

## 基于 Caco-2 细胞模型的辣椒素与槲皮素协同调节小肠糖代谢的分子机制

祝文轩, 李彤, 王向红, 米思\*  
(河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000)

**摘要** 为探究辣椒素与槲皮素协同调节小肠糖代谢的分子机制,借助 Caco-2 细胞单层模型,研究辣椒素与槲皮素单一及联合处理对 Caco-2 细胞存活率、细胞膜通透性的影响。采用免疫印迹法测定跨膜蛋白 Occludin、胞质蛋白 ZO-1、表面生长因子受体 EGFR 和纤维状肌蛋白 F-actin 以及葡萄糖转运关键蛋白 GLUT2、SGLT1、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 的表达量。结果显示:各试验处理组 Caco-2 细胞的增殖率均大于 75%,表明药物对细胞没有明显毒性,可进行后续试验。Caco-2 细胞单层模型的跨膜电阻值为(315.70±26.65)Ω·cm<sup>2</sup>,加药后各试验组的跨膜电阻值均呈现上升趋势,表明膜通透性变小,细胞屏障功能增强,可延缓小肠对葡萄糖的吸收。同时与空白对照组相比,各试验组上调了跨膜蛋白 Occludin(>0.65)、胞质蛋白 ZO-1(>0.51)、表面生长因子受体 EGFR(>0.19)和纤维状肌蛋白 F-actin(>0.04)的相对表达量,并且下调了葡萄糖转运关键蛋白 GLUT2(>1.00)、SGLT1(>0.78)、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase(>0.87)的相对表达水平。综合来看,辣椒素与槲皮素在调节小肠糖代谢方面具有协同效应,二者在高剂量水平以 1:3 比例混合效果最佳,主要通过增强肠道黏膜屏障功能,下调葡萄糖转运关键蛋白水平,从而抑制小肠对葡萄糖的吸收来达到调节糖代谢的效果。

**关键词** 辣椒素; 槲皮素; Caco-2 细胞模型; 小肠糖代谢; 分子机制

**文章编号** 1009-7848(2024)09-0093-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.009

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是我国栽培面积最大的蔬菜作物之一<sup>[1]</sup>,除作为鲜食蔬菜和调味品外,辣椒的营养健康功效受到国内外学者的关注。2019 年,《美国心脏病学会杂志》刊登的 1 项研究结果显示,成年人每周食用 4 次以上辣椒,可使各种疾病的总死亡风险降低 23%<sup>[2]</sup>。

新鲜辣椒果实中含有多种生物活性物质,包括辣椒碱、维生素、类胡萝卜素、矿物质、多酚化合物等<sup>[3-4]</sup>。前期研究普遍认为,辣椒素是辣椒果实中发挥调节糖代谢作用的活性成分,可通过抑制高级糖基化终产物生成,激活 PPAR $\gamma$ /FGF21/AMPK 信号通路<sup>[5]</sup>,改善肠道菌群失调<sup>[6]</sup>,刺激肠道胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)分泌<sup>[7]</sup>,激活香草素受体 1(TRPV1)<sup>[5,8-9]</sup>等多种途径发挥改善机体血糖稳态的功能作用。作者团队前期比较了不同品种辣椒的代谢物指纹图谱,发现

品种间差异最显著的化合物是辣椒素和槲皮素<sup>[3-4]</sup>。进一步研究发现,辣椒素含量低的品种反而具有更显著的调节糖代谢功效。由此推测,除辣椒素外,槲皮素是辣椒果实中发挥糖代谢调节作用的另一种关键活性化合物。

辣椒素和槲皮素为同时存在于辣椒果实中的两种具有调节糖代谢活性的关键化合物,二者间存在何种交互作用关系及其发挥作用的分子机制目前尚未明确。小肠是碳水化合物消化吸收最重要的场所<sup>[10-11]</sup>,上皮细胞是肠道机械屏障的核心。完整的肠道屏障能够延缓小肠对葡萄糖的吸收,降低餐后血糖水平,进而维持血糖稳态<sup>[12-13]</sup>。本研究以小肠屏障功能变化为切入点,借助 Caco-2 细胞单层模型,探讨辣椒素与槲皮素协同调节小肠糖代谢的分子机制。研究结果有助于深入的阐释辣椒果实发挥糖代谢调节功效的靶点和途径,为新型调节糖代谢功能因子的挖掘及辣椒资源的高值化开发利用提供试验依据。

**收稿日期:** 2023-09-16

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金项目(32202013);  
河北省自然科学基金生物农业联合基金培育项目(C2022204222)

**第一作者:** 祝文轩,女,硕士生

**通信作者:** 米思 E-mail: misi@hebau.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

Caco-2 细胞,北京协和细胞资源中心;辣椒

素(纯度 $\geq 98\%$ ),大连美仑生物技术有限公司;槲皮素(HPLC $\geq 98\%$ )、阿卡波糖,上海源叶生物技术有限公司;D-Hanks缓冲液、四甲基偶氮唑盐(MTT)、脱脂奶粉、DMEM培养基、二甲基亚砜(DMSO)、Tris、甘氨酸、SDS、Tween-20 0.1%,北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清、PBS缓冲液,南京维森特生物技术有限公司;三色预染蛋白质分子量标准、胰酶、BCA蛋白定量试剂盒,北京赛文生物技术有限公司;细胞裂解液、磷酸酶抑制剂,北京康为世纪生物技术有限公司;Omni-Easy™一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒,上海雅酶生物医药科技有限公司;Occludin、GLUT2,美国Abcam公司;GAPDH、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase、ZO-1、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG,武汉三鹰生物技术有限公司;SGLT-1,美国Immunoway公司。

## 1.2 仪器与设备

CP114型电子天平,奥豪斯仪器(常州)有限公司;显微镜YS100、倒置显微镜ECLIPSE Ts2, Nikon仪器公司;电泳仪BG-Power600、垂直电泳槽,北京百晶生物科技有限公司;半干转膜仪,美国Bio-Rad公司;凝胶成像仪JY04S-3E,北京君意东方电泳设备有限公司;细胞电阻仪,美国Milipore公司;GL-10000C型冷冻离心机、TGL-16G型离心机,上海安亭科学仪器厂;QTSX6150超声波清洗器,天津市瑞普电子仪器公司;超净工作台SW-CJ-1F,苏净安泰有限公司;CO<sub>2</sub>培养箱CB160, Binder公司;快速混均器MS3 digital, IKA公司;酶标仪1500-823, Thermo Scientific公司;电热恒温水浴锅HW.SY21-K,北京市长风仪器仪表有限公司;一次性巴氏吸管、贴壁细胞培养瓶、细胞培养板,广州洁特有限公司;Transwell培养板,中国甄选公司;无菌滤膜,美国PALL公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 样品制备 精密称取适量辣椒素和槲皮素,加入DMSO溶解,制得浓度为0.05 mol/L的母液;再用移液枪精密移取适量母液,加入DMEM培养基稀释,经0.22 μm无菌滤膜过滤除菌后,得到终浓度为1 000 μmol/L的辣椒素培养液和槲皮素培养液,封口膜封口,-20℃避光保存备用。

精密称取适量阿卡波糖,加入DMEM培养基

溶解,经0.22 μm无菌滤膜过滤除菌后,得到终浓度为1 mol/mL的阿卡波糖培养液,封口膜封口,-20℃避光保存备用。

1.3.2 Caco-2细胞培养及试验分组 Caco-2的细胞培养是用DMEM培养基,但需要另外添加10%的胎牛血清(FBS)。当细胞长至80%~90%时,进行传代培养。将DMEM培养基、胎牛血清、胰酶、PBS缓冲液放入水浴锅中37℃孵育30 min,用一次性移液管吸取培养瓶中旧的完全培养基,另一个一次性移液管吸取PBS缓冲液润洗细胞2次,加入适量胰酶,缓缓摇动细胞瓶后迅速吸弃,来去除贴壁不牢的细胞,在向瓶中加入适量胰酶,在37℃、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中消化3 min,显微镜下看到细胞不再紧密连接时,向瓶中加入之前胰酶量的双倍完全培养基,然后用移液枪吸取培养液将瓶底的细胞吹下来,再将培养液中的细胞吹打为单个细胞后,把细胞瓶中的培养液全部吸取到灭菌好的离心管中,1 000 r/min离心5 min,离心时间到弃上清加入适量完全培养基重新混匀,按1:3比例传代培养<sup>[14]</sup>。

试验分组:正常对照组(CK组)、阿卡波糖阳性对照组(Aca组,1×10<sup>-3</sup> mol/L)、辣椒素低浓度组(Cap-L组,12 μmol/L)、辣椒素中浓度组(Cap-M组,18 μmol/L)、辣椒素高浓度组(Cap-H组,24 μmol/L)、槲皮素低浓度组(Que-L组,12 μmol/L)、槲皮素中浓度组(Que-M组,18 μmol/L)、槲皮素高浓度组(Que-H组,24 μmol/L)、辣椒素与槲皮素低剂量联合处理组(Cap+Que/1:1-L组,12/12 μmol/L)、辣椒素与槲皮素中剂量联合处理组(Cap+Que/1:1-M组,18/18 μmol/L)、辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap+Que/1:1-H组,24/24 μmol/L)、辣椒素与槲皮素低剂量联合处理组(Cap+Que/1:3-L组,12/36 μmol/L)、辣椒素与槲皮素中剂量联合处理组(Cap+Que/1:3-M组,18/54 μmol/L)、辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap+Que/1:3-H组,24/72 μmol/L)、辣椒素与槲皮素低剂量联合处理组(Cap+Que/3:1-L组,36/12 μmol/L)、辣椒素与槲皮素中剂量联合处理组(Cap+Que/3:1-M组,54/18 μmol/L)、辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap+Que/3:1-H组,72/24 μmol/L)。

1.3.3 Caco-2 细胞存活率测定 选择对数生长期的 Caco-2 细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/mL 后摇匀, 将细胞悬液倒入无菌加样槽中, 使用排枪每孔吸取 100  $\mu$ L 接种到 96 孔板中。在恒温培养箱过夜培养后, 培养液换用由不含血清的 DMEM 培养基配制的药物各 100  $\mu$ L, 空白对照组中加入 100  $\mu$ L 不含血清的 DMEM 培养基。培养至 12, 24, 36 h 后, 不吸弃培养液, 直接在 96 孔板中每孔加入 0.5% MTT 溶液 20  $\mu$ L, 放到 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中继续培养 4 h。待培养结束, 小心将每个孔内的全部溶液吸弃, 避免枪头戳到细胞面, 之后用排枪向每孔加入 150  $\mu$ L DMSO 溶液, 放到摇床上低速振荡 10 min 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD)值<sup>[15]</sup>。根据公式(1)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \text{OD}_{\text{试验组}} / \text{OD}_{\text{空白对照组}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 Caco-2 细胞膜通透性测定 选择对数生长期的 Caco-2 细胞, 调整细胞密度为  $2.5 \times 10^5$  个/mL。0.5 mL 细胞悬液加入到 12 孔的 Transwell 培养板上室, 1.5 mL DMEM 完全培养基加入到下室, 留 1 个孔作为空白对照, 后置于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养。隔天拍照记录细胞生长形态, 采用细胞电阻仪每周测定 12 孔 Transwell 培养板的电阻值, 每次在各孔内取 3 个不同位置各测一次, 取平均值。其中第 1 周隔天换液, 后 2 周每天换液。

测定细胞跨膜电阻值之前, 首先将细胞电阻仪的电极用 75% 的酒精浸泡 15 min, 达到除菌的目的, 然后放入超净台中晾晒 10 min 风干残留酒精。之后将电极浸泡在预热到 37  $^{\circ}$ C 的 D-Hanks 缓冲液中 20 min 来平衡电极。吸弃掉 Transwell 培养板上室和下室内的完全培养基, 然后在上室和下室中分别加入 0.5 mL、1.5 mL 37  $^{\circ}$ C 的 D-Hanks 缓冲液, 再将培养板放入恒温培养箱中静置 20 min。轻轻摇晃 Transwell 培养板, 将细胞表面杂质和 D-Hanks 缓冲液一起吸弃掉。然后在上室和下室中重新加入 37  $^{\circ}$ C 的 D-Hanks 缓冲液, 将电极垂直插入 Transwell 培养板中, 电极短的一端伸到上室 D-Hanks 缓冲液内, 同时不能碰到 Transwell 培养板膜上的细胞; 电极长的一端伸到下室 D-Hanks 缓冲液内, 同时不能碰到下室 Transwell 培养板

的底部。测定下一个细胞孔之前要将电极放到 37  $^{\circ}$ C 的 D-Hanks 缓冲液中润洗<sup>[16]</sup>。

21 d 之后, 电阻值相近的细胞孔分为一组, 分别进行加药处理。后将 Transwell 培养板置于恒温培养箱中, 分别在给药处理后的 3, 6, 12, 18, 24 h, 测定各处理组细胞跨膜电阻值。按照公式(2)计算各组细胞的 TEER 值。

$$\text{TEER} = (\text{各孔电阻值} - \text{空白孔电阻值}) \Omega \times 1.1 \text{ cm}^2 / (\text{12 孔 Transwell 培养板的有效面积}) \quad (2)$$

1.3.5 Caco-2 细胞跨膜蛋白、胞质蛋白及葡萄糖转运关键蛋白表达量测定 按照 1.3.3 节的方法培养 Caco-2 细胞 24 h 后, 按照正常对照组(CK 组)、阿卡波糖阳性对照组(Aca 组,  $1 \times 10^{-3}$  mol/L)、辣椒素高浓度处理组(Cap-H 组, 24  $\mu$ mol/L)、槲皮素高浓度处理组(Que-H 组, 24  $\mu$ mol/L)、辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap + Que/1:1-H 组, 24/24  $\mu$ mol/L)、辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap + Que/1:3-H 组, 24/72  $\mu$ mol/L)、辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap + Que/3:1-H 组, 72/24  $\mu$ mol/L)对细胞分组, 加药处理 24 h。吸弃 6 孔板中的完全培养基, 分装好的 PBS 缓冲液在 4  $^{\circ}$ C 冰箱中提前预冷, 然后润洗细胞 2 次, 提前将磷酸酶抑制剂和 RIPA 裂解液按照 1:99 的比例配置好细胞裂解液, 每孔加入 200  $\mu$ L, 反复轻柔吹打细胞, 避免产生气泡, 全程冰上操作。待细胞脱落后, 将板中液体的液体全部转移到 1.5 mL 无菌离心管中, 放入碎冰中充分裂解 20 min。裂解结束后, 置于 4  $^{\circ}$ C 冷冻离心机中 14 000 g/min 离心 10 min。离心结束后, 将蛋白上清液分装至离心管, 避免吸到胶状物的基因组, 然后将离心管放置于 -80  $^{\circ}$ C 保存。

使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各处理组 Caco-2 细胞中总蛋白含量。酶标板中按照比例加入各试验组蛋白上清液与 BCA 工作液, 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 孵育结束后采用酶标仪在 562 nm 处测定 OD 值。根据建立的蛋白标准曲线, 计算各试验组的蛋白质浓度。调整蛋白样品上样量为 15  $\mu$ g/孔, 取 100  $\mu$ L 蛋白样品和 25  $\mu$ L 的 5 $\times$ 上样缓冲液振荡摇匀, 在沸水中加热 5 min, 放到流水下冷却至室温待用。使用 Omni-EasyTM 一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒配置胶板, 将蛋白样



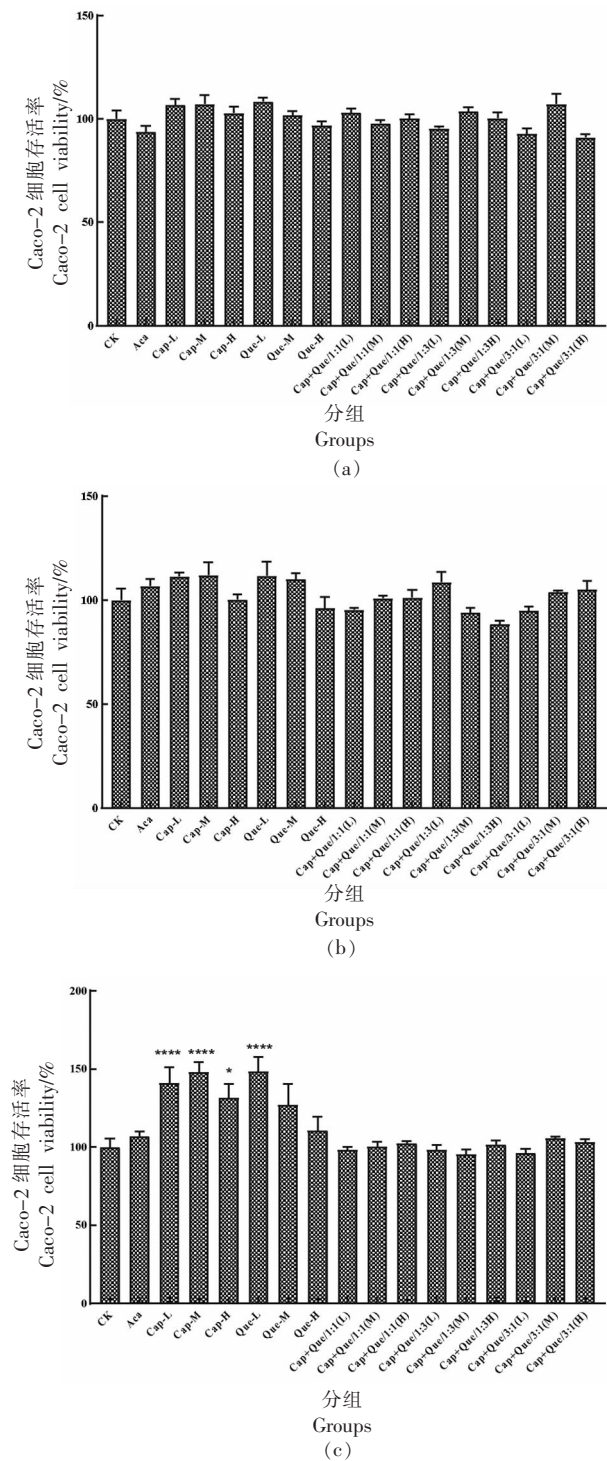
品加入胶孔中,全程电压 150 V,约 60 min,通过预染 maker 来判断电泳是否结束(条带距胶底部约 1 cm)。电泳结束后,切去浓缩胶,保留分离胶,通过 maker 找到目的蛋白对应的位置,切取含有目的蛋白的胶块。提前准备两张厚滤纸和两张薄滤纸,并剪取比胶块略大的 NC 膜,将胶块、厚滤纸、薄滤纸和 NC 膜浸泡到转印缓冲液中 20 min。利用半干法转膜,按照厚滤纸-薄滤纸-NC 膜-胶块-薄滤纸-厚滤纸的放置方式转膜,条件为恒压 25 V,时间 14 min,将胶块上的蛋白完全转移至 NC 膜上,用 TBS-T 溶液和脱脂奶粉配制 5% 的封闭液。封闭条带 2 h,4 °C 孵育一抗过夜。之后室温孵育二抗 2 h。按照 ECL 超敏发光显色液试剂盒说明,配置好显色试剂避光保存,每个 NC 膜滴加 200  $\mu$ L 显色液,发光成像系统显影条带,条带使用 Image J 软件进行灰度值分析<sup>[7]</sup>。

1.3.6 数据处理与统计分析 利用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析,数据均采用平均值 $\pm$ 标准偏差形式表示,每组试验重复 3 次。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)对数据进行组间差异比较。 $P < 0.05$  定义为显著性差异。文中图片均采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 辣椒素与槲皮素处理对 Caco-2 细胞存活率的影响

采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定了各试验组 Caco-2 细胞的活性,结果如图 1 所示。当孵育时间为 12 h(图 1a)和 24 h(图 1b)时,不同药物处理组细胞活性与正常对照组相比无显著性差异( $P > 0.05$ );当孵育时间为 36 h(图 1c)时,辣椒素低浓度( $P < 0.0001$ )、中浓度( $P < 0.0001$ )、槲皮素低浓度( $P < 0.0001$ )以及辣椒素高浓度( $P < 0.05$ )处理组细胞增殖率上升,显著高于正常对照组这可能是由于细胞培养时间延长以及低浓度辣椒素和槲皮素在一定程度上会促进细胞增殖所导致的<sup>[18]</sup>。各试验组对 Caco-2 细胞处理 12, 24 h 和 36 h 后,所测得的细胞存活率均大于 75%,表明所选辣椒素和槲皮素单一浓度和联合浓度对 Caco-2 细胞没有产生毒副作用<sup>[19]</sup>。因此,为了探究辣椒素与槲皮素调节小肠糖代谢的分子机制,可以



注:\*  $P < 0.05$ ,\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ,与正常对照组相比。

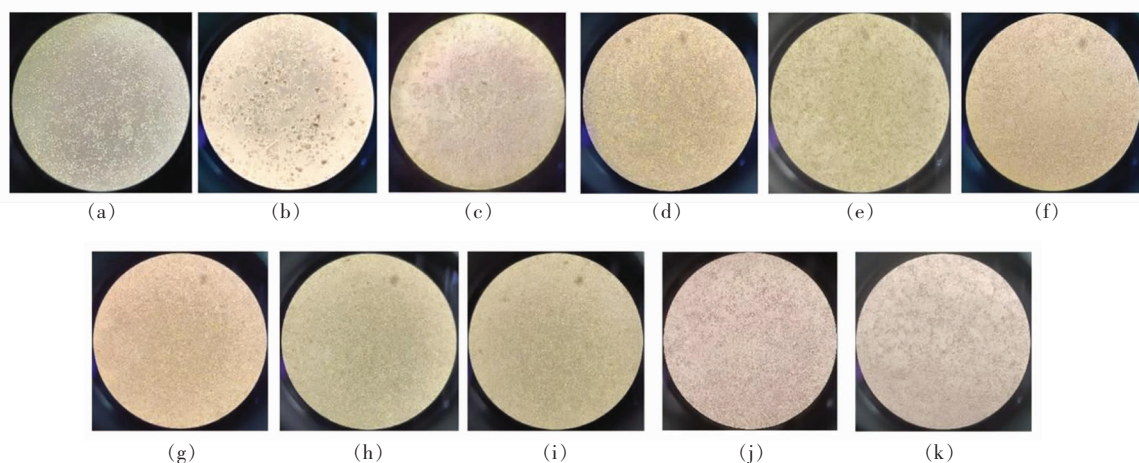
图 1 不同浓度辣椒素与槲皮素及其联合作用 12 h(a), 24 h(b), 36 h(c)对 Caco-2 细胞存活率的影响  
Fig.1 Effect of different levels and combinations of capsaicin and quercetin for 12 h (a), 24 h (b) and 36 h (c) on Caco-2 cell viability

将各试验组作用于 Caco-2 细胞开展后续试验。

## 2.2 辣椒素与槲皮素处理对 Caco-2 细胞膜通透性的影响

2.2.1 Caco-2 细胞生长形态 Caco-2 细胞为人结肠癌细胞,单个细胞形态为扁平状、多角形<sup>[20-21]</sup>。如图 2 所示,本试验在第 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21 天时拍照记录细胞生长形态。倒置显微

镜下观察到第 1 天细胞呈单个分布,第 3 天细胞开始连接,第 5 天时细胞生长情况良好,细胞与细胞之间连接成片状,随着时间的延长,Caco-2 细胞之间连接更加紧密,细胞逐渐形成致密单层,显微镜下观察细胞表面“铺路石样形态”,表明 Caco-2 细胞肠上皮屏障形成<sup>[22]</sup>。



注:a-k 分别为细胞生长的第 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21 天。

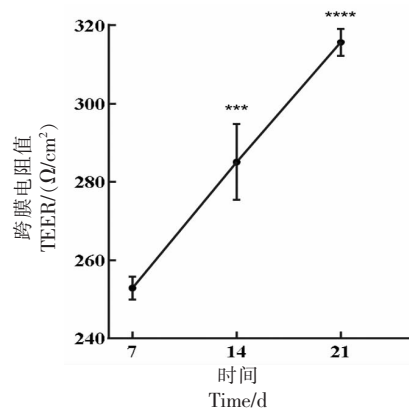
图 2 Caco-2 细胞生长形态变化

Fig.2 Variations in the morphology of Caco-2 cells

2.2.2 Caco-2 细胞单层完整性 1~21 d 细胞培养周期内,每周测定各孔 Caco-2 细胞跨膜电阻 (TEER) 值,监测细胞膜完整性的变化。如图 3 所示,随着培养时间延长,Caco-2 细胞 TEER 值呈现逐渐上升的趋势。由于细胞的来源不同,各实验室培养方法不同,所以建立 Caco-2 细胞单层模型的方法也有所差异。一般来说,当 TEER 值在 200~1 000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  时,Caco-2 细胞形成致密单层膜<sup>[24]</sup>,所以本研究建立的 Caco-2 细胞单层模型可用于后续试验。

2.2.3 Caco-2 细胞膜通透性 培养 21 d 后,Caco-2 细胞中分别加入不同浓度水平及不同比例组合的辣椒素与槲皮素标品溶液,继续培养 3,6,12,18,24 h 后,测定各组细胞的跨膜电阻值。

由图 4a 所示,加药 3 h 后,辣椒素低浓度 ( $328.53 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 3.54 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )、中浓度 ( $331.10 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 1.10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) 以及槲皮素低浓度 ( $332.57 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 2.77 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) 处理组细胞的 TEER 值显著高



注:\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ,与第 7 天相比。

图 3 Caco-2 细胞单层 TEER 值与培养时间的关系

Fig.3 Relationship between the TEER value and culture time of Caco-2 cells

于 ( $P < 0.01$ ) 正常对照组 ( $316.07 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 2.77 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )。加药 6 h 后,阿卡波糖阳性对照 ( $326.70 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 2.91 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )、辣椒素低浓度 ( $328.17 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 5.34 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )、中浓度 ( $339.17 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 4.45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )

cm<sup>2</sup>)、槲皮素低浓度(328.53 Ω·cm<sup>2</sup> ± 9.23 Ω·cm<sup>2</sup>)及辣椒素与槲皮素联合处理 1:3 中剂量(327.80 Ω·cm<sup>2</sup> ± 7.21 Ω·cm<sup>2</sup>)处理组细胞的 TEER 值高于

正常对照组(325.23 Ω·cm<sup>2</sup> ± 8.40 Ω·cm<sup>2</sup>)(图 4b)。加药 12,18,24 h 后,所有处理组 Caco-2 细胞的 TEER 值均显著高于 (*P* < 0.05) 正常对照组(图

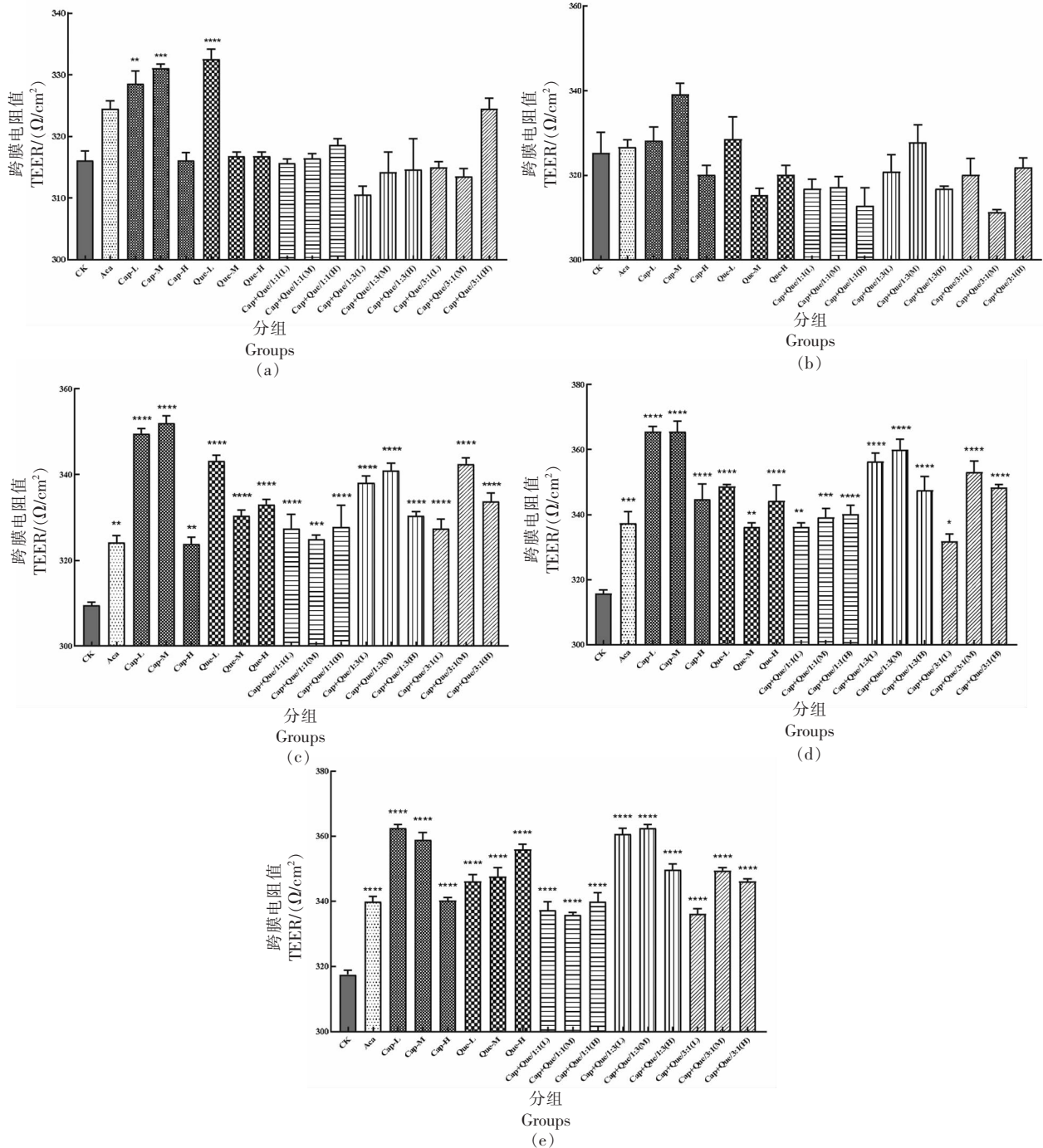


图 4 不同浓度辣椒素与槲皮素单独及其联合处理 3 h(a)、6 h(b)、12 h(c)、18 h(d)和 24 h(e)对 Caco-2 细胞 TEER 值的影响

Fig.4 Effect of different concentrations and combinations of capsaicin and quercetin for 3 h (a), 6 h (b), 12 h (c), 18 h (d) and 24 h (e) on the TEER values of Caco-2 cells



4c、4d、4e)。综合来看,加药 12 h 后,各处理组 Caco-2 细胞的 TEER 值趋于稳定,并全部大于正常对照组(CK 组)。相较而言,辣椒素与槲皮素联合处理 1:3 低剂量组(Cap + Que/1:3-L 组)(12/36  $\mu\text{mol/L}$ )、辣椒素与槲皮素联合处理 1:3 中剂量组(Cap + Que/1:3-M 组)(18/54  $\mu\text{mol/L}$ )及辣椒素与槲皮素联合处理 1:3 高剂量组(Cap + Que/1:3-H 组)(24/72  $\mu\text{mol/L}$ )的 TEER 值上升最为显著,表明二者之间存在协同作用关系。结果表明,各试验组 Caco-2 细胞的 TEER 值均呈现上升趋势,表明细胞单层通透性变小,细胞屏障功能增强,进而可以延缓小肠对葡萄糖的吸收<sup>[23]</sup>。同时辣椒素与槲皮素联合使用对调节 Caco-2 细胞单层通透性效果更好。

### 2.3 辣椒素与槲皮素处理对 Caco-2 细胞跨膜蛋白、胞质蛋白及葡萄糖转运关键蛋白表达量的影响

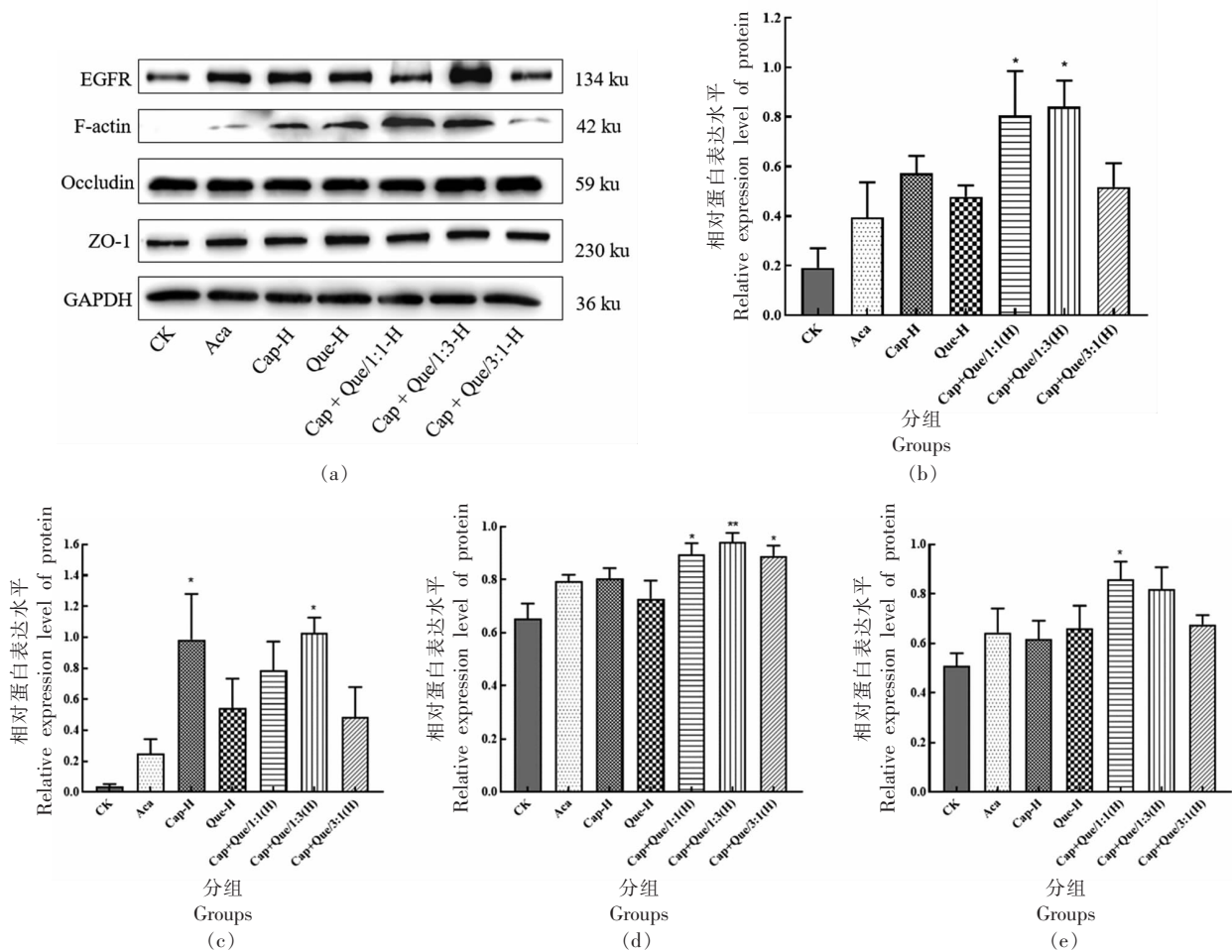
**2.3.1 辣椒素与槲皮素处理对 Caco-2 细胞肠道屏障相关蛋白表达量的影响** 小肠是碳水化合物消化吸收最重要的场所<sup>[14-15]</sup>。肠屏障功能的主要影响因素是细胞间紧密连接(tight junction, TJ),TJ 是由至少 3 种类型的跨膜蛋白(Claudin、Occludin 和 JAM)组成的多蛋白复合物,它们与细胞质支架蛋白如封闭带(ZO-1)相互作用,相互作用形成肠屏障。所以肠道表面的紧密结合蛋白表达降低会导致肠道屏障功能受损,伴有细胞通透性的增加<sup>[24]</sup>。表皮生长因子受体(EGFR)是受体酪氨酸激酶(RTK)EGFR 家族的成员<sup>[25]</sup>。通过配体结合 EGFR 后通过各种途径传递信号,以促进肠道发育,调节紧密连接蛋白的表达<sup>[26]</sup>。肠上皮细胞的屏障功能依赖于复杂的细胞骨架组织,细胞中的跨膜蛋白和结合蛋白与纤维状肌蛋白 F-actin 相连,以调节肠上皮屏障功能<sup>[27]</sup>。结构、功能或位置的任何改变都可能导致紧密连接蛋白结构的破坏,从而增加肠黏膜通透性。

为了明确辣椒素与槲皮素对于肠道屏障功能的影响,本研究对不同药物处理组 Caco-2 细胞中 Occludin、ZO-1、EGFR 和 F-actin 的蛋白表达量进行了测定。如图 5a 所示,各试验组中 Occludin、ZO-1、EGFR 和 F-actin 的蛋白表达量均高于正常对照组,其中辣椒素与槲皮素联合处理组的蛋白

表达水平显著上升( $P < 0.05$ )。与正常对照组相比,辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap + Que/1:1-H 组)、辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap + Que/1:3-H 组)的表面生长因子受体 EGFR 的蛋白相对表达水平显著升高( $P < 0.05$ ) (图 5b);槲皮素高浓度处理组(Que-H 组)和辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap + Que/1:3-H 组)的 F-actin 蛋白相对表达水平显著升高( $P < 0.05$ ) (图 5c);辣椒素与槲皮素联合处理组的 Occludin 蛋白相对表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ),其中辣椒素与槲皮素高剂量联合处理 1:3 组(Cap + Que/1:3-H 组)的 Occludin 蛋白相对表达水极显著升高( $P < 0.01$ ) (图 5d);辣椒素与槲皮素高剂量联合处理 1:1 组(Cap + Que/1:1-H 组)的 ZO-1 蛋白相对表达水平显著升高( $P < 0.05$ ) (图 5e)。Occludin、ZO-1、EGFR 和 F-actin 蛋白表达水平上升,提示机体肠道屏障功能增强,肠道渗透性降低<sup>[28,29-30]</sup>。由此可知,辣椒素与槲皮素处理可能通过上调跨膜蛋白 Occludin、胞质蛋白 ZO-1、表面生长因子受体 EGFR 和纤维状肌蛋白 F-actin 表达量来增强肠道黏膜屏障功能,进而延缓小肠对葡萄糖的吸收,最终达到稳定机体血糖稳态的功效。综合来看,辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组(Cap + Que/1:3-H 组)效果最好。

**2.3.2 辣椒素与槲皮素处理对 Caco-2 细胞葡萄糖转运关键蛋白表达量的影响** 碳水化合物是哺乳动物的重要营养素,主要包括蔗糖和各种植物淀粉。碳水化合物消化成葡萄糖的最后一步发生在小肠黏膜中。葡萄糖转运蛋白 2(GLUT2)通过促进扩散使小肠大量吸收葡萄糖。钠-葡萄糖协同转运蛋白 1(SGLT1)依靠葡萄糖转运关键酶  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 通过主动吸收途径将葡萄糖转运进小肠中<sup>[31,32-33]</sup>。有研究表明,在小肠组织中,槲皮素可以通过抑制葡萄糖转运蛋白 2(GLUT2)表达水平<sup>[34]</sup>,保护小肠上皮细胞膜的完整性而延缓葡萄糖吸收<sup>[35]</sup>。

为了明确辣椒素与槲皮素对葡萄糖转运的影响,本研究对不同药物处理组 Caco-2 细胞中葡萄糖转运关键蛋白 GLUT2、SGLT1、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 的表达量进行了测定。如图 6a 所示,与正常对照组相比,各试验组 Caco-2 细胞中 GLUT2、SGLT1、



注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与正常对照组相比。

图 5 不同浓度辣椒素与槲皮素单独及其联合处理 24 h 对 Caco-2 细胞内蛋白质免疫印迹条带(a), EGFR(b), F-actin(c), Occludin(d), ZO-1(e) 蛋白表达量的影响

Fig.5 Effect of different concentrations and combinations of capsaicin and quercetin for 24 h on the WB bands (a) and expression levels of EGFR (b), F-actin (c), Occludin (d) and ZO-1 (e) proteins in Caco-2 cells

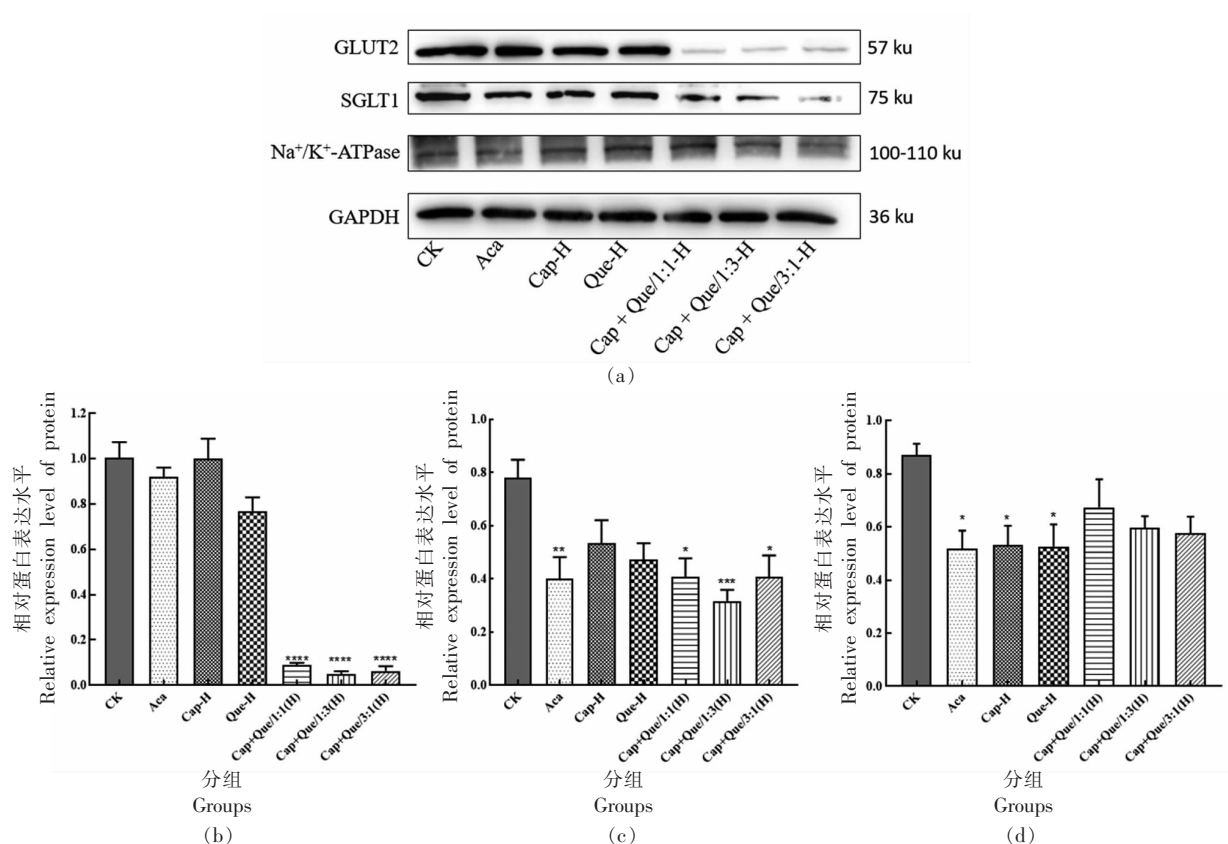
$\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  的蛋白相对表达水平均呈现下调趋势, 其中辣椒素与槲皮素联合处理组的蛋白表达水平下降。具体而言, 辣椒素与槲皮素联合处理组的 GLUT2 蛋白相对表达水平均极显著降低 ( $P < 0.0001$ ) (图 6b); 阿卡波糖阳性对照组 (Aca 组) 和辣椒素与槲皮素联合处理组的 SGLT1 蛋白相对表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 其中辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组 (Cap + Que/1:3-H 组) 与正常对照组相比, SGLT1 蛋白相对表达水平极显著降低 ( $P < 0.001$ ) (图 6c); 阿卡波糖阳性对照组 (Aca 组)、辣椒素高浓度处理组 (Cap-H 组)、槲皮素高浓度处理组 (Que-H 组) 的  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  蛋

白相对表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 6d)。结果表明, 各试验组均可下调葡萄糖转运关键蛋白 GLUT2、SGLT1、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  相对表达水平, 从而抑制小肠对葡萄糖的吸收。辣椒素与槲皮素的联合处理组效果优于单一处理组, 辣椒素与槲皮素高剂量联合处理组 (Cap + Que/1:3-H 组) 效果更佳。

### 3 结论

本研究借助 Caco-2 细胞单层模型, 探讨辣椒素与槲皮素协同对小肠葡萄糖吸收转运的影响及其分子机制。辣椒素与槲皮素处理可增加 Caco-2





注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , 与正常对照组相比。

图 6 不同浓度辣椒素与槲皮素单独及其联合处理 24 h 对 Caco-2 细胞内蛋白质免疫印迹条带 (a)、GLUT2 (b)、SGLT1 (c)、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (d) 蛋白表达量的影响

Fig.6 Effect of different concentrations and combinations of capsaicin and quercetin for 24 h on the WB bands (a) and expression levels of GLUT2 (b), SGLT1 (c) and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (d) in Caco-2 cells

细胞单层跨膜电阻值,降低细胞膜通透性;并且辣椒素与槲皮素处理可显著上调 Occludin、ZO-1、EGFR 和 F-actin 蛋白的表达水平,增强肠道的屏障功能;显著下调葡萄糖转运关键蛋白 GLUT2、SGLT1、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 的相对表达量,延缓葡萄糖的转运吸收。辣椒素与槲皮素联合处理组,尤其是 1:3 高剂量联合处理组效果明显优于二者单独处理组。由此可知,辣椒素与槲皮素在调节机体糖代谢方面具有协同作用功效,作用途径与小肠屏障功能改善及葡萄糖转运吸收相关。

### 参 考 文 献

[1] 陶兴林, 朱惠霞, 王晓巍, 等. 5 个不同产区地理标志辣椒营养成分分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(3): 303-310.

TAO X L, ZHU H X, WANG X W, et al. Analysis of nutritional components of geographical indication pepper in five different producing areas [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2023, 14(3): 303-310.

[2] BONACCIO M, DI CASTELNUOVO A, COSTANZO S, et al. Chili pepper consumption and mortality in Italian adults[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2019, 74(25): 3139-3149.

[3] MI S, ZHANG X N, WANG Y H, et al. Effect of different genotypes on the fruit volatile profiles, flavonoid composition and antioxidant activities of chilli peppers[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131751.

[4] MI S, YU W L, LI J, et al. Characterization and discrimination of chilli peppers based on multi-element and non-targeted metabolomics analysis [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 131:

- 109742.
- [5] MARQUEZ-IBARRA A, HUERTA M, VILLALPANDO-HERNANDEZ S, et al. The effects of dietary iron and capsaicin on hemoglobin, blood glucose, insulin tolerance, cholesterol, and triglycerides, in healthy and diabetic wistar rats[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152625.
- [6] ROSCA A E, IESANU M I, ZAHIU C D M, et al. Capsaicin and gut microbiota in health and disease [J]. *Molecules*, 2020, 25(23): 5681–5703.
- [7] 祝之明, 高鹏, 刘道燕. 辣椒素受体 TRPV1, 不仅仅感知热和痛[J]. *生理学报*, 2021, 73(5): 863–866. ZHU Z M, GAO P, LIU D Y. The capsaicin receptor TRPV1 is not only capable of sensing heat and pain[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2021, 73(5): 863–866.
- [8] FERDOWSI P V, AHUJA K D K, BECKETT J M, et al. TRPV1 Activation by capsaicin mediates glucose oxidation and ATP production independent of insulin signalling in mouse skeletal muscle cells[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1560–1575.
- [9] XIANG Q R, GUO W L, TANG X, et al. Capsaicin—the spicy ingredient of chili peppers: A review of the gastrointestinal effects and mechanisms [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021 (116): 755–765.
- [10] PAPOUYISIS K, ZHANG J Y, BOWYER M C, et al. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties: A review[J]. *Food Chemistry*, 2020, 338: 128119.
- [11] SARKAR D, CHRISTOPHER A, SHETTY K. Phenolic bioactives from plant-based foods for glycemic control [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 12: 727503.
- [12] SNELSON M, DE PASQUALE C, EKINCI E I, et al. Gut microbiome, prebiotics, intestinal permeability and diabetes complications[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2021, 35(3): 101507.
- [13] XU X Q, WANG P Y, WANG B G, et al. Glucose absorption regulation and mechanism of the compounds in *Lilium lancifolium* Thunb on Caco-2 cells[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 149: 112010.
- [14] ANDREA T, BARBARA R, BENEDETTA T, et al. Nature-identical compounds and organic acids ameliorate and prevent the damages induced by an inflammatory challenge in caco-2 cell culture [J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4296.
- [15] 刘颖. 酸枣仁酸性多糖提取制备及对 Caco-2 细胞保护作用的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2021. LIU Y. Extraction and preparation of acidic polysaccharide from Semen Ziziphi Spinosae and its effect on Caco-2 cell protection[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2021.
- [16] 王远微. 辣椒素对肥胖小鼠肠道菌群的影响及其降脂机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020. WANG Y W, Study on the effect of capsaicin on the intestinal flora of obese mice and its lipid-lowering mechanism[D]. Chongqing: Southwestern University, 2020.
- [17] 颜旭. 乳酸菌发酵胡柚汁中酚类物质的变化及其对 Caco-2 细胞损伤的保护作用研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2021. YAN X. Changes of phenolic substances in lactic acid bacteria fermented Huyou juice and their protective effect on Caco-2 cell damage[D]. Ningbo: Ningbo University, 2021.
- [18] 李娜, 马玉洁, 刘楠, 等. 鳕鱼鳔胶原肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 2BS 细胞早期衰老的保护作用[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(10): 101–107. LI N, MA Y J, LIU N, et al. Protective effect of cod cob gel propeptide on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced early aging of 2BS cells[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(10): 101–107.
- [19] CERMENO M, FITZGERALD R J, OBRIEN N M. *In vitro* antioxidant and immunomodulatory activity of transglutaminase-treated sodium caseinate hydrolysates[J]. *International Dairy Journal*, 2016, 63: 107–114.
- [20] 唐家明, 吕林, 张丽阳, 等. 不同接种密度对 Caco-2 细胞吸收模型分化及去极化评价指标的影响[J]. *河北科技师范学院学报*, 2016, 30(3): 66–70. TANG J M, LV L, ZHANG L Y, et al. Effects of cell density on differentiation and depolarization of caco-2 cell monolayers[J]. *Journal of Hebei Normal University of Science and Technology*, 2016, 30(3): 66–70.
- [21] 吕晓君, 曹易丹, 何开勇. Caco-2 细胞体外吸收模

- 型的建立及验证[J]. 医药导报, 2018, 37(11): 5.
- LÜ X J, CAO Y D, HE K Y. Establishment and validation of caco-2 cell in vitro absorption model [J]. Herald of Medicine, 2018, 37(11): 5.
- [22] 吴茂军, 侯龙龙. 关于 Caco-2 细胞构建肠粘膜屏障模型的相关研究[J]. 泰山医学院学报, 2016, 37(4): 361-364.
- WU M J, HOU L L. Study on the establishment of intestinal mucosal barrier model by Caco-2 cells[J]. Journal of Taishan Medical College, 2016, 37(4): 361-364.
- [23] COCETTA V, CATANZARO D, BORGONETTI V, et al. A fixed combination of probiotics and herbal extracts attenuates intestinal barrier dysfunction from inflammatory stress in an *in vitro* model using caco-2 cells[J]. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 2019, 10(1): 62-69.
- [24] LIU X F, ZHU H Q. Curcumin improved intestinal epithelial barrier integrity by up-regulating ZO-1/occludin/claudin-1 in septic rats[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2022: 2884522.
- [25] BRAND T M, HIDA M, LI C, et al. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer[J]. Discovery Medicine, 2011, 12(66): 419-432.
- [26] TANG X P, LIU H, YANG S F, et al. Epidermal growth factor and intestinal barrier function[J]. Mediators of Inflammation, 2016, 2016: 1927348.
- [27] HUANG B Y, WANG J J, GU A X, et al. Zearalenone-induced mechanical damage of intestinal barrier via the RhoA/ROCK signaling pathway in IPEC-J2 cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20): 12550.
- [28] 张一凡. TFF3 改善 NASH 肝损伤的机制及降脂颗粒的调控作用[D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- ZHANG Y F. Study on the mechanism of TFF3 ameliorating liver injury of NASH and the regulation of jiangzhi granules abstract[D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [29] PENG M, YI W H, MIN M R. Akkermansia muciniphila improves heat stress-impaired intestinal barrier function by modulating HSP27 in Caco-2 cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 177: 106028.
- [30] GUO J G, RAO Y F, JIANG J, et al. MicroRNA-155-5p inhibition alleviates irritable bowel syndrome by increasing claudin-1 and ZO-1 expression[J]. Annals of Translational Medicine, 2023, 11(2): 34-45.
- [31] LIU S Y, AI Z Y, MENG Y. Comparative studies on the physicochemical profile and potential hypoglycemic activity of different tea extracts: Effect on sucrase-isomaltase activity and glucose transport in Caco-2 cells[J]. Food Research International, 2021, 148: 110604.
- [32] ONTAWONG A, DUANGJAI A, SRIMAROENG C. Coffea arabica bean extract inhibits glucose transport and disaccharidase activity in Caco-2 cells [J]. Biomedical Reports, 2021, 15(3): 73-81.
- [33] 赵龙. 法尼酯 X 受体在胆汁酸调节肠道葡萄糖平衡中的作用及机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- ZHAO L. A novel role for farnesoid X receptor in the bile acid-mediated intestinal glucose homeostasis [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [34] XU X Q, WANG P Y, WANG B G, et al. Glucose absorption regulation and mechanism of the compounds in *Lilium lancifolium* Thunb on Caco-2 cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 149: 112010.
- [35] IFTIKHAR M, IFTIKHAR A, ZHANG H J, et al. Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFEs) in Caco-2 cells monolayer: A review[J]. Food Research International, 2020, 136: 109240.

## The Molecular Mechanism of Synergistic Effect of Capsaicin and Quercetin on the Glucose Metabolism in Small Intestine Using Caco-2 Monolayer Model

Zhu Wenxuan, Li Tong, Wang Xianghong, Mi Si\*

(College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei)

**Abstract** The present study was conducted to unravel the molecular mechanism underlying the synergistic effect of cap-



saicin and quercetin on the regulation of glucose metabolism in small intestine. The Caco-2 monolayer model was established to investigate the effect of capsaicin and quercetin, both singly and combined, on the cell viability and cell membrane permeability. Additionally, western blotting was utilized to determine the expression levels of Occludin, cytoplasmic protein ZO-1, epidermal growth factor receptor (EGFR) and fibrillar muscle protein F-actin as well as key proteins involved in glucose transport including GLUT2, SGLT1 and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Results showed that the cell viability of all treatment groups was higher than 75%, demonstrating no toxic effect of capsaicin and quercetin on Caco-2 cells. Administration of capsaicin and quercetin increased the TEER values of Caco-2 monolayer model ( $315.70 \pm 26.65$ )  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , which indicated smaller permeability and thus stronger barrier function. Furthermore, compared to the CK group, capsaicin and quercetin treatments upregulated the expression levels of Occludin (>0.65), ZO-1 (>0.51), EGFR (>0.19), and F-actin (>0.04), but downregulated that of GLUT2 (>1.00), SGLT1 (>0.78) and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (>0.87). In summary, capsaicin and quercetin can exert a synergistic effect on the regulation of glucose metabolism in small intestine and high dose levels of capsaicin and quercetin at a ratio of 1:3 was found to be optimal. The potential molecular mechanism can be attributed to the enhancement of barrier function of small intestine and downregulation of key proteins involved in glucose transport, which consequently hinders glucose absorption to achieve a hypoglycemic effect.

**Keywords** capsaicin; quercetin; Caco-2 cell model; glucose metabolism in small intestine; molecular mechanism