

- [10] 徐立, 时乐. 灌服与喂饲次黄嘌呤复制大鼠持续性高尿酸血症模型方法初探[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1671-1673.
- [11] 耿静. 腺嘌呤所致大鼠慢性肾功能衰竭的实验研究[J]. 河南中医学院学报, 2008, 23(6): 24-25.
- [12] Wu XW, Muzny DM, Lee CC, et al. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution[J]. *J Mol Evol*, 1992, 34(1): 78-84.

(责任编辑: 骆欢欢)

体外试验评价甘草对肠黏膜 P-糖蛋白的影响

李秀琼¹, 孙亚彬², 刘思佳³, 张继平⁴

1. 佛山市中医院药剂科, 广东 佛山 528000
2. 南方医科大学南方医院药物临床机构, 广东 广州 510515
3. 南方医科大学南方医院药学部, 广东 广州 510515
4. 南方医科大学附属佛山医院, 广东 佛山 528000

[摘要] 目的: 观察甘草对 P-糖蛋白 (P-gp) 底物经大鼠不同区段肠黏膜透过性的差异, 以评价其对肠黏膜 P-gp 功能的影响。方法: 通过对大鼠口服甘草煎液、生理盐水一周后, 使用体外扩散池 (Ussing Chamber) 技术评价罗丹明 123 (R123) 和荧光素钠 (CF) 经大鼠空肠回肠结肠黏膜的经时吸收方向和分泌方向的透过量和表观渗透系数。R123 和 CF 在接受室的浓度用荧光分光光度计检测。结果: R123 的透过性比较中, 甘草组与生理盐水组组内比较, 差异有统计学意义 ($F=5.602$, $P=0.000$)。CF 的透过性比较中, 甘草组组内比较, 差异有统计学意义 ($F=20.140$, $P=0.000$)。结论: 甘草对底物药物 R123 的影响可能与存在于肠黏膜的 P-gp 有关, 这可能是甘草与药物产生协同作用的机制之一。

[关键词] 甘草; Ussing Chamber 技术; P-糖蛋白 (P-gp)

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 06-0276-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.06.129

中医学素有“十方九草, 无草不成方”之说, 甘草配伍其他药物有增强药物疗效的作用。许立等^[1]研究提示了甘草对肝药酶有诱导作用。由于多药耐药蛋白 P-糖蛋白 (P-gp) 的底物特异性很大程度上与细胞色素 P450 相似^[2], 二者有很多重叠的底物, 所以研究甘草对肠黏膜 P-gp 产生的影响是非常有意义的。因此, 笔者采用体外扩散池 (Ussing chamber) 实验技术的方法来分析甘草对 P-gp 底物经大鼠不同区段肠黏膜的透过的影响, 找出甘草对 P-gp 底物药物吸收影响的可能机理之一。

1 材料与方

1.1 药品与试剂 罗丹明 123 (R123, 批号 046K3688), 荧光素钠 (CF, 批号 047K0676), 羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液

(Hepes) [(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine]ethanesulfonic acid, 批号 016K54331)], Trizma base [Tris (hydroxyethyl aminomethane), 批号 103K5411]。以上试剂均采购自美国 Sigma 公司。二甲基亚砜 (DMSO) 购自广州化学试剂厂, 戊巴比妥钠购自中国医药 (集团) 上海化学试剂厂, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与设备 荧光分光光度计 (美国 Waters 公司, 型号为 474); CQ-20 超声波清洗器 (明珠电器); TGL-16B 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); 单向电容运转电动机 (上海非标电机有限公司); 7 mL Ussing chamber 装置 (Harvard, 美国)。

1.3 药物溶液的制备

1.3.1 甘草提取液 甘草称重后加入 15 倍量的蒸馏水, 浸泡

[收稿日期] 2014-11-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81073061); 南方医科大学南方医院院长基金项目 (2012C028); 广东省医学科研基金项目 (B2013244)

[作者简介] 李秀琼 (1977-), 女, 主管中药师, 主要从事中药药理与临床应用研究工作。

[通讯作者] 张继平, E-mail: fszjping@163.com

90 min, 煮沸, 煎煮 60 min 后药液冷却用布氏漏斗过滤, 再将提取液用蒸发皿浓缩至 1 L 相当于原药 500 g, 即甘草水煎液, 得到的甘草液中甘草剂量为 500 g/L。

1.3.2 Hepes-Tris 缓冲液配制 取 Hepes 6 g, 溶于 800 mL 蒸馏水中, 使之完全溶解。通入混合气体(95%O₂:5%CO₂)10 min 后, 加入 1.8 mL KCl(3 mol/L), 1.8 mL CaCl₂(1 mol/L), 0.8 mL MgSO₄(1 mol/L), 8.18 g NaCl, 完全溶解, 用 Tris 溶液(1 mol/L)调节 pH 至 7.4, 再加入 5 mL 葡萄糖溶液(1 mol/L), 用蒸馏水稀释至 1000 mL, 混匀, 即得。

1.3.3 实验用药物溶液 分别将称量好的 R123 或 CF 溶解在 pH7.4 的 O₂/CO₂ 气体饱和的 Hepes-Tris 缓冲液中, Hepes-Tris 缓冲液需每天制备, R123 或 CF 的最终浓度均为 4 mg/L。

1.4 动物分组及处理 Wistar 大鼠, 雄性, 体重为(250±20) g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK 粤 2006-0015。动物实验的方法符合南方医科大学实验动物伦理委员会的有关规定和要求。

Ussing chamber 实验。R123 组: 使用 Ussing Chamber 实验法, 取离体大鼠肠黏膜, 检测灌胃给药 1 周后, 120 min 内 R123 经大鼠空肠、回肠、结肠黏膜的经时透过量。将大鼠随机分成 2 组: 甘草组及生理盐水组。灌胃给药(20 mL/kg), 每天 2 次, 连续 7 天。观察各组大鼠一般情况并记录大鼠每天体重变化。大鼠给予样品 1 周后, 禁食 16~18 h, 3%戊巴比妥钠(32 mg/kg)腹腔注射麻醉, 空肠组: 大鼠取 Treitz 韧带处行空肠置管; 回肠组: 自回盲部向上 25 cm 处置管; 结肠组: 行结肠置管。在肠段前端插入硅胶管(内径 2 mm)结扎, 肠段末端剪开一小口, 之后缓慢地用 0.9%生理盐水冲洗肠段 2 次、通入空气 4 次, 分离肠段置 Hepes-Tris 缓冲液中, 冰浴培养 5 min, 剪取 3~4 cm 长的肠段, 迅速分离剥离筋膜层, 将肠黏膜固定于扩散池上。吸收方向实验时(转运方向为从黏膜侧到浆膜侧, M-S), 黏膜侧加入 7 mL R123-Hepes 溶液, 浆膜侧加入 7 mL Hepes 缓冲液; 分泌方向实验时(转运方向为: 从浆膜侧到黏膜侧, S-M), 浆膜侧黏膜侧所加溶液与吸收方向实验时所加的溶液相反。在混合气体(95% O₂:5%CO₂)的情况下以及 37.5 °C 水浴保温下, 分别于 15、30、45、60、75、90、120 min 在接收侧取样(0.5 mL), 同时补充 0.5 mL 37.5 °C 的 Hepes-Tris 缓冲液。各份取样后的样品于冰箱中保存直到进行荧光分析。CF 组: 使用 Ussing Chamber 实验法, 取离体大鼠肠黏膜, 观察灌胃给药一周后, 120 min 内 CF 经大鼠肠黏膜的经时透过量, 方法与 R123 组相同。

1.5 定量方法的建立

1.5.1 R123 和 CF 的测定方法学考察 测定 R123 的荧光强度的波长为: 激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm。R123 在(10~200)μg/L 范围内, 荧光强度对浓度进行回归, 回归方程: $Y=0.2237X+2.5658(r^2=0.9993)$, 线性关系良好, 回收率和日内精密度分别为 99.9%和 0.9%。测定 CF 的荧光强度的波长

为: 激发波长 480 nm, 发射波长为 520 nm。CF 在(200~2000)μg/L 范围内, 荧光强度对浓度进行回归, 回归方程: $Y=0.6386X+0.0679(r^2=1)$, 线性关系良好, 回收率和日内精密度分别为 99.8%和 2.3%。

1.5.2 累计透过量及表观渗透系数的测定 将荧光分析法测定的每个样品进行数据处理, 得到给定时间吸收方向(浆膜侧)的药物浓度 C_{m1}和分泌方向(黏膜侧)的药物浓度 C_{m2}, 用下列公式计算累计透过量(Q_m): $Q_m=\sum [0.1C_{m1}-1]+7C_{m2}$ (其中 0.1 和 7 代表取样体积和加入药液量, 分别为 0.1 mL 和 7 mL)。根据给药剂量 D, 计算累计透过百分率(Q_m/D×100%), 并绘制经时累计透过百分率曲线图。表观渗透系数(P_{app})是表示药物经黏膜透过能力的重要指标, 计算公式为 $P_{app}=(dQ/dt)\times (1/AC_0)$, 其中 dQ/dt 表示稳态时时间-累计透过量线性回归所得的斜率, A 为有效渗透面积, C₀为加入药液侧初始药物浓度。

1.6 统计学方法 计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示。药物不同区段的 P_{app} 比较用析因设计资料的方差分析, 不同组间多重比较采用 SNK 法检验; 各组累计透过率的比较用重复测量数据的方差分析, 不同组间多重比较采用 LSD 法检验; 各组间不同方向, 不同区段的 P_{app} 及 ER 的均数比较用析因设计资料的方差分析, 不同组间多重比较采用 SNK 法检验。

2 实验结果

2.1 生理盐水组对 R123 经不同区段肠黏膜透过的影响

2.1.1 R123 经大鼠空肠黏膜透过 见图 1。R123 经大鼠空肠黏膜吸收方向(M-S)和分泌方向(S-M)的经时曲线计算得到 S-M 组及 M-S 组的表观渗透系数 P_{app}(×10⁻⁵, cm/s)分别为 1.16±0.46 和 0.28±0.15, 差异有统计学意义(F=10.233, P=0.000), 分泌是透过的(5.69±4.13)倍。

2.1.2 R123 经大鼠回肠黏膜透过 见图 1。R123 经大鼠回肠黏膜吸收方向(M-S)和分泌方向(S-M)的经时曲线计算得到 M-S 组及 S-M 组表观渗透系数 P_{app}(×10⁻⁵, cm/s)分别为 0.64±0.16 和 2.07±0.92, 差异有统计学意义(F=9.333, P=0.000)。分泌是透过的(3.51±2.20)倍。

2.1.3 R123 经大鼠结肠黏膜透过 见图 1。R123 经大鼠结肠黏膜吸收方向(M-S)和分泌方向(S-M)的经时曲线计算得到 M-S 组及 S-M 组表观渗透系数 P_{app}(×10⁻⁵, cm/s)分别为 0.51±0.68 和 1.00±0.52, 差异有统计学意义(F=0.866, P=0.000)。分泌是透过的(2.02±0.84)倍。

2.2 生理盐水组对 CF 经不同区段肠黏膜透过的影响

2.2.1 CF 经大鼠空肠黏膜透过 见图 2。CF 经大鼠空肠黏膜吸收方向(M-S)和分泌方向(S-M)的经时曲线计算得到 M-S 组及 S-M 组表观渗透系数 P_{app}(×10⁻⁵, cm/s)分别为 1.96±1.55 和 1.28±0.16, 分泌方向 CF 的透过能力同吸收方向差异无统计学意义。

2.2.2 CF 经大鼠回肠黏膜透过 见图 2。CF 经大鼠回肠黏膜吸收方向(M-S)和分泌方向(S-M)的经时曲线计算得到 M-S 组

及 S-M 组表观渗透系数 P_{app} ($\times 10^{-5}$, cm/s) 分别为 2.64 ± 0.13 和 2.4 ± 0.24 , ER 为 0.91 ± 0.09 , 分泌方向 CF 的透过能力同吸收方向差异无统计学意义。

2.2.3 CF 经大鼠结肠黏膜透过 见图 2。CF 经大鼠结肠黏膜吸收方向(M-S)和分泌方向(S-M)的经时曲线计算得到 M-S 组

及 S-M 组表观渗透系数 P_{app} ($\times 10^{-5}$, $cm \cdot s^{-1}$) 分别为 2.81 ± 0.2 和 2.42 ± 0.34 , 分泌方向 CF 的透过能力同吸收方向差异无统计学意义。

2.3 甘草组对 R123 经不同区段肠黏膜 P_{app} 比较

2.3.1 R123 经空肠转运的 P_{app} 的影响 见表 1。各组 R123 分

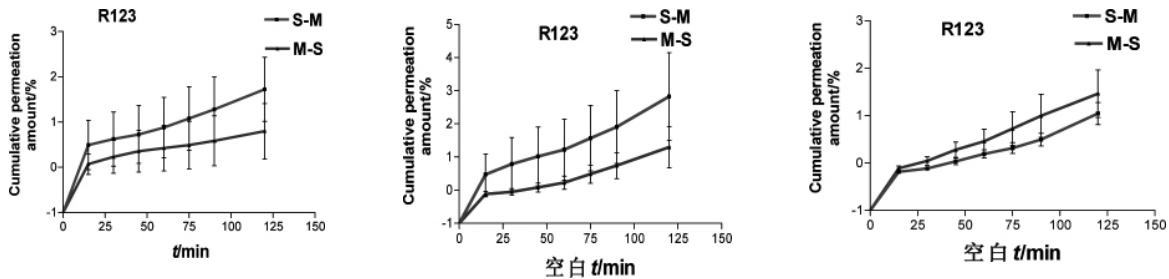


图 1 生理盐水组对 R123 经大鼠不同区段肠黏膜透过图

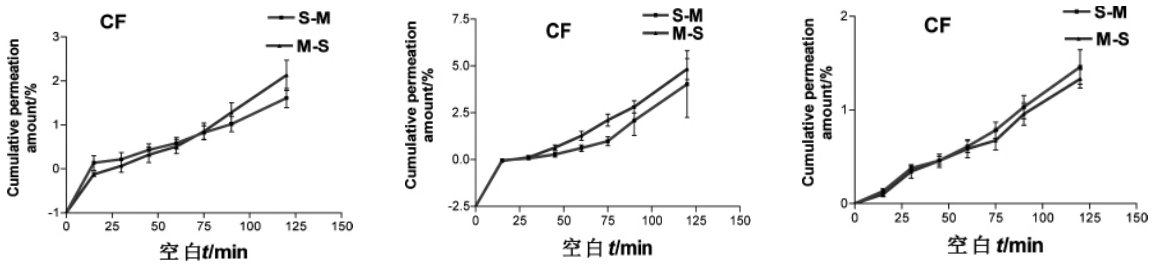


图 2 生理盐水组对 CF 经不同区段结肠黏膜透过图

泌方向和吸收方向累计透过率随时间呈递增关系, 差异有统计学意义 ($F=10.189$, $P=0.000$)。分泌与吸收方向中, 甘草组透过率均显著增高, 差异有统计学意义 (分泌方向: $F=14.897$, $P=0.009$; 吸收方向 ($F=26.124$, $P=0.005$)。吸收方向中, 甘草透过率均有显著差异 ($P=0.005$)。不同分组间 P_{app} 有显著差异 ($F=7.974$, $P=0.000$)。

2.3.2 R123 经回肠转运的 P_{app} 的影响 见表 1。各组 R123 分泌方向和吸收方向累计透过率随时间呈递增关系, 差异有统计

学意义 ($F=15.021$, $P=0.000$)。分泌和吸收方向中, 各组差异均无显著性 ($P>0.05$)。不同分组间 P_{app} 差异有统计学意义 ($F=7.974$, $P=0.000$)。

2.3.3 R123 经结肠转运的 P_{app} 的影响 见表 1。各组 R123 分泌方向和吸收方向累计透过率随时间呈递增关系, 差异有统计学意义 ($F=24.568$, $P=0.000$)。分泌方向和吸收方向中, 各组差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 甘草组对 CF 经不同区段肠黏膜 P_{app} 比较

表 1 甘草对 R123 经不同区段肠黏膜 P_{app} 比较

肠段	组别	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min
空肠	M S	2.71± 2.91	3.20± 3.35	3.43± 3.26	3.62± 3.35	4.03± 3.66	4.15± 3.62	4.52± 3.57
	S M	2.27± 2.11	2.68± 2.34	3.18± 2.43	3.72± 2.58	4.33± 2.69	4.84± 2.68	6.08± 2.82
回肠	M S	0.04± 0.38	0.07± 0.42	0.34± 0.57	0.40± 0.62	0.49± 0.69	0.56± 0.73	0.71± 0.78
	S M	0.82± 1.42	1.15± 1.79	1.30± 1.87	1.51± 2.02	1.77± 2.19	2.02± 2.35	2.68± 2.72
结肠	M S	- 0.18± 0.10	- 0.13± 0.14	0.00± 0.23	0.07± 0.28	0.14± 0.33	0.24± 0.42	0.42± 0.57
	S M	0.31± 1.07	0.42± 1.24	0.68± 1.60	0.82± 1.68	0.98± 1.75	1.18± 1.81	1.51± 1.86

2.4.1 CF 经空肠转运的 P_{app} 的影响 见表 2。各组 R123 分泌方向和吸收方向累计透过率随时间呈递增关系, 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。分泌与吸收方向中, 甘草组透过率均显著增高, 差异有统计学意义 (分泌方向 $F=14.987$, $P=0.009$; 吸收方向: $F=20.147$, $P=0.005$)。吸收方向中, 甘草透过率均有显著

差异 ($P=0.006$)。不同分组间 P_{app} 有显著性差异 ($F=7.974$, $P=0.000$)。

2.4.2 CF 经回肠转运的 P_{app} 的影响 见表 2。各组 R123 分泌方向和吸收方向累计透过率随时间呈递增关系, 差异有统计学意义 ($F=6.258$, $P=0.000$)。分泌方向和吸收方向中, 各组差异

均无显著性意义($P>0.05$)。不同分组间 P_{app} 差异显著($F=7.974, P=0.000$)。

2.4.3 CF 经结肠转运的 P_{app} 的影响 见表 2。各组 R123 分泌方向和吸收方向累计透过率随时间呈递增关系, 差异有统计学

意义($F=8.249, P=0.000$)。分泌方向和吸收方向中, 各组差异均无显著性意义($P>0.05$)。

3 讨论

表 2 甘草对 CF 经不同区段肠黏膜 P_{app} 比较($\bar{x} \pm s$)

肠段	组别	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min	%
空肠	M S	0.08± 0.05	0.19± 0.10	0.34± 0.13	0.60± 0.22	0.86± 0.30	1.15± 0.39	1.78± 0.63	
	S M	0.17± 0.18	0.28± 0.27	0.46± 0.45	0.62± 0.60	0.80± 0.70	1.06± 0.94	1.48± 1.14	
回肠	M S	0.06± 0.02	0.12± 0.04	0.20± 0.10	0.32± 0.15	0.45± 0.22	0.61± 0.27	0.99± 0.45	
	S M	0.15± 0.20	0.26± 0.27	0.46± 0.38	0.71± 0.54	1.00± 0.65	1.34± 0.78	2.05± 1.11	
结肠	M S	0.10± 0.04	0.16± 0.07	0.25± 0.15	0.34± 0.18	0.46± 0.23	0.61± 0.27	0.99± 0.32	
	S M	0.09± 0.12	0.23± 0.17	0.38± 0.27	0.57± 0.37	0.78± 0.45	1.05± 0.57	1.60± 0.79	

Ussing chamber 技术是建立在大鼠肠黏膜基础上, 可以用于预测药物在人体吸收的一个有效的手段。Watanabe E 等^[3]通过扩散池实验得到了 15 种水溶性及脂溶性药物的 P_{app} 并比较了与人吸收系数(F_a)的相关性。结果表明, 实验药物的 P_{app} 与 F_a 之间存在着良好的相关性。 $P-gp$ 在药物处置(吸收, 分布, 排泄)中发挥着极其重要的作用, 其具有广泛的底物, 抑制剂和诱导剂, 因此在联合用药过程中常会出现影响药物临床疗效的 $P-gp$ 分子水平上的竞争性或非竞争性药物相互作用。因此在药物间和食物间相互作用以及在制剂处方设计中不可忽视 $P-gp$ 这个关键因素。

R123 是 $P-gp$ 的典型底物, 由于其检测方便, 在细胞模型中评价 $P-gp$ 中已广泛应用。本实验通过体外 Ussing chamber 技术, 测得 R123 在空肠、回肠、结肠中的转运渗透系数分泌方向大于吸收方向, 与国际上研究的结果一致, 表明存在泵出系统: 其在小肠中的转运是以分泌为主, 显示以 R123 为底物药物来预测口服药物在肠内转运与 $P-gp$ 的关系是可行的。而荧光素钠(CF)则作为对照药物进行实验。这是由于两者的转运机制不同, R123 是主动转运且是 ATP 结合盒转运蛋白的一种外排转运蛋白 $P-gp$ 的底物; 而 CF 是被动转运(细胞旁途径)。而且这两种化合物容易分析, 都具有可见光范围的荧光, 检测灵敏度高。因此选用 CF 作为对照。

在本试验中, 大鼠灌胃甘草后, R123 在不同肠段间与生理盐水组比较, 透过性不同。一方面是表明甘草中的某些成分可能改变了细胞膜通透性, 从而改变了 R123 双向的渗透, 另外可能是由于甘草对肠道内不同肠段内中的影响使 R123 的渗透能力存在部位差及 $P-gp$ 在不同肠道区段的含量不同所导

致。因此, 这可能是甘草与某些药物合用产生协同作用的机理之一。而在评价甘草对 CF 影响的实验中, 甘草对 CF 经不同肠段肠黏膜转运的吸收方向及分泌方向的透过性与生理盐水比较, 均无显著差异($P>0.05$)。因此表明甘草可能对旁细胞通路不产生影响。

通过以上实验分析可知: 甘草对肠黏膜 $P-gp$ 起一定的诱导作用。 $P-gp$ 是药物外排泵, 能够使其介导的药物分泌增加, 吸收减小。但是笔者只做了一种浓度的药液, 而很多药物对 $P-gp$ 的影响都具有浓度依赖性和饱和性, 因此, 在未来的实验中, 应该增加更多浓度的药液的相关实验以及在体实验。

致谢: 在本项目的研究中, 得到南方医科大学南方医院药理学部博士生导师李国锋教授的悉心指导, 深表感谢!

[参考文献]

- [1] 许立, 孙晓进, 王志刚. 甘草、海藻相伍用对小鼠肝药酶的影响[J]. 辽宁中医药杂志, 1998(2): 84-85.
- [2] 缪海均, 刘皋林. P-糖蛋白与药代动力学[J]. 中国药房, 2002, 13(1): 49-51.
- [3] Watanabe E, Takahashi M, Hayashi M. A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an in vitro chamber method [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2004, 58: 659-665.

(责任编辑: 骆欢欢)