

# 应用 A549 细胞单层模型研究蛋白多肽类药物肺部吸收的特性

王智瑛<sup>1</sup>, 张悦<sup>2</sup>, 张强<sup>1\*</sup>

(北京大学药学院 1. 药剂学系, 2. 化学生物学系, 北京 100083)

关键词: 蛋白多肽类药物; A549; 肺部吸收; 表观渗透系数

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2004)05 - 0392 - 04

## Transport of proteins and peptides across human cultured alveolar A549 cell monolayers

WANG Zhi-ying<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>2</sup>, ZHANG Qiang<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmaceutics, 2. Department of Bioinorganic Chemistry, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

**Abstract: Aim** An *in vitro* cultured monolayer system of alveolar epithelial cells was used as a model to investigate the transport pathway peptides or proteins, salmon calcitonin (sCT), insulin (INS), recombinant hirudin (rHAV2), and recombinant human growth hormone (rhGH), in pulmonary epithelium *in vivo*. **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 cells formed continuous monolayers with growing polycarbonate filters of Transwell plate. Transport studies of macromolecules in the monolayer system were carried out after 6 days in culture. The transport of peptides or proteins with MW 3 400 - 22 000 was studied in cultured human lung adenocarcinoma A549 cell monolayers at different conditions. **Results** The results showed that the apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of these macromolecules across A549 cell monolayers ranged from  $2 \times 10^{-6}$  to  $5 \times 10^{-6}$   $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$  and exhibited good inverse correlation with molecule weight. No concentration, direction and temperature dependence were observed in the permeation of sCT, INS and rHAV2. While the  $P_{app}$  of rhGH in the BA direction ( $2.25 \times 10^{-6}$   $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) was significantly less than that in the reverse direction. The  $P_{app}$  values of rhGH were concentration and temperature independent in the AB direction. **Conclusion** These findings suggest that the hydrophilic peptides and proteins, salmon calcitonin, insulin, recombinant hirudin, and recombinant human growth hormone used in this study, appeared to penetrate the A549 cell monolayers *via* a paracellular pathway by passive diffusion mechanism.

**Key words:** proteins and peptides; A549; pulmonary absorption; apparent permeability coefficients

药物通过呼吸进行吸收的路径依次为气管→支气管→肺泡,其中通过肺泡上皮细胞吸收占90%以上。由于肺泡上皮细胞使大分子的蛋白多肽类药物不易通过,是它们渗透的主要屏障,因此对肺泡膜屏障特性、药物透过程及渗透特性的研究有助于更好地理解蛋白多肽类药物的肺部吸收。建立体外细胞培养模型进行蛋白多肽类药物肺部吸收体外研究具有如下优点:①可控制环境使上皮细胞在健康或

病理状态下生长与分化;②直接获得在上皮膜和基底膜表面药物透过途径及机制的实验数据;③排除其他非上皮细胞或基底细胞的干扰;④方便、快捷的评价药物渗透及酶稳定性。因此,建立体外细胞培养模型为在细胞水平上对蛋白多肽类药物的肺部吸收特性进行研究。

肺泡膜主要由 I 型和 II 型肺泡上皮细胞构成(AT I 和 AT II),此外还包括巨嗜细胞等 40 余种其他细胞。AT I 细胞覆盖肺泡膜表面超过 96%,形状扁平,高度伸展,胞质极薄,可为气体扩散提供有效的极短途径;AT II 细胞呈立方体,数量约为 AT I 细胞的 1 倍,肺部药物代谢酶主要分布在其中;而且,

收稿日期: 2003-05-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070902).

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 82802791,

E-mail: zqdodo@bjmu.edu.cn

当 AT II 细胞培养在塑料或聚碳酸酯膜支持物上时,其形态可逐渐接近 AT I 细胞并具有其功能及生化性质,因此,II 型肺泡上皮细胞模型被广泛的应用于肺部给药的基础研究中<sup>[1-3]</sup>。A549 细胞系是一种人肺腺癌细胞系,具有与 II 型肺泡上皮细胞相似的形态及生化特性<sup>[4]</sup>,所建模型较多被用于评价药物肺部吸收机理等方面的研究<sup>[5,6]</sup>。

本实验建立 A549 细胞模型并对药物的体外渗透行为进行考察,计算大分子肽类及蛋白药物在体外细胞模型上的表观渗透系数并讨论其与分子量的关系,研究蛋白及肽类药物的体外跨膜转运机制,进而预见药物在体内经过肺部吸收的作用机理。

## 材料与方 法

**实验材料与仪器** 鲑鱼降钙素(salmon calcitonin, sCT, 珠海恒通生物工程制药公司);胰岛素(insulin, INS, 17.7 u·mg<sup>-1</sup>, 徐州生化药厂);水蛭素(recombinant hirudin, rHAV2, 北大生命科学学院提供);生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH, 长春金赛药业);F12 培养基(GIBCO);胎牛血清(FBS, TBD 生物技术发展中心);胰蛋白酶(1:250, Sigma);异硫氰酸荧光素(FITC, Sigma);<sup>125</sup>I-胰岛素放射免疫分析试剂盒(中国原子能科学研究院同位素研究所);<sup>125</sup>I-GH 放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所);其他试剂均为分析纯。

A549 人肺腺癌细胞系(中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供)。

Transwell 培养板(聚碳酸酯膜, 1.13 cm<sup>2</sup>, 孔径 3.0 μm, 12 孔, COSTAR);细胞电位仪(EVOM, World Precision Instrument);RF-5301 荧光分光光度计(日本岛津);SN-695B 型智能放免 γ 测定仪(上海原子能核研究所日环仪器一厂)。

**细胞培养** A549 细胞于含 10% 胎牛血清的 F12 培养基中,在 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 条件下培养,隔天换培养液。以 0.05% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化制成细胞悬液,种于 12 孔 Transwell 培养板的聚碳酸酯膜支持物上,使细胞数为(0.8~1)×10<sup>6</sup>·cm<sup>-2</sup>,计为 0 天。上下两个液池分别加入含 10% FBS 的培养液 0.5 mL 和 1.5 mL,同条件下培养,每天换培养液。d 3 起监测膜电位(trans epithelial electrical resistance, TER, Ω·cm<sup>2</sup>)的变化,开始 TER 值迅速升高,d 5 细胞单层基本融合,TER 上升速度缓慢,d 6 基本达到最高(384±12) Ω·cm<sup>2</sup>,d 7 略有下降(382±15) Ω·cm<sup>2</sup>,因此在 d 6 进行药物转运实验。

**转运实验** 以 Eagle 平衡盐缓冲液作为药物转运介质。首先用 Eagle 液淋洗 A549 细胞单层两次,然后在上、下液池中分别加入 Eagle 液 0.5 mL 和 1.5 mL,实验条件(37 °C 或 4 °C)下平衡 1 h。0 时取出部分供给池中的 Eagle 液,然后加入等体积的含多肽蛋白药物的 Eagle 液,使达到所选初始浓度 C<sub>0</sub>,同时自供给池中取 50 μL 溶液测 C<sub>0</sub>,然后置于 37 °C 或 4 °C 环境中,分别于 15, 30, 60, 90, 120, 150 和 180 min 自接受池中取溶液 100 μL,测定并计算 37 °C 条件下药物溶液自 A549 细胞单层顶端至底端(apical→basolateral, 即 AB)方向和底端至顶端(basolateral→apical, 即 BA)方向,以及 4 °C 条件下 AB 方向转运的表观渗透系数,同时立刻补入同体积的 Eagle 液。

表观渗透系数(apparent permeation coefficient, P<sub>app</sub>, cm·s<sup>-1</sup>)的计算公式如下<sup>[7]</sup>:

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt}\right) \left(\frac{1}{AC_0}\right)$$

肽类及蛋白类药物在接受池中的累积量对时间作图,其斜率 dQ/dt 即为药物单位时间的累积渗透量;A 为渗透实验的工作面积,本实验为 1.13 cm<sup>2</sup>;C<sub>0</sub> 为药物初始浓度,即 0 时刻供给池中药物浓度。

**药物含量测定** sCT 和 rHAV2 标记 FITC 荧光分子,采用荧光分析法进行定量测定,检测条件:激发波长 490 nm,发射波长 520 nm,狭缝 10 nm。

INS 和 rhGH 采用<sup>125</sup>I 标记放射免疫分析法进行含量测定,实验方法参照试剂盒说明书。

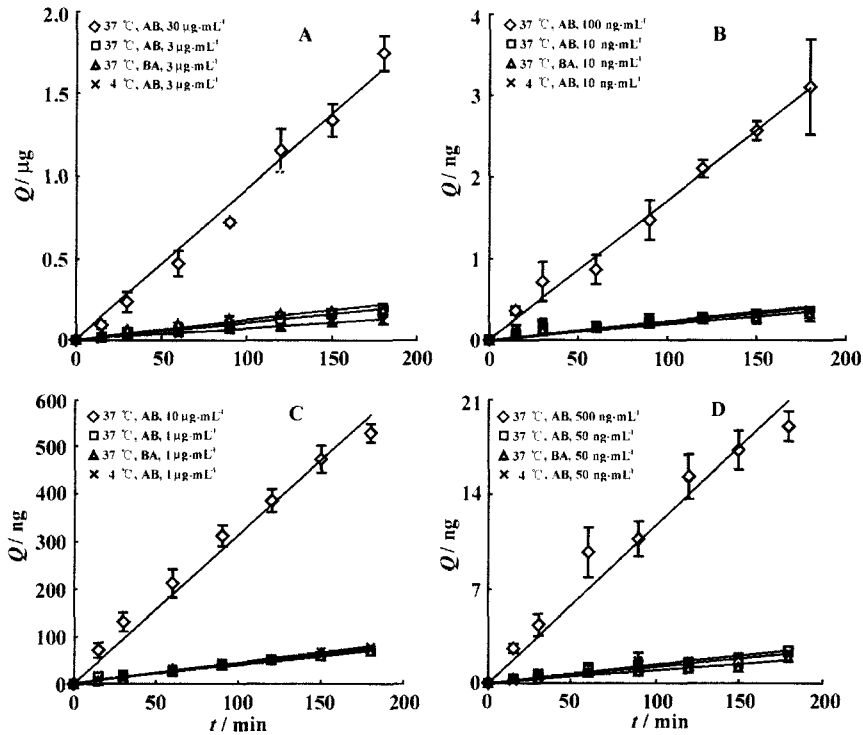
## 结 果

### 1 蛋白多肽类药物跨 A549 细胞单层转运实验结果

本实验考察了 4 个条件下蛋白多肽类药物的跨细胞单层膜转运行为:①不同分子量(3.4~22 ku);②不同药物初始浓度(相差 10 倍);③不同转运方向(AB 和 BA);④不同温度(4 °C 和 37 °C)。药物鲑鱼降钙素、胰岛素、水蛭素以及人生长激素在 A549 细胞单层模型上的转运结果见图 1。

由图可见,当初始浓度相差 10 倍时,4 种蛋白多肽类药物在高初始浓度条件下得到的单位时间累积渗透量也约为低初始浓度的 10 倍左右,而在相同初始浓度条件下,温度以及转运方向的改变对药物在 A549 细胞上的渗透几乎没有影响;同时,4 种药物的渗透在各浓度、转运方向及温度下均无滞后和饱和现象(3 h 内)。

表观渗透系数结果见表 1。由表 1 可见,随着分子量的增加,蛋白及肽类药物在 A549 细胞单层上



A: Salmon calcitonin (sCT); B: Insulin (INS); C: Recombinant hirudin (rHAV2); D: Human growth hormone (rhGH)

Figure 1 Time course of accumulation of proteins and peptides in the receiver fluid under different conditions.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

**Table 1 Apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) for peptides and proteins in A549 cell monolayers ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )**

Peptide ( $M_r$ )	Direction	Concentration	$P_{app}/\text{cm} \cdot \text{s}^{-1} (\times 10^{-6})$	
			37 °C	4 °C
sCT (3 400)	AB	30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	4.83 ± 0.17	-
		3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	4.5 ± 0.5	4.7 ± 0.9
	BA	3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	5.0 ± 1.0	-
INS (5 700)	AB	100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	4.5 ± 0.5	-
		10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	4.7 ± 0.6	4.9 ± 0.4
	BA	10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	4.7 ± 0.7	-
rHAV2 (6 900)	AB	10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	4.4 ± 0.3	-
		1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	4.8 ± 0.7	4.5 ± 0.4
	BA	1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	4.4 ± 0.6	-
rhGH (22 000)	AB	500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3.3 ± 0.6	-
		50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3.2 ± 0.3	3.57 ± 0.25
	BA	50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	2.2 ± 0.4*	-

\*  $P < 0.05$  vs the lower concentration with AB direction at 37 °C

的表观渗透系数逐渐降低;对于 sCT, INS 和 rHAV2, 在不同初始浓度、转运方向及温度条件下,其表观渗透系数相差不多,没有显著性差异,表明这 3 种药物经 A549 细胞单层转运的过程可能是非浓度、温度及方向依赖型的;但是对于 rhGH,转运方向为 BA 时,表观渗透系数  $P_{app}$  值( $2.25 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ )显著低于同浓度同温度但相反转运方向(AB)条件下的  $P_{app}$  值( $P < 0.05$ ),  $P_{app}(\text{AB}) : P_{app}(\text{BA})$  约为 1.5;转运方

向同为 AB 时,初始浓度及温度的改变对表观渗透系数的影响不显著,提示 rhGH 经 A549 细胞单层自顶端至底端方向的转运可能是非浓度及温度依赖的过程。

## 2 分子量与表观渗透系数的关系

文献<sup>[8,9]</sup>报道,对肽类药物在体内通过肺泡上皮细胞膜的行为研究,发现分子量在 1 000 ~ 100 000 u 时,药物分子量与肺泡清除率之间存在显著的负相关;本研究发现,肽类药物在 A549 细胞单层模型上的表观渗透系数 log 值与分子量 log 值表现良好的负相关(3.4 ~ 22 ku),见图 2,这种趋势与体内实验结果相符。

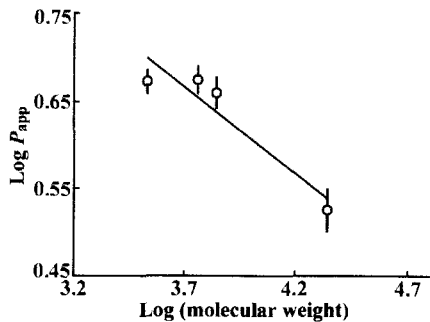


Figure 2 Correlation between apparent permeability coefficient and molecular weight of peptides and proteins.  $r = 0.9415, n = 4, \bar{x} \pm s$

## 讨论

本实验以 A549 细胞模型测得的渗透系数为  $2 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 比原代培养大鼠肺上皮细胞模型高 10 ~ 100 倍, 可能是由于 A549 细胞间紧密连接的张力比正常 II 型肺泡上皮细胞间的小, 这由膜电位 TER 值的大小可以看出。膜电位是反映细胞生长紧密程度的一个重要指标<sup>[10]</sup>, 一般原代培养正常肺泡上皮细胞单层膜的 TER 值在 2 000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  左右<sup>[3]</sup>, 约为本实验的 5 倍, 因此导致了表观渗透系数结果的不同。有研究发现<sup>[11]</sup>, 在 Caco-2 细胞模型上, TER 每增加 1 倍, 促甲状腺激素的渗透量可降至原来的 1/5 ~ 1/6。然而, 与原代培养正常大鼠肺泡上皮细胞相比, 具有与 II 型肺泡上皮细胞相似的形态及生化特性的 A549 细胞系纯度高、稳定、方便易得等优点, 并且所建模型已被用于评价药物肺部透过等方面, 因此本实验选用 A549 细胞系建立模型进行药物肺部吸收特性的研究。

由本次实验结果可见: ①药物跨 A549 细胞单层膜转运速率依赖于药物浓度, 但药物浓度对表观渗透系数的影响很小, 说明药物的转运是依靠浓度梯度驱使的; ②在 37 °C 和 4 °C 条件下, 渗透系数的值基本没有变化, 提示可能没有蛋白协同药物的转运; ③分子量在 3.4 ~ 22 ku 时, 渗透系数与分子量呈良好负相关; ④ 4 种药物的渗透均没有滞后现象。以上结果说明, 本研究所采用的 4 种肽类及蛋白药物很可能是通过细胞旁路以被动扩散的方式通过 A549 细胞单层膜进行转运的。

sCT, INS 和 rHAV2 的  $P_{\text{app}}(\text{AB})$  与  $P_{\text{app}}(\text{BA})$  相当, 而分子量 22 ku 的 rhGH 的  $P_{\text{app}}(\text{AB})$  约为  $P_{\text{app}}(\text{BA})$  的 1.5 倍, 表明 rhGH 顶端向底端的转运方向略占优势, 但相差并不明显, 提示这 4 种药物在 A549 细胞没有药物外流途径。从现有的数据很难推断出 A549 细胞对肽类药物的转运方向有选择性。

蛋白多肽类药物的肺部吸收机理比较复杂, 普遍认为分子量大于 40 ku 的药物主要以跨细胞运输 (transcytosis) 方式通过上皮及内皮细胞, 吸收很慢, 需要数小时甚至几天才能从空气腔进入血循环; 分子量小于 40 ku 的蛋白多肽类药物则主要通过紧密连接渗透, 少部分仍通过跨细胞运输作用转运, 作用迅速, 几十分钟内可以达到峰浓度<sup>[12]</sup>。本研究针对几个较低分子量的肽类及蛋白药物的体外渗透特性

进行讨论, 发现较低分子量的肽类及蛋白药物很可能是通过细胞旁路被动扩散的方式通过 A549 细胞单层膜进行转运的, 与体内实验结论相似, 为通过体外渗透实验进一步研究药物经肺部吸收的体内行为进行了有益的探索。

## References:

- [1] Forbes B, Wilson CG, Gumbleton M. Temporal dependence of ectopeptidase expression in alveolar epithelial cell culture: implications for study of peptide absorption [J]. *Int J Pharm*, 1999, **180**:225 - 234.
- [2] Kinnard WV, Tuder R, Papst P, et al. Regulation of alveolar type II cell differentiation and proliferation in adult rat lung explants [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1994, **11**:416 - 425.
- [3] Dadoo ANO, Bansal SS, Barlow DJ. Use of alveolar cell monolayers of varying electrical resistance to measure pulmonary peptide transport [J]. *J Pharm Sci*, 2000, **89**(2):223 - 231.
- [4] Shapiro DL, Nardone LL, Rooney SA. Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **530**:197 - 207.
- [5] Adjei AI, Carrigan PL. Pulmonary bioavailability of LH-RH analogs: some biopharmaceutical guidelines [J]. *J Biopharm Sci*, 1992, **3**:247 - 254.
- [6] Kobayashi S, Kondo S, Juni K. Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer [J]. *Pharm Res*, 1995, **12**:1115 - 1119.
- [7] Morimoto K, Yamahara H, Lee VHL, et al. Dipeptide transport across rat alveolar epithelial cell monolayers [J]. *Pharm Res*, 1993, **10**(11):1668 - 1674.
- [8] Patton JS, Trincherio P, Platz RM. Bioavailability of pulmonary delivery of peptides and proteins: alpha-interferon, calcitonin, and parathyroid hormone [J]. *J Controlled Release*, 1994, **28**:79 - 85.
- [9] Hastings RH, Grady M, Sakuma T. Clearance of different-sized proteins from the alveolar space in humans and rats [J]. *J Appl Physiol*, 1992, **73**:1310 - 1316.
- [10] Adson A, Raub TJ, Burton PS, et al. Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers [J]. *J Pharm Sci*, 1994, **83**:1529 - 1536.
- [11] Thwaites DT, Hirst BH, Simmons NL. Passive transepithelial absorption of thyrotropin-releasing hormone (TRH) via a paracellular route in cultured intestinal and renal epithelial cell lines [J]. *Pharm Res*, 1993, **10**:674 - 681.
- [12] Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs [J]. *Adv Drug Del Rev*, 1996, **19**:3 - 36.