

# Study on the Antitumor Activity of Rapeseed Low Poly Peptides

Shangwen Tang<sup>1</sup>, Yunjie Li<sup>1</sup>, Bo Yu<sup>1</sup>, Zhigang Xiao<sup>2</sup>, Moucheng Wu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Chemical Engineering and Food Science, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang

<sup>2</sup>College of Food Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan

Email: [41178619@qq.com](mailto:41178619@qq.com), \*[wumch98@mail.hzau.edu.cn](mailto:wumch98@mail.hzau.edu.cn)

Received: Feb. 19<sup>th</sup>, 2014; revised: Mar. 24<sup>th</sup>, 2014; accepted: Apr. 5<sup>th</sup>, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

In this paper, using China invention patent “rapeseed low poly peptides preparation method and products” (Patent No: 2007100533858) products as materials, the antitumor activity of the rapeseed low poly peptides was studied. The results showed that the rapeseed low poly peptides have inhibition to the growth of S<sub>180</sub> tumor; at the same time significantly improve a tumor-burdened immune function of mice; rise SOD value and reduce MDA value of mice serum; improve the formation of serum hemolysin HClgM of tumor-burdened mice; and enhance the ability of macrophage cell and delayed-type hypersensitivity intensity.

## Keywords

Rapeseed Low Poly Peptides, Antitumor Activity

# 菜籽低聚肽抗肿瘤活性研究

汤尚文<sup>1</sup>, 李云捷<sup>1</sup>, 于博<sup>1</sup>, 肖志刚<sup>2</sup>, 吴谋成<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>湖北文理学院化学工程与食品科学学院, 襄阳

<sup>2</sup>华中农业大学食品科技学院, 武汉

Email: [41178619@qq.com](mailto:41178619@qq.com), \*[wumch98@mail.hzau.edu.cn](mailto:wumch98@mail.hzau.edu.cn)

收稿日期: 2014年2月19日; 修回日期: 2014年3月24日; 录用日期: 2014年4月5日

\*通讯作者。

## 摘要

本文以中国发明专利“菜籽低聚肽的制备方法及产品”(专利号: 2007100533858)的产品为材料,研究了菜籽低聚肽的抗肿瘤活性。结果表明,菜籽低聚肽对S<sub>180</sub>肿瘤的生长具有抑制作用,同时明显提高荷瘤小鼠的免疫功能,使荷瘤小鼠血清中的SOD值升高和MDA值降低,提高荷瘤小鼠血清溶血素HClgM的形成,增强巨噬细胞吞噬能力和迟发型超敏反应强度。

## 关键词

菜籽低聚肽, 抗肿瘤活性

## 1. 引言

油菜是我国重要的油料作物之一,菜籽饼粕中的菜籽蛋白是一种非常优良的蛋白质源,其氨基酸生物效价 PER 值与 WHO/FAO 推荐值相近。专利“菜籽低聚肽的制备方法及产品”(专利号: 2007100533858)所获得的分子量为 1000~200 道尔顿的菜籽低聚肽是目前分子量段最低的小肽群[1],具有极强的生物活性和多样性。本文试图以其产品 1000~200 道尔顿的菜籽低聚肽为材料,对其抗肿瘤、抗氧化、预防心脑血管疾病等方面的生物活性进行了较系统的初步研究,为菜籽低聚肽的进一步开发利用提供理论依据。

肿瘤是危害人类健康和生命最常见疾病之一,大量的实验和临床研究证明,肿瘤的发生、发展与机体的满意状态密切相关。正常的免疫功能是机体战胜疾病和恢复健康的主要因素。随着生物化学的发展,一些对肿瘤细胞具有抑制或杀死的多肽被不断发现,它们也可以通过激活机体自身免疫功能的肿瘤抗原肽、刺激巨噬细胞吞噬作用的加强或促进淋巴细胞增殖等途径来增强其抑制肿瘤的效果。

本文报导了分子量在 1000~200 之间的菜籽低聚肽抑制肿瘤生长的效果,为探讨开发与利用抑制肿瘤活性的菜籽低聚肽提供基础。

## 2. 材料

### 2.1. 实验材料

菜籽低聚肽 RLP 按专利“菜籽低聚肽的制备方法及产品”(专利号: 2007100533858)方法制得[1]。昆明种 SPF 小鼠,雌性,5~6 周龄,体重 18~22 g;由湖北省卫生防疫站实验动物中心提供。腹水型 S<sub>180</sub> 肉瘤种鼠由华中科技大学同济医学院提供。

### 2.2. 主要试剂

环磷酸胺(Cy):	江苏恒瑞医药股份有限公司
RPMI-1640 培养基:	GibcoBRL
伴刀豆球蛋白 A (Con A):	Sigma
肝素钠:	生化试剂,上海伯奥生物科技有限公司
二硝基氟苯(DNFB):	E.Merck Germany
超氧化物歧化酶(SOD)测试盒:	南京建成生物工程研究所
丙二醛(MDA)测试盒:	南京建成生物工程研究所

Wright 染液: 取 0.1 g 瑞氏粉加 160 ml 甲醇,溶解后棕色瓶保存。

Hank's 工作液：由 A 液，B 液组成。

Hank's A 液：取 160 g NaCl、8 g KCl、2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 加入 800 ml 水，另取 2.8 g CaCl<sub>2</sub> 溶于 100 ml 水中，将两液混合后定容至 1000 ml，加 2 ml 氯仿，4℃ 冰箱保存。

Hank's B 液：3.04 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、1.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 20 g 葡萄糖加 800 ml 水，另取 0.4 g 酚红充分研磨，逐渐加入 0.1 mol/L NaOH 10~15 ml，待酚红完全溶解后加水稀释至 100 ml，将两液混合后加水定容至 1000 ml，加 2 ml 氯仿，4℃ 冰箱保存。

Hank's 工作液由 A 液、B 液和蒸馏水按 1:1:18 比例混合而成，经 380 Pa 灭菌 10 min，冷却后 4℃ 保存，可用一个月，临用前用 3.5% NaHCO<sub>3</sub> 调节至 PH 7.2~7.4。

Alsever 抗凝液：取 2.05 g 葡萄糖、0.8 g 柠檬酸钠和 0.42 g NaCl，加水至 100 ml，经 380 Pa 灭菌 10 min，冷却后 4℃ 保存备用。

绵羊红细胞(SRBC)：羊颈静脉血由湖北省卫生防疫站实验动物中心提供，Alsever 液抗凝，4℃ 冰箱保存，用前生理盐水洗涤 3 次，配成 20% 浓度。

鸡红细胞(cock red blood cells, CRBC)：采自健康成年公鸡翼静脉，5 倍 Alsever 液抗凝，4℃ 保存，临用前用前生理盐水洗涤 3 次，配成 1% 浓度。

豚鼠血清：豚鼠购自湖北省卫生防疫站实验动物中心，豚鼠心脏取血，将分离出的血清加入压积 SRBC 中(1:0.2, V/V)，4℃ 冰箱中放置 30 min，离心取上清液，用生理盐水稀释成 1:5 血清备用。

### 2.3. 主要仪器

主要设备仪器见下表：

电子分析天平：	METTLER TOLEDO, AB204-E 型, Switzerland
紫外可见分光光度计：	UV-265 型, Shimadzu, Japan
pH 酸度计：	METTLER TOLEDO, 320-S 型, Switzerland
荧光分光光度计：	日立-850 型, Japan
真空旋转蒸发器：	BUCHI, RE III Switzerland
低温高速离心机：	HITACHI, SCR20BC, Japan
电热恒温水浴锅：	GSY-II 型, 北京市医疗设备厂

## 3. 实验方法

### 3.1. 接种方法

无菌获取 S<sub>180</sub> 瘤种鼠的腹水，以生理盐水配制成细胞数位  $1 \times 10^6$  个/ml 的细胞悬液：每只小鼠右前腋下接种 0.2 ml。

### 3.2. 实验方法

实验动物随机分为正常对照组、荷瘤对照组、27.5 mg/(kg·d) 的 Cy 阳性对照组、25 mg/kg·d 菜籽低聚肽低剂量组、50 mg/kg·d 菜籽低聚肽中剂量组、75 mg/kg·d 菜籽低聚肽高剂量组。除正常对照组外，其余各组动物均接种肿瘤细胞液，接种次日开始按上述剂量分别用 Cy 和菜籽低聚肽灌胃，对照组用等容量的生理盐水灌胃，连续 9 天，第 10 天处死小鼠后实验。

### 3.3. 肿瘤抑制实验

眼眶取血后颈椎脱臼处死小鼠，摘取肿瘤、胸腺和脾，经生理盐水洗涤后用滤纸吸干称重，分别计算抑瘤率、胸腺指数(mg 胸腺/g 体重)和脾指数(mg 脾重/g 体重)。

$$\text{抑瘤率}(\%) = (\text{对照组平均瘤重} - \text{剂量组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重} \times 100$$

### 3.4. 巨噬细胞吞噬实验

实验第十天，小鼠腹腔注射 1% 鸡红细胞(CRBC)1.0 ml，轻揉小鼠腹部，30 min 后颈椎脱臼处死，腹腔注射 2.5 ml Hank's 工作液，用注射器吸取腹腔液少许，于载玻片上推成涂片，自然干燥后用 Wright 染液染 0.5~1 min 后，以磷酸缓冲液冲去染液，干燥后电镜计数，按下式计算吞噬百分率计吞噬指数：

$$\text{吞噬百分率} = \text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数} / \text{计数的巨噬细胞数目} (\text{吞噬及未吞噬鸡红细胞的}) \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \text{被吞噬的鸡红细胞数} / \text{计数的巨噬细胞数目}$$

### 3.5. 迟发型超敏反应(DTH)

实验第 5 天，小鼠腹部去毛，用 1% 二硝基氟苯(DNFB)丙酮麻油染液在去毛处均匀涂抹致敏(每鼠 25  $\mu\text{L}$ )，24 h 后重复操作加强致敏一次。致敏第四天用 10  $\mu\text{L}$  DNFB 溶液均匀涂抹右耳(两面)进行攻击，对照组同样涂耳但未致敏。24 小时后颈椎脱臼处死小鼠，剪下左右耳壳，用打孔器在双耳相应部分各取下直径 8 mm 的耳片，称重，以两耳重差表示肿胀程度。

### 3.6. 血清溶血素含量测定

实验第 2 天，小鼠腹腔注射 0.2 ml 20% 绵羊红细胞(SRBC)进行免疫，隔 7 天后，再注射一次。眼眶取血后颈椎脱臼处死，分离血清，每只小鼠血清分成 2 份，一份不作任何处理，另外一份加等量的 2-巯基乙醇后于 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 20 min 以破坏 IgM，再分别稀释 500 倍。

IgG 溶血素的测定：取 2-巯基乙醇处理血清 0.5 ml 和 5%SRBC 悬液 0.5 ml 充分混匀，加羊抗小鼠 IgG (1:25 稀释)和 1:5 稀释得豚鼠血清(补体)各 0.5 ml，再加 1.0 ml 生理盐水。空白以 0.5 ml 生理盐水代替血清。

IgM 溶血素的测定：取未处理血清 0.5 ml、5%SRBC 悬液 0.5 ml、1:5 稀释的补体 0.5 ml 和 1.5 ml 生理盐水混合于试管中。空白以 0.5 ml 生理盐水代替血清。

所有试管 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 1 hr，中间振摇一次，3000 r/min 离心 10 min，用空白调零后，上清液于 540 nm 处测定吸光度，根据下式计算 IgG 溶血素(HC<sub>IgG</sub>)和 IgM 溶血素(HC<sub>IgM</sub>)含量：

$$\text{HC}_{\text{IgG}} = \text{2-巯基乙醇处理血清的吸光度} \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{HC}_{\text{IgM}} = \text{未处理血清的吸光度} \times \text{稀释倍数}$$

### 3.7. 菜籽低聚肽对小鼠血清 MDA 的影响

TBA 法[2] [3]。

### 3.8. 菜籽低聚肽对小鼠血清 SOD 的影响

羟胺法[2] [3]。

## 4. 实验结果与分析

### 4.1. 菜籽低聚肽对荷 S<sub>180</sub> 瘤小鼠的抑瘤作用和对小鼠免疫器官的影响

实验结果见表 1 所示。给小鼠 25~75 mg/kg·d 剂量的抑瘤率与阳性环磷酰胺对照组抑瘤率 59.21%相

比较, 没有显著性差异。实验中还发现除 Cy 组外, 各剂量受试组与对照组小鼠体重均正常增加, 而且, RLP 组小鼠体重增加更大一些。而 Cy 组小鼠与对照组小鼠比较, 荷瘤对照组小鼠体重不但没有增加, 还有所下降。说明 Cy 虽对荷瘤小鼠有一定的抑瘤作用, 但亦有一定的负影响。而菜籽低聚肽对 S<sub>180</sub> 瘤小鼠的不但具有抑瘤作用, 对小鼠的正常增重没有影响, 表明抑瘤效果更为明显。

免疫器官重量是反应机体非特异性免疫功能的重要指标, 免疫抑制剂可以造成动物免疫器官重量下降或功能低下, 而免疫促进剂可促使免疫器官重量接近或恢复至正常水平。

由表 2 可知, 与正常对照组相比, 各荷瘤组胸腺指数均下降, 但只有 Cy 组有显著性差异; 与荷瘤对照组相比, 中、高剂量组胸腺指数达显著性水平, 且接近于正常组水平。对于脾指数, 菜籽低聚肽各组, 均低于 Cy 组, 远远低于荷瘤对照组。并随着剂量的增加, 更接近于正常组。说明菜籽低聚肽有利于提高荷瘤小鼠免疫功能。

#### 4.2. 菜籽低聚肽对荷 S<sub>180</sub> 瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

由表 3 可知, 荷瘤鼠腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数均低于正常对照组。RLP 各剂量组均可增强荷

**Table 1.** Effects of RLP on S<sub>180</sub> tumor growth *in vivo*

**表 1.** 菜籽低聚肽对 S<sub>180</sub> 肉瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量(mg/kg·d) Dosage	体重增重(g) Weight Difference	平均瘤重(g) Tumor Weight	抑瘤率(%) Tumor Inhibition Rate
Normal Control	-	12.36 ± 0.40	-	-
Tumor-Bearing Control	-		1.4664 ± 0.1888	-
Cy	27.5	12.10 ± 0.28	0.5982 ± 0.1132	59.21
RLP	25	12.65 ± 0.29	0.6572 ± 0.2005	55.18
RLP	50	13.92 ± 0.30	0.5983 ± 0.2066	59.20
RLP	75	13.10 ± 0.20	0.5696 ± 0.1640	61.16

**Table 2.** Effects of RLP on immune organ in tumor-bearing mice

**表 2.** 菜籽低聚肽对荷瘤小鼠免疫器官的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	剂量(mg/kg·d) Dosage	胸腺指数(mg/g) Thymus Index	脾指数(mg/g) Spleen Index
Normal Control	-	5.4058 ± 0.5852	3.042 ± 0.321
Tumor-Bearing Control	-	4.1107 ± 0.558	6.5429 ± 0.590
Cy	27.5	2.4371 ± 0.1162	4.7952 ± 1.387
RLP	25	4.0245 ± 0.1261	4.6513 ± 1.880
RLP	50	4.8422 ± 0.6562	4.1365 ± 0.802
RSP	75	4.9044 ± 0.8212	3.68124 ± 0.772

**Table 3.** Effects of RLP on macrophage in tumor-bearing mice

**表 3.** 菜籽低聚肽对荷瘤小鼠巨噬细胞功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	剂量(mg/kg·d) Dosage	吞噬率(%) Phagocytic Rate	吞噬指数 Phagocytic Index
Normal Control	-	6.18 ± 0.12	7.12 ± 0.23
Tumor-Bearing Control	-	3.57 ± 0.11	5.55 ± 0.15
Cy	27.5	4.65 ± 0.31	5.62 ± 0.43
RLP	25	4.88 ± 0.26	6.15 ± 0.17
RLP	50	5.44 ± 0.28	6.36 ± 0.25
RLP	75	5.98 ± 0.44	7.16 ± 0.52

瘤鼠巨噬细胞吞噬功能，特别是高剂量组。各组的吞噬指数也均升高。其中以 75 mg/kg·d RSP-R 剂量效果最好，可使荷瘤鼠巨噬细胞吞噬率和吞噬指数恢复到接近正常小鼠水平。

#### 4.3. 菜籽低聚肽对荷 S<sub>180</sub> 小鼠迟发型超敏反应的影响

二硝基氟苯(DNFB)是一种半抗原，与皮肤蛋白结合形成抗原，能刺激 T 淋巴细胞增值成致敏淋巴细胞，再次攻击后会诱发迟发型超敏反应(DTH)。表 4 的结果表明，RLP 各剂量组均提高了荷瘤小鼠 DTH 反应强度，但只有高剂量组(75 mg/kg·d)有较好的效果。

#### 4.4. 菜籽低聚肽对荷 S<sub>180</sub> 小鼠血清溶血素含量的影响

由表 5 可知，所有荷瘤鼠的 IgG 和 IgM 均明显低于正常对照组。RLP 可提高荷瘤鼠的 IgG 和 IgM 溶血素含量，但与正常对照组比较，仍有显著性差异。

#### 4.5. 菜籽低聚肽对荷 S<sub>180</sub> 瘤小鼠血清中的 SOD 的影响

由表 6 可知，荷瘤鼠血清中的 SOD 值较正常对照组有所下降；各 RLP 剂量组的 SOD 值与荷瘤对照

Table 4. Effects of RLP on DTH in tumor-bearing mice

表 4. 菜籽低聚肽对荷瘤小鼠迟发型超敏反应的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 10)

组别 Group	剂量(mg/kg·d) Dosage	耳重差(mg) Ear Weight Difference
Normal Control	-	13.12 ± 0.25
Tumor-Bearing Control	-	4.22 ± 0.25
Cy	27.5	11.93 ± 0.44
RLP	25	5.84 ± 0.65
RLP	50	9.55 ± 0.85
RLP	75	12.23 ± 0.34

Table 5. Effects of RLP on serum hemolysin content in tumor-bearing mice

表 5. 菜籽低聚肽对荷瘤小鼠血清溶血素含量的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 10)

组别 Group	剂量(mg/kg·d) Dosage	HC <sub>IgG</sub>	HC <sub>IgM</sub>
Normal Control	-	108.22 ± 4.80	236.88 ± 3.12
Tumor-Bearing Control	-	63.33 ± 4.12	140.55 ± 2.21
Cy	27.5	90.10 ± 3.22	143.53 ± 2.23
RLP	25	79.45 ± 3.43	154.56 ± 2.35
RLP	50	85.97 ± 2.72	160.54 ± 2.98
RLP	75	95.68 ± 2.66	179.54 ± 2.22

Table 6. Effects of RLP on serum SOD of tumor-bearing mice

表 6. 菜籽低聚肽对荷瘤小鼠血清 SOD 的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 8)

组别 Group	剂量(mg/kg·d) Dosage	SOD (nmol·ml <sup>-1</sup> )
Normal Control	-	146.52 ± 3.12
Tumor-Bearing Control	-	106.43 ± 1.88
Cy	27.5	99.45 ± 2.66
RLP	25	112.33 ± 3.33
RLP	50	128.11 ± 2.12
RLP	75	142.44 ± 3.25

Table 7. Effects of RLP on serum MDA of tumor-bearing mice

表 7. 菜籽低聚肽对荷瘤小鼠血清中的 MDA 的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别 Group	剂量(mg/kg·d) Dosage	MDA (nmol·ml <sup>-1</sup> )
Normal Control	-	9.44 ± 2.16
Tumor-Bearing Control	-	34.44 ± 2.93
环磷酰胺 Cy	27.5	19.76 ± 1.46
RLP	25	17.32 ± 1.65
RLP	50	13.55 ± 1.56
RLP	75	10.87 ± 2.32

组相比均升高,且中、高剂量组达显著水平,特别是高剂量组接近正常参对照组。且 RLP 浓度与 SOD 值呈正依赖性关系。

#### 4.6. 菜籽低聚肽对荷 S<sub>180</sub> 瘤小鼠血清中的 MDA 的影响

由表 7 可知,与正常对照组相比,各荷瘤组的 MDA 值均升高;与荷瘤对照组相比,菜籽低聚肽各剂量组的 MDA 值均显著降低,其中中剂量组和高剂量组达显著水平,高剂量组接近正常对照组。

### 5. 小结

菜籽低聚肽在 25~75 mg/kg·d 剂量下能显著得抑制肿瘤生长,与 Cy 对照组相比,没有阻碍小鼠生长的现象发生。菜籽低聚肽中、高剂量组可以显著提高巨噬细胞吞噬能力和迟发型超敏反应强度,但对 HC<sub>IgG</sub> 和 HC<sub>IgM</sub> 含量的提高没有显著影响,不过其中、高剂量组却可以显著提高荷瘤小鼠血清中的 SOD 值,降低 MDA 值。由此可见,菜籽低聚肽具有较显著的抑制肿瘤生长的作用。

### 6. 讨论

化疗药物在杀伤瘤细胞的同时也损害机体免疫细胞,因此,国内外学者开始应用免疫化学的综合疗法抗肿瘤。近年来,植物活性物质的研究越来越受到人们的关注,从天然植物中提取抑制肿瘤的活性多肽,特别是低聚肽也成为功能食品研究的一个发展方向。

本研究表明菜籽低聚肽能显著抑制移植性肿瘤 S<sub>180</sub> 的生长,同时明显提高荷瘤小鼠的免疫功能,提高荷瘤小鼠血清溶血素 HC<sub>IgM</sub> 的含量和巨噬细胞吞噬能力与迟发型超敏反应强度。提示菜籽低聚肽的体内抗移植性肿瘤的活性是通过增强机体的免疫功能来实现的。另外菜籽低聚肽可使荷瘤小鼠血清中的 SOD 值升高,MDA 值降低,说明低聚肽抗肿瘤活性还与其抗氧化活性有关。

与本实验室以前获得的菜籽肽对肿瘤活性[2] [3]相比较,菜籽低聚肽具有更为明显的抑制肿瘤的生物活性,为菜籽低聚肽的开发利用,并为我们更广泛地利用菜籽蛋白提供了一个新的思路。

### 参考文献 (References)

- [1] 吴谋成,肖志刚,袁俊华 (2010) 中国发明专利“菜籽低聚肽的制备方法及其产品”(专利号: 2007100533858).
- [2] 曾晓波,吴谋成 (2002) 菜籽肽对小鼠肿瘤生长抑制和免疫功能的影响. *营养学报*, **4**, 401-404.
- [3] 薛照辉,尉万聪,吴谋成,刘春泉 (2007) 菜籽肽抑制肿瘤作用和对免疫功能的影响. *中国粮油学报*, **1**, 73-75.