

海洋活性肽与健康



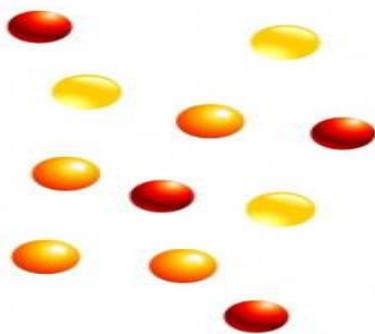
魏玉西 博士/教授

青岛大学生命科学学院

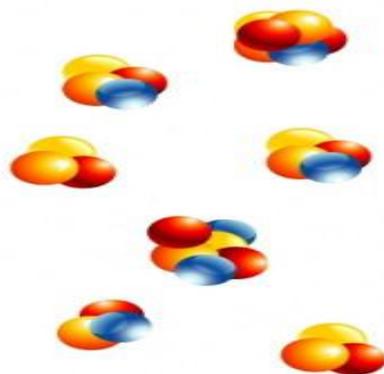
2018. 11. 01 北京

肽 ——前言

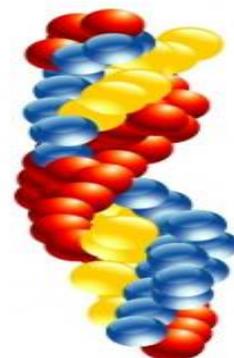
- 肽由两个或多个氨基酸分子通过肽键连接而成。
氨基酸只有20种，功能可数；而肽数量众多，功能多样。
- 目前，国际生命科学最热门研究领域之一。
- 国际化学、生命科学、医药学界的专家们一致认为：**二十一世纪将是肽的世纪。**



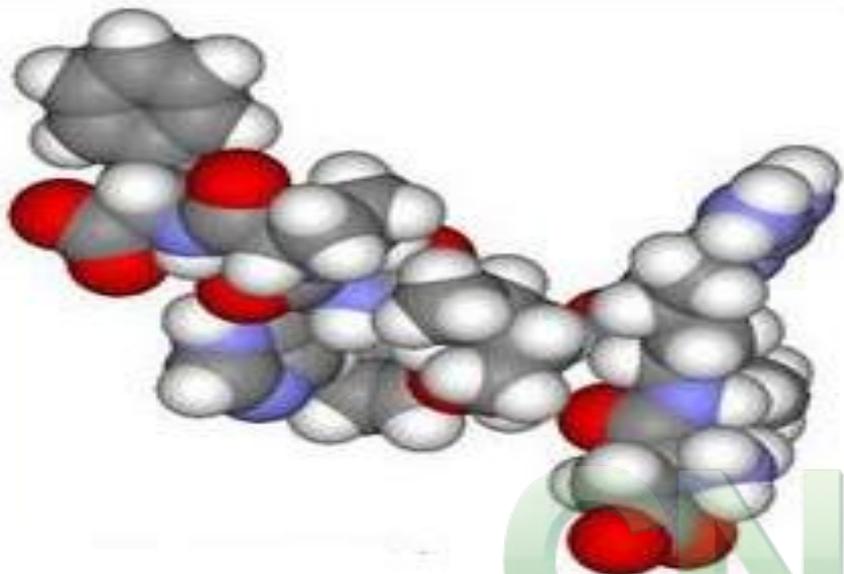
氨基酸



肽



蛋白质

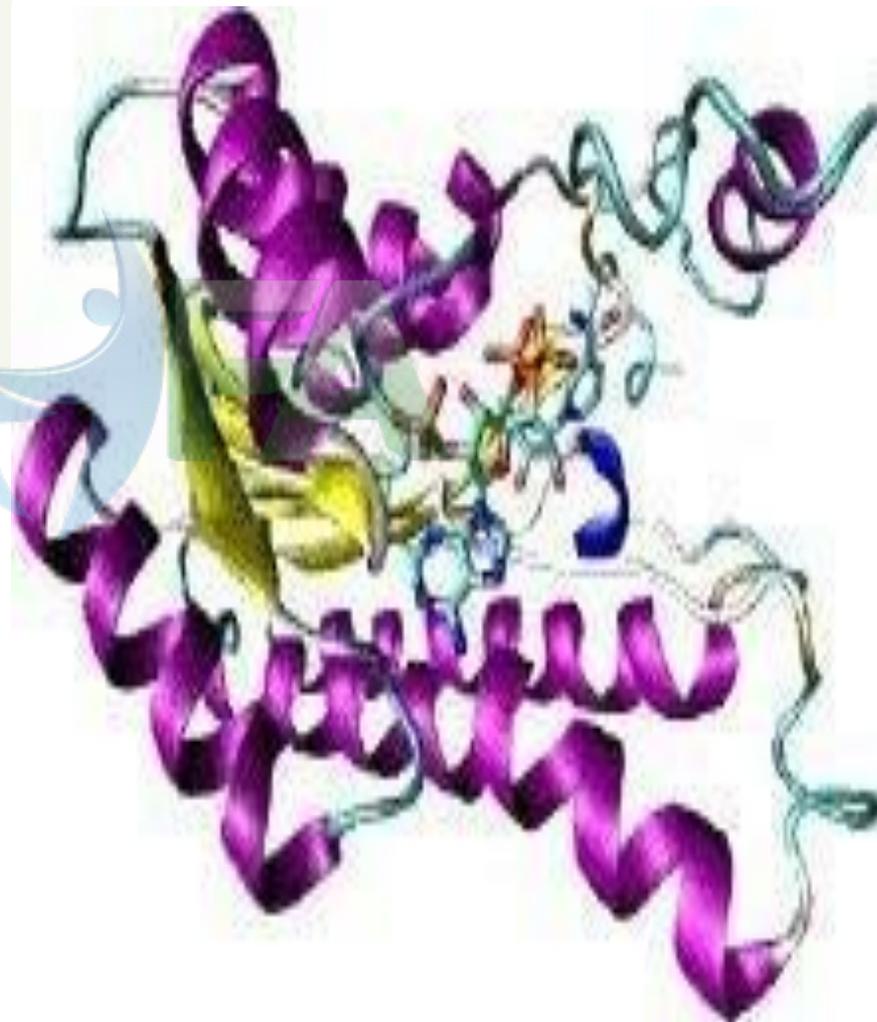


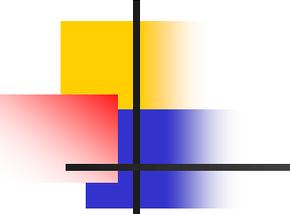
肽

中国营养保健食品协会

结构相对简单，一般为线性结构
但序列变化多端

蛋白质





肽 ——名人观点

美国医学专家尤·格林博士

“肽几乎被用于治疗任何疾病，无药可其相比。”

美国皮肤老化问题专家尼吉拉斯·佩里孔医学博士

“生物活性肽具有极强的活性和多样性，优于任何营养及药品。”

加拿大克雷尔·辛斯教授

“肽能使无论何种病因引起的肝病得到明显好转。”

德国专家鲍威尔·克鲁德博士

“找到了一种新的抗衰老药物——肽，肽能使人变得年轻、健康，肽使化妆品世界发生巨大变化。”

至少有10位以上的科学家因为研究肽而获得了诺贝尔奖。

肽——应用现状

- 《2017年版中国肽市场现状调研与发展趋势分析报告》

- ✓ 全球多肽产业年复合增长率近25%

- ✓ 中国2010-2015年，多肽药物的市场销规模从190亿达到368亿，复合增长率超过16.58%。2015年同比2014年增长率为15.46%。多肽药物市场需求规模大，行业前景好。

- ✓ 在食源性肽产品领域，我国生产的多肽营养品、功能性食品、保健食品刚起步，但发展迅速，产品热销于国内外市场，潜力巨大。



坚强的后盾

- 2016年10月《健康中国2030》规划纲要正式颁布实施，从“病中治疗”到“病前预防”的改变，将促进我国的大健康产业迎来新一轮的爆发增长。
- 2017年1月，国家发改委、工信部联合发布《关于促进食品工业健康发展的指导意见》：支持发展养生保健食品，研究开发功能性蛋白、功能性膳食纤维、功能性糖原、功能性油脂、益生菌类、生物活性肽等保健和健康食品，并开展应用示范。这是国家首次在政策层面明确提出将生物活性肽产业纳入优先发展位置。

肽 —— 为何受到如此重视？

- 营养学的角度：食物蛋白质 $\xrightarrow{\text{消化}}$ 氨基酸 $\xrightarrow{\text{合成}}$ 自身蛋白质
换言之，蛋白质不能通过肠粘膜屏障进入机体循环系统。
除了营养，不可能发挥其他生物活性。

- 动物实验研究表明：

- ✓ 当为动物提供人工平衡的20种氨基酸作为蛋白质类营养时，动物并不能够正常生长和发育；
- ✓ 当为其提供蛋白质或多肽时，动物即可正常生长和发育。

食物中的蛋白质或多肽不仅为机体提供氨基酸营养，还应该
有动物发育、分化和其它生命活动所必需的其它功能，
但是这些功能是什么？其作用机制是什么？已经成为众多科
学家探讨和争执的关键问题。

一、肽是如何被吸收的？ 半个世纪以来的研究成果

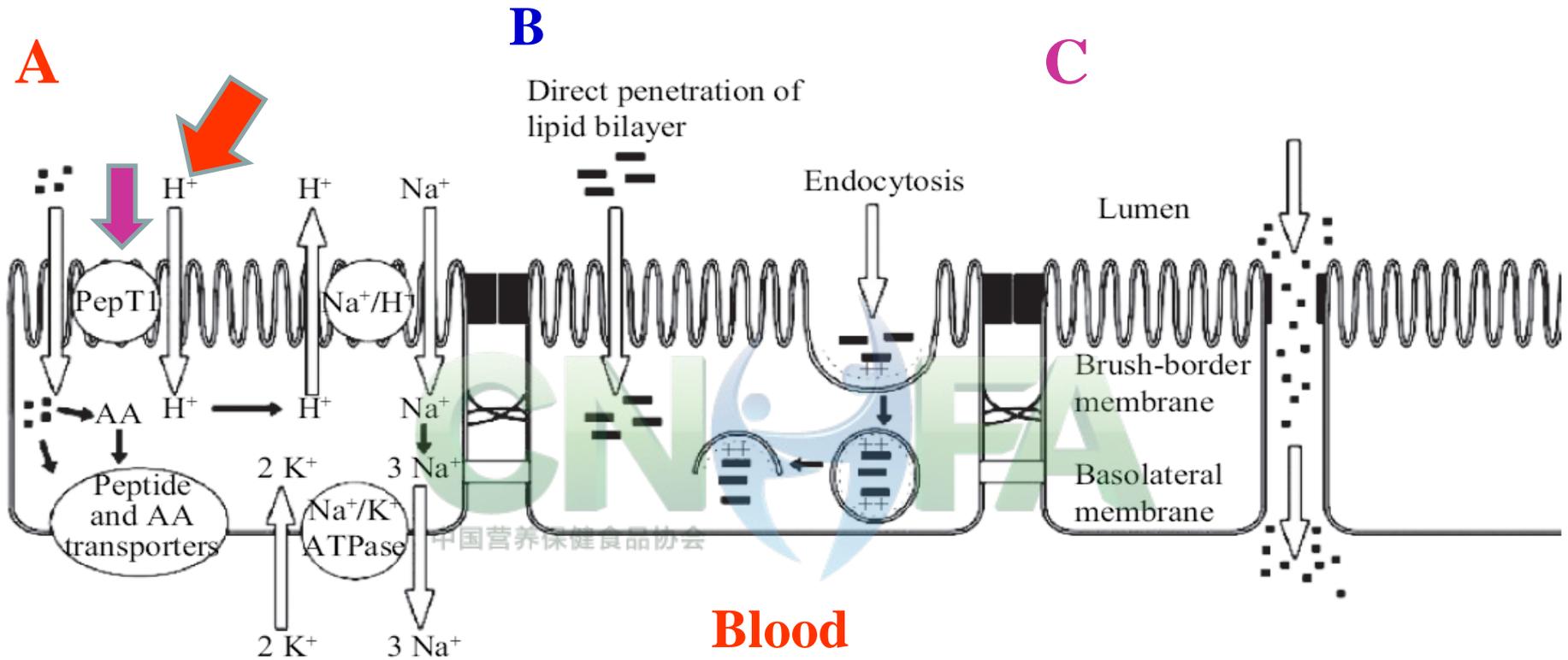
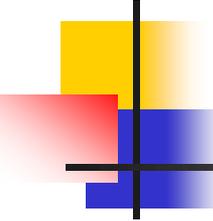


Fig. 1 肽类跨肠道细胞的吸收途径

- A. 二肽和三肽吸收途径是通过和 H^+ 协同转运途径，其载体为PepT1。
- B. 细胞穿越肽(CPP)可以运载肽类穿越细胞膜进入细胞内，或通过内吞作用。
- C. 增加紧密连接的肠上皮细胞的通透性吸收肽类。



二、肽的功能

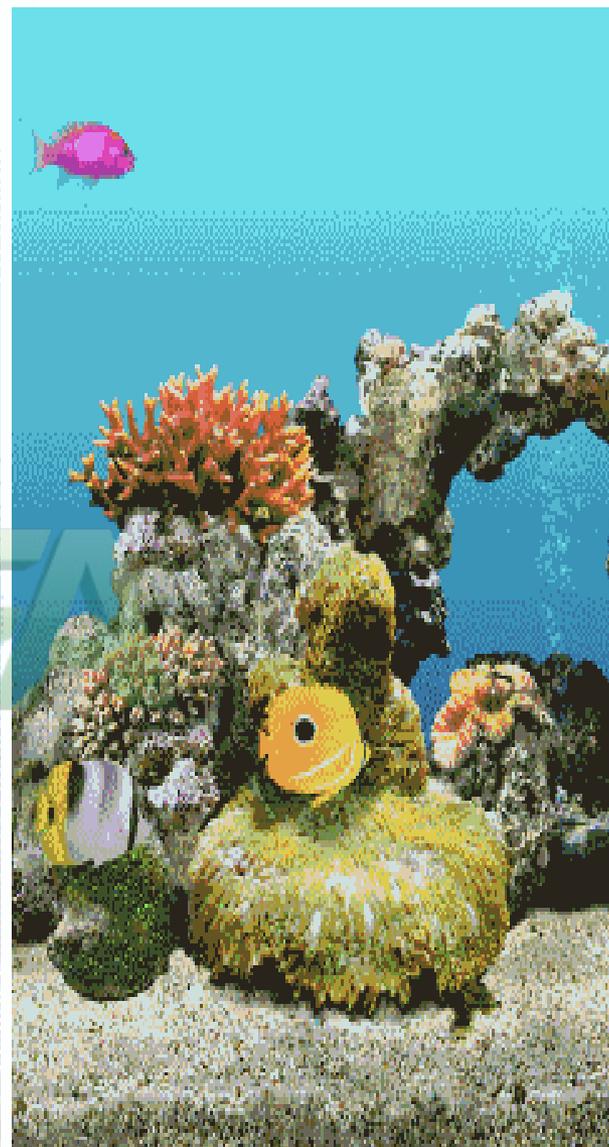
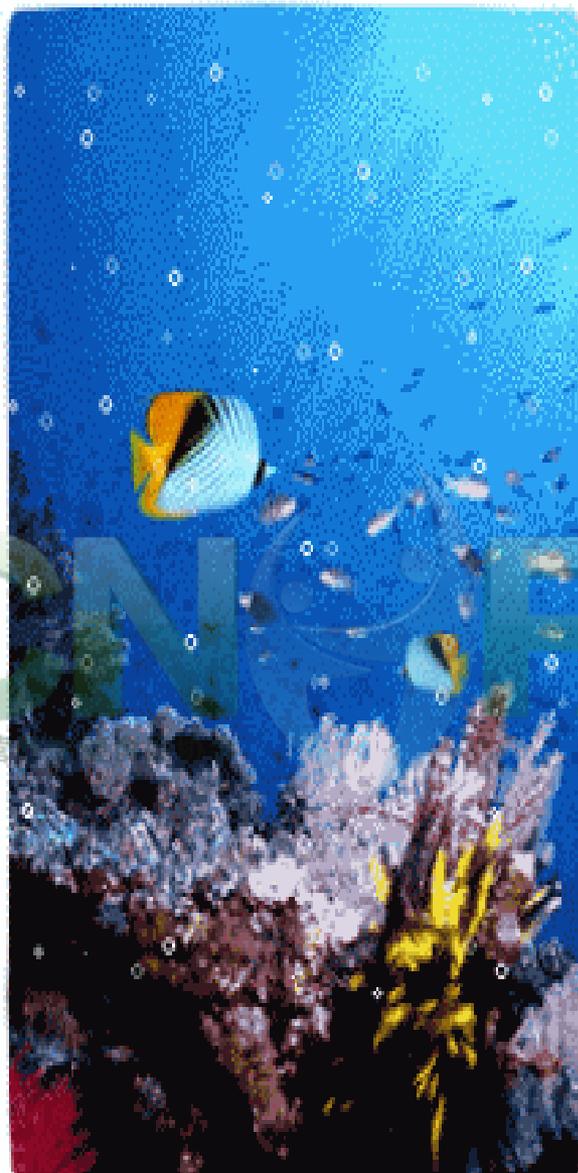
- (1) 调节体内的水分、电解质平衡
- (2) 为免疫系统制造对抗细菌和感染的抗体，提高免疫功能
- (3) 促进伤口愈合
- (4) 修复细胞，改善细胞代谢，防止细胞变性，能起到防癌的作用
- (5) 沟通细胞间、器官间信息，促进蛋白质、酶的合成与调控
- (6) 辅助降血压，防治心脑血管疾病
- (7) 调节内分泌与神经系统
- (8) 改善消化系统、治疗慢性胃肠道疾病
- (9) 改善糖尿病、风湿、类风湿等疾病
- (10) 抗病毒感染、抗衰老，消除体内多余的自由基
- (11) 促进造血功能，治疗贫血，能提高血红细胞的载氧能力。

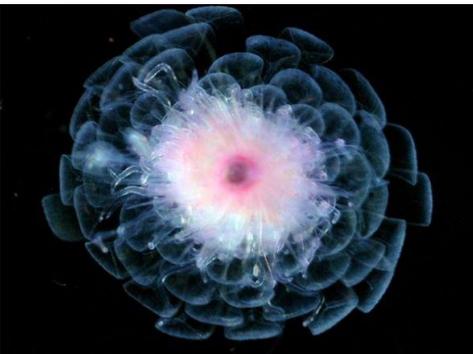
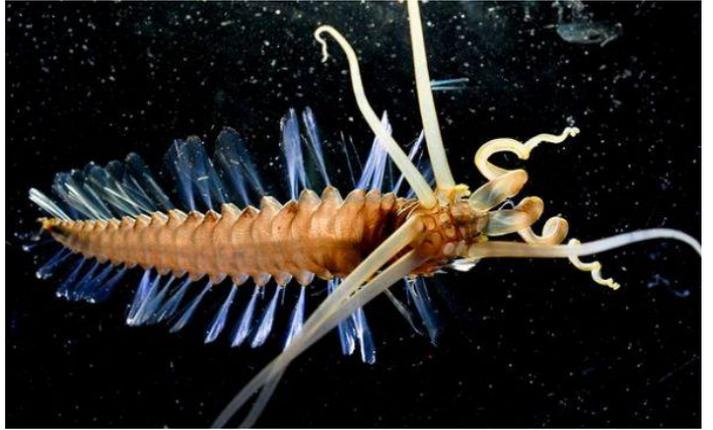
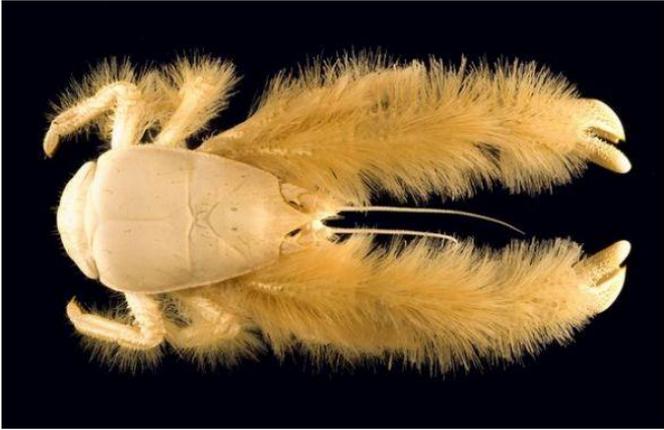


三、肽的来源

- 来源广泛：动物、植物、微生物
- 获得方法：天然产物提取、酶解、发酵

海洋活性多肽是当代生物学研究的一个最新热点和高地。由于海洋生物的生活环境与陆地生物迥异，海洋生物具有多样性、复杂性和特殊性，从而使源于其中的海洋天然产物与陆地天然产物不同，这为寻找新的天然活性物质提供了丰富的物质来源。据目前科研资料显示，相比陆地植物和动物性多肽，**源自海洋生物的多肽具有来源更丰富、活性更高、营养价值更全面等特点。**







Durvillaea



铁钉菜



叶托马尾藻



紫菜



石花菜



中国近海渔业捕捞的主要水产品

海上捕鱼



新华网
WWW.NEWS.CN

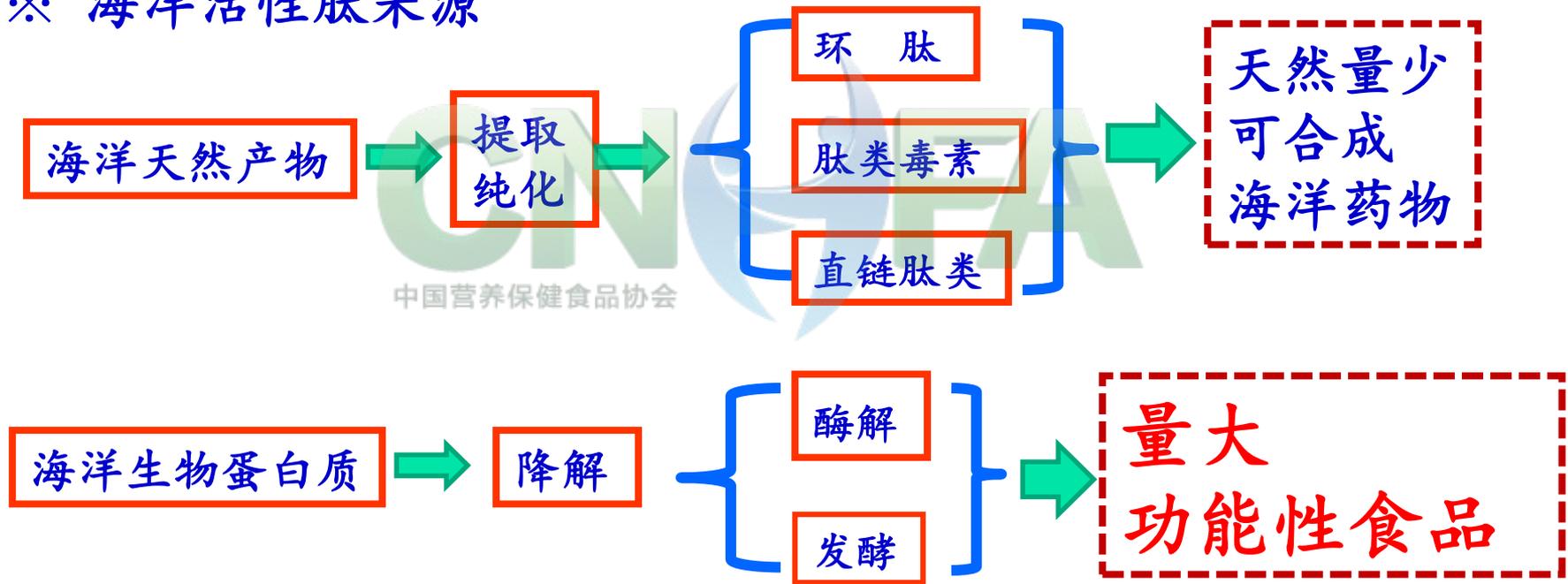
新华网
WWW.NEWS.CN



四、海洋生物活性肽

肽类是海洋生物活性物质中数量最庞大的一类化合物，达数万种之上。

※ 海洋活性肽来源



(1) 海洋天然产物 环肽

- ❖ 环肽：是由氨基酸通过首尾缩合形成酰胺键而成为具有大环的肽类化合物，或通过其余的键如酯键而形成的大环的肽类化合物。
- ❖ 1980年由美国学者ireland从海鞘分离第一个具有抗肿瘤活性的环肽ulithiacyclamide以来，环肽类化合物是目前研究最热的肽类化合物。
- ❖ 主要来源：海鞘、海兔、海绵以及海藻。



海洋天然产物

肽类毒素

海葵毒素
芋螺毒素
海蛇毒素

- ✿ 具有神经、心血管、细胞毒作用，以神经毒为主
- ✿ 具有麻醉、强心、抗癌、抗菌和抗病毒作用
- ✿ 毒性作用强烈、药效高、作用剂量小
- ✿ 分子量相对较小，容易通过基因工程进行大批量生产

中国营养保健食品协会



海藻凝集素

来源：红藻、绿藻
分子量：10000 - 30000D
结构特征：甘氨酸、丝氨酸和酸性氨基酸居多。

藻胆蛋白

来源：蓝藻和红藻
主要功用：光合作用的捕光色素的复合体。可以用于临床癌症患者治疗的光敏剂，提高敏感度，提高治疗效果。

麝香峭素

七肽：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
已知最有效的降压药，尚具有强烈的催产作用

中国营养保健食品协会

鲨鱼软骨血管形成抑制因子

多肽，分子量 30kD左右
鲨鱼：极少患恶性肿瘤的脊椎动物之一
血管形成抑制因子：当今抗癌研究与治疗的热点

降钙素

32肽 鲑鱼降钙素已用于临床
调节、降低血中钙、磷的作用，可保证骨中钙、磷的储存
对骨骼起保护作用

(2) 海洋生物蛋白质 小分子肽 (十肽以下)

- 研究、应用热点，但分离纯化困难，序列明确的肽少

- 种类繁多

依来源分：海参肽、牡蛎肽、磷虾肽、鱼皮胶原肽、扇贝多肽、螺旋藻多肽、紫菜多肽等；

中国营养保健食品协会

依活性分：抗氧化多肽、降血脂多肽、抗肿瘤多肽、降血压多肽 (ACE抑制肽)、抗菌肽、抗病毒肽等；

- 获得方法：多数采用酶解法

五、海洋贝源降血压肽与红藻源抗菌肽

(一) 海洋贝类源降血压肽(益生菌发酵法)

1、背景

高血压人口日益增多，严重影响世界各国居民的生活健康水平。

2017年中国大健康数据显示，我国高血压人口1.6-1.7亿，每年近100万人因高血压而死亡，一年用于治疗心脑血管疾病3000亿人民币。

临床药物副作用大，而食品源ACE抑制肽，安全且降压效果显著。

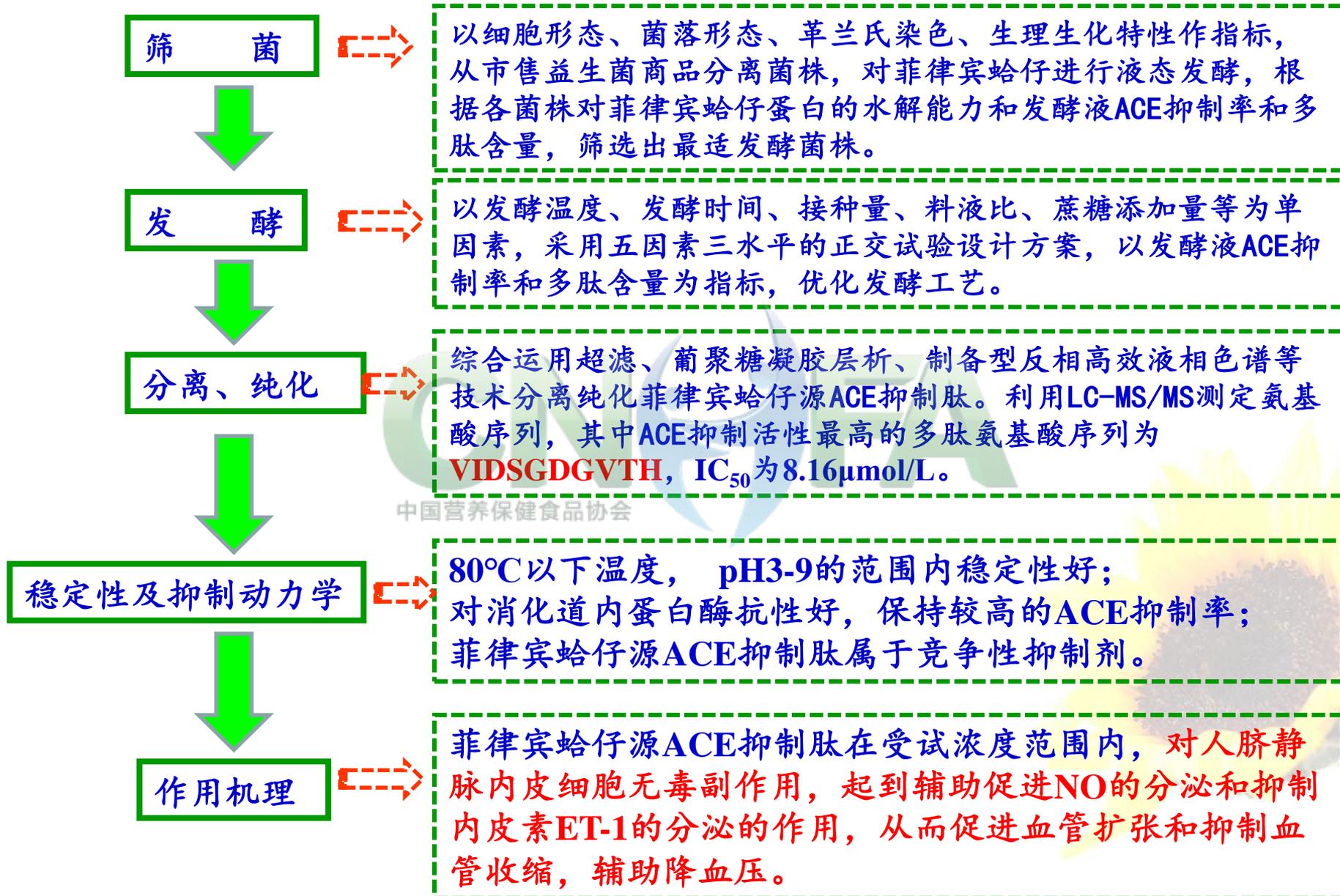
化学合成的ACE抑制剂卡托普利已得到医学界的普遍认可，然而，药物治疗高血压往往会产生药物依赖，咳嗽、肾功能可逆性降低、皮疹等副作用，所以人们越来越青睐于食物疗法。

养殖海产品：世界食品经济增长最快部分
(FDA报告)

我国是世界上最大的养殖海产品生产国，且贝类产量约占养殖品总量的3/4。资源量巨大！

我国沿海菲律宾蛤仔养殖量大，开发成降血压功能食品，意义重大。

2、制备技术（发酵法）及功能因子研究





动物实验验证

实验动物: SPF级Wistar/SD大鼠, 体重350g, 雄性。

受试药: 多肽Val-ILe-Asp-Ser-Gly-Asp-Gly-Val-Thr-His用生理盐水溶解配成3.2mg/ml溶液。生理盐水稀释浓度为1.6, 0.8mg/ml, 给药体积为2ml/只。

仪器: DSI PhysioTel®植入式遥测系统。

实验方法: (1)DSI PhysioTel®植入式遥测系统大鼠模型的建立。

(2)一氧化氮合酶抑制剂**左旋硝基精氨酸(L-NNA)** 高血压模型建立。

(3) 待L-NNA 组的大鼠血压稳定升高后, 开始进行药效实验。

(4) **给药方式:** 1) 给药方式: 腹腔注射给药;

2) 溶剂组: 溶剂对照组腹腔注射同等体积的生理盐水。

(5) **给药周期:** 给药7天

动物实验结果分析

中国营养保健食品协会

1、大鼠腹腔注射**L-NNA**一周后, 通过DSI PhysioTel®植入式遥测系统测定大鼠收缩压、舒张压, 发现平均绝对值升高均大于30mmHg, 形成稳定持续性的高血压, 表明造模成功。

2、在腹腔注射受试多肽Val-ILe-Asp-Ser-Gly-Asp-Gly-Val-Thr-His 第4天后, 高剂量组的收缩压和舒张压均开始降低, 给药1周后给药组各大鼠收缩压和舒张压均显著降低, 并呈现剂量依赖性。

3、给药前后各组大鼠的体温和体重均未发生明显变化, 该肽未显示毒性。

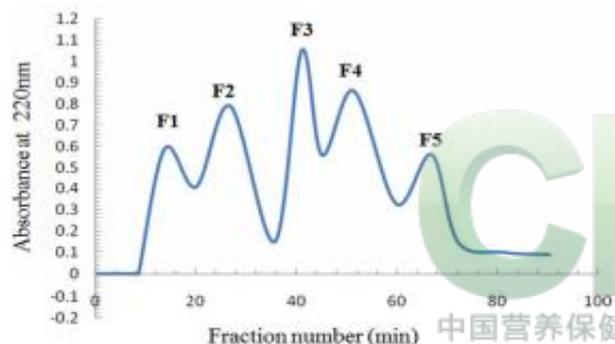


Fig. 1 Chromatogram of fractions isolated from RPFP-I by gel filtration chromatography.

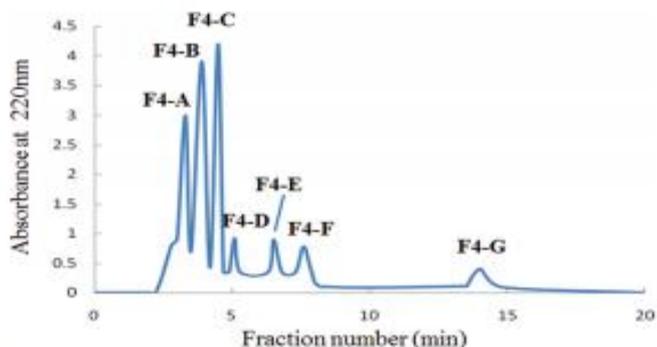


Fig. 2 Chromatogram of fractions isolated from F4 by RP-HPLC.

Table 1 ACE inhibitory activity of different ultrafiltration fractions

Fractions	ACE inhibitory rate (%)	IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)
RPFP-I (MW < 5 kDa)	72.55 ± 2.21	1.27 ± 0.11
RPFP-II (MW = 5-10 kDa)	58.35 ± 1.15	2.61 ± 0.15
RPFP-III (MW > 10 kDa)	46.51 ± 1.01	3.15 ± 0.12

All data are presented as mean ± SE. The IC₅₀ value is defined as the concentration of the inhibitor required to inhibit 50% of the ACE activity.

Table 2 ACE inhibitory activity of different fractions from RPFP-I separated by gel filtration chromatography

Fractions	ACE inhibitory rate (%)	IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)
F1	51.31 ± 1.03	1.19 ± 0.08
F2	54.15 ± 1.15	1.04 ± 0.09
F3	65.18 ± 2.01	0.81 ± 0.08
F4	78.59 ± 1.89	0.59 ± 0.06
F5	63.21 ± 1.04	0.91 ± 0.09

All data are presented as mean ± SE. The IC₅₀ value is defined as the concentration of the inhibitor required to inhibit 50% of the ACE activity.

Table 3 ACE inhibitory activity of different fractions from fraction F4 separated by RP-HPLC

Fractions	ACE inhibitory rate (%)	IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)
F4-A	53.61 ± 1.14	0.12 ± 0.01
F4-B	67.68 ± 1.03	0.10 ± 0.01
F4-C	89.69 ± 2.22	0.06 ± 0.01
F4-D	73.19 ± 1.15	0.08 ± 0.01
F4-E	41.36 ± 1.09	0.24 ± 0.01
F4-F	48.61 ± 1.19	0.16 ± 0.01
F4-G	38.56 ± 1.01	0.26 ± 0.01

All data are presented as mean ± SE. The IC₅₀ value is defined as the concentration of the inhibitor required to inhibit 50% of the ACE activity.

Table 4 Molecular weight and ACE inhibitory activity of peptides identified from fraction F4-C

Peptides	MW (Da)	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
VISDEDGVTH	1076.15	8.16 ± 0.12
LDSGDGVTH	899.92	26.11 ± 0.53
VVVG DGAVGK	900.05	43.33 ± 1.15
FAGDDAPRA	918.97	60.46 ± 1.56

All data are presented as mean ± SE. The IC₅₀ value is defined as the concentration of the inhibitor required to inhibit 50% of the ACE activity.

Stability of VISDEDGVTH against gastrointestinal proteases

The stability of VISDEDGVTH against gastrointestinal proteases was assessed *in vitro*.²⁹ VISDEDGVTH was incubated with various gastrointestinal enzymes, including pepsin, trypsin and α-chymotrypsin and the ACE inhibitory activity was assessed subsequently. The ACE inhibitory activity of the peptide digestion by pepsin and the mixture of pepsin, trypsin and chymotrypsin was 92.15% and 90.81%, respectively, and that of the control (without any gastrointestinal proteases) was 93.58%. No noteworthy changes were found after incubation with gastrointestinal proteases. The results suggested that the bioactivity of VISDEDGVTH may be resistant to digestion in the gastrointestinal tract.

对ACE抑制机理？

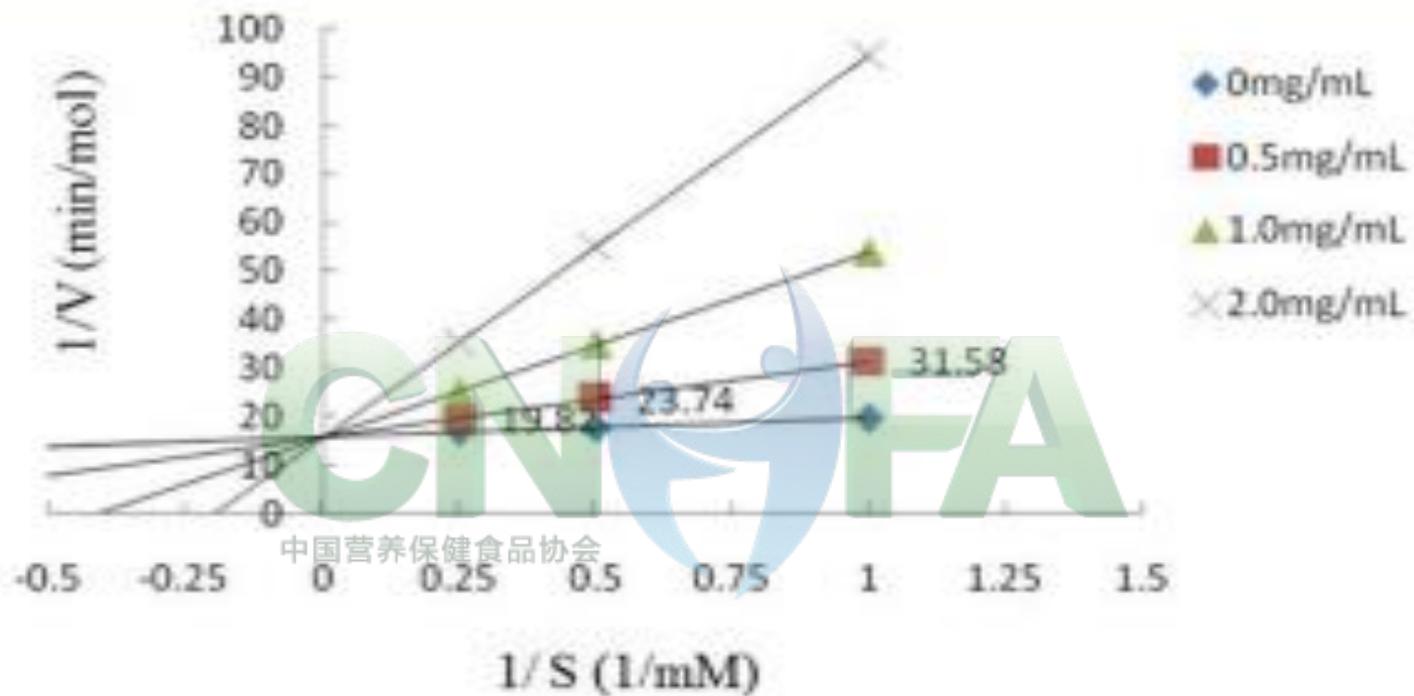


Fig. 3 Lineweaver-Burk plots of ACE inhibition by VISDEDGVTH.

竞争性抑制作用



ACE抑制肽对HUVECs细胞增殖、NO分泌和ROS清除的影响

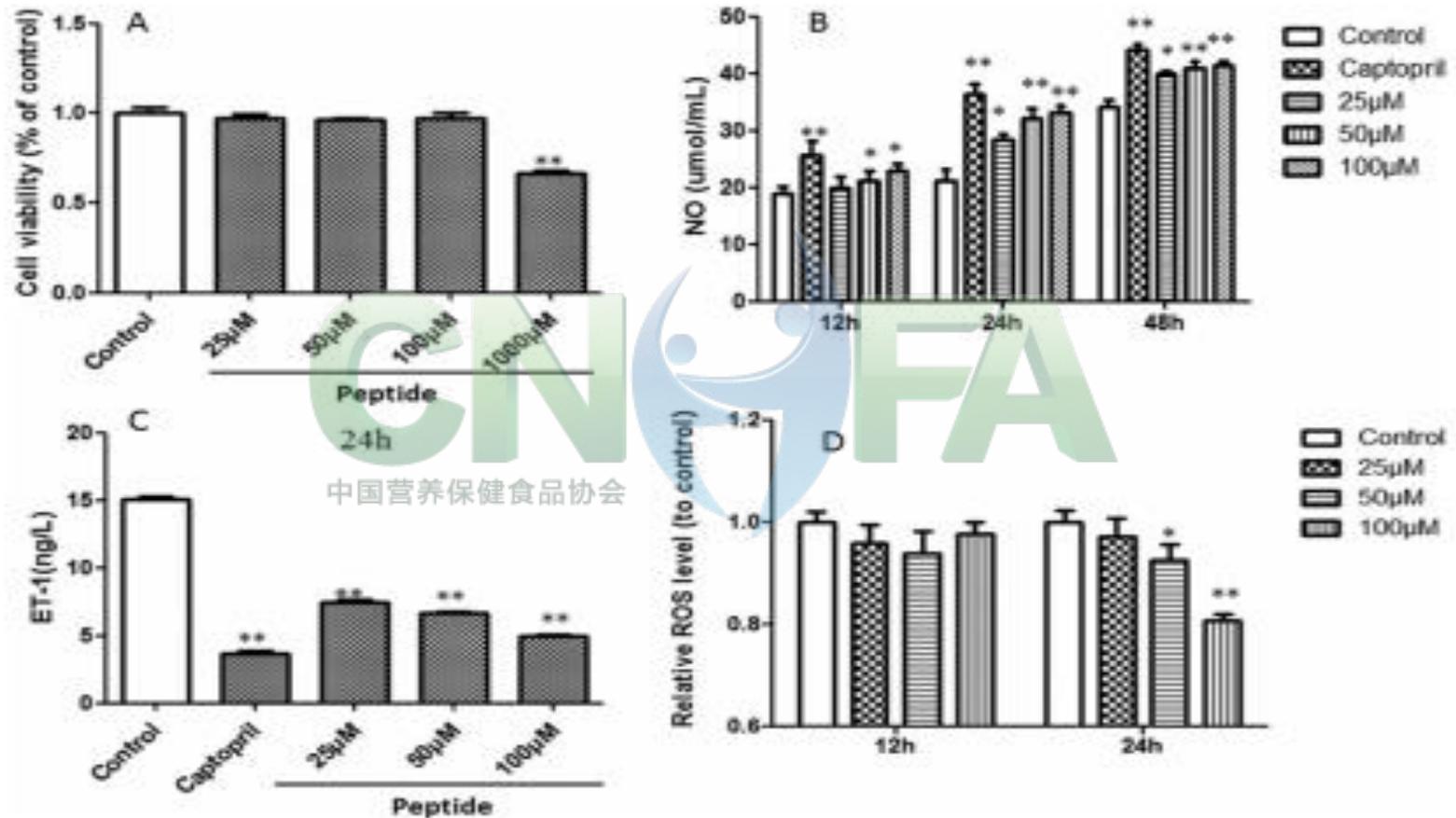
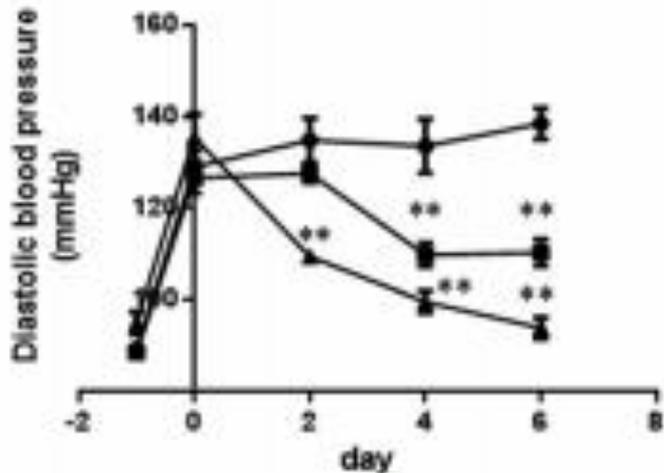
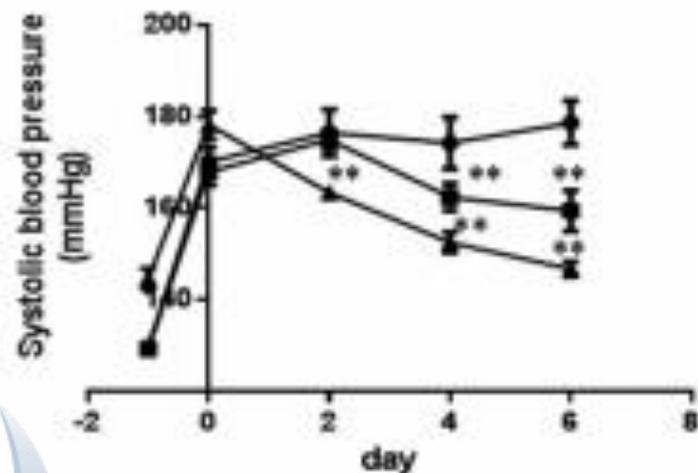


Fig. 5 Effect of VISDEDGVTH on NO, ET-1 secretion and ROS scavenging in HUVECs.

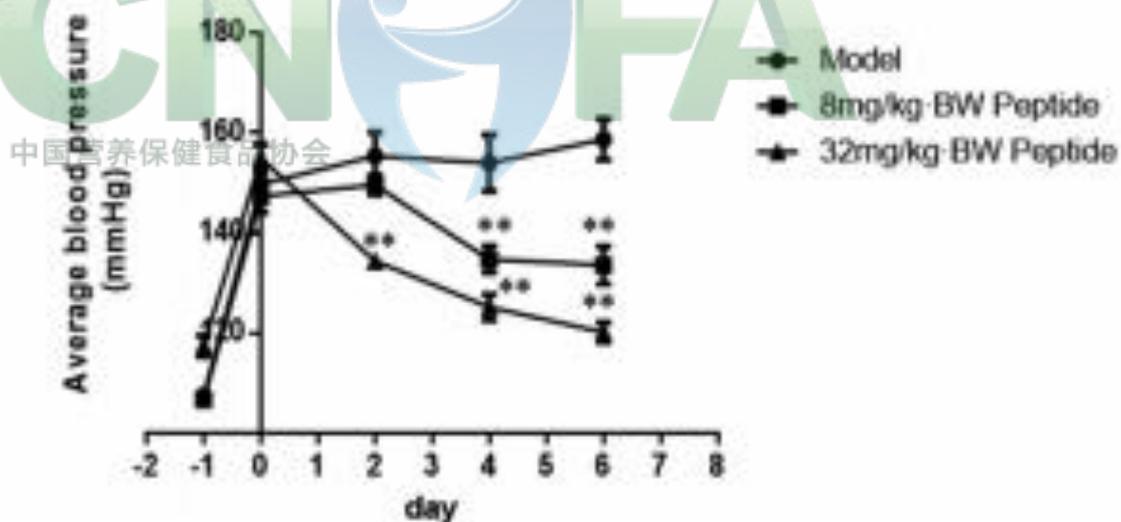
A



B



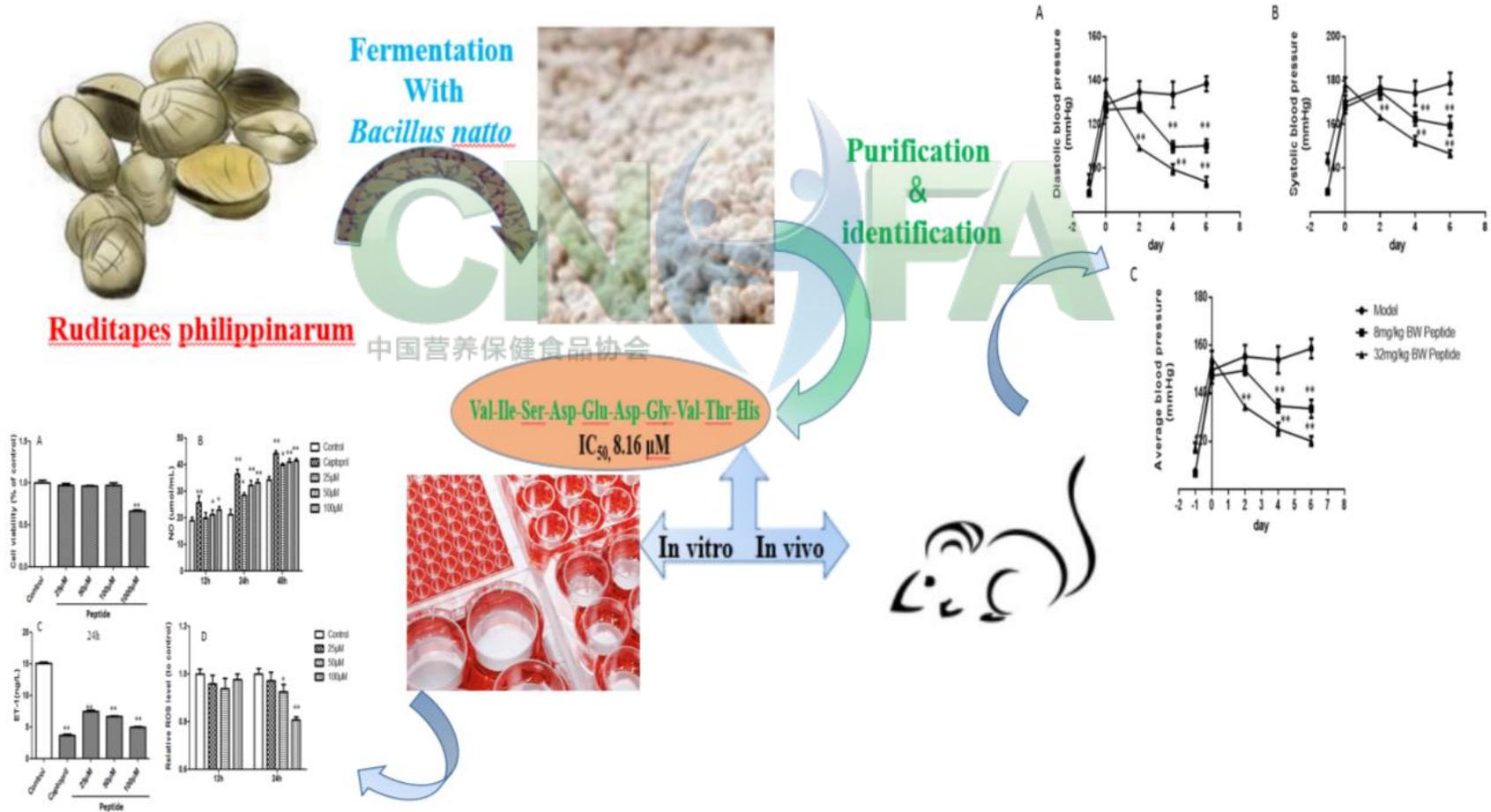
C



Anti-hypertension effect of VISDEDGVTH in animal models.

Isolation, purification and the anti-hypertensive effect of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from *Ruditapes philippinarum* fermented with *Bacillus natto*. *Food & Funct.*, 2018, 9, 5230–5237

Graphical Abstract



3、成果应用前景

成果：已申请发明专利
在中国典型生物保藏中心保存菌种

功能性食品

原料易得，工艺简便

营养成分，尚含**益生菌**、**多种降血压肽**及酶等诸多功能成分，

具有降血压、调节胃肠功能、降血脂等多种功能。

海洋药物

序列明确，易人工合成

分子量小，易吸收

安全性好，降血压活性高



(二) 红藻源抗菌肽 (Antibacterial peptides from red seaweeds, AMP)

1、背景

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)

属于红藻门，是我国特有的一种具有很高的经济价值的海藻，主要在长江以北的江苏沿海。条斑紫菜含有高达29~35%的蛋白质，能否作为抗菌肽的来源???

随着致病菌抗药性问题日益突出，寻找全新类型的抗生素是解决抗药性问题的一条有效途径。

抗菌肽是生物体内经诱导产生的一种具有生物活性的小分子多肽，分子量通常低于10 kDa

目前已发现的抗菌肽存在资源有限、活性不足或合成成本高等问题。

指具有优化机体代谢环境、有益于机体健康的一类多肽

AMP

抗菌肽

生物活性肽

2. 抗菌肽制备（酶解法）、纯化、抗菌活性及作用机制

紫菜蛋白质提取及筛选

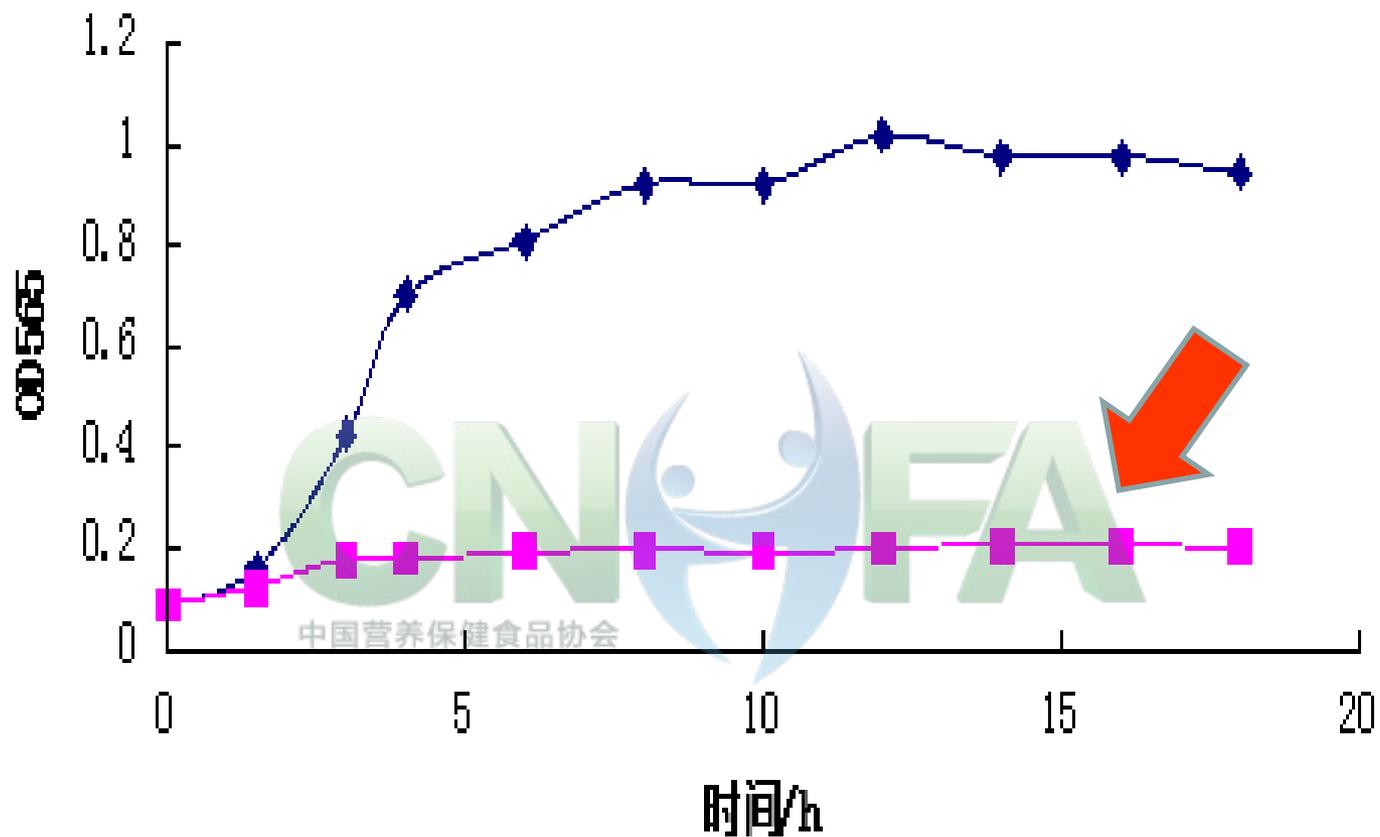
水溶性、酸溶性、盐溶性和碱溶性蛋白质分别用6种酶进行酶解，对金黄色葡萄球菌进行抗菌活性测定。其中，水溶性蛋白质在硫酸铵饱和度为40-50%时沉淀所得蛋白质的胃蛋白酶酶解物中分子量小于5 KD的级分，对金黄色葡萄球菌抗菌效果最为明显。最优酶解条件为温度40℃、加酶量2%、pH1.5、时间2h。

抗菌肽的纯化、测序

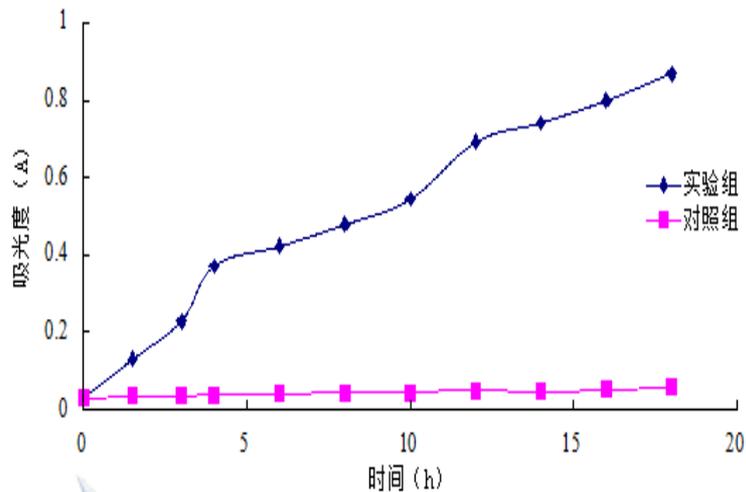
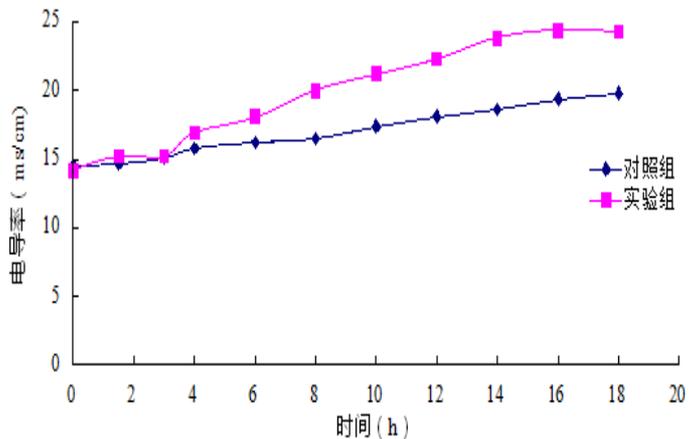
经超滤、凝胶过滤、离子交换层析纯化得到的组份进行混合质谱鉴定，从中筛选出具有最佳抗菌活性的多肽序列TPDSEAL，分子量为732Da，等电点为pH5.34

抗菌肽的活性及作用机理

- ① 抗菌肽显著抑制金黄色葡萄球菌生长，致使其生长不能出现正常的对数生长期。
- ② 随着培养时间的延长，培养液中碱性磷酸酶的含量、蛋白质含量、β-半乳糖苷酶的含量和电导率值逐渐增加，推测可能由于抗菌肽作用致使细胞破损，细胞的通透性增强，从而导致胞内物质严重外流。

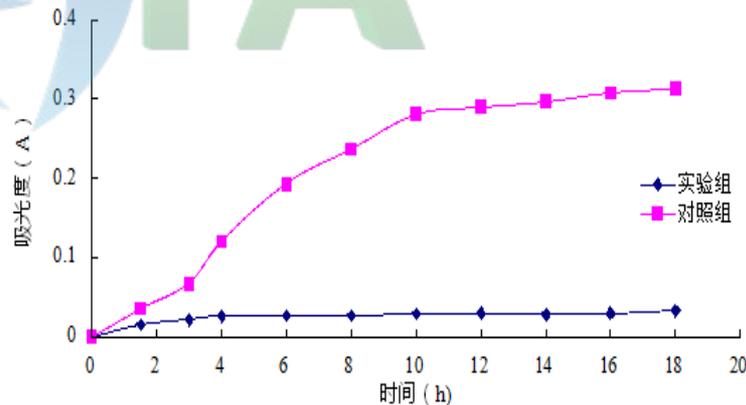
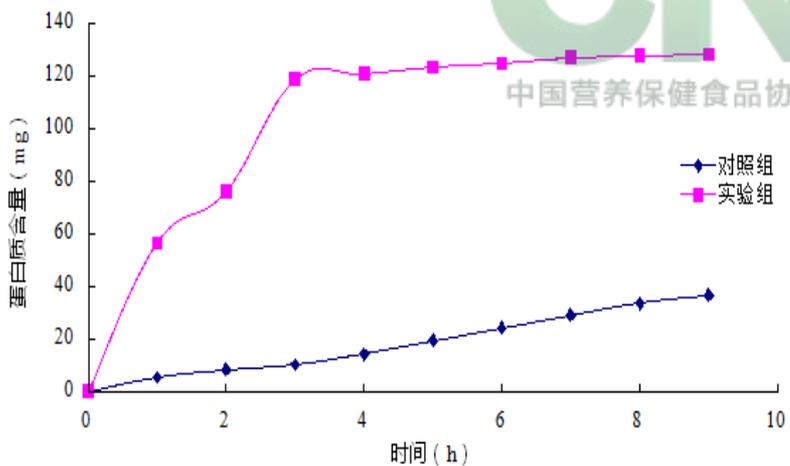


抗菌肽对金黄的葡萄球菌生长曲线的影响



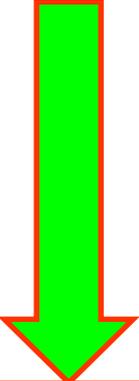
抗菌肽对培养液电导率的影响

抗菌肽对碱性磷酸酶活性的影响



抗菌肽对培养液中蛋白质含量的影响

抗菌肽对培养液中β-半乳糖苷酶含量的影响

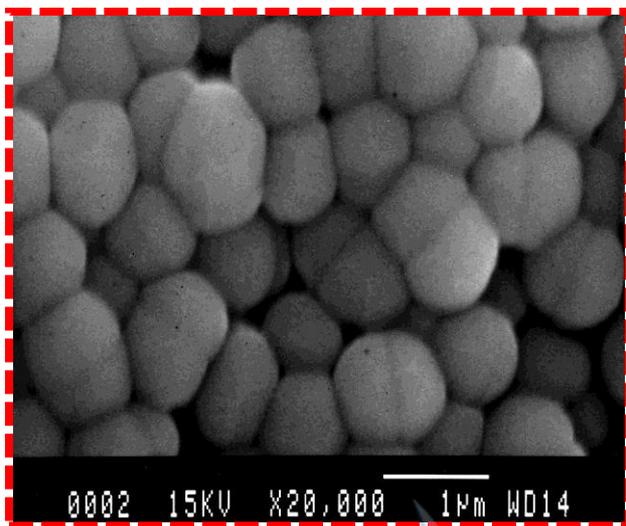


电镜分析

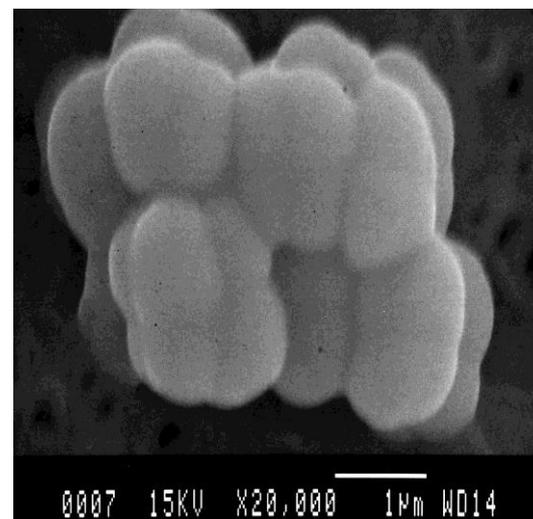
扫描电镜：金黄色葡萄球菌的菌体最初是光滑、均匀、饱满的；经抗菌肽处理后的菌体表面模糊、菌体不规则；随时间培养时间延长，细胞壁出现破损，细胞壁发生粘连，胞内物质外流，视野内菌体呈模糊状。

透射电镜：正常的菌体质壁结合紧密，菌体规则、圆滑，胞内物质分布均匀；经抗菌肽处理后，可见明显质壁分离、细胞质固缩，内部出现空腔或菌体破裂，内容物流出，菌体裂解死亡。

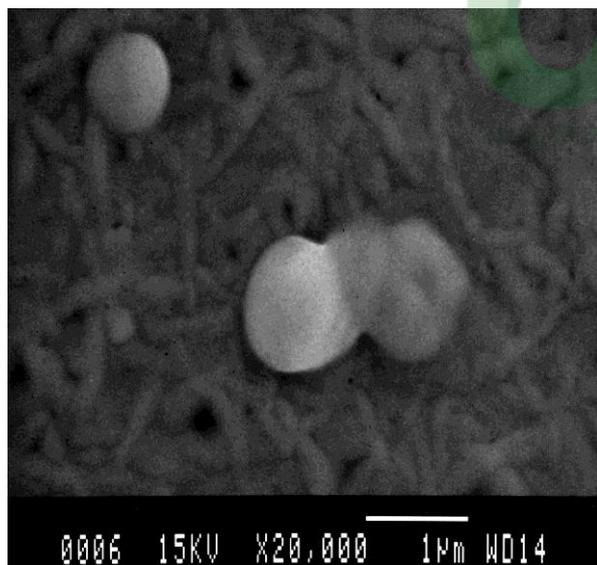
扫描电镜 观察结果



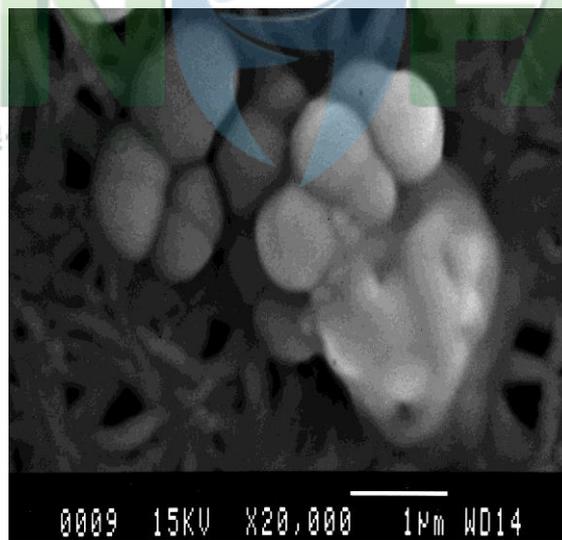
正常金黄色葡萄球菌



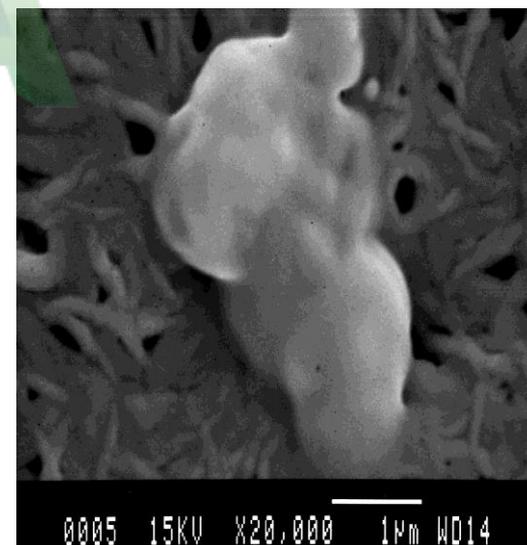
抗菌肽处理3h后



抗菌肽处理5h后



抗菌肽处理7h后

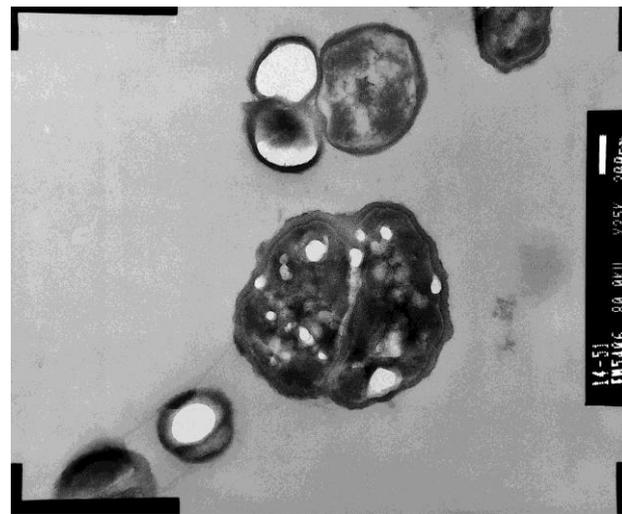


抗菌肽处理9h后

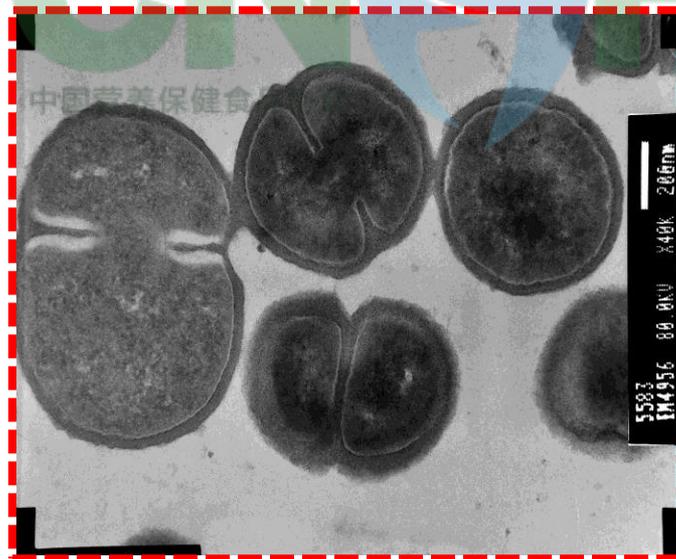
透射电镜 观察结果 (一)



正常金黄色葡萄球菌



抗菌肽处理3h后

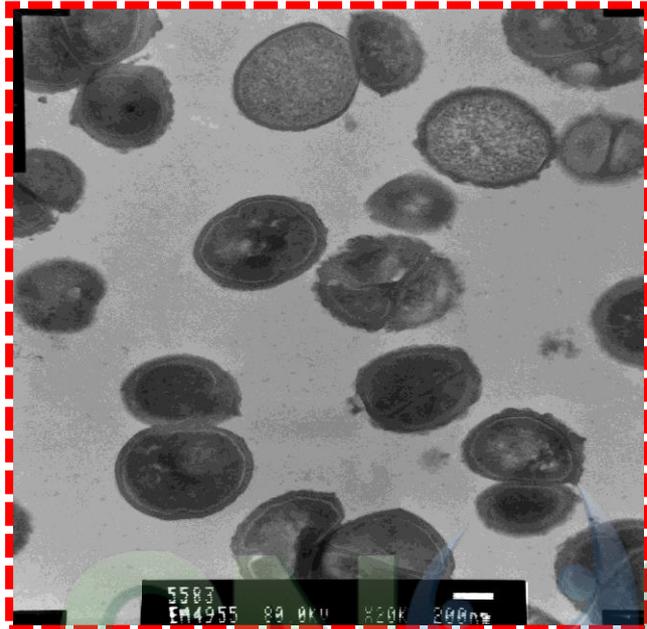


正常金黄色葡萄球菌5h后

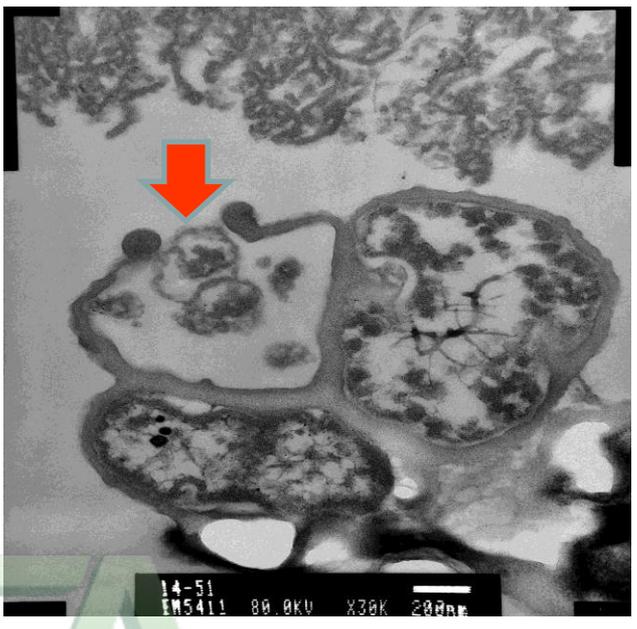


抗菌肽处理5h后

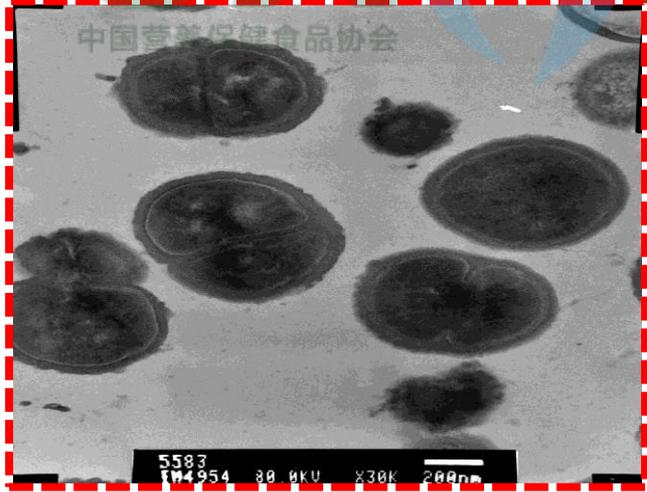
透射电镜 观察结果 (二)



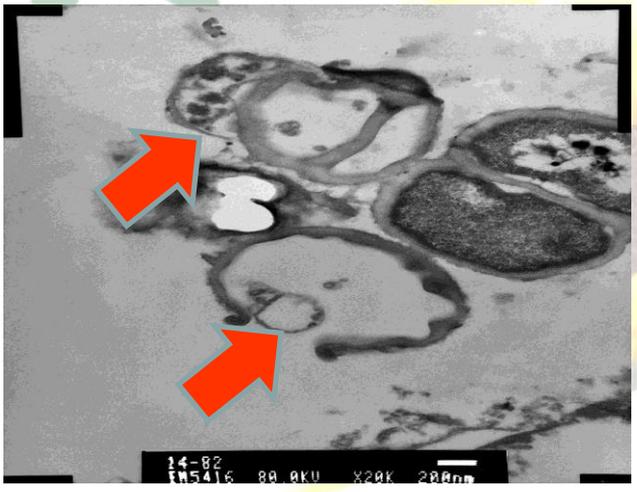
正常金黄色葡萄球菌7h后



抗菌肽处理7h后



正常金黄色葡萄球菌9h后



抗菌肽处理9h后



CNI & FA
中国营养保健食品协会



Thanks for your attention!