

(青岛海洋大学海洋药物与食品研究所 266003)

赵 锐 顾谦群 管华诗:

海洋活性肽的研究进展

PROGRESS IN STUDIES OF MARINE BIOLOGICAL PEPTIDES

随着人们对海洋资源认识的提高,以及现代生物技术海洋药物研究中的应用,反相-HPLC、2D-NMR、FAB MS、手性色谱(包括GC、HPLC)等技术的发展,使得对海洋活性肽的研究易于进行。近10多年来,海洋活性肽类,特别是海洋环肽的研究也取得了很大进展,其中从海鞘(*Trididemnum solidum*)中分离得到的环肽Didemnin B在美国已经作为一种新型抗肿瘤药进入临床试验阶段。

目前研究的海洋活性肽类主要来源于海绵、海鞘、芋螺、海葵、海星、海藻、海兔等海洋生物。

1 海绵多肽^[1]

海绵(Sponge)是最低等的多细胞动物,结构较简单,但作为一个特殊生物群体含有极为丰富的生理活性物质。

1.1 离海绵目(Choristide)

Jaspeptide是从斐济和几内亚海域离海绵目Jaspis属海绵中分离得到的环肽。实验证明其具有杀伤线虫活性(LD₅₀ < 1 μg/ml)和细胞毒活性,对喉上皮组织癌细胞毒性体内实验IC₅₀为0.32 μg/ml。其结构的全合成已经完成。Geodiamolides A、B是从加勒比海离海绵目Geodia sp.属海绵中分离得到的环肽成分。利用NMR、X射线晶体

衍射分析确定了其化学结构。它们对L₂₁₀细胞毒IC₅₀分别为:0.032, 0.0026 μg/ml,该化合物结构的全合成也已完成。

1.2 外射海绵目(Axinellida)

从巴布亚几内亚海域外射海绵目Pseudoaxinyssa sp.属海绵中分离出Geodiamolides C~F与Geodiamolides A、B具有相似的结构。对L₂₁₀细胞毒性IC₅₀分别为0.0025, 0.039, 0.014, 0.006 μg/ml。

Axinastatin I是从南太平洋Axinella sp.属, Pseudoaxiellin是从Pseudoaxinyssa nussa sp.属, Malargsiatin是从Pseudoaxinyssa sp.属海绵分离出来的3种环肽,具有抑制PS活性,其中Axinastatin IC₅₀为0.21 μg/ml。

Phakelastatin I是从印度洋助扁海蹄属(Phakellia costata)中分离出的一种抗白血病细胞活性肽(IC₅₀ = 7.5 μg/ml)。利用2D NMR、FAB MS/MS质谱联用技术分析结构为环肽(Pro-D-Thr-Phe-Ile-Phe-Se),其具有抑制肿瘤细胞生长的作用。

1.3 石海绵目(Lithistide)

此目中的Discodermia和Theonella属海绵中含有丰富的代谢产物。

Discodermins A~D是从石海绵目Discodermia kilensis Discodermin

属海绵中分离得到的一系列环肽。Discodermin A在浓度为3和1.6 μg/ml时分别抑制枯草杆菌和奇异型杆菌(IC₅₀在3.5 × 10⁻⁷ ~ 7.0 × 10⁻⁷ mol/L之间)。与大田软海绵酸合用可治疗小鼠耳炎。Discodermins A 500 μg/ml与1 μg/ml大田酸合用,可使荷瘤小鼠的瘤重从86.7%降至46.7%,肿瘤数从4.7降至1.1。具有显著的抑癌作用。

Polydiscamide A是从南美洲圣卢斯卡海岸附近274 m深处采集的加勒比海绵Discodermia sp.中分离得到的一种环肽,它与Discodermins具有相同结构特征:甲酰基取代的N末端、t-亮氨酸、Cys(OH)、Arg、Trp残基,以及Thr残基内酯化的C末端。Polydiscamide A对培养的人肺癌A549细胞具细胞毒活性(IC₅₀ 0.7 μg/ml),对枯草杆菌的MIC为3 μg/ml。

Discokidides A~D是从Discodermia kilensis属海绵中分离的环肽类,其结构中含有特殊的β-羟基酸(dicokic acid)以及β-甲氧基苯丙氨酸残基。其羧酸型具有显著细胞毒活性,对各种肿瘤细胞株的IC₅₀(μg/ml)分别为:淋巴白血病细胞P388, 2.6; P388/ADM, 7.2; 黑色素

收稿日期:1999-03-11;

修回日期:1999-10-2



瘤 BL6-BL6, 1.6; Lewis 肺癌细胞, 1.2; Lr99, 0.7; HF29, 1.2; CCD19Lu, 0.57。当分子中的羧基变为甲基酯形式时, 不再具有以上活性。

Theonella mides Ia-Ie 是从日本海蒂壳海绵 *Theonella* sp. 属中分离得到的环十三肽, 富含 β -丙氨酸和一个封闭的 N 末端。对 L_{210} 细胞具中等细胞毒作用, 同时具有抑制 Na, K ATP 酶活性。Konbamide 也是从此种海绵中提取的环肽, 结构与上述几种不同, 其主要活性为抑制超氧化物的产生。*Theonella mides F* 是此类海绵活性肽, 其结构中含有特异性的组氨酸-丙氨酸桥键, 具有抗真菌和细胞毒性。

Motuporin 是从巴布亚新几内亚的隋氏蒂壳海绵 (*Theonella sinhuoi*) 中分离得来的环肽与一种从泡沫节球藻 (*Nadularin*) 中提取的环状五肽肝脏毒素在结构上有相似之处, *Nadularin* 中的 Arg 被 Val 取代。这为海绵的一些代谢产物是通过共生的藻类或微生物产生提供了证据。Motuporin 是一种具有蛋白磷酸酶 1 抑制活性的环肽。IC₅₀ < 1 nmol/L 胞毒性 IC₅₀ (μ g/ml) 分别为: P388, 6; A549, 2.4; HEY, 2.8; LoLo, 2.3; MCF7, 12.4; UB73 MG, 2.47。Cyclotheonamides A~B 也是从此属中分离来的含特殊氨基酸的环肽, 对凝血酶、胰蛋白酶有极强的抑制活性 (IC₅₀ 0.07 μ g/ml)。

从 *Theonella sinhuoi* 属中分离的 Orbiculamide A 及从 *Theonella* sp. 属中分离的 Keramide B~D 和 F 具有相似结构, 都具中度的细胞毒作用, 而 Keramide B~D 具抑制人神经系统超氧离子产生的作用。

1.4 软海绵目 (Halichondrida)

Fenestins A~B 是从 *Leucophloeus festinata* 属海绵中提取的环肽 (L-Pro-L-Pro-L-Leu-L-Ile)。质谱碎片离子组合分析推测出它们的结构。Hymenistatin 是从膜海绵 *Hymeniacidon* sp. 中分离出, 具有对白血病细胞 P388 的细胞毒性 (IC₅₀ 0.26 μ g/ml)。

1.5 硬海绵目 (Hadromerida)

Celenamides A~D 是从东太平洋海绵 *Ciona celata* 中分离得到的具乙酰化的小肽, 体外实验证明其具降低血色素的作用。

2 海鞘多肽^[2, 3]

海鞘 (Tunicate) 属于脊索动物门, 其种类约有 2 000 多, 是被囊动物中种类最丰富的一种, 也是含有重要生理活性物质最多的一种。

自从 1980 年 Ireland 等从海鞘 *Lissoclinum patella* 中发现一个具有抗肿瘤活性的环肽 Uithiacyclamide 以来, 不断有环肽从此类海洋生物中发现。最令人瞩目的是从加利福尼亚海域及加勒比海中群体海鞘 *Tididenum* sp. 中分离出的 3 种环肽 Dideamin A~C, 它们都具有体内和体外抗病毒和抗肿瘤活性, 其中 Dideamin B 的活性最强, 对 DNA 单纯疱疹病毒 I 和 II 的抑制剂量为 0.05 μ mol/L, 对白血病细胞 L_{210} 的 IC₅₀ 为 7.5×10^{-4} μ g/ml。在 0.1 μ g/ml 量时, 对乳腺癌、卵巢癌具明显的抑制活性。同时, 它还有明显的免疫抑制活性, 体内活性较临床应用的环孢菌素 A 强 1 000 倍, 目前此药已经由美国国立癌症研究所 (NCI) 研制并进行 II 期临床试验研究, 有望成为新型抗癌药。

从 *Lissoclinum* 属海鞘中还分离出 Lissodinamide 4~8, 具有 2 个噁

唑啉环的一系列环肽。实验证明, Lissodinamide 7 具有细胞毒性, Lissodinamide 4 和 7 对 MRC5CV1 和 T24 细胞毒性 IC₅₀ 分别为 0.04 μ g/ml, 0.8 μ g/ml。Lissodinamide 4, 7, 8 对 PS 细胞的 IC₅₀ 分别为 12, 10, 6.9 μ g/ml。

从 *Lissoclinum bistatum* 属海鞘中分离得到 Bistratamides A, B 环肽, 对人体 MRC5CV1 成纤维细胞和 T24 膀胱癌细胞的细胞毒性 IC₅₀ 在 50~100 μ g/ml 之间。

3 海葵多肽^[4]

海葵 (Ane-mone) 是另一类富含海洋活性物质的海洋生物。文献报道从海洋生物海葵中提取得到的溶细胞性活性肽可分为 3 类: (1) 存在于 16 种海葵中的鞘酯抑制性碱性多肽, 平均分子量在 15 000~21 000 之间; (2) 从 *Metridium senile* 属海葵中分离得到具胆固醇抑制活性肽, 其平均分子量在 80 000 左右; (3) 从 *Aiptasia pallida* 属海葵中分离提取的、活性未知的 Aiptasiolysin A 海洋肽。

4 芋螺多肽^[5]

芋螺 (Conus) 是海洋腹足纲软体动物, 其在猎取鱼、海洋蠕虫、软体动物时常分泌一系列毒性物质, 称为芋螺毒素 (Conotoxin)。经过近 20 a 的研究已发现的芋螺毒素有近百种, 大多为由 10~30 个氨基酸残基组成的小肽, 富含两对或三对二硫键, 是迄今发现的最小核酸编码的动物神经毒素肽, 也是二硫键密度最高的小肽。其活性与蛇毒、蝎毒等动物神经毒素相似, 可引起动物出现惊厥、颤抖及麻痹等症状。

4.1 α -芋螺毒素 (α -conotoxin)



此类毒素可从芋螺毒腺管提取,但收量很少。也可在芋螺叮咬鱼时收集毒液。由于 α -芋螺毒素分子小,C末端含酰胺基,利用基因工程生产有一定的困难,现在一般采用固相合成直链肽,再环化成活性形式。化学全合成的方法也已经建立。

α -芋螺毒素与 α -银环蛇毒相似,作用与神经突触后乙酰胆碱受体(AchR)。竞争性结合受体,表现出对动物的麻痹和致死作用。由于其特殊作用,可作为分子探针来确定nAchR的不同亚型;作为分子模型,设计新药;作为研究神经性疾病如帕金森氏病、行动障碍、精神分裂症等的工具药,探讨发病机理。

4.2 μ -芋螺毒素(μ -Conotoxin)

分离得到的 μ -conotoxin GIIIA,经NMR分析,证明其结构与 α -毒素相近。利用此结构合成了一系列 μ -芋螺毒素的类似物。实验证明其生理活性与河豚毒素相似,在活化相起作用,专一性抑制敏感性钠通道。

4.3 ω -芋螺毒素(ω -conotoxin)

利用2D-NMR分析 ω -毒素GVIA的结构,发现其由3股 β -片层折叠成活性形式。其具有专一阻断神经末梢突触前膜电压敏感性钙通道作用,在小鼠脑内注射此毒素肽后,动物表现特征性震颤;一些 ω -芋螺毒素可作为探针检测不同受体亚型或作为疾病的诊断试剂,如 ω -GVLA已作为自身免疫性疾病Lambert-Eaton肌无力综合征的特异诊断试剂应用。

另一种 ω 型毒素—— ω -MMLA,作为新型镇痛药,用于艾

滋病、癌症及神经疼痛患者治疗,具有疗效确切,不成瘾等优点。

4.4 δ -芋螺毒素(δ -conotoxin)

此类毒素也作用于电压敏感性钠通道,但主要在非活化相起作用,延长动作电位持续时间。芋螺肽类可直接由基因表达而获得。与其他海洋有机物产生靠酶促反映等复杂形成过程不同,芋螺肽类可直接由核酸编码获得,但需要翻译后的进一步修饰才能达到天然活性,CDNA克隆表达 ω -GVIA已获得成功。研究表明,不同芋螺分泌不同的毒肽,且每种毒肽作用也不近相同,主要作用于钙通道、钠通道和乙酰胆碱受体。可根据其与受体特异性结合机制来研制疗效特异的新药。

5 海藻多肽^[6]

海藻(Alga)的种类繁多,其中含有的生物活性物质也较为多样。利用绿藻水提物制得一新制剂,内含多肽成分。药理实验证明其对胶原诱导的关节炎动物具有免疫抑制活性。从培养的蓝藻中分离出具有鱼毒性、抗菌、杀细胞活性的生理活性肽,其具大规模生产的能力。Hormothamin也具有良好的药用前景,它是从海藻*Pyramisium patelliferum*属中提取的毒素肽,具有溶细胞、细胞毒和神经毒等活性,其作用机制主要是影响脑垂体细胞道静止期的钙离子通,提高电压敏感性钙离子通道的释放,促进脑内激素如催乳素的分泌增加而产生作用。从蓝-绿海藻*Lyngbya majuscula*属中分离到一具细胞毒活性的环肽Majusculamide C,其对X5563骨髓瘤细胞的抑制

效果达到35%。

6 鱼类多肽^[7,8]

鱼类是人们最早食用的海洋生物之一,其体内含有丰富的蛋白质成分,营养价值相当高。但从其中开发具有药用价值的活性物质的研究却较少。曾有报道从铜吻蓝鳃太阳鱼中分离并鉴定出4种具缓激肽活性的肽类,对鱼肠组织细胞具有强烈的刺激作用。Reid等报道从大西洋鲑鱼(*Gadus morhua*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、欧洲鳗鱼(*Anguilla anguilla*)等鱼类的嗜咯细胞组织中提取到一系列的生物活性肽及其类似物,并利用免疫组织化学方法研究其在细胞组织中的作用,发现此类肽与肾上腺素类受体具有一定的亲合性,可能具有控制儿茶酚类物质释放的作用。

7 其他多肽^[9]

从烫灼或自主运动的一种海星所分泌的体液中分离纯化到一种自主刺激因子(Autonomy promoting factor, APF)。凝胶电泳确定其分子量为1200, HPLC检测为单峰组分。具有刺激细胞运动、使之产生应激反应的功能。

从印度海兔(*Dolabella auricularia*)中分离到10种细胞毒性环肽Dolabelatin 1~10。其中Dolabelatin 10对B16黑色素瘤治疗剂量仅为1.1 $\mu\text{g/ml}$,是目前已知活性最强的抗肿瘤化合物之一。

从海洋贝类(Mollusk)的神经元中提取到两种神经肽Pd5和Pd6,它们具有刺激并促进神经元生产的活性。利用HPLC方法纯化并对其氨基酸序列进行了分析。现已完成其结构的全合成。

8 结语

海洋生物物种的多样性以及所含化合物的特异性,给海洋生物资源的开发利用提供了许多机遇与挑战。就目前研究情况来看,海洋活性肽的研究主要集中在海绵、芋螺等少数几种生物体中,还有很大一部分海洋生物的活性肽成分没有被发现或开发出来。就已研究的海洋活性肽中,大多为海洋环肽,虽然它们的作用都很明确,但因其多含 D 型氨基酸、多种基团修饰、封闭的 N 末端等特殊结构,给研究开发带来一定困难。不易利用

蛋白质工程、基因工程方法大规模生产。鉴定分析仪器要求高,大多需使用 2D NMR, FAB MS 等方法。目前已开发的海洋活性肽类,多采用全合成及固相合成等方法。如何利用蛋白质工程技术与基因工程技术生产海洋多肽物质是未来的一个研究方向。

参考文献

- 1 Henry, J. et al.. *Peptides*, 1997, **18**(10) :1 469
- 2 Lee, I. H., Zhao, C. Q. et al.. *FEBS Lett.*, 1997, 400:158 ~ 162
- 3 Faulker, D.J.. *Nat. Prod. Rep.*, 1998, **15**(2) :113

- 4 Eduardo, M. S., et al.. *Toxicol.*, 1997, **35**(12) :1 699
- 5 Fenical, W.. *Trends Biotechnol.*, 1997, **15**(9) : 399
- 6 Kormprobst, J.M. et al.. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 1998, **119**(13) :1
- 7 Kinjo, S. et al.. *Pept. Chem.*, 1995 (pub 1996), 33: 189
- 8 Reid, S. G. et al.. *Cell Tissue Res.*, 1995, **280**(30) : 499
- 9 Lloyd, P. E. et al.. *Peptides* (*Tarntwon*, N. Y.), 1996, **17**(1) : 17

(本文编辑:张培新)