

不同因素对三价铬跨 Caco-2 细胞转运的影响

查龙应* 罗海吉 李万立

(南方医科大学, 公共卫生与热带医学学院, 营养与食品卫生学系, 广州 510515)

摘要 采用一种体外培养的人小肠上皮细胞模型 Caco-2 研究了铜、铁、锌、维生素 C、蔗糖、草酸钠、乙二胺四乙酸以及柠檬酸钠对三氯化铬和吡啶羧酸铬跨细胞转运的影响, 旨在探讨各种因素对不同形式三价铬吸收影响的差异。结果表明: 铁显著降低了吡啶羧酸铬和三氯化铬在 Caco-2 细胞中的转运量($P < 0.05$), 而铜和锌对它们的转运量没有产生显著影响($P > 0.05$); 维生素 C、蔗糖、草酸钠、乙二胺四乙酸和柠檬酸钠对吡啶羧酸铬的转运量没有产生显著影响($P > 0.05$), 但维生素 C 和草酸钠显著增加了三氯化铬在 Caco-2 细胞中的转运量($P < 0.05$), 蔗糖则显著降低了三氯化铬的转运量($P < 0.05$)。结果提示三氯化铬相对于吡啶羧酸铬而言, 在吸收时更容易受到各种因素的影响。

关键词 三氯化铬; 吡啶羧酸铬; Caco-2 细胞; 转运

微量元素铬(chromium, Cr)是人体的一种必需微量元素, 它作为葡萄糖耐受因子(glucose tolerance factor, GTF)的活性成分, 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。铬缺乏会导致胰岛素功能损伤, 机体蛋白质合成和能量产生受到抑制, 且 II 型糖尿病和心血管功能紊乱的发生率增加^[1]。铬主要在小肠内被吸收, 其主要吸收部位是空肠, 其次是回肠和十二指肠^[2]。许多因素都可以影响铬在肠道中的吸收。不同化合价格的吸收率不同, 六价铬吸收率是三价铬的 3~5 倍^[3]。三价铬在肠道吸收率低的原因是因为其能与食物中的螯合剂(如肌醇六磷酸)形成不溶性的铬盐, 而且其他微量元素(如锌、铁、铜等)能抑制三价铬的吸收^[4]。无机三价铬的吸收率较低, 大约在 1%~3%^[4], 当无机 Cr^{+3} 与有机分子(如氨基酸、吡啶酸等)形成复合物时则较易被吸收, 其吸收率最高可达到 10%~25%^[5]。食物中的营养成分也会影响铬的吸收, 如维生素 C、氨基酸、草酸盐等都能促进铬的吸收, 单糖(如果糖、葡萄糖等)则可抑制铬的吸收^[6]。三价铬主要经被动扩散方式吸收^[3,7], 而不同形式的三价铬吸收率存在显著差异。铬在吸收时会受到上述各种因素的影响, 那么这些因素对不同形式的三价铬在肠道的吸收影响是否存在差异呢? 还有待于进一步的研究。

Caco-2 细胞来自人结肠癌细胞系, 在体外一定条件下培养时能进行类似小肠上皮吸收细胞的分化, 产生细胞极性, 形成刷状缘, 并能分泌蔗糖酶、碱性磷酸酶、乳糖酶和氨基肽酶等水解酶类和表达产生

相关转运载体^[8,9]。同时, Caco-2 细胞体外吸收模型操作简便、重复性良好, 已被广泛用来模拟研究物质(如氨基酸、药物和微量元素等)在小肠内的吸收机制^[10,11]。

因此, 本试验利用 Caco-2 细胞模型研究了铜、铁、锌、维生素 C、蔗糖、草酸盐、乙二胺四乙酸(EDTA)以及柠檬酸盐对三氯化铬($CrCl_3$)和吡啶羧酸铬($CrPic$)跨细胞转运的影响, 旨在探讨各种影响因素对不同形式三价铬吸收影响的差异。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

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 7.2)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; 甘露醇(7.89×10^6 Bq)购自美国 NEN 公司; 水为三蒸水。

$CrCl_3$ 和 $CrPic$ 均为优纯级, 购自沈阳海中天精细化工厂; 维生素 C (Vc)、硫酸铜($CuSO_4$, 分析纯)、三氯化铁($FeCl_3$, 分析纯)和氯化锌($ZnCl_2$, 分析纯)购自华东医药股份有限公司; 蔗糖、EDTA、草酸钠和柠檬酸钠购自上海生工生物工程技术有限公司。

收稿日期: 2007-11-27 接受日期: 2008-01-28

* 通讯作者。Tel: 020-62789127, Fax: 020-61648309, E-mail:

lucasloug@126.com

1.2 Caco-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 μg/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% CO₂、90% 相对湿度。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 μm, 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)和甘露醇通透率进行评估。TEER 值用 Millicell®-ERS 电阻仪(Millipore 公司)进行测量。将 ¹⁴C 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 Ω·cm² 和甘露醇通透率低于 0.3%·cm²·h⁻¹ 的细胞单层用于转运研究。

1.3 溶液配制

将 CrPic 和 CrCl₃ 用 HBSS (pH 7.2) 配制成 4 mmol/L (以铬计)的溶液, 再用 0.22 μm 的滤菌器过滤除菌后备用。将 Vc、CuSO₄、FeCl₃、ZnCl₂、蔗糖、EDTA、草酸钠和柠檬酸钠用 HBSS 配制成 5 mmol/L 的溶液(调 pH 值为 7.2), 用 0.22 μm 的滤菌器过滤除菌后备用。

1.4 转运试验

将培养 21 天左右的 Caco-2 细胞紧密单层与 37 °C HBSS 在培养箱中预培养 20 min, 吸去缓冲溶液, 再

用 37 °C 预热的 HBSS 冲洗 3 次后备用。不同因素对铬跨 Caco-2 细胞转运影响试验从肠腔侧(AP)到基底侧(BL)进行。对照试验: 将 1.5 ml 含 4 mmol/L 铬的 HBSS 溶液加入 AP 侧作为供给池, BL 侧加入 2.6 ml 空白 HBSS 作为接收池。处理试验: 将 1.5 ml 含 4 mmol/L 铬和 5 mmol/L 不同影响因素(Vc、Cu、Zn、Fe 等, 每次研究一个因素)的 HBSS 溶液加入 AP 侧作为供给池, BL 侧加入 2.6 ml 空白 HBSS 作为接收池。试验在 37 °C 进行 120 min, 在不同时间点(20、40、60、80、100、120 min)从 BL 侧吸取 200 μl 样品, 同时立刻补加 200 μl 经 37 °C 预热的新鲜空白 HBSS, 每个处理设 3~5 个培养孔作为重复, 试验重复 2 遍。

1.5 铬含量测定

样品中铬含量测定参照 Quinaia 等^[12]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 μl, 分析精确度约为 0.45 μg/L。

1.6 统计分析

数据采用 SPSS(11.5)软件进行统计分析, 方差分析显著后多重比较采用 LSD 法进行。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 认为是差异显著。

2 结果

2.1 Vc 对三价铬转运的影响

Vc 对 CrPic(图 1)在 Caco-2 细胞中的转运量没有产生显著的影响($P > 0.05$), 但显著增加了 CrCl₃ 在 Caco-2 细胞中的转运量($P < 0.05$)。

2.2 微量元素对三价铬转运的影响

如表 1 所示, 铁显著降低了 CrPic 和 CrCl₃ 在 Caco-2 细胞单层中的转运量($P < 0.05$), 而铜、锌对 CrPic 和 CrCl₃ 在 Caco-2 细胞中的转运量没有显著影响($P > 0.05$)。

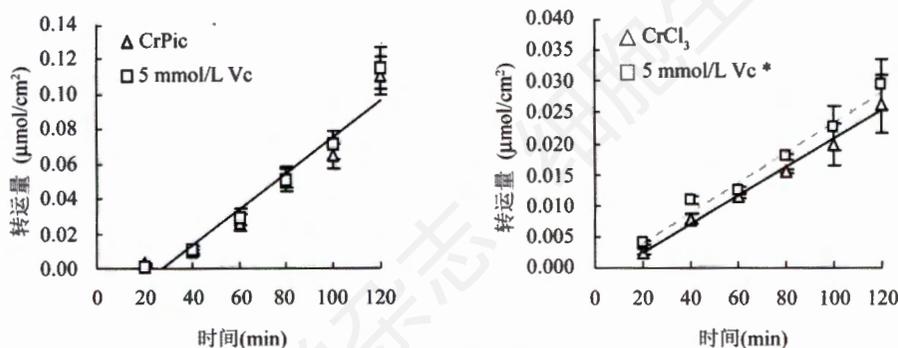


图 1 Vc 对三价铬在 Caco-2 细胞中转运的影响

转运试验从 AP 侧到 BL 侧于 37 °C 进行 120 min, 铬浓度为 4 mmol/L, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示($n=3$), * 表示每个数据点统计差异显著($P < 0.05$)。

表1 微量元素对三价铬在 Caco-2 细胞中转运的影响

转运量 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)		时间(min)					
		20	40	60	80	100	120
CrPic	对照	0.0028±0.0005	0.0094±0.0017	0.0283±0.0048	0.0506±0.0059	0.0658±0.0070	0.1137±0.0111
	Fe	0.0020±0.0004 *	0.0082±0.0013 *	0.0240±0.0042 *	0.0430±0.0054 *	0.0520±0.0070 *	0.1059±0.0109 *
	Cu	0.0025±0.0006	0.0095±0.0015	0.0260±0.0046	0.0505±0.0058	0.0657±0.0064	0.1105±0.0121
	Zn	0.0026±0.0004	0.0091±0.0015	0.0284±0.0036	0.0510±0.0054	0.0654±0.0075	0.1134±0.0132
CrCl ₃	对照	0.0026±0.0004	0.0079±0.0007	0.0115±0.0004	0.0156±0.0003	0.0198±0.0024	0.0264±0.0026
	Fe	0.0016±0.0002 *	0.0058±0.0008 *	0.0095±0.0003 *	0.0124±0.0003 *	0.0161±0.0016 *	0.0192±0.0014 *
	Cu	0.0025±0.0004	0.0078±0.0006	0.0107±0.0003	0.0142±0.0003	0.0186±0.0022	0.0268±0.0025
	Zn	0.0021±0.0002	0.0076±0.0007	0.0122±0.0006	0.0139±0.0003	0.0184±0.0050	0.0241±0.0071

转运试验从 AP 侧到 BL 侧于 37 °C 进行 120 min, 铬浓度为 4 mmol/L, Fe、Cu 和 Zn 浓度为 5 mmol/L, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示($n=3$), * 表示与对照组相比统计差异显著($P<0.05$)。

表2 EDTA、草酸钠和柠檬酸钠对三价铬在 Caco-2 细胞中转运的影响

转运量 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)		时间(min)					
		20	40	60	80	100	120
CrPic	对照	0.0027±0.0005	0.0092±0.0017	0.0284±0.0048	0.0507±0.0059	0.0654±0.0070	0.1133±0.0111
	EDTA	0.0028±0.0008	0.0090±0.0006	0.0293±0.0045	0.0500±0.0065	0.0645±0.0064	0.1135±0.0102
	草酸钠	0.0029±0.0006	0.0096±0.0023	0.0285±0.0064	0.0502±0.0065	0.0719±0.0098	0.1142±0.0132
	柠檬酸钠	0.0027±0.0009	0.0100±0.0025	0.0289±0.0065	0.0506±0.0064	0.0645±0.0074	0.1154±0.0123
CrCl ₃	对照	0.0026±0.0004	0.0079±0.0007	0.0121±0.0004	0.0154±0.0003	0.0198±0.0034	0.0262±0.0056
	EDTA	0.0026±0.0005	0.0078±0.0006	0.0114±0.0006	0.0162±0.0008	0.0199±0.0036	0.0260±0.0068
	草酸钠	0.0033±0.0006 *	0.0094±0.0007 *	0.0135±0.0010 *	0.0175±0.009 *	0.0219±0.0034 *	0.0288±0.0049 *
	柠檬酸钠	0.0025±0.0006	0.0079±0.0009	0.0126±0.0008	0.0161±0.0009	0.0189±0.0065	0.0264±0.0098

转运试验从 AP 侧到 BL 侧于 37 °C 进行 120 min, 铬浓度为 4 mmol/L, 草酸钠、柠檬酸钠和 EDTA 浓度为 5 mmol/L, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示($n=3$), * 表示与对照组相比统计差异显著($P<0.05$)。

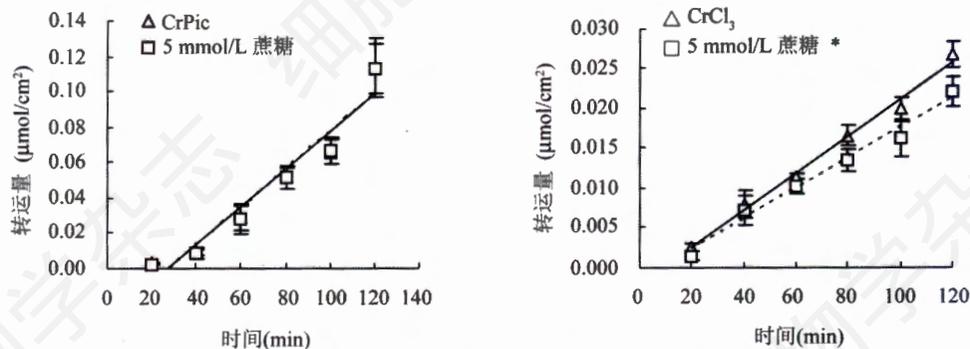


图2 蔗糖对三价铬在 Caco-2 细胞中转运的影响

转运试验从 AP 侧到 BL 侧于 37 °C 进行 120 min, 铬浓度为 4 mmol/L, $n=3$, * 表示每个数据点统计差异显著($P<0.05$)。

2.3 EDTA、草酸钠和柠檬酸钠对三价铬转运的影响

由表2可见, EDTA、草酸钠和柠檬酸钠对 CrPic 在 Caco-2 细胞中的转运量没有显著影响($P>0.05$)。EDTA 和柠檬酸钠对 CrCl₃ 在 Caco-2 细胞中的转运量也没有显著影响($P>0.05$), 但草酸钠显著增加了 CrCl₃ 在 Caco-2 细胞中的转运量($P<0.05$)。

2.4 蔗糖对三价铬转运的影响

如图2所示, 蔗糖对 CrPic 在 Caco-2 细胞中的转

运量没有显著影响($P>0.05$), 但显著降低了 CrCl₃ 在 Caco-2 细胞中的转运量($P<0.05$)。

3 讨论

铬在体内的吸收与食物中铬的形式密切相关, 并受食物营养成分的影响。报道认为 Vc 能促进铬在大鼠和豚鼠体内的吸收, 增加铬在组织中的沉积^[6]。本试验中, Vc 显著增加了 CrCl₃ 在 Caco-2 细胞中的转运量, 但对 CrPic 的转运量没有产生显著影响。CrCl₃

在溶液中很容易解离成 Cr^{3+} , Vc可能与其形成可溶性单体, 增强其与细胞黏膜的黏附, 从而增强其在 Caco-2 细胞中的转运, 而 CrPic 是以络合形式存在, 不易与 Vc 发生相互作用, 所以它在 Caco-2 细胞中的转运不受影响。

食物中含有的其他微量元素如铁、铜、锌等对铬的吸收能够产生一定的影响。本试验中, Fe 显著降低了铬在 Caco-2 细胞中的转运量。有报道认为, 在体内由于铁与铬共用同一运铁蛋白, 所以铁过多时, 铁与铬竞争运铁蛋白上的结合位点, 会使运送到组织中的铬量减少^[13]。Caco-2 细胞中能表达运铁蛋白受体^[14], 所以铬在 Caco-2 细胞中进行转运时, 铁可能与其竞争, 从而降低铬的转运量。然而, 铬在 Caco-2 细胞中主要经被动方式转运^[7], 所以 Fe 抑制铬在 Caco-2 细胞中转运的具体机制还有待于进一步研究。在过量锌引起的牛羊贫血的群体中, 用添加铬的日粮饲喂可以消除此现象, 说明铬能抑制锌的吸收, 其原因可能是铬与锌在体内有共同的代谢途径, 它们中的一种会抑制另一种的吸收^[15]。与上述报道不一致的是, 本试验中锌并没有影响 CrPic 和 CrCl_3 在 Caco-2 细胞中的转运。Caco-2 细胞 AP 侧对 Zn 的转运是一个由受体分子介导的饱和过程^[16], 而铬在 Caco-2 细胞中主要是经被动方式进行转运的^[7], 所以 Zn 并不影响铬在 Caco-2 细胞中的转运。同样, Cu 在 Caco-2 细胞中是经二价金属转运蛋白(DMT1)和铜转运蛋白(Ctr1)共同介导进行转运的^[17], 所以 Cu 对铬在 Caco-2 细胞中的转运也没有产生显著影响。然而, Zn、Cu、Fe 在体内对铬吸收的影响是否与本实验得出的结果一致有待于进一步探讨。

常见的螯合剂如草酸盐、植酸盐、柠檬酸盐、EDTA 能影响金属元素在体内的吸收^[2]。本试验研究了 EDTA、草酸钠和柠檬酸钠对 CrPic 和 CrCl_3 在 Caco-2 细胞中转运的影响, 结果发现, 只有草酸钠显著增加了 CrCl_3 在 Caco-2 细胞中的转运量。这与前人报道部分一致。Chen 等^[2]利用大鼠外翻肠囊模型研究了草酸盐、植酸盐、EDTA 和柠檬酸盐对 $^{51}\text{CrCl}_3$ 在小肠不同肠段的转运, 结果发现, 草酸盐显著增加了 $^{51}\text{CrCl}_3$ 转运量, 而 EDTA 和柠檬酸盐对 $^{51}\text{CrCl}_3$ 转运

量没有产生显著影响。 Cr^{3+} 在肠道生理 pH 值条件下很容易形成不溶性的大分子铬氧化物, 而草酸盐则能使 Cr^{3+} 避免形成不溶性的铬氧化物, 或者草酸盐能取代铬氧化物上的羟基基团, 而使不溶性的铬氧化物变成可溶性的铬氧化物^[18]。本试验中, 草酸钠可能与 Cr^{3+} 结合, 增强了对细胞膜的黏附性, 从而提高了 Cr^{3+} 在 Caco-2 细胞中的转运量。当 Cr^{3+} 与吡啶酸螯合后能形成较为稳定的复合体, 减弱或阻止了草酸钠与 Cr^{3+} 的作用, 因而草酸钠对 CrPic 在 Caco-2 细胞中的转运没有产生显著影响。

给大鼠饲喂蔗糖、果糖或葡萄糖含量高的日粮显著降低了 $^{51}\text{Cr}^{3+}$ 在大鼠组织器官中的沉积量, 说明它们能够降低 Cr^{3+} 的吸收^[19]。本试验也发现蔗糖显著降低了 CrCl_3 在 Caco-2 细胞中的转运量, 但蔗糖对 CrPic 的转运没有影响。游离的 Cr^{3+} 可能与蔗糖发生螯合, 形成大分子复合物, 从而难以被降解吸收。

以上结果表明, 日粮中各种影响因素对不同形式铬化合物吸收的影响不同。 CrCl_3 由于容易形成游离 Cr^{3+} , 而易受到各种因素的影响。而 CrPic 以较稳定的螯合复合体形式存在, 受日粮其他成分干扰少, 这可能也是有机 CrPic 吸收率高于无机 CrCl_3 的一个原因。

参考文献 (References)

- [1] Shara M et al. *J Inorg Biochem*, 2005, **99**: 2161
- [2] Chen NS et al. *J Nutr*, 1973, **103**: 1182
- [3] Lukaski HC. *Annu Rev Nutr*, 1999, **19**: 279
- [4] Mertz W. *J Nutr*, 1993, **123**: 626
- [5] Vincent JB. *Proc Nutr Soc*, 2004, **63**: 41
- [6] Stoecker BJ. *J Trace Elem Exp Med*, 1999, **12**: 163
- [7] 查龙应等. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**: 77
- [8] Hidalgo IJ et al. *Gastroenterology*, 1989, **96**: 736
- [9] Gan LSL et al. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, **23**: 77
- [10] Artursson P. *J Pharm Sci*, 1990, **79**: 476
- [11] Zodl B et al. *Microchem J*, 2005, **79**: 393
- [12] Quinaia SP et al. *Fresenius J Anal Chem*, 1999, **364**: 333
- [13] Fairweather-tait S et al. *Nutr Res Rev*, 1996, **9**: 295
- [14] Sanchez L et al. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1289**: 291
- [15] Hahn CJ et al. *Am J Physiol*, 1975, **228**: 1020
- [16] Yamaji S et al. *FEBS Lett*, 2001, **507**: 137
- [17] Tennant J et al. *FEBS Lett*, 2002, **527**: 239
- [18] Mertz W. *Physiol Rev*, 1969, **49**: 163
- [19] Seaborn CD et al. *J Nutr*, 1989, **119**: 1444

Effects of Different Factors on Transport of Trivalent Chromium in Caco-2 Cell Monolayers

Long-Ying Zha*, Hai-Ji Luo, Wan-Li Li

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract In order to investigate the effects of various dietary factors on intestinal absorption of different forms of trivalent chromium, a human intestinal epithelial cell model Caco-2 *in vitro* cultured was used to study the effect of copper, iron, zinc, vitamin C, sucrose, sodium oxalate, EDTA and sodium citrate on transport of chromium chloride and chromium picolinate. The results showed that iron significantly decreased the transport amount of chromium picolinate and chromium chloride in Caco-2 cell monolayers ($P < 0.05$). However, copper and zinc produced no significant effect on their transport amount ($P > 0.05$). The transport amount of chromium picolinate was not affected by vitamin C, sucrose, sodium citrate, EDTA and sodium oxalate ($P > 0.05$). However, the transport amount of chromium chloride was significantly increased by vitamin C and sodium oxalate ($P < 0.05$), and decreased by sucrose ($P < 0.05$). These results indicated that transport of chromium chloride was more easily affected by various dietary factors than that of chromium picolinate.

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

Received: November 27, 2007

Accepted: January 28, 2008

*Corresponding author. Tel: 86-20-62789127, Fax: 86-20-61648309, E-mail: lucaslong@126.com