

基于 MDCK 细胞单层模型研究去氢骆驼蓬碱吸收转运特性

高惠静¹, 李玉玲², 滕亮*¹

(1. 新疆医科大学第一附属医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐, 830054; 2. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐, 830011)

摘要: 目的 研究去氢骆驼蓬碱 (harmine, HM) 在马丁达比犬肾上皮 (MDCK) 细胞模型上的吸收转运特性。方法 利用 MTT 法考察去氢骆驼蓬碱对 MDCK 细胞的毒性; 建立 MDCK 细胞单层模型, 通过检测跨膜电阻以确定细胞单层的完整性和致密性; 考察不同方向、浓度、时间及 P-糖蛋白抑制剂 (P-gp) 对 HM 吸收的影响, 采用高效液相色谱仪测定 HM 的含量, 计算累积吸收量 (Q)、表观渗透系数 (P_{app}) 及外排比 (ER)。结果 HM 浓度在 $1.87\sim 7.77\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 MDCK 细胞无明显毒性作用。HM 在 MDCK 细胞模型上累计转运量具有浓度和时间依赖性, 且均大于 $10\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。低、中、高浓度下 HM 的 $P_{app}(\text{BL}\rightarrow\text{AP})$ 显著大于 $P_{app}(\text{AP}\rightarrow\text{BL})$, 外排比均大于 2.0。P-gp 可提高 HM 从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 。结论 HM 属于吸收良好的药物, 其转运机制以被动转运为主兼有主动转运参与, 是 P-gp 的底物可能受到 P-gp 的外排作用。

关键词: 去氢骆驼蓬碱; MDCK; 吸收转运特性

Study on the absorption and transport characteristics of harmine based on monolayer model of MDCK cells

GAO Hui-jing¹, LI Yu-ling², TENG Liang*¹

(1. Pharmacy College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT: Objective: To explore the absorption and transport properties of harmine in the MadinDarby canine kidney (MDCK) monolayer cell model. **Methods:** MTT assay was used to investigate the toxicity of harmine in MDCK cells. The TEER was measured in order to determine the compactness and integrity of the cell monolayer. The effects of direction, drug concentration, time, P-gp inhibitor on the absorption and transport of punicalagin were studied systematically. And then the drug concentration was analyzed by HPLC to calculate the cumulative absorption,

P_{app} and ER. **Results:** When the concentration of harmine was $1.87\sim 7.77\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, there was no toxic effect on MDCK cells. The transport of harmine in MDCK monolayer cell model was time-dependent and concentration-dependent. The P_{app} values of harmine are higher than $10\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. The $P_{app(BL\rightarrow AP)}$ of HM at low, medium, and high concentrations was significantly greater than $P_{app(BL\rightarrow AP)}$, and the ER was more than 2.0. P-gp can increase the P_{app} of HM from the AP side to the BL side. **Conclusion:** Harmine is a good absorbed drug, its transport mechanism is dominated by passive transport along with active transport. Harmine is the substrate of P-gp that may be affected by the efflux of P-gp.

KEY WORDS: Harmine; MDCK; absorption and transport properties

骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)为蒺藜科(*Zygophyllaceae*)骆驼蓬属(*Peganum*)多年生草本植物, 主要分布于我国西北部的新疆、内蒙古、陕西、甘肃、宁夏等干旱地区, 是维吾尔族、哈萨克族和蒙古族等民族沿用已久的民族药物^[1]。骆驼蓬种子和全草中含有 4-7%生物碱, 主要包括主要是去氢骆驼蓬碱(harmine, HM)和骆驼蓬碱(harmaline)^[2]。大量研究证实, 去氢骆驼蓬碱具有抗炎^[3]、抗肿瘤^[4]、杀虫^[5]、骨保护^[6]等广泛的药理作用。

肠吸收实验发现去氢骆驼蓬碱在全小肠段均有较好的吸收^[7], 但具体吸收机制不清楚。目前最广泛使用的体外药物吸收模型是人结肠癌细胞(Caco-2)单层模型和马丁达比犬肾上皮细胞(MDCK)单层模型。MDCK生长快, 形成完整致密的细胞单层仅需1周左右, 远远短于Caco-2的3~4周, 此外MDCK细胞亚型少, 有助于提高结果的重现性^[8]。因此, 本研究采用MDCK细胞模型研究去氢骆驼蓬碱的吸收机制, 并研究浓度、时间、抑制剂对其吸收转运的影响, 为评价体内吸收特性和制剂研发及临床应用奠定科学依据。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 药物与试剂

去氢骆驼蓬碱对照品(HM, 新疆华世丹药业股份有限公司, 批号171022, 纯度 $\geq 98\%$); 替硝唑对照品(TNZ, 中国食品药品检定研究, 批号100336-201704, 纯度 $\geq 98\%$); DMEM高糖培养基、胰蛋白酶、非必需氨基酸、双抗、胎牛血清(均为美国hyclone公司); 噻唑蓝(MTT, 美国Sigma

公司)；二甲基亚砷(DMSO, 美国 Sigma 公司)；环孢素 A、维拉帕米(北京索莱宝公司)；无水甲酸(天津光复精细化工研究所, 批号 20110329)；甲醇、乙腈为色谱纯

1.2 仪器

3543IR CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)；超净工作台(美国 Airtech 公司)；MR23i 高速冷冻离心机(法国 Joua 公司)；Millicell-ERS 跨膜电阻仪(美国 Millipore 公司)；Benchmark plus 酶标仪(美国 Bio-RAD 公司)；电子分析天平(德国赛多利斯)；Transwell 板 3401(美国 Corning 公司)；LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津)

1.3 细胞株

MDCK 细胞株购自中国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, CCTCC)细胞库, 批号: Q2017031。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-SP C₁₈ 柱(4.6×250 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液(40:60)；进样量 20 μL；流速 0.8 mL·min⁻¹；柱温 35 °C；检测波长 325 nm。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取 HM 对照品 10.00 mg 置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇溶解并定容, 摇匀, 得浓度为 1.00 mg·mL⁻¹HM 储备溶液。

精密称取 TNZ 对照品 20.40 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇溶解并定容, 摇匀后, 得质量浓度为 2.04 mg·mL⁻¹的替硝唑储备液。

2.3 细胞毒性试验

将处于对数生长的 MDCK 细胞以 1×10⁵ 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 设置空白组、对照组以及给药组。每孔加入 100 μL 细胞悬液, 置培养箱中孵育 24 h。吸弃原液, 每孔加入 180 μL 培养基, 给药组每孔加入 20 μL 不同浓度梯度的 HM 药液(0.97、1.94、3.89、7.77、15.54、31.09、62.18、124.35 μg·mL⁻¹)，对照组和空白组每孔加入 20 μL 的空白 PBS, 每浓度设置 6 个平行复孔。孔板置于培养箱中孵育 4 h, 每孔加入 20 μL MTT 试液(5 mg·mL⁻¹)，再孵育 4 h, 除去细胞上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡摇匀 15min, 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，选存活率>90%药物浓度用于转运实验。细胞存活率= $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 MDCK 细胞单层模型的建立

将处于对数生长的 MDCK 细胞以 1×10^5 个/mL 接种在 Transwell 板中，腔 (AP) 侧加 0.5 mL 细胞悬液，基底 (BL) 侧加入 1.0 mL 培养液。将 Transwell 板放在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 5-7 天，每天更换培养基并检测电阻值。

2.5 样品的预处理

分别精密移取 HM 细胞渗透液 100 μL ，加入 TNZ 内标溶液 20 μL ，加入 80 μL 乙腈，涡旋，于 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min (4 °C)，取上清液进样分析。

2.6 不同条件下去氢骆驼蓬碱转运实验

2.6.1 给药时间及浓度对 HM 转运的影响

取符合条件的细胞单层，D-Hank's 液荡洗 3 次后置于培养箱中孵育 30 min，吸弃废液。用 D-hank's 液配制浓度分别为 1.87、3.73、7.46 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HM 药液，分别加入 0.5 mL 到 AP 侧，BL 侧加入 1.0 mL D-hank's 液，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 100 μL D-hank's 液；按“2.5”项下处理后测定药物浓度，计算药物累计转运量 Q，绘制 Q-t 曲线，计算各给药浓度下药物 P_{app} 。

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{C_0 A}$$

式中 dQ/dt 为单位时间药物转运量($\mu\text{g}/\text{sec}$)，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($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.6.2 双向转运实验

AP-BL 转运实验: 同“2.6.1”项下；BL-AP 转运实验: BL 侧加入 1.0 mL $3.73 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ HM 药液，AP 侧加入 0.5 mL D-hank's 液，与上述同样时间点从 AP 侧取样 100 μL 。样品按“2.5”项下方法处理后测定，计算外排比 ER。

$$ER = \frac{P_{app(BL-AP)}}{P_{app(AP-BL)}}$$

2.6.3 P-gp 抑制剂 (维拉帕米、环孢素 A) 对 HM 转运的影响

取符合条件的细胞单层，AP 侧加入 100 μM 维拉帕米(Verapamil, Ver)或 20 μM 环孢素 A(Ciclosporin, 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 $3.73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HM 药液，BL 侧加入 1.0 mL D-hank's 液，其余按“2.6.1”项下操作分别计算 Ver 和 CsA 作用后 HM 的 $P_{inhibitor(A-B)}$ 。

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

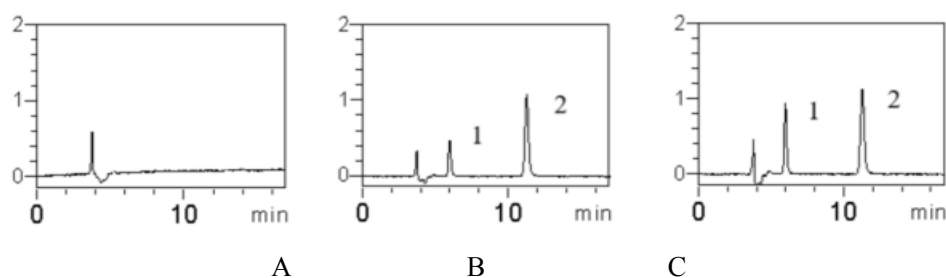
2.6.4 统计分析

每组 P_{app} 数据计算均值和标准差，结果以 Mean±SD 表示，结果用 SPSS 21.0 软件进行方差分析(ANOVA)，当 $P < 0.05$ ，判定结果有显著性差异。组间差异的比较采用 S-N-K 检验。

结果

1、方法学考察

1.1 专属性 空白 D-hank's 液、D-hank's+HM+TNZ、HM 转运样品+HM+TNZ 色谱图见图 1。由结果可知，空白 D-hank's 液不干扰测定。



A. Blank D-hank's; B. D-hank's+HM+TNZ; C. HM sample+HM+TNZ; 1. TNZ 2. HM

Fig1 HPLC diagram of harmine and internal standard

1.2 线性关系考察 配制浓度分别为 8, 4, 1, 0.50, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HM 细胞渗透液，按“2.5”项下的方法处理样品，进样测定，记录峰面积，以 HM 和 TNZ 峰面积之比 Y 对浓度 X 进行线性回归，得标准曲线方程 $Y=2.5674X+0.2562$ ($r=0.9994$)。结果表明，HM 在 $0.03\sim 8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好线性关系，定量限为 $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3 精密度与回收率 配制成低、中、高 3 个质量浓度的细胞渗透液 ($5, 0.50, 0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 各 5 份，1d 内连续进样 5 次，记录峰面积 A，连续测定 5 d，计算日内、日间精密度；另取空白细胞渗透液，加入乙腈 $80 \mu\text{L}$ ，离心处理后，分别加入 HM 标液及内标，配制成低、中、高浓度细胞渗透液，进样分析记录

峰面积 B，计算提取回收率，结果见表 1。实验结果表明方法精密度和回收率良好。

Tab1 Precision, accuracy and recovery rate of HM ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Intra-day			Inter-day			Recovery rate (%)
	Measured ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD (%)	Accuracy (%)	Measured ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD (%)	Accuracy (%)	
0.10	0.09±0.01	9.40	95.55	0.09±0.01	6.33	85.46	96.26±0.03
0.50	0.46±0.04	9.44	92.35	8.23±0.15	1.80	93.66	97.78±0.13
5.00	4.64±0.35	7.59	92.71	53.27±1.48	2.77	97.62	91.52±0.05

1.4 稳定性 配制低、中、高浓度的 HM 细胞渗透液各 5 份，分别考察处理后样品分别室温下放置 12 h、4 °C 下放置 24 h 及冻融后分别取样，按“2.5”项下方法处理各样品，进样分析，记录峰面积并计算 RSD 值，结果见表 2。

Tab 2 Stability of HM ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Stability	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Measured($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD (%)
6 h at room temperature	0.10	0.09±0.01	6.02
	0.50	0.45±0.04	9.38
	5.00	4.62±0.19	4.05
Stability in Auto- sampler,24 h	0.10	0.08±0.01	6.75
	0.50	0.46±0.02	3.80
	5.00	4.75±0.21	4.53
Freeze-thaw 3 times	0.10	0.10±0.01	11.49
	0.50	0.49±0.04	7.94
	5.00	4.92±0.31	6.30

2、MDCK 单层细胞模型评价

2.1 细胞形态 MDCK 细胞在连续培养 5-7 天时于倒置显微镜下观察，细胞排列紧密、细胞间无缝隙，见图 2。

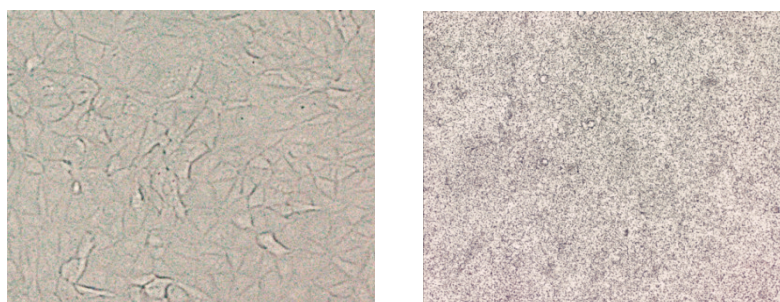


Fig 2 Optical microscope photo of MDCK cells (40×10)

2.2 跨膜电阻 培养 7 天电阻值变化如图 3，随着培养天数的增加，TEER 值不断增加。MDCK 细胞培养的 2~5 天 TEER 值增长速度较快，培养至第 5d，TEER 值大于 $600 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ，表明 MDCK 细胞形成了紧密连接的单层膜。

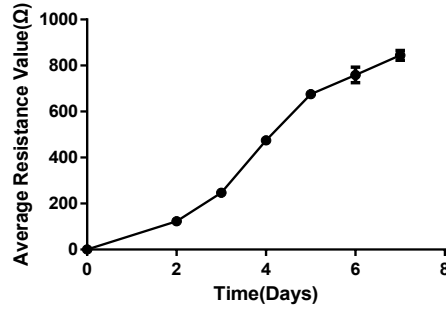


Fig 3 The TEER value of MDCK cell at different time

3、HM 实验浓度的筛选

细胞毒性试验结果如图 4 所示。HM 在 $0.97\sim 7.77 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内，细胞存活率均为 $90\%\sim 110\%$ ，表明 HM 在此范围为细胞安全范围。

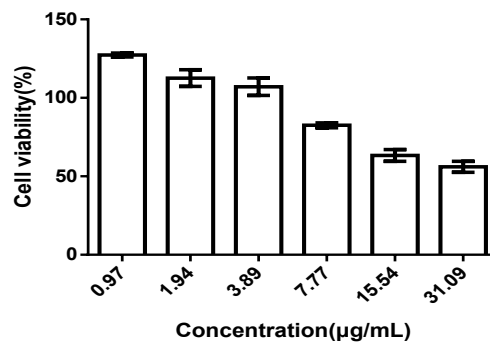


Fig 4 The effects of HM on MDCK cell proliferation

4、HM 在 MDCK 细胞中转运机制的研究

4.1 时间及浓度对 HM 转运的影响 Q-t 图结果见图 5。HM 累积透过量与时间及浓度呈正相关，且未出现饱和现象，表明 HM 转运方式为被动转运为主。

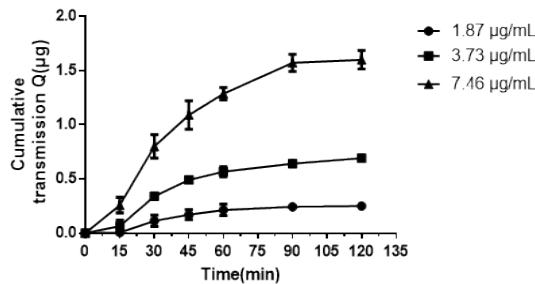


Fig 5 Q-t of different concentration diagram of HM

4.2 双向转运试验 结果见表 3，低、中、高浓度下 HM 的 P_{app} 均大于 $10\times 10^{-6} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ，说明 HM 属于吸收良好的药物。三种浓度下 BL-AP 方向的 P_{app} 显著大于 AP-BL 方向，ER 均大于 2.0，提示可能有载体介导的外排作用存在或主动转运参与。

Table 3 Bi-directional transport of HM in MDCK

Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	P_{app} ($\times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$)		ER
	AP-BL	BL-AP	
1.87	1.97 ± 0.09	4.28 ± 0.23	2.17
3.73	2.02 ± 0.18	5.84 ± 0.54	2.89
7.46	2.31 ± 0.16	6.11 ± 0.59	2.64

4.3 P-gp 抑制剂对 HM 转运的影响 结果见表 4，加入 P-gp 抑制剂后，HM AP→BL 方向 P_{app} 增大，维拉帕米使 P_{app} 增大 1.90 倍，环孢素 A 使 P_{app} 增大 2.05 倍，加入抑制剂后 P-gp 活性被抑制外排作用减弱，HM 吸收增加，表明 HM 是 P-gp 的底物受 P-gp 的外排作用。

Table 4 AP-BL transport of HM, HM+Ver and HM+CsA

Groups	P_{app} ($\times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$)	$R_{inhibitor}$ (AP-BL)
HM	2.10 ± 0.18	--
HM+Ver	3.99 ± 0.26	1.90
HM+CsA	4.29 ± 0.55	2.05

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^[9]。目前国内外研究药物肠吸收的方法主要有在体法、离体法和体内法。相比易受其他复杂因素影响的人体和动物模型，体外细胞模型更易控制，且具有重复性强、便于机制研究等特点^[10]。Caco-2 和 MDCK 细胞是研究药物吸收特性常用的细胞模型，由于 MDCK 细胞生长快、造模时间短，所以本实验选择 MDCK 细胞进行研究。

目前判断药物吸收难易的标准为吸收不良的药物 $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ，中等程度吸收的药物 P_{app} 处于 $1 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ，吸收良好的药物 $> 10 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ^[11]。在本实验中，HM $P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ，说明 HM 属于吸收良好的药物。

不同浓度及时间的转运结果显示，HM 累积吸收量 (Q) 与时间和浓度呈正相关，推测 HM 吸收机制为被动吸收。外排比 ER 被认为是一个评价药物是否是外排底物的指标。根据美国 FDA 指导原则当 $ER > 2$ 时，则可认为该药物是 P-gp 的底物^[12]。双向转运实验结果中不同浓度下 HM 的 ER 均大于 2，结果表明 HM 是 P-gp 的底物，具有主动外排特点。加入 P-gp 抑制剂后，HM 的 P_{app}

(AP-BL) 值明显增大, 表明 P-gp 介导了 HM 的外排。因此推测 HM 以被动扩散和主动转运 2 种方式跨过小肠上皮细胞, 但还需动物实验模型进一步验证。

参考文献

- [1] Zhang L, Teng L, Gong C, *et al* . Simultaneous determination of harmine, harmaline and their metabolites harmol and harmalol in beagle dog plasma by UPLC-ESI-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 85:162-168.
- [2] Wang CH, Cheng XM, Liu ZY, *et al* . Inhibitory effects of Peganum harmala L. seeds extract and its β -carboline alkaloids on the activity of DNA topoisomerase II in vitro [J]. Chin J Clinical Pharmacology, 2008, 24: 422-425.
- [3] 曼则热姆·热杰普, 木塔力甫·艾买提, 伊力亚斯·艾萨, 等. 骆驼蓬多糖调节细胞自噬及巨噬细胞炎症反应的活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(04):938-944
- [4] Ebtesam Nafie, Jade Lolarga, Brandon Lam, *et al* . Harmine inhibits breast cancer cell migration and invasion by inducing the degradation of Twist1[J]. PloS one, 2021, 16(2):e0247652
- [5] 李丽华, 赵军, 马运芳, 等. 去氢骆驼蓬碱和阿苯达唑联合治疗小鼠腹腔细粒棘球蚴病的实验研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, (9):815-820
- [6] Jie Huang, Hao Yin, Shan-Shan Rao, *et al* . Harmine enhances type H vessel formation and prevents bone loss in ovariectomized mice[J]. Theranostics, 2018, 8(9):2435-2446
- [7] 王长虹, 孙殿甲. 盐酸去氢骆驼蓬碱大鼠肠吸收动力学的研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2003, 20(6):474-478
- [8] 周本宏, 张红盼, 郭咸希, 等. 安石榴苷在 MDCK 细胞单层模型上的转运机制研究[J]. 中国药师, 2018, 21(1):1-5
- [9] 曾珍. 姜黄素及其类似物在 Caco-2 细胞模型中的吸收转运机制[J]. 浙江工业大学, 2017
- [10] 冉峥, 郭艳丽, 王丽凤, 等. 黄诺马昔在 MDCK 单层细胞模型上的转运机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15):155-160
- [11] 王彩云, 杜伟宏, 张颖, 等. 鲑鱼降钙素在 Caco- 2 细胞模型中的吸收机制[J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(2):154-156

[12]Grandvuiet A S, Vestergaard H T, Rapin N, *et al.* Intestinal transporters for endogenic and pharmaceutical organic anions: the challenges of deriving in-vitro kinetic parameters for the prediction of clinically relevant drug-drug interactions.[J]. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 2012, 64