

药用动物源蛋白质多肽化学组成和生物活性的研究进展

周凡星¹, 童明慧¹, 刘娟¹, 李蓉¹, 方爱青¹, 郭英球², 时贞平², 李娟^{1,3,4*} (1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 长沙欧邦生物科技有限公司, 长沙 410000; 3. 湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心, 长沙 410208; 4. 湖南省中美老年性退行性疾病治疗药物国际联合研究中心, 长沙 410208)

摘要: 动物药是中药的重要药源之一, 近年来, 其生物活性物质逐步被发现, 尤其是动物药中共有物质——蛋白质和多肽类成分, 具有良好的抗菌、抗肿瘤和抗血栓等生物活性。本文选择目前研究较多的蟾蜍科、不同科属的地龙和全蝎等动物来源中药, 检索国内外数据库, 查阅从 1989 年至今与动物蛋白质和多肽相关的研究资料, 重点综述了这些动物来源蛋白质/多肽的组成、成分分析和生物活性, 为动物来源蛋白质和多肽的进一步研究和应用提供参考依据。

关键词: 动物蛋白质; 动物多肽; 生物活性; 抗菌; 纤维蛋白溶解; 抗病毒

doi:10.11669/cpj.2024.01.002 中图分类号:R932 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)01-0007-11

Research Progress in Chemical Compositions and Bioactivities of Medicinal Animal-Derived Proteins Peptides

ZHOU Fanxing¹, TOGN Minghui¹, LIU Juan¹, LI Rong¹, FANG aiqing¹, GUO Yingqiu², SHI Zhenping², LI Juan^{1,3,4*} (1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208, China; 2. Changsha Oubang Biotechnology Co., Ltd., Changsha, 410000, China; 3. Hunan Engineering Technology Research Center for Bioactive Substance Discovery of Chinese Medicine, Changsha, 410208, China; 4. Hunan Province Sino-US International Joint Research Center for Therapeutic Drugs of Senile Degenerative Diseases, Changsha, 410208, China)

ABSTRACT: Animal medicine is one of the important sources of Chinese medicine for disease prevention and treatment. In recent years, its bioactive substances have been gradually discovered, especially the protein and peptide components, which are co-occurring substances in animal medicine, with good biological activities such as antibacterial, anticancer and antithrombotic. In this paper, it was selected animal sources such as toad, different families of earthworms and scorpion, which have been studied more frequently, and searched domestic and international databases to review the research data related to animal proteins and peptides from 1989 to the present, focusing on reviewing the composition, composition analysis and biological activities of the proteins and peptides of these animal sources, so as to provide a reference basis for further research and application of animal source proteins/peptides.

KEY WORDS: animal protein; animal peptide; bioactivity; antibacterial; fibrinolysis; antiviral

中药主要来源于植物、动物和矿物, 早在先秦的《山海经》中就记载了动物、植物和矿物品名 772 种, 有药用价值的 137 种, 其中动物药有 76 种(兽类 19 种, 鸟类 17 种, 鱼类 10 种和鱼龟类 30 种)。据第四次全国中药资源普查统计, 动物药在中药资源中的占比约为 12%。根据功效, 动物药分为具有平肝息风功效的全蝎、蜈蚣、地龙、僵蚕和牛黄等; 具有开窍功效的麝香和蟾酥等; 具有活血化瘀功效的土鳖虫、水蛭、斑蝥、穿山甲和虻虫等, 以及具有清热功效的熊胆粉和水牛角等, 其功效与各动物药的药效物质紧密联系。动物药富含糖类、脂类、蛋白质、多肽、生物碱、甾醇和萜类物质, 其中, 蛋白质/多肽是动物药中重要的共有物质, 具有良好的抗菌、抗

肿瘤和抗血栓等活性。本文对研究较多的蟾蜍科及不同科属的地龙和全蝎等, 经国内外数据库检索, 查阅从 1989 年至今动物蛋白质/多肽的相关研究资料, 综述了不同动物来源蛋白质/多肽的组成、成分分析和生物活性, 为动物来源蛋白质/多肽的进一步研究和应用提供参考依据(表 1)。

1 蟾蜍科来源蟾蜍蛋白质/多肽的研究进展

在我国, 蟾蜍的动物来源为蟾蜍科蟾蜍属中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans* Cantor) 和黑眶蟾蜍(*B. melanostictus* Schneider)^[1], 除中华大蟾蜍和黑眶蟾蜍外, 国外以同科喙蟾属巨型海蟾蜍(*Rhinella marina*) [甘蔗蟾蜍(*Bufo marinus*)] 的研究

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目资助(202110541017); 湖南省自然科学基金部门联合基金项目资助(2023JJ60472); 湖南省卫生健康委科研课题项目资助(202213055724); 湖南中医药大学中药学一流学科项目资助(校内科学[2018]3号)

作者简介: 周凡星, 女, 学士 研究方向: 中药学; 童明慧, 女, 学士 研究方向: 中药学。周凡星和童明慧为共同第一作者 * 通讯作者: 李娟, 女, 博士, 副教授 研究方向: 中药物质基础与作用机制研究 Tel: (0731)88459421

表1 动物来源蛋白质/多肽化学组成

| No. | 蛋白质/多肽名称 | 动物来源 | 提取分离部位或合成方法 | 氨基酸序列 | 参考文献 |
|-----|----------------|--|--------------------|--|--------|
| 1 | Buforin I | <i>Bufo bufo gargarizans Cantor</i> | 胃组织 | AGRCKQGCKVRKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNV | [2] |
| 2 | Buforin II | | Buforin I 结构经合成制得 | TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK | [2] |
| 3 | Fl(LK1) | <i>Lumbricus rubellus</i> | 从动物全体分离得到的蚓激酶中分离提取 | RSGLLNFCVAVALALNDQGFRAVGRIDRISGDLAYLSCLARETFE RISEQFKLPWFSKLTIVASNDINEETILSLNEQGHKIDCFGIGT HLVTCQRQPALGCVYKMVEIN- AQPRIKLSQDVVKVTMPGNKN VFRLYGADGHALIDLQRVDESPPVEVQKVLCRHPFQESKRA YVIPTHVEPLYDVYVW- ADGRVTQAMPSELEVRDRVQNSLRTLRL QDHKRTLNPPTPKV | [2] |
| 4 | Buforin II b | | Buforin II 结构经合成制得 | RAGLQFPVG[RLLR] ₃ | [3] |
| 5 | BGCATH37 | | 皮肤分泌物 | SSRRPCRCRSCGPRLRGGYTLIGRPVKQNRPKYMWV | [4] |
| 6 | BGCATH(5-37) | | | PCRCRSCGPRLRGGYTLIGRPVKQNRPKYMWV | [4] |
| 7 | 胰岛素 A | <i>Bufo marinus</i> | 胰腺 | GIVEQCCHSTCSLELENYCN | [5] |
| 8 | 胰岛素 B | | | LANQHLCGPHLVEALYLVCGERGFYYYPKV | [5] |
| 9 | 胰高血糖素 36 | | | HSQCFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNSKRSRGGMS | [5] |
| 10 | 胰高血糖素 29 | | | HSQCFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNS | [5] |
| 11 | 胰高血糖素类似物 GLP32 | | | HAEGTFTSDMTSFLEEKAAKEFDWLKGRPK | [5] |
| 12 | 胰高血糖素类似物 GLP37 | | | HAEGTYTNDVTQFLEEKAAKEFDWLKGPQKRLS | [5] |
| 13 | Bufokinin | | 肠 | KPRPDQFYGLM | [6] |
| 14 | F1 | <i>Lumbricus rubellus</i> | 动物全体 | VVGGSDTTIGQYPHQLSLRVTG | [7] |
| 15 | F2 | | | IIGGSNASPGEFPWQLSQTRG | [7] |
| 16 | F3 | | | VIGGTNASPGEFPWQLSQRRQ | [7] |
| 17 | F4 | | | VIGGTDAAPGEFPWQLSQTR | [7] |
| 18 | F5 | | | IVGGIEARPYEFPWQVSVRRKS | [7] |
| 19 | F6 | | | IVGGIEARPYEFPWQVSVRRKS | [7] |
| 20 | EQY-5 | <i>Pheretima aspergillum</i> | 动物全体 | N 端 19 个氨基酸序列为 QIGGTNASPGEFPWQLSQTR | [8-10] |
| 21 | EFE | <i>Pheretima posthumous</i> | 动物全体自溶物 | RKKGASWFWPWSVKKR | [11] |
| 22 | EPF3 | <i>Pheretima vulgaris</i> | 动物全体 | ILGCTEARVGEIPWQLSQRRGCSHSCGASLLRPGSALSAAH CVDGAPPADVRIVAGLHLRSESTAVASLAESFLIHPYVNGE GTFPNDAIHYLLTNINSAPVENIDFALLPPDNVEQFVGFCTCVLS GWGRISASNVLDPDALQKYSIDVITTAECDSRMAAVAGADCTD AHIADFDPALQKGCSCNGDSGCPMNCPLSECFVAGVTSWGI SGGGACLPEYPSVYTRTFYRQWIIDNIR | [12] |
| 23 | D2(8) | | 动物全体 | IVGGYTCCA | [13] |
| 24 | Band13 | | 动物全体 | GVHLTDAEKA | [13] |
| 25 | Band9 | | | 同 16 | [13] |
| 26 | Band7 | | | GVVISIANQKGGVG | [13] |
| 27 | ARSP1 | | 动物全体 | N 端 25 个氨基酸序列为 IIGGTNASPGEFPWQLSQTRGGSHS | [14] |
| 28 | F-1 | | 动物全体 | Ac-AMVSS | [15] |
| 29 | F-2 | | | Ac-AMVGT | [15] |
| 30 | Lumbricin-PG | <i>Pheretima guillelmi</i> | 皮肤分泌物 | FSRYARMRDSRPWSDRKNYSQPQFTYPPKAPPEKLIKW NNEGSPIFEMPAEGGHIEP | [16] |
| 31 | VQ-5 | | 体腔液 | VSSVQ | [17] |
| 32 | AQ-5 | | | AMAQQ | [17] |
| 33 | GGNG2 | <i>Eisenia foetida Pheretima vittata</i> | 动物全体 | GKCAGQWAIHAAGNGOH | [18] |
| 34 | GGNG3 | | | PKCSRWAHSCGGNGOH | [18] |
| 35 | GGNG1 | <i>Eisenia foetida</i> | 肠道 | ARPKCAGRWAHSCGGNGOH | [18] |
| 36 | ANTP | | 毒液 | N 端前 25 位氨基酸残基序列为 VRDGYIADDKNCAYFCG RNAYCDDE | [19] |
| 37 | AGAP | | 毒腺 | VRDGYIADDKNCAYFCGRNAYCDDECKNKAESGYCQW AGVYGNACWCYKLPDKVPIRVPGKCNCG | [20] |
| 38 | CTX | <i>Leiurus quinquestratum</i> | 毒液 | MCMPCFITTDHQMARDKDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR | [21] |
| 39 | BmKa1 | | 腺体 | MKPRVFLLFLLVAAMIETGESENEEGSNESGKSTEAKNT DASVDNEDSDIDGSD | [22] |
| 40 | Bmka2 | | | MSSKTLVLLLVGVLVSTFFTTADAYPASMDNSDDALEELDN LDLDDYDFLEPADFVLLDMWANMLESDFDDME | [22] |
| 41 | BmKb1 | | | MEIKYLLTVFLVLLIVSDHCQAFVLSLIPSAISGLISAFKGRR KRDNLNGYIDHFKNFRKRDAAELELLSKLPIY | [22] |
| 42 | BmKn2 | | | MKSQTFFLLFLVLLAISQSDAFIGAIARLLSKIFGKRSMGDM DTMKYLYDFLSAADLQTLQKLMENY | [22] |
| 43 | BmKlpp | | 蝎子毒液固相合成 | FRFGSFLKVMKSKLAKLRSKGGKQLLDYANKVLNGPEEE AAAPAE | [23] |

| No. | 蛋白质/多肽名称 | 动物来源 | 提取分离部位或合成方法 | 氨基酸序列 | 参考文献 |
|-----|-------------|-------------------------------|-------------|--|------|
| 44 | Kn2-7 | | 毒液 | FIKRIARLLRKIF | [24] |
| 45 | Pantinin-1 | <i>Pandinus imperator</i> | 尾巴 | MKTQFVILMITVILMQMLVQTEGGILGKLVWEGFKSIVGKRGL NDRDQLDDLFDSDLSADIKLLKEMFK | [25] |
| 46 | Pantinin-2 | | | MKAQFAILLITLVLFQMFQSEAIWKGISLLGKRGLNN LNDDELDFDGEITKADLDFMREIMK | [25] |
| 47 | Pantinin-3 | | | MKTQFAILLIALVLFQLLSQSDAFLSTIWNKISLLGRRGLNE LDNDELDFDGEISQADIDFLKELMS | [25] |
| 48 | SVP B5 | | 毒腺 | VRDGYIADDKNCAYFCGRNAYCDDECKKNGAESGYCQQAG VYYNACWCYLLDDVVIHPSGCDQW | [26] |
| 49 | BMK 9(3)-1 | | 毒腺 | GRDAYIADSENCYPYFCGANPN | [27] |
| 50 | BMK 9(3)2 | | | GRDAYIADSENCYPYTCALNP | [27] |
| 51 | BmTXKS3 | | 毒腺中克隆 | MKIFFAILLILAVCSMAIWTVNGTPFAIKCATDADC SRKCPG NPPCRNGFCACT | [28] |
| 52 | BmTXLP2 | | | MVKMQVIFIAFIAVIACSMVYGDSLSPWNEGDTYYGCQRQ TDFECNKICKLHLASGSCQQPAPFVKLCTCQGIDYDNS FFFGALEKQCPKLE | [28] |
| 53 | BmAP1 | | | MKFVFAFALFVIFLFCFSQSLSQSYFRCRDDEVDNCISNCGP PRCSNILNTYPCNLGPLCTPGCKCKDGRVYDNQGRVLTQE CFQK | [28] |
| 54 | HsTX1 | <i>Heterometrus spinnifer</i> | 毒素固相合成 | ASCRTPKDCADPCRKETGCPYKCMNRKCKCNR | [29] |
| 55 | Pi5 | | 毒液 | VAKCSTSECGHACQAGCRNSGCRYGSCICVGC | [30] |
| 56 | Pi6 | | | VDACYEACMHMNSDDCIEACKNPVPP | [30] |
| 57 | AEP | <i>Buthus martensii</i> | 毒液 | N 端前 50 个氨基酸残基为 DGYIRGSDNCKVSCLLGNEGC NKECRAYGASYGYCWTVKLAQDCEGLPDT | [31] |
| 58 | BmK M4 | | 毒液 | VRDAYIAKPENCVYHCAGNEGC- NKLCDNGAESGYCQWGR YGNACWCIKLPDDVPIRVPGKCH | [32] |
| 59 | BmK M1 | | | VRDAYIAKPHNCVYECARNEYCNDLCTKN- GAKSGYCQWVVK YGNACWCIELPDNPIRVPGKCH | [32] |
| 60 | BmK M8 | | | GRDAYIADSENCYFCGSNPYCNVCTENGAKSGYCQWAGR YGNACYCIDLPASERIEGGRCG | [32] |
| 61 | MAKATOXIN-1 | <i>Buthus martensii</i> | 毒液 | GRDAYIADSENCYTCALNPYCNLDLTKNGAKSGYCQWAG RYGNACWCIDLPDKVPIRIS GSCR | [33] |

为主,并集中在动物耳后腺和皮肤腺体等干燥分泌物,及动物体内胃、胰腺、肠等组织中蛋白质/多肽类成分的研究。

1.1 抗菌作用

1996年, Park等^[2]采用酸水从 *B. bufo gargarizans* 胃组织中提取得到总多肽,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)分析,所含肽类成分的相对分子质量均小于14 000,结合高效液相色谱法(HPLC)、Tricine-SDS-PAGE和MALDI质谱技术,分离并鉴定了一个新的抗菌肽 buforin I (1,表1),其结构中39个氨基酸有37个氨基酸终端残基与非洲爪蟾组蛋白H2A相同,并在 buforin I 结构的基础上,经胞内蛋白酶Lys-C裂解、Milligen pepsynthesizer 9050蛋白质固相合成和HPLC富集纯化,制得多肽 buforin II (2)。 buforin I 和 buforin II 对革兰阳性菌(G^+ :枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、变形链球菌和恶臭假单胞菌)、革兰阴性菌(G^- :大肠杆菌、伤寒杆菌和沙雷杆菌)和真菌(白念珠菌、新型隐球菌和酵母菌)等有较强的抑制作用,抑菌活性为阳性对照蛙皮素2(magainin 2)的10倍, buforin II 的抑菌活性高于 buforin I,且对真菌的抑制作用最佳。该团队^[34]于2009年报道了二者的抑菌机制, buforin I 是伴随胃黏膜细胞分泌盐酸和胃蛋白酶原进入管腔,充当胃表面的生物膜来抑制细菌生长; buforin II 可在不损伤细菌细胞膜的情况下,快速进入细胞膜,与细胞内大分子核酸结合,杀灭细菌,其抗菌效力取决于

细胞的通透效率^[35],脯氨酸铰链是其细胞穿透性的关键结构。此外,该团队在2008年合成的 buforin II b 因序列中间含有脯氨酸铰链,C端有一个典型的 α 螺旋序列,表现出比 buforin II 更强的抗菌活性^[3,36]。同年, Xu等^[37]从 *B. bufo gargarizans* 的鲜皮中分离得到多肽 F-I、F-II 和 F-III,其中多肽 F-III 的含量最高(78%)。3种多肽对 G^+ (枯草杆菌、金黄色葡萄球菌)和 G^- (大肠杆菌、绿脓杆菌)均具有较强的抑菌作用,F-III 的抑菌效果最佳。2015年, Sun等^[4]从 *B. bufo gargarizans* 皮肤分泌物中得到一个全新的能编码抗菌肽 BG-CATH 的 cDNA,分别作用于 BG-CATH 前体 C 端二元裂解信号处的2个可能的切割位点—— $K^{133}R^{134}$ -或 $R^{137}R^{138}$ -,制得 BG-CATH37(5)和 BG-CATH(5-37)(6),结构中均含有两个半胱氨酸,可形成分子内二硫键。BG-CATH37 和抗菌肽 BG-CATH 第5至37这一段的多肽片段对人体病原菌(大肠杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌等)的抑制作用较弱,最低抑菌浓度(MIC) $\geq 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,但对 *B. bufo gargarizans* 栖息地常见的水生微生物如灿烂弧菌、海豚链球菌和产气单胞菌等,有较强的抑菌活性, MIC 为 $3.125 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2 抗肿瘤作用

Park等^[3]在 buforin II 基础上,人工合成 buforin II b 多肽(4),其可与癌细胞表面神经节苷酯作用,具有特异性靶向定位,穿过癌细胞膜进入细胞内,诱导癌细胞线粒体依赖性

凋亡,从而对 62 株癌细胞有选择性杀伤作用,半数抑制浓度(IC_{50})为 $7.2 \sim 23.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中,对 jurkat 和 Hela 细胞的 IC_{50} 分别为 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,比阳性对照 magainin G ($IC_{50} 34 \sim 68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 作用更强,而 buforin II 对成人成纤维细胞、小鼠胚胎成纤维细胞和外周血淋巴细胞等正常细胞无影响, IC_{50} 约为 $350 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。当 buforin II b 的浓度大于 $5 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,对后肢移植 NCI-H460 细胞的肿瘤小鼠有显著的抑制作用。2011 年,Chen 等^[38]从 *B. bufo gargarizans* 的皮肤分泌物分离并提纯抗菌肽,将不同浓度的抗菌肽作用于大肠癌细胞 SW 480,当浓度为 $0.1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,SW 480 细胞数量明显减少,细胞明显皱缩,成圆形,死细胞增多,当浓度达到 0.3 和 $0.5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,无活细胞。进一步研究表明,当浓度低于 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,抗菌肽对 SW 480 细胞的生长抑制作用不明显,当浓度为 $60 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对细胞的抑制作用与浓度呈正相关,浓度高于 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对细胞的抑制率增长比较缓慢。

1.3 调节血糖作用

1998 年,Conlon 等^[5]从 *B. marinus* 胰腺中分离并收集到 4 个色谱峰,经鉴定,第一峰包括胰岛素 A(8)、胰岛素 B(8) 和胰高血糖素 36(9)3 个多肽类成分;第二至第四峰分别是胰高血糖素 29(10)、胰高血糖素类似物 GLP-32(11) 和 GLP-37(12)。蟾蜍胰岛素(胰岛素 A 和胰岛素 B, IC_{50} 为 $11 \times 10^{-22} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 抑制 [^{125}I -Tyr-A14] 胰岛素与可溶性全长重组人胰岛素受体的结合,其抑制作用是人胰岛素 (IC_{50} 为 $42 \times 10^{-22} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 4 倍。GLP-32 和 GLP-37 促进葡萄糖反应性大鼠胰岛素瘤细胞 BRIN-BD11 中胰岛素的释放,呈浓度依赖性,当浓度为 10^{-8} 和 $10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,胰岛素分泌量明显增加,当浓度为 $10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,胰岛素释放率最大,且释放率增长至用药前的 5 倍。

1.4 其他作用

1998 年,Conlon 等^[6]从 *B. marinus* 的肠中分离得到速效肽 bufokinin(13),其与 NK-1 受体有强亲和力,可抑制 NK-1 位点选择性结合放射性配体 (^{125}I -bolton-hunter 标记 [Sar^9 , $\text{Met}(\text{O}_2)^{11}$]),与 NK-1 受体结合的能力是选择性最强的 SP 配体的 1.8 倍,但抑制与 NK-2 位点、NK-3 位点选择性结合放射配体的作用分别只有神经激肽 A (NKA)、神经激肽 B (NKB) 的 1/2。Liu 等^[39]在 CONLON J M 研究基础上,发现 bufokinin 可作用于与哺乳动物 NK-1 受体相似的 [^{125}I] BH-bufokinin 受体,对蟾蜍大肠和圆形肠肌有强效持久的解痉作用。三卡因甲烷麻醉的蟾蜍,静脉给药 bufokinin ($1 \sim 1\,000 \times 10^{-22} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可降低心脏收缩血压和舒张血压,呈剂量依赖性,随着 bufokinin 剂量增加,低血压持续时间相应增加,全身动脉血压明显下降,且引起心脏收缩动脉血压下降的半数有效量 (ED_{50}) 为 2.9pmol ,同时持续低血压的患者可以增高血压,但其对心率没有显著改变。当 bufokinin 浓度为 10^{-12} 和 $10^{-11} \times 10^{-22} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可使三卡因甲烷麻醉的蟾蜍的血压在 5 min 内回到基准值,但当给药浓度为 100 和 $1\,000 \times 10^{-22} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,血压在 60 min 后只能回到

正常血压的 95% 和 89%。此外,bufokinin 的免疫反应性纤维存在于肾动脉、坐骨神经动脉、腹侧主动脉、膀胱、舌头等血管中,bufokinin 作用于这些免疫反应性纤维,调节蟾蜍的血流动力学和感觉神经功能。

2 不同科属来源地龙蛋白质/多肽的研究进展

2020 年版《中国药典》记载的地龙来源为钜蚓科动物参环毛蚓 [*Pheretima aspergillum* (*E. Perrier*)]、通俗环毛蚓 (*P. vulgaris* Chen)、威廉环毛蚓 [*P. guillelmi* (*Michaelsen*)] 或栉盲环毛蚓 (*P. pectinifera* Michaelsen)^[40],除上述来源,国外还重点研究了同科动物环毛蚓 (*P. vittata*) 和印度蚯蚓 (*P. posthumous*) 及正蚓科动物粉正蚓 (*Lumbricus rubellus*) 和赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 等。

2.1 纤维蛋白溶解作用

1991 年,Mihara 等^[41]从 *L. rubellus* 的生理盐水提取液中分离得到蚓激酶 (lumbrokinase), 相对分子质量 $20\,000 \sim 30\,000$,等电点 (PI) 3.4,是一种热稳定性的酶,且具有较宽的最佳 pH $3 \sim 10$,可水解富含溶酶原和纤溶酶原游离的纤维蛋白平板,水解前者的活性更强。当 pH 7.4, 37°C ,二异丙基氟磷酸盐 (DFP)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (SBTI) 和抗蛋白酶肽可有效抑制 lumbrokinase 活性,但抗纤溶酶剂和 t-环氨基酸衍生物 (t-AMCHA) 对其无抑制作用。lumbrokinase 经 DEAE-纤维素柱色谱分离得到 F-I、F-II 和 F-III,均具有纤维蛋白溶解活性,且可以溶解酪蛋白;F-I 和 F-III 继续经 Sephadex G-75 凝胶色谱分离得到 F-I-0、F-I-1、F-I-2 和 F-III-1、F-III-2,其中,F-III-1 和 F-III-2 均为胰蛋白酶,能分解精氨酸和赖氨酸键,这 6 个蛋白的相对分子质量在 $23\,500 \sim 34\,200$ 范围,PI $3.52 \sim 4.12$,其纤维蛋白溶解活性可被白扁豆胰蛋白酶抑制剂 (LBTI) 和 DFP 完全抑制;而 SBTI 仅完全抑制 F-II、F-III-1 和 F-III-2 的活性,对 F-I-1 和 F-I-2 表现出较弱的抑制作用。

2004 年,Cho 等^[7]从 *L. rubellus* 分离得到 6 个具有水解纤维蛋白活性的 lumbrokinase, F1 ~ F6 ($14 \sim 19$),均为多肽链,相对分子质量依次为 24.6、26.8、28.2、25.4、33.1 和 33.0。在 50°C , pH $4 \sim 12$ 时,这六种蚓激酶的活性最佳,纤溶活性大小依次为 $F6 > F2 > F5 > F3 > F1 > F4$;降解酪蛋白活性大小为 $F2 > F1 > F5 > F6 > F3 > F4$ 。同时发现苯甲磺酰氟 (PMSF) 可完全抑制 F1 ~ F4 的活性,抑酶肽、甲苯磺酰赖氨酰氯甲酮 (TLCK)、N-(对甲苯磺酰基)-L-苯丙氨酸甲酰甲基氯酮 (TPCK)、SBTI、LBTI 以及亮肽素均可抑制 F5 和 F6 的活性。同年,Fang 等^[42]从 *P. guillelmi* 的全体匀浆中分离得到 3 个较纯同工酶,命名为 EFE-II、EFE-III 和 EFE-IV,比活力分别为 $1\,050$ 、 $1\,250$ 、 $2\,000 \text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。经 Astrup 法测定,当 pH 为 $4.5 \sim 7.6$,EFE-IV 性质稳定;当 pH 为 6.5,该酶活力最高;当温度 $< 55^\circ\text{C}$ 时,酶比较稳定,活力基本不变;当温度为 70°C ,酶活力保持 50%。蚯蚓纤溶酶 EFE-IV ($1.25 \text{kU} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $2.5 \text{kU} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对血栓的抑制率分别为 35.1% 和 46.3%;EFE-IV (iv, $2.5 \text{kU} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的纤维蛋白溶解酶活性较

强,可使 ELT 显著缩短。Zhang 等^[8-10]从 *P. aspergillum* 的鲜品中得到蛋白酶 EQY-1、EQY-2、EQY-3、EQY-4 和 EQY-5 (20),相对分子质量依次为 ($> 97\ 000$)、 $60\ 500$ 、 $47\ 900$ 、 $28\ 100$ 和 $26\ 300$,经分析 EQY-1 ~ EQY-5 均不含胱氨酸, EQY-1 和 EQY-2 均无脯氨酸,苯丙氨酸含量最高;EQY-3 无组氨酸,赖氨酸含量最高;EQY-4 无组氨酸和脯氨酸,缬氨酸和赖氨酸含量较高;EQY-5 中无组氨酸和谷氨酸,丙氨酸和亮氨酸含量较高。经溶圈效价测定, EQY-1、EQY-2、EQY-3 和 EQY-4 无明显活性,以尿激酶效价计, EQY-5 效价为 $5\ 229\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$,在 pH 5,温度低于 $40\ ^\circ\text{C}$ 时,活性最强。2011 年,Trisina 等^[43]从 *L. rubellus* 中获得的 DLBS1033 蛋白提取物,该提取物由一群特有的粉正蚓低相对分子质量蛋白 (lumbricus low molecular - weight proteins, LLP) 组成,相对分子质量小于 100×10^3 ,当 pH 4 ~ 14, $50\ ^\circ\text{C}$ 时, DLBS1033 最稳定,且降解酪蛋白的活性最强,其可作用于纤维蛋白原的 α (66×10^3)、 β (54×10^3) 和 γ (48×10^3) 3 条多肽链,具有快速且长效的纤溶活性,且对纤维蛋白原的 α 链和 γ 链的溶解作用强于 β 链,其中, α 链在凝血酶诱导生成纤维蛋白过程中起重要作用。当 DLBS1033 浓度为 $60\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,可通过提高血小板 cAMP 浓度和抑制 Ca 通道,延长血凝块形成的时间,从而发挥抗血栓作用。2016 年,Verma 等^[11]从 *P. posthumous* 分离得到一个丝氨酸蛋白酶 EFE (21),由 6 种丝氨酸组成,相对分子质量 29.5,当 pH 4 ~ 12, $20 \sim 60\ ^\circ\text{C}$ 时, EFE 稳定,且具有蛋白水解活性,当 pH 8, $40\ ^\circ\text{C}$, EFE 浓度为 $1.2\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,蛋白水解活性最强。EFE 可激活循环中的血浆蛋白原,从而导致以血浆蛋白为基础的凝块溶解,并可直接作用于纤维蛋白,水解纤维蛋白原并激活纤溶酶原和凝血酶原。此外, EFE 具有广泛底物亲和力,这与其二级结构(如螺旋型、线型、翻转型)和高比例的无序酶区域有直接相关性。同年, Fu 等^[44]通过蛋白质均质化 10 min、中空纤维膜分离技术结合尺寸排除色谱法从 *L. rubellus* 的蚓激酶中分离得到 3 个高纯度的蛋白组分 F-I、F-II 和 F-III,其中, F-I (LK1) (3) 的相对分子质量为 25.8 kDa,具有高的酪蛋白水解活性,以尿激酶效价计,展示出 $60\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 纤溶活性。

2020 年, Wu 等^[45]从 *P. guillelmi* 中分离得到一个抗血栓活性物质 DPF3,比活力为 $(101.56 \pm 9.58)\ \text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$,蛋白质分布于 $26 \times 10^3 \sim 34 \times 10^3$,有两条明显的条带,分别命名为 DPF3 ID NO. 1 和 DPF3 ID NO. 2, Byonic 测序,最高序列为 $> \text{Ac}\ 44553_g1_il_1$ 和 $> \text{Dc}43026_g1_il_2$,分别含 329 和 241 个氨基酸,相对分子质量为 24 462.094 和 28 519.526 Da,两者均属于纤溶酶类或蚓激酶类。DPF3 ID NO. 1 和 DPF3 ID NO. 2 对纤维蛋白、纤维蛋白原、纤溶酶原均有直接作用,而对凝血酶无直接作用, DPF3 对纤维蛋白原的水解作用呈剂量和时间相关性,对 3 条链的水解速度为 α 链 $>$ β 链 $>$ γ 链,水解程度为 γ 链 $>$ α 链 \approx β 链,当浓度为 $6.25\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,可水解大部分的 α 链;当浓度为 $12.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,可水解大部分的 β 链;当浓度为 $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,才能完全水解纤维蛋白原的 α 和 β 链;当浓度为 $50\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,能够完全水解 γ 链。体

外血栓溶解试验发现在具有相似纤维蛋白水解作用的浓度下,尿激酶对照组仅使 6% 的栓块溶解,而 DPF3 可水解 20% 的栓块,高浓度的 DPF3 ($3\ 709.9\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 甚至可以水解 80% 的血栓,对血栓具有良好的溶解作用,且呈剂量和时间相关性。同时体外考察 DPF3 对凝血四项的影响,发现 DPF3 能显著延长 APTT 并降低 Fib 的含量,且具有延长 TT 的作用趋势,但对 PT 无显著影响,推测 DPF3 通过内源性或/和共同凝血途径以及第三种凝血途径产生抗血栓作用。2021 年, Zhang 等^[12]从 *P. vulgaris* 粗酶提取物中获得片段 PvQ。PvQ 对纤维蛋白和纤维蛋白原的比活力均较 *P. vulgaris* 粗酶提取物的高,且 PvQ 低中高浓度 ($342, 684, 1\ 368\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 可溶解超过 80% 的血栓块,其溶栓作用强于蚓激酶对照品 (41.97%),同时,当温度 $\geq 60\ ^\circ\text{C}$ 或 pH < 7 时, PvQ 活性显著降低或失活,而温度 $\leq 50\ ^\circ\text{C}$ 和碱性条件下, PvQ 活性则不受影响或受影响较少。2022 年, Liu 等^[13]从 *P. vulgaris* 全体提取纯化得到一个全新的类似胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶 EPF3 (22),相对分子质量 25 136.24,由 241 个氨基酸组成,经 WISS-MODEL 测定,其包含 α 螺旋结构 (3.9%)、 β 折叠 (43.8%)、 β 转角 (21.1%)、无规则线团 (32.1%) 等多种形式的二级结构。当 pH 为 7.0 ~ 11.0,温度低于 $40\ ^\circ\text{C}$, EPF3 结构稳定;当 pH 为 8, $50\ ^\circ\text{C}$, EPF3 的纤溶活性最强,且为蚓激酶的 5 倍。EPF3 主要通过直接纤溶,纤维蛋白原水解和纤溶酶原激活,发挥溶血栓的作用。此外, EPF3 也可以通过降解 3 条纤维蛋白原链 (α 、 β 和 γ),进一步将水解产物水解为更小的片段来发挥抗凝作用。

2.2 抗肿瘤作用

2002 年, Zhao 等^[46]从 *E. foetida* 全体的粗提物 D 中分离得到 D1、D2 和 D3 组分,其中, D2 组分相对分子质量为 $10 \times 10^3 \sim 60 \times 10^3$, PI 为 3.25 ~ 3.75,采用 HiPrepTM 16/60 DEAE 预装柱,从 D2 中分离得到 D2(8) (23),相对分子质量为 23 335.14。D2(8) 可有效抑制肿瘤 K562 细胞、Hela 细胞和 SY5Y 细胞的生长,在纤维蛋白平板实验中展示出激酶活性,以尿激酶效价计,活力单位为 $8\ 600\ \text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。D2 组分经非变性 PAGE 电泳分离得到 Band13 (24)、Band9 (25)、Band8、Band7 (26)、Band6 和 Band5,相对分子质量分别为 15 983.48、23 334.69、33 051.03、33 317.19、34 157.81 和 66 645.09,其中 Band9 和 D2(8) 是同一蛋白质,为丝氨酸蛋白酶,具有抗肿瘤和激酶活性。2003 年, Xie 等^[14]从 *E. foetida* 全体磷酸缓冲液中分离得到抽提物,其蛋白质含量为 $(60.43 \pm 2.36)\%$ 。当抽提物浓度为 $60 \sim 110\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对癌细胞 HCT-116、MGC803、HeLa 及 K562 的杀伤活性达到 50%,其中, K562 细胞最为敏感。该抽提物 (ip, 28 或 $36\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 可延长腹水型荷瘤小鼠的生存期,且效果远远好于空白对照组 (ip, 每天 0.2 mL 生理盐水) 和环磷酸胺标准药物组 (ip, $20\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),其主要通过癌细胞的直接杀伤作用和体质改善、增强身体等特异性免疫调节的间接作用来延长生存期。团队继续从该抽提物中分离鉴定出一个凋亡相关丝氨酸蛋白酶 1 (ARSP1) (27),

pI < 3.8, 表观相对分子质量为 28 000, 糖蛋白染色法鉴定 ARSP1 为糖蛋白(或糖肽), 其结构与丝氨酸蛋白酶类高度同源, 进一步由 PMSF 对其纤溶酶活性的抑制实验证明属于丝氨酸蛋白酶类。ARSP1 ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 可诱导人结肠癌细胞 HCT-116 凋亡杀死癌细胞。纤维蛋白平板法表明 ARSP1 也具有纤溶酶和纤溶酶原激活酶活性^[15]。

2.3 抗菌作用

2002 年, Zhang 等^[47] 从 *E. foetida* 全体中分离得到抗菌肽 F-1 (28) 和 F-2 (29), 相对分子质量为 535.27 和 519.27。F-1 和 F-2 对鸡大肠杆菌、绿脓杆菌、鲍氏不动杆菌、土生克雷伯氏菌有抑制作用, MIC 分别为 11.4 和 $12.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对粪肠球菌的 MIC 为 22.8 和 $25.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对白色念珠菌抑制作用较弱。该团队继续从 *E. foetida* 全体中分离得到抗菌肽 EABP-1^[16], 该抗菌肽的最大吸收波长 277.16 nm , 分子量约为 20 000, 对鸡大肠杆菌、绿脓杆菌、鲍氏不动杆菌、土生克雷伯氏菌的 MIC 均为 $11.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对粪肠球菌的 MIC 为 $22.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对白色念珠菌抑制作用较弱。2011 年, Li 等^[48] 从 *P. guillelmi* 皮肤分泌物中分离得到一种全新的曲霉毒素样抗菌肽 lumbricin-PG (30), 含 9 个碱性氨基酸残基和 8 个酸性氨基酸残基, 不含半胱氨酸, 紫外吸收最大波长 280 nm , 分子量为 6 909.07。lumbricin-PG 对铜绿单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的 MIC 分别为 2.5 、 5.0 、 20.0 和 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 有良好的抗菌活性。同时, 对人体和家兔红细胞几乎没有溶血活性。同年, Hua 等^[17] 从 *E. foetida* 体腔液中分离得到蚯蚓体腔液蛋白 ECFP, 相对分子质量为 38.6×10^3 , 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 值分别为 90 和 $45 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抑菌作用较强, 当 ECFP 浓度大于 $1.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对鸡的红细胞有显著的溶血作用。

2.4 抗炎镇痛作用

2017 年, Li 等^[18] 从 *E. foetida* 体腔液中分离得到两种全新的抗炎镇痛肽 VQ-5 (31) 和 AQ-5 (32), 相对分子质量为 519.277 和 535.218。AQ-5 ($iv, 1.25, 2.5, 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 可延长小鼠甩尾的反应时间, 延长小鼠热板反应时间, 降低醋酸引起的腹部扭动次数, 对福尔马林诱导的舔爪实验的早期神经源性疼痛 ($0 \sim 5 \text{ min}$) 和晚期炎症疼痛 ($15 \sim 30 \text{ min}$) 阶段都有抑制作用, 能抑制卡拉胶诱导的后爪水肿, 并能降低水肿组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 COX-2 的水平, 显著降低炎症中性粒细胞的数量和减轻组织结构的损伤。同时, AQ-5 (4 和 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 RAW 264.7 细胞中细胞外调节蛋白激酶 Erk1/2、应激活化蛋白激酶 JNK、Kappa B 抑制因子激酶 α/β (IKK α/β) 水平, 对丝裂原活化蛋白激酶 p38 MAPK 无影响, 而同样剂量下的 VQ-5 对此均无明显效果。

2.5 其他作用

1995 年, Oumi 等^[49] 从 *E. foetida* 肠道组织中分离得到多肽 GGNG-1 (35), 并从 *E. foetida* 和 *P. vittata* 全体中分离得到 2 个多肽 GGNG-2 (33) 和 GGNG-3 (34), 3 个多肽的相对分子质量分别为 1 756.0、1 598.6 和 1 824.8, 且均能增强 *E.*

foetida 肠组织的张力和自发收缩的频率。同时三者也能引起环节动物组织如多毛类食道和水蛭阴道的收缩, 但对软体动物和节肢动物组织均无影响。2000 年, Kobayashi 等^[50] 从 *E. foetida* 的体腔液中分离得到 1 个全新的蛋白质 Lysenin, 相对分子质量为 41 000, 在 $24 \sim 29 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 (除猴子在 $36 \text{ }^\circ\text{C}$ 测定), 对所测定的 33 种无脊椎动物中的 5 种动物的精子、39 种脊椎动物中的 30 种动物的精子有杀死作用, 这一作用主要和 Lysenin 与细胞膜上的鞘磷脂 (SM) 特异性结合从而导致细胞溶解有关, 而无 SM 的无脊椎动物的精子不会受 Lysenin 影响。2008 年, Ueda 等^[51] 从 *E. foetida* 的体腔液中分离得到适丝氨酸蛋白酶为特征的全新蛋白, 相对分子质量 27 000, 能耐热和 pH 变化。该蛋白可水解黄瓜花叶病毒和番茄花叶病毒的衣壳蛋白, 具有较强的抗病毒活性, 当 pH 9.5, $40 \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$, 抗病毒活性最强, 同时, 该蛋白活性能被各种丝氨酸蛋白酶抑制剂所抑制。2013 年, Sukumwang 等^[52] 从 *E. foetida* 体腔液中分离得到成孔毒素 Lysenin, 由 297 个氨基酸组成, 相对分子质量为 41, 其可与 SM 特异性结合从而导致红细胞溶解, 具体溶血过程包括 Lysenin 与靶膜 SM 的结合、形成的低聚物导致膜通透性增加和膜上形成成熟孔隙 (3 nm) 3 个阶段。Lysenin 的溶血作用与其剂量和作用温度有直接相关性, 当 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 浓度为 $10 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, Lysenin 更易与 SM 结合, 但糖脂、酪氨酸脯氨酸酰胺能抑制此过程, 从而降低溶血作用。

2014 年, Sukandar 等^[53] 进一步评估了 DLBS1033 的作用, 在急性实验中, 给药剂量在 $0.2 \sim 16.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 观察 14 d, 小鼠无发病率和死亡率; 在亚慢性毒性试验中, 给药剂量在 $270 \sim 1 080 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续给药 90 d 后, 大鼠无任何死亡, 药物安全; 在产前检查发育毒性试验中, 在大鼠妊娠的第 $6 \sim 15 \text{ d}$, 每日给药 DLBS1033 $540 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 未观察到不良反应; DLBS1033 能与一种抗凝药如氯吡格雷或阿司匹林一起给药, 而不能三者同时给药, 会导致胃损伤。同年, Tjandrawinata 等^[54] 从 *L. rubellus* 分离得到一种生物活性蛋白质组分 ^{99m}Tc-DLBS1033, 能以完整的蛋白质形式经小肠吸收, 循环半衰期为 70 min , 其长的生物半衰期可支持其作为溶栓蛋白。2021 年, Pinzon 等^[55] 在标准治疗 (阿司匹林 100 mg 、他汀类 20 mg 、维生素 B12 100 mg , 每天 3 次) 的基础上, 口服 DLBS1033 片剂 (每片 490 mg , 1 片 1 次, 每天 3 次) 30 d 后, 与标准治疗法比较, DLBS1033 可显著提高急性缺血性中风患者后期康复情况的生活能力指数 (BI) 评分, 降低患者脑梗死的美国国立卫生院卒中量表 (NIHSS) 评分, 在改善全身各项功能状态方面更有效, 安全性更高。

3 不同科属来源全蝎蛋白质/多肽的研究进展

钳蝎科东亚钳蝎 (*Buthus martensii* Karsch) 又名马氏正钳蝎 (*Mesobuthus martensii* Karsch) 是我国全蝎药材的主要来源^[56], 国内外除研究东亚钳蝎外, 还对蝎科统治者惧蝎 (*Pandinus imperator*) 和异距蝎亚科携刺异距蝎 (*Heterometrus spinifer*) 分泌的毒液中的蛋白质/多肽成分进行了研究。

3.1 抗肿瘤作用

目前,以东亚钳蝎 *B. martensii* 的研究为主,2002年,Liu等^[42]从 *B. martensii* 毒液中分离得到一个多肽 ANTP(36),相对分子质量为 6 280,富含甘氨酸,不含组氨酸和苏氨酸。ANTP($iv, 0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)对腹腔接种艾氏腹水瘤小鼠的生命延长率达 31.5% ($P < 0.05$);对 S-180 荷瘤小鼠实体瘤的抑制率达 39.0% ($P < 0.01$),与环磷酸胺对照组($iv, 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)比较,ANTP 抗肿瘤作用更有效,所用剂量更少,小鼠体重降低得更少,毒性更小。同年,该团队^[20]继续从 *B. martensii* 毒液中获得了编码多肽 AGAP(37)的基因,在强大的噬菌体 T7 启动子的控制下,基因在大肠杆菌中高水平表达,大部分重组 AGAP 基因以不溶性包涵体的形式表达,少数的重组 AGAP 基因以可溶形式存在。药理学实验表明,重组 AGAP ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)对艾氏腹水瘤腹腔接种小鼠的生命延长率达 29% ($P < 0.05$),对 S-180 荷瘤小鼠的纤维瘤的抑制率达 23% ($P < 0.01$),小鼠扭体反应抑制率达 60% ($P < 0.01$),热板法实验中可降低小鼠踢腿和舔食反应。

PESV 是从 *B. martensii* 的毒液中提取得到的一种多肽提取物,含 50~60 个氨基酸,纯度 89.1%,相对分子质量 6 000~7 000,pH 为 7.4,大多数由 3~4 对二硫键交联而成,对多种肿瘤细胞都具有抑制作用^[57]。Li 等^[58]团队研究发现 PESV 能够抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的生长,其机制可能与抑制 HPA、VEGF 的表达有关,继续研究发现 PESV 可通过抑制细胞增殖周期进行和促进细胞凋亡,当 PESV 浓度大于 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,可抑制 SKOV3 细胞的增殖,当浓度等于 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,增殖抑制率为 34.66%,且呈剂量依赖性;PESV 干预后,处于 S 期的细胞减少,处于 G0/G1 期的细胞增多;SKOV3 细胞 p27 表达上调,表达 Survivin 的肿瘤细胞减少,而表达半胱氨酸蛋白酶 (Caspase-12) 的细胞显著增加^[59]。同时,Yu 等^[60]发现当 PESV 浓度 $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,可促进 K562 细胞凋亡,使细胞中磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 及 p-Akt 的蛋白表达降低,抑制 K562 细胞增殖。2007年,Fu 等^[61]从 *B. martensii* 的毒腺中分离得到一个重组氯霉素样肽 rBmK Cta,该肽可抑制人脑胶质瘤细胞 SHG-44 的生长,IC₅₀ 值为 $0.28 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,呈剂量依赖性。

2016年,Satitmanwivat 等^[62]进一步报道,蝎毒肽 BmKn2 对人类正常齿龈细胞 HGC 和骨髓细胞 DPC 等健康组织无细胞毒性及诱导作用,而对人口腔鳞癌细胞 HSC4 和口腔表皮样癌细胞 KB 有显著的细胞毒作用,IC₅₀ 分别为 26 和 $34 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,且呈剂量依赖性,并伴有细胞凋亡。BmKn2 作用后的 HSC4 和 KB 细胞有明显变化,核解体以及细胞凋亡膜联蛋白 V 阳性细胞数量增加。BmKn2 对人口腔癌细胞的抑制作用主要通过 P53 依赖的内在凋亡途径诱导细胞凋亡,与细胞上的特异性受体结合,诱导激活 P53 和 BAX,反向调节使口腔癌细胞 BCL-2 减少,BAX 的激活导致几种线粒体凋亡介质的释放(如细胞色素 C),随后形成的凋亡小体会激活半胱氨酸蛋白酶 9 (caspase-9),caspase-9 又能激活 caspase-3 和 caspase-7,最终导致 DNA 的裂解。同年,He

等^[63]发现东亚钳蝎毒素 (BMK) $10 \sim 40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对人结肠癌细胞 Caco-2 有抑制作用,且抑制率与浓度和时长成正比,其抑制作用与 BMK 促进 Caco-2 细胞淋巴转化和细胞毒性作用有关。在研究发现 *B. martensii* Karsch 中短链神经毒素 BmK CT 与从以色列沙漠蝎 *Leiurus quinquestratum* 尾腺毒液中分离得到的可以特异性阻断氯通道的氯毒素 CTX 在相似的抑制神经胶质瘤细胞增殖功能的基础上,山西大学细胞分子生物学课题组^[21]于 2017 年报道了 BmK CT 通过活化 p38 α 激活下游丝裂原活化蛋白激酶激活的蛋白激酶-2 (MK2),而融合蛋白 GST-BmK CT 通过 p38 α 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 α MAPK) 信号通路激活 MK2 均引起细胞 S 期和 G2/M 期的阻滞从而抑制胶质瘤 U251 细胞的增殖,p38 α 特异性抑制剂 SB203580 可反转 GST-BmK 引起的细胞周期阻滞。于 2018 年发现 BmK CT 可以通过下调磷酸化的 AKT 水平增强了替莫唑胺 (TMZ) 诱导的 U251 细胞凋亡的敏感性,表明 BmK CT 和 TMZ 可联合治疗胶质瘤^[64]。2019 年,采用代谢组学方法发现 BmK CT 可通过下调低氧诱导因子 HIF-1 α 的表达,降低丙酮酸激酶 PKM2 介导的有氧糖酵解从而抑制神经胶质瘤细胞的增殖^[65]。

3.2 抗菌作用

2004年,Zeng 等^[22]采用 Fmoc N 端保护氨基酸的固相法,*B. martensii* 腺体组织中提取的总 DNA 经合成,得到 4 个全新的无二硫键桥的毒液肽, BmKa1 (39)、Bmka2 (40)、BmKb1 (41) 和 BmKn2 (42)。BmKa1 和 Bmka2 是酸性亲水基团,无抗菌活性,二级结构预测分别含 100% 和 62% 的线圈结构,不能与任何一种蛋白质受体或整个细胞的结合,而 BmKb1 和 Bmkn2 是两种新型阳离子螺旋抗菌肽,其中, Bmkn2 的抗菌活性最强,对 G⁺ (如金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、枯草芽孢杆菌) 和 G⁻ (如大肠杆菌、铜绿假单胞菌) 都具有很强的抑菌作用。2012年,该团队^[23]从 *M. martensii* 分离得到一种全新的不含二硫键桥多功能肽 BmKbpp (43),包含 47 个氨基酸残基,对单增李斯特菌、大肠杆菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、肠道沙门氏菌和铜绿假单胞菌等 G⁻ 都有强的抗菌活性, MIC 分别为 5.7、2.3、3.2、2.8、2.3 和 $4.7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,并对克拉萨、灰葡萄孢菌和镰刀菌等真菌的生长有抑制作用,IC₅₀ 值分别为 2.0、3.1 和 $0.2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,也对抗生素耐药病原体(如肺炎克雷伯氏菌、流感嗜血杆菌)有生长抑制作用,并且显示出非常弱的溶血活性。同年,Chen 等^[24]从 *M. martensii* 的毒液中分离得到的 BmKn2 肽 (42) 的衍生物 Kn2-7 (44),可直接作用于抗艾滋病病毒 (HIV-1) 微粒来发挥抗 HIV-1 作用,几乎能完全抑制病毒感染。Kn2-7 对 HIV-1 假型病毒 HIV-1 PV 的抗病毒活性呈剂量依赖性,EC₅₀ = $2.76 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;当 Kn2-7 剂量为 $16 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,对 HIV-1 PV 的抑制率可达到 98.7%,且 Kn2-7 起效快,在 60 min 达到峰值。同时,Kn2-7 对金黄色葡萄球菌 (AB 94004 和 ATCC 25923)、枯草杆菌 (AB 91021)、苏云金杆菌 (AB 92037)、黏液细胞 (AB 93113) 等 G⁺,大肠杆菌 (AB 94012 和 ATCC 25922)、铜绿假单胞菌 (AB 93066、A 092994、

A 093052、A 093056、A 093085 和 A 093115)等 G⁻,以及临床分离的耐抗生素菌株(如抗青霉素 P1383 和 P1389、耐甲氧西林 P1374、P1369、P1381、P1386、青霉素敏感 P111),都有较好的抑菌作用, MIC 分别为 3.13、3.13、6.25、6.25、6.25、6.25、25、25、50、100、50、50、100、6.25、6.25、3.13、3.13、6.25、6.25 和 3.13 μg · mL⁻¹, 抑菌作用与浓度呈正比例。Kn2-7 通过与金黄色葡萄球菌(AB 94004)细胞壁的脂磷壁酸和大肠杆菌(AB 94012)细胞壁的 LPS 结合,从而使细胞崩解死亡。Kn2-7 的抑菌效果强于 BmKn2,同时溶血作用也明显低于 BmKn2, HC50 分别为 90.27 和 17.13 μg · mL⁻¹[66]。

2013 年, Zeng 等[25] 从 *P. imperator* 中克隆纯化得到 3 个不含半胱氨酸的毒液肽, Pantinin-1 (45)、Pantinin-2 (46)、Pantinin-3 (47), 相对分子质量分别为 1 545.90、1 403.71、1 490.80。三种肽都含有一个 α 螺旋的阳离子两亲性分子, 对金黄色葡萄球菌(AB 94004)、芽孢杆菌(AB 90008)、黄体微球菌(AB 2010179)、抗万古霉素肠球菌(S13)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(16472)等 G⁺, 及真菌热带假丝酵母菌(AY 91009), 都有很强的抗菌活性, 而对大肠杆菌(DH5α)、恶臭假单胞菌、催产克雷伯菌(AB2010143)、阴沟肠杆菌(AB 2010162)和肠道沙门氏菌(AB 2010185)等 G⁻, 几乎没有抗菌活性; Pantinin-1 有微量的溶血活性, 而 Pantinin-2 和 Pantinin-3 有中等溶血活性。

3.3 促进生长因子释放

SVP 是从 *B. martensii* 的毒腺中分离纯化得到的多肽, 能抑制肿瘤细胞, 并且能对抗由射线造成的损伤[67]。Dong[68] 等进一步研究发现 SVP 通过刺激骨髓中的有效造血生长因子(SCF)、IL-1α、IL-6、GM-CSF 细胞因子等的释放, 加速给予亚致死剂量的 X 射线小鼠造血能力的恢复, 减轻由射线导致的骨髓抑制。2015 年, Wang 等[26] 主要研究蝎毒肽 SVP B5 (47), SVP-B5 可增加被辐射小鼠中骨髓有核细胞的数量及被辐射小鼠中的菌落形成单位, 加速被辐射小鼠内外周血白细胞和血小板的恢复, 显著地降低 BMNCS 中的活性氧水平, 减少 P16, P21 mRNA 的有关表达, 从而减轻辐射造成的 DNA 损伤, 增强照射后造血功能的恢复, 提高被辐射小鼠的存活率。2017 年, Wang 等[69] 从 *B. martensii* 的毒腺的粗提液中分离出 SVP I、SVP II 和 SVP III, SVP II 经 CM-Sepharose 离子交换柱色谱分离得到 SVP B1、B2、B3、B4、B5、B6 和 B7, 其中, SVP B5 纯度最高, SVP B4 次之。SVP B5 可促进小鼠骨髓性白血病细胞 M-NFS-60 的增殖, 可促进细胞中 IL-3R 的表达, 从而激活 JAK/STAT5 通道, 促进骨髓单个核细胞群的形成以及增强造血干细胞的修复, 同时, SVP-B5 能促进射线损伤细胞的增殖, 展示出类似生长因子的特性, 可用于治疗严重骨髓抑制, 而 SVP B4 并无明显的促细胞增殖作用。

3.4 离子通道阻滞作用

2000 年, Chen[27] 从 *B. martensii* 毒腺中分离纯化得到 BMK 9(3)-1 (49) 和 BMK 9(3)-2 (50), 相对分子质量分别为 7 020 和 7 037, 氨基酸序列与 α 神经毒素, 如马卡毒素 I 的相似, 具有与 α 神经毒素相同的减缓钠离子通道失活的作用,

此外, BMK9(3)-1 和 BMN9(3)-2 均可阻塞钾离子和钙离子通道来延长大鼠和青蛙神经的动作电位, 且呈剂量依赖性。2001 年, Zhu 等[28] 利用分子生物学克隆技术从 *B. martensii* 毒腺中克隆并分离出 3 种独特的富含半胱氨酸的肽的前体 BmTXKS3、BmTXLP2 和 BmAPI, 其中, BmTXKS3 (51) 是 1 个短链 K 通道毒素样碱性蛋白肽, PI 8.6; BmTXLP2 (52) 是 1 种酸性肽, PI 4.97; BmAPI (53) 是 1 种中性肽, PI 7.34, 二级结构预测, 其只包含 4 条 β 折叠, 其中 3 条位置与丝氨酸蛋白酶抑制剂家族系列的位置相同, 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂。2014 年, Rashid 等[29] 从 *H. spinifer* 分离得到 1 个有 4 个二硫键交联的 34 个氨基酸残基的 C 端酰胺化肽 HsTX1 (54)。HsTX1 是一种有效的 K 离子通道阻滞剂, 对大鼠 Kv1.3 离子通道的 IC₅₀ 为 12 × 10⁻²² mol · L⁻¹。因 HsTX1 无法靠近 Kv1.1 离子通道的孔结构域, 从而在通道的选择性过滤中, 阻止了 HsTX1 中赖氨酸通过孔与离子通道中酪氨酸羧基接触, HsTX1 与 Kv1.3 的结合能力强于其与 Kv1.1 的结合能力。HsTX1 的 14 位点上分别进行 Ala、Phe、Val 或 Abu 取代, 得到 HsTX1 类似物 HsTX[R14A], 当 14 位点的残基被中性残基取代时, 可降低 HsTX1 类似物与 Kv1.1 的结合, 但不影响与 Kv1.3 的作用, 对 Kv1.3 的选择性是 Kv1.1 的 2 000 倍。HsTX1 及 HsTX[R14A] 可有效抑制大鼠淋巴细胞 CCR7⁻T_{EM} 和 CCR7⁺T_{EM} 的增殖, 且 HsTX1[R14A] 的稳定性好, 可抵抗胃蛋白酶的蛋白水解, 对胰蛋白酶和胰岛素的敏感性低。2017 年, Olamendi-portugal 等[30] 从 *P. imperator* 的毒液中分离得到两种新的肽类 Pi5 (55) 和 Pi6 (56), 相对分子质量分别为 3 334.00 和 3 126.5, 其中 Pi5 有 8 个半胱氨酸能形成 4 个二硫键, Pi6 有 4 个半胱氨酸能形成 2 个二硫键。因 Pi5 和 Pi6 与 α-KTx 结构相似, 选择果蝇中与钾通道相关的基因 shaker 的人类同源基因编码的离子通道 Kv1.1、Kv1.2、Kv1.3、Kv1.4 进行研究, 发现即使 Pi5 和 Pi6 浓度为 100 nmol · L⁻¹, 对 Kv1.1 和 Kv1.4 也无抑制作用, 且 Pi6 对 Kv1.2、Kv1.3 是低亲和力和力阻断剂, 当 Pi6 的浓度为 100 nmol · L⁻¹, 剩余电流分数为 68% 和 77%, 而 Pi5 对 Kv1.2、Kv1.3 的阻断作用更强, 当 Pi5 浓度为 100 nmol · L⁻¹, 能抑制 Kv1.2 离子通道约 80% 的电流, 抑制 Kv1.2 离子通道的 K_d 为 92 nmol · L⁻¹, 抑制 Kv1.3 离子通道的 K_d 为 77 nmol · L⁻¹。

3.5 其他作用

1989 年, Zhou 等[31] 从 *B. martensii* 分泌的毒液中分离得到一个多肽 AEP (57), 分子量 8 290, PI 8.52。AEP 静脉给药可有效抑制由马桑内酯或头孢类药物诱导的白化病雄性大鼠癫痫动物模型的癫痫发作, 而对心率、血压和心电图没有不良影响。1997 年, Luo 等[32] 从 *B. martensii* 毒液中得到 3 个全新的中性哺乳动物神经毒素 BMK M4 (58)、BMK M1 (59) 和 BMK M8 (60), 相对毒性分别为 2.5、13.44 和 1, PI 分别为 9.44、7.60、5.30, LD₅₀ 依次为 (0.75 ± 0.034)、(4.0 ± 0.25)、(10.0 ± 0.34) μg · g⁻¹, 蝎子毒素的毒性与其 PI 值有直接相关性, 当毒素的 PI 越低, 毒性越弱, BmK M4 在蝎子毒

素中毒性为中等强度。1998年, Du等^[70]从东亚蝎毒中分离出一种新型多肽化合物 SPP, 研究发现 SPP 有镇痛作用, 在小鼠热板法中能升高痛阈、减少小鼠醋酸牛体次数。此外, 发现 SPP 有明显抗炎作用, 能减轻大鼠或小鼠急性非特异性炎症及大鼠慢性非特异性炎症。2020年, Chen^[70]通过小鼠福尔马林炎性痛和 CFA 慢性炎性痛模型发现东亚钳蝎蝎毒具有很强的镇痛效果, 且镇痛活性为东亚钳蝎毒液 > 东亚钳蝎毒腺 > 东亚钳蝎全体。一步经分离纯化和电生理技术从东亚钳蝎毒液中分离得到了一个新型的具有钠通道活性的东亚钳蝎毒素(61), 是一个长链毒素多肽, 含有 64 个氨基酸, 其中 8 个半胱氨酸形成四对二硫键, 相对分子质量为 7 113, 与 MAKATOXIN-1 序列同源性高达 98%。在小鼠福尔马林炎性痛模型中, MAKATOXIN-1 组(50、150 nmol · kg⁻¹)对小鼠的第一相痛的抑制率 < 30%, 150 nmol · kg⁻¹ MAKATOXIN-1 对第二相炎性痛的抑制率 > 70%, 镇痛作用更强, 由定量 PCR 技术检测发现其镇痛作用可能与腺苷受体 A1 和 HCN2 有关。在 CFA 慢性炎性痛模型中, MAKATOXIN-1 组对小鼠机械痛敏感有镇痛作用, 镇痛时效 > 4 h。

4 结 语

蛋白质/多肽作为治疗药物的研究和应用越来越受关注, Grand View Research 的报告显示, 2021 年全球多肽疗法市场规模达到 393 亿美元。预计年复合增长率为 6.4%, 到 2030 年, 多肽的市场份额将达到 687 亿美元。截至 2023 年, 已有 100 多种多肽药物进入临床, 还有大量药物正在临床开发中^[71-72]。研究发现, 来源于动物的蛋白质/多肽具有良好的生物活性, 蟾蜍蛋白质/多肽对革兰阴性菌、革兰阳性菌及真菌都有抑制作用; 地龙蛋白质/多肽主要以纤维蛋白溶解活性、抗肿瘤活性、抗菌活性, 以及抗炎镇痛活性为主; 全蝎蛋白质/多肽以抗肿瘤活性、抗菌活性、促进生长因子释放和离子通道阻滞作用为主。全蝎蛋白质/多肽, 主要以东亚钳蝎为主, 地龙蛋白质/多肽一直是研究热点, 可以从全蝎和地龙的各个品种展开系列全面研究, 而蟾蜍蛋白质/多肽有关报道在前期和近五年都很少, 也可以着重从这一方面研究。目前, 已上市的制剂华蟾素胶囊、华蟾素注射液和华蟾素片能有效治疗肝癌、胃癌、肺癌、结肠癌等, 其制剂中含蟾蜍蛋白质/多肽物质, 同时具有良好的免疫调节作用, 可有效降低不良反应和毒副作用^[73-76]; 以地龙蛋白/多肽为原料开发的药物地龙活性蛋白胶囊、地龙蛋白溶血栓胶囊和蚓激酶肠溶胶囊等, 具有溶栓抗栓作用, 在防治心脑血管和呼吸系统等疾病中发挥重要作用^[77], 与其他抗栓药物, 如尿激酶型纤溶酶原激活物 u-PA 和组织型纤溶酶原激活剂 t-PA 相比, 具有溶栓作用强、不良反应小、患者易耐受、半衰期长等优点, 更安全、有效且疗效稳定^[78-79]; 以蝎毒多肽为原料开发的镇痛治疗用生物制品蝎毒注射液、治疗急性消化道溃疡的速可平(SV)和治疗风湿性关节炎等自身免疫性疾病的痹痛灵胶囊等, 临床应用广泛, 在体内作用迅速、半衰期短、毒性反应迅速, 如蝎毒多肽的镇痛作用强于吗啡, 且无成瘾性, 优点显著^[80]。但已上市的动物蛋白

质/多肽类药物在使用中也存在一些问题, 如, 蚓激酶肠溶胶囊目前有一例致双下肢疼痛不良反应案例^[81], 全蝎中分离得到的活性多肽具有很强的哺乳动物毒性等。

整体上看, 药用动物蛋白质/多肽有极大研究开发利用的价值, 具有很多现在市面上常用治疗药物不具备的优势, 但是仍然需要做好临床试验和注意不良反应的相关报道, 及时进行反馈与处理, 使临床用药更安全。其次, 需进一步完善动物源蛋白质/多肽的提取纯化及分子设计与改造工艺, 获得活性更强, 毒性更低的生物活性蛋白质/多肽, 并系统研究其作用机理, 未来从技术层面和临床试验层面着手, 研制出安全、高效及低毒的动物蛋白/多肽。

REFERENCES

- [1] Ch. P(2020) Vol I (中国药典 2020 年版. 一部)[S]. 2020: 401.
- [2] PARK C B, KIM M S, KIM S C. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 218: 408-413.
- [3] LEE H S, PARK C B, KIM J M, et al. Mechanism of anticancer activity of buforin II b, a histone H2A-derived peptide [J]. *Cancer Lett*, 2008, 271(1): 47-55.
- [4] SUN T Y, ZHAN B, GAO Y Y. A novel cathelicidin from *Bufo bufo gargarizans* Cantor showed specific activity to its habitat bacteria [J]. *Gene*, 2015, 571(2): 172-177.
- [5] CONLON J M, ABDEL-WAHAB Y H, O'HARTE F P, et al. Purification and characterization of insulin, glucagon, and two glucagon-like peptides with insulin-releasing activity from the pancreas of the toad, *Bufo marinus* [J]. *Endocrinol*, 1998, 139: 3442-3448.
- [6] CONLON J M, WARNER F J, BURCHER E. Bufokinin: a substance P-related peptide from the gut of the toad, *Bufo marinus* with high binding affinity but low selectivity for mammalian tachykinin receptors [J]. *J Pept Res*, 1998, 51: 210-215.
- [7] CHO I H, CHOI E S, LIM H G, et al. Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus* [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37(2): 199-205.
- [8] ZHANG D F. Research on antithrombotic active protease in the *Pheretima aspergillum* [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2004.
- [9] ZHANG D F, ZHOU M H, QUAN W, et al. Purification and detection of thrombolytically active protease in the *Pheretima aspergillum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(9): 52-53.
- [10] ZHANG D F, ZHOU M Y, SHAN Y, et al. Study on thrombolytic enzymes from *Pheretima Aspergillum* (E. Perrier) [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2006, 13(1): 49-50, 58.
- [11] VERMA M K, PULICHERLA K K. Broad substrate affinity and catalytic diversity of fibrinolytic enzyme from *Pheretima posthumous*-Purification and molecular characterization study [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 10: 90-101.
- [12] ZHANG J W, YANG W Q, MA Y N, et al. Rapid enrichment and activity research of antithrombotic proteins from *Pheretima vulgaris* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27(22): 166-171.
- [13] LIU H, YANG J Q, LI Y, et al. A novel fibrinolytic protein from *Pheretima vulgaris*: purification, identification, antithrombotic evaluation, and mechanisms investigation [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 8: 772419.
- [14] XIE J B, HE W G, WENG N, et al. Extraction and isolation of the anti-tumor protein components from earthworm (*Eisenia fetida andrei*) and the anti-tumor activity [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*

- (中国生物化学与分子生物学报), 2003, 19(3): 359-366.
- [15] XIE J B, GUO Z Q, WENG N, *et al.* Purification, identification and partial characterization of an apoptosis-related serine protease from earthworm [J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 2003, 28(3): 453-460.
- [16] ZHANG X C, SUN Z J, GAO J, *et al.* Purification and characterization of antibacterial peptide EABP-1 from annelid *Eisenia fetida*[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 2003, 9(1): 36-38.
- [17] HUA Z, WANG Y H, CAO H W, *et al.* Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities[J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(3): 269-275.
- [18] LI C L, CHEN M R, LI, X J,*et al.* Purification and function of two analgesic and anti-inflammatory peptides from coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida*[J]. *Peptides*, 2017(89):71-81.
- [19] LIU Y F, HU J, ZHANG J H, *et al.* Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2002, 32(4): 317-327.
- [20] LIU Y F, MA R L, WANG S L, *et al.* Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii* karsch in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 27: 253-258.
- [21] DU J, WANG R J, CAI Y Q, *et al.* Inhibitive effect of BmK CT on proliferation of glioma U251 cells and its mechanism[J]. *J Shanxi Med Univ*(山西医科大学学报), 2017, 48(5): 420-425.
- [22] ZENG X C, WANG S X, ZHU Y, *et al.* Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch [J]. *Peptides*, 2004, 25(2): 143-150.
- [23] ZENG X C, WANG S X, NIE Y, *et al.* Characterization of BmK-bpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides[J]. *Peptides*, 2012, 33(1): 44-51.
- [24] CHEN Y Q, CAO L Y, ZHONG M H, *et al.* Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34947.
- [25] ZENG X C, ZHOU L L, SHI W X, *et al.* Three New antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus Imperator*[J]. *Peptides*, 2013: 28-34.
- [26] WANG C X, ZHOU M X, LI T, *et al.* Effects of Scorpion venom peptide B5 on hematopoietic recovery in irradiated mice and the primary mechanisms[J]. *Sci Rep*, 2015, 20(5): 15363. DOI: 10.1038/srep15363.
- [27] CHEN Z Y, REDDY G, HAHIN R. The isolation and purification of two peptides from the venom of *Buthus martensii* Karsch [J]. *Toxicon*, 2000(38): 1817-1832.
- [28] ZHU S Y, LI W X. Precursors of three unique cysteine-rich peptides from the scorpion *Buthus martensii* Karsch[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2002, 131: 749-756.
- [29] RASHID M H, HUQ R, TANNER M R, *et al.* A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases[J]. *Sci Rep*, 2014, 28(4): 4509-4517.
- [30] OLAMENDI-PORTUGAL T, CSOTI A, JIMENEZ-VARGAS J M, *et al.* Pi5 and Pi6, two undescribed peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* and their effects on K⁺-channels[J]. *Toxicon*, 2017, 133:136-144.
- [31] ZHOU X H, YANG D, ZHANG J H, *et al.* Purification and N-terminal partial sequence of anti-epilepsy peptide from venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Biochem J*, 1989, 257, 509-517.
- [32] LUO M J, XIONG Y M, WANG M, *et al.* Purification and sequence determination of a new neutral mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Toxicon*, 1997, 35(5): 723-731.
- [33] CHEN Y G. Isolation and identification of analgesic peptides *Buthus martensii* Karsh scorpion [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2020.
- [34] CHO J H, SUNG B H, KIM S C. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788: 1564-1569.
- [35] PARK C B, KIM H S, KIM S C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 244: 253-257.
- [36] PARK C B, YI K S, MATSUZAKI K, *et al.* Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15): 8245-8250.
- [37] XU X J, CHEN L, LÜ J W, *et al.* Isolation and antibacterial activities of skin-antibacterial peptides in *rena chensinensis* and *Bufo gargarizans* [J]. *Sichuan J Zool*(四川动物), 2009, 28(2): 164-167.
- [38] CHEN L P, HE L P, BA Y F. Growth inhibiting effect of antibacterial peptides in *Bufo Gargarizans* on cancer cells[J]. *Chin Mod Dr*(中国现代医生), 2011, 49(36): 24-26.
- [39] LIU L, SHANG F, COMIS A, *et al.* Bufokinin: actions and distribution in the toad cardiovascular system[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000, 27: 911-916.
- [40] *Ch. P* (2020) Vol I (中国药典2020年版,一部)[S]. 2020: 127.
- [41] MIHARA H, SUMI H, YONETA T, *et al.* A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*[J]. *Jpn J Physiol*, 1991, 41(3): 461-472.
- [42] FANG C, HE Z Z, ZHU F R, *et al.* Purification by FPLC and activity of fibrinolytic enzyme from *Pheretima Guillemi*[J]. *Pharm Biotechnol*(药物生物技术), 2004(1): 45-48. DOI:10.19526/j.cnki.1005-8915.2004.01.012.
- [43] TRISINA J, SUNARDI F, SUHARTONO MT, *et al.* DLBS1033, A protein extract from *Lumbricus rubellus*, possesses antithrombotic and thrombolytic Activities [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011(2011): 519652. DOI:10.1155/2011/519652.
- [44] FU T M, YANG F Y, ZHU H M, *et al.* Rapid extraction and purification of lumbrokinase from *Lumbricus rubellus* using a hollow fiber membrane and size exclusion chromatography[J]. *Bio-technol Lett*, 2016, 38(2): 251-258.
- [45] WU Y L, HU S, MA Y, *et al.* Novel *Pheretima guillelmi*-derived antithrombotic protein DP3: Identification, characterization, *in vitro* evaluation and antithrombotic mechanisms investigation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154:545-556.
- [46] ZHAO R, JI J G, TONG Y P, *et al.* Isolation and identification of proteins with anti-tumor and fibrinolytic activities from *Eisenia foetida*[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*(生物化学与生物物理学报), 2002, 27(5): 576-582.
- [47] ZHANG X C, ZHANG Z J, ZHUO R P, *et al.* Purification and characterization of two antibacterial peptides from *Eisenia fetida* [J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 2002, 27(6): 955-960.
- [48] LI W L, LI S S, ZHONG J, *et al.* A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, *Pheretima guillelmi* (Michaelson)[J]. *Peptides*, 2011, 32: 1146-1150.
- [49] OUMI T, UKENA K, MATSUSHIMA O, *et al.* The GGNG peptides: novel myoactive peptides isolated from the gut and the whole body of the earthworms[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 216(3): 1072-1078.
- [50] KOBAYASHI H, SEKIZAWA Y, AIZU M, *et al.* Lethal and

- non-lethal responses of spermatozoa from a wide variety of vertebrates and invertebrates to lysenin, a protein from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* [J]. *J Exp Zool*, 2020, 286(5): 538-549.
- [51] UEDA M, NODA K, NAKAZAWA M, *et al*. A novel anti-plant viral protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*: purification, characterization and its identification as a serine protease [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, 151: 381-385.
- [52] SUKUMWANG N, UMEZAWA K. Earthworm-derived pore-forming toxin lysenin and screening of its inhibitors [J]. *Toxins*, 2013, 5:1392-1401.
- [53] SUKANDAR E Y, ANGGADIREJA K, SIGIT J I, *et al*. Toxicity studies of a bioactive protein with antithrombotic-thrombolytic activity, DLBS1033 [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2014, 37(1): 8-16.
- [54] TJANDRAWINATA R R, TRISINA J, RAHAYU P, *et al*. Bioactive protein fraction DLBS1033 containing lumbrokinase isolated from *Lumbricus rubellus*: *ex vivo*, *in vivo*, and pharmaceutical studies [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 1585-1593.
- [55] PINZON R T, TJANDRAWINATA R R, WIJAYA V O, *et al*. Effect of DLBS1033 on functional outcomes for patients with acute ischemic stroke: a randomized controlled trial [J]. *Stroke Res Treat*, 2021, 2021: 5541616.
- [56] *Ch. P* (2020) Vol I (中国药典 2020 年版,一部) [S]. 2020: 149.
- [57] ZHANG W D. Scorpion venom peptide extract (PESV) inhibits tumour metastasis and tumour cell repopulation during inter-chemotherapy [R]. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, 2016-01-01.
- [58] LI X H, ZHANG W D, WANG Z P, *et al*. Inhibitive effect of polypeptide extract from Scorpion Venom (PESV) on the expression of HPA and VEGF in SKOV3 cell lines [J]. *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2012, 12(24): 4624-4626, 4657.
- [59] SONG X Y, WANG Z P, JIA Q, *et al*. Inhibitory effect of polypeptide extracts from scorpion venom on proliferation of ovarian cancer SKOV 3 cells [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2012, 21(3): 257-261.
- [60] YU W J, YANG W H, YANG X D, *et al*. Influence of polypeptide extract from scorpion venom on PI3K and p-Akt signaling protein expression and cell proliferation of K562 cells [J]. *Chin J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2012, 20(4): 872-875.
- [61] FU Y J, YIN L T, LIANG A H, *et al*. Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 412: 62-67.
- [62] SATITMANWIWAT S, CHANGSANGFA C, KHANUENGTHONG A, *et al*. The scorpion venom peptide BmKn2 induces apoptosis in cancerous but not in normal human oral cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1042-1050.
- [63] HE Y, XIAO K F, WANG Z. Study on proliferation inhibition effects of *Buthus martensii* Karsch venom on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 *in vitro* [J]. *Shandong Agric Sci* (山东农业科学), 2016, 48(12): 136-141.
- [64] DU J, WANG R, YIN L, *et al*. BmK CT enhances the sensitivity of temozolomide-induced apoptosis of malignant glioma U251 cells *in vitro* through blocking the AKT signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 1537-1544.
- [65] CAI Y Q, DU J, BO T, *et al*. BmK CT inhibits the proliferation of Glioma cells by Down-regulating PKM2-mediated aerobic glycolysis [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2019, 35(1): 42-50.
- [66] CAO L Y, DAI C, LI Z J, *et al*. Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40135.
- [67] ADAM N M, DOUGLAS B J. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601) [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2007, 4(2): 175-186.
- [68] DONG W H, WANG L N, KONG T H, *et al*. Scorpion venom peptides accelerate hematopoietic recovery of myelosuppression in irradiated mice [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(4): 701-712.
- [69] WANG Y, XING BQ, LI T, *et al*. SVP-B5 peptide from *Buthus martensii* Karsch scorpion venom exerts hyperproliferative effects on irradiated hematopoietic cells [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 5081-5086.
- [70] DU G J, XU Y, MU X S, *et al*. Analgesic effects and anti-inflammatory effects of scorpion poly-peptide [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1998, 15(2): 31-33.
- [71] Peptide therapeutics market size, share & trends report, 2022-2030 [EB/OL]. Straits Research, 2022, [2024-01-10]. <https://www.marketresearch.com/Straits-Research-v4257/Peptide-Therapeutics-Size-Share-Trends-32759299/>.
- [72] SHARMA K, SHARMA K K, SHARMA A, *et al*. Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances [J]. *Drug Discov Today*, 2023, 28(2): 103464.
- [73] WU X Y, TIAN F, ZHU X J, *et al*. Progress of Cinobufacini Antitumor Research [J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2018, 32(5): 82-86.
- [74] LIU Y, BAN L Y, SU X, *et al*. Effects of cinobufacini injection on cell proliferation and the expression of topoisomerases in human HepG-2 hepatocellular carcinoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 1598-1604.
- [75] DONG J, ZHAI X, CHEN Z, *et al*. Treatment of huge hepatocellular carcinoma using cinobufacini injection in transarterial chemoembolization: a retrospective study [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2016, 2016: 275454. DOI: 10.1155/2016/2754542.
- [76] LIU J, TONG M H, GUO Y Q, *et al*. Research progress on clinical application and therapeutic mechanism of Bufonis Venenum for anti-tumor [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34(8): 1430-1438.
- [77] LIU Q, BI Q R, TAN N H. Research progress on proteins and peptides from earthworm [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50(1): 252-261.
- [78] QI M M, SUN J B. Inhibitory effect of earthworm protein capsules on arteriovenous thrombosis in rats [J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2021, 37(5): 17-22, 16.
- [79] YE H Y, LI W D, LIN Z B. The Anti-inflammatory effect of Buthotoxin [J]. *J Gannan Med Univ* (赣南医学院学报), 2001, 21(3): 248-251.
- [80] SUN T. General pharmacology and toxicology research on scorpion venom peptides for injection [C]. [D]. Changchun: Jilin University, 2008.
- [81] CAO M C, CHEN X, XU L, *et al*. 1 case of pain in both lower limbs due to earth kinase enteric capsules [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2021, 38(3): 341-342.

(收稿日期:2022-09-05)