

汉麻籽多肽靶向抑制胰脂肪酶/胆固醇酯酶的分子作用机制

尹浩^{1,2}, 朱将雄¹, 赵海云³, 钟宇¹, 王丹凤¹, 邓云^{1,2,*}

(1.上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2.上海交通大学云南(大理)研究院, 云南 大理 671000;

3.云南省大理白族自治州检验检测院, 云南 大理 671000)

摘要:采用酶活动力学、联合抑制、荧光光谱、等温滴定量热法和分子对接等技术系统探究两种多肽(APAM和RLPA)对胰脂肪酶(pancreatic lipase, PL)和胆固醇酯酶(cholesterol esterase, CE)活性调控效果及分子结合机制。结果表明, RLPA对PL和CE具有更强的抑制活性, 其半抑制浓度分别为 $(79.62 \pm 3.20) \mu\text{mol/L}$ 和 $(301.27 \pm 14.40) \mu\text{mol/L}$ 。抑制动力学分析表明APAM对两种酶的抑制机制为竞争性抑制, 而RLPA则为混合性抑制。联合抑制表明APAM和RLPA在低浓度下均可与奥利司他协同抑制PL和CE, 但在高浓度下协同作用减弱, 甚至出现拮抗现象。荧光光谱结果表明两种多肽可以通过与PL和CE发生结合产生静态猝灭, 改变了酶中脂肪族氨基酸的疏水环境。等温滴定量热法证明多肽与酶的结合过程是自发且放热, 主要通过氢键和静电相互作用实现。分子对接模拟进一步分析表明氢键、盐桥和阳离子- π 相互作用在多肽与酶的结合中起着至关重要的作用。这项研究丰富了对多肽与PL和CE的相互作用机制的认识, 为开发基于汉麻籽蛋白的功能性食品提供了科学依据。

关键词: 脂质消化酶; 抑制机制; 荧光光谱; 等温滴定量热法; 分子模拟

Molecular Mechanism of Targeted Inhibition of Pancreatic Lipase and Cholesterol Esterase by Hempseed Peptides

YIN Hao^{1,2}, ZHU Jiangxiong¹, ZHAO Haiyun³, ZHONG Yu¹, WANG Danfeng¹, DENG Yun^{1,2,*}

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. Yunnan Dali Research Institute of Shanghai Jiao Tong University, Dali 671000, China;

3. Yunnan Dali Bai Autonomous Prefecture Inspection and Testing Institute, Dali 671000, China)

Abstract: In this study, we systematically investigated the regulatory effects of two hempseed peptides (APAM and RLPA) on pancreatic lipase (PL) and cholesterol esterase (CE) activities and the molecular binding mechanism using enzyme kinetics, synergistic inhibition, fluorescence spectroscopy, isothermal titration calorimetry and molecular docking. The results showed that RLPA had stronger inhibitory activity on PL and CE with half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of (79.62 ± 3.20) and $(301.27 \pm 14.40) \mu\text{mol/L}$, respectively. Kinetic analysis indicated that the inhibition mechanism of APAM on the two enzymes was competitive inhibition, whereas RLPA was a mixed-type inhibitor. Both APAM and RLPA synergistically inhibited PL and CE with orlistat at low concentrations, but the synergistic effect was weakened or even antagonized at high concentrations. Fluorescence spectroscopy results showed that both peptides could produce static quenching by binding to PL and CE, which changed the hydrophobic environment of aliphatic amino acids in the enzymes. Isothermal titration calorimetry demonstrated that the binding process between the peptides and the enzymes was spontaneous and exothermic, which was achieved mainly through hydrogen bonding and electrostatic interaction. Further analysis using molecular docking simulations showed that hydrogen bonding, salt bridges, and cation- π interactions played crucial roles in peptide-enzyme binding. This study enriches our understanding of the interaction mechanism of peptides with PL and CE, and provides a scientific basis for the development of functional foods based on hempseed protein.

Keywords: lipid-digesting enzymes; inhibition mechanism; fluorescence spectroscopy; isothermal titration calorimetry; molecular modeling

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240705-061

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2025)02-0038-12

收稿日期: 2024-07-05

基金项目: 云南省基础研究计划项目(202301AS070014); “十四五”国家重点研发计划重点专项(2023YFF1104302-1)

第一作者简介: 尹浩(1995—)(ORCID: 0000-0002-9334-6937), 男, 博士研究生, 研究方向为食品加工与营养。

E-mail: yinhao12138@sjtu.edu.cn

*通信作者简介: 邓云(1973—)(ORCID: 0000-0003-0647-3151), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品加工与包装。

E-mail: y_deng@sjtu.edu.cn

引文格式:

尹浩, 朱将雄, 赵海云, 等. 汉麻籽多肽靶向抑制胰脂肪酶/胆固醇酯酶的分子作用机制[J]. 食品科学, 2025, 46(2): 38-49.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240705-061. <http://www.spkx.net.cn>

YIN Hao, ZHU Jiangxiong, ZHAO Haiyun, et al. Molecular mechanism of targeted inhibition of pancreatic lipase and cholesterol esterase by hempseed peptides[J]. Food Science, 2025, 46(2): 38-49. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240705-061. <http://www.spkx.net.cn>

胰脂肪酶 (pancreatic lipase, PL) 和胆固醇酯酶 (cholesterol esterase, CE) 在脂质代谢中扮演着关键角色, 能够将食物中的脂肪分解成可吸收的分子, 如甘油、脂肪酸和胆固醇^[1-2]。PL是一种由两个结构域组成的蛋白质, 其中N端结构域(残基1~335)包含Ser152-His263-Asp176残基组成的催化三元组, 而C端结构域(残基336~449)主要参与辅因子与辅酶之间的相互作用^[3]。PL能将50%~70%的膳食脂肪水解为甘油单酯和游离脂肪酸, 随后被肠上皮细胞吸收。CE作为一种 α/β -水解酶家族中的丝氨酸水解酶, 通过催化三联体(Ser194、Asp320和His435)和氧阴离子腔(Gly107、Ala108和Ala195)水解胆固醇酯, 促进游离胆固醇向肠细胞的运输, 在脂质生物利用率方面发挥重要作用^[4]。奥利司他是目前临床上使用的唯一非处方脂质消化酶抑制剂, 它通过靶向结合PL中的Ser152和CE中的Ser194抑制这些酶的活性^[5]。尽管奥利司他在脂质消化酶抑制方面效果显著, 但它在减肥过程中可能产生恶心、腹泻、消化不良等副作用, 这促使人们寻找更安全的天然抑制剂。近年来, 研究发现黄酮、皂苷和多酚等天然化合物具有抑制脂质消化酶的潜力^[6-8]。然而, 这些化合物的稳定性、生物利用度和潜在不良反应限制了它们的广泛应用。与这些天然化合物相比, 生物活性肽在抑制脂质消化酶方面展现出更大的潜力。例如, 蛋白核小球藻中多肽FLGPFF可与PL中活性位点周围的残基以 π -氢键、 π -阳离子和氢键作用结合从而非竞争性抑制PL活性^[1]。驼血蛋白中也鉴定出PFF和FPHF两种具有显著PL抑制作用的肽段^[9]。此外, 来自啤酒酿造废料的蛋白水解物, 经过多阶段分离和纯化后, 鉴定出3种能够抑制PL和CE活性的肽, 它们在肠腔内与脂质微粒结合, 并与微粒表面相互作用, 从而抑制PL和CE的活性^[10]。然而, 目前大多数研究仅评估和比较了蛋白水解物对酶的抑制能力, 并通过肽鉴定和分子对接确定了潜在的抑制肽^[11-14]。少数研究进一步分离了水解物中的肽, 并研究其酶抑制行为^[15]。使用光谱、分子模拟和热力学方法对脂质消化酶抑制肽的分子机制进行全面和深入的研究很少。此外, 有关肽对CE的抑制效果和机制的信息也有限。因此, 对脂质消化酶抑制肽对PL和CE的抑制机制进行全面的评估和分析具有重要意义。

汉麻 (*Cannabis sativa* L.), 也称工业大麻, 是一种一年生草本植物, 以其高蛋白、高脂肪及独特的生理活

性著称^[16]。中国是汉麻的主要种植国, 种植面积约占全球的50%, 产品主要出口欧美国家^[17]。尽管汉麻籽在食品和保健品方面具有巨大的开发潜力, 但目前国内的开发利用主要集中在军用服装纤维和优质食用油上, 对其蛋白质的研究较少^[18]。汉麻籽蛋白以球蛋白和白蛋白为主, 营养价值高, 易消化, 且具有降血脂、降血压等功效, 是一种亟待开发的优质植物蛋白源^[19-21]。本课题组前期研究通过肽组学和虚拟筛选方法从汉麻籽蛋白水解物中初步筛选出14种具有PL和CE抑制潜力的多肽。在筛选出的多肽中, APAM和RLPA对PL和CE同时具有较好的抑制作用。然而, 这些多肽与PL和CE的分子相互作用机制尚未得到深入研究。为了进一步了解这些多肽的抑制机制, 进行以下研究: 通过酶活性测定和动力学分析, 初步研究两种多肽对PL和CE的抑制作用及其结合模式; 采用荧光光谱法和等温滴定量热法研究多肽的结合位点、亲和力、热力学及对酶构象的影响; 最后, 采用分子对接进一步分析多肽与酶相互作用的结合位点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

多肽APAM和RLPA (纯度>98%) 由南京肽谷生物科技有限公司合成。

PL 美国Sigma-Aldrich公司; CE 上海源叶生物科技有限公司; 4-硝基苯丁酸酯、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、奥利司他 上海麦克林生化科技股份有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

THM-2875恒温水浴锅 美国赛默飞世尔科技公司; Infinite M200 Pro多功能酶标仪 瑞士帝肯公司; RF-6000荧光分光光度计 日本岛津公司; Nano ITC等温滴定量热仪 美国TA公司。

1.3 方法

1.3.1 多肽对PL和CE的实时抑制作用

实时抑制PL和CE的实验参照张海龙^[7]和Herrera^[22]等的方法并稍作修改。肽和酶均溶解在去离子水中, PL和CE的浓度分别设定为3 U/mL和0.1 U/mL。实验步骤如下: 将50 μ L肽溶液 (最终浓度分别为25、50、100、200、400 μ mol/L)、50 μ L酶溶液和50 μ L 0.1 mol/L Tris-

马来酸盐缓冲液 (pH 7.5) 依次混合。混合物在 37 °C 条件下孵育 10 min, 然后通过加入 50 μ L 5 mmol/L 4-硝基苯丁酸酯溶液 (溶解在含 30% 异丙醇的 0.1 mol/L Tris-马来酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中) 启动反应。使用酶标仪每 60 s 在 405 nm 处测量吸光度, 并使用下式计算酶的抑制率:

$$\text{酶抑制率}/\% = \left(1 - \frac{C-D}{A-B}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中: A 为对照组 (含酶但不含肽) 的吸光度; B 为对照空白组 (不含酶和肽) 的吸光度; C 为样品组 (含酶和肽) 的吸光度; D 为样品空白组 (不含酶但含肽) 的吸光度。

1.3.2 多肽和奥利司他对酶的联合抑制作用

使用 SynergyFinder 在线工具 (<https://synergyfinder.fimm.fi>) 评估剂量反应交互建模分析^[23]。设计肽和奥利司他的剂量矩阵, 采用 1.3.1 节方法测定不同浓度下肽-奥利司他组合对 PL 和 CE 的抑制作用。药物组合的协同效应通过 ZIP 协同评分模型进行评分。

1.3.3 抑制动力学分析

通过测量在不同底物和肽浓度下的酶反应速率确定肽对酶活性的抑制类型^[24]。酶的浓度固定为 PL: 3 U/mL, CE: 0.1 U/mL。底物浓度范围为 4~10 mmol/L, 肽浓度分别为 0、100、150 μ mol/L 和 200 μ mol/L。将不同浓度的酶和样品混合后, 在 37 °C 条件下孵育 10 min。加入底物 30 min 后, 在 405 nm 处测量吸光度。使用酶反应速率的倒数作为纵坐标, 底物浓度的倒数作为横坐标, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。通过在不同肽浓度下绘制的 Lineweaver-Burk 方程确定肽对酶的抑制类型:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

式中: V 、 V_{\max} 、 K_m 和 $[S]$ 分别表示反应速率/ s^{-1} 、最大反应速率/ s^{-1} 、米氏常数/ $(\mu\text{mol/L})$ 和底物浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ 。

1.3.4 荧光光谱测定

使用 RF-6000 荧光分光光度计分析 PL 和 CE 的荧光光谱^[14]。具体步骤如下: 将不同浓度的肽溶液 0.2 mL 与 0.2 mL 的 PL/CE 溶液混合, 在 277、298 K 和 310 K 温度条件下孵育 5 min。然后将混合物转移到石英比色皿 (1 mm) 中, 测定荧光光谱。激发波长设定为 295 nm, 激发和发射带宽设定为 5 nm, 记录 310~430 nm 的发射波长处的荧光强度。按下式计算 Stern-Volmer 曲线各参数:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [I] = 1 + K_{sv} [I] \quad (3)$$

式中: F_0 和 F 分别为加入肽前后的荧光强度; K_q 、 K_{sv} 、 τ_0 和 $[I]$ 分别为双分子猝灭常数/ $(L/(\text{mol} \cdot s))$ 、Stern-Volmer 动态猝灭常数/ (L/mol) 、在无肽情况下的荧光寿命 (PL、CE 约为 10^{-8} s) 和猝灭剂的浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ 。

荧光猝灭机制可分为两类: 由于形成基态复合物引起的静态猝灭和由分子间碰撞引起的动态猝灭。对于静态猝灭, 根据下式计算结合位点数 (n) 和表观结合常数 (K_a)^[25]:

$$\lg \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \lg K_a + n \lg [I] \quad (4)$$

K_a 值和相应的温度 (T) 通过 van't Hoff 方程和 Gibbs-Helmholtz 方程拟合以确定焓变 (ΔH) 和熵变 (ΔS)^[26]:

$$\ln K_a = - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (6)$$

式中: R 为摩尔气体常数 ($8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$); ΔG 为吉布斯自由能变/ (kJ/mol) 。

1.3.5 等温滴定量热法

使用 Nano ITC 等温滴定量热仪通过将肽溶液滴定到缓冲液或酶溶液中来测量产生的能量^[27]。肽和酶溶解在 50 mmol/L Tris-马来酸盐缓冲液中, 并在滴定前进行脱气。量热仪的参考池填充蒸馏水, 样品池填充酶溶液。在基线稳定后, 肽溶液 ($2 \sim 3 \text{ mmol/L}$) 自动连续注入比色皿 21 次, 每次注入体积为 1.96 μ L, 搅拌速度为 200 r/min。每次注入间隔时间为 180 s。肽溶液每次注入 1.96 μ L。通过 Nanoanalyze 软件使用独立模型分析峰积分和结合参数。结合参数包括 K_d (平衡解离常数)、 n (结合化学计量数)、 ΔH (焓变)、 ΔG (吉布斯自由能变) 和 ΔS (熵变)。

1.3.6 分子对接

从 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取 PL (ID: 1LPB) 和 CE (ID: 1AQL) 的晶体结构。使用 Chem3D 软件中的 CHARMM 力场优化受体 (PL 和 CE) 的结构, 包括添加氢原子、移除冗余结构、移除水分子和能量最小化, 以便其结构可用于分子对接过程。同时, 使用殷赋科技平台中准备多肽结构板块 (https://cloud.yinfotek.com/tools/molkit/prepare_peptides?id=85050) 预测 APAM 和 RLPA 的结构。使用 Schrodinger Maestro 12.8 软件对 PL、CE 和肽进行柔性配体分子对接, 并选择结合得分最低的构象来分析其相互作用。分子对接参数如下: 选择催化三联体作为口袋中心, 口袋范围设置为 10 Å, 盒子边缘设置为 6 Å。PL: 盒子中心 (2.269, 26.968, 48.501), 盒子大小 (34.601, 37.467, 33.843); CE: 盒子中心 (41.53, 68.476, 21.442), 盒子大小 (40.827, 39.812, 42.161)。

1.4 统计分析

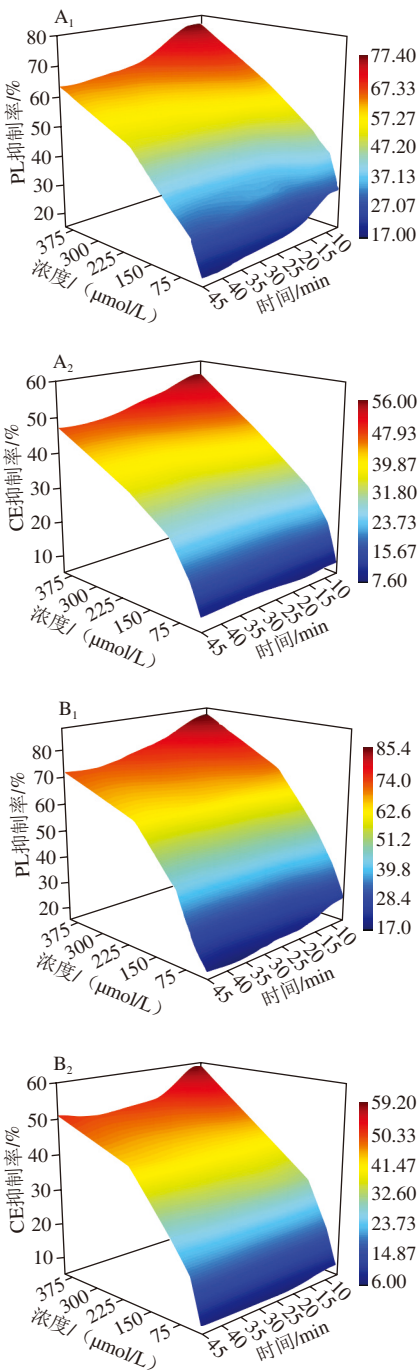
所有实验均进行 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 22.0 统计软件进行显著性分析。采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 多重范围检验确定差异显著性, 统计显著性定义为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 肽对PL和CE的抑制作用

2.1.1 肽对PL和CE的实时抑制作用

采用4-硝基苯丁酸酯作为底物确定APAM和RLPA对PL和CE的抑制活性。如图1所示,随着多肽浓度从25 $\mu\text{mol/L}$ 增加到400 $\mu\text{mol/L}$, PL和CE的活性抑制率从深蓝色向深红色转变,表明多肽对酶的抑制作用呈剂量依赖效应。具体来说,两种多肽对PL的抑制活性均强于对CE的抑制活性。尤其是RLPA在400 $\mu\text{mol/L}$ 时对PL的抑制率高达85.33% (半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) = (79.62 \pm 3.20) $\mu\text{mol/L}$), 而对CE的最高抑制率仅为59.19% (IC_{50} = (301.27 \pm 14.40) $\mu\text{mol/L}$), 这种差异主要由于酶结构的不同。PL的催化三联体由Ser152、His263和Asp176组成,活性中心外的3个由二硫键形成的表面环对PL的活性起到了关键作用。Cys237~Cys261形成了最大的环,而残基76~80和213~217则形成两个较小的环^[3]。这些表面环在水油界面上发生构象变化,有利于底物与活性位点结合。相比之下,CE的活性位点由Ser194、Asp320和His435残基组成的催化三联体和由Gly107、Ala108和Ala195残基组成的氧阴离子孔覆盖^[4]。CE的活性位点也被由Cys64~Cys80形成的环所覆盖。因此,多肽与PL或CE的活性位点或表面环的结合均会影响底物与活性位点的结合,从而影响酶的活性。此外,肽的一级结构和氨基酸组成也显著影响其对PL和CE的抑制活性。研究表明,富含疏水氨基酸(如亮氨酸、甲硫氨酸和脯氨酸)的肽能显著抑制PL^[28]。APAM中的所有氨基酸均为疏水氨基酸,这提高了其与PL表面疏水区结合的能力,从而更好地抑制PL的活性。Urbizo-Reyes等^[29]通过分子对接发现,多肽中的精氨酸与脂肪酶残基发生相互作用的频率较高,表明精氨酸对PL的抑制起关键作用。而RLPA的氨基末端为精氨酸,其余氨基酸均为疏水氨基酸,从而具备较强的PL抑制活性。除了一级结构,多肽的理化性质也会影响其抑制能力,尤其是疏水性和电荷。APAM和RLPA均具备较强的疏水性,且多肽所带的正电荷(如精氨酸)有助于其与酶的结合,增强抑制PL的活性(表1)。尽管一级结构和理化性质对多肽的抑制能力有显著影响,但其构象和高级结构对活性的影响尚不明确。进一步的光谱、热力学和分子模拟实验将有助于探索多肽的结构-活性关系。如图1所示,多肽对PL和CE的抑制作用随着时间的推移逐渐减弱,约30 min后趋于稳定,表明多肽与酶的结合是可逆的^[30]。



下标1. PL; 下标2. CE。下同。

图1 APAM (A)、RLPA (B) 对PL和CE的实时抑制3D表面热图
Fig. 1 The 3-dimensional (3D) surface heatmaps of the real-time inhibition of APAM (A) and RLPA (B) on PL and CE

表1 APAM和RLPA的物理化学性质以及对PL和CE的 IC_{50} 值和抑制类型
Table 1 Physicochemical properties of peptides PAM and RLPA and their IC_{50} values and inhibition types against PL and CE

多肽	等电点	净电荷	疏水性/ (kcal/mol)	PL抑制		CE抑制	
				IC_{50} / ($\mu\text{mol/L}$)	抑制类型	IC_{50} / ($\mu\text{mol/L}$)	抑制类型
APAM	5.41	0	8.37	98.10 \pm 2.26	竞争性	337.64 \pm 22.28	竞争性
RLPA	10.73	+1	9.10	79.62 \pm 3.20	混合性	301.27 \pm 14.40	混合性

2.1.2 肽和奥利司他对酶的联合抑制作用

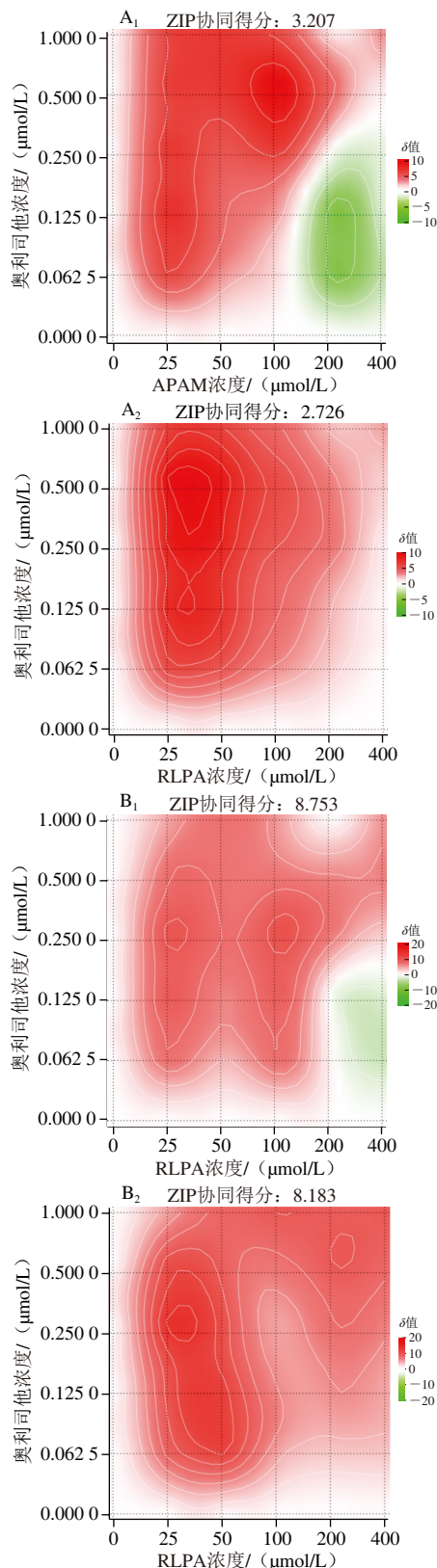


图2 APAM (A)、RLPA (B) 与奥利司他联合抑制PL、CE的剂量-反应矩阵和协同作用分布
Fig. 2 Dose-response matrix and synergistic distribution of inhibition of PL and CE by APAM (A) or RLPA (B) combined with orlistat

采用SynergyFinder设计了奥利司他和肽的剂量矩阵, 并使用ZIP评分模型对协同效应进行了评分。如图2所示, 奥利司他与APAM的组合对PL和CE的协同抑制平均值分别为3.207和2.726, 表明多肽与奥利司他对PL和CE的抑制可能存在相加作用^[23]。具体地看, 当APAM和奥利司他在较低浓度时对酶活性抑制的评分接近10, 表明两种物质可能存在加和和协同抑制作用。而随着多肽和奥利司他浓度的升高, ZIP模型对其评分逐渐下降, 甚至低于0分, 这表明多肽和奥利司他的组合在高浓度下产生了拮抗作用, 说明APAM与奥利司他的作用位点相同或相近。Li Xiangxin等^[5]同样在多酚与奥利司他对PL和CE的联合抑制中观察到了这一现象。而RLPA与奥利司他联合抑制PL和CE平均值分别为8.753和8.183, 说明它们极有可能存在协同抑制作用, 这可能归因于它们的结合位点不完全相同^[31]。黑莓多酚与奥利司他对PL的抑制同样存在累积效应, 表明多酚与奥利司他结合在PL不同的活性位点^[32]。

2.1.3 肽对PL和CE的抑制动力学

表2 不同浓度的APAM和RLPA抑制PL和CE的动力学参数				
Table 2 Kinetic parameters of PL and CE inhibition by different concentrations of peptides APAM and RLPA				
酶种类	多肽	浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	K_m / ($\mu\text{mol/L}$)	V_{\max} / s^{-1}
PL	APAM	200	12.110 ± 0.264	0.057 ± 0.002
		150	10.270 ± 0.274	0.057 ± 0.002
		100	8.220 ± 0.373	0.056 ± 0.004
	RLPA	0	5.245 ± 0.118	0.057 ± 0.001
		200	11.132 ± 0.341	0.065 ± 0.004
		150	9.872 ± 0.104	0.073 ± 0.001
CE	APAM	100	9.626 ± 0.460	0.078 ± 0.006
		0	9.051 ± 0.255	0.082 ± 0.004
	RLPA	200	34.277 ± 0.251	0.186 ± 0.006
		150	31.740 ± 0.309	0.194 ± 0.008
		100	27.004 ± 0.307	0.192 ± 0.009
	RLPA	0	22.073 ± 0.387	0.202 ± 0.013
		200	10.464 ± 1.361	0.066 ± 0.013
		150	9.186 ± 0.228	0.081 ± 0.004
		100	8.230 ± 0.274	0.101 ± 0.004
		0	7.423 ± 0.326	0.111 ± 0.006

为了更好地描述这两种肽对PL和CE的抑制作用, 进一步研究了其动力学抑制机制。酶抑制机制分为4 种类型: 竞争性、非竞争性、反竞争性和混合性^[24]。采用Michaelis-Menten模型计算酶动力学参数(表2), 并绘制Lineweaver-Burk图确定抑制类型。如图3所示, 随着肽浓度的增加, $1/V$ 和 $1/[S]$ 曲线显示出良好的线性关系。对于APAM, 拟合曲线在Y轴相交。对于PL, 随着多肽浓度的增加, K_m 从 $(5.245 \pm 0.118) \mu\text{mol/L}$ 增至 $(12.110 \pm 0.264) \mu\text{mol/L}$, V_{\max} 没有发生显著变化。这表明肽APAM与PL之间存在竞争性抑制作用, 竞争性地与酶结合形成抑制剂-酶复合物。同样地, APAM对CE的抑制同样呈现出竞争性抑制作用, 表明APAM可能通过与抑制PL相似的位点来抑制CE的活性。而对

于RLPA来说,与PL和CE的抑制动力学曲线均相交于第二象限,随着多肽浓度的增加,对PL和CE的 K_m 分别从 $(9.051 \pm 0.255) \mu\text{mol/L}$ 和 $(7.423 \pm 0.326) \mu\text{mol/L}$ 增加到 $(11.132 \pm 0.341) \mu\text{mol/L}$ 和 $(10.464 \pm 1.361) \mu\text{mol/L}$,而 V_{\max} 分别从 $(0.082 \pm 0.004) \text{s}^{-1}$ 和 $(0.111 \pm 0.006) \text{s}^{-1}$ 减小到 $(0.065 \pm 0.004) \text{s}^{-1}$ 和 $(0.066 \pm 0.013) \text{s}^{-1}$,说明RLPA通过混合性抑制与酶的活性位点以及其他部分结合形成复合物,从而阻止底物与酶的结合^[33]。

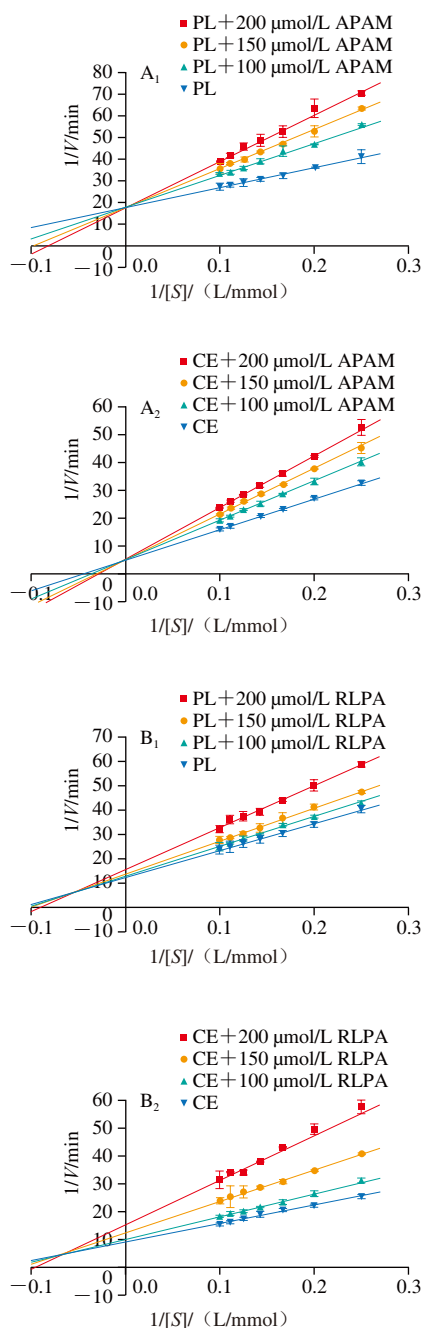


图3 APAM (A)、RLPA (B) 对PL和CE抑制作用的Lineweaver-Burk图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots of PL and CE inhibition by APAM (A) and RLPA (B)

关于PL抑制肽的抑制类型研究较少。从脱油米糠中分离出的肽FYLYGYCDY,从啤酒酿造过程中产生的废谷物中分离出的肽LAAVEALSTNG、WNIHMEHQDLTME,从发酵米糠中分离出的肽HWP以及从美藤果粕中分离出的肽WLLMWPYK可通过非竞争性抑制作用抑制PL活性^[10,14,34-35]。值得注意的是,所有这些肽都是通过多级分离和纯化鉴定出来的。因此,这些多肽通过与非结合位点结合改变酶的构象。相比之下,本研究中的多肽是通过虚拟筛选获得的,主要筛选与酶的活性位点及其附近残基结合能量较高的多肽。因此,本研究筛选的多肽均包含竞争性抑制作用与酶的活性位点结合。与本研究类似,Wang Xinyi等^[36]研究了从芝麻蛋白中筛选出的5种PL抑制肽的抑制动力学,发现TF、QWM和NIF可以通过混合抑制作用与PL结合。Wang Kai等^[15]发现,在美藤果中虚拟筛选得到的5种降脂肽中,有4种通过与酶活性位点结合来抑制酶的活性。柠檬^[3]从坛紫菜中虚拟筛选出的PL抑制肽TPPGP和NAPPP分别通过混合性和竞争性抑制PL的活性。

2.2 多肽诱导PL和CE构象变化的荧光光谱研究

2.2.1 肽对PL和CE的荧光猝灭分析

肽的加入会使酶的内源性荧光受到不同程度的猝灭^[14]。图4展示了不同浓度的多肽加入PL/CE后荧光光谱的变化。PL和CE的最大发射波长分别为338 nm和328 nm。随着肽的添加,酶的荧光强度逐渐降低。例如,加入250 $\mu\text{mol/L}$ RLPA后,PL和CE的最大荧光强度分别降低了23.8%和26.3%,表明多肽对酶有猝灭作用。

此外,荧光光谱还能揭示蛋白质的三维结构信息。PL和CE含有色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)残基,它们对酶的荧光发射至关重要^[14]。Trp和Tyr都能在280 nm波长处被激发,但只有Trp能在295 nm波长处被激发。由于Trp残基的灵敏度较高且内部猝灭较少,在295 nm激发波长下记录的荧光光谱信息量更大,更有助于解释酶结构的变化^[37]。当Trp嵌入天然蛋白质时,其最佳发射波长可能会发生蓝移,而随着蛋白质的展开,最大发射波长会发生红移^[38]。活性物质与酶的结合会改变Trp的微环境,从而改变最大吸收峰的波长。Wu Di^[37]和Thayumanavan^[39]等发现,添加谷胱甘肽和槲皮素3-鼠李糖苷会导致PL的最大发射波长发生蓝移。而大多数研究发现,添加抑制剂不会改变PL的最大发射波长,或者会导致红移^[7,14,24,40]。本研究中随着肽的添加,酶的最大吸收波长会发生轻微的蓝移或红移,尤其是RLPA的添加使CE的最大发射波长从328 nm红移到331 nm,表明多肽的添加使得PL和CE的蛋白质三维结构发生变化,改变了Trp的微环境。

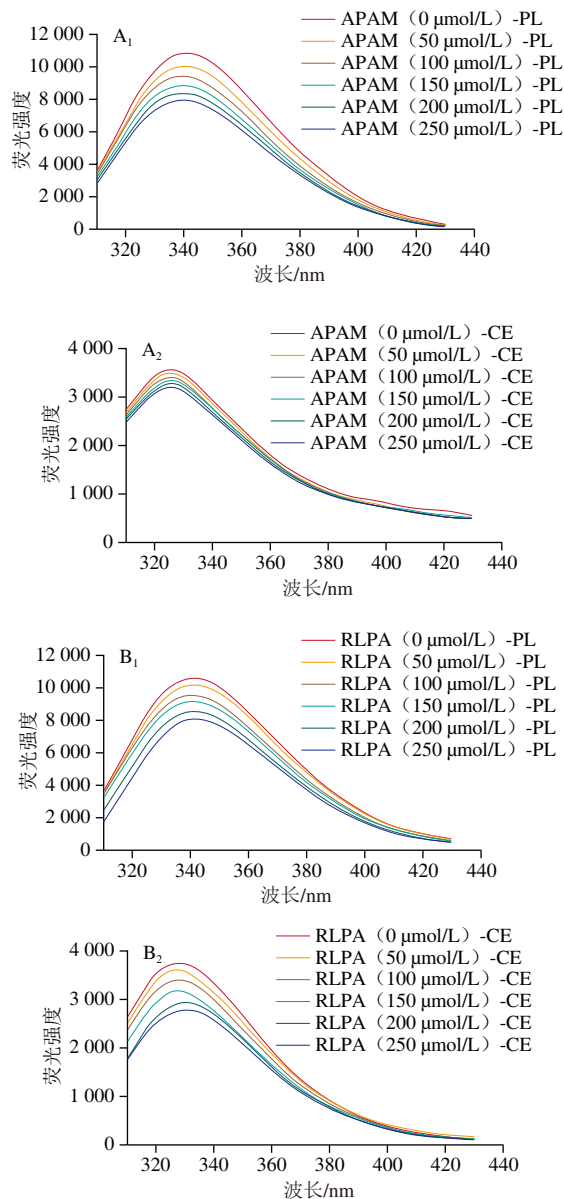


图4 在APAM (A)和RLPA (B)存在下PL和CE的荧光光谱
Fig. 4 Fluorescence spectra of PL and CE in the presence of APAM (A) and RLPA (B)

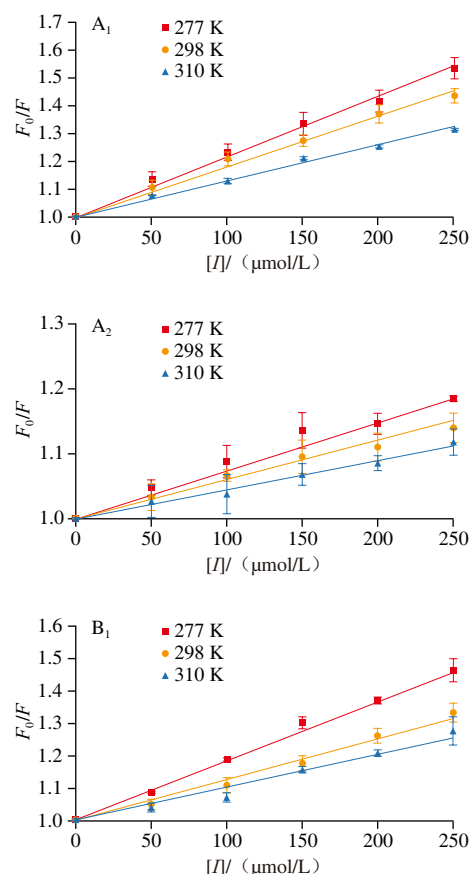
2.2.2 荧光光谱法研究多肽与PL和CE的结合模式

为了进一步研究多肽对PL和CE的荧光猝灭机制,使用Stern-Volmer公式分析了多肽对酶的猝灭效应。图5的Stern-Volmer图和图6的双对数图显示了不同温度下的良好线性关系,表明只有一种猝灭模式,即动态猝灭或静态猝灭^[24]。如表3所示,进一步计算了荧光猝灭参数,结果表明 K_{sv} 值随着温度的升高显著降低。随着温度的升高,APAM-PL的 K_{sv} 值从 $(4\,565.69 \pm 676.62)$ L/mol降至 $(2\,682.39 \pm 201.56)$ L/mol,RLPA-PL的 K_{sv} 值从 $(3\,696.71 \pm 255.03)$ L/mol降至 $(1\,952.79 \pm 242.06)$ L/mol。同样,肽的加入也导致CE的 K_{sv} 值随着温度的升高而降低。所有体系的 K_q 值都高于最大扩散碰撞猝灭速率常数

2×10^{10} L/(mol·s),表明多肽对酶的荧光猝灭是一种静态猝灭^[14]。

对于多肽在酶上的静态猝灭,计算了结合常数和结合位点数,如表3所示,所有多肽与PL/CE的 n 值都在1左右,表明多肽与酶主要有一个结合位点^[37,41]。多肽与PL的结合常数(K_a)范围为 $(2\,234.03 \pm 197.54)$ L/mol至 $(4\,259.56 \pm 230.18)$ L/mol,而与CE的结合常数范围为 (715.16 ± 26.07) L/mol至 $(3\,645.84 \pm 226.05)$ L/mol,表明多肽与两种酶的结合亲和力适中,这与 K_{sv} 的结果一致。

值得注意的是,多肽与PL和CE的结合亲和力顺序均为RLPA大于APAM。一般认为,抑制剂对酶的亲和力越强,对酶的抑制效果越好^[14,42]。然而,由于多肽具有独特的组成和结构,因此,当多肽通过不同的机制与酶结合时,可能会出现亲和力与活性不匹配的现象。对于PL而言,除了催化三元组外,还有几个表面环也对酶的活性有重大影响。与表面环的结合也会阻止活性位点的暴露,从而抑制酶的活性。在3种五环三萜酸中,与PL亲和力最强的科罗素酸和与CE亲和力最强的齐墩果酸都不是酶活性的最强抑制剂^[40]。然而,如果抑制剂的亲和力存在显著差异或结合位点相同,通常认为亲和力最强的抑制剂对酶的抑制活性更强^[30]。迄今为止,对PL和CE抑制肽的研究还很有限,因此需要进行更多研究完善多肽对PL/CE的亲和力和抑制能力之间的相关性。



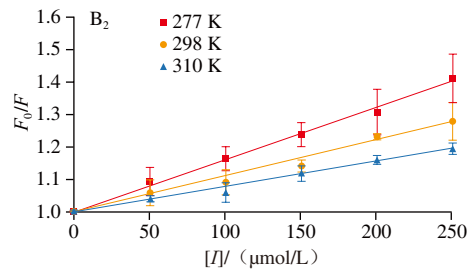


图5 在APAM (A)、RLPA (B)存在时PL和CE的Stern-Volmer图
Fig. 5 Stern-Volmer plots of PL and CE in the presence of APAM (A) and RLPA (B)

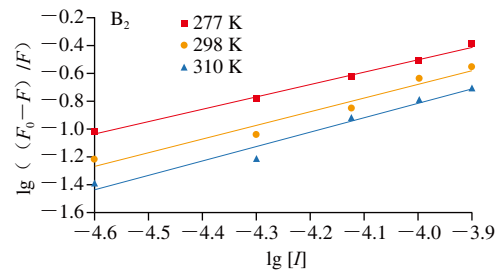
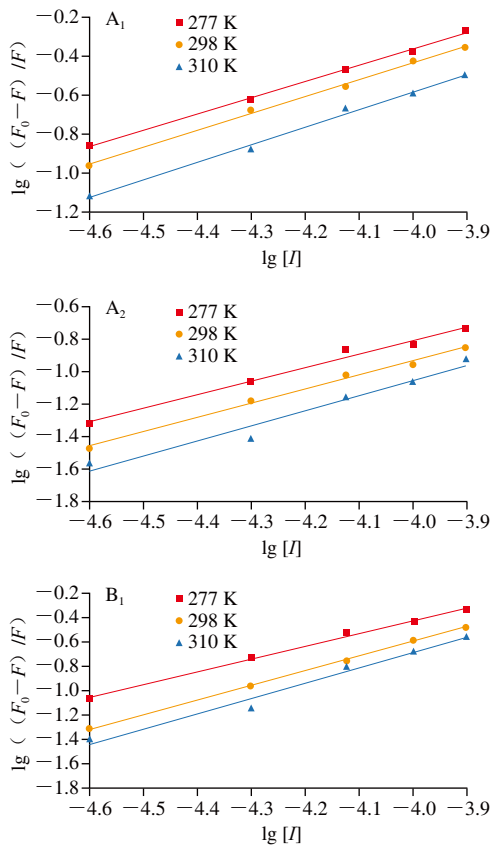


图6 APAM (A)和RLPA (B)对PL和CE荧光猝灭作用的双对数图
Fig. 6 Double logarithmic plots for fluorescence quenching of PL and CE by APAM (A) and RLPA (B)



2.2.3 荧光光谱法对多肽与PL和CE结合的热力学分析

如表3所示,通过计算不同温度下的荧光光谱参数,可以了解多肽-酶结合过程中 ΔH 、 ΔS 和 ΔG 的变化。这些数据用于分析肽与酶之间形成的复合物的热力学性质。表3中 ΔG 的负值表明多肽与酶的结合过程是自发的。小分子与受体结合的相互作用力包括氢键、范德华力、静电力和疏水相互作用。两种多肽与酶结合时观察到的负 ΔH 和正 ΔS 表明,静电相互作用和氢键在结合过程中起主导作用^[43-44]。

2.3 利用等温滴定量热法对肽与PL/CE的结合进行热力学分析

等温滴定量热法是解释分子结合机制的重要方法^[45]。多肽与酶反应的等温滴定量热曲线如图7所示。多肽与酶的结合在第15至第20滴左右达到平衡。如图8所示,反应热和摩尔比的拟合曲线呈现出典型的“S”形曲线^[46]。结合化学计量值(n)显示了多肽在酶上的结合位点数量。多肽-酶复合物的 n 值都在1左右,表明多肽与酶上的单个位点结合,这与荧光光谱的研究结果一致。

表3 APAM和RLPA在PL和CE上的荧光猝灭Stern-Volmer曲线常数、结合常数、结合位点和热力学参数

Table 3 Stern-Volmer constants, binding constants and sites and thermodynamic parameters for fluorescence quenching of PL and CE by APAM and RLPA

酶种类	多肽	温度/K	$K_{sv}/(L/mol)$	R^2 (Stern-Volmer图)	$K_d/(10^{11}L/(mol \cdot s))$	$K_d/(L/mol)$	n	R^2 (双对数图)	$\Delta H/(kJ/mol)$	$\Delta S/(J/(mol \cdot K))$	$\Delta G/(kJ/mol)$
PL	APAM	277	$4\ 565.69 \pm 676.62$	0.999 7	4.57 ± 0.68	$3\ 734.99 \pm 162.30$	0.83 ± 0.02	0.996 5			-19.02 ± 0.02
		298	$3\ 825.95 \pm 409.31$	0.999 8	3.83 ± 0.41	$3\ 126.28 \pm 147.11$	0.86 ± 0.03	0.996 6	-10.39 ± 0.39	31.18 ± 1.33	-19.68 ± 0.37
		310	$2\ 682.39 \pm 201.56$	0.999 9	2.68 ± 0.20	$2\ 234.03 \pm 197.54$	0.90 ± 0.04	0.992 7			-20.05 ± 0.60
	RLPA	277	$3\ 696.71 \pm 255.03$	0.999 1	3.70 ± 0.26	$4\ 259.56 \pm 230.18$	1.05 ± 0.04	0.996 7			-19.17 ± 0.02
		298	$2\ 475.08 \pm 236.07$	0.999 8	2.48 ± 0.24	$3\ 158.03 \pm 73.59$	1.20 ± 0.02	0.998 9	-8.74 ± 0.28	37.66 ± 0.96	-19.66 ± 0.45
		310	$1\ 952.79 \pm 242.06$	0.999 7	1.95 ± 0.24	$2\ 782.39 \pm 186.20$	1.25 ± 0.11	0.975 9			-20.41 ± 0.72
CE	APAM	277	$1\ 647.64 \pm 266.64$	0.999 4	1.65 ± 0.27	$1\ 118.87 \pm 53.78$	0.82 ± 0.06	0.987 7			-16.16 ± 0.02
		298	$1\ 226.42 \pm 19.05$	0.999 5	1.23 ± 0.22	835.02 ± 52.13	0.87 ± 0.04	0.913 6	-9.66 ± 0.09	23.45 ± 0.25	-16.65 ± 0.27
		310	954.25 ± 196.26	0.995	0.95 ± 0.02	715.16 ± 26.07	0.93 ± 0.10	0.971 6			-16.93 ± 0.44
	RLPA	277	$3\ 159.37 \pm 485.51$	0.999 7	3.16 ± 0.49	$3\ 645.84 \pm 226.05$	0.89 ± 0.04	0.991 6			-18.83 ± 1.35
		298	$2\ 024.56 \pm 324.93$	0.999 8	2.03 ± 0.32	$2\ 009.23 \pm 325.13$	0.99 ± 0.10	0.952 4	-17.22 ± 0.15	5.82 ± 0.51	-18.95 ± 1.28
		310	$1\ 548.64 \pm 195.81$	0.999 9	1.55 ± 0.20	$1\ 672.25 \pm 170.33$	1.03 ± 0.11	0.956 4			-19.02 ± 1.24

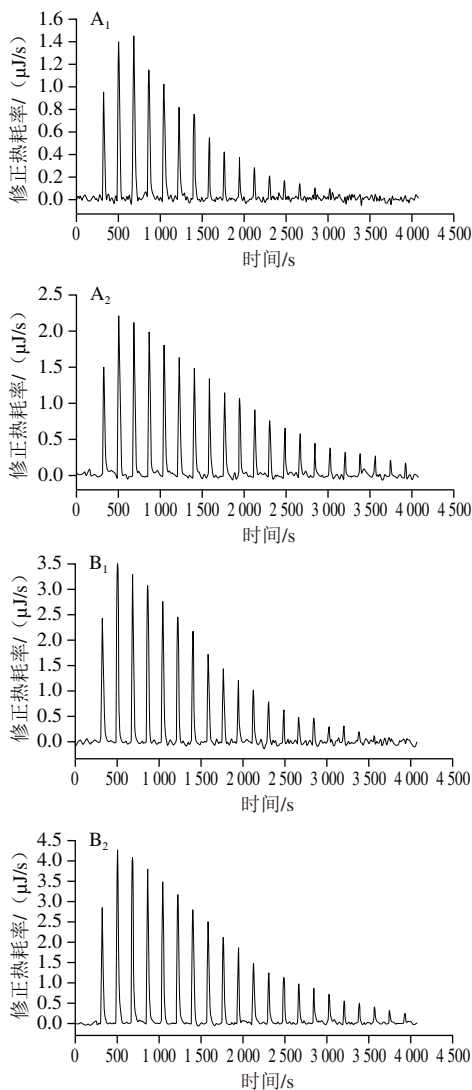


图7 APAM (A) 和RLPA (B) 溶液滴入PL溶液和CE溶液的热稀释校正后的滴定综合热量结果

Fig. 7 Integrated heat results of titration after correction for heat dilution of APAM (A) and RLPA (B) solutions against PL and CE solutions

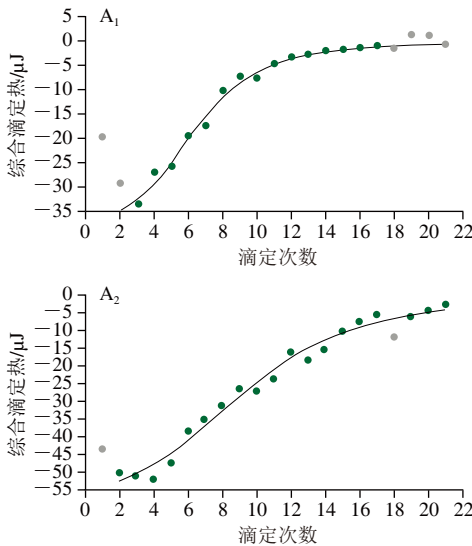


图8 APAM (A) 和RLPA (B) 溶液滴入PL和CE溶液的综合滴定热的最佳拟合曲线

Fig. 8 Best fitting curves for the integrated heat of titration of APAM (A) and RLPA (B) solutions against PL and CE solutions

平衡解离常数 (K_d) 的值表明了多肽与酶之间的结合亲和力。APAM和RLPA对PL的 K_d 值分别为 $(1.49 \pm 0.06) \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 和 $(1.23 \pm 0.03) \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (表4)。RLPA对CE的亲和力高于APAM, 这与抑制活性的结果一致 (表1)。Zhang Biying等^[47]也发现, 亲和力与多肽的抑制活性相关。配体与受体的相互作用涉及两种类型的结合: 特异性结合和非特异性结合。在本研究中, 多肽与酶结合的亲和力在 10^{-5} mol/L 的数量级, 表明多肽与酶的结合程度适中。多肽和酶通过非特异性结合与PL和CE相互作用, 亲和力较弱。

等温滴定量热法还计算了多肽与酶结合的热力学参数。如表4所示, 与荧光光谱的结果一致, 所有肽和酶结合时的 ΔG 和 ΔH 均为负值, 表明结合过程是自发和放热的。 ΔS 为正值表明肽与酶之间的作用力主要是静电相互作用^[45]。APAM对PL和CE较高的 ΔS 值表明, 熵的变化导致更强的结合力, 从而形成复合物。相比之下, RLPA与酶的结合主要由焓变驱动。肽与酶复合物的形成既是焓驱动过程, 也是熵驱动过程, 这表明抑制剂与酶的结合包括氢键和静电相互作用^[24,44-45]。

表4 APAM和RLPA添加后PL和CE的热力学参数
Table 4 Thermodynamic parameters for binding of PL and CE to peptides APAM and RLPA

酶种类	多肽	$K_d / (10^{-5} \text{ mol/L})$	n	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$	$\Delta S / (\text{J} / (\text{mol} \cdot \text{K}))$	$\Delta G / (\text{kJ/mol})$
PL	APAM	1.49 ± 0.06	1.26 ± 0.11	-10.54 ± 0.15	57.08	-27.55
	RLPA	1.23 ± 0.03	1.04 ± 0.05	-22.86 ± 0.20	17.31	-28.02
CE	APAM	3.42 ± 0.17	0.98 ± 0.10	-16.53 ± 0.25	30.04	-25.48
	RLPA	4.00 ± 0.16	0.80 ± 0.09	-24.13 ± 0.27	3.27	-25.10

2.4 多肽与酶的分子对接结合位点分析

为进一步直观地分析多肽与PL和CE的结合机制,使用分子对接方法研究了多肽与酶的结合位点。根据最小能量原理选择了最佳结合位点与结合构象,如图9所示。多肽与PL和CE的相互作用类型及距离如表5所示,对于PL来说,APAM与Asp79、Ser152和Phe215形成了氢键相互作用,除此之外,还形成了3个盐桥和1个阳离子- π 作用。其中,氢键的键长在1.69~2.73 Å之间,而静电相互作用的键长在3.04~5.55 Å之间。RLPA与PL的Ser152、Phe77和Asp79形成了5个氢键相互作用,键长在1.78~2.33 Å之间, Ser152和Asp79还与RLPA形成了盐桥。除此之外, RLPA还与Tyr114和Phe215形成了阳离子- π 相互作用。Phe77是氢键供体和静电稳定剂,可形成用于底物水解的氧阴离子孔, RLPA可以与Phe77形成氢键,这可能是其具有更好PL抑制活性的原因之一^[3]。对于CE而言,两种多肽更多的是通过氢键发生结合, APAM和RLPA分别与CE形成6个氢键,键长在1.71~2.77 Å之间。除此之外, APAM和Asp434与Asp437形成盐桥, RLPA和Asp434形成盐桥。总而言之,分子对接结果表明,多肽可通过氢键、盐桥、阳离子- π 等静电相互作用与酶活性位点或表面环中的氨基酸残基结合,与前述荧光光谱和等温滴定量热法的结果一致。这些结合改变了酶的构象,降低了底物对酶的亲和力,或阻止了底物进入活性位点。这与抑制动力学分析中混合性抑制或竞争性抑制的结果一致。

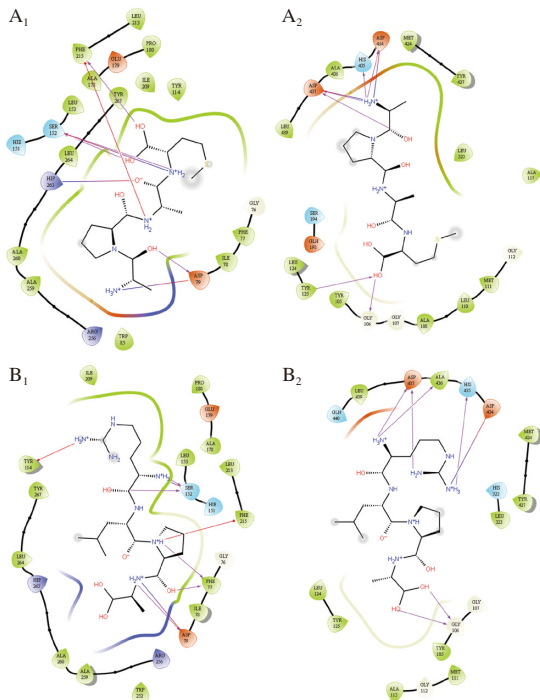


图9 PL和CE中氨基酸与APAM(A)、RLPA(B)的分子间相互作用
Fig. 9 Intermolecular interaction of amino acids present in PL and CE with APAM (A) and RLPA (B)

表5 APAM和RLPA与PL和CE的相互作用类型及距离

Table 5 Interaction types and distances of APAM and RLPA with PL and CE

酶种类	多肽	相互作用类型(键长/Å)		
		氢键	盐桥	阳离子- π
PL	APAM	Ala1-Asp79 (1.69)、Met4-Ser152 (1.86)、Met4-Ser152 (2.73)、Met4-Phe215 (2.00)	Ala1-Asp79 (3.04)、Ala3-Hip263 (4.51)、Met4-Ser152 (3.73)	Ala3-Phe215 (5.55)
	RLPA	Arg1-Ser152 (1.78)、Arg1-Ser152 (2.11)、Pro3-Phe77 (2.33)、Pro3-Phe77 (1.95)、Ala4-Asp79 (2.30)	Arg1-Ser152 (2.73)、Ala4-Asp79 (3.26)	Arg1-Tyr114 (4.97)、Pro3-Phe215 (6.55)
CE	APAM	Ala1-Asp434 (2.77)、Ala1-His435 (2.21)、Ala1-Asp437 (1.78)、Ala1-Asp437 (1.92)、Met4-Gly106 (1.71)、Met4-Tyr125 (2.12)	Ala1-Asp434 (3.52)、Ala1-Asp437 (4.32)	—
	RLPA	Arg1-His435 (1.81)、Arg1-Ala436 (2.33)、Arg1-Asp437 (2.65)、Arg1-Asp437 (1.93)、Ala4-Gly106 (1.96)、Ala4-Gly106 (1.99)	Arg1-Asp434 (2.88)	—

注:—,没有此类相互作用类型。

3 结论

本实验通过抑制动力学、联合抑制、荧光光谱、热力学、分子对接等方法,研究了两种汉麻籽多肽(APAM和RLPA)对PL和CE的抑制作用及其相互作用机制。实时抑制实验显示,RLPA对PL和CE的抑制活性优于APAM。协同抑制实验表明,这些肽在低浓度下可以与奥利司他产生协同作用,从而部分替代奥利司他。抑制动力学分析显示,两种肽对PL和CE表现出竞争性或混合性抑制作用。荧光光谱实验进一步验证了肽可以与PL和CE的活性位点及其周围残基结合,从而改变蛋白质残基的微环境,影响PL和CE的空间构象,限制底物进入酶的活性位点。等温滴定量热分析表明,肽与PL和CE的结合过程受熵和焓的共同驱动。分子对接模拟实验证明,氢键和静电相互作用在肽与酶的结合中起关键作用。本实验分子相互作用机制研究仅在简单的缓冲系统中进行。未来的研究应更准确地评估多肽在肠道环境中的行为,考虑酶抑制、胶束稳定性和消化稳定性等因素对酶活抑制的影响。总之,本研究丰富了对肽与PL和CE抑制及相互作用机制的理解,表明肽在开发功能性抑制脂肪酶产品方面具有潜力。

参考文献:

- [1] 林奕,柳雯郡,黄俊媛,等. 蛋白核小球藻胰脂肪酶抑制肽的分离纯化、鉴定及其降脂活性[J]. 食品科学, 2023, 44(24): 155-163. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230302-021.
- [2] 张笑莹,钟婉滢,马凤,等. 苦荞蛋白降血脂肽的酶解制备、氨基酸组成及活性研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 129-139. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2023110029.
- [3] 冷檬. 坛紫菜胰脂肪酶抑制肽制备及其作用机理研究[D]. 厦门: 集美大学, 2022: 42-44.

- [4] ZHANG H L, WU Q X, WEI X, et al. Pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory effect of *Camellia nitidissima* Chi flower extracts *in vitro* and *in vivo*[J]. Food Bioscience, 2020, 37: 100682. DOI:10.1016/j.fbio.2020.100682.
- [5] LI X X, PU Y J, JIANG H T, et al. Inhibitory effect of procyanidin B2 and tannin acid on cholesterol esterase and their synergistic effect with orlistat[J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(1): 360-369. DOI:10.26599/FSHW.2022.9250030.
- [6] 张炎, 康柱, 苏冬雨, 等. 3种黄酮类化合物对胰脂肪酶的抑制作用及其结合机制[J]. 中国食品学报, 2024, 24(7): 60-69. DOI:10.16429/j.1009-7848.2024.07.006.
- [7] 张海龙. 金花茶花黄酮类化合物抗食源性肥胖作用和机制研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020: 40-41.
- [8] 米佳, 张涓淘, 禄璐, 等. 中压制备色谱法分离黑果枸杞中2个矮牵牛素花色苷及其对胰脂肪酶的抑制活性[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 16-23. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221111-125.
- [9] 伊丽, 孙茹欣, 何静, 等. 驼血蛋白中胰脂肪酶抑制肽的计算机模拟评估[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(12): 2049-2060. DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.12.004.
- [10] GARZÓN A G, CIAN R E, AQUINO M E, et al. Isolation and identification of cholesterol esterase and pancreatic lipase inhibitory peptides from brewer's spent grain by consecutive chromatography and mass spectrometry[J]. Food & Function, 2020, 11(6): 4994-5003. DOI:10.1039/d0fo00880j.
- [11] ALNUAIMI A, FISAYO AJAYI F, HAMDI M, et al. A comparative analysis of anti-lipidemic potential of soybean (*Glycine max*) protein hydrolysates obtained from different ripening stages: identification, and molecular interaction mechanisms of novel bioactive peptides[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134192. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134192.
- [12] BABA W N, MUDGIL P, BABY B, et al. New insights into the cholesterol esterase- and lipase-inhibiting potential of bioactive peptides from camel whey hydrolysates: identification, characterization, and molecular interaction[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(7): 7393-7405. DOI:10.3168/jds.2020-19868.
- [13] 王璐, 武雅珍, 焦明雅, 等. 卵蛋白源胰脂肪酶抑制肽的制备及其对小鼠体质量控制效果[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(3): 81-88. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2021.03.010.
- [14] 王凯. 美藤果粕多肽降血糖和降血脂活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021: 20-48. DOI:10.27151/d.cnki.ghnlu.2021.001835.
- [15] WANG K, LIU X F, ZHANG X W. Isolation and identification of lipid-lowering peptides from Sacha inchi meal[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1529. DOI:10.3390/ijms24021529.
- [16] AHMED A T M F, ISLAM M Z, MAHMUD M S, et al. Hemp as a potential raw material toward a sustainable world: a review[J]. Heliyon, 2022, 8(1): e08753. DOI:10.1016/j.heliyon.2022.e08753.
- [17] PANNICO A, KYRIACOU M C, EL-NAKHEL C, et al. Hemp microgreens as an innovative functional food: variation in the organic acids, amino acids, polyphenols, and cannabinoids composition of six hemp cultivars[J]. Food Research International, 2022, 161: 111863. DOI:10.1016/j.foodres.2022.111863.
- [18] MALOMO S A, HE R, ALUKO R E. Structural and functional properties of hemp seed protein products[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(8): C1512-C1521. DOI:10.1111/1750-3841.12537.
- [19] TEH S S, BEKHIT A E D A, CARNE A, et al. Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain[J]. Food Chemistry, 2016, 203: 199-206. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.02.057.
- [20] SANTOS-SÁNCHEZ G, ÁLVAREZ-LÓPEZ A I, PONCE-ESPAÑA E, et al. Hempseed (*Cannabis sativa*) protein hydrolysates: a valuable source of bioactive peptides with pleiotropic health-promoting effects[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 127: 303-318. DOI:10.1016/j.tifs.2022.06.005.
- [21] 魏连会, 宋淑敏, 董艳, 等. 火麻籽多肽对高脂饮食喂养大鼠血脂的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 161-167. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200421-266.
- [22] HERRERA T, NAVARRO DEL HIERRO J, FORNARI T, et al. Inhibitory effect of quinoa and fenugreek extracts on pancreatic lipase and α -amylase under *in vitro* traditional conditions or intestinal simulated conditions[J]. Food Chemistry, 2019, 270: 509-517. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.07.145.
- [23] IANEVSKI A, GIRI A K, AITTOKALLIO T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(W1): W739-W743. DOI:10.1093/nar/gkac382.
- [24] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190620-234.
- [25] 曹舒云, 郑瑜雪, 柴子淇, 等. 芹菜素-8-C-葡萄糖苷对淀粉消化酶抑制作用机制[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 131-136. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220608-085.
- [26] 秦朝凤, 李姣, 郝经文, 等. 芦荟大黄素对 α -葡萄糖苷酶的抑制机理及其与阿卡波糖的协同作用[J]. 食品科学, 2024, 45(8): 37-44. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230530-281.
- [27] VILLO L, RISTI R, REIMUND M, et al. Calorimetric approach for comparison of angiotensin-like protein 4 with other pancreatic lipase inhibitors[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular and Cell Biology of Lipids, 2020, 1865(2): 158553. DOI:10.1016/j.bbalip.2019.158553.
- [28] 高佩佩. 牛乳酪蛋白胰脂肪酶抑制肽的制备及其结构鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017: 35. DOI:10.27409/d.cnki.gxbnu.2017.000293.
- [29] URBIZO-REYES U, LICEAGA A M, REDDIVARI L, et al. Enzyme kinetics, molecular docking, and *in silico* characterization of canary seed (*Phalaris canariensis* L.) peptides with ACE and pancreatic lipase inhibitory activity[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 88: 104892. DOI:10.1016/j.jff.2021.104892.
- [30] HUANG X, ZHU J X, WANG L, et al. Inhibitory mechanisms and interaction of tangeretin, 5-demethyltangeretin, nobiletin, and 5-demethylnobiletin from citrus peels on pancreatic lipase: kinetics, spectroscopies, and molecular dynamics simulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1927-1938. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.305.
- [31] LI S, HU X, PAN J H, et al. Mechanistic insights into the inhibition of pancreatic lipase by apigenin: inhibitory interaction, conformational change and molecular docking studies[J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 335: 116505. DOI:10.1016/j.molliq.2021.116505.
- [32] SOSNOWSKA D, PODSEDEK A, REDZYŃIA M, et al. Inhibitory effect of black chokeberry fruit polyphenols on pancreatic lipase: searching for most active inhibitors[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 196-204. DOI:10.1016/j.jff.2018.08.029.
- [33] 沈荷玉, 李梦阳, 敖婧芳, 等. 没食子酸对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及机理[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 31-38. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230116-132.
- [34] HU J F, WANG H Y, WENG N H, et al. Novel angiotensin-converting enzyme and pancreatic lipase oligopeptide inhibitors from fermented

- rice bran[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1010005. DOI:10.3389/fnut.2022.1010005.
- [35] KETPRAYOON T, NOITANG S, SANGTANOO P, et al. An *in vitro* study of lipase inhibitory peptides obtained from de-oiled rice bran[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(31): 18915-18929. DOI:10.1039/D1RA01411K.
- [36] WANG X Y, AI X, ZHU Z H, et al. Pancreatic lipase inhibitory effects of peptides derived from sesame proteins: *in silico* and *in vitro* analyses[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 222: 1531-1537. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.259.
- [37] WU D, DUAN R, TANG L, et al. Binding mechanism and functional evaluation of quercetin 3-rhamnoside on lipase[J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 129960. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129960.
- [38] PU Y J, CHEN L Y, HE X, et al. Soluble polysaccharides decrease inhibitory activity of banana condensed tannins against porcine pancreatic lipase[J]. *Food Chemistry*, 2023, 418: 136013. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.136013.
- [39] THAYUMANAVAN P, NALLAIYAN S, LOGANATHAN C, et al. Inhibition of glutathione and *S*-allyl glutathione on pancreatic lipase: analysis through *in vitro* kinetics, fluorescence spectroscopy and *in silico* docking[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 160: 623-631. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.215.
- [40] SHEN H Y, WANG J, AO J F, et al. The inhibitory mechanism of pentacyclic triterpenoid acids on pancreatic lipase and cholesterol esterase[J]. *Food Bioscience*, 2023, 51: 102341. DOI:10.1016/j.fbio.2022.102341.
- [41] XU Z R, CAO Q J, MANYANDE A, et al. Analysis of the binding selectivity and inhibiting mechanism of chlorogenic acid isomers and their interaction with grass carp endogenous lipase using multi-spectroscopic, inhibition kinetics and modeling methods[J]. *Food Chemistry*, 2022, 382: 132106. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132106.
- [42] ZHAO Y L, WANG M, HUANG G H. Structure-activity relationship and interaction mechanism of nine structurally similar flavonoids and α -amylase[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 86: 104739. DOI:10.1016/j.jff.2021.104739.
- [43] LI X X, JIANG H T, PU Y J, et al. Inhibitory effect of condensed tannins from banana pulp on cholesterol esterase and mechanisms of interaction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(51): 14066-14073. DOI:10.1021/acs.jafc.9b05212.
- [44] 郭时印, 李林, 周虹, 等. 1-脱氧野尻霉素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用机制[J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 45-50. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180808-081.
- [45] ZENG Z, WU D, TANG L, et al. Exploring the binding effects and inhibiting mechanism of hyperoside to lipase using multi-spectroscopic approaches, isothermal titration calorimetry, inhibition kinetics and molecular dynamics[J]. *RSC Advances*, 2023, 13(10): 6507-6517. DOI:10.1039/d2ra06715c.
- [46] FENG X Z, LIAO D K, SUN L X, et al. Exploration of interaction between angiotensin I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptide from Wakame (*Undaria pinnatifida*)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 204: 193-203. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.01.114.
- [47] ZHANG B Y, LIU J B, WEN H D, et al. Structural requirements and interaction mechanisms of ACE inhibitory peptides: molecular simulation and thermodynamics studies on LAPYK and its modified peptides[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(6): 1623-1630. DOI:10.1016/j.fshw.2022.06.021.