

分类号: TS201.2

单位代码: 10363

密级: 公开

学 号: 2220530105

安徽工程大学

低聚 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 的制备及其对肠道屏障功能调控机制的研究

Study on the preparation of oligo- γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its regulatory mechanism on intestinal barrier function

学生姓名: 祝 琼

指导老师: 朱西平 副教授

专 业: 食品科学与工程

研究方向: 食品生物技术

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：祝琮

日期：2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：祝琮

指导教师签名：朱西平

日期：2025 年 5 月 15 日

日期：2025 年 5 月 15 日

低聚 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 的制备及其对肠道屏障功能调控机制的研究

摘 要

肠道是慢性应激作用的关键靶器官,肠道屏障功能紊乱与肠道感染、炎症性肠病等肠道疾病有关。色氨酸(Tryptophan, Trp)及其代谢产物可以通过抑制炎症、降低肠通透性等方式去维持或修复肠道屏障。低聚肽与其相对应的游离氨基酸相比具有更优的吸收机制和更强的生物活性作用。但是低聚 γ -谷氨酰色氨酸肽(Oligo- γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp, OEW) 作为一类色氨酸寡肽其对肠道屏障功能紊乱的改善作用及调控机制尚未见报道。基于以上背景,本文选用了两种方法去研究 L-谷氨酰胺酶的 γ -谷氨酰转肽作用,并以 Trp 和谷氨酰胺(Glutamine, Gln)为原料,酶法定向合成 OEW,再借助体外模拟消化实验对其稳定性进行研究。随后,利用动物实验探究 OEW 对慢性应激致肠道屏障功能紊乱的影响及干预机制。旨在为膳食补充 OEW 预防肠道疾病提供参考依据。具体研究结果如下:

(1) 分别以对硝基苯胺(*p*-nitroaniline, *p*NA)含量和氨气生成量为酶活指标研究解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶的水解作用和转肽作用,并进行比较。结果表明,L-谷氨酰胺酶同时具有水解酶和转肽酶活性。由于以氨气生成量为指标的酶活测定方法无法保证在其实验过程中氨气吸收完全,因此以 *p*NA 含量为指标的酶活测定方法更

为准确、可用。利用该方法，在温度为 37℃、pH 值为 10.00 的条件下，其测定的水解酶活为 80.96 U/g，转肽酶活为 130.23 U/g。

(2) 以 Gln 作为 γ -谷氨酰供体，Trp 作为 γ -谷氨酰受体，L-谷氨酰胺酶作为催化剂，利用酶法制备 OEW，并以 220 nm 处吸光度和氨基酸态氮含量为指标对其合成条件进行优化。随后，利用两步法体外模拟消化实验研究 OEW 在胃肠液中的稳定性。结果表明，当 Gln 与 Trp 的添加比例为 2:1、底物浓度为 0.2 mol/L、酶添加量为 0.1%(w/v)、反应时间为 3 h、pH 值为 10.00、反应温度为 37℃时，OEW 的合成条件为最优。在此基础上，使用 LC-MS 从 OEW 中鉴定出 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp、 γ -[Glu]₄-Trp 四种 γ -谷氨酰色氨酸肽，其总合成率达到 60.72% (w/w)。此外，体外消化实验表明，胃肠消化后， γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 会分解成分子质量更小的低聚肽或者氨基酸，导致 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 所占比例上升。OEW 中 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 在胃肠液中的稳定性更高，其在机体内主要是 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 在发挥作用。

(3) 构建肠道屏障功能紊乱模型小鼠探究 OEW 对肠道屏障功能的调节作用。结果显示，OEW 干预缓解了模型小鼠体重下降的趋势，逆转了焦虑样行为，降低了疾病活动指数 (Disease activity index, DAI)，减轻了肠道屏障功能紊乱的相关症状。同时，OEW 可显著降低结肠组织学指数 (Histological index, HI)，增加结肠长度，减少炎症因子 (IL-6、IL-1 β 和 IL-8) 的分泌和表达，抑制肠道炎症反应。此外，OEW 通过降低肠道通透性，上调肠上皮紧密连接蛋白 (ZO-1、

Occludin 和 Claudin-1) 的表达, 保护肠道屏障的完整性, 进而缓解肠道屏障功能紊乱。

关键词: 低聚 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp, L-谷氨酰胺酶, 体外模拟消化, 慢性应激, 肠道屏障功能

STUDY ON THE PREPARATION OF OLIGO- γ - [GLU]($1 \leq n \leq 4$)-TRP AND ITS REGULATORY MECHANISM ON INTESTINAL BARRIER FUNCTION

ABSTRACT

The gut is a key target organ for the effects of chronic stress, and intestinal barrier dysfunction is associated with intestinal infections, inflammatory bowel disease, and other intestinal disorders. Tryptophan (Trp) and its metabolites can maintain or repair the intestinal barrier by inhibiting inflammation and reducing intestinal permeability. Oligopeptides have superior absorption mechanisms and stronger bioactive effects than their free corresponding amino acids. However, as a class of tryptophan oligopeptides, oligo- γ -glutamyl tryptophan peptide (oligo- γ -[Glu]_($1 \leq n \leq 4$)-Trp, OEW) have not yet been reported to improve the intestinal barrier dysfunction and its regulatory mechanism. Based on the above background, in this paper, two methods were firstly chosen to study the γ -glutamyl transpeptidation of L-glutaminase. Then OEW was synthesized using Trp and glutamine (Gln) as raw materials, and its stability was investigated with the help of in vitro simulated digestion experiments.

Finally, the effects of OEW on chronic stress-induced intestinal barrier dysfunction and its intervention mechanism were investigated using animal experiments. The objective of this study is to provide a reference for the prevention of intestinal diseases by dietary supplementation of OEW. The results of the study are as follows:

(1) The hydrolysis and transpeptidation processes catalyzed by L-glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* were studied and compared using *p*-nitroaniline (*p*NA) content and ammonia production as indicators of enzyme activity, respectively. The results showed that L-glutaminase possessed both hydrolytic and transpeptidase activities. Since the enzyme activity measurement method using ammonia production as an indicator cannot guarantee complete ammonia absorption during the experimental process, the enzyme activity measurement method using *p*NA content as an indicator of enzyme activity is more accurate and practical. Using this method, the hydrolytic enzyme activity of 80.96 U/g and the transpeptidase activity of 130.23 U/g were determined at the temperature of 37°C and the pH of 10.00.

(2) OEW was prepared using Gln as γ -glutamyl donor, Trp as γ -glutamyl acceptor and L-glutaminase as catalyst, and the synthesis conditions were optimized using absorbance at 220 nm and amino acid nitrogen content as indicators. Subsequently, the stability of OEW in gastrointestinal fluids was investigated using a two-step in vitro simulated

digestion experiment. The results showed that the synthetic conditions of OEW were optimal when the addition ratio of Gln to Trp was 2: 1, substrate concentration was 0.2 mol/L, enzyme addition was 0.1% (w/v), reaction time was 3 h, pH was 10.00, and reaction temperature was 37°C. On this basis, four γ -glutamyl-tryptophan peptides, γ -Glu-Trp, γ -[Glu]₂-Trp, γ -[Glu]₃-Trp and γ -[Glu]₄-Trp, were identified from OEW by LC-MS, and the total synthesis rate of them reached 60.72% (w/w). In addition, the results of in vitro digestion experiments showed that after gastrointestinal digestion, γ -[Glu]₃-Trp and γ -[Glu]₄-Trp were broken down into oligopeptides or amino acids with smaller molecular mass, resulting in an increase in the proportion of γ -Glu-Trp and γ -[Glu]₂-Trp. The γ -Glu-Trp and γ -[Glu]₂-Trp in OEW were more stable in gastrointestinal fluids, and it was mainly γ -Glu-Trp and γ -[Glu]₂-Trp that play a role in organisms.

(3) A model of intestinal barrier dysfunction was constructed to investigate the regulatory effects of OEW on intestinal barrier function. The results showed that the OEW intervention alleviated the trend of weight loss, reversed anxiety-like behaviour, lowered the disease activity index (DAI) and reduced the symptoms associated with intestinal barrier dysfunction in the model mice. Meanwhile, OEW significantly reduced the histological index (HI) of the colon, increased the length of the colon, reduced the secretion and expression of inflammatory factors (IL-6, IL-1 β and IL-8) and inhibited the intestinal inflammatory response. In addition,

OEW protects the integrity of the intestinal barrier by reducing intestinal permeability and upregulating the expression of intestinal epithelial tight junction proteins (ZO-1, Occludin and Claudin-1), thereby alleviating intestinal barrier dysfunction.

KEY WORDS: oligo- γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp, L-glutaminase, in vitro digestion, chronic stress, intestinal barrier function

缩略词表

缩写	英文全称	中文名称
AhR	Aryl hydrocarbon receptor	芳香烃受体
AJ	Adherens junction	黏附连接
BW	Body weight	体重
CaSR	Calcium-sensing receptor	钙离子敏感受体
CE	Capillary electrophoresis	毛细管电泳
CUMS	Chronic unpredictable mild stress	慢性不可预知性温和应激
CUS	Chronic unpredictable stress	慢性不可预知应激
DSS	Dextran sulfate sodium salt	葡聚糖硫酸钠
DAI	Disease activity index	疾病活动指数
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
ESI-TOF-MS	Electrospray time-of-flight mass spectrometry	电喷雾飞行时间质谱
Gln	Glutamine	谷氨酰胺
Glu	Glutamate	谷氨酸
H	High dose group	高剂量组
HI	Histological index	组织学指数
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
HRP	Horse Reddish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IEC	Ion exchange chromatography	离子交换色谱
Ig	Immunoglobulins	免疫球蛋白
IL	Interleukin	白介素
Kyn	Kynurenine	犬尿氨酸
L	Low-dose group	低剂量组
LC-MS	Liquid Chromatograph Mass Spectrometer	液相色谱-质谱联用
M	Medium dose group	中剂量组
MCU	Mucoprotein	黏蛋白
MC	Model control group	模型对照组
NC	Normal control group	正常对照组

NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁共振波谱
OEW	Oligo- γ -[Glu] _(1≤n≤4) -Trp	低聚 γ -谷氨酰色氨酸肽
PC	Positive control group	阳性对照组
pNA	p-nitroaniline	对硝基苯胺
RT-qPCR	Quantitative Real-time polymerase chain reaction	实时荧光定量聚合酶链式反应
SERT	Serotonin transporter	血清素转运蛋白
SGF	Simulated gastric fluid	模拟胃液
SIF	Simulated intestinal fluid	模拟肠液
TJ	Tight junction	紧密连接
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
Trp	Tryptophan	色氨酸
ZO	Zonula occludens	闭锁小带蛋白
5-HT	5-Hydroxytryptamine, Serotonin	5羟色胺, 血清素

目 录

摘 要.....	IV
ABSTRACT.....	VII
缩略词表.....	XI
第 1 章 绪论.....	1
1.1 γ -谷氨酰胺概述	1
1.1.1 γ -谷氨酰胺的制备方法	1
1.1.2 γ -谷氨酰胺的功能特性	2
1.1.3 γ -谷氨酰胺的检测方法	3
1.2 体外模拟消化模型的研究进展.....	4
1.3 慢性应激与肠道屏障功能.....	5
1.3.1 慢性应激.....	5
1.3.2 肠道屏障的组成与作用.....	6
1.3.3 慢性应激对肠道屏障功能的影响.....	7
1.4 色氨酸对肠道屏障功能的影响.....	8
1.5 色氨酸低聚肽的研究现状.....	9
1.6 本课题研究的立题依据和主要内容.....	9
1.6.1 立题依据.....	9
1.6.2 主要研究内容.....	10
1.6.3 技术路线.....	10
第 2 章 L-谷氨酰胺酶的水解作用和转肽作用	12
2.1 引言.....	12
2.2 材料与仪器.....	12
2.2.1 材料与试剂.....	12
2.2.2 仪器与设备.....	12
2.3 实验方法.....	13
2.3.1 L-谷氨酰胺酶的酶活测定	13

2.3.2 温度对 L-谷氨酰胺酶活性及稳定性的影响.....	13
2.3.3 pH 值对 L-谷氨酰胺酶活性及稳定性的影响.....	14
2.3.4 盐浓度和铵根离子浓度对 L-谷氨酰胺酶活性的影响.....	14
2.3.5 Gln 作为 γ -谷氨酰供体可行性的探究	14
2.3.6 数据分析.....	14
2.4 结果与分析.....	15
2.4.1 L-谷氨酰胺酶的水解酶活及转肽酶活.....	15
2.4.2 不同因素对 L-谷氨酰胺酶的水解酶活性及稳定性的影响.....	15
2.4.3 不同因素对 L-谷氨酰胺酶的转肽酶活性及稳定性的影响.....	18
2.4.4 Gln 作为 γ -谷氨酰供体的可行性	19
2.5 本章小结.....	20
第 3 章 低聚 γ -[Glu] _(1≤n≤4) -Trp 的酶法合成及体外模拟消化	21
3.1 引言.....	21
3.2 材料与仪器.....	21
3.2.1 材料与试剂.....	21
3.2.2 仪器与设备.....	21
3.3 实验方法.....	22
3.3.1 OEW 的酶法合成	22
3.3.2 紫外吸光度的测定.....	22
3.3.3 氨基酸态氮的测定.....	22
3.3.4 单因素实验.....	22
3.3.5 OEW 合成样的 HPLC 测定	23
3.3.6 LC-MS 测定	23
3.3.7 体外消化液的配置.....	24
3.3.8 体外模拟消化实验.....	24
3.3.9 OEW 消化产物的测定	24
3.3.10 数据分析.....	24
3.4 结果与分析.....	25
3.4.1 氨基酸比例对 OEW 合成反应的影响	25

3.4.2 反应时间对 OEW 合成反应的影响	26
3.4.3 底物浓度对 OEW 合成反应的影响	26
3.4.4 酶添加量对 OEW 合成反应的影响	27
3.4.5 pH 值对 OEW 合成反应的影响.....	28
3.4.6 温度对 OEW 合成反应的影响	29
3.4.7 OEW 合成物的定量定性分析	29
3.4.8 OEW 合成物的结构表征	30
3.4.9 消化产物的吸光度和氨基酸态氮含量.....	31
3.4.10 体外消化过程中 OEW 含量和构成的变化	31
3.5 本章小结.....	33
第 4 章 低聚 γ -[Glu] _(1≤n≤4) -Trp 对肠道屏障功能的影响及机制研究	34
4.1 引言.....	34
4.2 材料与仪器.....	34
4.2.1 材料与试剂.....	34
4.2.2 仪器与设备.....	35
4.3 实验方法.....	35
4.3.1 构建肠道屏障功能紊乱小鼠模型.....	35
4.3.2 动物分组与管理.....	36
4.3.3 小鼠体重采集.....	37
4.3.4 行为学实验.....	37
4.3.5 疾病活动指数评价.....	37
4.3.6 肠道通透性测定.....	38
4.3.7 样品采集与保存.....	38
4.3.8 结肠长度及器官指数测定.....	38
4.3.9 结肠组织病理学观察.....	38
4.3.10 ELISA 实验	39
4.3.11 RT-qPCR 实验	39
4.3.12 Western blot 实验	40
4.3.13 数据分析.....	40

4.4 结果与分析.....	40
4.4.1 肠道屏障功能紊乱小鼠模型的构建.....	40
4.4.2 OEW 对小鼠体重变化的影响	41
4.4.3 OEW 对小鼠精神状态的影响	42
4.4.4 OEW 对 DAI 评分及 H&E 染色的影响	43
4.4.5 OEW 对结肠长度及器官指数的影响	44
4.4.6 OEW 对小鼠炎症因子的影响	45
4.4.7 OEW 对肠道屏障完整性的影响	47
4.5 本章小结.....	48
第 5 章 结论与展望.....	49
5.1 结论.....	49
5.2 创新点.....	49
5.3 展望.....	50
参考文献.....	51
攻读硕士学位期间学术论文发表情况.....	64
致谢.....	65

第 1 章 绪论

1.1 γ -谷氨酰肽概述

γ -谷氨酰肽是一类含有 γ -谷氨酰残基的小分子肽^[1]。它们多以二肽、三肽及其衍生物的形式广泛存在于各种食物来源中,包括动物性(扇贝以及生活中常见的肉制品)、植物性(豆类及葱属类)以及发酵食品(酱料和奶酪)^[1,2]。自从二十世纪五十年代末,研究人员在菜豆提取物中发现 γ -谷氨酰肽以来,它的呈味特性一直是其研究的主要方面^[3]。并且,它对厚味味觉受体“钙离子敏感受体(CaSR)”的激活作用也再次印证了其具有呈味性质。近些年来,对 γ -谷氨酰肽的研究重心已经渐渐地向其生理活性的方向转移。目前已经证明 γ -谷氨酰肽可以参与人体内的各种代谢活动,具有降血糖^[4]、抗癫痫^[5]、改善情绪^[6]、缓解氧化应激^[7]等多种保健功能。随着其研究的深入, γ -谷氨酰肽在医疗和功能性食品领域具有广阔的市场前景。

1.1.1 γ -谷氨酰肽的制备方法

制备 γ -谷氨酰肽的方法主要有四种:天然提取法^[8]、化学合成法^[9]、微生物发酵法^[10]和酶促合成法^[11]。

天然提取法是直接从原料中提取天然存在的 γ -谷氨酰肽,例如谷胱甘肽(GSH)和茶氨酸(L-Theanine)^[12]。由于其提取过程中需要使用很多有机试剂,且流程繁杂,故不适合工业化批量生产 γ -谷氨酰肽^[12,13]。化学合成法可以生产出极高纯度的 γ -谷氨酰肽,是很多试剂生产商经常使用的方法^[1]。但步骤繁多,产率低,且需要使用大量酰化剂和偶联剂,不适用于食品领域^[14]。微生物发酵法是指在某些特殊条件下,通过微生物代谢活动将原料制备成 γ -谷氨酰肽。且其可以利用基因重组和诱变等技术对菌种进行改良,进而使 γ -谷氨酰肽的产率上升^[8,15],但是在其微生物发酵过程中无法确保中间产物和最终产物的种类^[16]。因此,虽然它的成本低,但仍然无法实现工业化生产 γ -谷氨酰肽。

酶促合成法是指在某些特定条件下利用酶催化合成 γ -谷氨酰肽的方法^[1],是 γ -谷氨酰肽制备的主要方法。该方法制备的 γ -谷氨酰肽含量高,肽分子量小,且容易和酶制剂分离,可以直接应用于食品中,但是专一度高的酶制剂难以获得^[17]。

目前已被证实具有 γ -谷氨酰转肽能力的酶有谷胱甘肽合成酶、 γ -谷氨酰转肽酶和 L-谷氨酰胺酶等等^[2,12]。其中，L-谷氨酰胺酶（L-glutaminase，EC 3.5.1.2）是一种酰胺水解酶，不需要能量参与，可以直接发生催化反应，对底物具有高度的专一性^[11]。目前研究人员在供体谷氨酰胺（Gln）和受体氨基酸存在的情况下，利用解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶已经成功合成了 oligo- γ -[Glu]_n-（Met、Phe、Gln、Trp、Cys）等一系列低聚肽^[4,12,18-20]。

L-谷氨酰胺酶合成低聚 γ -谷氨酰肽的作用机理可总结如下（图 1-1）：L-谷氨酰胺酶作用于 γ -谷氨酰基供体（Gln，N 端），并且没有对 C 端受体的高特异性。因此可以通过添加不同的受体（氨基酸或者 γ -谷氨酰肽）来合成不同的低聚 γ -谷氨酰肽。

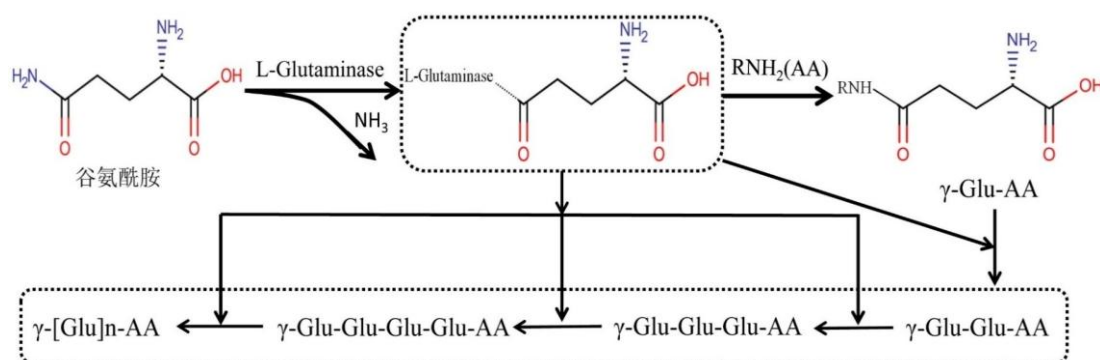


图 1-1 L-谷氨酰胺酶合成 γ -谷氨酰肽的作用机理

Figure 1-1 Mechanism of γ -glutamyl peptides synthesis by L-glutaminase

注：L-Glutaminase：L-谷氨酰胺酶；RNH₂（AA）：氨基酸

1.1.2 γ -谷氨酰肽的功能特性

1.1.2.1 γ -谷氨酰肽的呈味特性

经过了长时间的探索后，人们对于 γ -谷氨酰肽呈味特性的了解越来越深入。最早于二十世纪六十年代末，Kirimura 等人^[21]发现某些 γ -谷氨酰二肽具有酸味和涩味。在此之后，又有研究人员发现奶酪中含有的 γ -谷氨酰二肽具有酸味和金属味^[22]。然而，另一些研究人员却发现奶酪中含 γ -谷氨酰残基的物质不具有酸味，反而表现出明显“厚味”^[23,24]。目前许多 γ -谷氨酰肽的呈味特性已经被研究报道，包括 γ -Glu-Asp、 γ -Glu-Gly、 γ -Glu-Cys-Gly、 γ -Glu-Val-Gly 等等，他们在水中均呈现出酸涩味^[25-27]。此外， γ -Glu-Glu 和 γ -Glu-Tyr 等二肽也表现出鲜味或苦味^[1]。二十一世纪初，Gabriel 等人^[28]首先证实了 CaSR 可在味觉细胞中表达，由此推

测出 CaSR 可能与呈味物质使感觉器官产生印象相关。之后, Ohsu^[29]和 Amino^[30]等人发现 γ -谷氨酰二肽和三肽的“厚味”呈味特性与 CaSR 的激活有关, 且为正相关线性关系。但由于实验条件的局限性, 对于“厚味”呈味机制的探索依然处在初始阶段, 有很多谜团尚未解开, 仍需要进一步研究。

1.1.2.2 γ -谷氨酰肽的生理功能

人体内的 γ -谷氨酰肽有两种产生方式: 膳食摄入或体内自主合成。其中膳食摄入的 γ -谷氨酰肽能够维持机体代谢活动的正向发生, 但它在体内大量堆积也会导致疾病的发生。

γ -谷氨酰肽因其结构特殊, 已被证明具有抗氧化、抗癌、提高记忆和抗炎等多种功能活性, 尤其在中枢神经系统的调节中具有重要作用。第一个在细胞中被证明具有抗氧化性的 γ -谷氨酰肽是GSH, 被称为“超级抗氧化剂”^[31]。其结构中半胱氨酸的巯基会和自由基结合, 形成二硫键, 使自由基从体内排出^[32]。在抗癌方面, γ -D-Glu-L-Trp (SCV-07) 能够抑制多种肿瘤细胞系类型的生长, 包括小鼠的人头颈部肿瘤系^[33]。在提高记忆方面, γ -Gln-Asp通过抑制Asn和Glu的释放, 从而提升大脑学习和记忆的能力^[34]。在抗炎方面, γ -Glu-Cys和 γ -Glu-Val可以通过调控免疫应答信号转导通路和维持蛋白磷酸酶含量的正常水平来缓解急性胰腺炎、肠胃炎等疾病^[35-37]。此外, 有大量研究表明, γ -谷氨酰肽在中枢行为调节中扮演着非常重要的角色。 γ -L-Glu-DOPA可降解为多巴胺, 用于治疗帕金森病^[38]。 γ -Glu-Pro、 γ -Glu-Gly和 γ -Glu-Phe作为氨基酸的拮抗剂具有镇静作用, 对Na⁺通道的激活具有抑制作用^[39]。 γ -谷氨酸-牛磺酸 (γ -Glu-*taurine*) 参与脑内去甲肾上腺素、多巴胺和5-羟色胺 (5-HT) 的表达和代谢过程, 还具有抗癫痫、预防电休克触觉失忆等作用, 可以维持中枢神经系统的正常生理活动^[40]。以上研究均表明 γ -谷氨酰肽具有多种生理活性, 在医疗领域的应用范围非常广阔。

1.1.3 γ -谷氨酰肽的检测方法

γ -谷氨酰肽的检测包括分离、定性和定量三个部分, 其常用方法有: 离子交换色谱 (IEC)、电喷雾飞行时间质谱 (ESI-TOF-MS)、质谱 (MS)、核磁共振波谱 (NMR)、高效液相色谱 (HPLC)、串联质谱 (MS/MS) 和毛细管电泳 (CE) 等, 但在其实际操作中, 常采用多方法联用的手段对 γ -谷氨酰肽进行分析检测。

对于这些检测方法, 研究人员可以根据不同的检测需求选择相对应的方法。

Suzuki 等人^[39,41,42]利用 HPLC 对 γ -谷氨酰二肽进行分离和定量, 采用 NMR 进行定性。Ueda 等人^[43]使用 IEC 分离 γ -谷氨酰肽, 通过 MS 和 NMR 对其进行结构鉴定, 最后采用 HPLC 进行定量分析。对于不同的待测样品, 研究人员也需要选择不同的检测方法。食物中 γ -谷氨酰肽的检测多用 LC-MS/MS 法。Kuroda 等人^[44]采用 LC-MS/MS 对干贝中的多肽进行分离, 得到厚味肽 γ -Glu-Val-Gly。Toelstede 等人^[23]采用 HPLC-MS/MS 对奶酪中 α -和 γ -谷氨酰二肽进行分离鉴定, 均得到了精确的定性定量结果。杨娟^[1]和卢慧茵^[12]采用了 UPLC-MS/MS 对酶法合成的 γ -谷氨酰肽进行定性定量分析, 均成功检测出 γ -[Glu]_n-Cys 和 γ -[Glu]_n-Trp。另外, Hirayama 等人^[45]利用 CE-MS/MS 检测血清、肝脏样品中的 γ -谷氨酰肽, 其具有分离度好、灵敏度高且重现性好等优点。

此外, γ -谷氨酰肽的分析检测还有一些新型检测方法。快速检测法可以用于检测蚕豆中的 γ -Glu-S-ethenyl-Cys^[46]。生物检测法是根据大多数 γ -谷氨酰肽可以激活 CaSR 的特性所设计的一种检测方法^[29]。电化学方法是由吕赞等人提出的检测谷胱甘肽的方法, 目前已成功在海拉细胞内应用^[47,48]。

1.2 体外模拟消化模型的研究进展

在食品领域, 对食物功能特性和生理活性的各种研究基本上都是为了满足人类的食用需求。消化将食物从大分子物质分解成能被人体吸收的小分子物质, 是人体吸收食物中营养物质的关键步骤。食物中的营养物质被人体摄入并消化后, 才能在体内发挥其功能, 其生理活性与摄入量和其在胃肠液中的稳定性密切相关^[49,50]。因此进行体内消化研究是十分必要的。但是胃肠消化阶段是一个动态的过程, 难以在活体内监测其营养物质含量及结构的变化, 动物实验和人体实验具有一定局限性。

近几年, 国内外越来越多的研究人员将研究重心从动物实验和人体实验转移到体外模拟消化模型^[51]。与体内实验相比, 体外模拟消化研究不但在一定程度上真实地反映营养物质在体内的变化情况, 而且还具备便捷、成本低和无伦理限制等优点^[52]。虽然该方法无法完全复现人体内营养物质的运输和代谢过程, 但它具有快速、安全及稳定的特性, 能够为营养物质潜在生物利用度评估提供一种简单的预测手段。因此, 体外模拟消化模型成为食品研究领域的热点。

体外模拟消化模型一般可分为静态模型和动态模型两种。静态体外模拟消化

模型的模拟参数较为固定,操作简单,但无法复现胃肠道的动态消化过程,如胃蠕动、pH 值的变化、排空、消化液的连续分泌等^[53,54]。而动态模型,如荷兰的 TNO 胃肠道模型,能够很好的控制这些因素,模拟消化器官的动态消化特点。然而动态体外模拟消化模型成本昂贵,清洁难度大。因此目前关于食物的体外模拟消化研究中,静态体外消化模型被广泛使用^[55]。Minekus 等人^[56]根据人体的真实消化情况,提出了一种可应用于各种食物消化的成人静态消化模型,确定了口腔、胃和小肠阶段的消化参数。目前,两步法静态模拟胃肠消化模型因其操作简单等优点,被广泛应用于食物的体外模拟消化研究中。

1.3 慢性应激与肠道屏障功能

1.3.1 慢性应激

1.3.1.1 应激的概念及分类

应激是指刺激作用于机体所表现出的一种非特异性反应^[57]。将能导致机体产生应激反应的各种物理要素或心理压力等因素称为应激源,如噪音、高温、创伤、惊恐等。有相关数据表明,75%~90%的疾病与应激反应的激活有关,应激一般会导致疾病的诱发或恶化,给医疗和国家经济带来巨大负担^[58,59]。

根据应激源的不同,在医学上,将应激分为躯体性应激和心理应激^[60]。躯体性应激由物理、化学等机械性因素引起;心理应激由紧张、焦虑等心理因素引起。不过,这两种应激反应一般会同时存在。参加过战争的退伍军人会受到不同程度的战斗应激创伤,对于很大的响声会产生躯体性应激反应,且在战场上由于长期处于精神极度紧张的环境下会产生心理应激。在退伍之后,军人常常会不适应突然回归到平静祥和的生活,其应激反应加剧可能会变成病理性应激。

根据刺激的时间长短,将应激分为急性应激和慢性应激。急性应激持续时间相对较短(几分钟或几小时),应激源过强。与之相反,慢性应激应激源较弱,持续时间较长(几个月甚至几年)。急性应激通常对人体有益,可增加认知、记忆和学习能力^[61]。慢性应激会对人体造成损伤,导致失眠、抑郁、焦虑等疾病的发生^[62,63]。

根据应激应对机体的作用,可将其分为良性应激和劣性应激^[64]。良性应激是指应激可提高机体的适应和防御能力,使人在面对危险时能够及时应对。引起人体代谢紊乱及器官功能障碍,甚至死亡的应激被称为劣性应激。慢性应激属于

劣性应激，会使人产生心理疾病和肠道疾病。

1.3.1.2 慢性不可预知温和应激（CUMS）模型

由于伦理和道德问题，不能对人体进行过多干预。动物模型相对易获得、易操作，且不涉及伦理道德问题，因此动物模型成了学术界研究疾病的工具。单一的应激源刺激无法很好的模拟疾病发展过程中所经历的应激反应。CUMS 模型是由 Willner 等人在慢性不可预知应激（CUS）模型的基础上加从修改提出来的^[65]。该模型通过给予动物长时间慢性、温和、不可预见的应激刺激，模拟真实生活中人类或动物遇到的长期、无法控制、突发的困难和挫折等刺激。

CUMS 模型中的慢性应激可引起动物行为特征发生改变。而长时间的刺激、行为改变及激素水平变化，容易引起人或动物机体内环境稳态失衡，促进和加速身体疾病的发生与发展，进而致使心理疾病的产生^[66]。CUMS 模型被公认为是最理想的动物模型，目前已被普遍应用于模拟不可控应激源刺激对生物体的影响研究^[67]。

1.3.2 肠道屏障的组成与作用

完整的肠道屏障有助于机体内环境稳态的维持，对保护胃肠道及机体健康具有重要作用^[68]。根据功能来分，可将其分为机械屏障、化学屏障、微生物屏障和免疫屏障^[69]。

机械屏障主要指肠上皮细胞之间的连接，即紧密连接（TJ）和黏附连接（AJ）^[70]。TJ 蛋白由闭合蛋白（Occludin）、连接蛋白（Claudins）、闭锁小带蛋白（ZO）和肌动蛋白等构成^[71,72]。其中，Occludin、Claudin-1 和 ZO-1 等蛋白结构破坏均会引起肠道屏障完整性的损伤^[73]。化学屏障由肠道细胞分泌的黏液与消化液构成。当化学屏障受损时，肠道有害物质便会进入黏液层，加剧肠道损伤^[74]。研究表明，黏蛋白 2（MCU2）基因表达的下降会引起小鼠肠道屏障功能紊乱^[75]。微生物屏障指肠道以及肠道黏膜中的肠道菌群。它的丰富度和多样性不仅影响肠道机械屏障和化学屏障功能的稳定性，对免疫屏障功能还具有调节作用^[76,77]。人体的肠道菌群约为 10~100 万亿个^[78]。免疫屏障由肠道相关淋巴组织组成，其所分泌的免疫球蛋白 A（IgA）是参与免疫应答的重要物质，对肠道黏膜具有保护作用。

在这四种肠道屏障中，机械屏障和微生物屏障最为重要。而机械屏障中的 TJ

更是肠道屏障功能的基础防线。Occludin、Claudin-1 和 ZO-1 等 TJ 蛋白的表达上升均可增强肠道屏障紧密性，保护肠道屏障功能。

1.3.3 慢性应激对肠道屏障功能的影响

当机体遭受应激时，通常会导致情绪或认知上的变化，而被称为“第二大脑”的肠道也会经脑-肠轴途径受到影响，并出现肠道屏障破坏、免疫失衡等现象。急、慢性应激均可引起肠道屏障功能紊乱，但慢性应激会使胃肠道更加敏感，更易诱发疾病^[79,80]。目前大量研究证实在 CUMS、长期睡眠剥夺、获得性无助等多种慢性应激模型以及应激相关的疾病中发现肠道屏障功能的紊乱和受损，且损伤主要集中在微生物屏障与机械屏障上面^[81-83]。

慢性应激通常会导致生物体肠上皮细胞间 TJ 结构的变化，肠道修复能力下降，从而使肠道通透性上升。Ding 等人^[84]发现，CUS 模型中 ZO-1 和 Claudin-1 的表达降低，导致肠道致密性下降，病原侵入肠道，肠道损伤加剧。在大鼠慢性避水应激模型的研究中发现，肠道 TJ 蛋白含量下降，并导致肠道渗透性升高^[85]。王超然^[86]发现慢性束缚应激可引起肠道间 TJ 损伤和上皮细胞凋亡。以上研究均表明，慢性应激能够导致肠道机械屏障功能的破坏，表现为通透性增加，TJ 蛋白含量下降。

肠道中的大量微生物被称为肠道菌群。慢性应激过程中伴随的不良饮食习惯和不良作息时间，会影响肠道内环境稳态，肠道菌群失衡，致使人或动物消化不良。Habiyaambere 等人^[87]研究发现，当小鼠长期处于应激状态时，其肠道的吸收功能下降，影响其对营养物质的消化能力。溃疡性结肠炎发病过程中伴随肠道菌群失调，其微生物繁殖能力发生变化^[88]。并且，慢性应激会导致肠道中乳酸杆菌和双歧杆菌等具有维持肠道屏障作用的菌种丰度明显下降^[89]。改善肠道菌群的组成是恢复肠道屏障功能的重要因素。

肠道屏障损伤被认为是肠道炎症发生的起始。Gulhane 等人^[90]发现，长期高脂饮食可以引发小鼠慢性肠道炎症和氧化应激，导致杯状细胞分化减少，MUC2 表达降低。肠道黏液层主要由 MUC2 构成，用来抵御肠腔有害物质的入侵，黏液层一旦受损就易诱发肠道炎症。小鼠 24 小时长期处于噪音环境中，小肠白介素 (IL)-17 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α /TNF- β 比值均明显升高，导致肠道炎症及渗透性加重^[91]。Mankertz 等人^[92]研究表明，结肠炎小鼠 TNF- α 分泌增加，炎

症反应加剧。促炎性细胞因子参与肠道屏障功能的调控过程。

研究者在利用慢性心理应激构建肠易激综合征模型时发现,将小鼠暴露于避水应激中,其跨膜电阻降低,肠通透性增加,大分子辣根过氧化物酶(HRP)的通过率上升,机械屏障功能受损。随后发现 TJ 蛋白表达量显著下降,IL-1 β 和 TNF- α 含量升高^[93]。此外,应激在破坏肠道上皮细胞间 TJ 结构的同时也导致炎症反应的发生。因此,慢性应激下肠道的机械、化学、免疫和微生物屏障均受到影响,且它们之间存在协同作用。但慢性应激导致肠道屏障功能紊乱的具体机理仍不清楚,肠道屏障之间如何协同作用的机制问题也不明确。研究慢性应激影响肠道的机理对保持肠道屏障完整性和维护肠道屏障功能尤为重要。

1.4 色氨酸对肠道屏障功能的影响

色氨酸(Trp)属于人体必需氨基酸,且必须通过食物摄取,其在机体的代谢、生理、生长和发育中起着重要的调控作用。Trp 在肠道中主要通过 3 条途径被代谢:5-HT 途径(约 1-2%Trp 在肠嗜铬细胞被代谢);犬尿氨酸(Kyn)途径(约 95%Trp 在肠上皮细胞和免疫细胞被代谢);吲哚途径(约 2-3%Trp 被肠道菌群代谢)。

Trp 对机体内多种病理生理过程具有影响,可利用自身或微生物代谢产生的 5-HT、Kyn 和吲哚等活性物质,通过芳香烃受体(AhR)、旁分泌等方式增强肠道屏障功能,维持肠道菌群稳定,改善肠道健康。Trp 摄入不足会引发肠道炎症反应和腹泻,伴随肠道屏障功能紊乱和免疫调控失衡等现象^[94]。Lanis 等人^[95]研究发现,5-HT 能够通过 AhR 途径抑制炎症细胞因子(IL-10、IL-22 和 IL-17)的表达来影响肠道免疫。Chen 等人^[96]研究显示,Trp 通过抑制 NF- κ B-MLCK 信号通路和激活 ERK1/2 来缓解脂多糖诱导的 ZO-1 损伤,保护和修复肠道紧密连接。Kyn 可以通过调控吲哚-2,3-双加氧酶活性促进 T 细胞分化和维持肠道免疫力^[97]。此外,慢性应激状态下 Trp 代谢异常,说明它在慢性应激反应中可能具有重要作用。膳食补充 Trp 可以降低应激诱导的空肠组织中 5-HT 和色氨酸羟化酶 1 基因表达的水平,减轻肠道屏障功能损伤^[98]。以上研究均表明 Trp 及代谢产物都具有较好的维持肠道屏障功能、降低炎症反应以及提高肠道免疫力的作用,且 Trp 过量食入对机体无毒副作用,可以作为改善和缓解肠道屏障应激损伤的一种营养干预手段。

1.5 色氨酸低聚肽的研究现状

色氨酸低聚肽是指含有色氨酸残基的一类寡肽。低聚 γ -谷氨酰色氨酸肽 (Oligo- γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp, OEWS) 和 γ -Glu-Trp 作为一种新型的免疫调节肽, 具有降低炎症因子水平的作用^[17,33]; Yang 等人^[99]的研究表明 OEWS 可通过激活细胞内 CaSR 介导的 Ca^{2+} /CaM/CaMK 信号通路诱导胆囊收缩素分泌, 调节消化功能。He 等人^[100]以 Fe^{3+} 还原能力、ABTS 自由基清除率、DPPH 自由基清除率、 O_3 清除率为指标验证了 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 具有良好的体外抗氧化性。 γ -D-Glu-L-Trp 通过激活 SHP-2 和抑制 STAT3, 从而抑制粘膜炎和肿瘤^[101]。并且, 从已报道的研究中可知 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 具有显著的厚味呈味特性^[29,102]。由以上研究结果可知低聚 γ -谷氨酰色氨酸肽具有多种功能活性。

与 Trp 相比, Trp 肽具有更优的吸收机制和更强的生物活性作用^[103]。Zhu^[17]和 Orosco^[104]等人研究发现, 通过膳食补充乳清蛋白源色氨酸低聚肽可增加小鼠体内 5-HT 的分泌, 产生抗焦虑的作用。此外, 朱西平^[6]研究表明 OEWS 具有较好的抗氧化活性, 能够有效改善焦虑性抑郁症小鼠中枢神经系统抗氧化酶活性、降低血清炎症因子水平、保护中枢神经系统免受慢性应激引起的氧化损伤。以上报道表明色氨酸低聚肽均具有较强的生理活性作用, 尤其是 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 系列产物对改善慢性应激引起的行为障碍和炎症反应具有较好的效果。

1.6 本课题研究的立题依据和主要内容

1.6.1 立题依据

肠道不仅是营养物质消化吸收的主要场所, 也是应激反应发生时最重要的外周靶器官和维持机体稳态的重要免疫屏障。慢性应激可增加动物肠道通透性、破坏 TJ 结构和肠上皮细胞屏障功能、降低肠道免疫力, 从而引起多种功能性肠道疾病的发生。随着生活节奏加快、竞争压力增大, 肠道疾病的发病率逐年升高。慢性应激引起的肠道疾病病因复杂、久治不愈, 且机制尚未完全阐明, 不利于临床干预, 营养干预成为学术界研究的热点。

此外, 与氨基酸相比, 小分子肽具有生物活性强、无竞争性、耗能低、不增加肠胃负担等优点。但是关于 Trp 肽缓解慢性应激引起的肠道屏障紊乱的研究尚未见报道。OEWS 对应激引起的肠道屏障功能紊乱以及炎症反应的作用机制尚处于空白。因此本文的研究目的是利用 CUMS 和葡聚糖硫酸钠 (DSS) 构建肠道屏

障碍功能紊乱模型小鼠，研究 OEW 对肠道屏障功能及免疫系统的改善作用。为预防和改善肠易激综合征、炎症性肠病和功能性腹痛综合征等多种功能性肠道疾病提供理论依据。

1.6.2 主要研究内容

(1) L-谷氨酰胺酶的水解作用和转肽作用研究：通过比较以对硝基苯胺产量和氨气生成量为指标的两种酶活测定方法的差异，探究不同因素对 L-谷氨酰胺酶水解和转肽酶活的影响，得出最优酶活条件及最佳酶活测定方法。

(2) OEW 合成规律及稳定性研究：以 Gln 和 Trp 为原料，在 L-谷氨酰胺酶的催化下合成 OEW，监控 OEW 合成反应过程，并以紫外吸光度和氨基酸态氮含量为指标，利用单因素实验优化 OEW 合成工艺。此外，借助两步法体外模拟消化实验，研究 OEW 的消化规律并对其消化产物进行鉴定和分析。

(3) OEW 对慢性应激引起的肠道屏障功能紊乱的调控机制研究：采用 CUMS 和 DSS 构建肠道屏障功能紊乱模型小鼠，利用行为学实验和生化指标检测 OEW 对肠道屏障功能的影响。

1.6.3 技术路线

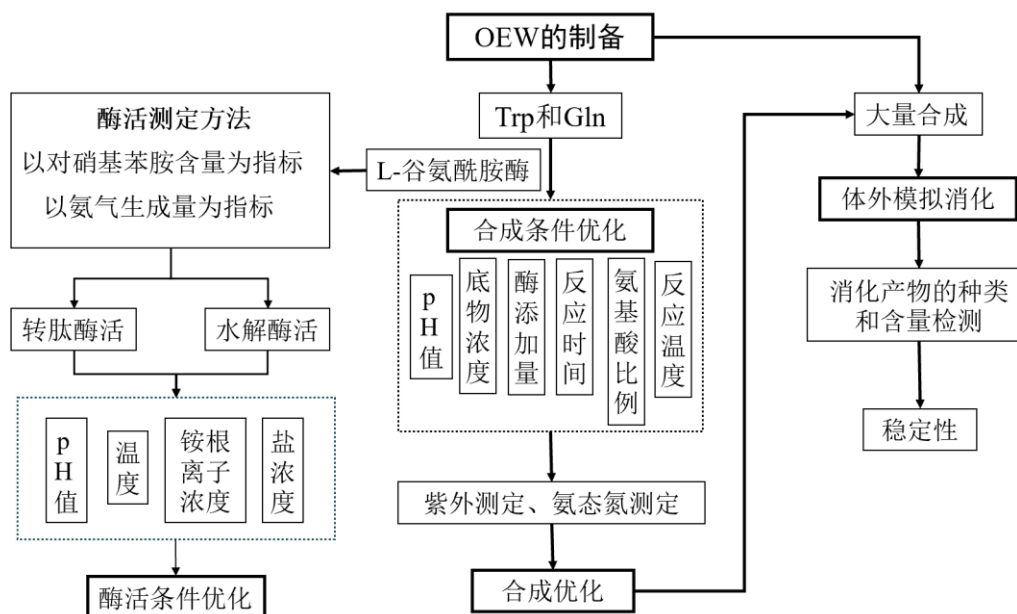


图 1-2 OEW 的制备和体外模拟消化技术路线

Figure 1-2 Technical route for the preparation and in vitro simulated digestion of OEW

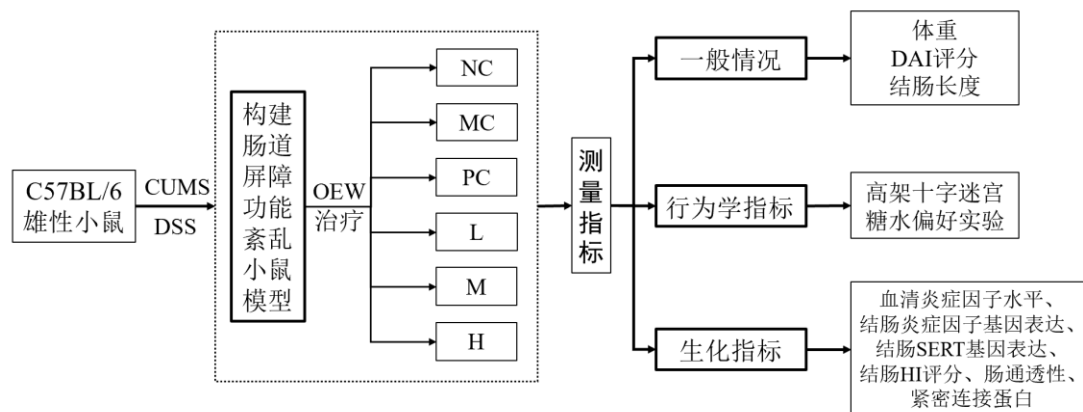


图 1-3 小鼠实验技术路线

Figure 1-3 Technical route to animal experiments

第 2 章 L-谷氨酰胺酶的水解作用和转肽作用

2.1 引言

L-谷氨酰胺酶可使 Gln 水解生成 Glu 和氨，同时，不需要能量参与，可直接发生催化反应，对底物具有高度的专一性^[1]。L-谷氨酰胺酶在细菌、真菌、酵母菌等微生物普遍存在，且大部分是胞外酶，分离纯化较容易，成本低。此外，微生物源 L-谷氨酰胺酶其稳定性更高。因此，即使 L-谷氨酰胺酶存在于自然界的各种生物中，但是微生物源 L-谷氨酰胺酶的研究意义更为重要，并且目前学术界对于微生物来源的 L-谷氨酰胺酶的研究更为常见。

目前，某些微生物源 L-谷氨酰胺酶已被证实同时具有水解酶活性和转肽酶活性，如杨娟^[1]和唐润梅^[2]已经证实解淀粉芽孢杆菌和米曲霉源的 L-谷氨酰胺酶既具有水解能力，又具有 γ -谷氨酰基转肽能力。本章通过两种酶活测定方法的对比，对解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶的水解作用和转肽作用进行研究，探究 pH 值、温度、盐浓度等单因素对其水解酶活和转肽酶活的影响，得出其催化 γ -谷氨酰转肽反应的最适条件，为其实际应用提供理论指导。

2.2 材料与仪器

2.2.1 材料与试剂

解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶（纯度 $\geq 99\%$ ）由安琪酵母股份有限公司提供； γ -谷氨酰-*p*-硝基苯胺（ γ -GpNA）为分析纯，购自上海皓鸿生物医药科技有限公司；双甘肽（Gly-Gly）和对硝基苯胺（pNA）均为分析纯，购自上海麦克林生化科技股份有限公司；甲基红和溴甲酚绿为指示剂，硼酸、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等试剂为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。

2.2.2 仪器与设备

数显恒温水浴锅（型号：HH-S28），金坛大地自动化仪器厂；紫外可见分光光度计（型号：756S），上海棱光技术有限公司；电子天平（型号：JA3003），上海力辰邦西仪器科技有限公司；数显台式酸度计（型号：PHS-3C），上海浦春计量仪器有限公司。

2.3 实验方法

2.3.1 L-谷氨酰胺酶的酶活测定

2.3.1.1 以对硝基苯胺含量为指标测定酶活

水解酶活测定：参考杨娟^[1]的方法，将 0.2 mL L-谷氨酰胺酶（1%，w/v）、0.6 mL 硼酸-氢氧化钠缓冲液（50 mmol/L, pH 10.0）和 0.2 mL γ -GpNA（5 mmol/L）混匀，于 37℃ 下反应 30 min。随后，用 1 mL 盐酸（0.1 mol/L）灭酶，在 440 nm 处测定吸光度值。水解酶活单位：1 μ mol pNA 在单位时间内从 γ -GpNA 释放所需酶量，以 U/g 表示。

转肽酶活测定：把上述相同条件下的实验组设为空白对照组。转肽酶活实际检测组在上述实验设置中另外加入 0.2 mL 的 Gly-Gly（20 mmol/L）作为转肽受体，测定波长 440 nm 处的吸光度值。转肽酶活=转肽酶活实际测定组 OD₄₄₀ 值—空白对照组 OD₄₄₀ 值。转肽酶活单位：1 μ mol pNA 在单位时间内通过转肽反应从 γ -GpNA 释放所需酶量，以 U/g 表示。

2.3.1.2 以氨气生成量为指标测定酶活

水解酶活测定：将 0.5 g Gln 和 0.1 g L-谷氨酰胺酶溶于 100 mL 磷酸盐缓冲液（50 mmol/L, pH 10.00）中，于 37℃ 反应 1 h，反应过程中用装有 20 mL H₃BO₃ 溶液（20 g/L, w/v）和 3 滴混合指示剂（甲基红：溴甲酚绿=2:1, v/v）的接收瓶吸收反应过程中释放的氨气（NH₃）。之后，以盐酸标准滴定液（0.01 mol/L）滴定至终点。水解酶活单位：单位时间内催化 Gln 分解生成 1 μ mol 氨气所需酶量，以 U/g 表示。

转肽酶活测定：把水解酶活相同测定条件下的实验组设为空白对照组。转肽酶活实际检测组在上述实验条件中额外添加 0.5 g 的 Gly-Gly 作为转肽受体，转肽酶活=转肽酶活实际测定组氨气生成量—空白对照组氨气生成量。转肽酶活单位：单位时间内 1 μ mol 氨气通过转肽反应从 Gln 释放所需酶量，以 U/g 表示。

2.3.2 温度对 L-谷氨酰胺酶活性及稳定性的影响

酶活性：根据 2.3.1.1 和 2.3.1.2 的测定方法，将温度分别设定为 25℃、37℃、45℃、55℃和 65℃，测定不同温度对 L-谷氨酰胺酶水解活性和转肽活性的影响。将最高酶活设定为 100%，其余酶活均通过最大酶活的百分比表示。

稳定性：取 0.01 g L-谷氨酰胺酶溶于 pH 10.0 的缓冲液中，之后分别于 25℃、

37°C、45°C、55°C和 65°C中保温 1 h。酶活的测定按 2.3.1.1 和 2.3.1.2 进行，探究温度对 L-谷氨酰胺酶稳定性的影响。

2.3.3 pH 值对 L-谷氨酰胺酶活性及稳定性的影响

酶活性：改变缓冲液的 pH 值，将其分别调至 6.00、7.00、8.00、9.00、10.00 和 11.00。根据 2.3.1.1 和 2.3.1.2 的检测方法，研究不同 pH 值对 L-谷氨酰胺酶水解活性和转肽活性的影响。将最高酶活设定为 100%，其余酶活均通过最大酶活的百分比表示。

稳定性：取 0.01 g 谷氨酰胺酶分别溶于 pH 值为 6.00、7.00、8.00、9.00、10.00 和 11.00 的缓冲液中，并于 4°C中保存 24 h。酶活的测定按 2.3.1.1 和 2.3.1.2 进行，探究 pH 值对 L-谷氨酰胺酶稳定性的影响。

2.3.4 盐浓度和铵根离子浓度对 L-谷氨酰胺酶活性的影响

盐浓度：准确称取不同质量的氯化钠，溶于缓冲液中，使盐浓度分别为 0%、5%、10%、15%、20%和 25%。按照 2.3.1.1 和 2.3.1.2 的测定方法，使用盐浓度不同的缓冲液控制变量，测定盐浓度对 L-谷氨酰胺酶水解活性和转肽活性的影响。将最高酶活设定为 100%，其余酶活均通过最大酶活的百分比表示。

铵根离子浓度：准确称取 0.0 g、0.5 g、1.0 g、1.5 g、2.0 g 和 2.5 g 氯化铵，将其加入到缓冲液中，使铵根离子浓度分别为 0%、5%、10%、15%、20%和 25%。按照 2.3.1.1 和 2.3.1.2 测定方法，使用不同铵根离子浓度的缓冲液控制变量，测定铵根离子浓度对 L-谷氨酰胺酶水解活性和转肽活性的影响。

2.3.5 Gln 作为 γ -谷氨酰供体可行性的探究

参考 Suzuki 等^[41]的方法，将 0.1 mol/L Trp 与 0.2 mol/L Gln 混合，调 pH 为 10.00，再将其分成两份，一份不添加任何其他物质（A 液），另一份添加 L-谷氨酰胺酶（0.1%，w/v；B 液），37°C下反应 4 h 后，沸水浴灭酶 10 min。通过比较有无添加 L-谷氨酰胺酶测出的波长 220 nm 处的吸光值差值来判断是否能将 Gln 作为 γ -谷氨酰供体。

2.3.6 数据分析

每个实验至少重复三次，数据报告为平均值 $\pm$ 标准差。采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析和事后 Duncan 检验，以确定不同组别平均值之间的显著差异。使用 Origin 2018 进行绘图。显著性差异的标准为 $P < 0.05$ ，用不同字母表示。

2.4 结果与分析

2.4.1 L-谷氨酰胺酶的水解酶活及转肽酶活

鉴于本研究主要探讨的是 γ -谷氨酰胺的合成，即 L-谷氨酰胺酶的 γ -谷氨酰转肽能力，所以本章没有选择水解反应的最适环境，而是在转肽反应的最适环境下进行酶活测定，结果如表 2-1 所示。在 pH 值为 10.0、温度 37℃ 的条件下分别以对硝基苯胺含量和氨气生成量为指标检测 L-谷氨酰胺酶的酶活，可以看出以氨气生成量为酶活指标测定的水解酶活和转肽酶活均显著小于以对硝基苯胺含量为指标测定出的酶活。这可能是由于氨气在实验过程中有可能吸收不完全，所以导致以氨气生成量为指标测出的 L-谷氨酰胺酶的酶活性较低，且误差较大。因此，以对硝基苯胺含量为指标的酶活测定方法更为精确，其水解酶活和转肽酶活分别为 80.96 ± 4.31 U/g 和 130.23 ± 2.74 U/g，其转肽酶活与卢慧茵^[12]测得的酶活结果相近。

表 2-1 L-谷氨酰胺酶的酶活

Table 2-1 Enzyme activity of L-glutaminase

测定指标	对硝基苯胺含量	氨气生成量
水解酶活 (U/g)	80.96 ± 4.31^a	66.24 ± 6.13^b
转肽酶活 (U/g)	130.23 ± 2.74^a	113.71 ± 7.56^b

注：同一行的不同字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.4.2 不同因素对 L-谷氨酰胺酶的水解酶活性及稳定性的影响

2.4.2.1 温度对水解酶活及稳定性的影响

由图 2-1 (A) 可知，两种方法测出的 L-谷氨酰胺酶水解酶活的最适温度均为 37℃，高于或者低于此温度，其水解酶活均显著降低。由图 2-1 (B) 可以看出，L-谷氨酰胺酶对温度的耐受范围较大 (24~45℃)，这和 Klein 等^[105]所得结果一致。这些结果均表明温度对 L-谷氨酰胺酶的水解活性具有显著影响。此外，分别以对硝基苯胺含量和氨气生成量为酶活指标的两种方法测出的水解酶活及稳定性随温度改变的变化趋势相一致。因此在利用此酶催化水解反应时，温度应选择 37℃。

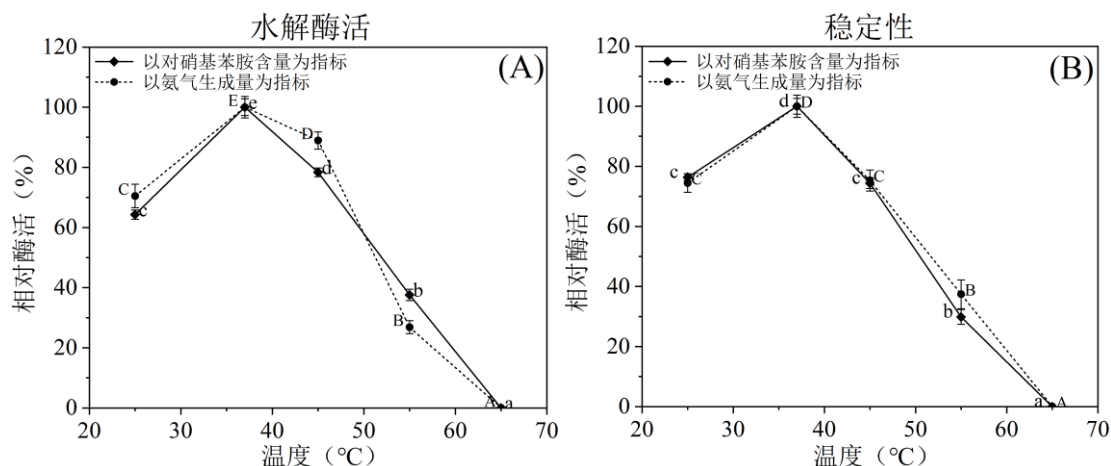


图 2-1 温度对水解酶活及稳定性的影响；(A) 水解酶活，(B) 稳定性

Figure 2-1 Effect of temperature on the hydrolytic activity and stability; (A) hydrolytic enzyme activity, (B) stability

注：小写字母和大写字母分别表示以对硝基苯胺含量和氨气生成量为指标检测出的酶活的显著性差异 ($P < 0.05$)。图下同。

2.4.2.2 pH 值对水解酶活及稳定性的影响

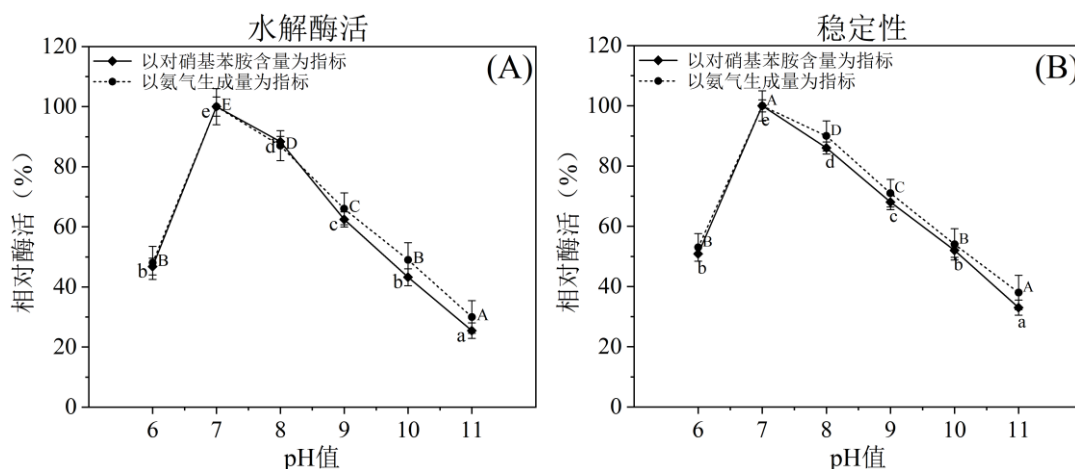


图 2-2 pH 值对水解酶活及稳定性的影响；(A) 水解酶活，(B) 稳定性

Figure 2-2 Effect of pH on the hydrolytic activity and stability; (A) hydrolytic enzyme activity, (B) stability

由图 2-2 (A) 可知，L-谷氨酰胺酶在 pH 6.00~11.00 的范围内均有水解活性。由图 2-2 (A) 可知，L-谷氨酰胺酶水解活性对一定范围内的酸碱度 (pH 6.00~11.00) 具有耐受性。尤其是 pH 为 7.00 时，L-谷氨酰胺酶的水解酶活力最强，其稳定性也为最高，这表明在偏中性环境下 L-谷氨酰胺酶催化水解反应的酶活性

高。此外,采用不同方法测出的水解酶活及稳定性受 pH 值影响的变化趋势相同。因此在利用该 L-谷氨酰胺酶催化水解反应时,最适 pH 值倾向选择 7.00 左右。

2.4.2.3 盐浓度和铵根离子浓度对水解酶活的影响

由图 2-3 (A) 可知,盐浓度显著影响 L-谷氨酰胺酶的水解酶活。两种酶活测定方法测出的水解酶活均随着盐浓度增加而逐渐减少,其中 5% 的盐浓度可使水解酶活降低 15% 左右;而当盐溶液浓度达到 25% 以下,此酶的酶活力仅剩 5% 左右。由此可知,L-谷氨酰胺酶对盐溶液极其敏感。由图 2-3 (B) 可以看出,用对硝基苯胺含量作为指标测定酶活时,L-谷氨酰胺酶的水解酶活随着铵根离子浓度的上升而呈现下降趋势,但降低得不明显,保持在 95% 以上,这说明 L-谷氨酰胺酶的水解活性在铵根离子的存在下耐受性较好。但使用氨气生成量作为指标测定水解酶活,由于氯化铵的存在本身就有可能生成氨气,因此随着加入氯化铵质量的增大,其所产生的氨气也随之增多,导致其所测得的氨气生成量随着铵根离子浓度的增加而逐渐增大,但这个实验结果不能代表 L-谷氨酰胺酶本身受到铵根离子的影响。综合提高酶活和节约成本的角度思考,在利用此酶催化水解反应时,应当尽量减少盐和铵根离子的含量,故选择 0% 的盐浓度和 0% 的铵根离子浓度。

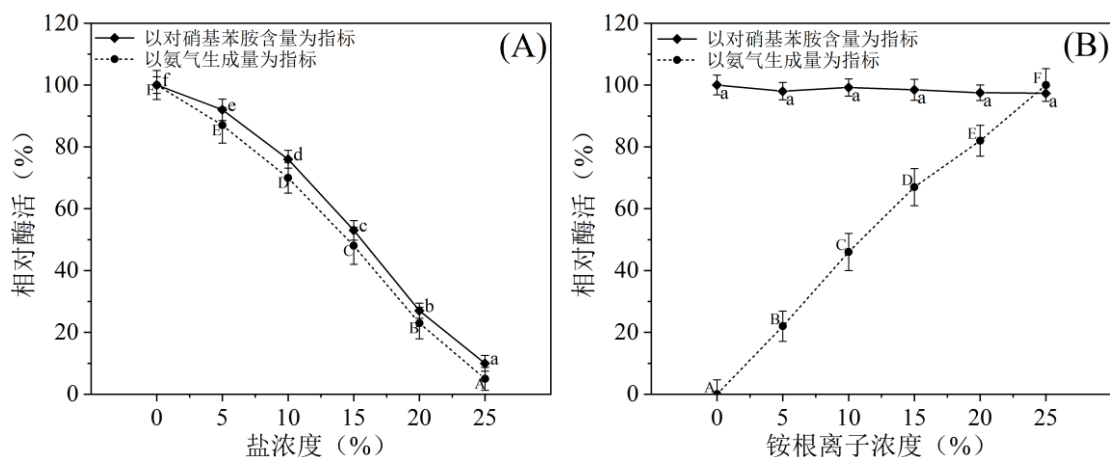


图 2-3 盐浓度和铵根离子浓度对水解酶活的影响; (A) 盐浓度, (B) 铵根离子浓度

Figure 2-3 Effect of salt concentration and ammonium ion concentration on the hydrolytic activity; (A) salt concentration, (B) ammonium ion concentration

2.4.3 不同因素对 L-谷氨酰胺酶的转肽酶活性及稳定性的影响

2.4.3.1 温度对转肽酶活及稳定性的影响

由图 2-4 (A) 可以看出, L-谷氨酰胺酶的转肽酶活随温度的升高呈现出先升后降的趋势, 在 37℃ 时转肽酶活达到最高值。并且, 该酶在一定温度范围内 (25~45℃), 酶活性较高, 保持在 70% 以上; 但温度超过 55℃ 时, 酶活降至 50% 以内。由图 2-4 (B) 可以看出, 当温度高于 55℃ 之后, L-谷氨酰胺酶的转肽能力的稳定性急剧下降至 0。以上结果表明温度对 L-谷氨酰胺酶的转肽酶活力具有显著影响。这是由于适当的温度提高会导致酶促反应速度加快, 酶活提高, 使酶促反应趋于正向进行; 而当温度过高时, 蛋白变性会破坏 L-谷氨酰胺酶的分子结构而使其失去活力。此外, 以氨气生成量为指标测出的 L-谷氨酰胺酶转肽酶活的稳定性高于以对硝基苯胺含量为指标测出的酶活。因此, 在利用 L-谷氨酰胺酶催化转肽反应时应选择 37℃ 左右。

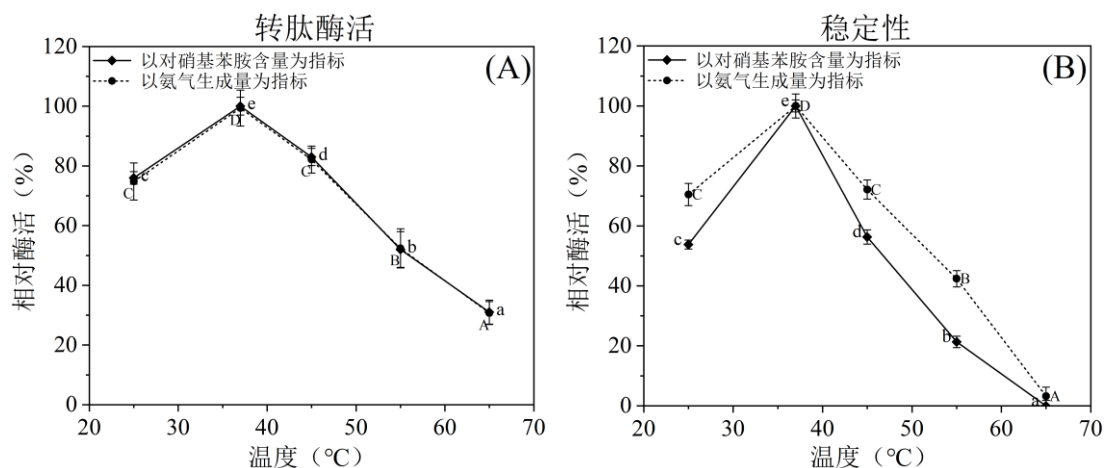


图 2-4 温度对转肽酶活及稳定性的影响; (A) 转肽酶活, (B) 稳定性

Figure 2-4 Effect of temperature on the transpeptidase activity and stability; (A) transpeptidase activity, (B) stability

2.4.3.2 pH 值对转肽酶活及稳定性的影响

如图 2-5 (A), L-谷氨酰胺酶在 pH 6.00~11.00 的范围内均有转肽酶活性, 并且在碱性环境下催化活性高。随着 pH 值增加, L-谷氨酰胺酶的转肽相对酶活随之上升, 在 pH 值为 10.00 时达到最高值, 随后下降; 在 pH 值为 11.00 时, 转肽酶活降至 75% 左右。由图 2-5 (B) 得出, 当 L-谷氨酰胺酶的长时间处于碱性环境中, 随着 pH 值的升高, L-谷氨酰胺酶的转肽酶活下降。并且以氨气生成量

为指标测出的转肽酶活随 pH 值的升高，其下降趋势更为明显，酶稳定性降低更迅速。这些结果表明 L-谷氨酰胺酶对强碱条件的耐受性不行，与孙媛媛^[106]的结果不一致，有可能是因为测定酶活的方法不一样。在利用 L-谷氨酰胺酶催化转肽反应时，选择 pH 值 10.00 左右。

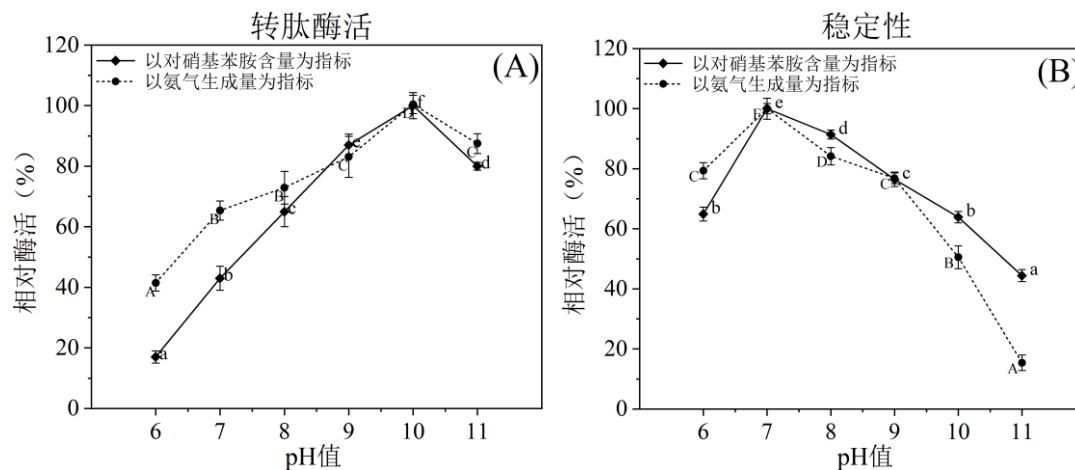


图 2-5 pH 值对转肽酶活及稳定性的影响；(A) 转肽酶活，(B) 稳定性

Figure 2-5 Effect of pH on the transpeptidase activity and stability; (A) transpeptidase activity, (B) stability

2.4.3.3 盐浓度及铵根离子浓度对转肽酶活的影响

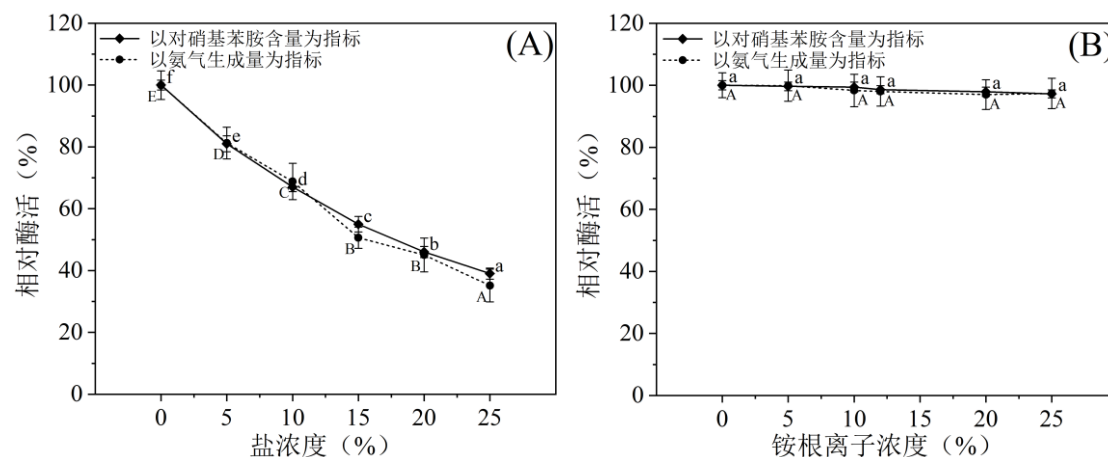


图 2-6 盐浓度和铵根离子浓度对转肽酶活的影响；(A) 盐浓度，(B) 铵根离子浓度

Figure 2-6 Effect of salt concentration and ammonium ion concentration on the transpeptidase activity; (A) salt concentration, (B) ammonium ion concentration

如图 2-6 (A)，L-谷氨酰胺酶的转肽酶活随着盐浓度增加而逐渐减弱。5%的盐浓度可使相对酶活降低 20%左右；而当盐浓度为 25%，L-谷氨酰胺酶的相对酶活力仅剩 40%左右。由此可知，盐浓度对转肽酶活有着显著影响。这与杨娟^[1]的

结果一致。因此在利用此酶催化合成 γ -谷氨酰胺时，应当尽量减少盐的生成，故选择 0% 的盐浓度。由图 2-6 (B) 可以看出，铵根离子浓度对 L-谷氨酰胺酶的转肽活性没有明显影响。因此选择无论多高的铵根离子浓度 (0%-25%)，都对转肽酶活的影响不大。但出于对成本的考虑，选择 0% 的铵根离子浓度。

2.4.4 Gln 作为 γ -谷氨酰胺供体的可行性

结果如表 2-2 所示，可见加 L-谷氨酰胺酶后的酶促反应混合物 (B 液) 在 220 nm 波长处的吸光度值较反应前明显增加，而没有添加酶的混合物在酶促反应前后吸光度无明显变化，说明加酶后有肽键形成，即 Gln 可以作为 γ -谷氨酰胺供体参与转肽反应。

表 2-2 Gln 作为 γ -谷氨酰胺供体的可行性

Table 2-2 Feasibility of Gln as a γ -glutamyl donor

样品名称	反应前混合物 (OD ₂₂₀)	酶促反应后混合物 (OD ₂₂₀)
A 液	0.00 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
B 液	0.00 ± 0.00 ^a	0.43 ± 0.04 ^b

注：同一行的不同字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.5 本章小结

(1) 采用两种方法测定解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶的酶活，得出以对硝基苯胺为指标的酶活测定方法更为准确可靠。

(2) 对 L-谷氨酰胺酶的水解作用和转肽作用进行研究，发现 L-谷氨酰胺酶同时具有水解活性和转肽活性，其以对硝基苯胺为指标测出的水解酶活和 γ -谷氨酰胺转肽酶活分别为 80.96 U/g 和 130.23 U/g。

(3) L-谷氨酰胺酶催化水解反应的最适条件为：温度 37℃，pH 7.00；催化 γ -谷氨酰胺转肽反应的最适条件为：温度 37℃，pH 10.00。

(4) Gln 可以作为 γ -谷氨酰胺供体参与 L-谷氨酰胺酶催化的 γ -谷氨酰胺转肽反应。

第3章 低聚 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 的酶法合成及体外模拟消化

3.1 引言

γ -谷氨酰胺肽是一类由 Gln 的 γ -羟基与氨基酸或者多肽的氨基脱水缩合形成的低聚肽。目前证明了其具有抗炎、抗氧化和抗癫痫等生理活性。在 γ -谷氨酰胺肽的制备方法中，酶促合成法的成本低、合成流程简单、反应条件温和、产率高。因此采用酶促合成法制备 γ -谷氨酰胺肽是目前的常见方法。杨娟、唐润梅和孙媛媛等人利用 Gln 和其他氨基酸作为原料在 L-谷氨酰胺酶的催化下成功合成了 γ -[Glu]_(n≥1)-Arg、 γ -[Glu]_{n(1-5)}-Gln 和 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Phe 等多种 γ -谷氨酰胺肽^[1,2,106]。

γ -谷氨酰胺肽想要在人体内发挥作用，需要经历胃肠消化阶段，并经过小肠吸收之后才能到达目标位置，进而发挥其生理作用^[49,107]。然而胃肠道作为营养物质消化的重要场所，会对肽的结构和活性造成影响^[51]。因此进行消化研究是十分必要的。本章探索了使用 L-谷氨酰胺酶催化合成 OEWS 的可行性，对其合成条件进行优化，并研究 OEWS 体外消化在胃肠液中的稳定性。

3.2 材料与仪器

3.2.1 材料与试剂

解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶（纯度 ≥ 99%）由安琪酵母股份有限公司提供；Gln 和 Trp 均为食品级，购自河北吉捷生物科技有限公司； γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 标准品（纯度 ≥ 99%）由南京杰肽生物科技有限公司合成；乙腈、甲醇和甲酸均为色谱纯，胃蛋白酶（> 3000 U/mg）和胰酶（130 U/mg），购自上海麦克林生化科技股份有限公司；甲醛溶液、磷酸二氢钾等试剂均为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。

3.2.2 仪器与设备

气浴恒温振荡器（型号：THZ-92B），宁国沙鹰科学仪器有限公司；循环水式多用真空泵（型号：SHB-III）和旋转蒸发仪（型号：R-1001VN），郑州长城科工贸有限公司；紫外可见分光光度计（型号：756S），上海棱光技术有限公司；高效液相色谱仪（型号：LC-20 AT），日本岛津；液相色谱-质谱联用仪（型号：

LC-MS 8030), 日本岛津公司; 冻干机 (型号: Free Zone), Labconco。

3.3 实验方法

3.3.1 OEW 的酶法合成

在恒温控制的摇床中, Gln: Trp 为 2: 1 (n/n)、底物浓度为 0.1 mol/L 和酶添加量为 0.1% (w/v) 的条件下, 酶促合成 γ -谷氨酰胺。在预先确定的 L-谷氨酰胺酶作为催化剂的最佳条件下, 将 pH 调节为 10.00, 于 37°C 下孵育 3 h。反应结束时, 在沸水浴中加热 10 min, 进行冷冻干燥后得到“OEW 合成反应物”, 于 -20°C 下储存备用。

3.3.2 紫外吸光度的测定

根据唐润梅^[2]的方法, 肽键在 220 nm 处表现出很强的吸收强度, 因此, 测量 220 nm 处的吸光度来估计 γ -谷氨酰胺转肽化的程度。称量 1 g 冻干固体产物用 100 mL 去离子水溶解之后, 再用去离子水稀释 100 倍, 于波长 220 nm 处测定吸光度。

3.3.3 氨基酸态氮的测定

按照 GB 5009.235—2016 中的甲醛滴定法测定氨基酸态氮含量。称取一定量的固体合成反应产物, 加入 80 mL 去离子水, 调 pH 至 8.20。然后加入 10 mL 甲醛溶液反应 1 min, 再利用 0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液将 pH 值滴定至 9.20, 记录氢氧化钠溶液消耗量, 按照式 (3-1) 计算氨基酸态氮含量。

$$\text{氨基酸态氮含量 (\%)} = (C \times (V_1 - V_0) \times 0.014) / m \times 100 \quad \text{式 (3-1)}$$

式中: C 为氢氧化钠标准溶液浓度 (mol/L), V_1 为氢氧化钠标准溶液消耗体积 (mL), V_0 为滴定空白体积 (mL), m 为样品质量 (g)。

3.3.4 单因素实验

3.3.4.1 氨基酸比例对酶促合成 OEW 的影响

准确称取 Gln 与 Trp 不同物质的量比 (Gln: Trp = 3: 1、2: 1、1: 1、1: 2 和 1: 3; n/n), 按照 3.3.1 描述的方法进行 OEW 合成实验。以波长 220 nm 处紫外吸光度值和氨基酸态氮含量为指标探究氨基酸比例对合成反应的影响。

3.3.4.2 反应时间对酶促合成 OEW 的影响

将反应时间分别设定为 1 h、2 h、3 h、6 h、12 h, 按照 3.3.1 描述的方法进行 OEW 合成实验。以波长 220 nm 处紫外吸光度值和氨基酸态氮含量为指标研

究反应时间对合成反应的影响。

3.3.4.3 底物浓度对酶促合成 OEWS 的影响

准确称取一定量 Gln 和 Trp (Gln: Trp = 2: 1, n/n), 溶于去离子水中, 使其底物浓度为 0.05 mol/L、0.10 mol/L、0.20 mol/L、0.50 mol/L、0.75 mol/L 的溶液, 按照 3.3.1 描述的方法进行 OEWS 合成实验。以波长 220 nm 处紫外吸光度值和氨基酸态氮含量为指标表示底物浓度对合成反应的影响。

3.3.4.4 酶添加量对酶促合成 OEWS 的影响

准确称取 L-谷氨酰胺酶适量, 溶于蒸馏水中, 使其 L-谷氨酰胺酶的添加量分别为 0.01%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20% (w/v)。按照 3.3.1 描述的方法进行 OEWS 合成实验。以波长 220 nm 处紫外吸光度值和氨基酸态氮含量为指标表示酶添加量对合成反应的影响。

3.3.4.5 pH 值对酶促合成 OEWS 的影响

按照 3.3.1 描述的方法进行 OEWS 合成实验, 并分别将酶促反应液调至 pH 值为 8.00、9.00、10.00、11.00 和 12.00, 探究 pH 值对合成反应的影响。以波长 220 nm 处紫外吸光度值和氨基酸态氮含量为指标研究 pH 值对合成反应的影响。

3.3.4.6 反应温度对酶促合成 OEWS 的影响

将酶促反应液分别于 30°C、37°C、45°C、55°C、65°C 中反应 3 h, 按照 3.3.1 描述的方法进行 OEWS 合成实验。以波长 220 nm 处紫外吸光度值和氨基酸态氮含量为指标研究反应温度对合成反应的影响。

3.3.5 OEWS 合成样的 HPLC 测定

参考杨娟^[1]的方法略作修改, 使用 0.22 μ m 滤膜过滤 OEWS 合成反应物 (1 mg/mL)。随后, 利用 LC-20AT 型 HPLC 仪, 配备 Supersil AQ-C18 色谱柱 (5 μ m $\times$ 4.6 mm $\times$ 250 mm) 对 OEWS 合成样进行分离定量检测。流动相为 0.1% 甲酸-水溶液 (A 相) 和乙腈 (B 相)。紫外检测波长为 220 nm, 进样量为 10 μ L, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40°C。洗脱程序为: 0-20 min, 20%-30% A; 20.00-20.01 min, 30%-20% A; 20.01-25 min, 20% A。

3.3.6 LC-MS 测定

使用 0.22 μ m 滤膜过滤 OEWS 合成反应物 (1 mg/mL) 制备样品。采用 LCMS-8030 液相质谱, 配备 ZORBAX RRHD SB-C18 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μ m;

Agilent) 进行分离鉴定。采用甲醇: 含 0.1%甲酸的纯水 = 1: 1 (v/v) 作为流动相, 等度洗脱 5 min。柱温为 40°C, 流速为 0.2 mL/min, 进样量为 5 μ L。

质谱采用电喷雾离子源, 正离子模式, DL 温度 250°C, Heat Block 温度 200°C, 雾化气流速 3 L/min, 干燥气流速 15 L/min, 离子源电压 4500 V, 质荷比 (m/z) 范围 50-1000。采用离子峰强度进行定量分析。

3.3.7 体外消化液的配置

模拟胃液 (SGF): 称取 0.2 g 氯化钠溶于 100 mL 去离子水中, 用 1 mol/L 盐酸调 pH 至 2.00, 此为模拟胃液空白液 (SGFc)。之后将 0.4 g 胃蛋白酶加入 SGFc 中, 使胃蛋白酶的浓度为 4 mg/mL, 此为 SGF。

模拟肠液 (SIF): 称取 0.68 g 磷酸二氢钾和 0.062 g 氢氧化钠溶于 100 mL 去离子水中, 用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸调 pH 至 6.8, 此为模拟肠液空白液 (SIFc)。之后将 1 g 胰酶溶解于 SIFc 中, 使胰酶浓度为 10 mg/mL, 此为 SIF。

3.3.8 体外模拟消化实验

准确称取 1 g OEW 合成反应物, 将其加入至 25 mL SGFc 中, 用盐酸将 pH 调至 2.0, 加入 SGFc 使溶液的总体积达到 29 mL。再加入新鲜配制的 SGF, 使得胃蛋白酶与多肽质量比为 1: 250 (w/w), 于 37°C 反应 2 h (150 rpm)。随后, 采用氢氧化钠调 pH 至 6.80, 使胃蛋白酶失活。经过胃消化之后, 加入 SIFc 使液体体积达到 35 mL, 于 37°C 反应 5 min。再加入 4 mL SIF, 在 37°C 恒温反应 4 h (150 rpm)。分别在消化零期 (合成原样)、胃期 (胃消化样) 末和胃+小肠期 (胃肠消化样) 采集样品。将收集的消化样品放置于沸水浴中 10 min 灭酶, 冷却至室温, 调节 pH 至 7.00, 离心 (12000 rpm、4°C) 15 min。上清液进行浓缩并冷冻干燥, 收集冻干样。

3.3.9 OEW 消化产物的测定

3.3.9.1 紫外吸光度与氨基酸态氮测定

紫外吸光度测定方法同 3.3.2, 氨基酸态氮测定同 3.3.3。

3.3.9.2 LC-MS 测定

LC-MS 测定同 3.3.6。

3.3.10 数据分析

每个实验至少重复三次, 数据显示为平均值 $\pm$ 标准差。采用 SPSS 20.0 进

行单因素方差分析和事后 Duncan 检验,以确定不同组别平均值之间的显著差异。使用 Origin 2018 进行绘图。显著性差异的标准为 $P < 0.05$, 并用不同小写字母表示。

3.4 结果与分析

3.4.1 氨基酸比例对 OEW 合成反应的影响

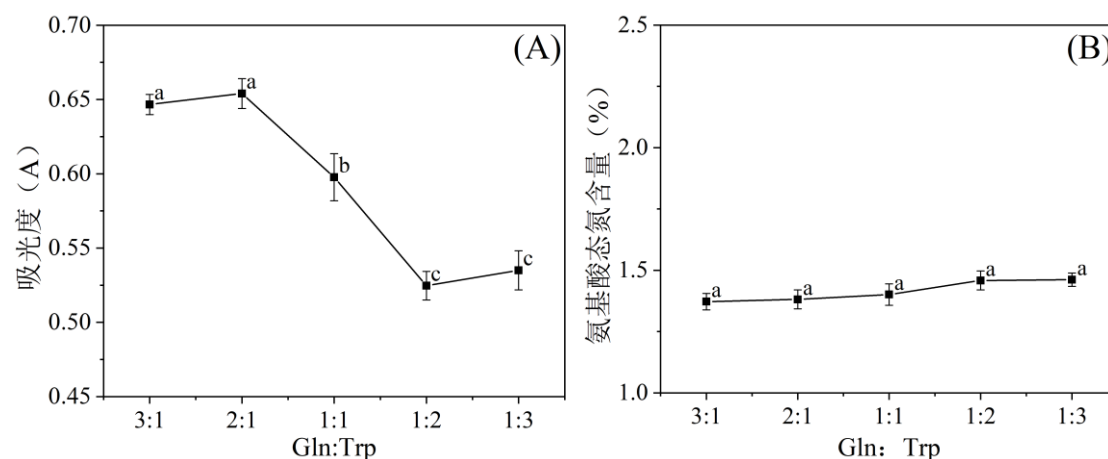


图 3-1 不同氨基酸比例对 OEW 合成反应的影响; (A) 吸光度, (B) 氨基酸态氮含量

Figure 3-1 Effects of different amino acid ratios on OEW synthesis; (A) absorbance, (B) amino acid nitrogen content

注: 不同字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。图下同。

在底物浓度、酶添加量和反应时间等条件保持不变的情况下, 改变 Gln 和 Trp 的比例, 探究了 Gln 与 Trp 的不同比例对 OEW 产率的影响, 结果如图 3-1 所示。由于肽键在 220 nm 处有吸收峰, 因此此波长处吸光度的大小可表示肽键含量的多少, 从而得出 OEW 产率^[108]。图 3-1 (A) 中显示当 Gln: Trp 的比例为 3: 1 和 2: 1 时, OEW 合成液在 220 nm 处的紫外吸光度最高, 其肽键合成率最高。当 Trp 含量超过 Gln 时, 随着 Trp 比例的增高, 220nm 处的吸光度也随之表示出下降的趋势。氨基酸态氮含量反应了溶液中游离氨基酸总量的变化, 该指标的降低说明了反应过程中游离氨基酸的消耗, 可从侧面证明转肽反应的发生及产物 OEW 的生成^[106]。由图 3-1 (B) 可以看出, 氨基酸态氮含量随着 Trp 比例的增加表现出上升的趋势, 但差异没有统计学意义, 说明溶液中的氨基酸比例变化对游离氨基酸含量没有明显影响。综合来看, 氨基酸比例 (Gln: Trp) 的变化对 OEW 产率有影响, 但影响不显著。根据之前的研究可知^[104], Gln 含量越高, 其 γ -[Glu]_n-Gln 副产物生成率越高, 因此选择 Gln: Trp = 2: 1 作为 OEW 酶促合成反应的最

适氨基酸比例条件。

3.4.2 反应时间对 OEW 合成反应的影响

不同反应时间对 OEW 合成的影响结果见图 3-2。在图 3-2 (A) 中, 总的趋势显示反应时间越长, OEW 合成液的吸光度 (220 nm) 越大。对于 L-谷氨酰胺酶催化的合成反应, 其合成液的吸光度在 0-3 h 内快速增高, 随后在 3-12 h 内增高趋势放缓, 说明在前 3 h 内合成反应速率上升趋势非常快速, 且在 3 h 时临近平衡。此结果与朱西平^[6]合成 OEW 的结果相一致。由图 3-2 (B) 可知, 氨基酸态氮含量的变化跟吸光度呈现相反的变化趋势。OEW 合成液的氨基酸态氮含量在 0-3 h 内下降速率较快, 说明溶液中的 Trp 和 Gln 都在酶的催化作用下不断参与合成反应; 随后在 3-12 h 内趋于平缓, 且无显著变化。结合图 3-2 (A) 和 (B), 3 h 时 OEW 合成液的吸光度最高, 氨基酸态氮含量最低, OEW 合成量最高, 说明随着时间的延长, 游离氨基酸 (Gln 和 Trp) 和 L-谷氨酰胺酶充分接触, 其肽键生成率增高, OEW 产率升高, 但超过一定的反应时间, 反应底物已经消耗完毕, 反应体系已经趋向平衡, 时间继续增长也没有多余的游离氨基酸与 L-谷氨酰胺酶结合促进肽键的生成^[1]。总之, 3 h 是 OEW 合成反应的最适反应时间。

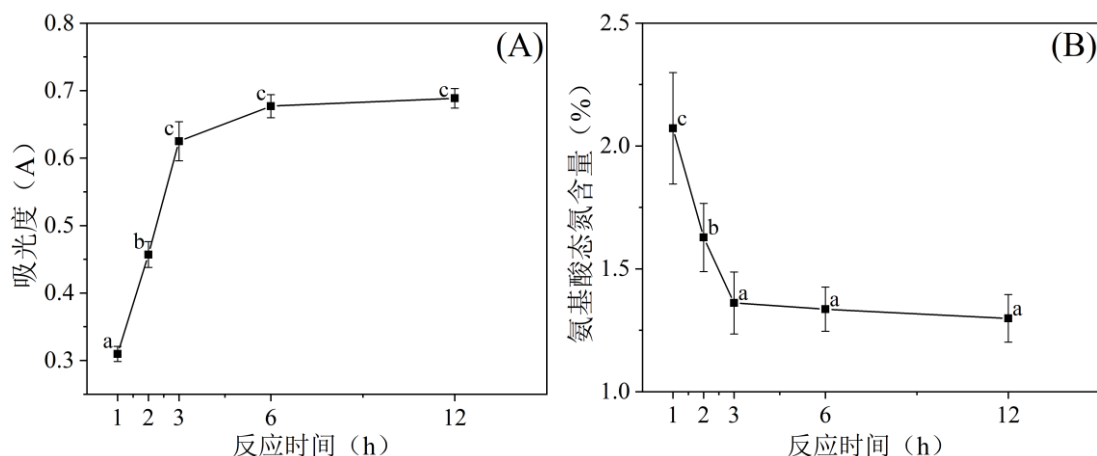


图 3-2 不同反应时间对 OEW 合成反应的影响; (A) 吸光度, (B) 氨基酸态氮含量

Figure 3-2 Effect of different reaction time on OEW synthesis; (A) absorbance, (B) amino acid nitrogen content

3.4.3 底物浓度对 OEW 合成反应的影响

不同底物浓度对 OEW 合成的影响结果见图 3-3。由图 3-3 (A) 可知, 在保持氨基酸比例、酶添加量和温度等条件维持不变的情况下, 底物浓度从 0.05 mol/L 增加至 0.20 mol/L, 紫外吸光度显著增加, 从 0.404 A 增加至 0.670 A。OEW 合

成反应的最适底物浓度为 0.20 mol/L。底物浓度低于 0.20 mol/L，其吸光度显著降低，肽键合成量明显下降。底物浓度高于 0.20 mol/L，吸光度变化趋于平缓，肽键合成量维持不变。如图 3-3 (B) 所示，氨基酸态氮含量随着底物浓度的增加逐渐增高。底物浓度低于 0.20 mol/L，氨基酸态氮含量变化差异无统计学意义；底物浓度高于 0.20 mol/L，氨基酸态氮含量上升速率增快。值得注意的是，0.20 mol/L 底物浓度反应下的吸光度最高，说明其生成的肽键总数更多，结合氨基酸态氮含量，0.20 mol/L 底物浓度的酶促反应液的氨基酸态氮含量低于高底物浓度反应液，以上现象综合说明了当底物浓度过低时，随着浓度的增加，越来越多的酶能和底物相结合，反应速率增大^[104]，OEW 产率增加。当底物浓度到达一定值后，酶分子被饱和，此时继续增加底物浓度不仅对产率无显著影响，反而会致使反应液中游离氨基酸含量上升。过高的底物浓度并不总是促进反应的进行^[106]。因此 0.2 mol/L 是 OEW 合成反应的最适底物浓度。

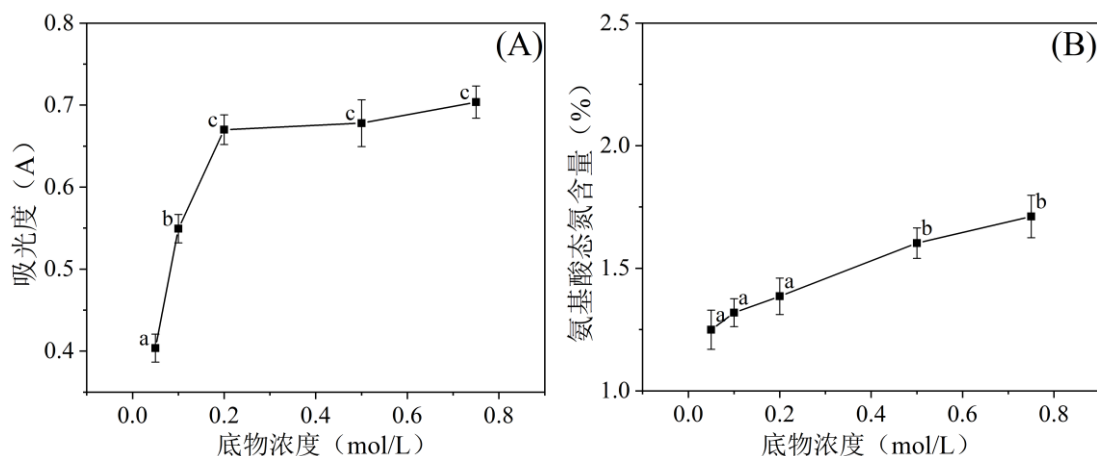


图 3-3 不同底物浓度对 OEW 合成反应的影响；(A) 吸光度，(B) 氨基酸态氮含量

Figure 3-3 Effects of different substrate concentrations on OEW synthesis; (A) absorbance, (B) amino acid nitrogen content

3.4.4 酶添加量对 OEW 合成反应的影响

酶添加量对 OEW 产率的影响结果如图 3-4 所示。从图 3-4 (A) 可以看出，当酶添加量低于 0.1% 时，随着酶添加量的增加，紫外吸光度也明显增加，在酶添加量到达 0.1% 时，紫外吸光度也到达最高值。此时继续增大酶添加量，紫外吸光度也无明显变化。氨基酸态氮含量在酶添加量为 0.1% 时达到最低值，高于此添加量，氨基酸态氮含量随着酶添加量的增加无显著变化；低于此添加量，氨基酸态氮含量随着 L-谷氨酰胺酶含量的增加显著下降（图 3-4 B）。酶添加量是

能直接影响合成反应的因素之一。在 Gln 和 Trp 浓度不变的情况下, L-谷氨酰胺酶含量的增加可以促进反应向生成 OEW 产物的方向进行, 增加产率^[12], 但底物消耗完毕时, 继续增加酶的含量, OEW 产率也不会增大。因此, 选择 0.1% 作为 OEW 合成反应的最适酶添加量。

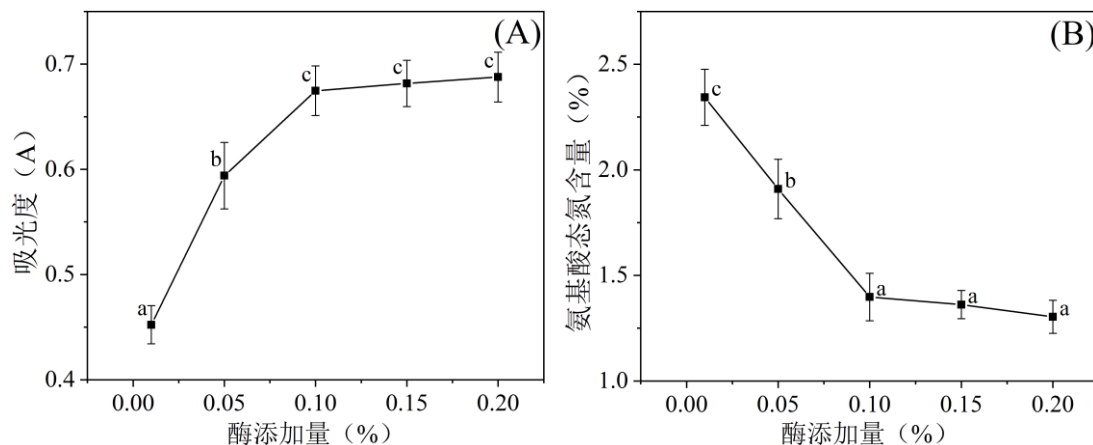


图 3-4 不同酶添加量对 OEW 合成反应的影响; (A) 吸光度, (B) 氨基酸态氮含量

Figure 3-4 Effects of different enzyme supplemental levels on OEW synthesis; (A) absorbance, (B) amino acid nitrogen content

3.4.5 pH 值对 OEW 合成反应的影响

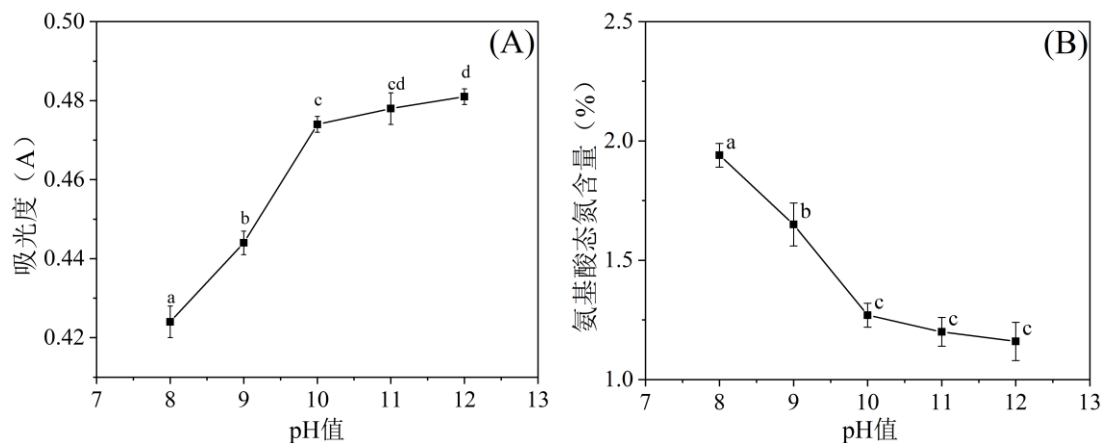


图 3-5 不同 pH 值对 OEW 合成反应的影响; (A) 吸光度, (B) 氨基酸态氮含量

Figure 3-5 Effect of different pH on OEW synthesis; (A) absorbance, (B) amino acid nitrogen content

由图 3-5(A)可以看出, 酶促反应液的吸光度随初始 pH 值升高而不断增高, 在 pH 值为 10.00 时, 吸光度的上升趋势减缓。如图 3-5 (B) 所示, 氨基酸态氮含量随酶促反应液的初始 pH 值升高而不断降低, 当 pH 值达到 10.00 时, 游离氨基酸含量达到一个低值。之后继续提高酶促反应液的初始 pH 值, 游离氨基酸

含量并无明显变化。这是因为随着合成反应的进行, Gln 脱去酰胺基, 反应过程中的溶液 pH 值会低于初始 pH 值。当初始 pH 值增大时, 合成反应的速率会在一定时间保持在一个较高的值, OEWS 生成率增加, 游离氨基酸含量减少。结合 2.4.3.2 的结果, 选择 10.00 作为酶促合成反应的最适 pH 值。

3.4.6 温度对 OEWS 合成反应的影响

由图 3-6 (A) 可以得知, 当反应温度为 30-37℃时, 吸光度随着反应温度的增加而缓慢上升, 当反应温度为 37-55℃时, 吸光度随着反应温度的增加而迅速降低, 这表明温度过高会导致 L-谷氨酰胺酶的酶活降低, 从而导致 OEWS 合成反应的速度变缓, 并且温度过高也会导致 L-谷氨酰胺酶的结构被破坏。由图 3-6 (B) 可以看出, 当反应温度为 37-45℃时, 氨基酸态氮含量没有显著差异。因而选择 37℃作为 OEWS 合成反应的最优反应温度。

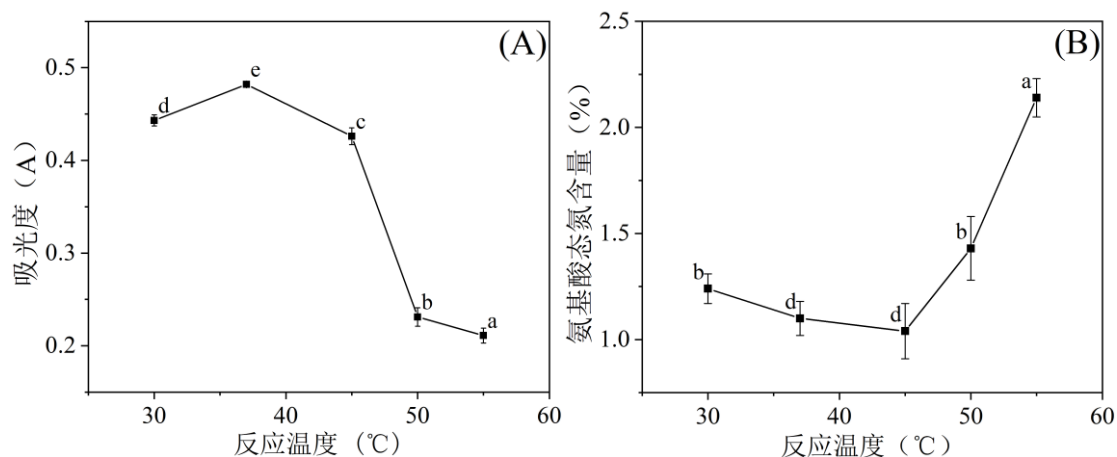


图 3-6 不同温度对 OEWS 合成反应的影响: (A) 吸光度, (B) 氨基酸态氮含量

Figure 3-6 Effect of temperatures on OEWS synthesis; (A) absorbance, (B) amino acid nitrogen content

3.4.7 OEWS 合成物的定量定性分析

利用 HPLC 对 Gln-Trp 反应体系中的 OEWS 产物进行分离鉴定, 结果如图 3-7 所示。OEWS 酶促合成液中的产物均得到了良好的分离。

通过比较分离出的各组物质的保留时间和 γ -谷氨酰色氨酸标准品的保留时间, 对 OEWS 合成物进行定性定量分析, 得到表 3-1。保留时间 13.473 min、14.917 min、15.365 min 和 15.643 min 所对应的物质分别是 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp。此外, 四条 γ -谷氨酰色氨酸标准曲线的相关系数 R^2 均大于 0.99, 说明峰面积与产物浓度呈线性相关。在最优合成反应条件

下, OEW 产率达到了 60.31%, 其中, γ -Glu-Trp 的产率最高。Yang 等人^[18]研究表明, 游离氨基酸与 L-谷氨酰胺酶的结合力高于肽, 且肽和酶的结合力随着分子量的增大而缩小。因此具有越短肽链的 OEW, 具有越高的浓度, 这与本实验液相结果一致。

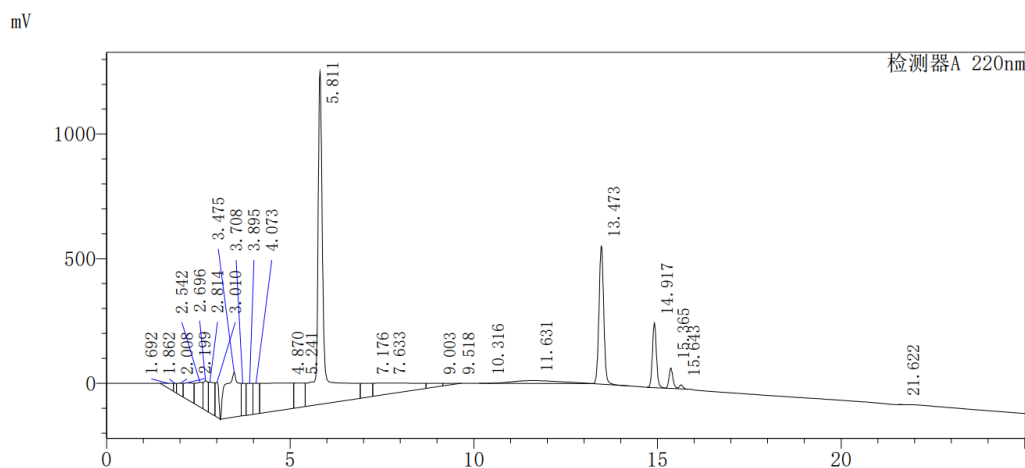


图 3-7 OEW 反应体系的 HPLC 图

Figure 3-7 HPLC diagram of OEW reaction system

表 3-1 HPLC 标准品标准曲线绘制及其含量测定

Table 3-1 HPLC standard curve drawing and content determination

名称	保留时间/min	标准曲线	相关系数 R^2	含量/%
γ -Glu-Trp	13.473	$y=1000000x-99650$	0.9926	24.57
γ -[Glu] ₂ -Trp	14.917	$y=648977x-61632$	0.9938	16.42
γ -[Glu] ₃ -Trp	15.365	$y=833935x-115050$	0.9983	11.89
γ -[Glu] ₄ -Trp	15.643	$y=565229x-67867$	0.9994	7.43

3.4.8 OEW 合成物的结构表征

采用 LC-MS 对酶促反应液进行定性定量分析, 结果如表 3-2 所示。从 OEW 酶促反应液中共鉴定出四种色氨酸肽: γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp、 γ -[Glu]₄-Trp, 其实际质量分别为 334.15、463.20、592.20、721.25。然后采用离子峰萃取的方法对这些低聚肽进行定量分析, 得出 OEW 的总合成率达到 60.72% (w/w), 与 3.4.7 结果相似。综上所述, 以 Gln 为酰基供体、Trp 为酰基受体, 在 L-谷氨酰胺酶催化作用下能够定向合成高含量的 OEW 系列产物, 从分析结果来看, γ -Glu-Trp 的合成率较高, 为 47.35%。

表 3-2 OEW 合成物的 LC-MS 数据

Table 3-2 LC-MS data of OEW

寡肽名称	实际质量	峰强度	合成率 (%)
γ -Glu-Trp	334.15	248966	41.35
γ -[Glu] ₂ -Trp	463.20	61613	9.86
γ -[Glu] ₃ -Trp	592.20	26969	6.03
γ -[Glu] ₄ -Trp	721.25	23140	3.48

3.4.9 消化产物的吸光度和氨基酸态氮含量

胃蛋白酶倾向于剪切氨基端或羧基端为芳香族氨基酸（如 Trp）或 Leu 的肽键^[109]。胰酶属于复合酶，对 OEW 也具有一定的水解作用。因此胃消化样和胃肠消化样较 OEW 合成原样来说，紫外吸光度显著下降，氨基酸态氮含量显著上升，说明其肽键减少，游离氨基酸含量增加，OEW 含量下降（图 3-8）。所以体外消化对 OEW 的稳定性有一定影响。

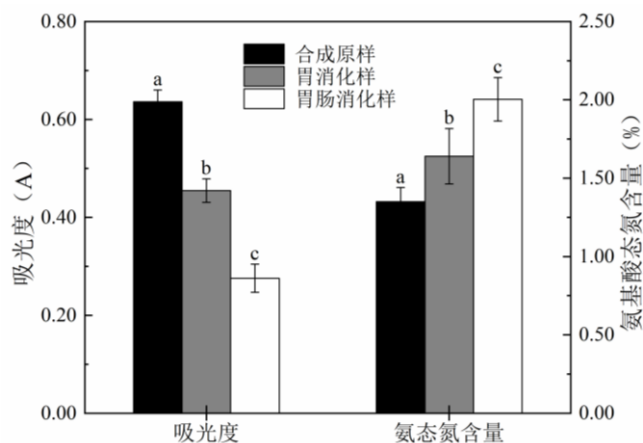


图 3-8 体外消化对 OEW 含量的影响

Figure 3-8 Effect of in vitro digestion on OEW content

3.4.10 体外消化过程中 OEW 含量和构成的变化

由表 3-3 和图 3-9 可知， γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 的实际质荷比 (m/z) 分别是 334.15、463.20、592.20 和 721.25。经过胃消化之后， γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 比例较合成原样降低， γ -[Glu]₂-Trp 的含量较合成原样升高。这说明经过胃消化之后， γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 会分解成分子质量更小的寡肽， γ -Glu-Trp 会分解成分子质量更小的氨基酸。和胃消化相比，胃肠消化之后的产物 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 的含量下

降, γ -Glu-Trp 的含量上升。这说明胃肠消化相比胃消化其多肽分解效果更好。经过胃肠消化之后, γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 的比例较合成样下降, γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 的比例较合成原样上升。这说明胃肠消化之后, γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 会分解其分子质量更小的 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp, 导致 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 的含量升高, 而人体内生理作用主要是 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 在调节, 这与 Zhu^[17]的研究结果一致。

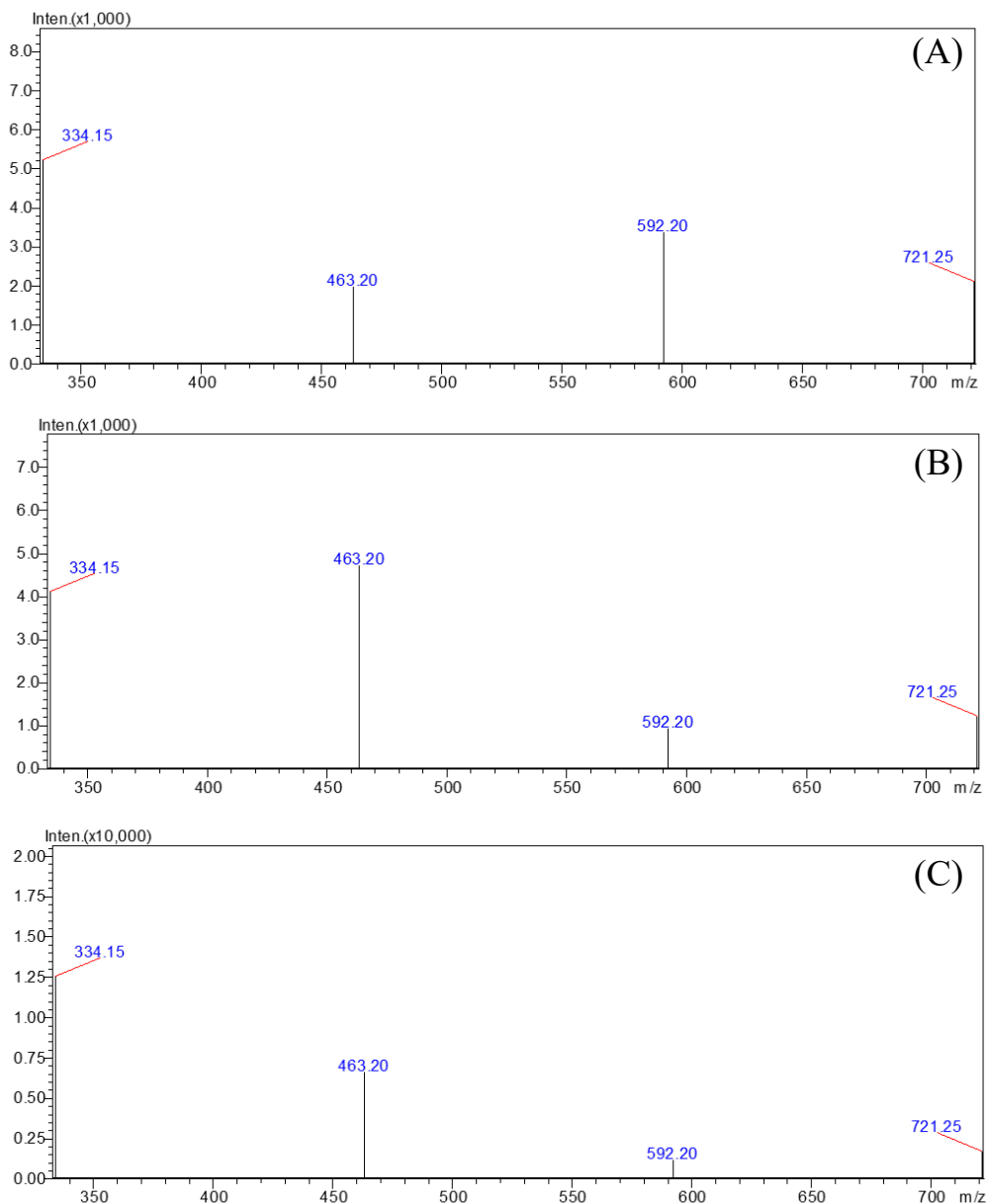


图 3-9 体外消化的 LC-MS 图: (A) 合成原样, (B) 胃消化样, (C) 胃肠消化样

Figure 3-9 LC-MS diagram of in vitro digestion; (A) synthetic original, (B) gastric digestive, (C) gastrointestinal digestive

表 3-3 体外消化的 LC-MS 结果

Table 3-3 LC-MS results of in vitro digestion

标准品	理论 m/z	实际 m/z	样品	峰强度	所占比例/%
γ -Glu-Trp	334.14	334.15	合成原样	5231	40.99
			胃消化样	4118	37.33
			胃肠消化样	12579	56.67
γ -[Glu] ₂ -Trp	463.18	463.20	合成原样	2005	15.71
			胃消化样	4730	42.88
			胃肠消化样	6650	29.96
γ -[Glu] ₃ -Trp	592.22	592.20	合成原样	3397	26.62
			胃消化样	956	8.66
			胃肠消化样	1224	5.51
γ -[Glu] ₄ -Trp	721.27	721.25	合成原样	2128	16.68
			胃消化样	1228	11.13
			胃肠消化样	1744	7.86

3.5 本章小结

(1) 本章利用单因素实验优化 OEWS 的合成工艺, 得出其最佳合成条件为: 氨基酸比例为 Gln: Trp = 2: 1, 酶添加量为 0.1% (w/v), 反应时间为 3 h, 底物浓度为 0.2 mol/L, 反应温度为 37°C, pH 值为 10.00。

(2) 利用 HPLC 和 LC-MS 对 OEWS 合成物进行定性定量分析, 得出其 OEWS 合成率为 60%左右, 且 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 的合成率较高。

(3) 利用两步法体外模拟消化实验研究 OEWS 在胃肠液中的稳定性。结果表明, 胃肠消化相比胃消化其多肽分解效果更好。经过胃肠消化之后, γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 会分解其分子质量更小的 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp。

第4章 低聚 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 对肠道屏障功能的影响及机制研究

4.1 引言

肠道屏障在维持肠道黏膜的完整性、防止有害物质进入体内等方面起着至关重要的作用。压力不仅容易导致肠道功能紊乱和损伤，也是肠道疾病（包括肠易激综合征和溃疡性结肠炎）的重要诱因。此外，长期慢性压力还会导致焦虑或抑郁等心理疾病。随着竞争压力的增加，与压力相关的慢性肠道疾病的发病率也在逐年上升。然而，目前的许多研究都集中于探讨与压力相关的心理疾病的发病机制，而与压力相关的肠道屏障功能紊乱却相对被忽视。

研究表明，Trp 及其代谢物可降低肠道通透性，增加 TJ 蛋白表达，并通过 AhR、旁分泌等多种途径缓解肠道炎症，增强肠道屏障功能，最终改善机体肠道健康^[95-98]。鉴于低聚肽具有比氨基酸更强的生理活性，近年来利用 Trp 肽预防或减缓肠道疾病发生的研究持续增加。OEW 是一系列含有色氨酸残基的 γ -谷氨酰肽，由 Gln 的 γ -羧基和 Trp 的氨基脱水缩合而成。Zhu 等人^[17]研究表明，OEW 可以缓解慢性应激引起的焦虑抑郁，降低血清炎症因子水平。但关于 OEW 对慢性应激情况下维持肠道屏障功能的研究还未见有关报道。

本章选择口服酶法合成的 OEW 作为干预手段，利用 CUMS 联合灌胃 DSS 的方法去建立肠道屏障功能紊乱的小鼠模型，通过分析焦虑样行为、肠道屏障通透性、肠道炎症和肠道紧密连接等相关指标的变化，研究 OEW 对肠道屏障功能的影响及作用机制。

4.2 材料与仪器

4.2.1 材料与试剂

本实验所使用的 6-8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠（ 20 ± 2 g，6-8 周龄；SCXK（YU）2020-0005），以及小鼠所用繁殖饲料及垫料，均购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司。OEW 为第 3 章获得的最优酶促合成条件所制备的冻干样品。小鼠饲养在安徽工程大学实验动物中心，适应性喂养一周。

DSS(36000-50000 Da),购自 MP Biomedicals 公司; FITC-葡聚糖(4000 Da), 购自 Med Chem Express 公司; 粪便隐血试剂盒 (邻甲苯胺法), 购自上海源叶生物科技有限公司; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒, 购自武汉傲星生物科技有限公司; 4%多聚甲醛 (生物试剂), 购自 biosharp; 蔗糖, 水合氯醛等试剂为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

4.2.2 仪器与设备

医用离心机 (型号: JW-2017HR), 安徽嘉文仪器装备有限公司; 小鼠高架十字迷宫视频实验系统, 上海玉研科学仪器有限公司; 酶标仪 (型号: HBS-SCANX), 南京德铁生物科技有限公司。

4.3 实验方法

4.3.1 构建肠道屏障功能紊乱小鼠模型

表 4-1 小鼠 CUMS 造模流程

Table 4-1 Mouse CUMS modelling process

时间 (天)	CUMS	5% DSS
1	夹尾 3 min	10 mL/kg·BW
2	禁水 24 h	10 mL/kg·BW
3	4℃冰水游泳 3 min	10 mL/kg·BW
4	潮湿垫料 24 h	10 mL/kg·BW
5	束缚 6 h, 夹尾 3 min	10 mL/kg·BW
6	45°鼠笼倾斜 2 h	10 mL/kg·BW
7	禁食 24 h	10 mL/kg·BW
8	潮湿垫料 24 h	10 mL/kg·BW
9	夹尾 3 min	10 mL/kg·BW
10	禁食 24 h, 禁水 24 h	10 mL/kg·BW
11	45°鼠笼倾斜 2 h	10 mL/kg·BW
12	4℃冰水游泳 3 min	10 mL/kg·BW
13	禁水 24 h	10 mL/kg·BW
14	束缚 6 h	10 mL/kg·BW

田瑞琦等人^[110]利用 C57BL/6 小鼠构建了肠道屏障功能紊乱模型, 因此, 本

研究选择雄性 C57BL/6 小鼠作为研究肠道屏障功能紊乱的动物模型。与急性应激相比,慢性应激使胃肠道更加敏感,更容易诱发疾病。所以,本研究选择 CUMS 结合 5% DSS 来构建肠屏障功能紊乱小鼠模型。

80 只雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠在温度 (25 ± 2) °C、相对湿度 (50 ± 5) %、光/暗周期为 12 h/12 h 的环境下饲养。本实验方案经安徽工程大学动物实验委员会批准,并遵循中国试验动物护理和使用指南。

将小鼠随机分为 6 个实验组 ($n=10$ /组)。其中 5 组小鼠采用 CUMS 联合灌胃 DSS 的方式建立肠道屏障功能紊乱小鼠模型。每天随机给予小鼠一种或两种慢性应激(夹尾、潮湿垫料、4°C 冰水游泳、禁食、禁水、45°鼠笼倾斜、束缚),同时小鼠每天灌胃 5 % DSS (w/v, 0.2 mL), 进行连续 14 天的造模实验。造模流程见表 4-1。造模期间小鼠继续服用药物。

4.3.2 动物分组与管理

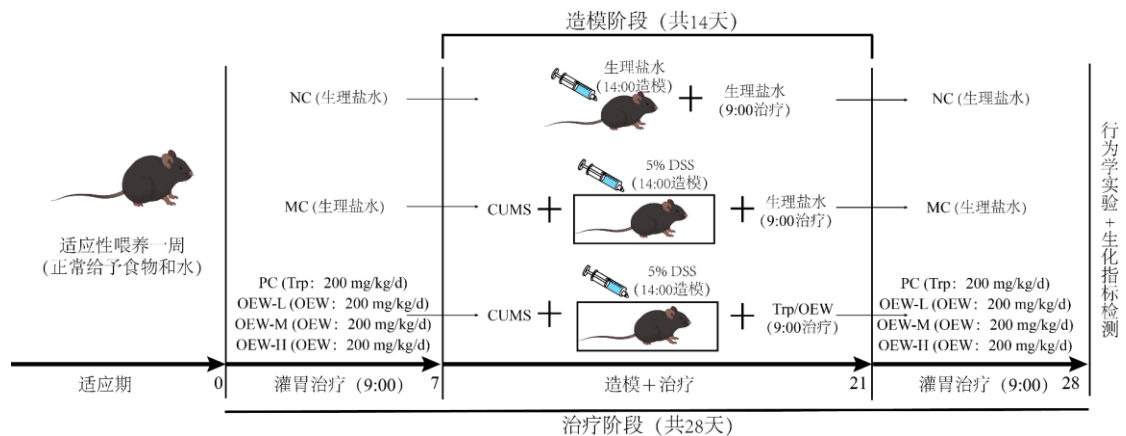


图 4-1 动物模型诱导和治疗过程范例图

Figure 4-1 Example diagram of animal model induction and treatment process

注: 小鼠每次灌胃剂量为 10 mL/kg·BW

小鼠分组(灌胃剂量为 10 mL/kg·BW): NC 为生理盐水治疗的正常对照组; MC 为生理盐水治疗的模型对照组; PC 为 Trp 治疗的阳性对照组, 200 mg/kg/d; L 为 OEWS 治疗的低剂量组, 50 mg/kg/d; M 为 OEWS 治疗的中剂量组, 100 mg/kg/d; H 为 OEWS 治疗的高剂量组, 200 mg/kg/d。

经过 7 天的不同药物灌胃治疗后,除 NC 组外,其他各组小鼠均开始构建肠屏障功能紊乱模型。造模期间小鼠继续服用药物。造模结束后,小鼠再接受为期七天的药物治疗,整个动物治疗过程为 28 天。动物模型诱导过程和治疗程序如

图 4-1 所示。

4.3.3 小鼠体重采集

小鼠每周测定一次体重并记录，造模与灌胃治疗期间共 28 天，收集三次体重变化数据并分析，分别是治疗 7 天体重变化量、造模后（治疗 21 天后）体重变化量和治疗 28 天体重变化量。治疗 7 天体重变化量=治疗 7 天后体重-适应性喂养一周后体重；造模后体重变化量=治疗 21 天后小鼠体重-治疗 7 天后小鼠体重；治疗 28 天体重变化量=治疗 28 天后体重-治疗 21 天后体重。分析不同处理时期对小鼠体重变化的影响。

4.3.4 行为学实验

4.3.4.1 高架十字迷宫

高架十字迷宫通常用于测量动物焦虑样行为。参照 Zhu 等人^[111]的方法，并稍作修改。高架十字迷宫装置距离地面 60 cm 高，由两个开放臂（35 cm 长×5 cm 宽）、两个封闭臂（35 cm 长×5 cm 宽×15 cm 高）和一个中心平台（5 cm 长×5 cm 宽）构成一个十字型形状组成。在安静的环境中，将一只小鼠面向一条开放臂，并放置在中心平台上，用数码摄像系统记录小鼠 5 min 内的活动情况。随后，使用 Dig Behv 动物行为分析系统对小鼠的行动轨迹进行数据分析。在每次实验开始之前用 75%酒精擦洗设备，以消除上一次实验残留的尿液和粪便对小鼠行动情况的影响。

4.3.4.2 糖水偏好实验

糖水偏好实验是利用啮齿类动物对甜味的偏好而设计一种检测方法，是检测快感缺失症状的经典实验，其方法参照 Wang 等人^[112]，并有所修改。将每只小鼠单独饲养在鼠笼中，给予小鼠两瓶 1%蔗糖水溶液（w/v）24 h，之后将其中一瓶糖水换成纯水后继续放置 24 h。小鼠正式实验前禁水禁食 24 h。实验开始时，给予小鼠一瓶糖水和一瓶纯水，记录 24 h 后糖水和纯水的消耗量。糖水偏好率（%）=（糖水消耗量/纯水和糖水的总消耗量）×100%。实验期间随机调换水瓶位置，以避免位置干扰。

4.3.5 疾病活动指数评价

在实验期间，使用疾病活动指数（DAI）评分对小鼠肠道状况进行评估，包含监测体重、粪便性状和粪便隐血的变化^[113,114]。按照表 4-2 计算 DAI 分数。DAI

分数=体重下降分值+粪便性状分值+粪便隐血情况分值。

表 4-2 DAI 评分表

Table 4-2 DAI score table

DAI 分数	体重下降率 (%)	粪便性状	粪便隐血情况
0	0	正常	无便血
1	1-5	软便（不粘附在肛门上	轻微便血
2	4-10	的半成型粪便）	
3	10-15	稀便（从肛门排出的粘	大量或肉眼可见便血
4	>15	连稀水样大便）	

4.3.6 肠道通透性测定

参考 Zhang 等人^[115]的方法,稍作修改,检测肠道通透性。小鼠禁食 12 h 后,给小鼠灌服 1mL FITC-dextran (0.6 mg/mL, w/v), 灌服 6 h 后,收集尾静脉血于离心管中,并于室温静置 30min 以上,离心 (3000 rpm, 15 min, 4℃),收集血清样本。使用酶标仪在激发波长 485 nm,发射波长 525 nm 下,测定 OD 值。通过与标准曲线对比计算血清中 FITC-dextran 的浓度。

4.3.7 样品采集与保存

肠道通透性实验结束 24 h 后,使用 10%水合氯醛麻醉小鼠,眼球摘除取血后,立即颈椎脱位处死。随后,取出心脏、肝脏、脾脏和肾脏,用生理盐水清理表面杂物后,置于-80℃进行冻存。血液室温静置 2 h, 4℃离心 (3000 r/min, 15 min) 后,收集血清样本,分装并置于-80℃保存。小鼠剖取肛门至盲肠末端的结肠组织,冲洗干净后分为两部分,一部分用 4%多聚甲醛进行固定,另一部分用锡箔纸包好并做好标记,与其他器官一起置于-80℃进行冻存。

4.3.8 结肠长度及器官指数测定

处死小鼠后,剖取结肠组织,平铺在白板上,观察结肠形态并测量结肠长度,拍照记录。

把小鼠的心脏、肝脏、脾脏和肾脏分别称重并记录,用来计算器官指数。器官指数 (g/kg) = 器官质量 (g) / 小鼠质量 (kg)。

4.3.9 结肠组织病理学观察

参照朱西平^[6]的方法,采用苏木精和伊红(H&E)染色评估结肠组织病理学。

新鲜结肠样本在 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h，然后进行脱水、渗透、蜡包埋，并切成厚度为 5 μm 的切片。切片用 H&E 染色，并用 Pannoramic SCAN 数字扫描仪进行扫描拍照。结肠组织学指数（HI）根据表 4-3 进行评分。

表 4-3 HI 评分表

Table 4-3 HI score table

	HI 分数	症状
肠上皮组织损伤和破坏程度	0	正常结肠粘膜
	1	少量杯状细胞消失
	2	大量杯状细胞消失
	3	丢失少量隐窝
	4	大量隐窝和表面上皮丢失
炎症因子浸润程度	0	正常结肠粘膜
	1	隐窝周围浸润
	2	粘膜肌层浸润
	3	粘膜肌层大量浸润并增厚
	4	粘膜下层浸润

4.3.10 ELISA 实验

根据 ELISA（双抗体夹心法）和比色法测定血清炎症因子的水平。用酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值，计算样品中 IL-6、IL-1 β 和 IL-8 的水平。

4.3.11 RT-qPCR 实验

利用 TRIzol 试剂从冻结结肠组织中提取总 RNA。利用 PrimeScript™实时定量聚合酶链反应（RT-qPCR）逆转录试剂盒制备 cDNA。随后，以 cDNA 为模板，GAPDH 为内参，使用 Bio-Rad Mini Option™ RT-PCR 检测系统扩增 PCR 产物。扩增条件如下：95℃ 变性 35 s，60℃ 退火 30 s，72℃ 延长 60 s；40 个循环。参考 Zhu 等人^[111]和李小兰^[116]的方法，使用 Bio-Rad CFX 管理软件计算 Ct 值。qPCR 结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算，定义 MC 组 $\Delta\Delta C_t = 0$ ，其余各组别基因表达差异用相对于 MC 组的倍数表示。引物序列见表 4-4。

表 4-4 RT-qPCR 引物序列

Table 4-4 Primer sequences for RT-qPCR

引物	Forward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'
IL-1 β	TCTGCATGAGCTTTGTGCAAG	ACAGGGCAGACTCGAATTCAAC
IL-6	CCTGAACCTTCCAAAGATGGC	TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA
IL-8	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCCTCTGCACCCAGTTTTTC
SERT	GGCGTTGCCGCTCTGAAGC	GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC
GAPDH	TGGCCTTCCGTGTTTCCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

4.3.12 Western blot 实验

采用 RIPA 裂解缓冲液均质结肠组织，并在冰上完全破坏 30 min。所得溶液经离心（12000 rpm，15 min，4℃）后收集上清，即为总蛋白溶液。采用 BCA 法测定蛋白浓度。在 SDS-PAGE 上电泳分离蛋白质。然后，将其转移到 PVDF 膜上，并用 5%脱脂奶粉溶液封闭 1 h。随后，将条带与稀释一抗（ZO-1 的稀释比例为 1: 200；Occludin 的稀释比例为 1: 100；Claudin-1 的稀释比例为 1: 100）在 4℃ 孵育过夜。清洗后，用稀释二抗（稀释比例为 1: 5000）在室温下孵育 1 h。加入 ECL 试剂对条带进行显色。使用 Image J 软件对条带强度进行量化。

4.3.13 数据分析

实验重复次数 ≥ 6 ，数据报告为平均值 $\pm$ 标准差。使用 Origin 2018 进行绘图。采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析和事后 Duncan 检验，以确定不同组别平均值之间的显著差异。显著性差异的标准为 $P < 0.05$ ，并用不同小写字母表示。

4.4 结果与分析

4.4.1 肠道屏障功能紊乱小鼠模型的构建

为了研究 OEW 对肠道屏障功能紊乱的影响，使用 CUMS 和 DSS 建立了小鼠肠道屏障功能紊乱模型。CUMS 使动物长期暴露于不同的应激源，有效地模拟了不可预知和多变的生理和心理应激。它是一种经典的抑郁/焦虑动物模型，同时也会引发肠道屏障受损，增加肠道通透性。DSS 可诱导细胞免疫反应，导致炎症细胞因子水平增加和肠道屏障功能障碍，通常用于诱导结肠炎。目前有证据表明，CUMS 单独使用或与其他技术结合使用均可成功导致动物肠道屏障功能紊乱。CUMS 造模操作过程见图 4-2。

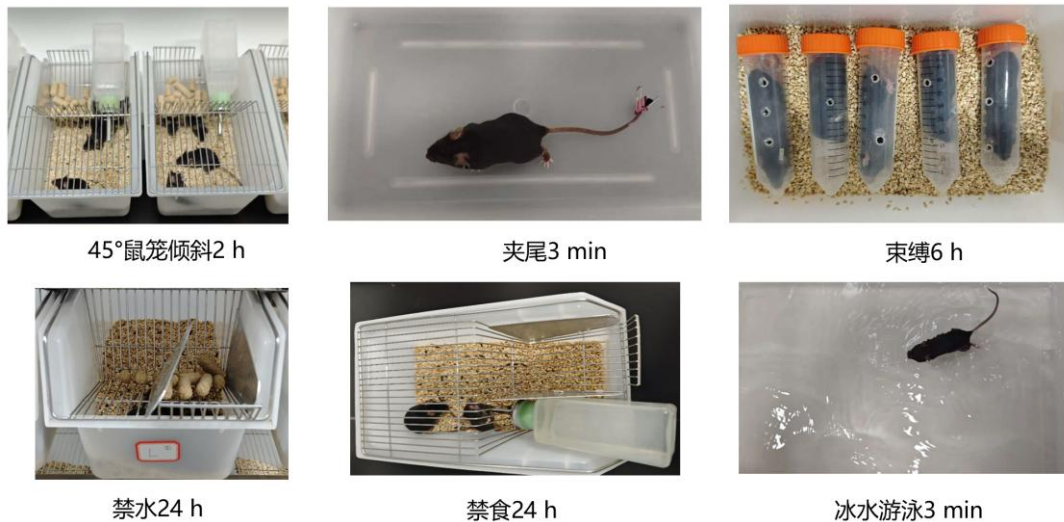


图 4-2 小鼠造模操作图

Figure 4-2 Mice modelling operation diagram

由图 4-3 至图 4-8 和表 4-5、6 可知，在 CUMS 和 DSS 诱导 14 天后，小鼠表现出一系列肠道疾病症状。与 NC 组相比，MC 组小鼠表现出一系列病理变化，包括体重减轻、DAI 和 HI 评分升高、结肠长度缩短、焦虑程度加深、结肠粘膜结构明显受损、炎症细胞大量浸润、促炎因子分泌及表达增加、肠道通透性上升，以及肠上皮 TJ 蛋白表达下降，肠屏障完整性受损等等。这些研究结果表明，本研究成功利用 CUMS 联合 DSS 成功构建了肠道屏障功能紊乱小鼠模型，为进一步研究奠定了重要基础。

4.4.2 OEW 对小鼠体重变化的影响

在整个治疗过程中监测所有小鼠的体重变化，结果如图 4-3 所示。经过 7 天的药物治疗后，小鼠体重有所增加，但各组（NC、MC、PC、L、M 和 H）之间没有观察到显著差异。经过 14 天的 CUMS 和 DSS 造模（OEW 治疗的第 21 天）后，除 NC 组外，其他各组（MC、PC、L、M 和 H）小鼠的体重均有所下降，其中 MC 组小鼠的体重下降幅度最大。经过 28 天的 OEW 治疗后，OEW（L、M 和 H）明显改善慢性应激引起的小鼠体重下降，且改善效果随着 OEW 剂量的增加而更为明显。这些研究结果表明，OEW 可以缓解慢性应激引起体重下降的症状。

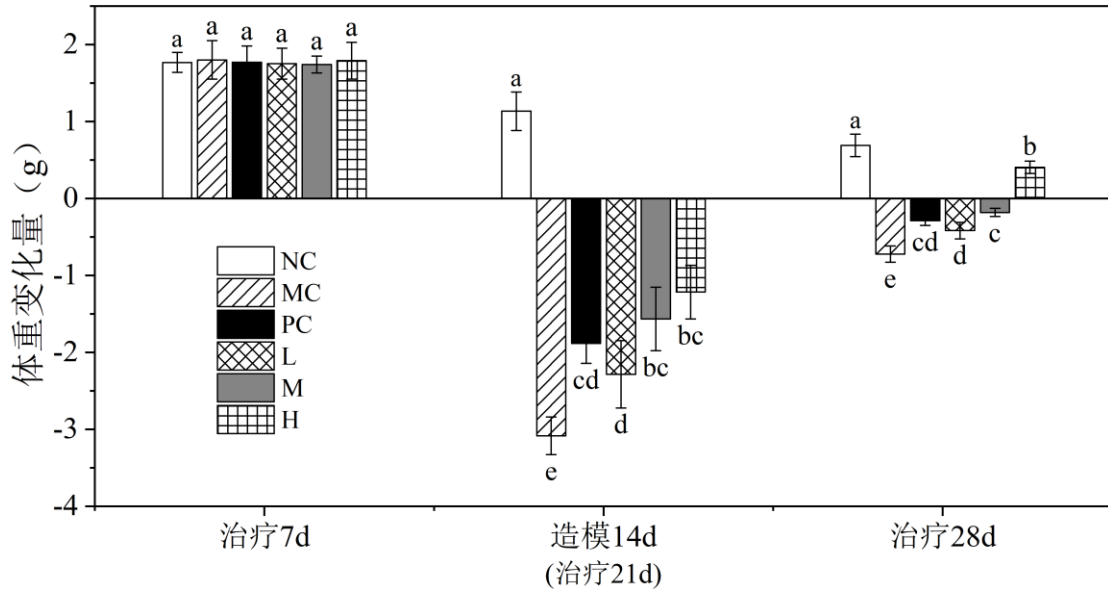


图 4-3 OEW 对小鼠体重变化的影响

Figure 4-3 Effect of OEW on body weight changes in mice

注：不同小写字母表示不同组别间差异显著 ($P < 0.05$)。图下同。

4.4.3 OEW 对小鼠精神状态的影响

抑郁和焦虑等精神疾病对肠道健康有着重要影响。为了评估 OEW 对肠道屏障功能紊乱小鼠情绪的影响,采用了高架十字迷宫和糖水偏好实验来评估小鼠焦虑程度。高架十字迷宫是一种评估啮齿动物焦虑程度的方法,它考虑了啮齿动物探索新环境的内在驱动力以及它们对开放或高架空间的天然厌恶^[117]。糖水偏好实验是一种用于评估啮齿动物情绪状态和愉悦程度的测试,它反映了动物的对愉快的感知^[112]。OEW 处理组 (L、M 和 H) 小鼠开臂进入次数和开臂停留时间百分比均显著高于 MC 组,且呈现一定的剂量-效应关系,OEW 干预增加了小鼠探索开放区域的倾向性 (图 4-4 A, B)。口服不同剂量的 OEW (L、M 和 H) 可明显提高小鼠的糖水偏好率,并增强其感知愉悦刺激的能力 (图 4-4 C)。

此外,测定了小鼠结肠中血清素转运蛋白 (SERT) mRNA 的表达,发现肠道屏障功能紊乱程度与 SERT mRNA 的表达量呈负相关。SERT 是一种神经递质转运体,负责从肠道重新摄取 5-HT。SERT 表达减少会导致肠道 5-HT 浓度增加,进而可能导致肠道刺激增加和肠道屏障功能障碍^[118]。OEW 治疗逆转了在 MC 组小鼠结肠中观察到的 SERT mRNA 表达减少的情况 (图 4-4 D),且 OEW 浓度和 SERT 基因表达呈现正相关的剂量-效应关系。综合高架十字迷宫实验、糖水偏好

实验和 SERT mRNA 表达这三种实验结果可知, OEW-H 组和 OEW-M 组对小鼠情绪的作用效果可与 PC 组 (Trp) 相当, 这些结果表明, OEW 治疗可缓解肠道屏障功能紊乱小鼠的焦虑情绪, 且治疗效果具有剂量依赖性。

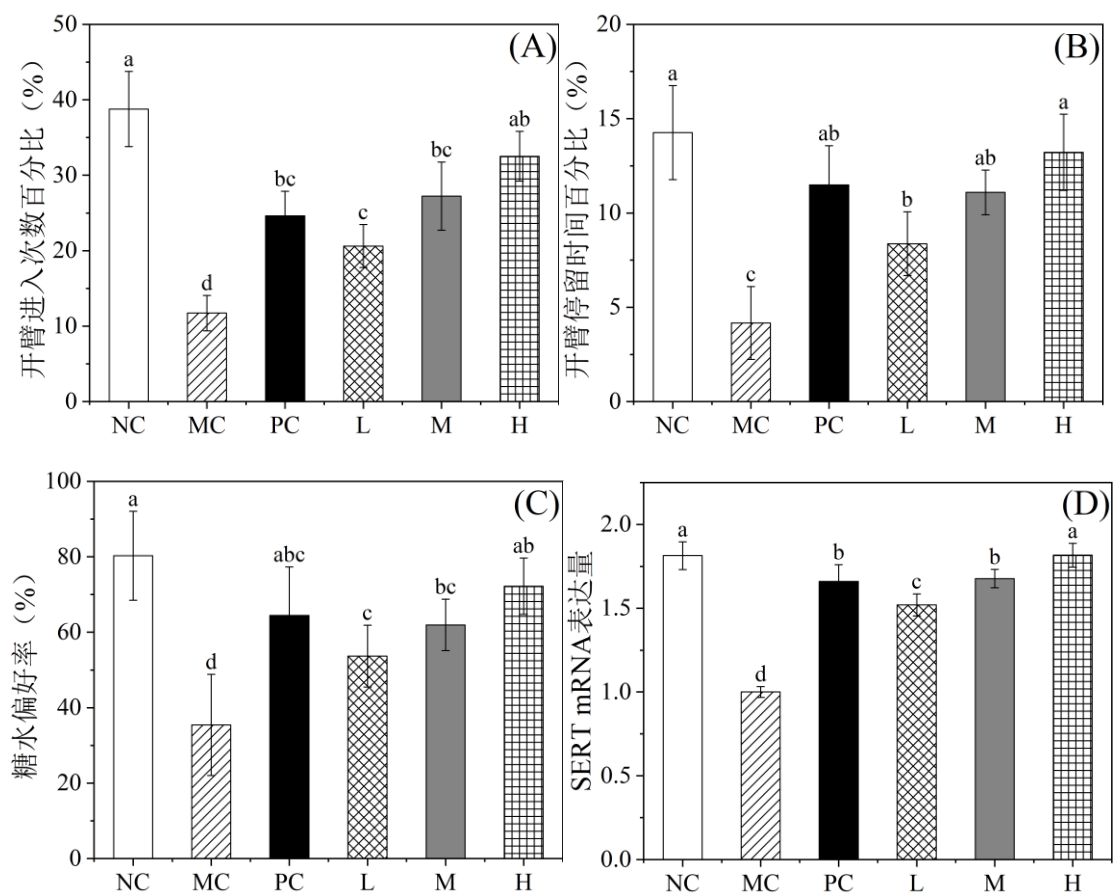


图 4-4 OEW 对小鼠精神状态的影响; (A) 开臂进入次数百分比, (B) 开臂停留时间百分比, (C) 糖水偏好率, (D) SERT mRNA 表达量

Figure 4-4 Effects of OEW on mental status in mice; (A) Percentage of open-arm entry times, (B) Percentage of open-arm dwell time, (C) Sugar-water preference rate, (D) SERT mRNA expression

4.4.4 OEW 对 DAI 评分及 H&E 染色的影响

DAI 分数是通过记录各实验组小鼠的体重减轻和粪便状况计算得出的。由图 4-5 (A) 可知, OEW 组 (L、M 和 H) 小鼠的 DAI 评分明显低于 MC 组。进一步分析结肠组织的 H&E 染色结果可知, OEW 干预后, 小鼠结肠组织隐窝结构的损伤得到缓解, 炎症细胞浸润程度明显降低 (图 4-5 C), HI 评分显著下降 (图 4-5 B)。此外, OEW-H 组的治疗效果优于 PC 组。这些研究结果表明, OEW 能够减轻慢性应激引起小鼠结肠组织的损伤。

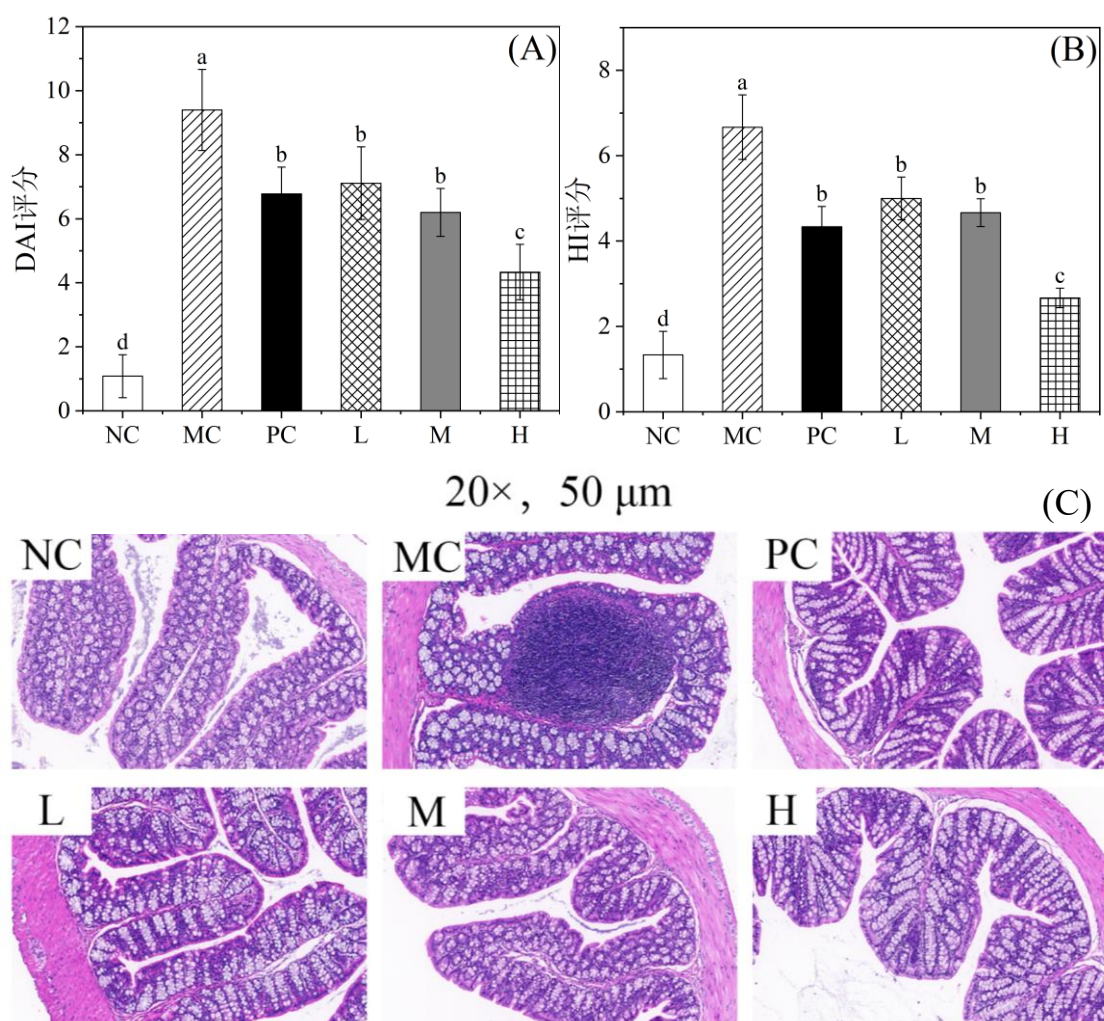


图 4-5 OEW 对 DAI 评分及 H&E 染色的影响; (A) DAI 评分, (B) HI 评分, (C) H&E 染色图

Figure 4-5 Effect of OEW on DAI scores and H&E staining; (A) DAI score, (B) HI score, (C) H&E staining plot

4.4.5 OEW 对结肠长度及器官指数的影响

结肠缩短是结肠炎的症状之一, 测量结肠长度可作为结肠炎症的宏观评估。如表 4-5 所示, 各组小鼠的结肠长度显示, 不同浓度的 OEW 可明显缓解肠道屏障功能紊乱小鼠的结肠缩短。OEW 干预组 (L、M 和 H) 之间小鼠的结肠长度虽然存在随着 OEW 剂量增长而延长的趋势, 但相互之间的差异没有统计学意义。心脏指数和肾脏指数在各组之间没有明显差异。OEW 治疗组小鼠的肝脏指数较 MC 组明显增高。此外, 脾脏指数也是一项反映肠道炎症严重程度的指标。OEW 治疗后, OEW-M 和 H 组小鼠脾脏指数较 MC 组显著降低。这些结果表明 OEW 干预可以减轻慢性应激引起的肠道不适症状。

表 4-5 OEW 对结肠长度及器官指数的影响

Table 4-5 Effect of OEW on colon length and organ index

组别	结肠长度 (cm)	心脏指数 (g/kg)	肝脏指数 (g/kg)	脾脏指数 (g/kg)	肾脏指数 (g/kg)
NC	8.00 ± 0.58 ^a	7.05 ± 1.11 ^a	41.03 ± 2.11 ^a	1.88 ± 0.06 ^a	12.43 ± 0.45 ^a
MC	5.28 ± 0.58 ^c	6.99 ± 1.27 ^a	35.82 ± 2.56 ^c	2.36 ± 0.07 ^d	12.37 ± 0.53 ^a
PC	6.30 ± 0.14 ^b	6.97 ± 0.88 ^a	39.29 ± 2.92 ^{ab}	2.25 ± 0.09 ^{cd}	12.71 ± 0.53 ^a
L	6.32 ± 0.36 ^b	7.17 ± 1.33 ^a	37.57 ± 1.43 ^b	2.26 ± 0.04 ^{cd}	12.64 ± 0.66 ^a
M	6.56 ± 0.57 ^b	6.89 ± 1.02 ^a	39.71 ± 1.74 ^{ab}	2.20 ± 0.07 ^c	12.55 ± 0.88 ^a
H	7.02 ± 0.46 ^b	7.09 ± 0.67 ^a	40.56 ± 2.24 ^a	2.04 ± 0.05 ^b	12.63 ± 0.37 ^a

注：同一列的不同字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。



图 4-6 小鼠结肠图

Figure 4-6 Pictures of mouse colon

4.4.6 OEW 对小鼠炎症因子的影响

肠道炎症反应是与肠道屏障功能障碍相关的一个重要病理过程。Zhu 等人^[119]的研究表明 IL-1 β 表达增加会导致肠道通透性升高，这是导致肠道炎症的一个重要因素。IL-6 在结肠炎患者的结肠粘膜中高表达，其表达水平随病情的加重而升高^[120]。IL-8 通过介导多种信号通路，在多种炎症性疾病中起到重要作用^[121]。因此包括 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 在内的促炎细胞因子已被确定为肠道疾病中观察到的炎症反应的关键介质^[122]。为了研究 OEW 治疗对炎症因子的影响，采用 ELISA 对血清中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的水平进行了定量分析（表 4-6）。结果表明，CUMS

联合 DSS（MC 组）可诱导小鼠血清促炎细胞因子分泌并加剧炎症反应。在所有 OEW 干预组别（L、M 和 H）中，血清 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的水平均显著下降，但三组之间没有显著性差异，说明 OEW 能抑制促炎细胞因子的分泌。

表 4-6 OEW 对小鼠血清中炎症因子水平的影响

Table 4-6 Effect of OEW on serum levels of inflammatory factors in mice

组别	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)
NC	160.65 $\pm$ 9.58 ^c	108.80 $\pm$ 10.67 ^c	370.27 $\pm$ 30.90 ^c
MC	267.32 $\pm$ 23.78 ^a	180.65 $\pm$ 7.53 ^a	490.93 $\pm$ 46.51 ^a
PC	197.27 $\pm$ 22.55 ^{bc}	142.37 $\pm$ 27.22 ^b	429.88 $\pm$ 41.83 ^b
L	207.04 $\pm$ 28.73 ^b	139.24 $\pm$ 4.81 ^b	438.75 $\pm$ 28.20 ^b
M	211.79 $\pm$ 14.16 ^b	145.02 $\pm$ 5.14 ^b	436.01 $\pm$ 28.09 ^b
H	180.55 $\pm$ 23.45 ^{bc}	138.71 $\pm$ 22.79 ^b	434.16 $\pm$ 34.57 ^b

注：同一列的不同字母表示具有显著差异（ $P < 0.05$ ）。

为了进一步研究 OEW 对炎症反应的抑制作用，选择 RT-qPCR 技术检测各组小鼠结肠组织中炎症因子的 mRNA 表达水平（图 4-7）。结果表明，OEW 干预后，小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的 mRNA 表达水平明显降低，且 OEW 剂量和 IL-1 β 基因表达水平呈现负相关的剂量依赖性，这表明 OEW 可以抑制结肠组织促炎细胞因子 mRNA 的表达。以上结果表明，OEW 可调节促炎细胞因子的水平和异常表达，防止过度炎症，进而缓解肠屏障功能紊乱。

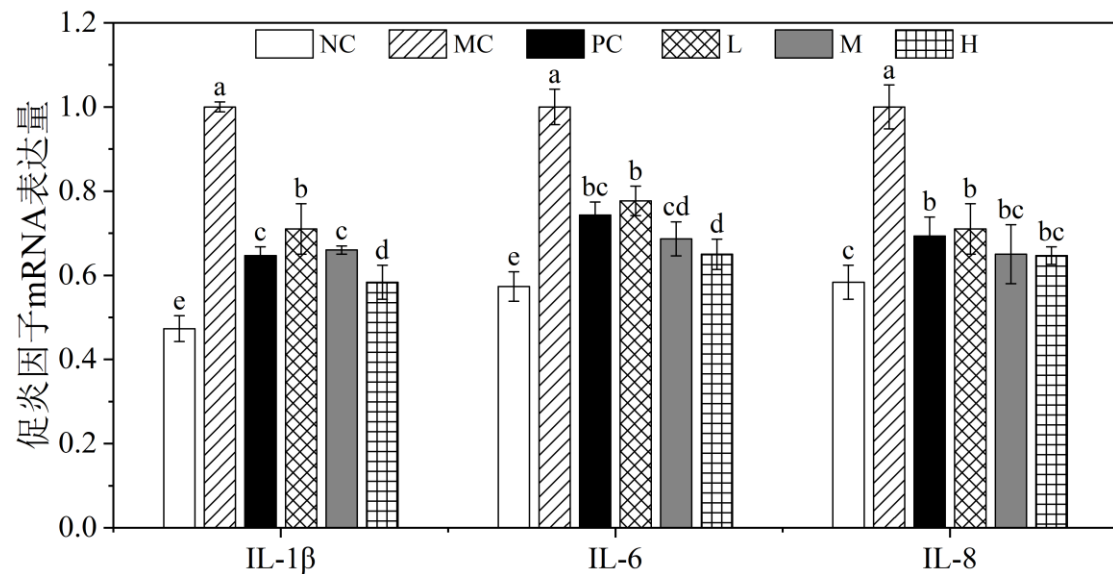


图 4-7 OEW 对小鼠结肠中炎症因子基因表达的影响

Figure 4-7 Effect of OEW on the expression of inflammatory factor genes in the mouse colon

4.4.7 OEW 对肠道屏障完整性的影响

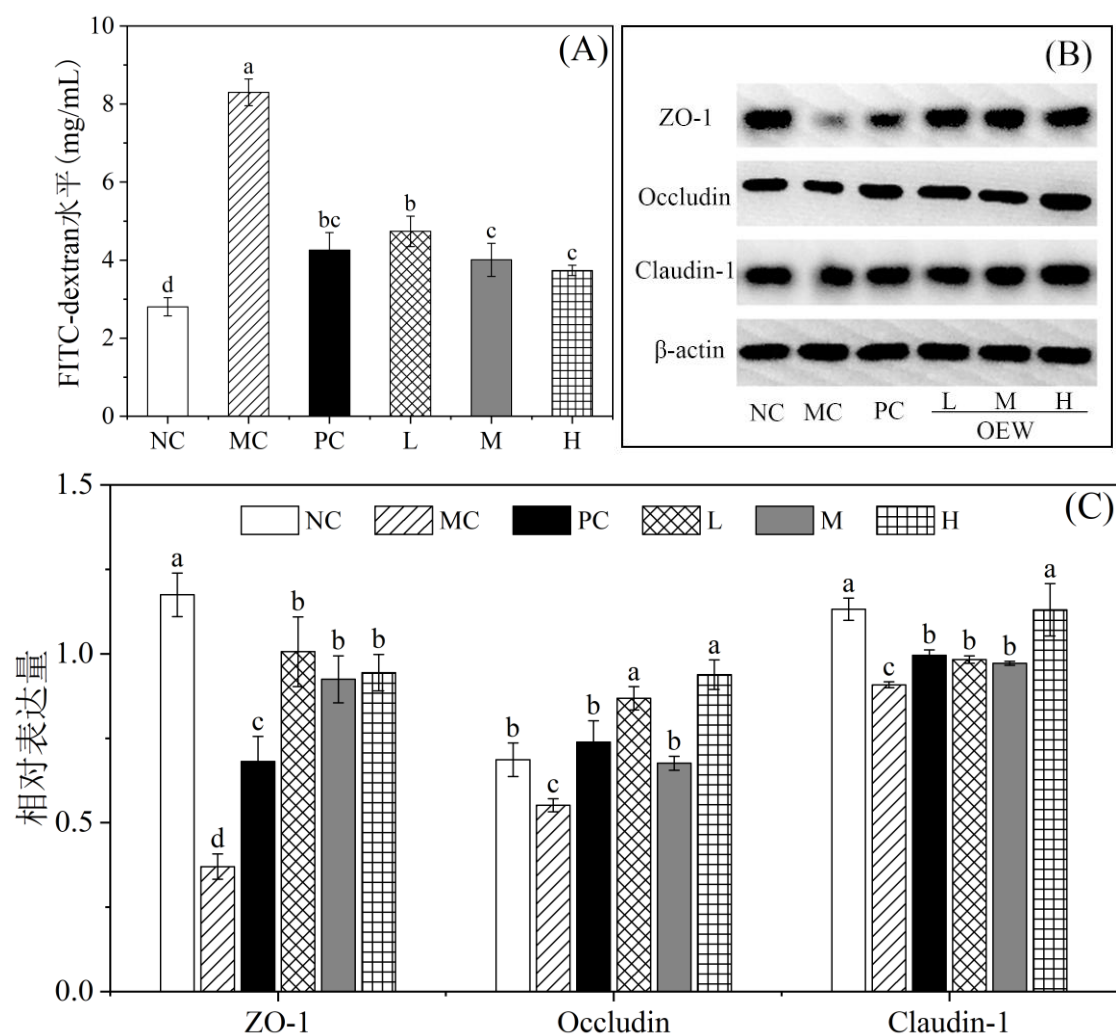


图 4-8 OEW 对肠道屏障完整性的影响；(A) FITC-dextran 水平，(B) Western blot 凝胶图，(C) 结肠中 TJ 蛋白相对表达量

Figure 4-8 Effect of OEW on the integrity of the intestinal barrier; (A) FITC-dextran levels, (B) Western blot gel plot, (C) relative expression of TJ protein in the colon

肠道通透性的变化能准确反映肠道损伤的程度，其增加是肠道屏障功能受损的标志，也是监测肠道屏障功能的重要指标^[123]。肠道通透性增加会导致有害的外来物质流入，从而破坏肠道屏障的完整性。血清 FITC-dextran 水平与肠道通透性呈正相关。OEW 干预组小鼠的 FITC-dextran 水平明显低于 MC 组，这表明 OEW 干预能有效逆转 CUMS 和 DSS 引起的肠道通透性增加（图 4-8A）。

TJ 蛋白在维持肠道结构平衡、保持肠道上皮细胞屏障完整性和调节粘膜通透性方面发挥着关键作用^[124]。肠粘膜上皮屏障由肠粘膜上皮细胞及其周围的 TJ

蛋白组成。TJ 蛋白主要包括 Claudin 家族、Occludin、ZO-1 等，Claudin 家族中的一部分蛋白反映了肠道的紧密性，如 Claudin-1、Claudin-3、Claudin-5 等，具有与 Occludin 和 ZO-1 相同的功能，保护肠粘膜屏障的致密性。肠道通透性增加和肠上皮 TJ 蛋白表达减少均会破坏肠屏障的完整性，最终导致肠屏障功能紊乱。通过 Western blot 法测定了各组小鼠结肠中 TJ 蛋白的水平。结果表明，用 OEW 治疗的小鼠 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达明显增加（图 4-8 B, C）。因此，可以得出结论，OEW 可以通过维持肠道屏障的完整性来调节肠道屏障功能紊乱。

4.5 本章小结

（1）OEW 增加小鼠对开发区域的探索欲，以及对愉悦程度的感知能力，降低结肠中 SERT 的基因表达，缓解肠道屏障功能紊乱小鼠的焦虑情绪。

（2）OEW 具有缓解小鼠体重下降、DAI 和 HI 评分升高、结肠缩短的能力，并逆转 CUMS 和 DSS 引起的肠上皮结构损伤。此外，OEW 降低血清促炎细胞因子的分泌和结肠中的基因表达，表明 OEW 通过抗炎作用去改善肠道屏障功能紊乱。

（3）OEW 具有维持肠道屏障功能紊乱小鼠肠道屏障完整性的作用，与 PC 组小鼠相比，OEW-H 组小鼠的 FITC-dextran 水平以及 TJ 蛋白表达量更接近正常小鼠。OEW 具有降低肠道通透性，增加 TJ 蛋白表达的作用，对肠道屏障具有明显保护作用。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

本文通过单因素实验研究了 L-谷氨酰胺酶的最适催化条件和 oligo- γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp(OEW)的最佳合成条件,利用两步体外模拟消化实验研究了 OEW 在胃肠液中的稳定性,并采用动物实验探索 OEW 对慢性应激引起的肠道屏障功能紊乱的调节作用。具体结果如下:

(1) 采用两种方法测定 L-谷氨酰胺酶的酶活,明确了以对硝基苯胺含量为指标的酶活测定方法更为精准。在温度为 37℃, pH 值为 10.00 的条件下,利用此方法测定的 L-谷氨酰胺酶的水解酶活和转肽酶活分别为 80.96 U/g 和 130.23 U/g。

(2) 以吸光度(220 nm)和氨基酸态氮含量为参考指标,采用单因素优化 OEW 的合成条件。OEW 的最佳合成条件为:反应温度 37℃, pH 值 10.00, 酶添加量 0.1% (w/v), 底物浓度 0.2 mol/L, 氨基酸比例 Gln: Trp = 2:1 (n/n), 反应时间 3 h。利用此条件合成的 OEW 含量为 60%左右。

(3) 体外模拟消化结果表明,经过胃肠消化之后, γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 所占比例较合成原样下降, γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 所占比例较合成原样上升。高分子量 γ -[Glu]_(3≤n≤4)-Trp 胃肠液稳定性较差,易被消化分解为分子量更小、稳定性较好的 γ -[Glu]_(1≤n≤2)-Trp 或氨基酸。

(4) 借助 CUMS 和 DSS 刺激 C57BL/6 小鼠研究 OEW 对肠道屏障功能紊乱小鼠的改善作用及其作用机制。结果表明, OEW 能明显改善体重下降情况,降低 DAI 和 HI 评分,增加结肠长度。同时, OEW 的干预明显逆转了小鼠的焦虑样行为,并增加结肠中 SERT mRNA 的表达。此外, OEW 降低血清中促炎细胞因子的水平及其在结肠中 mRNA 表达,从而抑制了炎症反应。最后, OEW 还能上调与肠道屏障相关的肠上皮 TJ 蛋白的表达,降低肠道通透性。

5.2 创新点

(1) 采用两种方法研究 L-谷氨酰胺酶的酶活,证实以对硝基苯胺含量为指

标的酶活测定方法更为精确、可用。

(2) 以 Trp 为 γ -谷氨酰基受体、Gln 为供体，L-谷氨酰胺酶为催化剂，系统地研究了 OEW 的催化合成条件。

(3) 利用体外模拟消化实验明确了 OEW 中的 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 在胃肠液中稳定性更好。

(4) 利用动物实验明确了 OEW 可通过缓解焦虑、抑制炎症反应和保护肠道屏障完整性去改善肠道屏障功能紊乱。

5.3 展望

(1) 本文利用两步法体外模拟消化实验研究 OEW 在胃肠液中的稳定性，由于胃肠消化程序复杂，本文只研究了体外静态消化对 OEW 的影响，因此需要进一步研究 OEW 在体内消化的稳定性。

(2) 本文研究 OEW 改善肠道屏障功能紊乱的作用及其可能机制，只选择 OEW 混合物进行动物实验，并未对单一色氨酸寡肽进行研究，无法证明主要是哪种低聚肽发挥作用。因此需要进一步探究单一色氨酸低聚肽对肠道屏障功能紊乱的作用。

(3) 本研究仅使用 C57BL/6 雄性小鼠模型，无法捕捉性别差异，无法模拟人类不同的行为和生理变化。为了克服这些局限性，需要通过其他动物模型和人体模型以及不同的实验设计，进一步验证 OEW 对肠道疾病的作用。

参考文献

- [1] 杨娟. γ -谷氨酰肽的酶法合成及其应用 [D]. 广东: 华南理工大学, 2018.
- [2] 唐润梅. γ -[Glu]_{n=(1-5)}-Gln 的酶法合成及其应用研究 [D]. 广东: 华南理工大学, 2020.
- [3] THOMPSON J F, MORRIS C J, ZACHARIUS R M. Isolation of (–) S-Methyl-L-Cysteine from Beans (*Phaseolus vulgaris*) [J]. *Nature*, 1956, 178(4533): 593.
- [4] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, etc. γ -Glu-Met synthesised using a bacterial glutaminase as a potential inhibitor of dipeptidyl peptidase IV [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(5): 1166-1175.
- [5] UEMURA S, IENAGA K, HIGASHIURA K, etc. Gamma-glutamyltaurine has potent and long-lasting antiepileptic action as demonstrated by intra-amygdaloid injection in amygdala-kindled rats [J]. *Brain Research*, 1992, 594(2): 347-350.
- [6] 朱西平. 抗焦虑性抑郁肽的制备及其作用机制 [D]. 广东: 华南理工大学, 2020.
- [7] STIUSO P, GIUBERTI G, LOMBARDI A, etc. Gamma-glutamyl 16-diaminopropane derivative of vasoactive intestinal peptide: a potent anti-oxidative agent for human epidermoid cancer cells [J]. *Amino Acids*, 2010, 39(3): 661-670.
- [8] 孙怡然. 酵母细胞通透性的调控及其合成谷胱甘肽研究 [D]. 江西: 南昌大学, 2018.
- [9] JIANG R, LIU M, LI C, etc. Facile fabrication of luminescent polymeric nanoparticles containing dynamic linkages via a one-pot multicomponent reaction: Synthesis, aggregation-induced emission and biological imaging [J]. *Materials Science & Engineering C*, 2017, 80: 708-714.
- [10] 赵红玲, 高杨, 尹志峰, 等. 发酵法生产还原型谷胱甘肽的研究进展 [J]. *承德医学院学报*, 2013, 30(06): 516-518.
- [11] 罗科丽, 彭喜春, 晏日安. 微生物谷氨酰胺酶的研究进展 [J]. *中国调味品*, 2010, 35(11): 30-34.

- [12] 卢慧茵. 谷氨酰胺酶合成 γ -谷氨酰肽及其抗氧化性的研究 [D]. 广东: 华南理工大学, 2019.
- [13] 万伟建. 耦合树脂分离酶法合成谷胱甘肽研究 [D]. 江西: 南昌大学, 2018.
- [14] 黄锋. E.coli 与 B.subtilis γ -谷氨酰基转移酶的重组表达及其催化合成 L-茶氨酸的研究 [D]. 浙江: 浙江大学, 2016.
- [15] 和斐. 利用重组钝齿棒杆菌高效表达 γ -谷氨酰转肽酶及酶催化合成 L-茶氨酸研究 [D]. 江苏: 江南大学, 2016.
- [16] ZHAO C J, GÄNZLE M G. Synthesis of Taste-Active γ -Glutamyl Dipeptides during Sourdough Fermentation by *Lactobacillus reuteri* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(40): 7561-7568.
- [17] ZHU X, SUN-WATERHOUSE D, TAO Q, etc. The enhanced serotonin (5-HT) synthesis and anti-oxidative roles of Trp oligopeptide in combating anxious depression C57BL/6 mice(Article) [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 67: 103859.
- [18] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, etc. Synthesis and Sensory Characteristics of Kokumi γ -[Glu]_(n)-Phe in the Presence of Glutamine and Phenylalanine: Glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* or *Aspergillus oryzae* as the Catalyst [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(39): 8696-8703.
- [19] TANG R, SUN-WATERHOUSE D, XIONG J, etc. Feasibility of synthesizing γ -[Glu]_(n≥1)-Gln using high solid concentrations and glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* as the catalyst [J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125920.
- [20] LIN J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, etc. Increasing antioxidant activities of the glutamine-cysteine mixture by the glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Food Chemistry, 2020, 308: 125701.
- [21] KIRIMURA J, SHIMIZU A, KIMIZUKA A, etc. Contribution of peptides and amino acids to the taste of foods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1969, 17: 689-695.
- [22] ROUDOT-ALGARON F, KERHOAS L, LE BARS D, etc. Isolation of γ -

- Glutamyl Peptides from Comté Cheese [J]. *Journal of Dairy Science*, 1994, 77(5): 1161-1166.
- [23] TOELSTEDE S, DUNKEL A, HOFMANN T. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(4): 1440-1448.
- [24] TOELSTEDE S, HOFMANN T. Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogenesis by *Penicillium roquefortii* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(9): 3738-3748.
- [25] KURODA M, MIYAMURA N. Mechanism of the perception of “kokumi” substances and the sensory characteristics of the “kokumi” peptide, γ -Glu-Val-Gly [J]. *Flavour*, 2015, 4(1): 11.
- [26] MARUYAMA Y, YASUDA R, KURODA M, etc. Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells [J]. *PloS one*, 2012, 7(4): e34489.
- [27] TAYLOR M, CHAPMAN R, BEYAERT R, etc. Seed storage protein deficiency improves sulfur amino acid content in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): redirection of sulfur from gamma-glutamyl-S-methyl-cysteine [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(14): 5647-5654.
- [28] SAN GABRIEL A, UNEYAMA H, MAEKAWA T, etc. The calcium-sensing receptor in taste tissue [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378(3): 414-418.
- [29] OHSU T, AMINO Y, NAGASAKI H, etc. Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(2): 1016-1022.
- [30] AMINO Y, NAKAZAWA M, KANEKO M, etc. Structure-CaSR-Activity Relation of Kokumi γ -Glutamyl Peptides [J]. *Chemical & Pharmaceutical bulletin*, 2016, 64(8): 1181-1189.
- [31] 张成国, 孙国祥, 杨晓, 等. 谷胱甘肽抑制氧化应激反应进展 [J]. *科技创新与应用*, 2021, 11: 50-55.

- [32] 陈玉娟, 邱泽钊, 沈铭, 等. 谷胱甘肽的生物学功能及其在养猪生产中的应用研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(12): 60-65.
- [33] TUTHILL C W, PAPKOFF J, WATKINS B A, etc. The effect of the immunomodulatory peptide gamma-D-glutamyl-L-tryptophan in leukemia, lymphoma, and head and neck cancer xenograft models [J]. Journal of Clinical Oncology, 2011, 29(15): 5592.
- [34] SHARMA E, JOSHI R, GULATI A. l-Theanine: An astounding sui generis integrant in tea [J]. Food Chemistry, 2018, 242: 601-610.
- [35] CHUNG S, LIM J W, KIM H. PP9 - Docosahexaenoic acid inhibits oxidative stress and cytokine expression in pancreatic stellate cells exposed to double-stranded RNA or TNF-alpha [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2015, 86: S22.
- [36] ZHANG H, KODERA T, ETO Y, etc. γ -Glutamyl valine supplementation-induced mitigation of gut inflammation in a porcine model of colitis [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 24: 558-567.
- [37] ZHANG H, KOVACS-NOLAN J, KODERA T, etc. γ -Glutamyl cysteine and γ -glutamyl valine inhibit TNF- α signaling in intestinal epithelial cells and reduce inflammation in a mouse model of colitis via allosteric activation of the calcium-sensing receptor [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2015, 1852(5): 792-804.
- [38] ICHINOSE H, TOGARI A, SUZUKI H, etc. Increase of catecholamines in mouse brain by systemic administration of gamma-glutamyl L-3,4-dihydroxyphenylalanine [J]. Journal of Neurochemistry, 1987, 49(3): 928-932.
- [39] TAL N, GOLDBERG O, LUINI A, etc. An evaluation of gamma-glutamyl dipeptide derivatives as antagonists of amino acid-induced Na⁺ fluxes in rat striatum slices [J]. Journal of Neurochemistry, 1982, 39(2): 574-576.
- [40] SUZUKI H, MIYAKAWA N, KUMAGAI H. Enzymatic production of γ -L-glutamyltaurine through the transpeptidation reaction of γ -glutamyltranspeptidase from Escherichia coli K-12 [J]. Enzyme and Microbial

- Technology, 2002, 30(7): 883-888.
- [41] SUZUKI H, KAJIMOTO Y, KUMAGAI H. Improvement of the bitter taste of amino acids through the transpeptidation reaction of bacterial gamma-glutamyltranspeptidase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(2): 313-318.
- [42] SUZUKI T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions [J]. Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho, 2020, 91(1): e13357.
- [43] UEDA Y, MAKOTO S, KAZUO H, etc. Characteristic Flavor Constituents in Water Extract of Garlic [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(1): 163-169.
- [44] KURODA M, KATO Y, YAMAZAKI J, etc. Determination of γ -glutamyl-valyl-glycine in raw scallop and processed scallop products using high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1640-1644.
- [45] HIRAYAMA A, IGARASHI K, TOMITA M, etc. Development of quantitative method for determination of γ -glutamyl peptides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry: an efficient approach avoiding matrix effect [J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1369: 161-169.
- [46] SÁNCHEZ-VIOQUE R, RODRÍGUEZ-CONDE M F, VIOQUE J, etc. A colorimetric method for determination of γ -glutamyl-S-ethenyl-cysteine in narbon vetch (*Vicia narbonensis* L.) seeds [J]. Analytical Biochemistry, 2011, 418(2): 180-183.
- [47] 吕赞. 谷胱甘肽电化学检测新方法的研究 [D]. 上海: 上海大学, 2017.
- [48] LV Y, LU M, YANG Y, etc. Electrochemical detection of intracellular glutathione based on ligand exchange assisted release of DNA-templated silver nanoparticles [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 244: 151-156.
- [49] SONG H, TIAN Q, LI B. Novel Hyp-Gly-containing antiplatelet peptides from collagen hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and intestinal

- p absorption [J].
- Food & Function*
- , 2020, 11(6): 5553-5564.
- [50] ZHU S, ZHENG Y, HE S, etc. Novel Zn-Binding Peptide Isolated from Soy Protein Hydrolysates: Purification, Structure, and Digestion [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(1): 483-490.
- [51] 石雅彤. 发酵乳上清液超滤组分抗氧化活性及体外消化特性的研究 [D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2024.
- [52] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, etc. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion [J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(4): 991-1014.
- [53] BARROSO E, CUEVA C, PELÁEZ C, etc. The Computer-Controlled Multicompartmental Dynamic Model of the Gastrointestinal System SIMGI [M]. Springer Copyright, 2015: 319-327.
- [54] MACKIE A, MULET-CABERO A I, TORCELLO-GÓMEZ A. Simulating human digestion: developing our knowledge to create healthier and more sustainable foods [J]. *Food & Function*, 2020, 11(11): 9397-9431.
- [55] LI C, YU W, WU P, etc. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 96: 114-126.
- [56] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, etc. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus [J]. *Food & Function*, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [57] KAZAKOU P, NICOLAIDES N C, CHROUSOS G P. Basic Concepts and Hormonal Regulators of the Stress System [J]. *Hormone Research in Paediatrics*, 2023, 96(1): 8-16.
- [58] 冯文林, 伍海涛, 洪睦铿, 等. 中国国内肠易激综合征流行病学调查研究的现状 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2017, 41(08): 685-687+691.
- [59] MASERE C, NAKADE Y, ZHENG J, etc. Chronic restraint stress has no more stimulatory effects on colonic motility in rats [J]. *Neuroscience Letters*, 2009, 453(3): 147-150.

- [60] 郑建华. 色氨酸改善肠应激损伤及调控肠道菌群结构的作用研究 [D], 2024.
- [61] KIRBY E D, MUROY S E, SUN W G, etc. Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2 [J]. *eLife*, 2013, 2: e00362.
- [62] 程宏博, 刘献, 尚慧莹, 等. 酸枣仁提取物对慢性不可预知温和应激致抑郁失眠小鼠的治疗作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 1-14.
- [63] 杜桐宇, 李群涛, 殷洁婷, 等. 罗布麻叶提取物通过下丘脑室旁核改善慢性应激小鼠的焦虑样行为 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(12): 2072-2078.
- [64] 赵元. 绿原酸通过肠肝轴缓解慢性应激致大鼠肝损伤的机制研究 [D]. 黑龙江: 东北农业大学, 2023.
- [65] 黄艳妮, 何小华, 郑晓霞, 等. 慢性不可预计温和刺激抑郁模型的研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(01): 54-58.
- [66] 岳云双. 色氨酸调节慢性不可预知应激动物肠道屏障及免疫功能的机制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [67] 杨一帆, 王豆, 李涛, 等. 慢性不可预知温和刺激抑郁模型及其评价指标的研究进展 [J]. *山东医药*, 2021, 61(25): 96-99.
- [68] CHEN P. Enteric dysbiosis, gut barrier and liver disease [J]. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 2018, 7(1): 38-40.
- [69] WELLS J M, BRUMMER R J, DERRIEN M, etc. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2017, 312(3): G171-G193.
- [70] GARCIA M A, NELSON W J, CHAVEZ N. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, 10(4).
- [71] ALLAIRE J M, CROWLEY S M, LAW H T, etc. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity [J]. *Trends in Immunology*, 2018, 39(9): 677-696.

- [72] OTANI T, FURUSE M. Tight Junction Structure and Function Revisited [J]. Trends in Cell Biology, 2020, 30(10): 805-817.
- [73] CHOPYK D M, GRAKOU I A. Contribution of the Intestinal Microbiome and Gut Barrier to Hepatic Disorders [J]. Gastroenterology, 2020, 159(3): 849-863.
- [74] CELEBIOGLU H U, SVENSSON B. Dietary Nutrients, Proteomes, and Adhesion of Probiotic Lactobacilli to Mucin and Host Epithelial Cells [J]. Microorganisms, 2018, 6(3).
- [75] LIU L, DONG W, WANG S, etc. Deoxycholic acid disrupts the intestinal mucosal barrier and promotes intestinal tumorigenesis [J]. Food & Function, 2018, 9(11): 5588-5597.
- [76] MORAIS C A, DE ROSSO V V, ESTADELLA D, etc. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 33: 1-7.
- [77] PALM N W, DE ZOETE M R, FLAVELL R A. Immune-microbiota interactions in health and disease [J]. Clinical Immunology (Orlando, Fla), 2015, 159(2): 122-127.
- [78] CHEN S, ZUO S, ZHU J, etc. Decreased Expression of Cystathionine β -Synthase Exacerbates Intestinal Barrier Injury in Ulcerative Colitis [J]. Journal of Crohn's & Colitis, 2019, 13(8): 1067-1080.
- [79] KEITA A V, SÖDERHOLM J D, ERICSON A C. Stress-induced barrier disruption of rat follicle-associated epithelium involves corticotropin-releasing hormone, acetylcholine, substance P, and mast cells [J]. Neurogastroenterology and Motility, 2010, 22(7): 770-778, e221-222.
- [80] VICARIO M, ALONSO C, GUILARTE M, etc. Chronic psychosocial stress induces reversible mitochondrial damage and corticotropin-releasing factor receptor type-1 upregulation in the rat intestine and IBS-like gut dysfunction [J]. Psychoneuroendocrinology, 2012, 37(1): 65-77.
- [81] DA SILVA S, ROBBE-MASSELOT C, AIT-BELGNAOUI A, etc. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift:

- prevention by a probiotic treatment [J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 2014, 307(4): G420-429.
- [82] GAREAU M G, JURY J, PERDUE M H. Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability [J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 2007, 293(1): G198-203.
- [83] LI B, GUO K, ZENG L, etc. Metabolite identification in fecal microbiota transplantation mouse livers and combined proteomics with chronic unpredictable mild stress mouse livers [J]. Translational Psychiatry, 2018, 8(1): 34.
- [84] DING F, WU J, LIU C, etc. Effect of Xiaoyaosan on Colon Morphology and Intestinal Permeability in Rats With Chronic Unpredictable Mild Stress [J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 1069.
- [85] TIAN R, HOU G, SONG L, etc. Chronic grouped social restriction triggers long-lasting immune system adaptations [J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33652-33657.
- [86] 王超然. 基于 TGF- β 1/P38 通路探究慢性束缚应激致大鼠回肠损伤的作用机制 [D]. 黑龙江: 东北农业大学, 2020.
- [87] HABİYAMBERE B M, ONYANGO E M J B J O M, RESEARCH M. Chronic Stress Modulates the Mucin Components of the Intestinal Barrier and the Intestinal Morphology [J]. Journal of Advances in Medicine and Medical Research, 2016, 13: 1-14.
- [88] GAO X, CAO Q, CHENG Y, etc. Chronic stress promotes colitis by disturbing the gut microbiota and triggering immune system response [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(13): E2960-2969.
- [89] 徐子伟. 仔猪肠道损伤修复营养调控及其机制和应用 [J] 动物营养学报, 2014, 26(10): 3033-3345.
- [90] GULHANE M, MURRAY L, LOURIE R, etc. High Fat Diets Induce Colonic

- Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22 [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28990.
- [91] MIRANDA S, ROUX M E. Acoustic stress induces long term severe intestinal inflammation in the mouse [J]. *Toxicology Letters*, 2017, 280: 1-9.
- [92] MANKERTZ J, AMASHEH M, KRUG S M, etc. TNF α up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling [J]. *Cell and Tissue Research*, 2009, 336(1): 67-77.
- [93] HATTAY P, PRUSATOR D K, TRAN L, etc. Psychological stress-induced colonic barrier dysfunction: Role of immune-mediated mechanisms [J]. *Neurogastroenterology and Motility*, 2017, 29(7).
- [94] HASHIMOTO T, PERLOT T, REHMAN A, etc. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation [J]. *Nature*, 2012, 487(7408): 477-481.
- [95] LANIS J M, ALEXEEV E E, CURTIS V F, etc. Tryptophan metabolite activation of the aryl hydrocarbon receptor regulates IL-10 receptor expression on intestinal epithelia [J]. *Mucosal Immunology*, 2017, 10(5): 1133-1144.
- [96] CHEN M, LIU Y, XIONG S, etc. Dietary l-tryptophan alleviated LPS-induced intestinal barrier injury by regulating tight junctions in a Caco-2 cell monolayer model [J]. *Food & Function*, 2019, 10(5): 2390-2398.
- [97] MOFFETT J R, NAMBOODIRI M A. Tryptophan and the immune response [J]. *Immunology and Cell Biology*, 2003, 81(4): 247-265.
- [98] YUE Y, GUO Y, YANG Y. Effects of dietary L-tryptophan supplementation on intestinal response to chronic unpredictable stress in broilers [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(7): 1227-1236.
- [99] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, ZHOU W, etc. Glutaminase-catalyzed γ -glutamylolation to produce CCK secretion-stimulatory γ -[Glu] $_n$ -Trp peptides superior to tryptophan [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 103418.
- [100] HE W, HUANG X, KELIMU A, etc. Streamlined Efficient Synthesis and Antioxidant Activity of γ -[Glutamyl] $_{(n \geq 1)}$ -tryptophan Peptides by Glutaminase

- from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *Molecules*, 2023, 28(13).
- [101] PAPKOFF J, LEE H, SINGH G, etc. Identification of signaling pathways involved in the mechanism of action of the immunomodulatory peptide gamma-D-glutamyl-L-tryptophan [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2011, 29(15suppl): 5591.
- [102] 姚玉静, 崔春, 黄俊伟. γ -谷氨酰肽呈味特性、鉴定及制备方法研究进展 [J]. *中国调味品*, 2016, 41(03): 146-152.
- [103] LIN J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, etc. Increasing antioxidant activities of the glutamine-cysteine mixture by the glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *Food Chemistry*, 2020, 308: 125701.
- [104] OROSCO M, ROUCH C, BESLOT F, etc. Alpha-lactalbumin-enriched diets enhance serotonin release and induce anxiolytic and rewarding effects in the rat [J]. *Behavioural Brain Research*, 2004, 148(1-2): 1-10.
- [105] KLEIN M, KALTWASSER H, JAHNS T. Isolation of a novel, phosphate-activated glutaminase from *Bacillus pasteurii* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 206(1): 63-67.
- [106] 孙媛媛. γ -[Glu]_{n≥1}-Arg 的高固形物浓度酶法合成及应用研究 [D]. 广东: 华南理工大学, 2021.
- [107] GALLEGO M, MAURI L, ARISTOY M C, etc. Antioxidant peptides profile in dry-cured ham as affected by gastrointestinal digestion [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 69: 103956.
- [108] MILLUCCI L, RAGGIASCHI R, FRANCESCHINI D, etc. Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A beta (25-35) peptide [J]. *Journal of Biosciences*, 2009, 34(2): 293-303.
- [109] 李圣翔. 猪胃蛋白酶原 A 基因克隆、毕赤酵母表达及其酶活性分析 [D]. 四川: 四川农业大学, 2011.
- [110] 田瑞琦, 张诗捷, 丁银川, 等. 绿原酸对顺铂诱导小鼠肠屏障功能障碍和肠道菌群的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2025, 42(01): 27-33.
- [111] ZHU X, TAO Q, SUN-WATERHOUSE D, etc. γ -[Glu]_n-Trp ameliorates

- anxiety/depression-like behaviors and its anti-inflammatory effect in an animal model of anxiety/depression [J]. *Food & Function*, 2019, 10(9): 5544-5554.
- [112] WANG D, WU J, ZHU P, etc. Tryptophan-rich diet ameliorates chronic unpredictable mild stress induced depression- and anxiety-like behavior in mice: The potential involvement of gut-brain axis [J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111289.
- [113] NONG K, LIU Z, QIN X, etc. Effect of the *Pseudopleuronectes americanus*-derived Pleurocidin on DSS-induced Ulcerative colitis in mice and its preliminary molecular mechanisms [J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 130: 111757.
- [114] 樊李晴. 莱阳梨渣多糖体外消化特性及其对结肠炎小鼠肠道保护作用研究 [D]. 山东: 山东农业大学, 2024.
- [115] ZHANG H, WANG X, ZHAO L, etc. Biochanin a ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by improving colonic barrier function and protects against the development of spontaneous colitis in the Muc2 deficient mice [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2024, 395: 111014.
- [116] 李小兰. 色氨酸对肠道屏障功能的作用 [D]. 江西: 南昌大学, 2015.
- [117] BELO-SILVA A E, DE GUSMÃO TAVEIROS SILVA N K, MARIANNO P, etc. Effects of the combination of chronic unpredictable stress and environmental enrichment on anxiety-like behavior assessed using the elevated plus maze in Swiss male mice: Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis-Mediated Mechanisms [J]. *Hormones and behavior*, 2024, 162: 105538.
- [118] GEERAERTS B, VAN OUDENHOVE L, TACK J. Serotonin transporter gene polymorphisms in irritable bowel syndrome [J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2006, 18(11): 957-959.
- [119] ZHU Y, ZHAO N, LIU C, etc. CXCL8 chemokine in ulcerative colitis [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2021, 138: 111427.
- [120] CHEY W D, KURLANDER J, ESWARAN S. Irritable bowel syndrome: a

- clinical review [J]. *Jama*, 2015, 313(9): 949-958.
- [121] WALANA W, YE Y, LI M, etc. IL-8 antagonist, CXCL8(3-72)K11R/G31P coupled with probiotic exhibit variably enhanced therapeutic potential in ameliorating ulcerative colitis [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2018, 103: 253-261.
- [122] HUANG Y, SUN K, XU J, etc. Study of the mechanism of acupuncture and moxibustion in protecting the intestinal mucosal barrier in DSS-induced UC rats based on the IL-9/IL-9R pathway [J]. *Journal of Acupuncture and Tuina Science*, 2024, 22(2): 91-103.
- [123] HOROWITZ A, CHANEZ-PAREDES S D, HAEST X, etc. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2023, 20(7): 417-432.
- [124] LIU G, LU J, SUN W, etc. Tryptophan Supplementation Enhances Intestinal Health by Improving Gut Barrier Function, Alleviating Inflammation, and Modulating Intestinal Microbiome in Lipopolysaccharide-Challenged Piglets [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 919431.

攻读硕士学位期间学术论文发表情况

- [1] Branched-Chain Amino Acid (BCAA) Oligopeptide Determination from Whey Proteins: Preparation, Peptide Profiles, and Anti-Fatigue Activity [J]. Foods, 2024, 14(1): 32. doi: 10.3390/foods14010032. (本人一作)
- [2] 香蕉皮蛋白质的制备及其组成分析 [J]. 食品工程, 2023, 2: 51-57. (本人一作)
- [3] 低聚 γ -谷氨酰色氨酸肽合成条件的优化及其对胃肠液稳定性的研究 [J]. 中国食品学报, 2025, 2. 已录用. (本人一作)
- [4] 一种中式汉堡胚及其制备方法 [发明]. 申请号: CN202311846647.1, 申请日: 2023 年 12 月 29 日, 公开号: CN117678618A. (导师一作, 本人二作)
- [5] Effect of oligo- γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp on chronic unpredictable mild stress and dextran sulfate sodium salt co-induced intestinal barrier dysfunction in mice [J]. 在投. (本人一作)

致谢

时光飞逝，转瞬间三年的硕士生活已接近尾声，回想起几年来的点点滴滴，其中充满了酸甜苦辣，更有收获和成长。几年来，感谢陪我一起度过美好时光的每位尊敬的老师和亲爱的同学，正是你们的帮助，我才能克服困难，正是你们的指导，我才能解决疑惑，直到学业的顺利完成。

首先要特别感谢我的导师朱西平老师。在硕士就读期间，我尊敬的导师朱西平老师在科研、学习和生活各个方面给予了我殷切地关怀和不遗余力地帮助和指导。在学位论文上，大到论文的选题，构架，小到一个小节一个标题，朱老师都给予了悉心的指导，使我的科研能力、理论水平、组织与协调能力等方面得到很大的提高；在获取知识的同时，朱老师严谨的治学态度以及平易近人的生活作风也对我产生了深刻的影响，将使我受益终身。

其次要感谢我的实验室师妹卢香如和艾斌丽在科研实验方面对我的支持和帮助；感谢我的室友杨云云、董雨露和王真真在日常生活方面对我的照顾和宽容；感谢我的同学和朋友们，是她们给我的研究生生活增添了更多快乐的回忆。

再次，要感谢我的父母和弟弟。因为有了他们的默默支持和无私奉献，我才能心无旁骛地完成我的硕士研究生学业，他们将是我不久的精神依靠。

最后，向所有关心和帮助过我的老师、同学、朋友，以及始终关心支持我的家人表示感谢。