

计算机模拟纳豆源多肽与 DPP-IV 和 SARS-CoV-2 Mpro 的相互作用

曾巧辉¹, 郭槟勇¹, 高立芳¹, 黄燕燕¹, 王敬敬¹, 曾新安^{1,2*}, 彭名军³

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东省食品智能制造重点实验室, 广东佛山 528225)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (3. 广州市食品检验所, 广东广州 511400)

摘要: 兼具糖尿病的新型冠状病毒肺炎 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19) 患者病死率明显偏高, 抑制 II 型糖尿病关键酶二肽基肽酶 4 (DPP-IV) 和新冠肺炎病毒主蛋白酶 (SARS-CoV-2 Mpro) 的活性能缓解相应的病症。该研究采用 UniProt、NCBI 和 PDB 数据库检索纳豆蛋白, 基于 BIOPBP-UWM 数据库开展计算机模拟胃肠道蛋白酶 (胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶) 水解纳豆蛋白的研究, 最后利用分子对接技术分别研究纳豆蛋白源多肽与 DPP-IV 和 SARS-CoV-2 Mpro 的结合能力, 分析参与相互作用的氨基酸残基与分子作用力类型。结果发现, 糖转运蛋白与两种酶具有良好的结合效果。特别地, 序列为 ISQPR、TIPVR 和 STVTR 的多肽对两种酶都具有较高的结合分数 (≤ -130), 被鉴定为 DPP-IV 和 SARS-CoV-2 Mpro 的双重抑制肽。因此, 纳豆蛋白具有缓解 II 型糖尿病病症和作为新型冠状病毒感染病人营养补充剂的潜力。

关键词: 二肽基肽酶-IV; 新冠肺炎主蛋白酶; 纳豆蛋白; 营养补充

文章编号: 1673-9078(2023)06-142-153

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0823

Computer Simulation of Interaction of Natto-derived Peptides with DPP-IV and SARS-CoV-2 Mpro

ZENG Qiaohui¹, GUO Binyong¹, GAO Lifang¹, HUANG Yanyan¹, WANG Jingjing¹, ZENG Xin'an^{1,2*}, PENG Mingjun³

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Intelligent Food Manufacturing, School of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, China) (2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (3. Guangzhou Institute for Food Control, Guangzhou 511400, China)

Abstract: People with diabetes have a significantly higher mortality rate of coronavirus disease 2019 (COVID-19) than the general population, and the symptoms can be alleviated by inhibiting the activity of the key enzyme of type 2 diabetes, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV), which is the main protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2 Mpro). The UniProt, NCBI, and PDB databases were used to search the natto protein. Based on the BIOPBP-UWM database, a computer simulation of the hydrolysis of natto proteins by gastrointestinal proteases (pepsin, trypsin, and chymotrypsin) was conducted. Finally, molecular docking technology was used to study the ability of natto-protein-derived polypeptides to bind to DPP-IV and SARS-CoV-2 Mpro, and the amino acid residues involved in the interaction and the type of molecular forces were analyzed. The sugar transporters were found to strongly bind with the two enzymes. In particular, peptides with the sequences ISQPR, TIPVR, and STVTR had high binding scores (≤ -130) for both enzymes and, therefore, were identified as inhibitory

引文格式:

曾巧辉, 郭槟勇, 高立芳, 等. 计算机模拟纳豆源多肽与 DPP-IV 和 SARS-CoV-2 Mpro 的相互作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 142-153.

ZENG Qiaohui, GUO Binyong, GAO Lifang, et al. Computer simulation of interaction of natto-derived peptides with DPP-IV and SARS-CoV-2 Mpro [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 142-153.

收稿日期: 2022-06-29

基金项目: 广东省科技创新战略专项资金 (2022B1212010015); 广东省基础与应用基础研究基金 (2020A1515110326); 广东省市场监督管理局科研攻关项目 (2022CS01); 广东省教育厅特色创新项目 (2022KTSCX120)

作者简介: 曾巧辉 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: z_qh2011@163.com

通讯作者: 曾新安 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品非热加工, E-mail: xazeng@scut.edu.cn

peptides of both DPP-IV and SARS-CoV-2 Mpro. Thus, natto protein has the potential to alleviate the symptoms of type 2 diabetes and be used as a nutritional supplement for people infected with COVID-19.

Key words: dipeptide peptidase-4; main protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; natto protein; nutritional supplement

糖尿病是全球普遍的慢性病之一,然而新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)伴随基础疾病的合并症患者病死率明显提升,其中国内COVID-19重症中糖尿病患者占16.2%^[1]。新冠肺炎病毒主蛋白酶(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Main Protease, SARS-CoV-2 Mpro)是新冠病毒的主要蛋白酶,抑制该酶的活性可以阻止病毒复制和转录,是SARS-CoV-2最具特征的有效药物靶标^[2]。美国一项纳入5 700例COVID-19患者的研究中,糖尿病以33.8%的比例位于合并症第三位^[3]。针对此问题,陈志会等^[4]研究发现二肽基肽酶-IV(Dipeptide Peptidase-IV, DPP-IV)抑制剂可能具有抑制COVID-19患者炎症反应的能力,减轻COVID-19患者肺部损伤和纤维化的作用。DPP-IV是一种丝氨酸外肽酶,广泛分布于肾脏、肝脏、肠道、脾脏、肾上腺、淋巴细胞、内皮细胞和胎盘^[5]。DPP-IV能够降解胰高血糖素样肽-1(Glucagon-Like Peptide-1, GLP-1)和糖依赖性胰岛素释放肽(Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide, GIP)^[6],而活性GLP-1和GIP通过促进胰腺 β 细胞的健康和功能来增加胰岛素的产生和释放。目前,在全球范围广泛使用的DPP-IV抑制剂有西他列汀,维格列汀,阿格列汀,利格列汀,替尼列汀,阿格列汀和萨格列汀^[7,8],然而,这些化学药物的使用由于其副作用而受到限制。因此,寻找安全有效的DPP-IV活性抑制剂成为近年来的研究热点。

纳豆(Natto)是一种大豆发酵食品,其含有多种营养物质,如纳豆激酶(Nattokinase, NK)、 γ 聚谷氨酸(γ -Polyglutamic Acid, γ -PGA)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶、大豆异黄酮、皂苷、血管紧张素转换酶抑制剂(Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor, ACEI)、维生素K₂和小分子肽等^[9]。Li等^[10]通过克隆长效GLP-1和纳豆激酶NK,转化后获得GLP-1和NK融合多肽,并采用II型糖尿病小鼠模型研究了融合多肽的降血糖功能。此外,大量研究表明NK^[11]、PGA合酶CapB^[12]、Hpr激酶/磷酸化酶、黄素蛋白^[13]、葡萄糖转运蛋白(Glucose Transporters, GLUT)家族^[14]、氨基酸通透酶^[15]、葡萄糖摄取蛋白和黄嘌呤磷酸核糖^[16]可能在糖尿病的发病机制中起着重要作用。近年来,随着生物信息学迅速发展,分子动力学模拟技术已取得重大进展。Zabidi等^[17]通过体外研究,运用分

子对接技术开展了DPP-IV抑制剂活性的筛选和评价。Nath等^[18]运用计算机模拟结合分子对接技术筛选了DPP-IV抑制剂。另外,Gu等^[19]运用分子对接技术揭示了小米蛋白抑制DPP-IV活性的作用机制。然而,对纳豆源DPP-IV与SARS-CoV-2 Mpro抑制肽相互作用的分子动力学模拟研究较少。

本文通过在数据库上对纳豆蛋白进行筛选,利用计算机模拟胃肠道水解,筛选活性肽后与DPP-IV和SARS-CoV-2 Mpro进行分子对接,分析活性肽与两种酶的结合能力,研究与两种酶具有高亲和力的肽对它们的抑制作用,为改善具有II型糖尿病的COVID-19患者的营养和身体状况提供一种新的策略。

1 材料与方法

1.1 网站和软件

UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)、NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)、Biopep-uwm数据库(<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>)、HPEPDOCK网站(<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/>)、Pymol软件和Ligplus软件。

1.2 实验方法

1.2.1 检索蛋白

前期研究表明,纳豆激酶(NK)、氨基酸通透酶、PGA合酶CapB、黄素蛋白、Hpr激酶/磷酸化酶、葡萄糖摄取蛋白、黄嘌呤磷酸核糖基转移酶、糖转运蛋白等8个蛋白与II型糖尿病有关,通过NCBI数据库获取它们的FASTA序列号,并在PDB数据库上检索SARS-CoV-2 Mpro和DPP-IV的PDB编号,从而进行下一步研究。

1.2.2 模拟水解

利用Biopep-uwm数据库模拟三种肠胃酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶)对8种纳豆蛋白(纳豆激酶、氨基酸通透酶、PGA合酶CapB、黄素蛋白、Hpr激酶/磷酸化酶、葡萄糖摄取蛋白、黄嘌呤磷酸核糖基转移酶、糖转运蛋白)进行水解得到产物^[20],并计算理论水解度(Theoretical Degree of Hydrolysis, TDH)^[21],详见如下公式。

$$TDH = \frac{d}{D} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

TDH——理论水解度, %;

D——蛋白质中肽键总数;

d——被裂解的肽键数。

1.2.3 分子对接

筛选 8 种纳豆蛋白经胃肠道蛋白酶水解后得到含有 2~5 个氨基酸残基的寡肽, 运用 HPEPDOCK 数据库 (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/>) 将获得的寡肽与 DPP-IV (PDB 编号为 1wcy) 和 SARS-CoV-2 Mpro (PDB 编号为 6lu7) 对接^[22], 分别获得各寡肽与 DPP-IV 的分子对接分数, 并进一步计算纳豆蛋白中高亲和寡肽的频率 F , 详见如下公式。

$$F = \frac{N}{L} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

F ——出现频率;

N ——蛋白链内高亲和寡肽的数量;

L ——蛋白链的长度。

1.2.4 对接结果的评价与数据分析

综合采用 PyMol 软件、LigPlus 软件等研究高亲和寡肽 (对接分数 < -120) 与目标蛋白质形成复合物发生相互作用的氨基酸残基, 并进一步分析两者结合部位的氨基酸残基之间的相互作用力, 最终明确纳豆蛋白源小分子肽与两种酶的结合能力。数据采用 Excel 表进行分析。

2 结果与讨论

2.1 模拟胃肠道水解研究及分析

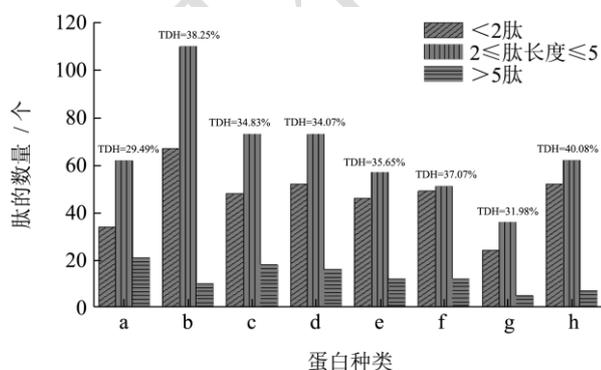


图 1 8 种纳豆蛋白的理论水解度 (TDH) 和小分子肽的数量

Fig.1 The theoretical degree of hydrolysis (TDH) and the number of small molecule peptides obtained by enzymatic hydrolysis of 8 natto proteins

注: a 表示纳豆激酶 (NK); b 表示氨基酸通透酶; c 表示 PGA 合酶 CapB; d 表示黄素蛋白; e 表示 Hpr 激酶/磷酸化酶; f 表示葡萄糖摄取蛋白; g 表示黄嘌呤磷酸核糖基转移酶; h 表示糖转运蛋白。

利用 Biopep-uwm 数据库模拟三种肠胃蛋白酶水解 8 种纳豆蛋白获得的理论水解度 TDH 值和小分子肽的数量见图 1。TDH 值在 30%~50% 范围内, 并且大多数水解物是氨基酸和寡肽 (2 ≤ 肽长度 ≤ 5), 少数是多肽 (肽长度 > 5)。其中, 3 种蛋白的 TDH 值相对较高, 分别是糖转运蛋白 (TDH=40.82%)、氨基酸通透酶 (TDH=38.25%) 和葡萄糖摄取蛋白 (TDH=37.07%)。另外, 从小分子肽数量来看, 氨基酸通透酶水解后的寡肽数量 (110) 是 8 种蛋白质中最高的, PGA 合酶 CapB、黄素蛋白的寡肽数量 (73) 共同位列数量榜第 2 位。

2.2 分子对接结果及分析

2.2.1 纳豆蛋白源小分子肽与 DPP-IV 对接结果分析

筛选出 8 种蛋白水解后含有 2~5 个氨基酸残基的寡肽, 利用 HPEPDOCK 数据库将这些寡肽与 DPP-IV (PDB 编号 1wcy) 进行分子对接, 结果如表 1 所示。8 种纳豆蛋白水解获得的含有 2~5 个氨基酸残基的寡肽与 DPP-IV 对接的结合分数中, 总共发现 10 个超高亲和寡肽 (对接分数 < -160), 并且每一种蛋白都至少含有一个超高亲和寡肽。如表 2 所示, 纳豆激酶 (NK) 含有 PTW 寡肽 (对接分数为 -171.84)、氨基酸通透酶含有 QTVW 寡肽 (对接分数为 -162.87)、PGA 合酶 CapB 含有 STVTR 寡肽 (对接分数为 -170.42)、黄素蛋白含有 EITSF 寡肽 (对接分数为 -162.93)、Hpr 激酶/磷酸化酶含有 TIPVR 寡肽 (对接分数为 -162.09)、黄嘌呤磷酸核糖基转移酶含有 TASVY 寡肽 (对接分数为 -168.07)、糖转运蛋白含有 QGQQF 寡肽 (对接分数为 -164.13), 葡萄糖摄取蛋白含有 3 个超高亲和寡肽, 分别为 VVVAR 寡肽 (对接分数为 -166.29)、GVIVF 寡肽 (对接分数为 -166.37)、ISQPR 寡肽 (对接分数为 -160.24)。纳豆激酶和 PGA 合酶 CapB 更是含有结合效果更好的顶级高亲和寡肽 (对接分数 < -170), 分别是 PTW 寡肽 (对接分数为 -171.84) 和 STVTR 寡肽 (对接分数为 -170.42)。用 F 值来评价蛋白质抑制 DPP-IV 活力发现, 这 8 种蛋白的高亲和寡肽频率 F 值中有 3 个超过 5.0%, 其中最高为糖转运蛋白 ($F=5.6%$), 其次是氨基酸通透酶 ($F=5.3%$), 最后是黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 ($F=5.2%$), 并且, 在这 8 种蛋白的 F 值中最低是纳豆激酶 ($F=2.6%$)。

表 1 高亲和寡肽与 DPP-IV 的分子对接结果

Table 1 Molecular docking results between high-affinity oligopeptides and DPP-IV

蛋白质名称 (序列号)	含有 2~5 个氨基酸的寡肽 (DPP-IV 对接分数<-120)	肽链 长度	高亲和寡肽 频率 F/%
纳豆激酶 (nattokinase) (AUR 450 12.1)	PTW(-171.84); PTTGY(-159.40); AQVR(-143.63); ATPH(-138.42); GAY(-120.82); GIEW(-142.37); SIGVL(-130.65); GGASF(-123.88); SQGY(-139.28); IVGF(-133.16)	381aa	2.6
氨基酸通透酶 (amino acid permease) (BAI 877 39.2)	QTVW(-162.87); QAGPL(-131.61); AVAF(-141.11); QTY(-141.69); ISPAF(-149.50); SAGQL(-134.42); IDVW(-141.59); AITTK(-124.36); AESEF(-125.85); ITVN(-121.98); QGTEL(-123.37); TIPR(-145.82); IPW(-143.65); VAVF(-141.05); AADIM(-120.07); ASTR(-138.38); EGQAF(-132.81); IVIM(-126.15); ITISL(-139.87); SQIM(-133.34); PVL(-129.17); DPEQR(-138.83); CGVPF(-150.61); VICY(-143.85); IY(-139.12)	470aa	5.3
PGA 合酶 CapB (PGA synthase CapB) (KIX 833 65.1)	STVTR(-170.42); VIGIL(-142.05); PVR(-148.87); TTGIL(-133.74); IEAGY(-135.43); PQGPN(-152.86); IGEQK(-123.81); ETVR(-148.42); PDY(-127.38); QIIF(-152.33); ITDEY(-129.14); EIGY(-139.58); TQQF(-150.01); VIY(-130.92)	393aa	3.6
黄素蛋白 (nitric oxide dioxygenase) (BAI 849 04.1)	EITSF(-162.93); QQH(-124.19); TQR(-123.37); QIGH(-147.20); SIGIK(-126.89); PEH(-123.94); PIVGK(-141.29); QAW(-140.81); PEF(-126.10); QAGQY(-151.32); IPDF(-133.50); TSVSK(-127.90); QPER(-154.47); TDADY(-130.40)	399a	3.5
Hpr 激酶/磷酸化酶 (HPrkinase/phosphorylase) (BAI 871 27.1)	TIPVR(-162.09); PITM(-144.40); PR(-123.69); TTR(-123.17); VDIY(-144.53); SETAL(-139.53); ITIVM(-136.26); PGR(-135.84); AAEQF(-138.97)	310aa	2.9
葡萄糖摄取蛋白 (glucose uptake protein) (BAI 838 72.1)	VVVAR(-166.29); GVIVF(-166.37); ISQPR(-160.24); GSIVL(-123.99); GGGPY(-146.11); VQPVL(-130.51); VSTSL(-138.07); VSGW(-151.94); GGIF(-126.84)	287aa	3.1
黄嘌呤磷酸核糖基 转移酶(xanthine phosphoribosyltransferase) (BAI 857 04.1)	TASVY(-168.07); VDSF(-125.18); QIDPL(-120.99); VGDEF(-125.36); SEQDH(-127.70); IIDDF(-134.13); GQAAH(-131.38); QPGR(-131.47); VSF(-123.35); VQEVH(-148.65)	194aa	5.2
糖转运蛋白 (sugar transporter) (BAI 865 37.1)	QGQQF(-164.13); SEIAR(-152.14); SQVY(-144.55); AQY(-124.31); GSTF(-128.12); AVTR(-136.04); TIVY(-153.77); PVM(-132.17); QSIPK(-132.40); EAAQM(-125.67); TITL(-127.94); IIGGL(-131.40); ASQSM(-129.91); SIF(-128.65); QDAGY(-145.31); IISF(-139.85)	287aa	5.6

表 2 10 个超高亲和寡肽

Table 2 10 Ultra-high affinity oligopeptides

蛋白名称	肽名称	对接分数
纳豆激酶(Nattokinase)	PTW	-171.84
PGA 合酶 CapB(PGA Synthase CapB)	STVTR	-170.42
氨基酸通透酶(Amino Acidpermease)	QTVW	-162.87
黄素蛋白(Nitric Oxide Dioxygenase)	EITSF	-162.93
Hpr 激酶/磷酸化酶(HPrkinase/Phosphorylase)	TIPVR	-162.09
葡萄糖摄取蛋白(Glucose Uptake Protein)	VVVAR	-166.29
葡萄糖摄取蛋白(Glucose Uptake Protein)	GVIVF	-166.37
葡萄糖摄取蛋白(Glucose Uptake Protein)	ISQPR	-160.24
黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(Xanthine Phosphoribosyltransferase)	TASVY	-168.07
糖转运蛋白(Sugar Transporter)	QGQQF	-164.13

2.2.2 纳豆蛋白源小分子肽与 SARS-CoV-2 Mpro 的对接结果分析

筛选 8 种蛋白水解后的 2~5 寡肽,利用 HPEPDOCK 数据库将这些寡肽与 SARS-CoV-2 Mpro (PDB 编号 6lu7) 进行分子对接,结果如表 3 所示。8 种纳豆蛋白的 2~5 寡肽与 SARS-CoV-2 Mpro 对接结果较好,均出现了高亲和寡肽(对接分数<-120)。如表 4 所示,纳豆激酶(NK)含有 PTW 寡肽(对接分数为-126.91),氨基酸通透酶含有 QTVW 寡肽(对接分数为-149.95),PGA 合酶 CapB 含有 STVTR 寡肽(对接分数为-135.02),黄素蛋白含有 EITSF 寡肽(对接分数为-124.67),Hpr

激酶/磷酸化酶含有 TIPVR 寡肽(对接分数为-136.98),葡萄糖摄取蛋白含有 ISQPR 寡肽(对接分数为-139.25)、GVIVF 寡肽(对接分数为-124.75)、VVVAR 寡肽(对接分数为-124.48),黄嘌呤磷酸核糖基转移酶含有 TASVY 寡肽(对接分数为-133.31),糖转运蛋白含有 QGQQF 寡肽(对接分数为-131.74),这 10 个高亲和寡肽不仅与 SARS-CoV-2 Mpro 具有高亲和力,还与 DPP-IV 具有超高亲和力,说明这些纳豆蛋白源小分子肽对这两种蛋白酶均具有较强的潜在抑制作用。8 种蛋白质的高亲和寡肽频率 F 值均低于 0.05,其中,最高是糖转运蛋白($F=0.02$),最低是纳豆激酶($F=0.01$)。

表 3 高亲和寡肽与 SARS-CoV-2 Mpro 分子对接的结果

Table 3 The result of docking of high-affinity oligopeptides with SARS-CoV-2 Mpro molecules

蛋白质名称(序列号)	与 SARS-CoV-2 Mpro 对接分数<-120 的 2~5 寡肽	肽链长度	高亲和寡肽频率 F /%
纳豆激酶(Nattokinase) (AUR 450 12.1)	SQGY(-123.58)、GIEW(-129.66)、 PGGTY(-130.44)、PTW(-126.91)	381aa	1.0
氨基酸通透酶(Amino Acid Permease) (BAI 877 39.2)	ISPAF(-131.59)、IDVW(-131.47)、QTVW(-149.95)、 IPW(-130.90)、EGQAF(-123.77)、CGVPF(-140.02)	470aa	1.3
PGA 合酶 CapB(PGA Synthase CapB) (KIX 833 65.1)	STVTR(-135.02)、PDY(-121.19)、QIIF(-127.73)、 ITDEY(-122.34)、EIGY(-142.71)、TQQF (-125.96)	393aa	1.5
黄素蛋白(Nitric Oxide Dioxygenase) (BAI 849 04.1)	QQH(-127.53)、PEH(-120.79)、QAW(-124.55)、 EITSF(-124.67)、QAGQY(-143.40)、IPDF(-124.47)	399aa	1.5
Hpr 激酶/磷酸化酶(HPrkinase/Phosphorylase) (BAI 871 27.1)	PITW(-125.41)、TIPVR(-136.98)、AAEQF(-145.56)	310aa	1.0
葡萄糖摄取蛋白(Glucose Uptake Protein) (BAI 838 72.1)	VSGW(-129.50)、ISQPR(-139.25)、GGGPY(-120.88)、 GVIVF(-124.75)、VVVAR(-124.48)	287aa	2.1
黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Xanthinephosphoribosyltransferase) (BAI 857 04.1)	TASVY(-133.31)、QIDPL(-120.52)、IIDDF(-126.97)、 VQEVH(-128.72)	194aa	2.1
糖转运蛋白(Sugar Transporter) (BAI 865 37.1)	SEIAR(-124.10)、SQVY(-126.01)、TIVY(-133.09)、 QSIPK(-123.19)、QGQQF(-131.74)、QDAGF(-121.87)、 IISF(-123.00)	287aa	2.4

表 4 10 个高亲和寡肽

Table 4 10 Highly affinity oligopeptides

蛋白名称	肽名称	对接分数
纳豆激酶(Nattokinase)	PTW	-126.91
PGA 合酶 CapB(PGA Synthase CapB)	STVTR	-135.02
氨基酸通透酶(Amino Acid Permease)	QTVW	-149.95
黄素蛋白(Nitric Oxide Dioxygenase)	EITSF	-124.67
Hpr 激酶/磷酸化酶(HPrkinase/Phosphorylase)	TIPVR	-136.98
葡萄糖摄取蛋白(Glucose Uptake Protein)	VVVAR	-124.48
葡萄糖摄取蛋白(Glucose Uptake Protein)	GVIVF	-124.75
葡萄糖摄取蛋白(Glucose Uptake Protein)	ISQPR	-139.25
黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(Xanthine Phosphoribosyltransferase)	TASVY	-133.31
糖转运蛋白(Sugar Transporter)	QGQQF	-131.74

2.3 纳豆蛋白源小分子肽的分子作用机理

2.3.1 纳豆蛋白源小分子肽与 DPP-IV 的相互作用

蛋白质结合口袋 (Protein Binding Pockets) 也称为活性口袋, 是指蛋白质表面或内部具有适合与配体结合的空腔, 口袋周围的氨基酸残基决定了它的形状、位置、理化特性以及功能。图 2 和图 3 是在 PyMol 软件中显示的 DPP-IV 活性口袋, 图 4 是参与形成活性口袋的具体氨基酸残基。研究发现, DPP-IV 含有 3 个活性口袋, 分别是由 Ser630、Asn710、His740 组成的 S1 口袋、由 Arg125、Glu205、Glu206 组成的 S2 口袋以及由 Tyr547、Arg358、Phe357 组成的 S3 口袋^[23,24]。将筛选得到的 10 个超高亲和寡肽 (PTW、STVTR、EITSF、GVIVF、ISQPR、TASVF、QGQQF、QTVW、TIPVR、VVVAR) 与 DPP-IV 进行分子对接, 其中有 6 个超高亲和寡肽结合到活性口袋处, 分别是 PTW、STVTR、EITSF、ISQPR、TIPVR、VVVAR。从图 5 可看出, 这 6 个超高亲和寡肽能够很好地嵌在 DPP-IV 的活性口袋中, 很大程度地阻碍了蛋白与底物的结合。

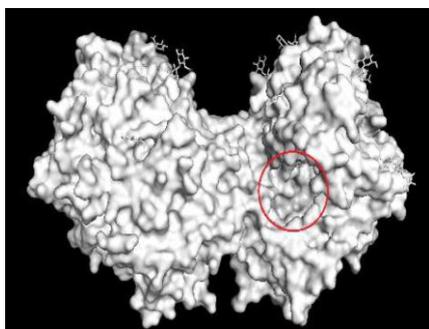


图 2 DPP-IV 的 3D 模型

Fig.2 3D model of DPP-IV

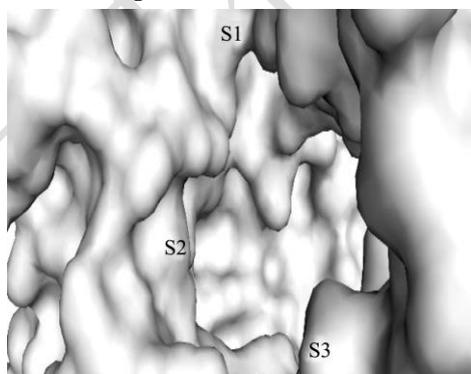


图 3 DPP-IV 的活性口袋

Fig.3 Active pocket of DPP-IV

采用 PyMmol 软件和 LigPlus 软件分析上述 6 个寡肽与 DPP-IV 活性口袋作用的 3D 模型和 2D 模型的结果如图 6 所示。

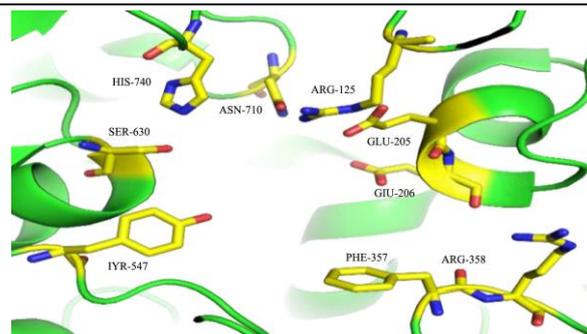


图 4 组成口袋的氨基酸

Fig.4 The amino acids that make up the pocket

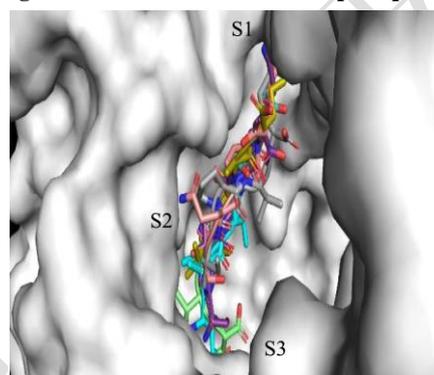


图 5 6 个与口袋结合的寡肽

Fig.5 6 oligopeptides bound to pockets

寡肽 TIPVR 与氨基酸残基 Arg125 和 Asp545 形成氢键作用, 其中 Arg125 是口袋 S2 的残基, 与 Asp709 和 Asp739 形成盐桥作用, 与 Asn710、His740、Trp124、Ile3、Gly741、Trp629、Tyr752、Trp627、Tyr547 和 Lys554 形成了疏水作用, 其中 Asn710 和 His740 是 S1 口袋的残基, Tyr547 是口袋 S3 的残基; 寡肽 STVTR 与氨基酸残基 Lys554、Tyr752、Arg125 和 Asp709 形成氢键作用, 其中 Arg125 是 S2 口袋的残基, 与 Asp739 和 Asp709 形成盐桥作用, 与 Asn562、Arg560、Tyr547、Ser630、Ile3、Trp629、Lys122、His740 和 Gly741 形成疏水作用, 其中 Ser630 和 His740 是 S1 口袋的残基, Tyr547 是口袋 S3 的残基; 寡肽 VVVAR 与氨基酸残基 Asn710、Asp709 和 Asp545 形成氢键作用, 其中 Asn710 是口袋 S1 的残基, 与 Asp709 形成盐桥作用, 与 Ile3 形成分子外部作用力, 与 Arg125、Ala743、Lys122、Gly741、His740、Trp629、Tyr48、Tyr752、Trp627 和 Lys554 形成疏水作用, 其中 Arg125 是口袋 S2 的残基, His740 是 S1 口袋的残基; 寡肽 ISQPR 与氨基酸残基 Asp545、Asp709 和 Tyr752 形成氢键作用, 与 Asp709 和 Asp739 形成盐桥作用, 与 Lys554 和 Val546 形成分子外部作用力, 与 Tyr547、Trp627、Gly628、His748、Trp629、Gly741、His740、Ile3、Ala743 和 Trp124 形成疏水作用, 其中 His740 是 S1 口袋的残基, Tyr547 是口袋 S3 的残基; 寡肽 EITSF 与氨基酸

残基 Arg125、Ile3、Ser577 和 Asp545 形成氢键作用，其中 Arg125 是 S2 口袋的残基，与 Lys554 形成盐桥作用，与 Glu205、Asn710、Asp709、Trp124、His740、Gly741、Trp629、Tyr752、Tyr48、Asn562 和 Gln527 形成疏水作用，其中 Asn710 和 His740 是 S1 口袋的

残基，Glu205 是口袋 S2 的残基；寡肽 PTW 与氨基酸残基 Asp545 和 Asn562 形成氢键作用，与 Trp629、Trp627、Gly628、Ala564、Gln527、Ile529、Lys554、Arg560、Ser577、Tyr547 和 Val546 形成疏水作用，其中 Tyr547 是口袋 S3 的残基。

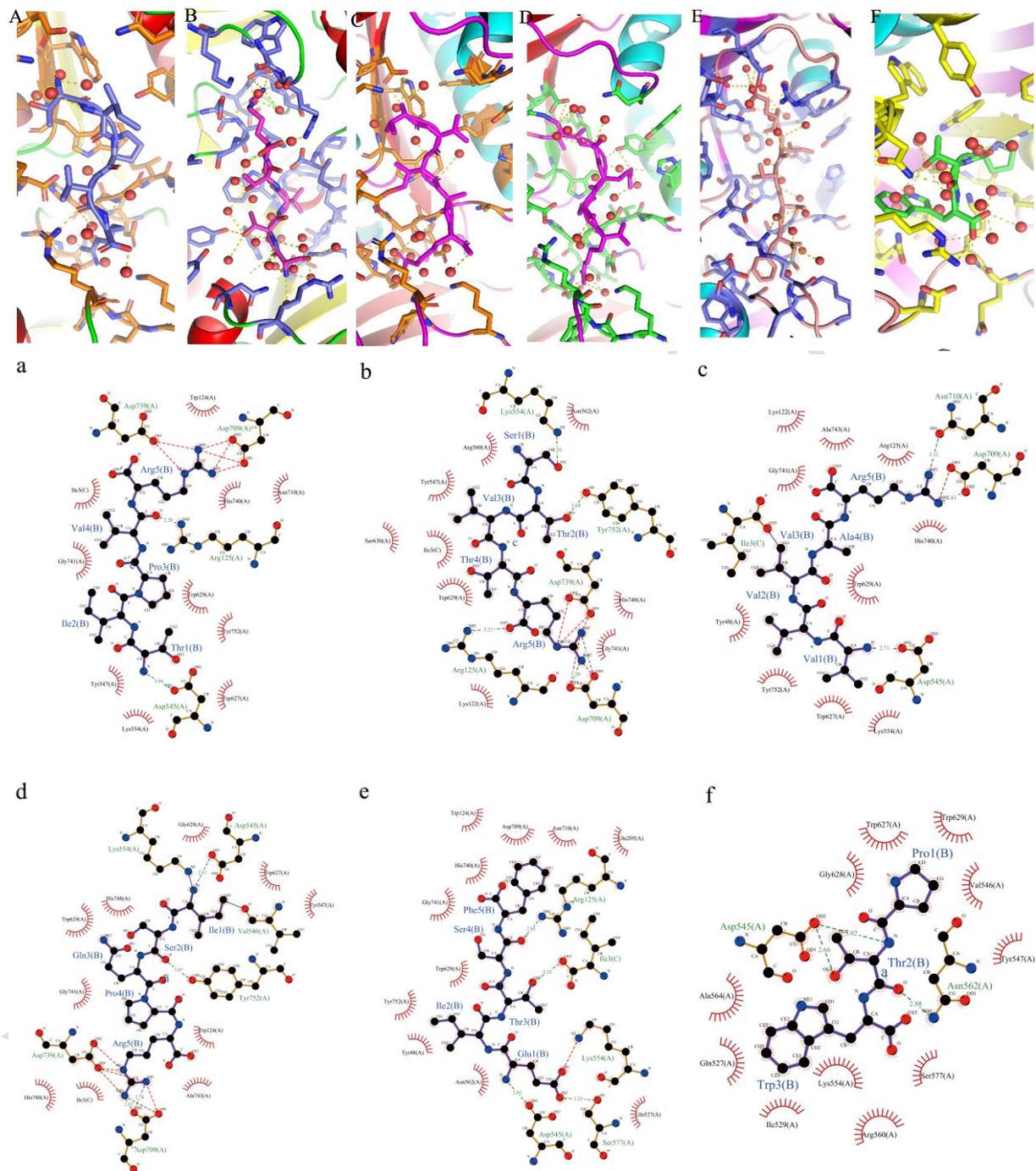


图 6 6 个超高亲和寡肽与 DPP-IV 结合的 2D 和 3D 模型

Fig.6 2D and 3D models of 6 ultra-high affinity oligopeptides bound to DPP-IV

注：A、B、C、D、E、F 分别是寡肽 TIPVR、STVTR、VVVAR、ISQPR、EITSF、PTW 与 DPP-IV 口袋残基形成之间形成氢键的 3D 模型，球状模型是水分子，棒状模型是肽，黄色虚线表示氢键。a、b、c、d、e、f 分别是 A、B、C、D、E、F 与 DPP-IV 口袋疏水相互作用的 2D 模型，绿色虚线表示氢键作用，红色虚线表示盐桥作用，紫色实线表示分子外部的作用力，2D 紫色模型和红色扇区模型分别是肽和 DPP-IV 残基。

2.3.2 纳豆蛋白源小分子肽与 SARS-CoV-2 Mpro 的作用

如图 7 所示, 研究发现 SARS-CoV-2 Mpro 主要有 3 个结构域构成, 即结构域 I (残基 8-101)、结构域 II (残基 102-184) 和结构域 III (残基 201-303), 并且和其它冠状病毒类似, 它还包含位于结构域 I 和结构域 II 之间裂隙中的 Cys145-His41 催化二元组^[25-29]。运用 PyMol 软件模拟获得了 10 个高亲和寡肽 (PTW、STVTR、EITSF、GVIVF、ISQPR、TASVF、QGQQF、QTVW、TIPVR、VVVAR) 与 SARS-CoV-2 Mpro 对接的 3D 模型, 由图 8 可以看出, 10 个高亲和寡肽大多紧密结合在结构域 II 和结构域 III 的裂隙之中。

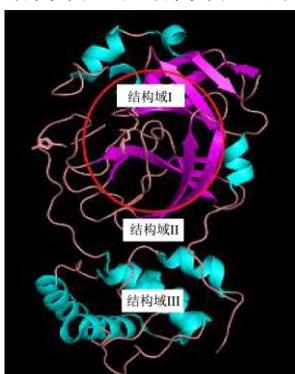


图 7 SARS-CoV-2 Mpro 的结构域 I、II、III

Fig.7 SARS-CoV-2 Mpro domains I, II, III

注: 红圈内是蛋白的催化活性位点。

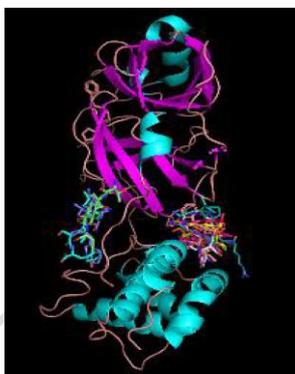


图 8 10 个高亲和寡肽与 SARS-CoV-2 Mpro 结合 3D 模型

Fig.8 3D model of 10 high-affinity oligopeptides bound to SARS-CoV-2 Mpro

利用 LigPlus 软件研究 10 个高亲和寡肽与 SARS-CoV-2 Mpro 氨基酸残基的相互作用。其中, 寡肽 QTVW、ISQPR、TIPVR 和 STVTR 的对接 2D 模型如图 9 所示, 发现寡肽 QTVW 与氨基酸残基 Lys137 形成氢键作用, 与 Phe291、Arg4、Phe3、Tyr126、Gln127、Gly138、Glu290、Lys5、Glu288、Leu282、Ser284 和 Trp207 形成疏水作用; 寡肽 ISQPR 与氨基酸残基 Thr111、Asn203、Glu240 和 Gln110 形成氢键作用, 与 Asp295 形成盐桥作用, 与 Phe294、Thr292、

Val202、Pro293、Pro108、Ile200、Gly109、His246 和 Ile249 形成疏水作用; 寡肽 TIPVR 与氨基酸残基 Asp248、Asn151、Thr111、Asp295 和 Thr292 形成氢键作用, 与 Asp245 形成盐桥作用, 与 Ile249、Phe294 和 Gln110 形成疏水作用; 寡肽 STVTR 与氨基酸残基 Asn151、Thr111、Glu240 和 Gln110 形成氢键作用, 与 Asp295 形成盐桥作用, 与 Phe294、Thr292、Asn203、Gly109、Val202、Pro108、Ile200、His246、Ile249 和 Pro293 形成疏水作用。如表 5 所示, 可以看出氢键作用和疏水作用是高亲和寡肽与 SARS-CoV-2 Mpro 相关氨基酸残基的主要结合作用力。虽然这些寡肽未与结构域 I 和结构域 II 之间裂隙中的 Cys145-His41 催化二元组形成关键作用, 但是, 上述形成的氢键和疏水作用对结构域 II 和结构域 III 的裂隙有着显著的影响, 一定程度上抑制了 SARS-CoV-2 Mpro 的活性。

利用传统方法从目标蛋白质水解物中分离、纯化和鉴定生物活性肽非常耗时, 而采用计算机模拟蛋白水解的方法操作更方便、速度更快、效率更高。影响机体对生物活性肽的利用度主要因素是对胃肠道酶的抵抗力和肠细胞的转运效率^[30]。胃肠道中的二肽和三肽主要是通过肠道上皮细胞吸收或转运, 转运途径是 PepT1 或 PepT2 介导的转运系统^[31], 而四肽和五肽则通过 SOPT1 和 SOPT2 途径转运^[32]。在本实验中, 通过计算机模拟胃肠道的水解, 筛选 2-5 寡肽与 DPP-IV 和 SARS-CoV-2 Mpro 进行分子对接, 并分析结合能力。

结果显示, 在短肽与 DPP-IV 对接结果中, 糖转运蛋白、氨基酸通透酶、黄嘌呤磷酸核糖基转移酶的 *F* 值均超过 0.05, 而且在与 SARS-CoV-2 Mpro 对接结果中, 糖转运蛋白 *F* 值最高, 可见纳豆中的糖转运蛋白是两种酶良好的结合剂。与 DPP-IV 具有超高亲和力的 10 个寡肽 (PTW、STVTR、EITSF、GVIVF、ISQPR、TASVF、QGQQF、QTVW、TIPVR、VVVAR) 中, 有 6 个寡肽与 DPP-IV 活性口袋氨基酸残基形成了相互作用, 分别是 PTW、STVTR、EITSF、ISQPR、TIPVR 和 VVVAR, 这些作用力主要是氢键作用和疏水作用。Jin 等^[33]和 Gong 等^[34]研究证明氢键作用和疏水作用是 DPP-IV 抑制肽与 DPP-IV 口袋结合的主要作用。寡肽 TIPVR、STVTR 和 EITSF 与 DPP-IV 口袋 S2 的氨基酸残基 Arg125 都形成了氢键作用, 还与其它口袋残基形成疏水作用, 有研究^[35-39]证明, 只有少数抑制肽可以结合到 S2 位点, 并与其它活性口袋作用增加对 DPP-IV 的抑制力。6 个与口袋结合的寡肽中, 有 3 个含有脯氨酸, 分别为 PTW、ISQPR、TIPVR。Nongonierma 等^[40]研究报道称, 寡肽里含有脯氨酸可大大促进肽对 DPP-IV 的抑制作用。寡肽 STVTR、

VVVAR、ISQPR 与 Asp709 形成了氢键作用和盐桥作用,寡肽 TIPVR 与 Asp709 形成了盐桥作用,推测 Asp709 可能是抑制 DPP-IV 活性的重要残基。这些结果表明,寡肽 PTW、STVTR、EITSF、ISQPR、TIPVR 和 VVVAR 是良好的 DPP-IV 活性抑制肽,因此,可初步推测纳豆蛋白可作为应对 II 型糖尿病病症的有效

膳食来源。国内外也有学者通过类似的方法获得 DPP-IV 活性抑制肽,比如国内李姣等^[41]通过分子对接技术从马氏珍珠贝蛋白中得到 LPIY 等 4 种 DPP-IV 活性抑制肽,国外 Daraksha 等^[42]也用此方法研究发现从羊奶蛋白获得的活性肽 PSGAW 与 DPP-IV 具有高亲和力,能有效抑制其活性。

表 5 10 个寡肽与 SARS-CoV-2 Mpro 的对接分数、相互作用的氨基酸残基和作用类型

Table 5 The docking fraction, amino acid residues and interaction types of 10 oligopeptides with SARS-CoV-2 Mpro

寡肽名称	对接分数	氨基酸残基	作用类型
		Lys137	氢键作用
QTVW	-149.95	Phe291、Arg4、Phe3、Tyr126、Gln127、Gly138、Glu290、Lys5、Glu288、Leu282、Ser284 和 Trp207	疏水作用
		Thr111、Asn203、Glu240 和 Gln110	氢键作用
ISQPR	-139.25	Asp295	盐桥作用
		Phe294、Thr292、Val202、Pro293、Pro108、Ile200、Gly109、His246 和 Ile249	疏水作用
		Asp248、Asn151、Thr111、Asp295 和 Thr292	氢键作用
TIPVR	-136.98	Asp245	盐桥作用
		Ile249、Phe294 和 Gln110	疏水作用
		Asn151、Thr111、Glu240 和 Gln110	氢键作用
STVTR	-135.02	Asp295	盐桥作用
		Phe294、Thr292、Asn203、Gly109、Val202、Pro108、Ile200、His246、Ile249 和 Pro293	疏水作用
		Leu282、Arg4、Ala7、Lys5 和 Trp207	氢键作用
TASVY	-133.31	Ser284、Glu288、Phe291、Tyr126、Pro9、Phe8、Val125、Met6 和 Phe3	疏水作用
		Gln110、Pro108 和 His246	氢键作用
QGQQF	-131.74	Phe294、Gln107、Thr292、Ile249、Pro293 和 Val297	疏水作用
		Phe294 和 Thr292	氢键作用
PTW	-126.91	Thr111、Asn151、Ile249、Pro293、Gln110 和 Ile106	疏水作用
		Gln110 和 Pro108	氢键作用
GVIVF	-124.75	Phe294、Ile249、Gln107、Glu240、Val202、Ile200、Gly109、Asn203、Pro293 和 Pro293	疏水作用
		Arg4 和 Lys5	氢键作用
EITSF	-124.67	Leu282、Trp207、Phe291、Phe3、Glu290 和 Lys137	疏水作用
		Thr111 和 Asp295	氢键作用
VVVAR	-124.48	Asp295	盐桥作用
		Ile200、Pro108、Gly109、His246、Ile249、Asn203、Asp153、Phe294、Gln110、Thr292、Val202、Pro293 和 Glu240	疏水作用

同时,在与 DPP-IV 活性口袋结合的 6 个寡肽 (PTW、STVTR、EITSF、ISQPR、TIPVR 和 VVVAR) 中,ISQPR、TIPVR 和 STVTR 与 SARS-CoV-2 Mpro 的对接分数 < -130,表现出高亲和力,并通过氢键作用、盐桥作用和疏水作用与 SARS-CoV-2 Mpro 的结构域 II 和结构域 III 的裂隙相互作用 (图 9),体现出对 SARS-CoV-2 Mpro 的抑制作用。因此,寡肽 ISQPR、TIPVR 和 STVTR 有望对 COVID-19 产生潜在的抑制作用。Yu 等^[43]也通过分子对接和分子动力学模拟得

出,从金枪鱼蛋白获得的 EEAGGATAAQIEM 活性肽能有效抑制 SARS-CoV-2 Mpro 活性。

综合以上分析,ISQPR、TIPVR 和 STVTR 这 3 个寡肽可被视为双重抑制肽,在对抗 II 型糖尿病病症和作为 COVID-19 病患者的营养补充剂方面具有重大应用潜力,但相关工作还有待于进一步开展体内和体外实验,从而更加全面地评价纳豆蛋白源小分子肽的功效。

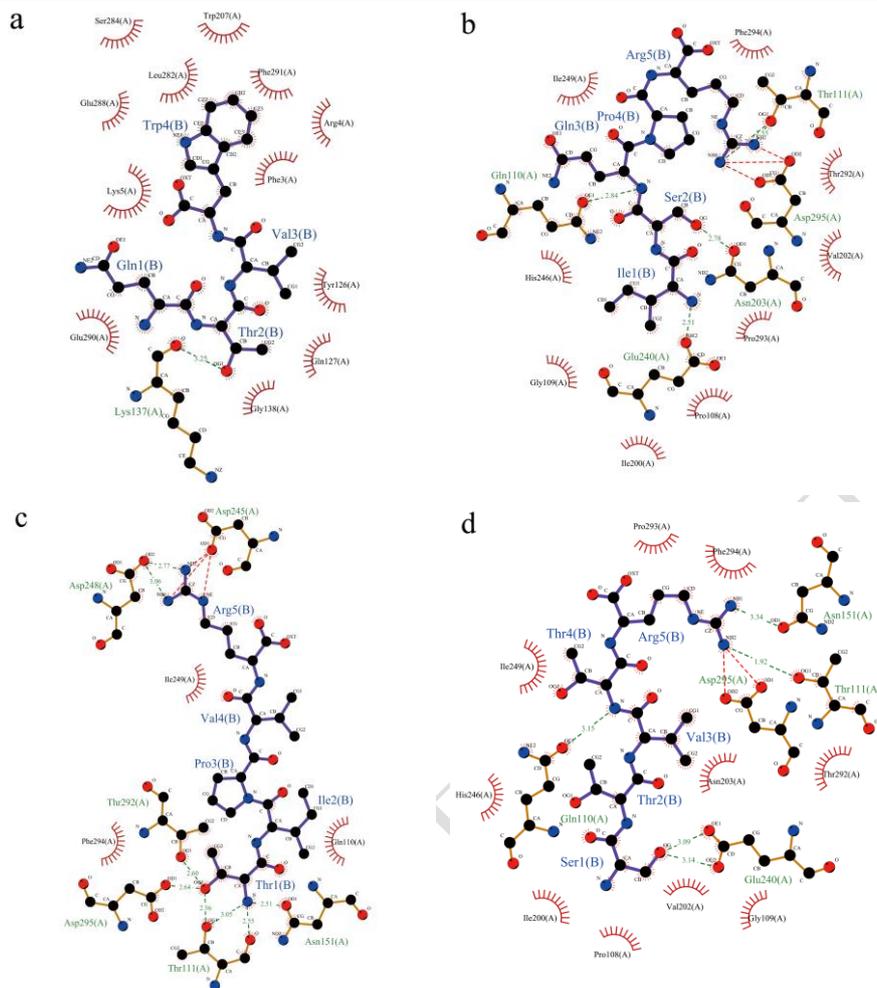


图9 4个高亲和寡肽与 SARS-CoV-2 Mpro 结合的 2D 模型

Fig.9 2D model of 4 high-affinity oligopeptides bound to SARS-CoV-2 Mpro

注: (a)、(b)、(c)、(d) 分别表示寡肽 QTVW、ISQPR、TIPVR、STVTR 与 SARS-CoV-2 Mpro 作用的 2D 模型, 绿色虚线表示氢键作用, 红色虚线表示盐桥作用, 2D 紫色模型和红色扇区模型分别是肽和 SARS-CoV-2 Mpro 残基。

3 结论

纳豆含有丰富的营养物质, 对预防和治疗人体许多血管疾病具有显著效果。本实验通过计算机模拟技术, 得到纳豆蛋白对 II 型糖尿病和新冠病毒具有一定的改善作用, 可以作为优质食物来源为患有 II 型糖尿病的新冠感染人群提供能量供给。其中, 糖转运蛋白对二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 和 SARS-CoV-2 Mpro 拥有较高的 *F* 值, 是两种酶良好的结合剂。寡肽 ISQPR、TIPVR 和 STVTR 对两种酶表现出较高的抑制作用, 可被视为双重抑制肽, 在对抗 II 型糖尿病病症和作为 COVID-19 病患者的营养补充剂方面具有重大应用潜力, 但相关工作还有待于进一步开展体内和体外实验。

参考文献

[1] Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China [J]. *New England Journal*

of Medicine, 2020, 382(18): 1708-1720.

[2] 周贤敏, 区灿盛, 邓森荣, 等. 采用计算机模拟技术评估花生蛋白作为新冠疫情期间营养补充剂的潜力[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(12): 104-111.

[3] Richardson S, Hirsch J S, Narasimhan M, et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area [J]. *Jama*, 2020, 323(20): 2052-2059.

[4] 陈志会, 杨艳, 涂玲, 等. 二肽基肽酶 4 及其抑制剂在新型冠状病毒肺炎防治中的研究进展[J]. *医药导报*, 2020, 40(1): 90-93.

[5] Kshirsagar A D, Aggarwal A S, Harle U N, et al. DPP IV inhibitors: successes, failures and future prospects [J]. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2011, 5(2): 105-112.

[6] Parmar H, Hati S and Sakure A. *In vitro* and *in silico* analysis of novel ACE-inhibitory bioactive peptides derived from

- fermented goat milk [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2018, 24(3): 441-453.
- [7] Chatterjee C, Gleddie S, Xiao C W. Soybean bioactive peptides and their functional properties [J]. Nutrients, 2018, 10(9): 1211.
- [8] Akan E. An evaluation of the *in vitro* antioxidant and antidiabetic potentials of camel and donkey milk peptides released from casein and whey proteins [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(10): 3743-3751.
- [9] Liu Y, Han Y, Cao L, et al. Analysis of main components and prospects of natto [J]. Advances in Enzyme Research, 2021, 9(1): 1-9.
- [10] Li X, Yang X, Umar M, et al. Expression of a novel dual-functional polypeptide and its pharmacological action research [J]. Life Sciences, 2021, 267: 118890.
- [11] Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinases [J]. Acta Haematologica, 1990, 84(3): 139-143.
- [12] Araki R, Yamada T, Maruo K, et al. Gamma-polyglutamic acid-rich natto suppresses postprandial blood glucose response in the early phase after meals: A randomized crossover study [J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2374.
- [13] Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes [J]. The Review of Diabetic Studies: RDS, 2010, 7(1): 15.
- [14] Kellerer M, Lammers R, Häring H-U. Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance [J]. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 1999, 107(2): 97-106.
- [15] Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, et al. Metabolomics in prediabetes and diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. Diabetes Care, 2016, 39(5): 833-846.
- [16] Eckhardt M, Langkopf E, Mark M, et al. 8-(3-(R)-aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione (BI 1356), a highly potent, selective, long-acting, and orally bioavailable DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2007, 50(26): 6450-6453.
- [17] Zabidi N A, Ishak N A, Hamid M, et al. Inhibitory evaluation of *Curculigo latifolia* on α -glucosidase, DPP (IV) and *in vitro* studies in antidiabetic with molecular docking relevance to type 2 diabetes mellitus [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2021, 36(1): 109-121.
- [18] Nath V, Ramchandani M, Kumar N, et al. Computational identification of potential dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors: structure based virtual screening, molecular dynamics simulation and knowledge based SAR studies [J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1224: 129006.
- [19] Gu H, Gao J, Shen Q, et al. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of millet protein peptides and the related mechanisms revealed by molecular docking [J]. LWT - food Science and Technology, 2021, 138: 110587.
- [20] Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(23): 5978.
- [21] Yao Y, Luo Z, Zhang X. In silico evaluation of marine fish proteins as nutritional supplements for COVID-19 patients [J]. Food & Function, 2020, 11(6): 5565-5572.
- [22] Zhou P, Jin B, Li H, et al. HPEPDOCK: a web server for blind peptide-protein docking based on a hierarchical algorithm [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): 443-450.
- [23] Zhu Q, Chen X, Wu J, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from *Chlorella vulgaris*: In silico gastrointestinal hydrolysis and molecular mechanism [J]. European Food Research and Technology, 2017, 243(10): 1739-1748.
- [24] Nongonierma A B, FitzGerald R J. Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins [J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12451.
- [25] Xue X, Yu H, Yang H, et al. Structures of two coronavirus main proteases: implications for substrate binding and antiviral drug design [J]. Journal of Virology, 2008, 82(5): 2515-2527.
- [26] Yang H, Yang M, Ding Y, et al. The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(23): 13190-13195.
- [27] Chan K, Lai S, Chu C, et al. Treatment of severe acute respiratory syndrome with lopinavir/ritonavir: a multicentre retrospective matched cohort study [J]. Hongkong Medical Journal, 2003, 9: 399-406
- [28] Anand K, Palm G J, Mesters J R, et al. Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra α -helical domain [J]. The EMBO Journal, 2002, 21(13): 3213-3224.
- [29] Jin Z, Du X, Xu Y, et al. Structure of mpro from

- SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors [J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 289-293.
- [30] Vij R, Reddi S, Kapila S, et al. Transepithelial transport of milk derived bioactive peptide VLPVPQK [J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 681-688.
- [31] Aito-Inoue M, Lackeyram D, Fan M Z, et al. Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane [J]. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 2007, 13(7): 468-474.
- [32] Chothe P, Singh N, Ganapathy V. Evidence for two different broad-specificity oligopeptide transporters in intestinal cell line Caco-2 and colonic cell line CCD841 [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2011, 300(6): 1260-1269.
- [33] Jin R, Teng X, Shang J, et al. Identification of novel DPP-IV inhibitory peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin [J]. *Food Research International*, 2020, 133: 109161.
- [34] Gong P X, Wang B K, Wu Y C, et al. Release of antidiabetic peptides from *Stichopus japonicas* by simulated gastrointestinal digestion [J]. *Food Chemistry*, 2020, 315: 126273.
- [35] Kang N S, Ahn J H, Kim S S, et al. Docking-based 3D-QSAR study for selectivity of DPP4, DPP8, and DPP9 inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17(13): 3716-3721.
- [36] Nabeno M, Akahoshi F, Kishida H, et al. A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 434(2): 191-196.
- [37] Jadav P, Bahekar R, Shah S R, et al. Long-acting peptidomimetics based DPP-IV inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22(10): 3516-3521.
- [38] Rasmussen H B, Branner S, Wiberg F C, et al. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog [J]. *Nature Structural Biology*, 2003, 10(1): 19-25.
- [39] Kuhn B, Hennig M, Mattei P. Molecular recognition of ligands in dipeptidyl peptidase IV [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2007, 7(6): 609-620.
- [40] Nongonierma A B, FitzGerald R J. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by tryptophan containing dipeptides [J]. *Food & Function*, 2013, 4(12): 1843-1849.
- [41] 李姣, 苏继磊, 陈敏, 等. 马氏珍珠贝来源 DPP-IV 抑制活性肽的虚拟筛选及其作用机制[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(16): 1-7.
- [42] Iram D, Sansi M S, Zana S, et al. In silico identification of antidiabetic and hypotensive potential bioactive peptides from the sheep milk proteins - a molecular docking study [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 56: e14137.
- [43] Yu Z, Kan R, Ji H, et al. Identification of tuna protein-derived peptides as potent SARS-CoV-2 inhibitors via molecular docking and molecular dynamic simulation [J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128366.