

青刺果 ACE 抑制肽的分离纯化、结构鉴定及其体外活性评价

张璐¹, 甘雨嫣¹, 钟玉旺¹, 黎依艳¹, 范江平^{1,2}, 王雪峰^{1,2*}

¹ 云南农业大学食品科学技术学院 昆明 650201

² 云南省畜产品加工工程技术研究中心 昆明 650201

摘要 以具有血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性的青刺果蛋白酶解物为研究对象,采用超滤、强阴离子交换层析分离纯化 ACE 抑制肽,液相色谱-串联质谱鉴定其肽序列。采用傅里叶红外光谱、酶反应抑制剂动力学、MTT 试验和分子对接技术解析其二级结构特征、体外活性以及与 ACE 的结合机制。结果表明,分子质量<3 ku 的超滤组分活性较好(IC₅₀=0.380 mg/mL),离子交换层析后以 F-a 组分活性最好(IC₅₀=0.159 mg/mL)。质谱鉴定出 4 条肽序列,通过生物信息学分析确定肽 PGDVF 为潜在的 ACE 抑制肽[IC₅₀=(0.56±0.1) mmol/L]。二级结构分析表明 PGDVF 由 α-螺旋(20.28%)、β-折叠(6.21%)、β-转角(31.55%)和无规则卷曲(41.85%)构成,其抑制模型为非竞争性抑制,肽质量浓度小于 1 mg/mL 时,对 HepG2 细胞无毒性。分子对接显示 PGDVF 可通过氢键、疏水作用与 ACE 紧密结合,从而有效抑制 ACE 活性。研究结果可为青刺果降压肽的开发利用提供参考。

关键词 青刺果; ACE 抑制肽; 液相色谱-串联质谱; 二级结构; 分子对接

文章编号 1009-7848(2024)07-0321-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.032

高血压是目前影响人类健康的主要疾病之一,据统计,全世界超过 10 亿成年人患有高血压^[1]。血管紧张素转化酶(Angiotensin-I converting enzyme, ACE)可有效影响人体血压平衡^[2]。目前,高血压的治疗药物多为合成的 ACE 抑制剂(ACEI)^[3],虽具有较强的降压作用,但高效的降压作用也伴随着很多副作用,比如:咳嗽、味觉障碍和皮疹等^[4],寻找新型 ACE 抑制剂迫在眉睫。有研究表明,天然产物中存在可以抑制 ACE 活性的物质,如一些动植物资源中存在大量具有 ACE 抑制活性的生物活性肽^[5]。相较于传统 ACE 抑制剂,食源性 ACE 抑制肽具有制备材料易得,制备工艺简单,容易消化、吸收和无副作用等优点^[6]。因而,食源性生物活性肽可能是一种更健康的高血压药物的替代品,天然 ACE 抑制肽的制备及其产品研发将具有良好的应用开发前景。

青刺果(*Prinsepia utilis*)又名阿娜斯果(纳西

语)、青刺尖、打油果,属蔷薇科植物,是一种野生油料资源^[7]。青刺果主产于云南省的丽江、大理和迪庆以及四川、贵州和西藏等地^[8]。青刺果提取的油料不仅具有食用性,在化妆品、食品、药品和保健领域的应用也较为广泛^[9]。因其适宜生长在高寒冷凉的西部地区,且西部地区经济发展较为落后,经济作物有限,故大力种植青刺果并开发其潜在的经济价值是助力乡村振兴的方法之一。研究人员发现青刺果中有多种营养物质,有的物质具有防止人体细胞遭受自由基破坏、调节内分泌的能力^[10],如一些酚类物质表现出抗氧化、降血脂、降血糖、减缓衰老、抗肿瘤和增强机体免疫的作用^[11]。高凡丁等^[12]检测了青刺果脱脂后的蛋白质含量高达 24.6%,是一种优质的植物蛋白资源。目前的研究主要针对青刺果油脂,而青刺果脱脂粕常被丢弃或者喂养家禽,造成蛋白质资源的浪费。因此,通过高效酶解青刺果脱脂粕中蛋白质制备 ACE 抑制肽,有利于提高其附加值,促进青刺果蛋白质资源的综合利用。

本研究以前期获得的具有 ACE 抑制活性的青刺果脱脂粕蛋白酶解物为研究对象,通过超滤和强阴离子交换层析对青刺果 ACE 抑制肽进行分离纯化,采用 LC-MS/MS 并结合生物信息学鉴定筛选出潜在的 ACE 抑制肽,解析其二级结构特

收稿日期: 2023-07-18

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(31960462);云南省基础研究计划面上项目(2019FB052);云南省农业联合专项重点项目(202101BD070001-013);云南省青年科技人才托举工程项目

第一作者: 张璐,女,硕士生

通信作者: 王雪峰 E-mail: 364135728@qq.com

征、体外活性以及与 ACE 酶的结合机制,以期为青刺果蛋白质资源综合利用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

青刺果,香格里拉碧罗雪山生物科技公司。

胃蛋白酶(200 U/mL)、胰蛋白酶(200 U/mL)、血管紧张素转化酶(0.25 units/mg)、HHL(马尿酸)、*N*-[3-(2-呋喃基)丙烯酰]-*L*-苯丙氨酰-甘氨酸-甘氨酸(FAPAG),源叶生物科技有限公司;甲醇、乙腈(均为分析纯级),默克股份两合公司;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、Q-琼脂糖凝胶 FF,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机(TGL20M),北京中兴伟业仪器有限公司;旋转蒸发仪(RE-52A1A),上海亚荣生化精密科学仪器厂;真空冷冻干燥机(SCIENTZ-18N),上海比朗仪器制造有限公司;pH计(STARTER3100),奥豪斯仪器(上海)有限公司;酶标仪(Multiskan Go1510),赛默飞世尔仪器有限公司;DBS-100全自动部分收集器,上海泸西分析仪器厂有限公司;高效液相色谱仪(Agilent 1200),天津市通利信达仪器厂;超滤杯(Merck Millipore),美国 Merck Millipore 公司;Q 琼脂糖凝胶柱(s8851),北京索莱宝科技有限公司;Easy-nLC 1200 HPLC 仪、Q Exactive 高分辨质谱仪,美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 青刺果蛋白酶解产物的制备 参照和丽等^[13]的方法提取青刺果脱脂粕蛋白,用 0.3 mol/L NaCl 溶液溶解青刺果脱脂粉(料液比为 1:10),水浴搅拌后抽滤(pH=7.15,30 °C,30 min),水浴蒸发浓缩(40 °C),真空冷冻干燥后得到青刺果脱脂粕蛋白粉。将蛋白粉用水溶解(料液比=1:30),加入胃蛋白酶(pH=7.8)匀浆 5 min,水浴酶解(37 °C,2.5 h),之后加入胰蛋白酶(pH 8.1)匀浆 5 min,再次进行水浴酶解(37 °C,2.5 h),95 °C水浴灭酶 10 min 后,离心 15 min(8 000 r/min),取上清液。

1.3.2 青刺果蛋白酶解物的超滤分离 将酶解后的上清液分别通过不同孔径的超滤膜获得<3 ku、

3~5 ku、5~10 ku 分子质量范围的超滤组分,将不同超滤组分冷冻干燥,分别测定 3 种超滤组分的 ACE 抑制活性。

1.3.3 ACE 抑制率的测定 参照 Wang 等^[14]的方法,使用 pH 值为 8.2,80 mmol/L 的 HEPES 缓冲液配制 1 mmol/L 的 FA-Phe-Gly-Gly(FAPGG)溶液和 0.1 U/mL 的 ACE 溶液和样品溶液,按照表 1 加样,37 °C 预热 5 min,使用酶标仪测定各孔在波长 340 nm 处的吸光值,在 37 °C 条件下避光反应 30 min 后,再次测定波长 340 nm 处的吸光值。ACE 抑制率计算公式如下:

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = (1 - \frac{\Delta A}{\Delta B}) \times 100 \quad (1)$$

式中: ΔA ($\Delta A = A_1 - A_2$)为样品孔溶液在波长 340 nm 处的吸光度减少值; ΔB ($\Delta B = B_1 - B_2$)为空白孔溶液在波长 340 nm 处的吸光度减少值; A_1 和 B_1 分别为样品孔和空白孔预热 5 min 后,在波长 340 nm 处的吸光值; A_2 和 B_2 分别为样品孔和空白孔在 37 °C 反应 30 min 后,于波长 340 nm 处的吸光值。

IC₅₀ 值为当 ACE 抑制率为 50% 时样品的浓度。采用上述方法测定 ACE 抑制浓度,样品设置为 4.00,2.00,1.00,0.50,0.25 mg/mL 共 5 个质量浓度梯度,再次测定 ACE 抑制肽的活性抑制率,绘制标曲后计算得到 ACE 抑制活性的半抑制浓度值。

表 1 ACE 抑制率测定加样表

Table 1 Sample adding table for ACE inhibition rate determination

试剂	A 样品/ μL	B 对照/ μL
血管紧张素转化酶(ACE)	10	10
FAPGG(1 mmol/L)	50	50
血管紧张素转化酶抑制剂	40	0
HEPES 缓冲溶液(80 mmol/L)	0	40

1.3.4 强阴离子交换柱层析纯化青刺果 ACE 抑制肽 参考李亚会等^[15]的方法,用 pH 9.5,浓度 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液将 ACE 活性抑制率较高的超滤组分配制成 5 mg/mL 的样品溶液。使用前需先对强阴离子交换柱进行平衡 12 h,然后准备样品并上样 30 mL,分别以浓度梯度为 0.07,0.018,1 mol/L 的 NaCl 溶液对上样的样品进

行洗脱,设置检测波长为 214 nm,洗脱液体积为 200 mL,测定各个洗脱组分的 ACE 抑制率。

1.3.5 LC-MS/MS 鉴定 将强阴离子交换柱层析分离纯化得到的组分 F-a 冻干后委托上海鹿明生物科技有限公司代为测定其氨基酸序列。本试验的分析仪器为 Easy-nLC 1200 超高效液相串联 Q Exactive 高分辨质谱仪组成的液质联用系统。色谱条件:色谱柱:Trap column,100 μm ×20 mm(RP-C18,thermo Inc.);液相 A 液:0.1%甲酸-水溶液,B 液:0.1%甲酸-乙腈溶液;洗脱速度为 300 nL/min。质谱条件:质谱仪:Q-Exactive(Thermo Scientific);母离子扫描范围^[16]: m/z 350~2 000;质谱扫描方式:信息依赖的采集工作模式下(Data dependent acquisition,DDA),每次全扫描(Full scan)后采集最强的 20 个碎片图谱(MS2 scan);碎裂方式:高能碰撞解离(High energy collision dissociation,HCD);NCE 能量:28;动态排除时间:25 s。MS1 在 m/z 200 时分辨率为 70 000,AGC target 设置为 3×10^6 ,最大注射时间 100 ms,MS2 分辨率设置为 17 500,AGC target 设置为 1×10^5 ,最大注射时间 50 ms。

利用 PeptideRanker (http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/peptideranker.php) 预测中肽的潜在生物活性评分。利用 Innovagen (<http://www.innovagen.com>) 预测肽的溶解度。利用数据库 BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) 和 AHTPDB 网站 (<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/pepsearch.php>) 查询氨基酸数目、相对分子质量、分子式、质荷比、毒性评价、理论等电点、蛋白质疏水性等。将具有 ACE 抑制活性更好的肽序列,委托安徽国平药业有限公司采用固相合成法,合成 ACE 抑制肽(纯度>95%)。

1.3.6 傅里叶红外光谱分析 采用 Guan 等^[17]的方法(KBr 压片法)。将青刺果合成肽粉末和 KBr 按 1:100 的比例放入玛瑙研钵中研磨 15~20 min,压制成 1~2 mm 的薄片,在 14 kg 的压力下保持 1 min 后,迅速放入傅里叶变换红外光谱仪扫描 64 次,波数为 400~4 000 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} ,波数精度为 0.01 cm^{-1} ,最后利用 PeakFit V4.12 软件分析谱图,利用积分面积计算各二级结构的相对含量^[18]。

1.3.7 酶反应抑制剂动力学分析 对合成肽的半抑制浓度进行测定,测定参照 He 等^[19]的方法对青刺果凝乳酶 ACE 抑制动力学进行分析。将 ACE 的底物(FAPGG)配制为 1,0.5,0.25,0.125,0.0625 mmol/L 的浓度。按照 1.3.3 节体外活性测定方法进行反应测定,以酶促反应速率的倒数($1/v$)为纵坐标与底物浓度倒数 ($1/S$) 为横坐标绘制 Lineweaver-Burk 双倒数图,计算米氏常数(K_m)和最大酶促反应速率(V_{\max})。

1.3.8 MTT 试验 参考 Mosmann^[20]的方法,稍作修改。将 HepG2 细胞培养至对数生长期,在其中加入 0.25%的胰蛋白酶消化,消化完毕后向其加入含牛血清的 DMEM 培养基,并使用滴管将 HepG2 细胞搅散为单细胞悬液,之后接种于 96 孔板,此时每孔的密度为 $5\times 10^4/\text{mL}$,培养箱内培养(37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 饱和湿度)培养 12 h,药物处理组分别加入不同质量浓度的肽 PGDFV:1,0.5,0.1,0.01,0.005 mg/mL。另设不加药物组和不接种细胞的空白对照组,每孔加入 20 μL 的 MTT 液(5 mg/mL)孵育 4 h 后,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,溶解结晶,于酶标仪在波长 570 nm 处(振板 10 min)测吸光值,每个浓度设 6 个复孔。按式(2)计算细胞存活率。

细胞存活率(%)=

$$\frac{\text{药物处理 OD}_{570\text{nm}} - \text{试剂空白组 OD}_{570\text{nm}}}{\text{对照组 OD}_{570\text{nm}} - \text{试剂空白组 OD}_{570\text{nm}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.9 分子对接技术 ACE 天然晶体结构(PDB ID:108A)作为受体,确定具有 ACE 抑制活性的肽序列作为配体。下载 ACE 天然晶体结构(PDB ID:108A),使用 Pymol2.3.0 去除其水分子、盐离子等,以制备蛋白质,保留 Zn^{2+} 和 Cl^- 。将其与具有 ACE 抑制活性的肽序列上传至 HPEPDOCK 进行对接,将蛋白结构导入 LIGPLOT(v2.2.4)进行加氢,计算电荷,分配电荷,指定原子类型。对接时,全局搜索的详尽度设为 32,其余参数保持默认设置,输出的打分最高的对接构象被认为是结合构象,最后使用 Pymol 2.3 对结果进行分析。

1.4 数据处理

结果使用 SPSS 26.0 进行分析。采用单因素方差分析和 Bonferron 统计学检验以确定 $P<0.05$ 的显著性差异。数据以 3 次重复的“平均值 \pm 标准

差”表示。

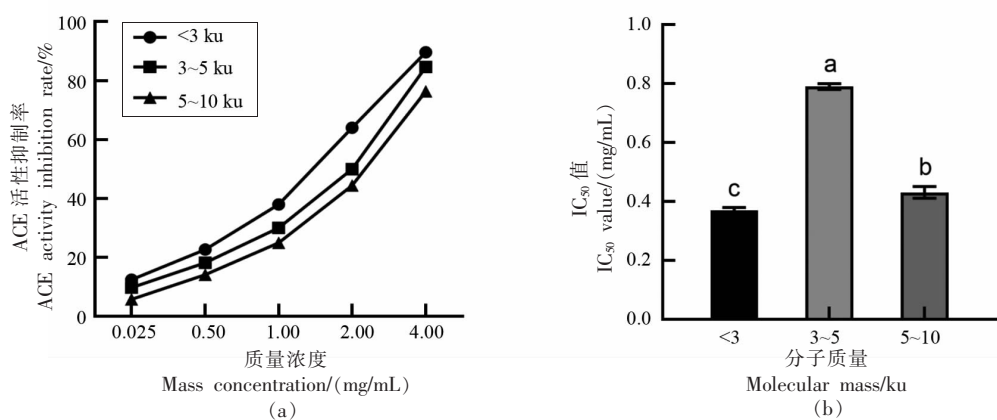
2 结果与分析

2.1 不同超滤组分的 ACE 抑制活性分析

将青刺果酶解液超滤,获得 5~10 ku,3~5 ku 和 <3 ku 分子质量的酶解液组分,将其冷冻干燥后分别配制质量浓度为 4.00,2.00,1.00,0.50,0.25 mg/mL 的肽溶液,测定其 ACE 抑制率和 IC_{50} 值。

由图 1a 可知,青刺果酶解物的分子质量不同,其 ACE 抑制活性也不同,且呈现一定的趋势,

低分子质量组分的 ACE 抑制活性强于高分子质量组分;同一分子质量不同质量浓度的 ACE 抑制活性与浓度呈正相关,<3 ku 的 ACE 活性抑制率最高,此结果与 Lin 等^[21]的研究结果一致。由图 1b 可知,<3 ku 组分的半抑制浓度与其它组分相比明显较低,可能的原因是组分的分子质量低,肽链短,空间位阻小,更易进入 ACE 活性口袋,从而改变 ACE 的催化活性^[22]。因此选择 <3 ku 组分的酶解液进行进一步的分离纯化。



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 1 不同组分的青刺果 ACE 抑制活性(a)和抑制肽的半抑制浓度(b)

Fig.1 ACE inhibitory activity (a) and semi inhibitory concentration of inhibitory peptides (b) of different components in prickly blueberries

2.2 强阴离子交换柱层析分离纯化

进一步纯化确定 <3 ku 酶解物中具有 ACE 抑制活性的组分,采用强阴离子交换柱进一步分离纯化,在检测波长为 214 nm,洗脱体积为 80~220 mL,520~580 mL,650~680 mL,洗脱浓度液浓度分别为 0.07,0.18,1.00 mol/L。

如图 2a 所示,<3 ku 组分的酶解液经强阴离子交换柱层析分离得到 3 个明显的洗脱峰 (F-a, F-b, F-c),收集 3 个目标峰并进行冷冻干燥,测定其 ACE 抑制率和 IC_{50} 值,结果分别如图 2b 和图 2c 所示。3 个目标峰的抑制活性各不相同,3 个目标峰中的 ACE 抑制肽的活性抑制率在 0.25~4.00 mg/mL 范围内都随质量浓度的增加而增强,且洗脱峰 F-a 的 ACE 抑制率最高, IC_{50} 值最小 ($IC_{50} = 0.159$ mg/mL),明显低于同条件下原分子质量 <3 ku 超滤液 ($IC_{50} = 0.380$ mg/mL),说明经过 Q-琼脂

糖凝胶柱层析可获得 ACE 活性抑制率更高的青刺果蛋白肽组分。

2.3 青刺果 ACE 抑制肽的氨基酸序列鉴定

为进一步确定 F-a 组分中具有 ACE 抑制活性的肽段结构,通过 LC-MS/MS 分析 F-a 组分,共鉴定到 4 条肽序列:YVPFI、LPGGLT、TGGLW 和 PGDVF,进一步对其进行生物活性评分,其理化性质结果见表 2。

侯成杰等^[15]的研究表明生物活性评分 ≥ 0.5 时,多肽有更大概率具有生物活性;并且水溶性 ACE 抑制肽有利于肠道吸收。由表 2 的结果可知,4 条多肽的生物活性评分均大于 0.5,说明其都可能具有较好的生物活性。多肽的理化性质在一定程度上影响了其生理活性,研究表明,具有较低分子质量的多肽有更高的可能与 ACE 结合,并且 ACE 抑制肽通常包含 2~20 个氨基酸^[23]。丁龙^[24]研

究发现多肽的 ACE 抑制活性与其疏水性相关,因为 ACE 活性中心是疏水的,具有亲水性的多肽较难与活性中心结合,所以通常具有亲水性的多肽的抑制活性较弱。如表 2 所示,肽 PGDVF 的分子质量小、水溶性好、整体疏水性最佳,证明它在水溶液中较稳定,更易于被肠道快速吸收,因此确定肽 PGDVF 可能是潜在的 ACE 抑制肽(图 3a 为鉴定到肽的二级质谱图)。为进一步明确肽 PGDVF

的 ACE 抑制活性,采用固相合成法合成该肽,其一级质谱及 HPLC 纯度分析如图 3b 和图 3c 所示,并测定其 IC_{50} 值为 0.56 mmol/L, 优于 Vil ladóniga 等^[25]从 α -乳白蛋白鉴定的 ACE 抑制肽 GYDTQAI VQ ($IC_{50} = 1.00$ mmol/L), 略差于 Liu 等^[26]采用酶法从珍珠牡蛎肉蛋白中制备 ACE 抑制肽 HLHT($IC_{50} = 0.46$ mmol/L)。

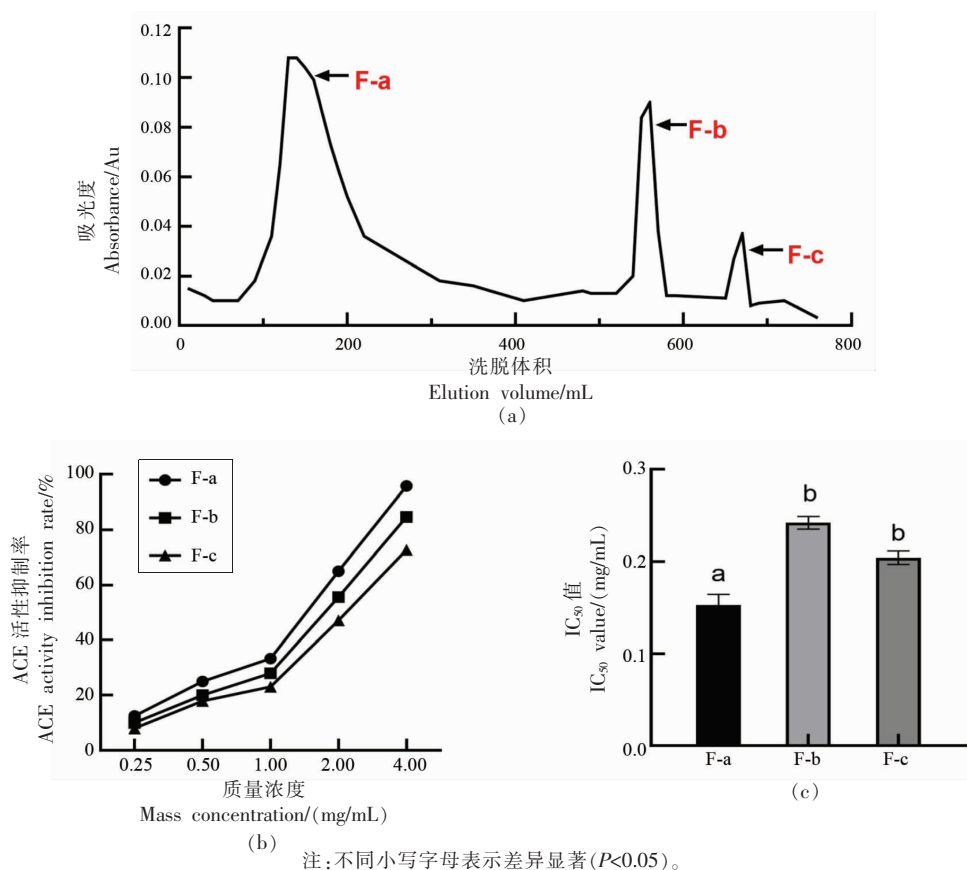


图 2 不同 NaCl 浓度下 QFF 的分离效果(a)及不同吸收峰的青刺果的 ACE 抑制活性(b)和抑制肽的半抑制浓度(c)
Fig.2 Separation efficiency of QFF under different NaCl concentrations (a) and ACE inhibitory activity of prickly blueberry with different absorption peaks (b) and semi inhibitory concentration of inhibitory peptides (c)

表 2 肽的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of peptides

肽序列	生物活性评分	相对分子质量	氨基酸个数	电荷数	水溶性	整体疏水性/(kcal/mol)	质荷比	毒性评价
YVPFI	0.770510	637.3475	5	1	水溶性差	+4.04	638.3553	无毒
LGPGGLT	0.511719	613.3435	7	1	水溶性差	+9.24	614.3514	无毒
TGGLW	0.795743	532.2645	5	1	水溶性差	+7.11	533.2714	无毒
PGDVF	0.757739	533.2485	5	1	水溶性好	+10.66	534.2578	无毒

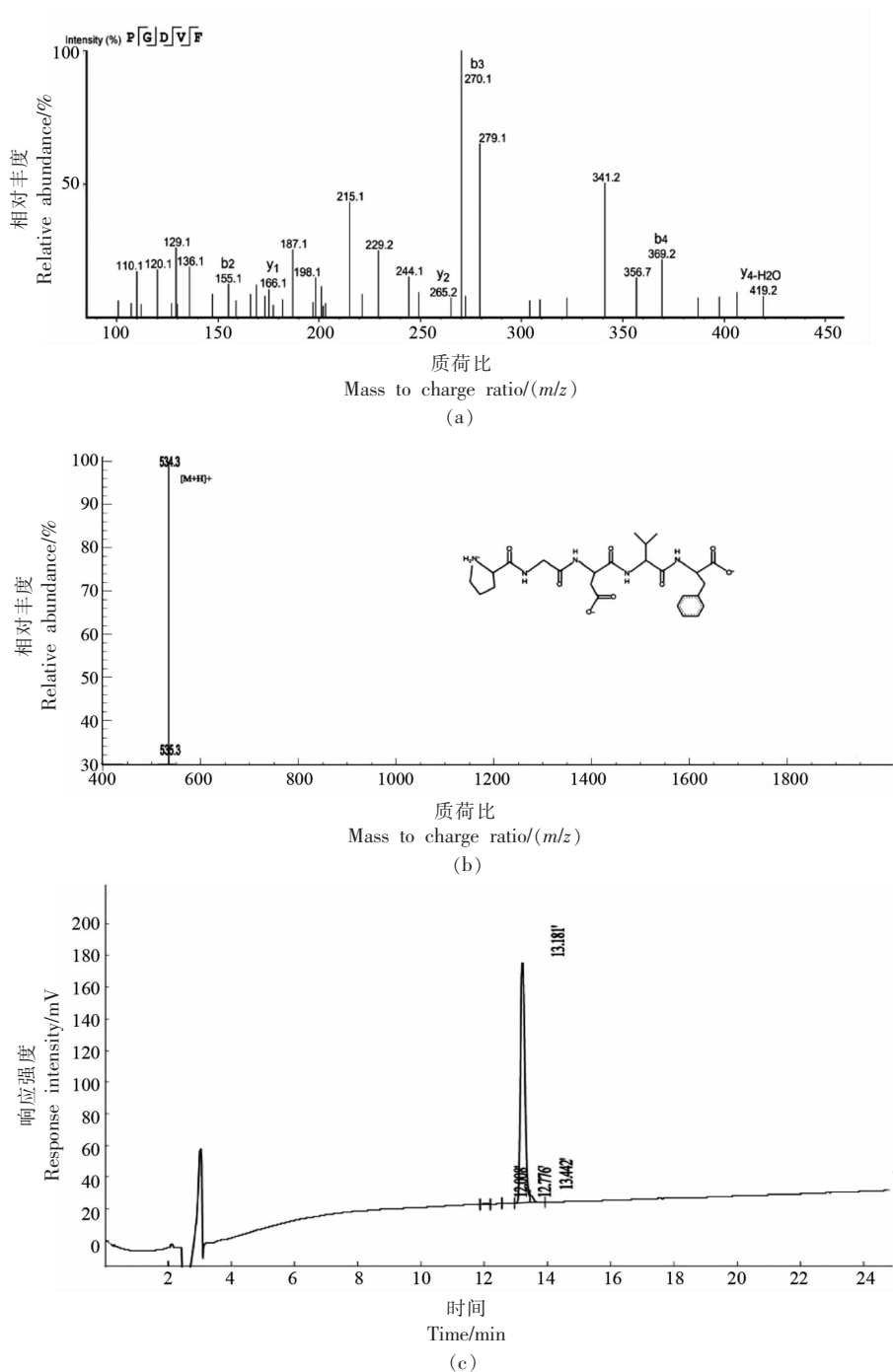


图3 PGDVF的二级质谱图(a)、一级质谱及化学结构式(b)和纯度图(c)

Fig.3 Secondary mass spectrometry (a), primary mass spectrometry, chemical formula (b), and purity map (c) of PGDVF

2.4 肽 PGDVF 的二级结构解析

通过固相合成法,得到了纯度 $\geq 95\%$ 的合成肽 PGDVF,其傅里叶红外光谱结果见图4。

傅里叶红外光谱可以测定多肽在固体状态下的二级结构。多肽在不同波长的吸光值代表了不

同的结构^[27]。吸收波数为 $1\ 600\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$ 的峰为酰胺 I 带(Amide I),其对于蛋白质/肽二级结构的研究最有价值, α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的波数分别为 $1\ 650\sim 1\ 660$, $1\ 600\sim 1\ 640$, $1\ 660\sim 1\ 700$, $1\ 640\sim 1\ 650\text{ cm}^{-1}$ ^[28]。由图5可知,肽

PGDVF 的吸收峰主要在酰胺 I 带范围内,且拟合了 6 个子峰。一般来说,酰胺 I 带吸收峰波数越大,代表蛋白质/肽结构有序度越高^[29],因此肽 PGDVF 二级结构较为有序。通过不同波数对应的吸收峰的面积,确定肽 PGDVF 的二级结构由 α -螺旋(20.28%)、 β -折叠(6.21%)、 β -转角(31.55%)和无规则卷曲(41.85%)组成。

2.5 肽 PGDVF 的抑制动力学分析

通过 Lineweaver-Burk 双倒数图,进一步判断肽 PGDVF 对 ACE 的抑制模式,其结果如图 5 所示。

在 Lineweaver-Burk 双倒数图中,若交点出现在 Y 轴上,其为竞争性抑制;若交点出现在 X 轴上,则为非竞争性抑制^[30]。由图 5 可知,3 条直线相交于 X 轴同一点,表明肽 PGDVF 对 ACE 是非竞争性抑制模式。根据酶的抑制动力学参数 K_m 没有显著的变化, V_m 值随着肽浓度的增加而不断增加的特点,也说明 PGDVF 是一种非竞争性的抑制剂。这与高泽汝^[31]从玉米胚芽中提取的二肽 PW 以及 Lu 等^[32]从茶叶中提取的多肽 III 一样,都属于非竞争性的抑制剂。

2.6 肽 PGDVF 对 HepG2 的抑制作用

MTT 比色法是一种非常经典的检测细胞存活和生长的方法。该方法已广泛用于生物活性因子的活性检测、药物筛选和细胞毒性试验等^[33]。

肽 PGDVF 在不同质量浓度下对 HepG2 细胞活性的影响如图 6 所示,在质量浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1 mg/mL 的区间内,HepG2 细胞的存活率都在 90% 以上,进一步说明肽 PGDVF 在质量浓度 <1 mg/mL 时,对 HepG2 细胞的生长均无明显影响,即合成肽 PGDVF 在质量浓度 <1 mg/mL 时,对细胞的生长无毒性作用。

2.7 基于分子对接解析肽 PGDVF 与 ACE 潜在的结合机制

为进一步确定 PGDVF 的 ACE 抑制活性,在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 ACE 天然晶体结构 (PDB ID: 108A) 文件,将其与氨基酸序列上传至 HPEPDOCK 进行对接。

PGDVF 与 ACE 蛋白的对接结果如图 7 所示。据 Santiago 等^[34]的报道可知,对接结果中的打分值的绝对值越大,提示配体和受体结合的能力

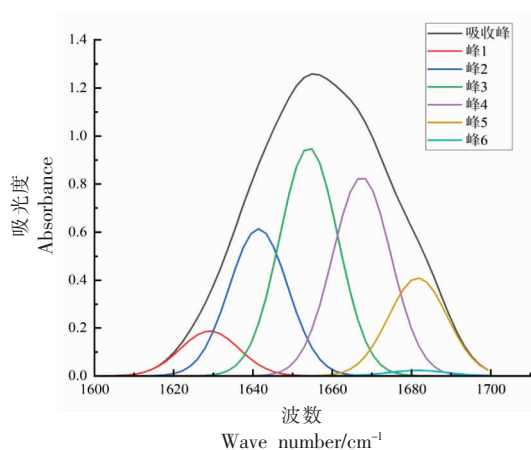


图 4 PGDVF 的傅里叶红外光谱图

Fig.4 Fourier infrared spectra of PGDVF

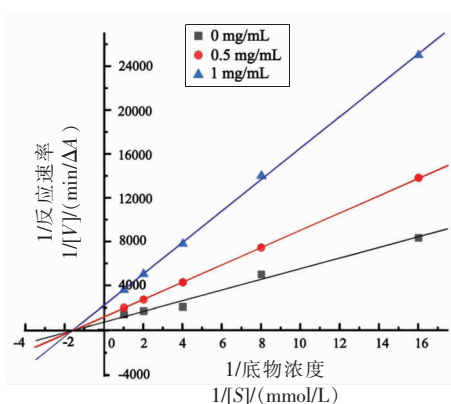
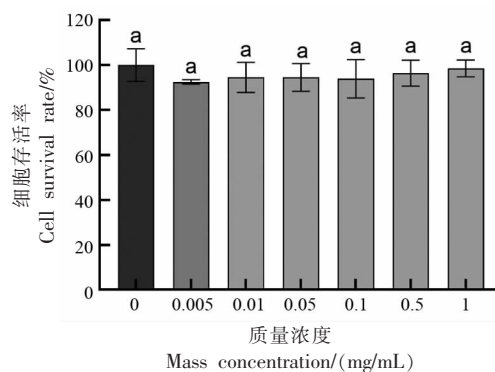


图 5 肽 PGDVF 对 ACE 的 Lineweaver-Burk 图

Fig.5 Lineweaver Burk plot of peptide PGDVF on ACE



注:相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。

图 6 PGDVF 的 MTT 试验结果

Fig.6 MTT experiment results of PGDVF

越强,这些化合物可能具有更强的抑制潜力。PGDVF 与 ACE 蛋白结构的对接打分为-165.711,其绝对值均大于何海艳等^[35]从南瓜籽中发现的肽

LLPGF(-112.99)和肽 WLP(-80.00)。进一步说明肽 PGDVF 与 ACE 蛋白结构之间具有较好的相互作用。先前的研究表明,氢键相互作用在稳定对接复合体和酶催化反应中起着最重要的作用^[27]。PGDVF 与 ACE 的结合中,可与 ACE 的氨基酸 Asn66(A)、Tyr360(A)形成 2 条氢键,氢键的长度分别为 3.86 Å 和 3.53 Å。除此之外,PGDVF 与 ACE 的氨基酸 Val119(A)、Thr92(A)、Tyr51(A)、Trp59(A)、Trp357(A)、Asp358(A)、Ala63(A)、Tyr62(A)、Ile88(A)又形成了 9 种疏水相互作用。

从氢键的数量和键长以及疏水作用的结果可以看出,肽 PGDVF 与 ACE 相互作用明显,可有效抑制 ACE 活性。此外,PGDVF 的结合模式同田文慧^[30]的结论一样,该肽段也没有与 ACE 活性位点中的关键氨基酸残基相互作用,然而仍然表现出良好的抑制活性,再次表明该肽与 ACE 之间的相互作用是非竞争性的,这与肽 PGDVF 酶反应抑制动力学结果一致。因此,肽 PGDVF 与 ACE 亲和力高,结合紧密,通过氢键和疏水作用形成了稳定的络合物,有望成为一种新型有效的 ACE 抑制肽。

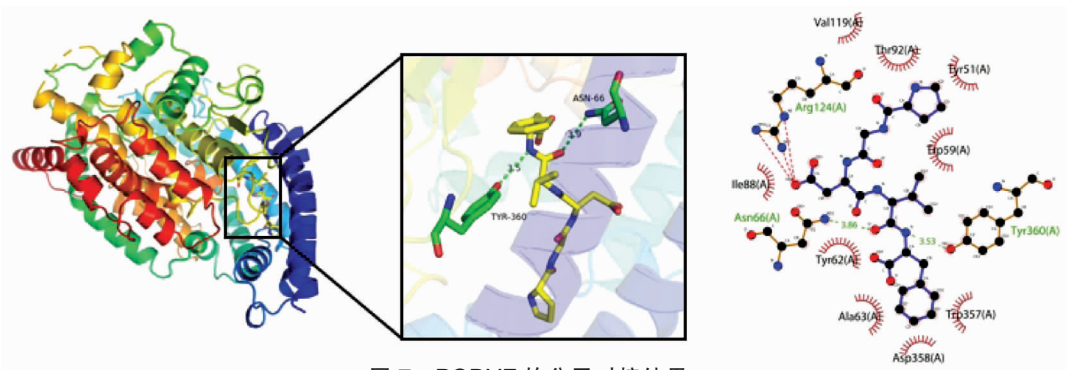


图 7 PGDVF 的分子对接结果

Fig.7 Molecular docking results of PGDVF

3 结论

本试验从青刺果蛋白酶解物中分离鉴定到 4 条肽序列,分别为 YVPFI、LPGGGLT、TGGLW、PGDVF,其中肽 PGDVF 具有更好的水溶性和整体疏水性,其 ACE 抑制的 IC_{50} 值为 0.56 mmol/L。进一步分析肽 PGDVF 二级结构由 α -螺旋(20.28%)、 β -折叠(6.21%)、 β -转角(31.55%)和无规则卷曲(41.85%)组成,其抑制类型为非竞争性,在肽质量浓度 <1 mg/mL 时,对 HepG2 细胞无毒性作用;分子对接显示该肽可与 ACE 通过氢键和疏水作用紧密结合,从而有效抑制其 ACE 活性。该研究为青刺果降压肽产品的开发提供理论依据,进一步提升其蛋白资源利用率。

参 考 文 献

[1] DEOLIVEIRA M R, SILVA T J, BARROS E, et al. Anti-hypertensive peptides derived from caseins: Mechanism of physiological action, production bio-

processes, and challenges for food applications [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2018, 185(4): 884-908.

[2] QU W J, MA H L, ZHONG L P, et al. Preparation and antihypertensive activity of peptides from *Porphyra yezoensis* [J]. Food Chemistry, 2010, 123(1): 14-20.

[3] 米辰洋, 陈鑫, 宁恒立, 等. 海洋来源的降血压肽研究进展 [J]. 精细与专用化学品, 2022, 30(8): 1-5. MI C Y, CHEN X, NING H L, et al. Progress of antihypertensive peptides from marine [J]. Fine and Specialized Chemicals, 2022, 30(8): 1-5.

[4] KO S, KANG C M, KANG N, et al. Effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition and nitric oxide (NO) production of 6,6'-bieckol, a marine algal polyphenol and its anti-hypertensive effect in spontaneously hypertensive rats [J]. Process Biochemistry, 2017, 58: 326-332.

[5] 侯成杰, 聂彩清, 王彦茜, 等. α -乳白蛋白源 ACE 抑制肽快速筛选及验证 [J]. 食品科学, 2021, 42(24): 100-107.

HOU C J, NIE C Q, WANG Y Q, et al. Screen-

- ing and verification of a-lactalbumin-derived ACE inhibitory peptides[J]. Food science, 2021, 42(24): 100-107.
- [6] 沈嘉森, 苏永昌, 林河通, 等. ACE 抑制肽的制备、构效关系及活性评价研究进展[J]. 渔业研究, 2022, 44(1): 100-108.
- SHEN J S, SU Y C, LIN H T, et al. Research progress on preparation, purification and structure activity relationship of ACE inhibitory peptide[J]. Fisheries Research, 2022, 44(1): 100-108.
- [7] 海潇平, 石峰, 李思敏, 等. 响应面优化水酶法提取青刺果中的抗氧化活性物质及其成分研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(1): 60-66.
- HAI X P, SHI F, LI S M, et al. Study on the extraction of antioxidative active substances and their components from *Prinsepia utilis* royle by response surface optimization and aqueous enzymatic method[J]. Chinese Seasoning, 2022, 47(1): 60-66.
- [8] 杜萍, 单云, 孙卉, 等. 丽江产野生青刺果油营养成分分析[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 217-220.
- DU P, SHAN Y, SUN H, et al. Nutritional composition analysis of the essential oil of wild *Prinsepia utilis* royle seed kernel from Lijiang[J]. Food Science, 2011, 32(20): 217-220.
- [9] 和建平, 李燕, 王宇萍, 等. 丽江木本油料青刺果资源调查[J]. 农学学报, 2020, 10(3): 55-63.
- HE J P, LI Y, WANG Y P, et al. Germplasm resources of *Prinsepia utilis* royle in Lijiang[J]. Journal of Agronomy, 2020, 10(3): 55-63.
- [10] 张瑞琳. 抗氧化青刺果果实蛋白应用生物化学作用特性与青刺果油制品的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- ZHANG R L. Study on biochemical properties of antioxidant *Prinsepia utilis* royle fruit proteins and research the oil of *Prinsepia utilis* royle[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [11] 刘招娣, 刘祥义, 张水滔, 等. 青刺果总黄酮超声波辅助提取及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(1): 20-24.
- LIU Z D, LIU X Y, ZHANG S T, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Prinsepia utilis* royle[J]. Food Research and Development, 2018, 39(1): 20-24.
- [12] 高凡丁, 张成庭, 蔡圣宝. 青刺果种子和油粕中的营养成分对比及酚类物质组成和抗氧化活性分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(2): 151-158.
- GAO F D, ZHANG C T, CAI S B. Comparative analysis of multiple nutrients, phenolic compounds and antioxidant activities of the seeds and pomace of *Prinsepia utilis* royle[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(2): 151-158.
- [13] 和丽, 熊海涛, 王雪峰, 等. 响应面试验优化复合酶法制备青刺果抗菌肽的工艺研究[J]. 中国油脂, 2021, 46(6): 33-37.
- HE L, XIONG H T, WANG X F, et al. Optimization of preparation of antimicrobial peptides from *Prinsepia utilis* royle by compound enzymes using response surface methodology[J]. Chinese Oil and Fat, 2021, 46(6): 33-37.
- [14] WANG F F, ZHOU B. Investigation of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory tri-peptides: A combination of 3D-QSAR and molecular docking simulations[J]. RSC Advances, 2020, 10(59): 35811-35819.
- [15] 李亚会, 李积华, 吉宏武, 等. 远东拟沙丁鱼抗氧化肽的分离纯化及结构解析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 229-238.
- LI Y H, LI J H, JI H W, et al. Isolation, purification and structural analysis of antioxidant peptides from *Sardinops sagax*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 229-238.
- [16] 赵丽丽. 子痫前期蛋白质组和糖蛋白组的整合分析及初步功能研究[D]. 西安: 西北大学, 2021.
- ZHAO L L. Integrated proteomic and glycoproteomic profiling of preeclampsia and its preliminary functional study[D]. Xi'an: Northwest University, 2021.
- [17] GUAN A Y, MEI K L, LV M C, et al. The effect of electron beam irradiation on IgG binding capacity and conformation of tropomyosin in shrimp[J]. Food Chemistry, 2018, 264: 250-254.
- [18] ZHOU X X, CHEN T, LIN H H, et al. Physicochemical properties and microstructure of surimi treated with egg white modified by tea polyphenols[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 90: 82-89.
- [19] HE R, ALUKO R E, JU X R, et al. Evaluating molecular mechanism of hypotensive peptides interactions with renin and angiotensin converting enzyme[J]. PloS One, 2014, 9(3): e91051.
- [20] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular

- growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55–63.
- [21] LIN K, ZHANG L W, HAN X, et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 32: 266–277.
- [22] FU W Q, CHEN C J, ZENG H L, et al. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from *Trichiurus lepturus* myosin: Molecular docking and surface plasmon resonance study[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 110: 54–63.
- [23] 王晓丹, 薛璐, 胡志和, 等. ACE抑制肽构效关系研究进展[J]. *食品科学*, 2017, 38(5): 305–310.
- WANG X D, XUE L, HU Z H, et al. Progress in research on structure-activity relationship of ACE inhibitory peptides[J]. *Food Science*, 2017, 38(5): 305–310.
- [24] 丁龙. 蛋清肽结构鉴定与完整吸收的构效关系研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- DING L. Identification of egg white derived peptides and relationships between structure and transport[D]. Changchun: Jilin University, 2018.
- [25] VILLADÓNIGA C, CANTERA B M A. New ACE-inhibitory peptides derived from α -lactalbumin produced by hydrolysis with *Bromelia antiacantha* peptidases[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 20(C): 101258.
- [26] LIU P R, LAN X D, YASEEN M, et al. Purification, characterization and evaluation of inhibitory mechanism of ACE inhibitory peptides from pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) meat protein hydrolysate[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(8): 463.
- [27] 刘芳芳. 海水鱼鱼糜加工及凝胶过程中蛋白质变化规律的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- LIU F F. Mechanism of protein changes during processing and gelation of marine fish surimi [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [28] 张秋会, 黄现青, 李苗云, 等. 傅里叶红外光谱法研究肌肉蛋白质的二级结构[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(10): 247–251.
- ZHANG Q H, HUANG X Q, LI M Y, et al. Study on secondary structure of meat protein by FTIR[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2015, 41(10): 247–251.
- [29] PAYNE K J, VEIS A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies[J]. *Biopolymers*, 1988, 27(11): 1749–1760.
- [30] 张静, 米佳, 禄璐, 等. 黑果枸杞花色苷提取物对胰脂肪酶活性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(5): 8–14.
- ZHANG J, MI J, LU L, et al. Effect of anthocyanins extract from *Lycium ruthenicum* murr. fruit on pancreatic lipase activity[J]. *Food Science*, 2020, 41(5): 8–14.
- [31] 高泽汝. 玉米胚芽 ACE抑制肽的制备及作用机制和稳定性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2021.
- GAO Z R. Preparation, inhibition mechanism and stability of ACE inhibitory peptides derived from maize germ [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2021.
- [32] LU Y T, WANG Y, HUANG D Y, et al. Inhibitory mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from black tea[J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2021, 22(7): 575–589.
- [33] 高阳. CDC20和RRM1基因在人结直肠癌辐射敏感性调控中的作用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021.
- GAO Y. The role of CDC20 and RRM1 in the regulation of radiosensitivity in human colorectal cancer [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2021.
- [34] SANTIAGO V, GIORGIO C, STEFANO M. Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): Application of QSAR and molecular docking to drug discovery [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, 8(18): 1555–1572.
- [35] 何海艳, 刘梦婷, 杨爱萍, 等. 南瓜籽蛋白源血管紧张素转化酶抑制肽的制备及其降血压活性[J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 214–220.
- HE H Y, LIU M T, YANG A P, et al. Preparation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from pumpkin seed protein and their antihypertensive activity[J]. *Food Science*, 2021, 42(23): 214–220.
- [36] 田文慧. 啤酒中血管紧张素转化酶及二肽基肽酶-IV

抑制肽的筛选及活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2021.

TIAN W H. Screening and activity study of an-

giotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides in beer[D]. Kunming: Kunming University of Technology, 2021.

Isolation, Identification, Structure Characterization and *in Vitro* Activity Evaluation of ACE Inhibitory Peptides from *Prinsepia utilis*

Zhang Lu¹, Gan Yuyan¹, Zhong Yuwang¹, Li Yiyan¹, Fan Jiangping^{1,2}, Wang Xuefeng^{1,2*}

(¹College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201

²Yunnan Engineering Technology Research Center for Processing of Livestock Products, Kunming 650201)

Abstract In this study, ACE inhibitory peptides were isolated and purified by ultrafiltration and strong anion exchange chromatography, and their peptide sequences were identified by LC-MS/MS. Fourier transform infrared spectroscopy, enzyme reaction inhibitor kinetics, MTT assay and molecular docking technology were used to analyze the secondary structure characteristics, *in vitro* activity and binding mechanism with ACE. The results showed that the activity of < 3 ku ultrafiltration fraction was better (IC₅₀ value: 0.380 mg/mL), and the activity of F-a fraction was the best (IC₅₀ value: 0.159 mg/mL) after ion exchange chromatography. Four peptide sequences were identified by LC-MS/MS, and bioinformatics analysis further confirmed that the peptide PGDVF was a potential ACE inhibitory peptide with an IC₅₀ value of (0.56 ± 0.1) mmol/L. the secondary structure analysis showed that PGDVF was composed of α -helix, β -sheet, β -turn and random coil, and its inhibition model may be mixed. The peptide concentration less than 1 mg/mL was basically non-toxic to HepG-2 cells. Molecular docking showed that PGDVF could be closely combined with ACE enzyme through hydrogen bond and hydrophobic force, thus effectively inhibiting ACE activity. In summary, this study can provide reference for the development and utilization of *Prinsepia utilis* decompression peptide.

Keywords *Prinsepia utilis*; angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; secondary structure; molecular docking