

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2):235–245; 4 February 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140380

法氏囊活性五肽 BP5 的抗肿瘤作用

郭香玲¹, 王臣^{1*}, 李小康¹, 吴庭才¹, 李德元², 陈溥言²

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】法氏囊活性五肽 Bursopentin (BP5) 是一种多功能生物学活性因子, 不仅具有免疫调节和抗氧化功能, 还具有抗肿瘤活性。目前, BP5 发挥抗肿瘤生物功能的作用机制尚不清晰。【方法】本研究利用 T7 噬菌体展示技术构建鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库, 以 BP5-BSA 为靶分子对文库进行亲和淘选, 通过序列测定和生物信息学分析, 获得 BP5 的结合蛋白。通过分析 BP5 诱导的鸡 DT40 细胞 mRNA 基因表达谱和检测 BP5 对 HCT116 细胞中 p53 Luciferase 活性和 p53 信号通路中相关蛋白表达的影响来探讨 BP5 抗肿瘤的作用机制。【结果】构建的鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库原始滴度为 1.2×10^4 pfu/mL, 重组率为 91.7%, 扩增后滴度为 1.9×10^9 pfu/mL; 通过生物淘选获得 3 条与 BP5 结合的鸡源蛋白血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A)、细胞周期蛋白 E1 (cyclin E1) 和运输蛋白颗粒复合体 2 (trafficking protein particle complex 2)。基因表达谱分析结果显示, BP5 参与调节多条与抗肿瘤功能有关的通路, 其中包括 p53 信号通路, 且 p53 信号通路涉及的 5 个差异表达基因均与细胞周期调控或抗肿瘤相关, 其中 SIAH1、TP53 (p53)、CIP1 (p21) 基因被上调, CHEK2、CCNE1 基因被下调。RT-PCR 方法检测 10 个表达水平有明显变化的差异基因, 其结果与基因芯片分析结果相符; BP5 对 p53 Luciferase 活性的影响实验结果显示, BP5 在 0.2–20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下能够明显提高 HCT116 细胞中 p53 相对 Luciferase 活性, Western blotting 结果证实, BP5 能显著促进 p53、p21 蛋白的表达水平, 而 CCNE1 和 CHEK2 蛋白的表达水平则明显降低。【结论】本研究结果表明 BP5 通过 p53 信号通路途径发挥其抗肿瘤生物学功能, 为进一步研究 BP5 抗肿瘤具体的分子机制提供了参考依据。

关键词: Bursopentin (BP5), 鸡 DT40 细胞, T7 噬菌体 cDNA 文库, 相互作用蛋白, p53 信号通路, 抗肿瘤

中图分类号: R392 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 02-0235-11

法氏囊 (bursa of Fabricius, BF) 是具有与胸腺相同地位的体液中枢器官, 是禽类特有的免疫器官。禽类前体 B 细胞从骨髓迁移到 BF, 并在 BF 中分化、发育为成熟的 B 细胞, 然后通过淋巴循环和血

液循环迁移到外周淋巴器官参与免疫反应^[1]。已证实, BF 组织中存在多种生物活性物质, 囊素三肽 (bursin, BS) 是 BF 组织中第一个化学结构明确的生物活性因子^[2], 此后, 法氏囊生物活性肽引起了人们的广泛关注, 近年来, 有多条法氏囊活性肽从法

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (31101792 和 31201928); 河南省高校青年骨干教师项目 (2012GGJS-077)

* 通信作者。E-mail: wangchen2001@126.com

作者简介: 郭香玲 (1988–), 女, 河南许昌人, 硕士研究生, 主要从事动物分子病原学与免疫学研究。E-mail: gxl0202@126.com

收稿日期: 2014-07-29; **修回日期:** 2014-09-08

氏囊组织中被分离鉴定^[3-6]。

不少学者对法氏囊活性肽展开了广泛而深入的研究,先前的研究主要集中在体液免疫方面,近两年研究发现法氏囊活性肽对细胞免疫也具有调节作用,有些还具有抗肿瘤活性^[5-6]。法氏囊活性五肽 BP5 (Bursopentin) 是从鸡 BF 中分离到的一种新的免疫活性肽,不仅具有调节体液免疫和细胞免疫反应、抗氧化功能,还具有抗肿瘤活性^[7-9]。目前, BP5 发挥抗肿瘤作用机制研究甚少,本研究通过 T7 噬菌体展示技术筛选 BP5 鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库相互作用蛋白,结合 cDNA 基因芯片技术检测 BP5 刺激鸡 DT40 细胞后抗肿瘤信号通路中重要的信号功能基因,并检测 BP5 对肿瘤细胞中 p53 Luciferase 活性和 p53 信号通路中相关蛋白表达的影响,进而从分子水平上为揭示 BP5 的抗肿瘤分子机制提供科学依据,同时为进一步明确 BP5 的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

鸡 DT40 细胞 (鸡 B 淋巴瘤细胞) 和 HCT116 细胞 (人结肠癌细胞) 购自广州吉妮欧生物科技有限公司;SV Total RNA Isolation System 和 PolyATtract® mRNA Isolation System II with Magnetic Stand 均购自 Promega 公司;T7 Select OrientExpress Random Primer cDNA Cloning Systems (包括 T7 Select OrientExpress Random Primer cDNA Synthesis Kit、EcoR I/Hind III End Modification Kit、DNA Ligation Kit、Mini Column Fractionation Kit 和 T7 Select1-1 Cloning Kit) 购自 Novagen 公司;Taq 酶、100 bp DNA Marker、TRIzol 试剂、One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit 均购自 TaKaRa 公司;T7 UP Primer、T7 DOWN Primer 及实时荧光定量 PCR 引物均由华大基因科技股份有限公司合成。文库鉴定引物序列为:T7 UP Primer: 5'-GGAGCTGTCGTA TTCCAGTC-3', T7 DOWN Primer: 5'-AACCCCTCA AGACCCGTTTA-3'。Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay Kit 购自 Promega 公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司;Doxorubicin (Dox) 和 Camptothecin (CPT) 购自 Sigma 公司;鼠抗人 p53 (DO-1)、鼠抗人 CHEK2

(B-4)、鼠抗人 CCNE1 (HE-12)、鼠抗人 p21 抗体 (F-5) 和兔抗人 action (H-196) 均购自 Santa Cruz 公司。BP5 和 BP5-BSA 由上海科肽生物有限公司合成,纯度 95% 以上。

1.2 鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库的构建

1.2.1 鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 原始文库的构建:将鸡 DT40 细胞约 3×10^6 cells/mL 按照 SV Total RNA Isolation System 和 PolyATtract® mRNA Isolation System II with Magnetic Stand 操作手册,提取其总 RNA 并进行 mRNA 纯化。用紫外分光光度计测定鸡 DT40 细胞总 RNA 及 mRNA 的含量与纯度。双链 cDNA 的合成、末端修饰、EcoR I/Hind III 接头连接、酶切及 cDNA 片段分离均按照 OrientExpress™ cDNA Manual 进行,cDNA 与 T7 噬菌体载体连接及体外包装则按照 T7 Select1-1 Cloning Kit 说明书进行,体外包装后的反应液即为鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 原始文库。

1.2.2 文库鉴定及文库扩增:按照 T7 Select® System Manual 进行文库滴度测定及文库扩增,通过 PCR 扩增进行文库重组率鉴定。原始文库滴度 (pfu/mL) = 噬菌斑数 × 稀释度 × 10。根据原始文库滴度,采用固体平板裂解法进行文库扩增,取 10 μL 扩增后文库进行滴度测定,剩下的与 1/10 体积 80% 甘油混合后分装,于 -70℃ 保存备用。随机挑取 24 个噬菌斑,取其裂解液进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:噬菌体裂解液 2 μL, T7 UP Primer 1 μL, T7 DOWN Primer 1 μL, dNTP 1 μL, Taq Buffer 5 μL, Taq Polymerase 1 μL, ddH₂O 39 μL。反应条件为:94℃ 2 min;94℃ 50 s, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s, 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小,并计算文库重组率。

1.3 BP5 鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库相互作用蛋白的筛选

用 BP5-BSA 和 BSA 包被酶标板,参照 T7 Select® System Manual 和三肽囊素特异性结合肽及筛选方法^[10],先进行 BSA 预筛选,再进行三轮亲和筛选,并进行滴度测定。随机挑取第三轮筛选后的噬菌体 20 个克隆,取其裂解液进行 PCR 扩增。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。大于 250 bp 的 cDNA 插入片断以 T7 UP Primer 为引物送至华大基因科技股份有限公司进行测序,同时对 BP5 鸡 DT40 细胞相互作用蛋白进行生物信息学分析。

1.4 BP5 刺激后鸡 DT40 细胞的基因表达谱分析

将鸡 DT40 细胞培养至约 2×10^6 cells/mL, 加入 $2 \mu\text{g/mL}$ BP5 刺激细胞 4 h, 以 PBS 组为空白对照组, 诱导结束后离心收集细胞, 并用 PBS 缓冲液快速洗 1 次, 收集细胞, 按照每 5×10^6 cells 加 1 mL TRIzol 的比例加入 TRIzol 试剂, 用移液器吸头反复吹打细胞直至看不见成团的细胞块, 形成清亮不粘稠的液体, 作为寄送的样品送至上海欧易生物医学科技有限公司, 采用美国 Affymetrix 公司 Affymetrix 3.0 鸡表达谱芯片进行基因芯片分析, 检测 BP5 刺激组和未刺激组鸡 DT40 细胞 mRNA 差异表达情况, 获得 BP5 刺激鸡 DT40 细胞的差异基因表达谱, 筛选 Fold change ≥ 2.0 的差异表达基因。利用 GO-analysis 软件统计差异表达基因的显著性, 分析差异基因的功能, 并进行相关的 Pathway 分析。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

根据 BP5 刺激鸡 DT40 细胞的差异基因表达谱的 GO 功能分析及 Pathway 分析结果, 选取表达水平有明显变化的 10 个基因 (SIAH1、CHEK2、TP53、CCNE1、CIP1、CHUK、BIRC2、PRKX、CACNA2D2、NRK 基因) 进行 RT-PCR, 以 GAPDH 基因为内参。将鸡 DT40 细胞培养至约 2×10^6 cells/mL, 加入 $2 \mu\text{g/mL}$ BP5 刺激细胞 4 h, 以 PBS 组为空白对照组, 收集细胞并提取总 RNA, 按照 One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit 说明书将总 RNA 反转录成 cDNA, 通过 Roche Light Cycler 480 进行 RT-PCR 检测。用 Rotor-Gene 软件进行 Ct 值分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析待测基因表达水平。

1.6 BP5 对 p53 Luciferase 活性的影响

按 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书, 将含有荧光素酶标记基因的 p53-Luc 质粒转染到 HCT116

细胞中, 12 h 后分别加入用不同浓度 ($0.02 - 20 \mu\text{g/mL}$) 的 BP5, 同时设立 Dox 和 CPT 阳性对照和 PBS 空白对照, 于转染后 24 h 后收样, 检测 p53 的相对 Luciferase 活性。另外, HCT116 细胞转染 24 h 后, 加入 p53 抑制剂 $20 \mu\text{mol/L}$ α -pifithrin 作用 2 h, 然后用 $20 \mu\text{g/mL}$ BP5 继续作用 22 h, 检测 p53 的相对 Luciferase 活性。

1.7 BP5 对 p53 通路中相关蛋白表达的影响

用 BP5 ($0.2 - 20 \mu\text{g/mL}$) 刺激 HCT116 细胞, 同时设 PBS 空白对照组和 Dox 和 CPT 阳性对照组, 24 h 后收集蛋白, 利用鼠抗人 p53、鼠抗人 CCNE1、鼠抗人 CHEK2、鼠抗人 p21 和兔抗人 action 抗体做 Western blotting 检测 p53、p21、CCNE1 和 CHEK2 蛋白的表达水平, actin 作为上样量的对照。

2 结果

2.1 鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库的构建

按试剂盒操作说明提取鸡 DT40 细胞的总 RNA 和 mRNA, 经分光光度计测定, 总 RNA 的纯度为 $A_{260}/A_{280} = 1.9$, 含量为 $656 \mu\text{g}$; mRNA 的纯度为 $A_{260}/A_{280} = 1.88$, 含量为 $19.72 \mu\text{g}$, 说明总 RNA 和 mRNA 纯度较高, 含量也较高, 可用于合成 cDNA。经噬菌斑测定, 构建的鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库原始滴度为 1.2×10^4 pfu/mL, 扩增后文库滴度为 1.9×10^9 pfu/mL。随机挑选 24 个噬菌斑进行 PCR 鉴定, 结果显示, 文库重组率为 91.7%, 重组体中插入片段大多在 250 - 1000 bp (图 1), 说明鸡 DT40 细胞 cDNA 分级纯化效果较好。随机选取 12 个 PCR 产物进行测序, 结果显示插入序列均为鸡源序列, 表明文库质量较好, 能够满足文库筛选的需求。

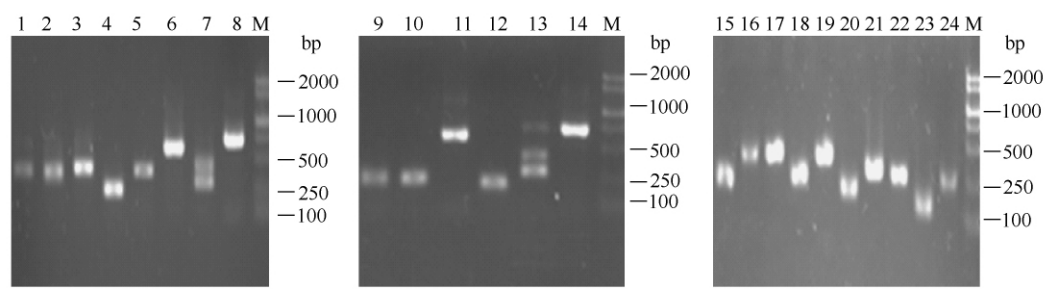


图 1. 鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库的 PCR 鉴定

Figure 1. Identification of T7 phage cDNA library of DT40 cells by PCR. M: 100bp DNA Marker; lane 1 - 24: PCR products

2.2 BP5 鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库相互作用蛋白的筛选

用 BP5-BSA 对鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库进行三轮生物淘选。三轮筛选中,每轮投入的噬菌体滴度固定为 1×10^9 pfu/mL,而洗脱回收的噬菌体滴度和产出投入比逐轮提高(表 1),表明筛选后与 BP5 特异性结合的噬菌体得到明显富集。随机挑取第三轮筛选后的噬菌体 20 个克隆,取其裂解液进行 PCR 鉴定,结果显示,第三轮筛选后噬菌体中的 cDNA 插入片段大小不等(图 2)。经序列测定,将噬菌体克隆插入的 DNA 序列与 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>)进行同源序列比对,结果显示分别与 3 条鸡源基因同源,为血管

内皮生长因子 A (VEGFA, vascular endothelial growth factor A)、细胞周期蛋白 E1 (CCNE1, cyclin E1) 和运输蛋白颗粒复合体 2 (TRAPPC2, trafficking protein particle complex 2)。

表 1. 三轮亲和筛选对噬菌体的富集
Table 1. Selective enrichment of phages in three rounds of affinity screening

Rounds of panning	Input titer (pfu/mL)	Output titer (pfu/mL)	Relative yield
1	1×10^9	4.8×10^5	4.8×10^{-4}
2	1×10^9	7.6×10^6	7.6×10^{-3}
3	1×10^9	4.0×10^7	4.0×10^{-2}

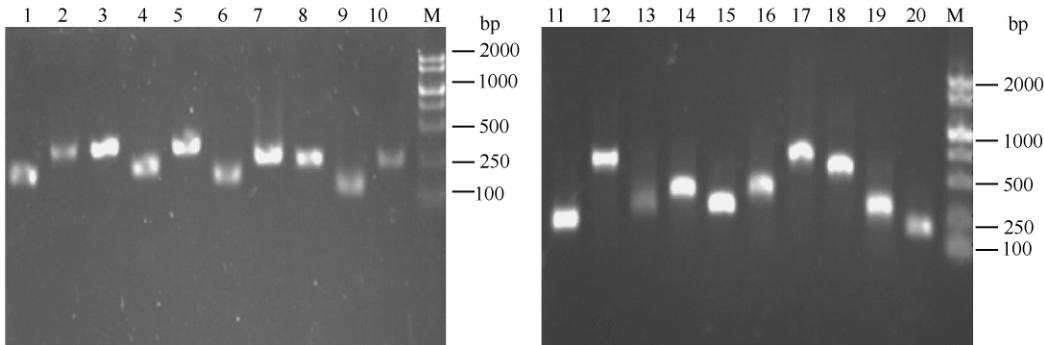


图 2. 噬菌体 cDNA 插入片段的 PCR 鉴定

Figure 2. Identification of the cDNA fragments by PCR. M: 100bp DNA Marker; lane 1 – 20: PCR products

2.3 BP5 诱导鸡 DT40 细胞的 mRNA 基因表达谱分析

分析 BP5 诱导鸡 DT40 细胞的 mRNA 差异基因表达谱,结果显示,BP5 诱导鸡 DT40 细胞差异表达的基因有 1078 个 (Fold change ≥ 2.0),其中上调基因有 537 个,下调基因有 541 个,BP5 调节差异基因的表达,推测 BP5 可能参与多种生物学过程。BP5 诱导鸡 DT40 细胞差异表达基因 GO 分析显示,BP5 刺激组鸡 DT40 细胞被 GO 数据库注释的有 795 个差异基因,而 Biological Process 有 237 个差异基因,主要参与胸腺的发育、细胞发育的调节、细胞周期调控、细胞因子产生、蛋白质酪氨酸磷酸化的调节、蛋白激酶级联、泛素依赖性蛋白的降解、JAK2 激酶的激活、信号转导通路的调节等生物过程(图 3)。利用 KEGG 数据库对 BP5 诱导鸡 DT40 细胞的差异表达基因进行 Pathway 分析,结果显示,BP5 刺激组差

异基因调节 25 个通路中多条通路与免疫调节和抗肿瘤功能有关,其中与抗肿瘤相关的通路有 Notch 信号通路、TGF- β 信号通路、凋亡、mTOR 信号通路、p53 信号通路(图 4)。差异表达的基因中与免疫相关的主要有 MAPK11、JAK2、IL6ST、JARID2、SRC、TYR、RPS6KA2、MAPK14、FAT4 等(表 2),与抗肿瘤相关的主要差异表达基因有 USP25、USP38、PSEN2、ANAPC2、USP45、BRCA1、SIAH1、CHEK2、TP53、CCNE1、CIP1 等(表 3),表明 BP5 可能参与 T 细胞和 B 细胞介导的免疫应答、细胞因子产生及抗肿瘤等生物过程。其中 p53 信号通路涉及的差异表达基因有 SIAH1、CHEK2、TP53 (p53)、CCNE1、CIP1 (p21),其中 SIAH1、TP53、CIP1 被上调,CHEK2、CCNE1 被下调。结合相互作用蛋白筛选结果,提示 BP5 可能通过 p53 信号通路途径发挥抗肿瘤生物学功能。

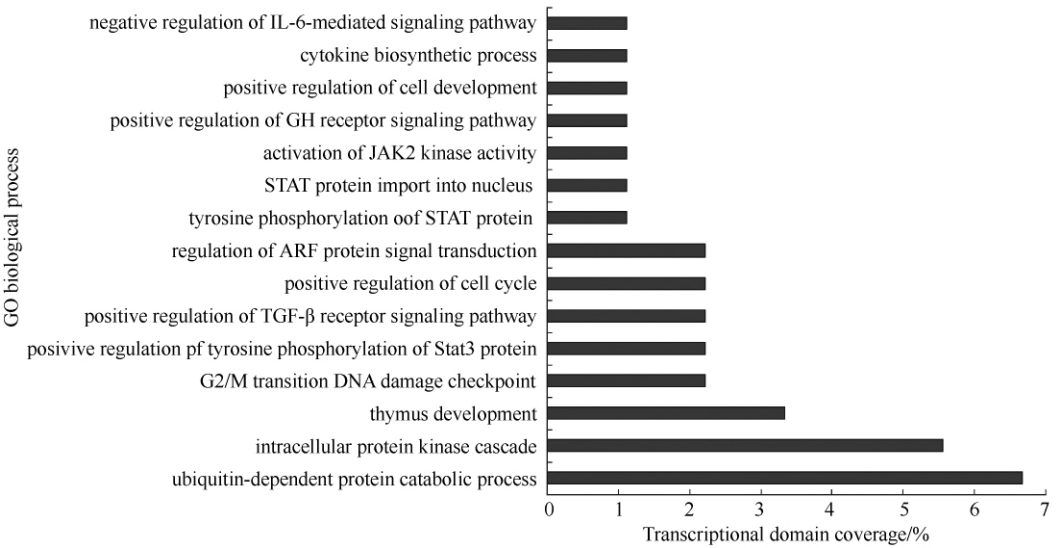


图 3. 差异表达基因 GO 分类的生物学过程

Figure 3. Categories of differentially expressed genes based on biological process.

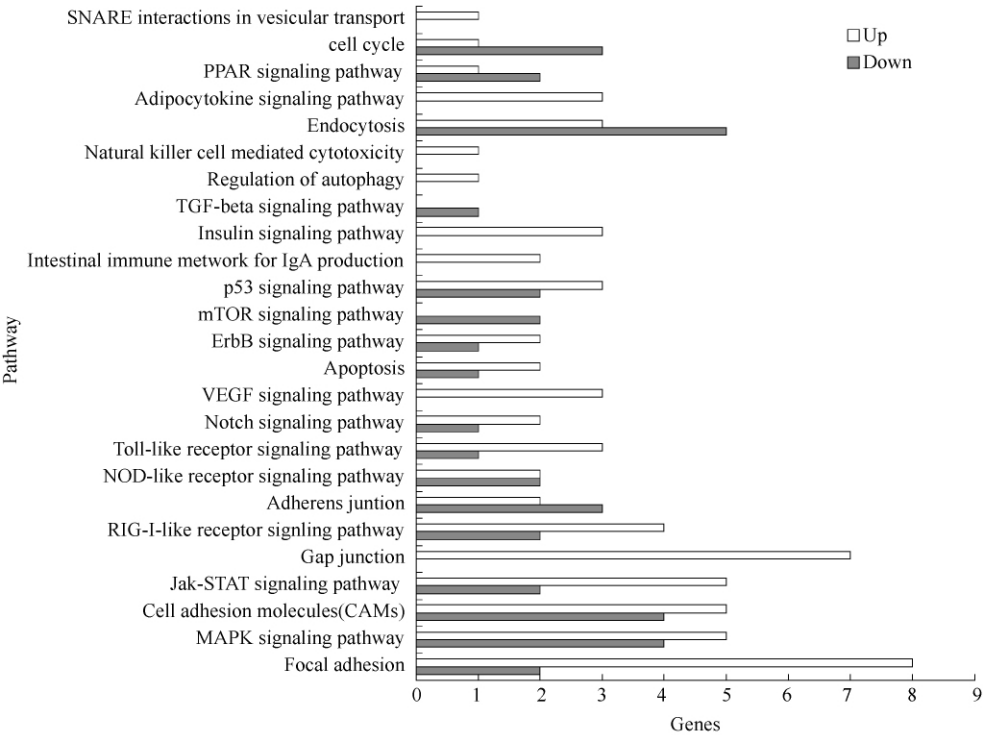


图 4. 差异表达基因的 Pathway 分析

Figure 4. Pathway analysis of differentially expressed genes based on KEGG.

表 2. BP5 刺激后与免疫相关的主要差异表达基因

Table 2. The main differentially expressed genes involved in biological process immune responses involved by BP5 treatment

Gene symbol	Fold Change	Up/Down	Gene Title
MAPK11	2. 238639	↑	mitogen-activated protein kinase 11
JAK2	2. 3020186	↑	janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)
IL6ST	2. 3752036	↑	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
JARID2	2. 7378066	↑	jumonji, AT rich interactive domain 2
SRC	2. 8902948	↑	v-src sarcoma viral oncogene
TYR	4. 640478	↓	tyrosinase
RPS6KA2	2. 5557175	↓	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
MAPK14	5. 271111	↓	mitogen-activated protein kinase 14
FAT4	2. 4609718	↓	FAT tumor suppressor homolog 4

表 3. BP5 刺激后与抗肿瘤相关的主要差异表达基因

Table 3. The main differentially expressed genes involved in biological process antitumor involved by BP5 treatment

Gene symbol	Fold Change	Up/Down	Gene Title
USP25	2. 524953	↑	ubiquitin specific peptidase 25
USP38	2. 0638268	↑	ubiquitin specific peptidase38
SIAH1	2. 1540031	↑	seven in absentia homolog 1
TP53	8. 915734	↑	tumor protein p53
CIP1	6. 156473	↑	cdk inhibitor CIP1 (p21)
PSEN2	8. 459107	↓	presenilin 2
CHEK2	2. 0815032	↓	checkpoint kinase 2
ANAPC2	6. 887097	↓	anaphase promoting complex subunit 2
CCNE1	7. 0173562	↓	cyclin E1
USP45	2. 0654762	↓	ubiquitin specific peptidase 45
BRCA1	2. 4218383	↓	breast cancer 1, early onset

2.4 实时荧光定量 PCR 检测

以 GAPDH 基因为内参,用实时荧光定量 PCR 技术对以下 10 个基因进行检测: SIAH1、CHEK2、TP53、CCNE1、CIP1、CHUK、BIRC2、PRKX、CACNA2D2、NRK, 其中 SIAH1、CHEK2、TP53、CCNE1、CIP1 涉及 p53 信号通路。RT-PCR 结果显示,BP5 刺激后,SIAH1、CHUK、PRKX、CACNA2D2、TP53 和 CIP1 基因 mRNA 表达被上调,CHEK2、CCNE1、BIRC2 和 NRK 基因 mRNA 表达被下调,RT-PCR 结果与基因芯片分析结果相符(图 5)。

2.5 BP5 对 p53 Luciferase 活性的影响

为进一步研究 BP5 是否是通过 p53 信号通路途径发挥抗肿瘤作用,以 BP5 诱导用荧光素酶标记的 p53-Luc 质粒转染 HCT116 细胞来研究 BP5 对 p53 Luciferase 活性的影响。结果显示,BP5 在 0.2 – 20 μg/mL 浓度下能够明显提高被转染的

HCT116 细胞中 p53 相对 Luciferase 活性,而未转染的 HCT116 细胞中 p53 相对荧光素酶活性无明显变化,表明 BP5 在实验浓度下能够诱导 p53 转录活性(图 6-A)。为进一步研究 BP5 对 p53 活性的影响,用 p53 通路特异性抑制剂 α-pifithrin 刺激被转染的 HCT116 细胞 2 h,然后用 20 μg/mL BP5 刺激 22 h,结果显示,α-pifithrin 能够明显抑制 BP5 诱导的 p53 Luciferase 活性,表明 BP5 能够直接激活 p53 转录(图 6-B)。

2.6 BP5 对 p53 通路中相关蛋白表达的影响

为进一步明确 BP5 对 p53 通路中相关蛋白表达的作用,用 0.2 – 20 μg/mL 的 BP5 刺激 HCT116 细胞,检测 p53、p21、CCNE1 和 CHEK2 蛋白的表达水平。结果显示,BP5 诱导能显著提高 HCT116 细胞中 p53、p21 蛋白的表达水平,而 CCNE1 和 CHEK2 蛋白的表达水平明显降低(图 7)。表明

BP5 能够激活 p53 的转录, 并调节 p53 通路中相关蛋白的表达。结合相互作用蛋白筛选及 BP5 诱导的鸡 DT40 细胞基因表达谱分析结果, 表明 BP5 通过 p53 信号通路途径发挥其抗肿瘤生物学功能。

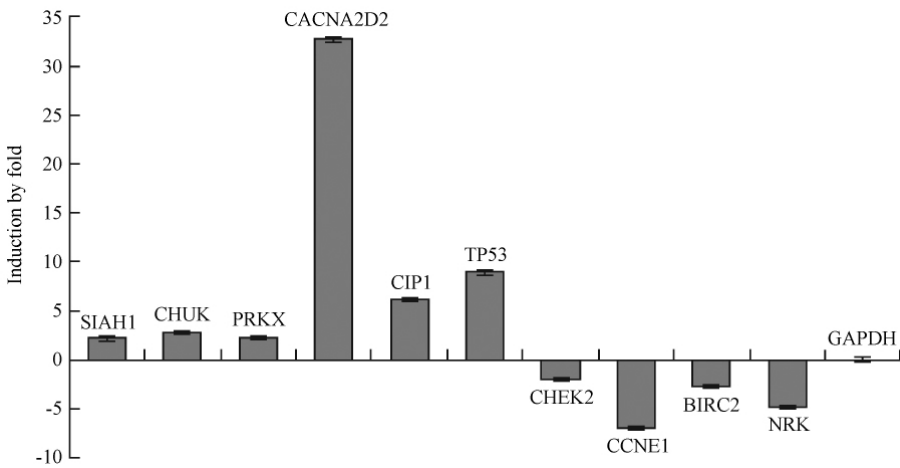


图 5. 实时荧光定量 PCR 验证部分差异表达基因

Figure 5. Some regulated genes were validated by real-time quantitative PCR.

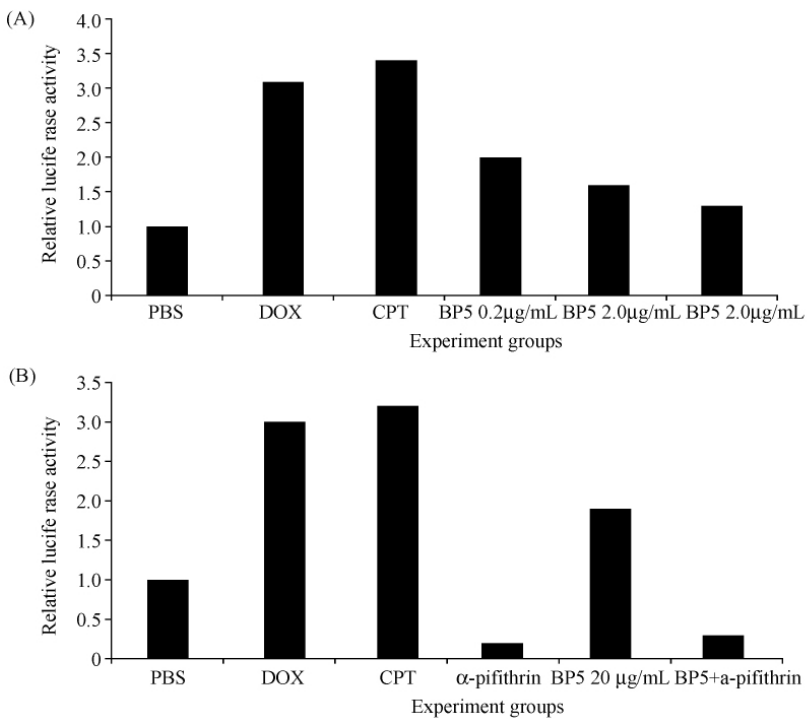


图 6. BP5 提高 p53 荧光素酶活性

Figure 6. BP5 enhanced p53 luciferase activity. A: p53 luciferase activity after BP5 treatment. HCT116 cells were transfected with indicated p53–Lucplasmids. After 24h, the transfected HCT116 cells were stimulated with BP5 for 24h, and p53 luciferase activity was determined. B: Inhibitor could inhibit p53 luciferase activity. The transfected HCT116 cells were pro-incubated with α-pifithrin for 2h, and stimulated with BP5 at 20 mg/mL for 22 h to detect the p53 luciferase activity. Data were expressed as the mean ± SE of three experiments in duplicates.

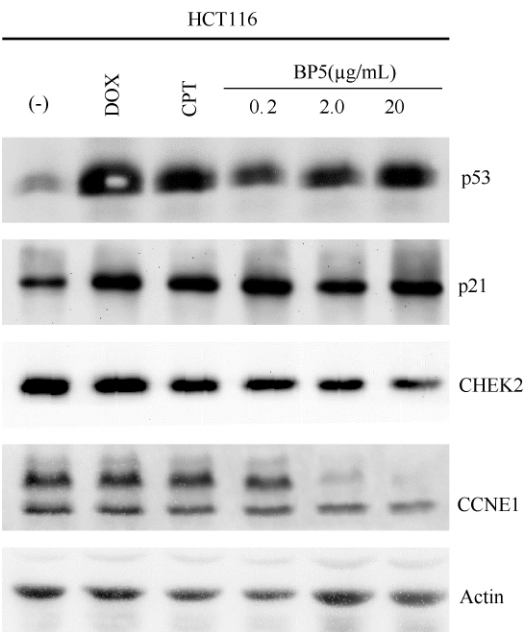


图 7. BP5 提高 p53 通路中相关蛋白的表达
Figure 7. BP5 enhanced p53 and target protein expression.
Non-transfected HCT116 cells were stimulated with BP5 for 24 h. p53, p21, CCNE1 and CHEK2 proteins were determined by Western blotting analysis.

3 讨论

BP5 是 2011 年从鸡 BF 中分离得到的一种新型法氏囊活性五肽,具有多种生物学活性,如免疫调节、抗氧化、抗肿瘤等^[7-9]。目前,国内外学者对 BP5 的生物学功能及其作用机理方面的研究甚少,尤其是对抗肿瘤分子机制方面的研究几乎是空白,尚需更深入的研究。本研究旨在采用 T7 噬菌体展示技术筛选 BP5 鸡 DT40 细胞(鸡淋巴瘤细胞)相互作用蛋白,结合 cDNA 基因芯片技术获得 BP5 刺激鸡 DT40 细胞后与其抗肿瘤功能相关的主要差异表达基因,并通过检测 BP5 对 p53 Luciferase 活性和 p53 信号通路中相关蛋白表达的影响,揭示 BP5 发挥抗肿瘤功能的作用机制。

以噬菌体展示技术构建的 cDNA 表达文库由于具有容量大、易于进行生物淘选、能特异地富集和分离到含有目标基因的噬菌体等特点^[11],在相互作用蛋白的筛选中得以广泛应用,如 HCV 核心蛋白相互作用蛋白^[12]、乙型肝炎病毒前 S2 蛋白结合蛋白^[13]等的筛选。本研究以 BP5-BSA 为靶分子对构建的鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库进行筛选,

最终得到 3 个 BP5 鸡 DT40 细胞相互作用蛋白,为 VEGFA、CCNE1 和 TRAPPC2。其中 VEGFA 主要参与细胞周期、血管生成及细胞增殖等生物过程的调控,TRAPPC2 主要参与转录、DNA 依赖及运输过程,而 CCNE1 则主要参与细胞周期的调控。已有研究证实 CCNE1 是参与细胞周期 G1/S 转换的重要调节因子,可在 G1 晚期及 S 早期与 CDK₂ 结合形成 cyclin E1/CDK₂ 复合物,导致其底物蛋白视网膜母细胞瘤蛋白 pRb 等磷酸化,释放出激活的游离转录因子 E2F,促进细胞周期从 G1 期进入 S 期^[14]。pRb 有低磷酸化和磷酸化两种状态,低磷酸化的 pRb 可与 E2F 结合并阻止 cyclin E 基因转录表达,从而使细胞阻滞于 G1 期,抑制细胞生长^[15]。本研究通过鸡 DT40 细胞 T7 噬菌体 cDNA 文库筛选到 BP5 鸡 DT40 细胞相互作用蛋白 CCNE1,表明 CCNE1 可能与 BP5 抗鸡 DT40 细胞增殖相关。

为了进一步探讨 BP5 发挥抗肿瘤作用可能的机制,本研究以 BP5 刺激鸡 DT40 细胞,通过基因芯片技术来分析 BP5 刺激后鸡 DT40 细胞基因表达谱的变化,从而获得与 BP5 抗肿瘤功能相关的重要信号功能基因和信号通路。基因芯片技术是一种可在较短时间内获得大量差异表达基因信息的大规模、高通量筛选技术,是目前基因研究方面最先进、最有效的方法之一,广泛应用于生命科学研究领域。本研究发现 BP5 刺激组差异基因调节的通路中有 Notch 信号通路、TGF-β 信号通路、凋亡、mTOR 信号通路、p53 信号通路等多条通路与抗肿瘤功能有关,其中与抗肿瘤相关的差异表达基因主要有 USP25、USP38、PSEN2、ANAPC2、USP45、BRCA1、SIAH1、CHEK2、TP53、CCNE1、CIP1,而 p53 信号通路中涉及的差异表达基因有 SIAH1、CHEK2、TP53 (p53)、CCNE1、CIP1 (p21),其中 SIAH1、TP53、CIP1 被上调,CHEK2、CCNE1 被下调。p53 信号通路中涉及的 5 个差异基因均与细胞周期的调控或抗肿瘤有着密切联系。CHEK2 (细胞周期检测点激酶 2) 是 DNA 断裂损伤中重要的信号转导蛋白,参与细胞周期 G1、S 期的阻滞,促进细胞对损伤进行修复。有研究证实,当细胞在 G1 期发生 DNA 损伤时,可激活 CHEK2 激酶使其磷酸化,活化的 CHEK2 又可引起 p53 磷酸化,从而发挥其作为转录激活因子的功能,启动 p21 基因的转录^[16]。p21 是 p53 的下游效应因子,其转录受 p53 的正调控,当 p53 过表

达时可促进 p21 的表达从而抑制细胞增殖^[14]。另外, p21 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 与细胞周期的调控密切相关, 可通过与 cyclin E/CDK₂ 复合物结合形成三聚体来抑制 G1 期 cyclin E/CDK₂ 复合物的激酶活性, 从而使细胞周期阻滞于 G1 期^[17]。本研究 BP5 诱导鸡 DT40 细胞的 mRNA 基因表达谱分析结果显示, BP5 调节的 p53 信号通路中 CHEK2 基因表达被下调, p53 和 p21 基因表达被上调, CCNE1 基因表达被下调, 结合相互作用蛋白筛选结果, 提示 BP5 可能通过 p53 信号通路途径导致细胞周期阻滞而发挥抗肿瘤生物学功能。另外, 据报道, p53 被激活以后还可使 SIAH1 基因的表达上调, 而 SIAH1 的过度表达又能抑制肿瘤发生^[18]。本研究发现 BP5 刺激后 p53 基因和 SIAH1 基因表达均被上调, 进一步表明 BP5 引起鸡 DT40 细胞增殖抑制可能是通过 p53 信号通路途径发挥作用的。以上结果提示 BP5 可能通过 p53 信号通路途径发挥抗肿瘤生物学功能。

同时, BP5 刺激后鸡 DT40 细胞基因表达谱的 GO 分析结果显示, BP5 调节的差异基因主要参与胸腺的发育、细胞发育的调节、细胞因子产生、蛋白质酪氨酸磷酸化的调节、蛋白激酶级联、泛素依赖性蛋白的降解、JAK2 激酶的激活、信号转导通路的调节等生物过程。Pathway 分析结果显示, BP5 调控 RIG-I 样受体通路、粘着连接、细胞间黏附分子、Jak-STAT 信号通路、NOD 样受体信号通路、MAPK 信号通路、IgA 产生的肠道免疫网络等多条与免疫相关的通路。这些结果中产生的信息为今后实验提供了重要的转录水平的参考依据, 同时揭示 BP5 具有多种生物学功能, 在细胞内多种信号中均发挥作用, 为 BP5 发挥生物学功能的作用机制研究提供了参考依据。

众所周知, 抑癌基因 p53 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^[19]。为进一步研究 BP5 抗肿瘤作用机制, 本研究以 BP5 刺激转染荧光素酶标记的 p53-Luc 质粒的 HCT116 细胞, 检测细胞中 p53 Luciferase 活性和 p53 通路中相关蛋白 p53、p21、CCNE1 和 CHEK2 蛋白表达水平的变化, 结果发现, BP5 在 0.2–20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下能够明显提高被转染的 HCT116 细胞中 p53 相对 Luciferase 活性, 而未转

染的 HCT116 细胞中相对 Luciferase 活性无明显变化, 且添加 p53 通路特异性抑制剂 α -pifithrin 的 BP5 诱导组 HCT116 细胞中相对 Luciferase 活性也无明显变化, 这就表明 BP5 在实验浓度下能够激活 p53 的转录活性。检测 BP5 刺激的 HCT116 细胞中 p53、p21、CCNE1 和 CHEK2 蛋白的表达水平发现, BP5 诱导能显著提高 HCT116 细胞中 p53、p21 蛋白的表达水平, 而 CCNE1 和 CHEK2 蛋白的表达水平明显降低。表明 BP5 能够激活 p53 的转录, 并调节 p53 通路中相关蛋白的表达。结合相互作用蛋白筛选及 BP5 诱导的鸡 DT40 细胞基因表达谱分析结果, 进一步证实了 BP5 通过 p53 信号通路途径发挥其抗肿瘤生物学功能, 为更深入地研究 BP5 抗肿瘤具体的分子机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Brand AD, Gilmour G, Goldstein G. Lymphocyte-differentiating hormone of bursa of Fabricius. *Science*, 1976, 193 (4250): 319-321.
- [2] Audhya T, Kroon D, Heavner G, Viamontes G, Goldstein G. Tripeptide structure of bursa, a selective B-cell-differentiating hormone of the bursa of Fabricius. *Science*, 1986, 231 (4741): 997-999.
- [3] Liu XD, Feng XL, Zhou B, Cao RB, Li XF, Ma ZY, Chen PY. Isolation, modulatory functions on murine B cell development and antigen-specific immune responses of BP11, a novel peptide from the chicken bursa of Fabricius. *Peptides*, 2012, 35 (1): 107-113.
- [4] Liu XD, Zhou B, Cao RB, Feng XL, Li XF, Chen PY. Comparison of immunomodulatory functions of three peptides from the chicken bursa of Fabricius. *Regulatory Peptides*, 2013, 186: 57-61.
- [5] Feng XL, Liu TQ, Wang FQ, Cao RB, Zhou B, Zhang Y, Mao X, Chen PY, Zhang H. Isolation, antiproliferation on tumor cell and immunomodulatory activity of BSP-I, a novel bursal peptide from chicken humoral immune system. *Peptides*, 2011, 32 (6): 1103-1109.
- [6] Feng XL, Liu QT, Cao RB, Zhou B, Wang FQ, Deng WL, Qiu YF, Zhang Y, Ishag H, Ma ZY. A bursal pentapeptide (BPP-I), a novel bursal-derived peptide, exhibits antiproliferation of tumor cell and immunomodulator activity. *Amino Acids*, 2012, 42 (6): 2215-2222.

- [7] Li DY, Geng ZY, Zhu HF, Wang C, Miao DN, Chen PY. Immunomodulatory activities of a new pentapeptide (Bursopentin) from the chicken bursa of Fabricius. *Amino Acids*, 2011, 40 (2) :505-515.
- [8] Li DY, Xue MY, Wang C, Wang JB, Chen PY. Bursopentine as a novel immunoadjuvant enhances both humoral and cell-mediated immune responses to inactivated H9N2 avian influenza virus in chickens. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18 (9) :1497-1502.
- [9] Li DY, Xue MY, Geng ZY, Chen PY. The suppressive effects of bursopentine (BP5) on oxidative stress and NF- κ B activation in lipopolysaccharide-activated murine peritoneal macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2012, 29 (1-2) :9-20.
- [10] 王臣, 陈溥言, 魏建超, 张广, 曹瑞兵, 周斌. 三肽囊素特异性结合肽及筛选方法. 中国专利: ZL200810155724. 8. 2011.
- [11] Santi E, Capone S, Mennuni C, Lahm A, Tramontano A, Luzzago A, Nicosia A. Bacteriophage lamda display of complex cDNA libraries: a new approach to functional genomics, *Journal of Molecular Biology*, 2000, 296 (2) : 497-508.
- [12] Huang Y, Cai XF, Zhang J, Huang AL. Screening of proteins interacting with hepatitis C virus core protein from T7-phage display library, *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2007, 29 (10) :876-878. (in Chinese)
黄英, 蔡雪飞, 张君, 黄爱龙. 用 T7 噬菌体展示技术筛选 HCV 核心蛋白的相互作用蛋白. 第三军医大学学报, 2007, 29 (10) :876-878.
- [13] Liu X, Lin S, Wei HS, Chen JL. Screening and characterization of hepatic B virus Pre-S2 binding proteins by phage display system, *Journal of Pathogen Biology*, 2007, 2 (1) :8-10. (in Chinese)
刘霞, 林森, 魏红山, 陈京龙. T7 cDNA 噬菌体展示文库筛选乙型肝炎病毒前 S2 蛋白结合蛋白. 中国病原生物学杂志, 2007, 2 (1) :8-10.
- [14] Li L, Qi FY, Zuo LF, Li P, Wang H. The gene expressions of cyclin E, CDK₂ and p21^{WAF1} and their significant in esophageal carcinogenesis, *Tumor*, 2005, 25 (2) :158-162. (in Chinese)
李丽, 齐凤英, 左连富, 李萍, 王辉. cyclin E、CDK₂ 和 p21^{WAF1} 在食管上皮癌变过程中的表达及意义. 肿瘤, 2005, 25 (2) :158-162.
- [15] Liu YC, Gao FS, Gao HQ, Wang ZJ, Wan YL. The expression and clinical role of p27, cyclin E and Rb protein in gastric carcinoma, *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2001, 33 (1) :20-22. (in Chinese)
刘玉村, 高付生, 高红桥, 王振军, 万远廉. p27、cyclin E、Rb 蛋白在胃癌中的表达及临床意义. 北京大学学报(医学版), 2001, 33 (1) :20-22.
- [16] Wang N, Wang YJ. The effect of cell cycle kinase CHEK2 and p53 in malignant tumor cell cycle and apoptosis, *Journal of Medical Research*, 2012, 41 (9) :4-6. (in Chinese)
王宁, 王雅杰. 细胞周期激酶 CHEK2 和 p53 在恶性肿瘤细胞周期和凋亡中的作用. 医学研究杂志, 2012, 41 (9) :4-6.
- [17] Liu D, Li Y, Zhang DR. Expression and significance of p21^{WAF1} and cyclin E in non-small cell lung cancer, *Journal of Practical Oncology*, 2002, 16 (4) : 289-291. (in Chinese)
刘东, 李奕, 张道荣. p21^{WAF1} 及 cyclin E 在非小细胞肺癌中的表达及其意义. 实用肿瘤学杂志, 2002, 16 (4) : 289-291.
- [18] Roperch JP, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tuynder M, Nemani M, Pasturaud P, Gendron MC, Dausset J, Oren M, Amson RB, Telerman A. SIAH1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21 (Waf1), *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (14) :8070-8073.
- [19] Li XL, Zhao YF. p53 and tumor treatment, *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32 (4) : 656-661. (in Chinese)
李秀兰, 赵云峰. p53 与肿瘤治疗. 中国细胞生物学学报, 2010, 32 (4) :656-661.

Antitumor mechanism of Bursopentin (BP5)

Xiangling Guo¹, Chen Wang^{1*}, Xiaokang Li¹, Tingcai Wu¹, Deyuan Li², Puyan Chen²

¹Key Laboratory of Veterinary Oncological Immunology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

²Key Laboratory of Animal Bacteriology of China's Department of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] Bursopentin (BP5) is a multi-functional bioactive peptide with functions of immunomodulatory, antioxidant and antitumor. However, the antitumor mechanism of BP5 is still unclear. [Methods] We constructed T7 phage cDNA library of DT40 cells, and the proteins interacted with BP5 were identified. Then, the expression profile of BP5-treated DT40 cells were analyzed using gene microarray, p53 Luciferase activity was detected. [Results] The results of the expression profiling revealed that BP5 regulated expression of 1078 genes, of which 537 were up-regulated and 541 were down-regulated. Differentially expressed genes involved in various pathways were identified, of which 25 pathways were associated with immune responses and tumorigenic processes, including the p53 signaling. Furthermore, BP5 significantly enhanced p53 luciferase activity and stimulated expression of p53 protein in HCT116 cells. [Conclusion] These results suggest that BP5 exerted antitumor activity through p53 signaling and that this study provides novel insights on the antitumor mechanism of BP5.

Keywords: Bursopentin (BP5), DT40 cells, T7 phage cDNA library, interacting proteins, p53 signaling pathway, anti tumor

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31101792, 31201928) and by the Foundation for University Key Teacher by Higher Education of Henan Province (2012GGJS-077)

* Corresponding author. E-mail: wangchen2001@126.com

Received: 29 July 2014/Revised: 8 September 2014