

青刺果肽对饮食性高血压大鼠肾脏的保护作用

张贝贝¹, 秦宇¹, 张文文¹, 李雯雯¹, 李莉蓉^{1*}, 黄锐^{2*}

¹昆明理工大学食品科学与工程学院 昆明 650500

²中垦华山牧乳业有限公司 陕西渭南 714000

摘要 将雄性 4 周龄 SD 大鼠随机分为 4 组($n=8$):正常组(Con)、模型组(BP)、卡托普利阳性对照组(Cap, 10 mg/kg 的卡托普利)和青刺果肽 NLPLL 干预组(PP, 10 mg/kg 的 NLPLL)。除正常组饲喂普通饲料和正常饮水外,其余各组皆饲喂 20% 的果糖水和 8% 的高盐饲料。造模 8 周,干预 8 周。结果表明,NLPLL 增加肾脏组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力,提高谷胱甘肽(GSH)含量和总抗氧化能力,减少丙二醛(MDA)的生成,降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平,升高抗炎因子白细胞介素-10(IL-10)的水平,从而缓解高果糖高盐引起的大鼠肾脏氧化损伤和炎症反应;提升 NO 和 eNOS 含量,降低肾素、PRR、ACE、Ang II、AT1R 的水平发挥降压作用,并减少肾间质纤维化及炎症细胞浸润。NLPLL 与 ACE 的 6 个氨基酸残形成 9 个氢键相互作用,包含 3 个(Gln281、Lys511 和 Tyr520)ACE 活性关键残基位点,与 AT1R 的 2 个残基形成 3 个氢键相互作用。结论:NLPLL 可以降低高果糖、高盐诱导的大鼠饮食性高血压,并通过降低肾脏的氧化损伤和炎症,提升 NO 含量和 eNOS 活性,调节肾素血管紧张素系统关键酶及分子的水平来改善饮食性高血压对肾脏的损伤。本研究可为青刺果肽对饮食性高血压及肾脏组织损伤的改善和天然降压功能因子的开发提供理论基础。

关键词 高盐、高糖; 高血压; 肾脏损伤; 青刺果; 氧化损伤

文章编号 1009-7848(2025)02-0188-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.017

多种外界因素均会影响机体血压,而膳食中的糖和盐摄入是目前影响人体血压的关键因素之一。研究证实,果糖通过刺激氧化应激反应,引起交感神经系统活性增加,内皮功能障碍,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(Renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)激活和炎症,从而使血压升高^[1]。肾脏是机体控制血压的重要器官,可以通过控制钠离子平衡、一氧化氮排泄、RAAS 系统平衡影响血压^[2]。长期膳食高钠摄入会引起水潴留,影响肾脏排泄能力,从而引起高血压,导致肾脏的结构和功能受损^[3],引发心血管疾病^[4]。2020 年中国的高血压患者达到 2.45 亿人,而高血压导致的肾脏损伤也成为终末期肾病的第二大病因^[5]。目前,主要通过降血压药物和保护肾脏损伤药物的联合

治疗方式控制高血压合并肾功能损伤,如血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体阻滞剂、钙通道阻滞剂和噻嗪类利尿剂^[6]等。现有的治疗方法短期内虽能在一定程度上控制血压并延缓高血压肾脏损伤的进展,但不可避免地存在肾、肝毒性,还会产生中性粒细胞减少、血管性水肿、哮喘和等毒副作用^[7-9]。因此,越来越多的研究关注于开发降压效果好,能够减缓肾脏、肝脏等组织器官损伤且副作用小的天然降压物质。

血管紧张素 I 转换酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)是 RAAS 的关键酶,在血压和心血管功能调节上发挥着重要的作用。通过酶解食物蛋白质获得的具有 ACE 抑制活性的肽有助于调节血压,而且其作用特异、有效、安全。Tsai 等^[10]通过动物实验证实大豆生物活性肽 VHVV 具有 ACE 抑制活性,并且具有抗氧化和清除自由基的作用,可以减少炎症因子的产生,有效缓解由高血压引起的肾脏损伤。Sun 等^[11]研究发现 Pea-Clam 双肽复合物通过调节肾脏的 RAAS 和重构失衡的肠道微生物生态来降低血压,同时该复合物还可消除肾纤维化和重塑血管,改善高血压引起的心、肾功能损伤。

收稿日期: 2024-02-26

基金项目: 陕西省科技厅厅市联动渭南现代农业重点项目(2022GD-TSLD-58);云南省科技厅科技计划面上项目(202001AT070032);云南省兴滇英才支持计划项目(KKRD202023026)

第一作者: 张贝贝,女,硕士生

通信作者: 李莉蓉 E-mail: lilirong-lily@126.com

黄锐 E-mail: 370760234@qq.com

青刺果(*Prinsepia utilis* Royle)为蔷薇科扁核木属灌木的果实,是中国云南丽江、香格里拉少数民族地区常见的一种具有长期食用和药用历史的油料植物^[12]。青刺果榨油后的果粕粗蛋白高达 46.97%,是开发利用废弃蛋白制备活性肽的良好来源^[13-14]。和丽等^[12]酶解青刺果蛋白获得抑菌率为 31.62% 青刺果抗菌肽。朱薪等^[15]从青刺果粕中筛选出对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 45.5% 和 39.1% 抗的菌肽组分。王兴妮等^[16]用青刺果粕蛋白水解肽混合物制备的复合薄膜有良好的机械性能、抗氧化和抗菌活性。张璐等^[17]将青刺果蛋白酶解物分离纯化得到高活性的 ACE 抑制肽 PGDFV($IC_{50}=0.56$ mmol/L)。目前,青刺果肽的研究主要集中在抗菌、抗氧化、ACE 抑制等青刺果活性肽的制备和体外活性评价方面,而青刺果降压肽体内降压活性仍缺少相关研究。

研究团队前期从酶解青刺果粕蛋白分离纯化获得 1 条体外 ACE 抑制活性优于卡托普利($IC_{50}=24.39$ μ mol/L)的青刺果肽 NLPLL($IC_{50}=0.19$ μ mol/L)。研究表明高血压会导致肾脏损伤,而肾脏是治疗高血压的重要靶器官。所以,具有体外 ACE 抑制活性的 NLPLL 是否体内也具有降压活性,对肾脏的作用尚不清楚。本研究通过构建果糖、高盐大鼠饮食性高血压动物模型,监控 NLPLL 干预大鼠血压的情况,分析肾脏组织的氧化应激状态和炎症水平。同时对影响血压的关键物质水平及肾脏组织病理学进行分析,将肽与 ACE 及受体蛋白进行分子对接,评价 NLPLL 的体内降压作用和对肾脏的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

青刺果肽(NLPLL, Asn-Leu-Pro-Leu-Leu)由杰肽生物科技有限公司固相合成,纯度 $\geq 98\%$ 。雄性 SD 大鼠(4 周龄)购自昆明医科大学(动物许可证编号:SYXK(滇)K2020-0006);普通饲料购自昆明医科大学;高盐饲料(普通饲料+8%的盐)实验室自制。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(Endothelial NO synthase, eNOS)测

定试剂盒,南京建成生物工程研究所;过氧化氢酶(Catalase, CAT)、总抗氧化能力测定试剂盒,苏州科铭生物技术有限公司;肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6(Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 10(Interleukin-10, IL-10)、(前)肾素受体(Pro-renin receptor, PRR)、肾素(Renin)、血管紧张素转化酶(ACE)、血管紧张素 II(Angiotensin II, Ang II)、血管紧张素受体 1(Angiotensin II 1 receptor, AT1R)分析试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;其它化学试剂均为分析纯级。

1.2 仪 器

XMTD-204 数显恒温搅拌水浴锅,金坛市白塔新宝仪器厂;XR1 台式高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技有限公司;Milli-ORReference 超纯水仪,美国密理博公司;Q-250BX3 高速多功能粉碎机,上海冰都电器有限公司;BP-2010A 无创血压仪,北京软隆生物技术有限公司;IX70 倒置显微镜,日本 OLYMPUS。

1.3 方 法

1.3.1 动物分组与处理 动物实验研究符合昆明理工大学动物实验伦理委员会所制定的伦理学标准,得到该委员会批准,批准编号为(PZWH(滇)K2022-0005)。实验选用 4 周龄雄性 SD 大鼠,适应性喂养一周后,将大鼠随机分为 4 组,每组 8 只。正常组(Con)喂食普通饲料和正常饮水,模型组(BP)饲喂 20%果糖水和 8%高盐饲料;阳性对照组(Cap)饲喂 20%果糖水和 8%高盐饲料,每天灌胃卡托普利(10 mg/kg 体质量);NLPLL 干预组(PP)饲喂 20%果糖水和 8%高盐饲料,每天灌胃 NLPLL(10 mg/kg 体质量)。造模 8 周,干预 8 周。

1.3.2 血压和体质量测量 大鼠在不同笼条件下自由喂养和饮水。在实验过程中,每周固定时间测量每只大鼠的体质量、收缩压(Systolic blood pressure, SBP)、舒张压(Diastolic blood pressure, DBP)和平均动脉压(Mean arterial pressure, MBP)。

1.3.3 肾脏组织生化指标测定 大鼠主动脉取血后,摘取肾脏,去掉包膜及周围脂肪组织,-80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。肾脏按液比 1:9 加入 0.9%的生理盐水,冰浴匀浆。以 9 000 r/min 转速冷冻离心,收集上清

液用于肾脏 MDA、SOD、GSH、CAT、总抗氧化能力、TNF- α 、IL-6、IL-10、NO、eNOS、PRR、肾素、ACE、血管紧张素 II (Ang II) 和 AT1R 指标的分析。

1.3.4 肾脏组织病理学分析 将肾脏置于 10% 中性福尔马林溶液中固定过夜。用石蜡包埋后,以 100%、95% 和 75% 的酒精进行连续脱水。将包埋的组织块用病理切片器切成 0.2 μm 厚的切片,随后用二甲苯浸泡脱蜡。切片用苏木精伊红(H&E)染色后通过倒置显微镜进行形态学观察,并进行图像拍摄。

1.3.5 分子对接 从蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/>) 下载 ACE (PDB ID108A) 和 AT1R 的天然晶体结构 (PDB ID 4YAY)。用 SYBYL-X 2.1.1 软件对蛋白结构进行优化,去除蛋白上所有的水分子并对其进行加氢和加电荷。构建配体 NLPLL 的结构并进行优化使其能量最小化。按照对接步骤将配体分别与受体蛋白 ACE 和 AT1R 进行对接分析。通过 SYBYL 软件计算对接的 T-评分、C-评分、结合氢键个数和氢键距离,以 T 评分 ≥ 6.0 、C-评分 ≥ 4.0 表明对接结果可靠。

1.3.6 数据分析 所有数据均重复测量 3 次,数据以平均值和标准差表示。用 SPSS 软件对数据进行单因素方差分析,Duncan's 法进行组间多重比较分析, $P < 0.05$ 为显著性水平。采用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 NLPLL 对高血压大鼠体质量和血压的影响

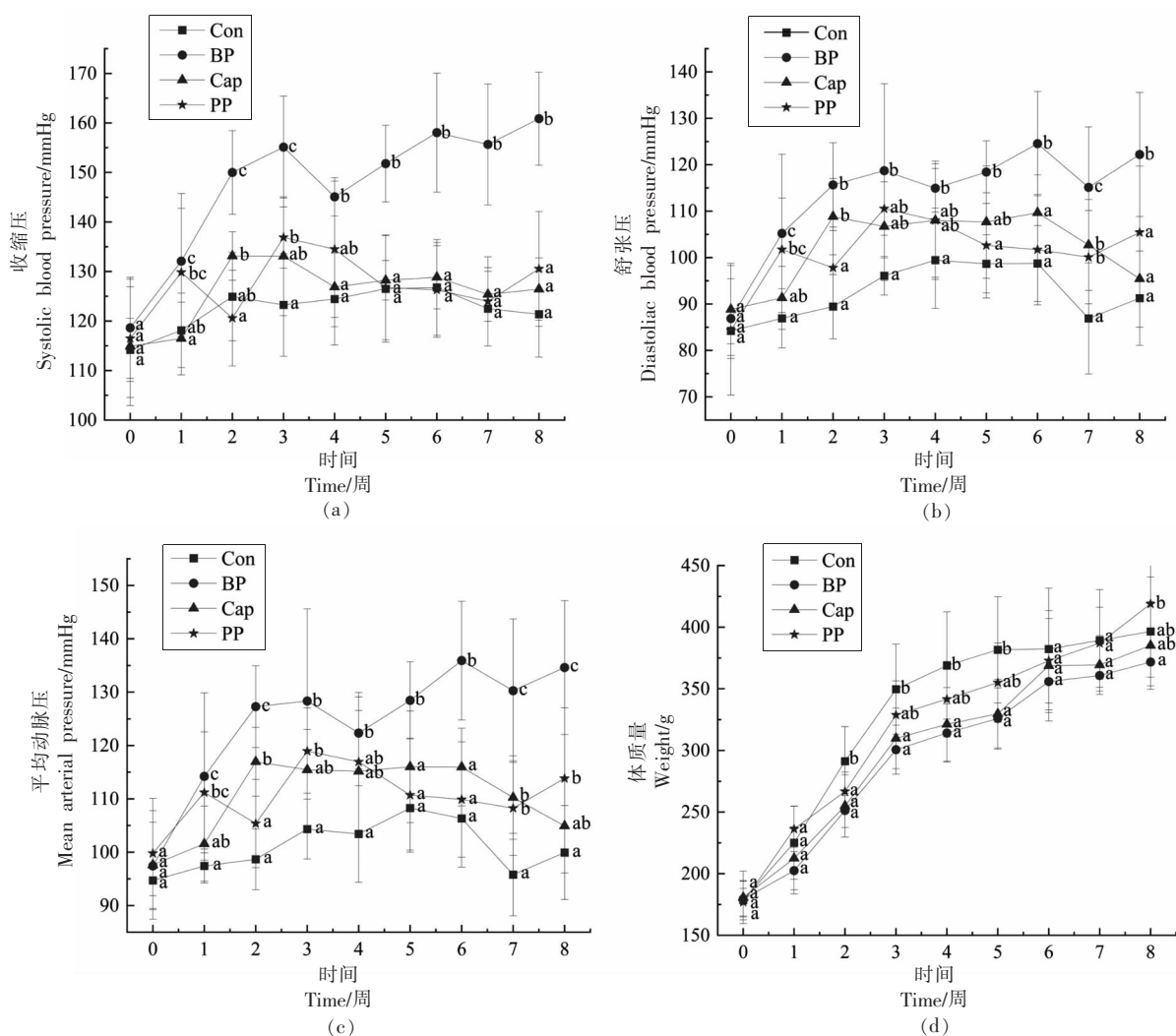
膳食果糖摄入量过高会使胰岛素和瘦素水平升高,导致胰岛素抵抗,同时这些激素引起交感神经输出增加,激活 RAAS,从而刺激血压升高,导致高血压^[18]。随着钠盐的摄入量增加,会导致大鼠 ROS 增加,肾脏巨噬细胞浸润增加,Ang II 氧化增加,最终导致血压升高和肾脏损伤^[19]。如图 1a 和图 1b 所示,Con 组大鼠收缩压在整个动物实验周期呈现出前 2 周先增加随后趋于平稳的趋势,收缩压一直维持在 125 mmHg 左右;而 BP 组大鼠的收缩压在前 3 周稳定上升,并在第 2 周达到高血压水平 (收缩压 ≥ 140 mmHg,舒张压 ≥ 90

mmHg),说明高果糖、高盐高血压大鼠模型构建成功。PP 组大鼠的收缩压和舒张压从造模成功的第 2 周开始先上升后下降,NLPLL 干预 8 周后大鼠血压呈现平缓降低的趋势。Cap 组大鼠的收缩压和舒张压在第 3 周之后的变化趋势与 PP 组相似,并且大鼠的组间血压差异不显著。PP 和 Cap 干预后大鼠的收缩压低于 140 mmHg,而舒张压高于 90 mmHg,说明青刺果肽可以调节钠排泄、血管反应性和心脏收缩力从而决定了总血管阻力、心输出量,最终导致血压降低^[20]。Sun 等^[11]用 Pea-Clam 双肽复合物降低了高血压大鼠的收缩压和舒张压。本研究与 Wang 等^[18]研究结果类似。与收缩压和舒张压的变化相比,心动周期内的动脉血压的平均值反映人体心动周期中血管内的压力平均变化情况。如图 1c 所示,与 BP 组相比,PP 组和 Cap 组大鼠的平均动脉压显著降低,而因高糖、高盐饮食使得大鼠的平均动脉压仍高于 105 mmHg。结果表明,NLPLL 可以缓解高糖、高盐引起的大鼠血压上升,并将血压调控在一个相对平缓的增加范围,体内降压作用效果与 ACE 抑制药物卡托普利相当。

图 1d 显示高血压大鼠的体质量变化情况,第 0 周时所有组别大鼠初始体质量的平均值处于同一水平,随后大鼠体质量持续上升,第 8 周 Con 组、BP 组、Cap 组和 PP 组大鼠体质量分别增长了 217.98,192.38,204.44 g 和 242.07 g,这与 Carole 等^[19]的结果类似,即与果糖相比,盐的摄入量是影响大鼠体质量的关键,高盐的摄入会增加大鼠的体质量,这是因为钠影响了与果糖饮食相关的脂肪组织的增加。综上,NLPLL 调控大鼠血压的同时不影响大鼠的食欲。

2.2 NLPLL 对高血压大鼠氧化应激的影响

肾脏是人类代谢最活跃的器官之一,线粒体含量、基础代谢率和能量需求高,因此,ROS 在肾脏功能和疾病的发病机制中起关键作用^[21]。MDA 会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,具有细胞毒性,能加剧细胞膜的损伤^[22]。CAT 可以通过将 H_2O_2 降解为氧和水来缓解自由基毒性^[23],并且收缩压和舒张压与氧化应激的生物标志物呈正相关关系,与高血压患者的抗氧化水平呈负相关关系^[24]。与 Con 组相比,BP 组大鼠肾脏



注:不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图 1 大鼠收缩压(a)、舒张压(b)、平均动脉压(c)和体质量(d)的变化

Fig.1 Change in systolic blood pressure (a), diastolic blood pressure (b), mean arterial pressure (c), and body weight (d) of rats

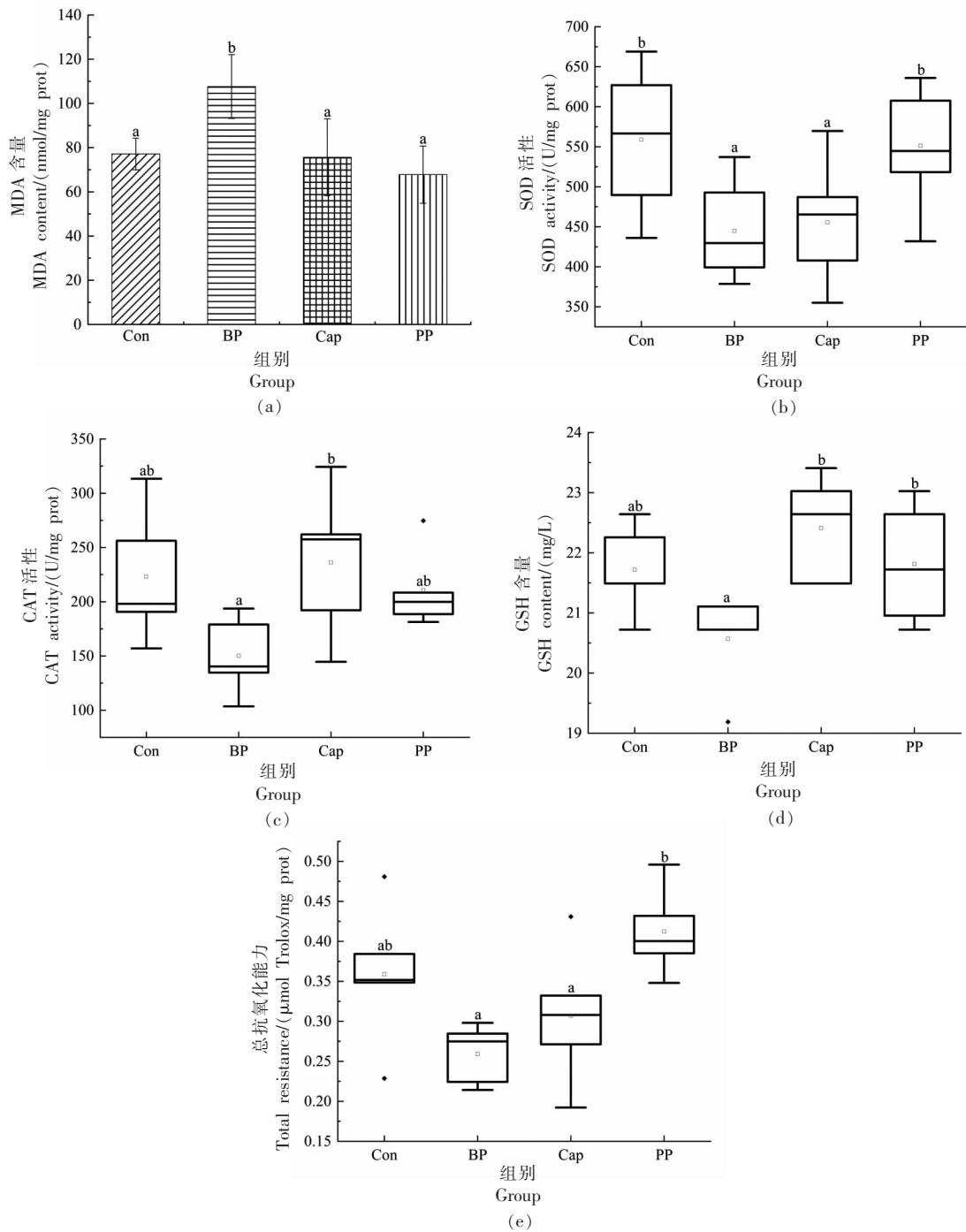
MDA 含量显著上升 ($P < 0.05$)、SOD 和 CAT 活性降低,说明高果糖、高盐高血压模型造成大鼠肾脏产生显著的氧化损伤。高血压会造成自由基对细胞膜的损害,从而加剧氧化应激对肾脏的损害^[22,25]。经 NLPLL 干预后,MDA 含量显著下降 ($P < 0.05$),大鼠肾脏 SOD 活性显著上升 ($P < 0.05$),CAT 活性明显上升并且与 Cap 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

果糖会引起 ROS 产生增加,NO 生物利用度降低和累积正钠平衡^[26]。在高血压中,ROS 由 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、解偶联一氧化氮合酶(eNOS)和线粒体以及 Ang II 和 ET-1 产生,当身体产生的活性氧超过其抗氧化防御能力时,

就会造成氧化应激损伤^[6]。如图示,BP 组大鼠肾脏的 GSH 和总抗氧化能力与 Con 组相比有所下降,说明肾脏的氧化损伤超过机体的防御能力。经肽干预后,PP 组大鼠肾脏的 GSH 和总抗氧化能力显著上升 ($P < 0.05$)。结果表明,NLPLL 可以增加高血压大鼠肾脏的抗氧化能力,减轻高血压对肾脏的氧化损伤。

2.3 NLPLL 对高血压大鼠肾脏炎症细胞因子产生水平的影响

在长期高血压条件下,肾脏分泌大量促炎性细胞因子 IL-6 和 TNF- α ,从而导致血管内皮细胞受损,血管弹性降低^[27]。TNF- α 会促进 IL-6 的释



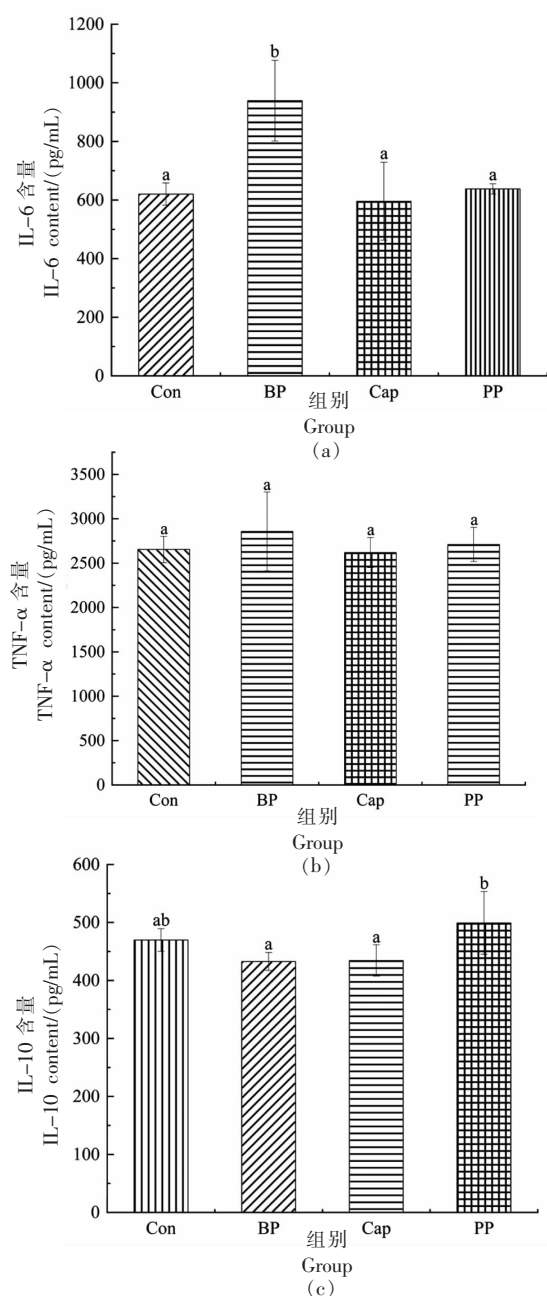
注:不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

图2 NLPLL对大鼠肾脏MDA(a)、SOD(b)、CAT(c)、GSH(d)和总抗氧化能力(e)的影响

Fig.2 The effects of NLPLL on MDA (a), SOD (b), CAT (c), GSH (d), and total resistance (e) in rats

放,还可使平滑肌细胞向血管内皮下聚集、增生、浸润,内膜增厚,管腔狭窄而促进高血压形成^[28]。IL-10是在IL-6和TNF- α 等促炎介质后产生的,因此IL-10在预防和限制过度反应方面具有重要作用,并且IL-10可以减少血管平滑肌收缩并阻

止Ang II作用,抗炎和促炎细胞因子失衡会影响血管功能,从而引起血压升高^[29]。与Con组相比,BP组大鼠肾脏的TNF- α 和IL-6水平明显升高,IL-10水平明显降低(图3, $P<0.05$)。高血压时RAAS的Ang II可诱导炎症激活并导致炎症细胞



注:不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图 3 NLPLL 对大鼠肾脏炎症因子 IL-6(a)、TNF- α (b) 和 IL-10(c) 的影响

Fig.3 Effects of NLPLL on pro-inflammatory factors, IL-6 (a), TNF- α (b), and IL-10 (c) in rat hearts

因子的释放,导致促炎因子 IL-6、TNF- α 表达水平升高,抗炎因子 IL-10 水平降低,说明高果糖、高盐摄入引发肾脏的炎症反应。与 BP 组相比,PP 组的 TNF- α 和 IL-6 ($P < 0.05$) 水平明显降低,IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明 NLPLL 可以

抑制促炎因子的释放、减轻血管内皮细胞受损和增厚从而降低血管压强,缓解血压的升高。

2.4 NLPLL 对高血压大鼠 NO 和 eNOS 的影响

eNOS 产生的 NO 是血管稳态及血压调节的关键因素之一,NO 缺乏会增加肾小管重吸收钠和肾素释放导致高血压。高果糖、高盐摄入显著降低肾髓质中内皮 eNOS 表达和尿中 NO 代谢物排泄,对 NHE₃ 等离子转运蛋白有直接的抑制作用,从而增加钠水滞留,增加高血压的风险^[30-31]。如图 4a 所示,与 Con 组相比,BP 组大鼠的 NO 活性显著下降 ($P < 0.05$)。这是因为果糖和盐的摄入会导致 NO 生物利用度降低^[30]。NO 生物利用度降低导致细胞内 Ca²⁺浓度增加和血管收缩,最终可增加总外周阻力和血压^[20]。经 NLPLL 干预后,PP 组大鼠肾脏 NO 活性显著高于 BP 组 ($P < 0.05$),且与 Con 组无显著性差异 ($P > 0.05$),说明 NLPLL 可以提高 NO 的活性,从而扩张血管、促进血液循环来减轻高血压^[18]。图 4b 显示了各组肾脏 eNOS 的含量,BP 组 eNOS 含量显著低于 Con 组 ($P < 0.05$),经青刺果肽干预后 PP 组 eNOS 含量显著上升 ($P < 0.05$)。先前的研究表明,提高 NO 活性和 eNOS 的含量可以降低血压^[32]。本研究结果表明,NLPLL 可以很好地提升 NO 和 eNOS 的含量,降低肾小管对钠的重吸收、减轻钠滞留,从而降低血压、减少肾脏损伤,这与之前的研究结果一致^[18]。

2.5 NLPLL 对高血压大鼠肾脏 RAAS 系统关键物质产生水平的影响

RAAS 是血管张力、血管功能、血压以及电解质和水平衡的重要调节因子^[33]。在经典的 RAAS 系统级联反应途径中,ACE 催化 Ang I 转变为 Ang II,它与 AGTR1 结合,作为一种强大的血管收缩剂,调节醛固酮的产生,导致血管收缩、血压升高^[5]。Ang II 是 RAAS 的关键调节因子,肾脏是 Ang II 的效应器官^[34]。Ang II 会刺激肾上腺皮质球状区、促进醛固酮分泌、水和钠滞留、刺激交感神经节提高去甲肾上腺素分泌、增加交感神经递质使血压升高^[35]。PRR 可以分解为可溶性 PRR (sPRR) 与 Renin 结合,从而增强 Renin 的催化活性,提高局部 Ang II 形成的催化效率^[36]。本研究检测了肾脏组织中的 PRR、Renin、ACE、Ang II 和 AT1R 水平,以探索 NLPLL 对肾脏 RAAS 系统的

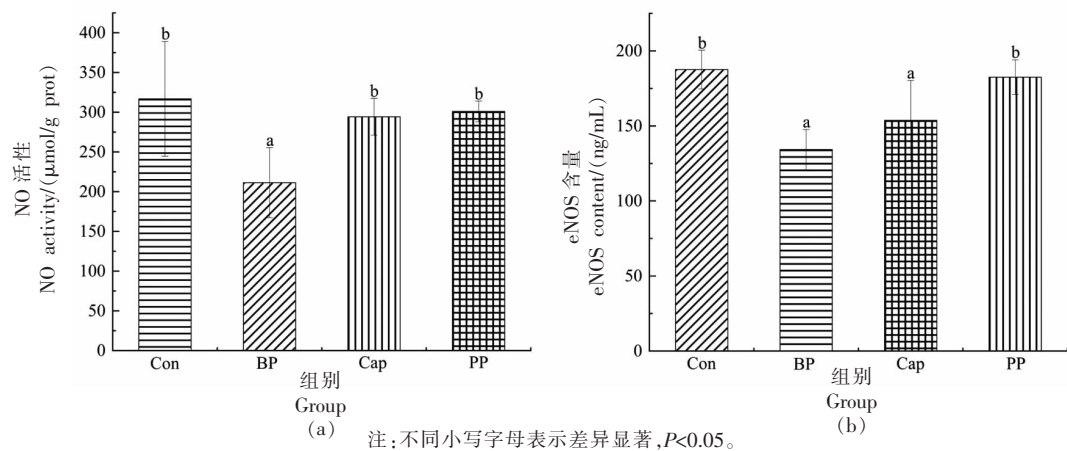


图4 NLPLL对大鼠肾脏NO(a)和eNOS(b)的影响

Fig.4 The effect of NLPLL peptide on NO (a) and eNOS (b) in kidney of rats

影响。与Con组相比,BP组PRR、肾素、ACE、Ang II和AT1R水平上升,其中PRR增加显著($P < 0.05$)。试验证明,高果糖会引起PRR表达增高,PRR会引起肾脏钠潴留从而导致血压升高^[37]。RAAS失衡会引起血压升高,还对血管张力、钠潴留、氧化应

激、纤维化、交感神经张力和炎症有影响^[38]。PP组大鼠肾脏PRR、Renin、ACE、Ang II和AT1R水平显著降低($P < 0.05$),从而减缓血管的收缩,达到降低血压的目的。

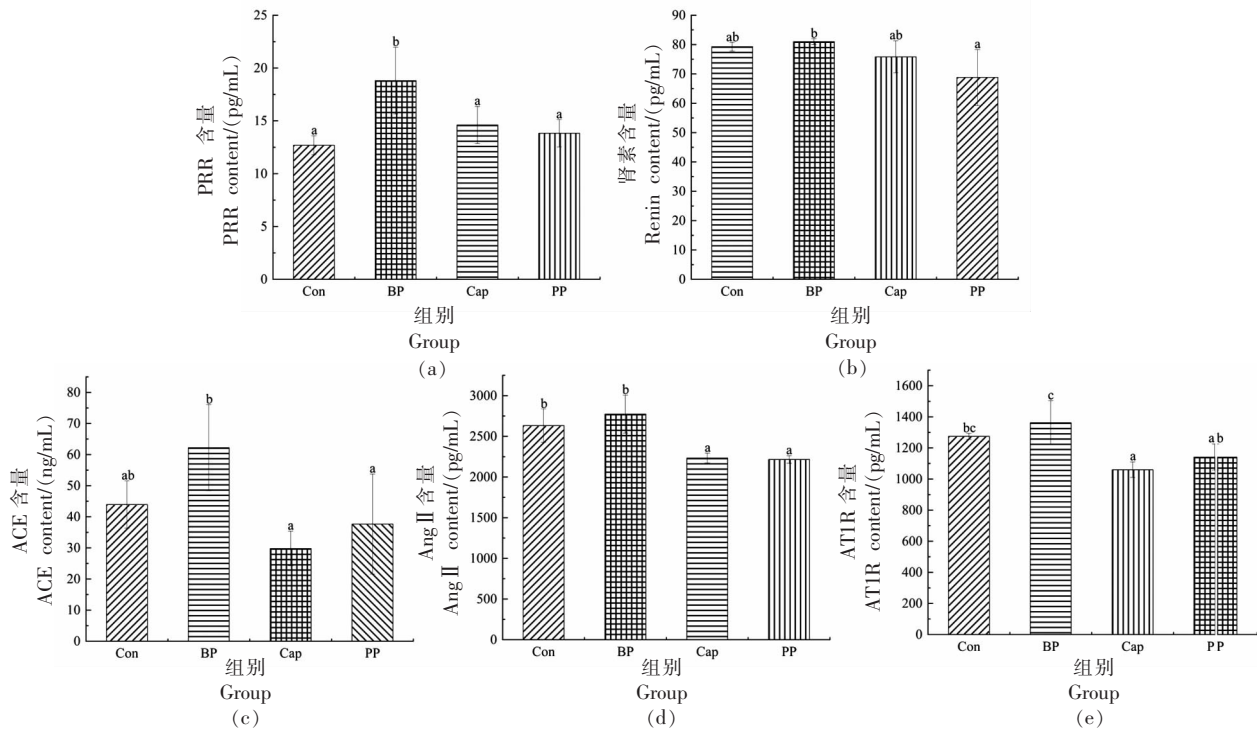


图5 NLPLL对高血压大鼠肾脏PRR(a)、肾素(b)、ACE(c)、Ang II(d)、AT1R(e)含量的影响

Fig.5 The effects of NLPLL on PRR (a), renin (b), ACE (c), Ang II (d), and AT1R (e) content in the kidney of hypertensive rats

2.6 组织病理学分析

肾脏是调节高血压的重要器官,同时肾脏也

容易受到高血压的损伤^[34]。高果糖饮食可增强胃肠道和肾脏钠的吸收,破坏钠稳态,从而引起高血

压和肾损伤^[18]。肾脏组织切片 HE 染色显示,Con 组大鼠肾脏细胞形态正常、无萎缩、结构完整、排列紧凑、分布均匀(图 6)。BP 组大鼠肾脏细胞肿胀肥大、增宽,细胞间距增大,排列稀疏杂乱,炎症因子浸润,肾小球出现萎缩变形,系膜扩张。氧化应激反应,促炎基因的产生以及炎症的激活会促进肾脏炎症和损伤^[24]。特别是氧化应激会引起的器官肥大和细胞凋亡,还会促进内皮功能障碍、炎症和血管结构改变^[39]。与 BP 组大鼠肾脏组织切片相比,PP 组能明显减轻大鼠肾脏细胞的杂乱排列和炎症细胞浸润,肾小球无明显变形,显著改善系膜扩张。结果表明,高血压会造成肾脏肾小球萎缩和炎症,而经 NLPLL 干预后,可缓解高血压大鼠的肾脏病理形态的病变。

2.7 NLPLL 与 ACE 和 AT1R 的分子对接

分子对接可以从分子水平探究 NLPLL 与 ACE 和 AT1R 之间的分子相互作用。如图 7 和表 1 所示,NLPLL 与 ACE 和 AT1R 的 T 评分分别为 10.1629 和 7.0494,远高于 T 评分可接受临界值 6.0,表明肽与蛋白的结合力较强,与 ACE 和 AT1R 之间分别以 9 个和 3 个氢键结合。氢键相互作用力在稳定对接配合物和酶催化反应中起着重要作用^[40]。NLPLL 与 ACE 的 6 个残基(Asp453、Lys454、Asp415、Gln281、Lys511、Tyr520)共形成 9 个氢键,NLPLL 肽段与 AT1R 的 2 个残基(Asp281、Asp263)共形成 3 个氢键。先前的研究表明,ACE 主要的活性位点为 Ala354、Glu384、Tyr523、Gln281、His353、Lys511、His513、Tyr520 和 Glu162 残基^[41]。NLPLL 与 ACE 相互作用的 6 个氨基酸中有 Gln281、Lys511 和 Tyr520 属于 ACE 活性位点的关键残基。分子对接结果表明,NLPLL 可以通过与 ACE 关键活性位点相互作用抑制 ACE 活性。AT1R 是钠稳态、血管收缩舒张和血压的重要调节因子,氧化应激导致 AT1R 上调,导致钠转运蛋白的过度刺激,随后导致钠潴留和高血压^[2]。

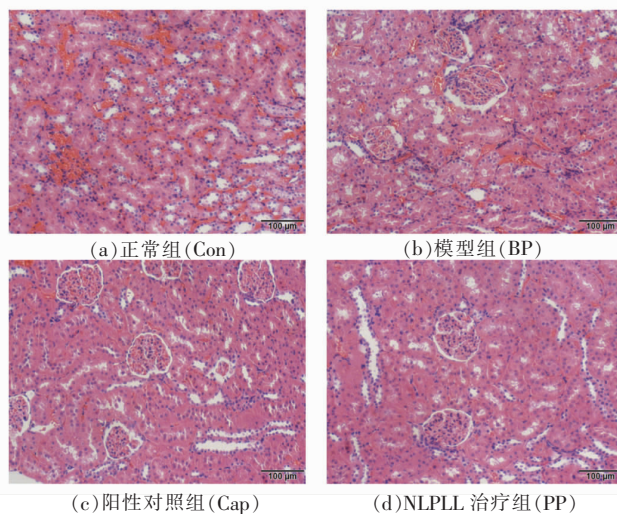


图 6 大鼠肾脏苏木精伊红(H&E)染色显微照片

Fig.6 Microscopic photos of rat kidney stained with haematoxylin eosin (H&E)

AT1R 的活性位点为 Tyr35、Trp84、Arg167^[42]。虽然 NLPLL 并未与 AT1R 的关键位点结合,但是氢键距离较短,结合紧密。NLPLL 与 AT1R 结合能力较强,可以很好的通过 AT1R 来调节高血压。

2.8 相关性分析

肾脏调节体内水和盐代谢、血管阻力和血容量,是高血压的重要靶器官,而高血压会导致肾功能不全、肾小球萎缩、炎症,最后形成肾脏疾病^[30],所以维持血压的稳定对高血压患者来说非常关键,探究降压肽缓解高血压与肾脏损伤的作用非常有必要。如图 8 所示,大鼠血压收缩压 SBP 与 MDA 和 Ang II 呈显著正相关关系 ($P<0.05$),与 IL-6 和肾素呈非常显著正相关关系 ($P<0.01$),与 eNOS 呈显著负相关关系 ($P<0.05$),与总抗呈非常显著负相关关系 ($P<0.01$); 大鼠舒张压 DBP 与 PRR 呈非常显著正相关关系 ($P<0.01$),与 SOD 呈显著负相关关系 ($P<0.05$),与 NO 呈极显著负相关关系 ($P<0.001$); 平均动脉压 MBP 与 PRR 呈非常

表 1 NLPLL 与 ACE 和 AT1R 分子对接结果

Table 1 Results of docking of NLPLL with ACE and AT1R molecules

名称	T-评分	C-评分	氢键数	氨基酸残基(距离)
ACE	10.1629	4	9	Asp453(2.018);Lys454(1.703、2.531、2.493);Asp415(2.576);Gln281(2.183);Lys511(2.016);Tyr520(2.027、2.371)
AT1R	7.0494	5	3	Asp281(2.089、2.177);Asp263(1.950)

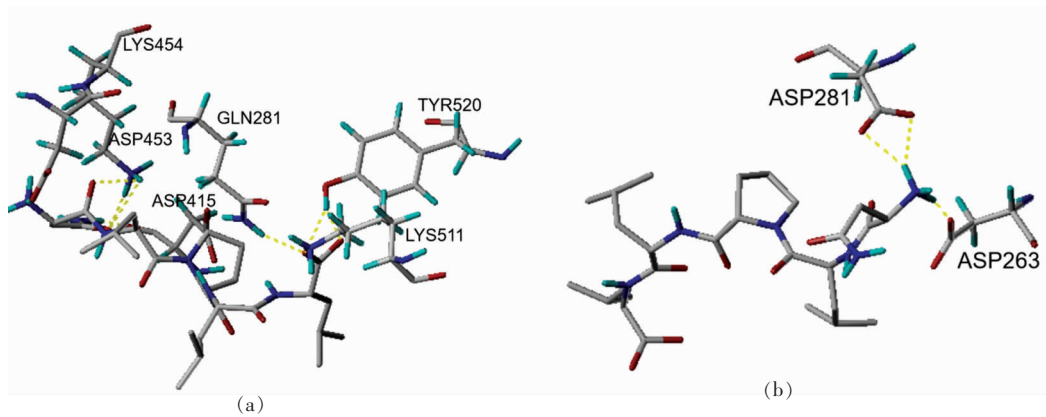


图 7 NLPLL 与 ACE(a)和 AT1R(b)分子对接的三维结构

Fig.7 The three-dimensional structure of NLPLL macromolecular docking with ACE (a) and AT1R (b)

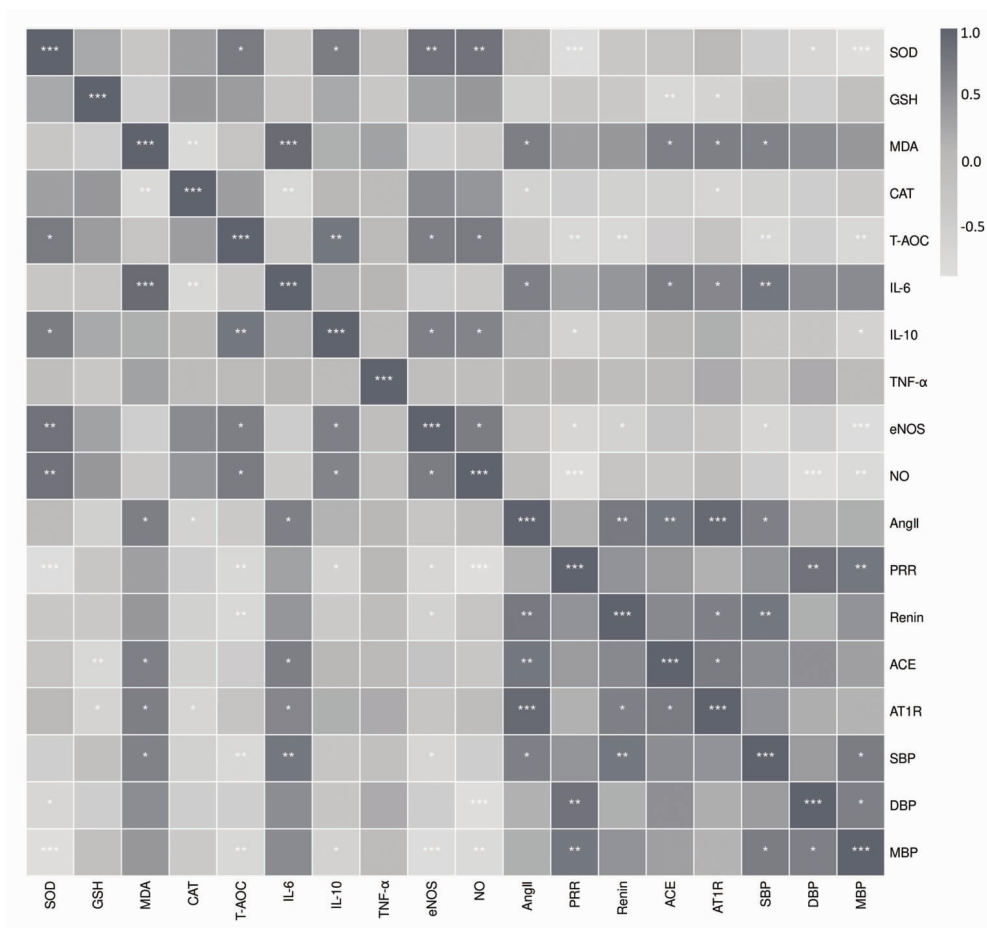


图 8 高血压大鼠血压与肾脏指标相关性分析

Fig.8 Analysis on the correlation between blood pressure and renal indicators in hypertensive rats

显著正相关关系 ($P < 0.01$), 与 IL-10 显著呈负相关关系 ($P < 0.05$), 与总抗、NO 呈非常显著负相关关系 ($P < 0.01$), SOD 和 eNOS 呈极显著负相关关

系 ($P < 0.001$)。结果表明, 高血压可激活 RAS 系统, 促进氧化应激、炎症和血压升高, 它们相互影响造成肾脏损伤。

3 结论

青刺果肽 NLPLL 对高果糖高盐诱导的大鼠饮食性高血压的降压作用和缓解肾脏损伤研究表明, NLPLL 有效地降低高血压大鼠的血压, 并且不影响高血压大鼠的食欲。青刺果肽通过增加高血压大鼠肾脏 SOD 和 CAT 活力, 提高 GSH、总抗氧化能力和 IL-10 的表达水平, 降低 MDA 的生成以及 TNF- α 和 IL-6 的表达水平, 降低高血压大鼠肾脏组织的氧化及炎症损伤, 改善肾脏的炎症浸润、肾小球萎缩。同时提升 NO 和 eNOS 的表达水平, 降低 PRR、肾素、ACE、Ang II 和 AT1R 的水平, 平稳降压。NLPLL 发挥降压作用与其与 ACE 和 AT1R 间的氢键相互作用有关。本研究为饮食性高血压的干预提供新思路。

参 考 文 献

- [1] LEE E J, KIM N K, KANG J J, et al. Activated pathogenic Th17 lymphocytes induce hypertension following high-fructose intake in Dahl salt-sensitive but not Dahl salt-resistant rats[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2020, 13(5): dmm044107.
- [2] WU T C, ZHENG Y H, HUANG Q Q, et al. Paeonol improves renal and vascular angiotensin II type 1 receptor function via inhibiting oxidative stress in spontaneously hypertensive rats[J]. *Clinical and Experimental Hypertension*, 2023, 45(1): 2182884.
- [3] SUN N L, JIANG Y N, WANG H Y, et al. Survey on sodium and potassium intake in patients with hypertension in China[J]. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2021, 23(11): 1957-1964.
- [4] LEVANOVICH P E, DAUGHERTY A M, KOMENOV D, et al. Dietary fructose and high salt in young male sprague dawley rats induces salt-sensitive changes in renal function in later life[J]. *Physiological Reports*, 2022, 10(18): e15456.
- [5] YUAN P P, LI M, ZHANG Q, et al. 2-Phenylacetamide separated from the seed of *Lepidium apetalum* Willd. inhibited renal fibrosis via MAPK pathway mediated RAAS and oxidative stress in SHR rats [J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2023, 23(1): 1-16.
- [6] MOHAMMED S A, LIU H, BALDI S, et al. Anti-hypertensive, antioxidant, and renal protective impact of integrated GJD with captopril in spontaneously hypertensive rats [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 10944.
- [7] MESSERLI F H, BANGALORE S, BAVISHI C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertension: To use or not to use?[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2018, 71(13): 1474-1482.
- [8] JANKOVIC S M, DAJIC M, JACOVIC S, et al. Measuring patients' knowledge about adverse effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors[J]. *Journal of Patient Safety*, 2019, 15(4): e28-e31.
- [9] GORSANE I, AYED T B, AOUDIA R, et al. Simultaneous acute pancreatitis and angioedema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor [J]. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 2019, 30(6): 1479-1484.
- [10] TSAI B C K, KUO W W, DAY C H, et al. The soybean bioactive peptide VHVV alleviates hypertension-induced renal damage in hypertensive rats via the SIRT1-PGC1 α /Nrf2 pathway[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 75(1): 104255.
- [11] SUN X P, WANG M, XU C J, et al. Positive effect of a pea-clam two-peptide composite on hypertension and organ protection in spontaneously hypertensive rats[J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 4069.
- [12] 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.
- [12] HE L, XIONG H T, WANG X F, et al. Response surface test was used to optimize the preparation of antibacterial peptides by compound enzyme[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(6): 33-37.
- [13] 和琼姬, 和加卫, 王宇萍, 等. 青刺果研究概述[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(7): 74-78.
- [13] HE Q J, HE J W, WANG Y P, et al. Overview of *Prinsepia utilis* Royle[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(7): 74-78.
- [14] 张瑞琳, 吴文惠, 张静怡, 等. 还原性青刺果果实蛋白生物化学特性的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(9): 1595-1601.
- [14] ZHANG R L, WU W H, ZHANG J Y, et al. Biochemical characteristics of reductive prinsepiautilis fruit protein[J]. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(9): 1595-1601.
- [15] 朱薪, 康山明, 张天雄, 等. 青刺果抗菌肽组分的

- 分离筛选及其稳定性分析[J/OL]. 中国油脂, (2023-03-22)[2023-11-26]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=jNHD1hIvxn31tRqzugK0VZ3R9xT-Y5D-Pw1EiwU2DlerX-P6Lu7ReDyQbzNC9jMunse-Qg1IQWLIx-4Kwi0cADfVj1hd0Pi_TxD7tmeYykccAxoVE-F3G2PTNZhTuenPXu3PB9092cYKnVLZTyZHWrOMqLAUJetp&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- ZHU X, KANG S M, ZHANG T X, et al. Solation and stability analysis of antimicrobial peptide fraction from *Prinsepia utilis* Royle[J/OL]. China Oils and Fats, (2023-03-22)[2023-11-26]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=jNHD1hIvxn31tRqzugK0VZ3R9xT-Y5D-Pw1EiwU2DlerX-P6Lu7ReDyQbzNC9jMunse-Qg1IQWLIx-4Kwi0cADfVj1hd0Pi_TxD7tmeYykccAxoVE-F3G2PTNZhTuenPXu3PB9092cYKnVLZTyZHWrOMqLAUJetp&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- [16] 王兴妮, 李莉蓉. 青刺果粕蛋白水解产物/多糖/纳米TiO₂复合薄膜的制备以及性能研究[C]//中国食品科学技术学会第十九届年会论文摘要集, 合肥: 中国食品科学技术学会, 2022: 427-428.
- WANG X N, LI L R. Study on preparation and properties of polysaccharides/ titanium dioxideprotein hydrolysates from *Prinsepia utilis* Royle composite films[C]// Abstracts of the 19th Annual Meeting of CIFST, Heifei: Annual Meeting of CIFST, 2022: 427-428.
- [17] 张璐, 甘雨嫣, 王雪峰. 青刺果 ACE 抑制肽的分离鉴定、结构表征及其体外活性评价[C]//中国食品科学技术学会第十九届年会论文摘要集, 合肥: 中国食品科学技术学会, 2022: 215-216.
- ZHANG L, GAN Y Y, WANG X F. Isolation identification structure characterization and in vitro activity evaluation of ACE inhibitory peptides from *Prinsepia utilis* Royle[C]. Abstracts of the 19th Annual Meeting of CIFST, Heifei: Annual Meeting of CIFST, 2022: 215-216.
- [18] WANG X Y, LIU Y Y, WANG Y, et al. Protective effect of coriander (*Coriandrum sativum* L.) on high-fructose and high-salt diet-induced hypertension; Relevant to improvement of renal and intestinal function [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(12): 3730-3744.
- [19] CAROLE O, D L A, BERNARD J, et al. Dietary sodium restriction prevents kidney damage in high fructose-fed rats[J]. Kidney International, 2013, 83(4): 674-683.
- [20] MUNGHO T C, RUFARO S C, OYEHAN O O, et al. Senecio serratuloides extract prevents the development of hypertension, oxidative stress and dyslipidemia in nitric oxide-deficient rats [J]. Journal of Complementary & Integrative Medicine, 2020, 17(2): 20180073.
- [21] SHIMA S, NAMRATA T, CHUN Y, et al. Effects of ROS pathway inhibitors and NADH and FADH2 linked substrates on mitochondrial bioenergetics and ROS emission in the heart and kidney cortex and outer medulla[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2023, 744: 109690.
- [22] 薛艳君, 吴娟娟, 张旭东, 等. 电针“太冲”对自发性高血压大鼠海马 MDA、SOD、GSH-Px 含量的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(9): 1439-1442.
- XUE Y J, WU J J, ZHANG X D, et al. Effect of electroacupuncture on ‘Taichong’ on contents of MDA, GSH-Px and SOD in hippocampus of spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2022, 28(9): 1439-1442.
- [23] TALEB A, AHMAD K A, IHSAN A U, et al. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 102: 689-698.
- [24] TOUYZ R M, RIOS F J, ALVES-LOPES R, et al. Oxidative stress: A unifying paradigm in hypertension[J]. Canadian Journal of Cardiology, 2020, 36(5): 659-670.
- [25] 袁牧, 王昌留, 王一斐, 等. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(6): 550-558.
- XUAN M, WANG C L, WANG Y F, et al. Progress in the research of superoxide dismutase[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2016, 25(6): 550-558.
- [26] KOMNENOV D, LEVANOVICH P E, PERECKI N, et al. Aortic stiffness and diastolic dysfunction in sprague dawley rats consuming short-term fructose plus high salt diet [J]. Integrated Blood Pressure Control, 2020, 2020: 111-124.
- [27] 李东, 李金帆. 天麻钩藤饮加减治疗肝肾阴虚型糖尿病合并高血压的效果及对血清 IL-6、hs-CRP 的影

- 响[J]. 四川中医, 2023, 41(2): 137-140.
- LI D, LI J F. Effect of using modified tianma gouteng decoction in the treatment of liver and kidney yin deficiency type diabetes mellitus with hypertension and its influence on serum IL-6 and hs-CRP[J]. Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine, 2023, 41(2): 137-140.
- [28] 秦存恒, 李远森, 陈旭. 血府逐瘀颗粒对高血压病患者血瘀证象及血清 hs-CRP、IL-6、TNF- α 的影响[J]. 中国医药指南, 2022, 20(26): 108-110.
- QIN C H, LI Y M, CHEN X. Effects of the signs of blood stasis and the level of hs-CRP IL-6 and TNF- α in hypertension treated with Xuefuzhuyu granule[J]. Guide of China Medicine, 2022, 20(26): 108-110.
- [29] LIMA V V, ZEMSE S M, CHIAO C W, et al. Interleukin-10 limits increased blood pressure and vascular RhoA/Rho-kinase signaling in angiotensin II-infused mice[J]. Life Sciences, 2016, 145: 137-143.
- [30] VASDEV S, GILL V D, RANDELL E, et al. Fructose and moderately high dietary salt-induced hypertension: Prevention by a combination of *N*-acetylcysteine and *L*-arginine[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2010, 337: 9-16.
- [31] ZHAO C X, XU X Z, CUI Y H, et al. Increased endothelial nitric-oxide synthase expression reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-treated rats[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009, 328(2): 610-620.
- [32] SUVORAVA T, METRY S, PICK S, et al. Alterations in endothelial nitric oxide synthase activity and their relevance to blood pressure[J]. Biochemical Pharmacology, 2022, 205: 115256.
- [33] ROSIVALL L. Intrarenal renin-angiotensin system[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 302(2): 185-192.
- [34] YOU Q N, SUN X P, CHEN J L, et al. Ameliorative effect of mussel-derived ACE inhibitory peptides on spontaneous hypertension rats[J]. European Journal of Nutrition, 2023, 62(7): 3097-3111.
- [35] FATIMA N, PATEL S N, HUSSAIN T. Angiotensin II type 2 receptor: A target for protection against hypertension, metabolic dysfunction, and organ remodeling[J]. Hypertension, 2021, 77(6): 1845-1856.
- [36] XU C M, LU A H, LU X H, et al. Activation of renal (pro)renin receptor contributes to high fructose-induced salt sensitivity[J]. Hypertension, 2017, 69(2): 339-348.
- [37] WANG B Y, JIE H P, WANG S X, et al. The role of (pro)renin receptor and its soluble form in cardiovascular diseases[J]. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2023, 10: 1086603.
- [38] MANIGANDAN N, BALASUBRAMANIAM M G, JEGANATHAN M. Exposure to low dose of bisphenol A (BPA) intensifies kidney oxidative stress, inflammatory factors expression and modulates angiotensin II signaling under hypertensive milieu[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2023, 38(1): e23533.
- [39] JIN L, PIAO Z H, SUN S M, et al. Gallic acid reduces blood pressure and attenuates oxidative stress and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15607.
- [40] TU M L, WANG C, CHEN C, et al. Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms[J]. Food Chemistry, 2018, 256: 98-104.
- [41] ZHANG M, MU T H, SUN M J. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by alcalase[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 191-200.
- [42] 李天翔. 氧化三甲胺与血管紧张素 II 1 型受体在动脉粥样硬化中的相互作用[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2020.
- LI T X. Interaction between trimethylamine oxide and angiotensin II type 1 receptor in atherosclerosis[D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2020.

The Protective Effects of *Prinsepia utilis* Royle Peptide on the Renal of Hypertension Rats

ZHANG Beibei¹, QIN Yu¹, ZHANG Wenwen¹, LI Wenwen¹, LI Lirong^{1*}, HUANG Rui^{2*}

(¹Faculty of Food Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500

²Zhongken Huashan Mu Dairy Co., LTD., Weinan 714000, Shaanxi)

Abstract Male 4-week-old SD rats were randomly divided into 4 groups ($n=8$): Normal group (Con), model group (BP), captopril group (Cap, 10 mg/kg captopril), and *Prinsepia utilis* Royle peptide NLPLL intervention group (PP, 10 mg/kg NLPLL). Except for the normal group, which was fed ordinary feed and normal drinking water, the other groups were fed 20% fructose water and 8% high-salt feed. The model was established for 8 weeks, and the intervention was conducted for 8 weeks. The results showed that NLPLL increased the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), increased glutathione (GSH) content and total antioxidant capacity, and reduced the production of malondialdehyde (MDA) in kidney tissue, thereby reducing the oxidative damage to rat kidneys caused by high fructose and high salt. Alleviating the inflammatory response in the kidneys of hypertensive rats by reducing the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) and increasing the levels of the anti-inflammatory factor interleukin-10 (IL-10). NLPLL could exert antihypertensive effect by increasing the activity of NO and eNOS, and decreasing the levels of renin, ACE, Ang II, AT1R and PRR, and reducing renal interstitial fibrosis and inflammatory cell infiltration. NLPLL formed nine hydrogen bonds with six amino acid residues of ACE, including three key active site residues of ACE (Gln281, Lys511, and Tyr520). Additionally, NLPLL forms three hydrogen bonds with two residues of AT1R. In summary, NLPLL could reduce blood pressure in rats with dietary hypertension induced by high fructose and high salt, and by reducing oxidative damage and inflammation in the kidney, increasing NO and eNOS activities, and regulating the levels of key enzymes and molecules of the renin-angiotensin system, improve kidney damage caused by dietary hypertension. This study could provide a theoretical basis for the improvement of diet-induced hypertension and renal tissue damage by *Prinsepia utilis* Royle peptide and the development of natural antihypertensive functional factors.

Keywords high-sugar and high-salt; hypertension; kidney injury; *Prinsepia utilis* Royle; oxidative damage