TAT-SOD 脂质体对 UC 模型大鼠的口服治疗作用

周建森， 周秋婷， 叶 芬， 林春通， 刘航琪， 刘树滔*
（福州大学 生物工程研究所，福建 福州 350002）

摘要：氧化应激是造成溃疡性结肠炎(UC)的重要原因之一，而超氧化物歧化酶(SOD)是调控氧化应激的基本分子。为了探究 TAT-SOD 脂质体对 UC 模型大鼠的口服治疗作用，作者利用乙醇沉淀和大孔树脂分离的方法，从基因重组毕赤酵母菌发酵液中分离纯化 TAT-SOD；利用 TritonX-114 相分离法，去除其细菌内毒素；利用逆向蒸发法，制备 TAT-SOD 脂质体；利用 DSS 诱导构建 UC 模型大鼠，经灌胃给药，通过 DAI 评分、结肠密度、组织切片、血清 SOD 酶活、血清脂多糖含量，评价其治疗效果。结果表明：初步分离获得 TAT-SOD，比活为 11 003 U/mg；TritonX-114 对内毒素的去除率为 99.30%；成功制备 TAT-SOD 脂质体，经体外模拟消化液处理，其酶活回收率为 81.80%；动物实验中，SOD 给药组与模型组相比，DAI 评分均显著降低($P<0.05$)，且 TAT-SOD 脂质体组的评分最好；结肠密度和组织切片观察发现，结肠组织损伤情况均明显改善，且 TAT- SOD 脂质体组的改善最好；血清中 SOD 酶活均显著提高($P<0.05$)，且 TAT-SOD 脂质体组的酶活最高；血清中 LPS 含量无显著差异。这些表明，TAT-SOD 脂质体对 DSS 诱导 UC 模型大鼠有良好的口服治疗效果，有望为 UC 的辅助治疗提供新的选择。

关键词：超氧化物歧化酶；脂质体；结肠炎；抗氧化
中图分类号：Q 554　**文章编号**：1673-1689(2020)10-0026-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.10.004

Therapeutic Effect of Orally Administered TAT-SOD Liposome on UC Rat Models

ZHOU Jiansen， *ZHOU Qiuting*， *YE Fen*， *LIN Chuntong*， *LIU Hangqi*， *LIU Shutao**
(Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Oxidative stress is one of the major causes of ulcerative colitis (UC), and superoxide dismutase (SOD) is the basic molecule to regulate oxidative stress. This study investigated the therapeutic effect of oral administered TAT-SOD liposome (L-TAT-SOD) on UC rat models.The isolated and purified TAT-SOD from the fermentation broth of recombinant *Pichia pastoris* was achieved by ethanol precipitation, macroporous resin column chromatography and TritonX-114 phase separation. Subsequently, the L-TAT-SOD was prepared by reverse evaporation. Finally, the UC rat models were established by dextran sodium sulfate (DSS) induction and administered by intragastric administration. The anti-UC effect of L-TAT-SOD was evaluated by DAI score, colon

收稿日期：2020-03-11
基金项目：国家重点研发计划专项项目(2016YFD0400202)；福建省科技厅产业技术开发与应用计划：区域发展项目(2018N3009)；福州市高校产学研合作项目(2017-G-104)。
* **通信作者**：刘树滔(1970—)，男，博士，教授，主要从事食品与药物生物技术研究。E-mail:stliu@fzu.edu.cn

density, damage of colon tissue, serum SOD enzyme activity and serum lipopoly saccharide content. Results showed that: The specific activity of isolated TAT-SOD was 11 003 U/mg. The recovery rates of enzyme activity of successfully prepared L-TAT-SOD were about 80% and 90% in simulated gastric and intestinal juice, respectively. In anti-UC experiments, all administered groups had lower DAI scores (P<0.05) than that of the model group. In contrast, the L-TAT-SOD group had the lowest DAI score.The results of colon density and tissue section showed that the damaged colon tissue was significantly repaired in all administered groups, and the L-TAT-SOD group performed best. Meanwhile, the serum SOD enzyme activity was significantly increased in all groups (P<0.05), and the activity in L-TAT-SOD group was highest. However, there was no significant difference in serum lipopolysaccharide content in each group. The oral administered L-TAT-SOD is confirmed with a beneficial therapeutic effect on DSS-induced UC rat models, expected to be a new option for the adjuvant therapy of UC.

Keyword: superoxide dismutase, liposomes, ulcerative colitis, antioxidant

溃疡性结肠炎(UC)是结肠的一种慢性特发性炎症性肠病[1]。UC 的发病机制很复杂,目前尚不明确。越来越多的证据表明,活性氧(ROS)在 UC 的发生和发展中起着至关重要的作用。ROS 是一类含氧元素、具有高活性的小分子物质,主要包括·O^{2-}、H_2O_2 和·OH^-。ROS 是体内正常氧代谢的中间代谢产物,主要由线粒体呼吸链和 NADPH 氧化酶系统生成[2]。在正常情况下,机体的 ROS 和抗氧化水平处于一个动态平衡,并维持细胞和组织的正常功能。但是,当 ROS 超出平衡时,过量的 ROS 会造成生物分子(如磷脂、蛋白质、核酸)的氧化损伤,导致组织和细胞的结构和功能异常[3-4]。过量的 ROS 可以通过补充外源性的抗氧化剂来去除。

已有报道,多种抗氧化剂被应用于治疗 UC。例如,口服 N-乙酰半胱氨酸(NAC)[5]、天然植物提取的多酚类化合物[6]等均可以改善 UC 动物模型结肠中的抗氧化状态,减轻结肠炎症。但是,这些抗氧化剂都是非特异性,可能有副作用,如引起恶心、呕吐,甚至导致肾脏损伤等等[7-9]。

超氧化物歧化酶(SOD)是机体内源性自由基清除剂中重要的酶类抗氧化剂,也可望用于治疗 UC。它可以催化两个超氧化物阴离子之间发生歧化反应,生成对人体伤害较低的过氧化氢和氧气,其中的过氧化氢可以在过氧化物酶的作用下转化成对人体完全无害的 H_2O 和 O_2[10]。补充 SOD 传统的方式是注射给药。例如,静脉注射人工合成的卵磷脂化的 SOD 可以降低 UC 小鼠的结肠损伤,但是其合成所用的交联剂是否存在副作用仍存在疑问[11]。口服补充 SOD 是更加安全、方便的给药方式,但是需要解决胃肠道消化使其失活的问题。已有一些口服 SOD 治疗 UC 的研究。例如,虫胶包被的 SOD[12]、超稳定的 SOD[13]均可抵抗胃肠道的消化并减轻 UC 小鼠的炎症。前期研究发现,TAT-SOD 是富含碱性氨基酸的 TAT 短肽与 SOD 的融合蛋白,它比 SOD 稳定并具有更好的细胞粘附性[14],这种生物粘附性可能会增强 SOD 与小肠上皮的黏附,从而延长 SOD 与肠道的结合。另外,脂质体包埋可保护药物免受酸性条件下胃蛋白酶的破坏[15],可以提高 SOD 在肠道的生物利用度。作者尝试探究 TAT 转导肽修饰和脂质体包埋的 SOD 对 UC 模型大鼠的口服治疗作用,以期为 UC 的辅助治疗提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 实验材料

TAT-SOD 发酵液冻干粉:福州大学生物工程研究所提供;无水乙醇(分析纯)、胆固醇(分析纯)、胃蛋白酶(分析纯):国药集团化学试剂有限公司产品;大孔树脂 HPD500:沧州宝恩吸附材料科技有限公司产品;SOD:天津生命科学应用研究所产品;胰酶(分析纯):美国 Amersco 公司产品;大豆卵磷脂(分析纯):萨思化学技术(上海)有限公司产品;葡聚糖硫酸钠(DSS):MPBiomedicals 公司产品;BCA 蛋白浓度测定试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司产品;TritonX-114:美国 Sigma 公司产品;细菌内毒素检测试剂盒:福州新北生化工业有限公司产品;SD 大鼠:上海禹堃实验动物有限公司产品;大鼠

血清脂多糖(LPS)检测试剂盒:江苏酶标生物科技有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液中的 TAT-SOD 的乙醇沉降 称取发酵液冻干粉状 20 g 溶解于 100 mL 蒸馏水中，充分溶解发酵液。分取 5 mL 发酵液上清置于离心管中，调整无水乙醇的添加量,使无水乙醇最终体积分数为 70%。充分混匀后于-20 ℃下静置 30 min。4 ℃条件下,以 13 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀溶于 5 mL SOD 酶活力测定用 PBS 中，使用盐酸羟胺法测定 SOD 酶活力[17]。使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒检测蛋白质含量,具体步骤见试剂盒说明书[16]。

1.2.2 大孔树脂纯化 TAT-SOD 经过乙醇沉淀重溶的样品在 4 ℃下以 12 000 r/min 离心 10 min,取复溶液过大孔树脂柱，并用 0.5 mol/L NaCl 溶液进行洗脱,流量为 0.6 mL/min,每管 5 min,测定在 280 nm 吸光值，得到除去大部分色素的样品。测定在 400 nm 及 490 nm 波长的吸光值，通过吸光值的变化,表征发酵液的脱色率[18]。

1.2.3 TritonX-114 相分离法去除细菌内毒素 收集以上所得 TAT-SOD 溶液与 Triton X-114 以体积比 99:1 混合；于 4 ℃下、800 r/min 条件下搅拌 30 min;将样品转移至 37 ℃水浴 10 min;经 25 ℃、13 000 *g* 离心 10 min,并取上层水相;以上各步至少循环 2 次;收集上层的 TAT-SOD 溶液,使用细菌内毒素检测试剂盒检测其中的内毒素含量,具体步骤见试剂盒说明书[20]。

1.2.4 TAT-SOD 脂质体的制备 将以上去除内毒素的 TAT-SOD 溶液,通过逆相蒸发法,包埋于脂质体。将大豆卵磷脂和胆固醇以质量比 2:1 加入到装有 30 mL 乙醚的茄型瓶中充分溶解;再将溶有适量 TAT-SOD 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4)10 mL 加入到有机相中,经常温水浴超声(100 W)5 min;超声形成的乳液经抽真空旋转蒸发(40 ℃水浴)充分去除有机相，最终得到 TAT-SOD 脂质体 (L-TAT-SOD)[21]。

1.2.5 TAT-SOD 脂质体在模拟消化液中的降解情况 将 TAT-SOD 脂质体分别与模拟胃液 (SGF)和模拟肠液(SIF)以体积比 1:3 混合,于 37 ℃水浴 240 min，并分别检测 0,15,30,60,120,240 min 时的 SOD 酶活力[22]。

1.2.6 动物实验 选取 SD 雄性大鼠 30 只,初始体质量(220±15)g,随机分成 5 组,每组 6 只,分别为模型组、正常组、L-TAT-SOD 组、L-SOD 组(SOD 脂质体组)和 TAT-SOD 组。造模期间,正常组自由饮用灭菌水，其余组大鼠连续 7 d 自由饮用 3.0 g/dL 葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液,构建急性结肠炎模型鼠[23]。造模成功后,分别给予每只大鼠 10 000 U/kg 的 SOD 剂量,灌胃给药。实验分组如下:正常组,全程饮用不含 DSS 灭菌水+灌胃生理盐水;L-SOD 组,全程饮用含 3.0 g/dL DSS 灭菌水+灌胃 L-SOD;TAT-SOD 组，全程饮用含 3.0 g/dL DSS 灭菌水+灌胃 TAT-SOD;L-TAT-SOD 组,全程饮用含 3.0 g/dL DSS 灭菌水+灌胃 L-TAT-SOD。

1.2.7 结肠损伤评价(DAI 评分) 通过疾病活动指数(DAI)评价大鼠的结肠损伤情况:每天记录大鼠体质量、排便情况,评分后取平均值得出结肠炎模型大鼠 DAI 评分以及其变化趋势[24]。

表 1 DAI 评分

Table 1 DAI score

评分	体质量质量分数下降/%	大便形态	血便
0	0	正常	无
1	1~5	松散	隐血阳性
2	5~10		
3	10~15	腹泻	肉眼可见
4	>15		

1.2.8 结肠密度的测定 给药 7 d 后，解剖大鼠腹腔,找到结肠,测定结肠密度[25]。

1.2.9 结肠组织的 HE 染色 取大鼠结肠组织做固定、脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色,再于显微镜下观察[26]。

1.2.10 血清中酶活和 LPS 的测定 从小鼠腹主动脉取血并按照盐酸羟胺法测血清中酶活。用试剂盒测定血清中的 LPS 含量,具体步骤见试剂盒说明书。

1.3 数据处理方法

用 SPSS 24 对数据进行统计分析,$P<0.05$ 表示差异显著,记为“*”。

2 结果与分析

2.1 TAT-SOD 的制备

发酵液经过乙醇沉淀、大孔树脂分离、TritonX-114 相分离,并检测其酶活、蛋白质质量分数、脱色率和细菌内毒素等。酶活回收率最终为 57.93%,脱色率为 94.72%，细菌内毒素由 5.6×10^{-3} EU/U 降为

0.4×10^{-3} EU/U,远低于人体给药的 SOD 的内毒素限度(5.0×10^{-3} EU/U),去除率为 99.30%[26]。

2.2 TAT-SOD 脂质体的制备

相比于 TAT-SOD,制备样品能形成纳米颗粒,且其平均粒径为(261.9±1.664) nm,说明已经成功制备 TAT-SOD 脂质体(L-TAT-SOD);其平均电位为(-41.3±4.40) mV≤-30 mV,具有较高的稳定性;其 PDI 为 0.226±0.020。数据表明,已经成功制备 L-TAT-SOD,且具有较高的稳定性,结果见图 1。

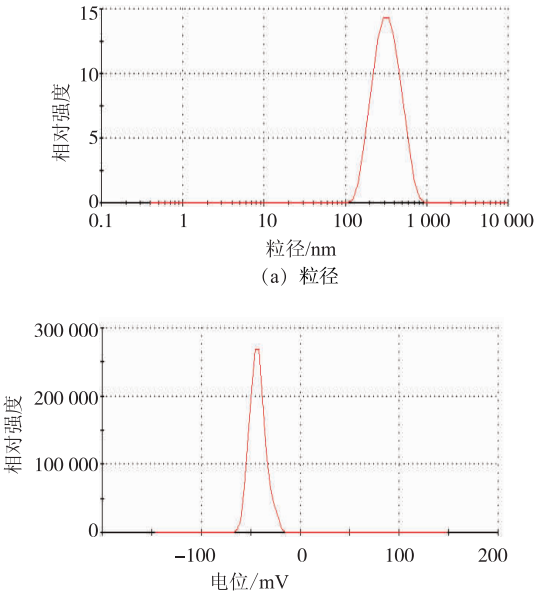


图 1 L-TAT-SOD 的粒径、电位

Fig. 1 Particle size and Zeta potential distribution of L-TAT-SOD

2.3 L-TAT-SOD 在体外模拟人工胃液(SGF)、人工肠液(SIF)的酶活回收率

如图 2 所示,在 SGF 的作用下,SOD 和 TAT-SOD 的酶活迅速降低,15 min 后几乎失活;脂质体包埋的 L- SOD、L-TAT-SOD 的酶活损失则比较少,240 min 后稳定于 85%左右。这些说明,在模拟胃液中,脂质体包埋能有效保护 SOD 的活性,TAT 转导肽的修饰对 SOD 活性的保护没影响。

如图 3 所示,在 SIF 的作用下,不同 SOD 样品的酶活都有小幅度的下降,240 min 后稳定于 90%左右,其酶活保留率顺序为:L-TAT-SOD>L-SOD>TAT-SOD>SOD。这些说明,在模拟肠液中,脂质体包埋和 TAT 转导肽的修饰都能一定程度地保护 SOD 的活性,且两者对 SOD 的协同保护更加明显。

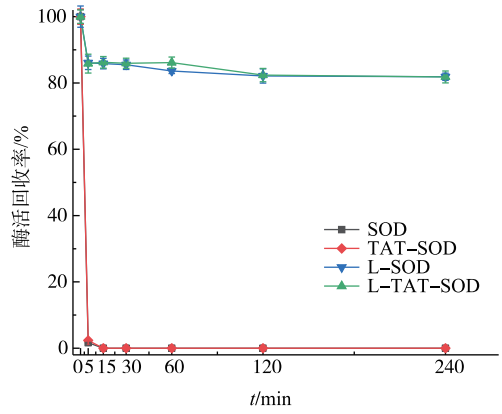


图 2 不同 SOD 在 SGF 中的酶活回收率

Fig. 2 Enzyme activity recovery of different SOD in SGF

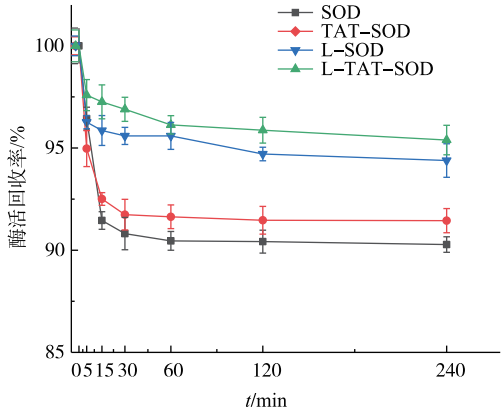


图 3 不同 SOD 在 SIF 中的酶活回收率

Fig. 3 Enzyme activity recoveryof different SOD in SIF

2.4 L-TAT-SOD 对 UC 大鼠模型的 DAI 评分的影响

DAI 评分越高,表明结肠损伤程度越高,正常生理状况的 DAI 评分为 0。如图 4 所示,经过灌胃给药 7 天的过程中,与模型组相比,L-TAT-SOD、L-SOD、TAT-SOD 组的 DAI 评分都呈现显著性降低 ($P<0.05$),且呈现持续下降的趋势。最终,L-TAT-SOD、L-SOD、TAT-SOD 组的 DAI 评分分别降低了(71.37±8.97)%、(69.33±6.15)%、(66.67±7.26)%。不同 SOD 组别之间,L-TAT-SOD 组的 DAI 评分在第 1、2、3 天显著性低于 TAT-SOD 组 ($P<0.05$),在第 4、5、6、7 天无显著性差异。而 L-TAT-SOD 组与 L-SOD 组之间、L-SOD 组与 TAT-SOD 组之间的差异性较低,但存在一定趋势。这些部分组别之间存在无显著性差异的情况,可能是动物实验误差范围较大造成的,这有待实验验证。

这些数据表明,从趋势以及 DAI 评分的降低情

况来看,治疗效果:L-TAT-SOD>L-SOD>TAT-SOD,其中 L-TAT-SOD 的效果最好。

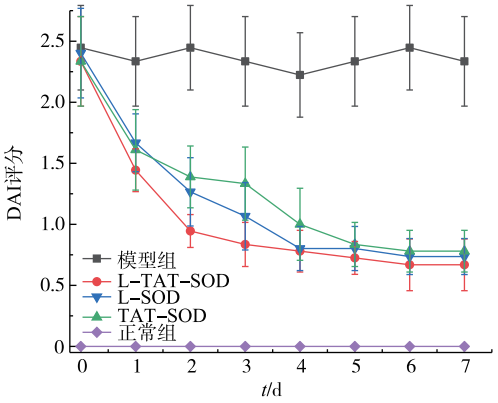


图 4 不同 SOD 对 DAI 评分的影响

Fig. 4 Effect of different SOD on DAI score

2.5 L-TAT-SOD 对 UC 大鼠模型的结肠密度的影响

结肠受损后,易纤维化致使密度变大[27]。因此,可以通过测定结肠密度来评估结肠组织的受损情况。如图 5 所示:L-TAT-SOD 组(0.086±0.012)、L-SOD 组(0.093±0.014)、TAT-SOD 组(0.092±0.016)和与模型组(0.121±0.020)相比,其结肠密度测量值均显著(P<0.05)低于模型组(0.121±0.020),与正常组(0.088±0.004)相比,无显著性差异。表明L-TAT-SOD、L-SOD、TAT-SOD 对 DSS 诱导的结肠炎症均有较好的治疗效果,且 L-TAT-SOD 的效果最好,最接近正常组。

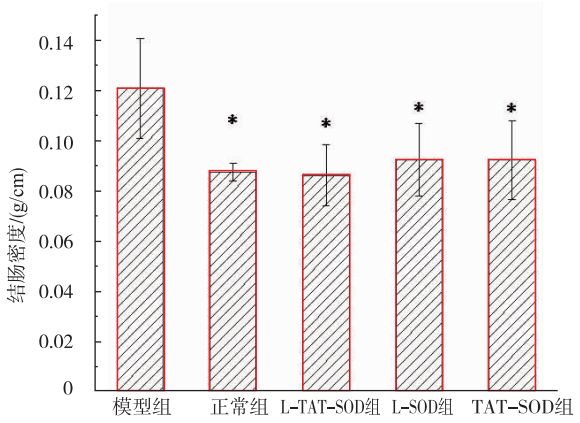


图 5 不同 SOD 对结肠密度的影响

Fig. 5 Effect of different SOD on colon density

2.6 结肠组织切片染色观察

如图 6 所示,TAT-SOD 组、L-SOD 组、L-TAT-SOD 组结肠组织表现较为相似,与模型组相比,其隐窝结构正常、杯状细胞正常、黏膜下层仅有少量炎性细胞浸润。表明 TAT-SOD、L-SOD、L-TAT-SOD 对 DSS 诱导的结肠炎屏障损伤有明显的修复作用。

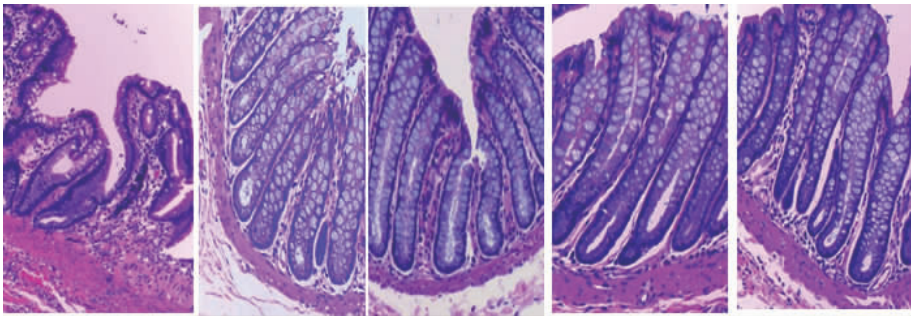


图 6 不同 SOD 对结肠组织的影响(HE,×100)

Fig. 6 Effects of different SOD on colonic tissue(HE,×100)

2.7 L-TAT-SOD 对 UC 大鼠模型的血清中 SOD 酶活的影响

通过测定用药对 UC 模型大鼠的血清中的 SOD 酶活的影响,来评估其对机体的抗氧化水平的调节情况。如图 7 所示,模型组与正常组相比,其血清酶活均显著(P<0.05)低于正常组。表明 DSS 诱导的结肠炎症的产生,伴随着机体的抗氧化酶水平的下降。而 L-TAT-SOD 组、L-SOD 组和 TAT-SOD 组的血清酶活均显著(P<0.05)高于模型组和正常组。而 L-TAT-SOD 组的血清酶活显著(P<0.05)高于 L-SOD 组、TAT-SOD 组。这些结果表明:L-TAT-SOD、L-SOD、TAT-SOD 均能通过口服灌胃来提高血清的 SOD 酶活,增强机体的抗氧化能力;而且,L-TAT-SOD 的改善效果要优于 L-SOD 和 TAT-SOD。根据

模型组大鼠血清 SOD 酶活显著低于正常组的数据,推测 3 种 SOD 样品可能是通过改善 UC 状况,从而提高血清酶活。

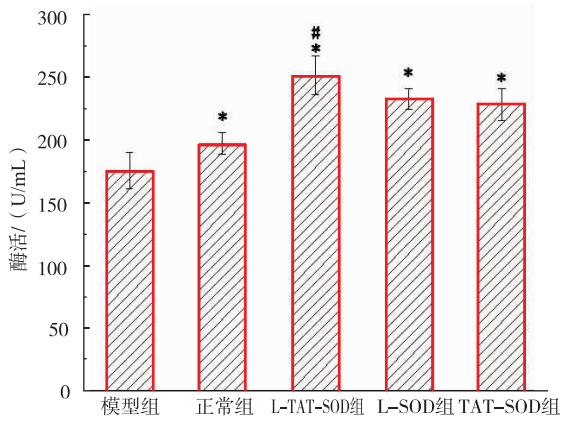


图 7　不同 SOD 对血清 SOD 酶活的影响

Fig. 7　Effect of different SOD on SOD enzyme activity in serum

2.8　L-TAT-SOD、TAT-SOD、L-SOD 对 UC 大鼠模型的血清中 LPS 质量浓度的影响

UC 模型大鼠肠道菌群产生的脂多糖(LPS)相比正常的大鼠更容易通过损伤的肠道屏障进入血液[28]。通过测定血清中 LPS 含量可评估肠道损伤情况,结果如图 8 所示,血清中 LPS 含量却无显著性差异。LPS 主要来源于革兰氏阴性菌的细胞壁[29],而 ROS 本身也具有抗革兰氏阴性菌的活性[30],由此推测,这可能是 UC 大鼠肠道中含有丰富的 ROS,抑制了革兰氏阴性菌的生长,从而使得肠道中可产生 LPS 的革兰氏阴性菌的数量减少。UC 大鼠的肠道屏障虽然受到破坏,受损的肠道更容易受到细菌的感染,但是 ROS 可能会造成肠道菌群整体数量下降,从而导致所测的 LPS 表观上并无显著性差异。

3　结　语

近年来,SOD 作为特异性的抗氧化剂来治疗溃疡性结肠炎,受到越来越多关注[12-13]。SOD 作为酶类抗氧化剂,可反复利用,能高效清除多余的 ROS,有很大的应用潜力和市场需求。尽管 SOD 来源较广,可从动植物中提取得到,但是,其提纯的步骤较为复杂[31]。作者通过基因工程菌表达的 SOD,更容易获得,提纯工艺也更为简单[32]。TAT-SOD 发酵冻干粉仅通过乙醇沉淀、大孔树脂吸附、TritonX-114 等步骤,就去除了大部分色素和细菌内毒素,获得了高

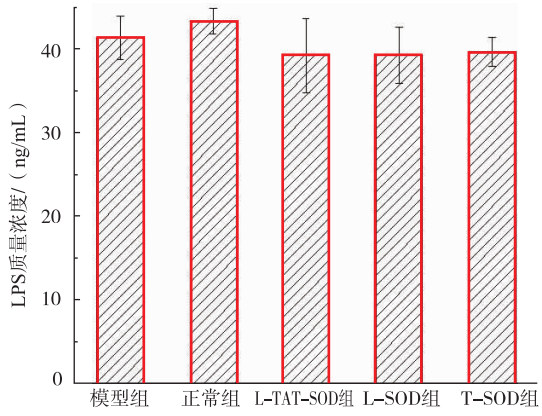


图 8　不同 SOD 对血清 LPS 质量浓度的影响

Fig. 8　Effect of different SOD on LPS content in serum

比活(11 003 U/mg)的 TAT-SOD;与天然 SOD 相比,TAT-SOD 添加了富含碱性氨基酸的短肽 TAT,提高了其对细胞表面的黏附能力[14],这为 SOD 应用于 UC 模型大鼠治疗提供了良好的基础。

天然 SOD 本身存在相对分子质量大、传递时难透过细胞膜、半衰期短、难耐酸、容易被胃蛋白酶降解等缺点,限制了其临床应用。前人用卵磷脂化和季铵化壳聚糖等化学修饰的方法,显著提高其静脉注射后 SOD 在血液中的半衰期,但是,静脉注射给药方式的舒适度有待提高[11]。利用脂质体包埋 TAT-SOD,在体外模拟消化液降解的试验中,能够保护 80%以上的 TAT-SOD 活性免受胃液环境的破坏,达到口服给药的要求,进一步提高了 UC 模型大鼠治疗时的生活质量评分(QOL)。

作者通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱发的大鼠结肠炎模型来评估 TAT-SOD 及 L-TAT-SOD 的治疗效果。结果表明,L-TAT-SOD 能够显著地降低结肠炎大鼠的 DAI 评分。此外,结肠组织的切片染色结果显示,L-TAT-SOD 能够减少杯状细胞的丢失、减少炎性细胞的浸润,这可能是 SOD 可以部分恢复 UC 模型大鼠结肠中紧密连接蛋白(如 ZO-1 和 occludin-1)的表达水平[13],改善肠道屏障,从而抵抗炎性细胞的入侵。L-TAT-SOD 还能够显著提高结肠炎大鼠血清中的 SOD 酶活水平。鉴于模型组大鼠血清 SOD 酶活显著低于正常组的数据,推测 L-TAT-SOD 可能是通过改善 UC 状况,来实现 SOD 水平的升高[13];也有可能是通过降低 ROS 水平来改善肠道环境,部分恢复肠道菌群的平衡状态,进一步提高机体的免疫力和自愈能力来实现。此外,相

对于 UC 模型,DSS 诱导的大鼠结肠炎被认为更像是急性肠道炎症[12],所以,L-TAT-SOD 对慢性肠道炎症模型的治疗效果有待进一步的验证。

与口服 SOD 样品相比，作者制备的 SOD 样品原料来源更广、制造成本更低[12]。与从嗜热菌中分离得到的超稳定SOD 相比,分离纯化步骤更简单[13]。

综上所述，口服 L-TAT-SOD、L-SOD、TAT-SOD 对于 DSS 诱导的结肠炎大鼠均有积极的治疗效果。其中,L-TAT-SOD 的治疗效果最好,TAT-SOD 和 L-SOD 的治疗效果相当。这可能是因为脂质体包埋有效避免其在胃肠道中酸解和酶解[22],TAT 短肽富含碱性氨基酸的结构提高了 SOD 对肠道的黏附能力[14],可能也会改善 SOD 的作用。因此,口服 L-TAT-SOD 作为治疗溃疡性结肠结肠炎的辅助治疗手段具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] GAJENDRAN M,LOGANATHAN P,JIMENEZ G,et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis [J]. **Disease-a-Month**,2019:100851.

[2] SUGAMURA K,KEANEY J F J. Reactive oxygen species in cardiovascular disease [J]. **Free Radical Biology & Medicine**,2011,51(5):978-992.

[3] PRAVDA J. Radical induction theory of ulcerative colitis[J]. **World Journal of Gastroenterology**,2005(16):2371-2384.

[4] PIECHOTA-POLANCZYK A,FICHNA J. Review article:the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment ofinflammatory bowel diseases[J]. **Naunyn-Schmiedeberg´s Archives of Pharmacology**,2014,387(7):605-620.

[5] AMROUCHE-MEKKIOUI I,DJERDJOURI B. N-acetylcysteine improves redox status,mitochondrial dysfunction,mucin-depletedcrypts and epithelial hyperplasia in dextran sulfate sodium- induced oxidativecolitis in mice [J]. **European Journal of Pharmacology**,2012,691(1-3):209-217.

[6] TOPCU-TARLADACALISIR Y,AKPOLAT M,UZ Y H,et al. Effects of curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis:the roles of c-Jun N-terminal kinase and p38mitogen-activated protein kinase[J]. **Journal of Medicinal Food**,2013,16(4):296-305.

[7] SCHWEIGERT N,ZEHNDER A J,EGGEN R I. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action incells,from microorganisms to mammals[J]. **Environmental Microbiology**,2001,3(2):81-91.

[8] EDWARDS M J J,HARGREAVES I P,HEALES S J R,et al. N-acetylcysteine and Unverricht-Lundborg disease:variable response and possible side effects[Z]. 2002:59,1447-1449.

[9] SKIBOLA C F,SMITH M T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake [J]. **Free Radical Biology and Medicine**,2000,29(3):375-383.

[10] FUKAI T,USHIO-FUKAI M. Superoxide dismutases:role in redox signaling,vascular function,and diseases[J]. **Antioxidants & Redox Signaling**,2011,15(6):1583-1606.

[11] ISHIHARA T,TANAKA K,TASAKA Y,et al. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase against colitis[J]. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**,2008,328(1):152-164.

[12] JE K,HD K,SY P,et al. Dietary Supplementation with a bacillus superoxide dismutase protects against γ-radiation-induced oxidative stress and ameliorates dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. **Journal of Crohn´s& Colitis**,2018(7):860-869.

[13] SHENG Y,LI H,LIU M,et al. A manganese-superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB27 suppresses inflammatory responses and alleviates experimentally induced colitis[J]. **Inflammatory Bowel Diseases**,2019(10):1644-1655.

[14] 赵辉，潘剑茹，刘树滔，等. TAT-SOD 融合蛋白的跨膜转导性质的研究 [J]. 福州大学学报：自然科学版,2007,35(6):936-940.

[15] LIU W,YE A,LIU W,et al. Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared frommilk fat globule membrane-derived phospholipids[J]. **Journal of Dairy Science**,2013,96(4):2061-2070.

[16] MOURE F,RENDUELES M. Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange

chromatography[J]. **Meat Science**,2003,64(4):391-398.
[17] 蔡丽萍,邱丹腾,刘树滔,等. 共存葡萄糖对超氧化物歧化酶热稳定性的影响[J]. 中国食品学报,2017,17(5):33-39.
[18] 王英燕,王萍,于锋臣,等. 大孔吸附树脂在 EC-SOD 纯化中的作用[J]. 齐鲁药事,2008(8):493-494.
[19] 吕蕾,郭志军,胡耀辉. 大孔树脂对茁霉多糖发酵液色素吸附性能的研究[J]. 食品与发酵科技,2009,45(4):39-41.
[20] 陈晓超,王友,崔文明,等. 重组 SOD 发酵液去除内毒素的效果研究[J]. 中国食品学报,2019,19(9):172-178.
[21] 张能. 杏鲍茹中 SOD 的分离纯化、脂质体制备及其抑制肿瘤细胞活性研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.
[22] 刘玮琳. 脂质体的结构和消化稳定性及其形成机理[D]. 南昌:南昌大学,2013.
[23] EICHELE D D,KHARBANDA K K. Dextran sodium sulfate colitis murine model:An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis[J]. **World Journal of Gastroenterology**,2017,23(33):6016-6029.
[24] MURANO M,MAEMURA K,HIRATA I,et al. Therapeutic effect of intracolonically administered nuclear factor kappa B antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium(DSS)-induced colitis[J]. **Clinical and Experimental Immunology**,2000,120(1):51-58.
[25] CAMUESCO D,GÁLVEZ J,NIETO A,et al. Dietary olive oil supplemented with fish oil,rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids,attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis[J]. 2005,135(4):687.
[26] 徐立,胡瑞斌,李兆波,等. STZ 诱导糖尿病大鼠胰腺及肝脏石蜡切片 HE 染色改进方法[J]. 临床与实验病理学杂志,2019,35(9):1122-1124.
[27] BRUYN J R,MEIJER S L,WILDENBERG M E,et al. Development of fibrosis in acute and longstanding ulcerative colitis[J]. **Journal of Crohn's & Colitis**,2015,9(11):966-972.
[28] TRIVEDI P P,JENA G B. Melatonin reduces ulcerative colitis-associated local and systemic damage inmice:investigation on possible mechanisms[J]. **Digestive Diseases and Sciences**,2013,58(12):3460-3474.
[29] FRANCO E,OACUTE V,GARCIA-RECIO N,et al. Endotoxins from a pharmacopoeial point of view[J]. **Toxins**,2018,10(8):331-336.
[30] WANG D,LI Q,QIU J,et al. Corrosion motivated ROS generation helps endow titanium with broad - spectrum antibacterial abilities[J]. **Advanced Materials Interfaces**,2019(6):514-519.
[31] AYDEMIR T. Purification and partial characterisation of superoxide dismutase from chicken erythrocytes[J]. **Turkish Journal of Chemistry**,2005,329(3):831-838.
[32] 杨志强,张晨,敖伟,等. 毕赤酵母表达重组人源 Cu/Zn SOD 的分离纯化与稳定性表征[J]. 中国食品学报,2011,11(5):108-113.

科　技　信　息

加拿大批准在多种食品中使用甜菊糖苷

2020 年 9 月 1 日,加拿大卫生部发布 NOM/ADM-0151 号文件,修订允许使用的甜味剂列表,批准在多种食品中使用来自酿酒酵母 Y63348(*Saccharomyces cerevisiae* Y63348)的甜菊糖苷(Steviol Glycosides)。

据了解,来自植物甜叶菊、酿酒酵母 CD15380 和酿酒酵母 CD15407 的甜菊糖苷在加拿大已经被允许用于多种食品中。此次修订自 2020 年 9 月 1 日起生效。

[信息来源]食品伙伴网. 加拿大批准在多种食品中使用甜菊糖苷 [EB/OL]. (2020-09-2). http://news.foodmate.net/2020/09/570796.html