

# 辣木多肽对 LPS 所致 Caco-2 细胞间高通透性的保护作用

宋家乐<sup>1</sup>, 钱波<sup>1</sup>, 王程强<sup>1</sup>, 曾榛<sup>1</sup>, 雷少玲<sup>2</sup>, 黄傲<sup>3</sup>

(1. 桂林医学院公共卫生学院, 广西高校预防医学重点实验室, 广西桂林 541000) (2. 广西肽王生物科技有限公司, 广西桂林 530000) (3. 广西民族大学相思湖学院, 广西南宁 530008)

**摘要:** 探讨了辣木多肽(MOPP)对脂多糖(LPS, 2  $\mu\text{g/mL}$ )诱发 Caco-2 细胞高通透性的保护作用。MTT 法测定细胞生存率, 细胞乳酸脱氢酶(LDH)水平依说明用试剂盒测定。酶联法(ELISA)检测白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-8 和肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )的分泌水平。跨上皮细胞电阻(TEER)值和异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(FD40)透过度评估细胞通透的改变。实时定量 PCR 检测细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 、闭锁蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白-1 (claudin-1)、ZO-1 和肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的 mRNA 表达。与模型细胞相比, 高浓度(150  $\mu\text{g/mL}$ )的 MOPP 处理能显著提高受损细胞生存率至 83.8%, 并有效抑制 50.3%的 LDH 溢出。MOPP 有效降低模型细胞中 IL-1 $\beta$  (19.8%), IL-8 (43.7%)和 TNF- $\alpha$  (37.9%)的分泌并抑制其 mRNA 转录(IL-1 $\beta$ : 44.3%, IL-8: 35.0%, TNF- $\alpha$ : 33.5%)。此外, MOPP 可增强细胞紧密连接因子(Occludin、claudin-1、ZO-1)的 mRNA 转录, 并抑制 31.3%的 MLCK 的 mRNA 转录。结果意味着, MOPP 具有较强的抗炎活性, 可由上调细胞内紧密连接相关因子的 mRNA 转录显著来改善 LPS 所致 Caco-2 细胞间高通透性的发生。

**关键词:** 辣木多肽; LPS; 炎症水平; 肠上皮细胞; 屏障完整性

文章编号: 1673-9078(2018)12-12-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.003

## Protection of LPS-induced Intercellular Hyperpermeability in Caco-2 Cells by Polypeptide from *Moringa oleifera*

SONG Jia-le<sup>1</sup>, QIAN Bo<sup>1</sup>, WANG Cheng-qiang<sup>1</sup>, ZEN Zheng<sup>1</sup>, LEI Shao-ling<sup>2</sup>, HUANG Ao<sup>3</sup>

(1.School of Public and Health, Guangxi Colleges and University Key Laboratory of Preventive Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541000, China) (2.Taiwang biotechnology Co. Ltd, Nanning 530000, China)  
(3.Xiangsihu College of Guangxi University for Nationalities, Nanning 530008, China)

**Abstract:** The protective effect of polypeptide from *Moringa oleifera* (MOPP) on lipopolysaccharide (LPS, 2  $\mu\text{g/mL}$ ) induced hyperpermeability in Caco-2 cells was investigated. The cell survival rate was measured by MTT assay. The cellular level of lactate dehydrogenase (LDH) was determined by kit. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the level of Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . The transepithelialelectricalresistance (TEER) and fluorescein dextran (FD40) permeability were used to evaluate the permeability of cells. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , Occludin, claudin-1, ZO-1, and myosin light chain kinase (MLCK). A high concentration of MOPP (150  $\mu\text{g/mL}$ ) treatment significantly increased the cell survival rate (to 83.8%) and inhibited the spillover of LDH (50.3%) compared with that in model cells. MOPP treatment effectively inhibited the secretion of inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ : 19.8%, IL-8: 43.7% and TNF- $\alpha$ : 37.9%) and reduced their mRNA transcription (IL-1 $\beta$ : 44.3%, IL-8: 35.0% and TNF- $\alpha$ : 33.5%)in model cells. In addition, MOPP also significantly increased the mRNA levels of Occludin, claudin-1, ZO-1, and inhibit the 31.3% of MLCK mRNA transcription to improve the intercellular permeability in LPS treated Caco-2 cells. These results suggest that the MOPP exhibited a strong anti-inflammatory activity, and can improve the LPS induced high permeability of Caco-2 cells may associate with regulating the mRNA transcription of tight junction related factors.

收稿日期: 2018-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560530、81760589); 广西自然科学基金项目(2016GXNSFCA380026); 桂林医学院引进人才科研启动基金(04010150001); 广西教育厅广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助项目(桂教人[2018]18号)

作者简介: 宋家乐(1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子营养学和功能性食品学

通讯作者: 黄傲(1979-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向: 食品科学与饮食文化学

**Key words:** *Moringa oleifera* polypeptide; lipopolysaccharide (LPS); inflammatory levels; intestinal epithelial cells; barrier integrity

肠黏膜屏障生理功能的异常是导致炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 肠应激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)及肠道肿瘤发生的重要原因之一<sup>[1,2]</sup>。肠上皮细胞和细胞间紧密连接所构成肠上皮结构在防止病原微生物侵入, 阻隔外源有害物质进入血液循环系统, 防止细菌移位等方面具有重大意义<sup>[3]</sup>。临床观察发现, IBD、IBS 以及肠道肿瘤患者的肠上皮组织中细胞间紧密连接结构遭受破坏, 上皮细胞通透性增大, 肠黏膜屏障损毁严重并由此能够引发严重的并发症<sup>[4]</sup>。因此, 改善肠上皮功能, 维持细胞间紧密结构完整则有助于改善 IBD、IBS 以及肠道肿瘤患者的临床症状<sup>[5]</sup>。

辣木(*Moringa oleifera*)属辣木科辣木属多年生热带落叶乔木, 广泛分布于亚洲南部热带地区, 非洲热带以及部分亚热带地区, 目前已被国家认定为一种新资源食品。在我国的广东、广西、台湾、云南等地均形成了具有一定规模的栽培种植<sup>[6-9]</sup>。特别是广西壮族自治区的百色、崇左和武鸣等地在当地政府的重点支持下已经开展了辣木的规模化种植, 并形成一定的产业规模<sup>[6,10]</sup>。近年来, 由于活性多肽类物质其本身所具有的抗菌、抗炎、抗氧化、抗衰老和免疫调节等诸多生物活性而成为实现可持续性农业和生物综合利用研究热点以及开发利用的重点<sup>[11]</sup>。当前, 对于辣木的研究主要集中在辣木叶提取物以及辣木叶多糖等方面, 而对辣木多肽的研究还不多见<sup>[7,9]</sup>。特别是, 就辣木多肽提取物对于肠道功能的调控效果, 尤其是对受损肠道上皮细胞高通透性保护作用的研究鲜见报道。人结肠癌 Caco-2 细胞是一株具有与正常小肠上皮细胞类似的紧密连接、微绒毛等结构而被公认为用于肠道屏障损伤与修复机制研究的经典细胞系<sup>[12]</sup>。因此, 本研究在基于 LPS 处理所制备的 Caco-2 肠上皮细胞高通透性模型中探讨辣木多肽对细胞高通透性的保护效果及作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

DMEM 高糖型细胞培养液、青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶-EDTA 消化液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyltetrazolium, MTT), 美国 Thermo Scientific 公司; Trizol 试剂、OligodT<sub>18</sub>、RNase、dNTPs、MLV 逆转录酶, 美国 Invitrogen 公司; ROX reference Dye 和 SYBR Premix

Ex Taq II, 大连宝生物工程公司; 异硫氰酸荧光素(FITC)-右旋糖酐(FD40, 分子量 40000 Da)、大肠杆菌脂多糖(LPS), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒, 南京建成生物工程研究所; IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  试剂盒, 美国 Cloud colon 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。辣木多肽(MOPP)由广西肽王生物科技股份有限公司提供。

### 1.2 仪器与设备

Biotek Elx808 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; ND2000 超微量核酸蛋白测定仪、3110 型二氧化碳细胞培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司; AL204 电子分析天平, 梅特勒-托利多公司上海有限公司; 电热恒温水浴锅 HWS-28, 上海一恒科学仪器有限公司; FLUOstar OPTIMA 荧光酶标仪, 德国 BMG 公司; MERS00002 Millicell-ERS 上皮跨膜细胞电阻仪, 美国 Millipore 公司。

### 1.3 细胞培养与分组

Caco-2 人结肠腺癌细胞(源自中国科学院上海细胞资源中心)系由桂林医学院生物技术学院邹先琼教授馈赠, 本研究室保种传代。DMEM 高糖型细胞培养液(含 10% FBS 与 1%青-链霉素双抗液)置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境下湿化培养。细胞贴壁长至 80%时, 胰蛋白酶-EDTA 液按比例消化传代后用于实验。DMEM 培养液(含 LPS: 2  $\mu$ g/mL)处理细胞 24 h 制备细胞模型。模型细胞以辣木多肽(10  $\mu$ g/mL、50  $\mu$ g/mL、100  $\mu$ g/mL、150  $\mu$ g/mL)继续培养 24 h 并进行后续实验。正常组为未经过任何处理的正常 Caco-2 细胞。

### 1.4 细胞存活率及 LDH 脱氢酶水平测定

细胞按前述分组处理后, 移除内培养基(用于后续 LDH 酶活性测定)并加入 100  $\mu$ L 的 MTT 试剂(终质量浓度: 0.5 mg/mL)继续培养 24 h。培养结束后弃上清液, 每孔加入 DMSO (100  $\mu$ L)避光振荡 30 min, 测定 OD<sub>490 nm</sub> 后按公式: 细胞生存率(%)=OD<sub>样品组</sub>/OD<sub>正常组</sub> $\times$ 100 来计算细胞生存率。LDH 脱氢酶水平采用比色试剂盒按照说明书操作要求进行测定。

### 1.5 IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 分泌水平的测定

细胞接种到培养板并依前述方法处理后, 4 °C 下收集细胞培养上清液。取适量培养上清液按照 IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  测定试剂盒说明书步骤操作(单位以

pg/mL 表示)。

### 1.6 模型细胞的膜通透性水平测定

依前述处理后的细胞接种至 Transwell 小室中, 实验前测定跨上皮细胞电阻(trans epithelialelectrical resistance, TEER)检查细胞融合状态和肠上皮屏障的完整性, 取细胞屏障完整的细胞(TEER $\geq$ 100  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>)用

于实验。移除 Transwell 小室内外的培养液, HBSS 液(pH 7.4)冲洗细胞 3 次, 37 °C 孵育 30 min 后测量 TEER 值, 待 TEER 值稳定后记录数据。此外, 在 Transwell 小室顶端腔内加入 100  $\mu$ L 的 HBSS 液(含有终浓度为 1 mg/mL 的 FD-40), 37 °C 孵育 2 h, 收集侧腔内溶液, 使用 FLUOstar OPTIMA 荧光酶标仪测定荧光强度(激发波长 480 nm, 发射波长 530 nm)。

表 1 引物序列表

Table 1 Sequences of primers

Genes	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
IL-1 $\beta$	5'-GAATGACGCCCTCAATCAAAGT-3'	5'-TCATCTGGGCAGTCACATACA-3'
IL-8	5'-CCTGAACCTTCCAAAGATGGC-3'	5'-TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA-3'
TNF- $\alpha$	5'-GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3'	5'-CGGGCCGATTGATCTCAGC-3'
Occludin	5'-CTTCCAATGGCAAAGTGAATG-3'	5'-TACCACCGCTGCTGTAAACGAG-3'
claudin-1	5'-CCAGGTACGAATTTGGTCAGG-3'	5'-TGGTGTGGGTAAGAGGTTGT-3'
ZO-1	5'-GAGCCTAATCTGACCTATGAACC-3'	5'-TGAGGACTCGTATCTGTATGTGG-3'
MLCK	5'-CAACAGGGTCACCAACCAGC-3'	5'-GCCTTGCAGGTGTACTTGGC-3'
GAPDH	5'-CCATTGATGTTAGCGGGATCTC-3'	5'-TGGTCTACATGTTCCAGTATGACT-3'

### 1.7 细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 、occludin、claudin-1、ZO-1 和 MLCK 的 mRNA 表达

Trizol 试剂盒法提取细胞内总 RNA, 紫外分光检测提纯后的 RNA 浓度用于后续实验。取总 RNA(2  $\mu$ g)加入 dNTPs(1  $\mu$ L)、OligodT<sub>18</sub> 引物(1  $\mu$ L)、MLV 逆转录酶(1  $\mu$ L)、RNases 抑制剂(1  $\mu$ L)及 5 $\times$ Buffer (10  $\mu$ L)逆转录成 cDNA。取适量 cDNA(2  $\mu$ L)用 qRT-PCR 法检测 IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 、Occludin、claudin-1、ZO-1 和 MLCK 的表达量。在总反应体系中(20  $\mu$ L)加入上游和下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L、2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II (10  $\mu$ L)、50 $\times$ ROX reference Dye(0.4  $\mu$ L)和灭菌双蒸水(5.6  $\mu$ L), 充分混匀后置于 Quant Studio TM 6 Flex PCR 仪中进行反应。扩增反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 25 s, 55 °C 25 s, 72 °C 50 s, 共 35~40 个循环, 72 °C 延伸 5 min。每个基因 cDNA 样本平行扩增 3 次, 取 Ct 值均数, 依公式计算目的基因表达量 $[F=2^{-(\text{检测样品中基因的 Cr 值}-\text{检测样品中持家基因的 Cr 值})/2^{-(\text{空白样品中基因的 Cr 值}-\text{空白样品中持家基因的 Cr 值})}]$ 。相关基因的引物序列见表 1 所示。

### 1.8 数据处理与统计分析

本研究中, 所有实验均重复 3 次, 结果以均值(means) $\pm$ 标准偏差(SD)表示。所得实验数据运用

SPSS20.0 统计软件进行单因素方差分析与统计处理,  $p < 0.05$  为具有统计差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 辣木多肽对细胞生存率和 LDH 释放水平的影响

Caco-2 细胞经 2  $\mu$ g/mL 的 LPS 处理后, 细胞生存率下降至 41.3%(表 2)。给予辣木多肽处理后, 受损细胞的生存率逐渐升高并呈显著的剂量效应关系( $p < 0.05$ )。特别是在经加高浓度(100  $\mu$ g/mL 和 150  $\mu$ g/mL)辣木多肽处理后, 细胞生存率分别升高至 72.9%和 83.8%, 生存率分别较未处理的模型细胞增高 1.77 倍和 2.03 倍。正常处于细胞内部的 LDH 在细胞遭受外界强烈应激刺激导致细胞膜损伤后能够直接从细胞内部溢出, 因此被常用作评估细胞损伤程度的一种生物指标<sup>[13]</sup>。与正常组细胞相比, LPS 模型组细胞中 LDH 的溢出量为正常细胞的 6.45 倍。经辣木多肽处理模型细胞后, 细胞 LDH 外溢水平显著降低, 且抑制效果存在显著的剂量效应关系( $p < 0.05$ )。较高浓度的辣木多肽(100  $\mu$ g/mL 和 150  $\mu$ g/mL)处理后, 细胞中 LDH 溢出水平分别较未经处理的模型细胞 LDH 溢出水平降低 40.9%和 50.3%。



表2 辣木多肽对LPS所致Caco-2细胞生存率和细胞LDH释放水平的影响

Table 2 Effects of MOPP on cell viability and LDH levels in LPS treated intestinal Caco-2 cells

组别	辣木多肽浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	细胞生存率/%	LDH 溢出水平/(U/mg protein)
正常组		100.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	8.92 $\pm$ 0.94 <sup>f</sup>
辣木多肽处理组	0	41.26 $\pm$ 1.45 <sup>e</sup>	57.56 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>
	10	46.41 $\pm$ 1.73 <sup>e</sup>	49.37 $\pm$ 2.47 <sup>b</sup>
	50	57.65 $\pm$ 3.09 <sup>d</sup>	41.34 $\pm$ 1.53 <sup>c</sup>
	100	72.90 $\pm$ 2.21 <sup>c</sup>	34.05 $\pm$ 2.32 <sup>d</sup>
	150	83.85 $\pm$ 2.38 <sup>b</sup>	28.62 $\pm$ 2.12 <sup>e</sup>

注: <sup>a-f</sup>: 字母不同表示组间差异显著( $p < 0.05$ )。

## 2.2 辣木多肽对 IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 分泌水平的影响

IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  等炎性细胞因子的异常表达是导致肠组织细胞间紧密连接丢失以及细胞上皮屏障损伤的主要原因,也在 IBD 发病过程中起着重要的作用<sup>[11-15]</sup>。如图 1 所示, LPS 处理能显著刺激 Caco-2 细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的分泌。而辣木多肽处理能够显著抑制模型细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的分泌。特别是,高浓度辣木多肽(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )能够使细胞中的 IL-1 $\beta$  水平分别较模型细胞中 IL-1 $\beta$  水平降低 10.6%和 19.8%, IL-8 水平降低 36.4%和 43.7%, TNF- $\alpha$  水平降低 30.7%和 37.9%。

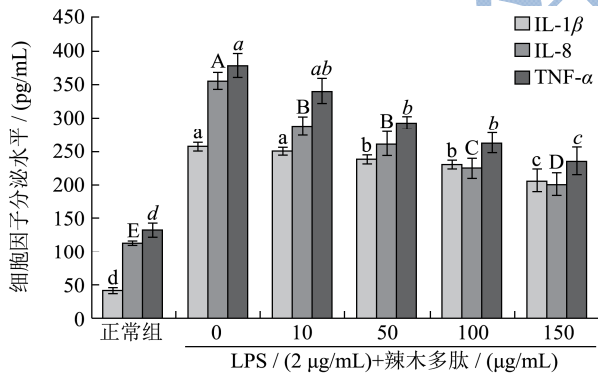


图1 辣木多肽对LPS处理Caco-2细胞中IL-1 $\beta$ 、IL-8和TNF- $\alpha$ 分泌水平的影响

Fig.1 Effects of MOPP on IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$  levels in LPS treated intestinal Caco-2 cells

注: <sup>a-e</sup>, <sup>A-E</sup>, <sup>a-d</sup>: 字母不同表示组间差异显著( $p < 0.05$ )。

## 2.3 辣木多肽对 IL-1 $\beta$ 、IL-8 与 TNF- $\alpha$ 的 mRNA 转录水平的影响

LPS(2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )刺激能显著诱发 Caco-2 细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 转录(图 2)。不同浓度的辣木多肽处理能够抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的异

常转录。与模型组细胞相比,高浓度的辣木多肽(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )能够分别降低模型细胞中 IL-1 $\beta$  转录水平至 32.8%和 44.3%, IL-8 转录水平至 32.6%和 35.0%, TNF- $\alpha$  转录水平至 25.7%和 33.5%。抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  等的过度表达能够直接改善肠组织炎症水平,从而缓解高炎症环境所致肠上皮细胞紧密连接丢失的发生<sup>[1,12,13]</sup>。

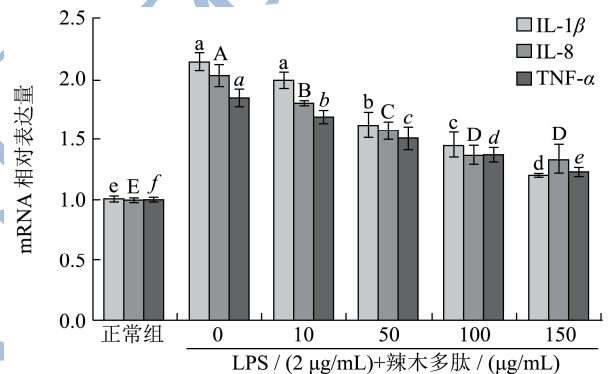


图2 辣木多肽对LPS处理Caco-2细胞中IL-1 $\beta$ 、IL-8和TNF- $\alpha$ 的 mRNA 转录水平影响

Fig.2 Effects of MOPP on IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression in intestinal Caco-2 cells

注: <sup>a-e</sup>, <sup>A-E</sup>, <sup>a-f</sup>: 字母不同表示组间差异显著( $p < 0.05$ )。

## 2.4 辣木多肽对LPS处理Caco-2细胞的膜通透性影响

细胞的跨上皮细胞电阻(TEER)值和异硫氰酸荧光素(FITC)-右旋糖酐(FD40)是用于检测肠上皮细胞单层屏障功能变化的经典生物指标<sup>[16]</sup>。TEER 值主要反映肠上皮屏障模型的离子通透性改变情况<sup>[17]</sup>。如表 3 所示, LPS 处理显著造成 Caco-2 细胞 TEER 值的降低。给予不同浓度辣木多肽能够显著回升模型细胞的 TEER 值( $p < 0.05$ )。其中,辣木多肽(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理组细胞分别较 LPS 组细胞的 TEER 值升高 1.22 倍、1.57 倍、1.80 倍和 2.04 倍。此外, FITC-右旋糖酐(FD-40)通过率也是

反映肠上皮屏障功能是否正常的指标之一, FD-40 透过水平越高则细胞的通透性损伤发生程度越高<sup>[18]</sup>。LPS 刺激显著造成 Caco-2 细胞的通透性增高( $p<0.05$ )。辣木多肽处理能够显著模型细胞的 FD-40 透过水平

( $p<0.05$ )。辣木多肽(10  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$  和 150  $\mu\text{g/mL}$ )处理组细胞分别较模型组细胞的 FD-40 透过水平降低 4.9%、15.7%、25.1%和 33.3%。

表 3 辣木多肽对 LPS 处理 Caco-2 细胞 TEER 与 FD-40 透过的影响

Table 3 Effects of MOPP on TEER and FD-40 levels in LPS treated intestinal Caco-2 cells

组别	辣木多肽浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	TEER 值	FD-40 透过度
正常组		0.942 $\pm$ 0.058 <sup>a</sup>	0.955 $\pm$ 0.052 <sup>e</sup>
辣木多肽处理组	0	0.427 $\pm$ 0.058 <sup>e</sup>	1.917 $\pm$ 0.069 <sup>a</sup>
	10	0.523 $\pm$ 0.027 <sup>e</sup>	1.823 $\pm$ 0.119 <sup>a</sup>
	50	0.671 $\pm$ 0.024 <sup>d</sup>	1.615 $\pm$ 0.027 <sup>b</sup>
	100	0.768 $\pm$ 0.051 <sup>c</sup>	1.436 $\pm$ 0.025 <sup>c</sup>
	150	0.870 $\pm$ 0.035 <sup>b</sup>	1.278 $\pm$ 0.090 <sup>d</sup>

注: <sup>a-e</sup>: 字母不同表示组间差异显著( $p<0.05$ )。

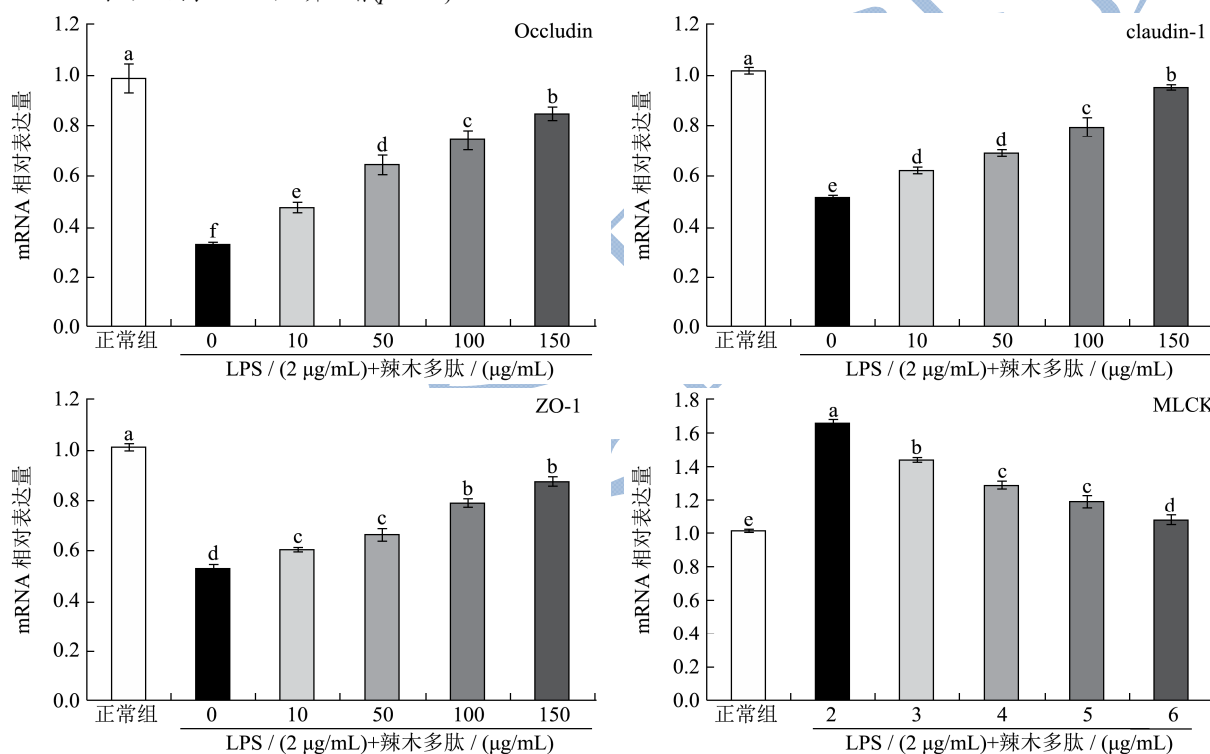


图 3 辣木多肽对 LPS 处理 Caco-2 细胞中细胞间紧密连接相关因子的 mRNA 转录水平的影响

Fig.3 Effects of MOPP on tight junction related factors mRNA expression in LPS treated intestinal Caco-2 cells

注: <sup>a-e</sup>: 不同字母表示差各组数据平均值显著性差异 ( $p<0.05$ )。

## 2.5 辣木多肽对 Occludin、claudin-1、ZO-1

和 MLCK 的 mRNA 转录水平影响

Occludin、claudin-1 与 ZO-1 蛋白是构成细胞间紧密连接(tight junction, TJs)的重要结构蛋白<sup>[19]</sup>。TJ 结构在参与调控物质的跨肠上皮运输, 维持细胞间结构稳定以及负责细胞间的通讯等方面具有非常重要的意义<sup>[20]</sup>。qRT-PCR 分析发现, LPS 刺激 Caco-2 细胞后, 细胞中 Occludin、claudin-1 和 ZO-1 的 mRNA 转录水

平显著下降(图 3)。与正常组相比, 模型细胞中 Occludin、claudin-1 和 ZO-1 的 mRNA 转录水平分别下降 67.2%、49.6%和 48.4%。相反, 给予辣木多肽处理后, 模型细胞中 Occludin、claudin-1 和 ZO-1 的 mRNA 转录水平均显著回升。高浓度辣木多肽(100  $\mu\text{g/mL}$  和 150  $\mu\text{g/mL}$ )能够较模型细胞分别提升 Occludin(2.30 倍与 2.61 倍)、claudin-1(1.55 倍与 1.85 倍)和 ZO-1(1.52 倍与 1.68 倍)的 mRNA 转录水平。

如图 3 所示, LPS 刺激能显著造成 Caco-2 细胞中 MLCK 的转录水平升高( $p<0.05$ )。而辣木多肽能够抑

制模型细胞中 MLCK 的转录水平。与模型组相比,高浓度(100  $\mu\text{g/mL}$  和 150  $\mu\text{g/mL}$ )的辣木多肽可显著抑制 MLCK 的 mRNA 转录水平(抑制率分别为 28.0%和 31.3%)。肌球蛋白轻链激酶(MLCK)能够通过促肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化使其参与肌动蛋白收缩,引发细胞骨架重排,破坏细胞 TJ 结构,最终造成细胞间通透性增高<sup>[21]</sup>。抑制肠上皮细胞中 MLCK 的过度活化,对于维持肠上皮细胞屏障和细胞间紧密连接的重要作用<sup>[22]</sup>。

### 3 结论

本研究基于 LPS 构建的 Caco-2 肠上皮细胞高通透性细胞模型研究了辣木多肽提取物对细胞高通透性的改善效果。研究发现,辣木多肽能够有效抑制 LPS 刺激所造成的细胞损伤后 LDH 外溢,并抑制 LPS 所造成的细胞死亡。辣木多肽可有效抑制 LPS 刺激所致 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  炎性细胞因子分泌并抑制其 mRNA 转录。此外,辣木多肽处理还能改善模型细胞的高通透性发生。从分子层面上,辣木多肽能显著上调受损细胞中 TJ 相关因子(Occludin、claudin-1 和 ZO-1)的 mRNA 转录,抑制导致细胞 TJ 丢失的 MLCK 的 mRNA 高转录。综合上述研究结果,辣木多肽对 LPS 所致 Caco-2 细胞发生高通透性的保护作用可能与其具有较强的抗炎作用以及对细胞 TJ 相关因子的 mRNA 转录水平的调控能力有关。在后续研究中,课题组将重点针对辣木多肽是否具有 MLCK 活化过程中的上、下游信号通路的调控作用而展开深入研究。

### 参考文献

- [1] 蔡文娟,章明放.上皮紧密连接与炎症肠病的研究进展[J].医学综述,2011,17(15):2274-2276  
CAI Wen-juan, ZHANG Ming-fang. Research advance in epithelial tight junctions and inflammatory bowel disease [J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(15): 2274-2276
- [2] Kaplan G G, Ng S C. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterology, 2017, 152(2): 313-321
- [3] Liu T C, Stappenbeck T S. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Annual Review Pathology. 2016, 11(1): 127-148
- [4] Greenhill C. IBD: glucocorticoids revealed to augment intestinal epithelial barrier function [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2014, 11(2): 75
- [5] Vlantis K, Polykratis A, Welz P S, et al. Original article: TLR-independent anti-inflammatory function of intestinal epithelial TRAF6 signalling prevents DSS-induced colitis in mice [J]. Gut, 2016, 65(6): 935-943
- [6] 邓卫利,林葵,黄一帆,等.辣木粉主要营养成分分析研究[J].食品研究与开发,2017,38(13):158-161  
DENG Wei-li, LIN Kui, HUANG Yi-fan, et al. Analysis of main nutrients in *Moringa oleifera* lam [J]. Food Research and Development, 2017, 38(13): 158-161
- [7] 周伟,刘能,林丽静,等.辣木叶功乙醇提取物的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2017,33(10):149-156  
ZHOU Wei, LIU Neng, LIN Li-jing, et al. Antioxidant activity of ethanol extract from *Moringa oleifera* leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 149-156
- [8] 任广旭,伊素芹,张鸿儒,等.辣木功效的研究现状[J].食品研究与开发,2016,37(16):219-222  
REN Guang-xu, YI Su-qin, ZHANG Hong-ru, et al. Research progress in function of *Moringa oleifera* [J]. Food Research and Development, 2016, 37(16): 219-222
- [9] 董竹平,李超,扶雄.不同品种辣木叶多糖的理化性质和抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2018,34(1):38-44  
DONG Zhu-ping, LI Chao, FU Xiong. Physicochemical characterization and antioxidant activity of polysaccharides from different varieties of *moringa oleifera* leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(1): 38-44
- [10] 许敏,赵三军,宋晖,等.辣木的研究进展[J].食品科学,2016,37(23):291-301  
XU Min, ZHAO San-jun, SONG Hui, et al. Advances in knowledge of *Moringa oleifera* [J]. Food Science, 2016, 37(23): 291-301
- [11] 叶红川,黄宏靓,高大可,等.抗氧化中药多肽研究进展[J].广东药学院学报,2017,33(2):282-284  
YE Hong-chuan, HUANG Hong-liang, GAO Da-ke, et al. Progress on antioxidant peptides derived from traditional Chinese medicine [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2017, 33(2): 282-284
- [12] Chen S W, Zhu J, Zuo S, et al. Protective effect of hydrogen sulfide on TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ -induced injury of intestinal epithelial barrier function in Caco-2 monolayers [J]. Inflammation Research, 2015, 64(10): 789-797
- [13] Li B, Zani A, Martin Z, et al. Intestinal epithelial cell injury is rescued by hydrogen sulfide [J]. Journal of Pediatric Surgery, 2016, 51(5): 775-778
- [14] 孟晓弘,季明昉,方一,等.炎症性肠病患者血清巨噬细胞极化相关细胞因子水平及其意义[J].胃肠病学,2015,20(9):538-541

- MENG Xiao-hong, JI Ming-fang, FANG Yi, et al. Levels and significance of serum macrophage polarization-related cytokines in patients with inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2015, 20(9): 538-541
- [15] 孙钦娟,李琴,宛东,等.细胞因子在炎症性肠病患者肠黏膜中表达的分析[J].胃肠病学,2018,23(1):13-17
- SHUN Qing-juan, LI Qing, WAN Dong, et al. Cytokines expression in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2018, 23(1): 13-17
- [16] 唐齐林,周国华,王为.TNF- $\alpha$ 、IL-6 在炎症性肠病发病机制中的研究进展[J].医学综述,2014,20(7):1174-1176
- TANG Qi-lin, ZHOU Guo-hua, WANG Wei. Research progress of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Medical Recapitulate, 2014, 20(7): 1174-1176
- [17] 王艳萍,姬林松,倪猛,等.不同严重程度溃疡性结肠炎患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-8 的表达及意义[J].中国老年学杂志,2015,35(14):3940-3941
- WANG Yan-ping, JI Lin-song, NI Meng, et al. Expression and significance of serum TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 in patients with different severity of ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(14): 3940-3941
- [18] 周勇.检测血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平对于评估溃疡性结肠炎患者病情的应用价值分析[J].中国中西医结合消化杂志,2015,23(4):286-287,290
- ZHOU Yong. Application value of serum IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 in evaluating the condition of patients with ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2015, 23(4): 286-287, 290
- [19] Perinelli D R, Vllasaliu D, Bonacucina G, et al. Rhamnolipids as epithelial permeability enhancers for macromolecular therapeutics [J]. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics, 2017, 119: 419-425
- [20] Seike S, Takehara M, Takagishi T, et al. Delta-toxin from *Clostridium perfringens* perturbs intestinal epithelial barrier function in Caco-2 cell monolayers [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2018, 1860(2): 428-433
- [21] Chopyk D M, Kumar P, Raeman R, et al. Dysregulation of junctional adhesion molecule-A contributes to ethanol-induced barrier disruption in intestinal epithelial cell monolayers [J]. Physiological Reports, 2017, 5(23)
- [22] 胡玥,吕宾.应激对肠上皮紧密连接功能的影响[J].生理科学进展,2017,48(2):113-116
- HU Yue, LYU Bing. Effect of stress in intestinal tight junctions [J]. Progress in Physiological Sciences, 2017, 48(2): 113-116
- [23] Xu P, Becker H, Elizalde M, et al. Intestinal organoid culture model is a valuable system to study epithelial barrier function in IBD [J]. Gut, 2017
- [24] 马军宏,于向阳,张楠,等.紧密连接蛋白与肠黏膜屏障损伤研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2015,21(1):104-105
- MA Jun-hong, YU Xiang-yang, ZHANG Nan, et al. Research progress on tight junction proteins and intestinal barrier damage [J]. Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine, 2015, 21(1): 104-105
- [25] 丁少桢,丁浩,梅俏,等.同型半胱氨酸调控 MEK-ERK-MLCK 通路影响结肠炎大鼠肠黏膜通透性的实验研究[J].中国药理学通报,2016,32(4):498-502
- DING Shao-zheng, DING Hao, MEI Qiao, et al. Effect of homocysteine on the intestinal permeability by regulating MEK-ERK-MLCK signal transduction in experimental colitis rats [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(4): 498-502