

菠菜中促进激肽释放酶(KLK)活性的多肽纯化和鉴定

顾 双, 谢 琳, 凌巧佳, 王向阳*
(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

摘要 目的:激肽释放酶(KLK)是激肽释放酶-激肽系统(KKS)的重要组成部分,在降血压等方面扮演重要角色。前人对食物成分影响 KLK 的研究较少。方法:选择 18 种蔬菜(胡萝卜、大蒜、紫甘蓝、娃娃菜、菠菜、芹菜、韭菜、西兰花、金针菇、苦瓜、黄瓜、山药、生姜、西红柿、南瓜、青椒、马铃薯和香菇),分别用水提取、乙醇提取和胃蛋白酶酶解后提取,测定其对 KLK 活性的影响,从中选出 7 种蔬菜(菠菜、南瓜、生姜、大蒜、西红柿、苦瓜和马铃薯)提取蛋白质,进行胃蛋白酶酶解和体外胃肠道模拟消化试验。选出促进 KLK 活性最强的菠菜多肽,采用葡聚糖凝胶层析和制备型高效液相色谱技术进行分离纯化,二级质谱鉴定多肽的氨基酸序列,通过该多肽与 KLK 进行分子对接,分析其作用机制。结果:18 种蔬菜中有 7 种蔬菜多肽显著促进 KLK 的活性,7 种乙醇提取液显著抑制 KLK 活性。经胃蛋白酶、胰蛋白酶酶解后的菠菜多肽显著增强 KLK 活性,该多肽是 1 条十肽,其氨基酸序列为 His-Asn-Ser-Pro-Gly-Tyr-Tyr-Asp-Gly-Arg。该多肽与 KLK 有两个对接点。N 端促进 KLK 的稳定性,C 端对促进 KLK 活性起主要作用。结论:大蒜、南瓜和马铃薯的酶解液促进 KLK 活性,但其乙醇提取液抑制 KLK 活性,菠菜的 HNSPGYYDGR 多肽显著促进 KLK 活性。

关键词 激肽释放酶;菠菜;多肽;酶活性

文章编号 1009-7848(2025)03-0410-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.03.039

激肽释放酶(KLK)又称血管舒缓素,是一种丝氨酸蛋白酶,也是激肽释放酶-激肽系统(KKS)的主要限速酶,可裂解激肽原释放缓激肽(BK)^[1]。KLK 分为两大类:血浆 KLK(肝细胞表达)和组织 KLK(胰/肾 KLK)^[2]。前者释放九肽 BK,而后者释放十肽赖氨酰 BK,其活性较 BK 强,可被氨基肽酶裂解为 BK^[3]。KKS 活性降低与很多疾病有关,特别是高血压、心血管疾病、炎症等^[4]。KKS 通过 BK 及其衍生物维持体液电解质稳定,调节血压^[5-6]。注射组织型 KLK 可引起快速而短暂的降压效应^[7]。黑人尿中 KLK 较白人低,黑人高血压发病率较高。尿 KLK 水平与原发性高血压患者的血压呈反比,KLK 基因显性表达可降低高血压危险^[8]。KLK 舒张血管,有利于水钠排泄,促进电解质转运,有利降血压^[9-10]。KLK 已成为治疗高血压的常用药物。组织 KLK 还涉及心力衰竭、癌症、皮肤病等。Whalley 等^[11]认为心血管 KKS 活性降低,促进心力衰竭的发展。KLK 参与癌症发展,KLK6 等可作为

癌症的预示指标^[12-13]。KLK 失调与一些炎性皮肤病有关,皮肤 KLK 抑制剂已成为其治疗方法^[14]。KLK 参与细胞信号传导和病毒感染^[15]。KLK 通过释放 BK 而起作用,BK 容易被激肽酶水解而失活,其生物半衰期仅有数秒。激肽酶包括激肽酶 I、激肽酶 II [血管紧张素转换酶 (ACE)]、中性内肽酶(NED)、羧基肽酶及氨基肽酶。BK 的受体分为两种:B1 和 B2。B2 受体介导 KKS 系统中多数功能,BK 的降压作用通常经过 B2 受体介导。B2 受体介导 BK 的心血管效应、电解质代谢及器官保护功能^[16]。正常生物体内缺乏 B1 受体,炎症或组织损伤时,会诱导 B1 受体产生,甚至过度表达,B1 受体也参与调节血压、伤害性感受等^[17]。BK 可降低低盐饮食高血压大鼠的血压,除原发性醛固酮增多症外,其余的高血压都可能与肾脏 KKS 功能低下有关^[18]。

另外,KLK 涉及凝血功能也受到重视。血浆型 KLK 参与凝血和纤溶过程^[19]。丝氨酸蛋白酶 PRCP,激活 PK 转变为 KLK,促使激肽原转变为 BK,随后 KLK 激活 FX II^[20]。BK 与 B2 受体结合,通过 Ca²⁺引起一氧化氮(NO)和前列腺素的释放。BK 还通过 B2 受体增加组织型纤溶酶原激活剂释放^[21]。Merlo 等^[22]报道心肌梗死患者凝血因子 FX

收稿日期: 2024-03-21

基金项目: 浙江省自然科学基金探索公益项目(LTGN24C200003);浙江省教育厅科研项目(Y202250368)

第一作者: 顾双,女,博士,讲师

通信作者: 王向阳 E-mail: wangxiangyang@zjsu.edu.cn

I、高分子激肽原(HMWK)和PK水平显著升高,表明它们与心肌梗死有关。KLK对FIX作用,导致凝血酶的生成^[23]。血浆KLK可促进单链尿激酶和纤溶酶原的活化,发挥抗血栓形成作用^[24]。目前除研究KLK功能作用外,前人也研究检测KLK水平,组织内定位方法等。Végvári等^[25]选择KLK2信号肽NSQVWLGR和HNLFEPEDTGQR建立内源KLK水平检测方法。Bisyris等^[26]设计KLK7特异性磷酸盐活性探针(ABP),原位定量KLK7。

目前,高血压是我国常见的一种亚健康状态^[27]。其临床用药毒副作用大,天然食物抑制ACE降低高血压已有颇多研究^[28-29]。如通过ACE抑制剂(ACEI),减少血管紧张素Ⅱ上升,并减少BK的分解,从而抑制血压^[30]。然而,对食物通过KLK降低血压缺少研究。作者选择常见的蔬菜(胡萝卜、大蒜、紫甘蓝、娃娃菜、菠菜、芹菜、韭菜、西兰花、金针菇、苦瓜、黄瓜、山药、生姜、西红柿、南瓜、青椒、马铃薯和香菇),研究其促进KLK活性,并对其成分分离提纯和鉴定,旨在阐明蔬菜辅助降低高血压的机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

胡萝卜、大蒜、紫甘蓝、娃娃菜、菠菜、芹菜、韭菜、西兰花、金针菇、苦瓜、黄瓜、山药、生姜、西红柿、南瓜、青椒、马铃薯和香菇,购自杭州联华超市。胃蛋白酶、胰蛋白酶,国药试剂公司;N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)、N-苯甲酰-L-精氨酸(BA)、KLK,麦克林试剂公司;胰蛋白酶抑制剂,阿拉丁试剂公司;Sephadex G-15,上海源叶生物有限公司。

1.2 设备与仪器

BSZ-100组分收集器,上海嘉鹏有限公司;BW100恒流泵,创锐泵业公司;1.6 cm×50 cm层析柱,上海联塔仪器公司;YTLG-10A冷冻干燥机,上海叶拓有限公司;R-210旋转蒸发仪,瑞士BUCHI公司;SPD-20A高效液相色谱仪,日本岛津公司;UV-2600紫外分光光度计,日本岛津公司;Waters 2535制备型高效液相、Nano ACQMLTY UPLC液相色谱系统,美国Waters公司;Q-Exactive Plus Nano电喷雾离子源质谱仪,

美国Thermo Fisher公司。

1.3 初次原料处理和对KLK作用

原料清洗后,晾干,切小块,称取20~30 g,加水3倍,匀浆3 min,取30 mL,-80℃冷冻,再真空冷冻干燥。

取冻干粉50 mg 3份。1)水提取:加水配制25 mg/mL溶液,80℃提取10 min,室温冷却,15℃,8 000 r/min,离心20 min,取上清液。2)乙醇提取:加无水乙醇配制25 mg/mL溶液,80℃提取10 min,室温冷却,15℃,8 000 r/min,离心20 min。取上清液,旋蒸去除乙醇,加10%乙醇复溶。3)胃蛋白酶酶解提取:加水配制25 mg/mL溶液,加100 μL 1 mol/L HCL调pH 2~3,加0.5 mg 50 mg/mL胃蛋白酶液,37℃下搅拌,酶解反应2 h,然后100℃15 min灭酶。加100 μL 1 mol/L NaOH。室温冷却,15℃,8 000 r/min,离心20 min,取上清液。

1.4 二次原料处理和对KLK作用

称取5 g原料,加25 mL纯水,匀浆3 min,4℃下,10 000 r/min离心20 min,取上清液。加等体积的90%乙醇,4℃静置过夜,4℃,10 000 r/min离心20 min。取沉淀,用5 mL超纯水溶解。胃蛋白酶酶解处理,离心取得的上清液。

1.5 含水量和蛋白质含量测定

含水量测定:烘干直到质量恒定法测定。蛋白质含量测定:采用考马斯亮蓝法测定^[31]。

1.6 体外胃肠道模拟消化处理^[32]

取上述离心沉淀,50 mL超纯水溶解,调节溶液pH值1~2,加40 mg/mL胃蛋白酶液,37℃酶解2 h,沸水浴灭酶10 min;NaOH调节pH值至8,加9 mL 2 mg/mL胰蛋白酶液(100 mmol/L的NaHCO₃溶解),37℃酶解3 h,沸水浴灭酶10 min,冷却离心取上清液。

1.7 高效液相色谱(HPLC)测定KLK酶活^[33]

取2.5 mL BAEE溶液,加0.2 mL胰蛋白酶抑制剂,混匀,25℃预热10 min,加入预热30 min的KLK酶液0.1 mL,反应5 min,加150 μL 1 mol/L HCL,结束酶促反应。反应液经0.45 μm滤膜过滤。水提、乙醇提取对照分别为等量的纯水、10%乙醇;酶解提取对照为沸水浴处理的0.25 mg/mL胃蛋白酶液。

高效液相色谱条件及方法:色谱柱:Hypersil

ODS2 C18柱;温度:30℃;检测器波长:253 nm;流动相:体积比为15:85的甲醇-超纯水(含有0.1%的三氟乙酸TFA);进样量:20 μ L;流速:1.0 mL/min。

标准曲线:用0.05 mol/L, pH 8.0的Tris-HCL缓冲液配制0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μ g/ μ L的BA标准溶液, 经过HPLC测定, 绘制标准曲线。

酶活:BAEE在25℃条件下每分钟催化生成1 μ mol BA所需酶量(U)。

1.8 菠菜KLK促进肽的纯化和检测^[34]

Sephadex G-15纯化:凝胶经过预处理、装柱。上样与洗脱操作:将菠菜蛋白经过体外消化酶解的冻干粉配制成20 mg/mL的酶溶液, 经0.45 μ m的滤膜过滤。加入到凝胶床。打开恒流泵, 开始洗脱。具体试验条件:Sephadex G-15填料, 内径1.6×直径50 cm层析柱, 2 mL上样量, 超纯水洗脱, 0.6 mL/min流速, 紫外检测器波长为280 nm, 3 min/管收集。收集后, 旋蒸浓缩, 测定其对KLK影响, 收集最优组分, 冻干保存。

制备型液相纯化:将上述冻干粉配制成10 mg/mL溶液, 0.22 μ m滤膜过滤后, 进样制备液相系统。具体试验条件:色谱柱YMC-Pack ODS-AQ, 柱温30℃, 进样量5 mL, 流速3 mL/min, 紫外检测器波长280 nm。流动相A:含0.1%三氟乙酸(TFA)的超纯水, 流动相B:100%的乙腈。洗脱梯度0~30 min, 100%的流动相A 30~50 min, 70%的流动相A, 30%的流动相B 50~70 min, 100%的流动相A。收集各组分, 旋蒸浓缩, 测定其对KLK影响, 选出最佳组分。冻干保存。

HPLC鉴定肽的纯度:取经制备液相色谱纯化的样品, 配制成10 mg/mL溶液, 0.22 μ m滤膜过滤。分析型HPLC测定。HPLC系统SPD-20A, 色谱柱Hypersil ODS2 C18柱, 柱温30℃, 进样量20 μ L, 流速0.8 mL/min, 紫外检测器波长280 nm。流动相A:100%的乙腈;流动相B:含0.1%三氟乙酸(TFA)的超纯水。乙腈和超纯水的体积比为30:70。

KLK促进肽的液质联用分析:取适量样品经C18除盐柱进行除盐。Nano-HPLC-MS/MS分析:将样品经由配备在线纳喷离子源的LC-MS/MS分析。整套系统为串联EASY-nanoLC 1200的Q-

Exactive Plus质谱仪。试验条件:电喷雾电压2 kV, 分析柱Acclaim PepMap C18, 75 μ m×25 cm;柱流量300 nL/min, 柱温40℃, 上样量3 μ L。流动相A相:0.1%甲酸水溶液, B相:含0.1%甲酸的ACN溶液。试验方法:以60 min的梯度分离样品, 梯度从2%的B相起始, 在47 min以非线性梯度升高到35%, 1 min内升高到100%, 维持12 min。质谱仪在数据依赖采集模式下运行, 自动在MS和MS/MS采集间切换。质谱参数设置如下:1)MS:扫描范围(m/z):200~2 000;分辨率70 000;AGC target 3e6;最大注入时间50 ms;2)HCD-MS/MS:分辨率17 500;AGC target 1e5;最大注入时间45 ms;碰撞能量28%;动态排除时间30 s。

1.9 分子对接模拟^[35]

将多肽的氨基酸序列与KLK进行分子对接模拟, 分析立体图和二维平面图来判断多肽序列与KLK的结合能力, 判断多肽哪一端对KLK起主要促进作用。

1.10 数据处理

样品对KLK活性试验重复3次。采用Microsoft Excel 2010处理数据, 采用样品与对照的BA值, 进行单因子之间显著性分析($P<0.05$)。具有显著性的样品在促进百分率计算后表中标注星号。

2 结果与分析

2.1 蔬菜提取液对KLK的影响

在18种蔬菜的水提取液中, 只有生姜显著促进KLK的活性, 促进率为30.59%。乙醇提取液有7种蔬菜显著抑制KLK的活性, 分别是南瓜、芹菜、金针菇、大蒜、紫甘蓝、马铃薯、青椒。只有西兰花乙醇提取液促进KLK的活性, 促进率为26.9%。在18种蔬菜的胃蛋白酶酶解提取液中(初筛采用水提取液胃蛋白酶酶解, 包含水提取成分), 有7种蔬菜显著促进KLK的活性, 分别是菠菜、南瓜、生姜、大蒜、西红柿、苦瓜、马铃薯。其中菠菜的酶解液对KLK的促进率为130.39%。见表1。

2.2 蔬菜酶解稀释液对KLK的影响

次筛酶解提取液的底物是乙醇沉淀的蛋白质(不包含水提取液), 并且其浓度只有初筛时的10%, 可能基于浓度较低, 7种蔬菜胃蛋白酶酶解

表 1 蔬菜提取液对 KLK 活性促进百分率(%)
Table 1 Percentage of vegetable extract promoting
KLK activity (%)

蔬菜	水提取	乙醇提取	酶解提取
胡萝卜	-6.5	13.13	12.43
大蒜	-3.96	-43.44*	52.1*
紫甘蓝	-1.27	-35.17*	4.64
娃娃菜	3.33	-1.78	9.43
菠菜	3.65	1.94	130.39*
芹菜	9.03	-56.08*	12.28
韭菜	10.62	0.97	8.23
西兰花	12.52	26.74*	-19.61
金针菇	6.973	-48.95*	-1.65
苦瓜	10.46	9.40	51.5*
黄瓜	12.36	13.45	8.53
山药	-6.022	-6.0	10.48
生姜	30.59*	2.76	52.54*
西红柿	-7.13	0.49	52.4*
南瓜	2.54	-56.72*	92.66*
青椒	12.84	-20.1*	-6.29
马铃薯	-5.23	-26.9*	50.9*
香菇	13.31	-30.63*	-0.6

注:* 代表具有显著性差异($P<0.05$)。

提取液对 KLK 的促进作用远远弱于初筛时的效果。由于提取液浓度较稀和成分单一(肽类),次筛时重复试验的误差明显变小。南瓜、大蒜、菠菜还是显著促进 KLK 活力,促进百分率分别为 10.52%, 10.45%, 4.02%, 基于蛋白质量的促进 KLK 的比活性分别为 0.30, 0.21, 0.08 U/mg。而基于干物质质

量,菠菜促进 KLK 的比活性(0.82 U/g)优于南瓜(0.50 U/g)和大蒜(0.44 U/g)。见表 2。说明菠菜含水多,干物质少,但是干物质中蛋白比例较高。如果基于干重比较,菠菜的肽类促进 KLK 较好,而基于蛋白质含量,南瓜、大蒜的肽类促进 KLK 的效果更好。

7 种蔬菜经过胃蛋白酶酶解的肽类,再经过体外模拟消化后,菠菜的肽类促进 KLK 活性显著提升,达到 54.75%,说明经过菠菜先经过胃蛋白酶,再经过胰蛋白酶酶解的肽类具有很好的促进 KLK 的作用。而原先促进 KLK 较好的南瓜、大蒜肽类(经胃蛋白酶酶解),被胰蛋白酶进一步分解,不但失去促进 KLK 的作用,南瓜的肽类还转变为抑制 KLK 的活性。胃蛋白酶分解的苦瓜、马铃薯肽类,经过胰蛋白酶酶解后,也从原来的无显著作用,转化为显著促进 KLK 活性,促进率为 13.48% 和 7.8%。如表 3 所示。目前,已有学者报道过菠菜肽类的相关功能研究。Yang 等^[36]从菠菜经胃蛋白酶-胰酶消化物中分离到 4 种多肽 MRWRD, MRW, LRIPVA 和 IAYKPAG,均强烈抑制 ACE。自发性高血压大鼠口服 MRW 和 MRWRD 后具有抗高血压作用。菠菜提取物及芦丁在异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌梗死中有保护心脏作用^[37]。菠菜的水提取物对白化大鼠银屑病斑的防治作用^[38]。但是对菠菜多肽对 KLK 的影响没有报道。鉴于菠菜的肽类促进 KLK 效果显著优于其它蔬菜,进一步对菠菜的肽类进行提纯和鉴定。

表 2 蔬菜水分、蛋白质含量及胃蛋白酶酶解液对 KLK 活性的影响

Table 2 Water content, protein content of vegetables and effects of its enzymatic hydrolysate by pepsin on KLK activity

样品	含水量/%	蛋白含量/ ($\mu\text{g/g}$ FW)	KLK 促进百分 率/%	Δ U/鲜重/ (U/g)	Δ U/干重/ (U/g)	Δ U/蛋白/ (U/mg)
大蒜	69.78	0.72	10.45*	0.15*	0.44*	0.21*
苦瓜	93.38	0.36	0.22	0.00	0.01	0.01
菠菜	92.90	0.70	4.02*	0.06*	0.82*	0.08*
南瓜	76.43	0.51	10.52*	0.15*	0.50*	0.30*
姜	96.00	0.18	0.22	0.00	0.08	0.02
西红柿	97.96	0.21	0.07	0.01	0.05	0.01
马铃薯	72.00	0.57	0.22	0.03	0.02	0.01

注:* 代表具有显著性差异($P<0.05$)。

表 3 蔬菜胃蛋白酶酶解液经体外模拟消化后
对 KLK 活性的影响

Table 3 Effect of vegetable enzymatic hydrolysate
by pepsin on KLK activity after simulated digestion

<i>in vitro</i>		
样品	KLK 促进率/%	$\Delta U/\text{鲜重}/(U/g)$
大蒜	-1.42	-0.02
苦瓜	13.48*	0.19*
菠菜	54.75*	1.32*
南瓜	-9.93*	-0.14*
生姜	4.33	0.07
西红柿	-0.71	-0.01
马铃薯	7.80*	0.11*

注:* 代表具有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 Sephadex G-15 凝胶分离

菠菜经体外模拟消化酶解后得到的肽类经 Sephadex G-15 凝胶分离,在波长 280 nm 下的洗脱曲线见图 1。肽类从 20 min 开始被洗脱下来,出

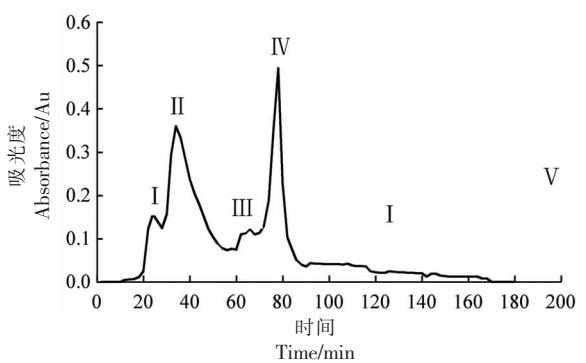


图 1 菠菜体外模拟消化酶解后多肽的
Sephadex G-15 洗脱曲线

Fig.1 *In vitro* simulation of Sephadex G-15 elution
curve of polypeptides after digestion enzymatic hydrolysis
of spinach

现 4 个峰,组分 I、II 分离效果较差,组分 IV 比较单一,含量也比较高,至 90 min 洗脱基本完成。各组对 KLK 的促进率最高的为组分 IV,其促进率达到了 46.85%。见表 4。

表 4 菠菜多肽的 Sephadex G-15 洗脱组分对 KLK 的影响

Table 4 Effect of sephadex G-15 eluting components of spinach polypeptide on KLK

菠菜体外模拟消化酶解产物组分	I	II	III	IV
KLK 促进率/%	5.12	23.24	15.67	46.85

2.4 制备型液相分离 KLK 促进肽

将组分 IV 利用制备型液相进行分离纯化,在

波长 280 nm 检测下的洗脱曲线见图 2。共含有 4 种组分,在 60 min 左右样品被完全洗脱下来。

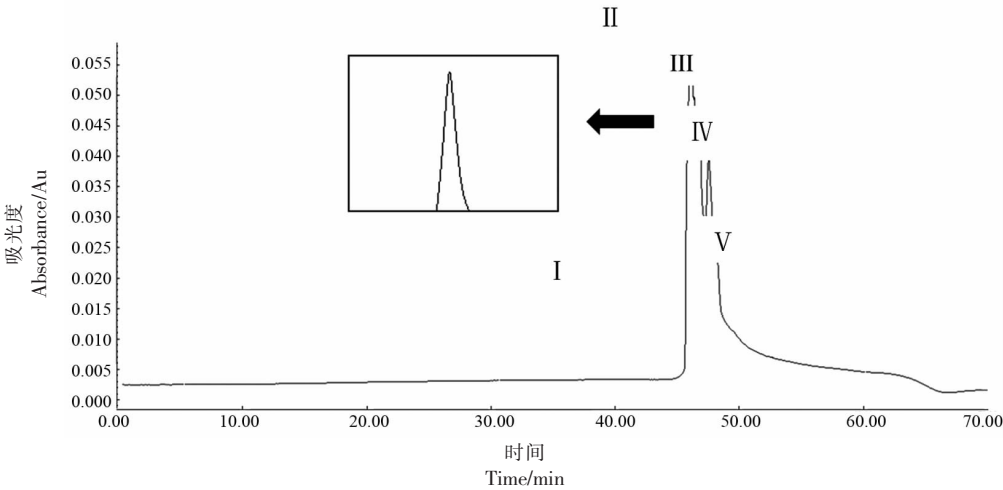


图 2 菠菜多肽的制备型高效液相色谱洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of spinach polypeptide by preparative HPLC

经过制备高效液相分离后的 4 个组分对 KLK 的影响,组分 II 促进率为 100%,随后组分对

KLK 的促进率稍微下降。见表 5。收集组分 II 用于纯度测定和鉴定。

表 5 菠菜多肽经制备型高效液相洗脱组分对 KLK 的影响

Table 5 Effect of components of spinach polypeptide eluted by preparative HPLC on KLK

样品组分	I	II	III	IV
KLK 促进率/%	55.68	100	97.38	95.62

2.5 HPLC 鉴定 KLK 促进肽纯度

经制备型液相洗脱后的组分 II 对 KLK 的促进率达到 100%,收集该组分。经分析型液相分

析,见图 3,组分 II 在 5 min 左右出现单一峰,纯度符合质谱联用分析。

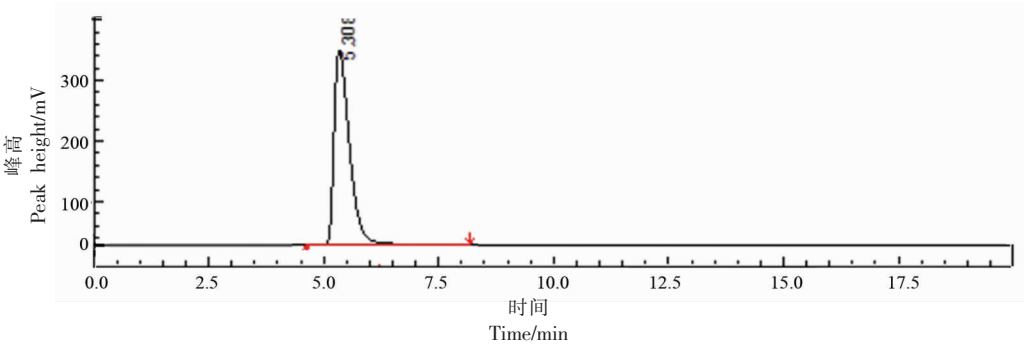


图 3 菠菜多肽经制备型液相洗脱组分 II 的纯度鉴定

Fig.3 Purity identification of spinach polypeptide by preparative HPLC elution component II

2.6 KLK 促进肽的液质联用分析

组分 II 存在碎片离子为 b,y 系列,分别为 b2、b3、b8、y2、y7、y8,其中 b2 代表 His-Asn,即 HN,图中 m/z 为 252.17;b3 代表 His-Asn-Ser,即 HNS,图中 m/z 为 338.12;b8 代表 His-Asn-Ser-Pro-Gly-Tyr-Tyr-Asp,即 HNSPGYYD,图中 m/z 为 935.25;y2 代表 Arg-Gly,即 RG,图中 m/z 为 232.56;

y7 代表 Arg-Gly-Asp-Tyr-Tyr-Gly-Pro,即 RGDYYGP,图中 m/z 为 829.65;y8 代表 Arg-Gly-Asp-Tyr-Tyr-Gly-Pro-Ser,即 RGDYYGPS,图中 m/z 为 916.36。最终确定序列为 His-Asn-Ser-Pro-Gly-Tyr-Tyr-Asp-Gly-Arg。菠菜 KLK 促进肽为一条 10 个氨基酸组成的短链肽。见图 4。

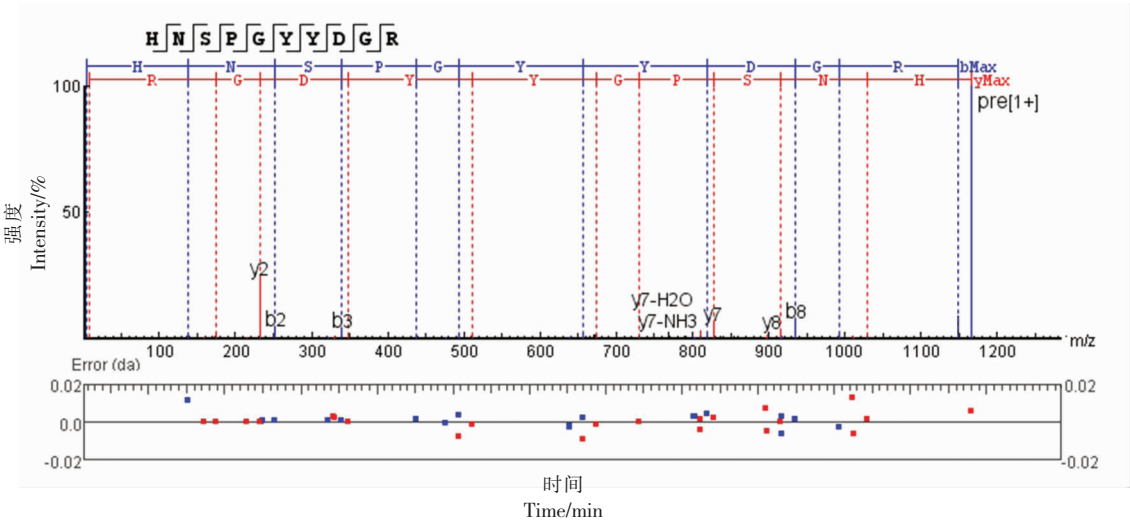


图 4 制备型液相洗脱组分 II 二级质谱图

Fig.4 Coupled with tandem mass spectrometry of preparative HPLC elution component II

2.7 分子对接模拟图

分子对接中，配体通过不同的分子间力与受体相互作用,包括疏水力、范德华力、氢键、 π 键和静电相互作用，其中，氢键相互作用可能是最强的。

HNSPGYYDGR 肽与 KLK 酶有两个对接点。见图 5。该肽的 N 端与 KLK 之间氢键的结合使得

酶-肽复合物的稳定性增加,参与促进 KLK 活性。见图 5a。该肽的 C 端与 KLK 酶对接,见图 5b。从该肽 C 端与 KLK 结合的基团数量和氢键来看,该肽的 C 端度 KLK 活性可能起主要作用。该肽的 N 端与 KLK 酶对接的平面图,显示该肽主要作用与 KLK 的 57 位 His、97 位 Cys、98 位 Glu、99 位 Gly、215 位 Trp 5 个氨基酸形成结构域。见图 6。

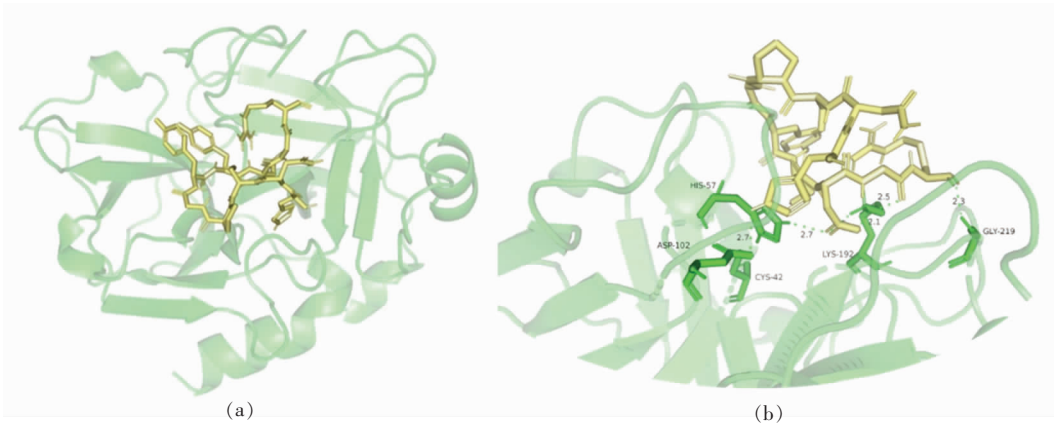


图 5 HNSPGYYDGR 与 KLK 分子对接三维图

Fig.5 3D diagram of HNSPGYYDGR and KLK molecular docking

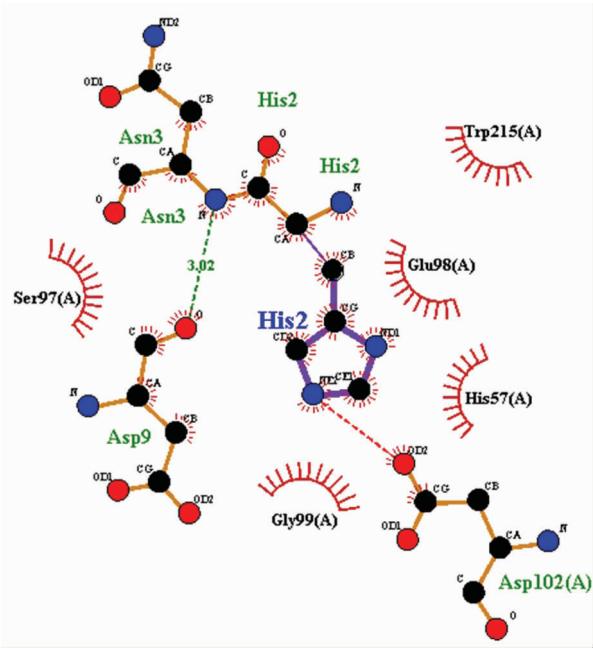


图 6 HNSPGYYDGR 与 KLK 分子对接平面图

Fig.6 Plan view of HNSPGYYDGR and KLK molecular docking

大蒜、西红柿、苦瓜和马铃薯)经胃蛋白酶酶解后，显著促进 KLK 的活性,南瓜、芹菜、金针菇、大蒜、紫甘蓝、马铃薯和青椒的乙醇提取液显著抑制 KLK 活性，生姜的水提取液显著促进 KLK 活性。南瓜、大蒜和菠菜的胃蛋白酶酶解多肽显著促进 KLK 活性，但该 3 种蔬菜继续经过体外模拟消化后，南瓜和大蒜的多肽失去促进 KLK 的活性,而菠菜的多肽经过胰蛋白酶酶切后，显著增强促进 KLK 活性的作用。

菠菜经胃蛋白酶、胰蛋白酶消化的多肽经过纯化后,再经过二级质谱图鉴定,最终鉴定为一条十肽，氨基酸序列为 His-Asn-Ser-Pro-Gly-Tyr-Tyr-Asp-Gly-Arg。通过 HNSPGYYDGR 肽的 N 端与 C 端与 KLK 酶分子对接模拟图，发现该肽与 KLK 酶有两个对接点。N 端促进 KLK 酶的稳定性,C 端对促进 KLK 活性起主要作用。

参 考 文 献

3 结论

18 种蔬菜中,有 7 种蔬菜(菠菜、南瓜、生姜、

[1] KRAUT H, FREY E K, WERLE E. Der Nachweis eines Kreislaufhormon in der Pankreasdruse. (IV.

- Mitteilung über dieses Kreislaufhormon.*)[J]. Biological Chemistry, 1930, 189(1): 97–106.
- [2] YOUSEF G M. microRNAs: A new frontier in kallikrein research[J]. Biological Chemistry, 2008, 389(6): 689–694.
- [3] YOUSEF G M, DIAMANDIS E P. The new human tissue kallikrein gene family: Structure, function, and association to disease[J]. Endocrine Reviews, 2001, 22(2): 184–204.
- [4] YAROVAYA G A, NESHKOVA E A. Kallikrein–kinin system. long history and present (To 90th Anniversary of Discovery of the System)[J]. Bioorg Khim, 2015, 41(3): 275–291.
- [5] KAYASHIMA Y, SMITHIES O, KAKOKI M. The kallikrein–kinin system and oxidative stress[J]. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2012, 21(1): 92–96.
- [6] DIAMANDIS E P, YOUSEF G M, EGELRUD J, et al. New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family[J]. Clinical Chemistry, 2000, 46(11): 1855–1858.
- [7] CHAO J, STALLONE J N, LIANG Y M, et al. Kallistatin is a potent new vasodilator[J]. The Journal Clinical Investigation, 1997, 10(1): 11–17.
- [8] WONG C M, OCONNOR D T, MARTINEZ J A, et al. Diminished renal kallikrein responses to mineralocorticoid stimulation in African Americans: Determinants of an intermediate phenotype for hypertension[J]. American Journal of Hypertension, 2003, 16(4): 281–289.
- [9] 潘玮, 朱鹏立, 余惠珍. 组织激肽释放酶与基质金属蛋白酶抑制剂在血管重构中的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2014, 35(4): 498–503.
- PAN W, ZHU P L, YU H Z. Research progress of tissue kallikrein and matrix metalloproteinase inhibitors in vascular remodeling[J]. Advances in Cardiovascular Diseases, 2014, 35(4): 498–503.
- [10] AZURMENDI P J, ODDO E M, OBIKA L F, et al. Gonadectomy influences blood pressure through the kallikrein–kinin system[J]. Kidney & Blood Pressure Research, 2009, 32(5): 342–348.
- [11] WHALLEY E T, SOLOMON J A, MODAFFERI D M, et al. CP-0127, a novel potent bradykinin antagonist increases survival in rat and rabbit model of endotoxin shock[J]. Agents Actions Supplements, 1992, 38(3): 413–420.
- [12] TALIERI M, ZOMA M, DEVETZI M, et al. Kallikrein–related peptidase 6 (KLK6) gene expression in intracranial tumors[J]. Tumour Biology, 2012, 33(5): 1375–1383.
- [13] 谢珂, 郑卫红, 谭潇. KLKs 促进肿瘤增殖、迁移与侵袭的分子机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(9): 935–941.
- XIE K, ZHENG W H, TAN X. Molecular mechanism of KLKs promoting tumor proliferation, migration and invasion[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 34(9): 935–941.
- [14] PAOLO C T D, DIAMANDIS E P, PRASSAS I. The role of kallikreins in inflammatory skin disorders and their potential as therapeutic targets[J]. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2021, 58(1): 1–16.
- [15] KALINSKA M, MEYER–HOFFERT U, KANTYKA T, et al. Kallikreins – the melting pot of activity and function[J]. Biochimie, 2016, 122: 270–282.
- [16] HAGIWARA M, MURKKAMI H, URA N, et al. Renal protective role of bradykinin B1 receptor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. Hypertension Research, 2004, 27(6): 399–408.
- [17] PESQUERO J B, ARAUJO R C, HEPPESTALL P A, et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(14): 8140–8145.
- [18] SHARMA J N, AMRAH S S, NOOR A R. Suppression of hypertensive responses of captopril and enalapril by kallikrein inhibitors aprotinin in spontaneously hypertensive rats[J]. Pharmacology, 1995, 50(6): 363–369.
- [19] SCHMAIER A H. The plasma kallikrein–kinin system counterbalances the renin–angiotensin system[J]. Journal of Clinical Investigation, 2002, 109(8): 1007–1009.
- [20] JOSEPH K, THOLANIKUNNEL B G, KAPLAN A P. Activation of the bradykinin forming cascade on endothelial cells: A role for heat shock protein 90[J]. International Immunopharmacology, 2002, 2(13/14): 1851–1859.
- [21] PRETORIUS M, ROSENBAUM D, VAUGHAN D E, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition increases human vascular tissue–type plasminogen activator release through endogenous bradykinin[J]. Cir-

- ulation, 2003, 107(4): 579–585.
- [22] MERLO C, WUILLEMIN W A, REDONDO M, et al. Elevated levels of plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen and factor XI in coronary heart disease [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 161 (2): 261–267.
- [23] KEARNEY K J, BUTLER J, POSADA O M, et al. Kallikrein directly interacts with and activates Factor IX, resulting in thrombin generation and fibrin formation independent of Factor XI [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(3): e2014810118.
- [24] HASAN A A, AMENTA S, SCHMAIER A H. Bradykinin and its metabolite, Arg–Pro–Pro–Gly–Phe, are selective inhibitors of α -thrombin-induced platelet activation [J]. *Circulation*, 1996, 94(3): 517–528.
- [25] VÉGVÁRI Á, SJÖDIN K, REZELI M, et al. Quantification of human kallikrein –2 in clinical samples by selected reaction monitoring [J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(10): 4612–4616.
- [26] BISYRIS E, ZINGKOU E, KORDOPATI G G, et al. A novel theranostic activity-based probe targeting kallikrein 7 for the diagnosis and treatment of skin diseases [J]. *Chemical Communications*, 2021, 57 (53): 6507–6510.
- [27] ZHENG C, WANG Z, WANG X, et al. Social determinants status and hypertension: a nationwide cross-sectional study in China [J]. *Journal of Clinical Hypertension*, 2020, 22(11): 2128–2136.
- [28] DANG Y L, ZHOU T Y, HAO L, et al. In vitro and *in vivo* studies on the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity peptides isolated from broccoli protein hydrolysate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(24): 6757–6764.
- [29] XIU Z Q, WU C P, SW A, et al. Identification of post-digestion angiotensin –I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean protein isolate: Their production conditions and in silico molecular docking with ACE [J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128855.
- [30] BRAUNWALD E M D. Cardiovascular medicine at turn of the millennium: Triumphs, concerns and opportunities [J]. *The New England Journal Medicine*, 1997, 337(19): 1360–1369.
- [31] 聂昌宏, 郑欣, 李欣荣, 等. 考马斯亮蓝法检测不同乳中乳清蛋白含量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(5): 1138–1142.
- NIE C H, ZHENG X, LI X R, et al. Determination of whey protein content in different kinds of milk by coomassie brilliant blue method [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(5): 1138–1142.
- [32] GARRETT D A, FAILLA M L, SARAMA R J. Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(10): 4301–4309.
- [33] 凌巧佳. 高效液相测定 KLK 活性及食源性 KLK 促进剂的筛选研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2023.
- LING Q J. Determination of KLK enzyme activity by high performance liquid chromatography and screening of foodborne KLK promoters [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2023.
- [34] GU X, HOU Y K, LI D, et al. Separation, purification, and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from walnut (*Juglans regia* L.) hydrolysate [J]. *International Journal of Food Properties*, 2015, 18(2): 266–276.
- [35] 刘畅. 食源性生物活性肽对 ACE N 和 C 结构域的抑制作用机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- LIU C. Study on the inhibitory mechanism of food-derived bioactive peptides on ACE N and C domains [D]. Changchun: Jilin University, 2021.
- [36] YANG Y J, MARCZAK E D, YOKOO M G, et al. Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-Converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach rubisco [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(17): 4897–4902.
- [37] PANDA V, BHANDARE N, MISTRY K, et al. Cardioprotective potential of *Spinacia oleracea* (Spinach) against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2022, 128(1): 101–110.
- [38] SIDDIQUI D, AFROZ S, KHAN R A. Preventive and therapeutic effects of aqueous extract of *Spinacia oleracea* on Psoriatic patches in albino rats [J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 32(1): 35–42.

Purification and Identification of Kallikrein-promoting Peptides from Spinach

GU Shuang, XIE Lin, LING Qiaojia, WANG Xiangyang*

(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract Objective: Kallikrein (KLK) is an important part of kallikrein kinin system (KKS), which plays an important role in lowering blood pressure. Previous studies on the influence of food ingredients on KLK are limited. Methods: Eighteen vegetables (carrot, garlic, purple cabbage, baby cabbage, spinach, celery, leek, broccoli, enoki mushroom, bitter melon, cucumber, yam, ginger, tomato, pumpkin, green pepper, potato, and shiitake mushroom) were extracted by water, ethanol and pepsin enzymolysis respectively, and their effects on KLK activity were determined. Seven vegetables (spinach, pumpkin, ginger, garlic, tomato, bitter melon, and potato) were selected for protein extraction, followed by pepsin hydrolysis and *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. Spinach-derived peptide with the strongest KLK-enhancing activity were isolated and purified via dextran gel chromatography and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). The amino acid sequence of the peptide was identified using secondary mass spectrometry, and molecular docking was performed to analyze its interaction mechanism with KLK. Result: Among the 18 vegetables, seven exhibited peptides significantly promoted the activity of KLK, while seven ethanol extracts significantly inhibited it from 18 vegetables. The polypeptide of spinach treated with pepsin and trypsin significantly enhanced KLK activity, which was a decapeptide with the amino acid sequence of His-Asn-Ser-Pro-Gly-Tyr-Tyr-Asp-Gly-Arg. The polypeptide has two docking points with KLK. N-terminal promotes the stability of KLK, and C-terminal plays a major role in promoting the activity of KLK. Conclusion: Enzymatic hydrolysates of garlic, pumpkin and potato enhanced KLK activity, whereas their ethanol extracts inhibited it. The spinach-derived peptide HNSPGYYDGR significantly promoted KLK activity.

Keywords kallikrein; spinach; polypeptide; enzyme activity