

5-氟尿嘧啶与卡莫氟的理化特性对其渗透性的影响

孟胜男^{1,2}, 王欣¹, 张懋璠¹, 赵妍¹, 李煦颖¹, 李明如¹, 何仲贵²(1.中国医科大学药学院药剂学教研室, 沈阳 110001; 2.沈阳药科大学药学院药剂教研室, 沈阳 110016)

摘要: 目的 应用 Caco-2 细胞模型研究 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)和卡莫氟(carmofur, HCFU)的渗透性并探讨物理化学性质如 logP、pKa 值、分子量及水溶性等对两者渗透性的影响。方法 实验中应用的 5-氟尿嘧啶和卡莫氟的 pKa 值、水溶性等由文献获得, logP 值用 HyperChem V5.0 软件中的 ChemPlus 模块计算得到; 用跨膜电阻值(trans epithelial electrical resistance, TEER)和荧光黄检测细胞完整性, 进行渗透实验, 计算表观渗透系数(apparent permeability coefficients, P_{app})。结果 5-氟尿嘧啶和卡莫氟的 logP 值分别为-0.96 和 2.63; 细胞的 TEER 值维持在 760~965 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 之间; 荧光黄的 P_{app} 值为 $(1.89 \pm 0.78) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 细胞融合形成了连续的单层细胞膜, 且其紧密性和完整性良好; HCFU 的 P_{app} 值约是 5-FU 的 P_{app} 值的 10 倍。结论 logP 值对 5-氟尿嘧啶和卡莫氟在 Caco-2 细胞模型中的渗透性起决定作用, 5-氟尿嘧啶和卡莫氟的理化特性对两者的渗透性有不同的影响。

关键词: 5-氟尿嘧啶; 卡莫氟; 渗透性; Caco-2 细胞模型; 理化特性

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)12-1007-04

Effect of Physicochemical Characteristics on the Permeability of 5-fluorouracil and Carmofur

MENG Shengnan^{1,2}, WANG Xin¹, ZHANG Maofan¹, ZHAO Yan¹, LI Xuying¹, LI Mingru¹, HE Zhonggui²
(1. Department of Pharmaceutics, Pharmacy School of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Pharmaceutics, Pharmacy School of Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the permeability of 5-fluorouracil and carmofur on Caco-2 cell monolayers and the influence of their physicochemical characteristics such as logP, pKa, molecular weight and aqueous solubility on their permeability

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究计划资助项目(05L472)

作者简介: 孟胜男, 女, 博士, 副教授 Tel: (024)23256666-5467 E-mail: shengnanmeng@yahoo.com.cn

was determined. **METHODS** The information of pK_a , aqueous solubility *etc.* was got from the references; $\log P$ values was predicted by the ChemPlus modules in the software of HyperChem V5.0; the integrity of Caco-2 cell monolayers was examined by the TEER values and the permeability of Lucifer yellow, performed the permeability assay, calculated the apparent permeability coefficients (P_{app}). **RESULTS** The $\log P$ of 5-fluorouracil and Carmofur were -0.96 and 2.63 , respectively, the TEER values was in range of $760\sim 965\ \Omega\cdot\text{cm}^2$, the P_{app} of Lucifer yellow was $(1.89\pm 0.78)\times 10^{-7}\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, and confluent cell monolayers in tight-junction integrity have formed, the P_{app} value of Carmofur is 10 folds of 5-fluorouracil. **CONCLUSION** $\log P$ played a decisive role in the permeability on the Caco-2 cell monolayers, and physicochemical characteristics of 5-fluorouracil and carmofur influenced their permeability differently.

KEY WORDS: 5-fluorouracil; carmofur; permeability; Caco-2 cells model; physicochemical characteristics

Caco-2 细胞模型作为药物吸收和代谢研究的一种快速筛选工具,能够在细胞及分子水平提供关于药物分子通过小肠黏膜的吸收、代谢、转运的信息;细胞分化的极性有助于研究药物双向(肠腔侧到肠壁侧或肠壁侧到肠腔侧)的转运,从而对被动、主动转运的药物进行研究;由于各种转运系统及代谢酶在 Caco-2 细胞的表达,使该模型的研究结果与体内药物的处置有较好的相关性等。因此, Caco-2 细胞模型已被应用于药物研究和开发的各个阶段^[1]。

5-氟尿嘧啶为嘧啶类的氟化物,是临床常用的抗癌药物之一。由于 5-氟尿嘧啶脂溶性差,胃肠道吸收不完全,因此其口服生物利用度较低^[2]。卡莫氟(carmofur, HCFU)是第三代氟尿嘧啶类抗代谢抗肿瘤药物,为氟尿嘧啶潜效型药物(前体药物),因其抗癌谱广,抗癌指数高,在临床上正在得到越来越广泛的应用^[3],但目前只有口服给药这一种给药途径。探索这两种药物吸收、转运特性及其影响因素,可通过改善药物的基本性质,提高药物的生物利用度,降低药物不良反应,使其更能高效、安全地在临床应用。有研究证实 5-氟尿嘧啶在小肠能被主动吸收,但主动吸收的转运机制显示其在远远低于临床口服剂量的浓度时即呈饱和状态,证明其口服吸收由被动机制支配^[4];本课题组对 HCFU 的吸收特性研究也表明,其吸收由一个饱和成分和一个非饱和成分组成(论文另外发表),即其吸收也由被动和主动吸收两部分组成。以上研究结果均说明被动吸收在 HCFU 和 5-氟尿嘧啶的口服吸收中占有重要作用,而被动转运的化合物的吸收与化合物的极性($\log P$)相关,并受化合物的 pK_a 值、分子量及水溶性的影响^[5],且化合物的理化性质与其在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收特性的研究少见报道。本试验应用 Caco-2 细胞单层模型研究 5-氟尿嘧啶和 HCFU 的渗透性并探讨物理化学性质如 $\log P$ 、 pK_a 值、分子量及水溶性等对两者渗透性的

影响,为这两种药物在临床合理应用提供帮助。

1 材料

1.1 细胞

Caco-2 细胞株购自美国 ATCC(American Type Culture Collection)。

1.2 药品与试剂

DMEM 培养基(dulbecco's modified eagle's medium, GIBCO 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Equitech-Bio Inc.公司);非必需氨基酸(non essential amino acids, Hyclone 公司);谷氨酰胺(L-glutamine, Hyclone 公司);胰蛋白酶(Trypsin, Sigma 公司);卡莫氟(济南制药厂);5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU, 济南制药厂);荧光黄(Lucifer yellow, Sigma 公司);甲醇均为色谱纯;水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器与材料

二氧化碳培养箱(Hearous and LISHEN 公司);CKX31 倒置显微镜(Olympus, 美国);Waters 600E 高效液相色谱仪(美国);Millicell-ERS 跨膜电阻仪(Millipore, 美国)。Transwell 细胞培养板(Corning Costar, 美国)。

2 方法

2.1 5-氟尿嘧啶和 HCFU 的 pK_a 值及 $\log P$ 值的确定

实验中应用的 HCFU 和 5-氟尿嘧啶的 pK_a 值、水溶性等有由文献[6-8]获得; $\log P$ 值用 HyperChem V5.0 软件中的 ChemPlus 模块计算得到。

2.2 细胞培养

Caco-2 细胞培养于 DMEM 培养液中,含胎牛血清(FBS)10%,非必需氨基酸 1%,谷氨酰胺 1%,青霉素($100\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)和链霉素($100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)双抗液,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 的 5% CO_2 恒温培养箱中培养。隔天换 1 次培养液,每 5~7 d 用胰蛋白酶消化传代。实验时将 Caco-2 细胞混悬液种植于 Transwell 培养板上的 Insert (Pore size $3.0\ \mu\text{m}$, Area $1.12\ \text{cm}^2$)中,细胞种植密度为 $1\times 10^5\ \text{cells}\cdot\text{cm}^{-2}$,接种后每 2

d 换液 1 次, 1 周后每日换液, 单层细胞于 19~21 d 左右分化形成。

2.3 细胞完整性

2.3.1 跨膜电阻的测定 细胞完整性测定的评定的方法之一是跨膜电阻的大小。用跨膜电阻仪检测跨膜电阻 (transepithelial electrical resistance, TEER)。测定时将生长时间符合要求的 Caco-2 细胞的培养液换成 HBSS 液(pH 7.4, 37 °C), 在转运实验前后均测定细胞的跨膜电阻, 各孔跨膜电阻值均大于 600 Ω·cm² 的 Caco-2 细胞单层显示具有良好的完整性^[2]。

2.3.2 荧光黄透过实验 生长良好的 Caco-2 细胞用 HBSS (pH 7.4)小心冲洗 3 次, 37 °C 孵育 30 min, 吸净孔内的 HBSS 以防止干扰; 在 transwell 顶端侧 (apicalside, AP)加入 80 mg·L⁻¹ 的荧光黄, 37 °C 孵育 1 h 后收集基底侧(basolateralside, BL)液体, 4 °C 避光保存, 用荧光分光光度计测定荧光黄浓度(激发波长 430 nm, 发射波长 540 nm)。荧光黄的表观渗透系数(apparent permeability coefficients, P_{app})少于 0.5×10⁻⁶ cm·s⁻¹ 细胞单层的完整性符合要求^[9]。

2.4 药物的渗透实验

将 5-氟尿嘧啶和 HCFU 分别溶于 DMSO 中配成 10 mmol·L⁻¹ 储备液, 实验前用 HBSS 缓冲液稀释制备成 50 μmol·L⁻¹ 的工作溶液。

实验前首先用 37 °C 预热的 pH 7.4 的 HBSS 溶液洗涤细胞单层 3 次, 再加入预热的 HBSS 溶液, 于 37 °C 摇床中孵育 30 min 左右, 吸弃 HBSS 溶液。药物从细胞绒毛面的 AP 侧到 BL 侧的转运: 将药物溶液 0.5 mL 加到 AP 侧作为供给池, 同时 BL 侧加入空白的 pH 7.4 的 HBSS 溶液 1.5 mL 作为接收池, 把加好药物溶液和空白 HBSS 溶液的 Transwell 培养板置于转速为 50 r·min⁻¹ 的 37 °C 恒温摇床中, 分别在 30, 60, 90, 120 min 时吸接收池溶液 200 μL, 同时补足同体积预热至 37 °C 预热的 HBSS 溶液。试验平行做 3 份。

2.5 定量分析方法

高效液相色谱法。分析柱: Dikma DiamonsilTM C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。HCFU: 流动相: 甲醇-水 (90:10), 吸收波长: 258 nm, 流速: 1 mL·min⁻¹, 进样量: 50 μL; 5-氟尿嘧啶: 流动相: 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 3.0), 吸收波长: 266 nm, 流速: 1 mL·min⁻¹, 进样量: 50 μL。

2.6 数据分析

Caco-2 细胞模型表观渗透系数的计算参考 Artursson 和 Karlson^[10]于 1991 年报道的药物透过 Caco-2 细胞单层的表观渗透系数 (apparent permeability coefficients, P_{app})进行数据处理。

$$P_{app}=(dQ/dt)/AC_0$$

P_{app} 单位为 cm·s⁻¹。上式中, Q 是积累转运量, 代表化合物在接收端(receiver)出现的总量, 单位为 μg, dQ/dt 是速率, 单位为 μg·min⁻¹; C₀ 是化合物在给予端(donor)的初始浓度, 单位为 μg·L⁻¹; A 是聚碳酸酯膜的表面积, 单位为 cm²。P_{app} 值越大, 通透率越高。

用 Student's t 检验对两组数据进行比较处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 5-氟尿嘧啶和 HCFU 的性质

5-氟尿嘧啶和 HCFU 的部分理化性质见表 1。

表 1 5-氟尿嘧啶和 HCFU 的理化特性

Tab 1 Physicochemical properties of 5-FU and HCFU				
化合物	分子量	pKa	logP	水溶性 pH 7.4/mg·mL ⁻¹
5-FU	130.00	8.0	-0.96	0.110
HCFU	257.26	6.7	2.63	0.057

3.2 5-氟尿嘧啶和 HCFU 对细胞完整性的作用

在转运实验过程中, Caco-2 细胞单层的完整性被检测。实验用细胞的 TEER 值一直维持在 760~965 Ω·cm² 之间; 荧光黄的 P_{app} 值为 (1.89±0.78)×10⁻⁷ cm·s⁻¹, 两项指标均说明细胞融合形成了连续的单层细胞膜, 且其紧密性和完整性良好, 符合渗透实验的要求。

3.3 5-氟尿嘧啶和 HCFU 在 Caco-2 细胞单层的渗透性

5-氟尿嘧啶和 HCFU 从 AP 侧到 BL 侧 P_{app} 值见表 2。

表 2 5-氟尿嘧啶和 HCFU 在 Caco-2 细胞单层的表观渗透系数(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Apparent permeability coefficients (P_{app}) of 5-FU (50 μmol·L⁻¹) and HCFU (50 μmol·L⁻¹) in Caco-2 cell monolayers (n=3, $\bar{x} \pm s$)

化合物	P _{app} /(×10 ⁻⁶ /cm·s ⁻¹)
5-FU	5.710±0.64
HCFU	58.35±4.59 ¹⁾

注: 与 5-FU 组比较, ¹⁾P<0.01
Note: Compared with 5-FU group, ¹⁾P<0.01

研究结果显示, HCFU 的 P_{app} 值约是 5-FU 的 P_{app} 值的 10 倍, 具有显著性差异($P<0.01$)。

4 讨论

药物渗透性的高低与药物吸收的程度直接相关。药物的吸收是一个非常复杂的过程, 受到许多因素的影响, 其中药物的理化性质对药物的吸收起着非常重要的作用。很多研究表明, 这些性质中的一些如 $\log P$, pK_a , 水溶性等都可了解或预测药物活性成分的吸收、分布、代谢^[11]。 $\log P$ 是一个广泛接受的表征化合物亲脂性的参数, 与药物的膜渗透性、吸收、分布以及消除途径等相关; pK_a 对化合物的溶解度、脂溶性、穿透性和吸收等有影响; 水溶性大小对药物的分散起作用, 对药物剂型的影响大, 水溶性好的药物能够获得较好的分散, 进而有利于药物的吸收。其中 $\log P$ 的影响起关键作用。

本试验应用 Caco-2 细胞模型研究 5-氟尿嘧啶和其衍生物 HCFU 的渗透性, 并考察了上述理化性质对其渗透性的影响。实验结果显示, 5-氟尿嘧啶的 $\log P$ 值为-0.96, 而 HCFU 的 $\log P$ 值为 2.63, 两者相差较大, 渗透实验结果显示, HCFU 的 P_{app} 值约是 5-氟尿嘧啶的 P_{app} 值的 10 倍, 具有显著性差异($P<0.01$)。说明 $\log P$ 值越大, 油/水分配系数越大, 药物极性越小, P_{app} 值越大。由于 P_{app} 值越大, 药物通透率越高, 因此 HCFU 在 Caco-2 细胞模型中的透过率比 5-氟尿嘧啶高。

5-氟尿嘧啶的 pK_a 值为 8.0, 比 HCFU 的大, 表明其在整个体系中以分子形式存在的较多, 有利于药物的吸收, 但其 $\log P$ 值非常低, 综合因素作用的结果使细胞对其渗透性较低, 不利于其吸收; 而 HCFU 的 pK_a 值为 6.7, 在体系中其离子成分相对比 5-氟尿嘧啶的多, 理论上不利于吸收, 但其 $\log P$ 值较高, 实验结果显示, 细胞对其有良好的渗透性, 体现较佳的吸收效果。

由于 5-氟尿嘧啶和 HCFU 分子量均较小, 对药

物渗透的影响不大。

总之, $\log P$ 值在 5-氟尿嘧啶和 HCFUCaco-2 细胞模型单层中渗透起决定作用, 其它理化特性对其渗透性有不同的影响。由于 5-氟尿嘧啶和 HCFU 在 Caco-2 的吸收均表现主动和被动两种形式, 这些性质的影响的综合作用还需进一步研究。

REFERENCES

- [1] 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): 27-43.
- [2] SULKES A. From 5-fluorouracil to the new oral fluoropyrimidines: a brief overview of four decades of clinical investigations [J]. *Isr Med Assoc J*, 2001, 3(4): 278-281.
- [3] IWAGAKI H, TANAKA N, ESATO K, et al. Randomized controlled trial of 5-fluorouracil (5-FU) infusion combined with 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) oral administration and HCFU alone as postoperative adjuvant chemotherapy for colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(5C): 3727-3734.
- [4] SMITH P, MIRABELLI C, FONDACARO J, et al. Intestinal 5-fluorouracil absorption: use of Ussing chambers to assess transport and metabolism [J]. *Pharm Res*, 1988, 5(9): 598-603.
- [5] RIVERA J C, YEPEZ-MULIA L, HERNANDEZ-CAMPOS A, et al. Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H- benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives [J]. *Int J Pharm*, 2007, 343(1-2): 159-165.
- [6] MERINO V, LOPEZ A, KALIA Y N, et al. Electrorepulsion versus electroosmosis: effect of pH on the iontophoretic flux of 5-fluorouracil [J]. *Pharm Res*, 1999, 16(5): 758-761.
- [7] SINGH B N, SINGH R B, SINGH J. Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum [J]. *Int J Pharm*, 2005, 298(1): 98-107.
- [8] KAWAGUCHI T, KANAZAWA A, TAKAYAMA K, et al. Release profiles of 5-fluorouracil and its lipophilic derivatives from lipiodol solutions [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1988, 15(6): 1995-1997.
- [9] SUZUKI H, SUGIYAMA Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 12(1): 3-12.
- [10] ARTURSSON P, KARLSSON J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175(3): 880-885.
- [11] LOBELL M, SIVARAJAH V. In silico prediction of aqueous solubility, human plasma protein binding and volume of distribution of compounds from calculated pK_a and $AlogP98$ values [J]. *Mol Divers*, 2003, 7(1): 69-87.

收稿日期: 2009-02-23