

脉君安片中主要成分对氢氯噻嗪在 Caco-2 细胞模型中转运的影响

廖晓欢, 王俊俊, 高明勇, 高倩, 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: 利用人源结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞单层模型, 研究了脉君安片中主要降压活性成分葛根素、钩藤碱与氢氯噻嗪配伍使用前后对氢氯噻嗪体外吸收与转运的影响, 探讨了氢氯噻嗪与葛根素、钩藤碱配伍使用时在吸收阶段的药物相互作用。结果表明, 氢氯噻嗪在 Caco-2 单层细胞模型中的吸收可能存在由载体介导的主动转运, 葛根素能减少 P-糖蛋白 (P-gp), 对氢氯噻嗪的外排, 钩藤碱对氢氯噻嗪的吸收转运无显著影响, 葛根素、钩藤碱与氢氯噻嗪合用能增强氢氯噻嗪的吸收。同时, 实验还发现氢氯噻嗪可能是 P-gp 的作用底物, 且 pH 值对氢氯噻嗪的转运有重要影响, 在弱酸性条件下, 氢氯噻嗪的吸收比在中性条件下好。

关键词: 氢氯噻嗪; 葛根素; 钩藤碱; Caco-2 单层细胞模型; 转运; P-糖蛋白

中图分类号: R964

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 01-0104-05

Effect of major components of Maijunan tablets on the transport of hydrochlorothiazide in Caco-2 cell monolayer model

LIAO Xiao-huan, WANG Jun-jun, GAO Ming-yong, GAO Qian, CHEN Yong*

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

Abstract: To study the effects of major components of Maijunan tablets, puerarin (Pue) and rhynchophylline (Rhy) on the transport of hydrochlorothiazide (Hct) Caco-2 cell monolayer model, the transport parameters of Hct, such as apparent permeability coefficient ($P_{app(B \rightarrow A)}$ and $P_{app(A \rightarrow B)}$) and the ratio of $P_{app(B \rightarrow A)}$ versus $P_{app(A \rightarrow B)}$, were studied and compared when Hct was used solely and co-used with Pue and/or Rhy. The effects of drug concentrations, conveying times, P-glycoprotein (P-gp) inhibitor verapamil and conveying Liq pH values on the transport of Hct in the above conditions were also investigated. The results indicated that the absorption of Hct in Caco-2 cell monolayer model could be a carrier-mediated active transport, along with the excretion action mediated by P-gp. Pue can decrease the excretion action of Hct mediated by P-gp, and Rhy had no significant effect on the transport of Hct. The co-use of Hct, Pue and Rhy enhanced the absorption of Hct. Meanwhile, conveying Liq pH value had significant influence on the transport of Hct. The absorption of Hct at pH 6.0 was higher than that at pH 7.4.

Key words: hydrochlorothiazide; puerarin; rhynchophylline; Caco-2 cell monolayer model; transport; P-glycoprotein

脉君安片^[1]是由氢氯噻嗪、葛根和钩藤组成的复方制剂, 临床上用于高血压症、头痛眩晕、颈项强痛、失眠心悸和冠心病等。氢氯噻嗪为中效利尿剂, 葛根

素是从中药葛根提取的一种异黄酮化合物, 临床上常用于心绞痛及脑血栓等, 钩藤碱是钩藤的主要降压活性成分之一, 具有舒张血管、抗高血压、抗实验性脑缺血及钙拮抗等作用。

Caco-2 细胞 (human colon adenocarcinoma cell lines) 来源于人体结肠腺癌细胞, 在培养条件下可自发进行上皮样分化并可形成紧密联结, 其形态学、标

收稿日期: 2009-08-25.

基金项目: 2008 年湖北省高等学校优秀中青年团队计划项目 (T200807).

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

志酶的功能表达及渗透特征与小肠类似^[2, 3], 已成为研究药物吸收机制和药物相互作用等的重要工具^[4, 5]。目前, 未见有脉君安片中其他降压成分对氢氯噻嗪吸收与转运影响的研究报道。本文运用 Caco-2 细胞单层模型, 研究了氢氯噻嗪与脉君安片中主要降压活性成分葛根素、钩藤碱配伍使用时, 对氢氯噻嗪体外吸收与转运的影响, 探讨了脉君安片中主要降压成分在吸收阶段的药物相互作用。

材料与方 法

药品与试剂 氢氯噻嗪 (hydrochlorothiazide, Hct, 批号 100309-200001, 纯度>98%)、葛根素 (puerarin, Pue, 批号 753-200007, 纯度>98%)、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; 钩藤碱 (rhynchophylline, Rhy, 批号 071012, 纯度>98%) 购于上海融禾医药科技有限公司; 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; 色谱纯乙腈购于美国 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, Millipore 公司 millicell 膜。

细胞培养条件 Caco-2 细胞培养于 37 °C, 5% CO₂ 的环境中, 采用 DMEM 培养基, 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 d 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 d 后每日换液, 培养至 21 d。参照文献^[6-8]方法, 检测碱性磷酸酶活性和各孔跨膜电阻 (跨膜电阻大于 $400 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), 选择 Caco-2 细胞单层生长状态完好、符合转运条件的 Millicell 膜用于转运实验。实验前, 用 37 °C 空白 Hank's 缓冲盐溶液 (HBSS 溶液, pH 7.4) 清洗细胞单层膜 3 次 (此步骤在 30 min 内完成), 之

后放入 CO₂ 培养箱, 于 37 °C 再用空白 HBSS 溶液漂洗膜 30 min。

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 HBSS 溶液 1.5 mL 作为接受池。B→A 侧的转运: 将各浓度药物溶液 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、浓度、pH 值、P-gp 抑制剂 Ver 对 Hct 与 Pue、Rhy 配伍前后, Hct 吸收与转运的影响。

色谱条件 Inertsil DOS-P (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) 色谱柱。流动相: 乙腈-水 (17:83); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 270 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 25 °C。

样品前处理方法 转运样品在 4 °C、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液于 37 °C 真空离心浓缩挥干, 用流动相 200 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。

数据处理 表观渗透系数 P_{app} (apparent permeability coefficient) 代表药物转运能力的大小, $P_{\text{app}} = (dQ/dt) / (A \times C_0)^{[9]}$ 。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 Hct 的初始浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

由于每次取样后都要补液, 对药物的通透产生了稀释作用, 因而要对药物的累积吸收浓度 (cumulative transport concentration, $\text{TR}_{\text{cum}}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行校正, $\text{TR}_{\text{cum}} = A_n + \frac{V_{S_n}}{V_R} \sum_{i=0}^{n-1} A_i^{[10]}$ 。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。统计学处理采用 t 检验。

结果

1 Hct 的色谱分析方法

在本文条件下, 空白 HBSS 溶液、Pue 及 Rhy 均对 Hct 的检测无干扰, 色谱分离良好。精密称取 Hct 对照品适量, 用空白 HBSS 溶液配制 0.15、0.5、2、4、8 和 $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hct 溶液, 按“样品前处理方法”项

操作后进样分析。以 Hct 色谱峰面积 (x) 为横坐标, 浓度 (y) 为纵坐标进行线性回归, 标准曲线为 $y = 0.021\ 9x - 0.192\ 1$, $r = 0.999\ 6$, 线性范围为 $0.15 \sim 15\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

用空白 HBSS 溶液配制 3 个浓度的 Hct 质控样品 (0.2 、 2.0 和 $15.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 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 $98.5\% \sim 102.0\%$ 。每样本测定 6 次, 连续测定 3 d, Hct 的日内精密度和日间精密度均小于 5% 。

2 浓度和时间对 Hct 吸收与转运的影响

Hct 的 TR_{cum} 随时间变化的结果见表 1。结果表明, Hct 单用时, 3 个浓度 A→B 方向的累积转运浓度在前 90 min 随转运时间的延长基本增加, 低、中两个作用浓度 B→A 方向的累积转运浓度前 90 min 随作用时间的延长而降低, 且不同转运时间药物 B→A 方向的转运均强于 A→B 方向的转运; Hct 与相同浓度 Pue 合用、Hct 与 Rhy 配伍以及 Hct 与 Pue、Rhy 配伍使用时, Hct A→B、B→A 方向的累积转运浓度均随浓度的增大、时间的延长而增加, 且 B→A 方向的转运强于 A→B 方向的转运。

Hct 在 120 min 时的 P_{app} 见表 2。结果表明, Hct 单用时的 $P_{\text{app (A→B)}}$ 随浓度的升高而降低, 且不同浓度下的 $P_{\text{app (B→A)}}$ 均大于 $P_{\text{app (A→B)}}$; Hct 与相同浓度 Pue 合用时, 不同浓度 Hct 的 $P_{\text{app (B→A)}}$ 均小于 $P_{\text{app (A→B)}}$; Hct 与 Rhy 配伍使用时, Hct 在不同浓度下的 $P_{\text{app (B→A)}}$ 均大于 $P_{\text{app (A→B)}}$; Hct 与 Pue 及 Rhy 配伍使用时, Hct 在 100 和 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的 $P_{\text{app (B→A)}}$ 大于 $P_{\text{app (A→B)}}$, 在 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的 $P_{\text{app (B→A)}}$ 小于 $P_{\text{app (A→B)}}$, 且 $P_{\text{app (B→A)}}$ 随浓度的增加而减小。

与 Hct 单用在 Caco-2 细胞中的转运情况比较分析可知, Hct 与相同浓度 Pue 合用 100 和 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的 $P_{\text{app (A→B)}}$ 无显著性差异, $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的 $P_{\text{app (A→B)}}$ 显著大于 Hct 单用时的 $P_{\text{app (A→B)}}$ ($P < 0.05$), 而 $P_{\text{app (B→A)}}$ 值在整个浓度范围内均小于 Hct 单用时的 $P_{\text{app (B→A)}}$ ($P < 0.01$); Rhy 与 Hct 配伍使用时, Hct 的 $P_{\text{app (A→B)}}$ (除 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hct 的 $P_{\text{app (A→B)}}$ 值显著减小外) 与 $P_{\text{app (B→A)}}$ 值均无显著性差异; Pue 及 Rhy 与 Hct 配伍使用时, Hct 的 $P_{\text{app (A→B)}}$ (除 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hct 的 $P_{\text{app (A→B)}}$ 值无显著性差异外) 与 $P_{\text{app (B→A)}}$ 均减小。

Table 1 Cumulative transport concentration (TR_{cum}) of hydrochlorothiazide (Hct)

Drug concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Direction	$\text{TR}_{\text{cum}} / \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$				
		30 min	60 min	90 min	120 min	
Hct	100	A→B	0.72 ± 0.16	1.93 ± 0.043	2.45 ± 0.22	1.97 ± 0.13
		B→A	25.38 ± 7.92	23.54 ± 4.90	18.10 ± 3.21	17.04 ± 2.77
	200	A→B	1.62 ± 0.033	3.45 ± 0.41	3.18 ± 0.21	3.43 ± 0.17
		B→A	30.55 ± 11.15	27.84 ± 4.48	25.45 ± 3.94	28.87 ± 6.57
	500	A→B	$0.11 \pm 0.005\ 5$	5.98 ± 0.67	7.59 ± 0.84	7.79 ± 0.74
		B→A	69.62 ± 38.23	89.64 ± 38.11	82.02 ± 26.50	81.70 ± 23.03
Hct/Pue	100/100	A→B	0.42 ± 0.050	0.92 ± 0.10	1.30 ± 0.22	1.87 ± 0.089
		B→A	0.58 ± 0.20	1.17 ± 0.23	2.85 ± 0.82	3.22 ± 0.54
	200/200	A→B	1.21 ± 0.48	1.96 ± 0.32	3.42 ± 0.89	4.66 ± 1.37
		B→A	1.03 ± 0.15	2.35 ± 0.35	5.32 ± 1.05	6.74 ± 1.24
	500/500	A→B	1.78 ± 0.25	5.43 ± 0.99	7.40 ± 0.93	9.42 ± 0.37
		B→A	2.92 ± 0.27	5.72 ± 1.02	11.82 ± 0.31	15.16 ± 0.42
Hct/Rhy	100/100	A→B	0.21 ± 0.12	0.48 ± 0.28	0.78 ± 0.44	1.44 ± 0.25
		B→A	3.75 ± 1.34	7.50 ± 0.68	10.52 ± 1.29	14.13 ± 1.73
	200/100	A→B	0.71 ± 0.27	1.55 ± 0.53	2.64 ± 0.46	3.54 ± 0.45
		B→A	3.54 ± 0.45	18.33 ± 1.04	26.54 ± 1.39	35.88 ± 1.54
	500/100	A→B	1.91 ± 0.84	3.38 ± 1.91	5.42 ± 2.28	7.08 ± 3.23
		B→A	25.69 ± 1.41	42.03 ± 2.30	59.85 ± 2.43	74.96 ± 6.97
Hct/Pue/Rhy	100/100/100	A→B	–	0.54 ± 0.40	1.06 ± 0.92	1.34 ± 1.29
		B→A	1.14 ± 0.082	2.71 ± 0.18	4.03 ± 0.38	5.47 ± 0.88
	200/200/100	A→B	0.27 ± 0.14	0.91 ± 0.53	1.24 ± 0.51	1.65 ± 0.67
		B→A	1.61 ± 0.36	4.46 ± 0.87	6.63 ± 1.66	10.46 ± 1.39
	500/500/100	A→B	0.76 ± 0.072	2.57 ± 0.55	3.34 ± 0.59	4.33 ± 0.91
		B→A	1.43 ± 0.31	3.78 ± 0.51	5.12 ± 0.41	6.93 ± 0.54

–: Not detected. Pue: Puerarin; Rhy: Rhynchophylline. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Table 2 Apparent permeability coefficients of Hct

Drug concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$P_{\text{app}}\times 10^{-6}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		$P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})/P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$
	A \rightarrow B	B \rightarrow A	
Hct 100	3.64 \pm 0.24	10.47 \pm 1.70	2.88
200	3.16 \pm 0.16 [△]	8.87 \pm 2.02	2.81
500	2.87 \pm 0.28 [△]	10.04 \pm 2.83	3.50
Hct/Pue 100/100	3.45 \pm 0.16	1.98 \pm 0.33**	0.57**
200/200	4.29 \pm 1.26	2.07 \pm 0.38**	0.48**
500/500	3.47 \pm 0.14*	1.86 \pm 0.051**	0.54**
Hct/Rhy 100/100	2.65 \pm 0.46*	8.68 \pm 1.06	3.28
200/100	3.26 \pm 0.41	11.00 \pm 0.47	3.37
500/100	2.61 \pm 1.19	9.21 \pm 0.86	3.53
Hct/Pue/Rhy 100/100/100	2.47 \pm 0.24	3.36 \pm 0.54**	1.36*
200/200/100	1.52 \pm 0.63*	3.21 \pm 0.43**	2.11
500/500/100	1.60 \pm 0.34**	0.85 \pm 0.066**	0.53**

$n = 3, \bar{x} \pm s. \Delta P < 0.05$ vs Hct 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs used Hct solely

3 P-gp 抑制剂对 Hct 吸收与转运的影响

P-gp 抑制剂 Ver 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对 Hct 转运的影响结果见表 3。Hct 单用时, Ver 能极显著增大 Hct 的 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ 、降低 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})/P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ ($P < 0.01$)。Hct 与 Pue 合用时, Ver 能显著增大 Hct 的 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ ($P < 0.01$) 和 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})$ ($P < 0.05$)。Hct 与 Rhy 合用时, Ver 能极显著增大 Hct 的 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ 、降低 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})/P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$

($P < 0.01$)。Hct 与 Pue 和 Rhy 合用时, Ver 能极显著增大 Hct 的 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ 与 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})$ 、降低 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})/P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ ($P < 0.01$)。

4 pH 值对 Hct 吸收与转运的影响

pH 值对 Hct 转运影响的结果见表 4。Hct 单用时, 在 pH 6.0 时的 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ 与 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})$ 分别是 pH 7.4 时的 3.9 倍和 53% ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$); 与 Pue 配伍使用时, Hct 在 pH 6.0 时的 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ 与 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})$ 分别是 pH 7.4 时的 3.1 倍和 2.7 倍 ($P < 0.01$); 与 Rhy 配伍使用时, Hct 在 pH 6.0 时的 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ 与 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})$ 分别是 pH 7.4 时的 12.1 倍和 38% ($P < 0.01$); 与 Pue 及 Rhy 配伍使用时, Hct 在 pH 6.0 时的 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ 与 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})$ 分别是 pH 7.4 条件下的 33.6 倍和 3.3 倍 ($P < 0.01$)。

讨论

通过测定不同浓度受试药物的 P_{app} 可以确定药物的转运机制。若在漏槽条件下药物的 P_{app} 不随浓度变化而变化, 则被动扩散为主要转运机制; 若 $P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$ 与 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})$ 相同也可确定被动扩散为主要转运机制; 若 $P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})/P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B}) > 1.5$, 则可能存在主动转运机制^[11]。Hct 100 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以及 100 和

Table 3 Effect of verapamil (Ver) on transport of Hct

Drug	Group	$P_{\text{app}}\times 10^{-6}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		$P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})/P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$
		A \rightarrow B	B \rightarrow A	
Hct 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Control	3.16 \pm 0.16	8.87 \pm 2.02	2.81
	Ver	8.42 \pm 0.86**	5.64 \pm 0.73	0.67**
Hct 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Pue 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Control	4.29 \pm 1.26	2.07 \pm 0.38	0.48
	Ver	18.55 \pm 1.30**	3.85 \pm 0.78*	0.21
Hct 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Rhy 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Control	3.26 \pm 0.41	11.00 \pm 0.47	3.37
	Ver	19.13 \pm 2.16**	9.63 \pm 1.54	0.50**
Hct 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Pue 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Rhy 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Control	1.52 \pm 0.63	3.21 \pm 0.43	2.11
	Ver	16.64 \pm 1.71**	12.12 \pm 0.018**	0.73**

$n = 3, \bar{x} \pm s. *P < 0.05, **P < 0.01$ vs control

Table 4 Effect of pH on transport of Hct

Drug	pH	$P_{\text{app}}\times 10^{-6}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$		$P_{\text{app}}(\text{B}\rightarrow\text{A})/P_{\text{app}}(\text{A}\rightarrow\text{B})$
		A \rightarrow B	B \rightarrow A	
Hct 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	7.4	3.16 \pm 0.16	8.87 \pm 2.02	2.81
	6.0	12.31 \pm 1.10**	4.72 \pm 0.22*	0.38**
Hct 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Pue 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	7.4	4.29 \pm 1.26	2.07 \pm 0.38	0.48
	6.0	13.34 \pm 1.61**	5.57 \pm 0.68**	0.42
Hct 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Rhy 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	7.4	3.26 \pm 0.41	11.00 \pm 0.47	3.37
	6.0	39.56 \pm 2.52**	4.14 \pm 0.33**	0.10**
Hct 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Pue 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Rhy 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	7.4	1.52 \pm 0.63	3.21 \pm 0.43	2.11
	6.0	51.00 \pm 3.45**	10.61 \pm 0.57**	0.21**

$n = 3, \bar{x} \pm s. *P < 0.05, **P < 0.01$ vs pH 7.4

500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的 $P_{\text{app (A}\rightarrow\text{B)}}$ 均有显著性差异 ($P < 0.05$), 因此, Hct 在整个浓度范围内的表观渗透系数不是恒定不变的, 且在整个浓度范围内 Hct 的 $P_{\text{app (B}\rightarrow\text{A)}}/P_{\text{app (A}\rightarrow\text{B)}} > 1.5$, 表明 Hct 在 Caco-2 细胞内可能存在主动转运机制。同时, $P_{\text{app (A}\rightarrow\text{B)}}$ 值随 Hct 浓度的增加而逐渐减小, 这可能与 Caco-2 细胞的转运载体有限有关。

与 Hct 单用在 Caco-2 细胞中的转运情况比较分析可知, Pue 与 Hct 配伍使用时, 能减小 Hct 的 $P_{\text{app (B}\rightarrow\text{A)}}$ 值, 这可能是 Pue 减弱了 P-gp 对 Hct 的外排作用; Rhy 与 Hct 配伍使用时, Rhy 对 Hct 的吸收转运基本没有影响; Pue 及 Rhy 与 Hct 配伍使用时, Hct 的 $P_{\text{app (A}\rightarrow\text{B)}}$ 、 $P_{\text{app (B}\rightarrow\text{A)}}$ 及 $P_{\text{app (B}\rightarrow\text{A)}}/P_{\text{app (A}\rightarrow\text{B)}}$ 均减小, 说明 Pue 及 Rhy 与 Hct 配伍使用, 能减弱 P-gp 对 Hct 的外排, 从而增强 Hct 的吸收。

P-gp 是由多药耐药基因编码的相对分子质量为 1.7×10^5 的膜蛋白, 系一种能量依赖性的药物外排泵^[12]。P-gp 存在于 Caco-2 细胞的 A 面上, 能将细胞内的底物排出细胞外, 使得 A \rightarrow B 的转运速率减慢, 而 B \rightarrow A 的转运速率增大。Ver 是 P-gp 的专属抑制剂, 在含有 Ver 时, Hct 单用或与 Rhy 配伍其 $P_{\text{app (B}\rightarrow\text{A)}}$ 均减小, 但 Hct 与 Pue 配伍或 Hct 与 Pue、Rhy 配伍 $P_{\text{app (B}\rightarrow\text{A)}}$ 却比没加 Ver 时大, 这说明加入抑制剂 Ver 后, 在含有 Pue 时, P-gp 对 Hct 的外排作用反而增强了, 这可能是 Pue 与 Ver 发生了某种化学反应或改变了 Ver 构象使 Ver 活性减弱, 致使 Hct 的 $P_{\text{app (B}\rightarrow\text{A)}}$ 反而增大。

由于消化道上皮细胞具有脂质膜的功能, 只允许脂溶性的非解离酸或碱通过, 酸性药物在酸性条件下吸收较强。Hct 的 $\text{p}K_{\text{a}1} = 7.2$, $\text{p}K_{\text{a}2} = 9.2$, 在 pH 6.0 时, Hct 主要以非解离 (脂溶性) 的形式存在。在 pH 6.0 条件下, Hct 单用及与 Pue、Rhy 合用时, Hct 的吸收均较 pH 7.4 时有显著提高, 且 $P_{\text{app (B}\rightarrow\text{A)}}/P_{\text{app (A}\rightarrow\text{B)}}$ 均降低, 说明 pH 值对 Hct 的转运有重要影响。Hct 属弱酸性物质, 在 pH 6.0 条件下, Hct 主要以非解离 (脂溶性) 的形式存在。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Ministerial Standards of Chinese Medicine. WS3-B-2389-97 (中药部颁标准) [S]. Z12-137.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Mu YP, Wu G, Zhou LS, et al. Application of Caco-2 cell model in drug research [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2005, 21: 536-539.
- [6] Ma Y, Li PB, Su WW, et al. The evaluation criterions about Caco-2 cell model [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2006, 29: 946-948.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [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] 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.
- [12] Haber BA, Mohn KL, Diamond RH, et al. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration [J]. J Clin Invest, 1993, 91: 1319-1341.