

Caco-2 细胞模型及其在中药吸收 转运研究中的应用

赵 静, 梁爱华*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] Caco-2 细胞模型是一种筛选药物离体口服吸收特性的模型, 现已广泛应用于评价药物在小肠的吸收特性和转运机理的研究。作者描述了 Caco-2 细胞的培养及其细胞单层模型如何建立和验证; 探讨了 Caco-2 细胞用于药物吸收转运研究的机制; 对其中药被动转运、载体介导的主动转运、中药外排机制和吸收过程中药物相互作用等方面的应用进行了详细的阐述; 并评价了该细胞用于中药吸收转运机制研究中的作用; 最后对该细胞模型可能的应用发展前景提出了展望。

[关键词] Caco-2 细胞模型; 中药; 吸收转运

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2009)05-0079-05

Caco-2 Cell Model and Its Application in the Absorption and Transportation Research of Chinese Materia Medica

ZHAO Jing, LIANG Ai-hua*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

[Abstract] The Caco-2 cell model is an in vitro model for screening drug oral absorption characteristics. It has been used widely for evaluating drug absorption characteristics and transportation mechanism. The authors describe the Caco-2 cells culture and how to establish and verify the cell monolayer model. The mechanism of its application in the drug absorption and transportation study is investigated. The applications for passive transportation of Chinese material medica, vector mediated active transportation, efflux mechanism and the drug-drug interaction in the absorption process are discussed in detail. The efficiency on the absorption and transportation mechanism research of Chinese material medica for the Caco-2 cell is evaluated. Finally, the prospect of the cell model in future application is put forward.

[Key words] Caco-2 monolayer cell model; Chinese materia medica; absorption and transportation

[收稿日期] 2009-01-09

[通讯作者] * 梁爱华, Tel: (010) 84035683; E-mail: liangaihua@sina.com

复方是中药的用药特色, 口服是最常见用药途径。口服药物制剂欲发挥全身作用, 吸收是关键。对吸收过程的研究有助于中药的处方筛选和工艺优化等。小肠是吸收的主要场所, 肠内上皮细胞屏障及酶系统是吸收的主要屏障, 而且肠上皮作为一个

重要的理化屏障和生化屏障限制了大量有活性的候选药物的口服吸收生物利用度。利用各种生物模型对口服药物肠吸收进行研究成为一种趋势。

评价药物在胃肠道透过性的方法中,体外实验的方法主要有:在体肠灌注法、肠襻法、分离肠黏膜法、翻转肠法等^[1]。然而,这些方法存在着动物组织与人组织的种属差异及复杂的手术操作等问题,而且药物胃肠道吸收机制的复杂性和多元性,使得目前难以用一种模型来预测药物的体内吸收特性。细胞培养模型作为研究药物吸收机制的模型之一,得到了越来越多人的认可。Caco-2 细胞(the human colon carcinoma cell lines 的简称)单层模型是最近十几年来国外广泛采用的一种研究药物肠吸收的体外模型,已经成为研究药物摄取、转运等机制的有效工具,其良好的体内外相关性使其成为药物开发早期有效的研究吸收机制的手段。

1 Caco-2 细胞模型概述

1.1 细胞系特征

Caco-2 细胞系于 20 世纪 70 年代首次分离自人类结、直肠癌细胞,其模型最初是由 Borchardt 和 Workel 在 1989 年提出的^[2]。以普通的培养条件培养成熟的 Caco-2 细胞即可形成与小肠上皮细胞相同的细胞极性和致密的单细胞层组织,其形态和功能上与人体的小肠上皮细胞相似^[3]。在肠腔侧分化出绒毛面 AP 侧(apical, 肠腔侧)和基底面 BL 侧(basolateral, 肠内壁侧)。Caco-2 细胞的 AP 面含有典型的小肠微绒毛水解酶和各种营养物质的转运载体,可发挥主动转运物质的作用;存在于小肠细胞刷状缘的酶,如氨肽酶、碱性磷酸酶、蔗糖酶及 γ -谷氨酰转肽酶也同样存在于 Caco-2 细胞;I 相代谢酶 CYP1A1 及 II 相代谢酶谷胱甘肽 S-转移酶、 β -葡萄糖醛糖苷酶及磺基转移酶在该细胞系统的表达也都有报道^[4]。由于形态学及生化性质都与小肠上皮很相似, Caco-2 细胞模型已被广泛地应用于体外营养物质分子肠吸收的研究。

1.2 Caco-2 细胞模型的建立

1.2.1 细胞的培养

将 Caco-2 细胞置于常规培养瓶内,通常培养在含 10% 胎牛血清(FBS)、1% L-谷氨酰胺以及青-链霉素双抗液的 MEM/EBSS NEAA 培养基中。在 5% CO₂ 浓度,90% 湿度,37 °C 恒温培养条件下生长。当细胞长至覆盖瓶底的 80% ~ 90% 时,用含 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 溶液消化,隔天换液,每 3~4 天传 1 代。

用于吸收和转运实验的 Caco-2 细胞通常为传代 20~80 代之间的细胞^[3],生长在聚碳酸酯膜上。一般将($1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$) 个细胞/cm² 接种于带有 0.4~3 μm 微孔的聚碳酸酯膜上,培养过程中向顶侧(相当于肠腔侧)和基底侧(相当于浆膜侧)小室分别加入一定量的培养液,每 2 天换液 1 次,一般在接种 21~24 天后使用。

1.2.2 细胞模型的验证

Caco-2 单层细胞用于实验前,需要验证其完整性,这是决定实验成功的关键。检测指标如下:①细胞形态学观察,用电子显微镜或者光学倒置显微镜进行形态学的检查;②在细胞培养的不同阶段,测定小肠刷状缘细胞标志性酶-碱性磷酸酶活性;③测量细胞单层的跨膜电阻,跨膜电阻值越高说明细胞单层的紧密性越好,具体测得的细胞跨膜电阻值会随着实验室以及实验条件的不同而呈现差异,通常为 200~700 $\Omega \cdot \text{cm}^2$;④用同位素标记的或转运性能低的荧光标记水溶性化合物(如 Lucifer yellow 染料 [¹⁴C]-甘露醇、荧光素钠、PEG-40 等)检测细胞单层的通透性;⑤用辣根过氧化物酶测定细胞的胞饮功能。

2 Caco-2 细胞对药物吸收转运的机制研究

通常药物跨过肠上皮细胞有 4 种主要途径:跨细胞转移、胞旁转运、载体介导转运、胞饮。Caco-2 细胞模型在药物吸收机制研究中的应用^[5]包括:研究口服药物从 AP 到 BL 方向或从 BL 到 AP 方向的转运过程,明确药物吸收是被动扩散还是主动转运,为给药方案设计提供依据;对于主动转运药物,明确从 AP 到 BL 是限速过程还是从 BL 到 AP 是限速过程,了解药物是否会在细胞内蓄积;探讨配伍用药物的相互作用及对吸收环境(如 pH 值和竞争转运载体及饱和机制等)的影响、改变吸收环境对主药吸收的影响等。

当药物经 Caco-2 细胞转运途径吸收时, P-gp 泵成为药物吸收的一个重要生化屏障,它把进入细胞内的药物泵出从而减少了药物的吸收,因此成为口服药物生物利用度低、波动大的一个重要影响因素。具有这种 P-gp 泵出性质的药物分子在与 P-gp 泵抑制剂共同经口服给药时,其透过细胞膜吸收的程度增强(表示为 Papp 值的增大)^[6]。若在整个浓度范围内所得的 Papp 值保持恒定,则被动扩散为主要转运机制。Papp 值可由 BL \rightarrow AP 方向测得(Papp1),也可由 AP \rightarrow BL 方向测得(Papp2),若 Papp1 与 Papp2 相

同也可确定被动扩散为主要转运机制, $P_{app1}/P_{app2} > 1.5$ 则提示可能存在主动转运机制。

3 Caco-2 细胞模型在中药吸收转运研究中的应用

3.1 用于被动转运的研究 90% 以上的药物主要通过被动扩散进入体内, 这些药物的脂溶性好, 油水分布系数大, 易分布于上皮细胞脂质膜^[7]。吸收缓慢且较差的药物, 如亲水性药物以及多肽等, 主要经胞旁转运; 而细胞旁间隙仅占肠管表面积的 0.1%~0.01%, 而且紧密连接是药物胞旁转运的限速因素^[5]。因此, 胞旁转运对药物吸收的贡献是有限的。Caco-2 细胞模型在中药吸收方面研究的热点目前主要集中在对黄酮类化合物及生物碱吸收机制的研究, 在强心苷、香豆素、皂苷及萜类化合物的研究也有报道^[5]。陈丙銮^[8]等的研究表明槲皮素、木樨草素、芹菜素、染料木素、大豆苷元、木樨草苷、忍冬苷、黄芩苷和芦丁等黄酮类化合物的吸收量均随药物的浓度的增加呈线性的增加, 此说明 Caco-2 细胞对这 9 种黄酮类化合物的吸收均为被动吸收, 药物的被动吸收与药物在细胞膜上的穿透性及其与脂质膜的亲和力有关, 一般脂溶性的更有利于被动吸收。这 9 种黄酮类化合物在结构上均有一定数目的酚羟基, 均显弱酸性。当介质呈酸性时, 它们均以分子形式存在, 脂溶性增大, 有利于它们被吸收, pH 对黄酮类化合物被吸收的影响随羟基数增多而增大。白芍是常用的中药, 具有益气, 养血, 止痛, 通络的作用, 芍药苷是其主要成分, 但其肠吸收的具体机制还不清楚。宋丽^[9]等利用 Caco-2 细胞模型研究了芍药苷的吸收机制, 发现该化合物从单层细胞层顶端到基底端的转运与基底端到顶端的转运大致相同; 随着芍药苷质量浓度的增加, 顶端到基底端方向的吸收量近似线性增加, 基底端到顶端方向的分泌量近似线性增加。由此可得出芍药苷在 Caco-2 细胞模型中吸收主要是被动转运。

3.2 用于载体介导的主动转运的研究 除了被动转运, 载体介导的主动转运在药物的吸收过程中也起重要作用。Caco-2 细胞有 3 种主动转运载体^[10-11]: 二肽载体、P-糖蛋白、寡肽载体。这些载体主要转运营养物质(氨基酸、葡萄糖、胆酸等) 及与营养物质结构类似的化合物。因此, Caco-2 细胞模型也可用于载体介导主动转运药物吸收机制的研究。丹参为常用中药, 其成分主要分为脂溶性的丹参酮类(二萜醌类) 和水溶性的酚酸类成分, 其中几

种具有明显抗氧化、改善微循环作用, 近几年的研究较多。朱狄峰^[12]等对丹参主要有效成分之一的丹参素利用 Caco-2 细胞模型研究其跨膜转运机制, 结果表明丹参素转运的速率受时间、给药浓度以及 P-gp 抑制剂等多方面因素的影响。在一定浓度条件下, AP 侧向 BL 侧转运的 P_{app} 值随时间增加而增大, 但在 90 min 后趋于饱和状态。不同浓度的丹参素给药后, P_{app1}/P_{app2} 值均大于 1.5, 且随着浓度的增加其值也逐渐减小, 这一现象表明在 Caco-2 细胞中存在某种转运载体, 这种转运载体位于细胞单层的 AP 侧。在相同时间情况下, AP 侧向 BL 侧转运的 P_{app} 值随丹参素浓度的增加而逐渐减小, 也说明丹参素的跨膜转运具有饱和现象, 随浓度的增加更容易使载体饱和从而达到平衡状态。在加入 P-gp 抑制剂维拉帕米 60 min 后, 丹参素 P_{appA-B} 值增大, 而 P_{appB-A} 值变小, 均与对照组有显著差异, 证明 P-gp 在丹参素的 Caco-2 细胞穿透转运中是一种重要的转运载体。丹参素在 Caco-2 细胞模型中的转运可能主要是由 P-gp 转运蛋白介导的主动转运。

3.3 用于药物外排机制的研究 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp) 和多药耐药蛋白(multi drug resistance protein, MRP) 是 Caco-2 细胞中两种主要的转运蛋白。两者均为能量(ATP) 依赖性膜蛋白, 发挥外排泵作用, 能将细胞内的化合物逆浓度梯度运至细胞外。目前的研究认为, P-gp 为人多药耐药基因(MDR) 编码的分子量为 170 KDa 的膜蛋白, 存在于细胞层的绒毛面一侧, 若某一药物的转运有 P-gp 参与, 则 $AP \rightarrow BL$ 的转运速率减慢, 而 $BL \rightarrow AP$ 转运速率加快, 当加入维拉帕米或环孢菌素 A 或地高辛^[13-14]等 P-gp 抑制剂后, 可使 $AP \rightarrow BL$ 的 P_{app} 值增大, 而 $BL \rightarrow AP$ 的 P_{app} 值减小。MRP 为 MRP 基因编码的分子量为 190 KDa 的膜蛋白, 存在于细胞层的两侧, 若某一药物的转运有 MRP 参与, 则加入 MK-571^[14] 或 LTC4^[15] 等 MRP 抑制剂后, 可使 $AP \rightarrow BL$ 的 P_{app} 值发生改变。紫杉醇和小檗碱是两种被广泛使用的生物碱类药物, 但它们的口服生物利用度都相对较低, 尤其是紫杉醇。有人^[16-17]应用 Caco-2 细胞模型对这两种药物的研究显示, 紫杉醇的跨膜转运可被 P-gp 抑制剂维拉帕米增强, 在加入维拉帕米后其 P_{app} 值增加了 7.5 倍。小檗碱 $BL \rightarrow AP$ 方向的 P_{app} 值是 $AP \rightarrow BL$ 方向的 30 倍, 且这一双向转运的差异在加入 P-gp 抑制剂维拉帕米后消失。表明

紫杉醇及小檗碱低生物利用度的主要原因是 P-gp 的外排作用,同时服用 P-gp 抑制剂可能对这两种药物的低生物利用度有所改善。柯因是一种日常饮食中的天然产物,是药物代谢酶的一种强有力的抑制剂。有学者^[18]研究了柯因在 Caco-2 模型中的转运,柯因 AP[→]BL 的 Papp 值在最初的 1 h 为 $(6.9 \pm 1.6 \times 10^{-6}) \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$,是甘露醇的 10 倍;而其 BL[→]AP 的 Papp 值为 $(14.1 \pm 1.6 \times 10^{-6}) \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$,是 AP[→]BL 的 Papp 值的 2 倍。转运实验经过 1 h 后,其 Papp 值迅速下降,这与两种代谢物一葡萄糖醛酸结合物(M1)、磺基结合物(M2)的出现有关。在 AP 侧加入转运抑制剂 MK2571 后,M1、M2 的转运分别降低 71% 和 20%,这提示可能有 MRP2 的参与。上述结果表明柯因具有良好的跨膜转运性质,但其肠道吸收可能会受到其葡萄糖醛酸结合物和磺基结合物的严重限制,而该两种代谢物可由 MRP2 排出。

3.4 用于吸收过程中药物相互作用的检测 通常,发生在小肠上皮的生化过程(即代谢、受体介导的转运、P-gp 对药物分子的泵出)是一个饱和过程^[19],此过程可显著地影响药物的生物利用度。当联合用药时,增加了药物竞争酶、载体或 P-gp 泵的可能性,导致单独给药时在动力学基础上预期的生物利用度偏高或偏低,这种与药物吸收有关的相互作用可以在 Caco-2 细胞模型中进行研究和估计。Caco-2 细胞中存在有与小肠上皮相同的各种转运系统、代谢酶,因此可以用来作为研究与吸收相关的药物相互作用的体外模型。需注意的是,Caco-2 细胞中某些特别的酶的活性与人体小肠上皮细胞的差别(如细胞色素 P450 CYP2A6, CYP3A4 等)及 P-gp 在 Caco-2 细胞中的过度表达对于结果的影响^[20]。Dean 等^[21]用 Caco-2 细胞模型考察 β-胡萝卜素和叶黄素这 2 种类胡萝卜素口服后在小肠中的吸收特征,并重点考察两者在吸收中可能存在的相互作用。分别在细胞培养基中同时加入 2 种类胡萝卜素和先加入 β-胡萝卜素,观察这 2 种类胡萝卜素的相互作用。发现这 2 种类胡萝卜素在 Caco-2 细胞中是独立摄入的,细胞外大量的 β-胡萝卜素不影响叶黄素的摄入。证明报道的 2 类胡萝卜素的相互作用可能在细胞内或者吸收后发生。

4 Caco-2 单层细胞模型研究中药吸收转运机制的评价

Caco-2 细胞模型作为药物吸收研究的一种快速

筛选工具,总结有如下的优点: Caco-2 细胞来源于人体,不产生上皮细胞形态学和生理学性质上的种属差异,同源性好;其培养方法简单,要比动物实验更省时经济; Caco-2 细胞受环境因素影响小,具有较好的体外实验重现性;培养成熟的 Caco-2 细胞是致密的单层细胞,具有与正常的小肠上皮细胞相同的极性;^[22]其细胞模型可测定药物的细胞摄取及跨膜转运,能基本满足进行多种胃肠道吸收机制研究的需要,并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,设计较高生物利用度的口服药物或制剂,并对其安全性进行评估等等。

Caco-2 细胞模型的缺点或限制在于:如形成完全分化并具有紧密连接的单层细胞生物膜所需培养时间较长(21~28 d);缺乏分泌黏液的功能,不似小肠上皮能够形成黏液层;缺少或低表达某些药物代谢酶和转运体;缺少细胞异质性(由单一细胞构成);屏障特性与结肠上皮细胞类似,而与小肠上皮细胞有一定差别等等。

5 展望

尽管 Caco-2 细胞模型有许多限制,但是在阐明药物吸收机制、预测体内吸收和药物相互作用、设计有更好吸收和更高生物利用度的口服药物或制剂并评价它们的安全性等方面仍然是一个很好的工具。Caco-2 细胞模型在中药吸收研究中的应用近年才见报道。在中医药传统理论基础上,从在临床上应用成熟的中药方剂中,就已经肯定药效作用的中药有效成分或其有效部位进行肠吸收的过程、性质和机制的研究,包括提取工艺、处方及制剂技术、剂型等因素对这些成分的作用和影响,从肠吸收的角度阐明中药配伍的科学内涵和合理性,有预见性地针对胃肠道吸收不良的中药成分或其制剂提出新的口服剂型方案,将对中药口服剂型的现代化发展和走向世界起到重要作用。由于大部分中药成分的吸收过程和机制还未明确,因此 Caco-2 细胞模型在中药口服吸收研究方面具有广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] Stenberg P, Bergstrom CA, Luthman K, et al. Theoretical predictions of drug absorption in drug discovery and development[J]. Clin Pharm acokinet, 2002, 41(11): 877.
- [2] Markowska M, Oberle R, Juzwin S, et al. Optimizing Caco2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis [J]. Pharmacol Toxicol

- Method, 2001, 46(1): 51.
- [3] 孙海燕, 廖晓慧, 彭光华. Caco-2 细胞模型及其在食品营养物质吸收研究中的新进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2573.
- [4] 王广基. 药物代谢动力学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 12.
- [5] 卢智玲, 冯 怡, 徐德生, 等. Caco-2 细胞模型在中药口服吸收及机制研究中的应用[J]. 中草药, 2006, 37(4): 616.
- [6] 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): 325.
- [7] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46(1-3): 27.
- [8] 陈丙奎, 李松林, 李 萍, 等. 黄酮类化合物在 Caco-2 细胞模型中的吸收规律[J]. 中国天然药物, 2006, 4(4): 299.
- [9] 宋 丽, 张 宁, 徐德生. 芍药苷在 Caco-2 细胞模型中吸收机制的研究[J]. 中草药, 2008, 39(1): 41.
- [10] Woo JS, Lee CH, Shin CK, *et al.* Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by coadministration of the P-glycoprotein inhibitor KP30031[J]. Pharm Res, 2003, 20(1): 24.
- [11] Menon RM, Barr WH. Transporters involved in apical and basolateral uptake of cefibuten into Caco-2 cells [J]. Biopharm Drug Dispos, 2002, 23(8): 317.
- [12] 朱狄峰, 赵筱萍, 程翼宇. 丹参素在 Caco-2 细胞单层模型中的跨膜转运研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(18): 1517.
- [13] Annaert P, Gelder JV, Naesens L *et al.* Carrier mechanism involved in the transepithelial transport of bis (POM)-PM EA and its metabolites across Caco-2 monolayers[J]. Pharm Res, 1998, 15(8): 1168.
- [14] Walgren RA, Karnaky KJ, Lindenmayer GE, *et al.* Efflux of Dietary flavonoid quercetin 4'- β -gluco side across human intestinal Caco-2 cell mono layers by apical multidrugresistance associated protein [J]. Pharmcol Exp Ther, 2000, 294(3): 830.
- [15] Makhey VD, Guo A, Norris DA, *et al.* Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells[J]. Pharm Res, 1998, 15(8): 1160.
- [16] Woo JS, Lee CH, Shim CK, *et al.* Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by coadministration of the P-glycoprotein inhibitor KR30031[J]. Pharm Res, 2003, 20(1): 24.
- [17] Maeng HJ, Yoo HJ, Kim IW, *et al.* P-glycoprotein mediated transport of herberine across Caco-2 cell monolayers[J]. Pharm Sci, 2002, 91(12): 2614.
- [18] Walle UK, Galijatovic A, Walle T. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2[J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58(3): 431.
- [19] Jezyk N, Li C, Stewart BH, *et al.* Transport of pregabalin in rat intestine and Caco-2 monolayers[J]. Pharm Res, 1999, 16(4): 519.
- [20] Yee S. 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(6): 763.
- [21] Dean AG, Mark LF, Robert JS, *et al.* Accumulation and retention of micellar β -carotene and lutein by Caco-2 human intestinal cells[J]. Nutr Biochem, 1999, 10(10): 573.
- [22] 赵艳红, 贾晓斌, 陈 彦. Caco-2 细胞模型及其对黄酮类成分作用机制研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(6): 938.