

α -常春藤皂苷缬氨酸酯在瘦素诱导 Caco-2 细胞上的吸收机制研究

孙勇兵¹, 傅国强¹, 谢俊霞², 张 鹏³

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006

2. 河北省化工医药职业技术学院, 河北 石家庄 050026

3. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 构建寡肽转运蛋白 (PEPT1) 高表达的 Caco-2 细胞系, 并用于 α -常春藤皂苷缬氨酸酯吸收机制的研究。方法 0.2 nmol/L 瘦素诱导 Caco-2 细胞 7 d 以增加细胞上 PEPT1 的表达量。通过在瘦素诱导 Caco-2 细胞上进行吸收抑制实验, 研究 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的吸收机制。结果 相对于未经诱导的 Caco-2 细胞, α -常春藤皂苷缬氨酸酯在诱导的 Caco-2 细胞上摄取量提高了 5.33 倍, 提示 PEPT1 的表达量增加了。结论 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的吸收是由 PEPT1 介导的。

关键词: α -常春藤皂苷缬氨酸酯; 瘦素; 寡肽转运蛋白; Caco-2 细胞

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)11-1209-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.11.004

Absorption mechanism of *L*-valyl- α -hederin in leptin-treated Caco-2 cells

SUN Yong-bing¹, FU Guo-qiang¹, XIE Jun-xia², ZHANG Peng³

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. Hebei College of Chemical and Pharmacy, Shijiazhuang 050026, China

3. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish a Caco-2 system with highly-expressed peptide transporter (PEPT1), and to apply this system to the absorption of *L*-valyl- α -hederin. **Methods** Caco-2 cells were induced with 0.2 nmol/L leptin for 7 d to increase the PEPT1 expression. The uptake mechanism of *L*-valyl- α -hederin was studied by inhibition absorption in leptin-treated Caco-2 cells. **Results** The uptake of *L*-valyl- α -hederin was 5.33 times higher in leptin-treated Caco-2 cells than those in the untreated Caco-2 cells which suggested more expression of PEPT1. **Conclusion** The uptake of *L*-valyl- α -hederin is mediated by PEPT1.

Key words: *L*-valyl- α -hederin; leptin; peptide transporter; Caco-2 cell

小肠寡肽转运蛋白 (peptide transporter 1, PEPT1) 是一类表达在人和哺乳动物小肠上皮细胞的主动转运蛋白, 它的底物是非常广泛的, 能够介导二肽、三肽化合物和一些拟肽类药物的口服吸收^[1-2]。利用 PEPT1 为靶点来改变药物体内药物动力学性质和提高药物的吸收是药物传递领域和药物设计领域的一个新的研究热点。目前研究 PEPT1 介导的药物吸收时, PEPT1 转染的 HeLa 细胞和 Caco-2 细胞是最好的模型。但是 PEPT1 质粒在国内很难获得, PEPT1 转染的细胞系不易获得。根据文献报道, 利用瘦素长期诱导 Caco-2 后, 瘦素能够激活 PEPT1 基因的转录和提高 PEPT1 mRNA 的稳定性, 导致细胞内

PEPT1 表达量增加^[3-4]。 α -常春藤皂苷具有很好的抗肿瘤活性, 但是其口服生物利用度很低, 仅为 1%~4%, 因此提高 α -常春藤皂苷口服生物利用度是一件非常有意义的事情。本课题组为了提高 α -常春藤皂苷的口服生物利用度, 合成了系列 α -常春藤皂苷缬氨酸酯衍生物, 药动学研究发现 α -常春藤皂苷缬氨酸酯 (结构见图 1) 能够将 α -常春藤皂苷在大鼠体内的口服生物利用度由 3% 提高到 14%。因此本实验利用瘦素长期诱导 Caco-2 细胞, 并利用 PEPT1 的典型底物甘氨酸肌氨酸确证瘦素长期诱导后的 Caco-2 细胞上 PEPT1 的表达得到了提高。利用该模型研究了 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的吸收机制, 结果

收稿日期: 2014-08-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360485); 江西省科技计划项目 (20133BBG70092)

作者简介: 孙勇兵 (1980—), 男, 安徽人, 讲师, 博士, 从事药物新剂型和药物动力学研究。Tel: (0791) 87119652 E-mail: yongbing_sun@hotmail.com

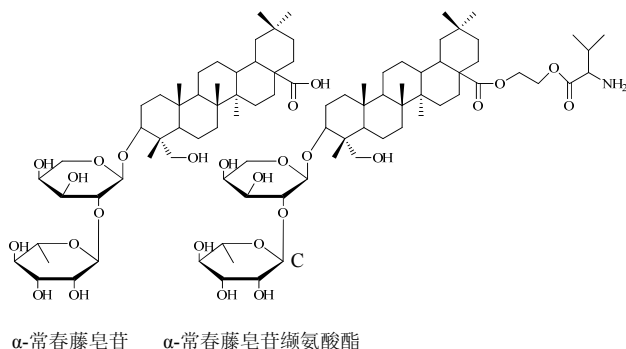


图 1 化合物 α-常春藤皂苷 (A) 和 α-常春藤皂苷缬氨酸酯 (B) 的结构

Fig. 1 Structures of α-hederin (A) and L-valyl-α-hederin (B)

证明 PEPT1 介导 α-常春藤皂苷缬氨酸酯的吸收。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪, 包括 LC-10AT 泵, SPD-10A UV-VIS 检测器, Anasat 色谱工作站。Waters ACQUITY TQD system 超高效液相串联质谱仪 (Waters 公司)。

1.2 试剂

甘氨酸肌氨酸 (美国 Sigma 公司, 质量分数大于 99.5%); 瘦素 (以色列 Prospec Technogene 公司, 纯度大于 99.5%); L-缬氨酸 (扬州宝盛生物化工有限公司, 质量分数大于 99.0%); α-常春藤皂苷 (江西中医药大学提供, 质量分数大于 99.0%); α-常春藤皂苷缬氨酸酯 (沈阳药科大学药物化学研究室合成, 质量分数为 98.2%); 甲醇、乙腈 (天津康科德科技有限公司, 色谱级); 其他试剂均为分析纯。

Caco-2 细胞株购自美国 ATTC 公司, 实验所用的细胞传代数在 60~80 代。胎牛血清、高糖 DMEM 细胞培养基、非必需氨基酸、左旋谷酰胺、青霉素、链霉素均购自美国 Gibco 公司; HBSS 粉末购自 Hyclone 公司; 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma 公司)。

2 方法和结果

2.1 甘氨酸肌氨酸的 UPLC-MS/MS 法测定^[5]

2.1.1 色谱条件 Acquity Uplc Beh Hilic 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相水 (含 0.1% 甲酸) (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱, 程序是 0 min (10% A), 2.3 min (90% A), 4.3 min (10% A), 6.5 min (10% A); 体积流量: 0.2 mL/min; 柱温: 22 °C; 进样量: 5 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源: ESI 源; 检测方式: 正离子检测; 扫描方式: 多反应监测 (MRM) 方式,

定量分析时选择离子分别为 m/z 147→90 (甘氨酸肌氨酸)、 m/z 138→121 (异烟肼, 内标), 扫描时间为 0.2 s; 毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 20 V; 离子源温度: 110 °C; 去溶剂气 (N_2) 温度: 380 °C; 去溶剂气 (N_2) 流量: 500 L/h; 锥孔气流量: 50 L/h; 碰撞电压: 11 eV (甘氨酸肌氨酸)、14 eV (异烟肼); 碰撞气 (氩气) 压力 0.32 Pa。

2.1.3 测定 取细胞匀浆 100 μL, 加入 50 μL 异烟肼溶液 (内标) 和 100 μL 乙腈溶液, 涡旋, 离心, 取上清液 5 μL 进样测定, 利用内标法计算甘氨酸肌氨酸的质量浓度。UPLC-MS/MS 图谱见图 2。

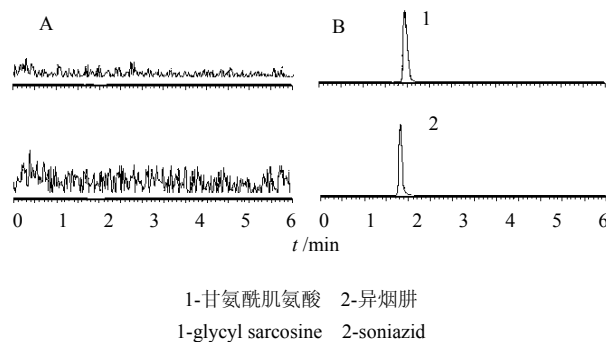


图 2 空白匀浆 (A) 和含甘氨酸肌氨酸和异烟肼细胞匀浆 (B) 的 UPLC-MS/MS 图谱

Fig. 2 UPLC-MS/MS of blank cell homogenate (A) and cell homogenate with glycyl sarcosine and isoniazid (B)

2.2 α-常春藤皂苷和 α-常春藤皂苷缬氨酸酯的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件 Dikma Diamosil C_{18} 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 5 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液 - 甲醇 (85:15); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 检测波长: 224 nm。

2.2.2 测定 取细胞匀浆 200 μL, 加入 100 μL 乙腈溶液, 涡旋离心, 取上清液, 取 20 μL 注入 HPLC, 测定峰面积, 采用外标法计算 α-常春藤皂苷和 α-常春藤皂苷缬氨酸酯质量浓度。色谱图见图 3。

2.3 细胞培养溶液的配制

2.3.1 Caco-2 细胞培养液的配制 取高糖 DMEM (500 mg/L 葡萄糖)、20 mmol/L HEPES、10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、4 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 1.0 mmol/L 丙酮酸钠适量, 调 pH 值至 7.4, 滤过除菌, 即得。

2.3.2 胰酶的配制 取胰酶 0.05%、NaCl 0.8%、D-葡萄糖 0.1%、 $NaHCO_3$ 0.08%、EDTA 0.02%、HCl 0.04%, 调 pH 值至 7.4, 即得。

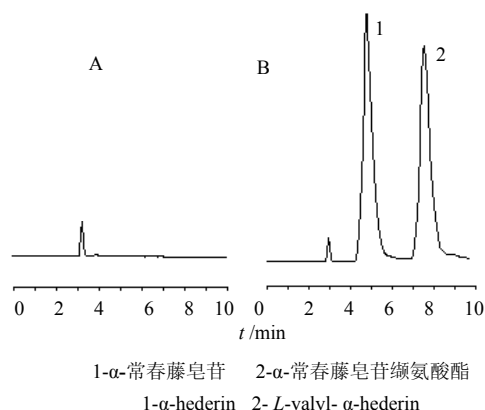


图 3 空白匀浆 (A) 和含 α -常春藤皂苷、 α -常春藤皂苷缬氨酸酯细胞匀浆 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of blank cell homogenate (A) and cell homogenate with α -hederin and L-valyl- α -hederin (B)

2.3.3 HBSS 缓冲溶液的配制 取 8.0 g/L NaCl、0.05 g/L Na_2HPO_4 、0.4 g/L KCl、0.06 g/L KH_2PO_4 、1.0 g/L D-葡萄糖、0.35 g/L NaHCO_3 、0.1 g/L CaCl_2 、0.14 g/L MgSO_4 适量，加 HEPES 适量使浓度为 20 mmol/L，调 pH 值至 6.0 或 7.4，即得。

2.4 细胞蛋白的考马斯亮蓝法测定^[6]

将考马斯亮蓝 G250 贮备液按所需量用蒸馏水 1:4 稀释 (即 5 倍稀释)，配成应用液。将标准白蛋白溶液按一定比例稀释后，加入考马斯亮蓝溶液，建立标准曲线，曲线方程为 $Y=0.023X+0.056$ 。将破碎后的细胞样品用水溶液按比例稀释，加入考马斯亮蓝溶液。所有样品混匀，静置 10 min，取同样的量加入到 96 孔板中，放入酶标仪中，于 595 nm 处，1 cm 光径，用空白管调零，测定各管吸光度值。计算样品中蛋白质量浓度时，取吸光度值在标准曲线范围的稀释样品，曲线方程法计算样品质量浓度。

2.5 瘦素长期诱导 Caco-2 细胞

将 Caco-2 细胞以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 种植在 24 孔板中，第 3~8 天每天更换正常的培养液。从第 8 天开始在培养液中加入 0.2 nmol/L 瘦素，用含有瘦素的培养液培养细胞，一直培养到第 15 天。取培养 15 d 的正常 Caco-2 细胞和经过瘦素诱导的 Caco-2 细胞，用 37 °C 的 HBSS 轻柔地清洗细胞 3 次，洗去细胞单分子层表面的杂质，最后一次置于 37 °C 培养箱中培养 30 min。吸去缓冲溶液，加入含有 5 $\mu\text{mol/L}$ 甘氨酸肌氨酸的 HBSS 溶液 (pH 6.0) 1.0 mL，将 24 孔板于恒温摇床 (37 °C, 50 r/min) 中孵育 10 min。

用冰冷的 HBSS 溶液 (pH 6.0) 轻柔地清洗细胞 3 次，弃去 HBSS 溶液，加入 0.3 mL 水，将细胞转移至 1.5 mL EP 管中，用超声组织匀浆机匀浆，混悬液在 4 000 r/min 下离心 10 min，取上清液放入 -80 °C 冻存。UPLC-MS/MS 法测定上清液中甘氨酸肌氨酸的质量浓度，考马斯亮蓝法测定蛋白的质量浓度。

结果甘氨酸肌氨酸在正常 Caco-2 细胞上摄取量是 1.43 nmol/(mg·10 min)，在诱导的 Caco-2 细胞上摄取量是 3.04 nmol/(mg·10 min)，后者是前者的 2.13 倍。因此 0.2 nmol/L 瘦素连续诱导 7 d 后，Caco-2 细胞对甘氨酸肌氨酸的摄取量明显增加，结合文献报道^[3-4]，由于甘氨酸肌氨酸是 PEPT1 的典型底物，因此可以确定本实验中利用瘦素长期诱导 Caco-2 细胞增加 PEPT1 的表达量是成功的。

2.6 α -常春藤皂苷和 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的摄取

取培养 15 d 的 Caco-2 细胞和经过瘦素诱导的 Caco-2 细胞，用 37 °C 的 HBSS 轻柔地清洗细胞 3 次，洗去细胞单分子层表面的杂质，最后一次置于 37 °C 培养箱中培养 30 min。吸去缓冲溶液，加入含有 0.5 mmol/L α -常春藤皂苷的摄取溶液。

在正常 Caco-2 细胞上面加入含有 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的摄取溶液。在经过瘦素诱导的 Caco-2 细胞上面，分别加入不含抑制剂、含有 4、8 mmol/L 甘氨酸肌氨酸、含有 8 mmol/L L-缬氨酸的 α -常春藤皂苷缬氨酸酯摄取溶液，其中 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的浓度是 0.5 mmol/L。

将 24 孔板于恒温摇床 (37 °C, 50 r/min) 中孵育 15 min 后，用冰冷的 HBSS 溶液 (pH 6.0) 轻柔地清洗细胞 3 次，弃去 HBSS 溶液，加入 0.3 mL 水，将细胞转移至 1.5 mL EP 管中，用组织匀浆机匀浆，混悬液在 4 000 r/min 离心 10 min，取上清液放入 -80 °C 冻存。HPLC 法测定上清液中 α -常春藤皂苷和 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的质量浓度，考马斯亮蓝法测定蛋白的质量浓度。结果见表 1。

可见在未经过诱导的 Caco-2 细胞上， α -常春藤皂苷缬氨酸酯的摄取量是 0.30 nmol/(mg·15 min)，在经过瘦素诱导的 Caco-2 细胞上面， α -常春藤皂苷缬氨酸酯的摄取量是 1.60 nmol/(mg·15 min)，后者的摄取量是前者的 5.33 倍。摄取提高的原因可能是 PEPT1 介导了 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的吸收。

在 4、8 mmol/L 甘氨酸肌氨酸存在的条件， α -常春藤皂苷缬氨酸酯在诱导 Caco-2 细胞上的摄取

表 1 α -常春藤皂苷和 α -常春藤皂苷缬氨酸酯在空白 Caco-2 细胞和瘦素诱导的 Caco-2 细胞上的摄取Table 1 Uptake of α -hederin and L-valyl- α -hederin in blank and leptin-treated Caco-2 cells

细胞	浓 度	摄取量/(nmol·mg ⁻¹ ·15 min ⁻¹)	
		α -常春藤皂苷缬氨酸酯	α -常春藤皂苷
空白	0	0.30±0.11	0.09±0.05
诱导	0 (不含抑制剂)	1.60±0.15 [*]	0.11±0.08
	4 mmol/L 甘氨酸肌氨酸	0.80±0.07 [#]	
	8 mmol/L 甘氨酸肌氨酸	0.50±0.09 [#]	
	8 mmol/L L-缬氨酸	1.40±0.12 [*]	

与空白细胞比较: ^{*} $P<0.05$; 与不加抑制剂的诱导细胞比较: [#] $P<0.05$ ^{*} $P<0.05$ vs control cell; [#] $P<0.05$ vs inducer cell without inhibitors

量分别减少了 50.0%、68.7%。甘氨酸肌氨酸是 PEPT1 的典型底物,与 PEPT1 能够相互作用,竞争性地抑制 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的摄取。但是 L-缬氨酸却不能抑制 α -常春藤皂苷缬氨酸酯的摄取,因为 L-缬氨酸不是 PEPT1 的底物,不能与 PEPT1 相互作用。

2.7 α -常春藤皂苷缬氨酸酯在瘦素诱导的 Caco-2 细胞对甘氨酸肌氨酸摄取抑制

将 0.2、1.0、2.0、10.0、20、40.0、60.0 mmol/L α -常春藤皂苷缬氨酸酯系列溶液与 10.0 μ mol/L 甘氨酸肌氨酸溶液以等体积混合,用微型震荡器混匀溶液。混合溶液中甘氨酸肌氨酸的浓度是 5.0 μ mol/L, α -常春藤皂苷缬氨酸酯的浓度分别是 0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、30.0 mmol/L。

将瘦素诱导的 Caco-2 细胞以 $1\times 10^5/\text{cm}^2$ 种植在 24 孔板中,从第 3 天开始,每天更换培养液,培养 15 d 后,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 HBSS 轻柔地清洗细胞 3 次,洗去细胞单分子层表面的杂质,最后一次置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 30 min。吸去缓冲溶液,分别加入含有 0、0.1、0.6、2、5、10、20 mmol/L α -常春藤皂苷缬氨酸酯的 HBSS 溶液(含甘氨酸肌氨酸 5.0 μ mol/L, pH 6.0),将 24 孔板于恒温摇床(37 $^{\circ}\text{C}$, 50 r/min)中孵育 10 min。

用冰冷的 HBSS 溶液(pH 6.0)轻柔地清洗细胞 3 次,弃去 HBSS 溶液,加入 0.3 mL 水,将细胞转移至 1.5 mL EP 管中,用组织匀浆机匀浆,混悬液在 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。UPLC-MS/MS 法测定上清液中甘氨酸肌氨酸的质量浓度,考马斯亮蓝法测定蛋白的质量浓度。抑制剂浓度为 0 mmol/L(不加抑制剂)时,摄取记为 100%;加入抑制剂的时候,摄取量与不加抑制剂的摄取量的比值即为摄取率。结果见表 2。

表 2 不同浓度的 α -常春藤皂苷缬氨酸酯对甘氨酸肌氨酸摄取的抑制Table 2 Uptake inhibition of glycyl sarcosine by L-valyl- α -hederin

抑制剂浓度/(mmol·L ⁻¹)	摄取率/%
0	100
0.1	89.5±12
0.5	75.6±14
1.0	65.9±20
5.0	45.3±9.6
10.0	28.0±7.4
20.0	18.7±3.2
30.0	8.8±2.9

可以看出,随着 α -常春藤皂苷缬氨酸酯浓度的增加,甘氨酸肌氨酸被摄取量逐渐减少。说明 α -常春藤皂苷缬氨酸酯与 PEPT1 之间有着较强的相互作用,它与甘氨酸肌氨酸相互竞争与 PEPT1 的结合,从而导致甘氨酸肌氨酸的摄取量逐渐减少。通过非线性拟合, α -常春藤皂苷缬氨酸酯对甘氨酸肌氨酸摄取的半数抑制浓度(IC₅₀)是 4.1 mmol/L。

3 讨论

在已经报道的 PEPT1 转运机制的研究中^[1, 7-12],大部分都是通过转染技术将 PEPT1 高表达在 HeLa、Caco-2 或 MDCK 细胞上面,但是含有小肠寡肽转运蛋白 DNA 的质粒很难得到,所以这种转染实验并不是所有的实验室都能开展。研究发现,PEPT1 的活性随着各种外部条件的改变而发生改变,如生理因素、外源性物质和环境 pH 值等^[13-14]。肠道 PEPT1 的活性受到许多生理因素的调控,包括饮食条件、激素(胰岛素、瘦素和甲状腺激素)、生长因子(表生长因子)、生长状况和昼夜规律等。瘦素是

相对分子质量为 1.6×10^4 的多肽, 利用瘦素短期诱导 Caco-2 后, PEPT1 可从细胞内膜以微管依赖的交换方式转移到细胞外膜, 使得 PEPT1 的活性增强, 但是细胞内膜上的 PEPT1 水平下降, 细胞内外膜 PEPT1 总体水平和 PEPT1 mRNA 是不变的。利用瘦素长期诱导 Caco-2 后, 瘦素能够激活 PEPT1 基因的转录和提高 PEPT1 mRNA 的稳定性, 最终导致细胞内 PEPT1 表达量的增加。根据文献报道, 当用 0.2 nmol/L 瘦素分别在 Caco-2 细胞的 A 面和 B 面诱导 7 d 后, A 面和 B 面对头孢氨苄 (PEPT1 的底物) 的摄取量分别提高 2.7、1.8 倍。Western Blotting 分析表明, Caco-2 细胞 A 面和 B 面的 PEPT1 表达量分别增加 2.1、2.5 倍。Hindlet、Nduati 等^[3-4]还证明利用瘦素长期处理的小鼠, 肠道对甘氨酸肌氨酸的摄取量也明显增加了。

在本研究中, 甘氨酸肌氨酸在诱导的 Caco-2 细胞上摄取量是正常 Caco-2 细胞的 2.13 倍。由于甘氨酸肌氨酸是 PEPT1 的典型底物, 因此可以确定本实验中利用瘦素长期诱导 Caco-2 细胞建立高表达 PEPT1 细胞系是成功的。

利用化合物抑制甘氨酸肌氨酸在 Caco-2 细胞上或高表达 PEPT1 的细胞系上的摄取是研究化合物和 PEPT1 相互作用的重要手段。如伐昔洛韦能够以浓度相关的方式抑制甘氨酸肌氨酸在高表达 PEPT1 的 HeLa 细胞上的摄取, 半数抑制浓度是 1.4 mmol/L^[7]。在本实验中, α -常春藤皂苷缬氨酸酯的半数抑制浓度是 4.1 mmol/L, 表明 α -常春藤皂苷缬氨酸酯与 PEPT1 存在较强的相互作用。

在经过 0.2 nmol/L 瘦素 7 d 诱导的 Caco-2 细胞和未经过诱导的 Caco-2 细胞上 α -常春藤皂苷缬氨酸酯摄取量增加了 4.33 倍, 并且能够被甘氨酸肌氨酸抑制, 但 L-缬氨酸没有这种抑制作用, 虽然 Caco-2 细胞上面表达着 Na^+ -葡萄糖转运蛋白和氨基酸转运蛋白等其他转运蛋白, 但可以确定 α -常春藤皂苷缬氨酸酯是 PEPT1 的底物, 它在小肠内由 PEPT1 介导吸收。

参考文献

- [1] Fei Y J, Sugawara M, Liu J C, *et al.* cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1492(1): 145-154.
- [2] 孙勇兵, 孙进, 何仲贵. 小肠寡肽转运蛋白及其在提
- [3] Hindlet P, Bado A, Farinotti R, *et al.* Long-term effect of leptin on H⁺-coupled peptide cotransporter 1 activity and expression *in vivo*: evidence in leptin-deficient mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 323(1): 192-201.
- [4] Nduati V, Yan Y, Dalmasso G, *et al.* Leptin transcriptionally enhances peptide transporter (hPepT1) expression and activity via the cAMP-response element-binding protein and Cdx2 transcription factors [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(2): 1359-1373.
- [5] Sun Y, Sun J, Liu J, *et al.* Rapid and sensitive hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of glycyl-sarcosine in cell homogenates [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(7): 649-652.
- [6] 李娟, 张耀庭, 曾伟, 等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2000, 13(2): 118-120.
- [7] Han H K, Oh D M, Amidon G L. Cellular uptake mechanism of amino acid ester prodrugs in Caco-2/hPEPT1 cells overexpressing a human peptide transporter [J]. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1382-1386.
- [8] Döring F, Theis S, Daniel H. Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PepT1 in the methylotropic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 232(3): 656-662.
- [9] Covitz K M, Amidon G L, Sadée W. Human dipeptide transporter, hPEPT1, stably transfected into Chinese hamster ovary cells [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(11): 1631-1634.
- [10] Mackenzie B, Loo DD, Fei Y, *et al.* Mechanisms of the human intestinal H⁺-coupled oligopeptide transporter hPEPT1 [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(10): 5430-5437.
- [11] Hsu C P, Hilfinger J M, Walter E, *et al.* Overexpression of human intestinal oligopeptide transporter in mammalian cells via adenoviral transduction [J]. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1376-1381.
- [12] Chu C, Okamoto C T, Hamm-Alvarez S F, *et al.* Stable transfection of MDCK cells with epitope-tagged human PepT1 [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(11): 1970-1973.
- [13] 赵小辰, 王广基, 孙炳伟, 等. Caco-2 细胞缺氧复氧损伤后二肽载体的表达及生物学功能的改变 [J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(1): 74-77.
- [14] Adibi S A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (PepT-1) in health and disease [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285(5): G779-788.