

· 综述 ·

动物药多肽的药效学与分子鉴定研究进展[△]叶聪^{1,2}, 李国卫¹, 胡绮萍¹, 童培珍¹, 罗宇琴¹, 罗文汇¹, 曲丽媛¹, 孙冬梅^{1*}

1. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244;

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

[摘要] 动物药在传统医学领域占据着重要地位, 经过数千年的实践在中国得到广泛应用, 其临床应用和药理活性一直是研究的核心。其中, 动物来源的蛋白质和肽被认定为其药理作用的重要物质基础。肽类药物有望成为国际药物研发的新热点, 动物药因富含潜在药效活性肽而成为备受关注的“宝库”。通过综述现有相关文献, 系统总结动物源药物中活性肽的药理功能研究进展。同时, 介绍了常见肽的分析鉴定和发现方法, 特别强调了液相色谱-质谱联用技术在研究动物源药物肽类成分方面的应用策略和现状, 及其在动物源药物中的肽成分研究中显示出的独特优势。该技术在动物源药物真伪鉴别、质量控制及潜在活性肽的筛选等方面具有显著效果, 为深入了解动物源药物的作用机制和推动肽类药物的发展提供参考。

[关键词] 动物药; 活性肽; 肽鉴定; 液质联用; 生物信息学

[中图分类号] R284.1R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2024)04-0757-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20231007006

**Research Progress on Pharmacodynamics and Molecular Identification of Active Polypeptides from
Animal-derived Chinese Medicine**

YE Cong^{1,2}, LI Guo-wei¹, HU Qi-ping¹, TONG Pei-zhen¹, LUO Yu-qin¹, LUO Wen-hui¹, QU Li-yuan¹, SUN Dong-mei^{1*}

1. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

[Abstract] Animal-derived medicines hold a significant position in traditional Chinese medicine, they have been widely practiced in China for thousands of years. The clinical application and pharmacological activity of these medicines have remained central topics of research. Among them, proteins and peptides derived from animals are identified as crucial molecular foundations for their pharmacological effects. Peptide drugs are poised to become a new focus in international pharmaceutical research, with animal-derived medicines attracting significant attention as a "treasure trove" due to their abundance of active peptides with potential therapeutic effects. This paper aims to systematically review existing literature, summarizing the recent advancements in the pharmacological functions of active peptides in animal-derived medicines. Additionally, common methods for peptide analysis, identification, and discovery are introduced, with a particular emphasis on the application strategies and current status of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technology in studying peptide components of animal-derived medicines. Overall, LC-MS technology exhibits unique advantages in the research of peptide components in animal-derived medicines. This technology has significant impact in the identification of authenticity, quality control, and screening of potentially active peptides of animal-derived medicines, providing a reference for a in-depth understanding of the mechanisms of action of animal-derived medicines and the advancement of peptide-based drugs.

[Keywords] animal-derived medicine; active peptides; peptide identification; LC-MS; bioinformatics

生物体内的肽是由生物代谢或特异性内切酶对蛋白质水解产生的小分子物质, 其英文名称被定为

“peptide”, 来自希腊语“peptos”^[1]。随着对肽研究的不断深入, 研究者发现肽键热振荡、电磁辐射等

[△] **[基金项目]** 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2020B1515120033)

* **[通信作者]** 孙冬梅, 教授, 研究方向: 中药新药研发及中药质量评价; Tel: 0757-85128602, E-mail: 1471237855@qq.com

物理方式也可使蛋白质的肽键碎裂形而成肽^[2-4]。目前,国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)对肽的定义为“分子量小于10 kDa、由两个或以上氨基酸缩合而成的酰胺可以被定义为肽”^[1]。多肽由10个以上氨基酸组成,寡肽由2~9个氨基酸组成,统称为肽。

动物是天然活性肽的来源宝库。胰岛素(一种51个氨基酸的肽)是一种由胰岛 β 细胞合成和分泌的多肽激素,自20世纪20年代初首次分离和商业化以来,动物胰岛素产品已在市场上流通了90余年^[5];后续研究者从家畜垂体中分离纯化出另一种多肽激素——促肾上腺皮质激素,用于治疗患者的各种内分泌疾病^[6-7]。目前,肽疗法已成为制药行业的一个新兴市场,每年有近20项新的基于肽的临床试验,目前有超过400种肽类药物正在全球临床开发中,全球批准临床使用的肽类药物数量超过60种^[1-5]。肽的结构表征可指导肽的人工合成,有助于将天然活性肽开发转化为市场产品。同时,高通量的结构表征手段可以鉴定动物药及其产品中的特征肽段,结构表征结合肽组学方法确定动物药的质量标志物是动物药质量控制的新思路。具备易操作、高效、高通量等特性的液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)可进行肽的分离、鉴定和含量测定,已成为肽类成分研究的主要工具。本文概述了动物药肽类成分的活性研究及质量研究现状,并对LC-MS在动物药来源肽上的应用作总结归纳,以期对动物类中药的肽类成分研究提供参考。

1 动物药活性肽功能

动物药活性肽具有生物活性高、靶向专一性高、选择性高、不良反应少等优点,来源广泛、功能多样,逐渐成为研究和应用的热点,尤其是在新药开发和传统医学的现代化研究中。研究者不断深入研究动物药肽类成分的药理活性及作用机制,为开发新型肽类药物和治疗方法提供参考。

1.1 调节血液流变学参数

地龙是中国广泛分布的药用动物,具有通络的传统功效。现代研究表明,地龙体内含有的蛋白多肽类成分具有抗凝血、促进纤维蛋白酶溶解等活性^[8]。魏玮^[9]采用纤维蛋白平板法测定地龙蛋白肽抗凝血活性,结果表明其具有较好的抗凝血活性,且序列为LVTLGNE的肽抗凝血活性最强;花生四烯酸诱导的斑马鱼血栓模型评价也显示,肽段

LVTLGNE具有较阿司匹林和地龙蛋白肽更好的抗血栓活性。相似地,水蛭是常见的活血化瘀通络类动物药,李华健等^[10]以纤维蛋白原-凝血酶时间(Fibg-TT)法为评价方法,从宽体金线蛭中分离了4段具有抗凝活性的肽并鉴定出其序列。因此,从活血化瘀通络类动物药中发掘影响血液流变的肽,对动物药传统功效的现代药理学研究、抗血栓药品或功能食品的开发具有重大意义。

1.2 促创面修复

伤口愈合是一个复杂的动态过程,涉及多种细胞类型和信号通路的协调作用,促创面修复活性肽可改善这一过程。《四川省中药材标准》(2010年版)记载美洲大蠊 *Periplaneta americana* 具有消肿、解毒的功效,能促进伤口和疮毒修复,可以外用于蛇虫咬伤,痔疮出血,烧伤、烫伤等^[11-12]。廖倩等^[13]使用LC-MS对美洲大蠊的肽组分进行研究,通过体外活性实验初步筛选了具有潜在促创面修复活性的4条肽段;相似地,《本草纲目》《神农本草经》等记载牛骨具有敛疮的功效^[14],Li等^[15]研究了牛骨胶原寡肽(BCOP)对两组模型小鼠(全层切口和全层切除)伤口愈合的影响,发现与正常对照组相比,BCOP治疗组的白蛋白、前白蛋白、转铁蛋白、羟脯氨酸、白细胞介素(IL)-10、基质细胞衍生因子-1 α 的水平 and 血管内皮生长因子的mRNA表达均显著升高($P<0.05$),表明口服BCOP可促进小鼠伤口愈合。此外,已有文献报道鹿茸多肽、林蛙多肽具有一定的促创面修复活性^[16]。从具备敛疮消痛功效的动物药中发掘促创面活性肽可行性较高。

1.3 镇痛

具备通络止痛功效的动物药是镇痛活性肽重要的来源。在痛觉产生的过程中,钠离子通道NaV1.7起着关键作用,其激活可提高神经元对外来刺激的敏感性^[17],故筛选NaV1.7选择性抑制剂是发掘镇痛活性肽的重点。Yang等^[18]从少棘蜈蚣的毒液中分离获得具有镇痛活性的多肽Ssm6a,该多肽特异性抑制钠离子通道NaV1.7,在福尔马林诱导的小鼠舔爪模型、乙酸及热诱导的小鼠疼痛模型中表现出不弱于吗啡的镇痛效果,且无影响血压、心率及运动功能的不良反应。Yang等^[19]通过实验证明蝎毒多肽BmK DKK13对炎性疼痛模型大鼠具有显著的镇痛作用。肽的作用机制研究在不断深入,镇痛肽与不同亚型

的钠离子通道之间的选择性结合是目前开发新型镇痛药物的重点, 将其与常规镇痛药进行对比研究, 体现出了肽镇痛效果显著且不良反应少的优点。

1.4 抗肿瘤

具备攻毒散结功效的蜈蚣、全蝎等动物药是现代抗肿瘤中药研究热点, 从以上两种动物药中也发掘出了相应的抗肿瘤活性肽。Yan等^[20]研究了蜈蚣毒素肽 Scolopin-2 和酰胺化 Scolopin-2 在体外对Hela细胞活性的影响, 以及其对皮下注射Hela细胞的BALB/c裸鼠诱导的小鼠肿瘤模型的作用, 研究表明Scolopin-2-NH₂在体外可抑制Hela细胞的增殖且显著抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长, 无明显不良反应。Panja等^[21]研究了一种源自蝎毒的肽BmKn-2对完整雌性犬常见的肿瘤CMGT的影响, 结果表明BmKn-2可以抑制CHMp-5b和CHMp-13a细胞系的增殖、诱导细胞凋亡, 证实了蝎毒肽BmKn-2的抗肿瘤作用。与传统的化学药物和放疗治疗相比, 抑制癌细胞的增殖及通过细胞通路诱导癌细胞凋亡是抗肿瘤肽的作用机制, 其具备不良反应少和疗效强的优势。不过, 抗肿瘤肽仍处于临床前动物实验阶段, 其疗效和安全性仍需要进一步的研究证明。

1.5 其他功能及肽键热振荡理论

来源于动物药的肽作用功能广泛, 除上述提及的功能以外, 动物肽还具有其他的生理活性, 如抗氧化^[22-24]、促进人成骨细胞增殖分化^[25]、抗炎^[26]、调节免疫功能等^[27]; 一种动物药中可以分离出多种具有不同活性的肽, 如从蜈蚣中既分离出作用于NaV1.7的镇痛肽, 又分离出通过调节细胞凋亡发挥作用的抗肿瘤肽, 反映了动物类中药多成分、多途径、多靶点的特性。

动物源中药材炮制目的在于使矿质类易于粉碎, 肉质类易于保存、改变腥臭类气味, 或利用辅料改变药性。有研究者认为, 动物类药材在加热炮制过

程中发生肽键的热振荡作用, 导致肽键断裂产生更多小分子肽段, 其结构发生不同程度的改变, 生理活性发生相应的变化^[2]。对常用动物药的主要炮制方法进行总结, 见表1。在中医药理论的指导下研究动物药活性肽可为中药的临床应用提供更准确可靠的理论基础, 还有助于中药制药行业的发展, 为中药制剂的开发提供更多的候选成分。

2 LC-MS在动物药肽类成分研究中的应用

目前动物药肽类成分的序列鉴定常用方法主要有两种, 分别为Edman降解法和质谱鉴定法。Edman降解法是最经典的蛋白质多肽类物质N末端氨基酸序列测定方法, 从N末端开始通过耦合、切割、萃取、转化、鉴定等几个步骤, 可以对未知肽段的氨基酸序列进行从头测序^[41]。但Edman降解法有其应用的局限性, 存在灵敏度低、无法应用于N末端封闭的肽段等, 且对测定样品的纯度要求较高, 在成分复杂的动物药研究中应用局限性较大。随着LC-MS不断发展, 其在动物药肽类成分的鉴定分析中兼具分离、鉴定功能, 且操作简易、可靠性高、可进行高通量分析, 应用日益广泛, 已经成为肽类成分序列鉴定的主要手段, 以下重点介绍LC-MS在动物药肽类成分研究中的应用。

2.1 真伪鉴别

肽图分析可用于动物类中药及其产品的真伪鉴定。例如, 刘睿等^[42]使用纳升液相-线型离子阱-静电轨道阱质谱法(Nano LC-LTQ-Orbitrap-MS)对水牛角、山羊角、牦牛角、猪蹄甲经胰蛋白酶酶切后的肽图谱进行分析, 结合化学计量学的方法, 筛选出了可分别区分水牛角与山羊角、水牛角与猪蹄甲的4个特征肽。刘宇文等^[43]利用超高效液相色谱-四级杆质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)对龟甲及8种常见混淆品各10批进行肽图分析, 筛选出用于区分龟甲与

表1 常用动物药的主要加工炮制方法

主要炮制方法	目的	常用动物药	参考文献
炒制	去除药材的水分, 便于贮存; 矫正不良气味、降低毒性	炒鸡内金、炒僵蚕、土鳖虫	[28-30]
煮制	提取药材中的有效成分, 方便人体吸收和利用; 改善口感, 使药材便于服用	阿胶、鹿角胶、龟甲胶	[31-33]
醋制	改变药性, 使其更符合临床需要; 矫正不良气味、降低毒性	醋鳖甲、醋龟甲、醋五灵脂	[34-36]
酒制	改变药性, 使其更符合临床需要; 改变药物不良气味、降低毒性	酒乌梢蛇、蜈蚣	[37-38]
盐制	防止药材发霉腐烂	全蝎	[39]
烫制	矫正不良气味、使其利于粉碎	水蛭	[40]

8种常见混淆品的特征肽段VGPAGSSGPR,建立了UPLC-Q-TOF-MS的专属性的龟甲特征肽鉴别方法。通过LC-MS对动物类中药及其混伪品进行肽图分析,比对真伪品之间的总离子流图谱差异,并进行统计分析查找特征离子,结合蛋白多肽类二级质谱图检索软件,可以得出用于鉴别动物类中药及其混伪品的特征肽。

2.2 质量评价

由于基础研究薄弱,动物药相关质量控制水平仍然较低。目前动物药质量鉴别主要依赖DNA鉴定,但其有着操作复杂、技术门槛较高等局限性,难以推广。传统色谱法主要应用于以氨基酸为指标的动物药质量评价,专属性、可靠性较差。例如,在治疗妇科疾病及贫血等方面疗效较佳、临床应用已有2000年历史的阿胶一直存在杂皮胶(马皮、骡皮、牛皮、猪皮、羊皮、废旧皮革等)掺假、掺伪现象^[44],因动物皮类的主要成分为蛋白质且其相似性较高,以氨基酸为指标的质量控制方法不够全面,而特征肽段用于阿胶的质量控制有很大的优势,故《中华人民共和国药典》2020年版中阿胶的含量测定项新增收录了LC-MS特征肽鉴别方法,规定了以离子对 m/z 469.25(双电荷) \rightarrow 789.40、712.30测定驴源多肽 A_1 及以离子对 m/z 618.35(双电荷) \rightarrow m/z 850.40、779.40测定驴源多肽 A_2 作为阿胶的真伪鉴别及含量测定方法,为完善动物药质量控制标准提供了新的思路^[45-46]。在完成动物药特征肽的筛选及序列鉴定后,化学合成特征肽标准品,通过LC-MS可以利用特征肽含量实现动物药的含量测定。

此外,通过LC-MS可以基于肽段峰面积通过无标记(label-free)定量得出不同样品之间肽段含量的差异并进行比较分析,为动物药的肽组学分析提供一种高效快速的方法。例如,蒋梦彤等^[47]通过纳升液相色谱-质谱法(Nano LC-MS/MS)采集鹿角胶和鹿皮胶样品数据,以label-free定量肽组学分析的方法筛选出鹿角胶和鹿皮胶样品存在差异极其显著的糖基化肽,解决了鹿源专属肽无法区分鹿角胶和鹿皮胶的问题,为鹿角胶和鹿皮胶的鉴别提供了新的思路,为动物药的物质基础研究及质量标准研究提供参考。

2.3 活性肽研究

生物活性肽的长度一般为2~30个氨基酸,由20

种天然氨基酸按照不同顺序排列组成,是对机体生命活动具有生理作用的一类化合物,因其生物活性高、靶向专一性高、选择性高、不良反应少等优点而被广泛应用于疾病治疗领域^[48-49]。LC-MS结合了色谱强大的分离功能和质谱的高灵敏度、高通量、高选择性鉴定功能,国内外研究者广泛使用LC-MS研究动、植物活性组分肽^[50]。LC-MS可以显著地缩短活性肽结构表征的周期^[51],指导动物药肽类成分的固相合成,以节省传统的分离纯化得到单体化合物的成本。结合生物信息学技术分析预测动物药肽类成分的活性,可以实现动物药活性肽的高通量快速筛选。例如,姜珊等^[52]运用LC-MS对酶解纯化后的土鳖虫肽组分进行鉴定得出序列后,固相合成单体氨基酸序列为DAVPGAGPAGCHPGAGP的土鳖虫活性肽,并考察其对高脂饲料诱导的高脂血症SD模型大鼠的作用,证明了土鳖虫活性肽有显著的调血脂的作用,可抑制大鼠肝脏脂肪堆积现象。

3 基于LC-MS的肽类成分鉴定方法

多肽片段在质谱中裂解时,根据肽键碎裂的方式不同,可产生N端保留了母离子正电荷的a、b、c系列离子和/或C段保留母离子正电荷的x、y、z系列离子,可对比碎片离子之间的质量差异,推断出多肽片段的氨基酸序列^[48,53-54]。根据以上原理,基于质谱的肽序列鉴定方法主要分为两种,一种为数据库搜索,另一种方法是de novo从头测序。

3.1 数据库搜索

基于肽在质谱中的裂解规律,可以将蛋白质序列数据库模拟裂解得到理论谱图,将样品中实际得到的二级质谱图与理论谱图进行匹配打分,保留可信度最高的肽段序列鉴定结果,即为数据库搜索的一般过程,也可用以完成鉴定的质谱实验真实谱图库代替蛋白质序列数据库进行搜索^[55-56]。数据库搜索是肽质谱研究的主要分析方法,具有操作简便、准确率高的优点,但也有其局限性,如依赖于现有的蛋白质序列数据库、容易遗漏肽段-谱图匹配、忽视肽段多样性、搜索时间随数据库条目的增大而增长^[57]。

3.2 de novo从头测序

与依赖于现有蛋白质序列数据库的搜索方法不同,de novo测序可以根据实验产生的二级质谱图离

子峰峰间距离获取初步的氨基酸序列信息, 通过考虑电荷状态、修饰、裂解位点、概率评估和其他因素^[58-59]的算法从谱图中提取氨基酸序列。虽然近年来 *de novo* 测序随着算法和质谱技术的提升得到广泛应用, 但其结果仍不如数据库搜索可靠^[58]。

3.3 其他测序方法

首先使用数据库搜索对质谱图进行鉴定, 然后对剩下的高质量未被解析质谱图使用 *de novo* 测序, 是保证鉴定结果的可靠性、全面性的研究策略^[60]。除了上述两种测序方法之外, 还有整合了两种鉴定方法思路形成的其他测序方法。序列标签搜索方法首先通过 *de novo* 测序从肽离子碎片谱图中推导出部分短序列标签 (序列标签), 然后利用这些序列标签和已知的需要匹配的蛋白质序列库中的肽段进行肽谱匹配^[61]。与数据库搜索的匹配相比, 该方法允许序列标签与蛋白质序列库中出现少量氨基酸不匹配, 可以显著缩短数据库搜索的时间, 提高鉴定效率, 并且适用于系统分析肽段翻译后修饰, 但该方法仍存在无法鉴定蛋白质数据库未收录肽的局限^[57]。

4 活性肽筛选策略

在完成样品中肽类成分的鉴定之后, 研究者通常会获得大量的肽段序列, 如何从冗余的肽序列数据中筛选出具有潜在活性的肽片段是从动物药中获取药效基础相关活性肽的一个关键点及难点。目前活性肽的筛选策略可分为酶切法和生物信息学法两种。

4.1 酶切法

使用特异性内切酶分解从动物样品中提取的蛋白质, 通过多维色谱联用技术或电泳技术分离鉴定肽, 最后使用生物活性检测技术验证肽活性, 是经典的动物药活性肽发掘策略。例如, 李华健等^[10]通过仿生酶解制备宽体金线蛭多肽, 通过超滤法、阳离子交换树脂、反向液相色谱分离纯化多肽, 以 Fibg-TT 法为评价方法从中筛选出具有抗凝活性的多肽, 并采用纳升液相色谱-四级杆-超高分辨轨道阱质谱法 (Nano LC-Q-Exactive-MS/MS) 多肽分析技术实现了宽体金线蛭蛋白质多肽类物质的快速鉴定, 从中发现了氨基酸序列为 LTEAPLNPK、GFAGDDAPRA、LGVEGPSKA、IIPSSTGAAK 的 4 条抗凝血活性多肽。弋静等^[62]从天然麝香中初步提取多肽后使用离子交换柱将麝香多肽分为 5 个流分,

从中发现 SPX4 可以在脂多糖 (LPS) 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症模型中显著抑制肿瘤坏死因子- α 和 IL-1 β 产生, 表现出明显的抗炎活性, 且在 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠模型中还可改善小鼠肺组织中炎症细胞浸润和肺泡壁增厚情况, 减轻小鼠肺组织病理损伤, 说明了麝香多肽 SXP4 具有较强的抗炎活性。

酶切法具有简单、快速和灵敏度高等优点, 因此广泛应用于生物学和医学研究中, 但其仍有实验周期长、效率较低等不足之处。

4.2 生物信息学法

生物信息学法是一种通过分析生物数据和数学模型来发掘活性肽的方法。其要求收集和整理动物药的蛋白质数据, 如基因组数据库、蛋白质数据库和蛋白质结构数据库等, 通过蛋白质计算预测软件预测肽的序列, 再使用分子对接预测活性、生物实验验证活性, 这是生物信息学法的一般过程。华羽彤等^[63]通过虚拟酶切结合分子对接初筛及分子动力学复筛, 从宽体金线蛭蛋白质库筛选出潜在抗凝活性多肽, 并最终通过抗凝实验验证得到宽体金线蛭抗凝多肽, 表明生物信息学用于活性肽筛选策略切实可行。此外, 由于肽表现出高度的结构-活性行为, 某些氨基酸残基的存在和序列排列表明了肽的性质和潜在的生物活性^[64], 例如, 含有较多半胱氨酸、疏水性氨基酸、芳香性氨基酸或具备两性性的肽更可能具有抗氧化性能^[65]。大多数肾素和血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制肽的 N 末端氨基酸为相对分子质量较小的疏水氨基酸, C 末端氨基酸或倒数第二个 C 端氨基酸为相对分子质量较大的芳香族/脂肪族氨基酸, 这种结构最有利于肽与 ACE 结合^[66]。

生物信息学法具有精确性高、高效率 and 可自动化等优点, 因此广泛应用于生物学和医学研究中。LC-MS 结合生物信息学快速高效筛选动物药潜在活性肽, 是高通量、低成本研究动物药药效物质基础的新方法, 国内外相关动物药活性肽文献数量呈逐步上升的趋势。

5 总结与展望

大部分动物药中含量较高的成分是蛋白多肽类化合物。动物药的成分复杂性和生物大分子蛋白质的结构复杂性, 导致了动物药成分的分离纯化困难, 阻碍了动物药的药效基础成分研究。小分子活性多

肽因其相对分子质量小、吸收利用率高、低毒性和低免疫原性的特性而成为研究热点。肽类药物在靶向治疗和癌症治疗中显示出巨大的潜力，蛋白质-蛋白质的相互作用调节成为研究的重点，肽组学和生物信息学对于新型肽药物的设计及揭示肽类药物的作用机制至关重要。代谢性疾病和癌症治疗是当前获批准的肽药物的主要治疗领域，而全球不断增长的代谢性疾病发病率将推动肽类药物市场的进一步增长^[3]，未来，肽类药物将成为药物研发领域中备受关注的焦点，为疾病治疗提供更多创新性选择。

尽管动物药活性肽的研究已经取得一定的成果，但其发展仍存在一些瓶颈。例如，大多数动物药以未验证药效的特征肽作为质量鉴别手段，虽保证了药品生产及临床用药的准确性、安全性，但单纯以这些成分来评价动物药的质量仍较为片面。另外，特征肽可用于动物药的真伪鉴定和质量控制，但其来自于动物药与其混伪品的肽图谱分析，存在蛋白质序列库未收录的特征肽序列无法准确鉴定的问题。更为重要的是，动物药在临床上多以炮制品入药，动物药中相对分子质量较大的蛋白质经一系列炮制加工后可产生更多的小分子活性肽，毒性蛋白质亦可经加热分解成小分子肽而失去毒性，但目前动物药生品及其炮制品的肽成分研究仍是基础薄弱的部分。

实现动物药的综合性质量评价需要解决动物药活性肽研究中存在的问题，可从以下几个方面入手：1) 应加强对动物药特征肽的活性研究，以生物信息学理论计算、动物模型验证靶点通路的方式，深入研究动物肽的药理作用机制，同时兼顾发掘研究薄弱的药理作用。2) 在动物药的质量控制方面，无法准确鉴定的肽段可通过分离提纯得到单体，再通过传统的Edman降解法测序，亦可通过de novo测序推断其序列，人工合成相应肽对照品并进行质谱指认从而确证其序列。3) 应开展对动物药生品及炮制品中蛋白多肽类成分的研究，明确炮制前后肽类成分的差异，结合其药效变化进行分析，为动物药炮制后增效减毒等传统理论提供现代研究支撑，从而推动动物类中药现代化进程。

综上，动物药肽类成分的研究为中药临床和中药制药行业提供了重要支撑，LC-MS在动物药肽类成分的研究中具有其独特的优势，通过动物药肽类成分研究进行药效基础物质明晰、真伪鉴别及质量控制已成为动物药现代化的趋势。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] SCHRADER M. Origins, technological development, and applications of peptidomics[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1719:3-39.
- [2] 李晶峰,边学峰,孙佳明,等. 基于肽键热振荡理论和酶工程技术的动物药肽类化合物研究[J]. *中国现代中药*, 2019,21(9):1147-1156.
- [3] 李晶峰,王亚萍,边学峰,等. 基于肽键热振荡理论对僵蚕炮制前后体外抗帕金森活性的研究[J]. *中国现代中药*, 2019,21(9):1229-1235.
- [4] 马思远,温志刚,张远聪,等. 食源性活性肽及其微囊化技术与应用的研究进展[J]. *食品科技*, 2023,48(11):216-223.
- [5] LEE A C L, HARRIS J L, KHANNA K K, et al. A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10):2383.
- [6] LAU J L, DUNN M K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions[J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(10):2700-2707.
- [7] GORDON D, MCLEAN J. Effects of pituitary adrenocorticotrophic hormone (acth) therapy in ophthalmologic conditions[J]. *JAMA*, 1950, 142: 1271-1276.
- [8] 于小钧,张兵,薛晴,等. 2种地龙饮片不同提取法体外抗凝活性对比研究[J]. *中国现代应用药学*, 2021,38(23):2955-2960.
- [9] 魏玮. 地龙蛋白肽的分离纯化、结构鉴定及抗血栓活性研究[D]. 镇江:江苏大学,2022.
- [10] 李华健,王常麟,李浩然,等. 宽体金钱蛭抗凝血活性肽的分离纯化及肽序列研究[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(7):1616-1619.
- [11] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准[M]. 成都:四川科学技术出版社,2010:450.
- [12] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:3784.
- [13] 廖倩,庞兰,石金凤,等. 基于多肽组学的美洲大蠊肽类组分分析及促创面修复活性多肽筛选[J]. *中草药*, 2022,53(7):2085-2094.
- [14] 帕尔哈提·柔孜,杨晓君,木合布力·阿布力孜,等. 4种动物骨骼的化学成分与生物活性研究进展[J]. *现代食品科技*, 2020,36(5):337-346.
- [15] LI D, REN J W, XU T, et al. Effect of bovine bone collagen oligopeptides on wound healing in mice [J].

- Aging, 2021, 13(6):9028-9042.
- [16] 郝林琳,陈熙,夏培钧,等. 动物源性生物活性肽在皮肤创伤愈合中的作用研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2022, 44(1):13-20.
- [17] 沈婷,王冬梅. 钠离子通道NaV1.7与神经病理性疼痛[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(6):725-735.
- [18] YANG S L, XIAO Y, KANG D, et al. Discovery of a selective NaV1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(43):17534-17539.
- [19] YANG R, SONG Y B, WANG H P, et al. BmK DKK13, A scorpion toxin, alleviates pain behavior in a rat model of trigeminal neuralgia by modulating voltage-gated sodium channels and MAPKs/CREB pathway [J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(7):4535-4549.
- [20] YAN W L, LU J, LI G T, et al. Amidated Scolopin-2 inhibits proliferation and induces apoptosis of Hela cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2018, 65(5):672-679.
- [21] PANJA K, BURANAPRADITKUN S, ROYTRAKUL S, et al. Scorpion venom peptide effects on inhibiting proliferation and inducing apoptosis in canine mammary gland tumor cell lines [J]. Animals, 2021, 11(7):2119.
- [22] 包显颖,陈丽,倪姮佳,等. 抗氧化多肽研究及其应用前景[J]. 生命科学, 2016, 28(9):998-1005.
- [23] DING Y L, KO S C, MOON S H, et al. Protective effects of novel antioxidant peptide purified from alcalase hydrolysate of velvet antler against oxidative stress in Chang liver cells *in vitro* and in a zebrafish model *in vivo* [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20):5187.
- [24] THAPA P, KATILA N, CHOI D Y, et al. Suntamide A, a neuroprotective cyclic peptide from Cicadidae Periostracum [J]. Bioorg Chem, 2021, 106:104493.
- [25] 刘颖男,吴晓冬,徐嘉鸿,等. 酶解鹿茸多肽促进人成骨细胞增殖分化的活性研究[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(12):2033-2036.
- [26] SEO M, LEE J H, BAEK M, et al. A novel role for earthworm peptide Lumbricisin as a regulator of neuroinflammation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 490(3):1004-1010.
- [27] 练方亮. 海参(*Colochirus robustus*)多肽对C57BL/6小鼠免疫功能及其作用机制的研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2020.
- [28] 杨语,初曦卓,孙小丽,等. 鸡内金炮制方法的历史沿革及现代研究[J]. 中药与临床, 2020, 11(4):8-11, 23.
- [29] 姜秋,王玲娜,刘燕,等. 僵蚕的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(12):3269-3280.
- [30] 王和沪,王云启. 土鳖虫的本草考证[J]. 中医药导报, 2023, 29(4):52-56.
- [31] 燕娜娜,熊素琴,陈鸿平,等. 阿胶炮制历史沿革与现代研究进展[J]. 中药材, 2018, 41(12):2948-2952.
- [32] 于大猛. 论鹿角霜炮制方法的变迁[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(1):182-188.
- [33] 于大猛. 龟甲胶传统制作工艺探讨[J]. 中医文献杂志, 2023, 41(1):30-33.
- [34] 童东昌,刘利娟,宁迪敏,等. 鳖甲的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3):163-170.
- [35] 张中华,黄清杰. 龟甲炮制加工历史沿革与临床应用[J]. 甘肃医药, 2021, 40(9):825-827.
- [36] 赵佳琛,王艺涵,翁倩倩,等. 经典名方中五灵脂的本草考证[J]. 中国现代中药, 2020, 22(8):1404-1412.
- [37] 朱春晓,谢明,李昶,等. 乌梢蛇的本草考证研究[J]. 中国现代中药, 2018, 20(12):1573-1578.
- [38] 马小兵,余金燕,刘文武. 蜈蚣的本草及临床应用考证[J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(13):29-33.
- [39] 梁晓莉,袁红芹,杨祎辰,等. 经典名方中全蝎的本草考证及资源现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(6):34-43.
- [40] 姜秋,王玲娜,刘谦,等. 水蛭的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21):5806-5816.
- [41] 谢博,傅红,杨方. 生物活性肽的制备、分离纯化、鉴定以及构效关系研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5):383-391.
- [42] 刘睿,赵明,刘晓,等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测水牛角特征肽[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5):1279-1285.
- [43] 刘宇文,谌宇,郑娟,等. 液质联用多肽识别技术用于龟甲的鉴别研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(4):408-409.
- [44] 杨帅,鲁婷婷,周祖英,等. 阿胶化学成分和药理作用及质量控制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(8):806-816.
- [45] 程显隆,李明华,郭晓晗,等. 胶类药材质量问题变化情况及其标准研究对策[J]. 中国现代中药, 2020, 22(7):996-999.
- [46] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部:[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [47] 蒋梦彤,黄潇正,蔡朔,等. 基于Label-free定量多肽组学的鹿角胶与鹿皮胶糖基化肽研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14):3487-3493.
- [48] 温学美,李悦,陆静. 串联质谱法在合成多肽药物结构

- 确证中的应用进展[J]. 中国药房, 2019, 30(20): 2876-2880.
- [49] 王凤亮. 非天然氨基酸在构象锁定多肽合成中的应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2016.
- [50] 赵楠, 程孟春, 吴玉林, 等. 基于超高效液相色谱-高分辨质谱的多肽组学技术用于人参不同部位多肽的差异分析[J]. 色谱, 2019, 37(12): 1305-1313.
- [51] 于志鹏, 薛如阳, 赵文竹, 等. 肽组学在食源性活性肽研究中应用的进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(4): 382-385.
- [52] 姜珊, 董萍萍, 李浩然, 等. 土鳖虫活性肽DP17对高脂血症大鼠的降脂作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5265-5272.
- [53] HARRISON A G, YOUNG A B, BLEIHOLDER C, et al. Scrambling of sequence information in collision-induced dissociation of peptides[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(32): 10364-10365.
- [54] 盛泉虎. 串联质谱蛋白质鉴定方法的研究[D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2004.
- [55] 许睿. 基于深度学习的串联质谱蛋白质鉴定方法研究[D]. 重庆: 重庆邮电大学, 2020.
- [56] SADYGOV R G, COCIORVA D, YATES J R 3rd. Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book[J]. Nat Methods, 2004, 1(3): 195-202.
- [57] 成茜. 基于大规模人类蛋白质组样本的新小肽DE NOVO鉴定策略研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [58] ISLAM M T, MOHAMEDALI A, FERNANDES C S, et al. De novo peptide sequencing: Deep mining of high-resolution mass spectrometry data [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1549: 119-134.
- [59] ALLMER J. Algorithms for the *de novo* sequencing of peptides from tandem mass spectra [J]. Expert Rev Proteomics, 2011, 8(5): 645-657.
- [60] NESVIZHSKI A I, ROOS F F, GROSSMANN J, et al. Dynamic spectrum quality assessment and iterative computational analysis of shotgun proteomic data: Toward more efficient identification of post-translational modifications, sequence polymorphisms, and novel peptides[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(4): 652-670.
- [61] TABB D L, SARAF A, YATES J R 3rd. GutenTag: High-throughput sequence tagging via an empirically derived fragmentation model [J]. Anal Chem, 2003, 75(23): 6415-6421.
- [62] 弋静, 尹竹君, 全云云, 等. 麝香多肽分离纯化及其抗炎作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(12): 2040-2049.
- [63] 华羽彤, 李尹, 董瑞娟, 等. 基于分子模拟技术筛选宽体金钱蛭抗凝活性肽[J]. 中国现代中药, 2023, 25(9): 1940-1948.
- [64] AGYEI D, TSOPMO A, UDENIGWE C C. Bioinformatics and peptidomics approaches to the discovery and analysis of food-derived bioactive peptides[J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(15): 3463-3472.
- [65] FREITAS A C, ANDRADE J C, SILVA F M, et al. Antioxidative peptides: Trends and perspectives for future research [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(36): 4575-4594.
- [66] WU J P, ALUKO R E, NAKAI S. Structural requirements of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(3): 732-738.

(收稿日期: 2023-10-07 编辑: 吴美琪)