

卵黄高磷蛋白磷酸肽在 Caco-2 细胞单层模型中的促钙转运作用

李松明^{1,2}, 赵梦蝶¹, 刘伟¹, 马美湖¹, 金永国¹, 黄茜^{1*}

(¹华中农业大学食品科学技术学院

蛋品加工技术国家地方联合工程中心农业农村部蛋品加工重点实验室 武汉 430070

²宜宾林竹产业研究院 四川宜宾 644000)

摘要 结合高温低压处理、胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶复合酶解制备具有高钙结合能力的卵黄高磷蛋白磷酸肽(Phosvitin phosphopeptides, PPP)。通过优化确定制备 PPP-Ca 的最佳条件为 pH 9.5, 多肽与钙质量比 7:1, 此条件下钙整合率达到 97%, PPP-Ca 在模拟胃肠道消化中显示了极高的稳定性。使用 Caco-2 细胞单层模型验证 PPP-Ca 在体外的钙转运作用, 通过细胞形态、电阻值和荧光素钠透过率等验证 Caco-2 细胞模型, 毒性实验(MTT)结果显示 PPP-Ca 对 Caco-2 细胞呈现低毒性作用。研究 PPP-Ca 和 PPP 对 Caco-2 细胞转运钙离子质量浓度和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性的影响, 采用 RT-PCR 测定 CalbindinD9K m RNA 的相对表达量。结果表明, PPP 和 PPP-Ca 能够显著提高 AKP 活性, 钙转运量从(3.06±0.08)μg 增到(5.66±0.62)μg, CalbindinD9K m RNA 的表达量增加 2 倍, 进而增强人体肠道中钙的转运吸收。研究结果为开发新的钙补充剂和卵黄高磷蛋白提供了科学证据。

关键词 卵黄高磷蛋白磷酸肽; 肽钙螯合物; 稳定性; Caco-2 细胞; 转运吸收

文章编号 1009-7848(2023)06-0008-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.002

钙是人体主要的二价阳离子, 约占人体体重的 1.5%~2.2%。体内大部分(99%)的钙沉积在骨骼和牙齿中, 然而, 钙也以离子形式存在于软组织、细胞外液和血液中。钙不仅是肌肉收缩和放松、神经传递、免疫反应的细胞内信使, 而且能保持细胞增殖、血清和骨钙含量之间的动态平衡^[1]。钙缺乏可能导致代谢性骨病, 如佝偻病和骨质疏松症。研究人员发现, 氨基酸可与钙结合, 形成氨基酸络合钙, 其吸收快、吸收率高, 价格低, 具有可同时提供氨基酸和钙的优点^[2]。近年来的研究表明, 相比氨基酸螯合钙, 肽螯合钙具有更易被吸收且吸收速率更快的特点, 这是由于其独特的螯合机制和转运机制, 同时多肽本身具有特殊生物活性^[3-4]。因此, 具有促钙吸收生物活性功能的肽钙复合物有很好的应用前景和发展空间。

传统观念认为钙仅以离子形式被吸收, 它必须被溶解或从它的来源中释放出来。然而, 一些溶解的钙会在小肠的碱性 pH 值中与矿物质或其它

膳食成分如草酸和植酸形成不溶性复合物, 导致钙吸收和利用不足。近年来研究发现, 酪蛋白磷酸肽(CPPs)能结合钙离子形成可溶性肽-钙复合物, 促进钙吸收和在骨中的积累^[5]。CPP 可以促进钙吸收的 Caco-2 细胞调控的 TRPV6 表达, 关于钙离子在肠道内的吸收转运机制主要有两种: 主动跨细胞转运机制和被动旁细胞转运机制^[6]。在鸡蛋蛋黄中同样存在一种高磷酸化的蛋白——卵黄高磷蛋白(PV), 它是自然界中磷酸化程度最高的蛋白^[7]。PV 中可以被磷酸化的丝氨酸和苏氨酸残基几乎都被磷酸化, 许多丝氨酸残基排列成最多 15 个连续残基。虽然目前所有的商业磷酸肽都是用酪蛋白制备的, 但是 PV 具有更高的磷酸化水平, 是比酪蛋白更好的磷酸肽制备来源。然而, 由于 PV 具有很强的负电荷, 阻碍了蛋白酶进入裂解位点^[8]。最近, 本课题组开发了一种高温中压(HTMP, 121 °C, 0.1 MPa)预处理技术, 在不损失 PV 中磷酸基团的情况下, 提高了卵黄高磷蛋白的酶解程度, 可释放出更丰富的磷酸肽片段(PPP)^[9]。

目前, 关于 PPP 促钙吸收转运的活性研究鲜有报道。本研究目的是采用复合酶解的方法处理 PV 得到水溶性多肽 PPP, 优化肽结合钙的制备条件, 探究肽钙螯合物的酸碱稳定性。采用 Caco-2

收稿日期: 2022-06-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072237); 湖北省自然科学基金项目(2020CFB583)

第一作者: 李松明, 男, 硕士生

通信作者: 黄茜 E-mail: huangxi@mail.hzau.edu.cn

单层细胞模型,依据细胞钙转运量、AKP 活性和 CalbindinD9K mRNA 的相对表达量来评估 PPP-Ca 的体外促钙吸收特性。研究结果旨在利用鸡蛋中的活性肽作为功能性营养补充剂提供参考。

1 材料方法

1.1 材料与试剂

采用 Lei^[10]的方法制备卵黄高磷蛋白。人结直肠腺癌细胞(Caco-2 cells),由武汉普诺赛生命科技有限公司提供,碱性蛋白酶(alkaline phosphatase, AKP)活性检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶,美国 Enzyme Co. Ltd (Elgin, IL, USA);MTT、DMEM 培养基、MEM 培养基、二甲基亚砷、PBS 缓冲液、0.25%胰酶(含 0.02% EDTA)、青霉素-链霉素,美国 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS),澳洲 GIBCO 公司。

1.2 主要仪器和设备

酶标仪,联想生物技术有限公司;JSM-6390LV 扫描电镜,日本 NTC 公司;HERAcell 1501 二氧化碳培养箱,德国 Thermo Scientific 公司;IX71 荧光倒置显微镜,日本 Olympus 公司;DL-CJ-2ND 超净工作台,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;Millicell-ERS 电阻仪,美国 Millicell 公司;XB-K-16 血球计数板,上海安信光学仪器公司;HH-4 数显电子恒温水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司;TDL-50B 台式低速离心机,上海安亭科学仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 卵黄高磷蛋白磷酸肽的制备 PPP 是按照 Ji 等^[11]的方法制备的,并进行了一些修改。PV 进行 HPMP 预处理,预处理的温度、压力和时间条件为 121 ℃、0.1 MPa、30 min,然后用胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶依次对 HTMP 预处理的卵黄高磷蛋白进一步水解,制备 PPP。两次酶解结束后都将样品在沸水浴中保存 10 min,以终止酶解得到 PPP。酶解溶液冻干并保存在-20 ℃的冰箱中直到使用。

1.3.2 肽-钙螯合物制备及其优化 将酶解得到的 PPP 溶于去离子水(10 mg/mL)中,加入 CaCl₂ 制备肽钙螯合物。

肽钙质量比:设定螯合反应条件,pH 7.0,温

度 40 ℃,反应时间 30 min,设定不同肽钙质量比为 5:1,6:1,7:1,8:1,9:1,10:1,以钙结合率确定最佳肽钙质量比。

反应 pH 值:设定螯合反应条件,肽钙比 1:1,温度 40 ℃,反应时间 30 min,设定不同 pH 值,以钙结合率为指标确定最佳反应 pH 值。

反应温度:设定螯合反应条件,肽钙比 1:1,pH 7.0,反应时间 30 min,设定不同温度为室温,30,40,50,60 ℃,以钙结合率为指标确定最佳反应温度。

反应时间:设定螯合反应条件,肽钙比 1:1,pH 7.0,温度 40 ℃,设定不同反应时间为 5,15,30,45,60,75 min,以钙结合率为指标确定最佳反应时间。

1.3.3 肽钙螯合物的胃肠稳定性分析 模拟消化稳定性:胃部消化,将肽钙复合物配制成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,用 1 mol/L HCl 调 pH 2.0,加入 2%胃蛋白酶 37 ℃水浴消化 0.5,1,1.5,2,2.5 h 后取出一部分消化液,100 ℃水浴灭酶 10 min,9 倍体积无水乙醇沉淀后离心,原子吸收测定上清液钙含量,计算胃部消化后 PPP 的钙结合量。

小肠消化:胃部消化后,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 7.5,加入胰蛋白酶 37 ℃水浴消化 0.5,1,1.5,2,2.5 h 后取出一部分消化液,100 ℃水浴灭酶 10 min,9 倍体积无水乙醇沉淀后离心,原子吸收测定上清液钙含量,计算小肠消化后 PPP 的钙结合量。

稳定性用钙储留率表示:

$$\text{钙储留率} = \frac{\text{Ca}_{\text{后}}}{\text{Ca}_{\text{前}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:Ca_后——消化后的钙含量;Ca_前——消化前的钙含量。

1.3.4 Caco-2 细胞培养及单层模型制备 Caco-2 细胞复苏是将细胞冻存管迅速从液氮罐中转移至 37 ℃水浴锅中,融化后用吸管吸出细胞悬液加适量完全培养基,混匀后离心(1 000 r/min,3 min)。弃去上清液,加入含有 20% FBS 的完全 DMEM 培养基重悬细胞,接种到 25 cm² 的细胞培养瓶中,于 37 ℃ CO₂ 培养箱中静置培养,次日更换培养基。

待培养瓶中的细胞融合到 80%以上,用 PBS

清洗3遍细胞,胰酶消化5~8 min,添加适量培养基终止消化,离心(1 000 r/min,3 min)得到细胞,添加新鲜完全培养基(89% DMEM、10% 胎牛血清、1%双抗)并吹打均匀,按照1:2或者1:3的比例传代培养,隔天换液,3~4 d进行传代,复苏以后的细胞传代3次后细胞活力上升,调整细胞密度约 1×10^5 cells/mL,每孔0.5 mL接种于TranswellTM 12板上室(AP侧),下室(BL侧)添加1.5 mL完全培养基于培养箱中培养。接种细胞后前1周,每隔1 d更换新鲜培养液,之后每天换液。培养到约21 d,细胞分化成致密单层细胞,可以用于科学试验。

1.3.5 不同浓度多肽及肽钙螯合物对Caco-2细胞毒性的影响 试验分为6组:①空白组:培养液+MTT溶液;②对照组:培养液+MTT溶液+细胞;③给药组1:PV+培养液+MTT溶液+细胞;④给药组2:HTMP-PV+培养液+MTT溶液+细胞;⑤给药组3:PPP+培养液+MTT溶液+细胞;⑥给药组4:PPP-CaCl₂+培养液+MTT溶液+细胞。

取对数生长期的 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个/mL的细胞悬浊液100 μ L放入96孔培养板中培育24 h,细胞贴壁后换液,分别加入含有不同质量浓度的样品(0,50,100,200,300,400,500 μ g/mL)的培养基100 μ L。培养24 h结束后,每孔加入含有0.5 mg/mL的MTT的无血清培养液MEM 200 μ L,继续培养4 h后,每孔加入150 μ L DMSO,室温下摇床振荡10 min,充分混匀并溶解蓝紫色的甲臜颗粒。在酶标仪上选择570 nm波长,测定各孔吸光度值。试验重复3次,取平均值。按以下公式计算:

$$\text{细胞增殖率}(\%) = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_s ——试验组吸光度值; A_c ——对照组吸光度值; A_b ——空白组吸光度值。

1.3.6 Caco-2细胞单层模型的建立 钙转运试验采用单层细胞模型^[12]。将处于生长对数期的Caco-2细胞消化后,以 1×10^5 个/mL的密度接种到12孔TranswellTM培养板上。TranswellTM培养板上室(AP侧)添加0.5 mL细胞培养基,随后在下室(BL侧)加入1.5 mL完全培养基,每组设置3个平行。细胞接种后隔天换液,7 d后每天换液,培养至21~27 d,细胞形成致密单层可以用于后续试

验。

1.3.7 Caco-2细胞单层跨上皮电阻 Caco-2细胞单层模型建立的整个过程都需要监控TEER值的变化情况,为研究药物渗透性提供依据。将MilicellERS-2型细胞电阻仪的电极两端分别放置于TranswellTM培养板中AP侧小室和BL侧小室测定电阻值。其计算公式为:

$$\text{TEER}(\Omega \cdot \text{cm}^2) = [\text{TEER}(\Omega) - \text{TEER}_{\text{空白}}(\Omega)] \times \text{支持膜面积}(\text{cm}^2) \quad (3)$$

其中12孔TranswellTM培养板中支持膜面积为1.12 cm^2 。

1.3.8 碱性磷酸酶活性试验 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,AKP)是肠上皮细胞刷状缘的标志酶,能反映肠上皮细胞分化程度及其功能状态。细胞TEER值大于200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 后,每隔2 d分别取AP侧与BL侧中培养基,根据碱性磷酸酶试剂盒的方法测定AKP活性。

1.3.9 Caco-2细胞单层通透性验证 荧光黄标准曲线的制备:用荧光分光光度计测定不同质量浓度(0.5,0.75,1,1.25,1.5,1.75 μ g/mL),以荧光强度为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,求得标准曲线。

向AP侧加入0.5 mL荧光黄溶液(5 μ g/mL),BL侧加1.5 mL HBSS,将培养板放置在37 $^{\circ}$ C恒温摇床上培养0,30,60,90,120 min,分别从BL侧取0.5 mL样品液,再向BL侧加入0.5 mL预热HBSS。在试验结束时,用荧光光度计测定样品液荧光强度,依据以下公式计算表观渗透系数 P_{app} 。

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ/dt}{AC_0} \quad (4)$$

式中: dQ/dt ——单位时间荧光黄转运量,mg/s; A ——转运膜表面积; C_0 ——培养液中荧光黄原始质量浓度, μ g/mL。

1.3.10 Caco-2细胞单层形态观察 将Caco-2细胞接种在12孔TranswellTM培养板中培养21 d,细胞用PBS清洗后用戊二醛固定,脱水处理后临界点干燥喷金,生物扫描电子显微镜下观察。

1.3.11 钙转运试验 钙离子不同浓度梯度转运试验:配制不同浓度的CaCl₂溶液(0.5,1,2,4 mg/mL),溶于HBSS缓冲溶液中后37 $^{\circ}$ C水浴)。Caco-2单层模型建立21 d后,将12孔TranswellTM板

上下室清洗 3 遍后, 下室加 1.5 mL 预热的 HBSS (无钙), 上室加入 0.5 mL 的 CaCl_2 溶液, 3 h 后取下室溶液, 原子吸收光谱法测定其钙含量。

肽钙复合物转运试验: 操作如钙离子转运试验, 清洗后, 下室加入 1.5 mL 预热的 HBSS, 上室加入 0.5 mL 的肽钙复合物, 3 h 后取下室溶液, 原子吸收光谱法测定其钙含量。

1.3.12 TRPV6 钙离子通路中 CalbindinD9K m RNA 相对表达量 在建模 21 d 后, 用含有 (PV、HTMP、PPP、PPP-Ca) 的完全培养基处理 24 h 后, HBSS 清洗 3 遍。用裂解液收集细胞, RT-PCR 测定 CalbindinD9K m RNA 的相对表达量。

1.3.13 数据分析 试验结果都采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 试验数据采用 SPSS Statistics 和 Excel 等软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 磷酸肽螯合钙制备条件优化

肽与钙的质量比是影响多肽与金属离子螯合

的最主要因素。肽与钙的比率过高会导致肽利用率降低, 过低则会导致反应形成的络合物稳定性差^[13]。Wu 等^[14]发现猪骨胶原肽与钙的质量比为 4.5:1 时, 钙结合率为 78.38%。

图 1a 显示, 随着 PPP 与 Ca^{2+} 的质量比的增大, 钙螯合率显著增加 ($P < 0.05$), 在质量比为 7:1 时, 钙螯合率达到 97%, 质量比继续增大钙螯合率稳定。pH 值对钙螯合率的影响如图 1b 所示。由图可知, 随着反应体系 pH 值的增大, 钙螯合率变化明显。当底物的 pH 值从 5.5 增加到 9.5 时, 钙螯合率显著增加 ($P < 0.05$)。钙结合率显著上升可能是因为反应体系中的氢离子减少, 因此有更少的氢离子与钙离子竞争结合磷酸基团, 有利于钙结合到磷酸肽表面。因此, 螯合反应的最佳 pH 值为 9.5。已有研究发现, 卵黄高磷蛋白的金属结合速率较快, 在较短时间内就可以结合金属离子^[15]。图 1c、1d 结果显示, 反应温度和螯合时间对肽钙结合率没有显著影响。

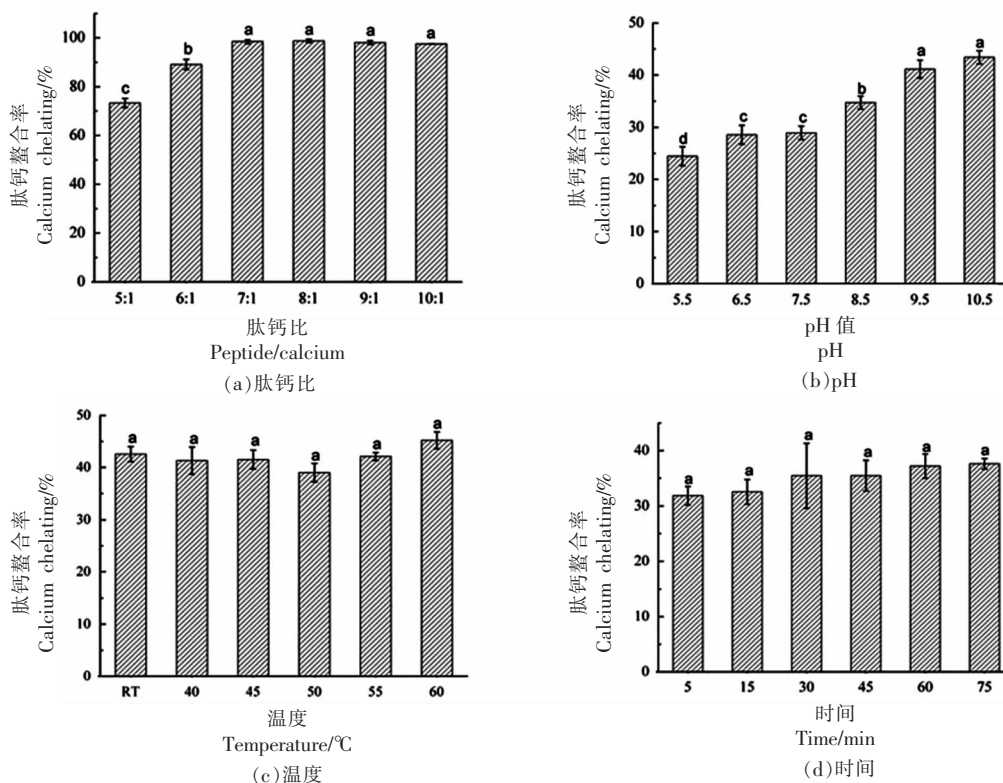
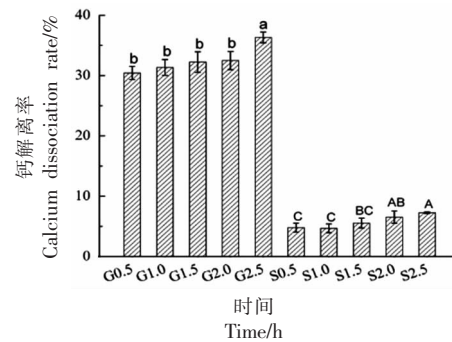


图 1 螯合条件对钙螯合率的影响

Fig.1 The effect of chelating conditions on the calcium chelating rate

2.2 模拟胃肠道消化稳定性

膳食成分被机体吸收利用需要经胃消化后在肠道被吸收,因此依据物质对胃蛋白酶、胰蛋白酶的耐受性可模拟评价其在消化过程中的稳定性^[16]。食物在体内的消化过程中,一般经过胃的时间是0.5~3.0 h,经过肠道的时间是2.0~2.75 h。如图2所示,肽钙复合物经胃蛋白酶作用时,随着时间的延长,其钙解离率增大。当胃蛋白酶酶解2.5 h时,其钙解离率为36.31%。这可能是因为模拟胃部消化体系的pH值为2.0,结合pH值对PPP-Ca稳定性结果可知,酸性条件下肽钙复合物的稳定性降低,解离出钙离子,因此钙解离率较高^[17]。复合物的最终钙保留率为63.69%,说明胃蛋白酶对PPP-Ca的作用不大,仅对pH值较为敏感。加入胰蛋白酶调节pH值到7.5,模拟肠液消化2.5 h时,肽钙复合物的钙解离率为7.25%。钙保留率为92.75%。结果表明,肽钙复合物对胰蛋白酶的消化不敏感,在胰蛋白酶酶解过程中,反应体系pH值为中性,由肽钙复合物的酸碱稳定性试验结果可



注:G0.5~G2.5:PPP-Ca在模拟胃消化液中0.5~2.5 h;S0.5~S2.5:PPP-Ca在模拟肠道消化液中0.5~2.5 h。

图2 模拟胃肠道消化对肽钙复合物稳定性的影响
Fig.2 The effects of simulated gastrointestinal digestion on the stability of peptide-calcium complexes

得,肽钙复合物可在此pH值条件下保持稳定^[18]。

2.3 Caco-2 细胞毒性试验

采用MTT法测定PV、HTMP-PV、PPP和PPP-Ca对于Caco-2细胞的毒性作用,试验结果如图3所示,PV、HTMP-PV、PPP、PPP-Ca的浓度

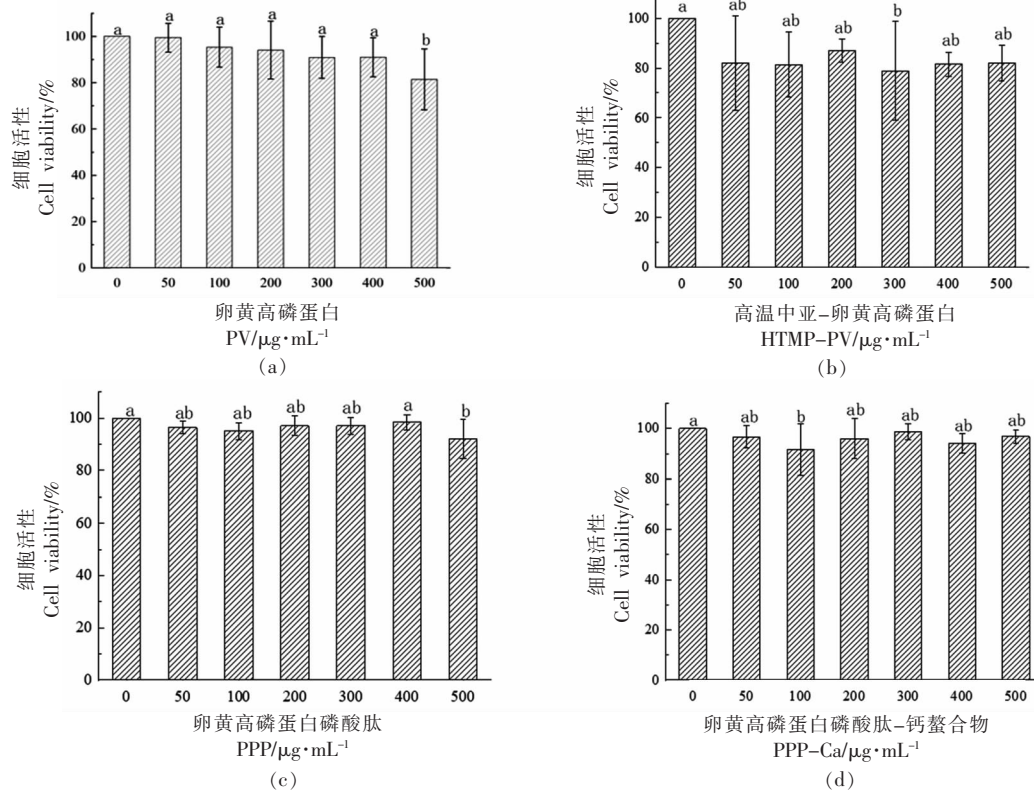


图3 不同浓度PV(a)、HTMP-PV(b)、PPP(c)和PPP-Ca(d)对Caco-2细胞的细胞毒性作用

Fig.3 Cytotoxic effects of PV (a), HTMP-PV (b), PPP (c) and PPP-Ca (d)

at different concentrations on cultured Caco-2 cells

在 0~400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, Caco-2 细胞经样品处理 24 h 后, 细胞活性均能保持在 80% 以上。说明 4 种样品对 Caco-2 细胞均不具有较大的毒性作用, 可做后续试验^[19]。

2.4 Caco-2 细胞单层模型 TEER 值

在接种 Caco-2 细胞于 TransWellTW 板上后, 每 2 d 测定细胞单层跨膜电阻值 (Trans epithelial electrical resistance, TEER)。由图 4 可知, TEER 值在建模 7 d 内增加稍缓, 这是由于 Caco-2 细胞刚开始贴壁, 细胞分裂尚未达到融合^[20]。而当 Caco-2 细胞开始融合, 从第 10 天起 TEER 值开始急剧增加, 在第 14 天达到 $860 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$, 此后保持相对稳定状态。据文献报道当 TEER 值大于 $250 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ 时, 表明 Caco-2 细胞形成了致密的单层膜结构, 可以用于药物的转运试验研究^[21]。

2.5 Caco-2 细胞单层模型碱性磷酸酶 (AKP) 活性

碱性磷酸酶是 Caco-2 细胞单层模型建立过程中分泌的标志性酶。主要在细胞单层的刷状缘部位表达, 并反映细胞单层膜的极化状况^[21]。若 AP 侧 AKP 活性显著高于 BL 侧, 则说明 Caco-2

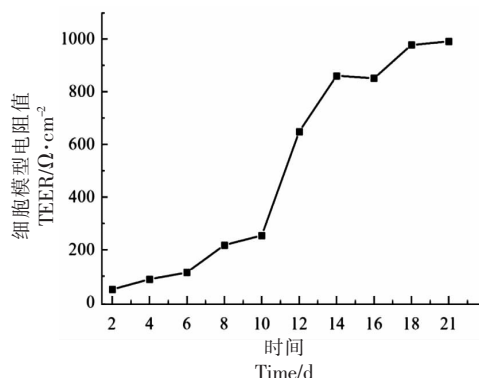


图 4 Caco-2 细胞单层模型的跨膜电阻 (TEER) 与建模时间的关系

Fig.4 The transepithelial electrical resistance (TEER) of Caco-2 cells monolayer model in relation to modeling time

细胞单层膜极化情况较好。如表 1 所示, 在第 10 天时, AP 侧和 BL 侧 AKP 活力比为 1.06, 说明细胞极化程度还未达到要求, 此时的 TEER 值也较低 (图 4)。随着培养时间的延长, AKP 活性呈上升趋势, 在第 21 天时, AP/BL 酶活力比达到 3.39, 表明 Caco-2 细胞单层模型极化基本完成, 可以用于药物转运试验。

表 1 不同培养时间 Caco-2 细胞单层膜两侧碱性磷酸酶活性变化情况

Table 1 The changes of alkaline phosphatase activity on both sides of the monolayer of Caco-2 cells at different culture times

培养天数/d	AP 侧酶活力/ 金氏单位 $\cdot (100 \text{ mL})^{-1}$	BL 侧酶活力/ 金氏单位 $\cdot (100 \text{ mL})^{-1}$	AP 侧酶活力/ BL 侧酶活力
10	1.97 ± 0.01	1.86 ± 0.17	1.06
14	2.16 ± 0.24	1.40 ± 0.14	1.54
18	2.49 ± 0.16	1.59 ± 0.13	1.58
21	5.36 ± 0.41	1.58 ± 0.09	3.39

2.6 Caco-2 细胞单层模型通透性试验

如表 2, 在培养 21 d 后, 测定 Caco-2 细胞单层膜荧光黄通透性。根据公式计算出添加荧光黄溶液于上室后, 每 30 min 后取下室溶液测定荧光

黄荧光强度。结果表明, Caco-2 细胞在 TranswellTM 板中培养 21 d 后, 荧光黄的渗透率在 120 min 能达到 $(7.79 \pm 0.12) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 表明已经形成了完整的单细胞层^[22]。

表 2 不同处理时间 Caco-2 细胞单层模型的荧光黄通透性

Table 2 Fluorescence yellow permeability of Caco-2 cell monolayer model at different treatment times

时间/min	30	60	90	120
荧光黄渗透率 $\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	—	2.77 ± 0.03	3.04 ± 0.08	7.79 ± 0.12

2.7 Caco-2 细胞单层模型形态

在 Caco-2 细胞接种于 TranswellTM 板上培养 21 d 后,用戊二醛进行固定,临界点喷金干燥后在生物扫描电镜下观察。结果如图 5 所示,可以观察到清晰致密的微绒毛结构,这说明 Caco-2 细胞已经形成了单层膜,并且分化出了单层膜的形态学特征,可用于药物转运试验。

2.8 钙转运试验

由图 6 可知,在建模 21 d 后,在上室中加入不同浓度的 CaCl_2 溶液 0.5 mL,3 h 后测定下室中的钙离子含量,发现随着钙离子浓度的增大,下室中钙的转运量增大,并呈现一定的剂量依赖性。说明 Caco-2 单层细胞模型建立成功,具有转运药物的能力。进一步由图 7 发现,在上室加入钙离子 100 μg 的 CaCl_2 、PV+ CaCl_2 、HTMP-PV+ CaCl_2 和 PPP- CaCl_2 ,3 h 后测定下室钙含量, CaCl_2 的钙转运量为 3.06 μg ,PV+ CaCl_2 、HTMP-PV+ CaCl_2 和 PPP- CaCl_2 的钙转运量分别为 4.09 μg 、5.33 μg 和 5.66 μg 。结果表明 PPP- CaCl_2 可明显提高钙转运量,且高于无机钙 CaCl_2 组。这也与有些文献结果一致,例如,13 ku 葵花籽肽(SSP4)和 10 ku 花生肽(PP1)的钙复合物组分在 Caco-2 细胞单层膜中的钙转运量显著高于 CaCl_2 组^[23]。

2.9 TRPV6 钙离子通路相关蛋白 mRNA 的表达

钙离子在肠道内的吸收转运机制主要有两种,主动跨细胞转运机制(如 TRPV6 钙离子通道、Cav3.1 钙离子通道等)和被动旁细胞转运机制。Caco-2 主要表达的是 TRPV6 钙离子通道,通过测定 TRPV6 钙离子转运通路中的 CalbindinD9K 蛋白基因表达情况可以得出其钙离子转运能力。由图 8 发现用 PPP- CaCl_2 处理 24 h 后,PV- CaCl_2 组的 CalbindinD9K mRNA 表达量与对照组没有显著差异($P>0.05$)。HTMP-PV 和 PPP-Ca 组的 CalbindinD9K mRNA 的相对表达量明显上调($P<0.05$),其中 PPP-Ca 组达到 2.22,是对照组的 2 倍多。表明肽钙复合物可通过上调 CalbindinD9K mRNA 的表达,增加钙的转运量^[24]。

3 结论

本试验首先优化了 PPP-Ca 整合的最佳条件,结果显示在 pH 值为 9.5,多肽与钙质量比 7:1

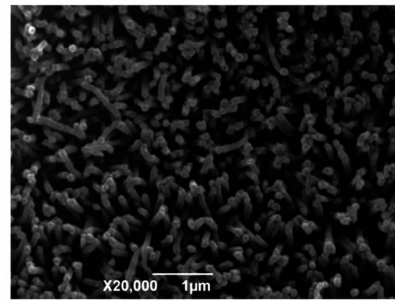


图 5 培养 21 d 后 Caco-2 细胞单层细胞的 SEM 图
Fig.5 SEM image of monolayer cells of Caco-2 cells after 21 days of culture

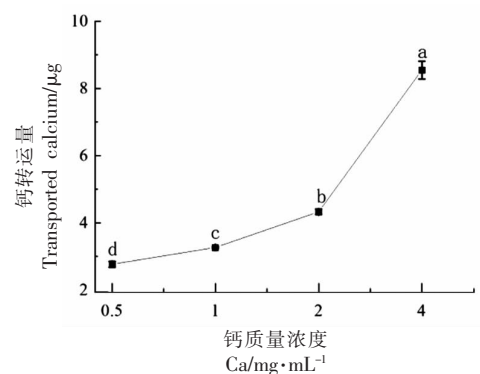


图 6 不同钙离子浓度的钙转运量

Fig.6 Calcium transports at different calcium ion concentrations

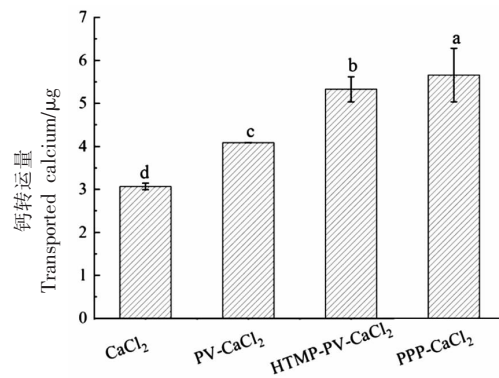
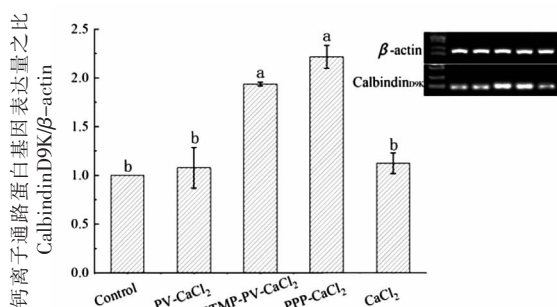


图 7 PV-Ca、HTMP-PV-Ca、PPP-Ca 和 CaCl_2 对 Caco-2 单层细胞模型钙转运量的影响
Fig.7 Effect of enzymatic hydrolysates of several different treatment conditions on proliferation of Caco-2 cells

的条件下,钙整合率达到 97%,PPP-Ca 在模拟胃肠道消化中显示了极高的稳定性。在 Caco-2 细胞单层模型中,用 MTT 法验证了 PV、HTMP-PV、PPP-Ca 对 Caco-2 细胞的无毒性作用,在建模 21



注:RT-PCR 电泳条带依次为:对照组、PV-CaCl₂、HTMP-PV-CaCl₂、PPP-CaCl₂、CaCl₂。

图 8 PV-Ca、HTMP-PV-Ca、PPP-Ca 和 CaCl₂ 对 Caco-2 单层细胞 TRPV6 钙离子通路基因 CalbindinD9K 表达水平 RT-PCR 分析

Fig.8 RT-PCR analysis of PV-Ca, HTMP-PV-Ca, PPP-Ca and CaCl₂ on the calbindinD9K of TRPV6 Ca²⁺ pathway genes expression level of Caco-2 monolayer cells

d 后检测细胞的钙离子转运量,结果表明:PV+CaCl₂、HTMP-PV+CaCl₂ 和 PPP-Ca 均可以增加钙转运量与 CaCl₂ 组相比,其中 PPP-Ca 组的钙转运量最高,达到(5.66±0.62)μg。同样在 Caco-2 细胞单层试验中,在探究 CalbindinD9K mRNA 表达情况时,发现 PPP-Ca 可以上调 CalbindinD9K mRNA 的表达,从而增加钙的转运量。

本试验对 PPP 的跨 Caco-2 细胞膜转运吸收机制进行研究,便于筛选出生物利用度高的促钙吸收肽和其结构特征,为这些肽提高生物利用度并起到更好补钙的作用提供可能。但是 PPP 在 Caco-2 细胞单层膜中的具体转运通路机制可能需要通过抑制通路表达来进一步验证。

参 考 文 献

- [1] CHEN J, QIU X, HAO G, et al. Preparation and bioavailability of calcium-chelating peptide complex from tilapia skin hydrolysates[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2017, 97(14): 4898-4903.
- [2] 赵立娜, 汪少芸, 张亚娇, 等. 响应面法优化乳清蛋白肽螯合钙离子的研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(4): 64-71.
Zhao L N, WANG S Y, ZHANG Y J, et al. Optimization of chelation of whey protein peptides with

calcium using response surface method[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(4): 64-71.

- [3] HIROSHI H, RYUHEI F, MITSUO I, et al. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained condition [J]. Journal of Nutrition, 1984, 114(6): 1122-1129.
- [4] 涂宗财, 李春平, 王辉, 等. 木瓜蛋白酶水解珠蚌制备肽钙及其红外光谱分析[J]. 食品科技, 2012, 37(7): 92-96.
TU Z C, LI C P, WANG H, et al. Preparation of mussel active peptide chelate with calcium by using papain and analysis with infrared spectrum[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(7): 92-96.
- [5] ZHAO M D, LI S S, AHN D U, et al. Phosvitin phosphopeptides produced by pressurized hea-trypsin hydrolysis promote the differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells via the OPG/RANKL signaling pathways[J]. Poultry Science, 2021, 100(2): 527-536.
- [6] LI X Y, MA M H, AHN D U, et al. Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123(15): 477-484.
- [7] HUANG X, AHN D U. How can the value and use of egg yolk be increased?[J]. J. Food Sci., 2019, 84(2): 205-212.
- [8] LI X Y, CAI Z X, AHN D U, et al. Development of an antibacterial nanobiomaterial for wound-care based on the absorption of AgNPs on the eggshell membrane [J]. Colloid. Surface B, 2019, 183(1): 110449.
- [9] HUANG X, SUN H M, LEE J, et al. Effective preparation method of phosphopeptides from phosvitin and the analysis of peptide profiles using tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(51): 14086-14101.
- [10] LEI B, WU J P. Purification of egg yolk phosvitin by anion exchange chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1223(3): 41-46.
- [11] JI S N, AHN D U, ZHAO Y L, et al. An easy and rapid separation method for five major proteins from egg white: successive extraction and MALDI-TOF-MS identification [J]. Food Chemistry, 2020,

- 315(3): 126207.
- [12] SUN N, JIN Z, LI D, et al. An exploration of the calcium-binding mode of egg white peptide, asp-his-thr-lys-glu, and in vitro calcium absorption studies of peptide-calcium complex[J]. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 2017, 65(44): 9782-9789.
- [13] JUNG W K, KARAWITA R, HEO S, et al. Recovery of a novel Ca-binding peptide from alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(9): 2097-2100.
- [14] WU W M, HE L C, LIANG Y H, et al. Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis[J]. *Food Chemistry*, 2019, 284(30): 80-89.
- [15] ZHANG X W, GENG F, HUANG X, et al. Calcium binding characteristics and structural changes of phosvitin[J]. *J Inorg Biochem*, 2016, 159: 76-81.
- [16] HUANG XI, LEE E J, AHN D U. Development of non-dairy creamers using egg white, yolk, and soy proteins [J]. *Asian Austral. J. Animal. Science*, 2019, 32(6): 881-890.
- [17] SHENG L, TANG G Y, WANG Q, et al. Molecular characteristics and foaming properties of ovalbumin-pullulan conjugates through the Maillard reaction[J]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 100: 105384.
- [18] YANG X, YU X, YAGOUB A G, et al. Structure and stability of low molecular weight collagen peptide (prepared from white carp skin) -calcium complex[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2021, 136(2): 110335.
- [19] LIAO W, CHEN H, JIN W, et al. Three newly isolated calcium-chelating peptides from tilapia bone collagen hydrolysate enhance calcium absorption activity in intestinal Caco-2 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(7): 2091-2098.
- [20] HOU T, WANG C, MA Z L, et al. Desalted duck egg white peptides: promotion of calcium uptake and structure characterization[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(37): 8170-8176.
- [21] SANGSAWAD P, ROYTRAKUL S, CHOOWONGKOMON K, et al. Transepithelial transport across Caco-2 cell monolayers of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from simulated in vitro gastrointestinal digestion of cooked chicken muscles[J]. *Food Chemistry*, 2018, 251(15): 77-85.
- [22] CHAN E C, TAN W L, HO P C, et al. Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1072(2): 159-168.
- [23] BAO X L, YUAN X Y, FENG G X, et al. Structural characterization of calcium-binding sunflower seed and peanut peptides and enhanced calcium transport by calcium complexes in Caco-2 cells[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 101(2): 794-804.
- [24] ZHAO Q C, ZHAO J Y, AHN D U, et al. Separation and identification of highly efficient antioxidant peptides from eggshell membrane [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 495.

Pro-calcium Transport by Phosvitin Phosphopeptides in a Monolayer Model of Caco-2 Cells

Li Songming^{1,2}, Zhao Mengdie¹, Liu Wei¹, Ma Meihu¹, Jin Yongguo¹, Huang Xi^{*}

¹National Research and Development Center for Egg Processing, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

²Yibin Forestry and Bamboo Industry Research Institute, Yibin 644000, Sichuan)

Abstract Phosvitin phosphopeptides (PPP) with high calcium binding capacity were prepared by a combination of high-temperature and low-pressure treatment, trypsin and thermophilic protease complex digestion. The optimum conditions for the preparation of PPP-Ca were determined to be pH 9.5 and a peptide-to-calcium mass ratio of 7:1. 97% calcium chelation was achieved under these conditions and PPP-Ca showed excellent stability in simulated gastrointestinal diges-

tion. The monolayer model of Caco-2 cells was used to verify the calcium transport of PPP-Ca *in vitro*. The Caco-2 cell model was validated by cell morphology, electrical resistance and sodium fluorescein permeation, and MTT results showed that PPP-Ca exhibited low toxic effects on Caco-2 cells. The effects of PPP-Ca and PPP on the mass concentration of calcium ions transported and the activity of alkaline phosphatase (AKP) in Caco-2 cells were investigated, and the relative expression of CalbindinD9K m RNA was determined by RT-PCR. The results showed that PPP and PPP-Ca significantly increased AKP activity, increased calcium transport from $(3.06 \pm 0.08) \mu\text{g}$ to $(5.66 \pm 0.62) \mu\text{g}$, and increased CalbindinD9K m RNA expression by 2-fold, thus enhancing calcium transport and absorption in the human intestine. The findings provide scientific evidence for the development of new calcium supplements and phosvitin phosphopeptides.

Keywords phosvitin phosphopeptides; peptide calcium chelate; stability; Caco-2 cells; transport uptake