

苏 丽,党庆玲,高瑞昌. 4 种花色苷在 Caco-2 细胞单层模型的转运吸收规律[J]. 江苏农业科学,2022,50(13):171-177.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.13.028

# 4 种花色苷在 Caco-2 细胞单层模型的转运吸收规律

苏 丽<sup>1</sup>,党庆玲<sup>2</sup>,高瑞昌<sup>2</sup>

(1. 宁夏贺兰山东麓葡萄产业园区管理委员会,宁夏银川 753000; 2. 江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

**摘要:**以 Caco-2 单层细胞为体外吸收评价模型,以矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy-3-G)、飞燕草素-3-葡萄糖苷(Dp-3-G)、锦葵素-3-葡萄糖苷(Mv-3-G)、天竺葵素-3-葡萄糖苷(Pg-3-G)为对象,研究其跨膜吸收规律。结果表明,在相同浓度下,4 种花色苷在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收表现为 Mv-3-G 最高,其次依次为 Pg-3-G、Cy-3-G、Dp-3-G,它们在 Caco-2 细胞的吸收过程中均存在外排现象,但是相互间的外排率无显著性差异。花色苷在 Caco-2 单层细胞吸收过程中的双向转运对时间有一定依赖性,正向的转运吸收作用比反向的外排作用大,且存在显著方向性,参与吸收的途径有主动运输和被动运输。花色苷苷元结构上的基团差异可能是导致其跨膜吸收差异的结构基础,转运方式的不同是其吸收差异的另一个原因。

**关键词:**花色苷;人结肠腺癌细胞单层模型;转运吸收

**中图分类号:** TS201.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)13-0171-07

花色苷是自然界中一大类水溶性的植物色素,具有多种对人体有益的健康活性,如改善胰岛素抵抗、抗肿瘤、清除体内自由基、保护内皮细胞等作用<sup>[1-4]</sup>。然而,花色苷在体内的生物利用度相对较低,其功能特性受到较大限制,因此,阐明花色苷的吸收过程,才能促进其在人体发挥更大的有益作用。小肠是人体吸收营养物质的主要部位,对小肠吸收的研究较多,其中,人结肠腺癌细胞(Caco-2)最常被使用。Caco-2 细胞在体外培育过程中可自发分化,且在细胞间能紧密地连接成细胞单层,呈微绒毛状,Caco-2 细胞的生化作用与人体小肠极为类似<sup>[5]</sup>,所以众多研究人员均将其用作探究小肠吸收的模型。本研究建立 Caco-2 单层细胞模型,研究 Cy-3-G、Dp-3-G、Mv-3-G、Pg-3-G 跨膜转运规律,为评价花色苷的生物利用度提供理论基础,并为开发能够提高不同花色苷生物利用度的转运营载体研究提供评价方法和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

Cy-3-G、Dp-3-G、Mv-3-G 和 Pg-3-G (纯度  $\geq 90\%$ ), 购于上海吉至生物化学公司。Caco-2 细胞, 购于南京科佰生物科技有限公司。非必需氨基酸、胎牛血清、EDTA-胰蛋白酶、青霉素、链霉素、丙酮酸钠、MEM 培养基, 购于美国 Gibco 公司。Hank's 平衡盐溶液(HBSS), 购于美国 Hyclone 公司。25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶、细胞培养板(96 孔)、细胞培养板(6 孔)、1.5 mL 冻存管、Transwell 板(膜面积 4.67 cm<sup>2</sup>), 购于美国 Corning 公司; MTT 试剂盒, 购于碧云天生物有限公司。乙腈、甲醇、甲酸, 色谱级, 购于美国 Sigma 公司; 柠檬酸等分析级试剂, 购于国药集团化学试剂上海有限公司。

HH-A 恒温水浴搅拌器, 购于江苏中大仪器科技有限公司; Millicell ERS-2 细胞电阻仪, 购于美国默克密理博公司; CO<sub>2</sub> 培养箱, 购于美国 Thermo 公司; Waters2690 高效液相色谱仪, 购于美国 Water 公司; 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器, 购于美国 Millipore 公司; Multiskan MK3 酶标仪, 购于芬兰 Thermo Labsystems 公司。

pH 值 = 2.0 的柠檬酸溶液: 3.84 g/100 mL 柠檬酸溶液, 微调 pH 值至 2.0。

### 1.2 试验时间和地点

本试验于 2019 年在江苏大学食品与生物工程

收稿日期: 2021-09-27

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31501444)。

作者简介: 苏 丽(1988—), 女, 河北承德人, 硕士, 中级农业工程师, 主要从事农业产业技术与推广, E-mail: 233087202@qq.com; 共同第一作者: 党庆玲(1996—), 女, 甘肃白银人, 硕士, 从事食品营养研究, E-mail: 2636918832@qq.com。

通信作者: 高瑞昌, 博士, 教授, 主要从事水产品化学与综合利用研究。E-mail: xiyuan2008@ujs.edu.cn。

学院实验室完成。

1.3 方法

1.3.1 高效液相色谱条件 根据 Artursson P 的方法<sup>[6]</sup>:色谱柱:C<sub>18</sub>柱,250 mm×4.6 mm×5 μm;流动相:A 为 1% 甲酸水溶液,B 为 1% 甲酸乙腈溶液;检测波长:525 nm;柱温:35 ℃;进样量:20 μL。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	0.8	92.0	8.0
2.0	0.8	88.0	12.0
5.0	0.8	82.0	18.0
10.0	0.8	80.0	20.0
12.0	0.8	75.0	25.0
15.0	0.8	70.0	30.0
18.0	0.8	55.0	45.0
20.0	0.8	20.0	80.0
22.0	0.8	92.0	8.0
30.0	0.8	92.0	8.0

1.3.2 标准曲线 称取 1 mg 花色苷,采用含 10% HCl 的甲醇溶液定容至 1 mL,配成 1 000 μg/mL 的储备液。分别取不同体积上述溶液,采用 10% HCl 甲醇溶液稀释,最后得到浓度为 10、25、50、75、100 和 200 μg/mL 标准溶液,采用 HPLC 法,在波长 525 nm 下测定其吸收峰,以浓度和峰面积作标准曲线,横坐标为浓度,纵坐标为峰面积。

C-3-G 标准曲线: $y = 88\,530.8x - 15\,423$ ,  
 $r^2 = 0.9999$ ;

Dp-3-G 标准曲线: $y = 29\,065x + 41\,918$ , $r^2 = 0.9997$ ;

Pg-3-G 标准曲线: $y = 29\,038x + 7\,007.4$ ,  
 $r^2 = 0.9996$ ;

Mv-3-G 标准曲线: $y = 31\,425x + 48\,572$ , $r^2 = 0.9994$ 。

Cy-3-G、Dp-3-G、Pg-3-G、Mv-3-G 浓度与峰面积在 10~200 μg/mL 线性关系较好。

1.3.3 细胞培养 细胞培养的方法参考 Ying 等的方法<sup>[7]</sup>稍作修改。选择 10~30 代 Caco-2 细胞培养在以 MEM 为培养基的 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,其中,胎牛血清含量为 20%、双抗(青霉素和链霉素)含量为 1%、非必需氨基酸含量为 1%、丙酮酸钠含量为 1%,置于 37 ℃,CO<sub>2</sub> 含量为 5% 培养箱中。每 2 d 换 1 次液。当瓶底长满细胞约 80% 时,采用 EDTA-

胰蛋白酶消化 5~10 min,以 1:3 进行传代。

1.3.4 Caco-2 细胞单层模型的建立 细胞模型建立方法参考 Zhao 等的方法<sup>[8]</sup>,并稍作修改。采用 PBS 把生长良好且处于对数期的 Caco-2 细胞清洗 2 遍,后加入 EDTA-胰蛋白酶 1 mL 左右消化 5~10 min 后,再加入 MEM 培养基 3~4 mL 以终止消化,并反复吹打确保细胞呈单个状态。采用血球计数板在 100 倍的倒置显微镜下直接计数。加入一定体积 MEM 培养基配制细胞悬液,细胞浓度达 5×10<sup>4</sup> cells/mL,然后接种至 6 孔 Transwell 板上。顶侧(AP)加入细胞悬液 1.5 mL,基底侧(BL)加入培养基 2.5 mL,第 2 天换液。随后 1 周内每隔 1 d 换 1 次液,从第 2 个星期起每天换液,培养约 21 d 时至细胞分化完全。

1.3.5 Caco-2 细胞的形态学观察 采用倒置显微镜直接观察培养瓶中的 Caco-2 细胞;接种在 Transwell 培养板上的 Caco-2 细胞,在培养 14~21 d 后,同样采用倒置显微镜观察。

1.3.6 Caco-2 细胞膜的电阻值测定 电阻值测定参考丁龙的方法<sup>[9]</sup>并稍作修改。电极在 75% 乙醇中浸洗 15 min,电极晾干后用 HBSS 清洗。将 Tanswell 板中 AP 侧和 BL 侧的培养基吸去,采用 HBSS 清洗细胞层 1~2 遍。随后向 AP 侧加入 1.5 mL HBSS,BL 侧加入 2.5 mL HBSS。电阻值测定时,将电极短端垂直插入培养小室 AP 侧(不要触碰到 AP 侧细胞膜),长端浸入培养小室 BL 侧。待示数稳定后,记录电阻值。计算方法如下:

$$TEER(\Omega \cdot \text{cm}^2) = (R - R_0) \times 4.67. \quad (1)$$

式中:TEER 代表 Caco-2 模型的跨膜电阻值,单位为 Ω·cm<sup>2</sup>;R 代表试验组跨膜电阻,单位为 Ω;R<sub>0</sub> 为空白组电阻,单位为 Ω;4.67 为 6 孔 Transwell 板培养小室的膜面积,单位为 cm<sup>2</sup>。

1.3.7 荧光黄通透性 参照祝倩等的试验方法<sup>[10]</sup>稍作修改。Caco-2 细胞膜培养 21 d 后使用预加热至 37 ℃ 的 HBSS 洗涤 3 次,然后再放入培养箱中稳定 30 min。在 AP 侧加入由 HBSS 配制的浓度为 0.4 mg/mL 的荧光黄,在 BL 侧加入 2.5 mL HBSS,置于培养箱中培养 120 min。每 0.5 h 从 BL 侧取 500 μL 作为待测样品进行后续测定,并用 HBSS 补充 BL 侧取样室溶液。采用酶标仪来测定荧光黄浓度,在 492 nm 下进行检测。

荧光黄标准曲线绘制参考毛小琴等的方法<sup>[11]</sup>。按照下列公式测算荧光黄的渗透率以评价模型的

通透性:

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt \times A \times C_0} \quad (2)$$

式中:  $P_{\text{app}}$  为表观渗透系数,  $\text{cm/s}$ ;  $dQ/dt$  为单位时间内荧光黄的转运量,  $\mu\text{g/s}$ ;  $A$  为膜的表面积,  $\text{cm}^2$ ;  $C_0$  为 AP 侧中荧光黄的初始浓度,  $\text{mg/mL}$ 。

1.3.8 细胞毒性试验 参照 Lakowicz 的方法<sup>[12]</sup>, 稍作修改。将  $100 \mu\text{L}$  浓度为  $4 \times 10^5$  细胞/ $\text{mL}$  Caco-2 细胞悬浊液加入到 96 孔板中, 在  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后除去培养液, 然后加入系列浓度的花色苷 ( $50 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ , HBSS 溶解), 再培养 24 h。设有空白、阴性和阳性对照试验组, 每组 6 个复孔。在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养箱中培养 24 h, 然后除去培养液, 采用 PBS 洗涤 1 遍后, 向每孔加入 MTT 溶液 ( $50 \mu\text{L}$ ), 继续培养 4 h。采用移液器将孔内的培养基小心吸除后加入  $150 \mu\text{L}$  二甲亚砜, 在摇床上使用低速进行振荡, 充分溶解, 15 min 后, 采用酶标仪测各孔的吸光度 ( $550 \text{ nm}$ ), 细胞的存活率用下列公式进行测算。

$$V = \frac{D_T - D_K}{D_C - D_K} \times 100\% \quad (3)$$

式中:  $V$  为细胞存活率, %;  $D_T$  为试验组吸光度;  $D_K$  为空白组吸光度;  $D_C$  为阴性对照组吸光度。

1.3.9 时间对花色苷吸收率的影响 将培养 21 d 后的 Caco-2 细胞膜采用预热的 HBSS 缓冲液清洗 3 遍, 然后放入培养箱中继续孵育 30 min 便于除去膜上的杂质。除去上层的 HBSS, 向 AP 侧加入  $200 \mu\text{g/L}$  花色苷  $1.5 \text{ mL}$ , 向 BL 侧加入 HBSS 缓冲液  $2.5 \text{ mL}$ , 在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养箱中培养。在 30、60、90、120、150、180 min 从 BL 侧吸取  $0.5 \text{ mL}$  液体用于检测, 同时向 BL 侧加入  $0.5 \text{ mL}$  新的 HBSS 缓冲液补足体积<sup>[5]</sup>。样品中加入 pH 值为 2.0 的柠檬酸溶液  $0.5 \text{ mL}$  进行酸化处理, 采用 HPLC 进行定量分析。

1.3.10 4 种花色苷的吸收率比较 当 Caco-2 细胞在 Transwell 上分化成完好且紧实的单细胞层时, 采用  $1.5 \text{ mL}$  HBSS 从 AP 侧冲洗 Transwell 板中的各孔室, 向 BL 侧加入 HBSS 溶液  $2.5 \text{ mL}$ , 清洗 3 遍, 然后在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养箱中孵育 30 min 便于去除膜上的杂质。

4 种花色苷浓度为  $200 \mu\text{g/mL}$ , 从 AP 侧到 BL 侧吸收率的测定方法: 在 AP 侧加入  $1.5 \text{ mL}$  花色苷溶液, BL 侧加入  $2.5 \text{ mL}$  HBSS, 放入  $\text{CO}_2$  培养箱中

孵育 120 min, 每 0.5 h 从 BL 侧收集  $0.5 \text{ mL}$  的溶液, 并用新的等体积 HBSS 溶液补足, 每组设有 3 个平行。取得的样品立刻加入 pH 值为 2.0 的柠檬酸  $0.5 \text{ mL}$  酸化, 然后 HPLC 测定花色苷的浓度。

花色苷从 BL 侧到 AP 侧吸收率的测定方法: 在 BL 侧加入  $2.5 \text{ mL}$  花色苷溶液, AP 侧加  $1.5 \text{ mL}$  的 HBSS 溶液, 放入  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 120 min, 每隔 30 min 从 AP 侧收集  $0.5 \text{ mL}$  溶液作为样品, 再补入等体积 HBSS, 每组设 3 个平行。随后立即加入 pH 值为 2.0 的柠檬酸  $0.5 \text{ mL}$  进行样品酸化处理, 然后利用 HPLC 测定花色苷的浓度。

转运率计算公式如下:

$$A = (S_{\text{BL}} \times V_{\text{BL}}) / (S_{\text{AP}} \times V_{\text{AP}}) \times 100\% \quad (4)$$

式中:  $A$  是待测样品吸收率, %;  $S_{\text{BL}}$  是 BL 侧溶液中样品的峰面积;  $V_{\text{BL}}$  是 BL 侧样品的体积;  $S_{\text{AP}}$  是 AP 侧原样品的峰面积;  $V_{\text{AP}}$  是 AP 侧样品的体积。

#### 1.4 数据分析与统计

HPLC 的数据利用 Waters 2695 自带软件处理。所有数据处理均利用 SPSS16.0 进行, 每组试验最少重复 3 次, 结果呈现为“平均值  $\pm$  标准差”, 用  $t$  检验分析比较每组的差异性,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Caco-2 细胞单层的形态学观察

在倒置显微镜下, Caco-2 细胞呈现出不规则形态, 形状扁平, 放大 40 倍可见细胞整齐且均匀排列。放大 200 倍, 可见细胞生长势好、边缘清晰、结构均一。生长 5 d 后, 能达到 80% 以上融合, 呈“铺路石”状紧密排列的单层结构, 单个细胞形状扁平、呈多角形 (图 1)。

### 2.2 Caco-2 细胞单层模型的紧密性与完整性

从电阻值的大小可判断出细胞模型的紧实程度与完整程度<sup>[6]</sup>。Transwell 6 孔培养板中 Caco-2 细胞模型的电阻值在 21 d 培养时间内不断增大。电阻在前 8 d 急速增加, 这是由于细胞在这期间快速分裂导致, 此时细胞也开始出现小肠上皮细胞的特有结构。16 d 开始电阻值增长变慢逐渐平稳, 表明此时 Caco-2 细胞单层膜已基本分化完成, 在后续的培养时间里细胞膜越来越密实 (图 2)。

细胞的来源、传代的次数、培养的条件、实验操作人员和环境等均会对 Caco-2 细胞单层膜的电阻值造成影响, 通常情况下电阻参考值在  $200 \sim$

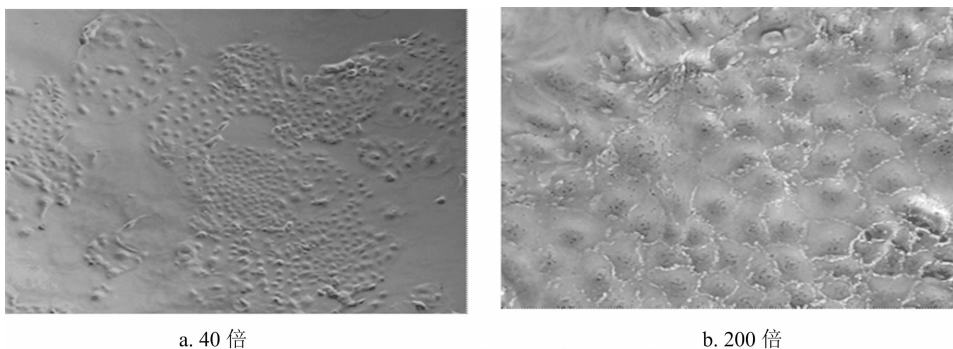


图1 Caco-2 细胞不同倍数下的形态

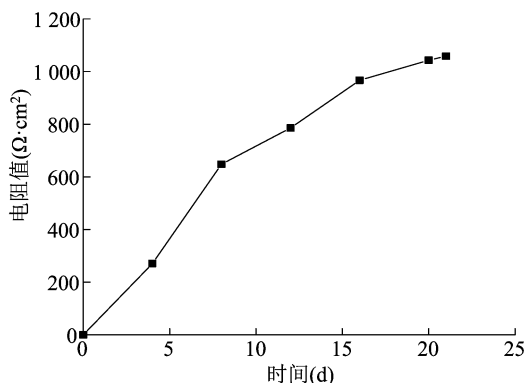
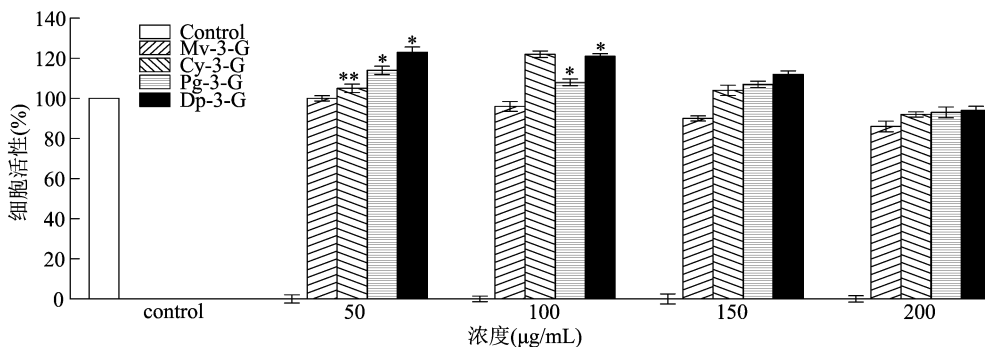


图2 Caco-2 细胞模型的电阻值随时间的变化曲线

1 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  间<sup>[6]</sup>, 本研究中细胞模型的 TEER 值达到 1 058  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , 说明形成的 Caco-2 细胞单层模型符合后期转运试验要求。

### 2.3 荧光黄通透性

本研究测定的荧光黄标准曲线为  $y = 0.0735x + 0.0047$ ,  $r^2 = 0.9994$ 。按照公式计算得到在 0 ~ 120 min Caco-2 细胞膜的表现渗透系数 ( $P_{\text{app}}$  值)



\*为与正常组对比差异显著  $P < 0.05$ , \*\*为与正常组对比差异极显著  $P < 0.01$

图3 4 种花色苷在不同浓度下对 Caco-2 细胞活性的影响

### 2.5 时间对花色苷吸收率的影响

由图 4 可知, 以 Cy-3-G 为例, 在 180 min 内吸收率逐渐增加, 趋于线性。考虑到在没有培养基条件下, 细胞活性本身就会随时间减弱, 花色苷在

均在  $(0.26 \sim 0.69) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  间, 符合常规要求的  $(0.1 \sim 0.7) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  范围<sup>[14]</sup>, 说明 Caco-2 细胞培养 21 d 后, 能够形成完整紧密连接的单层细胞, 进一步验证了所建立的细胞模型满足后期转运试验要求。

### 2.4 细胞毒性

在 0 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$  范围内, 4 种花色苷对 Caco-2 细胞活性的影响见图 3。在 0 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内, Mv-3-G 无显著影响 ( $P > 0.05$ )。Cy-3-G 浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时, 有极显著的促进作用 ( $P < 0.01$ ), 但随着浓度的不断升高, Cy-3-G 对细胞无显著影响 ( $P > 0.05$ )。当浓度等于或低于 100  $\mu\text{g/mL}$  时, Pg-3-G 和 Dp-3-G 有显著促进作用 ( $P < 0.05$ ); 当浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时, 2 种花色苷对细胞活性无显著影响 ( $P > 0.05$ )。综上, 在 0 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内, 任一浓度都可用于转运试验。为检测方便和准确, 本研究以 200  $\mu\text{g/mL}$  的花色苷进行后续研究。

37  $^{\circ}\text{C}$  下会随着时间延长而发生降解。为确保吸收研究的可信度, 所以将转运时间定为 150 min。

### 2.6 4 种花色苷的吸收率

4 种花色苷在 Caco-2 细胞模型中的双向转运

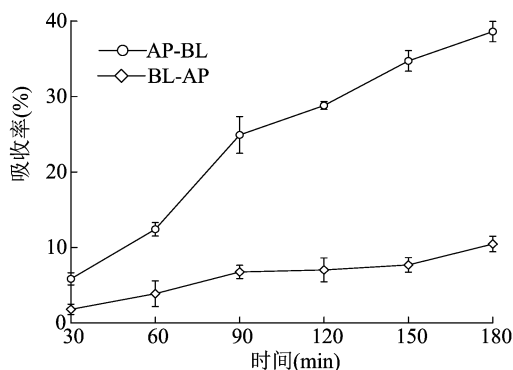
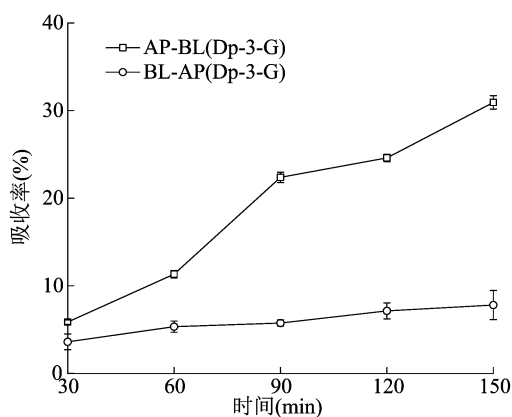
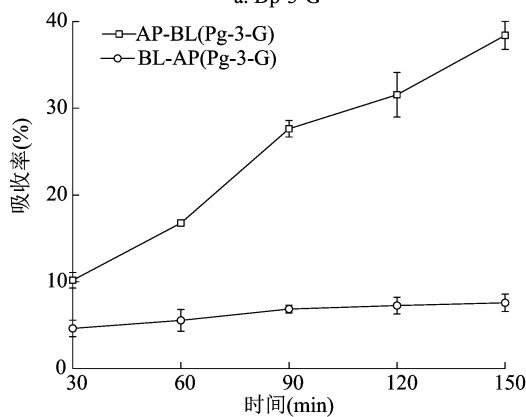


图4 时间对吸收率的影响

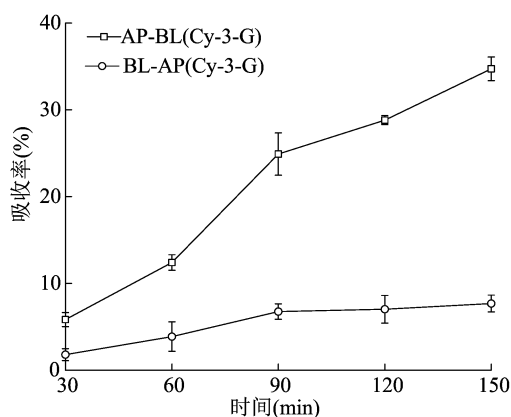
情况见图 5、图 6。由图 5、图 6 可知,4 种花色苷能以完整的形式被 Caco-2 细胞迅速吸收。由图 6 可知,相同浓度下 4 种不同苷元结构的花色苷在



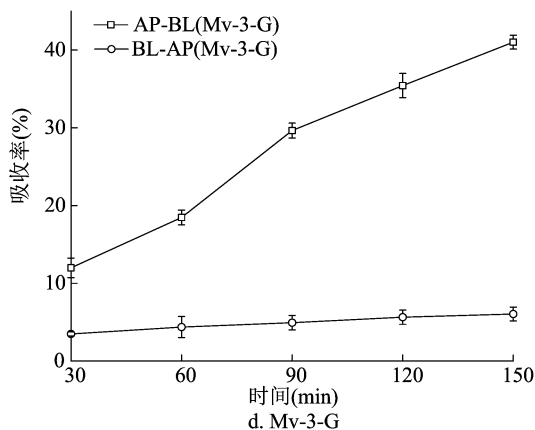
a. Dp-3-G



c. Pg-3-G



b. Cy-3-G



d. Mv-3-G

图5 4 种花色苷随时间转运率的变化

结果表明,在 150 min 内,200  $\mu\text{g/mL}$  的 Dp-3-G、Cy-3-G、Pg-3-G、Mv-3-G 从 AP 侧到 BL 侧和从 BL 侧到 AP 侧的转运量均随着时间的延长而呈线性增长。Dp-3-G、Cy-3-G、Pg-3-G 和 Mv-3-G 从 BL 侧到 AP 侧的外排率分别为 7.81%、7.68%、7.58% 和 6.04%。Dp-3-G 与其

Caco-2 细胞层从 AP-BL 侧的吸收率随时间延长而增加,吸收率: Mv-3-G > Pg-3-G > Cy-3-G > Dp-3-G。150 min 内 4 种花色苷吸收率分别为 Mv-3-G (41.01%)、Pg-3-G (38.39%)、Cy-3-G (34.73%) 和 Dp-3-G (30.93%)。4 种花色苷之间吸收差异显著 ( $P < 0.05$ )。由苷元结构分析,羟基数目越多,花色苷吸收率越低,4 种花色苷苷元结构中羟基数目: Dp (6 个)、Cy (5 个)、Pg (4 个)、Mv (4 个)。此外, Dp 没有  $\text{OCH}_3$  基团, Mv 有 2 个  $\text{OCH}_3$  基团。花色苷在 Caco-2 的吸收与它们的分子结构、本身所带羟基数量以及分子量等都有较大关系<sup>[7]</sup>。试验结果进一步证明了苷元结构,特别是亲水和疏水基团,对花色苷的生物利用度有重要影响。

他 3 种花色苷的外排率相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), Cy-3-G、Pg-3-G 和 Mv-3-G 之间无明显差异。

对于花色苷吸收机制研究认为,花色苷结构中含有葡萄糖,其肠吸收机制可能与葡萄糖吸收相似,可能共用相同的载体。最新分子模拟研究报道

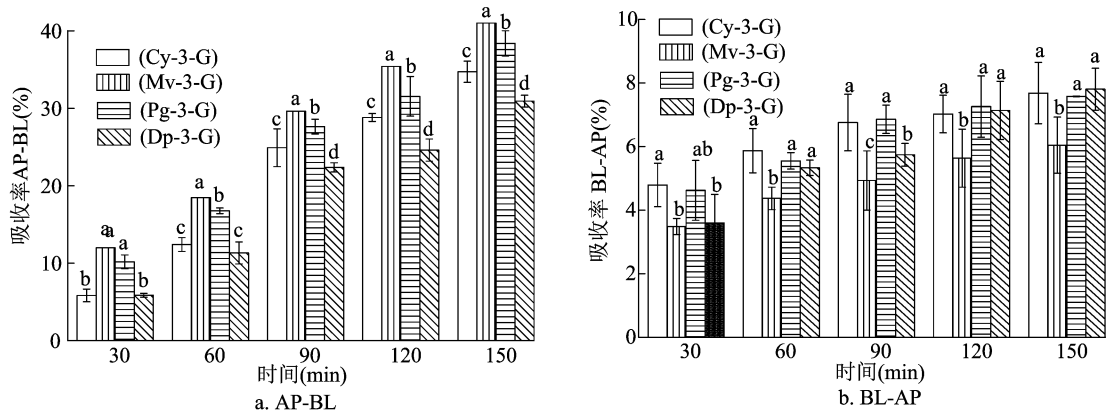


图6 4 种花色苷吸收率随时间的变化

葡萄糖在钠葡萄糖共转运载体(SGLT1)结构中由羟基与 N78、H83、E102、K321、Q457、Y290 和 W291 配位,并通过疏水残基(L84、F98 和 F453)和内部溶液(部分由 Y290)接触<sup>[6]</sup>。根据分子模拟发现,葡萄糖与人源葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)蛋白分子结合,结合能  $\Delta G$  为  $-6.6$  kcal/mol。但花色苷与 GLUT1 的结合能低于葡萄糖与 GLUT1 的结合能<sup>[15]</sup>,可能与花色苷 B 环上的疏水/亲水基团或花色苷的空间位阻有关。Cy-3-G 和 Dp-3-G 分子与 SGLT1 受体的相互作用比 Mv-3-G 更强,其原因可能是前 2 个花色苷中存在大量的羟基,可以与受体周质侧的氨基酸产生氢键相互作用。半缩酮形式的对接溶液都能通过葡萄糖或 B 环结合到 GLUT1 的周质侧,表明这 2 个单元在花色苷的入口中均起关键作用。氢键发生在花色苷的羟基和 glu380、asn317、asn411、asn415、tyr292 和 thr30 残基的侧链之间。已经证实了花色苷环与人肠细胞的 GLUT1 蛋白(phe379、trp412、trp388、phe72、phe291、his160)周质侧的大量芳香残基之间存在许多疏水作用( $\pi-\pi$  相互作用的叠加效应)<sup>[13]</sup>。所有这些相互作用强烈地促进了花色苷和人肠细胞的 GLUT1 之间形成的复合物的高稳定性。glu380 可通过最短的氢键与所有花色苷相互作用,并且在分子对接模拟期间具有很高的占用时间,表明这种残基在花色苷转运中起着关键作用<sup>[15]</sup>。

2.7 花色苷的表观渗透系数

Caco-2 细胞模型  $P_{app}$  值越大,其通透率越高。若药物可以完全吸收,则它的渗透系数比较大( $P_{app} > 1 \times 10^{-4}$  cm/s),如若吸收不完全则渗透系数较低( $P_{app} < 1 \times 10^{-7}$  cm/s)<sup>[13]</sup>。

由表 2 可知,4 种花色苷从 AP 侧到 BL 侧的吸收渗透系数(PAB)均较小,其中, Mv-3-G( $8.784 \times 10^{-8}$  cm/s) > Pg-3-G( $8.221 \times 10^{-8}$  cm/s) > Cy-3-G( $7.436 \times 10^{-8}$  cm/s) > Dp-3-G( $6.621 \times 10^{-8}$  cm/s),表明 B 环上 2 个甲氧基的花色苷(Mv-3-G)吸收要大于 B 环上 2 个 H 的花色苷(Pg-3-G),且大于 B 环上含羟基的花色苷(Cy-3-G、Dp-3-G)。结构上的差异可能会导致花色苷与转运载体间的相互作用发生变化,导致其转运途径和速率产生差异。4 种花色苷从 BL 侧到 AP 侧的渗透系数即分泌渗透系数(PBA)大于吸收渗透系数,外排比(PBA/PAB)依次为 Mv-3-G(0.682)、Pg-3-G(0.914)、Cy-3-G(1.024)和 Dp-3-G(1.168)。

$$P_{app} = \left( \frac{dQ}{dt} \right) / (S \times C) \quad (5)$$

式中: $\frac{dQ}{dt}$ 为接收池药物出现的速率;S 表示膜面积( $4.67 \text{ cm}^2$ );C 表示药物的初始质量浓度。

表 2 4 种花色苷的表观渗透系数与外排比率

化合物	吸收渗透系数 PAB( $\times 10^{-8}$ cm/s)	分泌渗透系数 PBA( $\times 10^{-8}$ cm/s)	外排比率 PBA/PAB
Dp-3-G	6.621 ± 0.039	7.738 ± 0.194	1.168
Cy-3-G	7.436 ± 0.020	7.615 ± 0.190	1.024
Pg-3-G	8.221 ± 0.003	7.513 ± 0.105	0.914
Mv-3-G	8.784 ± 0.009	5.99 ± 0.071	0.682

以上结果表明,4 种花色苷的吸收渗透系数均不大( $P_{app} < 1 \times 10^{-7}$  cm/s),说明吸收转运效率较差,这可能是它们生物利用度不高的原因之一。若组分是经过小肠顶侧膜内的转运蛋白转运或外排的,则体现为从 BL 到 AP 侧的  $P_{app}$  则会显著高于从 AP 到 BL 侧的<sup>[16]</sup>。本研究表明,4 种花色苷的分泌渗透系数是吸收渗透系数的 1 倍左右,因此显示这 4 种花色苷在吸收过程中存在肠道转运蛋白的外排现象,这也可能是导致其生物利用度不高的另一个因素。

根据 PBA/PAB 比值与 1 的大小关系推测出花色苷在小肠吸收中的转运方式<sup>[17]</sup>。由表 2 可知,Dp-3-G 和 Cy-3-G PBA/PAB 均大于 1,表明这 2 种花色苷在 Caco-2 单层细胞 AP 侧的转运为主动转运。Pg-3-G 和 Mv-3-G PBA/PAB 小于 1,表明二者在 Caco-2 单层细胞 AP 侧的转运主要是被动转运。因此,转运方式的不同也可能是导致了其吸收效率存在差异的重要原因。

### 3 结论

在 200  $\mu\text{g/mL}$  浓度下,4 种不同苷元结构的花色苷在 Caco-2 细胞层模型中从 AP-BL 侧的吸收率随时间的增加而增加,吸收率表现为  $Mv-3-G > Pg-3-G > Cy-3-G > Dp-3-G$ 。4 种花色苷的吸收表现渗透系数均不高( $P_{app} < 1 \times 10^{-7}$  cm/s),还存在外排现象,双向转运均对时间有显著依赖性,且主动和被动运输共存。Dp-3-G 和 Cy-3-G 这 2 种花色苷在 Caco-2 细胞单层 AP 侧上转运时主要是主动转运机制,而 Pg-3-G 和 Mv-3-G 在 Caco-2 细胞单层 AP 侧上转运时主要是被动转运机制。花色苷 B 环结构中的甲氧基和羟基的差异可能是导致其转运吸收差异的根本原因,但还需进一步研究。另外对于花色苷的肠细胞运载体还需进一步深入研究。

### 参考文献:

[1] Pojer E, Mattivi F, Johnson D, et al. The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2013, 12(5): 483 - 508.

[2] Prior R L, Wu X L. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities [J]. Free Radical Research, 2006, 40(10): 1014 - 1028.

[3] 王继萍, 柏广新, 李劲然, 等. 溶剂萃取法提取蓝莓中花色苷[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1952 - 1953.

[4] Mazza G, Velioglu Y S. Anthocyanins and other phenolic compounds in fruits of red - flesh apples [J]. Food Chemistry, 1992, 43(2): 113 - 117.

[5] Yee S. *In vitro* permeability across Caco - 2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man: fact or myth [J]. Pharmaceutical Research, 1997, 14(6): 763 - 766.

[6] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco - 2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1996, 22(1/2): 67 - 84.

[7] Yu Y X, Wang M M, Zhang K Q, et al. The transepithelial transport mechanism of polybrominated diphenyl ethers in human intestine determined using a Caco - 2 cell monolayer [J]. Environmental Research, 2017, 154: 93 - 100.

[8] Zhao L, Wang X, Zhang X L, et al. Purification and identification of anti - inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (*Cervus elaphus* Linnaeus) [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 24(2): 376 - 384.

[9] 丁 龙. 蛋清肽结构鉴定与完整吸收的构效关系研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018: 21 - 38.

[10] 祝 倩. 利用 Caco-2 细胞研究乳源 ACE 抑制肽的小肠转运机制[D]. 南京: 南京师范大学, 2014: 14 - 19.

[11] 毛小琴, 贾雄飞. Caco-2 细胞单层模型的建立和评估[J]. 四川医学, 2013, 34(1): 7 - 10.

[12] Lakowicz J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. 2nd ed. New York: Springer, 2006.

[13] 沈玲玲. 超声预处理对植物蛋白生物利用度的影响及其机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019: 21 - 27.

[14] Chen J, Lin H M, Hu M. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco - 2 model [J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2005, 55(2): 159 - 169.

[15] Oliveira H, Fernandes I, Brás N F, et al. Experimental and theoretical data on the mechanism by which red wine anthocyanins are transported through a human MKN - 28 gastric cell model [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(35): 7685 - 7692.

[16] Cermak R, Landgraf S, Wolfram S. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush - border - membrane vesicles of porcine jejunum [J]. The British Journal of Nutrition, 2004, 91(6): 849 - 855.

[17] 高 坤, 孙 进, 何仲贵. Caco-2 细胞模型在口服药物吸收研究中的应用[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(6): 469 - 474.