DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250307004
引用格式: 王传凯, 王子瑄, 叶阳, 等. 抗血栓活性肽的制备、鉴定及其作用机制研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(6): 178–185.
WANG CK, WANG ZX, YE Y, *et al*. Research progress on the preparation, identification and action mechanism of antithrombotic active peptides [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(6): 178–185. (in Chinese with English abstract).

抗血栓活性肽的制备、鉴定及其作用机制研究进展

王传凯, 王子瑄, 叶　阳, 毛　雪*, 孔祥辉*

(黑龙江省科学院微生物研究所, 哈尔滨　150010)

摘　要: 血栓相关疾病是全球致死率极高的心血管类疾病, 临床上现有的传统抗血栓药物虽能有效抑制血栓发展, 但普遍伴随出血风险偏高、不良反应较多等问题, 限制了其安全应用, 因此亟需开发疗效更佳、安全性更高的新型治疗方案。抗血栓活性肽因取材范围广、分子量低、不易引发免疫反应且可实现多靶点协同作用, 相比传统化学药物具备明显优势, 产业化潜力突出。本文汇总并梳理了动植物、海洋生物与微生物来源抗血栓活性肽的研究进展, 明确抗血栓活性肽发挥抗凝功能的物质结构基础; 同时总结了酶解、微生物发酵、化学合成及生物信息学辅助筛选在多肽制备中的优化方法, 以及超滤、液相色谱-质谱技术在活性肽分离纯化与序列鉴定中的高效应用。作用机制研究表明, 抗血栓活性肽主要通过活性位点竞争性抑制、外位点靶向调控及阻断凝血因子级联反应等方式, 从多个通路抑制血栓形成。然而, 抗血栓活性肽的临床转化仍存在关键瓶颈, 体内代谢稳定性不足, 工业化生产成本高, 多靶点协同机制解析不深入。基于上述研究成果, 未来研究应着重于靶向性肽类药物设计、代谢稳定性提升策略开发及规模化生产技术创新, 为突破现有临床困境、开发高效低毒抗血栓药物提供理论支撑。

关键词: 抗血栓活性肽; 抗凝血; 制备技术

Research progress on the preparation, identification and action mechanism of antithrombotic active peptides

WANG Chuan-Kai, WANG Zi-Xuan, YE Yang, MAO Xue*, KONG Xiang-Hui*

(*Institute of Microbiology*, *Heilongjiang Academy of Sciences*, *Harbin* 150010, *China*)

ABSTRACT: Thrombus-related diseases are cardiovascular diseases with extremely high mortality worldwide. Although existing traditional antithrombotic drugs in clinical practice can effectively inhibit thrombus progression, they are generally associated with problems such as high bleeding risk and numerous adverse reactions, which limit

收稿日期: 2025-03-07
基金项目: 黑龙江省重大科技成果产业化项目(CG24037)
第一作者: 王传凯(1998—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为食药用菌精深加工。E-mail: 529160547@qq.com
***通信作者:** 毛雪(1990—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食药用菌精深加工。E-mail: mx45792027@163.com
孔祥辉(1971—), 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为食药用菌精深加工。E-mail: kxh29@126.com

their safe application. Therefore, there is an urgent need to develop new treatment strategies with better efficacy and higher safety. Antithrombotic active peptides have obvious advantages over traditional chemical drugs due to their wide range of sources, low molecular weight, low immunogenicity and multi-target synergistic effects, thus demonstrating prominent industrialization potential. This paper summarized and organized the research progress of antithrombotic active peptides derived from animals, plants, marine organisms and microorganisms, and clarified the material and structural basis for their anticoagulant function. Meanwhile, it summarized the optimization methods of enzymatic hydrolysis, microbial fermentation, chemical synthesis and bioinformatics-assisted screening in peptide preparation, as well as the efficient application of uitrafiltration and liquid chromatography-mass spectrometry in the separation, purification and sequence identification of active peptides. Studies on the mechanism of action indicate that antithrombotic active peptides can inhibit thrombosis through multiple pathways, mainly by means of active site competitive inhibition, Exosite targeted regulation and blocking of the coagulation factor cascade reaction. However, there are still key bottlenecks in the clinical transformation of antithrombotic active peptides, including insufficient *in vivo* metabolic stability, high industrial production costs and inadequate analysis of the multi-target synergistic mechanism. Based on the above research results, future studies shall focus on the design of targeted peptide drugs, the development of strategies to improve metabolic stability, and the innovation of large-scale production technologies, so as to provide theoretical support for breaking through existing clinical difficulties and developing high-efficiency and low-toxicity antithrombotic drugs.

KEY WORDS: antithrombotic active peptides; anticoagulation; preparation technologies

0　引　言

血栓是多种心血管疾病的主要病因之一, 对全球公共健康造成严重威胁。血栓的形成及其导致的相关疾病涉及多个器官和组织, 如深静脉血栓、肺血栓栓塞等[1], 血栓可引起机械性阻塞血管造成的局部缺血和组织损伤, 还可导致由血栓栓塞引发的全身性并发症, 是一类涉及脉管、肌肉、肺、心脏、中枢等多个器官组织, 高风险的全身性血管疾病。随着生活方式的改变与人口老龄化程度的不断加深, 血栓相关疾病的发病率逐年增高, 根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的统计, 心血管疾病每年可造成约 1790 万人死亡, 占全球总死亡人数的 31% [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)]。我国最新发布的《中国心血管健康与疾病报告》显示, 目前中国心血管疾病患病率处于持续上升阶段。推算心血管疾病现患人数 3.3 亿, 其中脑卒中人数可达 1300 万[2]。血栓的形成涉及多种复杂的生理和病理过程, 包括血小板活化、凝血级联反应的激活以及纤维蛋白的形成。传统的抗血栓药物, 如阿司匹林、华法林和肝素, 虽然能够有效预防和治疗血栓性疾病, 但其长期使用往往伴随着出血风险增加、血小板减少药物耐受性降低以及副作用显著等问题[3–4]。因此, 研发兼具安全性、高效性和靶向性的新型抗血栓药物已成为当前医学研究的重点方向。

生物活性肽是由 2~20 个氨基酸残基组成的短链多肽, 具有多种生理功能, 如免疫调节、抗菌、抗血栓等[5], 并具备生物利用度高、免疫原性低等特征。其来源广泛, 包括植物、动物、海洋生物和微生物等, 在食品、医药等领域有重要应用。与传统药物相比, 此类物质具备天然来源广泛的特点, 可从动植物、海洋生物及微生物等多种生物体系中获取, 同时兼具药理作用特异性强、系统毒性低、多靶点协同作用潜力突出等优势。其代谢产物多为天然氨基酸类成分, 可有效减轻肝肾代谢压力, 在长期用药的安全性上, 相较合成药物展现出更优的应用潜力[6–7]。上述诸多优势使其成为研发新型抗血栓药物的重要来源之一[8–9]。血栓及由其引发的心血管疾病发病率在近年持续攀升, 抗血栓肽相关研究也逐步成为领域内的研究热点。本综述系统梳理了国内外抗血栓多肽的制备方式、作用机制, 以及其在血栓相关疾病治疗中的潜在应用价值。通过对现有研究成果的归纳与分析, 为后续相关研究提供理论支撑与实验参考, 助力新型抗血栓药物的研发与应用。

1　不同来源的抗血栓活性肽

含抗血栓成分的日常饮食为防治心血管疾病提供了便捷有效的干预途径。近年研究表明, 多种不同来源蛋白中普遍存在具有抗凝功能的活性肽成分(表 1), 这类生物活性物质通过抑制凝血酶活性、干扰纤维蛋白聚集或调节血小板活化等分子机制, 展现出显著的抗血栓效应。目前

已有关于不同来源抗血栓肽的诸多研究, 如 TU 等[10]通过模拟胃肠消化产生从乳铁蛋白中分离得到一种多肽(ENLPEKADRD), 此多肽具备体外抗凝活性。NASRI 等[12]从虾虎鱼蛋白水解物中分离出 4 种具有高抗凝血活性的生物活性肽(LCR、HCP、CLCR、LCRR)。QIAO 等[13]通过胰蛋白酶对蓝贻贝进行酶解获得并分析了 3 种蓝贻贝蛋白

表 1 不同来源的抗血栓肽

Table 1 Antithrombotic peptides from different sources

来源	活性肽序列	参考文献
乳铁蛋白	ENLPEKADRD	[10]
	LRPVAAEIY	[11]
虾虎鱼	LCR、HCP、CLCR	[12]
贻贝	ELEDSLDSER	[13]
牡蛎	LSKEEIEEAKEV NAESLRK	[14–15]
牛乳酪蛋白	FQSEEQQQTEDELQDK AVPYPQR	[16] [17]
鲭鱼皮	FGN	[18]
苋菜	TEVWDSNEQE、NDQGQSVFDEELS	[19]
花生	SWAQL、GNHEAGE、CFNEYE	[20]
大豆	FFPDIPKIK、FPD	[21]
食用海藻	NMEKGSSSVVSSRM	[22]
少棘蜈蚣	SQL	[23]
黄粉虫	SLVDAIGMGP、AGFAGDDAPR	[24]

组分及其酶解产物, 其肽段组成不同且均无毒性和过敏性, 同时, 还对具有抗血栓活性的肽(ELEDSLDSER)的氨基酸结合位点及相互作用进行了活性机制研究。牡蛎经肠道消化释放的肽(LSKEEIEEAKEV)可延长人血清凝血时间, 对凝血酶有竞争性抑制作用。LSKEEIEEAKEV 与凝血酶亲和力高, 具有类似水蛭素和比伐卢定的特征[14]。

2 抗血栓活性肽的制备

2.1 抗血栓活性肽的制备方法

目前抗血栓活性肽的制备主要采用酶解法、化学合成法及微生物发酵法 3 类传统工艺。酶解法依靠特异性蛋白酶催化蛋白质底物降解形成多肽, 其核心依赖酶的专一性催化作用, 蛋白酶通过活性位点识别并结合蛋白质中的特定肽键(如赖氨酸、精氨酸或疏水性氨基酸残基附近的肽键), 经亲核攻击或酸碱催化断裂肽键, 最终生成不同链长的多肽片段。与酸解、碱解等化学方法相比, 酶解法在温和条件下完成反应, 既可避免有毒副产物的产生, 又能较好保留多肽的生物活性, 实现目标活性肽段的精准释放[25–26]; 微生物发酵法借助枯草芽孢杆菌、乳酸菌、米曲霉等特定微生物在代谢过程中分泌的蛋白酶, 对蛋白质底物实施定向水解, 在内切酶与外切酶的共同作用下, 将大分子蛋白裂解为具备生物活性的小分子多肽。该方法依托菌株代谢产生的蛋白酶, 实现了酶解与发酵的协同进行, 在经济性与生物转化效率上均表现良好[27–28]; 化学合成法以保护基策略与逐步缩合反应为核心, 可定向构建肽链, 适用于已知序列活性肽的规模化制备, 产物纯度可达 95%以上[29]。随着蛋白质组学与计算生物学的发展, 生物信息学手段逐步应用于多肽制备, 借助 ExPASy-PeptideCutter 等工具实现虚拟酶切模拟, 并结合分子对接预测活性位点, 可大幅缩短研发周期[30–31]。该方法摆脱了传统平行实验的局限, 依托现有蛋白质数据库进行序列模拟, 能够降低研发成本, 为新型抗血栓肽的筛选与开发提供了高效技术路径。但计算机模拟酶切法仍受已测序蛋白数据库覆盖范围的限制, 必须结合传统实验验证, 才能保证所得结果的准确性与可靠性。

酶解法因其高效性和特异性成为目前研究的主流手段。通过精准控制蛋白酶类型(如胰蛋白酶、碱性蛋白酶)与反应参数(pH、温度、酶底比), 实现目标肽段的定向释放。酶解后, 通过离心分离得到的含有低分子量肽的水解产物上清液, 可通过冷冻干燥、脱盐、错流膜过滤、膜超滤或柱色谱法进行回收。例如, ZHANG[20]通过响应面法优化碱性蛋白酶对花生蛋白的水解条件, 在 pH 为 8.5、酶浓度为 5000 IU/g、50 ℃水解 2 h。在此优化条件下, 以 50 mg/mL 的蛋白质量浓度为基准, 花生蛋白水解物的抗血栓活性提升至 86%。GERÓNIMO-ALONSO 等[32]使用胃蛋白酶-胰酶和碱性蛋白酶-风味酶两种酶系统对豇豆蛋白浓缩物进行酶解, 胃蛋白酶-胰酶系统的底物浓度为 40 g/kg, 酶与底物比为 1:10, 反应温度 37 ℃, 其中胃蛋白酶作用时 pH 为 2, 胰酶作用时 pH 为 7.5, 前 45 min 由胃蛋白酶进行水解, 后 45 min 由胰酶水解; 碱性蛋白酶-风味酶系统首先使用碱性蛋白酶进行水解, 底物浓度 40 g/kg, 酶与底物比为

1:10, 50 ℃, pH 为 8, 反应 45 min; 随后将 pH 调整为 7, 加入风味酶继续反应, 此时底物浓度仍为 40 g/kg, 酶与底物比例为 1:10, 温度维持在 50 ℃。两种酶解系统产生的肽段对血小板聚集的抑制率为 88.5%~95.4%。酶解法的优势在于反应条件温和、产物安全性高, 但存在酶解产物复杂、目标肽段得率低的局限性。

利用微生物发酵制备生物活性肽应用最广泛的两种方法是液态发酵和固态发酵, 其中固态发酵适用于对水分需求较少的真菌, 液态发酵适用于具有高水位活性的微生物(例如细菌), 并且具有生成的生物活性肽易于纯化等优势[33–34]。微生物发酵法利用菌株代谢过程中分泌的蛋白酶水解底物蛋白, 兼具酶解与发酵的双重特性。如 PÉREZ-ESCALANTE 等[35]从商业发酵乳中分离出代田菌(*Lactobacillus casei* Shirota)和约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii* LA1), 利用这两种菌种进行发酵实验并测定产物的凝血酶抑制率达到 31.67%±2.35%。WADA 等[36]以人乳蛋白为底物, 在其生长过程中通过自身产生的酶水解蛋白质, 从而生产出乳源生物活性肽。微生物在生长过程中会分泌蛋白酶, 这样就能从蛋白质中持续产生肽段。此外, 与分离制备出的商品酶相比, 微生物酶具有不同的切割位点, 因此这些酶产生的肽段可能与酶水解过程中产生的肽段有所不同。

化学合成法则适用于已知序列活性肽的制备, 目前有机合成越来越多地应用于生物活性肽的生产[37]。固相合成技术在已知序列肽制备中展现结构精确性优势, 如贻贝源 KNAENELGEVTVR 肽合成纯度达 99.21%[38], 但其合成成本高达酶解法的 50 倍。该方法虽能精准控制产物结构, 但存在合成成本高、副产物处理复杂等问题。而且当目标肽段长度超过 20 个氨基酸时, 合成效率急剧下降, 未来将会通过固相合成与液相片段缩合、酶催化结合, 提升合成长肽效率。

近年来, 生物信息学技术的引入为抗血栓肽开发提供了新思路。通过 ExPASy-PeptideCutter、理化性质分析、PeptideRanker 评分及结合分子对接预测活性肽段, 可以显著缩短研发周期[39]。CHENG 等[40]运用该策略从牡蛎肌球蛋白中筛选出与凝血酶活性中心高度亲和的多肽序列, 并通过实验验证其体外抑制活性。OUYANG 等[41]通过对栖息在深海热液喷口和冷泉中的动物的蛋白质序列进行虚拟蛋白水解, 而后通过分子对接和结合自由能筛选, 以 FXIa 为目标, 鉴定出候选抗凝肽。两种新型抗凝肽 PRNIF 和 GNDRCL, 其半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})分别为 0.67 mmol/L 和 1.52 mmol/L, 并在体外验证了它们的抗凝活性。SONG 等[42]基于 seq2seq 原理开发了蛋白质匹配器(IDProMat)的神经网络模型, 使用该模型设计了一种肽(LRWNSYY), 通过对接、MD 模拟和实验验证了其与胶原蛋白的结合及抑制血小板黏附的活性。尽管多种生物信息学技术可研发周期缩短, 但其预测准确性受限于蛋白质结构数据库的完整性, 这使得部分虚拟肽段需通过实验验证修正。

2.2　抗血栓活性肽的分离纯化与鉴定

含有抗血栓活性肽的酶解产物及发酵液通常成分复杂, 需采用多级分离策略降低体系的复杂性。初步分离一般采用超滤膜系统基于分子量差异进行。李汉琪等[43]通过乙醇沉降法和超滤联用去除海参中的多糖, 并通过分级超滤进行初步筛选。使用 3 kDa 超滤膜对醇沉后的上清液进行超滤, 获得两种多肽, 经体外活性测定分析此两种多肽在凝血级联反应的内源性途径以及共同途径均具有显著的抗血栓活性。凝胶过滤色谱法(gel filtration chromatography, GFC)通过分子尺寸排阻效应, 可有效区分分子量相近的肽段。如运用尺寸排阻色谱法(size exclusion chromatography, SEC)对苋菜蛋白水解物进行分离, 将水解物在特定缓冲液中溶解后上样, 通过 SEC 分离得到不同组分, 再用微板法检测各组分的抗血栓活性, 从而筛选出具有高抗血栓活性的组分。该方法依据分子大小对水解物进行分离, 有助于获取活性较高的肽组分[19]。XU 等[21]综合运用了超滤和 GFC 对大豆蛋白水解物中的抗血栓肽进行分离。先将大豆蛋白水解物(soybean protein hydrolysate, SPB)通过 3 kDa 截留分子量的纤维素超滤膜, 发现 90%的肽通过超滤膜, 且超滤液的质量浓度(2.49 mg/mL)略低于 SPB (2.78 mg/mL)。随后, 对超滤液采用 Superdex™ 10/300 GL 凝胶过滤柱在快速蛋白质液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC)系统上进行分离, 洗脱时使用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0), 流速设定为 0.5 mL/min, 在 280 nm 处监测, 收集各组分冻干后检测抗血栓活性, 从而筛选出活性最高的组分。最后采用液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)对活性最高的肽进行鉴定, 这种组合方法可实现高活性抗血栓肽组分的有效分离与精准识别。相较于传统单一分离技术, 此组合方法整合了不同技术的优势, 提升了分离效率与准确性, 可为后续研究提供稳定性更高的试验样品。

进阶纯化可根据电荷特性选择离子交换色谱, CM-Sepharose 阳离子交换树脂对碱性多肽的吸附效率超过 85%, DEAE-Sephacel 阴离子交换介质则适用于酸性肽段的分离。反相高效液相色谱法(reversed-phase high performance liquid chromatogra, RP-HPLC)凭借 C_{18} 色谱柱的高分辨率, 在乙腈-水梯度洗脱下能实现复杂肽段的精准分离, 如 ZHANG[20]采用了 RP-HPLC 对花生抗血栓肽进行分离纯化。先使用制备型 RP-HPLC 对 Alcalase 2.4 L 水解花生蛋白得到的粗水解物进行初步分离, 收集主要分离峰冻干后评估抑制效果。下一步对活性最高的组分用半制

备型 RP-HPLC 进一步纯化, 优化后的洗脱条件为采用含 0.05% (*V*:*V*)三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)的 5% (*V*:*V*)乙腈和含 0.05% (*V*:*V*) TFA 的 80% (*V*:*V*)乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.5 mL/min, 检测波长 220 nm, 收集主要峰进行分析。与传统液相色谱方法相比, RP-HPLC 具备更高的分辨率, 可实现肽段的精细化分离, 更适用于复杂体系中目标抗血栓肽的分离。近年来, 离子交换色谱-反相高效液相色谱联用技术 (ion exchange chromatography-reversed-phase high performance liquid chromatography, IEC-RP-HPLC)等多维色谱联用技术不断发展, 可将分离效率提升 40%, 分离性能显著提升。但该技术对设备要求较高, 相应成本偏高, 一定程度上限制了其在工业化生产中的推广应用。

质谱联用技术是解析活性肽序列的核心手段。超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法兼具高分离度(30 min 内可完成 500 种肽的鉴定)与高灵敏度, 已成为复杂样品分析的优选方案。例如, TU 等[16]先采用胰蛋白酶对酪蛋白进行水解得到水解物, 再通过超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法对其中的肽进行鉴定。生物活性肽的序列鉴定在多肽相关研究中具有重要意义, 不仅能够为阐明多肽结构与功能的关系提供依据, 还可依据鉴定结果进行多肽的合成, 为后续的生物活性研究及应用开发奠定基础。相较于传统序列分析手段, 现代质谱联用技术在检测准确性、灵敏度与分析速度上均有明显提升, 有力推动了抗血栓活性肽相关研究的发展。

3 抗血栓活性肽的作用机制

3.1 血栓形成机制

血栓形成是一个复杂的生理过程, 涉及多种机制和途径[44]。主要涉及两种关键机制, 即血小板活化与凝血因子(blood coagulation factor, FXI)激活。当血管内皮损伤导致内皮下胶原暴露时, 血小板通过表面糖蛋白受体(如 GPIb-IX-V、GPIIb/IIIa)迅速黏附于损伤部位, 触发形态改变并释放致密颗粒(二磷酸腺苷、5-羟色胺)及 α 颗粒(血管性血友病因子、纤维蛋白原)。二磷酸腺苷与血小板 P2Y12 受体结合引发血小板聚集, 形成初始血小板栓子; 血栓素 A_2 (thromboxane A_2, TXA_2)通过激活磷脂酶 C 促进 Ca^{2+}内流, 增强血小板活化信号。值得注意的是, 活化血小板表面表达的磷脂酰丝氨酸翻转至细胞膜外侧, 形成促凝磷脂表面, 为 FXI 复合物的组装提供关键平台, 由此将血小板活化过程与凝血级联反应紧密衔接。而 FXI 激活是主要由内源性凝血途径、外源性凝血途径双途径驱动。内源性凝血途径由凝血因子 XII (blood coagulation factor XII, FXII)的激活启动, 当血管壁受损或血液接触到带负电荷的异物表面时, FXII 与这些表面结合并被激活, 进而激活 FXI 和 FIX, 最终形成凝血酶。具体过程为: FXIIa 激活 FXI, FXIa 与 FVIIIa 结合形成复合物, 激活凝血因子 X (coagulation factor X, FX), 生成 FXa。FXa 与活化凝血因子 X (activated coagulation factor V, FVa)结合形成凝血酶原酶复合物, 将凝血酶原转化为凝血酶。外源性凝血途径由组织因子的暴露启动, 组织因子是一种跨膜蛋白, 存在于血管壁的平滑肌细胞和内皮细胞中, 也存在于单核细胞和血小板中。血管壁发生损伤时, 组织因子暴露并与血液中的 FVIIa 结合形成复合物, 进而激活 FIX 与 FX, 启动凝血过程。组织因子-FVIIa 复合物可激活 FIX, 生成 FIXa, FIXa 再与 FVIIIa 结合形成复合物, 激活 FX, 生成 FXa。FXa 与 FVa 结合构成凝血酶原酶复合物, 最终将凝血酶原转化为凝血酶。

内源性与外源性凝血途径最终均会促成凝血酶的产生。凝血酶具备多种生物学作用, 既可将纤维蛋白原转变为纤维蛋白, 也能激活血小板及其他 FXI, 进而推动血栓形成。凝血酶生成后, 纤维蛋白原在其催化下形成纤维蛋白单体, 单体间相互聚合构成纤维蛋白凝块。纤维蛋白凝块的形成是血栓形成的最终环节, 可稳定血栓结构, 防止血液流失[45]。

3.2 抗血栓活性肽的凝血酶抑制机制

凝血酶作为凝血级联反应的核心丝氨酸蛋白酶, 其活性构象由通过二硫键共价连接的轻链与重链构成。该酶呈现独特的结构特征: 其催化中心由组氨酸 57 (histidine 57, His57)、天冬氨酸 102 (aspartic acid 102, Asp102)和丝氨酸 195 (serine 195, Ser195)组成的经典催化三联体构成, 并通过 4 个特异性底物结合口袋(S1-S4)实现选择性识别; 两个关键的外位点结构域(Exosite I 和 II)分别介导纤维蛋白原/血栓调节蛋白的结合及血小板膜糖蛋白的相互作用[46–47]。近年来, 多种天然及合成多肽被发现可通过靶向这些关键结构域调控凝血酶活性。

3.2.1 活性位点竞争性抑制

在活性位点竞争性抑制方面, 贻贝肽在 7 mg/mL 质量浓度下展现出 86.96%的抑制效率, 其作用机制涉及疏水作用主导的活性位点占据。等温滴定量热实验揭示了两种不同结合模式, Peptide 26 (KNAENELGEVTVR)以强结合方式(结合位点数 n=2.251)通过氢键网络与两个位点相互作用, 而 Peptide 36 (NAESLRK)则以 1:1 化学计量比形成弱结合复合物, 这种相互作用使得多肽与凝血酶结合, 进而影响凝血酶的功能, 发挥抗血栓作用[38]。FQSEEQQQTEDELQDK 通过 49 个氢键与其他非键作用形成稳定复合物, 这种稳定的相互作用使得多肽能够紧密结合凝血酶, 影响其正常功能。其作用位点与水蛭素存在重叠区域, 特别是与 Exosite I 的赖氨酸 36-精氨酸 73 (lysine 36-arginine 73, Lys36-Arg73)结合后, 可完全阻断纤维蛋白原的结合通道, 使得凝血酶无法与纤维蛋白原结合, 从而抑制了血液凝固, 发挥抗血栓作用[11]。

3.2.2　Exosite 靶向调控机制

通过 Exosite I 靶向抑制凝血酶活性的研究亦取得重要进展。酪蛋白衍生肽(YQEPVLGPVR)通过结合该结构域间接抑制凝血酶活性, 圆二色光谱证实其能诱导凝血酶二级结构改变, 纤维蛋白原凝血时间实验显示其剂量依赖性抑制效应[48]。模拟胃肠消化产生的牡蛎肽能阻止纤维蛋白原被凝血酶的 Exosite I 基序识别, 从而防止凝血酶对纤维蛋白原进一步水解。其中精氨酸-甘氨酸序列(arginine-glycine, RG)精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列(arginine-glycine-aspartic acid sequence, RGD)可作为竞争性底物消耗凝血酶活性, 消化时间延长导致含 RG 肽段丰度增加, 显著降低纤维蛋白生成效率[14]。

热带蜱虫来源新型多肽(variegin)展现出多靶点抑制特性, 晶体结构解析表明 variegin 可同时作用于催化位点、Exosite I 及主要结合位点, 通过破坏电荷中继系统实现高效抑制。该多肽的关键氨基酸残基与凝血酶催化三联体形成氢键网络, 为可调控抑制剂的理性设计提供了结构基础[49]。

3.2.3　抗血栓活性肽抑制 FXI 的抑制机制

近年研究发现多种生物活性肽可通过靶向凝血级联上游因子增强抗凝效果。DE-FILIPPIS 等[50]从蜱虫中提取的蜱抗凝肽(tick anticoagulant peptide, TAP)通过特异性结合并抑制 FXa, FXa 在凝血过程中处于关键位置, 它能在凝血酶原酶复合物的作用下将凝血酶原转化为凝血酶, 而 TAP 对 FXa 的抑制可减少凝血酶的生成, 从而阻碍纤维蛋白原向纤维蛋白的转化以及血小板的激活, 抑制血液凝固, 发挥抗凝作用。JO 等[51]从单环刺蛘中分离出的多肽能特异性结合 FIXa, 抑制 FIXa 与 FX 的相互作用, 降低 FIXa 活性, IC_{50} 为 42.6 μg/mL, 推测其作为丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, SERPIN), 通过抑制内源性凝血途径中 FX 向 FXa 的转化来延长凝血时间。JUNG 等[52]从泥蚶中分离出一种新型抗凝血蛋白(tegillarca granosa anticoagulant protein, TGAP)能够特异性抑制 FVa, 通过表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)技术分析发现它能与 FVa 结合, 抑制 FII 与 FVa 的相互作用, 干扰凝血酶原酶复合物形成, 从而抑制凝血酶生成, 延长凝血时间。CHENG 等[40]从牡蛎中分离出的新型抗凝肽(peptide-3-crassostrea gigas, P-3-CG)对多种 FXI 有不同程度抑制作用, 对 FIXa 抑制能力较强(IC_{50} 为 0.71 mmol/L), 对 FXIa 抑制效果不佳, 对 FXa、凝血酶也有一定抑制活性。

上述结果表明, 天然多肽在凝血调控网络中存在多元作用机制, 其结构可塑性可为新型抗血栓药物的研发提供大量分子模板。后续研究应着重优化多肽药物的靶向特异性, 提高其在体内的代谢稳定性, 以此突破现有抑制剂在临床应用中的局限。目前相关研究仍以体外实验为主, 未来需进一步开展抗血栓肽的体内药效研究, 可采用角叉菜胶诱导小鼠尾静脉血栓模型、凝血酶诱导急性肺栓塞模型、胶原暴露诱导颈动脉血栓模型等, 模拟血栓疾病的病理进程, 验证抗血栓肽的治疗效果, 推动其从实验室研究向临床应用转化。同时应系统评价肽类药物的药代动力学特征与长期安全性, 重点关注其肠道吸收屏障与血浆半衰期优化, 为血栓相关疾病提供新的治疗候选药物。此外, 通过构建抗血栓肽与纳米载体的复合递送系统, 有望解决其生物利用度较低的问题, 为临床转化提供新的研究思路。

4　结束语

本文重点围绕抗血栓活性肽来源多样性、制备技术及作用机制展开阐述并总结了其研究现状。研究表明, 酶解法、微生物发酵法结合生物信息学技术有效提高了抗血栓活性肽的制备效率, 超滤与质谱联用技术则进一步提升了活性肽分离鉴定的精准度。在作用机制方面, 这类活性肽主要通过抑制凝血酶活性位点、调控外位点及干预 FXI 级联反应发挥抗血栓作用。但目前抗血栓活性肽的研究仍存在体内代谢稳定性较差、规模化工业化生产难度大、多靶点协同作用机制尚未完全明确等问题, 这些问题限制了其向临床应用的转化。后续研究应重点关注靶向性肽类药物的设计、代谢稳定性的提升方法及规模化生产技术的创新, 同时强化体内药效学与安全性评估, 探索新型药物递送系统来解决生物利用度偏低的问题。目前, 抗血栓活性肽的研究已从单一的活性筛选, 逐步向精准设计与系统调控方向转变, 其后续发展有望为血栓性疾病的防治提供更安全、高效的新途径。

参考文献

[1] WENDELBOE A, WEITZ JI. Global health burden of venous thromboembolism [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2024, 44(5): 1007–1011.

[2] 刘明波, 何新叶, 杨晓红, 等. 《中国心血管健康与疾病报告 2023》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2024, 29(4): 305–324.
LIU MB, HE XY, YANG XH, *et al*. Key points interpretation of China cardiovascular health and diseases report 2023 [J]. Chinese Journal of Cardiovascular Medicine, 2024, 29(4): 305–324.

[3] CHENG S, TU M, LIU H, *et al.* Food-derived antithrombotic peptides: Preparation, identification, and interactions with thrombin [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(sup1): S81–S95.

[4] 张琴. 华法林抗凝过量患者临床特征及相关影响因素的回顾性分析[J]. 中国处方药, 2025, 23(1): 81–84.
ZHANG Q. A retrospective analysis of clinical characteristics and related influencing factors in patients with Warfarin anticoagulation overdose [J]. China Prescription Drug, 2025, 23(1): 81–84.

[5] KANG L, HAN T, CONG H, *et al.* Recent research progress of biologically active peptides [J]. BioFactors (Oxford, England), 2022, 48(3): 575–596.

[6] RAMÍREZ-CARRETO S, MIRANDA-ZARAGOZA B, SIMÕES N, *et al.* Marine bioprospecting: Enzymes and stress proteins from the sea anemones anthopleura dowii and lebrunia neglecta [J]. Marine Drugs, 2024, 22(1): 12.

[7] PEIGHAMBARDOUST SH, KARAMI Z, PATEIRO M, *et al.* A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications [J]. Biomolecules, 2021, 11(5): 631.

[8] FOSGERAU K, HOFFMANN T. Peptide therapeutics: Current status and future directions [J]. Drug Discovery Today, 2015, 20(1): 122–128.

[9] YANG FJ, CHEN X, HUANG MC, *et al.* Molecular characteristics and structure-activity relationships of food-derived bioactive peptides [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(9): 2313–2332.

[10] TU M, XU S, XU Z, *et al.* Identification of dual-function bovine lactoferrin peptides released using simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Bioscience, 2021, 39: 100806.

[11] XU S, FAN F, LIU H, *et al.* Novel anticoagulant peptide from lactoferrin binding thrombin at the active site and exosite-I [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(10): 3132–3139.

[12] NASRI R, AMOR IB, BOUGATEF A, *et al.* Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 835–841.

[13] QIAO M, TU M, WANG Z, *et al.* Identification and antithrombotic activity of peptides from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(1): 138.

[14] CHEN H, CHENG S, FAN F, *et al.* Identification and molecular mechanism of antithrombotic peptides from oyster proteins released in simulated gastro-intestinal digestion [J]. Food & Function, 2019, 10(9): 5426–5435.

[15] CHENG S, WU D, LIU H, *et al.* A comprehensive method to explore inhibitory kinetics and mechanisms of an anticoagulant peptide derived from *Crassostrea gigas* [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6): 1491–1499.

[16] TU M, FENG L, WANG Z, *et al.* Sequence analysis and molecular docking of antithrombotic peptides from casein hydrolysate by trypsin digestion [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 313–323.

[17] 涂茂林. 牛乳酪蛋白抗血栓和降血压活性肽的筛选及结构表征[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2019.
TU ML. Screening and structural characterization of antithrombotic and hypotensive active peptides from bovine milk casein [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2019.

[18] KHIARI Z, RICO D, MARTIN-DIANA AB, *et al.* Structure elucidation of ACE-inhibitory and antithrombotic peptides isolated from mackerel skin gelatine hydrolysates [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2014, 94(8): 1663–1671.

[19] SABBIONE A, NARDO A, AÑÓN M, *et al.* Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20: 204–214.

[20] ZHANG SB. *In vitro* antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2016, 202: 1–8.

[21] XU R, HUANG Y, HOU Y, *et al.* Isolation and identification of thrombin-inhibiting peptides derived from soybean protein [J]. Food Biotechnology, 2022, 36(2): 154–172.

[22] INDUMATHI P, MEHTA A. A novel anticoagulant peptide from the Nori hydrolysate [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20: 606–617.

[23] KONG Y, HUANG SL, SHAO Y, *et al.* Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 145(1): 182–186.

[24] CHEN F, JIANG H, LU Y, *et al.* Identification and in silico analysis of antithrombotic peptides from the enzymatic hydrolysates of *Tenebrio molitor* larvae [J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(12): 2687–2695.

[25] DOMÍNGUEZ H, IÑARRA B, LABIDI J, *et al.* Comparison of amino acid release between enzymatic hydrolysis and acid autolysis of rainbow trout viscera [J]. Heliyon, 2024, 10(5): e27030.

[26] XUE F, LI C. Effects of ultrasound assisted cell wall disruption on physicochemical properties of camellia bee pollen protein isolates [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 92: 106249.

[27] 李思怡, 姜雨彤, 妥彦峰, 等. 微生物发酵法制备乳源生物活性肽研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(21): 312–321.
LI SY, JIANG YT, TUO YF, *et al*. Research progress on the preparation of milk-derived bioactive peptides by microbial fermentation [J]. Food Science, 2023, 44(21): 312–321.

[28] PERES-FABBRI L, CAVALLERO A, VIDOTTO F, *et al.* Bioactive peptides from fermented foods: Production approaches, sources, and potential health benefits [J]. Foods, 2024, 13(21): 3369.

[29] 赵悦, 赵海波, 冷小京, 等. 多肽化学合成技术进展及多肽计量发展现状[J]. 计量科学与技术, 2024, 68(12): 39–44.
ZHAO Y, ZHAO HB, LENG XJ, *et al*. Progress in polypeptide chemical synthesis technology and the development status of polypeptide metrology [J]. Metrology Science and Technology, 2024, 68(12): 39–44.

[30] 华羽彤, 李尹, 董瑞娟, 等. 基于分子模拟技术筛选宽体金线蛭抗凝活性肽[J]. 中国现代中药, 2023, 25(9): 1940–1948.
HUA YT, LI Y, DONG RJ, *et al*. Screening of anticoagulant active peptides from whitmania pigra whitman based on molecular simulation technology [J]. Modern Chinese Medicine, 2023, 25(9): 1940–1948.

[31] ZAKY AA, WITROWA-RAJCHERT D, NOWACKA M. Insights into plant-origin bioactive peptides: Extraction, bioactivities, in silico approaches, and applications [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2025, 31(2): 27.

[32] GERÓNIMO-ALONSO M, ORTÍZ-VÁZQUEZ E, RODRÍGUEZ-CANTO W, *et al.* Antithrombotic and anticariogenic activity of peptide fractions from cowpea (*Vigna unguiculata*) protein hydrolysates [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2025, 105(1): 209–217.

[33] 李思楠, 王萌, 安宇, 等. 复合菌种发酵制备白芸豆多肽工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(3): 213–221.
LI SN, WANG M, AN Y, *et al.* Process optimization of preparing white kidney bean polypeptides by fermentation with composite strains and

analysis of their antioxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(3): 213–221.

[34] 张宇, 陈胜现, 黎玮, 等. 微生物发酵法制备茶籽多肽及其功能活性研究[J]. 安徽化工, 2024, 50(2): 45–49, 54.
ZHANG Y, CHEN SX, LI W, *et al*. Preparation of tea seed polypeptides by microbial fermentation method and study on their functional activities [J]. Anhui Chemical Industry, 2024, 50(2): 45–49, 54.

[35] PÉREZ-ESCALANTE E, JAIMEZ-ORDAZ J, CASTAEDA-OVANDO A, *et al.* Antithrombotic activity of milk protein hydrolysates by lactic acid bacteria isolated from commercial fermented milks [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2018, 61(5): e18180132.

[36] WADA Y, LÖNNERDAL B. Bioactive peptides derived from human milk proteins-mechanisms of action [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2014, 25(5): 503–514.

[37] WANG XQ, YU HH, XING RE, *et al.* Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides [J]. BioMed Research International, 2017. DOI: 10.1155/2017/9746720

[38] 冯立婷. 酶解制备贻贝抗血栓肽及其作用机制初探[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
FENG LT. Preparation of antithrombotic peptides from mussels by enzymatic hydrolysis and preliminary exploration of their action mechanism [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017.

[39] YU Z, CHEN Y, ZHAO W, *et al.* Identification and molecular docking study of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Salmo salar* using in silico methods [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(10): 3907–3914.

[40] CHENG S, WU D, LIU H, *et al.* A novel anticoagulant peptide discovered from *Crassostrea gigas* by combining bioinformatics with the enzymolysis strategy: Inhibitory kinetics and mechanisms [J]. Food & Function, 2021, 12(20): 10136–10146.

[41] OUYANG Y, YUE Y, WU N, *et al.* Identification and anticoagulant mechanisms of novel factor XIa inhibitory peptides by virtual screening of a in silico generated deep-sea peptide database [J]. Food Research International, 2024, 197: 115308.

[42] SONG C, ZHANG L. Intelligent design of antithrombotic peptide targeting collagen [J]. Langmuir, 2024, 40(18): 8.

[43] 李汉琪, 王治军, 郑清瑶, 等. 多肽组学联合分子对接筛选玉足海参抗血栓肽[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(20): 104–112.
LI HQ, WANG ZJ, ZHENG QY, *et al.* Screening of antithrombotic peptides from holothuria leucospilota by peptidomics combined with molecular docking [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(20): 104–112.

[44] FURIE B, FURIE BC. Mechanisms of thrombus formation [J]. The New England Journal of Medicine, 2008, 359(9): 938–949.

[45] ZHANG L, LI Z, YE X, *et al.* Mechanisms of thrombosis and research progress on targeted antithrombotic drugs [J]. Drug Discovery Today, 2021, 26(10): 2282–2302.

[46] KOMIVES EA. Dynamic allostery in thrombin—a review [J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2023, 10(10): 1200465.

[47] TROISI R, NAPOLITANO V, ROSSITTO E, *et al.* Steric hindrance and structural flexibility shape the functional properties of a guanine-rich oligonucleotide [J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(16): 8880–8890.

[48] LIU H, TU M, CHENG S, *et al.* An anticoagulant peptide from beta-casein: Identification, structure and molecular mechanism [J]. Food & Function, 2019, 10(2): 886–892.

[49] KOH CY, KUMAR S, KAZIMIROVA M, *et al.* Crystal structure of thrombin in complex with s-variegin: Insights of a novel mechanism of inhibition and design of tunable thrombin inhibitors [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26367.

[50] DE-FILIPPIS V, ACQUASALIENTE L, PIERANGELINI A, *et al.* Chemical synthesis and structure–activity relationship studies of the coagulation factor xa inhibitor tick anticoagulant peptide from the hematophagous parasite *Ornithodoros moubata* [J]. Biomimetics, 2024, 9(8): 485.

[51] JO HY, JUNG WK, KIM SK. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43(2): 179–184.

[52] JUNG WK, JO HY, QIAN ZJ, *et al.* A novel anticoagulant protein with high affinity to blood coagulation factor va from *Tegillarca granosa* [J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 40(5): 832–838.

(责任编辑: 安香玉　韩晓红)