

葡萄籽原花青素对胆汁酸盐在结肠腺细胞 Caco-2 中转运的影响[△]

来丽华^{1*},葛建^{2#}(1.杭州市中医院广兴堂国医馆中药房,杭州 310007;2.中国计量大学药学院,杭州 310018)

中图分类号 R361[†].3;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1323-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.07

摘要 目的:研究葡萄籽原花青素(GSP)对甘氨酸胆酸钠(GA)和牛磺胆酸钠(TA)在结肠腺细胞Caco-2中跨膜转运的影响。方法:利用Caco-2细胞模型,采用反相-高效液相色谱法测定细胞培养液中GA和TA的含量。试验分为GSP组、GA组、TA组、GSP+GA组和GSP+TA组,分别检测0、2、4、8h从Transwell小室顶端(AP)侧透过Caco-2细胞向基底端(BL)侧转运GA和TA的透过量。结果:GA和TA检测浓度的线性范围均为0.05~1.2 mmol/L($R^2=0.9999$)。随着时间的延长,GA组和TA组BL侧GA和TA的透过量急剧增加;而加入GSP后,BL侧GA和TA的透过量明显较少,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:GSP对GA和TA在Caco-2细胞中的跨膜转运具有抑制作用。

关键词 葡萄籽原花青素;结肠腺细胞Caco-2;牛磺胆酸钠;甘氨酸胆酸钠;跨膜转运

Effects of Grape Seed Proanthocyanidin on the Transport of Bile Salts in Colon Glandular Cell Caco-2

LAI Lihua¹, GE Jian² (1.Dept. of TCM, Guangxingtang Traditional Chinese Medicine, Hangzhou Hospital of TCM, Hangzhou 310007, China; 2.Dept. of Pharmacy, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of grape seed proanthocyanidin (GSP) on the transmembrane transport of sodium glycocholate (GA) and sodium taurocholate (TA) in colon glandular cell Caco-2. METHODS: Caco-2 model was used, and RP-HPLC was conducted to determine the contents of GA and TA in cell culture medium. The test was divided into GSP group, GA group, TA group, GSP+GA group and GSP+TA group, the transport volumes of transporting GA and TA from Transwell apical (AP) side to basolateral (BL) side by Caco-2 cell at 0, 2, 4, 8 h were detected, respectively. RESULTS: The linear ranges of GA and TA were 0.05-1.2 mmol/L ($R^2=0.9999$). With the time passing, transport volumes of GA and TA in BL site in GA group and TA group were sharply increased; while the transport volumes were obviously decreased after adding GSP, with statistical significance ($P<0.01$). CONCLUSIONS: GSP has inhibitory effect on the transmembrane transport of GA and TA in Caco-2 cell.

KEYWORDS Grape seed proanthocyanidin; Colon glandular cell caco-2; Sodium glycocholate; Sodium taurocholate; Transmembrane transportation

原花色素是广泛存在于多种植物中,具有C6-C3-C6基本构架的一类多酚化合物的总称,其中原花青素报道最多,分布最为广泛。国内外研究表明,原花青素具有抗氧化、清除自由基、抗菌、抗癌以及保护肝和心脑血管系统等作用^[1-3]。近年来,关于葡萄籽原花青素(GSP)在调控心脑血管系统功能方面的报道较多,尤其是GSP对机体脂质代谢过程改善方面的报道最多^[4]。然而,关于GSP调控脂质代谢的分子机制研究报道较少。

胆汁酸是在肝中由胆固醇合成的物质,与甘氨酸或

牛磺酸结合生成甘氨酸胆酸钠(GA)或牛磺胆酸钠(TA)分泌入十二指肠,胆汁酸盐可在盲肠末端被重吸收进入肠肝循环,以保持胆汁酸盐的动态平衡^[5]。有研究表明,部分水果、蔬菜或茶叶中某些组分可结合胆汁酸盐,使其排出体外,阻止胆汁酸盐的重吸收,可促进血浆及肝中胆固醇转化为胆汁酸,从而降低胆固醇的含量,起到降血脂的效果^[6-7]。

笔者前期研究表明,儿茶素类天然多酚化合物能显著吸附胆汁酸盐,从而抑制肠道脂质吸收,起到调控血

然产物研究与开发,2001,13(5):84-85.

[11] Li J, Liu H, Ramachandran S, et al. Grape seed proantho-

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31100499)

*中药师。研究方向:中草药活性。电话:0571-87881603。E-mail: xskathy@163.com

#通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:天然药物。电话:0571-86835702。E-mail: gejian16888@163.com

cyanidins ameliorate doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(3): 569-584.

[12] 赵文英,陈冬云,邢文,等.磷酸肌酸钠对小鼠阿霉素心肌损伤的保护机制初探[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(3): 259-262.

(收稿日期:2016-09-21 修回日期:2016-11-12)

(编辑:林静)

脂代谢功能^[8]。而GSP为儿茶素的天然聚合物,同样能显著吸附或结合胆汁酸盐。本文主要研究GSP对胆汁酸盐GA和TA在结肠腺细胞Caco-2中跨膜转运的影响,旨在揭示其在调节脂质代谢方面的可能机制。

1 材料

1.1 仪器

LC-20ATyp 高效液相色谱(HPLC)系统和 Prominence SPD-20A 紫外检测器(日本 Shimaduz 公司); CB53 CO₂ 细胞培养箱(德国 Binder 公司); 24 孔培养板用 Transwell 小室(美国 Corning 公司); TS100-F 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 药品与试剂

GSP 原料药(宁波禾普生物科技有限公司,批号: 20101012,纯度:>95%);TA 标准品(批号:C1319058,纯度:95%) 和 GA 标准品(批号:D1303029,纯度:98%) 均购于杭州邦易化工有限公司;苯酚红(批号:P110947,纯度:>99%) 和二甲基亚砷(批号:D103281,纯度:>99.9%) 均购于上海阿拉丁有限公司。

1.3 细胞与培养液

结肠腺细胞 Caco-2 购于中国科学院上海细胞典藏中心,用 DMEM 细胞培养液(含 1% 非必需氨基酸,1% L-谷氨酰胺、100 u/mL 青霉素、100 u/mL 链霉素和 10% 胎牛血清)培养,使用前以一次性过滤头除菌后密封,备用。

2 方法

2.1 GA 和 TA 的含量测定

2.1.1 色谱条件 将文献[9]方法略作修改,以反相(RT)-HPLC 法测定 GA 和 TA 的含量。色谱柱:Thermal BDS C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.6% 磷酸二氢钾(65:35, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:205 nm;进样量:20 μL。

2.1.2 方法学考察 用空白培养基分别制备浓度为 1.2、0.6、0.3、0.15、0.1、0.05 mmol/L 的 TA 和 GA 的混合溶液,其中 TA 和 GA 浓度相同。另称取 5 g 三氯乙酸,加入 50 mL 水,制备成 10% 三氯乙酸溶液。分别取 TA 和 GA 的混合溶液 0.1 mL,置于 1.5 mL 离心管中,加 0.1 mL 的培养基,再加入 0.2 mL 10% 三氯乙酸溶液,12 000 r/min (离心半径 5 cm) 离心 2 min。取上清进样测定 GA 和 TA 的峰面积,绘制标准曲线。按上述方法制备分别含 GA 和 TA 0.05、0.15、0.6 mmol/L 的质控样品,进样分析,每个浓度重复 5 次,以质控样品中 GA 和 TA 峰面积与其直接溶于流动相后测得的峰面积的比值计算 GA 和 TA 的回收率。每日测定质控样品 5 次考察日内精密度,连续测定 5 d 考察日间精密度。

2.2 苯酚红的含量测定

2.2.1 色谱条件 将文献[10]方法略作修改,以 RT-HPLC 法测定苯酚红的含量。色谱柱:Thermal BDS C₁₈

(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(55:45:0.2, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:276 nm;进样量:20 μL。

2.2.2 方法学考察 取 500 mg 苯酚红溶于 1 L 水中制备成 500 mg/L 苯酚红溶液。将 500 mg/L 苯酚红溶液倍比稀释成 125、62.5、31.25、15.6、7.8、3.91、1.95 mg/L 的溶液,进样测定苯酚红的峰面积,绘制标准曲线。按上述方法制备含苯酚红 1.95、7.80、31.25 mg/L 的质控溶液,进样分析,每个浓度重复 5 次,以质控溶液中苯酚红的峰面积与其直接溶于流动相后测得的峰面积的比值计算苯酚红的回收率。每日测定质控溶液 5 次考察日内精密度,连续测定 5 d 考察日间精密度。

2.3 Caco-2 细胞的培养

将 Caco-2 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 °C 下培养,每隔 1 d 更换 1 次培养基。待细胞长至满壁后分装于新的培养瓶传代,直至培养足量的细胞用于试验所需为止。将多余细胞保存在冻存管中,于液氮罐中冻存,备用。

2.4 Caco-2 细胞的铺板

取出无菌 Trans-well 小室中 24 孔培养板的中间部位并做好标记。取出长势良好的 Caco-2 细胞,消毒后弃原培养基,加适量消化液,倒置显微镜下观察细胞形态,待细胞轮廓清晰时弃去消化液,加适量新鲜培养液,吹打瓶壁,将细胞吹打至培养液中,混匀。每个小室加 400 μL 含细胞的培养液,其余孔加 400 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)作为空白对照,培养 2 h。

2.5 Caco-2 细胞紧密度的测定

取出“2.4”项下铺板培养后的 Caco-2 细胞,消毒后加入 4.5 mg/mL 的苯酚红溶液 200 μL,置于已标记的 2 个 Transwell 小室顶端(AP)侧,小室基底端(BL)侧加入 100 μL 空白培养液。2 h 后,分别从小室的 AP、BL 侧各取 100 μL 培养液,测定其中苯酚红浓度。根据 AP 侧和 BL 侧苯酚红浓度的比值,评价细胞紧密度。

2.6 分组和透过的测定

试验分为 GSP 组、GA 组、TA 组、GSP+GA 组和 GSP+TA 组。将 GSP 制备成 2 mg/mL 的溶液,GA、TA 制成 0.24 mmol/L 的溶液,按分组将 GSP 溶液和 GA、TA 溶液加入 Transwell 小室 AP 侧,使 GSP 最终质量浓度为 1 mg/mL,GA、TA 浓度均为 0.12 mmol/L。分别于 0、2、4、8 h 后吸取 BL 侧 100 μL 培养液于已标记离心管中,同时补充等量空白培养液,测定培养液中 GA、TA 的含量。试验重复 6 次。

3 结果

3.1 GA、TA 测定的方法学考察结果

以 GA、TA 浓度(*c*)为横坐标、峰面积(*A*)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 GA: $A=631\ 408c+1\ 747.8$ ($R^2=0.999\ 9$),TA: $A=381\ 762c-1\ 278.5$ ($R^2=0.999\ 9$),

线性范围均为0.05~1.20 mmol/L。0.05、0.15、0.6 mmol/L浓度下GA的回收率分别为(98.2±4.2)%、(98.7±2.5)%、(99.4±2.3)% (n=3),日内RSD分别为3.26%、2.53%、2.31% (n=5),日间RSD分别为2.37%、2.06%、1.62% (n=5);TA的回收率分别为(98.6±3.6)%、(98.5±1.2)%、(99.9±1.4)% (n=3),日内RSD分别为3.65%、1.22%、1.40% (n=5),日间RSD分别为1.97%、1.29%、1.12% (n=5)。

3.2 苯酚红测定的方法学考察结果

以苯酚红质量浓度(c)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $A=20\ 280c+451.66$ ($R^2=0.999\ 6$),线性范围为1.95~125 mg/L。苯酚红在1.95、7.80、31.25 mg/L质量浓度下回收率分别为(98.7±2.2)%、(99.8±2.5)%、(100.1±1.7)% (n=3),日内RSD分别为2.23%、2.51%、1.69% (n=5),日间RSD分别为1.17%、1.67%、2.29% (n=5)。

3.3 Caco-2细胞紧密度

Caco-2细胞紧密度测定结果见表1。

表1 Caco-2细胞紧密度测定结果

Tab 1 Determination results of Caco-2 cell compactness

Transwell 小室	AP侧苯酚红		BL侧苯酚红		BL侧浓度/ AP侧浓度/%
	峰面积	质量浓度,mg/L	峰面积	质量浓度,mg/L	
1号	878 942	43.32	27 886	1.35	3.12
2号	897 890	44.25	29 743	1.44	3.26

由表1可知,仅有约3%的苯酚红能通过Caco-2细胞的间隙,说明Caco-2细胞紧密度较高。

3.4 GA和TA的透过量

各组GA和TA的透过量测定结果见表2。

表2 各组GA和TA的透过量测定结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 2 Determination results of transport volume of GA and TA in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

时间, h	GA, μmol			TA, μmol		
	GSP组	GA组	GSP+GA组	GSP组	TA组	GSP+TA组
0	0	0	0	0	0	0
2	0	2.20±0.11	0.15±0.01*	0	3.61±0.49	0.001 1±0.000 26*
4	0	18.01±2.81	0.32±0.03*	0	16.00±2.40	0.001 9±0.000 31*
8	0	31.00±1.52	1.90±0.36*	0	47.01±5.81	0.35±0.052*

注:与GA组比较,* $P<0.01$;与TA组比较,* $P<0.01$

Note: vs. GA group,* $P<0.01$; vs. TA group,* $P<0.01$

由表2可知,随着时间的延长,GA和TA的透过量均有所增加,但是GSP+GA组细胞的GA透过量明显低于GA组($P<0.01$),GSP+TA组细胞的TA透过量明显低于TA组($P<0.01$)。

4 讨论

本研究结果表明,GSP能显著抑制GA和TA透过

Caco-2细胞。其原因可能是GSP与胆汁酸盐发生了吸附结合作用,造成胆汁酸盐的理化性质发生改变。胆汁酸盐的细胞跨膜方式为自由扩散和主动转运,其中以主动转运为主,而GSP与胆汁酸盐的氢键吸附改变了胆汁酸盐的空间位阻效应,因此阻碍了其跨膜转运,从而降低了胆汁酸盐通过细胞膜的转运能力^[1]。通过比较发现,GSP对TA透过Caco-2细胞的抑制作用强于GA,这可能是GSP羟基对TA的氢键作用强于GA所致。

本研究中GSP可能通过与GA和TA吸附结合,从而显著抑制了胆汁酸盐的小肠跨膜转运,阻断其肠道重吸收,促进了胆汁酸盐的排泄或降解。由此发现,一方面GSP可抑制肠道脂质吸收,另一方面GSP又促进了血液中胆固醇向胆汁酸盐转化,起到双重降血脂作用。

参考文献

- [1] 李小丽,王楷扬,胡建辉,等.葡萄籽原花青素对CCl₄诱导小鼠氧化性肝损伤的保护作用及其机制研究[J].中国药房,2016,27(13):1752-1755.
- [2] 张长贵,董加宝,谢伍荣.原花色素抗氧化生物活性研究进展[J].粮食与油脂,2009(6):10-12.
- [3] 闫少芳,李勇,吴娟,等.葡萄籽提取物原花青素调节血脂作用及机理研究[J].中国食品卫生杂志,2003,15(4):302-304.
- [4] 张晓晖.葡萄籽原花青素体外抗血小板聚集的机制研究[J].中国病理生理杂志,2012,28(4):714-717.
- [5] 张久聪,聂青和.胆汁酸代谢及相关进展[J].胃肠病学和肝病杂志,2008,17(11):953-956.
- [6] Kahlon TS, Chapman MH, Smith GE. In vitro binding of bile acids by spinach, kale, brussels sprouts, broccoli, mustard greens, green bell pepper, cabbage and collards [J]. *Food Chemistry*, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.12.020.
- [7] 胡凯.茶叶功能性成分体外降血脂的机理研究[D].广州:华南理工大学,2011.
- [8] 王玉洁,葛建,杨斌英,等.儿茶素EGCG对胆汁酸的结合及调控脂质代谢研究[J].食品科技,2016,41(2):228-232.
- [9] 王凤双,李亚红,袁兆坤. HPLC测定蛇胆川贝胶囊中牛磺胆酸钠的含量[J].现代中药研究与实践,2007,21(4):49-51.
- [10] 刘太明,蒋学华. HPLC同时测定肠循环液中黄芩苷、黄芩素和酚红的浓度[J].华西药学杂志,2005,20(5):390-392.
- [11] 邓雪,黄惠华.茶花浸提液及其功能性成分结合胆酸盐的效果探讨[J].食品科技,2013,38(1):199-205.

(收稿日期:2016-06-16 修回日期:2016-08-28)

(编辑:邹丽娟)