

文章编号: 1673-1689(2011)04-0613-05

马氏珠母贝高 *F* 值寡肽在 Caco-2 细胞中吸收的初步研究

郑惠娜¹, 章超桦¹, 吉宏武¹, 秦小明¹, 黄来珍²

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524025; 2. 广东海洋大学 海洋药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘 要: 采用 Caco-2 单层细胞模型体外模拟马氏珠母贝高 *F* 值寡肽(PHFP)小肠吸收, 研究结果显示: 无论是 AP 面 $\rightarrow$ BL 面还是 BL 面 $\rightarrow$ AP 面, PHFP 的吸收量均呈增加趋势。添加 P-糖蛋白的专属抑制剂维拉帕米后, AP $\rightarrow$ BL 的渗透系数由原来的 6.83×10^{-7} cm/min 提高到 8.16×10^{-7} cm/min, 而 BL $\rightarrow$ AP 渗透系数由 8.84×10^{-7} cm/min 降低到 2.20×10^{-7} cm/min, 说明 PHFP 溶液在 Caco-2 细胞中的转运存在外排泵的作用。并且, PHFP 在 Caco-2 细胞转运过程中被细胞中所存在的代谢酶所代谢, 而添加维拉帕米后, PHFP 的代谢量有所降低。

关键词: 马氏珠母贝; 高 *F* 值寡肽; Caco-2 细胞

中图分类号: TS 254.1

文献标识码: A

Preliminary Study on the Transport of Pinctada Martensii High Fischer Ratio Oligopeptides Across a Caco-2 monolayer

ZHENG Huina¹, ZHANG Chao-hua¹, JI Hong-wu¹,
QIN Xiao-ming¹, HUANG Lai-zhen²

(1. College of Food Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The transport of PHFP across a Caco-2 monolayer was studied in this manuscript. The results showed that the absorption quantity of PHFP increased either AP $\rightarrow$ BL or BL $\rightarrow$ AP. After adding the inhibitor of P-glycoprotein verapamil, the permeability coefficient (AP $\rightarrow$ BL) increased from 6.83×10^{-7} cm/min to 8.16×10^{-7} cm/min, and the permeability coefficient (BL $\rightarrow$ AP) decreased from 8.84×10^{-7} cm/min to 2.20×10^{-7} cm/min. This results indicated that there existed an efflux system and parts of PHFP were metabolized by metabolic enzymes of cells during the transport, and the metabolism yield of PHFP decreased after adding verapamil.

Key words: *Pinctada martensii*, high Fischer' ratio oligopeptides, Caco-2 cell

收稿日期: 2010-05-13

基金项目: 国家“十一五”支撑计划项目(2007BAD29B09); 广东海洋大学引进人才基金项目(0912259)

作者简介: 郑惠娜(1979-), 女, 福建漳州人, 理学博士, 讲师, 主要从事海洋生物资源开发与利用研究。Email: margaretphd@126.com

目前酶解蛋白制备生物活性肽及其吸收机制一直是研究的热点^[1-2], 现已经发现, 小肽(主要是二肽和三肽)和氨基酸存在两种相互独立的吸收转运机制。自由氨基酸通过刷状缘膜由特殊的氨基酸转运系统进入肠上皮细胞, 小肽则通过特殊的肽转运系统进行转运, 肽转运系统位于小肠上皮细胞的刷状缘膜^[3]。营养物质的吸收主要在小肠绒毛上的吸收细胞进行, 近十几年来, 国外已普遍采用组织细胞模型作为营养物质吸收研究的工具, 包括有 Caco-2 单层细胞模型、MDCK 细胞模型、MDR1-MDCK 细胞模型及 ECV304 细胞模型。Caco-2 单层细胞模型是最为普遍应用的一种模型, Caco-2 细胞是人结肠癌细胞, 在经过 3 周的培养, 细胞分化形成单层细胞, 并且具有成熟肠上皮细胞的形态及功能特性(微绒毛结构、二肽/三肽、氨基酸和葡萄糖转运系统、顶端致密的单层结构及各种绒毛水解酶的表达), 因此, 大量的研究已经将其作为一种肠道吸收的体外评价^[4-6]。近年来, 已经有不少研究者采用 Caco-2 单层细胞模型研究了蛋白水解来源肽或肽类药物的体外肠道模拟吸收机制^[7-8]。作者建立了 Caco-2 单层细胞模型, 并且运用 Caco-2 单层细胞模型研究马氏珠母贝高 F 值寡肽的跨膜转运机制从而探讨高 F 值寡肽在小肠中的吸收转运机制, 为高 F 值寡肽在人体内吸收机制的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

马氏珠母贝高 F 值寡肽制品(PHFP): 根据参考文献[7]制得; Caco-2 人结肠癌细胞: 购自上海细胞库; 维拉帕米: 购自广东华南药业集团有限公司; 高糖 DEME 培养基(GIBCO)、胎牛血清(杭州四季清)、双抗(GIBCO)、胰蛋白酶(GIBCO)、HBSS 平衡盐溶液(GIBCO)、12 孔 Transwell 培养板(Corning Costar): 均购自广州威佳生物技术有限公司。

1.2 试剂与仪器

数显 PHS-25C 酸度计: 上海康仪仪器有限公司产品; AUW120 电子天秤: 日本岛津仪器公司产品; DK98-1 水浴锅: 天津市泰斯特仪器有限公司产品; UV-2102 紫外可见分光光度计: 尤尼柯(上海)仪器有限公司产品; RCO3000T-5 VBC CO₂ 培养箱: 美国热电集团公司产品; SW-CJ-2FD 无菌工作台: 常州诺基仪器有限公司产品; 倒置显微镜: 日本 OLYMPUS 公司产品; ULT1386-3-V40 超低温冰箱, 美国热电集团公司产品; 立式蒸汽灭菌锅,

LDZX-30KBS: 上海申安医疗器械厂产品; TDL-5-A 低速台式离心机: 上海安亭科学仪器厂产品; Millipore cellERS 细胞电阻仪: 密理博(Millipore)中国有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 Caco-2 细胞培养 由细胞库购买的细胞为已复苏好的细胞, 收到细胞后, 将原瓶中的培养液吸出, 只留 5 mL, 然后将培养瓶置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱内培养过夜, 第二天传代。传代时, 先采用 PBS 清洗 1~2 次, 使用质量分数 0.25% 胰蛋白酶(含质量分数 0.05% EDTA)混合液消化 2 min, 加入含有体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DEME 8~10 mL 培养液, 终止消化, 然后采用吸管吹打呈细胞悬液, 1 瓶传 3 瓶。培养过程中, 每天观察细胞状态, 当细胞长满培养瓶时即可传代。

1.3.2 Caco-2 单层细胞模型的建立^[7] 待细胞培养到良好状态时候, 将细胞接种在 12 孔 Costar Transwell 插入式培养皿中, 接种密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 每孔 0.5 mL, 基底侧加入培养液 1.5 mL, 细胞培养 21 d 后根据测定跨膜电阻 TEER 和有无酚红泄漏检验模型(一般在 21~28 d 内均能使用), 当跨膜电阻 > 200 Ω · cm², 无酚红泄漏时即可用于吸收实验, 见图 1。

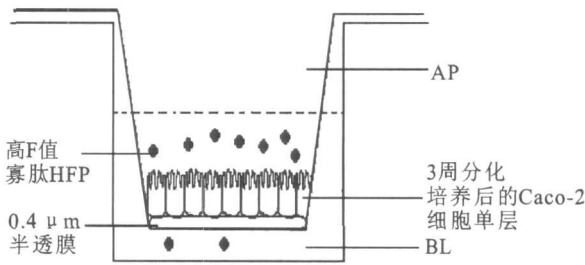


图 1 Caco-2 体外细胞培养模型

Fig.1 Caco-2 cell culture model in vitro

1.3.3 马氏珠母贝高 F 值寡肽于 Caco-2 单层细胞模型中吸收实验 将建好的 Caco-2 单层细胞模型取出, 吸去小室及基底部培养液, 用 HBSS 轻轻洗涤 2 次, 在小室中加入 pH 6.0 的 buffer (HBSS), 在基底部加入 pH 7.4 的 buffer (HBSS) 在 37℃ 培养箱中培养 15 min, 然后取出 Transwell 板, 吸取小室(AP)及基底部(BL)中的 HBSS buffer。吸收实验 AP → BL: 在 AP 中加入含有 PHFP 的 HBSS 0.5 mL, 在 BL 中加入 HBSS 1.5 mL (A-B); BL → AP 在 BL 中加入含有 PHFP 的 HBSS 1.5 mL, 在 AP 中加入 HBSS 0.5 mL (B-A); 同时采用维拉帕米(VP)抑制 P-糖蛋白, 研究高 F 值寡肽是否受 P-糖蛋白外排泵作用的影响。样品质量浓度: 1

mg/mL, 采用 HBSS 溶解, 37 ℃保温时间 8 h, 在保温过程中每隔一段时间(15、30、45、60 min, 1.5、2.0、3、4、6、8 h) 取出 AP 中溶液 0.1 mL, BL 中溶液 0.2 mL 测定 PHFP 含量。

1.3.4 紫外分光光度法测定高 F 值寡肽含量

1) 标准曲线的绘制 取纯度>99%的标准肽(GSH), 采用 HBSS 溶解分别配制成 0、1、3、5、7、10 μg/mL; 在波长为 214 nm 波长下检测, 绘制标准曲线, 见图 2。得到标准曲线方程: $y = 0.0134x + 0.0029$, 决定系数 0.995, 说明线性关系良好。

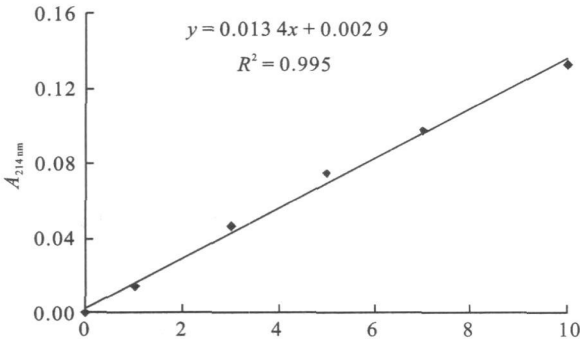


图 2 GSH 标准曲线

Fig.2 Standard curve of GSH

2) 溶液中高 F 值寡肽含量测定 将每隔一段时间取出的溶液, 根据标准曲线吸光值范围进行稀释, 然后按标准曲线测定方法进行测定。

1.3.5 数据分析

表观渗透系数(P_{app})的计算:

化合物在 Caco-2 单层细胞模型中的 P_{app} 值按下式计算:

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/60 \times 1/A \times 1/C_0 \quad \text{式 1}$$

上式中, P_{app} 单位为 cm/S; Q 是积累转运量, 代表化合物在接收端(receiver)出现的总量, 单位为 μg, dQ/dt 是速率, 单位为 μg/min; C_0 是化合物在给予端(donor)的初始质量浓度, 单位为 μg/L, A 是聚碳酸酯膜的表面积, 单位为 cm²。

由于每次取样后都要补液, 对物质的通透产生了稀释作用, 因而物质的累积浓度 TRcum(μg/mL) 进行公式校正。

$$TRcum = A_n + \frac{V_{sn}}{V_R} \sum_{i=0}^{n-1} A_i$$

其中 A_n 为第 n 个样品通量的测定值; V_{sn} 为第 n 个样品的采样体积; V_R 为接收池的体积。

2 结果与讨论

2.1 Caco-2 单层细胞模型的建立

迄今为止, Caco-2 细胞已经广泛用于建立小肠上皮细胞模型, 虽然 Caco-2 细胞是从人的结肠中分

离得到的细胞, 显示了肠上皮细胞样的分化并形成刷状缘膜。这些细胞的许多生物化学特性如: 酶的表达、褶皱的形成都与小肠粘膜类似^[9]。

显微镜观察 Caco-2 细胞显示(见图 3): Caco-2 细胞生长均匀, 边界清晰, 可以清楚的看见细胞之间的接触, 表明 Caco-2 细胞生长到一定周期具有形成紧密的细胞单层的特性。

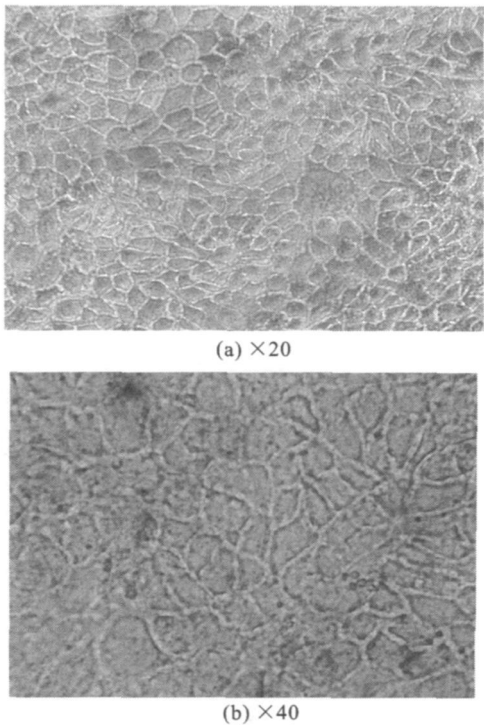


图 3 显微镜观察下 Caco-2 细胞

Fig.3 Microscopic observation results of Caco-2

2.2 马氏珠母贝高 F 值寡肽于 Caco-2 单层细胞模型中的转运

以 1 mg/L 高 F 值寡肽溶液作为待测液进行转运实验, 分别测定马氏珠母贝高 F 值寡肽在 AP 面和 BL 面的吸收总量与吸收时间的关系(见图 4)。

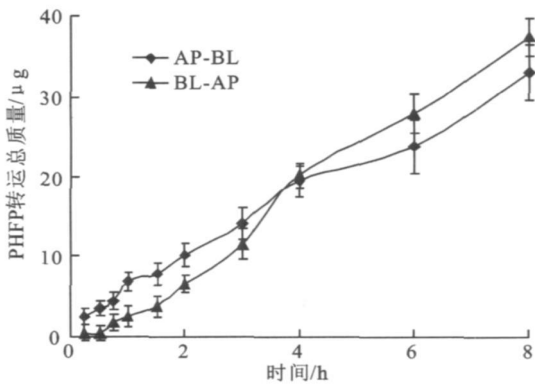


图 4 PHFP 在 Caco-2 细胞中的转运

Fig.4 PHFP transport through Caco-2 cells

研究表明: 随着孵育时间的延长, 无论是

AP 面 $\rightarrow$ BL 面还是 BL 面 $\rightarrow$ AP 面, 高 F 值寡肽的吸收总量均呈增加趋势, 渗透系数结果见表 1。

表 1 PHFP 在 Caco-2 单层细胞转运中的表现渗透系数 (n = 3)

Tab. 1 The permeability coefficient (Paap) through Caco-2 monolayer for PHFP

试 样	Papp/ ($\times 10^{-7}$ cm/ min)			
	AP-BL	BL-AP	AP-BL+ VP	BL-AP+ VP
PHFP (1 mg/ mL)	6.83 $\pm$ 0.98	8.84 $\pm$ 1.11	8.16 $\pm$ 0.79	2.20 $\pm$ 0.67

从表中结果可明显看出: Papp(BL-AP) 略大于 Papp(AP-BL), 为了进一步研究马氏珠母贝高 F 值寡肽的跨膜转运是否存在载体外排机制, 作者测定了维拉帕米存在下马氏珠母贝高 F 值寡肽溶液在 Caco-2 单层细胞中转运的渗透系数, 结果见图 5 及表 1。

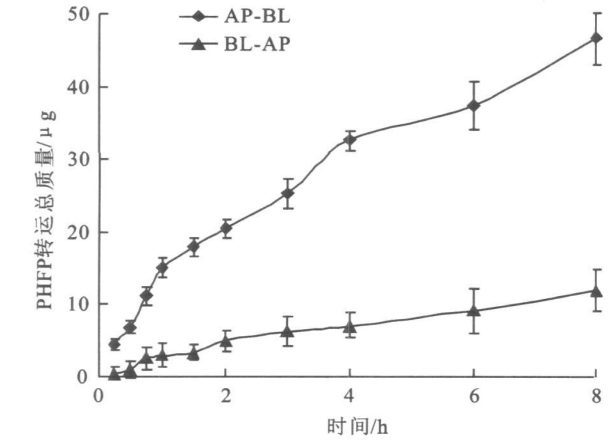


图 5 维拉帕米存在下 PHFP 在 Caco-2 细胞中的转运
Fig.5 PHFP transport through Caco-2 cells with verapamil

P-糖蛋白(P-glycoprotein)是由多药耐药(multidrugresistance, MDR) 基因编码的相对分子质量为170 000的膜蛋白, 由 1 280 个氨基酸组成, 属于 ABC(ATP binding cassert) 家族的成员, 是一种能量依赖性的药物外排泵, 通过 ATP 供能^[10]。P-糖蛋白可将多种化学上不相关的内源性和外源性的化合物排除细胞膜外^[11]。该蛋白具有能量依赖性地化合物从肠浆膜转运到肠黏膜而排入肠腔的作用, 从而导致化合物吸收量减少。P-糖蛋白存在于 Caco-2 细胞 AP 面的细胞膜上, 它将细胞内高 F 值寡肽作为底物排出细胞外, 使得 AP $\rightarrow$ BL 的转运速率减慢, 而 BL $\rightarrow$ AP 的转运速率增大。维拉帕米是 P-糖蛋白的专属抑制剂, 100 mg/ L 维拉帕米基本抑制了 P-糖蛋白的外排作用, 提高 AP $\rightarrow$ BL 的转运速率, 降低 B $\rightarrow$ A 转运速率。表 1 同时也

显示了维拉帕米存在下 PHFP 溶液在 Caco-2 单层细胞中转运的渗透系数, 从表中结果可看出, 在维拉帕米存在, AP $\rightarrow$ BL 的渗透系数由原来的 6.83×10^{-7} cm/ min 提高到 8.16×10^{-7} cm/ min, 而 BL $\rightarrow$ AP 渗透系数由 8.84×10^{-7} cm/ min 降低到 2.20×10^{-7} cm/ min, 说明高 F 值寡肽溶液在 Caco-2 细胞中的转运存在外排泵的作用。

马氏珠母贝高 F 值寡肽的相对分子质量范围约在 200~ 1 000 之间, 小肠组织中含有肽及拟肽类的特异性转运载体, 例如, 转肽载体 I(PEP1)。在胃肠道内, 这些肽转运载体被大量表达并对二肽和三肽及一些非肽类化合物进行特异性转运, 但是不能转运分子量较大的寡肽^[12]。高 F 值寡肽在 Caco-2 细胞中的转运过程, 是否存在转肽载体的转运作用有待进一步的研究。

2.3 马氏珠母贝高 F 值寡肽于 Caco-2 单层细胞模型中的代谢

肠上皮细胞表达各种酶, 如氨基酸酶、磷酸酶、淀粉酶等。已经有研究显示 Caco-2 细胞至少表达 8 种肠上皮细胞刷状缘特征的氨基肽酶^[13]。在这些酶中, 二肽基肽酶(DPPIV) 的表达活性最高, 大约占到合成酶的 85%^[14]。由于 Caco-2 单层细胞中存在的各种代谢酶, 马氏珠母贝高 F 值寡肽在 Caco-2 细胞中的转运过程中, 有很大一部分被这些代谢酶所代谢吸收。图 6 显示了马氏珠母贝高 F 值寡肽在 Caco-2 细胞中被代谢的比例。图中, Control 为加入的 PHFP 浓度, PHFP(AP) 为高 F 值寡肽由 AL 到 BP 的转运, PHFP(BL) 为高 F 值寡肽由 BP 到 AL 的转运, PHFP(AP+ VP) 为维拉帕米存在下, 高 F 值寡肽由 AL 到 BP 的转运, PHFP(BL+ VP) 为维拉帕米存在下, 高 F 值寡肽由 BP 到 AL 的转运, PHFP 代谢量为保温前后 PHFP 总量差值与保温前 PHFP 总量的比值。

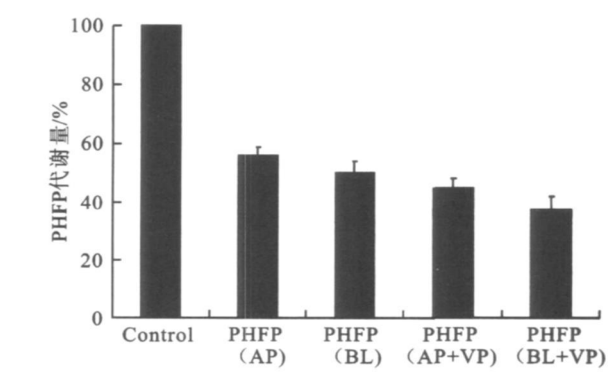


图 6 PHFP 在 Caco-2 细胞中的代谢
Fig. 6 Metabolic ratio of PHFP in Caco-2 cels

从图中结果可看出, 很大一部分的马氏珠母贝

高 F 值寡肽在 Caco-2 细胞转运过程中被代谢, 由于顶端膜表达的代谢酶较多, 因此, 位于顶端的高 F 值寡肽被代谢的量均高于位于底端的高 F 值寡肽。而添加维拉帕米后, 高 F 值寡肽的代谢量有所降低, 可能维拉帕米对一些降解酶存在抑制作用。

3 结 语

马氏珠母贝高 F 值寡肽在 Caco-2 单层细胞中

的转运存在外排泵的作用, 并且, 部分 PHFP 在 Caco-2 单层细胞转运过程中被细胞中存在的代谢酶所代谢。马氏珠母贝高 F 值寡肽在 Caco-2 单层细胞模型中的转运机制研究为进一步探讨高 F 值寡肽在人体内的生物利用度奠定了基础。

参考文献(References):

[1] 田刚, 陈代文, 余冰等. 酶解鸡蛋清寡肽混合物对小鼠体外免疫功能的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 53-59.
TIAN Gang, CHEN Dai-wen, YU Bing, et al. Effects of mixtures of oligopeptides from enzymic hydrolysates of egg white on immune functions of mice in vitro[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**, 2005, 24(6): 53- 59. (in Chinese)

[2] 金晶, 徐志宏, 魏振承, 等. 双酶分步水解制备菜籽蛋白肽[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1): 50- 55.
JIN Jing, XU Zh-hong, WEI Zhen-cheng, et al. Preparation rapeseed protein by double enzymes[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**, 2010, 29(1): 50- 55. (in Chinese)

[3] Ziv E, Bendayan M. Intestinal absorption of peptides through the enterocytes[J]. **Microscopy Research and Technique**, 2000, 49(4): 346- 352.

[4] Artursson P, Borchardt R T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond[J]. **Pharmaceutical research**, 1997, 14(12): 1655- 1658.

[5] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1996, 22(1-2): 67- 84.

[6] Sambuy Y, De A I, Ranaldi G, et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture related factors on Caco-2 cell functional characteristics[J]. **Cell Biology and Toxicology**, 2005, 21(1): 1- 26.

[7] Zhu X L, Watanabe K, Shiraishi K, et al. Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across caco-2 cell monolayers[J]. **Peptides**, 2008, 29(3): 338- 344.

[8] Sienkiewicz E, Jarmo B, Krawczuk S, et al. Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer[J]. **International Dairy Journal**, 2009, 19(4): 252- 257.

[9] Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model[J]. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 1997, 14(3): 221- 286.

[10] Haber B A, Mohn K L, Diamond R H, et al. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration[J]. **Situations**, 1993, 91: 1319- 1326.

[11] Litman T, Druley T E, Stein W D, et al. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance[J]. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, 2001, 58(7): 931- 959.

[12] Tiruppathi C, Ganapathy V, Leibach F H. Transport of peptides in renal brush border membrane vesicles. Suitability of 125 I-labelled tyrosyl peptides as substrates[J]. **Biochimica et biophysica acta Biomembranes**, 1991, 1069(1): 14- 20.

[13] Howell S, Kenny A J, Turner A J. A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29 [J]. **Biochemical Journal**, 1992, 284(2): 595.

[14] Alfalah M, Jacob R, Naim H Y. Intestinal dipeptidyl peptidase IV is efficiently sorted to the apical membrane through the concerted action of N- and O-glycans as well as association with lipid microdomains[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2002, 277(12): 10683- 10690.