

麦冬多糖 MDG-1在 Caco-2细胞模型中转运机制研究

卢智玲¹,林晓^{1*},徐德生²,冯怡¹(1.上海中医药大学,上海 201203;2.上海中医药大学附属曙光医院,上海 200021)

摘要:目的 研究麦冬多糖抗心肌缺血活性成分 MDG-1在 Caco-2细胞模型中转运机制。方法 以 Caco-2细胞作为转运研究模型,分别测定改变转运方向,使用 P糖蛋白(P-gp)外排泵专属抑制剂维拉帕米(verapamil),以及改变给药浓度各种条件下,MDG-1的跨细胞转运情况。结果 麦冬多糖 MDG-1的分泌转运(BL-AP)的表观渗透系数 P_{app} 并未数倍于吸收转运(AP-BL),两者相近,同时 P-gp抑制剂维拉帕米加入与否对麦冬多糖 MDG-1转运没有影响;在考察的系列药物浓度范围内,MDG-1的转运随着药物浓度的增加而呈线性增加。结论 麦冬多糖 MDG-1在 Caco-2细胞模型中的转运机制很可能是以被动扩散为主,并且以未降解的药物形式转运,无 P-gp外排泵参与。

关键词:麦冬多糖 MDG-1; Caco-2细胞模型; 转运机制

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)06-0452-03

Study on transport mechanism of polysaccharide MDG-1 from ophiopogon japonicus in Caco-2 cell culture model

LU Zhi-ling¹, LIN Xiao^{1*}, XU De-sheng², FENG Yi¹(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shuguang Affiliated Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the transport mechanism of polysaccharide MDG-1 from ophiopogon japonicus in Caco-2 cell culture model. **METHODS** Caco-2 cell was used as in vitro drug transport model. The transepithelial transport of MDG-1 was determined under various conditions, including changing the concentration and transport direction, adding P-glycoprotein (P-gp) inhibitor. **RESULTS** The P_{app} of transport from BL to AP was similar with that of opposite direction. Drug transport was not affected by verapamil, a prototypical inhibitor of P-gp. The AP-BL flux of MDG-1 increased linearly with increasing concentration of MDG-1 over the range of $9.5 \sim 380 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The transport of MDG-1 across Caco-2 cell is probably passive diffusion as the dominating process without the P-gp efflux, meanwhile, intact MDG-1 is proved to be absorbed through Caco-2 cell.

KEY WORDS: polysaccharide MDG-1 from ophiopogon japonicus; Caco-2 cell; transport mechanism

目前,多糖类药物由于其广泛的生物活性和低毒的特点,日益成为研究的热点。但国内外有关多糖口服后在胃肠道的跨膜转运情况及如何促进其以有效形式吸收等问题的研究报道并不多见,本文选择有一定前期工作基础的麦冬多糖来进行此项研究,希望能做些探索性工作,为更多地了解多糖在胃肠道的转运情况积累些资料。麦冬多糖经药效学实验表明,是抗急性心肌缺血的有效成分^[1],进一步药理实验确证了麦冬多糖 MDG-1是发挥药效的物质基础。

Caco-2细胞系来源于人结肠腺癌细胞,很容易在体外培养并保持稳定。培养成熟的 Caco-2可形成连续的单细胞层,与小肠上皮细胞类似,分化出绒毛面 AP(apical,肠腔一侧)和基底面 BL(basolateral,肠内壁一侧)。同时存在于小肠上皮中的各种转运系统、代谢酶等在 Caco-2细胞中都有表达。值得一提的是, Caco-2保持了 P糖蛋白(P-gp)高表达的特征^[2]。利用 Caco-2细胞模型,可在体外进行药物的摄取、排放及跨细胞转运等吸收机制的研究。麦冬多糖在 Caco-2细胞模型中的转运特性国内外未见文献报道,本研究旨在探讨其跨膜转运机制,以期有针对性地寻找可能的促进肠吸收的途径。

1 材料

1.1 仪器与器材 Hepa class 100 二氧化碳培养箱(英国 Thermo Electron); XDS-1 B倒置生物显微镜(上海精密仪器仪表有限公司); 5810R 高速冷冻离心机(美国 Beckman); F-4500 荧光分光光度计(日本 Hitachi); LC-20AB 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu); RF-10A_{XL} 荧光检测器; Millicell-ERS 跨膜电阻仪(美国 Millipore); MillicellTM膜(0.4 μm pore size, 0.6 cm², 美国 Millipore); 细胞培养皿(美国 Corning)。

1.2 药品与试剂 相对分子量均一的麦冬多糖 MDG-1(自制,数均分子量 3400); 异硫氰酸荧光素(FITC)(美国 Sigma); DMEM 高糖培养基、高灭活胎牛血清、非必须氨基酸、青、链霉素、0.25%胰蛋白酶、0.02% EDTA 消化液均购自美国 Gibco 公司; Hank's 缓冲盐溶液(HBSS)和磷酸盐缓冲溶液(PBS)均自配; 维拉帕米(verapamil)(上海信谊制药总厂); 细胞培养用水为新鲜三蒸水,其它所用试剂均为分析纯。

1.3 细胞 Caco-2 细胞株,购自北京协和医院,实验用的细胞代数在 30 - 60 代。

2 方法

作者简介:卢智玲,女,博士研究生

* 通讯作者:林晓, Tel: (021) 51322211, E-mail: linxiaol128@yahoo.com.cn

2.1 FITC标记麦冬多糖 MDG-1 参照文献方法^[3],并加以调整。取麦冬多糖 MDG-11g溶于含 10滴吡啶的 10mL二甲亚砜中,加入 0.1 g FITC和 20mg二丁基二月桂酸锡,密闭,95℃水浴反应 1h,取出,冷却至室温,加 10倍体积的氯化钠饱和和无水乙醇,所得沉淀经乙醇洗涤数次,将游离 FITC完全洗净,即得 FITC标记麦冬多糖 MDG-1。

2.2 细胞培养 参照文献方法^[4],Caco-2细胞株接种于常规培养皿中,培养液为 DMEM高糖,包括 10%胎牛血清,1%非必须氨基酸,1%丙酮酸钠,1%谷氨酰胺和 1%青链霉素。置于 37℃ CO₂培养箱中,通入 5% CO₂(相对湿度 90%)。当细胞汇合程度达到 80%时,胰酶消化,对于转运实验,将细胞按 2×10⁵个/孔接种于 Millicell™膜 AP侧,接种后每两天换液一次,一周后每日换液,培养至 21天。培养过程用跨膜电阻仪定期检测跨膜电阻值(TEER)。

2.3 药物转运实验

2.3.1 浓度对 FITC-MDG-1 吸收转运的影响 用 pH 7.4的 HBSS溶液配制浓度范围为 9.5~380μg·mL⁻¹的 FITC-MDG-1溶液,经过滤除菌。取符合转运条件且细胞生长状态完好的 Millicell™膜,试验前用空白 pH 7.4的 HBSS溶液 37℃培养 20min后,HBSS清洗三遍,洗去细胞单分子层表面的杂质。将 0.4mL各浓度的药物溶液加到 AP侧作为供给液,同时 BL侧加入 0.6mL空白 pH 7.4的 HBSS溶液作为接受液。将该装置放入 37℃ CO₂恒温培养箱中孵育。分别于 0.5,1,2,3 h从接受室取样 0.3mL,同时补加等量空白 pH 7.4的 HBSS溶液。

2.3.2 FITC-MDG-1 吸收和分泌转运研究 用 pH 7.4的 HBSS溶液配制浓度为 100μmol·L⁻¹的 FITC-MDG-1溶液,经过滤除菌。取生长 21天符合转运条件且细胞生长良好的 Millicell™膜,弃去细胞培养液,然后用 37℃ Hank's 溶液冲洗单层细胞表面 3次。对于从 AP-BL转运:将 FITC-MDG-1溶液 0.4mL加到 AP侧作为供给池,同时在 BL侧加入 pH 7.4 Hank's 液 0.6mL作为接收池;对于 BL-AP转运:将 FITC-MDG-1溶液 0.6mL加到 BL侧作为供给池,同时在 AP侧加入 pH 7.4 Hank's 液 0.4mL作为接收池。给药后,置于 37℃ CO₂恒温培养箱中孵育。分别在 0.5,1,2,3h从接收池吸尽接收液,同时补加等量空白 pH 7.4的 Hank's 溶液。

2.3.3 P-gp 专属抑制剂对 FITC-MDG-1 细胞转运的影响 取生长 21天符合转运条件且细胞生长良好的 Millicell™膜,弃去细胞培养液,然后用 37℃ Hank's 溶液冲洗单层细胞表面 3次。将含 100μg·mL⁻¹维拉帕米的 Hank's 溶液分别加入供给池和接收池中,37℃ 共浴 20min。弃去培养液,用 pH 7.4 Hank's 液配制成含 100μg·mL⁻¹维拉帕米的 47.5μg·mL⁻¹的 FITC-MDG-1溶液。对于从 AP-BL转运:将药物溶液 0.4 mL加到 AP侧作为供给池,同时在 BL侧加入 pH 7.4 Hank's 液 0.6mL作为接收池;对于 BL-AP转运:将药物溶液 0.6 mL加到 BL侧作为供给池,同时在 AP侧加入 pH 7.4 Hank's 液 0.4mL作为接收池。给药后,置于 37℃ CO₂恒温培养箱中孵育。分别于 0.5,1,2,3h从接受室取样 0.3mL,

同时补加等量空白 pH 7.4的 HBSS溶液。

2.4 FITC-MDG-1 跨膜转运后是否降解的研究

2.4.1 高效凝胶色谱条件 Shodex sugar ks-802柱(日本昭和电工);流动相:0.1 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲液(pH 7.0);激发波长 ex 495 nm;发射波长 em 515 nm;柱温:30℃;流速:0.5 mL·min⁻¹;进样量:20μL。

2.4.2 检测方法 分别将 FITC-MDG-1跨膜转运前后的 AP侧液及 BL侧液,注入高效凝胶柱色谱,通过保留时间来判断多糖跨膜后是否发生了糖链断裂和降解。

2.5 分析方法

样品用 pH 7.4 Hank's 液定容至 1 mL后,用荧光分光光度法测定其中的药物浓度。测定条件:激发波长 ex 495 nm;发射波长 em 515 nm;狭缝宽度 ex/em 5.0 nm/10.0 nm。

2.6 数据分析

转运实验:表观渗透系数 P_{app}代表药物转运能力的大小。

$$P_{app} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$$

其中 dQ/dt为单位时间药物转运量(μg·min⁻¹);A为转运膜的面积,此时 A为 0.6 cm²;C₀为 FITC-MDG-1的初始浓度 μg·mL⁻¹;P_{app}单位为距离/时间(cm·s⁻¹)。

外排率 P_{ntio}代表药物净外排的能力的大小,同时可以预测外排作用引起的药物口服吸收减弱的程度。

$$P_{ntio} = P_{app, ba} / P_{app, ab}$$

其中 P_{app, ba}为分泌表观渗透系数(BL-AP),P_{app, ab}为吸收表观渗透系数(AP-BL)。

由于每次取样后都要补液,对药物的通透产生了稀释作用,因而药物的累计通透量 TR_{cum}(μg·mL⁻¹)可由以下公式校正:

$$TR_{cum} = A_n + \frac{V_{S_n} \sum_{i=0}^{n-1} A_i}{V_R}$$

其中 A_n为第 n个样品通透量的测定值;V_{S_n}为第 n个样品的采样体积;V_R为接收池的体积。

3 结果

3.1 Caco-2细胞完整性验证

光镜下细胞生长均匀,边界清晰,可清楚地看到细胞之间的接触。电镜下可以清晰地看到 Caco-2细胞的紧密连接以及微绒毛,微绒毛的分化良好。TEER值是评价细胞紧密连接的重要指标,从实验结果看,随着培养天数的增加,TEER不断上升,在 21天时达到 600以上,同时,细胞间转运标志物³H甘露醇的通透量小于 0.5%/h,表明细胞间紧密连接已经形成。

3.2 浓度对 FITC-MDG-1 吸收转运的影响

以 pH 7.4的 HBSS为稀释介质,配制浓度为 9.5~380μg·mL⁻¹的 FITC-MDG-1溶液作为供试液,考察药物的吸收转运情况。加药前,用 MTT(噻唑蓝)试验对 9.5~380μg·mL⁻¹的麦冬多糖 MDG-1进行了细胞毒性的考察,结果未见有细胞毒。FITC-MDG-1累积转运结果见表 1。以 FITC-MDG-1转运速率与药物浓度作图,结果见图 1。

表 1 FITC-MDG-1在 3 h 内的累积转运量 (AP-BL 方向) (n=3)

Tab 1 Apical to basolateral cumulative transport concentration of FITC-MDG-1 across Caco-2 cell monolayers in 3h (n=3)

NO	cumulative transport		flux of FITC-MDG-1 in 3h ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	9.5	19	47.5	95	190	380
1	0.0480	0.1047	0.1521	0.4568	0.8760	1.8965
2	0.0402	0.1090	0.1433	0.4894	0.8654	2.1431
3	0.0468	0.1082	0.1390	0.4824	0.9520	2.1203
Average	0.0450	0.1073	0.1448	0.4762	0.8978	2.0533
SD	0.0042	0.0023	0.0067	0.0172	0.0470	0.1363

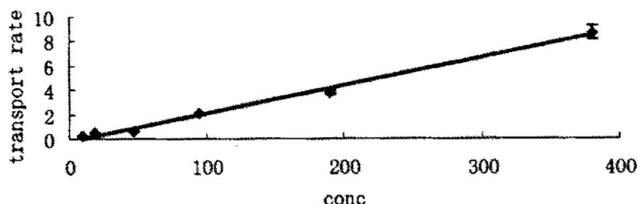


图 1 不同浓度 FITC-MDG-1 跨 Caco-2 细胞的转运速率

Fig 1 Transport rate of FITC-MDG-1 across Caco-2 cell monolayers (AP-BL)

结果表明,随着 FITC-MDG-1 浓度增加,AP-BL 方向的转运量近似线性增加, r 为 0.9970。初步表明药物的转运是被动扩散过程。因为如果细胞对药物的吸收是经某一载体而转运,则药物的转运速率有随药物浓度的增加而非线性增加的特征,即随浓度增加,转运速率趋向一个饱和值。

3.3 FITC-MDG-1 吸收和分泌转运研究

本实验对 $100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 FITC-MDG-1 溶液在 Caco-2 细胞模型中吸收转运 (AP-BL) 和分泌转运 (BL-AP) 进行研究, FITC-MDG-1 吸收和分泌表现渗透系数结果见表 2。

表 2 FITC-MDG-1 溶液在 Caco-2 细胞转运中的表现渗透系数 P_{app} (Mean \pm SD, n=3)

Tab 2 Apical to basolateral P_{app} of FITC-MDG-1 in Caco-2 cell (Mean \pm SD, n=3)

Conc	$P_{app}(1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s})$		
	AP-BL	BL-AP	P_{ratio}
$100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.18 ± 0.06	1.08 ± 0.04	0.91

结果表明, FITC-MDG-1 溶液在 Caco-2 细胞转运中的表现渗透系数 P_{app} (AP-BL) 较低, 这与我们前期做的大鼠口服药代动力学测得的生物利用度低的结果是一致的。另一方面, BL-AP 方向转运的表现渗透系数 (P_{app}) 并未数倍于 AP-BL 方向, 两者 P_{app} 比值即外排率接近于 1, 表明吸收过程可能无载体转运, 同时也说明可能不存在药物的外排^[5]。

3.4 P-gp 专属抑制剂对 FITC-MDG-1 细胞转运的影响

考察了 $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 维拉帕米对 FITC-MDG-1 细胞吸收和分泌的影响。吸收和分泌表现渗透系数 P_{app} 和外排率 P_{ratio} 的结果见表 3。由此可见, 加入抑制剂前后, FITC-MDG-1 的吸收和分泌转运的 P_{app} 变化不大, 两个方向的 P_{app} 比值都趋向于 1, 进一步证明了麦冬多糖 FITC-MDG-1 在吸收过程中可能没有受到外排蛋白 P-gp 的外排作用。

表 3 抑制剂对 FITC-MDG-1 细胞转运的影响 (Mean \pm SD, n=3)

Tab 3 Effect of P-gp inhibitor on transport of FITC-MDG-1 across Caco-2 cell monolayers (Mean \pm SD, n=3)

	$P_{app}(1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s})$		
	AP-BL	BL-AP	P_{ratio}
FITC-MDG-1 ($47.5\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.30 ± 0.08	1.14 ± 0.10	1.03
FITC-MDG-1 ($47.5\mu\text{g}/\text{mL}$) + verapamil ($100\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.34 ± 0.05	1.04 ± 0.07	0.91

3.5 FITC-MDG-1 跨膜转运后是否降解的研究

经高效凝胶过滤色谱分析, 跨膜前后的 FITC-MDG-1 保留时间一样, 说明多糖分子量未发生改变, 即多糖未降解。这与前期体内药代动力学实验中得出的血与尿样中多糖均是以未降解的形式存在的结果是一致的。

4 讨论

实验研究表明, 麦冬多糖 FITC-MDG-1 并非外排蛋白 P-gp 的底物, 可以初步判断 P-gp 外排不是导致 FITC-MDG-1 口服吸收不佳的原因。同时 FITC-MDG-1 的转运随着药物浓度的增加而呈线性增加, 细胞内载体蛋白的抑制剂 (维拉帕米) 不影响药物的转运, 这一结果基本表明药物的吸收是以被动扩散过程为主。同时, 高效凝胶过滤色谱分析证明了 FITC-MDG-1 是以未降解的药物的形式吸收。FITC-MDG-1 的表现渗透系数 P_{app} 较低, 这与其作为亲水性大分子不易穿过细胞膜的脂质双层膜, 穿越细胞间的通道又受到紧密连接的阻碍是一致的。针对已知的吸收机制, 如何克服多糖大分子的吸收不良的问题, 可能在后期实验中要从寻找可调节细胞间紧密连接的吸收促进剂着手^[6], 希望能为增加多糖的口服吸收进行探索性研究。

致谢 上海中医药大学科技实验中心张宁主任和病毒与免疫实验室杨扬老师在 Caco-2 细胞培养中给予指导和帮助。

参考文献

- [1] XU D S, FENG Y, ZHOU Y H, *et al*. Active components of polysaccharide of *Ophiopogon japonicus* on acute myocardial ischemia [J]. *Chin Traditional Patent Med* (中成药), 2004, 26(10): 832-837.
- [2] YANG H T, WANG G J. Caco-2 cell monolayers model and its application in pharmacy [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2000, 35(10): 797-800.
- [3] De BELDER A N, GRANATH K. Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans [J]. *Carbohydr Res* 1973, 30: 375-378.
- [4] SM J S, ZHAO H L, LID W, *et al*. Effects of saponins from the root bark of *Aralia elata* on the transport of chondroitin sulfate in Caco-2 cell monolayers and rats [J]. *Biol Pharm Bull* 2005, 28(6): 1043-1048.
- [5] ZORNOZA T, CANO-CEBRIN M J, NALDA-MOLINA R, *et al*. Assessment and modulation of acamprostate intestinal absorption: comparative studies using *in situ*, *in vitro* (Caco-2 cell monolayers) and *in vivo* models [J]. *Eur J Pharm Sci* 2004, 22: 347-356.
- [6] WARD P D, TIPPIN T K, THAKKER D R. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions [J]. *PSIT*, 2000, 3(10): 346-358.

收稿日期: 2006-01-30