

促红细胞生成素(EPO)对叶酸在 Caco-2 细胞中跨膜转运的影响

言君凯¹ 靳桂英¹ 李豪男² 杨青^{1Δ}

(¹ 复旦大学生命科学学院生物化学系 上海 200433; ² 金日成综合大学生命科学系 平壤)

【摘要】 目的 采用人结肠腺癌细胞系(human colon adenocarcinoma cell line) Caco-2 单细胞层模型观察促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)对叶酸跨膜转运的影响。方法 采用 Caco-2 单层细胞模型, 观察不同剂量 EPO (0.3, 1, 3 U/mL) 处理对叶酸在摄取与外排双向转运方面的影响。通过 real time-PCR 与 Western blot 观察 EPO 处理对质子偶联的叶酸转运体(proton coupled folate transporter, PCFT)、还原叶酸载体(reduced folate carrier, RFC)以及多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2) 表达的影响。结果 EPO 在剂量 0.3~3 U/mL 范围内可剂量依赖地增加叶酸在摄取方向的转运, 增幅分别为 31.6%、61.5% 和 120.5%。高剂量 EPO(3 U/mL) 对叶酸在外排方向的转运也具有促进作用, 增幅为 56.9%, 而中低剂量 EPO (1, 0.3 U/mL) 对叶酸外排无明显作用。叶酸转运体 PCFT、RFC 及 MRP2 均受 EPO 影响而表达上调, 并呈剂量依赖和时间依赖关系。结论 EPO 可上调叶酸的摄取并呈剂量依赖关系, 高剂量 EPO 对叶酸的摄取与外排具有双向促进作用。

【关键词】 叶酸; 促红细胞生成素(EPO); Caco-2 细胞; 叶酸转运体

【中图分类号】 Q 563+.8; Q 735 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2014.01.005

Effects of erythropoietin (EPO) on the transport of folic acid across Caco-2 monolayers

YAN Jun-kai¹, JIN Gui-ying¹, RI Ho-nam², YANG Qing^{1Δ}

(¹ Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;

² Department of Biochemistry, Faculty of Life Science, Kim Il Sung University, Pyongyang, D. P. R. Korea)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of erythropoietin (EPO) on the transport of folic acid across human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 monolayers. **Methods** Transport assays of folic acid in uptake direction and efflux direction were performed in Caco-2 monolayers with or without the supplement of EPO (0.3, 1 and 3 U/mL). The effects of EPO on the expressions of folate transporters-proton coupled folate transporter (PCFT), reduced folate carrier (RFC) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) were analyzed by real time-PCR and Western blot. **Results** Transporter-mediated uptake of folic acid was enhanced by EPO treatment in a dose-dependent manner, and the increasing degrees were 31.6%, 61.5% and 120.5% for 0.3, 1 and 3 U/mL EPO,

国家自然科学基金(30873153)

^ΔCorresponding author E-mail: yangqing68@fudan.edu.cn

respectively. The efflux of folic acid was enhanced only by EPO at high dose (3 U/mL), and the increasing degree was 56.9%. The expression levels of folate transporters (PCFT, RFC and MRP2) were up-regulated by EPO in a dose- and time-dependent manner. **Conclusions** EPO at high does bidirectionally regulates the transport of folic acid. The uptake of folic acid was enhanced by EPO in a dose-dependent manner while the efflux of folic acid was enhanced by EPO of high dose.

【Key words】 folic acid; erythropoietin (EPO); Caco-2 cell; folate transporter

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30873153).

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是临床上治疗肾性贫血的经典药物,其发挥作用的主要机制是在骨髓内刺激造血细胞的分化成熟^[1]。自20世纪90年代初EPO开始用于治疗肾性贫血以来,其极大地改善了患者的预后情况和生存质量。随着时间的推移,EPO治疗的个体差异性越发受到关注。有文献指出,在某些患者体内铁、叶酸等造血营养素的代谢水平是影响EPO疗效的重要因素之一^[2-3]。鉴于这些造血营养素不能为人体自身合成且只能由外源性食物供给,口服吸收便成为整个代谢过程中的关键^[4]。近年的研究发现,EPO具有调控体内铁代谢的功能^[5-6],它可直接促进铁的口服吸收^[7],但是叶酸的口服吸收是否也受到EPO调控仍不得而知。

基于叶酸的吸收主要在肠道进行,涉及的转运体包括还原叶酸载体(reduced folate carrier, RFC)^[8-9]、质子偶联的叶酸转运体(proton coupled folate transporter, PCFT)^[10-11]及多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)^[12]。RFC与PCFT负责将叶酸从肠腔摄取转运至血浆,而MRP2则将叶酸从血浆外排回肠腔^[4]。动物实验显示体内EPO水平与叶酸吸收之间存在联系。在先天叶酸吸收不良(hereditary folate malabsorption, HFM)的小鼠模型中,其血清EPO水平相对较高,提示EPO增高可能与机体对叶酸吸收不良的代偿有关^[13]。内源性EPO多由肾脏分泌,在5/6肾脏切除的小鼠模型中,动物肠道内叶酸转运体PCFT与RFC均有下调,考虑可能因EPO分泌不足所致^[14]。因此,我们提出假设,EPO对叶酸的肠道吸收具有一定调控作用,且可能与叶酸转运体蛋白表达的变化有关。

人结肠腺癌细胞系(human colon adenocarcinoma cell line) Caco-2来源于人类结肠和直肠癌细胞,其在形态学、标志酶的功能表达及渗透性等方面与小

肠上皮细胞相似。药物透过Caco-2细胞单层的体外过程与药物口服后在肠中的吸收和代谢有良好的相关性,因此Caco-2细胞成为研究药物吸收、转运和代谢最经典的体外细胞模型之一^[15]。该细胞模型在涉及叶酸吸收与EPO作用的研究中均有应用^[7,16-17],是体外研究EPO影响叶酸吸收的理想工具。

综上所述,本实验拟采用Caco-2单层细胞模型观察EPO对叶酸肠道吸收的影响,以期对拓宽EPO作用机制的认识、深化了解肾性贫血患者体内的病理生理改变有所帮助。

材料和方法

药品与试剂 叶酸标准品(98% HPLC,美国Sigma公司);促红细胞生成素(3 000 U,上海市第九人民医院);DMEM培养基、非必需氨基酸、青-链霉素和0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA(美国Gibco公司);胎牛血清(杭州四季青生物技术有限公司)。HPLC所用的乙腈及甲醇均为色谱纯级别。

设备和仪器 安捷伦1260高效液相色谱仪(美国Agilent公司);伯乐IQ5实时定量PCR(美国Bio-Rad公司);Typhoon FLA9000(美国GE Healthcare公司);24孔Transwell(底面积0.6 cm²,孔径0.45 μm)、跨膜电阻仪(美国Millipore公司)。

细胞培养 Caco-2细胞株来源于ATCC(HTB-37),采用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、0.1%青-链霉素)于37℃、5%CO₂培养箱中培养(相对湿度90%)。待细胞生长至80%~90%汇合时,用PBS冲洗2~3次,用0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化,按1:5传代。用于转运实验的细胞按5×10⁴/孔的密度接种至Transwell,隔天换液,连续培养21~23天,满足跨

膜电阻大于 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 的膜用于叶酸转运实验。

EPO 处理 转运实验前 48 h, 移去 Transwell 小室内培养基, 用 PBS 冲洗 2~3 次, 在 EPO 处理组细胞的顶端侧 (apical side, AP) 加入 $400 \mu\text{L}$ 空白无血清培养基, 在细胞的基底侧 (basolateral side, BL) 加入 $600 \mu\text{L}$ 含 EPO (0.3、1、3 U/mL) 的无血清培养基, 对照组细胞 AP 侧与 BL 侧均替换成空白无血清培养基, 继续培养 48 h 后用于后续实验。

叶酸转运试验 用 PBS 配制浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的叶酸标准品溶液并调节 pH 至 6.0 或 7.4, 分别用于 AP→BL 的吸收方向和 BL→AP 的外排方向的转运实验。AP→BL 转运: AP 侧加入 $400 \mu\text{L}$ 叶酸标品 (pH 6.0), BL 侧加入 $600 \mu\text{L}$ 空白 PBS (pH 7.4); BL→AP 转运: BL 侧加入 $600 \mu\text{L}$ 叶酸标品 (pH 7.4), AP 侧加入 $400 \mu\text{L}$ 空白 PBS (pH 6.0)。Transwell 培养板置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、60 r/min 的水浴恒温振荡器中, 在 30、60、90、120 min 时分别取样 $100 \mu\text{L}$ 待检, 并补加相应空白 PBS。

HPLC 法检测样品中叶酸含量 于相应时间点取 $100 \mu\text{L}$ 待测样品, $9391 \times g$ 离心 10 min, 取上清过滤后用高效液相色谱仪测定叶酸含量。色谱条件: Agilent C18 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测波长 280 nm, 流动相 50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 6.3): 乙腈 (95:5), 流速 1.0 mL/min , 进样量 $80 \mu\text{L}$ 。

数据处理 根据文献计算叶酸透过 Caco-2 细胞单层的表观渗透系数 (apparent permeability coefficients, P_{app})^[18], 线性条件下参考公式 1, 非线性条件下参考公式 2。

公式 1: $P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(A \times C_0)$ 。其中, dQ/dt 为药物渗透速率; A 为膜面积 (0.6 cm^2); C_0 是叶酸在供给侧的初浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$)。

公式 2: $C_{R(t)} = [M/(V_D + V_R)] + [C_{R(0)} - (M/(V_D + V_R))]e^{-P_{\text{app}}A(1/V_D + 1/V_R)t}$ 。其中, V_D 是供给侧溶液体积 (AP 侧 = $400 \mu\text{L}$; BL 侧 = $600 \mu\text{L}$), V_R 为接收侧溶液体积 (AP 侧 = $400 \mu\text{L}$; BL 侧 = $600 \mu\text{L}$), A 为膜面积 (0.6 cm^2), M 为叶酸在转运体系中的总量, $C_{R(0)}$ 为叶酸在初始时刻 ($t = 0$) 接收侧的浓度, $C_{R(t)}$ 为叶酸在 t 时刻接收侧的浓度。

real time-PCR 检测叶酸转运体 mRNA 表达

将 Caco-2 细胞培养于 12 孔板内, 待 80%~90% 汇合后进行 EPO 处理。EPO 处理方式分 3 种: (1) 观察 EPO 作用的剂量依赖关系: EPO 处理剂量分低

(0.3 U/mL)、中 (1 U/mL)、高 (3 U/mL) 3 组, 处理时间 48 h; (2) 观察 EPO 作用的时间依赖关系: EPO 处理剂量为 1 U/mL, 处理时间为 4、24、48 h; (3) 观察生理剂量下 EPO 的长期作用: EPO 剂量为 10 mU/mL , 连续培养 15 天。采用 Trizol 法提取 Caco-2 细胞内总 RNA。取 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 进行反转录, 并使用 SYBER Green 法对目的基因进行相对定量, β -actin 作为内参。PCR 反应条件为: $96 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $96 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 反应循环 35 次。数据通过 MyIQ 软件分析, 引物信息如表 1 所示。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

Gene	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size
PCFT	F:GGCATCTTCAACTCACTCTAC R:GGTGTTCACTTTGCTCCTC	205
RFC	F:GGGGCTGGTCTTCTCTCTG R:CGTCCGAGACAATGAAAGTGAT	220
MRP-2	F:CTCACTTCAGCGAGACCG R:CTCACCAGCCAGTTCAGG	288
β -Actin	F:TCCTGTGGCATCCACGAAACT R:GAAGCATTTGCGGTGGACGAT	314

Western blot 检测叶酸转运体蛋白表达 将 Caco-2 细胞培养于 6 孔板内, 待 80%~90% 汇合后进行 EPO 处理。EPO 处理方式同上。采用文献报道方法提取膜蛋白^[16], 经 BCA 法测定蛋白浓度后进行 Western blot 反应。SDS-PAGE (10%) 电泳上样量为 $40 \mu\text{g}$, 转膜, 5% 脱脂牛奶于室温下封闭 2 h, 加入 PCFT 一抗 (1:1 000, 美国 Abcam 公司)、RFC 一抗 (1:1 000, 美国 Abcam 公司)、MRP2 一抗 (1:1 000, 美国 CST 公司), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 经 PBS-Tween (0.3%) 洗膜后孵育, 加入相应二抗并使用 ECL PLUS 试剂盒显色 (美国 GE Healthcare 公司)。杂交信号由 Typhoon FLA9000 扫描, 条带密度由 Image Quant 软件分析, 以 GAPDH 作为内参, 数据以目的蛋白/GAPDH 比值表示。

统计分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 重复 3 次以上。两组数据间用差异用 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 统计分析使用 SPSS 11.0 统计软件。

结 果

EPO 处理对叶酸转运的影响 低、中、高 3 个剂量 EPO (0.3、1、3 U/mL) 处理 Caco-2 细胞后, 对该方向上双向转运的变化见图 1。在 AP→BL 摄取方向上, 叶酸的转运量随时间呈非线性增长, 90 min 后逐渐趋于饱和, EPO 处理上调了叶酸在该方向的转运并呈剂量依赖关系(图 1 A)。对照组及 EPO 处理低、中、高 3 个剂量组在 120 min 时的累积转运量分别为(117.9 ± 15.8)、(154.7 ± 8.4)、(189.9 ± 6.8)和(258.0 ± 7.6)pmol, EPO 处理后的增幅分别为 31.6%、61.5%和 120.5%, 中、高剂量 EPO 处理所致的差异有统计学意义(图 1B)。在 BL→AP 外排方向上, 叶酸的转运量随时间呈线性增长, 低、中

剂量 EPO 处理对该方向上的叶酸转运无明显影响, 而高剂量 EPO 处理可上调叶酸转运(图 1C)。对照组及 EPO 处理低、中、高 3 个剂量组在 120 min 时的累积转运量分别为(86.4 ± 4.2)、(96.2 ± 18.2)、(104.3 ± 27.9)和(135.6 ± 20.5)pmol, EPO 处理后的增幅分别为 11.3%、20.7%和 56.9%, 仅高剂量 EPO 所致差异有统计学意义(图 1D)。在 Papp 方面, 各时间点计算所得的结果如表 2 所示。在 AP→BL 吸收方向上, Papp 值随时间变化逐渐减小, 说明叶酸转运体在此过程中有逐渐饱和的趋势, 同时 Papp 值也随 EPO 作用剂量的上升而逐渐增大, 说明 EPO 处理对叶酸在该方向转运具有促进作用; 在 BL→AP 外排方向上, Papp 值随 EPO 作用剂量的上升而逐渐增大, 说明 EPO 处理对叶酸在该方向转运同样具有一定促进作用。

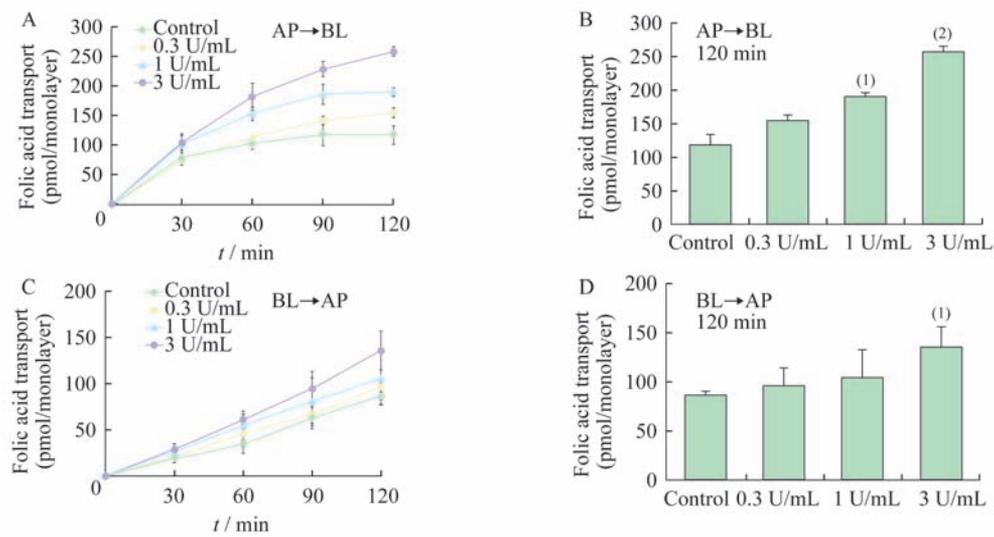


图 1 EPO 处理对叶酸转运的影响

Fig 1 Effect of EPO on the transport of folic acid across Caco-2 cell monolayers

A: Timecourse representing the AP→BL transport of folic acid; B: AP→BL transport amount of folic acid at 120 min; C: Timecourse representing the BL→AP transport of folic acid; D: BL→AP transport amount of folic acid at 120 min. vs. control, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$.

表 2 各时间点叶酸转运的 Papp

Tab 2 Papp of AP→BL or BL→AP at each designed time point

($\bar{x} \pm s$)

Group	Papp (10^{-6} cm/s)							
	AP→BL				BL→AP			
	30 min	60 min	90 min	120 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Control	5.54 ± 0.42	3.60 ± 0.36	2.75 ± 0.43	2.07 ± 0.27	1.49 ± 0.35	1.44 ± 0.14	1.71 ± 0.32	1.77 ± 0.08
0.3 U/mL	5.14 ± 0.48	3.94 ± 0.10	3.31 ± 0.16	2.73 ± 1.41	1.71 ± 0.45	1.86 ± 0.85	1.82 ± 0.27	1.97 ± 0.37
1 U/mL	7.08 ± 1.03	5.38 ± 0.41	4.38 ± 0.41	3.37 ± 0.12	2.13 ± 0.28	2.22 ± 0.63	2.18 ± 0.71	2.13 ± 0.57
3 U/mL	7.36 ± 0.99	6.43 ± 0.81	5.43 ± 0.32	4.64 ± 0.13	2.36 ± 0.45	2.49 ± 0.21	2.57 ± 0.49	2.77 ± 0.41

Papp: Apparent permeability coefficients.

EPO 处理对叶酸转运体 mRNA 表达水平的影响 观察 EPO 处理 Caco-2 细胞后,内叶酸转运体 PCFT、RFC 和 MRP2 在 mRNA 水平的变化(图 2)。EPO 处理上调了 PCFT 与 RFC 基因的表达,呈现剂量依赖型(图 2A),但仅中、高剂量 EPO 所致差异有统计学意义。MRP2 基因表达仅在高剂量

EPO 处理时上调,低、中剂量 EPO 对 MRP2 mRNA 水平无明显影响;在时间依赖性试验中发现,PCFT 与 RFC mRNA 水平的变化均在 48 h 时出现,且差异有统计学意义,24 h 时出现的上调结果的差异未见统计学意义(图 2B)。

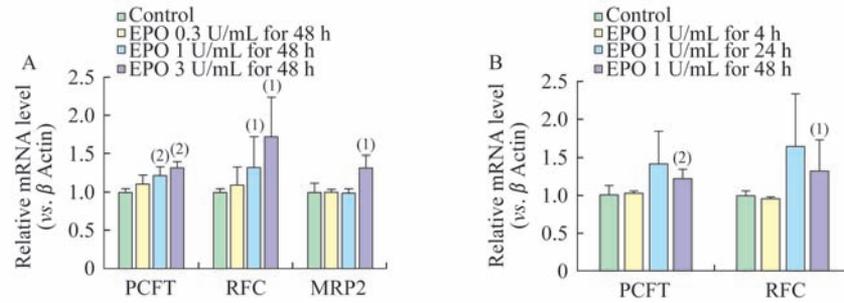


图 2 EPO 处理对叶酸转运体 mRNA 表达影响

Fig 2 Effects of EPO on the mRNA expressions of folate transporters

A: Effects of EPO dose on the mRNA expressions of PCFT, RFC and MRP2; B: Effects of EPO incubation time on the mRNA expressions of PCFT and RFC. vs. control, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$.

EPO 处理对叶酸转运体蛋白质表达水平的影响 观察 EPO 处理 Caco-2 细胞后,叶酸转运体 PCFT、RFC、MRP2 蛋白质水平的变化(图 3)。EPO 处理可剂量依赖性地上调 PCFT、RFC 和

MRP2 蛋白质水平(图 3A),但仅中、高剂量 EPO 所致差异有统计学意义;在时间依赖性试验中发现,PCFT、RFC 和 MRP2 蛋白质水平均在 48 h 时出现上调,且差异有统计学意义(图 3B)。

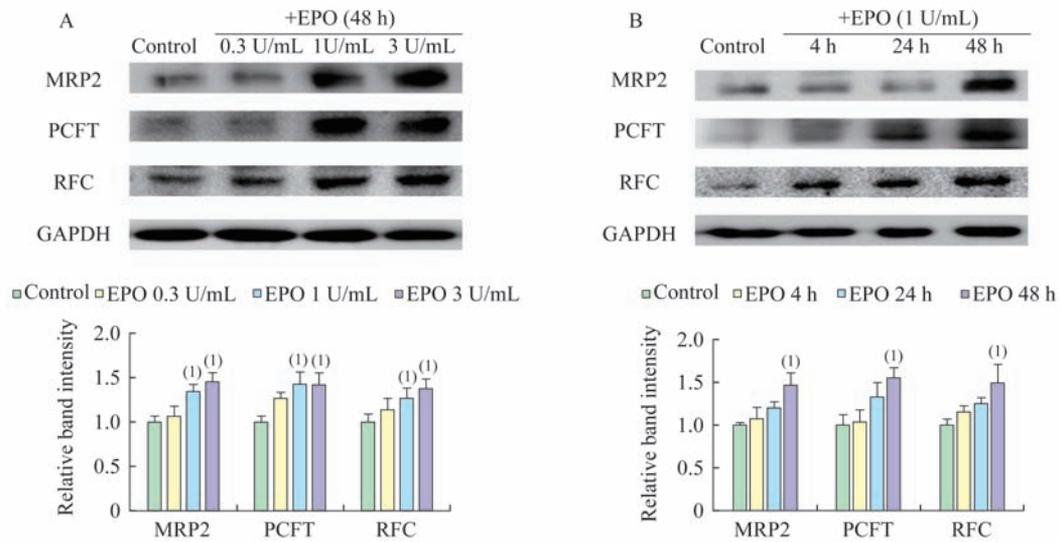


图 3 EPO 处理对叶酸转运体蛋白表达影响

Fig 3 Effects of EPO on the protein expressions of folate transporters

A: Effects of EPO dose on the protein expressions of MRP2, PCFT and RFC; B: Effects of EPO incubation time on the protein expressions of MRP2, PCFT and RFC. vs. control, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

生理剂量下 EPO 长期作用对叶酸转运体表达的影响 进一步观察生理剂量下 EPO (10 mU/mL)长

期作用对叶酸转运体表达的影响(图 4)。在 mRNA 水平上(图 4A),96 h 作用期间 EPO 处理组 PCFT 相对表

达量(实线)及 RFC 相对表达量(虚线)与对照组的比值为 80%~120%,差异无统计学意义;在蛋白质水平上

(图 4B),EPO 处理组与对照组的 PCFT、RFC 表达在 5、10 及 15 天时差异均无统计学意义。

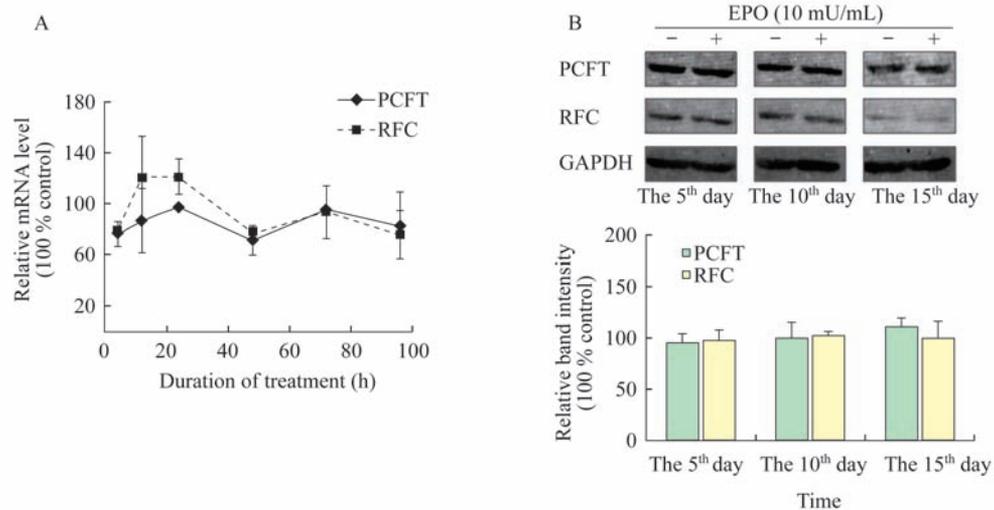


图 4 生理剂量(10 mU/mL)下 EPO 长期作用对叶酸转运体表达的影响

Fig 4 Long-term impact of EPO at physiological dose (10 mU/mL) on the expressions of folate transporters

A: The mRNA expression level of folate transporters; B: The protein expression level of folate transporters.

讨 论

叶酸、铁等微量营养素是造血过程中不可或缺的原料。近年来研究指出,EPO除了在骨髓内直接刺激造血细胞分化外,还具有调节铁吸收的作用,而叶酸的吸收是否也受 EPO 调控尚不明确。Caco-2 细胞模型是体外研究营养素吸收的经典模型,因此本实验拟以 Caco-2 细胞为模型观察 EPO 对叶酸吸收和转运的影响。

在转运实验中,我们采用 AP 侧 pH 6.0、BL 侧 pH 7.4 的转运环境,是考虑到人体中肠道 pH \approx 6,而血液 pH \approx 7.4 的实际情况。参考文献选择 EPO 的使用剂量^[7],低、中、高剂量分别为 0.3、1 和 3 U/mL,与临床上治疗肾性贫血的实际用量相当。从结果中我们发现,叶酸在摄取方向和外排方向的转运均受 EPO 影响。在摄取方向上(AP \rightarrow BL),EPO 处理对叶酸转运具有促进作用并呈剂量依赖关系;在外排方向上(BL \rightarrow AP),中低剂量 EPO 对叶酸转运虽无显著影响,但高剂量 EPO 处理对叶酸外排同样具有促进作用。因此,我们推测 EPO 纠正贫血的机制可能与其促进叶酸吸收、保证造血原料充足、优化造血环境有关;同时,高剂量 EPO 对叶酸转运的双向调控作用可能与 EPO 疗法的个体差异性有关。

肠道内负责叶酸转运的转运蛋白主要包括 PCFT、RFC 和 MRP2,其中 PCFT 与 RFC 负责将叶酸从肠道 AP 侧转运至 BL 侧(摄取),而 MRP2 则负责将叶酸从 BL 侧转运至 AP 侧(外排)。我们在转运体表达的检测中发现,药理剂量下 EPO (0.3、1、3 U/mL)处理 48 h 即可引起上述转运体表达的变化。其中,PCFT、RFC 表达在 EPO 作用下剂量依赖上调,与转运实验中叶酸在摄取方向的变化一致。值得注意的是,中剂量 EPO (1 U/mL)处理与高剂量 EPO (3 U/mL)处理引起的 PCFT、RFC 表达的变化十分接近,但在转运实验中两者引起的变化程度却有较大差异,说明高剂量 EPO (3 U/mL)影响下叶酸摄取的改变可能还有转运体表达之外的机制参与。MRP2 表达同样在 EPO 作用下呈剂量依赖上调,但仅高剂量 EPO (3 U/mL)引起叶酸在外排方向的改变,这可能与叶酸外排还有其他转运体参与介导有关。此外,我们发现转运体表达的变化在 mRNA 水平与蛋白水平并不完全一致,说明 EPO 的调控方式可能同时包括转录调控与翻译调控。

机体在非贫血状态下 EPO 水平含量极低,血中含量约 10 mU/mL,但在低氧应激中可上升 1 000 倍,达到 10 U/mL^[19-20]。生理剂量下 EPO 是否与药理剂量下 EPO 具有相似功能还值得探讨。本研

究结果发现,生理剂量下 EPO (10 mU/mL)长期作用 15 天,Caco-2 细胞内叶酸转运体 PCFT、RFC 的表达无显著变化。这一现象提示 EPO 在肠道细胞上的作用可能是机体在低氧胁迫下的应激反应,即通过促进造血原料的吸收、优化造血环境来刺激造血、改善低氧,而在正常情况下该作用处于静息状态。

综上所述,本研究采用体外培养 Caco-2 单层细胞,发现了 EPO 对叶酸肠道吸收的促进作用,以及高剂量 EPO 对叶酸转运的双向调控作用,对拓宽 EPO 作用机制的认识,深化了解肾性贫血患者体内病理生理的改变具有一定帮助。

参 考 文 献

- [1] Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action[J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(12):1573 - 1584.
- [2] Bamgbola OF. Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2011, 80(5):464 - 474.
- [3] Johnson DW, Pollock CA, Macdougall IC. Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2007, 12(4):321 - 330.
- [4] Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2009, 11:e4.
- [5] Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, et al. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha[J]. *Blood*, 2008, 111(12):5727 - 5733.
- [6] Kong WN, Chang YZ, Wang SM, et al. Effect of erythropoietin on hepcidin, DMT1 with IRE, and hephaestin gene expression in duodenum of rats[J]. *J Gastroenterol*, 2008, 43(2):136 - 143.
- [7] Srai SK, Chung B, Marks J, et al. Erythropoietin regulates intestinal iron absorption in a rat model of chronic renal failure[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(7):660 - 667.
- [8] Balamurugan K, Said HM. Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(1):C189 - C193.
- [9] Said HM. Recent advances in carrier-mediated intestinal absorption of water-soluble vitamins [J]. *Annu Rev Physiol*, 2004, 66:419 - 446.
- [10] Zhao R, Min SH, Wang Y, et al. A role for the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) in folate receptor-mediated endocytosis[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(7):4267 - 4274.
- [11] Qiu A, Jansen M, Sakaris A, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption[J]. *Cell*, 2006, 127(5):917 - 928.
- [12] Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, et al. Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293(3):717 - 723.
- [13] Salojin KV, Cabrera RM, Sun W, et al. A mouse model of hereditary folate malabsorption: deletion of the PCFT gene leads to systemic folate deficiency[J]. *Blood*, 2011, 117(18):4895 - 4904.
- [14] Bukhari FJ, Moradi H, Gollapudi P, et al. Effect of chronic kidney disease on the expression of thiamin and folic acid transporters[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(7):2137 - 2144.
- [15] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1-3):27 - 43.
- [16] Ashokkumar B, Mohammed ZM, Vaziri ND, et al. Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells[J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(1):159 - 166.
- [17] Verwei M, van den Berg H, Havenaar R, et al. Effect of folate-binding protein on intestinal transport of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate across Caco-2 cells[J]. *Eur J Nutr*, 2005, 44(4):242 - 249.
- [18] Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(9):2111 - 2119.
- [19] Fisher JW, Koury S, Ducey T, et al. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys [J]. *Br J Haematol*, 1996, 95(1):27 - 32.
- [20] Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, et al. Role of the kidney in erythropoiesis[J]. *Nature*, 1957, 179(4560):633 - 634.

(收稿日期:2013-03-07;编辑:王蔚)