

Caco-2 细胞单层模型中水飞蓟宾吸收机制研究

胡林¹, 童焕¹, 丁茹¹, 王湛博², 尤淋君², 杨劲^{1*}(中国药科大学¹药物代谢动力学研究中心, 南京 210009; ²新药安全评价研究中心, 南京 211198)

摘要 通过建立 Caco-2 细胞单层模型考察了不同浓度水平的水飞蓟宾和水飞蓟宾葡甲胺的双向跨膜通透性并研究其吸收机制。开发 HBSS 缓冲液中水飞蓟宾、普萘洛尔和阿替洛尔的 LC/MS/MS 检测方法, 检测实验样品的浓度, 并计算表观渗透系数(P_{app})。当 Caco-2 细胞培养到第 21 天时, 对所建立的 Caco-2 细胞模型进行验证: 跨膜电阻值(TEER) 大于 $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 荧光黄的 P_{app} 远远小于 $1 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$, 阳性对照药阿替洛尔和普萘洛尔的 P_{app} 与文献中报道的相近, 表明 Caco-2 细胞单层模型建立成功。3 个浓度水平的水飞蓟宾(5, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$) $P_{app(\text{AP-BL})}$ 均大于 $2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 证明水飞蓟宾的通透性良好。 $P_{app(\text{BL-AP})}$ 与 $P_{app(\text{AP-BL})}$ 的比值大于 2, 说明在水飞蓟宾吸收过程中有外排转运体的参与。水飞蓟宾葡甲胺的 P_{app} 与水飞蓟宾的基本一致, 成盐对于水飞蓟宾的跨膜通透性没有改变。结果表明, 水飞蓟宾为跨膜通透性良好药物, 其溶解度低, 在生物药剂学分类系统(BCS)分类上为 II 类。水飞蓟宾在胃肠道中的释放是其吸收过程的重要影响因素。

关键词 水飞蓟宾; 水飞蓟宾葡甲胺; 跨膜渗透性; Caco-2 细胞单层模型

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2018)02-0202-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180210

引用本文 胡林, 童焕, 丁茹, 等. Caco-2 细胞单层模型中水飞蓟宾吸收机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(2):202-208.

Cite this article as: HU Lin, TONG Huan, DING Ru, et al. Absorption mechanism of silybin in human intestinal Caco-2 cells[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(2):202-208.

Absorption mechanism of silybin in human intestinal Caco-2 cells

HU Lin¹, TONG Huan¹, DING Ru¹, WANG Zhanbo², YOU Linjun², YANG Jin^{1*}¹Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;²Center for New Drug Safety and Evaluation and Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract The aim of this paper was to investigate the absorption mechanism of silybin (SLB) in Caco-2 cells. Concentrations of samples in the study were determined by developing LC/MS/MS method of SLB, propranolol and atenolol in HBSS buffer to calculate apparent permeability coefficient (P_{app}). When Caco-2 cells were cultured to the 21st day, the TEER were above $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$. The P_{app} of Lucifer yellow was far less than $1 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$. As the positive control drugs, The P_{app} of atenolol and propranolol were similar to those reported in the literature, indicating that the Caco-2 monolayer model was successfully established in this experiment. The $P_{app(\text{AP-BL})}$ of SLB at 5, 20, and 50 $\mu\text{g/mL}$ were all more than $2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, which showed that SLB was a moderately permeable drug. The efflux ratio was greater than 2 indicating the efflux transporter may be involved in the absorption process of SLB. The P_{app} of silybin-*N*-meglumine was similar to that of SLB, suggesting that salt formation did not alter the membrane permeability of SLB. In conclusion, the membrane permeability of SLB is good, and its solubility is low. SLB is a BCS class 2 drug. The release of SLB in the gastrointestinal tract is an important factor in its absorption process.

Key words silybin; silybin-*N*-meglumine; permeability; Caco-2 monolayer

水飞蓟素是菊科植物水飞蓟(*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)干燥果实的活性提取物。水飞

蓟宾(silybin)是水飞蓟素的黄酮木质素类化合物的主要活性成分^[1], 水飞蓟宾葡甲胺为水飞蓟宾

的成盐衍生物,结构见图1。水飞蓟宾是公认的具有保肝作用的药物,在国内临床上应用于急慢性肝炎、脂肪肝的肝功能异常的恢复。目前国内市售的制剂有水飞蓟宾胶囊和水飞蓟宾葡甲胺片,其中胶囊剂是水飞蓟宾和卵磷脂复合物^[2]。水飞蓟宾具有低水溶性和低脂溶性的物理特性,原料药口服生物利用度低^[3]。通过在比格犬体内比较市售的水飞蓟宾胶囊和水飞蓟宾葡甲胺片、水飞蓟宾原料药羧甲基纤维素钠(CMC-Na)混悬液的绝对生物利用度(bioavailability, BA)发现,水飞蓟宾原料药的绝对BA小于5%,胶囊剂和成盐片剂的绝对BA相比于原料药有很大的提高,但两者提高BA的程度有较大差异(结果另文发表)。目前仅有少数文献有部分水飞蓟宾的吸收机制的相关报道。水飞蓟宾的胃肠道吸收分数为20%~47%^[4],在大鼠单向肠灌注试验中发现水飞蓟宾在小肠吸收良好^[5-6],水飞蓟宾的表观渗透系数($P_{app(AP-BL)}$)约为 $3 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ^[7],跨膜通透性低。这些研究结果不全面、不系统、机制不明确,且结论彼此矛盾。已证实药物在Caco-2单层细胞的渗透性与药物在人体中胃肠道吸收有良好的相关性,它是预测药物在人体吸收的金标准^[8-9]。因此,本实验采用Caco-2单层细胞模型研究不同浓度的水飞蓟宾和水飞蓟宾葡甲胺的双向跨膜转运通透性,为进一步改良水飞蓟宾的剂型,增加生物利用度,并减少生物利用度的变异提供理论基础。

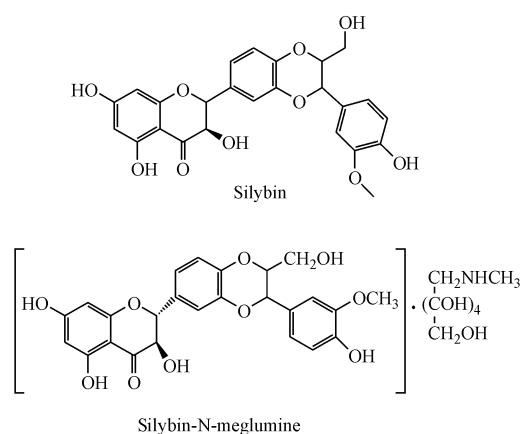


Figure 1 Structure of silybin and silybin-N-meglumine

1 材料

1.1 药品和细胞株

水飞蓟宾原料药(纯度:98%,南京泽郎医药

科技有限公司);水飞蓟宾葡甲胺原料药(纯度:83.45%,南京宸翔医药研究有限责任公司);氯唑沙宗对照品(纯度:99.99%,批号:100364-201302,中国食品药品检定研究院);荧光黄[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];盐酸普萘洛尔(纯度:99.00%)、阿替洛尔(纯度:99.00%)购于Biochemistry公司;Caco-2细胞株购于中国科学院上海生命科学院细胞库,实验中所用的代数在20~45代之间。

1.2 试剂和材料

DMEM培养基(含4.0 mmol/L谷氨酰胺,4500 mg/L葡萄糖)、胎牛血清(以色列Biological Industries公司);青链霉素(美国Hyclone公司);0.25%胰蛋白酶、非必需氨基酸(美国Gibco公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国Merck公司);甲酸(色谱纯,美国ROE Scientific公司);其他试剂均为分析纯;Millicell悬挂式培养小室(材料:聚酯膜,孔径:1.0 μm ,膜面积:0.3 cm^2 ;美国Millipore公司);培养皿、24孔细胞培养板(上海圣纳堡生物科技有限公司)。

1.3 仪器

LC/MS/MS液质联用仪(4000 Q-Trap质谱仪,美国AB公司;Agilent 1290超高效液相仪,美国Agilent公司);跨膜电阻仪(Millicell[®]-ERS-2,美国Millipore公司);恒温振荡仪(浙江卓恒公司);生物安全柜和CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);细胞计数仪(美国Nexcelom Bioscience公司);多功能酶标仪(美国Perkin Elmer公司)。

2 方法

2.1 HBSS缓冲液中水飞蓟宾的检测

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Kinetex XB-C₁₈(2.1 \times 50 mm, 2.6 μm , Phenomenex公司);流速:0.3 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样盘温度:6 $^{\circ}\text{C}$;进样体积10 μL ;洗针液:甲醇-水(1:1);流动相:纯水(含0.1%甲酸, A相);乙腈(B相);梯度洗脱:0~0.5 min, 20% B;0.5~1 min, 20~65% B;1~2.4 min, 65% B;2.4~2.5 min, 65%~90% B;2.5~3.4 min, 90% B;3.4~3.5 min, 90%~20% B;3.5~4.5 min, 20% B。

2.1.2 质谱方法 离子采集方式为多反应监测模式(MRM)。总时间4.5 min,切入质谱时间为1.2 min,切出质谱时间为2.8 min。气路参数:CUR:25

psi (1 psi = 6 894.8 Pa); IS: -4 500 V; TEM: 500 °C; GS1: 50 psi; GS2: 50 psi。化合物参数: 水飞蓟宾: 定量离子对 481.2/300.8; DP: -100 V; CE: -28 V; CXP: -15 V; EP: -10 V。氯唑沙宗(内标): 定量离子对 168.1/131.7; DP: -65 V; CE: -27.6 V; CXP: -6 V; EP: -10 V。

2.1.3 水飞蓟宾标准曲线和质控样品的制备 精密称取 2 份水飞蓟宾 10.20 mg 于 10 mL 量瓶中, 用乙腈定容到刻度线, 即得 1 mg/mL 的母液。其中一份稀释为标准曲线工作液: 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20, 30 µg/mL。另一份稀释为质控样品工作液: 0.04, 1.6, 8, 24 µg/mL。分别精密移取标曲工作液和质控工作液 10 µL, 加细胞温孵过空白 HBSS 缓冲液 190 µL, 涡旋混匀, 即得模拟标准曲线样品 (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1 000, 1 500 ng/mL) 和质控样品 (2, 80, 400, 1 200 ng/mL)。

2.1.4 前处理方法 移液枪移取样品 30 µL 加氯唑沙宗乙腈溶液(内标, 54 ng/mL) 10 µL, 混匀后, 加乙腈(析出缓冲盐) 270 µL 涡旋混匀, 12 000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 取上清液 75 µL 与超纯水 75 µL 混匀进样。

2.2 HBSS 缓冲液中阿替洛尔和普萘洛尔的检测

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Poroshell 120 EC-C₁₈ (3.0 mm × 50 mm, 2.7 µm); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样盘温度: 6 °C; 进样体积 5 µL; 洗针液: 甲醇-水(1:1); 流动相: 纯水(含 0.1% 甲酸, A 相); 乙腈(B 相); 梯度洗脱: 0 ~ 0.6 min, 10% B; 0.6 ~ 0.8 min, 10% ~ 65% B; 0.8 ~ 2.4 min, 65% B; 2.4 ~ 2.5 min, 65% ~ 90% B; 2.5 ~ 3.1 min, 90% B; 3.1 ~ 3.2 min, 90% ~ 10% B; 3.2 ~ 4.5 min, 10% B。

2.2.2 质谱方法 气路参数: CUR: 28 psi; IS: 4 500 V; TEM: 400 °C; GS1: 10 psi; GS2: 10 psi。化合物参数: 阿替洛尔: 定量离子对 267.6/145.3; DP: 60 V; CE: 40 V; CXP: 13 V; EP: 15 V。普萘洛尔: 定量离子对 260.6/116.4; DP: 47 V; CE: 25 V; CXP: 10 V; EP: 10 V。奥美拉唑(内标): 定量离子对 346.7/198.3; DP: 35 V; CE: 15 V; CXP: 10 V; EP: 10 V。总时间 4.5 min, 切入质谱时间为 0.5 min, 切出质谱时间为 2.5 min。

2.2.3 普萘洛尔和阿替洛尔的标准曲线和质控样品的制备 精密称取阿替洛尔 10.00 mg、盐酸普萘洛尔 11.45 mg, 分别放置于 10 mL 量瓶中, 用甲

醇定容到刻度线, 即得 1 mg/mL 的母液。分别精密移取阿替洛尔母液(1 mg/mL) 和普萘洛尔母液(1 mg/mL) 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容到刻度线即得 100 µg/mL 的混合母液。使用混合母液依次稀释标准曲线工作液: 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10 µg/mL。按上述操作制备另一份混合母液依次稀释为质控样品工作液: 0.1, 0.8, 8 µg/mL。分别精密移取标曲工作液和质控工作液 10 µL, 加细胞温孵过空白 HBSS 缓冲液 190 µL, 涡旋混匀, 即得模拟标准曲线样品和质控样品。

2.3 荧光黄的检测

精密称取荧光黄 15.65 mg 于 100 mL 量瓶中, 使用 HBSS 缓冲液定容至刻度, 即得 300 µmol/L 荧光黄溶液。用 HBSS 逐级稀释 300 µmol/L 荧光黄为 5, 10, 50, 100, 500, 1 000 nmol/L 标曲工作溶液, 采用多功能酶标仪, 激发波长 466 nm, 发射波长 522 nm 测量标准曲线和样品的荧光强度。

2.4 Caco-2 细胞模型的建立和评价

小室中的接种与培养: 取状态良好的复苏第 4 代之后的细胞, 用细胞计数仪计数, 并调整细胞密度至每毫升 1.0×10^5 个, 接种 24 h 后更换培养液, 第 1 周隔天换液, 1 周后每天换液, 培养 21 d。细胞单层完整性的形成: 将 Caco-2 细胞按上述接种密度接种到直径为 35 mm 的培养皿, 在接种后第 1, 3, 7, 12, 21 天使用倒置显微镜拍照。细胞单层致密性的形成: 使用 Millicell®-ERS 跨膜电阻仪测定 Caco-2 细胞接种到小室后的第 1, 3, 7, 12, 21 天的电阻值。检测细胞单层的渗透性: 测定 300 µmol/L 荧光黄 AP-BL 侧的通透性。

2.5 给药组和阳性对照组的转运实验

2.5.1 药物的配制

给药组: 分别精密称取水飞蓟宾 102.04 mg 和水飞蓟宾葡甲胺 119.83 mg 于 10 mL 量瓶中, 用 DMSO 溶液定容至刻度线即得 10 mg/mL 的母液。分别将给药组母液用 HBSS 缓冲液稀释成: 水飞蓟宾 HBSS (5, 20, 50 µg/mL); 水飞蓟宾葡甲胺 HBSS (28 µg/mL, 体系中的 DMSO 含量最终不超过 0.5%)。

阳性对照组: 分别精密称取盐酸普萘洛尔 148.00 mg 和阿替洛尔 133.20 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容到刻度线即得 50 mmol/L 的母液, 转运实验时取上述母液 50 µL 于 50 mL 量瓶中, 用

HBSS 缓冲液分别稀释 1 000 倍即得所需实验浓度的普萘洛尔 (50 $\mu\text{mol/L}$) 和阿替洛尔 (50 $\mu\text{mol/L}$) 的 HBSS 溶液。

2.5.2 最大药物浓度和溶剂对单层电阻值的影响

细胞在小室中培养 21 d 后,分别在给予 50 $\mu\text{g/mL}$ 水飞蓟宾的 1 h 和 2 h 测定 Caco-2 细胞单层的电阻值。给药 2 h 后将给药孔两侧更换为细胞培养液,在更换培养基后 24 h 再次测定给药孔的电阻。

2.5.3 正式转运实验 小室中细胞培养 21 d 后,选取电阻合格的孔室进行正式的转运实验。取出细胞板后倒掉小室两侧的培养基,用 HBSS 清洗 3 次,第 3 次在培养箱中孵 30 min。对 AP 侧到 BL 侧的转运:AP 侧加含药的 HBSS 缓冲液 200 μL ,作为给药侧,BL 侧加入空白 HBSS 缓冲液 1 000 μL ,作为接收侧;对于 BL 侧到 AP 侧的转运:BL 侧加入含药的 HBSS 缓冲液 1 000 μL ,作为给药侧,AP 侧加入空白 HBSS 缓冲液 200 μL ,作为接收侧。给药后将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡仪孵育,分别于 30、60、90 和 120 min 在接受侧收取溶液 100 μL ,取样后同时加入空白预热的 HBSS 液 100 μL 。试验结束后收集两侧溶液,计算回收率。

2.6 数据的计算与处理

2.6.1 表观通透系数 (P_{app}) 的计算

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ/dt}{A \times C_0} \quad (1)$$

dQ/dt 为单位时间内药物通过 Caco-2 细胞单层的转运量,以药物的累积转运量 (Q) 对取样时间 (t) 作图后,该直线的斜率为 dQ/dt ; A 为小室的膜面积,0.3 cm^2 ; C_0 为给药测药物的初始浓度。

2.6.2 药物外排率的计算

$$\text{ER} = P_{\text{app(B-A)}} / P_{\text{app(A-B)}} \quad (2)$$

若药物的 ER 大于 2,说明药物的吸收过程可能有外排转运体参与。

2.6.3 回收率的计算^[10]

$$\text{回收率}(\%) = (M_{r-120} + M_{d-120}) / M_{d-0} \times 100 \quad (3)$$

计算公式中 M_{r-120} 是接受侧 120 min 时药物的累积转运量,包括取出样品中的药物量, M_{d-120} 给药侧剩余药量, M_{d-0} 实验开始时给药侧的总药量。

2.6.4 统计分析 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

采用两独立样本的双侧 t 检验对两组数据进行统计分析,采用单因素方差分析对多组数据进行统计学分析。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 表明差异有显著性意义。

3 结果

3.1 水飞蓟宾 HBSS 缓冲液中方法学验证

特异性:在本试验的 LC-MS/MS 条件下,水飞蓟宾的出峰时间为 1.80 min,内标氯喹沙宗的出峰时间为 1.83 min。空白样本、水飞蓟宾以及内标的特异性色谱图见图 2。

残留效应:在高浓度样本 ULOQ 进样分析后,接着分析空白样本,本方法未观察到残留效应。

标准曲线和定量下限:按“2.1.3”和“2.1.4”步骤处理标准曲线样品并同时制备空白样本及含内标的空白样本,进行 LC-MS/MS 分析。以待测物峰面积 A_s 和内标峰面积 A_i 的比值 ($f = A_s/A_i$),对待测物浓度 c 作权重回归计算,选 $1/c^2$ 为权重因子得出标准曲线方程,水飞蓟宾: $y = 0.0125x + 0.00629$, $r = 0.9966$ ($n = 8$)。表明水飞蓟宾在 1 ~ 1 500 ng/mL 内线性关系良好。水飞蓟宾 LLOQ 为 1 ng/mL,准确度为 83.7% ~ 118.0%,RSD 为 13.8%。

稀释效应:考察了超限样品稀释 5, 20, 50 倍,其中 RSD 在 2.7 ~ 5.7% 之间,RE 在 -5.1% ~ -9%。

准确度和精密度:按“2.2.3”和“2.2.4”步骤处理质控样品,2 d 完成 3 个分析批,批间和批内的 RE 在 -5.6% ~ 2.9%,批间和批内 RSD 在 4.1% ~ 14.5%。

水飞蓟宾在 HBSS 缓冲液中的稳定性:准确度在 $\pm 15\%$,RSD 均小于 15%。各项结果均符合要求 FDA 生物样本分析方法学验证的要求^[11],表明此检测方法稳定可靠。

3.2 Caco-2 细胞单层的生长过程

倒置显微镜下观察到的 Caco-2 细胞单层从接种到小室中的第 1 天到第 21 天的生长过程见图 3。到第 21 天时,Caco-2 细胞基本无间隙,形成紧密连接。

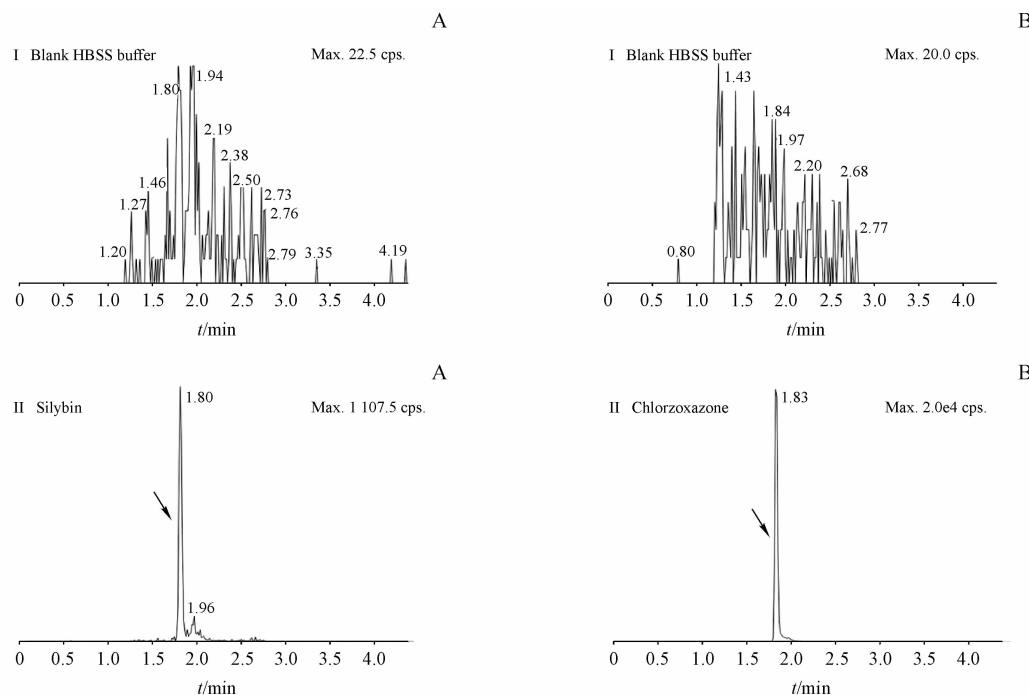


Figure 2 Representative MRM chromatograms of (A) silybin and (B) chlorzoxazone (IS) for (I) blank HBSS buffer and (II) blank sample spiked with silybin, chlorzoxazone. Arrows indicate retention time of silybin and IS

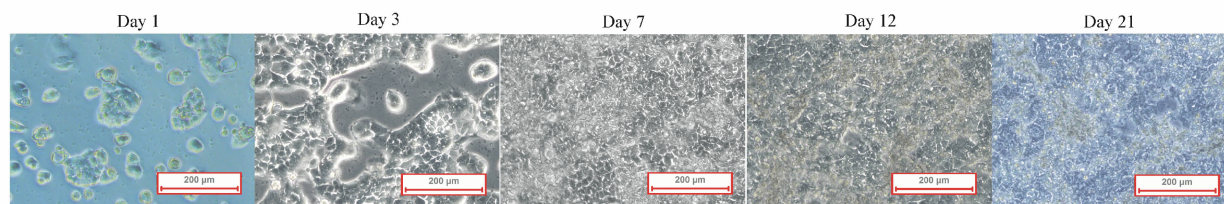


Figure 3 Growth process of Caco-2 cell monolayer model after seeding (×100)

3.3 Caco-2 细胞单层形成过程中跨膜电阻值变化

Caco-2 细胞接种到小室后,从第 1 周到第 2 周 TEER 随着接种的时间逐渐增大,直到第 3 周时 TEER 增长极其缓慢,几乎达到饱和,不再增长。到第 21 天时 TEER 已超过 $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。TEER 值易受多种因素的影响,一般 Caco-2 细胞培养到 15~21 d 时,达到一个稳定值,不同的实验环境会得到不同的 TEER,有的低至 $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$,有的高至 $900 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。结合本实验中 TEER 已达稳定的趋势以及荧光黄的 P_{app} 呈现低渗透性的特点,表明本实验中 Caco-2 细胞单层模型的致密性良好^[12]。

3.4 荧光黄、阿替洛尔和普萘洛尔细胞单层的渗透性结果

Caco-2 细胞在小室中培养 21 d 后,荧光黄 ($300 \mu\text{mol/L}$)、阿替洛尔 ($50 \mu\text{mol/L}$)、普萘洛尔

($50 \mu\text{mol/L}$) 的细胞单层渗透性结果见表 2。荧光黄的 P_{app} 在 $5.83 \sim 7.03 \times 10^{-10} \text{ cm/s}$ 之间,远远小于 $1 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$,表明此孔的紧密连接合格^[7]。文献中报道的阿替洛尔 P_{app} 约为 $2.01 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$,普萘洛尔 P_{app} 约为 $4.19 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ ^[8,13],本研究所得的阿替洛尔的 P_{app} 远远低于普萘洛尔,并且两者的 P_{app} 与文献中报道相接近。结果表明本实验成功建立了 Caco-2 细胞单层模型。

Table 1 Change of TEER value during Caco-2 cell monolayer formation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Time of cultivation/d	TEER/($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
1	11.5 ± 3.12
3	25.3 ± 1.25
7	168.1 ± 3.30
12	335.4 ± 4.25
21	366.4 ± 7.67

TEER: Transepithelial electrical resistance

Table 2 P_{app} value of lucifer yellow and positive control drugs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	Direction: AP-BL	
	P_{app}	$\bar{x} \pm s$
Propranolol(50 $\mu\text{mol/L}$)	15.12×10^{-6}	$(13.85 \pm 1.53) \times 10^{-6}$
	14.28×10^{-6}	
	12.16×10^{-6}	
Atenolol(50 $\mu\text{mol/L}$)	0.79×10^{-6}	$(0.77 \pm 0.04) \times 10^{-6}$
	0.73×10^{-6}	
	0.81×10^{-6}	
Lucifer yellow(300 $\mu\text{mol/L}$)	5.88×10^{-10}	$(6.25 \pm 0.68) \times 10^{-10}$
	5.83×10^{-10}	
	7.03×10^{-10}	

AP: Apical; BL: Basal

3.5 水飞蓟素的最高浓度和溶剂对单层电阻值的影响

在 Caco-2 细胞单层的 AP 侧给予 50 $\mu\text{g/mL}$ 水飞蓟素后,使用跨膜电阻仪检测细胞单层的电阻值变化,见表 3。TEER 变化很小,表明实验过程中细胞单层的完整性不受影响。

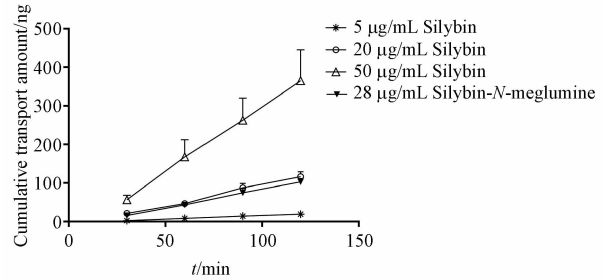
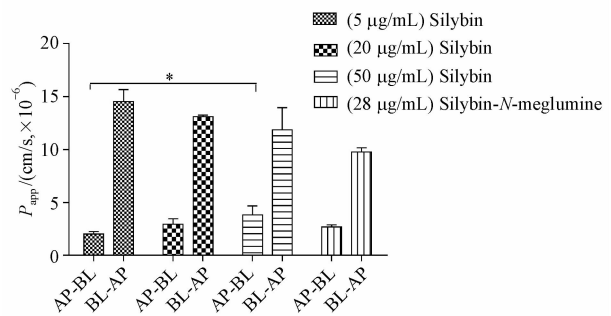
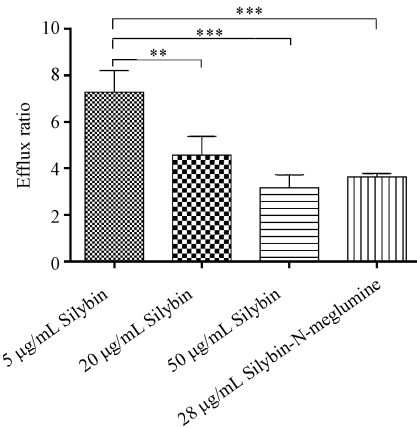
Table 3 TEER of Caco-2 monolayer was observed after adding 50 $\mu\text{g/mL}$ silybin in apical side ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

The time after silybin added to apical side/h	TEER/ $(\Omega \cdot \text{cm}^2)$
0	366.4 ± 7.67
1	358.2 ± 5.74
2	333.6 ± 3.24
24	354.7 ± 3.15

3.6 水飞蓟素双向转运结果

同一浓度水平的药物,随着时间的增加,药物的累积转运量呈线性增加;同一时间点,随着浓度的增加,药物的累积转运量也增加,见图 4,说明药物的转运量具有时间($r > 0.99$)和浓度的相关性。低、中、高 3 个浓度水平的水飞蓟素和中浓度的水飞蓟素葡甲胺 $P_{app(\text{AP-BL})}$ 平均值分别为 $2.01 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $2.93 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $3.81 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $2.70 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, $P_{app(\text{BL-AP})}$ 平均值分别为 $14.52 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $13.09 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $11.86 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $9.77 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (图 5)。由 $P_{app(\text{AP-BL})}$ 大于 $2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$,可判断水飞蓟素有良好的通透性^[14],水飞蓟素溶解度低,在 BSC 系统中为 II 类药物。结果显示 ER 远远大于 2(图 6),表明水飞蓟素的吸收过程中可能有外排转运体的参与。低浓度组的 $P_{app(\text{AP-BL})}$ 与高浓度组的存在显著性差异($P < 0.05$),随着水飞蓟素浓度的增加 ER 值有减少的趋势,可能是由于药物高浓度时外排转运体被饱和,这一现象与文献

中报道的水飞蓟素为 P-gp 底物,可抑制 P-gp 活性的结论相一致^[15]。此外中浓度的水飞蓟素和水飞蓟素葡甲胺的 P_{app} 相近,表明水飞蓟素成盐对于跨膜通透性没有改变。

**Figure 4** Relationship between cumulative transport amount and time of silybin and silybin-N-meglumine (AP-BL)**Figure 5** P_{app} values of silybin and silybin-N-meglumine ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
* $P < 0.05$ **Figure 6** Efflux ratio of silybin and silybin-N-meglumine ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.7 Caco-2 细胞转运回收率的计算

在 Caco-2 细胞转运实验的最后一个时间点同时取给药测和接受测的样品,检测给药初始浓度和给药测浓度,由表 4 可知平均回收率在 80% ~ 94% 之间,说明细胞单层对药物的吸附和溶剂的蒸发基本对实验结果无影响,实验中得到的 P_{app} 是准确的^[9]。

Table 4 Recovery of in transport in Caco-2 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group	Direction	$c/(\mu\text{g/mL})$	$M_{d-120}/(\text{ng})$	$M_{r-120}/(\text{ng})$	$M_{d-0}/(\text{ng})$	Recovery/%
Silybin	AP-BL	5	843 ± 32	19 ± 3	1 020 ± 14	85 ± 3
		20	2 928 ± 236	117 ± 13	3812 ± 7	80 ± 6
		50	8 597 ± 1 480	365 ± 81	10 700 ± 11	84 ± 13
Silybin- <i>N</i> -meglumine	BL-AP	28	2 590 ± 139	103 ± 9	3 342 ± 6	81 ± 4
Silybin		5	4 480 ± 160	144 ± 12	5 100 ± 69	91 ± 3
		20	16 880 ± 216	475 ± 7	19 060 ± 37	91 ± 1
		50	44 733 ± 2 380	1 062 ± 153	53 500 ± 57	86 ± 4
Silybin- <i>N</i> -meglumine		28	15 340 ± 1 588	372 ± 16	16 710 ± 30	94 ± 9

M_{d-120} : Residue of silybin at 120 min on the administration side; M_{r-120} : Cumulative transport amount of silybin at 120 min in receiving side; M_{d0} : Total amount of silybin at the beginning

4 讨论

本实验在 Caco-2 模型中初步考察了水飞蓟宾吸收机制,为改良已有的上市剂型,增加生物利用度,并同时减少变异提供理论依据。水飞蓟宾双向转运实验表明水飞蓟宾的跨膜通透性良好,可判断水飞蓟宾在 BSC 系统中为 II 类药物,水飞蓟宾在胃肠道中的释放是其吸收过程的重要影响因素,增加水飞蓟宾的溶解度和溶出速率,可提高其口服生物利用度。市售的水飞蓟宾卵磷脂复合物的胶囊剂和水飞蓟宾成盐片剂在比格犬体内生物利用度实验的结果表明胶囊剂和成盐片剂的绝对生物利用度相比于原料药均有极大的提高,这与本实验的结果相一致。为进一步明确胶囊剂与成盐片剂提高口服生物利用度的程度不同的原因,还需通过体外溶出实验考察药物磷脂复合物的形成、成盐、晶型、减小粒径对药物释放的影响。此外, Caco-2 细胞模型在研究由转运体参与和细胞旁介导的吸收时有其局限性^[16],在本实验中发现可能有外排转运体参与水飞蓟宾的吸收,因此除了 Caco-2 细胞模型外还需使用其他方法来进一步研究水飞蓟宾的吸收机制。

参考文献

- [1] Bijak, M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*silybum marianum* l. gaernt.)-chemistry, bioavailability, and metabolism [J]. *Molecules*, 2017, **22**(11):1942.
- [2] Chu Y, Li W, Han JP, et al. Study on pharmacokinetics of silibinin capsule in Chinese healthy volunteers [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2009, **25**(12):1669–1672.
- [3] Javed S, Kohli K, Ali M. Reassessing bioavailability of silymarin [J]. *Altern Med Rev*, 2011, **16**(3):239–249.
- [4] Xu D, Ni R, Sun W, et al. *In vivo* absorption comparison of nano-technology based silybin A tablets with its water-soluble derivative [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, **41**(4):552–559.
- [5] Yang QX, Ma FJ, Zhang LL, et al. Absorption characteristics of silybin-phospholipid complex by rat intestine [J]. *Acad J Second Military Med Univ*, 2009, **30**(11):1288–1291.
- [6] Luan LB, Zhan N. The absorption characteristics of silybinin small intestine of rat [J]. *Acta Pharm Sin*, 2006, **41**(2):138–141.
- [7] Wang Y, Zhang D, Liu Z, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of silybin A nanosuspensions for oral and intravenous delivery [J]. *Nanotechnology*, 2010, **21**(15):155–168.
- [8] Smetanová L, Štětinová V, Svoboda Z, et al. Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver [J]. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2011, **54**(1):3–8.
- [9] Wuys B, Riethorst D, Brouwers J, et al. Evaluation of fasted state human intestinal fluid as apical solvent system in the Caco-2 absorption model and comparison with FaSSIF [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015 (67):126–135.
- [10] Waterbeemd H, Lennernäs H, Artursson P. *Drug Bioavailability* (药物生物利用度) [M]. Beijing: Beijing Chemical Industry Press, 2007:82.
- [11] FDA. Guidance for industry bioanalytical method validation [S]. 2013:1–11.
- [12] Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems [J]. *Jala J Lab Autom*, 2015, **20**(2):107–126.
- [13] Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture I: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells [J]. *J Pharm Sci-US*, 1990, **79**(6):476–482.
- [14] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, **46**(1/2/3):27–43.
- [15] Tan ZR, Zhou YX, Liu J, et al. The influence of ABCB1 polymorphism C3435T on the pharmacokinetics of silybinin [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2015, **40**(6):685–688.
- [16] Krishna R, Yu L. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development* (生物药剂学在药物研发中的应用) [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2012:36.