

Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用

杨海涛*, 王广基

(中国药科大学药代中心, 江苏 南京 210009)

关键词: Caco-2; 体外模型; 细胞培养; 体内/体外相关

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2000)10-0797-04

评估药物口服吸收效果的常用方法是整体动物实验。但由于动物有个体差异,测定建立分析生物样本中药物的方法难度大,整体动物吸收代谢的耗药量大,周期较长。从80年代起,国外开始应用一种人结肠癌细胞(the human colon carcinoma cell line,简称:Caco-2细胞)体外培养模型进行药物的吸收研究。Hidalgo等^[1]通过实验证实在涂有胶原的多聚碳酸酯膜上培养的Caco-2细胞模型可作为小肠内皮细胞的转运模型。近年来,有关Caco-2细胞模型成为研究热点。

Caco-2细胞来源于人体结肠腺癌细胞。由于Caco-2细胞在培养条件下可自发进行上皮样分化并可形成紧密联结,其形态学、标志酶的功能表达及渗透特征与小肠类似,因而被大多数实验采用。Caco-2细胞模型可作为研究小肠表皮细胞药物转运和代谢的体外模型。其优点为:省时;可测定药物的细胞摄取及跨膜转运;Caco-2细胞内有药物代谢酶,可在有代谢状况下测定药物的跨膜转运;Caco-2细胞与肠上皮近似;Caco-2细胞易于培养且生命力强;Caco-2细胞来源是人结肠癌细胞,同源性好;可用于区分肠腔内不同吸收途径的差别。但Caco-2细胞也有一定的缺点,如:缺少肠壁的粘液层;缺少细胞异质性(单一细胞构成);缺少部分代谢酶;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。但大量的研究表明,Caco-2模型适用于新药开发的早期阶段,用来研究药物的吸收过程。

1 Caco-2 细胞体外模型

1.1 Caco-2 细胞的模型建立及监测

1.1.1 模型建立 Caco-2细胞培养:Caco-2细胞培养于DMEM培养液中,含FBS(10%),NEAA(1%),L-glutamine(1%),penicillin(1×10^4 U·mL⁻¹)-streptomycin(100 μg·mL⁻¹),在37℃的CO₂培养箱中培养待用。

1.1.2 细胞极性 细胞极性可用监测刷状缘的标志酶,光学或电子显微镜来确认。碱性磷酸酶及蔗糖异麦芽糖酶可作为标志酶。两种酶的分布与细胞极性一致。

1.1.3 单细胞层完整性 Caco-2单细胞层的完整性可测定以下几个指标:①用电子显微镜或光学倒置显微镜进行形态学检查;②在单细胞层培养的不同阶段,测定碱性磷酸酶的活性,该酶是小肠刷状缘细胞的标志性酶;③测量单细胞层的电阻(TEER);④标志物被动扩散的跨膜通量,通常用甘露醇, inulin, lucifer yellow等。甘露醇为小分子物质,有水溶性,非离子化,具膜通透性,不易代谢,而且可以放射性标记后使用,是一个较好的指标;⑤用辣根过氧化物酶测胞饮功能。

1.2 Caco-2 细胞模型的药物转运机理

在Caco-2细胞模型中,药物的转运过程为:药物分子从Caco-2单细胞层的顶侧——肠腔侧(AP侧)跨过Caco-2单细胞层或经由细胞间隙到达基底侧(BL侧)(图1)。药物跨过肠上皮有4条途径:①被动转运;②胞旁转运;③载体介导转运;④胞饮。吸收好的药物通常脂溶性较大,易分布于肠上皮细胞膜。由于刷状缘细胞面积巨大,此类药物基本上是经被动跨膜转运途径的。吸收缓慢且较差的药物,如亲水性药物以及多肽等,不易分布至刷状缘,再由胞旁转运透过上皮。但由于刷状缘细胞面积远大于(≥100倍)细胞侧面联结间的面积^[2],这足以补偿两种转运间的差别,所以亲水性药物跨膜转运

收稿日期:1999-11-11

作者简介:杨海涛,男,硕士研究生。

王广基,男,教授,博士生导师。

* Tel: (025) 3271347, E-mail: HTYANG2000@263.net

与胞旁转运几乎相当。对于亲水性药物的胞旁转运通路,有实验证明紧密联结是限速因素^[3]。许多 Caco-2 细胞模型的研究结果表明,在 Caco-2 细胞模型有 3 条主动转运途径^[4,5]: ① 二肽载体; ② P-糖蛋白; ③ 寡肽载体。有些药物由于与营养物质结构相似可经主动转运吸收。其中多数是半载体介导-半被动转运吸收。若被动转运的渗透系数小,则载体饱和将使吸收分数下降。而对于 P-糖蛋白介导的药物外排,其过程的饱和则可使吸收分数增加。胞饮作用由于容量小而极少被考虑。它主要用于大分子药物转运(如 Ag 等)。

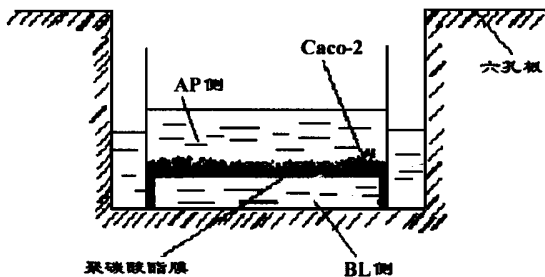


图1 Caco-2 单层细胞模型示意图
AP 侧:肠腔侧; BL 侧:基底侧

1.3 Caco-2 细胞模型与小肠中药物转运的关系

Artursson 等^[6]于 1996 年通过对 20 多个化合物的研究,试图将 Caco-2 细胞模型的表观渗透系数与口服吸收相关联。表观渗透系数为 $5 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。表观渗透系数可由下式计算:

$$P_{app} = \Delta Q / (\Delta t \cdot A \cdot C_0)$$

其中 ΔQ 为 Δt 内的转运量, A 为膜面积, C_0 为初始给药浓度。吸收良好的药物的表观渗透系数 $P_{app} > 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; 吸收为 1% ~ 100% 的药物表观渗透系数 P_{app} 为 $0.1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; 而吸收差的药物(即吸收 < 1%)的 $P_{app} < 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。由于这一相关关系主要适用于被动转运,因此对吸收良好的药物(被动转运), Caco-2 细胞模型是一个研究药物吸收的极好模型,而对于吸收差的药物, Caco-2 细胞模型只能作为体内吸收的一个定性而非定量指标。在 Caco-2 细胞模型中吸收差的药物的透过速度是其在人的空肠中透过速度的 3.33% ~ 1.25%。这可能由于 Caco-2 细胞模型中紧密联结的渗透性比正常小肠小。另一解释是吸收面的差异,吸收差的药物在体内扩散距离加长,它虽不会使吸收面增加,但药物会通过基底部胞旁通路的缝隙被吸收进入体内,从而提高吸收分数。

有研究^[7]表明 L-dopa、中性氨基酸等是经载体介导转运吸收的。其在 Caco-2 细胞模型中的吸收约为体内吸收的 1% 倍。而其他小分子有机物在 Caco-2 细胞模型以及小肠吸收模型中有很好的相关性。所以,对于载体介导的药物转运而言,只有当 Caco-2 细胞上的相关载体充分表达后,药物在 Caco-2 细胞模型中转运才能与体内转运状况相关,而且相关强度会因化合物不同而异。这也表明 Caco-2 细胞模型是被动转运途径较好的体外模型,对其他转运途径只可作为参考模型。

2 Caco-2 细胞模型主要应用^[8]

经过 20 多年的探索, Caco-2 细胞模型现已被大多数人认可为小分子药物口服吸收的体外筛选模型。主要应用于以下几个方面:

2.1 研究口服药物的吸收特性

2.1.1 研究药物的化学结构与吸收转运的关系

了解化学结构对小肠吸收的影响,可大大促进有效口服药物的发现。据报道^[9],一系列用于减肥的 1,5-苯二氮革类化合物(CCK-A 受体激动剂),其化学结构和吸收转运间(表观渗透系数 P_{app})有较强的相关关系。

$$\text{Log}(P_{app}) = 8.05 - 0.27 \times (\text{Number of Hydrogen bonds}) - 0.0065 \times (\text{Surface Area}) + 0.03 \times (\text{Solvation Energy})$$

Hovgaard L 等^[10]研究了 O-cyclopropane carboxylic acid ester 前药的转运,发现增加亲脂性可使前药的通透性较母药提高 17 倍。因此,应用化学结构方面的信息(如:油水分配系数,氢键数,偶极矩和分子表面积等),可以提高合成口服吸收较好的化合物的命中率。

2.1.2 预测药物在体内的吸收

Obermeier MT 等^[11]研究了血管紧张素 II 受体拮抗剂 BMS-183920,其在大鼠的生物利用度由于口服吸收不良,只有 11%。而对其 5 种酰-酯类前药进行筛选,结果筛选到 tetrazole-酯的前药。其生物利用度达到 37%。

2.1.3 研究辅料以及剂型对吸收的影响作用

Hovgaard L 等^[12]研究了一些环糊精对吸收的促进作用,发现二甲基环糊精能使 PEG-4000 的吸收提高 10 倍,而所用浓度对细胞的毒性很小。Ginski MJ^[13]等利用 Caco-2 细胞模型来对体外溶出-体内吸收关系进行预测,结果发现利用溶出/ Caco-2 细胞模型系统所预测出的溶出限速型或渗透限速型吸收与临床结果相一致。吡罗昔康具有较高渗透性和较

低的溶解度,但应用此系统可知:在速溶的处方中吡罗昔康是渗透限速型吸收,而在较慢溶出的处方中吡罗昔康是溶出限速型吸收。因而溶出/ $\text{Cac}\sigma 2$ 细胞模型系统到处方的改进是一个十分有力的工具。

2.2 研究口服药物的吸收转运机制

$\text{Cac}\sigma 2$ 细胞模型可在体外研究药物的摄取^[14]、代谢^[15]、排放^[16]和跨细胞转运^[17]。Hidalgo IJ等^[18]研究了大分子中性氨基酸(LNAA)-苯丙氨酸(Phe)的转运,发现其从AP到BL的转运速度约是BL到AP的10倍,且AP到BL的转运是载体介导的,Phe的转运在有叠氮盐、哇巴因存在或缺少葡萄糖时会减少。Mason JB等^[19]研究了叶酸在小肠的转运,发现pH影响了叶酸与小肠粘膜上的转运之间的亲和力,从而影响叶酸的吸收。

小肠内代谢对药物吸收也有影响,因此 $\text{Cac}\sigma 2$ 细胞模型在药物代谢方面也有应用^[20],L. Gan LS等报道^[9] $\text{Cac}\sigma 2$ 细胞可以产生碱性磷酸酶、二肽酶、氨基肽酶、 γ -glutamyl transpeptidase, peptidyl dipeptidase和微粒体酸(如:P₄₅₀3A4,3A5)等。已有文献对P₄₅₀酶表达的调节^[21]及转染特定cDNA^[22]进行了报道,这必将提高 $\text{Cac}\sigma 2$ 细胞模型在代谢研究方面的作用。

3 小结

$\text{Cac}\sigma 2$ 细胞模型被广泛地应用药物吸收机理的研究,也被用于预测各种途径的药物转运,但相关关系最好的是被动跨膜转运,而对于载体介导的主动转运只能对部分药物进行预测。总之,用 $\text{Cac}\sigma 2$ 细胞模型可详尽地研究药物从AP端跨过上皮、细胞摄取、代谢及BL端的排放等细节,对于研究药物在小肠的吸收机理有重要意义。

REFERENCES:

- [1] Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line ($\text{Cac}\sigma 2$) as a model system for intestinal epithelial permeability [J]. *Gastroenterology*, 1989, **96**(3): 736 - 749.
- [2] Pappenheimer JR, Reiss KZ. Contribution of solvent drug through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat [J]. *J Membr Biol*, 1987, **100**: 123 - 136.
- [3] Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. A novel integral membrane protein localizing a tight junctions [J]. *J Cell Biol*, 1993, **123**: 1777 - 1788.
- [4] Dantzig AH, Bergin L. Uptake of the cephalosporin, cephalexin, by a dipeptide transport carrier in the human intestinal cell line, $\text{Cac}\sigma 2$ [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1027**(3): 211 - 217.
- [5] Karlsson J, Kuo SM, Ziemniak J. Transport of celioprolol across human intestinal epithelial ($\text{Cac}\sigma 2$) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein [J]. *Br J Pharmacol*. 1993, **110**(3): 1009 - 1016.
- [6] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial ($\text{Cac}\sigma 2$) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **175**(3): 880 - 885.
- [7] Lennernas H, Nilsson D. The effect of L-leucin on the absorption of levodopa studied by regional jejunal perfusion in man [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1995, **35**: 243 - 250.
- [8] Zen YL. The screening of specialties of new drug in early research stage [J]. *Chin New Drugs J* (in Chinese), 1999, **8**(4): 217 - 219.
- [9] L. Gan LS, Thankker DR. Applications of the $\text{Cac}\sigma 2$ model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 1997, **23**(1 - 3): 77 - 98.
- [10] Hovggard L, Brondsted H, Buur A. Drug delivery studies in $\text{Cac}\sigma 2$ monolayers, synthesis, hydrolysis and transport of σ -cyclopropane carboxylic acid ester prodrugs of various β -blocking agents [J]. *Pharm Res*, 1995, **12**(3): 387 - 392.
- [11] Obermeier MT, Chong S, Dando SA. Predrugs of BMS-183920: metabolism and permeability considerations [J]. *J Pharm Sci*, 1996, **85**(8): 828 - 833.
- [12] Hovggard L, Brondsted H. Drug delivery studies in $\text{Cac}\sigma 2$ monolayers. IV. Absorption enhancer effects of cyclodextrins [J]. *Pharm Res*, 1995, **12**(9): 1328 - 1332.
- [13] Ginski MJ, Polli JE. Prediction of dissolution-absorption relationships from a dissolution/ $\text{Cac}\sigma 2$ system [J]. *Int J Pharm*, 1999, **177**(1): 117 - 125.
- [14] D'Agostino L, Pignata S. Polyamine uptake by human colon carcinoma cell line $\text{Cac}\sigma 2$ [J]. *Digestion*, 1990, **46** (Suppl 2): 352 - 359.
- [15] Tomom M, Tenenhouse HS, Jones G. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase activity in $\text{Cac}\sigma 2$ cells. An *in vitro* model of intestinal vitamin D metabolism [J]. *Endocrinology*, 1990, **126**(6): 2868 - 2875.
- [16] Chen JU, Hu M, Zhu YP, et al. The study of kinetic model for the frug efflux from a human intestinal epithelial membrane model system [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (in Chinese), 1996, **23**(4): 247 - 251.
- [17] Dantzig AH, Duckworth DC, Tabas LB. Transport mechanisms responsible for the absorption of loracarbef, cefixime and cefuroxime axetil into human intestinal $\text{Cac}\sigma 2$ cells [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1994, **1191** (1): 7 - 13.

- [18] Hidalgo IJ, Borhardt RT. Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco2 [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1990, **1028**(1):25 - 30.
- [19] Mason JB, Shoda R, Haskell M, *et al.* Carrier affinity as a mechanism for the pH dependence of folate transport in the small intestine [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1990, **1024**(2):331 - 335.
- [20] Meunier V, Bourrie M, Berger Y. The human intestinal epithelial cell line Caco2; pharmacological and pharmacokinetic applications [J]. *Cell Biol Toxicol*, 1995, **11**(3 - 4):187 - 194.
- [21] Rosenberg DW. Regulation of cytochrome P₄₅₀ in cultured human colonic cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **300**(1):186 - 192.
- [22] Tse CM, Levine SA, Yun CH. Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2) [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**(16):11917 - 11924.

CACO2 CELL MONOLAYERS MODEL AND ITS APPLICATION IN PHARMACY

YANG Hai tao, WANG Guangji

(Center of Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

KEY WORDS: human colon carcinoma cell line (Caco2); *in vitro* model; cell culture; *in vivo/in vitro* correlation