

抗血小板活性肽及其作用机制研究进展

田 淇, 李 博*

中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

摘要:血小板的激活、聚集是血栓形成过程中的关键因素。然而, 现有抗血小板药物虽能有效缓解血栓形成, 但仍存在诸多问题。大量研究发现, 多种天然生物活性肽存在抗血小板激活、聚集等活性, 且安全有效、来源广泛、副作用小。本文首先介绍了血小板激活的不同机制, 再对近年发表的抗血小板活性肽的来源、抗血小板聚集的效果以及抗血小板的作用机制进行了综述, 以期抗血小板肽作为膳食补充剂用于功能食品提供参考。

关键词:抗血栓; 抗血小板; 生物活性肽; 血小板聚集

中图分类号: R915

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)3-0528-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.3.026

Review on anti-platelet peptides and related mechanisms

TIAN Qi, LI Bo*

College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: Platelet activation and aggregation play an important role in the initiation and progression of thrombosis. Consequently, the anti-platelet therapy can be beneficial for the patients of coronary and cerebrovascular diseases. The anti-platelet drugs can effectively relieve the formation of thrombus, but there are still several problems, such as drug resistance, low response and complications. Many studies have shown that many bioactive peptides have significant anti-platelet activities which are from wide range of sources, safe and effective, with few side effects. This article firstly introduce the mechanism of platelet activation, then reviews the sources of anti-platelet peptides, peptide sequence, the effect of platelet aggregation that published in recent years, and probes into the mechanism of anti-platelet peptide, in order to provide reference for antiplatelet peptide as dietary supplement for functional food.

Key words: anti-thrombotic; anti-platelet; bioactive peptide; platelet aggregation

随着社会经济的发展及老龄化人口的增加, 血栓性疾病的发病率和死亡率逐年上升, 包括肺栓塞、脑卒中、心肌梗塞等常见病, 已严重威胁中老年人的身体健康。心脑血管疾病的病理基础是血栓形成, 而诱导血栓形成的关键因素是血小板的活化和聚集。因此, 目前抗血小板治疗已成为防治血栓类疾病的重要策略。然而, 现有抗血小板药物虽能有效缓解血栓的形成, 但由于存在药物抵抗或低应答, 并不适合所有患者, 部分药物还存在严重的并发症(如脑出血、消化道大出血等)^[1]。所以, 寻求来源更广泛更安全可靠的抗血小板活性物质, 对预防或延缓血栓性疾病具有重大意义。本文就近年来发现

的多种存在抗血小板激活、聚集等作用的生物活性肽及其作用机制进行综述。

1 血小板激活机制

血小板是哺乳动物血液中特有的成分之一, 它是从骨髓中巨核细胞上脱落下的具有生物活性的胞质成分^[2]。正常状态下, 血小板均以无活性的形式存在, 而在胶原、二磷酸腺苷(Adenosine diphosphate, ADP)、凝血酶、血栓素 A₂ (Thromboxane A₂, TXA₂) 等激动剂诱导下, 血小板膜表面相应受体被激活, 发生内信号转导后血小板通过粘附、聚集、释放等过程, 参与机体内的止血反应, 同时也在组织修复、炎症反应、器官移植排斥、血栓形成等病理过程中发挥着相当重要的作用^[3]。血小板活化信号通路呈网状, 多种激动剂可通过不同通路激活血小板, 且通路之间相互影响。其受体如图 1 所示。

收稿日期: 2018-10-18 接受日期: 2019-01-10

基金项目: 国家现代产业技术体系建设专项(CARS-46)

* 通信作者 Tel: 86-013681047217; E-mail: libo@cau.edu.cn

被激活,并通过偶联的 G 蛋白发挥作用^[9]。人血小板膜上凝血酶的受体是 PAR1 和 PAR4,其中 PAR1 与 G12、G13、Gq、Gi 蛋白偶联,G12 和 G13 可与 Rho 鸟苷酸交换因子结合,诱发 Rho 因子介导的细胞骨架反应,导致血小板发生形状改变^[10]。Gq 和 Gi 蛋白活化后同样可引起上述改变。因此,凝血酶不仅可引起血小板的变形,还能促使血小板内 Ca^{2+} 水平升高和 cAMP 水平下降,从而激活 GP II b-III a,使血小板活化。

各激动剂激活血小板后,血小板变形、扩散,并引起膜表面受体 GP II b-III a 构象改变,变为高亲和力受体,进而与二价纤维蛋白原等蛋白配体连接,介导血小板的粘附和聚集,最终导致血栓产生^[11]。

1.5 常见的血小板药物及其作用机制

目前临床使用的抗血小板药物主要分为:(1)阿司匹林(Aspirin),通过不可逆地阻断 COX-1 的合成,抑制 TXA_2 的合成,从而抑制血小板的活化和聚集。(2)替格瑞洛(Ticagrelor),通过可逆地与 P2Y12 受体相互作用,从而选择性抑制 ADP 诱导的血小板聚集。(3)氯吡格雷(Clopidogrel),通过不可逆地抑制 ADP 与受体 P2Y12 结合,从而选择性抑制 ADP 诱导的血小板聚集。(4)Vorapaxar 和 Atopaxar 是目前处于临床试验阶段的 PAR1 受体抑制剂^[12]。(5)阿昔单抗(Abciximab)、依替巴肽(Integrilin)、替罗非班(Tirofiban)均属于 GP II b-III a 受体拮抗剂,三者虽作用于同一受体,但结构却有所不同:阿昔单抗为抗 β_3 单克隆抗体;而依替巴肽和替罗非班是模拟受体与纤维蛋白原结合的序列,其中,依替巴肽是 7 个氨基酸组成的环肽^[13],而替罗非班为左旋酪氨酸非肽类结构。

2 抗血小板肽

早在 1984 年就有研究证实 RGDS 序列是纤维蛋白原结合细胞的活性位点,能够抑制血小板凝集和纤维蛋白结合到活化的血小板上,从而抑制血栓形成^[14]。此后,从各种天然产物中^[15]分离的抗血小板肽相继出现。这些天然抗血小板肽的抗血小板聚集效果虽然没有临床药物好,但其副作用小,因而备受关注。还有少数研究在天然抗血小板肽基础上进行结构优化和人工合成,从而开发抗血小板肽潜在的生物学价值和医学价值。按来源可将抗血小板肽分为以下几类:

2.1 动物源抗血小板肽

乳与血液的凝固有许多的相似之处,除本身具

有的抗凝因子外,经酶解后的肽段也具有抗血小板活性。Qian 等^[16]从绵羊乳铁蛋白的 N 端分离、提纯出三条抗凝血酶诱导的血小板聚集的肽段:TAQ-VTSTEV,QVTSTEV 和 KDQDK。实际上其 N 端序列残基 37-33 RKLGRPL 与人乳铁蛋白 N 端序列相同,具有相同抗血小板活性,其抑制凝血酶诱导的血小板聚集的 IC_{50} 值为 $4 \mu\text{M}$ 。酪蛋白作为乳的重要成分,不仅可以提供充足的氨基酸和氮源,还是生物活性肽的主要来源。Meddeb 等^[17]从牛乳 κ -酪蛋白中提取出残基 106-116 AIPPKKNQDK 以剂量依赖性方式抑制 ADP 诱导的血小板聚集和纤维蛋白原结合。该十一肽比人纤维蛋白原 β 链的 C 端十二肽具有更强的抑制性。用胰蛋白酶酶解该十一肽得到两条短肽:残基 106 ~ 112 MAIPPKK 和残基 113-116 NQDK。这两条短肽对血小板聚集的影响较小且不会抑制纤维蛋白原与血小板结合。Jolles 等人^[18]将从牛乳蛋白中分离出的四肽 KRDS 进行构象优化得到 KREE,其抗血小板活性高于早前发现的四肽 KRDS 和 RGDS。四肽 RGDS 可以抑制 ADP 和胶原诱导的血小板聚集, IC_{50} 值分别为 $32.3 \mu\text{M}$ 和 $13.75 \mu\text{M}$ 。

有部分研究关注了肉蛋白衍生肽的抗血小板活性,发现 I 型胶原含有氨基酸序列:DGEA^[19]、FGN、GPR、RGD 均具有抗血小板活性。Zied Khiari 等^[20]从鲭鱼皮明胶的酶解物中提取出抗血小板三肽 FGN。Maruyama 等^[21]从猪皮胶原的酶解物中提取出的三肽 GPR 抑制胶原和凝血酶诱导的血小板聚集,其 IC_{50} 值为 $250 \mu\text{M}$ 。某些胶原肽也具有抑制纤维蛋白原-凝血酶诱导血小板聚集的作用,但是不能抑制凝血酶的活性。Nonaka 等^[22]研究发现,胶原肽 GPR 及其衍生物能够与纤维蛋白原结合并阻止纤维蛋白单体间发生聚合,从而选择性抑制 ADP 诱导的血小板聚集。同时动物实验证实,静脉注射或口服三肽 GPR 以及猪皮胶原的酶解物可以抑制内毒素诱导的患有弥散性血管内凝血大鼠体内的血小板数量减少,也就是说口服该三肽可以对血小板聚集起到抑制作用。

自然界中存在多种具有抗血小板活性的蛋白类物质,到目前为止已从蚊蝇、水蛭、蜈蚣、蛇等生物体内提取出具有良好活性的抗凝血和溶栓蛋白,通过酶解后分离纯化得到活性更强的短肽。Kong 等^[23]从少棘蜈蚣(*Scolopendra mutilans*)中分离出三肽 SQL。在 $0.2 \sim 1.0 \text{ mg/mL}$ 浓度范围内,SQL 以剂量

依赖性方式抑制 ADP 诱导的人血小板聚集。同时, SQL 可有效延长活化部分凝血活酶时间(Activated partial thromboplastin time, APTT), 而凝血酶原时间(Prothrombin time, PT) 不受影响, 这可能是由于其对内源性凝血途径中的凝血因子发挥抑制作用, 而不影响外源性凝血途径。Hao 等^[19] 从棕点湍蛙(*Amolops loloensis*) 皮肤分泌物中分离出多肽 ZDPI (FRGCWLKNYSRPGCL-NH₂), 能够以剂量依赖性方式抑制 ADP 诱导的人血小板聚集, IC₅₀ 值为 12.27 μg/mL。Kato 等^[24] 从白蛉沙蝇(*Leishmania spp*) 的唾液中分离出的 Ayadualin 可通过影响纤维蛋白原与 GP II b-III a 的结合而显著抑制凝血酶、ADP 和胶原诱导的血小板聚集。Chen 等^[25] 从蕲蛇毒水解物中分离出多肽 ACH-11 (LTFPRIVFVLG)。在 0.1 ~ 1.0 mg/mL 浓度范围内, ACH-11 以剂量依赖性方式抑制 ADP 诱导的兔血小板聚集; 同时, 研究发现 ACH-11 可直接抑制 FXa 或 FXa-底物复合物(Ki 值为 9.02 μM), 进而发挥抗凝血作用; 此外, 动物实验发现 ACH-11 可缓解 ADP 诱导的血栓形成, 效果优于阿司匹林, 并且显著延长 PT 及 APTT, 但不影响出血时间(Bleeding time, BT)。

大量研究涉及蛇毒对血小板聚集的抑制作用, 活性位点均为 RGD 序列。除 ACH-11 之外, 研究人员从多种蛇毒中提纯出了抗血小板肽, 包括: Echistatin^[26], Trigramin, Rhodostomin, Arietin^[27], Halysin^[28], Gabonin^[29], NKV-66^[30], Triflavin^[31], Jerdonibitin^[32], Accutin^[33], pENW^[34], AAP^[35], LX0702^[36]。

2.2 植物源抗血小板肽

植物源抗血小板作用主要来自于中草药中的多酚类物质, 而抗血小板多肽的相关研究较少。目前, Hyun 等^[37] 从药用蘑菇(桦褐孔菌 *Inonotus obliquus*) 中提取、纯化出三肽 WGC, 可以抑制胶原和 ADP 诱导的血小板聚集, 其抑制率高达 91.6%, IC₅₀ 值为 0.16 mM。相对于其他血小板聚集抑制剂(如 Bassiatin, IC₅₀ 值为 0.19 mM), 由于 WGC 具有较高的抑制血小板聚集活性且更安全, 无副作用, 因此被认为是医药或功能性食品的更优选择。

近几年科学家逐渐注意到种子贮藏蛋白的多肽链内部可能普遍存在着功能区, 选择适当的蛋白酶水解这些多肽, 有可能将其释放出来, 从而制备生物活性肽。Lee 和 Kim^[38,39] 从大豆蛋白的水解产物中提纯并鉴定了两种活性最高的亲水性抗血小板肽:

SSGE 和 DEE。SSGE 和 DEE 的 IC₅₀ 值分别为 480、460 μM。均可以抑制 ADP 诱导的大鼠血小板聚集。同时, 大豆蛋白的水解物中多数组分具有抗血小板活性, 表明水解物中的大多数肽具有抗血小板作用。于国泳等^[40] 从燕麦, 青稞和荞麦的酶解并模拟消化产物中提取出 38 条抗血小板肽, 并从中筛选出了活性最高的 9 条肽: ALPIDVLANAYR, EFLLAGNKR, GEEFGAFTPK, QLAQIPR, LQAFEPLR, ALPVDVLANAYR, GEEFDAFTPK, QKEFLLAGNKR 和 TNPNSMVS HIAGK。这些肽通过以低结合能结合 COX-1 活性中心的方式抑制血小板聚集。所有水解产物均显示出高抗血小板活性, 并以剂量依赖性方式抑制血小板聚集, 其中, 燕麦球蛋白水解物的抗血小板活性最强, IC₅₀ 值为 0.282 mg/mL。通过蛋白酶水解这些种子贮藏蛋白所获得的生物活性肽具有很多优点: 原料廉价、成本低、安全性好、不需要很严格的实验条件和很贵重的仪器设备、便于工业化生产。

2.3 微生物源抗血小板肽

大多数重组的抗血小板肽选择在酵母菌、枯草杆菌及大肠杆菌中表达, 使工业化制备抗血小板肽成为可能, 鲜有报道从微生物蛋白中分离抗血小板肽。Pytela 等^[41] 从噬菌体文库中分离出的环状九肽 ACRGDGWCG, 通过抑制整合素 α_vβ₁ 介导的受体与纤维蛋白原结合, 从而抑制 ADP 和胶原诱导的大鼠血小板聚集, IC₅₀ 值为 6 μM。通过计算机模拟, 环肽 ACRGDGWCG 的类似物 ACDCRGDCFCG 同样具有较高的抗血小板活性。

2.4 人工合成的抗血小板肽

近几十年来, 随着基因工程和生物制药技术的发展, 国内外科学家根据已知抗血小板肽序列和相关受体结构优化和开发了多种新型高效抗血小板肽。Revcept(二聚体糖蛋白 VI-Fc) 通过清除激活血小板受体的关键配体, 阻断斑块中的胶原与 GPVI 结合从而降低血小板粘附。Revcept 能够有效抑制胶原诱导的人血小板聚集, 且呈剂量和时间依赖性, 但不抑制 ADP 或凝血酶诱导的血小板聚集^[42]。

N-{4-(4-Amidinophenoxy) butyryl}-a-L-aspartyl-L-valine (FK633) 是一种人工合成的肽类似物, 可以抑制凝血酶, ADP, 胶原和血小板活化因子(Platelet-activating factor, PAF) 诱导的人血小板聚集, IC₅₀ 值分别为 103、87、98、239 nM。FK633 与四肽 RGDS 的抑制作用相似, 但其效力比 RGDS 强约 1 000 倍。但与 RGDS 相比, FK633 不会抑制浓度高达 1.0 mM

的整合素 $\alpha_V\beta_3$ 和 $\alpha_V\beta_1$ 介导的细胞粘附^[43]。

SFLLRNPNDKYEPF 是基于人凝血酶受体结构而设计合成的凝血酶受体拮抗剂。可以通过抑制凝血酶引发的一些细胞内信号传导系统,从而抑制血小板聚集。基于仓鼠凝血酶受体 (SFLLRNP-NH₂) 推导出的衍生七肽也同样有效^[44]。

(S, S) PSRCDCR-NH₂ 衍生自整合素亚单位 α_{IIb} 。人血小板表面受体 GPIIb-IIIa 的亚单位 α_{IIb} 的 313-332 序列在与纤维蛋白原结合过程中起重要作用。

体外实验表明, (S, S) PSRCDCR-NH₂ 能显著抑制人血小板聚集。在电诱导兔动脉血栓模型中发现, 经股静脉给予该肽后, 与依替巴肽相比, 能更显著地延长动脉血流时间, 减轻血栓质量; 且该肽还具有不影响凝血功能和 BT 的优点^[45]。

大量研究还发现其他具有抗血小板激活、聚集活性的肽段, 除部分人工合成的肽类物质会影响血小板功能外, 多种食源性抗血小板肽也处于研发阶段。下表为已报道的抗血小板肽序列信息。

表 1 已报道的抗血小板肽序列

Table 1 Reported Anti-platelet Peptide Sequences

序号 Serial No.	名称 Name	来源 Source	氨基酸序列 Sequence	氨基酸数量 Number of amino acid residues	化学质量 Chemical Mass (Da)	参考文献 Ref.
1	Accutin	蛇毒 Snake venom	GAQCTAGPCCWPCEGTICRRARGD DLDDYCNGISADCPNPYY	43	3 966.19	33
2	Echistatin	蛇毒	ECESGPCCRNCKFLKEGTICKRARGDDMDD YCNKTCDCPRNPHKGPAT EAGEDCDCGSPANPCDAATCK	49	4 600.02	27
3	Trigramin	蛇毒	LIPGAQCCEGLCCDQCSFIEE GTVCRIARGDDLDDYCNGRSAGCPRNPFH GKECDCSSPENPCDAATCKLRPGAQCCEGLC	72	6 268.61	27
4	Rhodostomin	蛇毒	CEQCKFSRAGKICRIPRGDMPDDRCTGQSADCPRYH VSPPVCGNKILEQGEDCDCGSPANQDQCCNAAT	68	6 092.64	27
5	Arietin	蛇毒	CKLTPGSQC�NHGECCDQCKFKKARTV CRIARGDWNDYCTGKSSDCPWNH	84	7 676.20	27
6	NKV-66	蛇毒	-	-	66k	30
7	Triflavin(三黄素)	蛇毒	-	-	-	31
8	Integrilin	蛇毒	Mpa-Har-GDWPC-NH ₂	7	831.96	13
9	ACH-11	蕲蛇毒 Viper	LTFPRIVFVLG	11	1 441.71	25
10		蛇毒	pENW	3	429.00	34
11	Ayadualin	沙蝇毒素 Sand fly toxin	-	-	-	24
12	WP30	水蛭 Leech	VISRTQSNVQAAWQVGGHAADYSAVAIER	30	3 141.63	63
13		少棘蜈蚣 Less thorns	SQL	3	382.38	19
14		棕点湍蛙 Brown point frog	FRGCWLKNYSRPGCL-NH ₂	15	2 068.40	25
15	AoGDW	人工合成 Synthetic	ω -aminooctanoic-GDW	4	571.62	54
16	G4120	人工合成	cyclo-S-Ac-(AA1)-RGDC-OH	5	578.56	46
17	蛋白质二硫化物 异构酶抑制剂	人工合成	CxxC(CGHC)	4	472.47	62
18		人工合成	(S, S) PSRCDCR-NH ₂	7	1 024.09	45
19		人工合成	AC-RGDPE	3	545.58	56
20		牛胶原蛋白 Bovine collagen	KPGEPPGPK	8	808.92	47
21		猪皮胶原蛋白 Pig skin collagen	GPR	3	364.40	19
22		鲑鱼皮胶原蛋白 Salmon skin collagen	FGN	3	337.20	19
23	HIV 病毒 Tat 蛋白 HIV virus Tat protein		KKQRFRRHRNRQ	12	1 553.79	48
24		I 型胶原 Type I collagen	DGEA	4	390.34	19
25		I 型胶原	KDGEA	5	518.51	19

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 Serial number	名称 Name	来源 Source	氨基酸序列 Sequence	氨基酸数量 Number of amino acid residues	化学质量 Chemical Mass(Da)	参考文献 Ref.
26		I 型胶原	PAGKNGETGPQG	12	1 112.15	19
27		I 型胶原	GPAGKDGEAGAQG	13	1 114.12	19
28		绵羊乳铁蛋白 Sheep lactoferrin	TAQVTSTEV	9	934.99	16
29		绵羊乳铁蛋白	QVTSTEV	7	762.80	16
30		绵羊乳铁蛋白	KDQDK	5	632.66	16
31		乳铁蛋白 Lactoferrin	KRDS	4	504.53	52
32		噬菌体 Phage	ACRGDGWCG	9	717.73	41
33		噬菌体	ACDCRGDCFCG	11	736.73	41
34		噬菌体	CRRETAWAC	9	888.97	41
35		噬菌体	NGRAHA	6	624.64	41
36		纤维蛋白原 Fibrinogen	KREE	4	560.59	18
37		纤维蛋白原	RGDF	4	493.51	36
38		纤维蛋白原	LGGAKQAGDV	10	915.00	36
39		纤维蛋白原	NIMEILRGDF	10	1 207.40	36
40		人纤维蛋白原 Human fibrinogen	HHLGGAKQAGDV	12	1 189.29	36
41		人纤维蛋白原	RGDX	4	459.49	36
42		人凝血酶受体 Human thrombin receptor	SFLLRNPNDKYEPF	14	1 739.93	44
43		牛乳 κ -酪蛋白 Bovine milk κ -casein	PPK	3	340.41	17
44		牛乳 κ -酪蛋白	KNQDK	5	631.67	17
45		牛乳 κ -酪蛋白	NQDK	4	503.50	17
46		牛乳 κ -酪蛋白	MAIPPKNQDK	11	1 269.52	17
47		牛乳 κ -酪蛋白	MAIPPK	6	655.85	17
48		牛乳 κ -酪蛋白	MAIPPKK	7	784.02	17
49		药用蘑菇 Medicinal mushroom	WGC	3	381.27	37
50		大豆蛋白 Soy Protein	SSGE	4	378.33	38
51		大豆蛋白	DEE	3	391.32	39
52		模拟纤连蛋白 Simulated fibronectin	GRGDSPK	7	715.75	41

注:“-”表示未报道。

Note:“-” means not reported.

3 抗血小板肽的作用机理

3.1 纤维蛋白原受体拮抗剂

血小板膜上存在多种纤维蛋白原的受体,如整合素 $\alpha_{II}\beta_1$ 、GP II b-III a 和 GPIIb。整合素家族种类较多,与血小板相关受体主要有三种,纤连蛋白,玻连蛋白和纤维蛋白原的细胞表面受体,分别为: $\alpha_V\beta_1$ 整联蛋白, $\alpha_V\beta_3$ 整联蛋白,IIb-IIIa 整联蛋白。纤维蛋白原通过结合血小板表面上的特异性受体糖蛋白 IIb-IIIa(GPIIb-IIIa),形成网状结构从而导致血小板的聚集。在纤维蛋白原序列上已确定了两个结合

位点。首先, γ 链的 C 端序列:HHLGGAKQAGV。第二,对应于 α 链的残基 572-575 或 95-98 的四肽序列:RGD(S 或 F),这两条肽都能抑制胶原与 ADP 诱导的血小板的聚集。

依替巴肽(Integrilin)^[13] 是美国食品药品监督管理局批准上市的第一种抗血小板多肽,是衍生自东南侏儒响尾蛇(*Sistrurus miliarius barbouri*)毒液中蛋白质的环状七肽 Mpa-Har-GDWPC-NH₂,属 GPIIb-IIIa 受体拮抗剂。它活性基团为 Har-GD,该基团通过模拟与纤维蛋白原结合的氨基酸序列,选择性、竞争

性、可逆性抑制 GP II b-III a 与纤维蛋白原结合,进而起到抗血小板聚集的作用。

RGD 多肽及其衍生物和类似物: GPIIb-IIIa 与配体的结合主要通过一个三肽序列,即 RGD 序列, RGD 序列广泛存在于纤维蛋白原中,是黏附蛋白与血小板表面受体相互作用的识别位点,含 RGD 序列肽段可竞争性与 GPIIb-IIIa 识别位点结合,阻断纤维蛋白原与血小板结合,进而抑制血小板聚集^[49]。其衍生物和类似物包括:人工合成的四肽 RGDS^[50];人工合成的含 2 个 RGD 序列的小分子线性肽 Z4A5^[51];从乳蛋白中分离出的 KRDS^[52];对 RGD 周边部分氨基酸进行突变得到的三肽 RWR^[53];以 RGD 为先导物而设计合成的 AoGDW^[54];用液相法合成的新型多肽类似物 RGD-苯乙胺衍生肽 I^[55];含 RGD 序列的线性模拟物 Ac-RGD-pe^[56];含 RGD 序列的环状模拟物 cyclo-S-Ac-(AA1)-RGDC-OH^[57];在 N 端氨基处掺入水杨酸衍生的新型 RGD 类似物^[58];含有 RGD 序列的肽类似物 W2002(N^α-acetyl-RGD-p-methoxyphenethylamine)^[59];从白蛉沙蝇的唾液中分离出的 Ayadualin^[24];大部分蛇毒中的抗血小板多肽均含 RGD 结构: Accutin^[33], Echistatin^[26], Trigramin, Rhodostomin, Arietin^[27], Halysin^[28], Gabonin^[29], NKV-66^[30], Triflavin^[31];从噬菌体文库中分离出的环状九肽 ACRGDCWCG 和增加二硫键合成的 ACDCRGDCFCG;纤维蛋白原 α 链中的 RGDF 及其衍生肽 GRGDSPK^[41]、NIMEILRGDF, γ 链中的 LGGAKQAGDV^[36]。

P1c 是结缔组织生长因子中第 4 功能区的一个多肽序列,由 17 个氨基酸组成,能与人整合素 α_vβ₃ 特异性结合,用其标记的纳米颗粒能与高度表达整合素 α_vβ₃ 的肝癌细胞高度亲和,该纳米探针已成功用于肿瘤的体内定位。P1c 可以有效抑制 ADP 诱导的血小板聚集,同时抑制细胞内 ERK1-2 信号通路的磷酸化,显示 P1c 可能是通过抑制 ERK1-2 的磷酸化而实现对血小板聚集的抑制作用^[55]。研究还证实,作为 GPIIb-IIIa 的配体,P1c 可与该受体发生特异性结合而产生抗血小板作用。

3.2 凝血酶受体拮抗剂或凝血酶抑制剂

凝血酶的活性中心处于一个极性较强的缝隙中,因为底物必须与缝隙中的活性位点相结合从而使肽键断裂,所以凝血酶具有较强的特异性。1990 年,Rydel 等^[60]通过 X 射线晶体衍射阐明了水蛭素与凝血酶的结合方式,即水蛭素的 N 端在一定程度

上阻塞了凝血酶的活性位点,而其较长的 C 端则与凝血酶的带正电荷的外结合位点结合。目前对水蛭素的结构和作用机制研究比较深入,还有部分科学家对水蛭素结构进行重组和优化。

天然水蛭素主要包括 HV-1、HV-2 和 HV-3 三种异构体,均为由 65 ~ 66 个氨基酸组成的无糖基化单链多肽,相对分子量约为 7 000 Da。水蛭素是迄今为止发现的活性最强的天然凝血酶特异性抑制剂。水蛭素能与凝血酶以摩尔比为 1:1 的方式结合形成复合物,使凝血酶失活,阻止了凝血酶裂解纤维蛋白原,进而抑制了纤连蛋白的形成。同时,水蛭素也能阻断凝血酶诱导的血小板反应及凝血酶催化的止血反应^[61]。

比伐卢定(Bivalirudin)于 2 000 年被批准在美国上市,是一种近年来用于临床的直接凝血酶抑制剂,其主要成分是水蛭素的二十肽类似物。通过可逆地与凝血酶催化位点特异性结合,直接抑制凝血酶的活性,从而抑制凝血酶所诱导和催化的反应^[62]。

WP-30(VISRTQSNVQAAWGQVGGHAADYSVAI-IER)是从干燥水蛭中分离纯化出一种多肽,属凝血酶受体拮抗剂。研究发现,WP-30 可能通过干扰凝血酶与受体结合,从而以剂量依赖性方式抑制凝血酶诱导的血小板聚集,IC₅₀值为 445.1 μM。但对 U46619 及胶原诱导的血小板聚集抑制作用较弱。同时,动物实验发现,WP-30 能缓解小鼠体内血栓的形成,且呈剂量依赖性^[63]。

3.3 粘附受体 GPIb 拮抗剂

GPIb 是血小板膜上的主要粘附受体,参与血小板相关疾病。然而,使用生理配体在体内研究 GPIb 特异性识别是十分困难的。GPIb 结合蛇毒 C 型凝集素(Snaclecs)是体外探索 GPIb 的常用方法。蛇毒含有许多生物成分,其通过破坏内皮或影响凝血因子并最终影响血小板功能而发挥作用。具体来说,由 α、β 异二聚体组成的蛇毒 C 型凝集素低聚化后形成大分子与特异性血小板受体如 GP I b、α_{II}β₁ 或 GPIIb 受体相互作用,从而抑制血小板功能。

Chen 等^[32]从竹叶青蛇(*Trimeresurus jerdonii*)蛇毒中提取出一种名为 Jerdonibitin 的新型蛇毒 C 型凝集素能够与 GPIb 特异性结合。氨基酸序列显示 Jerdonibitin 不仅是一种蛇毒 C 型凝集素,而且与一种 GPIb 受体抑制性蛇毒 C 型凝集素 TSV-GPIb-BP 具有序列相似性。Jerdonibitin 剂量依赖性地抑制低

剂量凝血酶或瑞斯托霉素诱导的血小板聚集,但不抑制高剂量凝血酶诱导的血小板聚集。许多研究表明 GPIIb 是凝血酶受体,特别是在凝血酶剂量低时。在体内,Jerdonibitin 也剂量依赖性地使小鼠的血小板数量降低,并且在静脉注射 18 小时后血小板计数仍保持在非常低的水平。

3.4 TXA₂ 合成酶抑制肽

AA 代谢在血小板聚集过程中起到了重要作用,COX-1 是 AA 代谢产生 TXA₂ 过程中关键限速酶。于国泳^[40]研究发现,燕麦抗血小板聚集肽能显著抑制 AA 代谢过程中 COX-1 的活性从而抑制 TXA₂ 的生成。计算机模拟结果表明,燕麦球蛋白蛋白酶水解物可通过进入 COX-1 活性中心,与其中的氨基酸通过氢键、共价键和范德华力结合,产生空间位阻,引起 COX-1 活性中心构象改变,从而竞争性地抑制 COX-1 活性,从而介导 AA 代谢途径减少 TXA₂ 的生成,进而抑制血小板聚集。

3.5 其他

myr-RKEFAK 是模拟 GP II b-III a 的 β 3 亚单位 C 端 α 螺旋上 6 个氨基酸序列 (RKEFAK) 肽段,并通过十四烷酰化修饰而形成的肽模拟物。研究发现 myr-RKEFAK 的抗血小板作用可能与选择性调控血小板信号转导有关。myr-RKEFAK 可以浓度依赖性地抑制血小板固相化纤维蛋白原上稳定黏附和伸展、二相聚集以及纤维蛋白块回缩等外向内信号转导功能,但不影响游离纤维蛋白原结合和一相聚集等内向信号转导功能^[64]。

CGHC 是一种基于蛋白质二硫键异构酶 (Protein disulfide isomerase, PDI) 氧化还原序列设计合成的四肽。PDI 在血小板聚集起主要作用,其抑制剂已成为新型抗血栓药物。CGHC 抑制 PDI 还原酶活性和由嗜中性粒细胞 NOX-2 产生的 PDI 调节的超氧化物。研究发现,CGHC 的中间两个氨基酸并不影响该肽的抗血小板活性,在凝血酶活化的血小板中,CxxC 以剂量依赖性方式抑制血小板聚集,在较低的激动剂浓度下更有效。CxxC 肽通过与 PDI 中的 Cys400 结合(一种 PDI 促血栓形成活性的重要位点)显著抑制血小板聚集和活化,而不干扰颗粒分泌。揭示了其抗血小板活性的潜在机制,PDI 的 C 端 CGHC 序列的反应性半胱氨酸对血栓形成具有重要意义^[65]。

4 结语

抗血小板治疗在血栓性疾病的防治中具有关键

作用。尽管目前临床上使用的抗血小板药物种类良多,但仍存在一定的局限性:出血风险高、副作用大、个体差异性大(如某些药物需肝细胞色素 P450 酶代谢形成活性代谢物),半衰期短等。

自然界中存在大量具有抗血小板活性的蛋白类物质,到目前为止已经从沙蝇、水蛭、蛇、蛙等生物体内提取出具有良好活性的抗凝血和溶栓蛋白。但这些物质大都从吸血类动物的毒液中提取,安全性差且副作用没有得到改善。而从食源性蛋白质中发现的具有抗血小板活性的小分子肽类化合物具有安全、可食用、营养、来源广泛等特点,开发利用前景广泛。虽然大部分抗血小板肽的活性低于抗血小板药物,但通过结构优化和设计合成将会开发出多种新型高效的抗血小板肽类似物,具有一定的临床应用潜力。另一方面越来越多研究发现抗血小板药物的联合治疗获得的收益更大,而食源性蛋白水解物可抑制多种途径诱导的血小板激活和聚集,故抗血小板肽适合开发成具有预防或缓解血栓形成功能的多靶向的精准营养产品。因此,深入研究食源性抗血小板肽及其作用机理,将为今后抗血小板肽作为膳食补充剂用于功能食品,或用于血栓类疾病的防治提供新的策略和依据。

参考文献

- 1 Chen WW, et al. China cardiovascular disease report 2017 summary[J]. Chin Circ J (中国循环杂志), 2018, 33(1): 1-8.
- 2 Li W. Glacocalyxin A inhibits platelet activation and thrombus formation via GPVI pathway[D]. Suzhou: Soochow university (苏州大学), 2013: 23-24.
- 3 Zhang Y. Spontaneous activation of P2Y12 receptor and the role of Gi and G12-13 pathways in platelet activation and thrombosis[D]. Shanghai: Fudan University (复旦大学), 2013: 59-71.
- 4 Badimon L, et al. The thrombotic disease: progress in anti-platelet therapy[J]. Rev Esp Cardiol, 2008, 61: 501-513.
- 5 Cheng H. Effects of theafavin (TF-1) on collagen-induced platelet activation and thrombosis formation[D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2016: 99-100.
- 6 Zhong CS, et al. When the platelet is activated, its calcium content is reduced with the number of particles[J]. J Chin Electr Microsc Soc (电子显微学报), 1996, 1: 301-306.
- 7 Kim S, et al. P2Y12 receptor in platelet activation[J]. Platelets, 2011, 22(1): 54-58.
- 8 Lu YK. Study on increasing calcium adsorption effect with

- collagen peptide from skin of *Walleye Pollock* [D]. Qingdao: Ocean University of China (中国海洋大学), 2013:84-90.
- 9 Nakanishi MM, et al. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin [J]. *Nature*, 2000, 404:609-613.
- 10 Yu RM, et al. *Marine Science Bulletin* [J]. *Mar Sci Bull* (海洋通报), 2004, 3:87-93.
- 11 De Luca G. Glycoprotein IIb-IIIa inhibitors [J]. *Cardiovasc Drug Ther*, 2012, 30:242-254.
- 12 Liu D. Roles and mechanisms of chemokine CCL2 in platelet functions [D]. Chongqing: Third Military Medical University (第三军医大学), 2015:45-46.
- 13 Wan W, et al. Research progress of platelet associated active peptides [J]. *Clin Med* (临床医学), 2017, 37:121-124.
- 14 Ruoslahti E, et al. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule [J]. *Nature*, 1984, 309 (5963):30-33.
- 15 Xia MY, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of piper plants [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1676-1685.
- 16 Qian ZY, et al. Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1243 (1):25-32.
- 17 Meddeb S, et al. A conformational study of Lys-Arg-Asp-Ser and analogs, a series of potent antithrombotic peptides. an approach based on simulated annealing and H NMR [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 1994, 11:959-981.
- 18 Jolles P, et al. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function [J]. *Eur J Bio*, 1986, 158:379-382.
- 19 Khiari Z, et al. Structure elucidation of ACE-inhibitory and antithrombotic peptides isolated from mackerel skin gelatine hydrolysates [J]. *J Sci Food Agr*, 2014, 94:1663-1671.
- 20 Maruyama S, et al. Inhibitory effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related synthetic peptides on fibrinogen-thrombin clotting [J]. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993, 1164:215-218.
- 21 Nonaka I, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-platelet effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related peptides [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 1997, 61:772-725.
- 22 Kong Y, et al. Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145:182-186.
- 23 Hao X, et al. A novel ranacyclin-like peptide with anti-platelet activity identified from skin secretions of the frog *Amolops loloensis* [J]. *Gene*, 2016, 576:171-175.
- 24 Kato H, et al. Ayadualin, a novel RGD peptide with dual anti-hemostatic activities from the sand fly *Lutzomyia ayacuhen-sis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis [J]. *Biochimie*, 2015, 112:49-56.
- 25 Chen M, et al. A novel direct factor Xa inhibitory peptide with anti-platelet aggregation activity from *agkistrodon acutus* venom hydrolysates [J]. *Sci Rep-uk*, 2015, 5:10846.
- 26 Gan Z, et al. Echistatin, A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper [J]. *J Bio Chem*, 1988, 36:19827-19832.
- 27 Huang S, et al. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors [J]. *J Bio Chem*, 1987, 33:16157-16163.
- 28 Huang TF, et al. Halysin, an antiplatelet Arg-Gly-Asp-containing snake venom peptide, as fibrinogen receptor antagonist [J]. *Biochem Pharmacol*, 1991, 42:1209-1219.
- 29 Huang TF, et al. An antiplatelet peptide, gabonin, from *Bitis gabonica* snake venom [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 298 (1):13-20.
- 30 Chanda C, et al. Novel thrombolytic protein from *Cobra venom* with anti-adhesive properties [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 590:20-26.
- 31 Huang TF, et al. Mechanism of action of a potent antiplatelet peptide, triflavin from *Trimeresurus flavoviridis* snake venom [J]. *Thromb Haemostasis*, 1991, 66:489.
- 32 Chen Z, et al. A novel platelet glycoprotein Ib-binding protein with human platelet aggregation-inhibiting activity from *Trimeresurus jerdonii* venom [J]. *Toxicon*, 2011, 57:672-679.
- 33 Yeh CH, et al. A new short chain RGD-containing disintegrin, accutin, inhibits the common pathway of human platelet aggregation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-molecular Cell Res*, 1998, 1425:493-504.
- 34 Liu Y, et al. Stimulation of nitric oxide production contributes to the antiplatelet and antithrombotic effect of new peptide pENW (pGlu-Asn-Trp) [J]. *Thrombo Res*, 2015, 136:319-327.
- 35 Andrieux A, et al. Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIb/IIIa [J]. *J Bio Chem*, 1989, 264:9258-9265.
- 36 Yi K, et al. LX0702, a novel snake venom peptide derivative, inhibits thrombus formation via affecting the binding of fibrinogen with GPIIb-IIIa [J]. *J Pharmacol Sci*. 2015, 127:462-466.
- 37 Hyun KW, et al. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* [J]. *Peptides*, 2006, 27:1173-1178.
- 38 Lee K, et al. SSGE and DEE, new peptides isolated from a

- soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation [J]. Food Chem, 2005, 90:389-393.
- 39 Tian MH, et al. Food and fermentation industries [J]. Food Ferment Indus(食品与发酵工业), 2014, 06:110-116.
- 40 Yu, GY, et al. *In vitro* inhibition of platelet aggregation by peptides derived from oat (*Avena sativa* L.), highland barley (*Hordeum vulgare* Linn. var. nudum Hook. f.), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) proteins [J]. Food Chem, 2016, 194:577-586.
- 41 Pytela R, et al. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors [J]. Science, 1986, 231:1559-1562.
- 42 Martin M, et al. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited [J]. J Am Heart Assoc, 2011, 123:1891-1899.
- 43 Aoki T, et al. The anti-platelet and anti-thrombotic effects of FK633, a peptide-mimetic GPIIb-IIIa antagonist [J]. Thromb Res, 1996, 81:439-450.
- 44 Connolly TM, et al. Species variability in platelet and other cellular responsiveness to thrombin receptor-derived peptides [J]. Thromb Haemostasis, 1994, 72:627-633.
- 45 Roussa VD, et al. A highly constrained cyclic (S, S)-CDC-peptide is a potent inhibitor of carotid artery thrombosis in rabbits [J]. Platelets, 2011, 22:361-370.
- 46 Barker PL, et al. Cyclic RGD peptide analogues as antiplatelet antithrombotics [J]. J Med Chem, 1992, 35:2040-2048.
- 47 Morten LF, et al. Conformation-dependent platelet adhesion to collagen involving integrin alpha 2 beta 1-mediated and other mechanisms: multiple alpha 2 beta 1-recognition sites in collagen type I [J]. J Biochem, 1994, 299:791-797.
- 48 Bruce EV, et al. A novel integrin specificity exemplified by binding of the $\alpha_v\beta_3$ integrin to the basic domain of the HIV tat protein and vitronectin [J]. J Cell Bio, 1993, 2:461-468.
- 49 Wang XX, et al. Studies about AoGDW's antiplatelet action *in vitro* [J]. Chin Reme Clinics(中国药理学通报), 2007, 23:626-629.
- 50 Wen SM, et al. Synthesis of N^α-Ac-Arg-Gly-Asp-NHCH₂CH₂C₆H₅ as an antiaggregatory agent [J]. J General Hospital Air Force(空军总医院学报), 1994, 10:125-127.
- 51 Zhao HX, et al. RWR affects thrombosis by interaction with integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptor on surface of platelet [J]. Chin J Bio(中国生物制品学杂志), 2013, 26:1126-1133.
- 52 Wu G, et al. Inhibition effects of KRDS, a peptide derived from lactotransferrin, on platelet function and arterial thrombus formation in dogs [J]. Haemostasis, 1992, 22(1):1-6.
- 53 Li YB, et al. Antithrombotic effects and the conformation determination of KRDS, a synthetic peptide [J]. Zoo Res(动物学研究), 1994, 14(S):106-113.
- 54 Xiong J, et al. New peptide pENW (pGlu-Asn-Trp) inhibits platelet activation by attenuating Akt phosphorylation [J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 45:552-558.
- 55 Wang XH, et al. Study on platelet aggregation and ERK1-2 phosphorylation by a non-arginyl-glycyl-aspartate peptide [J]. Chi J Clin Lab Sci(临床检验杂志), 2010, 28:444-446.
- 56 Wang JC, et al. In vitro effects of a peptide mimetic (AC-RG-DPE) as an antiplatelet agent [J]. Biorheology, 1995, 32:227.
- 57 Baker PL, et al. Cyclic RGD peptide analogues as antiplatelet antithrombotics [J]. J Med Chem, 1992, 35:2040-2048.
- 58 Sarigianni YM, et al. Novel synthetic RGD analogs incorporating salicylic acid derivatives show antiplatelet activity *in vitro* [J]. Let Peptide Sci, 2002, 9:101-109.
- 59 Wang JCh, et al. Effect of N^α-acetyl-arginyl-glycyl-aspartyl-p-methoxyl phenylethylamine on platelet aggregation [J]. Chin J Pharm Toxi(中国药理学与毒理学杂志), 2000, 3:207-210.
- 60 Rydel TJ, et al. The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin [J]. Science, 1990, 249:277-280.
- 61 Huang YN. Structure basis of RGD-hirudin and development of new direct thrombin inhibitors [D]. Shanghai: Fudan University(复旦大学), 2013:97.
- 62 Wu G, et al. Novel peptide targeting integrin alphavbeta3-rich tumor cells by magnetic resonance imaging [J]. J Magn Reson Imaging, 2011, 34:395-402.
- 63 Steg PG, et al. Bivalirudin started during emergency transport for primary PCI [J]. New England J Med, 2013, 369:2207-2217.
- 64 Liu X, et al. A novel selective inhibitor to thrombin-induced platelet aggregation purified from the leech *Whitmania pigra* [J]. Biochem Bioph Res Co, 2016, 473:349-354.
- 65 Sousa HR, et al. Novel antiplatelet role for a protein disulfide isomerase-targeted peptide: evidence of covalent binding to the C-terminal CGHC redox motif [J]. J Thromb Haemost, 2017, 15:774-784.