

海洋肽类活性物质的研究概况*

STATUS OF MARINE PEPTIDE ACTIVE SUBSTANCES STUDIES

陈慧萍 吴文言 徐安龙

(中山大学生命科学院海洋生物功能基因组开放实验室 广州 510275)

现代海洋生物活性物质的研究始于 60 年代, 迄今为止已经发现具有重要生理及药理活性的化合物达 2 000 多种。近 10 多年来, 我国的海洋药物研究与开发也取得很大的进展。据初步统计, 我国近海已发现具有药用价值的海洋生物达 700 多种。许多具有免疫、抗炎、抗肿瘤、抗病毒以及作用于心血管系统和神经系统的活性物质先后被分离提纯, 并且对其中结构特殊、作用强烈的物质进行了人工合成或结构改造, 以求开发可供临床应用的新药。从海洋生物中得到的生物活性物质种类繁多, 包括有多肽类、萜类、生物碱类、大环聚酯类、聚醚类等化合物。其中的肽类物质具有研究和开发为基因工程药物的应用潜力, 因此下面仅就主要的海洋肽类活性物质的研究状况作简要介绍。

1 肽类毒素

肽类毒素研究是海洋活性物质研究中发展最迅速的重要领域之一。海洋动物肽类毒素作为一种攻击或防卫的武器, 往往含多种神经、心血管、细胞毒素, 一般以神经毒素为主。它们经分离纯化, 具有很好的麻醉、强心、抗癌、抗菌和抗病毒作用, 很有希望从中开发出可用于神经系统、心血管系统疾病治疗的特效药物。海洋生物肽类毒素具有毒性作用强烈、药效高、作用剂量小等特点, 而且分子量相对较小, 容易通过基因工程技术进行大批量生产。已研究的肽类毒素约有 40 余种, 其中研究最多的是海葵毒素、芋螺毒素和海蛇毒素等。

1.1 海葵肽类毒素 (Ane monetoxins)

海葵 (Sea anemones) 是一种腔肠动物, 在热带及温带海域中广泛分布, 海葵触手中含有丰富的肽类神经毒素和细胞毒素。海葵肽类毒素大都是一些小于 5 kD 的小分子多肽, 对离子通道有很强的选择性作用, 影响神经系统和心肌系统。已知海葵毒素有主要作用于钠通道的三类毒素, 分别与钠离子通道的不同特异受

体结合。最近又从隆脊海葵 *Bunlosoma ganlieim* 中得到作用于钾离子通道的神经毒肽。从海葵中还分离出 60 余种细胞溶素类毒素 (Cytolysin), 分子量在 15 ~ 20 kD 之间, 它们不作用于专一性受体, 而能选择性地与细胞膜的脂质结合, 引起疼痛、炎症及肌内麻痹等^[1]。

海葵毒素一般具有增强心肌收缩的作用, 是一个治疗心衰的极有潜力的海洋药物。如已开发的黄海葵强心肽 (Anthopleurin, Ap) A, B, C 有显著的强心作用。其中 ApA, ApB 均为含有 49 个氨基酸残基的多肽, 含有 3 对二硫键, 其序列已被测定, ApB 的强心作用较 ApA 高十几倍。1992 年 Gallagher 等人人工合成了 ApB 基因, 在 *Escherichia coli* 中成功地表达 ApB 与 *E. coli* T₄ 噬菌体基因-9 产物构成的融合蛋白, 纯化后经二硫键的修饰及蛋白酶酶切除去基因-9 产物, 重组蛋白在氨基酸序列、二级结构、高压液相层析迁移率及生物活性方面均与天然 ApB 相同。另外, Michael 等还合成并表达了 ApB 基因的突变形式 GR ApB, 其产物的氨基末端比天然 ApB 增加了一个甘氨酸残基和一个精氨酸残基, 但其生物活性及专一性也与天然 ApB 相同, 这一工作为 ApB 精细结构的分析及定位突变奠定了基础。1996 年 Kelso 等运用点突变技术对 ApB 的结构和功能进行了研究, 结果表明 Asp⁹、Lys³⁷ 的单点突变使 ApB 的活性降低为原来的 1/7 ~ 1/12, 而疏水残基 Leu¹⁸ 的突变使 ApB 活性降低为原来的 1/200 以下。此外 Arg¹²、Lys⁴⁹ 在 ApB 对电压敏感性钠通道的识别中起决定性的作用^[14, 15]。

1996 年王维荣等在青岛侧花海葵 *Anthopleum qingdaoensis* 提取的多肽中, 除分离到与 ApA、ApB 相对应的成分外, 还发现一个含量极低而活性远高于 ApB 的未确定成分。对与 ApB 相当的成分进行氨基酸分

* 国家 863 计划资助项目 819-06-06。

收稿日期: 2000-06-28; 修回日期: 2000-10-10

析与结构分析表明,该活性多肽化学结构与 ApA、ApB 均不同,介于两者之间。青岛海葵毒素可增加心肌收缩力,并有降血脂、抗凝血、降低血液黏稠度、抑制血栓形成以及改善心肌梗塞等作用。国内已有科研单位根据测定得到的氨基酸序列,人工合成了该基因,并在大肠杆菌中以融合蛋白的形式,在枯草杆菌中以分泌蛋白的形式进行表达,均得到了目的产物^[2]。

此外,海葵毒素还有抗癌作用。由沙海葵 *Paralythoa liscia* 中分离出 4 种抑制 P₃₈₈ 淋巴白血病(PS)的低分子量肽类 Palystatin A, B, C, D, 它们由 17 种氨基酸组成,其中 A 和 B 为糖肽, C 和 D 为相对应的肽,分子量分别为 4.5, 4.3, 3.3 和 3 kD。Palystatin A, B, C, D 对体外 PS 瘤系细胞系的 ED₅₀ 分别为 0.002 3, 0.020, 0.001 8 和 0.022 μg/ml。另外,从加勒比海海葵 *Stichodactyla helianthus* 中提取的一种分子量为 17.4 ~ 18.2 kD 的肽类毒素也可抑制肿瘤细胞的增殖。

1.2 芋螺毒素(Conotoxins, CTX)

芋螺(Conus)属于腹足纲 Gastropoda 软体动物,捕食时可释放神经麻痹性肽类毒素。芋螺毒素组成复杂,包含有对不同生物有良好选择性和具有多种神经系统作用的许多有毒肽类,构成了一种密切协同作用的毒素体系。已知芋螺毒素均为一些含 2 对或 3 对二硫键,由 10 ~ 30 个氨基酸残基组成的小分子肽,是目前发现最小的神经毒素肽,也是二硫键密度最高的小肽。目前已经分离鉴定了上百种的芋螺毒素,根据它们对神经肌肉系统的作用部位不同,分为 6 种类型:(1) α-芋螺毒素(α-CTX),与 α-银环蛇毒素相似,作用于神经突触后乙酰胆碱受体(AchR),起阻断作用。(2) μ-芋螺毒素(μ-CTX),与河豚毒素相似,在活化相起作用,专一抑制电压敏感性钠通道。(3) ω-芋螺毒素(ω-CTX),专一阻断神经末梢突触前的电压敏感性钙通道,为突触前毒素。(4) δ-芋螺毒素(δ-CTX),也专一作用于电压敏感性钠通道,在非活化相起作用,延长动作电位持续时间^[5]。(5) κ-芋螺毒素(κ-CTX),在活化相起作用,专一抑制电压敏感性钾离子通道。(6) λ-芋螺毒素(λ-CTX),这是最近才发现的一类新的芋螺毒素,二硫键构型与 α-芋螺毒素不同,功能有待进一步的研究^[11-13]。芋螺毒素使动物致死的原因是由于呼吸衰竭和心跳停止,说明芋螺毒素主要是干扰或阻断神经-肌肉的信息传递。除以上主要类型外,从芋螺中还陆续分离出一些其他种类的麻痹性神经毒素和一些具有其他生理活性作用的肽类物质,如具有催眠作用的芋螺睡眠肽和具有加压素作用的芋螺加压素。

研究发现 α, μ, ω-CTX 都存在 6 ~ 10 种同源化

合物,由一些结构保守但功能多样性的肽类组成。这些肽类保持其活性的必要条件是二硫键构型不发生变化,但二硫键之间的功能域片段各不相同,使毒素对不同生物物种有不同的选择性。芋螺毒素具有多样性的特征,因此构建芋螺毒素 cDNA 文库,从中筛选新毒素基因已成为研究新芋螺毒素及其分子特征的重要途径之一。迄今已构建 cDNA 文库的芋螺种类有:织锦芋螺 *Conus textile*、幻芋螺 *C. magus*、地纹芋螺 *C. geographus*、金翎芋螺 *C. pennaceus* 等^[3]。

芋螺毒素具有海洋生物活性物质的原始性和多样性的特点,结构新颖,功能独特,既可直接用作天然药物,又可以作为设计新药的先导化合物。由于芋螺毒素对受体的结合具有高亲和性和高度专一性,因此成为神经生物学中发现鉴定新受体、研究受体构效关系及其调控细胞活动分子机理的重要分子探针,并对研究离子通道具有重要意义^[14]。目前使用的很多药物由于对靶受体的组织特异性较低,副作用较大而影响了治疗效果,而芋螺毒素可以克服此缺陷,因而在新药研制方面格外受到重视,具有诱人的应用前景。目前国外对芋螺的研究涉及蛋白质化学、药理学、神经科学及分子生物学等领域,并取得了一些令人瞩目的成果。对芋螺毒素进行分子生物学研究,一方面有助于深入研究神经受体,另一方面依据与受体的特异结合研制特效新药,并可以在克隆表达的靶受体上设计和筛选高效新药,对海洋制药工业具有重要意义。我国有丰富的芋螺资源,因此开发利用我国芋螺资源不仅具有理论价值,而且具有重要的现实意义。

1.3 海蛇毒素(Sea snake toxins)

我国沿海栖居着 15 种海蛇,全部是毒蛇。这些海蛇的毒液毒性极强,比陆地上最毒的蛇毒还要强得多。海蛇毒与陆地蛇毒相似,也是多种蛋白的混合物,冷冻干燥后的蛇毒中多肽占 90% 左右,主要包括酶、多肽毒素和小肽等 3 类。酶的分子量均在 11 ~ 15 kD,主要有: L-氨基酸氧化酶、磷酸二酯酶、核苷酸酶、肽酶、磷脂酶等,多数为水解酶,起消化作用。几乎所有的陆地和海洋毒蛇的毒液中均含有透明质酸酶,它有利于蛇毒成分通透组织屏障,使之迅速扩散到组织细胞中发挥毒性作用。某些酶有直接毒性作用,如磷脂酶能破坏膜结合的磷脂,引起细胞溶胞,有的磷脂酶能专一性地直接作用于肌细胞的突触前膜上,损伤神经末梢和骨骼肌,同时影响神经递质的释放、合成、贮存和转换^[1]。

多肽毒素是蛇毒的主要成分,分子量均在 5 ~ 10 kD 之间。几乎全部海蛇毒中的多肽毒素与眼镜蛇科的毒素基本相似,均为突触后神经毒素,又叫 α-神经

毒素(α -neurotoxins),突触后神经毒素主要作用于骨骼肌突触后膜上的菸碱型乙酰胆碱受体,阻断突触后神经传递,主要是阻断胆碱能神经肌肉接头部位,引起呼吸肌麻痹而导致窒息死亡。经一级结构分析,海蛇神经毒素可分为短肽链和长肽链两种。短肽链神经毒素由60~62个氨基酸残基组成单肽链,有4个二硫键;长肽链由66~74个氨基酸残基组成,有5个二硫键。海蛇毒中不含有心脏毒素,对心脏血管和心肌的作用不是主要的致死原因^[4]。

作者所在的实验室已构建了高质量的平颞海蛇和青环海蛇的cDNA文库,并从文库中筛选得到多个短链、长链神经毒素新基因。把它们重组到本实验室构建的融合表达载体中,在*Escherichia coli*中获得高效的表达。动物实验表明均具有明显的神经毒性(另文发表)。

海蛇毒免疫学研究发现,一种海蛇的抗蛇毒抗体能中和几种不同蛇毒液的毒性,如裂颞海蛇毒的抗毒素能中和7~8种海蛇毒素,而且还能中和多种陆地蛇毒如蝥蛇、眼镜蛇、眼镜水蛇等的蛇毒,所以海蛇毒素抗血清有广泛应用价值。海蛇与其他毒蛇一样,具有祛风湿、活络、滋补强壮的功能,民间常用活蛇浸酒治疗风湿性关节炎。蛇毒还具有镇痛作用,对神经炎、恶性肿瘤、神经疼及神经性麻风等引起的疼痛都有缓解效果,而且止痛作用快,用量少,连续用药不会产生耐药性,无成瘾性,是一种较理想的镇痛剂。随着海洋药物的深入研究,海蛇毒素定将成为海洋新药的先导物。

1.4 水母毒素(Physaliatoxin)

水母(Sea nettle)是一类腔肠动物,供药用的水母有个别属于水螅纲,一些是钵水母纲动物。水母在口腕部的外胚层中藏有刺丝细胞(Nematocysts)或螫刺细胞(Stinging cells),一旦受到刺激,大量刺丝细胞一齐发射,同时放出毒液。已证明刺丝细胞的主要有毒成分为蛋白质毒素,分子量在50 000~100 000 D之间。

属于水螅纲的僧帽水母*Physalia physalis*刺丝囊中水母素(Physaliatoxin)的冻干粗毒中有9个肽成分,其中3种毒肽分子量分别是69 000,82 000,50 000~65 000,并含有溶血素磷脂酶A和B。如霞水母科Cyaneidae有很多触手,人被刺伤后形成条形红斑,引起肌肉疼痛,呼吸困难和黏液分泌亢进等,以心脏毒为主。细斑指水母*Chiropsx fleckeri*和方指水母*C. quadrangatus*的毒性最大,中毒严重可致死,尸检发现肺水肿,右心扩大和血管充血。细斑指水母又称海

黄蜂,其毒素对藤壶、鱼类及各种温血动物能引起平滑肌强烈收缩、麻痹,呼吸障碍与心脏障碍,还可使副交感神经的机能异常。这种毒素具有强烈的心血管毒性,还有溶血、溶细胞、皮肤坏死和其他细胞毒作用。

总的来说,水母毒肽有心脏毒性的、细胞毒性的、皮肤坏死的等等,但以溶血性的毒素居多。溶血性往往是由磷脂酶等溶血素直接造成的。这些毒素主要作用于离子通道,膜通透性蛋白及膜上的离子泵。通过作用于离子通道对心脏、血管产生影响,从而引起血压和心电图改变及造成细胞毒性。水母毒素有可能发展为作用于心血管系统、中枢神经系统和肌肉的药物^[1]。

1.5 章鱼毒素(Cephalotoxin)

1959年Ghitetti等从商乌贼*Sepia officinalis*、大腕蛸*Octopus mcropus*和麝香蛸*Eledone moschata*的唾液腺和唾液中分离出一种有毒的活性蛋白成分,定名为章鱼毒素或头足类毒素。此毒素蛋白不耐热,分子量小于5 kD,能被胰蛋白酶所灭活,水解后可得11或18个氨基酸残基。该毒素由于干扰可兴奋膜 Na^+ 通透性,而阻断神经末梢的传导,很快导致神经肌肉麻痹,特别是膈神经传导阻断,引起呼吸困难,甚至衰竭,但无显著的直接心脏毒作用。

章鱼毒素具有多方面的药理作用。微量的章鱼毒素能使试验动物动脉血压明显降低,它的作用大大超过包括血管缓激肽和组胺在内的常见降血压缩氨酸。章鱼毒素具有提高冠状动脉血流的能力,加强心脏输出和消除胸骨后疼痛,也能增强心肌活性和减少外周血管阻力。章鱼毒素具有珍贵的药理特性还因为它在静脉注射时能提高人血的纤维蛋白溶解活性,防止血栓形成。近年研究还证明章鱼毒素可提高人体白血球吞噬细胞的活性,提高毛细血管渗透性,亲肌作用和加强动物胃肠道的运动机能。

1.6 海胆毒素

海胆的生殖腺和叉棘含有海胆毒素。从毒棘海胆*Toxopneustes*中分离出一种肽类毒素,能使青蛙心脏周围的血管产生暂时收缩,对平滑肌有明显收缩作用,胰凝蛋白酶能使其失去活性。从有毒的绿海胆*Strongylocentrotus droebachiensis*中分离得到的Strongylostatin 1和2均为糖蛋白,具有抗肿瘤活性。白棘三列海胆(*Tripneustes gratilla*)中存在着高毒性的肽类蛋白质。毒腺提取物具有多种药效,不仅能抑制肿瘤细胞,而且对离体平滑肌具有收缩作用。这种物质溶于水,不可透析,在pH 4.3~10.6范围内是稳定的,但此物质不耐热,在45.0~47.5℃时可被灭活。用大约

2/3 饱和和硫酸铵溶液能被沉淀出来。其主要作用是释放组胺或产生激肽。

海胆毒素的作用各不相同,有的可引起动物呼吸困难、肌肉麻痹、抽搐以至死亡,有的对动物的红细胞有溶解作用,并能引起心脏的激活和使肌肉对非直接性刺激不起作用。

2 其他直链肽类活性物质

2.1 海藻凝集素(Algae lectin)

凝集素又称选择素,能一次性地识别并结合生物膜或溶液中的某种特定的糖链结构而呈现出多种生物活性,可凝集各种细胞及对复合糖质有沉降作用等,已作为生化及临床试剂,广泛应用于研究领域。凝集素所识别的糖链结构一般因其种类而异,所以开发新型的具有糖链识别能力的新的凝集素倍受关注。已证实多种海藻中存在凝集素,而且与源于陆地生物的凝集素相比有其独特的性状,可作为凝集素的重要来源。迄今为止,已从 10 种绿藻和 13 种红藻中分离出凝集素。具有强凝集素活性的海藻集中在绿藻中松藻目的羽藻科、蕨藻科及松藻科,红藻科中杉藻目的红翎菜科、江藻科,红皮藻目的仙菜科及松节藻科。

已分离的海藻凝集素,与源于其他生物的凝集素一样,均不是糖蛋白而是单纯的蛋白质。但海藻凝集素在分子量及亚单位结构的有无方面,与多数陆生植物凝集素不同,其特征是分子量低(10 000 ~ 30 000 D 左右),且多数以单体形式存在。海藻凝集素的氨基酸组成多为甘氨酸、丝氨酸及酸性氨基酸,等电点 4 ~ 6,均属酸性蛋白质。有研究表明红藻冻沙菜凝集素 *Hypn* A2 的氨基酸排列与源于其他生物的凝集素无同性,具热稳定性,在 100 °C 时加热 30 min 也不失活,这种耐热性极高的新型凝集素在工业、医疗等领域具有极高的应用价值。

海藻凝集素具有多种生物活性。如红藻的羽状翼藻凝集素对肿瘤细胞、淋巴细胞、鱼类精子、酵母、海洋细菌及单细胞蓝藻有强凝集活性。与豆科植物凝集素不同,多数海藻凝集素并不需要二价金属离子的存在就可显示活性。几乎所有的海藻凝集素对人淋巴细胞均有强的激活能力,其中对人 B 淋巴细胞有特异性的海藻凝集素开发利用价值大。冻沙菜凝集素 *Hypn* A2 在低浓度下能抑制血小板凝集。粗状红翎菜的 3 种同族凝集素和冻沙菜凝集素在体外分别能抑制白血病细胞 L₁₂₁₀ 及小鼠乳腺癌细胞 FMA 增殖,可望作为抗癌剂或癌症研究用药。

2.2 藻胆蛋白(Phycobiliprotein)

藻胆蛋白主要存在于蓝藻、红藻、隐藻和少数一些甲藻中,其主要功能是作为光合作用的捕光色素复合体。藻胆蛋白不仅在光合作用原初理论研究方面颇具优越性,而且是很具有开发价值的食用、饵料蛋白资源。目前研究还发现藻胆蛋白具有一定的医疗药用价值。

藻胆蛋白主要有藻蓝蛋白(Phycocyanin)、藻红蛋白(Phycocerythrin)、藻红蓝蛋白(Phycocyanin)和别藻蓝蛋白(Allophycocyanin)四大类。藻胆蛋白是一类寡聚体蛋白,由 α 和 β -亚单位构成,亚基分子量在 17 ~ 22 kD 之间,少数还存在 γ -亚基,分子量约为 30 kD。每种亚基是由脱辅基蛋白(Apoprotein)和开链四吡咯结构的色基组成。色基又称藻胆素,分别为藻红胆素(PEB)、藻蓝胆素(PCB)、藻尿胆素(PUB)和 Phycobilivardin(PXB) 4 种^[5]。

藻蓝蛋白是藻胆蛋白中的一种,实验证实它可开发为光敏剂用于激光治癌。1988 年 Morcos 等用藻蓝蛋白处理培养小鼠骨髓癌细胞,再经激光辐照,发现癌细胞存活率仅 15%。而单独用激光辐照或藻蓝蛋白处理的细胞存活率为 69% 和 71%。1995 年,蔡心涵等用钝顶螺旋藻 *Spinelina platensis* 中提取的藻蓝蛋白处理人大肠癌细胞株 HR₈₃₄₈ 后,经 630 nm 铜激光辐照,癌细胞存活率显著降低。在另一项实验中,给 S₁₈₀ 移植瘤小鼠分别注射 2 mg 或口服 20 mg 藻蓝蛋白后,再用铜激光辐照 15 d,有效杀死率分别为 60% 和 53%。上述研究结果,说明藻蓝蛋白的确具有光敏作用和良好的抑癌作用,且藻蓝蛋白无毒无副作用,是一种理想的光敏剂。

1982 年 Iijima 等和 1983 年日本 Dainippon Ink & Chemicals 公司的研究都发现,接种了肝癌的实验组小鼠口服藻蓝蛋白后比对照组小鼠的成活率明显提高,且实验组小鼠的淋巴细胞活性明显高于对照组以及正常小鼠,这说明藻蓝蛋白对免疫系统有某种刺激和促进作用。2000 年张成武等报道了螺旋藻藻蓝蛋白对人血癌细胞株 HL-60、K562 和 U937 的生长均有不同程度的抑制作用,可望开发成为一种抗癌剂^[6]。秦松等从钝顶螺旋藻 *Spinelina platensis* 等 4 种蓝藻中克隆了别藻蓝蛋白(APC)基因并进行了全序列测定,运用重组 DNA 技术,以融合蛋白的方式在大肠杆菌中获得了重组 APC 的高效表达。该表达产物经动物实验证明其对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤有显著的抑制作用^[2]。

藻蓝蛋白除了能提高机体免疫力和防癌抗癌作

用还可刺激小鼠粒单系祖细胞和造血干细胞的形成;具有类似 EPQ (促红细胞生成素) 作用,对骨髓造血有刺激作用;还可降低重金属和药物肾毒性及放射防护作用等等,因而其重要性已日益为人们所重视,应用前景非常广阔^[7]。

2.3 鲎试剂(Limulus amoebocyte lysate, LAL)、鲎素(Tachyplesin)及其类似物

鲎,隶属节肢动物门 Arthropoda, 现存的有 3 个属 5 个种。其中东方鲎属中的东方鲎(又叫中国鲎) *Tachyplesus tridentatus* 分布于我国沿海的浙江、福建、台湾、广西和广东。鲎的血液能提取鲎试剂,后来又发现鲎素对真菌、流感病毒 A、口腔疱疹病毒及获得性免疫缺陷综合症病毒(HIV)有抗性。所以鲎是可大力开发的珍贵海洋药用动物资源^[8]。

鲎试剂即鲎变形细胞溶解物,是用无菌法采取鲎血,离心分离血球和血浆,去掉血浆,低渗破裂血细胞,最终添加辅助剂而得。鲎血细胞含两种颗粒,即体积大而电镜下密度较小的大颗粒和体积小而电镜下密度较大的小颗粒,鲎试剂成分主要存在于大颗粒上。鲎试剂主要成分包括有凝固酶原、凝固酶、凝固蛋白原、抗脂多糖因子、激活因子 C、B、G 等多种蛋白质。这种鲎试剂遇内毒素能迅速形成凝胶,具有灵敏快捷、简便经济和重复性好的特点,已被广泛应用于检测生物学、医学研究、药学及环境卫生学中的痕量内毒素等的检测。

鲎素是 1988 年 Nakamura T. 等从中国鲎血细胞碎屑里用酸提取法得到的一种 17 氨基酸的抗菌肽。鲎素抗菌肽主要存在于鲎血细胞里的小颗粒中,它通过和细菌脂糖形成复合物,在低浓度下就能抑制革兰氏阴性及阳性细菌的生长。鲎素似乎是一种防止体外微生物入侵的自我防御的抗菌肽。鲎素还能以抗脂多糖因子相似的方式以脂多糖为媒介,强烈抑制鲎血液凝集系统的因子 C,有抗凝血作用。鲎素在低 pH、高温下相当稳定,是一种很有应用潜力的抗菌活性物质。

1989 年, Myata 等发现了鲎素 II (Tachyplesin II)、美洲鲎素 I (Polyphemus I)、美洲鲎素 II (Polyphemus II)、鲎素 III (Tachyplesin III) 等系列鲎素类似物,它们的氨基酸组成、结构、生物活性均和鲎素相似。1995 年 Saito 等又在美洲鲎血细胞大小两种颗粒上发现一种 79 个氨基酸,分子量为 9 kD 的大防卫素(Big defensin)。1996 年, Kamiabata 在鲎血细胞的小颗粒上发现一种 73 个氨基酸,分子量为 8.5 kD 的

Tachycitin。这两者都是阳离子抗菌肽,具有和鲎素相似的结构和生物活性。1992 年, Masuda M. 等人工合成一种 18 个氨基酸的鲎素类似物 T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷] Polyphemus II)。T22 能与 gp120(一种 HIV 囊膜蛋白) 结合,又能与 CD4(一种 T 细胞表面蛋白) 结合,阻止 HIV gp120 蛋白和 T 细胞 CD4 表面相识别及融合,从而达到抗 HIV 病毒的作用。T22 具有强烈的抗 HIV 活性,它的 IC₅₀ 是 2.6 nmd/L,比高效抗 HIV 药物 AZT (Azidothymidine, 3'-叠氮-3'-去氧胸腺嘧啶) 的 IC₅₀ (5.2 nmd/L) 还要高,是一种高效低毒抗 HIV 药。1999 年 Xu Y. 和 Tamamura H. 等报道了一系列 T22 类似物 TW70、T131、T134 和 T140,它们与 T22 相比少了 4 个氨基酸残基,但抗 HIV 的活性比 T22 高,而且细胞毒性都比较低^[15-16]。

2.4 麝香蛎素(Eleodisin)

麝香蛎 *Eledone moschata* 和阿氏麝香蛎 *E. atrovirens* 是头足纲八腕目动物,从它们的唾液中提取出一种具有生物活性的肽,即麝香蛎素。它是一种内癸肽(Endecapeptide),氨基酸序列为:焦谷氨酸-丙氨酸-苯丙氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-亮氨酸-甲硫氨酸酰胺。麝香蛎素的肽类是已知最有效的降压物质,生物活性主要在于 C-末端结构。此肽已能人工合成,它的 8 肽、9 肽和 10 肽衍生物一样具有生物活性,甚至比麝香蛎素更有效。低浓度的麝香蛎素可引起豚鼠支气管及兔离体结肠与子宫平滑肌的收缩,其催产作用比催产素还要强。麝香蛎素还具有强烈的外周血管舒张和增加冠状动脉血流的作用,能使某些外周血管疾病的患者增加血流和降低外周血管阻力^[1]。

2.5 鲨鱼软骨血管形成抑制因子

鲨鱼属脊椎动物门软骨鱼纲 Chondrichthyes,是自然界中极少患恶性肿瘤的动物之一,对癌细胞有极强的免疫力,可能是因为鲨鱼的骨骼是缺少血管的软骨组织。肿瘤生长依赖于血管形成,在血管网形成前肿瘤细胞的增殖速度为线性关系,但当血管网形成后其生长速度为指数关系。一般长到 1 cm 的肿瘤细胞就能分泌多种血管形成因子(Tumor angiogenesis factor)诱导血管增生,但与肿瘤良恶性无太大关系。科学实验还证明肿瘤周围血管丰富程度与肿瘤细胞转移相关。血管生成抑制因子(Angiogenesis inhibitor)通过阻止肿瘤周围毛细血管生长,使肿瘤细胞得不到氧和营养物供应,可达到抑制肿瘤生长的作用,而处于外围的正常细胞仍能继续生长^[17]。

鲨鱼软骨提取物中含有一种血管生成抑制因子

(Cartilage derived angiogenesis inhibitor), 它能抑制新生血管形成, 并能抑制哺乳动物胶原酶, 还能抑制使血管内皮细胞基底膜溶解的蛋白酶的活性。鲨鱼软骨抗血管形成因子是一种多肽, 分子量在 1 000 ~ 10 000 D 之间。它很耐热, 在 100 °C 2 min 或 37 °C 2 h 处理后, 仍保持生物学活性。1998 年, Shen 等报道, 从鲨鱼软骨中获得一种血管生成抑制因子 (U995), 由分子量分别为 10 kD 和 14 kD 的两条多肽组成, 能抑制体内、外血管生成和小鼠肿瘤的生长^[18]。从我国东海鲸鲨软骨中制备获得一种新的血管生成抑制因子 SCAFI, 分子量为 18 kD, 对原代培养的血管内皮细胞生长繁殖与运动迁移有明显抑制效应。动物实验表明它显著抑制 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌的生长, 当剂量达到 5.0 mg/(kg·d) 时, 抑瘤率达 87.93%^[9]。鲨鱼软骨血管生成抑制因子作为抗肿瘤药是非特异性的, 对肺癌、肝癌、乳腺癌、消化道肿瘤、子宫颈癌和骨癌等有丰富血管网的实体瘤有治疗作用。鲨鱼软骨还能治疗其他血管增生性疾病, 如牛皮癣、痛风性关节炎和糖尿病引起的视网膜病变等。

通过抗新生血管增生达到抑制肿瘤的目的是当今抗癌研究与治疗的热点。根据统计现有 24 种以上血管抑制因子进入临床 I、II 和 III 期试验, 国内已有“沙克一号”产品进行临床试验^[19]。为了进一步开发利用鲨鱼软骨的抗癌作用, 应积极开展鲨鱼软骨抗血管形成因子结构和功能的分析, 并通过化学方法进行基因修饰、改造以增强其抗血管形成和抗肿瘤效果, 或用基因工程方法进行生产。

2.6 降钙素(Calctonin, CT)

降钙素是由 32 个氨基酸组成的直链多肽类激素, 主要存在于哺乳动物甲状腺滤泡旁细胞中和鱼类(鲑鱼、鳟鱼、鳊鱼、鲨鱼)后鳃体组织中。

从鲑鱼 *Oncorhynchus gorbuscha* 提取的鲑降钙素(salcalcitonin, sCT) 活力最高, 它比猪降钙素活力高 20 倍, 比人降钙素高 10 倍。鲑降钙素由于结构中氨基酸组成不同又分为鲑降钙素 I、II、III 和 IV。降钙素氨基酸组成和它的生物学活性有密切关系, 特别是末端羧基的脯氨酸对活性影响很大。如果将脯氨酸去除, 则其活力几乎全部消失。在所有降钙素中, 鲑降钙素最不易降解, 半衰期比其他降钙素长。1996 年 Dix 等将分离到的 sCT 基因在大肠杆菌中以融合蛋白的形式进行表达, 得到的目的产物 GSTsCT 具有一定的免疫活性, 有望通过基因工程技术生产该药物。

降钙素具有调节、降低血中钙、磷作用, 可保证骨

中钙、磷的储存, 对骨骼起保护作用。鲑降钙素对肾脏有两种不同的作用, 其一是促使 P, Na, K, Ca 和 Mg 的排泄; 另一种是促进肾脏产生 1, 25-二羟基胆固固醇, 对维生素 D 代谢起间接作用。降钙素尚抑制胃酸分泌, 促进胃液素、甲状腺刺激素和胰岛素的分泌。鲑、鳟降钙素已应用于临床, 主要用于治疗高钙血症和骨科疾病, 如治疗骨转移性肿瘤的高钙血症、变形性骨炎、老年性骨质疏松症和成骨不全及早期诊断甲状腺髓样癌等^[20]。

3 环肽(Cyclic peptides)

3.1 海兔毒素(Dolastatins)

截尾海兔 (*Dolabella auricularia*) 是属于 Aplysiomorpha 目的海洋腹足类软体动物, 已分离出 15 种以上的海兔毒素 (Dolastatins), 为环肽类化合物, 具有强烈抑制癌细胞生长的作用^[21]。研究得较多的是 3, 10, 15。其中 Dolastatin 10 已经进入临床 I 期及临床 II 期实验阶段。Dolastatin 10 是一种四肽, 其中 3 个为特殊氨基酸, 它能抑制肿瘤细胞的微管聚合作用, 是一类新型强效的微管蛋白结合化合物。在体外抗肿瘤筛选中, 它对 P388 和 L1210 白血病细胞、B16 黑色素瘤、LOX 人黑色素瘤、M5076 子宫瘤和 DU145 人前列腺癌都有非常好的治疗效果。近年来, Pettit 和 Kobayashi 等还对 Dolastatin 10 和 Dolastatin 15 进行了全合成、结构修饰和构效关系研究, 修饰产物 Auristatin PE、LU103793 和 TZF1027 已经进入临床 I 期实验研究阶段^[22-23]。最近还发现 Dolastatin 10 具有强烈的抗真菌活性。截尾海兔 Dolastatin 3 的结构为环 [脯-亮-缬-(谷酰胺)Thz(甘)Thz], 除了常见的氨基酸外, 含有两种新的噻唑氨基酸(甘)Thz 及(谷酰胺)Thz, 抗癌活性强, 可能有助于从噻唑氨基酸发展成新型抗肿瘤制剂。

3.2 膜海鞘素(Didemins)

海鞘 (*Ascidian*) 属于脊索动物门的尾索动物亚门, 又称为被囊动物 (Tunicate)。近年来, 在海鞘代谢物中发现许多结构新颖、活性独特的化合物, 引起天然产物化学家及药物学家的注意, 成为海洋天然产物化学研究的热点之一。其中从海鞘分离出的环肽, 因其大多具有抗肿瘤活性而受到重视。

1981 年 Rinehart 等首次从加勒比海海鞘 *Trididemnum solidum* 中分出并测定了 Didemins A、B 和 C 的结构, 为脂肽类环状缩肽, 由肽键部分与非肽键联成。它们能抑制 RNA 和 DNA 病毒的增殖, 并对 L1210

白血病细胞有强烈的细胞毒作用,在小鼠肿瘤模型中显示抗 P388 白血病和 B16 黑色素瘤的作用。其中 Dide minin A 对柯萨奇病毒与马鼻病毒 (皆属 RNA 病毒) 和乙型单纯疱疹病毒 (DNA 病毒) 的 ID₅₀ 为 1.5 ng/ml,对 II 型单纯疱疹病毒 ID₅₀ 为 3 ng/ml。膜海鞘素 B 是一种环七肽,是第一个进入临床实验研究的海洋抗肿瘤化合物,目前已完成临床 II 期试验。药理研究结果表明对非何杰金氏 (non-Hodgkins) 淋巴瘤和神经胶质瘤有良好治疗效果,但对肝脏有较大毒性。对 Dide minin B 进行了全合成、半合成、结构修饰和构效关系等系统研究,发现去氢 Dide minin B 的活性较 Dide minin B 强 20 倍,且毒性较小。此外,从同一种海鞘中尚分离得到另外 3 种环肽 Patella mide A、B 和 C,均对 L1210 白血病细胞具有强烈的细胞毒作用。另外从海鞘 *Aplidium albicans* 分离到一种环肽 Aplidine,抗肿瘤活性比 Dide minin B 强,而且心脏毒性较低,目前已进入临床 I 期试验^[24]。由海鞘 *Lissoclinum patella* 分离到 8 种含恶唑啉、噁唑啉的环状肽,有较强的细胞毒性。关于 Dide minin 类化合物陆续有报道,已经分离鉴定了近 20 个环肽类化合物,均显示不同程度的抗肿瘤及抗病毒作用,作用机理主要是抑制蛋白质和 DNA 的合成,可望开发为新颖的抗癌药物^[10]。

4 结语

海洋生物活性物质,是经数亿年的自然筛选进化发展而来,其生物学活性在类似物结构中,往往是最强效果,最佳效力结构,能够给我们提供药物合成和筛选的导向。海洋生物将是本世纪人们研究开发的重要药物资源。近年来,随着海洋开发步伐的加快和基因工程技术的广泛应用,海洋药物基因工程成为海洋高技术研究领域的一大热点。已经从海洋生物中克隆了多个有开发价值的药物基因,如藻蓝蛋白、海葵毒素、芋螺毒素和海蛇毒素等的基因,并转入细菌中得到表达。所以海洋生物多肽类活性物质的研究有着十分广阔的前景,应积极开展肽类活性物质的一级结构分析和基因分析、结构修饰改造和构效关系研究,而且采用海洋生物基因工程技术生产海洋药物,这对创造新药和拓宽海洋药物新资源均有重要意义。总之,应尽快在国内开发海洋多肽类化合物,并使之商业化,不仅能产生巨大的经济效益,而且可因其独特的药效造福于人类。

参考文献

- 1 宋杰军,毛庆武主编。海洋生物毒素。北京:海洋出版社,1996。74~79,267~268,343,454~460
- 2 黄志峰,李新萍,秦松等。海洋科学,1998,1:19
- 3 王建华,黄培堂,黄翠芬。中国海洋药物杂志,1997,64(4):30~33
- 4 覃公平主编。中国毒蛇学。第三版。广西:科学技术出版社,1999。215~216,715~716
- 5 王广策,邓田,曾呈奎。海洋科学,2000,24(2):22~23
- 6 张成武,刘宇峰,王习霞等。海洋科学,2000,24(1):45~48
- 7 张成武,吴洁等。中国海洋药物杂志,1998,4:26
- 8 廖永岩,叶富良,洪水根。中国海洋药物杂志,1998,68(4):34,37~39
- 9 沈先荣,吉冬梅,贾福星等。生物化学与生物物理学报,2000,32(1):43~48
- 10 俎成立,顾谦群,方玉春等。中国海洋药物杂志,1998,67(3):41~43
- 11 Jones RM., Bulaj G. . *Curr. Pharm. Des.*, 2000,6(12):1249~1285
- 12 Jacobsen RB., Koch ED., Lange Malecki B. *et al.* . *J. Biol. Chem.*, 2000,275(32):24639~24644
- 13 Balaji RA., Ohtake A., Sato K., *et al.* . *J. Biol. Chem.*, 2000,275(50):39516~39522
- 14 MC. Intosh JM., Gardner S., Lao S. *et al.* . *Eur. J. Pharmacol.*, 2000,399(1~3):205~208
- 15 Xu Y., Tamamura H., Arakaki R. *et al.* . *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1999,15(5):419~427
- 16 Tamamura H., Arakaki R., Funakoshi H. *et al.* . *Bioorg. Med. Chem.*, 1998,6(2):231~238
- 17 Gasparini G. . *Drugs*, 1999,58(1):17~38
- 18 Sheu JR., Fu CC., Tsai ML. *et al.* . *Anticancer Res.*, 1998,18(6A):4435~4441
- 19 Robert SK. . *Carcinogenesis*, 2000,21(3):505~515
- 20 Sexton PM., Findlay DM., Martin TJ. . *Curr. Med. Chem.*, 1999,6(11):1067~1093
- 21 Poncet J., *Curr Pharm. Des.*, 1999,5(3):139~162
- 22 Mohammad RM., Varterasian ML., Almatchy VB. *et al.* . *Clin. Cancer Res.*, 1998,4(5):1337~1343
- 23 Kobayashi M., Natsume T., Tamaoki S. *et al.* . *Jpn. J. Cancer Res.*, 1997,88(3):316~327
- 24 Rinchart KL. . *Med. Res. Rev.*, 2000,20(1):1~27

(本文编辑:张培新)