

## 普朗尼克抑制 P 糖蛋白药泵的作用

黄建耿, 斯陆勤, 左克源, 吴祥根, 裘 军, 李 高\*

(华中科技大学 同济医学院 药学院, 湖北 武汉 430030)

**摘要:** 采用 Caco-2 细胞和动物模型, 以维拉帕米为阳性对照, 考察普朗尼克对塞利洛尔在 Caco-2 单层膜与肠道黏膜吸收的影响。用高效液相色谱法检测药物浓度, 计算表观透过系数、吸收速率常数与有效透过系数等参数, 评价普朗尼克对 P 糖蛋白药泵的抑制作用。结果显示, 塞利洛尔 Caco-2 细胞膜转运基底端 (BL) 到顶端 (AP) 的透过系数  $P_{app}$  大于 AP 到 BL 的  $P_{app}$ , 分别为  $(2.10 \pm 0.13) \times 10^{-6}$  和  $(0.333 \pm 0.018) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 且双向转运受到抑制剂维拉帕米和普朗尼克的影响。大鼠在体肠灌流实验中塞利洛尔在十二指肠段、空肠、回肠与结肠段的吸收速率常数  $k_a$  分别为  $(0.09 \pm 0.03)$ ,  $(0.14 \pm 0.04)$ ,  $(0.11 \pm 0.03)$  与  $(0.05 \pm 0.02) \text{ h}^{-1}$ ; 合用维拉帕米后各肠段吸收速率常数  $k_a$  分别为  $(0.14 \pm 0.03)$ ,  $(0.24 \pm 0.02)$ ,  $(0.25 \pm 0.03)$  和  $(0.23 \pm 0.02) \text{ h}^{-1}$ ; 合用普朗尼克后各肠段吸收速率常数  $k_a$  分别为  $(0.13 \pm 0.02)$ ,  $(0.22 \pm 0.02)$ ,  $(0.22 \pm 0.03)$  和  $(0.20 \pm 0.03) \text{ h}^{-1}$ 。可见, 普朗尼克通过抑制 P-gp 外排作用, 促进塞利洛尔 Caco-2 细胞膜和大鼠肠道黏膜的吸收。

**关键词:** Caco-2 细胞模型; P 糖蛋白; 在体肠灌流; 塞利洛尔; 普朗尼克

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)09 - 0989 - 06

## The inhibitory effect of Pluronic on P-glycoprotein drug pump

HUANG Jian-geng, SI Lu-qin, ZUO Ke-yuan, WU Xiang-gen, QIU Jun, LI Gao\*

(School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** To investigate the inhibitory effect of Pluronic on P-glycoprotein (P-gp) drug efflux pump, Caco-2 cells and animal models were established to study the influence of Pluronic on celiprolol transport across Caco-2 cell monolayer and intestinal mucous membrane with verapamil set as a positive control. Drug concentration was measured by HPLC and the apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ), absorption rate constant ( $k_a$ ) and the effective permeability coefficient ( $P_{eff}$ ) were calculated.  $P_{app}$  of basolateral to apical side and apical to basolateral side was  $(2.10 \pm 0.13) \times 10^{-6}$  and  $(0.333 \pm 0.018) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , respectively. Transports of celiprolol across Caco-2 cell monolayer were influenced by both verapamil and Pluronic. The absorption constants ( $k_a$ ) of celiprolol at duodenum, jejunum, ileum, and colon were  $(0.09 \pm 0.03)$ ,  $(0.14 \pm 0.04)$ ,  $(0.11 \pm 0.03)$  and  $(0.05 \pm 0.02) \text{ h}^{-1}$ ,  $k_a$  of celiprolol in verapamil group were  $(0.14 \pm 0.03)$ ,  $(0.24 \pm 0.02)$ ,  $(0.25 \pm 0.03)$  and  $(0.23 \pm 0.02) \text{ h}^{-1}$ , and  $k_a$  of celiprolol in Pluronic group were  $(0.13 \pm 0.02)$ ,  $(0.22 \pm 0.02)$ ,  $(0.22 \pm 0.03)$  and  $(0.20 \pm 0.03) \text{ h}^{-1}$ , respectively. Pluronic showed significant effect on inhibiting P-gp of Caco-2 cell and intestinal mucosa in rats.

**Key words:** Caco-2 cell model; P-glycoprotein; *in situ* intestinal perfusion; celiprolol; Pluronic

P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是一种分子质

量为 170 kD, 具有 ATP 能量依赖性的多药耐药基因 (MDR1) 调控的外排蛋白, 主要功能是外排各种外来异物, 保护机体不受外来异物的侵扰<sup>[1]</sup>。许多药物是 P-gp 的底物, 如地高辛、环孢素 A 等, 即它们在被口服吸收的过程中, P-gp 能将其吸收进入浆膜侧

收稿日期: 2007-04-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572265); 湖北省卫生厅科研基金项目 (JX2B04).

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 27 - 83692892,  
E-mail: ligao@163.com

的药物泵回黏膜侧,从而导致药物吸收减少、生物利用度降低。 $\beta_1$ 受体阻滞剂塞利洛尔(celiprolol, Cel)易溶于水与甲醇,但口服生物利用度约为30%左右。研究发现<sup>[2]</sup>其不被体内代谢,药物消除与CYP3A4代谢酶无关,而口服生物利用度低的主要原因是受P-gp影响,因此选择塞利洛尔作为研究P-gp药泵作用的探针药物。

Caco-2细胞模型作为一种简便、高效的体外模型广泛应用于口服药物吸收、分配、代谢、消除以及毒性研究<sup>[3,4]</sup>,此细胞具有与小肠上皮细胞相同的细胞极性和紧密连接且高度表达P-gp,可用于模拟小肠上皮吸收和P-gp作用机制研究<sup>[5]</sup>。本文采用Caco-2细胞和大鼠在体灌流方法考察探针药物塞利洛尔细胞膜双向转运和小肠黏膜吸收情况,并对药用辅料普朗尼克(Pluronic F-68)对P-gp药泵的抑制作用进行探讨。

## 材料和方法

**仪器** Dionex P680型高效液相色谱仪、Dionex UVD170U检测器(戴安公司,美国);CO<sub>2</sub>培养箱(Jouan公司,法国);跨膜电阻仪、millicell膜(Millipore,美国)。

**药品与试剂** 塞利洛尔(江西金瑞化工有限责任公司,纯度>99.8%);美托洛尔(无锡阿斯特拉制药有限公司);乙腈(色谱纯,天津市科密欧化学试剂开发中心);DMEM培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)、胎牛血清、非必需氨基酸、青链霉素、胰蛋白酶和HBSS溶液均购自Gibco公司;普朗尼克(南京威尔化工有限公司)。

**细胞株与动物** Caco-2细胞株,购自美国ATCC(American Type Culture Collection);雄性SD大鼠,体重(250±20)g,由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供。

**细胞培养条件** 应用DMEM培养液:10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1%谷氨酰胺和1%青链霉素。细胞培养在卡氏培养瓶中置于37℃培养箱,通入5%CO<sub>2</sub>(相对湿度90%)。每5d按1:2比例传代,传代后从第3d起每日换液。将细胞按80 000·cm<sup>-2</sup>接种到millicell膜上,接种后每2d换液1次,1周后每日换液,培养至21d,满足跨膜电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER)>500Ω·cm<sup>-2</sup>的膜用于药物转运实验。

**Caco-2细胞单层膜转运实验** 用pH6.5 HBSS溶液分别配制含有维拉帕米或不同浓度普朗尼克的

塞利洛尔供试液。在相同条件下,同时测定药物从Caco-2细胞单层膜顶端(apical side, AP)→基底端(basolateral side, BL)和BL→AP的转运。取符合细胞单层膜转运条件的millicell膜,用含Hepes的HBSS小心冲洗3次,最后1次在37℃培养箱中孵育0.5h,轻轻吸干孔内HBSS,以清除细胞表面对测定有干扰的物质。对于从AP到BL转运:将药物溶液1.5mL加到AP侧作为供应池,同时BL侧加入HBSS溶液2mL作为接收池;对于从BL到AP转运:将药物溶液2mL加到BL侧作为供应池,同时AP侧加入HBSS溶液1.5mL作为接收池。将millicell膜放置于转速为50r·min<sup>-1</sup>的37℃恒温摇床上振荡,分别定时取接收池液200μL, HPLC法测定药物浓度;每次取样后补充相同体积预热至37℃HBSS溶液。

**大鼠在体肠灌流实验** 实验前SD雄性大鼠禁食12h,自由饮水,腹腔注射15%乌拉坦溶液麻醉并固定,于大鼠腹中线切开约3cm,对考察部位两端(十二指肠段是从幽门以下2cm处开始约10cm肠段,空肠段是从距幽门15cm处开始约10cm肠段,回肠段是从盲肠上行20cm处开始的肠段,结肠段是紧邻盲肠处开始10cm)各剪一小口插管,结扎,先用37℃生理盐水将肠道内容物冲洗干净,再用空气将生理盐水排净。取供试液(预热至37℃)100mL,先以5mL·min<sup>-1</sup>灌流10min后,将流速调为2.5mL·min<sup>-1</sup>并计时,分别于回流后10, 20, 40, 60, 90, 120, 180和240min,取样2.0mL,经0.45μm微孔滤膜过滤,同时补充等体积的恒温酚红溶液,并分别按各自标准曲线方法测定塞利洛尔和酚红的浓度。

**塞利洛尔样品分析** (1) 色谱条件:色谱柱为Europher-100 C<sub>18</sub>柱(250mm×4.6mm, 5μm);流动相为乙腈-0.1mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-水(25:5:70),磷酸调pH至3.75;检测波长232nm;流速:1.0mL·min<sup>-1</sup>;柱温为室温。(2) 样品处理:取转运或灌流液样品200μL,分别加入塞利洛尔系列标准溶液10μL配成质量浓度为0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0和20.0mg·L<sup>-1</sup>的药物溶液,加入内标美托洛尔(150mg·L<sup>-1</sup>)20μL,涡旋15s;然后加入乙腈200μL,涡旋1min,高速离心10min(10 000r·min<sup>-1</sup>),取上清液20μL进样。建立标准曲线,计算精密度与回收率。

**肠灌流液中酚红浓度测定** (1) 酚红标准曲线的制备:分别精密吸取用Kreb-Ring's营养液(K-R

液)配制的含酚红  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 和 4.0 mL, 用 K-R 营养液定容至 10 mL, 得质量浓度依次为 2.501, 5.002, 10.004, 20.008 和  $40.016 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的酚红对照品溶液, 取各酚红对照品溶液 0.5 mL, 加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液 5.0 mL 显色, 在 558 nm 测定吸收度, 以 K-R 营养液为空白, 以吸收度  $A$  对酚红浓度  $C$  ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行线性回归得标准曲线。(2) 酚红浓度的测定: 分别移取肠灌流液 0.5 mL, 加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液 5.0 mL 显色, 以 K-R 液为空白, 在 558 nm 测定吸收度, 由标准曲线方程求得酚红浓度。

数据处理及统计学分析 Caco-2 细胞单层膜转运实验表观透过系数 ( $P_{\text{app}}$ ) 计算公式<sup>[6]</sup>如下:

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt) / (A \times C_0) \quad (1)$$

式中  $dQ/dt$  为单位时间药物转运量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$ );  $A$  为转运膜的面积 ( $A = 4.2 \text{ cm}^2$ );  $C_0$  为塞利洛尔的初始浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); Efflux ratio (ER) 值为 BL  $\rightarrow$  AP 方向转运的表观透过系数 ( $P_{\text{app}}$ ) 与 AP  $\rightarrow$  BL 表观透过系数 ( $P_{\text{app}}$ ) 的比值。

在体肠灌流实验吸收参数的计算<sup>[7]</sup>, 以剩余药量的对数 ( $\ln X$ ) 对取样时间  $t$  作图进行线性回归, 根据回归方程的斜率可求吸收速率常数  $k_a$ 。

$$\ln X = \ln X_0 - k_a t \quad (2)$$

单位时间吸收百分率 ( $P\%$ ) 的计算公式如下:

$$P\% (\text{h}^{-1}) = \frac{C_0 \times V_0 - C_t \times V_t}{C_0 \times V_0 \times t} \times 100\% \quad (3)$$

式中  $C_0$ : 0 时刻灌流液中药物浓度;  $V_0$ : 0 时刻灌流液体积;  $C_t$ : 取样点时刻灌流液中药物浓度;  $V_t$ : 取样点时刻灌流液体积;  $t$ : 灌流液循环时间。

有效透过系数 ( $P_{\text{eff}}$ ) 的计算公式如下:

$$P_{\text{eff}} = k_a \times 3600^{-1} \times A \quad (4)$$

$k_a$ : 吸收速率常数;  $A$ : 小肠吸收面积。

数据均以塞利洛尔组为对照应用 SPSS 12.0 进行方差分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 结果

### 1 塞利洛尔含量测定分析方法的建立

本实验色谱条件下, 塞利洛尔与内标美托洛尔有很好的分离效果, 其保留时间分别为 6.4 min 与 5.1 min。塞利洛尔在空白 HBSS 中测定的标准曲线为 ( $A/A_{\text{ps}} = 0.3326C + 0.0033$ ,  $r = 0.9999$ ), 线

性范围为  $0.125 \sim 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 定量限为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。低、中、高质量浓度分别为 0.25, 2.0, 18.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的质量控制样品平均方法回收率分别为 94.01%, 92.55% 与 95.49%; 日内和日间 RSD 分别为 9.0%, 1.2%, 2.6% 与 7.5%, 9.2%, 2.5%; 塞利洛尔在空白灌流液中测定的标准曲线为 ( $A/A_{\text{ps}} = 0.2232C + 0.0049$ ,  $r = 0.9999$ ), 线性范围为  $0.0625 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 定量限为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。低、中、高质量浓度 0.125, 1.25, 4.8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的质量控制样品平均方法回收率分别为 93.49%, 101.61% 与 98.47%; 日内和日间 RSD 分别为 8.1%, 4.2%, 3.4% 与 8.7%, 4.7%, 3.9%。酚红在空白灌流液中测定的标准曲线为 ( $A = 0.0211C - 0.006$ ,  $r = 0.9999$ )。

### 2 塞利洛尔细胞膜转运实验

2.1 药物浓度对细胞膜转运的影响 考察在  $37^\circ\text{C}$ , pH 6.5 HBSS 的条件下, 药物的细胞转运与药物浓度的关系。在 Caco-2 细胞单层模型中分别给予 25, 50, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  塞利洛尔后, 于 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h 取样, HPLC 法测定药物浓度并计算  $P_{\text{app}}$ 。不同浓度药物通过 Caco-2 细胞单层从 AP  $\rightarrow$  BL 转运的  $P_{\text{app}}$  随时间的变化见图 1。结果表明塞利洛尔在 25 和 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时 AP  $\rightarrow$  BL 方向转运的  $P_{\text{app}}$  接近, 根据计算公式 (1), 在  $P_{\text{app}}$  基本维持不变的条件下, 随药物浓度  $C_0$  增加, AP  $\rightarrow$  BL 方向药物转运量呈比例增加, 但当药物质量浓度增加至 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 药物 AP  $\rightarrow$  BL 方向转运的  $P_{\text{app}}$  低于药物浓度为 25 和 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $P_{\text{app}}$ 。综合考虑药物转运特性及 HPLC 测定灵敏度要求, 在考察辅料及维拉帕米对塞利洛尔跨膜转运影响实验中, 塞利洛尔的质量浓度设为 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

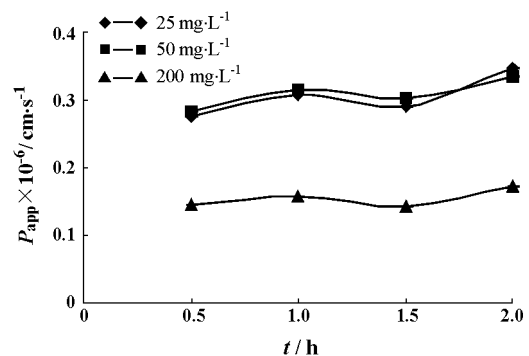


Figure 1 Influence of celiprolol concentration (25, 50, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on  $P_{\text{app}}$  (AP  $\rightarrow$  BL) across Caco-2 cell monolayer ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

**2.2 普朗尼克对塞利洛尔细胞膜转运表现透过系数的影响** 研究药物在加入  $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  维拉帕米 (P-gp 和 MRP 外排蛋白抑制剂) 和 0.03, 0.3 和  $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  普朗尼克后细胞膜转运特性, 采用 HPLC 法测定不同时间 Caco-2 单层细胞膜 AP→BL, BL→AP 跨膜转运量, 依据公式分别计算表现透过系数, 实验前后分别测定 Caco-2 细胞跨膜电阻值 (表 1)。结果表明, Caco-2 细胞跨膜电阻值无显著性差异, 说明在该实验条件下细胞膜单层完整性良好。塞利洛尔在 Caco-2 单层细胞膜 AP→BL 的  $P_{app}$  值远小于 BL→AP 的  $P_{app}$  值 ( $P < 0.01$ )。对 ER 值进行方差分析: 塞利洛尔与加入维拉帕米、Pluronic F-68 低、中、高浓度组之间均有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。P-gp 强抑制剂维拉帕米使塞利洛尔在细胞单层 AP 侧的外排被明显地抑制, Pluronic F-68 对细胞单层 AP 侧的外排泵的抑制作用随浓度的增加而增强。

**3 大鼠在体肠灌注实验**

**3.1 不同肠段对吸收速率的影响** 选用  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  塞利洛尔灌流液对大鼠各肠段的吸收特性进行考察, 求出不同肠段药物吸收速率常数、单位时间吸收百分率及有效透过系数, 结果见表 2。对各肠段吸收速率常数  $k_a$  进行方差分析, 结果表明结肠段与空肠段吸收速率常数具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其他肠段之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 药物吸收速率常数和单位时间吸收百分率按空肠、回肠、十二指肠、结肠顺序依次下降, 以空肠的吸收最好。

**3.2 不同药物浓度对空肠吸收的影响** 在 pH 6.5 的条件下, 分别采用 0.5, 2.5 和  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的塞利洛尔灌流液对空肠进行灌注, 考察不同浓度的药物在空肠中的吸收速率常数的差别, 结果见表 3。方差分析结果表明, 0.5, 2.5 和  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的吸收情况无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。对不同浓度下的吸收速率常数大小排列顺序: 中浓度 > 低浓度 > 高浓

度, 说明塞利洛尔在大鼠肠道吸收不仅仅是简单的被动扩散过程, 可能还有载体媒介转运过程的参与。

**Table 2** Absorption rate constants ( $k_a$ ,  $\text{h}^{-1}$ ), absorption percent (P) and effective permeability ( $P_{eff}$ ,  $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) of celiprolol ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) at various intestinal segments in rats ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Intestinal segment	$k_a / \text{h}^{-1}$	P / %	$P_{eff} \times 10^{-6} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Duodenum	$0.09 \pm 0.03$	$9.24 \pm 1.53$	$0.26 \pm 0.08$
Jejunum	$0.14 \pm 0.04$	$11.71 \pm 1.67$	$0.41 \pm 0.11$
Ileum	$0.11 \pm 0.03$	$10.82 \pm 1.09$	$0.32 \pm 0.09$
Colon	$0.05 \pm 0.02^*$	$6.75 \pm 0.93$	$0.14 \pm 0.05$

Experiments were performed at duodenum, jejunum, ileum and colon,  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$  vs jejunum

**Table 3** Absorption rate constants ( $k_a$ ,  $\text{h}^{-1}$ ), absorption percent (P) and effective permeability ( $P_{eff}$ ,  $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) of celiprolol from jejunum at different concentrations in rats ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

C / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$k_a / \text{h}^{-1}$	P / %	$P_{eff} \times 10^{-6} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
0.5	$0.13 \pm 0.03$	$11.32 \pm 1.39$	$0.38 \pm 0.10$
2.5	$0.14 \pm 0.04$	$11.71 \pm 1.67$	$0.41 \pm 0.11$
5.0	$0.09 \pm 0.02$	$8.37 \pm 1.07$	$0.24 \pm 0.06$

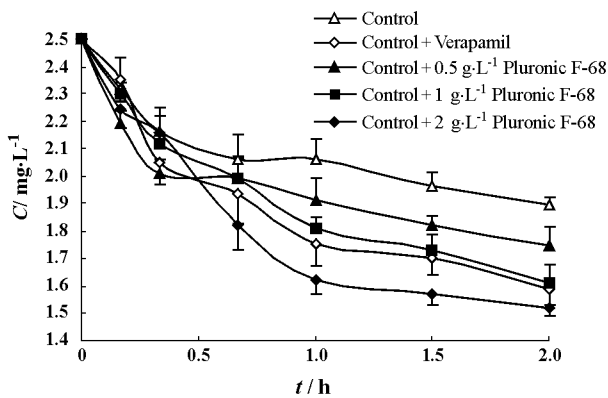
**3.3 不同浓度普朗尼克对塞利洛尔在空肠段吸收速率的影响** 加入 0.5, 1 和  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  普朗尼克或  $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  维拉帕米后, 塞利洛尔在灌流液中浓度变化, 空肠段吸收速率常数及其他参数结果分别见图 2, 表 4。由图 2 可见, 加入维拉帕米和普朗尼克灌流液中塞利洛尔浓度比对照组低, 说明在维拉帕米或者普朗尼克存在的前提下塞利洛尔透膜吸收增加。加入维拉帕米、中高浓度普朗尼克后  $k_a$  与对照组  $k_a$  有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 加入低浓度普朗尼克的  $k_a$  与对照组  $k_a$  无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。随

**Table 1** Effects of verapamil and Pluronic F-68 on the apparent permeability ( $P_{app}$ ) and the efflux ratio (ER) of celiprolol across Caco-2 cell monolayers ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compound	$P_{app} \times 10^{-6} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$		ER	TEER / $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$	
	AP→BL	BL→AP		Pre-experiment	Post-experiment
Cel	$0.333 \pm 0.018$	$2.10 \pm 0.13^{**}$	$6.3 \pm 0.4$	$570 \pm 22$	$557 \pm 23$
Cel + Verapamil ( $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$0.433 \pm 0.019$	$1.07 \pm 0.07^{**}$	$2.5 \pm 0.2^{\Delta \Delta}$	$557 \pm 28$	$546 \pm 32$
Cel + Pluronic F-68 ( $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$0.373 \pm 0.007$	$1.41 \pm 0.06^{**}$	$3.8 \pm 0.2^{\Delta \Delta}$	$579 \pm 25$	$566 \pm 27$
Cel + Pluronic F-68 ( $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$0.392 \pm 0.012$	$1.09 \pm 0.09^{**}$	$2.8 \pm 0.3^{\Delta \Delta}$	$581 \pm 29$	$573 \pm 35$
Cel + Pluronic F-68 ( $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$0.405 \pm 0.010$	$0.91 \pm 0.02^{**}$	$2.3 \pm 0.2^{\Delta \Delta}$	$563 \pm 24$	$543 \pm 30$

Experiments were performed at  $37^\circ\text{C}$  for 2 h with independent Caco-2 cell monolayers ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) Cel:  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Celiprolol.

\*\*  $P < 0.01$  vs  $P_{app} (\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ ;  $\Delta \Delta$   $P < 0.01$  vs Cel



**Figure 2** Mean concentration-time profile for celiprolol in perfusion following *in situ* Jejunum perfusion of verapamil and Pluronic F-68 perfusion with the concentrations of 0.5, 1 and 2 g·L<sup>-1</sup> (n=5,  $\bar{x} \pm s$ ). Control: 2.5 mg·L<sup>-1</sup> celiprolol

随着普朗尼克浓度的增加,  $k_a$  相应增加, 说明普朗尼克对塞利洛尔的吸收有显著的影响。

**3.4 普朗尼克与 P-gp 抑制剂对不同肠段吸收速率的影响** 加入 1.0 g·L<sup>-1</sup> 普朗尼克或者 125 mg·L<sup>-1</sup> 维拉帕米后塞利洛尔在十二指肠、空肠、回肠与结肠段吸收速率常数以及其他参数变化 (表 5)。结果表明维拉帕米与普朗尼克对各肠段塞利洛尔吸收速率常数  $k_a$  均增加, 维拉帕米、普朗尼克对不同肠段  $k_a$  与对照组比较, 十二指肠段吸收速率常数  $k_a$  无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 空肠与回肠段有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 结肠段有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

**讨论**

Caco-2 细胞模型与整体吸收有良好相关性, 是研究药物吸收机制、生物利用度、安全性及新药剂型设计的良好工具<sup>[8]</sup>; 且该模型操作简便, 重现性较好, 可评价不同实验条件下药物的跨膜转运速率。作为 P-gp 的底物, 塞利洛尔在 Caco-2 单层细胞膜

**Table 4** Absorption rate constants ( $k_a$ , h<sup>-1</sup>), absorption percent (P) and effective permeability ( $P_{eff}$ , cm·s<sup>-1</sup>) of celiprolol from jejunum with P-glycoprotein inhibitors in rats (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

Compound	$k_a$ /h <sup>-1</sup>	P /%	$P_{eff} \times 10^{-6}$ /cm·s <sup>-1</sup>
Control	0.14 ± 0.04	11.71 ± 1.67	0.41 ± 0.11
Control + Verapamil (125 mg·L <sup>-1</sup> )	0.24 ± 0.02 <sup>#</sup>	19.40 ± 1.83	0.70 ± 0.05
Control + Pluronic F-68 (0.5 g·L <sup>-1</sup> )	0.16 ± 0.03	14.38 ± 1.32	0.46 ± 0.08
Control + Pluronic F-68 (1.0 g·L <sup>-1</sup> )	0.22 ± 0.02 <sup>#</sup>	17.12 ± 1.72	0.64 ± 0.05
Control + Pluronic F-68 (2.0 g·L <sup>-1</sup> )	0.26 ± 0.03 <sup>#</sup>	22.75 ± 2.18	0.75 ± 0.10

Experiments were performed at Jejunum with pluronic and verapamil, n=5,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup>  $P < 0.05$  vs control. Control: 2.5 mg·L<sup>-1</sup> celiprolol

**Table 5** Absorption rate constants ( $k_a$ , h<sup>-1</sup>), absorption percent (P) and effective permeability ( $P_{eff}$ , cm·s<sup>-1</sup>) of celiprolol at various intestinal segments with P-glycoprotein inhibitors in rats (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

Compound	Intestinal segment	$k_a$ /h <sup>-1</sup>	P /%	$P_{eff} \times 10^{-6}$ /cm·s <sup>-1</sup>
Control	Duodenum	0.09 ± 0.03	9.24 ± 1.53	0.26 ± 0.08
	Jejunum	0.14 ± 0.04	11.71 ± 1.67	0.41 ± 0.11
	Ileum	0.11 ± 0.03	10.82 ± 1.09	0.32 ± 0.09
	Colon	0.05 ± 0.02	6.75 ± 0.93	0.14 ± 0.05
Control + Verapamil (125 mg·L <sup>-1</sup> )	Duodenum	0.14 ± 0.03	11.26 ± 1.28	0.40 ± 0.09
	Jejunum	0.24 ± 0.02 <sup>*</sup>	19.40 ± 1.83	0.70 ± 0.05
	Ileum	0.25 ± 0.03 <sup>*</sup>	21.06 ± 1.69	0.72 ± 0.12
	Colon	0.23 ± 0.02 <sup>* *</sup>	20.37 ± 1.76	0.66 ± 0.06
Control + Pluronic F-68 (1.0 g·L <sup>-1</sup> )	Duodenum	0.13 ± 0.02	11.53 ± 0.82	0.38 ± 0.04
	Jejunum	0.22 ± 0.02 <sup>*</sup>	17.12 ± 1.72	0.64 ± 0.05
	Ileum	0.22 ± 0.03 <sup>*</sup>	19.13 ± 1.69	0.64 ± 0.11
	Colon	0.20 ± 0.03 <sup>* *</sup>	17.61 ± 1.46	0.58 ± 0.10

Experiments were performed at various intestinal segments in rats with pluronic and verapamil, n=5,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  vs control; <sup>\* \*</sup>  $P < 0.01$  vs control. Control: 2.5 mg·L<sup>-1</sup> celiprolol

AP→BL及BL→AP双向跨膜转运实验中表现出明显的外排特性,AP→BL的 $P_{app}$ 值远小于BL→AP的 $P_{app}$ 值,说明P-gp在该细胞模型中有效表达;而加入P-gp强抑制剂维拉帕米后,塞利洛尔在细胞单层AP侧的外排被明显地抑制,进一步显示了该模型中P-gp的表达,且P-gp存在于细胞模型的AP侧,与体内一致。塞利洛尔Caco-2细胞膜转运特性研究表明药物浓度增加至 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $P_{app}$ 低于 $25, 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下的 $P_{app}$ ,这可能是Caco-2细胞单层参与塞利洛尔跨膜转运的载体有限,使等量药物跨膜转运量减少,最终表现为表观透过系数 $P_{app}$ 反而减小<sup>[9]</sup>。Caco-2细胞单层膜跨膜转运实验中普朗尼克不同浓度组均能增加药物透膜吸收,机制可能与抑制P-gp药泵作用有关,且中高浓度抑制作用强度与维拉帕米相当。

由于Caco-2细胞模型缺乏黏液层且不能考察肠道的蠕动等因素对药物吸收的影响,因此进一步考察了在体肠灌流实验普朗尼克对塞利洛尔吸收的影响。在体肠灌流实验中酚红用于测定肠道对水分的吸收,以计算肠灌流液中药物浓度的变化。该方法与文献报道的采用<sup>14</sup>CPEG-3500测定肠道水分吸收,采用重量分析法进行校正具有同样的精密度<sup>[6,10]</sup>。由于酚红可以采用可见分光光度计进行测定,方法简便,准确性好,在肠灌流实验中广泛应用。但有文献报道, $\text{Ca}^{2+}$ 能抑制酚红的吸收<sup>[7]</sup>。为了减少酚红标示体积的实验误差,故采用一定浓度 $\text{Ca}^{2+}$ 的K-R液。

在体肠灌流实验中考察不同浓度普朗尼克对空肠段吸收速率的影响,结果表明P-gp抑制剂维拉帕米能够增加药物透膜吸收,因此作为P-gp底物塞利洛尔的透膜吸收与P-gp药物溢出泵密切相关。普朗尼克浓度为 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,药物透膜吸收略有增加但无显著性差异,而在Caco-2细胞模型中普朗尼克浓度为 $0.03\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即具有抑制BL→AP方向外排作用,这可能与Caco-2细胞来源于人类结肠癌细胞,其细胞单层膜高度表达P-gp有关<sup>[5]</sup>。为进一步考察不同肠段P-gp表达量差异对塞利洛尔吸收的影响,分析了单一浓度普朗尼克与维拉帕米对不同肠段药物吸收速率的影响。药物透膜吸收提高倍数按结肠、回肠、空肠、十二指肠依次下降,这可能与P-gp在肠道表达差异性有关,大鼠肠道中P-gp高度表达于结肠和回肠顶端柱状上皮细胞的表面,且其表达在空肠较低,十二指肠更低。

普朗尼克作为一种非离子型高分子表面活性剂在药物制剂中主要用于乳化剂和增溶剂,其抑制肠道P-gp药泵作用能够促进P-gp底物的透膜吸收。对于溶解度差的P-gp底物,如环孢素A等,通过表面活性剂增溶作用及抑制P-gp药泵减少药物外排作用的双重途径提高药物生物利用度,为解决一些P-gp底物生物利用度问题提供新思路。有关P-gp在肠道表达差异性研究及普朗尼克抑制P-gp药泵的作用,还需采用分子生物学实验和整体动物实验相结合的方法进行深入研究。

## References

- [1] Tetao T, Hisanaga E, Sai Y, et al. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier [J]. J Pharm Pharmacol, 1996, 48: 1083 - 1089.
- [2] Comair G, Woodley J, Hemann P, et al. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Pharm, 2004, 278: 119 - 131.
- [3] 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: 763 - 766.
- [4] Vama MV, Ashokraj Y, Dey CS, et al. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement [J]. Pharm Res, 2003, 48: 347 - 359.
- [5] Walle UK, Walle T. Taxol transport by human intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. Drug Metab Dispos, 1998, 26: 343 - 346.
- [6] Sutton CS, Rinaldi MT, Vukovinsky KE, et al. Comparison of the gravimetric, phenol red, and <sup>14</sup>C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model [J]. AAPS Pharm Sci, 2001, 3: 25 - 29.
- [7] Hu YQ, Zheng LY. Aphenolsulfonphthalein: research of intestinal absorption about an ionic substance [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 1996, 27: 355 - 359.
- [8] Tian L, Yang XW, Wang Y, et al. Characteristics of uptake, transport and efflux of Z- and E-ajoenes in Caco-2 cell monolayers *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2007, 42: 87 - 92.
- [9] Camenisch G, Folkers G, Waterbeemd H. Comparison of passive drug transport through Caco-2 cells and artificial membranes [J]. Int J Pharm, 1997, 147: 61 - 70.
- [10] Han M, Han LM, Wang QS, et al. Mechanism of oral absorption of panaxnotoginseng saponins [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2006, 41: 498 - 505.