

血红蛋白生物活性肽的研究进展

孙赛, 胡鑫, 罗永康*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 动物血液富含大量优质蛋白质, 特别是血红蛋白占血液总蛋白质含量的60~70%。血红蛋白来源生物活性肽具有很多重要的功能活性, 可被开发为功能食品、医药及化妆品等具有高附加值的生物制品。但是动物血液却大部分被以污水的形式排放或丢弃, 导致大量宝贵营养资源流失, 且造成了严重的环境污染。加工血红蛋白制备生物活性肽不但可以充分利用血液中大量宝贵的蛋白质, 而且有助于环境的保护。本文综述了近年来有关血红蛋白生物活性肽的功能活性的研究进展, 并对其应用前景进行了展望。

关键词: 血液; 血红蛋白; 生物活性肽; 结构; 序列

Advances of Bioactive Peptides Derived from Hemoglobin

Sun Qian, Hu Xin, Luo Yong-kang*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 10083, China)

Abstract: Animal blood is rich in a large amount of high-quality proteins, especially the hemoglobin accounts for 60~70% of the content of total blood protein. Bioactive peptides derived from hemoglobin have a lot of important biological activities, and it can be developed for biological products with high value added as the function food, medicine and cosmetics, etc.. But major of animal blood is discharged or abandoned in form of sewage, which causes a large amount of valuable nutrition resource loss and it has brought serious environmental pollution. Processing hemoglobin not only can fully utilize a large number of valuable proteins in the blood to prepare bioactive peptides, but also contribute to protection of the environment. The research progress of functional activity of bioactive peptides derived from hemoglobin in recent years has been described synthetically, and this paper has looked forward to the application prospect of bioactive peptides derived from hemoglobin.

Key words: Blood; Hemoglobin; Bioactive peptides; Structure; Sequence

中图分类号: TS251.93 文献标志码: A 文章编号: 1001-8123 (2008)03-0013-05

生物活性肽被定义为对机体的功能及状态具有积极作用并可能最终影响机体健康的特殊的蛋白质片段^[1]。活性肽的氨基酸序列决定其生物功能。组成活性肽的氨基酸数量从2~20个不等, 并且许

多都呈现出多重功能活性。它们往往对人体的心血管系统、消化系统、免疫及神经等系统会产生重要的生理调节作用, 如抗高血压、抗血栓形成、免疫调节及抗氧化活性等。近年来, 由各种蛋白质水

* 通讯作者

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目 (2006BAD05A16); 浙江省科技厅重大科技攻关项目 (2006C12082)。

解产生的生物活性肽已被相继报道^[2-4]。

在制备活性肽的原料中,许多食品加工产生的副产物极具利用价值。如在动物的屠宰过程中产生的大量副产物就是一种宝贵的蛋白质来源库。血液中蛋白质的含量高达17~18%,且氨基酸组成平衡,其中有60~70%为存在于红细胞(RBC, red blood cell)中的血红蛋白^[5]。血红蛋白生物活性肽具有一系列重要的功能活性,如阿片样活性^[6-10]、ACE抑制活性^[11]、增强血管舒缓激活性^[12]、刺激细菌生长活性^[13]、镇痛活性^[14, 15]、抗菌活性^[16-19]及抗氧化活性^[20]等。2000年以来,我国每年猪牛羊总出栏总数已高达8亿头以上,畜血总量超过200万吨,除部分以血粉或血豆腐等初级加工形式利用之外,相当一部分以污水的形式排放或丢弃,利用率不到10%,致使大量宝贵营养资源流失,且造成严重的环境污染。开发利用血红蛋白,具有尤为重要的经济效益和社会效益。本文综述了近年来有关血红蛋白生物活性肽的功能活性,并对其利用前景进行了展望。

1 血红蛋白(Hemoglobin)

血红蛋白是由血红素(heme)与珠蛋白(globin)结合而成,珠蛋白分子量为68,000道尔顿,是由二条由141个氨基酸组成的称为 α 链的多肽链和二条由146个氨基酸组成的称为 β 链的多肽链结合而成的呈四面体、紧密的球状结构,每一肽链以非极性基结合一个血红素。血红素是以卟啉环为基本结构的化合物,在卟啉环中心络合有一个 Fe^{2+} 。每一个多肽链的螺旋结构形成一个疏水性的空间,可保护血红素分子不会与水接触, Fe^{2+} 不被氧化。 Fe^{2+} 与卟啉环的4个吡咯基、 O_2 及多肽链上的组氨酸形成六配位体,位于血红素卟啉环的中央。血红蛋白的结构如图1所示。

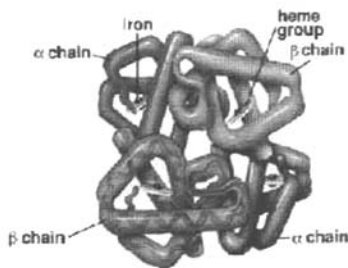


图1 血红蛋白的结构示意图

2 血红蛋白活性肽的功能活性

从表1可以看出,近年来有关血红蛋白来源多肽的阿片样活性研究最为广泛。以下对血红蛋白活性肽的一些主要功能活性进行阐述。

2.1 阿片样活性(Opioid Activity)

阿片样活性肽是第一种被广泛研究的生物活性肽。它们均具有X-Tyr-Phe、Tyr-X-X-Phe或Tyr-X-X-Tyr的氨基酸片段,使其发挥阿片样活性。阿片样活性肽具有吗啡受体配体活性,能作为激素和神经递质与体内的 μ -、 δ -和 γ -受体作用,具有镇痛、调节人体情绪、脉搏、呼吸和体温的功能。1979年,Christine等用胃蛋白酶水解小麦蛋白,能够获得阿片样活性肽,具有与阿片(吗啡)相似的药学性质,称为外啡肽(Exorphin)。研究表明,当肽序列Tyr-Pro-X-Ser-Leu中X为芳香族氨基酸或脂肪族氨基酸时,具有强阿片样活性。Piot JM等^[17]从牛血红蛋白的胃蛋白酶水解物中分离出了两种具有阿片样活性的多肽,它们是LVV-hemorphin-7(LVVYPWTNRF)及VV-hemorphin-7(VVYPWTNRF)。Q. Zhao等^[8]研究发现,这两种血啡肽的 IC_{50} 值(抑制猪回肠肠肌层网状组织的收缩而产生的电流感应值50%的浓度)分别为29.1 μM 和34.3 μM 。Qiuyu Zhao等^[17]用RP-HPLC(反相高效液相色谱)研究了牛血红蛋白的胃蛋白酶水解物中血啡肽的酶解动力学曲线,发现血红蛋白是LVV-hemorphin-5(LVVYPWTN)及LVV-hemorphin-7的直接前体物质,并且这两种血啡肽可以用胃蛋白酶直接水解后产生VV-hemorphin-5(VVYPWTN)及VV-hemorphin-7。另外,研究还显示LVV-hemorphin-7比LVV-hemorphin-5较难被胃蛋白酶水解。

2.2 血管紧张素转换酶抑制活性(ACE Inhibition Activity)

全球范围内都存在高血压疾病,而且有15~20%的成年人具有此类疾病。它是一种严重的慢性疾病,能导致动脉硬化、中风、心肌梗塞及肾衰竭。血管紧张素转换酶(Angiotensin I converting enzyme, EC 3.4.15.1; ACE)在调节血压方面起着重要的作用。ACE是一个含锌的蛋白酶类,主要存在于机体的肺部,它是肽链外切酶,可以从很多不同的寡肽上切除C末端的二个氨基酸残基。ACE可将无活性的十肽——血管紧张素I转换成八肽——

—血管紧张素Ⅱ，而血管紧张素Ⅱ是一个强活性的血管收缩因子，同时能钝化血管舒缓激肽。目前对ACE活性的抑制是作为体外筛选抗高血压肽的主要方法。具有ACE抑制活力的各种活性肽已被从很多食品蛋白质中被鉴定出来。Kazue Mito等^[21]酶解猪血珠蛋白得到了4种具有抑制ACE活性的多肽，分别为FQKVVA、FQKVAG、FQKVAK、GKKVLQ。它们对ACE活性的抑制率(IC₅₀)分别为：518、714、211、119μmol。口服给药SHR（原发性高血压大鼠）以FQKVVA、GKKVLQ半个小时后，大鼠血压从172±5mmHg降至150±6mmHg。Yike Yu等^[22]对猪血红蛋白的胃蛋白酶水解物用Sephadex LH-20分离、RP-HPLC纯化、MALDI-TOF/MS（基质辅助激光解析电离飞行时间质谱）及ESI-MS/MS（电喷雾离子串联质谱/质谱）分析氨基酸组成及序列鉴定出两种新颖的ACE抑制活性多肽LGFPTTKTYFPHF和VVYPWT，两者的IC₅₀值分别为4.92μM和6.02μM。将两者与胃蛋白酶共同温育后可发现它们的IC₅₀值变化很小，表明两者在体内具有潜在的抗高血压效果。

2.3 抗菌活性 (Antibacterial activity)

抗菌肽 (Antibacterial peptides)，又名肽类抗生素 (peptide antibiotics)，最初是基于对昆虫免疫机制的研究而发现。昆虫受到外界刺激时会产生免疫应答反应，在体内会产生出一种氨基酸数目小于100的小分子蛋白质，其具有强烈抗菌活性，常带正电，为宿主先天性非特异性防御系统的重要组成部分，能特异性抑制某些肿瘤细胞的生长。大部分抗菌肽的特征是：肽段较长，氨基酸残基数多数低于100，常含有较多的赖氨酸和精氨酸残基，并且疏水性氨基酸残基数超过50%，构象为α螺旋或者β折叠。有研究指出，具有α螺旋构象的生物活性肽具有较强的抗菌活性。据报道，从很多生物中获取的抗菌肽对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌及某些原生动物具有抑制力，最小的抑制浓度 (MIC) 从0.25~4μg/ml不等。一些阳离子多肽已被证实具有抑制病毒（流感病毒，A）外壳复制的能力。抗菌肽除了能直接杀死病原菌，还能充当单核细胞和T淋巴细胞的趋化因子，使它们迅速聚集在炎症部位，有效促进T辅助淋巴细胞的增殖反应及化学因子的表达、抑制细菌产物诱导产生的细胞因子，避免发生内毒素血症，促使被

激活的淋巴细胞及巨噬细胞的凋亡。国内外已经有对血液来源抗菌肽的相关研究。Froidevaux R等^[17]用阴离子交换色谱及制备型RP-HPLC纯化、MALDI-MS确定分子量、ESI-MS/MS裂解并测定多肽碎片的方法鉴定了一个从牛血红蛋白的胃蛋白酶水解物中分离的抗菌肽氨基酸序列，为VLSAADKGNVKAAGWKVGGAEE，此多肽对M. luteus strain A270的最低抑制浓度为1.5 mg/ml (671μM)。这是首次从牛血红蛋白中的体外酶解产物中获取的一个抗菌肽。Naima Nedjar-Arroume等^[24]对牛血红蛋白的胃蛋白酶水解物用RP-HPLC分离、进行抗菌及体外溶血试验、ESI-MS/MS分析了氨基酸组成及序列鉴定出了5个具有对革兰氏阳性菌 (M. luteus A270, L. innocua) 及革兰氏阴性菌 (E. coli, S. enteritidis) 具有抗菌活性的活性肽，另外，试验中并未观察到这些抗菌肽有使红血球溶血的现象发生，并且它们在高浓度下并未表现出细胞毒性。

表1 一些血红蛋白多肽的氨基酸序列及生物活性

序列 Sequence	片段 Fragment	生物活性 bioactivity	来源 Source
FQKVVA	8136-135	ACE inhibitory ^[21]	Porcine hemoglobin
FQKVAG	8130-136	ACE inhibitory ^[21]	Porcine hemoglobin
FQKVAK	n.f.	ACE inhibitory ^[21]	Porcine hemoglobin
GKKVLQ	864-69	ACE inhibitory ^[21]	Porcine hemoglobin
LGFPTTKTYFPHF	a34-46	ACE inhibitory ^[22]	Porcine hemoglobin
VVYPWT	834-39	ACE inhibitory ^[22]	Porcine hemoglobin
ASHLPSDFTFAVHASL	a110-125	Bradykinin potentiation ^[18]	Bovine hemoglobin
LAVYST	a129-134	Bradykinin potentiation ^[18]	Bovine hemoglobin
YFWT	834-37	Opioid ^[9]	Bovine hemoglobin
YFWTQ	834-38	Opioid ^[9]	Bovine hemoglobin
LVVYPWTQRF	831-40	Opioid ^[9]	Bovine hemoglobin
VVYPWTQRF	832-40	Opioid ^[9]	Bovine hemoglobin
LVVYPWTQ	831-38	Opioid ^[23]	Bovine hemoglobin
VVYPWTQ	832-38	Opioid ^[23]	Bovine hemoglobin
VVYPWT	832-37	Opioid ^[23]	Bovine hemoglobin
VLSAADKGNVKAAGWKVGGAEE	a1-23	Antibacterial ^[17]	Bovine hemoglobin
VTLSHLSDFITFAVHASLDFLANVSTVL	a107-136	Antibacterial ^[16]	Bovine hemoglobin
QADFQKVAGVANALAHRYH	8126-145	Antibacterial ^[24]	Bovine hemoglobin
VTLSHLSDFITFAVHASLDFLANVSTVLTSKYR	a107-141	Antibacterial ^[24]	Bovine hemoglobin
STVLTSKYR	a133-141	Antibacterial ^[24]	Bovine hemoglobin
TSKYR	a137-141	Antibacterial ^[24]	Bovine hemoglobin

n. f. 代表此活性肽并未在血红蛋白的氨基酸序列中存在。
n. f. represents that the active peptide has not existed in the amino acid sequence of the hemoglobin.

抗氧化活性 (Antioxidant activity)

机体内、食品内的氧化反应已越来越被重视。氧化是细胞生存所需的一种生理机制。细胞的这种依赖性会导致游离自由基及活性氧的产生。当游离自由基的产生超过一定的数量时，它们的活性将大于细胞保护酶（如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及过氧化物酶）的活性，那么类脂膜、胞内蛋白、DNA及酶的氧化反应将直接导致细胞破坏性的致死作用（细胞凋亡），细胞的呼吸作用也随之停止。越来越多的研究证实，在人体的衰老和某些疾病的发生过程中，氧化起着重要作用。这些疾病的发生因素是脂质过氧化及在后期的氧化过程中

产生的低分子量的化合物。例如,氧化危害到 Alzheimer 病人的大脑中的所有主要的生物大分子。与主要是游离自由基产生的相关病情有动脉粥样硬化、糖尿病及风湿性关节炎。另外,癌症可能是 DNA 氧化损伤的结果。食品的脂质过氧化作用会导致食品质量劣化,如会产生酸败味、不易接受的口感,而且也会缩短食品的货架期。一些人工合成的抗氧化剂(BHA, BHT and *n*-propyl gallate)对某些氧化反应具有很强的抑制作用。但是,由于这些氧化剂在机体内具有潜在的危害,在一些国家,这些氧化剂是禁止在食品中应用的。为了保护机体从而抵御疾病及避免食品劣化,极为重要的是抑制脂质过氧化及避免过多的游离自由基产生。抗氧化活性肽已逐渐显示出其在食品、医药、化妆品等领域应用的优势。近年来,科研工作者通过水解猪肉、鱼肉、猪血红蛋白获得了抗氧化活性肽。Chi-Yue Chang 等^[25]对猪血红蛋白先采用碱性蛋白酶后用风味蛋白酶酶解,结果表明,通过 2% 碱性蛋白酶 4h 后通过 1% 风味蛋白酶 6H 酶解,亚铁离子螯合力达到最高 63.54%(5.0mg/ml),只通过 2% 的碱性蛋白酶 4 h 酶解,水解物存在最高的 DPPH 自由基清除力 51.57%(5.0mg/ml)。

3 应用前景及展望

生物活性肽主要分为内源性生物活性肽和外源性生物活性肽两种。前者为天然存在于机体或组织的内部,含量很低,而后者一般都以无活性的形式存在于蛋白质氨基酸序列之中,可以通过水解蛋白质的方法进行大量制备,具有很大的工业化应用潜力。血红蛋白生物活性肽具有许多重要的功能活性,可被开发为功能食品、医药及化妆品等具有高附加值的生物制品。加工血红蛋白制备生物活性肽不但可以充分利用血液中大量宝贵的蛋白质,而且有助于环境的保护。

虽然近年来有关酶解血红蛋白制备活性肽方面的研究取得了许多突破,但是不能忽视的是已经和尚未发现的多肽的生物活性的研究仍有待深入,如建立有效筛选特定生物活性的体系来进行肽的功能性生物学评价、多肽分离纯化及序列分析、多肽生物活性和结构关系及其在人体内的调控机制等等。因此,未来有关血红蛋白活性肽的研究的重点是:①优化工艺流程,确定最佳的酶解工

艺参数,建立高效、易行的目标肽分离精制及活性鉴定技术,开发新颖的活性肽;②深入探讨血红蛋白活性肽的构效关系,为药物和功能性食品的开发提供可靠的理论依据。随着生物技术的发展,血红蛋白生物活性肽的它在食品工业、医药工业、化学工业中的应用前景将会越来越广阔。

参考文献

- [1]Kitts, D. D., & Weiler, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9:1309 1323.
- [2]FitzGerald, R. J., Meisel, H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: P.F. Fox, & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry*, 2003, Vol. 1: Proteins (3rd ed.) (pp. 675 698). New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- [3]Korhonen, H., & Pihlanto, A. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9:1297 1308.
- [4]Li GuanHong, Le GuoWei, Shi YongHui, Sundar Shrestha. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. [J].*Nutrition Research*, 2004, 24: 7, 469-486.
- [5]Ockerman, H.W. and C.L. Hansen. *Animal By-Product Processing & Utilization*[M]. Lancaster (PA): Technomic Publishing Co., Inc., 2000.
- [6]Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins[J]. *Eur J Pharmacol*, 1986, 125: 309-310.
- [7]Piot JM, Zhao QY, Guillochon D, Ricart G, Thomas D. Isolation and characterisation of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189: 101 110.
- [8]Zhao, Q., Garreau, I., Sannier, F., & Piot, J. M. Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins[J]. *Biopolymers*, 1997, 43:75 98.
- [9]Nyberg F, Sanderson K, Glamsta EL. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein

- haemoglobin[J]. Biopoly, 1997, 43:147 156.
- [10]Lignot B, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Guillochon D. Solvent effect on kinetics of appearance of neokyotorphin VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1999, 30:201 207.
- [11]Hyun, C. K., & Shin, H. K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides[J]. Process Biochemistry, 2000, 36:65 71.
- [12]Piot JM, Zhao QY, Guillochon D, Ricart G, Thomas D. Isolation and characterisation of a bradykinin potentiating peptide from bovine peptic hemoglobine hydrolysate[J]. FEBS Lett, 1992, 299: 75 79.
- [13]Zhao, Q., Coeur, C. L., & Piot, J. M. Analysis of peptides from bovine hemoglobin and tuna myoglobin enzymatic hydrolysate: use of HPLC with on-line second-order derivative spectroscopy for the characterization of biologically active peptides[J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 352:201 220.
- [14]Takagi H, Shiomi H, Ueda H, Amano H. A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser[J]. Nature 1979, 5737:410 412.
- [15]Zhao QY, Molina P, Piot JM. Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process[J]. J Liq Chrom Rel Technol 1997, 20: 1717 1739.
- [16]Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib N, et al. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin[J]. Peptides 2005, 26: 713 719.
- [17]Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kosciarsz E, Ruckebusch C, et al. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment[J]. FEBS Lett 2001, 491:159 163.
- [18]Liepke C, Baxmann S, Heine C, Breithaupt N, Standker L, Forssmann WG. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides[J]. J Chromatogr B 2003, 791:345 356.
- [19]Parish CA, Jiang H, Tokiwa Y, Berova N, Nakanishi K, McCabe D, et al. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin[J]. Bioorg Med Chem, 2001, 9: 377 382.
- [20]Wu, K. C., Lin, Z. Y., Chiang, S. H., & Chang, C. Y. (2004). Antioxidant properties of porcine blood protein before and after enzymatic hydrolysis[J]. Journal of the Biomass Energy Society of China, 23: 79 85.
- [21]Kazuo Mito, Mikio Fujii, Masayoshi Kuwahara, Nobuyasu Matsumura, Toshio Shimizu, Shigeru Sugano, Hideaki Karaki. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin [J]. European Journal of Pharmacology, 1996, 304: 93-98.
- [22]Yike Yu, Jianen Hu, Yuji Miyaguchi, Xuefang Bai, Yuguang Du, Bingcheng Lin. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin[J]. Peptides, 2006, 27:2950-2956.
- [23]Zhao QY, Sannier F, Piot JM. Kinetics of appearance of four hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by HPLC coupled with photodiode array detection[J]. Biochem Biophys Acta 1996, 1295: 73 80.
- [24]Naima Nedjar-Arroume, Ve'ronique Dubois-Delval, Khalil Miloudi, Rachid Daoud, Francois Krier, Mostafa Kouach, Gilbert Briand, Didier Guillochon. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin [J]. peptides, 2006, 27 :2082 2089.
- [25]Chi-Yue Chang, Kuei-Ching Wu, Shu-Hua Chiang. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates[J], Food Chemistry, 2007, 100:1537-1543.