生物活性肽调节NF- κ B信号通路的研究进展

龚建苗, 陈庆森*, 阎亚丽, 庞广昌

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘要: 核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是通过调节其靶基因的表达, 在机体免疫应答、炎症与肿瘤的发生发展过程中发挥着重要功能, 因此也被认为是调控免疫应答、预防和治疗肿瘤与炎症的理想靶点。生物活性肽具有许多的生理活性功能和独特的营养特性, 可广泛地应用于保健食品和医药产品。本文首先概括NF- κ B的组成、结构特点及其激活途径, 从肽类调节NF- κ B的机制出发, 结合本实验室和国外学者最新的研究成果, 对生物活性肽调节NF- κ B相关研究进行系统的介绍, 提出生物活性肽在一定程度上可以干预NF- κ B信号通路, 为生物活性肽作为相关疾病生物免疫治疗提供新的途径。

关键词: NF- κ B; 生物活性肽; 调节机制; 免疫应答

Research Progress in Immune Regulation of Bioactive Peptides on NF- κ B

GONG Jian-miao, CHEN Qing-sen*, YAN Ya-li, PANG Guang-chang

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Nuclear factor- κ B (NF- κ B) has been reported to play an important role in immunity, inflammation and carcinogenesis by regulating the expression of its target genes. Thus, NF- κ B was recognized as a promising target for the prevention and treatment of cancer and inflammation. Because bioactive peptides have many physiological functions and unique nutritional properties, it can be widely used in the fields of functional foods and medicinal products. In this paper, the compositions, structural characteristics and activation pathways of NF- κ B are outlined. Recent research advances in the regulation and therapeutic effects of bioactive peptides on NF- κ B pathways are reviewed. Moreover, the future development prospects of bioactive peptides are also proposed.

Key words: nuclear factor- κ B (NF- κ B); bioactive peptide; regulatory mechanism; immune response

中图分类号: R151

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0379-10

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321075

NF- κ B是一种广泛存在于哺乳动物细胞中的转录因子, 能与多种基因的启动子或增强子序列的特定位置结合而促进基因转录和表达, 从而调控细胞凋亡、细胞黏附、细胞增殖、天然以及适应性免疫应答、炎症、胞内胁迫应答和组织重塑等过程。NF- κ B的活性受到严格精密的调控, 是一个受到多因素共同维持其平衡的转录因子, 只有严格维系这种平衡, 细胞才能正常生存和行使生理功能。研究发现NF- κ B在一些疾病中存在持续活化状态, 而在另外一些自身免疫性疾病中却发现NF- κ B活性的降低^[1-3], 一旦这种平衡被打破, 过分激活或抑制就会导致生理功能紊乱, 产生疾病, 如风湿性关节炎、动脉粥样硬化、多发性硬化和哮喘等炎症以及前列腺癌、

神经胶质瘤和淋巴瘤等多种癌症, 因此维持NF- κ B活性的平衡具有重要作用。同时, NF- κ B在身体内分布的广泛性使其受到越来越多的关注, 已成为众多疾病治疗中的一个重要靶点^[4]。

生物活性肽(bioactive peptides, BAPP)指的是一类分子量小于6000D, 具有多种生物学功能的多肽, 是蛋白质中20种天然氨基酸以酰胺键组成的从二肽到复杂性、环形结构低分子肽或多肽类物质的总称。BAPP具有多种人体代谢和生理调节功能, 易消化吸收, 有促进免疫、激素调节、抗菌、抗病毒、降血压、降血脂等作用, 食用安全性极高, 且微量的状态下就能发挥强大的生理活性, 是目前国际食品界最热门的研究课题和极具

收稿日期: 2013-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071522)

作者简介: 龚建苗(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵生物技术、功能成分与肠道健康的关系。

E-mail: wanmeizidie@126.com

*通信作者: 陈庆森(1957—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为发酵生物技术、功能成分与肠道健康的关系。E-mail: chqsen@tjcu.edu.cn

发展前景的功能因子^[5], 在相关疾病的预防及治疗中受到越来越多的关注。但BAPP发挥生理作用的机制并非通过吸收进入体内, 至少绝大多数不能被吸收, 即使少量吸收也会被作为抗原处理掉, 或作为异物清除掉。因此, 它发挥生理作用主要是通过和肠道内复杂的受体系统、微生物系统、代谢系统相互作用, 通过改变自己的信号系统对机体发挥各种生理功能^[6]。到目前为止已有一些国内外学者陆续地对BAPP的制备、免疫调节作用和信号通路的影响进行探索性的研究, 国内关于其干预NF- κ B改善、预防和治疗相关疾病的研究还未见相关报道。本文首先概括NF- κ B的组成、结构特点及其激活途径, 从BAPP调节NF- κ B的机制出发, 结合本实验室和国内外学者最新的研究成果, 对BAPP调节NF- κ B相关研究进行系统地介绍, 提出BAPP在一定程度上可以干预NF- κ B信号通路, 为BAPP作为相关药物发挥生理作用的机制治疗疾病提供了新的途径。

1 NF- κ B信号通路

1.1 NF- κ B信号通路的组成和结构

1.1.1 NF- κ B/Rel蛋白家族

NF- κ B是1986年由美国麻省理工学院癌症研究中心的Baltimore和麻省理工Whitehead生物医学研究所的Rwiansen^[7]发现的。他们在成熟B细胞和浆细胞中发现的这种蛋白能与免疫球蛋白 κ -轻链基因增强子的B位点结合, 调控免疫球蛋白 κ -轻链上基因的转录, 故命名为核转录因子 κ B(NF- κ B)。NF- κ B广泛存在于真核生物细胞中, 是一个由复杂的多肽亚单位组成的蛋白家族。它作为信号传导途径中的枢纽, 与免疫、肿瘤的发生、发展, 细胞凋亡的调节以及胚胎发育等重要事件有着密切联系, 是一种重要的核转录因子。

NF- κ B/Rel蛋白属于Rel蛋白家族, 在哺乳动物细胞中Rel蛋白家族包括以下5个成员, 分别为NF- κ B 1 (p50及其前体p105)、NF- κ B 2 (p52及其前体p100)、RelA(p65)、RelB及c-Rel^[8-9]。所有Rel蛋白均含有高度保守的Rel同源区(relihomologyregion, RHR), 大约含有300个氨基酸残基。RHR包括有一个核定位信号(nuclear localization sequence, NLS)并且介导与DNA结合、二聚体化以及同I κ B的相互作用。RHR的2个免疫球蛋白样结构域都与DNA接触: 即N端结构域负责特异序列识别, C端结构域含有二聚体接触面, 沿接触面表面的疏水作用介导了二聚体化。RelA、RelB和c-Rel的C端含有转录激活域(transactivation domain), 其中富集着丝氨酸、酸性氨基酸和疏水性氨基酸, 而p50和p52中无此结构。在p50和p52的前体蛋白p105和p100的C端, 含有锚蛋白重复基序(ankyrin

repeat motif), 可以通过ATP依赖的蛋白水解过程裂解, 变为成熟的p50和p52^[10]。

NF- κ B/Rel蛋白以一定的方式两两结合成同源二聚体或异源二聚体, 目前发现的异源二聚体有p50/RelA、p50/c-Rel、RelA/c-Rel和同二聚体RelA/RelA、p50/p50、p52/p52等。在这些二聚体中以p50/RelA(即p65)最为普遍, 含量最丰富, 几乎存在于所有细胞中, 它与 κ B序列结合的亲和力高, 解离系数仅为 10^{-12} 。不同的NF- κ B二聚体对具有5'-GGGRNNYYCC-3'(R为嘌呤, Y为嘧啶, N为嘌呤或嘧啶)同源序列的 κ B序列亲和力不同, 因而对基因调控的特异性不同^[9]。

1.1.2 NF- κ B抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)

据研究证明, 所有的NF- κ B复合物均与抑制因子I κ B结合, 当上游信号导致I κ B蛋白的磷酸化、泛素化并降解时, NF- κ B就被释放出来并向核内迁移, 激活靶基因的转录。I κ B于1988年被发现, 共有8个成员: p100、p105、I κ B α 、I κ B β 、I κ B γ 、I κ B ϵ 、Bcl-3和I κ B-R。它们共同的结构特征是: 大多数I κ B的C端都含有3~8个锚蛋白重复序列, 每一个序列约含33个氨基酸, I κ B蛋白凭借这些重复序列与NF- κ B的RHR区域结合, 掩盖NF- κ B的NLS, 使NF- κ B滞留在细胞质中^[11]。I κ B的N端为信号反应区, 含有Ser磷酸化位点和泛素化位点, 在信号诱导的I κ B降解中起重要作用^[12]。

I κ B在终止NF- κ B信号中也起着非常重要的作用, 由于NF- κ B与I κ B的亲和力大于NF- κ B与DNA上 κ B位点的亲和力, 所以新合成的I κ B α 进入细胞核后与NF- κ B结合, 使其从DNA上解离下来, I κ B α 分子中的核输出序列(nuclear export sequence, NES)再促使NF- κ B由细胞核重新返回胞浆中, 使NF- κ B活化终止^[13]。

1.1.3 I κ B激酶复合物(I κ B kinase, IKK)

IKK是由IKK α 、IKK β 和IKK γ 组成的蛋白复合物, IKK α 和IKK β 是IKK复合物的催化亚基, 分子质量分别为85kD和7kD, 两者的同源性高达52%, 它们的N端含有蛋白激酶功能区和亮氨酸拉链基序leucine zipper, LZ), C端拥有螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)基序。IKK复合物最后一个被发现的是调节亚基IKK γ (也被称作NEMO, NF- κ B essential modulator), 分子质量为4kD的IKK γ 含有大量盘曲结构的螺旋, C末端也具有LZ, 但IKK γ 序列的前50个氨基酸残基和后50个氨基酸残基并无二级结构。IKK α 和IKK β 首先借助于子中的亮氨酸拉链结构域形成二聚体, 再分别通过C末端一段短的结构域与IKK γ 结合形成稳定的三聚体^[12,14]。

1.2 NF- κ B信号通路的激活

NF- κ B信号通路可以被不同的激活因子激活, 根据其机制可分为3种: 经典的NF- κ B信号通路、NF- κ B信号通路旁路途径和前体蛋白p105参与的NF- κ B活化途径。

1.2.1 经典的NF- κ B信号通路

当细胞受到病原微生物、应激、细胞因子、氧自由基、癌蛋白和紫外线等刺激时,引起特异性跨膜受体(Toll样受体、白介素-1、白介素-18、肿瘤坏死因子、B和T细胞受体)空间构象的改变,通过接头蛋白和激酶(如促分裂原活化的蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAP3Ks)使IKK γ 泛素化,泛素化的IKK γ 使IKK β 氨基端的激酶结构域(KD)中的T-loop (Ser177和Ser181)磷酸化,磷酸化的IKK β 进而磷酸化IKK α ,激活IKK^[15]。

IKK复合体在I κ Bs端丝氨酸上进行I κ B α 磷酸化位点: Ser 32和Ser 36, I κ B β 磷酸化位点: Ser19和Ser23, I κ B ϵ 亚基的磷酸化位点: Ser157和Ser161)^[16]。已磷酸化的I κ Bs在泛素连接酶的作用下进一步泛素化,即在已磷酸化的I κ Bs N端的21位和22位Lys上共价结合上泛素分子 β -TrCP-SCF。磷酸化并泛素化的I κ Bs发生构象改变被26S蛋白酶体识别并降解。于是, p65转录激活区域被激活,受I κ Bs抑制的NF- κ B得以释放出来,迅速发生核易位,通过p50亚基Rel同源区的NLS与相应的KB序列结合,从而启动或促进某些基因的转录^[17]。

在NF- κ B活化过程中, I κ B分解至关重要,而行使功能的就是IKK, 1998年Rothwarf等^[18]克隆到了IKK γ ,用TNF、IL-1和PMA等刺激IKK γ 缺陷的细胞均不能引起NF- κ B的活化,刺激后在这细胞中也未能观察到I κ B α 32和36位丝氨酸(Ser32和Ser36)的磷酸化,而在瞬时转染带有IKK γ 基因的载体后,经LPS刺激NF- κ B能达到野生型细胞的活化水平,证实了IKK γ 在NF- κ B活化中的重要作用,也为干预NF- κ B信号通路提供重要的靶点。

1.2.2 NF- κ B信号通路旁路途径

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF)与受体(CD40、LT β R)、B细胞活化因子与受体(B cell-activating factor receptor, BAFFR)结合后能够激活NF- κ B诱导激酶(NIK), NIK可以直接磷酸化和激活IKK α (磷酸化位点: Ser176和Ser180)^[16],磷酸化的IKK α 进而磷酸化p100(磷酸化位点: Ser866和Ser870), p100的C端含有7个锚蛋白重复片段,作为I κ B家族成员与NF- κ B家族成员结合,并与RelB形成RelB-p100异源二聚体和p100-p100同源二聚体,磷酸化的p100产生一个SCF- β TrCP结合位点,使得p100在Lys856位发生K48泛素连接的多聚泛素化,泛素后的p100被26S蛋白酶体水解成p52,形成p52-p52同源二聚体和RelB-p52异源二聚体,两个二聚体可以转移到细胞核中激活相应基因的转录。这个通路对于淋巴器官的形成、B细胞成熟和获得性体液免疫都是非常重要的^[19-20]。

1.2.3 前体蛋白p105参与的NF- κ B活化途径

p50的前体蛋白p105的C端含有7个锚蛋白重复序列,作为I κ B家族成员与NF- κ B家族成员p105结合,形成同源

二聚体,遇到刺激因子时诱导其磷酸化泛素化,二聚体多聚泛素化后降解成p50同源二聚体,之后进行核易位进行正向或者反向调节基因的转录^[18]。这条信号通路与免疫和炎症反应特异性相关。

2 BAPP对NF- κ B信号通路的调节作用

2.1 BAPP概述

1902年伦敦大学医学院附属医院的两位生理学家Bayliss和Starling在动物的胃肠发现一种能引起胰腺分泌活动的物质,两位科学家把这种物质称为促胰液素(secretin),这是人类第一次发现活性多肽物质^[21]。至1927年科学家在人体胃肠道内已发现35种BAPP,并且对肽的结构和作用的研究越来越深入^[22]。目前研究表明BAPP具有涉及神经、激素和免疫调节、抗血栓、抗高血压、抗胆固醇、抗细菌病毒、抗癌、抗氧化、清除自由基、改善氮素吸收关系和矿质运输、促生长、调节食品风味、口味、硬度以及美容等多种生理功能,被誉为21世纪人类健康的新宠儿^[23]。世界各国正在竞相研究和开发肽类药物和保健食品,日本已申报了在治疗溃疡病、高血脂症、抗风湿、类胰岛素样作用和治疗心肌梗塞多项作用的肽类药物专利,德国也为活性肽的抗炎、抗风湿作用申请了专利^[24]。

目前对BAPP的应用主要在以下三方面: 1)生物活性多肽作为药物、疫苗、导向药物、诊断试剂、酶抑制剂及药物先导化合物等。例如: Bermay等^[25]从牡蛎匀浆液中分离得到具有抗肿瘤作用的低分子牡蛎活性肽-1 (bio-active peptides of oyster 1, BPO-1)可以明显抑制胃腺癌和肺腺癌细胞的生长和分裂增殖,且经细胞周期检测出现凋亡峰。疏秀林等^[26]综述了 γ -聚谷氨酸及其衍生物作为药物载体,可以改善药物的水溶性、降低毒性、控制药物释放以及提高药物靶向性。郭海艳等^[27]采用固相合成技术合成了特异性精子肽并建立ELISA方法,可以用于免疫性不孕中抗精子抗体的检测。2)生物活性多肽作为功能食品。例如: Pins等^[28]水解小麦蛋白得到低聚合度的小麦肽,因其抑制血管紧张素转移酶(angiotensin converting enzyme, ACE)活性的作用显著,而成为降压肽应用于保健食品与医疗领域;酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptide, CPPs)对锌、铁、钙等矿物质的吸收有显著促进作用,因此广泛用于补充这些矿物质保健食品的生产中,在日本和德国已经有商品化的酪蛋白磷酸肽食品和药品问世^[29]。Lunasin是一种具有43个氨基酸残基的多肽,存在于大豆、大麦、黑麦和小麦中,有两种大豆来源的抗癌多肽Lunasin(Lunasin XP-R和LunaSoyTM)已经进行了商业化生产,主要用于降胆固醇食品的添加剂^[30]。日本森永乳业已先后开发了8种乳蛋白营养肽,其中W-800的

优点是没有苦味、更易消化。C-2500溶解性和酸、碱、热稳定性均较好,苦味低,合做饮料。C-700则有着良好的起泡性和乳化性,用作食品添加剂^[31]; Wang Bin等^[32]报道,紫贻贝酶解得到的多肽也具有较好的抗氧化活性;采用现代生物工程技术,从栉孔扇贝中提取的海洋多肽,能清除超氧负离子和羟自由基,延缓皮肤老化。3)生物活性多肽作为食品添加剂。肌肽(carnosine, B-Ala-His)是一种天然的二肽,大量有在于动物肌肉中。体外实验研究表明,它能抑制脂质的氧化,故可防治脂质的酸败^[33]。阿斯巴甜二肽(aspartame, Asp-Phe-Ome)和阿拉甜素(alitame, L-Asp-D-Ala-NH₂)被证明是有效的阿斯巴甜替代品,且其性质稳定,在食品工业中应用广泛^[34]。

基于以上优点,加之现代文明病(现代代谢综合症)的发展和蔓延,人们谈糖、脂肪色变,使BAPP作为功能食品的开发和研究已成为21世纪的焦点之一,其免疫活性也已经成为了近年来的研究热点,许多相应的研究成果也已见报道,同时促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)、转化生长因子 β (transforming growth factor beta TGF- β)、腺嘌呤核苷酸依赖的蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)、G蛋白等许多免疫信号途径也得以阐释,而NF- κ B在机体中的存在是最为普遍的,几乎每个细胞里都有,且能迅速对刺激产生反应,参与细胞凋亡、炎症等生理条件下的基因调控而受到了越来越多的重视。天然免疫和获得性免疫的应答均是通过各种各样的信号传递实现的,因此要研究BAPP调控免疫发挥生理作用的机制,其干预免疫信号通路的研究是必不可少的,本文将就BAPP对机体广泛存在的NF- κ B信号通路的抑制和激活作用以及维系其平衡的研究进行综述性介绍,以期对BAPP的深入研究开发尽微薄之力。

2.2 BAPP对NF- κ B信号通路的激活作用

2.2.1 感觉神经肽P(substance P, SP)

感觉神经肽P物质(SP)是目前发现最早、分布广泛、活性众多的一种神经肽。1931年由von Euler等从马脑和小肠的提取物中寻找乙酰胆碱时发现的,并将它分离出来^[35]。SP的分子质量为1340D,由11个氨基酸组成,属于速激肽家族,氨基酸顺序为Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂。SP广泛分布于周围和中枢神经系统中,巨噬细胞、肥大细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞也可合成。SP能以神经分泌的方式作用于各种免疫细胞,参与免疫调节,促进免疫功能,既能增强单核巨噬细胞的吞噬和趋化活性,又可以促进T细胞增生、B细胞合成和分泌免疫球蛋白,从多方面影响免疫反应^[36]。免疫细胞应答均是通过各种各样的信号传递实现的,NF- κ B免疫信号的传递正是将外界信息分子与其相应受

体结合的信号转变为细胞内部可以识别的信号,并最终引起细胞内蛋白质活性、功能等发生相应的变化。因此,SP被越来越多的用于NF- κ B信号传递途经的研究。

Lieb等^[37]提出SP是中枢神经系统和周围神经系统中神经性炎症的主要调控物质,它促进促炎因子的表达,其机制是SP促进IL-8基因而不是IL-1的表达,过表达的IL-8进而激活NF- κ B。这个结果已经表明NF- κ B可能是神经系统内控制炎症的一个重要组成部分。后续研究也证实了这一观点,SP不仅在神经细胞也在小鼠巨噬细胞和树状均能激活NF- κ B。免疫印迹(Western blotting)分析检测SP与NK-1(G蛋白结合型受体)的结合能力确定了SP的细胞内受体为NK-1^[38],鉴于NF- κ B通过巨噬细胞调控促炎性细胞因子的研究,我们可以推测SP可能是通过专门的抗原呈递细胞促进促炎细胞因子的产生,进而激活NF- κ B。

蒋伟等^[39]研究感觉神经肽SP对肉芽组织成纤维细胞核因子NF- κ B的激活作用,采用甲醛注射的方法造成Wistar大鼠局部无菌性炎症反应,提取肉芽组织进行成纤维细胞原代培养,然后采用凝胶迁移阻滞实验(EMSA)的方法,测定NF- κ B的激活。实验表明 $10^5 \sim 10^9$ mmol/L的SP即可激活NF- κ B,随给药剂量增加,其活性增强,当使用 10^7 mmol/L的SP作用15min就可明显激活NF- κ B,并在30min达到高峰。此外该实验还用探针检测了激活的NF- κ B是由p50和p65组成的二聚体。Sohn等^[40]用WB法同样的验证了SP可以促进破骨细胞中核因子NF- κ B的激活,且呈剂量依赖性,并验证了这种激活作用是通过促进p65的核移位引起的,在机理上更进一步的对SP对NF- κ B的激活作用进行了阐释。p65的核移位是NF- κ B活化的标志,也是有关NF- κ B生理病理变化的开始。p65在细胞内含量极少,但由于它与DNA亲和力高,对DNA实行包围式广泛接触,因此对靶位有高效、准确的识别。加之p65可通过与I κ B解离实现核转移,无需新合成蛋白的过程,因而诱导基因转录速度快,主要参与应激防御反应有关的“即刻基因”的转录调控。所以研究p65的核移位对BAPP促进或抑制NF- κ B活化意义重大,如果BAPP抑制了一系列瀑布式级连反应的起始点,将进而终止了其后的一系列病理生理过程有研究证实SP可通过SP受体(substance P receptor, SPR)促进促分裂原激活蛋白激酶(MAPK)磷酸化表达,磷酸化的MAPK可促进IKK活化,进而激活NF- κ B^[41]。此外,NF- κ B可以通过多种途径抑制细胞凋亡,而SP与NK-1结合后可诱导肿瘤细胞有丝分裂,抑制癌细胞凋亡^[42]。这又为SP对NF- κ B的调控作用提供了新的思路,有助于为抗癌治疗开辟新的靶点。

2.2.2 乳源酪蛋白糖巨肽(casein glycomacropeptide, CGMP)

CGMP是Delfour等^[43]于1965年发现的一种含有唾液酸的糖肽,是乳中 κ -酪蛋白(κ -CN,唯一含有糖成分的CN)上的一个多肽片段。在奶酪生产过程中凝乳酶水解乳中的酪蛋白(主要是 κ -CN)的苯丙氨酸-蛋氨酸的肽键,生成不溶性的副- κ -CN(肽链的1~105部分)和可溶性的多肽(肽链的106~169部分)两部分,这类多肽含有大量的碳水化合物称之为“糖巨肽”,酪蛋白来源的糖巨肽称为“酪蛋白糖巨肽”。过去10年来,CGMP作为一种生物活性成分,因其具有其独特的化学和功能特性引起了人们广泛的关注。CGMP大多数生物特性应归因于与肽连接的糖基。CGMP中独特的氨基酸组成使它作为保健食品很受欢迎,其最有前途的应用是抑制流感病毒红细胞凝集素、抑制胃液的分泌、促进双歧杆菌增殖以及调节免疫系统应答。CGMP除了具有生物活性外,它还具有使人们感兴趣的加工特性,如较广pH值范围的溶解性、乳化性和起泡性,这些特性使CGMP在食品和营养方面有较广阔的应用前景,现在已有将CGMP作为食品添加剂添加到饼干和苹果冻等产品中。CGMP的这些特性给人们一种全新的思维,那就是将干酪乳清合理的运用于乳制品工业中。此外,CGMP还用于检测奶中甜乳清/凝乳乳清是否掺假^[44-45]。

大量的研究已经证实,肠道不仅是人体内最大的消化器官,同时也是最大的免疫器官,人体肠道内的黏膜总面积约为300m²,是人体内环境与外环境间直接交流的巨大的界面。在所有黏膜系统中,肠黏膜系统是非常重要的,其免疫机制在体液免疫和细胞免疫的基础上又具有其特殊性和复杂性,肠上皮细胞有Toll样受体(TLR)、NOD1、NOD2受体以及特异性抗体的受体表达,这些受体是激活NF- κ B信号通路所必需的,因此NF- κ B激活或抑制可能成为IBD免疫应答激活或抑制的节点^[46]。且众多资料显示IBD患者肠黏膜组织活检中NF- κ B p65亚单位表达明显上调,在IBD复杂的细胞因子网络失调中,NF- κ B活化可能是一中心环节,因此CGMP介导NF- κ B信号转导途径是其发挥抗炎作用、调理和治疗IBD可能的作用机制。近年来,本实验室在连续获得国家自然科学基金的资助下,系统地研究CGMP对肠道免疫调控系统、肠道菌群变化以及和肠道炎症反应的相关性等方面进行了研究。证实CGMP具有抗炎活性,在一定程度上可以改善、缓解和治愈炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)。

朱晨晨等^[47]已经综述了国内外和本实验室CGMP改善炎症性肠病的研究进展,并提出CGMP具有抗炎活性,在一定程度上可以改善、缓解和治愈IBD,可以作为功能性食品用于炎症性肠病的生物免疫治疗的观点。但CGMP科学明确的抗炎活性机制还有待于后续从分子

水平上研究解决,围绕其对一些免疫分子和免疫信号途径的影响的探究将有助于进一步阐明治疗IBD的机制。本实验室最近完成了乳源CGMP通过抑制NF- κ B信号通路改善小鼠溃疡性结肠炎机制的研究,以灌胃CGMP剂量为50mg/(kg·d),连续灌胃5d为基础,利用流式微珠阵列技术(cytometric bead array, CBA)和酶联免疫技术(ELISA)检测各组小鼠血清中细胞因子IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IFN- γ 、TNF- α 和IL-10的浓度,并利用WB技术检测各组小鼠结肠组织蛋白中NF- κ B p65表达的差异,从细胞因子和免疫信号通路的角度探讨CGMP发挥抗炎活性的机制。研究证实CGMP通过抑制溃疡性结肠炎小鼠体内NF- κ B激活,有效抑制UC小鼠体内IL-1 β 、IL-5、IFN- γ 和TNF- α 的升高同时促进IL-10的分泌,从而减缓炎症程度^[44-47]。IL-1 β 和IL-2基因启动子上均含有NF- κ B结合位点,各种细胞外的刺激信号使胞浆中未活化的NF- κ B激活并进入胞核,导致相应的基因表达mRNA,促进其细胞因子的释放;释放的细胞因子又可反过来进一步活化,与细胞表面相应蛋白受体结合,由此形成一个正反馈调节,使炎症不断扩大。另外,IL-1 β 还有重要的免疫调节功能,它可通过自分泌或旁分泌刺激其他的细胞因子和炎症介质产生,如IL-6、IL-8和TNF- α 。IL-10可抑制小鼠Th1细胞的增殖以及IL-2、IL-3、IFN- γ 、TNF- α 以及GM-CSF等细胞因子合成,可能是IL-10作用于抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),降低其主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)类抗原的表达。因此,实验通过CGMP对细胞因子的作用,间接反映其对NF- κ B的作用。但CGMP是通过细胞内吞作用,还是通过细胞表面蛋白受体传递信号,进而影响NF- κ B的表达目前还没有确定,有待进一步确定。Requena^[48]用单核白血病细胞(THP-1)为模型,用含浓度梯度为0.01~10mg/mL牛乳酪蛋白糖巨肽(BGMP)的完全培养基培养细胞24h后,ELISA测定TNF、IL-1 β 、IL-8细胞因子的分泌,WB技术检测不同时间下I κ B α 32位丝氨酸的磷酸化以及p50、p65蛋白的表达,在炎症因子诱导的经典NF- κ B活化途径中,关键步骤是分子I κ B α 的磷酸化及降解。因此许多研究将I κ B α 作为其中靶点之一,对其磷酸化前后蛋白含量变化进行观测。研究证实BGMP促进TNF、IL-1 β 、IL-8细胞因子的分泌,且成剂量依赖关系。BGMP能激活NF- κ B,在加入BGMP 1h后p-I κ B α 、p50和p65蛋白的表达量达到最高。这与我们的实验相悖,但现在有的体外实验研究报告证实,食入更多CGMP,其促进生长的活性反而会降低,正如免疫调节作用,免疫低下和免疫过强都会使免疫失调,进食量与CGMP的免疫调节作用是否存在着一定的关系还需要进一步去研究。最近本实验室以含10⁻⁶~10⁻¹mg/mL CGMP的完全培养基培养结肠癌细胞系(HT-29)24h后,

免疫荧光测定p65核移位, 实验结果显示CGMP可以抑制p65核移位, 进而抑制NF- κ B信号通路的激活。由以上几个研究表明进食的BAPP多, 不一定会获得相应的效果, BAPP摄入的量效、构效关系, 摄入量的多少与免疫调节强度的关系有待于进一步的深入研究。我们在本实验室已取得的研究成果的基础上, 会继续在分子水平上探讨CGMP与NF- κ B信号通路上相关蛋白(如: 26S、泛素蛋白酶、NEMO)的相互作用, 确定CGMP在NF- κ B信号通路上的作用靶点, 为其抗炎活性机制提供理论依据。

2.3 BAPP对NF- κ B信号通路的抑制作用

2.3.1 谷胱甘肽(glutathione)

1921年Hopkins^[49]首先发现谷胱甘肽, 它是由谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸组成的含有巯基(-SH)的三肽物质, 广泛分布于人体肝、肾细胞和红细胞。由还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)组成, GSH是主要的活性状态大约占95%, 而GSSG以非活性状态存在约占1%。GSH、GSSG、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和谷胱甘肽还原酶(GSH-R)共同组成了谷胱甘肽氧化还原系统。它参与体内三羧酸循环及糖代谢, 并能激活多种酶, 从而促进糖、脂肪和蛋白质代谢。还能参与体内氧化还原过程, 能和过氧化物及自由基结合, 以对抗氧化剂对巯基的破坏, 保护细胞膜中含巯基的蛋白质和含巯基酶不被破坏, 减轻靶细胞损伤, 调节凋亡相关基因的平衡等。对维持细胞的正常代谢, 保护细胞膜的完整性, 具有重要的生化功能^[50]。人体衰老、感染、中毒、外源性毒素、氧化应激、亲电化合物攻击都可以使细胞内GSH生物合成能力降低、含量下降、或者使GSH转变为GSSG, 适时补充外源性GSH便成为必须。外源性GSH的补充, 可以预防、减轻、中止组织细胞的损伤, 改变病理生理过程。GSH在急诊中的应用最早是救治中毒患者, 随后是强调其抗氧化作用应用于肝肾功能的保护, 近年来大量临床基础实验资料表明, GSH还有抗炎、抗血栓、抗癫痫、血管保护等多种作用。除在医药中的应用, GSH还广泛应用于食品领域, 如加入酸奶和婴儿食品起类似VC的稳定作用; 防止水果罐头水果褐变; 在面制品中起还原和强化氨基酸作用; 缩短面包混揉时间; GSH在与谷氨酸钠、核酸类呈味物质或其混合物共存时具有肉类风味; GSH可抑制肉食类、鱼类和海鲜类食品的核酸分解, 延长保鲜期以及提高奶酪质量, 防止酪蛋白褐变^[51-52]。

GSH不仅参与了细胞抗氧化反应、维持机体的氧化还原平衡, 还参与了调节细胞增生、机体免疫应答以及在神经系统中充当神经调质和神经递质的作用。Bandyopadhyay等^[53]研究发现, 氧化应激条件下, 细胞核转录因子1(nuclear factor 1, NF1)的DNA结合活性呈GSH依赖性, 其机制可能是GSH在巯基转移酶的作用下维持NF1的氧

化敏感半胱氨酸的还原状态, 也可能是GSH参与了脂多糖诱导的细胞因子转录的调节及I κ B/NF- κ B信号通路的调节影响了NF1^[54]。此外, GSH量的降低, 是一种潜在的凋亡早期激活信号, 随后产生的氧自由基(ROS)促使细胞发生凋亡^[55], GSH这种生理活性也为抗癌药物的研发提供了新的思路——是不是可以通过检测GSH的含量来判断某种药物或活性成分抑制NF- κ B而促进癌细胞凋亡的功效。此外, GSH还通过氧化应激介导细胞信号转导的中间环节, 氧化应激可诱导GSH耗竭, 而且溢出细胞的GSH可进一步诱导细胞的氧化应激, 可见GSH在机体中广泛参与免疫信号途径, 其在体外的抗氧化免疫功能也在逐步地被阐释清楚。

赵兵等^[56]以大鼠为实验模型, 探讨了GSH对不同潮气量机械通气大鼠肺细胞凋亡的影响, 用免疫组织化学技术检测肺组织NF- κ B的表达, 酶联免疫吸附法检测肺匀浆中TNF- α 的变化。结果表明大潮气量机械通气可使血液和肺泡灌洗液中TNF- α 、NF- κ B的表达上调, 导致肺动脉内皮细胞凋亡的增加和屏障功能的下降。而注射还原型谷胱甘肽的大鼠组TNF- α 的表达量和NF- κ B活化水平都有所降低, 其机制可能是GSH可直接消除氧自由基、过氧化氢自由基(ROS), 还可以与白细胞在应激时产生的髓过氧化物酶衍生氧化物如次氯酸、氯胺等反应, 阻止ROS进一步参与氧自由基生成反应, 而GSH自身生成GSSG。人们很早就发现GSSG可氧化巯基, 靶蛋白在相邻的蛋白巯基间形成分子间二硫键, 或蛋白质和GSH间形成复杂的二硫化物, 使蛋白质的结构和功能发生改变, 并有人认为巯基的氧化、巯基-二硫键之间的平衡可能是调节细胞内酶活性的一种机制, 同时也可能是调节膜离子通道的一种机制: 离子通道蛋白的活性通过巯基-二硫键转换活性发生改变, 进而调节膜通道的离子通透性, 影响GSH、GSSG介导的ROS细胞信号传导。此外, GSH还通过巯基-二硫键转换作用于膜受体、转录因子和细胞内的调控蛋白直接起到细胞信号传导的作用。同时一系列实验显示ROS可能是众多刺激物激活NF- κ B的最终共同信号: 1)许多刺激物包括TNF- α 、IL-1、UV、 γ 射线等激活NF- κ B的同时引起细胞内ROS升高, 其中H₂O₂可直接激活NF- κ B; 2)直接予以抗氧化剂包括VE、儿茶酚衍生物等可阻断NF- κ B的激活, 相反, 某些降低细胞内巯基的化合物可诱导NF- κ B的激活^[51-55]。Rahman等^[57]发现GSH可通过抑制I κ B磷酸化而减少NF- κ B活化, 进而抑制相关细胞因子如TNF- α 、细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)等的合成, GSH可通过抑制NF- κ B减少TNF- α 介导的细胞过氧化损伤, 减轻内皮细胞通透性损害, 还可通过抑制TNF- α 活化的IL-1转化酶样蛋白酶而减少对细胞蛋白损害, 减少细胞凋亡。Fraternal等^[58]的研究表明GSH-C4(巯基进行修饰)略微减少了p-I κ B α 和

p65的表达。此外, Rel κ B在还原状态下才与DNA结合, 这对于激活NF- κ B信号通路至关重要, 而GSH可以抗氧化, 是不是当GSH达到一定量会促进NF- κ B调控某些炎症基因的表达有待进一步实验的验证, 因此, 研究GSH对NF- κ B信号通路的调节为人们探讨GSH作用机制开辟了一条途径, 也为进一步深入地阐明其生物学机制奠定了基础。

2.3.2 抗菌肽

抗菌肽(antibacterial peptide, ABP)是生物体内经诱导产生的一类具有生物活性的小分子多肽。根据抗菌肽的结构及功能, 可以分为三大类^[59]: 第一类是具有螺旋结构的两亲线性多肽, 这类抗菌肽最早发现于1980年, Steiner等^[60]从惜古比天蚕蛹中提取出的抗菌肽Cecropins是这一类的典型代表。第二类是富含半胱氨酸, 形成一个或多个二硫键的多肽, 这类分子的典型代表是防御素(defensins), 海洋贝类的抗菌肽属于这一类。第三类是富含某些特殊氨基酸(Pro、Gly、His)的多肽, 有时这些氨基酸占氨基酸组成的比例可达到25%以上, 这类氨基酸多从昆虫中得到。抗菌肽是一种无毒副作用、无残留、无细菌耐药性的环保型制剂, 具有水溶性好、热稳定性好和强碱性高等优点, 与传统的抗生素相比, 抗菌肽不仅有广谱抗菌能力, 而且对真菌、病毒、原虫及癌细胞也有一定的抑制作用, 广泛分布于昆虫、植物、动物及人体内, 最主要的是其自身也不会产生耐药性。目前的研究结果预示, 抗菌肽在临床上的使用将带来生物医药领域的“绿色革命”, 除了医药方面的作用, 抗菌肽还对畜禽具有促生长、保健和治疗疾病的功能^[61-62]。随着人们生活水平的提高, 人们对于防腐剂的要求也越来越高, 不但要求防腐剂安全无毒而且要营养化功能化^[63], 因此, 天然抗菌肽在食品和生物制品的防腐应用上也具有重要价值。

先天性免疫是保护有机体免受外来病原体侵害的第一道屏障, 作为生物体先天免疫的重要组成部分, 抗菌肽是保护有机体免受外来病原体侵害的重要屏障^[64]。尤其对于低等动物, 它们在缺乏淋巴细胞、胸腺和抗体的情况下, 依赖于体内抗菌肽的有效作用来抵抗微生物的入侵, 抗菌肽的存在对于它们抵抗微生物显得尤为重要^[65]。体外实验表明: 体外转染人肿瘤细胞HT1080后, 合成的TH2-3肽段和鱼类抗菌肽Epinecidin-1能起到潜在肿瘤因子的作用, 促进肿瘤细胞溶解, 抑制细胞增殖, 减少肿瘤细胞迁移^[66-68]。经过选择性离心, TH2-3对普通非肿瘤细胞没有细胞毒性影响^[66]。具有抗肿瘤功能的抗菌肽只对肿瘤细胞起作用, 而对其他正常非肿瘤细胞无害, 这种特性对癌症相关研究有重大的意义。另外, Chen等^[67]也报道了Epinecidin-1在体外实验中具有抗人白血病细胞U937功能和抗坏死功能, 能调节肿瘤细胞中细胞凋亡蛋白酶,

以诱导细胞凋亡。但相关机理并不清楚, 由于NF- κ B具有广泛的生理功能, 尤其与免疫应答、肿瘤和凋亡的发生发展关系密切, 因此, 已有研究从NF- κ B入手, 探索抗菌肽的作用机制。

Gao等^[69]分别以细胞、急性胰腺炎和心肌梗塞小鼠为模型, 以不同剂量猪抗菌肽PR39、不同作用时间处理各组, 用免疫共沉淀测定了PR39和从小麦胚芽中萃取的³⁵S-I κ B α 、³⁵S-S32A/S36A I κ B α 的相互作用, 也测定了PR39与从ECV304(人脐静脉内皮细胞株)克隆出的泛素酶的相互作用, 并利用WB技术检测各组I κ B α 和p-I κ B α 表达的差异, 研究证实PR39能可逆地结合到26S蛋白酶体的 α 7亚基上而抑制I κ B α 的降解, 并没有抑制I κ B α 的磷酸化和泛素化, 且通过WB技术证实这一结论。Bao等^[70]在缺血再灌注损伤模型中也得到PR39通过抑制26S蛋白酶体而抑制I κ B α 的降解这一结论。泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)^[71]是一个受到越来越多关注的调节蛋白质降解与功能的系统, 主要作用于细胞内一些半衰期短、结构异常、错构或受损伤的蛋白。其过程是以共价键形式联结多个泛素分子, 然后形成靶蛋白多聚泛素链即泛素化(ubiquitination), 再输送到26S蛋白酶体上被降解。这一途径在很多细胞生命过程中起调节作用, 包括细胞周期循环、信号转导、核酸密码翻译、DNA损伤修复、异常蛋白代谢、抗原递呈及细胞受体功能等, 并与许多疾病的发生发展密切相关。因此对该系统的调节及其意义的研究已成为医学研究的一个热点。泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)主要由泛素(ubiquitin, Ub)、泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素缀合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)、泛素连接酶(ubiquitin-ligating enzyme, E3)及26S蛋白酶体组成。特异性识别磷酸化I κ B的E3泛素连接酶属于其中的第4种类型: skp1-cullin-F-Box SCF。SCF自身没有明显的酶功能, 通过E2促使底物泛素化。人的p-I κ B α 特异性E3识别分子是E3RSI κ B(E3 receptor subunit of I κ B)。E3RSI κ B没有酶活性, 它的功能是引导特异的E2泛素连接酶(UBC5)与底物结合。因此, 研究泛素蛋白与BAPP相互作用及其含量变化具有重要的意义, 泛素蛋白体系中相关蛋白成为人们研究NF- κ B的另一重要靶点。以上实验不仅从分子水平研究了PR39与分解I κ B α 关键靶点相关结构域、蛋白的相互作用, 为PR39抗菌肽调控NF- κ B信号通路的机制从分子水平提供理论依据, 还为研究BAPP调控NF- κ B信号通路的作用机制提供了另一思路: 为了进一步确定BAPP调控NF- κ B的机制, 可将NF- κ B信号通路上相关蛋白、相关激酶克隆出来, 加一定的标签, 在体外探讨其与BAPP的相互作用。目前, 国内有关抗菌肽干预NF- κ B信号通路的报道还很少, 随着抗菌肽生物活性以及临床医药功效研究的

深入,相信会有越来越多的抗菌肽用于干预NF- κ B信号通路治疗相关疾病的研究。

近几年有关BAPP的生物活性功能的深入研究,还取得了一定的进展。Hattori等^[72]研究了胰高血糖素原类似肽(GLP-1)酰化产物利拉鲁肽可以通过NF- κ B途径增加内皮细胞NO的产生,通过对TNF- α 诱导的NF- κ B的激活和NF- κ B依赖的炎症基因的表达效果的研究,发现利拉鲁肽剂量依赖性地抑制I κ B降解和NF- κ B活化,同时还降低了TNF- α 诱导的单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)和ICAM1的表达,利拉鲁肽诱导增强NO的产生和抑制NF- κ B的激活是通过腺苷酸活化蛋白激酶(adenine mononucleotide protein kinase, AMPK)实现的,该实验对NF- κ B上游信号通路关键酶做了探究。Huang等^[73]研究发现,抗氧化肽SS31可以通过抑制NF- κ B保护视网膜的结构,还可以通过减少氧化损伤来保护内层视网膜屏障的完整性,但是SS31抑制NF- κ B信号通路的分子机制还不是很清楚,有待于进一步的研究证实。Jeon等^[74]对外源性胸腺素T β 4与间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)之间的关系进行了研究,发现T β 4可以促进细胞外信号调节激酶1/2(extracellular regulated protein kinases1/2, ERK1/2)的磷酸化和NF- κ B的核转位而增加IL-8的分泌,进而促进MSCs增值,为MSCs扩增提供了新的营养因子。李辉等^[75]采用信号转导抗体芯片技术证实了重组血管基膜衍多功能肽(vascular basement membrane-derived multifunctional peptide, rVBMDMP)可通过脆性组氨酸三联体(fragile histidine Triad, FHIT)蛋白磷酸化水平上调而阻断NF- κ B活化,表明rVBMDMP可能通过改变FHIT蛋白的磷酸化状态诱导肺癌细胞凋亡。Haddad等^[76]利用EMSA等实验方法研究了胸腺九肽(thymulin peptide)及其类似物对炎症的改善,发现胸腺九肽可抑制所有NF- κ B家族成员的表达,对p65的抑制效果最为明显,且以剂量依赖的方式降低p-I κ B α 的表达,在5 μ g具有最大抑制效果,表明胸腺九肽(thymulin peptide)及其类似物可通过NF- κ B发挥抗炎功效。此外,最近一项研究报道,一种来自大马哈鱼胶原酶解肽可以保护 γ 射线所引起的免疫抑制,增强脾脏产生IL-12,诱导产生I κ B,减少游离的NF- κ B,从而抑制脾细胞的凋亡^[77],该研究表明并非只有通过抑制I κ B降解还可通过促进I κ B的表达来抑制NF- κ B的表达,看来不仅调控NF- κ B通路有众多因素、众多“开关”,对于该通路上的蛋白的调控也是有多方面的,但无论如何都是使I κ B在细胞内的表达增加来加大其与NF- κ B结合进而抑制它的活性。通过以上促进和抑制NF- κ B免疫信号途径的综述可以看到,无论是BAPP、NF- κ B还是免疫调节,均有一个“度”,只有不超越这个限度,维持相对平衡,才

能使其发挥更好的功能使机体正常的运行,那么怎么通过适量BAPP调控NF- κ B的平衡,进而调节人体免疫平衡将是未来BAPP开发利用的趋势。

3 结语

现在,人们对于通过干预NF- κ B免疫信号途径治疗癌症及其相关疾病的药物开发兴趣越来越浓,许多从事NF- κ B途径研究的新型化学机构已经成立。但新药物开发周期长、投入资金多且具有无法预测性,使人们对被认可的活性物质越来越感兴趣,BAPP就是其中一个。通过本文综述可以看到,对于BAPP干预NF- κ B下游信号途径,大量学者已经研究,无论是I κ B磷酸化、泛素化及其被26S蛋白酶体降解,还是p65核移位、NF- κ B家族哪个蛋白表达量多都有所涉猎,但对于上游信号的关键蛋白的研究还很少,且涉及的干预NF- κ B的蛋白种类相对也比较少,Miller^[78]建立了大规模筛选已知药物调控NF- κ B免疫信号的实验方法,对未来BAPP大规模系统的用于调控NF- κ B免疫信号的研究筛选提供了强大的技术支撑。BAPP虽然与免疫的关系非常密切,但只有在分子水平上就BAPP对免疫的影响进行深入地研究,才能更有力地为BAPP对机体健康的促进作用提供佐证。因此,围绕调控机理来研究BAPP对NF- κ B信号通路和调节该通路的相关免疫分子的影响将具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] ANEST V, HANSON J L, COGSWELL P C, et al. A nucleosomal function for nase- α in NF- κ B-dependent gene expression[J]. *Nature*, 2003, 423: 659-663.
- [2] ATHMAN R, PHILPOT T D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(1): 25-32.
- [3] BEINKE S, LEY S C. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 382(2): 393-409.
- [4] DOYLE D A, CHAO J, HEIMANN D, et al. Effect of an NF- κ B inhibitor on the cell population in the fibroblast-populated collagen matrix[J]. *Journal of Surgical Research*, 2013, 179(2): 267-267.
- [5] GIESSEN T W, MARAHIEL M A. Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: application of synthetic biology to generate structural diversity[J]. *FEBS letters*, 2012, 586(15): 2065-2075.
- [6] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和, 等. 蛋白质的消化吸收及其功能评述[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 375-391.
- [7] RWIANSAN S, BALTIMORE D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences[J]. *Cell*, 1986, 46(5): 705-716.
- [8] GHOSH S, MAY M J, KOPP E B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses[J]. *A Rev Immunol*, 1998, 16: 225-225.
- [9] MILYAMOTO S, VERMAL M. REL/NF- κ B/I κ B story[J]. *Adv Cancer Res*, 1995, 66: 255-292.
- [10] MORRISON D C, BRADE H, OPAL S, et al. Role of NF- κ B in

- macrophage activation (review) in endotoxin in health and disease [M]. Marcel Dekker NYNY, 1999: 502-520.
- [11] KARIN M, BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 621-663.
- [12] JANG I L, PHARM D, GILBERTIL J B, et al. Nuclear factor KappaB important transcription factor and therapeutic target[J]. *J Clin Pharmacol*, 1998, 38: 981-993.
- [13] ARENZANA-SEISDEDOS F, TURPIN P, RODRIGUEZ M, et al. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm[J]. *Cett Sci*, 1997, 110: 369-369.
- [14] ZANDI E, ROTHWART D M, DELHASE M, et al. The I κ B kinase complex(IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation[J]. *Cell*, 1997, 91(2): 243-252.
- [15] 邢飞跃, 赵克森, 姜勇. NF- κ B的信号通路及阻断策略[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(6): 849-855.
- [16] YAMAMOTO Y, GAYNOR R B. IkappaB kinase: key regulators of the NF-kappaB pathway[J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29: 72-79.
- [17] PAUL N, MOYNA G H. the NF-kappaB pathway[J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(20): 4589-4592.
- [18] ROTHWART D M, ZANDI E, NATOLI G, et al. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex[J]. *Nature*, 1998, 395: 297-300.
- [19] PERKINS N D, GILMORE T D. Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(5): 759-772.
- [20] XIAO G, HARHAJ E W, SUN S C. NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B p100[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(2): 401-409.
- [21] BAYLISS W M, STARLING E H. The mechanism of pancreatic secretion[J]. *Journal of Physiol*, 1902, 28(5): 325-353.
- [22] YAMANO T, EJIRI M, MIZUNO S. Biogenic peptides and their potential use[J]. *Curt Pharma Design*, 2003, 9 (16): 1345-1355.
- [23] CLAREAND D A, SWAISGOOD H E. Bioactive milk peptides, a prospectus[J]. *J Dairy Sci*, 2000, 82(1): 1187-1195.
- [24] 姜晓光, 宋博, 迟春萍, 等. 生物活性肽的生理功能及研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2006, 26(5): 82-85.
- [25] BERMA Y B, BAUDY-FLOCH M, ZANUTTINI B, et al. Ovarian and sperm regulatory peptides regulate ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(5): 607-616.
- [26] 疏秀林, 施庆珊, 黄小荣, 等. γ -聚谷氨酸及其衍生物在生物医学领域中的应用[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(16): 3009-3012.
- [27] 郭海艳, 周文达. 精子肽的固相合成及其在免疫性不孕诊断中的应用研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2008, 23(2): 66-68.
- [28] PINS J J, KEENAN J M. Effects of whey peptides on cardiovascular disease risk factors[J]. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2006, 8(11): 775-782.
- [29] WANG J, GREEN K, MCGIBBO G, et al. Analysis of effect of casein phosphopeptides on zinc binding using mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(9): 1546-1554.
- [30] HERNANDEZ-LEDESMA B, HSIEH C C, de LUMEN B O. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention[J]. *Peptides*, 2009, 30(2): 426-430.
- [31] 吴建中, 赵谋明, 宁正祥. 食品中的生物活性多肽[J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(11): 46-50.
- [32] WANG Bin, LI Li, CHI Changfeng, et al. Purification and characterization of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel *Mytilus edulis* protein hydrolysate[J]. *Food chemistry*, 2013, 138(2): 1713-1719.
- [33] CHAN K M, DECKER E A, MEANS W J. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle[J]. *J Food Sci*, 1993, 58(1): 1-41.
- [34] 葛铁群, 俞建瑛, 宋聿文, 等. 生物活性肽的研究进展[J]. *中国生物药物杂志*, 1998, 19(6): 404-406.
- [35] DUNNIK C A, GIBRAN B S, HEIMBACH D M, et al. Substance P has a role in neurogenic mediation of human burn wound healing[J]. *J Burn Care Rehabil*, 1996, 17: 390-396.
- [36] 蒋伟, 王正国, 赖西南, 等. 感觉神经肽SP在伤口愈合细胞因子网络调控中的作用[J]. *创伤外科杂志*, 2002, 4(4): 250-252.
- [37] LIEB K, FIEBICHI B L, BERGER M, et al. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells[J]. *The Journal of Immunology*, 1997, 159(10): 4952-4958.
- [38] IAN MARRIOT T, MICHAEL J, ADAM Y, et al. Substance P activates NF- κ B independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, 102: 163-171.
- [39] 蒋伟, 王正国, 赖西南, 等. 钙拮抗剂在P物质激活肉芽组织成纤维细胞核因子- κ B中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(10): 1194-1196.
- [40] SONHN S J. Substance P upregulates osteoclastogenesis by activating nuclear factor kappa B in osteoclast precursors[J]. *Actaoto-Laryngologica*, 2005, 125(2): 130-133.
- [41] YAMAGUCHI K, KUGIMIYA T, MIYAZAKI T. Substance P receptor in U373 MG human astrocytoma cells activates mitogen-activated protein kinases ERK1/2 through Src[J]. *Brain Tumor Pathology*, 2005, 22(1): 1-8.
- [42] ESTEBAN F, MUNOZ M, GONZALEZ-MOLES M A, et al. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage[J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2006, 25(1): 137-145.
- [43] DELFOUR A, JOLLES J, ALAIS C. Caseino-glycopeptides: characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1965, 19(4): 452-455.
- [44] SHARMA R, RAJPUT Y S, MANN B. Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review[J]. *Dairy Science & Technology*, 2013, 93(1): 21-43.
- [45] FAYED A E. Healthy multifunctional spectra of milk glycoproteins and their fragments-a review article[J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2012, 62(3): 125-142.
- [46] YANG Z. Endothelial NF- κ B: the remote controller of the backyard fire in the vascular wall?[J]. *Cardiovascular Research*, 2013, 97(1): 8-9.
- [47] 朱晨晨, 陈庆森. 乳源酪蛋白糖巨肽改善炎症性肠病的研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(1): 262-266.
- [48] REQUENA P, DADDAOUA A, GUADIX E, et al. Bovine glycomacropeptide induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF- κ B signal transduction pathways[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 157(7): 1232-1240.
- [49] HOPKINS F G. On glutathione: a reinvestigation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1929, 84(1): 269-320.
- [50] 袁平戈, 张大志. 还原型谷胱甘肽的作用机制及临床应用[J]. *药品评价*, 2006, 3(5): 385-390.
- [51] 胡圣尧, 聂志妍, 袁勤生. 还原型谷胱甘肽的研究进展[J]. *食品与药品*, 2009, 11(1): 69-71.
- [52] 江洁, 单彦峰. 谷胱甘肽的制备及其应用[J]. *饲料工业*, 2007, 28(15): 15-17.

- [53] BANDYOPADHYAY S, STARKE D W, MIEYAL J J, et al. Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation- inactivated nuclear factor I[J]. J Biol Chem, 1998, 273(1): 392-397.
- [54] HADDAD J J, LAND S C. Redox signaling-mediated regulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine biosynthesis in alveolar epithelial cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(1): 179-193.
- [55] ARMSTRONG J S, STEINAUER K K, HORNUNG B, et al. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line[J]. Cell Death Differ, 2002, 9(3): 252-263.
- [56] 赵兵, 张华茹, 李海明, 等. 还原型谷胱甘肽在不同潮气量机械通气对大鼠肺细胞凋亡的影响[J]. 中国实用医刊, 2011, 38(8): 40-41.
- [57] RAHMAN I. Regulation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in alveolar epithelial cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 60(8): 1041-1049.
- [58] FRATERNAL A, CRINELLI R, CASABIANCA A, et al. Molecules altering the intracellular thiol content modulate NF- κ B and STAT-1/IRF-1 signalling pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 production in murine macrophages[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e57866-e57866.
- [59] DESTOUMIEUX D, MUNOZ M, BULET P, et al. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda)[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2000, 57(8/9): 1260-1271.
- [60] STEINER H, ENGSTRÖM Å, BENNICHT H, et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi*[J]. European Journal of Biochemistry, 1982, 127(1): 219-224.
- [61] 舒黛廉, 任敏, 王珏. 抗菌肽研究现状及其在畜牧业中的应用前景[J]. 中国畜牧医药, 2007, 34(6): 100-106.
- [62] 吴甜甜, 杨洁. 天然抗菌肽的研究进展及应用前景[J]. 生物技术通报, 2009(1): 27-30.
- [63] 李曼, 曹晓梅, 陈薇. 昆虫抗菌肽的生物学特点及药物研发进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(4): 706-709.
- [64] PENG K S, SHE R P, YANG Y R, et al. Anti-adherence of antibacterial peptides and oligosaccharides and promotion of growth and disease resistance in tilapia[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2007, 20(4): 569-576.
- [65] KIMBRELL D A M, BEUTLER B. The evolution and genetics of innate immunity[J]. Nature Rev Genet, 2001, 2: 256-267.
- [66] CHEN J Y, LIN W J, LIN T L. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepeidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells[J]. Peptides, 2009, 30: 1636-1642.
- [67] CHEN J Y, LIN W J, WU J L, et al. Epinecidin-1 peptide induces apoptosis which enhances antitumor effects in human leukemia U937 cells[J]. Peptides, 2009, 30: 2365-2373.
- [68] LIN W J, CHIEN Y L, PAN C Y, et al. Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish(*Inephelus coioides*)which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cell[J]. Peptides, 2009, 30: 283-290.
- [69] GAO Y, LECKER S, POST M J, et al. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I κ B α degradation by a naturally occurring antibacterial peptide[J]. Journal of Clinical Investigation, 2000, 106(3): 439-448.
- [70] BAO J, SATO K, LI M, et al. PR-39 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated I κ B α degradation[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2001, 281(6): H2612-H2618.
- [71] ESTEBAN V, RRPEREZ M, SANCHEZ-LOPEZ E, et al. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells[J]. Circulation Research, 2005, 96(9): 965-973.
- [72] HATTORI Y, JOJIMA T, TOMIZAWA A, et al. Retracted article: a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells[J]. Diabetologia, 2010, 53(10): 2256-2263.
- [73] HUANG J, LI X, LI M, et al. Mitochondria-targeted antioxidant peptide ss31 protects the retinas of diabetic rats[J]. Current Molecular Medicine, 2013, 13(6): 935-945.
- [74] JEON B J, YANG Y, KYUNG SHIM S, et al. Thymosin beta-4 promotes mesenchymal stem cell proliferation via an interleukin-8-dependent mechanism[J]. Experimental Cell Research, 2013, 4(14): 1-9.
- [75] 李辉, 曹建国. 重组血管基膜衍生多功能肽对肺腺癌A549细胞信号蛋白磷酸化水平的影响[J]. 中南药学, 2012, 10(2): 85-88.
- [76] HADDAD J J, HANBALI L H. The Anti-inflammatory and immunomodulatory activity of thymulin peptide is NF- κ B-dependent and involves the downregulation of I κ B- α [J]. American Journal of Medical and Biological Research, 2013, 1(2): 41-49.
- [77] YANG R, PEI X, WANG J, et al. Protective effect of a marine oligopeptide preparation from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) on radiation-induced immune suppression in mice[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(13): 2241-2248.
- [78] MILLER S C, HUANG R, SAKAMURU S, et al. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF- κ B signaling and their mechanism of action[J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 79(9): 1272-1280.