

Caco-2 细胞单层模型构建及 3 种药物吸收机制评价

黎 迎 朱春燕

(中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193)

摘 要 目的:研究 3 种不同特性药物体外 Caco-2 细胞转运及其机制.方法:构建 Caco-2 细胞单层模型,选择酚酸类药物丹参总酚酸,生物碱类药物盐酸小檗碱和皂苷类药物三七皂苷 R1 为模型药物,研究 3 种不同特性药物经 Caco-2 细胞单层膜转运特点,分析其转运机制.结果:丹参总酚酸在酸性条件下经 Caco-2 细胞单层膜转运较高,无外排机制.盐酸小檗碱外排机制较强,不受 pH 的影响.三七皂苷 R1 经 Caco-2 细胞转运较差,但无外排机制,不受 pH 的影响.结论:3 种药物口服吸收均较差,但机制不同.提高 3 种药物口服吸收的措施:提高丹参总酚酸在胃中滞留时间;消除盐酸小檗碱的外排影响;改善三七皂苷 R1 的膜透性.

关键词 盐酸小檗碱;三七皂苷 R1;丹参总酚酸;Caco-2 细胞单层模型;吸收机制

中图分类号 R966

文献标识码 A

0 引言

丹参总酚酸(salvianolic acids, SA)是丹参的水溶性提取物^[1],其主要成分包括丹酚酸 B(salvianolic acid B, SA-B)、丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸(rosmarinic acid, RA)、紫草酸(Alkannin)、丹酚酸 A 等,中国药典(2015 版)以 SA-B 及 RA 作为 SA 的质控指标. SA 易溶于水,是弱酸性药物.在前期对 SA 理化性质考察中发现,SA-B、Alkannin、RA(图 1)油水分配系数与 pH 值呈负相关,在胃部 pH 条件下油水分配系数明显高于在肠中,油水分配系数越高越有利于药物的跨膜转运^[2-5].

盐酸小檗碱(berberine hydrochloride, BER)可以降低血压、降低血脂、降低血糖、降低血小板聚集率、降低血粘度;有治疗高血压病、心率失常病、心力衰竭病和 II 型糖尿病等多种心血管疾病及其合并症的作用,目前仍未广泛运用于临床.目前研究表明,BER 属于季铵型异喹啉类生物碱(图 1),呈强碱性,荷正电,由于其溶解度低,生物膜透过性差,口服吸收不佳,且易被胃肠道中的蛋白吸附而影响吸收,生物利用度极低,造成难以达到发挥药理作用的有效浓度,用于治疗心血管疾病及其合并症时需要大剂量频繁服用,毒副作用就有所增强,给患者的身体带来了较大的负面影响^[6-8].

三七皂苷 R1(R1)是三七中的主要成分,是一种皂苷(图 1),其水溶性强,膜透性差.根据中国药典(2015 版),R1 是三七有效且具有结构代表性的生物活性成分,具有神经保护^[9]、肝脏保护、心血管保护和免疫刺激作用.Caco-2(the humancolon carcinoma cell line)细胞来源于人体结肠癌细胞,是一种评价药物肠吸收的体外模型,与肠上皮近似,细胞内有药物代谢酶,Caco-2 细胞单层模型因其较整体动物实验具有明显的快速、成本低等优点,被广泛地用于药物吸收和转运机制研究^[10,11].Caco-2 细胞适合大部分药物口服吸收机制的研究,例如被动转运、细胞旁路转运、载体介导的内吞和外排机制.

本研究选择 SA、BER 和 R1 为三种不同特性的模型药物,建立了 Caco-2 细胞单层模型,考察了其经 Caco-2 细胞膜转运的特性,探索了不同特性药物的胃肠道吸收机制,为三种药物剂型设计提供了参考.

收稿日期:2018-11-20

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81274094);协和青年科研基金资助项目(2017350017)资助

通讯作者:黎迎,女,汉族,博士,助理研究员,研究方向:口服及靶向制剂研究,E-mail: yli@implad.ac.cn.

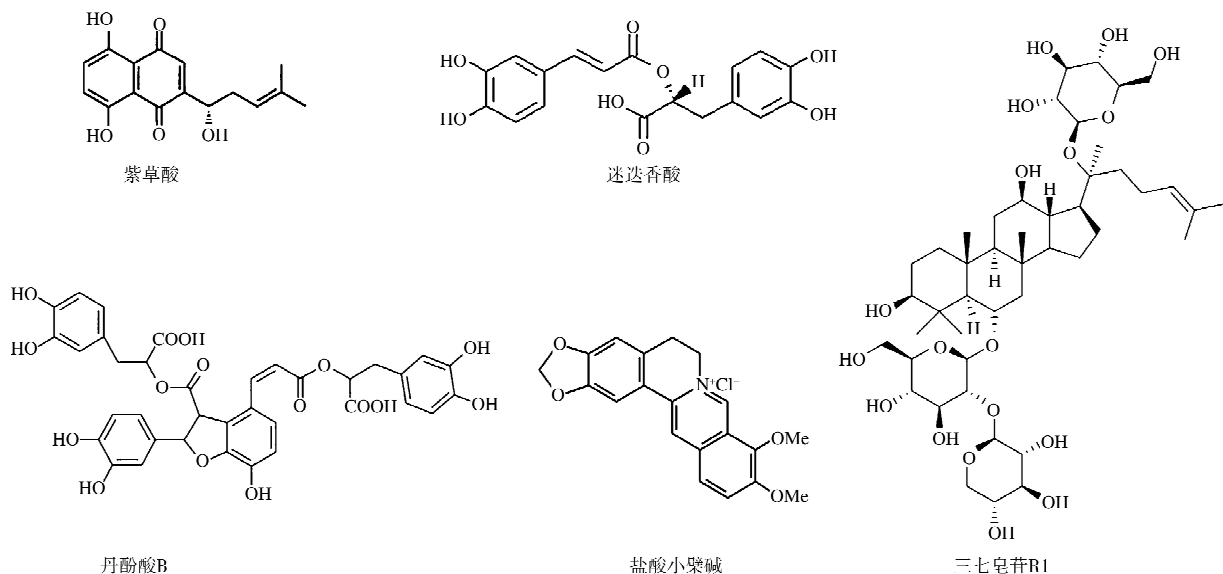


图1 各种药物成分化学结构示意图

1 仪器与试剂

1.1 仪器

BSA224S-CW 电子天平(德国 SARTORIUS 公司);LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司,SPD-10AVP 紫外检测器,SCL-10AVP 控制器,CTO-10ASVP 柱温箱,CLASS-VP 工作站);MILLICELL-ERS 电阻仪(美国 MILLIPORE 公司);MCO-15AC CO₂ 细胞培养箱(日本 SANYO 公司);DL-CJ-2ND 超级洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

1.2 试剂

丹参总酚酸提取物(西安小草植物科技有限公司,批号 XC20170112);丹酚酸 B 对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号 160928);紫草酸对照品(天津一方科技有限公司,批号 AW111Z);迷迭香酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 P26A7F13802);盐酸小檗碱提取物(上海融禾医药科技发展有限公司,批号 170726);盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,111566-201706);三七皂苷 R1 提取物(上海融禾医药科技发展有限公司,批号 171024);三七皂苷 R1(中国食品药品检定研究院,110745-201318). 乙腈和甲醇(UPLC-MS 级别)购于 Fisher 公司(Waltham, MA, USA). 胎牛血清(澳大利亚 LONZA 公司);MEM/HBSS(美国 HyClone 公司);碱性磷酸酶(AKP)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 细胞

Caco-2 细胞(北京协和医学院基础所细胞中心,实验用 30 代至 60 代)。

2 方法

2.1 Caco-2 细胞模型建立及表征

取 Caco-2 细胞,PBS 清洗,用胰酶消化,吹打细胞成单细胞混悬液,计数,调整浓度为 2.0×10^5 个/mL. 取 0.5 mL 细胞混悬液接种于 Transwell 板的肠腔侧(apical, AP),基底侧(basolateral, BL)加入 1.5 mL 培养液. 隔天换液. 分别于接种后 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 和 21 天测定接种于 Transwell 板上的 Caco-2 细胞的电阻值(Ω).

分别取 AP 侧和 BL 侧两侧培养基 100 μ L,按照 AKP 试剂盒方法,测其 AKP 活性. 分别测定空白孔、标准孔和测定孔的吸光度值,计算 AKP 的活性,每 5 天测一次。

2.2 透膜转运实验

BER、R1 和 SA 用不含钙离子、镁离子的 Hank's 平衡盐溶液(Hank's buffered salt solution,D-hank's)缓冲液(pH 7.4,pH 6.0)稀释至适当浓度. 将 Caco-2 细胞以浓度为每毫升 2.0×10^5 个接种于 Transwell 板 AP 侧,按照“2.1”方法培养. 于第 21 天,D-Hank's 清洗,AP 侧加入含 BER、R1 和 SA 的无菌 D-Hank's 液(pH=7.4)0.5 mL,BL 侧加入不含药物的 D-Hank's 液 1.5 mL,将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 水浴振荡器中,缓慢震

荡,于 2 h 取出至 EP 管中,实验平行 3 组.

外排实验(BL-AP): BL 侧加入含 BER, R1 和 SA 的无菌 D-Hank's 液(pH=7.4)1.5 mL, AP 侧加入不含药物的 D-Hank's 液(pH=7.4)0.5 mL.

BL 侧取出的样品溶液,微孔滤膜过滤,注入 HPLC-UV 分别测定 BER、R1、Alkannin、RA 和 SA-B 的含量.根据公式 $P_{app} = (dQ/dt)/AC_0$ 计算其跨膜转运表观渗透系数(P_{app})值,其中 dQ/dt 为单位时间药物转运量(mg/s), A 为转运膜的面积(0.6 cm^2), C 为药物的初始浓度(mg/L).

2.3 数据统计处理

所有数据均以 Mean±SD 表示.结果的差异性分析通过 SPSS 17.0 软件及 One-way ANOVA 分析进行计算. $p < 0.05$ 时认为结果具有显著性差异.

3 实验结果

3.1 Caco-2 细胞模型建立

Caco-2 细胞单层膜电阻值测定结果见图 2. Caco-2 细胞接种于 Transwell 板 21 D 时,其电阻在 1000Ω 以上,表明形成了致密的细胞单层.

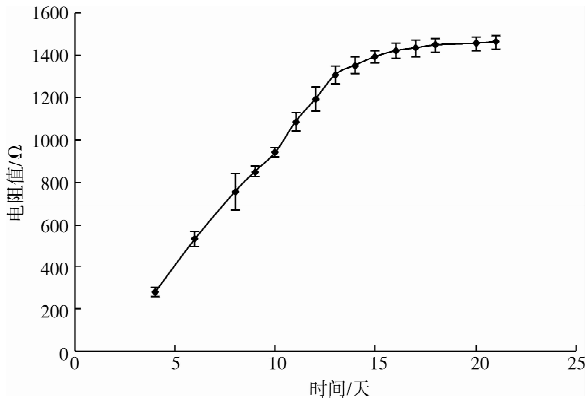


图 2 Caco-2 细胞单层电阻值随时间变化图($n=12$)

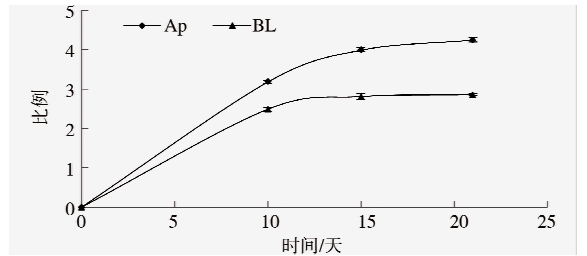


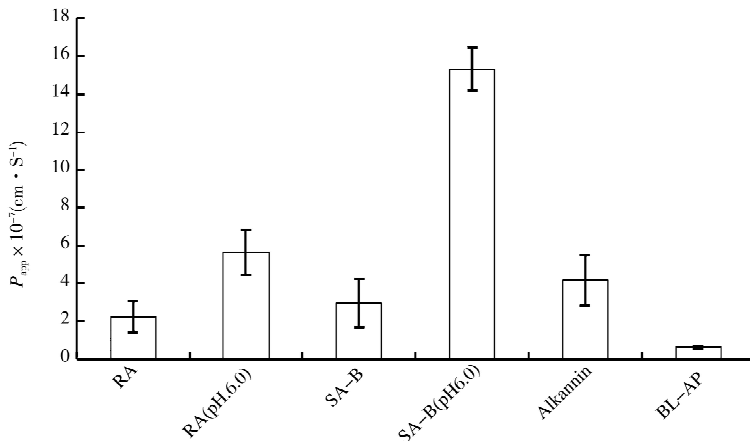
图 3 Caco-2 细胞 AP 侧和 BL 侧的 AKP 随时间的变化($n=3$)

Caco-2 细胞 AKP 测定结果见图 3.当细胞生长到 21 D 时,AP 和 BL 两侧的 AKP 酶数量差值明显,表明 Caco-2 细胞两侧的极化已经基本形成.

综上所述,Caco-2 细胞单层膜有较好的完整性,电阻值大于 1000Ω ,AKP 测定说明细胞生长分化良好,本实验所建立的 Caco-2 细胞模型可以用作药物转运实验.

3.2 Caco-2 细胞转运及机制研究

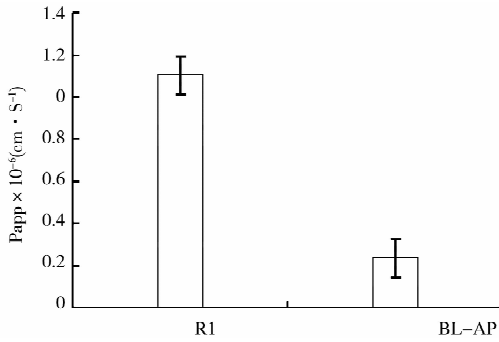
SA 经 Caco-2 细胞转运结果见图 4.由图 4 可知,SA 中 RA、SA-B 和 Alkannin 的 P_{app} 值小于 $10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,为吸收较差的药物^[12,13].与转运介质为 pH7.4 溶液相比,转运介质为 pH 6.0 溶液明显增高,且具有显著性差异, $p < 0.05$ ^[14],说明 RA 和 SA-B 在低 pH 条件下,细胞膜转运更好. AlkanninBL-AP 侧 P_{app} 值明显小于 AP-BL 侧, $p < 0.05$,说明其转运过程无外排机制.



注:“*” $p < 0.05$,与 RA 相比;“&.” $p < 0.05$,与 SA-B 相比;“#”, $p < 0.05$,与 Alkannin 相比.

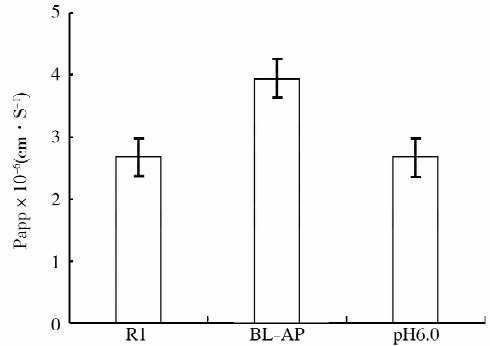
图 4 丹参总酚酸中迷迭香酸(RA)、丹酚酸 B(SA-B)和紫草酸(Alkannin)经 Caco-2 细胞转运 P_{app} 值

R1 经 Caco-2 细胞转运结果见图 5. 由图 5 可知, R1 的跨膜转运 P_{app} 值小于 $10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 为吸收较差的药物. R1 的 BL-AP 侧 P_{app} 值明显小于 AP-BL 侧, $p < 0.05$, 说明其转运过程无外排机制.



注: “*” , $p < 0.05$, 与 R1 相比.

图 5 三七皂苷 R1(R1)经 Caco-2 细胞转运 P_{app} 值



注: “*” , $p < 0.05$, 与 BER 相比.

图 6 盐酸小檗碱(BER)经 Caco-2 细胞转运 P_{app} 值

BER 经 Caco-2 细胞转运结果见图 6. 由图 6 可知, BER 的跨膜转运 P_{app} 值小于 $10 \times 10^{-6} (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$, 为吸收较差的药物. 与转运溶液为 pH 7.4 溶液相比, 转运溶液 pH 6.0 溶液明显增高, 无显著性差异, $p > 0.05$, 说明 BER 的转运不受 PH 条件的影响. BER 的 BL-AP 侧 P_{app} 值明显大于 AP-BL 侧, $p < 0.05$, 说明 BER 更易由基底面到肠腔面, 其转运过程有明显的外排效应^[15].

4 讨论

药物经 Caco-2 细胞的体外转运过程与药物口服后在肠道中的吸收有良好的相关性, 可作为药物吸收研究的一种快速筛选工具. 吸收良好的药物的 $P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; 而吸收差的药物, $P_{app} < 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

SA 从 AP 到 BL 的吸收远大于从 BL 到 AP 的吸收, 结果表明, 在 SA 从 AP 到 BL 的透膜吸收过程中, 无外排泵参与. 单羧酸转运蛋白家族(monocarboxylate transporters, MCT)可以介导具有单羧酸结构的物质的主动转运, SA 中主要成分含有单羧酸基团, 实验结果显示, SA 在 Caco-2 细胞单层膜上的吸收, 当 AP 侧转运溶液 pH 为 6.0 时, SA 从顶端到基底的透膜量明显多于 pH 为 7.4 时, 可能原因是 pH 为 6.0 时 SA 中主要成分的羧酸基团游离出来, 与 MCT 上的单氨基结合, 满足了底物识别的结构条件. 因此, 在弱酸性环境下, SA 中主要成分有较好的吸收, 提高 SA 的口服生物利用度制剂研究中, 可以通过延长药物在胃或小肠上端中的停留时间, 来促进药物的吸收.

BER 的外排比率($P_{app, BL} / P_{app, AP}$)的结果表明, 这种季铵碱在小肠吸收转运的过程中可能存在肠道转运蛋白的外排作用, 而外排的存在是导致 BER 的口服吸收减少, 口服生物利用度较低的原因. 有文献^[16]报道, BER 是 P-gp 的底物, P-gp 的外排作用可能是导致其生物利用度低的原因之一.

R1 的 P_{app} (BL-AP) 小于 P_{app} (AP-BL), 说明 R1 不易由基底面到肠腔面, 无外排泵参与转运. R1 是水溶性较强, 其转运较低, 说明 R1 口服生物利用度低可能是由于其膜透性差的原因.

5 结论

本研究建立了 Caco-2 细胞单层模型, 可应用于探索三种不同特性药物丹参总酚酸、盐酸小檗碱和三七皂苷 R1 经 Caco-2 细胞转运特点及其机制, 为三种药物进一步进行剂型设计提供参考.

参考文献

- [1] 赵洪芝, 王静, 姜民, 等. 丹参总酚酸提取物 UPLC 指纹图谱及成分定性研究[J]. 药物分析杂志, 2012(4): 620-622.
- [2] Liu Z, Zheng X, Guo Y, et al. Quantitatively metabolic profiles of salvianolic acids in rats after gastric-administration of Salvia miltiorrhiza extract[J]. Fitoterapia, 2016, 113: 27-34.
- [3] 高东雁. 丹参酚酸磷脂复合物及其自乳化给药系统研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [4] 张英丰, 李玉洁, 杨庆, 等. 大鼠在体单向肠灌注法进行丹参素、丹酚酸 B 的肠吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 96-100.

- [5] 唐星.口服缓控释制剂[M].北京:人民卫生出版社,2007.
- [6] 谭晓梅,郭友立,钟玉飞.黄连提取物中盐酸小檗碱及药根碱大鼠在体肠吸收特征的研究[J].中国中药杂志,2010,35(6):755-758.
- [7] 张艳斌,崔元璐.环糊精包合作用对在体大鼠肠道P-糖蛋白泵的影响[J].中国药理学通报,2008,24(10):1318-1323.
- [8] 肖学风,乔晓莉,高岚,等.黄柏中盐酸小檗碱的药代动力学研究[J].天津中医药大学学报,2008,27(4):263-265.
- [9] Gu B, Nakamichi N, Zhang WS, et al. Possible protection by notoginsenoside R1 against glutamate neurotoxicity mediated by N-methyl-D-aspartate receptors composed of an NR1/NR2B subunit assembly[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(9):2145-2156.
- [10] 高坤,孙进,何仲贵.Caco-2 细胞模型在口服药物吸收研究中的应用[J].沈阳药科大学学报,2005,22(6):73-78.
- [11] 蒋学华,贾运涛,袁媛,等.Caco-2 细胞模型在口服药物吸收过程研究中的应用[J].中国药学杂志,2002,37(5):7-9.
- [12] Yamashita S, Konishi K, Yamazaki Y, et al. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system[J]. J Pharm Sci, 2002, 91(3):669-679.
- [13] Ranaldi G, Consalvo R, Sambuy Y, et al. permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media[J]. Toicol In Vitro, 2003, 17(5-6):761-767.
- [14] 高东雁.丹参酚酸磷脂复合物及其自乳化给药系统研究[D].上海:复旦大学,2009.
- [15] Zhang X, Qiu F, Jiang J, et al. Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine and coptisine: involvement of glycoprotein[J]. Xenobiotica, 2011, 41(4):290-296.

Construction of Caco-2 Cell Monolayer Model and Absorption Mechanism Evaluation of Three Kinds of Drugs

LI Ying ZHU Chun-yan

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract Objective The transport mechanism of 3 kinds of drugs across Caco-2 cells in vitro were studied. Method Caco-2 cell monolayer model was constructed. Salvianolic acids (phenolic acid drugs), berberine hydrochloride (alkaloids drugs) and notoginsenoside R1 (saponins drugs) were selected as model drugs. Transport characteristics of three kinds of drugs transport across Caco-2 cell monolayer were studied and their transport mechanism was analyzed. Result Salvianolic acids was highly transported across Caco-2 cell monolayer under acidic conditions without efflux effect. The efflux effect of berberine hydrochloride was strong, the transport was not affected by pH of the transport media. Notoginsenoside R1 was poorly transported across Caco-2 cells, but had no efflux effect and was not affected by pH of the transport media. Conclusion Oral absorption of the three drugs is not good, what's more, the mechanism is different. The strategies to improve the three drugs oral absorption are as follows: Improving the retention time of salvianolic acids in stomach; Reducing the efflux of berberine hydrochloride; Improving lipophilicity of notoginsenoside R1.

Key words berberine hydrochloride; notoginsenoside R1; salvianolic acids; Caco-2 cells; absorption mechanism