

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.25.049

药物跨膜转运细胞模型影响因素及应用

元 宏 巫冠中[△]

(中国药科大学 药理教研室 江苏 南京 210009)

摘要:本文详细介绍了 Caco-2 细胞系和 MDCK 细胞系的特点、跨膜转运细胞模型的建立及其影响因素,包括细胞模型的选择、细胞接种密度、细胞单层的紧密性等细胞因素和 Transwell 多微孔膜的性质等环境因素。概述了国内外关于利用 Caco-2 和 MDCK 细胞系作为模型进行药物筛选、药物相互作用和研究药物吸收转运机制等方面的内容及 MDCK 细胞模型作为肠道模型、肾脏模型及血脑屏障模型的应用。比较了 Caco-2 细胞和 MDCK 细胞在肠道模型方面的差别, MDCK 细胞主要用于选择性研究药物在小肠吸收及转运机制,特别用于细胞旁被动转运药物的研究,而 Caco-2 细胞用于双向转运或能量依赖主动转运研究。MDCK 细胞模型可在体外培养条件下平稳转染人类 MDR1 基因,因此可高表达 P-gp 基因,可作为可用于评估肾脏药物相互作用、快速进行候选药物筛选及研究药物转运机制的理想模型。

关键词:Caco-2 细胞; MDCK 细胞; 细胞模型; 跨膜转运

中图分类号:R965.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)25-4987-04

Important Applications and Influence Factors of cell Monolayers in the Study of the Drug Transport

QI Hong, WU Guan-zhong[△]

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China)

ABSTRACT: This review introduces the characteristics and establishment of Caco-2 and MDCK cell line and summarizes the main influencing factors of drug transport. Cell factors contain the selection, tight junction and density of cell modes. Environment factor main is the performance of semi-permeable membranes. Caco-2 cell and MDCK cell could be used as a drug transport model are widely used in drug screenings, and the study of mechanisms of drug interaction and absorption or transport, as well as MDCK as models of intestinal mucosa, blood brain barrier and kidney. Comparison with the difference in model of intestinal mucosa between Caco-2 and MDCK cell, MDCK cell monolayer have been considered as an alternative for Caco-2 for studying absorption capacity and transport mechanisms of passive transport drugs in small intestine, especially for paracellular passive transport drugs. Caco-2 cells are used in the bidirectional transport and energy-dependent active transport study. MDCK cells are easy to culture and to transfect, and the high level of P-glycoprotein expression in MDR1-MDCK cells makes this a well-suited model for evaluating mechanisms of renal drug interactions and permeability screens.

Key words: Caco-2 cell; MDCK cell; Cell model; Drug transport

Chinese Library Classification(CLC): R965.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)25-4987-04

前言

动物模型广泛用于人类疾病的探索研究,然而实验动物造模不易形成,且存在种属差异,由于其在分子机制上不能直接反映人类疾病的过程,因而其在试验研究中的应用受到了很大的限制。通过借助建立体外细胞模型,模拟细胞膜的生物学特性,在更可控的环境下,研究其相互作用,揭示人类疾病相关信息具有重要意义。体外细胞模型主要有以下几个优点:1. 细胞模型能够在分子水平上对药物的吸收和代谢进行快速评估;2.

细胞单层容易建立,顶端和底端相互独立,有利于进行实验操作;3.不需要使用实验动物,从而降低了经济成本;4.重复性好。为了能更好地模拟体内生理条件,更好地研究和预测药物在人体的吸收、转运、及快速进行新药通透性高通量筛选,建立起更完善的体外细胞模型是目前研究的重点之一。本文对常用的药物跨膜转运体外细胞模型的影响因素及应用的研究进展进行综述。

1 体外跨膜转运的影响因素

影响体外跨膜转运的因素主要可以分为以下几类:模型类型、细胞因素、药物因素、环境因素等。其中细胞因素(接种密度、细胞融合度、细胞分化程度)和环境因素(转运介质、培养环境)对细胞模型的成功建立影响很大,本文主要讨论这两类因素。

作者简介:元宏(1986-),女,硕士,主要研究方向:内分泌与药理学(糖尿病及其并发症),E-mail: qihong2000@126.com

△通讯作者:巫冠中(1956-),男,博士,教授,主要研究方向:内分泌药理学(糖尿病及其并发症),E-mail: zhonghuw@sohu.com

(收稿日期:2013-11-16 接受日期:2013-12-12)

1.1 细胞模型的选择

从 20 世纪 80 年代开始,国外便开始应用细胞体外培养模型来进行药物吸收的研究,作为药物跨膜转运和药物间相互影响的理想细胞模型需要具备两个条件,即细胞具有极性同时能够形成紧密联结。细胞极性几乎是所有真核生物上皮细胞的共同特征,主要是指细胞所表现的沿着一个方向的,各部分彼此相对两端具有某些不同的形态特征或者生理特征的现象,其最明显的特征之一是细胞质膜极性的出现。紧密连接是维持膜完整性重要的结构和功能基础^[1]。目前常用的细胞培养模型有 Caco-2 单层细胞模型、MDCK 单层细胞模型、MDR1-MDCK 细胞模型、T84 细胞模型和 ECV304 细胞模型等^[2,3]。

1.2 细胞接种密度

体外培养细胞存在接触抑制现象,适宜的接种密度对细胞的良好生长至关重要。接种细胞密度过多时,细胞之间会因空间、培养液中营养成分等竞争而导致细胞倍增速度减弱,发生密度抑制,可能导致细胞分裂停止甚至死亡。反之,细胞则生长缓慢,会导致细胞活力降低,不利于细胞单层的融合形成。对于转运实验用的细胞单层来说,细胞在多微孔膜上接种密度是细胞增殖分化形成单层并达到紧密联结所需时间的决定性因素,通常 Caco-2 细胞以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种 21 天后即可分化形成单层细胞膜,而 MDCK 以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度更适宜。

1.3 细胞单层的紧密性

细胞单层的紧密性是决定药物转运和吸收能否成功的关键,通常有两种方法评价细胞单层紧密性^[4]。(1)测定细胞单层的跨膜电阻(TEER),细胞跨膜电阻会随着细胞生长天数的增加而增大,最后达到一个相对恒定的值,TEER 值越高说明细胞单层的紧密性越好^[5]。文献报道 Caco-2 细胞的膜电阻 TEER > $230 \Omega \text{ cm}^2$ 认为是可以用的,而 MDCK 细胞的膜电阻相对 Caco-2 细胞更低,TEER > $90 \Omega \text{ cm}^2$ 即认为细胞单层的紧密性良好^[6]。(2)用同位素标记的或转运性能低的荧光标记水溶性化合物荧光黄等测定单细胞层的通透性,结果显示 Caco-2 细胞荧光黄 Papp < 10 nm/s ($1 \text{ nm/s} = 1 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$)、MDCK 细胞荧光黄 Papp < 15 nm/s 时说明细胞单层的紧密性比较好,能够进行转运和吸收实验。Madgula VL 等^[7]建立 Caco-2 和 MDR-MDCK 细胞模型,测定 TEER 值分别为 $410\text{--}440 \Omega \text{ cm}^2$ 和 $1170\text{--}1230 \Omega \text{ cm}^2$,并进一步通过测定荧光黄标记物显示,Caco-2 的 Papp 值为 $2.5\text{--}5.0 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$,MDR-MDCK 的 Papp 值为 $6.0\text{--}8.0 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$,证实细胞间紧密联结可用于实验。

1.4 Transwell 多微孔膜的性质

细胞接种在 Transwell 多微孔膜上,在上面生长并形成细胞单层,膜上的胶原蛋白涂层会加速细胞生长分化利于细胞在膜上吸附,同时多微孔膜的材质和孔径也会对细胞模型的生长造成一定的影响^[8]。Transwell 滤膜有聚乙烯对苯二甲酸酯(PET)、聚碳酸酯(PC)和胶原包被的聚四氟乙烯(PTFE)三种材质,聚酯(PET)的特点是其滤膜在显微镜下呈透明状态,这样细胞在相差显微镜下更易观察,可以估计细胞的生长状态,而聚碳酸酯(PC)膜则呈半透明状态,不容易在镜下观察细胞。胶原包被的 PTFE 膜,使得细胞更易贴附和伸展。此外,Transwell 膜孔径的选择也很重要,膜底面孔径如果大于 $1 \mu\text{m}$ 会造成细胞的迁

移,可能会使细胞穿过微孔生长,因此对于药物转运和渗透性等的研究选用 $0.4 \mu\text{m}$ 孔径最适宜。

药物跨膜转运细胞模型,其中 Caco-2 细胞和 MDCK 细胞是最近十几年来国外广泛采用的一种研究药物吸收、转运、代谢的体外细胞模型,具有比较简单、重复性好、应用范围广泛的特点。下面本文将分别对国内外关于利用 Caco-2 和 MDCK 细胞系作为模型进行药物筛选、药物相互作用和研究药物吸收转运机制等方面的内容做一简单介绍。

2 体外细胞模型(Caco-2 和 MDCK 细胞)在跨膜转运研究中的应用

2.1 Caco-2 细胞模型

2.1.1 Caco-2 的来源和特性 Caco-2 细胞来源于人结肠癌细胞,其结构和生理生化作用类似人体小肠上皮细胞,在普通条件下培养,可在 $0.4 \mu\text{L}$ 孔径的 Transwell 多聚碳酸酯膜上自发进行上皮样分化并可形成紧密联结,分化出绒毛面 AP(apical, 肠腔侧)和基底面 BL(basolateral, 肠壁侧),同时能表达小肠的各种转运体和代谢酶^[9,10],因此可以作为研究小肠表皮细胞的药物转运、吸收和代谢的体外模型。Caco-2 细胞模型具有以下几个方面的优点:1. 细胞具有极性,能够形成紧密联结,可分化表达小肠的代谢酶;2. 来源于人体,具有同源性,不会造成形态学和生理学的种属差异;3. 条件可控,不要求使用实验动物,降低了经济成本 4. 结果具有较好的重现性。由于该模型其形态学、标志酶的功能表达、渗透特征等与小肠上皮细胞相似,故该模型更接近药物在人体内吸收的实际环境,可以在代谢状态下测定药物的摄取和吸收转运,因此,Caco-2 细胞模型常作为研究口服药物肠吸收特性和各种转运机制的理想体外模型。

2.1.2 Caco-2 细胞模型在药物开发中应用 (1)新药通透性高通量筛选 Clai X 等^[11]通过利用建立 Caco-2 体外细胞模型来预测先导化合物在人体内的吸收情况,显著地缩短了药物的发现时间,在药物开发的初期排除了不能透过小肠黏膜的药物,为高通量筛选提供了快速的方法。(2)口服药物吸收的研究 Jiang S 等^[12]利用 Caco-2 细胞模型对 7- 木糖 -10- 去乙酰基紫杉醇吸收进行了研究,分别考察了从 AP 侧(顶侧)→BL 侧(基底侧)和 BL 侧→AP 侧的跨细胞转运特性,表明 7- 木糖 -10- 去乙酰基紫杉醇转运以被动扩散为主。(3)复合组分中有效成分的研究天然药物提取物中含有许多成分,通过其在 Caco-2 细胞单层中的转运研究,可探知有效成分。例如:在美国用于治疗抑郁症的金丝桃提取物,普遍认为有效成分是金丝桃素,通过 Caco-2 细胞转运实验,发现原金丝桃素也是有效成分之一。

2.2 MDCK 细胞模型

2.2.1 MDCK 细胞的来源与特点 MDCK 细胞株源自犬肾脏上皮细胞,是 Madin SH 和 Darby NB 于 1958 年 9 月从一成年雄性西班牙猎狗的肾脏取得的,这种细胞株是典型的分泌型上皮细胞株,主要用于研究肾小管上皮细胞的形态和功能^[13]。MDCK 接种在 $0.4 \mu\text{m}$ 孔径的 Transwell 半透膜上之后能分化成柱状单层上皮并形成致密的连接,整个过程仅需要 2-6 天,是一个非常好的单层上皮细胞候选模型。相比 Caco-2 细胞,MDCK 细胞株生长快速培养简单,细胞单层的 TEER 更低^[14],

培养 2-4 天 TEER 值可达到 $250 \Omega \text{ cm}^{15}$ 。尽管 MDCK 细胞来源于犬肾细胞,但是 MDCK 细胞模型作为研究药物转运和代谢的体外模型,有其独特的特点:1.细胞培养时间短,MDCK 细胞自接种开始至达到稳定融合期一般只需 3-6 天,即平均每周能进行一次转运实验;2.跨上皮电阻低,接近于小肠;3 易于培养,无需特殊细胞培养条件。

2.2.2 MDCK 细胞模型的应用 (1)肠道模型应用在过去的几十年里,Caco-2、MDCK、LLC-PK1 和 HT-29-H 细胞作为肠道体外通透性模型应用广泛^[16,17]。尽管 Caco-2 细胞已被 FDA 批准作为标准的通透性筛选方法用于可溶性药物的吸收研究,但其细胞间紧密联结的特性限制了其在水溶性小分子药物细胞间转运中的应用,同样其缺乏人肠道药物吸收屏障的黏液层的不足也制约着其应用。MDCK 细胞来源于雄性的西班牙猎狗,与 Caco-2 细胞相比,能够在半透膜上分化成柱状上皮并形成紧密联结,缩短了培养时间并且细胞间紧密联结与人体小肠更加接近,因此,MDCK 细胞已经被替代用于选择性研究药物在小肠吸收及转运机制,特别用于细胞旁被动转运药物的研究^[18]。而 Caco-2 细胞用于双向转运或能量依赖主动转运研究。(2)肾脏模型应用 MDCK 细胞模型可在体外培养条件下平稳转染人类 MDR1 基因,因此可高表达 P-gp 基因^[19],可作为可用于评估肾脏药物相互作用、快速进行候选药物筛选及研究药物转运机制的理想模型。Karyekar CS 等^[20]通过采用 MDR1-MDCK 模型研究 P-gp 在肾小管有机阳离子分泌方面起重要作用。同时,MDCK 细胞来源于正常的肾组织,表达肾小管上皮细胞的功能特性,也可用于药物的体外肾毒性快速筛选的研究,淘汰毒性大的化合物,为新药研发提供毒性预测信息。Yeh JH 等^[21]采用 MDCK 细胞研究了氯化汞(HgCl_2)的肾毒性,表明 MDCK 细胞对 HgCl_2 的肾毒性特别敏感。(3)血脑屏障(Blood-brain barrier)模型应用血脑屏障(BBB)是存在于血液和脑组织之间的一层屏障系统,这种结构可使脑组织少受甚至不受循环血液中有害物质的损害,从而保持脑组织内环境的基本稳定,对维持中枢神经系统正常生理状态具有重要的生物学意义^[22]。在研发脑内作用的药物时,首先要考虑药物能否透过血脑屏障,目前已公布有大量的内皮细胞或上皮细胞可用于研究血脑屏障不同方面,其中 MDCK 细胞具有生理仿真的细胞构筑和相似的形态特征,容易培养且转染方便,可携带高表达 P-gp 蛋白基因等,是一合适的血脑屏障药物的高通量筛选模型^[23,24]。

3 小结

体外细胞模型作为研究药物双向转运、快速筛选、吸收转运机制、预测体内吸收和药物相互作用、新药设计及评价药物安全性的理想的模型,同时在研究人类疾病分子机制方面具有重要作用。但影响体外细胞模型的因素很多,只有综合考虑各个方面的影响因素,才能建立起理想的细胞模型并获得可信性较高的实验结果。

参考文献(References)

- [1] Van Itallie CM, Aponte A, Tietgens AJ, et al. The N-and C-termini of ZO-1 are surrounded by distinct proteins and functional protein networks[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 28(2) 389-395
- [2] Zhao S, Yuan L, Wang J, et al. A Novel and Facile Approach to Imaging Nanoparticles Transport across Transwell Filter Grown Cell Monolayer in Real-Time and in Situ under Confocal Laser Scanning Microscopy [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2012, 35(3): 335-345
- [3] Chu F, Jin X, Xu Y, et al. Effect of Lipopolysaccharide Mediating Early-and Late-Activated THP-1 Macrophages on ECV304 Endothelial Cell Dysfunction: Dysregulation of Secretion of VEGF and Proliferation and Migration of ECV304 [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2013, 31(2-3): 400-407
- [4] Ferrell N, Desai RR, Fleischman AJ, et al. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells[J]. Biotechnology and bioengineering, 2010, 107(4): 707-716
- [5] Wunrau C, Schnaeker EM, Freyth K, et al. Establishment of a matrix associated transepithelial resistance invasion assay to precisely measure the invasive potential of synovial fibroblasts [J]. Arthritis & Rheumatism, 2009, 60(9): 2606-2611
- [6] Xu Z, Zhang C, Zhang Y, et al. Europium Complexes as Novel Indicators of Paracellular Diffusion [J]. Chemistry & Biodiversity, 2012, 9(9): 1916-1922
- [7] Madgula VL, Avula B, Reddy NV, et al. Transport of decursin and decursinol angelate across Caco-2 and MDR-MDCK cell monolayers: in vitro models for intestinal and blood-brain barrier permeability[J]. Planta medica, 2007, 73(04): 330-335
- [8] Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model [J]. Critical Reviews? in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1997, 14(3):221-286
- [9] Mohamed HF. Molecular analysis and anticancer properties of two identified isolates, *Fusarium solani* and *Emmericella nidulans* isolated from Wady El-Natron soil in Egypt against Caco-2 (ATCC) cell line [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(11): 863-869
- [10] Gupta V, Doshi N, Mitragotri S. Permeation of Insulin, Calcitonin and Exenatide across Caco-2 Monolayers: Measurement Using a Rapid, 3-Day System[J]. PloS one, 2013, 8(2): e57136
- [11] Cai X, Walker A, Cheng C, et al. Approach to improve compound recovery in a high throughput Caco 2 permeability assay supported by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2012, 101(8): 2755-2762
- [12] Jiang S, Zu Y, Zhang Y, et al. Transport of a Hydrophilic Paclitaxel Derivative, 7-Xylosyl-10-Deacetylpaclitaxel, by Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells[J]. Planta medica, 2010, 76(14): 1592
- [13] Di L, Whitney Pickett C, Umland JP, et al. Development of a new permeability assay using low efflux MDCKII cells [J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2011, 100(11): 4974-4985
- [14] Li J, Wang Y, Hidalgo JJ. Kinetic analysis of human and canine P glycoprotein mediated drug transport in MDR1-MDCK cell model: Approaches to reduce false negative substrate classification [J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2013, 98(13): 423-435
- [15] Nkansah P, Antipas A, Lu Y, et al. Development and Evaluation of

- Novel Solid Nanodispersion System for Oral Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs [J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 1(8): 385-399
- [16] Hidalgo IJ. Assessing the absorption of new pharmaceuticals [J]. *Current topics in medicinal chemistry*, 2001, 1(5): 385-401
- [17] Shah P, Jogani V, Bagchi T, et al. Role of Caco 2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption [J]. *Biotechnology progress*, 2006, 22(1): 186-198
- [18] Wang M, Sun B, Feng J, et al. Investigation of Transport Mechanism of Exendin-4 across Madin Darby Canine Kidney Cell Monolayers[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(5): 745-752
- [19] Shu Y, Bello CL, Mangravite LM, et al. Functional characteristics and steroid hormone-mediated regulation of an organic cation transporter in Madin-Darby canine kidney cells [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 299(1): 392-398
- [20] Karyekar CS, Eddington ND, Garimella TS, et al. Evaluation of P glycoprotein-Mediated Renal Drug Interactions in an MDR1 MDCK Model [J]. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 2003, 23(4): 436-442
- [21] Yeh JH, Chung HM, Ho CM, et al. Mercury-induced Ca^{2+} increase and cytotoxicity in renal tubular cells [J]. *Life sciences*, 2004, 74(16): 2075-2083
- [22] Garberg P, Ball M, Borg N, et al. In vitro models for the blood-brain barrier[J]. *Toxicology in vitro*, 2005, 19(3): 299-334
- [23] Lv H, Wang F, Reddy MR, et al. Screening candidate anticancer drugs for brain tumor chemotherapy: Pharmacokinetic-driven approach for a series of (E)-N-(substituted aryl)-3-(substituted phenyl) propenamide analogues [J]. *Investigational New Drugs*, 2012, 30(6): 2263-2273
- [24] Strougo A, Eissing T, Yassen A, et al. First dose in children: physiological insights into pharmacokinetic scaling approaches and their implications in paediatric drug development [J]. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2012, 39(2): 195-203

(上接第 4986 页)

- [30] Zhang C, Wang C, Chen X, et al. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Chem*, 2010, 56(12): 1871-1879
- [31] Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(1): 104-111
- [32] Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, et al. Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Surg Oncol*, 2012, 106(2): 188-192
- [33] Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, et al. Prognostic impact of circulating miR-21 and miR-375 in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(Suppl 1): S53-59
- [34] Ko MA, Zehong G, Virtanen C, et al. MicroRNA expression profiling of esophageal cancer before and after induction chemoradiotherapy [J]. *Ann Thorac Surg*, 2012, 94(4): 1094-1102; discussion 1102-1093
- [35] Imanaka Y, Tsuchiya S, Sato F, et al. MicroRNA-141 confers resistance to cisplatin-induced apoptosis by targeting YAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Hum Genet*, 2011, 56(4): 270-276
- [36] Wang W, Huang J, Chen J. Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (6): 4364-4370
- [37] Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, et al. Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 3029-3038
- [38] Zhang H, Li M, Han Y, et al. Down-regulation of miR-27a might reverse multidrug resistance of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(9): 2545-2551