

牦牛乳硬质干酪苦味肽 RK7 的抗氧化活性及其机制

杨保军^{1,2}, 梁琪^{1,2*}, 宋雪梅^{1,2}

(¹甘肃农业大学食品科学与工程学院 兰州 730070

²甘肃省功能乳品工程实验室 兰州 730070)

摘要 目的:研究从牦牛乳硬质干酪中鉴定出苦味肽 RK7 的抗氧化活性及其机制。方法:运用生物信息学方法计算和分析 RK7 的理化和生物学特性,采用固相合成技术体外人工合成 RK7 并测定其抗氧化活性。借助分子对接工具,基于长寿酶家族 sirtuins(SIRT1-7)和单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)介导的信号通路,研究 RK7 的抗氧化机制。结果:RK7 的不稳定性指数为 19.84;疏水性为 42.86%;生物活性评分为 0.404;小肠吸收能力(HIA)为 0.9072+;血脑屏障穿透能力(BBB)为 0.9701-;急性口腔毒性为 0.6259;合成纯度为 99.579%;当肽质量浓度在 0.2~1.0 mg/mL 范围内变化时,DPPH 自由基清除率为 12.26%~53.78%,ABTS 自由基清除率为 80.86%~87.86%;RK7 与 NAD⁺降解酶(3DZK)和胞质接头蛋白(2FLU)分别形成 6 个和 5 个氢键,3DZK 的氨基酸残基 Arg140、Asp147 和 2FLU 的氨基酸残基 Ser390、Asp394 是其与 RK7 结合的重要活性位点。RK7 和 GSSH 与 3DZK 和 2FLU 的结合表现出相似的分子机制,分别结合于 3DZK 的 Site 1 区域($X:-11.93, Y:-1.30, Z:0.38, R:10 \text{ \AA}$)和 2FLU 的 Site 2 区域($X:8.33, Y:13.99, Z:20.41, R:9 \text{ \AA}$)。研究结果为从分子水平分析、解释 RK7 的抗氧化性提供科学依据。

关键词 牦牛乳硬质干酪;苦味肽;抗氧化活性;分子对接

文章编号 1009-7848(2022)08-0040-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.005

干酪成熟过程中酪蛋白发生降解,肽是酪蛋白降解后暂存的中间产物。Huma 等^[1]研究发现水牛乳和普通牛乳 Cheddar 干酪水溶性多肽均对结肠癌细胞产生的自由基具有抑制作用。自由基是人体内细胞代谢产生的中间产物,体内过量产生自由基会使细胞内多种物质(DNA、蛋白质和脂质等)发生氧化应激反应,致机体代谢紊乱。预防体内自由基过量产生(即抗氧化)对维持人体健康具有重要意义。

国内外研究表明,对氧化至关重要的信号通路由长寿酶家族 sirtuins(SIRT1-7)和单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)介导^[3]。机体中的组蛋白虽可参与到调节蛋白分子活性、稳定性以及相关激活因子和相关转录因子之中实现抗氧化,但前提是让 SIRT1-7 作为乙酰化酶催化组蛋白发生乙酰化反应^[2]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)具有承载和转移氢原子的作用,是 SIRT1-7 介导的信号通路发生乙酰化不可缺少的辅助因子,NAD⁺

含量与抑制机体氧化反应发生程度成正比,NAD⁺含量的调节可通过控制 NAD⁺合成酶或 NAD⁺降解酶活性来进行^[3]。体内细胞氧化应激反应、细胞以及整个机体能量代谢、细胞自噬降解以及应激耐受等过程同样受 AMPK 介导的信号通路的调控^[4]。调控因子 Keap1 和转录因子 Nrf2 是 AMPK 信号通路下重要抗氧化调控途径 Keap1-Nrf2 中的两个关键性蛋白分子,体内抗氧化应激反应可以被 Nrf2 激活,自然条件下 Nrf2 与 Keap1 的特定区域结合,促进 Nrf2 降解^[5]。生物活性肽的抗氧化作用主要归因于 Keap1-Nrf2 信号通路的激活^[5]。Tonolo 等^[6]研究表明牛乳来源的生物活性肽 KVLVPEK 能够阻碍 Nrf2 与 Keap1 的相互作用,上调相关抗氧化酶的表达。通过提供小分子抗氧化物质阻止 Nrf2 与 Keap1 蛋白结合位点的结合来维持高 Nrf2 水平,可增强机体抗氧化效果。

牦牛乳硬质干酪营养丰富,成熟期长,且原料乳中有较高含量的酪蛋白(约占总蛋白含量的 80%,且以 α -酪蛋白和 β -酪蛋白为主)。宋雪梅等^[7]研究表明 15 °C 成熟 4 个月的牦牛乳硬质干酪中水溶性多肽对 1,1-二苯基-2-三硝基苯(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率

收稿日期:2021-12-19

基金项目:国家自然科学基金项目(31260383,31660468)

作者简介:杨保军(1995—),男,硕士生

通信作者:梁琪 E-mail: Liangqi@gsau.edu.cn

最高(30.20%)。豆佳毓等^[8]研究表明脱脂牦牛乳硬质干酪 4℃成熟 4 个月时水溶性多肽的 DPPH 自由基清除率、超氧阴离子自由基(O₂⁻·)清除率和羟自由基(·OH)清除率分别为 52.39%、63.27%和 49.54%。乳源活性肽主要源自 α_{s1}-酪蛋白,其次为 β-酪蛋白和 α_{s2}-酪蛋白,少部分来自 κ-酪蛋白,一般由 2~20 个氨基酸发生缩合反应形成肽链,且分子质量小于 6 000 u^[9]。宋雪梅等^[10]经葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)色谱和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)从牦牛乳硬质干酪中鉴定出 14 种苦味肽,其中 RPKHPIK(RK7)来源于 α_{s1}-酪蛋白,分子质量为 875.09 u,疏水性平均值(Q)为 7 415.18 J/mol。Timon 等^[11]指出不同凝乳酶干酪中分子质量小于 3 000 u 的多肽都具有抗氧化作用,且主要源自 α_{s1}-酪蛋白。BIOPEP 数据库是目前最全面的生物活性肽数据库^[12],截止 2021 年 4 月共记录 689 种序列已知的抗氧化肽,将 RK7 与该数据库中抗氧化活性已知的肽序列比对后发现:其最高相似度为 0,RK7 极有可能是一种新型天然抗氧化肽。分子对接已被用于寻找能与靶蛋白相互作用的多肽并说明其生物学机制。目前对牦牛乳硬质干酪中苦味肽的抗氧化机制尚无报道。本试验中主要研究体外合成牦牛乳硬质干酪苦味肽 RK7 的抗氧化活性,然后利用分子对接软件研究其在 SIRT1-7 和 AMPK 信号通路介导下的抗氧化机制,为从分子水平分析和解释苦味肽的抗氧化性提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 试验工具和材料

1.1.1 试验工具 Discovery Studio Client v16.1.0 (DS)软件,主要用于蛋白质结构功能研究和药物设计^[13]。

1.1.2 试验材料 本试验以项目组前期从牦牛乳硬质干酪中鉴定出的苦味肽 RPKHPIK (RK7)为研究对象【注:R-精氨酸(Arg),P-脯氨酸(Pro),K-赖氨酸(Lys),H-组氨酸(His),I-异亮氨酸(Ile)】,RK7 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,为后续的研究提供材料和基础。

1.1.3 试剂与设备 无水乙醇,天津市光复科技有限公司;DPPH、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑

啉-6-磺酸(ABTS)、L-氧化型谷胱甘肽(GSSH),上海源叶生物科技有限公司;过硫酸钾(K₂S₂O₈),天津市化学试剂三厂;以上试剂均为分析纯级。酶标仪(VersaMax),上海光谱仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 RK7 分子特性预测 <https://pepcalc.com> 用于计算肽的等电点和净电荷^[14];<https://web.expasy.org/protparam/>用于计算肽的不稳定性指数(不稳定性指数低于 40 预示该肽可能是稳定的,不稳定性指数高于 40 则预示蛋白质或肽可能不稳定)^[14];<https://www.peptide2.com> 用于计算肽的疏水性氨基酸比例^[14];<http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/>用于预测肽的潜在生物学活性^[15];<http://www.innovagen.com/proteomics-tools> 用于预测肽的溶解度^[15];<http://lmd.ecust.edu.cn/admet-sar1/predict/?smiles=RPKHPIK&action=A> 用于计算肽的 ADMET 性质(包括人体肠道吸收能力、血脑屏障穿透能力、急性口腔毒性等)^[15]。

1.2.2 RK7 抗氧化活性测定

1.2.2.1 DPPH 自由基清除活性 参考 Sharma 等^[16]的方法并略作改动。DPPH 自由基清除率公式为:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_2 - A_0}{A_1}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中,A₀——样品对照(蒸馏水与乙醇混匀)的 OD 值;A₁——空白(蒸馏水代替样品)的 OD 值;A₂——待测样液(样品与 DPPH 反应液混匀)的 OD 值。

1.2.2.2 ABTS 自由基清除活性 参考张雪娇等^[17]的方法并略作改动。ABTS 自由基清除率公式为:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A' - A_0}{A_1}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中,A₀——样品对照(蒸馏水与乙醇混匀)的 OD 值;A₁——空白(蒸馏水代替样品)的 OD 值;A'——待测样液(样品与 ABTS⁺·工作液混匀)的 OD 值。

1.2.3 RK7 抗氧化机制研究

1.2.3.1 结构优化 考虑到 RK7 极有可能是一种新型抗氧化肽,为了提供足够的理论依据,抗氧化机制研究中也以 GSSH 作为阳性对照。RK7 和 GSSH 的分子结构式如图 1 所示。在 DS 软件的 Macromolecules 模块中构建肽的三维结构,在

Small molecules 模块、CHARMm 力场下对其进行能量最小化处理,以便后续的分子对接,其它参数

均为默认。

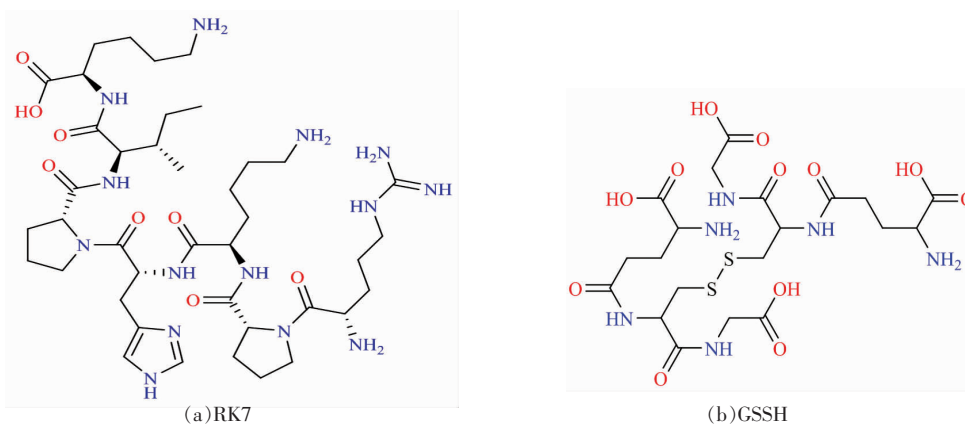


图 1 RK7 和 GSSH 的分子结构

Fig.1 Molecular structure of RK7 and GSSH

1.2.3.2 准备受体蛋白 参考杨小翠^[9]的方法,从 Protein Data Bank 数据库(www.rcsb.org)中下载受体分子 CD38 (NAD⁺降解酶,PDB ID:3DZK)和 Keap1(胞质接头蛋白,PDB ID:2FLU)蛋白晶体的 X 射线衍射三维结构并作进一步处理,具体处理方法参考文献[18]1.2.3 节所述内容。

1.2.3.3 分子对接 DS 软件中的分子对接工具 LibDock 适用于对功能肽快速精确的虚拟筛选^[13],因此本试验采用该方法,详细步骤参考文献[19] 1.2.4 节所述内容。

2 结果分析

2.1 RK7 体外合成与分析

采用固相合成技术合成牦牛乳硬质干酪中的

苦味肽 RK7,经质谱检测和 HPLC 分析可知 RK7 的合成纯度为 99.579%,相对分子质量理论值为:875.063 u,实际值为:875.25 u,分子质量与理论值基本一致,达到了预期标准。预测计算 RK7 的理化特性可知其等电点为 11.57,净电荷为 3.1,不稳定性指数为 19.84(不稳定性指数小于 40,预示该肽可能是稳定的),疏水性为 42.86%,生物活性评分为 0.404,显示出良好的水溶性。口服小分子生物活性肽主要通过肠道吸收且生理屏障限制了大多数化合物,通过预测 RK7 的 ADMET 性质发现其小肠吸收能力(HIA)为 0.9072+(吸收率>30%),血脑屏障穿透能力(BBB)为 0.9701-(透过性<30%),急性口腔毒性为 0.6259(无毒)。因此可将其用于抗氧化活性测定试验。

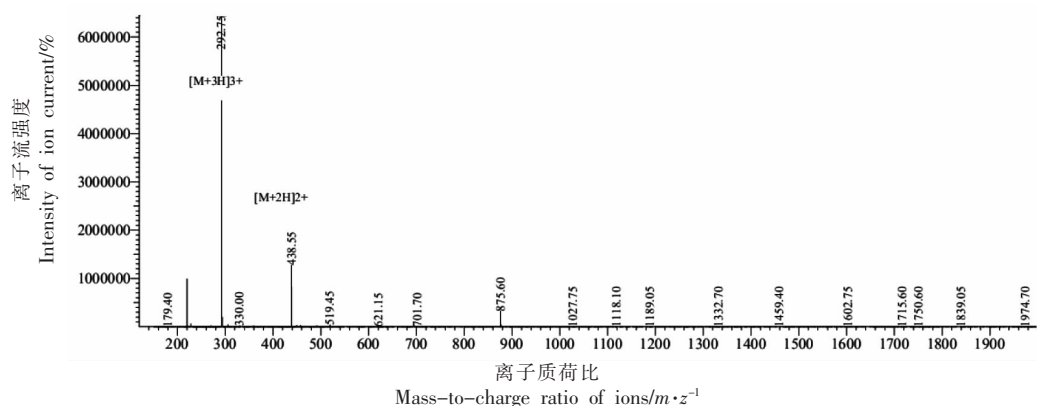


图 2 合成肽 RK7 基峰离子流色谱图

Fig.2 Base peak ion chromatogram of synthetic peptide RK7

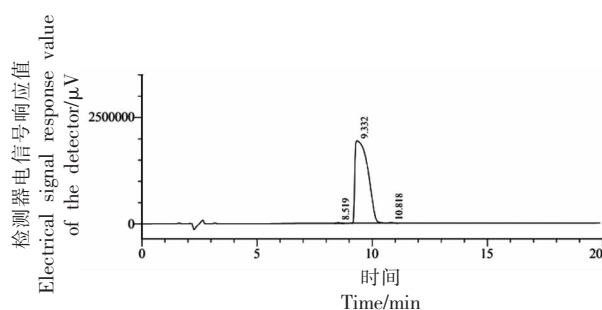


图3 合成肽 RK7 高效液相色谱图

Fig.3 High performance liquid chromatogram for synthetic peptide RK7

表1 RK7 的 HPLC 结果积分表

Table 1 Score table for HPLC results about RK7

峰数	保留时间/min	峰面积/min· μV	峰高/ μV	峰面积比/%	峰高比/%
1	8.519	124 665	13 641	0.166	0.696
2	9.332	74 965 098	1 934 096	99.579	98.699
3	10.818	192 471	11 862	0.256	0.605
总计		75 282 234	1 959 600	100.000	100.000

2.2 RK7 抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除能力 苦味肽 RK7 的 DPPH 自由基清除率曲线为 $y = -40.49x^2 + 99.39x - 5.36$ ($R^2 = 0.9957$), GSSH 的 DPPH 自由基清除率曲线为 $y = -54.06x^2 + 117.95x - 4.05$ ($R^2 = 0.9946$), RK7 和 GSSH 的 DPPH 自由基清除率 IC_{50} 分别为 0.85 mg/mL 和 0.65 mg/mL。肽质量浓

度在 0.2~1.0 mg/mL 范围内变化时, RK7 的 DPPH 自由基清除率范围为 12.26%~53.78%, GSSH 的 DPPH 自由基清除率范围为 16.54%~60.58%。苦味肽 RK7 具有很好的 DPPH 自由基清除能力, 且 DPPH 自由基清除能力随着肽质量浓度的增加而增强。

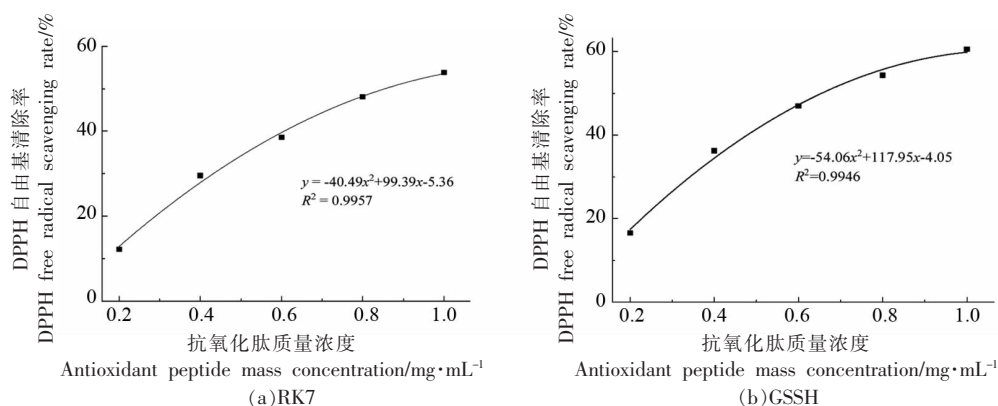


图4 肽质量浓度对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4 The effect of peptide mass concentration on the scavenging rate of DPPH free radicals

2.2.2 ABTS 自由基清除能力 苦味肽 RK7 的 ABTS 自由基清除率曲线为 $y = -6.98x^2 + 16.71x + 78.02$ ($R^2 = 0.9826$), GSSH 的 ABTS 自由基清除率曲线为 $y = -11.76x^2 + 29.96x + 78.81$ ($R^2 = 0.9975$)。肽质量浓度在 0.2~1.0 mg/mL 范围内变

化时, RK7 的 ABTS 自由基清除率范围为 80.86%~87.86%, GSSH 的 ABTS 自由基清除率范围为 84.16%~97.12%, 这说明苦味肽 RK7 具有很强的 ABTS 自由基清除能力, 且 ABTS 自由基清除能力随着肽质量浓度的增加而增强。

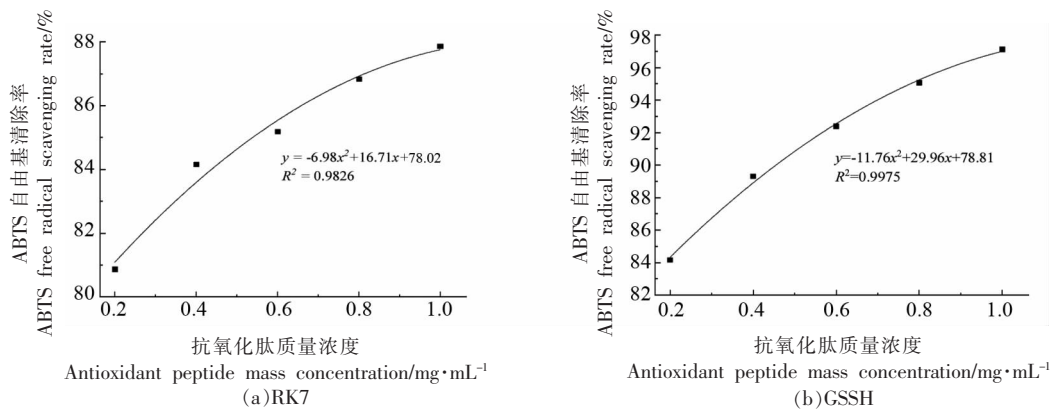


图5 肽质量浓度对 ABTS 自由基清除率的影响

Fig.5 The effect of peptide mass concentration on the scavenging rate of ABTS free radicals

2.3 RK7 抗氧化机制

2.3.1 寻找受体结合区 借助 DS 软件中的 Define and Edit Binding Site 工具寻找受体中的空腔,以此来寻找受体中可能的结合部位。图 6a 为

3DZK 的三维构象,图 6b 为 2FLU 的三维构象,经过处理后系统视图中均自动添加 5 个结合位点 (Site 1~5),即找到了 5 个可能的结合区域。

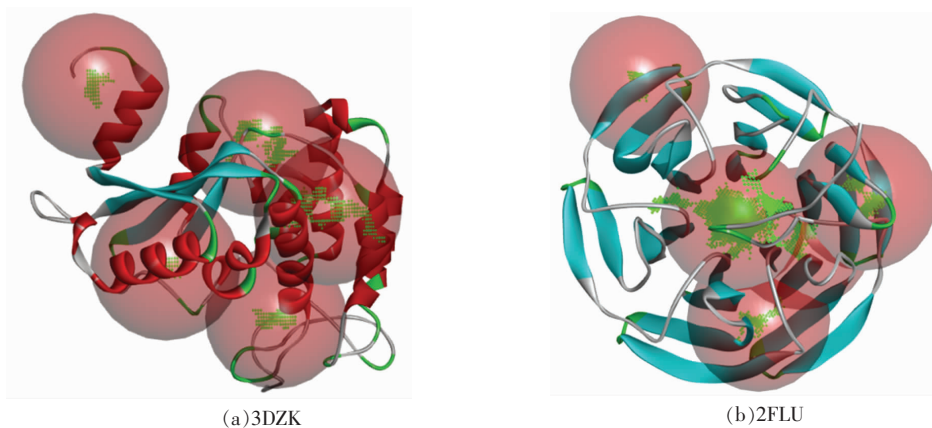


图6 受体结合区域图

Fig.6 Receptor binding region map

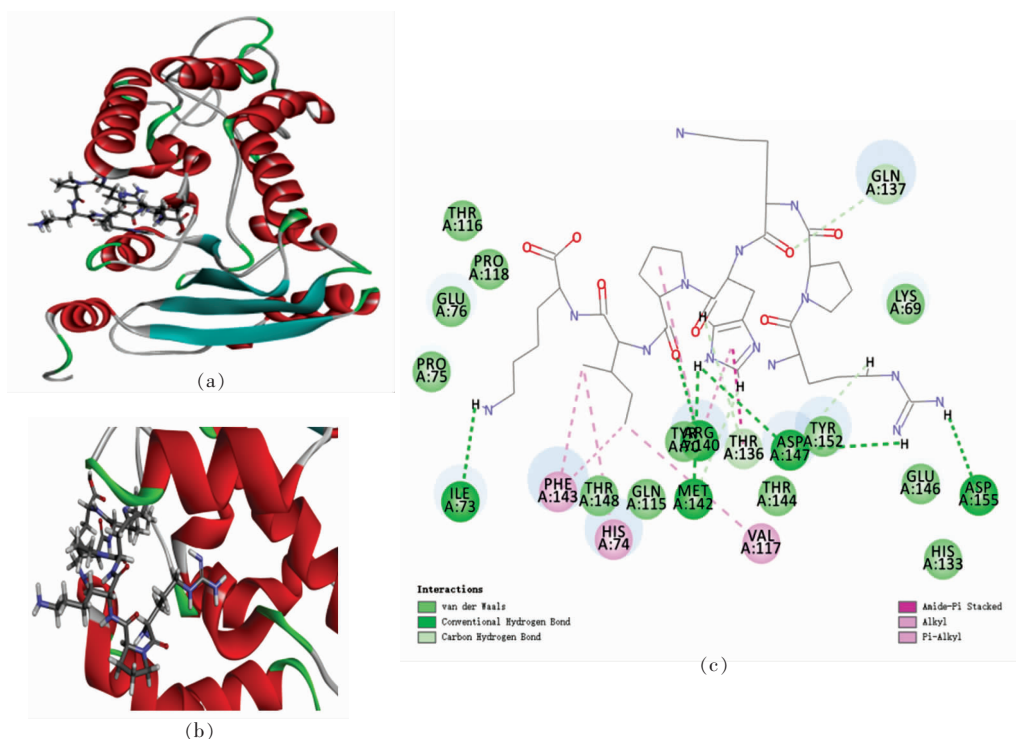
2.3.2 抗氧化肽分子对接的可视化分析

2.3.2.1 抗氧化肽抑制 CD38 活性分析 RK7 与 3DZK 对接后得到 3 个对接构象,其中 Site 1 区域包含 2 个对接构象,Site 5 区域包含 1 个对接构象,最佳对接构象位于 Site 1 区域($X: -11.93, Y: -1.30, Z: 0.38, R: 10 \text{ \AA}$),对接得分为 166.69,结合能为 20.88 kJ/mol,最佳对接构象如图 7 所示。

由图可知,RK7 与 3DZK 的氨基酸残基 Ile73 (5.22 Å)、Arg140(4.14 Å)、Met142(6.93 Å)、Asp147 (4.21 Å/3.92 Å) 和 Asp155(4.47 Å) 之间形成了 6 个不同距离的氢键,其中 RK7 和 Asp147 氨基酸残基之间含有 2 个氢键;RK7 与氨基酸残基

Thr136 (3.72 Å)、Gln137 (3.49 Å)、Met142 (6.95 Å) 和 Asp147(4.03 Å) 形成范德华力或碳氢键,与氨基酸残基 Thr136 (5.02 Å) 形成 Amide-Pi Stacked 相互作用,与氨基酸残基 Val117 (5.09 Å) 和 Arg140(4.11 Å) 形成 Alkyl 相互作用,与氨基酸残基 His74 (6.12 Å)、Arg140(4.98 Å) 和 Phe143 (4.84 Å/5.00 Å) 形成 Pi-Alkyl 相互作用。

GSSH 与 3DZK 对接后得到 34 个对接构象,其中 Site 1 区域包含 10 个对接构象,Site 2 区域包含 10 个对接构象,Site 3 区域包含 10 个对接构象,Site 4 区域包含 1 个对接构象,Site 5 区域包含 3 个对接构象,最佳对接构象位于 Site 1 区



注:(a)为最佳构象整体图;(b)为最佳构象局部图;(c)为最佳构象二维平面图;下同。

图 7 RK7 与 3DZK 之间的相互作用图

Fig.7 Interaction map between RK7 and 3DZK

域 ($X: -11.93, Y: -1.30, Z: 0.38, R: 10 \text{ \AA}$), 对接得分分为 158.35, 结合能为 2.93 kJ/mol, 最佳对接构象如图 8 所示。

由图可知, GSSH 与 3DZK 的氨基酸残基 Tyr70 (6.14 \AA)、Thr116 (3.90 \AA /4.06 \AA)、Arg140 (3.56 \AA) 和 Asp147 (4.62 \AA) 之间形成了 5 个不同

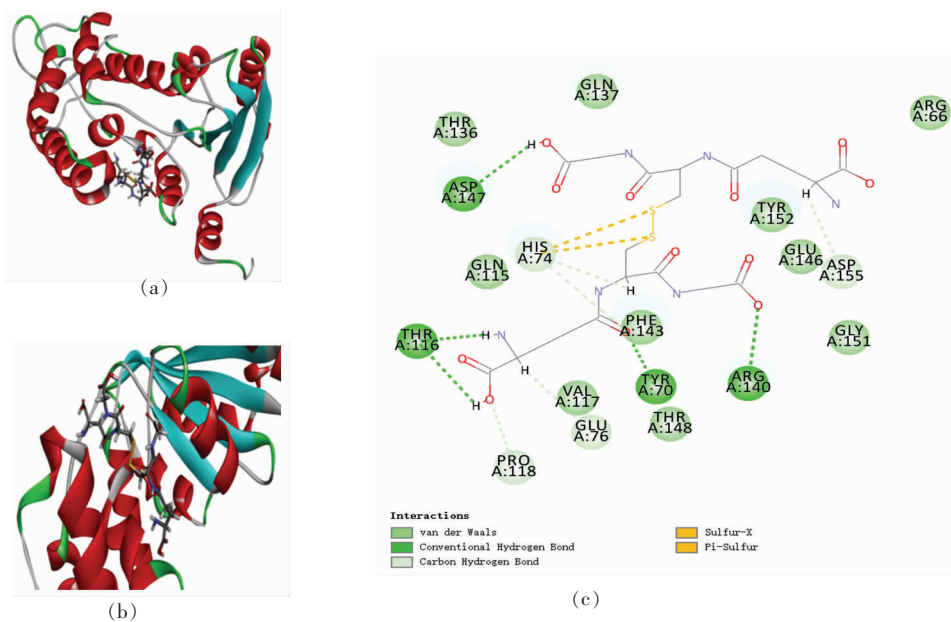
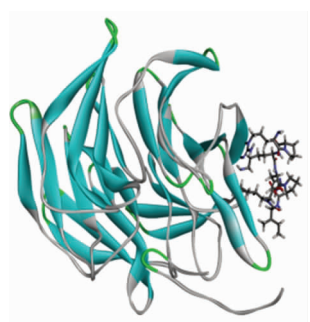


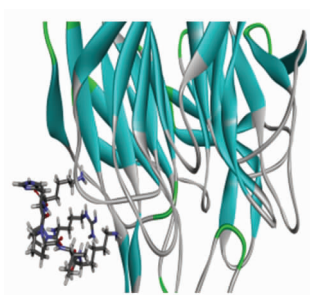
图 8 GSSH 与 3DZK 之间的相互作用图

Fig.8 Interaction map between GSSH and 3DZK

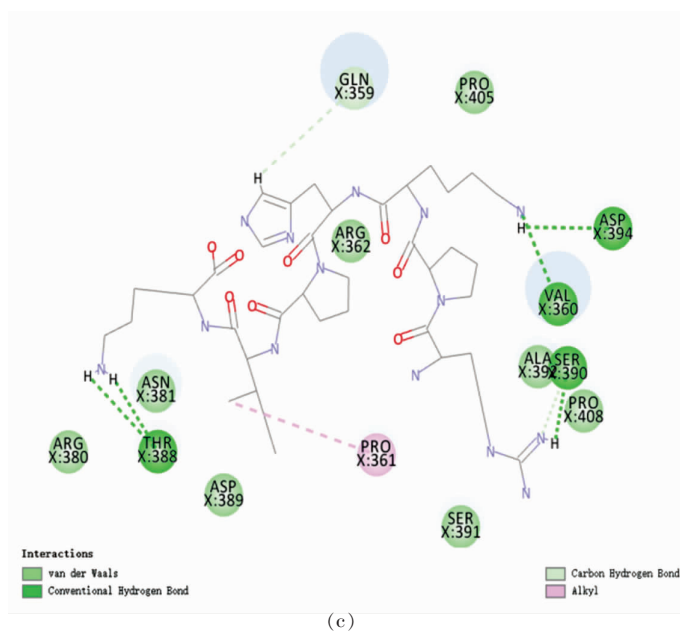
距离的氢键,其中 GSSH 和 Thr116 氨基酸残基之间含有 2 个氢键,与 Arg140 之间形成的氢键最短,结合最紧密;GSSH 与氨基酸残基 His74(4.67 Å/4.77 Å)、Glu76 (5.28 Å)、Pro118 (4.26 Å) 和 Asp155(3.39 Å)形成范德华力或碳氢键,与氨基酸残基 His74(5.73 Å/6.42 Å)形成 Sulfur 相互作用。



(a)



(b)



(c)

图9 RK7 与 2FLU 之间的相互作用图

Fig.9 Interaction map between RK7 and 2FLU

由图可知,RK7 与 2FLU 的氨基酸残基 Val360 (3.80 Å)、Thr388 (4.51 Å/4.12 Å)、Ser390 (3.88 Å) 和 Asp394(4.99 Å)形成 5 个不同距离的氢键,其中 RK7 和 Thr388 氨基酸残基之间含有 2 个氢键,与 Val360 之间形成的氢键最短,结合最紧密;RK7 与氨基酸残基 Gln359 (3.43 Å) 和 Ser390(3.73 Å)形成范德华力或碳氢键,与氨基酸残基 Pro361(4.21 Å)形成 Alkyl 相互作用。

GSSH 与 2FLU 对接后得到 16 个对接构象,其中 Site 2 区域包含 6 个对接构象,Site 5 区域包含 10 个对接构象,最佳对接构象位于 Site 2 区域($X:8.33, Y:13.99, Z:20.41, R:9 \text{ \AA}$),对接得分为 140.90,结合能为 2.93 kJ/mol,最佳对接构象如图 10 所示。

由图可知,GSSH 与 2FLU 的氨基酸残基 Gln359 (4.31 Å)、Arg362 (4.66 Å)、Asn381 (3.28

2.3.2.2 抗氧化肽抑制 Keap1 活性分析 RK7 与 2FLU 对接后得到 1 个对接构象,该构象位于 Site 2 区域($X:8.33, Y:13.99, Z:20.41, R:9 \text{ \AA}$),对接得分为 108.15,结合能为 20.88 kJ/mol,对接构象如图 9 所示。

Å)、Asp389 (5.69 Å)、Leu393 (4.98 Å/5.22 Å)、Asp394(4.30 Å/4.67 Å)和 Cys406(3.57 Å)形成 9 个不同距离的氢键,其中 GSSH 与 Leu393 和 Asp394 氨基酸残基分别形成 2 个氢键,与 Asn381 之间形成的氢键最短,结合最紧密;GSSH 与氨基酸残基 Arg362 (4.66 Å)、Thr388 (3.53 Å)、Ser390 (4.07 Å) 和 Cys406(4.87 Å)形成范德华力或碳氢键。

3 讨论

肽的抗氧化性主要与其组成、结构(氨基酸残基结构)和疏水性有关^[20]。王波^[21]利用 Caco-2 细胞模型研究了肽组分的分子质量大小、电荷性、疏水性对肽在小肠上皮细胞吸收转运以及生物利用度的影响,发现当肽组分分子质量<1 000 u、带有负电荷且是弱疏水性时,它的吸收率和抗氧化性保留率值高,而且生物利用度显著。陈冠群^[22]利用氧

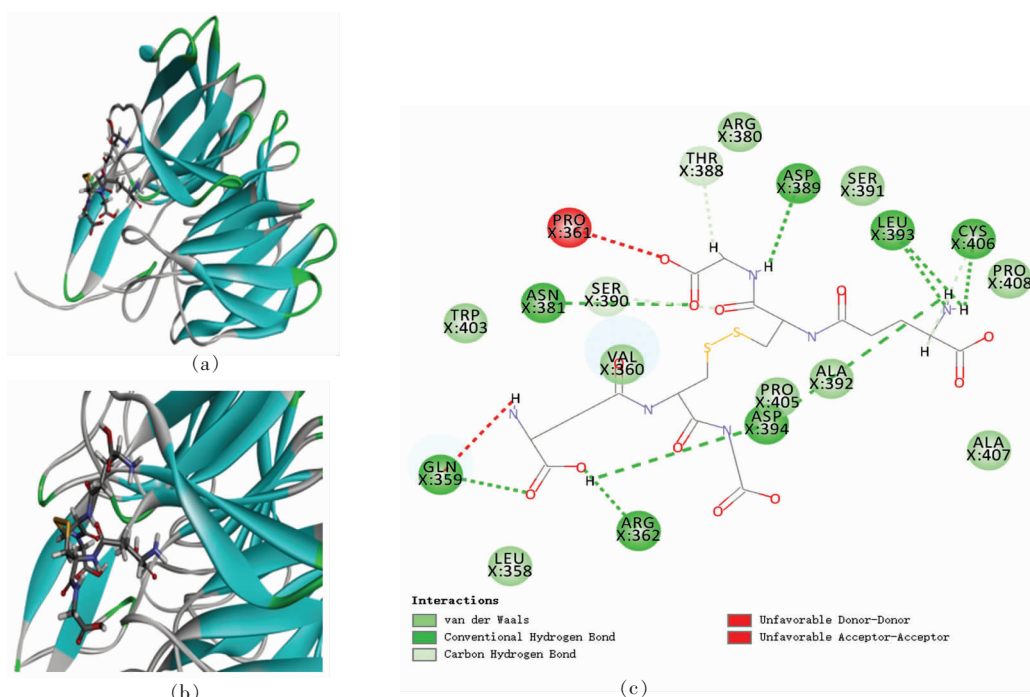


图 10 GSSH 与 2FLU 之间的相互作用图

Fig.10 Interaction map between GSSH and 2FLU

化还原滴定法(微量高锰酸钾法、微量碘量法)和总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒法测定了 22 种氨基酸(包括胱氨酸和羟脯氨酸)的抗氧化活性,结果发现色氨酸(Trp)、甲硫氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、半胱氨酸(Cys)6 种氨基酸具有较强的抗氧化活性。此外,组氨酸(His)的咪唑基可以提供孤对电子给亲电试剂(自由基),从而中和自由基,起到抗氧化作用^[23]。精氨酸(Arg)能有效地提高机体总抗氧化能力,降低体内自由基含量,抑制活性氧(ROS)的生成与积累,增强内源性抗氧化酶【过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等】活性,抑制氧化应激的产生^[24]。本试验 RK7 的分子质量为 875.25 u,疏水性为 42.86%,且表现出较好的生物学特性,RK7 序列中含有精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile),个别氨基酸的抗氧化活性为 RK7 具有抗氧化活性奠定了基础。

本研究以 GSSH 为阳性对照,通过体外抗氧化活性测定试验发现 RK7 具有较好的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力,其中 RK7 的 ABTS 自由

基清除能力与 Tonolo 等^[6]研究的 4 种合成肽 ARHPHLSFM、AVPYPQR、NPYVPR 和 KVLVPVEK 的 ABTS 自由基清除能力基本一致。DPPH 和 ABTS 自由基清除能力的不同趋势可能归因于两种测定方法的不同作用机制和 DPPH、ABTS 自由基特性差异,ABTS 法可用于亲水性和亲脂性抗氧化体系的评价,DPPH 法仅适用于疏水性多肽^[14,25]。有研究表明 ABTS 自由基清除能力与抗氧化活性之间有直接联系,半胱氨酸(Cys)、赖氨酸(Lys)、酪氨酸(Tyr)、甲硫氨酸(Met)、精氨酸(Arg)、苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、缬氨酸(Val)、色氨酸(Trp)具有 ABTS 自由基清除能力^[26]。

某些特定氨基酸有可能成为抗氧化肽的活性位点,包括亲核性的含硫氨基酸半胱氨酸(Cys)和甲硫氨酸(Met),芳香族氨基酸色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe),以及含咪唑基的氨基酸组氨酸(His)等^[27]。分子对接可虚拟模拟分子间的相互作用,本试验通过分子对接研究发现,RK7 能与 3DZK 的氨基酸残基 Met142 形成氢键、碳氢键或范德华力,与 His74 和 Phe143 形成 Pi-Alkyl 相互作用;GSSH 能与 3DZK 的氨基酸残基 Tyr70

形成氢键,与 His74 形成范德华力、碳氢键或 Sulfur 相互作用;GSSH 能与 2FLU 的氨基酸残基 Cys406 形成氢键、碳氢键或范德华力。氢键相互作用对稳定对接络合物和酶催化反应起着最重要的作用^[28]。3DZK 与 RK7 和 GSSH 分别形成 6 个和 5 个氢键,其中 3DZK 的氨基酸残基 Arg140 和 Asp147 是 RK7 和 GSSH 与 3DZK 形成氢键的共同结合位点,RK7 与 GSSH 表现出相同的作用机制,共同结合于 3DZK 的 Site 1 区域;2FLU 与 RK7 和 GSSH 分别形成 5 个和 9 个氢键,其中 2FLU 的氨基酸残基 Asp394 是 RK7 和 GSSH 与 2FLU 形成氢键的共同结合位点,Ser390 是 RK7 和 GSSH 与 2FLU 形成范德华力或碳氢键的共同结合位点,RK7 与 GSSH 表现出相同的作用机制,共同结合于 2FLU 的 Site 2 区域。综上可以确定 RK7 主要通过调节 SIRT1-7 和 AMPK 信号通路发挥抗氧化作用。

4 结论

本试验以牦牛乳硬质干酪苦味肽 RK7 为研究对象,经 BIOPEP 数据库比对发现 RK7 与数据库中抗氧化活性已知肽序列的最高相似度为 0,所以推测 RK7 为新型抗氧化肽;通过生物信息学网址提供的软件计算和预测发现 RK7 表现出较好的生物学特性,经体外人工合成后测定其抗氧化活性,结果显示 RK7 具有较强的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力;而后基于分子对接技术研究 RK7 在 SIRT1-7 和 AMPK 信号通路介导下的抗氧化机制,结果表明 RK7 均能和 3DZK、2FLU 形成稳定的配体-受体复合物构象,RK7 与 GSSH 表现出相似的作用机制,均结合于 3DZK 和 2FLU 的活性空腔内。本试验仅局限于体外模拟,为更全面体现 RK7 的抗氧化活性,下一步可将纯化肽进行动物体内模拟实验,为 RK7 的深入应用提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] HUMA N, RAFIQ S, SAMEEN A, et al. Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Ca-co-2) cells[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2018, 31(2): 287-292.
- [2] KOROGI W, YOSHIZAWA T, KARIM M F, et al. SIRT7 is an important regulator of cartilage homeostasis and osteoarthritis development[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 496(3): 891-897.
- [3] 杨小翠. 纳米微球固定化酶制备鱼皮胶原多肽及其抗氧化活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019. YANG X C. Preparation and antioxidant activity of fish skin collagen peptides by nanospheres-immobilized enzyme[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [4] STEINBERG G R, KEMP B E. AMPK in health and disease[J]. Physiological Reviews, 2009, 89(3): 1025-1078.
- [5] KARTTUNEN M, CHOY W Y, CINO E A. Prediction of binding energy of Keap1 interaction motifs in the Nrf2 antioxidant pathway and design of potential high-affinity peptides [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2018, 122(22): 5851-5859.
- [6] TONOLO F, FOLDA A, CESARO L, et al. Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103696.
- [7] 宋雪梅, 梁琪, 张炎, 等. 成熟温度和时间对牦牛乳硬质干酪中生物活性肽的影响[J]. 中国酿造, 2019, 38(7): 60-64. SONG X M, LIANG Q, ZHANG Y, et al. Effect of ripening temperature and time on bioactive peptides in hard cheeses made by yak milk[J]. China Brewing, 2019, 38(7): 60-64.
- [8] 豆佳毓, 梁琪, 张炎. 脱脂牦牛乳硬质干酪成熟期间水溶性多肽的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10): 80-86. DOU J Y, LIANG Q, ZHANG Y. Antioxidant activity of water-soluble polypeptide during the maturation of skim yak milk hard cheese[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(10): 80-86.
- [9] KARAMI Z, AKBARI-ADERGANI B. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(2): 535-547.
- [10] 宋雪梅, 张炎, 杨敏, 等. 牦牛乳硬质干酪苦味肽的分离与特征鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 160-164.

- SONG X M, ZHANG Y, YANG M, et al. Separation and characterization of bitter peptides from hard cheese made from yak milk[J]. Food Science, 2016, 37(15): 160-164.
- [11] TIMON M L, PARRA V, OTTE J, et al. Identification of radical scavenging peptides from Burgos-type cheese[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 57(1): 359-365.
- [12] FU Y, YOUNG J F, LØKKE M M, et al. Revalorisation of bovine collagen as a potential precursor of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides based on *in silico* and *in vitro* protein digestions[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 24: 196-206.
- [13] 黄勇, 陈晨, 张志毅, 等. Autodock Vina 与 Discovery Studio 在虚拟筛选耐药蛋白抑制剂中的比较[J]. 生物信息学, 2012, 10(4): 248-253.
- HUANG Y, CHEN C, ZHANG Z Y, et al. Comparison of Autodock Vina and Discovery Studio in virtual screening for antibiotic resistance protein inhibitors[J]. China Journal of Bioinformatics, 2012, 10(4): 248-253.
- [14] SOLEYMANZADEH N, MIRDAMADI S, MIRZAEI M, et al. Novel β -casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk fermented by *Leuconostoc lactis* PTCC1899: Identification and molecular docking[J]. International Dairy Journal, 2019, 97: 201-208.
- [15] 于志鹏, 樊玥, 赵文竹, 等. 鸡蛋蛋白 ACE 抑制肽的筛选、鉴定及其作用机制[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 129-135.
- YU Z P, FAN Y, ZHAO W Z, et al. Identification and mechanism of action of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from hen egg proteins[J]. Food Science, 2020, 41(12): 129-135.
- [16] SHARMA O P, BHAT T K. DPPH antioxidant assay revisited[J]. Food Chemistry, 2008, 113(4): 1202-1205.
- [17] 张雪娇, 刘登勇, 王惠民. 羧脯氨酸小肽的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 55-60.
- ZHANG X J, LIU D Y, WANG H M. Antioxidant activity of hydroxyproline peptide *in vitro*[J]. Food Science, 2021, 42(5): 55-60.
- [18] 管骁, 刘静, 苏浙娜, 等. 血管紧张素转化酶抑制二肽抑制 ACE 作用的柔性分子对接[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 1-6.
- GUAN X, LIU J, SU X N, et al. Flexible molecular docking of interaction between angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory dipeptides and ACE[J]. Food Science, 2015, 36(5): 1-6.
- [19] 杨保军, 梁琪, 宋雪梅. 基于计算机虚拟技术研究牦牛乳硬质干酪苦味肽的抑菌活性差异[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(12): 75-87.
- YANG B J, LIANG Q, SONG X M. Study on difference of antibacterial activity of bitter peptide from yak milk hard cheese based on computer virtual technology[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(12): 75-87.
- [20] 杨保军, 梁琪. 干酪源生物活性肽的构效关系研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 288-293.
- YANG B J, LIANG Q. Advances on the structure-activity relationship of bioactive peptides in cheese[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 288-293.
- [21] 王波. 酪蛋白抗氧化肽结构特征对其生物利用度的影响及其跨膜转运机制的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- WANG B. Effect of casein antioxidant peptide structure on the bioavailability and investigation of the mechanism of transepithelial transports[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.
- [22] 陈冠群. 机体总抗氧化力的氨基酸和基因基础以及氧化对抗体活性及其它实验室指标的影响[D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- CHEN G Q. Amino acids and genetic basis of body's total antioxidant activity and effects of oxidation on antibody activity and other laboratory indicators[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2014.
- [23] 芦鑫, 贾聪, 高锦鸿, 等. 体外模拟消化芝麻蛋白产生抗氧化肽的分离纯化与构效研究[J]. 核农学报, 2021, 35(4): 891-901.
- LU X, JIA C, GAO J H, et al. Separation, purification, structure-activity relationship of antioxidant peptides derived from *in vitro* gastrointestinal digestion of sesame protein[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(4): 891-901.
- [24] 梁明才, 杨林. 精氨酸抗氧化作用机制[J]. 生物信息学, 2020, 18(4): 201-205.
- LIANG M C, YANG L. Antioxidant mechanism of arginine[J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2020, 18(4): 201-205.
- [25] AYYASH M, AL-NUAIMI A K, AL-MAHADIN S,

- et al. *In vitro* investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk [J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 588–597.
- [26] XU N J, CHEN G Q, LIU H. Antioxidative categorization of twenty amino acids based on experimental evaluation [J]. *Molecules*, 2017, 22 (12): 2066.
- [27] 张晖, 唐文婷, 王立, 等. 抗氧化肽的构效关系研究进展 [J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32 (7): 673–679.
- ZHANG H, TANG W T, WANG L, et al. Review on structure–activity relationship of antioxidative peptides [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(7): 673–679.
- [28] CHAUDHARY S, VATS I D, CHOPRA M, et al. Effect of varying chain length between P1 and P1' position of tripeptidomimics on activity of angiotensin–converting enzyme inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19 (15): 4364–4366.

Antioxidant Activity and Mechanism of Yak Milk Hard Cheese Bitter Peptide RK7

Yang Baojun^{1,2}, Liang Qi^{1,2*}, Song Xuemei^{1,2}

¹College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070

²Functional Dairy Product Engineering Laboratory of Gansu, Lanzhou 730070)

Abstract Objective: The purpose of this experiment was to study the antioxidant activity and mechanism of the bitter peptide RK7 identified in yak milk hard cheese. Method: The bioinformatics methods were used to calculate and analyze the physicochemical properties and biological properties of RK7. The solid–phase synthesis technology was used to synthesize RK7 *in vitro* and detect its antioxidant activity. The molecular docking tool was used to study the antioxidant mechanism of RK7 based on the signal pathway mediated by longevity enzyme family sirtuins (SIRT1–7) and adenosine monophosphate–activated protein kinase (AMPK). The results showed that the instability index of RK7 was 19.84, the hydrophobicity was 42.86%, the biological activity score was 0.404, human intestinal absorption ability (HIA) was 0.9072+, blood–brain barrier penetration ability (BBB) was 0.9701–, acute oral toxicity was 0.6259, and the synthetic purity was 99.579%. When the peptide mass concentration changes in the range of 0.2–1.0 mg/mL, the scavenging rate of DPPH free radical was 12.26%–53.78%, and the scavenging rate of ABTS free radical was 80.86%–87.86%. RK7 formed 6 and 5 hydrogen bonds with NAD⁺ degrading enzymes (3DZK) and cytoplasmic linker protein (2FLU) respectively. The amino acid residues Arg140 and Asp147 of 3DZK and the amino acid residues Ser390 and Asp394 of 2FLU were important active sites for binding to RK7. The combination of RK7 and GSSH with 3DZK and 2FLU showed similar molecular mechanisms, binding to the Site 1 area of 3DZK ($X: -11.93, Y: -1.30, Z: 0.38, R: 10 \text{ \AA}$) and the Site 2 area of 2FLU ($X: 8.33, Y: 13.99, Z: 20.41, R: 9 \text{ \AA}$), respectively. The above research provided a scientific basis for analyzing and explaining the antioxidant activity of RK7 at the molecular level.

Keywords yak milk hard cheese; bitter peptide; antioxidant activity; molecular docking