

· 药物代谢 ·

理中汤对 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: 观察理中汤对 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 后给予理中汤处理, 并设立空白及 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, 用 Western blot 法测定 Caco-2 细胞膜上 PepT1 蛋白的表达, 荧光定量 PCR 法测定 PepT1 mRNA (SLC15A1) 的表达水平。结果: 理中汤处理组 Caco-2 细胞 15, 30, 60, 120 min 时点 Glycyl-Sarcosine 吸收转运量分别为 (4.52 ± 0.57) , (6.34 ± 0.57) , (7.29 ± 0.64) , (8.23 ± 0.67) $\mu\text{mol}/\text{孔}$, 高于空白对照组 ($P < 0.05$), 后者分别为 (2.42 ± 0.68) , (3.15 ± 0.76) , (5.62 ± 0.20) , (6.54 ± 0.54) $\mu\text{mol}/\text{孔}$; 理中汤与 Rp-8-Br-cAMP 合用组 15, 30, 120 min 时点分别为 (2.68 ± 0.46) , (4.13 ± 0.46) , (6.73 ± 0.43) $\mu\text{mol}/\text{孔}$, 明显低于相应时点单用理中汤组 ($P < 0.05$); 理中汤处理后 Caco-2 细胞膜 PepT1 蛋白表达增加, PepT1 表达与内参 GAPDH 表达灰度比值理中汤组为 (0.326 ± 0.031) , 高于空白对照组 (0.220 ± 0.019) ($P < 0.01$); 理中汤对 Caco-2 细胞 SLC15A1 mRNA 表达未见明显作用, 但与 cAMP 抑制剂合用, 理中汤能逆转 Rp-8-Br-cAMP 下调 Caco-2 细胞 SLC15A1 mRNA 表达的作用。结论: 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, 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。

[关键词] 理中汤; 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)10-0108-04

Effects of Lizhong Decoction on the Transport Ability of PepT1 in Caco-2 Cells

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

(1. Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. Institute of Chinese Materia 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 Lizhong Decoction on expression and transport ability of PepT1 in Caco-2 cells. **Method:** Caco2 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 15, 30, 60, 120 min of group treated by Lizhong Decoction were

[收稿日期] 2011-01-04

[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: chenww@gzhtcm.edu.cn

higher than those of controlled group, (4.52 ± 0.57) , (6.34 ± 0.57) , (7.29 ± 0.64) , (8.23 ± 0.67) $\mu\text{mol}/\text{well}$ vs (2.42 ± 0.68) , (3.15 ± 0.76) , (5.62 ± 0.20) , (6.54 ± 0.54) $\mu\text{mol}/\text{well}$. The group of Lizhong Decoction together with Rp-8-Br-cAMP at 15, 30, 120 min. were 2.68 ± 0.46 , 4.13 ± 0.46 , 6.73 ± 0.43 $\mu\text{mol}/\text{p well}$. The figures were significantly lower than that of Lizhong Decoction alone. The PepT1 protein expression level of cells treated with Lizhong Decoction was higher than that of control. **Conclusion:** Lizhong Decoction has significant effects on promoting the transport ability of dipeptides in Caco-2 cells, which maybe take effects by inducing the plasmatic PepT1 protein to insert to cell membrane.

[**Key words**] Lizhong Decoction; peptide transporter 1; transport ability; cyclic adenosine monophosphate

PepT1 (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”是密切相关的。作者在之前的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]。本次拟以培养 Caco-2 细胞模型观察理中汤对体外培养细胞 PepT1 表达及功能影响。

1 材料

1.1 药物与试剂 理中汤(党参、干姜、白术、制甘草)购自广州市药材公司,以上 4 药以 1:1:1:1 的比例水煎煮 2 次合并煎液,中性滤纸过滤后,冷冻干燥备用。临用时称取理中汤冷冻干燥粉末,用 PBS 溶解后,经 0.22 μm 微孔滤器过滤后加入到细胞培养液中。Glycyl-Sarcosine-[Gly-1-¹⁴C], 购自 American Radiolabeled Chemicals, Inc. 批号 090731, 浓度 3.7×10^6 Bq·mL⁻¹, S. A. 2.04×10^9 Bq mmol⁻¹; 8-Bromo-adenosine-3', 5'-cyclic mono-phosphorothioate, Rp-isomer, Simga 公司, 批号 029K1157; Gly-Sar, Sigma 公司, 批号 1428711 22009161; PEPT1 抗体: Abcam 公司产品; 定量 PCR 用酶 SYBR Green PCR Master Mix 购自 Toyobo 公司。

1.2 细胞 Caco-2 细胞, 购自 American Type Culture Collection (ATCC, HTB-37), 批号 57850025。购进时细胞代次 20。

1.3 仪器与器材 Transwell 聚碳酸酯膜单细胞层培养板, 嵌入膜直径 24 mm, 孔径 0.4 μm , Corning 公司, 批号 20109011; 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。

2 方法

2.1 Caco-2 细胞培养、单细胞层模型建立 取代次

为 25~28 的 Caco-2 细胞。为了测定 Caco-2 细胞从顶膜向基底膜的 [¹⁴C] Gly-Sar 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 2.0×10^5 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, 待细胞长成致密单细胞层后, 再连续培养 28 d 后进行试验。将跨膜电阻测定仪的两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, 以确定致密单细胞层模型的建立。

2.2 Glycyl-Sarcosine-[Gly-1-¹⁴C] 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 培养基中加入理中汤(用 PBS 配制成 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液), 使其终质量浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时设理中汤加 Rp-isomer 组, 在加入等量理中汤的同时, 加入 Rp-isomer(用 DMSO 溶解, 配制成浓度为 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液), 使其终浓度为 $50.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 理中汤组加入等体积的 DMSO, 另设空白对照组, DMEM 培养基中加入等体积的 DMSO 和 PBS, 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] 及未标记的 Glycyl-Sarcosine, 使 Glycyl-Sarcosine 终浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 分别于 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 Glycyl-Sarcosine-[Gly-1-¹⁴C] 浓度, 计算 Caco-2 单细胞层对 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 Caco-2 细胞种植于 6 孔培养板中, 参照跨膜转运 6 孔培养板培养条件和给药方案, 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 法测量蛋白浓度后, SDS-PAGE 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 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 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。洗 3 次。将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面, 并使反应持续 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。

2.4 荧光定量 PCR 检测 SLC15A1 表达 细胞培养和给药方法同 2.3。受试药作用 24 h 后收集细胞, 提取总 RNA: 移去培养板中培养基, 用 4 °C 预冷 PBS 轻柔漂洗细胞 1 次, 移去 PBS 后, 每孔加入 Trizol 0.5 mL, 吹打混匀, 使细胞充分裂解, 静置 5 min; 加入 200 μ L 氯仿, 剧烈振荡混匀 30 s, 使水相和有机相充分接触, 室温静置 15 min; 4 °C 下, 10 000 $\times g$ 离心 15 min, 可见分为 3 层, RNA 在上层水相, 移至另 1 个新的 RNase free EP 管; 加入 0.5 mL 异丙醇, 轻柔地充分混匀, 室温静置 10 min 沉淀 RNA; 4 °C 下, 10 000 g 离心 10 min, 收集 RNA 沉淀, 去上清; 用 75% 乙醇洗涤 2 次, 超净台风干; 加入 15 ~ 60 μ L DEPC 水溶解沉淀。RNA 纯度检测: 取 1 μ L RNA 样品 60 倍稀释, 在 Beckman Coulter DU $\text{\textcircled{R}}$ 520UV/Vis Spectrophotometer 上测定吸光度 (A), A_{260}/A_{280} 的比值大于 1.8, 说明制备的 RNA 较纯, 无蛋白质污染。总 RNA 完整性检测: 取 RNA 样品 1 μ L, 1% 琼脂糖凝胶电泳 80V \times 20 min, 用凝胶成像系统观察总 RNA 的 5S, 18S, 28S rRNA 条带, 3 条条带均完整可证明总 RNA 抽提比较完整。

逆转录: 在 RNase free 的 PCR 管中将 1.0 μ g 总 RNA 用水配制成总体积为 12 μ L 的溶液, 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 μ L, Random primer 0.5 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2.0 μ L, RNase inhibitor 0.5 μ L, 5x RT buffer 4.0 μ L, M-MLV 0.5 μ L, 最后总体积为 8.0 μ L; 将上述 20 μ L 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: 18 SrRNA-112 bp、目的片段: AQP1-151 bp。

设计的引物: 表达 PepT1 蛋白的 mRNA 为 SLC15A1, qh -SLC15A1-F1: 5' CTGCCCTGAAGT GAAGGTGT-3', qh -SLC15A1-R1: 5' GATCTCCG CTGGGTTGATGT-3'

反应体系包括: cDNA (1:15) 5.0 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, 2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10.0 μ L, 蒸馏水 4.0 μ L, 总体积为 20 μ L。

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 cycles; 融解曲线分析: 温度 60 ~ 95 °C, 每分钟读 1 次。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 方差齐的用 LSD、S-N-K 法, 方差不齐的用 Tamhane's T_2 和 Dunnett's T_3 方法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

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细胞层模型已经形成, 空白对照孔电阻为 110 Ω , 试验孔跨膜电阻测定结果均 $> 230 \Omega$ 。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 理中汤对 Caco-2 细胞转运能力的影响 用液体闪烁计数器测定

3.2.1 Glycyl-Sarcosine-[Gly-1-¹⁴C] 对应 Glycyl-Sarcosine 浓度标准曲线。 $Y = 734.66X, R^2 = 0.9993$ 结果表明, 检测方法线性良好, 可用于 Caco-2 单细胞层对 Glycyl-Sarcosine 吸收转运量的测定。

3.2.2 各组细胞 Glycyl-Sarcosine 吸收转运量及其与不同时间点之间的关系 见表 1。理中汤有促进 Caco-2 细胞转运 Glycyl-Sarcosine 的作用, 与未经理中汤处理的 Caco-2 细胞比较, 其于 15 min 后的累计转运总量即明显增加 ($P < 0.05$)。且理中汤促进 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, 与理中汤处理组比较, 合并添加 Rp-8-Br-cAMP 处理后, Caco-2 细胞转运 Glycyl-Sarcosine 总量在 15, 30, 120 min 时点均明显减少 ($P < 0.05$)。

3.3 理中汤对 Caco-2 细胞膜 PepT1 蛋白表达的影响 图像灰度识别转换成 A , 以 PepT1 表达 A /同组内参 GAPDH 表达 A 代表 PepT1 表达。见表 2。理中汤可提高 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,

表 1 理中汤对 Caco-2 细胞转运 Glycyl-Sarcosine 的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Glycyl-Sarcosine 吸收转累积量 $\mu\text{mol}/\text{孔}$				
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
空白对照	1.53 \pm 0.14	2.42 \pm 0.68	3.15 \pm 0.76	5.62 \pm 0.20	6.54 \pm 0.54
Rp-8-Br-cAMP	1.48 \pm 0.70	1.98 \pm 0.72	2.81 \pm 0.56	4.42 \pm 0.63	4.71 \pm 0.83
理中汤	1.63 \pm 0.31	4.52 \pm 0.57 ¹⁾	6.34 \pm 0.57 ²⁾	7.29 \pm 0.64 ¹⁾	8.23 \pm 0.67 ¹⁾
理中汤 + Rp-8-Br-cAMP	1.74 \pm 0.42	2.68 \pm 0.46 ³⁾	4.13 \pm 0.46 ⁴⁾	6.45 \pm 0.68	6.73 \pm 0.43 ²⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与理中汤组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

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

组别	$A_{\text{PepT1}}/A_{\text{GAPDH}}$
空白对照	0.220 \pm 0.019
Rp-8-Br-cAMP	0.073 \pm 0.018 ^{2,4)}
理中汤	0.326 \pm 0.031 ²⁾
理中汤 + Rp-8-Br-cAMP	0.248 \pm 0.027 ³⁾

Rp-8-Br-cAMP 与理中汤合用,可明显抑制理中汤增加 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,明显低于单用理中汤组($P < 0.05$)。

3.4 荧光定量 PCR 检测 SLC15A1 的表达 以 slc15a1 荧光值/内参 18 s 荧光值代表 slc15a1 表达水平。见表 3。Rp-8-Br-cAMP 处理 24 h 后 SLC15A1 表达明显下调($P < 0.01$)。理中汤对 Caco-2 细胞 SLC15A1 表达未见明显作用,但理中汤与 Rp-8-Br-cAMP 合并应用可逆转 Rp-8-Br-cAMP 下调 SLC15A2 表达的作用,SLC15A1 表达接近正常水平。

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

组别	mRNA 相对值
空白对照	2.83 \pm 0.18
Rp-8-Br-cAMP	1.94 \pm 0.10 ²⁾
理中汤	2.61 \pm 0.26
理中汤 + Rp-8-Br-cAMP	2.72 \pm 0.24

4 讨论

本研究结果显示,理中汤可促进 Caco-2 细胞转运二肽化合物 Glycyl-Sarcosine。该促进作用在与 Rp-8-Br-cAMP 合用时并不表现,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。理中汤能增加 Caco-2 细胞膜 PepT1 蛋白表达,经 Rp-8-Br-cAMP 处理的 Caco-2 细胞 PepT1 表达显著降低,合并运用理中汤后,Rp-8-Br-cAMP 抑制 Caco-2 细胞 PepT1 蛋白表达的情况得以改善,PepT1 蛋白表达结果与细胞转运二肽化合物 Glycyl-Sarcosine 的测定结果基本一致。

表达肽转运载体蛋白 PepT1 的基因为 SLC15A1,我们采用荧光定量 PCR 方法检测了理中汤处理后的 Caco-2 细胞 SLC15A1 基因的表达情

况,结果表明,理中汤对 SLC15A1 表达并无增加效应,与蛋白表达结果并不一致。有研究报道,PepT1 转运功能一方面取决于细胞膜上 PepT1 蛋白的量,另一方面与其转运活力有关。结合现有相关研究报导^[3-5],理中汤提高 Caco-2 细胞膜上 PepT1 蛋白表达量及转运二肽能力的作用,可能与其促使胞浆中的 PepT1 蛋白插入胞膜中发挥转运二肽作用有关。

另外我们也观察到人参皂苷 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。由于 Rg1 只是理中汤复方中诸多药效物质中的一种,复方的作用不能等同于组成复方的单体化合物的简单相加,更详细的作用及机制还有待更多的相应研究观察才能确定。

本研究结果与我们之前整体动物实验结果基本相符^[1-2],可从体外细胞培养实验角度补充温阳健脾方药改善脾虚证动物模型小肠吸收蛋白质消化产物二肽功能的论述。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 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(1):8.
- [3] Zhang Q, Liu Q, Wu J, et al. PEPT1 involved in the uptake and transepithelial transport of cefditoren *in vivo* and *in vitro*[J]. Eur J Pharmacol,2009,612(1/3):9.
- [4] Shimizu R, Sukegawa T, Tsuda Y, et al. Quantitative prediction of oral absorption of PEPT1 substrates based on *in vitro* uptake into Caco-2 cells[J]. International Journal of Pharmaceutics,2008,354(1/2):104.
- [5] Dalmasso G, Nguyen H T, Charrier-Hisamuddin L, et al. PepT1 mediates transport of the proinflammatory bacterial tripeptide L-Ala- γ -D-Glu-meso-DAP in intestinal epithelial cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2010,299(3):G687.

[责任编辑 何伟]