

· 综述 ·

生物活性肽-单核细胞迁移抑制因子研究进展

程浩¹, 芮耀诚², 章越凡², 李铁军^{1,2} (1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 单核细胞迁移抑制因子(monocyte locomotion inhibitory factor, MLIF)是阿米巴原虫产生的具有抗炎作用的五肽。体内、外研究发现, MLIF可以发挥抗炎和免疫保护作用, 对类风湿关节炎、神经损伤、心肌缺血、脑缺血及痴呆具有良好的保护作用。研究证明 MLIF通过 NF- κ B 和 MAPK 信号通路调节炎症反应和免疫保护。笔者对 MLIF 的来源和生物活性做一综述。

[关键词] 单核细胞迁移抑制因子; 炎症; 免疫; 生物活性肽

[中图分类号] R96 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)01-0017-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.01.005

Research progress of bioactive peptide monocyte locomotion inhibitory factor

CHENG Hao¹, RUI Yaocheng², ZHANG Yuefan², LI Tiejun^{1,2} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Monocyte locomotion inhibitory factor(MLIF) was an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *In vivo* and *in vitro* study showed that MLIF displayed anti-inflammatory and immune protection effects and MLIF had protective effects on rheumatoid arthritis, nerve injury, myocardial ischemia, cerebral ischemia and Alzheimer's disease. Studies had shown that MLIF regulated inflammatory response and immune protection through NF- κ B and MAPK signal pathways. The sources and biological activities of MLIF were reviewed in this paper.

[Key words] monocyte locomotion inhibitory factor; inflammation; immune; bioactive peptide

肽是氨基酸彼此之间以酰胺键相互连接的化合物, 由于肽的相对分子质量较小, 并具有各种生物学活性, 所以又被称为生物活性肽。生物活性肽易消化吸收, 微量的状态下就能发挥强大的生理活性, 具有神经调节、免疫调节、抗病毒、抗氧化、降血压、降血脂、抗癌等作用^[1]。1986年, 美国科学家斯坦利·科恩(Stanley Cohen)和丽塔·列维-蒙塔尔奇尼(Rita Levi-Montalcini)因发现生长因子而获得诺贝尔生理学奖(或医学奖)。单核细胞迁移抑制因子(monocyte locomotion inhibitory factor, MLIF)是由5个氨基酸组成的寡肽, 自1985年发现以来^[2], 报道 MLIF 的外文文献已有30多篇, 但未见中文文献报道。笔者对 MLIF 的来源和生物活性做一综述。

1 MLIF 的来源及理化性质

MLIF 是在无菌培养的溶组织内阿米巴上清液中发现的热稳定化合物, 经过超滤, 凝胶色谱分离和 HPLC 纯化, 通过 Edman 降解法和质谱法确定 MLIF 的一级结构为 Met-Gln-Cys-Asn-Ser(相对分子质量 581)。MLIF 以单倍体和二倍体两种形式存在, 人工合成的五肽与原生产物具有相同的抗炎活性。但是研究发现向溶组织内阿米巴培养基中加入蛋白酶抑制剂, 上清液中并未检测到 MLIF 的活性, 因此, 推测 MLIF 可能不是溶组织内阿米巴培养基的降解产物, 而是由大分子蛋白剪切所得^[3]。研究表明^[2], MLIF 可以在体内外抑制人单核细胞和单核巨噬细胞的迁移, 而对嗜中性多形核白细胞和嗜酸性粒细胞没有影响, 因此得名单核细胞迁移抑制因子——MLIF。

Jiang 等^[4]建立了 LC-MS/MS 方法检测 MLIF, 测得比格犬血液中 MLIF 的半衰期为 0.4~0.5 min, 由此可以看出 MLIF 的半衰期极短, 可能与生物基质中的蛋白水解酶容易使多肽类快速降解

[基金项目] 国家科技重大专项项目: 防治心肌缺血的抗炎短肽候选化合物研究(2013ZX09103001-005)

[作者简介] 程浩, 硕士研究生. Tel: 15026671908; E-mail: chenghao4433@163.com

[通讯作者] 李铁军, 博士, 副教授. 研究方向: 心脑血管药理. Tel: (021)81871236; E-mail: ltj204@163.com

有关。另外, MLIF 含有两个极易发生氧化的氨基酸残基甲硫氨酸(Met)和半胱氨酸(Cys), 这也使 MLIF 在体内代谢迅速。然而, 在室温条件下, MLIF 可以在 0.2% 的甲酸和 50% (V/V) 的甲醇中稳定地存在 8 h。

2 MLIF 的生物活性

2.1 抗炎作用 炎症是指机体对感染、外来物质或者其他原因所致损伤的一种反应, 炎症反应有利于损伤的减轻和修复, 其中趋化因子和细胞因子与炎症细胞的相互作用构成了炎症反应的重要组成部分。早期的急性炎症过程伴随着单核细胞的炎症反应, 而在患有肠病的患者中, 小于 1% 的是由阿米巴肝脓肿引起的, 提示炎症过程伴随着阿米巴病, 阿米巴原虫可以产生并释放促/抗炎因子抑制白细胞向病灶处移动。

MLIF 可以通过抑制黏附分子、趋化因子和其他因子(如 IL-1 β)的表达来抑制单核细胞的迁移和呼吸爆发, 降低皮肤的超敏反应并延迟人皮肤中单核细胞向炎症区域的迁移。在豚鼠的炎症实验中^[5], MLIF 可以抑制单核吞噬细胞黏附分子 VLA-4 和 VCAM-1 的表达, 也可以降低血管内皮细胞中 VCAM-1 的表达^[6]。Godina-Gonzalez 等^[6]的体内试验表明, MLIF 通过下调细胞黏附分子、炎症因子和基质金属蛋白酶来减轻急性关节炎小鼠的炎症反应。Velázquez 等^[7]的体外实验表明, MLIF 可以降低类风湿关节炎患者的外周血单个核细胞的 IL-1 β 表达水平, 而在 LPS 刺激的 U-937 细胞上清液中未检测到相关细胞因子的调节作用。有研究进一步发现 MLIF 的部分体内代谢产物二肽 Met-Gln、四肽 Gln-Cys-Asn-Ser 也有抗炎作用, 可以抑制 IL-1 β 、IFN- γ 、IL-5 和 IL-6 等细胞因子的表达^[8]。

另外, Utrera-Barillas 等^[9]在 PMA 刺激的 U-937 细胞中发现, MLIF 对趋化因子 MIP-1 α 、MIP-1 β 和细胞因子 IL-1 β 有显著的抑制作用, IL-8 和趋化因子 CCL1 以及趋化因子受体 CCR1 的表达也相应降低。提示 MLIF 的抑制作用不仅可以直接作用于炎症细胞, 也可通过下调内源促炎趋化因子的聚合来发挥作用。

MLIF 的抗炎作用在不同的阶段表现不同, 它可以改变促炎和抗炎过程中的信号通路, 有些基因在正常的生化条件下就可以产生作用, 而有些则在刺激后才表达。如 Silva-García 等^[10]利用基因芯片研究了 PMA 刺激的 U-937 细胞中编码人细胞因子、受体和相关因子的基因表达谱, 结果显示, 在总的基因变化中, 上调的基因比下调的基因少, 提示以抑制

作用为主。其中在所研究的 375 个基因中, MLIF 影响了正常情况下 U-937 细胞中的 17 个基因的表达, 而影响 PMA 诱导的细胞中 22 个基因的变化。

在机体防御体系中, NF- κ B 途径是一种保守的、基本的防护体系, 它可以激发并参与调节先天性的免疫调节作用。NF- κ B 途径经激活后主要影响细胞因子(如 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12 等)、趋化因子(如 IL-8、MIP-1 α 、MIP-1 β 等)、黏附分子(如 ICAM、VCAM)和酶(如 iNOS、COX-2)的合成, 其中的大部分参与炎症过程。MAPK 途径也可以参与炎症基因的调节, 其中调节的产物主要包括细胞因子、表面受体和黏附分子。当 MAPK 被激活后, p38 参与转录水平的炎症调节, 产生了一个潜在的抗炎治疗靶点。

目前尚未完全了解 MLIF 发挥生物学调节功能的作用机制。有文献报道^[10], MLIF 通过参与 NF- κ B 和 MAPK 信号途径来改变免疫应答中相关分子的表达, 并偏向于 Th2 型应答。在众多变化的基因中, IL-8、MIP-1 α 、MIP-1 β 参与 NF- κ B 信号通路的调控, 而 FGF-10、IL-5R、OSMR β 和 IL-10 则与 MAPK 信号通路的调控有关, 其中 IL-1 β 在两条信号通路中都起作用, 说明 MLIF 至少参与了以上两条信号通路来发挥相应的作用。

有研究表明^[11], 在 MLIF 的氨基酸序列中, Cys-Asn-Ser 基团是 MLIF 的药效基团。当 MLIF(Met-Gln-Cys-Asn-Ser)的第二个氨基酸 Gln(谷氨酰胺)被 Pro(脯氨酸)取代后成 pMLIF(Met-Pro-Cys-Asn-Ser)时, 仍具有抗炎活性; 但是把 MLIF 的氨基酸序列打乱变成 sMLIF(Gln-Cys-Met-Ser-Asn)时, 抗炎活性消失; 而当 MLIF 中的 Ser(丝氨酸)被 Thr(苏氨酸)取代后, 抗炎活性消失。因此 3 个氨基酸必须连接在一起时才能发挥作用。另有研究利用计算机量子化学和量子力学的方法, 验证了 MLIF 发挥抗炎作用的是 Cys-Asn-Ser 基团^[12]。

2.2 免疫调节作用 天然免疫是机体抵抗和防御病原微生物入侵的第一道防线, 也是获得性免疫应答的基础, 主要通过吞噬细胞、细胞因子和趋化因子发挥效应。免疫是机体的一种自我保护形式, 在炎症中, MLIF 主要是通过活化、黏附和补充免疫细胞来参与免疫调节, 如通过作用于细胞外基质来调节关节炎。

在 MLIF 改善急性关节炎小鼠实验中^[7], 通过分析基因芯片的结果, 按照基因功能, 研究人员将参与的基因分为 6 类: 细胞周期控制基因、凋亡相关基因、免疫应答相关基因、黏附分子基因、炎症基因以及其他基因, 其中 MLIF 参与免疫应答上调 26 条基

因,下调 11 条基因。在炎症过程中,MLIF 可能是作为一个免疫调节剂产生作用,也可以通过活化、黏附和募集免疫细胞在免疫调节中发挥作用。

MLIF 也可以参与 Th1/Th2 型免疫应答的极化^[10],一方面,在下调的炎症趋化因子中,MLIF 降低 IL-8、MIP-1 α 和 MIP-1 β 使细胞向炎症部位迁移的能力;另一方面,MLIF 可以使抗炎因子 IL-10 过表达,而 IL-10 则可以参与 Th2 型细胞、巨噬细胞和 CD8⁺ 细胞的炎症反应,抑制促炎因子如 TNF、IL-1 β 等的合成,从而发挥抗炎作用。

有研究检测了 MLIF 对人 CD4⁺ T 淋巴细胞的激活作用和产生胞内细胞因子的影响^[13],结果表明,MLIF 激活了 Th1/Th2 型的细胞因子和细胞因子/受体,有可能是 MLIF 产生了信号级联,从而引起转录因子如 NF- κ B 的变化,当其转位进入细胞核后,与位点结合并调节更多的细胞因子。MLIF 通过干扰白细胞迁移,并调节抗炎细胞因子与促炎细胞因子的表达,从而发挥免疫调节作用^[14];也可以抑制细胞因子如 IFN- γ 和 TNF- α 产生 NO,进而降低阿米巴原虫产生的损伤^[15]。

2.3 对缺血损伤的保护作用 缺血性脑血管病是世界上发病率、死亡率最高的疾病之一,极大地影响了人类的寿命与生活质量。MLIF 是一种抗炎活性小肽,可以通过血脑屏障,对脑血管病具有良好的预防与治疗作用。Zhang 等^[16]证实 MLIF 通过与核糖体蛋白翻译延长因子 eEF1A1 结合而发挥作用。其中 MLIF 与 eEF1A1 结构域的区段 1(domain1) 结合,抑制脑微血管内皮细胞炎症黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,升高 eNOS 的表达量,改变内皮细胞功能,从而发挥保护作用。不仅如此,MLIF 及其部分代谢物还可以显著地降低小鼠缺血再灌注脑损伤面积,并显著改善小鼠缺血后的神经行为^[17,18],还可以降低心肌缺血模型大鼠的心肌损伤程度和心肌梗塞范围,防治心肌缺血^[19,20]。

此外,Yao 等^[21]将 MLIF 的氨基酸基团给予修改,设计并合成出两个四肽,氨基酸序列分别为 Tyr-Cys-Asn-Ser 和 His-Cys-Asn-Ser,结果显示合成的两个四肽均可以降低促炎细胞因子的表达,降低炎症细胞的黏附和迁移能力,降低血清和脑组织中的 MDA 含量并升高 SOD 含量,提示该 MLIF 类似物在脑缺血再灌注损伤中可以通过抗炎和抗氧化两条途径发挥保护作用。

2.4 神经保护作用 MLIF 不仅保护缺血损伤,而且参与神经保护。有研究报道^[22] MLIF 可以改善脊髓挫伤之后的运动功能障碍,并且发现腹角和红核骨髓神经元数目增加,提示 MLIF 对神经元损伤

有保护作用。为了进一步探究 MLIF 增强神经元保护的作用机制,研究者检测了外周血中 NO 和脂质过氧化物的含量,并检测了 iNOS、IL-10、TGF- β 基因在损伤区的表达。结果显示 MLIF 使体循环中 NO 含量和脂质过氧化物的水平降低,iNOS 基因表达降低,同时 MLIF 提高 IL-10 和 TGF- β 的表达,进而发挥神经保护作用。另外,MLIF 及其体内代谢物能显著地降低老年性痴呆动物的潜伏时间,增加穿越平台的次数,表明 MLIF 及其体内代谢物对血管性痴呆、老年性痴呆及两者混合症具有良好的治疗作用^[23]。

2.5 其他作用 此外,MLIF 可以调节生长因子、分化因子(如激活素类、抑制素类等)和与其相关分子的含量,这些分子可以调控细胞的生物学过程,进而影响疾病进程^[24]。MLIF 可以调节成纤维细胞的迁移、增殖、细胞外基质的合成与降解、血管增生等生理过程的基因表达,在机体修复过程中扮演重要角色^[25,26]。

3 展望

MLIF 作为一种抗炎活性肽,调节着机体众多的生理过程,更加全面的报道使得其在转录和翻译水平的研究得到进一步发展^[27]。由于活性肽具有特异性高、活性较强、毒性低、副作用小等优点,加快了活性肽在药物合成、诊断试剂和疫苗开发等方面的发展^[28]。随着研究手段和方法的不断提高,更多特殊功能的活性肽将会被发现,其研究将不断深入,作用机制将进一步得到阐释,为新药研发提供有力的保障。

【参考文献】

- [1] 王竹青,李八方.生物活性肽及其研究进展[J].中国海洋药物杂志,2010,29(2):60-68.
- [2] Kretschmer RR,Collado ML,Pacheco MG, et al. Inhibition of human monocyte locomotion by products of *Entamoeba histolytica*[J]. Parasite Immunol,1985,7:527-543.
- [3] López-Osuna M,Cárdenas G,Isario J, et al. Induction of protective immunity against experimental amebic abscess of the liver (EAAL) using the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica*: a preliminary report[J]. Arch Med Res,2000, 31(4):S110-S111.
- [4] Jiang HF,Li J,Zhao X, et al. Determination of an unstable pentapeptide, monocyte locomotion inhibitory factor, in dog blood by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study [J]. J Pharm Biomed Anal,2013,83:305-313.
- [5] Giménez-Schr JA,Arenas E,Díaz L, et al. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* on the expression of cell adhesion molecules

- [J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(1): 34-36.
- [29] 张乐之, 何华美, 李新芳, 等. 粉防己碱的抗炎作用与炎症白细胞 cAMP 的关系[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(7): 791-796.
- [30] Choi B, Ahn I, Kim Y, et al. Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte[J]. Exp Mol Med, 2006, 38(6): 599-605.
- [31] Taguchi K, Hagiwara Y, Kajiyama K, et al. Pharmacological studies of *Houttuynia herba*: the anti-inflammatory effect of quercitrin[J]. Yakugaku Zasshi, 1993, 113(4): 327-333.
- [32] 刘琳娜, 程建峰. 乙醇提取新鲜当归油的抗炎镇痛作用[J]. 中国药房, 2002, 13(9): 526-527.
- [33] Kobayashi Y, Shen J, Li S, et al. Suppressive effects of a plant-origin polyol, dulcitol on collagen-induced arthritis in mice[J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 1997, 110(Supple 1): 132-137.
- [34] 阮金兰, 邹健, 蔡亚玲. 菝葜的抗炎活性成分研究[J]. 医药导报, 2005, 24(8): 670-672.
- [收稿日期] 2013-03-21 [修回日期] 2013-07-05
[本文编辑] 顾文华

(上接第 19 页)

- (CAMs) in the skin of guinea pigs[J]. Arch Med Res, 2000, 31(4 Suppl): S92-S93.
- [6] Godina-Gonzalez S, Furuzawa-Carballeda J, Utrera-Barillas D, et al. Amebic monocyte locomotion inhibitory factor peptide ameliorates inflammation in CIA mouse model by down-regulation of cell adhesion, inflammation/chemotaxis, and matrix metalloproteinases genes[J]. Inflamm Res, 2010, 59(12): 1041-1051.
- [7] Velázquez JR, Garibay-Martínez L, Martínez-Tejada P, et al. An amebic anti-inflammatory peptide down-regulates *ex vivo* IL-1 β expression in patients with rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Clin, 2012, 8(6): 315-320.
- [8] 章越凡, 芮耀诚, 李铁军, 等. 五肽代谢物在制备抗炎药物中的应用[P]. 中国专利, CN 103611149 A, 2014-03-05.
- [9] Utrera-Barillas D, Velázquez JR, Enciso A, et al. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines[J]. Parasite Immunol, 2003, 25(10): 475-482.
- [10] Silva-García R, Estrada-García I, Ramos-Payán R, et al. The effect of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* on gene expression in the U-937 monocytic cell line[J]. Inflamm Res, 2008, 57(4): 145-150.
- [11] Morales-Martínez ME, Silva-García R, Soriano-Correa C, et al. The Cys-Asn-Ser carboxyl-terminal end group is the pharmacophore of the amebic anti-inflammatory monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) [J]. Mol Biochem Parasitol, 2008, 158(1): 46-51.
- [12] Barrientos-Salcido C, Rico-Rosillo G, Giménez-Scherer JA, et al. Computational study of the electronic structure characterization of a novel anti-inflammatory tripeptide derived from monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF)-pentapeptide [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44 (8): 3114-3119.
- [13] Rojas-Dotor S, Perez-Ramos J, Gimenez-Scherer, et al. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *E. histolytica* on cytokines and chemokine receptors in T CD4⁺ lymphocytes[J]. Bio Res, 2009, 42 (4): 415-425.
- [14] Rojas-Dotor S, Rico G, Pérez J, et al. Cytokine expression in CD4⁺ cells exposed to the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* [J]. Parasitol Res, 2006, 98(5): 493-495.
- [15] Rico G, Leandro E, Rojas S, et al. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes[J]. Parasitol Res, 2003, 90 (4): 264-267.
- [16] Zhang Y, Chen J, Li F, et al. A pentapeptide monocyte locomotion inhibitory factor protects brain ischemia injury by targeting the eEF1A1/endothelial nitric oxide synthase pathway [J]. Stroke, 2012, 43(10): 2764-2773.
- [17] 杨鹏远, 芮耀诚, 章越凡. 多肽小分子在制备防治缺血性脑血管药物中的应用[P]. 中国专利, CN 101361961 A, 2009-2-11.
- [18] 章越凡, 芮耀诚, 李铁军, 等. 五肽代谢物及其在制备防治缺血性脑血管疾病药物中的应用[P]. 中国专利, CN 103611149 A, 2014-03-05.
- [19] 芮耀诚, 李铁军, 杨鹏远, 等. 多肽小分子 MLIF 在制备防治心肌缺血药物中的应用[P]. 中国专利, CN 101612384A, 2009-12-30.
- [20] 李铁军, 芮耀诚, 章越凡, 等. 一种五肽的部分代谢物用于制备抗心肌缺血产品的新用途[P]. 中国专利, CN 103203009 A, 2013-07-17.
- [21] Yao J, Xu Y, Ji F, et al. Protective effects of MLIF analogs on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Peptides, 2011, 32(5): 1047-1054.
- [22] Bermeo G, Ibarra A, García E, et al. Monocyte locomotion inhibitory factor produced by *E. histolytica* improves motor recovery and develops neuroprotection after traumatic injury to the spinal cord[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 340727.
- [23] 李铁军, 芮耀诚, 章越凡, 等. 一种五肽及其代谢物用于制备抗痴呆产品的新用途[P]. 中国专利, CN 103191407, 2013-07-10.
- [24] Silva-García R, Rico-Rosillo G. Anti-inflammatory defense mechanisms of *Entamoeba histolytica* [J]. Inflamm Res, 2011, 60(2): 111-117.
- [25] Sasaki M, Kashima M, Watanabe A, et al. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1 β and TNF- α [J]. Mediators Inflamm, 2000, 9(3-4): 155-160.
- [26] Gharaee-Kermani M, Phan SH. Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases[J]. Curr Pharm Des, 2001, 7(11): 1083-1103.
- [27] Velázquez JR. The monocyte locomotion inhibitory factor an anti-inflammatory peptide; therapeutics originating from amebic abscess of the liver[J]. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2011, 5(1): 7-12.
- [28] Silva-García R, Rico-Rosillo G. Anti-inflammatory defense mechanisms of *Entamoeba histolytica* [J]. Inflamm Res, 2011, 60(2): 111-117.
- [收稿日期] 2014-08-11 [修回日期] 2014-11-05
[本文编辑] 顾文华