

荔枝类甜蛋白的体外消化吸收特性 及其对肠道屏障的调节作用

文舜华, 曾诗蔼, 王凯, 刘旭炜, 胡卓炎, 赵雷*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 荔枝类甜蛋白 (LcTLP) 被认为是荔枝食物不耐受反应的重要相关蛋白, 本研究旨在探究其体外消化吸收特性及其对肠道屏障功能和肠道微环境的潜在影响。通过构建 Caco-2 单层细胞模型、RAW264.7 巨噬细胞炎症模型及伪无菌小鼠模型, 系统分析 LcTLP 消化产物的跨膜转运能力和免疫激活效应, 并观察菌群耗竭背景下 LcTLP 干预后的肠道表型和代谢响应。结果表明, 体外消化后的 LcTLP 在 Caco-2 模型中的表观吸收率为 $24.53\% \pm 1.45\%$, 提示其具有一定跨上皮转运能力; 其跨膜吸收产物 ($50 \sim 200 \text{ ng mL}^{-1}$) 可促进 RAW264.7 巨噬细胞释放 NO, 分泌量增至 $9.19 \sim 12.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 达空白组的 $1.80 \sim 2.43$ 倍, 说明消化和跨膜转运后仍可能保留促炎活性。进一步采用伪无菌小鼠模型观察菌群耗竭背景下 LcTLP 干预后的肠道表型和代谢响应。结果显示, LcTLP 处理可引起粪便 pH 值升高和 SCFAs 水平下降, 提示其可能影响结肠微生态代谢稳态。综上, LcTLP 可能通过跨屏障免疫激活及肠道微环境扰动共同参与机体应激反应。

关键词: 荔枝类甜蛋白; 体外消化; 跨膜吸收; 伪无菌小鼠; 免疫应激

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0803

In Vitro Digestion and Absorption Characteristics of Litchi Thaumatococcus Protein (LcTLP) and Its Regulatory Effects on The Intestinal Barrier in Pseudoseptic Mice

WEN Shunhua, ZENG Shiai, WANG Kai, LIU Xuwei, HU Zhuoyan, ZHAO Lei*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Litchi thaumatococcus protein (LcTLP) has been identified as a predominant contributor to "Shanghuo". This study aimed to investigate the in vitro digestion and absorption characteristics of LcTLP and its regulatory effects on the intestinal barrier. By establishing a Caco-2 monolayer cell model, a RAW264.7 macrophage inflammation model, and a pseudo-germ-free mouse model, the transmembrane transport capacity and immune-activating effects of LcTLP were systematically analyzed, the regulatory effects of intestinal microbiota on LcTLP-induced intestinal morphological and metabolic alterations were also elucidated. The results indicated that in vitro digested LcTLP was absorbed at a rate of 24.53% in the Caco-2 model and was capable of penetrating the intestinal epithelial barrier effectively. Its absorbed products ($50 \sim 200 \text{ ng mL}^{-1}$) were found to directly induce NO release from macrophages, with secretion levels elevated to $9.19 \sim 12.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($1.80 \sim 2.43$ -fold of the control), indicating retained pro-inflammatory activity. Further, the pseudo-germ-free mouse model was used to observe the intestinal phenotype and metabolic response after LcTLP intervention under the background of microbiota depletion. The results showed that LcTLP treatment could induce an increase in fecal pH value and a decrease in the level of short-chain fatty acids (SCFAs), suggesting that LcTLP may affect the metabolic homeostasis of colonic microecology. In conclusion, LcTLP may jointly participate in the body's stress response through trans-barrier immune activation and intestinal microenvironment perturbation.

Key words: litchi thaumatococcus protein; in vitro digestion; transmembrane absorption; pseudoseptic mice; immune stress

收稿日期: 2026-05-26; 修回日期: 2026-07-10; 接受日期: 2026-07-13

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2024YFD1600300)、广东省现代农业产业技术体系创新团队 (2026CXTD19)、广东省自然科学基金-面上项目 (2023A1515012599)

作者简介: 文舜华 (2000-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: wingo974@163.com

通讯作者: 赵雷 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: z100700@163.com

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 作为岭南地区极具代表性的特色大宗水果, 因其独特的风味与丰富的生物活性成分而备受青睐^[1]。然而, 过量食用荔枝常诱发口舌生疮、喉咙肿痛及全身性炎症应激等临床症状, 这一典型的食物不耐受现象已成为制约荔枝产业高值化扩张与鲜果消费的关键瓶颈。

团队前期通过免疫学评价与结构筛选证实, 荔枝类甜蛋白 (Litchi Thaumatin-Like Protein, LcTLP) 是诱发机体炎症级联反应的核心免疫原^[2]。作为一种典型的大分子促炎蛋白, LcTLP 具有富含二硫键的球形构象, 这种特殊的分子结构赋予了其优异的热稳定性及极强的消化道蛋白酶耐受性^[3-5]。这种理化抗性暗示 LcTLP 在肠道运输过程中可能保留了关键的免疫活性表位, 而非被彻底降解为无活性的氨基酸或寡肽^[6]。目前, 关于膳食蛋白诱发机体损伤的机制研究多聚焦于“肠道菌群-代谢轴”, 即膳食组分通过重塑微生态结构、干扰短链脂肪酸 (Short-Chain Fatty Acids, SCFAs) 等代谢产物水平诱导宿主慢性炎症^[7,8]。然而, 越来越多的研究提示, 部分具有高度结构稳定性的膳食蛋白及其消化片段, 具备直接穿透肠粘膜屏障并作为外源性免疫信号激活宿主免疫系统的潜力, 这种“非菌群依赖性”的炎症通路在急性食物不耐受及早期免疫应激中可能占据重要地位^[9,10]。团队前期通过异硫氰酸荧光素 (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) 荧光标记结合活体成像技术, 系统追踪了 LcTLP 口服后的代谢动力学特征, 发现其可通过小肠吸收直接抵达肝脏诱导炎症反应^[11], 但其在剥离肠道菌群代谢干扰后是否仍能独立激活宿主免疫系统, 目前尚缺乏机理支撑。

基于蛋白结构表征发现, LcTLP 的分子结构中含有 16 个半胱氨酸残基形成的 8 个二硫键, 使其具有较好的耐酸、碱、热等作用的特点, 在消化道中具有极强的耐受性, 难以被彻底酶解^[12,13]。虽有研究提示 LcTLP 可能干扰肠道菌群稳态, 但该蛋白作为一种中等分子量的活性物质, 其在体内全过程的生物利用度, 特别是其能否跨越肠上皮屏障直接作用于宿主免疫系统, 目前尚缺乏直接证据^[14]。以往研究多侧重于菌群代谢介导的间接损伤, 忽略了蛋白片段可能具备的直接免疫原性及其在进入循环系统后的系统性调控规律。

鉴于此, 本研究拟构建 Caco-2 细胞单层模型, 在模拟肠道生理屏障的基础上, 系统评估 LcTLP 及其消化产物的跨膜吸收特征; 同时, 通过建立基于抗生素联合干预的菌群耗竭小鼠模型, 观察 LcTLP 在菌群耗竭背景下对肠道屏障、宿主表型及肠道代谢产物的影响, 从而为分析 LcTLP 直接吸收作用与肠道微生态变化之间的关系提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡嘴荔品种荔枝, 由茂名市果园提供。小鼠巨噬细胞系 RAW264.7, 人结直肠腺癌细胞 Caco-2, 中国科学院细胞库; DMEM 培养基、青霉素、硫酸链霉素, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 胎牛血清, Gibco; BCA 蛋白定量试剂盒、细胞计数盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8), 上海碧云天生物技术有限公司; NO 测定试剂盒, 南京建成生物科技有限公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SpectraMax i3x 型多功能酶标仪, 奥地利 Molecular Devices 公司; IVIS Lumina III 型活体成像系统, PerkinElmer; Nikon Eclipse E100 型倒置荧光显微镜, 日本尼康; ZEISS Axio Imager D2 型正置荧光显微镜, 德国蔡司; BPN-150CW 型细胞培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; SW-CJ-1D 型无菌操作台, 苏州净化设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 荔枝类甜蛋白 (LcTLP) 与异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联荔枝类甜蛋白 (F-LcTLP) 的制备

1.3.1.1 LcTLP 的分离纯化

LcTLP 的分离纯化参考陈慧芳^[12]。荔枝去皮去核后打浆, 加入 3 倍重量 (m/m) 的常温丙酮搅拌均匀, 得到的沉淀物用丙酮-乙醚 (1:1 V/V) 混合液洗涤; 将该沉淀用液氮研磨, 加入 20 倍 0.01 mol L^{-1} 磷酸钾缓冲液 (含有 $0.15 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$, pH 值 7.4), 在 4°C 震荡提取 1 h, 过滤离心 (4°C , $10\,000 \text{ r min}^{-1}$, 10 min), 得到的上清液透析 (截留分子量 14 kDa), 真空冷冻干燥, 得到荔枝粗蛋白; 将荔枝粗蛋白配制成 20 mg mL^{-1} 的溶液, 用不同饱和度的硫酸铵 (20%, 40%, 60%, 80%) 逐级沉淀, 收集 60% 和 80% 的沉淀复溶, 冻干得到 LcTLP, 并保存在 -20°C 。

1.3.1.2 F-LcTLP 的制备

根据 Shah 等^[15]的方法建立荧光素标记 LcTLP 的方法体系, 稍作修改。称取 200 mg LcTLP 溶解在 pH 值 8.5 的 NaHCO_3 溶液, 配置 3 mg mL^{-1} 溶液; 称取 67 mg FITC 溶解在 NaHCO_3 溶液 (pH 值 8.5), 配置成 5 mg mL^{-1} 溶液。向 LcTLP 溶液中缓慢滴入 FITC 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光搅拌 24 h。反应结束后, 3 500 r min^{-1} 离心 10 min, 弃去沉淀收集上清液, 流水透析, 收集透析液利用超滤 (3 000 Da) 5 000 r min^{-1} 离心 10 min, 填补相同体积的一级水至上液, 重复离心操作, 直至下液无 FITC 存在。冻干上液即可得到 FITC 偶联的 LcTLP, 命名为 F-LcTLP, 置于干燥皿内避光保存。

1.3.2 模拟胃肠道消化

用 0.1 mol L^{-1} 的 HCl 溶液配制质量浓度为 5% 的 LcTLP 蛋白溶液, 以 1:100 的比例加入胃蛋白酶 (酶重:蛋白重), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 120 min, 随后用 1 mol L^{-1} 磷酸盐缓冲液调至溶液 pH 值为 8.0, 以 1:100 的比例加入胰蛋白酶 (酶重:蛋白重), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 120 min, 消化液用 1 mol L^{-1} 的 NaOH 溶液调节至 pH 值 7.0 终止反应, 300 Da 的透析袋透析, 冷冻干燥后得到 LcTLP 消化物, 命名为 X-LcTLP, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用^[16]。

1.3.3 细胞模型及实验方法

1.3.3.1 Caco-2 细胞培养

细胞培养的方法参考 Hu 等^[17]。当 Caco-2 细胞生长至 80%~90% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 4~5 min, 按照 1:3 的比例进行传代, 细胞的代数在 30~40 之间时用于吸收实验。采用 CCK-8 试剂盒测定 X-LcTLP 对 Caco-2 细胞活性的影响, 将细胞以每孔 200 μL , 密度为 5×10^5 个 mL^{-1} 接种于 96 孔板, 并在培养箱中孵育 24 h。移除培养基后分别添加 HBSS 稀释的 250、500、1 000、2 000 ng mL^{-1} 浓度的 X-LcTLP, 孵育 2 h。根据 CCK-8 试剂盒说明书进行活性测定。

1.3.3.2 Caco-2 单层细胞模型

细胞模型建立的方法参考 Mortensen 等^[18], 并稍作修改。Caco-2 细胞消化后制备成密度为 2×10^5 个 mL^{-1} 的细胞悬液, 接种到 12 孔 Transwell 板上, 随即向 Transwell 培养小室的顶侧 (apical side, AP) 加入 0.5 mL 细胞悬液, 接种量为每孔 1×10^5 个, 向底侧 (Basolateral side, BL) 加入 1.5 mL 完全培养基, 培养于 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 90% 的 CO_2 培养箱中, 直至第 21 天。

1.3.3.3 Caco-2 细胞转运模型

将培养 21 天后的 Caco-2 细胞膜用预热的 HBSS 缓冲液清洗 3 遍, 第 3 遍放入培养箱中平衡 30 min, 以除去细胞膜上的杂质。吸去 HBSS 缓冲液, 向 AP 侧加入 0.5 mL 浓度为 1 000 ng mL^{-1} 的 X-LcTLP, 向 BL 侧加入 1.5 mL 新鲜 HBSS 缓冲液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养 2 h, 分别收集 AP 侧和 BL 侧样品, 得到 X-LcTLP 的跨膜吸收产物, 命名为 S-LcTLP, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。转运实验结束后, 分别收集 AP 侧和 BL 侧样品, 采用 BCA 蛋白定量法测定样品中 X-LcTLP 相关蛋白浓度, 并以未加样 Transwell 体系作为空白背景进行扣除。X-LcTLP 的表观吸收率按以下公式计算:

$$A = \frac{C_{BL}}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A——吸收率, %;

C_{BL} ——转运 2 h 后 BL 侧样品中 X-LcTLP 相关蛋白浓度, ng mL^{-1} ;

C_0 ——AP 侧初始给药浓度, 1 000 ng mL^{-1} 。

1.3.3.4 巨噬细胞炎症模型

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞采用 DMEM 完全培养基 (含 10% (V/V) 胎牛血清、100 U mL^{-1} 青霉素和 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 硫酸链霉素) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验。采用 CCK-8 试剂盒测定 S-LcTLP 对细胞活性的影响。将细胞以每孔 200 μL , 密度为 5×10^5 个 mL^{-1} 接种于 96 孔板, 并在培养箱中孵育 24 h。移除培养基后分别添加含 S-LcTLP (50、100、200 ng mL^{-1}) 的培养基, 孵育 24 h。以 1 000 ng mL^{-1} LPS 作为阳性对照组, 根据 CCK-8 试剂盒及 NO 试剂盒说明书分别进行活性及炎症水平测定。

1.3.4 动物实验方法

1.3.4.1 小肠组织切片的制备、染色及观察

将购买来的雄性 BALB/c 小鼠置于 18~24 °C, 相对湿度为 50% 的环境下适应性喂养一周。小鼠按照 100 mg kg⁻¹ 剂量灌胃 F-LcTLP, 2 h 后处死 ($n=3$)。参照 Li 等^[19]的方法制作小肠组织切片, 稍作修改。各收集 5 cm 十二指肠、空肠、回肠, 将染色完的组织切片置于无水乙醇中脱水 3 次, 每次 5 min, 之后置于二甲苯中浸泡 5 min 透明, 用含抗荧光猝灭剂的中性树胶进行封片。在 100 倍的正置荧光显微镜观察组织并进行拍照。

1.3.4.2 伪无菌小鼠模型的建立

伪无菌小鼠模型的建立参考 Olson 等^[20]将购买来的雄性 BALB/c 小鼠置于 18~24 °C, 相对湿度为 50% 的环境下适应性喂养一周, 将小鼠随机分成 3 组, 分别为 con 组、LcTLP 组和 ABX+LcTLP 组, 每组 10 只小鼠。其中, con 组灌胃蒸馏水, LcTLP 组灌胃 100 mg kg⁻¹ LcTLP, ABX+LcTLP 组作抗生素 (四联抗生素: 氨苄西林、新霉素、甲硝唑、万古霉素) 处理, 再灌胃等剂量的 LcTLP。为灭活正常小鼠 (Specific Pathogen Free, SPF) 肠道菌群, 每隔 12 h 用万古霉素 (50 mg kg⁻¹)、新霉素 (100 mg kg⁻¹) 和甲硝唑 (100 mg kg⁻¹) 的混合溶液对小鼠灌胃 1 次, 灌胃体积 10 mL kg⁻¹; 并在饮用水中加入氨苄西林 (1 mg mL⁻¹)。实验期间记录小鼠体重、采食量及粪便形态变化。实验结束后, 处死小鼠。无菌条件下采集结肠内容物用于短链脂肪酸 (SCFAs) 测定。

1.3.4.3 盲肠内容物的 SCFAs 水平以及粪便 pH 值、水分含量的测定

称取冻干后的粪便样品, 加入内标, 经乙醚萃取处理后, 利用气相色谱-质谱联用仪 (GC-FID) 测定短链脂肪酸 (乙酸、丙酸、丁酸等) 的含量。

仪器条件: 色谱柱: WAX, 进样口温度: 100 °C, 进样方式: 分流比 3:1, 升温程序: 30 °C 维持 2 min; 以 5 °C min⁻¹ 的速度升至 120 °C, 维持 2 min; 以 20 °C min⁻¹ 的速度升至 230 °C, 维持 3 min; 检测器: MS, 离子源温度: 200 °C, 接口温度: 250 °C, 进样量: 1 μ L。

用蒸馏水将粪便按 1:10 (m/V) 的比例稀释后, 用微量 pH 计测量 pH 值。收集小鼠新鲜粪便立即在液氮中冷冻后, 将粪便样品保存至 -80 °C 下, 备用。将小鼠的粪便样品置于 105 °C 烘箱中, 然后干燥至恒重, 记录干燥前后的粪便质量并根据公式 (1) 计算粪便水分含量。其中 FW 为原始样品的重量, DW 为干燥后样品的重量。

$$W = \frac{F_w - D_w}{F_w} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

W ——粪便水分含量, %;

F_w ——原始样品的重量, g;

D_w ——干燥后样品的重量, g。

1.4 数据分析

所有数据均采用 IBM SPSS Statistics Version 20.0 进行处理, Origin 2021 作图, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\text{mean} \pm \text{SD}$) 表示。采用单因素方差分析进行统计分析, 并使用 Tukey's 事后检验来确定均值之间的差异, $P < 0.05$ 视为具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 Caco-2 细胞模型的建立与评价

采用跨上皮电阻 (Trans epithelial Electrical Resistance, TEER)、荧光黄表观渗透系数 (Apparent Permeability Coefficient, Papp) 及碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, AKP) 活性分布三个维度对 Caco-2 细胞模型进行综合评价^[21]。如图 1a 所示, Caco-2 细胞在 Transwell 小室培养 21 d 后, 其 TEER 值稳定在 $1\,030 \pm 49 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上, 显著高于 $800 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ 的成模标准, 表明细胞单层膜已基本分化完成且连接紧密。进一步利用荧光黄对该模型进行通透性验证 (图 1b), 结果显示在 0~120 min 内, 其 Papp 值处于 $0.32 \pm 0.01 \sim 0.38 \pm 0.01 \times 10^{-6} \, \text{cm s}^{-1}$ 之间, 证明该模型能有效阻滞非特异性渗透, 具备良好的选择透过性。

此外, 通过测定刷状缘标志 AKP 的分布情况以表征细胞的分化极性^[22]。如表 1 所示, 培养至 21 d 时, AKP 表现出极显著的非对称分布, 其 AP 侧活性为 BL 侧的 8.45 倍。这一结果表明 AKP 已高度局限于细胞刷状缘侧, 证明细胞已完全分化出功能极性, 并具备吸收转运所需的载体与酶系统, 可用于后续吸收机制研究。

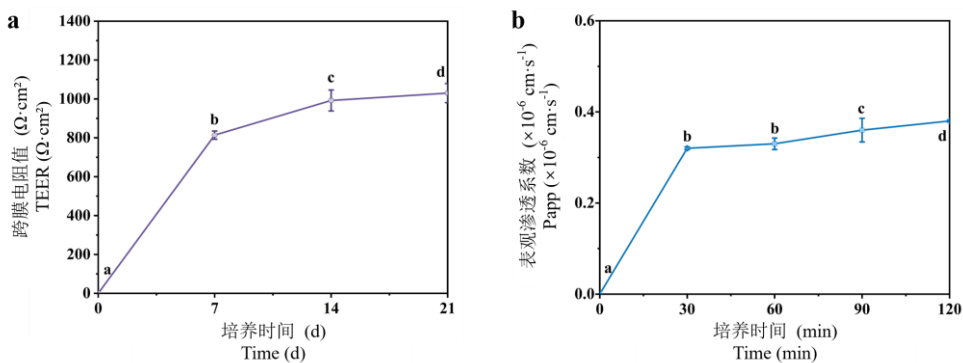


图1 Caco-2 细胞单层模型的完整性评价

Fig.1 Assessment of the integrity of the Caco-2 monolayer model

注：（a）Caco-2 细胞单层模型的跨膜电阻（TEER）；（b）荧光黄表观渗透系数（Papp）。图中 a、b、c、d 代表显著性差异（ $P<0.05$ ）。下图同。

表 1 不同培养时间下单层膜两侧碱性磷酸酶活力的变化

Table 1 Changes in alkaline phosphatase activity on both sides of a monolayer membrane at different incubation times

培养时间/天	AP 侧酶活力/金氏单位	BL 侧酶活力/金氏单位	AP 侧酶活/BL 侧酶活
7	0.869±0.017	0.171±0.011	5.08 ^a
14	1.101±0.021	0.198±0.005	5.56 ^b
21	1.530±0.013	0.181±0.010	8.45 ^c

注：表中同列右肩不同的小写字母 a、b、c 代表显著性差异（ $P<0.05$ ）；AKP：碱性磷酸酶。

2.2 Caco-2 细胞对荔枝类甜蛋白消化物（X-LcTLP）的吸收情况

图 2 是 X-LcTLP 对 Caco-2 细胞活性的影响。在 250~1 000 ng mL⁻¹ 浓度范围内，X-LcTLP 处理后的 Caco-2 细胞存活率均保持在 95%以上，与空白组相比无显著性差异（ $P>0.05$ ），表明该浓度区间对小肠上皮模型无明显的细胞毒性。当浓度提升至 2 000 ng mL⁻¹ 时，细胞活性受到显著抑制（存活率<75%）。因此，本研究选取无抑制作用的临界浓度 1 000 ng mL⁻¹ 作为后续跨膜转运实验的给药浓度。

X-LcTLP 经 Caco-2 细胞吸收实验后所得的吸收率结果如表 2 所示。样品经过 2 h 培养后，X-LcTLP 的吸收率为 24.53%±1.45%，提示其具有较强的跨膜通透性。依据膳食成分吸收评价标准，吸收率超过 20%即可界定为易吸收物质^[23]，这表明 X-LcTLP 具备穿透小肠屏障进入循环系统的可能。

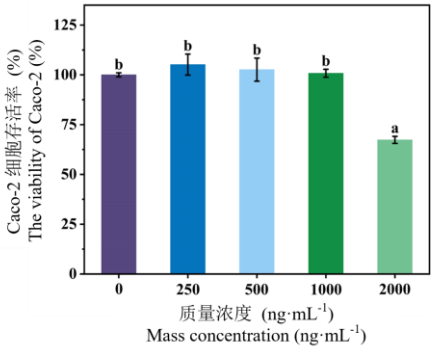


图 2 不同浓度 X-LcTLP 对 Caco-2 细胞活力的影响

Fig.2 The effect of different concentrations of protein digestives on the viability of Caco-2

表 2 Caco-2 对 X-LcTLP 的吸收率

Table 2 Absorption rate of LcTLP hydrolysate in Caco-2 cells

样品	AP 侧	BL 侧	吸收率/%
LcTLP 消化物	0.72±0.09	0.25±0.02	24.53±1.45

2.3 X-LcTLP 的跨膜吸收产物 (S-LcTLP) 对巨噬细胞免疫应答

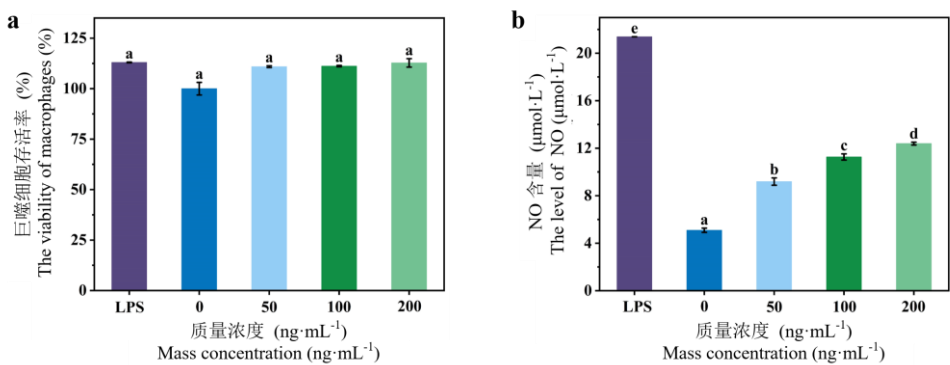


图 3 S-LcTLP 吸收产物对巨噬细胞活力和 NO 水平的影响

Fig.3 The effect of LcTLP absorption products on the viability of macrophages and the level of NO

通过 CCK-8 法评价了 S-LcTLP 对 RAW264.7 巨噬细胞活性的影响。如图 3a 所示，在 50~200 ng mL⁻¹ 浓度范围内，细胞存活率均保持在 95% 以上，与空白组相比无显著性差异，表明该吸收产物在此剂量范围内对巨噬细胞无显著毒害作用。然而，其对炎症标志物一氧化氮（NO）的分泌具有显著的诱导作用（图 3b）。结果显示，1 000 ng mL⁻¹ LPS 的 NO 分泌量为 21.39±0.01 μmol·L⁻¹，在 50~200 ng mL⁻¹ 浓度下，NO 分泌量随剂量增加分别显著提升至 9.19±0.31、11.26±0.26 和 12.39±0.12 μmol·L⁻¹，达空白组的 1.80~2.43 倍。表明经过跨膜吸收后的产物 S-LcTLP 仍具有较高的促炎活性，会诱导 RAW264.7 细胞产生炎症反应。明确的剂量效应关系提示，LcTLP 经过胃肠道消化及 Caco-2 单层膜跨膜转运后，仍保留了关键的致炎活性位点，这与其作为类甜蛋白家族成员所具备的高含量二硫键稳定性密切相关^[24]。

2.4 荧光标记荔枝类甜蛋白 (F-LcTLP) 在正常小鼠小肠组织中的空间分布及跨膜渗透行为

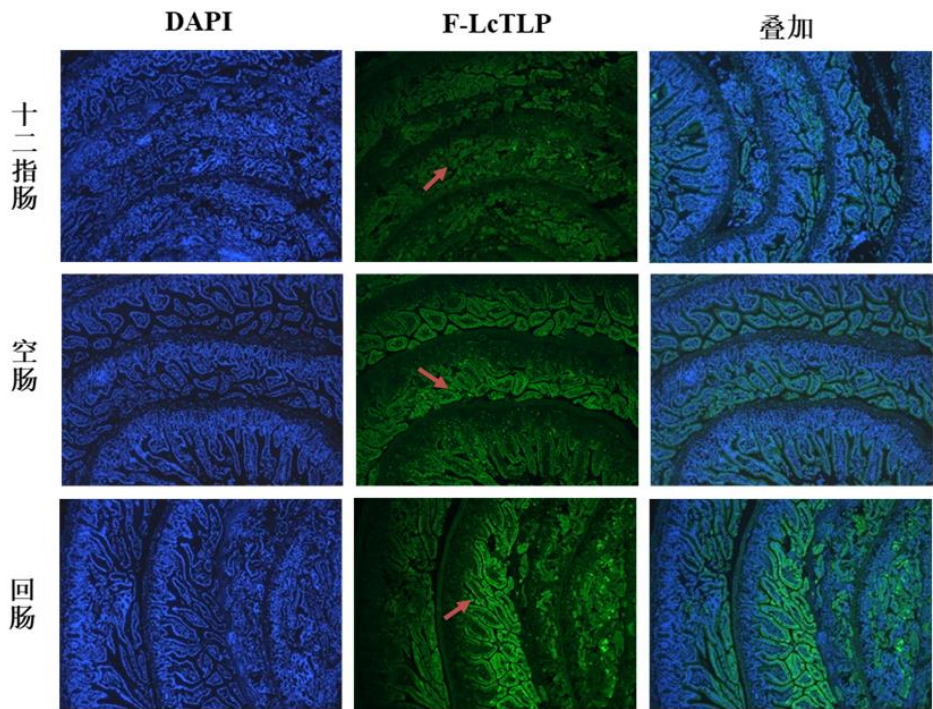


图 4 荧光标记荔枝类甜蛋白 (F-LcTLP) 在卷肠切片中的荧光分布

Fig.4 Fluorescence distribution of F-LcTLP in intestinal sections

前期基于 Caco-2 细胞模型的体外研究已初步证实，LcTLP 能够发生跨膜转运，且其转运吸收产物保留了显著

的促炎活性。为进一步在活体生理环境下验证这一吸收特性,本研究采用瑞士卷(Swiss roll)肠组织处理技术,通过免疫荧光定位考察了 F-LcTLP 在小肠不同节段(十二指肠、空肠及回肠)的渗透行为(图 4)。灌胃 2 h 后的结果显示,各肠段组织切片均呈现出不同程度的 F-LcTLP 绿色荧光信号。在十二指肠和空肠节段,荧光信号较弱且主要游离于绒毛边缘的管腔侧;而在回肠节段,则观察到强烈的荧光信号在绒毛基底部发生显著聚集。类似地, Li 等^[11]通过 FITC 标记 LcTLP,对小鼠进行活体荧光追踪,发现 F-LcTLP 在灌胃后可迅速富集于小肠,并在 2 h 左右于回肠区域呈现最强荧光信号。这种体内分布模式直观地表明,消化后的 LcTLP 能够逃避胃肠道的完全酶解,成功抵达小肠上皮并发生跨粘膜吸收,其中回肠是其实现体内摄取的主要生理靶区。

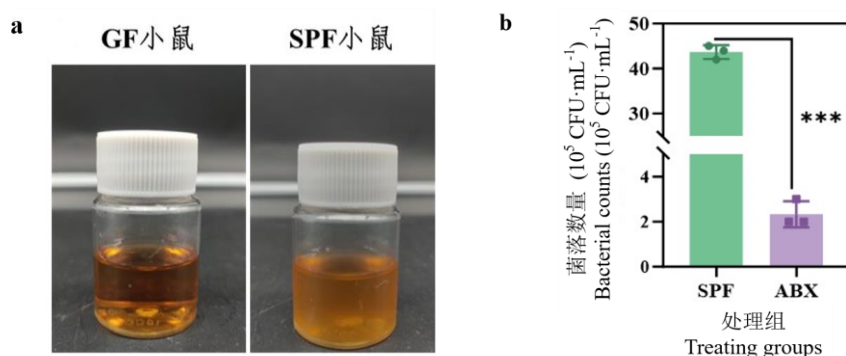
活体组织学证据与前期 Caco-2 模型中观察到的通透特性相互印证。F-LcTLP 表现出较强的回肠粘膜渗透能力,这可能与其特征及回肠独特的生理环境有关。首先,膳食蛋白必须克服肠表面的粘液屏障才能与上皮细胞接触^[25]。回肠段虽然具有相对深厚的粘液层,但其微环境可能更有利于某些具有特定表面电荷或疏水性结构的蛋白接近上皮表面。F-LcTLP 能够吸附于绒毛表面^[19,26,27],提示该蛋白可能具备一定黏膜滞留和跨屏障转运潜力。其次,回肠作为肠道免疫监视的重要区域,分布有派氏结及具有内吞活性的 M 细胞,这可能为稳定蛋白片段进入黏膜免疫相关结构提供窗口^[28]。体内外数据共同提示, LcTLP 在消化道内可能未被完全降解,其中一部分可突破肠道第一道防线进入黏膜相关区域,并与免疫细胞接触,从而参与巨噬细胞免疫应答^[29]。

2.5 LcTLP 对伪无菌小鼠生长性能及肠道内环境的影响

前期研究提示, LcTLP 经消化后可部分跨越小肠上皮屏障并表现出一定促炎活性。然而,未被小肠吸收而进入结肠远端的 LcTLP 残余物,其对宿主生理机能的潜在干预作用以及肠道共生菌群在该作用过程中扮演的生态学角色仍有待阐明。鉴于此,本研究利用广谱抗生素鸡尾酒疗法(氨苄西林、新霉素、万古霉素联合甲硝唑)构建菌群耗竭小鼠模型,旨在观察肠道菌群显著降低背景下 LcTLP 干预后的肠道表型和代谢响应(图 5)。模型评价结果显示,相较于正常菌群(SPF)小鼠粪便悬液培养基的浑浊表现(图 5a), GF 组呈现典型清亮透明特征;微生物定量分析(图 5b)进一步确证,抗生素(ABX)干预后小鼠粪便活菌数由 $(4.3 \pm 1.53) \times 10^6$ CFU/mL 显著降至 $(2.33 \pm 0.58) \times 10^5$ CFU/mL,菌群清除率达 94.67%,进一步证明了伪无菌小鼠模型的成功构建。

宿主表型分析显示, LcTLP 暴露导致小鼠体重增加量显著削减(LcTLP 组: 0.59 ± 0.44 g, 对照组: 1.31 ± 0.67 g);而 ABX 主导的微生态清除有效逆转了该生长迟缓现象,使 ABX+LcTLP 组增重代偿性恢复至 1.75 ± 0.86 g,该结果提示肠道菌群状态可能参与 LcTLP 相关生长表型变化。在肠道生理解剖学指标方面,各干预组粪便含水量均维持于正常生理基线(50%~70%,图 5d、e),且结肠长度($6.33 \pm 0.98 \sim 6.60 \pm 0.42$ cm)及盲肠指数未见统计学差异($P > 0.05$,图 6a~c)。上述结果提示, LcTLP 并未诱发结肠挛缩或粘膜毁损等宏观器质性病变。然而, LcTLP 的摄入显著驱动了肠腔 pH 值的异常碱性偏移(由 7.17 ± 0.07 上调至 $7.27 \pm 0.06 \sim 7.40 \pm 0.01$)。

结合上述理化与表型数据, LcTLP 干预后小鼠结肠内环境发生了一定程度的稳态偏移,其作用过程可能同时涉及肠道微生态代谢改变和宿主直接免疫响应。通常生理条件下,肠腔 pH 值维持在相对稳定范围内,其异常升高常被认为是肠道代谢环境改变的表型指标^[30]。本研究中, LcTLP 处理后粪便 pH 值升高,同时乙酸、丙酸等 SCFAs 水平下降,提示酸性发酵产物减少可能削弱了其对肠腔酸碱稳态的维持作用^[31-33]。另一方面, LcTLP 具有较强的消化耐受性,其未被小肠吸收的残余部分进入结肠后,可能作为蛋白质发酵底物被肠道菌群进一步利用^[34]。根据蛋白质发酵相关研究,结肠内蛋白质发酵增强可伴随氨(NH_3)等碱性含氮代谢物及硫化氢(H_2S)等硫代谢物生成^[35,36],因此, LcTLP 残余物介导的蛋白质发酵增强可能是粪便 pH 值升高及结肠微环境紊乱的潜在原因之一。



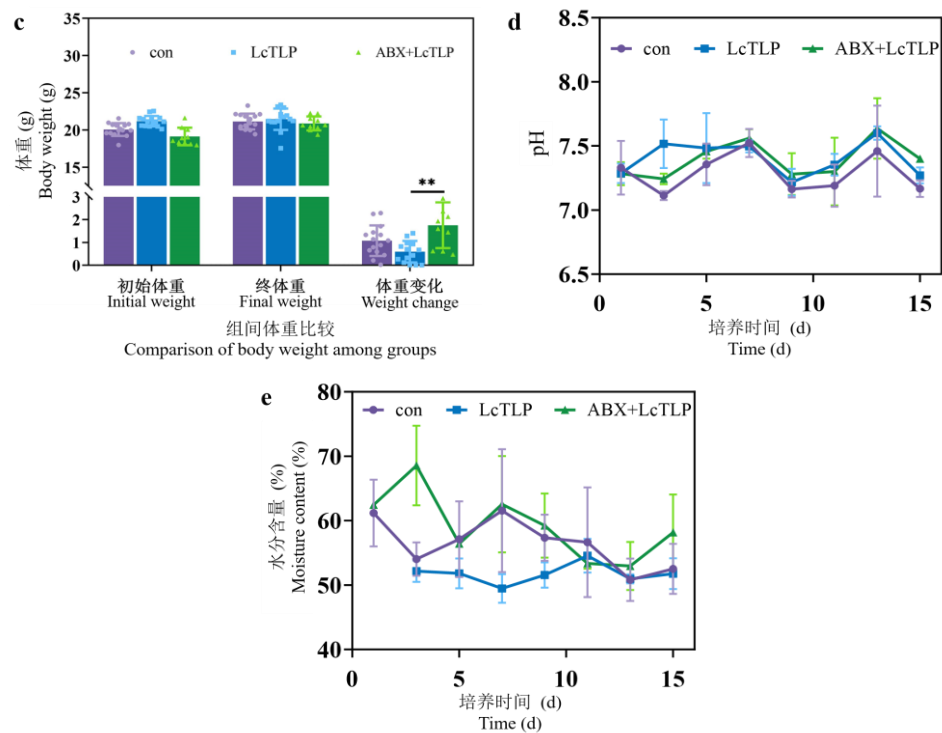


图 5 抗生素干预对 LcTLP 诱发小鼠生理特征变化的影响

Fig.5 Effects of antibiotic intervention on physiological changes induced by LcTLP in mice

注：（a）伪无菌小鼠（GF）和正常小鼠（SPF）的粪便悬液培养表现；（b）SPF 小鼠与抗生素（ABX）处理后的粪便菌落总数定量分析；（c）各组小鼠初始体重、终体重及体重变化量的比较；（d）各组小鼠粪便 pH 值；（e）各组小鼠粪便水分含量。*表示组间具有显著性差异（** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ）。

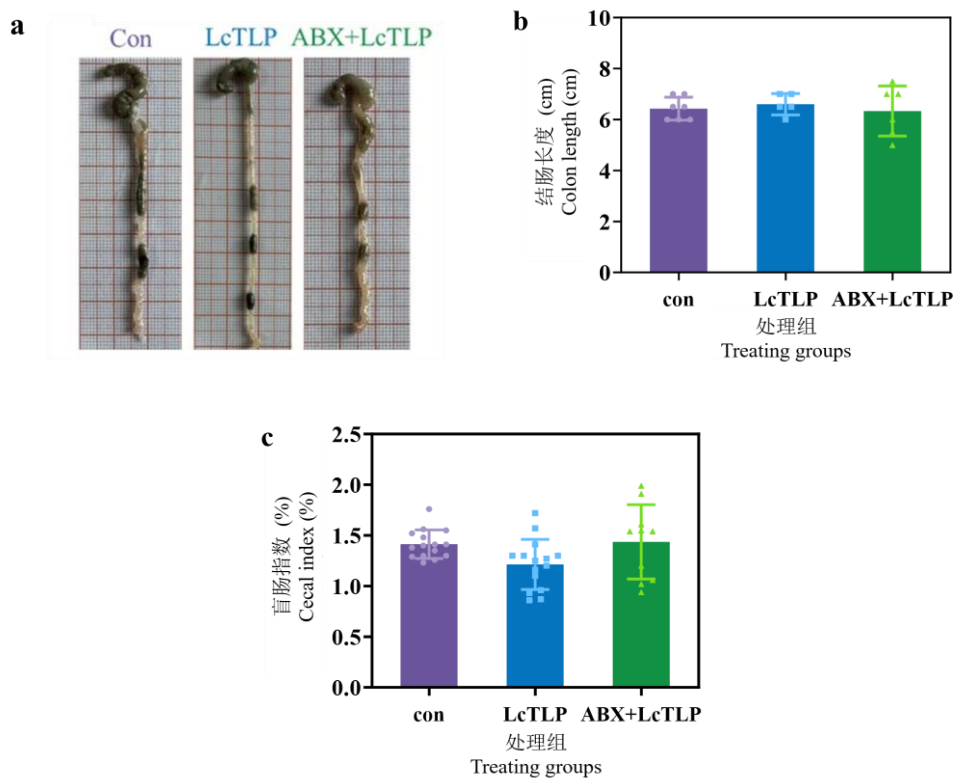


图 6 LcTLP 对正常和伪无菌小鼠结肠外观、结肠长度和盲肠指数的影响

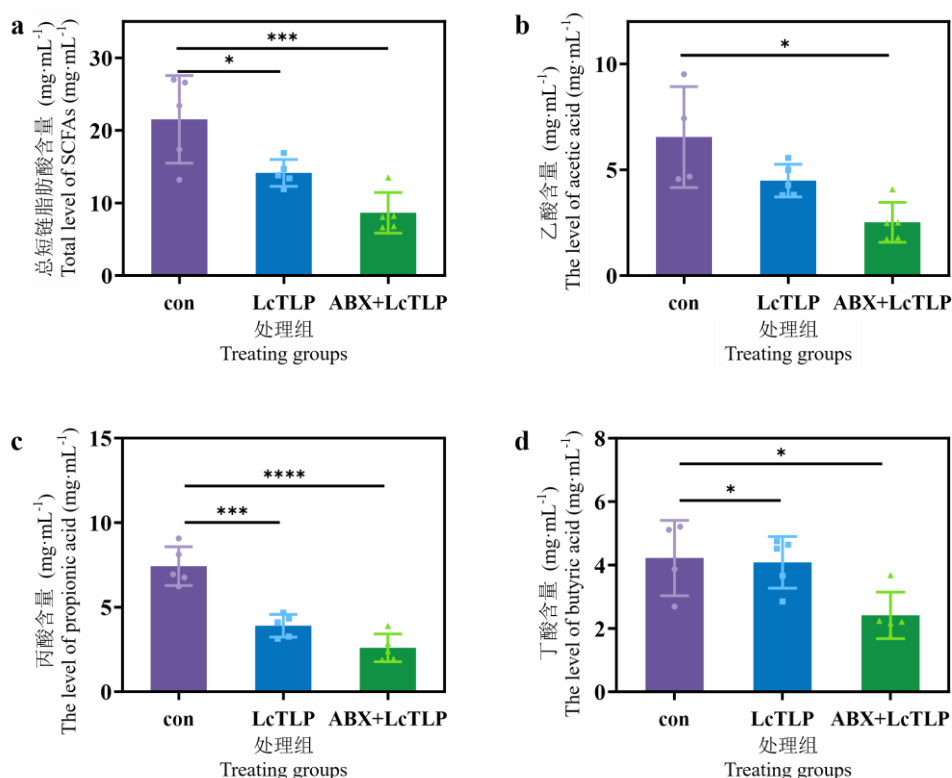
Fig.6 Effects of LcTLP on the appearance, length, and cecal index of the colon in normal and pseudo-germ-free mice

2.6 LcTLP 对肠道短链脂肪酸 (SCFAs) 代谢稳态的影响

SCFAs 作为肠道微生物发酵产生的重要代谢产物,主要包括乙酸、丙酸和丁酸等,在维持肠道上皮能量供应、调节免疫稳态和维护肠道屏障功能方面发挥重要作用^[37,38]。为评价 LcTLP 对肠道微生态代谢稳态的影响,本研究利用 GC-MS 测定了各组小鼠粪便中 SCFAs 的组成及含量(图 7)。结果显示,与 Con 组相比,LcTLP 组和 ABX+LcTLP 组的总 SCFAs 水平分别降至 $14.14 \pm 1.84 \text{ mg mL}^{-1}$ 和 $8.65 \pm 2.80 \text{ mg mL}^{-1}$,跌幅达 34.29% ($P < 0.05$) 和 59.80% ($P < 0.05$)。其中,乙酸、丙酸和丁酸为主要组分,这与 Dalile 等^[39]关于短链脂肪酸在“微生物-肠道-脑轴”信息传递中的作用规律相契合。在 LcTLP 组中,乙酸和丙酸含量同比显著降低了 31.43% 和 47.44%,而丁酸水平 ($4.084 \pm 0.81 \text{ mg mL}^{-1}$) 波动较小。此外,ABX+LcTLP 组总 SCFAs 水平进一步降低,提示在抗生素介导的菌群耗竭背景下,肠道 SCFAs 生成能力明显受限。但由于缺少 ABX+溶剂对照组,该变化不能完全区分 ABX 处理本身与 LcTLP 干预的叠加效应。

传统微生态病理范式认为,SCFAs (尤其是乙酸和丙酸等关键组分) 的显著缺乏可能削弱结肠上皮的能量代谢,并增加黏液层和物理屏障受影响的风险^[40]。然而,本研究中各干预组小鼠的结肠组织形态并未呈现与之平行的器质性损伤。该结果提示,在当前实验剂量和干预周期下,SCFAs 下降不能被直接等同于肠道物理屏障损伤或系统性应激的充分原因。结合前期 F-LcTLP 在肠道内的滞留及其跨膜通透特性,可推测高度稳定的 LcTLP 片段可能在屏障结构相对完整的情况下发生跨上皮转运,并作为外源性刺激参与宿主免疫应答^[41];但其具体受体识别机制及与微生态代谢扰动之间的因果关系仍需进一步验证。

另一方面,肠道屏障是维持宿主内环境稳态的重要防线,主要由黏液层、肠上皮细胞层及黏膜免疫相关结构共同构成,其完整性对限制外源性膳食因子和微生物代谢产物异常刺激具有重要意义^[42]。本研究中,尽管 LcTLP 处理显著降低了乙酸和丙酸等 SCFAs 水平,但小鼠结肠长度、盲肠指数及宏观形态并未出现明显异常,提示在本实验剂量和干预周期下,SCFAs 减少可能尚未达到诱发可检测肠道形态损伤的程度。已有研究表明,肠上皮细胞除利用 SCFAs 外,也可通过谷氨酰胺、葡萄糖等底物维持基础能量代谢^[43]。因此,不排除宿主在 SCFAs 供应下降时通过其他能量底物利用或上皮代谢适应维持短期肠道结构稳定的可能。与此同时,LcTLP 组小鼠生长性能下降提示其仍可能造成一定的整体代谢负担。基于目前结果,SCFAs 谱改变更适合被推测为 LcTLP 干扰肠道微生态代谢稳态的重要表征之一。



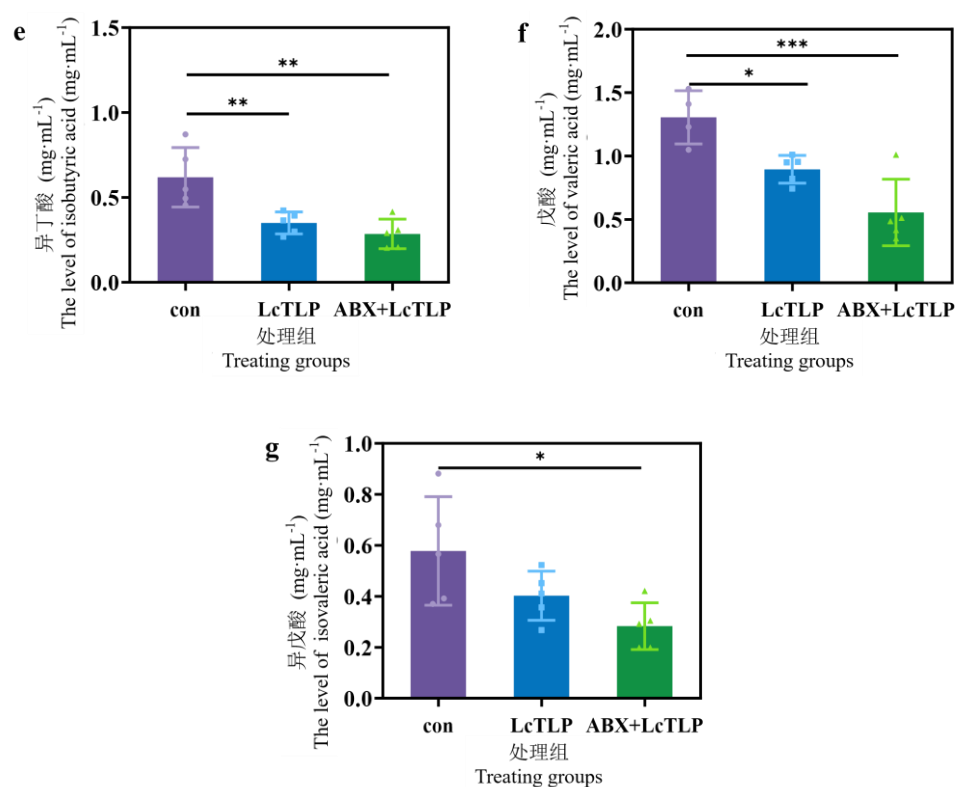


图 7 LcTLP 对小鼠粪便的短链脂肪酸的影响

Fig.7 Effects of LcTLP on short-chain fatty acids in mouse feces

注：（a）总短链脂肪酸；（b）乙酸；（c）丙酸；（d）丁酸；（e）异丁酸；（f）戊酸；（g）异戊酸。*表示组间具有显著性差异（**P*<0.05，***P*<0.01，****P*<0.001，*****P*<0.000 1）。

3 结论

本研究系统分析了荔枝类甜蛋白（LcTLP）的体外消化吸收特性及其对肠道微环境和宿主免疫应答的潜在影响。结果显示,LcTLP 消化产物在 Caco-2 单层细胞模型中具有一定跨上皮转运能力,表观吸收率为 24.53%±1.45%;其跨膜吸收产物在非细胞毒性剂量范围内可促进 RAW264.7 巨噬细胞 NO 释放,提示 LcTLP 经消化和跨膜转运后仍可能保留促炎活性。体内伪无菌小鼠模型进一步提示, LcTLP 诱发的机体应激可能同时涉及微生态代谢扰动与宿主直接免疫响应两个层面:一方面,高度稳定的 LcTLP 片段可能在不造成明显肠道物理屏障损伤的情况下发生跨黏膜转运,并作为外源性刺激参与宿主免疫应答;另一方面,未被完全吸收的 LcTLP 残余物进入结肠后,可能被共生菌群进一步利用,改变结肠发酵模式并伴随 SCFAs 水平下降,从而影响肠道能量代谢稳态及小鼠生长表型。综上所述,本研究表明 LcTLP 作为一种具有较强消化耐受性的膳食蛋白,可能通过跨屏障免疫刺激和肠道微生态稳态扰动共同参与机体炎症应激反应。本研究为系统阐明荔枝食物不耐受的复杂病理机制提供了新的实验依据和理论支撑。未来可结合更精细的菌群干预模型、靶向代谢检测及免疫受体验证实验,进一步阐明 LcTLP 诱导肠道微环境改变和宿主免疫应答之间的因果关系。

参考文献

[1] ZHAO L, WANG K, WANG K, et al. Nutrient components, health benefits, and safety of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): A review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(4): 2139-2163.

[2] 罗杨合,曾诗蒿,李洛欣,等.荔枝落果中 A 型低聚原花青素抑制类甜蛋白促炎机制[J].食品科学,2024,45(8):145-152.

[3] 刘潮,韩利红,王海波,等.植物类甜蛋白基因家族研究进展[J].生物技术通报,2018,34(3):9-17.

[4] CHEN H, WANG K, XIAO H, et al. Structural characterization and pro-inflammatory activity of a thaumatin-like protein from pulp tissues of *Litchi chinensis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(23): 6439-6447.

- [5] ZENG S, WANG K, WU G, et al. Time-specific ultrasonic treatment of litchi thaumatin-like protein inhibits inflammatory response in RAW264.7 macrophages via NF- κ B and MAPK transduction pathways [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 95(1): 106355.
- [6] WANG Y, WANG D, WANG K, et al. γ -Aminobutyric acid alleviates litchi thaumatin-like protein-induced inflammation and reduces gut microbial translocation [J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(5): 3043-3053.
- [7] NIGAM M, DEVI K, COUTINHO H D M, et al. Exploration of gut microbiome and inflammation: A review on key signalling pathways [J]. Cellular Signalling, 2024, 118(1): 111140.
- [8] WANG Z, WU Q, GUAN M, et al. Investigation of gut microbiota changes and allergic inflammation of mice with milk protein-induced allergic enteritis [J]. FEMS Microbiology Letters, 2024, 371(1): fnad127.
- [9] DISCEPOLO V, KELLY C P, KONING F, et al. How future pharmacologic therapies for celiac disease will complement the gluten-free diet [J]. Gastroenterology, 2024, 167(1): 90-103.
- [10] ZEVALLOS V F, YOGEV N, HAUPTMANN J, et al. Dietary wheat amylase trypsin inhibitors exacerbate CNS inflammation in experimental multiple sclerosis [J]. Gut, 2024, 73(1): 92-104.
- [11] LI W, ZENG S, WANG K, et al. Litchi induced liver inflammation: Investigating litchi thaumatin-like protein metabolic kinetics in mice [J]. Food Chemistry, 2025, 481(1): 144012.
- [12] 陈慧芳.荔枝干制过程中类甜蛋白糖基化对炎症活性的影响[D].广州:华南农业大学,2023.
- [13] 曹琳彩,文舜华,王凯,等.重组荔枝类甜蛋白的高效表达、纯化及活性鉴定[J].食品与发酵工业,2024,50(9):92-98.
- [14] WANG K, LI W, WANG K, et al. Litchi thaumatin-like protein induced the liver inflammation and altered the gut microbiota community structure in mice [J]. Food Research International, 2022, 161(1): 111868.
- [15] SHAH D, GUO Y, OCANDO J, et al. FITC labeling of human insulin and transport of FITC-insulin conjugates through MDCK cell monolayer [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 9(6): 400-405.
- [16] 胡霞,弘子珊,代晶晶,等.核桃蛋白抗炎成分的筛选及其活性比较[J].现代食品科技,2024,40(6):29-42.
- [17] HU A, YE Y, HAN B, et al. Effect of perilla frutescens polyphenols against tight junction alterations and intestinal inflammation: A Caco-2/macrophage co-culture model-based study integrated with network pharmacology [J]. Food Bioscience, 2024, 62(1): 105459.
- [18] MORTENSEN J S, BOHR F, NIELSEN E E M, et al. Methods for drug delivery and compatibility studies in an ex vivo mucus-covered Caco-2 cell monolayer model [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2025, 682(1): 125912.
- [19] LI Z, ZHANG B, WANG N, et al. A novel peptide protects against diet-induced obesity by suppressing appetite and modulating the gut microbiota [J]. Gut, 2023, 72(4): 686-698.
- [20] OLSON C A, VUONG H E, YANO J M, et al. The gut microbiota mediates the anti-seizure effects of the ketogenic diet [J]. Cell, 2018, 173(7): 1728-1741.e13.
- [21] 李文倩,韩静静,张贤,等.药物通透性在新药发现和开发阶段的评估策略[J].药学报,2021,56(5):1279-1285.
- [22] 项清芳.富硒灰树花多糖在 Caco-2 细胞模型中的吸收及在大鼠体内代谢动力学研究[D].镇江:江苏大学,2020.
- [23] 康晶玲,李汉宗,李心怡,等.柚皮蛋白-茶多酚纳米颗粒在 Caco-2 单层细胞模型中的转运机制及其应用[J].现代食品科技,2025,41(4):14-24.
- [24] LI Y, ZHENG R, WANG Y, et al. Ultra-high pressure effectively inhibits the pro-inflammatory activity of thaumatin-like protein from *Litchi Chinensis*: Insights from gut metabolism and theoretical investigation [J]. Food Research International, 2025, 205(1): 116011.
- [25] GELLI H P, VAZQUEZ-URIBE R, BUCKLEY S T, et al. Advanced microbiome therapeutics for oral delivery of peptides and proteins: Advances, challenges, and opportunities [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2025, 222(1): 115603.
- [26] SCHMID R, VOLCIC M, FISCHER S, et al. Surface functionalization affects the retention and bio-distribution of orally administered mesoporous silica nanoparticles in a colitis mouse model [J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 20175.
- [27] SUBRAMANIAN D A, LANGER R, TRAVERSO G. Mucus interaction to improve gastrointestinal retention and pharmacokinetics of orally administered nano-drug delivery systems [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 362.
- [28] PARK J I, CHO S W, KANG J H, et al. Intestinal Peyer's patches: Structure, function, and in vitro modeling[J]. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2023, 20(3): 341-353.
- [29] 张雅欣,李拥军,梁嘉熹,等.铁皮石斛多糖对小肠上皮细胞肠道屏障的保护作用[J].现代食品科技,2025,41(5):28-35.
- [30] 潘张磊,王瑞珩,刘跟莉.pH 值对粪便微生物移植治疗溃疡性结肠炎小鼠肠道微环境的影响[J].中国免疫学杂志

- 志,2022,38(16):1935-1939.
- [31] BLAKELEY-RUIZ J A, BARTLETT A, MCMILLAN A S, et al. Dietary protein source alters gut microbiota composition and function [J]. The ISME Journal, 2025, 19(1): wraf048.
- [32] KOH A, DE VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites [J]. Cell, 2016, 165(6): 1332-1345.
- [33] 张舒睿,冯晗,丁雪,等.六味地黄方通过调节肠道菌群和胆汁酸代谢改善绝经后 APOE^{-/-}小鼠的胆固醇代谢异常[J].南京中医药大学学报,2023,39(8):728-737.
- [34] LAVELLE A, SOKOL H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2020, 17(4): 223-237.
- [35] WANG Y, LIU G, WANG M, et al. Rethinking soy protein allergenicity: An integrated model of matrix-dependent digestion, transport, and immune activation [J]. Food Chemistry, 2026, 514(1): 149103.
- [36] 朱莹莹,李春保,周光宏.饮食、肠道微生物与健康的关系研究进展[J].食品科学,2015,36(15):246-252.
- [37] XU S Y, AWEYA J J, LI N, et al. Microbial catabolism of *Porphyra haitanensis* polysaccharides by human gut microbiota [J]. Food Chemistry, 2019, 289(1): 177-186.
- [38] 赵佳怡,徐梦琦,朱佳琪,等.工程益生菌短链脂肪酸的合成生物学设计: 从代谢强化到智能调控[J].食品科学,2026,47(10):1-18.
- [39] DALILE B, VAN OUDENHOVE L, VERVLIET B, et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019, 16(8): 461-478.
- [40] LIANG L, LIU L, ZHOU W, et al. Gut microbiota-derived butyrate regulates gut mucus barrier repair by activating the macrophage/WNT/ERK signaling pathway [J]. Clinical Science, 2022, 136(4): 291-307.
- [41] MATZINGER P. The danger model: A renewed sense of self [J]. Science, 2002, 296(5566): 301-305.
- [42] 张琦敏,倪妮妮,张欣,等.母乳成分影响婴儿肠道屏障功能的研究进展[J].食品科学,2020,41(9):240-247.
- [43] ZHU K, FAN H, ZENG S, et al. Polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Jackfruit) pulp modulates gut microbiota composition and improves short-chain fatty acids production [J]. Food Chemistry, 2021, 364(1): 130434.