

## 肠上皮细胞模型不同培养条件的优化及适应性研究

马博<sup>1,2</sup>, 孙桂波<sup>2</sup>, 杨志宏<sup>2</sup>, 李明<sup>3</sup>, 孙晓波<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193;  
3. 温州医学院, 浙江 温州 325035)

**[摘要]** 目的: 建立肠上皮(Caco-2)细胞单层模型, 探讨不同培养条件对细胞单层模型的影响, 优化适宜的条件, 提供稳定、重复性好的 Caco-2 细胞模型。方法: 将细胞接种 Transwell 培养板上进行体外培养, 并比较 3 种 Transwell 培养板及包被鼠尾胶原蛋白对细胞单层的影响, 通过透射电镜和倒置显微镜观察细胞单层的形态学特征, 通过测定细胞单层的电阻值、细胞两侧碱性磷酸酶含量、荧光素钠的透过量验证细胞单层的完整性、极性、通透性。结果: 经过 21 d 培养, 24 孔 Transwell 培养的细胞单层的完整性、极性高于 12 孔 Transwell 培养的细胞单层, 而透过性低于 12 孔 Transwell 培养的细胞单层; 包被鼠尾胶原蛋白的 Transwell 于细胞单层生长前期跨上皮细胞电阻值(trans epithelium electrical resistance, TEER)迅速升高, 对细胞单层生长的中后期无显著性影响。结论: 3 种 Transwell 均可成功培养 Caco-2 细胞单层, 24 孔站立式 Transwell 适用于样品需求量少、检测灵敏度高的物质, 可应用于大量样品的高通量筛选; 12 孔悬挂式 Transwell 提供检测的样品量和透过率较大, 适于实验室的常规操作和常用仪器的样品需求。

**[关键词]** Caco-2 细胞; 跨膜电阻; 碱性磷酸酶; 表观渗透率

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0205-06

## Comparative Study on Different Culture Conditions for Caco-2 Cell Model

MA Bo<sup>1</sup>, SUN Gui-bo<sup>2</sup>, YANG Zhi-hong<sup>2</sup>, LI Ming<sup>3</sup>, SUN Xiao-bo<sup>2\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China;

2. Chinese Academy of Medical Sciences·Peking Union Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China; 3. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the impacts of culture conditions on the Caco-2 cell model, to optimize the appropriate conditions for a stable, reproducible Caco-2 model. **Method:** The environment of small intestine was *in vitro* simulated, and rat tail collagen was coated on three types of Transwell monolayerly and compared. Morphological features were observed by microscope, the integrity, polarity and permeability of monolayer were measured by the resistance, alkaline phosphatase, the amount of sodium fluorescein. **Result:** After culture of 21 days, the integrity, polarity of Caco-2 monolayer cultured on 24-well Transwell were higher than that on 12-well Transwell, but the permeability were the opposite. The TEER of the monolayer coated with rat tail collagen was increased rapidly in early stages, and was no significant effect at the middle and late stages. **Conclusion:** Three types of Transwell can be successfully used to culture Caco-2 cell monolayer. 24-well Transwell is suitable for small samples with high sensitivity and high-throughput screening of a large number of samples. 12-well Transwell has higher volume of sample and permeability, is suitable for routine laboratory operations and equipment.

**[Key words]** Caco-2 cell; TEER; AKP;  $P_{app}$

**[收稿日期]** 2011-01-25

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2008BAI51B00); 国家科技部科研院所技术开发研究专项(2008EG150298); 高等学校博士学科点专项科研基金(200800231106); 国家科技部重大新药创制专项(2009ZX09301-003)

**[第一作者]** 马博, 在读博士研究生, 从事中药复方药理及新技术研究, Tel: 18911531909, E-mail: emma0emma@163.com

**[通讯作者]** \* 孙晓波, 研究员, 博士, 从事中药复方的药理学研究, Tel: 010-62898496, E-mail: sun-xiaobo@163.com

Caco-2 细胞最初由 Fogh<sup>[1]</sup> 等于 1977 年从人类结肠腺癌细胞中分离得到。其同源性好,生命力强,细胞经过约 3 周左右的培养<sup>[2]</sup>,形成连续的单层并具备与人类小肠上皮细胞相似的微绒毛结构,部分表达出与小肠上皮相同的某些特征酶,如蔗糖酶、酯酶、乳糖酶、氨基肽酶等。Caco-2 模型已经越来越多的应用于中药及中药复方中有效成分的研究。Caco-2 细胞模型与其他用于研究吸收的模型相比具有操作简便、模型稳定的特点,成为药物吸收研究的一种快速筛选工具,可在细胞水平上提供药物分子透过小肠黏膜的吸收、代谢、转运的综合信息,为药物研究提供依据。但 Caco-2 细胞在应用中由于造模时间过长,培养条件各异,使实验结果缺乏可比性。不同实验室对 Caco-2 细胞模型的培养条件和验证标准均存在不同程度的差别,文献报道不一,为使 Caco-2 模型具有更高的稳定性和重复性,本实验对 Caco-2 细胞单层模型的不同培养条件进行了对比研究,探讨了不同培养条件对 Caco-2 细胞建模的影响,为建立可靠、稳定的 Caco-2 细胞模型用于药物吸收、转运研究提供依据。

## 1 材料

**1.1 药品与器材** MEM 培养基(Gibico 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),碱性磷酸酶(AKP)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),HEPES、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、鼠尾胶原蛋白(Sigma 公司),葡萄糖(天津市标准科技有限公司),EDTA 二钠、丙酮酸钠(北京鼎国生物技术有限责任公司),NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, DMSO(北京化学试剂公司),细胞培养板(Corning 公司), Transwell™ 培养板(美国 Millipore),酶标仪(Biotek 公司),millicell-ERS 细胞电阻仪(美国 Millipore 公司),pH 计(梅特勒-托利多公司),磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司),CO<sub>2</sub> 培养箱(Theme 公司),细胞计数仪(Casy 公司),超净工作台(Zhjh 公司),倒置相差显微镜(Olympus),JEM1400 型透射电子显微镜(日本)。

**1.2 试剂配制** HBSS: NaCl 8.00 g, KCl 0.4 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.086 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06 g, NaCO<sub>3</sub> 0.35 g, 葡萄糖 1.00 g, 加三蒸水至 1 000 mL, 调 pH 为 7.2~7.4, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 4℃ 保存备用。MEM 培养液: 取一袋 MEM 干粉培养基(含非必需氨基酸), NaHCO<sub>3</sub> 2.2 g, 丙酮酸 0.11 g, HEPES

1.42 g 加入适量三蒸水溶解, 磁力搅拌器搅拌, 加浓度为 100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素、链霉素各 0.5 mL, 加三蒸水至 1 L, 调 pH 7.0~7.2, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 4℃ 保存, 用前加入 20% 胎牛血清。胰酶(0.25% 胰蛋白酶 + 0.03% EDTA): 胰蛋白酶 0.25 g, NaCl 0.8 g, KCl 0.04 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.058 g, EDTA 0.03 g, 葡萄糖 0.1 g, 青、链霉素 100 U·mL<sup>-1</sup> 各 0.1 mL, 加三蒸水至 100 mL, 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 4℃ 保存备用。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 将 Caco-2 细胞(来源于 ATCC, 实验用细胞为 30~60 代)接种于 T25 细胞培养瓶中, 加入 MEM 培养基(含 20% 胎牛血清)3 mL 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。隔天换液, 当细胞达到 80% 汇合时(约 4~5 d), 用胰酶进行消化并按 1/3 的比例进行传代。

**2.2 单层模型的建立** 将处于对数生长期的细胞消化下来, 按 2 × 10<sup>5</sup> cells·mL<sup>-1</sup> 接种于 Transwell 的 AP 侧, BL 侧加入适量培养液如图 1 所示。于接种后第 1 周隔天换液, 1 周后每天换液, 培养 21 d 待用。本实验中选用的 3 种 Transwell 加入液体量分别为: 12 孔, 悬挂式, AP 侧 500 μL, BL 侧 1 500 μL; 24 孔, 悬挂式, AP 侧 300 μL, BL 侧 1 700 μL; 24 孔, 站立式, AP 侧 400 μL, BL 侧 600 μL。

**2.3 细胞形态学观察** 于倒置相差显微镜下观察细胞生长状态, 了解其生长习性并记录拍照, 将生长于微孔滤膜上的细胞单层(21 d)固定后, 纵切制备铜网, 于透射电子显微镜下观察其特征的微绒毛结构。

**2.4 分组** 本实验按选取的 Tranwell 不同分为 3 组, 分别为 0.4 μm、24 孔、站立式、聚碳酸酯膜(Millipore); 0.4 μm、24 孔、悬挂式、聚碳酸酯膜(Millipore); 0.4 μm、12 孔、悬挂式、聚酯膜(Corning)进行 Caco-2 细胞单层的培养。

**2.5 细胞单层的完整性比较** 应用 3 种 Transwell 及包被鼠尾胶原蛋白的 3 种 Transwell 进行 Caco-2

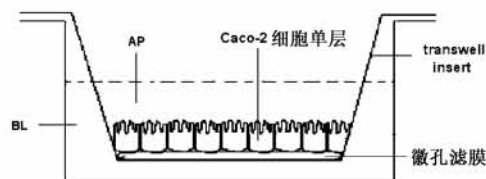


图 1 Caco-2 细胞模型培养示意(悬挂式 Transwell)

细胞单层的培养,于第1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21天测定TEER值,观察6组细胞单层紧密连接的动态形成过程及其差别。

**2.6 细胞单层的极性** 于Caco-2细胞单层生长的第7,14,21天,取AP及BL侧培养液,按试剂盒要求测定AKP酶活性,观察单层形成过程中两侧的极性变化及生长于不同Transwell上的Caco-2细胞模型极性的差别。

**2.7 细胞单层的通透性** 将荧光素钠(30 mg·L<sup>-1</sup>, HBSS 配制)加入到3种不同Transwell。AP→BL侧透过时,加药于AP侧;BL→AP侧透过时,加药于BL侧。于0.5,1,1.5,2,2.5,3 h于接收侧取样,用紫外分光光度法(酶标仪)在490 nm处进行测定,按公式计算表观渗透率。

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

$dQ/dt$ :单位时间内透过量的变化(mg·s<sup>-1</sup>), $A$ :膜的有效面积(cm<sup>2</sup>), $C_0$ :加入药物的初始质量浓度(mg·L<sup>-1</sup>)。

### 3 结果和讨论

**3.1 细胞的形态学检查** 在倒置光学显微镜下观察,Caco-2细胞生长24 h后,开始出现边缘轮廓清晰的细胞;生长至第4~5天时可达到70%~90%汇合,成熟的Caco-2细胞呈多角形,细胞间呈现紧密连接并具有单层特征。见图2。将接种于Transwell上,生长至21 d的Caco-2细胞单层,制备电镜片,于透射电子显微镜下观察,可清晰观察到细胞单层上侧所分化出的微绒毛结构,见图3。

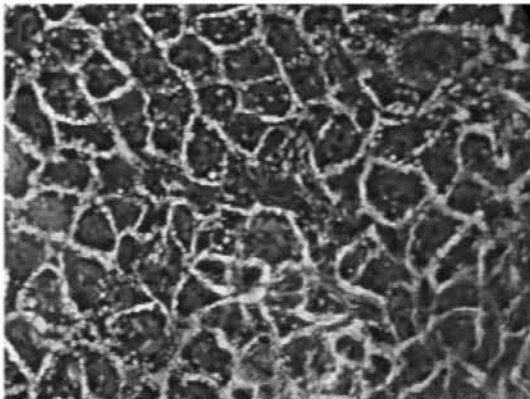


图2 光学显微镜下观察生长至成熟的Caco-2细胞(×400)

**3.2 6组细胞单层的完整性比较** 6组Caco-2细胞单层分别为3种不同Transwell及其包被了鼠尾胶原蛋白的Transwell,实验所选的3种膜的空白TEER分别为(151 ± 6.18)Ω(24孔,站立式);(85 ±

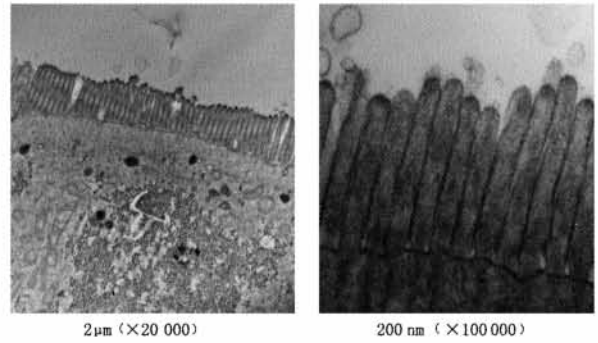


图3 透射电子显微镜下观察 Transwell上生长至21 d的细胞单层

3.47)Ω(24孔,悬挂式);(112 ± 6.27)Ω(12孔,悬挂式)。计算Caco-2细胞单层的电阻值。

$$TEER_{Caco-2细胞单层} = TEER_{实测值} - TEER_{空白值}$$

生长于3种不同Transwell上的细胞单层于生长前期TEER迅速增高,中期即可达到1 000 Ω以上,后期电阻值增长缓慢,见图4。鼠尾胶原蛋白对站立式Transwell上生长的Caco-2细胞单层的完整性影响较大,涂有鼠尾胶原蛋白的站立式Transwell于细胞单层生长期的所有时段,电阻值均高于未涂有鼠尾胶原蛋白的站立式Transwell;鼠尾胶原蛋白对悬挂式Transwell的影响主要集中于前7 d,TEER值呈现迅速上升后下降的趋势,对7 d以后的TEER则没有显著性影响,见图5。

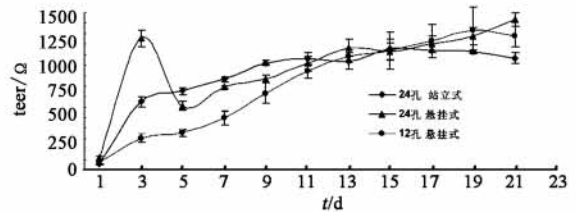


图4 3种不同Transwell培养的Caco-2细胞单层完整性比较

**3.3 不同处理对细胞单层极性的影响** 碱性磷酸酶是小肠上皮细胞刷状缘的标志性酶,Caco-2细胞分化后,可根据测定刷状缘上此酶的活性对其极性的形成进行判断。结果显示生长于3种不同Transwell上的细胞单层生长至7 d时,膜两侧AKP的量具有显著性差别( $P < 0.05$ );生长至14 d,3种Transwell膜两侧极性均呈现极显著性差异( $P < 0.01$ );生长至21 d,膜两侧这种极性的差别继续加大,膜两侧AKP的比值(AP/BL)分别为:2.02(12孔悬挂式),2.64(24孔悬挂式),2.47(24孔站立式),这种比值均可达到2~3倍,其中以24孔悬挂

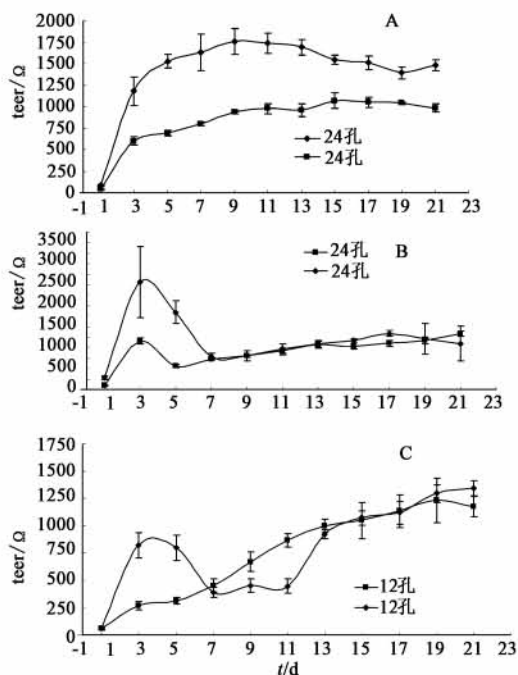


图 5 鼠尾胶原蛋白对 Caco-2 细胞单层完整性的影响  
A. 24 孔站立式; B. 24 孔悬挂式; C. 12 孔悬挂式

式的差别最为突出。见表 1。

表 1 细胞单层生长至 7, 14, 21 d 时, AP 和 BL 侧碱性磷酸酶的差异 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

单层		7 d	14 d	21 d
12 孔悬挂式	AP	6.92 ± 0.10	6.93 ± 0.12	7.60 ± 0.33
	BL	6.80 ± 0.12 <sup>1)</sup>	5.43 ± 0.17 <sup>2)</sup>	3.76 ± 0.42 <sup>2)</sup>
24 孔悬挂式	AP	6.77 ± 0.42	9.35 ± 1.34	9.79 ± 0.66
	BL	6.09 ± 0.41 <sup>1)</sup>	6.80 ± 0.38 <sup>2)</sup>	3.71 ± 0.30 <sup>2)</sup>
24 孔站立式	AP	6.78 ± 0.13	9.06 ± 0.49	9.88 ± 0.33
	BL	6.29 ± 0.23 <sup>2)</sup>	7.35 ± 0.31 <sup>2)</sup>	3.99 ± 0.40 <sup>2)</sup>

注: BL 与 AP 侧比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.4 不同处理对细胞单层通透性的影响** 本实验选用的荧光素钠 ( $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ( $Y = 0.060 8X + 0.062, r^2 = 0.998 2$ ), 对比研究了生长于 3 种 Transwell 上的 Caco-2 细胞单层的透过能力的差别, 表观渗透系数 ( $P_{app}$ ) 见图 7。结果显示, 荧光素钠 B→A 的透过率 (%) 大于 A→B, 其透过百分率-时间的关系, 见图 6; 3 h 时 B→A 透过的  $P_{app}$  大小依次为 12 孔悬挂式 ( $31.26 \times 10^{-6}$ ) > 24 孔悬挂式 ( $11.76 \times 10^{-6}$ ) > 24 孔站立式 ( $11.74 \times 10^{-6}$ ); A→B 透过的  $P_{app}$  大小依次为: 12 孔悬挂式 ( $8.58 \times 10^{-6}$ ) > 24 孔悬挂式 ( $3.70 \times 10^{-6}$ ) > 24 孔站立式 ( $3.15 \times 10^{-6}$ ), 见图 7, 结果显示 12 孔透过率显著高于 24 孔。

#### 4 讨论

微孔滤膜是 Transwell 的主要组成部分, 是

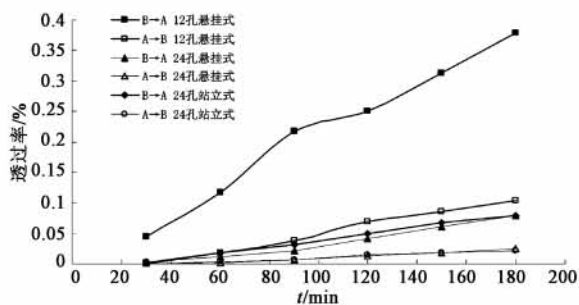


图 6 荧光素钠生长于 3 种不同 Transwell 上 Caco-2 细胞单层透过率-时间关系曲线

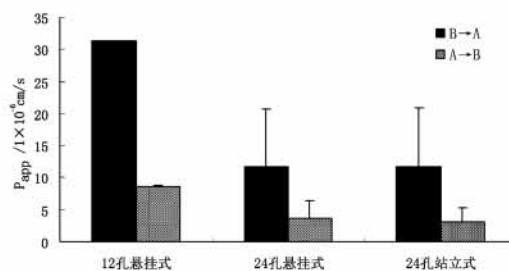


图 7 生长于 3 种不同 Caco-2 细胞单层于 3 h 的  $P_{app}$  ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Caco-2 透过模型建立必须依赖的材料, 不同的微孔滤膜在材质、孔径、大小等诸多因素上存在差别, 这些差别对 Caco-2 细胞单层的生长是否具有影响未见文献报道, 因此本实验比较了 3 种实验室常用的 Transwell 对 Caco-2 细胞模型建立的影响。实验结果显示 24 孔较 12 孔 Transwell 培养的细胞单层紧密性高、透过率低, 适用于样品量少, 且检测灵敏度较高的物质的转运研究, 12 孔 Transwell 细胞单层模型, AP 侧容积较 24 孔大, 取样量更充足, 方便取样和补液, 适用于大多数样品的转运研究。微孔滤膜的材质有多种, 实验室最常用的为聚碳酸酯膜 (polycarbonate membrane) 和聚酯膜 (polyester membrane), 二者的区别在于: ① 聚酯膜可于倒置相差显微镜下直接观察到细胞的生长状态, 而聚碳酸酯膜在显微镜下观测不到细胞; ② 相同孔径的膜, 聚碳酸酯膜单位面积的小孔多于聚酯膜, 例如同为  $0.4 \mu\text{m}$  孔径的膜, 聚碳酸酯膜含有  $1 \times 10^8$  pores/cm<sup>2</sup> 多于聚酯膜  $4 \times 10^6$  pores/cm<sup>2</sup>。另有文献报道<sup>[3]</sup>, 生长于聚碳酸酯膜上的细胞单层状态较聚酯膜好, 本实验结果显示二者对于 Caco-2 细胞单层的基本性质没有极显著性的差别。目前, 微孔滤膜产品的孔径主要有 0.4, 3, 5, 8, 12  $\mu\text{m}$  5 种, 其孔径越小, 单位面积的微孔数量越多。微孔的选择主要根据样品相对分子质量的大小而定, 样品相对分子质

量大如蛋白类就要选大孔径的微孔滤膜,实验中的常用药物样品多为小分子样品,国际上通常选择 0.4  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜。是否在滤膜上涂布鼠尾胶原蛋白不同实验室的选择也有很大差别,本实验通过对未涂和涂布有鼠尾胶原蛋白的 Caco-2 细胞单层的紧密度考察发现,悬挂式 Transwell 培养的细胞单层对其生长初期有极显著的提高 TEER 值的作用,对中后期影响不显著;而站立式 Transwell 培养的细胞单层于生长过程中,涂有鼠尾胶原蛋白的细胞单层 TEER 值显著高于未涂鼠尾胶原蛋白的站立式 Transwell。

另外,验证 Caco-2 细胞模型的形成主要从细胞形态、TEER、极性、透过性及蛋白的表达等方面进行。具有与小肠上皮细胞相似的微绒毛结构是 Caco-2 细胞模型的典型特征,生长至 21 d 的细胞单层于透射电子显微镜下可观察到这种微绒毛状的典型特征。Caco-2 细胞单层电阻是判断其能否用于药物吸收转运的重要指标之一,而文献报道的不同实验室之间 TEER 值存在有较大的差异。造成这种现象的最主要原因即,是否将直接测得的 TEER 值换算成为单位面积的 TEER 值,例如:24 孔、12 孔、6 孔 Transwell 直接测得的 TEER 值为 1 000  $\Omega$  时,当乘以其有效面积 0.33, 1.12, 4.67  $\text{cm}^2$  后单位面积的 TEER 值 330, 1 120, 4 670 ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ),单位面积的 TEER 值( $1 \text{ cm}^2$ ) = 测得的 TEER 值  $\times$  膜的有效面积 ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ),即膜的面积越大,单位面积的 TEER 值越大。其次,直接测得的 TEER 值与 Transwell 的微孔滤膜面积呈现负相关,即滤膜面积越大,Caco-2 细胞单层的电阻值越低。再次,TEER 值与实验前是否进行 HBSS 或 D-Hank's 的清洗和预孵育有关系,经测定 HBSS 预孵育 20 min 后,TEER 值可降低 200 ~ 500  $\Omega$ ;其他原因如细胞来源、试剂和培养条件等则不是造成这种差异的主要原因。有文献报道<sup>[4]</sup>,大鼠回肠 TEER 值为 35.3  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ,结肠 TEER 值为 100.6  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ,而 Caco-2 细胞单层的 TEER 值则达到 662  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ,TEER 值证明 Caco-2 细胞单层的紧密性更强。近年的其他实验结果也均表明其屏障功能与真正的小肠肠段是基本一致的<sup>[5]</sup>。

小肠能够分泌小肠液,这种碱性液体(pH 为 7.6)内含黏蛋白和多种酶类物质,参与了物质的代谢。Caco-2 细胞模型也能够部分分泌与小肠微绒毛相同的酶类和转运载体,单层两侧这种活性物质的分泌是不均衡的,这种差别造成了两侧极性的差别。

Caco-2 细胞模型所含的酶类主要有氨肽酶、碱性磷酸酶、蔗糖酶及  $\gamma$ -谷氨酰转氨酶、代谢酶 CYP1A1, CYP3A4, 谷胱甘肽 S-转移酶, $\beta$ -葡萄糖醛糖苷酶及磺基转移酶、羧酸酯酶等<sup>[6-7]</sup>。这些酶对物质的吸收起到不同程度的影响。其中最常用于细胞单层极性形成验证的酶为碱性磷酸酶,生长至 21 d 的细胞单层两侧的碱性磷酸酶的差别可达到 2 ~ 3 倍。通过对 3 种不同细胞单层极性的比较,发现孔径较小的细胞单层,极性形成较快(24 孔 > 12 孔)。

药物跨肠上皮细胞转运的途径有 4 条:被动扩散、主动转运(二肽载体、P-gp、寡肽载体)、细胞旁路转运、胞饮作用。药物跨膜转运的吸收度由表观渗透系数来衡量, $P_{\text{app}}$  与口服生物利用度存在以下的对应关系,当  $P_{\text{app}} > 1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  时,为吸收良好物质,口服生物利用度 > 70%;当  $1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} > P_{\text{app}} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  时,为可吸收物质,70% > 口服生物利用度 > 20%;当  $P_{\text{app}} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  时,为难吸收物质,口服生物利用度 < 20%<sup>[8-9]</sup>。常用于验证细胞单层透过性的物质有甘露醇、荧光黄、菊粉、聚乙二醇 4 000 等荧光或放射性标记物等。本实验选择的荧光素钠是一类橙红色粉末,于 490 nm 处吸光度最高,为透过实验常用的标志性物质之一,通过测定 0 ~ 2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  荧光素钠标准曲线发现,呈现两段线性相关的直线,拐点在 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,因此,本实验室选择荧光素钠的加入量为 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,其在 0 ~ 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  呈现良好的线性相关性,以避免拐点对透过实验的影响。3 种 Transwell 培养的细胞单层相比较,12 孔细胞单层的透过率显著高于 24 孔,而 24 孔站立式和悬挂式细胞单层的透过率无显著性差别。

本实验通过对比研究发现选取的 3 种 Transwell 均可培养出符合各项指标要求的 Caco-2 细胞单层,24 孔站立式 Transwell 培养的 Caco-2 细胞单层容积较小,AP 侧可加样 400  $\mu\text{L}$ ,BL 侧可加样 600  $\mu\text{L}$  适用于样品量小、检测灵敏度高的物质,可应用于大量样品的高通量筛选;24 孔悬挂式 Transwell 培养的 Caco-2 细胞单层与 24 孔站立式 Transwell 培养的 Caco-2 细胞单层具有除加样量以外相同的特点,其加样量为 AP 侧可加样 300  $\mu\text{L}$ ,BL 侧可加样 1 700  $\mu\text{L}$ ,两侧加样量差距较大,且于 21 d 的培养过程需要 24 孔站立式 2 倍的培养基,故不做首选;12 孔悬挂式 Transwell 加样量适中,可达到检测仪器对样品量的需求,适于实验室的常规操作,可作为建模首选。

# 大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 R<sub>g1</sub> 的代谢转化研究

陈新梅\*

(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

**[摘要]** 目的:考察大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 R<sub>g1</sub> (GR<sub>g1</sub>)的代谢转化作用。方法:研究 100 mg·L<sup>-1</sup>的 GR<sub>g1</sub> 溶液在 37 ℃人工胃液(pH 1.0)和人工肠液(pH 6.8)中的稳定性;考察大鼠 ig GR<sub>g1</sub> 后粪便和尿液中的 GR<sub>g1</sub> 代谢状况。结果:GR<sub>g1</sub> 在人工胃液中 2 h 内 100% 降解;在人工肠液 pH 中 4 h 相对稳定(RSD < 1.5%);GR<sub>g1</sub> 被大鼠肠道内酶和菌群代谢。结论:为提高生物利用度,GR<sub>g1</sub> 应选择非口服途径给药。

**[关键词]** 人参皂苷 R<sub>g1</sub>;代谢转化;生物利用度

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0210-03

## Experimental Study on Metabolism and Bio-Transformation of Ginsenoside R<sub>g1</sub> by Intestinal Enzyme and Microflora in Rats

CHEN Xin-mei\*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of metabolism and bio-transformation of GR<sub>g1</sub> by intestinal enzyme and microflora in rats. **Method:** The stability of GR<sub>g1</sub> in the artificial gastric juice and intestinal juice was

**[收稿日期]** 20101220(003)

**[通讯作者]** \* 陈新梅, 博士, 讲师, E-mail: xinmeichen@126.com

### [参考文献]

- [1] Fogh J, Fogh J M, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice[J]. J Natl Cancer Inst, 1977, 59(1): 221.
- [2] Anderle P, Rakhmanova V, Woodford K, et al. Messenger RNA expression of transporter and ion channel genes in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells compared to human intestines[J]. Pharm Res, 2003, 20: 3.
- [3] Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption; advantages and limitations of the Caco-2 model[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1997, 14: 221.
- [4] Hidalgo I J, Raub T J, Borchardt R T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability [J]. Gastroenterology, 1989, 96: 736.
- [5] Buur A, Trier L, Magnusson C, et al. Permeability of 5-fluorouracil and prodrugs in Caco-2 cell monolayers [J]. Int J Pharm, 1996, 129: 223.
- [6] Mouly S, Meune C, Bergmann J F. Uncertainty and inaccuracy of predicting CYP-mediated *in vivo* drug interactions in the ICU from *in vitro* models: focus on CYP3A4[J]. Intensive Care Med, 2009, 21: 173.
- [7] Hyatt J L, Tsurkan L, Wierdl M, et al. Intracellular inhibition of carboxylesterases by benzil: modulation of CPT-11 cytotoxicity[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5: 2281.
- [8] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 175 (3): 880.
- [9] Yee S Y. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man: fact or myth [J]. Pharm Res, 1997, 14: 763.

[责任编辑 何伟]