

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200911003

王坤, 肖羽芯, 李梦莹, 等. 重金属人体生物有效性、吸收及毒性研究中的肠道细胞模型[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 57-71

Wang K, Xiao Y X, Li M Y, et al. Intestinal cell models for heavy metals bioavailability, absorption and toxicity investigation: A review [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 57-71 (in Chinese)

重金属人体生物有效性、吸收及毒性研究中的肠道细胞模型

王坤^{1,2}, 肖羽芯², 李梦莹^{1,2}, 马骄阳^{1,2}, 覃一书^{1,2}, 向萍^{1,2,*}

1. 西南林业大学环境污染与食品安全及人体健康云南省创新团队, 昆明 650224

2. 西南林业大学生态与环境学院/环境修复与健康研究院, 昆明 650224

收稿日期: 2020-09-11 录用日期: 2020-12-13

摘要: 重金属污染对人体健康产生极大威胁, 因而备受关注。肠道吸收是人体重金属暴露的主要途径之一, 因此, 重金属的生物有效性、肠道吸收过程和毒性研究成为当前的研究热点。体外胃肠模拟法和动物模型被广泛用于重金属的相关研究, 然而体外胃肠模拟法缺少人体肠道细胞成分, 动物模型与人体存在着物种差异且实验成本高。鉴于此, 研究者开发了能够部分模拟人体肠道上皮功能的体外肠道细胞模型。此模型作为研究生物有效性的重要工具, 能模拟肠道对重金属的吸收转运过程, 并能够结合分子生物学等技术, 采用多学科交叉的研究方法探索重金属的肠吸收和肠毒性的分子机制。本文系统介绍了人肠上皮的细胞功能、肠道上皮细胞对重金属吸收转运机制、肠道细胞模型的发展及其在重金属相关研究中的应用与优缺点, 总结了肠细胞模型功能验证指标和优化方法。同时, 还对肠道微流控培养系统(芯片肠道)和肠类器官等三维肠细胞模型技术的最新进展进行了介绍和展望。

关键词: 重金属; 3D 肠道细胞模型; 生物有效性; 共培养模型; 毒性

文章编号: 1673-5897(2021)4-057-15 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Intestinal Cell Models for Heavy Metals Bioavailability, Absorption and Toxicity Investigation: A Review

Wang Kun^{1,2}, Xiao Yuxin², Li Mengying^{1,2}, Ma Jiaoyang^{1,2}, Qin Yishu^{1,2}, Xiang Ping^{1,2,*}

1. Yunnan Innovative Research Team of Environmental Pollution, Food Safety and Human Health, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

2. Institute of Environmental Remediation and Human Health, School of Ecology and Environment, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Received 11 September 2020 accepted 13 December 2020

Abstract: Heavy metals poses great threats on human health, so people pay more attention to heavy metals pollution induced health risks in recent years. Intestinal absorption is one of the main routes for human exposure to heavy metals. Therefore, the investigations on bioavailability, intestinal absorption and toxicity of heavy metals attracted the scientific community. To systematically study the potential health risk of heavy metals, the *in vitro* gas-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41967026); 国家林业和草原局林草科技创新青年拔尖人才项目(2020132613); 云南省创新团队项目(202005AE160017); 国家重点研发计划项目(2018YFC1800504); 云南省高层次人才引进计划项目(YNQR-QNRC-2018-049)

第一作者: 王坤(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为重金属的胃肠道毒性与吸收转运机制, E-mail: kun_wang1996@126.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: ping_xiang@126.com

gastrointestinal simulations and animal models have been widely used. However, due to the lack of human intestinal cells in gastrointestinal simulation methods and species differences between animal models and human, both of them have their limitations. Given that, the researchers developed an *in vitro* human intestinal cell model that partially mimics the *in vivo* human epithelium physiological functions. Based on the human intestinal cell models, the researchers could better investigate the bioavailability, intestinal absorption and transport of heavy metals. Besides, their related molecular mechanisms of intestinal absorption and toxicity can also be figured out via these new models combining with molecular biology techniques and interdisciplinary research methods. Collectively, this review systematically summarizes the structure and function of human intestinal epithelium, the intestinal absorption and transport mechanisms of heavy metals, the development process of intestinal cell models and their applications and limitations. In addition, the validation and optimization methods of intestinal cell models were analyzed. Furthermore, the state-of-the-art 3D intestinal cell models technology like the intestinal microfluidic culture system (Gut-on-a-chip) and intestinal organoids were also be introduced and prospected in this review.

Keywords: heavy metals; 3D intestinal cell model; bioavailability; co-culture model; toxicity

广义上,重金属是指密度 $>4.5\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 的金属元素,而在环境污染中重金属通常指的是镉、汞、铅、铬和砷等具有生物毒性的金属(砷是一种类金属,因其毒性效应与其他有毒金属相似,故也被划为重金属之一)。由于重金属污染具有隐蔽性、长期性、不可逆转性和生物蓄积性等特点,因此重金属暴露对人类健康的影响受到广泛重视。为此,世界卫生组织(WHO)每年定期评估重金属对人类健康的影响,世界各国也以据其健康风险评估结果,先后建立起重金属污染管控的环境标准,规定了多介质中重金属的环境限量标准。然而,越来越多的研究表明,传统基于重金属总量开展的健康风险评估方法并不能全面地评价人体实际面临的暴露风险,因此需要建立更为准确的重金属暴露风险评估方法。

面对不足,研究者们陆续发展起了多种基于生物可给性(bioaccessibility)的重金属人体暴露风险评估方法,如体外胃肠模拟法,即还原胃肠物理化学环境,对环境介质中污染物的胃肠阶段溶出率进行分析。常见的体外胃肠模拟法有基于生理学的提取试验法(physiologically based extraction test, PBET)、体外胃肠法(*in vitro* gastrointestinal, IVG)和可溶性生物可给性研究联合会方法(Solubility Bioaccessibility Research Consortium, SBRC)等^[1]。重金属的生物可给性通常被定义为重金属经过消化过程从环境介质中溶出至胃或肠道消化液中的部分占总量的百分比^[1],它优于基于总量的评估方法,反映了人体胃肠道实际接触重金属的情况。即便如此,生物可给性依然无法确定有多少重金属进入了人体内。为更好地反映重金属的吸收转运,研究者把通过胃肠道吸

收进入人体内循环的重金属量占重金属总量的百分比定义为生物有效性(bioavailability),在此基础上能较好地对人体重金属暴露风险展开评估^[2]。

目前,研究者们通过动物实验(*in vivo*)或体外实验(*in vitro*)开展了有关重金属的生物有效性和暴露毒性研究。但由于动物实验存在周期长、成本高、实验动物与人类的物种间差异等缺陷,限制了动物实验在重金属相关研究上的应用。相较之下,体外实验具有成本低、高通量、重复性好的优点,一些研究者选择体外肠细胞模型开展重金属肠道暴露的体外实验研究。重金属的跨肠细胞转运是重金属对人体内脏器官产生毒害的重要前提,因而肠细胞模型在重金属生物有效性、吸收转运和毒性机制研究中受到特别关注。为了尽可能模拟体内肠道功能,多种体外肠道模型得以成功构建与应用。本文综述了肠道上皮层的结构功能、体外肠道细胞模型发展、肠细胞模型在重金属生物有效性或吸收研究中的应用及优缺点分析、模型优化方法等,并对肠细胞模型的发展方向进行了展望。

1 人体肠道上皮的结构与功能 (The structure and function of human intestinal epithelium)

1.1 人体肠道上皮层结构与功能

摄入受重金属污染的食物是人体重金属暴露的重要途径。进食后,经口腔和胃作用后的食糜被送入肠道完成主要的吸收过程。人体消化道中约90%的吸收过程发生在肠道的小肠之中,其具有不同尺度上的折叠结构,如肠绒毛(villi)和微绒毛(microvilli),使其具有巨大的表面积,实现对物质的最大程度吸收,同样包括了对重金属的吸收^[3]。因此,

肠道组织结构和各类肠细胞类群的功能特征对建立和优化体外肠道细胞模型尤为重要。

在肠道组织结构中,肠道与肠腔直接接触的是上皮层(图1),其能够实现肠道的主要功能,具有自我更新能力,由包括执行选择性吸收的吸收性肠上皮细胞(absorptive enterocytes)、分泌黏液的杯状细胞(goblet cells)、转运颗粒和呈递抗原的微褶皱细胞(microfold cells,简称M细胞)和分泌抗菌肽的潘氏细胞(Paneth cells)等构成。此外,巨噬细胞和淋巴细胞等免疫细胞散布于上皮层下的结缔组织、毛细血管和淋巴组织中,它们同样对肠上皮功能起着重要作用。肠腔侧,覆盖着上皮细胞的黏液、共生微生物和食糜也与肠道上皮功能密切相关^[1]。肠上皮细胞之间通过紧密连接(tight junction)维持了肠道上皮的完整性,并与黏液、细胞分泌的抗菌肽等一起维持了肠道上皮的屏障功能,实现了肠道分泌、免疫和物质的选择性吸收功能^[1]。基于对上述肠道上皮结构与功能的理解,提出并建立了多种肠道细胞模型。

1.2 重金属的肠道上皮细胞转运

肠道吸收性上皮细胞作为肠道吸收转运物质的关键部位,存在4种吸收转运方式:细胞旁途径扩散(paracellular diffusion)、跨细胞途径的被动扩散(passive diffusion)、转胞吞作用(transcytosis)和载体介导的转运(carrier-mediated transport)。一些低分子量的亲水分子能够直接通过细胞旁途径穿过肠道上皮细胞层,细胞旁途径转运受细胞间紧密连接和黏附连接的调控,紧密连接是肠道上皮屏障的重要组成部分

,能够阻止物质自由穿越肠道上皮细胞层。据报道,一些毒性重金属如砷、镉和汞能够通过调节细胞紧密连接相关蛋白质的表达来增强细胞旁途径的通透性^[4]。小分子可以通过不依赖能量的被动扩散穿过肠道上皮细胞膜的脂质双分子层。转胞吞作用是肠道上皮细胞肠腔侧通过受体介导的胞吞,将分子吸收,然后通过胞吐将内吞物释放转运到细胞的基底侧的吸收转运过程。

作为载体介导的转运方式,金属离子转运蛋白(transporter)调控着重金属在肠上皮细胞膜上的进出,这是肠上皮细胞吸收和转运重金属的重要途径,本文综述了部分转运蛋白对重金属的转运功能(表1)。内流转运蛋白(influx transporter)在肠腔侧将金属离子吸收进细胞,而外排蛋白(efflux transporter)可以将金属离子从细胞内排出肠上皮细胞的基底侧或肠腔侧。铁、锰和锌等金属是人体的必需元素,细胞膜上存在着吸收转运这些金属的转运蛋白,而一些毒性重金属与必需元素特征相近,采用模仿“搭便车”的方式,竞争或劫持必需元素的转运蛋白进入细胞,这一过程被称为离子拟态(ionic mimicry)^[5]。例如,在肠道吸收过程中,镉能够利用细胞重要的二价金属转运蛋白DMT1(divalent metal transporter 1)进入肠上皮细胞^[6]。除此以外,重金属还能通过分子拟态(molecular mimicry)间接被细胞吸收转运,部分重金属能够结合到生物分子的特定位置点上形成复合物,结合了重金属的生物分子复合物通过转运蛋白(如氨基酸转运蛋白、有机阴离子转运蛋白)携带着

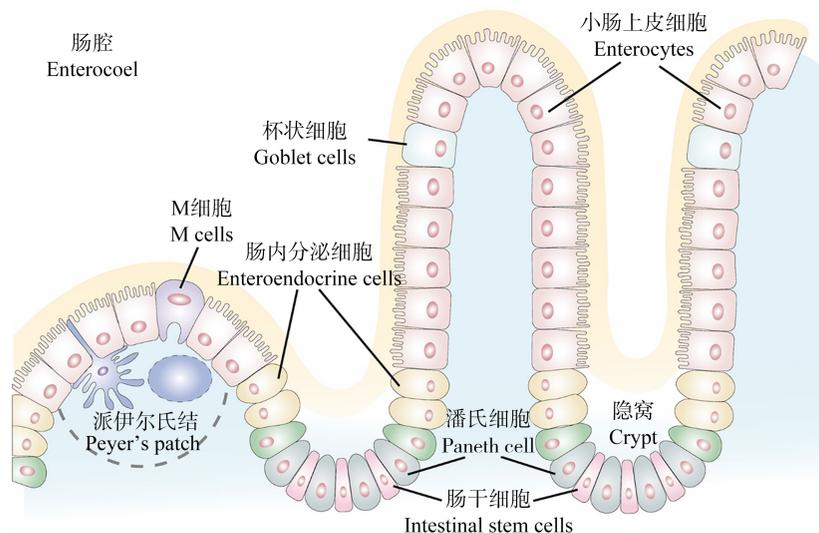


图1 小肠上皮的组织结构

Fig. 1 The structural pattern of small intestinal epithelium

重金属完成了跨膜转运^[5]。如砷在细胞内能够与谷胱甘肽形成 As(GS)₃ 复合物, Shukalek 等^[7]研究发现多药耐药蛋白(multidrug resistance-associated protein)MRP1 和 MRP2 负责将 As(GS)₃ 复合物转运出细胞。

2 基于肠道细胞的体外模型 (*In vitro* models based on intestinal cells)

为研究重金属的生物有效性、吸收转运过程和毒性效应及其机制,模式动物(如小鼠)被广泛应用,然而随着研究深入,越来越多的报道指出小鼠肠道结构、菌群与人类存在差异,因此,动物模型并不能完全模拟人体肠道^[7]。此外,出于实验伦理考虑,欧盟等发达地区以替代(replace)、减少(reduce)和优化(refine)的“3R 原则”提倡研究者使用体外方法替代和减少动物实验。鉴于此,肠道细胞模型为重金属的肠道暴露研究提供了一种具有较好生理相关性的体外方法,其采用的人源细胞能较好地模拟人体肠道的功能特征,并在不同实验室表现出了较高的可重复性,还具有实验成本低、高通量和周期短等优点。

随着细胞生物学的发展,肠道细胞体外模型日益完善。基于 Transwell 小室的肠道细胞模型(图 2(a))早期被应用于药物吸收研究领域,近年来陆续应用在环境污染物的生物有效性、吸收转运和毒性研究上,这有助于更早识别出生物有效性高、毒性大的污染物,为污染物的人体健康风险评估提供依据。目前,肠道细胞模型在重金属人体暴露方面的研究可简要归纳为以下几点:(1)人体对环境介质中重金属的吸收转运过程和生物有效性研究;(2)环境介质中的其他成分对重金属吸收转运的影响研究;(3)重金属暴露对人体所需营养元素摄取的影响研究;(4)重金属对肠道产生的直接毒性效应及其机制研究。

2.1 肠道细胞单培养模型

肠道细胞单培养模型所采用的细胞大多来源于人结肠腺癌,相较于更复杂的细胞模型,它具有成本低廉、技术简单等优势,目前仍然是应用最广泛的一类肠道细胞模型(图 2(b))。近年来,许多环境污染物肠道暴露研究采用了这一模型,并取得了与动物实验相近的结果^[18]。基于研究需求, Bourguine 等^[19]报道了一些常用于建立肠道细胞模型的细胞系基因

表 1 人体肠道上皮细胞负责重金属转运的相关蛋白

Table 1 Transporters for transporting heavy metals in human intestinal epithelial cells

转运蛋白 Transporters	转运的重金属 Transporting heavy metals	蛋白质功能 Functions of transporter	参考文献 References
CTR1	Cu、Fe	内流 Influx	[8-9]
TfRs	Mn、Cr、Fe	转运金属与转铁蛋白复合物 Transport metal-Tf complex	[9-10]
DMT1	Cd、Pb、Mn、Fe	二价金属离子内流 Divalent metal ion influx	[11-12]
ATPase7A/B	Cu	外排 Efflux	[13]
ZIPs	Cd、Zn、Mn	内流 Influx	[11]
氨基酸转运蛋白 Amino acid transporter	Cd、As	转运金属与氨基酸复合物 Transport of metal-amino acid complex	[11, 14]
OCTs	Cd	转运 Cd 与有机阳离子复合物 Transport Cd-organic cation complex	[11]
OATs	Cd、Hg	转运 Cd 和 Hg 与有机阴离子复合物 Transport Cd/Hg-organic anion complex	[11, 15]
钙离子通道蛋白 Ca ²⁺ channels	Pb、Cd、Fe、Mn、Zn	二价金属离子内流, Pb ²⁺ 的外排 Divalent metal ion influx and Pb ²⁺ export	[11]
Ca-ATPase	Pb	外排 Efflux	[9]
GLUTs	As	内流 Influx	[14, 16]
AQPs	As	内流 Influx	[14, 16]
MRPs	As、Hg	外排 Efflux	[14-16]
OATPs	As	内流 Influx	[14]
LAT	Hg	内流 Influx	[15]

表达谱,以帮助研究者根据具体需要,选择合适的肠道细胞材料。Caco-2、HT29 和 T84 细胞系常用于建立肠道细胞单培养模型,是目前研究最多和应用最广的肠道细胞系。

2.1.1 Caco-2 细胞模型

分离自人结肠腺癌的 Caco-2 细胞系长期被广泛用于重金属的生物有效性、肠道吸收转运和毒性效应研究。尽管 Caco-2 细胞源自人结肠腺癌,但其能够表达大多数吸收性肠细胞的形态和功能特性,是建立肠细胞模型的良好材料,许多改进版的肠道细胞模型也是以 Caco-2 细胞为基础发展起来的。Caco-2 模型的建立一般将 Caco-2 细胞在 Transwell 小室中培养 21 d,在此期间 Caco-2 细胞生长汇合,并自发分化,细胞顶部(肠腔侧)逐渐形成具有微绒毛的刷状缘,细胞之间形成紧密连接,表达多种转运蛋白和代谢酶,最终形成一层极化的吸收性肠细胞层。

Caco-2 细胞模型常应用于环境介质中的重金属生物有效性和吸收转运机制的研究^[20-22]。研究方法简言之,即对介质进行体外模拟消化后,用缓冲盐溶液或培养基对模拟消化液进行混合配比,使其达到细胞生存所需的营养与渗透压要求,后将溶液加入 Caco-2 细胞模型的肠腔侧进行转运实验。Lee 和 Lee^[22]对砷污染稻米进行体外模拟消化,结合 Caco-2 模型转运实验发现,大米中的总砷生物有效性在 16%~38% 之间,为评估食用稻米带来的砷暴露风险提供重要信息。而 Fujishiro 等^[6]利用 Caco-2 模型研究转运蛋白 DMT1 和 ZIP14 在镉吸收转运过程中的作用,进一步阐述了镉跨上皮吸收转运的分子机理。

食物基质或药物对重金属的生物有效性可能会产生一定影响,因此 Caco-2 模型可被用于发掘和筛选降低重金属暴露风险的方法。Lee 等^[22]研究发现精白米中总砷的生物有效性(31%)高于糙米(21%),研究结果可为砷污染区居民砷暴露风险防控提供科学膳食指导。此外,Caco-2 模型实验还发现一些食品添加剂能降低重金属的生物有效性。Fu 和 Cui^[23]在受污染小白菜的体外模拟消化过程中分别添加 FeCl₃、CaCl₂ 和醋酸,经 Caco-2 模型转运后发现 3 种添加剂均能降低镉和铅的生物有效性。近年来,通过类似研究,一些物质对重金属吸收的抑制或促进作用也被陆续揭示^[24-25]。同理,Caco-2 模型也能被用于研究重金属暴露对人体营养物质吸收的影响,不过目前这一领域的研究仍很少。

此外,Caco-2 模型还被大量用于重金属对肠道上皮毒性的研究。肠道屏障的完整性是肠道上皮细胞选择性吸收物质的前提,重金属暴露可能破坏肠道屏障的完整性,导致肠上皮细胞旁路途径转运通量的增加,使外源有害物质更易进入人体。Luo 等^[18]利用 Caco-2 模型发现镉暴露导致细胞旁路通透性增强,进一步研究发现,这是由于镉暴露引起细胞钙黏蛋白 E 和闭锁蛋白减少,导致肠屏障破坏。许多重金属能直接或间接诱导细胞产生活性氧,过量的活性氧将导致细胞产生氧化损伤甚至死亡,Sutherland 等^[26]将 Caco-2 模型暴露于多种重金属污染的鱼和牡蛎提取溶液,发现超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶活性被激活,Caco-2 细胞发生氧化应激反应。

Caco-2 模型仍存在许多局限性。Caco-2 细胞会随着培养时间和传代次数的增加,发生异质性变化现象,为了减少 Caco-2 细胞的异质性,目前已从 Caco-2 细胞系中分离出克隆型,如 Caco-2/TC-7、Caco-2/15 和 Caco-2/AQ 等。其中,Caco-2/TC-7 细胞保留了亲本 Caco-2 的功能特征,但分化速度更快,且更为均一稳定^[27]。相较于人真实肠道,Caco-2 模型缺乏黏液层,而黏液层是肠道上皮屏障的重要组成部分,为模拟黏液层,研究者采用 Caco-2 细胞与产生黏液的肠道细胞(如 HT29)共培养(co-culture)的方法来建立肠道细胞模型^[28]。此外,Caco-2 细胞还存在高表达 P-糖蛋白(P-gp)和低表达代谢酶的缺陷,因此 Caco-2 模型仍需更新和改进。

2.1.2 HT29 细胞模型

HT29 细胞系源自人结肠腺癌,HT29 细胞模型同样可用于生物有效性和细胞机制的研究。不同于 Caco-2 细胞,HT29 细胞的分化不是自发进行的,而是营养和培养条件驱动的,HT29 细胞系被认为是一种多能的细胞系,根据其培养条件的不同,细胞将会以不同路径分化^[29]。在一定培养条件下(例如高葡萄糖无血清培养条件),HT29 细胞会分化为杯状细胞样,具备分泌黏液的能力^[29]。Lecoeur 等^[30]采用 HT29 细胞建立了单培养模型,发现镉能够通过 Nramp2 转运蛋白进入肠上皮细胞,并证明了镉在细胞内的积累量与金属硫蛋白的含量部分相关。

除 HT29 亲本细胞以外,较常用的亚克隆细胞系还有 HT29-MTX,其通过甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)对 HT29 细胞进行药物抗性筛选获得^[31]。与 HT29 细胞的不同,HT29-MTX 细胞能够自发分化

为杯状细胞样细胞^[31],有助于简化实验步骤。然而 HT29 和 HT29-MTX 细胞生长缓慢,低表达乳糖酶,且细胞间紧密连接性能不足^[32],因此较不适合用于单独建立细胞模型开展重金属相关研究,其更多是和 Caco-2 细胞建立共培养模型。

2.1.3 T84 细胞模型

来源于人结肠癌(肺转移)的 T84 细胞系也能用于构建肠细胞模型。T84 细胞培养在 Transwell 膜上能形成细胞间紧密连接和微绒毛的极化细胞单层,但微绒毛数量较少,没有在细胞肠腔侧形成明显的刷状缘。不同于 Caco-2 细胞系,T84 细胞在分化过程中始终表现结肠细胞特征,在许多研究中作为结肠模型^[33-35]。Breton 等^[33]选用 T84 细胞于 Transwell 膜上建立了细胞模型,用 CdCl₂ 和 PbCl₂ 分别暴露细胞模型的肠腔侧 24 h,其中 20 μmol·L⁻¹ CdCl₂ 诱导 T84 模型发生可逆的屏障损伤,而 68 μmol·L⁻¹ CdCl₂ 则对屏障造成不可逆损伤,而 1 000 μmol·L⁻¹ PbCl₂ 并不诱导屏障损伤,这表明重金属对肠上皮单层渗透性的影响取决于元素种类、暴露时间和暴露浓度。不过目前基于 T84 模型的重金属研究仍然较少,作为结肠模型的 T84 细胞模型更多被用于电解质转运机制的研究^[36]和与腹泻有关的 Cl⁻ 分泌研究^[34-35]。可见 T84 模型在开展重金属暴露下的结肠电解质紊乱和腹泻方面的研究具有一定潜力。

综上所述,肠细胞单培养模型在重金属研究领域的应用十分广泛。但随着研究的不断深入,许多报道证实,单培养模型结构单一,难以完全模拟体内肠道细胞的生理功能,包括多种关键代谢酶和部分转运蛋白的低表达、黏液层的缺失等^[20,37](表 2),因而很难满足人体肠道暴露重金属的精确研究。鉴于此,研发生理功能更为接近体内肠道的模型成为研究者们努力的新方向。

2.2 肠道细胞共培养模型

生理状态下的肠道上皮层通常由多种细胞类群组成,不同细胞相互协作,共同组成了肠道上皮层的结构与功能。因此,研究者们提出,可以利用不同种类肠道细胞,借鉴细胞共培养技术在体外构建功能化的肠道细胞模型^[26]。目前的肠道细胞共培养模型多是在 Caco-2 模型的基础上发展起来的,共培养模型整合了 2 种或 2 种以上细胞,相比于细胞单培养模型,其能更好地模拟复杂的肠道上皮组织结构。

2.2.1 Caco-2/HT29 细胞共培养模型

在人肠道上皮中,分泌黏液的杯状细胞占到了

10%~25%,黏液是人肠道屏障的重要组成部分,起着应对外源有害物质威胁的作用。Caco-2 模型缺乏分泌黏液的能力,无法模拟人肠道黏液层,这一缺陷可以通过建立 Caco-2/HT29 细胞共培养模型来克服,在此模型中 Caco-2 细胞提供屏障功能和作为吸收性肠细胞,而 HT29 细胞作为生成黏液的杯状细胞。但是,在模型建立过程中,HT29 细胞向杯状细胞样分化需要设置特定的培养条件,这导致实际步骤较为繁琐,还易分化形成异质细胞^[31],因此实际研究中较多选择 HT29-MTX 细胞用于 Caco-2/HT29 共培养模型的构建。Caco-2/HT29 模型在肠腔侧覆盖的黏液层通常被认为是肠道接触或吸收重金属的重要屏障。另外,黏液层也能影响外源物质在肠壁上的停留时间^[38]。Vázquez 等^[38]基于 Caco-2/HT29-MTX 模型研究 Hg²⁺ 和甲基汞的转运,结果表明共培养模型对 Hg²⁺ 和甲基汞的转运能力弱于 Caco-2 模型,这一现象被解释为 Hg²⁺ 和甲基汞被保留在了黏液层中。

在屏障功能上,Caco-2/HT29 模型紧密连接性能不如 Caco-2 模型紧密,但与人体肠道实际情况更为接近,这使得细胞旁途径转运通量增加^[28]。此外,关于转运蛋白的研究发现,Caco-2/HT29 模型中二价金属转运蛋白 DMT1 的表达高于 Caco-2 或 HT29 细胞单培养模型^[39]。目前 Caco-2/HT29 模型在重金属的生物有效性研究方面应用较多^[28,38]。Lv 等^[28]分别使用 Caco-2/HT29 模型和 Caco-2 模型研究了煮熟大米中镉的生物有效性,发现 Caco-2/HT29 模型对镉的吸收转运活性高于 Caco-2 模型。但目前该细胞模型的建立存在一些难点,如在建立该模型的过程中 2 种细胞的生长速度不一,导致模型稳定建立时 2 种细胞比例偏离预期,目前主要采用根据实际情况摸索并调整 Caco-2/HT29 细胞比例的方法解决^[40]。

2.2.2 Caco-2/免疫细胞共培养模型

常见的肠道细胞模型主要采用上皮细胞,却忽视免疫细胞是肠道上皮中的第二大细胞类群,免疫细胞在肠道细胞间通讯、炎症反应和分化控制中发挥着重要作用。研究者理解并利用肠道上皮细胞与免疫细胞之间的关联性,建立了以 Caco-2 模型为基础的 Caco-2/免疫细胞共培养模型,该模型能够为研究重金属引起的肠道上皮炎症和肠道细胞-免疫细胞间通信提供有效工具。目前,常用以建立此模型的免疫细胞主要有人外周血单核细胞(PBMC)、人髓

系白血病单核细胞(THP-1)和人 Burkitt's 淋巴瘤细胞(Raji B)等。目前比较主流的 Caco-2/免疫细胞模型是在 Transwell 膜上培养肠道细胞,待其形成完整单层后(约 14 d),在膜的下侧培养免疫细胞,2 种细胞并不直接接触。然而一些研究采用了较为特殊的建立方法,Susewind 等^[41]将 2 种细胞培养在同一腔室中,使两者直接接触;还有的研究则采用 3 μm 孔径 Transwell 建立 Caco-2/免疫细胞共培养倒置模型,用于考察免疫细胞在肠上皮层的迁移^[42]。

Caco-2/免疫细胞模型目前多用于纳米颗粒毒性、微生物对肠道炎症的影响和细胞间通信研究^[43-44],在重金属领域的研究较少。不过近几年陆续有研究采用此模型开展金属毒性的相关研究。Kämpfer^[45]建立了 Caco-2/THP-1 共培养模型研究氧化铜(CuO)纳米颗粒(nanoparticles, NPs)对肠道炎症反应和通透性的影响。Calatayud 等^[46]报道了无机三价砷和 2 种有机三价砷 MMA(III)和 DMA(III)在 Caco-2/PBMC 共培养模型中的促炎症作用,并检测到释放到基底侧的炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 大幅增加。

在各种 Caco-2/免疫细胞模型中,Caco-2/Raji B 模型是较为特殊的一种。据报道,来源于人淋巴瘤的 Raji B 细胞能够诱导 Caco-2 细胞分化为 M 细胞表型^[41]。在人体实际环境中,M 细胞通过在肠腔侧的内吞作用和基底侧的胞吐作用跨肠上皮转运多种物质(尤其是颗粒性物质的转运)。利用 Caco-2/Raji B 模型,Ude 等^[47]评估了 CuO NPs 和 CuSO₄ 对肠道上皮屏障和炎症因子分泌的影响,发现 CuO NPs 和 CuSO₄ 诱导的铜毒性水平相似,结合 Caco-2/HT29-MTX 模型的对比实验发现,Caco-2/Raji B 模型对 CuO NPs 和 CuSO₄ 的转运效率更高,且对两者的毒性更为敏感。此外,Huang 等^[48]进行了稀土金属镧的吸收转运机制研究,氯化镧和柠檬酸镧在体外消化后>99.9%的镧发生了沉淀,形成了粒径 200 ~ 600 nm 的颗粒,Caco-2 模型和 Caco-2/Raji B 模型的转运实验显示 M 细胞是转运磷酸镧颗粒的主要途径。这都表明 Caco-2/Raji B 模型在(重)金属及其纳米颗粒在人体暴露风险方面的研究具有一定潜力,尽管如此,该模型依然忽视了黏液和基质细胞的作用。

2.2.3 Caco-2/HT29/Raji B 细胞共培养模型

综合考虑上述各模型的优缺点,一些研究者将 Caco-2/HT29 模型和 Caco-2/Raji B 模型结合,开发了囊括多种类型肠道细胞的 Caco-2/HT29/Raji B 细

胞三重共培养模型^[49]。该模型利用多种细胞各自的特征和共培养时的行为,以求在单层水平上更大程度地模拟人肠道上皮(图 2(c))。类似于 Caco-2/免疫细胞模型,Caco-2/HT29/Raji B 细胞共培养模型目前也多见于金属纳米毒理学的研究。Sohal 等^[49]建立 Caco-2/HT29/Raji B 共培养模型以研究 Fe₂O₃ NPs 和 ZnO NPs 对肠道上皮的影响,发现 ZnO NPs 的毒性较强。此外,该研究还通过与 Caco-2 模型的对比实验发现 Caco-2/HT29/Raji B 模型在研究金属 NPs 毒性方面具有较高的生理相关性,显著优于 Caco-2 模型。

此外有研究者将纳米颗粒毒性研究与金属生物有效性研究相结合,深入研究了纳米颗粒暴露对肠道吸收金属元素或营养元素的影响。Mahler 等^[50]对比了肠道细胞模型与动物实验的结果,证实了 Caco-2/HT29/Raji B 模型在金属生物有效性和纳米毒性交叉研究方面的潜力。该研究采用膳食性摄入的方式将三细胞模型暴露于聚苯乙烯纳米颗粒,分析了聚苯乙烯纳米颗粒暴露下的肠道模型对铁的吸收与转运,以及纳米颗粒的跨肠上皮转运,发现肠细胞模型对大粒径(>200 nm)聚苯乙烯颗粒的转运是主动耗能的过程,Raji B 细胞诱导分化的 M 细胞在大粒径颗粒物转运中起重要作用,小粒径氨基化聚苯乙烯纳米颗粒则能够增强肠道细胞对铁的吸收与转运。

尽管 Caco-2/HT29/Raji B 三细胞模型在重金属相关领域的研究中鲜有应用,但不可否认的是,在其他领域的研究方法和经验对重金属研究极具参考价值。随着实验室硬件条件的改善和实验技术的发展,这一更具生理相关性的细胞模型在重金属领域具有广阔的应用前景。

2.2.4 Caco-2 细胞/靶细胞分层共培养模型

重金属经肠道上皮吸收转运进入人体血液循环,最终到达相应的毒性靶器官,并对其产生毒害作用。因此,研究者将肠道细胞与不同器官来源的细胞共同建立了 Caco-2/靶细胞分层共培养模型(图 2(d)),以期同时进行重金属的生物有效性与生物毒性研究,并为重金属细胞毒性参数和生物代谢转化研究提供一种具有潜力的评估工具。该模型常见的共培养体系有 Caco-2/肝细胞、Caco-2/血管细胞和 Caco-2/神经细胞等,这些共培养体系已被证明具有类似器官系统的功能,以及不同器官来源细胞之间的相互作用,并能够用以检测化学物质的吸收转运和转化代谢过程。

Caco-2/肝细胞共培养模型是一类典型的 Caco-

2/靶器官模型,肝细胞的引入能够使模型在研究肠道吸收转运和毒性效应的同时,开展肠细胞/肝细胞相互作用、肝毒性和肝脏代谢转化的研究。Scheers等^[51]在Caco-2细胞模型的基底侧孔底培养了HepG2肝细胞,建立的Caco-2/HepG2模型被同时用于研究肠道对铁的吸收转运和肝细胞分泌的铁调素(hepcidin)对肠道铁吸收转运的调节作用。研究发现,在铁的肠道吸收转运过程中,HepG2细胞通过分泌铁调素与Caco-2细胞产生相互作用,Caco-2/HepG2细胞共培养模型增加了Caco-2细胞中的铁蛋白水平,这也表明在研究中需考虑肝脏对肠道铁吸收转运的调节作用。此外,Sutherland等^[26]采用Caco-2/肝HepaRG细胞共培养模型评估了人肠道细胞和肝脏细胞对多种有机污染物和重金属污染的鱼和牡蛎提取物的抗氧化反应,还通过单培养与共培养模式的比较研究提出,Caco-2/HepaRG共培养模型可能更适用于重金属复合污染的毒性研究。这种共培养模式在研究重金属或其他污染物对人类健康方面的影响尤为重要,因为肝脏是代谢最活跃的器官,负责外源性物质的解毒。

除上述模型外,一些研究者建立了Caco-2/血管内皮细胞(如EA.hy926细胞)分层共培养模型,用于研究食品活性成分对炎症反应和心血管疾病发展的影响^[52-53]。另有研究者建立了Caco-2/神经细胞(如PC12细胞)分层共培养模型,以研究肠上皮细胞与肠神经细胞之间的相互作用,如Satsu等^[54]研究Caco-2/PC12细胞共培养模型,发现Caco-2细胞合成分泌的神经生长因子能够促使神经PC12细胞分化为交感神经样细胞,并促进神经细胞轴突分支和生长。虽然这些模型目前应用的主要领域在食品科学和生命科学方面,但其可以推广至包括重金属在内的污染物毒性研究中,如Caco-2/血管内皮细胞模型可用于研究重金属在被肠道吸收后引起的炎症反应或对心血管疾病发展的影响,Caco-2/神经细胞模型可评估重金属吸收后对人体产生的神经毒性。

肠细胞共培养模型虽说增加了肠道细胞类群,在一定程度上提高了生理拟真性,但共培养模型缺乏细胞与基质的相互作用,不能完全重建组织结构,一些癌症来源的细胞系也与真实肠道细胞存在表达谱差异。但迄今为止共培养模型仍是研究重金属跨肠道细胞吸收转运和毒性机制的有利工具(表2)。为了开发更接近真实生理状态的肠细胞模型,近年来干细胞、类器官和微流控芯片技术兴起,这为3D

化肠道细胞模型提供了新方向。

3 肠细胞模型体外功能化培养优化研究 (Optimization of functional culture of intestinal cell model *in vitro*)

由于建立肠道细胞模型一般需要维持21 d的培养以实现细胞的分化和紧密连接,较长的培养时间易使模型受到微生物污染而导致实验失败,因此许多研究者尝试缩短肠道细胞模型建立所需时间。

生长因子是调节细胞的生长和分化的重要生物分子,马美湖和黄晶^[58]向Caco-2细胞培养基中添加生长因子抗坏血酸,模型完整建立的时间缩短为9 d。细胞外基质(ECM)是肠道上皮细胞的主要微环境成分,其中含有胶原、生长因子等生物分子,Li等^[59]通过还原肠道细胞ECM的方式,将Caco-2细胞培养于小肠粘膜下层水凝胶之上,用时7 d即成功建立Caco-2细胞模型,同时添加ECM也是肠道细胞模型3D化的一种尝试。此外,一些化学物质也能够促进Caco-2细胞的生长与分化,例如在细胞培养基中添加细胞分化诱导剂丁酸,11 d内建成模型^[28]。

尽管快速建立法能大幅缩短模型建立所需的时间,减少实验成本,但目前对待Caco-2快速建立模型的态度仍需谨慎,有研究发现通过快速方法建立的Caco-2模型的细胞外排蛋白表达较少,影响了物质的跨上皮转运^[60]。

4 肠道细胞模型的验证评价方法 (Validation methods of intestinal cell model)

验证肠道细胞模型是否成功建立,需要对模型的完整性、分化特征和肠道功能进行检测。测量细胞层的跨膜电阻值(trans epithelial electrical resistance, TEER)是验证模型完整性最为简单易行的方法。随着肠细胞的生长汇合以及紧密连接的加强,多孔膜上的孔隙不断被细胞封闭,其TEER也不断提高,因此运用跨膜电阻仪检测模型的TEER即可快速检验细胞模型的完整性。通常,细胞间紧密连接性能越强,测得的模型TEER值就越高。在一项食品中重金属生物有效性的研究中,研究者在进行转运实验前对模型进行验证,检测到TEER值达到520~610 $\Omega \cdot \text{cm}^2$,高于设备参考值的250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ^[55]。此外,细胞间紧密连接直接影响细胞旁途径转运量。一些分子(如荧光黄、FITC标记的葡聚糖和甘露醇等)通过细胞旁途径实现跨肠道上皮转运,因此当细胞间紧密连接性能越强、模型完整性越高时,此类分子

表 2 肠道细胞模型的优缺点及其在重金属研究领域的应用范围
Table 2 Advantages and limitations of each intestinal cell model and its application in the research areas of heavy metals

模型种类 Model types	优点 Advantages	缺点 Limitations	在重金属领域的主要应用场景 Application scenarios
单培养模型 Single-culture models	<p>Caco-2 模型 Caco-2 model</p> <p>模型培养方法简便; 培养在多孔膜上能自发分化; 重复性好 Culture method is handy; spontaneous differentiation; good repeatability</p> <p>HT29 模型 HT29 model</p> <p>具有黏液层 Production of mucus layer</p> <p>T84 模型 T84 model</p> <p>理想的结肠模型; 不易分化; 可分泌黏液 Colon model; difficult to differentiate; mucus secretion</p>	<p>低表达一些转运蛋白和代谢酶; 缺少黏液层; 紧密连接过度导致细胞旁路途径减少 Low expression of some transporters and metabolic enzymes; lack of mucus layer; too tight junctions to reduce paracellular transport</p> <p>紧密连接性能不足; 细胞表型因培养条件而异; 且转运性能不如 Caco-2 模型 Less tight junctions; cell phenotypes vary on culture conditions; transport performance is weaker than Caco-2 model</p> <p>顶侧微绒毛数量少; 转运性能不如 Caco-2 模型 Few microvilli on apical side; transport performance is weaker than Caco-2 model</p>	<p>重金属的生物有效性^[21-25, 55], 吸收转运机制^[6]和肠上皮毒性研究^[18, 26] Bioavailability^[21-25, 55], transport mechanisms^[6] and intestinal epithelial toxicity caused by heavy metals^[18, 26]</p> <p>重金属的生物有效性^[30, 36], 吸收转运机制^[30]和肠上皮毒性研究^[56] Bioavailability^[30, 36], transport mechanisms^[30] and intestinal epithelial toxicity caused by heavy metals^[56]</p> <p>重金属/重金属纳米颗粒的肠上皮毒性^[31] Intestinal epithelial toxicity of heavy metals or heavy metal nanoparticles^[31]</p> <p>重金属的生物有效性^[28, 38], 吸收转运机制^[28, 39]和肠上皮毒性研究^[57] Bioavailability^[28, 38], transport mechanisms^[28, 39] and intestinal epithelial toxicity caused by heavy metals^[57]</p> <p>重金属/重金属纳米颗粒的生物有效性, 肠道炎症反应研究^[43, 45-46] Bioavailability and intestinal inflammatory response for heavy metals or heavy metal nanoparticles^[43, 45-46]</p>
共培养模型 Co-culture models	<p>Caco-2/HT29 模型 Caco-2/HT29 model</p> <p>具备黏液层; 细胞旁路途径转运量增加; 一些转运蛋白的表达更接近体内值 Production of mucus layer; better paracellular transport; expression levels of some transporters are close to actual levels</p> <p>Caco-2/免疫细胞模型 Caco-2/immune cell model</p> <p>理想的肠道免疫研究模型 Ideal model for studies on intestinal immunity</p> <p>Caco-2/Raji B 模型 Caco-2/Raji B model</p> <p>良好的颗粒物肠道吸收转运模型; 具有 M 细胞 Better model for absorption and transport of particles; have M cells</p> <p>Caco-2/靶细胞模型 Caco-2/target cell model</p> <p>经转运后, 可直接对重金属对靶细胞的毒性效应进行分析 After transport, toxic effects of heavy metals on target cells can be directly analyzed</p> <p>Caco-2/HT29/Raji B 模型 Caco-2/HT29/Raji B model</p> <p>囊括了 3 种细胞类型; 适用于多类型研究; 生理相关性较好 Include 3 cell types; suitable for multiple types of research; better physiological relevance</p>	<p>细胞系克隆型的差异性导致不同实验室存在结果差异 Differences of clones lead to different results in different laboratories</p> <p>肠细胞种类单一; 且缺少黏液层 Few intestinal cell types; lack of mucus layer</p> <p>模型中的 M 细胞比例取决于 Caco-2 与 Raji B 细胞共培养时间长短; 缺少黏液层 Proportion of M cells in the model depends on the duration of Caco-2 cell and Raji B cell co-culture; lack of mucus layer</p> <p>肠细胞种类单一; 缺少黏液层 Few intestinal cell types; lack of mucus layer</p> <p>仍以癌症细胞系构成; 一些基因表达有异于人体实际; 缺少细胞外基质(ECM) Still constitute by cancer cell lines; expression levels of some genes are different from human actual condition; lack of extracellular matrix (ECM)</p>	<p>重金属/重金属纳米颗粒的生物有效性和摄取机制研究^[47-48] Bioavailability and uptake mechanisms of heavy metals or heavy metal nanoparticles^[47-48]</p> <p>重金属生物有效性和肠道上皮/靶细胞毒性效应研究^[26, 51] Bioavailability, intestinal epithelial toxicity and target cytotoxicity of heavy metals^[26, 51]</p> <p>重金属/重金属纳米颗粒生物有效性, 吸收转运机制, 肠上皮毒性研究^[49-50] Bioavailability, transport mechanisms and intestinal epithelial toxicity of heavy metals or heavy metal nanoparticles^[49-50]</p>

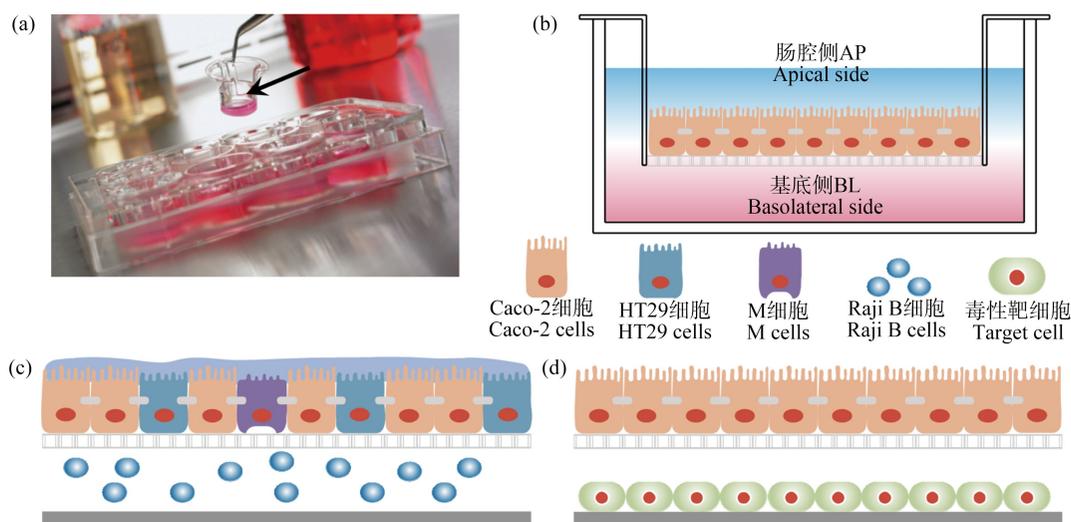


图2 肠道细胞模型示意图

注:(a) Transwell 小室;(b) Caco-2 单培养模型;(c) Caco-2/HT29/Raji B 细胞模型;(d) Caco-2/毒性靶细胞模型。

Fig. 2 Illustration of intestinal cell models

Note: (a) Transwell chamber; (b) Caco-2 cell model; (c) Caco-2/HT29/Raji B cell model; (d) Caco-2/target cell model.

越难以通过,借助这一现象也能够验证模型的完整性。例如,Lv 等^[28]通过检测荧光黄的转运量来验证模型完整性,基于荧光黄的转运量计算渗透系数,间接反映了模型的完整性。

对于模型细胞分化特征的验证,最直观的方法是用电子显微镜或原子力显微镜观察肠道细胞形态。一项研究中采用的方法是将多孔膜从小室取下,将多孔膜上的细胞固定化后,经包埋切片置于投射电子显微镜下成像,观察细胞是否出现极化,细胞间的紧密连接、桥粒和细胞顶侧的刷状缘是否形成,以此作为细胞分化的依据^[28]。除此以外,还可以通过免疫细胞化学技术(immunocytochemistry)对不同细胞的特异性细胞标志物进行检测,如 Caco-2 细胞的 P-糖蛋白(P-gp)、HT29-MTX 的黏液蛋白(MUC)等。Mahler 等^[50]为验证 Caco-2/HT29/Raji B 模型出现 M 细胞样分化,对其特异性标志物整联蛋白 $\beta 1$ 和 Sialyl Lewis A antigen 进行了免疫荧光染色,由此证明模型部分细胞出现 M 样细胞分化。此外,为了衡量建成模型的肠道转运功能,对转运蛋白的活性进行检测,如用模型单位时间内对地高辛(digoxin)的转运量验证 P-gp 的转运活性^[61],用 5(6)-羧基-2',7'-二氯荧光素(CDCE)检测多药耐药相关蛋白(MRP2/3/5)的转运活性^[62]等。

5 展望:肠道细胞模型的 3D 化尝试 (Prospects: 3D modeling of intestinal cell model)

肠道细胞模型作为动物模型的替代,在重金属

暴露风险评估与毒性机制研究方面具有重要作用。从最初简单的 2D 肠道细胞单培养模型,发展到多种细胞的 2D 共培养模型,再到 3D 肠道类器官模型,虽然肠道细胞模型已经得到了一定发展,但在增加模型的生理相关性和重金属研究应用方面仍有许多工作要做。目前,大多数肠道细胞模型仍然以 2D 形式构建,尽管 2D 模型尚存局限性,但其提供了一种比动物实验更经济和道德的选择,且与重金属领域研究结合最紧密,并取得了不少有意义的研究成果,未来还能继续在重金属研究领域发挥其应有的作用。此外,近年出现了以微流控芯片、肠道类器官为代表的 3D 肠道细胞模型,有着更高的生理相关性与复杂性,是肠道-重金属研究的良好改进方案,为未来的发现提供前所未有的机遇,但其挑战在于目前高昂的研究成本和技术难度。

5.1 肠道类器官

由于肠道细胞模型所采用的永生或癌症细胞系中的信号通路和核心代谢有所改变,动物模型也与人体实际肠道存在物种差异。为了更好地重现肠道上皮的复杂性,还原人肠上皮组织结构,研究者基于诱导分化培养或多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和肠干细胞(intestinal stem cells, ISCs)开发构建了人类肠道类器官(intestinal organoids, 又称 mini-gut)^[63]。在近年来对已知的发育线索和生长发育因子的理解基础上,干细胞可以在人工 ECM 上诱导产生类似肠

道器官的绒毛样三维细胞结构,干细胞诱导分化形成多种肠道上皮细胞(包括肠干细胞、肠上皮细胞、杯状细胞、潘氏细胞和内分泌细胞)(图 3),能够实现人体肠道吸收转运、屏障和分泌等多种功能^[64]。

根据细胞的来源不同,肠道类器官分为 HIOs (human intestinal organoids)和 HIEs(human intestinal enteroids)2 种类型。多能干细胞或胚胎干细胞来源的 HIOs 除肠道上皮外还可能具有间质,因为材料细胞的稀缺和干细胞培养的高成本,目前在肠道生理学或病理学研究中应用较少。HIEs 是从肠隐窝组织中的肠干细胞发育而来的肠道类器官,能够长期维持其原始的生理和遗传特征^[65]。然而,在 ECM 凝胶中培养的肠类器官是封闭的管腔结构,使得在实际研究中很难进行肠腔重金属暴露或取样操作。为了增强肠类器官的应用场景和可操作性,研究者将培养于 ECM 上的 HIEs 移植至平板或 Transwell 膜上用以开展独立的肠道上皮暴露研究^[66]。

不同于细胞模型和动物模型,肠道类器官培养反映了人体肠道上皮的细胞异质性,因此肠道类器官提供了一个全新的高生理相关性体外平台,这个平台为重金属暴露风险研究带来了新机遇。但不可

否认的是,肠道类器官的取材存在着伦理问题,此外高成本、高人力的现状也使得肠道类器官模型只在高水平研究中有应用空间。

5.2 “肠道芯片”模型

器官芯片(Organ-on-a-Chip)是一种微流控细胞培养装置,重现人体活体器官的关键功能和微环境,为研究器官结构和功能提供了另一种途径。它最初借鉴了计算机微电子芯片的制造方法(如光刻等),它的主体结构为流体连续灌流的腔室,里面培养有用以模拟组织和器官的细胞(图 4)。目前常见的商业化肠道细胞模型平台,如 Transwell 小室,上下腔室的培养液是静止的,而在人体实际肠道环境中,肠道上皮承受着肠腔内食糜的流动和剪切应力的作用。鉴于此,人体肠道微流控芯片又称为肠道芯片(Gut-on-a-Chip)已被开发并应用于肠道生理学和病理学研究中。

已有研究团队报道了基于聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)设计和制造的肠道微流控芯片的器件,微流控芯片系统为肠道细胞提供支持、流体持续灌注和实时监控^[67]。Bein 等^[68]报道,在 Caco-2 细胞和肠道来源的其他上皮细胞构建

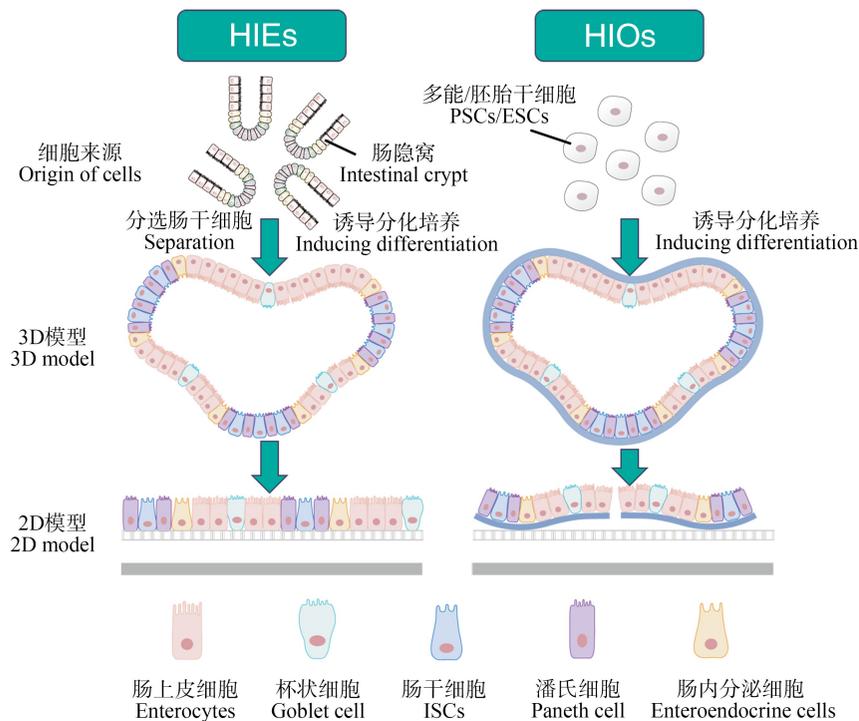


图 3 人肠道类器官的 2 种形式 (HIEs 和 HIOs)

注:PSCs 为多能干细胞;ESCs 为胚胎干细胞;ISCs 为肠干细胞。

Fig. 3 Illustration of two forms for human gut organoids (HIEs and HIOs)

Note: PSCs means pluripotent stem cells; ESCs means embryonic stem cells; ISCs means intestinal stem cells.

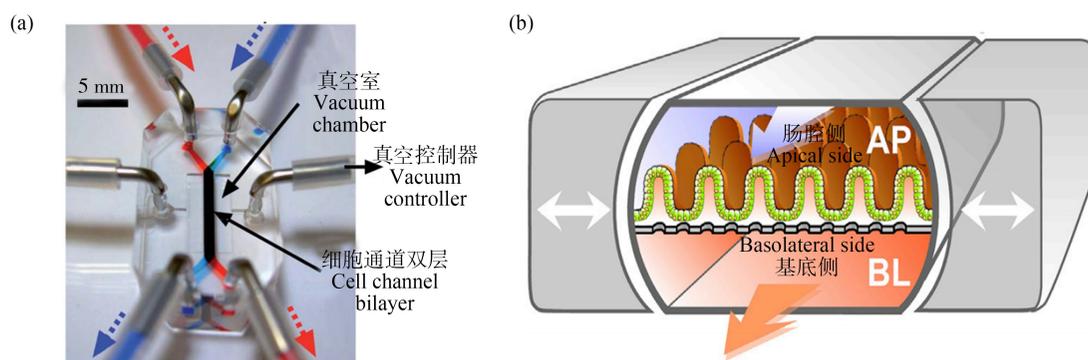


图4 肠道细胞微流控芯片^[69, 71]

注:(a)微流控芯片实物;(b)微流控芯片剖面图。

Fig. 4 Illustration of intestinal cell microfluidic chip^[69, 71]

Note: (a) Microfluidic chip; (b) Section view of microfluidic chip.

的肠道芯片中,同时施加肠腔侧和基底侧的流体灌流,能刺激肠细胞模型形成肠绒毛样结构,绒毛生长高度可达上百微米,并增加肠道特异性功能的表达,包括黏液的分泌等。为更好重建肠道类器官的隐窝与绒毛结构,Shin等^[69]结合生物来源的肠道类器官构建了肠道类器官-微流控芯片模型。近年来,肠道芯片模型的工程复杂性逐步增加,研究者通过流体管道连接不同器官微流控芯片陆续建立起肠道-血管芯片^[67]、甚至肠道-多器官芯片模型,如肠-肝-皮肤-肾四器官芯片模型^[70]等。

许多微流控芯片研究团队采用的是自制芯片,这就使得不同实验室间的芯片参数与功能不尽相同,并且不是每个实验室都有条件制造此类芯片。尽管目前已有商业化芯片的推出,使得不具备制造芯片条件的实验室也能够采用这一技术,但高昂的售价让许多研究者望而却步。未来,随着肠道微流控芯片模型发展完善,肠道芯片能够为研究包括重金属在内的污染物人体暴露风险评估提供新的技术方案,对于揭示重金属等污染物人体暴露风险具有重要意义。

通讯作者简介:向萍(1985—),男,博士,特聘研究员,主要研究方向为环境污染与人体健康。

参考文献(References):

- [1] Li H B, Li M Y, Zhao D, et al. Arsenic, lead, and cadmium bioaccessibility in contaminated soils: Measurements and validations [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2020, 50(13): 1303-1338
- [2] Li H B, Chen X Q, Wang J Y, et al. Antagonistic interac-

tions between arsenic, lead, and cadmium in the mouse gastrointestinal tract and their influences on metal relative bioavailability in contaminated soils [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(24): 14264-14272

- [3] Allaire J M, Crowley S M, Law H T, et al. The intestinal epithelium: Central coordinator of mucosal immunity [J]. *Trends in Immunology*, 2018, 39(9): 677-696
- [4] Jeong C H, Seok J S, Petriello M C, et al. Arsenic down-regulates tight junction claudin proteins through p38 and NF- κ B in intestinal epithelial cell line, HT-29 [J]. *Toxicology*, 2017, 379: 31-39
- [5] Bridges C C, Zalups R K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals [J]. *Toxicology and applied pharmacology*, 2005, 204(3): 274-308
- [6] Fujishiro H, Hamao S, Tanaka R, et al. Concentration-dependent roles of DMT1 and ZIP14 in cadmium absorption in Caco-2 cells [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2017, 42(5): 559-567
- [7] Shukalek C B, Swanlund D P, Rousseau R K, et al. Arsenic triglutathione [As(GS)₃] transport by multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC₁) is selectively modified by phosphorylation of Tyr920/Ser921 and glycosylation of Asn19/Asn23 [J]. *Molecular Pharmacology*, 2016, 90(2): 127-139
- [8] Clifford R J, Maryon E B, Kaplan J H. Dynamic internalization and recycling of a metal ion transporter: Cu homeostasis and CTR1, the human Cu⁺ uptake system [J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(8): 1711-1721
- [9] Martinez-Finley E J, Chakraborty S, Fretham S J, et al. Cellular transport and homeostasis of essential and non-essential metals [J]. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 2012, 4(7): 593-605

- [10] Cousins R J, Liuzzi J P. Trace Metal Absorption and Transport [M]//Physiology of the Gastrointestinal Tract. Amsterdam: Elsevier, 2018: 1485-1498
- [11] Thévenod F, Fels J, Lee W K, et al. Channels, transporters and receptors for cadmium and cadmium complexes in eukaryotic cells: Myths and facts [J]. *BioMetals*, 2019, 32(3): 469-489
- [12] Yanatori I, Kishi F. DMT1 and iron transport [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 133: 55-63
- [13] Tadini-Buoninsegni F, Smeazzetto S. Mechanisms of charge transfer in human copper ATPases ATP7A and ATP7B [J]. *IUBMB Life*, 2017, 69(4): 218-225
- [14] Roggenbeck B A, Banerjee M, Leslie E M. Cellular arsenic transport pathways in mammals [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2016, 49: 38-58
- [15] Engström K, Ameer S, Bernaudat L, et al. Polymorphisms in genes encoding potential mercury transporters and urine mercury concentrations in populations exposed to mercury vapor from gold mining [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2013, 121(1): 85-91
- [16] Garbinski L D, Rosen B P, Chen J. Pathways of arsenic uptake and efflux [J]. *Environment International*, 2019, 126: 585-597
- [17] Ichida Y, Hosokawa N, Takemoto R, et al. Significant species differences in intestinal phosphate absorption between dogs, rats, and monkeys [J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2020, 66(1): 60-67
- [18] Luo S, Terciolo C, Bracarense A P F L, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of a mycotoxin, deoxynivalenol, and a trace metal, cadmium, alone or in a mixture on the intestinal barrier [J]. *Environment International*, 2019, 132: 105082
- [19] Bourguin J, Billaut-Laden I, Happillon M, et al. Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: Comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines [J]. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 2012, 40(4): 694-705
- [20] 王振洲, 崔岩山, 张震南, 等. Caco-2 细胞模型评估金属人体生物有效性的研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(6): 1027-1034
Wang Z Z, Cui Y S, Zhang Z N, et al. Evaluation on the human bioavailability of metals using Caco-2 cell model: A review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(6): 1027-1034 (in Chinese)
- [21] 方勇, 夏季, 李红梅, 等. 基于体外模拟消化/Caco-2 细胞模型测定大米中铅的生物有效性 [J]. *食品科学*, 2016, 37(16): 199-204
- Fang Y, Xia J, Li H M, et al. Determination of the bioavailability of lead in rice by *in vitro* simulate digestion/Caco-2 cell model [J]. *Food Science*, 2016, 37(16): 199-204 (in Chinese)
- [22] Lee K W, Lee S G. Inorganic arsenic bioaccessibility/bioavailability from cooked rice using *in vitro* digestion/Caco-2 cell model [J]. *The FASEB Journal*, 2017, 31(Suppl1): 608
- [23] Fu J, Cui Y S. *In vitro* digestion/Caco-2 cell model to estimate cadmium and lead bioaccessibility/bioavailability in two vegetables: The influence of cooking and additives [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 59: 215-221
- [24] Kachenpukdee N, Santerre C R, Ferruzzi M G, et al. Modified dietary fiber from cassava pulp and assessment of mercury bioaccessibility and intestinal uptake using an *in vitro* digestion/Caco-2 model system [J]. *Journal of Food Science*, 2016, 81(7): T1854-T1863
- [25] Xia J, Fang Y, Shi Y, et al. Effect of food matrices on the *in vitro* bioavailability and oxidative damage in PC12 cells of lead [J]. *Food Chemistry*, 2018, 266: 397-404
- [26] Sutherland G E, Franco M E, Willing S M, et al. Applicability of a human cell co-culture model to evaluate antioxidant responses triggered by chemical mixtures in fish and oyster homogenates [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 128: 154-162
- [27] Turco L, Catone T, Caloni F, et al. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this *in vitro* model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? [J]. *Toxicology in Vitro*, 2011, 25(1): 13-20
- [28] Lv Q, He Q, Wu Y, et al. Investigating the bioaccessibility and bioavailability of cadmium in a cooked rice food matrix by using an 11-day rapid Caco-2/HT-29 co-culture cell model combined with an *in vitro* digestion model [J]. *Biological Trace Element Research*, 2019, 190(2): 336-348
- [29] Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, et al. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function [J]. *Comprehensive Physiology*, 2011: 223-255
- [30] Lecoeur S, Huynh-Delerme C, Blais A, et al. Implication of distinct proteins in cadmium uptake and transport by intestinal cells HT-29 [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2002, 18(6): 409-423
- [31] Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, et al. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells [J]. *Cancer*

- Research, 1990, 50(19): 6334-6343
- [32] Hidalgo I J. Assessing the absorption of new pharmaceuticals [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2001, 1 (5): 385-401
- [33] Breton J, Daniel C, Vignal C, et al. Does oral exposure to cadmium and lead mediate susceptibility to colitis? The dark-and-bright sides of heavy metals in gut ecology [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19200
- [34] Van Seville Y Z A, Gibson R J, Wardill H R, et al. Dacomitinib-induced diarrhea: Targeting chloride secretion with crofelemer [J]. *International Journal of Cancer*, 2018, 142(2): 369-380
- [35] Duan T Y, Cil O, Tse C M, et al. Inhibition of CFTR-mediated intestinal chloride secretion as potential therapy for bile acid diarrhea [J]. *FASEB Journal*, 2019, 33 (10): 10924-10934
- [36] Huang H, Liu J Q, Yu Y, et al. Regulation of TWIK-related potassium channel-1 (Trek1) restitutes intestinal epithelial barrier function [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2016, 13(1): 110-118
- [37] Maares M, Duman A, Keil C, et al. The impact of apical and basolateral albumin on intestinal zinc resorption in the Caco-2/HT-29-MTX co-culture model [J]. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 2018, 10(7): 979-991
- [38] Vázquez M, Calatayud M, Vélez D, et al. Intestinal transport of methylmercury and inorganic mercury in various models of Caco-2 and HT29-MTX cells [J]. *Toxicology*, 2013, 311(3): 147-153
- [39] Laparra J M, Glahn R P, Miller D D. Different responses of Fe transporters in Caco-2/HT29-MTX cocultures than in independent Caco-2 cell cultures [J]. *Cell Biology International*, 2009, 33(9): 971-977
- [40] Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh C G, et al. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000, 89(1): 63-75
- [41] Susewind J, de Souza Carvalho-Wodarz C, Repnik U, et al. A 3D co-culture of three human cell lines to model the inflamed intestinal mucosa for safety testing of nanomaterials [J]. *Nanotoxicology*, 2016, 10(1): 53-62
- [42] Tyrer P C, Bean E G, Ruth Foxwell A, et al. Effects of bacterial products on enterocyte-macrophage interactions *in vitro* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 413(2): 336-341
- [43] Kämpfer A A M, Urbán P, la Spina R, et al. Ongoing inflammation enhances the toxicity of engineered nanomaterials: Application of an *in vitro* co-culture model of the healthy and inflamed intestine [J]. *Toxicology in Vitro*, 2020, 63: 104738
- [44] Morini J, Babini G, Barbieri S, et al. The interplay between radioresistant Caco-2 cells and the immune system increases epithelial layer permeability and alters signaling protein spectrum [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 223
- [45] Kämpfer A A M. Development of an *in vitro* co-culture model of the human small intestine in homeostatic or inflamed state and its application in nanotoxicological research [D]. Edinburgh: Heriot-Watt University, 2017: 172-178
- [46] Calatayud M, Gimeno-Alcañiz J V, Devesa V, et al. Proinflammatory effect of trivalent arsenical species in a co-culture of Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells [J]. *Archives of Toxicology*, 2015, 89(4): 555-564
- [47] Ude V C, Brown D M, Stone V, et al. Using 3D gastrointestinal tract *in vitro* models with microfold cells and mucus secreting ability to assess the hazard of copper oxide nanomaterials [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, 17 (1): 70
- [48] Huang H X, Liu H X, Ma X J, et al. Lanthanum chloride or citrate is absorbed mainly via M cells in gastrointestinal tracts with lanthanum phosphates as the transformed species [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2018, 27(8): 553-564
- [49] Sohal I S, DeLoid G M, O' Fallon K S, et al. Effects of ingested food-grade titanium dioxide, silicon dioxide, iron (III) oxide and zinc oxide nanoparticles on an *in vitro* model of intestinal epithelium: Comparison between monoculture vs. a mucus-secreting coculture model [J]. *Nano-Impact*, 2020, 17: 100209
- [50] Mahler G J, Esch M B, Tako E, et al. Oral exposure to polystyrene nanoparticles affects iron absorption [J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(4): 264-271
- [51] Scheers N M, Almgren A B, Sandberg A S. Proposing a Caco-2/HepG2 cell model for *in vitro* iron absorption studies [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25(7): 710-715
- [52] Jiang Q, Zhang H, Yang R Q, et al. Red-osier dogwood extracts prevent inflammatory responses in Caco-2 cells and a Caco-2 BBe₁/EA.hy926 cell co-culture model [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 428
- [53] Chen Y H, Zhang H, Mats L, et al. Anti-inflammatory effect and cellular uptake mechanism of peptides from common bean (*Phaseolus vulga* L.) milk and yogurts in Caco-2 mono- and Caco-2/EA.hy926 co-culture models [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67

- (30): 8370-8381
- [54] Satsu H, Yokoyama T, Ogawa N, et al. Effect of neuronal PC12 cells on the functional properties of intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(6): 1312-1318
- [55] Aziz R, Rafiq M T, Li T Q, et al. Uptake of cadmium by rice grown on contaminated soils and its bioavailability/toxicity in human cell lines (Caco-2/HL-7702) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(13): 3599-3608
- [56] Zhai Q X, Tian F W, Zhao J X, et al. Oral administration of probiotics inhibits absorption of the heavy metal cadmium by protecting the intestinal barrier [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(14): 4429-4440
- [57] Saez-Tenorio M, Domenech J, García-Rodríguez A, et al. Assessing the relevance of exposure time in differentiated Caco-2/HT29 cocultures. Effects of silver nanoparticles [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 123: 258-267
- [58] 马美湖, 黄晶. Caco-2 细胞模型快速培养法的建立与评价[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(3): 265-270
- Ma M H, Huang J. Establish and evaluation of an accelerated Caco-2 monolayer culture system [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(3): 265-270 (in Chinese)
- [59] Li N, Sui Z G, Liu Y, et al. A fast screening model for drug permeability assessment based on native small intestinal extracellular matrix [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(60): 34514-34524
- [60] Sevin E, Dehouck L, Fabulas-da Costa A, et al. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery [J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2013, 68(3): 334-339
- [61] Cai Y K, Xu C S, Chen P Y, et al. Development, validation, and application of a novel 7-day Caco-2 cell culture system [J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2014, 70(2): 175-181
- [62] Siissalo S, Hannukainen J, Kolehmainen J, et al. A Caco-2 cell based screening method for compounds interacting with MRP2 efflux protein [J]. *European Journal of Pharmacology and Biopharmacology*, 2009, 71(2): 332-338
- [63] Fatehullah A, Tan S H, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease [J]. *Nature Cell Biology*, 2016, 18(3): 246-254
- [64] Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, et al. A refined culture system for human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial organoids [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(1): 314-328
- [65] Ramani S, Crawford S E, Blutt S E, et al. Human organoid cultures: Transformative new tools for human virus studies [J]. *Current Opinion in Virology*, 2018, 29: 79-86
- [66] VanDussen K L, Marinsaw J M, Shaikh N, et al. Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays [J]. *Gut*, 2015, 64(6): 911-920
- [67] Jalili-Firoozinezhad S, Prantil-Baun R, Jiang A, et al. Modeling radiation injury-induced cell death and countermeasure drug responses in a human Gut-on-a-Chip [J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 223
- [68] Bein A, Shin W, Jalili-Firoozinezhad S, et al. Microfluidic organ-on-a-chip models of human intestine [J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 5(4): 659-668
- [69] Shin W, Hinojosa C D, Ingber D E, et al. Human intestinal morphogenesis controlled by transepithelial morphogen gradient and flow-dependent physical cues in a microengineered gut-on-a-chip [J]. *iScience*, 2019, 15: 391-406
- [70] Maschmeyer I, Lorenz A K, Schimek K, et al. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents [J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(12): 2688-2699
- [71] Kim H J, Huh D, Hamilton G, et al. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow [J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(12): 2165-2174
- ◆