

# Caco-2 细胞模型建立及其在纳米脂质体包裹胰岛素体外吸收研究中的应用

李正荣<sup>1</sup>, 王琰<sup>1</sup>, 潘飞燕<sup>1</sup>, 王文<sup>1</sup>, 郭建新<sup>2</sup>, 平其能<sup>2</sup>, 李朝军<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学江苏省分子医学生物技术重点实验室 210097, 江苏, 南京)

(2. 中国药科大学药剂教研室 21000, 江苏, 南京)

**[摘要]** 为建立 Caco-2 细胞模型, 并用于纳米脂质体包裹胰岛素的体外吸收特性研究. 通过 Caco-2 细胞培养于 Transwell 上, 培养 20 余天, 使其生长分化成单层小肠上皮样细胞, 然后以单层细胞电阻, 电镜观察小肠上皮结构的形成, 碱性磷酸酶反应测定单层细胞极性以及对葡聚糖的通透特性等指标对该模型进行评估, 并运用 Caco-2 细胞模型, 对胰岛素和纳米脂质体胰岛素进行通透特性研究. 结果表明, Caco-2 细胞形成刷状缘及紧密连接结构, 碱性磷酸酶活性集中在刷状缘侧, 单层细胞电阻达到  $300 \sim 500 \Omega/\text{cm}^2$ , 类似小肠上皮. 纳米脂质体包裹后, 胰岛素的通透量显著增加, 说明纳米脂质体包裹可提高胰岛素的通透性, 可以作为胰岛素口服用药的有效方法.

**[关键词]** 口服胰岛素, Caco-2 细胞模型, 纳米脂质体

**[中图分类号]** Q502, Q578, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2004)03-0088-04

## 0 引言

评估药物口服吸收效果的常用方法是整体动物实验. 而用细胞模型进行体外吸收特性评估可以: ①避免动物的个体差异, 体外重现性好; ②克服整体动物吸收代谢耗药量大的缺点, 尤其适于对微量样品的检测; ③检测周期较短, 可作为快速药物筛选工具; ④可以在分子水平对药物分子的吸收、代谢和转运进行研究; ⑤可以对治疗药物可能有的黏膜毒性进行评估<sup>[1, 2]</sup>.

Caco-2 细胞系来源于人结肠癌细胞, 在一定的培养条件下能自发形成有极性的、具微绒毛以及紧密连接等类似于小肠上皮细胞刷状缘侧的分化特征, 其标志酶的功能表达及通透特征也与小肠类似, 因而被大多数研究人员采用作为研究药物小肠表皮细胞转运和代谢的体外模型. Caco-2 细胞模型不仅可用于药物制剂开发前研究, 即各种药物赋形剂、吸收促进剂及药物分子结构、pH 值和其他生理生化因素对药物吸收的影响, 还可以在一定的控制条件下对药物进行高通量筛选, 以获得药物结构与吸收利用之间的相互关系的大量信息<sup>[3, 4]</sup>.

本文建立了模拟小肠上皮吸收的 Caco-2 细胞模型, 并将该细胞模型应用于纳米脂质体包裹胰岛素体外吸收特性的研究, 为筛选口服胰岛素提供了理论依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 仪器与器材

Transwell filters 为 Costar 公司出品; EVOM 皮肤伏特计为美国 World Precision Instruments, Inc 出品; 电子显微镜(H600-2), 为日立公司出品; 分光光度计(SmartSpec3000)为 BIO-RAD 公司出品; 倒置显微镜(DMIL), 荧光显微镜(DMR)为 Leica Microsystems 出品; SPOT 成相系统为 DIAGNOSTIC instruments inc 出品.

#### 1.1.2 药品与试剂

DMEM 培养液、非必须氨基酸为 Gibco 公司出品; 胰酶为 AMRESCO 公司产品, 鼠尾胶原为 Sigma 公司产品; 胎牛血清、新生牛血清为杭州四季青公司产品; 碱性磷酸酶试剂盒为南京建成生物技术公司产品; Dextran-rhodamine(MW10kD), Hoechst 33342 均为 Molecular Probes Inc 产品; 胰岛素为徐州生化制药厂出品, (批号 980102, 26 U/mg); 纳米脂质体包裹胰岛素由中国药科大学药剂教研室提供, 胰岛素放免试剂盒为北

收稿日期: 2005-05-11.

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(39930200).

作者简介: 李正荣, 1976- , 硕士, 南京凯基生物科技发展有限公司, 实验室主管, 从事核药物的研究. E-mail: lzrbio@keygentec.com.cn

— 88 — 万方数据

京北方生物技术研究所以出品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

Caco-2 细胞接种于常规培养瓶中,培养基为 DMEM,含 1% 非必须氨基酸,10% 胎牛血清,细胞培养于 CO<sub>2</sub> 培养箱中(37℃,5% CO<sub>2</sub>,相对湿度 90%)。当细胞长至覆盖瓶底的 80%~90% 时,胰酶消化,并以 6×10<sup>4</sup> 个/mL 接种于已涂有鼠尾胶原的 Transwell 的聚碳酸酯膜上(0.5mL/孔),在 Transwell 的下腔加入培养液 1.5 mL。接种 24 h 后更换培养液。接下来一周隔天换液,一周以后每天换液,培养 20 余天待用<sup>[5]</sup>。

1.2.2 单层细胞电阻测定

将 Caco-2 及 Hela 细胞以前述方法培养于 Transwell 中,用 EVOM 皮肤伏特计每天测定单层细胞电阻(trans epithelial electrical resistance,TEER)值,并将两种细胞的 TEER 值进行对比,

1.2.3 电镜观察

将 Transwell 上培养 20 余天的 Caco-2 细胞(TEER>300 Ω/cm<sup>2</sup>)进行常规电镜固定、脱水、包埋、切片、观察。

1.2.4 标志酶测定

用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AKP)试剂盒对培养于 Transwell 中的 Caco-2 细胞(TEER>300 Ω/cm<sup>2</sup>)进行 AKP 反应,刷状缘侧(AP 侧)和基底侧(BL 侧)的总反应液体积均为 1.5 mL。37℃ 孵育 30 min 后,分别从 AP 及 BL 侧取样,用分光光度计检测酶反应活力。(酶活力定义为 37℃ 时,与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。)

1.2.5 Caco-2 细胞转运葡聚糖实验

将 5 μmol/L 的 Dextran-rhodamine 与盖玻片上培养的 Caco-2 细胞孵育 60 min 后,PBS 洗去荧光标记物,细胞核用 Hoechst33342 染色 10 min,然后观察细胞内 Dextran-rhodamine 荧光情况。

1.2.6 纳米脂质体包裹胰岛素的通透性研究

取细胞生长完好的 Transwell(TEER 达到 400~500 Ω/cm<sup>2</sup>)用 PBS 小心冲洗以除去黏附在细胞表面的代谢物。在 AP 池加入胰岛素浓度为 500 μg/mL,100 μg/mL,20 μg/mL 的胰岛素(ins)或纳米脂质体包裹的胰岛素(ins-lip),在 BL 池加入无血清的 DMEM 培养液,37℃ 培养箱中孵育。分别于 15、45、60、120、150 min 从 BL 池取样 0.5 mL,并立即补加等量的无血清 DMEM 培养液于 BL 池,用放免试剂盒测定样品液中胰岛素浓度,并计算累计通透量。

2 实验结果

2.1 细胞模型的建立及鉴定

当生长在培养瓶中的细胞长满瓶底后,光镜可见随着细胞数目不断增加,细胞逐渐变小、变密,在细胞之间形成接触清晰可见的边界线(图 1)。在电子显微镜下可观察到:接种在 Transwell 上的细胞(TEER>300 Ω/cm<sup>2</sup>)已成柱状凸起状态,细胞间有紧密连接结构;AP 面微绒毛结构分化良好,而 BL 面没有微绒毛结构。刷状缘侧微绒毛、紧密连接的出现表明 Caco-2 细胞典型的不对称分布,已具有小肠上皮细胞的某些结构特征(图 2)。

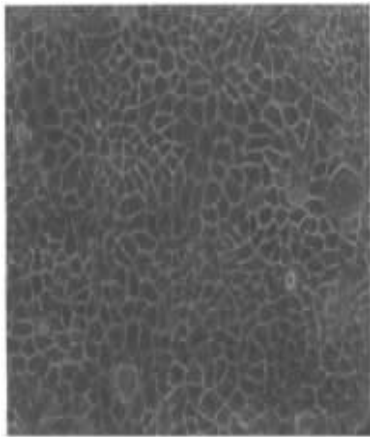


图 1 Caco-2 细胞光镜照片(细胞接种后 3 d 200×)  
万方数据



图 2 Caco-2 细胞光镜照片箭头标向细胞间紧密连接处 90 000×)

细胞接种 3 d 后,电阻值与本底相比差异不明显,16 d 后,Caco-2 细胞 TEER 值达  $400\ \Omega/\text{cm}^2$ ,甚至超过  $500\ \Omega/\text{cm}^2$ ;而 Hela 细胞 TEER 值从第 5 d 到第 20 d 呈平缓增加,且达到  $200\ \Omega/\text{cm}^2$  之后不再增加. TEER 测定结果表明,Caco-2 能形成致密的单层细胞. 而 Hela 细胞不能像 Caco-2 一样形成更加紧密的生物屏障结构(图 3).

图 4 显示 AKP 活力检测结果:在 AP 侧,AKP 活性比 BL 侧大 10 倍. 图 5A 显示 细胞内、细胞间均无荧光物质 Dextran-rhodamine. 表明 Dextran-rhodamine 不能进入细胞内,说明 Dextran-rhodamine 不能通过胞内途径透过单层细胞;细胞间无荧光,表明 Dextran-rhodamine 不能进入细胞间隙,说明 Dextran-rhodamine 也不能通过胞旁途径透过单层细胞. 图 5B 显示细胞形成致密的单层细胞的细胞核.

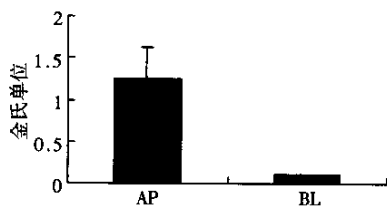
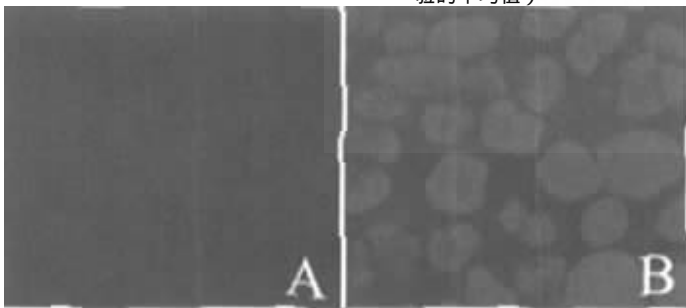


图 4 碱性磷酸酶活性



A. 罗丹明标志的葡聚糖转运 Caco-2 细胞, B. 转运的 Caco-2 细胞用 Hoechst 33342 染色  
图 5 转运后的 Caco-2 细胞荧光图(400 ×)

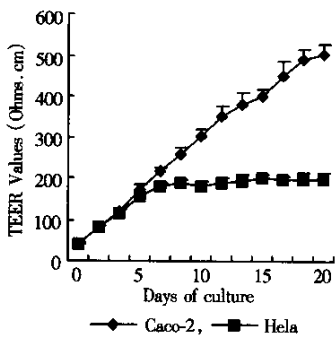


图 3 培养在 Transwell 小室中 Caco-2 和 Hela 单层细胞的电阻图(每点均为四次实验的平均值)

2.2 纳米脂质体包裹胰岛素的通透实验结果

细胞转运结果表明,通透量与浓度有相关性,浓度越大则通透量越大;此外,通透量与时间也有相关性,随时间推移,通透量增加. 相同的胰岛素浓度下,纳米脂质体包裹后,通透量显著提高. 提示纳米脂质体包裹后可以大大提高口服药物的吸收. 低浓度下,不同的浓度间和不同组间,通透量差异不显著(图 5).

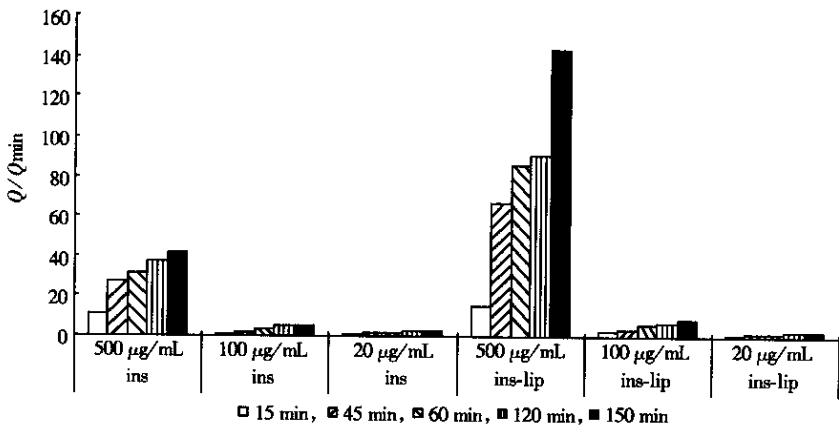


图 6 Caco-2 单层细胞转运后胰岛素的累积通透量

3 讨论

本实验光镜、电镜显示:Caco-2 细胞可形成致密的单层细胞,并且有类似小肠上皮样的紧密连接和微绒毛结构. 与物质运输相关的 AKP 也与小肠上皮一致,分布在微绒毛侧. TEER 值检测达  $300\sim500\ \Omega/\text{cm}^2$ ,这些都与文献报道一致. Dextran-Rhodamine(相对分子质量 10 000)不能通过 Caco-2 细胞层,说明 Caco-2 细胞层非常致密,有类似小肠上皮的屏障作用. 药物可通过细胞膜上载体作用或内吞作用被 Caco-2 细胞层吸收<sup>[348]</sup>.

胰岛素是目前治疗糖尿病的主要药物之一,而口服是较方便的给药途径. 但由于胰岛素在胃肠道内易被低 pH 和各种酶降解以及肝脏首过效应等因素导致吸收差,口服无效,必须采取适当措施防止降解、提

— 90 — 万方数据

高吸收.围绕防止降解、提高吸收,国内外近年来进行的研究大致有以下几个方面:①肠溶包衣或结肠给药;②加入酶抑制药和/或吸收促进药;③新型药物载体如:微球、微囊、脂质体和微乳等新型载体的研究.而纳米粒多糖、脂质体作药物载体可有利于提高口服胰岛素的生物利用度和病人的顺应性就是旨在提高口服利用度的研究探索之一<sup>[1]</sup>.

胰岛素属两亲性(Amphiphilic)多肽药物,可与细胞膜表面受体结合,通过受体介导的胞吞作用进入细胞.脂质体作为一种可降解的无毒载体,可以包封亲水性和疏水性药物.脂质体包裹胰岛素后,能防止酶的降解作用.此外,脂质体通过与肠道细胞膜融合或者表面吸附,增加了胰岛素进入细胞的途径,有助于胰岛素的稳定与吸收<sup>[6,7]</sup>.

本研究显示纳米脂质体包裹胰岛素后,Caco-2 细胞模型通透效率大大增加,当通透浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$ ,最佳的通透时间是 120 ~ 150 min.但在 20  $\mu\text{g/mL}$  以下,两组通透量差异不显著,推测可能是微量样本接近放免测试极限而导致的误差.

可见,Caco-2 细胞模型可用来进行药物筛选,是一种高通透量筛选和微量样品筛选的有效方法<sup>[2]</sup>.

### [参考文献]

- [1] 梁永广,赵秀杰,李明光,等.胰岛素口服给药研究概况[J].中国药师,2003,6(1):48—50.
- [2] Liang-shang L Gan, Dhiren R. Thakker. Applications of the Caco-2 model in the design and physical barriers posed by the intestinal epithelium[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 23: 77—98.
- [3] 杨海涛,王广基.Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用[J].药学报,2000,35(10):797—800.
- [4] 蒋学华,贾运涛,袁媛,等.Caco-2 细胞模型在口服药物吸收过程研究中的应用[J].中国药理学杂志,2002,37(5):325—327.
- [5] Sibel Demirbas, Salomon Stavchansky. Effects of citicholine and dimethylsulfoxide on transepithelial transport of passively diffused drugs in the Caco-2 cell culture Model[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2003, 251(1):107—112.
- [6] 张焯,张强,齐先荣.胰岛素脂质体的结构特点[J].药学报,2001,36(6):448—451.
- [7] 杨天智,王向涛,阎雪莹,等.胰岛素纳米脂质体口腔给药研究[J].药学报,2002,37(11):885—891.
- [8] 苏英豪,杨光霖,等.碱性磷酸酶同工酶电泳细胞化学技术在胃癌研究中的应用[J].安徽医科大学学报,1994,29(2):147—148.

## Establishment of Caco-2 Cell Model and the Application on the Transport Study in Vitro of Nano-liposome Coated Insulin

Li Zhengrong<sup>1</sup>, Wang Yan<sup>1</sup>, Pan Feiyan<sup>1</sup>, Wang Wen<sup>1</sup>, Guo Jianxin<sup>2</sup>, Ping Qineng<sup>2</sup>, Li Chaojun<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, 210009, Nanjing, China)

**Abstract** To establish Caco-2 cell model and to use it evaluate the permeating characteristics of peroral nano-liposome coated insulin. Caco-2 cells were cultured on transwell for more than 20 days to get an epithelium like monolayer. Parameters of the cell model were assayed such as transepithelial electrical resistance, ultrastructure, the distribution of alkaline phosphatase activity and the permeability of Dextran-Rhodamine across the monolayer. The transport characteristics of insulin and insulin encapsulated in nano-liposome was also examined using the established cell model. Results: Like intestinal epithelial cells, Caco-2 cells formed brush borders and tight junction between adjacent cells. Alkaline phosphatase activity was detected on the side of the brush border. Transepithelial electrical resistance arrived 300 ~ 500  $\Omega/\text{cm}^2$ . Dextran-Rhodamine cannot enter or across the monolayer of the Caco-2 cells. Nanoliposome encapsulation can increase the permeability of insulin across monolayer of Caco-2 cell. Conclusion: Using the established Caco-2 cell model, we found that nanoliposome encapsulation is a good method to promote bioavailabilities of peroral insulin.

**Key words** peroral administration of insulin, caco-2 cell model, nanoliposome

[责任编辑:孙德泉]