

# 根皮苷和3-羟基根皮苷在Caco-2细胞单层模型中的转运与吸收研究

罗明琍<sup>1,2\*</sup>, 黄松<sup>2</sup>, 吴新荣<sup>1#</sup> (1.广州军区广州总医院, 广州 510010; 2.广州中医药大学, 广州 510006)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1950-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.11

**摘要** 目的:研究根皮苷和3-羟基根皮苷在人克隆结肠腺癌细胞(Caco-2细胞)单层模型中的转运与吸收。方法:采用高效液相色谱法,以表观渗透系数( $P_{app}$ )为指标,分别考察50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ 的根皮苷和3-羟基根皮苷在Caco-2细胞单层模型中的双向(AP $\rightarrow$ BL、BL $\rightarrow$ AP)转运;并通过两药配伍同时混合转运与两药单独转运比较,考察两药转运的相互作用。结果:随着浓度的增加,根皮苷AP $\rightarrow$ BL和BL $\rightarrow$ AP的 $P_{app}$ 均有一定的上升趋势;3-羟基根皮苷AP $\rightarrow$ BL的 $P_{app}$ 有下降趋势,BL $\rightarrow$ AP的 $P_{app}$ 却略有上升趋势。与单独转运比较,混合转运中根皮苷和3-羟基根皮苷的转运量和 $P_{app}$ 均明显下降( $P < 0.05$ )。结论:根皮苷和3-羟基根皮苷在Caco-2细胞单层模型的吸收状况良好,两药配伍转运时存在竞争性抑制。

**关键词** 根皮苷;3-羟基根皮苷;Caco-2细胞单层模型;吸收;转运

## Study on Absorption and Transportation of Phloridzin and 3-Hydroxy-phloridzin in Caco-2 Cell Monolayer Model

LUO Ming-li<sup>1,2</sup>, HUANG Song<sup>2</sup>, WU Xin-rong<sup>1</sup> (1.Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China; 2.Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study absorption and transportation of phloridzin and 3-hydroxy-phloridzin in cloning of human colon adenocarcinoma cells (Caco-2 cell) monolayer model. METHODS: HPLC method was adopted. Using apparent permeation coefficient  $P_{app}$  as index, two-way absorption and transportation (AP $\rightarrow$ BL and BL $\rightarrow$ AP) of phloridzin and 3-hydroxy-phloridzin (50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$ ) in Caco-2 cell monolayer model were investigated. Simultaneous transportation of drug combination was compared with that of single drug; the interaction of the two drugs was investigated. RESULTS: With the increase of concentration,  $P_{app}$  of phloridzin (AP $\rightarrow$ BL and BL $\rightarrow$ AP) increased to some extent;  $P_{app}$  of 3-hydroxy-phloridzin (AP $\rightarrow$ BL) decreased to some extent, while that of 3-hydroxy-phloridzin (BL $\rightarrow$ AP) increased slightly. Compared with single transportation, transportation amount and  $P_{app}$  of phloridzin combined with 3-hydroxy-phloridzin decreased significantly ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: Phloridzin and 3-hydroxy-phloridzin have good permeability coefficient on Caco-2 cell monolayer model. When transport together, competitive inhibition is found between two drugs.

**KEY WORDS** Phloridzin; 3-Hydroxy-phloridzin; Caco-2 cell monolayer model; Absorption; Transportation

根皮苷(Phloridzin)和3-羟基根皮苷(3-Hydroxy-phloridzin)都属于植物黄酮类中的二氢查尔酮苷,与其他黄酮类相比,二氢查尔酮在自然界存在很少,被称为“少数黄酮类”。根皮苷主要存在于苹果的根皮、茎、嫩叶和果实中<sup>[1]</sup>。近年来发现,多穗柯甜茶(*Lithocarpus polystachyus* Rehd)含有丰富的根皮苷和3-羟基根皮苷,且含量比苹果高出上百倍<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>证明,根皮苷和3-羟基根皮苷具有显著降血糖、改善胰岛素抵抗的作用,且在降血糖的同时具有降血脂作用。目前未见对根皮苷和3-羟基根皮苷在人体内肠吸收情况、转运方式的文献报道。人克隆结肠腺癌细胞(Caco-2细胞)模型是目前为止用来研究外源化合物肠道吸收和毒性的最好体外模型。笔者利用Caco-2细胞单层模型模拟小肠环境,研究根皮苷和3-羟基根皮苷的吸收转运情况,为其新药开发提供一定的参考依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

\* 博士研究生。研究方向:抗糖尿病中药药效及药物作用机制。电话:020-36654670。E-mail:luomingli@gmail.com

# 通信作者:主任药师,博士研究生导师。研究方向:抗糖尿病中药药效及药物作用机制。电话:020-36654670。E-mail:gzwrxiong@yahoo.com

高效液相色谱仪(日本岛津公司);Millicell-ERS型数字电导仪(美国Millipore公司);CO<sub>2</sub>培养箱(美国NBS公司);CKX-41-32型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 药品、试剂与培养基

根皮苷、3-羟基根皮苷(广州中医药大学新药中心提供,经检测纯度: $>98\%$ );达尔伯克改良伊格尔(DMEM)培养基(高糖型,批号:NTA0079)、胎牛血清(批号:NWG0435)、非必需氨基酸(NEAA,批号:AWD10436)均由美国Hyclon公司提供;0.25%胰酶液(含酚红指示剂,美国Gibco公司,批号:1036080);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司);青霉素-链霉素双抗液(批号:11111702)、磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液,pH7.2~7.4)、无机盐平衡盐缓冲液(HBSS缓冲液)、L-谷氨酰胺试剂、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)试剂均由杭州吉诺生物医药技术有限公司提供;HCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>均为分析纯,甲醇为色谱纯,实验用水为双蒸水。

### 1.3 细胞株

Caco-2细胞购于中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所,试验所用的细胞传代数为40~50代。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Dikma ODS(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲

醇-水(50:50),流速:1 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:285 nm;进样量:40 μl。取根皮苷溶液、3-羟基根皮苷溶液和相同体积的空白HBSS缓冲液(pH 6.5)进样,考察溶剂HBSS缓冲液对测定是否产生干扰。结果表明,HBSS缓冲液对根皮苷、3-羟基根皮苷的测定无干扰。色谱见图1。

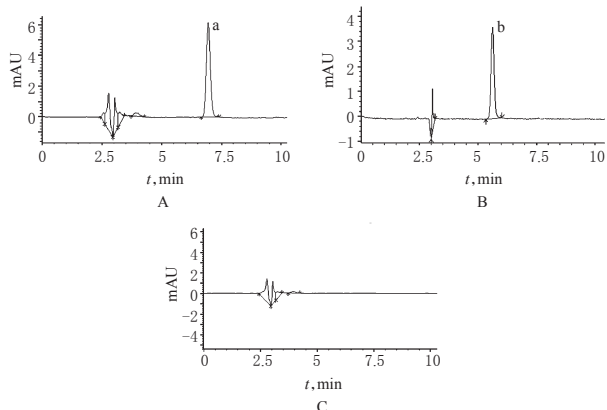


图1 高效液相色谱图

A.根皮苷溶液;B.3-羟基根皮苷溶液;C.空白HBSS缓冲液;a.根皮苷;  
b.3-羟基根皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. phloridzin solution; B. 3-hydroxy-phloridzin solution; C. blank HBSS buffer solution; a. phloridzin; b. 3-hydroxy-phloridzin

## 2.2 线性关系考察

精密称取根皮苷21.80 mg和3-羟基根皮苷22.70 mg,分别以HBSS缓冲液溶解并定容至5 ml量瓶中,得10 mmol/L的贮备液。精密吸取上述贮备液适量,分别以HBSS缓冲液稀释制备成1、5、25、50、100、200 μmol/L的根皮苷溶液和1、2、5、10、20、50、100、200 μmol/L的3-羟基根皮苷溶液,进样测定。以浓度(x)对峰面积积分值(y)进行线性回归,得回归方程为根皮苷: $y=18\ 474x+9\ 766.2(r=0.999\ 9)$ 、3-羟基根皮苷: $y=7\ 671.9x-10\ 865(r=0.999\ 8)$ 。结果表明,根皮苷和3-羟基根皮苷浓度的线性范围均为1~200 μmol/L。

## 2.3 方法回收率、精密度与稳定性考察

在线性范围内,根皮苷和3-羟基根皮苷的方法回收率分别为95.29%~98.76%( $n=9$ )和94.12%~97.63%( $n=9$ );日内RSD和7 d内日间RSD均<3%;HBSS缓冲液溶解处理根皮苷和3-羟基根皮苷后的溶液72 h内的稳定性RSD均<3%。

## 2.4 转运试验的回收率考察

转运试验中,Caco-2细胞层顶端(AP端)给药,根皮苷、3-羟基根皮苷给药浓度均为200 μmol/L,分别在给药4 h后,取Caco-2细胞层基底端(BL端)样品,进样分析,测定浓度,计算回收率(AP端和BL端药物浓度之和/给药量×100%)。结果,根皮苷、3-羟基根皮苷AP→BL的回收率分别为90.50%、74.23%;同法测定BL端给药后AP端接受时的回收率,结果,根皮苷、3-羟基根皮苷BL→AP的回收率分别为95.29%、73.63%。以上提示根皮苷在细胞内有少量的摄取存留,回收率良好;3-羟基根皮苷在细胞内的存留量比较大,约达到26%,回收率差。

## 2.5 Caco-2细胞的培养及单层模型的建立

Caco-2细胞培养于DMEM培养液中,含10%胎牛血清、1%NEAA、1%L-谷氨酰胺、青霉素(100 u/ml)-链霉素(100 u/

ml)双抗液,在37 ℃、5%CO<sub>2</sub>饱和的恒温培养箱中培养,隔天换1次培养液,每5~7 d用胰蛋白酶消化传代。将Caco-2细胞混悬液接种于12孔培养板上,种植密度为 $1\times 10^5\ \text{ml}^{-1}$ ,单层细胞于19~21 d分化形成,用跨膜电阻仪检测跨膜电阻,各孔跨膜电阻值均大于500 Ω/cm<sup>2</sup>时,即建模成功。

## 2.6 细胞毒性试验

通过MTT法检测根皮苷和3-羟基根皮苷的细胞毒性来确定给药剂量。取对数生长期Caco-2细胞种植于96孔平底细胞培养板中,种植密度为 $6\times 10^3\ \text{ml}^{-1}$ ,每孔加入190 μl培养液培养24 h。分组为试验孔和空白对照孔,试验孔分别加入不同浓度根皮苷10 μl,使根皮苷最终浓度分别为1 000、500、250、125、62.5、31.3、15.6 μmol/L,空白对照孔加入无菌的0.9%氯化钠溶液10 μl,每组设6个平行孔。培养48 h后,每孔加入5.0 mg/ml的MTT溶液10 μl,继续培养4 h后,取出终止培养,小心吸弃上清液,每孔加入150 μl DMSO,微量震荡使结晶物充分溶解,30 min内用调零后的酶标仪在490 nm波长处测定其光密度(OD)值。取6孔平均OD值按以下公式计算细胞的存活率(IC), $IC=(\text{试验孔OD值}/\text{空白对照孔OD值})\times 100\%$ 。同法测定3-羟基根皮苷对Caco-2细胞的毒性以确定给药剂量。结果根皮苷的IC分别为101.34%、113.76%、102.14%、98.78%、104.28%、103.06%、92.05%,3-羟基根皮苷的IC分别为90.93%、94.96%、98.24%、101.01%、91.94%、98.49%、83.88%。与空白对照孔比较,试验孔中细胞的IC均无明显变化( $P>0.05$ ),提示根皮苷和3-羟基根皮苷对Caco-2细胞并无明显细胞毒性,剂量范围为15.6~1 000 μmol/L。综合考虑,选择50、100、200 μmol/L作为根皮苷和3-羟基根皮苷的吸收转运试验浓度。

## 2.7 跨膜转运试验<sup>[4-5]</sup>

2.7.1 双向转运试验。在相同条件下,同时测定药物从Caco-2细胞AP→BL和BL→AP的转运情况。用HBSS缓冲液制备浓度分别为50、100、200 μmol/L的根皮苷溶液和3-羟基根皮苷溶液,除菌。用37 ℃预热的HBSS缓冲液冲洗生长有Caco-2细胞的培养板2次,再加入预热的HBSS缓冲液,置于与培育Caco-2细胞相同条件的培养箱中培养30 min,吸弃HBSS缓冲液。对于从AP→BL的转运:将不同浓度的根皮苷溶液和3-羟基根皮苷溶液0.5 ml加到AP端作为供给池,同时BL端加入空白HBSS缓冲液1.5 ml作为接受池;从BL→AP的转运:将不同浓度的根皮苷溶液和3-羟基根皮苷溶液1.5 ml加到BL端作为供给池,同时AP端加入空白HBSS缓冲液0.5 ml作为接受池。然后把培养板继续放入培养箱中孵育,于给药后30、60、90、120、150、180、210、240 min收集接受池中的溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。每次取样后补足相同体积空白HBSS缓冲液。

2.7.2 同时转运试验。将根皮苷和3-羟基根皮苷配伍同时进行吸收转运,考察化学结构相似的药物之间的转运相互作用。将培养板培养21 d的Caco-2细胞,转运方向为AP→BL,于AP端加入37 ℃含100 μmol/L根皮苷和3-羟基根皮苷的HBSS缓冲液(1:1)0.5 ml,置于37 ℃的培养箱中孵育,于60 min时从BL端取样,按“2.1”项下色谱条件进样测定,并与根皮苷和3-羟基根皮苷单独转运进行比较。

2.7.3 数据处理。按Artursson P等<sup>[6]</sup>于1991年报道的药物透过Caco-2细胞单层模型的表现渗透系数( $P_{app}$ )作为指标,进行数据处理。 $P_{app}=(dQ/dt)/(A\times c_0)$ , $P_{app}$ 单位为cm/s。式中, $Q$ 为

转运量(Cumulative amount of transport),表示化合物在接受端出现的总量,单位为 $\mu\text{g}$ (在计算时需要累加上取样时取走的化合物的量); $dQ/dt$ 为速率,单位为 $\mu\text{g/s}$ ;  $c_0$ 为化合物在供给端的初始浓度,单位为 $\mu\text{mol/L}$ ;  $A$ 为聚碳酸酯膜的表面积,单位为 $\text{cm}^2$ 。转运的有向性(PDR)按 $\text{PDR} = P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP}) / P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 计算。 $c_t$ 为化合物在接受端 $t$ 时间的浓度,单位为 $\mu\text{mol/L}$ 。用 $t$ 检验对两组数据进行比较处理,每个数据点为平行3孔的平均值,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.7.4 结果。不同浓度根皮苷和3-羟基根皮苷通过Caco-2细胞的浓度-时间变化图见图2,  $P_{\text{app}}$ 和PDR结果见表1。

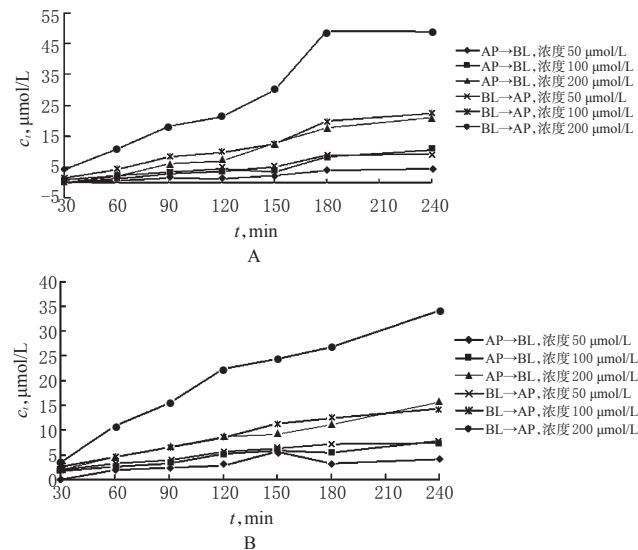


图2 不同浓度根皮苷和3-羟基根皮苷通过Caco-2细胞的浓度-时间图

A. 根皮苷; B. 3-羟基根皮苷

Fig 2 Transportation concentration-time profiles of phloridzin and 3-hydroxy-phloridzin with different concentrations

A. phloridzin; B. 3-hydroxy-phloridzin

表1 不同浓度根皮苷和3-羟基根皮苷通过Caco-2细胞的 $P_{\text{app}}$ 和PDR( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1  $P_{\text{app}}$  and PDR of phloridzin and 3-hydroxy-phloridzin across Caco-2 cells with different concentrations ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

化合物	$c_0, \mu\text{mol/L}$	$P_{\text{app}}, \times 10^{-6} \text{cm/s}$		PDR
		AP→BL	BL→AP	
根皮苷	50	6.87 ± 0.080	5.59 ± 0.353	0.814
	100	7.03 ± 0.341	6.97 ± 0.174	0.991
	200	7.42 ± 0.101	7.51 ± 0.176	1.012
3-羟基根皮苷	50	7.54 ± 0.219	4.73 ± 0.306	0.627
	100	7.18 ± 0.079	4.75 ± 0.518	0.662
	200	7.30 ± 0.081	5.29 ± 0.045	0.724

由表1可知,随着浓度的增加,根皮苷AP→BL和BL→AP的 $P_{\text{app}}$ 均有一定的上升趋势,表明根皮苷通过Caco-2细胞的吸收转运具有浓度依赖性。随着浓度的增加,3-羟基根皮苷AP→BL的 $P_{\text{app}}$ 有下降趋势,BL→AP的 $P_{\text{app}}$ 却略有上升趋势,表明随浓度的增加,3-羟基根皮苷的吸收转运减弱,浓度对其通过Caco-2细胞的吸收转运有一定的影响。此外,根皮苷和3-羟基根皮苷通过Caco-2细胞的吸收转运呈现一定的方向性,整体来看AP→BL转运的速率较BL→AP转运的速率稍大,

AP→BL转运呈较小的优势,表明根皮苷和3-羟基根皮苷的跨细胞转运主要为透细胞被动转运。

与根皮苷单独转运比较,混合转运中根皮苷的 $c_{60 \text{ min}}$ 和 $P_{\text{app}}$ 均明显减小( $P < 0.05$ );与3-羟基根皮苷单独转运比较,混合转运中3-羟基根皮苷的 $c_{60 \text{ min}}$ 和 $P_{\text{app}}$ 均明显减小( $P < 0.05$ )。提示根皮苷和3-羟基根皮苷转运过程中存在竞争性抑制。单独、混合转运时根皮苷和3-羟基根皮苷的 $c_{60 \text{ min}}$ 和 $P_{\text{app}}$ 详见表2。

表2 单独、混合转运时根皮苷和3-羟基根皮苷的 $c_{60 \text{ min}}$ 和 $P_{\text{app}}$  ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2  $c_{60 \text{ min}}$  and  $P_{\text{app}}$  of phloridzin and 3-hydroxy-phloridzin when transport alone or mixed ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

指标	单独转运		混合转运	
	根皮苷	3-羟基根皮苷	根皮苷	3-羟基根皮苷
$c_{60 \text{ min}}, \mu\text{mol/L}$	8.97 ± 0.396	7.72 ± 0.084	4.72 ± 0.125*	6.70 ± 0.246 <sup>#</sup>
$P_{\text{app}}, \times 10^{-6} \text{cm/s}$	8.34 ± 0.368	6.99 ± 0.135	4.39 ± 0.161*	6.03 ± 0.229 <sup>#</sup>

与根皮苷单独转运比较: \*  $P < 0.05$ ; 与3-羟基根皮苷单独转运比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

vs. transportation of phloridzin alone: \*  $P < 0.05$ ; vs. transportation of 3-hydroxy-phloridzin alone: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

### 3 讨论

根皮苷、3-羟基根皮苷在Caco-2细胞单层模型的转运中存在一定的方向性,两个化合物的AP→BL的 $P_{\text{app}}$ 均>BL→AP的 $P_{\text{app}}$ 。这两个化合物在模型中的转运外排不明显,可能在细胞膜上还存在转运吸收促进蛋白作用,使化合物从AP→BL的转运速率大。这些促进吸收转运的机制还有待进一步的研究与探索。

根皮苷和3-羟基根皮苷是结构相似的两个化合物。虽然这两个化合物在Caco-2细胞单层模型的转运过程都为被动转运,但是它们同时转运却表现出竞争性抑制,这可能与化合物结构有关。跨Caco-2细胞单层细胞膜的被动转运过程主要由化合物的极性和油/水分配系数决定,而化合物的结构决定了这一结果。对化合物油/水分配系数的获得可能将有助于解释根皮苷和3-羟基根皮苷同时转运时存在的竞争性抑制作用。

### 参考文献

- [1] Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, *et al.* Phloridzin: a review[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2005, 21(1):31.
- [2] 黄松, 罗明琳, 陶艳, 等. 甜茶质量标准研究[J]. *中国药房*, 2010, 21(23):2 176.
- [3] 董华强, 宁正祥, 于立静, 等. 多穗柯黄酮根皮苷对糖尿病小鼠的降血糖血脂效果[J]. *食品科学*, 2006, 27(12):714.
- [4] Matthias A, Blanchfield JT, Penman KG, *et al.* Permeability studies of Kavalactons using a Caco-2 cell monolayer model[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2007, 32(3):233.
- [5] Yang XW, Huang X, Ma L, *et al.* The intestinal permeability of neoligans from the seeds of *Myristica fragrans* in the Caco-2 cell monolayer model[J]. *Planta Med*, 2010, 76(14):1 587.
- [6] 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.

(收稿日期:2012-08-13 修回日期:2012-09-17)