SWATH定量蛋白质组学揭示光酶诱导桑叶及桑辛素N对家蚕中肠组织的影响

虞姣姣^{1†}, 彭晓国^{2†}, 朱玮¹, 管祺杰¹, 钟卓珩¹, 严海建³, 田景奎^{1,4*}

1. 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 杭州 310027;

2. 浙江佐力药业股份有限公司, 湖州 313200;

3. 淳安县茧丝绸总公司, 杭州 311700;

4. 浙江-马来西亚传统药物联合研究中心, 杭州 310027

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: tjk@zju.edu.cn

收稿日期: 2017-11-22; 接受日期: 2017-12-29; 网络版发表日期: 2018-03-21

浙江省科学计划(批准号: 2016C04005)和浙江省自然科学基金(批准号: LZ14H280001)资助

摘要 桑是一种重要的药用植物, 桑叶是家蚕的主要食物来源。前期研究表明, 桑叶经光酶诱导后次生代谢产物的含量发生变化, 其中桑辛素N的含量显著增加。为了研究饲喂不同桑叶对家蚕生长发育的影响, 本文应用了SWATH定量蛋白质组学技术对饲喂新鲜桑叶(FM)、饲喂光酶诱导桑叶(UVM)及饲喂涂布桑辛素N(NM)的桑叶家蚕中肠组织进行蛋白质表达谱的差异分析。结果表明, 与FM组相比, 在UVM组中共鉴定到90个差异蛋白, 而在NM组中共鉴定到182个差异蛋白。其中与能量代谢相关蛋白液泡ATP合酶上调表达17倍, 与家蚕抗病性相关的蛋白如ABC转运蛋白、PDCD6IP、核糖体蛋白等均有不同程度上调表达。GO注释和KEGG pathway分析结果表明, 饲喂诱导桑叶或涂布桑辛素N的桑叶会影响家蚕氨基酸代谢和丙酸代谢。因此, 光酶诱导桑叶及桑辛素N有可能发展成为一种潜在的用于提高家蚕的免疫力。

关键词 桑叶, 光酶诱导, 蛋白质组学, 家蚕, 中肠组织

桑叶为桑科植物桑的叶片, 《神农本草经》中称桑叶为“神仙叶”, 可用于治疗风热感冒, 肺热燥咳等病症, 是一种常用中药, 也是家蚕的主要食物来源^[1]。桑叶中所含的次生代谢产物如黄酮类、生物碱类、萜类及芪类化合物具有抗炎、抗病毒及抗菌等多种药理活性^[2]。光酶诱导是一种利用紫外光照射结合暗培养胁迫, 改变药用植物次生代谢过程, 从而提高药用植

物中活性成分含量的方法^[3]。前期研究表明, 光酶诱导的桑叶中次生代谢产物含量显著提高, 其中桑辛素N的含量增加了20倍^[4]。而桑辛素N是一种天然的植物抗毒素, 具有抗菌、抗病毒、抗氧化及酪氨酸酶抑制作用^[5]。

家蚕(*Bombyx mori* L.)是一种以桑叶为食的寡食性鳞翅目模式昆虫, 同时也是丝绸生产工业中的重要

引用格式: 虞姣姣, 彭晓国, 朱玮, 等. SWATH定量蛋白质组学揭示光酶诱导桑叶及桑辛素N对家蚕中肠组织的影响. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 436–446
Yu J J, Peng X G, Zhu W, et al. Proteomic analysis of midgut in silkworm reared on UV-B induced mulberry leaves and moracin N by SWATH-MS (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 436–446, doi: [10.1360/N052017-00198](https://doi.org/10.1360/N052017-00198)

经济昆虫^[6]。虽然家蚕没有适应性的免疫系统,但是它具有对病原微生物感染做出快速有效应答的先天性免疫系统^[7]。中肠是家蚕消化吸收营养物质的重要器官,也是抵御病原菌侵染的第一道生理屏障^[8]。Zhou等人^[9]比较了饲喂新鲜桑叶和人工饲料的家蚕中肠差异表达蛋白,考察不同的饮食方式对家蚕生长发育的影响,结果表明饲喂人工饲料能影响家蚕的免疫力和消化吸收能力,降低家蚕体内能量代谢过程,最终导致结茧率低,致病率高。但是,饲喂光酶诱导的桑叶及涂布天然植物抗毒素桑辛素N的桑叶对家蚕中肠组织的影响,尚未有报道。

随着家蚕全基因组序列测定的完成^[10],蛋白质组学已经广泛应用于家蚕各个组织部位的研究如中肠、丝腺、血液及脂肪体等^[11]。Gao等人^[12]利用iTRAQ技术对家蚕中肠进行差异蛋白质组学分析,结果发现家蚕感染BmCPV病毒后,其体内p62/sequestosome-1蛋白上调表达并通过调控细胞自噬和凋亡过程来抵御病毒侵入。通过对家蚕中肠的蛋白质组学分析,Feng等人^[13]揭示了高糖饮食能抑制家蚕的生长,其中生长因子相关蛋白IDGF起着重要的调控作用。SWATH技术是一种新型的数据非依赖性采集的蛋白定量技术,通过一次性进样分析即可获得复杂样品中所有肽段的定性与定量结果^[14],并且该定量方法具有较高的准确性和精确性,有利于低丰度蛋白的分析^[15]。因此,基于SWATH技术的家蚕中肠差异蛋白质组学分析将为揭示光酶诱导桑叶及涂布桑辛素N的桑叶对家蚕中肠组织的影响提供有力的帮助。

为了研究饲喂不同的桑叶对家蚕生长发育的影响,本文应用了SWATH定量蛋白质组学技术对饲喂新鲜桑叶、光酶诱导桑叶及涂布桑辛素N的桑叶的家蚕中肠组织进行蛋白质表达谱的差异分析。结果发现,饲喂光酶诱导桑叶和涂布桑辛素N的桑叶能影响家蚕的消化吸收功能,同时能改善家蚕的免疫系统。因此,光酶诱导桑叶及桑辛素N有可能发展成为一种潜在的药物用于提高家蚕的抗病性。

1 材料与方法

1.1 实验材料与中肠组织分离

家蚕品种:P50(中文名:大造),由浙江大学动物科学学院蚕蜂研究所提供。孵化后在25℃±1℃恒温培养

箱中生长,相对湿度为75%±2%。桑叶采摘自浙江大学桑树种质资源圃,诱导桑叶为采摘后的桑叶经1345.00 μW/cm²的UV-B照射15 min后,放入暗室培养18 h。桑辛素N由诱导桑叶中分离纯化得到,结构经核磁共振氢谱碳谱鉴定,含量经高效液相色谱检测大于97%^[4]。家蚕饲养共分3组,取90头4龄眠起家蚕,分别饲喂新鲜桑叶(FM)、诱导桑叶(UVM)、涂布桑辛素N的桑叶(NM)。并于5龄眠起后第1天解剖并分离中肠组织,置于冷的0.75%生理盐水中,洗涤后液氮冻存,保存于-80℃。

1.2 蛋白提取与定量

蛋白提取参考文献方法^[9],取中肠组织0.1 g,液氮充分研磨成粉末,加入蛋白裂解液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,5% CHAPS,2 mmol/L三丁基膦)后涡旋,室温放置1 h。之后,室温下,20000×g离心20 min,收集上清液即为蛋白液。采用Bradford法进行蛋白浓度的测定。

1.3 蛋白纯化、酶解与质谱分析

取100 μg蛋白液,参照文献^[16]采用甲醇/氯仿法进行蛋白的纯化以去除杂质。取400 μL甲醇加入100 μg蛋白溶液中,涡旋,接着加入100 μL氯仿和300 μL二次水。混匀后,室温下20000×g离心10 min,溶液发生分层且中间出现蛋白薄片。小心吸取上层水溶液并弃去,然后缓慢分次加入300 μL甲醇。接着,室温下20000×g离心10 min,弃去上清液,将所得蛋白固体放置空气中晾干。向所得蛋白沉淀中加入20 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃溶液重悬,加入50 mmol/L DTT溶液避光下,于56℃还原反应60 min,然后加入50 mmol/L碘乙酰胺溶液避光下于37℃烷基化反应60 min。向烷基化的蛋白溶液中按照1:100(酶:蛋白)比例加入胰蛋白酶,于37℃酶解16 h。脱盐,得到肽段溶液。

质谱仪为Trip-TOFTM5600,液相色谱采用Eksigent nanoLC-Ultra 2D系统(AB Sciex,美国)。离子源:ESI;喷雾电压:2.3 kV;一级扫描范围:350~1500 m/z。取2 μL肽段溶液上样,色谱柱为C¹⁸柱(100 mm×75 μm)。流动相为:A溶液(0.1%甲酸,2%乙腈),B溶液(0.1%甲酸,98%乙腈)。洗脱条件为线性洗脱:B溶液(5%~30%,120 min),流速为0.3 μL/min。

1.4 SWATH数据采集及参考谱库的建立

SWATH数据采集模式为信息相关采集模式(information dependent analysis, IDA), 一级扫描模式: 全扫描; 一级扫描范围: 350~1500 m/z; TOF分辨率设为30000; 碎裂模式: CID; 碎裂能量: 动态碎裂; 二级扫描范围: 350~1500 m/z. 将3组样本等量混合并进行质谱分析以建立SWATH-MS参考谱库. 采用ProteinPilot (V4.5.1)软件进行数据库检索以鉴定样品中的肽段和蛋白质. 数据库为2014年本地自建. 酶解: 胰蛋白酶; 固定修饰: 脲甲基半胱氨酸; 可变修饰: 氧化蛋氨酸; 假阳性率控制在小于1%, 肽段置信度阈值为99%. 肽段的绝对信号采用所有特征碎片离子的提取面积之和进行计算. 当同一个蛋白质的量在不用样品间的丰度比大于1.5或者小于0.667, 且 $P < 0.05$ 视为该蛋白为不同样品间的差异蛋白.

1.5 数据分析

鉴定到的蛋白氨基酸序列在UniprotKB/Swiss-Prot数据库中用BLASTP进行分析, GO号由UniprotKB中的ID mapping程序检索得到; 使用BLASEP在Uniprot数据库进行蛋白注释, 然后根据它们的生物学过程进行分类. GO注释的结果用WEGO (Web Gene Ontology Annotation Plot)来作图^[17]. 在KEGG数据库中对差异蛋白的序列进行搜索, 得到匹配上的KEGG途径. 采用SPSS (Version 22.0)软件对实验数据进行统计分析, 当进行两组间比较时, 选择Student's *t*-test作为显著性统计分析的方法. 当进行多组间比较时, 选择one-way ANOVA作为显著性统计分析的方法. 此外, 所有实验数据都是根据3次独立的生物学重复结果进行 $\bar{x} \pm SD$ 的计算. 当 $P < 0.05$ 时, 才被认为具有显著性差异.

2 结果

2.1 饲喂光酶诱导及涂布桑辛素N的桑叶的家蚕中肠差异蛋白质组学分析

前期研究发现, 桑叶经过光酶诱导后, 其次生代谢产物的含量发生显著性变化, 桑辛素N是其中变化较为显著的化合物之一. 将桑辛素N的混悬水溶液涂布在新鲜桑叶表面, 晾干后, 饲喂四龄家蚕. 于五龄眠起后第1天, 分离并收集各组家蚕中肠, 经蛋白提取、纯

化及酶解肽段后, 进行蛋白质组学分析, 共鉴定了346个蛋白(肽段置信度 $>99\%$, $FDR < 1\%$). 与FM相比, 在UVM中共鉴定了90个差异蛋白($peptide \geq 2$, $fold\ change \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67 , $P \leq 0.05$), 其中72个蛋白表达量上调, 18个蛋白表达量下调. 与FM相比, 在NM中共鉴定了182个差异蛋白, 其中29个蛋白表达量上调, 153个蛋白表达量下调(图1). 此外, 在240个差异蛋白中, 有32个蛋白为NM和UVM组所共有的差异蛋白, 150个蛋白为NM组所特有的差异蛋白, 58个蛋白为UVM组所特有的差异蛋白(图1).

2.2 差异表达蛋白的GO注释分析

在32个UVM和NM组共有的差异蛋白中, 有21个蛋白表达量上调, 11个蛋白表达量下调(表1). 与FM组相比, UVM和NM组中的液泡ATP合酶和羟酰基辅酶A脱氢酶的表达量均上调5倍以上, 此外UVM组中的线粒体导入受体以及NM中的神经软骨蛋白表达量也上调5倍以上. 而calexictin-2蛋白在两组中的表达量均下调64%以上(表1). 通过对32个共有差异蛋白的GO分析, 发现这些共有差异蛋白主要与细胞、细胞组分、结合、催化、细胞进程、建立定位、定位, 以及代谢过程有关(图2).

GO分析结果表明, 在UVM和NM组中, 差异表达的蛋白共被分为生物途径和3个大类25个子类. 其中UVM组中共有56个蛋白匹配到89个GO号, NM组中共有115个蛋白匹配到179个GO号. GO分类图表明与细胞、细胞组分、结合、催化、细胞进程和代谢过程功能相关的差异蛋白占了大部分(图3). 但是, 膜蛋白、抗氧化、酶的调节、细胞成分的生物合成, 以及对刺激的反应相关的差异蛋白仅存在于NM组中(图3).

2.3 差异表达蛋白的KEGG pathway分析

将GO注释后的蛋白进一步进行KEGG pathway富集分析. 在UVM组中, 90个差异蛋白中共有56个蛋白匹配上KEGG通路, 有9条KEGG通路是超过4个蛋白匹配的(图4A). 在NM组中, 182个差异蛋白中共有115个蛋白匹配上KEGG途径, 有31条KEGG通路是超过4个蛋白匹配的(图4B). 这些KEGG通路主要与代谢、细胞过程、人类疾病及信号转导等相关. 除了次生代谢生物合成和抗生素生物合成通路外, 氨基酸代谢是差

图1 饲喂不同桑叶的家蚕中肠差异蛋白质组学分析(网络版彩图)

异蛋白富集的主要通路之一(图4)。

2.4 饲喂光酶诱导桑叶和涂布桑辛素N的桑叶影响家蚕的氨基酸代谢

为了进一步揭示饲喂光酶诱导桑叶和涂布桑辛素N的桑叶后对家蚕代谢途径的影响, 将所有差异蛋白在KEGG数据库进行pathway匹配, 并对其中匹配上的

甘氨酸、丝氨酸、半胱氨酸代谢、亮氨酸异亮氨酸降解, 以及丙酸代谢通路进行分析(图5)。其中甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸代谢通路中的蛋白如羟基丙酮酸还原酶(hydroxypyruvate reductase, EC 1.1.1.81)、磷酸甘油酸变位酶(phosphoglyceromutase, EC 5.4.2.11)、磷酸丝氨酸转氨酶(phosphoserine aminotransferase, EC 2.6.1.52)等均下调表达。而亮氨酸和异亮氨酸降解通

图2 UVM和NM组中共有的32个差异蛋白GO功能注释分类图

路中大部分蛋白如酰基辅酶A脱氢酶(acyl-coenzyme A dehydrogenase, EC 1.3.99.12)、羟酰基辅酶A脱氢酶(3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, EC 1.1.1.35)、氨基丁酸转氨酶(4-aminobutyrate aminotransferase, EC 2.6.1.22)等均上调表达。丙酸代谢通路中的蛋白如2-氧代异戊酸脱氢酶(2-oxoisovalerate dehydrogenase, EC 1.2.4.4)、甲基丙二酸半醛脱氢酶(methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, EC 1.2.1.27)、硫辛酰胺酰基转移酶(lipoamide acyltransferase, EC 2.3.1.168)等均上调表达。

3 讨论

3.1 光酶诱导桑叶及涂布桑辛素N的桑叶具有潜在的调节家蚕免疫力的作用

在饲喂诱导桑叶组和涂布桑辛素N的桑叶组的差异蛋白中,有32个蛋白为NM组和UVM组所共有的差异蛋白,其中21个蛋白表达量上调,11个蛋白表达量下调(表1)。其中与家蚕抗病或免疫相关蛋白均有不同程度的升高。有研究表明,ATP合酶能激活gp64融合蛋白

的活性并促进感染病毒的细胞形成合胞体^[18]。Cheng等人^[19]发现,ATP合酶可能在病毒包膜融合及病毒粒子释放过程中起着重要作用,并且可能是家蚕免疫响应的重要蛋白^[20]。本研究中ATP合酶的表达量在UVM组和NM组中分别上调了17.88和14.56倍。并且与家蚕抗病免疫相关的其他蛋白均有不同程度的上调表达,如ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白不仅在分子转运过程中有重要作用,而且在抗病、代谢和发育中均起着重要作用^[21]。细胞程序性死亡蛋白在转录和翻译过程中起着重要作用能诱导癌细胞的凋亡^[22]。核糖体蛋白参与细胞大小的调节,能在细胞质和细胞核中被磷酸化,起到DNA修复和保护的作用^[23]。真核起始因子(eukaryotic initiation factor)在家蚕中参与翻译调控以响应各种环境胁迫,在细胞防御体系中也起着重要作用^[24]。这表明饲喂诱导桑叶和涂布桑辛素N的桑叶可能会改善家蚕的免疫力提高其抗病性。此外,clexcitin蛋白是键合钙和GTP的信号蛋白,具有抑制钾离子通道,增强细胞膜兴奋性的作用^[25]。钾离子通道与多种生理过程有关,在饲喂诱导桑叶后,clexcitin蛋白表达量下调了88%,而饲喂涂布桑辛素N的桑叶后下调了

表 1 饲喂诱导桑叶组和涂布桑辛素N的桑叶组所共有的家蚕中肠差异蛋白列表

序号	蛋白ID号	蛋白名称	匹配的肽段数	差异变化倍数 (UVM:FM)		差异变化倍数 (NM:FM)	
				比率	P值	比率	P值
1	gi 148298878	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (<i>Bombyx mori</i>)	6	17.88	0.00058	14.56	0.00014
2	BGIBMGA007409-PA	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (<i>Bombyx mori</i>)	3	13.78	0.00126	6.45	0.00369
3	gi 512908256	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog 1-like (<i>Bombyx mori</i>)	2	6.70	0.00346	4.93	0.00378
4	gi 95102546	ATP-binding cassette sub-family F member 2 (<i>Bombyx mori</i>)	2	4.76	0.04495	3.00	0.00291
5	gi 215435076	Transport protein Sec61 alpha subunit (<i>Bombyx mori</i>)	2	4.40	0.04556	3.44	0.04762
6	gi 512887085	Neurochondrin homolog (<i>Bombyx mori</i>)	2	3.79	0.00254	5.00	0.00079
7	gi 148298697	Eukaryotic initiation factor 5C (<i>Bombyx mori</i>)	3	3.15	0.01515	2.89	0.00177
8	gi 54609295	Ribosomal protein S7 (<i>Bombyx mori</i>)	3	3.12	0.01783	1.84	0.03990
9	gi 512894005	MAP7 domain-containing protein 1-like (<i>Bombyx mori</i>)	2	2.96	0.00852	1.63	0.02659
10	gi 512908162	Programmed cell death 6-interacting protein-like (<i>Bombyx mori</i>)	3	2.85	0.00083	1.94	0.00616
11	gi 512915254	Probable 4-coumarate-CoA ligase 3-like (<i>Bombyx mori</i>)	4	2.77	0.00436	1.76	0.03717
12	BGIBMGA014226-PA	Myosin heavy chain (<i>Bombyx mori</i>)	3	2.46	0.04697	3.18	0.0005
13	gi 95102688	Eukaryotic translation initiation factor 6 (<i>Bombyx mori</i>)	2	2.44	0.01530	1.72	0.04318
14	gi 155955	Transfer RNA-Ala synthetase (<i>Bombyx mori</i>)	5	2.39	0.00264	1.95	0.00468
15	gi 512894972	T-complex protein 1 subunit alpha-like (<i>Bombyx mori</i>)	2	2.38	0.02093	1.60	0.03986
16	BGIBMGA001037-PA	Leucine-tRNA ligase, cytoplasmic (<i>Bombyx mori</i>)	2	2.33	0.01745	1.76	0.00019
17	gi 95102692	Fructose-1,6-bisphosphatase (<i>Bombyx mori</i>)	3	2.32	0.00263	1.64	0.00594
18	gi 512908283	Apolipoproteins isoform X2 (<i>Bombyx mori</i>)	10	2.22	0.03787	1.97	0.00376
19	gi 512886957	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3-like (<i>Bombyx mori</i>)	3	2.06	0.04393	1.72	0.03951
20	gi 512899483	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 1-like (<i>Bombyx mori</i>)	3	1.59	0.00718	1.52	0.01239
21	BGIBMGA006179-PA	4-coumarate-CoA ligase 1-like (<i>Bombyx mori</i>)	7	1.52	0.00333	1.53	0.00236
22	gi 512902257	Uncharacterized protein LOC101739018 (<i>Bombyx mori</i>)	4	0.65	0.01484	0.44	0.00032
23	BGIBMGA008983-PA	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial (<i>Bombyx mori</i>)	4	0.63	0.03116	0.50	0.00349
24	gi 95102694	Ferritin (<i>Bombyx mori</i>)	2	0.61	0.0161	0.47	0.00894
25	BGIBMGA014429-PA	Serine protease (<i>Bombyx mandarina</i>)	3	0.59	0.00754	0.50	0.0011
26	gi 512922101	Atlastin-like (<i>Bombyx mori</i>)	3	0.58	0.00207	0.62	0.00446
27	gi 512924489	Myosin light chain alkali-like isoform X3 (<i>Bombyx mori</i>)	7	0.57	0.02465	0.45	0.00818
28	gi 19070649	Aminopeptidase N3 (<i>Bombyx mori</i>)	2	0.51	0.00881	0.55	0.00309
29	gi 95102914	Troponin C 25D (<i>Bombyx mori</i>)	2	0.45	0.00232	0.51	0.00113
30	gi 512902253	Uncharacterized protein LOC101738879 (<i>Bombyx mori</i>)	2	0.44	0.00341	0.20	0.0002
31	gi 512928590	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2 (<i>Bombyx mori</i>)	10	0.28	0.00032	0.38	0.00039
32	gi 512908327	Calexitin-2-like (<i>Bombyx mori</i>)	3	0.12	0.00391	0.36	0.01082

图3 光酶诱导桑叶组和涂布桑辛素N的桑叶组差异表达蛋白的GO功能注释分类图

64%, 这表明诱导桑叶和涂布桑辛素N的桑叶在影响家蚕免疫能力的同时也对其生理过程产生了一定的影响。

3.2 饲喂光酶诱导桑叶和涂布桑辛素N的桑叶影响家蚕氨基酸代谢和丙酸代谢

氨基酸代谢和丙酸代谢通路的KEGG分析结果表明, 甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸代谢通路中相关蛋白的表达量下调, 而亮氨酸异亮氨酸降解和丙酸代谢通路相关蛋白的表达量上调(图5)。家蚕体内氨基酸代谢对家蚕生长, 蛋白质合成及蚕丝形成具有密切的联系。有研究表明, 家蚕中存在一种隐性遗传的臭蚕, 其体内支链氨基酸代谢异常如亮氨酸、异亮氨酸大量积累^[26]。而在本研究中亮氨酸异亮氨酸降解通路中相关蛋白的上调表达可能参与维系家蚕体内亮氨酸和异亮氨酸含量的平衡。但是, 丝氨酸代谢通路中大部分蛋白均下调表达如磷酸丝氨酸转氨酶(phosphoserine aminotransferase)和羟基丙酮酸还原酶(hydroxypyruvate reductase)。磷酸丝氨酸氨基转移酶是L-丝氨酸生物合

成途径中的关键酶, 在家蚕氨基酸代谢和丝蛋白的合成中起着重要的作用^[27]。羟基丙酮酸还原酶是丝氨酸代谢通路中负责将羟基丙酮酸还原为甘油酸酯, 磷酸化后的甘油酸酯在磷酸丝氨酸氨基转移酶的作用下合成丝氨酸的前体磷酸丝氨酸^[28]。这表明, 虽然饲喂诱导桑叶和涂布桑辛素N的桑叶能改善家蚕的免疫能力, 但是可能会对家蚕丝蛋白的合成及产丝能力造成一定的影响。

3.3 光酶诱导桑叶及桑辛素N对家蚕中肠组织的影响

桑是一种重要的药用植物, 具有滋阴补血、疏风散热、益肝通气、降压利尿等功效。现代药理实验也证实了桑叶具有多种药理活性, 如抗凝血、降血压、抗炎、抗病毒和抗肿瘤等^[29]。其中微量存在于桑树根皮中的查桑酮具有较好的抗病毒^[30]和抗肿瘤^[31]作用, 桑辛素C具有抗炎作用^[32], 桑辛素N具有抗氧化作用^[5]。这些成分在桑树中含量低、结构复杂、化学合成困难。而光酶诱导法是在中药合成生物学的基础上利用

图 4 KEGG pathway分析(网络版彩图)

A: 饲喂光酶诱导组差异蛋白的KEGG pathway分析; B: 饲喂涂布桑辛素N的桑叶组差异蛋白的KEGG pathway分析

紫外光诱导提高药材中的活性成分含量。经光酶诱导后桑树叶片中查桑酮、桑辛素C、桑辛素N等活性成分的含量显著提高^[4], 这大大提高了桑叶的药用价值。

实验结果表明, 饲喂诱导桑叶和涂布桑辛素N的桑叶对家蚕中肠组织的影响存在较大差异: 与FM组相比, UVM组特有的差异蛋白共有58个, NM组特有的差异蛋白共有150个, 产生这种差异一方面是由于

光酶诱导引起桑叶中多种次生代谢产物的含量发生变化, 除了桑辛素N含量增加外, 光桑酮、查桑酮、莫拉查尔酮等化合物的含量均增加。因此, UVM组是多种化合物共同作用的结果。另一方面, NM组中在桑叶上涂布桑辛素N的量(66.57 $\mu\text{g/g}$ FW)远大于UVM组叶片中桑辛素N(5.33 $\mu\text{g/g}$ FW)的含量^[33], 这可能导致了饲喂涂布桑辛素N的桑叶对家蚕中肠组织的影响更大。

图5 甘氨酸、丝氨酸及半胱氨酸代谢, 亮氨酸及异亮氨酸代谢, 丙酸代谢通路中相关蛋白的变化
灰色代表鉴定到的蛋白上调表达, 黑色代表鉴定到的蛋白下调表达, 白色代表未鉴定到的蛋白

4 展望

光酶诱导技术能有效改善药用植物中活性成分的含量, 光酶诱导桑叶中次生代谢产物发生了变化如桑辛素N、桑辛素C、桑辛素M、光桑酮、桑根酮等化合物含量显著升高, 这些化合物在体外药理活性研究中均具有较好的抗氧化、抗菌和抗病毒等作用。与传统的化学合成蚕用药物相比, 光酶诱导桑叶所产生的

化合物是通过影响桑叶中次生代谢合成途径而生物合成, 能大大降低对家蚕的不利作用。本研究结果表明, 光酶诱导桑叶中产生的桑辛素N具有潜在的调节家蚕免疫力的作用, 今后可以成为一种新型蚕用天然药物。但是, 诱导桑叶中氨基酸代谢途径的变化说明光酶诱导也改变了桑叶中初生代谢产物如氨基酸、糖类和脂类等。因此, 光酶诱导桑叶中家蚕所需营养成分的变化及其对家蚕生长发育过程的影响值得进一步研究。

参考文献

- Zafar M S, Muhammad F, Javed I, et al. White mulberry (*Morus alba*): a brief phytochemical and pharmacological evaluations account. Int J Agric Biol, 2013, 15: 612-620
- Chan E W C, Lye P Y, Wong S K. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. Chin J Nat Med, 2016, 14: 17-30
- 马鲁豫, 陈润泽, 崔磊, 等. 光酶诱导技术增加植物活性成分的研究进展. 中国药理学杂志, 2010, 45: 1041-1045

- 4 Gu X D, Sun M Y, Zhang L, et al. UV-B induced changes in the secondary metabolites of *Morus alba* L. leaves. *Molecules*, 2010, 15: 2980–2993
- 5 Yang Z, Wang Y, Wang Y, et al. Bioassay-guided screening and isolation of α -glucosidase and tyrosinase inhibitors from leaves of *Morus alba*. *Food Chem*, 2012, 131: 617–625
- 6 Goldsmith M R, Shimada T, Abe H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annu Rev Entomol*, 2005, 50: 71–100
- 7 Yamakawa M, Tanaka H. Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol*, 1999, 23: 281–289
- 8 Yue Y J, Tang X D, Xu L, et al. Early responses of silkworm midgut to microsporidium infection—a digital gene expression analysis. *J Invertebr Pathol*, 2015, 124: 6–14
- 9 Zhou Z H, Yang H J, Chen M, et al. Comparative proteomic analysis between the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry leaves and on artificial diet. *J Proteome Res*, 2008, 7: 5103–5111
- 10 Xia Q, Zhou Z, Lu C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, 306: 1937–1940
- 11 刘培刚, 李卫国, 王永强. 家蚕蛋白质组学研究进展. *浙江农业学报*, 2010, 22: 124–129
- 12 Gao K, Deng X Y, Shang M K, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of midgut in silkworm infected with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus. *J Proteomics*, 2017, 152: 300–311
- 13 Feng F, Chen L, Lian C, et al. Comparative proteomic analysis reveals the suppressive effects of dietary high glucose on the midgut growth of silkworm. *J Proteomics*, 2014, 108: 124–132
- 14 Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: O111.016717
- 15 Basak T, Bhat A, Malakar D, et al. In-depth comparative proteomic analysis of yeast proteome using iTRAQ and SWATH based MS. *Mol Biosyst*, 2015, 11: 2135–2143
- 16 Komatsu S, Kobayashi Y, Nishizawa K, et al. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. *Amino Acids*, 2010, 39: 1435–1449
- 17 Ye J, Fang L, Zheng H, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: W293–W297
- 18 Kingsley D H, Behbahani A, Rashtian A, et al. A discrete stage of baculovirus GP64-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell*, 1999, 10: 4191–4200
- 19 Cheng Y, Wang X Y, Hu H, et al. A hypothetical model of crossing *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus through its host midgut physical barrier. *PLoS ONE*, 2014, 9: e115032
- 20 Chen H Q, Yao Q, Bao F, et al. Comparative proteome analysis of silkworm in its susceptibility and resistance responses to *Bombyx mori* densovirus. *Intervirology*, 2012, 55: 21–28
- 21 Liu S, Zhou S, Tian L, et al. Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 2011, 12: 491
- 22 Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, et al. Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor- β 1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2006, 25: 6101–6112
- 23 Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31: 342–348
- 24 Prasad M D, Han S J, Nagaraju J, et al. Cloning and characterization of an eukaryotic initiation factor-2 α kinase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1628: 56–63
- 25 Nelson T J, Cavallaro S, Yi C L, et al. Calexcitin: a signaling protein that binds calcium and GTP, inhibits potassium channels, and enhances membrane excitability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13808–13813
- 26 Inokuchi T, Yoshitake N. Abnormality of amino acid metabolism in the mutant-skunk of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Seric Sci Jpn*, 1978, 47: 154–160
- 27 Huang S H, Yao L L, Zhang J Y, et al. Direct and indirect effects of RNA interference against pyridoxal kinase and pyridoxine 5'-phosphate oxidase genes in *Bombyx mori*. *Gene*, 2016, 587: 48–52
- 28 Chistoserdova L V, Lidstrom M E. Cloning, mutagenesis, and physiological effect of a hydroxypyruvate reductase gene from *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, 1992, 174: 71–77
- 29 Nomura T. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. *Fortschr Chem Org Naturst*, 1988, 53: 87–201
- 30 Kim Y J, Sohn M J, Kim W G. Chalcomoracin and moracin C, new inhibitors of *Staphylococcus aureus* enoyl-acyl carrier protein reductase from *Morus alba*. *Biol Pharmaceut Bull*, 2012, 35: 791–795

- 31 Zhang Q J, Tang Y B, Chen R Y, et al. Three new cytotoxic Diels-Alder-type adducts from *Morus australis*. *Chem Biodivers*, 2007, 4: 1533–1540
- 32 Yao X, Wu D, Dong N, et al. Moracin C, a phenolic compound isolated from *Artocarpus heterophyllus*, suppresses lipopolysaccharide-activated inflammatory responses in murine Raw264.7 macrophages. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1199
- 33 Hu J, Zhu W, Li Y, et al. SWATH-based quantitative proteomics reveals the mechanism of enhanced *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-resistance in silkworm reared on UV-B treated mulberry leaves. *Proteomics*, 2017, 17: 1600383

Proteomic analysis of midgut in silkworm reared on UV-B induced mulberry leaves and moracin N by SWATH-MS

YU JiaoJiao¹, PENG XiaoGuo², ZHU Wei¹, GUAN QiJie¹, ZHONG ZhuoHeng¹, YAN HaiJian³ & TIAN JingKui^{1,4}

¹ College of Biomedical Engineering and Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

² Zhejiang Jolly Pharmaceutical Co., Ltd, Huzhou 313200, China;

³ Chun'an Country Cocoon & Silk Company, Hangzhou 311700, China;

⁴ Zhejiang-Malaysia Joint Research Center for Traditional Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

Mulberry is a kind of important medicinal plant and its leaf is the main food sources of silkworm. Previous studies showed that the content of secondary metabolites in mulberry leaves, particularly for moracin N, was increased after UV-B induction. To uncover the effects on the growth and development in silkworm reared on different mulberry leaves, SWATH-based proteomic technique was used to analyze the protein profiles of midgut in silkworm reared on fresh mulberry leaf (FM), UV-B induced mulberry leaf (UVM), and fresh mulberry leaf spread with moracin N (NM), respectively. Compared to the FM group, a total of 90 and 182 proteins were identified as differentially expressed proteins in UVM and NM groups, respectively. Of note, the abundance of vacuolar ATP synthase protein was increased by 17 times. The abundance of proteins related to silkworm disease resistance such as ATP-binding cassette, programmed cell death 6-interacting protein, and ribosomal protein were also increased. GO category and KEGG pathway analysis showed that amino acid metabolism and propanoate metabolism in silkworm were affected by UVM and NM. These results suggest that UVM and NM could be developed as a potential drug for improving the immune system in silkworm.

mulberry leaf, UV-B induction, proteomics, silkworm, midgut

doi: [10.1360/N052017-00198](https://doi.org/10.1360/N052017-00198)