

梁秋玲,朱叶萌,麦子盈,等. 基于 Caco-2 细胞单层模型对盐酸氨溴索吸收机制的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 47-53.

Liang QL, Zhu YM, Mai ZY, et al. Absorption mechanism of ambroxol hydrochloride in the Caco-2 cell monolayer model [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 47-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.06.007

基于 Caco-2 细胞单层模型对盐酸氨溴索吸收机制的研究

梁秋玲,朱叶萌,麦子盈,王凤姬,龙淑娴,王 弋,饶子亮,邝少松*

(广东省医学实验动物中心,广东 佛山 528248)

【摘要】 目的 通过 Caco-2 细胞单层模型研究盐酸氨溴索 (ambroxol hydrochloride, AMB) 的吸收机制,提高其生物利用度。**方法** 通过跨上皮电阻 (transepithelial electrical resistance, TEER)、低渗透性药物阿昔洛韦的表现渗透系数 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 和罗丹明 123 的外排率 (efflux ratio, ER) 验证 Caco-2 细胞单层模型的完整性和功能性。考察浓度、药物相互作用、体液 pH 对 AMB 的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 和 ER 值的影响。**结果** 整个实验过程中 Caco-2 细胞单层的 $TEER > 200 \Omega \cdot cm^2$, 阿昔洛韦的 $P_{app}(AP \rightarrow BL) < 10^{-6} cm/s$, 罗丹明 123 的 $ER > 2$ 。与高渗透性对照组比较, AMB 低剂量组的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 显著降低 ($P < 0.01$), ER 值无显著差异 ($P > 0.05$)。与 AMB 单独给药组比较, 联合给药组的 AMB $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值显著降低 ($P < 0.05$), ER 值无显著差异 ($P > 0.05$)。与 AMB 低 pH 组比较, AMB 中、高 pH 组的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 显著增高 ($P < 0.01$)。**结论** AMB 为易化扩散转运方式, 与 METO 联合给药不利于 AMB 的吸收, 提高肠液 pH 可促进 AMB 的吸收。

【关键词】 盐酸氨溴索; 吸收机制; 药物相互作用; pH; Caco-2 细胞单层模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 06-0047-07

Absorption mechanism of ambroxol hydrochloride in the Caco-2 cell monolayer model

LIANG Qiuling, ZHU Yemeng, MAI Ziyang, WANG Fengji, LONG Shuxian, WANG Yi, RAO Ziliang, KUANG Shaosong*
(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

【 Abstract 】 Objective To study the absorption mechanism and improve the bioavailability of ambroxol hydrochloride (AMB) across the Caco-2 cell monolayer model. **Methods** The integrity and functionality of the Caco-2 cell monolayer model were analyzed by the transepithelial electrical resistance (TEER), the apparent permeability coefficient (P_{app}) of acyclovir and the efflux ratio (ER) of rhodamine 123. The effects of drug concentration, drug-drug interaction and pH on the $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ and ER of AMB were investigated using the Caco-2 cell monolayer model. **Results** The TEER values of all the permeation experiments were above $200 \Omega \cdot cm^2$. The $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ of acyclovir was less than $1 \times 10^{-6} cm/s$. Furthermore, the ER of rhodamine 123 was lower than 2, indicating that the Caco-2 monolayer model was successfully established in this experiment. Compared with the high permeability control group, the $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ was significantly

[基金项目] 广东省省级科技计划项目 (2019A030317015)。

[作者简介] 梁秋玲 (1989—), 女, 实习研究员, 硕士, 研究方向: 药效学、肿瘤学。E-mail: 540617256@qq.com

[通信作者] 邝少松 (1973—), 女, 高级兽医师, 博士, 研究方向: 病理学、毒理学、兽医学。E-mail: kuangss@126.com

decreased in the low-dose AMB group, but the ER was not affected. There was also no difference in the ER between AMB used alone and in combination with METO; however, there was a significant increase in the $P_{app (AP \rightarrow BL)}$ in the monotreatment group. Furthermore, the $P_{app (AP \rightarrow BL)}$ of AMB transport under pH 6.5 showed a significant difference compared with that under pH 7.4 and 8.0 ($P < 0.01$). **Conclusions** The transport of AMB across the Caco-2 cell monolayer model was facilitated by diffusion, and combination therapy was not conducive to AMB absorption. However, an alkaline environment accelerated AMB absorption.

【Keywords】 ambroxol hydrochloride; absorption mechanism; drug-drug interaction; pH; Caco-2 cell monolayer model

AMB 是盐酸溴己新的 N-去甲基代谢物,是盐酸溴己新在环己基环上去掉一个甲基再引入一个羟基的衍生物,这种结构的改变使 AMB 具有促进排痰、溶解粘液、缓解排痰性咳嗽、抗炎、抗氧化和局部麻醉的作用^[1]。根据世界卫生组织发布的解剖治疗化学分类系统,自 1970 年以来 AMB 广泛用于伴有痰液分泌不正常及排痰功能不良的急性、慢性呼吸系统疾病^[2]。除此之外,近些年来 AMB 的应用领域越来越广,例如改善帕金森病症状,提高肌萎缩性脊髓侧索硬化症大鼠模型的运动机能和存活率,抑制肥胖大鼠模型的术后腹腔粘连^[3-5]。AMB 还可通过联合给药治疗方案治疗肺癌,帕金森病、中耳炎、延缓耐药性等^[6-9]。尽管 AMB 已经广泛应用于临床治疗,但是 AMB 仍然存在一定的胃部灼烧、恶心、呕吐、致敏等副作用,欧盟的药物警戒风险评估委员会 (PRAC) 于 2015 年专门发表了一篇关于 AMB 应用安全性的文章,里面就提到 AMB 存在过敏反应的副作用^[2]。研究 AMB 的吸收机制从而提高其生物利用度可减少不良反应的发生,但是很少有文章研究 AMB 的吸收机制。

Caco-2 来源于人结肠腺癌细胞,可在培养过程中进行肠细胞分化,Caco-2 细胞接种到碳酸聚脂多孔膜等基质上,在培养 21 d 后可自发形成有极性的,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的单细胞层^[10-11]。因此,Caco-2 细胞可以模拟小肠上皮细胞,广泛用于药物吸收过程中物理和生化屏障的研究^[12]。Caco-2 细胞单层模型广泛应用于药物在小肠吸收的评价和转运机制研究中,Caco-2 细胞的结构和功能类似于人小肠上皮细胞,表达与小肠刷状边缘上皮相关的外排转运体,例如 P-糖蛋白 (P-gp) 和乳腺癌耐药蛋白 (BCRP2)^[13-14]。尽管人肠上皮由多种不同类型的细胞组成,但主要成分还是小肠上皮细胞,并且小肠上皮细胞是形致密的细胞单层

和表达各种外排转运体的重要组成部分,因此 Caco-2 细胞单层模型可用于模拟肠道吸收的药物筛选模型^[15]。

本文通过 Caco-2 细胞单层模型研究 AMB 在肠道中的吸收机制,探索影响 AMB 吸收的关键因素,提高其生物利用度。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人结直肠腺癌细胞 Caco-2,购于中国科学院干细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

AMB,批号 100599-201604、METO,批号 100084-201403、阿昔洛韦,批号 140630-201403,均购自中国食品药品检定研究院;罗丹明 123,批号 041818180905,购自碧云天生物技术有限公司;MEM 基础培养液,批号 8119027,GIBCO;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS),批号: FBS00717-1, AUSGENEX; 100X 非必需氨基酸溶液,批号 8820010101,GENVIEW; 100 mmol/L 丙酮酸钠溶液,批号 2003977,GIBCO。24 孔 Transwell 培养板,批号 26217029,Corning; 1260 高效液相色谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司; Millicell ERS-2 细胞电阻仪,德国 Meck millipore。

1.3 实验方法

1.3.1 Caco-2 细胞单层模型的建立

用含 10% FBS、1% 双抗、1% 非必需氨基酸、1 mM 丙酮酸钠的 MEM 完全培养液培养 Caco-2 细胞,当细胞生长至 70%~80% 汇合时,消化细胞,调节细胞密度至每毫升 2×10^5 个,接种于 24 孔 Transwell 培养板中,顶端 (AP) 加入 0.1 mL 细胞悬液,底端 (BL) 加入 MEM 完全培养液 0.6 mL,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,隔天换一次液,培养 7 d 后每天换液,连续培养至 21 d。

1.3.2 HPLC 检测

AMB 和 METO 检测的色谱条件用 ZORBAX SB-C18(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以磷酸氢二铵-乙腈混合溶液(用磷酸调节 pH 至 7.0)-乙腈(50:50)为流动相,流速为 1.0 mL/min,柱温 25℃,AMB 的检测波长为 248 nm,METO 的检测波长为 275 nm。阿昔洛韦检测的色谱条件用 ZORBAX SB-C18(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以甲醇-水(10:90)为流动相,流速为 1.0 mL/min,柱温 35℃,检测波长为 254 nm。

1.3.3 Caco-2 细胞单层模型完整性及功能性检测

Caco-2 细胞培养至第 21 天时,将细胞电阻仪的检测电极用 70% 乙醇灭菌,HBSS 冲洗电极晾干。用 37℃ 预热的 HBSS 轻柔地清洗细胞单层,将细胞电阻仪的检测电极置于 Transwell 小室外侧检测电阻值并按公式(1)计算 TEER,本文所有实验均选用 TEER≥200 Ω·cm² 的孔进行实验,将 Caco-2 单层细胞用 37℃ 预热的 HBSS 洗涤平衡 20 min 后,于 24 孔 Transwell 培养板的 AP 端分别加入 0.1 mL 50 μg/mL 阿昔洛韦(pH 7.4)、20 μmol/L 罗丹明 123 溶液(pH 7.4),BL 端加入 0.6 mL HBSS(pH 7.4)进行 AP→BL 方向的转运实验。于 BL 端分别加入 0.6 mL 50 μg/mL 阿昔洛韦(pH 7.4)、20 μmol/L 罗丹明 123 溶液(pH 7.4),AP 端加入 0.1 mL HBSS(pH 7.4)进行 BL→AP 方向的转运实验,于 CO₂ 培养箱中孵育 2 h 后从接收池取出阿昔洛韦检测液进行 HPLC 检测按公式(2)、(3)计算 P_{app} 和 ER,罗丹明 123 检测液用荧光酶标仪于 507 nm 激发波长,529 nm 发射波长处检测待测液荧光强度,同时检测 0、5、10、20、40 μmol/L 罗丹明 123 溶液的荧光强度绘制标准曲线再次检测 TEER 值。

$TEER(\Omega \cdot cm^2) = (\text{测定电阻} - \text{空白小室电阻}) \times \text{Transwell 小室面积}$ 公式 (1)

$$PaPP(cm/s) = \frac{V}{AC_i} \times \frac{C_f}{T} \quad \text{公式 (2)}$$

注:V:接收池的体积(单位:cm³);Ci:供给池的配制液浓度(单位:μg/mL);Cf:接收池的检测液浓度(单位:μg/mL);T:培养时间(单位:s);A:24 孔 Transwell 培养板小室底面积为 0.33 cm²。

$$ER = \frac{PaPP(BL \rightarrow AP)}{PaPP(AP \rightarrow BL)} \quad \text{公式 (3)}$$

1.3.4 浓度对 AMB P_{app} 和 ER 的影响

将每毫升 1.2×10⁵ 个的 Caco-2 细胞悬液接种于 96 孔板中,孵育 24 h 后,分别加入 MEM 完全培养液作为阴性对照组,200 μg/mL、100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL、12.5 μg/mL、6.25 μg/mL AMB 溶液与细胞共同孵育 2 h 后采用 MTT 法检测细胞的存活率,选择细胞存活率≥90% 的 AMB 浓度做为 AMB 高剂量组,采用等比稀释法设计 AMB 低、中剂量组。Caco-2 细胞单层用预热的 HBSS 洗涤平衡后,AP 端加入 15 μg/mL METO(pH 7.4)作为高渗透性对照、分别加入 0.1 mL AMB 低、中、高剂量组溶液(pH 7.4),BL 端加入 0.6 mL HBSS(pH 7.4)进行 AP→BL 方向的转运实验。AP 端加入 0.1 mL HBSS(pH 7.4),BL 端分别加入 0.6 mL 15 μg/mL METO(pH 7.4)、AMB 低、中、高剂量组溶液(pH 7.4)进行 BL→AP 方向的转运实验,孵育 2 h 后从接收池中取出检测液用 HPLC 法检测 METO、AMB 的浓度,取样结束后,再次检测 TEER 值,确认实验结束后 Caco-2 细胞单层的完整性。

1.3.5 药物相互作用对 AMB P_{app} 和 ER 的影响

Caco-2 细胞单层用预热的 HBSS 洗涤平衡后,AP 端分别加入 0.1 mL AMB 单独给药组溶液(pH 7.4)、METO 单独给药组溶液(pH 7.4)、AMB 和 METO 联合给药组溶液(pH 7.4),BL 端加入 0.6 mL HBSS(pH 7.4)进行 AP→BL 方向的转运实验。AP 端加入 0.1 mL HBSS(pH 7.4),BL 端分别加入 0.6 mL AMB 单独给药组溶液(pH 7.4)、METO 单独给药组溶液(pH 7.4)、AMB 和 METO 联合给药组溶液(pH 7.4)进行 BL→AP 方向的转运实验,孵育 2 h 后从接收池中取出检测液用 HPLC 法检测 AMB、METO 浓度,取样结束后,再次检测 TEER 值,确认实验结束后 Caco-2 细胞单层的完整性。

1.3.6 pH 对 AMB P_{app} 和 ER 的影响

Caco-2 单层细胞用预热的 HBSS 洗涤平衡后,AP 端分别加 0.1 mL AMB 低、中、高 pH 组溶液,BL 端加 0.6 mL HBSS(pH 7.4)进行 AP→BL 方向转运实验,孵育 2 h 后从接收池中取出检测液用 HPLC 法检测 AMB 浓度,取样结束后,再次检测 TEER 值,确认实验结束后 Caco-2 单层细胞的完整性。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 HPLC 检测

AMB 在 0~70.31 μg/mL 浓度范围内,其浓度和峰面积呈良好的线性关系,相关系数为 0.9999, METO 在 0~17.00 μg/mL 浓度范围内,其浓度和峰面积呈良好的线性关系,相关系数为 0.9995,阿昔洛韦在 0~60.98 μg/mL 浓度范围内,其浓度和峰面积呈良好的线性关系,相关系数为 0.9997,精密度良好,故 HPLC 法检测 AMB、METO、阿昔洛韦重复性高,结果准确可靠。

2.2 Caco-2 细胞单层模型完整性及功能性检测

Caco-2 细胞接种于小室培养至第 21 天时,加样前和取样后 Caco-2 细胞单层模型 TEER 值的范围为 (656 ± 26)~(817 ± 96) Ω·cm²,均大于 200 Ω·cm²,见表 1, Caco-2 细胞单层具有良好的致密性^[16],同时低渗透性药物阿昔洛韦的 P_{app}(AP→BL) < 10⁻⁶ cm/s, ER < 2,与文献报道的 P_{app} 值和 ER 相符^[17],符合低渗透性药物的特性。罗丹明 123 为 P-糖蛋白 (p-gp) 外排转运体的底物,罗丹明 123 的 P_{app}(AP→BL) 远小于 1×10⁻⁶ cm/s, ER 值远大于 2,表明 Caco-2 细胞单层模型高表达 p-gp 外排转运体可以主动外排罗丹明 123^[18-19],见表 2。因此, Caco-2 细胞单层模型同时具备完整性和功能性,可用于转运吸收的研究。

2.3 浓度对 AMB P_{app} 和 ER 的影响

如图 1A 所示, AMB 与 Caco-2 细胞共培养 2 h 细胞存活率 ≥ 90% 的最高浓度为 50 μg/mL,表明 50 μg/mL AMB 溶液对 Caco-2 细胞无细胞毒性,故选择 50 μg/mL AMB 溶液作为 AMB 高剂量组,采用等

比稀释法设计 AMB 低、中剂量组考察浓度对 AMB P_{app} 和 ER 的影响。如图 1B、1C、1D 所示,各组在加样前和取样后 Caco-2 细胞单层模型的 TEER 值均大于 200 Ω·cm²,表明在整个实验过程中 Caco-2 细胞单层模型保持完整性,依据 P_{app}(AP→BL) 值大小判断渗透性, P_{app}(AP→BL) > 10×10⁻⁶ cm/s 为高渗透性药物, P_{app}(AP→BL) < 1×10⁻⁶ cm/s 为低渗透性药物^[20]。高渗透性对照组 METO 的 P_{app}(AP→BL) > 10×10⁻⁶ cm/s, ER < 2,与文献报道的 P_{app} 值和 ER 相符^[21], METO 为高渗透性药物, AMB 低、中、高剂量组的 P_{app}(AP→BL) 均大于 10×10⁻⁶ cm/s, ER 值均小于 2,与高渗透性对照组比较, AMB 低剂量组的 P_{app}(AP→BL) 值显著降低 (P < 0.01), AMB 中、高剂量组无显著性差异 (P > 0.05), ER 值无显著性差异 (P > 0.05),表明 AMB 为高渗透性药物, AMB 的渗透性随着浓度的增加而增高,但对其吸收机制无影响。

2.4 药物相互作用对 AMB P_{app} 和 ER 的影响

如图 2 所示,各组在加样前和取样后 Caco-2 细胞单层模型的 TEER 值均大于 200 Ω·cm²,表明在整个实验过程中 Caco-2 细胞单层模型保持完整性, AMB 和 METO 单独给药和联合给药时, 2 种化合物的 P_{app}(AP→BL) 均大于 10×10⁻⁶ cm/s, ER 值均小于 2。与 METO 单独给药组比较,联合给药组的 METO P_{app}(AP→BL) 值显著降低 (P < 0.01),与 AMB 单独给药组比较,联合给药组的 AMB P_{app}(AP→BL) 值显著降低 (P < 0.05),但是 ER 值无显著性差异 (P > 0.05),表明 AMB 和 METO 联合给药会同时降低 AMB 和 METO 的渗透性,但对 2 种化合物吸收机

表 1 Caco-2 细胞单层模型的 TEER 值 (n = 3, $\bar{x} \pm s$)
Table 1 The TEER values of Caco-2 cell monolayer model

组别 Groups	转运方向 Transfer direction	跨上皮电阻 TEER (Ω·cm ²)	
		加样前 Before sample addition	取样后 After sampling
罗丹明 123 组 Rhodamine 123 group	AP→BL	746±56	710±93
	BL→AP	721±81	656±26
阿昔洛韦组 Acyclovir group	AP→BL	784±31	758±22
	BL→AP	817±96	764±62

表 2 罗丹明 123、阿昔洛韦的渗透性 (n = 3, $\bar{x} \pm s$)
Table 2 The permeability of rhodamine 123 and acyclovir

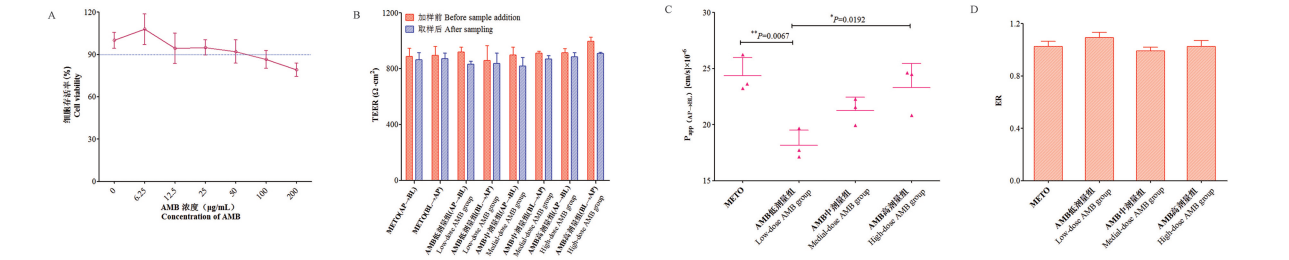
化合物 Compound	P _{app} (AP→BL) (cm/s) × 10 ⁻⁶	P _{app} (BL→AP) (cm/s) × 10 ⁻⁶	渗透性高/低 High permeability/Low permeability	外排率 ER
罗丹明 123 Rhodamine 123	0.14±1.84	1.80±0.31	低 low	10.75±3.35
阿昔洛韦 Acyclovir	0.88±0.09	1.36±0.13	低 low	1.55±0.25

制无影响。

2.5 pH 对盐酸氨溴索 P_{app} 和 ER 的影响

各组在加样前和取样后 Caco-2 细胞单层模型的 TEER 值均大于 200 Ω·cm², 表明在整个实验过程中 Caco-2 细胞单层模型保持完整性, AMB 低、中、

高 pH 组的 P_{app}(AP→BL) 均大于 10×10⁻⁶ cm/s, 与 AMB 低 pH 组比较, AMB 中、高 pH 组的 P_{app}(AP→BL) 值显著性增加 (P<0.01), 表明 AMB 的渗透性随着溶媒 pH 值的升高而增加, 见图 3。

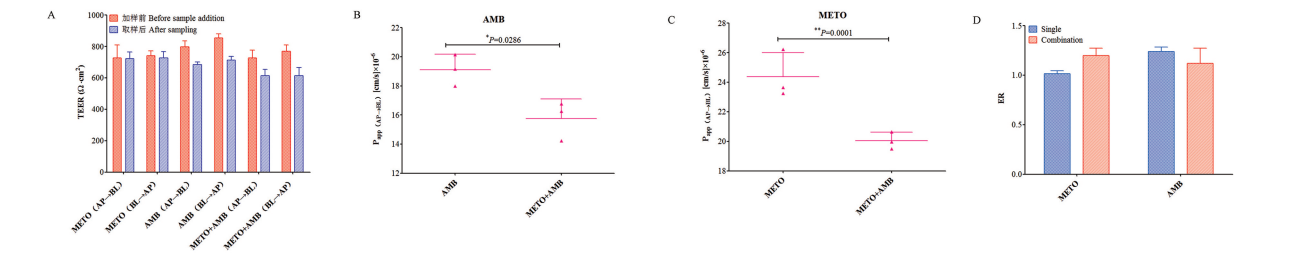


注: METO-高渗透性对照组, 15 µg/mL METO; AMB 低剂量组-12.5 µg/mL AMB; AMB 中剂量组-25 µg/mL AMB; AMB 高剂量组-50 µg/mL AMB。

图 1 浓度对盐酸氨溴索 P_{app} 和 ER 的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Note. METO-High permeability control group, 15 µg/mL METO. Low-dose AMB group -12.5 µg/mL AMB. Medial-dose AMB group -25 µg/mL AMB. High-dose AMB group -50 µg/mL AMB.

Figure 1 Effect of concentration on ambraxol hydrochloride P_{app} and ER

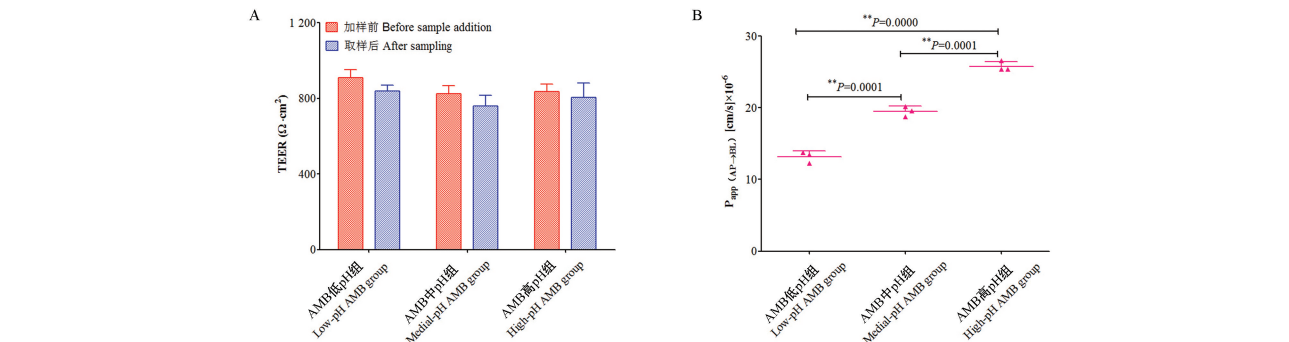


注: METO-METO 单独给药组, 15 µg/mL METO; AMB 单独给药组-25 µg/mL AMB; METO+AMB-METO 和 AMB 联合给药组, 15 µg/mL METO, 25 µg/mL AMB。

图 2 药物相互作用对盐酸氨溴索 P_{app} 和 ER 的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Note. METO-METO used alone, 15 µg/mL METO. AMB used alone-25 µg/mL AMB. METO+AMB-Combination of AMB and METO, 15 µg/mL METO, 25 µg/mL AMB.

Figure 2 Effect of durg-drug interaction on ambraxol hydrochloride Papp and ER



注: AMB 低 pH 组-25 µg/mL AMB, pH 6.5; AMB 中 pH 组-25 µg/mL AMB, pH 7.4; AMB 高 pH 组-25 µg/mL AMB, pH 8.0。

图 3 pH 对盐酸氨溴索 P_{app} 的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Note. Low-pH AMB group -25 µg/mL AMB, pH 6.5. Medial-pH AMB group -25 µg/mL AMB, pH 7.4. High-pH AMB group -25 µg/mL AMB, pH 8.0.

Figure 3 Effect of pH on ambraxol hydrochloride P_{app} and ER

3 讨论

AMB 是溴己新的人体内代谢物,在临床前和临床研究中具有广泛的药理作用,AMB 除了应用于急性、慢性呼吸系统疾病外,近些年的研究发现 AMB 还具有治疗帕金森病,抗肿瘤、增强抗菌活性、促进溶酶体外排等药理作用^[22-26],大剂量的 AMB 还可以有效减少肺癌患者术后并发症的复发^[27]。然而,AMB 在临床应用中存在胃部灼烧、恶心、呕吐、致敏等副作用,特别是大剂量使用时其副作用会更显著。因此,探索 AMB 在肠道中的转运吸收机制,提高其生物利用度可减少临床使用发生的副作用。

化合物在 Caco-2 细胞单层模型中由 AP 端的肠上皮细胞转运吸收至 BL 端从而进入体循环中发挥药效,因此, $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值是衡量化合物透过肠粘膜屏障转运吸收至体循环的关键指标。AMB 高剂量组的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值是 AMB 低剂量组的 1.28 倍,AMB 的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值随着浓度的增加而增高,同时 AMB 的 ER 值小于 2,表明 AMB 的转运方式为依赖药物浓度的被动转运或易化扩散^[28-29]。影响被动转运和易化扩散药物转运吸收的因素主要是分子大小,电荷、溶解度、脂水分配系数、药物间的相互作用^[14,30],METO 的化学名为 1-异丙氨基-3-[4-(2-甲氧乙基)-苯氧基]-2-丙醇,带有 2 个羟基,解离常数 PK_a 为 9.70,极性表面积 PSA 为 $55.0 \text{ \AA}^2$,分子量为 267.37,METO 是水溶性小分子,其转运方式为依赖浓度和转运蛋白的易化扩散,其转运吸收具有竞争性抑制的特性,故选择 METO 和 AMB 联合用药,考察 AMB 与易化扩散类药物联合用药的影响及 AMB 的转运机制^[29,31]。AMB 单独给药的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值是 AMB 和 METO 联合给药的 1.21 倍,METO 单独给药的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值是 AMB 和 METO 联合给药的 1.55 倍,但是联合给药对 2 种化合物的 ER 值无显著影响,表明联合给药会同时降低 2 种化合物的转运吸收,其原因可能为联合用药时 METO 和 AMB 竞争性的与转运蛋白结合导致 METO 和 AMB 的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值均降低。人体肠道的 pH 值范围为 5~8^[32-33],所以于 AP 端设置了 3 个不同 pH 值考察肠液 pH 对 AMB 转运吸收的影响,当 AP 端 pH 为 8.0 时,AMB 的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值分别是 pH6.5 的 1.95 倍、pH7.4 的 1.32 倍,AMB 的 $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ 值随着 AP 端 pH 值的升高而增高,此结果可能与 AMB 的离子化程度高低有关,非离子型药物比离子型药

物更容易透过肠粘膜屏障进入体循环^[31]。AMB 为有机弱碱性,其解离常数 PK_a 为 9.30^[34],当肠液的 pH 值越高时,AMB 的非离子型越多,离子型越少,转运吸收的速度更快从而提高其生物利用度。

综上所述,AMB 在 Caco-2 细胞单层模型上为易化扩散转运方式,联合给药可能会降低 AMB 的吸收,联合给药方案可按先后给药方式进行给药,2 种药物给药之间有一定的时间间隔,同时提高肠液的 pH 值可提高 AMB 的转运吸收,促进其生物利用度。

参考文献:

- [1] Malerba M, Ragnoli B. Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4(8): 1119-1129.
- [2] Cazan D, Klimek L, Sperl A, et al. Safety of ambroxol in the treatment of airway diseases in adult patients [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2018, 17(12): 1211-1224.
- [3] Silveira CRA, MacKinley J, Coleman K, et al. Ambroxol as a novel disease-modifying treatment for Parkinson's disease dementia: protocol for a single-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *BMC Neurol*, 2019, 19(1): 20.
- [4] Bouscary A, Quessada C, Mosbach A, et al. Ambroxol hydrochloride improves motor functions and extends survival in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 883.
- [5] Zhao JM, Jin ZZ, Zhao QZ. The preventive effect of ambroxol hydrochloride chitosan on postoperative intraperitoneal adhesion formation in a rat model [J]. *Acta Chir Belg*, 2017, 117(4): 232-237.
- [6] Li J, Yi W, Jiang P, et al. Effects of ambroxol hydrochloride on concentrations of paclitaxel and carboplatin in lung cancer patients at different administration times [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2016, 62(13): 85-89.
- [7] Ishay Y, Zimran A, Szer J, et al. Combined beta-glucosylceramide and ambroxol hydrochloride in patients with Gaucher related Parkinson disease: from clinical observations to drug development [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2018, 68: 117-120.
- [8] Xiaorong D, Li M, Xuefeng L, et al. Effects of dexamethasone combined with ambroxol hydrochloride on T-Cell subsets and hearing in patients with secretory otitis media [J]. *Pak J pharm Sci*, 2019, 32(3 Special): 1437-1440.
- [9] Li X, Zhao Y, Huang X, et al. Ambroxol hydrochloride combined with fluconazole reverses the resistance of *Candida albicans* to fluconazole [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 124.
- [10] Sevin E, Dehouck L, Fabulas-da CA, et al. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 68(3): 334-339.

- [11] Press B. Optimization of the Caco-2 permeability assay to screen drug compounds for intestinal absorption and efflux [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 763: 139–154.
- [12] Zheng M, Zhou H, Wan H, et al. Effects of herbal drugs in Mahuang decoction and their main components on intestinal transport characteristics of Ephedra alkaloids evaluated by a Caco-2 cell monolayer model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 22–29.
- [13] Wang Q, Qiao X, Qian Y, et al. Intestinal absorption of ergostane and lanostane triterpenoids from *Androea cinnamomea* using caco-2 cell monolayer model [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2015, 5(5): 237–246.
- [14] Sarmiento B, Andrade F, da Silva SB, et al. Cell-based *in vitro* models for predicting drug permeability [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8(5): 607–621.
- [15] Press B, Di Grandi D. Permeability for intestinal absorption; Caco-2 assay and related issues [J]. *Curr Drug Metab*, 2008, 9(9): 893–900.
- [16] Lakeram M, Lockley DJ, Pendlington R, et al. Optimisation of the caco-2 permeability assay using experimental design methodology [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(7): 1544–1551.
- [17] Shah P, Jogani V, Mishra P, et al. *In vitro* assessment of acyclovir permeation across cell monolayers in the presence of absorption enhancers [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008, 34(3): 279–288.
- [18] Volpe DA. Transporter assays as useful in vitro tools in drug discovery and development [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11(1): 91–103.
- [19] Sevin E, Dehouck L, Fabulas-da CA, et al. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 68(3): 334–339.
- [20] Press B. Optimization of the Caco-2 permeability assay to screen drug compounds for intestinal absorption and efflux [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 763: 139–154.
- [21] Shah P, Jogani V, Mishra P, et al. *In vitro* assessment of acyclovir permeation across cell monolayers in the presence of absorption enhancers [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008, 34(3): 279–288.
- [22] Silveira CRA, MacKinley J, Coleman K, et al. Ambroxol as a novel disease-modifying treatment for Parkinson's disease dementia: protocol for a single-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Bmc Neurol*, 2019, 19(1): 20.
- [23] Li J, Yi W, Jiang P, et al. Effects of ambroxol hydrochloride on concentrations of paclitaxel and carboplatin in lung cancer patients at different administration times [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2016, 62(13): 85–89.
- [24] Zhang X, Chen Q, Chen M, et al. Ambroxol enhances anti-cancer effect of microtubule-stabilizing drug to lung carcinoma through blocking autophagic flux in lysosome-dependent way [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(12): 2406–2421.
- [25] Choi SW, Gu Y, Peters RS, et al. Ambroxol induces autophagy and potentiates rifampin antimycobacterial activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(9): e01019.
- [26] Fois G, Hobi N, Felder E, et al. A new role for an old drug: Ambroxol triggers lysosomal exocytosis via pH-dependent Ca^{2+} release from acidic Ca^{2+} stores [J]. *Cell Calcium*, 2015, 58(6): 628–637.
- [27] Wang X, Wang L, Wang H, et al. Perioperative lung protection provided by high-dose ambroxol in patients with lung cancer [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(2): 281–284.
- [28] Fang Y, Cao W, Xia M, et al. Study of structure and permeability relationship of flavonoids in Caco-2 cells [J]. *Nutrients*, 2017, 9(12): 1301.
- [29] Pereira C, Costa J, Sarmiento B, et al. Concepts and models for drug permeability studies, 3.3 – Cell-based *in vitro* models for intestinal permeability studies [M]. Sarmiento B, Woodhead Publishing, 2016, 57–81.
- [30] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1–3): 27–43.
- [31] Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, et al. pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(8): 1141–1148.
- [32] Palm K, Luthman K, Ros J, et al. Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport; pH-dependent transport of cationic drugs [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 291(2): 435–443.
- [33] Boisset M, Botham RP, Haeghele KD, et al. Absorption of angiotensin II antagonists in Ussing chambers, Caco-2, perfused jejunum loop and *in vivo*: importance of drug ionisation in the *in vitro* prediction of *in vivo* absorption [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 10(3): 215–224.
- [34] Lazar A, Lenkey N, Pesti K, et al. Different pH-sensitivity patterns of 30 sodium channel inhibitors suggest chemically different pools along the access pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 210.

[收稿日期] 2020-01-10