

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.024.html

◇ 药学研究 ◇

利用 Caco-2 细胞模型研究 新型 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的表观渗透系数

马雁, 徐绍辉, 于坤宏, 郭圣荣

摘要 目的 利用人结肠癌 Caco-2 细胞模型研究新型 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的表观渗透系数, 为药物制剂设计提供生物药剂学依据。方法 建立 Caco-2 细胞单层模型, 通过细胞形态观察、跨上皮细胞电阻测定和酚红通透性实验验证 Caco-2 细胞单层完整性。考察不同浓度 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 从绒毛面 (AP 侧) 到基底面 (BL 侧), BL 侧到 AP 侧两个方向的转运情况。应用高效液相色谱法对该化合物进行定量分析, 计算其表观渗透系数 (P_{app})。结果 建立的 Caco-2 细胞单层完整, 适用于转运实验。Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 浓度为 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 从 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 分别为 $(4.72 \pm 0.05) \times 10^{-5}$ 、 $(5.29 \pm 0.20) \times 10^{-5}$ 、 $(2.10 \pm 0.41) \times 10^{-5}$ cm/s ($P < 0.05$); 从 BL 侧到 AP 侧的 P_{app} 分别为 $(7.59 \pm 0.78) \times 10^{-6}$ 、 $(1.08 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ 、 $(6.23 \pm 0.63) \times 10^{-6}$ cm/s ($P < 0.05$)。结论 成功构建 Caco-2 细胞单层模型并用于考察 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的透过细胞单层的性能。在考察的浓度范围内, 无论从 AP 侧到 BL 侧, 还是从 BL 侧到 AP 侧, Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的 P_{app} 均与其浓度有关, 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时的 P_{app} 大于 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时的 P_{app} 。

关键词 KY-C002; Caco-2 细胞单层模型; 表观渗透系数; 药物转运

中图分类号 R 94

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0236-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.014

原癌基因 Pim-1 是基因 pim 家族(现发现 pim-1、pim-2、pim-3)中的一员, Pim-1 激酶在调控细胞凋亡、分化、增殖以及肿瘤形成等方面发挥非常重要的作用。Pim-1 蛋白作为新的抗肿瘤靶点, 具有较高的选择性, 近年来越来越被关注^[1-4]。化合物 KY-

C002(结构见图 1)是杂芳基酰胺类化合物。Ge^[5]首先合成并证实该化合物是一种优良的 Pim-1 激酶抑制剂, 可用于预防和治疗癌症、自身免疫疾病、过敏反应等疾病, 具有很好的临床应用价值。目前尚未有关于其生物药剂学性质的研究报道, 对于其生物药剂学性质的研究是十分必要的。Caco-2 细胞系来源于人类结肠癌细胞, 在常规的细胞培养条件下, 即可自发分化形成肠上皮细胞样的细胞, 广泛应用于小分子药物口服吸收的体外筛选模型^[6-8]。该文采用 Caco-2 细胞单层模型研究 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的表观渗透系数及药物浓度的影响, 为进一步开展 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的动物在体肠吸收以及开发其口服制剂提供有价值的参考。

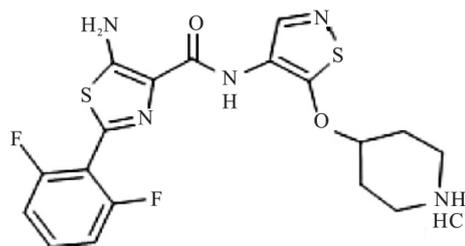


图 1 KY-C002 的分子结构图

1 材料与方法

1.1 主要仪器 高效液相色谱仪购自美国 Waters 公司; BSA124S 万分之一电子天平购自北京赛多利斯科学仪器有限公司; KQ5200 型超声清洗仪购自昆山市超声仪器有限公司; MQS-30 电热恒温水浴摇床购自上海市旻泉仪器有限公司; 85-2 型磁力搅拌器购自上海司乐仪器有限公司; L500 型离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; HF151UV CO₂ 培养箱购自香港力康生物医疗科技控股集团; JB-CJ-4FX 超净工作台购自吴江市万里彩钢净化有限公司; XSP-37XBW 型倒置显微镜购自上海光学仪器六厂; Millicell-ERS-2 型细胞电阻仪购自美国 Milli-

2017-10-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81573352)

作者单位: 上海交通大学药学院医药用高分子材料及控释用课题组, 上海 200240

作者简介: 马雁, 男, 硕士研究生;

郭圣荣, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sr-guo@sjtu.edu.cn

pore 公司; Multiskan MK3 酶标仪购自芬兰 Thermo LabSystems 公司。

1.2 主要试剂与细胞 化合物 KY-C002(自制); 乙腈(色谱纯,批号:0000077519)购自美国 J. T Baker 公司; 三氟乙酸(分析纯,批号:STBF6924V)购自美国 Sigma 公司; 24 孔聚碳酸酯膜转运板和 25 cm² 细胞培养瓶购自美国 Corning costar 公司; DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; Caco-2 细胞株购自中科院细胞库。

1.3 KY-C002 含量分析的高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography HPLC) 的建立

1.3.1 色谱条件 色谱柱: C18 柱(4.6 mm × 250 mm, 粒径 5 μm); 波长 301 nm; 流速 1 ml/min; 流动相: A 相为 0.1% 三氟乙酸水溶液, B 相为 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液; 0 ~ 8 min A 相: 95% ~ 5%, B 相: 5% ~ 95%; 8 ~ 10 min A 相: 5%, B 相: 95% 相; 10 ~ 12 min B 相: 100%。

1.3.2 HPLC 方法的建立 从系统适用性、专属性、重复性、准确度、线性等方面验证 HPLC 方法。

1.3.3 溶液稳定性 置于 2 ~ 8 °C、室温和 37 °C 条件下考察对照品溶液的稳定性。

1.4 Caco-2 细胞单层膜模型的建立和评价^[9-11]

1.4.1 细胞培养 细胞培养和种板: 复苏冻存的 Caco-2 细胞, 加入 10 ml 完全 DMEM+10 培养液, 将得到的细胞悬浮液转移至 25 cm² 细胞培养瓶中, 放入 5% CO₂ 37 °C 恒温培养箱中培养, 隔天换液, 当细胞达到约 80% 汇合时进行传代。细胞培养至合适状态时进行种板, 细胞接种到 24 孔 Transwell 板, 接种密度 6 × 10⁴ 个/ml。向 Transwell 板的单层膜基底端(basolateral side, BL 侧)加入 0.3 ml 完全 DMEM+10 培养液(无细胞), 向孔板单层膜顶端(apical side, AP 侧)加入 0.2 ml 已经充分混合的细胞悬液。2 d 换 AP 侧和 BL 端侧; 3 ~ 7 d 隔天换 AP 侧和 BL 侧液; 8 ~ 17 d 每天 AP 侧换液, 隔天 BL 侧换液; 18 d 以后每天换 AP 侧和 BL 侧液。

1.4.2 细胞单层模型评价

1.4.2.1 显微镜观察 Caco-2 细胞形态 Caco-2 细胞在培养至 20 d 左右, 显微镜下观察细胞生长情况, 观察细胞生长是否均匀, 是否可以清楚地看见细胞之间的接触, 以此判断细胞是否形成完整的细胞单层。

1.4.2.2 测量 Caco-2 细胞单层膜跨膜电阻 将 Millicell-ERS 电阻仪电极放入 PBS(pH 7.2) 内平衡 24 h, 然后置于与培养液类似的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的

Hank's 平衡盐溶液内平衡 2 h。平衡后将电极置于 70% 乙醇浸泡 15 min, 再在空气中干燥 15 s 后放入无菌无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 平衡盐溶液液中浸泡 15 min, 打开电源, 校正电压与电阻, 测量空白对照 Millicell 膜的跨膜电阻值, 然后测 Caco-2 细胞单层膜跨膜电阻值, 样品的实际电阻为样品实测电阻减去空白电阻值。

1.4.2.3 酚红通透性实验 取电阻值 ≥ 250 Ω/cm² 的 Caco-2 细胞单层膜^[12], 用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 平衡盐溶液小心冲洗 3 次, 轻轻吸干孔内无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 平衡盐溶液, 以清除细胞表面对测定有干扰的物质。于 Caco-2 细胞 AP 侧加入含 5 mg/L 酚红的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 平衡盐溶液(pH 7.2) 300 μl, 细胞 BL 侧加入不含酚红的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 平衡盐溶液 400 μl。将培养板置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内, 于 30、60、90、120 min 于 BL 侧取样 200 μl, 并加入 200 μl 不含酚红的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 平衡盐溶液。以酶联免疫荧光分析仪于 560 nm 处测定 Caco-2 细胞单层膜 BL 侧内酚红的累积透过量。计算表观渗透系数(apparent permeability coefficient P_{app}), P_{app} = (dQ/dt) / (AC₀), 其中 dQ/dt 为单位时间药物转运量(mg/s); A 为转运膜的面积, 此时 A 为 0.6 cm²; C₀ 为酚红的初始浓度 5 mg/ml。

1.5 化合物 KY-C002 转运实验 将化合物 KY-C002 溶解在纯水中配制成 100 μg/ml 储备液, 以无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 平衡盐溶液稀释至所设计浓度。选取细胞跨膜电阻 ≥ 250 Ω/cm² 的 Caco-2 细胞单层, 根据实验设计, 分别在细胞两侧加入化合物 KY-C002 溶液和无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 平衡盐溶液(AP 侧 0.3 ml, BL 侧 0.4 ml), 与恒温摇床上(37 °C, 50 r/min) 温育。化合物溶液的浓度分别为 5、10、20 μg/ml。再按实验设计时间点进行取样, 单孔取点, 每点平行 3 个孔。取得的样品溶液过滤之后按照“KY-C002 含量分析的 HPLC 方法”测定转运量, 计算 P_{app} 和 BL → AP 侧跨膜转运的表观系数与 AP → BL 侧跨膜转运的表观系数的比值外排率(eflux ratio, ER) 值。

1.6 统计学处理 实验数据采用 SPSS 16.0 软件分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 *t* 检验进行比较。

2 结果

2.1 建立 KY-C002 含量分析的 HPLC 方法 本文中建立的 HPLC 方法适用于新型 Pim-1 激酶抑制

剂 KY-C002 含量分析。具体结果如下。

2.1.1 系统适用性 KY-C002: 两份对照品溶液各连续进样 3 针, 响应因子的 RSD 均为 0.2%, 均 ≤ 3.0%; 两份对照品溶液 3 针响应因子平均值之比为 99.3%, 在 97.0% ~ 103.0%。酚红: 两份对照品溶液各连续进样 3 针, 响应因子的 RSD 分别为 0.4%、0.1%, 均 ≤ 2.0%; 两份对照品溶液 3 针响应因子平均值之比为 100.2%, 在 97.0% ~ 103.0%。

2.1.2 专属性 空白溶剂在主峰保留时间处无明显干扰, 对照溶液中主峰和邻近峰之间的分离度均 > 1.5。

2.1.3 重复性 KY-C002: 平行配制 6 份供试品溶液含量的为 99.7%, RSD 为 1.3%, ≤ 3.0%。酚红: 平行配制 6 份供试品溶液含量的为 99.2%, RSD 为 1.0%, ≤ 3.0%。

2.1.4 准确度 KY-C002: 40% 浓度的回收率分别为 101.5%、103.9%、99.9%; 100% 浓度的回收率分别为 96.7%、100.2%、100.7%; 200% 浓度的回收率分别为 100.5%、101.8%、101.6%; 在 95.0% ~ 105.0%。酚红: 40% 浓度的回收率分别为 98.1%、98.0%、98.4%; 100% 浓度的回收率分别为 99.3%、99.0%、97.6%; 200% 浓度的回收率分别为 99.6%、99.3%、99.7%; 在 95.0% ~ 105.0%。

2.1.5 线性 KY-C002: 对照品溶液在 0.21 ~ 21.06 μg/ml 范围内线性良好, 线性方程为 $Y = 47690.5971X - 4934.1532$, $R = 0.9998$, 响应因子的 RSD% 为 1.9%。酚红: 对照品溶液在 0.41 ~ 40.58 μg/ml 范围内线性良好, 线性方程为 $Y = 15036.1307X - 174.7088$, $R = 1.0000$, 响应因子的 RSD% 为 0.8%。

2.1.6 溶液稳定性 样品溶液保存在 2 ~ 8 °C 条件下, 至少 1 d 内保持稳定; 对照品溶液保存在 2 ~ 8 °C 条件下, 至少 1 d 内保持稳定。

2.1.7 化合物 KY-C002 的色谱行为图 见图 2。

2.2 Caco-2 细胞单层膜模型的评价 本实验室条件下建立的 Caco-2 细胞单层膜模型可用于化合物 KY-C002 的跨膜转运实验。

2.2.1 显微镜观察 Caco-2 细胞形态 Caco-2 细胞在 24 孔 Transwell 板上培养 21 d 左右, 显微镜下观察细胞生长情况, 细胞生长均匀, 在细胞之间形成接触清晰可见的边界线, 其形态见图 3。

2.2.2 Caco-2 细胞单层膜跨膜电阻 本实验中细胞培养至 19 d、20 d 进行电阻测定, 连续两天电阻值为 $(455 \pm 40) \Omega/cm^2$ 均 > 250 Ω/cm^2 。

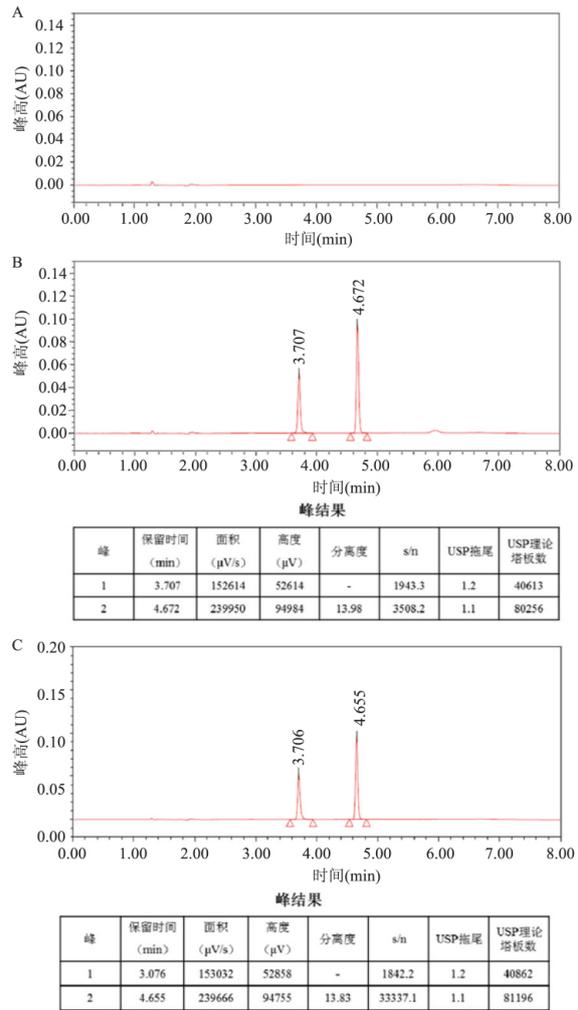


图 2 化合物 KY-C002 的 HPLC 色谱图

注: t_R = 7.87 min; 右侧峰为 KY-C002 左侧为酚红; A: 空白溶剂色谱行为图; B: KY-C002 对照品色谱行为图; C: 细胞样品色谱行为图

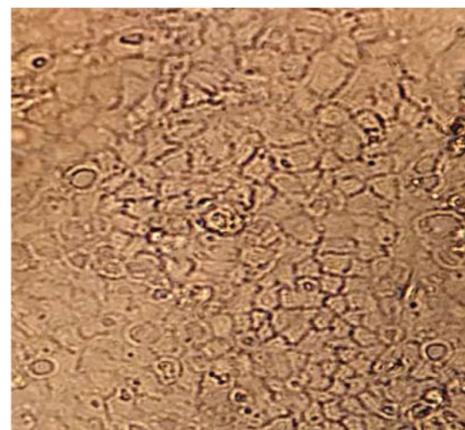


图 3 培养 20 d 显微镜下 Caco-2 细胞形态 ×40

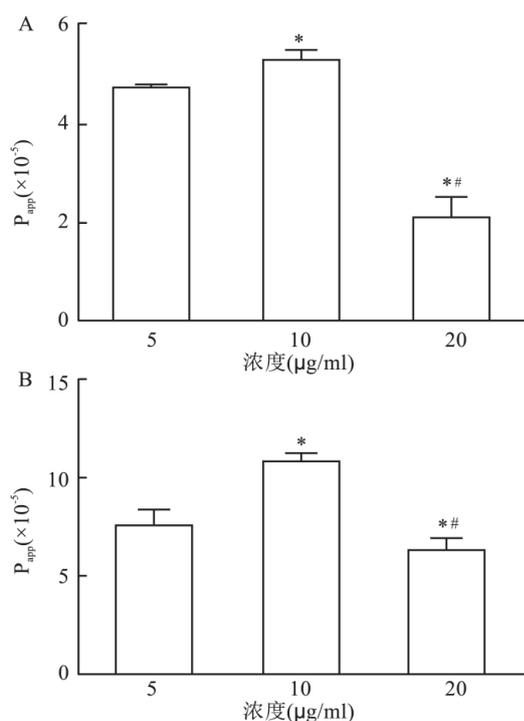
2.2.3 酚红通透性实验 取酚红标准试液 5 mg/L

加入到 24 孔板的 Millicell 膜中,于不同时间取样 (Millicell 膜接收池) 酶标仪测定其吸光度值,通过酚红标准曲线计算酚红透过量,计算 P_{app} 。酚红在 Caco-2 细胞单层膜的 P_{app} 均 $< 10^{-6}$ cm/s,远低于没有培养细胞的空白组,说明酚红从 AP 侧渗透入 BL 侧较少,膜的完整性良好。在实验中,也可用肉眼与空白对照观察有无酚红。见表 1。

表 1 酚红透过试验不同时间的 P_{app} (cm/s)

样本	30 min	60 min	90 min	120 min
空白	5.22×10^{-5}	5.80×10^{-5}	5.12×10^{-5}	5.10×10^{-5}
1	4.41×10^{-7}	4.01×10^{-7}	9.44×10^{-7}	8.09×10^{-7}
2	4.66×10^{-7}	6.05×10^{-7}	1.88×10^{-7}	3.20×10^{-7}
3	3.00×10^{-7}	2.05×10^{-7}	3.09×10^{-7}	7.00×10^{-7}

2.3 化合物 KY-C002 转运实验 不同浓度 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的 P_{app} 、ER 结果见图 4、表 2。结果表明:①在考察的浓度范围内,无论从 AP 侧到 BL 侧,还是从 BL 侧到 AP 侧 P_{app} 均与 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的浓度有关,不同浓度间差异有统计学意义 ($P < 0.05$);浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 时的 P_{app} 大于 5 $\mu\text{g/ml}$ 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 时的 P_{app} 。②在考察的浓度范围内,从 AP 侧到 BL 侧 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的 P_{app} 均 $> 10^{-6}$ cm/s,表明该化合物吸收良好。

图 4 不同浓度 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的 P_{app}

A: AP 侧 \rightarrow BL 侧; B: BL 侧 \rightarrow AP 侧; 与 5 $\mu\text{g/ml}$ KY-C002 比较: * $P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{g/ml}$ KY-C-002 比较: # $P < 0.05$

表 2 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的 P_{app} ($n=3, \bar{x} \pm s$)

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	AP \rightarrow BL 侧 (cm/s)	BL \rightarrow AP 侧 (cm/s)	ER 值
5	$(4.72 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	$(7.59 \pm 0.78) \times 10^{-6}$	0.16
10	$(5.29 \pm 0.20) \times 10^{-5}$	$(1.08 \pm 0.40) \times 10^{-5}$	0.61
20	$(2.10 \pm 0.41) \times 10^{-5}$	$(6.23 \pm 0.63) \times 10^{-6}$	0.25

3 讨论

本研究建立了新型 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的 HPLC 色谱检测方法且完成方法学验证,结果表明该方法简便、灵敏、可靠、专属性良好,符合定量分析要求。

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具有以下优点^[13]: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。一般来说,连续 2 d 测得的电阻值 $> 250 \Omega/\text{cm}^2$ 的 Caco-2 细胞单层膜可用于化合物的跨膜转运实验^[14],本实验室条件下建立的 Caco-2 细胞模型适用于化合物的转运实验。

综上所述,在考察浓度范围内,新型 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的 P_{app} 与浓度有关,化合物 KY-C002 的 $P_{app} > 10^{-6}$ cm/s,表明该化合物的吸收良好^[14],具有开发口服给药剂型的可能性,为进一步开展动物体内肠吸收实验提供了参考和基础。

参考文献

- [1] Kumar A, Mandiyan V, Suzuki Y, et al. Crystal structures of proto-oncogene kinase pim1: a target of aberrant somatic hypermutations in diffuse large cell lymphoma [J]. J Mol Biol, 2005, 348 (1): 183-93.
- [2] Magnuson N S, Wang Z, Ding G, et al. Why target PIM1 for cancer diagnosis and treatment [J]. Future Oncol, 2010, 6(9): 1461-78.
- [3] 郑小洲, 金晓磊, 赵临襄. 小分子 PIM 激酶抑制剂的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2013, 23(6): 499-505.
- [4] 刘浩秋. 靶向 PIM 蛋白激酶抗肿瘤药物的研究进展及设想 [J]. 中国当代医药, 2014, 21(28): 191-3.
- [5] Ge Yu. PIM kinase inhibitor, preparation method and use thereof in drug preparation [P]. WO 2014.
- [6] 廖沙, 谢剑炜. Caco-2 细胞模型在药物体外研究中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(4): 416-9.
- [7] 崔孟珣, 李敬来, 张振清, 等. Caco-2 细胞模型在药物制剂学研究中的应用 [J]. 解放军药理学学报, 2009, 25(1): 59-61.
- [8] 刘璐, 李晓华. 仙茅苷在 Caco-2 细胞模型中跨膜转运特征

- 研究[J]. 药学与临床研究, 2016, 24(6): 445-8
- [9] Tian X J, Yang X W, Yang X, et al. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model [J]. *Int J Pharm*, 2009, 367(1-2): 58-64.
- [10] Li N, Tsao R, Sui Z, et al. Intestinal transport of pure diester-type alkaloids from an aconite extract across the Caco-2 cell monolayer model [J]. *Planta Med*, 2012, 78(7): 692-7.
- [11] Sun S, Zhang H, Sun F, et al. Intestinal transport of sophorcarpine across the Caco-2 cell monolayer model and quantification by LC/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(6): 885-90.
- [12] 黄霞, 江涛, 翟青等. 应用 Caco-2 细胞模型观察介质 pH 和氨氯地平对替米沙坦跨膜吸收转运的影响 [J]. *上海交通大学学报医学版*, 2012, 32(12): 1605-9.
- [13] 关溯, 陈孝, 黄民. 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): 609-14.
- [14] 沈凯, 王景田. 药物肠吸收实验研究方法进展 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(12): 988-91.

Study on cell permeability coefficients of a new Pim-1 kinase inhibitor KY-C002 by using Caco-2 cell monolayer

Ma Yan, Xu Shaohui, Yu Kunhong, et al

(School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract Objective To study the cell permeability coefficients of a new Pim-1 kinase inhibitor KY-C002 through a human colorectal cancer Caco-2 cell monolayer providing a biological basis for the pharmacy pharmaceutical formulation design. **Methods** Caco-2 cell monolayer was built, and its integrity was confirmed through cell morphology observation, transepithelial electrical resistance measurement and Phenol Red Permeability experiment. The apparent permeability coefficients of Pim-1 kinase inhibitor KY-C002 from apical side (AP side) to basolateral side (BL side) or from BL side to AP side were investigated. The concentrations of KY-C002 were measured by high performance liquid chromatography. The apparent permeability coefficients (P_{app}) were then calculated. **Results** The Caco-2 cell monolayer was integrated. The P_{app} values of Pim-1 kinase inhibitor KY-C002 were $(4.72 \pm 0.05) \times 10^{-5}$ cm/s, $(5.29 \pm 0.20) \times 10^{-5}$ cm/s, $(2.10 \pm 0.41) \times 10^{-5}$ cm/s ($P < 0.05$) from AP side to BL side when the concentrations of KY-C002 were 5, 10, 20 μ g/ml respectively. The P_{app} values of Pim-1 kinase inhibitor KY-C002 were $(7.59 \pm 0.78) \times 10^{-6}$ cm/s, $(1.08 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ cm/s, $(6.23 \pm 0.63) \times 10^{-6}$ cm/s ($P < 0.05$) from BL side to AP side when the concentrations of KY-C002 were 5, 10, 20 μ g/ml respectively. **Conclusion** The Caco-2 cell monolayer model was successfully constructed and used to investigate the properties of the permeated monolayer of Pim-1 kinase inhibitor KY-C002. The P_{app} of the Pim-1 kinase inhibitor KY-C002 was related to its concentration, and the P_{app} at the concentration of 10 μ g/ml was greater than 5 μ g/ml and 20 μ g/ml of P_{app} .

Key words KY-C002; Caco-2 cell monolayer model; P_{app} ; drug transport