

大米免疫活性肽在小鼠体内的作用机制

A preliminary study on the effect mechanism of a rice immune peptide in mice

文诗雨¹ 张芷萌¹ 吴昊¹ 谢雨菲¹

WEN Shiyu¹ ZHANG Zhimeng¹ WU Hao¹ XIE Yufei¹

黄庆明² 廖娟² 文李¹

HUANG Qingming² LIAO Juan² WEN Li¹

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410014; 2. 湖南助农米业有限公司, 湖南 益阳 413200)

(1. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410014, China; 2. Hunan Zhunong Rice Industry Co., Ltd., Yiyang, Hunan 413200, China)

摘要: **目的:** 证明前期筛选出的肽 GBP1 (NSVFRALPVDVVANAYR) 在小鼠体内的免疫调节活性。**方法:** 通过动物试验探讨 GBP1 肽的免疫调节作用机制; 利用 RNA-Seq 技术对 GBP1 肽处理前后的小鼠脾脏组织进行转录组测序分析, 阐释 GBP1 肽免疫调节作用的分子机制。**结果:** GBP1 肽处理组小鼠脾脏细胞增殖数趋于正常值水平, 肝脏系数显著降低, 血清中 IgG 含量稳定; 终质量分数为 25 mg/kg 的 GBP1 肽能够在一定程度上抑制小鼠血清中 IL-2、IFN- γ 以及 TNF- α 的分泌; 通过转录组分析, 从脾脏组织中获得 780 个差异基因, 该基因在机体内涉及与免疫相关的 p53 信号通路、铁死亡、补体和凝血级联等通路密切相关。**结论:** GBP1 肽可以影响细胞因子的表达, 介导信号转导通路, 行使免疫调节功能。**关键词:** 大米; 免疫活性肽; 炎症反应; 小鼠试验; 转录组分析

Abstract: **Objective:** This study aimed to demonstrate the potential immunomodulatory activity in mice of rice immunopeptide GBP1 (NSVFRALPVDVVANAYR) screened previously. **Methods:** Animal experiments were conducted to investigate the immunomodulatory mechanism of GBP1 peptide. RNA-Seq was used to sequence the transcriptome of mouse spleen tissues before and after GBP1 peptide treatment, and the molecular mechanism of GBP1 peptide immunomodulatory effect was explained. **Results:** In the GBP1 peptide treatment group,

the number of spleen cells tended to be normal, the liver organ coefficient decreased significantly, and the serum IgG content was stable. GBP1 peptide can affect the expression of cytokines, mediate signal transduction pathways, and exercise immune regulation function, and inhibit the secretion of IL-2, IFN- γ and TNF- α in serum of mice. Through transcriptome analysis, 780 differentially expressed genes were obtained from spleen tissue, which were closely related to immune-related p53 signaling pathway, ferroptosis, complement and coagulation cascade in the body. **Conclusion:** GBP1 peptide can affect the expression of cytokines, mediate signal transduction pathways, and exercise immune regulation function.

Keywords: rice; immunopeptides; inflammatory response; testing in mice; transcriptome analysis

生物活性肽可为机体提供基本营养, 还具备多种有益于人体健康的生物学功能, 因此可以通过调节和改善生理功能来抑制慢性疾病^[1]。来自于食物蛋白的生物活性肽是一类经蛋白酶水解及分离纯化后、具有特殊生物活性的多肽, 其氨基酸残基数目不等且相对分子质量一般较小, 由 2~20 个氨基酸组成^[2]。研究^[3-4]表明, 食物源生物活性肽具有显著高血压抑制、抗氧化、免疫调节、降血糖血脂、降人体总脂蛋白胆固醇、抗肿瘤、体外抗菌、识别体外免疫异常细胞、抗疲劳、改善提高人体骨代谢和神经活性调节能力等多种功能特性。

中国是水稻种植和消费大国, 其中湖南省为水稻种植大省。精白米加工会产生大量副产物——米糠, 其中仍含有丰富的营养物质, 但在实践中的利用率极低。国内外对免疫活性肽的研究主要集中在大豆肽和一些动物源肽, 而有关植物肽——大米源生物活性肽的报道较少。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31972077); 湖南省教育厅资助科研项目(编号: 22C0137)

作者简介: 文诗雨, 女, 长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者: 文李(1971—), 女, 长沙理工大学教授, 博士。

E-mail: wl@csust.edu.cn

收稿日期: 2024-01-04 **改回日期:** 2024-02-20

大米胰蛋白酶解物可从蛋白及 mRNA 水平抑制 RAW264.7 细胞的炎症因子表达,通过阻碍 p65 入核及 ERK 的磷酸化,分别影响巨噬细胞的 NF- κ B 及 MAPK 炎症通路,从而实现抗炎作用显示出免疫活性^[5-6]。有研究^[7]表明,通过计算机预测、网络药理学方法可进行免疫活性成分的筛选。将先进的组学技术与生物信息学分析相结合,有望阐明肽在体内的新作用途径^[8]。研究拟在前期以大米源免疫活性肽 GBP1 细胞试验研究^[5]的基础上,深入探讨 GBP1 进入小鼠体内后对小鼠体重、血清中细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)、脾细胞增殖数和脏器系数的影响,并对免疫器官胸腺和脾脏的病理切片进行分析;利用 RNA-Seq 在基因转录组水平上分析大米源免疫活性肽 GBP1 对小鼠机体基因表达水平的影响,以期为大米源免疫活性肽在临床上的应用提供理论及研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料

合成大米肽 GBP1:肽序 NSVFRALPVDVVANAYR, 合肥赛曼诺生物科技有限公司;

免疫低下型 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠:20 只,体重 18.6~22.2 g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.1.2 试剂

0.9%氯化钠注射液:湖南康源制药有限公司;

胎牛血清(FBS):浙江天杭生物科技有限公司;

刀豆蛋白 A(Con A):分析纯,德国默克公司;

噻唑蓝(MTT)细胞活力及毒性测试试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;

二甲亚砜:99.8%,北京兰杰柯科技有限公司;

白细胞介素-2(IL-2)、 γ 干扰素(IFN- γ)、 α 肿瘤坏死因子(TNF- α)、免疫球蛋白 G(IgG)酶联免疫试剂盒:江苏酶免生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平:ME2002E/02 型,梅特勒—托利多仪器有限公司;

生物显微镜:B203LED 型,重庆奥特光学仪器有限公司;

石蜡切片机:RM2235 型,德国 Leica 公司;

全自动脱水机:TP1020 型,德国 Leica 公司;

摊片机:HI1210 型,德国 Leica 公司;

组织包埋机:EG1150H+C 型,德国 Leica 公司;

病理成像系统:DFC 420C 型,德国 Leica 公司;

压力蒸汽灭菌器:BKQ-B75L 型,山东博科生物产业有限公司;

生物安全柜:BSCIIB2-1101 型,山东博科生物产业有限公司;

高速冷冻离心机:Centrifuge 5418R 型,德国 Eppendorf 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计 选取免疫低下型 SPF 级 Balb/c 小鼠 20 只,雌雄各半,体重 18.6~22.2 g,根据性别、体重随机分为 4 组,分别为 GBP1 肽灌胃低、中、高剂量组(25, 50, 100 mg/kg)和对照组,每组 5 只,对照组灌胃纯水,给药量为 20 mL/kg,每天给药 1 次,连续给药 21 d。观察给药期间是否出现动物死亡,按式(1)计算各组死亡率。解剖取血、脾脏、肠系膜淋巴结、胸腺、肝脏、肾脏,称重相应脏器并按式(2)计算免疫器官指数。

$$D = \frac{C_1}{C_2} \times 100\%, \quad (1)$$

$$R_1 = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

D ——死亡率,%;

C_1 ——每组动物死亡数量,只;

C_2 ——每组动物数量,只;

R_1 ——免疫器官指数,mg/kg;

m_1 ——器官质量,mg;

m_2 ——体重,kg。

1.3.2 GBP1 肽对小鼠脾细胞的增殖作用 采用 MTT 法检测脾细胞增殖。使用 RPMI-1640 磨碎脾组织,过 200 目细胞筛网。使用红细胞裂解缓冲液清除红细胞,离心,加入 10% FBS 至 RPMI-1640 中,重悬细胞浓度为 1×10^7 个/mL。将脾细胞(106 个/孔)接种于 96 孔板上,每孔加入含 ConA(12.5 μ g/mL)或不含 Con A(作为对照)的培养基培养 72 h,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL)再培养 4 h,弃培养液,每孔加入二甲亚砜,用分光光度计测定 570 nm 处吸光值,并按式(3)计算刺激增殖指数。

$$R_2 = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R_2 ——脾细胞增殖指数,%;

A_1 ——加入 ConA 培养后的吸光值;

A_0 ——不含 ConA 培养后的吸光值。

1.3.3 GBP1 肽对小鼠细胞因子释放及免疫球蛋白分泌情况的影响 末次给药 24 h 后取眼球采血,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min 取血清,对血清样本进行细胞因子分析。在相同稀释液中制备细胞因子标准品的系列稀释液,将对照品、标准品和血清样品添加至 ELISA 试剂盒孔中,并根据 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 及免疫球蛋白 IgG 水平。

1.3.4 GBP1 肽对小鼠组织病理的影响 末次给药 2 h 后,在深度麻醉下处死每个治疗组的一只小鼠。取小鼠的胸腺、脾脏组织,用 4% 福尔马林固定 24 h,石蜡包埋,

采用苏木精—伊红对组织切片进行染色,并使用生物显微镜观察。

1.3.5 转录组学分析 采用酚/氯仿法,分别从对照组和 GBP1 肽处理组小鼠的脾脏中提取 RNA,在浓度与完整性检测前对提取的 Total RNA 按一定比例进行稀释。利用微量分光光度计检测 RNA 纯度,Agilent 2100 Bioanalyzer 和 Agilent RNA 6000 Nano Kit 检测 RNA 浓度与完整性;基于 UHPLC-MS/MS 和联合测序平台,进行全面转录组分析;并委托武汉希望组生物科技有限公司进行测定。

1.3.6 差异表达基因功能富集分析

(1) GO 富集:GO 的基本单位是 term(词条、节点),富集性分析首先需把所有差异表达基因映射到 Gene Ontology 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 的各个 term 上,筛选出与参考基因组相比样本差异表达基因中显著富集的 GO 条目。将阈值 $Qvalue \leq 0.05$ 的 GO term 定义为在差异表达基因中显著富集的 GO term,通过 GO 功能的显著富集分析确定差异表达基因所执行的主要生物学功能。

(2) KEGG 富集:通过 KEGG 数据库可以在基因水平上对生物学上的复杂行为进行深入研究,经多重校验后,筛选出满足 $Qvalue \leq 0.05$ 条件的 Pathway 即为在差异表达转录本中显著富集的 Pathway。

(3) 数据处理与统计分析:使用 SPSS 22.0 软件进行差异显著性分析和相关性分析,其中 * 表示有统计学意

义($P \leq 0.05$),** 表示非常显著性意义($P \leq 0.01$),结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。采用 IBM SPSS Statistics 22、Origin 9.0、Cytoscape 软件进行数据分析及绘图。

2 结果与讨论

2.1 GBP1 肽对小鼠的影响

2.1.1 对小鼠机体的影响 体重变化是反映机体健康状态的一个重要指标,通常免疫力低下都会伴随着体重下降^[9]。由图 1(a)可知,肽处理前,各组小鼠体重随时间延长不断增加。经灌胃递送 GBP1 肽后,各组小鼠相对体重均上涨。灌胃第 7 天,肽处理组小鼠体重显著上升,对小鼠机体有良性影响,因此 GBP1 肽处理组符合对照组体重增长趋势,尤其是 50 mg/kg 肽处理组的体重值出现极显著著增加。

体外培养 T 细胞时,受到植物血凝素或特异性抗原刺激后,可出现细胞体积增大,代谢旺盛,蛋白和核酸合成增加并能进行分裂,成为淋巴母细胞,因此淋巴细胞增殖率的高低可以反映机体细胞免疫水平,可作为测定机体免疫功能的指标之一,正常脾淋巴细胞增殖区间为 3%~5%^[10]。由图 1(b)可知,经 25,50 mg/kg 的 GBP1 肽处理后,小鼠脾细胞增殖数趋于正常值水平。

免疫器官脏器系数的变化能直接反映机体免疫功能的改变^[11],其中脾脏和胸腺是机体内重要的免疫器官,其脏器系数的变化能够有效反映机体免疫状态。由图 1(c)可知,与对照组比较,25 mg/kg 的 GBP1 肽处理组小鼠胸

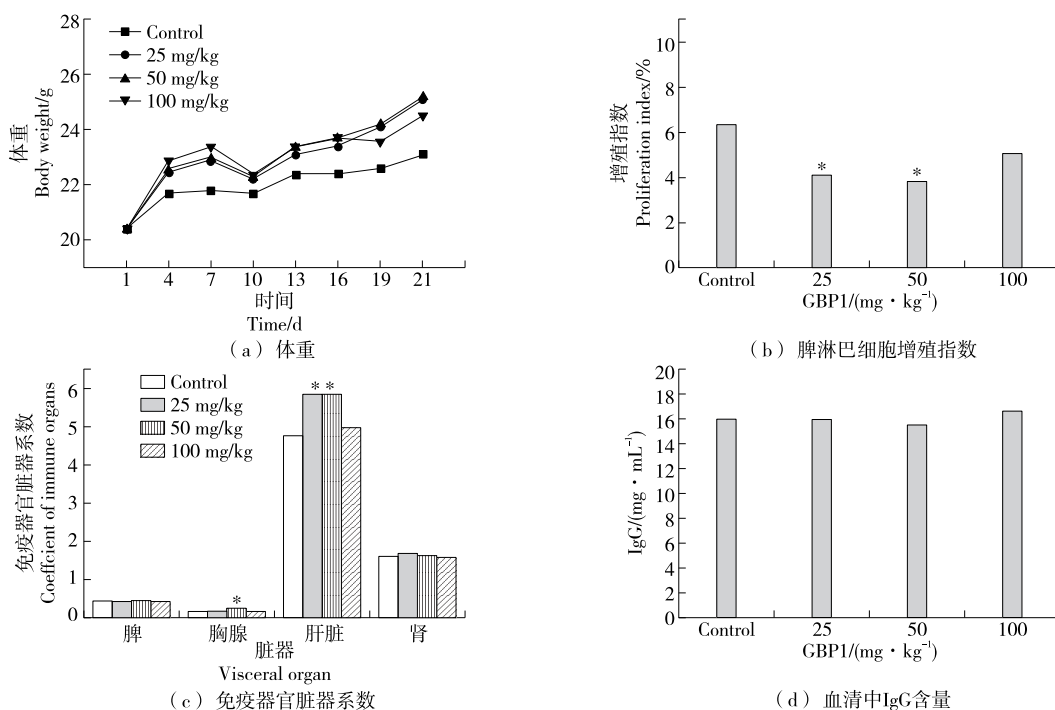


图 1 GBP1 肽对小鼠机体的影响

Figure 1 Effect of GBP1 peptide on the mouse body

腺脏器系数和 25,50 mg/kg 的 GBP1 肽处理组的肝脏脏器系数显著升高,说明 GBP1 肽未对脾脏、肾脏组织产生不良影响。

由图 1(d)可知,经肽处理后,小鼠血清中 IgG 含量稳定,无统计学差异;说明肽处理后机体的体液免疫功能状态良好,未产生不良影响。

2.1.2 对血清中细胞因子表达量的影响 由图 2 可知,25 mg/kg 的 GBP1 肽处理对小鼠机体产生的促炎因子 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 均有抑制作用;50 mg/kg 的 GBP1 肽处理组中小鼠机体产生的促炎因子 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 有上升趋势,说明低浓度肽对促炎因子分泌具有良好的抑制作用。

2.1.3 对小鼠胸腺和脾脏组织的影响 小鼠的脾脏、胸腺代表适应性免疫器官,在其中维持了免疫稳态的平衡^[12]。由图 3 可知,与对照组相比,GBP1 肽处理组小鼠的脾脏和胸腺组织切片显示正常结构,形态清晰,无组织学改变,表明 GBP1 肽可以提高正常小鼠的免疫力,不会对脾脏、胸腺形态造成损害,且未对胸腺、脾脏组织产生病理影响。

综上,经 25 mg/kg 的 GBP1 肽处理后,可以显著影响小鼠的脏器指数变化、脾脏细胞增殖及炎症因子的分泌,且对脏器无损害。因此,进一步对 25 mg/kg 的 GBP1 肽处理的小鼠脾脏组织进行转录组分析。

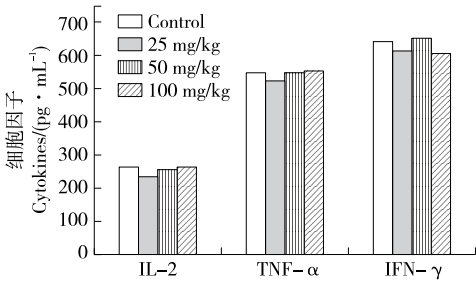
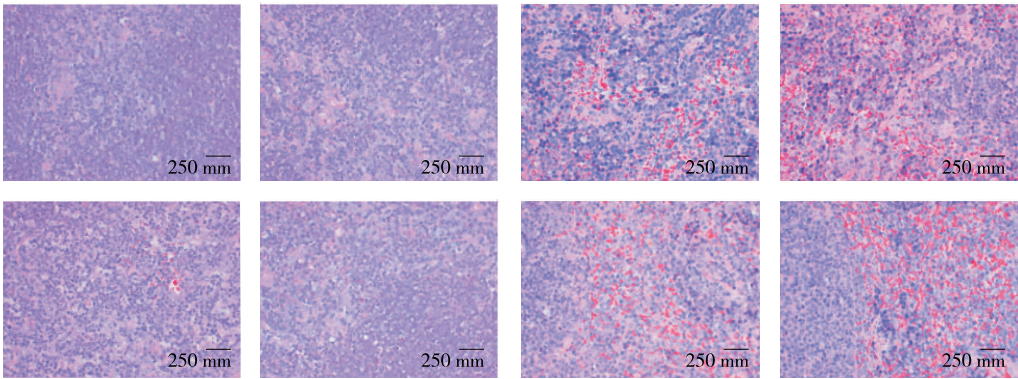


图 2 GBP1 肽对小鼠细胞因子分泌的影响
Figure 2 Effects of GBP1 peptide on cytokine secretion in mice

2.2 小鼠脾脏组织转录组测序分析

2.2.1 过滤后的 Reads 质量统计 由表 1 可知,经过滤和比对后,共获得 299 632 082 Raw Reads,293 293 182 Clean Reads。Clean Reads 达到了 Raw Reads 的 98%,比对到基因组上的比例均>97%。二代测序要求 Q20 的碱基比例>95%,Q30 的碱基比例>85%;该测序中 6 个样品的 Q20 值均>97%以上,Q30 值均>92%,表明每个样品的碱基正确识别率均>90%。

2.2.2 基因表达水平分析 Reads 计数除了与基因的真实表达水平成正比例外,还与基因的长度和测序深度呈正相关^[13]。每百万映射读片段的每千碱基读数(FPKM)值可以反映出一个基因在 RNA 样本中的相对表达水平大



从上至下依次为胸腺、脾脏切片;从左至右依次为对照组、25,50,100 mg/kg GBP1 肽处理组

图 3 胸腺和脾脏 H&E 染色切片图像

Figure 3 Representative images of H&E stained sections of the thymus and spleen

表 1 过滤后的 Reads 质量统计

Table 1 Quality statistics of filtered Reads

样品	总序列数	总碱基数	净序列数	净碱基数	Q20 比例/%	Q30 比例/%	GC/%
对照组 1	48 683 540	7 302 531 000	47 572 764	7 086 639 281	97.28	92.36	49.57
对照组 2	46 437 646	6 965 646 900	45 339 400	6 757 378 668	97.00	91.84	49.61
对照组 3	62 565 948	9 384 892 200	61 225 200	9 043 760 470	98.29	94.80	51.21
GBP1 处理组 1	47 227 934	7 084 190 100	46 259 450	6 897 232 883	97.17	92.16	50.28
GBP1 处理组 2	46 683 530	7 002 529 500	45 781 824	6 835 726 448	97.18	92.20	50.02
GBP1 处理组 3	48 033 484	7 205 022 600	47 114 544	6 973 326 680	98.25	94.64	50.98

小,FPKM在0.10~3.75可以认为是低丰度表达水平的基因;FPKM在3.75~15.00为中等丰富度表达水平基因;FPKM>15为高丰富度表达水平基因。利用StringTie^[14]软件对所有基因表达量进行统计,结果见表2。

依据各样品的基因表达量绘制主成分分析图,样本的表达分布及相关性分析结果如图4所示。由图4可

知,对照组与GBP1处理组分开,各样本转录组间差异较大,说明GBP1处理改变了脾脏组织的基因表达丰度。

2.2.3 差异表达基因分析 有生物学重复的差异表达基因定义为FoldChange ≥ 2 且fdr ≤ 0.05 ,无生物学重复的差异表达基因定义为FoldChange ≥ 2 且fdr ≤ 0.005 。由此可得差异基因共780个,其中显著上调的差异基因741个,

表2 表达量统计表

Table 2 Expression statistics table

组别	0~0.10		0.10~3.75		3.75~15.00		>15.00	
	数量	比例/%	数量	比例/%	数量	比例/%	数量	比例/%
对照组 1	18 721	52.60	7 505	21.09	4 740	13.32	4 623	12.99
对照组 2	18 678	52.48	7 521	21.13	4 770	13.40	4 620	12.98
对照组 3	19 417	54.56	7 122	20.01	4 330	12.17	4 720	13.26
GBP1 处理组 1	18 584	52.22	7 862	22.09	4 837	13.59	4 306	12.10
GBP1 处理组 2	18 656	52.42	7 857	22.08	4 694	13.19	4 382	12.31
GBP1 处理组 3	19 477	54.73	7 045	19.80	4 498	12.64	4 569	12.84

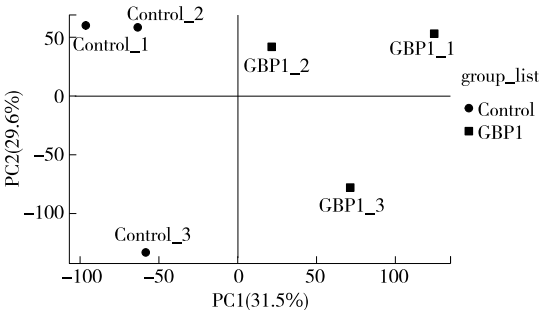


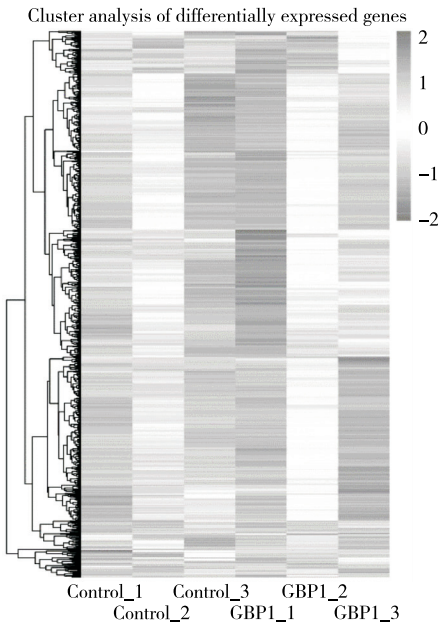
图4 主成分分析图

Figure 4 Principal component analysis diagram

显著下调的差异基因39个。通过两组转录本对比,对基因表达进行层次聚类分析,结果如图5所示。由图5可知,经GBP1肽处理后的小鼠脾脏组织中上调基因数高于下调基因数。通过两组样本中差异表达基因分析,GBP1肽可明显促进小鼠脾脏组织中基因的转录水平。

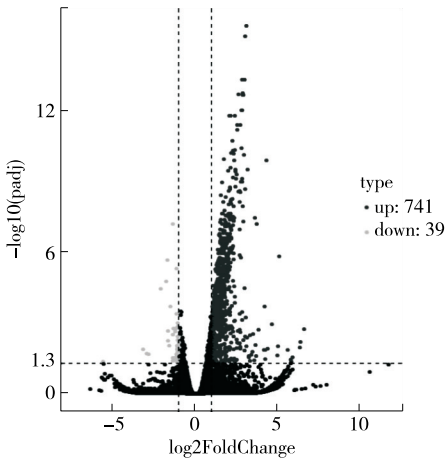
2.3 GO 和 KEGG 富集分析

GO 富集包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3部分。由图6可知,GO分析共富集了219个条目,其中70个与生物过程相关,24个与细胞成分相关,125个与分子功能相关。根据P值<0.01,选取生物过



深灰色代表上调基因;浅灰色代表下调基因;白色代表基因无显著差异

(a) 差异基因聚类热图



(b) 差异基因火山图

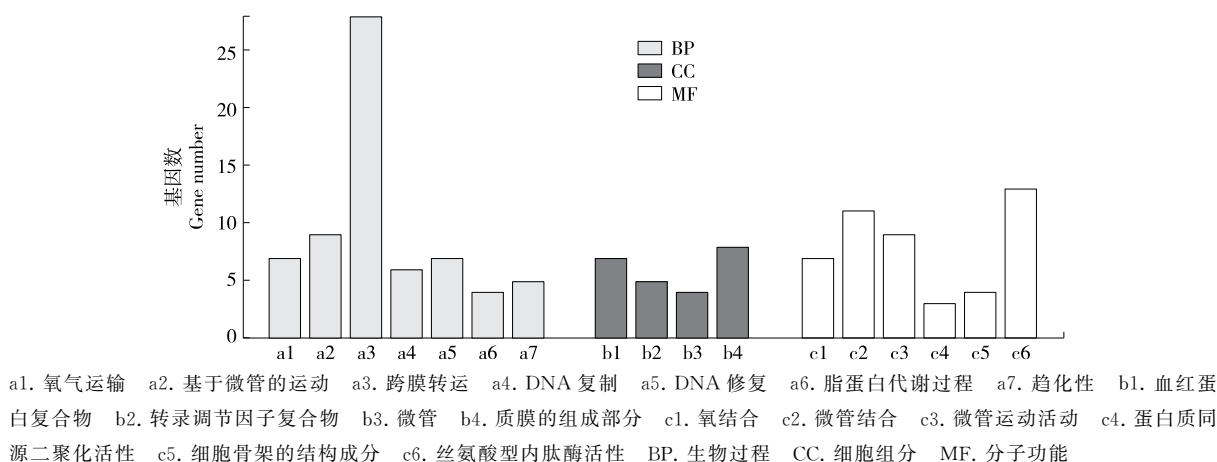
图5 差异基因分析图

Figure 5 Differential gene analysis diagram

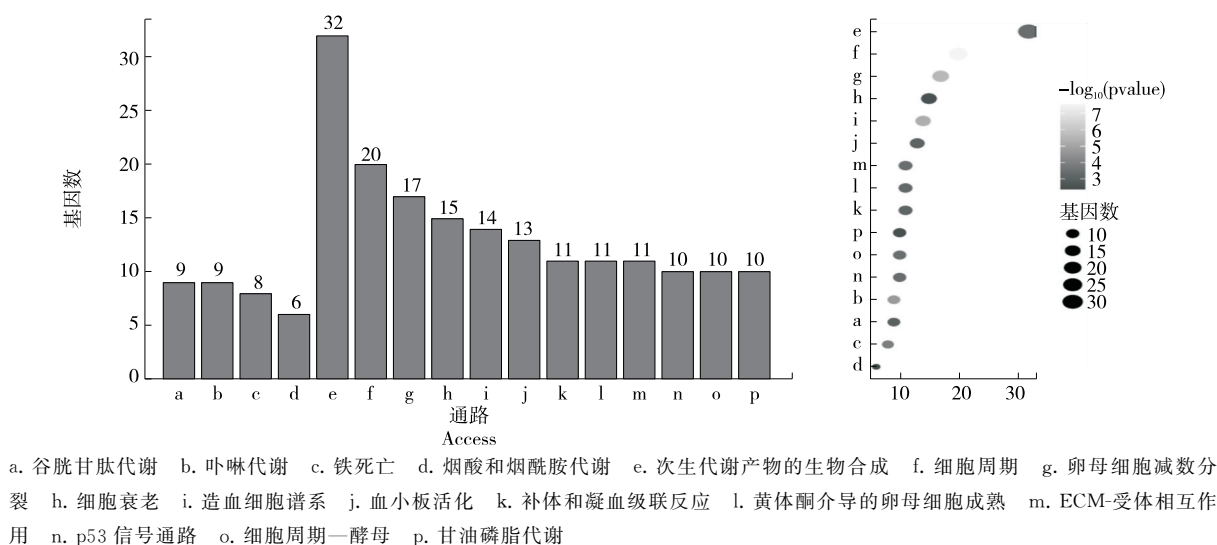
程、细胞成分、分子功能富集结果排名靠前的条目进行可视化处理。GBP1 处理脾脏组织的差异基因主要参与微管运动和跨膜转运等生物过程,存在于血红蛋白的复合物和质膜等细胞成分,行使微管结合、调节丝氨酸型内肽酶活性和微管运动等分子功能。

KEGG 分析共富集了 217 个信号通路。根据 P 值 < 0.01 ,选取前 16 条通路进行可视化处理,主要涉及细胞周期、铁死亡、ECM-受体相互作用、p53 信号通路、次生代谢物的生物合成等途径。这些通路均与免疫、癌症、细胞凋亡等息息相关。其中 p53 信号通路是一个重要的细胞生存和死亡调控通路,p53 是所有癌症中最常见的突变蛋白。研究^[15]认为,活性 p53 在肿瘤抑制方面具有重要作用。p53 信号通路中所富集到的 10 个基因均上调,其中表达量最高的基因为 *Rrm2*,该基因编码核糖核苷酸还原酶,参与核苷酸代谢并催化核苷酸转化为脱氧核苷酸,且

该基因与耐药性、调节细胞死亡和肿瘤免疫有关^[16];另一个表达量较高的基因为细胞周期蛋白 B2(*Ccnb2*),该基因是细胞周期蛋白通路的重要组成部分,在癌症的发生发展中起关键作用^[17];铁死亡通路是一种细胞死亡形式,具有直接杀死癌细胞的能力,并具有潜在的抗肿瘤作用,随着免疫细胞在肿瘤微环境(TME)中的作用不断增强,铁死亡可能对免疫细胞产生额外的影响^[18]。铁死亡信号通路中所富集到的 8 个基因均上调,其中表达量最高的基因为 *Tfrc*,该基因编码转铁蛋白受体,该受体表达广泛分布于免疫系统、造血系统(如骨髓干细胞、红细胞和白细胞)、神经系统(如神经元和神经胶质细胞)等^[19]。补体和凝血级联是由具有相似结构特征的丝氨酸蛋白酶组成的共同祖先途径衍生的两个进化级联反应,具有综合和高度复杂的功能,它们将彼此交织在机体的全过程中,从而达到机体的止血作用和免疫防御作用^[20]。补血和凝



(a) GO 富集



(b) KEGG 富集

图 6 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Figure 6 GO and KEGG enrichment of differentially expressed genes

级联通路中所富集到的 11 个基因均上调,其中表达量最高的为 *Itgam*,该基因编码整合素 α M 链,整合素 ITGAM/ITGB2 与单核细胞、巨噬细胞和粒细胞的各种黏附相互作用以及介导补体包被颗粒和病原体的摄取有关^[21]。

2.4 GBP1 肽对脾脏组织转录组信号通路及差异基因表达分析

选择 KEGG 富集分析中免疫调节相关通路前 8 条进行分析。由表 3 可知,细胞周期通路相关的差异基因为 20 个,与铁死亡通路相关的差异基因为 8 个,ECM-受体相互作用通路相关的差异基因为 11 个,次生代谢物的生物合成通路相关的差异基因为 32 个,p53 信号通路相关的差异基因为 10 个,补体和凝血级联反应通路相关的差异基因为 11 个,谷胱甘肽代谢通路相关的差异基因为 9 个,细胞衰老通路相关的差异基因为 15 个。

表 3 差异基因与免疫调节相关的 KEGG 途径

Table 3 Differentially expressed gene associated with immunomodulation of the KEGG pathway

通路	基因数量	P 值
细胞周期	20	2.90E-08
铁死亡	8	0.000 110 121
ECM-受体相互作用	11	0.000 356 757
次生代谢物的生物合成	32	0.000 374 042
p53 信号通路	10	0.000 383 083
补体和凝血级联反应	11	0.000 698 088
谷胱甘肽代谢	9	0.000 969 903
细胞衰老	15	0.002 872 478

结合 GO 和 KEGG 富集结果,与免疫调节密切相关的有铁死亡通路、p53 信号通路、补体和凝血级联反应 3 条通路,包含相关的差异基因有 28 个(表 4),且均为上调基因。

2.5 差异基因互作网络分析

利用 String 网站分析得到总的差异基因的互作网络,如图 7 所示。为明确与免疫调节相关通路的关键基因,选择 KEGG 富集分析中免疫调节相关通路前 8 条及其相关基因导入 Cytoscape 软件,分析得到关键基因互作网络图。

通过比较介数中心度(betweenness centrality),筛选出与免疫调节相关的基因包括 *Rrm2*、*Thbs1*、*Tfric*、*Itgam*、*Ccnb1*、*Cdk1* 等。*Thbs1* 基因编码血小板凝血酶蛋白-1,其是近年来肿瘤领域研究的热门靶点基因^[22]; *Ccnb1* 基因编码细胞周期蛋白 B1,该基因编码周期蛋白依赖性激酶 1,且 *Ccnb1*、*Cdk1* 和 *Ccnb2* 与肝癌细胞的免疫浸润相关^[21]。这些关键基因,均与肿瘤、癌症、炎症等

表 4 脾脏组织的差异基因及差异表达水平分析

Table 4 Analyses of differential genes and their expression levels in spleen tissue

基因	对照组表达量	肽处理组表达量
<i>Bcl2l1</i>	23.02±1.75	62.42±10.01 * *
<i>C5ar1</i>	0.59±0.09	1.53±0.35 *
<i>Ccnb2</i>	40.95±5.37	104.63±21.04 *
<i>Ccne1</i>	20.96±4.84	51.44±14.00 *
<i>Ccne2</i>	2.10±0.55	7.33±1.60 *
<i>Cd59a</i>	5.51±0.46	14.72±2.97 *
<i>Cdk1</i>	14.65±2.54	33.30±6.66 *
<i>Gadd45a</i>	25.56±2.82	62.98±10.93 * *
<i>F10</i>	1.05±0.24	2.47±0.78
<i>F2rl2</i>	1.24±0.38	3.14±1.20
<i>F5</i>	0.65±0.27	1.89±0.48 *
<i>Acs1l</i>	6.88±1.30	18.95±4.61 *
<i>Gclc</i>	14.92±3.72	27.50±5.64
<i>Gclm</i>	23.42±4.26	71.68±24.74
<i>Itgam</i>	2.27±0.12	4.88±1.14 *
<i>Itgb2l</i>	0.20±0.10	1.22±0.63
<i>Serp1nb2</i>	0.28±0.04	0.93±0.49
<i>Rrm2</i>	55.55±10.62	126.49±34.31 *
<i>Thbs1</i>	5.57±1.12	12.09±4.14
<i>Tfric</i>	45.40±9.12	118.07±34.48 *
<i>Vwf</i>	1.52±0.41	4.44±1.33 *
<i>Slc39a8</i>	2.49±0.51	5.61±2.07
<i>Steap3</i>	8.92±3.05	31.32±10.93 *
<i>1300017J02Rik</i>	5.26±0.70	19.32±6.58 *
<i>F13a1</i>	0.82±0.20	2.41±0.70 *
<i>Acs16</i>	0.08±0.03	0.25±0.06 *
<i>Ccnb1</i>	17.90±1.95	38.99±9.86 *
<i>Cd59b</i>	1.15±0.40	3.60±1.12 *

免疫调节有关。

3 结论

研究考察了大米源免疫活性肽 GBP1 肽小鼠机体发挥的免疫调节作用,并从转录组水平分析了免疫活性肽对小鼠发挥免疫调节作用的机制。结果表明,大米源免疫活性肽 GBP1 肽处理后的小鼠体重整体呈上升趋势,25 mg/kg 的 GBP1 肽处理组小鼠肝脏器系数升高,50 mg/kg 的 GBP1 肽处理组小鼠胸腺、肝脏器系数升高,低浓度肽组对促炎因子分泌具有良好的抑制作用,肽处理组脾淋巴细胞体外增殖能力无明显变化,免疫球蛋白 IgG 水平无统计学差异。经 GO 功能富集和 KEGG 通路富集,发现 GBP1 肽与 p53 信号通路、铁死亡、补体和凝血

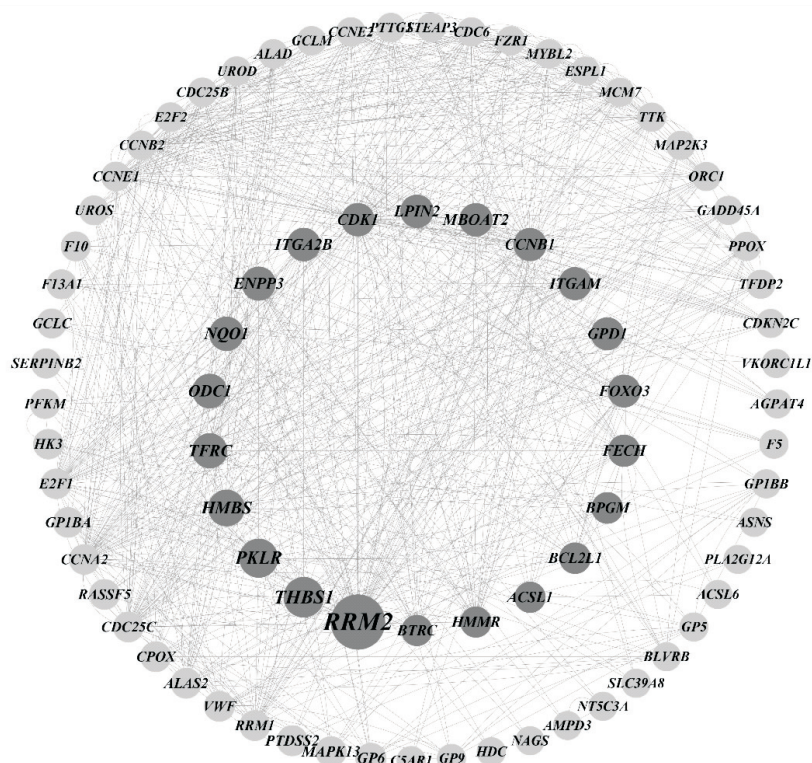


图 7 免疫相关关键基因互作网络图

Figure 7 Interaction network diagram of key immune-related genes

级联等免疫调节通路相关;通过分析免疫相关通路的基因表达量以及构建关键基因互作网络,预测与肿瘤、癌症、免疫调节等相关的关键基因包括 *Rrm2*、*Ccnb2*、*Thbs1*、*Tfrc*、*Itgam*、*Ccnb1* 和 *Cdk1* 等。研究主要考察了免疫活性肽 GBP1 肽小鼠机体发挥免疫调节作用,从转录组水平出发分析了免疫活性肽对在小鼠发挥免疫调节作用的机制,这为未来更进一步研究 GBP1 肽的免疫活性及作用机制提供了相关的研究路线。后续可对 GBP1 肽进行人群试验以探讨其在人体内的作用机制。

参考文献

- [1] 贺舒雯, 朱豪杰, 韩鹏薇, 等. 虾壳活性肽对斑马鱼氧化应激损伤的保护作用[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 140-147.
HE S W, ZHU H J, HAN P W, et al. Protective effects of *Procambarus clarkii* shell bioactive peptides on oxidative stress injury of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 140-147.
- [2] 张芷萌, 倪策, 欧晓晖, 等. 食源性生物活性肽的免疫功能研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(5): 193-202.
ZHANG Z M, NI C, OU X H, et al. Research progress on immune function of food-derived bioactive peptides[J]. Food & Machinery, 2023, 39(5): 193-202.
- [3] WONG F C, XIAO J, WANG S, et al. Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 44-57.
- [4] WANG C, SHEN Z, LI L, et al. Immunomodulatory activity of R-phycoerythrin from *Porphyra haitanensis* via TLR4/NF- κ B-dependent immunocyte differentiation[J]. Food & Function, 2020, 11(3): 2173-2185.
- [5] WEN L, HUANG L, LI Y W, et al. New peptides with immunomodulatory activity identified from rice proteins through peptidomic and in silico analysis [J]. Food Chemistry, 2021, 364: 130357.
- [6] WEN L, CHEN Y, ZHANG L, et al. Rice protein hydrolysates (RPHs) inhibit the LPS-stimulated inflammatory response and phagocytosis in RAW264.7 macrophages by regulating the NF- κ B signaling pathway[J]. RSC Advances, 2016, 6(75): 71295-71304.
- [7] LIU B, WANG A, CAO Z, et al. Mechanism of Pilose antler in treatment of osteoporosis based on network pharmacology [J]. Journal of Healthcare Engineering, 2022, 2022: 5298892.
- [8] LIANG Y, ZHANG X, CUI W, et al. Improvement of mutated peptide identification through MS/MS signals searching against the protein libraries generated from transcriptome and translome[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2023, 483: 116965.
- [9] MORARI J, HADDAD-TÓVOLLI R, SILVA NOGUEIRA P A, et al. Body mass variability in age-matched outbred male Swiss mice is associated to differential control of food intake by ghrelin[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2022, 550: 111646.

(下转第 240 页)

- 究[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(6): 38-40.
- LIU S Y, DOU K N, LU P P, et al. Study on the effect of apple pectin on flour quality[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(6): 38-40.
- [46] 李晓, 李静雯, 陈晔, 等. 豆腐柴叶低甲氧基果胶提取工艺优化及其加工特性和微观结构研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 14-21.
- LI X, LI J W, CHEN Y, et al. Optimization of low-methoxy pectin extraction from *Premna microphylla* Turcz and study on its processing characteristics and microstructure properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 14-21.
- [47] 张蓓. 柠檬皮果胶的理化特性及其稳定酸性乳饮料的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019: 8-44.
- ZHANG R. Study on physicochemical properties of lemon peel pectin and its stability in acidic milbeverage [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019: 8-44.
- [48] JRIDI M, ABDELHEDI O, SALEM A, et al. Physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of fish gelatin-based edible films enriched with orange peel pectin: Wrapping application[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103: 105688.
- [49] PRIYADARSHI R, RIAHI Z, RHIM J W. Antioxidant pectin/pullulan edible coating incorporated with *Vitis vinifera* grape seed extract for extending the shelf life of peanuts [J]. Postharvest Biology and Technology, 2022, 183: 111740.
- [50] GUO Z L, GE X Z, LI W Z, et al. Active-intelligent film based on pectin from watermelon peel containing beetroot extract to monitor the freshness of packaged chilled beef [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 119: 106751.
- [51] 淡新鑫. 基于果胶凝胶超高压熔化现象的结肠靶向给药体系构建与优化[D]. 厦门: 厦门大学, 2020: 14-55.
- DAN X X. Construction and optimization of colon-specific drug delivery system based on ultra-high pressure melting of pectin gel [D]. Xiamen: Xiamen University, 2020: 14-55.
- [52] JUNG J, ARNOLD R D, WICKER L. Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon-targeted drug delivery carrier[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 104: 116-121.
- [53] MÉNDEZ D A, SCHROETER B, MARTÍNEZ-ABAD A, et al. Pectin-based aerogel particles for drug delivery: Effect of pectin composition on aerogel structure and release properties [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 306: 120604.
- [54] 姚元勇, 何来斌, 张萌, 等. 新型生物质果胶吸附材料的制备及水溶液中铜离子(Cu^{2+})吸附性能研究[J]. 化学试剂, 2022, 44(3): 393-400.
- YAO Y Y, HE L B, ZHANG M, et al. Preparation of novel biomass pectin adsorption materials and its adsorption performance of copper (Cu^{2+}) in aqueous solution[J]. Chemical Reagents, 2022, 44(3): 393-400.
- [55] ARACHCHIGE M P M, MU T, MA M. Effect of high hydrostatic pressure-assisted pectinase modification on the Pb^{2+} adsorption capacity of pectin isolated from sweet potato residue [J]. Chemosphere, 2021, 262: 128102.
-
- (上接第 148 页)
- [10] MCGEEHAN G M, UHL J. $\text{TNF-}\alpha$ in Human diseases[J]. Current Pharmaceutical Design, 1996, 2(6): 662-667.
- [11] MIMS B M, GRISHAM M B. Humanizing the mouse immune system to study splanchnic organ inflammation[J]. The Journal of Physiology, 2018, 596(17): 3 915-3 927.
- [12] CHEI S, OH H J, LEE K, et al. Dysfunction of B cell leading to failure of immunoglobulin response is ameliorated by dietary silk peptide in 14-month-old C57BL/6 mice[J]. Frontiers in Nutrition, 2020, 7: 583186.
- [13] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [14] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3): 290.
- [15] HANAZONO K, NATSUGOE S, STEIN H J, et al. Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 expression[J]. Oncology Reports, 2006, 15: 821-824.
- [16] ZUO Z W, ZHOU Z R, CHANG Y Z, et al. Ribonucleotide reductase M2 (RRM2): Regulation, function and targeting strategy in Human cancer[J]. Genes & Diseases, 2022, 11(1): 218-233.
- [17] WANG D, SUN H, LI X, et al. CCNB2 is a novel prognostic factor and a potential therapeutic target in low-grade glioma [J]. Bioscience Reports, 2022, 42(1): 1 939.
- [18] QI D, PENG M. Ferroptosis-mediated immune responses in cancer [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1188365.
- [19] LI H H, CHOESANG T, BAO W L, et al. Decreasing TfR1 expression reverses anemia and hepcidin suppression in β -thalassemic mice[J]. Blood, 2017, 129(11): 1 514-1 526.
- [20] GONG Z, HE Y, MI X, et al. Complement and coagulation cascades pathway-related signature as a predictor of immunotherapy in metastatic urothelial cancer[J]. Aging (Albany NY), 2023, 15(18): 9 479-9 498.
- [21] DISCIPIO R G, DAFFERN P J, SRIRAMARAO P, et al. Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves $\alpha\text{M}\beta 2$ (CD11b/CD18) [J]. Journal of Immunology, 1998, 160(8): 4 057-4 066.
- [22] OMATSY M, NAKANISHI Y, IWANE K, et al. THBS1-producing tumor-infiltrating monocyte-like cells contribute to immunosuppression and metastasis in colorectal cancer[J]. Nature Communications, 2023, 14: 5 534.