响

Str 的 TR_{cum} 随时间变化的结果见图 2。结果表明, Str 单用 (25、50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Str 与 3 个作用浓度的 Liq (25、50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 配伍使用时, Str 的 TR_{cum} (A→B、B→A 方向) 均随 Liq 浓度的增大、转运时间的延长而增加, 且 Str 单独作用时 B→A 方向的转运均强于 A→B 方向的转运。

Str 在 120 min 时的 P_{app} 见表 1。结果表明, Str 单用时的 $P_{app(A\rightarrow B)}$ 、 $P_{app(B\rightarrow A)}$ 在整个浓度范围内基本恒定不变, 且 $P_{app(B\rightarrow A)}$ 均大于对应浓度下的 $P_{app(A\rightarrow B)}$ 。Str (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 分别与 3 个作用浓度 Liq 配伍使用, 均能显著提高 Str 的 $P_{app(A\rightarrow B)}$ 、降低 Str 的 $P_{app(B\rightarrow A)}$ / $P_{app(A\rightarrow B)}$ 。

3 P-gp 抑制剂对 Str 吸收与转运的影响

P-gp 抑制剂 Ver 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对 Str 转运的影响结果见表 2。Str 单用时, Ver 能显著降低 Str 的 $P_{app(A\rightarrow B)}$

Table 1 Apparent permeability coefficients of Str. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Str (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) used solely

Drug concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$P_{app} \times 10^{-6} / \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		$P_{app(B\rightarrow A)} / P_{app(A\rightarrow B)}$
	A→B	B→A	
Str 25	25.74 ± 0.44	32.17 ± 0.22	1.25
50	26.41 ± 0.31	31.60 ± 0.45	1.20
100	26.14 ± 2.82	31.61 ± 0.59	1.21
Str/Liq 50/25	29.38 ± 1.74*	32.21 ± 0.73	1.10
50/50	34.96 ± 2.24**	32.21 ± 1.33	0.92
50/100	30.36 ± 2.63*	28.34 ± 1.64*	0.93

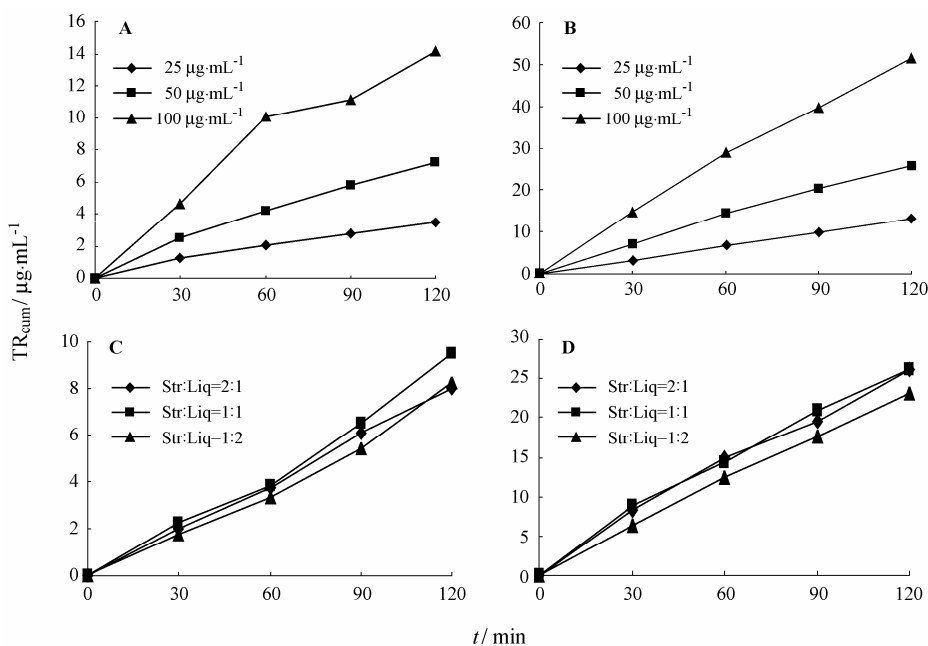


Figure 2 Cumulative transport concentration of Str at different times. A: Str solely (A→B); B: Str solely (B→A); C: Str with Liq (A→B); D: Str with Liq (B→A)

和 $P_{app(B \rightarrow A)}$, 但 $P_{app(B \rightarrow A)}/P_{app(A \rightarrow B)}$ 比值减小。Str 与 Liq 合用时, Ver 能显著降低 Str 的 $P_{app(A \rightarrow B)}$ ($P < 0.01$) 和 $P_{app(B \rightarrow A)}$ ($P < 0.05$), 但 $P_{app(B \rightarrow A)}/P_{app(A \rightarrow B)}$ 比值增大。

Table 2 Effect of verapamil (Ver, 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the transport of Str (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. ^aLiq 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Drug	Group	$P_{app} \times 10^{-6} / \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		$P_{app(B \rightarrow A)}/P_{app(A \rightarrow B)}$
		A \rightarrow B	B \rightarrow A	
Str	Control	26.41 \pm 0.31	31.60 \pm 0.45	1.20
	Ver	25.04 \pm 5.68*	27.90 \pm 2.68*	1.11
Str + Liq ^a	Control	34.96 \pm 2.24	32.21 \pm 1.33	0.93
	Ver	23.04 \pm 2.66**	26.37 \pm 2.36*	1.14

4 pH 值对 Str 吸收与转运的影响

pH 值对 Str 转运影响的结果见表 3。Str 单用、pH 6.0 时的 $P_{app(A \rightarrow B)}$ 与 $P_{app(B \rightarrow A)}$ 分别是 pH 7.4 时的 0.72 和 0.30 ($P < 0.01$); Str 与 Liq 配伍使用、Str 在 pH 6.0 时的 $P_{app(A \rightarrow B)}$ 与 $P_{app(B \rightarrow A)}$ 分别是 pH 7.4 时的 0.66 和 0.27 ($P < 0.01$)。

Table 3 Effect of pH on the transport of Str (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs the group of pH 7.4. ^aLiq 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Drug	pH	$P_{app} \times 10^{-6} / \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		$P_{app(B \rightarrow A)}/P_{app(A \rightarrow B)}$
		A \rightarrow B	B \rightarrow A	
Str	7.4	26.41 \pm 0.31	31.60 \pm 0.45	1.20
	6.0	19.06 \pm 1.72**	9.34 \pm 0.89**	0.49
Str + Liq ^a	7.4	34.96 \pm 2.24	32.21 \pm 1.33	0.93
	6.0	23.25 \pm 2.91**	8.84 \pm 0.79**	0.38

讨论

Caco-2 细胞是人结肠癌细胞系, 是常用的研究药物肠吸收机制及药物相互作用的较理想的体外模型^[11, 12]。MTT 实验结果表明, 0~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Str 和 0~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Liq 对 Caco-2 细胞的增殖没有明显影响。当 Str 浓度低于 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 本文检测方法已检测不到药物通过 Caco-2 细胞的吸收量, 因此实验选择 Str 的给药浓度为 25、50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同时, 当 Str 在 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 其 $P_{app(B \rightarrow A)}/P_{app(A \rightarrow B)}$ 值最小, 说明此时 Str 的吸收最强。因此选择 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Str 与 Liq 进行配伍吸收研究。

药物在 Caco-2 细胞模型上的 P_{app} 与其口服吸收密切相关。吸收良好的药物, 其 P_{app} 大于 $1 \times 10^{-6} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, 吸收较差的药物, 其 P_{app} 小于 $1 \times 10^{-7} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ [13]。本研究发现 Str 的 P_{app} 值均大于 $1 \times 10^{-6} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, 说明 Str 口服吸收良好。在漏槽条件下, 如药物的 P_{app} 不随药

物浓度变化而变化, 或 $P_{app(A \rightarrow B)}$ 与 $P_{app(B \rightarrow A)}$ 基本相同, 则药物的主要转运机制为被动扩散; 若 $P_{app(B \rightarrow A)}/P_{app(A \rightarrow B)}$ 或 $P_{app(A \rightarrow B)}/P_{app(B \rightarrow A)} > 1.5$, 则可能存在主动转运机制^[14]。本研究发现, Str 的 P_{app} 不随浓度变化而变化, 说明 Str 的主要转运机制为被动扩散。

Caco-2 细胞的 A 面上存在能量依赖性药物外排泵 P-gp^[15, 16], 能将胞内底物排出细胞。Ver (P-gp 的专属抑制剂) 能显著降低 Str 单用及与 Liq 合用时的 $P_{app(B \rightarrow A)}$ 值, 说明 Ver 能抑制 P-gp 对 Str 的外排作用, 提示 Str 可能是 P-gp 的作用底物。Caco-2 细胞具有脂质膜的功能, 只允许脂溶性的非解离的酸或碱通过, 而离子化的药物分子只有很窄的吸收范围^[17]。在 pH 6.0 条件下, Str ($\text{p}K_a = 8.0$) 无论单用还是与 Liq 合用, 其 $P_{app(A \rightarrow B)}$ 、 $P_{app(B \rightarrow A)}$ 和 $P_{app(B \rightarrow A)}/P_{app(A \rightarrow B)}$ 均较 pH 7.4 时显著降低, 且外排降低的程度大于吸收降低的程度, 说明环境 pH 值对 Str 的外排作用有重要影响。

痹祺胶囊在临床上广泛用于风湿与类风湿关节炎的治疗, 其君药为马钱子, 使药为甘草^[18]。本研究发现 3 个作用浓度的 Liq 均能显著促进 Str 的吸收, 且当 Str : Liq = 1 : 1 时, 对 Str 吸收的促进作用最强。文献^[3]报道, Str 吸收较快, 主要在血液中消除, 且消除速度与血药浓度密切相关。低浓度时消除较慢, 会在体内蓄积到一定浓度后被快速清除。由于 Str 毒性很强, 血药浓度较低时即出现中毒现象。当马钱子单独给药时, Str 可被较快吸收进入血液, 累积到一定浓度后被快速清除, 在此累积过程中, Str 的血药浓度可能已达到或超过了其最低有毒浓度而导致中毒。当甘草与马钱子配伍时, 甘草苷可显著促进 Str 的吸收, 有效降低 Str 从低浓度慢清除到较高浓度快清除所需时间。这可能是甘草能降低马钱子毒性的重要原因之一。

References

- [1] Xu GJ. Pharmacognosy (生药学) [S]. Beijing: People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 1994: 309.
- [2] Zhang XJ, Jin RX, Chen YJ. Advances of pharmacokinetic study on semen strychnine and its dosage forms [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2008, 14: 75-78.
- [3] Zhang ZQ, Wang Y, Li J. In vivo distribution and metabolism research of strychnine in *Strychnos* [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 1998, 25: 433-434.
- [4] Xu XY, Cai BC, Pan Y, et al. Pharmacokinetics of the alkaloids

- from the processed seeds of *Strychnos nux-vomica* in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 458-461.
- [5] Cai BC, Xu XY, Pan Y. Tissue distribution of *Strychnos nux-vomica* alkaloids in rats [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2004, 20: 421-424.
- [6] Liao XH, Wang JJ, Gao MY, et al. Effect of major components of Maijunan tablets on the transport of hydrochlorothiazide in Caco-2 cell monolayer model [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 104-108.
- [7] Cai RL, Wang M, Qi Y, et al. Selection and utilization on the evaluation criterions of Caco-2 cell model [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2008, 43: 1471-1475.
- [8] Sun MJ, Sheng X, Hu YQ. Establishment and validation of Caco-2 cell lines for intestinal epithelial permeability [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2006, 41: 1431-1434.
- [9] 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: 880-885.
- [10] Song L, Zhang N, Xu DS. Absorption mechanism of paeoniflorin across Caco-2 monolayer model [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2008, 39: 41-44.
- [11] Yang HT, Wang GJ. Caco-2 cell monolayers model and its application in pharmacy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2000, 35: 797-800.
- [12] Wang YR, He Y. The application of Caco-2 cell model in the research of natural drug absorption [J]. Chin J Biochem Pharm (中国生化药物杂志), 2007, 28: 66-69.
- [13] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46: 27-43.
- [14] Liao S, Xie JW. Application of Caco-2 cell model in drug *in vitro* research [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2005, 14: 416-419.
- [15] Terry RS, Olafur G. Progress in understanding the structure-activity relationships of P-glycoprotein [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54: 315-328.
- [16] Sha XY, Fang XL, Wu YJ. The *in vivo* kinetics of uptake, transport and efflux of 9-nitrocamptothecin in Caco-2 cell model [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 839-843.
- [17] Gao K, Sun J, He ZG. Important application of Caco-2 cell monolayers in the study of the intestinal oral absorption [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2005, 22: 469-474.
- [18] Liu W, Chen FY, Wang Y, et al. Clinical observation on therapeutic effect of Biqi capsule and Zhengqingfengtongning pill in treating rheumatoid arthritis patients [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2007, 22: 244-247.