

Caco-2 细胞模型快速培养法的建立与评价

马美湖, 黄晶

(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

摘要: Caco-2 细胞模型可用于预测各种途径的食品营养物质吸收, 被普遍用于营养物质开发的早期快速筛选过程中。传统 Caco-2 单层细胞模型的建立通常需要培养 21 d, 本研究建立一种快速培养 Caco-2 单层细胞的方法以缩短实验周期、降低成本。采用向标准培养基中添加生长因子的方法培养 Caco-2 细胞, 分别研究细胞模型跨膜电阻值 (TEER)、亲水标志物的渗透性、关键蛋白基因的表达、细胞膜特征形态等评价模型的完整性。表明快速培养法 (9 d) 获得的 Caco-2 模型跨膜电阻值 (TEER) $> 220 \Omega \cdot \text{cm}^2$; 漏出标志物荧光黄表现分配系数为 $(0.39 \pm 0.15) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; 肠腔侧 (apical, AP)/基底侧 (Basolateral, BL) 碱性磷酸酶活力比值为 5.481 ± 0.5304 , 单层细胞极性分化明显; qRT-PCR 检测细胞单层关键蛋白质 (P-gp、MRP2) 的 mRNA 表达量快速法同标准培养法无显著差异。此法仅需 9 d 即可形成完整 Caco-2 细胞模型。结论是向标准培养基中添加生长因子的 Caco-2 细胞模型快速培养法可推广。

关键词: Caco-2 细胞; 转运; 药物渗透; 跨膜电阻

文章编号: 1673-9078(2016)3-265-270

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.042

Establish and Evaluation of an Accelerated Caco-2 Monolayer Culture System

MA Mei-hu, HUANG Jing

(Food Science and Engineering College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The Caco-2 cell model can be used to predict nutrient absorption in various ways, and it has been widely applied to the early rapid screening process of nutritional product development. Although it usually takes 21 days to establish a conventional Caco-2 monolayer model, an accelerated Caco-2 monolayer culture system was developed in this study to shorten the experimental period and reduce costs. Caco-2 cells were cultured by adding growth factors to the standard medium, and the model integrity was evaluated by its transepithelial electrical resistance (TEER) values, permeability of hydrophilic markers, expression of key protein genes, morphological characteristics of the cell membrane, etc. The results showed that the Caco-2 model obtained by the accelerated nine-day method had a TEER value of more than $220 \Omega \cdot \text{cm}^2$ and an apparent partition coefficient (P_{app}) value of leakage marker Lucifer yellow of $(0.39 \pm 0.15) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. The apical (AP)/basolateral (BL) alkaline phosphatase activity ratio was 5.481 ± 0.5304 , showing obvious polar differentiation of the cell monolayer. A quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to measure the mRNA expression of the key proteins (P-gp and MRP2) in the cell monolayer, and no significant difference was found between the accelerated method and the standard culture method. Using this method, a complete Caco-2 cell model can be established in only nine days, providing a viable alternative to the conventional Caco-2 monolayer model.

Key words: Caco-2 cell; transport; drug penetration; transepithelial electrical resistance

人类细胞培养系统作为肠屏障体外模型的应用, 是模拟营养物质透过小肠黏膜的机制与影响因素的有效方法之一。国内外已普遍将组织细胞模型作为营养物质吸收的重要研究工具, 包括有人结肠癌细胞单层模型 (The human Colon adenocarcinoma cell lines, Caco-2)、犬肾上皮细胞单层模型 (Madin-Darby canine kidney, MDCK)、MDR1-犬肾上皮细胞单层模型

(MDR1-MDCK) 及人脐静脉内皮细胞细胞模型 (ECV304)。其中人结肠腺癌细胞 Caco-2 单层细胞模型结构和功能与分化的肠上皮细胞相似, 具有微绒毛的结构, 含有小肠上皮细胞刷状缘相关酶系^[1]。Caco-2 细胞可以自发的形成分化的上皮和紧密连接组织, 在培养过程中 Caco-2 细胞的形态, 标记酶的特异性表达和渗透特性都与分化小肠上皮细胞类似, 因此 Caco-2 细胞模型已广泛地应用于体外营养物质分子肠吸收的研究^[2]。

Caco-2 细胞模型可以预测不同转运途径的食品营养物质体内吸收, 尤其适用于被动转运营养物质,

收稿日期: 2015-04-17

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303084); 现代农业产业技术体系 (CARS-41-K23) 资助项目

作者简介: 马美湖 (1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 禽蛋营养与代谢

这一细胞模型在吸收机制、营养物质吸收过程中的相互作用、营养物质的化学结构和体内转运关系、营养物质代谢稳定性及 pH 值对营养物质吸收的影响等研究中均有较广泛的应用^[3], 例如利用胃蛋白酶、(猪)胰酶和胆汁、乳糖酶与 Caco-2 单层培养模型相结合, 研究槲皮素及其葡萄糖苷的吸收情况^[4]; 利用体外模拟消化与 Caco-2 细胞相结合的方法研究, 提高铁的生物利用度等^[5]。随着测试营养素潜在活性的化合物数目迅速增加, 导致药理学活性和药代动力学性质筛选测试需求大为增加。然而, 传统的 Caco-2 细胞单层标准培养法通常需要 21 d 的培养周期才能形成足够的细胞层完整性及较好的细胞分化程度, 实验周期长、影响细胞存活率和实验效果的因素增多、成本高。因此建立为了缩短简化 Caco-2 细胞模型的培养, 美国 Becton Dickinson 生物公司建立了一种短期的细胞培养方法^[6], 这种方法独特的方面在于使用丁酸分化剂。发现这种短链脂肪酸可以引起一些克隆癌细胞的生长和分化停滞^[7], 提高了 Caco-2 细胞筛选化合物渗透性的效率。但是短期培养得到的细胞单层膜的屏障功能远远低于传统的标准培养法的细胞膜^[7]。细胞膜渗透性的增加, 导致低、中等渗透率的化合物的渗透率很难确定。

本研究建立一种更好的细胞快速培养方法, 研究不同培养方法对培养期间 Caco-2 细胞单层跨膜电阻 (TEER) 和药物在细胞模型上的渗透率的影响, 并测定快速细胞培养法中关键转运因子 (P-gp 和 MRP2) 的 mRNA 表达量, 为 Caco-2 细胞快速培养方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 Caco-2 细胞的来源

Caco-2 细胞购自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 代数为 23 代, 实验中使用的细胞代数为 35~45。

1.1.2 试剂

细胞培养基 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), 非必需氨基酸 (nonessential amino acids, NEAA)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA、青霉素-链霉素混合液 (10000 U/mL 青霉素, 10 mg/mL 链霉素) 购自美国 Hyclone 公司; L-谷氨酰胺和荧光黄购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自澳大利亚 Gibco 公司; Trizol 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司; 碱性磷酸酶试剂盒购于南京建成公司, CCK-8 试剂盒购于北京庄盟

科技公司。

1.1.3 仪器

12 孔聚碳脂膜转运板 (Transwell) 和 25cm² 细胞培养瓶购于美国 Corning 公司; HERAcell 150I 型 CO₂ 培养箱购于德国 Thermo Fisher 公司; IX71 荧光倒置显微镜购于日本 Olympus 公司; 5415D 台式小型离心机购自德国 Eppendorf 公司; MERS2000 型 Millicell 电阻仪购于美国 Millicell 公司; M200 多功能酶标仪购于瑞士 Tecan 公司; H-7650 透射电子显微镜购自日本 Hitachi 公司; HVE-50 高压灭菌锅购于日本 Hirayama 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 Caco-2 细胞培养^[8]

从液氮中取出冻存 Caco-2 细胞快速放入 40 °C 水浴中, 快速摇晃, 直至冻存液融化, 吸出细胞液置于干净的离心管低速离心 (3 min, 1000 g), 除去上清液, 加入 5 mL 完全 DMEM 培养液 (含 15% 胎牛血清、1% NEAA、1% L-谷氨酰胺、1% 青霉素-链霉素) 重悬沉淀细胞, 将重悬细胞液接种到培养瓶中, 标明名称、代数、时间、作者等信息。置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中进行培养每隔一天更换一次培养液。当细胞汇合程度达到 80% 时, 加入 1~2 mL 的 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 混合消化液, 轻轻摇晃培养瓶放于 37 °C 培养箱中消化 5 min, 按 1:2 进行细胞传代。

1.2.2 抗坏血酸对 Caco-2 细胞的活性试验

参照 CCK-8 试剂盒说明书操作, 当培养瓶内细胞生长达到 80%~90% 时, 将细胞消化为细胞悬液, 细胞计数然后将细胞悬液配置成 3×10⁴~5×10⁴ cell/mL。在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μL/孔, 5 个平行), 孵育 24 h。去除培养液, 将配置的不同浓度含抗坏血酸培养基 (0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL、5 mg/mL 及 10 mg/mL) 加入培养孔中每孔 100 μL。在 37 °C, 5% CO₂ 条件下孵育 24 h。每孔加入 10 μL cck-8 (不能产生气泡) 溶液孵育 4 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处吸光值。

$$\text{细胞毒性活力 (\%)} = \frac{A_{(\text{加药})} - A_{(\text{空白})}}{A_{(0\text{加药})} - A_{(\text{空白})}} \times 100\% \quad (1)$$

注: A_(加药): 具有细胞、cck-8 溶液和蛋白质溶液的孔的吸光度; A_(空白): 具有培养基、cck-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度; A_(0加药): 具有细胞、cck-8 溶液而没有蛋白质溶液的吸光度。

1.2.3 Caco-2 单层细胞模型培养过程中跨膜电阻值的变化

按前述步骤将对数生长期的细胞 (约第 5 d) 消化, 调节细胞浓度为 1×10⁵~1×10⁶ cell/mL, 转移至 12

孔 TransWell™ 板上生长 (12 孔板中培养液推荐体积: 内: 500 μL , 外: 1500 μL), 三个平行孔 ($n=3$)。分别使用含抗坏血酸完全培养基与完全培养基培养细胞, 接种后隔天换液, 7 d 后每天换液。

细胞单层模型建立的整个过程都需监控细胞在 TransWell™ 培养板中 TEER 值的变化情况, 为研究药物渗透性提供依据, 用细胞电阻仪测定跨上皮细胞电阻 (TEER), 一般 TEER 值为 220 $\Omega\text{cm}^2 \sim 600 \Omega\text{cm}^2$ 时表明单层细胞紧密且完整。将 Millicell MRS-2 型细胞电阻仪的电极在 70% 乙醇浸泡 15 min, 在空气中干燥, 然后放入与培养液相似的无菌电解质中浸泡后, 将电极两端分别放置于 TransWell™ 培养板中 A 侧小室与 B 侧小室测定电阻值。先测两个空白 (未放细胞) 的电阻, 再测样品电阻, 求其平均值按下式计算:

$$\text{电阻值} \Omega \cdot \text{cm}^2 = (R_{(\text{样品孔})} - R_{(\text{空白孔})}) \times 1.12 \text{cm}^2 \quad (2)$$

1.2.4 Caco-2 细胞生长分化特征的鉴定

碱性磷酸酶是一种胞外酶, 在第 5 d、9 d、13 d、17 d、21 d, 在 AP 侧与 BL 侧分别取出培养皿中的培养液 ($n=3$) 作为样品, 然后使用 ALP/AKP 试剂盒检测细胞液中 AKP 的活力。

1.2.5 Caco-2 细胞单层荧光黄通透性试验

预热 HBSS (0.4 g/L KCl、60 mg/L KH_2PO_4 、8 g/L NaCl、60 mg/L Na_2HPO_4 、0.35 g/L NaHCO_3 、1 g/L D-葡萄糖 and 2.38 g/L HEPES, 调节 pH 7.2) 溶液到 37 $^\circ\text{C}$, 配置无菌荧光黄溶液 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 然后分装。在培养到各细胞膜紧密生长后, 取 3~4 个单层膜, 弃去 Caco-2 细胞中的培养基。A 加入预热 HBSS 液 0.5 mL, B 加入预热 HBSS 液 1.5 mL。在 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 孵育 15~20 min 之后弃去 HBSS。然后在新孔中每孔加入 1.2 mL HBSS, 缓慢在每个单层膜中加入 0.45 mL 培养液, 然后每孔 0.05 mL 荧光黄溶液。将培养板放置在 37 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床上培养 60 min, 从 B 取 0.6 mL 样品液, 再向 B 加入 0.6 mL 预热 HBSS。如此培养 2 h, 每隔 60 min 取一次样。在实验结束时, 在 A 端每孔中取 0.05 mL 样品液。用荧光分光光度计测定样品荧光强度。依据以下公式计算表观渗透系数

$$P_{\text{app}} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \left(\frac{1}{AC_0} \right) \quad (3)$$

其中 dQ/dt 是单位时间药物转运量 (mg/s), A 是转运膜表面积, C_0 是培养液中荧光黄原始浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.2.6 Caco-2 细胞单层模型形态学观察

将 Caco-2 细胞接种在 TransWell™ 板, 分别用两种培养基培养, 标准培养基培养 15-21 d, 加入抗坏血酸的培养基培养 9 d, 使用 IX71 倒置荧光显微镜及

H-7650 透射电镜观察细胞的超微结构。

1.2.7 实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)

分别收集标准培养 21 d 和快速培养 9 d 所得的 Caco-2 单细胞层, 使用磷酸盐缓冲液清洗细胞 2-3 次, 按照 Trizol 试剂盒说明书抽提总 RNA, 定量实时聚合酶链反应 (qRT-PCR) 操作与分析的参照 Park 等的方法^[9], 引物为 MDR1 和 MRP2, 内参选择 β -actin。引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence	
Gene	Primer sequence
MDR1	Forward: 5'- CCTTCACCCAGGCAATGATG-3'
	Reverse: 5'- TGGGCTGCTGATATTTTGGC-3'
MRP2	Forward: 5'- TCATCCCTCACAACTGCCT-3'
	Reverse: 5'- CAGGCTCCAGAGAACAGGA-3'
β -actin	Forward: 5'-CACGATGGAGGGGCCG GACTCATC-3'
	Reverse: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAA CACAGT-3'

1.2.8 数据处理与统计分析

数据统计分析利用 SPSS 软件 ANOVA 和 Duncan 分析方法, 所有数据采用平均数 \pm 标准差表示, 检验水平为 $p < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果与分析

2.1 抗坏血酸对 Caco-2 细胞活性的影响

消化细胞在 96 孔板中接种细胞, 浓度约为 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ cell/mL。孵育 24 h。使用 CCK-8 试剂测定 Caco-2 细胞的活性。结果如图 1 所示。

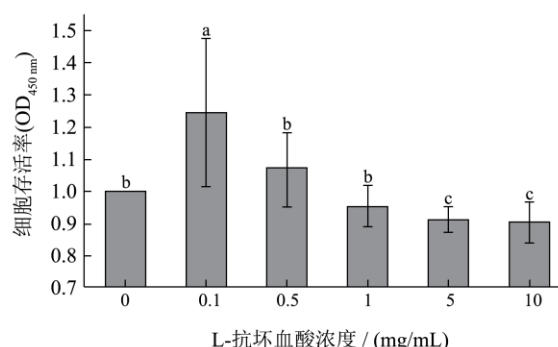


图 1 cck-8 法测定不同浓度抗坏血酸添加后 Caco-2 细胞的存活率 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$)

Fig.1 CCK-8 assay of cell viability in Caco-2 cells exposed to various concentrations of L-ascorbic acid

由图 1 可见, 当抗坏血酸浓度在 1 mg/mL 以内时细胞的存活率均在 95% 以上。当浓度在 0.5 mg/mL 以

内时抗坏血酸具有促进细胞生长的作用，对细胞的活力基本上没有影响，抗坏血酸具有活性高抗坏血酸浓度、毒性小的特性。从图 1 可看出在抗坏血酸浓度为 0.1 mg/mL 时细胞的存活率显著高于空白对照组 ($p < 0.05$)，细胞的生长增加率达到最高，因此选择完全培养基中抗坏血酸的添加浓度为 0.1 mg/mL。

2.2 Caco-2 细胞在 TransWell™ 内不同时间 TEER 值的测定结果

测量细胞的跨膜电阻 (TEER) 可以用来确定 Caco-2 细胞单层的完整性，当细胞的快膜电阻值大于 $220 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 时说明细胞单层致密完整。从细胞接种 TransWell™ 开始每隔两天使用细胞电阻仪检测培养板中每孔的电阻值。由图 2 可看出标准培养细胞模型跨膜电阻在前 1 周迅速增加说明细胞开始融合。第 2 d 后电阻开始急速增加，第 8 d 后缓慢增加，到第 16 d 后基本上维持在一个水平上下直至 21 d，最终跨膜电阻值达到 $464 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。快速培养到第 9 d 时 Caco-2 细胞单层跨膜电阻值达到 $443 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ，与标准培养 21 天所得的跨膜电阻值无显著差异，表明快速组在培养至第 9 d 左右时已经形成紧密的单层细胞膜。

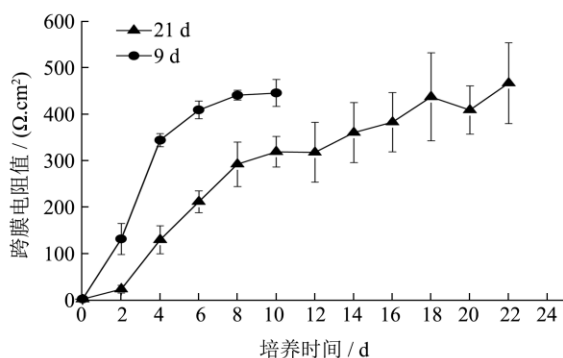


图 2 不同的时间段 12 孔 TransWell 培养板细胞的跨膜电阻值 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$)

Fig.2 TEER curves of the Caco-2 monolayer in a TransWell 12-well plate at different time periods

2.3 不同培养方法 Caco-2 细胞碱性磷酸酶的活性

碱性磷酸酶可分解磷酸苯二钠，产生游离酚和磷酸，酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物，根据红色深浅可以测定酶活力的高低 [10]。使用 ALP/ AKP 试剂盒测定碱性磷酸酶活力，不同培养方法在不同时间的细胞单层的 (AP/BL) 碱性磷酸酶活力比值结果见表 2。

纵向观察表 2 可得，标准培养碱性磷酸酶活力比 (AP/ BL) 随时间的增加而迅速增长，到第 21 d 活力比第 5 d 增加了 9 倍左右，比值为 8.90 ± 0.51 ，证明碱性磷酸酶的分布不对称，出现明显的极化现象。标准培养 21 d 与快速培养 9 d 相比，快速培养 Caco-2 单细胞层第 9 d AP 侧 AKP 活性显著升高与 BL 侧 AKP 活性的差异增大，AKP 比值为 5.88 ± 0.53 与标准组第 21 天比值无显著差异，碱性磷酸酶的分布不对称极化程度高。快速培养第 9 d 时就能出现单细胞层的极化的现象。

表 2 不同的培养方法所得的 Caco-2 细胞单层肠腔侧与基底侧碱性磷酸酶活性比值

Table 2 AP/BL alkaline phosphatase activity ratio of Caco-2 monolayers obtained by different culture methods

t/d	Ratio of AKP (AP/BL)	
	Standard	Short-term
5	1.12 ± 0.05^b	1.72 ± 0.73^b
9	2.24 ± 0.38^b	5.88 ± 0.53^a
13	4.53 ± 1.34^{ab}	
17	6.68 ± 0.62^a	
21	8.90 ± 0.51^a	

注：结果表示为三次测定的平均值 \pm 标准差。不同小写字母表示在 0.05 显著水平上差异显著。

2.4 不同培养方法 Caco-2 细胞 B 端荧光黄的浓度

测定 Caco-2 细胞单层完整性及其通透性除采用 TEER 值外，还可以用探针药物评价其完整性。常用荧光黄，荧光黄为水溶性小分子物质，不易被肠粘膜代谢且不会通过细胞膜转运，可以间接反应单层细胞之间紧密连接处的通透量，作为细胞单层完整性的标志物。在标准 21 d 培养的 Caco-2 单细胞层荧光黄转运的 P_{app} (cm/s) 为 $(0.087 \pm 0.04) \times 10^{-6}$ ，添加抗坏血酸快速培养的 Caco-2 单细胞层上，在第 9 d 时荧光黄转运的 P_{app} (cm/s) 为 $(0.39 \pm 0.15) \times 10^{-6}$ ，快速培养方法的通透量明显大于标准的培养方法，但是二者均小于转运实验规定的 1.0×10^{-6} cm/s，说明所形成的单细胞层完整性符合实验要求可用于转运实验。

2.5 Caco-2 细胞单层模型的形态学观察

分别用两种培养方法培养细胞，在细胞置第 5 d 和第 7 d 时可以通过倒置荧光显微镜及透射电镜观察 Caco-2 细胞单层模型的超微结构。

如图 4 所示，在倒置荧光显微镜下观察 Caco-2

细胞的生长状态,可以清楚的看到细胞生长到第 5 d 时两组细胞达到融合,标准培养基组 Caco-2 细胞铺满整个培养瓶底部,快速组可以看见细胞之间有清晰的边缘。快速组在生长至第 7 d 的时候细胞开始逐渐变得均匀且紧密,细胞呈现为多边形,边缘清晰排列很整齐。标准培养基组在 7 d 的时候出现较为清晰细胞边缘,但是还没有出现固定的形状。

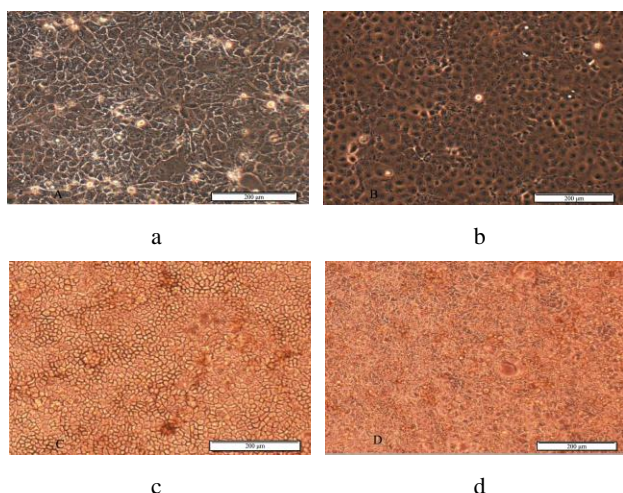


图 4 培养过程中 Caco-2 细胞生长的形态

Fig.4 Morphologies of Caco-2 cell monolayers during the culture process

注: 倒置荧光显微镜, $\times 100$; a:快速组在生长至第 5 d 状态; b:标准组在生长至第 5 d 状态; c:快速组在生长至第 7 d 状态; d:标准组在生长至第 7 d 状态。

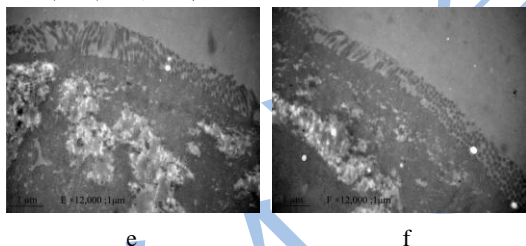


图 2-5 Caco-2 细胞单层亚显微结构特征图

Fig.5 Ultrastructural features of Caco-2 monolayer

注: 透射电镜, $\times 12,000$; e: 快速培养 9 d Caco-2 细胞模型; f: 标准培养 21 d Caco-2 细胞模型。

当 Caco-2 细胞分化成型之后从透射电镜下可以观察到清晰的刷状缘微绒毛结构(见图 5, E 和 F 所示),说明经过培养的细胞已经完成了形态学上的分化。F 图是标准培养细胞 21 d 的 Caco-2 细胞模型, E 图是快速培养 9 d Caco-2 细胞模型。两组细胞透射图都出现了清晰的刷状缘微绒毛结构,说明细胞分化基本完成可以进行后续的转运实验。

2.6 关键蛋白基因 P-gp 与 MRP2 的 RNA 表达

P-gp 和 MRP2 是 Caco-2 细胞单层膜上的两个关

键的外排蛋白,通过测定细胞膜中 P-gp 和 MRP2 两种 mRNA 的表达量可以鉴定细胞的完整性。

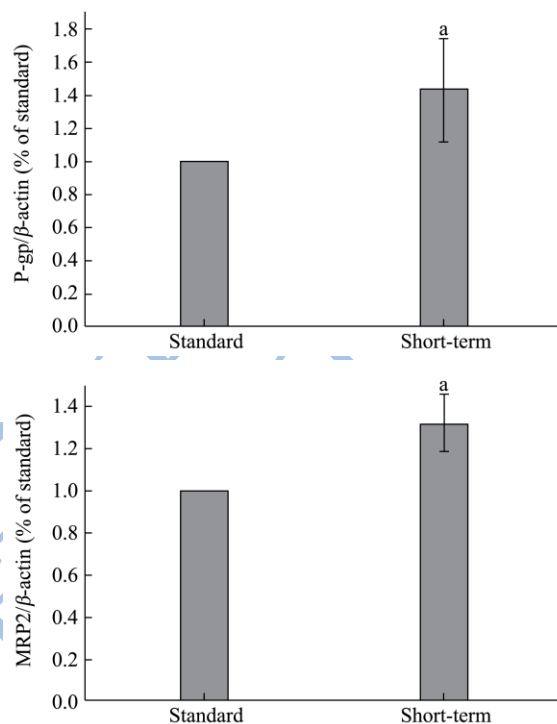
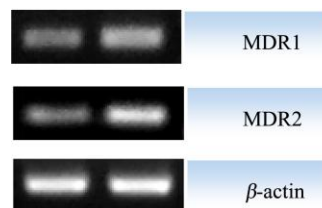


图 6 不同培养方法所得的 Caco-2 细胞单层中 P-gp 与 MRP2 的 RNA 表达情况 ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$)

Fig.6 Expression levels of P-gp and MRP2 mRNA in Caco-2 monolayers cultured using different protocols

注: ^a 与标准组比 $p > 0.05$ 。

将快速培养 9 d 与标准培养 21 d 的单细胞层刮下,采用 qRT-PCR 法检测 P-gp 和 MRP2 的 mRNA 表达水平(图 6),快速培养与标准培养所获得的单细胞层中 P-gp 与 MRP2 的表达水平基本一致无明显差异,说明快速培养所得的 Caco-2 单细胞层一样能用于考察营养物质吸收过程中相关转运蛋白的作用。

3 讨论

Caco-2 细胞在遗传学方面及细胞的脂质、蛋白质组成方面是最为理想的上皮细胞系^[11],其许多生理特性均与小肠上皮相似,常用作体外药物的筛选模型,特别是在研究主动吸收药物的渗透性方面。然而, Caco-2 细胞单层标准培养法通常需要 21 d 的培养周期才能形成足够的细胞层完整性及较好的细胞分化程度,消耗时间较长。本实验建立的快速培养法将培养

时间缩短 57%，仅需 9 d 即可形成达到实验标准的细胞模型。

经过多种短期培养法的筛选，我们发现在培养基中加入细胞生长因子能够缩短细胞培养的时间^[12]。然后分别从细胞模型跨膜电阻值 (TEER)、亲水标志物的渗透性、关键蛋白基因的表达、细胞膜特征形态的形成等几点评价这个模型的完整性^[13]。结果表明我们的方法缩短了标准方法中细胞培养的时间，仅需要 9 d 培养，细胞存活好、活性强、能确保药物渗透实验效果，完全可用于研究食品营养物吸收转运实验。本研究通过对多种浓度抗坏血酸的细胞毒性试验，筛选出一个比较合适的抗坏血酸浓度。可以看出抗坏血酸对细胞具有毒性小、促进生长的作用。为了评价快速培养所建立的 Caco-2 单细胞层的完整性，本实验测定了模型的跨膜电阻 (TEER) 值、肠腔侧和基底侧的碱性磷酸酶活性及标志物荧光黄的通透性；采用倒置荧光显微镜、透射电镜观察细胞的微观结构，从形态学的角度观察细胞的特征形态；在关键转运蛋白方面，选取两个主要的排外蛋白 P-gp 和 MRP2^[14]，测定了细胞单层膜上两种关键蛋白的 mRNA 表达量。将以上各项指标的检测结果与标准培养 21 d 的 Caco-2 模型进行比较发现各个指标均可达到了实验标准。

4 结论

本试验的快速培养方法可以缩短建立 Caco-2 单细胞层模型的时间，该模型的完整性及渗透性均与 21 d 标准培养一致，表明该快速培养方法所建立的 Caco-2 单细胞模型能够应用于食品营养素吸收转运实验中。这种快速的细胞培养，不仅能够提高模型药物筛选的效率，也可以降低细胞培养过程中昂贵试剂的使用量以及细菌、真菌污染的危险。

参考文献

- [1] Hubatsch I, Ragnarsson E G, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers [J]. Nature Protocols, 2007, 2(9): 2111-2119
- [2] Yamashita S, Tanaka Y, Endoh Y, et al. Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer: implication for predicting *in vivo* drug absorption [J]. Pharmaceutical Research, 1997, 14(4): 486-491
- [3] Tavelin S, Gråsjö J, Taipalensuu J, et al. Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport [M]// Epithelial Cell Culture Protocols. Humana Press, 2002: 233-272
- [4] Boyer J, Dan B, Liu R H. *In vitro* digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer [J]. Nutrition Journal, 2005, 4(2): 176-188
- [5] Yun S, Habicht J P, Miller D D, et al. An *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture system accurately predicts the effects of ascorbic acid and polyphenolic compounds on iron bioavailability in humans [J]. Journal of Nutrition, 2004, 134(10): 2717-2721
- [6] Chong S, Dando S A, Morrison R A. Evaluation of biocoat03 intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity [J]. Pharmaceutical Research, 1997, 14(12): 1835-1837
- [7] Basson M D, Turowski G A, Rashid Z, et al. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate [J]. Dig. Dis. Sci., 1996, 41(10): 1986-1993
- [8] Natoli M, Leoni B D, D'Agnano I, et al. Good Caco-2 cell culture practices [J]. Toxicology in Vitro An International Journal Published in Association with Bibra, 2012, 26(8): 1243-1246
- [9] Park Y, Tp C. Unsaturated fatty acids and phytosterols regulate cholesterol transporter genes in Caco-2 and HepG2 cell lines [J]. Nutrition Research, 2013, 33(2): 154-161
- [10] Ball V. Activity of alkaline phosphatase adsorbed and grafted on "polydopamine" films [J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2014, 429: 1-7
- [11] Inaba M, Murota K, Nikawadori M, et al. Extracellular metabolism-dependent uptake of lysolipids through cultured monolayer of differentiated Caco-2 cells [J]. Biochimica ET Biophysica Acta, 2013, 1841(1): 121-131
- [12] Yamashita S, Konishi K, Yamazaki Y. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002, 11(91): 669-679
- [13] Violante G D, Zerrouk N, Richard I, et al. Short Term Caco-2/TC7 cell culture: comparison between of conventional 21-d and a commercially available 3-d system(biopharmacy) [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27(12): 1986-1992
- [14] Fan J, Maeng H J, Du Y, et al. Transport of 5,5-diphenylbarbituric acid and its precursors and their effect on P-gp, MRP2 and CYP3A4 in Caco-2 and LS180 cells [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 42(1-2): 19-29

现代食品科技