

王宁,谢莉,丁文欢,等. 基于 UPLC-TQ-MS 探究野鸦椿酸在 Caco-2 细胞单层模型上的吸收转运研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9): 1-7.

Wang N, Xie L, Ding WH, et al. Uptake and transport properties of euscaphic acid in Caco-2 cells revealed by UPLC-TQ-MS [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9): 1-7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.09.001

基于 UPLC-TQ-MS 探究野鸦椿酸在 Caco-2 细胞单层模型上的吸收转运研究

王宁¹, 谢莉², 丁文欢¹, 田莉^{1,3*}

(1.新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆维吾尔自治区药品检验研究院, 乌鲁木齐 830011; 3.新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 本研究建立 Caco-2 单层细胞模型研究野鸦椿酸摄取和转运特性。方法 采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪 (UPLC-TQ-MS) 测定野鸦椿酸的含量, 考察不同时间、温度对其摄取的影响, 在此基础上考察不同浓度、P-gp 抑制剂、螯合剂和 pH 对其双向转运的影响。结果 在 37°C 条件下, 野鸦椿酸在 Caco-2 细胞模型上 180 min 时的摄取量为 $(8.38 \pm 0.87) \mu\text{g}/\text{mg}$ 。野鸦椿酸低、中、高浓度的表观渗透系数 (P_{app} 值) 与浓度呈正相关, 分别为 $(61.41 \pm 2.92) \times 10^{-4}$ 、 $(146.90 \pm 14.91) \times 10^{-4}$ 、 $(167.18 \pm 6.72) \times 10^{-4} \text{ cm/s}$, P-gp 抑制剂和螯合剂对其 P_{app} 值无影响, 弱酸性环境 (pH=6.00) 可明显提高其 P_{app} 值, 其外排率 (ER) 介于 0.8~1.4 之间。结论 在 Caco-2 细胞模型中野鸦椿酸跨膜渗透性良好, 其主要吸收方式为被动扩散, 不是 P-gp 的底物, 且不存在细胞旁路转运。本研究可为含有野鸦椿酸的药物的体内肠道吸收提供实验依据。

【关键词】 野鸦椿酸; Caco-2 细胞模型; 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪 (UPLC-TQ-MS); 摄取; 双向转运

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 09-0001-07

Uptake and transport properties of euscaphic acid in Caco-2 cells revealed by UPLC-TQ-MS

WANG Ning¹, XIE Li², DING Wenhuan¹, TIAN Li^{1,3*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China.

2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Pharmaceutical Inspection, Urumqi 830011.

3. Xinjiang Key Laboratory of Famous Medicine and Famous Prescription and Characteristic Formulae, Urumqi 830011)

【Abstract】 **Objective** Explore euscaphic acid uptake and transport mechanisms in Caco-2 cells. **Methods** Ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry (UPLC-TQ-MS) was employed to determine the content of euscaphic acid. The effects of various times and temperatures on its uptake were investigated. On the basis of the result of uptake analyses, the effects of various concentrations, P-gp inhibitors, chelating agents, and pH values on its bidirectional transport were explored. **Results** Euscaphic acid uptake was $(8.38 \pm 0.87) \mu\text{g}/\text{mg}$ for 180 min in Caco-2 cells at 37°C. The apparent permeability coefficient (P_{app}) values of euscaphic acid at low, medium, and high concentrations were $(61.41 \pm 2.92) \times 10^{-4}$, $(146.90 \pm 14.91) \times 10^{-4}$, and $(167.18 \pm 6.72) \times 10^{-4} \text{ cm/s}$, respectively,

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81860744); 新疆维吾尔自治区“十四五”重点学科中医学。

【作者简介】 王宁 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 中药新制剂的研究与开发。E-mail: 542266938@qq.com

【通信作者】 田莉 (1974—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药新制剂的研究与开发。E-mail: tianli109@126.com

which were positively correlated to the concentrations. P-gp inhibitors and chelating agents had no effect on P_{app} values. A weakly acidic environment (pH=6) significantly increased the P_{app} value, and the efflux rate ranged from 0.8 to 1.4.

Conclusions Euscaphic acid has good transmembrane permeability in Caco-2 cells, and the uptake mode is mainly passive diffusion. It is not a substrate of P-gp and no cellular bypass transport exists. This study may provide an experimental basis for *in vivo* intestinal absorption of medicines containing euscaphic acid.

[Keywords] euscaphic acid; Caco-2 cells; Ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry (UPLC-TQ-MS); uptake; bidirectional transport

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

野鸦椿酸(euscaphic acid, EA)又名蔷薇酸,是一种存在于蔷薇科类植物(如蔷薇果、金樱子等^[1])中的三萜酸类化合物,分子式 $C_{30}H_{48}O_5$, 分子量 488.70, 结构式见图 1, 其不溶于水, 可溶于甲醇、氯仿、DMSO 等有机溶剂^[2]。

野鸦椿酸具有抗氧化^[3]和抗癌^[4-5]等药理活性,且无毒、无致突变作用^[6]。目前,关于野鸦椿酸的吸收特性及体内过程研究未见文献报道。来源于人类结肠和直肠癌的 Caco-2 细胞经体外培养后可形成与小肠上皮细胞具有相似的微绒毛结构及细胞间紧密连接的单细胞层,且形态学、标志酶的功能表达及渗透特征与小肠上皮细胞类似,可作为模拟小肠上皮细胞吸收转运的体外吸收模型,目前已被广泛应用于药物的肠吸收机制研究^[7]。本研究采用 Caco-2 细胞模型研究野鸦椿酸的吸收特性,为其后续药效研究以及体内过程评价提供参考。

1 材料和方法

1.1 细胞株

Caco-2 人结直肠腺癌细胞株购自于武汉博士德生物工程有限公司,实验所用细胞传代数在 22~42 代内(货号: CX2266)。

1.2 主要试剂与仪器

野鸦椿酸对照品(批号: YRY097-210101, 纯度 $\geq 98\%$), 购自成都仪捷睿生物科技有限公司; Transwell[®] 12 孔转运小室(批号: 5662)、12 孔板、96

孔板、培养瓶均购自美国 Costar 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(批号: FND622)购自依科赛生物科技有限公司; DMEM 培养基(批号: 7121572)、非必需氨基酸(批号: 11140050)、青霉素-链霉素双抗液(批号: 10378016)、胰蛋白酶(批号: 25200056)、D-Hank's 平衡盐溶液(批号: 88284)均购自美国 Gibico 公司; 荧光素钠(批号: F8140)、维拉帕米(批号: IV0040)、环孢素 A(批号: SC5120)、EGTA(批号: E8050)、无菌二甲基亚砜(DMSO)(批号: D8371)均购自索莱宝科技有限公司; 甲醇、乙腈(色谱纯)均购自美国 Fisher Scientific 公司。超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(美国 Waters 公司); Millicell-ERS 电位仪(德国 Meck millipore); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); Motic AE51 荧光倒置显微镜(日本尼康公司); MULTISKAN FC 酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司); HY-1 型快速漩涡混合器、pHS-5 型精密 pH 计(上海仪电科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 对照品溶液的配制

精密称取野鸦椿酸 5.00 mg, DMSO 溶解完全, 再用 HBSS 稀释至浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 储备液, 备用(DMSO < 0.1%)。

1.3.2 色谱及质谱条件

色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 样品室温度: 4 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: A 相 10 mmol/L 乙酸铵; B 相为乙腈; 洗脱方式: 梯度洗脱(0~1 min, 97% A; 1~3 min, 97% A \rightarrow 30% A; 3~4 min, 30% A \rightarrow 97% A; 4~6 min, 97% A); 流量: 0.3 mL/min; 进样体积: 5 μL ^[8]。

质谱条件: 电喷雾离子源, 负离子扫描模式; 离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$; 锥孔反吹气为氮气(纯度 > 99.99%), 流量 50 L/h; 脱溶剂气为氮气, 温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 流量为 650 L/h; 多反应监测(MRM)模式采集, 见表 1^[1]。

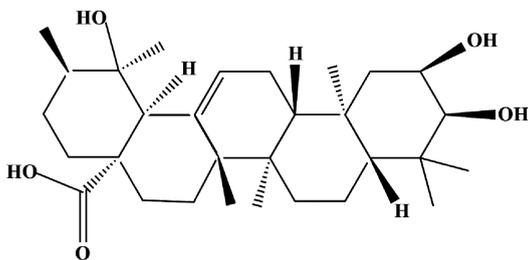


图 1 野鸦椿酸结构式

Figure 1 Structural formula of euscaphic acid

1.3.3 野鸭椿酸方法学考察

用甲醇将野鸭椿酸储备液梯度稀释制备系列浓度标准溶液,按照“1.3.2”项下条件测定,绘制标准曲线,并考察精密度、重复性、稳定性和加样回收率,计算 RSD 值。

1.3.4 Caco-2 细胞模型验证及细胞毒性试验

将 Caco-2 细胞以 2.5×10^5 /mL 密度接种至 Transwell® 12 孔板中,每孔接种 0.5 mL,通过测定电阻值 (TEER) 和荧光素钠的表观渗透系数 (P_{app} 值) 对细胞模型进行验证^[9]。

采用 MTT 比色法考察野鸭椿酸对 Caco-2 细胞的毒性,按照公式 $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$, 计算细胞的存活率^[10]。

1.3.5 野鸭椿酸摄取试验

(1) 细胞模型建立

将 Caco-2 细胞以 2.5×10^5 /mL 密度接种于 12 孔板中,每孔 1 mL,连续培养 18 d 后进行摄取试验。

(2) 时间对摄取的影响

12 孔板中每孔加入 1 mL 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的野鸭椿酸溶液,分别在 0、10、30、60、90、120、150、180、210 min 取样测定,每个时间点设置 3 个复孔,考察时间对摄取的影响。

(3) 温度对摄取的影响

12 孔板中每孔加入 1 mL 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的野鸭椿酸溶液,分别置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下中孵育 180 min,每个温度设置 3 个复孔,考察温度对摄取的影响。

(4) 摄取样品的制备

将摄取实验结束后的每孔加入 0.5 mL 胰酶消化细胞,1000 r/min 离心 5 min,收集沉淀,加入 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解,水浴蒸干,甲醇复溶,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液按照“1.3.2”项下条件测定。

1.3.6 野鸭椿酸转运试验

(1) 野鸭椿酸转运液的配制

精密吸取一定量的野鸭椿酸储备液稀释制成 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,作为野鸭椿酸双向转运的低、

中、高浓度。并制备每毫升分别含有 0.100 μmol 的盐酸维拉帕米 (Ver)、0.099 μmol 环孢菌素 A (CsA) 和 0.025 μmol 乙二醇-双-(2-氨基乙醚) 四乙酸 (EGTA) 低、中、高浓度双向转运液。

(2) 细胞模型建立

采用 12 孔 Transwell® 板进行双向转运实验,包括 AP 侧 \rightarrow BL 侧 (即 B \rightarrow A, 吸收转运) 和 BL 侧 \rightarrow AP 侧 (即 A \rightarrow B, 分泌转运)^[11]。

A \rightarrow B 转运:将 Caco-2 细胞以 2.5×10^5 /mL 密度每孔接种 0.5 mL 于 Transwell® 12 孔板中,连续培养 18 d 后,在 AP 侧 (作为供给侧) 加入 0.5 mL 的含药 HBSS 溶液,在 BL 侧 (作为接受侧) 加入 1.5 mL 空白液,分别在 15、30、60、90、120、150 和 180 min 时从 BL 吸取 200 μL 同时补加 200 μL HBSS 缓冲液,水浴蒸干,甲醇复溶,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液按照“1.3.2”项下条件测定,分别考察不同浓度,不同抑制剂,螯合剂和不同 pH 对野鸭椿酸双向转运的影响。

B \rightarrow A 转运:类似 A \rightarrow B 转运。在 BL 侧 (作为供给侧) 加入 1.5 mL 的含药 HBSS 溶液,在 AP 侧 (作为接受侧) 加入 0.5 mL HBSS 空白液,按“A \rightarrow B 转运”方法取样测定。

1.3.7 计算公式

$\text{TEER} (\Omega \cdot \text{cm}^2) = (\text{测定电阻} - \text{空白小室电阻}) \times \text{Transwell 小室面积} (1.12 \text{ cm}^2)$

加入空白溶液的一侧为接收侧,接收侧中的药量视为其吸收量 (Q_r)。A \rightarrow B 转运试验中,B 侧室在任意时间点吸收的药量记为 (Q_{rBi});B \rightarrow A 转运试验中,A 侧室在任意时间点吸收的药量为 (Q_{rAi}),具体计算见下公式:

A \rightarrow B 转运: $Q_{rBi} = 0.2 \times (C_{r1} + C_{r2} + \Lambda + C_{r(i-1)}) + 1.5 \times C_{ri}$

B \rightarrow A 转运: $Q_{rAi} = 0.2 \times (C_{r1} + C_{r2} + \Lambda + C_{r(i-1)}) + 0.5 \times C_{di}$

公式中,1.5 为 B 侧室所加的供试液体积 (mL),0.5 为 A 侧室所加的供试液体积 (mL),0.2 为每次的取样体积 (mL), C_{ri} 为第 i 个时间点接受

表 1 野鸭椿酸质谱条件
Table 1 Escaphic acid mass spectrometry conditions

质荷比 m/z	碎片 Mass fragment	锥孔电压 (V) Cone	碰撞电压 (V) Collision	母离子 Precursor ion
488	487	38	10	
	425	38	30	
	407	38	42	[M-H] ⁻

室的实测浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

表观渗透系数 P_{app} (cm/s) 公式计算如下:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

其中 dQ/dt 为单位时间药物转运量 ($\mu\text{g}/\text{s}$), 是以时间 (s) 为横坐标, 药物累计吸收药量 (μg) 为纵坐标所得直线的斜率; A 为 12 孔 Transwell[®] 膜表面积 (1.12 cm^2), C_0 为供给侧中加入药物的初始浓度 ($\mu\text{g}/\text{cm}$)。

外排比率 (ER) 公式计算如下: 若比值大于 2, 则表明药物在 Caco-2 细胞中的转运具有明显的方向性, 有外排转运体参与转运。

$$P_{B \rightarrow A/A \rightarrow B} = \frac{P_{app}(B - A)}{P_{app}(A - B)}$$

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.1 软件对数据进行方差分析 (ANOVA), 结果以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异的比较采用 t 检验, 当 $P < 0.05$ 时, 判定差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 野鸦椿酸方法学考察

2.1.1 线性考察

野鸦椿酸的标准曲线为 $A = 30214C + 19246$ ($r = 0.9999$), 浓度范围为 $0.10 \sim 32.00 \mu\text{g}/\text{mL}$, 见图 2。

2.1.2 精密性、重复性、稳定性和加样回收率

野鸦椿酸的精密性、重复性、稳定性均有 RSD 值 $< 2.00\%$, 平均回收率为 99.75% , RSD 值为 1.14% , 表明该测定方法准确度高, 见表 2。

2.2 Caco-2 细胞模型评价及细胞毒性试验

2.2.1 Caco-2 细胞模型的评价

Caco-2 细胞细胞培养至 20 d 时, TEER 值为

$703 \Omega/\text{cm}^2$, 荧光素钠的表观渗透系数 P_{app} 值为 $(4.06 \pm 0.17) \times 10^{-7} \text{ cm}/\text{s}$, 表明所建立 Caco-2 细胞模型符合摄取和转运实验要求。

2.2.2 野鸦椿酸细胞毒性实验

野鸦椿酸的浓度在 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以内, Caco-2 细胞的存活率在 95% 以上。在此基础上, 双向转运的低、中、高浓度分别设置为 12.5 、 25 、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 野鸦椿酸摄取实验

2.3.1 时间对摄取的影响

在 $0 \sim 180 \text{ min}$ 内, 随着时间延长野鸦椿酸的吸收量逐渐增加, 180 min 吸收量为 $(8.38 \pm 0.87) \mu\text{g}/\text{mg}$, 之后呈下降趋势, 后续考察时间设为 180 min , 见图 3。

2.3.2 温度对摄取的影响

结果表明, 随着温度升高, 野鸦椿酸的吸收量逐渐增加, 37°C 吸收量为 $(8.38 \pm 0.87) \mu\text{g}/\text{mg}$, 后续考察温度设为 37°C , 见图 4。

2.4 野鸦椿酸双向转运实验

2.4.1 浓度对野鸦椿酸双向转运的影响

野鸦椿酸的 Q_r 值和 P_{app} 值随着浓度增加而增加, 并呈正相关, 且 P_{app} 值 $> 10^{-6} \text{ cm}/\text{s}$; $A \rightarrow B$ 的 Q_r 值明显低于 $B \rightarrow A$ 的 Q_r 值, $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值范围为 $1.20 \sim 1.40$, 见表 3。表明野鸦椿酸吸收良好, 主要转运方式为被动转运, 且无明显方向性。

2.4.2 P-gp 抑制剂对野鸦椿酸双向转运的影响

加入 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂 Ver 和 CsA 后, 野鸦椿酸双向转运的 Q_r 值和 P_{app} 值无明显变化, $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值范围为 $1.20 \sim 1.40$, 表明野鸦椿酸不是 P-gp 的底物, 见表 4。

2.4.3 EGTA 螯合剂对野鸦椿酸双向转运的影响

加入 EGTA 螯合剂后, 野鸦椿酸双向转运的

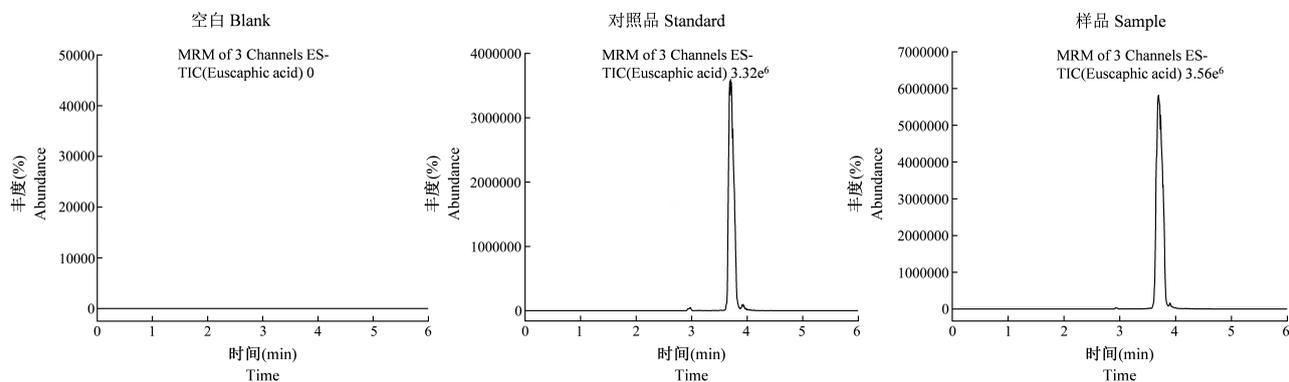


图 2 野鸦椿酸的 MRM 质谱图

Figure 2 MRM mass spectra of euscaphic acid

Q_r 值和 P_{app} 值无明显变化, $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值范围为 1.10~1.40, 表明野鸦椿酸不存在细胞旁路转运, 见表 5。

2.4.4 pH 对野鸦椿酸双向转运的影响

在设定的 pH 中, 野鸦椿酸的 Q_r 值和 P_{app} 值存

在明显差异 ($P < 0.01$), 见表 6。 Q_r 值和 P_{app} 值均有 $pH = 6.00 > pH = 5.00 > pH = 7.20$, $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值范围为 0.80~1.40, 表明弱酸性环境有利于野鸦椿酸的转运。

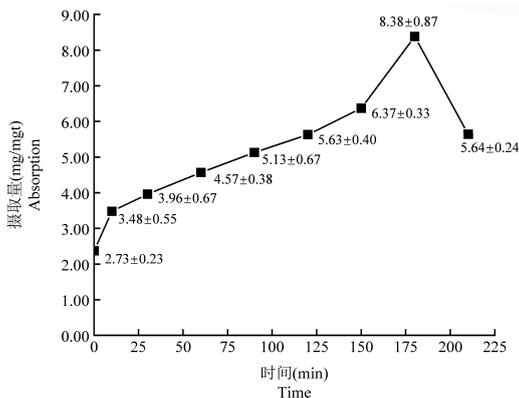


图 3 野鸦椿酸不同时间的摄取量 ($n = 3$)

Figure 3 Content of different time of intake euscaphic acid

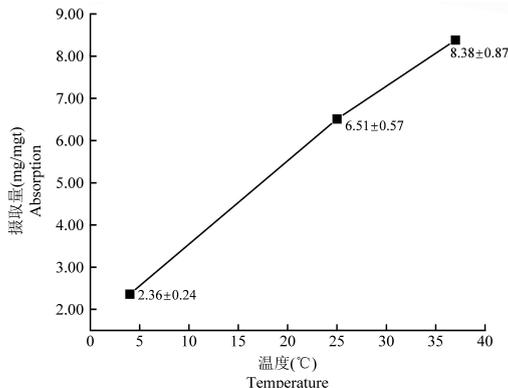


图 4 不同温度下野鸦椿酸的摄取量 ($n = 3$)

Figure 4 Content for different temperature intake euscaphic acid

表 2 野鸦椿酸的加样回收率 ($n = 6$)

Table 2 Recovery of euscaphic acid

成分 Components	样品含量 (μg) Sample content	加入量 (μg) Amount added	测得量 (μg) Measured amount	回收率 (%) Recovery	平均回收率 (%) Average recovery rate	RSD (%)
野鸦椿酸 Euscaphic acid	1.21	1.20	2.39	99.12	99.75±1.14	1.14
	1.22	1.20	2.37	98.12		
	1.15	1.20	2.36	100.62		
	1.17	1.20	2.39	100.95		
	1.17	1.20	2.35	99.08		
	1.20	1.20	2.42	100.63		

表 3 不同浓度野鸦椿酸对 Caco-2 细胞模型 Q_r 、 P_{app} 和 $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值的影响 ($n = 3$)

Table 3 Effect of different concentrations of euscaphic acid on Q_r , P_{app} and $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ values in Caco-2 cell model

C ($\mu\text{g/mL}$)	Q_r (μg) (A→B)	Q_r (μg) (B→A)	$P_{app} \times 10^{-4}$ (cm/s) (A→B)	$P_{app} \times 10^{-4}$ (cm/s) (B→A)	$R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$
12.50	3.44±0.16	4.15±0.15**	61.41±2.92	74.07±2.76**	1.21±0.02
25.00	8.23±0.84	10.80±0.03**	146.90±14.91	192.92±0.49**	1.32±0.13
50.00	9.36±0.38	12.87±0.15**	167.18±6.72	229.86±2.76**	1.38±0.07

注: 与 Q_r (μg) (A→B) 或 $P_{app} \times 10^{-4}$ (cm/s) (A→B) 组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Q_r (μg) (A→B) or $P_{app} \times 10^{-4}$ (cm/s) (A→B) group, ** $P < 0.01$.

表 4 P-gp 抑制剂对野鸦椿酸在 Caco-2 细胞模型 Q_r 、 P_{app} 和 $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值的影响 ($n = 3$)

Table 4 Effect of P-gp inhibitors on euscaphic acid in Caco-2 cell model Q_r , P_{app} and $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ values

抑制剂 Inhibitor	Q_r (μg) (A→B)	Q_r (μg) (B→A)	$P_{app} \times 10^{-4}$ (cm/s) (A→B)	$P_{app} \times 10^{-4}$ (cm/s) (B→A)	$R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$
野鸦椿酸 Euscaphic acid	8.23±0.84	10.80±0.03	146.90±14.91	192.92±0.49	1.32±0.13
野鸦椿酸+Ver Euscaphic acid+Ver	7.89±0.56	10.25±0.29	140.93±10.05	182.99±5.17	1.30±0.08
野鸦椿酸+CsA Euscaphic acid+CsA	8.49±0.81	10.39±0.86	151.68±14.48	185.58±15.42	1.22±0.23

表 5 EGTA 螯合剂对野鸦椿酸在 Caco-2 细胞模型 Q_r 、 P_{app} 和 $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值的影响 ($n=3$)
Table 5 Effect of EGTA on euscaphic acid in Caco-2 cell model Q_r , P_{app} and $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ values

螯合剂 EDTA	$Q_r(\mu\text{g})$ (A→B)	$Q_r(\mu\text{g})$ (B→A)	$P_{app} \times 10^{-4}(\text{cm/s})$ (A→B)	$P_{app} \times 10^{-4}(\text{cm/s})$ (B→A)	$R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$
野鸦椿酸 Euscaphic acid	8.23±0.84	10.80±0.03	146.90±14.91	192.92±0.49	1.32±0.13
野鸦椿酸+EGTA Euscaphic acid+EGTA	8.97±0.12	10.23±0.57	160.18±2.15	181.61±10.25	1.14±0.08

表 6 pH 值对野鸦椿酸在 Caco-2 细胞模型 Q_r 、 P_{app} 和 $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值的影响 ($n=3$)
Table 6 Effect of pH on euscaphic acid in Caco-2 cell model Q_r , P_{app} and $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ values

pH	$Q_r(\mu\text{g})$ (A→B)	$Q_r(\mu\text{g})$ (B→A)	$P_{app} \times 10^{-4}(\text{cm/s})$ (A→B)	$P_{app} \times 10^{-4}(\text{cm/s})$ (B→A)	$R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$
7.20	8.23±0.84	10.80±0.03	146.90±14.91	192.92±0.49	1.32±0.13
6.00	21.97±0.55**	22.56±0.53**	392.26±9.86**	402.82±9.38**	0.97±0.01
5.00	10.06±0.67**	9.03±0.43**	179.63±12.50**	161.28±7.59**	1.12±0.11

注:与 $Q_r(\mu\text{g})(A \rightarrow B)$ 或 $P_{app} \times 10^{-4}(\text{cm/s})(A \rightarrow B)$ 组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with $Q_r(\mu\text{g})(A \rightarrow B)$ or $P_{app} \times 10^{-4}(\text{cm/s})(A \rightarrow B)$ group, ** $P < 0.01$.

3 讨论

Caco-2 单层细胞模型可模拟小肠上皮细胞的形态和功能,其对药物的吸收特性与药物在肠道的吸收相关性良好,因此,建立和验证可靠、稳定、重复性好的 Caco-2 细胞体外吸收模型是进行药物吸收特性的基础,并以细胞形态学特征、TEER、 P_{app} 和碱性磷酸酶活性等指标进行验证^[12]。本研究建立了 Caco-2 单层细胞吸收模型,并评估了细胞形态学、TEER 和荧光素钠 P_{app} 值等指标,表明建模成功,符合后续摄取和转运实验要求。采用 Caco-2 单层细胞吸收模型研究药物吸收特性,细胞存活率应高于 85%,当细胞存活率低于 85%后,Caco-2 单层细胞吸收模型的 TEER 明显降低。采用 MTT 法考察野鸦椿酸对 Caco-2 细胞的毒性^[10]。结果显示,当野鸦椿酸浓度 $\leq 50 \mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率 $> 95\%$,因此,后续实验中设置的低、中、高浓度(12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$)符合要求。

表观渗透系数(P_{app})是反映物质在肠道内的吸收能力。在人的空肠中 0~100% 吸收率的物质在 Caco-2 细胞中转运的 P_{app} 值介于 $5 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-5} \text{cm/s}$ 之间。吸收良好药物的 P_{app} 值 $> 10 \times 10^{-6} \text{cm/s}$;中等吸收药物的 P_{app} 值为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{cm/s}$;吸收不良药物的 P_{app} 值 $< 1.0 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ ^[13]。本研究结果显示,野鸦椿酸的 P_{app} 值与浓度呈正相关,介于 $(61.41 \pm 2.92) \times 10^{-4} \sim (167.18 \pm 6.72) \times 10^{-4} \text{cm/s}$ 之间,属于吸收良好物质。在 Caco-2 细胞吸收模型中,外排比率($R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$)可评价药物双

向转运是否具有方向性。当 $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值接近于 1 时,表明药物主要以被动扩散方式转运;当 $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值 $\ll 1$ (一般 < 0.6) 时,表明药物主要被小肠顶侧膜的转运载体所摄取^[14];而当 $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 值 $\gg 1$ 时(一般 > 1.5),表明药物被小肠顶侧膜的转运蛋白外排。野鸦椿酸的 $R_{B \rightarrow A/A \rightarrow B}$ 介于 0.8~1.4 之间,表明其转运以被动扩散方式为主。

在 Caco-2 单层细胞吸收模型中,当药物是 P-gp 的底物,P-gp 会降低其摄取以及双向转运速率,而 P-gp 抑制剂能够发挥拮抗作用,从而促进药物的吸收^[15]。本研究选取 2 种典型的 P-gp 抑制剂 Ver 和 CsA,考察它们对野鸦椿酸在 Caco-2 细胞中摄取转运的影响。结果表明,加入 P-gp 抑制剂后野鸦椿酸的 Q_r 和 P_{app} 值均无明显变化,表明野鸦椿酸不是 P-gp 的底物。EGTA 是 Ca^{2+} 专属螯合剂,其可通过拮抗 Ca^{2+} 通过细胞膜进入细胞,减少细胞收缩,打开细胞之间的间隙,从而明显增加药物的转运能力。结果表明,加入 EGTA 后,野鸦椿酸双向转运的 Q_r 和 P_{app} 值均无明显变化($P > 0.05$),即野鸦椿酸不存在细胞旁路转运^[16]。

肠道吸收理论认为药物电离后呈离子状态,不易通过肠道屏障被吸收,而药物电离主要由于溶剂 pH 值发生改变^[17-18]。本实验考察了不同 pH 值(7.20、6.00、5.00)对野鸦椿酸吸收特性的影响。结果表明,当(pH=6.00)条件下野鸦椿酸的 Q_r 和 P_{app} 值最高,在中性(pH=7.20)条件下 Q_r 和 P_{app} 值最低,由于野鸦椿酸为三萜酸类化合物,弱酸性环境抑制了电离,有利于其透膜吸收。

综上所述,基于 Caco-2 细胞模型研究了野鸦椿

酸的双向转运特性,考察了不同浓度、pH、温度、时间、P-gp 抑制剂对药物吸收的影响。结果表明,野鸦椿酸双向转运特性包括主动转运和被动扩散,在设定的浓度内吸收良好,同时弱酸性的环境可提高野鸦椿酸的转运吸收,提高其生物利用度。

参考文献:

[1] Shoei-sheng L, Shew-neu S, Karin C. Triterpenes from *Paliurus hemsleyanus*-ScienceDirect [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(3): 549-554.

[2] Chen F, Li HH, Tai YF, et al. A sensitive and cost-effective LC-ESI-MS/MS method for quantitation of euscaphic acid in rat plasma using optimized formic acid concentration in the mobile phase [J]. *Anal Methods*, 2014, 6(21): 8713-8721.

[3] Jeong NH, Lee S, Choi YA, et al. Inhibitory effects of euscaphic acid in the atopic dermatitis model by reducing skin inflammation and intense pruritus [J]. *Inflammation*, 2022, 45(4): 1680-1691.

[4] Dai W, Dong P, Liu J, et al. Euscaphic acid inhibits proliferation and promotes apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by silencing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2090-2098.

[5] 黎光儒,戴卫波,杨静,等. 野鸦椿酸通过 JAK2/STAT3 信号抑制淋巴瘤 Raji 细胞生长及诱导凋亡作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(3): 513-516.

[6] Park HJ, Nam JH, Jung HJ, et al. Inhibitory effect of euscaphic acid and tormentic acid from the roots of *Rosa rugosa* on high fat diet-induced obesity in the rat [J]. *Korean J Pharmacogn*, 2005, 36(4): 324-331.

[7] 于连婷,矫艳磊,于美娜,等. Caco-2 单层细胞模型在中药化学成分吸收转运研究中的应用 [J]. *吉林医药学院学报*, 2022, 43(1): 50-52.

[8] 哈及尼沙. 高效液相色谱法同时测定椴椴籽中蔷薇酸和委陵菜酸的含量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(5): 1812-1816.

[9] Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems [J]. *J Lab Autom*, 2015, 20(2): 107-126.

[10] Alizadeh-Navaei R, Rafiei A, Abedian-Kenari S, et al. Effect of first line gastric cancer chemotherapy regime on the AGS cell line-MTT assay results [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(1): 131-133.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 梁秋玲,朱叶萌,麦子盈,等. 基于 Caco-2 细胞单层模型对盐酸氨溴索吸收机制的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 47-53.

[14] 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(4): 1319-1326.

[15] Ferreira A, Moreira S, Rui L, et al. Permeability evaluation of gemcitabine- CPP_6 conjugates in Caco-2 cells [J]. *ADMET DMPK*, 2021, 9(1): 41-48.

[16] 张馨,王莉芳,陈佳琪,等. 龙血竭酚类提取物主要成分在 Caco-2 细胞中吸收机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(20): 4889-4895.

[17] Appel (Kohn) BN, Gottmann J, Schäfer J, et al. Absorption and metabolism of modified mycotoxins of alternariol, alternariol monomethyl ether, and Zearalenone in Caco-2 cells [J]. *Cereal Chem*, 2021, 98(1): 109-122.

[18] 王素莲,黄荳,杨发有,等. 藏花酸在 Caco-2 细胞模型中的吸收转运研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(15): 1894-1897.

[收稿日期]2023-03-06