2,6-吡啶二羧酸钒(Ⅲ, Ⅳ)配合物透过 MDCK 细胞单层的能力以及与 Caco-2 细胞单层的比较

张 悦 杨晓达 * 王 夔

(北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室; 化学生物学系预防药物研究室, 北京 100083.)

* 联系人, E-mail: xyang@bjmu.edu.cn

摘要 应用 MDCK 细胞模型研究了有降糖作用的 2,6-吡啶二羧酸钒(Ⅲ)、钒(Ⅳ)、钒(Ⅴ)配合物吸收能力和细胞毒性, 并和 Caco-2 细胞模型的一些结果进行了比较. 用 MDCK 细胞模型, 实验测得 3 种钒配合物的表观渗透系数(P_{app})分别为 7.5 ± 1.0 (V(Ⅲ)-dipic), 1.0 ± 0.2 (V(Ⅳ)-dipic), 1.7 ± 0.4 (V(Ⅴ)-dipic) ($\times 10^{-6}$ cm/s); 其中 V(Ⅲ)-dipic 络合物有明显较大的吸收能力, 这和其动物实验中的降糖效果一致. 用 Caco-2 细胞模型测定得到相近的跨膜渗透能力($P_{app}=1\sim3 \times 10^{-6}$ cm/s); 但显著不同的是, 在过量吡啶二羧酸配体存在时, 3 种配合物从 AP $\rightarrow$ BL 方向的跨 MDCK 细胞单层的渗透能力有较大的提高, 显示在 MDCK 上可能存在氧钒配阴离子的主动运输方式. 3 种配合物对 MDCK 细胞的毒性相似, IC_{50} 为 0.6~0.9 mmol/L, 略高于对 Caco-2 细胞的毒性($IC_{50}=1.6\sim2$ mmol/L); 其结果与渗透能力相呼应, 表明钒化合物的吸收、代谢和毒性有着密切的相关关系.

关键词 钒配合物 MDCK Caco-2 肠吸收 糖尿病

近年来, 各种钒化合物的类胰岛素及抗糖尿病作用受到国内外学者的重视和深入研究. 目前钒化合物降糖效应的机理并不清楚, 同时无机钒化合物较低的口服吸收能力($<10\%$)^[1]和对胃肠道的刺激性等影响限制了钒化合物进入进一步的临床应用^[2-5]. 为此, 合成了一系列新的有机配体钒络合物, 如双麦芽酚氧钒(VO(ma)₂ Bis(maltolato)oxovanadium (Ⅲ))^[6,7]、双乙酰丙酮氧钒等^[8,9]. 其中双麦芽酚氧钒已经在国外开始了临床研究^[10]. 近几年来, 以吡啶环为母核的一系列包含羧基的衍生物有机配体又得到关注^[11]. Crans 等合成了一系列以 2,6-吡啶二羧酸(dipicolinic acid, Dipic)为配体的不同价态的氧钒配合物, 用动物模型研究了它们的降糖效果, 发现 V(Ⅲ)-dipic 配合物降糖作用较为显著, 并未发现明显毒性反应^[8]. 有机氧钒配合物一般有增大的生物利用度和较小的毒性反应^[9,12,13].

分析可知, 解决钒化合物应用的一个关键是提高生物利用度. 对口服药物来说, 其跨肠道表皮细胞的渗透能力是一个决定性的环节. 目前广泛应用的离体研究药物肠渗透过程主要是 Caco-2 和 MDCK 细胞单层模型^[14,15]. Caco-2 是人源的肠细胞系^[16,17], 因

此能够很好地预测药物的口服吸收能力. 我们用 Caco-2 细胞单层模型研究比较了几种有机和无机钒化合物的肠吸收能力, 发现几种钒化合物均以被动扩散的机理吸收^[18]. 但 Caco-2 细胞单层模型的建立需要 21 天的培养程序, 耗时耗力. 而 MDCK 细胞单层模型仅需 7 天的培养便可达到分化成熟, 比较高效. 此外, MDCK 来源于狗肾上皮细胞^[19], 细胞亚型少, 细胞膜表面受体的种类和数量均大大少于 Caco-2 细胞^[20], 这种简单性使 MDCK 细胞模型的实验结果相比较而言重现性高^[21]. Irvine 应用人肠黏膜、Caco-2 细胞模型、MDCK 细胞模型测定了一系列药物的经小肠吸收能力, 发现 MDCK 细胞模型在研究以被动扩散方式经肠吸收的药物时, 预测吸收能力上相对于 Caco-2 细胞模型略占优势^[21]. 但是, 目前还没有两种细胞对于金属配合物吸收有何差异的研究报道. 因此, 建立 MDCK 细胞模型并且与 Caco-2 细胞模型比较对于研究钒化合物以及其他金属络合物的吸收和细胞毒性是有实际意义的.

本文应用 MDCK 细胞模型分别研究了 V(Ⅲ)、V(Ⅳ)O、V(Ⅴ)O₂-2, 6-吡啶二羧酸的 3 种配合物(见图 1)小肠吸收能力和细胞毒性. 并且与 Caco-2 细胞模型的结果进行了比较.

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972005-102>

图1 2,6-吡啶二羧酸钒氧配合物(, ,)的结构示意图

1 材料与方法

() 材料. 狗肾上皮细胞 MDCK、人体结肠腺癌细胞 Caco-2 购自中国协和医科大学基础医学研究所细胞中心; 细胞培养基及其他试剂购自 Hyclone 公司. 12 孔 Transwell (1 cm², 3 μm) 转运池购自 Corning Costar 公司; 钒氧配合物由 Crans 教授(Colorado State University, USA)惠赠.

() 细胞培养. 培养基为 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium 高糖, 3.7 g/L 碳酸氢钠)培养基, 另含 10% 胎牛血清, 1% 非必需氨基酸, 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素, 置 5% CO₂ 培养箱中培养. 实验所用 MDCK 细胞传代数为 35~45 代, Caco-2 细胞传代数为 45~60 代.

() 细胞单层的制备和表征. MDCK, Caco-2 细胞接种于 Transwell 转运池, 接种密度分别为 5×10⁴ (MDCK) 和 1×10⁵ (Caco-2) 个/cm², 加在顶端 (Apical, AP) 和基底端 (Basolateral, BL) 的培养基分别为 0.5 和 1.5 mL. 按文献方法^[14] MDCK 细胞培养 7 d; Caco-2 培养 21 d, 达到汇合分化. 用上皮电阻仪 (EVOM, World Precision Instrument, Sarasota, FL) 测量细胞单层的跨膜电阻 (Transepithelial electrical resistance, TEER), 测试细胞完整性. 此外, 用等渗缓冲溶液 PBS (pH 7.4) 洗涤细胞单层 2 次, 切下聚碳酸酯膜, 25% 戊二醛/PBS 固定 30 min, PBS 漂洗 3 次. 1% 四氧化锇固定 45 min, PBS 漂洗 3 次之后, 先后用丙酮/醋酸异戊酯 (1:1)、醋酸异戊酯分别脱水 10, 30 min. 临界点干燥、喷金后, 在扫描电子显微镜 (JSM-5600 LV, Japan) 下观察细胞单层外观.

() 转运实验. 按上述相同方法分别制备 MDCK、Caco-2 细胞单层. 用等渗缓冲溶液 HBSS (pH 7.4, 37 °C)、EBSS (pH 6.0, 37 °C) 洗 2 次后, 测量细胞单层的跨膜电阻 TEER. 实验用细胞单层 TEER 分别大于 700 Ω·cm² (Caco-2) 和 140 Ω·cm² (MDCK). 按照实验方案分别于 BL 端或 AP 端加入标准样品 (普奈洛尔 Propranolol, 阿替洛尔 Atenolol) 或实验样品. 置于 37 °C 恒温水浴摇床进行转运实验, 按设计时间点取样. 普奈洛尔、阿替洛尔的量用 HPLC (Agilent 1100, USA) 法测量^[22]; 钒总量用等离子发射质谱仪 ICP-MS 测定^[18] (ELAN5000 ICP-MS).

表观渗透系数 P_{app} (apparent permeability coefficient) 按下式计算:

$$P_{app} = (\Delta Q / \Delta t) / (A C_0),$$

其中 $\Delta Q / \Delta t$ 为单位时间内药物的转运总量, A 为药物

与细胞的作用面积, C_0 为药物初始浓度.

() MTT 实验. MDCK、Caco-2 细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度接种于 96 孔板, 用 DMEM-10 培养 48 h. 吸出培养基后, 用 DMEM(无 FBS)洗涤一次, 加入稀释于 DMEM(无 FBS)的钒配合物 100 μL (浓度系列为 2.70×10^{-3} , 9.00×10^{-4} , 3.00×10^{-4} , 1.00×10^{-4} , 3.33×10^{-5} , 1.11×10^{-5} mol/L), 置 5% CO_2 培养箱(37)中培养 24 h. 取出, 用 PBS 缓冲液洗涤一次, 加入 100 μL MTT(0.5 mg/mL)后置 5% CO_2 培养箱(37)中温育 4 h. 取出, 吸去溶液, 加入 100 μL DMSO 溶解. 15 min 后在酶标仪(TECAN, Switzerland)上测定 570 nm, 630 nm 吸收值. 计算 $A=A_{570}-A_{630}$, 相对细胞成活率 = $A_{\text{TEST}}/A_{\text{CONTROL}} \times 100\%$. 通过相对细胞成活率对浓度作图, 用 Origin 软件拟和 Hill 公式, 计算得到钒化合物的 IC_{50} 值.

2 结果与讨论

2.1 MDCK 细胞单层的制备和 Caco-2 细胞单层比较

MDCK细胞单层按文献方法于 12 孔Transwell上培养 7 天后, 测定TEER均为 140~300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, 这与文献结果一致[15], 表明细胞单层的致密性与完整性足够良好. 显然MDCK细胞单层的TEER与Caco-2 细胞单层(大于 700 $\Omega \cdot \text{cm}^2$)相比, 其细胞紧密连接程度较低. 通过扫描电子显微镜观察, 培养 7 天MDCK细胞单层已分化出致密的微绒毛(图 2). MDCK细胞单层的微绒毛比Caco-2 更为密集和粗壮, 显示MDCK细胞单层有较大的渗透面积, 因此其药物渗透过膜的能力可能更强.

2.2 标准化合物普奈洛尔与阿替洛尔的跨细胞单层转运

普奈洛尔是高通透性的靠被动扩散机理跨膜的 药物, 而阿替洛尔是典型的仅透过细胞连接吸收 (paracellular transport)的药物. 两种药物通常用作转运实验的标准. 表 1 给出两种药物透过MDCK 和 Caco-2 细胞单层的 P_{app} 值. 可以看出, 两种药物跨 Caco-2 细胞单层渗透的 P_{app} 与文献基本一致[16]. 而对于MDCK细胞单层, 所测定的 P_{app} 比Caco-2 细胞单层明显增大, 显示药物更容易透过MDCK细胞单层. 特别是阿替洛尔, 其 P_{app} 在透过MDCK细胞单层时为 4.5×10^{-6} cm/s, 说明MDCK细胞单层有较大的透过细胞间隙转运的吸收能力.

图 2 扫描电子显微镜观察 MDCK、Caco-2 细胞单层形态 (a) MDCK 细胞; (b) Caco-2 细胞

表 1 普奈洛尔与阿替洛尔的表现渗透系数 $P_{\text{app}}(10^{-6}\text{cm/s})^{\text{a}}$

	Caco-2 细胞模型	MDCK 细胞模型
普奈洛尔	28.5±0.6	51.2±3.3
阿替洛尔	0.21±0.01	4.5±0.3

a) 实验条件: 转运方向为 AP→BL, 标准药物初始浓度为 1.0 mmol/L, 所测 P_{app} 为 3 个膜孔的平均值

2.3 2,6-吡啶二羧酸钒配合物(, ,)跨细胞单层的转运

2,6-吡啶二羧酸钒配合物(, ,)跨 MDCK 和 Caco-2 细胞单层转运的结果显示于表 2. 从跨 MDCK 单层的 P_{app} 可见, 在 3 种络合物中, V()配合物跨膜渗透能力较强, 其他两种氧钒配合物的渗透能力相对低一些, 这与 3 种化合物的降糖效果一致. Caco-2 细胞单层转运的实验结果显示, 3 种配合物在两种不同跨膜方向的 P_{app} 均比较接近, 在 $(1\sim3) \times 10^{-6}$ cm/s 的范围. 但 V()配合物跨膜渗透能力较低, 这与 MDCK 单层结果不同.

在过量 2,6-吡啶二羧酸配体存在时, 3 种配合物从 BL→AP 方向跨 MDCK 细胞单层转运的能力没有明显变化, 但从 AP→BL 方向的渗透能力获得较大的

表2 2,6-吡啶二羧酸钒配合物的表观渗透系数 P_{app} (10^{-6} cm/s)

配合物种类	过量配体浓度	MDCK 细胞单层			Caco-2 细胞单层
		AP→BL	BL→AP	比值	AP→BL
V()-dipic	0	7.5±1.0	3.7±0.5	2.0	1.4±0.2
	0.25 mmol/L	11.1±2.7	2.9±0.2	3.8	—
V()-dipic	0	1.0±0.2	0.5±0.1	2.0	3.6±0.2
	0.25 mmol/L	4.0±0.2	1.2±0.2	3.3	—
V()-dipic	0	1.7±0.4	1.1±0.1	1.5	3.0±0.3
	0.25 mmol/L	7.7±1.6	1.2±0.2	6.4	—

实验条件: 实验药物初始浓度为 0.25 mmol/L, 所测 P_{app} 为三个膜孔的平均值

提高. 除了绝对 P_{app} 的增大外, 其双向渗透系数 $P_{app}(AP \rightarrow BL)/P_{app}(BL \rightarrow AP)$ 的比值从 1.6~2.0 变为 3.3~6.4, 表明 AP→BL 方向的渗透相对扩大. 比较而言, 在 Caco-2 细胞模型上, 3 种钒配合物有无配体加入时的渗透能力没有明显变化.

2.4 2,6-吡啶二羧酸钒配合物(, ,)对 MDCK 细胞毒性

不同 2,6-吡啶二羧酸钒配合物(, ,)对 MDCK 细胞的毒性很相近, IC_{50} 分别为 0.86 ± 0.05 V()-dipic, 0.90 ± 0.15 V()-dipic, 0.60 ± 0.04 V()-dipic mmol/L. 此细胞毒性略高于配合物对 Caco-2 细胞的毒性, IC_{50} 分别为 1.69 ± 0.23 V()-dipic, 1.93 ± 0.27 V()-dipic, 1.84 ± 0.44 V()-dipic mmol/L.

2.5 讨论

本实验建立了 MDCK 细胞单层模型, 从细胞分化形态和跨膜电阻看(详见 2.1 结果), 所建立的细胞单层与文献结果一致, 表明了所建立的模型符合药物转运实验的要求. 对标准化化合物的表观渗透系数测定可见, MDCK 细胞单层的渗透系数数值比 Caco-2 细胞单层的大, 这与 MDCK 细胞具有较大的渗透面积一致. 同时, 由于 MDCK 细胞连接不如 Caco-2 紧密, 因此具有较大的通过细胞间隙的渗透能力. 从表 2 实验结果看到, 3 种钒-吡啶二羧酸络合物渗透系数 P_{app} 在 $(1 \sim 11) \times 10^{-6}$ cm/s, 具有一定良好的口服吸收能力; 但与标准化化合物普奈洛尔和阿替洛尔的 P_{app} 比较, 这些钒配合物跨膜渗透能力接近而有限, 仍然期待进一步改变配合物结构或其他方法提高其生物利用度. 在跨 MDCK 细胞单层的渗透能力上, 3 种钒-吡啶二羧酸络合物有一些差别. 其中 V()-吡啶二羧酸络合物具有较大的 P_{app} 值, 显示其有相对较大的口服吸收能力; 这和该化合物在动物实验中有良好的降糖效果是一致的. 一般情况下, 由于 Caco-2 细胞是人源的, 因此 Caco-2 细胞模型与人的肠道更接近, 特

别是能够反映药物通过载体的吸收情况, 这对于预测一些药物体内吸收是关键. 不过, 从另一角度, Caco-2 细胞是结肠细胞, 细胞连接比小肠更为紧密, 此外由于是体外细胞培养, 条件与体内生长环境有差距, Caco-2 细胞易出现表面 P-型药物外排受体 (P-gp) 过度表达的情况. 因此, 对靠简单扩散机制吸收的药物分子, Caco-2 模型一般都低估其渗透和吸收能力^[14]. 上述结果显示在预测完全靠简单扩散机制跨膜的带电荷小分子, 如金属配合物的体内吸收能力上, MDCK 细胞模型可能比 Caco-2 更为合理, 和 Irvine 等的观点是一致的^[21].

与 MDCK 细胞单层的测定结果比较, 3 种配合物跨 Caco-2 细胞单层的能力基本接近. V()-dipic 在 MDCK 细胞单层的表观渗透系数比 Caco-2 细胞单层大 5 倍左右, 而 V(,)-dipic 配合物则接近或者偏小. 可能性之一是两种细胞单层对药物的渗透能力, 特别是通过细胞间隙的渗透能力的差异造成; 此外配合物的电荷情况不同可能也有影响. 因此配体电荷对跨膜扩散的影响值得深入研究. 与标准化化合物以及我们以前的结果^[16,18]相比较, 3 种钒-吡啶二羧酸络合物有一定良好的渗透能力, 低于双乙酰丙酮氧钒而高于双麦芽酚氧钒^[18]. 在 3 种钒-吡啶二羧酸络合物中, 中心钒原子的化合价态的不同, 但其跨 Caco-2/MDCK 转运的能力相互接近, 说明配合物可能基本上以相近的形式跨膜转运. 其中深入的化学机理值得进一步的研究确认.

值得注意的是, 与 Caco-2 单层渗透重要的不同是: 在有过量配体存在时, 3 种钒-吡啶二羧酸络合物从 AP→BL 方向跨 MDCK 细胞单层膜的渗透能力都大大提高, 使得其双向渗透系数 $P_{app}(AP \rightarrow BL)/P_{app}(BL \rightarrow AP)$ 的比值从 1.6~2.0 增大 3.3~6.4. 此结果显示配合物可能存在主动运输的方式, 有待进一步的实验确认和发现运输机制. 有一种可能性是在过量配体存在时, 3 种配合物都以 1:2 配合物的阴

离子形式存在,有可能借助 MDCK(肾细胞)上某种阴离子转运载体而吸收。

用MTT方法测定了 3 种配合物对MDCK细胞的 IC_{50} 值,可见其毒性($IC_{50} = 0.60 \sim 0.90$ mmol/L)稍大于配合物对Caco-2 细胞的毒性($IC_{50} = 1.6 \sim 2$ mmol/L)。可能由于MDCK细胞形态和载体表达更利于吸收,而Caco-2 细胞由于表达细胞色素P450,包括 相代谢酶及 相代谢酶^[23];其细胞表面P-型药物外排受体(P-gp)表达较高并有可能存在过度表达^[20],因而细胞的代谢和排除能力更强。因此,3 种配合物的细胞毒性结果与上面跨膜转运结果相呼应,再次说明钒化合物的吸收、代谢和毒性有着密切的相关关系。

3 结论

本文建立了 MDCK 细胞单层药物渗透模型,研究了抗糖尿病 2,6-吡啶二羧酸钒配合物(,) 的渗透能力和细胞毒性,并与 Caco-2 细胞单层进行了比较。结果表明 3 种钒配合物都有一定良好的跨细胞单层吸收能力,总体上用两种模型获得的药物表观渗透系数是一致的,但在预测金属配合物等靠简单扩散机制跨膜的带电荷小分子的体内吸收能力上,MDCK 可能比 Caco-2 更为合理。在过量配体存在时,3 种钒-吡啶二羧酸络合物从 AP→BL 单侧方向跨 MDCK 细胞单层膜的渗透能力都大大提高;这与 Caco-2 细胞模型的结果显著不同,显示钒配阴离子在 MDCK 可能存在主动运输方式。3 种配合物的细胞毒性结果与跨膜转运结果相互呼应,表明钒化合物的吸收、代谢和毒性有着密切的相关关系。进一步的深入研究正在进行之中。

致谢 感谢科罗拉多州立大学化学系的 Crans 教授提供钒氧配合物以及堪萨斯大学药物化学系的 Borchardt 教授在 Caco-2/MDCK 细胞实验方面的帮助。本工作为国家“863”计划、国家自然科学基金(批准号: 20101001, 20331020)和北京市自然科学基金资助项目。

参 考 文 献

- 1 Shechter Y, Shisheva A. Vanadium salts and the future treatment of diabetes. *Endeavour*, 1993, 17(1): 27~31[DOI]
- 2 Shechter Y, Karlsh S J. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl() ions. *Nature*, 1980, 284(5756): 556~558[DOI]
- 3 Posner B I, Faure R, Burgess J W, et al. Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphate inhibitors which are insulin mimetics. *J Biol Chem*, 1994, 269(6): 4596~4604
- 4 Fantus I G, Tsiani E. Multifunctional actions of vanadium compounds on insulin signaling pathways:evidence for preferential

- enhancement of metabolic versus mitogenic effects. *Mol Cell Biochem*, 1998, 182(1-2): 109~119[DOI]
- 5 Thompson K H, McNeill J H, Orvig C. Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem Rev*, 1999, 99(9): 2561~2572[DOI]
 - 6 Yuen V G, Orvig C, McNeill J. Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(). *Can J Physiol Pharmacol*, 1995, 73(1): 55~64
 - 7 McNeill J H, Yuen V G, Hoveyda H R, et al. Bis(maltolato)oxovanadium() is a potent insulin mimic. *J Med Chem*, 1992, 35: 1489~1491[DOI]
 - 8 Crans D C. Chemistry and insulin-like properties of vanadium() and vanadium() compounds. *J Inorg Biochem*, 2000, 80: 123~131[DOI]
 - 9 Reul A B, Amin S S, Buchet J P, et al. Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *Br J Pharmacol*, 1999 126: 467~477[DOI]
 - 10 Thompson K, Yuen V G, McNeill J H, et al. Chemical and Pharmacological Studies of a New Class of Antidiabetic Vanadium Complexes in Vanadium Compounds. Cary NC: Oxford University Press, 2001. 329~352
 - 11 Nadai M, Watanabe H, Fujiwara C, et al. Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate:studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18: 719~725
 - 12 Li J, Elberg G, Crans D C, et al. Evidence for the distinct vanadyl(+4) dependent activating system for manifesting insulin-like effects. *Biochem*, 1996, 35: 8314~8318[DOI]
 - 13 Sakurai H, Fujii K, Watanabe H, et al. Orally active and long-term action insulin-mimetic vanadylcomplex:bis(picolinato) oxovanadium() *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 214: 1095~1101
 - 14 Artursson P, Borchardt R T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res*, 1997, 14: 1655~1658[DOI]
 - 15 Cho M J, Thompson D P, Cramer C T, et al. The Madin Darby canine kidney(MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharm Res*, 1989, 6: 71~77[DOI]
 - 16 Markowska M, Oberle R, Juzwin S, et al. Optimizing Caco-2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis. *J Pharmacol Toxicol Method*, 2001, 46(1): 51~55[DOI]
 - 17 Li A P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today*, 2001, 6(7): 357~366[DOI]
 - 18 杨晓改, 袁兰, 王夔, 等. 用Caco-2 细胞单层模型比较两种胰岛素效应的钒氧配合物的小肠吸收能力. *科学通报*, 2002, 47(20): 1550~1555[摘要][PDF]
 - 19 Annette B, Sibylle H, Kayoshi S, et al. Cell cultures as tools in biopharmacy. *Pharm Sci*, 2000, 2: 551~560
 - 20 Mitchell E, Lisbeth K, Sven F. Optimized conditions for MDCK permeability and turbidimetric solubility studies using compounds representative of BCS classes . *Pharm Sci*, 2002, 15: 331~340[DOI]
 - 21 Irvine J D, Takahashi L, Lockhard K, et al. MDCK(Madin-Darby canine kidney)cells: a tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci*, 1999, 88: 28~33[DOI]
 - 22 Mohanmmad E, Abdel H. Comparative LC-MS and HPLC analyses of selected antiepileptics and beta-blocking drugs. *IL Farmaco*, 2000, 55: 136~145[DOI]
 - 23 Meunier V, Bourrie M, Berger Y, et al. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; Pharmacological and Pharmacokinetic Application. *Cell Biol Toxicol*, 1995, 11: 187~194[DOI]

(2005-01-17 收稿, 2005-02-25 收修改稿)