维普资讯 http://www.cqvip.com

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)

R965.1

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})-streptomysin (100 μg·mL^{-1})，在 37℃ 的 CO_2 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

维普资讯 http://www.cqvip.com

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)。

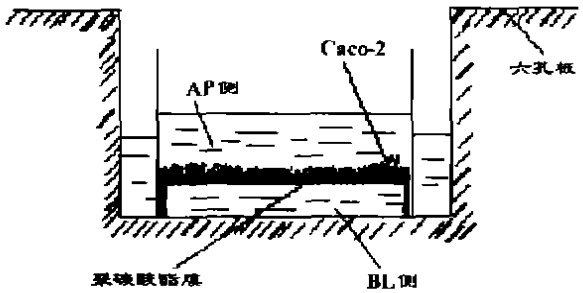

图1 Caco-2单层细胞模型示意图
AP侧:肠腔侧; BL侧:基底侧

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$5\times10^{-8}\sim5\times10^{-5}$ cm·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$P_{app}>10^{-6}$ cm·s^{-1};吸收为1%～100%的药物表观渗透系数P_{app}为$0.1\times10^{-6}\sim1\times10^{-6}$ cm·s^{-1};而吸收差的药物(即吸收<1%)的$P_{app}<10^{-7}$ cm·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-苯二氮䓬类化合物(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。

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

Hovggard 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

维普资讯 http://www.cqvip.com

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/Caco-2 细胞模型系统对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

Caco-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 Caco-2 细胞模型在药物代谢方面也有应用[20],L. Gan LS 等报道[9] Caco-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:P_{450}3A4,3A5)等。已有文献对 P_{450}酶表达的调节[21]及转染特定 cDNA[22]进行了报道,这必将提高 Caco-2 细胞模型在代谢研究方面的作用。

3 小结

Caco-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 Caco-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 (Caco-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 inegral 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, Caco-2 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1027**(3):211－217.

[5] Karlsson J, Kuo SM, Ziemniak J. Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-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 (Caco-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 jejeunal 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 Caco-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 Caco-2 monolayers, synthesis, hydrolysis and transport of *O*-cycolpropane 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 Caco-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/Caco-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 Caco-2 [J]. *Digestion*, 1990, **46** (Suppl 2):352－359.

[15] Tomon M, Tenenhouse HS, Jones G. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase activity in Caco-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 Caco-2 cells [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1994, **1191** (1):7－13.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[18] Hidalgo IJ, Borchardt RT. Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2 [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 Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications [J]. *Cell Biol Toxicol*, 1995, **11**(3 - 4):187 - 194.

[21] Rosenberg DW. Regulation of cytochrome P_{450} 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.

CACO-2 CELL MONOLAYERS MODEL AND ITS APPLICATION IN PHARMACY

YANG Hai-tao, WANG Guang-ji

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

KEY WORDS: human colon carcinoma cell line (Caco-2); *in vitro* model; cell culture; *in vivo/in vitro* correlation

欢迎订阅 2001 年《药学学报》

《药学学报》是由中国药学会主办、国内外公开发行的专业性学术性期刊，旨在报道我国药学创新性科研成果，促进国内外学术交流。内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、生药学、药剂学等领域的研究论文、研究简报、述评和综述。读者对象主要为从事本学科的科研及教学人员、大专院校师生等。

《药学学报》为我国自然科学核心期刊，据中国科学引文数据库连续 5 年的数据统计，在中国科技期刊 500 名排行表中，《药学学报》排名第 7 - 9 位，在医药卫生期刊中居首位；在美国"CA"千种表中居 421 位，本刊为我国药学界高水平的刊物，在国际上享有一定知名度。本刊荣获首届"国家期刊奖"。

本刊为月刊，大 16 开本，每期定价 10.00 元，全年定价 120.00 元。国内邮发代号：2 - 233，国外代号：M105。欢迎到当地邮局订阅，也可直接与本刊联系。

另：编辑部尚有部分过刊，欢迎邮购。

地址：北京市先农坛街 1 号 《药学学报》编辑部 **邮编**：100050

电话：(010)63035116, 63026192, 63165208 **E-mail**: yxxb@imm.ac.cn