

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2019.04.012

血脑屏障渗透模型 PAMPA 的构建及其条件优化

付莹,吕金鹏,李文建,丁淑敏,柳丽,宋国强

(常州大学 制药与生命科学学院,江苏 常州 213164)

摘要:平行人工膜渗透模型(parallel artificial membrane permeation assay,PAMPA)主要以人工磷脂作为生物膜来模拟药物跨膜的屏障,能测定通过被动扩散途径跨过血脑屏障的药物,该模型操作简单,成本低。以实验室合成的化合物为研究对象,在 MultiScreen® 96-well 板上铺一层牛脑磷脂的十二烷溶液作为 PAMPA 模型,并通过高效液相色谱(HPLC)测定化合物的血脑屏障渗透率。实验中发现亲脂性化合物水溶性较差,需要添加助溶剂以帮助溶解,因此考察了 4 种助溶剂(DMSO、乙腈、乙醇、正丙醇)对化合物溶解度的影响及助溶剂含量对磷脂膜完整性的影响,最终选择了浓度为 10% 的正丙醇做为助溶剂来进行渗透实验,测得了各个化合物的渗透率,并筛选出了渗透率最好的化合物,为将来的药物开发提供指导。

关键词:平行人工膜渗透模型;血脑屏障;助溶剂;磷脂膜;渗透率

中图分类号:TK 8

文献标志码:A

文章编号:2095-0411(2019)04-0086-07

Model Establishment and Optimized Conditions of PAMPA for Blood-Brain Barrier

FU Ying,LYU Jinpeng,LI Wenjian,DING Shumin,LIU Li,SONG Guoqiang

(School of Pharmaceutical Engineering & Life Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract:Parallel artificial membrane permeation assay (PAMPA) mainly uses artificial phospholipids as biofilm to simulate the barrier of drug transmembrane, and can measure drugs that cross the blood-brain barrier through passive diffusion. The model is simple in operation and low in cost. In this study, a laboratory-synthesized compound was used as a research object. A layer of bovine brain phospholipid dodecane solution was applied to the MultiScreen® 96-well plate as a PAMPA model, and the Blood-Brain Barrier Permeability of the compound was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). In the experiment, it was found that the lipophilic of four cosolvents (DMSO, acetonitrile, ethanol, n-propanol) on the solubility of the compound and compound was poorly water-sol-

收稿日期:2018-03-20。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81603336)。

作者简介:付莹(1993—),女,江苏徐州人,硕士生。通信联系人:宋国强(1969—),E-mail:sgq@cczu.edu.cn

引用本文:付莹,吕金鹏,李文建,等.血脑屏障渗透模型 PAMPA 的构建及其条件优化[J].常州大学学报(自然科学版),2019,31(4):86-92.

uble. To solve this problem, this experiment investigated the effects of the concentration of the cosolvent on the integrity of the phospholipid membrane. The effect was chosen to select the best cosolvent for the penetration test of the Blood-Brain Barrier penetration model PAMPA.

Key words: parallel artificial membrane permeation model; Blood-Brain Barrier; cosolvent; phospholipid film; permeability

血脑屏障(Blood Brain Barrier, BBB)是一种保护大脑免受血液循环中有害物质的影响,并调节特定分子从血液进入中枢神经系统(central nervous system, CNS)的膜^[1-2]。血脑屏障包括脑毛细血管内皮细胞形成的血浆与脑细胞间的屏障和脉络丛形成的血浆与脑脊液间的屏障,这些屏障能够限制物质(多半为有害物质)在血液和脑组织之间的自由交换,并对不同的物质有不同的通透性^[3-4]。

许多药物正在被发现用于中枢神经系统(CNS)疾病,但由于无法穿过血脑屏障(BBB)而未能进入市场,是中枢神经药物开发成新药过程中的一个重要限制因素,这对药学界来说是一个明显的挑战^[5-8],因此需要开发检测候选药物血脑屏障(BBB)渗透率的方法以用作中枢神经药物的早期筛选。

平行人工膜渗透模型(parallel artificial membrane permeation assay, PAMPA),在 1998 年首先由 Kansy 等^[9]建立,该模型比传统细胞及动物模型更经济、高效、便捷,能够快速检测药物通过人工膜的渗透率。PAMPA 是一种新型的、基于人造膜系统的,用于药物转运分析的体外模型,用于评估药物通过被动扩散途径跨过血脑屏障的通透性^[10-13]。该模型是一种基于 96 孔板技术的快速体外系统,主要以人工脑磷脂作为生物膜来进行药物的血脑屏障渗透研究^[14]。

在药物开发过程中,经常遇到水溶性差的化合物,这些化合物在确定其渗透性时经常会引起一些问题,特别是在体外渗透性试验中^[15]。为了克服这个问题,可以在测定前过滤溶液,但有时过滤后溶液中化合物的量太低而不能检测到,特别是对于微溶化合物^[16]。在用 PAMPA 模型测定药物血脑屏障渗透率时,化合物在水性介质里的浓度必须达到一定的量。对于一些溶解性较差的化合物,通常会在水性介质中加入一定的助溶剂,例如 DMSO、乙腈、乙醇、正丙醇等,用于增加溶解度,因此助溶剂的选择对于 PAMPA 模型渗透性的测定有着至关重要的影响^[17-18]。

选用了课题组前期合成的一类活性小分子化合物,在自己建立的 PAMPA 上,选用合适的助溶剂来溶解待测化合物,然后进行渗透实验,以考察化合物的渗透率,为将来的药物开发提供指导。

1 实验材料

试剂:苯丙酸类化合物 1—6(实验室合成,如图 1 所示);牛脑磷脂(Avanti Polar Lipids Inc);十二烷(Sigma);荧光、卡马西平和阿替洛尔均由阿拉丁化学试剂有限公司提供;乙腈和甲醇为色谱纯, Sigma 公司;其余试剂均为国药,分析纯。

仪器:MultiScreen® 96 孔板(Millipore, USA);高效液相色谱(HPLC 1260, Agilent);多功能读板

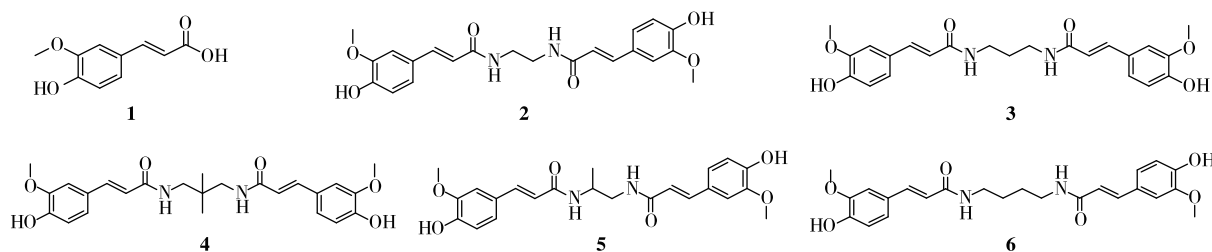


图 1 苯丙酸类化合物 1—6

机(Spectra Max M5);电子分析天平(JA1203,上海良平);恒温培养箱(DHP-9162,上海齐欣)。

2 方法与结果

2.1 PAMPA 模型的建立

PAMPA 模型装置如图 2 所示,上层为板盖,中间为 96 孔滤板(供给板),下层为接收板。首先,配制体积分数为 2% 的牛脑磷脂(PBL)-十二烷溶液,超声至溶液完全溶解。然后,贴壁加 100 μL 70% 的乙醇,润湿 96 孔滤板,30 s 后吸出,加入 100 μL PBS 洗涤,重复 2 遍,第二遍吸净所有 PBS。取 5 μL 超声后的 PBL-十二烷溶液加到供给板的滤膜上,然后加入 150 μL 药物待测液,在接收板各孔中加入 300 μL PBS。

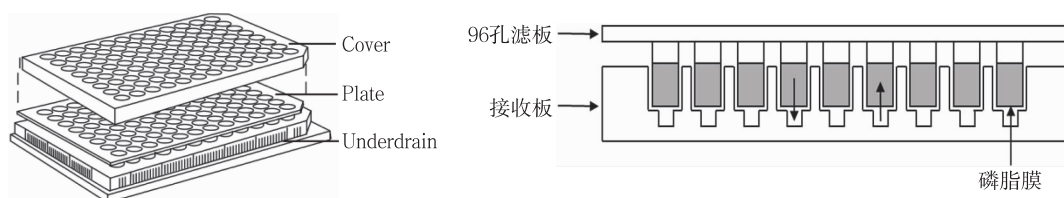


图 2 PAMPA 模型装置图

2.2 PAMPA 人工膜完整性检测

荧黄(LY)无法透过完整的脂质膜,因此选择荧黄为阳性化合物,通过检测接收板中的荧光强度,可以确定人工膜的完整性。称取 2.61 mg 荧黄,加入 100 μL DMSO 配成 500 mmol/L 的母液,吸取 1 μL 母液加入到 1 mL 含 1% DMSO 的 PBS 溶液中,配制好的荧黄检测液待用。

PAMPA 模型供给板的滤膜上加入 5 μL PBL-十二烷溶液后,立即加入 150 μL 的检测液;对照组用 5 μL 十二烷溶液代替 PBL-十二烷溶液;空白组不加磷脂膜,直接加入 150 μL 检测液,在各个接收板上加入 300 μL 的 PBS 缓冲溶液,每组实验重复 3 次。把供给板放在接收板上,盖上上层盖子,室温避光 4 h 后取出接收板,用多功能读板机测定接收液中荧黄的荧光强度(激发波长为 425 nm,发射波长为 528 nm),结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出,供给板上加入 PBL-十二烷溶液后,接收板中荧黄的荧光强度几乎为 0,因此加入 PBL-十二烷后的人工磷脂膜是完整的。

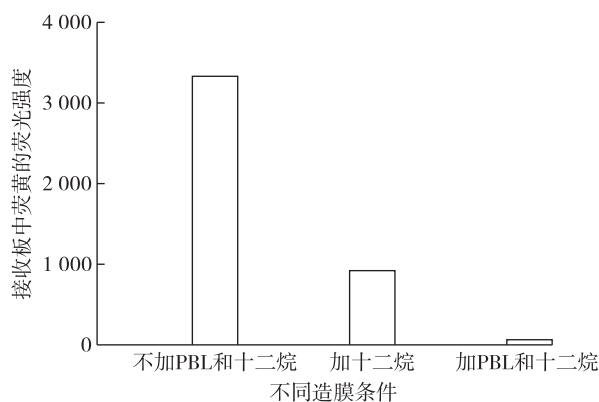


图 3 PAMPA 人工膜完整性检测

2.3 不同浓度助溶剂的配制

选取 DMSO、乙腈、乙醇、正丙醇 4 种助溶剂,分别配制 1 mL 不同体积分数助溶剂(4 种)的 PBS 溶液,吸取 1 μL 50 mmol/L 的荧黄母液(前已配制),分别加入到含助溶剂的 PBS 溶液中。

2.4 助溶剂对磷脂膜的影响

按照上述 2.1,2.2 的方法进行实验,每种的分体积分数做 4 个复孔,空白组在供给板上加 150 μL 含 20% 乙腈的 PBS,在各个接收板上加入 300 μL 的 PBS 缓冲溶液,室温避光 4 h,结果如图 4 至图 7 所示。

荧光透过完整磷脂膜后,荧光强度不高于空白组的3倍。图中横线标记的数值为空白组荧光强度的3倍。

从图4至图7可以看出,当待测液中含1%的DMSO或1%的乙醇时,磷脂膜都能保持稳定,DMSO的体积分数大于1%时,磷脂膜会被破坏;当待测液中乙腈的体积分数小于20%时,磷脂膜都能保持稳定;当待测液中正丙醇的体积分数小于或等于10%时,磷脂膜能保持稳定,正丙醇的体积分数为20%时,磷脂膜会被破坏。

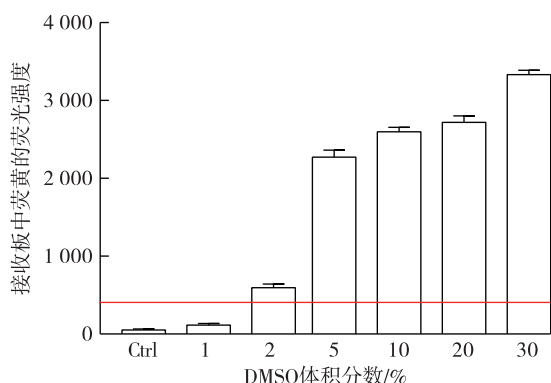


图4 DMSO 体积分数对 PAMPA 膜完整性的影响

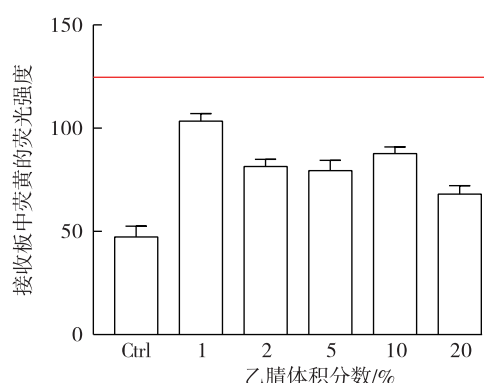


图5 乙腈体积分数对 PAMPA 膜完整性的影响

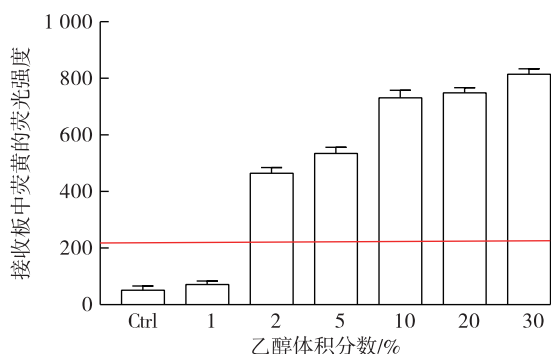


图6 乙醇体积分数对 PAMPA 膜完整性的影响

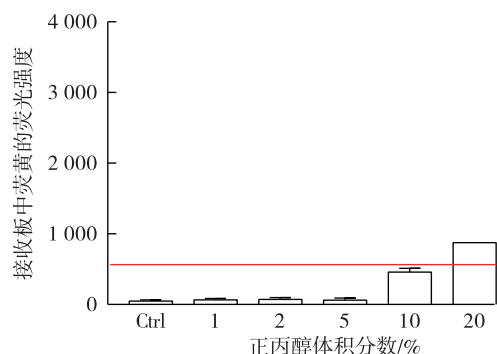


图7 正丙醇体积分数对 PAMPA 膜完整性的影响

因为DMSO的体积分数为5%时,溶液稀释时会有沉淀析出,所以现在忽略DMSO,进一步考察乙腈(1%,2%,5%,10%,20%)、乙醇(1%)和正丙醇(1%,2%,5%,10%)对化合物溶解度的影响。

通过实验观察发现,用体积分数为10%的正丙醇溶解待测化合物时,溶液稀释成所有所需浓度后,均无沉淀析出,除此之外,其他均会有少量沉淀析出。因此,用10%的正丙醇为助溶剂,对待测化合物进行PAMPA模型的血脑屏障渗透研究。

2.5 待测药物的 PAMPA 模型透过实验

分别称取4 mg 化合物1—6及卡马西平、阿替洛尔(其中卡马西平为阳性对照,阿替洛尔为阴性对照),用1 mL 正丙醇溶解,然后分别加入9 mL 含20% 乙腈的PBS溶液,配成400 $\mu\text{g/mL}$ 的药物待测液。按照上述2.1,2.2的方法进行PAMPA模型透过实验,室温16 h后取出接收板,用高效液相色谱分别检测接收液的峰面积,并带入标曲计算化合物的质量浓度,然后按照下式分别计算出各化合物血脑屏障的透过系数 $P_e(\text{cm/s})$ 和渗透率 T 。

$$P_e = \frac{-218.6}{t} \log \left[1 - \frac{2\rho_{At}}{\rho_{Dt_0}} \right], T = \frac{\rho_{At}}{\rho_{Dt_0}} \times 100\%$$

式中: ρ_{At} 为 t 时接受板中药物溶液的质量浓度, mg/L; ρ_{Dt_0} 为供给板中溶液的初始质量浓度, mg/L; t 为孵育时间, s。

根据公式计算得到各化合物血脑屏障的透过系数 P_e 和渗透率 T , 见表 1。

表 1 各个化合物的血脑屏障渗透系数及渗透率

化合物	标准曲线	R^2	PAMPA	
			$P_e \times 10^7 / (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$	$T \times 10^3 / \%$
1	$y = 0.104\ 2x - 1.473\ 6$	0.997	2.57 ± 0.003	7.87 ± 0.05
2	$y = 0.281\ 8x - 2.258\ 5$	0.999	3.35 ± 0.02	10.30 ± 0.31
3	$y = 0.129\ 8x + 0.271\ 3$	0.998	4.73 ± 0.08	14.32 ± 0.70
4	$y = 0.145\ 1x - 0.749\ 4$	0.998	6.50 ± 1.00	19.83 ± 8.46
5	$y = 0.148\ 3x - 1.464\ 3$	0.996	2.57 ± 0.01	7.73 ± 0.16
6	$y = 0.123\ 7x - 0.176\ 8$	0.996	4.77 ± 0.003	14.37 ± 0.05
卡马西平	$y = 0.030\ 3x + 0.3177$	0.998	8.00 ± 0.73	24.53 ± 6.25
阿替洛尔	$y = 0.213\ 7x - 1.102\ 5$	0.998	1.80 ± 0.03	5.89 ± 0.04

从表 1 中可以看出, 卡马西平的渗透率最高, 阿替洛尔的渗透率最低, 根据阳性和阴性药物的渗透率, 也可以进一步验证 PAMPA 模型的可行性。实验室合成的化合物中, 化合物 3 的渗透率都最高, 仅次于阳性药物, 因此本课题组准备用化合物 3 进行下一步的细胞实验。

2.6 待测药物标准曲线的绘制

分别称取 5 mg 化合物 1—6 及卡马西平、阿替洛尔, 加入 500 μL 正丙醇溶解, 配成 10 g/L 的一级母液, 待用。分别吸取 10 g/L 的一级母液 30 μL , 加入 720 μL 含 20% 乙腈的 PBS, 配成 400 $\mu\text{g/mL}$ 的二级母液。分别吸取二级母液, 加入含 20% 乙腈的 PBS 依次稀释成 0, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的标准溶液, 用高效液相色谱分别测定其峰面积, 以峰面积对化合物的质量浓度做标准曲线, 结果如图 8 所示。

3 结 论

本研究选用实验室合成的苯丙酸类化合物来进行血脑屏障渗透研究, 选取 DMSO 为助溶剂, 并控制其体积分数小于 5%, 用此条件来溶解待测化合物^[19-20], 溶解后的化合物用含 20% 乙腈的 PBS 稀释成所需浓度。实验中发现, 稀释后的溶液中会有少量白色沉淀析出, 随着稀释比例的增大, 白色沉淀逐渐增多, 溶液变浑浊。对于这些水溶性较差的化合物, 从助溶剂入手, 考察不同助溶剂对溶解度的影响, 从而选取可溶解待测化合物的助溶剂来进行试验。通过参考相关文献, 选取了 4 种主流助溶剂: DMSO、乙腈、乙醇、正丙醇。通过不同助溶剂和同一助溶剂不同浓度对化合物溶解度的影响及磷脂膜完整性的实验, 最终选择了 10% 正丙醇做为本次实验中的助溶剂。用此助溶剂来溶解待测化合物, 然后进行血脑屏障渗透模型 PAMPA 的渗透实验, 从而得到了各个化合物的渗透率, 为将来的药物开发提供了指导, 同时也为 PAMPA 模型上助溶剂的选择提供了借鉴。

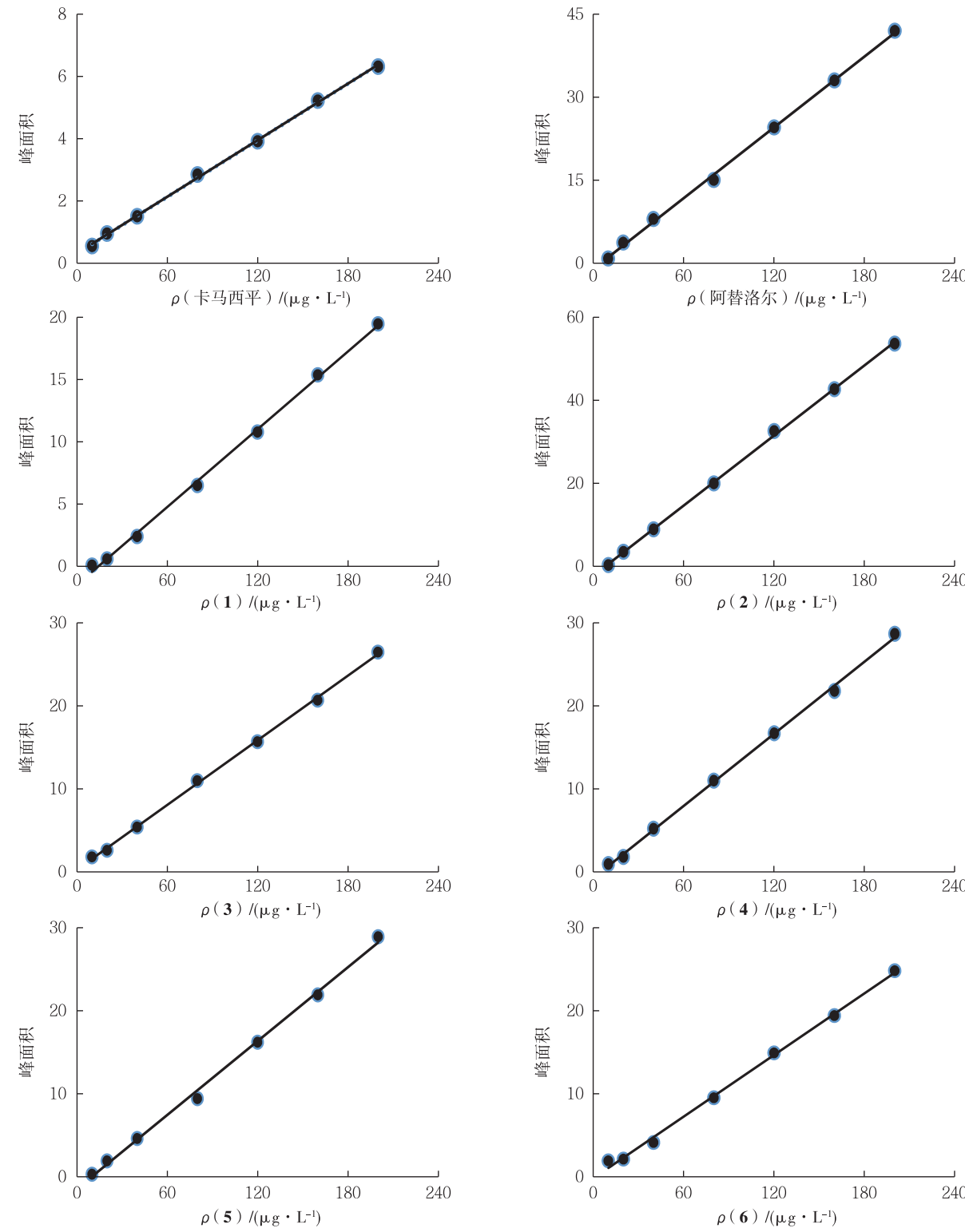


图 8 待测药物的标准曲线

参考文献:

- [1]EGLETON R D, DAVIS T P. Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the Brain-Binding to plasma proteins[J]. *Peptides*, 1997, 18(9): 1431-1439.
- [2]PARDRIDGE W M. CNS drug design based on principles of Blood-Brain Barrier transport[J]. *Neuro Chem*, 1998, 70(5): 1781-1792.
- [3]SCHERRMANN J M. Drug delivery to brain via the Blood-Brain Barrier[J]. *Vascular Pharmacology*, 2002, 38(6): 349-354.
- [4]SUN J, XIE L, LIU X. Transport of carbamazepine and drug interactions at Blood-Brain Barrier[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(2): 249-253.
- [5]MAYUR M P, BHOOMIKA M P. Crossing the Blood-Brain Barrier: recent advances in drug delivery to the brain[J]. *CNS Drugs*, 2017, 31(2): 109-133.
- [6]艾妮.中药成分血脑屏障渗透性的计算预测研究及验证[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [7]梁超, 李安民. 评价药物通过血脑屏障方法现状[J]. *临床军医杂志*, 2009, 37(3): 498-500.
- [8]HABGOOD M D, BEGLEY D J, ABBOTT N J. Determinants of passive drug entry into the central nervous system [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2000, 20(2): 231-252.
- [9]KANSY M, SENNER F, GUBERNATOR K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998, 41(7): 1007-1010.
- [10]MALAKOUTIKHAH M, PRADES R, TEIXIDO M, et al. N-Methyl phenylalanine-rich peptides as highly versatile blood-brain barrier shuttles[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(6): 2354-2363.
- [11]于晖.合成磷脂类化合物及其药物[D].上海: 东华大学, 2009: 80-100.
- [12]葛建丹, 陈媚, 宋必卫. 用 PAMPA 和 MDCK 模型研究川芎嗪的跨膜吸收机制[J]. *浙江工业大学学报*, 2010, 38(6): 616-619.
- [13]SUGANO K, HAMADA H, MACHIDA M, et al. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay[J]. *J Biomol Screen*, 2001, 6(3): 189-196.
- [14]吴一凡, 刘晖, 倪京满. 平行人工膜渗透模型及其应用进展[J]. *药学报*, 2011, 46(8): 890-895.
- [15]MORTEZA M, MERITXELL T, ERNEST G. Toward an optimal blood-brain barrier shuttle by synthesis and evaluation of peptide libraries[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(16): 4881-4889.
- [16]KIYOHICO S, HIROKAZU, MINORU M, et al. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 228(2): 181-188.
- [17]颜锐思, 张晓露, 杨慧, 等. 药物平行人工膜渗透性试验的研究进展[J]. *今日药学*, 2012, 22(1): 51-55.
- [18]LIPINSKI C A. Drug-like property and the cause of poor solubility and poor permeability[J]. *J Pharm Toxicol Meth*, 2000, 44(1): 235-249.
- [19]马林楠, 刘晖, 倪京满. 血脑屏障渗透模型 PAMPA 的构建及其应用[J]. *中国科技论文在线*, 2014, 7(11): 1093-1096.
- [20]LI D, EDWARD H K, KRISTI F, et al. High throughput artificial membrane permeability assay for Blood-Brain Barrier[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, 38(3): 223-232.

(责任编辑:殷丽莉)