

基于计算机模拟探究鱼类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶源活性肽抗运动疲劳的功效

曾巧辉¹, 林妙銮¹, 丁瑶¹, 彭名军², 王敬敬^{1*}

(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. 广州市食品检验所, 广东广州 511400)

摘要: 为了研究鱼类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase, NADH Dehydrogenase) 源活性肽抗运动疲劳的功效, 该研究利用计算机模拟水解 5 种我国常见鱼类中的 NADH Dehydrogenase 蛋白亚基, 将模拟水解得到的寡肽与乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 分别进行分子对接, 确定与 LDH 和 CK 具有超高亲和力的寡肽 (对接分数 ≤ -160), 并利用 Pymol、Ligplot+ 软件分析寡肽与 LDH 和 CK 分子间相互作用机制。结果显示, 5 种鱼类的 7 种不同 NADH Dehydrogenase 蛋白亚基经计算机模拟水解和分子对接后共获得 72 个超高亲和力寡肽, 其中, 与 LDH、CK 均具有超高亲和力的寡肽共 36 种, 对接分数最高且出现次数最多的寡肽是 PTIW (-198.762、-204.400)。研究结果为提升鱼类蛋白质的高值化利用以及开发抗疲劳功能食品提供理论参考。

关键词: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶; 乳酸脱氢酶; 肌酸激酶; 抗疲劳; 鱼类; 计算机模拟

文章编号: 1673-9078(2023)09-205-214

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1225

Computer Simulation-based Investigation of the Anti-exercise-fatigue

Effect of Active Peptides from Fish NADH Dehydrogenases

ZENG Qiaohui¹, LIN Miaoluan¹, DING Yao¹, PENG Mingjun², WANG Jingjing^{1*}

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

Abstract: The anti-exercise-fatigue effect of active peptides derived from fish nicotinamide adenine dinucleotide Dehydrogenase (NADH) was investigated by simulating the hydrolysis of NADH Dehydrogenase protein subunits in five common fish species in China using computer simulations. The oligopeptides obtained through simulated hydrolysis were docked with lactate Dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) to identify the oligopeptides with ultra-high affinity for both enzymes (docking fraction ≤ -160), whereas Pymol and Ligplot+ software were used to display and analyze the mechanisms of interaction for molecular docking. The results showed that a total of 72 oligopeptides with ultra-high affinity were obtained from seven different NADH Dehydrogenase protein subunits of five fish species after computer-simulated hydrolysis and molecular docking. There were 36 oligopeptides with ultra-high affinity for LDH and CK, among which the oligopeptide with the highest docking score and the most frequent occurrence was PTIW (-198.762, -204.400). These results establish a theoretical foundation for improving the high-value utilization of fish protein and developing functional foods for anti-exercise-fatigue.

引文格式:

曾巧辉, 林妙銮, 丁瑶, 等. 基于计算机模拟探究鱼类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶源活性肽抗运动疲劳的功效[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 205-214

ZENG Qiaohui, LIN Miaoluan, DING Yao, et al. Computer simulation-based investigation of the anti-exercise-fatigue effect of active peptides from fish NADH Dehydrogenases [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 205-214

收稿日期: 2022-09-26

基金项目: 广东省科技创新战略专项 (2022B1212010015); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2020A1515110326); 广东省市场监督管理局科研攻关项目 (2022CS01); 广东省教育厅创新强校项目 (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: 王敬敬 (1986-), 男, 博士, 特聘青年研究员, 研究方向: 食品蛋白的构效关系及高质化利用, E-mail: w_j2010@126.com

Key words: nicotinamide adenine dinucleotide Dehydrogenase; lactate Dehydrogenase; creatine kinase; anti-exercise-fatigue effect; fish; computer simulation

近年来, 由于疫情, 人们生活和工作压力增大, 许多人出现了生理或心理疲劳, 形势不可小觑。提高身体机能、缓解疲劳与心理压力成为运动医学和军事医学争相研究的课题。关于运动疲劳机制的学说主要有四种, 分别是能量物质消耗学说、代谢产物堆积堵塞学说、保护性抑制学说、钙离子代谢紊乱学说等^[1-3]。其中“能量物质消耗学说”认为疲劳的产生是由于体内能量物质耗竭, 而“代谢产物堆积堵塞学说”则认为这是由于体内代谢产物的过多累积, 不能及时消除引起肌肉工作能力下降^[4]。

在短时间高强度运动时, 血清中乳酸、肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 等代谢产物增加。CK 是反映肌肉的重要临床指标, 如果高 CK 出现的时间太长, 机体较容易出现局部损伤。同时, CK 活性的失调也与很多严重的疾病的发生密切相关, 比如心肌梗死、病毒性心肌炎。乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 则是产生乳酸代谢途径中的关键酶, 其催化丙酮酸转化成乳酸, 从而引起肌肉收缩的效率下降导致体力衰竭。因此, 对能够抑制 CK 与 LDH 活性的多肽的筛选和鉴定, 能够为疲劳的恢复和有效抑制病理性心肌损伤提供思路。

近年来学者发现, 食物中的一些天然活性成分具有抗疲劳效果, 尤其是生物活性肽具有消除体内累积的乳酸等物质的能力, 达到恢复疲劳的效果^[4]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase, NADH Dehydrogenase) 是一种蛋白酶, 由多个肽链 (亚基) 组成, 它可作用于细胞呼吸生理活动中的柠檬酸循环和糖酵解, 在维持细胞生长、分化以及氧化还原反应与能量代谢过程中发挥着重要作用。系列研究发现, 从鱼类、贻贝、海鳗、藻类和鱿鱼等海洋生物中获取的多肽均具有较好的抗疲劳活性。陈丽丽等^[5]从草鱼蛋白质中获取多肽, 发现草鱼蛋白源多肽可以延长小鼠力竭游泳时间。丁树慧等^[6]通过实验证明, 从低值海洋鱼类获取的低聚肽能够有效地抵抗机体疲劳。陶静等^[7]在制备带鱼高 F 值寡肽及活性实验中证明, 高 F 值寡肽具有较好的抗醉酒、醒酒、抗疲劳和抗氧化作用, 可用作辅助治疗肝性脑病、抗疲劳和抗氧化功能食品的开发。以上事实都说明鱼类蛋白水解产生的多肽对缓解机体运动疲劳具有重要作用。

近年来, 分子模拟技术在物理、化学等领域得到了广泛的应用, 但在食品科学领域却是比较新的技

术^[8]。传统的生物活性肽筛选方法主要通过分离纯化, 结合体内外活性评价进行肽段的确定, 整个过程费时、费力且技术难度大。随着科学技术的发展, 运用计算机辅助酶法技术, 通过在线数据及虚拟筛选手段研究肽的活性, 能够快速高效的从中发现和预测具有较高生物活性的肽段, 并能够减少工作强度, 提高鉴定成功率^[9]。本研究利用计算机模拟水解 5 种我国常见鱼类中的 NADH Dehydrogenase 蛋白亚基, 将模拟水解得到的寡肽与 LDH、CK 分别进行分子对接研究, 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, 研究结果将为提升鱼类蛋白质的高值化利用程度以及开发抗疲劳功能食品提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 鱼类蛋白查找与模拟胃肠道酶解

通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找我国 5 种常见鱼类 (草鱼、鳊鱼、带鱼、三文鱼、子梅鱼) 蛋白, 得到几种 NADH Dehydrogenase 蛋白亚基 (结果如表 1), 并得到对应蛋白亚基的 FASTA 序列。基于计算机模拟技术运用 BIOPEP-UWM 数据库中的三种肠胃酶 (胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶)^[10,11]对以上蛋白进行水解, 构建模拟水解 NADH Dehydrogenase 的小分子肽数据库, 并对各蛋白的水解度进行计算。理论水解度的计算公式为:

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

式中:

TDH——理论水解度, %;

d——蛋白质中肽键总数;

D——氢的数目。

1.2 小分子肽与 LDH 和 CK 的分子对接能力

评价分析

分子对接技术可以直观反映配体与受体的相互作用信息, 已发展成为一种预测分子间相互作用结合位点的新方法^[12]。本文利用 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取 LDH 和 CK 的 PDB 代码, 利用 HPEPDOCK (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/>) 将经三种肠胃水解酶切后的 5 种蛋白质释

放的含有 2~5 个氨基酸残基的短链寡肽与 LDH (PDB 代码 7EPM) 和 CK (PDB 代码 1I0E) 进行分子对接, 获得各小分子肽对接参数^[13]。即在 HPEPDOCK 网站首页, 在受体输入栏中分别输入 LDH 和 CK 相关信息, 在配体输入栏中分别输入小分子活性肽相关信息, 提交之后等待结果即可。其中, 评分 ≤ -120 的寡肽被认为是高亲和力寡肽 (见附录)、评分 ≤ -160 的寡肽被认为是超高亲和力寡肽。通过蛋白中超高亲和力寡肽的频率 (F) 来评估鱼中 NADH Dehydrogenase 作为潜在的抗疲劳小分子肽的开发能力。

$$F=N/L \quad (2)$$

式中:

F ——出现的频率;

N ——蛋白链内超高亲和力寡肽的数量;

L ——蛋白链的长度。

1.3 超高亲和力寡肽与 LDH 和 CK 对接及相互作用力分析

江文婷等^[14]通过计算机筛选得到海鲈鱼抗冻多肽, 并进行分子对接分析作用力, 发现这种相互作用可以阻碍肌球蛋白在温度变化中的结构改变, 其机理可能是抗冻多肽结合在肌球蛋白重链的结构空腔上, 影响了结合水解离后引起的疏水键及二硫键等化学键的形成, 阻碍蛋白侧链聚集、结构改变和冰晶的位移等, 这有利于鱼糜及鱼糜制品在冷冻贮藏中的品质保持。同时, 她们经过实验研究证明海鲈鱼源胶原蛋白的胰蛋白酶酶解物确实具有较高的抗冻活性, 与计算机模拟效果相一致, 该实验为计算机模拟小分子肽和蛋白的对接准确性提供依据。

在本文中, 将上述方法筛选出的对接分数和出现频率较高的小分子肽, 利用 Pymol^[15] (<https://www.lfd.uci.edu/~gohlke/pythonlibs/#pymol/>) 处理配体和受体, 构建对接口袋 3D 图, 明确参与分子间相互作用的氨基酸残基种类和相互作用力类型。利用 Ligplot+^[16] (版本号: V.2.2) 分析参与分子间相互作用的氨基酸残基种类和相互作用力类型的 2D 图, 进一步揭示超高亲和力寡肽与 LDH、CK 的对接结果。

表 1 用的鱼种类及其蛋白种类与序列号

Table 1 Selected fish species and their protein types and serial numbers

鱼类	拉丁学名	所模拟的蛋白	序列号
草鱼	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	NADH Dehydrogenase subunit 3	AYO99432.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4	AYO99434.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4L	AYO99433.1
		NADH Dehydrogenase subunit 5	AYO99435.1
		NADH Dehydrogenase subunit 6	AYO99436.1
鳊鱼	<i>Engraulis japonicus</i>	NADH Dehydrogenase subunit 3	AHF96346.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4	AHF96348.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4L	AHF96347.1
		NADH Dehydrogenase subunit 5	AHF96349.1
		NADH Dehydrogenase subunit 6	AHF96350.1
带鱼	<i>Trichiurus lepturus</i>	NADH Dehydrogenase subunit 4	QJT42861.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4L	QJT42860.1
		NADH Dehydrogenase subunit 5	QJT42862.1
三文鱼	<i>Oncorhynchus keta</i>	NADH Dehydrogenase subunit 3	YP_006280901.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4	YP_006280903.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4L	YP_006280902.1
		NADH Dehydrogenase subunit 5	YP_006280904.1
		NADH Dehydrogenase subunit 6	YP_006280905.1
子梅鱼	<i>Collichthys lucidus</i>	NADH Dehydrogenase subunit 3	QQY84821.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4	QQY84823.1
		NADH Dehydrogenase subunit 4L	QQY84822.1
		NADH Dehydrogenase subunit 5	QQY84824.1
		NADH Dehydrogenase subunit 6	QQY84825.1

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 模拟肠胃酶水解目标蛋白质的结果

表2 模拟水解获得的鱼类蛋白质的水解度

Table 2 Degree of hydrolysis of fish proteins obtained by simulated hydrolysis

鱼类	蛋白质	水解度/%
三文鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4L	54.00
子梅鱼	NADH Dehydrogenase subunit 3	47.86
草鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4L	46.46
子梅鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4	45.65
鳃鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4L	45.45
带鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4L	45.45
子梅鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4L	45.45
三文鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4	45.44
鳃鱼	NADH Dehydrogenase subunit 3	44.44
子梅鱼	NADH Dehydrogenase subunit 5	44.18
草鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4	43.95
带鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4	43.68
草鱼	NADH Dehydrogenase subunit 5	43.29
带鱼	NADH Dehydrogenase subunit 5	43.06
草鱼	NADH Dehydrogenase subunit 3	42.74
鳃鱼	NADH Dehydrogenase subunit 4	42.68
三文鱼	NADH Dehydrogenase subunit 5	42.42
草鱼	NADH Dehydrogenase subunit 6	40.34
鳃鱼	NADH Dehydrogenase subunit 5	39.46
三文鱼	NADH Dehydrogenase subunit 6	38.64
三文鱼	NADH Dehydrogenase subunit 3	38.46
子梅鱼	NADH Dehydrogenase subunit 6	38.07
鳃鱼	NADH Dehydrogenase subunit 6	36.93

注: 按水解度由高到低排序。

表3 草鱼超高亲和力寡肽结合LDH的序列和频率

Table 3 Sequence and frequency of lactate Dehydrogenase binding by ultra-high affinity oligopeptide in *Ctenopharyngodon idella*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与LDH对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 3(52)	AYO99432.1	PTGTF[-175.65]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4(213)	AYO99434.1	IPTIM[-175.75]; VIQY[-164.96]; TAVW[-167.18] IITTL[-167.17]; PTIW[-198.76]; IIITR[-168.36] IQTPW[-185.63]; ITAGY[-174.47]	0.04
NADH Dehydrogenase subunit 4L(48)	AYO99433.1	ESTSF[-182.13]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 5(277)	AYO99435.1	QAVIY[-184.41]; ICTH[-161.94]; TGTPF[-162.42] IITSN[-160.01]; PAVIH[-163.13]; QTW[-171.83]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 6(74)	AYO99436.1	PTPY[-163.93]; PEAW[-181.18]	0.06

利用3种肠胃酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶)对5种鱼类的NADH Dehydrogenase的多种蛋白亚基进行水解,结果如表2所示。所有蛋白质的TDH在30%~50%范围内,水解产物主要为氨基酸和寡肽(含有2~5个氨基酸残基的小分子肽),少部分为多肽(含有5个以上氨基酸残基的肽)。结果显示,所选用的NADH Dehydrogenase的多种蛋白亚基的水解产物主要为肽链长度在2~5个氨基酸残基之间的寡肽。其中,TDH较高的NADH Dehydrogenase蛋白亚基包括三文鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 4L(54.00%)、子梅鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 3(47.86%)、草鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 4L(46.65%)。

2.1.2 小分子寡肽与LDH的结合能力分析

使用HPEPDOCK数据库研究NADH Dehydrogenase的蛋白亚基水解获得的小分子寡肽与LDH(PDB代码为7EPM)的分子对接能力,分子对接分数≤-120被认为是高亲和力肽,对接分数≤-160被认为是超高亲和力肽,F值用于评价小分子寡肽抗疲劳的潜力,超高亲和力肽对接评分和F值如表3~7所示。

结果显示,草鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 6的F值最大(0.06),其次得到的F值较大的有子梅鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 6(0.04),草鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 4(0.04)。同样,可以观察到有四种蛋白水解后没有得到对接分数≤-160的超高亲和力多肽,它们分别是鳃鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 4L,三文鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 3和NADH Dehydrogenase subunit 4L,以及子梅鱼中的NADH Dehydrogenase subunit 3,其余蛋白的超高亲和力寡肽出现的频率均在0.01~0.03的范围内。

表 4 鲢鱼超高亲和力寡肽结合 LDH 的序列和频率

Table 4 Sequence and frequency of lactate Dehydrogenase binding by ultra-high affinity oligopeptide in *Engraulis japonicus*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 LDH 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 3(54)	AHF96346.1	TVSF[-160.12]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4(208)	AHF96348.1	TATW[-164.56]; IITM[-164.51]; PPY[-169.35] PTIW[-198.76]; IIITR[-168.36]; ITAGY[-174.47]	0.03
NADH Dehydrogenase subunit 4L(47)	AHF96347.1		0.00
NADH Dehydrogenase subunit 5(253)	AHF96349.1	PATVH[-170.43]; QAVIY[-184.41]; ICTH[-161.94] TGTPF[-162.42]; QTW[-171.83]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 6(67)	AHF96350.1	PEGW[-186.91]; PAPY[-161.87]	0.03

表 5 带鱼超高亲和力寡肽结合 LDH 的序列和频率

Table 5 Sequence and frequency of lactate Dehydrogenase binding by ultra-high affinity oligopeptide in *Trichiurus lepturus*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 LDH 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 4(210)	QJT42861.1	ITAAY[-171.62]; PPH[-161.29]; PDIIF[-174.56]	0.01
NADH Dehydrogenase subunit 4L(47)	QJT42860.1	VATCR[-160.50]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 5(279)	QJT42862.1	QAPSF[-164.49]; TGTPF[-162.42]	0.01

表 6 三文鱼超高亲和力寡肽结合 LDH 的序列和频率

Table 6 Sequence and frequency of lactate Dehydrogenase binding by ultra-high affinity oligopeptide in *Oncorhynchus keta*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 LDH 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 3(47)	YP_006280901.1		0.00
NADH Dehydrogenase subunit 4(220)	YP_006280903.1	PTIW[-198.76]; IIITR[-168.36]; IQTPW[-185.63] IITSM[-164.97]; ITASY[-176.75]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4L(46)	YP_006280902.1		0.00
NADH Dehydrogenase subunit 5(271)	YP_006280904.1	IITH[-161.02]; PAIHH[-162.62]; DQTW[-179.60] QAVIY[-184.41]; ICTH[-161.94]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 6(70)	YP_006280905.1	PAPY[-161.87]; PESW[-184.92]; ETSW[-174.46] IACAW[-190.26]	0.06

表 7 子梅鱼超高亲和力寡肽结合 LDH 的序列和频率

Table 7 Sequence and frequency of lactate Dehydrogenase binding by ultra-high affinity oligopeptide in *Collichthys lucidus*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 LDH 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 3(58)	QQY84821.1		0.00
NADH Dehydrogenase subunit 4(220)	QQY84823.1	IPTTW[-195.61]; SETGW[-169.42]; ITAGY[-174.47] IQTPW[-185.63]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4L(47)	QQY84822.1	VATTR[-164.76]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 5(282)	QQY84824.1	PDPR[-165.07]; GPDW[-161.94]; ICTH[-161.94] TGTPF[-162.42]; TAIY[-160.31]; PAVIH[-163.13]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 6(70)	QQY84825.1	AAEPY[-162.23]; VSGQY[-165.90]; VISAW[-181.45]	0.04

2.1.3 小分子寡肽与 CK 的结合能力分析

同样地, 使用 HPEPDOCK 数据库研究 NADH Dehydrogenase 的蛋白亚基水解获得的小分子寡肽与 CK (PDB 代码为 1I0E) 的分子对接能力, 结合对接

分数≤-120 被认为是高亲和力肽, 对接分数≤-160 被认为是超高亲和力肽, F 值用于评价小分子寡肽抗疲劳的潜力, 超高亲和力肽对接评分和 F 值如表 8~12 所示。

表 8 草鱼超高亲和力寡肽结合 CK 的序列和频率

Table 8 Sequence and frequency of high affinity oligopeptide binding creatine kinase in *Ctenopharyngodon idella*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 CK 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 3(52)	AYO99432.1	ITIL[165.89]; PTGTF[-174.37]	0.04
NADH Dehydrogenase subunit 4(213)	AYO99434.1	IPTM[-175.02]; VIQY[-165.20]; TAVW[-167.53] PPF[-164.42]; PTIW[-204.40]; IIITR[-172.36] IQTPW[-180.93]; ITAGY[-175.59]	0.04
NADH Dehydrogenase subunit 4L(48)	AYO99433.1	ESTSF[-167.01]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 5(277)	AYO99435.1	PEW[-172.00]; QAVIY[-168.75]; ICTH[-164.09] TGTPF[-177.74]; IITSN[-171.91]; PAVIH[-179.26] QTW[-180.39]	0.03
NADH Dehydrogenase subunit 6(74)	AYO99436.1	PTPY[-166.62]; PEAW[-172.68]; SVVGY[-173.41] EGSW[-167.30]	0.05

表 9 鲢鱼超高亲和力寡肽结合 CK 的序列和频率

Table 9 Sequence and frequency of high affinity oligopeptide binding creatine kinase in *Engraulis japonicus*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 CK 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 3(54)	AHF96346.1		0.00
NADH Dehydrogenase subunit 4(208)	AHF96348.1	TATW[-180.95]; IIITM[-167.02]; PTIW[-204.40] IIITR[-172.36]; ITAGY[-175.59]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4L(47)	AHF96347.1	SGVAF[-165.53]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 5(253)	AHF96349.1	GQW[-161.49]; GTPR[-160.95]; PATVH[-169.03] QAVIY[-168.75]; ICTH[-164.09]; TGTPF[-177.74] QTW[-180.39]	0.03
NADH Dehydrogenase subunit 6(67)	AHF96350.1	CGW[-161.18]; PEGW[-175.45]; VVCY[-169.54] SGDW[-173.68]; GVDR[-161.41]; PAPY[-170.50]	0.09

表 10 带鱼超高亲和力寡肽结合 CK 的序列和频率

Table 10 Sequence and frequency of high affinity oligopeptide binding creatine kinase in *Trichiurus lepturus*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 CK 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 4(210)	QJT42861.1	ITAAAY[-169.61]; PDIIF[-182.40]	0.01
NADH Dehydrogenase subunit 4L(47)	QJT42860.1	STAPM[-165.39]; VATCR[-192.39]	0.04
NADH Dehydrogenase subunit 5(279)	QJT42862.1	QAPSF[-164.07]; STW[-160.83]; IIAF[-162.03] TGTPF[-177.74]	0.01

表 11 三文鱼超高亲和力寡肽结合 CK 的序列和频率

Table 11 Sequence and frequency of high affinity oligopeptide binding creatine kinase in *Oncorhynchus keta*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 CK 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 3(47)	YP_006280901.1	ATISF[-163.16]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4(220)	YP_006280903.1	PTIW[-204.40]; IIITR[-172.36]; IQTPW[-180.93] ITASY[-171.00]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4L(46)	YP_006280902.1	EATGY[-184.08]; SVAPM[-164.78] VATAR[-166.48]	0.07
NADH Dehydrogenase subunit 5(271)	YP_006280904.1	PAIIIH[-179.53]; DQTW[-166.27]; QAVIY[-168.75] ICTH[-164.09]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 6(70)	YP_006280905.1	PAPY[-170.50]; PESW[-190.82]; ETSW[-164.43] IACAW[-191.32]	0.06

表 12 子梅鱼超高亲和力寡肽结合 CK 的序列和频率

Table 12 Sequence and frequency of high affinity oligopeptide binding creatine kinase in *Collichthys lucidus*

蛋白质名称	序列号	超高亲和力寡肽序列号 (1<长度<6 对接分数≤-160) 与 CK 对接得分	蛋白质中超高亲和力寡肽的频率 (F)
NADH Dehydrogenase subunit 3(58)	QQY84821.1	AIVSF[-165.07]; PDH[-164.88]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4(220)	QQY84823.1	IPTTW[-197.57]; SETGW[-174.34]; IITSL[-161.30] ITAGY[-175.59]; IQTPW[-180.93]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 4L(47)	QQY84822.1	VATTR[-176.66]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 5(282)	QQY84824.1	PDPR[-167.79]; GPDW[-174.22]; SIIF[-178.32] ICTH[-164.09]; TGTPF[-177.74]; PAVIH[-179.26]	0.02
NADH Dehydrogenase subunit 6(70)	QQY84825.1	VSGQY[-172.90]; VISAW[-184.36]	0.03

结果显示, 鳀鱼中的 NADH Dehydrogenase subunit 6 蛋白的 F 值最大 (0.09), 其次得到的 F 值较大的有三文鱼中的 NADH Dehydrogenase subunit 4L (0.07), 三文鱼中的 NADH Dehydrogenase subunit 6 (0.06), 草鱼中的 NADH Dehydrogenase subunit 6 (0.05)。可以观察到其中有 2 种蛋白水解后并没有得到对接分数 ≤-160 的超高亲和力多肽, 它们分别是鳀鱼中的 NADH Dehydrogenase subunit 3 和带鱼中的 NADH Dehydrogenase subunit 4L, 其余蛋白的超高亲和力寡肽的频率均在 0.01~0.04 的范围内。

2.1.4 双亲和寡肽与 LDH、CK 的结合能力分析

表 13 双亲和高分肽及其出现频数

Table 13 The occurrence frequency of high peptide in both parents

肽名称	出现频数	肽名称	出现频数	肽名称	出现频数
ICTH	4	IPTIM	1	PESW	1
PTIW	3	VIQY	1	ETSW	1
IIITR	3	TAVW	1	IACAW	1
IQTPW	3	ESTSF	1	IPTTW	1
ITAGY	3	IITSN	1	SETGW	1
QAVIY	3	PTPY	1	ITAGY	1
TGTPF	3	PEAW	1	PDPR	1
PAPY	2	TATW	1	GPDW	1
PAVIH	2	IITTM	1	VSGQY	1
QTW	2	ITASY	1	VISAW	1
ITAAAY	1	PAIHH	1	PTPY	1
PTGTF	1	DQTW	1	IPTM	1

基于以上结果, 5 种鱼类的 7 种 NADH Dehydrogenase 蛋白亚基, 经模拟水解和分子对接后共得到 72 个超高亲和力寡肽, 包括获得顶级亲和力寡肽的 NADH Dehydrogenase subunit 6, 但仍有少量蛋白水解后并没有得到对接分数 ≤-160 的寡肽, 且通过观察数据发现 7 种蛋白源寡肽对 CK 的亲和力比 LDH 的亲和力高。

分析发现, 对 LDH、CK 均有超高亲和力的寡肽共有 36 种, 其中, 对 LDH、CK 分子对接分数最高的是序列为 PTIW (-198.76, -204.40) 的寡肽, 其次是序列为 IPTTW 的寡肽 (-195.61, -197.57), 序列为 IACAW 的寡肽 (-190.26, -191.32), 序列为 IQTPW 的寡肽 (-185.63, -180.93)。另外, 5 种鱼类的 7 种蛋白经水解后获得的小分子寡肽对 LDH、CK 均具有超高亲和力, 并且出现次数最多的寡肽是 ICTH (-161.94, -164.09), 草鱼、三文鱼和子梅鱼中的 NADH Dehydrogenase subunit 5 以及鳀鱼的 NADH Dehydrogenase subunit 5, 这 4 种蛋白水解后均得到了序列为 ICTH 的寡肽, 其后出现 3 次的寡肽有 PTIW (-198.76, -204.40)、IQTPW (-185.63, -180.93)、QAVIY (-184.66, -168.75)、ITAGY (-174.47, -175.59)、IIITR (-168.36, -172.36)、TGTPF (-162.42, -177.74)。

综上所述, 与 LDH、CK 对接分数最高且出现次数最多的寡肽是 PTIW (-198.76, -204.40)。其来源于草鱼、鳀鱼、三文鱼中的 NADH Dehydrogenase subunit 4。所得四肽 PTIW 与 LDH、CK 两种酶的对接图如图 1、2 所示 (2D 结构由 LigPlot+ 软件制作, 版本号: V2.2; 3D 结构由 Pymol 软件制作)。

图 1a 与图 1b 分别展示了 LDH、CK 与 PTIW 计算机模拟的分子对接位点。由上图 1c 知, LDH 与 PTIW 形成了三对氢键, 其中, 在 LDH 氨基酸序列中 Arg270 (键长 2.27, 3.19) 与 PTIW 形成了 2 对氢键, 与 Ser256 (键长 3.20) 形成了 1 对氢键。此外, 还有 14 个氨基酸残基参与形成了疏水作用力, 分别是 Arg172、So4405、Arg270、Thr184、Pro183、Thr184、Trp189、Val271、Pro273、His272、Asp259、Asn165、Ser168、Ala169。

类似地, 由图 1d 可得, CK 与 PTIW 也形成了 4 对氢键, 对应的氨基酸分别是 Leu193 (2 对, 键长 2.87, 3.23), Arg292 (键长 2.40), Arg130 (键长 2.80)。12 个残基涉及到疏水接触, 分别是 Glu231、Asp195、

Trp228、Arg236、Ile238、Met240、His296、His191、Ser128、Ile188、Phe194、Arg132。

图 2a 与图 2b 分别展示了 LDH、CK 与 PTIW 在

Pymol 软件上对接后的结合口袋，可以观察到序列为 PTIW 很好地进入 LDH、CK 的立体结构中，并与周围的氨基酸残基形成了紧密的分子相互作用。

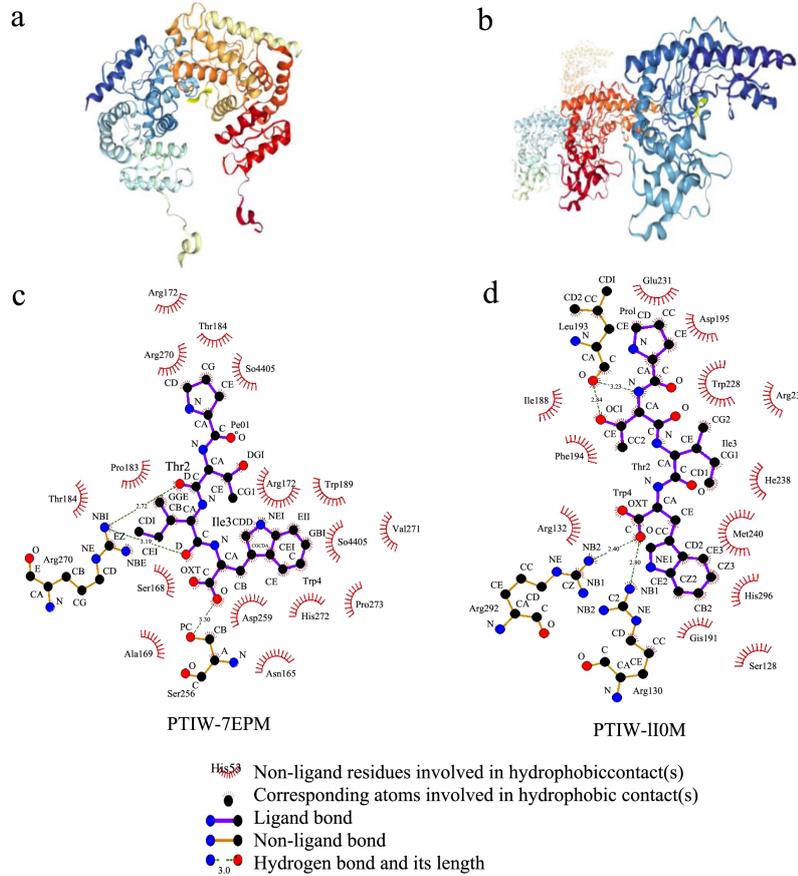


图 1 寡胎 PTIW 和 LDH、CK 两种酶的对接图像和 2D 结构

Fig.1 Docking image and 2D structure of oligofetal PTIW with lactate Dehydrogenase and creatine kinase enzymes

注：a：寡胎 PTIW 与 LDH 酶的对接图像；b：寡胎 PTIW 与 CK 酶的对接图像；c：表示寡胎 PTIW 与 LDH 酶结合的 2D 结构；d：表示寡胎 PTIW 与 CK 酶结合的 2D 结构。

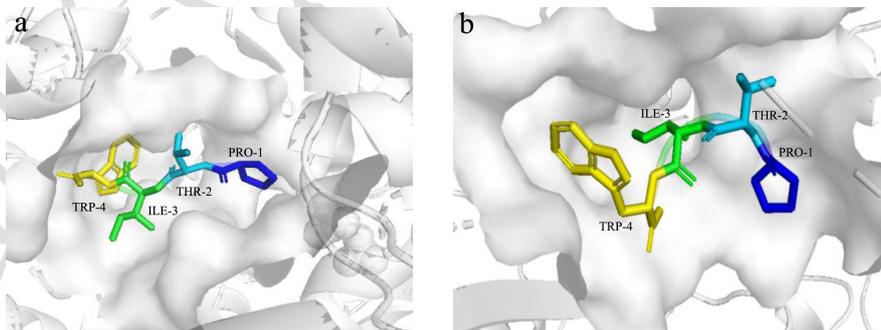


图 2 寡胎 PTIW 和 LDH、CK 两种酶的对接图像的 3D 结合口袋

Fig.2 Oligofetal PTIW and lactate Dehydrogenase, creatine kinase two enzymes docking image of the 3D binding pocket

注：a：表示寡胎 PTIW 与 LDH 的 3D 结合口袋；b：表示寡胎 PTIW 与 CK 的 3D 结合口袋。

2.2 讨论

2.2.1 运动疲劳的研究分析

运动疲劳定义最早产生于十九世纪末叶，1982 年第五届国际运动生物化学会议将运动疲劳统一定义

为：运动性疲劳是人体脑力和体力持续活动到一定阶段出现的生理现象。对于其生理产生机制，目前主要有能量物质消耗学说、代谢产物堆积堵塞学说、保护性抑制学说等^[1]。

基于三类学说，本研究通过模拟筛选获得理论上

能够有效抑制能量物质消耗,减少产物堆积堵塞以及增强中枢神经的保护性抑制的抗运动疲劳小分子活性肽。在短时间高强度运动时,由于氧供应相对不足,糖原代谢增加,血清中乳酸、CK等代谢产物增加。而LDH则是产生乳酸代谢途径中的关键酶,其催化丙酮酸转化成乳酸,从而引起肌肉收缩效率下降导致体力衰竭^[1],筛选抑制LDH活性肽对避免过度疲劳和运动损伤的发生具有重要意义。本文通过模拟实验,利用从鱼类NADH Dehydrogenase蛋白中筛选出的多肽与LDH、CK进行分子对接,理论上筛选出具有抑制LDH、CK活力的活性肽,相关成果有助于指导现实中的体内和体外实验,为定向筛选抗疲劳功能活性肽提供理论指导。

2.2.2 鱼类活性蛋白的研究分析

水产品经酶解后得到的多肽降低了人类的患病几率,增强人们的免疫力的功能,这一事实已经得到了许多专家学者的关注,这类功能性多肽主要来源于藻类、鱼类等。由于其结构与组成的差异性,因此,具有的生理功能活性也多种多样,例如抗氧化活性、免疫调节、抗疲劳、抗血栓、降血压和降低胆固醇等^[17]。有研究发现,线粒体是细胞内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)产生的主要部位和氧化损伤的靶细胞器,线粒体DNA(mtDNA)容易遭受ROS攻击而受损^[18,19]。还原型NADH脱氢酶是线粒体呼吸链电子传递中的关键酶,且是ROS产生的主要位点,线粒体DNA编码构成NADH脱氢酶的7个亚单位(ND1~ND6, ND4L)^[20]。Merlo等^[21]、Ide等^[22]、Piruat等^[23]、彭琼玲等^[24]均对还原型NADH脱氢酶蛋白的生理活性作了研究,一致推测机体可以通过影响mtDNA的表达,调节NADH脱氢酶的组成单位及数量来适应能量代谢需要以及抑制ROS介导的组织细胞损伤,总的来说NADH脱氢酶具有抗氧化活性。另外,水产品生物多肽本身具有抗氧化活性,其能够清除人体内自由基^[25]。相关研究成果已经被广泛报道,如通过酶解鳕鱼皮得到的多肽氨基酸序列为His-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Leu^[26],其抗氧化活性好;陈丽丽等^[27]对草鱼多肽的抗氧化活性与抗疲劳作用进行了研究,发现提取出的草鱼多肽具有抗氧化、抗疲劳活性。Qian等^[28]研究牡蛎蛋白多肽并且从中分离出一种较纯的抗氧化肽,其抗氧化活性比维生素E更高。因此,本文中通过计算机模拟筛选出的来自鱼类NADH Dehydrogenase的超高亲和力活性肽PTIW(氨基酸序列为Pro-Thr-Ile-Trp),有可能同样具有超高抗氧化活性,但最终结果有待进一步实验认证。

2.2.3 双超高亲和力寡肽

本研究共分析了来源于5种鱼类的NADH Dehydrogenase的7个亚单位,共23种不同结构的蛋白,水解后通过分子对接共获得72个具有超高亲和寡肽,具有双超高亲和力寡肽的有36种。其中对接分数均在-180~-160的寡肽共有31个分别为DQTW、ESTSF、ETSW、GPDW、ICTH、IIITR、IITSN、IITTM、IPTM、ITAAAY、ITAGY、ITASY、PAIHH、PAPY、PATVH、PAVIH、PDPR、PEAW、PEGW、PTGTF、PTPY、QAPSF、QAVIY、QW、SETGW、TATW、TAVW、TGTPF、VIQY、VISAW、VSGQY;对接分数均在-200~-180的寡肽共有5个,分别为IACAW、IPITW、IQTPW、PESW、PTIW,其中对接分数最高的肽是PTIW。根据分析结果,观察到双超高亲和寡肽的对接评分主要在-180到-160之间,对接评分-200到-180也有多个,这些寡肽都为低分子量且具有较好功能活性的肽,具有良好的生物利用度,更易于通过肠道发挥功能,也是选出的对LDH、CK具有理论抑制作用的生物活性肽,这些成果提示鱼类蛋白源多肽可能是抗疲劳功能性食品和保健品研发的重要资源。

2.2.4 重复的双超高亲和力寡肽

23种不同结构的NADH Dehydrogenase蛋白模拟水解后的双超高亲和力寡肽有36种共143个多肽,其中,ICTH是重复出现次数(4次)最多的寡肽,其次是寡肽PTIW、IIITR、IQTPW、ITAGY、QAVIY、TGTPF(重复出现3次),以及重复次数为2个的寡肽,分别是PAPY、PAVIH、QW。在出现重复的双超高亲和力肽中,QW为含有3个氨基酸序列的寡肽;含有5个氨基酸序列的寡肽最多,有6种,分别是IIITR、IQTPW、ITAGY、QAVIY、TGTPF、PAVIH;含有4个氨基酸的寡肽3种,分别是ICTH、PTIW、PAPY。重复出现的双超高亲和力寡肽表明,不同结构的蛋白质水解后可以得到相同的超高亲和力寡肽序列,说明这些寡肽在鱼类蛋白中的来源较广,为该类物质的开发利用奠定前提条件。

3 结论

LDH和CK活性的抑制有助于运动疲劳的恢复,并能有效减轻疲劳引起的病理性心肌损伤。本研究利用计算机模拟水解5种我国常见鱼类中的NADH Dehydrogenase亚基,得到的小分子寡肽分别与疲劳产生相关的LDH和CK两种酶进行分子对接,共获得72个超高亲和力寡肽,其中,与LDH、CK均具有超高亲和力的寡肽共36种,对接分数最高且出现次数最多的寡肽是PTIW,研究结果为提升鱼类蛋白质的高值化利用以及开发抗疲劳功能食品提供理论参考。

参考文献

- [1] 邓树勋,王健,乔德才.运动生理学[M].北京:高等教育出版社,2013.
- [2] 黄鑫.温肝阳滋肾阴时相组合改善运动性疲劳的理论研究[D].北京:中国中医科学院,2008.
- [3] 杨锡让.实用运动生理学[M].北京:北京体育大学出版社,2002.
- [4] 赵静.运动疲劳机制及食源性抗疲劳活性成分研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(9):3565-3571.
- [5] 陈丽丽,赵利,白春清,等.草鱼多肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2015,36(6):74-82.
- [6] 丁树慧.低值鱼低聚肽的酶法制备及抗氧化、抗疲劳活性研究[D].长春:吉林农业大学,2018.
- [7] 陶静,丁冬各,陈荫,等.带鱼高 F 值寡肽的制备工艺及活性[J].水产学报,2018,42(10):1648-1660.
- [8] Wang Y, Liu T, Xie J, et al. A review on application of molecular simulation technology in food molecules interaction [J]. *Curr Res Food Sci*, 2022, 5: 1873-1881.
- [9] 何静,史睿,吉日木图.超声辅助酶提取技术对驼皮源胶原蛋白降解及其活性肽的影响[J].食品与发酵工业,2023,49(15):153-159
- [10] Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23): 5978.
- [11] Ratnaparkhe M, Lee T, Tan X, et al. Comparative and evolutionary analysis of major peanut allergen gene families [J]. *Genome Biology & Evolution*, 2014, 6(9): 2468-2488.
- [12] 胡嘉伦,姜瞻梅.计算机软件模拟 α -乳白蛋白与皂苷的分子对接[J].乳业科学与技术,2022,45(4):1-6.
- [13] Zhou P, Jin B, Li H, et al. HPEPDOCK: A web server for blind peptide-protein docking based on a hierarchical algorithm [J]. *Nuclc Acids Research*, 2018, 46(W1): W443-W450.
- [14] 江文婷,陈旭,蔡茜茜,等.基于分子对接技术研究鱼源抗冻多肽与鱼肌球蛋白的相互作用[J].食品工业科技,2022,43(20):29-38.
- [15] Delano W L. The PyMol molecular graphics system [J]. *Proteins*, 2002, 30: 442-454.
- [16] Laskowski R A, Swindells M B. ligplot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery [J]. *J ChemInf Model*, 2011, 51(10): 2778-2786.
- [17] 张俏.梅鱼蛋白肽的制备及其生理活性研究[D].舟山:浙江海洋学院,2015.
- [18] Machida, Keigo, Cheng, et al. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(14): 7199-7207.
- [19] Anseth J W, Goffin A J, Fuller G G, et al. Lung surfactant gelation induced by epithelial cells exposed to air pollution or oxidative stress [J]. *Am J Respir Cell MolBiol*, 2005, 33(2): 161-168.
- [20] Edwards J C, Johnson M S, Taylor B L. Differentiation between electron transport sensing and proton motive force sensing by the Aer and Tsr receptors for aerotaxis [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(3): 823-837.
- [21] Merlorpich M, Raule N, Catani L, et al. Increased transcription of mitochondrial genes for complex I in human platelets during ageing - ScienceDirect [J]. *FEBS Letters*, 2004, 558(1-3): 19-22.
- [22] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction [J]. *Circulation Research*, 2001, 88(5): 529-535.
- [23] Piruat J I, Lopez-barneo J. Oxygen tension regulates mitochondrial DNA-encoded complex I gene expression [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(52): 42676-4284.
- [24] 彭琼玲,常立文,卢红艳,等.早产大鼠高氧肺损伤组织还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶的动态表达及其意义[J].实用儿科临床杂志,2007,22(14):1047-1049.
- [25] 胡二坤,郭兴凤,郑慧.鱼蛋白水解产物抗氧化活性[J].食品工业,2021,42(3):181-184.
- [26] Mendis E, Rajapakse N, Kim S K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(3): 581-587.
- [27] 陈丽丽,白春清,袁美兰,等.草鱼多肽功能性质及营养价值[J].食品科学技术学报,2016,34(5):33-42.
- [28] Qian Z J, Jung W K, Byun H G, et al. Protective effect of an antioxidative peptide purified from [J]. *Bioresource Technology: Biomass, Bioenergy, Biowastes, Conversion Technologies, Biotransformations, Production Technologies*, 2008, 99(9): 3365-3371.