

基于蛋白质组学、肽组学的 中药动物药活性组分的研究*

□靳 艳** 刘晓艳 邹汉法

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘 要:动物药是我国传统中药的重要组成部分,但由于其组成复杂,分离较困难,与植物药相比动物药的研究相对落后。动物药组成中蛋白质占很大比例,目前已从动物药中发现许多蛋白质和多肽类活性组分。蛋白质组学、肽组学技术是快速发展的大规模表征蛋白质、肽的技术,借助蛋白质组学、肽组学快速、高效的特点,将蛋白质组学、肽组学技术应用于动物药中蛋白质和肽类活性组分的研究是动物药新的研究方向。本文综述了近年来应用蛋白质组学和肽组学技术研究动物药中蛋白质和肽类活性组分的进展。

关键词:中药 动物药 蛋白质组学 肽组学 蛋白质 肽

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.01.032

一、中药动物药及其活性组分

中药按照属性分可分为植物药、动物药和矿物药 3 大类。动物入药在我国有悠久的历史,明代李时珍编著的《本草纲目》记载药物 1892 种,其中有动物药 440 种,约占 1/4。中医称动物药为血肉有情之品,疗效确切而显著,因此动物药在中药处方配伍中具有十分重要的意义。动物药的主要来源于动物的组织、器官、腺体、体液、分泌物以及皮、骨、角、甲和胎盘。经现代生物技术验证的动物药的活性主要表现在神经系统、血液系统、心血管系统、抗肿瘤、免疫、抗炎等诸多方面。与植物药相比,动物药的成分复杂,活性组分中除了小分子化合物外,还包含许多蛋白质、多糖、多肽等大分子化合物,这些大分子物质

的提取分离较为困难,而且动物资源十分有限,因此动物药的活性组分研究相对滞后。

动物药的组成中蛋白质占有很大比例,比如蛇毒中蛋白质含量为 90%^[1],蜈蚣中蛋白质含量为 60%~70%^[2],鹿血中蛋白质含量为 70%~80%,蚂蚁中蛋白质含量为 42%~67%。近年来,从各种动物中提取分离的具有生物活性的蛋白质和肽类物质非常多,比如各种抗菌肽、降血压的血管紧张素转换酶抑制肽、抗血栓肽、抗肿瘤肽等等。传统研究活性蛋白质和肽的方法是通过分离纯化得到单一组分后再进行结构鉴定和活性检测,该方法费时、费力、工作量大,大大延缓了新活性的蛋白质和肽的发现速度,使得动物药活性组分的研究远远滞后于植物药的研究。随着分离分析、基因组学、肽组学、蛋白质组学等技术的发展,肽和蛋白质的分析方法得到了快速发展,极大地推动了以肽和蛋白质为主要成分的动物药的药效

收稿日期: 2010-11-19

修回日期: 2011-02-12

* 中国科学院绿色农业技术集成与发展中心创新方向项目(KSCX2-YW-N-093):鹿血生物活性组分的制备和应用,负责人:靳艳。

** 通讯作者:靳艳,博士,研究员,主要研究方向:生物活性肽的研究,Tel:0411-84379576,E-mail:yanjin@dicp.ac.cn。

物质基础研究。

二、肽组学、蛋白质组学

新活性的蛋白质和肽的发现是以高效的分析检测技术为基础,高灵敏度的质谱技术和生物信息技术的发展,使得许多来源于动物和植物的高活性的蛋白质和肽被发现^[3]。

蛋白质组学(Proteomics)的概念是由 Wilkins 和 Williams 提出来的,其研究目标是系统分析生物体内蛋白质结构、功能及其相互作用与动态变化,为了解生命活动中的变化机制、寻找药物靶标等重大问题提供重要的分析方法和技术手段。肽组学(Peptidomics)是在蛋白质基础上发展起来的,其目标是研究生物体中的肽的组成和变化^[4]。随着蛋白质和肽分离技术的不断提高、质谱仪器及其技术的快速发展、数据分析工具的开发,以及大量物种蛋白质数据库的日益完善,大规模表征蛋白质的技术得到了快速发展^[5-6]。蛋白质组学和肽组学不仅被应用于新药物靶标的发现,而且应用于蛋白质或肽等活性药物先导化合物的药物发现^[3,7]。蛋白质组学和肽组学技术通过色谱分离、质谱鉴定、数据库检索等步骤快速分析混合物中蛋白质和肽组成,省略传统天然产物提取过程中的纯化等步骤,极大提高了发现新蛋白质和肽的效率。蛋白质组学和肽组学技术在活性蛋白质和肽中的应用,使得动物药中活性组分的研究从单一组分的研究转变为多组分的同步研究。

将蛋白质组学技术与转录组学、基因组学等技术结合用于发现新的特异性的蛋白质和肽序列,再通过蛋白质重组进行活性验证,对于揭示活性蛋白质和肽产生机理、研究生物体内自我防御系统、药物的活性机理、新药设计具有重要的推动作用。

三、蛋白质组学和肽组学在中药动物药中的应用

根据不同的分类标准将动物药分为海洋动物和陆生动物、无脊椎动物和脊椎动物、哺乳动物和非哺乳动物等等,由于动物种类广、有效部位和活性各有不同,本文根据动物特点和活性进行归类阐述。

1. 动物毒液

动物界中产生毒液的动物有超过 10 万种,动物毒液在中西方都有悠久的药用历史,被认为是尚未被开发的活性物质的宝库。血管紧张素转换酶抑制肽是最早发现的蛇毒肽^[8],在该肽基础上研发出第一

个商业化降压药物“卡托普利”。毒液通过干扰生物体中的关键酶、离子通道、受体等方式扰乱神经系统、心血管系统、神经肌肉系统、血液凝结和平衡系统,其活性表现在镇痛、抗血栓、抗肿瘤、降血压等方面。

毒液是以肽和蛋白质为主的混合物,早期毒液中活性物质是通过分离纯化得到的。以蛋白质组学技术为基础的动物毒液的蛋白质研究形成了毒液组学(Venomics)^[9-10]。Calvete^[9]提出的毒液组学技术研究策略:利用反相 HPLC 对毒液进行分离,对每个组分进行 N-端测序、SDS-PAGE、质量质谱分析、半胱氨酸含量等分析,蛋白质分析结果用 BLAST 归类,建立蛇毒蛋白数据库。毒液组学不仅研究毒液中蛋白质、肽与蛇种属、生物进化、环境的关系,而且有助于发现新活性的肽或蛋白质。Journal of Proteomic 杂志于 2009 年第 72 卷由 Calvete^[11]主编了毒液组学的特辑。动物毒液中研究最为广泛的是蛇毒^[10,12]。Risch^[13]运用蛋白质组学技术研究了 *Daboia russelli siamensis* 蛇毒的蛋白质组成,并对其各种酶活进行了研究。Valente 等^[14]运用转录组学和蛋白质组学技术研究了 *Bothrops insularis* 蛇毒的蛋白质和肽,对蛋白质和肽进行了分类。有关蛇毒的更多研究可参见文献^[9]。

蜘蛛毒液中的活性物质包括小分子化合物和蛋白质,从蜘蛛毒液中得到的活性肽已超过 600 多种,蜘蛛毒的活性表现在离子通道、细胞毒性等多方面。Tang 等^[15]运用转录组学、肽组学、基因组学分析方法,研究了蜘蛛 *Ornithoconus hainana* 的毒液,共发现了 192 个肽。Diego-Garcia^[16]运用转录组学、蛋白质组学和生物活性功能分析等技术,研究了蜘蛛 *Citharischius crawshayi* 的毒腺体及其毒液,构建了 cDNA 文库,得到 236 个表达序列标签,通过比对得到一个与毒样物质相关的序列;对毒液的蛋白质进行了质谱分析和生物活性检测,验证了毒液的毒性和离子通道活性。Escoubas^[17]运用 cDNA 和 LC/MALDI-TOF 质谱技术研究了蜘蛛毒液,发现了 1000 多种肽。Yuan 等^[18]对蜘蛛 *Ornithoconus huwena* Wang 的蛋白质组学和肽组学进行了系统分析。有关蜘蛛毒液中的肽和蛋白质研究进展及策略可参考文献^[19]。

中药材全蝎的主要成分是蝎毒,蝎毒不仅具有抗惊厥、抗癫痫、镇痛镇静的作用,还具有抑制肿瘤的作用^[20]。Bringans 等^[21]对蝎子 *Heterometrus longimanus* 的毒液的蛋白质组学进行了研究,发现了具有

抗菌、离子通道抑制等活性的肽,并建立了评价预测肽生物活性的方法体系。Ma 等^[22]运用转录组学和蛋白质组学对黑蝎子 *Heterometrus petersii* 的毒液进行分析,共发现 10 个与离子通道毒性、抗菌及酶活性等相关的蛋白质家族,同时发现 12 个非典型蛋白质家族及一个独特家族。另外,有关蜂、黄蜂和蚁的毒液组学研究可参考文献^[23]。

2. 蛙、蟾蜍

两栖动物通过分泌化学物质抵御外界的刺激和危险,肽类物质是其分泌物之一。目前已发现的两栖动物分泌的肽类物质主要有抗菌、抗肿瘤、抗真菌、神经肽等^[24]。从蛙、蟾等两栖动物表皮分离得到抗菌肽的报道较多,已从不同种属的蛙表皮得到的抗菌肽有 200 多种^[25]。Li 等^[26]运用肽组学和蛋白质组学技术研究了青蛙 *Odorrana grahami* 皮肤表面的抗菌肽,372 个 cDNA 抗菌肽序列编码 107 个新抗菌肽。Lai^[27]对中国蟾蜍表皮分泌物的蛋白质进行了研究,发现了两组抗菌肽,其中几个肽还具有抗 HIV 等活性。Yang 等^[28]运用肽组学技术研究了蛙 *Rana pleu-raden* 表皮的抗氧化肽。

3. 水蛭、虻虫

水蛭和虻虫均属于吸血动物,两者在医药记载中均有逐瘀的功效。

水蛭是吸血环节动物,《本草纲目》记载水蛭具有破血的功效。水蛭素是从水蛭中分离出来具有抗血凝活性的多肽化合物^[29],另外还从水蛭中发现具有抗感染、抗肿瘤、丝蛋白酶抑制剂等活性的物质^[30]。Yanes 等^[31]运用蛋白质组学技术对水蛭提取物进行研究,从 232 个组分中发现 13 个组分与以往报道的丝蛋白酶抑制剂的序列有高度相似性。

虻虫为虻科昆虫复带虻,主要功能是逐瘀、破积、通经^[20]。Xu 等^[32]运用蛋白质组学、转录组学和活性筛选技术研究了牛虻唾腺的蛋白质,发现了与凝血和免疫抑制相关等一系列蛋白质和肽,该结果有助于从分子水平揭示寄生物与宿主的关系和发现新的药物先导化合物。另外,Francischetti^[33]对吸血的臭虫的蛋白质组学进行研究。

4. 鹿茸、鹿血

鹿产品入药在我国有悠久的历史,鹿的全身是宝,鹿茸、鹿鞭、鹿血等均是传统的滋补佳品。鹿茸多肽、鹿茸血多肽、鹿血肽、鹿角盘多肽的活性包括:增强免疫力^[34]、抑制 ACE 酶^[35]、抗氧化^[36]等活性。鹿茸是

哺乳动物中唯一能够反复再生的组织,中医认为鹿茸具有壮元阳,补气血,益精髓,强筋骨的功效。Park 等^[37]对马鹿(*Cervus elaphus*)鹿茸的蛋白质组学进行分析,共鉴定出 130 个蛋白质,发现鹿茸蛋白质与其他组织特别是邻近的骨组织中的蛋白质明显不同,与细胞生长和信号传递的相关蛋白质被高量表达。Liu 等^[38]运用蛋白质组学和 ACE 活性导向的方法,研究了鹿血血浆蛋白质,结合 ACE 酶抑制肽的构效关系,预测并验证了鹿血血浆蛋白质所含有的 ACE 抑制肽,其中一个九肽 IC₅₀ 为 3.1 μmol·L⁻¹,该肽还具有很好的 pH 稳定性、热稳定性,经过胃肠蛋白酶酶解之后仍具有较强的 ACE 抑制活性。

目前运用蛋白质组学和肽组学研究动物药活性组分的研究较多地集中在毒液或分泌液等活性成分相对简单的动物种属和有效部位,动物药中绝大部分种类及动物组织、器官、腺体、皮、骨、甲等有效部位较复杂的体系的研究较少。体系复杂、数据库不健全等因素是阻碍其研究进程的主要因素。随着新的高分辨率、高灵敏度的分离技术和高分辨质谱的发展、蛋白质数据库的不断完善,将有更多的药用动物的蛋白质组学和肽组学被研究,也会发现更多活性蛋白质和肽,这些研究成果与中医理论相结合对于推动中药动物药现代化具有积极的推动作用。

参考文献

- 1 张豁中,温玉麟. 动物活性成分化学. 天津:天津科学技术出版社,1995.
- 2 王贤纯. 蜈蚣的药用研究进展. 动物学杂志,2002,37(3):88~91.
- 3 Adermann K, John H, Standker L, et al. Exploiting natural peptide diversity: novel research tools and drug leads. Current Opinion in Biotechnology, 2004,15(6):599~606.
- 4 Ivanov VT, Yatskin ON. Peptidomics: a logical sequel to proteomics. Expert Review of Proteomics, 2005, 2(4):463~473.
- 5 Ye ML, Jiang XG, Feng S, et al. Advances in chromatographic techniques and methods in shotgun proteome analysis. Trac -Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26(1):80~84.
- 6 Hu LH, Ye ML, Zou HF. Recent advances in mass spectrometry-based peptidome analysis. Expert Review of Proteomics, 2009, 6(4):433~447.
- 7 Clynen E, Baggerman G, Husson SJ, et al. Peptidomics in drug research. Expert Opinion on Drug Discovery, 2008, 3(4):425~440.
- 8 Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from bothrops -Jararaca venom. Biochemistry, 1970,9 (13): 2583~2593.
- 9 Calvete JJ, Juarez P, Sanz L, et al. Strategy and applications. Journal of

- Mass Spectrometry, 2007, 42(11):1405-1414.
- 10 Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, et al. Venoms, venomics, antivenomics. *Febs Letters*, 2009, 583(11):1736-1743.
 - 11 Calvete JJ. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. *Journal of Proteomics*, 2009, 72(2):121-126.
 - 12 Boldrini-Franca J, Correa-Netto C, Silva MMS, et al. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of Proteomics*, 2010, 73(9):1758-1776.
 - 13 Risch M, Georgieva D, von Bergen M, et al. Snake venomics of the Siamese Russell's viper (*Daboia russelli siamensis*) - Relation to pharmacological activities. *Journal of Proteomics*, 2009, 72(2):256-269.
 - 14 Valente RH, Guimaraes PR, Junqueira M, et al. *Bothrops insularis* venomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *Journal of Proteomics*, 2009, 72(2):241-255.
 - 15 Tang X, Zhang YQ, Hu WJ, et al. Molecular Diversification of Peptide Toxins from the Tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) Venom Based on Transcriptomic, Peptidomic, and Genomic Analyses. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(5):2550-2564.
 - 16 Diego-Garcia E, Peigneur S, Waelkens E, et al. Venom components from *Citharischius crawshayi* spider (Family Theraphosidae): exploring transcriptome, venomics, and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(16):2799-2813.
 - 17 Escoubas P, Sollod B, King GF. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, 2006, 47(6):650-663.
 - 18 Yuan CH, Jin QH, Tang X, et al. Proteomic and peptidomic characterization of the venom from the Chinese bird spider, *Ornithoctonus huwena* Wang. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(7):2792-2801.
 - 19 Liang S. Proteome and peptidome profiling of spider venoms. *Expert Review of Proteomics*, 2008, 5(5):731-746.
 - 20 中药大辞典. 上海:上海科学技术出版社, 1997.
 - 21 Bringans S, Eriksen S, Kendrick T, et al. Proteomic analysis of the venom of *Heterometrus longimanus* (Asian black scorpion). *Proteomics*, 2008, 8(5):1081-1096.
 - 22 Ma YB, Zhao Y, Zhao RM, et al. Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. *Proteomics*, 2010, 10 (13):2471-2485.
 - 23 de Graaf DC, Aerts M, Danneels E, et al. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *Journal of Proteomics*, 2009, 72(2):145-154.
 - 24 Pukala TL, Bowie JH, Maselli VM, et al. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Natural Product Reports*, 2006, 23(3):368-393.
 - 25 Conlon JM. The therapeutic potential of antimicrobial peptides from frog skin. *Reviews in Medical Microbiology*, 2004, 15(1):17-25.
 - 26 Li JX, Xu XQ, Xu CH, et al. Anti-infection peptidomics of amphibian skin. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(5):882-894.
 - 27 Lai R, Zheng YT, Shen JH, et al. Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. *Peptides*, 2002, 23 (3):427-435.
 - 28 Yang HL, Wang X, Liu XH, et al. Antioxidant Peptidomics Reveals Novel Skin Antioxidant System. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, 8(3):571-583.
 - 29 Corral-Rodriguez MA, Macedo-Ribeiro S, Pereira PJB, et al. Leech-Derived Thrombin Inhibitors: From Structures to Mechanisms to Clinical Applications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53 (10):3847-3861.
 - 30 Schoofs L, Clynen E, Salzet M. Trypsin and chymotrypsin inhibitors in insects and gut leeches. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8 (7): 483-491.
 - 31 Yanes O, Villanueva J, Querol E, et al. Functional screening of serine protease inhibitors in the medical leech *Hirudo medicinalis* monitored by intensity fading MALDI-TOF MS. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, 4(10):1602-1613.
 - 32 Xu XQ, Yang HL, Ma DY, et al. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008, 7(3):582-590.
 - 33 Francischetti IMB, Calvo E, Andersen JF, et al. Insight into the Sialome of the Bed Bug, *Cimex lectularius*. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(8):3820-3831.
 - 34 姜红,施用晖,乐国伟,等. 木瓜蛋白酶水解目录茸血制备免疫活性肽的研究. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(1):72-76.
 - 35 Liu XY, Song CX, Chen R, et al. Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors in Peptides Mixture of Hydrolyzed Red Deer Plasma with Proteomic Approach. *Chinese Journal of Chemistry*, 2010, 28(9):1665-1672.
 - 36 王志兵,邱芳萍,解耸林. 鹿角盘蛋白多肽的制备与活性研究. 中国食品工业, 2008, 8(3):28-32.
 - 37 Park HJ, Lee DH, Park SG, et al. Proteome analysis of red deer antlers. *Proteomics*, 2004, 4(11):3642-3653.

Screening Bioactive Protein and Peptides in Animal Medicine of Chinese Materia Medica by Proteomics and Peptidomics

Jin Yan, Liu Xiaoyan, Zou Hanfa

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Chinese Materia Medica (CMM) is composed of plants, animals and minerals. Compared with herbal medicine, most bioactive components in animal medicine are macromolecules, such as proteins and peptides. Although many bioactive proteins and peptides have been revealed from animal medicine, it is still a time-costing and labor-consuming work to separate and purify proteins and peptides from the extraction mixture of animal medicine. Proteomics and peptidomics are high-throughput approaches in proteome and peptide analysis. Hence, both methods are applied on screening bioactive proteins and peptides of animal medicine in this study. Progress of the application of proteomics and peptidomics on bioactive proteome and peptides in CMM animal medicine are reviewed in this article.

Keywords: Chinese Materia Medica, Animal medicine, Proteomics, Peptidomics, Protein, Peptide

(责任编辑: 李沙沙 张志华, 责任译审: 王 晶)