

基于药效团模型筛选鳕鱼源可溶性环氧化物水解酶抑制肽及其作用机制

刘攀¹, 涂茂林², 刘汉雄¹, 程述震^{1,*}, 徐献兵¹, 杜明¹

(1.大连工业大学食品学院, 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁 大连 116034;

2.宁波大学食品与药学学院, 浙江 宁波 315800)

摘要:以可溶性环氧化物水解酶(soluble epoxide hydrolase, sEH)为靶点的生理性抑制剂在治疗高血压、炎症、心血管疾病及糖尿病等方面具有显著的疗效。以大西洋真鳕鱼多肽粉为原料, 构建Hypogen药效团, 结合分子对接法筛选含有色氨酸且抑制sEH活性的生物活性肽, 通过固相合成技术制备生物活性肽序列, 并采用高效液相色谱法测定其sEH体外抑制活性。结果表明, 利用最佳药效团模型(1号药效团)筛选出的四肽(PLLW)具备最优的Fit值(9.053)和LibDock评分(147.807), 其半抑制浓度(IC₅₀)为506.66 μmol/L。分子对接结果表明, PLLW通过氢键和疏水相互作用与生理性底物竞争结合sEH活性位点, 起到抑制活性。本研究为食源性混合体系中sEH抑制剂的筛选及机制研究提供了一种新思路, 为sEH抑制剂产品的开发提供了一个合适的模型。

关键词:鳕鱼; 多肽; 可溶性环氧化物水解酶; 抑制剂; 分子对接

Screening, Identification and Mechanism of Action of Cod-Derived Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitory Peptides Based on Pharmacophore Model

LIU Pan¹, TU Maolin², LIU Hanxiong¹, CHENG Shuzhen^{1,*}, XU Xianbing¹, DU Ming¹

(1. National Engineering Research Center of Seafood, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315800, China)

Abstract: The physiological inhibitors of soluble epoxide hydrolase (sEH) have significant efficacy in the treatment of hypertension, inflammation, cardiovascular disease and diabetes. In this study, a Hypogen pharmacophore was developed using Atlantic cod peptide and was used to screen for bioactive peptides with tryptophan and sEH inhibitory activity by molecular docking. Bioactive peptide sequences were prepared by solid-phase synthesis, and their *in vitro* sEH inhibitory activity was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the tetrapeptide (PLLW) selected by the optimal pharmacophore model had the best Fit value (9.053) and LibDock score (147.807), and its half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was 506.66 μmol/L. The molecular docking results showed that PLLW competed with physiological substrates to bind to the active site of sEH through hydrogen bonding and hydrophobic interactions. This study provides a new idea for the screening and mechanistic study of sEH inhibitors in foodborne mixed systems, and also provides a suitable model for the development of sEH inhibitor products.

Keywords: cod; peptides; soluble epoxide hydrolase; inhibitor; molecular docking

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220517-222

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)06-0220-07

引文格式:

刘攀, 涂茂林, 刘汉雄, 等. 基于药效团模型筛选鳕鱼源可溶性环氧化物水解酶抑制肽及其作用机制[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 220-226. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220517-222. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Pan, TU Maolin, LIU Hanxiong, et al. Screening, identification and mechanism of action of cod-derived soluble epoxide hydrolase inhibitory peptides based on pharmacophore model[J]. Food Science, 2023, 44(6): 220-226. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220517-222. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-05-17

基金项目: 辽宁省科技重大专项计划项目(2020JH1/10200001)

第一作者简介: 刘攀(1997—)(ORCID: 0000-0003-4195-3457), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。

E-mail: liupan2015310672@foxmail.com

*通信作者简介: 程述震(1990—)(ORCID: 0000-0003-2757-8008), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食源性多肽构效关系。

E-mail: chengshuzhen0547@yeah.net

鳕鱼 (*Gadus morhua*)，来源于北欧和北美东部的北大西洋冷水区，富含优质蛋白，为全球每年捕获量最高的鱼类之一，在全球渔业中具有重要地位^[1-2]。研究表明，鳕鱼多肽具有改善骨质疏松^[3]、增强骨密度^[4]、抗酒精性胃溃疡^[5]、防止钙流失^[6]以及抗氧化^[7-8]等多种功能活性。

可溶性环氧化物水解酶 (soluble epoxide hydrolase, sEH)，属于环氧化物水解酶中的一类，在机体内以环氧化脂肪酸为底物。主要分布在肾脏、肾上腺、肝脏、胰岛和血管内皮细胞等组织结构中^[9]。sEH的底物环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acids, EETs) 具有抗炎、镇痛、抗高血压、心脏保护和器官保护特性，而其水解产物二羟基二十碳三烯酸 (dihydroxyeicosatrienoic acids, DHET) 则丧失了相应活性^[10]。因此目前sEH抑制剂在治疗高血压、炎症、心血管疾病及糖尿病等方面呈现良好的应用前景。现有研究表明，在多种疾病动物模型中应用sEH抑制剂或sEH基因敲除的方式，从而提高体内EETs的水平，将在心肌肥厚、糖尿病、炎症、高血压和肾病等疾病中发挥重要的生理作用^[11]。目前开发的sEH抑制剂主要是针对其催化位点对sEH进行抑制，其大多为人工合成类抑制剂，但其工艺复杂，价格昂贵，如t-AUCB、AUDA、TPPU等。此外虽有从天然产物中分离得到的抑制剂，但多数效果不如人工合成类，如从辣椒中分离出的辣椒素^[12]等。目前研究发现sEH的抑制剂分子质量大多不超过600 Da，且从表观上看大多具有酰胺键结构。

研究配体和受体之间的相互作用对于快速筛选新的活性分子极其关键，构建药效团模型是解决该问题的一种途径，该方法被认为在寻找靶标生物活性分子上非常有效，并且可以极大程度节约时间和成本^[13-14]。定量结构活性关系模型 (quantitative structure-activity relationship, QSAR) 是揭示化合物结构性质与生物活性之间关系的一种计算建模方法，不但能够对已知活性的化合物进行结构改进，以获的具有更高活性的生理性物质，同时也可对未知化合物的生理活性做出预测，帮助筛选具有良好生理活性的物质^[15-16]。利用QSAR的计算原理可构建常用的药效团模型，包括Discovery Studio软件中的Hypogen和Hippop模型等。有研究表明，单个的色氨酸分子在一定浓度下可抑制sEH活性^[17]。因此，本研究通过构建Hypogen药效团，筛选获得具有抑制sEH活性的鳕鱼源多肽，并对其体外活性进行验证，同时利用分子对接的方式探究其作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大西洋真鳕鱼多肽粉由青岛益和兴公司提供。该样品的基本组分构成为：蛋白质（多肽）84.92%，脂肪

1.46%，灰分3.62%，水分5.95%，糖0.68%。其中蛋白质（多肽）中分子质量低于1 000 Da的占比为83.42%^[18]。

可溶性环氧化物水解酶抑制剂筛选试剂盒（货号10011671）美国Cayman Chemical公司；AUDA美国MedChemExpress公司；二甲基亚砜、6-甲氧基-2-萘甲醛 上海麦克林试剂公司；甲醇（色谱纯）美国斯百全公司；甲酸、乙腈（均为色谱纯）美国Sigma公司；Cleanert S C₁₈-SPE小柱 天津博纳艾杰尔科技有限公司；实验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

Discovery Studio 2017 R2 Client 美国Accelrys公司；1260高效液相色谱系统（配有荧光检测器）美国安捷伦公司；sy-2000型旋转蒸发器 上海荣升生化仪器厂；SCIETZ-10ND型号冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司；固相萃取仪 北京凯瑞恩科贸中心；ME3002E精密天平 梅特勒-托利多仪器有限公司；Aqua® 5 μm C₁₈色谱柱（250 mm×4.6 mm，125 Å）美国Phenomenex公司；EASY-nanoLC 1200系统 美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 大西洋鳕鱼疏水性多肽的制备

亲疏水性多肽的分离提取采用C₁₈-SPE小柱进行分离^[19]。首先使用3 mL甲醇对C₁₈-SPE小柱填料进行活化，然后用3 mL含有0.1%甲酸溶液对C₁₈-SPE小柱进行平衡，之后将肽粉样品溶于水中，以80 mg/mL质量浓度上样，每次上样量1 mL，之后使用3 mL含有0.1%甲酸溶液对样品进行洗脱，洗脱脱去鳕鱼肽的亲水部分；然后使用3 mL 80%甲醇溶液对样品再次进行洗脱，最终得到鳕鱼肽的疏水部分。全程均使用布氏漏斗装置抽滤以加快洗脱流速。收集疏水肽部分后使用旋转蒸发器在50 °C水浴下旋转蒸发提高样品浓度，之后使用冷冻干燥机将样品冻干。

1.3.2 疏水性多肽序列鉴定

冻干后的肽粉样品鉴定序列并选出含有色氨酸的短肽序列。将样品重新溶解在A相（0.1%甲酸溶液）中，并通过Q Exactive耦合到EASY-nanoLC 1200系统中进行分析。共上样3 μL样品（分析柱：Acclaim PepMap C₁₈，75 μm×25 cm），以60 min梯度分离样品，柱流量控制在300 nL/min，柱温40 °C，电喷雾电压2 kV，梯度从2%的B相（80%乙腈溶液，含有0.1%甲酸）起始，平衡3 min，在第47分钟以非线性梯度升高到35%，第48分钟升高到100%，此后维持12 min。质谱（mass spectrometry, MS）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：质量扫描范围 *m/z* 200~1 500；分辨率70 000；AGC target: 3×10⁶；

最大注入时间60 ms; 2) 高分辨高能碰撞解离质谱(HCD-MS/MS): 分辨率17 500; AGC target: 5×10^4 ; 最大注入时间50 ms; 碰撞能量27 eV; 动态排除时间20 s。

1.3.3 药效团模型

1.3.3.1 训练集和测试集分子构象的选择

在PDB数据库及文献资料中收集共计29种sEH抑制剂的化学结构^[20-23], 并获得具体生理活性数值。其抑制活性数据均采用同一原理方法^[24]进行测定, 该方法是通过测定在加入sEH抑制剂的同时, sEH催化水解底物PHOME, 最终得到反应产物6-甲氧基-2-萘甲醛的量, 以此判断抑制剂与sEH结合的能力, 抑制活性用 IC_{50} 值表示, 所有抑制剂的抑制活性 IC_{50} 值覆盖了5个数量级, 范围广。在构建Hypogen药效团模型时, 所使用的是 IC_{50} 值的负对数(pIC_{50})。所有29个抑制剂分子中, 其中训练集分子18个, 测试集分子11个, 所有抑制剂的化学分子结构式与活性数据详见图1。

利用ChemDraw 18.0软件, 画出所有收集到的sEH抑制剂的化学结构, 然后使用DS软件中的Minimize模块, 对29个抑制剂分子进行CHARMM力场的能量最小化, 并

将其 IC_{50} 值的活性数值编辑输入到浏览器表格的Active一栏中, 活性不确定值(Uncert值)设定为默认值1.5。

1.3.3.2 Hypogen药效团模型的构建与验证

使用Discovery Studio软件中的Feature Mapping程序筛选出需要匹配的特征元素, 运行程序后即可从训练集分子中提取得到训练集分子药效团特征元素及其空间排列形式。随后在Discovery Studio软件中选择3D QSAR Pharmacophore Generation模块产生药效团模型, 选取氢键受体、氢键供体、疏水中心、正电离子中心和芳香环中心为特征元素, 设定相关参数后运行程序, 将会生成10个药效团模型。其中低能量的构象用Conformation Generation模块中的Fast算法生成药效团模型, 并设置能量阈值为10 kcal/mol, 其余参数设为默认值后运行程序, 将会生成10个药效团模型。

根据产生药效团模型的统计性指标(如交叉验证相关系数(q^2)和均方根误差等), 筛选出其中效果较好的模型, 并采用测试集分子进行验证, 对比分析预测活性与实际活性。评价药效团模型的一般准则, 模型药效团特征元素尽可能存在于所有训练集分子, 同时测试集分子含有该特征元素。采用Fisher随机检验对药效团模型数据进行随机交叉验证^[25], 之后利用DS软件中的

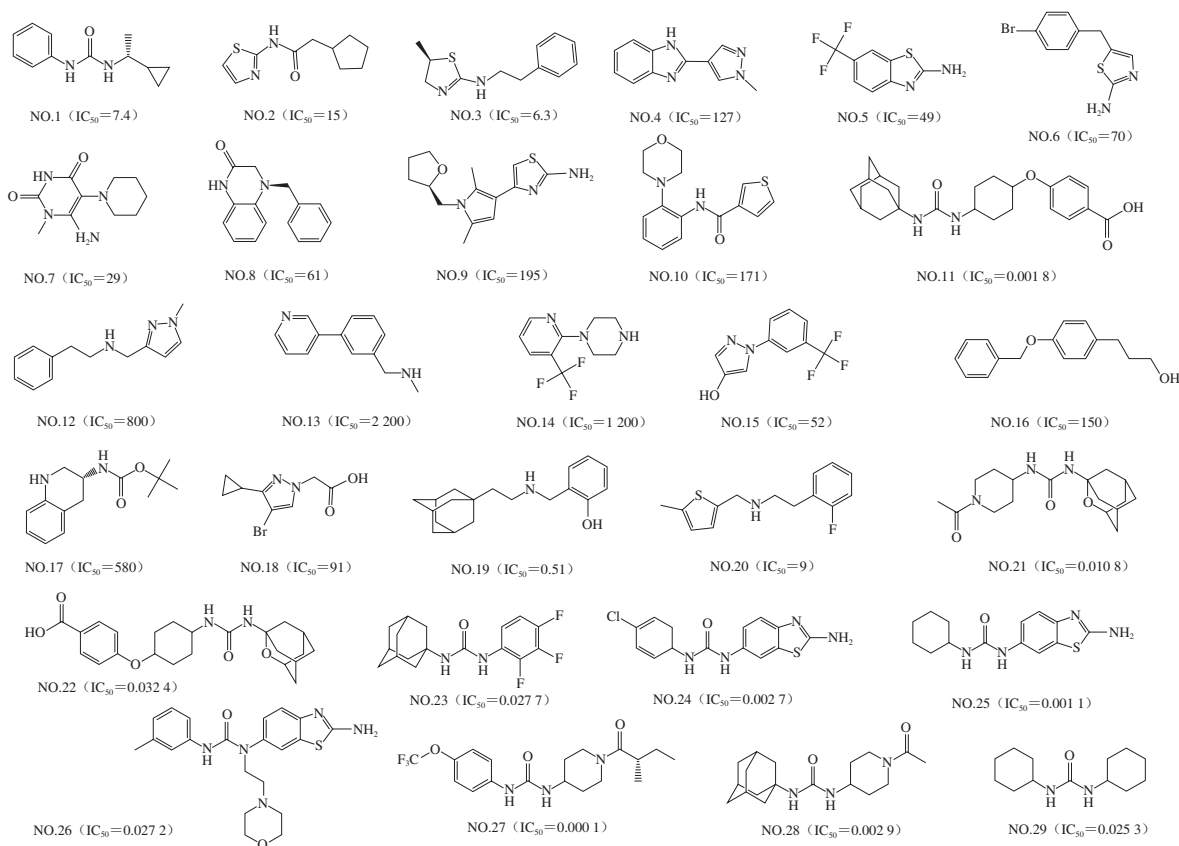


图1 训练集和测试集的结构与活性数据($\mu\text{mol/L}$)

Fig. 1 Structure and activity data of training and test sets ($\mu\text{mol/L}$)

Ligand Profile模块分析配体分子与药效团中关键化学特征元素间的叠合情况。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。

1.3.3.3 多肽生理活性的预测与筛选

利用1.3.3.2节中生成的最佳Hypogen药效团模型对1.3.2节中筛选出的含有色氨酸的3-5肽序列进行分析预测, 使用sEH抑制剂t-AUCB作为参照的标准, 并得到Fit值。同时, 利用PeptideRanker^[26]程序预测这些多肽序列潜在具有sEH抑制活性的概率。然后使用Innovagen网站^[15-16] (<http://www.innovagen.com/proteomics-tools>) 中的“Peptide property calculator”工具预测多肽的溶解性和等电点。另外, 利用ADMETlab 2.0^[27]预测这些序列的ADMET性质, 包括人体肠道吸收性, 血脑屏障穿透性和大鼠急性口服毒性。将预测得到的ADMET结果进行分析, 筛选出最合适的多肽序列进行合成。

1.3.4 分子模拟

1.3.4.1 sEH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sEH (PDB ID: 3ANS^[28], 分辨率: 1.98 Å) 晶体复合物结构, 使用Prepare Protein删除在对接过程中不需要的水分子及杂原子, 移除自带配体并补全氢原子。

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。随后使用DS软件的LibDock模块进行sEH与活性肽的模拟对接。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。活性肽及配体与sEH的结合能力以“LibDock Score”值表示。

1.3.4.3 sEH体外抑制活性的测定

鳕鱼源sEH抑制肽的抑制活性的测定原理参考Morisseau等^[24]的方法, 并进一步改进。采用高效液相色谱法进行测定: 流动相A为水, 流动相B为乙腈, 流动相A和B中均含有0.01%甲酸。流动相洗脱程序见表1。

表1 sEH酶活力高效液相色谱测定方法

时间/min	体积分数/%		流速/(mL/min)
	A水	B乙腈	
0	40	60	1.0
8.5	40	60	1.0
11.5	10	90	1.0
16	10	90	1.0
19	40	60	1.0
23	40	60	1.0

含有抑制剂或者样品的反应组先使用抑制剂或者样品与sEH在25 °C培养30 min, 再添加底物PHOME。在反应进行30 min后, 使用0.22 μm有机滤膜对样品进行过滤, 然后进行上样, 上样量为10 μL, 设定PMT增益值为

15, 在激发波长330 nm和发射波长465 nm条件下测定反应产物6-甲氧基-2-萘甲醛的荧光强度, 反应体系如表2所示。测定结果用IC₅₀值表示。

表2 sEH酶活力测定的反应体系

Table 2 Reaction system for the assay of sEH activity

组别	sEH	底物	Buffer	抑制剂	肽	抑制剂溶剂
空白对照组	0	20	160	0	0	20
完全反应组	20	20	140	0	0	20
阳性对照组	20	20	140	20	0	0
样品组	20	20	140	0	20	0

1.4 数据统计分析

采用Origin 8.0软件对数据采用t检验进行处理分析, 分子对接所得图形及结果均来自于Discovery Studio 2017 R2 Client软件。

2 结果与分析

2.1 Hypogen药效团

依据3D-QSAR原理, 采用训练集18个sEH抑制剂分子建立Hypogen药效团模型, 表3给出了利用训练集分子结构与活性生成的10个Hypogen药效团模型, 包含各个模型的Cost值、相关系数因子(*r*)、均方根偏差(root mean squared deviation, RMSD)和药效团特征元素。

生成的10个药效团模型的Total cost值的范围为58.065 8~61.978 2; Null cost值为121.698; Fixed cost值为51.362 9; *q*²在0.798~0.954之间; RMSD的范围为0.427~0.902之间。而10个生成的药效团模型中均匹配到了3~4个药效团特征元素, 其中多为氢键受体和氢键供体。Cost值是评估药效团模型的关键指标, 是对模型的预测活性与实际活性偏差以及药效团构成的复杂程度的综合评价。如果ΔCost值大于60, 则表明模型的置信区间为75%~90%, 如果该值小于40, 则该药效团模型的置信区间不到50%; 如果交叉验证相关系数(*q*²)越接近于1、RMSD越小则说明药效团效果更优^[29-30]。

从表3可以看出, 1号药效团的Total cost值为最低(58.065 8), 接近于Fixed cost值(51.3629), ΔCost值为63.632 (>60), 这说明1号药效团模型的置信区间为75%~90%, 具有较好的可信度。从统计学指标看, 相对于其他药效团模型而言, 1号药效团具有一定的预测能力, 匹配的药效团特征元素为较多的4个, 且类型广泛, 包括1个氢键受体特征、1个疏水中心特征及2个氢键供体特征。同时与其他的9个药效团的指标相比较分析, 1号药效团具有较大的*q*²值(0.949), 较低的RMSD值(0.437), 也可以说明1号药效团优于其他药效团模型, 因此选择1号药效团为最佳药效团。

表3 由训练集构建的Hypogen药效团效果

编号	Total cost	RMSD	q^2	Δ Cost	特征元素
1	58.065 8	0.437	0.949	63.632	HBA HBD HBD HY
2	58.394 9	0.444	0.947	63.303	HBA HBD HBD HY
3	59.331 0	0.427	0.954	62.367	HBA HBD HBD
4	59.920 3	0.595	0.900	61.778	HBD HBD HY HY HY
5	60.814 1	0.902	0.774	60.884	HBA HBD HBD HY
6	61.334 1	0.639	0.884	60.364	HBD HBD HY HY HY
7	61.693 4	0.649	0.880	60.005	HBD HBD HY HY HY
8	61.911 1	0.662	0.875	59.787	HBD HBD HY HY HY
9	61.925 8	0.546	0.921	59.772	HBD HBD HY HY
10	61.978 2	0.848	0.798	59.720	HBA HBD HBD HY

注: HBA.药效团含有氢键受体特征元素; HBD.药效团含有氢键供体特征元素; HY.药效团含有疏水中心特征元素。

2.2 药效团的验证

在Fisher随机验证的过程中,会先把所有训练集分子的活性值全部打乱,并随机分配到各个分子结构上,之后再采用相同的参数完成药效团模型的建立。若得到的随机模型与生成的初始模型相比,不具有相似或更好的 Δ Cost值、RMSD值以及 q^2 值等相关系数,则可以说明生成的模型并非是偶然产生的,具有统计学意义。按照该验证方法,并重新构建生成了随机的药效团模型,在95%的置信度水平对Cost值和RMSD值进行评估。如图2所示,结果表明9次随机实验结果得到的Cost值与RMSD值都与生成的1号药效团模型的值相差较大,说明生成的Hypogen药效团模型并不是偶然得到的结果,具有统计学意义。

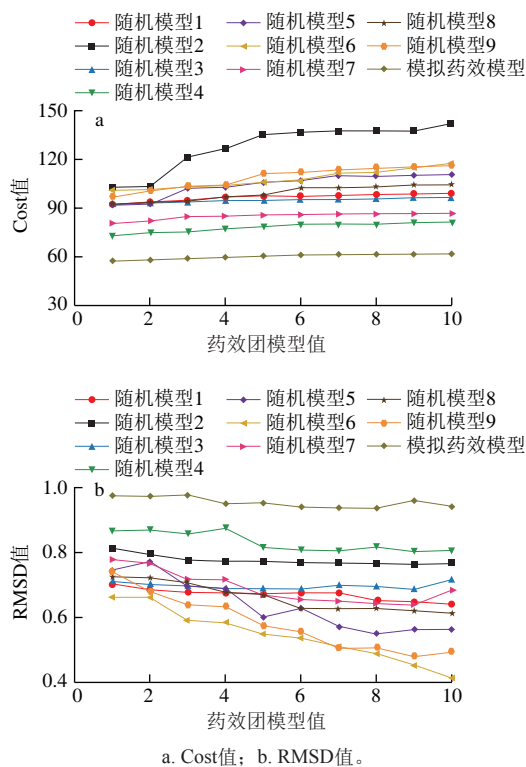


图2 药效团的Fisher验证

Fig. 2 Fisher validation of the hypogen pharmacophore

2.3 sEH抑制肽活性的预测

采用1号药效团模型预测鳕鱼疏水性多肽的sEH抑制活性,使用sEH抑制剂t-AUCB作为参照的标准,结果如表4所示。随后使用1号药效团对带有色氨酸的短肽进行筛选,并生成Fit值。其中Fit值最高的序列为PLLW的4肽序列,相对分子质量为527.31,Fit值为9.053,且LibDock评分值为147.807,而t-AUCB的Fit值为10.309,LibDock评分值为158.586,相对分子质量为412.50。PLLW序列的Fit值与t-AUCB最为接近,且其他值与t-AUCB也较为接近,因此选择PLLW序列进行合成并测定sEH抑制活性。

表4 Hypo 01药效团预测部分鳕鱼疏水肽结果

名称	相对分子质量	Fit最高值	LibDock评分
PLLW	527.31	9.053	147.807
IAW	388.46	9.038	144.882
WEIL	559.65	9.010	151.334
WEI	446.50	8.995	150.773
FLGW	522.62	8.994	168.018
KIW	445.55	8.983	141.246
SITWI	618.72	8.979	152.935
GILW	488.60	8.975	147.900
HGFMW	676.79	8.958	159.502
KLW	445.55	8.955	156.885
t-AUCB	412.50	10.309	158.586

多肽的ADMET及其他性质是影响其成为sEH的关键因素。如表5所示,所列出的10条多肽虽然同出于鳕鱼多肽的疏水部分,然而其中的部分序列仍然具备亲水性,相较于疏水肽而言更易溶于水。但sEH的抑制剂基本多为疏水性极强的有机化合物,因此挑选具有良好潜力的sEH抑制剂,亲水性的多肽可能不是最好的选择。而PeptideRanker的预测值表明这些多肽序列具有潜在的生理活性,越接近于1则越好,结果显示,PLLW、FLGW和HGFMW三者都具有较高的概率具有潜在的生理活性。结合ADMET性质的预测结果看,所有的多肽序列都没有急性口服毒性,但人体肠道吸收和血脑屏障穿透的性能却有差异,PLLW在这两者间均表现出了极好的性能。而且作为药效团筛选出的具有最高Fit值的多肽,PLLW在各方面都符合成为sEH抑制剂的潜在条件,因此选择PLLW序列进行合成,并进行下一步研究。

表5 鳕鱼多肽的基本理化性质、PeptideRanker值及ADMET性质

名称	溶解性预测	等电点预测	PeptideRanker预测	人体肠道吸收性	血脑屏障穿透性	急性口服毒性
PLLW	疏水	4.04	0.952	优	优	良
IAW	疏水	3.61	0.838	优	差	良
WEIL	疏水	0.92	0.534	良	优	优
WEI	亲水	0.94	0.408	优	优	优
FLGW	疏水	3.36	0.988	良	优	良
KIW	亲水	9.91	0.713	差	良	良
SITWI	疏水	3.39	0.590	差	优	良
GILW	疏水	3.60	0.926	优	差	良
HGFMW	疏水	7.56	0.986	优	优	良
KLW	亲水	9.91	0.838	良	优	良

2.4 鳕鱼疏水肽sEH抑制活性的测定及作用机制

使用高效液相色谱方法用鳕鱼疏水肽样品测定sEH的体外抑制活性，检测反应产物6-甲氧基-2-萘甲醛的荧光强度。结果显示，在疏水肽终质量浓度为0.1 mg/mL时，sEH的抑制率达到80.04%；而当疏水肽终质量浓度为1 mg/mL时，sEH的抑制率达到98.04%。而使用不同浓度梯度的PLLW溶液对sEH的体外抑制活性进行测定，最终得到PLLW的IC₅₀值为506.66 μmol/L。这说明鳕鱼疏水肽在一定浓度下可以达到体外抑制sEH的效果。由于多肽结构的复杂性，导致其在使用荧光酶标仪法进行测定时，在测定方法条件下，多肽将在酶标孔中产生荧光，其荧光强度数值甚至高出反应产物本身的数百倍，且无法将其从中分离，对实验检测结果造成巨大影响，故重新构建了高效液相色谱法对体外抑制活性进行测定。该法采用的检测条件与荧光酶标法保持一致，但可能由于检测限度的原因，无法像荧光酶标法那样得到极为灵敏的结果，因此在进行酶的反应时放大了反应浓度的配比。而最终得到的IC₅₀值也受方法的影响，与使用荧光酶标法得到的结果数量级相差较大，但仍然能说明在体外PLLW具备对sEH的抑制活性。

利用LibDock对接模型研究PLLW对sEH的抑制机制，从分子角度阐述鳕鱼活性肽PLLW与sEH的作用机制。由图3可知，PLLW在相同的对接区域与氨基酸残基Asp335则是形成了静电相互作用（5.22 Å），与Pro371（2.49 Å）结合形成1个碳氢键，与催化位点相邻的氨基酸残基Trp336也形成了2个静电相互作用（4.03 Å/4.34 Å）。而sEH抑制剂主要与sEH活性中心的3个关键氨基酸残基Asp335、Tyr383及Tyr466产生作用^[31-33]，在抑制作用机理上PLLW也符合对sEH活性中心关键氨基酸残基的抑制，说明PLLW具备抑制sEH的能力。

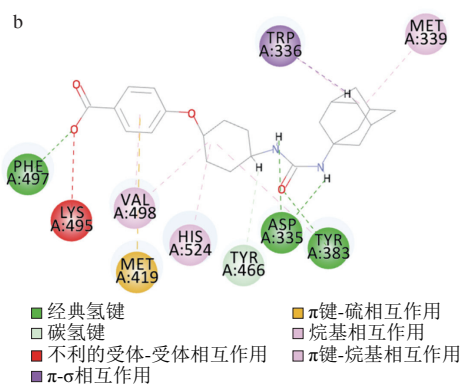
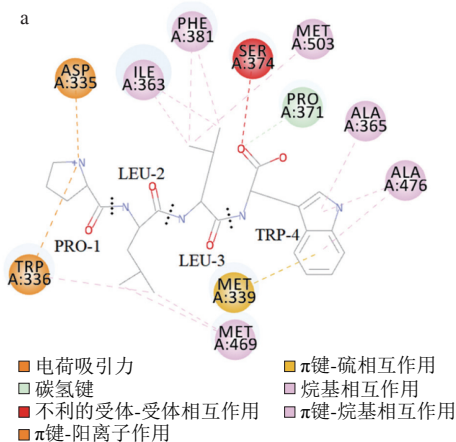


图3 PLLW与t-AUCB和sEH的分子对接相互作用示意图
Fig. 3 Molecular docking between PLLW/t-AUCB and sEH

3 结论

目前，大量的sEH抑制剂主要采用人工化学合成，而从天然产物中提取的研究报道较少，多肽型的sEH抑制剂研究更少。通过构建药效团模型，筛选多肽序列文库中具有抑制sEH活性的潜在多肽，同时筛选制备sEH抑制肽的实验原料。本实验通过构建Hypogen药效团模型结合分子对接法，筛选得到大西洋真鳕鱼源具有的sEH活性抑制肽PLLW，并对其体外抑制活性和作用机理展开探究。实验表明PLLW具有体外sEH抑制活性，其IC₅₀值为506.66 μmol/L。研究发现PLLW可与sEH的催化位点中的氨基酸残基发生氢键及疏水等相互作用，但并未完全与所有组成活性中心的氨基酸残基形成相互作用，这可能是PLLW的体外sEH抑制活性不如t-AUCB的原因。未来以PLLW序列肽的结构为基础，针对sEH的催化活性位点做进一步的改进与修饰，以期开发出活性更高的sEH抑制肽。

参考文献:

[1] NELSON J S, GRANDE T C, WILSON M V H. Fishes of the world[M]. John Wiley & Sons, 2016. DOI:10.1016/0044-8486(77)90216-2.
 [2] AGUIAR J, CARPENA P, MOLINA-BOLIVAR J A, et al. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2003, 258(1): 116-122. DOI:10.1016/s0021-9797(02)00082-6.
 [3] 刘鲁, 金利新, 杨洁茹, 等. 狭鳕鱼皮胶原多肽对去势大鼠骨微结构影响的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, 31(10): 1214-1219. DOI:10.7507/1002-1892.201704130.
 [4] 黄薇. 鳕鱼皮蛋白肽修饰技术及生物活性研究[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2012: 46-49.
 [5] 王志聪, 孙京沙, 倪鑫, 等. 鳕鱼皮胶原蛋白肽的抗酒精性胃溃疡作用[J]. 中国海洋药物, 2012, 31(5): 17-22. DOI:CNKI:SUN:HY YW.0.2012-05-006.

- [6] JUNG W K, LEE B J, KIM S K. Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats[J]. *British Journal of Nutrition*, 2006, 95(1): 124-128. DOI:10.1079/BJN20051615.
- [7] 李娜, 马玉洁, 刘楠, 等. 鳕鱼鳔胶原蛋白对H₂O₂诱导2BS细胞早期衰老的保护作用[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(10): 101-107. DOI:10.13327/j.jjlau.2021.1523.
- [8] HOU H, LI B, ZHAO X, et al. The effect of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice[J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(3): 945-950. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.01.015.
- [9] WAGNER K M, MCREYNOLDS C B, SCHMIDT W K, et al. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for pain, inflammatory and neurodegenerative diseases[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2017, 180: 62-76. DOI:10.1016/j.pharmthera.2017.06.006.
- [10] 高婉婷, 何静, 吉日木图. 可溶性环氧化物水解酶在疾病中的作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(2): 128-132. DOI:CNKI:SUN:SWHZ.0.2017-02-005
- [11] INCEOGLU B, SCHMELZER K R, MORISSEAU C, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs)[J]. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 2007, 82(1-4): 42-49. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2006.05.004.
- [12] KIM J H, JO Y D, JIN C H. Isolation of soluble epoxide hydrolase inhibitor of capsaicin analogs from *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 135: 1202-1207. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.06.028.
- [13] 黄婷婷. 基于药效团模型的新型 BCR-ABL 酪氨酸激酶抑制剂筛选及其分子机制探究[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
- [14] SANDERS M P A, MCGUIRE R, ROUMEN L, et al. From the protein's perspective: the benefits and challenges of protein structure-based pharmacophore modeling[J]. *MedChemComm*, 2012, 3(1): 28-38. DOI:10.1039/c1md00210d.
- [15] 于志鹏, 樊玥, 赵文竹, 等. 鸡蛋蛋白ACE抑制肽的筛选、鉴定及其作用机制[J]. *食品科学*, 2020, 41(12): 129-135. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190507-050.
- [16] 于志鹏, 武思佳, 赵文竹, 等. 蛋清中ACE抑制肽的筛选及其作用机制[J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 126-133. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181109-118.
- [17] GAO D, LE BA V, RUSTAM R, et al. Isolation of bioactive components with soluble epoxide hydrolase inhibitory activity from *Stachys sieboldii* MiQ. by ultrasonic-assisted extraction optimized using response surface methodology[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(4): 395-404. DOI:10.1080/10826068.2020.1821217.
- [18] 杜明, 袁祺, 程述震, 等. 一种具有免疫调节活性的鳕鱼肽及其应用: CN114403455A,2022-04-29[P].
- [19] BURTON L J, RIVERA M, HAWSAWI O, et al. Muscadine grape skin extract induces an unfolded protein response-mediated autophagy in prostate cancer cells: a TMT-based quantitative proteomic analysis[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(10): e0164115. DOI:10.1371/journal.pone.0164115.
- [20] AMANO Y, YAMAGUCHI T, TANABE E. Structural insights into binding of inhibitors to soluble epoxide hydrolase gained by fragment screening and X-ray crystallography[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014, 22(8): 2427-2434. DOI:10.1016/j.bmc.2014.03.001.
- [21] AMANO Y, TANABE E, YAMAGUCHI T. Identification of *N*-ethylmethylamine as a novel scaffold for inhibitors of soluble epoxide hydrolase by crystallographic fragment screening[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, 23(10): 2310-2317. DOI:10.1016/j.bmc.2015.03.083.
- [22] HAN Y F, HUANG D S, XU S C, et al. Ligand-based optimization to identify novel 2-aminobenzo [*d*] thiazole derivatives as potent sEH inhibitors with anti-inflammatory effects[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 212: 113028. DOI:10.1016/j.ejmech.2020.113028.
- [23] CODON Y S, C CALVÓ-TUSELL, VALVERDE E, et al. From the design to the *in vivo* evaluation of benzohomoadamantane-derived soluble epoxide hydrolase inhibitors for the treatment of acute pancreatitis[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 64(9). DOI:10.1021/acs.jmedchem.0c01601.s001.
- [24] MORISSEAU C, GOODROW M H, NEWMAN J W, et al. Structural refinement of inhibitors of urea-based soluble epoxide hydrolases[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 63(9): 1599-1608. DOI:10.1016/s0006-2952(02)00952-8.
- [25] SAKKIAH S, THANGAPANDIAN S, JOHN S, et al. 3D QSAR pharmacophore based virtual screening and molecular docking for identification of potential HSP90 inhibitors[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45(6): 2132-2140. DOI:10.1016/j.ejmech.2010.01.016.
- [26] 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(10): e45012. DOI:10.1371/journal.pone.0045012.
- [27] XIONG G L, WU Z X, YI J C, et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W5-W14. DOI:10.1093/nar/gkab255.
- [28] TANAKA D, TSUDA Y, SHIYAMA T, et al. A practical use of ligand efficiency indices out of the fragment-based approach: ligand efficiency-guided lead identification of soluble epoxide hydrolase inhibitors[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54(3): 851-857. DOI:10.1021/jm101273e.
- [29] 黄闽辉. 基于构效关系的CCR5受体抑制剂的虚拟筛选及体外活性评价[D]. 广州: 南方医科大学, 2019: 27-28.
- [30] 段爱霞, 陈晶, 刘宏德, 等. 分子对接方法的应用与发展[J]. *分析科学学报*, 2009, 25(4): 473-477. DOI:CNKI:SUN:FXKX.0.2009-04-025.
- [31] ARAND M, WAGNER H, OESCH F. Asp333, Asp495, and His523 form the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(8): 4223-4229. DOI:10.1074/jbc.271.8.4223.
- [32] BORHAN B, JONES A D, PINOT F, et al. Mechanism of soluble epoxide hydrolase: Formation of an α -hydroxy ester-enzyme intermediate through Asp-333[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(45): 26923-26930. DOI:10.1074/jbc.270.45.26923.
- [33] HAMMOCK B D, PINOT F, BEETHAM J K, et al. Isolation of a putative hydroxyacyl enzyme intermediate of an epoxide hydrolase[J]. *Biochemical and biophysical Research Communications*, 1994, 198(3): 850-856. DOI:10.1006/bbrc.1994.1121.