

氯化铬和吡啶羧酸铬在 Caco-2 细胞中的摄取和转运

查龙应 许梓荣* 王敏奇 辜良英

(浙江大学饲料科学研究所, 浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029)

摘要 采用一种体外培养的人小肠上皮细胞模型 Caco-2 研究了时间、浓度、温度对氯化铬和吡啶羧酸铬细胞摄取和跨细胞转运的影响。旨在探讨氯化铬和吡啶羧酸铬在小肠上皮细胞中的摄取和转运特点。结果表明: Caco-2 细胞对氯化铬和吡啶羧酸铬的摄取和转运随浓度、时间而成线性增加, 当温度从 37 °C 降到 4 °C 时, 摄取和转运有下降趋势($P>0.05$)。氯化铬和吡啶羧酸铬从肠腔侧(AP 侧)到基底侧(BL 侧)的表观通透系数(P_{app})近似于 BL 侧到 AP 侧(分别为 0.95~1.41 倍和 0.84~1.07 倍)。氯化铬和吡啶羧酸铬的摄取率分别为 $(0.88\pm 0.08)\%$ 和 $(4.73\pm 0.60)\%$, 转运率分别为 $(2.11\pm 0.05)\%$ 和 $(9.08\pm 0.25)\%$ 。结果提示氯化铬和吡啶羧酸铬是以被动扩散为主要方式被 Caco-2 细胞摄取和转运。

关键词 氯化铬; 吡啶羧酸铬; Caco-2 细胞; 摄取; 转运

铬是一种必需微量元素, 常见的化合态有三价铬(Cr^{3+})和六价铬(Cr^{6+})^[1], 三价铬是食物和生物体内最稳定的化学形式, 并且是葡萄糖耐量因子(glucose tolerance factor, GTF)的活性成分, 它能提高胰岛素的活性, 进一步调节葡萄糖、蛋白质和脂肪的代谢^[2,3]。人和动物机体对铬的吸收与许多因素有关。不同形式的铬吸收率不同, 无机铬很难被吸收, 其吸收率为 0.5%~2%^[4], 有机铬较易被吸收, 吸收率为 10%~25%^[5]。日粮因素如淀粉、维生素 C、矿物质、草酸盐以及氨基酸等都可影响铬的吸收。铬在小肠黏膜被吸收, 其吸收部位包括十二指肠、空肠和回肠^[6], 但不同形式的铬在小肠吸收的确切机制目前尚不清楚。

Caco-2 细胞来源于人结肠癌细胞, 体外培养时能自发地进行类似肠道细胞的形态学和生化学上的分化, 获得许多小肠吸收细胞的特性如形成微绒毛结构; 在细胞表面形成良好的刷状缘; 在细胞间形成紧密连接; 分泌水解酶以及合成转运糖、氨基酸和药物等的载体转运系统^[7]。由培养在微孔滤膜上的 Caco-2 细胞构建的模型已被广泛应用于药理、生化、毒理以及微量元素的摄取和转运研究^[8,9]。

三氯化铬($CrCl_3$)为常用无机铬形式, 而吡啶羧酸铬($CrPic$)为常用有机铬形式, 本研究以 Caco-2 为细胞模型, 探讨了 $CrCl_3$ 和 $CrPic$ 的摄取动力学和转运特点。

1 材料与方法

1.1 材料

Caco-2 细胞株购自中科院上海生化细胞所;

DMEM(Dulbecco's minimum essential medium)培养基, 胎牛血清, 非必需氨基酸, L-谷氨酰胺和 Hanks 缓冲液(HBSS, pH 7.4)购自 Gibco 公司; 双抗(青、链霉素), 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)和 I 型鼠尾胶原购自 Sigma 公司; $CrCl_3$ 和 $CrPic$ 均为优纯级, 铬含量分别为 18.95% 和 12.32%。 $[^{14}C]$ 甘露醇(7.89×10^6 Bq)购自美国 NEN 公司; 水为三蒸水。

1.2 细胞模型的建立与完整性检测

细胞用含 10% 胎牛血清, 1% 非必需氨基酸, 4.5 g/L 葡萄糖, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 100 U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基于 25 cm² 的培养瓶中进行传代培养, 培养条件为 37 °C, 5% 二氧化碳, 90% 相对湿度。将细胞接种于 6 孔细胞培养板, 培育至 14 天左右用于细胞摄取试验。将细胞接种于 6 孔 Snapwell 细胞转运培养槽(Corning 公司)的微孔聚酯滤膜上(膜孔径 0.4 μ m, 生长面积 4.7 cm²)用于转运试验, 接种密度为 80 000 个/cm²。所有滤膜在接种细胞前均铺上 I 型鼠尾胶原。转运槽肠腔侧(AP 侧)加入 1.5 ml 培养基, 基底侧(BL 侧)加入 2.6 ml 培养基, 培养基第 1 周每 48 h 换液, 以后每 24 h 换液, 待细胞长到 20~22 天备用。

细胞单层的紧密性通过测定跨膜电阻值(transcellular epithelial electrical resistance, TEER)和甘

收稿日期: 2006-05-16 接受日期: 2006-10-13

浙江省自然科学基金项目资助(No.M303450)

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-86994963, E-mail: lucaslong@126.com

露醇通透率进行评估。TEER 值用 Millcell®-ERS 电阻仪(Millipore 公司)进行测量,并以生长面积进行校正,以 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 表示。将 ^{14}C 甘露醇加到转运槽 AP 侧,从 BL 侧定时取样,用液闪仪(Wallac MicroBeta® TriLux, 芬兰)测定含量。TEER 值大于 $600 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 和甘露醇通透率低于 $0.3\% \text{ h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的滤膜用于转运研究。

1.3 铬溶液配制

将 CrCl_3 和 CrPic 用三蒸水配制成 1 mol/L 的贮液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤菌器过滤除菌,再用 HBSS 稀释成试验所需浓度。

1.4 摄取试验

将培养 14 天的 Caco-2 细胞与 37°C HBSS 在培养箱中预培养 20 min,吸去缓冲溶液,加入 $2\sim 20 \text{ mmol/L}$ 的 CrCl_3 和 CrPic 溶液,分别观察时间、浓度、温度对 CrCl_3 和 CrPic 细胞摄取的影响。加入 4°C HBSS 液冲洗细胞表面 2~3 次,用细胞刮取器小心刮下细胞,用稀硝酸溶液冲洗细胞到 eppendorf 管中,超声粉碎细胞,离心,测定上清液中铬含量。

1.5 转运试验

将培养 21 天的 Caco-2 细胞与 37°C HBSS 在培养箱中预培养 20 min,吸去缓冲溶液,再用 HBSS 冲洗 3 次。转运试验分两步进行,从 AP 侧向 BL 侧转运:将 1.5 ml 不同浓度的铬溶液加入 AP 侧作为供给池,同时 BP 侧加入空白 HBSS 2.6 ml 作为接收池。从 BP 侧向 AP 侧转运:将 2.6 ml 不同浓度的铬溶液加入 BP 侧作为供给池, 1.5 ml 空白 HBSS 加到 AP 侧作为接收池。将转运培养槽置于转速为 50 r/min 的 37°C 恒温振荡水槽中,分别于不同时间点从接受池采样 $200 \mu\text{l}$,同时立刻补加 $200 \mu\text{l}$ 37°C 空白 HBSS。

1.6 铬含量的测定

样品中铬含量测定参照 Quinaia 等^[10]方法并作适当改进,原子吸收光谱仪为岛津 AA-6500,石墨炉 GFA-6000 系统。自动进样量为 $20 \mu\text{l}$,分析精确度约为 $0.45 \mu\text{g/L}$ 。

1.7 数据分析

表观通透系数(apparent permeability coefficient, Papp)按下式计算,单位为 cm/s :

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt \cdot 60 \cdot A \cdot C_0} \quad (1)$$

dQ/dt 为转运率 (mmol/min), A 为微孔滤膜面积 (4.7 cm^2), C_0 为供给池中铬溶液的初始浓度 (mmol/ml)。

数据采用 SPSS(11.5)软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$

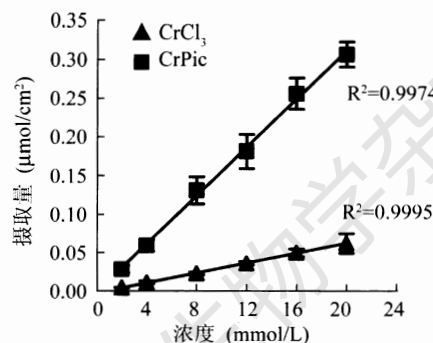


图1 浓度对 CrCl_3 和 CrPic 在 Caco-2 细胞中摄取的影响
摄取试验于 37°C 进行 120 min, CrCl_3 和 CrPic 浓度范围为 $2\sim 20 \text{ mmol/L}$, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n=3$)。

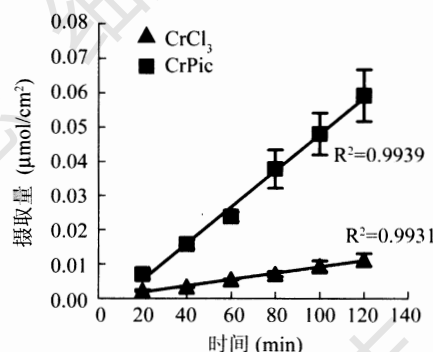


图2 CrCl_3 和 CrPic 在 Caco-2 细胞中摄取的时间曲线
摄取试验于 37°C 进行, CrCl_3 和 CrPic 的浓度为 4 mmol/L , 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n=3$)。

s 表示, $P < 0.05$ 认为是差异显著。

2 结果

2.1 Caco-2 细胞对 CrCl_3 和 CrPic 的摄取

2.1.1 浓度对摄取的影响 图1表示 Caco-2 细胞对不同浓度 CrCl_3 和 CrPic ($2\sim 20 \text{ mmol/L}$) 的摄取随浓度近似线性增加。

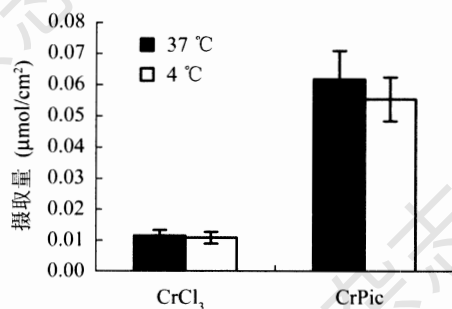
2.1.2 时间对摄取的影响 在 120 min 内, Caco-2 细胞对 4 mmol/L CrCl_3 和 CrPic 的摄取随时间增加呈线性增加(图2)。

2.1.3 温度对摄取的影响 分别观察了在 37°C 和 4°C 条件下 Caco-2 细胞对 4 mmol/L CrCl_3 和 CrPic 的摄取, 图3表明细胞对铬的摄取不受温度的影响。

2.2 CrCl_3 和 CrPic 的跨细胞转运

2.2.1 表观通透系数 考察了 CrCl_3 和 CrPic 在 $0.2\sim 20 \text{ mmol/L}$ 浓度范围内的跨细胞转运(AP到BL方向和BL到AP方向)情况, 其表观通透系数见表1。

2.2.2 浓度对转运的影响 不同浓度范围 ($0.2\sim 20 \text{ mmol/L}$), CrCl_3 和 CrPic 从 AP 到 BL 和 BL 到 AP 两个方向的转运结果见图4, 表明两者的跨细胞转运都随

图3 温度对 CrCl_3 和 CrPic 摄取的影响

CrCl_3 和 CrPic 浓度为 4 mmol/L, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n=3$)。

浓度增加而呈线性增加。

2.2.3 时间对转运的影响 图5表明, 4 mmol/L CrCl_3 和 CrPic 在 120 min 内从 AP 到 BL 和 BL 到 AP 两个方向的转运随时间增加而近似线性增加。

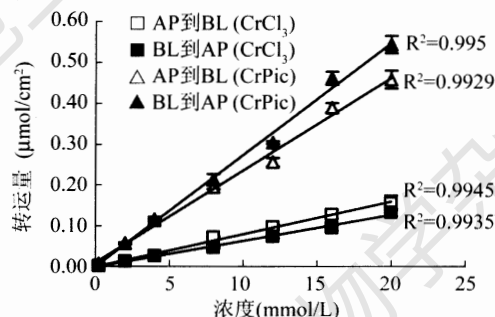
2.2.4 温度对转运的影响 分别考察了 37 °C 和 4 °C 条件下, 4 mmol/L CrCl_3 和 CrPic 从 AP 到 BL 和 BL 到 AP 方向跨细胞转运的情况。表2表明在 4 °C 条件下, CrCl_3 和 CrPic 的跨细胞转运有下降趋势, 但统计分析差异不显著 ($P>0.05$)。

2.3 转运摄取率

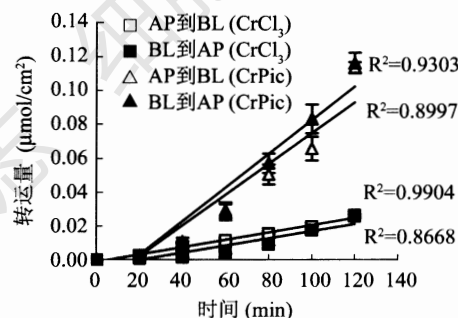
37 °C 条件下, Caco-2 细胞对 CrCl_3 和 CrPic 的摄取率分别为 $(0.88 \pm 0.08)\%$ 和 $(4.73 \pm 0.60)\%$, 转运率分别为 $(2.11 \pm 0.05)\%$ 和 $(9.08 \pm 0.25)\%$ 。表明 CrPic 的吸收率高于 CrCl_3 。

3 讨论

Caco-2 细胞来源于人的结肠癌细胞, 生长在微孔滤膜上的细胞于体外培养一定时间后能够分化成类

图4 浓度(0.2~20 mmol/L)对 CrCl_3 和 CrPic 转运的影响

转运试验分别从 AP 侧到 BL 侧和 BL 侧到 AP 侧于 37 °C 进行 120 min, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n=3$)。

图5 CrCl_3 和 CrPic 跨细胞转运的时间曲线

转运试验分别从 AP 侧到 BL 侧和 BL 侧到 AP 侧于 37 °C 进行 120 min, CrCl_3 和 CrPic 的浓度为 4 mmol/L, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n=3$)。

似正常小肠上皮细胞的结构, 如产生微绒毛结构, 表达多种转运载体和酶。该细胞模型最早用于药物的筛选研究, 之后也被许多营养学家作为研究营养素吸收的一种有力工具, 如用于微量元素吸收、转运以及代谢研究^[9,11]。该细胞模型在研究营养素分子吸

表1 CrCl_3 和 CrPic 在不同浓度下跨细胞转运的 P_{app}

浓度(mmol/L)	CrCl_3 的 P_{app} (1×10^{-6})			CrPic 的 P_{app} (1×10^{-6})		
	AP 到 BL	BL 到 AP	比值	AP 到 BL	BL 到 AP	比值
0.2	1.00±0.27	0.99±0.28	1.01	5.31±0.40	4.96±1.17	1.07
2	0.99±0.27	1.01±0.29	0.98	4.69±0.80	4.73±1.10	0.99
4	1.01±0.11	1.06±0.32	0.95	4.71±0.84	4.82±0.92	0.98
8	1.37±0.32	0.97±0.31	1.41	4.03±0.83	4.42±0.84	0.91
12	1.12±0.11	1.00±0.32	1.12	3.52±0.59	4.20±0.74	0.84
16	1.21±0.26	0.97±0.31	1.25	4.03±0.84	4.80±1.01	0.84
20	1.20±0.28	1.09±0.33	1.10	3.78±0.72	4.50±0.99	0.84

转运试验分别从 AP 侧到 BL 侧和 BL 侧到 AP 侧于 37 °C 进行 120 min, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n=3$)。

表2 温度对 CrCl_3 和 CrPic 跨细胞转运的影响

转运量($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	AP 到 BL		BL 到 AP	
	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C
CrCl_3	0.0270±0.0009	0.0262±0.0021	0.0258±0.0011	0.0249±0.0008
CrPic	0.1190±0.0021	0.1111±0.0094	0.1162±0.0061	0.1084±0.0238

转运试验分别从 AP 侧到 BL 侧和 BL 侧到 AP 侧两个方向进行 120 min, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n=3$)。

收机制时具有以下优点: (1)细胞模型有很大的灵活性,能对营养素分子的吸收和代谢进行快速评估; (2)细胞单层肠腔侧和基底侧相互独立,有利于进行实验操作; (3)不需要使用实验动物,从而降低了经济损耗; (4)重复性好。

不同形式的铬化合物其吸收情况不同, CrCl_3 是常见的无机铬化合物形式, CrPic 则是一种高效的有机铬化合物形式。本文采用 Caco-2 细胞模型研究了两者的摄取动力学和转运特点。结果显示, CrCl_3 和 CrPic 的摄取和转运都随浓度和时间的增加而呈线性增加, 当温度从 37 °C 降到 4 °C 时, 虽然摄取和转运有下降趋势, 但差异不显著, 这说明它们的摄取和转运不是能量依赖型的^[12]。这些结果表明 CrCl_3 和 CrPic 在小肠主要是经被动扩散方式吸收的。在 0.2~20 mmol/L 浓度范围内, CrCl_3 和 CrPic 的转运没有出现饱和现象, 且它们从 AP 到 BL 和 BL 到 AP 方向转运的 P_{app} 比值接近 1.0, 这进一步说明了 CrCl_3 和 CrPic 在小肠内是主要经由被动转运方式吸收的。Dowling 等^[13]利用大鼠在体肠回流模型体外研究了大鼠小肠对 $^{51}\text{CrCl}_3$ 的吸收, 认为小肠对 $^{51}\text{CrCl}_3$ 的吸收是被动转运过程, 本试验结果与此一致。文献资料关于 CrPic 吸收方面的研究比较少, 但 CrPic 的生物学效价显著高于 CrCl_3 , 正因如此, CrPic 已成为营养学领域广受欢迎的一种有机铬添加形式。本研究发现,

虽然 CrPic 也是以被动方式经肠道上皮细胞吸收, 它的摄取率和转运率都明显高于 CrCl_3 。但也不能排除在某些情况下, CrPic 会以载体介导的主动运输形式被吸收。例如, 在铁和锌缺乏的情况下, 转运载体就会降低对铁和锌的特异性, 进而会转运包括三价铬离子在内的其他相关金属离子^[14]。Lukaski 等^[1]也认为由于某些形式的铬能够优先被吸收, 所以铬的吸收不是通过简单的扩散作用, 而应该是几种方式结合的较复杂的过程。关于铬究竟是如何通过肠道黏膜的, 人们推测铬可能是以小分子量的有机铬配合物通过肠道黏膜进入体内的, 这还有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Lukaski HC. *Annu Rev Nutr*, 1999, **19**: 279
- [2] Vincent JB. *Polyhedron*, 2001, **20**: 1
- [3] Glinsmann WH et al. *Metabolism*, 1966, **15**: 510
- [4] Mertz W. *Physiol Rev*, 1969, **49**: 163
- [5] Stoecker BJ. *J Trace Elem Exp Med*, 1999, **12**: 163
- [6] Chen NS et al. *J Nutr*, 1973, **103**: 1182
- [7] Hidalgo IJ et al. *Gastroenterology*, 1989, **96**: 736
- [8] Gan LSL et al. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, **23**: 77
- [9] Pigman EA et al. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, **142**: 243
- [10] Quinaia SP et al. *Fresenius J Anal Chem*, 1999, **364**: 333
- [11] Finley JW et al. *J Nutr Biochem*, 1997, **8**: 92
- [12] Davda J et al. *Int J Pharm*, 2002, **233**: 51
- [13] Dowling HJ et al. *J Nutr*, 1989, **119**: 1138
- [14] Vincent JB. *Proc Nutr Soc*, 2004, **63**: 41

Transport and Uptake of Chromium Chloride and Chromium Picolinate in Caco-2 Cell Monolayers

Long-Ying Zha, Zi-Rong Xu*, Min-Qi Wang, Liang-Ying Gu

(Institute of Feed Science; The Key laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract In order to investigate the uptake and epithelial transport characteristics of chromium chloride and chromium picolinate in small intestine, a human intestinal epithelial cell model Caco-2 *in vitro* cultured was used to study the effects of time, concentration and temperature on uptake and transport of chromium chloride and chromium picolinate. The results showed that the uptake and transport of chromium chloride and chromium picolinate were increased linearly with the increase of concentration and incubation time, and were inclined to be decreased ($P>0.05$) when the incubation temperature was lowered from 37 °C to 4 °C. The apparent permeability coefficient (P_{app}) of chromium chloride and chromium picolinate from apical to basolateral was similar to that from basolateral to apical (0.95–1.41 fold and 0.84–1.07 fold respectively). The uptake rate of chromium chloride and chromium picolinate was (0.88±0.08)% and (4.73±0.60)%, respectively. The transport rate of chromium chloride and chromium picolinate was (2.11±0.05)% and (9.08±0.25)%, respectively. Thus, the uptake and transport of chromium chloride and chromium picolinate were passive diffusion as the dominating process.

Key words chromium chloride; chromium picolinate; Caco-2 cell; uptake; transport

Received: May 16, 2006 Accepted: October 13, 2006

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.M303450)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86994963, E-mail: lucaslong@126.com