

•方法学研究•

稳定同位素示踪法用于 Caco-2 细胞葡萄糖吸收模型的研究

任 理, 郭文峰, 刘 佳, 陈蔚文(广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 建立 Caco-2 细胞葡萄糖吸收模型, 为考察药物对葡萄糖吸收的影响提供方法。方法 Caco-2 细胞培养 7, 14, 21 d 后, 分别加入 25, 50, 75, 100 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖溶液孵育 5, 10, 15, 20 min, 采用高效液相色谱-质谱联用技术, 以稳定同位素示踪法比较培养时间、葡萄糖浓度以及孵育时间对葡萄糖吸收的影响。结果 Caco-2 细胞培养 21 d 后葡萄糖的吸收优于培养 7 d 和 14 d 的吸收, 吸收量大, 趋势稳定。此时用 75 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖溶液孵育细胞 10 min, 葡萄糖吸收量与 100 mmol·L⁻¹ 比较差异无统计学意义, 但高于 25, 50 mmol·L⁻¹ 时的葡萄糖吸收量。结论 本实验条件下建立的 Caco-2 细胞模型可作为研究葡萄糖吸收的模型。

关键词: Caco-2 细胞; 葡萄糖; 吸收模型; 稳定同位素; 液质联用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0386-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.016

Application of Stability Isotope Tracer Method in Caco-2 Cell Model of Glucose Absorption

REN Li, GUO Wenfeng, LIU Jia, CHEN Weiwen (Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish Caco-2 cell model of glucose absorption for studying the effect of drugs on glucose absorption. **Methods** The Caco-2 cells cultured for 7, 14 and 21 days were incubated with glucose solution (at 25, 50, 75 and 100 mmol·L⁻¹) containing stability isotope for 5, 10, 15 and 20 minutes, respectively. High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was adopted to investigate the effect of culture time, glucose concentration and incubated time on the glucose absorption. **Results** The glucose absorption volume in Caco-2 cells cultured for 21 days was higher than that for 7 and 14 days, and was in stable tendency. When Caco-2 cells cultured for 21 days were incubated with glucose solution at 75 mmol·L⁻¹ for 10 minutes, the glucose absorption volume was higher than that at 25 and 50 mmol·L⁻¹, but had no significant difference in comparison with that at 100 mmol·L⁻¹. **Conclusion** The developed Caco-2 cell model can be used for the research of glucose absorption.

Keywords: Caco-2 cells; Glucose; Model of absorption; Stability isotope; LC-MS

Caco-2 细胞是一种人的结直肠腺癌细胞, 在体外培养条件下, Caco-2 细胞可形成分化的连续致密的单细胞层, 具有微绒毛结构, 其形态学特征、标志酶的功能表达与小肠上皮细胞相似, 是一个很好的研究肠上皮细胞功能的模型, 在物质的吸收转运研究中应用广泛^[1-2]。稳定同位素标记的化合物与未标记的化合物质子数相同, 中子数不同且无放射性的元素, 物理化学性质几乎完全相同, 在临床诊断、

药物研究、农业研究、环境保护、食品安全等领域应用较多^[3-4]。目前运用 Caco-2 细胞对药物肠吸收转运特性的研究较多^[5-6], 有关该细胞吸收葡萄糖的报道也集中在糖尿病相关方面^[7-8]。研究 Caco-2 细胞对葡萄糖的吸收通常采用放射性同位素示踪技术^[9-10], 而以稳定同位素作为示踪剂观察葡萄糖吸收的模型还未见报道。本实验研究了分化的 Caco-2 细胞对葡萄糖吸收的情况, 以 ¹³C-D- 葡萄糖示踪, 根据

收稿日期: 2013-02-28

作者简介: 任理, 女, 博士研究生, 研究方向: 脾胃病症的临床基础研究。Email: 283917922@qq.com。通讯作者: 郭文峰, 副教授, 研究方向: 脾虚证候本质研究。Email: wenfeng.guo@gmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81072753)。

^{13}C -D- 葡萄糖的吸收量推算细胞内吸收的葡萄糖含量, 研究培养时间、葡萄糖浓度以及刺激时间对葡萄糖吸收的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株 Caco-2 细胞, 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 试剂 DMEM 高糖培养液(批号: 8112145)、胎牛血清(FBS, 批号: 8153379)、Penicillin Streptomycin (批号: 1078514), Gibco 公司; 胰酶 Trypsin (1:250, 批号: 2716B052), Amresco 公司; $\text{ED-TA}2\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 广州威佳科技有限公司, 进口分装; PBS 缓冲液 (每 1 L 含 NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, Na_2HPO_4 3.58 g, KH_2PO_4 0.24 g, 超纯水配制, 调节 pH 值 7.2, 0.22 μm 滤膜过滤); ^{13}C -D- 葡萄糖 (U- $^{13}\text{C}6$, CAS. 110187-42-3, 批号: PR-23414), Cambridge Isotope Laboratories 公司; 三氯蔗糖(CAS. 56038-13-2, 批号: B1229018), Aladdin 公司; 乙腈为色谱纯, Merck 公司; 葡萄糖、正丁醇、氯仿均为分析纯。

1.3 仪器 3111 型 CO_2 细胞培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司; CKX41 型相差倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 台式高速冷冻离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; QT-1 旋涡混合器, 上海琪特分析仪器有限公司; MTN-2800D 氮吹浓缩装置, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; TSQ Quantum Access 液相色谱-串联三重四级杆质谱仪, 带 Xcalibur 2.0 操作软件, 美国 Thermo Scientific 公司。

1.4 溶液配制 ^{13}C -D- 葡萄糖溶液: 准确称取 ^{13}C -D- 葡萄糖 0.45 g, 加超纯水定容到 250 mL, 得到浓度为 72 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

供试葡萄糖溶液: 准确称取葡萄糖 37.62 g, 加超纯水定容, 得到浓度为 1.9 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液。临用时取 DMEM 培养液, 加入 1.9 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液, 配制浓度依次为 25, 50, 75, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖系列溶液, 并分别加入 ^{13}C -D- 葡萄糖(使葡萄糖最终含量为 4%)作为示踪剂。

三氯蔗糖溶液: 准确称取三氯蔗糖 0.05 g, 加超纯水定容到 250 mL, 得到浓度为 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 临用时稀释成 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

1.5 Caco-2 细胞样品的制备 复苏 Caco-2 细胞, 细胞生长至 80%~90% 时, 消化并以 6×10^5 $\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于普通 6 孔培养板, 每孔 2 mL, 隔天换液。取生长融合后分别培养 7, 14, 21 d 的细胞, 吸

除培养液, 加入含 ^{13}C -D- 葡萄糖示踪的浓度为 25, 50, 75, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖溶液, 每孔 2 mL, 细胞分别吸收 5, 10, 15, 20 min 后吸除。用预冷的 PBS 冲洗 2 次, 超纯水冲洗 1 次, 加超纯水 2 mL 将细胞吹打均匀, 转移到离心管中。反复冻融 3 次, 超声 2 次, 每次 20 min 裂解细胞。加 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯蔗糖溶液 100 μL 作内标, 离心取上清, 加 1/3 体积的 Sevag 试剂(氯仿: 正丁醇=4:1), 涡旋 1 min 后静置 5 min, 10000 $\times g$ 离心 5 min, 取上层水相, 重复 3 次, 氮气吹干, 残渣加超纯水溶解并定容至 1 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

用 LC-MS/MS 法检测 Caco-2 细胞吸收的 ^{13}C -D- 葡萄糖和三氯蔗糖的含量, 建立内标物吸收与 ^{13}C -D- 葡萄糖吸收之间的关系, 然后根据 ^{13}C -D- 葡萄糖的吸收量推算细胞内吸收葡萄糖的含量, 研究培养时间、葡萄糖浓度以及孵育时间对葡萄糖吸收的影响。

1.6 色谱及质谱条件 色谱条件: 使用 Atlantis HILIC 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , 美国 Waters 公司); 以乙腈(A)与 0.1% 甲酸(B)作为流动相, 线性梯度洗脱条件: 0~6 min, 75% A; 6~14 min, 50% A; 14~20 min, 75% A。流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量: 10 μL 。采用柱后分流方式, 进入质谱的流量由三通阀调为 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。质谱参数设置: 离子源: 电喷雾电离源(ESI); 喷雾电压: 3000 V; 鞘气压力: 30 psi; 辅助气压力: 15 arb; 毛细管温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞气氩气压力: 1.0 mTorr。负离子模式下以选择反应监测(SRM)方式进行监测。碰撞能量: 10 eV; ^{13}C -D- 葡萄糖: m/z 185 $\rightarrow$ m/z 92.47; 内标三氯蔗糖: m/z 395 $\rightarrow$ m/z 359。

1.7 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 统计软件, 多组比较用单因素方差分析, 组间比较分别用 LSD(方差齐)和 Games-Howell(方差不齐)。

2 结果

2.1 不同培养时间的 Caco-2 细胞对葡萄糖吸收量的影响 Caco-2 细胞生长融合后再分别培养 7, 14, 21 d, 加入葡萄糖溶液孵育。各培养天数的细胞对葡萄糖的吸收量如图 1 所示, 不同培养天数的 Caco-2 细胞对同一浓度的葡萄糖的吸收都会随着孵育时间的延长而增加。同时, 孵育相同的时间, 葡萄糖的吸收也随着糖溶液浓度的升高而增加。

培养 7 d 的 Caco-2 细胞对 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的吸收较平缓, 不随孵育时间的增加而增加。对

50, 75 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的吸收呈由快到慢趋势, 但 100 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖孵育 20 min 时的吸收量依然表现出上升的趋势。

Caco-2 细胞培养 14 d 后, 给予 25 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖, 细胞对葡萄糖的吸收量较低, 且不随孵育时间的增加而增加。给予 50, 75, 100 mmol·L⁻¹ 葡萄糖时, 其吸收呈由快到慢趋势。孵育时间为 10~15 min 时, Caco-2 细胞对 50 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖的吸收量甚至高于 75, 100 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖, 但是随着

吸收时间的增加, 浓度越高的葡萄糖溶液其吸收量也越多。

Caco-2 细胞培养 21 d 后, 对 25 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖的吸收量较低, 而对 50, 75, 100 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖吸收较多, 且呈由快到慢趋势。在 15~20 min 的时间内, 各个浓度的葡萄糖的吸收进入平台期。

通过对不同培养时间的 Caco-2 细胞吸收葡萄糖含量的比较, 可以认为培养 21 d 的 Caco-2 细胞适用于葡萄糖吸收的研究。

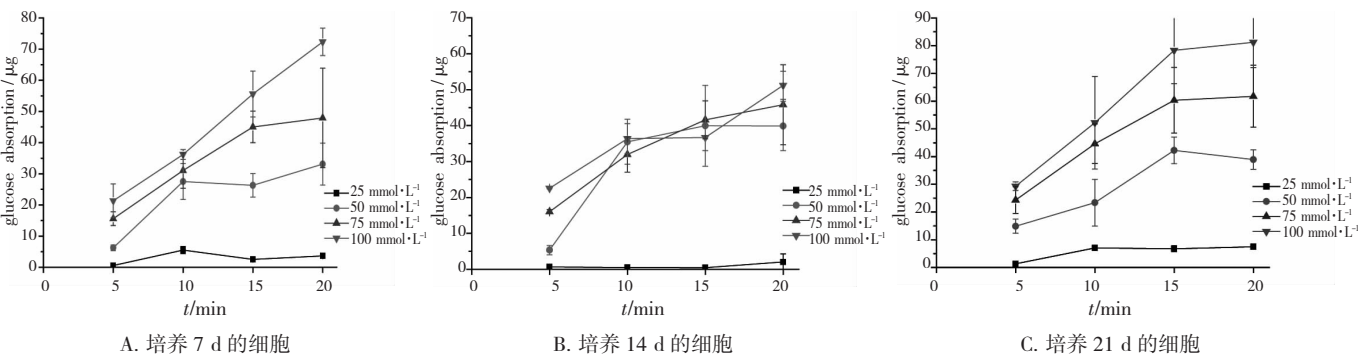


图 1 培养时间对 Caco-2 细胞葡萄糖吸收量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Figure 1 Effect of cultured days on the absorption of glucose in Caco-2 cells

2.2 不同浓度葡萄糖和孵育时间对培养 21 d 的 Caco-2 细胞葡萄糖吸收量的影响 如表 1 所示, 不同孵育时间下, 75 mmol·L⁻¹ 组、100 mmol·L⁻¹ 组葡萄糖吸收量均高于 25 mmol·L⁻¹ 组以及 50 mmol·L⁻¹ 组。分别比较 5, 10, 15, 20 min 时 75 mmol·L⁻¹ 与 100 mmol·L⁻¹ 组, 结果显示两个剂量下葡萄糖的吸收量比较差异无统计学意义($P>0.05$), 因此, 选择浓度为 75 mmol·L⁻¹ 葡萄糖溶液作为孵育细胞的刺激浓度。

葡萄糖溶液浓度为 75 mmol·L⁻¹ 时, 10, 15, 20 min 组之间葡萄糖吸收量比较差异无统计学意义。孵育 15 min 后, 葡萄糖吸收进入平台期, 此时若加入促进葡萄糖吸收的物质, 其吸收量也不会明显增加, 可能会影响促进剂的效果, 而 10 min 时糖吸收量有较大的上升空间, 因此选择 10 min 做为孵育吸收的时间。

3 讨论

有研究表明, 加入浓度分别为 10, 25, 50 mmol·L⁻¹ 葡萄糖溶液 10 min 后, Caco-2 细胞对葡萄糖的吸收均仍处于上升状态, 而且葡萄糖吸收量与葡萄糖浓度和吸收时间正相关^[10]。在此基础上, 本实验设计葡萄糖浓度为 25, 50, 75, 100 mmol·L⁻¹, 孵育时间为 5, 10, 15, 20 min。

Caco-2 细胞生长融合后分别培养 7, 14, 21 d

表 1 葡萄糖浓度及孵育时间对培养 21 d 的 Caco-2 细胞葡萄糖吸收量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of concentrations of glucose and incubated time on the absorption of glucose in Caco-2 cells

葡萄糖浓度 /mmol·L ⁻¹	Caco-2 细胞葡萄糖吸收量 /μg			
	5 min	10 min	15 min	20 min
25	1.33 ± 0.38	7.04 ± 0.30	6.74 ± 1.06	7.47 ± 0.97
50	14.88 ± 2.55	23.35 ± 8.43	42.22 ± 4.83	38.95 ± 3.51
75	24.34 ± 4.84 ^{**△△}	44.62 ± 7.12 ^{**△}	60.33 ± 11.85	61.75 ± 11.15
100	29.33 ± 1.58 ^{**△△}	52.24 ± 16.70 ^{**△△}	78.33 ± 11.98	81.21 ± 9.14

注: 与 25 mmol·L⁻¹ 组比较, ^{**} $P<0.01$; 与 50 mmol·L⁻¹ 组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ 。

进行葡萄糖吸收实验。随着培养时间的增加, 细胞不断增殖, 当细胞生长至完全融合后, 开始进入分化状态。随着时间的延长, Caco-2 细胞分化出微绒毛, 结构类似于小肠上皮细胞。细胞培养 14~28 d 时间段内均有应用于实验的文献报道^[6,9-10,12-13], 提示培养 14 d 时细胞已分化出类似于小肠上皮细胞的结构。从图 1C 中我们也可以看到不同浓度葡萄糖溶液孵育时 Caco-2 细胞对葡萄糖的吸收都非常稳定, 原因可能是经过 21 d 的培养细胞已分化良好, 且具有稳定的吸收功能。

在 Caco-2 细胞葡萄糖吸收模型建立过程中, 选

择浓度分别为 25, 50, 75, 100 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖溶液孵育。已有的研究表明随着葡萄糖刺激浓度的增加, 细胞吸收葡萄糖的机理逐步发生了变化。在低浓度葡萄糖(25 mmol·L⁻¹)刺激时, 葡萄糖的吸收主要通过主动转运的方式完成, 由葡萄糖转运载体 SGLT1 介导转运吸收。随着葡萄糖浓度的增加, 易化扩散发挥主要作用, 由葡萄糖转运载体 GLUT2 介导转运吸收^[9-10]。随着葡萄糖刺激浓度的增加, 由 SGLT1 通过主动转运吸收葡萄糖的量达到饱和, 而 GLUT2 介导的易化扩散逐步发挥主要的转运吸收功能。本研究的结果也证实, 高葡萄糖浓度下 Caco-2 细胞葡萄糖吸收量远高于低浓度的葡萄糖。

有研究观察了 Caco-2 细胞从 30 s 至 10 min 内葡萄糖的吸收量。结果表明葡萄糖吸收量随孵育时间的增加而增加, 孵育 10 min 时, 细胞对葡萄糖的吸收依然呈明显上升趋势^[10]。在此基础上, 本实验分别选取 5, 10, 15, 20 min 的葡萄糖孵育时间, 结果发现, 葡萄糖的吸收量随着孵育时间的增加而增加, 吸收 5 至 10 min 时, 葡萄糖吸收速率较高; 在 10 至 15 min 时, 葡萄糖的吸收速率处于中等水平; 但吸收 15 至 20 min 时, 葡萄糖吸收速率明显下降, 维持在较低的水平。此实验是在细胞正常状态时进行的, 并未加任何工具药, 考虑到后续实验需加入葡萄糖吸收的抑制剂和促进剂, 10 min 的孵育时间是比较合适的, 这一孵育时间下, Caco-2 细胞能够保持中等速率的葡萄糖吸收, 便于观察葡萄糖的吸收情况。

本研究中 Caco-2 细胞用 DMEM 高糖培养液培养, 进行葡萄糖吸收实验时, 细胞本身含有一定量的葡萄糖, 会对检测造成干扰。针对这一问题, 国外研究者通常应用放射性同位素 ³H 或 ¹⁴C 标记的葡萄糖作为示踪剂, 测定细胞吸收的葡萄糖含量^[9-10]。考虑到放射性同位素可能会对人体造成伤害, 实验中选用了稳定同位素 ¹³C 标记的葡萄糖作为示踪剂, 将 ¹³C-D-葡萄糖按照一定的比例加入到葡萄糖溶液中, 通过测定 ¹³C-D-葡萄糖的吸收量来推算细胞内吸收的葡萄糖含量。稳定同位素示踪技术在药物的药理、药效以及药代动力学方面应用较多^[4,11]。它不具有放射性, 不会对人体造成伤害, 而且稳定同位素标记的化合物与未标记的化合物混合以后进行质谱分析, 由于质量数的差异, 在质谱图上表现为一对峰, 二者能够很好地区分开来。因此, 稳定同位素标记葡萄糖的应用, 在安全性和准确性方面均适合药理学相关领域研究。

稳定同位素常用核磁共振(NMR)、气相色谱与质

谱联用(GC/MS)以及液相色谱与质谱联用(LC/MS)检测分析。LC/MS 是一种强有力的分析工具, 液相色谱可以分离绝大多数的化合物, 质谱仪具有高灵敏度和高专属性, 检测时所需样品量仅为纳克甚至皮克, 在生物样品分析中被公认为可以对小分子药物, 代谢物和存在于如血清、血浆、生物组织和尿液等复杂生物基质中的生物分子进行准确定量的可靠工具。本实验中 Caco-2 细胞吸收的 ¹³C-D-葡萄糖含量极微小, 使用 LC-MS 能够达到检测的要求并准确定量。

本研究建立了 Caco-2 细胞葡萄糖吸收模型, 应用生长融合后培养 21 d 的 Caco-2 细胞, 以 75 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖孵育 10 min, 来模拟体内小肠上皮细胞吸收结构及状态。应用 LC/MS 检测 ¹³C-D-葡萄糖含量, 保证了检测的精密性和准确性, 为葡萄糖吸收的研究提供了方法。

参考文献:

- [1] 卢智玲, 冯怡, 徐德生, 等. Caco-2 细胞模型在中药口服吸收及机制研究中的应用[J]. 中草药, 2006, 37(4): 616-619.
- [2] 袁明勇, 瞿铁营, 郑玲利, 等. Caco-2 细胞模型在药物研究中的应用[J]. 中国药师, 2009, 12(7): 969-971.
- [3] 李虎林. 碳、氮、氧稳定同位素生产技术现状及发展趋势[J]. 同位素, 2011, 24(suppl): 7-14.
- [4] 叶玲, 刘宁, 杨远友, 等. 同位素在中药研究中的应用进展[J]. 同位素, 2006, 19(3): 177-183.
- [5] 廖音, 杨秀伟. 麻黄生物碱在人源肠 Caco-2 细胞单层模型的吸收转运研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 3010-3015.
- [6] 程晓华, 熊玉卿. Caco-2 细胞单层模型中熊果酸摄取转运机制的研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1935-1939.
- [7] 吴慧平, 哈团柱, 邵明. 夏枯草提取物对 Caco-2 细胞 α -葡萄糖苷酶、SGLT-1、GLUT-2、Na⁺-K⁺-ATP 酶 mRNA 表达的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(6): 373-376.
- [8] 吕欢. 桑叶提取物影响人小肠葡萄糖吸收的体外机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- [9] Johnston K, Sharp P, Michael C, et al. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells [J]. FEBS Letters, 2005, 579: 1653-1657.
- [10] Zheng Y, Scow JS, Duenes JA, et al. Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: Role of GLUT2[J]. Surgery, 2012, 151(1): 13-25.
- [11] 李高. 稳定同位素标记药物在临床药代动力学研究中的应用[J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 16(1): 58-62.
- [12] 姚媛, 廖琼峰, 谢智勇, 等. 脱水穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1154-1157.
- [13] 郭文峰, 胡灿, 刘佳, 等. 理中汤、人参皂苷 Rg1、6-姜酚对 Caco-2 细胞 PepT1 转运功能影响的比较 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(8): 7-10.

(编辑: 梁进权)