

鸡蛋蛋白ACE抑制肽的筛选、鉴定及其作用机制

于志鹏¹, 樊玥¹, 赵文竹^{1*}, 张馨月¹, 刘静波^{2,*}

(1.渤海大学食品科学与工程学院, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013;
2.吉林大学营养与功能食品研究室, 吉林 长春 130062)

摘要: 借助在线数据库, 以鸡蛋蛋白为原料, 进行虚拟酶解, 通过对活性肽分子质量、生物活性、水溶性及其吸收、分配、代谢、排泄和毒性等性质进行预测, 并结合分子对接筛选出与血管紧张素转化酶(angiotensin-I converting enzyme, ACE)稳定结合的3种ACE抑制肽。FOMC法固相合成三肽FQK、WGK和ADW, 并经反相高效液相色谱法测定其体外ACE抑制活性, 半抑制浓度分别为(250±0.25)、(222.74±1.02)、(85.38±0.54) μmol/L。分子对接结果表明, FQK、WGK和ADW对ACE的抑制主要归因于能够与ACE的活性口袋S₁和S₂形成氢键相互作用。本研究为食源性ACE抑制肽的鉴定提供一种高通量筛选方法。

关键词: 鸡蛋蛋白质; 虚拟筛选; ACE抑制肽; 活性口袋; 分子对接

Identification and Mechanism of Action of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Hen Egg Proteins

YU Zhipeng¹, FAN Yue¹, ZHAO Wenzhu^{1*}, ZHANG Xinyue¹, LIU Jingbo^{2,*}

(1. National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China;
2. Lab of Nutrition and Functional Food, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: In this study, *in silico* methods were used to discover novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from hen eggs for regulation of blood pressure. Hen egg proteins were *in silico* hydrolyzed using ExPASy PeptideCutter program. Potential activity, solubility, and absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) properties of the generated peptides were predicted using program online. Three novel ACE inhibitory peptides, FQK, WGK and ADW, were identified from hen egg protein with IC₅₀ values of (250 ± 0.25), (222.74 ± 1.02) and (85.38 ± 0.54) μmol/L, respectively. The molecular docking studies revealed that the ACE inhibitory activity of FQK, WGK and ADW was mainly attributed to their ability to form very strong hydrogen bonds with the S₁ and S₂ pockets. This study provides a high-throughput screening method for the identification of food-derived ACE inhibitory peptides.

Keywords: hen egg proteins; virtual screening; angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides; pocket site; molecular docking
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190507-050

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)12-0129-07

引文格式:

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.
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190507-050. <http://www.spkx.net.cn>

YU Zhipeng, FAN Yue, ZHAO Wenzhu, 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. (in Chinese with English abstract)
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190507-050. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2019-05-07

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0400301)

第一作者简介: 于志鹏(1984—)(ORCID: 0000-0001-9019-5494), 男, 副教授, 博士, 研究方向为蛋白质及活性肽的功能研究与产品开发。E-mail: yuzhipeng20086@sina.com

*通信作者简介: 赵文竹(1986—)(ORCID: 0000-0001-6253-3943), 女, 副教授, 博士, 研究方向为营养与功能食品。
E-mail: zhaowenzhu777@163.com

刘静波(1962—)(ORCID: 0000-0002-1419-0808), 女, 教授, 博士, 研究方向为营养与功能食品。
E-mail: ljb168@sohu.com

蛋白质在消化过程中会释放出小肽和氨基酸,其中小肽以完整的形式被人体利用,会产生类似激素活性物质的作用,比游离的氨基酸更容易被人体吸收,且对人体具有特殊的生理调节功能^[1-2]。生物活性肽具有特定的生理功能,如调节血压、预防老年痴呆和痛风等,可以作为保健食品的功能因子^[3-5]。血管紧张素转化酶(angiotensin-I converting enzyme, ACE)抑制肽是生物活性肽研究领域的热点之一,已经有大量研究证明食源性生物活性肽具有ACE抑制活性^[6]。但利用传统方法筛选ACE抑制肽的周期长且成本高,因此,从天然蛋白资源中高效筛选ACE抑制肽成为研究的焦点。随着生物信息学不断发展,一种基于已知蛋白质氨基酸序列的虚拟筛选技术成为解决当前瓶颈的有效手段^[7]。计算机辅助水解工具ExPASy是瑞士生物信息研究所提供的数据库平台,PeptideCutter可以预测蛋白质序列在特定蛋白酶条件下的切割位点。admetSAR是预测活性肽的吸收、分布、代谢、排泄和毒性(absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity, ADMET)化学性能的工具,能快速判断候选活性肽的生物活性和安全性,节省研发时间和经费的投入。

鸡蛋是良好蛋白质资源,因此,本研究以鸡蛋蛋白质为原料,通过虚拟筛选的方法获得具有潜在ACE抑制活性的肽序列,并对其体外活性进行确证。同时,利用分子对接技术阐明ACE抑制肽与ACE的相互作用机制。本研究旨在为合理利用鸡蛋蛋白质资源,开发鸡蛋蛋白ACE抑制肽提供理论依据,具有广阔的应用前景和经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ACE(来自兔肺)、马尿酸-组氨酸-亮氨酸、马尿酸美国Sigma-Aldrich公司;乙腈、甲醇、三氟乙酸(均为色谱级)美国Fisher Scientific公司;盐酸(分析纯)锦州古城化学试剂厂;氢氧化钠(分析纯)天津市风船化学试剂科技有限公司;硼砂(分析纯)天津市天力化学试剂有限公司;活性肽上海淘普生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Discovery Studio 2017 R2 Client 美国Accelrys公司;2010分析型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪 日本Shimadzu公司;XW-80A涡旋混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-501型超级恒温水浴锅 常州国宇仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 鸡蛋源蛋白质的筛选

鸡蛋中卵清蛋白^[8](Accession: 1OVA_A)、

卵黄蛋白原-1前体^[9](Accession: NP_001004408 XP_422384)、卵黄蛋白原-2前体^[10](Accession: NP_001026447 XP_422370)和铁转运蛋白^[11](Accession: 1AIV_A)作为ACE抑制肽的原料蛋白,其氨基酸数分别为386、1 912、1 850和686。使用BIOPEP-UWM^[12]程序中的“潜在生物活性”工具(<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>)预测所选定的鸡蛋蛋白质作为制备ACE抑制肽原料的潜力。按式(1)计算ACE抑制肽理论释放量(A)^[13]:

$$A/\% = \frac{a}{N} \times 100 \quad (1)$$

式中:a为蛋白质序列中ACE抑制肽片段的数量;N为蛋白质中氨基酸残基的数量。

1.3.2 虚拟酶解与筛选

利用ExPASy PeptideCutter^[14](<http://web.expasy.org/peptidecutter/>)程序中胃蛋白酶(EC3.4.23.1)和胰蛋白酶(EC3.4.21.4)对鸡蛋蛋白质进行虚拟酶解,得到理论多肽序列,从中挑选出三肽序列。利用PeptideRanker^[15]程序预测这些多肽的潜在生物活性(http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/peptideranker.php),用Innovagen程序(<http://www.innovagen.com/proteomics-tools>)的“Peptide property calculator”工具预测肽的溶解度,挑选出水溶性良好的多肽,用admetSAR预测其ADMET^[16](<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/predict/>)性质,主要包括人体肠道吸收(human intestinal absorption, HIA)、血脑屏障穿透(blood-brain barrier penetration, BBB)和急性口服毒性。将筛选得到的具有良好生物活性、水溶性和ADMET性质的活性肽与在线数据库BIOPEP-UWM和AHTPDB^[17](<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/>)中已经被数据库收录的ACE抑制肽进行对比,将未被研究报道的三肽进行下一步研究。

1.3.3 药效团模型

1.3.3.1 训练集的选择及模型构建

选取6个高活性的ACE抑制三肽作为训练集,分别为IKW^[18]、LKP^[19]、LGP^[20]、PLG^[20]、FCF^[18]和FAL^[21],其半抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀)值分别为0.21、0.32、0.72、1.62、2.65、3.5 μmol/L。使用Discovery Studio 2017 R2 Client的Macromolecules模块构建结构,在CHARMM力场下进行能量最小化优化。将这6个训练集小分子的Principal参数设置为2, MaxOmitFeat参数设置为0,构象生成方式的算法为BEST,其他参数均为默认值。并根据评分选择前10个模型进行质量评估^[22]。

1.3.3.2 药效团模型的评估

以表1的15种ACE抑制三肽为测试集^[23-27], Principal参数为2表示验证集是高活性分子, Principal参数为1表示验证集是中活性分子, Principal参数为0表示验证集是无

活性分子。使用Discovery Studio中的Ligand Profile模块分析测试集分子与药效团中关键化学特征间的叠合情况。构象产生参数设为BEST, 在结果中是否显示配体分子和药效团模型的叠合参数设为True, 其他参数均为默认。

表1 测试集分子
Table 1 A set of peptides

肽序列	IC ₅₀ 值/ ($\mu\text{mol/L}$)	Principal	肽序列	IC ₅₀ 值/ ($\mu\text{mol/L}$)	Principal
VSV	0.15	2	AFL	57.1	1
LRP	0.21	2	YGL	409	1
IVY	0.48	2	KGP	172	1
GLP	1.62	2	RVR	526	1
LKA	8.5	2	PER	>1 000	0
LAP	3.5	2	YPF	>1 000	0
PGL	13.93	1	NVR	>1 000	0
VAE	35.8	1			

1.3.4 分子模拟

1.3.4.1 ACE初始结构的处理

使用Discovery Studio 2017 R2 Client软件进行分子对接。从RCSB Protein Data Bank数据库下载ACE (PDB ID: 1O86, 分辨率: 2.0 Å) 的晶体复合物结构^[28], 删除在模拟过程中不必要的水分子以及杂原子, 移除自带配体, 保留Zn²⁺和Cl⁻, 并补全氢原子^[29]。

1.3.4.2 分子对接

利用Discovery Studio 2017 R2 Client构建活性肽的3D结构作为配体, 在CHARMM力场下进行能量最小化优化。使用软件的CDOCKER模块进行ACE与活性肽的半柔性对接, 即ACE设为刚性, 活性肽分子设为柔性, 对接坐标为x: 40.497 4, y: 34.882 9和z: 44.381 4。每个分子生成的对接构象数目设置为10, 其他参数为默认值。活性肽与ACE的结合能力以“-CDOCKER Energy”值表示。

1.3.5 ACE抑制肽的合成

利用FMOC固相化学合成法合成筛选得到的鸡蛋源ACE抑制肽^[30], 活性肽的纯度大于90%。

1.3.6 ACE抑制活性测定

采用已建立的反相HPLC法进行^[31]。

1.3.7 ACE-肽分子互作机制

将活性肽与1.3.3.1节处理后的ACE进行分子对接, 对接条件与1.3.4.2节相同, 研究ACE抑制活性与活性肽化学结构之间的关系, 明确活性肽与ACE之间的相互作用的氨基酸与位置关系。

1.4 数据统计分析

采用Microsoft Excel和Origin对数据进行处理分析, 样品测定结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 ACE抑制肽原料蛋白质的筛选

通过BIOPEP-UWM评估鸡蛋卵清蛋白、卵黄蛋白原-1前体、卵黄蛋白原-2前体和铁转运蛋白作为生物活性肽的潜在来源, 结果表明其ACE抑制肽理论释放量分别为25.1%、8.5%、10.1%和17.2%, 含有的ACE抑制肽理论片段分别为97、163、187和118 (表2), 其中ACE抑制肽理论片段不包括重复序列。卵清蛋白、卵黄蛋白原-1前体、卵黄蛋白原-2前体、铁转运蛋白的蛋白质可以作为筛选ACE抑制肽的前体蛋白, 其中卵黄蛋白原-2前体释放出理论种类最多的ACE抑制肽序列, 这是由于其蛋白长度最长, 蛋白质链中氨基酸序列排列方式理论水解得到ACE的数量最多。此外, 鸡蛋蛋白质水解产物的特征与其氨基酸含量及排列顺序有关。通过BIOPEP-UWM评估, 鸡蛋蛋白质可以作为潜在ACE抑制肽的蛋白来源。

表2 鸡蛋蛋白质理论释放ACE抑制肽含量
Table 2 Amount of ACE-inhibitory peptides from hen egg proteins predicted with BIOPEP-UWM

蛋白名称	Accession编号	蛋白长度	ACE肽序列理论片段	ACE抑制肽理论释放量/%
卵清蛋白	IOVA_A	386	97	25.1
卵黄蛋白原-1前体	NP_001004408 XP_422384	1912	163	8.5
卵黄蛋白原-2前体	NP_001026447 XP_422370	1850	187	10.1
铁转运蛋白	IAIV_A	686	118	17.2

2.2 虚拟筛选

2.2.1 虚拟酶解

使用胃蛋白酶 (pH 1.3) 和胰蛋白酶, 通过ExPASy Peptide Cutter程序虚拟水解卵清蛋白、卵黄蛋白原-1前体、卵黄蛋白原-2前体和铁转运蛋白, 虚拟水解得到大量的二肽、三肽和四肽等。将水解得到的所有三肽收集, 并利用PeptideRanker程序进行生物活性预测, 其中生物活性评分不小于0.5的肽认定为具有潜在高生物活性, 并利用Innovagen程序预测其水溶性, 最终获得了18种水溶性良好、具有潜在高生物活性的三肽, 其中来自卵黄蛋白原-1前体的三肽为GDF、WGK、FKP、FDR、SDF、ACR、QWK、LGR、FQK和IGR, 来自卵黄蛋白原-2前体的三肽为IWR、FTR、AWK和DIC, 来自铁转运蛋白的三肽为ADW、SDF、CDR和DGG。虽然理论上卵清蛋白源释放的ACE抑制肽含量高, 但是并没有在其中获得对应数量的三肽, 这可能是因为卵清蛋白虚拟水解得到的三肽片段较少。

2.2.2 ADMET性质预测结果

对肽的ADMET性质预测可以作为高活性ACE抑制肽的前期筛选条件, 在后续活性肽鉴定和活性验证研究中起重要作用。admetSAR是根据活性肽的结构预测并

分析其吸收和代谢性质的工具。研究发现,在上述18种肽中,仅7种肽WGK、QWK、FQK、AWK、DIC、ADW和SDF具有良好的ADMET特性,均表现为HIA+和BBB+,表明这些肽具有良好的小肠吸收性(>30%)和血脑屏障透过性,且这7种肽均无毒。

2.2.3 药效团模型

以6个高活性的ACE抑制三肽IKW、LKP、LGP、PLG、FCF和FAL为训练集,产生了10个药效团模型Hypothes 1、Hypothes 2、Hypothes 3、Hypothes 4、Hypothes 5、Hypothes 6、Hypothes 7、Hypothes 8、Hypothes 9和Hypothes 10(表3),Rank值分别为86.625、85.470、85.334、85.248、85.202、84.856、84.775、84.773、84.635和84.491。Rank值是HipHop算法得到的药效团模型打分值,体现了药效团与这6个训练集小分子的匹配度,匹配数目越多,Rank值越高。药效团特征匹配数目是111111表示此药效团药效特征与6个小分子均可匹配;部分匹配药效团特征数目表示此药效团药效特征中与6个小分子部分匹配的药效特征数目为0;最大匹配值为5,表示5个药效特征均可匹配。其中Hypothes 1的Rank值最高为86.625,表明活性化合物与药效团Hypothes 1匹配最好,构建的药效团模型最可靠。

表3 训练集生成的10个药效团模型参数

Table 3 Ten pharmacophore model parameters generated from training set

模型	特征	Rank值	药效团特征匹配数目	部分匹配药效团特征数目	最大匹配值
Hypothes 1	PNHDA	86.625	111111	000000	5
Hypothes 2	PNHAA	85.470	111111	000000	5
Hypothes 3	PNHDA	85.334	111111	000000	5
Hypothes 4	PNHDA	85.248	111111	000000	5
Hypothes 5	PNHDA	85.202	111111	000000	5
Hypothes 6	PNHAA	84.856	111111	000000	5
Hypothes 7	PNHDA	84.775	111111	000000	5
Hypothes 8	PNHAA	84.773	111111	000000	5
Hypothes 9	PNHDA	84.635	111111	000000	5
Hypothes 10	PNHAA	84.491	111111	000000	5

注: A.药效团含有氢键受体特征; D.药效团含有氢键供体特征; H.药效团含有疏水中心特征; N.药效团含有负电离子中心特征; P.药效团含有正电离子中心特征。

实验以6个活性分子、6个中等活性分子和3个无活性的ACE抑制肽对所获得的10个药效团模型进行验证。图1为测试集分子与药效团匹配生成的热图,颜色从红色到蓝色表示匹配度越来越高。由图1可知,药效团模型测试集中的12个高活性及中活性肽序列VSV、LRP、IVY、GLP、LKA、LAP、PGL、VAF、AFL、YGL、KGP、RVR所对应的区域大部分显示橙色、黄色及浅绿色,而3个无活性肽PER、YPF和NVR所对应的区域都显示为蓝色和深蓝色,能够较好地识别区分测试集

中的活性分子和无活性分子。Hypothes 1与活性最好的分子区域呈明显的橙色,与无活性分子区域呈明显的蓝色,证明该模型最可靠。药效团模型通过分析三肽的氢键受体特征、氢键供体特征、疏水中心特征、负电离子中心特征和正电离子中心特征预测其生物活性,因此,利用Ligand Profile模块分析三肽WGK、QWK、FQK、AWK、DIC、ADW和SDF分别与Hypothes 1关键化学特征元素间的叠合情况,其Fit值分别为2.287、2.987、2.402、3.106、3.046、2.744和1.311。结果表明,SDF的Fit值最低,与Hypothes 1匹配度最低,因此,实验剔除掉三肽SDF,以剩余的6种三肽WGK、QWK、FQK、AWK、DIC和ADW进行分子对接和活性验证。

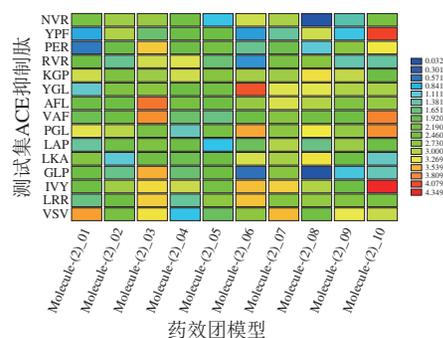


图1 ACE抑制肽药效团热图

Fig. 1 Pharmacophore heat maps of ACE inhibitory peptides

2.2.4 分子对接与活性验证

使用Discovery Studio 2017 R2 Client软件进行ACE(1O86)与上述6种肽的对接,计算ACE-肽之间结合能量,考察ACE-肽复合物的稳定性。通过分子对接中打分函数可知,ACE-WGK、ACE-QWK、ACE-FQK、ACE-AWK、ACE-DIC和ACE-ADW的“-CDOCKER Energy”值分别为96.45、91.64、111.98、83.05、94.40、97.59 kcal/mol。“-CDOCKER Energy”值相对越高,表示其结合越紧密。结果表明,这6种肽均可与ACE发生结合,ACE-FQK、ACE-WGK和ACE-ADW结合较好,即FQK、WGK和ADW可能具有更好的ACE抑制活性。最后,通过与BIOPEP-UWM和AHTPDB数据库中已经发表的ACE抑制肽(2019年4月在BIOPEP-UWM数据库处获得的数据)进行比较,结果表明,实验获得的3种三肽均为首次研究报道。对三肽FQK、WGK和ADW进行Fomc法固相合成,并利用反相HPLC法检测其体外ACE抑制活性,IC₅₀值分别为(250±0.25)、(222.74±1.02)、(85.38±0.54) μmol/L,其中ADW的活性最高。

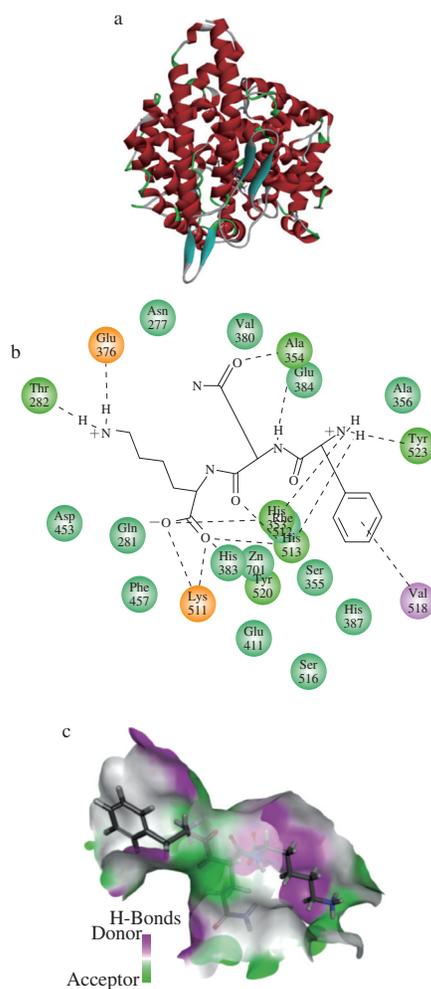
2.3 ACE-肽的作用机制

通过CDOCKER程序研究了FQK、WGK和ADW对

ACE的抑制机制, 从分子角度阐述优选活性肽FQK、WGK和ADW与ACE的作用机制(3D模型见图2a、3a和4a)。由图2b可知, 三肽FQK与ACE的氨基酸残基Ala354(2.07 Å/2.59 Å)、His353(2.18 Å)、His513(2.25 Å)、Tyr523(2.04 Å)、Tyr520(2.12 Å)、Lys511(1.85 Å)和Thr282(1.89 Å)之间形成了8个不同距离的氢键, 其中, FQK和氨基酸残基Ala354之间含有2个氢键, 与Lys511之间形成的氢键最短, 结合最紧密; FQK与氨基酸残基His513(2.71 Å/3.08 Å)形成2个不同距离的碳氢键, 与His353(2.86 Å)的结合形成1个碳氢键。FQK与氨基酸残基Val518(4.47 Å)形成疏水相互作用, Lys511和Glu376形成盐桥。

由图3b可知, 在ACE-WGK复合物中, WGK与ACE中的氨基酸残基Gln281(2.03 Å)、Tyr520(1.97 Å)、Asp453(1.87 Å)、His353(2.53 Å/2.04 Å)、His513(2.09 Å)和Tyr523(2.20 Å)形成了7个不同距离的氢键, 与Glu384(2.70 Å)之间形成了1个碳氢键, 与Lys511(2.01 Å)相互作用形成盐桥, 与Lys511(2.01 Å)、Asp453(3.64 Å)和Glu376(5.04 Å)形成静电相互作用, 与Val518(4.25 Å/4.36 Å)形成疏水相互作用。此外, WGK中的氧原子还与Zn701(2.17 Å)形成金属受体相互作用。ACE的活性中心含有二价锌阳离子的活性口袋, WGK和ADW和活性口袋中的残基发生作用, 且具备能与锌离子有较强的结合能力, 占据ACE的活性中心, 使其活性降低。

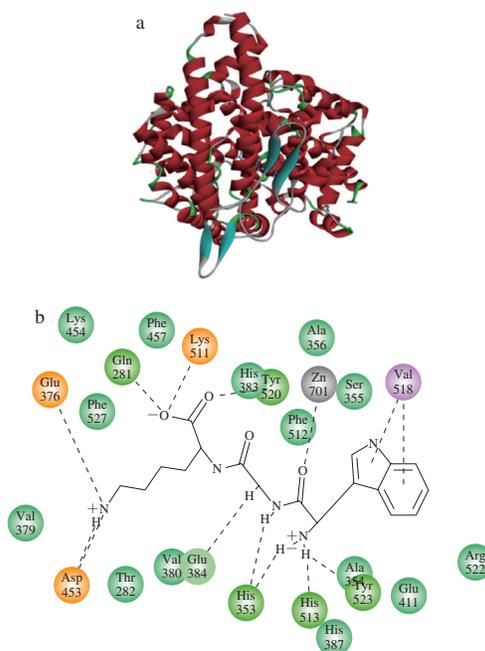
由图4b可知, 三肽ADW与ACE中的Gln281、Ala354以及Tyr523氨基酸残基之间形成了3个氢键, 氢键长度分别为2.25、2.91 Å以及2.66 Å; 与His513(2.54 Å/2.76 Å)、His353(2.53 Å/2.61 Å)、Tyr523(2.66 Å)和His383(2.69 Å)之间形成了6个不同距离的碳氢键。同时, ADW与氨基酸残基Lys511(1.81 Å)和Glu162(2.19 Å)形成盐桥, 与His353(4.53 Å)发生静电相互作用, 与氨基酸残基Ala356(5.45 Å)和Val518(4.87 Å)发生疏水相互作用。此外, ADW中的氧原子与Zn701(2.24 Å)形成金属受体相互作用, 其余的氨基酸残基与ACE抑制肽形成的都是范德华力。活性口袋中的氨基酸是ACE与三肽分子相互作用的关键氨基酸, 通过已经解析出的ACE晶体结构(PDB ID: 1O86)可知, ACE主要含有3个活性口袋 S_1 (Ala354、Glu384和Tyr523), S_2 (Gln281、His353、His513、Lys511和Tyr520)和 S_1' (Glu162)^[32]。研究表明, ACE抑制肽的氨基酸组成与其抑制活性密切相关, 因此, 三肽的氨基酸残基与ACE的相互作用关系的研究有助于ACE机理的解析^[33-34]。



a. 3D模型图; b. 2D模型图; c. 氢键相互作用。下同。

图2 ACE-FQK分子对接相互作用

Fig. 2 Molecular docking between FQK and ACE



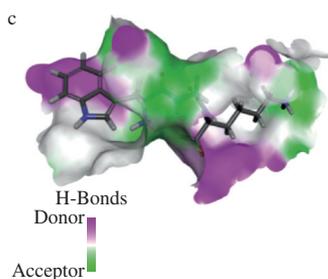


图3 ACE-WGK分子对接相互作用

Fig. 3 Molecular docking between WGK and ACE

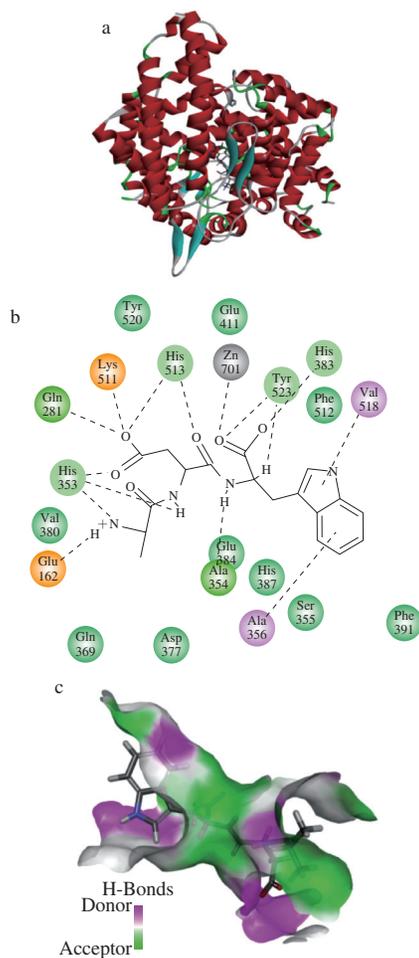


图4 ACE-ADW分子对接相互作用

Fig. 4 Molecular docking between ADW and ACE

3 结论

目前,生物活性肽的大量研究主要集中在蛋白酶和蛋白质的筛选上,在原料蛋白质和蛋白酶选择上具有盲目性。利用虚拟酶解等手段不仅可以明确肽序列,同时也可以预测实验选取的蛋白质是否可以作ACE抑制肽的原料蛋白,有利于选择今后实验研究的对象,同时为从原料蛋白质中寻找已知序列的生物活性肽提供了基

础。本实验利用虚拟筛选、药效团模型并结合分子对接的方法获得了来自鸡蛋蛋白源的ACE抑制肽FQK、WGK和ADW,并对其体外ACE抑制活性和作用机制进行研究。实验表明鸡蛋蛋白源三肽FQK、WGK和ADW具有体外ACE抑制活性,IC₅₀值分别为(250±0.25)、(222.74±1.02)、(85.38±0.54) μmol/L。研究发现FQK、WGK和ADW能与ACE的活性口袋S₁、S₂中的氨基酸残基发生作用,WGK和ADW与锌离子能够牢固的结合,且ADW是本研究中唯一一个与活性口袋S₁氨基酸残基Glu162形成相互作用的三肽,这也可能是ADW的体外ACE抑制活性最高的原因。虚拟筛选可以定向筛选ACE抑制肽,药效团为ACE抑制活性肽序列预测提供了辅助,与传统酶解方法相比降低了实验成本并提高了筛选鉴定ACE抑制肽的效率。

参考文献:

- [1] 张贵川. 食源三肽ACE抑制活性构效关系研究[D]. 重庆: 西南大学, 2009: 17-18.
- [2] JR K E W, MATTHEWS J C, DIRIENZO D B, et al. Peptide absorption: a review of current concepts and future perspectives[J]. Journal of Animal Science, 1992, 70(10): 3248. DOI:10.1111/j.1439-0388.1992.tb00418.x.
- [3] 李莹, 周剑忠, 夏秀东, 等. 超声波辅助酶解制各泥鳅蛋白源ACE抑制肽[J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 182-187. DOI:10.16429/j.1009-7848.2018.09.023.
- [4] YU Z P, WU S J, ZHAO W Z, et al. Anti-alzheimers activity and molecular mechanism of albumin-derived peptides against AChE and BChE[J]. Food & Function, 2018, 9(2): 1173-1179. DOI:10.1039/C7FO01462G.
- [5] JANG I T, HYUN S H, SHIN J W, et al. Characterization of an anti-gout xanthine oxidase inhibitor from pleurotus ostreatus[J]. Mycobiology, 2014, 42(3): 296-301. DOI:10.5941/MYCO.2014.42.3.296.
- [6] WANG C, TU M L, WU D, et al. Identification of an ACE inhibitory peptide from walnut protein and its evaluation of the inhibitory mechanism[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 2-11. DOI:10.3390/ijms19041156.
- [7] YU Z P, CHEN Y, ZHAO W Z, et al. Identification and molecular docking study of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Salmo salar* using *in silico* methods[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2018, 98(10): 3907-3915. DOI:10.1002/jsfa.8908.
- [8] STEIN P E, LESLIE A G W, FINCH J T, et al. Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins[J]. Nature, 1990, 347: 99-102. DOI:10.1038/347099a0.
- [9] AMO A, RODRÍGUEZ-PÉREZ R, BLANCO J, et al. Gal d 6 is the second allergen characterized from egg yolk[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(12): 7453-7457. DOI:10.1021/jf101403h.
- [10] CZERNICK D, LIU J, SERGE D, et al. Topographical distribution of phosphorylation sites of phosphotyrosines by mass spectrometry[J]. Journal of Proteomics, 2013, 83: 76-98. DOI:10.1016/j.jpro.2013.02.016.
- [11] KUOKAWA H, MIKAMI B, HIROSE M. Crystal Structure of diferric hen ovotransferrin at 2.4 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 254(2): 196-207. DOI:10.1006/jmbi.1995.0611.
- [12] IWANIAK A, MINKIEWICZ P, DAREWICZ M, et al. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids[J]. Food Research International, 2016, 85: 155-161. DOI:10.1016/j.foodres.2016.04.031.

- [13] DAREWICZ M, DZIUBA M, IWANIAK A, et al. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences[J]. Journal of AOAC International, 2008, 91(4): 965-980. DOI:10.1093/jaoac/91.4.965.
- [14] WIEDERSCHAIN G Y. The proteomics protocols handbook[M]. Biochemistry, 2006, 71(6): 696. DOI:10.1134/S0006297906060150.
- [15] MOONEY C, HASLAM N J, POLLASTRI G, et al. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity[J]. PLoS ONE, 2012, 7: e45012. DOI:10.1371/journal.pone.0045012.
- [16] CHENG F X, LI W H, ZHOU Y D, et al. admetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012, 52(11): 3099-3105. DOI:10.1021/ci300367a.
- [17] KUMAR R, CHAUDHARY K, SHARMA M, et al. AHTPDB: a comprehensive platform for analysis and presentation of antihypertensive peptides[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43: 956-962. DOI:10.1093/nar/gku1141.
- [18] FUJITA H, YOKOYAMA K, YOSHIKAWA M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(4): 564-569. DOI:10.1111/j.1365-2621.2000.tb16049.x.
- [19] FUJITA H, YOSHIKAWA M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein[J]. Immunopharmacology, 1999, 44(1/2): 123-127. DOI:10.1016/S0162-3109(99)00118-6.
- [20] BYUN H G, KIM S K. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from alaskan pollack skin[J]. Journal of Biochemistry Molecular Biology, 2002, 35(2): 239-243. DOI:10.5483/BMBRep.2002.35.2.239.
- [21] SUETSUNA K, CHEN J R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*[J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(4): 305-309. DOI:10.1007/s10126-001-0012-7.
- [22] PALAKURTI R, VADREVVU R. Pharmacophore based 3D-QSAR modeling, virtual screening and docking for identification of potential inhibitors of β -secretase[J]. Computational Biology and Chemistry, 2017, 68: 107-117. DOI:10.1016/j.compbiolchem.2017.03.001.
- [23] MIYOSHI S, KANEKO T, ISHIKAWA H, et al. Production of bioactive peptides from corn endosperm proteins by some proteases[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1995, 750: 429-431. DOI:10.1111/j.1749-6632.1995.tb19990.x.
- [24] UENO T, TANAKA M, MATSUI T, et al. Determination of antihypertensive small peptides, val-tyr and ile-val-tyr, by fluorometric high-performance liquid chromatography combined with a double heart-cut column-switching technique[J]. Analytical Sciences, 2005, 21(8): 997-1000. DOI:10.2116/analsci.21.997.
- [25] PIHLANTO-LEPPÄLÄ A, KOSKINEN P, PIILOLA K, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides[J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67(1): 53-64. DOI:10.1017/s0022029999003982.
- [26] O'KEEFFE M B, NORRIS R, ALASHI M A, et al. Peptide identification in a porcine gelatin prolyl endoproteinase hydrolysate with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and hypotensive activity[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 77-88. DOI:10.1016/j.jff.2017.04.018.
- [27] ORIO L P, BOSCHIN G, RECCA T, et al. New ACE-inhibitory peptides from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(48): 10482-10488. DOI:10.1021/acs.jafc.7b04522.
- [28] NATESH R, SCHWAGER S L U, STURROCK E D, et al. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex[J]. Nature, 2003, 421: 551-554. DOI:10.1038/nature01370.
- [29] 陶萌良. 蚕蛹蛋白源ACE抑制多肽的抑制机理及构效关系研究[D]. 南宁: 广西大学, 2017: 18-20.
- [30] 刘静波, 于志鹏, 赵文竹, 等. 蛋清源ACE抑制肽结构鉴定及其稳定性[J]. 吉林大学学报(工学版), 2011, 41(2): 579-584. DOI:10.13229/j.cnki.jdxbgxb2011.02.001.
- [31] LIU J B, YU Z P, ZHAO W Z, et al. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1159-1163. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.03.108.
- [32] RAWENDRA R D S, AISHA, CHANG C I, et al. A novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptide derived from proteolytic digest of Chinese soft-shelled turtle egg white proteins[J]. Journal of Proteomics, 2013, 94(6): 359-370. DOI:10.1016/j.jprot.2013.10.006.
- [33] LEO F D, PANARESE S, GALLERANI R, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food[J]. Current Pharmaceutical Design, 2009, 15: 3622-3643. DOI:10.2174/138161209789271834.
- [34] 邱娟, 沈建东, 翁凌, 等. 利用牡蛎制备ACE抑制肽的工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 165-172. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716026.