

# Caco-2 细胞系及其在药物吸收、代谢中的应用

胡晓渝 姚彤炜 曾 苏 (杭州 310006 浙江大学药学院)

由于小肠的生理结构适用于药物吸收,所以口服给药是最广泛、最方便的给药途径之一,因此研究药物在肠道的吸收与代谢就显得十分必要。目前用于药物吸收的实验方法主要有:在体肠回流法,肠攀法,分离肠粘膜法、外翻囊法等<sup>[1]</sup>。由于这些方法存在采用动脉组织及其它一些局限性,近年来人们尝试使用人肠细胞培养系统来研究药物在肠道的吸收和代谢,以快速筛选口服药物。Caco-2 细胞模型被认为是目前最好的体外吸收模型,可用于快速评估新药的细胞渗透性、阐明药物转运的途径、评价提高膜通透性的方法、确定被动扩散的药物最合适的理化性质和评估新药的潜在毒性作用等,成为药物吸收研究的必备手段。本文就 Caco-2 细胞及其应用作一简要介绍。

## 1 Caco-2 细胞系

Caco-2 (the human colon carcinoma cell line) 是一种人类结肠癌细胞。由 Fogh 等人在 1977 年分离出的 Caco-2 具有一种极有意义的特征:在培养过程中,一旦细胞达到单层厚度便自发地进行分化,并在 20 天内完成这种分化。分化了的 Caco-2 细胞单层不仅在形态学上类似小肠吸收细胞,即在其肠腔侧形成一个界定明确的刷状边缘且具有紧密的细胞连接,而且还表达了典型的小肠微绒毛水解酶和营养物质转运体。研究表明在 Caco-2 细胞系中可观察到:大肠杆菌热稳定肠毒素受体,胰岛素、儿茶酚胺、转铁(球)蛋白及前列腺素受体,果糖和葡萄糖特定转运体,二肽特定转运体,牛磺酸特定转运体,已糖的各种转运体和维生素 B<sub>12</sub> 的各种转运体。Caco-2 细胞系同样表达了异麦芽糖的  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶,乳糖酶,二肽-肽酶-IV,氨基肽酶 N,碱性磷酸酯酶,肽链内切酶-24-11,  $\gamma$ -谷氨转肽酶, I 相代谢酶和 II 相代谢酶, P-葡萄糖蛋白和多药耐药蛋白等<sup>[2]</sup>。

Caco-2 细胞的培养:将 Caco-2 细胞种植于直径为 3cm

的 Snapwell™ 上(一种碳酸聚酯多孔膜), Snapwell 放置在六孔组合培养皿中。种植密度每个 snapwell 上 10<sup>5</sup> 个细胞。培养液为含有小牛血清、非必须氨基酸、抗生素的 DMEM 溶液。细胞在 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。种植后第一周,每天更换一次培养液,一周后每两天更换一次培养液。待 20~25 天时,细胞形成具有生物屏障性质的融合层,即可用于实验。

影响培养细胞的转运和代谢性质的因素:① 细胞培养条件 a. 细胞种植的密度 b. 细胞是否达到融合 c. 细胞分化的阶段 d. 重要营养物质或生长因子的存在或缺失。② 转运介质组成 a. 溶液的浓度、温度、PH 值 b. 某种代谢来源的能量或离子的存在或缺失 c. 可能与溶质结合的蛋白的存在或缺失 d. 竞争性溶质的存在或缺失。③ 溶质加在细胞单层的绒毛面一侧还是加在基底面一侧。

## 2 药物吸收实验

2.1 方法:用 hanks 平衡盐溶液(HBSS)将培养好的细胞洗涤 2~3 次。最后一次洗涤后测定跨上皮电阻值以监控细胞质量。然后在细胞层的基底面一侧(basolateral side, BL)换上 HBSS,在绒毛面一侧(apical side, AP)换上含有待测药物的 HBSS(见插图 1),或相反操作,在 37℃ 恒温摇床中释药,模拟体内吸收情况,间隔一定时间取样或在一定时间后撤去药物并破碎细胞,以液体闪烁计数法或高效液相色谱法测定两侧药物含量及细胞中的药物含量。

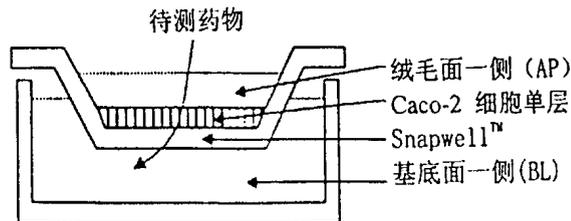


图 1

胡晓渝,女,1977 年 11 月浙江大学药学院药物分析专业硕士研究生。\* 联系人: Tel: 0571- 7217203, E-mail: Yaotw@zju.edu.cn

2.2 参数计算: 表观渗透系数( $P_{app}$ )计算公式为:

$$P_{app}(\text{cm/s}) = \frac{\Delta Q}{\Delta t 60 A C_0}$$

其中  $\Delta Q/\Delta t$  为渗透速率( $\mu\text{g}/\text{m in}$ ),  $C_0$  为供药室中被测药物的初始浓度( $\mu\text{g}/\text{m l}$ ),  $A$  为细胞单层的表面积( $\text{cm}^2$ )<sup>[3]</sup>。动力学参数计算公式为:

$$P = \frac{P_c}{1 + (C/K_m)} + P_m$$

其中  $P_c$  为载体介导透过系数,  $K_m$  为米氏常数,  $V_{max}$  为最大转运速率,  $P_m$  为被动扩散透过系数<sup>[4]</sup>。  $P_{app}$  用于研究药物的跨膜机制(被动扩散或主动转运),  $K_m$  用于表征主动转运中药物对所参与载体的亲和能力。

2.3 转运机制的研究: 若在整个浓度范围内(于漏槽条件下)测得的  $P_{app}$  值保持恒定, 则被动扩散为主要转运机制。  $P_{app}$  值可由  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  方向测得( $P_{app1}$ ), 也可由  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  方向测得( $P_{app2}$ ), 若  $P_{app1}$  与  $P_{app2}$  相同也可确定被动扩散为主要转运机制, 若  $P_{app1}/P_{app2} > 1.5$  则提示可能存在主动转运机制:  $P$ -糖蛋白( $P$ -glycoprotein,  $P$ -gp) 和多药耐药蛋白(multi-drug resistance protein, MRP) 是  $\text{Caco-2}$  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 170KDa 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  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  的转运速率减慢, 而  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  转运速率加快, 当加入维拉帕米或环孢菌素 A 或地高辛<sup>[5,6]</sup>等  $P$ -gp 抑制剂后, 可使  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  的  $P_{app}$  值增大, 而  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  的  $P_{app}$  值减小。 MRP 为 MRP 基因编码的分子量为 190KDa 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<sup>[6]</sup>或 LTC<sub>4</sub><sup>[7]</sup>等 MRP 抑制剂后, 可使  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  的  $P_{app}$  值发生改变(见插图 2)。

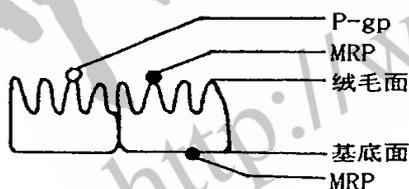


图 2

### 3 Caco-2 细胞在药物转运吸收研究中的应用

#### 3.1 研究黄酮类物质的转运

有学者<sup>[8]</sup>研究了槲皮素、槲皮素 4'-葡萄糖苷、槲皮素 3, 4'-二葡萄糖苷在  $\text{Caco-2}$  细胞模型中的转运情况。槲皮素  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  的  $P_{app}$  值为  $5.8 \pm 1.1 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ , 是拟细胞转运标示物甘露醇  $P_{app}$  值的 10 倍, 而跨细胞转运标示物普萘洛尔  $P_{app}$  值是槲皮素的 5 倍。而槲皮素  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  的  $P_{app}$  值为  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  的 2 倍。槲皮素 4'-葡萄糖苷  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  无吸收, 而  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  的  $P_{app}$  值为  $1.6 \pm 0.2 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ 。槲皮素 3, 4'-二葡萄糖苷  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  呈现低吸收( $P_{app}$  值为  $0.09 \pm 0.03 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ ), 而  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  的转运是该值的 4 倍。上述结果提示槲皮素在人小肠可被迅速吸收, 槲皮素葡萄糖苷并非由位于基底

面的己糖转运体所主动转运。有人<sup>[9]</sup>应用  $\text{Caco-2}$  模型研究了染料木黄酮及其 7-葡萄糖苷的转运。染料木黄酮  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  的  $P_{app}$  值为  $20.0 \pm 0.8 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ , 相反地, 染料木黄酮的主要食物来源, 染料木苷(染料木黄酮-7-葡萄糖苷)  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  无吸收, 而其  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  的  $P_{app}$  值为  $1.28 \pm 0.1 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ , 是甘露醇的 6 倍。使用抑制剂 MK-571 后, 染料木苷的  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  的  $P_{app}$  值由  $1.48 \pm 0.07 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$  降至  $0.19 \pm 0.02 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ , 提示 MRP2 可能参与染料木苷的转运。柯因也是一种存在于日常饮食中的天然产物, 它是药物代谢酶的一种强有力的抑制剂。有学者<sup>[10]</sup>研究了柯因在  $\text{Caco-2}$  模型中的转运, 柯因  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  的  $P_{app}$  值在最初的小时为  $6.9 \pm 1.6 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ , 是甘露醇的 10 倍; 而其  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  的  $P_{app}$  值为  $14.1 \pm 1.6 \times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ , 是  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  的  $P_{app}$  值的 2 倍。转运实验经过 1 小时后, 其  $P_{app}$  值迅速下降, 这与两种代谢物一葡萄糖醛酸结合物( $M_1$ )、磺基结合物( $M_2$ )的出现有关。在  $\text{AP}$  侧加入转运抑制剂 MK-571 后,  $M_1$ 、 $M_2$  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。

#### 3.2 研究新型抗肿瘤药物的吸收

近年来倍受人们关注的抗肿瘤药紫杉醇的前期临床研究显示, 其口服给药后不被吸收, 这种低口服生物利用度是由低吸收还是广泛的前系统肝脏代谢引起的尚不清楚。有人<sup>[11]</sup>使用  $\text{Caco-2}$  细胞模型研究了紫杉醇的跨上皮转运, 认为该药的跨上皮的快速的被动扩散可部分地被一个外排作用所中和, 该外排作用可能为  $P$ -gp 所介导。但由肠腔侧至肠壁侧相对较高的表观渗透系数来看, 该药在肠道仍有可能被有效地吸收。国内学者<sup>[12]</sup>研究了新型抗癌药 AG337 在该模型上的吸收, 发现其跨细胞转运显示强烈的有向性,  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  大于  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  10 倍以上,  $P$ -糖蛋白的专属抑制剂维拉帕米可以消除这种有向性。说明 AG337 在  $\text{Caco-2}$  模型中的跨细胞转运, 受到  $P$ -糖蛋白强烈的外排作用。该学者<sup>[13]</sup>又研究了 5-氟尿嘧啶在  $\text{Caco-2}$  细胞模型上转运特性, 比较了 5-氟尿嘧啶在不同 pH 条件下的吸收情况, 考察了 5-氟尿嘧啶吸收与浓度的关系。结果显示: 吸收在 pH 6 的介质中为佳, 吸收的初速随浓度的增加趋于一个饱和值, 吸收可被氯化钠、双嘧达莫等代谢抑制剂抑制, 也被同类结构的化合物尿嘧啶、胸腺嘧啶等抑制。因此认为 5-氟尿嘧啶在  $\text{Caco-2}$  细胞模型中的吸收为尿嘧啶载体所转运。

#### 4 Caco-2 细胞在药物代谢研究中的应用

##### 4.1 I 相代谢方面的研究:

一些学者<sup>[14,15]</sup>的研究发现在塑料盘上培养数周的  $\text{Caco-2}$  细胞可将 7-乙氧基异吩恶唑代谢为其 0-去乙基衍生物, 并由以下事实确认该酶应为 CYP1A1: 1. 可被多环烃类特异性地诱导 2. 可被 CYP1A1 的抑制剂特异性地抑制 3. 7-乙氧基异吩恶唑的 0-去乙基酶的活性和 CYP1A1 蛋白的存在及

CYP1A1 mRNA 的累积之间存在密切相关。Lampen<sup>[16]</sup>等人的研究表明 Caco-2 细胞系在 mRNA 和蛋白质水平表达 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A 蛋白也在 Caco-2 中被检测到。同时还发现 Caco-2 细胞催化前致癌物二甲基-苯并蒽 (DMBA) 生成四种代谢产物, 催化免疫抑制剂 tacrolimus 生成三种代谢产物, 后者可被人肝微粒体的 CYP3A4 催化代谢生成 9 种产物。

#### 4.2 II 相代谢方面的研究

Peters 和 Roelofs<sup>[17]</sup>评估了在融合与分化的各种条件下谷胱甘肽-S-转移酶在 Caco-2 细胞上的表达。他们指出, 在指数生长期, 细胞主要表达  $\pi$ -异构体, 其浓度在生长的稳定期缓慢而持续的降低。 $\pi$ -异构体的这种降低与  $\alpha$ -异构体的出现和持续增加有关。Sergent-Engelen<sup>[15]</sup>等人报道无论在细胞绒毛面还是在基底面加入氯二硝基苯, 其谷胱甘肽结合物形成后, 主要在细胞绒毛面排出。在另外一个研究<sup>[18]</sup>中, 多巴胺和对一硝基苯酚的磺基结合物均被发现, 而 p-硝基苯酚与 1-萘酚的葡醛化反应均未观察到。Caro 等人<sup>[19]</sup>支持上述观点, 认为与 Caco-2/TC-7 克隆相比较, Caco-2 细胞几乎观察不到 1-萘酚的葡醛化反应。

综上所述, Caco-2 细胞模型是一种在体外研究药物分子穿越特定的生物屏障进行转运的新的工具。由于其具有体内肠上皮的许多形态和功能上的性质, 它为研究药物的转运机制、预测药物的小肠吸收情况以及药物在肠道的代谢提供了广阔前景。

#### 参考文献

- 1 梁桂贤, 刘谦民. 药物肠吸收研究方法近况[J]. 国外医药一合成药生化药制剂分册, 1998, 19(4): 251
- 2 Meunier V, Bourrie M, Berger Y et al. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications[J]. Cell Biol Toxicol, 1995, 11: 187
- 3 Crowe A, Lemaire M. In vitro and in situ absorption of SDZ-RAD using a human intestinal cell line (Caco-2) and a single pass perfusion model in rats: comparison with rapamycin[J]. Pharm Res, 1998, 15 (11): 1666-1672
- 4 Yang CY, Dantzig AH, Pidgeon C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability[J]. Pharm Res, 1999, 16(9): 1331
- 5 Annaert P, Gelder JV, Naesens L et al. Carrier mechanism involved in the transepithelial transport of bis (POM)-PMEA and its metabolites across Caco-2 monolayers[J]. Pharm Res, 1998, 15(8): 1168
- 6 Walgren RA, Karnaky KJ, Lindenmayer GE, et al. Efflux of Dietary flavonoid quercetin 4'- $\beta$ -glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug

- resistance-associated protein-2<sup>[J]</sup>. J Pharmol Exp Ther, 2000, 294(3): 830
- 7 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
- 8 Walgren RA, Walle UK, Walle T. Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55: 1721
- 9 Walle UK, French KL, Walgren RA et al. Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal Caco-2 cells: potential role for MRP2 [J]. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology. 1999, 103(1): 45
- 10 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: 431
- 11 Walle UK, Walle T. Taxol transport by human intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. Drug Metab Dispos, 1997, 26(4): 343
- 12 陈纪岳, 李宜琪, 胡明. 新抗癌活性物 AG337 在 Caco-2 细胞模型中经 p-蛋白介导的跨细胞转运[J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 9 (3) : 168
- 13 陈纪岳, 徐子酋, 李宜琪. 5-氟尿嘧啶在 Caco-2 细胞模型中的吸收特性[J]. 药学报, 1998, 33 (3): 222
- 14 Rosenberg DW, Leff T. Regulation of cytochrome P450 in cultured human colonic cells [J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 300: 186
- 15 Sergent-Engelen T, Delistrié V, Schneider. Phase I and II biotransformations in living Caco-2 cells cultivated under serum-free conditions; selective apical excretion of reaction products [J]. Biochem Pharmacol, 1993, 46: 1393
- 16 Lampen A, Bader A, Bestmann T et al. Catalytic activities, protein and mRNA-expression of cytochrome P450 isoenzymes in intestinal cell lines [J]. Xenobiotica, 1998, 28(5): 429
- 17 Peters WH, Roelofs HM. Time-dependent activity and expression of glutathione in the S-transferases in the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 [J]. Biochem J, 1989, 264: 613
- 18 Baranczyk-Kuzma A, Garren JA, Hidalgo J et al. Substrate specificity and some properties of phenol sulfotransferase from human intestinal Caco-2 cells [J]. Life Sci, 1991, 49: 1197
- 19 Caro I, Boulenc X, Rousset M et al. Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs [J]. Int J Pharm, 1995, 116: 147

收稿日期: 2001-05-08