

唐鹏杰, 韩秋煜, 包斌, 等. 海洋生物活性肽的制备、分离纯化及构效关系研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 488–495. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020264

TANG Pengjie, HAN Qiuyu, BAO Bin, et al. Research Progress on Preparation, Separation, Purification and Structure-Function Relationship of Marine Bioactive Peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 488–495. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020264

· 专题综述 ·

海洋生物活性肽的制备、分离纯化及构效关系研究进展

唐鹏杰¹, 韩秋煜¹, 包斌¹, 包春玲², 吴文惠^{1,*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 上海健康医学院附属第六人民医院东院妇产科, 上海 201306)

摘要: 海洋生物活性肽是一类结构多样且具有多种功能和活性的肽类, 其制备、分离纯化和生物活性受到了广泛关注。已有不少相关研究证明海洋生物活性肽是一类很具开发潜力的新型药物来源。然而, 整合海洋生物活性肽制备技术和生物应用的研究还较缺乏, 为此本文综述了近年来海洋生物活性肽制备、分离纯化的方法, 并阐述了其原理、优缺点、适用对象和未来发展趋势, 介绍了海洋生物活性肽的抗氧化、抗糖尿病、降血压、抗菌、抗癌等功能活性, 并深入探讨了其构效关系和未来发展方向, 以便为开发新型海洋药物提供有力理论依据。

关键词: 海洋生物活性肽, 酶解, 超滤, 制备, 分离纯化, 构效关系

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)24-0488-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020264



本文网刊:

Research Progress on Preparation, Separation, Purification and Structure-Function Relationship of Marine Bioactive Peptides

TANG Pengjie¹, HAN Qiuyu¹, BAO Bin¹, BAO Chunling², WU Wenhui^{1,*}

(1. College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, East Hospital of the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Health Medical College, Shanghai 201306, China)

Abstract: Marine bioactive peptides are a kind of peptides with various structures, functions and activities. The production and preparation, separation and purification as well as biological activities have attracted much attention. It's already proved by many researches that marine bioactive peptides are a new drug source with a lot of potential. However, research on the integration of marine bioactive peptide preparation technology and biological application is still lacking. In this paper, the methods of production and preparation, separation and purification of marine bioactive peptides in recent years are reviewed. The principles, advantages and disadvantages, applicable objects and future development trend are expounded while the functional activities of marine bioactive peptides such as anti-oxidation, anti-diabetes, lowering blood pressure, anti-bacterial and anti-cancer are introduced. The structure-activity relationship and the future development direction of marine bioactive peptides are explored in depth so as to provide a strong theoretical basis for developing the new marine drugs.

Key words: marine bioactive peptides; enzymatic digestion; ultrafiltration; preparation; separation and purification; structure-function relationship

收稿日期: 2022-02-28

基金项目: 上海市创新行动计划 (19440741200); 国家自然科学基金 (82173731)。

作者简介: 唐鹏杰 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物制药, E-mail: 15722869010@163.com。

* 通信作者: 吴文惠 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生理活性物质化学, E-mail: whwu@shou.edu.cn。

海洋结构多样、动植物资源丰富,是新型功能化合物重要来源^[1]。自 20 世纪 70 年代以来,已有数千种新化合物从海洋动植物(如乌贼、海兔、海葵、海藻和海绵等)中分离出来。海洋肽提取自海洋动植物,其具有一定功能特性,可用于预防某类疾病,其疗效好,副作用少,与其他治疗药物相比具有很大的优势^[2-3]。海洋生物活性肽的活性取决于其氨基酸组成和序列。据相关文献报道,3~20 个氨基酸组成的短肽展示出优良的抗氧化^[4-5]、抗肿瘤、免疫激活^[6]、抑菌^[7]等活性^[8-10]。因此,开发新的肽类药物非常重要。近些年,学者们对海洋天然产物中具有潜在健康益处的海洋生物活性肽产生了浓厚的兴趣。本文综述了从海洋中提取、分离和纯化活性肽的方法及部分海洋生物活性肽活性的研究进展,以为海洋生物活性肽在预防和治疗疾病等方面提供一些参考。

1 海洋生物活性肽的制备

海洋生物活性肽产业化生产及如何提高活性一直是国内外学者研究的热点。目前,制备海洋生物活性肽的主流方法有溶剂萃取法、化学水解法、酶解法、微生物发酵法、化学合成法。其中酶解制备运用最为广泛,具有操作简单、高效、安全、专一性强等优点^[11]。一些学者通过重组 DNA 和化学合成等技术大规模生产特定序列活性肽,利用不同技术组合使用获得高纯度、高产率海洋生物活性肽,这将是未来海洋生物活性肽制备发展的新趋势^[12]。

1.1 化学水解法

根据海洋生物活性肽的极性及溶解度,可以选择合适溶剂或多种溶剂组合使用来获取目的蛋白肽。此外,加入适量的酸碱通常可以提高蛋白肽提取率。Joshi 等^[13]通过 6 种不同溶剂(甲醇、乙醇、丁醇、乙酸乙酯、己烷、丙酮)对 3 种可食用双壳类生物进行蛋白肽提取,发现甲醇提取的抗菌肽对 13 种不同的病原菌抗菌效果最好。同样, Sruthy 等^[14]通过改进后的乙酸-丙酮沉淀法从印度刺鲳(*Psenopsis cyanea*)中分离出抗菌肽。本着绿色、健康、可持续原则,许多学者提倡使用环保材料,如氯化胆碱-草酸(DES),在一条鳕鱼皮中提取胶原蛋白肽的研究中, Bai 等^[15]使用的 DES 提取率高达 96% 以及 100% 的回收率,但提取方法效率低,耗时长。为克服该问题则需要一种新颖、环保、经济、高特异性的蛋白肽提取方法,可结合新型物理技术,如超声、微波等,来提高提取率。总之,传统的溶剂萃取法虽然简单方便,但存在使用的有机溶剂昂贵且有毒以及获取的目的海洋生物活性肽降解现象等缺点。因此使用绿色有机溶剂配合新技术辅助提取来减少有毒溶剂的使用和提高天然海洋生物活性肽回收过程中的环境安全性。

1.2 酶解法

酶解法是制备海洋生物活性肽最常用的方法,该方法专一性强,获得蛋白肽稳定,被广泛运用于化

工、食品、制药等行业。Wang 等^[16]发现通过木瓜蛋白酶预处理的泥鳅肽,再经胃蛋白酶和胰蛋白酶的消化,其抗氧化活性显著提高。蛋白酶酶解效果与 pH、酶类型、蛋白来源、浓度、提取条件都有着很大关联,通过优化这些条件可以提高海洋生物活性肽的得率及提高海洋生物活性肽活性^[17]。基于响应面 Box-Behnken 设计优化带鱼鱼糜肽的水解条件,在酶浓度 1858.8 U/g,酶解时间 12 h,酶解温度 44.7 °C 时,抗氧化活性最好。Fang 等^[18]研究了胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶 5 种蛋白酶对鲑鱼蛋白进行酶解,木瓜蛋白酶制备的抗氧化肽 DPPH 自由基清除能力最强;优化后酶解条件后(酶浓度 1.74%、反应温度 51 °C、反应时间 46 min),酶解物 DPPH 自由基清除活性提高了 24.77%,且可以显著抑制脂质过氧化。Sinthusamran 等^[19]探索发现不同酶解工艺对太平洋白对虾头和胸部酶解物的蛋白回收率和抗氧化活性有着直接的影响。上述研究表明,酶解制备海洋生物活性肽具有能有效获取特定活性肽段,专一性强,保障实验稳定性等优点。其中碱性蛋白酶和胃蛋白酶在制备海洋生物活性肽中运用最为广泛,碱性蛋白酶制备具有特异性酶切位点多,制备海洋生物活性肽分子量小等优点,胃蛋白酶制备的带有疏水性氨基酸残基多肽通常生物活性高。除此之外,多酶联用及不同酶解工艺也是影响其制备海洋生物活性肽活性的关键因素。

1.3 微生物发酵法

微生物发酵法是将微生物接种于原料蛋白上,通过微生物(如细菌或酵母)和内源性蛋白水解酶对底物蛋白进行分解反应后,释放大量活性肽。如乳酸菌和枯草芽孢杆菌在发酵过程中通常会改变底物蛋白质的组成和含量且释放出大量活性肽。Shin 等^[20]发现海洋链霉菌与海洋芽孢杆菌共同培养时会产生两种新的含哌嗪酸环肽。影响微生物发酵的重要因素有微生物菌株类型、蛋白质来源、发酵时间和温度等。例如, Venegas-Ortega 等^[21]的研究表明乳酸菌发酵中细胞壁结合蛋白酶(PrtP 家族)在参与海洋生物活性肽制备中起到关键作用,此外原蛋白酶表达依赖于生长培养基中的酪蛋白胨浓度,且在菌株 *L. helveticus* H9 生长阶段发现了两种不同的 PrtP 基因表达模式,并与 α -和 β -酪蛋白的裂解有关。Xiang 等^[22]也指出微生物菌株类型,发酵条件及发酵过程中产生的活性肽功能性和 IC₅₀ 值均能够提高活性肽产量。如常用革兰氏阳性球菌(乳酸杆菌、片球菌、链球菌)发酵鱼类,获得海洋生物活性肽产量高,活性强且风味佳。此外发酵温度 >25 °C 时,海洋生物活性肽产率会显著增加。同样, Petlada 等^[23]证明了发酵时间会影响从鱼露副产物中分离的肽的抗氧化活性和 ACE 抑制活性。现代发酵技术高速发展、日益成熟,相比于酶工程技术,具有能耗低、环保、废水产生量少等优点,但易受微生物污染。

1.4 化学合成法

多肽合成方法大致分为 2 类: 固相多肽合成法和液相多肽合成法。Merrifield 于 1963 年提出的固相多肽合成法运用最为广泛, 其原理是以树脂为固相载体, 将固定在保护基团的氨基酸通过羧基相连, 接着对氨基进行脱保护后, 再以同样方法与下个氨基酸的羧基相连, 以此来延长肽链, 从而合成目的多肽。Pettit 等^[24] 从截尾海兔 (*Dolabella auricularia*) 中分离得到一种九肽——海兔毒素, 具有显著抗肿瘤的活性成分, 但在生物体中含量极低, 生产研究中通常采用固相多肽合成法进行合成。人工全合成海鞘 (*Trididemnum* sp.) 的 Didemin B 是由 7 个氨基酸和 2 个羧酸组成的带有分枝的环缩肽, 具有很强的抗病毒、抗肿瘤活性。从海绵中分离出来的 Bengamides B, 少剂量就可抑制肿瘤细胞生长及人乳腺癌细胞的转移。但由于其结构复杂, 不稳定, 难以进行人工合成。进而, 部分学者转向研究合成其类似物, 如 LAF389 等。Towbin 等^[25] 对 LAF389 进行了人工合成并进行活性分析, 利用蛋白组学对 LAF389 的生理活性进行定位测试, 结果发现甲硫氨酸氨基蛋白酶在抗肿瘤过程中起着关键作用。在海洋生物中存在的天然抗肿瘤和抗癌肽都是极其微量的, 通过常规的化学水解法、酶解法和微生物发酵法均难以获得, 因此化学合成法成为了制备获得小分子抗肿瘤和抗癌肽不可缺少的手段之一。此外, 化学合成法不应只关注海洋生物天然存在的多肽及蛋白质的研究, 还应多通过对非自然存在的氨基酸以及氨基酸残基的定点突变和肽段活性位点转移来构造出高活性海洋生物活性肽, 以此来满足人们的需求。

2 海洋生物活性肽的分离纯化

海洋生物活性肽分离主要根据其蛋白分子量及极性进行分离。其方法主要有 3 大类: 膜分离技术、色谱分离技术、毛细管分离技术。

2.1 膜分离技术

膜分离技术是一种蛋白肽在压差驱动下的膜系统中的渗透和保留的技术。根据过滤精度, 可分为: 微滤 (0.1~10 μm)、超滤 (0.001~0.1 μm)、纳滤 (0.001 μm) 和反渗透 (0.0001 μm)。微滤属于粗过滤, 常用于大分子海洋生物活性肽的粗过滤^[26]。纳滤可有效截留二价以上的离子和其他颗粒, 脱盐率高, 常用来分离低分子量海洋生物活性肽。反渗透由于其精度较高, 废水率高, 通常不用来制备海洋生物活性肽。在分离纯化时, 通常会将酶水解、微生物发酵等技术与膜分离技术相结合^[27], 以获得纯度较高的海洋生物活性肽。

Jiang 等^[28] 利用复合酶水解蓝圆鲀 (*Decapterus maruadsi*) 肌肉蛋白制备抗氧化肽时, 发现利用超滤技术分离时, 分子量较小的肽 (<5 kDa) 具有更高的抗氧化活性。Je 等^[29] 也证实超滤技术复合酶水解技术, 可有效提高大腹海马 (*Hippocampus abdominalis*)

水解物肽 (<5 kDa) 的雄性功能。超滤技术的使用提高了小分子肽的有效浓度, 有助于提高海洋生物活性肽的特殊功效。

然而, 膜过滤技术也存在各种问题, 如半透膜与疏水肽之间的相互作用、膜的污染和堵塞、难以获得纯肽以及需要大量样品等问题。对此, 不少学者将膜过滤技术与电渗析^[30-31]、多步循环膜反应器^[1]、色谱分离等其他技术相结合^[32], 从而来分离纯化高纯度功能活性肽。

2.2 色谱分离技术

色谱分离技术常用于分离和纯化混合物中的化合物, 基于样品与流动相和固定相之间的相互作用, 进行分离保留。根据海洋生物活性肽分子特性, 将其分为四种分离技术, 即离子交换、液-固吸附、液-液分配和尺寸排阻技术。Sudhakar 等^[33] 通过离子交换和凝胶色谱法对印度洋乌贼 (*Loligo duvauceli*) 水解产物进行分离纯化, 发现纯化后的海洋生物活性肽表现出很强的自由基清除、金属螯合和还原能力, 并且通过电喷雾质谱法测定该肽分子量 (682.5 Da) 和氨基酸序列 (Trp-Cys-Thr-Ser-Val-Ser)。此外, 该肽还可以有效防止 DNA 损伤并抑制脂质过氧化。Kim 等^[34] 通过使用凝胶过滤色谱法和 RP-HPLC (C_{18} 柱) 从海鞘 (*Halocynthia roretzi*) 蛋白酶解物中分离纯化得到了 3 种抗氧化肽组分并通过液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 对其进行鉴定 (LEW, $M_w=446.2$ Da; MTTL, $M_w=464.2$ Da; YYPYQL, $M_w=845.4$ Da)。在这 3 种肽中, 5 mmol/L LEW 表现出最高的 DPPH 自由基清除活性 (75%)。综上可知, 色谱技术是分离海洋生物活性最常用的技术之一, 能有效分离和纯化多种所需特定海洋生物活性肽段。

2.3 毛细管电泳技术

毛细管电泳技术 (CE) 是一种基于 m/z 值分析肽的分析技术。它所使用的是简单的熔融石英毛细管 (通常为 100 cm $\times$ 100 μm), 具有快速、成本低、效率高、分辨率高和选择性高等优点, 该技术常被视为色谱法的补充技术。Pero-Gascon 等^[35] 开发出一种含镍的固定化金属亲和固相萃取与毛细管电泳-质谱联用 (IMA-SPE-CE-MS) 方法, 从胰蛋白酶中选择性富集组氨酸肽, 该方法使用 α -酪蛋白进行了优化, 并使用其他标准蛋白 (β -酪蛋白和 κ -酪蛋白) 进行了验证, 后来在大肠杆菌 (*E. coli*) 全细胞裂解物上进一步测试了该方法。尽管 Pero-Gascon 等开发的 IMA-SPE-CE-MS 方法具有众多优点, 但与 CE 相似, 也存在灵敏度不足和检测限低等缺点, 这点有待改善。

3 海洋生物活性及构效关系

目前已从海洋生物中提取分离出多种海洋生物活性肽, 并对其进行了活性鉴定及构效关系研究, 如表 1 所示。

3.1 抗氧化肽

活性氧 (ROS) 是生物体内正常的代谢副产物, 正

常状态下是处于一个平衡状态,当这个平衡状态被打破时会处于氧化应激状态。氧化应激常与许多慢性疾病有着直接或者间接的关系,如心血管疾病、糖尿病、类风湿关节炎等疾病。此外,近年 Vaccaro 等^[36]通过苍蝇和小鼠实验探索发现 ROS 不仅与睡眠剥夺有关,而且是死亡的驱动因素;通过服用抗氧化剂可以防止 ROS 在肠道积累,从而推断没有睡眠的生存也是有可能实现的。

海洋抗氧化肽作为一种安全性高、稳定性高的抗氧化剂,备受人们关注。抗氧化肽体外抗氧化能力主要体现在自由基清除能力、抑制脂质过氧化能力、还原力、金属离子螯合力、上调内源性抗氧化剂能力以及调节细胞内抗氧化酶活能力等方面。海洋抗氧化肽通常是含有 5~16 个氨基酸残基的寡肽,因为寡肽易透过细胞膜被人体吸收利用,安全性高,在生物学功能上均具有显著优势。如 Zheng 等^[37]发现从海参内脏中提取的 2 个四肽(Val-Thr-Pro-Tyr 和 Val-Leu-Leu-Tyr)和 1 个六肽(Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met)可以有效保护由羟自由基引起的 DNA 损伤。同样, Wang 等^[38]在通过超滤从带鱼鱼糜中提取的四种肽组分中,分子量<3 kDa 的肽组分在弱酸性、碱性或盐溶液中、在体外消化液中以及在加热时表现出良好的稳定性和高抗氧化活性。海洋抗氧化肽除了与分子量有关外,与氨基酸组成序列也密切相关。据相关文献报道,海洋生物活性肽 N 末端的疏水性氨基酸增强脂质溶解度,易进入靶器官发挥其功效,清除自由基能力显著增强。海洋生物活性肽 N 末端的芳香族氨基酸残基(Tyr、Phe、Trp)是作用于自由基清除的关键位点^[39], Yang 等^[5]采用碱性蛋白酶酶解黑鲨鱼皮得到抗氧化肽(序列为 Ala-Thr-Val-Tyr),发现 ABTS 阳离子自由基的抗氧化相互作用关键位点为 N 末端的 Tyr。除此之外,海洋生物活性肽 N 端的 Pro 能够向 DPPH 自由基提供质子,从而阻止自由基链式反应^[40-41]。海洋生物活性肽 C 端的 Met 氧化产物甲硫氨酸亚砜抗氧化效果明显^[42]。上述研究均表明低分子量的海洋抗氧化肽展现出更优良的抗氧化活性,且海洋抗氧化肽中通常含有 Met、Tyr、Leu、Phe、Trp、Ala 和 Glu。

3.2 抗糖尿病及降压肽

糖尿病是一类以高血糖为特征的代谢类疾病,长期存在高血糖会诱发各种并发症。糖尿病分为两种类型:1 型糖尿病和 2 型糖尿病。1 型糖尿病属于胰岛素依赖型,其特征是它由胰腺 β 细胞破坏和胰岛素分泌不足引起的细胞介导的自身免疫性疾病。2 型糖尿病占糖尿病总病例绝大多数约 90%~95%,2 型与胰岛素分泌障碍和胰岛素抵抗有关。目前对 2 型糖尿病治疗通过口服降糖药如格列美脲、瑞格列奈、吡格列酮等对降低胰岛素抵抗或血糖浓度均有显著作用,但与此同时,这些药物也会导致患者出现低血糖、恶心、腹泻等不良反应。因此,开发出一种

无副作用的抗糖尿病药物是人们一直探索的方向。

最近的几项研究表明,海洋生物活性肽可以有效缓解与糖尿病相关的综合征。Harnedy 等^[43]发现鲑鱼副产物的蛋白酶解物在体外表现出显著的抗糖尿病(促进胰岛素 GLP-1 分泌和抑制 DPP-IV 合成)。与 Harnedy 等研究类似, Gong 等^[44]研究表明海参胃和肠道消化水解物(<3 kDa 组分)可以改善 3T3-L1 细胞和高胰岛素诱导的胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖摄取,接着通过分子对接验证得出,海参胃和肠道消化释放的肽与二肽基肽酶 IV(DPP-IV)与抑制剂阿格列汀具有相似的结合模式。2015 年, Chin 等^[45]比较了 6 种马来西亚海藻的抗糖尿病能力,其中绿色海藻(*H. macroloba*)对 α -葡萄糖苷酶活性抑制最为显著(IC₅₀ 值为 6.388 mg/mL)。Sun 等^[46]在研究微藻(*Chlorella pyrenoidosa*)时发现,这种藻类对 α -淀粉酶活性有中度抑制作用,对 α -葡萄糖苷酶活性也有很强的抑制作用,并得出结论认为 *Chlorella pyrenoidosa* 是一种潜在抗糖尿病药物来源。海洋生物活性肽 C 末端 Lys 和 Tyr 以及倒数第二位的 Pro 和 Cys 在抑制血管紧张素转换酶(ACE)活性中起着重要的作用^[47],此外, C 端区含有 Arg 也是海洋 ACE 抑制肽的结构特点^[48],而海洋 DPP-IV 抑制肽多含疏水性氨基酸(Leu、Ile、Val、Pro)和芳香族氨基酸(Phe、Trp)^[49]。Zhao 等^[50]发现含有 2~4 氨基酸且第一位点氨基酸为 Trp 或 Phe 是海洋降压肽氨基酸组成特点。Ji 等^[51]从南极磷虾蛋白中分离纯化 2 种 DPP-IV 抑制肽(Ala-Pro 和 Ile-Pro-Ala)。上述研究清楚地揭示了海洋生物活性肽在糖尿病和高血压治疗中的潜在应用。然而,仍需进行人体临床试验,以将海洋抗糖尿病肽从试验台转移到床边,用于未来的生物医学应用。

3.3 抗菌肽

海洋抗菌肽抗菌活性与其氨基酸组成、阳离子电荷、分子量大小、疏水性、柔韧性和两亲性都有着重要关联。通常抗菌肽分子量较小,含有 10~50 个氨基酸残基,大多数由单个基因编码,由核糖体合成,带正电荷(+2~+9),疏水性氨基酸含量占比>30%,并且还具有亲水性和两亲性特征。海洋抗菌肽抗菌机制多是通过吞噬作用调节免疫系统,主动进入细胞壁与靶点相互作用,杀死微生物,干扰核酸合成和破坏细胞质膜^[52],从而达到抗菌效果。

不同来源的海洋生物活性肽对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌株有不同的抗菌性能。Sruthy 等^[14]研究了从印度刺鲃(*Psenopsis cyanea*)中分离的抗菌肽,并证明了该抗菌肽可以有效抑制革兰氏阳性和革兰氏阴性菌株活性,尤其是在抑制革兰氏阴性嗜水气单胞菌活性方面有显著效果。Oh 等^[53]研究发现从海洋双壳类(*Mytilus coruscus*)中分离的抗菌肽对 6 种革兰氏阳性细菌(蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌、链球菌和变形链球

菌)和4种革兰氏阴性菌(大肠杆菌、铜绿假单胞菌、溶藻弧菌和肺炎克雷伯菌)的抗菌效果明显,其中对枯草芽孢杆菌抑制最为显著。Piscidins 家族抗菌肽是海洋鱼类独有的,其富含的 His 可与脂质双层相互作用,从而形成两亲性 α -螺旋结构,进而起到抗菌效果^[54-55]。海洋抗菌肽富含的 Cys 通过形成二硫键来稳定 β -折叠结构达到抗菌效果, Qin 等^[56]通过使用反相高效液相色谱法(RP-HPLC),从紫斑贻贝血淋巴中分离出一种具有55个氨基酸残基的新型抗菌肽(分子量为6621.55 Da)。这种新型抗菌肽具有一个几丁质结构域和由6个Cys残基组成的3个分子内二硫键,且该抗菌肽对真菌和革兰氏阳性菌活性有显著抑制作用。海洋抗菌肽不仅抗菌效果明显且具有溶血活性,易进入靶器官发挥其抗菌功效。Haug 等^[57]发现从海胆(*Strongylocentrotus droebachiensis*)、海星(*Asterias rubens*)和海参(*Cucumaria frondosa*)的不同组织部位提取物中均检测出抑菌活性,且海星胃肠器官和卵以及海参卵中提取物的抑菌活性较高,

此外,这3种海洋不同组织提取物均被检测出具有溶血活性,尤其是在它们的体壁提取物中。由此推断海洋是发现新型抗生素的潜在来源。

3.4 抗癌肽

每年因癌症死亡的人不计其数,令世人谈癌色变。癌症是由于正常细胞生长失控,出现细胞增殖异常,最终损害正常细胞功能。从海洋中提取的大多数抗癌肽通常富含D-氨基酸、 α -氨基酸、 β -氨基酸、羧酸和噻吩的小环肽,有些还含有烯键和炔键,稳定性强、生物利用度高。

1976年, Pettit 等^[24]首次从截尾海兔中分离得到18种低分子量环肽(命名为Dolastatins 1-18)对癌症细胞活性有显著抑制作用,其中Dolastatins 10最具开发为抗癌药物潜力。对此,不少学者对Dolastatins 10进行了进一步的研究。Yokosaka 等^[58]对Dolastatins 10设计并合成了一系列新的Dolastatins 10类似物(C-末端含有噻唑基)。这些新的类似物在肿瘤细胞增殖试验中显示出极好的效力,因此

表1 典型海洋生物活性肽
Table 1 Typical marine bioactive peptides

功能活性	来源	结构特征	作用机制	文献
抗菌肽	印度刺鲳(<i>Psenopsis cyanea</i>)	5792 Da	抑菌广谱性,显著抑制革兰氏阴性嗜水气单胞菌活性	Sruthy等 ^[14]
抗氧化肽	黑鲨鱼皮	Ala-Thr-Val-Tyr	清除ABTS ⁺ 自由基,抗氧化相互作用关键位点为N末端的Tyr	Yang等 ^[5]
抗氧化肽	蓝圆鲀(<i>Decapterus maruadsi</i>)	His-Asp-His-Pro-Val-Cys(706.8 Da), His-Glu-Lys-Val-Cys(614.7 Da)	HEKVC和HDHPVC的DPPH自由基清除率EC ₅₀ 为0.0677±0.0012, 0.0310±0.0011 (mmol/L)	Jiang等 ^[28]
降压肽	大腹海马(<i>Hippocampus abdominalis</i>)	<5000 Da	体内和体外通过抑制血管紧张素转换酶酶活来改善血管舒张	Je等 ^[29]
抗氧化肽	印度乌贼(<i>Loligo duvauceli</i>)	Trp-Cys-Thr-Ser-Val-Ser(682.5 Da)	防止DNA损伤并抑制脂质过氧化	Sudhakar等 ^[33]
抗氧化肽	海鞘(<i>Halocynthia roretzi</i>)	Leu-Glu-Trp(446.2 Da)	5 mmol/L LEW DPPH自由基清除活性(75%)	Kim等 ^[34]
抗氧化肽	海参内脏	Val-Thr-Pro-Tyr, Val-Leu-Leu-Tyr, Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met	保护由羟自由基引起的DNA损伤	Zheng等 ^[37]
抗氧化肽	带鱼鱼糜	<3000 Da	弱酸性、碱性或盐溶液中、在体外消化液中以及在加热时表现出良好的稳定性和高抗氧化活性	Wang等 ^[38]
抗糖尿病肽	海参	<3000 Da	改善3T3-L1细胞和高胰岛素诱导的胰岛素抵抗HepG2细胞的葡萄糖摄取	Gong等 ^[44]
抗糖尿病肽	南极磷虾(<i>Euphausia superba</i>)	Pro-Ala-Leu(299 Da)	抑制DPP-IV酶活(IC ₅₀ 0.88 mg/mL)	Ji等 ^[51]
抗菌肽	海洋双壳类(<i>Mytilus coruscus</i>)	Val-Asp-Ala-Phe-His-Ile-Tyr-Ser-Arg	抗菌广谱性,对枯草芽孢杆菌抑制最为显著	Oh等 ^[53]
抗菌肽	紫斑贻贝血淋巴	55个氨基酸残基, 6621.55 Da, 一个几丁质结构域, 由6个半胱氨酸残基组成的3个分子内二硫键	对真菌和革兰氏阳性菌活性有显著抑制作用	Qin等 ^[56]
抗癌肽	海绵(<i>Callispongia fistularis</i>)	-Pro-Tyr	下调PI3K/Akt信号通路有效抑制人肝癌细胞HepG2和小鼠成纤维细胞McCoy细胞的生长	Karanam等 ^[59]
抗氧化肽	华南牡蛎(<i>Crassostrea talienwhanensis</i>)	Pro-Val-Met-Gly-Ala(518 Da), Gln-His-Gly-Val(440 Da)	清除羟自由基(82.6%, 91.2%)和DPPH自由基(77.8%, 45%)	Wang等 ^[65]
抗氧化肽	贻贝	Tyr-Pro-Pro-Ala-Lys(574 Da)	DPPH自由基清除率(EC ₅₀ 为2.62 mg/mL)、羟基自由基清除率(EC ₅₀ 为0.228 mg/mL)和超氧化物自由基(EC ₅₀ 为0.072 mg/mL);有效抑制脂质过氧化	Wang等 ^[66]
抗癌肽	菲律宾蛤仔(<i>Ruditapes philippinarum</i>)	Ala-Val-Leu-Val-Asp-Lys-Gln-Cys-Pro-Asp(1950 Da)	有效抑制PC-3(前列腺)、A549(肺)和MDA-MB-231(乳腺)癌细胞活性	Kim等 ^[67]
抗癌肽	僧帽牡蛎(<i>Saccostrea cucullata</i>)	Leu-Ala-Asn-Ala-Lys(515 Da)	对人类结肠癌细胞(HT-29)有抑制作用	Umayaparthi等 ^[68]
降压肽	军曹鱼(<i>Rachycentron Canadum</i>)	Ala-Trp-Trp, Ile-Trp-Trp	ACE抑制活性(IC ₅₀ 分别为9.40和0.51 μ mol/L)	Lin等 ^[69]

这一系列的 Dolastatins 10 类似物适合作为偶联药物中的多功能有效载荷。2020 年, Karanam 等^[59]从海绵(*Callyspongia fistularis*)中分离纯化出一种环二肽(-Pro-Tyr), 这种环二肽通过下调 PI3K/Akt 信号通路有效抑制人肝癌细胞 HepG2 和小鼠成纤维细胞 McCoy 细胞的生长。海洋抗癌肽通过诱导癌细胞凋亡、下调 PI3K/Akt 信号通路和抑制癌细胞增殖等方式进而抵抗癌症, 据报道其靶向作用机制是其能够与癌细胞膜表面一些阴离子成分特异性表达, 如磷脂酰丝氨酸、O-糖基化粘蛋白和肝素等^[60]。此外, 海洋抗癌肽可以通过破坏溶酶体膜或线粒体, 释放其内容物致其细胞内环境酸化, 进而引起癌细胞死亡^[61]。如 Singh 等^[62]从海参(*Elysia rufescens*)中分离出的抗癌肽(Kahalalide F)能够破坏癌细胞溶酶体膜从而致癌细胞死亡。同样, Held-Kuznetsov 等^[63]发现宿主防御肽模拟物 OAK 可以通过破坏线粒体和溶酶体, 导致癌细胞细胞死亡, 且其能够克服多药耐药性。相关文献指出抗癌肽促使癌细胞自噬也是其抗癌机制之一, Ren 等^[64]发现 LL-37 的片段 FK-16 (第 17~32 个氨基酸)通过提高结肠癌细胞中 LC3-I/II、Atg5 和 Atg7 自噬相关蛋白的表达量, 进而诱导结肠癌细胞 HCT116 自噬和凋亡。尽管如此, 还需要通过体内和临床实验来进一步深入挖掘海洋生物活性肽与抗癌之间的联系, 早日将攻克癌症难题。

4 结论与展望

本文综述了近年来海洋生物活性肽研究现状, 着重介绍了其制备工艺(化学水解法、酶解法、微生物发酵法、化学合成法)、分离纯化技术(膜分离技术、色谱技术、毛细管电泳)作用机制及原理以及其生物活性(抗氧化肽、抗糖尿病肽、抗菌肽、抗癌肽)。海洋生物活性肽主要分离制备自海洋无脊椎动物, 有寡肽和多肽两种类型, 常采用酶解法制备, 超滤结合色谱技术进行分离纯化寡肽和多肽, 寡肽的分子量约 320~1600 Da, 多肽分子量约为 3200~16000 Da, 带有疏水性氨基酸和芳香族氨基酸为主要氨基酸残基。海洋生物活性肽具有氧化抑制、免疫激活、降低血糖、抑菌抗炎、抑癌抑瘤等活性, 海洋生物活性寡肽氧化抑制和癌细胞抑制作用明显, 海洋生物活性多肽抑菌抗炎、免疫激活作用明显。

传统技术配合现代科技以及多技术联用大大提高了海洋生物活性肽的产量和纯度。但目前从海洋资源中分离得到高产率和优良生物活性的新肽的相关研究还很有限。因此, 开发环保、高效、制备高产率及高纯度海洋生物活性肽的新技术依旧是未来研究的重点。研究和探索海洋生物活性肽的氨基酸构成及其序列与生物活性的关系是未来海洋生物活性肽的前瞻性方向。越来越多学者关注到海洋生物活性肽构效关系分析是决定这些分子生物活性的关键点, 进而通过对已有海洋生物活性肽进行分子模拟及结构修饰, 提高其生物活性及性能, 便于日后临床医

学开发利用。此外, 海洋生物活性肽多为寡肽, 在胃肠道内易被降解。基于纳米的递送系统还可以通过改变其体内代谢和生物活性来改变生物活性物质的吸收途径, 以纳米形式的海洋生物活性肽比非封装的海洋生物活性肽具有更高的胃肠道稳定性和生物利用度。因此, 可开发新的基于纳米技术, 将海洋生物活性肽封装在各种纳米结构中, 如纳米乳液、纳米脂质体和聚合物纳米颗粒, 以增强其体内稳定性和生物利用度, 将会是海洋生物活性肽应用发展的新趋势。

参考文献

- [1] CHEUNG R C F, NG T B, WONG J H. Marine peptides: Bioactivities and applications[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(7): 4006–4043.
- [2] LIN H M, DENG S G, HUANG S B, et al. The effect of ferrous-chelating hairtail peptides on iron deficiency and intestinal flora in rats[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(8): 2839–2844.
- [3] WANG J, ZHAO W, CHUNMEI H U, et al. Research advances on protein and polypeptide drug liposomes[J]. *Technology and Development of Chemical Industry*, 2017, 46: 32–36.
- [4] CHEN X, FANG F, WANG S Y, et al. Physicochemical properties and hepatoprotective effects of glycosylated snapper fish scale peptides conjugated with xylose via maillard reaction[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 137: 111115.
- [5] YANG Q, CAI X X, YAN A, et al. A specific antioxidant peptide: Its properties in controlling oxidation and possible action mechanism[J]. *Food Chemistry*, 2020, 327: 126984.
- [6] WANG Y K, HE H L, WANG G F, et al. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(2): 255–268.
- [7] LIU L, LI S S, ZHENG J X, et al. Safety considerations on food protein-derived bioactive peptides[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2020, 96: 199–207.
- [8] ABDELHEDI O, NASRI M. Basic and recent advances in marine antihypertensive peptides, production, structure-activity relationship and bioavailability[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2019, 88: 543–557.
- [9] FITZGERALD R J, CERMEO M, KHALES I M, et al. Application of in silico approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 64: 103636.
- [10] WANG S Y, ZHAO J, CHEN L, et al. Preparation, isolation and hypothermia protection activity of antifreeze peptides from shark skin collagen[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 55(1): 210–217.
- [11] LIU M, WANG Y P, LIU Y H, et al. Bioactive peptides derived from traditional Chinese medicine and traditional Chinese food: A review[J]. *Food Research International*, 2016, 89(1): 63–73.
- [12] SRIDHAR K, INBARAJ B S, CHEN B H E, et al. Recent developments on production, purification and biological activity of marine peptides[J]. *Food Research International*, 2021, 147: 110468.

- [13] JOSHI I, JANAGARAJ K, MOHAMED NOORANI K P, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by-catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101770.
- [14] SRUTHY K S, CHAITHANYA E R, SATHYAN N, et al. Isolation, purification and characterization of antimicrobial peptides from Indian ruff, *psenopsis cyanea* (Alcock, 1890)[J]. *International Journal of Research in Biological Sciences*, 2015, 5: 1–6.
- [15] BAIC J, WEI Q F, REN X L. Selective extraction of collagen peptides with high purity from cod skins by deep eutectic solvents (DESs)[J]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2017, 5(8): 7220–7227.
- [16] WANG P X, LIN Y, WU H Q, et al. Preparation of antioxidant peptides from hairtail surimi using hydrolysis and evaluation of its antioxidant stability[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 40(1): 1–11.
- [17] JO C, KHAN F F, KHAN M I, et al. Marine bioactive peptides: Types, structures, and physiological functions[J]. *Food Reviews International*, 2016, 33(1): 44–61.
- [18] FANG X B, XIE N N, CHEN X E, et al. Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology[J]. *Food and Bioprocess Processing*, 2012, 90(4): 676–682.
- [19] SINTHUSAMRAN S, BENJAKUL S, KIJROONGROJANA K, et al. Protein hydrolysates from pacific white shrimp cephalothorax manufactured with different processes: Compositions, characteristics and antioxidative activity[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2020, 11(5): 1657–1670.
- [20] SHIN D, BYUN W S, MOON K, et al. Coculture of marine *Streptomyces* sp. with *Bacillus* sp. produces a new piperazine acid-bearing cyclic peptide[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6: 498.
- [21] VEBEGASORTEGA M G, FLORESGALLEGOS A C, MARTÍNEZHERNÁNDEZ J L, et al. Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(4): 1039–1051.
- [22] XIANG H, SUN-WATERHOUSE D X, WATERHOUSE G I N, et al. Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2019, 8(3): 203–243.
- [23] PETLADA K, NAPHATSAWAN P, SITTIRUK R, et al. Effects of fermentation periods on antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of peptides from fish sauce by-products[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 135: 110122.
- [24] PETTIT G R, HOGAN F, HERALD D L. Synthesis and X-ray crystal structure of the dolabellaauricularia peptide dolastatin 18[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2004, 69(12): 4019–4022.
- [25] TOWBIN H, BAIR K W, DECAPRIO J A, et al. Proteomics-based target identification: Bengamides as a new class of methionine aminopeptidase inhibitors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(52): 52964–52971.
- [26] WELDERUFAEL F T, GIBSON T, JAUREGI P. Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from β -lactoglobulin- and casein-derived peptides: An integrative approach[J]. *Biotechnology Progress*, 2012, 28(3): 746–755.
- [27] ZHOU X Q, WANG C H, JIANG A L. *In vitro* antitumor activities of low molecular sea cucumber *stichopus japonicus* peptides sequentially hydrolyzed by proteases[J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 393-395: 1259–1262.
- [28] JIANG H P, TONG T Z, SUN J H, et al. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2014, 154: 158–163.
- [29] JE J G, KIM H S, LEE H G, et al. Low-molecular weight peptides isolated from seahorse (*Hippocampus abdominalis*) improve vasodilation via inhibition of angiotensin-converting enzyme *in vivo* and *in vitro*[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 95: 30–35.
- [30] ACQUAH C, CHAN Y W, PAN S, et al. Structure-informed separation of bioactive peptides[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(1): e12765–10.
- [31] DLASK O, VACLAVIKOVA, N, et al. Electrodialysis with ultrafiltration membranes for peptide separation[J]. *Chemical Papers*, 2018, 12(2): 261–271.
- [32] LAFARGA T, ACIEN-FERNANDEZ F G, MARCO G V. Bioactive peptides and carbohydrates from seaweed for food applications: Natural occurrence, isolation, purification, and identification[J]. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 2020, 48: 101909.
- [33] SUDHAKAR S, NAZEER R A. Structural characterization of an Indian squid antioxidant peptide and its protective effect against cellular reactive oxygen species[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14: 502–512.
- [34] KIM S S, AHN S B, MOON S W, et al. Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (*Halocynthia roretzi*) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis[J]. *Food Bioscience*, 2018, 25: 128–133.
- [35] ROGER P G, ESTELA G E, VICTORIA S N, et al. Enrichment of histidine containing peptides by on-line immobilised metal affinity solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 157: 105013.
- [36] VACCARO A, DOR Y K, NAMBARA K, et al. Sleep loss can cause death through accumulation of reactive oxygen species in the gut[J]. *Cell*, 2020, 181(6): 1307.
- [37] ZHENG J, WU H T, ZHU B W, et al. Identification of antioxidative oligopeptides derived from autolysis hydrolysates of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) guts[J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(5): 895–904.
- [38] WANG T T, LIN S Y, CUI P B, et al. Antarctic krill derived peptide as a nanocarrier of iron through the gastrointestinal tract[J]. *Food Bioscience*, 2020, 36: 100657.
- [39] NWACHUKWU I D, ALUKO R E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(1): 1–13.
- [40] LI X C, LIN J, HAN W J, et al. Antioxidant ability and mechanism of rhizoma *atractylodes macrocephala*[J]. *Molecules*, 2012, 17(11): 13457–13472.
- [41] BOUGATEF A, NEDJAR-ARROUME N, MANNI L, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from en-

- zymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(3): 559–565.
- [42] LEVINE R L, MOSONI L, BERLETT B S, et al. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(26): 15036–15040.
- [43] HARNEDY T A P, MCLAUGHLIN C M, MARTINA B O, et al. Identification and characterisation of peptides from a boarfish (*Capros aper*) protein hydrolysate displaying in vitro dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitory and insulinotropic activity[J]. *Food Research International*, 2020, 131(C): 108989.
- [44] GONG P X, WANG B K, WU Y C, et al. Release of antidiabetic peptides from *Stichopus japonicus* by simulated gastrointestinal digestion[J]. *Food Chemistry*, 2020, 315: 126273.
- [45] CHIN Y X, LIM P E, MAGGS C A, et al. Anti-diabetic potential of selected Malaysian seaweeds[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(5): 2137–2148.
- [46] SUN Z, CHEN F. Evaluation of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* for management of diabetes[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2012, 20: 246–249.
- [47] MIRZAEI M, MIRDAMADI S, SAFAVI M. Structural analysis of ACE-inhibitory peptide (VL-9) derived from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysate[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2020, 1213: 128199.
- [48] PAL S, ELLIS V. The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals[J]. *Obesity*, 2010, 18(7): 1354–1359.
- [49] CHEUNG I W Y, LI-CHAN E C Y. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(4): 1003–1012.
- [50] ZHAO Y Q, ZHANG L, TAO J, et al. Eight antihypertensive peptides from the protein hydrolysate of Antarctic krill (*Euphausia superba*): Isolation, identification, and activity evaluation on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)[J]. *Food Research International*, 2019, 121: 197–204.
- [51] JI W, ZHANG C H, JI H W. Purification, identification and molecular mechanism of two dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from antarctic krill (*Euphausia superba*) protein hydrolysate[J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1064: 56–61.
- [52] BARBOSA F, PINTO E, KIJOA A, et al. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 56(1): 106005.
- [53] OH R, MIN J L, KIM Y O, et al. Myticusin-beta, antimicrobial peptide from the marine bivalve, *Mytilus coruscus*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 99(C): 342–352.
- [54] MIHAILESCU M, SORCI M, SECKUTE J, et al. Structure and function in antimicrobial piscidins: Histidine position, directionality of membrane insertion, and pH-dependent permeabilization[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(25): 9837–9853.
- [55] PERRIN B S, TIAN Y, FU R Q, et al. High-resolution structures and orientations of antimicrobial peptides Piscidin 1 and Piscidin 3 in fluid bilayers reveal tilting, kinking, and bilayer immersion[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(9): 3491–3504.
- [56] QIN C L, HUANG W, ZHOU S Q, et al. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 362–370.
- [57] HAUG T, KJUUL A K, STYRVOLD O B, et al. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2002, 81(2): 94–102.
- [58] YOKOSAKA, SHINYA, IZAWA, et al. Synthesis and evaluation of novel dolastatin 10 derivatives for versatile conjugations[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2018, 26(8): 1643–1652.
- [59] KARANAM G, ARUMUGAM M K, SIRPU NATESH N. Anticancer effect of marine sponge-associated bacillus pumilus amk1 derived dipeptide cyclo (-Pro-Tyr) in human liver cancer cell line through apoptosis and G2/M phase arrest[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 26(1): 445–457.
- [60] GASPAR D, VEIGA A S, CASTANHO M B. From antimicrobial to anticancer peptides: A review[J]. *Frontiers Microbiology*, 2013, 4: 294.
- [61] ADAK A, MOHAPATRA S, MONDAL P, et al. Design of a novel microtubule targeted peptide vesicle for delivering different anticancer drugs[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(48): 7549–7552.
- [62] SINGH R, SHARMA M, JOSHI P, et al. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2008, 8(6): 603–617.
- [63] HELD-KUZNETSOV V, ROTEM S, ASSARAF Y G, et al. Host-defense peptide mimicry for novel antitumor agents[J]. *The FASEB Journal*, 2009, 23(12): 4299–4307.
- [64] REN S X, SHEN J, CHENG A, et al. FK-16 Derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): 1932–6203.
- [65] WANG A B, LI B, HE B, et al. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*)[J]. *Food Chemistry*, 2014, 145(7): 991–996.
- [66] WANG B, LI L, CHI C F, et al. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2–3): 1713–1719.
- [67] KIM E K, OH H J, KIM Y S, et al. Purification of a novel peptide derived from *Mytilus coruscus* and *in vitro/in vivo* evaluation of its bioactive properties[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1078–1084.
- [68] UMAPARVATHI S, MEENAKSHI S, VIMALRAJ V, et al. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*)[J]. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 2014, 4(3): 343–353.
- [69] LIN Y H, CHEN C A, TSAI J S, et al. Preparation and identification of novel antihypertensive peptides from the *in vitro* gastrointestinal digestion of marine cobia skin hydrolysates[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1351.