

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

具鈣螯合能力肽對於 Caco-2 細胞和 HT-29 細胞
之促進鈣吸收機制

**Mechanism of calcium-stimulating absorption for peptides with
calcium-chelating activity in Caco-2 cells and HT-29 cells**

施映竹

Ying-Chu, Shih

指導老師：江文德 博士

Advisor : Wen-Dee Chiang, Ph.D.

中華民國一零七年七月

July, 2018

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 施映竹 君所提之論文

具鈣螯合能力肽對於 Caco-2 細胞和 HT-29 細胞

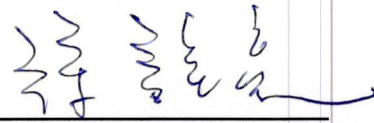
之促進鈣吸收機制

Mechanism of calcium-stimulating absorption for peptides with
calcium-chelating activity in Caco-2 cells and HT-29 cells

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任



指導教授



中華民國一零七年七月二日

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 施映竹 君所提之論文

具鈣螯合能力肽對於 Caco-2 細胞和 HT-29 細胞

之促進鈣吸收機制

Mechanism of calcium-stimulating absorption for peptides with
calcium-chelating activity in Caco-2 cells and HT-29 cells

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

林書如 宜蘭大學食品科學系 教授

蔡正宗 珍果生技股份有限公司 執行長

翁正光 東海大學食品科學系 教授

指導教授：

施映竹

中華民國一零七年七月二日

謝誌

在讀研究所這段期間，首先很感謝指導老師 江文德 教授，在面談我時第一眼就認同我，讓我進到江 LAB 家庭，在研究所這條路，學到的不只有學術上的專業知識，還學會如何面對挑戰以及解決問題，更能學到江老師身上的做事和做人處事的態度，使我受益良多，感謝之意無法用文字及言語表達。這段期間也是我人生中很重要的轉捩點，在我實驗最低潮的時候給予我最大的鼓勵及動力讓我沒有後悔走研究這條路，我很高興能把老師當作自己的朋友，一起分享生活的點點滴滴。

於論文口試期間，承蒙口試委員蔡正宗 博士、蘇正德 教授及林世彬 教授於百忙之中審閱論文、指證疏漏，並於口試時給予許多寶貴意見及指教，讓我受益良多。

進到東海食科系，受到許多人的幫忙與指教。首先，我要感謝江 Lab 的學長姐：有容、佑星、慈樺、暉婷，一開始進到實驗室什麼都不懂的我，在這些學長姐的教導後讓我慢慢上軌道；而在細胞實驗上，我很感謝宥勝學長及羽庭，教導對細胞一點概念都沒有的我們，即使我們一直問一樣的問題，他們都會耐心地回答我們，讓我們在細胞實驗的路程解了許多困惑，讓我們能順順利利產出 data；我很開心我在一間歡樂的實驗室裡，因為有你們：佳純、琇綾、上詠、文彥、宜榛、還有專題生們，因為打屁聊天所以很歡樂，很怕老師會不會嫌我們很吵，哈哈！讓我在讀研究所的這段期間不覺得乏味，是我來學校的動力之一，畢業後不知道會不會很懷念那種吵鬧的生活。

我真的真的很感謝我的研究同伴：琇綾、佳純和上詠。琇綾是一位很正向思考的女生，在我實驗低潮的時候，給予我極大的動力，讓我似乎又看到了希望，感謝妳在我最需要幫忙的時候給予我最大的幫助，認識妳真的很好，愛你；從生科系轉到食科系的我對食品相關的專業知識還不足，上詠給予我許多專業知識，而在實驗上也給我許多建議，幫了我好多，衷心感謝；佳純是我的心靈之窗，我們的想法很相似，因此很能夠了解對方在想什麼並給予最大的建議及慰藉，同時我們也是最佳血拚夥伴，哈哈，很愛很愛妳。

最後，我真的要好好的感謝我的爸爸媽媽，從以前就很支持我的選擇，不論是學業上、生活上或是工作上有任何問題，你們都會給予相當豐富的分析與回答，讓我在面對事情的時候不畏懼。未來，我相信能讓你們看到有所成就的我，相信投資我栽培我是對的選擇。真心的感謝家裡的每一個人，總是關心我哪時要畢業，哈哈！我現在可以大喊”我要畢業了”！！

學生 施映竹 謹誌於
東海大學食品科學研究所
機能性食品開發研究
中華民國一零七年七月二十五日

目 錄

壹、	前言.....	1
貳、	文獻回顧.....	3
	一、鈣對人體的重要性.....	3
	二、大豆與其蛋白水解物之相關研究.....	5
	三、胰蛋白酶 (Trypsin) -大豆蛋白水解物之研究.....	6
	四、人體中鈣質吸收與調節.....	7
	(一) 旁細胞途徑 (Paracellular pathway).....	8
	(二) 跨細胞途徑(Transcellular pathway).....	8
	五、蛋白質水解物可能促進小腸鈣吸收之研究.....	13
	六、大豆蛋白水解物促進鈣吸收之測定.....	14
	(一) Caco-2 cell 之體外測定.....	14
	(二) HT-29 cell 之體外測定.....	15
	七、跨上皮電阻測定.....	17
參、	材料與方法.....	20
	一、實驗材料與儀器.....	20
	(一) 樣品來源.....	20
	(二) 小腸上皮細胞株之培養.....	20
	(三) 跨上皮細胞電阻之測定.....	21
	(四) 細胞中鈣吸收量之測定.....	22
	(五) 蛋白質定量分析.....	22

(六) 西方轉漬法	22
二、實驗方法	23
(一) 實驗流程	23
(二) 細胞培養	23
(三) 細胞存活率測定	24
(四) 跨上皮細胞電阻測定	24
(五) 細胞鈣吸收量測定	25
(六) 蛋白質定量分析	25
(七) 西方轉漬法 (Western Blot)	26
(八) 統計方法	26
肆、結果與討論	27
一、Caco-2 細胞和 HT-29 細胞體外模式之建立	27
二、探討不同濃度之 SQ 和 NL 對細胞存活率之影響	29
三、探討時間對細胞中鈣離子運輸之影響	32
四、探討細胞中鈣離子通道之確立	32
五、探討不同濃度之 SQ 及 NL 合成胜肽對細胞鈣離子吸收之影響	36
六、.探討 SQ 及 NL 對鈣離子通道蛋白表現量之影響	43
伍、結論	49
陸、參考文獻	50

圖目錄

圖一、	不同胜肽經胃腸道消化酵素水解對鈣螯合增量之影響	9
圖二、	小腸中鈣離子吸收機制.....	12
圖三、	在穿透式電子顯微鏡下 Caco-2 cell & HT-29 cell 的生長情形。.....	16
圖四、	跨上皮細胞電阻試驗.....	19
圖五、	在光學顯微鏡下觀察 Caco-2 細胞和 HT-29 細胞的生長情形	28
圖六、	探討不同胜肽與鈣濃度對 Caco-2 細胞存活率之影響.....	30
圖七、	探討不同胜肽與鈣濃度對 HT-29 細胞存活率之影響	31
圖八、	培養時間及鈣濃度對 Caco-2 細胞鈣離子吸收之影響.....	33
圖九、	培養時間及鈣濃度對 HT-29 細胞鈣離子吸收之影響	34
圖十、	細胞中鈣離子通道之確立	35
圖十一、	探討在低鈣濃度 (4 mM) 下不同胜肽濃度對 Caco-2 細胞鈣吸收之影響	37
圖十二、	探討在高鈣濃度 (8 mM) 下不同胜肽濃度對 Caco-2 細胞鈣吸收之影響	38
圖十三、	探討在低鈣濃度 (4 mM) 下不同胜肽濃度對 HT-29 細胞鈣吸收之影響	39
圖十四、	探討在高鈣濃度 (8 mM) 下不同胜肽濃度對 HT-29 細胞鈣吸收之影響	41
圖十五、	在低鈣濃度 (4 mM) 下分別探討不同胜肽及其濃度對 Caco-2 細胞中 TRPV6 蛋白質表現量之影響	44

圖十六、在高鈣濃度（8 mM）下分別探討不同胜肽及其濃度對 Caco-2 細胞中
TRPV6 蛋白質表現量之影響45

圖十七、在低鈣濃度（4 mM）下分別探討不同胜肽及其濃度對 HT-29 細胞中
Cav1.3 蛋白質表現量之影響47

圖十八、在高鈣濃度（8 mM）下分別探討不同胜肽及其濃度對 HT-29 細胞中
Cav1.3 蛋白質表現量之影響48



摘要

本研究室先前的研究以分子量限值濾膜、逆相高效液相層析以及固定化金屬離子親和層析等，對大豆分離蛋白之 Trypsin 水解物進行促鈣吸收肽之分離純化，最後利用液相層析串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) 鑑定出具有鈣螯合作用之胜肽，分別為 NLQGENEEEDSGAIVTVK(NL)及 SQRPQDRHQK(SQ)。本研究目的為利用 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞探討 NL 和 SQ 合成胜肽對細胞促鈣吸收之機制。Caco-2 細胞及 HT-29 細胞皆為人類大腸癌細胞，當 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞分化後，其細胞型態分別類似於人類的十二指腸及空腸迴腸，具有豐富的微絨毛，在研究上常被用來模擬小腸上皮細胞。結果顯示，在低鈣濃度時，100 ppm NL 及 50~100 ppm SQ 均可顯著促進 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞鈣離子吸收。而在高濃度時，50 ppm NL 及 100 ppm SQ 亦均可顯著促進兩種細胞的鈣離子吸收。NL 及 SQ 可能是經由提升 Caco-2 細胞中 TRPV6 鈣離子通道蛋白的表現量而增加細胞鈣吸收的量；HT-29 細胞中 Cav1.3 鈣離子通道蛋白的表現量與細胞鈣離子吸收量沒有相關性，其細胞鈣離子機制還需再深入探討。

Abstract

Two calcium-chelating peptides have been identified from trypsin-isolated soy protein hydrolysates using membrane filtration, reversed phase high liquid chromatography, immobilized metal affinity chromatography and liquid chromatography coupled with mass spectroscopy(LC/MS/MS) in our previous studies. The amino acid sequence of the two peptides were NLQGENEEEDSGAIVTVK(NL) and SQRPQDRHQK(SQ). Therefore, the aim of this study was to further investigate the mechanism of calcium-stimulating absorption for these two peptides in both Caco-2 and HT-29 cells. This was because both Caco-2 cells and HT-29 cells were able to differentiate into human duodenum and jejunum cells respectively, which had structures of microvilli capable to be used as a model system for small intestinal epithelial cell research. The results showed that at low calcium concentrations, 100 ppm NL and 50~100 ppm SQ significantly promoted calcium absorption in Caco-2 cells and HT-29 cells. At higher calcium concentrations, 50 ppm of NL and 100 ppm of SQ also significantly promoted calcium uptake in both cells. In Caco-2 cells, the possible mechanism of calcium-stimulating absorption for NL and SQ was through increasing expression of calcium channel protein TRPV6. However, in HT-29 cells, increase of calcium absorption was not positively related with their expression of calcium channel protein Cav1.3. Further study of regulation mechanism for peptides with

calcium-stimulating absorption in HT-29 cells was suggested.



壹、前言

根據衛生福利部國民健康署調查，發現 6 歲以下幼兒的鈣攝取量不足率約 6 成，其他年齡層更高達 9 成以上，尤其是 13~18 歲青少年的鈣攝取近 100%未達建議量，顯示國人的鈣攝取量普遍不足(衛生福利部國民健康署, 2013)。因此，市面上有許多鈣補充產品，但研究證實這些鈣補充品的生物利用率低(AC, 2011)，故現在的研究多以促進鈣吸收為目標，以蛋白質作為原料，探討蛋白質水解物及生物活性肽與鈣形成可溶性複合物，以提高人體的生物利用率。

本研究室先前已篩選出具有鈣螯合能力之大豆分離蛋白水解物 (Isolated soy protein hydrolysate ; ISPH) 可增加鈣的溶解度，並以分子量限值 (Molecular weight cut-off, MWCO) 濾膜提升其鈣螯合增量，利用 30、10 及 1 kDa MWCO 濾膜對 ISPH 區分並測定其區分物之鈣螯合增量，結果顯示以 1 kDa MWCO permeate (1P) 具有最佳的鈣螯合增量，其鈣螯合增量可顯著的從 0.14 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}$ 增加到 1.83 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}$ ，後續 1P 以兩種分離方法再進行區分，第一種是利用逆相高效液相層析以極性大小區分，分離出三個區分物分別是 Reverse phase 1(RP1)、Reverse phase 2(RP2)、Reverse phase 3(RP3)進行鈣螯合增量測定，其中以 RP2 的鈣螯合增量為最高，其鈣螯合增量為 2.97 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}$ ；另一種則是 1P 以固定化金屬離子親和層析進行區分，吸附 1P 後的管柱經由 pH 2 乙酸緩衝溶液進行等位沖提 (isocratic

elution) 所得的區分物為 IIE2；或吸附 1P 的管柱以 pH6、pH4 及 pH2 乙酸緩衝液進行梯度沖提 (gradient elution) 所得區分物分別為 IGE6、IGE4 及 IGE2，將此四個區分物進行鈣螯合增量測定，其中以 IIE2 的鈣螯合增量為最高，可顯著的提升至 3.27 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}$ 。將 RP2 及 IIE2 進行胜肽序列鑑定，結果得到兩個序列，分別是 NLQGENEEEDSGAIVTVK(NL)及 SQR PQDRHQK(SQ)。經由模擬腸胃道試驗可得，NL 及 SQ 具有較佳的鈣螯合能力(周, 2018)。

Caco-2 細胞和 HT-29 細胞都是從人類大腸直腸癌細胞所分離出來的細胞株，其細胞經分化後的細胞型態分別類似於人類的十二指腸及空腸迴腸，具有豐富的微絨毛。因此常被用來體外模擬小腸的吸收實驗 (Liu et al., 2017)可應用在多方面的探討，如藥物在腸道吸收路徑 (Artursson et al., 2001; Sevin et al., 2013)、鈣吸收實驗 (Perego et al., 2013) 等。Caco-2 細胞和 HT-29 細胞中分別有鈣離子通道蛋白 TRPV6 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6) 及 Cav1.3 (Voltage-gated calcium channels)。本研究參考(T. Hou et al., 2015)等方法加以修改，利用 NL 和 SQ 兩種合成胜肽易與鈣螯合的特性，探討在模擬腸胃道的細胞中是否有促鈣吸收之可能機制，以了解腸道不同部位對鈣吸收的關聯性。

貳、 文獻回顧

一、鈣對人體的重要性

人體中含有多種礦物質，其中鈣的含量為第二多，約佔人體重量的1.5-2.2%，99%的鈣都儲存於骨頭和牙齒中，人體每天會持續製造骨頭，因此需不斷地吸收鈣並且將鈣沉積在新生骨中。鈣質吸收及鈣質沉積於骨中會隨著年齡而變化，在兒童和青少年發育期間，骨形成超過骨吸收，而在成年早期和中期，兩種過程相對平衡。在衰老成人中，特別是在停經後的婦女，骨質破壞的速度大於骨生成的速度而導致骨質流失，隨著時間而增加骨質疏鬆症的風險(AC, 2011)。剩下的1%鈣則存在血液中，血清中的鈣調節非常嚴謹，不會隨著食物中鈣攝入量的變化而有波動，人體中的骨組織為鈣的來源，保持血液，肌肉和細胞間液中鈣濃度不變。鈣離子涉及到全身，像是神經傳導、骨骼及肌肉生長等，因此鈣缺乏會影響生理機能、骨骼生長、骨質疏鬆、高血壓、心臟功能、智能發展等問題(Tunick, 1987)。先前研究指出，維生素 D 能夠增加腸道的鈣離子吸收(Fleet *et al.*, 2010)，同時也能降低心血管疾病及罹患乳癌的風險(Moyad, 2003)。

美國國家科學院醫學研究所食品與營養委員會 (Food and Nutrition Board, FNB) 訂鈣質攝取之每日建議量，兒童和青少年發育期間每日攝取量為 1000~1300 mg，成年人為 1000 mg，老年人則為 1200 mg。根據衛生福利部國民健康署調查，發現 6 歲以下幼兒的鈣攝取量不足

率約 6 成，其他年齡層更高達 9 成以上，尤其是 13~18 歲青少年的鈣攝取近 100%未達建議量，顯示國人的鈣攝取量普遍不足(衛生福利部國民健康署, 2013)。

因此現在市面上出現許多種補鈣相關之保健食品，這些鈣補充劑主要的形式是碳酸鹽和檸檬酸鹽，食物中的碳酸鈣被吸收的效率最高，而檸檬酸鈣不論在食物中或直接食用，其被吸收率一樣好(Deborah A. Straub MS, RD, 2007)。檸檬酸鈣也可用於胃酸過多、炎症性腸病或吸收障礙患者(AC, 2011)。但後來的研究顯示，即使補充更多的鈣，人體的生物利用率低，無法有效地吸收(AC, 2011)。由於以上的問題，現在的研究多以促進鈣吸收為目標，以蛋白質作為原料，探討蛋白質水解物及生物活性肽與鈣形成可溶性複合物，以提高人體的生物利用率。目前研究的原料有酪蛋白(Perego *et al.*, 2013)、吳郭魚魚鱗(Peng *et al.*, 2017)、雞蛋蛋白(Daengprok *et al.*, 2003)、鹹鴨蛋蛋白(Hou *et al.*, 2015)等，其中被列為最具有促鈣吸收的胜肽為酪蛋白磷酸肽(Casein phosphopeptide; CPP)，但由於製作價格昂貴，加上不適合給素食者食用，因此許多研究多以植物蛋白質為主要原料。

蛋白質水解胜肽中具有鈣螯合能力的胺基酸為 Glu、His、Lys、Ser 和 Asp(T. Hou *et al.*, 2015)。目前胜肽與鈣螯合的模式有兩種。

第一種是磷酸基團與鈣結合，酪蛋白磷酸肽(CPP)為代表，CPP 的結構中有許多高極性酸性序列，序列為 Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu(Cosentino *et al.*, 2010)。磷酸肽溶解鈣的主要關鍵在於磷酸絲胺酸殘基，磷酸絲胺酸殘基與鈣結合形成非晶體的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Anita *et*

al., 2003)。

(Sun et al., 2016)分別以 0~3 個連續或不連續的 Ser (P) s 為樣本，合成了 6 種不同的磷酸肽，研究了磷酸肽的分子結構與鈣結合性質之間的關係。結果顯示，肽中磷酸絲氨酸殘基的量和磷酸絲氨酸的位置對鈣結合性質都是重要的。具體而言，含有 3 個 Ser (P) 的磷酸肽結合鈣最佳並有效地抑制磷酸鈣沉澱，但釋放的鈣顯著降低。與磷酸肽中連續的 Ser (P) 相比，磷酸肽中不連續的 Ser (P) 被發現與鈣結合更弱，然而更容易釋放鈣。

另一種是羧基與鈣結合，大豆蛋白水解勝肽為代表。實驗證實，結合鈣的量隨著羧基含量的增加而線性增加，並且最可能的鈣結合位點是 Asp 和 Glu 的羧基 (Lv et al., 2013)。此外，結合鈣的濃度與大豆蛋白水解物 (Soy protein hydrolysate ; SPH) 的分子量相關，分子量為 14.4kDa 或 8-9kDa 的肽片段表現出高的鈣結合能力 (Lv et al., 2008)。這些結果說明了大豆肽具有螯合鈣能力且在鈣結合後形成特定的空間結構以促進鈣吸收。

二、大豆與其蛋白水解物之相關研究

大豆，學名為 *Glycine max(L.) Merrill*，其為豆科 (Fabaceae) 大豆屬 (Glycine) 之草本植物，原產地來自中國，長期以來一直栽植，為主要農作物之一。大豆的營養價值相較其他經濟農作物高，主要成分為 35~40%的蛋白質、30~35%的碳水化合物、約 20%的油脂和 4~5%灰份、微量飽和脂肪酸，其中蛋白質及脂肪酸多屬於必需胺基酸及必需脂肪酸。

大豆含有豐富蛋白質，大部分儲存於子葉中，其含量是穀類食物的4~5倍。大豆蛋白的胺基酸組成跟牛奶蛋白質相似，必需胺基酸都非常豐富，屬於植物性完全蛋白，故可供給素食者當作主要蛋白質來源。許多研究指出，大豆蛋白經由酵素水解成胜肽具有許多機能性功效，目前研究發現大豆水解之機能性胜肽具有降膽固醇(莊, 2006)、調節血糖(招, 2016)、抗脂肪生成(李, 2010)、免疫調節(呂, 2015)等作用。

三、胰蛋白酶 (Trypsin) -大豆蛋白水解物之研究

胰蛋白酶原在胰腺的腺泡外分泌細胞中產生。酶原在到達小腸腸腔後才被激活，腸激酶藉由水解酶原 NH₂ 末端六肽（在 Lys⁶-Ile⁷ 肽鍵處）來激活胰腺胰蛋白酶原轉變為胰蛋白酶。牛胰蛋白酶原由 229 個氨基酸的單一多肽鏈所組成，並通過六個雙硫鍵交聯。胰蛋白酶可以自動催化激活更多的胰蛋白酶原轉變為胰蛋白酶。此酵素在 pH 7.5 及最適溫度為 50°C 下有最大活性，主要切位點為 Lysin 及 Arginine 之 C 端。(Bjarni *et al.*, 1989)

本研究室先前已使用四種不同商業酵素 Alcalase[®]、Trypsin、Chymotrypsin 及 Pepsin，依照各酵素最適溫度及 pH 值水解七種不同的植物性蛋白，其中以 Trypsin 水解大豆蛋白具有最佳促鈣螯合作用(周, 2018)；該研究是以 3% 大豆蛋白溶液在 50°C 以及 pH 7.5 之條件下添加 1% Trypsin 進行水解，其中以 8 h 水解物 (Trypsin-isolated soy protein hydrolysate; TISPH8h) 之鈣螯合增量最佳且產量最高，因此以 T-ISP8h 進行後續的分離純化。探討不同分子量限值濾膜 (Molecular weight cut-off, MWCO) 對提升鈣螯合增量之影響，利用 30、10 及 1

kDa MWCO 濾膜對 T-ISP8h 區分並測定其區分物之鈣螯合增量，結果顯示以 1 kDa MWCO permeate (1P) 具有最佳的鈣螯合增量，其鈣螯合增量可顯著的增加到 1.83 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}$ ，後續 1P 以兩種分離方法再進行區分，第一種是利用逆相高效液相層析以極性大小區分，分離出三個區分物分別是 Reverse phase 1(RP1)、Reverse phase 2(RP2)、Reverse phase 3(RP3)進行鈣螯合增量測定，其中以 RP2 的鈣螯合增量為最高，其鈣螯合增量為 2.97 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}$ ；另一種則是 1P 以固定化金屬離子親和層析進行區分，吸附 1P 後的管住經由 pH 2 乙酸緩衝溶液進行等位沖提 (isocratic elution) 所得的區分物為 IIE2；或吸附 1P 的管住以 pH6、pH4 及 pH2 乙酸緩衝液進行梯度沖提 (gradient elution) 所得區分物分別為 IGE6、IGE4 及 IGE2，將此四個區分物進行鈣螯合增量測定，其中以 IIE2 的鈣螯合增量為最高，可顯著的提升至 3.27 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}$ 。將 RP2 及 IIE2 進行胜肽序列鑑定，結果得到兩個序列，分別是 NLQGENEEEDSGAIVTVK(NL)及 SQRPQDRHQK(SQ)。不同胜肽經由模擬腸胃道試驗可得，NL 的鈣螯合增量為 3.76，而 SQ 的鈣螯合增量為 2.15，兩者的鈣螯合增量皆大於 1P 及未過濾水解物，因此 NL 及 SQ 具有較佳的鈣螯合能力 (圖一)。

因此本研究將進一步藉由 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞探討 NL 及 SQ 對細胞促鈣吸收之機制。

四、人體中鈣質吸收與調節

當食物中的鈣進到人體時，主要的鈣離子吸收分為三大部分，包括小腸吸收、腎臟再吸收和骨頭再吸收，其中小腸吸收為最大宗，而本

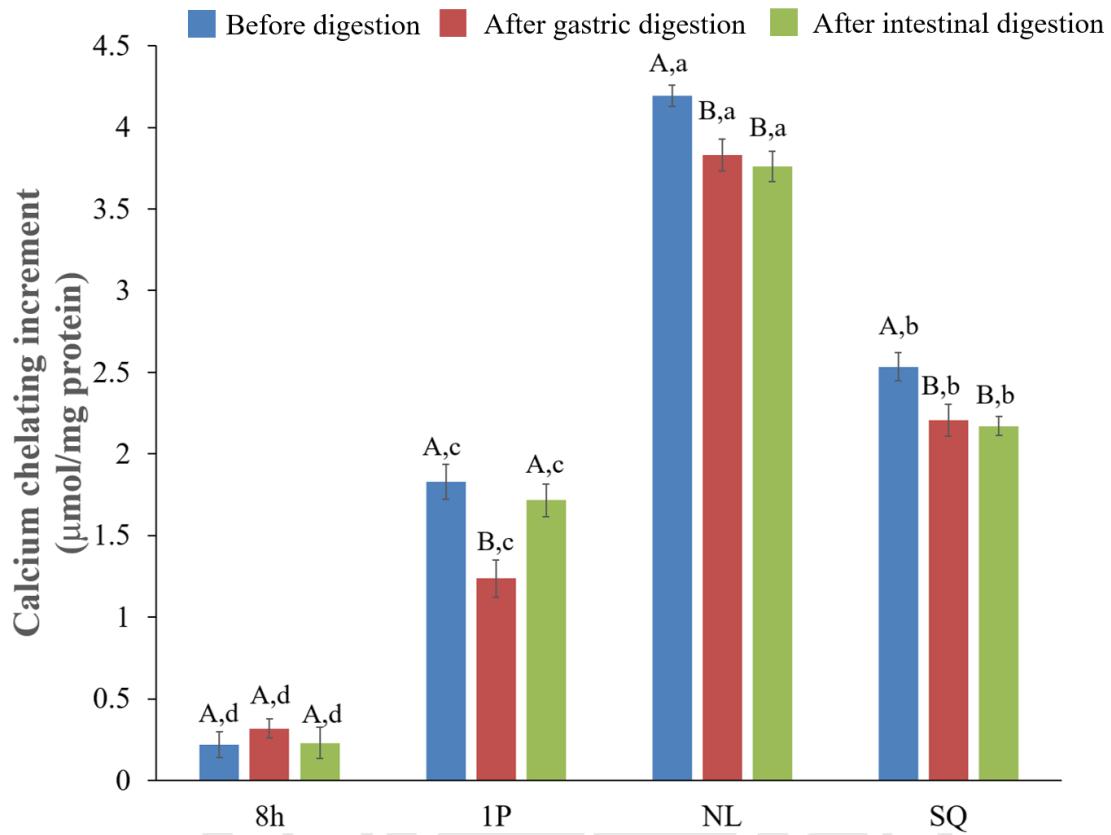
研究是探討小腸中鈣離子吸收的部分。小腸是由十二指腸、空腸及迴腸所組成，其鈣離子吸收包括藉由旁細胞 (Paracellular) 和跨細胞 (Transcellular) 吸收的兩大途徑 (Kellett, 2011)。

(一) 旁細胞途徑 (Paracellular pathway)

鈣離子旁細胞吸收主要發生在空腸以及迴腸。當細胞中腸腔的鈣離子濃度達到 5~200 mM 時擴散動力學會促使鈣離子隨著化學濃度梯度以被動運輸的方式進入到血液中 (Kellett, 2011)。

(二) 跨細胞途徑 (Transcellular pathway)

鈣離子跨細胞吸收主要發生在十二指腸，少部分在空腸及迴腸。當腸腔中鈣離子濃度低於 5 mM 且小於血漿中鈣濃度時，小腸上皮細胞的鈣離子通道蛋白會被啟動，並以主動運輸的方式進入血液中。鈣離子跨細胞吸收受營養和生理因素調節，尤其是維生素 D。跨細胞鈣吸收有三個步驟，首先鈣離子由跨越刷狀緣膜 (Brush border membrane; BBM) 進入細胞內，再到基底外側膜 (Basolateral membranes; BLM)，最後穿過 BLM 進到血漿中 (Pérez et al., 2008)。鈣離子跨細胞吸收有三種模型包括簡單擴散 (Simple diffusion)、囊泡運輸 (Vesicular transport) 及促進性擴散 (Facilitated diffusion) (Diaz de Barboza et al., 2015)。



圖一、不同胜肽經胃腸道消化酵素水解對鈣螯合增量之影響

Figure 1. Effect of different peptides following digested by gastrointestinal protease on calcium chelating increment. (周, 2018)

1. 簡單擴散

鈣離子經由通道蛋白進到細胞內藉由簡單擴散轉移至 PMCA1b (Ca^{2+} -ATPase)，再將鈣離子送至血漿中(Kellett, 2011)。

2. 囊泡運輸

當鈣離子藉由通道蛋白進到細胞內時，當 BBM 周圍鈣離子濃度快速增加，鈣離子聚集後會形成囊泡，這些囊泡會與含有鈣結合蛋白的溶酶體融合，最後移動到 BLM 以膜融合的形式將鈣離子送至血漿中(Kellett, 2011; Larsson et al., 2002)。

3. 促進性擴散

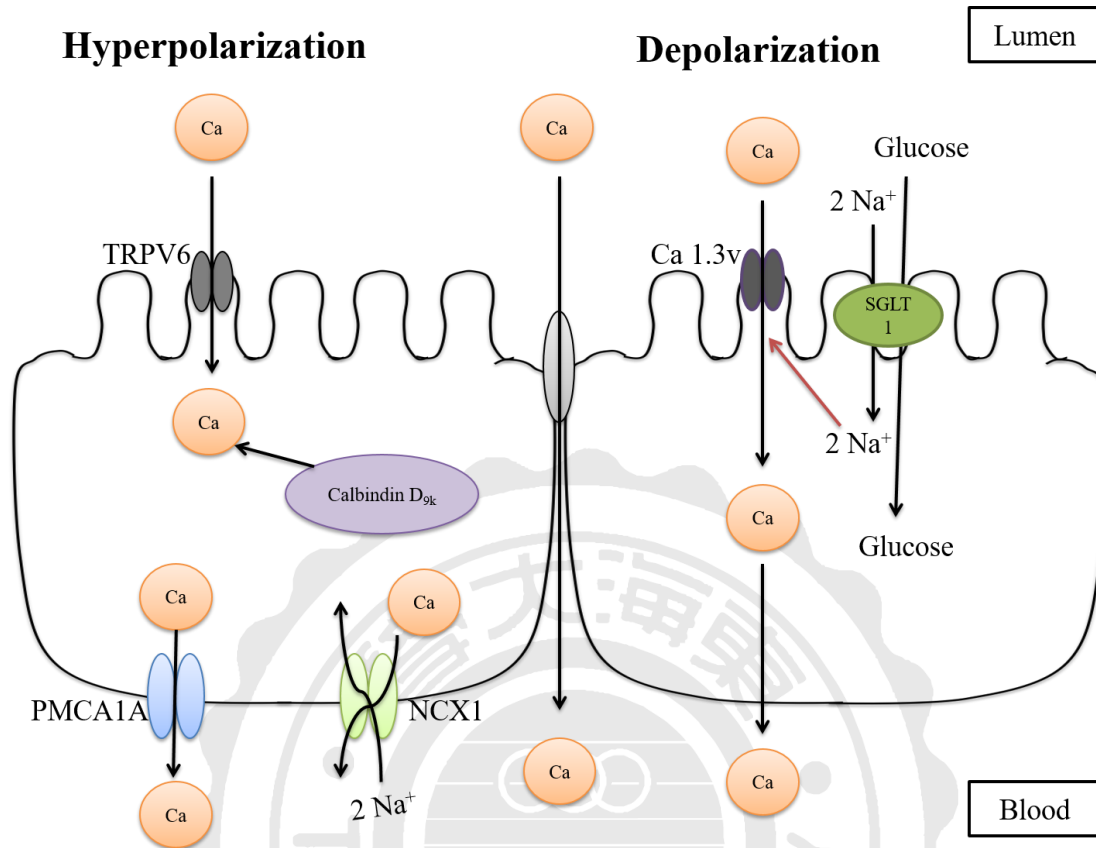
鈣離子會由 BBM 上的通道蛋白 TRPV6 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6)、TRPV5 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5) 及 Cav1.3 (Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit) 進入細胞內，細胞內的鈣結合蛋白會與鈣結合，通過細胞質轉運至 BLM，最後鈣離子會從鈣結合蛋白轉移至高鈣親和力的 PMCA1b (Ca^{2+} -ATPase) 及 NCX1 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger)，將鈣離子送至血漿中(Kellett, 2011)。

在十二指腸中，當腸腔的鈣離子濃度小於血漿中鈣離子濃度並且在過極化狀態 (Hyperpolarization) 時，也就是膜電位處於-90~-110mV(Morgan et al., 2003)，會促使腸腔中的鈣離子藉由通道蛋白 TRPV6 進入絨毛上皮細胞，接著鈣離子會結合於鈣結合蛋白 Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ ，最後再經由 PMCA1b (Ca^{2+} -ATPase) 及 NCX1 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) 通道蛋白進到血漿中。TRPV6 是膜蛋白瞬間受

體電位 (TRP) 家族成員之一，TRPV6 對鈣離子有選擇性，與近親同源物 TRPV5 共享，而 TRPV5 主要表現在腎臟，其作用為對鈣離子再吸收(Kellett, 2011)。

當吃完飯後，空腸及迴腸中有許多營養物質會使得腸腔呈現去極化現象 (Depolarization)，膜電位在-20~-10 mV(Morgan *et al.*, 2003)，同時腸腔內的 Na⁺/glucose 共同通過 SGLT1 轉運蛋白 (Sodium-dependent glucose cotransporters) 進到細胞內，此時會激活 Cav1.3 打開通道，使得鈣離子進到細胞內 (圖二) (Kellett, 2011)。Cav1.3 屬於電壓門控鈣通道 (Voltage-gated calcium channels) 家族中的 CaV1 亞家族之一成員。電壓門控鈣通道是細胞內 Ca²⁺瞬變的轉換器導致膜電位差異，啟動許多生理反應。在哺乳動物中有 10 個電壓門控鈣通道家族成員，它們在細胞信號傳導中有不同的作用。CaV1 亞家族引發特定感覺細胞的收縮、分泌、基因表達的調節、突觸輸入在神經元中的整合以及在帶狀突觸處的突觸傳遞。CaV2 亞家族主要負責在快速突觸處引發突觸傳遞。CaV3 亞家族對於有節奏地發射細胞如心肌細胞和丘腦神經元中的動作電位的重複性發放是重要的(Catterall, 2011)。

本研究採用 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞模擬小腸上皮細胞；Caco-2 細胞中有 TRPV6 鈣離子通道蛋白，而 HT-29 細胞中有 Cav1.3 通道蛋白，分別代表人類的十二指腸及空腸迴腸(*Perego et al.*, 2012; *Perego et al.*, 2013)。



圖二、小腸中鈣離子吸收機制

Figure 2. Mechanism of calcium absorption in the small intestine. (Kellett, 2011)

五、蛋白質水解物可能促進小腸鈣吸收之研究

目前 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞已被證明可用於鈣螯合肽對細胞吸收鈣之研究 (Guo *et al.*, 2014)。

酪蛋白磷酸肽 (Casein Phosphopeptides ; CPP) 可能將自身插入小腸上皮細胞膜上，把自己形成一種鈣通道蛋白，使得鈣離子進到細胞內 (Ferraretto *et al.*, 2001)。CPP 依賴於磷酸化的酸性基序 (acidic motif) 和前面的 N 末端部分所賦予的結構，其特徵在於存在環和 β -轉角 (β -turn)，這可以使它們具有適合插入 Caco-2 細胞和 HT-29 細胞質膜的物理化學特性 (Ferraretto *et al.*, 2001)。另有研究證實，將 CPP 與鈣結合成 CPP-Ca 複合體，探討 CPP-Ca 複合體對 HT-29 細胞鈣吸收之影響，結果顯示，CPP-Ca 複合體能顯著增加細胞內的鈣離子濃度 (Claudia *et al.*, 2007)，由此可進一步支持 CPP 作為一種鈣載體的概念 (Anita *et al.*, 2003)。

去鹽鹼鴨蛋蛋白肽 (DPs) 經由質譜儀分離得知 DPs 中含有豐富的 Glx (Glu + Gln) 和 Asx (Asp + Asn)，分別佔肽質量的 12.14 和 7.14 %。Ser, Leu, Phe, Thr 和 Met 的含量也均 > 5%，因此鑑定出七個胺基酸序列分別是 Val-Ser-Glu-Glu (VSEE)，Leu-Tyr-Ala-Glu-Glu (LYAEE)，Ile-Asn-Glu (INE)，Leu-Ser-Tyr-Leu (LSYL)，Leu-His-Gln (VHQ) 和 Ile-Leu-Lys-Asn (ILKN)，該肽具有 E, L, N, S 含量高的特點，在 VSEE 和 LYAEE 的 C-末端發現重複的 Glu 序列，Glu 的羧基為鈣提供許多潛在的結合位，而在 CPPs 中也發現 Glu-Glu。LSYL

和 LNSW 中，Ser 的磷酸化可改善鈣結合。VHQ 中 His 的咪唑環的 δ -N，存在可能大大有助於結合鈣，從蝦加工副產物水解產物中鑑定出一種鈣結合肽 Thr-Cys-His，並且其高鈣結合活性可能是由於存在 His 殘基。ILKN 中 Lys 側鏈胺基酸中的 N 為與鈣結合的位點，Lys 佔 DPs 質量的 4.5% (<5 kDa)，羅非魚規模蛋白質水解產物和牛血清蛋白水解產物的鈣結合肽中也鑑定出 Lys。根據這些研究的結果，可以推斷 Glu，Asp，His 和 Ser 殘基可能在 DPs 鈣螯合中起關鍵作用。研究使用 ITC 分析探討 DPs 與鈣相互作用的熱力學，結果顯示所有肽與鈣的結合常數相似，但顯著低於 EDTA，這表明這三種肽可以容易地釋放鈣。作者將這七種胺基酸分別進行三種模型的試驗：Caco-2 細胞單層模型，Caco-2 細胞群體模型和從大鼠擷取小腸上皮細胞模型，結果顯示七種胺基酸序列皆對細胞促鈣吸收有顯著增加，這些胺基酸序列的分子量皆小於 5 kDa，作者認為 DPs 對鈣吸收的貢獻可歸因於兩個因素：(1) DPs 的結構可以確保高保持生物活性，以使鈣與膜相互作用並打開特定的鈣通道；(2) 最適合的 DP 結構不僅與鈣結合而用於運輸，而且還容易釋放離子(Hou *et al.*, 2015)。而在另一篇研究顯示，DPs 能夠增加 Caco-2 細胞中 TRPV6 鈣離子通道蛋白及 CaD_{9k} 鈣離子轉運蛋白之表現量(Hou *et al.*, 2017)。

六、大豆蛋白水解物促進鈣吸收之測定

(一) Caco-2 cell 之體外測定

Caco-2 cell 類似於人類的十二指腸(Kellett, 2011)，是由人類大腸癌細胞所分離出來的細胞株，此細胞會形成像小腸上皮黏膜組織的癌細

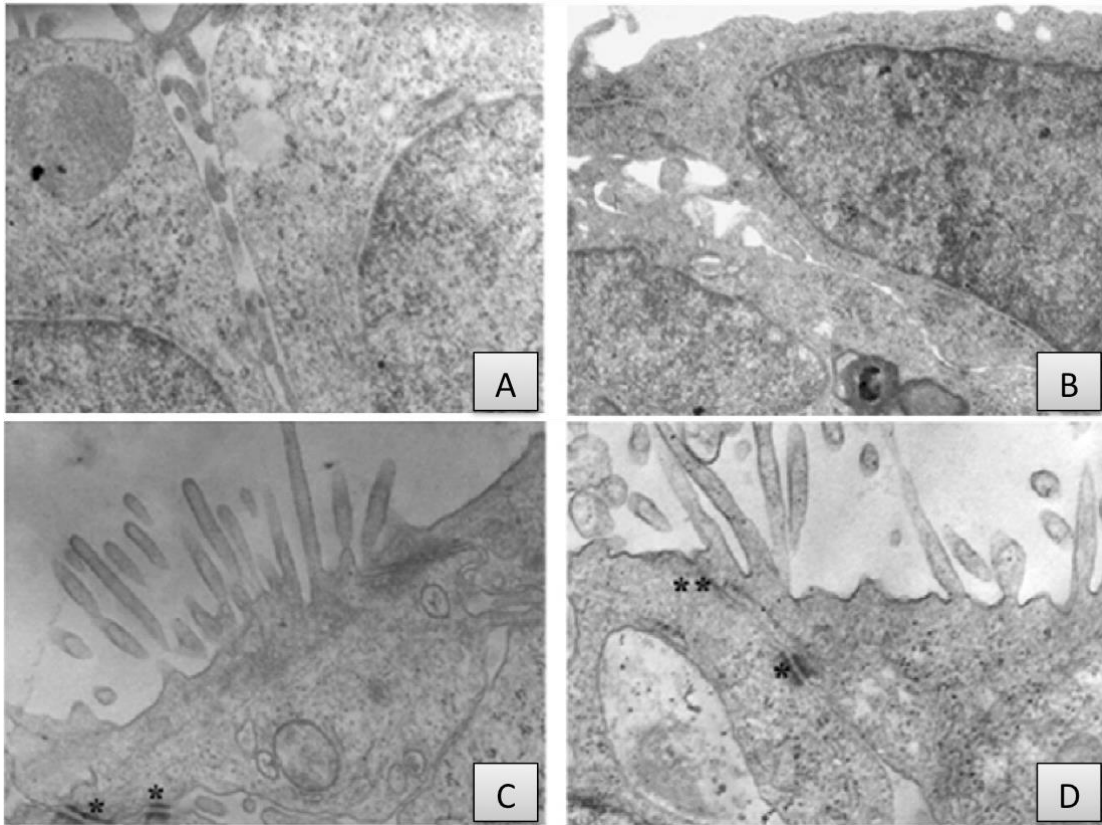
胞，屬於貼壁細胞，細胞特徵在培養至第七天會形成匯流聚集（圖三（B）），當培養至 14~21 天後會完全匯流合成單層（圖三（D）），利用穿透式顯微鏡觀察其表面會有類似絨毛的結構，其形態類似於人體中小腸上皮細胞，因此常被用來體外模擬小腸的吸收實驗(Sambuy *et al.*, 2005)，可應用在多方面的探討，如藥物在腸道吸收路徑(Artursson *et al.*, 2001)、鈣吸收實驗 (Lv *et al.*, 2008) 等。

(Lv *et al.*, 2008) 使用 Caco-2 cell 模擬腸道的實驗，探討大豆蛋白水解物 (Soy protein hydrolysate ; SPH) 結合鈣之複合物對體外鈣攝取之影響。此實驗是利用 fura-2 探針偵測細胞內鈣離子濃度的變化並以螢光強度表示，結果顯示 SPH-鈣複合物 (10-30kDa)，SPH-鈣複合物 (3-10kDa) 和 SPH-鈣複合物 (1-3kDa) 中改進的螢光強度顯著不同。SPH-鈣複合物 (10-30kDa) 發生相對螢光強度的最大值。SPH-鈣複合物 (10 至 30kDa) 之濃度在 0.5 至 4mg / mL 的範圍內對促進細胞鈣吸收有顯著上升。

(二) HT-29 cell 之體外測定

HT-29 cell 類似於人類的小腸中迴腸(Kellett, 2011)，HT-29 cell 是從大腸癌所分離出來的細胞株。細胞培養在 DMEM 培養液中，細胞型態呈現未分化現象（圖三（A））。但細胞培養在 RPMI1640 培養液中，細胞會呈現豐富的微絨毛，細胞間更加緊密結合，此時細胞呈現分化現象（圖三（C））。(Claudia *et al.*, 2007; Cosentino *et al.*, 2010)

(Perego *et al.*, 2012; Perego *et al.*, 2013)該研究探討酪蛋白磷酸肽 (CPP) 在 HT-29 細胞中促鈣吸收機制之影響。利用 HT-29 細胞



圖三、在穿透式電子顯微鏡下 Caco-2 cell & HT-29 cell 的生長情形。

Figure 3. Transmission electron microphotographs of undifferentiated/differentiated HT-29 and Caco2 cells. (A) HT-29 cell in 7 days (B) Caco-2 cell in 7 days (C) HT-29 cell in 14 days (B) Caco-2 cell in 14 days. Original magnifications are as follows: Panel A, $\times 14,000$; Panel B, $\times 19,000$; Panel C, $\times 10,000$; Panel D, $\times 20,000$. (Cosentino *et al.*, 2010)

模擬空腸及迴腸上皮細胞驗證 CPP 促鈣吸收的途徑是否由 CaV1.3 通道蛋白進到細胞內。作者利用刺激劑 Bay-K 8644 及抑制劑 Nimodipine 探討細胞鈣吸收途徑。實驗證實，Nimodipine 抑制 HT-29 細胞的 CaV1.3 通道蛋白後，細胞內鈣離子顯著性下降；相反地，Bay-K 8644 刺激 CaV1.3 通道蛋白，細胞內鈣離子顯著性上升。由此實驗可知，HT-29 中具有 CaV1.3 通道蛋白的存在。

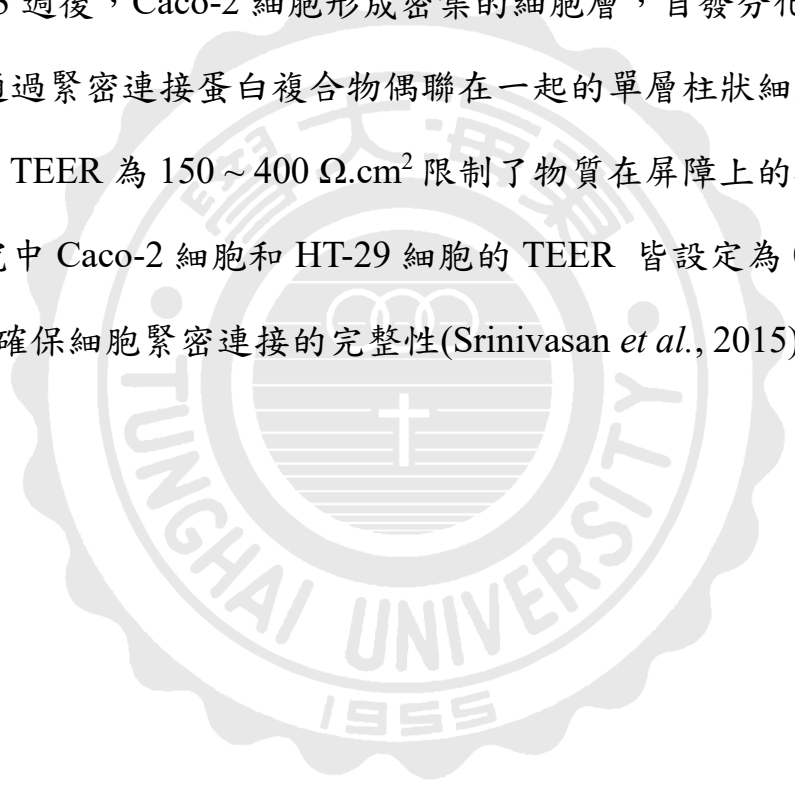
七、跨上皮電阻測定

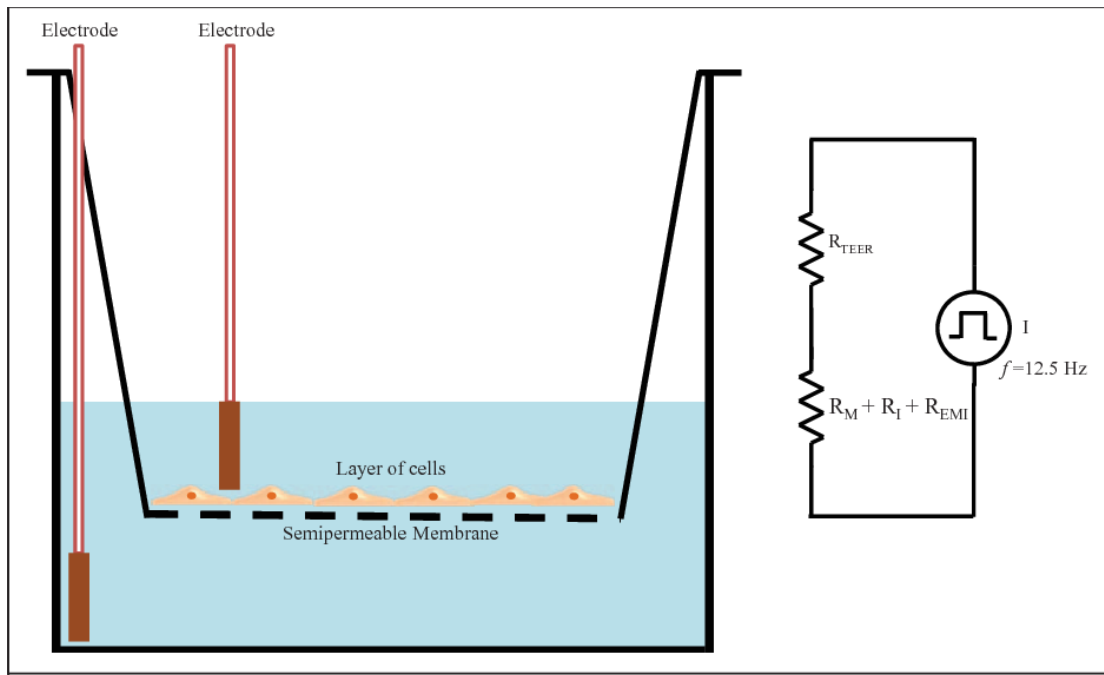
跨上皮電阻測定 (Transepithelial electrical resistance, TEER) 是一種廣泛接受的定量技術，用於測量內皮細胞和上皮細胞單層細胞培養模型中緊密連接的完整性 (圖四)。如圖四所示，TEER 測量的經典設置是半通透性濾膜的 insert 上培養單層細胞，insert 分為頂部 (或上部) 和基底外側 (或下部)，使用兩個電極，一個電極放置在上部隔室中，另一個放置在下部隔室中，並且電極由細胞單層隔開。理論上，歐姆電阻可以通過向電極施加直流 (DC) 電壓並測量所得電流來確定。歐姆電阻是根據歐姆定律來計算的，即電壓和電流的比值。電極的規格為 4 毫米寬和 1 毫米厚，其包含用於測量電壓的銀/氯化銀顆粒和用於通過電流的銀電極。測量程序包括測量半透膜 (無細胞) 的空白電阻 (R_{blank})，並測量半透膜上細胞層的電阻 (R_{total})，電阻的單位為 Ω ，可得以下公式計算：

$$\text{TEER}(\Omega * \text{cm}^2) = (R_{\text{total}} - R_{\text{blank}}) * \text{半透膜面積}(\text{cm}^2)$$

電阻越高代表細胞的緊密度越高(Hickman, 2016)

TEER 廣泛運用在屏障模型包括血腦屏障 (BBB)，胃腸 (GI) 道和肺模型(Srinivasan *et al.*, 2015)。研究將 TEER 運用於胃腸模型。目前，有許多細胞系及其共培養物正在研究胃腸道的體外模型。用於開發人體胃腸道體外模型最廣泛使用的細胞源自於人類大腸腺癌的 Caco-2 系。這些細胞可以在培養中維持數週，並且能夠在培養液中建立緊密連接。2~3 週後，Caco-2 細胞形成密集的細胞層，自發分化為極化的腸細胞和通過緊密連接蛋白複合物偶聯在一起的單層柱狀細胞。Caco-2 單層產生 TEER 為 $150 \sim 400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 限制了物質在屏障上的擴散。因此在本研究中 Caco-2 細胞和 HT-29 細胞的 TEER 皆設定為 $0 \sim 400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ，以確保細胞緊密連接的完整性(Srinivasan *et al.*, 2015)。





圖四、跨上皮細胞電阻試驗

Figure 4. Transepithelial electrical resistance (TEER)(Srinivasan *et al.*, 2015)

參、材料與方法

一、實驗材料與儀器

(一) 樣品來源

1. NL 及 SQ 合成胜肽由東海大學江文德老師實驗室提供
2. 酪蛋白水解物 (Hydrolysed casein protein, 15% CPP) 購自漢馨科技有限公司 (Taipei, Taiwan)

(二) 小腸上皮細胞株之培養

1. 細胞株

- (1) Caco-2 細胞株：C2BBel 購自 BCRC (Hsinchu, Taiwan)
- (2) HT-29 細胞株：WiDr 購自 BCRC (Hsinchu, Taiwan)

2. 細胞生長培養液

- (1) Caco-2 細胞培養液：Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、High glucose、4 mmol/L L-glutamine、110 mg/L sodium pyruvate、100 units/mL penicillin G、100 μ g/mL sodium streptomycin sulfate 購自 Gibco (NY, USA)
- (2) HT-29 細胞培養液：Modified Eagle's medium (MEM)、High glucose、4 mmol/L L-glutamine、110 mg/L sodium pyruvate、100 units/mL penicillin G、100 μ g/mL sodium streptomycin sulfate 購自

Gibco (NY, USA)

(3) 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 購自 Gibco (NY, USA)

(4) Nonessential amino acid 購自 BioWhittaker® (PA, USA)

(1) Sodium bicarbonate 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)

3. 繼代培養所需試劑

(1) Trypsin-EDTA 購自 Gibco (NY, USA)

(2) Trypan blue 購自 BioWhittaker® (PA, USA)

4. 細胞存活率所需試劑

(1) AlamarBlue™ Cell Viability Reagent 購自 Thermo

5. 細胞培養所需設備

(1) 細胞培養箱 (HEPA CLASS 100, Thermo, MO USA)

(2) 無菌操作台 (Bellco Glass, Inc., NJ, USA)

(3) 倒立式顯微鏡 (IX71, Olympus, Tokyo, Japan)

(4) 水浴槽 (SB-7D, Wissddm, Taipei, Taiwan)

(5) 抽氣幫浦 (Tokyo, Japan)

(6) CO₂ 鋼瓶購自昞暉有限公司 (Taichung, Taiwan)

(三) 跨上皮細胞電阻之測定

1. 測量電阻所需耗材

(1) 12-well Millicell Hanging Cell Culture Insert (PET 0.4 μm pore size, 12 mm diameter) 購自 Millipore Cor., Billerica (MA, USA)

2. 測量電阻所需設備

(1) Millicell ERS-2 Volt-Ohm Meter 購自 Millipore Cor., Billerica (MA,

USA)

(四) 細胞中鈣吸收量之測定

1. 測量鈣吸收所需設備

(1) 茲曼偏光原子吸收光譜儀購自 HITACHI (Tokyo, Japan)

(五) 蛋白質定量分析

1. BCA™ Protein Assay Kit Pierce Biorechology (IL, USA)

(六) 西方轉漬法

1. 材料

(1) Hydrochloric acid 購自聯工化學 (Hsinchu, Taiwan)

(2) Sodium dodecyl sulphate (SDS) 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)

(3) Acrylamide 購自 SERVA (Gaiberg, DE)

(4) Aminopropyltriethoxysilane (APS)購自 GERBU (Gaiberg, DE)

(5) 1,2-Bis(dimethylamino)ethane 購自 TEMED 1 購自 Alfa Aesar (MA, USA)

(6) Bis-tris methane 購自 J. B. Baker® (PA, USA)

(7) Glycine 購自 J. B. Baker® (PA, USA)

(8) polyvinylidene fluoride (PVDF) 購自 Millipore Cor., Billerica (MA, USA)

(9) Sodium chloride 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)

(10) Bovine serum albumin 購自 Gibco (NY, USA)

(11) Glycerol 及 Tween 20 皆購自 Panreac Quimca Sa (Barcelona, ES)

二、實驗方法

(一) 實驗流程



(二) 細胞培養

1. 解凍細胞

從液態氮桶中取出細胞株置入 37°C 溫水中，快速解凍 1 min 後，置入已加有 9 mL 新鮮培養液之培養皿中，再將培養皿放置 37°C、5% CO₂ 培養箱中生長。解凍隔天，將培養皿中的培養液以無菌吸管吸出，以 5 mL PBS 分別清洗兩次後，再加入 10 mL DMEM/MEM 培養液於培養皿中，於 37°C、5% CO₂ 培養箱中生長，當細胞完全貼壁時換新培養液，約培養 2~3 天後進行繼代培養。

2. 繼代培養

將培養皿中的培養液以無菌吸管吸出，以 5 mL PBS 分別清洗兩次

後，再加入 1 mL trypsin/EDTA 使細胞脫離壁面，放入 37°C、5% CO₂ 培養箱中作用 3 分鐘，輕輕拍打 dish 側邊使細胞更容易脫落壁面，再加入 2~3 倍量的 DMEM/MEM 培養液終止 trypsin/EDTA 的作用。將 dish 中細胞液分別取 1 mL 加入 2~3 盤已有 9 mL 新鮮培養液的培養皿中，再放置 37°C、5% CO₂ 培養箱中生長。

3. 細胞分化

(1) Caco-2 細胞

待培養皿中的 Caco-2 細胞長滿時，便會自行分化，約 14~21 天後細胞會長出微絨毛，即為完全分化細胞。

(2) HT-29 細胞

將培養皿中的 HT-29 細胞長約 90% 滿時，將培養液從 DMEM 轉換至 RPMI-1640 (low glucose 2 g/L)，約 10~14 天後細胞會長出微絨毛，即為完全分化細胞。

(三) 細胞存活率測定

待接種 12-well 的細胞培養 14 天後，以無菌吸管吸出廢液，再以 PBS 分別清洗兩次後，加入不同濃度的樣品，經過 24 h 培養後，以無菌吸管吸出廢液，再以 PBS 分別清洗三次後，加入 Alamar Blue 溶液培養 2.5 h 後，從 12-well 取每孔 200 μ l 至 96-well 中，在 575 nm 波長下以 ELISA Reader 進行分析。

(四) 跨上皮細胞電阻測定

將細胞以每孔 2×10^5 接種於 12 mm transwell 中培養 14~21 天。培養液體積是以 transwell 的上層加入 0.5 mL 培養液及下層加入 1.5 mL

培養液進行培養。每兩天就以跨上皮細胞電阻儀 (Transepithelial electric resistance, TEER) 進行電阻測試，以評估細胞緊密結合通透性。本研究的細胞電阻值需大於 $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 即代表細胞之間緊密連結的完整性，才能進行鈣吸收測定。

(五) 細胞鈣吸收量測定

以 HBSS 緩衝溶液 (125 mM NaCl, 4 mM KCl, 4 Mm L-Glu, 10 mM glucose, 30 mM HEPES, 調整至 pH 7.4) 清洗 12 mm transwell 兩次，並且在 37°C 培養 20 min。從培養箱取出後，將 transwell 換至注有 1.5 mL HBSS 緩衝溶液的 12-well 中，transwell 的上層加入 0.5 mL 之不同濃度的鈣離子溶液，每小時測量一次細胞電阻，共測量三次，確認細胞在鈣溶液中達到平衡狀態。接著在 transwell 的上層加入不同濃度的胜肽進行培養並測量加入不同濃度胜肽前後之細胞電阻，收集 transwell 下層的溶液，再利用茲曼偏光原子吸收光譜儀測定鈣離子濃度。

(六) 蛋白質定量分析

本實驗利用 BCA kit 檢測細胞中蛋白質濃度，先將 BCA 蛋白質分析試劑 A 與 B 以 50 : 1 的比例混成反應試劑，將反應試劑以每 well 200 μL 加入 96 孔盤中，再各別加入蛋白質標準品 (0-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bovine serum albumin, BSA) 或細胞破碎上清液 10 μL ，將反應試劑均勻混合， 37°C 下作用 30 min 後冷卻至室溫，使用 ELISA reader 以波長 562 nm 檢測其吸光值。而 BSA 濃度所得的標準曲線即可計算出細胞中的蛋白質含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)。

(七) 西方轉漬法 (Western Blot)

取蛋白質濃度 10 μ L 的細胞破碎上清液與樣品緩衝液混合，在 95°C 下加熱 5 min 使其變性，以 10 % SDS-PAGE 進行電泳將蛋白質分離，為了使蛋白質能讓抗體進行專一性的結合，分離後利用 Trans buffer (Tris-Bis 25 mM 及 Glycine 190mM) 使用電流將蛋白質在 250 v/200 mA/4°C/14 h 下轉漬於 polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上。將膜置於 2% BSA/TBST(Tris-HCl 200 mM、NaCl 1.5 M 及 1% tween-20)以 150 rpm 震盪 1 h 進行 Blocking，由於抗體以及目標蛋白都屬於蛋白質，都會殘留在轉漬膜上，因此利用別的蛋白將膜上孔洞填滿，避免沒有結合目標蛋白的抗體殘留在轉漬膜上，再以一級抗體辨識目標蛋白質，於室溫下震盪 2 h 或 4°C overnight，於 TBST 中漂洗 3 次後加入二級抗體，在室溫下震盪 1 h。最後再以 TBST 中漂洗 3 次於膜上加入 chemiluminescent HRP Substrate 反應，使用冷光儀偵測蛋白質表現量強度。

(八) 統計方法

所有實驗數據結果皆以平均值 \pm 標準差 (Mean \pm SD) 表示。利用 Statistical analysis system (SAS) 統計分析軟體，並以 Duncan's multiple range test 分析樣品數據之間是否具有差異性， $p < 0.05$ 為顯著差異。

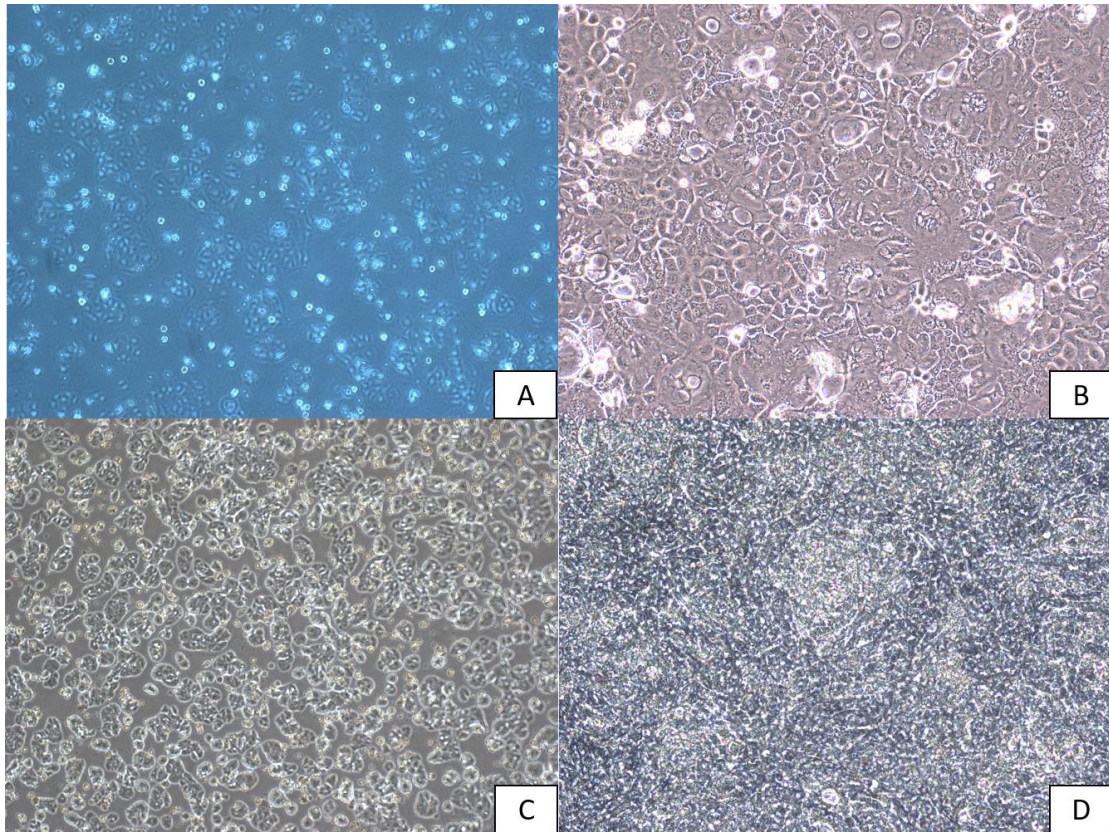
肆、 結果與討論

本研究室先前的研究以分子量限值濾膜、逆相高效液相層析以及固定化金屬離子親和層析對 T-ISP8h 進行促鈣吸收肽之分離純化，最後利用質譜儀鑑定出具有鈣螯合之胜肽片段並合成具有鈣螯合能力之胜肽，分別為 NLQGENEEEDSGAIVTVK(NL)及 SQRPQDRHQK(SQ)(周, 2018)。本研究目的為利用 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞探討 NL 和 SQ 合成胜肽對細胞鈣吸收之機制。

根據研究指出，在餐後的人體小腸腸腔中鈣離子濃度會在 7~8 mM (Bronner et al., 1986)，當小腸腸腔的鈣離子濃度低於 5 mM 時，鈣離子會以主動運輸的方式進入細胞內，而濃度達到 5~200 mM 時會以被動運輸的方式進入細胞中(Kellett, 2011)，因此本研究以 4 mM 及 8 mM 之鈣離子濃度分別模擬腸腔的低鈣及高鈣濃度環境。

一、 Caco-2 細胞和 HT-29 細胞體外模式之建立

圖五為光學顯微鏡下所觀察的 Caco-2 和 HT-29 細胞生長情形，其中圖五(A) 為接種 2×10^5 Caco-2 細胞於 12-well plate，細胞生長速度很快，在第四天能長到九成滿，在培養期間每兩天換培養液直到第 21 天後由圖五(B)可看到細胞已匯集形成無細胞間隔的單層膜，此時的細胞型態類似人類的十二指腸，TEER 值須高於 250 Ω (Srinivasan *et al.*, 2015)，以確保單層細胞的完整性，這結果與(Daengprok *et al.*, 2003; Lea, 2015)



圖五、在光學顯微鏡下觀察 Caco-2 細胞和 HT-29 細胞的生長情形

Figure 5. Light micrographs of Caco-2 cell and HT-29 cell. (A) Caco-2 cell culture on 4 days(40 \times) (B) Caco-2 cell culture on 21 days(100 \times) (C) HT-29 cell culture on 4 days(100 \times) (D) HT-29 cell culture on 21 days(100 \times).

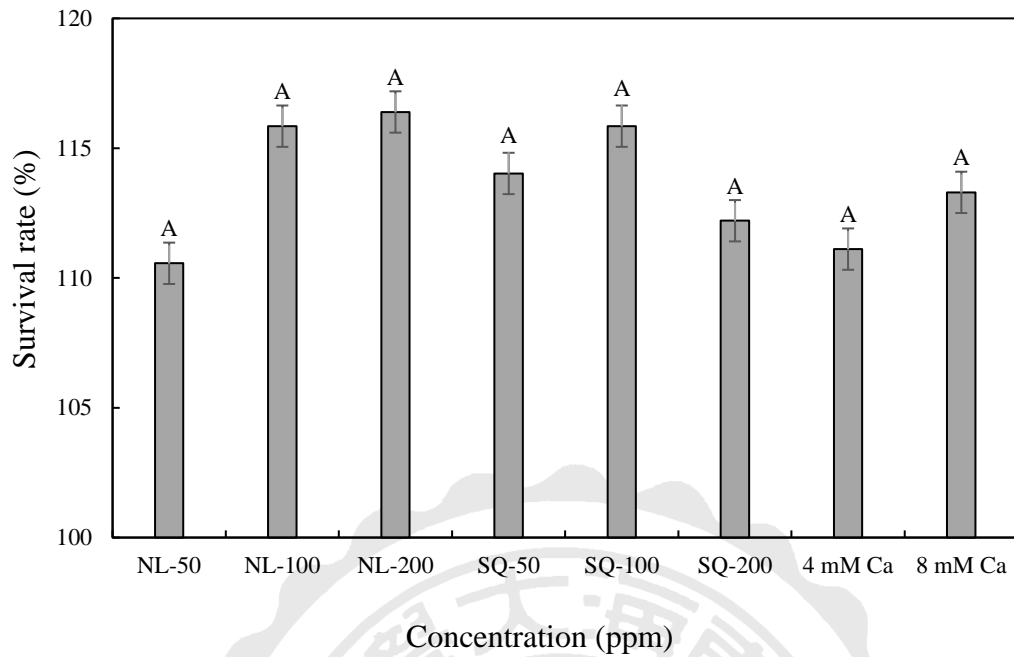
所做的 Caco-2 細胞培養相似，皆在 21 天完全分化，匯流聚集單層。

圖五(C)為接種 2×10^5 HT-29 細胞於 12-well plate，當細胞長滿時，將細胞培養液從 MEM 換成 RPMI1640，換成 RPMI1640 後每兩天換培養液直到第 21 天細胞會呈現豐富的微絨毛，細胞間更加緊密結合，此時細胞呈現分化現象(圖五(D))，TEER 值須高於 100Ω ((Srinivasan et al., 2015)，以確保單層細胞的完整性，這結果與(Polak-Charcon et al., 1989)所做的 HT-29 細胞相似。

分化後的 Caco-2 細胞與 HT-29 細胞型態皆具有絨毛構造，類似於人類的小腸上皮細胞，因此用來模擬腸胃道實驗。在本次的細胞培養為了避免擴增代數差距過大而產生的差異，因此 Caco-2 細胞所用的代數介於 44 到 49 之間，而 HT-29 細胞的代數介於 54 至 59 之間。

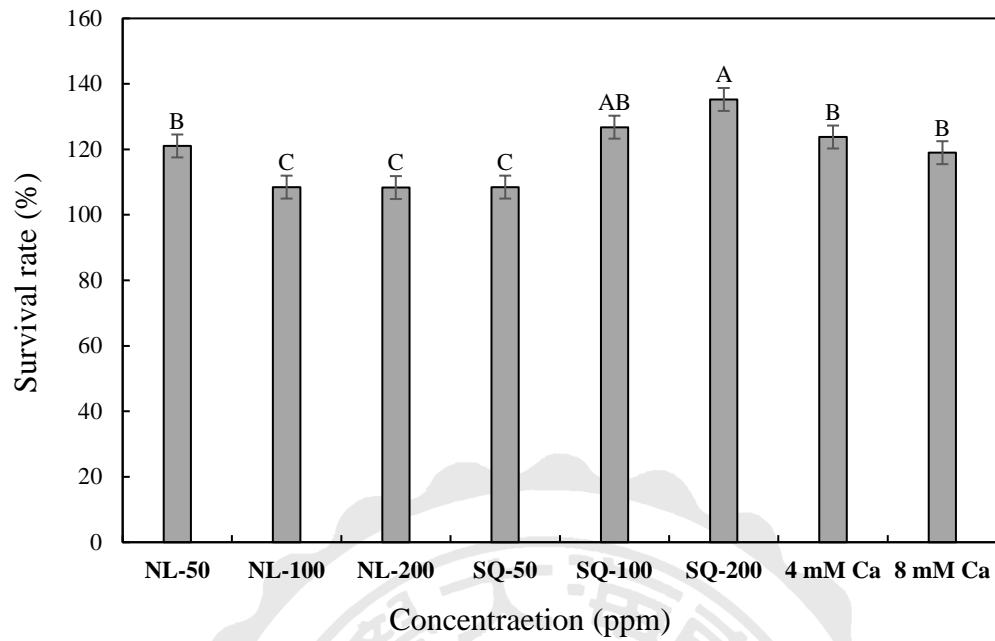
二、探討不同濃度之 SQ 和 NL 對細胞存活率之影響

圖六和圖七為加入不同濃度之 SQ、NL 及鈣對 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞存活率之影響。目的為找出不毒殺細胞之濃度並進行後續實驗，結果顯示，加入不同濃度的胜肽及鈣之後，不會毒殺 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞，因此本實驗中的胜肽濃度將採用 0~200 ppm，而鈣離子濃度為 4 及 8 Mm。



圖六、 探討不同胜肽與鈣濃度對 Caco-2 細胞存活率之影響

Figure 6. Effect of different concentration of peptides and calcium on the viability of Caco-2 cell. Bars represent mean±RSD, n=3. Means with different letter were significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖七、探討不同胜肽與鈣濃度對 HT-29 細胞存活率之影響

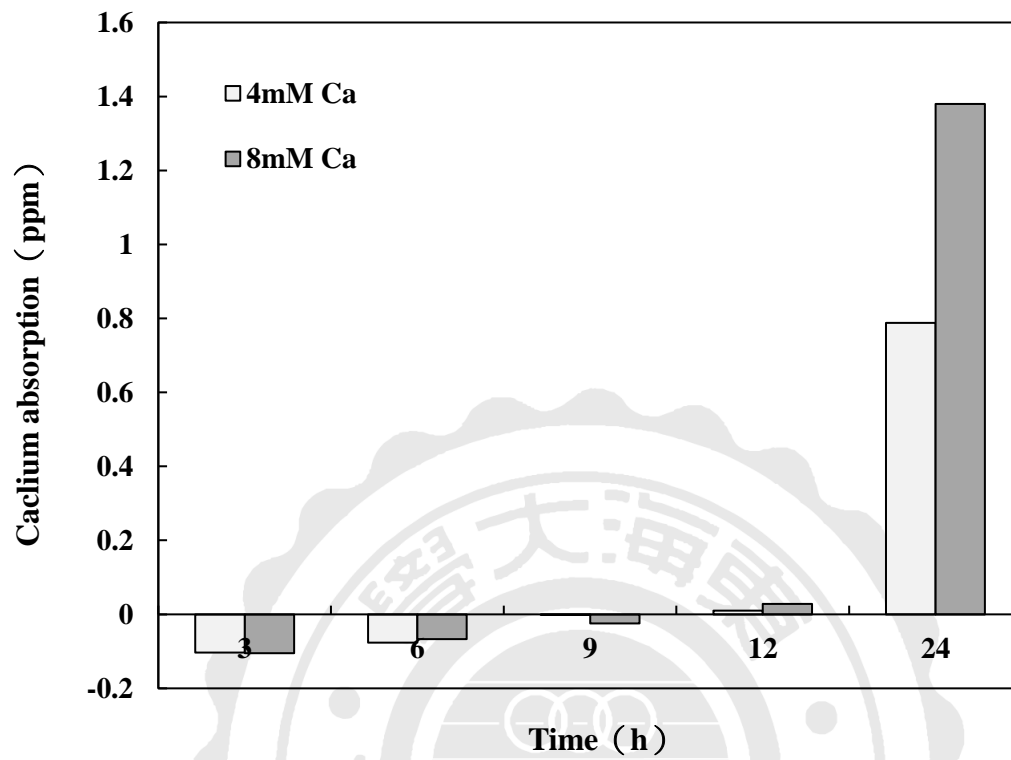
Figure 7. Effect of different concentration of peptides and calcium on the viability of HT-29 cell. Bars represent mean±RSD, n=3. Means with different letter were significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

三、探討時間對細胞中鈣離子運輸之影響

圖八及圖九分別探討培養時間及鈣濃度對 Caco-2 細胞與 HT-29 細胞鈣離子運輸之影響，將鈣離子溶液加進細胞中分別培養 3、6、9、12 及 24 h，結果得知，Caco-2 細胞對於鈣離子運輸比較慢，不論在低或高鈣濃度之下於 12 h 才開始有鈣離子從細胞底層釋出(圖八)。而 HT-29 細胞不論在低或高鈣濃度之下，在 3 h 就有鈣離子釋出(圖九)。本次結果與(Hou *et al.*, 2017; Tao Hou *et al.*, 2015)不同，他們的研究中 Caco-2 細胞培養 6 h 就有鈣離子從細胞底層釋出。此差異的可能原因為本研究所用的細胞代數與其不同，加上在不同實驗室所馴化出來的細胞會有些許差異而導致鈣離子釋出的時間不一樣，但在細胞型態上是一致的。

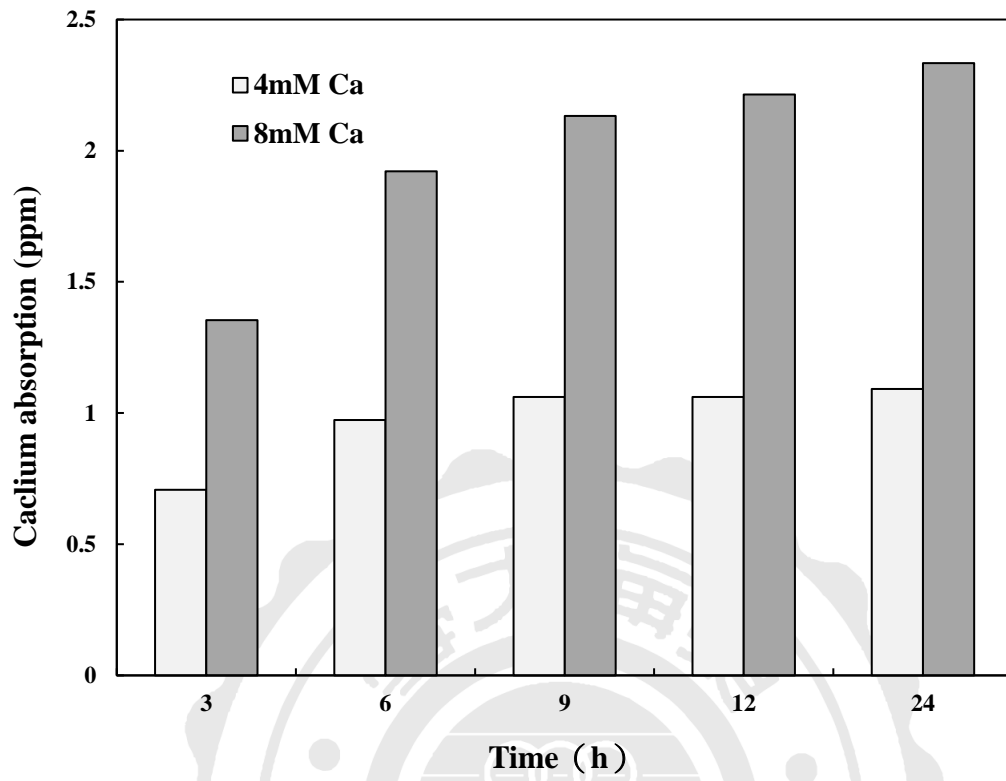
四、探討細胞中鈣離子通道之確立

圖十為利用西方轉漬法驗證 Caco-2 細胞與 HT-29 細胞中是否分別含有鈣離子通道蛋白 TRPV6 及 Cav1.3 的存在。Caco-2 細胞及 HT-29 細胞已被證實分別具有 TRPV6 及 Cav1.3 鈣離子通道蛋白(Kellett, 2011)，本次實驗結果驗證，不添加任何樣品及鈣離子溶液下，Caco-2 細胞中確定有 TRPV6 鈣離子通道蛋白的存在，而在 HT-29 細胞中確定有 Cav1.3 鈣離子通道蛋白的存在。



圖八、 培養時間及鈣濃度對 Caco-2 細胞鈣離子吸收之影響

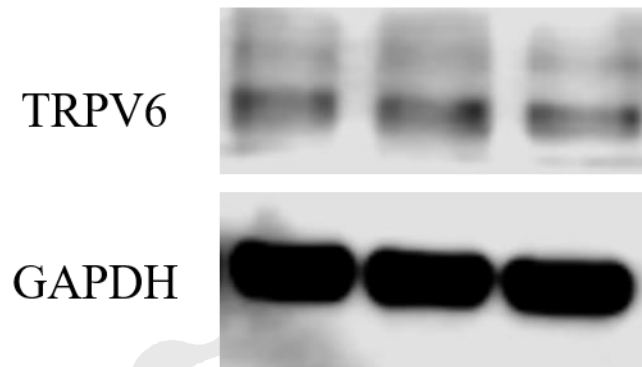
Figure 8. Effect of incubation time and calcium concentration on calcium absorption in Caco-2 cell.



圖九、 培養時間及鈣濃度對 HT-29 細胞鈣離子吸收之影響

Figure 9. Effect of incubation time and calcium concentration on calcium absorption in HT-29 cell.

A



B



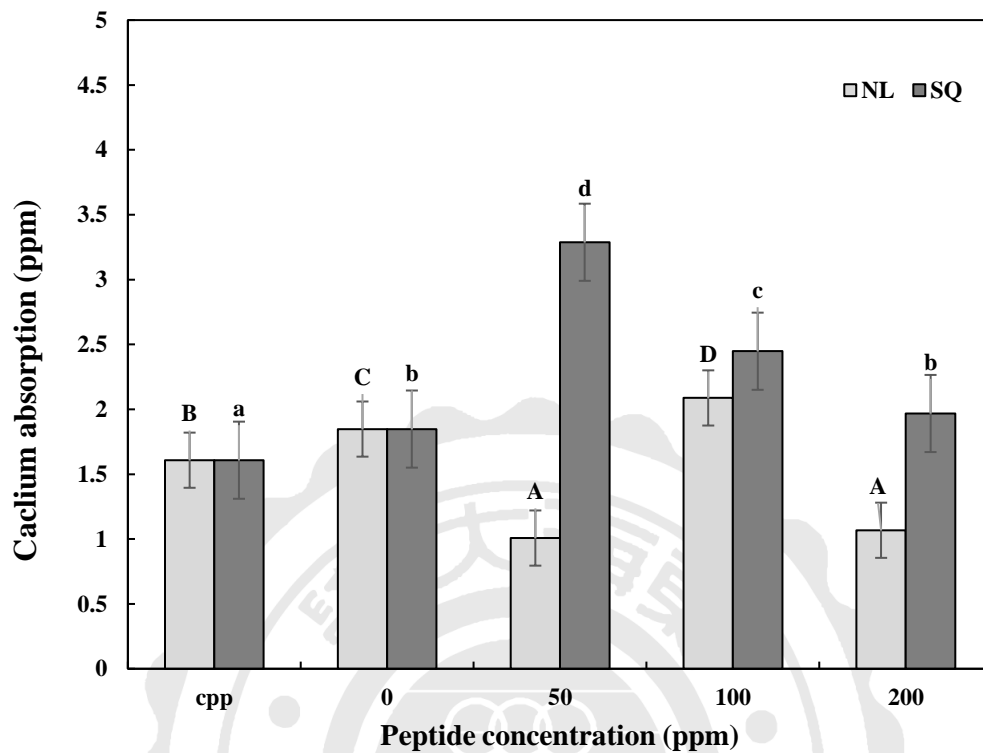
圖十、細胞中鈣離子通道之確立

Figure 10. Confirmation of calcium channel in cells by western blot.

(A)TRPV6 in Caco-2 cells (B)Cav1.3 in HT-29 cells

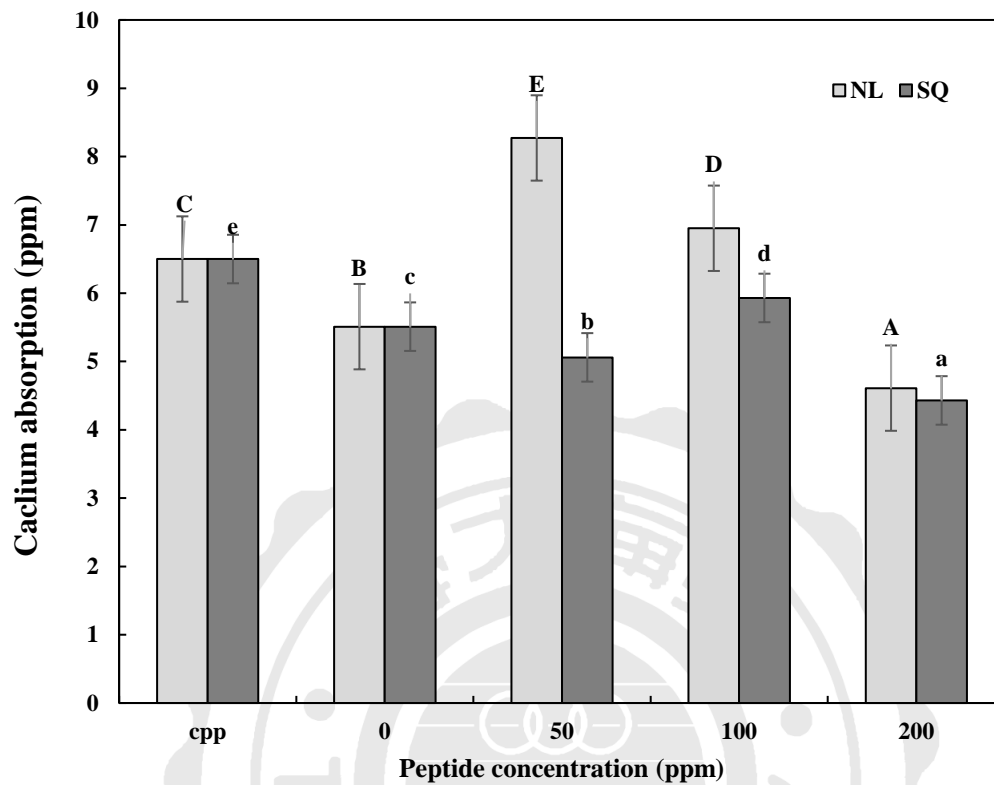
五、探討不同濃度之 SQ 及 NL 合成胜肽對細胞鈣離子吸收之影響

本次實驗所添加的胜肽濃度分別為 50、100 及 200 ppm，當胜肽添加濃度為 0 時，代表是控制組；圖十一為探討在低鈣濃度（4 mM）下不同胜肽濃度對 Caco-2 細胞鈣吸收之影響，結果顯示，加入 50~200 ppm 的 SQ 合成胜肽後，Caco-2 細胞的鈣離子吸收量有先增後減的趨勢，其中 50 和 100 ppm SQ 均顯著高於控制組與 CPP 組；而加入不同劑量的 NL 合成胜肽，只有 100 ppm NL 可顯著高於控制組與 CPP 組，再將兩種胜肽具有較佳鈣吸收能力的濃度相比，可得知 50 ppm SQ 顯著高於 100 ppm NL，因此 50 ppm SQ 對在低鈣濃度下的 Caco-2 細胞具有較佳的鈣吸收能力。圖十二為探討在高鈣濃度（8 mM）下不同胜肽濃度對 Caco-2 細胞鈣吸收之影響。加入不同劑量的 SQ 合成胜肽後，只有 100 ppm SQ 可使 Caco-2 細胞的鈣離子吸收量與控制組比較顯著增加，但低於正控制組 CPP。而加入不同劑量的 NL 合成胜肽對鈣的吸收有先增後減的趨勢，其中 50 和 100 ppm NL 均顯著高於控制組與 CPP 組，再將兩種胜肽具有較佳鈣吸收能力的濃度相比，可得知 50 ppm NL 顯著高於 100 ppm SQ，因此 50 ppm NL 對在高鈣濃度下的 Caco-2 細胞具有較佳的鈣吸收能力。圖十三為探討在低鈣濃度（4 mM）下不同胜肽濃度對 HT-29 細胞鈣吸收之影響。結果顯示，加入 50~200 ppm SQ 合成胜肽後，HT-29 細胞的鈣離子吸收量均顯著高於控制組，其中 100 及 200 ppm SQ 鈣吸收量又比 CPP 組效果更佳；而加入 50~200 ppm NL 合成胜肽，細胞的鈣離子吸收量亦顯著高於控制



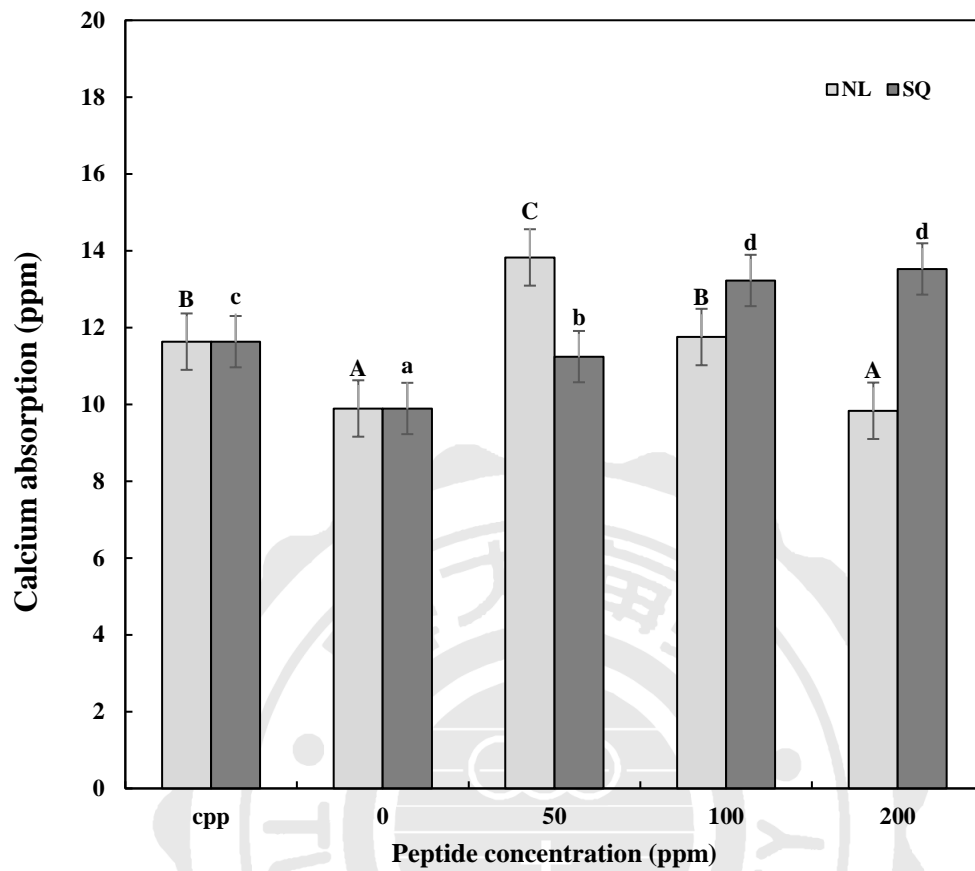
圖十一、探討在低鈣濃度（4 mM）下不同胜肽濃度對 Caco-2 細胞鈣吸收之影響

Figure 11. Effect of different concentration of peptides on calcium absorption under low-calcium concentration in Caco-2 cells. Bars represent mean \pm RSD, n=3. Means with different letter were significant difference within the same peptides ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖十二、 探討在高鈣濃度（8 mM）下不同胜肽濃度對 Caco-2 細胞鈣吸收之影響

Figure 12. Effect of different concentration of peptides on calcium absorption under high-calcium concentration in Caco-2 cells. Bars represent mean±RSD, n=3. Means with different letter were significant difference within the same peptides ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



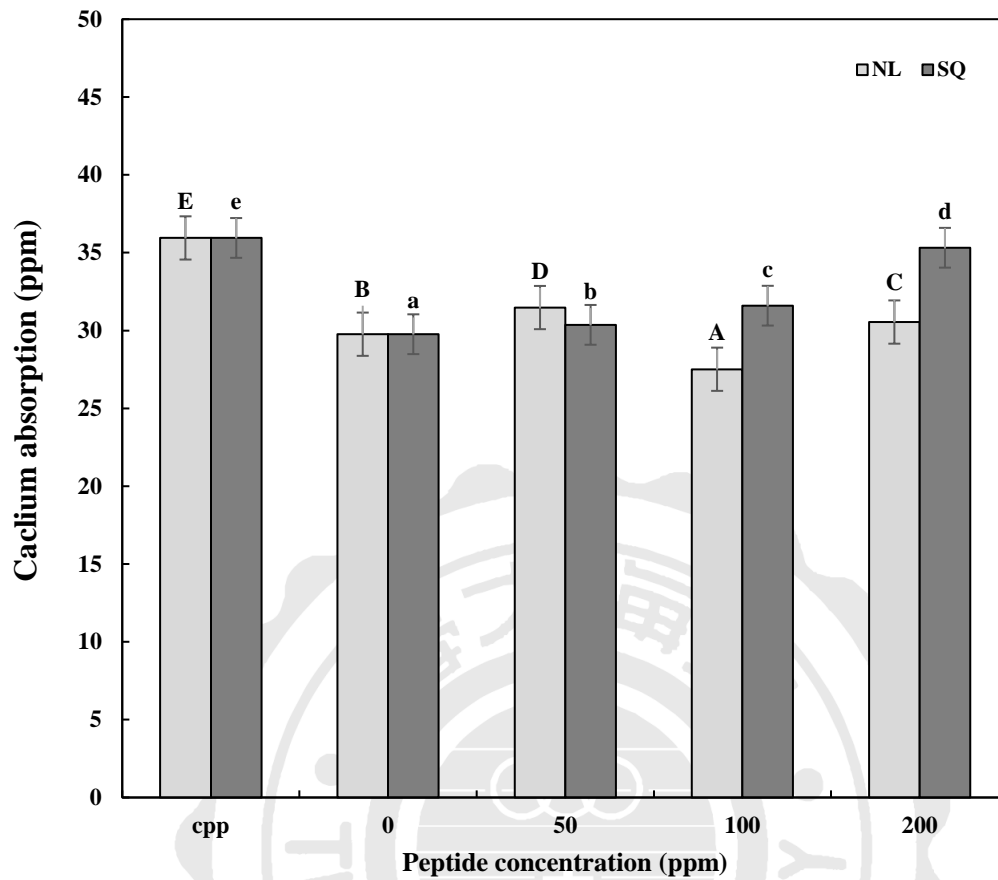
圖十三、 探討在低鈣濃度 (4 mM) 下不同胜肽濃度對 HT-29 細胞鈣吸收之影響

Figure 13. Effect of different concentration of peptides on calcium absorption under low-calcium concentration in HT-29 cells. Bars represent mean±RSD, n=3. Means with different letter were significant difference within the same peptides ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

組，再將兩種胜肽具有較佳鈣吸收能力的濃度相比，可得知 50 ppm NL 顯著高於 100 ppm 和 200 ppm SQ，因此 50 ppm NL 對在低鈣濃度下的 HT-29 細胞具有較佳的鈣吸收能力。

圖十四為探討在高鈣濃度（8 mM）下不同胜肽濃度對 HT-29 細胞鈣吸收之影響。結果顯示，加入 100 及 200 ppm SQ 合成胜肽後，HT-29 細胞的鈣離子吸收量顯著高於控制組；而加入 50 及 200 ppm NL 合成胜肽，其細胞的鈣離子吸收量亦顯著增加，再將兩種胜肽具有較佳鈣吸收能力的濃度相比，可得知 50 ppm NL 顯著高於 50 ppm 和 100 ppm SQ，因此 50 ppm NL 對在高鈣濃度下的 HT-29 細胞具有較佳的鈣吸收能力。

由以上結果得知，加了 SQ 及 NL 對 Caco-2 細胞與 HT-29 細胞之鈣吸收作用皆有上升的趨勢，並推測鈣離子濃度的高低不影響胜肽對細胞的促鈣吸收，鈣離子濃度高於 5 mM 時鈣吸收主要以被動運輸為主，主動運輸為輔；當鈣離子濃度低於 5 mM 時，細胞主要是以主動運輸將鈣離子帶進細胞內，而能控管鈣離子通道蛋白的主要因子是膜電位(Morgan *et al.*, 2003)。Caco-2 細胞和 HT-29 細胞的鈣離子通道激活的機制不同，Caco-2 細胞中的 TRPV6 鈣離子通道蛋白在過極化狀態下會被活化，而 HT-29 細胞中的 Cav1.3 鈣離子通道蛋白在去極化狀態下才會被打開(Kellett, 2011)。



圖十四、 探討在高鈣濃度 (8 mM) 下不同胜肽濃度對 HT-29 細胞鈣吸收之影響

Figure 14. Effect of different concentration of peptides on calcium absorption under high-calcium concentration in HT-29 cells. Bars represent mean \pm RSD, n=3. Means with different letter were significant difference within the same peptides ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

本研究 NL 及 SQ 合成胜肽對細胞具有促鈣吸收之作用，推測是因為 NL 合成胜肽之序列為 NLQGENEEEDSGAIVTVK，其中含有豐富的酸性胺基酸 Glu 及 Asp，其羧基易與鈣離子結合，因此在 NL 能夠好好地結合鈣離子，NL 帶有疏水性胺基酸會使得胜肽具有聚集性，因此 NL 與鈣離子結合後呈現聚集性。Liu et al.(2016)指出疏水性胺基酸會使得胺基酸有聚集性之現象，將所有 Glu 和 Asp 的鈣結合基團藉由疏水性胺基酸側鏈進行聚集，並藉由聚集 NL 尾端帶有正電側鏈之胺基酸 Lys，會與帶負電的細胞膜相互作用(Liu et al., 2017)，使得帶有鈣離子的胜肽更接近細胞膜上的鈣離子通道蛋白，因而促使鈣離子進到細胞內。

SQ 合成胜肽的序列為 SQRPQDRHQK，其中 Asp 為酸性胺基酸，其羧基易與鈣離子結合，而序列中含有豐富的 Lys、Arg 及 His，帶正電的 Lys、Arg 及 His 會與帶負電的細胞膜相互作用(Liu et al., 2017)。由本研究可推測，帶正電的 Lys、Arg 及 His 對細胞促鈣吸收影響很大，Liu et al(2017) 也指出，大豆蛋白胜肽中含有豐富的 Lys、Arg 及 His，這些側鏈帶正電的胺基酸能與帶負電的細胞膜相互吸引，間接可將螯合的鈣離子運送至鈣離子通道蛋白，促進鈣離子吸收。

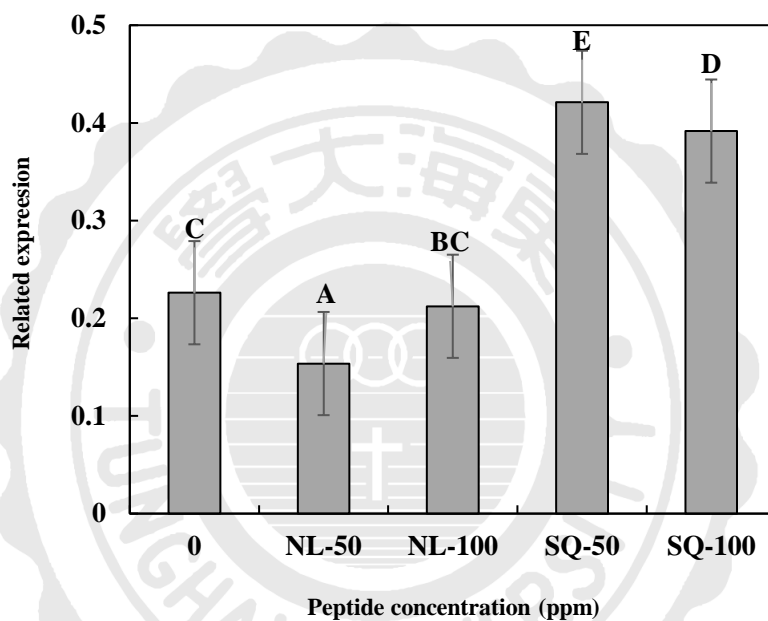
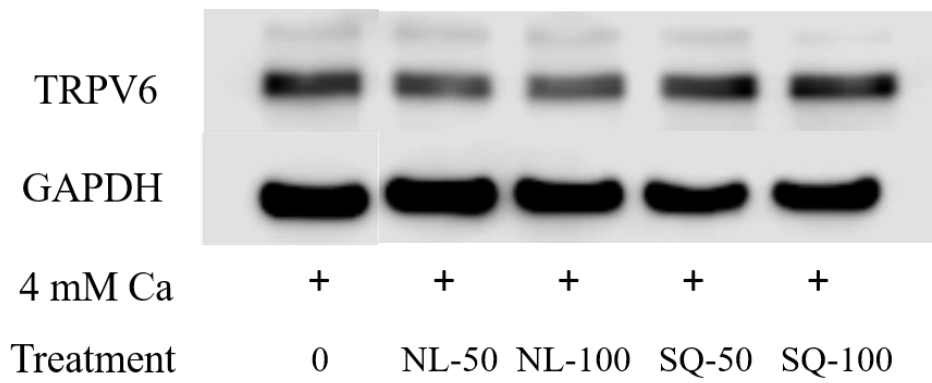
由結果可得知，唯獨 SQ 合成胜肽對低鈣濃度下的 Caco-2 細胞具有較佳的鈣螯合能力，原因是 Caco-2 細胞中的 TRPV6 在細胞過極化狀態時才會打開通道，而細胞過極化狀態即為細胞內帶負電居多，因此促使帶正電的 SQ 合成胜肽被吸引至細胞膜上，間接將螯合的鈣離子運送至鈣離子通道蛋白，促進鈣離子吸收。

六、探討 SQ 及 NL 對鈣離子通道蛋白表現量之影響

由於在細胞鈣離子吸收的實驗中發現 50 及 100 ppm 的合成胜肽對細胞鈣吸收的影響較佳，因此在蛋白質表現量的部分也進行 50 及 100 ppm 兩種劑量。

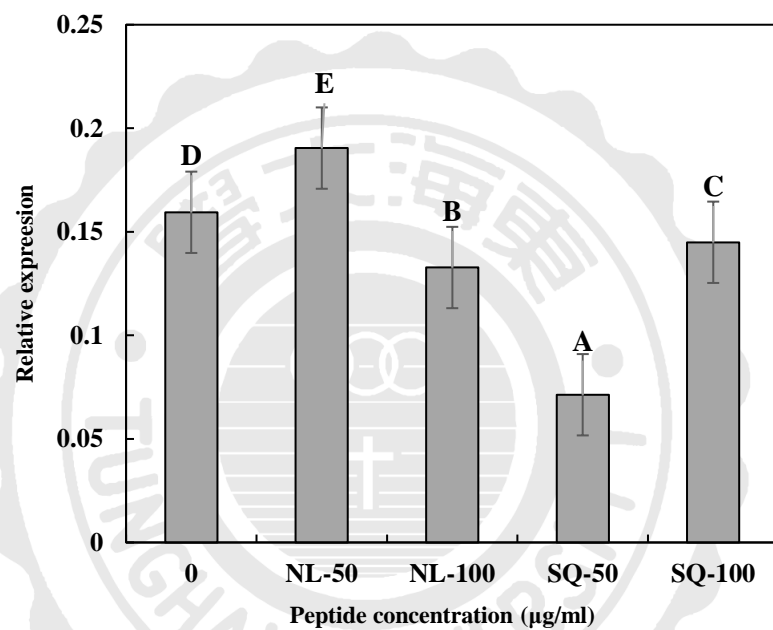
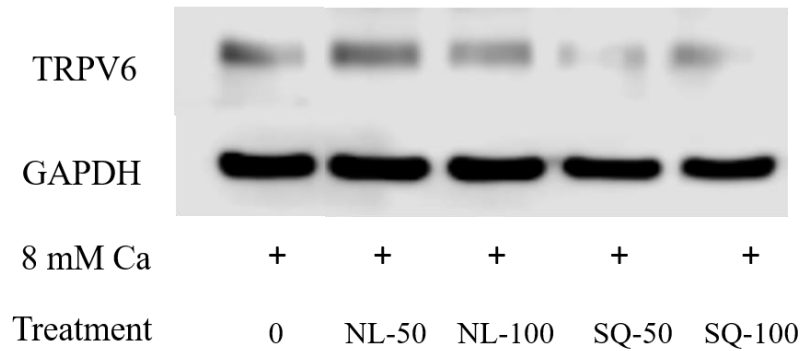
圖十五及圖十六分別為在低及高鈣濃度下探討不同胜肽及其濃度對 Caco-2 細胞中 TRPV6 蛋白質表現量之影響；圖十五與圖十一對照，在低鈣濃度下加入 50 及 100 ppm NL 胜肽後，其 TRPV6 蛋白質表現量與細胞鈣離子吸收量呈正相關，然而添加 NL 50 及 100 ppm，其 TRPV6 的表現量分別小於或趨近於控制組。而在低鈣濃度下加入 50 及 100 ppm SQ 胜肽後，TRPV6 的表現量皆顯著高於控制組，其結果與細胞鈣離子吸收量亦呈正相關，即細胞鈣吸收量與 TRPV6 的表現量成正比。

圖十六與圖十二對照，在高鈣濃度下加入 50 及 100 ppm NL 胜肽後，其 TRPV6 蛋白質表現量與細胞鈣吸收量呈正相關，有先增後減的趨勢，其中 50 ppm NL 顯著高於控制組，由此結果亦可推測鈣離子吸收與 TRPV6 呈正相關性。而在高鈣濃度下加入 50 及 100 ppm SQ 胜肽後，其 TRPV6 與細胞鈣吸收量之趨勢相同。綜合以上結果顯示，添加 50~100 ppm NL 在高鈣濃度時，與控制組比較可顯著提升 Caco-2 細胞的 TRPV6 蛋白質表現量及鈣吸收；相反的在低鈣濃度時，則是以添加 50 ppm SQ，與控制組比較可顯著提升 Caco-2 細胞的 TRPV6 蛋白質表現量和鈣吸收。



圖十五、在低鈣濃度（4 mM）下分別探討不同胜肽及其濃度對 Caco-2 細胞中 TRPV6 蛋白質表現量之影響

Figure 15. Effect of different peptides and their concentration of on TRPV6 protein expression under low calcium concentration in Caco-2 cells. Bars represent mean±RSD, n=3. Means with different letter were significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test



圖十六、 在高鈣濃度（8 mM）下分別探討不同胜肽及其濃度對 Caco-2 細胞中 TRPV6 蛋白質表現量之影響

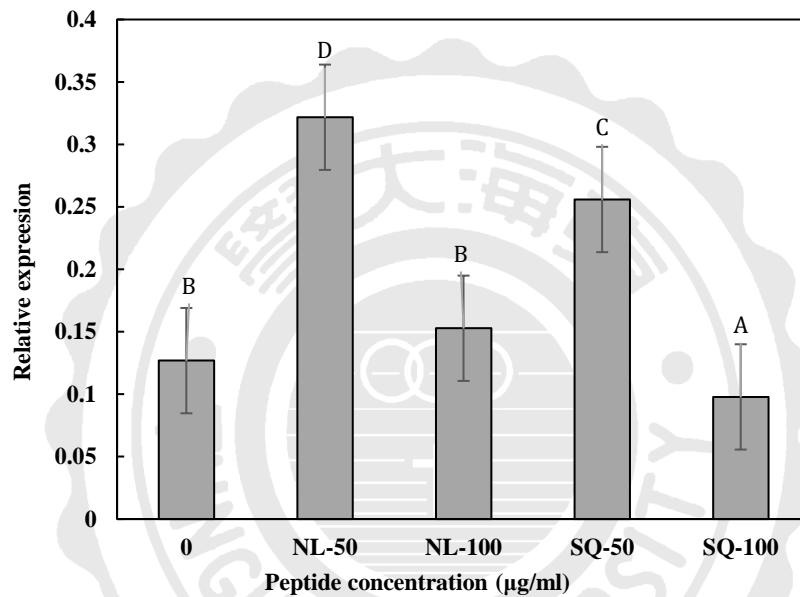
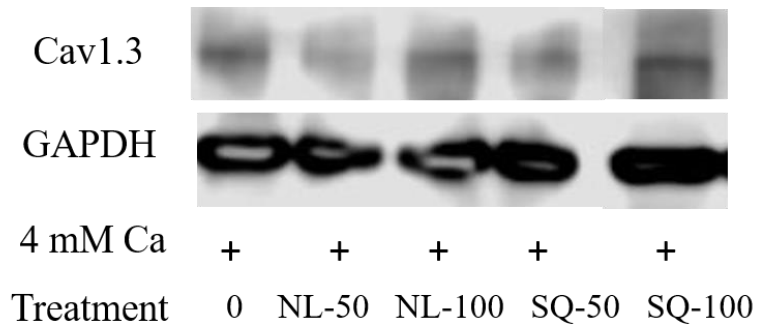
Figure 16. Effect of different peptides and their concentration of on TRPV6 protein expression under high calcium concentration in Caco-2 cells. Bars represent mean±RSD, n=3. Means with different letter were significant difference ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test

TRPV6 鈣離子通道蛋白的選擇過濾器是由 Asp 胺基酸組成 (McGoldrick *et al.*, 2018)，因此 NL 與 SQ 能顯著增加 TRPV6 蛋白質表現量之原因為這兩種合成胜肽皆有帶正電胺基酸，能與 TRPV6 上的 Asp 作用，並且進行調節作用，與 Hou *et al.* (2007)的結果相似，他們的研究指出去鹽鹹鴨蛋蛋白肽 (DPs) 也能夠增加 Caco-2 細胞中 TRPV6 鈣離子通道蛋白之表現量。因此本研究所使用的鈣螯合肽能夠經由增加鈣離子通道蛋白之表現量，進而提升細胞鈣吸收量。

圖十七及圖十八分別為在低及高鈣濃度下探討不同胜肽及其濃度對 HT-29 細胞中 Cav1.3 蛋白質表現量之影響；圖十七與圖十三對照，在低鈣濃度下加入 50 及 100 ppm NL 胜肽後，其 Cav1.3 蛋白質表現量與細胞鈣離子吸收量呈正相關，然而只有添加 50 ppm NL，其 Cav1.3 的表現量顯著高於控制組。而在低鈣濃度下加入 50 及 100 ppm SQ 胜肽後，Cav1.3 的表現量與細胞鈣離子吸收量沒有相關性。

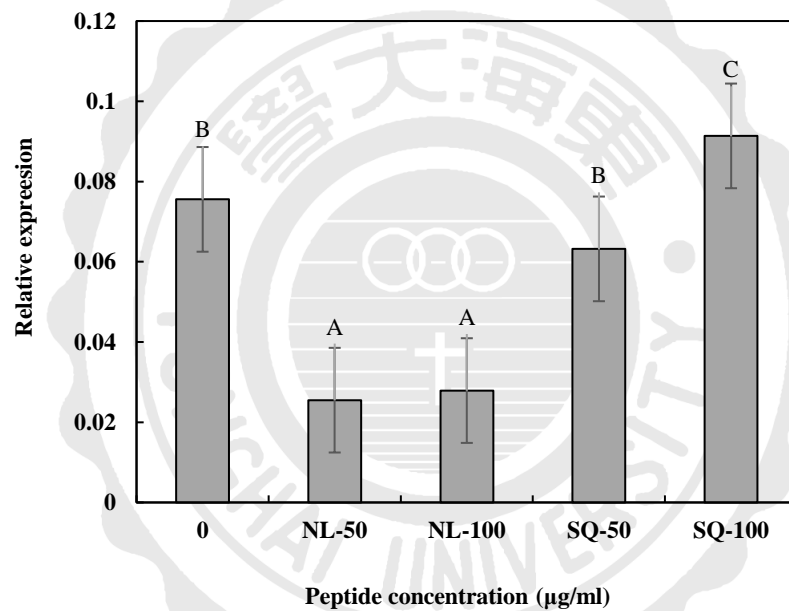
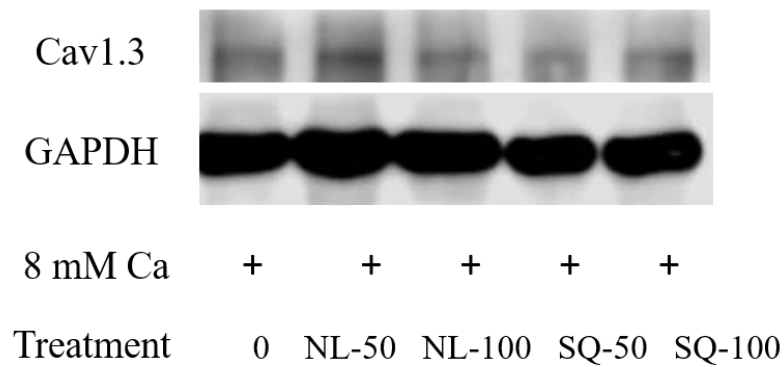
圖十八與圖十四對照，在高鈣濃度下加入 50 及 100 ppm NL 後，Cav1.3 的表現量與細胞鈣離子吸收量沒有相關性。而在高鈣濃度下加入 50 及 100 ppm SQ 胜肽後，其 Cav1.3 蛋白質表現量與細胞鈣離子吸收量呈正相關，且只有添加 100 ppm SQ，其 Cav1.3 的表現量顯著高於控制組。

由結果推測，HT-29 細胞中 Cav1.3 鈣離子通道蛋白對細胞鈣吸收的影響並不大，關於 HT-29 細胞中 Cav1.3 鈣離子通道蛋白的文獻不多，其鈣吸收機制還需再深入探討。



圖十七、在低鈣濃度（4 mM）下分別探討不同胜肽及其濃度對 HT-29 細胞中 Cav1.3 蛋白質表現量之影響

Figure 17. Effect of different peptides and their concentration of on Cav1.3 protein expression under low calcium concentration in HT-29 cells. Bars represent mean±RSD, n=3. Means with different letter were significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test



圖十八、 在高鈣濃度（8 mM）下分別探討不同胜肽及其濃度對 HT-29 細胞中 Cav1.3 蛋白質表現量之影響

Figure 18. Effect of different peptides and their concentration of on Cav1.3 protein expression under high calcium concentration in HT-29 cells. Bars represent mean±RSD, n=3. Means with different letter were significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

伍、 結論

利用 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞模擬腸胃道，探討 NL 及 SQ 合成胜肽對細胞鈣離子吸收之影響以及機制探討。在低鈣濃度時，100 ppm NL 及 50~100 ppm SQ 均可顯著促進 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞鈣離子吸收。而在高濃度時，50 ppm NL 及 100 ppm SQ 亦均可顯著促進兩種細胞的鈣離子吸收。以劑量及經濟效益來看，在低鈣濃度時，50 ppm SQ 對 Caco-2 細胞具有較佳的促鈣吸收能力，而 50 ppm NL 對 HT-29 細胞具有較佳的促鈣吸收能力；在高鈣濃度時，50 ppm NL 對 Caco-2 細胞及 HT-29 細胞皆具有較佳的促鈣吸收能力。NL 及 SQ 可能是經由提升 Caco-2 細胞中 TRPV6 鈣離子通道蛋白的表現量而增加細胞鈣吸收的量；HT-29 細胞中 Cav1.3 鈣離子通道蛋白的表現量與細胞鈣離子吸收量沒有相關性，其細胞鈣離子機制還需再深入探討。由結果可驗證先前研究的鈣螯合肽，SQ 序列中含有豐富的鹼性胺基酸及少許的酸性胺基酸和疏水性胺基酸，鹼性胺基酸能夠與帶負電的細胞膜互相吸引，加上少許的酸性胺基酸能夠與鈣結合，鈣離子能夠更容易接近鈣離子通道蛋白，促進鈣離子進到細胞內。而 NL 序列中含有大量的酸性胺基酸以及疏水性胺基酸，酸性胺基酸易與鈣離子結合，而疏水性胺基酸會形成聚集性，將結合後的鈣聚集，再經由鹼性胺基酸能夠與帶負電的細胞膜互相吸引，使得鈣離子能夠更容易接近鈣離子通道蛋白，促進鈣離子進到細胞內。因此，NL 與 SQ 合成胜肽皆具有開發成促鈣吸收肽之潛力。

陸、 參考文獻

- 呂明興. (2015). Pepsin-大豆蛋白水解物中免疫調節肽之純化及鑑定. 東海大碩士論文.
- 李怡樺. (2010). 利用膜反應器生產具抗脂質新生活性之胃蛋白酶-大豆蛋白水解物並以 3T3-L1 前脂肪細胞探討其活性機制. 東海大學碩士論文.
- 周佑星. (2018). 蛋白質酵素水解物中具鈣螯合能力胜肽之分離及鑑定. 東海大學碩士論文.
- 招有容. (2016). 蛋白質水解物中調節血糖肽之純化及鑑定. 東海大學碩士論文.
- 莊鈞弼. (2006). 利用 Caco-2 細胞和倉鼠評估大豆水解蛋物的降膽固醇作用. 東海大學碩士論文.
- 衛生福利部國民健康署. (2013). 102 年調查國人每日鈣攝取量.
- Deborah A. Straub MS, RD. (2007). Calcium Supplementation in Clinical Practice: A Review of Forms, Doses, and Indications. *Nutrition in Clinical Practice*, 22(3), 286-296.
- Anita, F., Claudia, G., Amelia, F., & Guido, T. (2003). Casein-derived bioactive phosphopeptides: role of phosphorylation and primary structure in promoting calcium uptake by HT-29 tumor cells. *FEBS Letters*, 551(1-3), 92-98.
- Artursson, P., Palm, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(1), 1-14. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 22 (1996) 67-84.1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1), 27-43.
- Bjarni, Á., W., F. J., & B., B. J. (1989). Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *European Journal of Biochemistry*, 180(1), 85-94.
- Bronner, F., Pansu, D., & Stein, W. D. (1986). An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 250(5), G561-G569.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(8), a003947. doi:10.1101/cshperspect.a003947
- Claudia, G., Elena, D. F., Laura, C., Elena, D., Marzia, B., Amelia, F., . . . Anita, F. (2007). Casein phosphopeptide promotion of calcium uptake in HT-29 cells – relationship between biological activity and supramolecular structure. *The FEBS Journal*, 274(19), 4999-5011.
- Cosentino, S., Gravaghi, C., Donetti, E., Donida, B. M., Lombardi, G., Bedoni, M., . . . Ferraretto, A. (2010). Caseinphosphopeptide-induced calcium uptake in human intestinal cell lines

- HT-29 and Caco2 is correlated to cellular differentiation. *J Nutr Biochem*, 21(3), 247-254.
- Daengprok, W., Garnjanagoonchorn, W., Naivikul, O., Pornsinlpatip, P., Issigonis, K., & Mine, Y. (2003). Chicken Eggshell Matrix Proteins Enhance Calcium Transport in the Human Intestinal Epithelial Cells, Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6056-6061.
- Diaz de Barboza, G., Guizzardi, S., & Tolosa de Talamoni, N. (2015). Molecular aspects of intestinal calcium absorption. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 21(23), 7142-7154.
- Ferraretto, A., Signorile, A., Gravaghi, C., Fiorilli, A., & Tettamanti, G. (2001). Casein Phosphopeptides Influence Calcium Uptake by Cultured Human Intestinal HT-29 Tumor Cells. *The Journal of Nutrition*, 131(6), 1655-1661.
- Fleet, J. C., & Schoch, R. D. (2010). Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 47(4), 181-195.
- Guo, L., Harnedy, P. A., Li, B., Hou, H., Zhang, Z., Zhao, X., & FitzGerald, R. J. (2014). Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 92-105.
- Hickman, J. (2016). *Trans epithelial/endothelial Electrical Resistance (TEER) theory and applications for microfluidic body-on-a-chip devices* (Vol. 1).
- Hou, T., Liu, W., Shi, W., Ma, Z., & He, H. (2017). Desalted duck egg white peptides promote calcium uptake by counteracting the adverse effects of phytic acid. *Food Chemistry*, 219, 428-435.
- Hou, T., Wang, C., Ma, Z., Shi, W., Weiwei, L., & He, H. (2015). Desalted Duck Egg White Peptides: Promotion of Calcium Uptake and Structure Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(37), 8170-8176.
- Hou, T., Wang, C., Ma, Z., Shi, W., Weiwei, L., & He, H. (2015). Desalted Duck Egg White Peptides: Promotion of Calcium Uptake and Structure Characterization. *J Agric Food Chem*, 63(37), 8170-8176.
- Kellett, G. L. (2011). Alternative perspective on intestinal calcium absorption: proposed complementary actions of Ca(v)1.3 and TRPV6. *Nutr Rev*, 69(7), 347-370.
- Larsson, D., & Nemere, I. (2002). Vectorial Transcellular Calcium Transport in Intestine: Integration of Current Models. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2(3).
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T.

- Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (pp. 103-111). Cham: Springer International Publishing.
- Liu, H., Lv, Y., Xu, J., & Guo, S. (2016). Soybean peptide aggregates improved calcium binding capacity. *LWT - Food Science and Technology*, *67*, 174-180.
- Liu, H., Lv, Y., Xu, J., & Guo, S. (2017). Interaction mode of calcium-binding peptides and Caco-2 cell membrane. *Food Research International*, *102*, 225-233.
- Lv, Y., Bao, X. L., Yang, B. C., Ren, C. G., & Guo, S. T. (2008). Effect of Soluble Soybean Protein Hydrolysate-Calcium Complexes on Calcium Uptake by Caco-2 Cells. *Journal of Food Science*, *73*(7), H168-H173.
- Lv, Y., Liu, H., Ren, J., Li, X., & Guo, S. (2013). The positive effect of soybean protein hydrolysates-calcium complexes on bone mass of rapidly growing rats. *Food & Function*, *4*(8), 1245-1251.
- McGoldrick, L. L., Singh, A. K., Saotome, K., Yelshanskaya, M. V., Twomey, E. C., Grassucci, R. A., & Sobolevsky, A. I. (2018). Opening of the Human Epithelial Calcium Channel TRPV6. *Nature*, *553*(7687), 233-237.
- Morgan, E. L., Mace, O. J., Helliwell, P. A., Affleck, J., & Kellett, G. L. (2003). A role for Cav1.3 in rat intestinal calcium absorption. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *312*(2), 487-493.
- Moyad, M. A. (2003). The potential benefits of dietary and/or supplemental calcium and vitamin D. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *21*(5), 384-391.
- Pérez, A. V., Picotto, G., Carpentieri, A. R., Rivoira, M. A., Peralta López, M. E., & Tolosa de Talamoni, N. G. (2008). Minireview on Regulation of Intestinal Calcium Absorption. *Digestion*, *77*(1), 22-34.
- Peng, Z., Hou, H., Zhang, K., & Li, B. (2017). Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats. *Food Chemistry*, *221*, 373-378.
- Perego, S., Cosentino, S., Fiorilli, A., Tettamanti, G., & Ferraretto, A. (2012). Casein phosphopeptides modulate proliferation and apoptosis in HT-29 cell line through their interaction with voltage-operated L-type calcium channels. *J Nutr Biochem*, *23*(7), 808-816.
- Perego, S., Zabeo, A., Marasco, E., Giussani, P., Fiorilli, A., Tettamanti, G., & Ferraretto, A. (2013). Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells

- through their interaction with the TRPV6 calcium channel. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 847-857.
- Polak-Charcon, S., Hekmati, M., & Ben-Shaul, Y. (1989). The effect of modifying the culture medium on cell polarity in a human colon carcinoma cell line. *Cell Differentiation and Development*, 26(2), 119-129.
- Ross AC, T. C., Yaktine AL, et al., editors. (2011). Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. *Washington, DC: National Academy Press*.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), 1-26.
- Sevin, E., Dehouck, L., Fabulas-da Costa, A., Cecchelli, R., Dehouck, M. P., Lundquist, S., & Culot, M. (2013). Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 68(3), 334-339.
- Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*, 20(2), 107-126. doi:10.1177/2211068214561025
- Sun, N., Wu, H., Du, M., Tang, Y., Liu, H., Fu, Y., & Zhu, B. (2016). Food protein-derived calcium chelating peptides: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 140-148.
- Tunick, M. H. (1987). Calcium in Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 70(11), 2429-2438.