

· 药物代谢 ·

6-姜酚对 Caco-2 细胞 PepT1 转运功能的影响

郭文峰¹, 杨伟鹏², 王怡薇², 王彦礼², 胡灿¹, 温鹏¹, 高小玲¹, 陈蔚文^{1,3*}

(1. 广州中医药大学脾胃研究所, 广州 510405; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 上海市高校中医内科学 E-研究院, 上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 观察 6-姜酚对 Caco-2 细胞肽转运载体 PepT1 转运二肽的能力及其蛋白、mRNA 表达的影响。方法: Caco-2 细胞融合后连续培养 28 d 后给予 6-姜酚处理, 并设立正常对照组及 cAMP 抑制剂对照组, 用放射性同位素示踪技术比较 Caco-2 细胞转运二肽化合物 Glycyl-Sarcosine 的能力, 采用 Western blot 方法测定 Caco-2 细胞膜上 PepT1 蛋白的表达, 荧光定量 PCR 方法测定 PepT1 mRNA (SLC15A1) 的表达水平。结果: 6-姜酚处理组 Caco-2 细胞 60, 120 min 时点 Glycyl-Sarcosine 吸收转运累积量分别为 (6.84 ± 0.46) , (8.61 ± 0.54) $\mu\text{mol}/\text{孔}$, 高于正常对照组 ($P < 0.05$), 后者分别为 (5.62 ± 0.20) 、 (6.54 ± 0.54) $\mu\text{mol}/\text{孔}$; 6-姜酚与 Rp-8-Br-cAMP 合用组 120 min 时点为 (6.92 ± 0.67) $\mu\text{mol}/\text{孔}$, 明显低于相应时点单用 6-姜酚组 ($P < 0.05$); 6-姜酚处理后 Caco-2 细胞膜 PepT1 蛋白表达增加, PepT1 表达与内参 GAPDH 表达灰度比值 6-姜酚组为 (0.317 ± 0.022) , 高于空白对照组 (0.220 ± 0.019) ($P < 0.01$); 荧光定量 PCR 结果, 6-姜酚能上调 Caco-2 细胞 SLC15A1 mRNA 表达, 但与 cAMP 抑制剂合用后该抑制作用被阻断。结论: 6-姜酚具有促进正常培养 Caco-2 细胞转运二肽化合物 Glycyl-Sarcosine 的作用, 该作用可能与上调 PepT1 蛋白及 mRNA 表达有关, 该过程调控与胞内第二信使 cAMP 有一定的关系。

[关键词] 6-姜酚; 肽转运载体 1; 转运功能; 环磷酸腺苷

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0116-04

Effects of 6-gingerol on Transport Ability of PepT1 in Caco-2 Cells

GUO Wen-feng¹, YANG Wei-peng², WANG Yi-wei², WANG Yan-li², HU Can¹,
WEN Peng¹, GAO Xiao-ling¹, CHEN Wei-wen^{1,3*}

(1. Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. Institute of Chinese Meteria Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of 6-gingerol on expression and transport ability of PepT1 in Caco-2 cells. **Method:** Caco-2 monolayers were grown on permeable supports. Peptide transport activity was studied using [¹⁴C]-glycyl-sarcosine ([¹⁴C]-Gly-Sar). The densities of PepT1 protein and mRNA (SLC15A1) expression levels were analyzed by Western blot and Real-time quantitative polymerase chain reaction. **Result:** The total transported Gly-Sar of Caco-2 cells within 60, 120 minutes of group treated by 6-gingerol were higher than those of controlled group, (6.84 ± 0.46) , (8.61 ± 0.54) $\mu\text{mol}/\text{per well}$ vs (5.62 ± 0.20) , (6.54 ± 0.54) $\mu\text{mol}/\text{per well}$, and higher than group of cells treated together with Rp-8-Br-cAMP within 120 minutes, the latter result were (6.92 ± 0.67) $\mu\text{mol}/\text{per well}$. And 6-gingerol showed up-regulated effect on PepT1 protein and mRNA

[收稿日期] 2011-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600798); 上海市教育委员会 E-研究院建设计划项目(E03008)

[第一作者] 郭文峰, 副教授, 博士, 从事脾虚证证候本质研究, Tel: 020-36585444, E-mail: guowenfeng@gzhtcm.edu.cn

[通讯作者] * 陈蔚文, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合消化道药理研究, Tel: 020-36585444, E-mail: chenw@gzhtcm.edu.cn

expression, also can be inhibited by Rp-8-Br-cAMP. **Conclusion:** 6-gingerol has significant effects on promoting the transport ability of dipeptides in Caco-2 cells, which maybe take effects by up-regulating PepT1 protein and mRNA expression.

[**Key words**] 6-gingerol; peptide transporter 1; transport ability; cyclic adenosine monophosphate

肽转运载体 1PepT1 (peptide transporter 1) 是蛋白质消化产物小分子肽 (二肽、三肽) 在小肠吸收的主要转运体,其表达和功能直接影响蛋白质消化产物的吸收水平,我们认为 PepT1 的功能与“脾主运化水谷精微”密切相关。前期动物实验研究中观察到脾阳虚模型大鼠小肠黏膜 PepT1 转运功能增强,蛋白表达上调,理中汤治疗可逆向调节这种改变^[1-2]。本次拟从培养 Caco-2 细胞模型,观察干姜成分之一——6-姜酚对体外培养细胞 PepT1 表达及功能影响。

1 材料

1.1 试剂 6-姜酚 (6-gingerol, C₁₇H₂₆O₄, CAS. 23513-14-6), 购自 忒尔塔医药科技有限公司, 纯度 >98%, 批号 20091106; ¹⁴C-glycyl-sarcosine, 购自 American Radiolabeled Chemicals Inc. 批号 090731, 浓度 3.7 × 10⁶ Bq · mL⁻¹; 8-bromoadenosine-3', 5'-cyclic mono-phosphorothioate, rp-isomer (Rp-8-Br-cAMP), Simga 公司, 批号 029K1157; glycyl-sarcosine, Sigma 公司, 批号 1428711 22009161; PEPT1 抗体: Abcam 公司; 定量 PCR 用酶 SYBR Green PCR Master Mix, Toyobo 公司; Transwell 聚碳酸酯膜单层细胞培养板, 嵌入膜直径 24 mm, 孔径 0.4 μm, Corning 公司产品, 批号 20109011。

1.2 仪器 定量 PCR 仪, 美国 Stratagene 公司实时荧光定量 PCR 仪 Mx3005P; Millicell® -ERS 跨膜电阻测定仪, 美国 Millipore 公司; 液体闪烁及发光仪, Perkin Elmer 1450, 美国 Perkin Elmer 公司; 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; 紫外-可见分光光度计, Beckman Coulter DU® 520, 德国贝克曼公司; 凝胶成像系统, KADAK Image Station 2000MM, 美国 Eastman Kodak 公司。

1.3 细胞株 Caco-2 细胞, 来源于人结肠腺癌细胞, 结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞, 购自 American Type Culture Collection (ATCC, HTB-37), 批号 57850025。

2 方法

2.1 Caco-2 细胞培养、单层细胞模型建立及给药

取 25 ~ 28 代次的 Caco-2 细胞。为了测定 Caco-2 细胞从顶膜向基底膜的 ¹⁴C-glycyl-sarcosine 吸收转运, 将 Caco-2 细胞种植于跨膜转运 6 孔培养板微孔滤膜上, 初始种植密度为 2.0 × 10⁵ 个/孔, 每孔上、下室各加入高糖 DMEM 培养基 2.0 mL, 隔日更换培养基, 参照文献[4]报道的方法, 待细胞长成致密单层细胞层后, 再连续培养 28 d 后进行试验。

用跨膜电阻测定方法确定致密单层细胞模型的建立^[4]。将跨膜电阻测定仪的 2 个电极分别插入跨膜转运 6 孔培养板培养小室的上下室培养液中, 读取跨膜电阻值。加入 DMEM 培养基后, 未种植细胞的跨膜转运 6 空培养板上下室之间的跨膜电阻 < 120 Ω, 聚碳酸酯膜上细胞形成致密细胞层后, 其跨膜电阻当 > 200 Ω。

2.2 ¹⁴C-Glycyl-Sarcosine 转运观测 更换跨膜转运 6 孔培养板上下小室中的培养基, 在上室 2.0 mL DMEM 培养基中加入 6-姜酚 (用 DMSO 配制成 1.0 mmol · L⁻¹ 的母液), 使其终浓度为 50 μmol · L⁻¹, 同时设 6-姜酚加 Rp-isomer 组, 在加入等量 6-姜酚的同时, 加入 Rp-isomer (用 DMSO 溶解, 配制成浓度为 5.0 mmol · L⁻¹ 的母液), 使其终浓度为 50.0 μmol · L⁻¹, 另设正常对照组, DMEM 培养基中加入等体积的 DMSO, 每组设 3 个复孔。更换培养基及添加受试药的同时, 每孔在上室培养基中加入 Glycyl-Sarcosine-[Gly-1-¹⁴C] 及未经同位素标记的 Glycyl-Sarcosine, 使 Glycyl-Sarcosine 终浓度为 50 μmol · L⁻¹。置于 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度培养箱中培养, 分别与 5, 10, 15, 30, 60, 120 min 时取下室培养基 100 μL, 液体闪烁计数仪测定 ¹⁴C-Glycyl-Sarcosine 浓度, 计算 Caco-2 单层细胞对 Glycyl-Sarcosine 的转运功能, 用于评价 PepT1 对二肽的转运能力。

2.3 膜蛋白中 PepT1 蛋白表达检测 采用 Western blot 方法进行。Caco-2 细胞种植于 6 孔培养板中, 培养条件和给药方案同 2.2。在给药 24 h 后, 移去培养液, PBS 漂洗 2 遍, 根据细胞量加入相应的膜蛋白提取缓冲液, 4 °C 轻摇 15 min, 收集裂解液到 EP 管中, 14 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清到新的 EP

管中。BCA (bicinchonine acid assay) 法测量蛋白浓度后, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 80 V 恒压 50 min, 120 V 恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止。低温条件下, 100 V 恒压 60 ~ 120 min 转移电泳至 PVDF 膜, 取出杂交膜, TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20) 缓冲液漂洗 5 min × 3 次。5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h 或 4 °C 过夜。TBST 缓冲液洗膜 5 min, 3 次。一抗稀释液 4 °C 过夜或 37 °C 孵育 2 h。TBST 洗膜 5 min, 3 次。二抗稀释液 37 °C 孵育 1 h。TBST 洗膜 5 min × 3 次。蒸馏水漂洗膜 2 min, 共洗 3 次。将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面, 使反应持续 5 min。用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液, 放至暗盒曝光, 显影。凝胶成像系统测定条带灰度值, 以 PepT1 表达灰度值与同组内参 GAPDH 灰度值的比值 ($Ratio = A_{PepT1} / A_{GAPDH}$) 为各组蛋白表达相对值, 用于组间比较。

2.4 荧光定量 PCR 检测 SLC15A1 (PepT1 mRNA) 表达 细胞培养和给药方法同 2.2。受试药作用 24 h 后收集细胞, 提取总 RNA。采用紫外分光光度计测定 A_{260} / A_{280} 方法进行 RNA 纯度检测, 确认 RNA 较纯, 无蛋白质污染。琼脂糖凝胶电泳法进行总 RNA 完整性检测。

逆转录 在 RNase free 的 PCR 管中, 取 1.0 μg 总 RNA 稀释至 12 μL。吹打均匀, 置 65 °C 保温 5 min, 使 RNA 变性。随后立即冰上致冷, 以防止 RNA 复性; 在该 PCR 管中加入 Oligo (dT) 0.5 μL, Random primer 0.5 μL, 10 mmol · L⁻¹ dNTP 2.0 μL, RNase inhibitor 0.5 μL, 5 × RT buffer 4.0 μL, M-MLV 逆转录酶 0.5 μL。将上述 20 μL 反应溶液 30 °C 保温 10

min, 42 °C 保温 60 min, 72 °C 保温 10 min。

定量 PCR 检测序列片段大小。内参片段: 18SrRNA-112bp; 目的片段: AQP1-151bp。设计的引物: 表达 PepT1 蛋白的 mRNA 为 SLC15A1, qh-SLC15A1-F1: 5'-CTGCCCTGAAGTGAAGGTGT-3', qh-SLC15A1-R1: 5' GATCTCCGCTGGGTTGATGT-3'。反应体系总体积 20.0 μL; cDNA (1:15) 5.0 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 2 × SYBR Green PCR Master Mix 10.0 μL, dH₂O 4.0 μL。反应条件: 预变性 95 °C 5 min, 95 °C 15 s, 65 °C 15 s, 72 °C 20 s 读板, 40 个循环。融解曲线分析: 温度 60 °C ~ 95 °C, 每分钟读 1 次。以 SLC15A1 荧光值 ($q_{SLC15A1}$) 与内参 18 s 荧光值 (q_{18s}) 的比值, 即 SLC15A1 相对值判断 SLC15A1 表达水平的高低。

2.5 统计方法 采用 SPSS 13.0 软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析, 组间比较分别采用 LSD, S-N-K (方差齐) 和 Tamhane's T2 和 Dunnett's T3 (方差不齐) 方法。

3 结果

3.1 单细胞层模型建立 Caco-2 细胞融合后, 继续常规培养 28 d, 跨膜电阻测定结果表明致密单层细胞模型已经形成, 空白对照孔电阻为 110 Ω, 试验孔跨膜电阻测定结果均大于 230 Ω。表明单细胞层结构致密, 可用于模拟肠上皮细胞吸收转运试验。

3.2 各组 ¹⁴C-Glycyl-Sarcosine 转运量 液体闪烁计数器测定 ¹⁴C-Glycyl-Sarcosine 量, 通过已知浓度样品测定结果制作标准曲线, 计算对应 Glycyl-Sarcosine 浓度。各组别细胞 Glycyl-Sarcosine 吸收转运量及其与不同时间点之间的关系见表 1。

表 1 6-姜酚对 Caco-2 细胞转运 Glycyl-Sarcosine 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

μmol/孔

组别	Glycyl-Sarcosine 吸收转运量				
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
正常对照	1.53 ± 0.14	2.42 ± 0.68	3.15 ± 0.76	5.62 ± 0.20	6.54 ± 0.54
Rp-8-Br-cAMP	1.48 ± 0.70	1.98 ± 0.72	2.81 ± 0.56	4.42 ± 0.63 ¹⁾	4.71 ± 0.83 ¹⁾
6-姜酚	1.58 ± 0.42	2.61 ± 0.61	4.49 ± 0.63	6.84 ± 0.46 ¹⁾	8.61 ± 0.54 ²⁾
6-姜酚 + Rp-8-Br-cAMP	1.61 ± 0.45	2.13 ± 0.52	3.76 ± 0.55	6.02 ± 0.59	6.92 ± 0.67 ³⁾

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 6-姜酚组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

从表 1 结果可知, 6-姜酚有促进 Caco-2 细胞转运 Glycyl-Sarcosine 的作用, 与未经 6-姜酚处理的 Caco-2 细胞比较, 其于 60 min 后的累计转运 Glycyl-Sarcosine 的总量明显增加 ($P < 0.05$)。且 6-姜酚促进 Caco-2 细胞转运二肽化合物 Glycyl-Sarcosine 的效应可部分被 cAMP 的抑制剂 Rp-8-Br-cAMP 阻断,

表现在添加该阻断剂之后, 6-姜酚对 Caco-2 细胞转运 Glycyl-Sarcosine 的能力下降, 与单独以 6-姜酚处理组比较, 合并添加 Rp-8-Br-cAMP 处理后, Caco-2 细胞转运 Glycyl-Sarcosine 总量在 120 min 时点均明显减少 ($P < 0.05$)。

3.3 各组 PepT1 蛋白表达 (Western blot 法) 6-姜

酚处理 24 h 可提高 Caco-2 细胞膜 PepT1 蛋白表达水平,Rp-8-Br-cAMP 显著降低膜 PepT1 蛋白表达水平,Rp-8-Br-cAMP 与 6-姜酚合用,可抑制 6-姜酚增加 Caco-2 细胞膜 PepT1 表达的作用,其 PepT1 蛋白表达水平接近空白对照组,低于单用 6-姜酚组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 6-姜酚对 Caco-2 细胞膜 PepT1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$A_{\text{PepT1}}/A_{\text{GAPDH}}$
正常对照	0.220 ± 0.019
Rp-8-Br-cAMP	0.073 ± 0.018 ^{2,4)}
6-姜酚	0.317 ± 0.022 ²⁾
6-姜酚 + Rp-8-Br-cAMP	0.249 ± 0.021 ²⁾³⁾

3.4 各组 SLC15A1 表达 Rp-8-Br-cAMP 处理 24 h 后 SLC15A1 表达明显下调 ($P < 0.01$)。6-姜酚能明显上调 Caco-2 细胞 SLC15A1 表达,但合并应用 Rp-8-Br-cAMP 后,6-姜酚上调 SLC15A1 表达的作用不明显,两者合用时,SLC15A1 表达接近正常水平。见表 3。

表 3 6-姜酚对 Caco-2 细胞 SLC15A1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	SLC15A1 相对值
正常对照	2.83 ± 0.18
Rp-8-Br-cAMP	1.94 ± 0.10 ²⁾⁴⁾
6-姜酚	3.71 ± 0.23 ²⁾
6-姜酚 + Rp-8-Br-cAMP	2.94 ± 0.21 ³⁾

4 讨论

前期研究发现,脾阳虚动物模型小肠黏膜上皮 PepT1 表达及其转运二肽的能力有明显改变,温阳健脾方理中汤对这种改变具有治疗作用^[2-3]。先期的研究结果显示,理中汤具有促进正常培养 Caco-2 细胞转运二肽化合物 Glycyl-Sarcosine 的作用^[5],该作用可能与其促进胞浆中 PepT1 蛋白嵌入胞膜中发挥转运二肽的功能有关,该过程调控与胞内第二信使 cAMP 有一定的关系。干姜是理中汤组方中重要药味,而 6-姜酚是干姜的主要成分之一。既往对 6-姜酚药理作用的研究主要涉及神经元保护功能和诱导细胞凋亡等^[6-7]。6-姜酚对肠上皮细胞吸收转运活性的药理研究尚无报道。

本研究结果显示,6-姜酚可促进 Caco-2 细胞转运二肽化合物 Glycyl-Sarcosine,该促进作用在与 cAMP 的抑制剂 Rp-8-Br-cAMP 合用时表现为明显的抑制,表明二肽化合物经由细胞膜中肽转运载体 PepT1 的转运与胞内信使 cAMP 的参与有关。蛋白表达实验结果显示,6-姜酚能增加 Caco-2 细胞膜

PepT1 蛋白表达,合并运用胞内 cAMP 抑制剂 Rp-8-Br-cAMP 后,6-姜酚上调 Caco-2 细胞 PepT1 蛋白表达的效应受到抑制 ($P < 0.05$)。

表达肽转运载体蛋白 PepT1 的基因为 SLC15A1,我们采用荧光定量 PCR 方法检测了经过 6-姜酚处理后的 Caco-2 细胞 SLC15A1 基因的表达情况,结果表明,6-姜酚对 SLC15A1 也有明显上调作用,与蛋白表达结果及细胞转运二肽化合物 Glycyl-Sarcosine 的测定结果基本一致。

另外我们单独观察了人参皂苷 Rg₁ 对 Caco-2 细胞肽转运载体蛋白 PepT1 的转运能力表达的影响^[8],结果表明,人参皂苷 Rg₁ 促进 Caco-2 细胞 PepT1 转运功能及蛋白表达方面与理中汤结果近似,而在对 Caco-2 细胞 SLC15A1 表达方面不尽相同,人参皂苷 Rg₁ 有抑制正常培养 Caco-2 细胞 SLC15A1 mRNA 表达的作用。结合前期理中汤复方及人参皂苷 Rg₁ 对 Caco-2 细胞 PepT1 转运活性及表达情况影响的研究结果,本次研究 6-姜酚的相应结果,可为在细胞分子生物学水平部分阐明理中汤中人参参与干姜配伍组方理论提供实验依据。

[参考文献]

- [1] Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport [J]. Annu Rev Physiol, 2004,66(3): 361.
- [2] 郭文峰,羊燕群,高小玲,等. 脾阳虚大鼠肽转运载体蛋白表达级转运功能的改变[J]. 时珍国医国药, 2010,21(10):2665.
- [3] 郭文峰,羊燕群,潘怀耿,等. 理中汤对脾阳虚大鼠模型 PepT1 及其转运功能的影响[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(1):8.
- [4] Barrington R, Williamson G, Bennett R N, et al. absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CACO-2/TC7 cell model [J]. J Funct Foods, 2009,1(1): 74.
- [5] 郭文峰,杨伟鹏,王怡薇,等. 理中汤对 Caco-2 细胞 PepT1 转运功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(10):178.
- [6] 曾慧兰,韩新爱,古晨,等. 6-姜酚诱导白血病细胞凋亡中细胞内活性氧及线粒体跨膜电位的改变[J]. 中药材,2010,33(4):584.
- [7] 夏斌,蔡飞,姜泉. 6-姜酚对海马神经元缺糖缺氧后 SGK1 表达的影响[J]. 咸宁学院学报:医学版,2010,24(4):280.

[责任编辑 何伟]