·论著·

不同温度及 pH 值对人结肠腺癌细胞模型的影响*

刘 影，李月婷，查雨锋，王静娴，肖婷婷，李 靖，董 莉，傅晓钟，黄 勇，王永林**
（贵阳医学院 药学院，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：建立人结肠腺癌细胞系（Caco-2）细胞模型并对其药物研究的方法进行初步探讨。**方法**：通过测定跨细胞膜电阻（TEER）、荧光素通透量及碱性磷酸酶（AKP）评价 Caco-2 细胞模型，用 MTT 法考察 HBSS 缓冲液在不同 pH 值、不同温度及不同时间条件下对 Caco-2 细胞的毒性。**结果**：各项指标的测定值符合要求，表明本实验建立的 Caco-2 细胞模型的完整性、紧密性和通透性良好；进行药物 Caco-2 细胞吸收潜性研究时，药物作用 4 h 之内对 Caco-2 细胞模型没有影响。**结论**：建立的 Caco-2 细胞模型可用于药物吸收机制研究。

［关键词］结肠；腺癌；细胞，培养的；碱性磷酸酶；毒性试验
［中图分类号］R329.2 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2012）04-0465-04

Effects of Different Temperature and PH Value on Caco-2 Cell Model

LIU Ying, LI Yueting, ZHA Yufeng, WANG Jingxian, XIAO Tingting, LI Jing, DONG Li, FU Xiaozhong, HUANG Yong, WANG Yonglin
(*School of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To establish the Caco-2 cell model, and to explore the method for applying it in drug research. **Methods**: Transepithelial electrical resistance (TEER), the permeability of fluorescein and the expression of alkaline phosphatase (APK) were used to evaluate Caco-2 cell model. MTT method was used to detect the toxicity of HBSS buffer to Caco-2 cell on the condition of different pH, different temperature and cultivation time. **Results**: Test results of all the indexes met the requirements, which indicated that integrity, consistency and permeability of the established Caco-2 cell model were good. The model was not affected when Caco-2 cell was used in drug absorption study within 4 hours. **Conclusions**: The established Caco-2 cell model can be used to study the absorption mechanism of drugs.

［**Key words**］ colon; adenocarcinoma; cells, cultured; alkaline phosphatase; toxicity tests

人结肠腺癌细胞系（human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2）细胞模型是目前较为理想的体外肠吸收研究的细胞模型，由于其与药物的体内吸收具有良好的相关性，已越来越受到国内研究者的重视[1]，并已广泛用于药物吸收、转运、代谢等方面的研究[2~4]。目前对 Caco-2 细胞模型的建立已有很多报道，但对建立模型过程中的细胞密度的选择报道较少，在药物转运研究过程中 HBSS 转运介质及不同温度对细胞的毒性还没有进行深入的研究[4~8]。因此，对建立模型过程中的细胞密度进行选择，并对在药物转运研究过程中 HBSS 转运介质及不同温度对细胞的毒性进行了研究，以期进

*［基金项目］国家自然科学基金（No. 20962004，No. 81060359），贵州省中药现代化科技产业研究开发专项［黔科合设字（2010）5019］，贵州省社会发展攻关计划［黔科合 SY（2010）3046 号］，贵州省科技厅攻关计划［黔科合 GY 字（2008）3028］。
**通讯作者 E-mail：gywyl@gmc.edu.cn

一步的优化建立 Caco-2 细胞模型的方法,同时对不同 pH 值的 HBSS 缓冲液及不同温度作用 Caco-2 细胞后的毒性进行了研究,以便为 Caco-2 细胞在药物吸收研究中的应用提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

Caco-2 细胞株(上海中科院),DMEM 培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium,Gibco),胎牛血清(Fetalbovineseurm,Biochrom),青、链霉素,0.25% 胰蛋白酶 -0.02% EDTA 消化液和 HBSS 缓冲溶液(Gibco);碱性磷酸酶(AKP)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),其它试剂均为分析纯,实验用水为三蒸水。二氧化碳培养箱(Thermo scientific 公司),Millicell®-ERS Ⅱ 电阻仪(Millipore,USA),超低温冰箱(Thermo Flesher Scientifies),680 型酶标仪(Bio-Rad),Millicell™ 膜(12 mm,0.4 μm,Millipore,USA),荧光素(上海灵锦精细化工有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Caco-2 细胞模型

Caco-2 细胞株,传代数在 35 ~ 50 代,培养于含 10% 胎牛血清、4 mmol/L 谷氨酰胺及青-链霉素双抗液的 DMEM 培养液中,于 37 ℃、5% CO_2、相对湿度 90% 条件培养。建立不同密度 Caco-2 细胞模型[4~7],为了确定最佳细胞铺板密度,将对数生长期细胞按(5、10、20)×10^4 个/ml 密度,每孔 400 μl 接种到 Millieell™膜顶端膜 Apieal side(AP)侧(黏膜侧或肠腔侧),并于基底膜 Basolateral side(BL)侧,又称浆膜侧或肠内壁侧加入 600 μl DMEM 空白培养液,接种后每 2 d 换液 1 次,1 周后每日换液,培养至第 21 天。

1.2.2 细胞模型的验证[4~7]

1.2.2.1 细胞单层完整(紧密)性 在细胞接种 Transwell™培养板后,分别于第 0、1、5、10、15 及 25 d用细胞电阻仪测定跨上皮细胞电阻(transepitheliumelectrical resistance,TEER),了解细胞单层完整性与紧密性动态形成过程。

1.2.2.2 碱性磷酸酶(AKP)活性 分别于细胞接种 Transwell™培养板后第 1、4、8、12、16 及 21 d 取 Caco-2 细胞单层 AP 侧及 BL 侧培养基适量,按 AKP 试剂盒测定双侧培养基中 AKP 的活性并计算比值。

1.2.2.3 细胞单层通透性 用 37 ℃预温的 HBSS(pH7.4)将培养 21 d 的 Caco-2 单层细胞膜冲洗 2 次,第 2 次置于 37 ℃培养箱中平衡 20 min 后换液,换液后将含有荧光素的 37 ℃预温 HBSS 加入到 Caco-2 细胞单层 AP 侧,不含药物的 37 ℃预温 HBSS 加入细胞单层 BL 侧,加样后 1 h 于 BL 侧取样置酶标仪 450 nm 处测定吸光度值,并通过标准曲线计算其浓度。

1.2.3 HBSS 缓冲液对 Caco-2 细胞的毒性

1.2.3.1 pH 对 Caco-2 细胞模型的影响 选取对数生长期 Caco-2 细胞,以每孔 100 μl,(30 ~ 50)×10^4 个/ml 种植于 96 孔培养板中,培养板置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。实验分为正常对照组、不同 pH 组(7.4、6.0、4.0)。正常对照组每孔加入 100 μl DMEM 培养液;不同 pH 组每孔分别加入不同 pH 值的 HBSS 溶液 100 μl,作用 2、4、6 h 后用 MTT 法检测。即在 96 孔培养板中吸去培养液,每孔加入 0.25 g/L 100 μl MTT 溶液,孵育 4 h,吸去上清液,每孔加入 100 μl DMSO 溶解结晶,用酶标仪检测 490 nm 波长处每孔吸光度 OD 值。每个浓度平行 5 孔,实验重复 3 次,并计算细胞存活率。

1.2.3.2 温度对 Caco-2 细胞模型的影响 方法同 1.2.3.1,考察 37 ℃、25 ℃和 4 ℃条件下,不同 pH 值的缓冲液作用 2、4、6 h 后对细胞的影响。

1.2.4 计算公式

表观渗透系数(P_{app})=(dQ/dt)/(A × C_0),dQ/dt 为单位时间药物转运量(μg/min),A 为转运膜的面积(此时 A 为 0.4 cm^2),C_0 为受试化合物的初始浓度(mg/L);跨膜电阻 TEER = $R_{true\ tissue}$ × A,R 为电阻值,A 为转运膜的面积($R_{true\ tissue}$ = R_{total} - R_{blank})。

1.2.5 统计学方法

各组数据用均值 ± 标准误($\bar{x} \pm S, E$)表示,采用 One-Way ANOVA 评价整体性差异,并对组间数据进行 Dunnett 或 Dunnett's T3 检验,$\alpha = 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 TEER 的测定结果

在实验中,以接种当天为 0 d,0 d 时所测定的电阻值为所用膜加入培养液时所形成的电阻本底,

因此计算接种细胞后形成的 TEER 值时，均需扣除该本底值，TEER 值测定结果见图 1。细胞组测得值较稳定（$>200\ \Omega \cdot cm^2$），并且细胞已形成紧密的单层，可用于转运试验的研究。

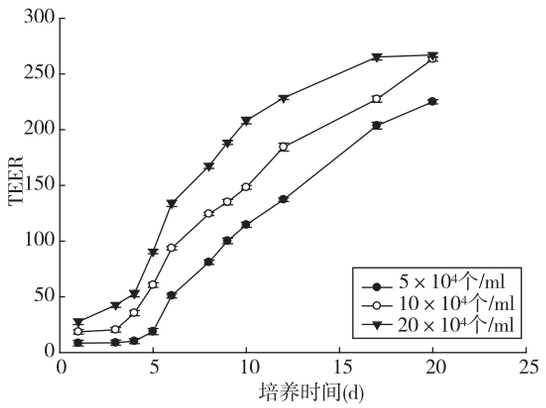


图 1　Caco-2 细胞模型 TEER（$n=5$）

Fig. 1　Test value of TEER of Caco-2 cell model at different time points

2.2　AKP 表达

从第 4 天开始，细胞单层两侧 AKP 活性差异已具显著性（$P<0.05$），表明极化特征已初步显现；至第 19～21 天，极化更趋显著，两侧酶性活比扩大为 1∶2.7（见图 2）。说明建立的 Caco-2 细胞模型具有 AP 活性，证明 Caco-2 细胞分化足够，具备药物转运需要的各种载体和酶。

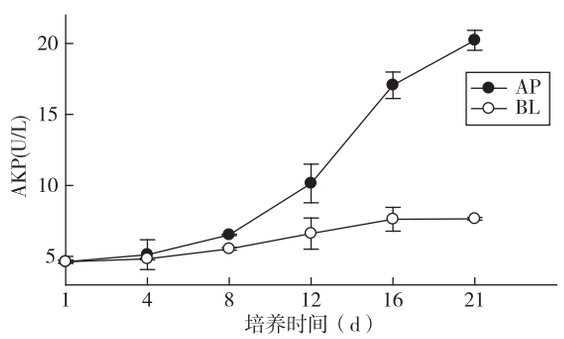


图 2　Caco-2 细胞 AKP

Fig. 2　Test results of AKP expression levels of Caco-2 cell model at different time points

2.3　荧光素通透量的测定

2.3.1　荧光素标准曲线的制备

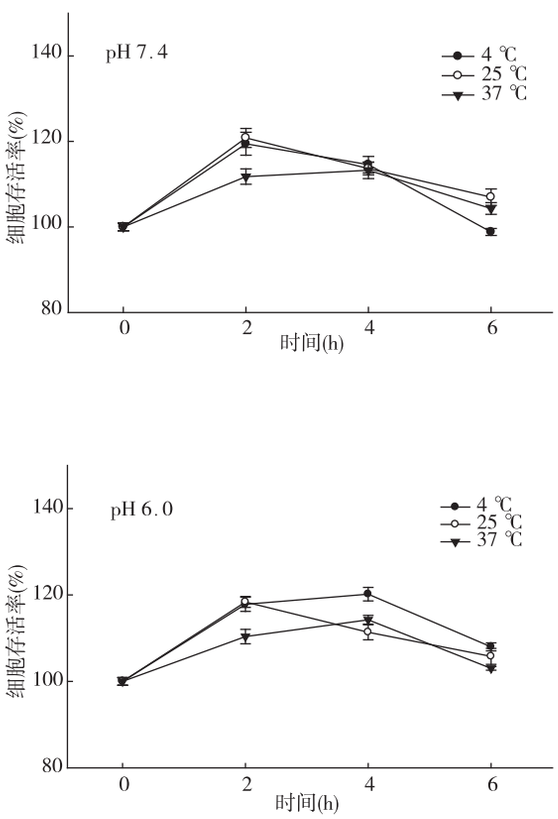
用转运介质 HBSS 配制不同浓度溶液，酶标仪测定，以峰面积（y）与质量浓度（x）对应作图，以荧光强度与浓度对应作图，测得荧光素标准曲线为 $y=0.022\ 8x+0.046\ 5$，相关系数 $r=0.999\ 5$，线型范围为 0.000 5～0.1 g/L。取相同反应体系溶液，平行测定 6 次，按含量测定方法测定荧光强度或峰面积，RSD 均 <3%；取上述物质溶液，重复测定 6 次，每次间隔 10 min，按含量测定方法测定荧光强度或峰面积（比值），RSD 均 <3%。

2.3.2　荧光素的转运量

空白对照的 $P_{app}=5.68\times10^{-5}$ cm/s，荧光素的 $P_{app}=0.147\ 3\times10^{-6}$ cm/s，小于通透实验规定的 0.5×10^{-6} cm/s 值，满足实验要求，说明 Caco-2 细胞在 Millicell 膜中培养 21 d 后，已经形成了完整的单细胞层，通透性符合要求，可以用于转运实验。

2.4　pH 值及 HBSS 时间对 Caco-2 细胞毒性

从图 3 可以看出，不同 pH 值的 HBSS 缓冲液作用 4 h 对 Caco-2 细胞有作用，当不同 pH 值的 HBSS 缓冲液作用 Caco-2 细胞 4 h 后，细胞存活率已经呈明显下降趋势，说明细胞已经发生凋亡或者坏死，从结果中可以推断，进行药物的 Caco-2 吸收潜性研究时，作用时间选择 4 h 之内不会破坏 Caco-2 细胞单层模型。



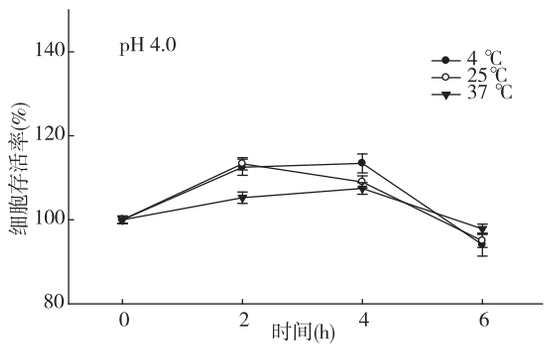


图 3 不同 pH 值对 Caco-2 细胞毒性

Fig. 3 Cytotoxicity of HBSS to Caco-2 cells on the condition of different pH values and different temperature at different time points

3 讨论

Caco-2 细胞模型是目前最常用的体外细胞对药物的吸收模型,在药物的吸收过程及吸收机制的研究方面有广泛的应用,尤其在药物吸收研究方面,Caco-2 细胞模型的应用成为目前的研究热点。

本研究中,传代 35 ~ 50 代的 Caco-2 细胞经过 21 d 的培养后,细胞分化形成类似小肠上皮单细胞层,细胞的生理、生化方面已经有了相当的变化,且细胞密度为 10×10^4 个/ml 时细胞生长状态良好,因此确定用 10×10^4 个/ml 密度来建立 Caco-2 细胞模型。在既往的研究中,大多对 Caco-2 细胞在不同温度和不同时间的药物转运量进行了考察,但没有对 HBSS 缓冲液的 Caco-2 细胞的毒性进行研究[9~11]。在 HBSS 缓冲液对 Caco-2 细胞毒性研究结果中可以推断,进行药物的 Caco-2 吸收潜性研究时,HBSS 液作用 4 h 之内对 Caco-2 细胞模型没有影响。

本实验室建立的 Caco-2 细胞模型能基本满足进行多种胃肠道吸收机制研究的需要,作为药物的吸收转运筛选模型有其自身的优势,但也存在一些缺陷,如细胞结构单一致密、缺少部分代谢酶等。基于 Caco-2 细胞模型还存在着不足,本实验室将进一步研究 Caco-2 细胞模型在药物研究中的应用前景。

4 参考文献

[1] 蔡润兰,王敏,齐云,等. Caco-2 细胞模型验证指标的选择与评判[J]. 中国药学杂志,2008(43):1871 - 1875.

[2] 鲁鑫焱,蒋惠娣,曾苏. 黄铜类化合物在 Caco-2 细胞模型上的转运和代谢研究进展[J]. 中国药学杂志,2006(17):1289 - 1292.

[3] 郭涛. Caco-2 细胞模型在药物动力学研究中的应用[J]. 中国药师,2003(12):774-776.

[4] 袁明勇,郑伶俐,陈静,等. Caco-2 细胞模型在药物研究中的应用[J]. 中国药师,2009(7):969 - 971.

[5] 曾宝,王春玲,吴安国,等. Caco-2 细胞模型的建立及其在中药吸收研究中的应用探讨[J]. 中药新药与临床药理,2010(21):570 - 573.

[6] 杨秀伟,杨晓达,王莹,等. 中药化学成分肠吸收研究中 Caco-2 细胞模型和标准操作规程的建立[J]. 中西医结合学报,2007(6):634 - 641.

[7] 齐云,王敏,蔡润兰. Caco-2 细胞模型在口服药物转运机制研究中应用的进展[J]. 中国药学杂志,2009(17):1281 - 1284.

[8] 王敏,齐云. Caco-2 细胞模型及其在药物吸收研究中的应用新进展[J],中国药学杂志,2007(16):1201 - 1204.

[9] Zhenting Yuana, Haiyan Xu, Ke Wanga. Determination of osthol and its metabolites in a phase I reaction system and the Caco-2 cell model by HPLC-UV and LC-MS/MS [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009(49):1226 - 1232.

[10] Yongbing Sun, Jin Sun, Shiliang Shi. Synthesis, transport and pharmacokinetics of 5#-amino acid ester prodrugs of 1-#-d-arabinofuranosylcytosine [J]. Molecular Pharmaceutics,2009(1):1021 - 1031.

[11] Yasuhiro Tsume, John M, Hilfinger, et al. Amidon, enhanced cancer cell growth inhibition by dipeptide prodrugs of floxuridine: increased transporter affinity and metabolic stability [J]. Molecular Pharmaceutics, 2008(5):717 - 727.

(2012 - 06 - 31 收稿,2012 - 08 - 28 修回)

编辑:张丽君