

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.004

· 基础研究 ·

## 法氏囊活性肽-II 对肿瘤细胞增殖的抑制作用及其可能机制

郭香玲<sup>1</sup>, 王臣<sup>1</sup>, 李小康<sup>1</sup>, 汪洋<sup>1</sup>, 吴庭才<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>2</sup> (1. 河南科技大学 兽医肿瘤免疫学重点实验室, 河南 洛阳 471003; 2. 南京农业大学 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095)

**[摘要]** **目的:** 研究法氏囊活性肽(Bursal-derived pentapeptide, BPP)-II 对肿瘤细胞增殖的抑制作用及其可能的作用机制。**方法:** 采用不同质量浓度(0.02、0.2、2、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的 BPP-II 分别处理小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 WEHI-231、人鼻咽癌细胞 CNE、大鼠肝癌细胞 RH-35 和正常细胞系人胚肾细胞 293、猪肾细胞 PK15、中国仓鼠卵巢细胞 CHO, 48 h 后采用 MTT 法检测细胞增殖情况; 以双荧光素酶报告系统和 Western blotting 方法检测 BPP-II 对荧光素酶标记的 p53-Luc 质粒转染的 Vero 细胞中 p53 转录活性和 P53 蛋白表达的影响; 利用噬菌体随机 12 肽库筛选 BPP-II 特异性结合肽, 人工合成 BPP-II 结合肽, 采用 MTT 法检测 BPP-II 结合肽对 BPP-II 抗 WEHI-231 细胞增殖能力的影响。**结果:** 2 和 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 BPP-II 对肿瘤细胞 WEHI-231、CNE、RH-35 的增殖均有抑制作用(均  $P < 0.05$ ), 而对正常细胞系 293、PK15、CHO 的增殖均不表现出抑制作用。BPP-II 明显激活 p53 基因的转录, 并上调 P53 蛋白的表达。应用噬菌体展示技术筛选获得 3 个 BPP-II 结合肽 P3-12、P5-12、P6-12, 其中 2 和 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 P3-12 能显著抑制 BPP-II 的抗 WEHI-231 细胞增殖能力[(97.5  $\pm$  3.4)%、(98.9  $\pm$  3.5)% vs (86.3  $\pm$  1.9)% ,  $P < 0.05$ ]; 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 P5-12 和 P6-12 均能显著抑制 BPP-II 的抗 WEHI-231 细胞增殖能力[(96.7  $\pm$  3.1)%、(95.4  $\pm$  3.8)% vs (86.3  $\pm$  1.9)% ,  $P < 0.05$  ]。**结论:** BPP-II 可特异性抑制 WEHI-231、CNE、RH-35 等肿瘤细胞增殖, 其机制可能与激动 p53 信号通路有关。

**[关键词]** 法氏囊活性肽-II; 肿瘤细胞; 抗肿瘤; 结合肽; p53 信号通路

**[中图分类号]** R730.51; R392.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)01-0022-06

## Inhibitory effect and mechanism of Bursal-derived pentapeptide-II on tumor cell proliferation and its possible mechanism

Guo Xiangling<sup>1</sup>, Wang Chen<sup>1</sup>, Li Xiaokang<sup>1</sup>, Wang Yang<sup>1</sup>, Wu Tingcai<sup>1</sup>, Chen Puyan<sup>2</sup> (1. Key Laboratory of Veterinary Oncological Immunology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China; 2. Key Laboratory of Animal Bacteriology of the Ministry of Agriculture of China, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the anti-tumor activity and mechanism of Bursal-derived pentapeptide-II (BPP-II). **Methods:** Tumor cells including murine B-cell lymphoma WEHI-231 cells, human nasopharyngeal carcinoma CNE cells and rat hepatoma RH-35 cells and normal cells including human embryonic kidney 293 cells, pig kidney PK15 cells and Chinese hamster ovary CHO cells were stimulated with BPP-II at 0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 48 h. Cell viability was then measured by MTT assays, p53 luciferase activity and the expression of P53 at the protein level were assessed, and the effect of BPP-II binding peptides biopanned from a phage display 12-mer random peptide library on BPP-II-mediated inhibition of WEHI-231 cell proliferation was determined by MTT assays. **Results:** BPP-II inhibited the proliferation of tumor cells but not normal cells, activated p53 transcription, and increased P53 protein content. After four rounds of biopanning, three BPP-II binding peptides were obtained: QSLPSPLWIQQS (P3-12), DRMPDSAWTTRK

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 31101792, No. 31201928); 河南省高校青年骨干教师资助项目(No. 2012GGJS-07)。Projects supported by the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China(No. 31101792, No. 31201928), and the Foundation for the Young Core Instructor from the Higher Education of Henan Province(No. 2012GGJS-07)

**[作者简介]** 郭香玲(1988-), 女, 河南省许昌市人, 硕士生, 主要从事动物分子病原学与免疫学研究, E-mail: gx10202@126.com

**[通信作者]** 王臣(Wang Chen, corresponding author), E-mail: wangchen2001@126.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150205.1443.004.html>

(P5-12) and ALWPPNLHAWVP (P6-12). P3-12 significantly inhibited the anti-proliferative activity of BPP-Ⅱ at both 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $97.5 \pm 3.4$ )% and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $98.9 \pm 3.5$ )% as compared with the control ( $86.3 \pm 1.9$ )% in WEHI-231 cells ( $P < 0.05$ ). At 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , both P5-12 ( $96.7 \pm 3.1$ )% and P6-12 ( $95.4 \pm 3.8$ )% inhibited the anti-proliferative activity of BPP-Ⅱ as compared with the control ( $86.3 \pm 1.9$ %) in WEHI-231 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** BPP-Ⅱ appears to have an antitumor activity, possibly attributable to p53 activation. Taken together, our findings suggest a significant clinical importance for BPP-Ⅱ from the perspective of cancer therapy.

[ **Key words** ] Bursal-derived pentapeptide-Ⅱ(BPP-Ⅱ); tumor cells; anti-tumor; binding peptide; p53 signaling pathway

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 22-27 ]

生物活性肽(bioactive peptides, BAP)是一类天然存在于动植物和微生物等生物体内的具有多种特殊生理活性的小分子多肽类物质,其也可经化学合成、生物工程等人工方法获得。由于BAP具有增强免疫、抗氧化、抗血栓及抗肿瘤等多种生物活性<sup>[1]</sup>,其研究及应用日益引起人们的重视。研究<sup>[2]</sup>发现,BAP可通过抑制肿瘤新生血管生成、干扰肿瘤细胞DNA合成、调控蛋白降解、调节细胞周期及诱导细胞凋亡等多种途径发挥抗肿瘤功能。

法氏囊活性肽(Bursal-derived pentapeptide, BPP)是从法氏囊中分离获得的一类小分子BAP,近年来人们对BPP的生物学功能及其作用机制进行了广泛的研究。已证实,BPP大多具有免疫调节功能<sup>[3-5]</sup>,有些如BPP-I、BSP-I、BP5等还具有抗肿瘤活性<sup>[6-8]</sup>。法氏囊活性肽-Ⅱ(Bursal-derived pentapeptide-Ⅱ, BPP-Ⅱ)是从鸡BF中分离出的一种新的免疫调节肽,其氨基酸组成为Met-Thr-Leu-Thr-Gly,已证实BPP-Ⅱ具有抗肿瘤的潜能<sup>[9]</sup>,然而,其抗肿瘤作用机制尚不清晰。本研究以不同浓度的BPP-Ⅱ处理多种肿瘤细胞,观察BPP-Ⅱ对其增殖的影响,并探索其抗肿瘤作用可能的机制,为进一步研发BPP-Ⅱ抗肿瘤临床应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

WEHI-231(小鼠B细胞淋巴瘤细胞)、RH-35(大鼠肝癌细胞)、CNE(人鼻咽癌细胞)、293(人胚肾细胞)、PK15(猪肾细胞)和CHO细胞(中国仓鼠卵巢细胞)均购自广州吉尼欧生物科技有限公司。RPMI-1640细胞培养基、DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、PEG-8000、X-gal、IPTG、TMB均购自郑州久是生物技术有限责任公司, Dual-Luciferase<sup>®</sup>双荧光素酶报告基因检测试剂盒[ Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter (DLR<sup>™</sup>) Assay Kit ]购自Promega公司, Lipofectamine<sup>™</sup> 2000转染试剂盒购自Invitrogen公司,多柔比星(Doxorubicin, DOX)、鼠抗人 $\beta$ -action和兔抗

人p21抗体购自Sigma公司,细胞培养裂解试剂购自Promega公司,鼠抗人p53抗体购自Santa Cruz公司,噬菌体随机12肽库试剂盒购自New England Biolabs公司,HRP-抗M13 mAb购自Pharmacia公司, M13噬菌体单链DNA提取试剂盒购自北京百泰克生物科技有限公司。BPP-Ⅱ、BPP-Ⅱ-BSA、BPP-Ⅱ结合十二肽P3-12、P5-12、P6-12均由上海科肽生物有限公司合成,纯度95%以上。

### 1.2 MTT法检测BPP-Ⅱ对肿瘤细胞及正常细胞增殖的影响

将肿瘤细胞WEHI-231、CNE、RH-35和正常细胞系293、PK15、CHO悬液(各约细胞 $2 \times 10^5$ 个/ml),分别分为5组,第1组加入PBS作为空白对照,第2~5组分别加入0.02、0.2、2、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的BPP-Ⅱ,每组设5个复孔,于37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中作用44 h后取出,加入MTT(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )20  $\mu\text{l}$ 每孔,继续培养4 h,取出后弃上清,每孔加100  $\mu\text{l}$  DMSO,使结晶溶解,在微量振荡器上震荡,测 $D_{570}$ 值。相对细胞增殖率(%) = 实验组 $D$ 值/对照组 $D$ 值  $\times 100\%$ ; 细胞抑制率(%) = (对照组 $D$ 值 - 实验组 $D$ 值)/对照组 $D$ 值  $\times 100\%$ 。

### 1.3 双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测BPP-Ⅱ对p53基因荧光素酶活性的影响

按Lipofectamine<sup>™</sup> 2000转染试剂盒说明书,将含有荧光素酶标记的p53-Luc质粒转染到野生型p53 Vero细胞中,以p53-binding DNA序列为对照,24 h后,用不同浓度(0.2~20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的BPP-Ⅱ处理被转染的Vero细胞,检测其P53荧光素酶活性。另外,用p53抑制剂20  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\alpha$ -pifithrin处理被转染的Vero细胞2 h,然后用2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BPP-Ⅱ处理22 h,按照试剂盒说明书,通过Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter (DLR<sup>™</sup>) Assay Kit检测P53荧光素酶活性。

### 1.4 Western blotting检测BPP-Ⅱ对p53蛋白表达的影响

用BPP-Ⅱ(0.2~20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )诱导Vero细胞24 h后,用细胞培养裂解试剂裂解细胞,收集蛋白样

品。同时设 1 μg/ml DOX 诱导细胞阳性对照组和 PBS 诱导细胞空白对照组, 每组设 2 个复孔。用鼠抗人 P53、鼠抗人 β-actin 和兔抗人 P21 抗体做 Western blotting, 检测 BPP-Ⅱ诱导 24 h 后 Vero 细胞中 P53、P21 和 β-actin 蛋白的表达。凝胶成像分析系统分析、定量, 以 β-actin 为内参照, 条带用 Quantity One 软件转化为灰度值, P53 和 P21 蛋白的相对表达量以目的蛋白与 β-actin 蛋白条带的灰度值的比值表示。实验重复 3 次。

### 1.5 噬菌体展示技术筛选 BPP-Ⅱ结合肽

用 BPP-Ⅱ-BSA 和 BSA 分别包被酶标板, 参照噬菌体随机 12 肽库实验手册和三肽囊素特异性结合肽及筛选方法<sup>[10]</sup>, 进行 4 轮亲和筛选, 并进行噬菌体阳性克隆的 ELISA 鉴定和竞争抑制试验, 获得与 BPP-Ⅱ特异性结合的阳性噬菌体克隆, 提取其单链 DNA, 用 M13 噬菌体-96 g III 衣壳蛋白测序引物 (M13 噬菌体 DNA 全自动测序引物), 送至上海生工生物有限公司测序, 用 DNASTar 软件分析推导其插入 12 肽的氨基酸序列。

### 1.6 MTT 法检测 BPP-Ⅱ结合肽对 BPP-Ⅱ抗 WEHI-231 细胞增殖能力的影响

利用 MTT 法分析人工合成筛选所得的 BPP-Ⅱ结合肽对 WEHI-231 细胞增殖的影响, 将 WEHI-231 细胞约 2 × 10<sup>5</sup> 个/ml 接种至细胞培养板, 实验分为三组: P3-12 肽组、P5-12 肽组和 P6-12 肽组, 三个结合肽实验组均设四个浓度 (0.02、0.2、2、20 μg/ml), 以不加 BPP-Ⅱ的 PBS 组为空白对照, 各组处理 48 h 后, 通过 MTT 法检测不同组 WEHI-231 细胞增殖情况, 分析 BPP-Ⅱ结合肽对 WEHI-231 细胞增殖的影响。

为进一步分析 BPP-Ⅱ结合肽对 BPP-Ⅱ抗 WEHI-231 细胞增殖功能的影响, 将 WEHI-231 细胞约 2 × 10<sup>5</sup> 个/ml 接种至细胞培养板, 实验分为五组: PBS 空白对照组、20 μg/ml BPP-Ⅱ单独刺激组、20 μg/ml BPP-Ⅱ + P3-12 肽组、20 μg/ml BPP-Ⅱ + P5-12 肽组、20 μg/ml BPP-Ⅱ + P6-12 肽组, P3-12、P5-12 和 P6-12 肽均设 4 个亚质量浓度组: 0.02、0.2、2、20 μg/ml。各组处理细胞 48 h 后, 通过 MTT 法检测 WEHI-231 细胞增殖情况。

### 1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6 统计软件, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BPP-Ⅱ明显抑制肿瘤细胞的增殖

MTT 法检测 BPP-Ⅱ对肿瘤细胞增殖的影响, 结果 (图 1A) 显示, 与对照组相比, BPP-Ⅱ在 2 μg/ml 质量浓度下已显示对肿瘤细胞 WEHI-231、CNE、RH-35 增殖有轻微的抑制作用, 抑制率分别为 (4.6 ± 0.65)%、(2.8 ± 0.32)%、(6.8 ± 0.54)% (均  $P > 0.05$ ); 而在 20 μg/ml 质量浓度下则其抑制作用显著增强, 抑制率分别为 (12.6 ± 0.45)%、(11.6 ± 0.29)%、(13.3 ± 0.38)% (均  $P < 0.05$ )。检测 BPP-Ⅱ对正常细胞系增殖的影响, 结果 (图 1B) 显示, 与对照组相比, BPP-Ⅱ在 2 μg/ml 时能够明显促进 293 细胞的增殖, 其相对增殖率提高 (11.5 ± 1.24)% ( $P < 0.05$ ), BPP-Ⅱ在 0.2 μg/ml 和 2 μg/ml 时能够明显促进 PK15 细胞的增殖, 相对增殖率分别提高 (10.5 ± 1.08)% 和 (14.4 ± 0.95)% ( $P < 0.05$ ), BPP-Ⅱ在 2 μg/ml 时能够明显促进 CHO 细胞增殖, 相对增殖率提高 (10.9 ± 1.33)% ( $P < 0.05$ )。以上结果表明, BPP-Ⅱ能够抑制肿瘤细胞 WEHI-231、CNE、RH-35 的增殖, 而对非肿瘤细胞 293、PK15 和 CHO 的增殖不具有抑制作用。

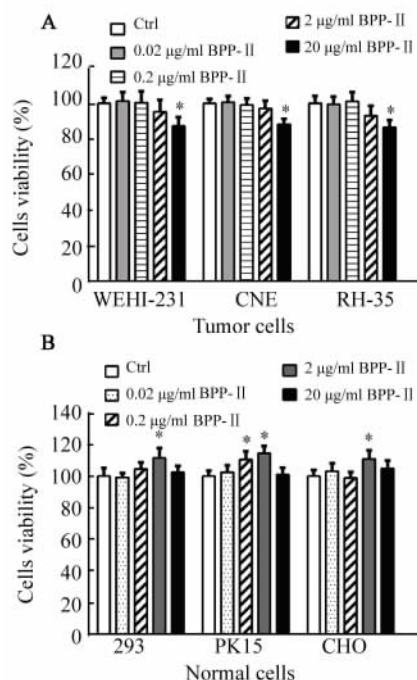


图 1 BPP-Ⅱ对肿瘤细胞和正常细胞增殖的影响  
Fig. 1 Effect of BPP-Ⅱ with different concentrations on the proliferation of tumor and normal cells

### 2.2 BPP-Ⅱ明显提高 P53 转录活性

为进一步研究 BPP-Ⅱ抗肿瘤作用可能的机制, 以 BPP-Ⅱ处理 p53-Luc 质粒转染的 Vero 细胞后检

测 p53 转录表达。结果(图 2)显示,阳性 DOX 处理阳性对照组 P53 相对荧光素酶活性值为(  $3.74 \pm 0.92$  ),BPP-II 在  $0.2 \sim 20 \mu\text{g/ml}$  质量浓度下能够明显提高被转染的 Vero 细胞中 P53 相对荧光素酶活性[ (  $2.15 \pm 0.67$  )、(  $1.58 \pm 0.42$  )、(  $1.35 \pm 0.26$  ) vs (  $1.12 \pm 0.53$  )], 均  $P < 0.05$  ](图 2A),表明 BPP-II 在实验浓度下能够诱导增强 P53 转录活性。用特异性 P53 抑制剂  $\alpha$ -pifithrin 处理被转染的 Vero 细胞 2 h,然后用  $2 \mu\text{g/ml}$  BPP-II 处理 22 h,结果显示, $\alpha$ -pifithrin 能够特异性抑制 BPP-II 处理组[ (  $0.23 \pm 0.14$  ) vs (  $2.16 \pm 1.03$  )],  $P < 0.05$  ]和未处理组[ (  $0.21 \pm 0.32$  ) vs (  $1.05 \pm 0.23$  )],  $P < 0.05$  ]被转染 Vero 细胞的 P53 荧光素酶活性,表明 BPP-II 能够直接激活 P53 转录。

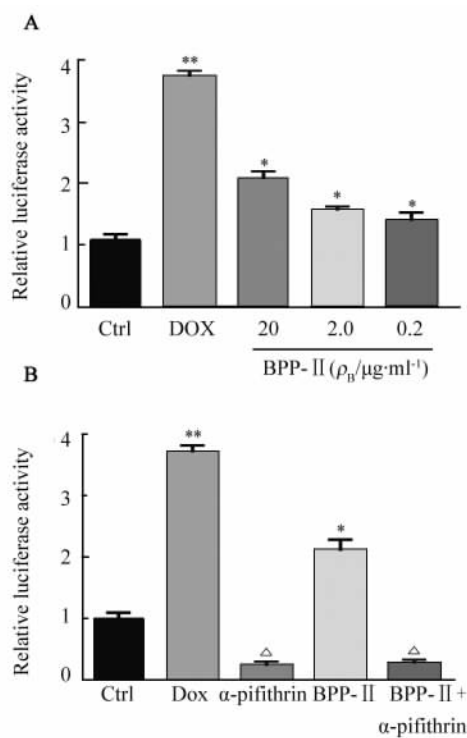


图 2 BPP-II 提高 P53 荧光素酶活性

Fig. 2 BPP-II enhanced the activity of P53 luciferase

(A) P53 luciferase activity after BPP-II treatment in Vero cells transfected with indicated p53-Lucplasmids;

(B) The transfected Vero cells were pre-incubated with  $\alpha$ -pifithrin for 2 h, and stimulated with BPP-II at  $20 \mu\text{g/ml}$  for 22 h to detect the P53 luciferase activity

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ctrl;  $\Delta P < 0.05$  vs Ctrl or BPP-II

### 2.3 BPP-II 能够上调 Vero 细胞中 P53 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 3 和表 1)显示,  $0.2 \sim 20 \mu\text{g/ml}$  的 BPP-II 能明显促进 Vero 细胞中 P53 的蛋白表达水平;结果同时显示,BPP-II 处理

后,Vero 细胞中 P53 通路下游的 P21 蛋白表达量也增加。上述结果表明,BPP-II 能够激活 P53 的转录,并诱导 P53 蛋白的表达。

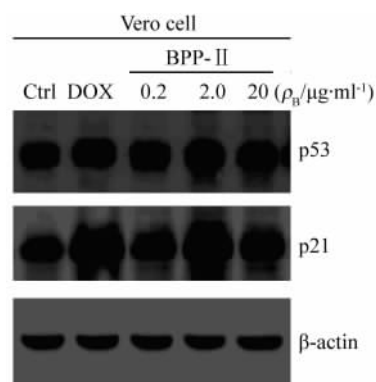


图 3 BPP-II 提高 P53 和 P21 蛋白的表达

Fig. 3 BPP-II enhanced P53 and P21 protein expression

表 1 BPP-II 促进 Vero 细胞中 P53 和 P21 蛋白的表达

Tab. 1 Expression of P53 and P21 proteins was enhanced in Vero cells treated with BPP-II

Group	P53 protein	P21 protein
Control	$0.64 \pm 0.18$	$0.72 \pm 0.19$
DOX	$1.17 \pm 0.32$	$1.61 \pm 0.42$
BPP-II ( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )		
0.2	$0.87 \pm 0.25$	$1.12 \pm 0.30$
2	$0.94 \pm 0.33$	$1.31 \pm 0.25$
20	$1.10 \pm 0.29$	$1.38 \pm 0.27$
F	48.973	64.724
P	0.000	0.000

### 2.4 筛选获取与 BPP-II 特异性结合的十二肽

为进一步探讨 BPP-II 抗肿瘤可能的作用位点,利用噬菌体随机 12 肽库筛选 BPP-II 特异性结合肽。经过 4 轮亲和筛选,并结合 ELISA 鉴定,获得 10 个噬菌体阳性克隆(P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7、P8、P9、P10)(图 4A)。通过噬菌体阳性克隆的竞争抑制实验,结果(图 4B)显示,P3、P5、P6 能够特异性与 BPP-II 结合。经序列测定,该 3 个结合肽分别为 QSLPSPLWIIQQS、DRMPDSAWTTRK 和 ALWPPNLHAWVP,分别命名为 P3-12、P5-12 和 P6-12。

### 2.5 BPP-II 特异性结合肽明显减弱 BPP-II 对 WEHI-231 细胞增殖抑制的能力

MTT 法检测 BPP-II 结合肽对 WEHI-231 细胞增殖的影响,结果(图 5)显示,与 PBS 空白对照组相

比, P3-12、P5-12 和 P6-12 在不同质量浓度(0.02 ~ 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )下处理 WEHI-231 细胞时, 细胞相对增殖率均无显著变化( $P > 0.05$ ), 表明 BPP- II 结合肽 P3-12、P5-12 和 P6-12 本身对 WEHI-231 细胞的增殖均无明显影响。

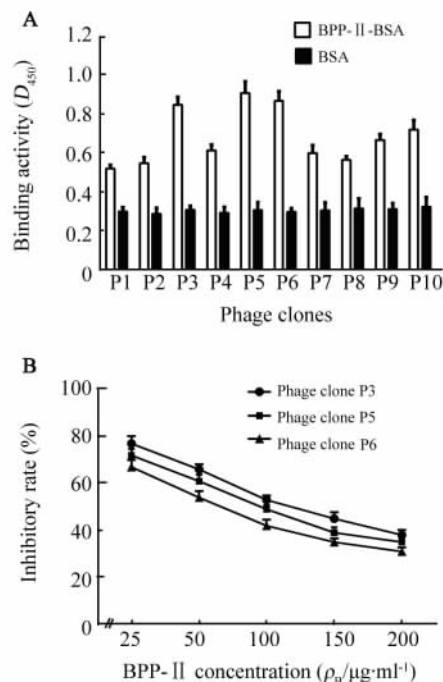


图 4 噬菌体阳性克隆的鉴定( A ) 及其竞争抑制率( B )

Fig. 4 Identification of the positive phage clones ( A ) and the competitive inhibition rate ( B )

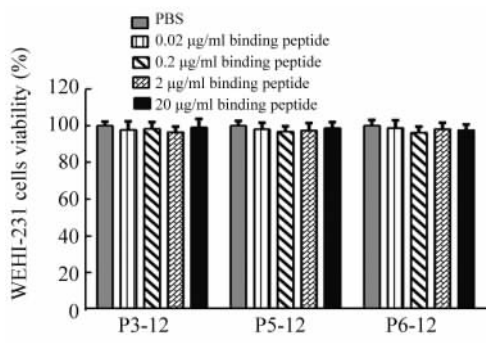


图 5 不同浓度的 BPP- II 结合肽对 WEHI-231 细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of BPP- II binding peptides with different concentrations on WEHI-231 cells proliferation

为进一步研究 BPP- II 结合肽对 BPP- II 抗 WEHI-231 细胞增殖功能的影响, 用不同质量浓度(0.02 ~ 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的 P3-12、P5-12、P6-12 与 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BPP- II 联合处理细胞, 结果(图 6)显示, P3-12 在 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  质量浓度下能够显著减弱 BPP-

II 对 WEHI-231 细胞增殖的抑制[ (97.5 ± 3.4)%、(98.9 ± 3.5)% vs (86.3 ± 1.9)% ,  $P < 0.05$  ]; P5-12 和 P6-12 在 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  质量浓度下能够显著减弱 BPP- II 对 WEHI-231 细胞增殖的抑制[ (96.7 ± 3.1)%、(95.4 ± 3.8)% vs (86.3 ± 1.9)% ,  $P < 0.05$  ]。以上实验结果表明, BPP- II 可能通过特异性途径发挥抗肿瘤细胞增殖功能。

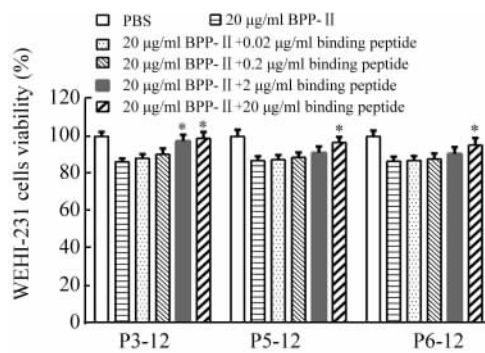


图 6 BPP- II 结合肽对 BPP- II 抗 WEHI-231 细胞增殖功能的影响

Fig. 6 Effect of BPP- II binding peptides with different concentrations on anti-proliferation function of BPP- II against WEHI-231 cells

\*  $P < 0.05$  vs BPP- II (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

### 3 讨论

BAP 来源广泛, 其能够促进淋巴细胞的增殖, 增强巨噬细胞吞噬功能, 进而提高机体的抗病毒能力, 并具有免疫调节、抗血栓、抗氧化和抗肿瘤等活性<sup>[1]</sup>。近年来, 具有抗肿瘤活性的 BAP 引起了科学家们的广泛关注。研究发现, BAP 可在抗肿瘤免疫的不同阶段以不同方式增强抗肿瘤的效果, 如胸腺肽、干扰素、白介素等, 不仅能起到免疫调节作用, 而且能增强免疫器官的免疫应答和巨噬细胞的吞噬能力, 进而提高机体抵抗外界病原体的能力和减少肿瘤发生的可能性<sup>[11]</sup>。随着研究的深入, 胸腺肽、白介素等抗肿瘤 BAP 已被广泛应用于肿瘤和免疫缺陷性疾病的治疗<sup>[12-13]</sup>。BPP 是从禽类中枢体液免疫器官 BF 中分离得到, 除具有重要的免疫调节功能<sup>[3-5]</sup>外, 一些 BPP 如 BPP-I、BSP-I、BP5 等还具有抗肿瘤活性<sup>[6-8]</sup>。BPP- II 是新分离出的一种 BPP, 已有研究证实它具有抗肿瘤的潜能<sup>[9]</sup>, 然而, 其发挥这种生物学功能的机制尚不清楚。

本研究以 WEHI-231、CNE、RH-35 细胞为肿瘤细胞模型来观察 BPP- II 对肿瘤细胞增殖的影响。

这三种肿瘤细胞分别来源于三个不同的物种,其中 WEHI-231 细胞是小鼠未成熟 B 淋巴瘤细胞,RH-35 细胞是大鼠肝癌细胞,CNE 细胞是人鼻咽癌细胞。实验显示,BPP- II 在一定浓度下对肿瘤细胞 WEHI-231、CNE、RH-35 的增殖均表现出抑制作用,表明 BPP- II 可能具有抗肿瘤活性。相反,BPP- II 对三种正常细胞系的增殖均未表现出抑制作用,进一步说明了 BPP- II 能够特异性抑制肿瘤细胞的增殖。

众所周知,p53 作为一个重要的抑癌基因,其在细胞周期调控、细胞凋亡诱导等过程中发挥着重要作用,主要在转录水平上通过调控一些编码细胞生长和凋亡过程中的关键因子来抑制肿瘤的发生<sup>[14]</sup>。本研究发现,BPP- II 刺激 Vero 细胞后,细胞中 p53 荧光素酶活性明显提高;而添加特异性 p53 抑制剂  $\alpha$ -pifithrin 后,BPP- II 诱导组 Vero 细胞中 p53 荧光素酶活性与对照组相比无明显差异,结果表明 BPP- II 能够激活 p53 的转录活性。用 BPP- II 刺激 Vero 细胞 24 h,细胞中 p53 的表达量升高,p21 的表达量也明显升高。一般认为,p53 可启动 p21 的合成,而 p21 是一种细胞周期依赖性激酶的抑制蛋白,能够抑制细胞周期依赖性激酶的活性,进而引起细胞周期阻滞。BPP- II 诱导 Vero 细胞后,细胞中 p53 荧光素酶活性明显提高,p53 和 p21 的表达量均升高,提示 BPP- II 可能通过 p53 信号通路途径发挥其抗肿瘤细胞增殖功能。

噬菌体展示技术是寻找可与靶蛋白结合的多肽或蛋白的强效工具,由于其可直接将表现型与基因型联系在一起,从而通过筛选获得与靶蛋白特异性结合的蛋白质或多肽,因而广泛应用于 H1N1 型流感病毒血凝素抑制肽、胃癌特异性结合肽和 hFGF-7 相关模拟肽等的筛选<sup>[15-17]</sup>。本研究利用噬菌体随机 12 肽库筛选 BPP- II 特异性结合肽,最终获得 3 条 BPP- II 结合肽:P3-12( QSLPSPLWIIQQS )、P5-12( DRMPDSA WTTTRK )和 P6-12( ALWPPNLHAWVP )。体外实验进一步表明,P3-12、P5-12 和 P6-12 在一定浓度下均能减弱 BPP- II 对 WEHI-231 细胞增殖的抑制能力。实验提示 BPP- II 可能是通过特异性途径来抑制肿瘤细胞的增殖。

综上,本研究结果表明,BPP- II 能够特异性地抑制小鼠 B 淋巴瘤细胞、人鼻咽癌细胞和大鼠肝癌细胞等肿瘤细胞的增殖,其机制可能是通过 p53 信号通路途径发挥抗肿瘤功能,研究结果为进一步探讨 BPP- II 抗肿瘤的分子机制提供了实验依据。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 王竹清,李八方. 生物活性肽及其研究进展 [ J ]. 中国海洋药

物杂志, 2010, 29( 2 ): 60-68.

- [ 2 ] 苏丽娅,苏秀兰. 生物活性肽抗肿瘤作用的研究进展 [ J ]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16( 16 ): 1272-1276.
- [ 3 ] Feng XL, Liu QT, Cao RB, et al. Characterization and immunomodulatory function comparison of various bursal-derived peptides isolated from the humoral central immune organ [ J ]. Peptides, 2012, 33( 2 ): 258-264.
- [ 4 ] Li DY, Geng ZY, Zhu HF, et al. Immunomodulatory activities of a new pentapeptide ( Bursopentin ) from the chicken bursa of Fabricius [ J ]. Amino Acids, 2011, 40( 2 ): 505-515.
- [ 5 ] Liu XD, Feng XL, Zhou B, et al. Isolation, modulatory functions on murine B cell development and antigen-specific immune responses of BP11, a novel peptide from the chicken bursa of Fabricius [ J ]. Peptides, 2012, 35( 1 ): 107-113.
- [ 6 ] Feng XL, Liu QT, Cao RB, et al. A bursal pentapeptide ( BPP-I ), a novel bursal-derived peptide, exhibits antiproliferation of tumor cell and immunomodulator activity [ J ]. Amino Acids, 2012, 42( 6 ): 2215-2222.
- [ 7 ] Feng XL, Liu TQ, Wang FQ, et al. Isolation, antiproliferation on tumor cell and immunomodulatory activity of BSP-I, a novel bursal peptide from chicken humoral immune system [ J ]. Peptides, 2011, 32( 6 ): 1103-1109.
- [ 8 ] Feng XL, Liu QT, Cao RB, et al. Gene expression profiling of hybridoma cells after bursal-derived bioactive factor BP5 treatment [ J ]. Amino Acids, 2012, 43( 6 ): 2443-2456.
- [ 9 ] Feng XL, Liu QT, Cao RB, et al. Identification and characterization of novel immunomodulatory Bursal-derived Pentapeptide-II ( BPP-II ) [ J ]. J Biol Chem, 2012, 287( 6 ): 3798-3807.
- [ 10 ] 王臣,陈溥言,魏建超,等. 三肽囊素特异性结合肽及筛选方法. 中国, ZL200810155724. 8 [ P ]. 2011-06-15.
- [ 11 ] 董超,毕力夫,苏秀兰. 生物活性肽与抗肿瘤免疫 [ J ]. 内蒙古医学院学报, 2009, 31( 3 ): 252-255.
- [ 12 ] Fan YZ, Chang H, Yu Y, et al. Thymosin  $\alpha$ 1 suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia cell lines [ J ]. Peptides, 2006, 27( 9 ): 2165-2173.
- [ 13 ] Akaza H, Tsukamoto T, Onishi T, et al. A low-dose combination therapy of interleukin-2 and interferon-alpha is effective for lung metastasis of renal cell carcinoma: A multicenter open study [ J ]. Int J Clin Oncol, 2006, 11( 6 ): 434-440.
- [ 14 ] 李秀兰,赵云峰. p53 与肿瘤治疗 [ J ]. 中国细胞生物学学报, 2010, 32( 4 ): 656-661.
- [ 15 ] 汪崇文,丁晓然,杨静,等. H1N1 型流感病毒血凝素抑制肽的筛选研究 [ J ]. 国际药学研究杂志, 2013, 40( 1 ): 48-52.
- [ 16 ] 余明军,孙学军,禄韶英,等. 噬菌体随机十二肽库筛选及鉴定胃癌特异性结合肽 [ J ]. 中国普外基础与临床杂志, 2010, 17( 10 ): 1050-1055.
- [ 17 ] 宗宪磊,蔡景龙,姜笃银,等. 应用噬菌体随机十二肽库筛选 hFGF-7 相关模拟肽 [ J ]. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47( 11 ): 46-49.

[ 收稿日期 ] 2014-10-15

[ 修回日期 ] 2014-12-25

[ 本文编辑 ] 阮芳铭