

茵陈中 6,7-二甲氧基香豆素在 MDCK 模型中的吸收机制研究

李杨杨, 黄 成, 孟晓明, 陈昭琳, 马陶陶, 李 俊

摘要 目的 基于马丁达比犬的肾近曲小管上皮(MDCK)细胞模型研究茵陈中 6,7-二甲氧基香豆素的吸收机制。方法 考察时间、药物浓度(12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)、温度(4、37 $^{\circ}\text{C}$)和抑制剂(碘乙酰胺、维拉帕米、MK571)对 6,7-二甲氧基香豆素吸收和转运的影响。采用高效液相色谱法(HPLC)检测 6,7-二甲氧基香豆素的浓度,计算出表观渗透系数(P_{app})并分析其吸收机制。结果 根据 P_{app} 得出 6,7-二甲氧基香豆素在 MDCK 细胞模型上的转运量呈时间和浓度依赖性且不同浓度下的 $P_{\text{app(B-A)}}/P_{\text{app(A-B)}} \approx 1$ 。4、37 $^{\circ}\text{C}$ 和加入抑制剂碘乙酰胺后 6,7-二甲氧基香豆素的吸收 $P_{\text{app(A-B)}}$ 之间差异无统计学意义。37 $^{\circ}\text{C}$ 和加入外排蛋白抑制剂维拉帕米、MK571 后 6,7-二甲氧基香豆素的外排 $P_{\text{app(B-A)}}$ 之间差异无统计学意义。结论 6,7-二甲氧基香豆素在 MDCK 细胞模型上表现为浓度依赖的单纯扩散。

关键词 MDCK; 6,7-二甲氧基香豆素; HPLC; 单纯扩散

中图分类号 R 945

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0973-05

6,7-二甲氧基香豆素是常用中药茵陈的主要有效成分之一,茵陈为菊科植物滨蒿或茵陈蒿的地上干燥部分,《中国药典》2010 年版(一部)收载,具有清湿热、退黄疸的功效,临床上常用做保肝中药^[1],其主要药效物质基础为香豆素类化合物。研究^[2]表明 6,7-二甲氧基香豆素具有抗凝血、降血脂、促血管舒张、抗氧化、抗炎等生物学特性。目前关于 6,7-二甲氧基香豆素的吸收机制研究未见文献报道。马丁达比犬肾近曲小管上皮(Madin Darby canine kidney, MDCK)细胞模型被用来研究小肠上皮细胞药物转运和代谢的体外模型,已广泛应用于口服药物的筛选和研究药物肠吸收的过程,成为了研究药物吸收较适合的模型^[3]。该实验用 MDCK 细胞单层模型研究 6,7-二甲氧基香豆素的吸收机制,考察时间、药物浓度、温度以及相关抑制剂对 6,7-二甲氧基香豆素双向转运转运的影响。

2015-04-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273526, 81202978)

作者单位: 安徽医科大学药学院、安徽天然药物活性研究省级实验室、安徽省创新药物产业共性研究院, 合肥 230032

作者简介: 李杨杨, 男, 硕士研究生;

李 俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lijun@ahmu.edu.cn

Effect of resveratrol on expression of VEGF in rats with adjuvant arthritis

Lu Jinsen, Ma Zhongfei, Zong Hexiang, et al

(Dept of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of anti-inflammatory and expression level of vascular endothelial growth factor(VEGF) of resveratrol (Res) on synovial tissues in rats with adjuvant arthritis (AA). **Methods** 60 SD rats were randomly divided into two groups: normal group (10 rats), model group (50 rats). Model group was injected Freund's complete adjuvant induced arthritis, when the right paw was induced after 12 days and secondary immune-inflammatory feet were swollen, the model rats were randomly divided into 5 groups, and each group had 10 rats. AA model, Res low dose group (5 mg/kg), Res middle dose group (15 mg/kg), Res high dose group (30 mg/kg), positive control celecoxib group (5 mg/kg) qd $\times$ 16. After induced inflammatory paw, the expressions of VEGF in synovial tissue and articular cartilage were detected by immunohistochemistry, VEGF protein content in synovial tissue were detected by Western blot. **Results** Res could inhibit model group rats pathological damage, compared with the AA model group, synovial tissue expression of VEGF was significantly low in the resveratrol-treated groups and celecoxib group. **Conclusion** Res prevents the pathological changes of the joint degeneration, its mechanism may be involved regulating the expression of VEGF in synovial tissue of AA rats.

Key words adjuvant arthritis; resveratrol; vascular endothelial growth factor; rats

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 6,7-二甲氧基香豆素(纯度 > 98%,批号: ZL140316982) 购自南京泽郎医药科技有限公司; 碘乙酰胺(批号: H1420070) 购自美国 aladdin 公司; MK571 购自美国 Sigma 公司(纯度 > 95%,批号: 103M4621V); 橙皮苷(内标,批号: 110721-200613)、盐酸维拉帕米(批号: 100223-200102) 购自中国药品生物制品检定所; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 甲醇(色谱纯) 购自美国 Tedia 公司; Hank's 溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS) 购自上海碧云天生物技术有限公司; MEM 培养液购自美国 Hyclone 公司。

1.1.2 仪器 四元低压梯度高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC) 仪(型号 LC-20A) 购自日本岛津公司; 台式高速冷冻离心机(型号 Neofuge 23R) 购自香港力康发展有限公司; 分析天平(型号 FA2004N) 购自上海精密科学有限公司; 超纯水机(型号 ROIS5 30 L)、细胞电压电阻仪(Millicell-ERS)、悬挂式培养皿(Millicell-CPI) 均购自美国 Millipore 公司; 细胞培养箱(型号 Napco-6100) 购自美国杜邦公司; 酶标仪(型号 MK3) 购自荷兰雷勃公司。

1.1.3 细胞株 MDCK 细胞株(american type culture collection, ATCC) 由浙江工业大学宋必卫教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 单层细胞模型的建立 将 MDCK 细胞培养于 MEM(含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素双抗液) 中,置 37℃、5% CO₂ 环境中培养。MDCK 细胞按每孔密度 5×10^3 个/cm² 接种到含有 Millicell CPI 膜的 24 孔板中,在 A 侧加入培养基 0.5 ml, B 侧加入 1.5 ml 后置于培养箱中培养 3~6 d,期间用 Millicell-ERS 测跨细胞单层膜电阻(transsepithelial electrical resistance, TEER) 当每孔的 TEER > 140 Ω·cm² 便能进行跨膜转运实验。

1.2.2 MTT 法 将浓度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬液接种到 96 孔板中,每孔加入 0.1 ml 细胞悬液,放置于培养箱中培养 16 h 后,给药孔分别加入 6.25、12.5、25、50、100、200、400、800 μmol/L 浓度溶液各 100 μl,空白对照孔只加含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液,调零孔加 PBS,每组设置 5 个复孔,培养 24 h 后,各孔加入 20 μl 浓度为 5 g/L 的 MTT,继续培

养 4 h 后,吸去上清液并加入 150 μl 的 DMSO,振荡 10 min,并用酶标仪检测其在 492 nm 处的吸光度(absorbance, A) 值,结果用细胞存活率表示。细胞存活率(%) = (给药孔 A 均值 - 调零孔 A 均值) / (空白对照孔 A 均值 - 调零孔 A 均值) × 100%。

1.2.3 转运实验方法 选取 TEER > 140 Ω·cm² 的 24 孔板,用 HBSS 清洗 2 遍,并孵育 30 min 后加药。转运分为吸收(CPI 的 A 侧到 B 侧的转运)和外排(CPI 的 B 侧到 A 侧的转运)两组实验,吸收实验步骤为: A 侧分别加入 0.6 ml 不同浓度的药物, B 侧加入 1.2 ml HBSS,放入恒温培养箱,于 30、60、90、120 min 时间点从 B 侧取样 120 μl,并在 B 侧补充 120 μl HBSS。分泌实验步骤: B 侧分别加入 1.2 ml 不同浓度的药物, A 侧加入 0.6 ml HBSS 培养箱中培养,分别于 30、60、90、120 min 时间点从 A 侧取样 120 μl,并在 A 侧补充 1.2 ml HBSS,每组试验平行 3 份,为确定细胞单层没有破损,实验结束时需再次测量各孔的 TEER 值。

1.2.4 分析方法 精密称取适量 6,7-二甲氧基香豆素对照品,用 DMSO 溶解,用培养基溶解并稀释成 12.5、25、50、100、200 μmol/L 系列溶液。取样品溶液 100 μl 加入内标橙皮苷溶液 10 μl 和甲醇溶液 90 μl,涡旋,12 000 r/min 离心 3 min,吸取上清液 100 μl,进样。色谱柱为 Hypersil ODS column (250 mm × 4.6 mm 5 μm),流动相为甲醇溶液-水溶液(30:70),检测波长: 343 nm,流速为 1.0 ml/min,进样量为 20 μl,柱温为 40℃。

1.3 统计学处理 用药物的表观渗透系数(P_{app}) 值进行数据处理。两组的比较用 *t* 检验,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P_{app} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$ 。式中 dQ/dt 代表单位时间药物转运量(μmol/s); A 代表 Millicell 膜面积(1.33 cm²); C_0 代表药物初浓度(μmol/L)。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 专属性试验 空白 HBSS、含 6,7-二甲氧基香豆素和内标橙皮苷对照品的 HBSS、实验样品的色谱图见图 1。HBSS、6,7-二甲氧基香豆素、橙皮苷互不干扰测定。

2.1.2 线性关系的考察 取 6,7-二甲氧基香豆素备液适量,用 HBSS 稀释成 3.9、7.8、15.6、31.25、62.5、125、250、500 μmol/L 的对照品系列溶液,按“1.2.4”处理并进样,测定峰面积并绘制标准曲线,

得标准曲线 $Y = 12.018X + 0.073$ $r = 0.991$ (X 为 6, 7-二甲氧基香豆素浓度, Y 为 6, 7-二甲氧基香豆素与内标的峰面积)。可以看出 6, 7-二甲氧基香豆素在浓度 3.9 ~ 500 $\mu\text{mol/L}$ 内与峰面积之间线性关系良好。

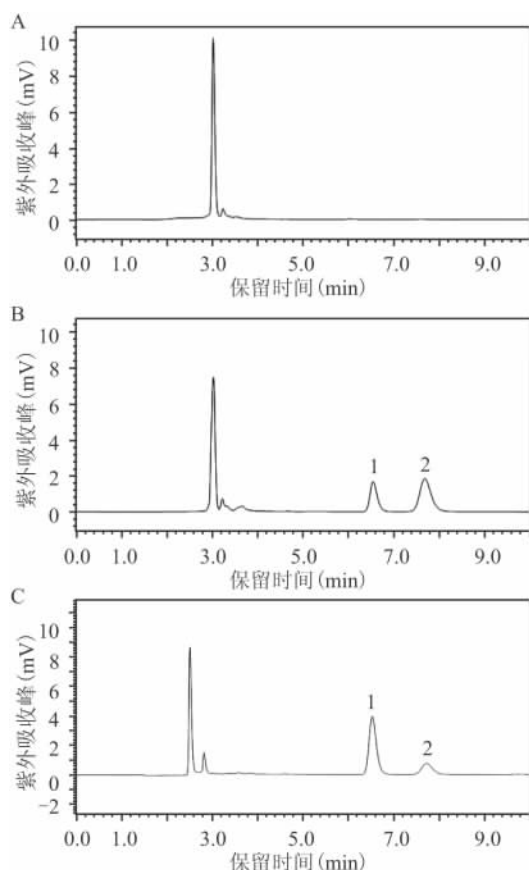


图1 HPLC 色谱图

A: 空白 HBSS; B: HBSS 加 6, 7-二甲氧基香豆素和橙皮苷对照品; C: 6, 7-二甲氧基香豆素样品; 1: 6, 7-二甲氧基香豆素; 2: 橙皮苷

2.1.3 精密度与准确度 取 6, 7-二甲氧基香豆素备液适量, 用 HBSS 稀释成 7.8、31.25、125 $\mu\text{mol/L}$ 系列的质控样品 ($n = 5$), 按“1.2.4”处理并进样, 1 d 内连续测定 5 次, 算出日内精密度相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 值分别为 1.80%、1.58%、1.75%, 并连续测定 5 d, 算出日间精密度 RSD 值分别为 2.41%、1.95%、1.86%, 符合小于 10% 的要求。准确度分别为 93.56%、91%、105.93% 符合 85% ~ 115% 的要求。

2.1.4 稳定性试验 取 6, 7-二甲氧基香豆素备液适量, 用 HBSS 稀释成 7.8、31.25、125 $\mu\text{mol/L}$ 系列的质控样品 ($n = 5$), 算出室温放置 24 h 和 -20°C 存放 20 d 两者的稳定性进行考察, 按“1.2.4”处理并进样, 测定 6, 7-二甲氧基香豆素的浓度, 计算出

24 h 的 RSD 值分别为 3.53%、2.75%、2.52%, -20°C 的 RSD 值分别为 3.17%、2.48%、2.13%, 均符合小于 5% 的要求。

2.1.5 6, 7-二甲氧基香豆素对 MDCK 细胞的毒性作用 MTT 结果表明 6, 7-二甲氧基香豆素浓度在 6.25 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率都大于 70% 以上, 可以用于转运实验。见图 2。

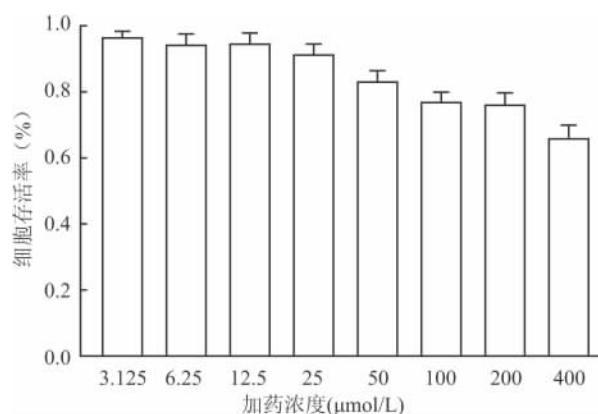


图2 药物浓度对细胞存活率的影响

2.2 6, 7-二甲氧基香豆素的双向跨膜转运 不同浓度下 6, 7-二甲氧基香豆素在 MDCK 模型上的累积透过量随时间变化的曲线见图 3。6, 7-二甲氧基香豆素的累积透过量和时间呈正相关性, 且初始浓度越大累积透过量越多。双向转运的 P_{app} 值见表 1。6, 7-二甲氧基香豆素的 $P_{app(B \rightarrow A)}$ 与 $P_{app(A \rightarrow B)}$ 不随浓度的增加而升高, 且比值均 ≈ 1 , 表明其转动主要机制为被动扩散。见表 1。

表1 浓度对 6, 7-二甲氧基香豆素 P_{app} 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	$P_{app} (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$		$P_{app(B \rightarrow A)} / P_{app(A \rightarrow B)}$
	A $\rightarrow$ B	B $\rightarrow$ A	
12.5	2.347 ± 0.064	2.139 ± 0.631	0.911
25	2.581 ± 0.294	2.368 ± 0.444	0.917
50	2.270 ± 0.225	2.141 ± 0.212	0.943
100	1.704 ± 0.361	1.699 ± 0.224	0.997
200	2.014 ± 0.283	1.887 ± 0.152	0.937

2.3 温度对 6, 7-二甲氧基香豆素跨膜转运的影响 固定 6, 7-二甲氧基香豆素浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 4°C 、 37°C 条件下 6, 7-二甲氧基香豆素 $P_{app(A \rightarrow B)}$ 分别为 $(1.961 \pm 0.527) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 、 $(2.270 \pm 0.225) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, 差异无统计学意义 ($t = 2.316$, $P > 0.05$); $P_{app(B \rightarrow A)}$ 分别为 $(1.967 \pm 0.648) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 、 $(2.141 \pm 0.212) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, 差异无统计学意义 ($t = 2.441$, $P > 0.05$), 表明 6, 7-二甲氧基香豆素的

跨膜转运不会受到载体的影响。见图4。

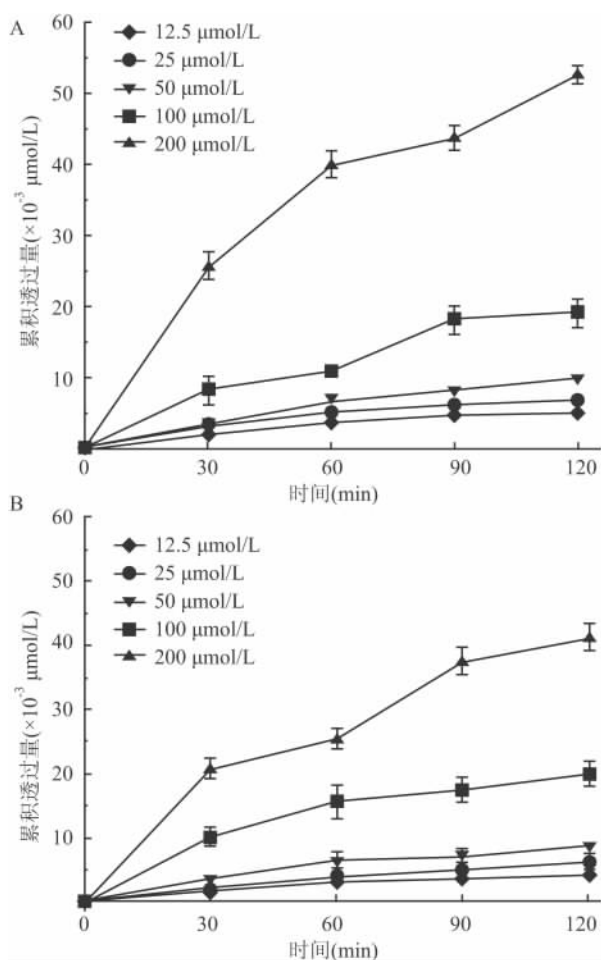


图3 6,7-二甲氧基香豆素在MDCK细胞模型上的累积透过量与时间关系曲线

A: A→B; B: B→A

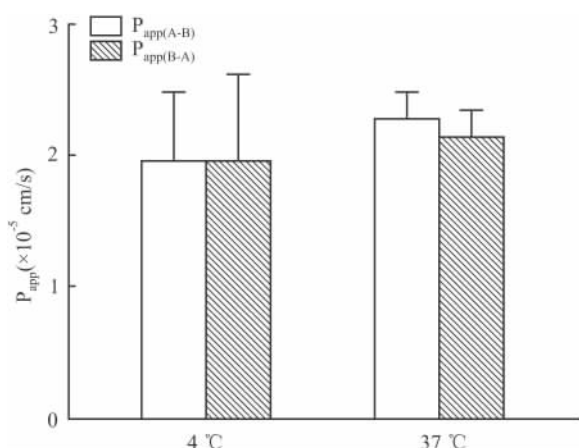


图4 温度对6,7-二甲氧基香豆素转运的影响

2.4 碘乙酰胺对6,7-二甲氧基香豆素跨膜转运的影响 为了进一步证明6,7-二甲氧基香豆素的转

运不受载体的参与,本实验加入三磷酸腺苷耗竭剂碘乙酰胺(5 mmol/L),加入碘乙酰胺后,6,7-二甲氧基香豆素A→B($t = 0.997, P > 0.05$)和B→A($t = 1.21, P > 0.05$)的 P_{app} 差异均无统计学意义。见表2。

表2 碘乙酰胺对6,7-二甲氧基香豆素 P_{app} 的影响($n = 3, \bar{x} \pm s$)

项目	转运方向	$P_{app} (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$
6,7-二甲氧基香豆素	A→B	2.270 ± 0.225
	B→A	2.141 ± 0.212
6,7-二甲氧基香豆素 + 碘乙酰胺	A→B	2.549 ± 0.178
	B→A	2.162 ± 0.145

2.5 抑制剂对6,7-二甲氧基香豆素跨膜转运的影响 固定6,7-二甲氧基香豆素浓度为50 $\mu\text{mol/L}$,加入维拉帕米、MK571后,6,7-二甲氧基香豆素的 $P_{app(A-B)}$ 分别为 $(2.052 \pm 0.129) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 、 $(2.256 \pm 0.289) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$,与37 °C的 $P_{app(A-B)}$ (2.270 ± 0.225) $\times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 相比差异无统计学意义($t = -1.444, -0.36, P > 0.05$); $P_{app(B-A)}$ 分别为 $(2.390 \pm 0.208) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 、 $(2.168 \pm 0.311) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$,与37 °C的 $P_{app(B-A)}$ (2.141 ± 0.212) $\times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 相比差异无统计学意义($t = 1.21, 1.000, P > 0.05$)。见图5。

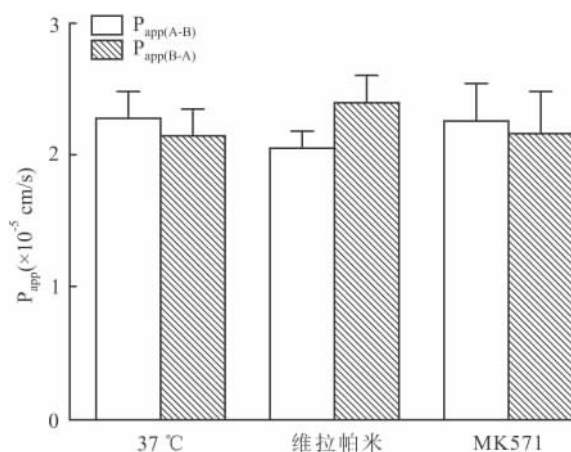


图5 维拉帕米、MK571对6,7-二甲氧基香豆素转运的影响

3 讨论

药物跨膜转运过程是药物体内过程的前提,也是其发挥药物活性的必需,所以透膜过程贯穿着药物在体内的整个过程,研究药物的跨膜转运机制对提高药物的生物利用度和药效具有重要意义^[4]。目前广泛应用的是人结肠癌细胞模型和MDCK模

型。MDCK 细胞模型最早由 Leighton et al^[5] 建立, MDCK 接种在半透膜上之后能分化成柱状单层上皮并形成致密的连接, 整个过程仅需要 2 ~ 6 d。MDCK 细胞具有生长快和细胞亚型少的优势, 这使得实验周期能够大大缩短并且实验结果重现性较高^[6]。本实验利用 MDCK 细胞模型研究 6,7-二甲氧基香豆素在 MDCK 单层细胞中的吸收机制, 随着浓度和时间的增加, 转运量呈线性增加且两个方向各浓度的 P_{app} 值并无显著差异, 基本保持恒定, 即 $P_{app(B-A)} / P_{app(A-B)} \approx 1$ 。结果表明 6,7-二甲氧基香豆素的吸收转运可能以被动扩散为主。众所周知, 对温度敏感是载体介导主动转运的共同特征, 当温度下降时, 载体活性逐渐减弱或者失活。改变温度对 6,7-二甲氧基香豆素吸收没有影响, 表明其吸收没有载体蛋白的参与。另外, 在转运机制探讨方面, 已知碘乙酰胺具有抑制能量代谢并且耗竭细胞内储存 ATP 的作用^[7], 在 MDCK 细胞单层用 5 mmol/L 的碘乙酰胺处理实验中, 6,7-二甲氧基香豆素的吸收和外排皆未受到影响, 提示其转运无能量的参与。P-糖蛋白和多药耐药相关蛋白是影响药物转运通过细胞膜的一个重要因素, 两者主要功能是外排各种外来异物, 保护机体不受外来异物的侵扰。已知维拉帕米是 P-糖蛋白外排抑制剂, MK-571 是多药耐药相关蛋白-2 外排抑制剂, 两者对 6,7-二甲氧基香豆素的

转运皆没有影响。这些结果进一步证明了 6,7-二甲氧基香豆素在 MDCK 细胞模型上是通过浓度依赖的单纯扩散机制进行的。6,7-二甲氧基香豆素 P_{app} 大于 1.0×10^{-5} cm/s 属于吸收中等的化合物, 推断其吸收率大于 70 %。

参考文献

- [1] 孟繁钦, 吴宜燕, 雷涛, 等. 茵陈的药理作用及临床应用进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2009, 30(1): 46-8.
- [2] 杨艳, 王庆伟, 张琰. 滨蒿内酯的研究进展[J]. 中国药业, 2011, 20(19): 1-3.
- [3] Gartzke D, Fricker G. Establishment of optimized MDCK cell lines for reliable efflux transport studies[J]. J Pharm Sci, 2014, 103(4): 1298-304.
- [4] 韩静文, 李俊, 黄成, 等. 栀子苷与栀子柏皮汤中栀子苷在 MDCK 细胞跨膜转运模型上的转运研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 468-72.
- [5] Leighton J, Estes L W, Mansukhani S, et al. A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium[J]. Cancer, 1970, 26(5): 1022-8.
- [6] 孔一帆, 李俊, 黄成, 等. 基于 MDCK 的葛根素跨膜转运机制的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(12): 1418-22.
- [7] 姚媛, 廖琼峰, 谢智勇, 等. 新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 113-6.

Absorption mechanism of 6,7-dimethylesculetin in capillary artemisia in MDCK cell membrane model

Li Yangyang, Huang cheng, Meng Xiaoming, et al

(School of Pharmacy, Anhui Provincial Laboratory on Bioactivity of Natural Products, Anhui Institute of Innovative Drugs, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study absorption of 6,7-dimethylesculetin in capillary artemisia in MDCK cell membrane model. **Methods** The effects of time, drug concentration, temperature and inhibitor on the absorption and transport of 6,7-dimethylesculetin were studied systematically in the MDCK cell membrane. The drug concentration was determined by high performance liquid chromatography to calculate the apparent permeability coefficient (P_{app}). **Results** 6,7-dimethylesculetin transport in MDCK cell monolayer was time and concentration dependent. The $P_{app(B-A)} / P_{app(A-B)} \approx 1$. With the 4 °C, 37 °C and presence of iodoacetamide, the $P_{app(A-B)}$ of 6,7-dimethylesculetin had no significant difference. With the 37 °C and presence of verpamil, MK571, the $P_{app(B-A)}$ of 6,7-dimethylesculetin also had no significant difference. **Conclusion** The transport of 6,7-dimethylesculetin in MDCK cell membrane model is passive diffusion.

Key words MDCK; 6,7-dimethylesculetin; HPLC; passive diffusion