

• 药理与临床 •

制霜对千金子总蛋白结构及肠道毒性的影响

王慧楠, 魏晓彤, 姜明瑞, 马思媛, 胡宇峰, 朱海婷, 张俊丽, 张新宁, 王英姿*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 研究制霜对千金子 *Euphorbiae Semen* 总蛋白结构及肠道毒性的影响。方法 采用凝胶电泳、紫外光谱、红外光谱、圆二光谱、荧光光谱等研究千金子总蛋白经模拟制霜前后蛋白结构的变化; 通过 MTT、ELISA、Western blotting 法研究千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞存活率、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-10 含量、闭合蛋白 (occludin) 和紧密连接蛋白-1 (claudin-1) 蛋白表达的影响; 利用 HE 染色、Western blotting 法探讨千金子总蛋白经模拟制霜前后对小鼠结肠组织病理形态及 occludin、claudin-1 蛋白表达的影响。**结果** 千金子总蛋白经模拟制霜后总蛋白变性、溶解度降低 ($P < 0.01$), 其相对分子质量分布发生改变; 280 nm 处的紫外特征吸收峰强度降低; 荧光强度降低, 最大荧光吸收波长发生红移; α -螺旋结构含量减少, β -折叠、 β -转角和无规卷曲结构含量增加 ($P < 0.01$); 红外光谱中酰胺 I 带向低波数发生位移, 且峰形趋于平缓。与千金子总蛋白相应剂量组比较, 千金子总蛋白模拟制霜对 TNF- α 、IL-1 β 含量的上调作用、对 IL-10 含量的下调作用以及对 occludin、claudin-1 蛋白表达的下调作用均明显减弱 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 千金子制霜减毒的机制可能与制霜后毒性成分总蛋白发生变性, 总蛋白结构发生改变, 致使千金子总蛋白的肠黏膜刺激性毒性降低有关。

关键词: 千金子; 千金子总蛋白; 制霜; 炎症; 肠道毒性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)22-7684-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.012

Effect of frosting on structure and intestinal toxicity of total protein from *Euphorbiae Semen*

WANG Huinan, WEI Xiaotong, JIANG Mingrui, MA Siyuan, HU Yufeng, ZHU Haiting, ZHANG Junli, ZHANG Xinning, WANG Yingzi

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To study the effect of frosting on the structure and intestinal toxicity of total protein from Qianjinzi (*Euphorbiae Semen*). **Methods** The changes in the structure of total protein from *Euphorbiae Semen* before and after simulated frosting were determined by gel electrophoresis, ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy, circular dichroism and fluorescence spectroscopy. The effects of total protein from *Euphorbiae Semen* before and after simulated frosting on the viability, the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-10, as well as the protein expressions of occludin and claudin-1 in IEC-6 cells were investigated by MTT, ELISA and Western blotting. The effects of total protein from *Euphorbiae Semen* before and after simulated frosting on the pathological morphology and the protein expressions of occludin and claudin-1 in mice colon tissues were explored using HE staining and Western blotting. **Results** The total protein from *Euphorbiae Semen* was denatured after simulated frosting, with reduced solubility and altered molecular weight distribution ($P < 0.01$). After the simulation of frosting, the ultraviolet

收稿日期: 2024-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82374040); 北京市科技新星计划 (20240484548); 中央高校基本科研业务费专项基金 (2024-JYB-JBZD-047); 国家中医药管理局高水平建设学科 (zyzdsk-2023272)

作者简介: 王慧楠 (1997—), 女, 博士研究生, 从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究。E-mail: 2672667045@qq.com

*通信作者: 王英姿 (1975—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究。

Tel: (010)84738615 E-mail: wangyzi@sina.com

spectroscopy characteristic absorption peak intensity at 280 nm of total protein from *Euphorbiae Semen* decreased, the fluorescence intensity was decreased, the maximum fluorescence absorption wavelength was red-shifted, the content of α -helix structure of the protein was decreased, the content of β -sheet, β -turn, and random coil structure was increased ($P < 0.01$), the amide I band of the infrared spectrum was shifted to low wavenumber and the peak shape tended to be gentle. Compared with the corresponding dose of total protein from *Euphorbiae Semen*, the up-regulation of TNF- α and IL-1 β content, the down-regulation of IL-10 content, as well as the down-regulation of occludin and claudin-1 protein expressions were significantly attenuated by the total protein from *Euphorbiae Semen* after simulated frosting ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The mechanism of the toxicity attenuation of *Euphorbiae Semen* after frosting may be related to the denaturation of the total protein after frosting, and the structure of the total protein are thus altered, which ultimately leads to a reduction in the intestinal mucosal irritant toxicity of the total protein from *Euphorbiae Semen*.

Key words: *Euphorbiae Semen*; total protein from *Euphorbiae Semen*; making frostlike powder; inflammation; intestinal toxicity

千金子为大戟科植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子, 具有泻下逐水、破血消癥之效, 千金子对胃肠道黏膜表现出刺激性毒性, 临床多经制霜入丸、散内服^[1-2]。现代研究表明, 千金子含有脂肪油、二萜醇酯、蛋白质、黄酮等多种化学成分^[3]。蛋白质作为种子类植物富含的成分之一, 具有较高的研究价值^[4]。与千金子同科的巴豆、蓖麻所含蛋白具有促炎毒性, 对肠道黏膜表现出强烈的刺激性, 经加热炮制后, 毒蛋白受热变性而毒性降低^[5-8]。由于同科属的有毒中药大多含有相同的毒性成分, 存在共性的炮制方法及减毒机制, 据此推测千金子蛋白质可能具有一定的毒性, 这对于解析千金子制霜减毒的科学内涵具有重要意义。但千金子的前期研究大多以脂肪油、二萜醇酯类化合物的成分分析、分离纯化及毒性作用为主, 对于千金子蛋白质的研究尚未深入开展, 千金子制霜前后蛋白质结构是否发生变化以及其与制霜后肠黏膜刺激性毒性减弱的关联性均未见研究报道。

本研究对千金子总蛋白进行模拟制霜炮制, 采用凝胶电泳、紫外光谱、红外光谱、圆二光谱、荧光光谱等考察制霜对千金子总蛋白结构的影响, 进一步从体内外层面探讨千金子总蛋白经模拟制霜前后肠道毒性的变化, 以期明确千金子制霜前后肠黏膜刺激性毒性变化与蛋白质结构变化的相关性, 为进一步解析千金子制霜减毒的科学内涵奠定科学依据, 为含蛋白的有毒类中药炮制机理研究提供有益参考。

1 材料

1.1 细胞

大鼠小肠隐窝上皮 (IEC-6) 细胞由北纳生物科技有限公司提供。

1.2 动物

健康雄性 BALB/c 小鼠, 体质量 (20 \pm 2) g, 购自斯贝福生物技术有限公司 (北京), 动物许可证

号为 SCXK (京) 2019-0010。小鼠饲养于北京中医药大学 SPF 级动物实验中心, 温度为 23~27 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 50%~60%, 自由摄食饮水。本研究涉及的动物实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理号 2023102501-4067)。

1.3 药品与试剂

千金子购自亳州市中药饮片厂, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为大戟科植物续随子 *E. lathyris* L. 的干燥成熟种子, 经测千金子脂肪油质量分数为 48.61%。

大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 2024011156)、大鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (批号 2024011123)、大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒 (批号 2024011171) 均购自江苏酶免实业有限公司; β -actin 抗体 (批号 AH11286487)、闭合蛋白 (occludin) 抗体 (批号 BC04369469)、紧密连接蛋白-1 (claudin-1) 抗体 (批号 BB07012155)、Goat Anti-rabbit IgG/HRP (批号 BJ08079044) 均购自北京 Bioss 公司; MTT 试剂 (批号 20230508)、Marker (1.0 \times 10⁴~1.8 \times 10⁵, 批号 20221222)、过硫酸铵 (批号 L1917091)、PAGE 胶促凝剂 (批号 20230216)、1.5mol/L Tris-HCL (pH 8.8, 批号 20230825)、1 mol/L Tris-HCL (pH 6.8, 批号 20220907)、10% SDS 溶液 (批号 20230404)、30% 蛋白凝胶溶液 (批号 20231125)、RIPA 裂解液 (批号 20230714)、10 \times SDS-PAGE 电泳缓冲液 (批号 20230327)、10 \times TBST 缓冲液 (批号 20231115)、超敏化学发光检测试剂盒 (批号 20230717)、BCA 检测试剂盒 (批号 20230621) 均购自北京 Biorigin 公司; 考马斯亮蓝 R250 (批号 S13N11D130881) 购自上海源叶生物科技有限公司; 封闭专用脱脂奶粉 (批号 SKJ2106) 购自日本 FUJIFILM 公司; PVDF 膜 (批号 IPVH00010) 购自美国 Millipore 公司; DMEM 培养

基(批号 8123305)、0.25%胰酶-EDTA(批号 2509042)均购自美国 gibco 公司;胎牛血清(批号 A0823D)购自大连美仑生物技术有限公司;DMSO(批号 710N0313)购自北京 Solarbio 公司;冰醋酸(批号 20230201303)购自天津致远化学试剂有限公司;甲醇(批号 F22M9S202)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.4 仪器

6YY-150 型压油制霜机(河南盛金机械设备有限公司);BSI10S 型分析级天平(北京赛多利斯仪器公司);HH-S4 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器公司);B004 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);756PC 型紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);NEXUS 型傅里叶变换红外吸收光谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);LS45 型荧光光谱仪(英国 PrekinElmer 公司);Chirascan V100 型圆二光谱色谱仪(英国 Applied Photophysics 公司);Tanon 1600 型凝胶成像系统、凝胶电泳仪、电泳芯、电转夹、转印电极芯(美国 Bio-rad 公司);细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Centrifuge 5415D 型离心机(德国 Eppendorf 公司);Direct-Q3 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 千金子总蛋白的提取

取千金子种仁,石油醚脱脂后,以 0.02 mol/L PBS 缓冲液为提取溶剂,按照料液比为 1:23 提取 3.2 h,离心收集上清,加入硫酸铵至饱和度达 90% 进行盐析,4 °C 放置过夜,离心,收集沉淀,透析除盐,冷冻干燥,即得千金子总蛋白冻干粉,-20 °C 保存备用。

2.2 千金子总蛋白模拟制霜品的制备

取适量千金子总蛋白冻干粉,按照课题组前期优选得到的机械压榨制霜工艺条件^[9]对千金子总蛋白进行模拟制霜,即将千金子总蛋白冻干粉置于压油制霜机物料腔,设置温度 50 °C、压力 50 MPa、压制 10 min,得到千金子总蛋白模拟制霜品。

2.3 千金子总蛋白经模拟制霜前后结构变化研究

2.3.1 千金子总蛋白经模拟制霜前后蛋白相对溶解度测定 取等量的千金子总蛋白和千金子总蛋白模拟制霜品,用 0.02 mol/L PBS 缓冲液配制成 1 mg/mL 的蛋白溶液,4 °C、10 000×g 离心 5 min,收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度,计算蛋白相对溶解度。

相对溶解度=模拟制霜后上清蛋白浓度/模拟制霜前上清蛋白浓度

2.3.2 千金子总蛋白经模拟制霜前后 SDS-PAGE 电泳测定 取千金子总蛋白和千金子总蛋白模拟制霜品溶液,配制等浓度蛋白样品。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质,电泳结束后,将分离胶浸于考马斯亮蓝 R250 染色液中染色 4 h,超纯水漂洗后,加入脱色液脱色,适时更换脱色液,至蓝色背景基本全部脱去且条带清晰时,拍照分析蛋白组成。

2.3.3 千金子总蛋白经模拟制霜前后傅里叶变换红外吸收光谱测定 取千金子总蛋白与千金子总蛋白模拟制霜品,溴化钾压片后置于傅里叶红外变换红外光谱仪,在 4 000~400 cm⁻¹ 进行全波段扫描,光谱分辨率为 4 cm⁻¹。

2.3.4 千金子总蛋白经模拟制霜前后圆二色谱测定 取千金子总蛋白和千金子总蛋白模拟制霜品溶液,以 PBS 缓冲液作溶剂空白对照,室温下在远紫外区 195~250 nm 进行光谱扫描,谱带宽度为 1 nm,采用 BeStSel 软件计算分析蛋白质二级结构所占比例。

2.3.5 千金子总蛋白经模拟制霜前后紫外吸收光谱测定 取千金子总蛋白和千金子总蛋白模拟制霜品溶液,以 PBS 缓冲液作空白参比,用紫外分光光度计测量溶液在 200~400 nm 波长处的紫外光谱。

2.3.6 千金子总蛋白经模拟制霜前后内源荧光光谱测定 取千金子总蛋白和千金子总蛋白模拟制霜品溶液,以 PBS 缓冲液作空白参比,用荧光光谱仪进行光谱扫描,激发波长为 280 nm,发射光谱扫描范围为 300~500 nm,激发和发射狭缝为 10 nm。

2.4 千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞毒性的影响

2.4.1 IEC-6 细胞培养 取 IEC-6 细胞,胰酶消化、传代,以含 10%胎牛血清和 1%青链霉素双抗的 DMEM 为培养基,置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养。

2.4.2 MTT 检测千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞存活率的影响 取对数生长期的 IEC-6 细胞,按 5×10³ 个/孔接种于 96 孔板中,培养至细胞贴壁,设置对照组(仅含细胞和培养基)、千金子总蛋白组(50、100、200、400、800、1 600、3 200、6 400 μg/mL)、千金子总蛋白模拟制霜品组(50、100、200、400、800、1 600、3 200、6 400 μg/mL,按炮制前总蛋白含量计),另设置不含细胞只含培养基的阴性对照组,每组设 6 个复孔,孵育 24 h 后,避光加入 20 μL MTT 溶液,孵育 4 h 后,加入 150 μL

DMSO, 于 490 nm 检测 A 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{阴性对照}})$$

2.4.3 ELISA 检测千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 含量的影响 取对数生长期的 IEC-6 细胞, 按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 培养至细胞贴壁, 分为对照组、千金子总蛋白 (1 600、3 200、6 400 $\mu\text{g/mL}$) 组、千金子总蛋白模拟制霜品组 (1 600、3 200、6 400 $\mu\text{g/mL}$, 按炮制前总蛋白含量计), 每组设 3 个复孔, 孵育 24 h 后, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IEC-6 细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 的含量。

2.4.4 Western blotting 法检测千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞 occludin、claudin-1 蛋白表达的影响 取对数生长期的 IEC-6 细胞, 按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 培养至细胞贴壁, 分为对照组、千金子总蛋白 (1 600、3 200、6 400 $\mu\text{g/mL}$) 组、千金子总蛋白模拟制霜品组 (1 600、3 200、6 400 $\mu\text{g/mL}$, 按炮制前总蛋白含量计), 每组设 3 个复孔, 孵育 24 h 后, 弃去上清, 加入 RIPA 裂解液收集细胞上清液, BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h; TBST 洗涤, 加入稀释好的一抗 (occludin 抗体、claudin-1 抗体均按 1 : 1 000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗涤, 加入相对应的二抗 (1 : 20 000 稀释), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤后, 凝胶成像系统曝光, 采用 Image-J 软件分析目标条带灰度值。

2.5 千金子总蛋白经模拟制霜前后对小鼠肠道毒性的影响

2.5.1 动物分组与给药 根据课题组前期研究结果, 取健康雄性 BALB/c 小鼠 30 只, 适应性饲养后随机分为对照组和千金子总蛋白低、高剂量 (3.52、7.04 g/kg) 组及千金子总蛋白模拟制霜品低、高剂量 (3.52、7.04 g/kg, 按炮制前总蛋白含量计) 组, 每组 6 只。给药组 ig 给予相应剂量药物, 对照组 ig 给予等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 7 d。末次给药后, 将小鼠脱颈处死, 取小鼠结肠组织, 一部分置于组织固定液中用于结肠病理学检测, 另一部分于 -80°C 保存。

2.5.2 千金子总蛋白经模拟制霜前后对小鼠结肠组织病理学的影响 取小鼠结肠组织, 4% 多聚甲醛固定 48 h 后, 常规脱水、石蜡包埋、切片, 然后进行 HE 染色, 利用显微镜观察结肠组织病理损伤程度。

2.5.3 Western blotting 法检测千金子总蛋白经模拟制霜前后对小鼠结肠组织 occludin、claudin-1 蛋白表达的影响 取小鼠结肠组织, 加入 RIPA 裂解液裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。按“2.4.4”项下方法检测小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 蛋白表达。

2.6 统计学分析

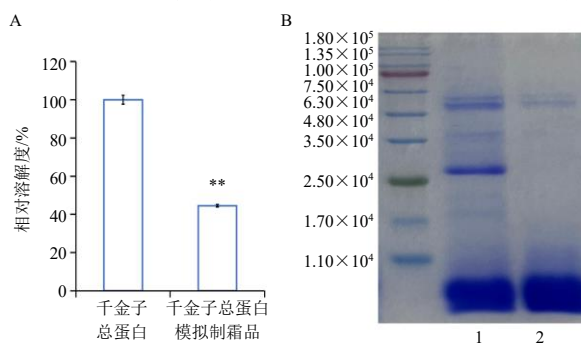
采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较用 LSD 检验。

3 结果

3.1 千金子总蛋白经模拟制霜前后结构变化研究

3.1.1 千金子总蛋白经模拟制霜前后蛋白相对溶解度和组成变化 如图 1-A 所示, 千金子总蛋白模拟制霜后蛋白溶解度显著降低 ($P < 0.01$), 且在溶解过程中出现沉淀。如图 1-B 所示, 千金子总蛋白的电泳条带主要集中在 6.3×10^4 以下, 千金子总蛋白有 3 条较明显的条带分布在 $4.8 \times 10^4 \sim 6.3 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^4 \sim 3.5 \times 10^4$ 和 1.1×10^4 以下。与千金子总蛋白比较, 千金子总蛋白经模拟制霜后 $1.7 \times 10^4 \sim 4.8 \times 10^4$ 的条带基本消失, $4.8 \times 10^4 \sim 6.3 \times 10^4$ 的条带变浅, 表明模拟制霜使千金子总蛋白变性, 改变其蛋白组成。

3.1.2 千金子总蛋白经模拟制霜前后红外光谱分析 如图 2 所示, 千金子总蛋白的酰胺 I 带为 $1 654.88 \text{ cm}^{-1}$, 模拟制霜后其酰胺 I 带向低波数发



1-千金子总蛋白; 2-千金子总蛋白模拟制霜品, 与千金子总蛋白比较; ** $P < 0.01$ 。

1-total protein from *Euphorbiae Semen*; 2-total protein from *Euphorbiae Semen* after simulated frosting, ** $P < 0.01$ vs total protein from *Euphorbiae Semen*.

图 1 千金子总蛋白经模拟制霜前后相对溶解度 (A) 及蛋白组成 (B)

Fig. 1 Relative solubility (A) and protein composition (B) of total protein from *Euphorbiae Semen* before and after simulated frosting

生位移, 由 1 654.88 移至 1 652.72 cm^{-1} , 且峰形趋于平缓, 原因可能是制霜后蛋白球状折叠结构展开, 游离的氨基酸残基之间形成分子间氢键, 蛋白二级结构发生了改变^[10]。

3.1.3 千金子总蛋白经模拟制霜前后圆二色谱检测 如图 3 所示, 千金子总蛋白和千金子总蛋白模拟制霜品在 195 nm 附近均出现明显的正峰谱带, 在 200~240 nm 波长内有较宽的负峰。千金子总蛋白模拟制霜后 α -螺旋结构含量显著下降 ($P < 0.01$), β -折叠、 β -转角和无规卷曲结构含量显著增加 ($P < 0.01$)。由此推测千金子总蛋白经模拟制霜后维持 α -螺旋结构的氢键断裂进而使其发

生解螺旋, α -螺旋结构占比下降, 无规卷曲结构含量增加。同时 α -螺旋结构可能由于分子间相互作用而向 β -折叠结构转换, β -折叠结构占比的增加可以增强分子间氢键作用力, 可能会导致蛋白质不可逆聚集^[11]。

3.1.4 千金子总蛋白经模拟制霜前后紫外吸收光谱和内源荧光光谱分析 如图 4-A 所示, 千金子总蛋白经模拟制霜前后在 220 nm 和 280 nm 处存在明显吸收峰, 220 nm 处的吸收峰由蛋白质中存在的肽键引起, 280 nm 处的吸收峰由蛋白质所含共轭双键的芳香族氨基酸残基产生, 可以表征蛋白质的三级结构^[12]。与千金子总蛋白比较, 总

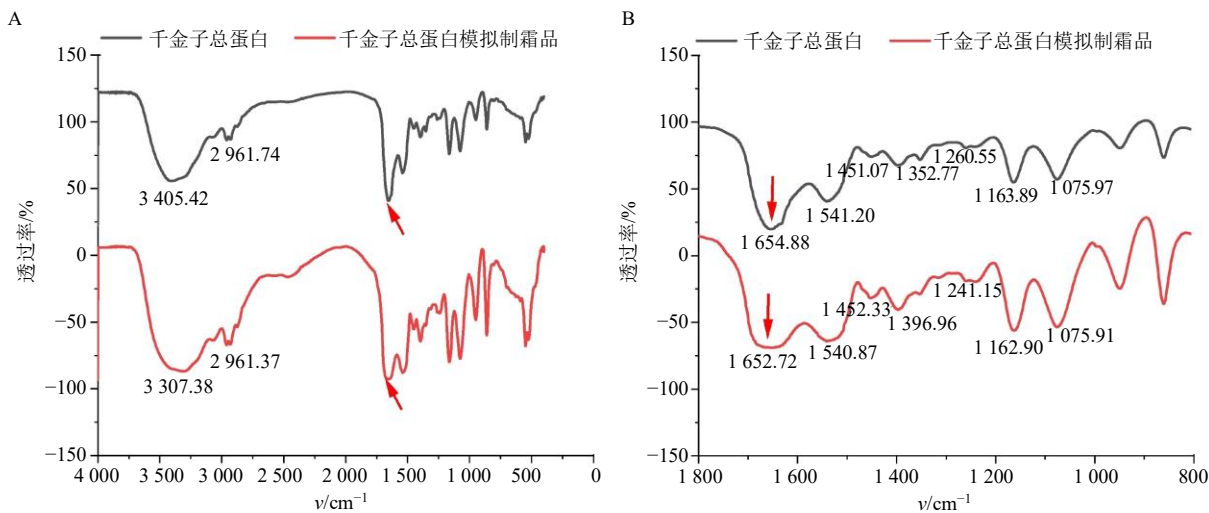
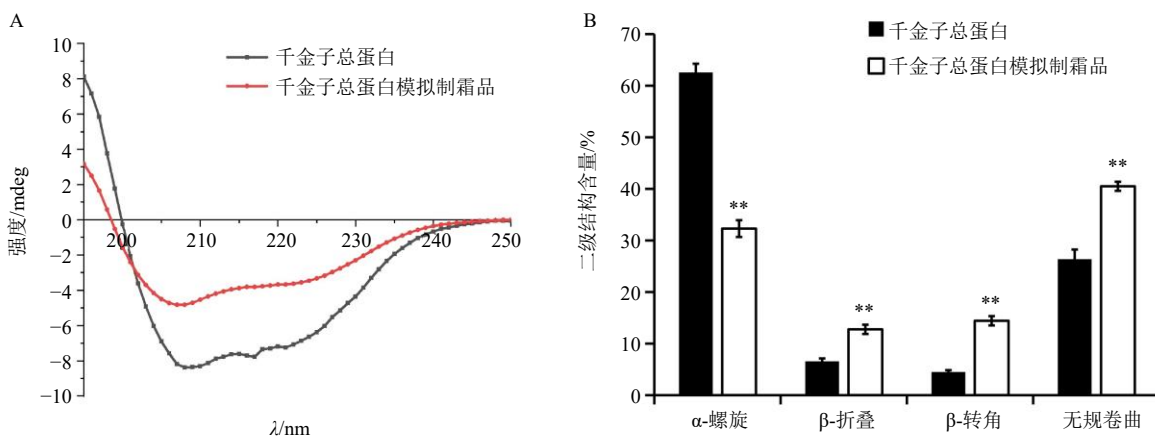


图 2 千金子总蛋白经模拟制霜前后红外光谱图 (A) 和局部放大图 (B)

Fig. 2 Infrared spectra (A) and local magnification (B) of total protein from *Euphorbiae Semen* before and after simulated frosting



与千金子总蛋白比较: ** $P < 0.01$ ($n = 3$)。

** $P < 0.01$ vs total protein from *Euphorbiae Semen* ($n = 3$)。

图 3 千金子总蛋白经模拟制霜前后圆二色谱图 (A) 和二级结构含量 (B)

Fig.3 Circular dichroism (A) and secondary structure (B) of total protein from *Euphorbiae Semen* before and after simulated frosting

蛋白经模拟制霜后 280 nm 的紫外吸收强度降低, 说明千金子总蛋白经模拟制霜后蛋白的三级结构发生改变, 可能是蛋白质的热聚集使紫外生色基团被掩埋, 造成紫外吸收强度降低^[13]。

如图 4-B 所示, 千金子总蛋白经模拟制霜前后谱峰形状相似, 千金子总蛋白经模拟制霜后荧光强度降低, 最大吸收波长发生红移, 表明千金子总蛋白经模拟制霜后蛋白质结构展开, 内部发色基团暴露, 使最大吸收波长红移, 同时在疏水相互作用下蛋白质分子发生聚集使表面性质发生一定程度的改变^[4], 导致蛋白荧

光发射减弱, 相对荧光强度降低。

3.2 千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞毒性的影响

3.2.1 千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞存活率的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 千金子总蛋白组和千金子总蛋白模拟制霜品组在 100~6 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IEC-6 细胞的存活率显著降低 ($P<0.01$)。同一质量浓度下, 与千金子总蛋白比较, 千金子总蛋白模拟制霜品对 IEC-6 细胞存活率的抑制作用明显减弱 ($P<0.01$)。

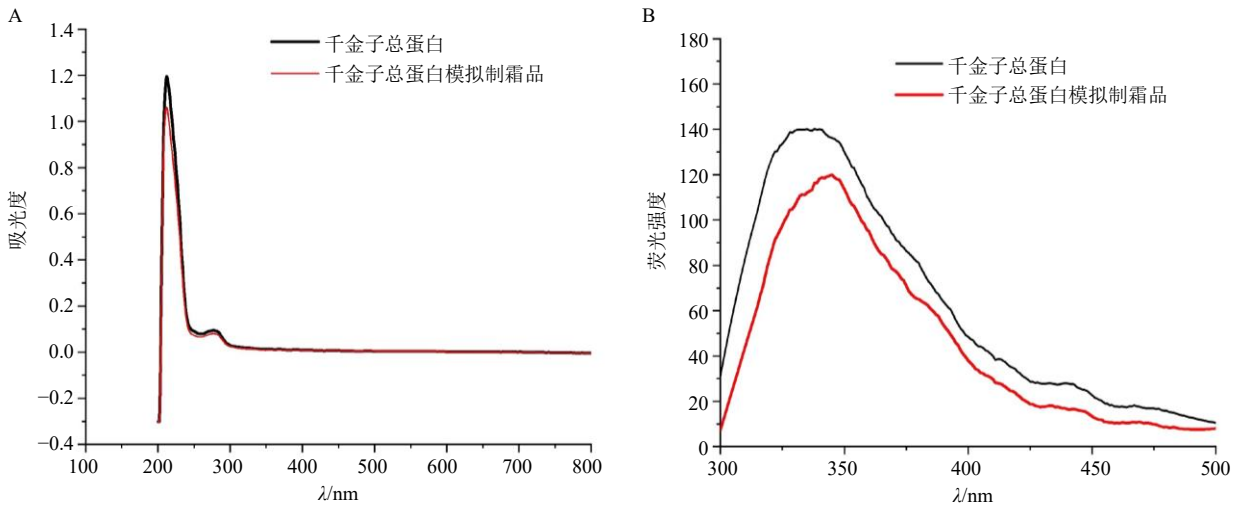
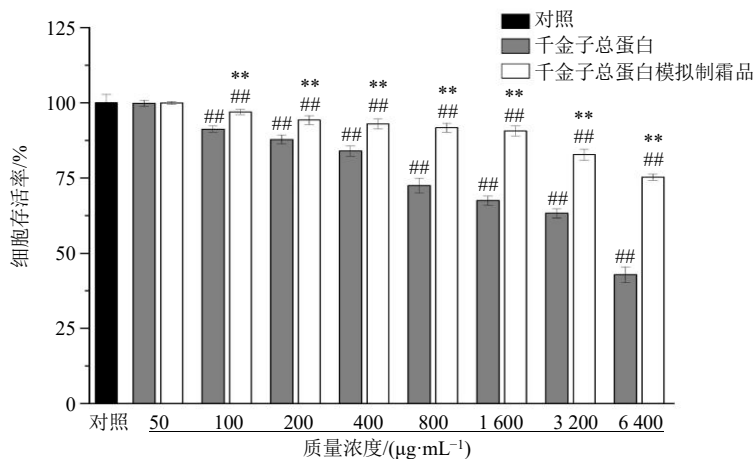


图 4 千金子总蛋白经模拟制霜前后紫外吸收光谱 (A) 和内源荧光光谱 (B) 图

Fig. 4 Ultraviolet absorption spectra (A) and endogenous fluorescence spectra (B) of total protein from *Euphorbiae Semen* before and after simulated frosting



与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$; 与千金子总蛋白相应剂量组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$, 图 6、7、9 同。
 $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs the corresponding dose of total protein from *Euphorbiae Semen*, same as Fig. 6, 7, 9.

图 5 千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of total proteins from *Euphorbiae Semen* on viability of IEC-6 cells before and after simulated frosting ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2.2 千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 含量的影响 如图 6 所示, 与对照组比较, 千金子总蛋白和千金子总蛋白模拟制霜品各剂量组 TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高, IL-10 含量显著降低 ($P < 0.01$); 与千金子总蛋白各剂量组比较, 千金子总蛋白模拟制霜后对 TNF- α 、IL-1 β 含量的上调作用、对 IL-10 含量的下调作用减弱 ($P < 0.01$)。

3.2.3 千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞 occludin、claudin-1 蛋白表达的影响 如图 7 所示, 与对照组比较, 千金子总蛋白各剂量组和千金子总蛋白模拟制霜品高剂量组均可以显著降低 IEC-6 细胞中 occludin、claudin-1 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 同一质量浓度下, 千金子总蛋白模拟制霜品对 IEC-6 细胞中 occludin、claudin-1 蛋白表达水平的下调作用明显弱于千金子总蛋白 ($P < 0.01$)。

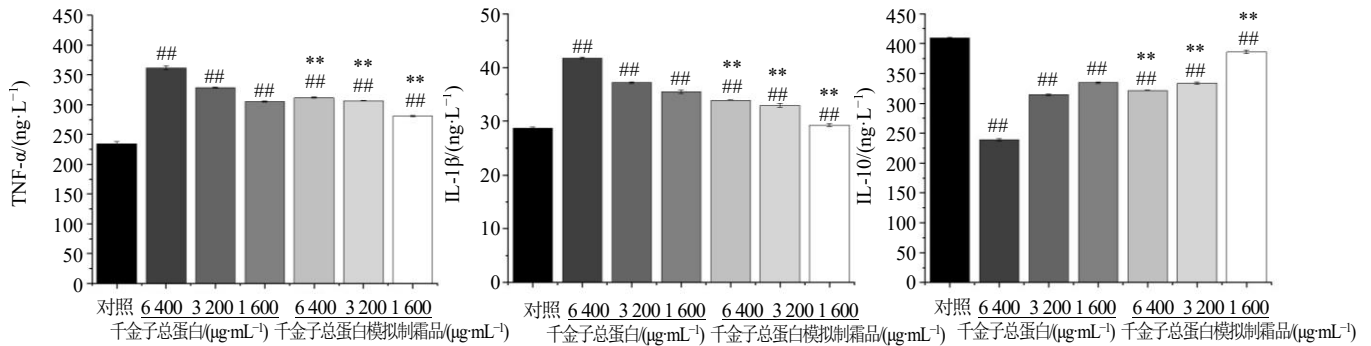


图 6 千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of total proteins from *Euphorbiae Semen* on content of TNF- α , IL-1 β , and IL-10 in supernatant of IEC-6 cells before and after simulated frosting ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

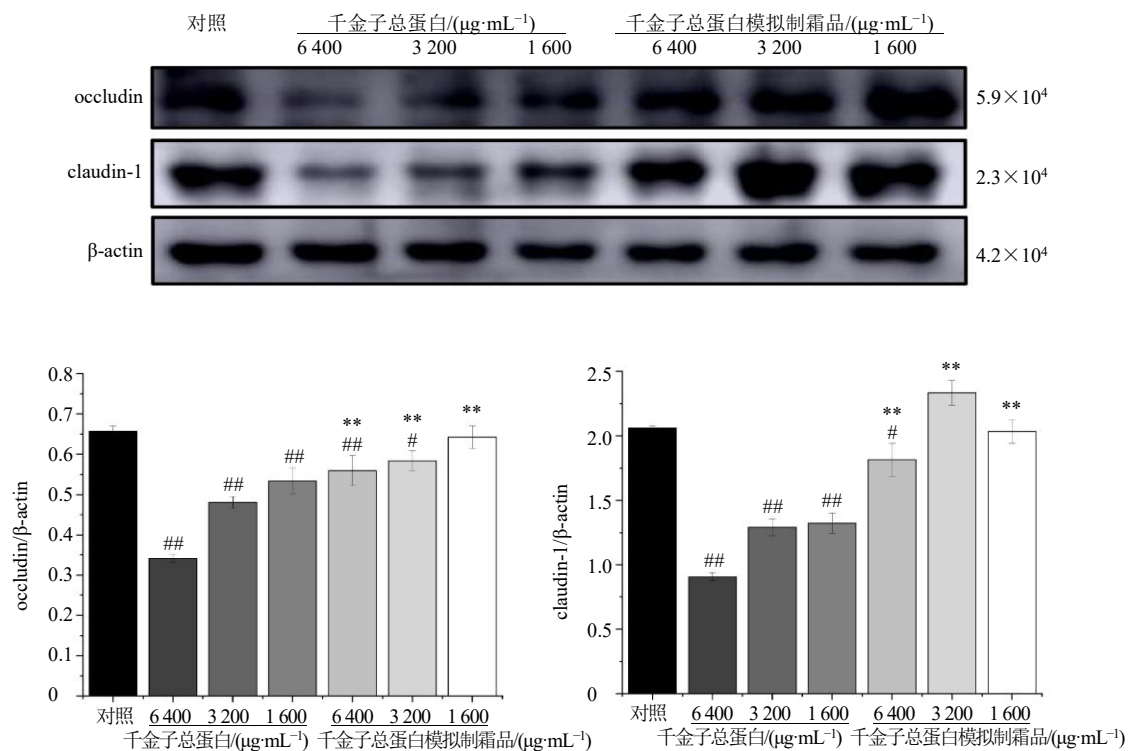


图 7 千金子总蛋白经模拟制霜前后对 IEC-6 细胞 occludin、claudin-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

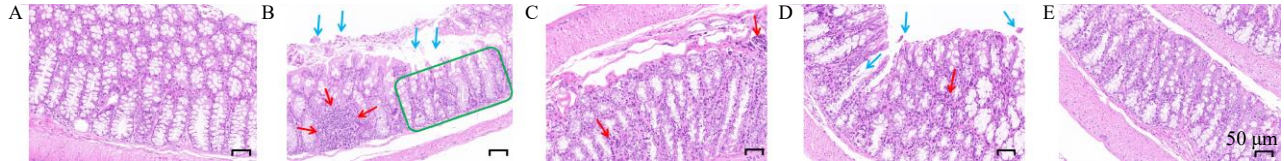
Fig. 7 Effect of total proteins from *Euphorbiae Semen* on protein expressions of occludin and claudin-1 in IEC-6 cells before and after simulated frosting ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 千金子总蛋白经模拟制霜前后对小鼠肠道毒性的影响

3.3.1 千金子总蛋白经模拟制霜前后对小鼠结肠组织病理形态学的影响 如图 8 所示, 对照组小鼠结肠黏膜组织结构清晰, 黏膜上皮腺体排列规则。千金子总蛋白高剂量组小鼠结肠组织出现黏膜层缺失、脱落, 大量炎细胞浸润, 杯状细胞明显减少的情况; 与千金子总蛋白相应剂量组比较, 千金子模拟制霜品组小鼠结肠组织损伤均有

一定程度的减轻。

3.3.2 千金子总蛋白经模拟制霜前后对小鼠结肠组织 occludin、claudin-1 蛋白表达的影响 由图 9 所示, 与对照组比较, 千金子总蛋白和千金子总蛋白模拟制霜品均能显著降低小鼠结肠组织中紧密连接蛋白 occludin、claudin-1 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 同一剂量下, 千金子总蛋白模拟制霜品对小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 蛋白表达水平的下调作用弱于千金子总蛋白 ($P < 0.05$ 、 0.01)。



A-对照组; B-千金子总蛋白高剂量组; C-千金子总蛋白低剂量组; D-千金子总蛋白模拟制霜品高剂量组; E-千金子总蛋白模拟制霜品低剂量组; 蓝色箭头表示结肠黏膜层缺失、脱落; 红色箭头表示炎细胞浸润; 绿色框表示杯状细胞减少。

A-control group; B-high-dose group of total protein from *Euphorbiae Semen*; C-low-dose group of total protein from *Euphorbiae Semen*; D-high-dose group of total protein from *Euphorbiae Semen* after simulated frosting; E- low-dose group of total protein from *Euphorbiae Semen* after simulated frosting; blue arrows indicate absence and detachment of the colonic mucosal layer; red arrows indicate inflammatory cell infiltration; green boxes indicate decreased cuprocytes.

图 8 各组小鼠结肠组织 HE 染色结果 (×200)

Fig. 8 HE staining results of mouse colon tissue in each group (× 200)

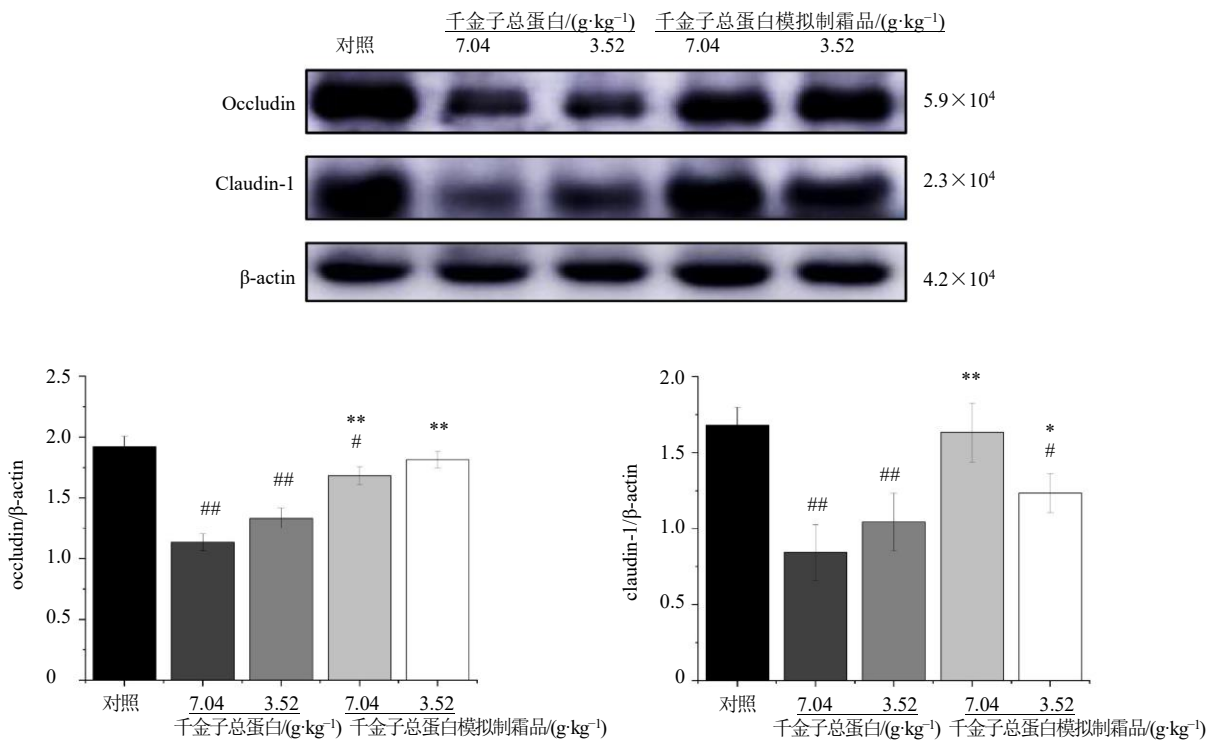


图 9 千金子总蛋白经模拟制霜前后对小鼠结肠 occludin、claudin-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of total proteins from *Euphorbiae Semen* on protein expressions of occludin and claudin-1 of mouse colon tissue before and after simulated frosting ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

现代研究表明千金子对肠道黏膜有强烈刺激性,可产生峻泻作用,主要表现为肠黏膜损伤和肠屏障功能减弱,临床上多经去油制霜后使用^[3,15]。蛋白质作为种子类植物富含的成分之一,具有多种生理生化功能,极具研究价值,但目前关于千金子总蛋白的研究鲜有报道,因此本研究以千金子所含的总蛋白为研究对象,创新性探索制霜对千金子总蛋白结构及肠道毒性的影响。

红外光谱、圆二色谱、紫外光谱、荧光光谱结果显示千金子总蛋白经热压制霜处理后,维持蛋白空间结构的氢键、离子键等被破坏,蛋白结构趋向于无序状态^[16-17]。同时热压处理使得千金子总蛋白发生变性,蛋白结构展开,内部色氨酸、酪氨酸等发色基团暴露于外部极性环境,暴露的疏水基团相互作用形成不可溶聚集体,溶解度下降^[18-20]。以上结果说明千金子总蛋白模拟制霜后二级结构和三级结构发生改变,可能会导致其生物活性发生改变。

肠上皮细胞顶部的紧密连接是连接肠上皮细胞和肠黏膜屏障、维持肠道完整性和黏膜屏障功能的关键,主要由 occludin、claudins 等蛋白组成^[21-22]。紧密连接蛋白表达降低可使肠黏膜屏障功能受损,通透性增加,引发炎症反应^[23]。细胞因子按作用机制可分为促炎症细胞因子和抑炎型细胞因子,两者之间的动态失衡是肠黏膜病理损伤的关键环节。TNF- α 和 IL-1 β 是机体中常见的 2 种促炎细胞因子^[24]。IL-10 属于抗炎细胞因子,能够发挥抗炎作用,在调节炎症反应中发挥重要作用^[25]。基于此,本研究进一步从体内外层面初步开展了千金子总蛋白模拟制霜前后的肠道毒性研究,结果显示千金子总蛋白模拟制霜前后均会上调 TNF- α 、IL-1 β 的含量,下调 IL-10 的含量,降低紧密连接蛋白 occludin、claudin-1 表达;与千金子总蛋白各剂量组比较,千金子总蛋白模拟制霜后对 TNF- α 、IL-1 β 含量的上调作用、对 IL-10 含量的下调作用、以及对 occludin、claudin-1 蛋白表达的下调作用均明显减弱,表明千金子总蛋白能够对细胞间的紧密连接结构造成损伤,导致肠黏膜通透性增加,肠黏膜屏障受损,引起肠道炎症反应,千金子总蛋白经模拟制霜后能够缓解肠道炎症反应,降低肠道毒性,后续将进一步研究千金子总蛋白的作用,为深入揭示千金子制霜减毒的物质基础及作用机制提供实验支撑。

综上,千金子总蛋白具有一定的肠道毒性,能

够引起炎症反应并对肠黏膜屏障功能造成损伤,模拟制霜后能够减轻对肠黏膜屏障的损伤作用,降低肠道毒性,可能与其模拟制霜后总蛋白发生变性,蛋白二级结构和三级结构改变有关。由此可见,毒性成分千金子总蛋白结构变化可能是千金子制霜后减轻肠黏膜刺激性毒性的机制之一。本研究初步阐明了千金子总蛋白的肠道毒性以及制霜对千金子总蛋白结构及肠道毒性的影响,为从生物大分子角度深入研究千金子的制霜减毒机理提供科学依据,对阐释有毒中药的炮制减毒机制、炮制工艺优化、改革和创新具有重要的现实意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 36-37.
- [2] Zhang Y, Wang Y Z, Li S J, et al. ITRAQ-based quantitative proteomic analysis of processed *Euphorbia lathyris* L. for reducing the intestinal toxicity [J]. *Proteome Sci*, 2018, 16: 8.
- [3] 朱娟娟, 辛义周, 马传江. 千金子炮制减毒机理的研究进展 [J]. *药学研究*, 2020, 39(3): 153-155.
- [4] 则拉莱·司玛依, 帕尔哈提·柔孜, 吾哈丽娜萨·麦麦提托合提, 等. 三种甘草种子蛋白的提取方法、结构及抗氧化活性比较研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(18): 227-234.
- [5] 单雪莲. 不同炮制方法制备巴豆霜对巴豆蛋白毒性的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [6] Sowa-Rogozińska N, Sominka H, Nowakowska-Gołącka J, et al. Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin [J]. *Toxins*, 2019, 11(6): 350.
- [7] 刘林娜, 高宏伟, 董颖, 等. 口服蓖麻毒素对小鼠肠道及免疫器官的毒性作用 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(7): 898-900.
- [8] 谢泽碧, 梁子宁. 蓖麻子的现代研究进展 [J]. *壮瑶药研究*, 2020, (1): 24-29.
- [9] 魏晓彤, 石双慧, 王梦琳, 等. 正交试验优选千金子制霜工艺及制霜前后脂肪油成分变化分析 [J]. *中国药事*, 2024, 38(5): 567-574.
- [10] Renaud C, de Lamballerie M, Guyon C, et al. Effects of high-pressure treatment on the muscle structure of salmon (*Salmo salar*) [J]. *Food Chem*, 2022, 367: 130721.
- [11] 何兴芬. 热处理对藜麦蛋白质功能特性、结构及体外消化的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.
- [12] Yi J, Fan Y T, Yokoyama W, et al. Characterization of milk proteins-lutein complexes and the impact on lutein chemical stability [J]. *Food Chem*, 2016, 200: 91-97.
- [13] 康怀彬, 邹良亮, 张慧芸, 等. 高温处理对牛肉蛋白质

- 化学作用力及肌原纤维蛋白结构的影响 [J]. 食品科学, 2018, 39(23): 80-86.
- [14] 周筠梅, 周军贤. 蛋白质表面疏水性的研究 [J]. 生物物理学报, 1996, 12(4): 559-564.
- [15] 韩石誉. 千金子抑制基质金属蛋白酶 16 抗肿瘤机制的实验研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [16] 孟妍. 汉麻籽分离蛋白提取技术及功能特性研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020.
- [17] 陈浩. 克氏原螯虾煮制红变色素蛋白结构与性质的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2022.
- [18] Neuman R C Jr, Kauzmann W, Zipp A. Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers [J]. *J Phys Chem*, 1973, 77(22): 2687-2691.
- [19] Gao F, Zhang X F, Wang J Q, *et al.* Systematical characterization of functional and antioxidative properties of heat-induced polymerized whey proteins [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2018, 27(6): 1619-1626.
- [20] 朱明明. 不同改性方式对 SPI 结构与功能特性及乳液氧化稳定性的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [21] Otani T, Furuse M. Tight junction structure and function revisited: (trends in cell biology 30, 805-817, 2020) [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(12): 1014.
- [22] Valdez J C, Cho J, Bolling B W. *Aronia* berry inhibits disruption of Caco-2 intestinal barrier function [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 688: 108409.
- [23] Tatiya-Aphiradee N, Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2018, 30(1): 1-10.
- [24] Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives [J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(9): 372-377.
- [25] Wang X, Wong K, Ouyang W, *et al.* Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(2): a028548.

[责任编辑 罗 曦]