



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

苦瓜籽蛋白 MAP30 的分离及其对肠道紧密连接的保护
作用研究

STUDY ON EXTRACTION OF BITTER MELON (*BALSAM
PEAR*) SEEDS PROTEIN MAP30 AND ITS PROTECTIVE
EFFECT ON INTESTINAL TIGHT JUNCTION

硕 士 学 位 论 文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

研 究 生:	陈梦蝶
CANDIDATE:	CHEN MENGDI
学 号:	2016309110028
STUDENT NO.:	
专 业:	食品科学
MAJOR:	FOOD SCIENCE
导 师:	胡筱波 副教授
SUPERVISOR:	ASSO.PROF. HU XIAOBO

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇一九年六月
JUNE, 2019

华中农业大学硕士学位论文

苦瓜籽蛋白 MAP30 的分离及其对肠道紧密连接的保护
作用研究

**Study on Extraction of Bitter Melon (*balsam pear*) Seeds
Protein MAP30 and Its Protective Effect on Intestinal Tight
Junction**

研 究 生：陈梦蝶

学 号：2016309110028

指 导 教 师：胡筱波 副教授

指 导 小 组：熊善柏 教 授

黄琪琳 教 授

严守雷 副教授

刘 茹 副教授

专业：食品科学

研究方向：天然产物化学

获得学位名称：工学硕士

获得学位时间：2019 年 6 月 26 日

华中农业大学食品科技学院

二〇一九年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密		如需保密, 解密时间	年 月 日
独创性声明 本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。 研究生签名: 陈梦蝶 时间: 2019年06月05日			
学位论文使用授权书 本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保留提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。 注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。 学位论文作者签名: 陈梦蝶 导师签名: 胡筱波 签名日期: 2019年06月05日 签名日期: 2019年06月05日			

注: 请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间

目录

摘 要	i
Abstract	iii
中英文缩略词对照表	vii
第一章 前言	1
1.1 苦瓜籽中活性成分的研究现状	1
1.1.1 苦瓜籽中蛋白、多肽的研究应用	1
1.1.2 苦瓜籽中黄酮类化合物的研究应用	2
1.1.3 苦瓜籽中油脂研究现状	2
1.2 苦瓜籽中核糖体失活蛋白的研究现状	3
1.2.1 苦瓜籽中的核糖体失活蛋白	3
1.2.2 苦瓜籽 MAP30 的提取纯化方法	5
1.2.3 苦瓜籽 MAP30 的结构与酶学性质	5
1.2.4 苦瓜籽 MAP30 的生理功能	7
1.3 肠道屏障紧密连接研究现状	9
1.3.1 肠道屏障研究现状	9
1.3.2 紧密连接蛋白研究现状	10
1.3.3 紧密连接相关信号通路	12
1.4 本研究的内容、意义及创新性	13
1.4.1 研究内容	13
1.4.2 研究意义及创新性	13
1.4.3 技术路线图	14
第二章 苦瓜籽蛋白 MAP30 的提取纯化与性质表征	15
2.1 实验材料	15
2.1.1 实验原料	15
2.1.2 主要试剂	15
2.1.3 主要仪器	16
2.2 实验方法	16
2.2.1 苦瓜籽的主要成分分析	16
2.2.2 苦瓜籽 MAP30 的提取纯化	18
2.2.3 苦瓜籽 MAP30 的鉴定	20
2.2.4 苦瓜籽 MAP30 的抗肿瘤活性验证	22
2.2.5 数据统计分析	24
2.3 结果与分析	24
2.3.1 苦瓜籽的主要成分分析结果	24
2.3.2 苦瓜籽 MAP30 的提取纯化结果	26
2.3.3 苦瓜籽 MAP30 的鉴定结果	27
2.3.4 苦瓜籽中 MAP30 的抗肿瘤活性验证结果	30
2.4 讨论	31
2.5 结论	33
第三章 苦瓜籽蛋白 MAP30 对肠道紧密连接的保护作用研究	34
3.1 实验材料	34
3.1.1 实验原料	34
3.1.2 主要试剂	34

3.1.3 主要仪器	35
3.2 实验方法	36
3.2.1 主要溶液的配制	36
3.2.2 细胞单层模型的建立与评价	36
3.2.3 MTT 法检测 MAP30 对 Caco-2 生长增殖的影响	40
3.2.4 跨膜电阻值与荧光黄通量测定	40
3.2.5 基因表达量测定	40
3.2.6 蛋白表达量测定	44
3.2.7 数据统计分析	47
3.3 结果与分析	47
3.3.1 单层模型评价结果	47
3.3.2 MTT 测定结果	49
3.3.3 跨膜电阻值与荧光黄通量测定结果	49
3.3.4 基因表达量测定结果	50
3.3.5 蛋白表达量测定结果	51
3.3.6 通路因子表达量测定结果	53
3.4 讨论	54
3.5 结论	55
第四章 MAP30 中色氨酸对肠道紧密连接的影响研究	57
4.1 实验材料	57
4.1.1 实验原料	57
4.1.2 主要试剂	57
4.1.3 主要仪器	57
4.2 实验方法	57
4.2.1 主要溶液的配制	57
4.2.2 细胞单层模型的建立与评价	57
4.2.3 MTT 法检测 MAP30 对 Caco-2 生长增殖的影响	58
4.2.4 跨膜电阻值与荧光黄通量测定	58
4.2.5 基因表达量测定	58
4.2.6 蛋白表达量测定	58
4.2.7 数据统计分析	59
4.3 结果与分析	59
4.3.1 MTT 测定结果	59
4.3.2 跨膜电阻值和荧光黄通量变化	59
4.3.3 基因表达量测定结果	61
4.3.4 蛋白表达量测定结果	61
4.3.5 通路因子表达量测定结果	64
4.4 讨论	65
4.5 结论	66
第五章 结论	68
展望	69
参考文献	70
致 谢	83
附 录	84

摘要

许多研究表明,癌症、病毒入侵等的发生都伴随着肠道屏障的损伤。苦瓜籽蛋白 MAP30 是从苦瓜籽中分离得到的一种核糖体失活蛋白,具有显著的抗病毒和抗癌活性。目前对 MAP30 的研究大多集中在抗癌抗病毒活性评价方面,而对癌症患者及病毒感染者的肠道屏障损伤方面的研究还未见报道。本文从苦瓜籽中分离得到高纯度 MAP30 蛋白,证明其具有显著的抗癌活性,在此基础上,从肠道紧密连接的角度探究 MAP30 对肠道屏障损伤的改善机制,并研究了 MAP30 中主要必需氨基酸色氨酸对肠道屏障紧密连接的保护和修复作用。本文的主要研究结果如下:

1. 苦瓜籽 MAP30 的提取纯化与性质表征

对苦瓜籽中的主要成分进行分析,发现苦瓜籽中氨基酸种类丰富,含有全部 8 种必需氨基酸和丰富的 Ca、Mg、K 等金属元素;苦瓜籽中共检出 7 种主要脂肪酸,不饱和脂肪酸含量为 64.34%;苦瓜籽中粗蛋白含量为 31.07%,其中主要为盐溶蛋白和水溶蛋白,有利于下一步提取盐溶性蛋白 MAP30。

采用盐提,硫酸铵分级,透析,凝胶柱层析分离的方法提取纯化苦瓜籽中的 MAP30 蛋白,得到的样品经 SDS-PAGE 电泳呈单一稳定条带,分子量约为 30 kDa,经 Nano LC-MS/MS 鉴定所得样品即为 MAP30。氨基酸组成分析表明,MAP30 中必需氨基酸色氨酸和亮氨酸含量最高,均为 8.12%。MTT 实验表明 MAP30 对小鼠黑色素瘤 B16 细胞、人胃癌 SGC7901 细胞和人肝癌 HepG2 细胞均具有增殖抑制作用。

2. MAP30 对肠道紧密连接损伤的改善及其机制

将 MAP30 作用于脂多糖(LPS)损伤的 Caco-2 细胞单层紧密连接模型,与未损伤组相比,LPS 导致细胞单层跨膜电阻值(TEER)降低 30%,荧光黄通过量(LY-Flux)升高 36%;0-40 $\mu\text{g/mL}$ MAP30 对 LPS 介导的 TEER 和 LY-Flux 的改变均有不同程度的改善效果,且效果呈现剂量效应,中、高浓度(20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$) MAP30 作用组 TEER 与 LY-Flux 均恢复到未损伤组同一水平,说明 MAP30 能有效改善 LPS 诱导的肠道屏障紧密连接完整性和通透性改变。

蛋白和基因表达水平上,经 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 作用 24 h 后,单层细胞主要紧密连接蛋白 Claudin-1, Occludin 和 ZO-1 的蛋白表达量分别下调 39%、28%和 29%,mRNA 表达量分别下调 66%、25%和 61%;不同浓度 MAP30 均能有效改善 LPS 引起的 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白和 mRNA 表达量下调,且对 Claudin-1 的调控作用

最为显著，与未损伤组相比，高浓度 MAP30 组 Claudin-1 蛋白表达量上调了 79%，mRNA 表达量上调了 55%。

核转录因子（NF κ B）和肌球蛋白轻链激酶（MLCK）是导致肠道紧密连接（TJ）通透性增加，屏障功能受损的重要炎症因子。而细胞外调节蛋白激酶（ERK1/2）和丝裂原活化蛋白（MAP）信号通路的激活会调节肠上皮细胞的细胞旁通路转运，进而增强 TJ 的屏障功能。本研究发现 MAP30 能显著提高 ERK1/2 和 MAP 的 mRNA 表达量，显著抑制 NF κ B 和 MLCK 的表达，说明 MAP30 可能是通过激活 ERK1/2-MAP 通路和抑制 NF κ B-MLCK 信号通路来调控相关蛋白基因的表达，实现对肠道紧密连接损伤的保护。

3. 色氨酸对肠道屏障紧密连接的保护和修复作用

选取 MAP30 中的必需氨基酸色氨酸作用于单层模型，从保护和修复两方面探究色氨酸对肠道紧密连接的影响，发现 8 μ g/mL 和 16 μ g/mL 色氨酸能有效缓解 LPS 导致的 TEER 值的降低，其中 8 μ g/mL 色氨酸修复组的 TEER 值达到未损伤组的 98.6%，8 μ g/mL 色氨酸保护组的 TEER 值高出未损伤组 12%；4 μ g/mL 和 8 μ g/mL 色氨酸能显著降低 LPS 导致的 LY-Flux 的升高，色氨酸保护组和修复组 LY-Flux 均恢复到与未损伤组同一水平。说明色氨酸可有效保护和修复肠道紧密连接的完整性和通透性，且保护作用效果强于修复作用。

蛋白表达水平上，与未损伤对照组相比，LPS 损伤组 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 表达量分别下调 38%、26%和 29%，中浓度（8 μ g/mL）和高浓度（16 μ g/mL）色氨酸保护组 Claudin-1 的蛋白表达量显著回升，分别达到未损伤组的 93%和 114%，Occludin 和 ZO-1 表达量回升不显著；色氨酸修复组 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 的表达量变化不显著。mRNA 测定结果与蛋白基本一致，不同浓度色氨酸均能显著缓解 Claudin-1 的 mRNA 表达量下调，中浓度组达到未损伤组的 78%，高浓度组高出未损伤组 45%；色氨酸对 Occludin 和 ZO-1 mRNA 表达量的影响不显著。

在信号通路方面，色氨酸也可能是通过激活 ERK1/2-MAP 通路和抑制 NF κ B-MLCK 信号通路实现对肠道紧密连接损伤的改善。但在肠道屏障紧密连接完整性和通透性，紧密连接相关基因蛋白以及信号因子表达的调控等方面，MAP30 的作用效果均优于色氨酸，猜测 MAP30 对肠道屏障 TJ 的调控中，可能还有其他氨基酸或活性结构的协同作用。

关键词： 苦瓜籽蛋白；MAP30；色氨酸；肠道屏障；紧密连接；信号通路

Abstract

Many studies have shown that the occurrence of cancer, virus invasion are accompanied by the intestinal barrier damage. Bitter melon seeds protein MAP30, a ribosomal inactivated protein isolated from bitter melon seeds, has significant antiviral and anticancer activities. At present, most of the research on MAP30 focus on the evaluation of anti-cancer and antiviral activities, but little on the intestinal barrier damage in cancer patients and virus infected patients. In this paper, high-purity MAP30 protein was isolated from bitter melon seeds and proved to have significant anti-cancer activity. On this basis, the alleviated mechanism of MAP30 on intestinal barrier damage was explored from the perspective of intestinal tight junctions(TJ), and the protective and reparative effect of major essential amino acid tryptophan in MAP30 on intestinal barrier tight junctions was studied. The main results are as follows:

1. Extraction, purification and characterization of MAP30 from bitter melon seeds

Through the analysis of the main components in bitter melon seeds, it was found that the varieties of amino acids in it were abundant, including all 8 essential amino acids, and it also rich in metal elements such as Ca, Mg and K. Seven main fatty acids were detected in bitter melon seeds, and the content of unsaturated fatty acids was 64.34%. The crude protein content of balsam pear seeds was 31.07% and mainly salt soluble and water soluble protein, which is beneficial to the next step of extracting salt-soluble protein MAP30.

MAP30 protein was extracted and purified from bitter melon seeds by salt extraction, ammonium sulfate grading, dialysis and gel column chromatography. The final obtained high purity sample showed a single stable band at 30 kDa by SDS-PAGE electrophoresis and was identified as MAP30 by Nano LC-MS /MS. Amino acid composition analysis showed that the content of essential amino acids tryptophan and leucine in MAP30 was the highest, both of which were 8.12%. MTT assay showed that MAP30 inhibited the proliferation of B16 cells, SGC7901 cells and HepG2 cells.

2. Alleviated effect of MAP30 on intestinal TJ injury and its mechanism

MAP30 was applied to lipopolysaccharide(LPS)-damaged caco-2 cell monolayer tight junction model. Compared with the uninjured group, LPS resulted in a 30% reduction in cell monolayer transmembrane resistance (TEER) and a 36% increase in lucifer yellow flux(LY-Flux). 0-40 g/mL MAP30 can alleviate the changes of LPS-induced TEER and LY-Flux to varying degrees, and the results show a dose effect. TEER and LY-Flux in the MAP30 group at medium and high concentrations (20 g/mL and 40 g/mL) both recovered to the same level with the undamaged group, indicating that MAP30 can effectively alleviate the LPS-induced changes in the integrity and permeability of intestinal barrier TJ.

At the protein and gene expression levels, after 24 h of 100 g/mL LPS treatment, the expression of major TJ proteins Claudin-1, Occludin and ZO-1 in monolayer cells were down-regulated by 39%, 28%, 29%, and mRNA expression were down-regulated by 66%, 25% and 61%, respectively. MAP30 at different concentrations can effectively up-regulated the LPS-induced decrease in Claudin-1, Occludin, ZO-1 protein and mRNA expressions, and has the most significant regulatory effect on Claudin-1. Compared with the uninjured group, the expression of Claudin-1 protein in the high concentration MAP30 group was up-regulated by 79%, and the mRNA expression level was up-regulated by 55%.

Nuclear transcription factor (NF κ B) and myosin light chain kinase (MLCK) are important inflammatory factors that lead to intestinal TJ permeability increased and barrier dysfunction. Activation of the extracellular regulatory protein kinase (ERK1/2) and mitogen-activated protein (MAP) signaling pathways can regulate the paracellular transport of intestinal epithelial cells, thereby enhancing the barrier function of TJ. In this study, it was found that MAP30 significantly increased the mRNA expression of ERK1/2 and MAP, while significantly inhibited the expression of NF κ B and MLCK. Therefore, MAP30 may regulate the expression of related protein genes by activating the ERK1/2-MAP pathway and inhibiting the NF κ B-MLCK signaling pathway, so as to protect the intestinal barrier tight junction injury.

3. Protective and healing effects of tryptophan on tight junctions in the intestinal barrier

The essential amino acid tryptophan in MAP30 was selected to treat the monolayer model, and the protective and reparative effect of tryptophan on intestinal tight junction was explored. It was found that 8 g/mL and 16 g/mL tryptophan could effectively alleviate the reduction of TEER value caused by LPS. The TEER value of the 8 g/mL tryptophan repair group reached to 98.6% of the undamaged group, and 8 g/mL tryptophan protection group was 12% higher than that of the undamaged group. 4 g/mL and 8 g/mL tryptophan could significantly reduce the increase of LY-Flux caused by LPS, and the levels of LY-Flux in the tryptophan protection group and repair group were restored to the same level as uninjured group. It shows that tryptophan can effectively protect and repair the integrity and permeability of intestinal TJ, and the protective effect is stronger than the reparative effect.

As for protein expression level, Claudin-1, Occludin and ZO-1 expression in the LPS injury group were down-regulated by 38%, 26% and 29% compared with the uninjured group. Claudin-1 protein expression level significantly increased in the medium concentration (8 g/mL) and high concentration (16 g/mL) tryptophan protection group, reaching to 93% and 114% of the uninjured group, respectively, while the expression of Occludin and ZO-1 did not increase significantly. The protein expression of Claudin-1, Occludin and ZO-1 did not change significantly in the tryptophan repair group. The expression results of mRNA were consistent with protein, tryptophan at different concentrations could significantly alleviate the down-regulation of Claudin-1 mRNA expression. The medium concentration tryptophan group reached to 78% of the uninjured group, and the high concentration group was 45% higher than the uninjured group, while the mRNA expression level of Occludin and ZO-1 were not significantly changed.

In terms of signal pathway, tryptophan may protect the intestinal barrier tight junction injury by activating the ERK1/2-MAP pathway and inhibiting the NF κ B-MLCK signaling pathway, which indicates that tryptophan plays a role in the improvement of intestinal barrier TJ injury by MAP30. However, MAP30 is superior to tryptophan in regulation of intestinal barrier tight junction integrity and permeability, tight junction

related protein, gene and signal factor expression. It is speculated that there may be synergistic effects of other amino acids or active structures in the regulation of intestinal barrier TJ by MAP30.

Key words: bitter melon seeds protein; MAP30; tryptophan; intestinal barrier; tight junction; signal pathway

中英文缩略词对照表

英文缩写	英文名称	中文名称
RIPs	Ribosomal inactivating proteins	核糖体失活蛋白
MAP30	Momordica anti-HIV protein of 30 kDa	抗人类免疫缺陷病毒蛋白 30
IBD	Inflammatory bowel disease	炎症性肠病
TJ	Tight junctions	紧密连接
MLCK	Myosin light chain kinase	肌球蛋白轻链激酶
NFκB	Nuclear factor-kappa B	核转录因子
MAP	Mitogen-activated protein	丝裂原活化蛋白
ERK1/2	Extracellular regulated protein kinase 1/2	细胞外调节蛋白激酶
TEER	Transepithelial electrical resistance	细胞单层的跨膜电阻
LY	Lucifer yellow	荧光黄
AKP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶活性
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	半抑制浓度
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖

第一章 前言

苦瓜 (*Momordica charantia* L.)，别名凉瓜、赖葡萄、锦荔枝等，是一种葫芦科苦瓜属植物，广泛分布在亚洲、非洲和南美等地区。苦瓜中含有大量的蛋白质、维生素、糖类、膳食纤维等多种生物活性成分以及人体所需的全部 8 种必需氨基酸。苦瓜不仅营养丰富，还具有非常高的药用价值，苦瓜的果实、种子、藤叶等在降血糖、抗癌抗病毒以及肠道免疫调节方面均有较好的预防和治疗效果，在中国、印度等国家更是一一直被用于治疗多种疾病，是一种药食两用的蔬菜。苦瓜在我国南北方均被广泛种植，苦瓜籽作为苦瓜的副产物，价格低廉，同样含有大量的活性成分，如蛋白质、多肽、油脂，以及少量的黄酮类化合物等，具有抗肿瘤抗病毒 (Hora et al 2011, Leehuang et al 1995)、降血脂 (Xu et al 2016)、降血压 (Priyanto et al 2015) 等生物活性，尤其是在抗病毒方面功效卓越，但苦瓜籽利用率低，合理开发利用其药用价值具有广阔的发展前景。

核糖体失活蛋白 (Ribosomal inactivating proteins, RIPs) 广泛存在于各种植物中，其中抗人类免疫缺陷病毒蛋白 MAP30 (*Momordica anti-HIV protein of 30 kDa*) 是最早从苦瓜种子和果实提取物中分离得到的一种 I 型 RIPs，分子量约 30 kDa，因其具有抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性，特别是其对 HIV 病毒的抑制效果引起广泛关注。包括癌症在内的许多机体疾病的发生都是从肠道屏障的破坏开始的，外来菌和病原菌在肿瘤发生中的致癌作用、在肿瘤发展中的促进作用已有诸多报道，某些病毒、细菌及寄生虫被确定为肿瘤的高危因素，进入肠道后引发严重的病理后果，MAP30 作为一种天然的免疫抑制剂，对肠道免疫性疾病以及结肠癌等均有良好的改善效果，但作用机制尚不明确。

1.1 苦瓜籽中活性成分的研究现状

1.1.1 苦瓜籽中蛋白、多肽的研究应用

苦瓜籽中含有丰富的蛋白质，含量占 40% 左右。苦瓜籽蛋白是一种天然高分子化合物，研究发现，苦瓜籽粗蛋白在抗氧化，尤其是自由基清除方面具有良好的生物活性。张美萍等 (2013) 研究了苦瓜籽蛋白的还原能力和清除羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的能力，结果表明，苦瓜籽蛋白具有较强的还原能力，且其清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力与同等质量浓度的 Vc 接近。有研究表明，苦瓜籽中的衣色素粗蛋白和纯化蛋白均具有

抗氧化活性，且粗蛋白的抗氧化活性大于纯化蛋白（于群 2017）。另外，苦瓜籽粗蛋白分离得到的不同大小的蛋白组分还被证实具有抑菌活性（郭红莲和张泽生 2005），可作为天然的食品抗氧化剂和抗菌消炎药物成分加以开发。

大多数蛋白质的分子结构复杂，机体对蛋白质的消化和吸收有限，而多肽相比蛋白质，分子量更小，结构也更简单，因而表现出一些蛋白质所没有的生理活性和功能（黄建中 2008）。与苦瓜籽蛋白不同，苦瓜籽多肽的生理活性主要表现在降血糖方面。1981 年，首次从苦瓜籽中分离出降血糖多肽，Khanna（1901）用有机酸和醇提取苦瓜种仁，通过薄层层析从中分离纯化得到具有显著的降血糖活性的多肽，后被命名为降糖多肽-P。随着层析技术的发展，盛清凯（2004，2008）先凝胶柱层析，再通过反相高效液相色谱柱分离得到苦瓜籽降糖多肽-P，并通过建立 II 型糖尿病大鼠模型，发现多肽-P 可降低 II 型糖尿病模型大鼠的血糖血脂等。顾俊峰等（2005）用苦瓜籽多肽饲喂四氧嘧啶诱导的高血糖小鼠，深入研究了苦瓜籽多肽的降糖机理，发现苦瓜籽多肽是通过修复和调整胰脏的分泌功能，使之分泌功能正常的胰岛素，从而有效地降低高血糖小鼠的空腹血糖。后又有学者从苦瓜籽中分离纯化得到一种新的抗真菌多肽，该多肽不仅具有胰蛋白酶抑制活性，并且对瓜果腐霉病菌、棉花枯萎病菌和葡萄灰霉 3 种植物致病菌的生长表现出明显的抑制效果（刘璇等 2008）。

1.1.2 苦瓜籽中黄酮类化合物的研究应用

天然黄酮类化合物主要以苷类形式广泛存在于自然界的植物中，具有抗氧化、抗菌及降血脂等药理活性（李慧华和徐希明 2019）。苦瓜籽中油脂含量较高，为了避免油脂影响黄酮的纯度，一般会在索氏提取法除去苦瓜籽油的基础上，通过传统浸提或超声波辅助法提取得到苦瓜籽黄酮。苦瓜籽黄酮不仅具有和常用抗氧化剂丁基羟基茴香醚（BHA）相当的抗氧化能力（肖付刚等 2014），还具有良好的抑菌性，对大肠杆菌、以及枯草杆菌和金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌都具有明显的抑制作用（魏珂等 2012）。

1.1.3 苦瓜籽中油脂研究现状

油脂是苦瓜籽中含量最高的成分，占苦瓜籽的 40%以上。近年来提出的一些新的提取方法，如水代法、水酶法、超临界流体萃取法等，能快速高效地提取苦瓜籽中的油脂。有研究表明，通过二氧化碳超临界萃取法提取苦瓜籽油可在常温下进行，

减少油脂的劣败和损失,效率高成本低(黄建中 2008)。国内外关于苦瓜籽油生理功能的研究较少,目前已证实苦瓜籽油具有减肥、降血脂、抗癌等功效。徐丽(2015)通过建立肥胖小鼠模型,发现高剂量(10 g/kg)苦瓜籽油的摄入能显著改善由高脂饮食所引起的血清总胆固醇、低密度脂蛋白以及机体脂肪含量的增多。Noguchi 等(2001)发现食用苦瓜籽能明显的减少小鼠身体和肝脏的重量,且饲喂苦瓜籽油的小鼠游离胆固醇明显降低, HDL 胆固醇增加。Yasui(2001)和 Kohno(2005)分别研究了苦瓜籽油对 Caco-2 细胞以及对小鼠 ACF 发生率的影响,发现苦瓜籽油不仅可以诱发 Caco-2 细胞内的癌细胞死亡,还能改变结肠中的脂类组成和提高结肠粘膜中的 PPAR γ 蛋白质的含量,从而降低小鼠 ACF 的发生率。另外,有学者推测苦瓜的抗炎、抗风湿作用也归功于苦瓜籽油(石雪萍 2008)。

苦瓜籽中富含多种不饱和脂肪酸,其中约有 50%的共轭亚麻酸,含量显著高于其他油脂。刘旭庆等(2004)研究发现苦瓜籽的乙醚提取物中富含多不饱和脂肪酸(PUFA),可以抵消胆固醇吸收过多而引起的血脂升高,降低高脂血症金黄地鼠体内的血脂水平,同时具有防治动脉粥样硬化、心衰、心梗等作用。而苦瓜籽油中的单不饱和脂肪酸也具有保护心脏、降血糖、降血脂、降低胆固醇含量等作用。因此,苦瓜籽中的脂肪酸可能是苦瓜籽降血糖、降血脂等生理活性的功能成分之一。

1.2 苦瓜籽中核糖体失活蛋白的研究现状

1.2.1 苦瓜籽中的核糖体失活蛋白

核糖体失活蛋白的发现最早是在十九世纪八十年代,在蓖麻种子中发现并分离得到了苦瓜凝集素,被命名为 ricin。到目前为止,已从 350 多种植物中分离得到了 110 多种 RIPs。根据蛋白的一级结构可以将 RIPs 分为 I 型、II 型和 III 型核糖体失活蛋白, I 型 RIPs 是一种单链的碱性糖蛋白,分子量约 25-32 kDa,等电点在 8-10 之间,一般具有 RNA N-糖苷酶活性。另一类 II 型 RIPs 或由两条多肽链组成,分子量在 60 kDa;或由四条多肽链组成,分子量在 120 kDa 左右。共同点在于都有一条 A 链和一条 B 链, A 链是与 I 型 RIPs 功能相似的毒素链, B 链是可以结合 D 型半乳糖的结合链,二者通过二硫键及氢键连接(王宾香 2004)。相对于 I 型和 II 型, III 型 RIPs 是比较不常见的一类 RIPs,目前仅发现两种,一种是大麦毒蛋白(JIP60),分子量为 16.5 kDa,另一种是来源于玉米的毒蛋白(b-32),分子量为 8.5 kDa。因为 RIPs 的多种生理活性,对苦瓜籽蛋白的研究主要集中在苦瓜籽中 RIPs 的提取纯

化与应用方面。迄今为止，国内外学者已成功从苦瓜籽中分离纯化得到多种核糖体失活蛋白，如苦瓜凝集素（MLC）、 α -苦瓜素（ α -MCC）、 β -苦瓜素（ β -MCC）、MAP30 和 γ -苦瓜素（ γ -MCC）等（曹东亮 2014）。其中 MLC 是一种免疫调节剂，MAP30、 α -MCC 和 β -MCC 均具有抗肿瘤抗病毒等药理活性。

苦瓜素是 Tomita 等（1972）首次从苦瓜的种仁中分离得到，因其具有凝集人红细胞的活性，又被称为苦瓜凝集素（MCL）。目前已分离得到两种 I 型和两种 II 型共四种 MCL，分子量分别为 24 kDa、32 kDa、115 kDa 和 130 kD，均具有凝集人 O 型血红细胞的能力，其中最早被发现的分子量为 130 kDa 的 MLC 还能破坏蛋白质的翻译过程从而抑制蛋白质的合成。目前对苦瓜凝集素的研究较少，Kabir 等（2015）对有艾氏腹水癌细胞（EAC）细胞的小鼠腹腔注射不同浓度的苦瓜素，发现 MCL 可引起 EAC 细胞 G0/G1 期细胞周期阻滞，从而抑制 EAC 的体外生长，且抑制作用呈现浓度依赖性。

α -MMC 和 β -MMC 是同一时间被 Chan 等（1984）纯化发现的 I 型 RIPs，分子量分别为 30 kDa 和 29 kDa，且都是中性糖蛋白，抑制兔网织红细胞蛋白质合成的能力高。 α 苦瓜素和 β 均无凝集素活性，且具有相似的药理活性，如抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性，但产生机制不同。其中 α -MMC 是通过专一修饰真核细胞核糖体大亚基 rRNA，抑制蛋白质的生物合成实现其抗肿瘤功能的（王庆华和于长春 1995）。 γ -苦瓜素是 Pu 等（1996）从苦瓜籽中分离得到的一种分子量为 11.5 kDa 的 I 型核糖体失活蛋白， γ -MMC 不像 α -MMC 和 β -MMC 那样含有微量的中性糖，抑制兔网织红细胞蛋白质合成的能力也较 α -MMC 和 β -MMC 弱。

Leehuang 等（1990）第一次从苦瓜果实和种仁中分离得到一种碱性苦瓜籽核糖体失活蛋白，因分子量约为 30 kDa 得名 MAP30。MAP30 不仅同 MLC 一样具有 RNA N-糖苷酶活性，且 MAP30 可以作用于病毒繁殖的复制期，切割质粒和 HIV 的 DNA，因而具有抑制病毒整合、抗肿瘤和抗微生物等作用，尤其是对 HIV 病毒有显著的抑制作用。MAP30 可以显著抑制 HIV-1 型病毒感染宿主和在宿主体内复制（王宾香 2004），且作为一种蛋白质，MAP30 对正常细胞无毒性作用，被认为是治疗 HIV-1 型病毒感染的理想物质，因此又被称为免疫缺陷病毒型苦瓜抑制剂。近年来，MAP30 的抗肿瘤特性也引起研究者的广泛关注，目前已被证实对人肝癌细胞、小鼠黑色素瘤细胞、人胃癌细胞以及恶性胶质瘤细胞等多种肿瘤细胞具有较强的抑制作用，作为抗肿瘤药物具有广阔的开发前景。

1.2.2 苦瓜籽 MAP30 的提取纯化方法

随着 RIPs 诸多生理活性的发现,大量研究者试图通过多种方式来提取纯化得到苦瓜籽核糖体失活蛋白,进而研究其抗病毒抗肿瘤活性。对于 MAP30 的提取纯化方法,目前主要有传统盐提分离与异源表达两种。

传统提取方法主要是通过盐析提取,配合凝胶层析法达到分离目的。最早是 Leehuang (1990) 等用 NaCl 提取盐溶性蛋白,通过硫酸铵沉淀分级、醋酸钠透析,最后利用 CM-琼脂糖 CL-6B 和葡聚糖凝胶 G75 色谱法再次分离得到纯度较高的 MAP30。随着技术的发展,蛋白的提取纯化工艺也取得了较大的进步。郎海滨(2002) 和 Fang 等(2012) 分别通过假配基亲和层析结合凝胶层析法和 Blue-葡聚糖凝胶层析结合 SP-葡聚糖凝胶层析法获得纯化的 MAP30,这两种方法都对 Huang 等的方法基础上进行改进,提高了 MAP30 的得率和纯度。Meng (2012) 等研究了得到一种新的提取工艺,将分级透析得到的蛋白液依次通过 SP-Sepharose FF 层析柱、Sephacryl S-100 层析柱以及 Macro-Cap-SP 层析柱,同时纯化得到 α -MMC 和 MAP30 两种主要的核糖体失活蛋白,提取效率大大提高。

由于传统纯化方法步骤繁多,且提取纯度不高,国内外研究者尝试将 MAP30 进行异源表达,宿主主要选择酵母或大肠杆菌。目前已成功将 MAP30-pPIC9 载体和 pGAP α -MAP30 重组质粒转化到巴斯德毕赤酵母 GS115 中,在毕赤酵母中成功表达并获得高纯度 MAP30 (王丽媛 2010, Wang et al 2014)。关于 MAP30 在大肠杆菌中表达的研究更多,因为大肠杆菌生长速度快,且其克隆、表达系统更为成熟。常见的克隆方式是将 MAP30 的基因克隆到原核表达载体 pET-28a 或 pET-30a 中,进而转化至大肠杆菌中进行表达(杨洲平等 2007, 张黎黎等 2010),然后将构建好的菌株用一定浓度的 IPTG 进行诱导表达后纯化得到 MAP30。

1.2.3 苦瓜籽 MAP30 的结构与酶学性质

1.2.3.1 苦瓜籽 MAP30 的结构

MAP30 属单链 RIPs 家族,是由一条多肽链组成的,基因全长 861bp,共编码 286 个氨基酸,MAP30 蛋白序列包含 N 端信号肽、低复杂度区域和 RIP 样活性区域 3 个区域,并含有特定的色氨酸 190 和蛋氨酸 254 残基,序列上分布着 N-糖基化位点、N-豆蔻酰化位点、Shiga /ricin 蛋白活性位点和多段蛋白激酶磷酸化位点(周小东等 2011)。MAP30 相对分子量为 30 kDa,分子式为 $C_{1468}H_{2306}N_{372}O_{423}S_4$,包含 24 个

天冬氨酸+谷氨酸组成的负电荷残基和 29 个精氨酸+赖氨酸的正电荷残基，电荷性质稳定（Leehuang et al 1995）。

MAP30 的二级结构包括 14 个 α -螺旋区、11 个 β -折叠区、23 个无规则卷曲和 20 个延伸链区，分别占比 31.47%、8.04%、27.62%和 32.87%，其中 α -螺旋集中在 C 端， β -折叠集中在 N 端，预示着 MAP30 拥有复杂的高级结构（蔡东梅 2017）。1-105 位残基的 N 末端结构域是由 6 条 β 链构成的混合 β 折叠层，其中 51-53 位有 N 连接的糖基化位点，108-180 位中心结构域是高度螺旋化 α -螺旋区，181-263 位残基的 C 端结构域包含一个长转折的螺旋和一个反平行 β 折叠，240-263 位残基的 C 末端具有高度柔性（Wang et al 2010）。

1.2.3.2 苦瓜籽 MAP30 的酶学性质

MAP30 的主要酶学性质包括 RNA N-糖苷酶活性、DNA 拓扑失活活性和抑制整合酶活性等。MAP30 的 RNA N-糖苷酶活性体现在它可以专一地作用于真核生物核糖体的 28S rRNA 和原核生物核糖体的 23S rRNA 的保守区域“S/R 结构域”，水解该结构第 4324 位点上的腺嘌呤 N-C 糖苷键释放一个腺嘌呤，引起 28S rRNA 的构象发生改变而丧失结合延长因子的能力，阻碍肽链合成进而抑制蛋白质的生物合成（Wang and Neamate 1999, Damme et al 2001）。除了 N-糖苷酶活性外，MAP30 还具有大部分 RIPs 不具备的 DNA 拓扑失活活性。MAP30 除了作用于 rRNA 外，还能作用于病毒、质粒的 DNA 及 mRNA，使超螺旋的病毒和质粒 DNA 发生不可逆的解螺旋，改变病毒 DNA 拓扑学结构，由超螺旋 DNA 变成线状或开环 DNA，进而影响其功能（吕强 2015）。病毒 DNA 处于拓扑学活性状态下才能完成从整合到转录的整个过程，而 MAP30 可以使其的拓扑结构失去活性，阻碍病毒 DNA 的整合和转录，进而阻止其进入宿主基因组（Wang et al 2013），因此，MAP30 对病毒 DNA 的这种拓扑失活功能尤其重要。MAP30 蛋白还具有直接和间接抑制 HIV-1 整合酶的活性，一方面是通过抑制 DNA 3'末端加工、链转移和去整合 3 个方面的活性直接发挥抑制整合酶活性，另一方面，MAP30 蛋白可以封闭 HIV-1 特异性 DNA 的高度保守序列的活性区域，使之无法成为整合酶发生反应，间接导致整合酶失活（Wang and Neamate 1999）。研究者认为 MAP30 蛋白抗病毒的作用机制与这三种主要酶学特性，特别是 DNA 拓扑失活和抑制整合酶活性密切相关。

1.2.4 苦瓜籽 MAP30 的生理功能

1.2.4.1 MAP30 的抗病毒功能

早在 Leehuang 等 (1990) 第一次分离得到 MAP30 蛋白就对其抗 HIV 活性进行了研究, 发现 MAP30 蛋白不但可以抑制 HIV 的整个感染过程, 而且可以抑制病毒颗粒释放和通过抑制病毒的复制与表达阻断病毒 DNA 在细胞间的传播。Leehuang 等 (1994) 和 Wang 等 (2000) 后续对 MAP30 的抗病毒活性进行了系统的研究, 发现 MAP30 可以抑制急、慢性感染的 T 淋巴细胞以及单核或巨噬细胞内的 HIV 复制, 对 HIV 检测指标 p24 的抗原表达的半数抑制浓度 EC_{50} 值为 0.2-0.3 nM, 但对无病毒感染的正常细胞未显示任何毒副作用, 是一种高效、安全的 HIV 抑制蛋白。

MAP30 以病毒本身以及病毒感染细胞作为攻击靶点, 决定了其抗病毒活性的广谱性。除了抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 外, 对单纯疱疹病毒 (HSV)、人类疱疹病毒 8 (HHV8) 和乙肝病毒 (HBV) 等均有明显的抑制作用。王临旭 (2002) 研究了 MAP30 对 HSV 和 HBV 的体外抑制作用, 试验结果表明, MAP30 可减轻 HSV 致细胞病变效应, 且其半数抑制浓度 IC_{50} 值明显低于已知抗 HSV 的药物无环鸟苷 (acyclic guanosine, ACV); MAP30 还具有明显抗 HBV 的活性, 其 IC_{50} 值为 0.5-0.8 μ M, 抗 HBV 活性略高于已知抗 HBV 药物 TFN- α 。Nicolas (1997) 研究发现, MAP30 对无环鸟苷耐药病毒也具有明显的抑制作用, 其作用活性为 ACV 的 100-1000 倍。MAP30 蛋白也能抑制原发性渗出性淋巴瘤 (PEL) 细胞 BC-2 的增殖, 从而阻止这些细胞感染 HHV8, Northern 印迹和 qPCR 分析表明, MAP30 能够抑制白细胞介素 6 (vIL-6)、细胞周期蛋白 D (vCD) 以及人类疱疹病毒第八型抗凋亡蛋白 (v-FLIP) 等病毒基因的表达 (Sun et al 2001), 但具体的抗 HBV 机制尚未明确。

1.2.4.2 MAP30 的抗肿瘤功能

近年来, 除了抗病毒活性以外, MAP30 的抗肿瘤活性也称为研究热点。1993 年 MAP30 被列入 NCI 抗癌药物筛选计划, 经研究发现, MAP30 对乳腺癌、胃癌、肝癌、黑色素瘤、骨髓瘤、人恶性胶质瘤等均具有显著抑制作用, 具有全面的抗肿瘤活性。

早期 Leehuang 等 (1990) 采用 MAP30 处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 发现细胞抗原 HER2 的表达受到显著影响, 细胞增殖受到明显的抑制, 证实 MAP30 在体内外都有抗人乳腺肿瘤的效果。李春阳等 (2001) 和韩晓红 (2011) 分别研究了 MAP30

对人胃癌细胞 SGC7901 和 BGC823 的影响, 研究发现, MAP30 蛋白在体内外对 SGC7901 细胞和 BGC823 细胞均有明显的增殖抑制作用。SGC7901 细胞经 MAP30 处理后呈现典型的凋亡形态, 且 DNA 含量也发生改变; MAP30 蛋白对 BGC823 的 IC_{50} 值为 51.67 $\mu\text{g/mL}$, 且抑制作用呈剂量-效应依赖关系。Fang (2012) 采用人肝癌 HepG2 细胞和 HepG2 型小鼠在体外和体内模型中对 MAP30 的有效性和安全性进行了评估, 认为 MAP30 可以作为一种新型的、相对安全的预防和治疗肝癌的药物。2013 年, 何义国等 (2013) 研究发现 MAP30 蛋白对小鼠黑色素瘤细胞 B16、人表皮癌细胞 A431 和人宫颈癌细胞 Hela 这三种细胞均表现出抑制作用, 且这种作用在一定范围内呈时效和量效依耐性。

目前已经明确的 MAP30 的抗肿瘤机制主要为以下几点: (1) 导致核糖体失活。MAP30 作为核糖体失活蛋白, 通过发挥其 N-糖苷酶活性和 DNA 拓扑失活活性, 能导致核糖体失活, 抑制肿瘤细胞蛋白合成, 或致使 DNA 拓扑结构失活, 影响肿瘤 DNA 的复制与转录, 从而抑制肿瘤生长。(2) 诱导细胞凋亡 (Fan 2008, 熊术道等 2006, Fang 2012)。大量研究表明, MAP30 能够上调或下调 Bcl-2 家族、caspase 家族以及其他细胞凋亡相关基因和蛋白的表达, 诱导肿瘤细胞发生凋亡。(3) 抑制肿瘤细胞增殖相关的蛋白和基因表达 (刘子记 2019)。MAP30 可有效下调一些在肿瘤细胞增殖相关的基因, 抑制基质金属蛋白酶活性调节白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、核转录因子 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 等炎症因子的表达 (Sun 2001), 或上调可致黏附分子 CD54 的表达, 改变细胞的黏附性, 从而抑制肿瘤细胞的生长、转移和侵袭, 导致肿瘤细胞凋亡等 (熊术道等 2005)。目前的研究已初步阐明了 MAP30 蛋白的抗肿瘤机制, 更详尽的细胞及分子机制还有待深入研究。

1.2.4.3 MAP30 的其它功能 (抗微生物)

研究表明, MAP30 蛋白还具有广泛的抗菌活性, 对革兰氏阴性菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、真菌烟曲霉菌 (*Aspergillus flimigatus*) 和酵母菌白色念珠菌 (*Candida albicans*) 等均有较强的抑制作用 (Arazi 2002)。在近几十年, 由于抗生素的滥用, 细菌对抗生素的耐药性越来越强, MAP30 作为一种蛋白, 不仅可以有效控制细菌感染, 还不会增加细菌的抗药性, 是性质非常优良的抗生素替代蛋白。值得一提的是 MAP30 在抗白色念珠菌上效果非常突出, 白色念珠菌极易在艾滋病人和免疫缺陷病人体内感染, 且往往容易引起严重感染并发症, 死亡率极高。综合考虑 MAP30 蛋白的抗 HIV 病

毒的活性以及 HIV 病人极易感染白色念珠菌的事实, MAP30 有可能作为一种强效的抗菌抗病毒药物, 用于 HIV 的综合治疗 (Moghadam 2014)。

1.3 肠道屏障紧密连接研究现状

1.3.1 肠道屏障研究现状

肠道作为机体表面积最大的免疫器官, 不仅是机体食物消化和营养物质吸收的主要场所, 也是抵御外界病原、毒素、细菌以及食物抗原的重要屏障, 肠道的屏障功能对维持组织稳态至关重要, 破坏甚至轻微扰动上皮屏障可导致严重的病理后果。肠道屏障是由机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障组成的, 分别由肠上皮细胞和紧密连接的完整、黏液的正常分泌、微生物菌群的稳定和免疫反应的平衡来实现和维持 (Reynolds 1996)。

机械屏障是肠道的第一道物理屏障, 主要由肠黏膜表面黏液层、肠道上皮细胞膜和细胞之间的紧密连接蛋白组成 (邵玉新 2017)。肠道上皮细胞主要包括肠上皮细胞 (Epithelial cells)、杯状细胞 (Goblet cells)、潘氏细胞 (Paneth cells) 和肠内分泌细胞 (Enteroendocrine cells), 共同发挥选择性屏障功能, 包括跨细胞途径 (Transcellular pathway) 和细胞旁路途径 (Paracellular pathway), 只允许肠腔内必需的营养素、水和离子等跨细胞转运进入血液循环, 阻止非必需和有害的物质进入机体内环境, 以此维持细胞内的稳态 (王斌 2018)。细胞旁路途径是维持肠道屏障的主要途径, 主要通过紧密连接 (TJs)、黏附连接 (AJs)、间隙连接 (GJs) 和细胞桥粒 (Desmosome) 等细胞间连接进行调控 (Ma et al 2013), 其中 TJ 是维持肠道屏障的最直接限制因素, 一旦紧密连接发生损伤, 屏障的完整性被破坏, 通透性增强, 毒素物质进入屏障, 导致 TJ 蛋白的表达和分布发生改变, 进而引发一系列炎症性肠病。

肠道化学屏障功能主要是由胃肠道粘膜上皮的黏液层实现的, 黏液层通过细胞分泌黏液和细胞表面的多糖包被形成化学屏障, 将上皮细胞和宿主组织与共生菌群有效分隔, 防止肠道受到肠内微生物的感染 (McGuckin 2011), 同时调控免疫相关信号的转导。黏液层由上皮细胞表面的内外层无菌黏液层、免疫球蛋白、细胞分泌到黏液层的非特异性分子和一些无机成分组成 (王斌 2018), 主要有效成分是黏蛋白 (Mucin)。黏蛋白根据结构和功能的不同被分为分泌型黏蛋白和膜结合型黏蛋白, 前者主要用于形成黏液层, 后者与肠上皮细胞膜结合, 参与肠道细胞生长、免疫相

关信号分子的信号转导等，代表蛋白为 Mucin1 (Mcauley 2007)。黏蛋白主要由杯状细胞分泌，肠上皮细胞也能分泌少量膜结合型黏蛋白。

人体的胃肠道中微生物种类多达 1000 多种，微生物群通过内部以及与宿主的外部通讯和反馈维持动态平衡，参与免疫系统的调控，影响宿主的生理机能。肠道的微生物屏障是通过多种复杂的机制形成的 (Tlaskalova et al 2011, Donaldson et al 2016, Chu et al 2016)，主要有：（1）微生物群作为黏膜表面保护机制的一部分，在处于稳态平衡时，可有效防肠止上皮黏膜表面致病菌或有害微生物的附着、增殖和入侵。

（2）有益的微生物群组成会加速肠上皮细胞的分化和成熟，加速糖蛋白中糖链合成，从而促进上皮屏障的形成和维持。（3）微生物定植可以通过促进肠上皮细胞、T 细胞、突触细胞以及吞噬细胞的发育和成熟，间接促进肠道免疫系统的形成与稳定。近年来，越来越多的研究发现微生物群稳态和宿主免疫系统的破坏可能会导致肠道炎症的出现。

肠道作为哺乳动物最大的免疫器官，包含的免疫细胞为集机体的 70% 左右，肠道免疫系统通过与体液免疫和细胞免疫的协同作用，防止有害病原物质侵入黏膜组织，同时传导信号促进淋巴细胞分泌免疫球蛋白，免疫清除肠内的抗原物质，维持肠道黏膜屏障的健康和稳定。和其他免疫系统类似，肠道免疫系统也是由组织样淋巴组织以及分布在肠壁上的淋巴细胞组成，肠道淋巴细胞是免疫反应的效应部位，由分布在肠道上皮的上皮内淋巴细胞 (IEL) 和分布在结缔组织固有层中的淋巴细胞 (PL) 组成 (Castro et al 2013)。

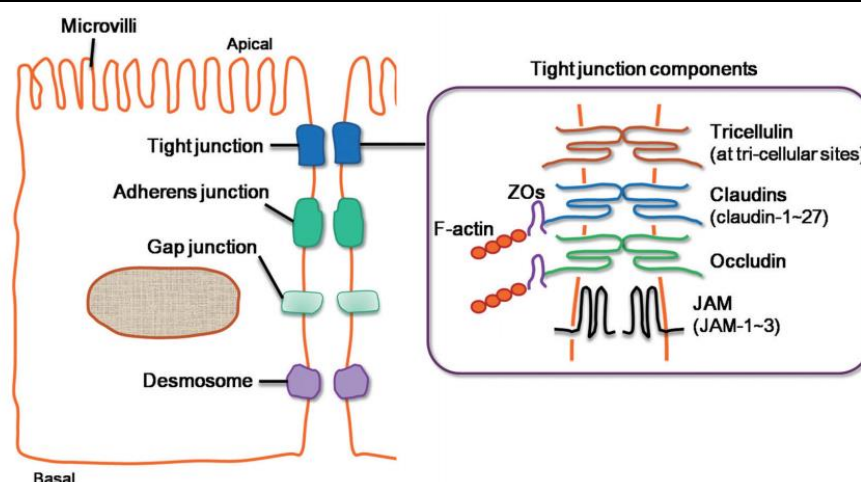
1.3.2 紧密连接蛋白研究现状

上皮屏障由两种类型的周向连接构成：小带黏着 (Zonula adhaerens, ZA) 和紧密连接 (Citi 2018)。在细胞水平上，屏障受 TJ 调控，TJ 不仅调控着上皮细胞的通透性，还是细胞内和细胞与外环境之间信息传递的信号中心，调节着细胞的生长、表型与极性等 (Steed et al 2010)。TJ 处于上皮细胞最顶端，由 50 多种功能蛋白和结构蛋白组成，其中以闭合蛋白 Claudins、闭锁蛋白 Occludin 和 JAM 为主要跨膜蛋白 (Shigetomi et al 2018)。闭锁小带 Zonula occludens (ZO)，一个通过与不同的 TJ 蛋白相互作用调节屏障功能和细胞增殖的蛋白家族，其中 ZO-1 在紧密连接中起着至关重要的作用 (Garcia et al 2018)。

从 1998 年 Furuse 等首先克隆出人类 Claudin-1 和 Claudin-2 基因,迄今已有 27 个 Claudin 家族成员相继被发现,分子量约在 20-27 kDa。Claudin 蛋白家族作为结构性 TJ 蛋白,不仅对 TJ 结构起着支柱的作用(Sadi et al 2011),在细胞间形成“孔道”只允许离子和小分子物质通过,阻隔大分子和有害物质(从馨等 2016),在胞内外信号转导中也发挥着重要作用(庾庆华 2009)。在人类小肠中表达的 Claudins 有 Claudin 1-5,7,8,12 和 15 (Lameris et al 2013, Lu et al 2013),在表皮表达的有 Claudin 1,4,7 (Kirschner and Brandner 2012)。Claudins 的表达水平与跨上皮细胞电阻(Transepithelial resistance, TEER)的变化和 TJ 的屏障功能紧密相关,是非常重要的一类紧密连接蛋白。

Occludin 是第一个被发现的 TJ 跨膜蛋白,分子量约为 65 kDa,广泛表达于所有上皮和内皮细胞中,在相邻细胞的紧密度和 TJ 的屏障功能中发挥着重要的作用。Occludin 也具有四次跨膜结构,相邻细胞间 Occludin 的胞外环相互结合,同时也和 Claudin-1、Claudin-2 及其他外周膜蛋白结合(Melvin 2001),从而封闭旁细胞途径,维持和调节 TJ 的屏障功能。Occludin 可能不是构成 TJ 所必需的结构蛋白,但有研究表明 Occludin 蛋白可增强成纤维细胞间的黏附性,增加 TEER(VanItallie 1997),调节细胞间的通透性(Sadi et al 2011)等, Occludin 仍然是 TJ 发挥屏障功能的重要分子。

ZOs 是外周膜蛋白,包括 ZO-1, ZO-2 和 ZO-3 这 3 个异构体,分子量分别为 220 kDa、160 kDa 和 130 kDa。ZOs 包含自作用结构域(PDZ2),以及分别能与 Claudins, Occludin 相互作用的 PDZ1 和 U5pGUK 多功能结构域(Fanning et al 2007)。这些相互作用对生命至关重要,ZO-1 或 ZO-2 缺乏都会导致胚胎死亡(Katsuno et al 2008, Xu et al 2008)。目前,ZOs 家族中以 ZO-1 的研究最多,研究表明,在多种上皮细胞如 Caco-2 中,减少 ZO-1 均可引起 TEER 值降低、旁细胞示踪分子透过率增加等,进而造成 TJ 功能的损伤(VanItallie et al 2009),故 ZO-1 被用作判定各种上皮组织 TJ 屏障功能的标志性分子。ZOs 除了对 TJ 结构有贡献,在调节细胞的增殖与分化、上皮间质转化引起的肿瘤细胞转移等重要过程。



细胞间连接复合物及 TJ 构成示意图（从馨 2016）

1.3.3 紧密连接相关信号通路

紧密连接蛋白的调控机制是复杂而模糊的，由多种信号蛋白和信号分子调控。肿瘤坏死因子- α (TNF α)、interferon- γ (IFN- γ) 以及白细胞介素是众所周知调节紧密连接完整性的信号因子。目前大量研究已证实肌球蛋白轻链激酶 MLCK、核转录因子 NF κ B、Toll 样受体家族 (TLRs)、蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC)、Rho/Rho 激酶 (ROCK) 和丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 等信号因子也与 TJ 蛋白的表达密切相关 (Gonzalez et al 2008)。另外，几个参与信号转导过程的分子，包括 GTP 结合蛋白和酪氨酸激酶，如 C-src、C-yes 和蛋白激酶 C (PKC)，已被发现定位于紧密连接，可能表明了它们在维持紧密连接完整性方面的关键作用 (Itoh et al 2012)。

目前研究较多的是 MLCK/pMLC 信号通路和 MAPK 信号通路。MLCK 属于 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖蛋白激酶家族，是最主要的调节肠黏膜通透性的钙调蛋白激酶。激活的 MLCK 使肌球蛋白轻链 (MLC) 的 Thr18 及 Ser19 作用位点磷酸化 (Hong et al 2009)，在改变 MLC 的空间构象的同时引起细胞骨架重塑，紧密连接结构被破坏，增加上皮细胞的通透性，使肠道屏障功能受损 (陈婷 2016)。Ye 等 (2017) 研究发现 MLCK 的活化是由 TNF- α 通过 NF κ B p50/p65 结合和激活 MLCK 转录启动子实现的，活化的 MLCK 介导 MLC 转录、表达和活性逐步增加，最终导致肠上皮 TJ 通透性增加，TJ 屏障功能受损。MAPK 对 TJ 屏障的影响与 MLCK 通路正好相反，作为细胞内最重要的信号通路之一，丝裂原活化的蛋白激酶可被多种生长因子激活，通过调控基因表达促进肠上皮细胞的增殖，增强肠道屏障功能 (颜军 2011)。ERK1/2-MAPK

信号转导通路被认为是最经典的通路, 一些生长因子如 TGF- β 、EGF、HGF 等可活化 ERK1/2, 激活 MAPK 调控 TJ 蛋白尤其是 Occludin 的基因表达及磷酸化程度, 调节肠上皮细胞的细胞旁通路转运进而增强 TJ 的屏障功能 (吴国琳等 2015)。

1.4 本研究的内容、意义及创新性

1.4.1 研究内容

(1) 分析脱壳苦瓜籽的主要成分, 全面评价苦瓜籽作为食品的营养性和医药材料的安全性; 通过盐提、硫酸铵分级和凝胶柱层析分离纯化得到苦瓜籽核糖体失活蛋白 MAP30, 分析其氨基酸组成, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳测定其分子量, Nano LC-MS/MS 鉴定其结构; 并对纯化得到的 MAP30 进行抗肿瘤活性评价, 验证其对人肝癌 HepG2, 人胃癌 SGC7901, 小鼠黑色素瘤 B16 三种细胞的增殖抑制效果。

(2) 成功建立 Caco-2 细胞单层模型, 并用脂多糖 (LPS) 损伤模型以模拟肠道紧密连接损伤, 通过测定细胞单层的跨膜电阻 (TEER)、荧光黄通量 (LY-Flux) 评价 MAP30 对肠道屏障完整性和通透性的影响, 并通过测定 Claudin-1, Occludin, ZO-1 等肠道紧密连接蛋白、基因以及 NF- κ B-MLCK 和 ERK1/2-MAP 信号通路表达量的变化, 完成苦瓜籽蛋白 MAP30 对肠道紧密连接的改善作用及机制初探。

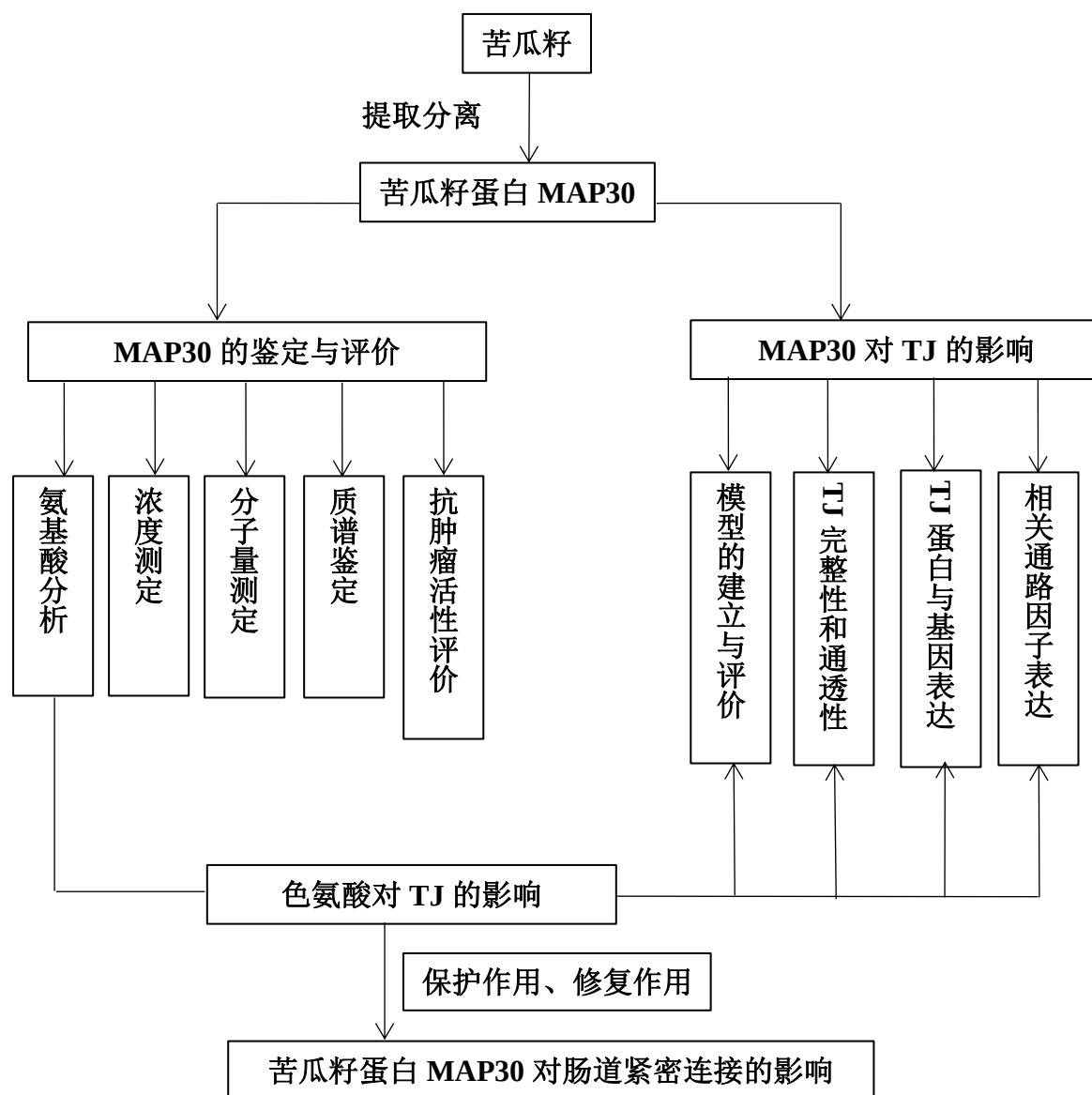
(3) 根据 MAP30 的氨基酸分析结果, 结合文献选择 MAP30 中含量最高的必需氨基酸色氨酸作用于紧密连接损伤模型, 从保护和修复两方面研究色氨酸对肠道紧密连接完整性和通透性、主要 TJ 蛋白和基因以及信号通路的影响, 探究色氨酸在 MAP30 对肠道紧密连接的调控中的贡献。

1.4.2 研究意义及创新性

苦瓜具有优良的食用和药用价值, 在全国范围被广泛种植, 传统的直接食用和初步加工并不能使苦瓜的价值被充分利用, 苦瓜籽则大部分被丢弃。大量研究表明苦瓜籽中含有多种活性成分, 如蛋白、多肽等, 特别是苦瓜籽中特有的核糖体失活蛋白 MAP30, 因其良好的抗病毒抗肿瘤等功效受到广泛关注, 具有非常高的开发价值。近些年研究发现, 病毒的入侵和肿瘤的发生往往伴随着肠道屏障的损伤, 肠道屏障作为机体阻隔多种病原体和有害微生物的第一道物理屏障, 对维持肠道组织稳态至关重要。一旦肠道屏障被损伤, 病原体和有害微生物进入肠道, 引发一系列严重的病理后果。MAP30 作为一种能有效抑制肿瘤和病毒的天然植物蛋白, 大多研究集中在抗肿瘤抗病毒功效评价方面, 但对机体肠道屏障损伤方面的影响尚未见报道。

本文尝试通过建立 Caco-2 单层细胞模型,并通过 LPS 损伤模拟肠道屏障紧密连接损伤,将提取纯化得到的苦瓜籽核糖体失活蛋白 MAP30 作用于该损伤模型,从紧密连接的角度探究 MAP30 对肠道屏障损伤的保护作用并初步探究其作用机制。本研究结果可以为 MAP30 的高值化开发利用提供理论基础。

1.4.3 技术路线图



第二章 苦瓜籽蛋白 MAP30 的提取纯化与性质表征

作为一种药食两用的材料，苦瓜中含有丰富的蛋白质和其他活性物质。且随着对苦瓜研究的逐步深入，苦瓜中不断有新的物质被发现，目前从苦瓜中分离出的活性物质已有近百种，其中较早从苦瓜籽中被发现的核糖体失活蛋白更是有着非常突出的抗病毒、抗肿瘤功效。MAP30 是存在于苦瓜籽中的一种典型的 I 型核糖体失活蛋白，不仅具有十分突出的抗病毒活性，对消化道肿瘤如肝癌、胃肠癌，神经中枢系统肿瘤、黑色素瘤等多种人类肿瘤细胞系等均有不同程度的抑制作用。

苦瓜在我国被广泛种植，但苦瓜籽往往作为“废料”被遗弃，造成资源浪费和环境污染。大量文献报道，通过盐提、离子交换层析等纯化策略，可从苦瓜籽中提取纯化得到较高纯度的 MAP30，在抗病毒和抗肿瘤方面体现出极高的利用价值。本实验对苦瓜籽中的蛋白、氨基酸、脂肪酸等活性成分进行测定和分析，较为全面地评价苦瓜籽的营养价值和安全性，同时进一步纯化得到核糖体失活蛋白 MAP30，进行鉴定并验证其抗肿瘤功效，为苦瓜籽的开发和高值化利用提供理论基础。

2.1 实验材料

2.1.1 实验原料

干燥苦瓜籽采购于安徽亳州药材批发市场，去壳粉碎后过 60 目筛，预烘脱脂后石油醚浸泡一周，低温风干，常温保存备用。

2.1.2 主要试剂

层析介质 DEAE-Sepharose CL 6B	上海源叶公司
层析介质 Sephadex G75	上海源叶公司
普通透析袋 (8000-14000)	上海源叶公司
1M Tris-HCl (pH 7.6)	美国 biosharp 公司
南美胎牛血清	美国 Gibco 公司
DMEM 高糖培养基	美国 Hyclone 公司
PBS	美国 Hyclone 公司
MTT	索莱宝
DMSO (冻存级)	美国 Sigma 公司
0.25% 胰蛋白酶	美国 Hyclone 公司

盐酸、冰乙酸、硫酸铜、硼酸、氢氧化钠、硫酸、氯化钠、乙醇、硫酸铵、醋酸钠、过硫酸铵、异丙醇、石油醚、考马斯亮蓝、磷酸、茚三酮、碳酸氢钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾、氯化钙等均为国产分析纯。

2.1.3 主要仪器

HC-280T2 高速多功能粉碎机	永康市红太阳机电有限公司
DHG-9070A 电热鼓风干燥箱	上海索普仪器有限公司
K9840 自动凯氏定氮仪	海能仪器股份有限公司
RE-52AA 旋转蒸发器	上海亚荣生化仪器厂
Beta2-8LD 冷冻干燥机	德国 Christ 公司
AL204 型电子天平	梅特勒-托利多（上海）仪器有限公司
UV-1750 紫外可见分光光度计	日本岛津公司
全波长读数仪 MULTISKAN GO	德国 Thermo scientific 公司
L-8800 全自动氨基酸分析仪	日本日立公司
DYCZ-24DN 双垂直电泳仪	北京六一仪器厂
超净工作台	苏州净化设备厂
凝胶成像仪 SYSTEM GelDoc XR+	德国 Bio-Rad 公司
Bio-Rad 低压液相层析仪	美国 Bio-Rad 公司
冷冻离心机 5804R	德国 eppendorf 公司
二氧化碳培养箱	美国赛默飞世尔科技公司
普通光学显微镜	日本 OLYPUS 公司
电感耦合等离子体质谱仪 ICP-MS	美国赛默飞世尔科技公司
全自动水解脂肪测定仪	济南阿尔瓦仪器有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 苦瓜籽的主要成分分析

2.2.1.1 苦瓜籽粉前处理

粉碎：苦瓜籽脱壳，置于高速粉碎机中粉碎 10 s-20 s，收集未被完全粉碎的样品，反复粉碎 3-4 次，以完全粉碎。

过筛：粉碎后的苦瓜籽样品过 60 目筛，以除去颗粒较大以及未完全粉碎的苦瓜籽。过筛后的残渣再次粉碎，重复上述操作 3-4 次。

脱脂：称取适量的苦瓜籽粉末于棕色广口瓶中，用石油醚浸泡脱脂，100 g 苦瓜籽粉加入 300 mL 石油醚，密封避光处存放一周。浸泡过程中反复多次摇晃，使样品充分脱脂，石油醚回收。

烘干：脱脂后的样品在通风橱风干 30 min 左右，同时可以将石油醚挥发，再于烘箱中 40 °C 烘干 4 h，烘干后的样品密封避光保存备用。

2.2.1.2 基本成分测定

水分含量：采用 GB 5009.3-2010 法（直接干燥法）测定样品中的水分含量。

脂肪含量：采用 GB 5009.6-2003 法（索氏提取法）测定样品中的脂肪含量。

蛋白质含量：采用 GB 5009.5-2010 法（凯氏定氮法）测定样品中的蛋白质含量。

灰分含量：采用 GB 5009.4-2016 法测定样品中的灰分含量。

还原糖含量：采用 GB 5009.7-2016 法（直接滴定法）测定样品中的还原糖含量。

2.2.1.3 苦瓜籽蛋白组分含量测定

参照薛照辉（2015）的方法稍作改动：

水溶性蛋白：精确称取 5.0 g 脱脂后的苦瓜籽粉，按料液比 1:15 确定加水量，浸提温度为 40 °C，恒温搅拌提取 1 h，4 °C，4000 r/min 离心 20 min，将得到的上清液倒进洁净的烧杯中，按相同方法重复提取 3 次，合并上清液，用 0.5 mol/L HCl 调 pH 至 4.0（即等电点附近），静置 1 h 待蛋白质充分下沉，4 °C，4000 r/min 离心 20 min。收集沉淀冷冻干燥，即为水溶性蛋白；

盐溶性蛋白：收集上述提取水溶性蛋白后的剩余残渣，按料液比 1:15（g/mL）加入 0.12 mol/L NaCl 溶液进行提取，其他操作过程同上，即为盐溶性蛋白；

醇溶性蛋白：收集上述提取盐溶性蛋白后的剩余残渣，按料液比 1:15（g/mL）加入 70 %乙醇溶液进行浸提，收集 3 次提取后的上清液后用旋蒸仪对上清液进行蒸发浓缩，温度设为 40 °C，浓缩 2 h，然后对浓缩后的溶液进行等电点酸沉，其他操作过程均同上，即为醇溶性蛋白；

碱溶性蛋白：收集上述提取醇溶性蛋白后的剩余残渣，按料液比 1:15（g/mL）加入浓度 0.075 mol/L NaOH 溶液恒温浸提，操作步骤同上述水溶性蛋白的提取过程，即为碱溶性蛋白。

将四种蛋白冻干样品取出，称重，按式（1）计算苦瓜籽蛋白各组分含量。

$$\text{蛋白组分含量 (\%)} = \frac{\text{各组分蛋白质量 (mg)}}{\text{提取蛋白总质量 (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.1.4 苦瓜籽各组分蛋白氨基酸组成分析

准确称取各组分蛋白各 20 mg 分别于 1 mL 6 mol/L 盐酸溶液中, 110 °C 下密封水解 22 h-24 h。水解后过滤, 取 0.1 mL 于 1 mL 样品稀释液中, 上样量为 20 μ L, 用氨基酸自动分析仪进行测定。

2.2.1.5 苦瓜籽脂肪酸组成测定

采用 GB 5009.168-2016 法（内标法）测定样品中的脂肪酸组成。

2.2.1.6 苦瓜籽中常见金属元素含量测定

采用 SN/T0448-2011 法（ICP-MS 法）测定样品中常见金属元素含量。

2.2.2 苦瓜籽 MAP30 的提取纯化

2.2.2.1 主要溶液与缓冲液

蛋白提取用液: 0.15 M NaCl

层析用缓冲液: 5 mM NaAc (pH 5.8)

1 M NaAc (pH 3.0)

0.2 M NaOH

0.2 M HCl

1 M Tris-HCl (pH 7.6)

饱和硫酸铵

蛋白电泳用液: 蛋白电泳缓冲液 (pH 8.3)

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

30% (29:1) 丙烯酰胺

10%过硫酸铵 (SDS)

染色液: 1%考马斯亮蓝 R250 5%甲醇 10%冰醋酸

高甲醇脱色液: 50%甲醇 10%冰醋酸

2.2.2.2 MAP30 提取纯化

参照王临旭（2003）的方法，并稍作改动，提取流程如下图：

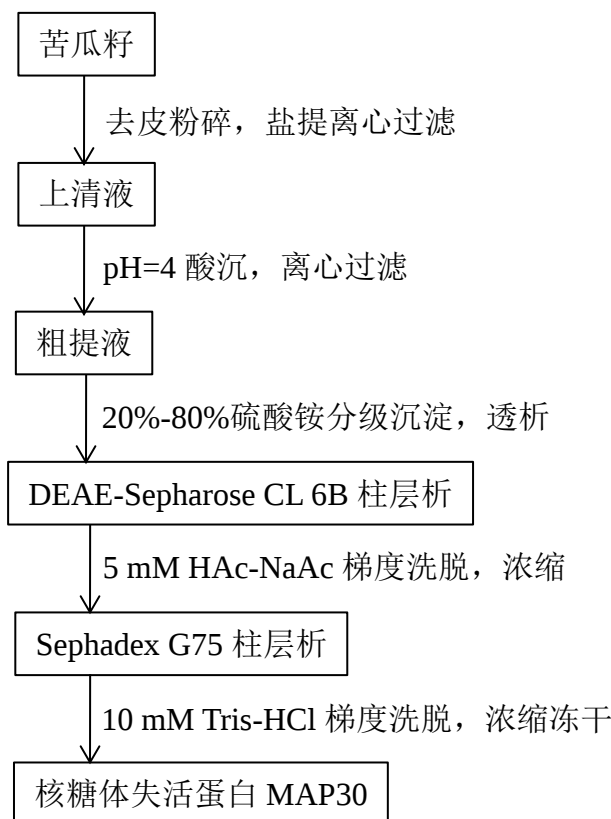


图 2-1 苦瓜籽蛋白 MAP30 纯化流程图

Fig-2-1 Flowchart of purification of MAP30 protein in bitter melon seeds

粗提：50 g 苦瓜籽粉，按料液比 1:20 (m/v) 于 0.15 M NaCl 浸泡 12 h 抽提，4℃ 恒温搅动 15 min，4℃，5000 r/min 离心 30 min，用 1 M HCl 调节 pH 至 4，4℃，10000 r/min 离心 30 min，纱布过滤，滤液 4℃，5000 r/min 离心 30 min，得粗提液样品 1。

硫酸铵沉淀：粗提液经 20%硫酸铵沉淀，离心取上清，再经 80%硫酸铵沉淀，过滤得到沉淀物缓慢充分溶于 5 mM NaAc (pH 5.8) 缓冲液中，并于 5 mM NaAc (pH 5.8) 中透析 48 h，离心后得样品 2。

DEAE-Sephadex CL 6B 柱层析：

(1) 纯化策略：首先采用离子交换层析，利用蛋白质等电点不同而达到分离目的，与树脂无亲和力者被洗脱，与树脂结合者亲和力又各不相同，可采用逐步增加洗脱液离子浓度逐一将其洗脱下来，达到分离目的。DEAE-Sephadex CL 6B 为带正电荷的阴离子交换剂，采用缓冲液 pH < MAP30 等电点，使 MAP30 净电荷为正，MAP30 不被 DEAE-Sephadex CL 6B 结合而洗脱下来。

(2) 柱体大小: 2.5 cm × 40 cm 约 200 mL。

样品缓冲液: 5 mM NaAc(pH 5.8)。

(3) 介质处理: 取 DEAE-Sepharose CL 6B 250 mL, 经 0.2 M NaOH、0.2 M HCl 和 1 M NaAc (pH 3.0) 活化处理, 于 5 mM NaAc (pH 5.8) 中部分平衡。

(4) 装柱并用 5 mM NaAc (pH 5.8) 润洗树脂, 直至使流出液 pH 达 5.8 左右。

(5) 将样品 2 缓缓上样于 DEAE-Sepharose CL 6B 柱, 调节 Bio-Rad 低压液相层析仪流速为 1 mL/min, 注意观察穿过峰, 收集穿过峰流出液即为样品 3。

Sephadex G75 柱层析:

(1) 纯化策略: 采用凝胶过滤层析, 根据蛋白质分子大小不同而达到分离目的, 大分子蛋白被阻挡在填料微孔外而最先到达柱底, 小分子蛋白可进入填料孔内, 最后被洗脱下来。

(2) 柱体大小: 2.5 cm × 95 cm 约 470 mL。

样品缓冲液: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 含 0.1 M NaCl。

(3) 凝胶处理: 将 Sephadex G75 34 g 在沸水中溶胀, 体积达 500 mL。

(4) 装柱并用 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 含 0.1 M NaCl 的缓冲液润洗凝胶, 直至使流出液 pH 达 7.6 左右。

(5) 样品处理: 样品 3 经 80%硫酸铵沉淀, 将沉淀物缓慢充分溶于 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 含 0.1 M NaCl 的缓冲液中, 并于同样缓冲液中透析 48 h, 离心后的上清, 用 Centriprep YM-10 离心浓缩管浓缩蛋白溶液至 10 mL 以下。

(6) 缓缓上样于 Sephadex G75 柱, 调节泵流速为 0.8 mL/min, 注意观察各个洗脱峰, 收集第二峰流出液即为样品 4 (MAP30), 浓缩后冷冻干燥, -20 °C 保存备用。

2.2.3 苦瓜籽 MAP30 的鉴定

2.2.3.1 MAP30 的浓度测定

紫外分光光度仪测定: 经紫外分光光度仪测定 MAP30 吸收峰及 A_{280} 、 A_{260} , 按式 (2) 计算蛋白质浓度。

$$\text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260} \quad (2)$$

2.2.3.2 MAP30 的纯度鉴定

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法鉴定分子量大小及纯度:

(1) 制胶: 分别灌制 15% 分离胶和 4% 浓缩胶各两块, 插入梳子, 待聚合。

(2) 上样: 拔掉梳子, 分别取 1 mg/mL 样品 2、3、4 及低分子量标准蛋白质金属浴 5 min 后, 每孔 20 μ L 上样于加样孔, 于 100 V 电泳 0.5 h, 后调整电压至 160 V 电泳至结束。

(3) 考马斯亮蓝染色过夜, 经高甲醇脱色液脱色完成后, 凝胶成像仪拍照保存。

2.2.3.3 MAP30 的 Nano LC-MS/MS 鉴定

准确称取样品 4 (MAP30) 5 mg 溶解于 500 μ L 去离子水, 1:1 加入蛋白 loading buffer, 调整蛋白浓度为 5 μ g/ μ L, 沸水浴 10 min 后上样于 SDS-PAGE 胶, 每孔上样体积 20 μ L, 上样量 100 μ g。电泳程序: 80 V 30 min 转 160 V 60 min 直至溴酚蓝跑出即停。在凝胶染色和脱色过程中, 应使用新的或保证干净的容器, 避免污染目的条带。

待胶略干后, 小心切下目的条带 (尽可能保留目的条带, 垂直高度小于 2.5 毫米), 装入新的 EP 管中送检。整个操作过程避免蛋白质胶带与手直接接触。

检测条件如下:

UPLC: 色谱柱为德国迈克 ReproSil-Pur C18 柱 (3 μ m, 120 $\text{\AA}$, 4.6 mm $\times$ 250 mm)。流动相为 0.1% 甲酸 (A), 乙腈-水 (80:20, 含 0.1% 甲酸) (B), 梯度洗脱: 0-1 min, 0-5% B; 1-12 min, 5%-65% B; 12-31 min, 65%-23% B; 31-46 min, 23%-40% B; 46-51 min, 40%-50% B; 51-52 min, 50%-90% B; 52-62 min, 90% B。流速 0.3 mL/min, 进样量 4 μ L。

质谱: SASY-Spray 纳流点喷雾离子源, 毛细管电压 2.0 kV, 毛细管温度 275 $^{\circ}\text{C}$, S-Lens: 60%, 扫描范围 m/z 400-30000, 碎裂模式为高能碰撞诱导解离 HCD (NCE 33%)

2.2.3.4 MAP30 氨基酸组成分析

称取 20 mg 冷冻干燥的样品 4 于 1 mL 6 mol/L 盐酸溶液中, 110 $^{\circ}\text{C}$ 下密封水解 22 h-24 h。水解后过滤, 取 0.1 mL 于 1 mL 样品稀释液中, 上样量为 20 μ L, 用氨基酸自动分析仪进行测定。

2.2.4 苦瓜籽 MAP30 的抗肿瘤活性验证

2.2.4.1 细胞培养

细胞培养基：DMEM 高糖培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素（人肝癌细胞 HepG2、人胃癌细胞 SCG7901）或 RPMI 1640 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素（小鼠黑色素瘤细胞 B16）。

冻存液：按照 FBS 与 DMSO 9:1 的比例配制成细胞冻存液。

细胞复苏：将冻存的细胞从液氮中取出后，立即放入 37 °C 水浴中，轻轻晃动冻存管，使其在 1 min 内（不要超过 3 min）全部融化；将冻存管中的液体全部吸出，离心去除冻存液，加入新鲜的完全培养基吹散细胞后接种到细胞培养瓶中，补足 4 mL 培养基进行培养，24 h 待细胞贴壁后，再用新鲜完全培养液替代旧培养液，以去除 DMSO。

细胞的换液与传代：选取生长良好的细胞，在超净工作台的酒精灯旁，吸去培养瓶中的旧培养液，加入 2 mL 左右 PBS 漂洗细胞两次，以去除细胞碎片、代谢产物以及旧的培养基，以免影响消化效果。再加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶消化液，盖好瓶盖，消化细胞 6-8 min，倒置显微镜下观察，见单层细胞收缩突起出现空隙，轻轻晃动培养瓶，将贴壁细胞从壁上冲下，加入适量培养液，用吸管反复吹打细胞，使其成细胞悬液。以 1:2 或 1:3 进行分装，并在培养瓶上做好标记，注明代号、日期，轻轻摇匀，放入 37 °C，5% CO₂ 培养箱中继续培养，即完成细胞的传代。细胞培养 24 h 后，观察培养液的颜色及细胞的贴壁情况和生长状态。更换培养基时，用吸管将旧培养基吸除后，加入 2 mL 左右 PBS 漂洗细胞两次，再加入新培养基，将细胞放回培养箱中继续培养。一般传代 24 h 之后换液一次，之后隔天换液，2-4 d 可在瓶内形成单层。

细胞冻存：冻存细胞时，首先按 1:9 将 DMSO 和血清混合配制成冻存液，取对数生长期细胞，经胰酶消化后，吸出细胞悬液至离心管中，离心，弃培养液，加入适量冻存液，用吸管吹打制成细胞悬液（ $1-5 \times 10^6$ cell/mL），加 1 mL 细胞于冻存管中，密封后标记冻存细胞名称和冻存日期，置于程序性降温盒中，放到 -80 °C 冰箱中，隔天取出冻存管，放入液氮长期保存。

细胞计数：取血细胞计数板和盖玻片，用 75%酒精擦净，将盖玻片放于计数板上。用移液器取 10 μ L 混合均匀的细胞悬液，滴入计数室内，要保证盖玻片下充满

悬液，不要有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中，静置 1 min 后进行计数。将计数板放于显微镜的低倍镜下观察，并移动计数板，分别数出四角的四个大格（每个大格含有 16 个中格）中的细胞数。计算公式为：细胞悬液的细胞数/mL = (四个大格细胞数/4) × 10⁴ × 稀释倍数。

2.2.4.2 MTT 法检测 MAP30 对几种常见肿瘤细胞形态的影响

MTT 法检测样品 MAP30 对人肝癌细胞 HepG2、胃癌细胞 SGC7901、小鼠黑色素瘤细胞 B16 生长状态的影响。

(1) 收集对数期细胞，调整细胞悬液浓度，每孔加入 100 μL，铺板控制待测细胞密度为 1000-10000 cell/孔，边缘孔用无菌 PBS 填充。

(2) 5% CO₂，37 °C 孵育，至细胞单层铺满孔底（96 孔平底板），加入浓度梯度的药物，原则上，细胞贴壁后即可加药，通常在前一天下午铺板，次日上午加药。一般 5-7 个梯度，每孔 100 μL，设 3-5 个复孔。

(3) 5% CO₂，37 °C 孵育 48 h，分别在 0 h，24 h 和 48 h 于倒置显微镜下观察拍照记录。

(4) 同时设置调零孔（培养基、MTT、DMSO），对照孔（细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、DMSO）。

用药浓度梯度：12.5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、400 μg/mL、800 μg/mL。

用药时间：24 h、48 h。

2.2.4.3 MTT 法检测 MAP30 对几种常见肿瘤细胞生长增殖的影响

同 2.2.4.2 处理细胞

加药 24 h 或 48 h 后每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL，即 0.5% MTT），继续培养 4 h。若药物与 MTT 能够反应，可先离心后弃去培养液，小心用 PBS 冲洗 2-3 遍后，再加入含 MTT 的培养液。

终止培养，小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砷，置全波长低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解，在全波长读数仪 OD 490 nm 处测量各孔的吸光值，并计算 MAP30 对各细胞的 IC₅₀ 值。

2.2.5 数据统计分析

实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$ ，用 Microsoft Excel 2013、SPSS 18.0、GraphPad Prims 5 等软件进行图表的绘制和相关数据的处理。

2.3 结果与分析

2.3.1 苦瓜籽的主要成分分析结果

2.3.1.1 基本成分与蛋白组成分析结果

粗蛋白和脂肪是苦瓜籽的主要成分，有文献报道，成熟苦瓜籽中粗蛋白含量约为 30%，且其中主要为白蛋白（49.3%），球蛋白（29.3%）和谷蛋白（3.1%）（Ronny et al 2010），脂肪含量为 35%-40%（Farhan et al 2018）。从表 2-1 中可看出，所选的苦瓜籽中粗蛋白含量为 31.07%，脂肪含量为 40.19%，与文献报道一致。且苦瓜籽中蛋白和脂肪含量均较高，可进一步开发利用。

从表 2-2 中可以看出，苦瓜籽蛋白中主要是水溶性和盐溶性的蛋白，占总蛋白含量的 83.84%，醇溶性和碱溶性蛋白含量相对较少，有利于人体吸收利用和进一步盐提纯化活性蛋白 MAP30。

表 2-1 苦瓜籽基本成分组成(g/100g)

Table 2-1 The basic ingredients composition of bitter melon seeds (g/100g)				
水分	粗蛋白	灰分	脂肪	还原糖
5.13 ± 0.06	31.07 ± 0.18	3.59 ± 0.09	40.19 ± 0.50	0.76 ± 0.05

表 2-2 苦瓜籽蛋白各组分比例（%）

Table 2-2 Percentage of the components of the protein in bitter gourd seeds (%)			
水溶蛋白	盐溶蛋白	醇溶蛋白	碱溶蛋白
44.00 ± 0.62	39.84 ± 0.56	2.39 ± 0.06	13.77 ± 0.17

2.3.1.2 苦瓜籽各组分蛋白氨基酸组成分析结果

由表 2-3 可知，苦瓜籽中氨基酸种类丰富，但四种蛋白组分在氨基酸含量上有所不同。其中盐溶蛋白、水溶蛋白、碱溶蛋白中各种氨基酸含量相当，每组中都以谷氨酸含量为最高，精氨酸次之。从盐溶蛋白、水溶蛋白、碱溶蛋白三种组分的氨基酸组成来看，必需氨基酸占比（EAA/TAA）分别为 31.20%、29.57%、35.83%，可见苦瓜籽是非常好的必需氨基酸来源。同时，苦瓜籽蛋白中含有多种具有特殊功效的氨基酸如药效氨基酸：天冬氨酸 Asp、谷氨酸 Glu、甘氨酸 Gly、蛋氨酸 Met 等，且含量较高，可见苦瓜籽在医药方面具有良好的应用前景。

表 2-3 苦瓜籽蛋白氨基酸分析 (%)

Table 2-3 Amino acid analysis of bitter melon seeds protein (%)

氨基酸名称	盐溶蛋白	水溶蛋白	碱溶蛋白	醇溶蛋白
天冬氨酸 Asp	4.51	4.34	4.22	0.54
苏氨酸 Thr	1.00	0.97	0.97	0.14
丝氨酸 Ser	1.04	0.95	0.83	0.10
谷氨酸 Glu	8.86	9.25	8.03	1.10
甘氨酸 Gly	2.17	2.17	2.10	0.41
丙氨酸 Ala	2.05	2.04	2.04	0.37
半胱氨酸 Cys	0.09	0.20	0.08	0.34
缬氨酸 Val	3.27	3.12	3.12	0.33
甲硫氨酸 Met	0.64	0.66	0.62	0.14
异亮氨酸 Ile	1.97	1.95	1.88	0.30
亮氨酸 Leu	3.23	3.24	3.14	0.36
酪氨酸 Tyr	1.33	1.23	1.28	0.03
苯丙氨酸 Phe	2.47	2.47	2.41	0.32
赖氨酸 Lys	1.60	1.60	1.54	0.29
组氨酸 His	1.34	1.28	1.32	0.26
精氨酸 Arg	1.59	1.59	1.43	0.21

2.3.1.3 脂肪酸组成分析结果

一般用饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸比例评价评价油脂品质，饱和脂肪酸摄入过多往往会导致血液中胆固醇以及低密度脂蛋白胆固醇升高，不饱和脂肪酸，尤其是多不饱和脂肪酸在体内具有降血糖、调节血脂、降低体内胆固醇、保护肝脏等作用（徐雪峰等 2018）。由表 2-4 可知，苦瓜籽油主要由棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸等 7 种脂肪酸组成，饱和脂肪酸含量为 34.39%，不饱和脂肪酸含量为 64.34%，其中亚油酸和亚麻酸组成的多不饱和脂肪酸占 61.37%，相比其他食用油脂，苦瓜籽油中的不饱和脂肪酸含量并不高，不建议作为食用油脂使用。

表 2-4 苦瓜籽脂肪酸组成 (%)

Table 2-4 Fatty acid composition of bitter melon seeds protein (%)

脂肪酸种类	棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	亚麻酸	其它
含量 (%)	1.33±0.01	33.06±0.22	2.97±0.03	3.20±0.03	58.17±0.39	1.27±0.12

2.3.1.4 常见金属元素含量分析结果

由表 2-5 可知, 苦瓜籽中常见金属元素含量符合国内中药或食品相关限量规定。苦瓜籽中 Ca、Mg、K 等金属含量较高, 且几乎不含 As、Cd、Co、Cr 等重金属, 是矿物质含量丰富且非常安全的食物或中药原料。

表 2-5 苦瓜籽金属元素组成 (mg/kg)

Table 2-5 Metallic elements composition of bitter melon seeds protein (mg/kg)

元素	含量	中药或食品限量 (GB 2762-2012)
Al	13.08 ± 1.2	未见限量标准
As	0.59 ± 0.06	≤ 2.0 (参考西洋参, 白芍, 甘草)
Ca	1414 ± 27	未见限量标准
Cd	0 ± 0.03	≤ 0.5 (坚果及籽类)
Co	0 ± 0.02	未见限量标准
Cr	0 ± 0.02	≤ 1.0 (参考植物)
Cu	32.60 ± 1.63	≤ 20 (参考西洋参, 白芍, 甘草)
Fe	445.2 ± 10.2	未见限量标准
K	24427 ± 181	未见限量标准
Mg	14960 ± 114	未见限量标准
Mn	60.82 ± 0.38	未见限量标准
Na	69.77 ± 0.99	未见限量标准
Ni	6.12 ± 0.02	≤ 1.0 (参考人造奶油)
Zn	341.5 ± 4.4	≤ 100 (参考豆及制品、肉)

2.3.2 苦瓜籽 MAP30 的提取纯化结果

MAP30 的等电点为 9.0, 从苦瓜籽中提取纯化 MAP30, 应用最广泛的方法是先通过盐析法提取出含有目的蛋白的粗蛋白, 再利用 MAP30 是碱性蛋白这一特点, 用弱阳离子交换层析将粗蛋白中的碱性蛋白洗脱出来, 再根据蛋白质分子量的不同利用凝胶层析进一步纯化, 最终得到纯度较高的目的蛋白。

2.3.2.1 苦瓜籽蛋白梯度洗脱曲线

粗提液样品 1 经硫酸铵沉淀, 透析后浓缩得到 10 mL 样品 2 上样于 DEAE-Sepharose CL 6B 柱层析, 梯度洗脱后收集合并穿过峰 (约第 10-25 管), 浓缩得到 10 mL 样品 3 再经 Sephadex G75 柱层析分离, 收集合并穿过峰 (约第 20-30

管), 记为样品 4, 即为目的蛋白 MAP30, 样品 3 和样品 4 的洗脱曲线分别见图 2-2a 和 2-2b。

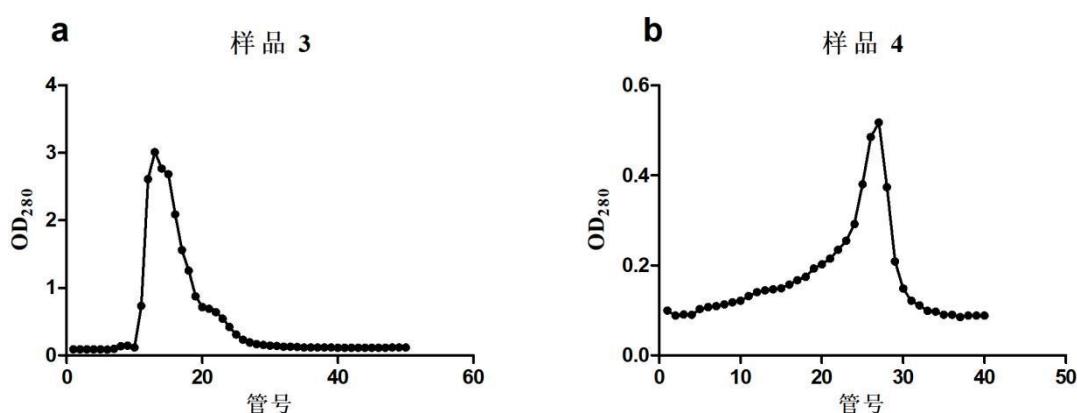


图 2-2 苦瓜籽蛋白梯度洗脱曲线

Fig.2-2 Gradient elution curve of bitter melon seeds protein

2.3.2.2 苦瓜籽蛋白提取纯化结果

样品 2 中蛋白浓度为 12.80 mg/mL, 共 88 mL, 样品 3 和样品 4 蛋白浓度分别为 3.50 mg/mL 和 0.85 mg/mL, 体积分别为 67 mL 和 36 mL, 即从 100 g 苦瓜籽中分离纯化得到目的蛋白 MAP30 共 61.2 mg, 提取率为 0.61‰, 见表 2-6。

表 2-6 苦瓜籽蛋白 MAP30 提取纯化结果

Table 2-6 Extraction and purification result of bitter melon seeds protein MAP30

样品号	蛋白浓度 (mg/mL)	体积 (mL)	蛋白含量 (mg/100g)
2	12.8	88	2252.8
3	3.50	67	469.0
4	0.85	36	61.2

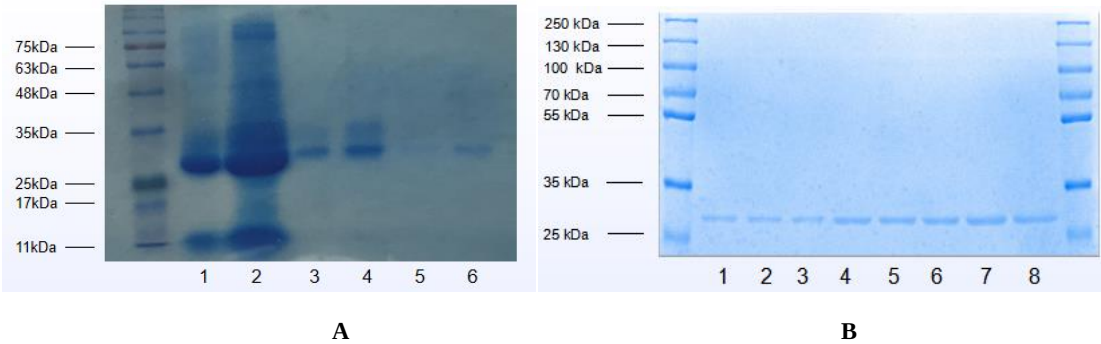
注: 实验原料为 100 g 预干苦瓜籽粉。

2.3.3 苦瓜籽 MAP30 的鉴定结果

2.3.3.1 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

将样品 2-4 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 其中样品 2 为经硫酸铵分级沉淀和醋酸-醋酸钠缓冲溶液透析得到的粗蛋白, 样品 3 为样品 2 经 DEAE-Sepharose CL 6B 柱层析分离得到的穿过峰蛋白, 样品 4 为样品 3 经 Sephadex G75 柱凝胶过滤层析得到的纯化蛋白样品, 即 MAP30。样品 2, 3 可见清晰杂带, 经多次凝胶柱层析分离后最终所得的样品 4 (MAP30) SDS-PAGE 电泳呈单一条带, 分子量在 30 kDa, 说明提取纯化得到纯度较高的苦瓜籽核糖体失活蛋白 MAP30, 见图 2-3A。图 2-3B 是

冻干保存 1 年后 MAP30 的电泳结果，纯化得到的 MAP30 始终为单一清晰条带，稳定性较好。



注：图 2-3A 中，1,2:样品 2; 3,4:样品 3; 5,6:样品 4 (MAP30)，1,3,5 蛋白上样量为 20 μg ，2,4,6 上样量为 40 μg ；图 2-3B 中，1-8 均为样品 4 (MAP30)，其中，1-3 上样量为 50 μg ，4-6 上样量为 100 μg ，7,8 上样量为 150 μg 。

图 2-3 苦瓜籽蛋白样品电泳图

Fig.2-3 Electrophoresis of bitter melon seeds protein

2.3.3.2 Nano LC-MS/MS 鉴定结果

经 Nano LC-MS/MS 分析，蛋白样品 4 理论分子量为 32067.96 Da，经对比数据库确定为苦瓜籽核糖体失活蛋白 MAP30，检测到 16 个唯一肽段，匹配度达 99%。数据库描述该 MAP30 能在 28S rRNA 上的一个特定腺苷上专一地内水解 N-糖苷键，具有 RNA N-糖苷酶活性和 DNA 拓扑失活活性。匹配得到的 MAP30 的氨基酸序列与文献报道完全一致（吕强 2015），含 MAP30 特有的色氨酸 190 残基和蛋氨酸 254 残基，如下：

MVKCLLSFL IIAIFIGVPT AKGDVNFNLS TATAKTYTKF IEDFRATLPF
SHKVYDIPLL YSTISDSRRF ILLNTSYAY ETISVAIDVT NVYVVAYRTR
DVSYFFKESP PEAYNLFKG TRKITLPYTG NYENLQTAAH KIRENIDLGL
PALSSAITTL FYYNAQSAPS ALLVLIQTTA EAARFKYTER HVAKYVATNF
KPNLAIISLE NQWSALSKQI FLAQNQGKGF RNPVDLIKPT GERFQVTNVD
SDVVKGNIKL LLNSRASTAD ENFITMTLL GESVNN

MAP30 的氨基酸序列

从二级结构来分析，MAP30 含有 14 个 α -螺旋和 11 个 β -折叠，分别占总氨基酸残基数的 48.6%和 14.1%，N-末端结构域有一个 6 条链组成的 β 折叠层，C-末端的 20 个氨基酸残基呈高度柔性状，且富有弹性的卷曲片段，占总氨基酸残基数的 21.7%。MAP30 的 α -螺旋结构主要集中在第 108-180 位点上，为高度螺旋化的中心结构域，与 Wang 等报道结果一致（1999）。如下图：

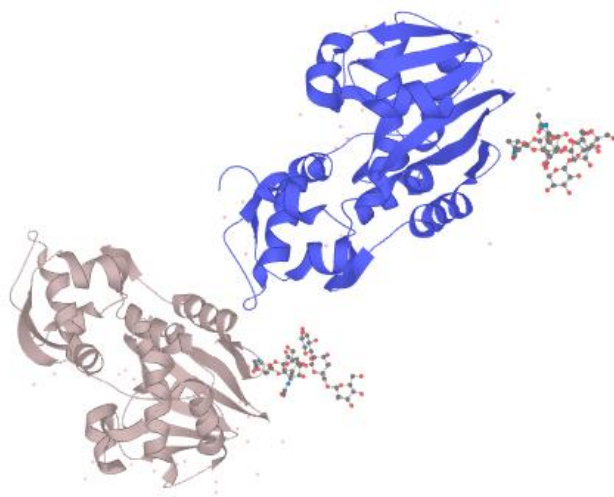


图 2-4 MAP30 的二级结构带状图 (UniProt 数据库)

Fig.2-4 Schematic diagram of secondary structure of MAP30

2.3.3.3 MAP30 氨基酸组成分析结果

表 2-7 苦瓜籽粗蛋白及 MAP30 氨基酸分析 (%)

Table 2-7 Amino acid analysis of MAP30 and bitter melon seeds protein (%)

氨基酸名称		粗蛋白	MAP30
EAA	色氨酸 Trp		8.12
	亮氨酸 Leu	9.97	8.12
	异亮氨酸 Ile	6.10	4.75
	缬氨酸 Val	9.84	3.96
	赖氨酸 Lys	5.03	3.17
	苯丙氨酸 Phe	7.67	2.57
	苏氨酸 Thr	3.08	2.38
	甲硫氨酸 Met	2.06	1.39
NEAA	谷氨酸 Glu	27.2	18.6
	精氨酸 Arg	4.82	14.1
	天冬氨酸 Asp	13.6	6.93
	甘氨酸 Gly	6.85	5.35
	丙氨酸 Ala	6.50	4.16
	丝氨酸 Ser	2.92	3.56
	组氨酸 His	4.20	3.37
	脯氨酸 Pro		3.37
	酪氨酸 Tyr	3.87	3.17
	半胱氨酸 Cys	0.71	2.97

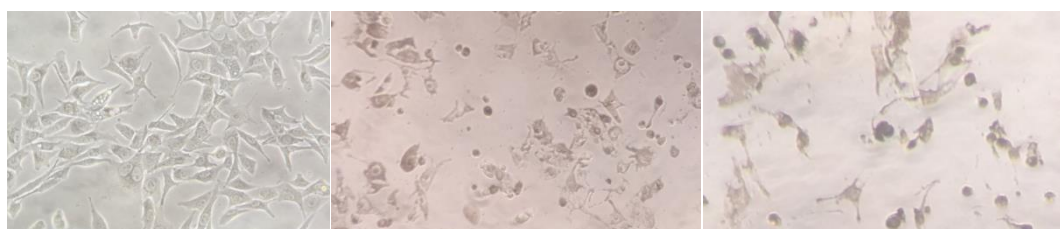
MAP30 中的氨基酸组成与苦瓜籽粗蛋白大致相同，含量较高的依次为：谷氨酸 18.61%，精氨酸 14.06%，必需氨基酸亮氨酸和色氨酸含量也较高，均为 8.12%。说明 MAP30 相对苦瓜籽粗蛋白，其氨基酸模式并未改变，且其中限制性氨基酸色氨酸含量相对较高，可待进一步研究利用。

2.3.4 苦瓜籽中 MAP30 的抗肿瘤活性验证结果

采用 MTT 法验证 MAP30 对小鼠黑色素瘤 B16 细胞、人胃癌 SGC7901 细胞和人肝癌 HepG2 细胞生长形态和生长增殖的影响。根据前期预实验结果设置 MAP30 浓度为 12.5、25、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ ，作用时间为 24 h，48 h。

2.3.4.1 MAP30 对几种常见肿瘤细胞生长状态的影响

B16 细胞：（10 倍）

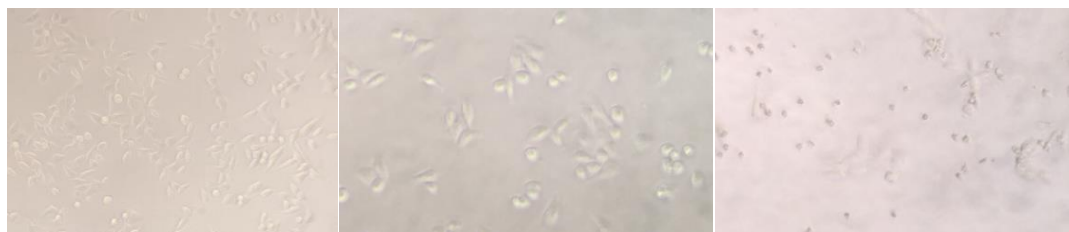


正常状态

加药 24 h

加药 48 h

SGC7901 细胞：（10 倍）

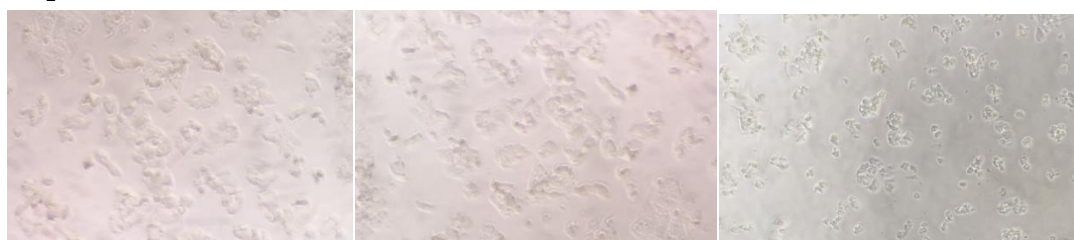


正常状态

加药 24 h

加药 48 h

HepG2 细胞：（10 倍）



正常状态

加药 24 h

加药 48 h

图 2-5 MAP30 作用不同时间下三种肿瘤细胞的生长状态

Fig.2-5 The growth status of the three types of tumor cells at different time under the action of MAP30

在倒置显微镜下观察发现, 对照组细胞生长状态良好, 细胞呈梭形或菱形贴壁生长, 细胞间界限清晰, 且细胞增殖速度快; B16 和 SGC7901 细胞加药组细胞增长速度缓慢, 生长状态也逐渐变差, 细胞皱缩呈圆点, 细胞间隙增大, 且随着 MAP30 作用时间的延长, 胞质内黑色颗粒物增多, 作用 48 h 时, 细胞大量死亡, 后期几乎不再生长, 状态更加劣化; HepG2 细胞加药组细胞生长状态只稍有改变, 细胞死亡数目相对较少, 见图 2-5。说明 MAP30 对 B16 细胞、SGC7901 细胞和 HepG2 细胞具有生长毒性作用, 且对 B16 细胞、SGC7901 细胞的毒性大于 HepG2 细胞。

2.3.4.2 MAP30 对几种常见肿瘤细胞生长增殖的影响

通过进行 MTT 实验, 发现 MAP30 对人肝癌细胞 HepG2、胃癌细胞 SGC7901、小鼠黑色素瘤细胞 B16 三种细胞的增殖均有不同程度的抑制作用, 且具有浓度效应, 时间效应不显著。其中, MAP30 对 B16 细胞的抑制作用最为显著, 抑制活性 B16 > SGC7901 > HepG2。

表 2-8 MAP30 作用不同时间对三种肿瘤细胞的抑制率

Table 2-8 Inhibition rate of MAP30 on three types of tumor cells at different time

蛋白浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	24h 抑制率			48h 抑制率		
	B16	SGC7901	HepG2	B16	SGC7901	HepG2
6.25	10.05%	-4.35%	17.52%	19.29%	10.19%	-7.44%
12.5	12.35%	3.23%	14.80%	4.09%	14.04%	-6.33%
25	19.20%	11.78%	20.80%	24.80%	19.03%	-6.36%
50	26.01%	22.02%	20.43%	29.22%	22.87%	-3.18%
100	27.75%	23.37%	32.24%	41.86%	35.09%	8.24%
200	41.30%	24.17%	31.31%	50.84%	40.20%	22.50%
400	50.28%	33.24%	35.07%	56.44%	47.92%	10.73%
800	58.73%	44.18%	29.26%	67.48%	62.30%	30.02%

2.4 讨论

本章试验对苦瓜籽中的蛋白和氨基酸组成、脂肪酸组成、矿物质等成分进行分析。Ronny 等 (2010) 报道预干燥苦瓜籽中粗蛋白含量约为 30%, 且其中白蛋白、球蛋白以及谷蛋白含量分别为 49.3%、29.3%和 3.1%。Farhan 等报道苦瓜籽中脂肪含量为 35%-40%。本试验中苦瓜籽粗蛋白含量为 $31.07 \pm 0.18\%$, 脂肪含量为 $40.19 \pm 0.50\%$, 水分含量为 $5.13 \pm 0.06\%$, 苦瓜籽中基本成分含量以及粗蛋白组分含量均与文献一致。

由苦瓜籽蛋白的氨基酸分析结果可知, 苦瓜籽蛋白共含有 18 种氨基酸, 包括全部 8 种必需氨基酸, 必需氨基酸/非必需氨基酸比例约为 30%, 含有多种具有特殊功效的氨基酸如药效氨基酸, 是非常好的氨基酸食物和药物来源。经纯化得到的 MAP30 氨基酸组成变化不大, 精氨酸和谷氨酸含量高, 必需氨基酸中色氨酸含量最高, 蛋氨酸含量最低, 已有研究表明适宜添加色氨酸和谷氨酸含量以及降低蛋氨酸含量均有利于改善肠道屏障紧密连接损伤(Trevisi 2009, Wang 2016, 申晓婷 2017), 根据其氨基酸组成和含量, 推测 MAP30 可能具有改善肠道屏障损伤的功效。

众所周知, 多不饱和脂肪酸可以降低血中的胆固醇和甘油三酯, 改善多种心脑血管疾病, 单不饱和脂肪酸在体内具有降血糖、调节血脂、降低体内胆固醇、保护肝脏等多种作用(徐雪峰 2018)。本章分析苦瓜籽油是由 7 种脂肪酸组成的, 其中饱和脂肪酸含量为 34.39%, 不饱和脂肪酸含量为 64.34%, 而大豆油、葵花籽油、橄榄油等不饱和脂肪酸含量均在 80%或 90%以上(王瑞等 2011), 相比这些食用油脂, 苦瓜籽油中的不饱和脂肪酸含量并不高, 不适宜作为食用油脂。

MAP30 是由美国科学家 Sylvia Lee Huang 在苦瓜中发现的单链核糖体失活蛋白, 分子量约为 30 kDa (Huang et al 1990) 本章节采用传统盐提分离方法得到纯化的 MAP30, SDS-PAGE 鉴定为单一稳定条带, 分子量为 30 kDa, 纯化得率为 0.61%。王林旭从 50 g 苦瓜籽中(2003)通过盐提、分级、层析分离得到 46.06 mg 纯化的 MAP30, 提取率为 0.9%。一方面可能是不同方法提取的 MAP30 得率有所差异, 另一方面, 苦瓜籽来源和种类对 MAP30 的得率也有所影响。传统纯化方法步骤繁多, 且得率不高, 国内外研究者已尝试将 MAP30 进行异源表达, MAP30 的得率和纯度都大大提高, 解决了天然 MAP30 来源不足的问题。

经 Nano LC-MS/MS 鉴定得到 MAP30 的高级结构信息, 并确定其具有 rRNA N-糖苷酶活性, 可以专一地水解真核生物核糖体的 28S rRNA 保守区域“S/R 结构域”上的腺嘌呤 N-C 糖苷键释放一个腺嘌呤, 引起 28S rRNA 的构象发生改变而丧失结合延长因子的能力, 阻碍肽链合成进而抑制蛋白质的生物合成。关于 MAP30 结构的系统报道最早见于 1999 年, Wang 等综述了 MAP30 的结构与功能之间的联系。他们通过对比 MAP30 与其他 RIPs 的序列与结构同源性, 发现 MAP30 的 N-糖苷酶活性可能归因于其 Y70、Y109、E158、R161 残基, 且这些残基位于一个深口袋中, 专门容纳一个螺旋外腺嘌呤碱基。可见, MAP30 结构的同源性和特殊性同时决定了其酶活性和功能活性。

目前已有大量文献报道了 MAP30 对多种肿瘤细胞的抑制活性。李春阳等(2001)研究发现苦瓜蛋白培养 48 h 对胃癌细胞 SGC7901 的增长具有明显的抑制作用,细胞发生典型的凋亡形态学改变。Fang 等(2012)研究报道,MAP30 培养人肝癌 HepG2 细胞 24 h 和 48 h, 60 μ M 浓度下细胞死亡率分别达到 58%和 72%。本研究验证了 MAP30 对人肝癌 HepG2 细胞、小鼠黑色素瘤 B16 细胞以及人胃癌 SGC7901 细胞的增殖抑制活性,发现 MAP30 作用会显著改变 B16 细胞和 SGC7901 细胞的生长形态,对 HepG2 细胞的形态改变不明显,且 MAP30 对三种细胞的增殖抑制活性为 B16 > SGC7901 > HepG2。

虽然 MAP30 具有多种生理功能,但 MAP30 是植物性蛋白,作为抗病毒和抗肿瘤药物,在临床应用上受到诸多限制。合理的化学修饰可以改变 MAP30 蛋白分子的空间结构,最终改变 MAP30 的各种生物化学性质,可能降低或消除其抗原性和免疫原性。因此,MAP30 的化学修饰成为近些年的研究热点。何义国等(2013)提取分离得到纯净的 MAP30 并对其进行聚乙二醇修饰得到 MAP30 和聚乙二醇的结合物(PEG-MAP30),研究发现 PEG-MAP30 也表现出抑制细胞增殖的活性,对 B16、Hela、A431 等细胞的抑制效果均能达到 MAP30 的 60%-70%。为了更好的发挥 MAP30 的抗病毒和抗肿瘤活性,其他物质和方式的化学修饰还有待研究和改进。

2.5 结论

(1) 苦瓜籽粗蛋白含量为 $31.07 \pm 0.18\%$, 脂肪含量为 $40.19 \pm 0.50\%$, 水分含量为 $5.13 \pm 0.06\%$; 苦瓜籽的脂肪酸组成较为简单,其中多不饱和脂肪酸含量为 64.34%; 苦瓜籽中矿物质和必需氨基酸含量丰富。苦瓜籽蛋白组分主要为盐溶蛋白和水溶蛋白,占粗蛋白含量的 83.8%,有利于下一步提取纯化盐溶性活性蛋白 MAP30。

(2) 纯化得到的苦瓜籽蛋白 MAP30 在 30 kDa 附近出现单一稳定条带,纯度较高,纯化得率为 0.61%,经 Nano LC-MS/MS 鉴定纯化所得蛋白即为核糖体失活蛋白 MAP30,匹配度达 99%,其氨基酸序列和二级结构均与文献报道一致。

(3) MAP30 对三种细胞的 MTT 分析结果显示: MAP30 对 B16 细胞、SGC7901 细胞和 HepG2 细胞具有生长毒性作用。不同浓度的 MAP30 作用 48 h,对人肝癌细胞 HepG2、胃癌细胞 SGC7901、小鼠黑色素瘤细胞 B16 三种细胞的增殖均有不同程度的抑制作用,且具有浓度依赖性,时间依赖性不显著。其中,对 B16 细胞的抑制作用最为显著,优于 SCG7901 和 HepG2 细胞。

第三章 苦瓜籽蛋白 MAP30 对肠道紧密连接的保护作用研究

目前, 基于 MAP30 的研究主要集中在其抗肿瘤和抗病毒活性评价方面, 但在对肠道免疫方面的研究较少, 其作用机制也尚不明确。肿瘤的发生和病毒入侵引起的肠道屏障功能损伤, 进而导致机体免疫功能下降的问题越来越受到人们的重视。肠道屏障的损伤体现在肠通透性增加, 屏障完整性被破坏, 会诱导肠道对脂多糖的吸收, 激发相关细胞信号通路活性的改变, 进而引发包括癌症在内的多种疾病。本章试验通过建立脂多糖 (LPS) 诱导的肠道紧密连接损伤模型, 拟从对紧密连接完整性、通透性以及相关蛋白和基因表达调控的角度, 探究 MAP30 对肠道屏障紧密连接损伤的影响, 并从相关信号转导通路方面初步探究其影响机制, 为 MAP30 在肠道免疫修复方面的应用提供理论基础。

3.1 实验材料

3.1.1 实验原料

MAP30, 本实验室自制; 人结直肠腺癌细胞株 (human colon carcinoma cell line, Caco-2), 购于 ATCC 细胞库。

3.1.2 主要试剂

(1) 细胞实验相关试剂

DMEM 高糖培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司
胰蛋白酶	美国 Sigma 公司
二甲基亚砷(DMSO)	杭州吉诺生物技术有限公司
HEPES	中国 Thermo 公司
青、链霉素	美国 Sigma 公司
荧光黄(Lucifer yellow, LY)	美国 Sigma 公司
碱性磷酸酶(AKP)测试盒	南京建成生物工程研究所
PBS	杭州吉诺生物技术有限公司
MTT	北京索莱宝科技有限公司

(2) qPCR 实验所用试剂

引物合成	杭州金斯瑞生物公司
------	-----------

Trizol	北京索莱宝科技有限公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
三氯甲烷	上海凌峰化学试剂有限公司
乙醇	国药集团化学试剂有限公司
DEPC 水	上海生工生物工程有限公司
逆转录试剂盒(RR047A)	日本宝生物公司
SYBR Premix Ex Taq(RR420A)	日本宝生物公司

(3) Western Blot 实验相关试剂

RIPA 裂解液	北京索莱宝科技有限公司
PMSF	北京索莱宝科技有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
彩色预染蛋白分子量标准	北京索莱宝科技有限公司
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
PVDF 滤膜	美国 Millipore 公司
ECL 发光试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
脱脂奶粉	上海碧云天生物技术有限公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)	上海碧云天生物技术有限公司
β-actin 抗体	北京博奥龙免疫技术有限公司
Anti-Occludin antibody	北京博奥龙免疫技术有限公司
Anti-Claudin-1 antibody	北京博奥龙免疫技术有限公司
ZO-1 Polyclonal Antibody	北京博奥龙免疫技术有限公司
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)	北京博奥龙免疫技术有限公司
HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)	北京博奥龙免疫技术有限公司
显影液、定影液	上海碧云天生物技术有限公司

3.1.3 主要仪器

二氧化碳细胞培养箱	美国赛默飞公司
超净工作台	苏州净化设备厂
普通光学显微镜	日本 OLYPUS 公司
Centrifuge 5804(R)冷冻离心机	德国Eppendorf公司

荧光定量 PCR 仪 Qtower2.2	德国耶拿仪器有限公司
Millicell ERS 2 电阻仪	美国 Millipore 公司
Transwell(3460,3470)	美国 Coming 公司
全波长读数仪 MULTISKAN GO	德国 Thermo scientific 公司
电热恒温水浴箱	国华仪器有限公司
凝胶电泳系统	美国 Bio Rad 公司
凝胶成像仪 SYSTEM GelDoc XR+	德国 Bio-rad 公司
超声清洗机 SB-5200DT	宁波新芝生物科技有限公司
超微量分光光度计 IMPLEN	联想生物科技有限公司
PCR 仪 C100 Touch Thermal Cycler	德国 Bio-rad 公司

3.2 实验方法

3.2.1 主要溶液的配制

3.2.1.1 细胞培养基的配制

DMEM 高糖培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素+0.4% HEPES。

3.2.1.2 冻存液的配制

按照 DMEM:FBS:DMSO= 6:3:1 的比例配制成细胞冻存液，现用现配。

3.2.1.3 Western blot 相关缓冲液配制

(1) 10×电泳缓冲液（使用时稀释到 1×, pH 8.3）：甘氨酸（MW 75.07）144 g，Tris（MW 121.14）30.3 g，SDS 10 g，加蒸馏水定容至 1000 mL。

(2) 10×转膜缓冲液（使用时稀释到 1×, pH 8.3）：甲醇 200 mL，甘氨酸（MW 75.07）144 g，Tris（MW 121.14）30.3 g，加蒸馏水定容至 1000 mL。

(3) 10×TBS 缓冲液：Tris 121.1 g，NaCl 87.66 g，加蒸馏水定容至 1000 mL；加入浓盐酸约 6 mL，调至 pH=7.6。

(4) 1×TBST 缓冲液：10×TBS 缓冲液 100 mL，Tween20 1 mL，加入蒸馏水定容至 1000 mL。

(5) 封闭液：5%脱脂奶粉+TBST 缓冲液。

3.2.2 细胞单层模型的建立与评价

3.2.2.1 Caco-2 细胞的培养

Caco-2 细胞培养相关技术同 2.2.4.1。

3.2.2.2 Caco-2 单层细胞模型的建立

利用 Caco-2 细胞建立肠道屏障体外模型：目前，构建此模型所用培养板通常为 Corning 公司生产的 Transwell 通透性支持物。先将培养液依次加入多孔板和 Transwell 嵌套内，培养板放置于培养箱中过夜预平衡，用以提高细胞的贴附效率。用新鲜的培养基配制密度为 2.5×10^5 cell/mL 的细胞悬液，接种于 Transwell 嵌套内，放回培养箱 5% CO₂，37 °C 中培养，记为第 0 天。Transwell 嵌套和孔板推荐加入的培养液体积见表 3-1 所示。接种 24 h 细胞贴壁后按照推荐加入量更换 inserts 内外培养液，第一周隔天换液，之后两周每天更换培养液。细胞培养 21 d 后待用。

表 3-1 推荐的透明嵌套规格与培养基体积

Table 3-1 Recommended Transwell Permeable Support Medium Volumes

Transwell Insert Diameter	Insert Membrane Growth Area	Multiple Well Plate	Volume Added per Plate Well	Volume Added to Inside of Transwell Insert
6.5 mm	0.33 cm ²	24 well	0.6 mL	0.1 mL
12 mm	1.12 cm ²	12 well	1.5 mL	0.5 mL
24 mm	4.67 cm ²	6 well	2.6 mL	1.5 mL

3.2.2.3 Caco-2 单层细胞模型的评价

(1) 细胞形态学观察：每天在光学倒置显微镜下观察 Caco-2 细胞生长状态，单层形成情况，并查看 inserts 内外培养液颜色，是否有细胞大片脱落等；每次换液时吸取适量培养液在显微镜下观察是否出现污染。

(2) 单层细胞跨膜电阻 (Trans epithelial electrical resistance, TEER) 测定：Caco-2 单层细胞模型如图 3-1 所示。微孔膜的 Apical (AP) 侧又称为肠腔侧或黏膜侧，Basolateral (BL) 侧又称为基底侧或浆膜侧。测量前，将电极放入预热至 37 °C 的 HBSS 中，平衡 30 min。移走培养板中的培养基，在 AP 侧和 BL 侧分别加入相应体积预热至 37 °C 的 HBSS，37 °C 平衡 30 min，同时洗去细胞表面的杂质。移走 HBSS，重新加入预热的 HBSS，将电阻仪模式转到 Ohms，开关转到 ON，将电极短端浸入 AP 侧，长端浸入 BL 侧，注意短端不要碰到膜上生长的细胞，长端刚好接触到 BL 侧底部，电极与培养板呈 90 度。Transwell 小室有三个孔，分别在三个孔中测量，每个孔都反复测量至连续三次出现相同结果时记录，取三孔测量值的均值作为实测电阻值。每次实验需设不接种细胞的空白小室，并按照上述步骤测量得到空白电阻值。TEER = (实测电阻值 - 空白电阻值) × Transwell 小室膜面积，单位用 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 表示。

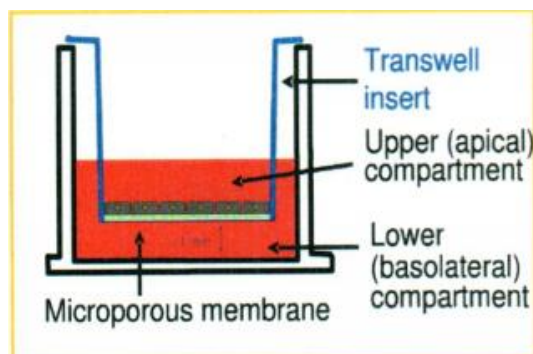


图 3-1 Caco-2 单层细胞模型示意图（申晓婷 2017）

Fig.3-1 Schematic diagram of Caco-2 single-layer cell model

(3) 被动扩散标志物荧光黄 (Lucifer yellow, LY) 跨膜通量的测定：选择荧光黄作为 Caco-2 细胞单层模型的细胞旁转运标记物，将其跨膜通透率作为检测细胞单层紧密性与通透性的指标。取培养至第 21 d 左右的 Caco-2 细胞，移走培养板中旧的培养基，在 AP 侧和 BL 侧按照推荐加入量分别加入预热至 37 °C 的不含血清的 DMEM 培养液，37 °C 平衡 30 min，同时洗去细胞表面的杂质。移走不含血清的 DMEM 培养液，在 AP 侧加入 0.5 mL 预热至 37 °C 的含 100 µg/mL LY 的 DMEM 培养液，BL 侧加入 1.5 mL 预热至 37 °C 的不含血清的 DMEM 培养液，在常规培养条件下培养 2-4 h。取 BL 侧的培养液，在激发波长 427 nm，发射波长 536 nm 的条件下，利用多功能酶标仪检测荧光强度。根据标准曲线，计算 BL 侧转运液中 LY 浓度，并按式 (3) 计算表观渗透系数 (P_{app})。

$$P_{app} = \Delta Q / (\Delta t \cdot A \cdot C_0) \quad (3)$$

其中， ΔQ 为 Δt 时间段内的荧光黄的透过量；

A 为细胞单层表面积，即 Transwell 小室膜面积 (cm^2)；

C_0 为 AP 侧荧光黄的初始浓度，100 µg/mL。

(4) 细胞极性研究：Caco-2 细胞的极性可以通过测量单层生长的不同阶段的碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AKP) 活力来表征。AKP 是肠上皮细胞在单层形成过程中分化出的刷状缘标志性酶，在细胞生长到一定阶段后，分别测定 AP 侧和 BL 侧的 AKP 活性，以分析 Caco-2 单层细胞分化的程度及其功能状态。培养第 5 天、第 9 天、第 13 天、第 17 天、第 21 天分别吸取 AP 侧和 BL 侧培养液，1500 r/min，离心 10 min，取上清液进行测定。具体操作如下所示：

① 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 510 nm，蒸馏水调零。

②试剂二置于 37 °C 水浴中预热 30 min 以上。

③按照表 3-2 测定并按式 (4) 计算得到 AP 和 BL 测的 AKP 活性。

$$AKP(U/mL) = [C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{样}}] \div V_{\text{样}} \div T \quad (4)$$

其中, $C_{\text{标准品}}$: 2 $\mu\text{mol/mL}$;

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液的体积, 0.004 mL;

T: 反应时间, 15 min。

表 3-2 AKP 活性检测操作表
Table 3-2 Operation of AKP activity detection

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管	标准管
蒸馏水	-	-	4	-
2 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品	-	-	-	4
上清液	4	-	-	-
试剂一	40	40	40	40
试剂二	40	40	40	40
混合后置于 37 °C 水浴中保温 15 min				
试剂三	120	120	120	120
上清液	-	4	-	-
混匀后于 510 nm 测定吸光度, 记为 A 测定管、A 对照管、A 空白管、A 标准管				

3.2.2.4 细胞分组

培养至 21 d 的 Caco-2 细胞, 根据是否加入 LPS 和 MAP30 以及加入 MAP30 的浓度将细胞分为 NC 组, LPS 损伤组, 低、中、高浓度 MAP30 组。NC 组继续用 DMEM 培养基培养, LPS 组 AP 测换成含 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的 DMEM 培养基培养, MAP30 组换成含 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和不同浓度 MAP30 的 DMEM 培养基培养。每次实验每组至少设 3 个孔。其中, NC: 阴性对照组; LPS: 100 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖损伤; LPS+L: 脂多糖损伤+10 $\mu\text{g/mL}$ MAP30 组; LPS+M: 脂多糖损伤+20 $\mu\text{g/mL}$ MAP30 组; LPS+H: 脂多糖损伤+ 40 $\mu\text{g/mL}$ MAP30 组。

3.2.3 MTT 法检测 MAP30 对 Caco-2 生长增殖的影响

方法同 2.2.4.2。

样品浓度梯度：0 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1600 $\mu\text{g/mL}$ 。

用药时间：24 h、48 h、72 h。

3.2.4 跨膜电阻值与荧光黄通量测定

方法同 3.2.2.3（2）。

3.2.5 基因表达量测定

实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR) 检测 Claudin-1, Occludin, ZO-1, NF κ B, MLCK, ERK1/2, MAP 的基因表达。

本研究使用 Takara Ex Taq HS 进行 PCR 扩增，通过检测反应液中 SYBR Green I 的荧光强度，达到监控 PCR 产物扩增量的目的。实验原理：在 PCR 反应体系中，加入过量 SYBR Green I 荧光染料，反应刚开始时，体系中只有微量的模板，基本上检测不到荧光信号。在扩增过程中，随着新的双链 DNA 的产生，SYBR Green I 分子会结合在上面，发射荧光信号，而没有掺入链中的 SYBR Green I 分子不会发射任何荧光信号，因此，每形成一个双链 DNA 分子，就有一定量的染料结合产生荧光信号，且信号强度与 DNA 分子总数目成正比。

3.2.5.1 总 RNA 提取

用 TransZol RT101 提取细胞中的总 RNA。TransZol 利用异硫氰酸胍裂解细胞。在样品裂解过程中，可保持 RNA 完整性，加入氯仿后，溶液分为无色水相和粉红色有机相，RNA 在水相，用异丙醇沉淀回收 RNA。

（1）每 10 cm^2 生长的细胞中加入 1 mL 的 TransZol，水平放置片刻，使裂解液均匀分布于细胞表面并裂解细胞，移液枪吹打细胞使其脱落（对于贴壁牢固的细胞可用细胞刮勺剥离细胞）。将内含细胞的裂解液转移至 RNase free 的离心管中，用移液枪反复吹打直至无明显沉淀，室温静置 5 min。

（2）每使用 1 mL TransZol，加 0.2 mL 氯仿，剧烈震荡 15 s，室温孵育 3 min。

（3）10000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。注意此步骤必须低温离心，否则产物会有少量基因组污染。

（4）小心取出离心管。此时溶液分为三层：无色的水相（上层）、白色中间层

以及粉红色有机层（下层）。RNA 主要在水相中，水相体积约为所用 TransZol 试剂的 60%，小心将水相转移至另一干净的 RNase free 离心管中，注意不要吸的太完全，以防吸到中间层导致基因组污染。

（5）每使用 1 mL TransZol 加入 0.5 mL 异丙醇，颠倒混匀，室温孵育 10 min。

（6）10000 g 4 °C 离心 10 min，去上清，在管侧和管底形成胶状沉淀。

（7）加入 1 mL 75% 乙醇（DEPC 水配制），剧烈涡旋，7500 g 4 °C 离心 5 min。重复清洗 3 次。

（8）弃上清（为了更好地控制 RNA 中的盐离子含量，应尽量除尽乙醇），室温晾干沉淀（大约 5 min 左右）。注意不可过分干燥，否则会导致 RNA 难以溶解。

（9）沉淀溶于 50-100 μ L RNA 溶解液中。

（10）55 - 60 °C 孵育 10 min，保存样品于 -70 °C 以备长期使用。

3.2.5.2 纯度及浓度检测

用 TE 稀释 RNA，检测 260 nm, 280 nm OD 值，并计算 OD_{260}/OD_{280} 。纯的 RNA 的比值应在 1.8-2.2 之间。若 < 1.8，可能有 DNA 或蛋白残留；若 < 1.6，可能 RNA 未溶解完全。RNA 浓度按式（6）计算。

$$RNA \text{ 浓度 (ng/}\mu\text{L)} = OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 \quad (6)$$

3.2.5.3 逆转录合成第一链 cDNA 产物

（1）去除基因组 DNA 反应

按如下成分于冰上配制反应混合液，为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数+2 的量配制 Master Mix，然后再分装到每个反应管中，最后加入 RNA 样品。

表 3-3 去除 DNA 反应体系

Table 3-3 Reaction system of removing DNA

试剂	使用量
5 × gDNA Eraser Buffer	2.0 μ L
gDNA Eraser	1.0 μ L
Total RNA	1.0 μ g
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μ L

42 °C 2 min （或室温 5 min）。

（2）反转录反应

反应液配制在冰上进行。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数+ 2 的量配制 Master Mix，然后再分装 10 μL 到每个反应管中。轻柔混匀后立即进行反转录反应。

表 3-4 应用于 SYBR Green qPCR 法的反应体系

Table 3-4 Reaction systems applied to SYBR Green qPCR method

试剂	使用量
步骤 1 的反应液	10.0 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 μL
RT Primer Mix	1.0 μL
5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4.0 μL
RNase Free dH ₂ O	4.0 μL
Total	20.0 μL

37 °C 15 min, 85 °C 5 sec。

产物可立即用于 PCR 反应，或在-20 °C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-80 °C保存，cDNA 应避免反复冻融。

3.2.5.4 实时荧光定量 PCR(qPCR)

（1）引物序列：（表 3-5）按照 PCR 引物设计原则设计引物，利用基因设计软件 Primer 5，分别设计 Claudin-1、Occludin、ZO-1、NF κ B、MLCK、ERK1/2 和 MAP 的 PCR 引物，以三磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）作为内参对照的校准基因，由杭州金斯瑞生物技术有限公司合成。

表 3-5 qPCR 引物序列

Table 3-5 Sequences of primers used for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequences(5'-3')
GAPDH	F: CTCCTCCTGTTTCGACAGTCA R: CGACCAAATCCGTTGACTCC
Claudin-1	F: TGGTCAGGCTCTCTTCACTG R: TTGGATAGGGCCTTGGTGTT
Occludin	F: GGGCATTGCTCATCCTGAAG R: GCCTGTAAGGAGGTGGACTT
ZO-1	F: TTCACGCAGTTACGAGCAAG R: TTGGTGTTTGAAGGCAGAGC
NFκB	F: AGCAAATAGACGAGCTCCGA R: TCGGTAAAGCTGAGTTTGCG
MLCK	F: CAGCATGCAGATCTGGGACT R: TGATTGCACGTACACGGAAC
ERK1/2	F: GGCGTGATCCTGGACTATGA R: CTGTGGCGTTGTACTCACTG
MAP	F: AAGCATAACCGTTGGTCGTG R: CTTCTGGCCAGGAACGAATG

(2) qPCR 反应体系配制：按照表 3-6 所示进行配制。

表 3-6 qPCR 反应体系

Table 3-6 qPCR reaction system

试剂	使用量	终浓度
SYBR Premix Ex Taq (2×)	10.0 μL	1×
PCR Forward Primer	0.4 μL	0.2 μM
PCR Reverse Primer	0.4 μL	0.2 μM
DNA 模板	2.0 μL	
dH ₂ O	7.2 μL	
Total	20.0 μL	

(3) qPCR 反应程序设置：如表 3-7 所示两步法标准程序

表 3-7 两步法标准程序

Table 3-7 Two-step standard procedure

Stage 1 预变性	Reps: 1	95 °C	30 sec
Stage 2 循环反应	Reps: 40	95 °C	5 sec
		60 °C	30 sec
Stage 3 溶解曲线	Reps: 1	95 °C	10 sec
		65-90 °C	increment 0.5 °C 5 sec

(4) 实验结果分析: 反应结束后, 确定 qPCR 的扩增曲线和融解曲线以及 threshold cycle (Ct 值)。Ct 值就是每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。Ct 值跟初始模板的量成反比。第 3-15 个循环的荧光值就是基线(baseline), 是由于测量的偶然误差引起的。样本的 Ct 值与该样本 DNA 模板原始拷贝数的对数存在线性关系, ΔCt (目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值) 同样和 cDNA 模板的原始拷贝数的对数存在线性关系。因此, qPCR 结果可用比较阈值法进行相对定量分析, 即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 得到的结果是实验组中目的基因相对于对照组中目的基因表达的差异倍数。首先用内参基因的 Ct 值对实验组(test)和对照组(con)的靶基因 Ct 值进行归一化: ΔCt_{test} = 实验组目的基因 Ct 值-实验组内参基因 Ct 值, ΔCt_{con} = 实验组目的基因 Ct 值-实验组内参基因 Ct 值; 随后用对照组的 Ct 值归一实验组的 ΔCt : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{test} - \Delta Ct_{con}$; 最后计算表达水平的差异倍数: $Change\ Fold = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

3.2.6 蛋白表达量测定

3.2.6.1 收集蛋白样品

- (1) 取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (PMSF), 调整 PMSF 至终浓度为 1 mM。
- (2) 将六孔板 Transwell 小室内的培养液去除, 用 PBS 清洗一遍。每个小室内加入 300 μL 裂解液, 冰上裂解。移液枪轻轻吹打使裂解液和细胞充分接触。
- (3) 裂解完全后, 取 2 μL 用于蛋白浓度测定。将 $5\times$ 蛋白上样缓冲液加入剩余蛋白样本中, 使上样缓冲液终浓度为 $1\times$ 。
- (4) $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 10 min, 使蛋白变性。
- (5) 冷却到室温后, 离心 10 min, 直接上样或者置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。

3.2.6.2 BCA 法测定蛋白浓度

为确保每个蛋白样本的上样量一致, 需要测定每个蛋白样本的蛋白浓度, 本实验采用 Solarbio BCA 蛋白浓度测定试剂盒。

- (1) 配制工作液: 根据标准品和样品数量, 按 50 体积 BCA 试剂加 1 体积 Cu 试剂 (50:1) 配制成 BCA 工作液。充分混匀, BCA 工作液室温 24 h 内稳定。
- (2) 稀释标准品: 取 10 μL BSA 标准品用 PBS 稀释至 100 μL (样品一般可用 PBS 稀释), 使终浓度为 0.5 mg/mL。将标准品按 0、2、4、6、8、12、16、20 μL 加到 96 孔板的蛋白标准品孔中, 加 PBS 补足至 20 μL 。

(3) 将样品作适当稀释(最好多做几个梯度,如作 2 倍、4 倍、8 倍稀释),加 20 μL 到 96 孔板的样品孔中。由于移液器移液器在取小量样品时误差偏大,标准线前面的点可能不很准确,所以尽可能让样品点落在标准线 1/2 后。

(4)各孔加入 200 μL BCA 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15-30 min。用酶标仪测定 A562nm,根据标准曲线计算出蛋白浓度。使用温箱孵育时,注意防止水分蒸发影响检测结果。

3.2.6.3 电泳

(1) SDS-PAGE 凝胶配制:按照表 3-8 和表 3-9 的配方分别配制 SDS-PAGE 的分离胶和浓缩胶。

表 3-8 SDS-PAGE 的分离胶配制

Table 3-8 Preparation of SDS-PAGE separation adhesive

成分	配制不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分的体积 (mL)					
10%胶	5	10	15	20	30	50
蒸馏水	1.3	2.7	4.0	5.3	8.0	13.3
30%Acr-Bis (29:1)	1.7	3.3	5.0	6.7	10.0	16.7
1M Tris, pH8.8	1.9	3.8	5.7	7.6	11.4	19.0
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.012	0.02

表 3-9 SDS-PAGE 的浓缩胶配制

Table 3-9 Preparation of SDS-PAGE concentrated adhesive

成分	配制不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分的体积 (mL)					
5%胶	2	3	4	6	8	10
蒸馏水	1.4	2.1	2.7	4.1	5.5	6.8
30%Acr-Bis (29:1)	0.33	0.5	0.67	1.0	1.3	1.7
1M Tris, pH6.8	0.25	0.38	0.5	0.75	1.0	1.25
10%SDS	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
10%过硫酸铵	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.002	0.003	0.004	0.006	0.008	0.01

(2)灌胶:准备 Bio-Rad 电泳装置,将干净的玻璃夹板底端对齐后放入配胶夹中,保证两块板平齐,检漏。将配制好的分离胶溶液立即混匀,用移液枪加入两块

玻璃板之间，注意不要留有气泡，持续加入分离胶至液面达梳子下缘 0.5 cm 处。加好之后立即在胶面上加一层水或异丙醇封胶，室温放置 20 min。待分离胶凝固后，弃去水或异丙醇，用 ddH₂O 轻轻冲洗分离胶胶面并用滤纸吸去残液。将配制好的浓缩胶混匀后，加满玻璃板剩余空间，将梳子插入浓缩胶中，注意不要留有气泡。待浓缩胶凝固之后，立即使用或者置于 1×电泳缓冲液中放入 4 °C 冰箱短时间保存。

(3) 上样与电泳：将制好胶的玻璃板放入电泳槽中，加入 1×电泳缓冲液，轻轻将梳子拔出。将蛋白样本取出，依次加入孔道，最后在第一道和最后一道加样孔各加入 5 μL 彩色预染蛋白质分子量标准。盖好保护罩后接通电源。电泳时，在上层胶（浓缩胶）时使用低电压恒压电泳，即 80 V 电泳 30 min；在下层胶（分离胶）时使用高电压恒压电泳即 120 V 电泳 60-120 min。根据彩色预染蛋白质分子量标准的电泳情况，判断目的蛋白已被适当分离后即可停止电泳。

3.2.6.4 Bio-Rad 的标准湿法转膜

(1) 裁剪大小适合的滤纸与 PVDF 膜，将 PVDF 膜置于甲醇中浸泡激活，并在右上角剪角标记。

(2) 按照顺序依次在转膜夹中放置海绵垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵垫，注意在将凝胶移至滤纸上时，应将浓缩胶轻轻切去，小心剥下分离胶至滤纸上，并调整方向，使凝胶和 PVDF 膜准确贴合，每层之间避免留气泡。

(3) 夹好之后将其放入转膜槽中，加入 1×转膜缓冲液，注意转膜夹的方向，黑面对槽的黑面，透明面对槽的红面。盖好保护罩后将转膜装置放置在冰浴中进行转膜。接通电源，Claudin-1 和 β-actin 转膜条件为恒流 200 mA, 60 min (Occludin 和 ZO-1 的转膜条件为恒流 350 mA, 120 min)。

3.2.6.5 封闭

转膜完毕后，根据目的蛋白分子量大小剪下 PVDF 膜，并在右上角剪角做标记，将剪好的蛋白膜立即置于预先配好的 5% 脱脂奶粉（TBST 稀释）中，一定要注意膜的保湿，然后置于摇床上，室温封闭 120 min，以消除抗体的非特异性结合。

3.2.6.6 一抗孵育

用封闭液稀释 β-actin 抗体（1:4000），Claudin-1 抗体（1:1000），Occludin 抗体（1:1000），ZO-1 抗体（1:1000）。弃去封闭液后，对应加入 4 mL 稀释好的一抗，4 °C 摇床孵育过夜。

3.2.6.7 二抗孵育

回收一抗后,用 $1 \times \text{TBST}$ 进行洗涤,置于摇床上缓慢摇动洗涤 10 min,共洗涤 3 次。弃去洗涤液后,各加入 4 mL 稀释好的二抗,室温摇床缓慢摇动孵育 2 h。回收二抗后,用 $1 \times \text{TBST}$ 再次洗涤,置于摇床上缓慢摇动洗涤 10 min,共洗涤 3 次。

3.2.6.8 化学发光

(1) 等体积混合 ECL 试剂 A 液和 B 液,制成 ECL 工作液避光放置备用。用平头镊子将蛋白膜取出,用吸水纸略吸去过多的液体(切勿接触膜的蛋白面),然后置于一洁净的保鲜膜上。根据蛋白膜的大小,按每 10 cm^2 膜加 1 mL ECL 工作液的比例,滴加到膜上,确保工作液均匀覆盖在膜上。

(2) 将膜蛋白面朝上放置在曝光区域中心进行曝光,调整曝光时间,以得到最好的结果。

3.2.6.9 Western blot 图像分析及处理

结果经 Image Pro Plus 软件转换成灰度格式,随后进行累积光密度值的分析, β -actin 蛋白条带作为上样量的内参标准,目的蛋白的表达量是面积和光密度的乘积,以此表达目的蛋白的表达水平。

3.2.7 数据统计分析

采用 SPSS 21 软件进行 Duncan 单因素方差分析(限制性水平 $P < 0.05$),实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$,用 Microsoft Excel 2013、GraphPad Prims 5 等软件进行图表的绘制和相关数据的处理。

3.3 结果与分析

3.3.1 单层模型评价结果

3.3.2.1 跨膜电阻值变化趋势

单层细胞跨膜电阻值是评价细胞单层完整性的最常用指标之一,TEER 值 $> 400 \Omega \text{ cm}^2$ 时即可认为细胞单层紧密连接已形成。Caco-2 细胞接种到 Transwell 小室中记为第 0 天,基本一周以后就会形成致密的单层。从第 10 天开始,每隔天测一次跨膜电阻。由图 3-2 可以看出,TEER 在第 10 天时已到达平台期,一直维持在 $600 \Omega \text{ cm}^2$ 以上,在第 18 天达到最高 $685 \pm 59 \Omega \text{ cm}^2$ 。

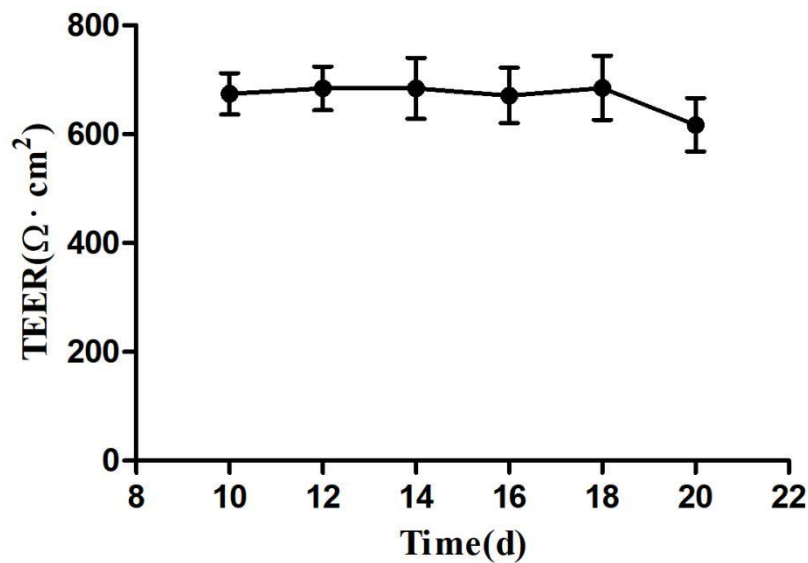


图 3-2 Caco-2 单层细胞跨膜电阻

Fig.3-2 Caco-2 single layer cell transmembrane resistance

3.3.2.2 碱性磷酸酶比值变化

在 Caco-2 细胞单层模型建立过程中，分别于第 5 天、第 9 天、第 13 天、第 17 天和第 21 天测定碱性磷酸酶（AKP）活性，并计算 AP/BL 的 AKP 活力比值。由表 3-10 可见，随着培养时间的延长，AKP 活力比值逐渐增加，并在第 21 天时达到最大值 5.99，可见细胞的极性标志酶--碱性磷酸酶已经大部分被限制在 AP 侧，细胞生长呈现出明显的极性（黄晶 2015）。

表 3-10 Caco-2 细胞单层 AP 侧与 BL 侧碱性磷酸酶活性比值

Table 3-10 Alkaline phosphatase activity ratio of single layer AP side and BL side of caco-2 cells

t/d	Ratio of AKP（AP/BL）
5	1.16 ± 0.10
9	2.15 ± 0.45
13	3.55 ± 0.29
17	5.40 ± 0.84
21	5.99 ± 0.97

3.3.2.3 荧光黄通量变化

细胞旁转运标记物从 AP 侧向 BL 侧的被动扩散表观渗透系数（Papp）可以反映单层细胞的通透性，本实验选择的荧光黄作为细胞旁转运标记物，测定其通透量并计算 Papp。荧光黄的 Papp 见表 3-11，其 Papp 值低于参考值（Qiang et al 2011），综合 TEER 和 AKP 比值结果，单层模型建立较为成功，可用于进一步试验。

表 3-11 细胞旁转运标记物荧光黄的 Papp

Table 3-11 The Papp of the cell transport marker fluorescein yellow

标记物	Papp($\times 10^{-6}$ cm/s)	
	实验值	参考值 (Zhang et al 2014)
荧光黄	0.88	< 1

3.3.2 MTT 测定结果

图 3-3 是不同浓度 MAP30 作用不同时间细胞存活率结果, 可见, 0-50 $\mu\text{g/mL}$ MAP30 作用组在 72 h 内细胞存活率没有显著性差异 ($P > 0.05$), 细胞存活率均在 90% 以上, 100 $\mu\text{g/mL}$ MAP30 组在作用 24、48、72 h 后, 细胞存活率分别降低了 11%、18%和 24%, 200 $\mu\text{g/mL}$ MAP30 组在作用 72 h 后细胞存活率降低至 76%, MAP30 对 Caco-2 细胞的作用效果呈现浓度和时间效应。0-50 $\mu\text{g/mL}$ 的 MAP30 作用对 Caco-2 细胞的生长增殖并无毒性作用, 故选择 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ 作为进一步试验的三个浓度梯度, 且作用时间不宜超过 72 h。

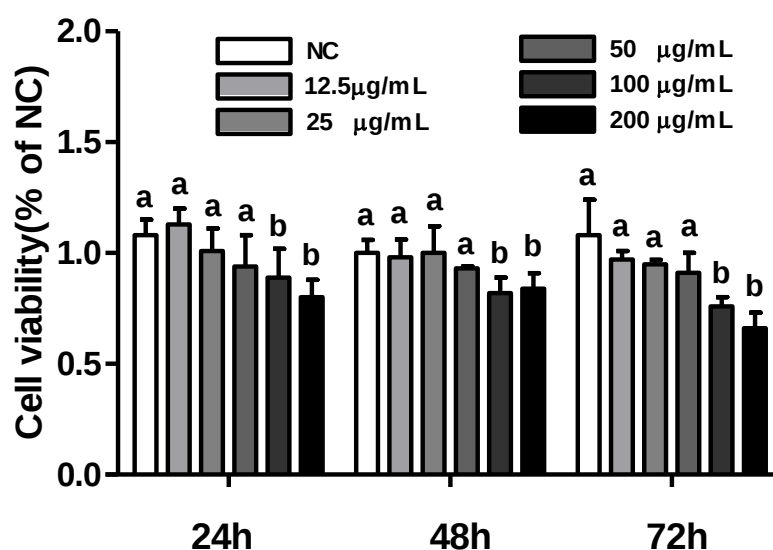


图 3-3 MAP30 对 Caco-2 细胞存活率的影响

Fig.3-3 Effect of dietary MAP30 on the cell viability of Caco-2 cells

3.3.3 跨膜电阻值与荧光黄通量测定结果

NC 组测量结果反映正常培养的 Caco-2 细胞单层模型的 TEER 值和 LY 通过量, LPS 组表示 LPS 诱导的 Caco-2 肠黏膜屏障损伤体外模型, L+LPS、M+LPS、H+LPS 则分别是在 LPS 损伤同时加入低、中、高剂量 MAP30 的损伤保护体外模型。TEER 值的降低代表着单层细胞完整性遭到破坏, 五组细胞单层的 TEER 值如图 3-4a 所示。经 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理 24 h 之后, 细胞单层的 TEER 值显著降低 (L+LPS、M+LPS、

H+LPS VS LPS, $P < 0.05$), 添加不同浓度 MAP30 的细胞与 LPS 损伤组相比, TEER 值显著回升 (NC VS LPS, $P < 0.05$), 且在 0-40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, TEER 值随着 MAP30 浓度的提高而升高。

LY 通过量的升高代表着单层细胞的通透性升高, 即紧密连接受到损伤。由图 3-4b 可见, 相比与 NC 组, LPS 组的 LY 通过量显著升高 (NC VS LPS, $P < 0.05$), L+LPS、M+LPS、H+LPS 组 LY 通过量都有不同程度的降低。LY 通过量的变化结果与 TEER 反应的结果一致, 不同浓度 MAP30 的添加对 LPS 引起的单层细胞紧密连接的损伤呈现出不同程度的改善作用。

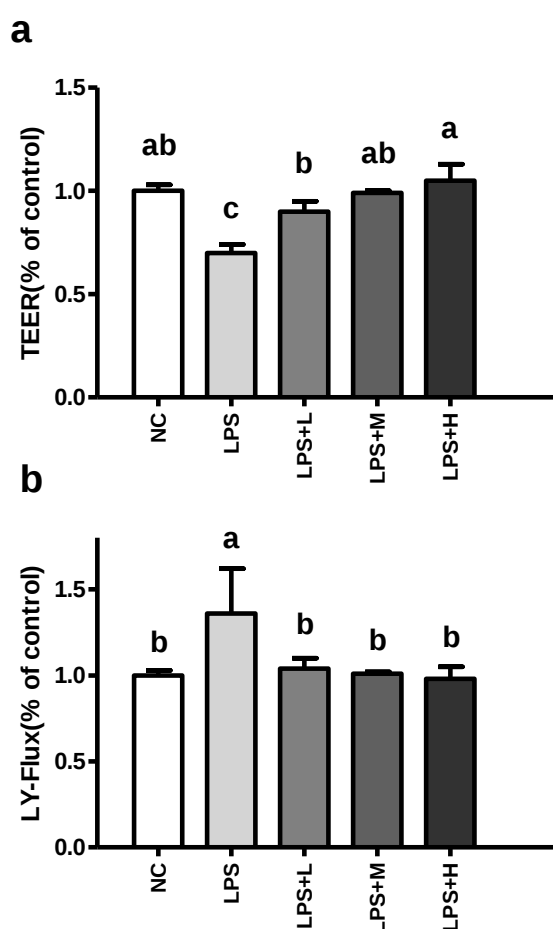


图 3-4 MAP30 对肠道紧密连接完整性和通透性的影响

Fig.3-4 The effects of MAP30 on the LPS-induced disruption of epithelial integrity and permeability

3.3.4 基因表达量测定结果

紧密连接蛋白有很多种, 本研究结合文献选取了在紧密连接中发挥重要作用的闭合蛋白 Claudin-1、闭锁蛋白 Occludin 和闭锁小带 ZO-1 三种蛋白进行检测。荧光

定量的融解曲线特异性良好, 选择 GAPDH 作为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较三种紧密连接蛋白相对基因表达量, 结果如图 3-5 所示。在转录水平上, LPS 作用组 Claudin-1, Occludin, ZO-1 mRNA 表达量均有所下调, 其中 ZO-1 表达量下调最多 (LPS vs NC, $P < 0.05$), 高达 49%。不同浓度 MAP30 处理组的相应 mRNA 表达量均显著回升 (MAP30+H vs NC, $P < 0.05$), 且相较于对照组, 高浓度 MAP30 作用组 (40 $\mu\text{g/mL}$) Claudin-1, Occludin, ZO-1 mRNA 表达量分别上调 55%, 37%和 49%。

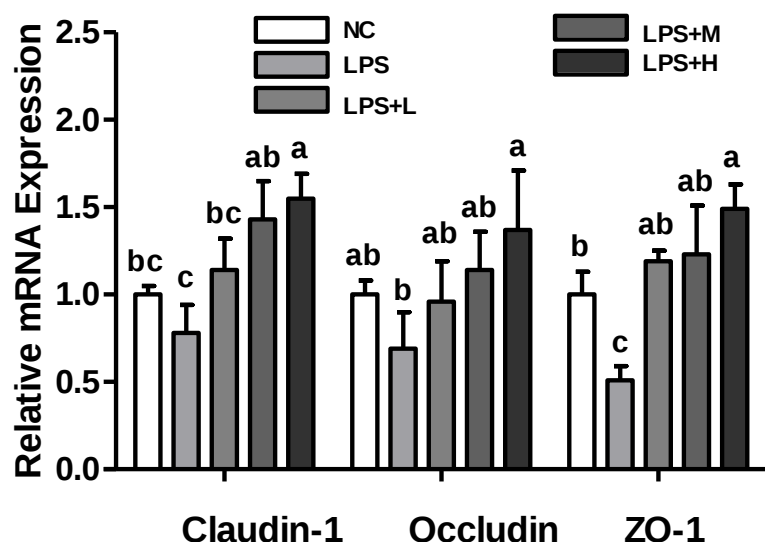


图 3-5 MAP30 对肠道紧密连接基因的影响

Fig.3-5 The effects of MAP30 on the mRNA expression of intestinal tight junction

3.3.5 蛋白表达量测定结果

在 Western Blot 实验中, 同样选择 Claudin-1、Occludin、ZO-1 三种紧密连接蛋白进行相对定量分析。三种蛋白的分子量大小分别在 23 kDa、59 kDa 和 191 kDa 左右。以 β -actin 作为内参标准, Western Blot 实验结果经 Image Pro Plus 软件灰度分析, Claudin-1、Occludin、ZO-1 的蛋白表达条带和相对表达量分别如图 3-6a、3-6b、3-6c 所示。相比于对照组, LPS 损伤组的紧密连接蛋白 Claudin-1, Occludin, 和 ZO-1 的表达分别降低了 34%, 11%和 28%, LPS 可能是通过下调紧密连接蛋白的表达, 导致肠道紧密连接损伤。在 LPS 损伤下, 添加不同浓度 MAP30, Claudin-1, Occludin, 和 ZO-1 蛋白表达量均明显回升 (MAP30+M, MAP30+H vs LPS, $P < 0.05$) 且在 0-40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, MAP30 浓度越高, 紧密连接蛋白表达量上调越明显。

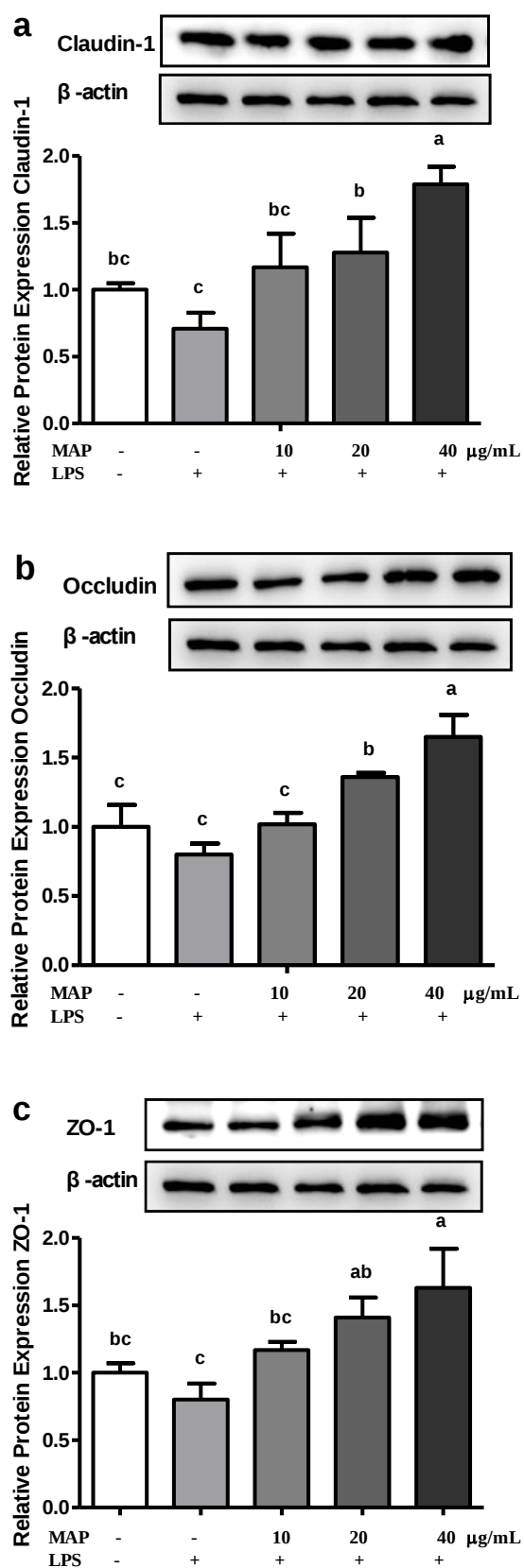


图 3-6 MAP30 对肠道紧密连接蛋白表达的影响

Fig.3-6 The effects of MAP30 on the protein expression of intestinal tight junction

3.3.6 通路因子表达量测定结果

MLCK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 它催化 MLC 蛋白磷酸化, 刺激肌动蛋白/肌球蛋白交界周丝的收缩, 从而导致 TJ 的通透性升高 (Chaithanya et al, 2018)。因此, MLCK 表达升高表示促炎细胞因子诱导的 TJ 屏障破坏。如图 3-7a 所示, 相比于对照组, LPS 损伤组的 NF κ B 和 MLCK 表达均上调 2-3 倍 ($P < 0.05$), 且 MAP30 能有效改善这种下调, 高浓度 MAP30 处理组的 NF κ B 和 MLCK 表达量均下降至对照组同一水平。与 NF κ B-MLCK 通路相反, ERK1/2-MAP 信号通路的表达量下调代表着肠道紧密连接被破坏。ERK1/2 和 MAP 的表达结果见图 3-7b, LPS 导致 ERK1/2 和 MAP 的表达量分别下调 40%和 22%, 中、低浓度 MAP30 组中 ERK1/2 和 MAP 表达量未见明显回升 (MAP30+L, MAP30+M vs LPS, $P > 0.05$), 高浓度 MAP30 组的表达量均显著上调, 且显著高于对照组 (MAP30+H vs NC, $P < 0.05$)。

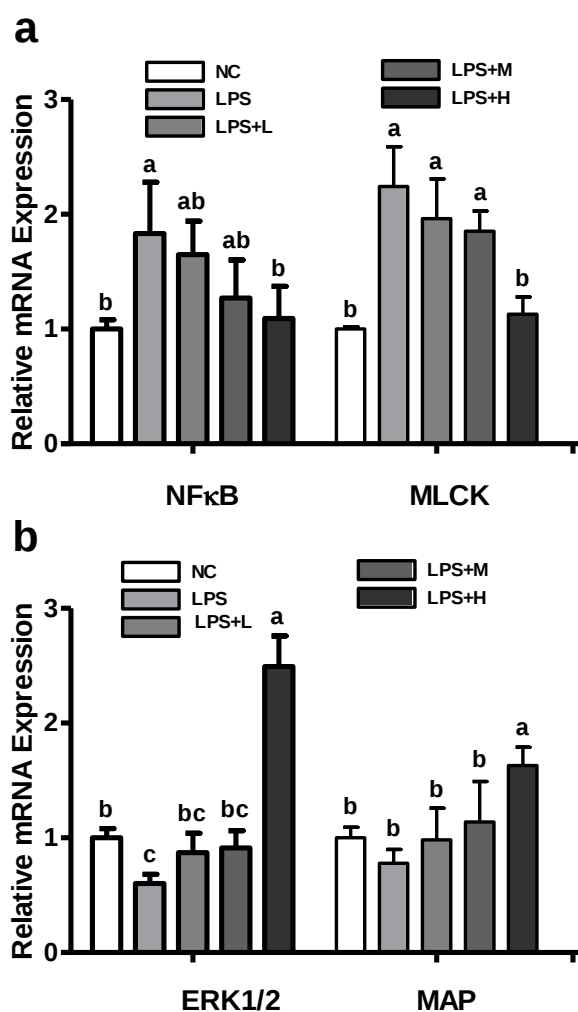


图 3-7 MAP30 对 NF κ B-MLCK 和 ERK1/2-MAP 通路的影响

Fig.3-7 The effect of MAP30 on the expression of NF κ B-MLCK and ERK1/2-MAP pathway

3.4 讨论

肠道紧密连接屏障的损伤，往往随之而来的就是肠道微生态失调。据统计，全世界约 20% 的肿瘤由细菌引起（Martel et al 2012），细菌可穿过损伤状态下的肠道屏障进入肝肠循环甚至血液循环，进而引发一系列消化、血液系统肿瘤的发生（Clavel et al 2017），另外肠道菌群比例失调及细菌易位可以促进肿瘤细胞的增殖及侵袭（Scarpellini et al 2015），可见维持和加强肠道屏障功能是预防和治疗癌症等多种机体疾病的关键。目前，基于 MAP30 的研究多集于抗病毒抗肿瘤等方面，而其对肠道疾病方面的影响尚未明确。故本章通过建立 Caco-2 单层细胞模型模拟肠道紧密连接结构，选用实验室自提纯化的 MAP30 作用于肠道屏障紧密连接损伤模型，通过测定细胞单层完整性、通透性、蛋白基因以及相关信号通路的表达水平，试图揭示 MAP30 蛋白对肠道紧密连接的影响及其作用机制，为 MAP30 在肠道免疫损伤修复方面的应用提供理论基础。

LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的重要组成部分，在介导 IBD 肠道炎症反应中发挥重要作用（Chelakkot et al 2018），LPS 损伤模型广泛应用于肠道 TJ 屏障的研究。本章采用 LPS 损伤细胞单层模型，结果可知 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 作用 24 h 在不损伤细胞的基础上，显著改变了单层模型的完整性和通透性，与对照组相比，TEER 值降低了 30%，LY-Flux 升高了 36%。Nighot 等（2017）报道，100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 作用 3 d 导致 Caco-2 单层 TEER 值降低 43% 左右，LY-Flux 升高至对照组的 6 倍，作用呈现时间依赖性，且 LPS 是通过介导 TLR-4/MyD88 信号转导通路上调 MLCK 表达水平，从而提高肠通透性，与本章研究结果较为一致。

TEER 和 LY 通过量是内皮细胞和上皮细胞单层培养模型中被广泛接受的测量紧密连接动力学完整性的定量指标（Srinivasan et al 2015, Trevisi et al 2009）。大量研究发现多种氨基酸，如色氨酸、谷氨酸、精氨酸等，在适宜浓度下可通过调节 TEER 值、FD4 通过量或 LY 通过量有效改善肠道屏障损伤（Jiao et al 2015, Wang et al 2015, Chen et al 2017）。另外，低蛋氨酸水平也能改善 TNF- α 诱导的肠道屏障损伤（申晓婷 2017），而本研究发现 MAP30 中色氨酸、谷氨酸、精氨酸等含量均较高，蛋氨酸含量低，猜测 MAP30 对肠道功能的调控作用可能与其氨基酸的组成有关。

MAP30 作为 RIPs 的一种，在所选浓度下不仅对 Caco-2 细胞的形态和活力无显著影响，且能改善 LPS 导致的紧密连接损伤。大量研究发现活性蛋白和多肽，如鸡

蛋胶质蛋白、乳清蛋白水解物和胶原蛋白肽等，在临床前研究中被发现可以改善肠道炎症，修复肠道屏障损伤（Xu 2012, Iskandar 2013, Mukhopadhyaya 2015）。本章实验中 MAP30 蛋白对脂多糖诱导的 Caco-2 细胞单层紧密连接主要蛋白和基因表达的影响与文献报道一致。与对照组相比，高浓度（40 $\mu\text{g/mL}$ ）MAP30 作用 24 h，细胞中 Claudin-1、Occludin-1 和 ZO-1 的蛋白表达量分别上调 79%、65%和 63%，mRNA 表达量分别上调 55%、37%和 49%，在分子水平上，推测 MAP30 是通过调控单层细胞 TJ 蛋白及 mRNA 的表达水平实现的。

在信号通路水平上，MAP30 显著上调修复因子 ERK1/2 以及 MAP 的表达量，显著下调炎症因子 NF κ B 和 MLCK 的表达量，Wang 等研究肠道屏障调控机制发现 LPS/TNF- α 作为损伤剂，二者的表达量上调均会刺激 NF κ B 信号转导，进而上调 MLCK 表达，从而破坏肠道紧密连接（Wang 2005），说明 MAP30 可能是通过激活 ERK1/2-MAP 通路和抑制 NF κ B-MLCK 信号通路来调控相关蛋白基因的表达的。

肠道屏障损伤后肠道细菌引发癌症主要是通过激活相关信号通路实现的，已有研究发现，LPS 的配体 TLR4 可以促进肝癌、胃癌、结肠癌以及皮肤癌症的发生（Yang et al 2017），其促癌作用的关键一方面是激活 NF κ B 途径、转录激活因子以及多种白细胞介素的表达（Mao et al 2017），另一方面是促进髓样分化因子初级应答基因 MYD88 信号转导的天然免疫激活，进而促发抗细胞的抗凋亡机制，导致癌症的发生（Alvarado et al 2017）。MAP30 发挥其抗肿瘤活性的其中一条机制为调节白细胞介素-6（IL-6）核转录因子 NF κ B 及肿瘤坏死因子 TNF- α 等细胞因子的表达水平，进而调控蛋白质的合成和表达，白细胞介素和 TNF- α 都是已知的调节肠道紧密连接的重要细胞因子（Capaldo 2009），而 TNF- α 刺激 NF κ B 信号转导是紧密连接调节相关的另一条主要机制。结合本研究结果可见，MAP30 调节肠道屏障损伤的机制是非常复杂的，除已知的 ERK1/2-MAP、NF κ B-MLCK 等信号通路外，可能还与其他信号通路相关，有待进一步研究探索。

3.5 结论

（1）MAP30 在 0-50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内对 Caco-2 细胞无明显毒性作用，选择 10，20，40 $\mu\text{g/mL}$ 作为 MAP30 对紧密连接模型的作用浓度。

（2）TEER 值和 LY-Flux 测定结果显示：0-40 $\mu\text{g/mL}$ 的 MAP30 蛋白对 LPS 介导的 TEER 值降低和 LY-Flux 升高均有不同程度的改善效果，且效果呈现剂量效应，

MAP30 可有效保护肠道紧密连接的完整性和通透性。

（3）Western blot 和 qPCR 分析结果显示：不同浓度的 MAP30 可显著改善 LPS 介导的主要 TJ 蛋白 Claudin-1、Occludin-1 和 ZO-1 的蛋白和 mRNA 表达量下调，且对 Claudin-1 的影响最为显著。

（4）在分子水平上，MAP30 可能是通过激活 ERK1/2-MAP 通路和抑制 NF κ B-MLCK 信号通路来调控相关蛋白基因的表达，进而改善肠道紧密连接损伤的。

第四章 MAP30 中色氨酸对肠道紧密连接的影响研究

氨基酸对肠道屏障功能、肠道发育以及细胞增殖具有重要的作用(李小兰 2016),从 MAP30 的氨基酸组成来看,必需氨基酸中色氨酸含量最高。色氨酸是一种食物或饲料中的限制性氨基酸,国内外研究表明,添加适宜剂量色氨酸的饲料可以提高断奶仔猪的生长性能和肠道健康,而高剂量的色氨酸添加会增加肠道通透性,破坏紧密连接结构,但在细胞水平上研究色氨酸对肠道紧密连接影响的报道较少,其作用机制也不明确。

本章试验拟从保护和修复两方面,找到适宜的增强肠道紧密连接功能的色氨酸浓度,并初步揭示色氨酸缓解肠道紧密连接损伤的分子机制。从宏观上对紧密连接完整性和通透性,蛋白和分子水平上对紧密连接蛋白和基因以及相关信号通路的影响等方面,揭示色氨酸在 MAP30 对肠道紧密连接功能调控中的贡献。

4.1 实验材料

4.1.1 实验原料

色氨酸(HPLC $\geq 98\%$),购自源叶生物;人结直肠腺癌细胞株(human colon carcinoma cell line,Caco-2),购于 ATCC 细胞库。

4.1.2 主要试剂

同第三章 3.1.2。

4.1.3 主要仪器

同第三章 3.1.3。

4.2 实验方法

4.2.1 主要溶液的配制

同第三章 3.2.1。

4.2.2 细胞单层模型的建立与评价

4.2.2.1 Caco-2 细胞的培养

Caco-2 细胞培养相关技术同第二章 2.2.4.1。

4.2.2.2 Caco-2 单层细胞模型的建立

Caco-2 单层细胞模型的建立同第三章 3.2.2.2。

4.2.2.3 Caco-2 单层细胞模型的评价

Caco-2 单层细胞模型的建立同第三章 3.2.2.2。

4.2.2.4 细胞分组

培养至 21 d 形成单层的 Caco-2 细胞模型，根据是否加入 LPS 和色氨酸以及色氨酸浓度将细胞分为空白对照组，LPS 损伤组，低、中、高浓度色氨酸组。NC 组继续用 DMEM 培养基培养，LPS 组 AP 测换成含 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的 DMEM 培养基培养，色氨酸高、中、低组换成含 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和不同浓度色氨酸的 DMEM 培养基培养。另外，根据作用时间的不同，将色氨酸作用组分为保护组和修复组，其中，保护组不同浓度的色氨酸和 LPS 同时加入 DMEM 培养基中对细胞进行培养，而修复组则是 LPS 作用对细胞造成损伤后，再用含有不同浓度色氨酸的 DMEM 培养基进行培养修复。每次实验每组至少设 3 个孔。其中，NC：阴性对照组；LPS：100 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖损伤组；LPS+L：脂多糖损伤+ 4 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸组；LPS+M：脂多糖损伤+ 8 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸组；LPS+H：脂多糖损伤+ 16 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸组。

4.2.3 MTT 法检测 MAP30 对 Caco-2 生长增殖的影响

方法同 2.2.4.2。

用药浓度梯度：0 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 。

用药时间：24 h、48 h、72 h。

4.2.4 跨膜电阻值与荧光黄通量测定

方法同 3.2.2.3(2)。

4.2.5 基因表达量测定

实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, qPCR)检测 Claudin-1, Occludin, ZO-1, NF κ B, MLCK, ERK1/2, MAP 的基因表达。

方法同 3.2.5。

4.2.6 蛋白表达量测定

Western blot 检测 Claudin-1, Occludin, ZO-1 的蛋白表达。

方法同 3.2.6。

4.2.7 数据统计分析

采用SPSS 21软件进行Duncan单因素方差分析（限制性水平 $P < 0.05$ ），实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$ ，用Microsoft Excel 2013、GraphPad Prims 5等软件进行图表的绘制和相关数据的处理。

4.3 结果与分析

4.3.1 MTT 测定结果

图 4-1 是不同浓度色氨酸作用不同时间对可见，相比于对照组，0-16 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸作用组在 72 h 内细胞存活率没有显著性差异（ $P > 0.05$ ），细胞存活率均在 95% 以上，32 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸组在作用 72 h 后，细胞存活率降低了 17%，且呈现出轻微的时间效应。适宜浓度（0-16 $\mu\text{g/mL}$ ）的色氨酸作用对 Caco-2 细胞的生长增殖并无毒性作用，故选择 4, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$ 作为进一步试验的三个浓度梯度。

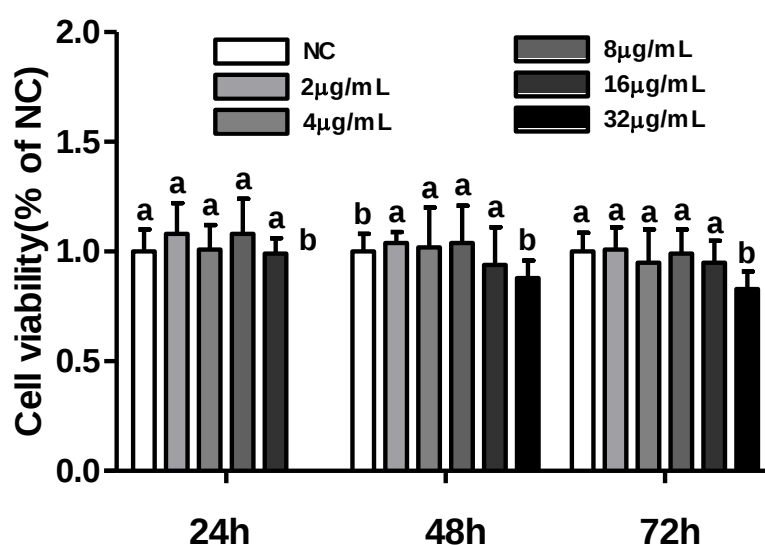


图 4-1 色氨酸对 Caco-2 细胞存活率的影响

Fig.4-1 Effect of dietary L-Trp on the cell viability of Caco-2 cells

4.3.2 跨膜电阻值和荧光黄通量变化

通过测定细胞单层的 TEER 值和 LY 通过量反应色氨酸对单层紧密连接的保护和修复作用，结果见图 4-2。同时加入 LPS 和不同浓度的色氨酸培养细胞探究不同浓度色氨酸对紧密连接的保护作用。由图 4-2a 可见，LPS 作用 24 h 后，Caco-2 细胞的 TEER 值显著降低（LPS vs NC, $P < 0.05$ ），而加入不同浓度色氨酸的细胞组，TEER 值明显回升。单层细胞的 LY 通过量结果与 TEER 一致，LPS 导致的 LY 通

过量升高可被 4 $\mu\text{g/mL}$ 和 8 $\mu\text{g/mL}$ 的色氨酸有效降低（LPS vs LPS+L, LPS+M, $P < 0.05$ ），而 16 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸组的 LY 通过量并无显著降低，见图 4-2b。

另一方面，通过加入不同浓度的色氨酸到预先 LPS 损伤 24 h 的细胞组中探究色氨酸对单层细胞紧密连接的修复作用。由图 4-2a 可见，100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 作用细胞单层 24 h 后，TEER 值显著降低（LPS vs NC, $P < 0.05$ ），8 $\mu\text{g/mL}$ 和 16 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸组与对照组的 TEER 值无显著差异（ $P > 0.05$ ）。对于 LY 通量，4 $\mu\text{g/mL}$ 和 8 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸能显著改善 LPS 导致的 LY 通过量的升高（LPS vs LPS+L, LPS+M, $P < 0.05$ ），而 16 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸组的 LY 通过量与 LPS 组无明显差异，见图 4-2b。由此可见，较低浓度的色氨酸可有效缓解 LPS 导致的紧密连接损伤，而高浓度色氨酸（16 $\mu\text{g/mL}$ ）并未对此损伤表现出改善效果。

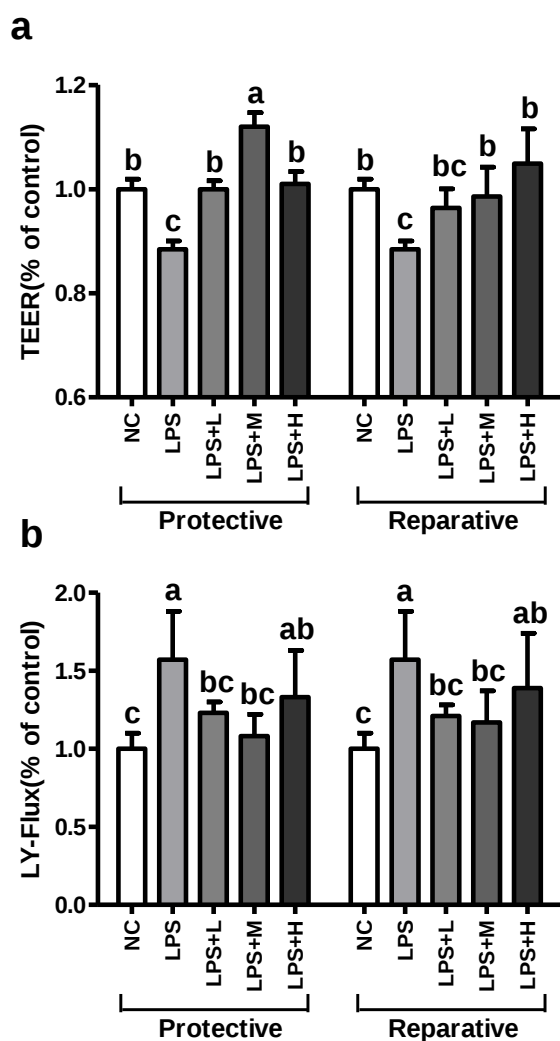


图 4-2 色氨酸对肠道紧密连接完整性和通透性的影响

Fig.4-2 The effects of L-Trp on LPS-induced disruption of epithelial integrity and permeability

4.3.3 基因表达量测定结果

图 4-3 显示了 Caco-2 单层细胞在不同浓度色氨酸作用下 Claudin-1, Occludin 和 ZO-1 mRNA 的表达量。由图可见,在转录水平上,LPS 组 Claudin-1 的 mRNA 表达量显著下调 ($P < 0.05$),而这种下调在不同浓度色氨酸组都显著变缓(LPS vs LPS+M, LPS+H, $P < 0.05$),且由结果可知,Claudin-1 的 mRNA 表达量与色氨酸浓度之间存在轻微的剂量效应。比较 NC 组和 LPS 作用组 Occludin 的 mRNA 表达量,二者没有显著性差异(LPS vs NC, $P > 0.05$),LPS 组 ZO-1 的 mRNA 表达量显著降低 (LPS vs NC, $P < 0.05$),在且仅在 8 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸作用下有轻微回升 ($P > 0.05$),说明色氨酸主要通过调节 Claudin-1 的转录表达量改善 LPS 导致的肠道紧密连接损伤。

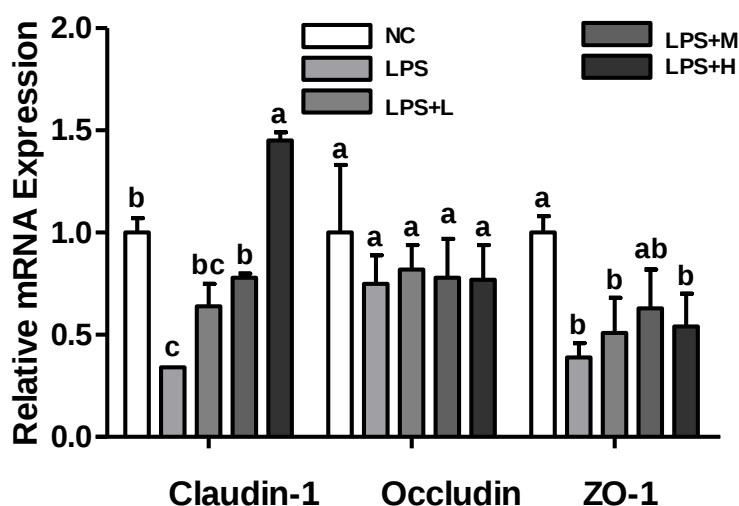


图 4-3 色氨酸对肠道紧密连接基因的影响

Fig.4-3 The effects of L-Trp on the mRNA expression of intestinal tight junction

4.3.4 蛋白表达量测定结果

Western blot 结果显示,相比于 NC 组,LPS 作用组的紧密连接蛋白表达量显著降低,Claudin-1, Occludin,和 ZO-1 的表达量分别下降 39%, 28%, 和 29%, 8 $\mu\text{g/mL}$ 和 16 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸保护组的 Claudin-1 表达量显著回升 (LPS+M, LPS+H vs LPS $P < 0.05$), Occludin 和 ZO-1 表达量变化不显著 (LPS+M, LPS+H vs LPS $P > 0.05$),结果见图 4-4A。

对于色氨酸修复组,细胞单层被 LPS 预先损伤后,高浓度色氨酸组(16 $\mu\text{g/mL}$)的 Claudin-1 的表达量显著回升 (LPS+H vs LPS $P < 0.05$),较低浓度色氨酸组表达量与 LPS 损伤组无显著性差异。且 LPS 损伤后,不同浓度色氨酸组 Occludin 和 ZO-1 的表达量均未见显著回升,结果见图 4-4B。

综合保护组和修复组蛋白表达结果可见，色氨酸对 LPS 导致的紧密连接损伤的修复作用较保护作用弱。

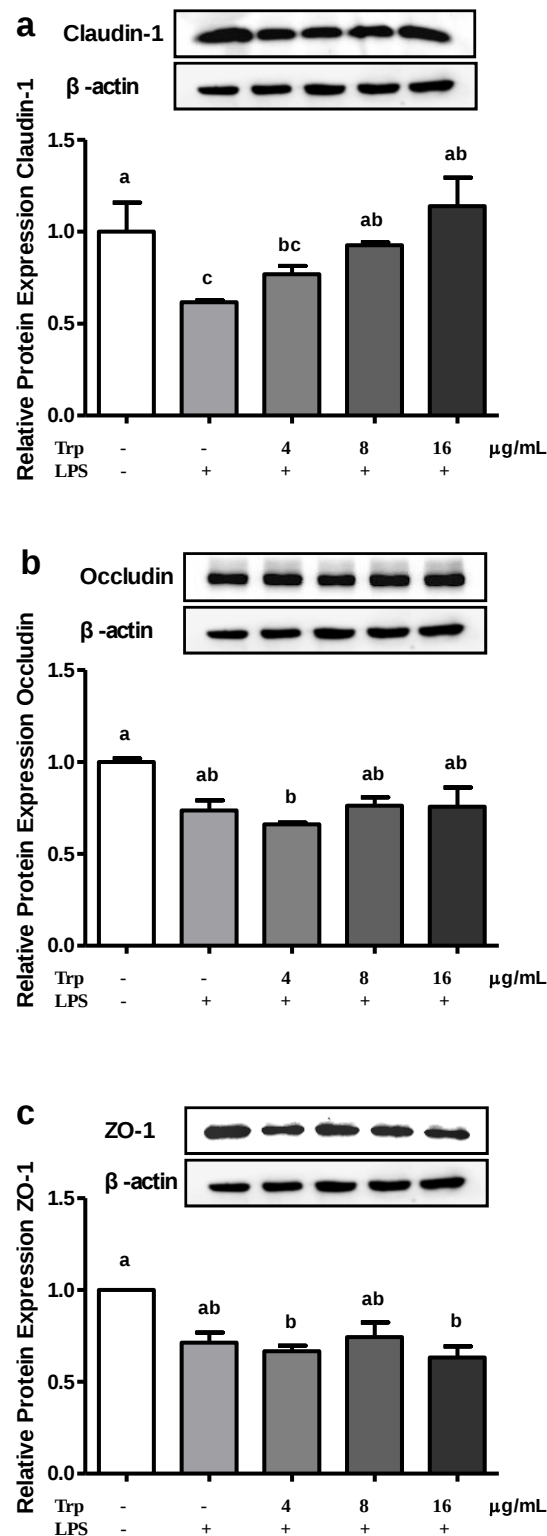


图 4-4A 色氨酸对肠道紧密连接蛋白表达的保护作用

Fig.4-4A The protective effects of L-Trp on the protein expression of intestinal tight junction

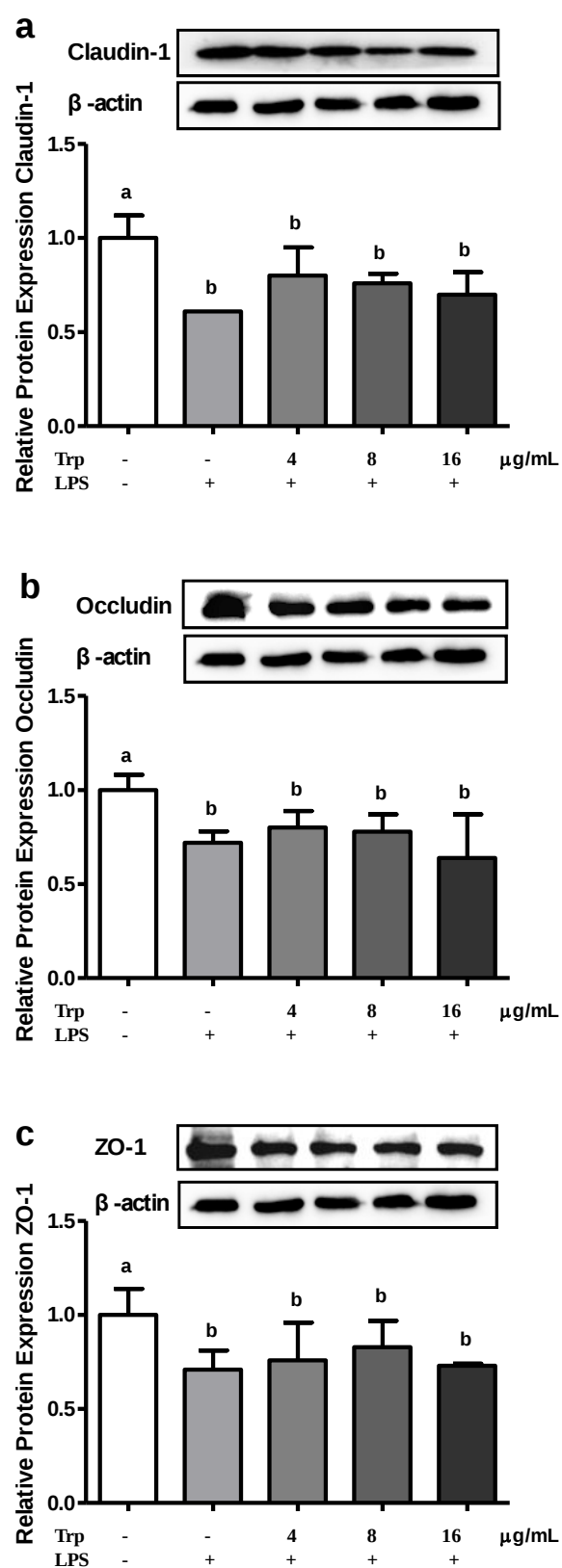


图 4-4B 色氨酸对肠道紧密连接蛋白表达的修复作用

Fig.4-4B The reparative effects of L-Trp on the protein expression of intestinal tight junction

4.3.5 通路因子表达量测定结果

单层细胞的 NF κ B, MLCK, ERK1/2, 和 MAP mRNA 表达量变化如图 4-5 所示。由图 4-5a 可知, LPS 导致 Caco-2 细胞的 NF κ B 和 MLCK mRNA 表达量比 NC 组上调 3-4 倍 ($P < 0.05$), 这种上调在低浓度色氨酸组有所改善, 在中、高浓度色氨酸组被显著改善, 与 NC 组表达量无显著性差异 (LPS+M, LPS+H vs NC $P < 0.05$)。另一方面, 如图 4-5b, 与 NC 组相比, 不同浓度色氨酸均有效改善 LPS 导致的 ERK1/2 和 MAP 的 mRNA 表达量下调 (LPS+M, LPS+H vs LPS, $P < 0.05$), 色氨酸可能通过调控 ERK1/2 和 MAP 等细胞因子的表达, 实现肠道紧密连接功能的保护作用。

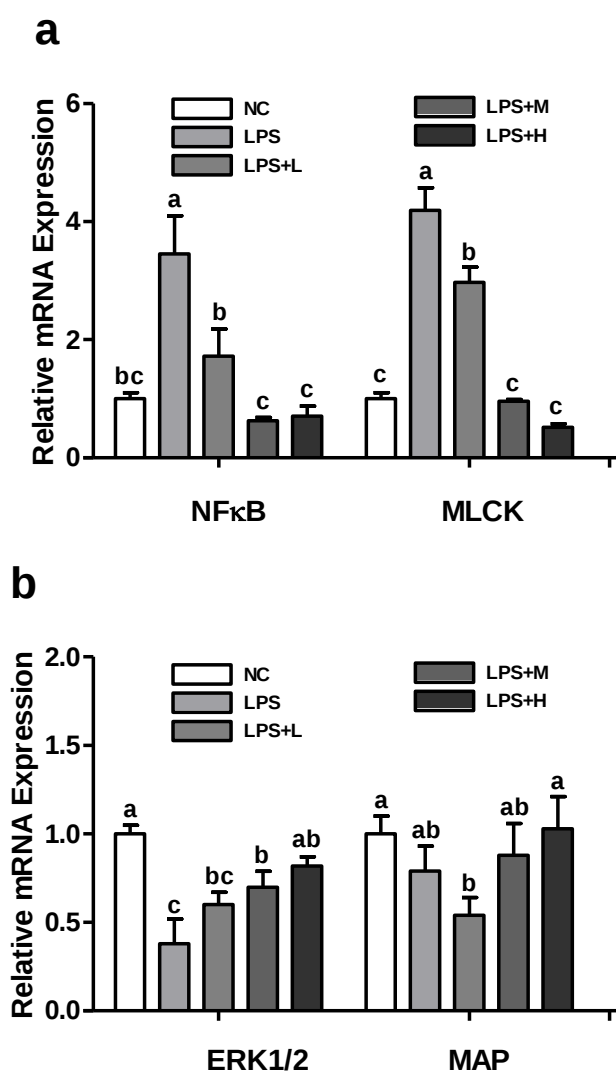


图 4-5 色氨酸对 NF κ B-MLCK 和 ERK1/2-MAP 通路的影响

Fig.4-5 The effect of L-Trp on the expression of NF κ B-MLCK and ERK1/2-MAP pathway

4.4 讨论

肠上皮屏障在阻止病原微生物、病原抗原和有毒物质从肠腔进入体循环中起着至关重要的作用 (Wang et al 2016)。肠道屏障功能的损伤导致这些物质进入人体, 随后引发胃肠道炎症。而脂多糖除了具有引起感染和多器官功能衰竭的作用外, 在肠屏障功能障碍的发生和发展中也起着重要的作用 (Nighot et al 2017, Guo et al 2013, Jin et al 2019)。与之前的研究结果一致 (Wu et al 2018, Zheng et al 2018), 本章研究发现 LPS 可能是通过下调紧密连接主要蛋白 Claudin-1, Occludin 和 ZO-1 的 mRNA 和蛋白表达量, 激活 NF κ B-MLCK 信号通路和抑制 ERK1/2-MAP 信号通路的表达实现的。

色氨酸, 作为八种必需氨基酸之一, 是唯一含有吲哚结构的氨基酸, 能被肠道细菌分解代谢产生多种吲哚衍生物, 这些吲哚衍生物被认为可以通过增加参与维持上皮细胞结构和功能的基因表达来增强肠上皮屏障功能 (Bansal et al 2010, Swimm et al 2018)。最近的研究表明, 含有吲哚结构的分子, 如色氨酸, 通过增加紧密连接相关蛋白, 如 claudins 和 occludins 的表达, 增强上皮屏障功能 (Shimada et al 2013), 从结构基础上解释了色氨酸对 TJ 屏障功能具有保护作用的原因。Liang 等 (2018) 研究发现, 喂食添加色氨酸的饲料 4 周后, 仔猪肠道紧密连接蛋白丰度增加, 3-吲哚乙酸和吲哚浓度升高。据此我们推测, 色氨酸对 TJ 屏障完整性和功能的调节作用可能与其吲哚结构有关。

在本研究中, 我们发现在 4-16 μ g/mL 浓度范围内, 色氨酸可显著改善 LPS 导致的紧密连接蛋白 Claudin-1 的蛋白质和 mRNA 表达量的下调, 部分改善 ZO-1 的表达下调, 对 Occludin 的表达下调没有显著的影响。综合蛋白、基因以及通路因子表达量变化结果, 我们可以看到, 色氨酸对紧密连接通路细胞因子和转录调节因子表达的影响是普遍存在的, 但对相关蛋白和基因表达的调控是具有特异性的, 在本章研究中仅通过调节 Claudin-1 的蛋白和 mRNA 表达量实现。这一假设与其他一些研究结果相符合, 如 Liang 等 (2018) 发现加入 0.1% 的色氨酸只能提高 Occludin 的表达量, Corl 等 (2008) 研究发现在饲料中加入 1% 的谷氨酸能提高仔猪 Occludin、Claudin-1 和 ZO-2 的表达量, 但对 Claudin-3、Claudin-4 以及 ZO-1 的表达量无显著影响, 而饲料中添加氨基酸混合物可以通过增加几乎所有 TJ 蛋白的丰度来增强仔猪的肠道功能 (Yi et al 2018)。因此, 针对不同氨基酸的特异性作用, 合成不同氨基

酸的配方也许可以更好地修复肠道损伤，提高肠道的屏障功能。

NFκB-MLCK 信号通路在肠道上皮屏障功能调节方面起着至关重要的作用（Trevisi et al 2009, Koopmans et al 2012, Silva et al 2014）。肌球蛋白轻链激酶（MLCK）是一种促进肌球蛋白轻链磷酸化的 Ca^{2+} / 钙调蛋白活化酶，而越来越多的文献表明 NFκB 是炎症基因表达的重要调节因子（Chen et al 2008, Ye et al 2008）。已有研究表明，膳食谷氨酸可能通过抑制 NFκB-MLCK 信号通路增强肠道屏障功能，从而缓解肠源性疾病（Liu et al 2018）。与此一致的是，本章研究发现 LPS 作用会显著提高单层细胞 NFκB 和 MLCK 的 mRNA 表达量，而这种升高又被色氨酸有效缓解，即色氨酸可完全抑制 LPS 导致的 NFκB-MLCK 通路活化。本研究的另一个新颖而重要的发现是，LPS 导致 ERK1/2 和 MAP 的表达谱发生显著改变。作为一种蛋白激酶，ERK 及其磷酸化可以调控包括 MAP 在内的一些转录因子的活性，进而调控细胞的代谢和功能，以及包括 Claudins 和 Occludin 在内的特定蛋白的活性和表达（Song et al 2015）。本研究中，在用色氨酸预处理细胞单层后，我们注意到 ERK1/2 和 MAP 的 mRNA 表达呈时间和剂量依赖性增加。据我们所知，这是关于氨基酸对 ERK1/2-MAP 通路影响的首次研究。然而，活性物质如益生菌分泌蛋白、白细胞介素 22 和布拉迪酵母等已被证实可通过调节 ERK1/2-MAP 信号通路或 ERK1/2 和 MAP 激酶依赖机制提高肠道屏障功能（Seth et al 2008, Czerucka et al 2000, Stephan et al 2006）。综合 NFκB-MLCK 信号通路的结果，我们猜测色氨酸可能是通过抑制 NFκB-MLCK 信号通路和激活 ERK1/2-MAP 通路实现对肠道紧密连接屏障损伤的改善作用。另外有研究发现，色氨酸（Wang et al 2015）和谷氨酸（Trevisi et al 2009）分别通过激活 mTOR 和 CaMK 激酶 2-AMP 激活的蛋白激酶信号通路增强猪肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达，因此可能还有其他机制调节色氨酸对肠紧密连接的影响，有待进一步研究。

4.5 结论

本章实验将不同浓度的色氨酸加入 LPS 诱导损伤的单层细胞模型中，根据色氨酸加入时间的不同分别探究色氨酸对肠道紧密连接的保护作用和修复作用。得出以下结论：

（1）色氨酸在 0-16 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内不会对 Caco-2 细胞的生长繁殖产生显著影响，其中 8 $\mu\text{g/mL}$ 和 16 $\mu\text{g/mL}$ 色氨酸能有效改善 LPS 导致的 TEER 值的降低，4

μg/mL 和 8 μg/mL 色氨酸能显著降低 LPS 导致的 LY 通过量的升高,从而保护和修复肠道紧密连接的完整性和通透性,且保护作用效果较修复作用明显。

(2)在蛋白表达水平上,8 μg/mL 和 16 μg/mL 的色氨酸对 LPS 导致的 Claudin-1 蛋白表达量下调有显著的改善作用,对 Occludin 和 ZO-1 表达量影响不显著;高浓度的色氨酸(16 μg/mL)修复使 Claudin-1 的表达量显著回升,对 Occludin 和 ZO-1 的表达量影响不显著。可见,色氨酸主要通过改善 LPS 导致的紧密连接蛋白 Claudin-1 的蛋白表达下调来保护和修复肠道紧密连接,且保护作用优于修复作用。

(3)在转录水平上,不同浓度色氨酸均能显著缓解 LPS 导致的 Claudin-1 mRNA 表达量下调,8 μg/mL 色氨酸能轻微缓解 Occludin 的 mRNA 表达量下调,色氨酸对 Occludin 的表达量的影响不显著。说明色氨酸可能主要是通过调节 Claudin-1 的转录表达量改善 LPS 导致的肠道紧密连接损伤。

(4)在信号通路方面,推测色氨酸与 MAP30 的作用机制相同,可能是通过抑制 NFκB-MLCK 信号通路和激活 ERK1/2-MAP 通路共同实现对 LPS 导致的肠道紧密连接屏障损伤的保护作用。

(5)色氨酸对肠道紧密连接损伤的改善作用略弱于 MAP30,猜想色氨酸在 MAP30 对肠道紧密连接的调控中起作用,但在这个过程中可能还有其他氨基酸或活性结构的贡献,有待进一步研究。

第五章 结论

本论文为对苦瓜籽进行高值化开发利用，从苦瓜籽中分离得到高纯度 MAP30 蛋白，并验证其具有显著的肿瘤抑制活性，在此基础上，从肠道紧密连接的角度探究 MAP30 对肠道屏障损伤的改善机制，并进一步研究了 MAP30 中主要必需氨基酸色氨酸对肠道屏障紧密连接的保护和修复作用。结果如下：

100 g 苦瓜籽粉经 0.15 M NaCl 浸提，硫酸铵分级沉淀，DEAE-Sepharose CL 6B 和 Sephadex G75 层析柱梯度洗脱，分离得到 61.2 mg 样品，提取率为 0.61‰；样品经 SDS-PAGE 电泳呈现 30 kDa 附近单一条带，经 Nano LC-MS/MS 鉴定所得样品即为苦瓜籽核糖体失活蛋白 MAP30，匹配度达 99%；经验证，所得 MAP30 对 HepG2、SGC7901 和 B16 细胞均有增殖抑制作用，且抑制活性 B16 > SGC7901 > HepG2。

建立 Caco-2 细胞单层模型，脂多糖诱导模拟肠道屏障紧密连接损伤，同时添加不同浓度的 MAP30 以探究 MAP30 对肠道紧密连接的保护作用。通过测定细胞单层的 TEER 值和 LY-Flux，主要紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 蛋白、基因的表达量以及相关信号通路因子 ERK1/2、MAP、NFκB、MLCK 表达量的变化，发现 10-40 μg/mL MAP30 均能有效改善脂多糖导致的肠道紧密连接损伤，增强肠道屏障功能；MAP30 可能是通过激活 ERK1/2-MAP 通路和抑制 NFκB-MLCK 信号通路，上调 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 蛋白、基因的表达，改善紧密连接的完整性、通透性，实现对肠道紧密连接损伤的改善作用。

从保护和修复两方面研究 MAP30 中主要必需氨基酸色氨酸对肠道紧密连接的影响机制，发现 4-16 μg/mL 范围内，低浓度色氨酸添加能有效改善肠道紧密连接损伤，且保护作用优于修复作用，高浓度色氨酸对紧密连接损伤的改善作用不显著；适宜浓度色氨酸可能是通过激活 ERK1/2-MAP 通路和抑制 NFκB-MLCK 信号通路，上调 Claudin-1 的蛋白、基因表达量，改善紧密连接的完整性、通透性，实现对肠道紧密连接损伤的改善作用。

MAP30 对肠道紧密连接损伤的改善作用优于色氨酸，猜想色氨酸在 MAP30 对肠道紧密连接的调控中起作用，但在这个过程中可能还有其他氨基酸或活性结构的贡献。

展望

MAP30 是植物性蛋白,在临床应用上受到诸多限制,目前已有学者通过聚乙二醇修饰,试图降低或消除其抗原性和免疫原性,但不合理的化学修饰往往会导致其抗肿瘤抗病毒等活性降低,为了更好的发挥 MAP30 的诸多活性,合理的化学修饰有待进一步研究。

MAP30 中色氨酸、谷氨酸、精氨酸含量均较高,甲硫氨酸含量低,而适当提高色氨酸、谷氨酸、精氨酸含量和降低甲硫氨酸含量均被报道具有改善紧密连接损伤的作用,且 MAP30 对肠道屏障损伤的改善作用优于色氨酸,可见除色氨酸外,MAP30 对肠道紧密连接的调控作用中还存在其他氨基酸的贡献,这些氨基酸对紧密连接的作用具体如何还有待验证。

MAP30 改善肠道屏障的分子机制比较复杂,其调控作用依赖多条信号通过,本文只选择了 ERK1/2-MAP 和 NF κ B-MLCK 两条通路进行研究,其他相关信号通路对紧密连接的调控作用还有待探索。

参考文献

1. 蔡东梅. 苦瓜蛋白 MAP30 的原核表达及活性研究. [硕士学位论文]. 西安: 陕西科技大学图书馆, 2017
2. 曹东亮, 金家贵, 沈富兵. 苦瓜核糖体失活蛋白广泛的生物学功能. 成都医学院学报, 2014, 9(5):636-641
3. 陈婷. 基于 MLCK-MLC 信号通路研究肠安II号方对肠上皮细胞紧密连接的分子调控机制. [博士学位论文]. 北京: 中国中医科学院图书馆, 2016
4. 丛馨, 张艳, 俞光岩, 吴立玲. 上皮细胞间紧密连接功能的研究进展. 生理学报, 2016, 68(4):492-504
5. 顾俊峰, 钱英昊, 王朔, 王桂琴. 苦瓜种子提取一种活性成份——“降糖多肽”. 实用糖尿病杂志, 2005, 13(1):59-60
6. 郭红莲, 张泽生. 苦瓜籽中营养成分及抗菌蛋白的研究. 粮油加工与食品机械, 2005, 6:77-78
7. 韩晓红. 重组蛋白 MAP30 诱导 EC-1.71 和 BGC-823 细胞凋亡及其机制的初步研究. [博士学位论文]. 镇江: 江苏大学图书馆, 2011
8. 何义国, 赵兴秀, 邓静, 吴华昌. 苦瓜籽蛋白 MAP30 的聚乙二醇化学修饰及抗肿瘤活性研究. 天然产物研究与开发, 2013, 25(5):662-666
9. 黄建中. 苦瓜籽活性成分的研究进展. 技术与市场, 2008, 04:62-64
10. 黄晶. 鸡蛋主要蛋白及氨基酸调控 Caco-2 细胞胆固醇吸收转运及其机理研究. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2015
11. 郎海滨, 糜漫天, 黄国荣. 植物种子I型核糖体失活蛋白提取、纯化与鉴定. 见: 中国营养学会临床营养分会主编, 中国营养学会第八届临床营养学术会议暨第三届营养与肿瘤会议论文摘要汇编. 中国营养学会营养与肿瘤会议, 西安, 2001
12. 李春阳, 贾文祥, 张雪梅. 苦瓜蛋白诱发胃癌细胞 SGC7901 凋亡的研究. 四川生理科学杂志, 2000, 14(4):1-4
13. 李慧华, 徐希明. 苦瓜籽活性成分的药理研究进展. 中医药信息, 2019, 36(01):125-129
14. 李小兰, 阮征, 米书梅, 江敏, 吴信, 姚康, 周艳, 印遇龙. 色氨酸对肠道屏障功能的影响. 现代食品科技, 2016, 3:42-47

15. 刘旭庆, 黄永忠, 张海霞. 苦瓜籽中脂肪酸的分离鉴定与比较. 兰州大学学报(自科版), 2004, 40(1):50-52
16. 刘璇, 时祥柱, 叶秀云. 苦瓜籽中一种抗胰蛋白肽的分离及抗真菌作用观察. 福州大学学报(自然科学版), 2008, 36(1):148-151
17. 刘子记, 刘维侠, 朱婕, 牛玉, 杨衍. 苦瓜 MAP30 蛋白研究现状及应用前景分析. 江苏农业科学, 2019, 47(06):15-19
18. 吕强. 苦瓜中抗肿瘤蛋白 MAP30 的制备和性质研究. [硕士学位论文]. 上海: 华东理工大学图书馆, 2015
19. 邵玉新. 锌营养对肉鸡肠黏膜及 Caco-2 细胞肠上皮屏障功能的作用及机制. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学图书馆, 2017
20. 申晓婷. 低蛋氨酸对 Caco-2 肠上皮细胞紧密连接蛋白表达和功能的影响. [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学图书馆, 2017
21. 盛清凯, 姚惠源, 徐华军, 凌小云, 何婷. 苦瓜子中植物胰岛素的凝胶柱与 RP-HPLC 法分离. 中药材, 2004, 27(6):414-416
22. 盛清凯, 赵红波, 刘俊珍, 石雪萍, 姚惠源. 苦瓜降糖多肽-P 对 2 型糖尿病模型鼠血糖血脂的影响. 山东农业大学学报(自然科学版), 2008, 39(1):23-25
23. 石雪萍, 姚惠源, 张卫明. 苦瓜籽油的研究现状及开发前景. 中国粮油学报, 2008, 5:214-217
24. 王斌. L-色氨酸缓解动物肠道炎症的作用机制研究. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学图书馆, 2018
25. 王宾香. 苦瓜籽核糖体失活蛋白的分离纯化及对细胞抑制活性的研究. [硕士学位论文]. 福州: 福州大学图书馆, 2004
26. 王丽媛. 苦瓜 map30 基因的优化及其转化毕赤酵母的研究. [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2010
27. 王临旭. 植物蛋白 MAP30 的制备及其体外抗病毒活性的实验研究. [硕士学位论文]. 西安: 第四军医大学图书馆, 2003
28. 王庆华, 于长春. α -苦瓜素和 β -苦瓜素的研究进展. 中草药, 1995, 5:266-267
29. 王瑞, 刘海学, 马俪珍. 几种食用油中脂肪酸含量的测定与分析[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(7):106-109.

30. 魏珂, 肖付刚, 何爱丽, 郝肖霞. 苦瓜籽黄酮提取及其抑菌性研究. 农业机械, 2012, 33:94-96
31. 吴国琳, 余国友, 卢雯雯. 中药复方对肠道微生态的调节作用研究现状. 中国中药杂志, 2015, 40(18):3534-3537
32. 肖付刚, 孙军涛, 王德国. 苦瓜籽黄酮对油脂的抗氧化研究. 食品研究与开发, 2014, 10:20-23
33. 熊术道, 尹丽慧, 李景荣. 苦瓜蛋白诱导 K562 细胞凋亡及其对 Bcl-2、PCNA 蛋白表达的影响. 中国免疫学杂志, 2006, 22(11):1002-1005
34. 熊术道, 尹丽慧, 李景荣, 韩义香, 章圣辉, 吴建波, 杨悦, 李冠武, 温博贵. 粘附分子 CD(54)、CD(44)在苦瓜蛋白诱导 K562 细胞凋亡中的作用. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(12):1403-1407
35. 徐丽. 苦瓜籽油的超临界提取工艺及其减肥作用和机制的初步研究. [硕士学位论文]. 合肥: 合肥工业大学图书馆, 2015
36. 徐雪峰, 闫浩, 杜金凤. 海南油茶籽含油率及脂肪酸组成分析. 生物化工, 2018, 6:45-48
37. 薛照辉, 刘珊珊, 李勇, 耿鹿宁, 谭茜倩, 万玉婷, 刘春泉. 鹰嘴豆蛋白的制备及其抗氧化活性. 中国油脂, 2008, 33(8):24-26
38. 颜君. 肠黏膜生物屏障的研究进展. 医学综述, 2011, 17(21):3246-3247
39. 杨洲平, 黄乾明, 刘一江, 陈平, 杨菲, 王晗光. 苦瓜核糖体失活蛋白 MAP30 基因的克隆及原核表达. 四川农业大学学报, 2007, 25(3):262-266
40. 庾庆华. 肠上皮细胞紧密连接调节的研究. [博士学位论文]. 南京: 南京农业大学图书馆, 2009
41. 于群, 张惠, 安磊, 杨浩宇. 苦瓜子衣色素蛋白提取及抗氧化能力研究. 安徽农业科学, 2017, 45(05):54-56
42. 张黎黎, 丁倩, 詹金彪. 苦瓜核糖体失活蛋白 MAP30 的原核表达和生物活性研究. 浙江大学学报(医学版), 2010, 39(3):264-271
43. 张美萍, 叶淑红, 王际辉, 王晗, 肖珊, 金慧燕. 苦瓜籽蛋白的提取条件及其抗氧化性质. 大连工业大学学报, 2013, 1:4-7
44. 周小东, 沈富兵, 郑崛村. β -苦瓜蛋白质分子结构模建研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(4):399-406

45. Alvarado AG, Thiagarajan PS, Mulkearns-Hubert EE, et al. Glioblastoma Cancer Stem Cells Evade Innate Immune Suppression of Self-Renewal through Reduced TLR4 Expression. *Cell stem cell*, 2017, 20(4):450
46. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011, 300(6):G1054-G1064
47. Arazi T, Lee HP, Huang PL, et al. Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2002, 292(2):441-448
48. Bansal T, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A, The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 228-233
49. Corl BA, Odle J, Niu X, Moeser AJ, Gatlin LA, Phillips OT, Rhoads JM. Arginine activates intestinal p70(S6k) and protein synthesis in piglet rotavirus enteritis, *J Nutr*, 2008, 138, 24-29
50. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes*, 2009, 1788(4):0-871
51. Castro-Sánchez P, Martín-Villa JM. Gut immune system and oral tolerance. *Br J Nutr*, 2013, 109(109):S3-S11
52. Chan WY, Tam PP, Yeung HW. The termination of early pregnancy in the mouse by beta-momorcharin]. *Contraception*, 1984, 29(1):91-100
53. Chaithanya C, Jaewang G, Ho RS. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50(8):103.
54. Chelakkot C, Choi Y, Kim DK, et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50(2):e450
55. Chen Q, Chen O, Martins IM, Hou H, Zhao X, Blumberg JB, Li B. Collagen peptides ameliorate intestinal epithelial barrier dysfunction in immunostimulatory Caco-2 cell monolayers via enhancing tight junctions. *Food Funct.*, 2017, 8, 1144-1151

56. Chen G, Shi J, Qi M, Yin H, Hang C, Glutamine decreases intestinal nuclear factor kappa B activity and pro-inflammatory cytokine expression after traumatic brain injury in rats, *Inflamm Res*, 2008, 57, 57-64
57. Chen T, Kim CY, Kaur A, et al. Dietary fibre-based SCFA mixtures promote both protection and repair of intestinal epithelial barrier function in a Caco-2 cell model. *Food Funct*. 2017, 8(3):1166-1173
58. Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science*, 2016, 352(6289):1116
59. Citi V, Del RM, Martelli A, et al. Phosphorylation of AKT and ERK1/2 and mutations of PIK3CA and PTEN are predictive of breast cancer cell sensitivity to everolimus in vitro. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 2018, 81(4):1-10
60. Clavel T, Gomesneto JC, Lagkouvardos I, et al. Deciphering interactions between the gut microbiota and the immune system via microbial cultivation and minimal microbiomes. *Immunological Reviews*, 2017, 279(1):8-22
61. Czerucka SD, Mograbi B, Rossi B, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic escherichia coli-infected T84 cells. *Infection and Immunity*, 2000, 68, 5998–6004
62. Damme EJMV, Qiang H, Ying C, et al. Ribosome-Inactivating Proteins: A family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2001, 20(5):395-465
63. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(1):20-32
64. Fan JM, Luo J, Xu J, et al. Effects of recombinant MAP30 on cell proliferation and apoptosis of human colorectal carcinoma LoVo cells. *Molecular Biotechnology*, 2008, 39(1):79-86
65. Fang EF, Zhang CZY, Wong JH, et al. The MAP30 protein from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 2012, 324(1)

66. Fanning A, Lye MJ, Lavie A. Domain swapping within PDZ2 is responsible for dimerization of ZO proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(52):37710-37716
67. Farhan S, Muhammad A, Bushra N, et al. Bitter melon (*Momordica charantia*): a natural healthy vegetable. *International journal of food properties*, 2018, 21(1):1270–1290
68. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, et al. A single gene product, Claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits Occludin in fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 1998, 143(2):391-401
69. Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N. Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2017:a029181
70. González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *BBA - Biomembranes*, 2008, 1778(3):729-756
71. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology*, 2013, 182, 375-387
72. Hong F, Haldeman D, Brian D, et al. Characterization of tightly associated smooth muscle myosin—myosin light-chain kinase-calmodulin complexes. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 390(5):879-892
73. Horax R, Hettiarachchy N, Kannan A, et al. Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chemistry*, 2011, 124(2):545-550
74. Horax R, Hettiarachchy N, Over K, et al. Extraction, fractionation and characterization of bitter melon seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(3):1892-1897
75. Iskandar MM, Dauletbaev N, Kubow S, et al. Whey protein hydrolysates decrease IL-8 secretion in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated respiratory epithelial cells by affecting LPS binding to Toll-like receptor 4. *British Journal of Nutrition*, 2013, 110(1):58-68

76. Itoh M, Tsukita S, Yamazaki Y, et al. Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-myosin II signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(25):9905-9910
77. Jin J, Xu W, Wan B, Wang X, Zhou Z, Miao Y, Song Y. Topotecan alleviates lipopolysaccharide-mediated acute lung injury via the NF- κ B signaling pathway. *Journal of Surgical Research*, 2019, 235, 83-92
78. Jiao N, Wu Z, Ji Y, Wang B, Dai Z, Wu G. L-Glutamate Enhances Barrier and Antioxidative Functions in Intestinal Porcine Epithelial Cells. *J Nutr*, 2015, 145, 2258-2264
79. Kabir SR, Nabi MM, Nurujjaman M, et al. Momordica charantia seed lectin: toxicity, bacterial agglutination and antitumor properties. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2015, 175(5):2616-28
80. Katsuno T, Umeda K, Matsui T, et al. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(6):2465-75
81. Khanna P, Jain SC, Panagariya A, et al. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. *Journal of Natural Products*, 1981, 44(6):648-655
82. Kirschner N, Brandner JM. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012, 1257(1):158-166
83. Kohno H, Suzuki R, Sugie S, et al. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *Bmc Cancer*, 2005, 5(1):1-12
84. Koopmans SJ, Van S, Floc'h LN, Dekker R, Van JHD, Jansman AJ. Effects of surplus dietary L-tryptophan on stress, immunology, behavior, and nitrogen retention in endotoxemic pigs. *J Anim Sci.*, 2012, 90, 241-251
85. Lameris AL, Huybers S, Kaukinen K, et al. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2013, 48(1):58
86. Leehuang S, Huang PL, Nara PL, et al. MAP 30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication. *Febs Letters*, 1990, 272(1):12-18

87. Leehuang S, Kung HF, Huang PL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inhibition, DNA-binding, RNA-binding, and ribosome inactivation activities in the N-terminal segments of the plant anti-HIV protein GAP31. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(25):12208-12212
88. Lee-Huang S, Huang PL, Chen HC, et al. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. *Gene*, 1995, 161(2):151-156
89. Liu Y, Chen Z, Dai J, Yang P, Hu H, Ai Q, Mai K. The protective role of glutamine on enteropathy induced by high dose of soybean meal in turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture*, 2018, 497, 510-519
90. Lu Z, Ding L, Lu Q, et al. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers*, 2013, 1(3):e24978
91. Ma Y, Semba S, Khan RI, et al. Focal adhesion kinase regulates intestinal epithelial barrier function via redistribution of tight junction. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 2013, 1832(1):151-159
92. Mao Q, Jiang F, Yin R, et al. Interplay between the lung microbiome and lung cancer. *Cancer Letters*, 2017:S0304383517307607
93. Martel CD, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*, 2012, 13(6)
94. Mcauley JL, Linden SK, Png CW, et al. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(8):2313-24
95. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, et al. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(4):265-278
96. Melvin AJ. Molecular Structure of Tight Junctions and Their Role in Epithelial Transport. *Physiology*, 2001, 16(3):126-130
97. Meng Y, Liu S, Li J, et al. Preparation of an antitumor and antiviral agent: chemical modification of α -MMC and MAP30 from *Momordica Charantia* L. with covalent conjugation of polyethylene glycol. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7(1):3133-3142

98. Moghadam A, Niazi A, Afsharifar A, et al. Expression of a Recombinant Anti-HIV and Anti-Tumor Protein, MAP30, in *Nicotiana tobacum* Hairy Roots: A pH-Stable and Thermophilic Antimicrobial Protein. *Plos One*, 2016, 11(7):e0159653
99. Mukhopadhy A, Noronha N, Bahar B, et al. The anti-inflammatory potential of a moderately hydrolysed casein and its 5 kDa fraction in in vitro and ex vivo models of the gastrointestinal tract. *Food & Function*, 2015, 6(2):612
100. Nicolas E, Goodyer ID, Taraschi TF. An additional mechanism of ribosome-inactivating protein cytotoxicity: degradation of extrachromosomal DNA. *Biochemical Journal*, 1997, 327(Pt 2)(2):413
101. Nighot M, Al-Sadi R, Guo S, Rawat M, Nighot P, Watterson MD, Ma TY. Lipopolysaccharide-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) activation of Myosin Light Chain Kinase expression. *The American Journal of Pathology*, 2017, 187, 2698-2710
102. Noguchi R, Yasui Y, Suzuki R, et al. Dietary effects of bitter gourd oil on blood and liver lipids of rats. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2001, 396(2):207-212
103. Nighot M, Al-Sadi R, Guo S, et al. Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is Mediated by Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Activation of Myosin Light Chain Kinase Expression. *The American Journal of Pathology*, 2017, 187(12):2698-2710
104. Priyanto AD, Doerksen RJ, Chang CI, et al. Screening, discovery, and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from proteolytic hydrolysate of bitter melon seed proteins. *Journal of Proteomics*, 2015, 128:424-435
105. Pu Z, Lu BY, Liu WY, et al. Characterization of the enzymatic mechanism of gamma-momorcharin, a novel ribosome-inactivating protein with lower molecular weight of 11,500 purified from the seeds of bitter gourd (*Momordica charantia*). *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229(1):287-294
106. Reynolds JV. Gut barrier function in the surgical patient. *British Journal of Surgery*, 2010, 83(12):1668-1669

107. Scarpellini E, Ianiro G, Attili G, Bassanelli C, Desantis A, Gasbarrini A. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease*, 2015, 47(12):S1590865815004144
108. Seth A, Yan F, Polk DB, et al. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(4):G1060
109. Shigetomi K, Ikenouchi J. Regulation of the epithelial barrier by post-translational modifications of tight junction membrane proteins. *Journal of Biochemistry*, 2018, 163(4):265
110. Shimada Y, Kinoshita M, Harada K, Mizutani M, Masahata K, Kayama H, Takeda K, Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PLoS One.*, 2013, 8, e80604
111. Silva T, Silva JM, Marques A, Domingues A, Bayon Y, Reis R. Marine origin collagens and its potential applications, *Marine Drugs*, 2014, 12, 5881-5901
112. Song ZH, Ke YL, Xiao K, Jiao LF, Hong QH, Hu CH. Diosmectite–zinc oxide composite improves intestinal barrier restoration and modulates TGF- β 1, ERK1/2, and Akt in piglets after acetic acid challenge. *J. Anim.*, 2015, 93, 1599–1607
113. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems, *J Lab Autom*, 2015, 20, 107-126
114. Steed E, Balda MS, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends in Cell Biology*, 2010, 20(3):142-149
115. Stephan B, Florian B, Torsten O, Kathrin Z, Soren T, Eichhorst, Otte JM, Helmut D, Andreas M, Wolfgang J, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290, G827–G838
116. Sun Y, Huang PL, Jian JL, et al. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with kaposi's sarcoma-associated virus. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2001, 287(4):983-994

117. Swimm CR, Giver ZD, Filipp S, Rangaraju A, Sharma AU, Antonova EK. Indoles derived from intestinal microbiota act via type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease, *Blood*, 2018, 132:2506-2519
118. Tlaskalov ěogenov á H, Koz ákov á H, Hudcovic T, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 2011, 8(2):110
119. Tomita M, Kurokawa T, Zakia ON, et al. Purification of galactose-binding phytoagglutinins and phytotoxin by affinity column tography using sepharose. *Experientia*, 1972, 28(1):84-85
120. Trevisi P, Melchior D, Mazzoni M, Casini L, Filippi SD, Minieri L, Bosi P. A tryptophan-enriched diet improves feed intake and growth performance of susceptible weanling pigs orally challenged with Escherichia coli K88. *J Anim Sci.*, 2009, 87, 148-156
121. VanItallie CM, Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 1997, 110:1113-1121
122. Wang B, Wu Z, Ji Y, et al. L-Glutamine enhances tight junction integrity by activating CaMK kinase 2-AMP-activated protein kinase signaling in intestinal porcine epithelial cells. *Journal of Nutrition*, 2016:jn.115.224857
123. Wang F, Graham WV, Wang Y, et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *American Journal of Pathology*, 2005, 166(2):409-419
124. Wang F, Chi C, Wang L, et al. Gene cloning and expression of MAP30 in Pichia pastoris. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2014, 28(1):136-139
125. Wang H, Ji Y, Wu G, Sun K, Sun Y, Li W, Wu Z. L-Tryptophan activates mammalian target of rapamycin and enhances expression of tight junction proteins in intestinal porcine epithelial cells. *J Nutr*, 2015, 145, 1156-1162
126. Wang YX, Jacob J, Wingfield PT, et al. Anti-HIV and anti-tumor protein MAP30, a 30 kDa single-strand type-I RIP, shares similar secondary structure and beta-sheet topology with the A chain of ricin, a type-II RIP. *Protein Science*, 2010, 9(1):138-144

127. Wang, YX, Neamate, et al. Solution structure of anti-HIV-1 and anti-tumor protein MAP30: structural insights into its multiple functions. *Cell*, 1999, 99(4):433-42
128. Wang S, Zheng Y, Yan J, et al. Alpha-momorcharin: a ribosome-inactivating protein from *Momordica charantia*, possessing DNA cleavage properties. *Protein & Peptide Letters*, 2013, 20(11)
129. Wu H, Luo T, Li YM, Gao ZP, Zhang KQ, Song JY, Cao YP. Granny Smith apple procyanidin extract upregulates tight junction protein expression and modulates oxidative stress and inflammation in lipopolysaccharide-induced Caco-2 cells. *Food Funct*, 2018, 9, 3321-3329
130. Xu C, Yang C, Yin Y, et al. Phosphopeptides (PPPs) from hen egg yolk phosvitin exert anti-inflammatory activity via modulation of cytokine expression. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(4):718-726
131. Xu J, Kausalya PD, Ali S, et al. Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but not ZO-3, reveals critical and non-redundant roles for individual ZO proteins in mammalian development. *Molecular & Cellular Biology*, 2008, 28(5):1669
132. Xu Y, Xu L, Chen XT, et al. Bitter melon seed oil may reduce the adiposity through the hypothalamus mTOR signaling in mice fed a high fat diet. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 2016, 6(C):16-21
133. Yasui Y, Hosokawa M, Sahara T, et al. Bitter melon seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR γ in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 2005, 73(2):113-119
134. Ye D, Ma TY. Cellular and molecular mechanisms that mediate basal and tumour necrosis factor- α -induced regulation of myosin light chain kinase gene activity. *J Cell Mol Med*, 2008, 12, 1331-1346
135. Ye X, Sun M. AGR2 ameliorates tumor necrosis factor- α -induced epithelial barrier dysfunction via suppression of NF- κ B p65-mediated MLCK/p-MLC pathway activation. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 39(5):1206-1214
136. Yi D, Li B, Hou Y. Dietary supplementation with an amino acid blend enhances intestinal function in piglets, *Amino Acids*, 2018, 50, 1089-1100

137. Zhang W, Parniak MA, Sarafianos SG, et al. In vitro transport characteristics of EFdA, a novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor using Caco-2 and MDCKII cell monolayers. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 732:86-95
138. Zheng S, Lin Z, Liu Z, Liu Y, Wu W. Lipopolysaccharide mediates the destruction of intercellular tight junction among renal tubular epithelial cells via RhoT1/SMAD-4/JAM-3 pathway. *Int J Med Sci*, 2018, 15, 595-602

致 谢

我与华农的缘分始于 2012 年，高考结束的我曾到华农参观，便记住了那一池荷塘，真是世外桃源般的地方！以数分之差与华农失之交臂，但我不曾放弃，2016 年 9 月，我再次踏进华中农业大学校门，这里依然恬静又饱含生机，我怀着无比的憧憬开始我的硕士求学生涯。时光总是在不经意间流走，有恣意有沮丧，有收获也有失去，在华农的三年，我真切感受到了老师对我们的关怀与鼓励，学校对学生的包容与保护。如今我的校园生活即将结束，我怀着感激与不舍写下这篇致谢，向曾经帮助和陪伴过我的人们表达真诚的感谢，向这片包容和培养过我的土地说一声谢谢！

感谢导师胡筱波副教授对实验课题的精心指导和悉心关怀。在三年的学习生涯中，胡老师渊博的知识、严谨负责的工作态度令我折服，在研究过程中学到的知识和锻炼的技能是我一生中的宝贵财富。在此论文完成之际，再次向胡老师致以由衷的感谢和崇高的敬意。感谢阮征老师对我的关心和帮助，他指导我从试验设计到完成，一丝不苟地为我的文章把关。感谢熊善柏教授给予的指导，作为团队的领头人，熊老师的包容大度，对工作严谨认真，对学生课题和生活上提供切实帮助，让我受益匪浅，是我今后学习生活的榜样。

同时，我要感谢本实验室与我并肩努力过的郭开红师姐、张蕾蕾师姐、金钰师兄、刘玉玉师妹、蔡晓雯师妹，感谢他们与我共同面对困难，相互鼓励支持，感谢他们的欢声笑语为我的硕士生活增添色彩；感谢细胞房石文师兄、彭进明师兄，研究生同学晏芳芳、方梦雪、袁子、贾离离、师玲，师妹余小月等，在我的实验遇到困难时给予的帮助；感谢 1602 班的全体同学给予的关心与支持。我还要特别感谢我的室友，是她们陪伴我三年，不厌其烦的听我抱怨并开导我乐观积极面对，一直耐心的鼓励与支持令我感动；感谢父母的养育，还有哥哥姐姐的支持，是你们的支持与关怀，我才有了奋发向上的动力和克服挫折的勇气。

最后，感谢食品科技学院对我的栽培，在此我要向华中农业大学食品科技学院的所有老师们致以最真诚的感谢！

陈 梦 蝶

2019 年 6 月于华中农业大学

附 录

攻读硕士学位期间发表论文：

1. **Chen Mengdie**; Liu Yuyu; Xiong Shanbai; Wu Moucheng; Li Bin; Ruan Zheng; Hu Xiaobo, Dietary l-tryptophan alleviated LPS-induced intestinal barrier injury by regulating tight junctions in a Caco-2 cell monolayer model. Food&Function, 2019, DOI:10.1039/c9fo00123a. (1 区, IF: 3.62)