

Caco-2 细胞中药物转运蛋白的 mRNA 表达及活力评价

慈小燕¹, 王 泽², 李亚卓¹, 谷 元¹, 武卫党¹, 曾 勇^{1*}, 伊秀林^{1*}, 司端运¹

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 释药技术与药代国家重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 系统研究 Caco-2 细胞中各药物转运蛋白的 mRNA 表达水平及转运活力, 对比其与人正常肠道中药物转运蛋白表达的差异。方法 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法测定 Caco-2 细胞中人肠道相关转运蛋白 MDR1、BCRP、MRP2、OATP1A2、OATP2B1 和 PEPT1 的表达水平; 将 Caco-2 细胞接种于 Transwell 板内培养 21 d 并给予不同药物转运蛋白的底物及抑制剂, 评价 Caco-2 细胞中相关转运蛋白的转运活性。结果 qRT-PCR 结果表明, 药物转运蛋白 MDR1、MRP2、BCRP 和 OATP2B1 在 Caco-2 细胞中均有相对高的表达, 表达量的顺序为: MDR1>MRP2>OATP2B1>BCRP, 在正常人肠道表达量顺序为 BCRP>MDR1>MRP2>OATP2B1; 转运蛋白活力评价表明, 各药物转运蛋白的活力测试结果均为阳性, 验证了基因的表达水平结果。结论 Caco-2 细胞中表达正常人体肠道表达的部分药物转运蛋白 (MDR1、MRP2、BCRP 和 OATP2B1), 表达水平与正常人体肠道中大致相当, 但也存在一定差异。

关键词: Caco-2 细胞; 肠道渗透性; 药物转运蛋白; 实时荧光定量 PCR; 表观渗透系数

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 06- 0980 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.008

Expression of drug transporters mRNA in Caco-2 cells and its viability evaluation

CI Xiaoyan¹, WANG Ze², LI Yazhuo¹, GU Yuan¹, WU Weidang¹, ZENG Yong¹, YI Xiulin¹, SI Duanyun¹

1. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd., Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the mRNA expression and transport activity of drug transporters in Caco-2 cells, and compare the differences of the expression of drug transporters between Caco-2 cells and human normal intestinal. **Method** Establishing a method for the determination of mRNA expression of drug transporter by qRT-PCR method to determine the expression levels of human intestinal related transport proteins MDR1, BCRP, MRP2, OATP1A2, OATP2B1, and PEPT1 in Caco-2 cells; Caco-2 was then seeded in Transwell plates for 21 days and administered with different drug transporter substrates and inhibitors to assess the transporter activity of the relevant transporter in Caco-2 cells. **Results** The qRT-PCR results indicated that MDR1, MRP2, BCRP, and OATP2B1 were relatively higher expressed in Caco-2 cells. The relative expression levels of various drug transporters were as follows: MDR1>MRP2>OATP2B1>BCRP, the expression level of intestinal tract in normal subjects was BCRP>MDR1>MRP2>OATP2B1. Drug transporter activity assessment showed that all drug transporter activity test results were positive, validating the expression level of the previous drug transporter gene. **Conclusions** The expression levels of many drug transporters (MDR1, MRP2, BCRP and OATP2B1) originated from normal human intestinal tract expressed in Caco-2 cells were roughly equivalent to those expressed in the normal human intestinal tract, but there were also some differences between them.

Key words: Caco-2 cell; intestinal permeability; drug transporter; real time-PCR; apparent permeability coefficient (P_{app});

收稿日期: 2018-01-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81503154); 国家重点研发计划应用系统生物学结合 PK-PD 研究乌头汤药性配伍理论 (2016YFE0121400)

第一作者: 慈小燕 (1987—), 助理研究员, 主要从事药代动力学研究工作。Tel: 13622099172 E-mail: cixy@tjipr.com

*通信作者: 曾 勇 (1965—), 研究员, Tel: (022) 84845243 E-mail: zengy@tjipr.com

伊秀林 (1964—), 研究员, Tel: (022) 84845242 E-mail: yixl@tjipr.com

参与药物跨膜转运的蛋白质称为药物转运蛋白,一般表达于各种组织的特定细胞膜上,决定着药物的吸收、分布、消除以及靶区内药物分布程度,决定着药物的有效性和安全性。药物转运蛋白分为两个超家族:ATP结合盒转运蛋白超家族(ATP binding cassette superfamily, ABC超家族)和溶质转运蛋白(solute carrier, SLC)超家族。SLC转运蛋白是起主动摄入作用的摄入型转运蛋白,ABC转运蛋白是起吸收屏障功能的外排型转运蛋白。摄入型转运蛋白主要包括: Na^+ -非依赖型的有机阴离子化合物的转载体(OATPs)、寡肽转运蛋白(PEPT)、有机阴离子转运蛋白(OATs)、有机阳离子转运蛋白(OCTs);外排型转运蛋白主要包括:多糖耐药蛋白P-糖蛋白(P-gp/MDR1)、多药耐药相关蛋白(MRPs)和乳腺癌耐药蛋白(BCRP)^[1]。

药物跨膜转运的方式主要包括细胞间途径和跨膜途径,跨膜转运又可分为被动扩散和药物转运蛋白介导的跨膜转运,它们各具特点,且与药物的药动学特点关系密切。在研究药物的吸收过程时,药物的理化性质(如亲脂性)并不是决定其跨膜能力的唯一因素,肠系膜上的药物转运蛋白在其跨膜过程中起到了重要的、甚至是决定性的作用^[2-3]。

人克隆结肠腺癌(Caco-2)细胞模型是近10年来国内外广泛用于药物吸收机制研究的工具,适用于大多数口服药物跨膜转运机制的研究,早期研究主要局限于被动扩散,近年来较为关注药物转运蛋白介导的跨膜机制研究。但目前国内尚无针对Caco-2细胞中人肠道相关药物转运蛋白表达水平及活性的全面系统的研究报道^[4-5]。本研究通过建立测定药物转运蛋白mRNA表达水平的实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法,评价Caco-2细胞中人肠道相关转运蛋白MDR1、BCRP、MRP2、OATP1A2、OATP2B1和PEPT1的表达水平;并将Caco-2接种于Transwell板内培养并给予不同转运蛋白的底物,评价Caco-2细胞中相关转运蛋白的转运活性。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

荧光黄CH(sigma公司,批号061M1369V);咖啡因(中国食品药品检定研究院,批号16030504); ^3H -雌二醇-17 β -葡萄糖醛酸苷、 ^3H -地高辛(美国ARC公司,批号140331、160624);氯噻嗪、维拉帕米、Ko143、利福平、环孢素A(美国MCE公司,批号分别为15327、18578、03621、11246、08527);DMEM

高糖培养基、青链霉素混合液(100 $\times$)、Phosphate Buffered Saline(PBS, 1 $\times$)、HBSS(含钙镁)、含EDTA的0.25%胰酶、胎牛血清(美国Gibco公司);Transwell 12孔聚碳酸酯膜转运板(美国Coring公司);DEPC水(北京索莱宝科技有限公司);TRNzol Reagent(天根生化科技(北京)有限公司);逆转录试剂盒Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit和实时定量试剂盒Fast Start Universal SYBR Green Master(Rox)(Roche公司);PCR引物购自深圳华大基因科技有限公司。

1.2 主要仪器

Olympus-CKX41倒置显微镜(日本Olympus公司);二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);Millicell ERS-2跨上皮电阻仪(美国Millipore公司产品);Tri-Carb 2910 TR放射性液体闪烁仪(PerkinElmer公司);ZHWHY-上海智诚恒温振荡器(北京华威兴业科技有限公司);HPLC-UV系统为Agilent1100(日本安捷伦公司);SpectraMax M5多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

1.3 细胞株

Caco-2细胞购自中国科学院上海生命科学研究院,本实验所用细胞代次为26~28代。

2 方法

2.1 细胞培养

将Caco-2细胞置于常规培养皿内,以DMEM高糖培养基(含10%FBS)、在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和相对湿度90%的培养箱内培养,培养基隔天更换,当细胞覆盖盘底80%~90%时,用含0.25%EDTA的胰酶消化,用新鲜培养基调细胞密度至每毫升 2×10^5 个,部分离心后加入TRNzol Reagent裂解用于药物转运蛋白mRNA的检测;另一部分接种于Transwell聚碳酸酯膜12孔板中,在细胞层顶端(AP)每孔加0.5 mL细胞悬液,基底端(BL)每孔加1.5 mL新鲜培养基,连续培养21 d,得到完全分化的细胞单层。

2.2 qRT-PCR测定Caco-2细胞中药物转运蛋白的mRNA表达水平

检测Caco-2细胞中MDR1、BCRP、MRP2、OATP1A2、OATP2B1和PEPT1的mRNA表达水平。

2.2.1 RNA的提取 将TRNzol Reagent裂解的细胞样品于室温放置5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min(4 $^{\circ}\text{C}$)离心10 min,取100 μL 上清至另一EP管,加入40 μL 三氯甲烷,剧烈震荡15 s,室温放置3 min后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、

12 000 r/min 离心 15 min, 将上层水相转移至新的离心管中, 加入等体积异丙醇, 混匀, 室温放置 30 min。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 加入 400 μ L 的 75%乙醇 (以 DEPC 水配制) 洗涤沉淀, 4 °C、5 000 r/min 离心 3 min 弃上清。沉淀室温放置晾干, 加入 30 μ L 的 DEPC 水, 反复吹打使 RNA 充分溶解。

2.2.2 RNA 逆转录为 cDNA 根据 Roche 公司 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit 逆转录试剂盒说明书, 按 8 μ L Total RNA、1 μ L Anchored-oligo (dT) 18 Primer、4 μ L Water (PCR-grade) 配置逆转录体系, 65 °C 反应 10 min 后, 立即于冰上制冷, 再按 4 μ L Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer、0.5 μ L Protector RNase Inhibitor、2 μ L Deoxynucleotide Mix、0.5 μ L Transcriptor Reverse Transcriptase 将反应体系的剩余部分试剂加入, 55 °C 反应 30 min, 85 °C 反应 5 min, 反应结束。

2.2.3 样品 qRT-PCR 检测 以逆转录的 cDNA 为模板, 将 Caco-2 细胞的内参基因 β -actin 分别与 MDR1、BCRP、MRP2、OATP1A2、OATP2B1 和 PEPT1 的基因同时扩增, 比较各基因表达量的差异。基因引物序列见表 1, 按照表 2 配制实时定量 PCR 反应体系, 进行 PCR 反应。

2.4 Caco-2 细胞的给药及测定

摄入方向的操作: 吸去 Transwell 小室 AP 和 BL 端的培养基, 加入 37 °C 预热的 HBSS 溶液, 37 °C 平衡 20 min; 吸去 HBSS, 在 AP 端加入 0.5 mL

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

引物名称	碱基序列 (5' - 3')
β -actin-F	GGCATCCTCACCCTGAAGTA
β -actin-R	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA
MDR1-F	CGCACCTGCATTGTGATTGC
MDR1-R	AGATGCCTTTCTGTGCCAGC
BCRP-F	AGCAGCAGGTCAGAGTGTGG
BCRP-R	CTGAAGCCATGACAGCCAAG
MRP2-F	TGAGCTGGATCTGGTCCTCA
MRP2-R	CACCGGCAGCCTCTAAGATT
OATP1A2-F	GAATGCCCAAGAGATGATGCTT
OATP1A2-R	AACCCAGTGCAAGTGATTTCAAT
OATP2B1-F	CGCACTCACTGATTCTACACATT
OATP2B1-R	AAGCCATAGCATCACTCATTACAC
PEPT1-F	TGCCCAAGAGATGATGCTT
PEPT1-R	CCAGTGCAAGTGATTTCAA

表 2 qRT-PCR 反应体系

Table 2 qRT-PCR reaction system

试剂	体积/ μ L
Fast Start Universal SYBR Green Master(Rox)	25
正向引物 (10 μ mol·L ⁻¹)	1.5
反向引物 (10 μ mol·L ⁻¹)	1.5
H ₂ O	18
cDNA 模板	4
总体积	50

预热的含有转运底物的 HBSS 溶液, BL 端加入 1.5 mL 空白 HBSS 溶液; 37 °C 恒温振荡器孵育, 40 min 后吸取 BL 端的转运液, 测定转运液中的底物浓度。

外排方向的操作: 吸去 Transwell 小室 AP 和 BL 端的培养基, 加入 37 °C 预热的 HBSS 溶液, 37 °C 平衡 20 min; 吸去 HBSS, 在 AP 端加入 0.5 mL 空白 HBSS 溶液, BL 端加入预热的含有转运底物的 HBSS 溶液; 37 °C 恒温振荡器孵育 40 min; 吸取 AP 端的转运液, 测定转运液中的底物浓度。

检测 P-gp/BCRP/MRP2/OATP2B1 抑制剂对转运底物在单层 Caco-2 细胞中转运的影响时, 用同时含有抑制剂和转运底物的 HBSS 液代替只含底物的 HBSS 液即可。

咖啡因、荧光黄 CH 用来验证细胞模型的致密性, 给药浓度分别为 10 和 100 μ mol/L; ³H-地高辛作为 P-gp (MDR1) 的转运底物, 给药浓度为 1 μ Ci/mL, 维拉帕米作为 P-gp 的抑制剂, 给药浓度为 25 μ mol/L; 氯噻嗪作为 BCRP 的转运底物, 给药浓度为 50 μ mol/L, Ko143 作为 BCRP 的抑制剂, 给药浓度为 1 μ mol/L; ³H-雌二醇-17 β -葡萄糖醛酸苷 (EG) 作为 MRP2 的转运底物, 给药浓度为 1 μ Ci/mL, 环孢素 A 作为 MRP2 的抑制剂, 给药浓度为 25 μ mol/L; 利福平用作为 OATP2B1 的转运底物, 给药浓度为 50 μ mol/L, 环孢素 A 作为 OATP2B1 的抑制剂, 给药浓度为 25 μ mol/L。

2.5 Caco-2 细胞单层跨膜电阻值 (TEER) 的测定

将电极放入预热至 37 °C 的 HBSS 中, 平衡 20 min。移走培养板中的培养基, 在 AP 侧每孔加预热的 HBSS 0.5 mL, BL 侧每孔加 1.5 mL, 37 °C 平衡 20 min, 同时洗去细胞表面的杂质。移去 HBSS, 重新加入预热的 HBSS, 测定 TEER, 用 1 个空白载体重复上述步骤以获得空白值。

$$\text{TEER} = (\text{测定电阻值} - \text{空白值}) \times \text{单层表面积} (\text{cm}^2)$$

2.6 药物的测定

2.6.1 ^3H -地高辛及 ^3H -EG 含量测定 用液闪计数器测定转运液和给药液中 ^3H -地高辛及 ^3H -EG 的 DPM 值, 取转运液 200 μL , 加入闪烁液 3 mL, 混匀, 进样, 放置于 α/β 射线计数器上进行读数。

2.6.2 咖啡因、氯噻嗪及利福平的测定 HPLC-UV 法测定, 色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 转运液中咖啡因含量检测方法^[4]: 流动相为甲醇-水(含 1% 乙酸)-三乙胺 (24:76:0.2), 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 260 nm, 进样量为 50 μL ; 转运液中氯噻嗪检测方法^[6]: 流动相为乙腈-水 (含 0.1 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 用磷酸调 pH 至 3) (90:10), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 1.5 mL/min, 检测波长 271 nm, 进样量为 60 μL ; 转运液中利福平检测方法^[7]: 流动相为甲醇-乙腈-0.075 mol/L KH_2PO_4 溶液-枸橼酸 1.0 mol/L 溶液 (30:30:36:4), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 进样量为 50 μL 。

2.6.3 荧光黄 CH 的测定 采用荧光法测定转运液中荧光黄 CH, 取转运液 100 μL , 置于 96 孔黑色酶标板, 使用 SpectraMax M5 多功能酶标仪检测荧光强度, 激发波长 425 nm, 发射波长 520 nm。

2.7 数据处理与分析

2.7.1 RNA 相对表达量 同时测定 Caco-2 细胞中药物转运蛋白基因 (MDR1、BCRP、MRP2、OATP1B1、OATP2B1、PEPT1 和 PEPT2) 和内参基因 (β -actin) 的 C_T 值, 计算药物转运蛋白基因的相对表达量。

$$\text{RNA 相对表达量 (转运体}/\beta\text{-actin)} = 2^{C_T(\beta\text{-actin mRNA}) - C_T(\text{Transporter mRNA})}$$

2.7.2 转运活性 表观渗透系数 (Apparent permeation coefficient, P_{app}) 的大小反映了药物透过单层细胞的能力以及药物吸收的速度:

$$P_{\text{app}} = V \times (dC/dt) \times 1/A \times 1/C_0$$

V 表示接收室的溶液体积 (本实验中 AP 端为 0.5 cm^3 , BL 端为 1.5 cm^3); A 表示膜的面积 (本实验中为 1.13 cm^2); C_0 表示药物的起始浓度; dC/dt 表示接收室在单位时间获得的药物浓度, 即接收室的最终浓度除以转运时间。

外排率 (efflux ratio, R_E) 代表药物外排能力的大小, 通过它可以预测药物在肠吸收是否存在外排机制。

$$R_E = P_{\text{app(B-A)}}/P_{\text{app(A-B)}}$$

2.7.3 统计学分析 本实验中每个数据点为平行 3

孔的平均值, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用微软 office excel 软件, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 细胞模型的完整性验证

Caco-2 细胞单层培养 21 d, TEER 达到 (387 $\pm$ 9.02) $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 。2 种已知特性的工具药 (咖啡因、荧光黄 CH) 在 Caco-2 细胞单层的转运试验具体结果见表 3。Caco-2 细胞单层 TEER $>350 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 咖啡因的 P_{app} 值 <49 , 荧光黄 CH 的 P_{app} 值 <1 , 外排率均约等于 1, 数据表明 Caco-2 细胞单层的致密性和完整性均符合实验要求^[8], 应用此模型得到的数据具有可信性。

表 3 咖啡因及荧光黄 CH 在 Caco-2 细胞单层的双向转运的 P_{app} 值 ($n=3$)

Table 3 P_{app} values of caffeine and lucifer yellow CH in Caco-2 cell monolayer by bi-directional transporter assay ($n=3$)

工具药	$P_{\text{app}}(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		R_E
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP	
咖啡因	23.0 $\pm$ 2.00	21.6 $\pm$ 2.60	0.939
荧光黄 CH	0.199 $\pm$ 0.024 2	0.201 $\pm$ 0.019 4	1.01

3.2 Caco-2 细胞药物转运蛋白基因的相对表达量

同时测定 Caco-2 细胞中 6 种药物转运蛋白基因 (MDR1、BCRP、MRP2、OATP1A2、OATP2B1、和 PEPT1) 和 β -actin 的 C_T 值, 结果见表 4。结果表明, 外排型药物转运蛋白 MDR1、MRP2、BCRP 和摄入型药物转运蛋白 OATP2B1 在 Caco-2 细胞中均有相对高的表达, 需进一步的活力验证; 且在 Caco-2 细胞中, 各药物转运蛋白相对表达量的顺序为: MDR1 $>$ MRP2 $>$ OATP2B1 $>$ BCRP。

表 4 不同药物转运蛋白基因在 Caco-2 细胞中的 C_T 值及相对表达量 ($n=3$)

Table 4 C_T and relative expression level of drug transporters gene in Caco-2 cell ($n=3$)

基因	C_T 值	相对表达量/%
β -actin	17.5 $\pm$ 0.015 0	/
MDR1	18.2 $\pm$ 0.045 0	62.4
BCRP	22.9 $\pm$ 0.115	2.29
MRP2	20.9 $\pm$ 0.015 0	9.47
OATP1A2	37.8 $\pm$ 0.228	6.81 $\times 10^{-5}$
OATP2B1	22.2 $\pm$ 0.055 0	3.67
PEPT1	30.4 $\pm$ 0.010 0	0.012 9

3.3 Caco-2 细胞中各药物转运蛋白的活力检测

^3H -地高辛为 MDR1 的转运底物,在 Caco-2 细胞中外排率为 5.43,加入抑制剂维拉帕米后, BL $\rightarrow$ AP 的 P_{app} 值显著下降,外排率降为 1.54;氯噻嗪为 BCRP 的转运底物,在 Caco-2 细胞中外排率为 26.6,加入抑制剂 ko143 后, BL $\rightarrow$ AP 的 P_{app} 值显著下降,外排率降为 2.14; ^3H -EG 为 MRP2 的转运

底物,在 Caco-2 细胞中外排率为 4.04,加入抑制剂环孢素 A 后, BL $\rightarrow$ AP 的 P_{app} 值显著下降,外排率降为 1.36;利福平为 OATP2B1 的转运底物,在 Caco-2 细胞中外排率为 0.392,加入抑制剂环孢素 A 后, AP $\rightarrow$ BL 的 P_{app} 值显著下降,外排率升为 0.816,结果见图 2 和表 5。结果表明,各药物转运蛋白的活力测试结果均为阳性,验证了基因表达水平检测结果。

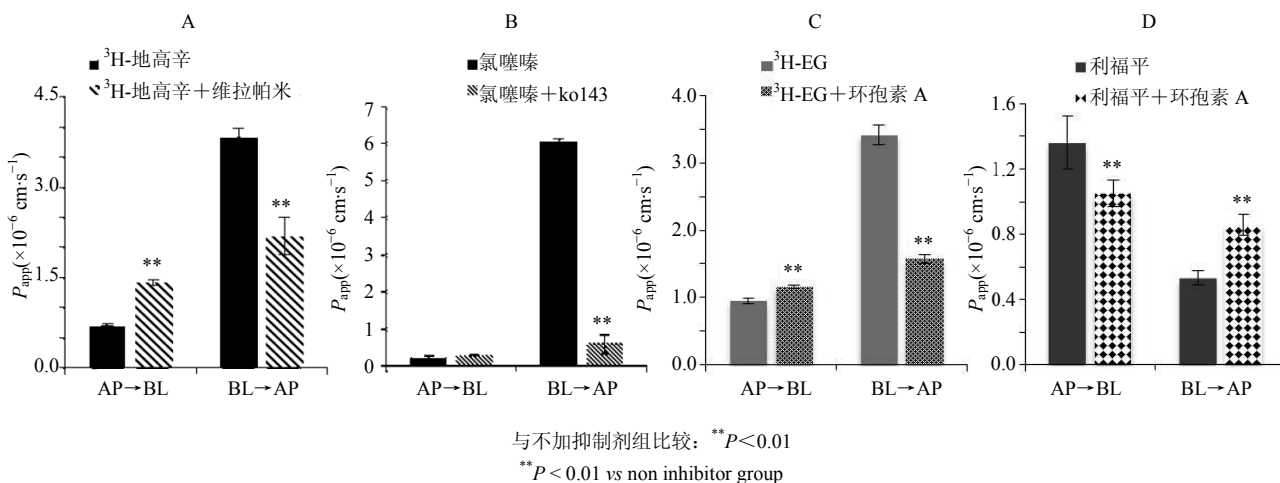


图2 MDR1 (A)、BCRP (B)、MRP2 (C) 及 OATP2B1 (D) 底物及含抑制剂时在 Caco-2 细胞内的双向转运的 P_{app} 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 P_{app} values of substrate of MDR1(A), BCRP(B), MRP2(C), and OATP2B1(D) with and without inhibitor in Caco-2 cell monolayer by bi-directional transporter assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表5 不同药物转运体的底物及含抑制剂时在 Caco-2 细胞内的外排率 ($n=3$)

Table 5 R_E of different substrates with and without inhibitor of drug transporters in Caco-2 cell monolayer ($n=3$)

药物转运蛋白	工具药	R_E
MDR1	^3H -地高辛	5.43
	^3H -地高辛+维拉帕米	1.54
BCRP	氯噻嗪	26.6
	氯噻嗪+ko143	2.14
MRP2	^3H -EG	4.04
	^3H -EG+环孢素 A	1.36
OATP2B1	利福平	0.392
	利福平+环孢素 A	0.816

4 讨论

据 2010 年 Nature Reviews 发表的《Membrane transporters in drug development》^[9]及 2012 年美国 FDA 颁发的《关于药物间相互作用的指导原则》^[10]可知,在人体肠道表达的药物转运蛋白主要有:外排型药物转运蛋白(MDR、BCRP、MRP2)及摄入型药物转运蛋白(OATP、PEPT1)。据文献报道^[11],

在正常人体肠道中各药物转运蛋白相对表达量的顺序为:PEPT1>BCRP>MDR1>MRP2>OATP2B1>OATP1A2。

Caco-2 细胞为癌化细胞且长期在体外培养,与正常人体肠道表达的药物转运体可能存在差异,但目前国内尚无针对 Caco-2 细胞中人肠道相关药物转运蛋白表达水平及活性的全面的研究报道,无法评估应用 Caco-2 研究所得结果的准确性。本研究 mRNA 表达水平结果表明, Caco-2 细胞表达部分正常人体肠道药物转运蛋白,表达水平与正常人体肠道大致相当,但仍存在一定差异。现将差异总结如下:①摄入型药物转运蛋白 PEPT1 相对表达量较小,可判定为基本没表达。如应用 Caco-2 细胞进行 PEPT1 转运底物的肠道吸收机制研究,得到的结果会与人体内数据不符。②在正常人体肠道中,外排型药物转运蛋白的表达量的顺序为 BCRP>MDR1>MRP2;在 Caco-2 细胞中顺序为 MDR1>MRP2>BCRP,与正常人体肠道表达不一致。如应用 Caco-2 细胞进行外排型药物转运蛋白(MDR1/BCRP/MRP2)转运底物的肠道吸收机制研究,得到

的结果可能会与人体内数据不一致。

Caco-2 细胞中各药物转运蛋白的活力评价结果表明,MDR1、MRP2、BCRP、OATP2B1 药物转运蛋白的活力结果均为阳性,与基因的表达水平的检测结果一致。研究药物与肠道药物转运蛋白 MDR1、MRP2、BCRP、OATP2B1 之间的亲和性关系,可以应用 Caco-2 细胞,但只能研究药物与药物转运蛋白是否有关系;如果研究药物与药物转运蛋白的半数抑制浓度 (IC_{50}) 或 K_m 值,则不能用 Caco-2,只能用单一过表达的功能细胞。

参考文献

- [1] 伊秀林,司端运,刘昌孝.应用药物转运体的药代动力学评价[J].药物评价研究,2010,33(5):341-346.
- [2] Dobson P D, Kell D B. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule [J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(3): 205-220.
- [3] Dobson P D, Lanthaler K, Oliver S G, et al. Implications of the dominant role of transporters in drug uptake by cells [J]. Curr Top Med Chem, 2009, 9(2):163.
- [4] 慈小燕,夏媛媛,曾勇,等.3-乙酰基-11-羰基- β -乙酰乳香酸在 Caco-2 和 MDCK 细胞模型中的吸收研究[J].中草药,2013,44(9):1162-1167.
- [5] Lakeram M, Lockley D J, Pendlington R, et al. Optimisation of the Caco-2 permeability assay using experimental design methodology [J]. Pharm Res, 2008, 25(7): 1544-1551.
- [6] 许波,裴玲,高玲. HPLC 法测定复方利血平片中维生素 B1、B6、泛酸钙和氢氯噻嗪的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, (11): 1906-1908.
- [7] Zhu B, Hu C Q. Development and validation of liquid chromatographic method for the determination of the related substances of rifampicin [J]. J Chin Pharmaceut Sci, 2002, 11(1): 19-23.
- [8] 魏敏吉,赵明.创新药物药代动力学研究与评价[M].北京:北京大学医学出版社,2008.
- [9] Huang S M. Membrane transporters in drug development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(3): 215-236.
- [10] FDA. Drug interaction studies-study design, data analysis, and implications for dosing and labeling recommendations [S]. 2012.
- [11] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies [J]. Drug Met Pharm, 2005, 20(6): 452-477.