

驼血蛋白中胰脂肪酶抑制肽的计算机模拟评估

伊丽^{1,2*}, 孙茹欣¹, 何静^{1,2}, 明亮^{1,2}, 张秀荣³, 吉日木图^{1,2}¹内蒙古农业大学食品科学与工程学院 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 呼和浩特 010018;²内蒙古中哈骆驼研究院, 阿拉善 737300; ³阿拉善右旗农业技术推广中心, 阿拉善 750306

摘要:本研究利用中性蛋白酶对驼血蛋白进行酶解, 对其酶解工艺、胰脂肪酶(PDB code:1ETH)抑制活性、多肽分子特征以及分子结合模式进行研究, 以期获得高活性的胰脂肪酶抑制肽。结果表明: 中性蛋白酶在酶用量为 5%、酶解 pH 为 7.0、酶解温度为 55 °C、酶解时间为 3 h 的最佳工艺条件下酶解驼血蛋白所获多肽的胰脂肪酶抑制率为 42.13%。使用 LC-MS/MS 共鉴定出 533 种肽段, 肽兰克评分大于 0.8 的有 8 条肽段。其中 ALERMFLGF、GQPAVPVRF、WDPSKVPPR 三条肽段与胰脂肪酶结合显著。通过 AMBER 19 进行分子动力学模拟, 结果显示, 三条肽段均能与胰脂肪酶活性口袋残基结合, 主要通过静电作用、氢键和疏水相互作用抑制其活性。其中 GQPAVPVRF 结合能最高且具有更多的结合位点而成为最具潜能的胰脂肪酶抑制肽。本研究为开发新型 PL 抑制剂肽提供了参考, 为驼血蛋白的高价值利用提供了新途径。

关键词: 驼血蛋白; 胰脂肪酶; 生物活性肽; 分子动力学模拟

中图分类号: TS251.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)12-2049-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.12.004

In silico evaluation of pancreatic lipase inhibitory peptide in camel blood proteinYI Li^{1,2*}, SUN Ru-xin¹, HE Jing^{1,2}, MING Liang^{1,2}, ZHANG Xiu-rong³, JIRIMUTU^{1,2}¹Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Ministry of Education, College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China;²Inner Mongolia China-Kazakhstan Camel Research Institute, Alxa 737300, China;³Alxa Right Banner Agricultural Technology Promotion Center, Alxa 750306, China

Abstract: In this study, camel blood proteins were enzymatically digested using neutral protease, and the enzymatic process, pancreatic lipase (PL, PDB code:1ETH) inhibitory activity, molecular characteristics of the peptides, and molecular binding patterns were investigated with the aim of PL inhibitory peptides. The optimal processing conditions were 5% neutral protease, pH was 7.0, enzymolysis temperature was 55 °C, and enzymolysis time was 3 h. Under optimized conditions, the PL inhibition rate reached 42.13%. A total of 533 peptides were identified using LC-MS/MS, of which eight peptides had a PeptideRanker score greater than 0.8. Among them, ALERMFLGF, GQPAVPVRF, and WDPSKVPPR exhibited significant binding with pancreatic lipase. Molecular dynamic simulation by AMBER 19 showed that all of them could interact with the residues in the active pocket residues of PL, primarily through electrostatic interactions, hydrogen bonding and hydrophobic interactions, thereby inhibiting its activity. Among them, CGPAVPVRF stands out the most potent PL inhibitor peptide, exhibiting the highest binding energy and possessing a greater number of binding sites. The study not only provides a reference for the development of novel PL inhibitor peptides, but also offers a new avenue for the high-value utilization of camel blood proteins.

Key words: camel blood protein; pancreatic lipase; bioactive peptide; molecular dynamic simulation

近年来,随着人们生活水平的提高和饮食习惯的改变,高脂血症(hyperlipidemia, HLP)已逐渐成为

危害人类健康的“第一杀手”^[1]。该病是由机体脂质代谢紊乱导致的。鉴于胆固醇吸收与脂质代谢的密切关系,胆固醇吸收通路成为了治疗高脂血症药物的重要干预靶点,可以通过减少肠道对胆固醇的吸收来有效预防高脂血症^[2]。膳食摄入的脂质先经过胰脂肪酶水解,分解为脂肪酸和甘油单酯,与胆

收稿日期: 2023-04-27

接受日期: 2023-08-25

基金项目: 高层次人才引进科研启动项目(NDYB2018-48); 双一流学科创新团队建设(NDSC2018-14); 国家重点研发计划(2020YFE0203300)

* 通信作者 Tel: 86-01864797212; E-mail: yili_imau@163.com

固醇、胆盐等形成胶团,最后在肠道被细胞吸收。因此,有效抑制胰脂肪酶(pancreatic lipase, PL)活性可以减少机体对脂质的吸收,从源头缓解病情,预防疾病^[3]。市面上一些药物存在一定的副作用,会引起患者产生不适。因此,亟需开发出天然源生物活性物质来辅助治疗高脂血症。

生物活性肽因其来源广、安全系数高,成为近几年的研究热点。驼血蛋白含量高,总蛋白含量为 6.80 g/dL,血红蛋白含量为 141.11 g/L,高于其他家畜^[4],且氨基酸种类丰富,满足 WHO/FAO/UNU 推荐值,是潜在的优质生物活性肽来源^[5]。且已有研究证明,驼血蛋白酶解产物有抗疲劳、抗氧化、降血压等功效^[6]。因此,以驼血蛋白为原料制备胰脂肪酶抑制肽具有一定的研究价值。

本研究采用中性蛋白酶对驼血蛋白进行酶解,以胰脂肪酶抑制率为评判指标,优化酶解工艺,采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)测定驼血多肽的分子量分布,并基于液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)对驼血多肽进行鉴定与分析,同时利用 PepSite2 建模预测结合位点,通过分子动力学模拟对筛选出的多肽进行结合位点与作用方式的评价,为今后胰脂肪酶抑制活性肽的研究提供参考,为驼血的开发及利用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

驼血采于四子王旗健康的戈壁红驼。

中性蛋白酶(批号:Z8031-500 g)、BCA 蛋白浓度试剂盒(批号:PC0020-50 T)购于北京 Solarbio 科技有限公司;胰脂肪酶(批号:L3126-25 g)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(批号:70990-250 mg,纯度 $\geq 99\%$)、对硝基苯酚(p-nitrophenol, PNP)(批号:241326-50 g,纯度 $\geq 99\%$)、对硝基棕榈酸苯酯(p-nitrophenyl phosphate, PNPP)(批号:N2752-1 g,纯度 $\geq 98\%$)购于美国 Sigma 生物科技有限公司;Mass Standards Kit for the 4700 Proteomics Analyzer 购于美国 AB SCIEX 公司;乙腈(批号:1.00029-1 L,纯度 $\geq 99\%$)、三氟乙酸(批号:80457-10 mL,纯度 $\geq 99\%$)购于德国 Merck 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 驼血蛋白的制备

采集鲜驼血加入 0.8% (W/V) 柠檬酸钠抗凝,

用 400 目纱布过滤,并离心去细胞膜(4 °C, 4 000 r/min, 5 min)^[7]。将已去细胞膜的驼血用 0.1 mol/L (pH 7.2) 磷酸盐缓冲溶液在 4 °C 条件下透析 24 h,在 -50 °C, 1 Pa 条件下真空冷冻干燥制成驼血粉。采用 BCA 蛋白浓度试剂盒测得驼血蛋白含量为 (77.28 \pm 1.34)%。

1.2.2 酶解制备驼血多肽

将驼血粉按原浓度复原后,选用中性蛋白酶对驼血蛋白酶解。酶解完成后,沸水浴 10 min 灭酶,离心(4 °C, 4 000 r/min, 10 min),取上清液为驼血蛋白酶解产物。

1.2.3 单因素试验

对中性蛋白酶的酶用量、酶解时间、酶解温度、酶解 pH 进行单因素试验,以胰脂肪酶抑制率为指标,确定单因素试验的酶解条件。控制酶解温度为 55 °C,酶解 pH 为 7.0,酶解时间为 4 h,设定酶用量的水平梯度分别为 (E/S, W/W) 1%、3%、5%、7%、9%,考察酶用量对驼血多肽胰脂肪酶抑制率的影响。控制酶用量为 5%,酶解 pH 为 7.0,酶解时间为 4 h,设定酶解温度的水平梯度分别为 40、45、50、55、60、65 °C,考察酶解温度对驼血多肽胰脂肪酶抑制率的影响。控制酶用量为 5%,酶解温度为 55 °C,酶解时间为 4 h,设定酶解 pH 的水平梯度分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,考察酶解 pH 对驼血多肽胰脂肪酶抑制率的影响。控制酶用量为 5%,酶解温度为 55 °C,酶解 pH 为 7.0,设定酶解时间的水平梯度分别为 1、2、3、4、5、6 h,考察酶解时间对驼血多肽胰脂肪酶抑制率的影响。

1.2.4 响应面优化试验

根据单因素试验选取酶解时间、酶解温度和酶解 pH 三个因素,以胰脂肪酶抑制率为响应值,设计 17 个试验点的响应面分析试验(见表 1)^[8]。

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Response surface test factor levels

水平 Level	因素 Factor		
	A 酶解温度 Enzymolysis temperature (°C)	B 酶解时间 Enzymolysis time (h)	C 酶解 pH Enzymolysis pH
-1	50	2	6.5
0	55	3	7.0
1	60	4	7.5

1.2.5 胰脂肪酶抑制活性的检测

使用 0.1 mol/L (pH 7.2) 的磷酸钾缓冲溶液溶

解 1 mg PNP 并定容至 100 mL, 得到母液, 再按梯度稀释, 避光静置 10 min 后, 取各个浓度的 PNP 溶液 200 μ L 于 96 孔板中, 用酶标仪测定在 410 nm 波长下测定吸光度, 以 0.1 mol/L (pH 7.2) 的磷酸钾缓冲溶液为参比溶液。以 PNP 浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线 (见图 1), 得到方程为 $Y = 0.499X - 0.0558, R^2 = 0.9925$ 。

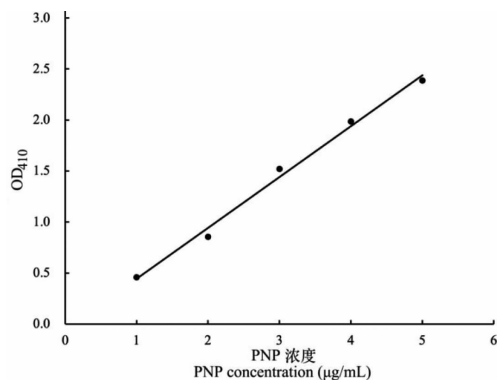


图 1 PNP 标准曲线

Fig. 1 PNP standard curve

PNPP 底物的配制: 称取 30 mg PNPP 溶于 10 mL 异丙醇。称取阿拉伯胶 (0.09 g) 和脱氧胆酸钠 (0.2 g) 溶于 90 mL 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲溶液中混匀, 完全溶解后室温下稳定 2 h, 驼血多肽与 5 mg/mL 的胰脂肪酶在 37 $^{\circ}$ C 下共温 1 h, 再加入底物 PNPP 于 37 $^{\circ}$ C 下反应 20 min, 测 OD₄₁₀ 值^[9,10]。

$$I = \left(1 - \frac{A_B - A_b}{A - A_a}\right) \times 100\%$$

式中, I : 驼血多肽对胰脂肪酶抑制率。A: 对照实验组的吸光度。A_a: 对照空白组的吸光度。A_B: 样品实验组的吸光度。A_b: 样品空白组的吸光度。

1.2.6 MALDI-TOF-MS 分子量测定

样品采用校准标准品 Calibration Mixture 1 进行外标一级校准, 一级质谱 (MS) 范围为 0 ~ 5 000 m/z 和 5 000 ~ 20 000 m/z ^[11]。

1.2.7 多肽的鉴定

对驼血多肽进行超滤、SPE C₁₈ 柱除盐、冷冻干燥后利用 LC-MS 鉴定。液相 A 液: 0.1% 甲酸水溶液, B 液: 0.1% 甲酸乙腈水溶液。色谱柱以 95% 的 A 液平衡, 样品经过色谱柱分离, 梯度设置: 0 ~ 50 min (4% \rightarrow 50% B); 50 ~ 54 min (50% \rightarrow 100% B); 54 ~ 60 min (100% B)。驼血多肽经 Q Exactive 质谱仪 (Thermo Fisher) 进行分析 60 min。检测方式: 正离子。并用软件 MaxQuant 1.5.5.1 检索得到蛋

白质鉴定及定量分析结果^[12]。

1.2.8 多肽的分子特性与结合位点预测

使用 PeptideRanker 程序 (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 对筛选得到肽列表进行肽兰克评分, 以 0.8 作为活性预测单阈值, 当多肽预测得分大于该值时, 认为其具有潜在的活性。通过 Peptide Property Calculator (<http://www.innovagen.com/proteomics-tools>), 计算所得多肽的理论相对分子量、等电点、净电荷和水溶性^[13]。使用 ToxinPred 程序 (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) 对其潜在毒性进行预测^[14]。使用 PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>) 评估多肽的疏水性^[15]。利用 https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html 网站预测多肽二级结构^[16]。使用 Pepsite2 (<http://pepsite2.russelllab.org/>) 预测结合位点^[17]。

1.2.9 分子动力学模拟

1.2.9.1 分子对接

从 RCSB PDB 蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/home/home.do>) 检索获得胰脂肪酶 (PDB code: 1ETH) 晶体结构, 采用 Maestro 13.4 软件构建三条肽段与 1ETH 的结合模式。通过 LigPrep 模块计算三条肽段在生理环境下的电荷状态及能量最低构象, 采用 Maestro 中的蛋白准备模块 (protein preparation wizard) 对 1ETH 进行非配体和水分子的去除, 加氢原子, 使用 OPLS4 力场优化结构以去除分子间碰撞。进一步, 采用 Maestro 中受体格点准备模块 (receptor grid generation) 生成对接口袋的格文文件, 以晶体结构的共晶配体的质心作为活性口袋中心, 生成 30 nm \times 30 nm \times 30 nm 的格点文件。最后, 通过 Glide 对接模块的 SP-Peptide 算法进行分子对接。

1.2.9.2 分子动力学模拟

采用 AMBER 19 软件^[18] 对上述对接获得的肽段与 1ETH 复合物分别进行全原子分子动力学模拟。首先, 通过 antechamber 模块和 gaussian 09 软件的 Hartree-Fock (HF) SCF/6-31G* 计算肽段的电荷。之后, 采用 GAFF2 小分子力场和 ff14SV 蛋白力场^[19,20] 分别对肽段和 1ETH 进行描述, 采用 LEaP 模块添加氢原子, 在体系 10 nm 距离处添加截断的八面体 TIP3P 溶剂盒, 并在体系中添加 Na⁺/Cl⁻ 用于平衡体系电荷, 输出用于模拟的拓扑和参数文件。然后, 使用 2 500 步的最陡下降法和 2 500 步的共轭梯度法进行能量优化。在体系维持温度 298.15 K

的条件下,进行 500 ps 的 NVT 系综模拟和 500 ps 的 NPT 平衡模拟。最后,在周期边界性条件下,进行 100 ns(50 000 000 步)的 NPT 系综模拟,采用 PME 法计算长程静电相互作用^[21],非键的截断距离设为 1 nm,碰撞频率 γ 设为 2 ps^{-1} ,体系压强为 1 atm,积分步长为 2 fs,每隔 10 ps 保存轨迹,对均方根偏差(Root-mean-square deviation, RMSD),MM/GBSA 结合能进行分析。

1.3 数据处理

所得数据均用 SPSS 20.0 和 Microsoft Excel 2019 进行统计分析,使用 Graphpad prism9 绘制图。各组实验均重复三次,采用 ANOVA 进行 Duncan 差异分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 胰脂肪酶抑制肽制备的单因素实验

2.1.1 酶用量

由图 2A 可知,随着酶用量的增加,胰脂肪酶抑制率呈先上升后下降的趋势。当酶用量达到 5% 时,胰脂肪酶抑制率为 27.46%,酶用量继续增加,胰脂肪酶抑制率逐渐降低,可能是过饱和的蛋白酶对其中驼血多肽进一步作用导致的。为保护具有胰脂肪酶抑制能力的多肽,故确定最佳酶用量为 5%。

2.1.2 酶解温度

由图 2B 可知,随着温度的升高,呈先上升后下降的趋势。当温度逐渐升高时,酶活增强,酶促反应加快,驼血多肽的胰脂肪酶抑制能力逐渐升高。当酶解温度达到 55 °C 时,驼血多肽的胰脂肪酶抑制率为 22.84%。温度继续增加,蛋白酶失活,驼血多肽的胰脂肪酶抑制率降低。故确定最佳酶解温度为 55 °C。

2.1.3 酶解 pH

在中性蛋白酶最适 pH 的范围内设置水平梯度,随着 pH 的增大,驼血多肽的胰脂肪酶抑制率呈先上升后下降的趋势(见图 2C)。当酶解 pH 为 7.0 时,中性蛋白酶酶解产物的胰脂肪酶抑制率为 20.81%,达到最大,显著高于组间其他 pH 条件下酶解产物的胰脂肪酶抑制活性。故确定最佳酶解 pH 为 7.0。

2.1.4 酶解时间

在一个酶解反应中,酶解时间也起着至关重要的作用。由图 2D 可知,随着酶解时间的增加,驼血多肽的胰脂肪酶抑制率呈先上升后下降的趋势。驼血多肽的胰脂肪酶抑制率在酶解时间为 3 h 时达到最大,为 39.26%。故确定最佳酶解时间为 3 h。

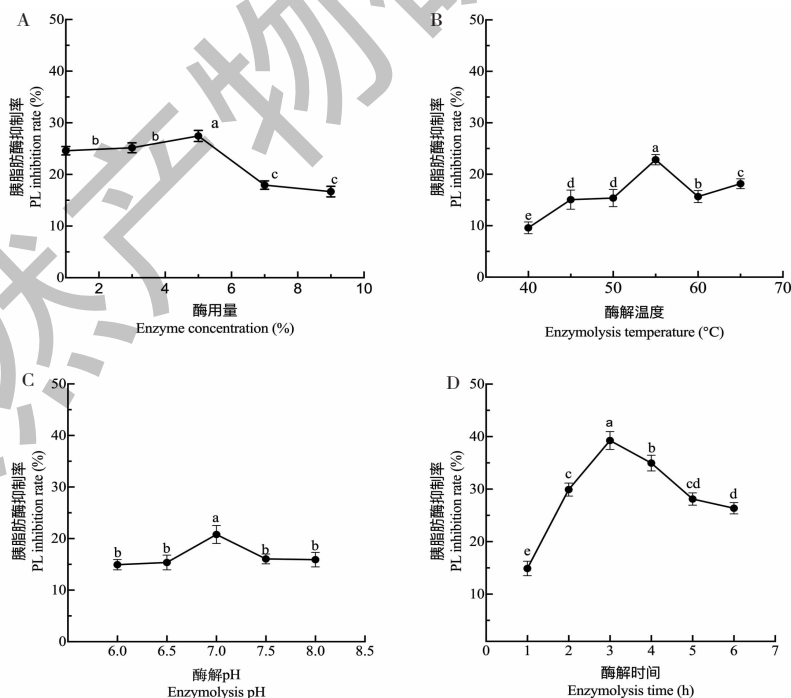


图 2 酶解条件对胰脂肪酶抑制能力的影响

Fig. 2 Effect of enzymatic hydrolysis conditions on PL inhibition rate

注:不同字母表示在不同条件下酶解产物的胰脂肪酶抑制率的差异显著($P < 0.05$) Note: Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in the PL inhibition rates of the hydrolysates under different conditions.

2.2 胰脂肪酶抑制肽的响应面优化试验

利用 Design-Expert v8.0.6 软件对结果进行多元回归拟合,得到驼血多肽的胰脂肪酶抑制率(Y)与酶解时间(A)、酶解温度(B)、酶解 pH(C)方程为: $Y = 40.83 + 1.99A - 0.64B + 1.23C - 2.52AB + 0.51AC + 1.27BC - 12.95A^2 - 8.19B^2 - 7.63C^2$ (见表

2)。最佳酶解工艺条件为:酶解时间 3 h、酶解温度 55 °C、酶解 pH 7.0,驼血多肽的胰脂肪酶抑制率预测值为 42.13%。与王璐^[22]提取的鸡蛋清蛋白肽、周美含^[23]提取的榛仁肽的胰脂肪酶抑制率相近,说明在驼血中提取的多肽胰脂肪酶抑制效果良好。

表 2 响应面试验结果

Table 2 Response surface test results

样品号 Sample No.	酶解时间 Enzymolysis time	酶解温度 Enzymolysis temperature	酶解 pH Enzymolysis pH	胰脂肪酶抑制率 PL inhibition rate (%)
1	-1	-1	0	14.75
2	1	-1	0	26.07
3	-1	1	0	18.34
4	1	1	0	19.59
5	-1	0	-1	19.17
6	1	0	-1	19.83
7	-1	0	1	19.64
8	1	0	1	22.34
9	0	-1	-1	25.13
10	0	1	-1	21.47
11	0	-1	1	26.01
12	0	1	1	27.44
13	0	0	0	41.19
14	0	0	0	40.78
15	0	0	0	40.16
16	0	0	0	39.58
17	0	0	0	42.13

回归方程方差分析结果见表 3,回归模型差异显著($P < 0.01$),失拟项差异不显著($P > 0.05$),且 R^2 为 0.988 6, R_{adj}^2 为 0.974 0,表明自变量与响应值之间的模型关系显著,模型与实际结果拟合良好。经验证与预测值几乎一致,证明试验效果较好。由图 3 可知,3 个因素间交互作用对驼血多肽胰脂肪

酶抑制率的影响均呈抛物面型,且响应面图开口向下,等高线均呈椭圆,说明在所选范围内存在极大值点。其中,酶解时间的轴向等高线密集程度强,说明酶解时间对驼血多肽胰脂肪酶抑制率的影响较为显著($P < 0.01$)。酶解时间与酶解温度的交互作用对驼血多肽胰脂肪酶抑制率的影响显著($P < 0.05$)。

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Regression equation analysis of variance

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F -value	P 值 P -value
模型 Model	1 446.80	9	160.76	67.51	< 0.000 1
A	31.72	1	31.72	13.32	0.008 2
B	3.28	1	3.28	1.38	0.279 1
C	12.08	1	12.08	5.07	0.059 0
AB	25.35	1	25.35	10.65	0.013 8

续表 3 (Continued Fig. 3)

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
<i>AC</i>	1.04	1	1.04	0.44	0.529 8
<i>BC</i>	6.48	1	6.48	2.72	0.143 1
<i>A</i> ²	706.55	1	706.55	296.71	<0.000 1
<i>B</i> ²	282.18	1	282.18	118.50	<0.000 1
<i>C</i> ²	245.06	1	245.06	102.91	<0.000 1
残差 Residual	16.67	7	2.38	—	—
失拟项 Lack of fit	12.53	3	4.18	4.04	0.105 6
纯误差 Pure error	4.14	4	1.03	—	—
总回归 Cor total	1 463.47	16	—	—	—

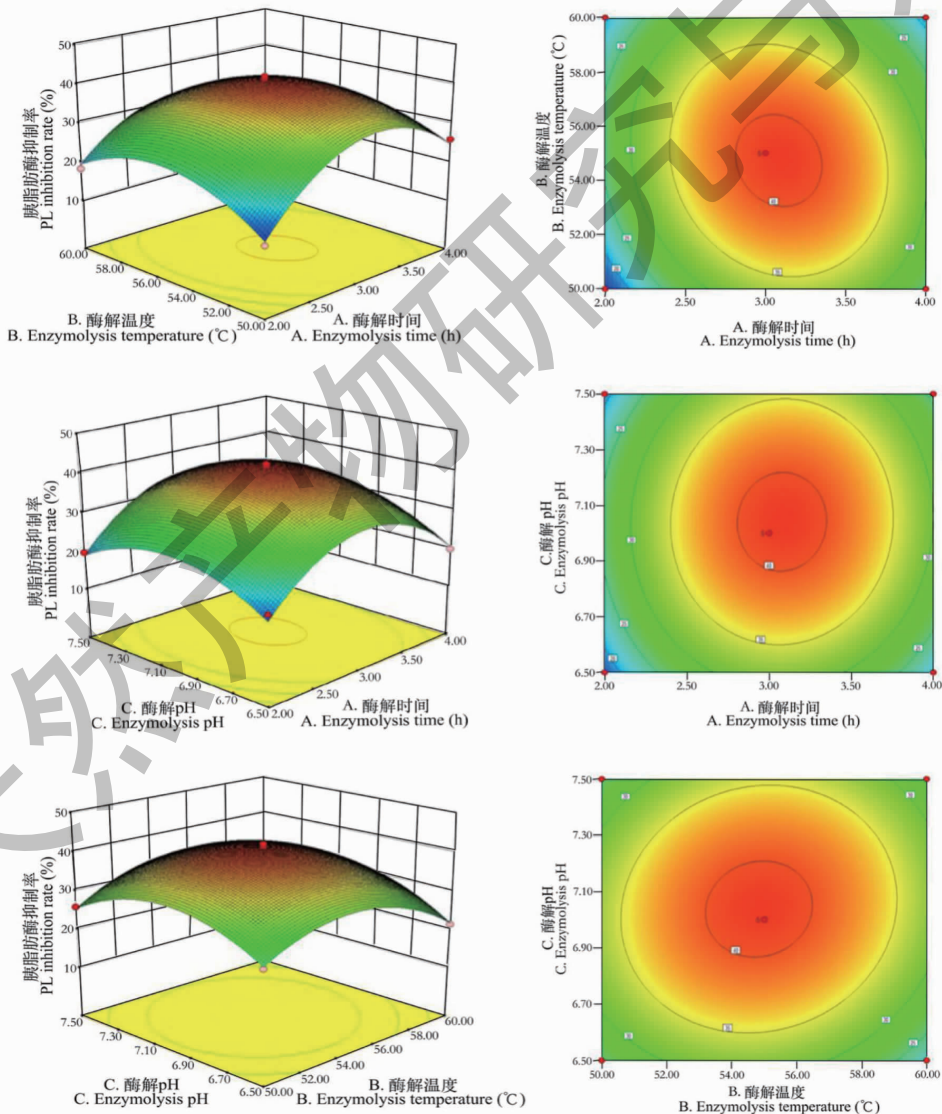


图 3 各因素交互作用对胰脂肪酶抑制率的影响的响应面图和等高线图

Fig. 3 Response surface plots and contour plots illustrating the influence of factors on PL inhibition rate

2.3 驼血多肽的分子量

MALDI-TOF-MS 是一种新型软电离质谱技术,用于测定混合物绝对分子量^[24]。本研究在正离子的检测模式下检测驼血多肽分子量主要集中在 200~2 000 Da,该范围内肽段占比为 98.06%,说明此次驼血蛋白酶解效果良好,产生了大量小分子肽段。

如图 4 所示,500~1 500 Da 分子量范围内的肽段较多,占总量的 79.77%。其中,683.393、912.580、1 126.639、1 223.739、1 239.723 离子相对丰度较高,说明该分子量的氨基酸固定缩合在一起的肽段较多,起到良好的胰脂肪酶抑制作用。

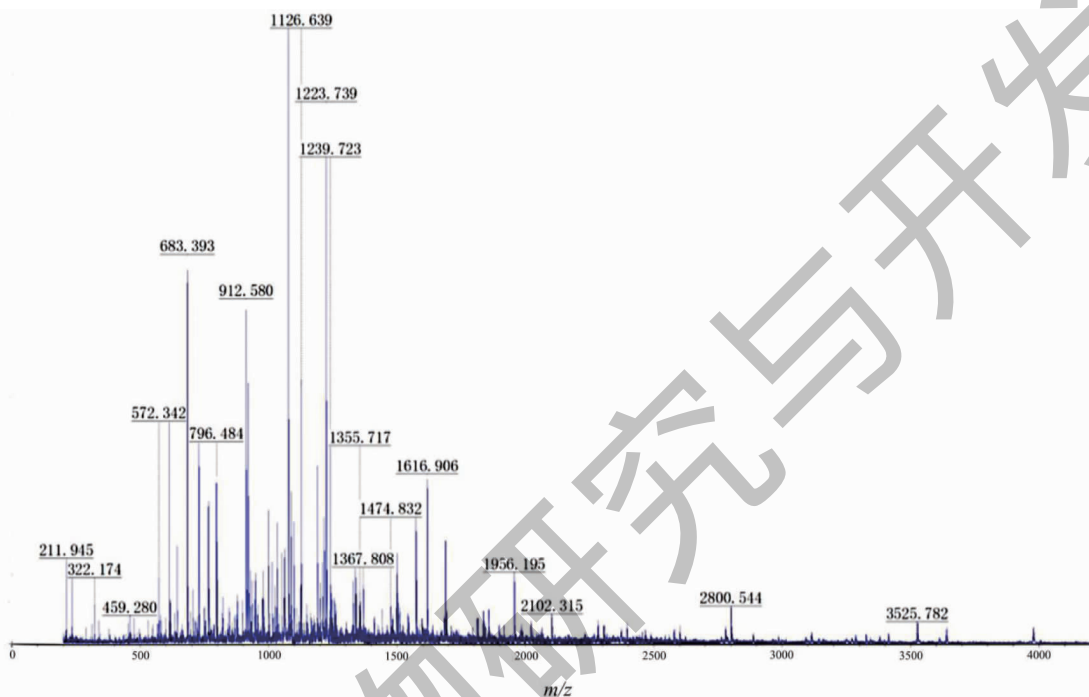


图 4 驼血多肽的 MALDI-TOF-MS 质谱图

Fig. 4 MALDI-TOF-MS mass spectra of camel blood peptides

2.4 驼血多肽鉴定

驼血多肽鉴定出的肽段在 UniProt Camelidae 数据库中进行比对。由表 4 可知,鉴定出 533 种多肽,共计 1 633 条。主要源于血红蛋白、血清蛋白和纤维原蛋白,占比分别为 57.78%、12.84%、9.26%。

肽段长度分布在 8~25 个氨基酸之间,其中 10~11 个氨基酸长度的肽段数量最多为 405 条,12~13 个氨基酸长度的数量次之为 331 条,少量肽段由 6~9 个氨基酸组成(见图 5),表明经消化后,驼血蛋白释放出了大量的短肽,对于提供生物活性肽具有良好潜力。

表 4 鉴定出的多肽及蛋白信息

Table 4 Identified peptide and protein information

蛋白编号 Protein ID	蛋白名称 Protein name	肽段种类 Peptide type	肽段数 Peptide number
A0A5N4E196/S9XBS9/S9XR87/A0A5N4E3Y8/A0A6J0B233	免疫球蛋白	15	24
A0A5N4DSC6/S9WX48	α -1B 糖蛋白/ α 1-酸性糖蛋白	14	18
A0A5N4CXD3	α -血红蛋白稳定蛋白	3	6
A0A5N4EKQ6	β -1 金属结合球蛋白	5	5
A0A6J3B9W7/A0A6J3AFK0/A0A6J0AW67	补体 C4/ C9-X2/补体 I-X3	5	5
A0A6J3B2X5	蛋白质 4.1 亚型 X15	7	8
A0A6I9I7P0/T0MGL4	红细胞膜蛋白带 7/4.2 亚型 2	10	12

续表 4(Continued Tab. 4)

蛋白编号 Protein ID	蛋白名称 Protein name	肽段种类 Peptide type	肽段数 Peptide number
A0A5N4CF27	锚蛋白 1	18	21
S9YTS3/T0MIA6	肌动蛋白(细胞质)/肌动蛋白解聚因子	13	18
A0A6J0AU98/A0A6I9IF00	抗氧化蛋白 4 亚型 X2/抗氧化蛋白 6	7	8
A0A6J3AZG1/S9WPL9;S9WJD1	微管蛋白 α -1C 链/微管蛋白 β 链	12	16
A0A6J3A6K7/S9W7K0/S9XCM5/T0NTZ5	未表征的蛋白质	26	43
A0A5N4EFL2/S9Y2M0;S9XXW2/A0A5N4E169	纤维蛋白原 α 链/ β 链/ γ 链	85	150
A0A5N4E636	纤连蛋白	5	6
P63106/S9WA55/S9YCX3/S9YCX7/A0A6I9I5T0	血红蛋白亚基	166	936
A0A5N4EFPO	血清白蛋白	78	208
A0A5N4E1N0/A0A6I9IC13	血影蛋白 β 链	26	36
A0A5N4D4V3/S9W3S8	阴离子交换蛋白	31	52
A0A5N4C8W1/A0A5N4C7E3/P0DOC3/A0A5N4D305	载脂蛋白 A-I/A-IV/E/H	6	5
A0A6I9ILA3	黄素还原酶(NADPH)	1	56

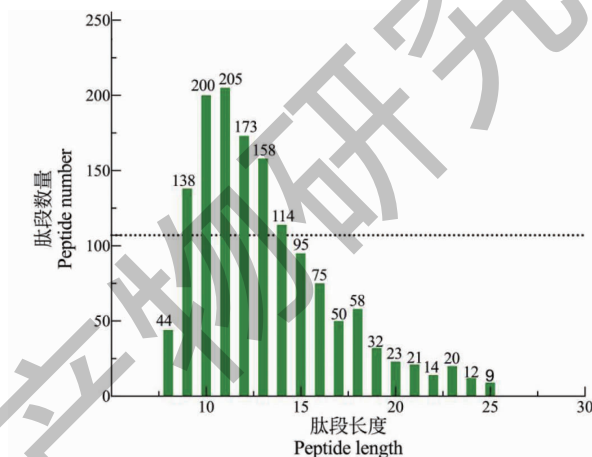


图 5 鉴定的肽段长度分布

Fig. 5 Length distribution of identified peptides

2.5 驼血多肽活性与分子特点分析

利用 Peptide Ranker 对多肽进行肽兰克评分, 通过在线预测软件对多肽进行了理化性质与二级结构的分析(见表 5)。结果表明, 评分大于 0.8 的 PL 抑制多肽有 8 条, 分子量集中在 970 ~ 1 600 Da 之间, PI 主要集中在 9 ~ 11 之间, 净电荷主要集中在 1 ~ 3 之间, 疏水性在 8 ~ 19 之间, 无毒且主要以无规则卷曲形式存在。该结果与 Mudgil^[10]、Tian^[25] 等的结果相近。

2.6 驼血多肽与胰脂肪酶的结合位点

胰脂肪酶是一种脂质消化酶, 将甘油三酯底物转化为单甘脂和游离脂肪酸, 负责消化 50% ~ 70%

的膳食脂肪。临床上已将 PL 认定为高胆固醇血症和肥胖症管理策略的关键抑制代谢酶^[26]。研究表明, PL 在其催化过程中涉及 6 个主要氨基酸残基, 即 Ser153、Asp177、His264、Phe78、His152 和 Phe216 组成了酰基酶催化三要素和脂肪酶的潜在底物结合或抑制位点^[27]。因此, 预测多肽与这些位点或残基的结合即可调节胰脂肪酶动力学。根据 PepSite 2 预测结果可知, ALERMFLGF、GQPAVPVRF 和 WDPSKVPPR 三条多肽与胰脂肪酶活性位点显著结合(见表 6)。这是由于三条肽段主要由疏水氨基酸组成, PL 则是一种亲脂性酶, 因此, 它们可以很容易与胰脂肪酶的活性部位结合, 从而抑制其活性。

表 5 驼血多肽的活性评价及分子特点分析

Table 5 Activity evaluation and molecular characteristics analysis of camel blood peptides

肽段序列 Peptide sequence	来源 蛋白 Source protein	肽兰克 得分 Peptide ranker score	分子量 Molecular weight (g/mol)	等电点 Isoelec- tric point (pI)	净电荷 Net charge	水溶性 Water solu- bility	疏水性 Hydrop- hobicity (kcal/mol)	毒性 预测 Toxin- pred	二级结构 Secondary structure			
									α -螺旋 α - Helix	β -折叠 β - Sheet	β -转角 β - Turn	无规则 卷曲 Random coil
ALERMFLGF	血红蛋白酶亚基	0.87	1 083.31	6.93	0	差	+8.40	无毒	0	0	0	100
LQAAYQKVVAGV ANALAHRYH	血红蛋白亚基 β 样亚型 2	0.84	2 280.59	10.1	2.2	差	+18.41	无毒	95.24	0	0	4.76
GDAGDAFDGF	纤维蛋白原 γ 链	0.83	970.93	0.53	-3	优	+19.85	无毒	0	0	0	100
GSKVLNSFGDGLN HLDNLKGTYAK	血红蛋白亚基 β 样亚型 2	0.82	2 548.8	9.61	1.1	优	+26.85	无毒	79.17	0	12.50	4.17
GQPAVPVRF	阴离子交换蛋白	0.81	970.13	10.84	1	差	+9.78	无毒	0	0	0	100
GRLLVVPWTR- RF	血红蛋白亚基 β 样亚型 2	0.81	1 662.98	11.82	3	差	+6.94	无毒	0	0	0	100
LLVVYPWTRRF	血红蛋白亚基 β 样亚型 2	0.80	1 449.74	11	2	差	+3.98	无毒	0	0	0	100
WDPSKVPPR	黄素还原酶 (NADPH)	0.80	1 081.22	9.99	1	优	+14.48	无毒	0	0	0	100

表 6 驼血多肽与胰脂肪酶 (PDB code:1ETH) 结合位点的预测

Table 6 Prediction of the binding site of camel blood peptide to pancreatic lipase (PDB code:1ETH)

肽段序列 Peptide sequence	PePsite2 (<i>P</i> 值)	肽内结合的位点 Reactive residue in peptide	与 1ETH 活性位点 Bound residue in 1ETH
ALERMFLGF	0.030 36	R ₄ M ₅ F ₆ L ₇ G ₈ F ₉	Gly77、Phe78*、Ile79、Tyr115、Ser153*、Leu154、Pro181、Phe216*、His264*
GQPAVPVRF	0.024 95	G ₁ Q ₂ P ₆ V ₇ F ₉	Gly77、Phe78*、Lys81、Tyr115、His152*、Ser153*、Leu154、Gly155、Ala179、Phe216*、Trp253、His264*
WDPSKVPPR	0.017	W ₁ D ₂ V ₆ P ₇ P ₈ R ₉	Phe78*、Tyr115、His152*、Ser153*、Phe216*、Trp253、Ala261、His264*

注: * 已知胰脂肪酶抑制剂的结合位点。

Note: * Binding sites for known pancreatic lipase inhibitors.

2.7 分子动力学模拟

2.7.1 RMSD 值结果

本研究计算了三条肽段与 1ETH 分子动力学模拟 100 ns 时长轨迹的 RMSD 值,以检验体系稳定性,结果如图 6 所示。肽段 ALERMFLGF 在模拟前期波动较大,模拟后期收敛到 0.22 nm,波动相对稳定,达到稳定的结合模式。肽段 GQPAVPVRF 和 WDPSKVPPR 在模拟前期即达到稳定状态,中后期持续在 0.15~0.2 nm 范围内波动。该结果表明,三条肽段在模拟后均实现了稳定。

2.7.2 结合自由能的计算

基于分子动力学模拟的轨迹,采用 MM/GBSA 计算方法计算了肽段与 1ETH 的结合能,该结果可以更为准确地反映结合效果。如表 7 所示,ALERMFLGF/1ETH、GQPAVPVRF/1ETH 和 WDPSKVPPR/1ETH 的结合能分别为 -31.00 ± 3.55 、 -36.68

± 2.77 和 -32.22 ± 4.10 kcal/mol,表明三条肽段与 1ETH 均具有较好的结合力。通过能量分解,主要贡献力为静电势能,其次是范德华作用能,再就是非极性溶剂化作用。

2.7.3 分子结合模式

分子动力学模拟可以精炼对接获得的肽段和蛋白的结合方式,因此,本研究通过 100 ns 的分子动力学模拟优化了肽段和 1ETH 的结合模式(见图 7)。结果显示,三条肽段均能占据胰脂肪酶蛋白活性袋,其中肽段 ALERMFLGF 与 1ETH 上的 ASP206 发生静电作用(盐桥作用),与 Phe78、Asp80、Asn213、Asp206 发生氢键作用,与 Ala179、Pro181、Tyr115 发生疏水作用。肽段 GQPAVPVRF 与 1ETH 上的 Asp206 发生静电作用(盐桥作用),与 Phe78、Tyr115、Ser153、Asp80、Val260、Asn213、Asp206、Lys233、His264、Gln234 发生氢键作用,与 LEU214、

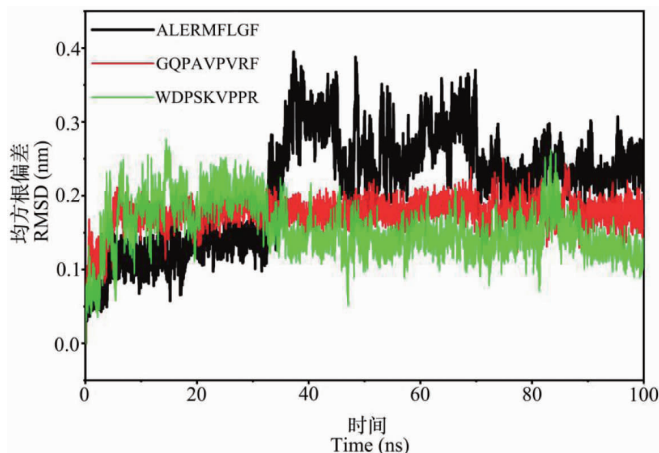


图6 分子动力学模拟过程中肽段与1ETH复合物RMSD随时间的变化

Fig. 6 Variation of RMSD of peptide/1ETH complex over time during molecular dynamics simulation

表7 MM/GBSA计算结合能

Table 7 MM/GBSA calculation of binding energy

能量 Energy	能量值 Energy value (kcal/mol)		
	ALERMFLGF/1ETH	GQPAVPVRF/1ETH	WDPSKVPPR/1ETH
范德华作用能 Van der Waals energy	-53.95 ± 3.85	-52.90 ± 6.66	-51.91 ± 8.74
静电势能 Electrostatic energy	-217.58 ± 7.24	-331.79 ± 8.87	-250.26 ± 9.39
极性溶剂化作用 Electrostatic contribution to solvation	248.31 ± 6.67	356.72 ± 3.37	276.62 ± 6.75
非极性溶剂化作用 Non-polar contribution to solvation	-7.77 ± 0.41	-8.71 ± 0.31	-6.67 ± 1.21
结合能 Binding energy	-31.00 ± 3.55	-36.68 ± 2.77	-32.22 ± 4.10

Phe78、Tyr115、Phe259 发生疏水作用(见图7B)。肽段 WDPSKVPPR 与1ETH 上的 Asp80 发生静电作用(盐桥作用),与 Glu180、Phe78 发生氢键作用。此外,还和 Ala261、Phe78、Phe216、Ile210 发生疏水作用(见图7C)。

据研究报道,PL 由 N-末端和 C 末端结构域组成,其中 N-末端结构域是活性部位,包含催化三要素 Ser153、Asp177 和 His264,以及底物结合残基 Phe78、Ile79、His152、Phe216、Trp253 和 Arg257。该结构域的活性位点埋在瓣膜的柔性环下面,使酶处于非活性状态;C 端结构域(残基 337~449)主要参与与其辅助因子—辅脂酶的互动,该结构域是通过瓣膜构象变化激活酶的必要条件^[29]。为了使胰脂肪酶有效的发挥作用,N-端结构域翻转可以使活性位点被底物接触,形成一个功能性的氧阴离子孔并产生界面结合点。由此推测,本研究筛选得到的三

条肽段可能通过预先阻止 N 端结构域(催化部位)的重新定位,限制脂肪酶的功能,推迟对甘油三酯的消化和吸收,从而防止肥胖和高脂血症的发生^[28]。此外,Ngoh 等^[28]报道,拥有越多结合位点的肽,该肽的抑制活性就越高,由此推测,GQPAVPVRF 可能显示出更好的胰脂肪酶抑制性,该结果有待进一步验证。

3 结论

胰脂肪酶的抑制被认为是针对高脂血症和肥胖的重要的治疗干预措施之一。本研究基于胰脂肪酶抑制活性,通过单因素和响应面实验对中性蛋白酶水解制备驼血胰脂肪酶抑制肽的工艺进行了优化。在最优条件下,驼血多肽的胰脂肪酶抑制率为 42.13%。通过 MALDI-TOF-MS、LC-MS 以及生物信息技术对酶解产物进行分析,最终鉴定出 ALERMFLGF、GQPAVPVRF、WDPSKVPPR 三条与胰脂肪酶

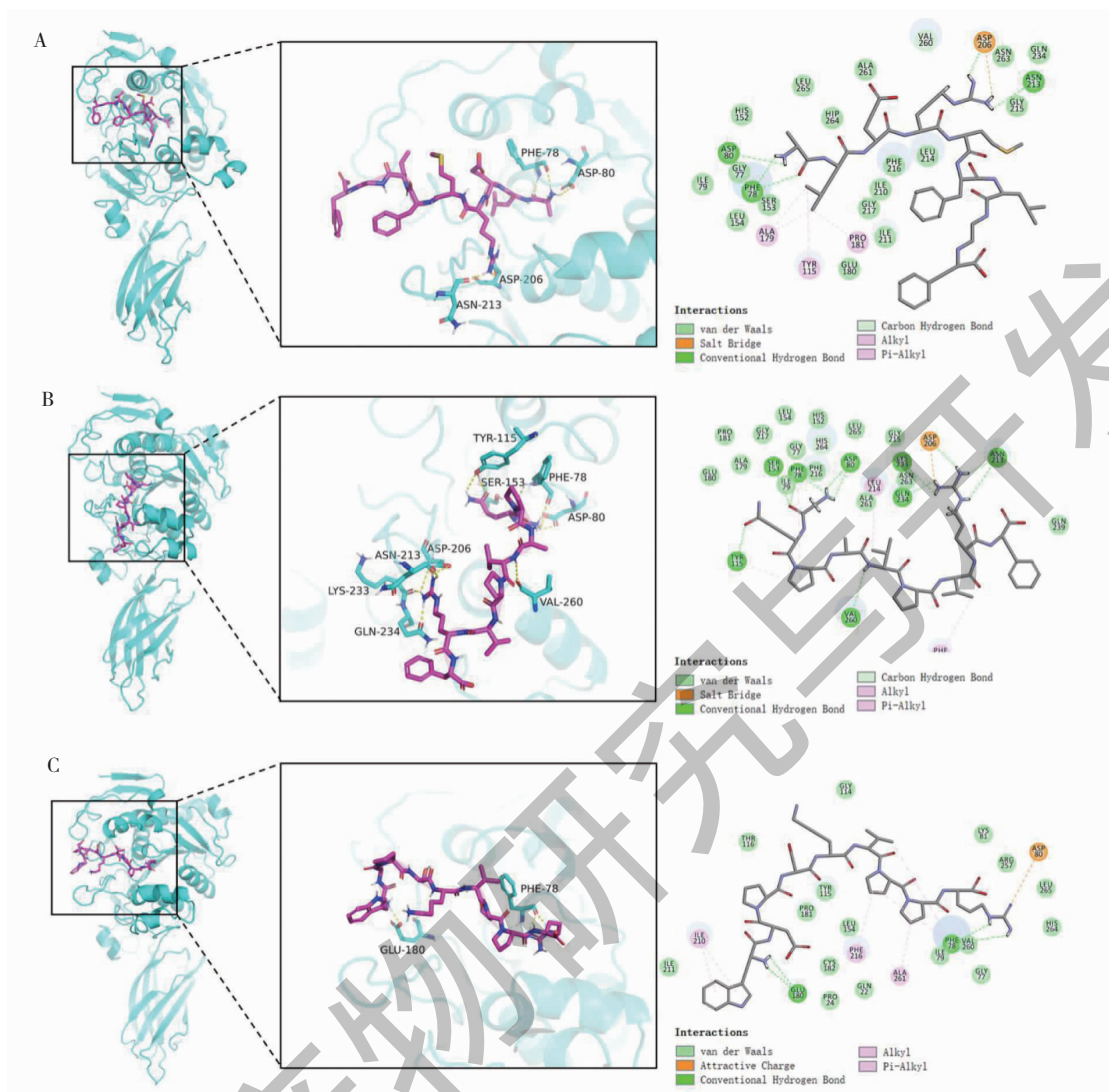


图7 基于分子动力学模拟获得的 ALERMFLGF (A)、GQPAVPVRF (B) 和 WDPSKVPPR (C) 与胰脂肪酶 (PDB:1ETH) 的结合模式

Fig. 7 Binding patterns of ALERMFLGF (A), GQPAVPVRF (B) and WDPSKVPPR (C) to pancreatic lipase (PDB:1ETH) based on molecular dynamics simulations

注:左图 of 整体视图;中图 of 3D 局部视图,黄色虚线表示氢键作用;右图 of 2D 相互作用图。Note: The left figure shows the overall view; the middle figure shows the 3D binding patterns, with the yellow dashed line indicating the hydrogen bond; the right figure shows the 2D binding patterns.

显著结合的肽段。通过分子动力学模拟发现,三条肽段主要通过氢键、疏水相互作用与 PL 活性部位的氨基酸残基结合,破坏胰脂肪酶 N-端结构域瓣膜的功能,抑制其活性。其中 GQPAVPVRF 的结合自由能高且 100 ns 内的氢键数量多,意味着它能与 1ETH 的结合紧密,有望成为胰脂肪酶抑制剂成分。该研究表明,驼血蛋白可作为胰脂肪酶抑制肽的来源。然而,虚拟筛选结果存在一定的局限性,今后还需要对肽段进行水溶性和消化稳定性的优化,人工合成后通过体外和体内实验加以验证抗高血脂

症的效果。

参考文献

- 1 Wang C, Dai XY, Gong LH, et al. Effects of emodin on lipid metabolism in zebrafish with hyperlipidemia [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1873-1879.
- 2 Rudel LL, Lee RG, Parini P. ACAT2 is a target for treatment of coronary heart disease associated with hypercholesterolemia [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 1112-1118.
- 3 Adisakwattana S, Intrawangso J, Hemrid A, et al. Extracts of

- edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids [J]. *Food Technol Biotech*, 2012, 50:11-16.
- 4 Liu LJ, Yi L, Li T, et al. Process parameters for the preparation of antioxidant peptides by enzymatic digestion of camel blood proteins [J]. *Food Sci Technol (食品科技)*, 2019, 44: 119-125.
- 5 Wang NL, Liu Y, Liu YF, et al. Analysis of the amino acid composition of camel blood peptides [J]. *Amino Acids Biotic Resour (氨基酸和生物资源)*, 2016, 38:11-14.
- 6 Liu LJ. Preparation and characterization of antioxidant and hypoglycemic active peptides from camel blood [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (内蒙古农业大学), 2019.
- 7 Tang QW. Biopreparation technology and stability study of pig blood protein-derived antioxidant peptides [D]. Changsha: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), 2016.
- 8 Tavares TG, Contreras MM, Amorim M, et al. Optimization, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract [J]. *Int Dairy J*, 2011, 21:926-933.
- 9 Zheng CD, Duan YQ, Gao JM, et al. Screening for anti-lipase properties of 37 traditional chinese medicinal herbs [J]. *J Chin Med Assoc*, 2010, 73:319-324.
- 10 Mudgil P, Kamal H, Yuen GC, et al. Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates [J]. *Food Chem*, 2018, 259:46-54.
- 11 Su N, Yi L, Jirimutu. Preparation and characterization of camel milk protein alpha-amylase inhibiting active peptide [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2020, 41:57-166.
- 12 Beverly RL, Underwood MA, Dallas DC. Peptidomics analysis of milk protein-derived peptides released over time in the preterm infant stomach [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18:912-922.
- 13 Soleymanzadeh N, Mirdamadi S, Mirzaei M, et al. Novel β -casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk fermented by *Leuconostoc lactis* PTCC1899: Identification and molecular docking [J]. *Int Dairy J*, 2019, 97:201-208.
- 14 Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins [J]. *PLoS One*, 2013, 8:e73957.
- 15 Tu ML, Qiao XY, Wang C, et al. In vitro and in silico analysis of dual-function peptides derived from casein hydrolysate [J]. *Food Sci Hum Well*, 2021, 1:32-37.
- 16 Li J, Hang BL, Qin AJ, et al. Preparation of bovine blood red egg white protein peptides and study of their weight loss function [J]. *China Animals Husb Vet Med (中国畜牧兽医)*, 2017, 44:59-64.
- 17 Trabuco LG, Lise S, Petsalaki E, et al. PepSite: Prediction of peptide-binding sites from protein surfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:W423-W427.
- 18 Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package [J]. *WIERs Comput Mol Sci*, 2013, 3:198-210.
- 19 Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, et al. Development and testing of a general amber force field [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25:1157-1174.
- 20 Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, et al. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB [J]. *J Chem Theory Comput*, 2015, 11:3696-3713.
- 21 Sagui C, Darden TA. Molecular dynamics simulations of biomolecules: long-range electrostatic effects [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1999, 28:155-179.
- 22 Wang L. Preparation and study on weight loss function of peptide from egg white protein [D]. Xi'an: Northwest A&F University (西北农林科技大学), 2019.
- 23 Zhou MH. Preparation, purification and structural identification of hazelnut peptides and study of the mechanism of lipid-lowering and weight loss [D]. Changchun: Jilin Agricultural University (吉林农业大学), 2019.
- 24 Ayyash M, Al-dhaheri AS, Mahadin SA, et al. In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: a comparative study with fermented bovine milk [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101:900-911.
- 25 Tian YQ, Liu CC, Wang SH, et al. Efficient screening of pancreatic lipase inhibitors from cod meat hydrolysate through ligand fishing strategy [J]. *Front Nutr*, 2022, 9:969558.
- 26 Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: Unexplored potential [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12:879-889.
- 27 Hermoso J, Pignol D, Kerfelec B, et al. Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monoethyl ether complex [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271:18007-18016.
- 28 Ngho YY, Choi SB, Gan CY. The potential roles of Pinto bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto) bioactive peptides in regulating physiological functions: protease activating, lipase inhibiting and bile acid binding activities [J]. *J Funct Foods*, 2017, 33:67-75.
- 29 Zhang B, Deng Z, Ramdath DD, et al. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase [J]. *Food Chem*, 2015, 172:862-872.