

КУЛЬТУРА КЛЕТОК CACO2 КАК МОДЕЛЬ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСПОРТА ГЕКСОЗ

© Н. М. Грефнер,¹ Л. В. Громова,² А. А. Груздков,² Я. Ю. Комиссарчик¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Институт физиологии им. акад. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: grefner@mail.cytspb.rssi.ru

Оценено распределение транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2, а также фибриллярного актина и белков плотных контактов в культуре клеток Caco2 при инкубировании их в среде, содержащей глюкозу в разных концентрациях. Определено количество глюкозы, поглощаемой при этом из инкубационной среды. Показано, что распределение фибриллярного актина, концентрирующегося вблизи плотных контактов и в микроворсинках, не зависит от концентрации глюкозы. SGLT1 не связан с актином щеточной каймы, его локализация не зависит от концентрации глюкозы в среде. При низкой (2.5 мМ) концентрации глюкозы в инкубационной среде GLUT2 сосредоточен преимущественно в базальной области клеток, а при ее высокой (25 мМ) концентрации обнаруживается в апикальной области клеток, где он локализован с актином микроворсинок. Распределение белков плотных контактов окклюдина и клаудинов 1, 3 и 4 не зависит от концентрации глюкозы. Клаудин 2 в клетках Caco2 не обнаружен. Культура клеток Caco2 может быть использована в качестве модели кишечного эпителия при исследовании всасывания гексоз.

Ключевые слова: клетки Caco2, фибриллярный актин, транспортеры SGLT1 и GLUT2, окклюдин, клаудины 1—4, всасывание глюкозы.

Известно, что наиболее подходящей моделью для исследования транспорта пищевых веществ через кишечный эпителий является монослой первичной культуры энтероцитов. Эта модель исключает влияние мышечного и подслизистого слоев кишечника на процессы транспорта нутриентов. Однако культура энтероцитов имеет короткий срок жизни, поэтому на ней трудно создать стабильно воспроизводимые условия эксперимента (Hillgren et al., 1995). В 1980-е годы внимание исследователей привлекла клеточная линия Caco2 из аденокарциномы ободочной кишки человека. Первые исследования этой линии показали, что клетки Caco2 в культуре приобретают свойства, характерные для энтероцитов (Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989). Клетки образуют конфлюэнтный монослой и поляризуются, при этом у них формируются соединительные комплексы и микроворсинки на апикальной поверхности клеток. В дальнейшем было показано, что проницаемость монослоя клеток Caco2 хорошо коррелирует с процессами всасывания в кишечнике (Artursson et al., 2001). Кроме того, клетки Caco2 экспрессируют ферменты, свойственные энтероцитам, например дисахаридазы, пептидазы и щелочную фосфатазу (Rousset et al., 1985; Matsumoto et al., 1990; Nakano et al., 2009). В них обнаружены также транспортеры глюкозы SGLT1 и GLUT2 (Mahraoui et al., 1994; Kipp et al., 2003; Khoursandy et al., 2004), хотя их экспрессия в клетках Caco2 ниже, чем в энтероцитах (Hillgren et al., 1995).

В литературе описаны как недостатки, так и преимущества использования клеток Caco2 в качестве модели энтероцитов (см. обзоры: Hillgren et al., 1995; Sambuy et al., 2005). Одним из недостатков клеток Caco2 является

их опухолевое происхождение, однако именно благодаря такому свойству культура этой клеточной линии имеет длительное время жизни. Другим недостатком является то, что клеточные контакты в монослое Caco2 «более плотные» (менее проницаемы для ряда веществ), чем у энтероцитов тонкой кишки. Это, по-видимому, связано с тем, что линия клеток Caco2 происходит из толстой кишки. Наконец, эта клеточная линия не всегда фенотипически стабильна: экспрессия транспортеров и активность ферментов могут меняться в зависимости от количества пассажей, концентрации клеток при очередном посеве, состава среды и сыворотки. Несмотря на перечисленные ограничения, использование культуры клеток Caco2 для анализа функционирования энтероцитов имеет ряд преимуществ по сравнению с методами *in vivo* или другими моделями *in vitro*. Она позволяет задавать стандартные условия эксперимента в отношении температуры, pH, состава среды и т. п. При варьировании этих условий легче наблюдать сопутствующие функциональные изменения, в частности в процессах транспорта. Немаловажным достоинством работы с культивируемыми клетками является возможность использования минимальных количеств исследуемых субстратов.

Культура клеток Caco2 широко применяется в токсикологических и фармакологических исследованиях (Shah et al., 2006). Кроме того, Caco2 использовали как модель для изучения систем активного транспорта нутриентов, в том числе глюкозы (Harris et al., 1992; Matosin-Matekalo et al., 1998; Le Gall et al., 2007).

В предшествующих работах мы исследовали всасывание гексоз в тонкой кишке крыс в условиях хронического

опыта и роль транспортеров SGLT1 и GLUT2 в переносе глюкозы через апикальную мембрану энтероцитов, а также использовали культуру клеток Caco2 в качестве модели кишечного эпителия для исследования всасывания глюкозы и галактозы при низких концентрациях этих субстратов (Грефнер и др., 2006, 2010; Громова и др., 2006).

В настоящей работе продолжено изучение распределения транспортеров SGLT1 и GLUT2 в клетках Caco2 при всасывании гексоз, а также участия в этом процессе элементов цитоскелета, в частности фибриллярного актина.

В последнее время большой интерес исследователей вызывают белки плотных контактов окклюдин и семейство клаудинов, которые, как полагают, играют важную роль в функционировании плотных контактов (Tsukita, Furuse, 2000; Turksen, Troy, 2004). Показано, что изменение экспрессии этих белков в культуре клеток Caco2 приводит к нарушению целостности плотных контактов и их парacellularной проницаемости (Dorkoosh et al., 2004; Takehara et al., 2009). В связи с этим в настоящем исследовании мы попытались оценить также роль белков плотных контактов в клетках Caco2 в поглощении глюкозы при ее высоких и низких концентрациях.

Материал и методика

Культивирование клеток. Клетки Caco2 были получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН. Клетки выращивали в пластиковых флаконах объемом 25 см³ и на покровных стеклах в чашках Петри диаметром 5 см. Клетки выращивали в течение 21 сут в среде DMEM с добавлением 10 % бычьей эмбриональной сыворотки при 37 °C и 5 % CO₂ в атмосфере. При этом среду во флаконах и чашках Петри меняли на свежую через сутки.

Определение поглощения глюкозы. Всасывание глюкозы определяли на культуре клеток, выращенной в пластиковых флаконах. Инкубационная среда для эксперимента содержала (в mM): 137 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 10 буферного раствора HEPES (pH 7.2), 4 глутамин и 2.5 или 25 глюкозы в качестве субстрата. Пассивный компонент транспорта субстрата определяли в присутствии в инкубационной среде 0.2 mM флоридзина, блокирующего работу переносчика SGLT1.

Перед опытом среду DMEM удаляли, культуру клеток во флаконе 2 раза промывали 1 мл инкубационной среды без субстрата и 1 раз 1 мл среды с субстратом. Затем во флакон добавляли 1 мл среды с субстратом и инкубировали клетки в течение 3 ч при 37 °C. После этого инкубационную среду удаляли для определения в ней концентрации оставшейся глюкозы, а к культуре клеток добавляли 1 мл охлажденной до 4 °C среды без субстрата и скребком снимали клетки. Полученную суспензию использовали для определения в ней концентрации белка.

Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (Dahlqvist, 1964), а белка — методом Лоури (Lowry et al., 1951). Поглощение глюкозы оценивали по ее убыли в инкубационной среде и выражали в мкмоль на 1 мг белка за 3 ч.

Конфокальная микроскопия. Культуру клеток на стеклах в чашках Петри инкубировали в среде с субстратами так же, как и во флаконах. Контролем служи-

ли клетки, инкубированные в среде без субстрата. После нагрузки субстратами монослой клеток на стеклах фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида на буферном растворе: 0.2 % Triton X-100 на PBS. Время фиксации составляло 10 мин. Затем клетки промывали в PBS 2 раза по 5 мин.

Переносчики глюкозы SGLT1 и GLUT2 выявляли методом непрямой иммунофлуоресценции. Для этого клетки пермеабилizировали указанным буферным раствором в течение 10 мин. Неспецифическое связывание иммуноглобулинов блокировали раствором 2 % BSA на PBS в течение 15 мин. В качестве первых антител использовали поликлональные козы антигена к SGLT1 и кроличьи к GLUT2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., США) в разведении 1 : 500 раствором 2 % BSA на PBS. С первыми антителами клетки инкубировали 1 ч при комнатной температуре, после чего 2 раза по 10 мин промывали в PBS. В качестве вторых антител использовали антикозы иммуноглобулины, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 633, и антикроличьи иммуноглобулины, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, США) в разведении 1 : 500 раствором 2 % BSA на PBS. Со вторыми антителами клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После этого клетки промывали 2 раза по 10 мин в PBS. Для визуализации фибриллярного актина клетки окрашивали родамин-фаллоидином (Molecular Probes Inc., США) в разведении 1 : 100 на PBS в течение 30 мин, а затем промывали 4 раза по 10 мин PBS.

Белки плотных контактов окклюдин и клаудины также выявляли методом непрямой флуоресценции. Для этого культуру клеток фиксировали, пермеабилizировали и блокировали неспецифическое связывание иммуноглобулинов, как описано выше. Затем клетки окрашивали первыми поликлональными кроличьими антителами к клаудинам 1—4 (Zymed Laboratories, США) в разведении 1 : 100 раствором 2 % BSA на PBS течение 1 ч, промывали 2 раза по 10 мин PBS, окрашивали вторыми антителами, в качестве которых использовали антикроличьи иммуноглобулины, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, США) в разведении 1 : 500 раствором 2 % BSA на PBS, и промывали 2 раза по 10 мин PBS.

Для выявления окклюдина на препаратах, окрашенных антителами к клаудинам, клетки дополнительно фиксировали 1%-ным параформальдегидом на PBS в течение 10 мин, промывали 2 раза по 10 мин PBS, а затем окрашивали моноклональными мышиными антителами к окклюдину (Zymed Laboratories, США) в разведении 1 : 500 раствором 2 % BSA на PBS в течение 1 ч, промывали в PBS 2 раза по 10 мин, окрашивали 30 мин антимышиными иммуноглобулинами, конъюгированными с Alexa Fluor 532 (Molecular Probes, США) в разведении 1 : 500 раствором 2 % BSA на PBS, и промывали 4 раза по 10 мин PBS.

По окончании окрашивания монослой клеток помещали в среду DABCO на предметное стекло. Готовые препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Leica, Германия).

Измерение трансэпителиального сопротивления. Для измерения трансэпителиального сопротивления клетки Caco2 культивировали, как описано выше, в планшетах на полиэстеровых фильтрах диаметром 6.5 мм и с диаметром пор 0.4 мкм (Corning Incorporated, США). Трансэпителиальное сопротивление измеряли после образования конфлюэнтного монослоя на 16, 21 и

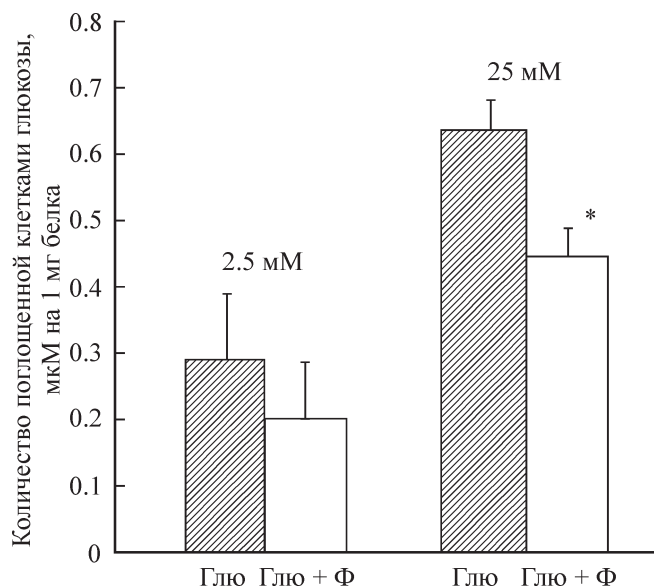


Рис. 1. Поглощение клетками Caco2 глюкозы (Глю; 2.5 и 25 мМ) в присутствии и в отсутствие флоридина (Ф; 0.2 мМ).

Темные столбики — интактные клетки, нагрузка глюкозой; светлые столбики — блокирование переносчика глюкозы SGLT1 флоридином, нагрузка глюкозой. Звездочкой отмечено достоверно различающееся изменение поглощения глюкозы при $P < 0.05$.

28-е сут культивирования. Измерения проводили с помощью вольтметра EVOM² и электрода STX2 (World Precision Instrument, Inc., США). Из результатов измерений вычитали сопротивление фильтра, полученную величину умножали на площадь фильтра и выражали в $\Omega \cdot \text{см}^2$ (EVOM² Instruction Manual, 2009, World Precision Instruments, Inc.).

Результаты

Поглощение глюкозы клетками Caco2. При инкубировании клеток Caco2 в средах с глюкозой (2.5 и 25 мМ) наблюдалось ее поглощение из инкубационной среды (рис. 1). При этом поглощение из среды с концентрацией глюкозы 25 мМ было в 2 раза более высоким, чем из среды с концентрацией 2.5 мМ. Добавление в инкубационную среду флоридина снижало на 30 % поглощение глюкозы как при низкой, так и при высокой концентрациях субстрата.

Трансэпителиальное сопротивление. Для оценки степени дифференцировки клеток в культуре и барьерной функции монослоя измеряли его трансэпителиальное сопротивление. Обнаружено, что трансэпителиальное сопротивление культуры Caco2 пропорционально времени культивирования клеток. На 16-е сут культивирования оно составляло $256 \pm 21 \Omega \cdot \text{см}^2$. На 21-е сут сопротивление выросло до $352 \pm 33 \Omega \cdot \text{см}^2$, а на 28-е — до $454 \pm 24 \Omega \cdot \text{см}^2$.

Распределение актина и переносчиков глюкозы в культуре Caco2. С помощью конфокального микроскопа проведен анализ распределения фибриллярного актина в культуре клеток Caco2. Выявлено, что актин конденсируется вблизи клеточных границ и в микроворсинках (рис. 2), при этом локализация актина при разных видах нагрузки не различалась. Микроворсинки служили маркером при выборе в культуре участков

дифференцированных клеток, обладающих свойствами энтероцитов и пригодных для анализа распределения переносчиков глюкозы.

Локализация Na-зависимого переносчика SGLT1 одинакова в контроле и при разных вариантах нагрузки. На горизонтальных срезах, проведенных на апикальном и базальном уровнях клеток (рис. 2, а—б), и на вертикальном срезе (рис. 2, в) можно видеть распределение SGLT1 в клетках при инкубации культуры в растворе 25 мМ глюкозы. Метка к переносчику в виде глобул присутствует в базальной, латеральной и апикальной цитоплазме. Коллокализации этого переносчика и актина микроворсинок не было выявлено.

Распределение переносчика GLUT2 зависит от уровня нагрузки. После инкубирования культуры в буферном растворе (контроль) метка к переносчику в виде глобул выявляется по всей цитоплазме (рис. 2, г—е). На некоторых участках вблизи латеральной мембраны она колокализована с актином. При инкубировании культуры в растворе с низким (2.5 мМ) содержанием глюкозы на срезе в апикальной области клеток метка к этому переносчику почти отсутствует (рис. 2, ж). Метка, организованная в глобулы, выявляется только вблизи базолатеральной мембраны на горизонтальном срезе в базальной области клеток (рис. 2, з) и на вертикальном срезе (рис. 2, и). При добавлении в инкубационную среду 25 мМ глюкозы (высокая концентрация) метка к GLUT2 присутствует преимущественно в апикальной части клеток в области микроворсинок, причем она колокализована с меткой к актину в области микроворсинок (рис. 2, к, м—о). В базальной цитоплазме метка к переносчику отсутствует (рис. 2, л). При добавлении флоридина в инкубационную среду метка к GLUT2 выявляется как в апикальной, так и в базальной частях цитоплазмы, т. е. ее распределение аналогично таковому в контроле.

Распределение белков плотных контактов в культуре клеток Caco2. Выявлено распределение белков плотных контактов клаудинов 1—4 и окклюдина в клетках Caco2 при нагрузке глюкозой (рис. 3). Окклюдин и клаудины 1, 3 и 4 образуют кольцо в области плотных контактов. При этом метки к клаудинам колокализованы с меткой к оккклюдину. Метка к клаудину 2 в клетках отсутствует. Распределение и экспрессия белков плотных контактов не меняются при разных вариантах нагрузки (высокая и низкая концентрации глюкозы, добавление флоридина).

Обсуждение

Как было показано в нашей предшествующей статье (Грефнер и др., 2010), на 21-е сут культивирования клетки Caco2 формируют конфлюэнтный монослой, дифференцируются и приобретают морфологические особенности, характерные для энтероцитов. Это было подтверждено электронно-микроскопическим анализом и конфокальной микроскопией препаратов. В настоящей работе мы показали, что клетки Caco2 формируют микроворсинки на своей апикальной поверхности. При этом трансэпителиальное сопротивление монослоя клеток с 16-х по 28-е сут культивирования увеличилось почти в 2 раза. Это подтверждает наши данные о том, что происходит функциональная поляризация клеток Caco2 в исследуемом монослое, который приобретает свойства, характерные для одноклеточного эпителиального слоя энтероцитов.

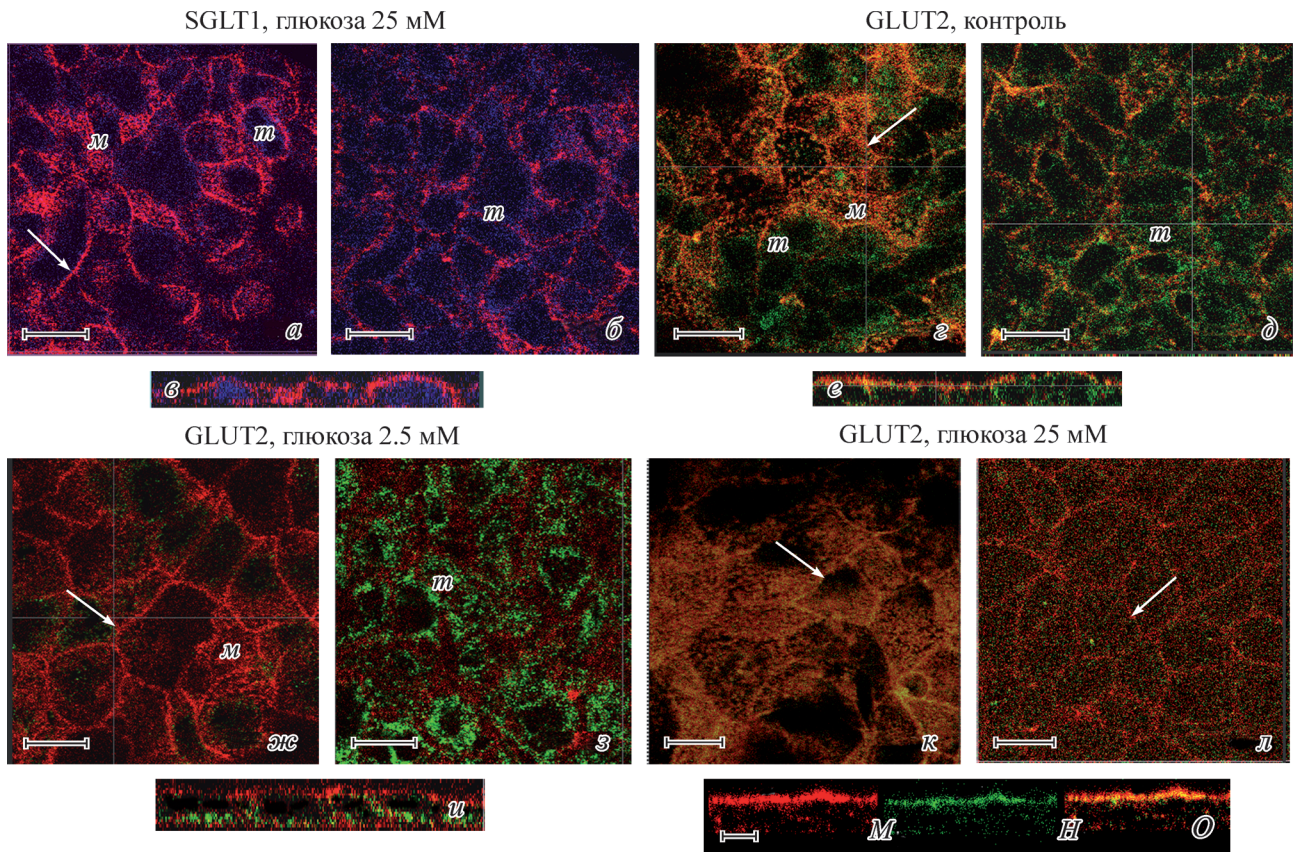


Рис. 2. Распределение фибриллярного актина и транспортеров SGLT1 и GLUT2 в культуре клеток Caco2. Конфокальная микроскопия.

Красная флуоресценция — фибриллярный актин, синяя флуоресценция — метка к SGLT1, зеленая флуоресценция — метка к GLUT2. *а–в* — распределение транспортера SGLT1 после инкубирования культуры в растворе 25 мМ глюкозы: *а* — горизонтальный оптический срез на апикальном уровне клеток, метка к транспортеру — по периферии клеток, актин — в микроворсинках и вблизи латеральной мембраны; *б* — горизонтальный оптический срез на базальном уровне клеток, метка к транспортеру — по периферии клеток; *в* — вертикальный срез (в плоскости XZ) через монослой клеток, реконструированный из серии горизонтальных оптических срезов, метка к переносчику на уровне апикальной и базальной цитоплазмы. *з–е* — распределение транспортера GLUT2 в контроле: *з* — горизонтальный оптический срез на апикальном уровне клеток, метка к транспортеру — в апикальной и латеральной цитоплазме, актин — вблизи латеральной мембраны и в микроворсинках, метка к переносчику колокализована с актином (желтое свечение); *д* — горизонтальный оптический срез на базальном уровне клеток, метка к транспортеру в базальной и латеральной цитоплазме колокализована с активном вблизи латеральной мембраны (желтое свечение); *е* — вертикальный срез (в плоскости XZ) через монослой клеток, реконструированный из серии горизонтальных оптических срезов, метка к переносчику — в апикальной, латеральной и базальной цитоплазме. *ж–и* — распределение транспортера GLUT2 после инкубирования в растворе 2.5 мМ глюкозы: *ж* — горизонтальный оптический срез на апикальном уровне клеток, актин — в микроворсинках и по границам клеток, метка к GLUT2 отсутствует; *з* — горизонтальный оптический срез на базальном уровне клеток, метка к транспортеру — по периферии клеток; *и* — вертикальный срез (в плоскости XZ) через монослой клеток, реконструированный из серии горизонтальных оптических срезов, метка к переносчику — в базальной цитоплазме. *к–о* — распределение транспортера GLUT2 после инкубирования в растворе 25 мМ глюкозы: *к* — горизонтальный оптический срез на апикальном уровне клеток, колокализация метки к транспортеру с актином (желтое свечение); *л* — горизонтальный оптический срез на базальном уровне клеток, метка к GLUT2 отсутствует; *м–о* — вертикальные оптические срезы через монослой клеток в плоскости XZ: *м* — актин микроворсинок, *н* — GLUT2 в области микроворсинок, *о* — наложение фото *м* и *н*, колокализация метки к транспортеру и актина (желтое свечение). *т* — транспортер, *м* — микроворсинки, стрелки указывают на клеточные границы. Масштабные отрезки — 15 мкм.

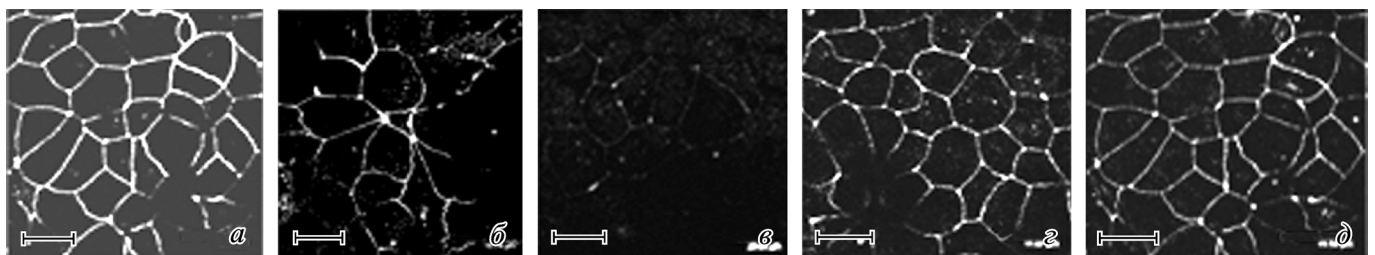


Рис. 3. Распределение белков плотных контактов в культуре клеток Caco2 при отсутствии нагрузки.

а — окклюдин, *б* — клаудин 1, *в* — клаудин 2, *г* — клаудин 3, *д* — клаудин 4. Горизонтальные оптические срезы в апикальной части клеток, в области плотных контактов. Клаудин 2 в клетках отсутствует. Масштабные отрезки — 15 мкм.

Приведенные выше результаты физиологического эксперимента показали, что при добавлении в инкубационную среду флоридзина (0.2 мМ), ингибитора переносчика глюкозы SGLT1, поглощение глюкозы снижается на 30 % как при низкой, так и при высокой ее концентрациях. Это подтверждает наличие в наших экспериментальных условиях активного транспорта глюкозы, опосредованного транспортером SGLT1. Не исключено также некоторое участие облегченной диффузии, опосредуемой транспортером GLUT2, которая также ингибируется при применении флоридзина (Kellett, 2001).

Не исключено, что небольшая часть глюкозы транспортируется парацеллюлярно благодаря структурным изменениям плотных контактов (Parphenheimer, Reiss, 1987; Грефнер и др., 2006).

Обнаруженная в настоящей работе в отличие от предшествующей (Грефнер и др., 2010) меньшая степень ингибирования флоридзином поглощения глюкозы при ее низкой концентрации, по-видимому, связана с использованием более длительного (3 ч вместо 1 ч) времени инкубации. Как известно, в этом случае активный транспорт глюкозы приходит в состояние насыщения, а доля пассивной диффузии сильно возрастает.

Ранее мы показали, что после инкубирования культуры клеток Caco2 в растворах глюкозы и галактозы при их низкой концентрации транспортер GLUT2 сосредоточен в базальной области клетки, где, по-видимому, обеспечивает перенос гексоз через базолатеральную мембрану (Грефнер и др., 2010). В этом отношении полученные ранее данные нашли подтверждение в настоящей работе. Кроме того, получены новые результаты, которые показывают, что при инкубировании культуры клеток в среде с высокой концентрацией глюкозы транспортер GLUT2 обнаруживается в апикальной части клетки и располагается в области микроворсинок, о чем свидетельствует колокализация меток к актину микроворсинок и к данному переносчику. Колокализация метки к транспортеру GLUT2 и к периферическому актину может также косвенно указывать на участие актина в транспорте этого белка к плазматической мембране. Аналогичный характер распределения транспортера GLUT2 наблюдался и в энтероцитах при нагрузке изолированной петли тонкой кишки раствором с высокой концентрацией глюкозы: транспортер GLUT2 обнаруживался в апикальной области клетки, где он, по-видимому, включается в перенос глюкозы через апикальную мембрану энтероцита (Грефнер и др., 2006, 2010; Громова и др., 2006). Эти результаты согласуются с данными Дж. Келлета с соавторами (Helliwell et al., 2000; Kellett, Helliwell, 2000; Kellett, 2001) об участии транспортера GLUT2 в переносе глюкозы через апикальную мембрану энтероцитов при высоких углеводных нагрузках.

В литературе продолжается обсуждение возможности парацеллюлярного механизма транспорта глюкозы через эпителий тонкого кишечника (D'Souza et al., 2003). На примере монослоя клеток Caco2 эти авторы показали, что при выращивании культуры в среде с высокой (25 мМ) концентрацией глюкозы по сравнению со средой с низкой (5 мМ) концентрацией изменяются барьерные свойства монослоя клеток Caco2. В частности, уменьшается трансэпителиальное сопротивление, а распределение F-актина на клеточных границах становится диффузным. Это не согласуется с нашими данными, полученным *in vivo* (Грефнер и др., 2006): при нагрузке изолированной петли тонкой кишки раствором с высокой концентрацией глю-

козы происходит конденсация актина энтероцитов вблизи плотных контактов. В клетках Caco2 мы не обнаружили изменений в распределении актина при разных видах нагрузок. Правда, в наших условиях в отличие от условий, приводимых в цитируемых выше работах, культура клеток выращивалась при высокой (25 мМ) концентрации глюкозы, а растворы с низким или высоким содержанием глюкозы добавляли на 3 ч только на последнем этапе эксперимента. Возможно, различия в условиях проведения эксперимента привели к несовпадению полученных результатов.

В настоящей работе мы также проанализировали распределение белков плотных контактов в клетках Caco2 при различных нагрузках. Оказалось, что локализация и экспрессия клаудинов 1, 3, 4 и окклюдина остается неизменной как при низкой, так и при высокой концентрациях глюкозы в инкубационной среде. Что касается клаудина 2, наличие которого, по данным некоторых авторов (Turksen, Troy, 2004), повышает проницаемость плотных контактов клеток, то в наших опытах он совсем не выявлялся. По-видимому, потребуются дополнительные исследования с использованием как поликлональных, так и моноклональных антител различных фирм, чтобы окончательно решить, какова степень участия указанных белков плотных контактов в парацеллюлярном транспорте исследованных гексоз.

Авторы благодарят д. б. н., проф. А. Г. Маркова за предоставление антител к окклюдину и клаудинам 1—4.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00018-а).

Список литературы

- Грефнер Н. М., Громова Л. В., Груздков А. А., Комиссарчик Я. Ю. 2010. Сравнительный анализ распределения переносчиков SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тонкой кишки крысы и клетках Caco2 при всасывании гексоз. Цитология. 52(7) : 580—587.
- Грефнер Н. М., Громова Л. В., Груздков А. А., Снигиревская Е. С., Комиссарчик Я. Ю. 2006. Структурно-функциональный анализ роли облегченной диффузии в процессе всасывания глюкозы энтероцитами тонкой кишки крысы. Цитология. 48(4) : 355—363.
- Громова Л. В., Грефнер Н. М., Груздков А. А., Комиссарчик Я. Ю. 2006. Оценка роли облегченной диффузии в транспорте глюкозы через апикальную мембрану энтероцита. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 92 (3) : 362—373.
- Artursson P., Palm K., Luthman K. 2001. Caco2 monolayer in experimental and theoretical predictions of drug transport. Adv. Drug Deliv. Rev. 46 : 27—43.
- Dahlqvist A. 1964. Method for assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem. 7 : 18—25.
- Dorkoosh F. A., Broekhuizen C. A. N., Borchard G., Raffiee-Tehrani M., Verhoef J. C., Junginger H. E. 2004. Transport of octreotide and evaluation of mechanism of opening the paracellular tight junctions using superporous hydrogel polymers in Caco-2 cell monolayers. J. Pharm. Sci. 93 : 743—752.
- D'Souza V. M., Shertzer H. G., Menon A. G., Pauletti G. M. 2003. High glucose concentration in isotonic media alters Caco-2 cell permeability. AAPS Pharm. Sci. 5 : 1—9.
- Harris D. S., Slot J. W., Geuze H. J., James D. E. 1992. Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 89 : 7556—7560.
- Helliwell P. A., Richardson M., Affleck J. A., Kellett G. L. 2000. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-

border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. *Biochem. J.* 350 : 149—154.

Hidalgo I. J., Raub T. J., Borchardt R. T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 96 : 736—749.

Hillgren K. M., Kato A., Borchardt R. T. 1995. *In vitro* systems for studying intestinal drug absorption. *Med. Res. Rev.* 15 (2) : 83—109.

Kellett G. L. 2001. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J. Physiol.* 531 : 585—595.

Kellett G. L., Helliwell P. A. 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem. J.* 350 : 155—162.

Khoursandi S., Scharlau D., Herter P., Kuchnen C., Martin D., Kinne R. K. H., Kipp H. 2004. Different modes of sodium-D-glucose cotransporter-mediated D-glucose uptake regulation in Caco-2 cells. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 287 : C1041—C1047.

Kipp H., Khoursandi S., Scharlau D., Kinne R. K. H. 2003. More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 285 : C737—C749.

Le Gall M., Tobin V., Stolarczyk E., Dalet V., Leturque A., Brot-Laroche E. 2007. Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism. *J. Cell. Physiol.* 213 : 834—843.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275.

Mahraoui L., Rodolosse A., Barbat A., Dussaulx E., Zweibaum A., Rousset M., Brot-Laroche E. 1994. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem. J.* 298 : 629—633.

Matosin-Matekalo M., Mesonero J. E., Delezay O., Poirée J. C., Ilundain A. A., Brot-Laroche E. 1998. Thyroid hormone regulation of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 in Caco-2 cells. *Biochem. J.* 334 : 633—640.

Matsumoto H., Erickson R. H., Gum J. R., Yoshioka M., Gum E., Kim Y. S. 1990. Biosynthesis of alkaline phosphatase du-

ring differentiation of the human colon cancer cell line Caco2. *Gastroenterology*. 98 : 1199—1207.

Nakano T., Inoue I., Alpers D. H., Akiba Y., Katayama S., Shinozaki R., Kaunitz J. D., Ohshima S., Akita M., Takahashi S., Koyama I., Matsushita M., Komoda T. 2009. Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297 : G207—G214.

Pappenheimer J. R., Reiss K. Z. 1987. Contribution of solvent drag through intercellular functions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J. Membr. Biol.* 100 : 123—136.

Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.-D., Kedinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47 : 323—330.

Rousset M., Laburthe M., Pinto M., Chevalier G., Rouyer-Fesard A., Dussaulx E., Trugnan G., Boige N., Brun J. L., Zweibaum A. 1985. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2 : modulation by forskolin. *J. Cell. Physiol.* 123 : 377—385.

Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M. L., Stamma-ti A., Zucco F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21 : 1—26.

Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A. 2006. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol. Prog.* 22 : 186—198.

Takehara M., Nishimura T., Mima S., Hoshino T., Mizushima T. 2009. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32 : 825—831.

Tsukita S., Furuse M. 2000. The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915 : 129—135.

Turksen K., Troy T.-C. 2004. Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117 : 2435—2447.

Поступила 29 XI 2011

CACO2 CELL CULTURE AS INTESTINAL EPITHELIUM MODEL FOR HEXOSE TRANSPORT STUDYING

N. M. Grefner,¹ L. V. Gromova,² A. A. Gruzdkov,² Ya. Yu. Komissarchik¹

¹ Institute of Cytology RAS and ² I. P. Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg;
e-mail: grefner@mail.cytspb.rssi.ru

Distribution of SGLT1 and GLUT2 hexose transporters as well as that of fibrillar actin and tight junction proteins in cultured Caco2 cells incubated in medium with different hexose concentrations has been considered. Glucose absorption by the cells from incubation medium has been determined. Fibrillar actin was concentrated in the microvilli and closely to tight junction. The actin distribution was not dependent on the glucose concentration. There was no SGLT1 association with brush border actin and the transporter localization was not dependent on the concentration of hexose. GLUT2 was localized in the basal part of Caco2 cells after low concentration hexose load (2.5 mM). The transporter was colocalized with microvilli actin in the apical part of the cells after high concentration hexose load (25 mM). The tight junction proteins, occludin and claudin 1, 3, 4 were not dependent on glucose concentration. Claudin 2 was not detected in Caco2 cells. Caco2 cell culture can be used as a model for studying of hexose transport in small intestine epithelium.

Key words: Caco2 cell, fibrillar actin, SGLT1 transporter, GLUT2 transporter, occluding, claudin 1—4, glucose absorption.