

• 药理与临床 •

乳糖化-去甲斑蝥素及其纳米粒在 Caco-2 细胞模型中的跨膜转运机制

管 敏, 贝永燕, 周 奕, 陈晓艳, 张学农*

苏州大学药学院 药剂学教研室, 江苏 苏州 215123

摘 要: 目的 研究乳糖化-去甲斑蝥素(Lac-NCTD)及其壳聚糖纳米粒(Lac-NCTD-NPs)的细胞摄取、转运机制。方法 采用 Caco-2 细胞单层模型研究 Lac-NCTD 和 Lac-NCTD-NPs 的摄取和跨膜转运, 考察了时间、温度、pH 值、药物质量浓度、吸收抑制剂和促进剂对药物跨膜吸收的影响, 并比较两种剂型吸收过程的差异。结果 Lac-NCTD 以主动转运为主要方式被细胞摄取和转运, 少部分通过旁路转运。药物的摄取和时间呈正相关, 与温度呈负相关。P-糖蛋白(P-gp)和多药耐药相关蛋白 2(MRP2)抑制剂能增加 Lac-NCTD 的细胞摄取($P<0.05$)。药物从基底侧(basolateral, BL)到肠腔侧(apical, AP)的渗透系数($P_{app(BL\rightarrow AP)}$)大于 $P_{app(AP\rightarrow BL)}$ 。内吞抑制剂氧化苯砷对药物的转运无影响, 旁路转运促进剂去氧胆酸钠能增加药物转运。结论 Lac-NCTD 主要以主动转运方式被吸收, 少部分通过旁路转运被 Caco-2 细胞摄取和转运, 此过程受 P-gp 和 MRP2 外排蛋白的影响, 且药物纳米粒的摄取和转运较其溶液均有增加。

关键词: 乳糖化-去甲斑蝥素(Lac-NCTD); 乳糖化-去甲斑蝥素壳聚糖纳米粒(Lac-NCTD-NPs); Caco-2 细胞; 转运; 摄取
中图分类号: R969.1; R979.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0722-06

Transport mechanism of lactosyl-norcantharitin and lactosyl-norcantharitin nanoparticles across Caco-2 monolayer model

GUAN Min, BEI Yong-yan, ZHOU Yi, CHEN Xiao-yan, ZHANG Xue-nong

Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: **Objective** To study the mechanisms of absorption and transport of lactosyl-norcantharitin (Lac-NCTD) and lactosyl-norcantharitin nanoparticles (Lac-NCTD-NPs) in intestinal membranes. **Methods** The Caco-2 cell monolayer model was used to study the transport mechanism of Lac-NCTD and Lac-NCTD-NPs across the membranes. The relative factors for enhancing the absorption of drug carriers, including time, temperature, pH value, drug concentration, enhancers, and inhibitors, were also investigated. The differences between Lac-NCTD and Lac-NCTD-NPs in transport of membranes were explored. **Results** Lac-NCTD was not only absorbed simply by active transport but also through paracellular transference as the minor. The Lac-NCTD uptake was not controlled by pH value, but positively correlated to uptake time and negatively correlated to temperature and it was also significantly enhanced by the inhibitor of P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). Apparent permeability coefficients (P_{app}) of basolateral (BL) to apical (AP) was higher than that of AP to BL. Sodium deoxycholate (SDCh) slightly enhanced the drug absorption but oxophenylarsine had no effect. **Conclusion** The uptake and absorption of Lac-NCTD are active transport as the dominant process. P-gp and MRP2 have strong efflux effects on the uptake and transepithelial transport of Lac-NCTD. Lac-NCTD-NPs could significantly enhance the drug absorption compared with Lac-NCTD.

Key words: lactosyl-norcantharitin (Lac-NCTD); lactosyl-norcantharitin nanoparticles (Lac-NCTD-NPs); Caco-2 cell; transport; uptake

乳糖化-去甲斑蝥素(lactosyl-norcantharidin, Lac-NCTD)系以去甲基斑蝥素(norcantharidin, NCTD)为原料, 利用乙二醇为连接臂, 经乳糖化

合成的新型衍生物。前期药理学研究表明, 去甲斑蝥素具有抗肿瘤作用^[1-2], 而 Lac-NCTD 对多种肝癌细胞具有强抑制活性, 且比 NCTD 不良反应少, 显

收稿日期: 2010-07-21

基金项目: 国家科技支撑计划课题资助(2006BAI09B00); 国家科技部科技型中小企业技术创新基金(07C26223201333); 江苏省“六大人才高峰”资助项目(2007094); 国家大学生创新实践课题(57315420)

作者简介: 管 敏(1987—), 女, 江苏扬州人, 硕士研究生, 研究方向为药物新技术与新剂型。

Tel: (0512)65882087 E-mail: guanmin_1987@163.com

*通讯作者 张学农 Tel/Fax: (0512)65882078 E-mail: zhangxuenong@163.com

示了较好的开发前景^[3-4]。以壳聚糖为载体包裹 Lac-NCTD, 制得的纳米粒 (lactosyl-norcantharidin nanoparticles, Lac-NCTD-NPs), 血管注射具有靶向、增效的作用^[5]。本实验从更简便的给药途径口服给药考虑, 对 Lac-NCTD 及 Lac-NCTD-NPs 的体外吸收进行研究。Caco-2 细胞模型被认为是进行药物吸收研究最好的体外模型之一, 与药物体内吸收有良好的相关性, 其结果的重现性也很理想, 因此被国外广泛采用^[6-11]。本实验旨在运用 Caco-2 细胞模型研究 Lac-NCTD 及 Lac-NCTD-NPs 的吸收机制, 探讨时间、温度、pH 值、药物浓度、吸收促进剂及吸收抑制剂对药物吸收的影响, 为药物剂型、处方的合理设计, 给药途径的选择以及新型制剂的研究与开发提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

Lac-NCTD (由苏州大学药学院药剂学教研室合成, 质量分数为 98.43%^[12]), Lac-NCTD-NPs (由苏州大学药学院药剂学教研室制备), 壳聚糖 (江苏南通兴成生物制品厂, 相对分子质量 8 000~10 000, 脱乙酰度 91.2%, 黏度 2.95 mPa·s), 三聚磷酸钠 (TPP, 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司), 氧化苯砷 (化学纯, 北京华威锐科化工有限公司), MK-571 (Sigma 公司), 环孢素 A (CyA, 福建科瑞药业有限公司, 批号 060801), 去氧胆酸钠 [中国医药 (集团) 上海化学试剂公司, 批号 F20070521], 胎牛血清 (北京索莱宝科技有限公司), DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司), 胰蛋白酶 (1:250, 沃凯公司), 二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司), 噻唑蓝 (MTT)、异硫氰酸荧光素 (FITC, Sigma 公司), 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 碱性磷酸酶试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), pH 7.4 PBS (0.01 mol/L, 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄、0.24 g KH₂PO₄, 双蒸水稀释至 1 000 mL)。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

LC-10A 高效液相色谱 (HPLC) 系统 (SPD-M10A 紫外检测器、SCL-10A 系统控制器、CTO-10AS 恒温箱、CR-10A 数据处理机, 日本 Shimadzu 公司), 12 孔 Millicell 培养板 (美国 Millipore Inc), DDS-12A 数字电导率仪 (萧山市科学仪器厂), Y92-II 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技公司), Elx 808 酶联免疫检测仪 (英国 Bio Tek 公司)。

1.3 细胞

人源性结肠癌细胞株 Caco-2: 由复旦大学药学院药剂教研室提供, 实验用 35~50 代细胞。

2 方法

2.1 Caco-2 细胞模型的建立^[13]

DMEM 培养液 (高糖): 包括 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 丙酮酸钠、1% 谷氨酰胺和 1% 青链霉素。细胞培养在 75 cm² 卡氏培养瓶, 置于 37 °C 培养箱中, 通入 5% CO₂ (相对湿度 90%)。2 d 换 1 次培养液, 每 5 天按 1:3 的比例传代。将细胞按 50 000/cm² 接种到 12 孔细胞培养板中, 接种后每 2 天换液 1 次, 1 周后每日换液, 培养至 15 d, 进行碱性磷酸酶活性验证, 同批实验结果阳性的用于药物的细胞摄取实验。将细胞按 50 000/cm² 接种至 Millicell 膜上, 接种后每 2 天换液 1 次, 1 周后每日换液, 培养至 21 d, 满足跨膜电阻 >600 Ω/cm² 和酚红透过率 <0.005/h 的膜用于药物转运实验。

2.2 Lac-NCTD-NPs 制备

依据文献方法^[12]。即称取壳聚糖 0.1 g, 溶解于 0.2% 醋酸水溶液中, 再加入药物溶解, 将 1.2 g/L TPP 水溶液 21 mL 滴入溶液中。30 °C 水浴搅拌 10 min, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得纳米粒。

2.3 细胞毒性检测

将 Caco-2 细胞悬液接种于 96 孔板中, 每孔接种 50 000 个细胞, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 加入不同质量浓度的 Lac-NCTD 及 Lac-NCTD-NPs (5、10、25、50、100、200、400、500 μg/mL) 各 200 μL, 每组设 3 个平行孔, 不含药物孔作阴性对照, 培养基作调零孔。培养 2 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL, 再培养 4 h, 离心, 倾去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 微量振荡器振荡, 待蓝色结晶完全溶解后, 用酶标仪在波长 570 nm 处读取吸光度。确定药物对 Caco-2 细胞的安全质量浓度范围。

2.4 Lac-NCTD 及 Lac-NCTD-NPs 的细胞摄取

将培养 15 d 的 Caco-2 细胞与 37 °C PBS 缓冲溶液在培养箱中共浴 20 min, 吸去 PBS。用 PBS 冲洗细胞单分子层表面的杂质。加入含 Lac-NCTD 的 PBS 溶液 1 mL, 分别考察时间 (5、15、30 min)、药物质量浓度 (100、250、400 μg/mL)、pH (6.0、7.4)、温度 (4、37 °C)、P-糖蛋白 (P-gp) 和多药耐药相关蛋白 2 (MRP2) 抑制剂对 Lac-NCTD 细胞摄取的影响, 实验结束后 4 °C 空白 PBS 溶液终止

细胞摄取,快速冲洗细胞单分子层。细胞刮取器刮下细胞,用0.1 mol/L HCl 1 mL冲洗细胞到EP管中,超声粉碎细胞。将破碎细胞分为2份,分别用于测定 Lac-NCTD 和细胞蛋白水平。

将培养15 d的Caco-2细胞与37℃ PBS缓冲溶液在培养箱中共浴20 min,吸去缓冲溶液。用PBS冲洗细胞单分子层表面的杂质。加入含 Lac-NCTD-NPs (250 μg/mL) 溶液1 mL,37℃下孵育15 min,实验结束后操作同 Lac-NCTD。

按文献方法对壳聚糖进行荧光标记^[14],使壳聚糖连上 FITC,用 FITC 标记的壳聚糖制备带荧光的 Lac-NCTD-NPs^[12]。取培养15 d符合摄取条件、生长形态完好的 Caco-2 细胞,实验前用空白 PBS 等渗溶液 37℃培养后,洗去细胞单分子层表面的杂质。加入 FITC 标记的 Lac-NCTD-NPs 溶液1 mL,分别孵育15、30 min后,4℃空白 PBS 溶液终止细胞摄取,快速清洗单分子层,直至上清液无荧光检出。用75%乙醇固定15 min,PBS冲洗,荧光显微镜(×500)下观察摄入情况。

2.5 Lac-NCTD 及 Lac-NCTD-NPs 的转运试验

取符合转运条件且细胞生长形态完好的 Millicell 膜,用 PBS 缓冲溶液 37℃共浴20 min,PBS 溶液冲洗3遍。用 PBS 溶液配制 Lac-NCTD 溶液(100、250、400 μg/mL),经滤过除菌备用。从肠腔侧(apical, AP)到基底侧(basolateral, BL)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 PBS 1.5 mL 作为接收池。从 BL 到 AP 转运:将药物溶液1.5 mL加到 BL 侧作为供给池,空白 PBS 溶液0.5 mL加到 AP 侧作为接收池。将 Millicell 膜置转速为50 r/min 的37℃恒温振荡水槽中,分别在5、15、30、60、120 min 吸取接收液0.1 mL,同时补加37℃空白 PBS 溶液0.1 mL。考察 P-gp 抑制剂 CyA、MRP2 抑制剂 MK-571、细胞内吞抑制剂氧化苯砷及细胞旁路转运促进剂去氧胆酸钠对 Lac-NCTD 转运的影响。

取符合转运条件且细胞生长形态完好的 Millicell 膜,用空白 PBS 溶液 37℃共浴20 min,PBS 溶液冲洗,分别在 AP 侧和 BL 侧给予 Lac-NCTD-NPs (250 μg/mL),其余操作同 Lac-NCTD。

2.6 样品分析

HPLC 色谱条件: ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 大连依利特公司);流动相为乙腈-pH 3.2 磷酸水溶液(10:90);体积流量 0.8 mL/min;柱温

25℃;检测波长210 nm;进样量20 μL。

取摄取或转运样品高速离心15 min(13 000 r/min),取上清液20 μL进样。

2.7 数据分析

表观渗透系数(P_{app})计算^[15]: $P_{app} = (dQ/dt) / (AC_0)$, 其中 dQ/dt 为单位时间药物转运量(μg/min);A 为转运膜的面积,此时 A 为 1.1 cm²; C_0 为 Lac-NCTD 的初始质量浓度(μg/mL)。

3 结果

3.1 Lac-NCTD 分析方法的建立

在上述色谱条件下,Lac-NCTD 的保留时间约为5.1 min,样品峰尖锐,对称性良好,杂质对有效成分的测定无干扰,方法专属性好。Lac-NCTD 在0.05~13 μg/mL,在空白 PBS 和空白细胞匀浆液中线性关系良好。检测限为20 ng,线性范围内回收率为98.99%~102.46%,RSD 小于5%。

3.2 细胞毒性

MTT 实验中,Lac-NCTD 及 Lac-NCTD-NPs 在50~400 μg/mL 时,无明显的细胞死亡,表明 Lac-NCTD、Lac-NCTD-NPs 在50~400 μg/mL 对 Caco-2 细胞几乎无毒性作用。以下实验中采用的药物质量浓度是安全的。

3.3 细胞摄取

3.3.1 Lac-NCTD 细胞摄取量与时间的关系
Caco-2 细胞对250 μg/mL、pH 7.4 的 Lac-NCTD 的摄取量在30 min 内随摄取时间近似线性增加($R^2=0.817$),5、15、30 min 时 Caco-2 细胞对 Lac-NCTD 的摄取量分别为(0.41±0.02)、(0.80±0.15)、(1.08±0.09) mg/g ($n=3$)。因此在以下药物摄取实验中,考察时间定为15 min。

3.3.2 Lac-NCTD 细胞摄取量与质量浓度的关系
100、250、400 μg/mL Lac-NCTD 溶液(pH 7.4)细胞摄取量分别为(0.55±0.08)、(0.80±0.15)、(0.83±0.07) mg/g ($n=3$)。结果表明 Lac-NCTD 在100~400 μg/mL,其 Caco-2 细胞摄取量随质量浓度的增加有饱和趋势, $R^2=0.675$ 。

3.3.3 Lac-NCTD 细胞摄取量与介质 pH 值的关系
分别在 pH 值为6.0、7.4 的 PBS 介质中,测定 Caco-2 细胞对250 μg/mL Lac-NCTD 的摄取量,细胞摄取量分别为(0.82±0.23)、(0.80±0.15) mg/g ($n=3$)。不同 pH 值条件下细胞对 Lac-NCTD 的摄取量无统计学意义($P>0.05$)。由此可知 Lac-NCTD 细胞摄取不受介质 pH 值的影响。因此本实验介质的 pH 值

控制在 7.4。

3.3.4 Lac-NCTD 细胞摄取量与温度的关系 分别考察在 4、37 °C 条件下, Caco-2 细胞对 250 $\mu\text{g/mL}$ Lac-NCTD 的摄取量。细胞摄取量分别为 (1.35 ± 0.13) 、 (0.80 ± 0.15) mg/g ($n=3$)。表明药物的细胞摄取受温度的影响, 低温下, 摄取量反而增加。

3.3.5 Lac-NCTD 细胞摄取量与蛋白抑制剂的关系 考察 P-gp 抑制剂 CyA (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 MRP2 抑制剂 MK-571 (50 $\mu\text{mol/L}$) 对 250 $\mu\text{g/mL}$ Lac-NCTD 细胞摄取量的影响, 结果见图 1。表明抑制剂能显著增加药物的细胞摄取量。说明药物的细胞摄取可能受到 P-gp 和 MRP2 的外排作用, 加入抑制剂后, 抑制了外排蛋白作用, 增加了药物的细胞摄取, 其中 MK-571 的作用更显著。

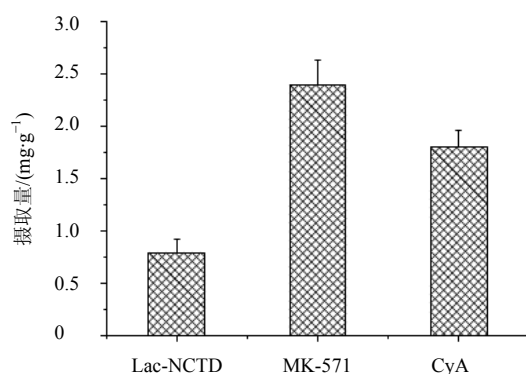


图 1 MK-571 和 CyA 对 Caco-2 细胞药物摄取量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of MK-571 and CyA on Caco-2 cell uptake ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3.6 Lac-NCTD-NPs 与 Lac-NCTD 细胞摄取量的比较 Caco-2 细胞对 250 $\mu\text{g/mL}$ Lac-NCTD-NPs 与 Lac-NCTD 的摄取量分别为 (1.54 ± 0.32) 、 (0.80 ± 0.15) mg/g 。

3.3.7 利用 FITC 标记动态示踪 Caco-2 细胞对 Lac-NCTD-NPs 的摄取 由图 2 可见, 孵育 15 min 时, 荧光素大多聚集在细胞膜的表面, 有少部分进入细胞内部。30 min 时, 细胞内部已见较强烈的荧光, 细胞摄入纳米粒增多。应用荧光标记的方法, 动态地显示了 Caco-2 摄取 Lac-NCTD-NPs 的过程。

3.4 细胞转运

3.4.1 Lac-NCTD 细胞转运与质量浓度的关系 Caco-2 细胞单层模型, 观察低、中、高 (100、250、400 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度 Lac-NCTD 跨细胞单层膜转运, 结果见表 1。

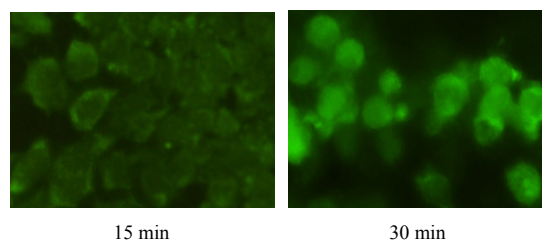


图 2 不同时间下 FITC 标记 Lac-NCTD-NPs 的 Caco-2 细胞摄取情况

Fig. 2 Fluorescence micrographs of uptake of Lac-NCTD-NPs-FITC by Caco-2 cells in different times

表 1 不同质量浓度 Lac-NCTD 在 Caco-2 细胞转运的 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 P_{app} of Lac-NCTD at different concentrations in Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$		$P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP})}/P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL})}$
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
100	3.29 ± 1.24	6.28 ± 0.97	1.91
250	3.67 ± 0.68	6.76 ± 1.12	1.85
400	3.34 ± 1.06	4.58 ± 0.35	1.37

3.4.2 Lac-NCTD 细胞转运与外排抑制剂的关系 给予 Lac-NCTD (250 $\mu\text{g/mL}$) 的同时加入 CyA 和 MK-571 后, $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL})}$ 和 $P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP})}$ 的变化结果见图 3。加入 CyA 后, Lac-NCTD 的 $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL})}$ 增大, 而 $P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP})}$ 变小; 加入 MK-571 后, $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL})}$ 显著增加, $P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP})}$ 基本不变。

3.4.3 Lac-NCTD 细胞转运与细胞内吞抑制剂和旁路转运促进剂的关系 给药的同时加入内吞抑制剂氧化苯砷 (25 mmol/L) 或细胞旁路转运促进剂去氧胆酸钠 (100 mmol/L), $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL})}$ 的变化结果见图 4。

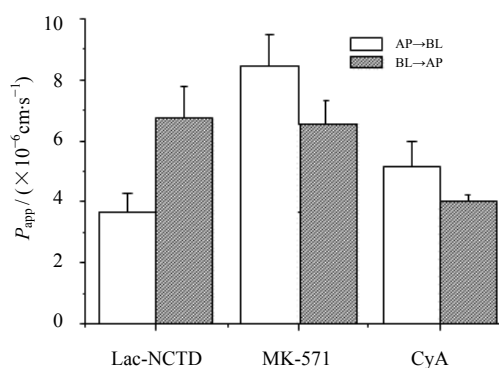


图 3 CyA 和 MK-571 对 Lac-NCTD 转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of CyA and MK-571 on transport of Lac-NCTD ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞旁路转运促进剂去氧胆酸钠促进药物转运的作用比较明显 ($P < 0.05$), 内吞抑制剂氧化苯砷对转运影响较小 ($P > 0.05$), 与 Lac-NCTD 相比没有统计学差异。

3.4.4 Lac-NCTD-NPs 细胞转运 250 $\mu\text{g/mL}$ 的 Lac-NCTD-NPs 与相同质量浓度的 Lac-NCTD 的转运结果比较见表 2。

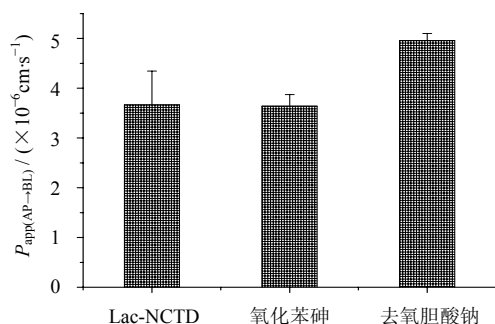


图4 氧化苯砷和去氧胆酸钠对 Lac-NCTD 转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of oxophenylarsine and SDCh on transport of Lac-NCTD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表2 Lac-NCTD 和 Lac-NCTD-NPs 在 Caco-2 细胞单层转运的 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 P_{app} of Lac-NCTD and Lac-NCTD-NPs on Caco-2 cell monolayers ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制 剂	$P_{app} / (\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		$P_{app}(BL \rightarrow AP) / P_{app}(AP \rightarrow BL)$
	AP→BL	BL→AP	
Lac-NCTD	3.67 ± 0.68	6.76 ± 1.12	1.85
Lac-NCTD-NPs	5.38 ± 0.23	6.01 ± 0.45	1.11

4 讨论

本实验采用 Caco-2 细胞模型研究了 Lac-NCTD 及其纳米粒给药系统的摄取、转运及其影响因素。研究表明 Caco-2 细胞对 Lac-NCTD 的摄取存在浓度饱和现象, 推测 Lac-NCTD 的吸收可能存在主动转运过程; Lac-NCTD 的摄取不受溶液 pH 值的影响, 但受温度的影响。低温下, 摄取量反而增加, 推测可能由于外排蛋白排出药物依赖能量的作用^[15], 低温下能量产生受限, 一定程度上抑制了外排蛋白的作用。

鉴于近年来研究发现参与药物胞内摄取和分泌相关的转运蛋白是一类蛋白超家族, 除了 P-gp 以外, 还有 MRP2 等发挥外向型转运泵的功能, 影响化合物的肠道吸收, 而这两种蛋白在 Caco-2 细胞上均有表达^[15]。因此, 本研究中应用特异抑制剂, 同

时观察了 Lac-NCTD 与 P-gp 和 MRP2 的相互作用。研究结果显示, Lac-NCTD 在摄取、转运过程中受到这两种外排蛋白的共同作用, 在 CyA 和 MK-571 作用下, Lac-NCTD 的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 分别提高了 1.41 和 2.29 倍。P-gp 和 MRP2 都分布在 AP 侧的细胞膜上^[16-17], 它们将 Lac-NCTD 作为底物排出, 使得药物的分泌速度大于吸收速度。在药物低浓度时, 外排载体表现出强烈的外排作用; 高浓度时, 载体趋于饱和, $P_{app}(BL \rightarrow AP) / P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 从 1.91 下降到 1.37。两种外排蛋白中, MRP2 对于药物的外排较为强烈, 该结论需要应用 MDCK-MRP2 等细胞模型做进一步验证。

在内吞和旁路转运考察中, 细胞旁路转运促进剂去氧胆酸钠促进药物转运的作用比较明显 ($P < 0.05$), 内吞抑制剂氧化苯砷对转运几乎无影响 ($P > 0.05$)。说明 Lac-NCTD 的转运过程并非简单的主动转运, 还存在一小部分药物通过细胞间的旁路进行转运, 而内吞并不存在。这一点推测也正与 Lac-NCTD 的理化性质吻合, Lac-NCTD 为水溶性的小分子化合物, 对于这类化合物, 细胞旁路转运是常见的转运方式。

纳米粒系统研究表明, 在细胞摄取和转运中, Lac-NCTD-NPs 的摄取量、 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 均比相同质量浓度 Lac-NCTD 溶液的对应值要大, 提示壳聚糖纳米粒制剂有利于药物的细胞吸收。一方面可能由于纳米粒总表面积大, 分散性良好, 与 Caco-2 细胞的亲和力增加。另一方面壳聚糖本身也是良好的吸收促进剂, 它能破坏带负电的双分子层的规整排列, 以其为载体做成纳米粒之后, 吸收增加。尤其要提出的是在两种剂型的双向转运实验中, 纳米粒的 $P_{app}(BL \rightarrow AP)$ 比 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 略大, $P_{app}(BL \rightarrow AP) / P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 只有 Lac-NCTD 的 $P_{app}(BL \rightarrow AP) / P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 的 67.3%, 由此推测药物经壳聚糖包载之后, 部分以纳米粒原型进行转运, 避过了外排蛋白的作用, 直接转运到细胞内。

以壳聚糖为载体, 包裹 Lac-NCTD 制成纳米给药系统能够增加药物的摄取和转运量, 为了进一步获得较高生物利用度, 在设计 Lac-NCTD 口服制剂处方时, 还可考虑如何克服胃肠道外排蛋白对吸收的影响。

参考文献

- [1] 李金龙, 蔡于琛, 胡志明, 等. 去甲斑蝥素干扰 HL-60 肿瘤细胞周期及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8):

- 1315-1319.
- [2] 李 柏, 凌昌全. 去甲斑蝥素基础及临床研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 184-185.
- [3] 胡展红, 周 奕, 陈晓艳, 等. 乳糖化-去甲斑蝥素纳米粒的双重肝靶向性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2005-2010.
- [4] 管 敏, 周 奕, 贝永燕, 等. 乳糖化-去甲斑蝥素的抗肿瘤药效学及急性毒性试验研究 [J]. 抗感染药学, 2010, 7(3): 171-175.
- [5] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 290-295.
- [6] 陈 彦, 贾晓斌, Hu M, 等. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 220-224.
- [7] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763-766.
- [8] 李苏宁, 杨秀伟. 6 个线型呋喃香豆素类化合物在人源肠 Caco-2 细胞模型的吸收转运研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 96-102.
- [9] Annette B, Sibylle H, Kayosh I S, *et al.* Cell cultures as tools in biopharmacy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11 (Suppl 2): 51-60.
- [10] 卢智玲, 冯 怡, 徐德生, 等. Caco-2 细胞模型在中药口服吸收及机制研究中的应用 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 616-619.
- [11] 朱容慧, 赵军宁, 毕岳琦, 等. 中药肠吸收动力学的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 25-29.
- [12] 胡展红, 章 良, 张学农. 肝靶向去甲斑蝥素修饰物的合成及其纳米粒的制备 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(9): 679-684.
- [13] Sha X Y, Fang X L. Transport characteristics of 9-nitrocamptothecin in the human intestinal cell line Caco-2 and everted gut sacs [J]. *Int J Pharm*, 2004, 272: 161-171.
- [14] 王 钦, 章 良, 胡 玮, 等. 去甲斑蝥素 N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备与体外抗肿瘤活性 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(12): 913-919.
- [15] 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.
- [16] Nakagami T, Yasui-Furukori N, Saito M, *et al.* Effect of verapamil on pharmacokinetics and pharmacodynamics of risperidone: *in vivo* evidence of involvement of P-glycoprotein in risperidone disposition [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 78(1): 43-51.
- [17] Haimeur A, Conseil G, Deeley R G, *et al.* The MRP related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation [J]. *Curr Drug Metab*, 2004, 5(1): 21-53.