

Caco-2 细胞模型结合单向肠灌注法探究去氢骆驼蓬碱衍生物 H-2-168 的肠吸收特性

徐勤伟¹,滕亮²,陈蓓²,马芹³,李金新¹,黄雨杰¹,高惠静^{2*}

(1 新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011; 2 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室/新疆医科大学第一附属医院药学部,乌鲁木齐 830054; 3 新疆华世丹药业股份有限公司,乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**结合 Caco-2 细胞模型和在体单向肠灌注法考察去氢骆驼蓬碱衍生物 H-2-168 的肠吸收特性。**方法:**建立 Caco-2 细胞单层模型及大鼠在体单向肠灌注模型,采用高效液相色谱法测定细胞渗透液及肠灌注液中 H-2-168 的浓度,考察 H-2-168 在 Caco-2 细胞模型不同影响因素下表观渗透系数(P_{app})的变化及在大鼠在体单向肠灌注模型不同影响因素(肠段、浓度、pH 及 P-糖蛋白抑制剂)下的吸收速率常数(K_a)和 P_{app} 的变化。**结果:**在 Caco-2 细胞模型中,中、高浓度 H-2-168 的 P_{app} 均显著高于低浓度($P < 0.05$),但高浓度 P_{app} 略低于中浓度,呈高浓度饱和现象;H-2-168 在大鼠全肠段均有吸收,随药物浓度增加 K_a 和 P_{app} 呈明显下降趋势($P < 0.05$);pH 7.4 时 K_a 和 P_{app} 明显高于 pH 5.4 时;加入 P-糖蛋白抑制剂前后,吸收参数无显著变化($P > 0.05$)。**结论:**H-2-168 为吸收良好的药物,其吸收机制可能涉及主动转运或促进扩散,不是 P-糖蛋白的底物。

[关键词] 去氢骆驼蓬碱衍生物;Caco-2 细胞模型;在体单向肠灌注;肠吸收

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2025)17-1845-07

Investigation on the intestinal absorption characters of harmine derivative H-2-168 using Caco-2 cells and single-pass intestinal perfusion

XU Qin-wei¹, TENG Liang², CHEN Bei², MA Qin³, LI Jin-xin¹, HUANG Yu-jie¹, GAO Hui-jing^{2*}

(1 College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2 State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia Fund, Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3 Xinjiang Huashidan Pharmaceutical Co., Ltd., Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the intestinal absorption characteristics of harmine derivative H-2-168 using Caco-2 cells model and *in situ* single-pass intestinal perfusion method. **Methods:** The Caco-2 cell monolayer model and *in situ* single pass intestinal perfusion model of rat were established. The concentrations of H-2-168 in cell permeation fluid and intestinal perfusion fluid were determined by HPLC. The changes of apparent permeability coefficient (P_{app}) of H-2-168 in Caco-2 cell model and those of absorption rate constant (K_a) and P_{app} in *in situ* single pass intestinal perfusion model of rat under different influence factors (intestinal segment, concentration, pH and P-glycoprotein inhibitor) were investigated. **Results:** In Caco-2 cell model, P_{app} values at medium and high concentrations of H-2-168 were significantly higher than that at low concentration ($P < 0.05$), but P_{app} at high concentration was slightly lower than that at medium concentration, showing a high concentration saturation

[基金项目] 中华国际医学交流会基金会-中华医学会临床药学会 2023 年度临床药学科研基金资助项目(Z-2021-46-2101-2023);新疆维吾尔自治区重点研发资助项目(2022B03013-4);“天山英才”医药卫生高层次人才培训计划资助项目(TSYC202401B058);新疆维吾尔自治区药学会科研基金资助项目(YXH202406);兵团科技攻关计划资助项目(2023AB009-04)

[作者简介] 徐勤伟,男,硕士研究生,主要从事新药研发研究。E-mail: 2721859484@qq.com。

[通讯作者] *高惠静,女,副主任药师,硕士生导师,主要从事中药/天然药物新药发现与药理毒理研究。E-mail: gaohuijing1380@163.com。

[DOI] 10.20251/j.cnki.1003-3734.2025.17.009

phenomenon. H-2-168 was absorbed in the whole intestine of rats, with K_a and P_{app} decreased significantly with the increase of drug concentration ($P < 0.05$). K_a and P_{app} at pH 7.4 were significantly higher than those at pH 5.4. There were no significant changes in the absorption parameters before and after the addition of P-glycoprotein inhibitor ($P > 0.05$). **Conclusion:** H-2-168 is a well-absorbed drug, and its absorption mechanism may involve active transport or facilitated diffusion, and it is not a substrate of P-glycoprotein.

[Key words] harmine derivative; Caco-2 cell model; in situ single-pass intestinal perfusion; intestinal absorption

去氢骆驼蓬碱(harmin, HM)为蒺藜科骆驼蓬属植物骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)中主要的生物碱^[1],具有抗肿瘤、改善阿尔茨海默病、杀虫、抗炎等多种药理作用^[2]。新疆为包虫病高发区,因此课题组多年来聚焦于抗包虫病新药研究。据文献报道, HM具有良好的抗包虫作用且前期课题组研究也已证实这一结论^[3],然而其明显的神经毒性限制了临床转化应用^[4]。因此,为减毒增效,课题组以HM母核为先导化合物对其进行结构修饰获得多种衍生物,前期通过体内外药效及安全性筛选,从众多衍生物中筛选出了高效低毒的候选化合物-衍生物H-2-168,分子式为 $C_{18}N_3H_{15}$ ^[5]。

药物吸收研究是新药开发和评价的首要环节,直接影响药物生物利用度及口服制剂的开发^[6],因此有必要对H-2-168的吸收特性进行考察。在体单向肠灌注法因保留了肠道神经及内分泌系统的完整性和血液及淋巴液的供应,成为体内法广泛应用的模型^[7-8]。体外法目前常采用细胞模型法,其中Caco-2细胞因具有与小肠上皮细胞相同的细胞特性且可以表达各种蛋白载体和酶,成为目前最成熟且应用最多的体外吸收模型^[9-10]。因此,本文采用Caco-2细胞模型和大鼠在体单向肠灌注模型综合评价H-2-168的肠吸收特性,为其进一步研究开发提供生物药剂学依据。

材料与方法

1 仪器

3543IR型CO₂培养箱(美国Thermo公司);超净工作台(美国Airtech公司);MR23i型高速冷冻离心机(法国Joua公司);Millicell-ERS型跨膜电阻仪(美国Millipore公司);Benchmark plus型酶标仪(美国Bio-RAD公司);BP211D型电子天平(德国赛多利斯公司);LC-20AD型高效液相色谱仪(日本岛津公司);BT100-1L-A型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

2 药品与试剂

H-2-168(新疆华世丹药业股份有限公司提供,批号:180815,纯度 $\geq 98\%$);替硝唑(timidazole, TNZ)对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100336-201704,纯度 $\geq 98\%$);MEM/EBSS培养基(批号:AF29584106)、胰蛋白酶(批号:J190002)、非必需氨基酸(批号:AF29585030)、青链霉素(批号:J190007)、胎牛血清(批号:RB35949)、D-hank's液(批号:20150504)均购自美国Hyclone公司;噻唑蓝(MTT,批号:H8130,北京索莱宝科技有限公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号:D2650,美国Sigma公司);盐酸维拉帕米(verapamil, Ver)对照品(批号:823A024,纯度 $\geq 98\%$)和环孢素A(cyclosporine A, CsA)对照品(批号:045K403,纯度 $\geq 98\%$)均购自中国药品生物制品检定所;氯化钠(批号:20120926)、氯化钾(批号:20191212)、氯化钙(批号:20220721)、磷酸二氢钠(批号:20230110)、碳酸氢钠(批号:20240426)、氯化镁(批号:20190618)均购自国药集团化学试剂有限公司;葡萄糖(批号:20200414,天津市鑫铂特化工有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水。

3 细胞株

人结肠腺癌Caco-2细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司(Procell Life Science & Technology Co., Ltd),批号:CL-0050。

4 实验动物

SPF级SD大鼠,54只,雌雄各半,体质量(200 \pm 20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号:SCXK(湘)2020-0006。本动物实验经新疆医科大学第一附属医院动物实验医学伦理委员会批准,批准编号:20220309-175。

5 溶液的配制

5.1 对照品溶液的配制 精密称取H-2-168对照品10.00 mg,置10 mL棕色量瓶中,加甲醇适量溶解,定容至刻度,摇匀配制成1.00 mg \cdot mL⁻¹的储备

液,4℃冷藏备用。

5.2 内标溶液的配制 精密称取 TNZ 对照品 20.40 mg,置于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀后,得质量浓度为 $2.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNZ 储备液,4℃冷藏备用。

6 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-SP C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇-0.1% 甲酸水 (30:70);进样量 10 μL ;流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 35℃;检测波长 302 nm。

7 样品处理

分别精密移取 H-2-168 细胞渗透液或肠灌流液 100 μL ,加入 TNZ 内标溶液 20 μL ,加入 80 μL 乙腈,涡旋,于 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min (4℃),取上清液进样分析。

8 Caco-2 细胞模型摄取与转运实验

8.1 细胞培养及单层模型的建立^[11] Caco-2 细胞接种于 25 cm^2 的细胞培养瓶中,加入 5 mL 的 MEM/EBSS 培养基,含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 青链霉素,于 CO_2 恒温培养箱中培养,隔 3 d 换 1 次液。细胞以 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种在 Transwell 板中,肠腔侧 (apical, AP) 加 0.5 mL 细胞悬液,基底侧 (basolateral, BL) 加入 1.0 mL 培养液。将 Transwell 板放在 37℃、5% CO_2 培养箱中,每 2 d 更换培养基 1 次,每 3 d 采用细胞电阻仪测定单层细胞跨上皮细胞电阻 (TEER),TEER > 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 的膜用于转运实验^[12]。

8.2 H-2-168 对 Caco-2 细胞活性的影响 Caco-2 细胞以 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔板,每孔体积为 200 μL ,培养 3 d 后更换培养基。细胞分为空白组、阴性对照组和实验组。空白组不加细胞仅加培养基;阴性对照组加入细胞、培养基和 DMSO (终体积分数 1%);实验组加入不同浓度梯度的 H-2-168 药液,使终浓度分别为 7.81,15.63,31.25,62.50,125.00,250.00,500.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每浓度设置 5 个平行复孔。孔板置于培养箱中孵育 4 h,避光每孔加入 20 μL 的 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 试液,再孵育 4 h,除去细胞上清液。每孔加入 150 μL DMSO,振荡摇匀 15 min,用酶标仪在 490 nm 波长处测定每孔吸光度 (A)。计算细胞存活率,存活率 > 90% 药物浓度用于下一步实验。细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

8.3 给药时间及浓度对 H-2-168 摄取的影响 取符合条件的细胞单层,D-Hank's 液洗涤 3 次后置于培养箱中孵育 30 min,吸弃废液。用 D-hank's 液配制低、中、高浓度 (62.50,125.00,250.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的药液。分别取 0.5 mL 加入细胞 AP 侧,细胞 BL 侧加入 D-hank's 液 1.0 mL,置于培养箱中孵育,分别于 15,30,45,60,90,120 min 从 BL 侧取样,同时立即向 BL 侧补加 D-hank's 液 100 μL ;测定药物浓度,计算药物累计转运量 Q (μg),见公式 1。绘制 $Q-t$ 曲线,计算各给药浓度下药物 P_{app} ,见公式 2。式中 C_i 为第 i 个时间点测得的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), dQ/dt 为单位时间药物转运量 ($\mu\text{g} \cdot \text{sec}^{-1}$), A 为 Transwell 板接种细胞的表面积 (1.12 cm^2), C_0 为 AP 侧中加入药物的初始浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

$$Q = 0.1 \times (C_1 + C_2 + C_3 + \dots + C_{i-1}) + 1 \times C_i \quad \text{公式(1)}$$

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{C_0 A} \quad \text{公式(2)}$$

8.4 双向转运实验 AP-BL 转运实验:同“8.3”项下;BL-AP 转运实验:BL 侧加入 34.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ H-2-168 药液 1.0 mL,AP 侧加入 D-hank's 液 0.5 mL,与上述同样时间点从 AP 侧取样 100 μL 。处理后测定,计算外排比 (efflux ratio, ER),见公式 3。其中 $P_{\text{app(BL-AP)}}$ 和 $P_{\text{app(AP-BL)}}$ 分别为药物从 BL 侧 \rightarrow AP 侧、AP 侧 \rightarrow BL 侧转运的表现渗透系数。

$$\text{ER} = \frac{P_{\text{app(BL-AP)}}}{P_{\text{app(AP-BL)}}} \quad \text{公式(3)}$$

8.5 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 抑制剂 Ver 和环孢素对 H-2-168 转运的影响 取符合条件的细胞单层,AP 侧加入 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ver 或 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CsA 置于培养箱中孵育 30 min 后,小心吸去 P-gp 抑制剂,然后用 D-hank's 液荡洗细胞 3 次,AP 侧加入 34.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,BL 侧加入 1.0 mL D-hank's 液,不同时间取样后测定,分别计算 Ver 和 CsA 作用后 H-2-168 的 $P_{\text{inhibitor(A-B)}}$,见公式 4。

$$R_{\text{inhibitor(A-B)}} = \frac{P_{\text{app(AP-BL)inhibitor}}}{P_{\text{app(AP-BL)control}}} \quad \text{公式(4)}$$

9 H-2-168 大鼠在体单向肠灌流实验

9.1 溶液的配制 Krebs-Ringer's (K-R) 溶液:称取 NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、 CaCl_2 0.37 g、 NaH_2PO_4 0.32 g、 NaHCO_3 1.37 g、 MgCl_2 0.02 g、葡萄糖 1.4 g,用超纯水溶解。其中需将 CaCl_2 单独充分溶解后加入,避免产生沉淀。溶解后用定容至 1 L,用稀盐酸调节

pH 至 7.4, 即得。

空白肠灌液:用 37 °C 生理盐水将肠内容物冲洗干净后,用不含药物的 K-R 液迅速充盈肠段,以 0.2 mL·min⁻¹ 的速度连续泵入肠段,在出口处收集流出液,作为空白肠灌液。

H-2-168 灌液的制备:称取 H-2-168 适量,先加入 0.5 mL 吐温 80(10%)溶解,后用 K-R 液稀释定容至 100 mL,配制成浓度分别为 20, 40, 80 μg·mL⁻¹ 的肠灌液。

9.2 不同肠段对 H-2-168 吸收的影响 取禁食过夜的大鼠(自由饮水),采用异氟烷麻醉。按照王丽峰等^[13]方法分离出十二指肠、回肠、盲肠、结肠。用预热至 37 °C 的生理盐水将肠内容物冲洗干净, K-R 溶液灌流 15 min,再用 40 μg·mL⁻¹ 的含药灌液(预热 37 °C)先以 0.5 mL·min⁻¹ 的流速灌流 10 min,再将流速调为约 0.2 mL·min⁻¹,平衡 30 min 后,每隔 15 min 迅速更换 1 次已知质量的供试液小瓶和收集液小瓶,直至 120 min,称质量,计算灌入和收集的供试液质量。实验结束后,剪下被考察肠段,测量其长度(L)和横截面半径(r)。吸取灌液,按“7”项下方法处理后进样测定。按公式(5)和(6)计算药物 K_a 和 P_{app}。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{V_{out}}{V_{in}}\right) \cdot \frac{Q_{in}}{\pi r^2 L} \quad \text{公式(5)}$$

$$P_{app} = \frac{-Q_{in}}{2\pi r L} \cdot \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{V_{out}}{V_{in}}\right) \quad \text{公式(6)}$$

式中 V_{in} 和 V_{out} 分别为灌入和收集的供试液体积; C_{in} 和 C_{out} 分别为进口和出口处灌液中的药物质量浓度; L 和 r 分别为被考察肠段长度和半径; t 为灌流时间; Q_{in} 为灌流速度。

9.3 不同浓度对 H-2-168 吸收的影响 选择十二指肠作为目标肠段,分别采用低(20 μg·mL⁻¹)、中(40 μg·mL⁻¹)、高(80 μg·mL⁻¹)浓度的肠灌液对十二指肠进行灌流,考察不同浓度对 H-2-168 吸收参数的影响。

9.4 不同 pH 对 H-2-168 吸收的影响 采用 40 μg·mL⁻¹ 浓度 H-2-168 肠灌液对十二指肠进行灌流,每组 6 只大鼠。考察不同 pH 值(5.4, 6.4, 7.4)对药物吸收的影响。

9.5 不同 P-gp 抑制剂对 H-2-168 吸收的影响 采用含有 P-gp 抑制剂(Ver/CsA)和不含 P-gp 抑制剂的中浓度 H-2-168 肠灌液对大鼠十二指肠进行灌流,比较 P-gp 抑制剂加入前后 H-2-168 的吸收情况。

10 数据处理

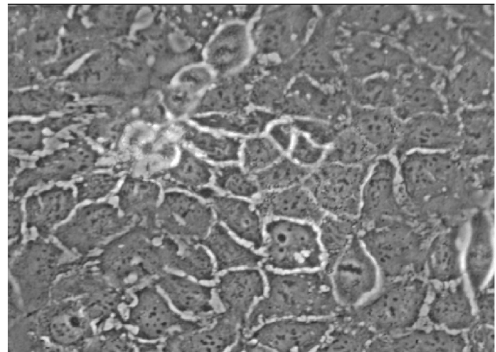
采用 SPSS 21.0 统计软件分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均值比较采用方差分析(analysis of variance, ANOVA)法,组间两两比较采用双侧 Student t-test,以 P < 0.05 表示有显著性差异。

结 果

1 Caco-2 细胞模型摄取与转运实验

1.1 Caco-2 细胞单层模型评价 连续培养 20 d 时于倒置显微镜下观察,可见细胞排列紧密、细胞间无间隙,形成了良好的紧密连接,见图 1A。观察培养电阻值变化,随着培养天数的增加,TEER 值不断增加。当培养至 d 20, TEER 值 > 600 Ω·cm², 见图 1B, 表明形成了紧密连接的单层膜,可用于后续转运实验。

A 显微镜下细胞形态图(×400)



B 培养不同时间电阻值

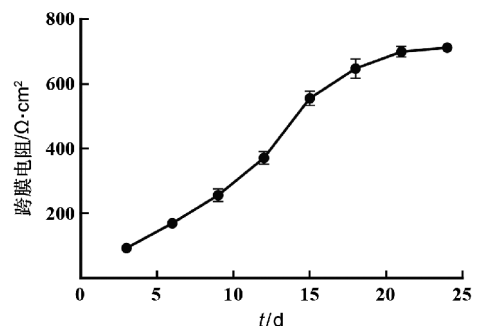


图 1 Caco-2 细胞形态

1.2 H-2-168 对 Caco-2 细胞活性的影响 实验结果见图 2。在浓度范围 7.81 ~ 500.00 μmol·L⁻¹ 范围内时,细胞存活率均在 90% ~ 110% 范围内,表明 H-2-168 浓度在此范围内不会对细胞产生明显抑制或促进作用,因此可用该浓度范围进行后续转运实验。

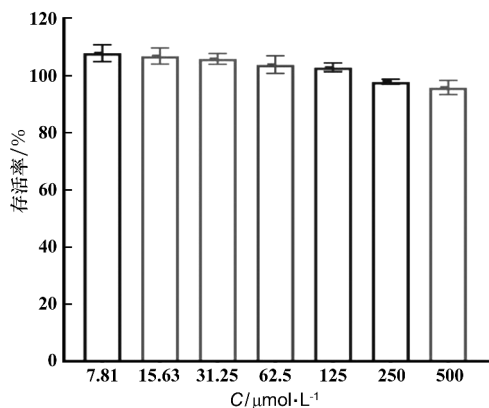


图2 不同浓度 H-2-168 对 Caco-2 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

1.3 时间及浓度对 H-2-168 转运的影响 分别给予低 ($62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、中 ($125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、高 ($250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度的 H-2-168 细胞渗透液, 考察其不同取样点的累计透过量 (Q) 及不同浓度下的 P_{app} , 结果见图 3 和图 4。结果显示, 随着时间增加, 药物 Q 逐渐增加, 但 Q 增加幅度降低。低浓度 P_{app} 明显低于中、高浓度 ($P < 0.05$), 但高浓度时 P_{app} 出现下降, 推测原因可能为吸收饱和现象。提示 H-2-168 吸收可能有主动转运或促进扩散等转运机制参与。

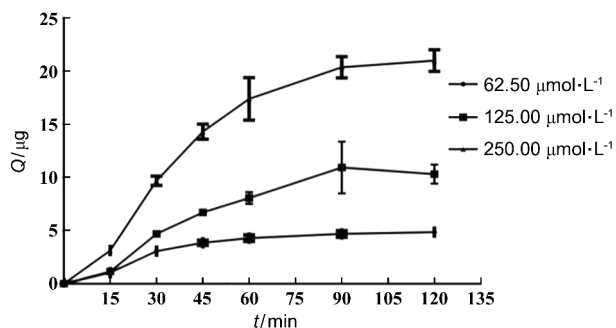


图3 不同浓度下 H-2-168 的 $Q-t$ 图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

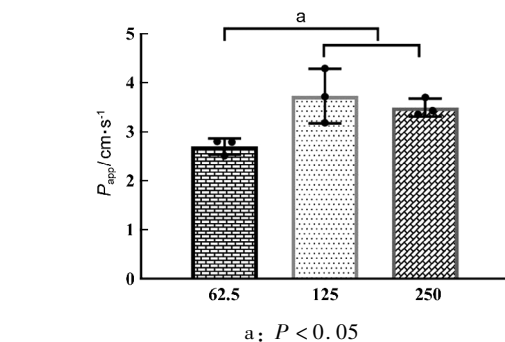
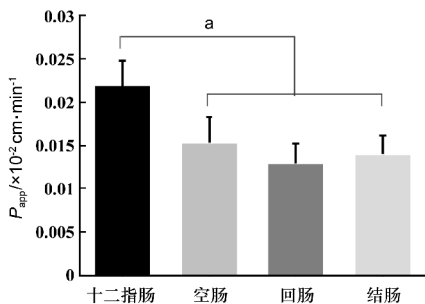


图4 不同浓度 H-2-168 在 Caco-2 细胞的 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

1.4 双向转运实验 H-2-168 在 BL-AP 方向的 P_{app} 为 $(4.51 \pm 0.18) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, AP-BL 方向的 P_{app} $(3.51 \pm 0.29) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, ER = 1.13。ER < 2, 表明在所考察浓度范围内 H-2-168 转运不具有外排现象, 推测其可能不是 P-gp 底物^[14]。

1.5 P-gp 抑制剂对 H-2-168 转运的影响 由表 1 结果可看出, 加入 Ver 和 CsA 后, H-2-168 P_{app} 均减小, 但与不加抑制剂无显著性差异 ($P > 0.05$), 因此推测 H-2-168 可能不是 P-gp 的底物。

表1 H-2-168, H-2-168 + Ver, H-2-168 + CsA 的 AP-BL 转运 P_{app} 结果

药物	$P_{app} / \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$
H-2-168	3.73 ± 0.55
H-2-168 + Ver	3.03 ± 0.14
H-2-168 + CsA	3.38 ± 0.17

2 大鼠在体单向肠灌注实验

2.1 不同肠段对 H-2-168 吸收的影响 用 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肠灌注液灌注 2 h 后各肠段的 P_{app} 及 K_a 值结果见图 5。结果显示, H-2-168 在各个肠段均有吸收, 且十二指肠段的 K_a 和 P_{app} 显著高于空肠、回肠和结肠 ($P < 0.05$), 提示十二指肠可能为 H-2-168 的主要吸收部位。

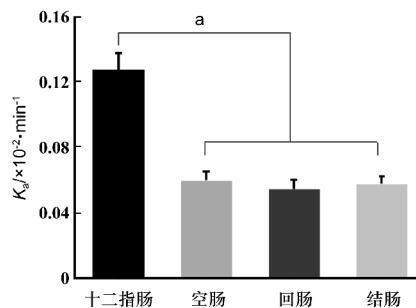


图5 H-2-168 在不同肠段的 P_{app} 和 K_a 值 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

a: $P < 0.05$

2.2 不同浓度对 H-2-168 吸收的影响 不同浓度的 H-2-168 肠灌流液灌流十二指肠 2 h 后结果见表 2。结果显示,低浓度吸收参数显著高于中、高浓度 ($P < 0.05$),表明药物浓度影响 H-2-168 在十二指肠的吸收,吸收具有高浓度饱和现象,提示 H-2-168 的吸收过程可能涉及主动转运或促进扩散。

表 2 不同浓度的 H-2-168 在十二指肠的吸收参数

$\bar{x} \pm s, n = 6$		
浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$P_{\text{app}} / \times 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$	$K_a / \times 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$
20	$4.14 \pm 0.54^{\text{ab}}$	$15.86 \pm 0.58^{\text{ab}}$
40	$2.70 \pm 0.36^{\text{b}}$	$13.75 \pm 0.77^{\text{b}}$
80	2.02 ± 0.14	11.98 ± 0.46

与中浓度比, a: $P < 0.05$; 与高浓度比, b: $P < 0.05$

2.3 不同 pH 对 H-2-168 吸收的影响 采用不同 pH 的 H-2-168 肠灌流液在对十二指肠进行灌流 2 h 后结果见图 6。结果显示,当灌流液 pH 值升高时, H-2-168 在十二指肠的 K_a 和 P_{app} 值均显著增高 ($P < 0.05$),提示 H-2-168 在偏碱性条件下吸收较好。

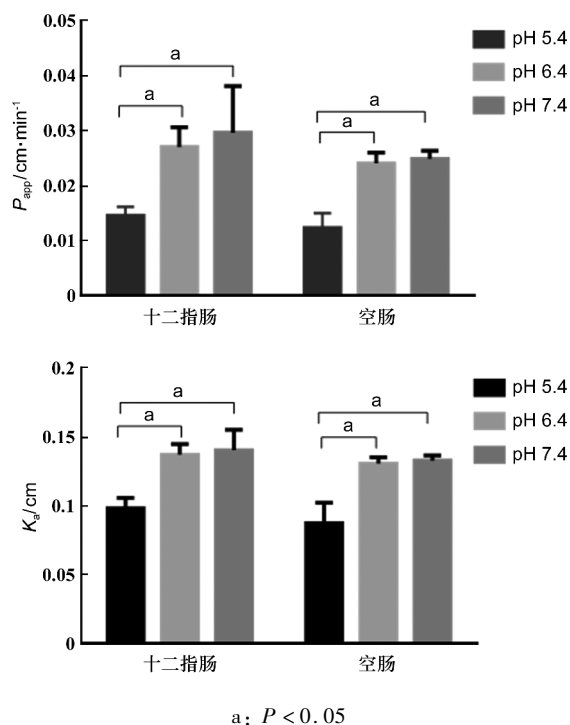


图 6 H-2-168 在不同 pH 下的吸收参数值

2.4 不同 P-gp 抑制剂对 H-2-168 吸收的影响 P-gp 抑制剂加入前后对 H-2-168 吸收参数的影响结

果见图 7。含抑制剂的 H-2-168 组与不含抑制剂组比较,差异无统计学 ($P > 0.05$),表明 H-2-168 可能不是 P-gp 的底物。

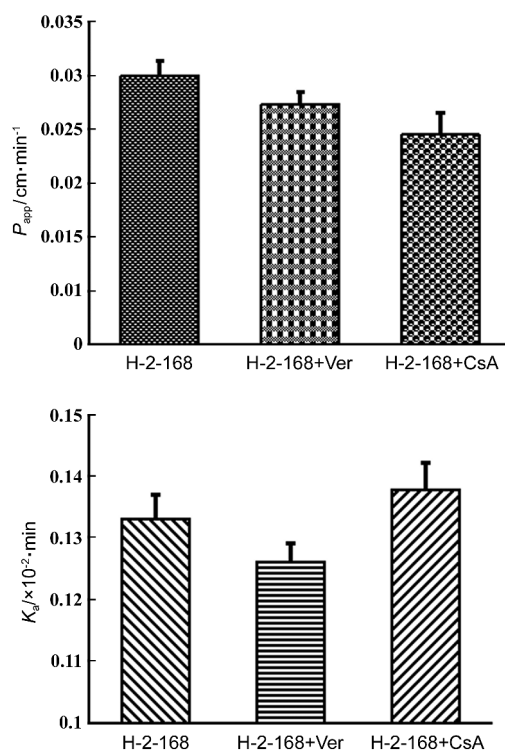


图 7 P-gp 抑制剂对 H-2-168 吸收参数的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

讨论

药物的吸收特性是决定药物生物利用度及影响药物疗效的关键,对药物在体内的吸收的研究有助于对药物进行结构修饰、选择合适的剂型及处方等^[15]。本研究建立 Caco-2 单层细胞模型和大鼠在体单向肠灌流模型,结合体外和在体法综合评价 H-2-168 的肠吸收特性。

大鼠在体单向肠灌流结果显示, H-2-168 在小肠全肠段均有吸收且十二指肠的吸收速率常数明显大于其他肠段,这可能与十二指肠具有丰富的毛细血管网利于药物吸收有关。研究认为,当药物的 $P_{\text{app}} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 表明化合物吸收差,而当 $P_{\text{app}} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 则表明化合物吸收良好^[16]。在本实验 2 种模型中, H-2-168 的 P_{app} 均 $> 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 表明 H-2-168 属于吸收良好的药物。前期研究显示盐酸 H-2-168 溶解度差,约为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 根据生物药剂学分类系统,属于初步判定盐酸 H-2-168 为

低溶解度/高渗透性药物。

大鼠在体单向肠灌流结果显示,随着药物浓度的增加, K_a 和 P_{app} 不断递减,呈现高浓度抑制现象,Caco-2细胞模型实验中高浓度 P_{app} 低于中、低浓度,也证实了H-2-168的吸收具有高浓度饱和现象,因此推测H-2-168的吸收机制可能为主动吸收或促进扩散。大鼠在体单向肠灌流实验还显示,随pH值的增大吸收参数不断增大,原因可能为H-2-168的 pK_a 为7.4左右(课题组前期实验测的结果),当溶液的pH值接近其 pK_a 值时,H-2-168主要以分子形式存在,易于药物的吸收。

P-gp是肠道内主要的外排转运蛋白,能够将底物从肠上皮细胞主动泵出细胞外,影响药物吸收,降低生物利用度。本研究结果测得H-2-168的ER为1.13,根据美国FDA指导原则,当ER接近于1时可认为该药物不是P-gp的底物;当 $ER > 2$ 时,则可认为该药物是P-gp的底物^[17],H-2-168的ER接近1,提示H-2-168不是P-gp的底物,且通过加入抑制剂前后 P_{app} 的变化,进一步证实了168不是P-gp的底物,但H-2-168是否其他外排转运蛋白如多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance related protein 2, MRP2)或乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein,BCRP)等的底物尚待研究。

综上所述,本研究结合Caco-2细胞模型和大鼠在体单向肠灌流模型对H-2-168的肠吸收特性进行了评价,为后续剂型设计及进一步开发提供了重要的实验基础和科学依据。

[参 考 文 献]

[1] 刘永建,刘浩,李华爽,等. 骆驼蓬子生物碱化学成分研究[J]. 中草药,2024,55(3):705-710.
[2] 尹琪楠,陈晓玲,肖洪涛. 去氢骆驼蓬碱药理作用研究现状

[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(6):594-596,600.
[3] 李红玲,赵军,马运芳,等. 去氢骆驼蓬碱抗细胞棘球蚴原头节作用研究[J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(11):995-999.
[4] CHEN B, YAN MZ, GAO HJ, *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacies of novel harmine derivatives in the treatment of cystic echinococcosis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 2441-2454.
[5] 温浩,许兆辉,王建华,等. 去氢骆驼蓬碱衍生物在制备治疗或预防囊型包虫病药物中的应用:CN113181177B[P]. 2023.02.21.
[6] 高秀蓉,蒋学华,杜青青. 基于Caco-2细胞模型研究蝙蝠葛碱的跨膜吸收机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):139-143.
[7] ITALIYA KS, SINGH AK, CHITKARA D, *et al.* Nanoparticulate tablet dosage form of lisofylline-linoleic acid conjugate for type 1 diabetes: *in situ* single-pass intestinal perfusion (SPIP) studies and pharmacokinetics in rat[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2021, 22(3):114.
[8] 于绍华,朱立俏,李传厚,等. 在体单向肠灌流模型研究萝卜苷的肠吸收特性[J]. 中华中医药杂志,2021,36(6):3273-3276.
[9] 罗波,赵建棋,李娇,等. Caco-2细胞模型评价白术对人参皂苷Rg1肠吸收影响[J]. 中药药理与临床,2023,39(5):51-55.
[10] 邓改改,徐嵬,杨秀伟. 禹白芷香豆素成分在人源Caco-2细胞层模型上的吸收转运研究[J]. 中国中药杂志,2021,46(8):2094-2103.
[11] HUANG WY, CHEN S, SUN L, *et al.* Study on the intestinal permeability of lamivudine using Caco-2 cells monolayer and Single-pass intestinal perfusion[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2022, 29(4):2247-2252.
[12] 吴秀稳,赵子阳,宋怡臻,等. 三种角型吡喃香豆素在Caco-2细胞模型中的吸收转运[J]. 中国药理学通报,2023,39(9):1799-1800.
[13] 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.
[14] 费巧玲,王建,侯睿,等. 厚朴水提物在Caco-2细胞模型中的转运特征研究[J]. 中草药,2016,47(13):2313-2318.
[15] MICHELETTO M, GAIO E, TEDESCO E, *et al.* Intestinal absorption study of a granular form of ferric pyrophosphate[J]. *Metabolites*, 2022, 12(5):463.
[16] 刘婉霞,陈瑞,班玉娟,等. 基于在体单向肠灌流法探究刺囊酸的大鼠肠吸收特性[J]. 中国新药杂志,2022,31(10):998-1002.
[17] GRANDVUINET AS, VESTERGAARD HT, RAPIN N, *et al.* Intestinal transporters for endogenous and pharmaceutical organic anions: the challenges of deriving *in-vitro* kinetic parameters for the prediction of clinically relevant drug-drug interactions[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(11):1523-1548.

编辑:毕晓帆/接受日期:2025-01-06