

# 白头翁皂苷 B4 在 Calu-3 细胞单层中的渗透性研究<sup>\*</sup>

狄孟华<sup>1\*\*</sup>, 李 言<sup>2</sup>, 李桂凤<sup>2</sup>, 崔京浩<sup>2</sup>, 王永林<sup>1</sup>, 杨世林<sup>1\*\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 苏州大学 药学院, 江苏 苏州 215123)

**[摘 要]** 目的: 建立白头翁皂苷 B4 的 HPLC 测定方法, 研究其在单层 Calu-3 细胞中的渗透性。方法: 色谱条件为 Agilent C18 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、流动相为 0.1% 磷酸-乙腈(71% ~ 29%)、流速为 0.8 mL/min、检测波长 205 nm、柱温 25 °C, 考察不同浓度 B4 在 Calu-3 单层细胞中的渗透情况, 以卡波姆 974P 为促渗剂, 考察卡波姆对 B4 渗透性的影响。结果: B4 在 1.5 ~ 30.0 mg/L 内与峰面积呈良好线性关系( $r=0.999\ 3$ ), B4 在 Calu-3 细胞的渗透性具有浓度依赖性, 卡波姆的加入提高了 B<sub>4</sub> 的渗透量。结论: B4 的渗透以细胞旁路为主要途径, 而卡波姆的加入可提高细胞旁路通透性, 使药物渗透量增加。

**[关键词]** 高效液相色谱; 白头翁皂苷 B4; Calu-3 细胞; 卡波姆; 渗透性

**[中图分类号]** R285.5; O657.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)07-0750-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.07.002

## Evaluation of Anemoside B4 Permeability in Calu-3 Cell Monolayer

DI Menghua<sup>1</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, LI Guifeng<sup>2</sup>, CUI Jinghao<sup>2</sup>, WANG Yonglin<sup>1</sup>, YANG Shilin<sup>1</sup>

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou China; 2. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method to investigate of anemoside B4 permeability in Calu-3 cell monolayer. **Methods:** The samples were analyzed with a Agilent C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 25 °C. The mobile phase was water containing 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-acetonitrile (71% : 29%). The flow rate was 0.8 mL/min. The transport of B4 in Calu-3 monolayer cells was investigated with different concentrations of B4, and Carbopol 974P was used as a penetration enhancer to determine the effect of carbopol on B4 permeability. **Results:** The line-arity of B4 calibration curve was good in the range of 1.5 ~ 30.0 mg/L ( $r=0.999\ 3$ ). The minimal quantitation limit was 1.5 mg/L. The penetration of B4 on Calu-3 cells was concentration-dependent, and the addition of Carbopol increased the penetration of B4. **Conclusions:** The absorption of B4 on mucous membrane is mainly through paracellular pathway, and the Carbopol can enhance the permeation of B4.

**[Key words]** high efficiency liquid chromatography; anemoside B4; Calu-3 cells; carbopol; permeability

白头翁皂苷 B4 (anemoside B4, B4) 是从毛茛科植物白头翁中提取具有药理活性的五环三萜类皂苷, 白头翁皂苷具有抗炎、抗菌和增强免疫力等多种功效, 据文献报道 B4 还具有抗癌活性<sup>[1-3]</sup>。

呼吸道给药系统具有吸收表面积大、血流丰富、吸收迅速, 能绕过肝脏首过效应、较低的酶活性, 给药剂量小等诸多优点因而受到越来越多的关注。Calu-3 细胞是来源于人呼吸道上皮细胞, 经过培养

<sup>\*</sup> [基金项目] 国家自然科学基金项目资助 (K113231513)

<sup>\*\*</sup> 贵州医科大学 2015 级硕士研究生

<sup>\*\*\*</sup> 通信作者 E-mail: sun17908@126.com

网络出版时间: 2018-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180718.1503.022.html>

的 Calu-3 细胞可连接分化,可形成极性单层膜,结构上形成紧密连接和微纤毛,膜表面除可表达 P-糖蛋白和一定量的水解酶、转移酶及细胞色素外,还具有黏液分泌功能,体外实验时可以模拟呼吸道上皮细胞层<sup>[4]</sup>,国内外学者已将 Calu-3 细胞模型广泛应用于呼吸道给药系统的研究中<sup>[5-6]</sup>。卡波姆是生物相容性物质,在非口服给药时可以提高水溶性药物的渗透性<sup>[7]</sup>,本研究首次应用高效液相色谱法对 B4 在 Calu-3 细胞单层上的渗透性进行研究,并考察了卡波姆的加入对 B4 渗透性的影响,为 B4 呼吸道给药的研究中提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及试剂

Calu-3 细胞株(中国科学院上海生科院细胞资源中心,原代细胞来自 American Type Culture Collection),二氧化碳培养箱 HF151(上海力申科学仪器有限公司),高效液相色谱仪 LC-15C(日本岛津),Transwell-12 膜嵌套细胞培养板(膜表面积  $1.13\text{ cm}^2$ 、膜孔径  $0.4\text{ }\mu\text{m}$ ,美国 Costar 公司),Milli-cell ERS-2 跨膜电阻仪(美国 Millipore 公司),MH-2 微量振荡器(海门其林贝尔仪器制造有限公司),高糖培养基(DMEM,批号 AC10221098,HyClone 公司),胎牛血清和非必须氨基酸(批号 1828728, Gibco 公司);青霉素-链霉素(批号 C0222,上海碧云天生物技术有限公司),胰蛋白酶-EDTA(批号 J170003, HyClone 公司),Hank's 缓冲液(批号 C0219,上海碧云天生物技术有限公司),白头翁皂苷 B4 由苏州大学许琼明教授惠赠(高效液相色谱法和定量法标定纯度  $\geq 98\%$ ),乙腈和甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养(空气-界面培养法)** Calu-3 细胞株传代数为 22~35 代。购置的细胞接种于培养皿中,培养液为 DMEM 培养基,其中含有 10% 的胎牛血清、1% 的非必需氨基酸、1% 的青霉素-链霉素;细胞置于 5%  $\text{CO}_2$ 、37℃ 的培养箱中,隔天更换 1 次培养液,细胞于光学显微镜下观察,直至细胞融合度达 90%<sup>[8-9]</sup>。胰酶消化细胞,细胞计数为  $4.4 \times 10^8/\text{L}$ ,吸取含细胞的培养液 0.5 mL 于 Transwell 板 AP(apical)侧,BL(basolateral)侧加入空白培养液 0.8 mL;细胞继续于 5%  $\text{CO}_2$ 、37℃ 培养箱中培养,48 h 后吸去 AP 侧培养液,使其暴露于空

气中,并更换 BL 侧培养液。此后隔天更换 BL 侧培养液 1 次,1 周后每天换液 1 次,空气-界面培养法培养细胞至 12~16 d<sup>[10-12]</sup>。

**1.2.2 跨膜电阻值的测定** 取出细胞,吸尽培养液,在 AP 侧和 BL 侧分别加入 37℃ 的 HBSS 0.3 mL 和 1.0 mL,清洗单层细胞 2 次。加入 37℃ 的 HBSS 0.5 mL 于 AP 侧,1.0 mL 于 BL 侧,细胞于 37℃ 环境中放置振荡器上低速振荡,平衡 1 h 后取出,用带有筷子电极的跨膜电阻仪检测单层 Calu-3 细胞的跨膜电阻值(trans epithelial electrical resistance, TEER),长电极于 BL 侧,短电极于 AP 侧,每孔测定 3 个不同位置,求平均值,减去空白孔的值后,与膜表面的乘积即表示该孔的 TEER<sup>[13-14]</sup>。

**1.2.3 不同浓度 B4 的渗透性** 空气-界面法培养 Calu-3 细胞至 12~16 d,吸尽各孔培养液,加入 37℃ 的 HBSS 清洗单层细胞 2 次,在 AP 侧和 BL 侧分别注入 37℃ 的 HBSS 0.5 mL 和 1.0 mL,细胞置于培养箱中平衡 1 h、取出,立即吸干 AP 侧液体,在 AP 侧分别加入不同浓度 B4(0.41、0.82、4.10 mmol/L)的 HBSS 溶液 0.3 mL( $n=3$ ),开始计时,细胞放置于培养箱中,按规定的时间取出,快速于 BL 侧吸取样品 0.3 mL 并及时补充等量新鲜 37℃ 的 HBSS,样品经 HPLC 方法分析,计算不同时间点 B4 在 BL 侧的渗透量,并以药物累积渗透量为纵坐标时间为横坐标绘制渗透曲线。

**1.2.4 卡波姆对 B4 渗透性的影响** 将卡波姆 974P 溶于去离子水中,分别制成浓度(W/V)为 0.10%、0.25% 及 0.50% 卡波姆 974P 的溶液、紫外杀菌处理,过夜使其充分溶胀。B4 溶于其中制成浓度为 0.41 mmol/L 的卡波姆溶液,另取 B4 溶于去离子水中(0.41 mmol/L)作为对照组,于 AP 侧加入以上溶液各 0.3 mL( $n=3$ ),按“1.2.3”项下方法处理细胞,样品经 HPLC 法分析,绘制渗透曲线,并按下式计算表观渗透系数( $P_{\text{app}}$ ), $P_{\text{app}} = dQ/(dtA C_0)$ , $P_{\text{app}}$  单位为  $\text{cm}^2/\text{s}$ 、Q 为药物累积渗透量( $\mu\text{g}$ )、A 为渗透面积( $\text{cm}^2$ )、 $C_0$  为药物初始浓度。

## 2 结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent C18 柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相为 0.1% 磷酸-乙腈(71%~29%)。流速 0.8 mL/min,检测波长 205 nm,柱温 25℃,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

## 2.2 标准曲线的绘制

精密称取 15 mg 白头翁皂苷 B<sub>4</sub>, HBSS 溶解并转移至 100 mL 容量瓶中, 加 HBSS 稀释至刻度, 得 150 mg/L 的 B<sub>4</sub> 贮备液, 精密吸取该贮备液适量, 用 HBSS 稀释, 分别制得 1.5、3.0、7.5、15.0、20.0 及 30.0 mg/L 的系列溶液。各进样 20  $\mu$ L, 以 B<sub>4</sub> 峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归, 求得 B<sub>4</sub> 在 HBSS 液中的回归方程为:  $A = 6\,351.5C - 10\,827$ ,  $r = 0.999\,3$ ,  $n = 3$ 。结果表明, HBSS 溶液中 B<sub>4</sub> 浓度在 1.5 ~ 30.0 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系。

## 2.3 精密度和准确度

按“2.2”项下分别配制低、中、高(3.0、7.5、15.0 mg/L)3 种浓度的 B<sub>4</sub> 溶液, 每个质量浓度配制 5 个平行样品, 每天连续进样 5 次、连续 3 d; 求得日内精密度分别为 3.02%、2.13%、0.42%, RE 在 -13.1% ~ 5.4%; 日间精密度分别为 3.12%、2.02%、0.79%, 准确度在 0.4% ~ 3.0%, 表明日内、日间精密度和准确度良好。

## 2.4 回收率

按“2.2”方法配制低、中、高(3.0、7.5、15.0 mg/L)3 种质量浓度样品, 经 HPLC 法分析, 记录目标峰面积 A<sub>1</sub>; 另外配制 B<sub>4</sub> 的甲醇标准液低、中、高(3.0、7.5、15.0 mg/L)3 种质量浓度样品, 同法分析, 记录目标峰面积 A<sub>2</sub>; 按  $A_1/A_2 \times 100\%$  计算回收率, 求算的回收率分别为低(100.28  $\pm$  2.86)%、中(100.54  $\pm$  2.70)% 和高(100.16  $\pm$  1.70)%。

## 2.5 白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的渗透实验

**2.5.1 细胞培养** 细胞经空气-界面法培养, 刺激分化形成边界清晰平滑完整的极性单层细胞, 细胞间形成紧密连接, 见图 1。

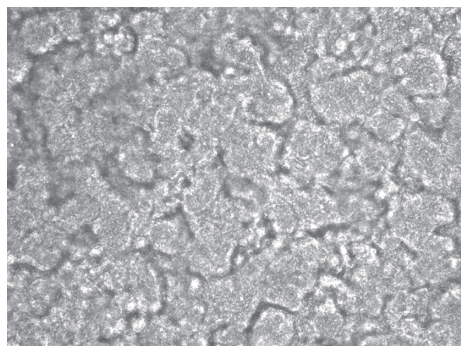


图 1 Calu-3 单层细胞(80 $\times$ )

Fig. 1 Calu-3 cell monolayers under microscope

**2.5.2 TEER** 经过 10 d 以上的培养, TEER > 400  $\Omega/\text{cm}^2$ , 且趋于稳定。见图 2。

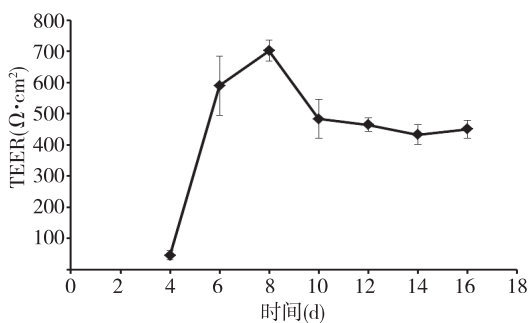


图 2 培养时 Calu-3 细胞 TEER 值( $n = 3$ )

Fig. 2 Measurement of Calu-3 cell TEER under cultivation

**2.5.3 不同浓度 B<sub>4</sub> 在 Calu-3 细胞中的渗透性** 随着 B<sub>4</sub> 浓度及处理时间的增加, 药物的渗透量增加。见图 3。

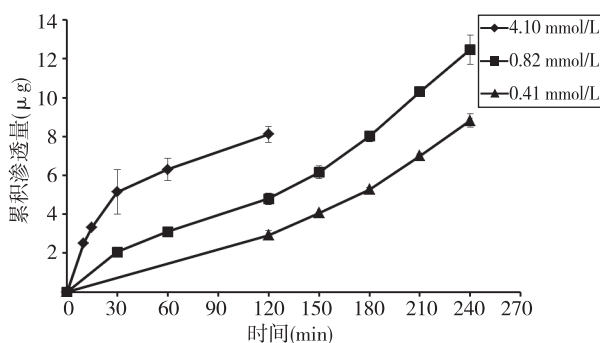


图 3 不同浓度 B<sub>4</sub> 在 Calu-3 细胞中的渗透性( $n = 3$ )

Fig. 3 Concentration-dependent permeation of B<sub>4</sub> in Calu-3 cell monolayers

**2.5.4 不同浓度卡波姆对 B<sub>4</sub> 在 Calu-3 细胞中渗透性的影响** 卡波姆的加入使 Calu-3 细胞对 B<sub>4</sub> 渗透增加, 且随卡波姆浓度的增加导致 B<sub>4</sub> 的渗透性随之增加。见图 4 和表 1。

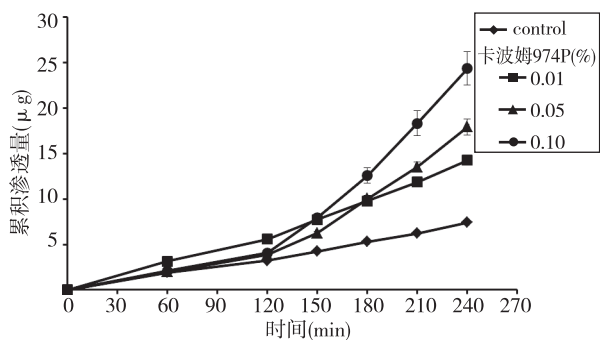


图 4 不同浓度卡波姆对 B<sub>4</sub> 在 Calu-3 细胞中渗透性的影响( $n = 3$ )

Fig. 4 Effect of carbopol at different concentrations on transport of B<sub>4</sub> across Calu-3 cell layers

表 1 卡波姆促进 B<sub>4</sub> 在 Calu-3 细胞的渗透(*n* = 3)

Tab. 1 Carbopol promote B<sub>4</sub> transport across Calu-3 cell layers

分组	P <sub>app</sub> (cm/s) × 10 <sup>-7</sup>	促渗率
对照组	8.40 ± 0.39	1.00
卡波姆 974P		
0.10%	14.45 ± 0.86 <sup>(1)</sup>	1.72
0.25%	25.88 ± 1.73 <sup>(1)</sup>	3.08
0.50%	38.46 ± 1.95 <sup>(1)</sup>	4.58

<sup>(1)</sup> 与对照组比较, *P* < 0.05

### 3 讨论

TEER 值是考察单层细胞完整性的一个指标, 一般认为当 TEER 值 > 400 Ω/cm<sup>2</sup> 时即可用于渗透实验<sup>[16]</sup>。结果发现, Calu-3 细胞经 10 d 以上的培养其 TEER 值相对稳定, 且大于 400 Ω/cm<sup>2</sup>。表明细胞经 10 d 以上的培养用于渗透实验可保证 Calu-3 细胞单层的完整性。B4 为水溶性药物(按药典规定为溶解级), 随着 B4 在 AP 侧浓度的增加, 其渗透量随之增加, 提示 B4 在生物黏膜上的吸收以细胞旁路为主要途径。卡波姆为丙烯酸高聚物, 一般认为卡波姆为生物安全性物质, 在非口服途径中卡波姆可提高水溶性药物的吸收, 近年来受到研究者的广泛关注。在本实验中, 当加入卡波姆时, B4 的渗透量增加, 且随着卡波姆用量的增加, B4 的渗透量进一步增加。这可能与卡波姆结构中的羧基有关, 其结构中的羧基可与黏膜表面的 Ca<sup>2+</sup> 等二价离子发生螯合作用, 从而暂时性打开单层细胞的紧密连接, 药物渗透增加<sup>[16]</sup>。但卡波姆确切的促进药物渗透机制, 还需要进一步的考察与验证。

### 4 参考文献

[1] 王海侠, 郑新勇, 郜尽. 白头翁皂苷 B4 体外抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖并诱导其凋亡[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2011, 31(10): 1481 - 1485.

[2] 李敏, 方明治. 白头翁皂苷 B4 粉防己碱对奥沙利铂耐药的结肠癌细胞的耐药逆转作用及其机制[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(1): 38 - 44.

[3] 许慧君. 白头翁质量评价与五环三萜皂苷类成分的药物代谢动力学研究[D]. 河北医科大学, 2012.

[4] 邓万定, 金方, 张启明. 高效液相色谱法测定苯环喹溴铵在 Calu-3 细胞中的摄取[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(14): 1187 - 1190.

[5] HAGHI M, YOUNG P M, TYAINI D, et al. Time- and

passage-dependent characteristics of a calu-3 respiratory epithelial cell model. [J]. Drug Development & Industrial Pharmacy, 2010, 36(10): 1207 - 1214.

[6] LIN H, LI H, CHO H J, et al. Air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cell monolayers as an *in vitro* model for airway drug transport studies. [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, 96(2): 341 - 350.

[7] LI L, MATHIAS N R, HERAN C L, et al. Carbopol-mediated paracellular transport enhancement in calu-3 cell layers[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 95(2): 326.

[8] MUKHERJEE M, PRITCHARD D I, BOSQUILLON C. Evaluation of air-interfaced calu-3 cell layers for investigation of inhaled drug interactions with organic cation transporters *in vitro*[J]. Int J Pharm, 2012, 426(1-2): 7 - 14.

[9] BORCHARD G, CASSARA M L, ROEMELE P E, et al. Transport and local metabolism of budesonide and fluticasone propionate in a human bronchial epithelial cell line (Calu-3)[J]. J Pharm Sci, 2002, 91(6): 1561 - 1567.

[10] GRAINGER C I, GREENWELL L L, LOCKLEY D J, et al. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier[J]. Pharm Res, 2006, 23(7): 1482 - 1490.

[11] LI L, MATHIAS N R, HERAN C L, MOENCH P, et al. Carbopol-mediated paracellular transport enhancement in Calu-3 cell layers[J]. J Pharm Sci, 2006, 95(2): 326 - 335.

[12] BABU P B, CHIDEKEL A, SHAFFER T H. Protein composition of apical surface fluid from the human airway cell line Calu-3: Effect of ion transport mediators[J]. Clin Chim Acta, 2004, 347(1-2): 81 - 88.

[13] ASAI A, OKUDA T, SONODA E, et al. Drug permeation characterization of inhaled dry powder formulations in air-liquid interfaced cell layer using an improved[J]. Simple Apparatus for Dispersion. Pharm Res, 2016, 33(2): 487 - 497.

[14] MATILANINEN L, TOROPANINEN T, VIHOLA H, et al. *In vitro* toxicity and permeation of cyclodextrins in calu-3 cells[J]. J Control Release, 2008, 126(1): 10 - 16.

[15] SHANJ, LIAO J, HUANG J, et al. Bicarbonate-dependent chloride transport drives fluid secretion by the human airway epithelial cell line Calu-3[J]. Journal of Physiology, 2012, 590(21): 5273.

[16] COLO G D, ZAMBITO Y, ZANINO C. Polymeric enhancers of mucosal epithelia permeability: Synthesis, transepithelial penetration-enhancing properties, mechanism of action, safety issues[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 97(5): 1652 - 1680.

(2018-05-11 收稿, 2018-07-07 修回)  
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅