

# Labrasol 对 P-gp 底物罗丹明 123 经肠黏膜透过性的影响

李国锋, 侯连兵, 李亦蕾, 陈如大 (南方医科大学南方医院药学部, 广州 510515)

**摘要:**目的 观察低浓度 labrasol 对肠黏膜 P-gp 的调控作用。方法 使用体外扩散池评价罗丹明 123 (R123) 经空肠、回肠和结肠黏膜的经时经吸收方向和分泌方向的透过量 and 透过系数 (Papp), 并测定不同浓度 labrasol 对 R123 和荧光素钠 (CF) 经肠黏膜透过性的影响。R123 和 CF 在接受室中的浓度用荧光分光光度法测定。结果 R123 经肠道黏膜的透过性存在部位差, 即以空肠、回肠和结肠的次序透过性依次减少。另一方面, R123 经肠道分泌方向的透过性显著地高于其吸收方向的透过性。低浓度的 labrasol 具有增加 R123 经吸收方向的透过性, 减少经分泌方向的透过性。但试验浓度的 labrasol 对 CF 的肠道转运没有影响。结论 低浓度的 labrasol 可通过对 P-gp 功能的抑制而用于改善受 P-gp 介导药物的吸收, 有望提高此类药物的口服生物利用度。

**关键词:** P-糖蛋白; 罗丹明 123; 荧光素钠; labrasol; 扩散池; 透过性

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2009)02-095-05

## Effect of Labrasol on the Permeabilities of Rhodamine 123, a P-gp Substrate Across the Rat Intestinal Membranes *in vitro*

LI Guofeng, HOU Lianbin, LI Yilei, CHEN Ruda (Pharmaceutical Department of Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the modulation of labrasol on the permeability characteristics of rhodamine123 (R123) across the intestinal membranes. **METHODS** The permeability (Papp) of R123 or fluorescein sodium (CF) via rat intestinal membranes at concentration of  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  was evaluated by an *in vitro* diffusion chamber system after the membranes were isolated from the intestine of rat, with or without the co-administration of labrasol at different low concentrations. And the concentration of R123 or CF in the receptor was determined by the fluorospectrophotometry. **RESULTS** There exists regional difference for the permeability of R123 across the rat intestinal membranes, which means the permeabilities of R123 was gradually decreased from jejunum, then ileum to colon. On the other hand, the serosal-to-mucosal transport (S-M) of R123 was much greater than its mucosal-to-serosal (M-S) transport. With co-administration of labrasol at low concentrations, the absorptive directed transport of R123 was significantly

基金项目: 2005 年广东省科技计划项目 (编号: 2005B30101007)

作者简介: 李国锋, 男, 博士, 教授, 主任药师, 博士生导师 Tel: (020)62787724 E-mail: lgnf@fimmu.com

increased while its secretory directed transport was decreased, and the concentration-dependent effect was also found. However, no action of labrasol at test concentration was found on the transport of CF across the intestinal membranes. **CONCLUSION** It may be possible to improve the absorption of P-gp mediated drugs by co-administration of labrasol at low concentration, therefore to improve the oral bioavailability of these drugs.

**KEY WORDS:** P-glycoprotein; rhodamine 123; fluorescein sodium; labrasol; diffusion chamber; permeability

60% 以上的药物通过口服给药的形式发挥其防病治病的作用。药物口服给药后,主要通过小肠吸收入血液循环,其吸收过程主要分为经细胞途径和旁细胞途径。最近研究发现,许多口服药物生物利用度低的主要原因与存在于小肠黏膜的 P-糖蛋白(P-gp)有关。P-gp 作为一种能量依赖性药物外排泵,通过 ATP 供能,将细胞内的药物泵出细胞外,从而降低细胞内的药物浓度<sup>[1-2]</sup>。P-gp 在肿瘤细胞中的表达,通过主动排出各种肿瘤化疗药物而产生 mdr(multidrug resistance)表型<sup>[3-4]</sup>,引起肿瘤细胞耐药性。同样,肠黏膜中的 P-gp,一方面限制了药物的吸收,另一方面可以把药物排泄到胃肠道<sup>[5]</sup>,这种双重作用是导致受 P-gp 调控作用药物(P-gp 底物药物)生物利用度低的主要原因之一。因此,抑制肠黏膜 P-gp 的活性是提高这些药物吸收的非常有用的办法之一。本实验采用 Diffusion Chamber 实验技术来分析考察低浓度的 labrasol 对 P-gp 的底物之一罗丹明 123(R123)经肠黏膜透过的调控作用,试图从无药理活性的药用辅料中优选具有 P-gp 抑制作用的物质,为进一步开发 P-gp 抑制剂来提高药物的生物利用度提供一些有价值的实验数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试药

罗丹明 123(R123, Sigma 公司); 荧光素钠(CF, Sigma 公司); HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid) 购于光和纯药(日本); TRIZMA BASE (Tris [hydroxymethyl aminomethane]) 为 Sigma 公司产品; labrasol 来自法国 Saint-Priest。戊巴比妥钠(上海化学试剂总公司进口分装); 其余所有的化学品均是分析纯。

### 1.2 仪器

扩散池(美国 HARVARD APPARATUS, Inc.); 荧光测定仪 F-2000(日本东京 HITACHI 株式会社)

### 1.3 动物

Wistar 雄性大鼠, 体重 260 ~ 280 g, 由南方医科大学实验动物中心提供。

### 1.4 实验用药物溶液的配制

**1.4.1 HEPES 溶液的制备** 取 HEPES 0.6 g, 溶于 80 mL 蒸馏水中, 使之完全溶解。通入混合气体

(95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub>) 10 min 后, 加入 0.18 mL KCl (3 mol · L<sup>-1</sup>), 0.18 mL CaCl<sub>2</sub> (1 mol · L<sup>-1</sup>), 0.08 mL MgSO<sub>4</sub> (1 mmol · L<sup>-1</sup>), 0.818 g NaCl, 完全溶解后用 Tris 溶液 (1 mmol · L<sup>-1</sup>) 调节 pH 至 7.4, 再加入 0.5 mL 葡萄糖溶液 (1 mol · L<sup>-1</sup>), 用蒸馏水稀释至 100 mL, 混匀即得。

**1.4.2 试验药物溶液的制备** 分别将 R123 或 CF 溶解在 pH 7.4 的混合气体饱和的 HEPES 中, 这种 HEPES 溶液每天制备, 实验用 R123 或 CF 的最终浓度均为 5 μg · mL<sup>-1</sup>。在评价对 R123 透过影响的实验中, 配制含有 labrasol 的浓度为 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.2% 和 0.5%。在评价对 CF 透过的影响中, 使用了 labrasol 的浓度为 0.01%。

### 1.5 荧光分光光度法测定 R123 和 CF 的方法

R123 的激发波长为 480 nm, 发射波长为 540 nm, 可以在此波长条件下定量测定 R123 的荧光强度。结果 R123 浓度在 10 ~ 200 ng · mL<sup>-1</sup> 之间, 线性关系良好,  $r = 0.9999$ ; CF 激发波长为 490 nm, 发射波长为 520 nm, 在试验的浓度 200 ~ 2000 ng · mL<sup>-1</sup> 之间, 线性关系良好,  $r = 0.9996$ 。

### 1.6 渗透研究

用一种扩散 Chamber 池实验法, 使用离体大鼠小肠黏膜, 研究 120 min 内在各种低浓度 labrasol 共存或没有共存时 R123 或 CF 经不同肠黏膜的经时透过量的变化。Wistar 大鼠, ♂, 质量 260 ~ 280 g, 禁食 16 h, 用戊巴比妥钠 (32 mg · kg<sup>-1</sup>) 麻醉。取出全部肠道组织, 用 pH 7.4 的 PBS 冲洗干净。小肠顶部的 5 cm 被去掉, 接着的 10 cm 的小肠被作为空肠, 最后的 10 cm 被作为回肠。大肠的最初 2 cm 被去掉, 接着的 6 cm 被作为结肠。剥离浆膜侧的浆膜肌层, 将肠黏膜固定在扩散室中, 扩散室的有效面积为 1.78 cm<sup>2</sup>。一旦肠黏膜被固定好后, 即刻在扩散池的黏膜侧或浆膜侧加入已经加热到 37.5 °C, pH 7.4 的 HEPES 缓冲液 7 mL, 而等体积同温度的试验用药物溶液被加入到相反侧。扩散池的两边均通入混合气体, 并在 37.5 °C 恒温下维持肠黏膜的活性。在给定的时间间隔内, 从接收侧取样 1 mL, 同时立刻补充同温度的等体积的 HEPES 缓冲液。实验重

复3次,样品中 R123 或 CF 的浓度用荧光分光光度计来测定。

### 1.7 表观透过系数(Papp)

用下列公式计算:  $P_{app} = dC/dT(1/A \times C_0)$ , 这里  $P_{app}$  以  $cm \cdot s^{-1}$  表示,  $dC/dT$  是透过曲线直线部分的斜率,  $A$  指扩散面积,  $C_0$  是药物在供体室的初始浓度。结果用 Student's  $t$ -test 进行统计处理。

## 2 结果

### 2.1 R123 经肠黏膜的透过性

R123 经大鼠不同肠段吸收方向转运(从肠黏膜侧到浆膜侧, M-S)和分泌方向转运(从浆膜侧到黏膜侧, S-M)经时透过变化曲线见图 1。可见, 由于 R123 为 P-gp 的底物, 因此不易透过肠道黏膜。R123 经肠道黏膜的透过存在部位差, 即以空肠、回肠和结肠的次序透过性依次减少。另一方面, R123 经肠道分泌方向的透过性显著地高于其吸收方向的透过性。表 1 为 R123 经不同肠黏膜透过的  $P_{app}$  汇总结果。在空肠, R123 S-M 方向的  $P_{app}$  是 M-S 方向的 2.93 倍, 而在回肠和结肠则分别为 3.85 和 2.35 倍。

表 1 R123 经大鼠不同肠黏膜透过时平均  $P_{app}$  ( $\times 10^{-6} cm \cdot s^{-1}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 1 Average  $P_{app}$  of rhodamine 123 in the different intestinal membranes in rats ( $\times 10^{-6} cm \cdot s^{-1}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

肠黏膜	M-S	S-M
空肠	$2.48 \pm 0.25$	$7.28 \pm 1.61^{(1)}$
回肠	$2.40 \pm 0.38$	$9.25 \pm 1.31^{(1)}$
结肠	$1.67 \pm 0.25$	$3.93 \pm 0.87^{(1)}$

注:与 M-S 组比较,  $^{(1)}P < 0.01$

Note: Compared with M-S group,  $^{(1)}P < 0.01$

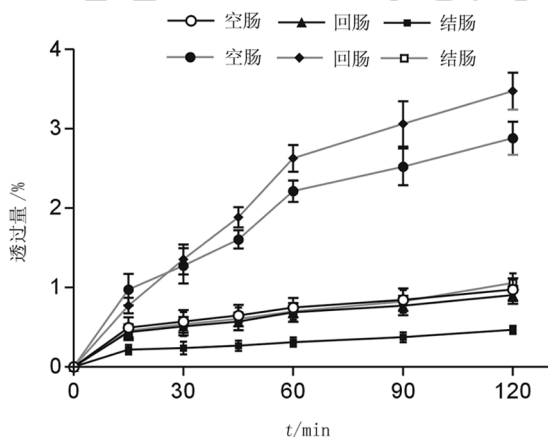


图 1 R123 经大鼠不同肠黏膜透过时吸收方向(M-S)和分泌方向(S-M)经时透过量( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

M-S: 吸收方向转运; S-M: 分泌方向转运

Fig 1 Time course of absorptive (M-S), secretory (S-M) transport of rhodamine 123 in the different intestinal membranes in the rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

M-S: absorptive transport; S-M: secretory transport

### 2.2 labrasol 对 R123 经空肠透过的影响

不同浓度 labrasol 对 R123 经空肠 M-S 方向和 S-M 方向  $P_{app}$  的影响见图 2。在 labrasol 作用下, 同样可以增加 R123 M-S 方向的透过性, 并随着 labrasol 浓度的增加, R123 经 M-S 方向的透过性逐渐增加, 到 0.10% 时达到高峰, 但浓度进一步增加, R123 的透过性开始降低。在 S-M 方向, 在浓度 0.10% 时, 可以显著地降低 R123 的透过性, 但试验的其他浓度对 R123 的 S-M 方向透过性没有影响。

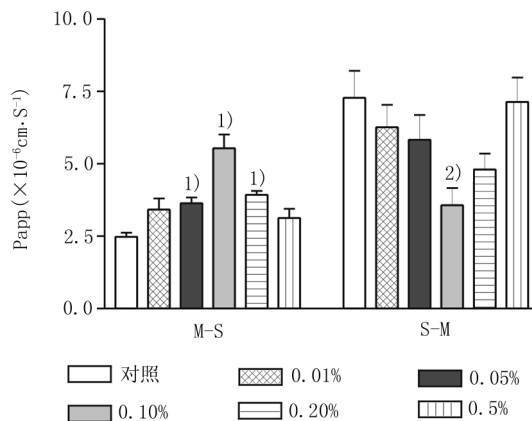


图 2 labrasol 对 R123 经大鼠空肠透过的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ ) 与 M-S 对照组比较,  $^{(1)}P < 0.01$ ; 与 S-M 对照组比较,  $^{(2)}P < 0.05$

Fig 2 Effect of labrasol on the transport of rhodamine 123 across the rat jejunal membranes ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Compared with M-S control group,  $^{(1)}P < 0.01$ ; Compared with S-M control group,  $^{(2)}P < 0.05$

### 2.3 0.1% labrasol 对 CF 经空肠黏膜透过的影响

对 R123 透过影响显著的 0.1% labrasol 对 CF 经空肠黏膜的透过性见图 3。统计学检验表明, 试验剂量的 0.1% labrasol 对 CF 经结肠黏膜在 M-S 方向和 S-M 方向的透过性均无显著差异。

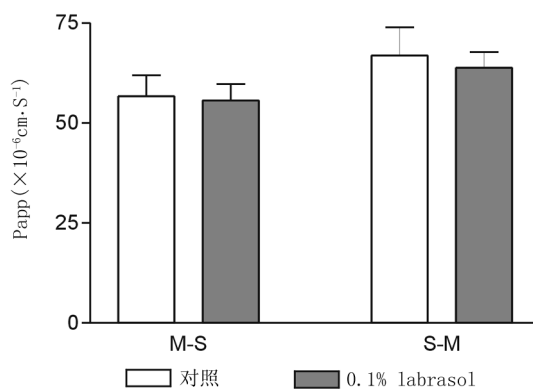


图 3 0.1% labrasol 对 CF 经大鼠空肠透过时  $P_{app}$  的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig 3 Effect of 0.1% labrasol on the  $P_{app}$  of CF across the rat jejunal membranes ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

## 3 讨论

随着分子生物学的迅速发展,大量的研究表明 P-gp 不仅在肿瘤细胞中有高度表达,而且在很多正常组织和器官中也有丰富的表达,如肠道上皮细胞刷状缘,肝细胞毛细胆管膜,血脑屏障毛细管内皮细胞。生物药剂学的研究发现,许多药物即使通过提高药物的溶解度,加入吸收促进剂或采用乳剂、脂质体和纳米球混悬液等新型载药载体等措施来提高口服给药时的吸收程度,但效果甚微,主要原因就在于这些药物为 P-gp 的底物,胃肠黏膜中 P-gp 对这些药物具有外排作用(Efflux)。在胃肠道中,关于 P-gp 功能与活性表达的定量数据目前还不清楚,然而,有很多的研究<sup>[6-9]</sup>表明了 P-gp 的表达水平是随着肠段部位的降低而升高。

目前发现的 P-gp 底物已经有几百种,如罗丹明 123、地高辛、长春新碱、红豆杉醇、柔红霉素、 $\beta$ -受体阻滞剂(如塞利洛尔、他利洛尔)、利福平、雷尼替丁和表柔霉素等。因此,给需要这些药物治疗的患者同时使用 P-gp 抑制剂,就有望提高药物的口服生物利用度。一些公认的经典抑制剂如维拉帕米、奎尼丁等可以抑制 P-gp 的作用,不仅提高了药物吸收方向的转运,并且可以显著抑制药物分泌方向的转运。然而,这一类抑制剂由于本身已经作为有效的药理活性物质应用于临床,因此,从药剂学的角度来看,在制剂处方中的应用受到了一定的限制。为此,本实验从逆转抗癌药物外排具有明显作用的 P-gp 抑制剂中,选择无药理活性的功能药用辅料表面活性剂,用 Diffusion Chamber 实验技术来分析考察底浓度的表面活性剂对 P-gp 的底物之一罗丹明 123 (R123)经肠黏膜透过的调控作用。

Diffusion Chamber 实验技术,操作简单,对于 P-gp 功能研究、P-gp 抑制剂筛选、P-gp 底物在组织中的转运行为以及生理学研究等方面具有重要意义。尤其为肠段的分段定位研究提供了有效的手段。药物既可以加在黏膜侧,亦可加在浆膜侧,因此不仅可以用于研究药物从黏膜侧向浆膜侧的转运行为,还可用于研究药物从浆膜侧向黏膜侧的转运行为。由于药物首先是从肠腔吸收至黏膜层的上皮细胞到固有层,固有层存在很多的微血管和淋巴细胞,药物就在此被吸收入血液循环中,很小的一部分透过黏膜肌层。因此,需要分离除去肠黏膜上的肌层组织,减少药物与肌细胞的结合等因素对实验结果带来的影响。虽然 Caco-2 细胞模型也已经成为一种研究药物透膜吸收的重要手段,被广泛应用于 P-gp 抑制剂的筛选以及作用机制的研究,然而,这种

方法存在许多的局限性。如: Caco-2 细胞的 P-gp 表达水平有赖于培养条件,变异性较大。此外,还有 Caco-2 细胞过度表达 P-gp,甚至高于人类结肠表达水平的报道。因此,体内外数据的相关性较差。除此之外,细胞培养时间较长(约 2-3 周),不能区分 P-gp 和其他药物泵出系统如 MRP 的区别。

R123 是一种荧光染料,作为 P-gp 的底物广泛应用于 P-gp 功能活性的研究中。本实验的结果表明,R123 在小肠中的转运渗透系数  $P_{app}$  分泌方向大于吸收方向(约三倍以上),表明其在小肠中的转运是以分泌为主。其透过性较典型的细胞旁转运的 CF 要明显的低,实验结果表明,在相同的  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度时,CF 经空肠 M-S 的  $P_{app}$  是 R123 的 22 倍以上。本实验选择 R123 作为 P-gp 底物来评价优选 P-gp 抑制剂的另外一个原因是因为 R123 具有荧光性,检测方便,灵敏度高。

在本实验中,发现低浓度的 labrasol 对 R123 的 M-S 方向转运具有显著的促进作用。由于许多表面活性剂同时具有促进药物吸收的能力,因此评价了 0.1% labrasol 对 CF 的影响。CF 是一种典型的旁细胞转运的药物,结果表明,对 R123 有显著影响的 0.1% labrasol,对 CF 的转运没有产生有统计学意义的影响。因此,0.1% labrasol 可能是通过抑制了存在于肠黏膜的 P-gp 活性而发挥了其增加底物药物 R123 的透过性的能力。

本研究结果表明,扩散池法可用于 P-gp 功能考察与 P-gp 抑制剂筛选的研究中。研究工作初步揭示低浓度的 labrasol 作为 P-gp 抑制剂的可行性,其作用具有浓度依赖性。提示有望通过 labrasol 对 P-gp 功能的抑制而用于改善受 P-gp 介导药物的吸收,提高此类药物的口服生物利用度。有关 labrasol 对一些临床常用 P-gp 底物药物如紫杉醇,环孢霉素等的转运和体内生物利用度会产生怎样的影响,有关研究正在进行中。

## REFERENCES

- [1] PLEBAN K, KOPP S, CSASZAR E, et al. P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(2): 365-374.
- [2] ROSENBERG M F, CALLAGHAN R, MODOK S, et al. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(4): 2857-2862.
- [3] PERLOFF M D, VON MOLTKE L L, MARCHAND J F, et al.

- Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line [J]. *J Pharm Sci*, 2001, 90(11): 1829-1837.
- [4] KRISHNA R, MAYER L D. Multidrug resistance (mdr) in cancer mechanisms, reversal using modulators of mdr and the role of mdr in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs [J]. *Eru J Pharm Sci*, 2000, 11(4): 265-283.
- [5] ZHANG Y, BENET L Z. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P4503A and P-glycoprotein [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40(3): 159-162.
- [6] CORNAIRE G. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2004, 278(1): 119-131.
- [7] SALPHATI L, BENET L Z. Metabolism of digoxin and digoxigenin digoxosides in rat liver microsomes: involvement of cytochrome P4503A [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(2): 171-185.
- [8] STEPHENS R H, TANIANIS-HUGHES J, HIGGS N B, et al. Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters: *in vitro* studies in *mdr1a* (+/-) mouse intestine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 303(3): 1095 - 1101.
- [9] MOULY S, PAINE M F. P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(10): 1595-1599.

收稿日期: 2007-11-26