

蒙药塔布森-2 中 9 种苯丙素类成分在 Caco-2 细胞中的吸收特性研究

李春燕, 王曦悦, 陆景坤, 董馨, 赵鹏伟, 马飞翔, 薛培凤^{*}(内蒙古医科大学, 呼和浩特 010110)

摘要: 目的 研究蒙药塔布森-2(Tabson-2 decoction, TBD)中苯丙素类成分在 Caco-2 细胞中的吸收特性, 初步阐明 TBD 的口服吸收机制。方法 采用 Caco-2 细胞单层细胞模型, 通过 UPLC-MS/MS 分析 TBD 在 Caco-2 细胞中的摄取成分, 并建立 UPLC-MS/MS 分析方法测定 TBD 中吸收最好的 9 种苯丙素类成分原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C、咖啡酸、二氢咖啡酸、3-羟基肉桂酸在 Caco-2 细胞中的含量, 分别考察时间、浓度和 P-糖蛋白抑制剂对各成分的吸收影响。结果 研究发现咖啡酸、二氢咖啡酸的总摄取量在 0~180 min 为上升趋势, 未呈现饱和; 3-羟基肉桂酸在 90 min 左右吸收恒定趋于饱和; 隐绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C、新绿原酸、绿原酸、原儿茶酸的摄取量约从 90 min 开始, 随时间的增加先下降后上升。与苯丙素类成分相比, 加入 P-糖蛋白抑制剂维拉帕米及环孢菌素 A 后对二氢咖啡酸的吸收产生了影响, 说明二氢咖啡酸是 P-糖蛋白底物。结论 TBD 主要苯丙素类成分进入 Caco-2 细胞以被动扩散为主, 主动转运为辅, 且除二氢咖啡酸外其他 8 个成分的吸收过程不受 P-糖蛋白的外排作用影响。

关键词: 塔布森-2; 苯丙素类; Caco-2 细胞; UPLC-MS/MS; P-糖蛋白

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)15-2048-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221847

引用本文: 李春燕, 王曦悦, 陆景坤, 等. 蒙药塔布森-2 中 9 种苯丙素类成分在 Caco-2 细胞中的吸收特性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(15): 2048-2055.

Absorption Characteristics of Nine Phenylpropanoids in Mongolian Medicine Tabson-2 Decoction in Caco-2 Cells

LI Chunyan, WANG Xiyue, LU Jingkun, DONG Xin, ZHAO Pengwei, MA Feixiang, XUE Peifeng^{*}(Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the absorption characteristics of phenylpropanoids of Mongolian medicine Tabson-2 decoction(TBD) in Caco-2 cells and to preliminarily clarify the oral absorption mechanism of TBD. **METHODS** Caco-2 cell monolayer model was used to analyze the uptake components of TBD in Caco-2 cells by UPLC-MS/MS, and UPLC-MS/MS analysis method was established to determine the nine best absorbed components of TBD, protocatechuic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptogenic acid, 1,5-dicaffeinate quinic acid, isochlorogenic acid C, caffeic acid, dihydrocaffeic acid, chlorogenic acid. The effects of time, concentration and P-glycoprotein inhibitor on the absorption of each component were investigated. **RESULTS** The overall intake of caffeic acid and dihydrocaffeic acid showed an upward trend in 0–180 min, and did not show saturation. The absorption of 3-hydroxycinnamic acid was constant at about 90 min and tended to saturation. The intakes of cryptochlorogenic acid, 1,5-dicaffeinate, quinic acid, isochlorogenic acid C, neochlorogenic acid, chlorogenic acid and protocatechuic acid first decreased and then increased with time from about 90 min. The addition of P-glycoprotein inhibitor verapamil and cyclosporin A had an effect on the absorption of dihydrocaffeic acid compared with the phenylpropanoid components, indicated that dihydrocaffeic acid was the substrate of P-glycoprotein. **CONCLUSION** The main phenylpropanoids of TBD enter Caco-2 mainly by passive diffusion, supplemented by active transport, and the absorption process of the other eight components is not affected by the efflux of P-glycoprotein except dihydrocaffeic acid.

KEYWORDS: Tabson-2 decoction; phenylpropanoids; Caco-2 cells; UPLC-MS/MS; P-glycoprotein

塔布森-2(Tabson-2 decoction, TBD)是蒙医典籍《蒙医金匱》中的接骨疗伤常用方剂, 由杜仲和蓝刺头 2 味组成, 具有壮骨、接骨愈伤的功效^[1]。杜仲为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)的干燥树皮, 化学成分主要有黄酮类、苯丙素类

等, 具有降压、调节血脂、抗骨质疏松等药理作用^[2-4]。蓝刺头是菊科植物驴欺口(*Echinops latifolius* Tausch.)的干燥复头状花序, 主要成分为苯丙素类、黄酮类等, 具有降低血糖血脂、促成骨、抑制破骨等作用^[5-8]。目前, 蒙药 TBD 临床和

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860756, 81960758); 内蒙古自治区科技创新引导项目(02039001); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08111)

作者简介: 李春燕, 女, 硕士, 副教授 E-mail: lichunyan322@126.com

^{*}通信作者: 薛培凤, 女, 硕士, 教授 E-mail: Xpfdc153@163.com

药理研究集中于预防和治疗骨质疏松症,为在传统民族医药中寻求疗效可靠的骨质疏松症防治方法提供了参考^[9],本课题组前期基于网络药理学和代谢组学技术对 TBD 抗骨质疏松症作用机制进行了研究^[10-11]。但 TBD 整方化学成分及其吸收代谢过程、化学成分和药理作用的相关性尚无相关报道,不足以阐明该方剂抗骨质疏松的药效物质基础。

肠吸收是口服药物体内吸收过程的重要环节,是药物作用于机体发挥相关作用的前置条件,研究口服中药的肠吸收过程和肠吸收机制,可以在一定程度上阐明其物质基础^[12-13]。Caco-2 细胞的形态、转运系统和代谢酶与小肠上皮细胞相似,该细胞模型重现性好,与肠道吸收机制有良好的相关性,常被用作研究药物在小肠吸收和转运特性的体外模型,并用于预测药物在小肠中的吸收情况^[14-17]。因此,本研究依据 TBD 主要成分的相关研究报道^[18-19],以 Caco-2 细胞模型为筛选工具,借助 UPLC-MS/MS 分析方法,选取 TBD 中主要活性成分苯丙素类,研究其在不同时间、不同浓度和 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)抑制剂条件下的吸收摄取特点,以期从细胞水平阐明 TBD 的口服吸收机制,为阐明该方剂药效物质基础提供体外吸收依据,同时为含苯丙素类的中药材及中药制剂吸收机制研究提供方法学参考。

1 仪器与试剂

HF000 二氧化碳细胞培养箱(美国 Heal-Force); DFC450C 倒置相差显微镜(德国 Leica); FC 型酶联免疫检测仪、Heraeus Multifuge X3R 常温离心机、高效液相色谱仪 ThermoUltiMate 3000 系列、Q-Exactive 液相色谱-质谱联用系统均购自美国 Thermo; MX-S 旋涡混合器(德国 SCILOGEX); Millicell-ERS 电阻仪(美国 Millipore)。

Caco-2 细胞(中国科学院细胞库,细胞代数 30~50);胎牛血清(批号:SH30087.01B)、DMEM 培养基(批号:G11995500BT)、胰蛋白酶(批号:25200056)、青霉素-链霉素双抗液(批号:15140148)、PBS 缓冲液(批号:BL310A)、HBSS 缓冲液(批号:14185052)均购自美国 Gibco 公司;非必需氨基酸(美国 Hyclone,批号:SH30238.01);DMSO(美国 Sigma,批号:CD4731-100);MTT 试剂盒(北京 coolaber,批号:CM7461-25OHG);甲醇(色谱级,美国 Fisher,批号:67-56-01);甲

酸(天津永晟科技有限公司,批号:64-18-6);绿原酸(批号:SH19071907)、隐绿原酸(批号:SH19092207)、异绿原酸 C(批号:SH20080802)、1,5-二咖啡酰奎宁酸(批号:SH20081003)、原儿茶酸(批号:SH20052804)、咖啡酸(批号:110885-200102)均购自北京赛百草科技有限公司;维拉帕米(中国食品药品检定研究院,批号:100223-200102);环孢菌素 A(中国食品药品检定研究院,批号:130495-201904)。对照品纯度均 $\geq 98.0\%$ 。

杜仲药材(批号:154633)购自亳州中药材有限责任公司,蓝刺头药材(批号:1707181)采自内蒙古自治区呼和浩特市,经内蒙古医科大学药学院渠弼教授鉴定,分别为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)的干燥树皮,菊科植物驴欺口(*Echinops davuricus* Trevir.)的干燥花序。

2 方法

2.1 测定方法

2.1.1 色谱条件 ACE Excel 3 C₁₈-PFP 色谱柱(100 mm $\times$ 3 mm, 3 μ m);流动相为 0.2%甲酸的甲醇溶液(A)-0.2%甲酸水溶液(B),梯度洗脱程序为 0.0~0.8 min, 2% $\rightarrow$ 5%A; 0.8~1.7 min, 5% $\rightarrow$ 10%A; 1.7~2.5 min, 10% $\rightarrow$ 18%A; 2.5~3.3 min, 18% $\rightarrow$ 23%A; 3.3~4.2 min, 23% $\rightarrow$ 28%A; 4.2~5.8 min, 28% $\rightarrow$ 33%A; 5.8~9.2 min, 33% $\rightarrow$ 43%A; 9.2~11.2 min, 43% $\rightarrow$ 46%A; 11.2~14.3 min, 46% $\rightarrow$ 60%A; 14.3~16 min, 60% $\rightarrow$ 65%A; 16~17.7 min, 65% $\rightarrow$ 68%A; 17.7~19.2 min, 68% $\rightarrow$ 75%A; 19.2~20 min, 75% $\rightarrow$ 80%A; 20~20.8 min, 80% $\rightarrow$ 2%A; 20.8~24 min, 2%A;流速为 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹; 4 $^{\circ}$ C 自动进样;柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),全扫描(full-scan)模式下获取质谱信息。方中主要成分苯丙素类在负离子模式(ESI⁻)下离子化效果较好,故采用负离子模式进行检测。质谱条件如下:①鞘气流速 35 L $\cdot$ min⁻¹;②辅助气流速 10 L $\cdot$ min⁻¹;③喷雾电压 2.8 kV;④毛细管离子传输管温度 350 $^{\circ}$ C;⑤S-lens 电压 50 kV;⑥加热温度 150 $^{\circ}$ C。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取绿原酸、异绿原酸 C 和 1,5-二咖啡酰奎宁酸对照品各适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,

摇匀,即得分别含 $1.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 绿原酸、 $0.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 异绿原酸 C、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,5-二咖啡酰奎宁酸的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 将药材蓝刺头、杜仲分别粉碎后过 50 目筛,精密称取药材粉末各 100 g,置于圆底烧瓶中,加适量蒸馏水 100°C 回流提取 2 次,每次 30 min,合并药液,减压浓缩后冷冻干燥,得冻干粉,置于 4°C 冰箱保存备用。使用时加适量蒸馏水溶解,经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过即得(冻干粉含量为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,相当于 TBD 生药量 $11.11 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.3 方法学考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液,用甲醇稀释成系列质量浓度(2.5, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1, $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),在“2.1”项色谱条件下进样测定。每个浓度平行操作 5 次,连续测定 3 d,考察此方法的准确度和精密性;在室温放置 10 h 内每间隔 2 h 进样分析,考察此方法的稳定性;并平行制备已知量的供试品溶液 9 份,分别精密加入高、中、低浓度($0.3, 0.5, 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对照品溶液适量分别进样测定,高、中、低浓度的绿原酸,1,5-二咖啡酰奎宁酸和异绿原酸 C 的平均回收率。

2.4 TBD 安全浓度范围的确定

采用 MTT 比色法,将 Caco-2 细胞以每孔 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于 96 孔板,每孔 $100 \mu\text{L}$,细胞分为 TBD 组、对照组和空白组,每组 6 个复孔。置 CO_2 培养箱($5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C)中培养 24 h 后,TBD 组分别加入 $100 \mu\text{L}$ 以 HBSS 稀释而成的系列浓度 TBD 溶液(4 000, 2 000, 1 000, 500, 250, 125, $62.5, 31.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),对照组加入等体积 $10\% \text{ DMEM}$ 高糖培养液,空白组加入等体积无血清培养基。孵育 24 h 后,分别加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 试剂 $20 \mu\text{L}$,继续孵育 4 h 后,再加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO 溶解残留的 MTT 结晶,震荡混匀,测定 570 nm 处的光密度(OD)值,计算细胞存活率,细胞存活率= $(\text{OD}_{\text{药物组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}})^{[20]}$ 。

2.5 Caco-2 细胞摄取试验

2.5.1 Caco-2 细胞模型的建立与评价方法 Caco-2 细胞完全培养基(组成为 $10\% \text{ 血清}$, $1\% \text{ 青霉素链霉素双抗}$, $1\% \text{ 非必需氨基酸}$)加 DMEM 高糖培养基至所需体积。在 $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C 培养箱中培养至细胞对数生长期,用 37°C 预热胰酶消化, $10\% \text{ DMEM}$ 培养液混悬后调整细胞密度为 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,接种

于 Transwell 12 孔板(聚碳酸酯膜将每孔分为上下两侧室,上侧室 AP 侧为肠腔侧,下侧室 BL 侧为基底侧)培养。连续培养 21 d,第 1 周隔天换液,之后每天换液。待细胞生长均匀、边界清晰成单层膜状态,测量跨膜电阻值(transsepithelial electrical resistance values, TEER),当 $\text{TEER} > 400 \Omega \cdot \text{cm}^2$,用于测定 TBD 提取物中各化合物在实验中的摄取特点^[21-22]。

2.5.2 TBD 在 Caco-2 细胞中的转运试验 Caco-2 细胞单层模型用 37°C HBSS 缓冲液荡洗 3 次,加入 HBSS 缓冲液,孵育 20 min,弃上清。开始双向转运试验,考察顶侧(AP 侧)→基底侧(BL 侧)转运时,在 AP 侧分别加入 0.5 mL 含不同浓度 TBD 溶液,BL 侧加入空白 HBSS 液 1.5 mL ,置恒温摇床(37°C , $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)中孵育,于 30, 60, 90, 120, 180 min 时从 BL 侧吸取 $200 \mu\text{L}$ 溶液作为供试品,同时补加等体积空白 HBSS 液。考察 BL 侧→AP 侧转运时,在 BL 侧分别加入 1.5 mL 含不同浓度药物的 HBSS 液,AP 侧加入空白 HBSS 溶液 0.5 mL ,置于恒温摇床(37°C , $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)中孵育,分别在相同时间点从 AP 侧吸取 $200 \mu\text{L}$ 溶液作为供试品,同时补加等体积空白 HBSS 液。吸取的供试品采用 HPLC-MS/MS 法测定主要吸收成分及含量,计算表观渗透系数 P_{app} , $P_{\text{app}} = dQ/dt \times A \times C_0$ (dQ 为转运时间 dQ 为 dt 内的转运量, A 为 12 孔板表膜面积, C_0 为供给初始质量浓度),在 AP→BL(吸收)和 BL→AP(流出)2 个方向上计算药物的 P_{app} ,并根据 $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$ 与 $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$ 的 P_{app} 值的比值计算外比值 $R_{\text{B-A/A-B}}$, $R_{\text{B-A/A-B}} = P_{\text{app(B-A/A-B)}} / P_{\text{app(A-B/A-B)}}^{[23-24]}$ 。

2.5.3 浓度对 TBD 在 Caco-2 细胞中转运的影响 按“2.5.2”项下方法分别考察 TBD 低、中、高浓度($0.5, 1, 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的双向转运特性,HPLC-MS/MS 测定 TBD 中苯丙素类吸收成分及其含量,并计算其在接受室的累积转运吸收量(Q_r)、 P_{app} 值、 $R_{\text{B-A/A-B}}$ 值。

2.5.4 P-gp 抑制剂对 TBD 在 Caco-2 细胞中转运的影响 按“2.5.2”项下方法分别考察含 P-gp 抑制剂盐酸维拉帕米、环孢菌素 A 的 TBD 溶液在 Caco-2 细胞中的双向转运特性,HPLC-MS/MS 测定 TBD 中苯丙素类吸收成分的含量,并计算其在接受室的 Q_r 、 P_{app} 值、 $R_{\text{B-A/A-B}}$ 值。

2.6 统计学方法

实验数据用 SPSS 22.0 统计软件进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检

验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察

以峰面积为纵坐标(Y)对质量浓度为横坐标(X)进行线性回归, 得对照品回归方程见表 1, 提示各成分在一定浓度范围内对应的线性关系良好, 检测限满足该样品测定。

测得绿原酸、异绿原酸 C 和 1,5-二咖啡酰奎宁酸日内精密度峰面积 RSD 分别为 0.20%, 0.34%, 0.16%; 日间精密度峰面积 RSD 分别为 0.30%, 0.42%, 0.46%; 稳定性峰面积 RSD 值分别为 0.75%, 0.39%, 0.44%, 均 $< 3\%$, 表明溶液在 10 h 内稳定性良好; 绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸和异绿原酸 C 的平均回收率为 99.70%, 100.40%, 98.66%; RSD 分别为 2.97%, 2.36%, 1.89%, 上述结果表明仪器精密度良好, 符合生物样品测定要求。

表 1 3 种标志化合物的校正曲线和检测限

Tab. 1 Linearity of calibration curves and limit of detection for three marker constituents

对照品	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	线性方程	回归系数 R^2	检测限/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
绿原酸	0.14~2.28	$Y=484\ 602X+187\ 489$	0.999 7	0.048
异绿原酸 C	0.06~0.92	$Y=720\ 446X+125\ 193$	0.999 9	0.019
1,5-二咖啡 酰奎宁酸	0.06~1.00	$Y=503\ 738X+143\ 332$	0.999 9	0.021

3.2 细胞模型构建

Caco-2 细胞接种于 Transwell 板 21 d 时, 细胞呈膜状在培养瓶中贴壁生长, TEER 值检测结果显示其电阻 $> 400\ \Omega$, 表明形成了致密的细胞单层, Caco-2 细胞单层具有良好的致密性, 见图 1。

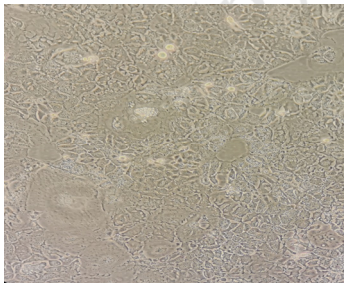


图 1 Caco-2 细胞单层膜结构生长形态(10 $\times$)

Fig. 1 Morphology of Caco-2 cell monolayer(10 $\times$)

3.3 不同浓度 TBD 提取物对细胞的毒性

当 TBD 浓度 $< 4\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 对 Caco-2 细胞生长抑制 $< 10\%$, 确定 TBD 安全浓度范围在 $4\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以内。因此选取 2, 1, $0.5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TBD 进行下一步摄取试验。见表 2。

表 2 塔布森-2 对 Caco-2 细胞生长存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Effect of Tabson-2 on the survival rates of Caco-2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	存活率/%
4	88.21 ± 1.23
3	91.97 ± 0.97
2	94.20 ± 0.39
1	94.78 ± 0.25
0.5	95.77 ± 0.23
0.25	96.63 ± 0.94

3.4 TBD 提取物在 Caco-2 细胞中转运的主要成分

前期建立了 TBD 化学成分数据库, 共收集了 246 个组方药材中的原型成分, 利用质谱计算各成分的精确分子量, 在各质谱图中搜索其准分子离子峰, 并结合保留时间比对确认各图谱的共有峰, 同时对各共有峰的二级质谱碎片信息进行全面分析, 确认 TBD 通过 Caco-2 细胞转运的原型成分^[6,18-19]。本试验共鉴定 TBD 通过 Caco-2 细胞转运的原型成分 24 个, 其中苯丙素类 13 个, 烯醚萜类 4 个, 黄酮类 3 个, 其他 4 个。表明 TBD 通过 Caco-2 细胞转运的原型成分以苯丙素类为主, 其中 9 个吸收最好的苯丙素类原型成分信息见表 3。

3.5 时间依赖性摄取试验

考察在 $1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下, TBD 中 9 个苯丙素类成分的累计转运吸收量随时间增加的变化, 计算对应表观渗透系数 P_{app} 值, 见表 4, 图 2。结果表明, 在设定的给药浓度下, 9 个成分均 $P_{\text{app}} > 10^{-3}\ \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 即在设定的给药浓度下其肠吸收良好。咖啡酸、二氢咖啡酸的摄取量(Q_r 值)随时间的增加而增加; 3-羟基肉桂酸在 90 min 左右吸收基本恒定, 摄取量 Q_r 值随着时间的增加变化很小; 隐绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C、新绿原酸、绿原酸、原儿茶酸等 6 个成分的 Q_r 值从开始到 90 min 左右, 随时间的增加而减少, 后缓慢增加。综合考虑, 选择 120 min 作为最佳摄取时间来进行后续实验。

3.6 浓度对 TBD 在 Caco-2 细胞中转运的影响

除咖啡酸、二氢咖啡酸、3-羟基肉桂酸外, 其他 6 个成分在高浓度下双向转运的 Q_r 值高于中、低浓度, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。大部分主要吸收成分双侧 P_{app} 值均随着浓度的增加而增加, 高浓度与中、低浓度间 P_{app} 值的比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。高浓度主要吸收成分与中、低浓度主要吸收成分 AP-BL 侧 P_{app} 值高于 BL-AP

表3 塔布森-2 通过 Caco-2 细胞转运的原型成分的鉴定

Tab. 3 Identification of prototypical components of Tabson-2 transported by Caco-2 cells

序号	保留时间/ min	名称	分子式	[M-H] ⁻ 理论值	主要碎片离子(<i>m/z</i>)	塔布森-2	杜仲	蓝刺头
1	9.37	原儿茶酸 ¹⁾	C ₇ H ₆ O ₄	153.018 98	109.027 69, 91.018 76	+	+	+
2	9.81	二氢咖啡酸 ¹⁾	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.051 08	153.019 56, 108.024 31	+	+	
3	14.67	3-羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	163.037 69	147.021 45, 131.031 29, 103.053 29, 77.087 01	+		+
4	18.15	异绿原酸 C ¹⁾	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.118 84	335.044 71, 353.084 63, 173.081 71, 179.034 70, 191.056 05	+	+	+
5	16.87	1,5-二咖啡酰奎宁酸 ¹⁾	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.118 84	191.056 08, 179.034 81, 173.081 65, 135.035 49	+	+	+
6	8.68	咖啡酸 ¹⁾	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 93	135.044 65, 151.039 66, 164.034 96	+	+	+
7	11.26	隐绿原酸 ¹⁾	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 81	135.044 56, 179.034 91, 173.045 43, 191.056 31	+	+	+
8	11.08	绿原酸 ¹⁾	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 81	135.044 69, 179.034 88, 173.045 26, 191.056 41	+	+	+
9	9.34	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 81	135.044 65, 179.034 85, 173.045 64, 191.056 11	+	+	+

注: +成分存在于药味中; ¹⁾化合物为对照品确认。

Note: + ingredient existed in the medicine taste; ¹⁾ compound was confirmed as the reference substance.

表4 透析液中 9 种成分的 $P_{app}(\times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$ 随时间变化的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 4 Results of $P_{app}(\times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$ of 9 components in dialysis fluid over time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

<i>t</i>	隐绿原酸	1,5-二咖啡酰奎宁酸	异绿原酸 C	新绿原酸	绿原酸	咖啡酸	二氢咖啡酸	3-羟基肉桂酸	原儿茶酸
I-30 min	0.27±0.05	0.49±0.09	0.25±0.05	0.10±0.02	0.51±0.09	0.14±0.02	0.05±0.007	0.01±0.006	0.06±0.008
I-60 min	0.18±0.03	0.22±0.04	0.08±0.01	0.09±0.02	0.34±0.06	0.08±0.01	0.04±0.005	0.03±0.004	0.05±0.008
I-90 min	0.10±0.02	0.06±0.01	0.03±0.004	0.05±0.008	0.18±0.03	0.05±0.007	0.02±0.003	0.02±0.003	0.03±0.005
I-120 min	0.12±0.02	0.06±0.01	0.02±0.002	0.06±0.01	0.20±0.04	0.04±0.007	0.02±0.004	0.02±0.003	0.02±0.004
I-180 min	0.14±0.03	0.10±0.02	0.02±0.003	0.07±0.01	0.29±0.06	0.05±0.01	0.03±0.005	0.02±0.003	0.09±0.02
$P_{appBL-AP}$	0.81±0.07	0.93±0.02	0.40±0.02	0.31±0.02	1.52±0.13	0.36±0.04	0.16±0.01	0.10±0.005	0.26±0.03
O-30 min	0.02±0.005	0.11±0.01	0.12±0.005	0.001±0.000 3	0.09±0.01	0.17±0.03	0.06±0.009	0.24±0.04	0.01±0.006
O-60 min	0.01±0.002	0.06±0.009	0.04±0.003	0.003±0.003	0.03±0.004	0.10±0.02	0.04±0.006	0.15±0.03	0.02±0.003
O-90 min	0.001±0.000 4	0.03±0.004	0.02±0.002	0.001±0.000 7	0.002±0.002	0.07±0.01	0.03±0.005	0.15±0.03	0.01±0.002
O-120 min	0.003±0.002	0.02±0.003	0.01±0.002	0.001±0.000 5	0.01±0.001	0.06±0.01	0.03±0.004	0.12±0.02	0.01±0.001
O-180 min	0.02±0.003	0.03±0.004	0.01±0.002	0.01±0.001	0.06±0.01	0.05±0.01	0.03±0.004	0.07±0.01	0.01±0.001
$P_{appAP-BL}$	0.05±0.008	0.23±0.04	0.20±0.05	0.02±0.005	0.19±0.03	0.46±0.04	0.19±0.01	0.73±0.06	0.06±0.004
$R_{B-A/A-B}$	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	<1	<1	<1	>1.5

注: I-transwell 板顶端侧的内部 HBSS 液; O-transwell 板基底外侧的外部 HBSS 液。

Note: I-HBSS liquid inside the top side of the transfer plate; O-external HBSS fluid on the outside of the transwell plate base.

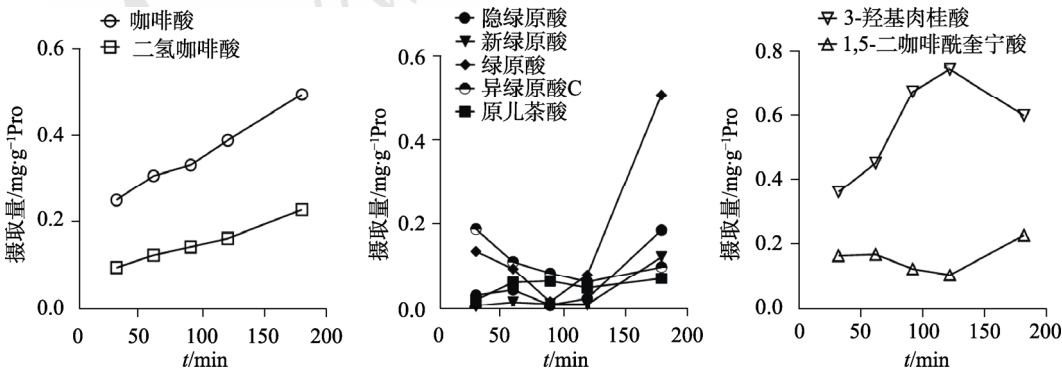


图2 塔布森-2 提取物不同时间对 Caco-2 细胞吸收的影响

Fig. 2 Effect of Tabson-2 extract on Caco-2 cell absorption at different time

侧, 差异有统计学意义($P<0.05$), 表明 TBD 中大部分苯丙素类成分的转运主要通过被小肠顶侧膜的转运载体摄取和被动扩散形式完成^[17]。总的来说 TBD 水提取物中成分的摄取方式主要表现为主动被

动扩散, 见表 5。

3.7 P-gp 抑制剂对 TBD 摄取的影响

在 PH 为 6.0, 温度为 37 °C 的摄取条件下进行试验, 表 6 结果表明, 在维拉帕米或环孢菌素 A 条

表 5 不同浓度 TBD 水提取物中主要吸收成分对 Caco-2 细胞模型 Qr, P_{app} 值和 R_{B-A/A-B} 值的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab. 5 Effects of main absorption components of TBD aqueous extract at different concentrations on Qr, P_{app} and R_{B-A/A-B} of Caco-2 cell model($\bar{x} \pm s$, n=3)

成分	浓度/mg·mL ⁻¹	Qr/ μ g		P _{app} /×10 ⁻³ cm·s ⁻¹		R _{B-A/A-B}
		AP-BL	BL-AP	AP-BL	BL-AP	
原儿茶酸	0.5	0.05±0.008	0.04±0.008 ²⁾	0.004±0.001 ²⁾	0.007±0.001 ²⁾	<1.5
	1	0.04±0.008 ¹⁾	0.14±0.02 ¹⁾	0.007±0.001	0.02±0.003 ¹⁾	>1.5
	2	0.53±0.10 ¹⁾²⁾	0.50±0.09 ¹⁾²⁾	0.18±0.02 ¹⁾²⁾	0.08±0.02 ¹⁾²⁾	<1.5
新绿原酸	0.5	0.04±0.008 ²⁾	—	0.004±0.001 ²⁾	—	<1.5
	1	0.01±0.003	0.33±0.06 ¹⁾	0.001±0.0005	0.06±0.01 ¹⁾	>1.5
	2	1.54±0.30 ¹⁾²⁾	0.54±0.10 ¹⁾²⁾	0.51±0.05 ¹⁾²⁾	0.09±0.01 ¹⁾	<1.5
绿原酸	0.5	0.27±0.05 ²⁾	0.05±0.008 ²⁾	0.02±0.008	0.01±0.001 ²⁾	<1.5
	1	0.08±0.01 ¹⁾	1.20±0.24 ¹⁾	0.01±0.002	0.20±0.04 ¹⁾	>1.5
	2	4.47±0.90 ¹⁾²⁾	1.79±0.36 ¹⁾²⁾	1.49±0.15 ¹⁾²⁾	0.30±0.06 ¹⁾²⁾	<1.5
隐绿原酸	0.5	0.08±0.01 ²⁾	0.01±0.001 ²⁾	0.006±0.002 ²⁾	0.002±0.0001 ²⁾	<1.5
	1	0.01±0.009 ¹⁾	0.74±0.14 ¹⁾	0.002±0.001	0.12±0.02 ¹⁾	>1.5
	2	1.72±0.34 ¹⁾	1.00±0.20 ¹⁾	0.57±0.06 ¹⁾²⁾	0.17±0.03 ¹⁾²⁾	<1.5
1,5-二咖啡酰奎宁酸	0.5	0.19±0.03 ²⁾	0.03±0.008 ²⁾	0.02±0.005	0.004±0.001 ²⁾	<1.5
	1	0.10±0.02 ¹⁾	0.35±0.06 ¹⁾	0.02±0.003	0.06±0.01 ¹⁾	>1.5
	2	1.50±0.30 ¹⁾²⁾	0.49±0.09 ¹⁾²⁾	0.50±0.05 ¹⁾²⁾	0.09±0.02 ¹⁾	<1.5
异绿原酸 C	0.5	0.09±0.01	0.004±0.001 ²⁾	0.01±0.002	0.001±0.000 1 ²⁾	<1.5
	1	0.06±0.01	0.12±0.02 ¹⁾	0.01±0.001 ¹⁾	0.02±0.002 ¹⁾	>1.5
	2	0.72±0.14 ¹⁾²⁾	0.21±0.04 ¹⁾²⁾	0.24±0.02 ¹⁾²⁾	0.03±0.005 ¹⁾²⁾	<1.5
咖啡酸	0.5	0.36±0.07	0.25±0.04	0.03±0.01 ²⁾	0.04±0.007	<1.5
	1	0.39±0.07	0.26±0.04	0.06±0.01	0.04±0.007	<1.5
	2	0.42±0.08 ¹⁾	0.20±0.03 ²⁾	0.14±0.01 ¹⁾²⁾	0.03±0.005	<1.5
二氢咖啡酸	0.5	0.14±0.02	0.11±0.02	0.01±0.004 ²⁾	0.02±0.003	<1.5
	1	0.16±0.03	0.15±0.02	0.03±0.004 ¹⁾	0.02±0.004	<1.5
	2	0.16±0.03	0.17±0.03 ¹⁾	0.05±0.004 ¹⁾	0.03±0.004	<1.5
3-羟基肉桂酸	0.5	0.78±0.15	0.04±0.008 ²⁾	0.06±0.03 ²⁾	0.01±0.001	<1.5
	1	0.74±0.14	0.12±0.02 ¹⁾	0.12±0.02 ¹⁾	0.02±0.003	<1.5
	2	0.84±0.16 ¹⁾	0.26±0.05 ¹⁾²⁾	0.28±0.03 ¹⁾²⁾	0.04±0.007 ¹⁾²⁾	<1.5

注: 与低剂量组相比(0.5 mg·mL⁻¹), ¹⁾P<0.05; 与中剂量组相比(1 mg·mL⁻¹), ²⁾P<0.05。

Note: Compared with low dose group(0.5 mg·mL⁻¹), ¹⁾P<0.05; compared with medium dose group(1 mg·mL⁻¹), ²⁾P<0.05.

表 6 P-gp 抑制剂对 Caco-2 细胞吸收成分的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab. 6 Effect of P-gp inhibitors on compound uptake in Caco-2 cells($\bar{x} \pm s$, n=3)

成分	苯丙素类成分	维拉帕米+苯丙素类成分	环孢菌素 A+苯丙素类成分
原儿茶酸	0.02±0.00	0.01±0.002	0.01±0.002
新绿原酸	0.01±0.00	—	—
绿原酸	0.02±0.001	0.01±0.002	0.01±0.003
隐绿原酸	0.01±0.001	—	—
1,5-二咖啡酰奎宁酸	0.14±0.02	0.01±0.00 ²⁾	0.01±0.00 ²⁾
异绿原酸 C	0.12±0.02	0.01±0.001 ²⁾	0.01±0.001 ²⁾
咖啡酸	0.27±0.05	0.10±0.01 ²⁾	0.11±0.02 ²⁾
二氢咖啡酸	0.15±0.02	0.26±0.05 ²⁾	0.24±0.04 ²⁾
3-羟基肉桂酸	0.66±0.13	0.60±0.11 ¹⁾	0.60±0.11 ¹⁾

注: 与苯丙素类成分相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

Note: Compared with the phenylpropanoid components, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01.

件下, TBD 水提取物中主要吸收苯丙素类成分二氢咖啡酸摄取量明显增加(P<0.01), 表明二氢咖啡酸可能是 P-gp 的底物。

4 讨论

Caco-2 细胞模型具有培养方法快速、操作简便的优点, 成熟的单层细胞膜极性与小肠上皮细胞极性相似, 与药物在人体内的实际吸收环境接近, 这使结果更接近实际值。Caco-2 细胞作为一种很好的阐明药物吸收机制的模型, 被国内外广泛用于药物吸收特性研究^[25]。本研究以细胞摄取的苯丙素类成分为指标性成分, 建立 Caco-2 细胞摄取模型, 结合 UPLC-MS/MS 分析方法, 考察 TBD 中苯丙素类成分的细胞摄取量与其浓度、时间、

抑制剂的关系。一般认为, P_{app} 值 $>1\times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 代表具有高吸收^[26], 本实验结果表明 9 个苯丙素类代表成分在肠中吸收良好。研究表明, 在设定浓度范围内, 咖啡酸、二氢咖啡酸在 Caco-2 细胞的摄取量与药物浓度呈线性关系, 表现出一级速率过程的特征, 表明其摄取方式主要为被动扩散; 但隐绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C、新绿原酸、绿原酸、原儿茶酸的摄取量在一定时间段内随时间的增加而降低, 可能是药物在进入细胞后受到酶的水解或转运体的外排作用的所致。

在 Caco-2 细胞试验中通常用外排比值 $R_{B-A/A-B}$ 值作为评价药物转运特性的指标。如果药物转运主要以被动扩散形式完成, 则 $R_{B-A/A-B}$ 值 <1.5 ; 如药物存在主动转运机制, 转运有方向性, 则 $R_{B-A/A-B}$ 值 >1.5 ^[27]。不同浓度条件下, 咖啡酸、二氢咖啡酸、3-羟基肉桂酸外排比值 $R_{B-A/A-B}$ 值 <1.5 , 代表其摄取方式主要为被动转运。其余成分在中浓度时, 转运有方向性, 存在主动转运机制; 低、高浓度时依旧为被动转运。提示不同浓度范围内, 各成分的细胞吸收呈现浓度依赖性, Caco-2 细胞对 TBD 中 9 个苯丙素类成分的摄取方式主要为被动扩散。

P-gp 是一种能量依赖性的药物外排泵, 能够与许多亲脂性或两亲性化合物结合, 将其底物药逆向泵出细胞, 降低药物在细胞内的浓度, P-gp 抑制剂可抑制 P-gp 的外排功能, 增加 P-gp 底物的细胞内浓度^[28], 在 TBD 提取物的 9 个代表性苯丙素类成分中, 在维拉帕米等 P-gp 抑制剂参与条件下, 二氢咖啡酸摄取量明显增加, 证实了二氢咖啡酸的吸收受到 P-gp 的外排作用, 降低了成分的吸收。

本实验探索了不同时间、浓度和抑制剂对咖啡酸、二氢咖啡酸、3-羟基肉桂酸、隐绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C、新绿原酸、绿原酸和原儿茶酸吸收和转运的影响。结果发现 9 种苯丙素类成分主要为被动转运, 可能受到酶的水解、复方成分存在复杂的相互作用等原因在中浓度下发生转运方式改变, 需要进一步深入研究。本实验通过 Caco-2 细胞模型吸收试验, 初步阐明了 TBD 中 9 种主要苯丙素类成分的细胞吸收机制及其影响因素, 为其临床应用和口服制剂的研究开发提供了细胞水平的参考。

REFERENCES

[1] 巴音额古乐, 苏毕力格图. 蒙药二味杜仲汤对骨代谢疾病

及骨折愈合研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26(2): 58-59.

[2] 中国药典. 一部[S]. 2020: 172-173.

[3] LUO X M, SU M F, CHANG X Y, et al. Qualitative and quantitative analysis of main chemical constituents in *Eucommia ulmoides* by LC-MS[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2019, 21(8): 1029-1040.

[4] LIU C, GUO F F, XIAO J P, et al. Research advances in chemical constituents and pharmacological activities of different parts of *Eucommia ulmoides*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(3): 497-512.

[5] 原中华人民共和国卫生部药品标准(蒙药分册)[S]. 1998: 51.

[6] LI N, DONG X, MA F, et al. Pharmacokinetics study of 16 active ingredients from Tabson-2 decoction in normal and d-galactose induced osteoporosis rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2020, 43(18): 3702-3713.

[7] WANG J Q, GAO J P, YANG N, et al. Chemical constituents from inflorescence of *Echinops latifolius* tausch II [J]. Central South Pharm(中南药学), 2018, 16(12): 1713-1716.

[8] XUE P F, BOLATI-MAKABILI, YANG L, et al. Study on chemical constituents from inflorescence of *Echinops latifolius*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(19): 3921-3926.

[9] 赵军. 蒙药蓝刺头抗骨质疏松研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(9): 43-45.

[10] YANG F, DONG X, MA F X, et al. The interventional effects of tubson-2 decoction on ovariectomized rats as determined by a combination of network pharmacology and metabolomics[J]. Front Pharmacol, 2020(11): 581991.

[11] 杨帆, 张秀艳, 董馨, 等. 二味杜仲汤对 D-半乳糖诱导骨质疏松大鼠的影响[J]. 中成药, 2022, 44(4): 1291-1294.

[12] HE S, LIN M X, JIANG Y N, et al. Intestinal absorption model of component of Chinese medicinal: Its research progress and reflection[J]. Acta Chin Med Pharm(中医学报), 2018, 46(3): 121-124.

[13] ZHOU B H, LI K Y, JIANG S, et al. Transport mechanism of punicalagin based on human intestinal Caco-2 cells[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2019, 21(3): 316-322.

[14] 韦梦洁, 马莹慧, 刘媛媛, 等. 组分配伍对“甘草附子汤”中皂苷组分吸收转运影响的研究[C]. 中国化学会质谱分析专业委员会. 第三届全国质谱分析学术报告会摘要集-分会场 4: 质谱在医药研究中的应用, 2017: 1

[15] OUYANG Y. Absorption mechanism of baicalin solid lipid nanoparticles on Caco-2 cell model[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2020.

[16] 米晓, 张建霞, 王艳艳. 黄酮及生物碱类成分体外吸收转运机制研究进展[J]. 哈尔滨医药, 2020, 40(5): 486-489.

[17] XU Q, OU Y Y, WU H F. Absorption mechanism of baicalin and its solid lipid nanoparticles on Caco-2 cells[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2019, 54(12): 1000-1006.

[18] XIE Y L, LAI X P, YI Z B. Research progress of Mongolian medicine *Echinops latifolius* tausch[J]. Asia Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2019, 15(12): 22-24.

[19] MU W B, CHEN Q H, DUAN C C, et al. Advances in research

- on active ingredients and pharmacokinetics of *Eucommia ulmoides* oliv[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药
学), 2019, 36(20): 2598-2604.
- [20] ZHANG W X, ZHANG H, WENG W F. Toosendaninl Enhances cisplatin-induced apoptosis in lung cancer through downregulating the expression of ATF2[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药
学), 2018, 35(4): 547-551.
- [21] NICKLIN P L, IRWIN W J, HASSAN I F, et al. The transport of acidic amino acids and their analogues across monolayers of human intestinal absorptive(Caco-2) cells *in vitro*[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1269(2): 176-186.
- [22] WEN J H, SUN W X, CHENG X H, et al. Effect of clarithromycin on tacrolimus transport in Caco-2 cells and its mechanism[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药
学), 2022, 39(3): 329-333.
- [23] MENG J, SU R, LIAO Y, et al. Absorption mechanism of rhynchophylline in the Caco-2 cell model[J]. J Tradit Chin Med Anhui Univ(安徽中医药大学), 2020, 39(5): 60-65.
- [24] CHEN H, QIN X L, XIA T, et al. Study on absorption activity of five components of *Polygonum orientale* L. Flower in Caco-2 cell monolayer[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学
通报), 2018, 34(6): 764-769.
- [25] 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.
- [26] WANG A P, ZHOU P, ZHANG T, et al. Characterization of the intestinal absorption of albiflorin from Kunfukang tablets in Caco-2 cell monolayer model[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药
学), 2022, 39(1): 20-26.
- [27] TIAN L, GUO S, HE Y, et al. Study on the transport characteristics of apigenin in Caco-2 cells[J]. J Med Xinjiang Univ(新疆医科大学学报), 2019, 42(09): 1189-1192, 1197.
- [28] YANG S T, PAN J, LU Y, et al. Absorptive characteristic of *Bletilla striata* extract in Caco-2 cell monolayer[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(01): 167-174.
- 收稿日期: 2022-09-09
(本文责编: 沈倩)