

· 药物研究 ·

齐墩果酸体外肠吸收特征及 P-糖蛋白介导跨膜转运机制*

杨茗钊¹,程晓华²,徐文炜³

(1. 南昌大学第一附属医院妇产科,南昌 330006;2. 南昌大学第一附属医院 GCP 中心,南昌 330006;3. 南昌大学临床药理研究所,南昌 330006)

摘要 目的 观察齐墩果酸体外肠吸收特征及 P-糖蛋白介导跨膜转运的机制。方法 建立齐墩果酸细胞摄取量以及转运量高效液相色谱-质谱联用仪的定量检测方法,噻唑蓝法确定齐墩果酸对 Caco-2 细胞的安全浓度范围,考察不同药物浓度、孵育时间、介质 pH 值、体系温度对 Caco-2 细胞摄取齐墩果酸的影响;通过构建 Caco-2 细胞单层模型,评价 P-糖蛋白抑制剂维拉帕米对齐墩果酸跨膜转运的影响,计算其表观渗透系数(P_{app})。结果 在安全浓度范围内,Caco-2 细胞对齐墩果酸摄取量呈浓度和时间依赖性,与温度呈负相关,不同 pH 值对药物摄取影响差异无统计学意义。与对照组比较,加入维拉帕米后, P_{app} 显著改变($P < 0.05$),表观渗透率由 2.90 下降至 0.95。结论 齐墩果酸吸收转运以被动扩散为主,可能有 P-糖蛋白介导外排作用的参与。

关键词 齐墩果酸;Caco-2 细胞;P-糖蛋白

中图分类号 R286;R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)03-0247-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.03.004

Absorption Characteristics and Mechanism of P-glycoprotein Mediated Transport of Oleanolic Acidin Across the Membrane *In Vitro*

YANG Mingfang¹, CHENG Xiaohua², XU Wenwei³ (1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of GCP Center, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 3. Institute of Clinical Pharmacology, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT Objective To explore the absorption characteristics and mechanism of P-glycoprotein (P-gp) mediated transport of oleanolic acid (OA) across membrane *in vitro*. **Methods** The intake and transport of OA were evaluated by an HPLC/MS quantitative detection method. Safe concentration range of OA was determined by MTT. The effect of different drug concentration, incubation time, pH and temperature on the intake of OA by Caco-2 cells were investigated. The effect of P-gp inhibitor on the transmembrane transport of OA was investigated by the Caco-2 cell monolayer model, and the apparent permeability coefficient (P_{app}) was calculated. **Results** The uptake of OA was concentration-time dependent and correlated negatively to temperature in Caco-2 cells within the safe concentration range, but was not significantly affected by pH value. Compared with controls, the P_{app} significantly changed when the P-gp inhibitor was added to the model ($P < 0.05$). The apparent permeability ratio decreased from 2.90 to 0.95. **Conclusion** The absorption of OA was primarily by passive diffusion and might be mediated by the efflux by P-gp.

KEY WORDS Oleanolic acid; Caco-2 cell; P-glycoprotein

收稿日期 2015-08-23 修回日期 2015-09-22

基金项目 *国家十二五“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09302-007-03); 江西省青年科学基金项目 (20142BAB215019)

作者简介 杨茗钊 (1984-), 女, 江西瑞金人, 主治医师, 硕士, 主要研究方向: 妇科肿瘤及药代动力学。电话: 0791-88692250, E-mail: 649479518@163.com。

通信作者 程晓华 (1979-), 男, 江西余干人, 主管药师, 硕士, 主要研究方向: 药动学与新药临床试验。电话: 0791-88695051, E-mail: ncujg2009@163.com。

齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 具有护肝降酶、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种药理作用^[1-4], 临床主要用于急性黄疸型肝炎和慢性病毒性肝炎的治疗。OA 疗效稳定, 不良反应小, 但由于溶解度较差, 生物利用度低, 限制了其临床应用。针对其生物利用度低的缺点, 国内外学者在 OA 剂型改进及相关剂型药动学研究方面取得不少进展^[5], 但体外肠吸收机制研究笔者较少见到。

Caco-2 细胞模型重现性好, 与药物体内吸收具有良好的相关性, 近年来被国内外学者广泛用于研

究药物体外肠道吸收过程与机制,也是目前研究体外肠吸收的经典模型^[6]。笔者在本研究采用 Caco-2 细胞模型研究小肠上皮细胞对 OA 的摄取、跨膜转运及外排作用,评价药物浓度、孵育时间、介质 pH 值、体系温度对细胞摄取的影响,以及 P-糖蛋白(P-gp)抑制药对细胞跨膜转运吸收的影响,以期阐明 OA 的吸收机制,为合理设计其剂型和深入研究其药动学提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 Caco-2 细胞株购于美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),实验中使用第 30~40 代细胞。

1.2 药品与试剂 达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)(GIBCO 公司,批号:31800-022),胎牛血清(Hyclone 公司,批号:NXJ0709),0.1% 胰蛋白酶(GIBCO 公司,批号:27250018),谷氨酰胺(GIBCO 公司,批号:25030),非必需氨基酸(GIBCO 公司,批号:1232254),维拉帕米(Sigma 公司,批号:20120816),罗丹明 123(Sigma 公司,批号:R06154),OA(中国食品药品检定研究院,含量:98%,批号:201206),格列喹酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130824,含量:99.2%),乙腈(TEDIA 公司,色谱纯,批号:14025017),胰蛋白酶-EDTA(Sigma 公司,批号:S10054),醋酸铵(天津福晨化学试剂厂,批号:20140415),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 MCO20-AIC 型二氧化碳(CO₂)培养箱(日本三洋公司),CKX-41 型倒置光学显微镜(日本奥林巴斯公司),EVOM 细胞电位仪(美国 WPI 公司),GS-15R 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),LCMS-2010EV 型高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS,日本岛津公司);LCMSsolution 色谱工作站(日本岛津公司)。

1.4 细胞培养和细胞单层完整性评估 将 Caco-2 细胞培养于高糖 DMEM 培养基中(含 10% 胎牛血清、非必需氨基酸、1% L-谷氨酰胺、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 μg·mL⁻¹ 链霉素),置于 37℃、含 5% CO₂、相对湿度 90% 下培养。隔日换液一次,当细胞融合率达 90% 后,0.25% 胰蛋白酶-1 mmol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。取对数生长期细胞,调节密度为 6×10⁴ 个·mL⁻¹,接种于 Transwell 板,肠腔侧(apical, AP)和基底侧(basolateral, BL)加适量培养液。隔日换液,一周后每天换液,培养 21~24 d、待细胞达到基本汇合、跨膜电阻 >400 Ω·cm²,以及罗丹明 123 不能透过细胞间隙时,待确认形成紧密单层后,用于转运实验。

1.5 色谱条件 色谱柱:Shim-pack VP-ODS C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 醋酸铵 = 68:32,流速:0.2 mL·min⁻¹,柱温:35℃;采用选择性负离子检测及电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI);检测对象:OA, *m/z*:455.3;格列喹酮, *m/z*:527.1;雾化气流速为 1.5 L·min⁻¹;干燥气流量为 4.0 L·min⁻¹,检测电压 1.60 kV;曲形脱溶剂装置温度为 250℃;加热块温度:200℃。

1.6 MTT 细胞毒性实验 取对数生长期 Caco-2 细胞,调整细胞密度至 5×10⁴ 个·mL⁻¹ 接种于 96 孔培养板,24 h 后换液,实验组分别加入不同浓度 OA 培养液,调零空白组加入等体积培养液,每组设 4 个复孔,继续培养 12 和 24 h 后每孔加入噻唑蓝(MTT),每孔加二甲亚砜(DMSO)溶液 150 μL,空气恒温振荡器振荡 10 min,待结晶物充分溶解,在酶标仪上选择波长 570 nm,空白孔调零,测定各孔吸光度值。细胞存活率(%)=(实验组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。

1.7 Caco-2 细胞摄取实验 取对数生长期 Caco-2 细胞,调整细胞密度为 1×10⁴ 个·mL⁻¹,接种培养于 24 孔培养板,实验前 2 h 缓慢吸弃旧培养液,加入预热 Hank 平衡盐溶液(hank's balanced salt solution, HBSS)1.0 mL 荡洗细胞 3 次,最后置于 37℃ 培养箱温孵 30 min,缓慢吸弃 HBSS 溶液,洗去细胞单分子层表面杂质,考察药物浓度、孵育时间、体系温度以及介质 pH 值对药物摄取的影响。不同因素各组均设 4 个复孔,加入药液 1 mL,培养 24 h 后弃去药液,加入 4℃ HBSS 缓冲液终止摄取。每孔加入超纯水 1 mL,细胞刮取器刮下细胞,超声粉碎细胞,取上清液 200 μL,加入乙腈,离心,取上清液 20 μL 用于 HPLC-MS 分析,另取 200 μL 进行细胞蛋白质含量测定,OA 摄取量以 μg·mg⁻¹ 蛋白质为单位。

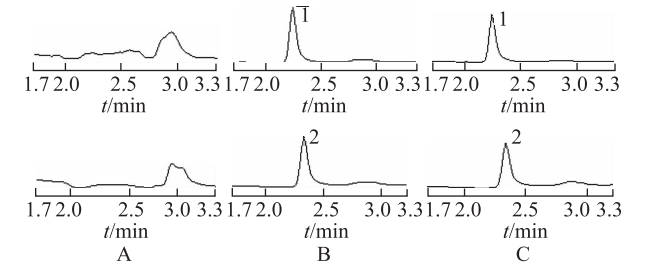
1.8 Caco-2 细胞单层跨膜转运实验 取符合转运实验要求的 Caco-2 细胞模型,试验前用预热 HBSS 清洗生长有 Caco-2 细胞的 Transwell 板 3 次,置于 37℃ 培养箱温孵 30 min,考察药物浓度、反应时间、转运方向及 P-gp 抑制药维拉帕米对细胞转运 OA 的影响。当转运方向为 AP→BL 时,AP 中加入 OA 供试溶液 0.4 mL 作为供给液,BL 中加入空白 HBSS 1.0 mL 作为接收液。当转运方向为 BL→AP 时,AP 中加入空白 HBSS 0.4 mL 作为接收液,BP 中加入供试药液 1.0 mL。将 Transwell 板置于 37℃、转速 50 r·min⁻¹ 双层空气恒温振荡器中孵育,分别于 10, 20, 40, 60, 90, 120 min 吸取接收液,同时补加空白 HBSS 200 μL,每组设 4 个平行孔。取转运样品 200 μL,加入乙腈,离

心 10 min,取上清液进行 HPLC-MS 分析,计算其表观渗透系数(P_{app})。

1.9 数据处理及统计学方法 细胞的摄取量 = $C/C_{protein}$, C 是细胞摄取样品中 OA 的浓度, $C_{protein}$ 是考马斯亮蓝法测得的蛋白质浓度; $P_{app} = (dC/dt \cdot V)/(A \cdot C_0)$, dC/dt 为药物在单位时间转运量, V 为接受侧溶液体积, A 为 Transwell 多聚碳酸酯膜表面积 (0.33 cm^2), C_0 为 OA 在供侧初始浓度; 表观渗透率 (apparent permeability ratio, PDR) 的计算: $PDR = P_{app} BL \rightarrow AP/P_{app} AP \rightarrow BL$, 表示药物 $AP \rightarrow BL$ 表观渗透系数。采用 SPSS 17.0 版统计软件进行统计分析, 计量数据结果均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPLC-MS 分析方法的建立 成功建立了测定 OA 含量专属性强、灵敏度高的 HPLC-MS 分析方法, OA 保留时间约 2.3 min, 转运液及细胞悬液均无杂质干扰样品的测定。结果见图 1。



A. 空白 HBSS; B. 标准品溶液; C. 样品溶液; 1. OA; 2. 格列喹酮
A. blank HBSS; B. standard solution; C. sample solution;
1. OA; 2. glicludone

Fig. 1 HPLC-MS chromatograms of the sample

2.2 MTT 细胞毒性实验结果 MTT 实验结果表明, 随着 OA 浓度增加, 细胞存活率逐渐下降, 呈剂量依赖性, 培养时间对细胞存活率基本无影响。在 $5 \sim 40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内细胞的存活率 $> 80\%$, OA 的浓度 $> 40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 部分细胞出现细胞毒作用并伴随细胞形态学改变, 结果见表 1。因此, 在 Caco-2 细胞摄取和转运实验时, 选择 $5 \sim 40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为实验中 OA 给药浓度范围。

2.3 培养时间对细胞摄取 OA 的影响 Caco-2 细胞对 OA 的摄取量随培养时间的延长而变化, $0 \sim 40\text{ min}$ 细胞对其摄取呈增加趋势, 40 min 后逐渐趋于饱和, 细胞摄取量无显著增加 ($P > 0.05$), 结果见图 2。开始时可能由于细胞内外浓度差较大, 药液被细胞快速摄取, 40 min 后细胞内外液 OA 浓度达到相对平衡, 摄取量

趋于平缓。因此, 在细胞摄取试验中, 将摄取时间定为 40 min 。

表 1 OA 不同浓度和作用时间对 Caco-2 细胞存活率的影响
Tab.1 Effects of different concentration and incubation time of OA on the survival rate of Caco-2 cells

$\bar{x} \pm s, n = 4, \%$		
浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	12 h	24 h
5	98.8 ± 25.3	96.5 ± 23.5
10	92.3 ± 18.6	90.6 ± 15.9
20	86.3 ± 12.8	84.4 ± 14.6
40	82.4 ± 15.3	80.3 ± 10.7
80	69.5 ± 12.6	62.8 ± 10.3

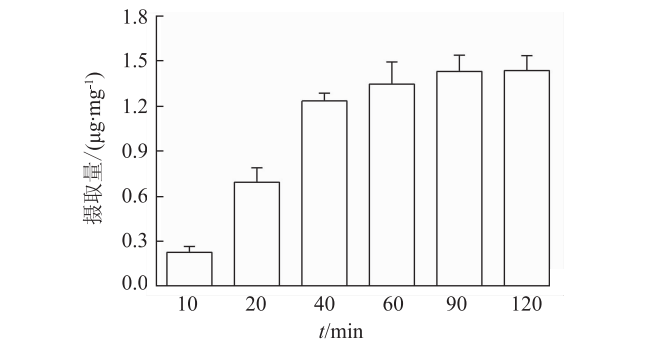


图 2 培养时间对 Caco-2 细胞摄取 OA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 2 Effects of incubation time on the uptake OA volume of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.4 药物浓度对细胞摄取 OA 的影响 将 Caco-2 细胞分别与 $5, 10, 20, 40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 OA 供试液培养 40 min , 考察浓度对细胞摄取 OA 的影响, 结果见图 3。摄取量随浓度的增加呈线性上升, 细胞对 OA 的摄取可能主要以被动扩散的方式进行。

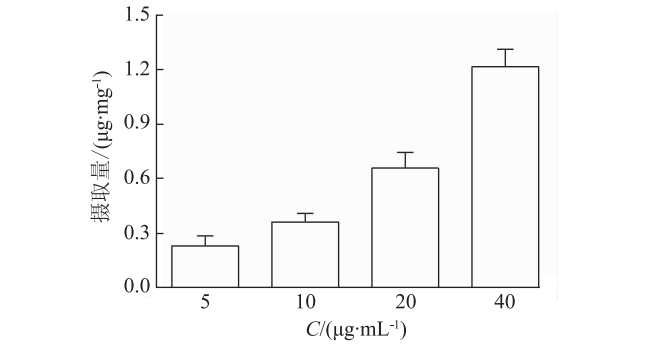


图 3 药物浓度对 Caco-2 细胞摄取 OA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 3 Effects of different drug concentration on the uptake OA volume of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.5 介质 pH 值对细胞摄取 OA 影响 将 $40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OA 供试液在 pH 值为 $5, 6, 7.4, 8$ 的条件下培

养 40 min,测定加药 40 min 后细胞对 OA 的吸收量,考察 pH 值对细胞吸收 OA 的影响。结果在 pH 值为 5,6,7.4,8 条件下,细胞对 OA 摄取量分别为 (1.27 ± 0.25) , (1.31 ± 0.35) , (1.36 ± 0.33) , (1.41 ± 0.28) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究中培养液 pH 值定为 7.4。

2.6 培养体系温度对细胞摄取 OA 的影响 分别考察 37 ℃ 与 4 ℃ 时,作用不同时间 Caco-2 细胞对 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OA 的摄取量,结果见图 4。结果表明,4 ℃ 时细胞摄取量 OA 大于 37 ℃ ($P < 0.05$)。细胞摄取量可能随着温度的升高而降低,呈现一定的温度依赖性。结果预示细胞摄取 OA 可能受外排蛋白影响,当温度为 4 ℃ 时,外排蛋白活力下降,外排作用减弱,药物的摄取量增加。

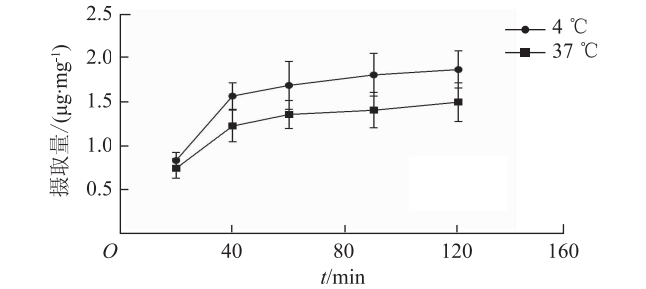


图 4 不同体系温度对 Caco-2 细胞摄取 OA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.4 Effects of different system temperature on the uptake OA volume of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.7 Caco-2 细胞转运实验 取 OA 供试液,分别加入 Caco-2 细胞单层膜的 AP 侧和 BL 侧,不同浓度 OA 在不同时间点跨膜转运 (AP→BL) 过程中的转运量变化情况见图 5。AP→BL 时,OA 转运量随浓度和转运时间增加呈线性增加,表现为浓度和时间依赖性,而 P_{app} AP→BL 随浓度的增加无显著改变 ($P > 0.05$); BL→AP 时, P_{app} BL→AP 随浓度的增加而减小,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),结果见表 2。结果表明,吸收过程 (AP→BL) 具有明显的浓度依赖性,主要以被动扩散的方式转运,而分泌过程 (BL→AP) 存在一定的浓度饱和性, P_{app} BL→AP 随着浓度升高而下降, PDR 随着浓度的增加而下降,可能受载体转运蛋白外排作用的影响。

为证实是否存在 P-gp 外排作用对 OA 转运的影响,转运液中加入 P-gp 抑制剂维拉帕米 (Ver, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),孵育 30 min 后加入 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OA 进行转运实验。结果见图 6。结果表明,吸收方向 (AP→BL) OA 转运量显著上升,差异有统计学意义 ($P <$

0.05),OA 分泌过程中 (BL→AP) 转运量则有所下降, PDR 值由 2.90 下降为 0.95。结果见表 3。该结果进一步说明 OA 在吸收过程中受到 P-gp 外排作用影响。

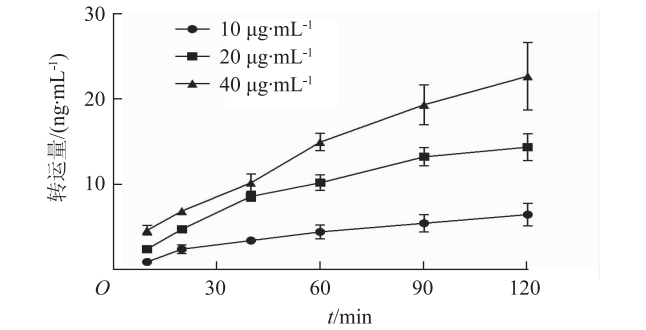


图 5 OA 浓度与作用时间对 AP→BL 转运量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.5 Effects of time and concentration of OA on AP→BL transport volume ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表 2 OA 浓度对 P_{app} 和 PDR 的影响
Tab.2 Effects of concentration of OA on P_{app} and PDR
 $\bar{x} \pm s, n = 4$

浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$		PDR
	AP→BL	BL→AP	
10	0.87 ± 0.22	3.88 ± 0.89	4.46
20	0.95 ± 0.26	3.31 ± 0.55	3.48
40	0.81 ± 0.18	$2.35 \pm 0.46^{*1}$	2.90

与 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, $^{*1}P < 0.05$

Compared with 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, $^{*1}P < 0.05$

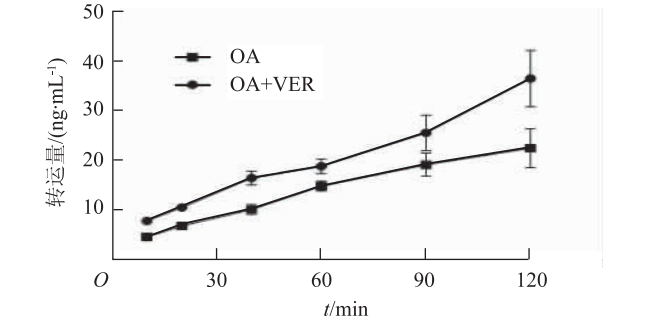


图 6 Ver 对 AP→BL 转运量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.6 Effects of Ver on AP→BL transport volumn of OA ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表 3 Ver 对 P_{app} 和 PDR 的影响
Tab.3 Effects of P-gp on P_{app} and PDR $\bar{x} \pm s, n = 4$

转运液	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$		PDR
	AP→BL	BL→AP	
OA	0.81 ± 0.18	2.35 ± 0.46	2.90
OA + Ver	$1.71 \pm 0.37^{*1}$	1.62 ± 0.39	0.95

与 OA 组比较, $^{*1}P < 0.05$

Compared with OA group, $^{*1}P < 0.05$

3 讨论

Caco-2 细胞来源于人结肠癌细胞,其结构和生化特点类似于人类小肠上皮细胞,体外培养一定时间后可以分化成具有多种药物载体和酶的小肠微绒毛结构,能够在细胞水平提供关于药物分子通过小肠黏膜的吸收、代谢信息,因此被广泛用于研究药物吸收机制^[7]。

本研究结果显示,在 0 ~ 24 h、OA 浓度为 5 ~ 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,Caco-2 细胞存活率均 > 80%,因此选取 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为最大药物浓度应用于本实验,以避免浓度过高导致细胞死亡,影响对药物吸收的判断。通过建立灵敏度高、特异性强的细胞摄取液和转运液中 OA 浓度的 HPLC-MS 测定方法,评价不同药物浓度、反应时间、介质 pH 值等因素对 OA 摄取以及 P-gp 抑制药对 OA 跨膜转运的影响。研究结果表明,OA 摄取存在时间和浓度依赖性,随着 OA 浓度上升细胞摄取量呈线性增加,表明 OA 主要以被动扩散方式被摄取。快速摄取在开始时出现,40 min 后细胞内外液浓度达到相对平衡,摄取量趋于平缓并达到相对饱和,不同介质 pH 值对 OA 的摄取量无显著影响;细胞摄取量随着温度的升高而降低,呈现一定的温度依赖性,4 $^{\circ}\text{C}$ 时 OA 细胞摄取量明显大于 37 $^{\circ}\text{C}$,预示 OA 细胞摄取可能受外排蛋白质影响,当温度 4 $^{\circ}\text{C}$ 时,外排蛋白质活力下降,外排作用减弱,故药物摄取量增加。

P_{app} 的数量级是反映药物透过 Caco-2 细胞单层能力及药物吸收难易程度的一般标准^[8]。本研究结果表明,OA 的吸收方向 P_{app} 在 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 数量级, P_{app} AP→BL 在 $(0.81 \sim 0.95) \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 之间,表明其肠黏膜的渗透性低,吸收不佳,这与其口服生物利用度较低的结果基本一致。吸收转运实验结果显示:细胞跨膜转运具有明确方向性,吸收方向 (AP→BL) 累积转运量随着 OA 浓度 ($10 \sim 40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 及孵育时间增加而增加, P_{app} 差异无统计学意义,提示药物吸收主要以被动扩散的方式转运;而分泌 (BL→AP) 方向, P_{app} 随浓度增加而减小,呈现一定的浓度饱和性,且 P_{app} AP→BL 和 P_{app} BL→AP 两组比较差异有统计学意义,不同浓度 PDR 值均 > 1.5,提示可能存在载体介导的外排转运过程^[9]。P-gp 是能量依赖性外排转运蛋白,能将许多结构不同的化合物逆向转运出细胞,从而培养形成完整细胞单层的 Caco-2 细胞能表达此类外排蛋白^[10]。有研究证实,部分同类五环三萜类化合物是 P-gp 底物,其吸收过程受到 P-gp 外排作用影响^[11]。为考察是否存在 P-gp 对 OA 吸收的外排作用,在转运

液中加入 P-gp 专属性抑制药 Ver,与对照组比较,Ver 能显著增加 OA 吸收方向 (AP→BL) 的转运量,提高吸收方向 P_{app} ,降低分泌方向 (BL→AP) P_{app} ,且 PDR 由 2.90 下降为 0.95,该研究结果进一步证实 OA 肠吸收过程可能受 P-gp 外排作用的影响,降低了药物的吸收,OA 可能是 P-gp 底物。综上所述,OA 口服生物利用度低可能受现有剂型溶解度及溶出速率的影响,肠黏膜低渗透性和吸收转运中存在外排蛋白 (P-gp) 作用,导致吸收较差也是其中原因之一。

参考文献

- [1] LIU J, LU Y F, ZHANG Y, et al. Oleanolic acid alters bile acid metabolism and produces cholestatic liver injury in mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272 (3): 816 - 824.
- [2] NKEH-CHUNGAG B N, OYEDEJI O O, OYEDEJI A O, et al. Anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of two semisynthetic derivatives of oleanolic acid [J]. *Inflammation*, 2015, 38 (1): 61 - 69.
- [3] MA C M, WU X H, MASAO H, et al. HCV protease inhibitory, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of oleanolic acid derivatives[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2009, 12 (3): 243 - 248.
- [4] 吴珍, 王启斌, 陈永顺, 等. 齐墩果酸诱导人结肠癌 LoVo 细胞凋亡作用研究[J]. *医药导报*, 2011, 30 (2): 176 - 180.
- [5] YANG R, HUANG X, DOU J, et al. Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of oleanolic acid: design and evaluation [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 2917 - 2926.
- [6] 杨海涛, 王广基. Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用[J]. *药学学报*, 2000, 35 (10): 797 - 800.
- [7] 董瑞华, 梁宇光, 单婷婷, 等. Caco-2 细胞模型对毛萜乙素的摄取与转运 [J]. *医药导报*, 2010, 29 (11): 1408 - 1411.
- [8] SEKI T, HAMADA A, EGAWA Y, et al. Evaluation of the effects of absorption enhancers on Caco-2 cell monolayers by using a pore permeation model involving two different sizes[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36 (11): 1862 - 1866.
- [9] 辛华雯, 吴笑春, 李罄, 等. 黄连素对 P-糖蛋白底物在 Caco-2 和 L-MDR1 细胞跨膜转运的影响[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23 (6): 799 - 803.
- [10] 刘志浩, 刘克辛. 肠道药物转运体及其研究方法[J]. *药学学报*, 2011, 46 (4): 370 - 376.
- [11] 程晓华, 熊玉卿. 熊果酸在 Caco-2 细胞单层模式中的跨膜转运[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25 (8): 1118 - 1119.