

蚕蛹主要过敏原 Bomb m 6 对肠道上皮屏障的损伤作用

刘兵¹, 于荣贤¹, 余玉芳¹, 岳文琪², 魏定钧³, 吴序栋^{4*}

(1. 华臻生物科技(深圳)有限公司, 广东深圳 518000) (2. 深圳大学医学部基础医学院, 广东深圳 518000)
(3. 深圳大学化学与环境工程学院, 广东深圳 518000) (4. 深圳大学医学部公共卫生学院, 广东深圳 518000)

摘要: 食物过敏已成为全球高发的免疫相关疾病, 肠道屏障损伤是食物过敏原致敏的关键环节。蚕蛹作为优质蛋白源被广泛食用, 但其主要新型脂蛋白过敏原 Bomb m 6 的肠道作用机制尚不明确, 限制了蚕蛹过敏防控与安全利用。本研究以 Caco-2、HT-29 细胞及 Caco-2/HT-29 共培养肠道屏障模型为对象, 采用 CCK-8、ELISA、FITC-Dextran 通透实验与 Western blot 等方法, 探究 Bomb m 6 对肠道上皮细胞活力、炎症因子、警报素及屏障功能的影响。结果显示, 6.25~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 对 Caco-2 细胞无显著毒性, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可显著抑制 HT-29 细胞活力; 100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 使 Caco-2 细胞 IL-6、IL-8 分别升至 6.80、31.20 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可显著提升 Caco-2 细胞 IL-33、IL-25、TSLP 水平, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上可显著提升 HT-29 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-33、TSLP 水平; 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 处理 24 h 后, 体外肠道屏障模型表观渗透系数 Papp 升高 2.5 倍, IL-6、IL-8 分泌增加, ZO-1、Occludin、Claudin-1 紧密连接蛋白表达显著下调。Bomb m 6 可能通过诱导肠上皮细胞炎症反应、降低紧密连接蛋白表达、增加屏障通透性, 对肠道上皮屏障功能产生损伤作用, 为蚕蛹过敏的机制阐释、预防诊断及家蚕资源安全开发提供实验依据。

关键词: 蚕蛹; 过敏原; 肠道屏障

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0549

Study on the Effect of the Major Allergen Bomb m 6 from Silkworm Pupa on the Intestinal Epithelial Barrier

LIU Bin¹, YU Rongxian¹, YU Yufang¹, YUE Wenqi², WEI Dingjun³, WU Xuli^{4*}

(1. Huazhen Biotechnology (Shenzhen) Co. Ltd., Shenzhen 518000, China)

(2. School of Basic Medical School, Shenzhen University Medical School, Shenzhen University, Shenzhen 518000, China)

(3. College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518000, China)

(4. School of Public Health, Shenzhen University Medical School, Shenzhen University, Shenzhen 518000, China)

Abstract: Food allergy has become a highly prevalent immune-related disease worldwide, and intestinal barrier damage is a critical step in sensitization to food allergens. Silkworm pupae are widely consumed as a high-quality protein source; however, the intestinal effects of Bomb m 6, a major novel lipoprotein allergen from silkworm pupae, remain unclear, which limits the prevention and control of silkworm pupa allergy and the safe utilization of silkworm resources. In this study, Caco-2 cells, HT-29 cells, and a Caco-2/HT-29 co-cultured intestinal barrier model were used to investigate the effects of Bomb m 6 on intestinal epithelial cell viability, inflammatory cytokines, alarmins, and barrier function using CCK-8 assay, ELISA, FITC-Dextran permeability assay, and Western blot. The results showed that 6.25~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 had no significant cytotoxicity toward Caco-2 cells, whereas 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 significantly inhibited the viability of HT-29 cells. Treatment with 100 and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 increased IL-6 and IL-8 levels in Caco-2 cells to 6.80 and 31.20 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. Treatment with 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 significantly increased the levels of IL-33, IL-25, and TSLP in Caco-2 cells, while concentrations of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and above significantly increased IL-1 β , TNF- α , IL-33, and TSLP levels in HT-29 cells. After treatment with 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 for 24 h, the apparent permeability coefficient (Papp) of the in vitro intestinal barrier model increased by 2.5-fold, IL-6 and IL-8 secretion was enhanced, and the expression levels of the tight junction proteins ZO-1, Occludin, and Claudin-1 were significantly downregulated. These results suggest that

收稿日期: 2026-04-10; 修回日期: 2026-07-08; 接受日期: 2026-07-09

基金项目: 国家基金面上项目 (32472448); 广东省普通高校重点领域专项 (2024ZDZX2020); 深圳市科技计划 (JCYJ20250604182701002)

作者简介: 刘兵 (1983-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品营养, E-mail: 648264216@qq.com

通讯作者: 吴序栋 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养, E-mail: wxl@szu.edu.cn

Bomb m 6 may impair intestinal epithelial barrier function by inducing inflammatory responses in intestinal epithelial cells, reducing tight junction protein expression, and increasing barrier permeability, thereby providing experimental evidence for elucidating the mechanism of silkworm pupa allergy, its prevention and diagnosis, and the safe development of silkworm resources.

Key words: silkworm pupa; allergen; intestinal barrier

近三十年来,食物过敏的发病率在全球范围内显著攀升,越来越多婴幼儿及成人受到困扰^[1,2]。食物过敏本质上是机体免疫系统对食物中某些过敏原产生的异常免疫应答。根据 IgE 抗体在该病理过程中的参与程度,食物过敏可划分为三类:典型 IgE 介导型、非 IgE 介导型以及混合型,其中以 IgE 介导的速发型反应最为多见^[3]。该病的常见临床表现涵盖皮肤症状(如荨麻疹、血管性水肿)、呼吸道症状(如喉头水肿、支气管痉挛)及消化道症状(如呕吐、腹泻),严重病例可发展为过敏性休克^[4-6]。

肠道是食物过敏发生与发展的核心部位,其屏障结构在此过程中发挥关键作用^[7,8]。经胃肠道致敏的动物蛋白过敏原,其致敏过程始于对肠道屏障的穿透^[9],过敏原只有穿越该屏障,才能被抗原呈递细胞(Antigen Presenting Cells, APCs)摄取、加工并呈递,从而有效激活免疫应答。肠道屏障由黏液层、单层上皮细胞构成的物理屏障以及富含免疫细胞的固有层共同组成。过敏原可通过以下方式进入固有层:1)经肠道 M 细胞的主动转运;2)被杯状细胞包裹于囊泡中进行跨细胞传递;3)部分具有蛋白酶活性的过敏原可降解紧密连接蛋白(如 ZO-1、Occludin、Claudin-1),破坏上皮屏障的完整性,增加过敏原的被动扩散,进而促进抗原呈递^[10,11]。因此肠道屏障的完整性与食物过敏息息相关。

蚕(*Bombyx mori*)在我国是一种被广泛饲养的养殖昆虫,蚕及其衍生物具有很高的营养、药用和经济价值^[12,13]。其中蚕蛹常被亚洲国家,尤其是中国用作食物。在中国,蚕蛹不仅作为食品被食用,也是治疗高血压和脂肪肝的中药重要组成部分^[14]。随着对可持续动物源性膳食蛋白需求的增加,可食用昆虫作为蛋白质来源受到广泛关注。蚕蛹被认为是优质的动物蛋白来源,是中国卫生部发布的《新型食品资源名录》中唯一的昆虫类食品,并广泛用于中国和韩国的膳食补充剂、药品及动物饲料^[15]。近年来,蚕蛹凭借其高营养价值和多样的生物活性被用作食品工业的原材料。然而包括蚕蛹在内的新型蛋白质来源,可能引发食物过敏^[16],甚至过敏性休克^[17]。因此,蚕蛹过敏现已成为全球广泛研究的课题。

此前研究组成功从鲜蚕蛹中纯化并鉴定了一种分子大小为 27.6 kDa 的新型蚕蛹过敏原(家蚕脂蛋白 3),此过敏原被 WHO/IUIS 过敏原命名委员会审定命名为 Bomb m 6^[18]。作为一种新发现的脂蛋白类过敏原,其致敏机制尚未明确,为此,本研究重点探讨 Bomb m 6 对肠道上皮屏障的作用,旨在阐明其致敏机理,从而为蚕蛹过敏的预防与治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PBS、DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗, Gibco 公司;氯化钠, 麦克林公司; FITC-Dextran, Sigma 公司; CCK-8 试剂盒, Solarbio 公司; 人 IL-6 检测试剂盒、人 IL-8 检测试剂盒、人 IL-1 β 检测试剂盒、人 TNF- α 检测试剂盒、人 TSLP 检测试剂盒、人 IL-33 检测试剂盒、人 IL-25 检测试剂盒, 江莱生物公司; Tris, Bio-Rad 公司; BCA 试剂盒, Biosharp 公司; 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, Solarbio 公司; Tris-HCl 缓冲液(pH 值 6.8), Biosharp 公司; Tris-HCl 缓冲液(pH 值 8.8), Solarbio 公司; TEMED, amresco 公司; 十二烷基硫酸钠(SDS), 上海生工公司; 30%制胶液(29:1), Solarbio 公司; 过硫酸铵, Sigma 公司; 考马斯亮蓝 R250、彩虹 130 广谱蛋白 marker, Solarbio 公司; 蛋白 Marker(10~250 kDa), Uelandy 公司; 聚偏二氟乙烯膜, Bio-Rad 公司; 甲醇、无水乙醇, 麦克林公司; 20 $\times$ TBST 缓冲液, Solarbio 公司; 牛血清白蛋白, Biosharp 公司; 脱脂奶粉, Solarbio 公司; ZO-1 Antibody、Occludin Antibody、Claudin-1 Antibody、Beta-actin Antibody、Beta tubulin Antibody, Affinity 公司; ECL 化学发光底物试剂盒, 四正柏公司。

1.2 实验仪器

HERAguard HPH9 型超净工作台, Thermo 公司; Centrifuge 5424 R 型台式高速离心机, Eppendorf 公司; LV-150N

型光学显微镜, 日本 Nikon 公司; DZKW-D-2 型电热恒温水浴锅, 科恒公司; Heracell 150i GP 型 CO₂ 培养箱, Thermo 公司; RE1600 型细胞电阻仪, 北京金工公司; MS7-H550-Pro 型磁力搅拌器, Scilogex 公司; BSA224S 型电子分析天平, Sartorius 公司; CHB-100HB-100 型干式恒温器, 博日公司; PowerPac 系列电泳仪, Bio-Rad 公司; KS 3000i 型恒温空气摇床, IKA 公司; MINI HD6 型 ECL 成像分析系统, UVITEC 公司; MX-S 型涡旋混合器, SCIOLOGEX 公司; SYNERGY HTX 型酶标仪, Bio-Tek 公司; Research® plus 系列单道可调量程移液器, Eppendorf 公司; Milli-Q Academic 型 Milli-Q 超纯水仪, Millipore 公司; Revco ULT-1786-6V 型超低温冰箱, Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 Caco-2 与 HT-29 细胞的培养

Caco-2 细胞及 HT-29 细胞分别培养于含有体积分数 10% FBS 及体积分数 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基中, 培养箱条件设置为 37 °C, 5% CO₂ (体积分数)。每天观察细胞状态, 待细胞融合度达到 90% 以上时, 进行细胞传代: 弃去旧培养基, 加入适量 PBS 溶液轻轻润洗细胞, 加入适量胰酶消化, 用三倍体积的完全培养基中止, 1 200 r min⁻¹ 离心 3 min, 弃上清, 用适量完全培养基重悬细胞, 加到新的培养皿中继续培养。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞毒性

选取生长状态良好的 Caco-2 细胞及 HT-29 细胞, 按每毫升 2×10^5 cells 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 培养 24 h, 待细胞贴壁后, 弃去板内旧培养基, 实验组用 DMEM 配置 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μ g·mL⁻¹ 质量浓度的 Bomb m 6, 对照组则加入等量含有细胞的 DMEM 培养基, 空白组加入等体积不含细胞的 DMEM 培养基, 每组设 3~6 个复孔。继续培养 24 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 3 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度 (OD 值)。细胞存活率按以下公式计算, 实验重复 3 次, 数据以均值 $\pm$ 标准差表示。

$$V = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_3 - OD_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

V——细胞存活率, %;

OD₁——实验组吸光度;

OD₂——空白组吸光度;

OD₃——对照组吸光度。

1.3.3 细胞因子含量检测

为分析细胞上清中炎症因子 (IL-6、IL-8、TNF- α 、IL-1 β) 与警报素 (IL-33、IL-25、TSLP) 的分泌水平, 本研究采用酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 进行定量检测。待细胞经过敏原刺激处理 24 h 后, 收集各组细胞的培养上清液, 置于 4 °C 条件下以 300 $\times$ g 离心 10 min, 以去除上清中悬浮的细胞碎片, 离心结束后小心吸取上清并分装至无菌 EP 管中, 于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。实验检测前, 将江莱生物生产的 ELISA 试剂盒从冰箱中取出, 室温平衡后, 参照试剂盒说明书梯度稀释标准品, 制备标准曲线, 并按说明书步骤依次进行加样、孵育、洗涤、显色与终止反应。最终通过标准曲线计算得到各样品中细胞因子的浓度, 所有实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差的形式进行统计表示。

1.3.4 Caco-2/HT-29 共培养构建体外肠道上皮屏障模型

按 3:1 比例混合 Caco-2 与 HT-29 细胞, 以每毫升 2.0×10^5 cells 的密度接种于 0.4 μ m 孔径 Transwell 小室顶端室 (每孔 0.5 mL), 基底室加入 1.5 mL 完全培养基。培养 21 d, 第 1 周隔天换液, 之后每日换液; 隔周测定跨上皮电阻 (TEER), 仅选用 TEER > 400 Ω ·cm² 的完整单层模型用于后续实验^[19,20]。

1.3.5 体外肠道上皮屏障模型通透性的检测

采用 4 kDa FITC-Dextran 通透实验评估单层细胞模型的屏障通透性。将 FITC-Dextran 溶于 HBSS 溶液中避光保存, 实验前以无血清培养基稀释备用。待共培养模型培养至第 21 天, 首先通过跨膜电阻仪检测各孔 TEER 值, 仅选择 TEER > 400 Ω ·cm² 的孔用于后续实验。弃去 Transwell 上室培养基, 用预热的 HBSS 轻柔洗涤细胞单层 3 次以去除残留培养基。随后, 向上室加入含 20 μ g·mL⁻¹ FITC-Dextran 及不同质量浓度 Bomb m 6 (0、50、100、200 μ g·mL⁻¹) 的无血清培养基, 下室加入 1.5 mL 无血清培养基, 每组设置 3~5 个复孔。将细胞置于 37 °C、5% CO₂

(体积分数)培养箱中避光孵育,分别于2、4及24 h从下室吸取100 μL 培养基,转移至黑色不透光96孔板中,采用荧光酶标仪在激发波长485 nm、发射波长535 nm条件下检测各孔荧光强度。同时,以无血清DMEM培养基配制0.156 25~20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度的FITC-Dextran标准溶液,根据标准曲线计算各实验孔中FITC-Dextran的浓度,并按下式计算表观渗透系数(Papp):

$$X = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A} \times \frac{1}{C_0} \quad (2)$$

式中:

X ——表观渗透系数, $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$;

dQ/dt ——单位时间内透过细胞单层的FITC-Dextran量, $\mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$;

A ——Transwell膜面积, cm^2 ;

C_0 ——上室FITC-Dextran初始浓度, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3.6 体外肠道上皮屏障模型的细胞因子含量检测

ELISA对细胞上清液中炎症因子与警报素进行定量检测。细胞经Bomb m 6处理24 h后,收集Transwell小室上室上清液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 、300 $\times g$ 条件下离心10 min,去除细胞碎片后将上清分装,并置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。检测前从冰箱取出江莱生物ELISA试剂盒,按照说明书要求配制标准品,其余操作严格遵循试剂盒步骤进行。根据标准曲线计算各样品中IL-6、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子及IL-33、IL-25、TSLP等警报素的浓度,实验数据以平均值 $\pm$ 标准差。

1.3.7 蛋白免疫印迹检测目标蛋白表达量

为检测紧密连接蛋白ZO-1、Occludin及Claudin-1的表达水平,将处理后的细胞用预冷PBS洗涤,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,冰上裂解30 min。随后在4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心15 min,收集上清液。采用BCA法测定蛋白浓度,并将各组样品浓度统一,蛋白样品置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取等量蛋白(30 μg)与5 $\times$ 上样缓冲液混匀,95 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸10 min,经SDS-PAGE电泳分离后转印至PVDF膜。用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,依次加入相应一抗(稀释比例1:1 000)及HRP标记的二抗(稀释比例1:5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST洗膜3次后,使用ECL化学发光系统显影并检测目的蛋白条带。

1.3.8 数据分析

所有样品测定均重复3次,数据均表示为平均值 $\pm$ 标准偏差,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)评估组间显著性差异,统计分析通过GraphPad Prism 10.3.0完成, $P<0.05$ 处的差异被认为具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 Bomb m 6对Caco-2和HT-29细胞存活率的影响

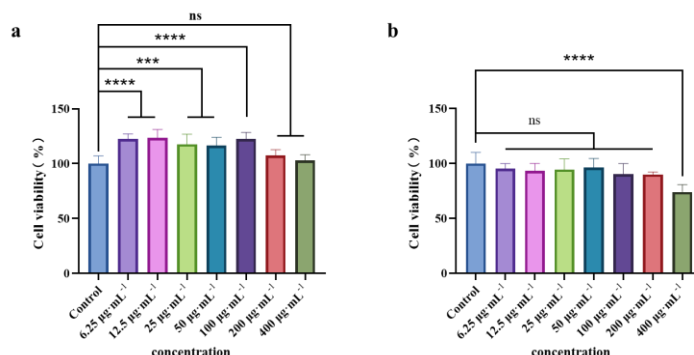


图1 Bomb m 6对Caco-2和HT-29两种细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of Bomb m 6 on the Viability of Caco-2 and HT-29 Cells

注:(a)不同浓度的Bomb m 6对Caco-2细胞存活率的影响;(b)不同浓度的Bomb m 6对HT-29细胞存活率的影响。

**** $P<0.0001$, *** $P<0.001$, ns表示无显著差异。

本文选用 Caco-2 和 HT-29 两种细胞用于肠道屏障功能的研究^[21-24]。为排除 Bomb m 6 自身引起的细胞毒性对后续实验的影响, 首先采用 CCK-8 法初步探索 Bomb m 6 的给药浓度, 结果如图 1 所示。

本文首先考察了不同浓度梯度的 Bomb m 6 对 Caco-2 与 HT-29 细胞活力的影响。结果表明, 在设定的浓度范围内, Bomb m 6 对 Caco-2 细胞无明显细胞毒性, 细胞存活率未出现显著下降 (图 1a)。而对于 HT-29 细胞, 当 Bomb m 6 质量浓度升高至 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞活力受到显著抑制 (图 1b)。基于上述细胞毒性预实验结果, 本研究将后续实验的最高给药质量浓度确定为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以避免非特异性毒性干扰。为进一步探究 Bomb m 6 作用的剂量效应关系, 最终选取 50、100 和 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为低、中、高三个浓度梯度开展后续实验。

2.2 Bomb m 6 可诱导 Caco-2 和 HT-29 细胞炎症因子的释放

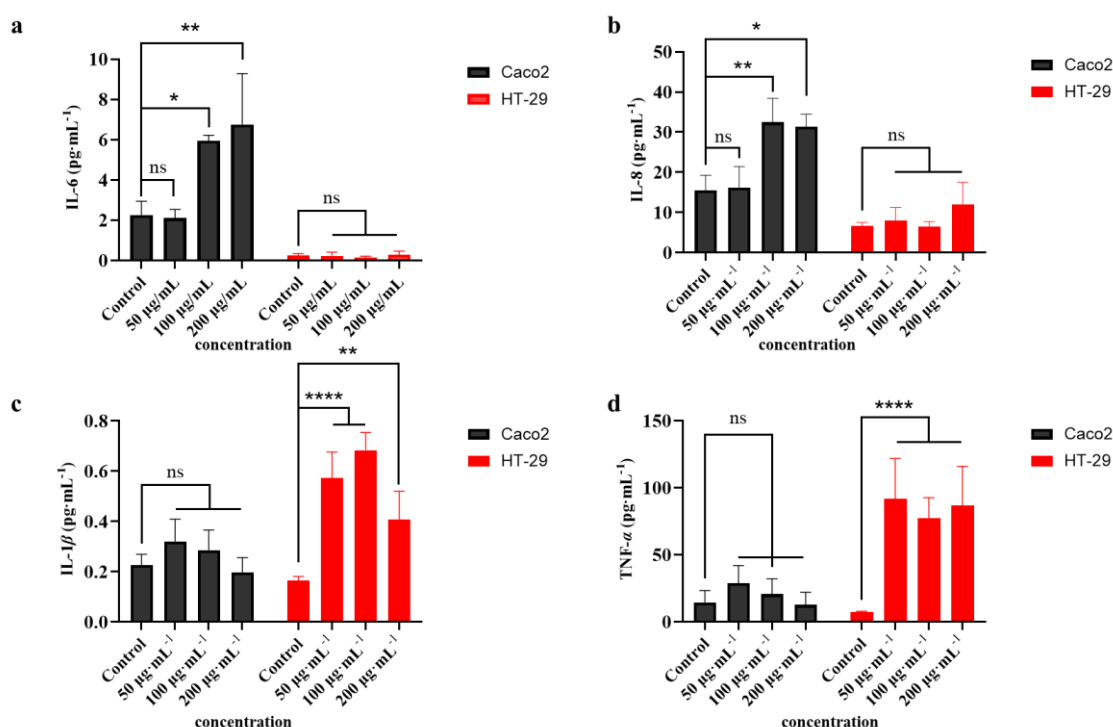


图 2 Bomb m 6 对 Caco-2 和 HT-29 两种细胞的炎症因子水平的影响

Fig.2 Effects of Bomb m 6 on Inflammatory Cytokine Levels in Caco-2 and HT-29 Cells

注: Caco-2 和 HT-29 细胞上清中 IL-6 的含量 (a); Caco-2 和 HT-29 细胞上清中 IL-8 的含量 (b); Caco-2 和 HT-29 细胞上清中 IL-1β 的含量 (c); Caco-2 和 HT-29 细胞上清中 TNF-α 的含量 (d)。**** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns 表示无显著差异。

当抗原暴露伴随上皮屏障损伤时, 受损上皮细胞会释放促炎因子^[25-27]。因此本文采用 ELISA 试剂盒测试了 Bomb m 6 对 Caco-2 和 HT-29 两种细胞的炎症因子水平的影响, 结果如图 2 所示。

如图所示, Bomb m 6 对 Caco-2 和 HT-29 两种肠道上皮细胞的炎症因子分泌具有显著的细胞特异性调控作用: 在 Caco-2 细胞中, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 可显著上调 IL-6 分泌水平, 分别从对照组的 $2.20 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 升至 $6.00 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $6.80 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 同时 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 可显著促进 IL-8 分泌, 分别从对照组的 $15.30 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 升至 $32.50 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $31.20 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 对 IL-6、IL-8 分泌无显著影响, 且各浓度 Bomb m 6 对 Caco-2 细胞 IL-1β、TNF-α 的分泌均无显著诱导作用; 在 HT-29 细胞中, Bomb m 6 可显著诱导多种促炎因子的分泌, 其中 50、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 可使 IL-1β 水平从对照组的 $0.15 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 分别升至 0.57 、 $0.67 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 IL-1β 水平为 $0.40 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 同时 50、100、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 可显著上调 TNF-α 分泌, 分别从对照组的 $3.20 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 升至 91.20 、 76.50 、 $87.30 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而各浓度 Bomb m 6 对 HT-29 细胞 IL-6、IL-8 的分泌无显著影响, 整体表明 Bomb m 6 可选择性诱导肠道上皮细胞的促炎反应, 且 HT-29 细胞对 Bomb m 6 的炎症刺激敏感性显著高于 Caco-2 细胞。结果与以往报道的体内实验结果共同表明了食物过敏会导致细胞炎症因子水平上升^[28,29]。

2.3 Bomb m 6 可增加 Caco-2 和 HT-29 细胞警报素的分泌

在肠道屏障功能受损的病理过程中, 肠上皮细胞会主动分泌 IL-33、IL-25、TSLP 等上皮源性警报素, 这些分子可通过激活 2 型固有淋巴细胞 (ILC2s) 和 Th2 细胞, 启动并放大过敏性炎症反应, 是食物过敏等肠道过敏性疾病的关键启动环节^[30,31]。基于这一核心机制, 本研究在检测炎症因子的基础上, 进一步分析了 Bomb m 6 处理后细胞上清中警报素的分泌水平。实验结果如图 3 所示: 与对照组相比, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 干预可显著上调 Caco-2 和 HT-29 细胞中 IL-33 的分泌量; 同时, 该质量浓度处理可特异性诱导 Caco-2 细胞 IL-25 的水平升高至 2.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。综合炎症因子与警报素的检测结果, Bomb m 6 能够同时促进 Caco-2 和 HT-29 细胞释放炎症介质与上皮源性警报素, 从炎症激活与屏障损伤两个层面, 提示其可能破坏肠道屏障完整性、诱发过敏性炎症的潜在致病作用。

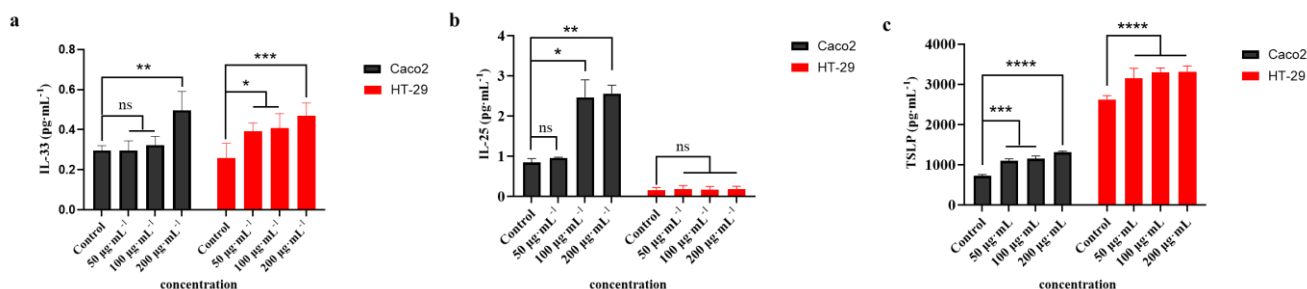


图 3 Bomb m 6 对 Caco-2 和 HT-29 两种细胞的警报素分泌水平的影响

Fig.3 Effects of Bomb m 6 on the secretion levels of alarmins in Caco-2 and HT-29 cells

注: Caco-2 和 HT-29 细胞上清中 IL-33 的含量 (a); Caco-2 和 HT-29 细胞上清中 IL-25 的含量 (b); Caco-2 和 HT-29 细胞上清中 TSLP 的含量 (c)。**** $P<0.0001$, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, ns 表示无显著差异。

2.4 Bomb m 6 对体外肠道上皮屏障模型通透性的影响

为更直观地揭示 Bomb m 6 对肠道上皮屏障的作用效应, 本研究采用 Caco-2/HT-29 细胞共培养体系构建体外肠道上皮屏障模型, 以此评估 Bomb m 6 对屏障功能的影响。如图 4 所示, 在 Bomb m 6 刺激 4 h 内, 各处理组 FITC-Dextran 的跨膜渗透量与对照组相比均无统计学差异。随着处理时间延长至 24 h, 各组渗透量均呈现不同程度升高, 其中 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 处理组的 FITC-Dextran 渗透量 ($5.21\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) 较空白对照组 ($2.13\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) 显著上升 2.4 倍。表观渗透系数 (Papp) 是评价体外肠道屏障完整性的关键量化指标^[32], 进一步计算结果表明, 经 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 高质量浓度 Bomb m 6 处理 24 h 后, 相较于对照组 Papp 值显著升高 2.5 倍, 提示高剂量 Bomb m 6 可明显增加肠道上皮屏障的通透性, 破坏屏障结构与功能完整性。

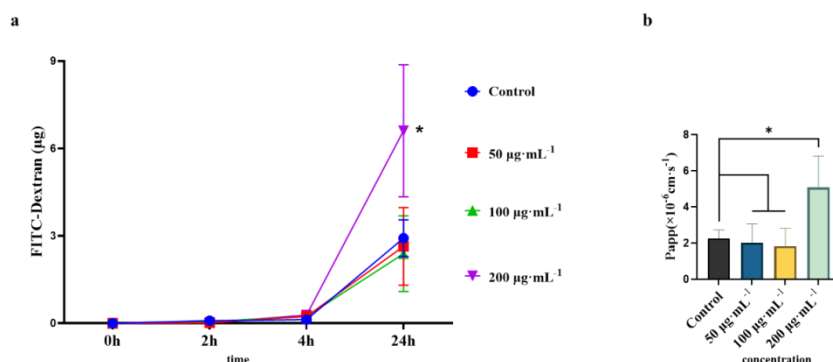


图 4 Bomb m 6 处理对体外肠道上皮屏障模型的影响

Fig.4 Impact of Bomb m 6 on the Intestinal Epithelial Barrier Function In Vitro

注: 不同浓度的 Bomb m 6 处理 2 h, 4 h 和 24 h 时的 FITC-Dextran 的渗透量 (a); 不同浓度的 Bomb m 6 处理 2 h 时体外肠道上皮屏障模型的 Papp 值 (b)。* $P<0.05$,

2.5 Bomb m 6 对体外肠道上皮屏障模型炎症因子水平的影响

鉴于 Bomb m 6 可显著上调 Caco-2 与 HT-29 细胞中 IL-6、IL-8、IL-1 β 及 TNF- α 等炎症因子的释放, 本研究

进一步在 Caco-2/HT-29 体外共培养的肠上皮屏障模型中检测了上述炎症因子的分泌水平。如图 5 所示, Bomb m 6 处理可显著上调体外肠道上皮屏障模型中促炎因子 IL-6、IL-8 的分泌水平, 对 IL-1 β 、TNF- α 无显著影响: 与对照组相比, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 可使 IL-6 水平从 12.30 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 显著升高至 27.10 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 IL-6 水平为 20.80 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 (14.50 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与对照组无显著差异; 同时, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 可使 IL-8 水平从 58.20 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 显著升高至 95.70 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 (89.30 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 (81.50 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与对照组相比差异均有统计学意义; 而各质量浓度 Bomb m 6 处理后, IL-1 β 水平 (对照组 0.14 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 0.13 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 0.14 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 0.13 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、TNF- α 水平 (对照组 4.00 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 3.70 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 3.00 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 3.50 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 均无显著变化, 表明 Bomb m 6 可选择性诱导体外肠道上皮屏障模型的 IL-6、IL-8 炎症反应。其中 Caco-2 细胞更倾向于释放 IL-6 与 IL-8, 由此推测共培养模型中显著升高的 IL-6 和 IL-8 主要来源于经 Bomb m 6 刺激活化的 Caco-2 细胞。

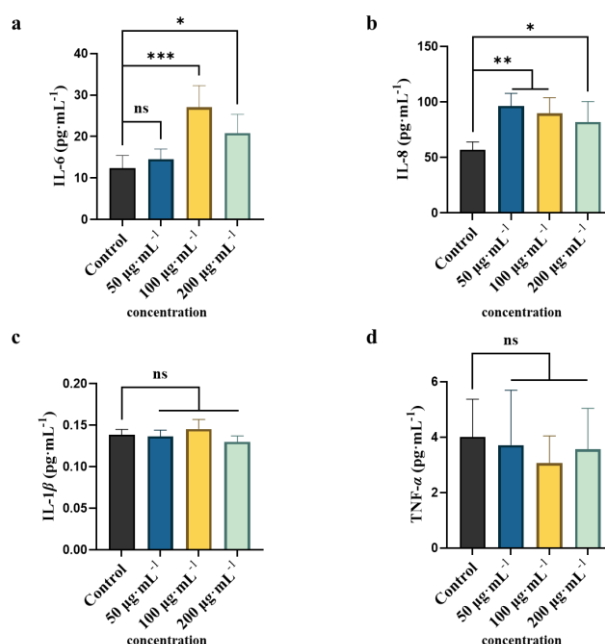


图 5 Bomb m 6 处理对体外肠道上皮屏障模型炎症因子水平的影响

Fig.5 Effects of Bomb m 6 on Inflammatory Cytokine Levels in an In Vitro Intestinal Epithelial Barrier Model

注: 上清中 IL-6 的含量检测结果 (a); 上清中 IL-8 的含量检测结果 (b); 上清中 IL-1 β 的含量检测结果 (c); 上清中 TNF- α 的含量检测结果 (d)。*** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, ns 表示无显著差异。

2.6 Bomb m 6 对体外肠道上皮屏障模型警报素水平的影响

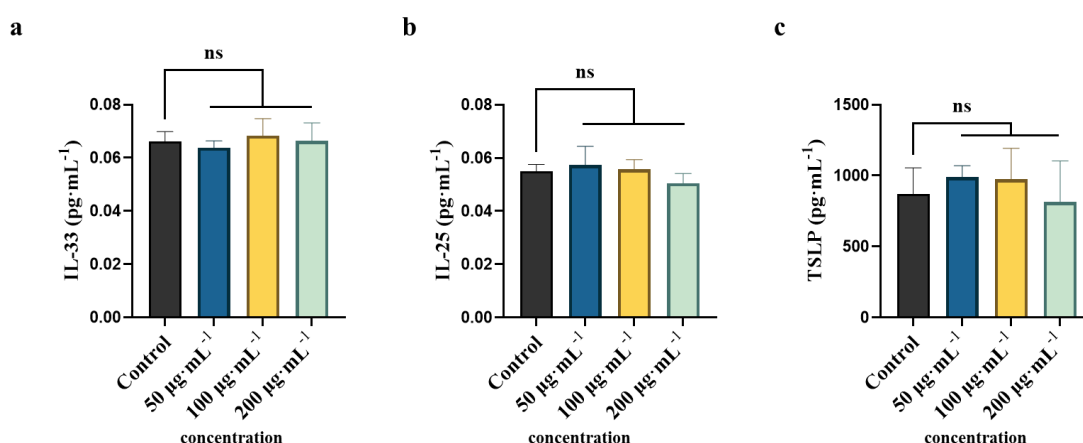


图 6 Bomb m 6 对体外肠道上皮屏障模型警报素水平的影响

Fig.6 Effects of Bomb m 6 on Alarmin Levels in an In Vitro Intestinal Epithelial Barrier Model

注：体外肠道上皮屏障模型 IL-33 的含量检测结果 (a)；体外肠道上皮屏障模型 IL-25 的含量检测结果 (b)；体外肠道上皮屏障模型 TSLP 的含量检测结果 (c)，ns 表示无显著差异。

本文进一步对共培养单层细胞模型中警报素水平进行了检测。结果显示 (图 6)，经处理后，三种警报素水平均无显著变化。该结果提示，在 Caco-2/HT-29 共培养构建的肠道屏障模型中，Bomb m 6 对 IL-33、IL-25 和 TSLP 的诱导作用并不显著，其屏障损伤效应可能主要表现为 IL-6、IL-8 等炎症因子升高及紧密连接蛋白表达下降。与单培养模型相比，共培养体系中细胞间旁分泌调节、屏障结构形成及黏液样保护作用可能共同影响 Bomb m 6 诱导警报素释放的程度。

2.7 Bomb m 6 对体外肠道上皮屏障模型紧密连接蛋白的影响

现有研究表明，炎症因子可通过调控紧密连接蛋白 (Tight Junction Proteins, TJPs) 的表达与功能，破坏肠上皮细胞间的紧密连接结构，进而导致肠道屏障通透性异常增高^[33]。基于上述机制，本研究检测了 ZO-1、Occludin 及 Claudin-1 三种核心紧密连接蛋白的表达水平。结果如图 7 所示，经 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 处理后，三种蛋白的表达量均出现显著下调，提示 Bomb m 6 可通过抑制体外肠上皮屏障模型中紧密连接蛋白的表达，破坏细胞间连接结构，最终导致屏障通透性增加。

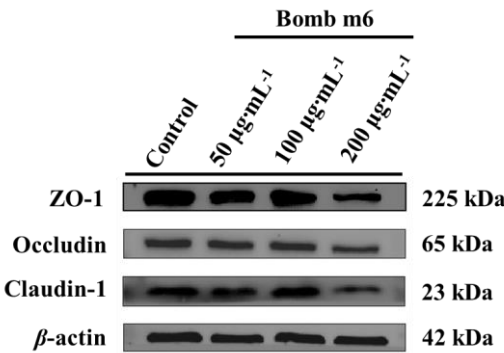


图 7 Bomb m 6 对体外肠道上皮屏障模型的紧密连接蛋白表达水平的影响

Fig.7 Effects of Bomb m 6 on TJPs Expression in the In Vitro Intestinal Epithelial Barrier Model

2.8 本研究的局限性

需要指出的是，本研究仍存在一定局限性。首先，本文主要基于 Caco-2、HT-29 单培养细胞及 Caco-2/HT-29 共培养肠道上皮屏障模型开展实验，虽然该模型可用于初步评价 Bomb m 6 对肠上皮细胞炎症反应、屏障通透性及紧密连接蛋白表达的直接影响，但其仍属于体外简化模型，不能完全模拟体内肠道环境。真实肠道屏障不仅包括肠上皮细胞和杯状细胞，还涉及免疫细胞、肠道菌群、消化酶、黏液层动态更新以及神经-免疫调节等多种因素。因此，本文结果主要反映 Bomb m 6 对肠上皮屏障的直接损伤作用，尚不能完全等同于体内食物过敏发生过程。

其次，本研究尚未开展动物实验进行交叉验证，缺乏对 Bomb m 6 在体内是否能够诱导肠道屏障损伤、过敏性炎症反应及全身免疫应答的直接证据。后续研究可进一步建立 Bomb m 6 致敏动物模型，结合腹泻、体温变化、血清特异性 IgE、组胺、肥大细胞活化、肠组织病理学、炎症因子水平及紧密连接蛋白表达等指标，系统验证 Bomb m 6 在体内诱导食物过敏和肠道屏障损伤的作用。此外，也可进一步引入免疫细胞共培养体系或类器官模型，以更接近体内肠道免疫微环境，从而深入阐明 Bomb m 6 介导肠道屏障损伤及过敏反应的分子机制。

3 结论

综上所述，100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Bomb m 6 可使 Caco-2 细胞的 IL-6 和 IL-8 水平显著升高，而 Bomb m 6 的质量浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时会增加 HT-29 细胞 IL-1 β 和 TNF- α 水平。200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bomb m 6 处理会使体外肠道上皮屏障模型的 Papp 增加 2.5 倍，并使其 IL-6 和 IL-8 的释放水平升高，同时下调其紧密连接蛋白的表达。以上结果表明，Bomb m 6 会诱导肠上皮细胞发生炎症，对肠道屏障中机械屏障的紧密连接产生影响。本文为蚕蛹过敏的预防诊断和治疗奠定了一定的研究基础，为进一步开发家蚕资源提供了重要的理论依据。

参考文献

- [1] BARTHA I, ALMULHEM N, SANTOS A F. Feast for thought: A comprehensive review of food allergy 2021-2023 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2024, 153(3): 576-594.
- [2] WARREN C M, JIANG J, GUPTA R S. Epidemiology and Burden of Food Allergy [J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2020, 20(2): 6.
- [3] AMIN K. The role of mast cells in allergic inflammation [J]. *Respir Med*, 2012, 106(1): 9-14.
- [4] YU W, FREELAND D M H, NADEAU K C. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(12): 751-765.
- [5] ANVARI S, MILLER J, YEH C Y, et al. IgE-Mediated Food Allergy [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2019, 57(2): 244-260.
- [6] D'SOUZA N, WEBER M, SARZINSZKY E, et al. The Molecular Allergen Recognition Profile in China as Basis for Allergen-Specific Immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 719573.
- [7] ASERO R, ANTONICELLI L. Does sensitization to foods in adults occur always in the gut? [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 154(1): 6-14.
- [8] XIONG Y, XU G, CHEN M, et al. Intestinal Uptake and Tolerance to Food Antigens [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 906122.
- [9] BERIN M C, SHREFFLER W G. TH2 adjuvants: Implications for food allergy [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 121(6): 1311-1320.
- [10] GROZDANOVIC M M, ČAVIĆ M, NEŠIĆ A, et al. Kiwifruit cysteine protease actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(3): 516-526.
- [11] ZUO L, KUO W T, TURNER J R. Tight Junctions as Targets and Effectors of Mucosal Immune Homeostasis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 10(2): 327-340.
- [12] RATCLIFFE N A, MELLO C B, GARCIA E S, et al. Insect natural products and processes: New treatments for human disease [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(10): 747-769.
- [13] YANG Y, TANG L, TONG L, et al. Silkworms culture as a source of protein for humans in space [J]. *Advances in Space Research*, 2009, 43(8): 1236-1242.
- [14] 张峰,张钟宁.食用昆虫资源的开发利用研究[J].*资源科学*,2001,2: 58-61.
- [15] KIM S A, KIM K-M, OH B-J. Current status and perspective of the insect industry in Korea [J]. *Entomological Research*, 2008, 38(s1): S79-S85.
- [16] JI K M, ZHAN Z K, CHEN J J, et al. Anaphylactic shock caused by silkworm pupa consumption in China [J]. *Allergy*, 2008, 63(10): 1407-1408.
- [17] ARAUJO L M L, FILHO N A R, RIEDI C A. Respiratory allergy to moth: the importance of sensitization to *Bombyx mori* in children with asthma and rhinitis [J]. *Jornal de Pediatria (Versão em Português)*, 2014, 90(2): 176-181.
- [18] YUE W, HUANG S, LIN S, et al. Purification, Immunological Identification, and Characterization of the Novel Silkworm Pupae Allergen *Bombyx mori* Lipoprotein 3 (Bom m 6) [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(36): 13527-13534.
- [19] LIAN P, BRABER S, VARASTEY S, et al. Hypoxia and heat stress affect epithelial integrity in a Caco-2/HT-29 co-culture [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13186.
- [20] HU W, FENG P, ZHANG M, et al. Endotoxins Induced ECM-Receptor Interaction Pathway Signal Effect on the Function of MUC2 in Caco2/HT29 Co-Culture Cells [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 16933.
- [21] WEI C X, WU J H, HUANG Y H, et al. *Lactobacillus plantarum* improves LPS-induced Caco2 cell line intestinal barrier damage via cyclic AMP-PKA signaling [J]. *PLoS One*, 2022, 17(5): e0267831.
- [22] QU N, CHEN L, LIANG S, et al. Roxadustat Attenuates the Disruption of Epithelial Tight Junction in Caco2 Cells and a Rat Model of CKD Through MicroRNA-223 [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 850966.
- [23] YANG Y J, KIM M J, LEE H J, et al. *Ziziphus jujuba* Miller Ethanol Extract Restores Disrupted Intestinal Barrier Function via Tight Junction Recovery and Reduces Inflammation [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(5): 13050575.
- [24] MILNER A J, ANUJAN P, FROST G S, et al. D- and L-Lactate enhance intestinal barrier function via activation of an apical HCAR1/Gai pathway in a human colonic epithelial cell model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2026, 195: 119041.
- [25] YU W, FREELAND D M H, NADEAU K C. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy [J]. *Nature Reviews*

- Immunology, 2016, 16(12): 751-765.
- [26] OGULUR I, MITAMURA Y, YAZICI D, et al. Type 2 immunity in allergic diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2025, 22(3): 211-242.
- [27] PAT Y, YAZICI D, D'AVINO P, et al. Recent advances in the epithelial barrier theory [J]. Int Immunol, 2024, 36(5): 211-222.
- [28] ZHU Q, WANG J, MA J, et al. Changes in inflammatory factors in the Brown Norway rat model of food allergy [J]. BMC Immunol, 2021, 22(1): 8.
- [29] LIU C, CHEN C, YAN X, et al. Assessment of immune responses and intestinal flora in BALB/c mice model of wheat food allergy via different sensitization methods [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(3): 871-881.
- [30] PAUL W E, ZHU J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? [J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(4): 225-235.
- [31] DIVEKAR R, KITA H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2015, 15(1): 98-103.
- [32] WANG Y, BAI X, HU B, et al. Transport Mechanisms of Polymannuronic Acid and Polygluronic Acid Across Caco-2 Cell Monolayers [J], 2020, 12(2): 167.
- [33] LIU Y, YU G, ZHANG R, et al. Early life exposure to low-dose perfluorooctane sulfonate disturbs gut barrier homeostasis and increases the risk of intestinal inflammation in offspring [J]. Environmental Pollution, 2023, 329: 121708.