

口服药物吸收模型的研究进展

莫李立, 王素军

(广东药学院 药科学院, 广东 广州 510006)

摘要: 对口服药物吸收模型进行综述, 介绍各模型的研究方法、特点和应用进展, 为药物吸收的科学评价提供参考。

关键词: 口服药物; 肠道吸收; 人工生物膜; 细胞模型; 灌流模型

中图分类号: R 945 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.026

文章编号: 1006-8783(2011)01-0104-04

The research progresses of oral drug absorption models

MO Li-li, WANG Su-jun

(School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Based on investigation of the domestic and foreign relevant literatures published in recent years, the progresses on oral drug absorption models were reviewed. The experimental methods, the characteristics and application progress of oral drug absorption models were introduced to provide a reference for the scientific evaluation of drug absorption.

Key words: oral drug; intestinal absorption; artificial biomembrane; cell model; perfusion model

口服给药是最常见也是最方便的给药方式。对于口服药物来说, 小肠是吸收的主要场所, 因此药物的跨肠道表皮细胞渗透是产生药效的决定性环节。了解药物在体内吸收的机制、速度和程度, 有助于进行药物结构的改善、处方设计和工艺过程, 指导合理的临床用药。目前研究药物吸收的模型有人工生物膜模型、细胞模型和动物实验模型等。

1 人工生物膜模型

上皮细胞膜就是一种生物膜, 药物的吸收过程实际上就是一个跨膜转运的过程。因此通过在体外模拟生物膜, 可以对药物的吸收进行科学的预测和评价。人工生物膜模型主要有平行人造膜法和固定化人工膜色谱柱法。

1.1 平行人造膜法 (parallel artificial membrane permeability assay, PAMPA) PAMPA 也称通透性测定法, 通过测定化合物通过或保留于磷脂双分子层屏障的通透性系数来预测药物的吸收性能。其方法是: 吸取溶解于十二烷的磷脂

溶液 10 μ L 加于 96 孔滤板中的疏水膜上, 10 min 内定量吸取待测样品液加入到膜上方作为给药池, 膜另一侧加入空白磷酸盐缓冲液为接受池, 将滤板置于振荡水浴锅内低速振摇后取接受池样品进行测试分析。KV 等^[1] 结合了 PAMPA 和 Caco-2 细胞模型 2 种方法对沙氏菌蛋白酶 (serratiopeptidase) 纯品和其脂质体制剂进行体外吸收评价, 发现该药物制成脂质体制剂后其渗透性得到提高, 获得了更好的口服吸收效果。

1.2 固定化人工膜色谱柱 [immobilized artificial membrane (IAM) columns] 1995 年 Beigi 等^[2] 首次采用凝胶作为载体, 利用固定化的脂质体作为固定相模拟小肠上皮细胞来研究药物的被动吸收过程。后利用涂敷磷脂的硅胶作为固定相, 大大提高了固定相的机械强度和稳定性。

由于药物在模拟生物膜色谱柱上的保留值与药物的小肠吸收有较好的相关性, 因而通过测定药物在色谱柱上的保留值的差别, 就可以粗略的判断药物在体内可能的吸收状况。Shin 等^[3] 用 IAM 卵磷脂柱色谱法预测了 15 种药

收稿日期: 2010-10-28

基金项目: 国家自然科学基金 (81073141); 广东省自然科学基金 (9152402301000007); 广东省医学科学技术研究基金 (A2009317); 广东药学院博士启动基金

作者简介: 莫李立 (1986 -), 女, 硕士研究生, Email: swee_theartxxox@ hotmail.com; 通讯作者: 王素军 (1972 -), 男, 副教授, 硕士生导师, 从事药物代谢动力学研究, Email: wsj7272@ 126.com。

网络出版时间: 2011-01-21 17: 20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1720.023.html>

物在该色谱行为中容量因子的值,结合体外肝微粒消除半衰期来预测口服药物的生物利用度,发现预测的和实测的口服生物利用度之间具有良好的相关性。因此在药物研发前期,将化合物在该色谱行为中容量因子的值与体外消除半衰期结合起来可以判断化合物是否具有良好的口服吸收。

2 细胞模型

细胞模型方法所需的药量少,药物分析方法简单、快速,温度可控,能模拟体内复杂的生理条件,已经被广泛用于药物高通量筛选和指导先导化合物的合成。目前用于研究药物分子跨膜转运的细胞模型主要包括 Caco-2、HT29、T84 和 MDCK、LLC-PK1。

2.1 Caco-2 细胞模型 Caco-2 细胞系 (the human colonic adenocarcinoma cell line) 来源于人结肠腺癌细胞,用含 10% (ρ) FBS 的 DMEM 培养液培养 (37 °C、 $\varphi = 5\% \text{CO}_2$) 至 20 ~ 30 代后将其接种于多孔 Transwell 的多聚碳酸酯膜上,21 d 后细胞自发生长成为具有生物屏障性质的融合层即可使用。在细胞层的基底面一侧 (basolateral side, BL) 换上 HBSS,在顶侧 (apical side, AP) 换上含有待测药物的 HBSS (或相反操作),在 37 °C 恒温摇床中释药,模拟体内吸收情况。间隔一定时间取样或在一定时间后撤去药物并破碎细胞,测定两侧药物含量及细胞中的药物含量,用公式 $P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot c_0}$ (其中 c_0 是受试药物所在端的初始浓度, dQ/dt 是在接受端受试药物出现的速率, A 是多聚碳酸酯膜的表面积) 求算药物的表观通透系数 (P_{app})。从表 1^[4] 可以看出被动扩散药物的口服生物利用度与表观渗透系数间具有良好的相关性。

王素军^[5] 等首次采用 LC-MS 法对槐果碱 (sophocarpine, SC) 在 Caco-2 细胞上的转运特征进行研究,发现 SC 从 BL→AP 方向与 AP→BL 方向的通透性差别不明显,平均表观通透系数 $P_{app} = 3.159 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 且受温度影响不明显,因此 SC 的转运表现为被动扩散。

表 1 被动扩散药物的口服生物利用度与表观渗透系数间的相关性

Table 1 Relationship between apparent permeability coefficients (P_{app}) and bioavailability

生物利用度 / %	表观渗透系数 / ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
100	$> 1 \times 10^{-5}$
1 ~ 100	$0.1 \times 10^{-5} \sim 0.1 \times 10^{-6}$
< 1	$< 1 \times 10^{-7}$

该细胞系中不仅含有人体小肠细胞刷状缘中的各种肠道代谢酶,而且部分主动运载体在 Caco-2 细胞中有表达,因此该模型与人体的吸收环境很接近,被认为是目前最好的体外吸收模型。美中不足的是该模型缺少了肠

壁的黏液层,而黏液层是小肠吸收的主要屏障之一,使得 Caco-2 细胞的屏障特性与小肠上皮细胞有一定的差异。

2.2 HT29 细胞模型 HT29 细胞系 (the human colonic adenocarcinoma cell line) 与 Caco-2 细胞一样来源于人结肠腺癌细胞,能高水平表达肠道营养物质的转运蛋白。置于含 10% FBS 的 McCoy's 5a 培养基中培养 (37 °C、 $\rho = 5\% \text{CO}_2$)。Maresca 等^[6] 用 HT29 细胞模型研究发现:不同浓度的脱氧瓜蒌镰菌醇 (deoxynivalenol, DON) 能有选择性的调节肠道转运蛋白的活性,从而影响各种营养素 (如:糖、氨基酸和脂类) 的吸收。与 Caco-2 细胞不同的是,HT29-H 和 HT29-MTX 细胞可以通过分泌黏液来模拟小肠的黏液层。但该细胞生长很缓慢且不能获得理想的模型评价指标 (如单层细胞跨膜电阻值、甘露醇被动扩散的跨膜通量),因此为了更好地模拟人小肠环境,研究者通常将 Caco-2 和 HT29-H (或 HT29-MTX) 共同培养^[7]。

2.3 T84 细胞模型 T84 细胞系 (transplantable human colonic carcinoma cell line) 来源于人结肠癌细胞。用含 5% FBS 的 DMEM/F12 (DMEM 和 F12 的体积比为 1:1) 混合培养基培养 (37 °C、5% CO_2) ,10 ~ 15 d 以后能在可渗透的支撑膜上形成单层细胞^[8]。T84 除了能像 Caco-2 那样本身就能表达 P-gp 以外,还能表达 PXR (pregnane X receptor, 孕甾烷受体)。有学者^[9] 发现与地高辛预孵育 72 h 后的 T84 细胞能大大提高 MDR1 的表达水平,从而降低地高辛的生物利用度;而 T84 细胞与利福平预孵育 72 h 后利福平可通过激活 PXR 来诱导 MDR1 在 T84 细胞内的表达,因此这 2 种药物增加细胞内 P-gp 的机制是不一样的。

2.4 MDCK 细胞模型 MDCK 细胞系 (Madin-Darby canine kidney cell line) 来源于马丁达比犬肾上皮细胞。用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养 (37 °C、5% CO_2) ,该细胞系最突出的特点就是能在很短时间内 (3 d) 形成与肾远曲小管相似的带微绒毛的极性单层细胞,且 MDCK 细胞电阻值比 Caco-2 细胞要低,更接近人小肠的电阻。将人的 MDR1 (multidrug resistance 1) 基因转染到 MDCK 细胞中,可建立一个能大量表达 P-gp 的 MDCK-MDR1 细胞系^[10] ,采用双向转运实验法考察药物是否为 P-gp 的底物或抑制剂,这在药物的前期研发过程中具有重要的意义。de Souza 等^[11] 就采用该方法利用 MDCK、MDCK-MDR1 和 Caco-2 3 种细胞模型研究发现虽然拉米夫定和齐多夫定都是 P-gp 的底物,但 P-gp 并不影响二者的跨膜转运,且 MDCK 细胞和 Caco-2 细胞的渗透性具有良好的相关性。

2.5 LLC-PK1 细胞模型 LLC-PK1 细胞系 (the porcine kidney epithelial cell line) 来源于猪的近端肾小管上皮细胞。用含 3% FBS 的 Medium 199 培养基中培养 (37 °C、5% CO_2) ,约 1 周后可以生长成为带微绒毛的紧密连接的高极化的单层细胞。与 MDCK 细胞模型相似,LLC-PK1 细胞表达的 P-gp 少,故将人的 MDR1 基因地转染到 LLC-PK1 细胞中亦可建立一个大量表达 P-gp 的细胞系 LLC-PK1/MDR1。Hoffmann^[12] 等用 LLC-PK1/MDR1 细胞模型进行

奥司他韦 (oseltamivir, OS) 的跨膜转运实验, 证明了其转运是可以饱和的, OS 为 P-gp 的底物致使只有少量的 OS 及其活性代谢产物能跨过血脑屏障进入到中枢神经系统。

3 动物实验模型

口服药物吸收的动物实验模型法主要包括在体法、离体法和体内法 3 种。

3.1 在体法 (*in situ*)

3.1.1 肠道单向灌流法 (unidirectional perfusion) 将麻醉的大鼠开腹, 对需要考察的部位两端插管后结扎, 用生理盐水将肠道内容物冲洗干净。用缓冲液平衡系统 5 min 后灌入药物溶液再平衡 5 min, 于不同的时间段从灌流液中取样计算表观渗透系数。由于在实验过程中水分的吸收会影响灌流液体积, 因此用一种几乎不被吸收的标示物 (如酚红) 来标示灌流液体积的变化。曹玲等^[13] 采用在体单向灌流模型研究了维胺酯的大鼠小肠吸收动力学, 证明维胺酯在大鼠各肠段均有吸收, 并且按十二指肠、空肠、回肠、结肠顺序依次下降。其在肠道的吸收呈现一级吸收动力学, 吸收机制为被动扩散。在体单向灌流相对于下文提到的循环灌流, 是采用较低流速, 在较短时间内进行的, 这样不仅可以减少灌流导致的肠黏膜损伤, 还可以防止在实验过程中药物的化学降解。

3.1.2 肠道循环灌流 (circulatory perfusion) 按 3.1.1 的方法插管并冲净内容物后, 将插管与蠕动泵的胶管相连, 形成回路并开动蠕动泵。于不同时间段取样测定药物和标示物的质量浓度并补加相同体积的空白循环液, 根据标示物质量浓度计算供试液体积, 根据每一时间段药物质量浓度和供试液体积的变化计算肠循环液中的药物剩余量。王素军等^[14] 利用该模型研究了氧化苦参碱 (oxymatrine, OMT) 的吸收动力学特征, 表明药物的吸收无浓度饱和现象且呈现一级动力学特征, 转运机制为被动扩散, 该药在小肠吸收良好且吸收窗比较长, 适于制备缓释给药系统。

3.1.3 肠血管灌流 (vascularly perfused intestine) 在肠道灌流的基础上, 插管于对一段肠管供血的肠系膜血管, 或者插管于对整段小肠供血的肠系膜上动脉和肝门静脉, 形成肠血管灌流模型。Andlauer 等^[15] 利用这一模型研究了白藜芦醇 (resveratrol) 的吸收和代谢, 实验结果显示白藜芦醇在肠道有良好吸收, 被吸收的白藜芦醇大量地代谢转化为白藜芦醇葡萄糖醛酸苷, 证明了该灌流模型可以作为评价药物肠道吸收和代谢的有效工具。该方法基于血中药物的增加来计算药物被吸收到血管的量, 而不是像肠灌流那样基于灌流肠管中药物的损失来计算药物的吸收, 所以更能真实反映药物在小肠吸收的情况。

3.1.4 肠肝血管灌流 (vascularly perfused intestine-liver preparation) 上肠系膜动脉以及肝静脉插管进行循环灌流, 胆管插管引流胆汁, 幽门静脉插管作为取样用 LC-MS 分析样品。Hirayama 等^[16] 研究表明: 该模型和肠道血管

灌流模型标本可在 2 h 内仍具活性并保持稳定, 但其主要缺点在于缺乏激素和神经控制, 导致大量水分涌入肠腔。王素军等^[17] 在肠肝灌流模型的基础上优化了灌流条件: 在灌流液中加入适量的牛血清蛋白和右旋糖酐, 能在维持一定的胶体渗透压以防止脏器水肿的同时防止过多泡沫的产生; 加入一定量的地塞米松和肾上腺素, 克服肠模型因缺乏神经、激素调节而导致肠分泌过度和蠕动剧烈的现象。

该模型具有封闭性, 避免了药物向全身分布与排泄, 使受试药物的浓度约为相同条件下口服的上百甚至上千倍, 因此受试药物需药剂量小。此方法可用于研究代谢产物的形成, 研究药物及其代谢产物的肝肠循环, 评价药物吸收和肝首过作用, 具有良好的应用前景和潜力。

3.2 离体法 (*in vitro*)

3.2.1 分离肠黏膜法 (isolated mucosa) 大鼠麻醉状态下开腹, 在肠腔内插管, 用生理盐水冲洗肠内容物, 取出肠管置于 pH 为 7.4 的 Krebs-Henseleit 的缓冲液中, 套在直径约为 0.3~0.5 cm 的玻璃棒上, 用解剖刀小心地刮掉上皮下层组织, 制得分离肠黏膜并将其固定于扩散池上, 用于测定药物透过上皮细胞的情况。该方法干扰因素少、快速准确、精度高, 适于进行吸收机理的研究。但黏膜的分离操作较困难, 而且刮离过程中容易使黏膜被破坏^[18]。

3.2.2 外翻囊法 (everted gut sac) 麻醉动物, 分离出小肠段并去掉肠系膜, 用生理盐水或缓冲液冲洗干净, 然后根据实验目的将所需肠段分割为若干小段, 外翻使肠黏膜向外, 结扎一端后灌注人工培养液再结扎另一端形成囊状, 置于含药培养液中培养, 根据囊内、外被测药物随时间的变化量来反映肠道对物质吸收状况^[19]。董宇等^[20] 利用肠外翻囊模型研究小檗碱和巴马汀的体外肠吸收特征, 表明了二者在大鼠不同肠段均为线性吸收, 符合零级吸收速率, 吸收形式可能为被动吸收。离体肠的生物有效性及完整性是该方法受限制的主要原因, 肠道离体后破坏了试验器官的真实存在环境。

3.2.3 肠襻法 (intestinal loops) 动物麻醉, 开腹结扎肠腔, 将含药人工肠液注入肠襻, 一定时间吸收后取出肠襻, 收集肠腔内肠液测定药物剩余量。该法操作简单, 但由于肠腔内容物存在, 分析样品处理较复杂。

3.2.4 组织流动室法 (tissue flux chambers) 将离体肠段剪成一定面积的小肠块置于装有缓冲液的扩散池中。药物从供应室加入, 在接收室取样测量药物不同时间的累积量。通常向黏膜及浆膜缓冲液中加入谷酰胺或葡萄糖等作为能量源, 使组织具有最大可能的存活能力^[21]。该方法可以测定黏膜到浆膜或浆膜到黏膜的药物流量, 预测药物的转运方式是以载体介导的主动转运还是被动扩散, 还可研究细胞旁路转运对药物吸收的影响。但上段肠道的细胞旁路途径较下段多, 使得肠道区段不同, 药物的吸收也就会不同, 同时血流供应的不足也会给细胞的旁路转运带来影响。

3.2.5 体系法(Ussing chamber) Ussing chamber 装置由灌流室和电路系统以及其他的配套系统组成。向灌流室中的管道系统通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体,体系恒温在 37 ℃。从动物体内取出所需研究的肠段沿肠系膜层剪开, Ringer 溶液清洗后用玻片除去肌肉层,分成小段置于 Ussing chamber 体系上,将药液加入释放池,在接受池中补充等量的 Ringer 溶液。定时、定量地从接受池中取样来测定受试药物的含量,从而进行药物肠通透性的研究。林玉莲等^[22]用该模型研究 Labrasol 对肠 P-gp 底物若丹明 123 转运的影响。同时考察了非 P-gp 底物荧光黄在 Labrasol 作用下的转运行为。结果显示低浓度的 Labrasol 能够抑制回肠与结肠中 P-gp 的功能,对荧光黄的转运无显著影响。表明 Labrasol 有望作为 P-gp 抑制剂改善受 P-gp 介导的药物的吸收,提高口服药物的生物利用度。

3.3 体内法(*in vivo*)

体内法是指口服药物后采用色谱法、分光光度法等测定体内药量(或血药浓度)及尿中原形药物排泄总量,通过求算一系列药动学参数来评价药物的吸收速度和程度。除此之外还有目前正越来越广泛地应用于生物技术药物的吸收研究的同位素示踪法(isotopic tracer method),它是指以放射性同位素作为示踪剂将其标记在药物分子上,使药物有别于内源性物质。通过 HPLC 分离出原型药物,再用相应的仪器检测出原药的放射性,从而计算出药物的浓度,评价药物的吸收。

4 结语

大多数情况下使用单一的方法来研究药物的吸收是不够的,需要权衡各个方法的利弊,结合多种方法去优化评价药物吸收的模型,或者是在药物研发的不同阶段,应用不同的模型来进行筛选评价,也是完全必要和可行的。

参考文献:

- [1] KV S, DEVI G S, MATHEW S T. Liposomal formulations of serratiopeptidase: *in vitro* studies using PAMPA and Caco-2 models [J]. *Mol Pharm* 2008, 5(1): 92-97.
- [2] BEIGI F, YANG Q, LUNDAHL P. Immobilized-liposome chromatographic analysis of drug partitioning into lipid bilayers [J]. *J Chromatogr A* 1995, 704(2): 315-321.
- [3] SHIN BS, YOON CH, BALTHASAR JP *et al.* Prediction of drug bioavailability in humans using immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography and *in vitro* hepatic metabolic clearance [J]. *Biomed Chromatogr* 2009, 23(7): 764-769.
- [4] 关溯. Caco-2 细胞模型——药物吸收研究的有效“工具” [J]. *中国药理学通报* 2004, 20(6): 609-614.
- [5] 王素军, 王广基, 李晓天, 等. LC-MS 法测定槐果碱及其在 Caco-2 细胞上的转运特征 [J]. *中国中药杂志* 2007, 32(1): 57-60.
- [6] MARESCA M, MAHFOUD R, GARMY N, *et al.* The Mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells [J]. *J Nutr* 2002, 132(9): 2723-2731.
- [7] HIDALGO I J. Assessing the absorption of new pharmaceuticals [J]. *Curr Top Med Chem* 2001, 1(5): 385-401.
- [8] KEELY S J, SCHARL M M, BERTELSEN L S *et al.* Bile acid-induced secretion in polarized monolayers of T84 colonic epithelial cells: Structure-activity relationships [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 292(1): G290-G297.
- [9] HASLAM I S, JONES K, COLEMAN T, *et al.* Rifampin and digoxin induction of MDR1 expression and function in human intestinal (T84) epithelial cells [J]. *Br J Pharmacol* 2008, 154(1): 246-255.
- [10] 刘瑶, 曾苏. MDCK-MDR1 细胞模型及其在药物透过研究中的应用进展 [J]. *药理学学报* 2008, 43(6): 559-564.
- [11] de SOUZA J, BENET L Z, HUANG Y, *et al.* Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers [J]. *J Pharm Sci* 2009, 98(11): 4413-4419.
- [12] HOFFMANN, FUNK C, FOWLER S, *et al.* Nonclinical Pharmacokinetics of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in the central nervous system [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(11): 4753-4761.
- [13] 曹玲, 刘文英, 马鹏程, 等. 在体单向肠灌流模型研究维胺酯的大鼠肠吸收特性 [J]. *中国临床药理学与治疗学* 2005, 10(12): 1326-1329.
- [14] 王素军, 王广基, 李晓天, 等. 氧化苦参碱大鼠肠道吸收机理及吸收部位的研究 [J]. *中国中药杂志* 2007, 32(1): 57-60.
- [15] ANDLAUER W, KOLB J, SIEBERT K, *et al.* Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat [J]. *Drugs Exp Clin Res* 2000, 26(2): 47-55.
- [16] HIRAYAMA H, XU X, PANG K S. Viability of the vascularly perfused, recirculating rat intestine and intestine-liver preparations [J]. *Am J Physiol*, 1989, 257(2Pt1): G249-G258.
- [17] 王素军, 张志伟, 赵艳红, 等. 建立大鼠原位肠-肝灌流模型评价绿原酸的代谢 [J]. *中国临床药理学与治疗学* 2006, 11(12): 1340-1344.
- [18] 梁桂贤, 刘谦民. 药物肠吸收研究方法近况 [J]. *国外医药: 合成药·生化药·制剂分册* 1998, 19(4): 251-252.
- [19] 李高, 方超. 药物肠道吸收的生物学研究方法 [J]. *中国药理学杂志* 2002, 37(10).
- [20] 董宇, 张英丰, 杨庆. 黄连提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收研究 [J]. *中国中药杂志* 2008, 33(9): 755-758.
- [21] 单进军, 狄留庆, 吴皓. 口服吸收模型在中药研究中的应用进展 [J]. *南京中医药大学学报* 2007, 23(4): 270-272.
- [22] 林玉莲, 蒋学华, 杨俊毅. Labrasol 对肠 P-糖蛋白功能的影响 [J]. *华西药理学杂志* 2005, 20(2): 139-142.

(责任编辑: 王昌栋)