

# Caco-2 细胞模型用于毒害污染物转运与吸收研究\*

王德庆<sup>1</sup> 余应新<sup>1</sup> 钟玉芳<sup>1</sup> 吴明红<sup>1\*\*</sup> 盛国英<sup>1 2</sup> 傅家谟<sup>1 2</sup>

(1. 上海大学环境与化学工程学院环境污染与健康研究所 上海 200444; 2. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室 广东省环境资源利用与保护重点实验室 广州 510640)

**摘 要** Caco-2 细胞来源于人类结肠癌细胞,其单层细胞模型常用于体外模拟肠道上皮细胞转运与吸收外源性物质的研究,并被广泛地应用于毒理学研究等方面。本文简要介绍了 Caco-2 单层细胞模型的培养、细胞特性及常用功能指标;详细综述了环境毒害污染物在 Caco-2 细胞中转运与吸收机制以及污染物细胞毒性对其转运与吸收的影响,并对 Caco-2 单层细胞模型在环境毒害污染物的人体健康风险评估中的应用进行了展望。

**关键词** Caco-2 细胞 体外实验 转运与吸收 毒害污染物 生物利用度 环境风险评估

中图分类号: X131; X503.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2010)04-0740-08

## Application of Caco-2 Cell Model to Transportation and Absorption of Toxic Substances

Wang Deqing<sup>1</sup> Yu Yingxin<sup>1</sup> Zhong Yufang<sup>1</sup> Wu Minghong<sup>1\*\*</sup> Sheng Guoying<sup>1 2</sup> Fu Jiamo<sup>1 2</sup>

(1. Institute of Environmental Pollution and Health, School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangdong Key Laboratory of Environmental Resources Utilization and Protection, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract** The Caco-2 cell monolayer, isolated from human colon carcinoma, has been widely used in toxicology study and used as a tool to study the intestinal uptake and transport processes of xenobiotic. We introduces the culture conditions, the basic characteristics and functional parameters of Caco-2 cell monolayer model in brief. The paper also discussed the application of Caco-2 cell monolayer model in studying the mechanism of intestinal transportation and absorption of environmental toxic substances and toxic effects of these substances on their intestinal transportation and absorption in detail. In addition, the application of Caco-2 cells in human health risk assessment for environmental toxic substances is prospected.

**Key words** Caco-2 cells; in vitro test; transportation and absorption; toxic substances; bioavailability; environmental risk assessment

### Contents

1 Introduction

2 Caco-2 cell monolayer model

3 Transportation and absorption of environmental toxic substances

3.1 Transportation and absorption of heavy metals

3.2 Transportation and absorption of organic

收稿: 2009 年 5 月, 收修改稿: 2009 年 7 月

\* 国家自然科学基金重点项目 (No. 40830744)、国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 20807026) 和上海市重点学科项目 (No. S30109) 资助

\*\* Corresponding author e-mail: mhwu@shu.edu.cn

pollutants

#### 4 Perspectives

### 1 引言

人类细胞培养系统作为肠屏障功能研究的体外模型,是研究物质透过小肠黏膜的机制与影响因素的有效方法。它可采用人体或与人体最接近的生物材料,从而消除动物模型和人体的巨大差异,有高通量、节省时间、节省资金等多方面的优点。近十几年来,国内外普遍采用组织细胞模型作为外源性物质在人体肠道吸收研究的工具,包括MDR1-MDCK细胞模型、MDCK细胞模型及ECV304细胞模型,尤其是Caco-2细胞(human colon adenocarcinoma cell lines)单层模型,因其形态学、标志酶的表达及渗透特性与人体小肠类似,广泛用于药物和营养物质在小肠内的摄取、转运和代谢研究<sup>[1]</sup>。近年来,该模型被越来越多地引入到环境污染物的转运、摄取和代谢等机制的研究中。这些环境污染物(主要包括重金属及有机污染物)多具有致癌、致畸、致突变效应和遗传毒性,还可能干扰、抑制或破坏生物体的神经、免疫及内分泌系统。本文着重就这方面的进展进行详细论述,并对Caco-2细胞模型在污染物人体健康风险评估方面的应用进行展望。

### 2 Caco-2 单层细胞模型

Caco-2细胞系于20世纪70年代首次分离自人类结肠癌细胞,在一定条件下培养时,能产生细胞极性,形成刷状缘,分化出绒毛面顶侧(apical, AP)和基底侧(basolateral, BL),形成类似小肠上皮细胞,如图1所示。在肠腔侧分化出的绒毛面含有典型的小肠微绒毛水解酶(如蔗糖酶、6- $\alpha$ -葡糖苷酶、乳糖酶、氨基肽酶N和蛋白酶CIV等)和各种营养物质转运载体(如P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药蛋白(MRP)、二价金属离子转运载体等)。由于与人体小肠上皮细胞在形态和功能上十分相似,Hidalgo等<sup>[2]</sup>在1989年提出Caco-2单层细胞模型并用于研究小肠的吸收特性。

Caco-2细胞基本培养条件与其他肿瘤细胞类似,培养至对数生长期时消化并接种在0.25—6.0  $\mu\text{m}$ 孔径的Transwells聚碳酸酯膜上,接种密度为 $1 \times 10^4$ — $1 \times 10^5$ 个细胞/ $\text{cm}^2$ ,如图2所示。培养过程中向AP(相当于肠腔侧)和BL(相当于浆膜侧)小室分别加入一定量的培养液,每两天换液1次,一般在接种15—24 d后使用;也可采用较高密度以4

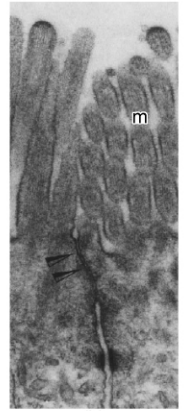
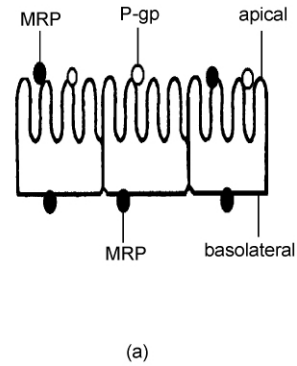


图1 (a) Caco-2细胞单层示意图;(b)具有微绒毛(m)和紧密连接(箭头)结构的2个Caco-2细胞顶侧的透射电镜图<sup>[3]</sup>

Fig. 1 (a) Scheme for the Caco-2 cell monolayers; (b) Transmission electron micrograph of the apical part of two Caco-2 cells with microvilli (m) and a tight junction (arrowheads)<sup>[3]</sup>

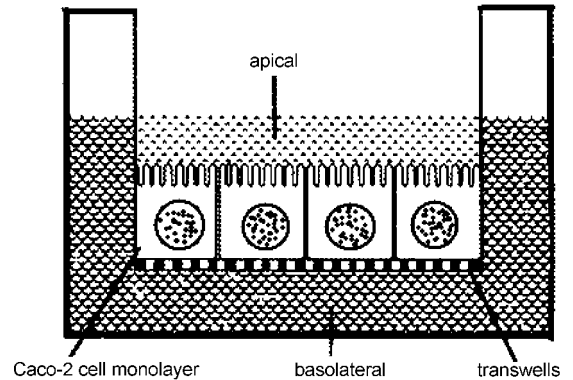


图2 Caco-2细胞单层培养模型

Fig. 2 The model of Caco-2 cell monolayers

$\times 10^4$ — $5 \times 10^5$ 个细胞/ $\text{cm}^2$ 接种,14—17 d后使用。

为了确定Caco-2细胞单层是否建立,通常采用以下5个指标验证其完整性:(1)用电子显微镜或光学倒置显微镜进行形态学上的检查,要求细胞生长均匀,边界清晰,具有紧密的细胞单层特性;(2)测定碱性磷酸酶的活性,以确定细胞极性的生成,要求它主要集中于AP侧;(3)跨膜电阻(trans epithelium electrical resistance, TEER)的测定以确定细胞单层的完整性和紧密性;(4)通透性的测定,通常用普萘洛尔、甘露醇、荧光黄、菊粉、聚乙二醇4000等标记物检测其被动扩散跨膜通量;(5)用辣根过氧化物酶测定其胞饮功能。目前已有商品化的跨膜电阻测定系统,仪器的使用和维护方便,测

定方法简单,已经成为一种常规检测细胞单层生长状况的指标。其他方法由于过于复杂,使用较少,可作为辅助检测手段。一般在细胞单层培养的过程中,实验前、实验中和实验后均需检测 TEER 值,及时观察细胞单层的生长情况和完整性,以确保用于实验的细胞单层在通透性方面的一致性,排除由于各细胞单层间通透性较大的差异对实验结果的影响。

在 Caco-2 细胞模型用于吸收转运研究中,通常是取培养合格的 Caco-2 细胞单层插件来进行,在细胞单层 AP(或 BL)侧的培养液中加入适量用 Hanks 缓冲液溶解的待测物,另一侧加空白 Hanks 溶液,培养过程中定时从 BL(或 AP)侧培养液中取样,分析待测物含量(转运量)或破碎细胞测定细胞中待测物含量(摄取量),这两个量的总和为物质的吸收量,以此来测定物质在 Caco-2 细胞中的摄取和转运。通过测定细胞两侧不同方向转运速率及检测加入转运蛋白抑制剂后表观通透系数( $P_{app}$ )的变化来确定物质的转运机制。

### 3 环境污染物的转运与吸收

Caco-2 细胞模型研究环境污染物在特定环境介质和不同暴露场景下的吸收转运所涉及的污染物包括镉、汞、铅、铜、锌、铬、砷等重金属盐及其相关络合物和多环芳烃(PAHs)、多氯联苯(PCBs)、二噁啉(如 TCDD)、农药等有机污染物。下面就这些污染物在 Caco-2 细胞的转运与吸收及其影响转运与吸收的毒理机制进行详细论述。

#### 3.1 重金属的转运与吸收

##### 3.1.1 镉

目前对镉的转运与吸收研究比较广泛,镉在 Caco-2 细胞系主要通过主动运输进行跨细胞转运(transcellular transport)<sup>[4]</sup>,细胞内镉结合位点的饱和限制了镉的进一步转运<sup>[5,6]</sup>。对于镉的细胞摄取存在特定饱和机制,可敏感地被汞所抑制<sup>[7]</sup>。氯化镉、谷胱甘肽镉和植物螯合物镉等不同形态的镉在 Caco-2 细胞中的摄取率也不相同,镉离子不是细胞摄取镉的唯一形式,但  $Cd^{2+}$  在转运方面占有较大比例;另外,与无机金属镉的转运不同,和巯基肽结合的镉通过不同的转运系统进入细胞<sup>[8]</sup>。污染物进入细胞首先要克服肠屏障效应,Caco-2 细胞 AP 侧是有毒物质进入的主要屏障,因此在毒性表现上,BL 侧暴露的细胞毒性大于 AP 侧暴露的细胞毒性,且不同金属暴露的毒性大小不同<sup>[9]</sup>。镉的毒性主

要是造成 Caco-2 细胞间紧密连接(tight junction)功能改变和细胞单层通透性增加,使得肠道上皮细胞的屏障功能下降,导致不可逆的 TEER 值下降<sup>[10]</sup>。Caco-2 细胞经长时间低浓度镉预处理,可明显诱导细胞中金属硫蛋白的表达,促进镉的摄取<sup>[4]</sup>。镉的细胞毒性还表现在可以增强其他有毒物质的毒性作用,如同时用软海绵酸(OA)和镉或铬处理后的 Caco-2 细胞存活率由 OA 单独处理后的 60% 及铬或镉单独处理后的 85% 降低到 40%<sup>[11]</sup>。此外,镉的毒性还表现在增加 P-gp 的表达,进而对细胞的通透性和转运特性产生影响<sup>[12]</sup>。

##### 3.1.2 铬

铬在 Caco-2 细胞的转运机制主要是被动扩散<sup>[13]</sup>。Caco-2 细胞对纳米铬、氯化铬和吡啶羧酸铬的摄取和转运量随浓度、时间呈线性增加,当培养温度下降时,纳米铬的摄取有下降趋势。纳米铬、氯化铬和吡啶羧酸铬从 AP 侧到 BL 侧的  $P_{app}$  值近似于 BL 侧到 AP 侧。相对于常规氯化铬和吡啶羧酸铬,纳米铬具有更高的吸收率<sup>[14]</sup>。铁可显著降低吡啶羧酸铬和三氯化铬在 Caco-2 细胞中的转运量,而铜和锌不会对它们的转运量产生显著影响;维生素 C、蔗糖、草酸钠、乙二胺四乙酸和柠檬酸钠对吡啶羧酸铬的转运量没有显著影响,但维生素 C 和草酸钠可显著增加三氯化铬在 Caco-2 细胞中的转运量,蔗糖则可显著降低三氯化铬的转运量。相对于吡啶羧酸铬,三氯化铬在吸收时更容易受到各种因素的影响<sup>[15]</sup>。铬对 Caco-2 细胞毒性及对 Caco-2 细胞转运特性影响的研究尚未见报道。

##### 3.1.3 砷

砷是非金属元素,具有金属的性质,砷及其化合物广泛存在于环境中,对人体具有剧毒,因此一般把它和镉、铅、汞等有毒重金属归为一类。Laparra 等<sup>[16]</sup>对砷在 Caco-2 细胞中的迁移、转运及毒理学方面做了大量研究。Caco-2 细胞经砷暴露后诱导 GSH 合成,且随着砷浓度的增加,AP 到 BL 侧渗透率逐渐减小,说明在 Caco-2 细胞中存在一个协调转运机制。随后研究发现砷只有在较高浓度时( $As(III):156.0 \mu M; As(V):170.6 \mu M$ )才会产生细胞毒性, $As(III)$  主要是改变细胞紧密连接的渗透性,而  $As(V)$  主要是造成细胞呼吸链的解偶联<sup>[17]</sup>。

食品中砷的吸收与砷的赋存形态及食品加工方式等有关。在砷地方病区域,烹饪后大米中无机砷的含量显著增加,经体外模拟肠胃消化后无机砷的释放率达到 63%—99%,且主要为  $As(V)$ <sup>[18]</sup>。经

4 h 暴露后 Caco-2 细胞内无机砷吸收率达到 (3.9%—17.8%);且不同价态的砷的摄取和转运率也不相同,As(III)相对于 As(V)更易于被 Caco-2 细胞摄取和转运<sup>[17]</sup>。对有机砷的摄取和转运研究也表明不同有机砷物质其转运效率也不相同,如海产品中砷甜菜碱(AB)的转运效率只有 1.7%,而四甲基砷离子(TETRA)的转运效率达到 15.5%<sup>[19]</sup>。

### 3.1.4 微量重金属元素

重金属中锰、铜、锌等是生命活动所需要的微量元素,但过度摄入会对人体有毒性作用。Caco-2 细胞单层 AP 侧对锌的摄取是一个饱和过程,但在高浓度时存在扩散现象,细胞单层 AP 侧对锌的摄取不受代谢抑制体或锌配体的影响;但细胞单层 BL 侧对锌的摄取呈浓度依赖型,且能被乌本苷和钒酸盐部分抑制;锌从细胞单层 AP 侧或 BL 侧进行跨细胞转运呈浓度依赖型,不受代谢抑制体的影响。Caco-2 细胞单层 AP 侧和 BL 侧对锌的转运吸收机制不同,且锌从 BL 侧的转运速率比从 AP 侧大 2 倍<sup>[20,21]</sup>。Caco-2 细胞对锰的摄取和转运在细胞单层 AP 侧和 BL 侧也存在不同的机制<sup>[22]</sup>,AP 侧对锰的摄取率低于 BL 侧,AP 侧对锰的摄取及 AP 侧到 BL 侧的转运呈显著浓度依赖型,但 BL 侧对锰的摄取及 BL 侧到 AP 侧的转运呈饱和型,与锌恰好相反<sup>[23]</sup>。在培养基中加入镍、铜及钙离子可显著抑制锰的转运,但加入锰离子则可以增加锰的转运。AP 侧到 BL 侧的转运相对不受温度、配体或竞争离子的影响,但会降低 BL 侧到 AP 侧的转运,当细胞单层两侧加入等量的锰时,细胞倾向于将锰移向 AP 侧,从而产生从 AP 侧到 BL 侧的浓度梯度。Caco-2 细胞 AP 侧对铜的摄取呈饱和型,AP 侧到 BL 侧的转运呈浓度依赖型。Caco-2 细胞内较低的铜浓度有利于外源铜 AP 侧到 BL 侧的跨细胞转运,高的细胞内铜浓度会降低外源铜 AP 侧到 BL 侧的跨细胞转运<sup>[24]</sup>。金属元素间的相互干扰也会影响金属元素的摄取和转运。Caco-2 细胞中原有铜的含量可降低铜的摄取<sup>[25]</sup>。Caco-2 细胞培养后期培养基中补充铜可增加细胞 AP 侧和 BL 侧铁转运相关载体的表达,从而增加对铁的摄取和转运<sup>[26]</sup>。铁的含量与锌的转运量呈负相关而与铜摄取量呈正相关<sup>[27]</sup>。Caco-2 细胞经镉(0—10 $\mu$ M)5 周培养后,细胞对镉、铜及锌的聚集能力显著增强。在镉、锌、铜和锰之间的相互作用研究中发现,对于镉的吸收,锰的抑制作用最大,铜的抑制作用最小,在培养基中增加镉的

浓度会增加锌的吸收<sup>[28]</sup>。

近年来,许多学者利用 Caco-2 细胞模型对微量重金属元素在人体转运与吸收中所表现出的毒性,以及细胞毒性对转运与吸收的影响等方面开展了一系列研究,这些毒性主要表现在影响了 Caco-2 细胞内一些蛋白和酶的形成和表达以及细胞间渗透性的变化。铜可导致 Caco-2 细胞表面 P-gp 活性降低,使细胞对某些外源化学物的分泌减少,从而引起细胞内外源化学物的蓄积,造成细胞对毒物更为敏感<sup>[29]</sup>。铁和铜的毒性作用主要是对单分子层间连接渗透性造成影响,铁主要造成细胞单分子层中 F-肌动蛋白细胞骨架解体,而铜主要造成 F-肌动蛋白细胞骨架解聚,从而导致渗透性增强<sup>[30]</sup>。Caco-2 细胞培养 24h 后添加铜能够降低二价金属转运蛋白 1(DMT1)及其 mRNA 的表达水平,铜能够与铁竞争 DMT1 进行转运<sup>[31]</sup>;而锌则能够提高 DMT1 及其 mRNA 的表达水平,且能够促进铁的吸收<sup>[32]</sup>。一般认为经 Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Fe<sup>2+</sup>等二价阳离子处理的 Caco-2 细胞能够改变 DMT1 的 mRNA 表达水平,从而影响锰等二价金属的转运<sup>[22]</sup>。

### 3.1.5 其他重金属

除以上重金属外,其他重金属的研究相对较少。汞在 Caco-2 细胞的摄取是被动扩散过程<sup>[6]</sup>;对于汞的细胞毒性,研究发现随着 HgCl<sub>2</sub> 浓度的增加,培养 2 h 后 Caco-2 细胞的渗透率逐渐增大,跨膜电阻逐渐减小,对小肠上皮细胞具有遗传毒性和细胞毒性<sup>[33]</sup>。铅在 Caco-2 细胞吸收机制是细胞膜被动渗透运输和细胞间被动运输<sup>[34]</sup>。

## 3.2 有机污染物的转运与吸收

### 3.2.1 PCBs

Caco-2 细胞 AP 侧和 BL 侧对 PCBs 的摄取没有显著的区别,但从 AP 侧到 BL 侧的转运能力明显高于 BL 侧到 AP 侧。类脂物和脂蛋白的单向转运可同时影响 PCBs 的转运;脂肪酸可将 PCBs 在 Caco-2 细胞内的摄取和转运量增加大约 10 倍,且 Caco-2 细胞拥有代谢低氯联苯的能力<sup>[35]</sup>。利用 Caco-2 细胞模型对 PCBs 的吸收研究表明,在 PCBs 吸收过程中,主要通过胶束转运克服肠屏障;同时,细胞质分室也提供了 PCBs 转运的重要通道。PCBs 的疏水性越强越容易通过甘油三酯和脂蛋白被优先转运<sup>[36]</sup>。Caco-2 细胞对土壤基质中 PCBs 的摄取和转运呈明显的剂量依赖性关系,且受不同介质的影响,如 PCB153,介质为 DMEM-油酸时的吸收速率(63%)比介质为 DMEM-食糜时的吸收速率(70%)小,介质

为 DMEM-脂肪酸-胆汁的吸收速率(60%)最小<sup>[37]</sup>。PCBs 对 Caco-2 细胞毒性作用及对 Caco-2 细胞转运特性影响的研究目前尚未见报道。

### 3.2.2 PAHs

PAHs 中苯并[a]芘(BaP)的毒性最大,是强致癌物质,Caco-2 细胞对 BaP 的摄取量与浓度呈线性关系,且摄取是一个被动扩散过程<sup>[38]</sup>。BaP 与脱脂奶粉老化 6 个月,经体外模拟消化后 BaP 的生物有效性(bioaccessibility)显著减少,但老化过程并不影响 BaP 在 Caco-2 细胞内的吸收量;脱脂类食品的消化和吸收过程伴随着 BaP 的扩散吸收,且主要从 Caco-2 细胞 AP 侧向 BL 侧转运<sup>[39]</sup>。在污染物的选择渗透性和吸收率方面,肠内上皮细胞具有重要作用,如对 PAHs 中 BaP、芘(Pyr)和菲(Phe)的 Caco-2 细胞摄取和转运特性研究表明,经过 6 h 暴露后细胞对 Pyr 的摄取最快,对 Phe 的转运最快,转运速率分别是 Pyr 和 BaP 的 1.1 倍和 1.8 倍<sup>[40]</sup>。PAHs 的肠内代谢对 PAHs 转运具有一定的影响,Caco-2 细胞对 Phe、Pyr 和 BaP 暴露 6 h 后的代谢率分别为 45%、65% 和 96%,PAHs 的肠内代谢有利于 PAHs 的跨细胞转运,且亲脂性越强越有利于 PAHs 的转运<sup>[41]</sup>。

PAHs 对 Caco-2 细胞的毒性主要是影响细胞内一些蛋白和酶的产生及表达,从而对细胞的吸收过程产生影响。Caco-2 细胞经 BaP、蒽、苯并[k]荧蒽或二苯并[a,l]芘等 PAHs 处理后可诱导细胞色素 P4501A1(CYP1A1)的 mRNA、ABC 转运蛋白、多药耐药基因(MDR1) mRNA 等的表达,但不会影响环氧化物水解酶(mEH)、磺基转移酶(SULT)、多药耐药相关蛋白 2(MRP2) mRNA 的表达<sup>[42]</sup>。Caco-2 细胞经 BaP 暴露后,可诱导 P-gp 的表达,从而导致罗丹明 123(Rho-123)的  $P_{app}$  值增大,最终增加其外排转运<sup>[43]</sup>。Caco-2 细胞经苯并[e]芘(BeP)暴露后也可提高 MDR1 的 mRNA 和 P-gp 的表达,增加 Rho-123 的外排转运<sup>[44]</sup>。此外,PAHs 在细胞内可进行代谢,相应地对细胞的摄取和转运产生影响。BaP-1-硫酸盐和 BaP-3-硫酸盐是 BaP 的主要代谢产物,细胞通过主动运输方式将这两种极性产物从 BL 侧向 AP 侧外排,且经 CYP1A1/CYP1B1 代谢诱导后可增加 BL 侧向 AP 侧的转运,但 ABC 转运蛋白、P-gp、MRP1 及 MRP2 不影响代谢物的外排<sup>[45,46]</sup>。

### 3.2.3 TCDD

四氯二苯并-p-二噁啉(TCDD)主要来源为含氯物质焚烧以及氯酚/除草剂等化学品制造过程中的

副产品。该物质有亲脂性,难溶于水,在环境中很稳定,对生物有明显的蓄积作用,是迄今已知污染物中毒性最强的有机氯化物。目前对 TCDD 的摄取和转运研究相对较少。Caco-2 细胞经 TCDD 暴露 15 min 后,对 TCDD 的细胞摄取率为 6.1%,暴露 90 min 时摄取量趋于稳定,摄取率达到最大值 13%;暴露 15 min 和 90 min 后 AP 侧到 BL 侧跨细胞转运率分别为 0.3% 和 0.7%;随着暴露时间的增加转运量缓慢增加,但最大转运率不超过 1.5%<sup>[40]</sup>。另外,不同食品成分也会对 TCDD 的跨细胞转运产生影响。据报道,加入叶绿素和不溶性的玉米纤维可显著降低 TCDD 的跨细胞转运量,叶绿素浓度为 0.5% 和 0.1% (W/V) 时,TCDD 24 h 跨细胞转运率由加入前的 7% 分别降低到 5% 和 2%;不溶性的玉米纤维浓度为 0.5% 和 1% 时,TCDD 24 h 跨细胞转运率由加入前的 7% 分别降低到 3% 和 1%,但可溶性的玉米纤维不会影响 TCDD 的跨细胞转运。经过急速冻融处理的茶底(tea dregs)比没经过冻融处理的茶底能更有效抑制 TCDD 的跨细胞转运,原因是茶底经冻融处理后产生的孔隙结构可捕获 TCDD,从而减少了 AP 侧 TCDD 的浓度<sup>[47]</sup>。

### 3.2.4 农药及化学工业品

Caco-2 细胞经甲基对硫磷、敌敌畏、氧乐果、辛硫磷等有机磷农药处理,随着时间的延长,Caco-2 细胞 TEER 值逐渐降低,细胞通透性能增强<sup>[48]</sup>。有机磷农药二嗪农持续的暴露可增加细胞内 P-gp 的表达,导致二嗪农 BL 侧到 AP 侧方向转运率增大,AP 侧向 BL 侧方向转运率降低,P-gp 和二嗪农的转运密切相关<sup>[49]</sup>。在有机磷农药毒死蜱(CPF)自然环境本底浓度暴露条件下,Caco-2 细胞 TEER 值基本不变,但可以改变 Caco-2 细胞肠屏障的完整性,使得更易于吸收其他化学物质<sup>[50]</sup>。对于食物中兽药残留味喃唑酮,样品经过 0.5% 盐酸-链酶蛋白酶 E 消化,结果显示消化后游离的降解产物可被 Caco-2 细胞吸收,而结合状态的残留药物不能被转运<sup>[51]</sup>。在 4℃ 培养条件下,除草剂 2-甲-4-氯苯氧基乙酸(MCPA)在 Caco-2 细胞 AP 侧的吸收显著降低;但随着 pH 值的降低,MCPA 的吸收显著增强;加入代谢抑制剂可降低 MCPA 的吸收。MCPA 初始吸收动力学分析表明 MCPA 是通过载体调介过程吸收<sup>[52]</sup>。

以上这些研究表明,污染物在不引起明显细胞毒性的剂量下,就可引起 Caco-2 细胞间紧密连接功能改变和细胞单层通透性增加,使得肠道上皮细胞

的屏障功能下降,从而导致在正常情况下不能进入体内循环的污染物进入机体,引起毒性反应。因此,可以通过实时监测暴露过程中 TEER 值和对标志物通透性的改变,结合其他细胞毒性指标来综合反映环境污染物对肠道上皮细胞的影响。还可通过免疫荧光和荧光染色观察的方法来检查紧密连接相关蛋白和细胞微丝的改变,来直接反映污染物对紧密连接和细胞骨架的影响。Caco-2 细胞模型作为一种成熟的研究外源性物质经肠道摄取和吸收的体外模型,不仅为研究肠道对污染物转运机制和相互作用方面提供了一种可靠模型,还可提供污染物在不同介质中和模拟暴露场景下的生物利用度(bioavailability),为污染物经口暴露评价方面提供有用的信息。

#### 4 展望

虽然利用 Caco-2 细胞模型对环境污染物转运与吸收的研究取得了大量成果,但 Caco-2 细胞模型并非完美的上皮细胞模型。相关比较研究(与正常肠道)显示 Caco-2 细胞分泌的蛋白酶类以及多肽受体等与正常肠道存在差异,Caco-2 细胞形成的细胞间紧密连接限制了水溶性小分子物质的穿细胞间转运(paracellular transport),且 Caco-2 细胞上没有黏液层,而黏液层是吸收的主要障碍之一。为了能在体外很好地模拟体内生理条件,优化 Caco-2 细胞培养条件、通过不同类型肠道细胞共同培养和用生化诱导技术改善 Caco-2 细胞模型的性质以便更好地在体外预测人体内污染物吸收行为以及准确评价污染物吸收特性,仍然是今后研究发展最重要的领域之一。

通过食物链经口摄入是毒害污染物进入人体的主要途径之一,这些污染物经口腔、食道、胃、小肠、大肠被人体所消化、吸收、转化或排出体外。小肠是物质吸收的主要场所,为了评价环境污染物对人体造成损害的可能性及程度大小,可通过检测人体内污染物及其代谢产物的含量来进行健康风险评估。如采用尿样中 PAHs 的代谢产物——羟基多环芳烃作为标志物来综合评价 PAHs 通过食物链进入人体后的吸收情况<sup>[53]</sup>;利用尿液、血液、唾液、头发和指甲中砷化合物作为标志物来直接反映暴露主体的砷暴露程度等<sup>[54]</sup>,但这类研究往往受到样品采集的限制。此外,还可以通过外暴露进行人体健康风险评估<sup>[55]</sup>,生物利用度和生物有效性是两个最常用的评估因子。污染物的人体生物有效性评估目前应用比

较广泛的是胃肠模拟实验<sup>[56]</sup>,国内外已经有十余种不同的方法,成为污染物生物有效性测定并进行人体健康风险评估的重要手段之一。目前报道的污染物主要有铅<sup>[57-60]</sup>、砷<sup>[59,61-63]</sup>、镉<sup>[64]</sup>、汞<sup>[65]</sup>、多环芳烃(PAHs)<sup>[66-70]</sup>、二噁啉/呋喃(PCDD/Fs)<sup>[71]</sup>、多氯联苯(PCBs)<sup>[72,73]</sup>、石油烃(TPHs)<sup>[74]</sup>、有机氯农药(OCPs)<sup>[72,75-77]</sup>和多溴联苯醚(PBDEs)<sup>[78,79]</sup>等。但这些研究大多仅限于污染物在模拟胃肠内的消化释放,分析其生物有效性。虽然污染物的生物有效性与其生物利用度之间存在一定的相关性,但由于不同物质具有不同的物理化学特性,造成在小肠的吸收具有很大的差异性。生物利用度的测定一般通过动物或人体活体实验(in vivo)得到,因此生物利用度才能更准确表达毒害污染物进入人体内循环的程度,准确评估污染物对人体健康风险。然而活体实验周期长、费用高,且不同的动物之间、动物与人之间都存在或大或小的差异,这种种属间的差异使得动物实验数据不能完全地外推至人体,而直接利用人体组织进行研究是非常有限的,并带来伦理方面的问题。如果与胃肠模拟测定污染物的生物有效性研究结合,利用 Caco-2 细胞模型在污染物的转运与吸收方面的优点,研究污染物的人体生物利用度并进行其人体健康风险评估,必将得到更为科学的数据。目前国外已经开展了一些相关研究,如 Oomen 等<sup>[80]</sup>利用 Caco-2 细胞模型对土壤中铅的生物利用度进行了研究。目前,利用 Caco-2 细胞模型进行污染物人体健康风险评估的工作才刚刚起步,随着研究的深入及交叉学科的发展,此领域必将成为环境研究的热点之一。此外,目前的研究多针对单一因素,在现实环境中,通常是几种污染物同时存在、同时起作用,因此污染物之间形成的多种污染物复合污染及联合毒性对细胞转运影响方面的研究也将是今后研究的重点之一。随着 Caco-2 细胞模型的不完善,在评估环境污染物对人体健康风险方面将具有广阔的发展前景。

#### 参考文献

- [1] Sambruy Y, Ferruzza S, Ranaldi G, et al. Cell. Biol. Toxicol., 2001, 17: 301-317
- [2] Hidalgo I J, Raub T J, Borchardt R T. Gastroenterology, 1989, 96(3): 736-749
- [3] Artursson P, Palm K, Luthman K. Adv. Drug Deliv. Rev., 2001, 46: 27-43
- [4] Blais A, Lecoer S, Milhaud G, et al. Toxicol. Appl. Pharm., 1999, 160: 76-85

- [5] Jumarie C, Campbell P G, Houde M, et al. *J. Cell. Physiol.*, 1999, 180: 285—297
- [6] Jumarie C, Campbell P G, Berteloot A, et al. *J. Membrane Biol.*, 1997, 158: 31—48
- [7] Aduayom I, Campbell P G, Denizeau F, et al. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 2003, 189: 56—67
- [8] Jumarie C, Fortin C, Houde M, et al. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 2001, 170: 29—38
- [9] Rossi A, Poverini R, Lullo G D, et al. *Toxicol. in Vitro*, 1996, 10: 27—36
- [10] Duizer E, Gilde A J, Versantvoort C H, et al. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 1999, 155: 117—126
- [11] Soud-Mensi G, Moukha S, Maaroufi K, et al. *Environ. Toxicol.*, 2008, 23: 1—8
- [12] Huynh-Delerme C, Huet H, Noël L, et al. *Toxicol. in Vitro*, 2005, 19: 439—447
- [13] Zha L Y, Xu Z R, Wang M Q, et al. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 2008, 92: 131—140
- [14] 查龙应 (Zha L Y), 许梓荣 (Xu Z R), 王敏奇 (Wang M Q) 等. *细胞生物学杂志 (Chinese Journal of Cell Biology)*, 2007, 29: 77—80
- [15] 查龙应 (Zha L Y), 罗海吉 (Luo H J), 李万立 (Li W L). *细胞生物学杂志 (Chinese Journal of Cell Biology)*, 2008, 30: 401—405
- [16] Laparra J M, Velez D, Barbera R, et al. *Toxicol. in Vitro*, 2006, 20: 658—663
- [17] Laparra J M, Velez D, Barbera R, et al. *Toxicol. in Vitro*, 2005, 19: 1071—1078
- [18] Laparra J M, Velez D, Barbera R, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53: 8829—8833
- [19] Laparra J M, Velez D, Barbera R, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55: 5892—5897
- [20] Raffaniello R D, Lee S Y, Teichberg S, et al. *J. Cell. Physiol.*, 1992, 152: 356—361
- [21] Finley J W, Briske-Anderson M, Reeves P G, et al. *J. Nutr. Biochem.*, 1995, 6: 137—144
- [22] Leblondel G, Allain P. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1999, 67: 13—28
- [23] Finley J W, Monroe P. *J. Nutr. Biochem.*, 1997, 8: 92—101
- [24] Arredondo M, Uauy R, Gonzalez M. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1474: 169—176
- [25] Zerounian N R, Carmen R, Rashmi M, et al. *Am. J. Physiol.*, 2003, 284: G739—G747
- [26] Han O, Wessling-Resnick M. *Am. J. Physiol.*, 2002, 282: G527—G533
- [27] Camara F, Barbera R, Amaro M A, et al. *Food Chem.*, 2007, 100: 1085—1092
- [28] Noel L, Huynh-Delerme C, Guerin T, et al. *Biometals*, 2006, 19: 473—481
- [29] 刘志伟 (Liu Z W), 陈佳琳 (Chen J L), 陈秉衡 (Chen B H). *卫生研究 (Journal of Hygiene Research)*, 2004, 33: 284—287
- [30] Ferruzza S, Scacchi M, Scarino M L, et al. *Toxicol. in Vitro*, 2002, 16: 399—404
- [31] Tennant J, Stansfield M, Yamaji S, et al. *FEBS Lett.*, 2002, 527: 239—244
- [32] Yamaji S, Tennant J, Tandy S, et al. *FEBS Lett.*, 2001, 507: 137—141
- [33] Watzl B, Abrahamse S L, Treptow-van Lishaut S, et al. *Food Chem. Toxicol.*, 1999, 37: 627—637
- [34] Aduayom I, Jumarie C. *J. Biochem. Mol. Toxic.*, 2005, 19: 256—265
- [35] Dulfer W J, Groten J P, Govers H A J. *J. Lipid Res.*, 1996, 37: 950—961
- [36] Dulfer W, Govers H, Groten J. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1998, 17: 493—501
- [37] Oomen A G, Tolls J, Kruidenier M, et al. *Environ. Health Perspect.*, 2001, 109: 731—737
- [38] Vasiluk L, Pinto L J, Walji Z A, et al. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2007, 26: 387—393
- [39] Vasiluk L, Pinto L J, Tsang W S, et al. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 46: 610—618
- [40] Cavret S, Feidt C, Laurent F. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53: 2773—2777
- [41] Cavret S, Feidt C. *Environ. Res.*, 2005, 98: 22—32
- [42] Lampen A, Ebert B, Stumkat L, et al. *Gene Structure & Expression*, 2004, 1681: 38—46
- [43] Sugihara N, Toyama K, Michihara A, et al. *Toxicology*, 2006, 223: 156—165
- [44] Sugihara N, Toyama K, Okamoto T, et al. *Toxicol. in Vitro*, 2007, 21: 827—834
- [45] Buesen R, Mock M, Seidel A, et al. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 2002, 183: 168—178
- [46] Buesen R, Mock M, Nau H, et al. *Chem. Biol. Interact.*, 2003, 142: 201—221
- [47] Natsume Y, Satsu H, Hamada M, et al. *Cytotechnology*, 2005, 47: 79—88
- [48] 汝少国 (Ru S G), Isoda Hiroko, 郇欣 (Bing X). *环境科学研究 (Research of Environmental Sciences)*, 2003, 16: 47—50
- [49] Lecoer S, Videmann B, Mazallon M. *Toxicol. Lett.*, 2006, 161: 200—209
- [50] Tirelli V, Catone T, Turco L, et al. *Toxicol. in Vitro*, 2007, 21: 308—313
- [51] Klee S, Baumung I, Kluge K, et al. *Xenobiotica*, 1999, 29: 641—654
- [52] Kimura O, Tsukagoshi K, Endo T. *Toxicol. Appl. Pharma.*, 2008, 227: 325—330
- [53] 牛红云 (Niu H Y), 蔡亚岐 (Cai Y Q), 魏复盛 (Wei F S) 等. *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2006, 18 (10): 1381—1390
- [54] 陈保卫 (Chen B W), 那仁满都拉 (Naramandura Hua), 吕美玲 (Lv M L) 等. *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2009, 21 (2/3): 474—482
- [55] 秦涛 (Qin T), 赵立新 (Zhao L X), 徐晓白 (Xu X B). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 1997, 9 (1): 22—35

- [56] 张东平 (Zhang D P), 余应新 (Yu Y X), 张帆 (Zhang F) 等. 科学通报 (Chinese Science Bulletin), 2008, 53: 2537—2545
- [57] Ren H M, Wang J D, Zhang X L. China Environ. Pollut., 2006, 144: 327—335
- [58] Denys S, Tack K, Caboche J, et al. Chemosphere, 2009, 74: 711—716
- [59] 崔岩山 (Cui Y S), 陈晓晨 (Chen X C), 朱永官 (Zhu Y G). 农业环境科学学报 (Journal of Agro-Environment Science), 2008, 27: 414—419
- [60] Van de Wiele T R, Oomen A G, Wragg J, et al. J. Environ. Sci. Health A, 2007, 42: 1203—1211
- [61] Laird B D, van de Wiele T R, Corriveau M, et al. Environ. Sci. Technol., 2007, 41: 5542—5547
- [62] Ollson C A, Koch I, Smith P, et al. Environ. Toxicol. Chem., 2009, 28: 668—675
- [63] Wragg J, Cave M, Nathanail P. J. Environ. Sci. Health A, 2007, 42: 1303—1315
- [64] Wragg J, Cave M R. Technical Report, Environmental Agency, UK. 2002
- [65] Shim S M, Ferruzzi M G, Kim Y C, et al. Food Chem., 2009, 112: 46—50
- [66] Gron C, Oomen A G, Weyand E, et al. J. Environ. Sci. Health A, 2007, 42: 1233—1239
- [67] Hurdzan C M, Basta N T, Hatcher P G, et al. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2008, 69: 525—530
- [68] Jurjanz S, Rychen G. J. Agric. Food Chem., 2007, 55: 8800—8805
- [69] Gron C, Oomen A G, Weyand E, et al. J. Environ. Sci. Health A, 2007, 42: 1233—1239
- [70] Hurdzan C M, Basta N T, Hatcher P G, et al. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2008, 69: 525—530
- [71] Wittsiepe J, Schrey P, Hack A, et al. Int. J. Hyg. Environ. Health, 2001, 203: 263—273
- [72] Shock S S, Bessinger B A, Lowney Y W, et al. Environ. Sci. Technol., 2007, 41: 4813—4820
- [73] Pu X, Lee L S, Galinsky R E, et al. Toxicology, 2006, 217: 14—21
- [74] Holman H N, Goth-Goldstein R, Aston D, et al. Environ. Sci. Technol., 2002, 36: 1281—1286
- [75] Yu Y X, Lu M, Jia W L, et al. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2008, 22: 2803—2808
- [76] Ljung K, Oomen A G, Duits M, et al. J. Environ. Sci. Health A, 2007, 42: 1241—1250
- [77] Scott W C, Dean J R. J. Environ. Monit., 2005, 7: 710—715
- [78] 陆敏 (Lu M), 韩姝媛 (Han S Y), 余应新 (Yu Y X) 等. 分析测试学报 (Journal of Instrumental Analysis), 2009, 28: 1—6
- [79] Yu Y X, Han S Y, Zhang D P, et al. J. Agric. Food Chem., 2009, 57: 133—139
- [80] Oomen A G, Tolls J, Sips A J, et al. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2003, 44: 116—124