

## 5-氨基水杨酸在 Caco-2、L-MDR1 和 MRP2 细胞中的转运研究

辛华雯, Matthias Schwab<sup>1</sup>, Ulrich Klotz<sup>1</sup>

广州军区武汉总医院临床药理科, 武汉 430070, 湖北;

<sup>1</sup>Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart 70376, Germany

**摘要** 目的: 研究 5-氨基水杨酸(5-ASA)的跨膜转运是否涉及 P-糖蛋白和多药耐药蛋白(MRP2)。方法: 以 Caco-2、L-MDR1、MRP2 等三种细胞为模型, 测定 5-ASA 跨膜转运的转运率和表观渗透常数。此外还研究了 5-ASA 对地高辛在 Caco-2 细胞转运的影响。结果: 在 Caco-2、L-MDR1 和 MRP2 细胞, 5、50、500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  5-ASA 从底端(B)→顶端(A)方向和 A→B 方向的转运率和表观渗透系数( $P_{\text{app}}$ )均无统计学差异( $P > 0.05$ )。在 Caco-2 细胞, 与未用 5-ASA 组相比, 各浓度 5-ASA 组(50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ~ 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对地高辛的  $P_{\text{app}}$  和 B→A 方向的净转运率无明显影响( $P > 0.05$ )。结论: 5-ASA 可能不是 P-糖蛋白和 MRP2 的底物, 也不能提示 5-ASA 是 P-糖蛋白的抑制剂或诱导剂。

**关键词** 5-氨基水杨酸; 肠道转运; P-糖蛋白; 细胞株

中图分类号: R965.2; R966

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2006)11-1265-05

5-氨基水杨酸(5-ASA)是治疗慢性炎症性肠病(chronic inflammatory bowel disease, IBD)的首选药物<sup>[1-3]</sup>。现已认定<sup>[1,2]</sup>, 5-ASA 主要作用于炎性肠壁的局部, 因而在治疗过程中必须在肠粘膜局部达到有效药物浓度, 同时全身的吸收应控制在一定范围, 以降低产生不良反应的可能性。在早期的临床研究中, Goebell 等人发现吸收的 5-ASA 及其代谢产物乙

酰-5-ASA 可部分重新分泌至肠腔<sup>[4,5]</sup>。因此, 可能存在从肠上皮细胞底端至顶端的主动转运机制, 从而完成上述药物的泵出。为了弄清 5-ASA 在肠道的转运机制, 本研究以 Caco-2、L-MDR1、MRP2 等三种细胞为药物转运模型, 对 5-ASA 的跨膜转运进行了体外研究。

## 1 材料和方法

**1.1 药品与试剂** [<sup>3</sup>H] 5-ASA(26.3 Ci·mmol<sup>-1</sup>)购自美国 Vitrox 公司; [<sup>3</sup>H] 地高辛(19 Ci·mmol<sup>-1</sup>)和 [<sup>3</sup>H] 菊粉(298 mCi·g<sup>-1</sup>)为美国 NEN Life Science 公司产品; 未标记 5-ASA 和地高辛购自 Sigma 公司(Taufkirchen, Germany)。

**1.2 细胞培养** 人结肠癌细胞株 Caco-2 购自美国典型培养物保藏中心。Caco-2 细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境中培养。培养液为高糖 DMEM(美国 GIBCO 公司), 内含 10% 胎牛血清、2 mmol·L<sup>-1</sup> 谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸、1% 丙酮酸钠、100 U·ml<sup>-1</sup> 青霉素、100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  链霉素。L-MDR1 细胞由荷兰癌症研究所 Schinkel 博士赠送。L-MDR1 细胞是 LLC-PK1 细胞(猪肾上皮细胞)稳定转染人 MDR1 cDNA 所得。L-MDR1 细胞生长在 Medium 199(美国 GIBCO 公司)培养液中, 内含 10% 胎牛血清, 640 mmol·L<sup>-1</sup> 长春新碱, 100 U·ml<sup>-1</sup> 青霉素, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  链霉素。MRP2 细胞株是表达人 cMOAT(multispecific organic anion transporter)(MRP2) cDNA 的 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney)细胞(犬肾上皮细胞), 由荷兰癌症研究所 Evers 博士赠送。MRP2 细胞用 DMEM 培养基培养, 内含 10% 胎牛血清、100 U·ml<sup>-1</sup> 青霉素、100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  链霉素。

**1.3 药物转运研究**<sup>[6]</sup> Caco-2 细胞(18—32 代)以  $2 \times 10^5$  个/皿种植在孔径 0.4  $\mu\text{m}$ 、直径 12 mm 的多聚碳酸酯膜上(Transwell<sup>TM</sup>, 美国 Costar 公司); L-

2006-04-03 收稿 2006-05-12 修回

德国 Robert Bosch 基金资助项目

辛华雯, 女, 医学博士, 副主任医师, 主要从事临床药理学研究。

Tel: 027-68878690 E-mail: hwxin@public.wh.hb.cn

MDR1 细胞(23—30代)和 MRP2 细胞(10—20代)以  $4 \times 10^5$  个/皿种植在孔径  $3.0 \mu\text{m}$ 、直径 12 mm 的多聚碳酸酯膜上(Transwell™, 美国 Costar 公司)。Caco-2 和 L-MDR1 细胞在种植后 9~12 d、MRP2 在 d 3 用于药物转运研究。在药物转运实验前 1 h, 以无血清培养基 Optimen(美国 GIBCO 公司)替换原培养液, 测定跨膜电阻, 电阻经空白校正后  $> 200 \Omega$  的细胞才能用于正式实验。去掉每皿中的培养基, 在细胞单层的底端(B 侧)或顶端(A 侧)一侧加入以 Optimen  $800 \mu\text{l}$  稀释的  $[^3\text{H}]$  5-ASA ( $500, 50, 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 另一侧加入  $800 \mu\text{l}$  Optimen。分别在 1、2、3、4 h 从 A 侧或 B 侧取  $25 \mu\text{l}$  样品测定放射性活性。药物转运用加入放射性活性的百分比表示。4 h 时从 B 侧至 A 侧的净转运率等于 A 侧至 B 侧的转运率减去从 B 侧至 A 侧的转运率。表观渗透系数( $P_{\text{app}}$ )用下式计算<sup>[7]</sup>:

$$(P_{\text{app}}) = dQ/dt \cdot 1/(A \cdot C_0) [\text{cm} / \text{s}]$$

$dQ/dt (\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1})$  指转运率,  $C_0 (\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3})$  指药物在供侧的初始浓度,  $A (\text{cm}^2)$  指单层细胞的表面积。所有实验均至少做 3 次。

1.4 药物转运抑制实验 以  $[^3\text{H}]$  地高辛 ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为 P-糖蛋白底物来评价 5-ASA 是否是 P-糖蛋白抑制剂。细胞株采用 Caco-2 细胞, 不同浓度 5-ASA ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 需加至 A、B

两侧, 基本实验方法同前。

$[^3\text{H}]$  菊粉用于细胞单层在高药物浓度下完整性的测定。当 5-ASA 作为底物和作为抑制剂时, 测定其最高浓度时  $[^3\text{H}]$  菊粉的转运率, 此转运率小于  $2\% / \text{h}$  表示细胞单层完整<sup>[8]</sup>。

1.5 药物测定  $25 \mu\text{l}$  含  $[^3\text{H}]$  5-ASA 或  $[^3\text{H}]$  地高辛的样品采用液体闪烁计数器(Beckman LS1800, Germany)测定。

1.6 统计分析 实验数据均以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。统计分析采用美国 Graph Pad 软件。同一浓度下不同方向的  $P_{\text{app}}$  的差异采用配对  $t$  检验, 不同浓度间  $P_{\text{app}}$  的差异采用方差分析。

2 结果

2.1 5-ASA 的跨膜转运研究 在 Caco-2 和 L-MDR1 细胞,  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  5-ASA 从 B→A 方向的转运率稍高于 A→B 方向, 但无统计学差异。当 5-ASA 浓度为 50 和  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 两个方向的转运率亦无统计学差异 ( $P > 0.05$ , 图 1)。在 MRP2 细胞, 各浓度 5-ASA 在 B→A 方向和 A→B 方向的转运率亦无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 图 1)。此外, 在上述三种细胞中, 5-ASA B→A 方向和 A→B 方向的  $P_{\text{app}}$  均无统计学差异(表 1)。

表 1 5-氨基水杨酸(5-ASA)在 Caco-2、L-MDR1 和 MRP2 细胞中的表观渗透系数( $P_{\text{app}}$ ) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3, \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \times 10^{-6}$ )

5-ASA $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Caco-2 细胞中的 $P_{\text{app}}$		L-MDR1 细胞中的 $P_{\text{app}}$		MRP2 细胞中的 $P_{\text{app}}$	
	B→A 方向	A→B 方向	B→A 方向	A→B 方向	B→A 方向	A→B 方向
500	$7.0 \pm 0.3$	$5.8 \pm 0.6$	$6.6 \pm 0.6$	$7.1 \pm 1.0$	$8.2 \pm 1.4$	$8.3 \pm 0.9$
50	$7.1 \pm 0.2$	$6.8 \pm 0.6$	$8.0 \pm 2.0$	$6.0 \pm 0.5$	$7.7 \pm 1.2$	$8.2 \pm 1.3$
5	$8.0 \pm 0.8$	$6.1 \pm 1.2$	$9.8 \pm 3.6$	$7.1 \pm 1.9$	$8.5 \pm 1.4$	$8.1 \pm 1.1$

2.2 5-ASA 对地高辛跨膜转运的影响 在 Caco-2 细胞, 与未用 5-ASA 组相比, 各浓度 5-ASA 组对地高辛的  $P_{\text{app}}$  和 B→A 方向的净转运率无明显影响, 即便

在高浓度 2 和  $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时亦如此 ( $P > 0.05$ , 表 2, 图 2)。

表 2 5-氨基水杨酸(5-ASA)对地高辛在 Caco-2 细胞的表观渗透系数( $P_{\text{app}}$ )及 4 h B→A 方向净转运率的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

5-ASA $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	净转运率 $/\%$ B→A 方向	$P_{\text{app}} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \times 10^{-6}$	
		B→A 方向	A→B 方向
对照组	$25.4 \pm 1.4$	$14.1 \pm 1.0$	$1.5 \pm 0.4$
50	$24.8 \pm 5.0$	$13.4 \pm 2.6$	$1.8 \pm 0.5$
200	$24.8 \pm 3.1$	$13.6 \pm 1.7$	$1.9 \pm 0.1$
500	$24.6 \pm 2.0$	$14.0 \pm 0.8$	$1.3 \pm 0.5$
2000	$20.9 \pm 3.6$	$12.2 \pm 2.1$	$1.8 \pm 0.3$
5000	$18.8 \pm 0.8$	$12.0 \pm 1.1$	$2.7 \pm 1.2$

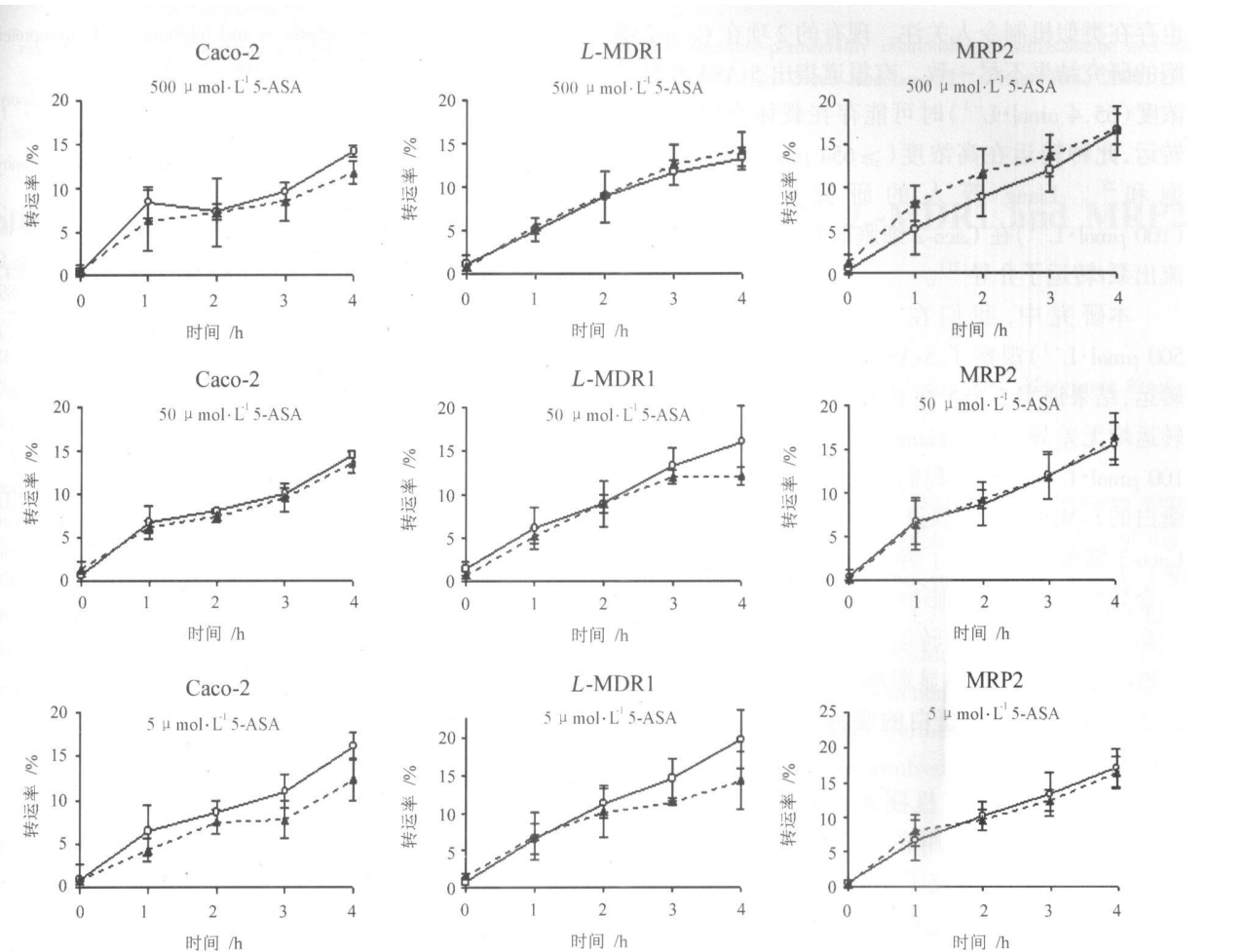


图1 5-氨基水杨酸(5-ASA)在 Caco-2, L-MDR-1 和 MRP2 细胞的跨膜转运(○: B→A 方向, ▲: A→B 方向)( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

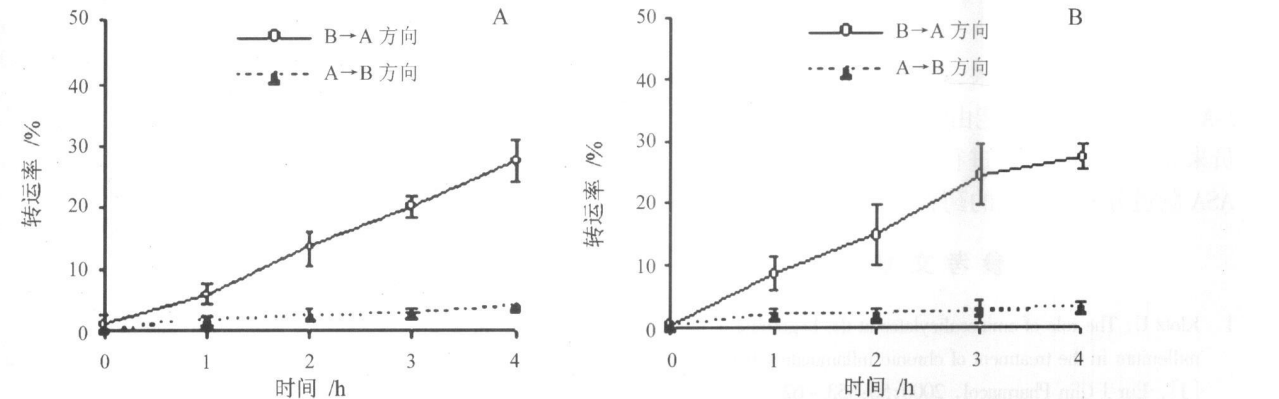


图2 5-氨基水杨酸(5-ASA)对地高辛( $5 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )在 Caco-2 细胞跨膜转运的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

A: 加  $200 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  5-ASA; B: 未加 5-ASA

3 讨论

5-ASA 口服或直肠给药后, 主要被小肠和大肠的上皮细胞吸收。三项临床研究表明, 5-ASA 的局部浓度决定着药物的临床反应<sup>[9-11]</sup>。不少研究表明, 很多药物的吸收和口服生物利用度在很大程度上受肠上皮细胞药物代谢酶和药物泵出转运子的影

响<sup>[12, 13]</sup>。至于 5-ASA, 其经 NAT1 (N-乙酰化转移酶 1) 介导的肠代谢已得到证实<sup>[14]</sup>。

由于 Caco-2 高表达 P-糖蛋白, 故其广泛用于研究药物的转运和泵出<sup>[6, 15]</sup>。不同的 IBD 患者其肠道 P-糖蛋白的表达水平可能不同<sup>[16]</sup>。这可以影响一些 P-糖蛋白底物如糖皮质激素(可的松、布地奈德、强的松)和环孢素等的治疗效果<sup>[17-19]</sup>。5-ASA 是否

也存在类似机制令人关注。现有的 2 项在 Caco-2 细胞的研究结果不尽一致。有报道指出 5-ASA 在较低浓度 ( $65.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时可能存在载体介导的跨膜转运, 此种转运在高浓度 ( $\geq 654 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时达到饱和<sup>[20]</sup>。Liang 等人的研究则提示 5-ASA ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 在 Caco-2 细胞的转运并无某些药物流出泵/转运子介导<sup>[21]</sup>。

本研究中, 我们在一定的浓度范围 ( $5 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 观察了 5-ASA 在 Caco-2 细胞的跨膜转运, 结果证实 5-ASA 在 B→A 方向和 A→B 方向的转运均无差异, 这和 Liang 等人的研究结果 (5-ASA  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 一致。我们应用另一高表达人 P-糖蛋白的 L-MDR1 细胞株进行了进一步研究, 结果与 Caco-2 细胞一致。为了弄清 5-ASA 是否对 P-糖蛋白介导的药物转运有影响, 本文还研究了 5-ASA 对地高辛在 Caco-2 细胞转运的影响, 结果显示 5-ASA 对地高辛的转运无明显影响。从以上结果可以看出, 5-ASA 不是 P-糖蛋白的底物, 也不是 P-糖蛋白的抑制剂或诱导剂。

Suzuki 等报道有机阴离子的肠道分泌可由 MRP2 完成, 为此我们用表达 cMOAT(MRP2) 的 MDCK 细胞作为模型, 研究了 5-ASA 在此系统是否是一底物。从测试的浓度范围 ( $5 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 来看, 5-ASA 在 B→A 方向和 A→B 方向的转运率和表现渗透系数差异无统计学意义, 这表明 5-ASA 并非 MRP2 的底物。

从本文的研究结果, 我们推测, 在体内观察到的 5-ASA 的肠道分泌可能由药物泵出转运子的其它成员来介导, 因此, 需要进行更深入的研究, 以确定 5-ASA 肠道分泌所涉及的药物转运系统。

## 参考文献

- Klotz U. The role of aminosaliclates at the beginning of the new millenium in the treatment of chronic inflammatory bowel disease [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000; 56: 353—62
- Sandbom WJ. Rational selection of oral 5-aminosalicylate formulations and prodrugs for the treatment of ulcerative colitis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2002; 97: 2939—41
- Hanauer SB. Medical therapy for ulcerative colitis 2004 [J]. *Gastroenterology*, 2004; 126: 1582—92
- Goebell H, Klotz U, Nehlsen B, Leyer P. Oroileal transit of slow release 5-aminosalicylic acid [J]. *Gut*, 1993; 34: 669—75
- Leyer PH, Goebell H, Keller J, Dignass A, Klotz U. Delivery and fate of oral mesalamine microgranules within the human small intestine [J]. *Gastroenterology*, 1995; 108: 1427—33
- Pauli-Magnus C, von Richter O, Burk O, Ziegler A, Mettang T, Eichelbaum M, *et al.* Characterization of the major metabo-

- lites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000; 293: 376—82
- 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; 29: 880—5
- Hidalgo JJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability [J]. *Gastroenterology*, 1989; 96: 736—49
- Frieri G, Pimpo MT, Andreoli A, Annesse V, Comberlato M, Corrao G, *et al.* Prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease requires adequate mucosal concentrations of mesalazine [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999; 13: 557—82
- Frieri G, Giacomelli G, Pimpo M, Palumbo G, Passacantando A, Pantaleoni G, *et al.* Mucosal 5-aminosalicylic acid concentrations inversely correlate with severity of colonic inflammation in patients with ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2000; 47: 410—4
- Naganuma M, Iwao Y, Ogata H, Inoue N, Funakoshi S, Yamamoto S, *et al.* Measurement of colonic mucosal concentrations of 5-aminosalicylic acid is useful for estimating its therapeutic efficacy in distal ulcerative colitis: comparison of orally administered mesalamine and sulfasalazine [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2001; 7: 221—5
- Hunter J, Hirst BH. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 1997; 25: 129—57
- Suzuki H, Sugiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000; 12: 3—12
- Allgayer H, Ahnfelt NO, Knus W, Klotz U, Frank-Holmberg K, Söderberg HNA, *et al.* Colonic N-acetylation of 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 1989; 97: 38—41
- Bhardwaj RK, Glaeser H, Becquemont L, Klotz U, Gupta SK, Fromm MF. Piperine, a major constituent of black pepper inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 302: 645—50
- Yacyszyn B, Maksymowicz W, Bowen-Yacyszyn MB. Differences in P-glycoprotein-170 expression and activity between Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. *Human Immunol*, 1999; 60: 677—87
- Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Chenkun A, O'Toole D. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy [J]. *Gastroenterology*, 2000; 118: 279—88
- Farrell RJ, Menconi MJ, Keates AC, Kelly CP. P-glycoprotein-170 inhibition significantly reduces cortisol and ciclosporin efflux from human intestinal epithelial cells and T lymphocytes [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002; 16: 1021—31
- Dilger K, Schwab M, Fromm MF. Identification of budesonide and prednisone as substrates of the intestinal drug efflux pump P-glycoprotein [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2004; 10: 578—83
- Zhou SY, Fleisher D, Pao LH, Li C, Winward B, Zimmer-

mann EM. Intestinal metabolism and transport of 5-aminosalicylate[ J] . Drug Metab Disp, 1999; 27: 479—85

21 Liang E, Proudfoot J, Yazdanian M. Mechanisms of transport

and structure-permeability relationship of sulfasalazine and its analogs in Caco-2 cell monolayer[ J] . Pharm Res, 2000; 17: 1168—74

## Study on transport of 5-aminosalicylate in Caco-2, L-MDR1 and MRP2 cell monolayers

XIN Hua-wen, Schwab Matthias<sup>1</sup>, Klotz Ulrich<sup>1</sup>

Department of Clinical Pharmacology, Wuhan General Hospital, Wuhan 430070, Hubei, China; <sup>1</sup>Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart 70376, Germany

**ABSTRACT** **AIM:** To investigate whether *P*-glycoprotein and MRP2 are involved in transport of 5-aminosalicylate (5-ASA). **METHODS:** Permeability coefficients and transport rates of 5-ASA across Caco-2, L-MDR1 and MRP2 monolayers were measured. Trans epithelial transport of digoxin across Caco-2 monolayer with addition of 5-ASA was also studied. **RESULTS:** No differences of permeability coefficients and transport rates of 5-ASA at 5, 50 and 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  between basal-to-apical and apical-to-basal direction were measurable across Caco-2, L-MDR1 and MRP2 monolayers ( $P > 0.05$ ). Compared

with control experiments, no significant differences were observed in basal-to-apical net transport and  $P_{\text{app}}$  of digoxin ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the presence of 5-ASA ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ — $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION:** 5-ASA can not be regarded as a substrate of *P*-gp or MRP2. Inhibition or induction of *P*-glycoprotein by 5-ASA could be excluded. Further studies are needed to identify the nature of the involved active carrier system(s) in intestinal secretion of 5-ASA.

**KEY WORDS** 5-aminosalicylate; intestinal transport; *P*-glycoprotein; cell lines