

矢车菊黄素在 Caco-2 细胞模型中的吸收机制研究

付达华¹, 李妍², 王二丽¹, 郭素华¹ (1.漳州卫生职业学院药系, 福建 漳州 363000; 2.中国医学科学院&中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究矢车菊黄素(centaureidin)在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制。方法 以 HPLC 分析矢车菊黄素浓度, 用 Caco-2 细胞单层模型评价吸收时间、药物浓度、介质 pH 值、抑制剂等对矢车菊黄素吸收的影响, 研究矢车菊黄素的吸收机制, 计算表观渗透系数(apparent permeability coefficient, P_{app})。结果 药物的吸收与药物浓度和吸收时间正相关; 弱酸性介质条件下有利于药物的吸收; 2,4-二硝基酚(DNP)对药物吸收无影响, 但异博定(verapamil)可增加药物的吸收; 从肠腔侧到基底侧的转运小于基底侧到肠腔侧的转运。结论 矢车菊黄素在 Caco-2 细胞模型中的吸收主要是被动转运, 受 P-糖蛋白的外排作用。

关键词: 矢车菊黄素; Caco-2 细胞单层; 跨膜转运; 表观渗透系数; P-糖蛋白

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)12-1076-05

Transepithelial Transport of Centaureidin Across Caco-2 Cell Monolayers

FU Dahua¹, LI Yan², WANG Erli¹, GUO Suhua¹ (1.Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China; 2.Institute of Medical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the transepithelial transport of centaureidin across Caco-2 cell monolayers. **METHODS** The permeated amounts of centaureidin across Caco-2 cell monolayers were measured by HPLC to calculate the permeation rate and the apparent permeability coefficient (P_{app}), based on the effect of absorption time, drug concentration, pH in apical side, and inhibitors, the P_{app} was determined. **RESULTS** Transport of centaureidin was concentration-dependent and time-dependent and nonsaturable. The acidic pH in apical side conducted to transepithelial transport of centaureidin. Though 2,4-dinitrophenol had no effect on transport of centaureidin, verapamil improved it. And the apical-to-basolateral P_{app} was less

基金项目: 福建省教育厅基金课题(JB10248)

作者简介: 付达华, 男, 博士 Tel: (0596)2559589

E-mail: fdh1002@hotmail.com

than the basolateral-to-apical P_{app} . **CONCLUSION** Transport of centaureidin across Caco-2 cell monolayers is via passive diffusion with efflux by P-glycoprotein.

KEY WORDS: centaureidin; Caco-2 cell monolayers; transport; apparent permeability coefficient(P_{app}); P-glycoprotein

矢车菊黄素为类黄酮化合物, 可从矢车菊、小白菊、银叶薯蓣、欧洲薯蓣等多种菊科植物中分离提取。该类黄酮具抗炎^[1]、抗氧化及清除氧自由基^[2]、有丝分裂阻滞^[3]、抗感染等作用^[4]; 除上述药理作用外, 矢车菊黄素还具有抗肿瘤活性。Trifunovic 等^[5]报道矢车菊黄素对 HeLa、Fem-X 和 K562 等肿瘤细胞具增殖抑制作用, 其 IC_{50} 分别为 2.55, 3.56, 5.37 $mol \cdot L^{-1}$, 但对正常的人细胞(PBMC)毒性作用很小(IC_{50} 为 40.82 $mol \cdot L^{-1}$)。Csopor-Löffler 等^[6]也报道矢车菊黄素对 MCF-7 细胞具增殖抑制作用, IC_{50} 为 0.123 $mol \cdot L^{-1}$ 。其药理作用可能是通过增加 IFN- γ 的表达和减少肿瘤坏死因子(TNF- α)的积累而产生的^[7]。上述研究结果表明矢车菊黄素具备成为新型强效抗肿瘤药物的潜能。鉴于此, 研究矢车菊黄素在体内的吸收机制颇为重要, 可以为其进一步的开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂

矢车菊黄素(购于百灵威化学试剂有限公司, 批号: 03356-22B, 规格: 10 mg·支⁻¹), 以 DMSO 配制成 20 mg·mL⁻¹ 的储备液, 临用前以空白 HBSS 稀释成不同浓度的矢车菊黄素工作液。

DMEM 培养基(Hyclone); 胎牛血清(FBS, 杭州四季青); 非必需氨基酸、胰蛋白酶、HBSS(Hanks 平衡缓冲盐溶液)均为 Amresco 公司产品; 甲醇(天津南开, 色谱纯); MTT(Sigma); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

LC-10ATvp 高效液相色谱仪(日本岛津); Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州苏净); MDF-75 型细胞培养箱(日本三洋); TGL-16M 高速冷冻离心机(湖南湘仪); 细胞培养板均为 Costar 产品; TranswellTM 细胞培养小室(直径 12 mm, 膜孔 0.3 μ m, Millipore); EVOM 电阻仪(WPI); 笔式酸度计(Sciencetool)。

1.3 Caco-2 细胞培养

Caco-2 细胞常规培养于 37 $^{\circ}C$ 、5% CO₂、相对湿度为 90%的培养箱中, 采用 DMEM 高糖培养

基(培养基中含 10% FBS、1% 非必需氨基酸、1% 丙酮酸钠、1% 谷氨酰胺、1%青-链霉素)。细胞达 80%融合时按 1:3 的比例传代, 中间换液一次。取代次在 40~55 代之间的细胞用于实验。按约 1×10^5 个·孔⁻¹ 的密度接种于细胞培养小室的聚碳酸酯膜上, 并将培养小室置于加有培养基的 12 孔细胞培养板中以同样的条件培养, 每 3 d 换液一次, 一周后每天换液。培养 19~21 d 后观察, 细胞完全汇合并分化, 形成紧密单层, 以 EVOM 电阻仪测定跨膜电阻, 满足跨膜电阻>500 $\Omega \cdot cm^{-2}$ 时即可用于细胞跨膜转运实验^[8-9]。

1.4 MTT 法测定矢车菊黄素的细胞毒作用

将对数生长期的 Caco-2 细胞以 0.25%胰蛋白酶消化至细胞脱落, 以 DMEM 培养基终止消化并调整细胞浓度为 3×10^4 个·mL⁻¹。于 96 孔板中加入调整浓度后的细胞悬液, 每孔 180 μ L。将 96 孔板置于培养箱中培养过夜, 使细胞贴壁, 按常规 MTT 设计加入不同浓度的矢车菊黄素工作液(药物终浓度分别为 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} $mol \cdot L^{-1}$), 每孔 20 μ L, 每个浓度设立 3 个重复孔, 并设立空白对照组和 0.5% DMSO 对照组。药物作用 48 h 后, 于显微镜下观察各孔细胞形态, 并于每孔中加入 20 μ L MTT, 继续培养 4 h。取出 96 孔板, 小心吸去各孔内液体后, 每孔中加入 150 μ L DMSO, 平板摇床震荡 10 min 使紫色小颗粒溶解, 平板读数计测定各孔的光吸收, 波长为 570 nm。记录结果, 按照下列公式计算各浓度组细胞存活率: 细胞存活率/%=($A_{加药组}-A_{本底}$)/($A_{空白对照组}-A_{本底}$) $\times 100\%$; 细胞增殖抑制率/%=100%-细胞存活率/%。以细胞增殖抑制率为纵坐标, 药物浓度的负对数为横坐标, OriginPro 7.5 软件拟合细胞生长抑制曲线, 并计算矢车菊黄素的半数抑制浓度(IC_{50})和拟合曲线的拐点值, 确定矢车菊黄素对 Caco-2 细胞的安全浓度范围。

1.5 矢车菊黄素的测定方法

采用高效液相色谱法测定矢车菊黄素浓度^[3]。流动相为水:乙腈=7:3; 流速为 1 mL·min⁻¹; 检测波长为 351 nm, Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)。

1.6 药物的转运实验

取跨膜电阻 $>500 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ 的培养小室,以空白HBSS孵育10 min,并用空白HBSS洗涤3次以去除细胞单层肠腔侧(AP)和基底侧(BL)表面的杂质。测定跨膜电阻,符合条件者进行下一步实验。吸去细胞单层两侧的HBSS,根据实验设计,分别加入不同浓度的矢车菊黄素工作液或空白HBSS。对于吸收转运实验(从AP侧到BL侧):将0.5 mL矢车菊黄素工作液加到肠腔侧(AP侧)作为供给液,同时在基底侧(BL侧)加入1.5 mL空白HBSS作为接收液。对于外排实验(从BL侧到AP侧):将1.5 mL矢车菊黄素工作液加到BL侧作为供给液,同时在AP侧加入0.5 mL空白HBSS作为接收液。将培养板置于37 °C恒温摇床上孵育。根据实验设计于接收端取样,每次取样100 μL ,保存于-20 °C冰箱中备用,同时补充100 μL 空白HBSS。HPLC测定样品中矢车菊黄素的浓度,根据下列公式计算表观渗透系数(apparent permeability coefficient, P_{app})。分别考查吸收时间、药物浓度、介质pH值、抑制剂等对药物吸收转运的影响。 $P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(A \times C_0)$,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(cm^2), C_0 为矢车菊黄素的初始浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以SPSS 13.0软件进行F检验, $\alpha=0.05$ 为检验标准,以 $P<0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 矢车菊黄素的标准曲线

以空白HBSS配制浓度分别为0.1, 0.5, 2, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的矢车菊黄素工作液,分别精密吸取10 μL ,进样,按“1.5”项下色谱条件下测定峰面积。以浓度(X)对峰面积(Y)进行作图,经拟合得直线回归方程 $Y=7.4623X+0.4471$ ($r=0.9998$),线性范围为0.5~200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 矢车菊黄素对Caco-2细胞的增殖抑制作用

以细胞增殖抑制率为纵坐标,药物浓度的负对数为横坐标,经OriginPro 7.5软件拟合后,细胞增殖抑制曲线见图1。

由结果可知,当药物浓度达一定数值时,Caco-2细胞的存活率随药物浓度的增加而下降,呈剂量依赖性。经拟合, IC_{50} 为58.38 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当药物浓度小于33 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对细胞增殖几乎无影响。

以浓度为2, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的矢车菊黄素工作液分别作用于细胞,用药48 h后观察细胞形态。可见药物浓度 $<25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞形态均无明显变化;随着药物浓度的增加,细胞间紧密连接破坏,细胞变圆、皱缩,死细胞逐渐增多。故选定药物浓度 $\leq 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为安全用药范围。

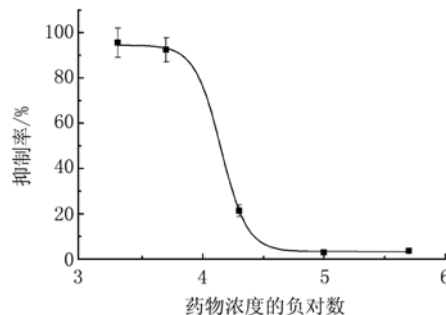


图1 矢车菊黄素对Caco-2细胞的增殖抑制作用

Fig 1 The inhibitory effect of centaureidin on growth of Caco-2 cells

2.3 药物吸收实验结果

2.3.1 药物吸收与吸收时间的关系 于AP侧加入不同浓度的矢车菊黄素工作液,分别于5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 min自BL侧取样分析,结果见图2。如结果所示,在30 min内药物吸收随时间近似线性增加($r=0.9983$),30 min即达峰值,此后吸收无明显变化,因此在以下药物吸收实验中,取样时间定为30 min。

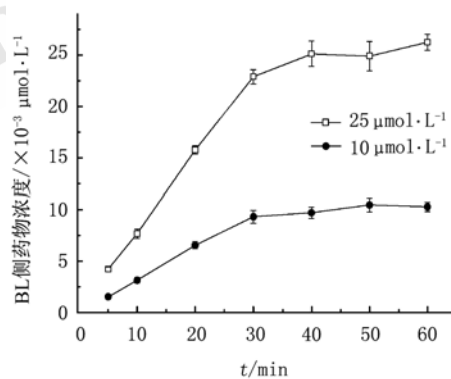


图2 药物吸收与吸收时间的关系($n=5$)

Fig 2 The relationship between centaureidin absorption and absorption time($n=5$)

2.3.2 药物浓度对吸收的影响 将浓度分别为2, 10, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的矢车菊黄素工作液作用于Caco-2细胞,第30分钟取样,测定细胞单层对不同浓度矢车菊黄素的转运速率。转运速率随药物浓度呈线性增加, $Y=0.6639X-0.1319$ ($r=0.9994$), Y 为转运速率,单位为 $\times 10^{-6} \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), X 为矢车

菊黄素浓度，提示矢车菊黄素的吸收可能为被动吸收。

2.3.3 介质pH值对药物转运的影响 分别将AP侧pH值调为5.0, 6.0, 7.4, 测定Caco-2细胞单层对矢车菊黄素的跨膜转运速率, 结果见图3。统计结果表明, 当介质pH值为5.0和6.0时, 两组间跨膜转运速率无统计学差异($P>0.05$); 但当介质pH值为7.4时, 转运速率降低, 与酸性环境介质相比较, 具有统计学差异($P<0.05$)。表明介质pH对矢车菊黄素的吸收有影响, 在酸性介质条件下吸收较好。因此实验时将介质pH值控制在pH=6。

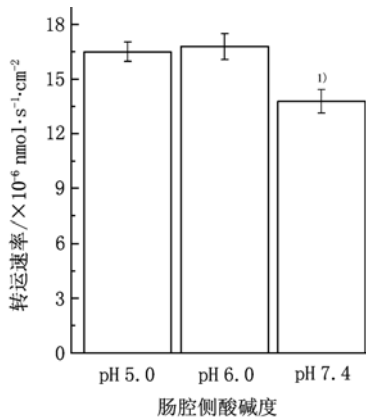


图3 pH值对药物跨膜转运的影响($n=5$)
与其他两组比较, $^{1)}P<0.05$

Fig 3 The effect of pH in apical side on drug transport across Caco-2 monolayers($n=5$)
Compared with the other two groups, $^{1)}P<0.05$

2.3.4 抑制剂对药物跨膜转运的影响 设立低、中、高3个浓度组(矢车菊黄素浓度分别为2, 10, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 分别考察异博定、2,4-二硝基酚(DNP)对药物跨膜转运的影响, 结果见图4。异博定的存在能增加细胞对矢车菊黄素的吸收, 尤其是在药物浓度较低($2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)时, 增加的比例约为60%, 提示可能存在P-糖蛋白的外排作用; DNP对矢车菊黄素的吸收几乎无影响, 提示其吸收过程可能不存在耗能的主动吸收过程。

2.4 P_{app}

分别将供给侧药物浓度调整为2, 10, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 30 min 后于接收端取样分析。分别计算从AP侧到BL侧(吸收)的 $P_{app(AP\rightarrow BL)}$ 和从BL侧到AP侧(外排)的 $P_{app(BL\rightarrow AP)}$, 结果见表1。结果表明从AP侧到BL侧的 P_{app} 均值为 $(0.584 \pm 0.106) \times 10^{-6}\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, 从BL侧到AP侧的 P_{app} 均值为 $(2.279 \pm 0.233) \times 10^{-6}\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$; 从BL侧到AP侧的转运快于相反方向。

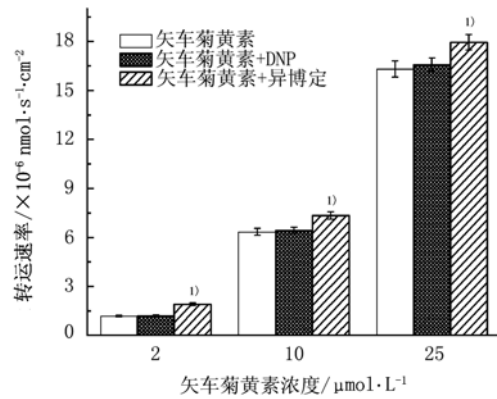


图4 抑制剂对药物吸收的影响($n=5$)

与矢车菊黄素组相比, $^{1)}P<0.05$

Fig 4 The effect of different inhibitors on drug transport across Caco-2 monolayers($n=5$)
Compared with centaureidin group, $^{1)}P<0.05$

表1 不同浓度矢车菊黄素双向转运的表观渗透系数

Tab 1 The P_{app} of bidirectional transport of centaureidin with different concentrations

组别	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$P_{app(AP\rightarrow BL)}$ / $\times 10^{-6}\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	$P_{app(BL\rightarrow AP)}$ / $\times 10^{-6}\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	$P_{app(BL\rightarrow AP)}$ / $P_{app(AP\rightarrow BL)}$
低浓度组	2	0.744 ± 0.165	3.431 ± 0.122	4.49
中浓度组	10	0.525 ± 0.117	1.833 ± 0.204	3.49
高浓度组	25	0.483 ± 0.076	1.662 ± 0.093	3.44
平均		0.584 ± 0.106	2.279 ± 0.233	3.81

3 讨论

经过20多年的研究和应用, Caco-2细胞单层模型已经成为研究药物吸收和转运机制的有效手段, 不仅如此, Caco-2细胞模型已被美国FDA批准成为药物筛选模型。Caco-2细胞来源于人的结肠腺癌组织, 成熟的Caco-2细胞能形成微绒毛结构, 也能表达特异底物的水解酶和ATP依赖的载体, 从而表现出与肠上皮细胞在形态学与生物学上的相似性, 药物通过Caco-2细胞单层的跨膜转运类似于体内肠粘膜上皮。研究抗肿瘤药物的吸收与转运机制时, 如果药物浓度过高, 药物对细胞的细胞毒作用会造成细胞损伤, 从而导致实验结果不可信。本研究首先采用MTT方法确定矢车菊黄素的半数抑制浓度(IC_{50}), 在 IC_{50} 值以下选择几个浓度值, 通过细胞形态学及MTT方法选定药物的安全浓度为 $\leq 25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并在此浓度范围内进行药物吸收和转运机制研究。

本研究考查了吸收时间、药物浓度、介质pH值、抑制剂等因素对矢车菊黄素吸收的影响。结果表明矢车菊黄素主要是通过被动扩散的方式被Caco-2细胞单层吸收转运的, 可能未受到主动转

运载体的介导。主要证据有二：首先，矢车菊黄素的吸收随药物浓度呈线性增加，未表现出达到饱和状态的特性。如果 Caco-2 细胞对该药物的摄取是经过某种载体介导的，则药物的摄取应随着药物浓度的增加呈非线性增加，且在高浓度时达饱和状态。其次，细胞对药物的摄取不受 DNP 的影响。DNP 为代谢抑制剂，需要消耗能量的主动运输过程易受该抑制剂的影响；但实验结果显示该抑制剂不影响细胞对矢车菊黄素摄取的影响，排除了矢车菊黄素主动转运的可能性。研究结果还表明矢车菊黄素的吸收受 P-糖蛋白的外排作用。P-糖蛋白广泛分布在人体的胃肠道上皮细胞、肝细胞、肾、血脑屏障的内皮细胞等，主要功能是外排各种异物，保护机体不受外来异物的侵袭。在小肠上皮细胞中，P-糖蛋白分布在 AP 侧的细胞膜上。常用的 P-糖蛋白抑制剂有两种：环孢霉素 A(cyclosporine A)和异搏定。本研究中异搏定的使用能明显增加细胞对矢车菊黄素的摄取，药物浓度较低时可增加约 60%的摄取，证明存在着 P-糖蛋白对矢车菊黄素的外排作用。研究结果还表明 Caco-2 细胞对矢车菊黄素的吸收受肠腔侧介质酸碱度的影响，偏酸性环境利于药物的摄取。这可能是由于矢车菊黄素分子中存在着酸性的酚羟基，偏酸性环境有利于保持药物的分子状态，偏碱性环境则易使酚羟基解离，携带一定的电荷，不易透过细胞膜进入细胞。

本模型中矢车菊黄素从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 为 $(0.584 \pm 0.106) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ，按照 $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 为不易透过细胞单层的标准(不易透过

Caco-2 细胞单层的阳性对照药物阿替洛尔的 P_{app} 为 $0.277 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)，推测该药物在肠道内的吸收较差，生物利用度较低。

REFERENCES

- [1] ABAD M J, BERMEJO P, ALVAREZ M, et al. Flavonoids and a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum* inhibit anti-inflammatory mediators in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages [J]. *Planta Med*, 2004, 70(1): 34-38.
- [2] PÉREZ G R M, VARGAS S R, MARTINEZ M F J, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia* [J]. *Phytother Res*, 2004, 18(5): 428-430.
- [3] LONG C, SAULEAU P, DAVID B, et al. Bioactive flavonoids of *Tanacetum parthenium* revisited [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(2): 567-569.
- [4] STOJANOVIĆ G, RADULOVIĆ N, HASHIMOTO T, et al. *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four Achillea species: The composition of *Achillea clavennae* L [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 101(1-3): 185-190.
- [5] TRIFUNOVIĆ S, VAJS V, JURANIĆ Z, et al. Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(9): 887-893.
- [6] CSUPOR-LÖFFLER B, HAJDÚ Z, ZUPKÓ I, et al. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(5): 672-676.
- [7] CHANG S L, CHIANG Y M, CHANG C L, et al. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN-expression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 112(2): 232-236.
- [8] YANG X W, YANG X D, WANG Y, et al. Establishment of Caco-2 cell monolayer model and standard operation procedure for assessing intestinal absorption of chemical components of traditional Chinese medicine [J]. *J Chin Integ Med(中西医结合学报)*, 2007, 5(6): 634-641.
- [9] MENG S N, WANG X, ZHANG M F, et al. Effect of physicochemical characteristics on the permeability of 5-fluorouracil and carmofur [J]. *Chin Mol Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2009, 26(12): 1007-1010.

收稿日期：2011-03-07