

应用 Caco-2 细胞模型进行 毒性中药研究的思路*

□罗明媚 刘树民** 索 晴 (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘 要: 本文概述了 Caco-2 细胞模型的基本特点、培养方法及其在中药研究方面的应用, 提出了应用 Caco-2 细胞模型对毒性中药进行研究的新思路。

关键词: Caco-2 细胞模型 毒性中药

古往今来, 历代医药学家在利用中药防病治病的同时, 对中药毒性的探索始终未曾停止。近年来, 我国毒理学领域取得了前所未有的巨大进展, 如何运用现代药理学、毒理学知识, 通过先进的实验手段确定有毒中药的有效成分和毒性成分, 剖析毒性成分的作用机理成为中药现代化和国际化进程中亟待解决的重大问题。但中药毒性研究的方法学及实验技术手段的明显滞后成为阻碍这一进程的主要因素。

中药及其制剂绝大多数为口服给药, 所以研究中药在肠道的吸收、代谢及药物对肠道细胞是否存在毒性作用就显得十分必要。自上世纪 90 年代起, Caco-2 细胞 (The human colon adenocarcinoma cell line) 模型作为一种药物初筛和研究药物肠吸收的体外模型已被国外广泛使用^[1-3]。本世纪初, 国内有学者经研究预测 Caco-2 细胞模型在中药口服的具体吸收成分和机制研究方面将具有广泛的应用前景^[4]。而该模型在毒性中药的吸收及肠道细胞毒作用的研究方面国内外均未见报道, 这一思路的可行性一经研究证实将丰富

毒性中药研究的实验技术手段。

一、Caco-2 细胞模型的基本特点

Caco-2 细胞为来源于人结肠腺癌细胞克隆株, 体外培养达到融合后, 可以自然分化为与成熟小肠细胞具有相似形态和生化特性的细胞。其具有细胞极性并紧密连接, 在肠腔侧分化出的绒毛膜面含有典型的小肠微绒毛水解酶 (蔗糖酶, 6- α -葡萄糖苷酶, 乳糖酶, 氨基肽酶 N 和蛋白酶 CM) 和各种营养物质转运载体如 P-糖蛋白 (P-gp), 二价金属离子转运载体等。研究表明 I 相代谢酶如细胞色素 P450 (CYP450)、II 相代谢酶如 UDP-葡萄糖醛酸转移酶、磺基转移酶和谷胱甘肽硫基转移酶在 Caco-2 细胞中也存在, 并保持了 P-糖蛋白高表达的特征。以上特点决定了 Caco-2 细胞模型可用于药物吸收动力学的研究。

二、Caco-2 细胞的培养

Caco-2 细胞置于曲颈瓶中, 5% CO₂ 37℃ 培养箱中培养, 每升培养基为 1 × 10⁵ U 青霉素, 100 mg 链霉素, 100 mL 小牛血清, 其余为高糖 DMEM (Du Becco's Modified Eagle's medium, Gibco)。每两天换一次培养液。

收稿日期: 2006-03-13

修回日期: 2006-07-28

* 国家自然科学基金资助项目 (30572368): 黄药子配伍当归后活性/毒性成分体内吸收基代谢研究, 负责人: 刘树民。

** 联系人: 刘树民, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药毒性研究, Tel 0451-82196262, E-mail liushumi@hljcm.net

细胞聚集生长, 不易均匀扩增分散于培养瓶底部, 此种情况不利于细胞的继续增殖, 可用 0.25% 胰酶消化, 1:1 传代, 分散后的细胞在新瓶中继续培养。当细胞生长至 80% ~ 90% 融合时, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 按 1:3 传代培养。细胞形成具有生物屏障性质的融合层或数量符合要求时, 即可用于不同性质的实验研究。

三、Caco-2 细胞模型在中药研究方面的应用

因为药物透过 Caco-2 单细胞层的体外过程与药物口服后在肠中的吸收和代谢具有良好的相关性, 所以在国外 Caco-2 细胞模型已被广泛的应用于研究药物的吸收、代谢及药物开发的早期快速筛选过程中。利用该模型进行中药的吸收、代谢研究起步较晚, 目前也仅限于对从中药中分离出的某些化合物的吸收机制及动力学的研究, 对利用 Caco-2 细胞模型进行整体中药及复方的吸收、代谢研究仍未见报道。

唐灿^[3]用外翻肠囊法、在体肠灌流法、Caco-2 细胞模型法对灯盏花素的肠吸收进行考察, 指出 Caco-2 细胞模型法与其它两种方法在灯盏花素的肠吸收动力学参数上显示了良好的相关性。王堃等^[6]应用 Caco-2 细胞模型对紫杉醇和小檗碱进行研究, 结果表明, 紫杉醇及小檗碱低生物利用度的主要原因是 P-gp 的外排作用, 同时服用 P-gp 抑制剂可能对这两种药物的低生物利用度有所改善。谢海棠等^[7]研究 Caco-2 细胞对人参皂苷 Rg3 的摄取、代谢及其动力学变化, 实验结果显示: Rg3 在 Caco-2 细胞上的摄取是时间及浓度依赖性的, 其被动转运系数 K_d 为 $0.07 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$, 最大摄取速率 V_{max} 为 $3.32 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$, K_m 是 $16.31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。加入代谢抑制剂叠氮化钠及 2,4-二硝基酚时摄取速率明显降低 (与对照组相比 $P < 0.01$)。并指出 Rg3 在肠道中的代谢为其生物利用度低的原因之一。

四、利用 Caco-2 细胞模型研究毒性中药的思路

1. 确定毒性中药的肠道吸收成分

Caco-2 细胞经毒性中药染毒后, 收集被细胞吸收或穿透 Caco-2 细胞单细胞层的成分, 采用高效液相法将收集到的物质与实验药物的固有成分进行比

较, 可能出现以下几种结果: ①收集到的物质为实验药物的固有成分, 则结合该药物的药效靶器官进行此物质的体外实验, 确定其为毒性成分或有效成分。②收集到的物质为实验药物的固有成分, 但经进一步研究, 确定该物质不是药物的毒性成分及有效成分, 此时仍不能认定其无效性, 因为该吸收成分需经肝脏的进一步代谢。③收集到的物质不是实验药物的固有成分, 则结合 HPLC-MS 法测定其药物分子结构, 经进一步的实验研究确定其毒效或药效。

2. 研究毒性中药肠道吸收成分的吸收机制

在毒性中药肠道吸收成分确定的基础上, 研究其吸收机制。于 Caco-2 细胞绒毛面一侧加入一定量的待测药物, 间隔一定时间取样或撤去药物并粉碎细胞, 以液体闪烁计数法或高效液相色谱法测定不同时间段内两侧药物的含量变化或细胞中的药物含量变化。计算 P_{app} (表观穿透系数) 及 $P_{\text{app1}}/P_{\text{app2}}$ (P_{app1} 为基底面至绒毛面方向测得的表观穿透系数; P_{app2} 为绒毛面至基底面方向测得的表观穿透系数) 的数值, 以确定吸收成分的吸收机制。P-蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 和多药耐药蛋白 (multi-drug resistance protein, MRP) 是 Caco-2 细胞中两种主要转运蛋白。两者均为能量 (ATP) 依赖性膜蛋白。我们可通过细胞基底面及绒毛面两侧不同方向转运速率的比较及检测加入转运蛋白抑制剂后 P_{app} 值的变化确定吸收成分的转运机制。

3. 研究炮制、配伍等因素对毒性中药肠道吸收成分的影响

利用 Caco-2 单细胞层, 模拟体内吸收情况, 计算毒性中药肠道吸收成分的药动学参数。以药动学参数的变化考察毒性中药的物化性质、剂型、炮制、配伍及人体生理等因素对其肠道吸收成分的影响。这方面的研究在毒性中药肠道吸收的某些成分被确定为是其毒性成分或毒性成分前体时进行, 更具意义。因为, 由此即可以找出中药炮制减毒、配伍减毒等传统理论的现代科学依据。

4. 研究毒性中药的肠道细胞毒作用

Caco-2 细胞模型作为一个极好的研究外源化学物质经肠道摄取和吸收的体外模型, 近些年来, 已被越来越多的引入毒理学研究领域。我们可以以 Caco-2 细胞为模型, 利用噻唑蓝 (MTT) 实验、P-蛋白 (P-gp) 活

性检测实验、活性氧检测及克隆形成实验,研究毒性中药对肠道上皮 Caco-2 细胞的直接细胞毒作用^[8]。

再者,由于中药的成分复杂,多效性、多靶点共同作用,所以毒性中药的直接细胞毒作用很可能并不显著。但经研究表明,毒性物质在不引起明显的细胞毒性的剂量下,就可引起 Caco-2 细胞细胞间紧密连接功能改变和细胞单层通透性增加,使得肠道上皮细胞的屏障功能下降,从而导致在正常情况下不能进入体循环的分子进入机体,引起局部或更为广泛的系统效应^[9]。我们可以以 Caco-2 细胞单层为模型,通过测定毒性中药作用后细胞单层的跨上皮细胞电阻 (TEER) 来反映通透性的改变;通过免疫荧光和荧光染色观察毒性中药对紧密连接蛋白 ZO-1 和 F 微丝的影响,由此推断:毒性中药使肠道上皮细胞的屏障功能下降,从而导致正常情况下不能进入体循环的毒性物质进入机体,引起毒性反应,为其毒性作用的机制之一。

目前,毒性中药研究的实验方法主要集中于整体研究,而对快速、敏感、条件易控、重现性好的体外实验方法却少有涉猎,只在有毒中药诱导肿瘤细胞凋亡及考察某些中药及复方的致突变毒性研究中有个案报道。原因是中药及其复方粗提物的理化性质如杂质、渗透压等对离体系会产生很大干扰。以 Caco-2 细胞为模型进行毒性中药的体外实验研究,需尽量采用超细粉末等新技术,使中药的粗提物得以“纯化”,减少杂质、酸碱度等因素的不利影响。另外,体外实验结果要与毒性中药的整体实验结果相互结合,细胞毒理与药理相互补充,印

证以 Caco-2 细胞为模型进行毒性中药的体外实验研究的可行性,并以此为基础使 Caco-2 细胞模型的应用标准化,丰富毒性中药研究的方法学及实验技术手段。

参考文献

- 1 Gan LL, Dh iren RT. Application of the Caco-2 model in the design and development of orally active drug elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 23(1): 77282.
- 2 Hovgaard L, B røndsted H, Buur A. Drug delivery studies in Caco-2 monolayer: synthesis, hydrolysis and transport of cyclopropane carboxylic acid ester prodrugs of various B- blocking agents. *Pharm Res* 1995; 12 (3): 3872392.
- 3 Rouquayrol M, Gaucher B, Rodhe D, et al. Trans epithelial transport of prodrugs of the HIV protease inhibitors saquinavir, indinavir, and nelfinavir across Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res*, 2002, 19 (11): 1704 ~ 1712.
- 4 刘昌孝. 中药药代动力学研究的难点和热点. *药学报*, 2005, 40 (5): 398.
- 5 唐灿. 中药肠吸收动力学研究—灯盏花素肠吸收动力学研究. 成都中医药大学博士学位论文, 2004.
- 6 王堃, 仲来福. 肠道 CYP3A 和 P- gp: 口服药物的吸收屏障. *中国药理学通报*, 2003, 19 (9): 988 ~ 991.
- 7 谢海棠, 王广基, 赵小辰, 等. Caco-2 细胞对人参皂苷 Rg3 的摄取及代谢研究. *中国临床药理学治疗学*, 2004, 9(3): 257 ~ 260.
- 8 刘志伟, 陈佳琳, 陈秉衡. 铜对人类肠道上皮 Caco-2 细胞的毒性研究. *卫生研究*, 2004, 33(3): 284 ~ 287.
- 9 刘志伟. Caco-2 细胞单层模型及其在毒理学中的应用. *卫生研究*, 2004, 33(6): 758.

Application of Caco-2 Cell Model in Studying Poisonous Chinese Traditional Medicine

Luo Mingmei, Liu Shumin, Suo Qing

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, 150040)

The Paper discusses the basic characteristics of a Caco-2 cell model and the associated cell culture process and applications in studying traditional Chinese medicines. A new thinking line is proposed in the paper to study poisonous Chinese traditional medicines using the Caco-2 cell model, the first attempt of its kind in the country.

Keywords: Caco-2 cell model; poisonous Chinese traditional medicines

(责任编辑:付建华, 责任编审:杜力军, 责任译审:邹春申)