

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.05.02

兽用鸡源和猪源转移因子与 免疫活性相关的多肽分析

黄迪海^{1,2}, 盛晓丹^{1,2}, 刘霞^{1,2}, 黄兵³, 亓丽红³, 张再辉^{1,2}, 秦卓明^{1,2,3*}

(1. 山东省健牧生物药业有限公司, 济南 250100; 2. 济南市动物生物药品工程技术研究中心, 济南 250100;

3. 山东省农业科学院家禽研究所, 济南 250100)

[收稿日期] 2022-01-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 05-0010-10 [中图分类号] S852.4

[摘要] 为探明兽用鸡脾和猪脾转移因子(Transfer factor, TF)与免疫活性相关的多肽种类及其氨基酸组成, 采用液相色谱-质谱联用法(LC-MS)对其进行多肽测序, 并与蛋白质比对。结果发现, 由鸡脾和猪脾制备的 TF 分别检测到免疫相关多肽 45 条和 102 条, 多肽的氨基酸数量为 5~24 个, 分子量为 599.2784~2507.8258 Da; 这些多肽对应于免疫活性蛋白质 64 种, 以细胞免疫和先天免疫活性为主。该研究揭示了兽用鸡脾和猪脾 TF 的免疫活性多肽的组成及其氨基酸序列, 有助于进一步研究其有效成分和作用机理。

[关键词] 转移因子; 多肽; 氨基酸序列; 免疫激活

Peptide Analysis of Chicken-derived and Pig-derived Transfer Factors Associated with Immune Activity in Veterinary

HUANG Di-hai^{1,2}, SHENG Xiao-dan^{1,2}, LIU Xia^{1,2}, HUANG Bing³,
QI Li-hong³, ZHANG Zai-hui^{1,2}, QIN Zhuo-ming^{1,2,3*}

(1. Shandong Jianmu Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250100, China;

2. Jinan Center of Engineering Technology Research for Animal Biologics, Jinan 250100, China;

3. Institute of Poultry Science Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250023, China)

Corresponding author: QIN Zhuo-ming, E-mail: qinzm1997@163.com

Abstract: To explore the peptide species and their amino acid composition of chicken-derived spleen and pig-derived spleen transfer factors (TF) associated with immune activity in veterinary, they were polypeptide sequenced using liquid chromatography-mass spectrometry usage (LC-MS) and aligned to proteins. The results

基金项目: 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2022A25); 山东省科技成果转移转化补助(鲁渝科技协作)项目“家禽养殖替抗饲料添加剂的应用与示范”

作者简介: 黄迪海, 硕士, 副研究员, 从事兽药、饲料研究。

通讯作者: 秦卓明。E-mail: qinzm1997@163.com

confirmed that 45 and 102 peptides were detected in the chicken and pig spleen TF respectively, with the peptide of 5 to 24 amino acids and the molecular weight of 599.2784 ~ 2507.8258 Da. These peptides correspond to 64 immunoactive proteins, mainly possessing cellular and innate immune activity. This study revealed the composition and amino acid sequence of immunoactive peptides associated with the veterinary TF in chicken and pig spleen, which is important for studying its effective components and mechanism.

Key words: transfer factor; peptides; amino acid sequences; immunoactive

转移因子(Transfer Factor, TF)是由动物淋巴细胞产生的小分子物质,能够将供体的特异性免疫信息递呈给受体淋巴细胞,使其致敏从而激发受体细胞介导的免疫反应,在国内主要作为免疫增效剂使用,对于天然免疫和获得性免疫均有一定的免疫调节作用^[1]。动物脾转移因子一般含有多肽、核糖、氨基酸、核苷酸、微量元素等多种成分,商品化的 TF 口服溶液通常把多肽、核糖含量作为质控指标,但缺乏相应的理论支撑。目前,有关脾转移因子多肽成分的研究报道较少^[2],尤其是缺乏多肽种类、功能及其序列的研究。为此,本文应用质谱色谱法(LC-MS)对兽用鸡脾和猪脾 TF 的多肽进行鉴定,筛选与免疫相关的多肽进行比较和分析,为转移因子及多肽药物的研发提供思路 and 参考。

1 材料与方法

1.1 材料 兽用鸡脾 TF、兽用猪脾 TF,由山东省

健牧生物药业有限公司通过冻融、透析法制备,多肽含量≥1 mg/mL,核糖含量≥30 μg/mL; Millipore 10 kD 超滤离心管。

1.2 方法 TF 溶液用 10 kD 超滤管 10000 r/min 离心处理,收集通过的滤液,冷藏;委托中国科学院上海生命科学研究院进行蛋白质鉴定,按照文献^[1]的方法,进行溶液内酶解(Trypsin, 20 h),抽提酶解肽段,应用 LC-MS 法采集多肽碎片的质量电荷比,应用 BIOWORKS 软件搜索相应的数据库,得到鉴定的蛋白质结果,查询 Uniprot 数据库,筛选具有免疫活性的蛋白质。

2 结果与分析

2.1 蛋白质与多肽的鉴定概况 兽用鸡脾和猪脾 TF 分别检测到多肽片段 656 条和 1194 条,对应蛋白质 512 种、554 种,包含有特征的蛋白 448 种、485 种,其中,与免疫相关的蛋白分别有 30 种、40 种(表 1)。

表 1 鸡脾和猪脾 TF 中的多肽及其分子量分布

Tab 1 Peptides and their molecular weight distribution in chicken spleen - derived and pig spleen - derived TF					
来源	多肽片段(P)的数量/条				
	P < 1000Da	1000 ≤ P < 2000Da	2000 < P ≤ 3000Da	3000 < P ≤ 4000Da	合计
鸡脾	0	489	164	3	656
猪脾	372	781	40	1	1194

此外,多肽片段对应的完整蛋白还具有生长发育调节、生物酶解、营养代谢以及维持细胞结构和运动等多种活性。

2.2 免疫活性蛋白质及多肽序列

2.2.1 细胞免疫作用 在鸡脾和猪脾 TF 中,与细胞免疫活性相关的蛋白质共 21 种蛋白。其中,鸡脾有 8 种、猪脾有 16 种,二者均含有淋巴细胞

胞质蛋白(LCP)、白细胞介素-16(IL-16)和胸腺肽β4(TMSB4X)3 种蛋白。在细胞免疫的感应阶段,涉及 9 种蛋白,其中,鸡脾 2 种,猪脾 7 种(表 2)。在细胞免疫的反应阶段,共涉及 11 种蛋白,其中,鸡脾 5 种,猪脾 6 种(表 3)。在效应阶段,共涉及 4 种蛋白,其中,鸡脾 1 种,猪脾 3 种(表 4)。

表 2 TF 中与细胞免疫感应阶段有关的多肽

Tab 2 Peptides in TF associated to the cellular immune sensing phase						
序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
1	鸡脾	H-2 类组织相容性抗原 γ 链 (CD74)	抗原递呈启动免疫应答	IPA EKAPAPTQPPSAEPEE	1960.1308	8.52
2	猪脾	T 细胞表面糖蛋白 CD3δ 链 (CD3D)	TCR 途径的信号传递	IDLGKR	701.4304	4.72
3	猪脾	SH3 结构域的蛋白质 7 (DBNL)	经 TCR 途径激活 T 细胞	DSFWAK	753.3566	8.72
				A EEDVEPECIMQK	1577.6822	
				ELREAALR	957.5476	
				NGPALQDAYMR	1235.5837	
4	猪脾	淋巴细胞胞质蛋白 (LCP1)	经 TCR 途径激活 T 细胞	AACLPLPGYR	1117.5823	4.71
				GSVSDEEMMELR	1382.5926	
				ISFDEFIK	998.5193	
5	鸡脾	淋巴细胞胞质蛋白 (LCP1、LCP2)	经 TCR 途径激活 T 细胞	IDANDLTDVLK	1217.3512	2.40
				GNGFIDANDLTDVLK	1591.7160	
				E EAEHDSGDYEP (LCP2)	1475.4094	2.45
6	猪脾	含有 SAM 和 SH3 结构域的蛋白 3 (SASH3)	经 TCR 途径激活 T 细胞	ETHLNELNIMDPQHR	1846.8864	3.95
7	猪脾	Stomatin 样蛋白 2 (STOML2)	调节线粒体功能,激活 T 细胞	DVQGT DASLDEELDR	1662.7453	4.21
8	猪脾	E3 泛素-蛋白质连接酶 (STUB1)	抑制 T 细胞激活	ESGARLGAGGGSPEK	1372.6815	4.95
9	猪脾	泛素蛋白连接酶 (RNF114)	抑制 T 细胞激活	EGGAQLAGPAAEADPLGR	1679.8347	7.89

表 3 TF 中与细胞免疫反应阶段有关的多肽

Tab 3 Peptides in TF associated to the stage of cellular immune response						
序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
1	鸡脾	白细胞介素 16 (IL-16)	诱导 T 细胞增殖	SPEELAKLIEEVKSLDE	1930.1429	2.46
2	猪脾	白细胞介素-16 (IL-16)	诱导 T 细胞增殖	LDATSGGSK	835.4156	7.26
				LGEDDGTQGHDPGTASK	1684.7409	
				QLPEAASCSQPTPTTPASR	2096.0077	
3	猪脾	同种异体炎症因子 1 (AIF1)	促进 T 细胞增殖激活巨噬细胞	AREQEKP TGPPAKK	1536.8492	9.59
				EQEKP TGPPAK	1181.6161	
				EQEKP TGPPAKK	1309.7110	
4	猪脾	T 细胞表面抗原 (CD2)	调节 T 细胞分化	NDEELEIR	1017.4847	2.35

续表						
序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
5	鸡脾	胸腺肽 β4 (TMSB4X)	调节 T 细胞分化	NPLPSKETIEQ	1256.3874	35.56
				NPLPSKETIEQE	1385.5020	
				NPLPSKETIEQEKQ	1641.8047	
				PLPSKETIEQEK	1399.5718	
				PLPSKETIEQEKQ	1527.7016	
				LPSKETIEQEKQ	1430.5859	
				EKNPLPSKETIEQEKQ	1899.0921	
6	猪脾	胸腺肽 β4 (TMSB4X)	调节 T 细胞分化	ETIEQEK	876.4309	81.2
				KTETQEKNPLPSK	1499.8064	
				LKKTETQEK	1104.6259	
				NPLPSK	655.3773	
				NPLPSKETIEQEK	1512.7904	
				TETQEKNPLPSK	1371.7114	
				TETQEKNPLPSKETIEQEK	2229.1245	
				SDKPDMAEIEKFDK	1652.7836	
7	鸡脾	酪氨酸蛋白激酶 (TEC)	经非受体酪氨酸蛋白激酶途径调控 T 细胞分化和发育	RQTEKLAPGCEKYKFFE	2075.3765	2.70
8	鸡脾	巨核细胞关联酪氨酸蛋白激酶 (MATK)	抑制 T 细胞增殖	EDNVAKVSDFGLA	1365.4707	2.91
9	鸡脾	整合素 β-8 (ITGB8)	抑制 T 细胞增殖	LCRAGRPPSPGAAAAAAPA	1933.2313	2.28
10	猪脾	WASH 复合亚基 1 (WASH1)	参与 TCR 通路, T 细胞活化和增殖	LFDAPLSISK	1090.6143	2.13
11	猪脾	钙联蛋白 (CANX)	调节 T 细胞成熟	AEDEILNR	1088.5218	3.2
				GTLSGWILSK	1061.5990	

表 4 TF 中与细胞免疫效应阶段有关的多肽

Tab 4 Peptides in TF associated to the effector stage of cellular immunity						
序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
1	鸡脾	T 细胞凋亡抑制相关蛋白 (TIAL1)	参与细胞凋亡的调节	QIMEIRVFPEKGYSFV	1944.2860	4.12
2	猪脾	整合素 β2 (ITGB2)	有助于自然杀伤细胞的细胞毒性	LGAILTPNDGR	1126.6215	1.43
				EDTEEHHLR	1165.5232	
3	猪脾	异质核糖核蛋白 M (HNRNPM)	诱导 IL-1 等多种细胞因子的生成	IDTIEHTDR	1188.6470	13.49
				IVI(L)QK/LVI(L)QK	600.4079	
				LTDCVVMR	993.4856	
				LTDCVVMRDPASKR	1647.8305	
				DYFEEYGK	1050.4415	
4	猪脾	酪氨酸激酶 Fyn 结合蛋白 (FYB)	调节 IL-2 的表达	AGFPKPAGPK	969.5516	2.26
				NIKPLDLK	1037.6353	

2.2.2 体液免疫 参与体液免疫调节的蛋白有 11 种,其中,鸡脾有 6 种,猪脾有 5 种,二者均含有烯醇酶(ENO1)(表 5)。

2.2.3 其他免疫调节作用

2.2.3.1 先天免疫 涉及先天免疫调节作用的有 15 种蛋白,其中猪脾有 9 种,鸡脾有 7 种,二者均含

有甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(表 6)。

2.2.3.2 多种免疫活性 涉及多种免疫调节作用的有 9 种蛋白,其中,鸡脾有 4 种、猪脾有 5 种,二者均含有信号转导转录激活因子(STAT1)(表 7)。

2.2.3.3 抗肿瘤活性 涉及多种免疫调节作用的有 9 种蛋白,鸡脾 4 种,猪脾 5 种(表 8)。

表 5 TF 中与体液免疫有关的多肽

Tab 5 Peptides involved in humoral immunity in TF						
序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
1	鸡脾	筏连接蛋白(RFTN1)	BCR 介导的信号传导	KTTQGYDAIVVEQWTV	1839.0384	2.66
2	猪脾	通用转录因子 II-I(GTF2I)	激活 B 细胞	SMLSPGCGSGPIK	1290.6180	1.35
3	猪脾	IgM 重链恒定区(IGHD)	激活体液免疫反应	VSSQNIQDFPSVLR	1589.8282	3.5
4	鸡脾	烯醇酶(ENO1)	刺激产生免疫球蛋白	GNPEVILPVPAFNVINGGSH	2032.2882	4.61
				NPEVILPVPAFNVINGGSH	1975.2366	
5	猪脾	烯醇酶(ENO1)	刺激产生免疫球蛋白	EALELLK	815.4873	6.68
				KLNVVEQEK	1086.6153	
				GNPTVEVDLHTAK	1380.7118	
6	鸡脾	锌指转录因子(KLF6)	调节 B 细胞生长发育	NSGNLCSSVTSTPPSSP	1635.7356	6.01
7	鸡脾	含 pH 结构域的 K 家族成员(PLEKHK1)	调节 B 细胞生长发育	AGNEESSFWLP	1237.2995	1.81
8	猪脾	DNA 结合蛋白 Ikaros(IKZF1)	调节 B 细胞生长发育	ACEMNGEECAEDLR	1683.6407	2.7
9	鸡脾	干扰素调节因子结合蛋白(IRF2BP2)	调节 B 细胞分化	GQSPMAALILVADNAGGNHA	1908.1290	5.43
10	鸡脾	酸性哺乳动物几丁质酶(CHIA)	刺激 B 细胞增殖	TGDNIYFNVDYAMNYW	1987.1367	3.38
11	鸡脾	包含 SAM 结构域的蛋白(SAMS1)	下调 B 细胞增殖	KKKMCKKYYKALSEEMNEE	2317.7125	5.09
12	猪脾	含有 EF-hand 结构域的蛋白 D2(EFHD2)	调节 B 细胞凋亡	FEEEIKAEQEER	1536.7176	5.02

表 6 TF 中与先天免疫有关的多肽

Tab 6 Peptides involved in innate immunity in TF						
序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
1	鸡脾	杀菌/通透性增加蛋白(BPI)	抗菌	GNDASGKPTVSTSACST	1583.6607	4.44
				ETVCPRPTR	1115.5626	
				AVDRLNEQSSEANLYR	1864.9147	
2	猪脾	抗菌肽(NPG4/NPG1)	抗菌	LLELDQPPK	1052.5986	31.54
				LNEQSSEANLYR	1423.6812	
				QPPELCDFK	1133.5296	
				QPPELCDFKENG	1589.7377	
3	鸡脾	干扰素调节因子 1(IRF1)	诱导干扰素产生 抗病毒	KTIVDEDEDEMKSNIIK	2008.2371	5.28

续表						
序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
4	鸡脾	核糖核酸聚合酶(POLR3B)	通过 RIG - 1 途径, 诱导干扰素产生抗病毒	ENKVDDR DY YGNK	1616. 6706	1. 15
5	猪脾	甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(GAPDH)	参与 NF - κ B 信号通路, 诱导干扰素产生抗病毒	FHGTVK	688. 3777	26. 13
				IVSNASCTTNCLAPLAK	1819. 9041	
				QASEGPLK	829. 4414	
				TVDGPSGK	760. 3836	
				VIPELNGK	869. 5091	
				GAAQNIIPASTGAAK	1369. 7434	
				LEKPAK	685. 4243	
				LEKPAKYDDIK	1319. 7205	
				VPTPNVSVVDLTCR	1556. 8101	
6	鸡脾	甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(GAPDH)	参与 NF - κ B 信号通路, 诱导干扰素产生抗病毒	DAGAGIALNDH	1054. 0957	3. 30
7	猪脾	质核核糖核蛋白 A2 /B1 (HNRNPA2B1)	诱导干扰素产生抗病毒	EDTEEHHLR	1165. 5232	13. 49
				IDTIEITDR	1188. 6470	
				IVI(L) QK	600. 4079	
				LTDCVVMR	993. 4856	
				LTDCVVMRDPASKR	1647. 8305	
				DYFEEYGK	1050. 4415	
8	猪脾	ATP 依赖性 RNA 解旋酶(DDX60)	诱导干扰素产生抗病毒	DPDPR	599. 2784	0. 29
9	猪脾	泛素融合降解蛋白 1(UFD1L)	抑制干扰素产生	GVEPSPSPIKPGDIK	1520. 8319	4. 89
10	猪脾	细胞基质蛋白 3 (Matrin 3)	通过 cGAS - STING 途径激活先天免疫反应	TESTTEGKEQEEK	1495. 6758	2. 94
				DLDELSRYPEDK	1479. 6962	
11	鸡脾	自噬相关蛋白 16 - 1(ATG16L1)	参与线粒体介导的抗病毒先天免疫	RRSLSFPPP	1144. 3084	1. 64
12	鸡脾	ATP 酶家族 AAA 结构域蛋白 3A (ATAD3A)	参与线粒体介导的抗病毒先天免疫	GESGQGAAGLSLPPGPGG GGPAG	1906. 0033	3. 97
13	猪脾	Poly(rC) 结合蛋白 2(PCBP2)	负向调节由 MAVS 信号介导的细胞抗病毒反应	EVGSHGK	802. 4669	10. 48
				IANPVEGSTDR	1158. 5749	
				IGGELR/INEI(L) R	644. 3726	
				IKEI(L) R/LKEI(L) R	658. 4246	
				MREESGAR	935. 4363	
14	猪脾	异质核核糖核蛋白 U 样蛋白 1 (HNRNPUL1)	抑制病毒和细胞转录	LQAALEAEEPDDER	1585. 7340	1. 62
15	猪脾	Poly(rC) 结合蛋白 1(PCBP1)	启动病毒 RNA 复制	EVGSHGK	802. 4669	7. 58
				IKEI(L) R/LKEI(L) R	658. 4246	
				LVVPATQCGSLICK	1442. 8036	
16	鸡脾	泛素连接酶结合蛋白(N4BP1)	抑制先天免疫信号	IQDTCADITVLEIGL	1604. 8477	1. 64

表 7 TF 中与多种免疫有关的多肽

Tab 7 Peptides associated with multiple immunity in TF

序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
1	鸡脾	白细胞介素 - 6 受体 亚基 β 前体 (IL6ST)	激活 JAK - MAPK 和 JAK - STAT3 信号通路	LQISGQSSQPLGFE	1491.6278	1.53
2	鸡脾	信号转导转录 激活因子 (STAT1)	免疫信号转导 和转录激活 (JAK - STAT 途径)	DILRDYKVMADNVPE EERRILAAASMPAQGPLE	1908.1656 1940.2141	4.54
3	猪脾	信号转导转录激活 因子 (STAT1)	免疫信号转导 和转录激活 (JAK - STAT 途径)	ELSAVTFPDIIR TELISVSEVHPSR TLEDLQDEYDFK YLYPNIDKDHAFGK	1360.7471 1453.7645 1515.6849 1680.8380	6.74
4	鸡脾	锌指蛋白 341 (ZNF341)	激活 JAK - STAT 通路,参与调节 免疫稳态	PPPPPPPPPPPP SLSMHAGAGYLSQPPPPPPPP SLSMHAGAGYLSQPPPPPPPP PPPPPPPPPP	1281.5265 2115.3974 2212.5131 1087.2952	4.51
5	鸡脾	包含 SH2 结构域的 蛋白 3C (SH2D3C)	介导细胞信号通路, 调节免疫反应	LPDPAHSTHSTPCHGYARASP	2203.3833	3.48
6	猪脾	热休克蛋白 90 (HSP90AA1)	参与细胞周期控制, 调节免疫反应	ADLINNLGTIAK HLEINPDHSIETLR KHLEINPDHSIETLR SLTNDWEDHLAVK TLTLVDTGIGMTK	1242.7052 1786.9446 1915.0396 1527.7438 1349.7345	7.37
7	猪脾	蛋白磷酸酶 1 调节 亚基 18 (PPP1R18)	调节白细胞功能	DTETQSQKPESAEK	1577.7289	2.27
8	猪脾	含硫氧还蛋白结构域的 蛋白质 17 (TXNDC17)	调节先天性和 适应性免疫	LTAVPTLLK TIFAYFSGSK	955.6186 1120.5673	15.45
9	猪脾	蛋白质冠层同 源物 3 (CNPY3)	调节先天性和 适应性免疫	ELGGIEGDPSPEEDEGIQK	1998.9138	6.71

表 8 TF 中与抗肿瘤有关的多肽

Tab 8 Polypeptides associated with antitumour in TF

序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
1	鸡脾	肾脑蛋白 (KIBRA)	抑制肿瘤增殖, 促进细胞凋亡	GFQTLKNIDMKMSDTQGGYKLD	2507.8258	1.96
2	鸡脾	胶原蛋白 α 1 或 α 3 (IV) 链 (COL4A1/ COL4A3)	抑制肿瘤形成	KGSQGLKGVVGPQGEPG GPPGPPGPAPHMKEKGSEII GIMGPLGIPPPGRIGS(COL4A3)	1595.7824 1997.3073 1592.8882	2.22 0.94
3	鸡脾	酸性富亮氨酸核 磷酸蛋白 32 家族 成员 A (ANP32A)	抑制肿瘤,促进细胞凋亡	EGKIEGLTDEFEELE	1738.8276	6.05
4	鸡脾	蛋白剪切同 源物 2 (PRUNE2)	调控肿瘤细胞的分化、 存活和侵袭性	LDEKNSSVVPQKL	1457.6545	0.49

续表						
序号	来源	完整蛋白的名称及缩写	蛋白的免疫活性	多肽片段的氨基酸序列	多肽片段的分子量	覆盖率/%
5	猪脾	RNA 结合基序蛋白 (RBMX)	肿瘤抑制	ALEAVFGK	834.4720	7.69
				GFAFVTFESPADAK	1486.7213	
				IVEVLLMK	944.5849	
6	猪脾	MOB 激酶激活剂 1B(MOB1B)	经 Hippo 途径 抑制肿瘤增殖, 促进细胞凋亡	ELAPLQELIEK	1282.7253	6.75
7	猪脾	酪氨酸蛋白 磷酸酶非受体 18 型(PTPN18)	抑制肿瘤增殖	AAPAGTGAGAGSR	1043.5228	2.86
8	猪脾	肌腱蛋白 (SYNP02)	抑制肿瘤转移	GASAPVVALLGAEK	1282.7365	2.69
				IAPPAKR	754.4934	
				TGILQEAKE	859.4883	
9	猪脾	ABI 基因家族成员 3 (ABI3)	抑制肿瘤转移	TGTLR	634.3519	1.67

3 讨 论

TF 中的多肽成分比较复杂,相关研究尚处于探索阶段。Kirkpatrick C H^[3]制备了牛源和鼠源特异性 TF,测序发现其均含有多肽 LLYAQDL/VEDN,且能抑制受体迟发性超敏反应的表达。黄静芳等^[4]在猪脾脏制备的脾氨肽口服冻干粉中鉴定出胸腺肽 β4,占其多肽总量的 0.117%。陈艳菊等^[5]从抗乙肝 TF 中分离到多肽与核苷酸的复合物,该多肽由 15 种氨基酸组成。本文通过对兽用鸡脾和猪脾 TF 的多肽鉴定,确定了其含有的潜在免疫活性多肽的氨基酸序列,其氨基酸数量为 5~24 个,多肽分子量为 599.2784~2507.8258 Da。这些多肽对应 70 余种免疫相关蛋白质,其中,鸡脾和猪脾蛋白分别占其总蛋白数的 5.86% 和 7.22%,二者均含有 IL-16、TMSB4X、LCP、ENO1、GAPDH、STAT1 等六种蛋白质。多肽序列对相关蛋白质的覆盖率为 0.29%~81.2%,其中,覆盖率较高的是胸腺肽 β4(81.2%)和抗菌肽(31.54%)。结合黄静芳的报道,推断胸腺肽是 TF 的主要成分之一,但不同工艺制备的 TF,其多肽成分、含量有所差异,可能与脾脏来源、粉碎细度、冻融次数、透析或超滤的孔径和时间等因素有关。

研究发现,TF 的免疫活性蛋白质中,涉及细胞

免疫 21 种、先天免疫 15 种、体液免疫 11 种、多种免疫活性 8 种、抗肿瘤 9 种,这些蛋白主要通过某些信号通路发挥作用,如:TCR 或 BCR 介导的信号通路、非受体酪氨酸激酶信号途径、JAK-STAT、cGAS-STING、及 NF-κB 信号通路等。

研究表明,某些活性肽可以口服发挥免疫调节作用,比如:脯-甘氨酸环二肽^[6]、胶原三肽^[7]、牡蛎肽^[8]、胸腺蛋白肽^[9]、环孢素 A 等。研究发现,多肽口服进入胃和小肠,有的被消化酶、氨肽酶等降解为游离氨基酸和小肽;有的不被降解,通过细胞紧密连接的细胞旁路径、被动扩散、内吞作用或载体转运系统被小肠吸收^[10]。进入细胞的小肽一部分被胞浆中的肽酶水解为游离氨基酸,用于细胞本身代谢合成或被运至体循环;一部分具有抗水解酶活性的多肽可直接通过基底侧的肽转运体完整地转运至体循环发挥作用,后被血浆中的可溶性蛋白酶降解为氨基酸^[11]。鸡脾和猪脾转移因子中含有免疫活性蛋白的多肽片段达 100 多种,但尚不能确定哪些多肽片段具有口服免疫活性,还需要进一步通过多肽合成和免疫学试验研究来证实。

除多肽外,TF 中还包含核糖、微量元素、游离氨基酸以及核苷酸等多种成分。其中核糖在 TF 中的含量不低于 30 μg/mL,核糖是 RNA 的组成物之

一,也是 ATP 及 NADH 等生化代谢所需分子的原料,因其分子量较小,一般不具备免疫原性;微量元素和游离氨基酸是基本营养代谢所需,锌、铜具有一定的免疫调节作用,但其含量仅有 $0.49 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.04 \mu\text{g/mL}$ ^[12],正常剂量难以发挥免疫功能。TF 中核苷酸含量达 $200 \sim 300 \mu\text{g/mL}$ ^[13],其免疫活性成分可能是尿嘧啶类化合物^[14],钱微等^[15]也证实了对早期玫瑰花结形成具有显著促进作用的 TF 成分中含有鸟苷酸、尿嘧啶和尿苷。TF 中的核苷酸可能具有口服免疫活性,因为外源食物 DNA 在小鼠胃肠道中是不完全降解的,其碱基片段可在小鼠进食后的 8 h 在血液中检测到,24 h 内可在淋巴细胞中检出,24 h 后发生降解^[16]。外源 DNA 口服后,经非序列依赖性 DNA 结合蛋白内吞入细胞核,一部分发生降解,未降解的 DNA 则插入细胞基因组 DNA 中,可能导致某些外源基因的表达,也可能被机体通过甲基化方式进行控制和清除^[17]。TF 中的核苷酸主要来自脾脏本身,也可能来自脾脏携带的微生物,其种类和序列有待于应用 PCR 扩增和高通量测序方法进行鉴定,进而研究其体内外的生物活性。

参考文献:

- [1] 秦卓明,徐怀英,黄迪海,等. 转移因子的组成和作用机制研究[J]. 家禽科学, 2017(07): 47-52.
Qin Z M, Xu H Y, Huang D H, *et al.* Study on the composition and mechanism of transfer factor [J]. Poultry Science, 2017 (07): 47-52.
- [2] 黄迪海,刘霞,盛晓丹,等. 兽用鸡脾转移因子的多肽组成研究[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(02): 23-27.
Huang D H, Liu X, Sheng X D, *et al.* The diverse polypeptides consisting of the chicken spleen transfer factor in veterinary [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(02): 23-27.
- [3] Kirkpatrick C H. Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules [J]. Molecular Medicine (Cambridge Mass), 2000, 6(4): 332-341.
- [4] 黄静芳,郑秋凌,李起竖,等. 脾氨肽口服冻干粉中活性多肽的分离及鉴定[J]. 中南药学, 2019, 17(05): 681-686.
Huang J F, Zheng Q L, Li Q S, *et al.* Isolation and identification of active peptides from spleen aminopeptide oral lyophilized powder [J]. Chinese pharmacol, 2019, 17(05): 681-686.
- [5] 陈艳菊,林琳,刘刚,等. 抗乙肝转移因子结构与性质的初步研究[J]. 中国生化药物杂志, 2005(04): 230-232.
Chen Y J, Lin L, Liu G, *et al.* Studies on structure and properties of anti-HBV specific TF [J]. Chinese Journal of Biochemical Medicine, 2005(04): 230-232.
- [6] 田颖,王刚. 脯-甘氨酸环二肽对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3093-3094.
Tian Y, Wang G. Effects of prol-glycine cyclodipeptide on immune function in mice [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2014, 34(11): 3093-3094.
- [7] 李亚楠,邹炯,宋璐瑶,等. 胶原三肽生物活性及其应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(03): 333-337.
Li Y N, Zou J, Song L Y, *et al.* Bioactivities and applications of collagen tripeptides: A review [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(03): 333-337.
- [8] WANG Y, He H, Wang G, *et al.* Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice [J]. Marine Drugs, 2010, 8(2): 255-268.
- [9] 刘铁强,范志恒,吉晓月,等. 胸腺蛋白肽粉对人体免疫力的影响[J]. 食品与药品, 2021, 23(03): 219-224.
Liu T Q, Fan Z H, Ji X Y, *et al.* Effect of thymic protein peptide powder on human immunity [J]. Food and Drug, 2021, 23 (03): 219-224.
- [10] Matthews D M. Intestinal absorption of peptides [J]. Physiol Rev, 1975, 55(4): 537-608.
- [11] 王宁,令狐恩强. 寡肽吸收的研究进展[J]. 中华胃肠内镜电子杂志, 2018, 5(04): 167-173.
Wang N, Linghu E Q. Advances in oligopeptides absorption [J]. Chin J Gastrointestinal Endoscopy (Electronic Edition), 2018, 5 (04): 167-173.
- [12] 冷红霞,刘伟明,朱志国,等. 生物制剂胸腺肽和转移因子中 Zn, Cu, Fe, Mn, Co, Ni 的含量分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2004(05): 625-627.
Leng H X, Liu W M, Zhu Z G, *et al.* Analysis of the contents of Zn, Cu, Fe, Mn, Co and Ni in thymopeptide and transfer factor biological injections [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2004(05): 625-627.
- [13] 于妮娜,薛美玲,杨静,等. 一测多评法测定转移因子口服液中心糖核酸的含量[J]. 北方药学, 2019, 16(07): 8-9, 131.

Yu N N, Xue M L, Yang J, *et al.* Determination of RNA content in transfer factor oral liquid by one test and multiple evaluation method [J]. Northern pharmacy, 2019, 16(07): 8-9, 131.

[14] Krohn K J E, Uotila A, Gröhn P, *et al.* Uracil in transfer factor [J]. The Lancet, 1975, 306(7946): 1209.

[15] 钱 微, 万芷芳. 人脾转移因子的研究——Ⅱ人脾转移因子免疫活性组分中核苷酸类的分析研究[J]. 第四军医大学学报, 1981(01): 17-21.

Qian W, Wan Z F. Study on human spleen transfer factor—ⅡAnalysis of nucleotides in immunoactive components of human spleen transfer factor [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 1981(01): 17-21.

[16] Doerfler W, Schubbert R, Heller H, *et al.* Integration of foregrn DNA and its consequences in mammalian systems[J]. Trends in Biotechnology, 1997, 15: 297.

[17] 王志军, 乐国伟, 施用晖, 等. 外源 DNA 在体内的吸收与降解[J]. 生命的化学, 2001(01): 54-55.

Wang Z J, Le G W, Shi Y H, *et al.* Absorption and degradation of exogenous DNA *in vivo* [J]. Chemistry of Life, 2001(01): 54-55.

(编 辑:李文平)