

# 计算机模拟筛选食用藻蛋白源 PAR2 抑制肽

高立芳<sup>1</sup>, 曾新安<sup>1</sup>, 金可沆<sup>1</sup>, 范土贵<sup>1</sup>, 彭名军<sup>2</sup>, 曾巧辉<sup>1\*</sup>

(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:** 该研究主要是通过计算机模拟, 从食品来源蛋白质中预测筛选具有蛋白酶激活受体 2 (Protease Activated Receptor 2, PAR2) 抑制作用的生物活性肽, 同时预测食用藻类蛋白质酶解后所得的肽段的生物活性、水溶性等理化指标。首先, 利用 NCBI 数据库和蛋白质晶体数据库 (Protein Data Bank, PDB) 比对选择食用藻类蛋白质, 其次通过 BIOPEP-UWM 数据库模拟酶解, Peptide Ranker 进行活性分析, Innovagen 和 ToxinPred 预测高活性肽, 最后采用 HPEPDOCK 将获得的活性评分超过 0.5、水溶性优且无毒的小分子活性肽与 PAR2 进行分子对接模拟, 以探究两者之间的分子结合能力, 进而分析判别不同小分子活性肽抑制 PAR2 活力的潜力和机制。结果表明, 小分子寡肽 PAGR (-165.80)、PAR (-163.93)、IDQW (-152.95)、DISAW (-154.48) 与 PAR2 具有较高的结合分数, 是 PAR2 潜在的活性抑制肽。该研究旨在为藻类蛋白的开发利用以及 PAR2 抑制剂的挖掘研究提供参考。

**关键词:** 食用藻蛋白; 生物活性肽; 蛋白酶激活受体 2; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2023)12-158-168

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.1576

## Computer Simulation for Screening Protease Activated Receptor 2

### Inhibitory Peptides Derived from Edible Algal Proteins

GAO Lifang<sup>1</sup>, ZENG Xin'an<sup>1</sup>, JIN Kehang<sup>1</sup>, FAN Tugui<sup>1</sup>, PENG Mingjun<sup>2</sup>, ZENG Qiaohui<sup>1\*</sup>

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

**Abstract:** Computer simulations were used to predict the bioactive peptides inhibiting protease activated receptor 2 (PAR2) from food source proteins, as well as the bioactivity, water solubility, and other physicochemical parameters of the peptides obtained from the enzymatic digestion of edible algal proteins. First, edible algal proteins were selected from the NCBI database and Protein Data Bank (PDB). Thereafter, enzymatic digestion was simulated using the BIOPEP-UWM database, activity analysis was performed using Peptide Ranker, high active peptides were predicted using Innovagen and ToxinPred, and finally, HPEPDOCK was used. The obtained small active peptides with activity scores over 0.5, excellent water solubility, and non-toxicity were simulated by molecular docking using PAR2 to investigate their molecular binding ability. The potential and mechanism to discriminate different small active peptides to inhibit PAR2 activity was analyzed. The results showed that the small molecule oligopeptides PAGR (-165.80), PAR (-163.93), IDQW (-152.95) and DISAW (-154.48) exhibited high binding to PAR2 and were potential active inhibitory peptides of PAR2. The findings of this study provide valuable insights for developing and utilizing algal proteins and exploring PAR2 inhibitors.

**Key words:** edible algal protein; bioactive peptides; protease-activated receptor 2; molecular docking

引文格式:

高立芳, 曾新安, 金可沆, 等. 计算机模拟筛选食用藻蛋白源 PAR2 抑制肽[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 158-168

GAO Lifang, ZENG Xin'an, JIN Kehang, et al. Computer simulation for screening protease activated receptor 2 inhibitory peptides derived from edible algal proteins [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 158-168

收稿日期: 2022-12-13

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); 广东省教育厅创新强校项目 (2022KTSCX120)

作者简介: 高立芳 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 973590023@qq.com

通讯作者: 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

蛋白质是人体所必须的重要的营养物质之一。通常,蛋白质进入人体后,经过胃肠道消化酶的降解才能被机体吸收,其在人体不是仅以氨基酸形式被吸收,更多是以肽的形式被吸收<sup>[1]</sup>。小分子生物肽的分子量小、结构简单,且可快速透过小肠黏膜被吸收,相较于游离氨基酸,吸收耗能低、转运速度快、载体不易饱和<sup>[2]</sup>。因此,食品蛋白质源的小分子活性肽的吸收、转化和利用具有高效性<sup>[3]</sup>。海洋生物中存在丰富的生物活性天然产物可以用于开发治疗多种人类疾病<sup>[4]</sup>。近年来,人们越发关注从鱼类、藻类、甲壳类动物和海绵中分离和鉴定具有广泛生物活性的蛋白质和多肽。

藻类蛋白是人类重要的海洋蛋白质来源,且其经酶解后能释放出具有生物活性的小分子肽。研究表明,大豆、牛奶、带鱼等食物的酶解产物具有降血脂、抗炎症、降血糖、抗抑郁等多种生物活性<sup>[5-7]</sup>。蛋白酶激活受体(PARs)是G蛋白偶联受体家族的一员,与人体内许多的生理反应相关<sup>[8]</sup>,且参与诱发多种疾病的发生,如各种炎症、癌症、冠心病和糖尿病等<sup>[9-11]</sup>。通常情况下,PARs的N末端序列被丝氨酸蛋白酶水解切割而发生不可逆的激活,暴露含有系锁配体的新的N末端,新的N末端作为系锁配体可与PARs进行分子内结合,从而实现自发激活,进而引发细胞级偶联反应以响应炎症信号和其它刺激反应<sup>[12]</sup>。PARs包含有四种亚型,分别为PAR1、PAR2、PAR3、PAR4,其中蛋白酶激活受体2(PAR2)比较特殊,且不能被凝血酶激活<sup>[13]</sup>,而PAR2主要激活剂包括胰蛋白酶、类胰蛋白酶和弹性蛋白酶,其中胰蛋白酶是最有效的PAR-2激活剂<sup>[14]</sup>。

我国是藻类生产消费大国,常见的藻类品种有海带(*Laminaria japonica*)、紫菜(*Porphyra*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida* Suringar)、江蓠(*Gracilaria*)、螺旋藻(*Spirulina*)以及微藻杜氏藻(*Microalgae Dunaliella*)等<sup>[15]</sup>,其富含优质蛋白。目前,基于计算机的分子模拟技术高速发展,能一定程度上减少传统科研实验存在的耗时、费力、缺乏靶向性等问题。传统的生物活性肽主要是从蛋白质酶解产物的分离纯化和活性鉴定开展研究,其不仅存在上述局限性,还有可能导致微量但活性高的生物活性肽的损失。

本研究利用生物数据库和基于计算机模拟的多肽-蛋白分子对接技术,理论上从食用藻类蛋白质中筛选具有蛋白酶激活受体2(PAR2)抑制作用的小分子多肽;以对接分数和配体与受体相互作用力作为评估藻类蛋白质源多肽对PAR2的抑制潜力的依据,为藻类蛋白的开发利用以及PAR2抑制剂发掘研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

在NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)<sup>[16]</sup>中输入“Edible algae”,结合蛋白质晶体数据库(PDB),检索出所有种类食用藻类蛋白,并下载各种蛋白质的氨基酸序列。从PDB数据库获取蛋白酶激活受体2(PAR2)的晶体结构(PDB: 5NDD, 5NDZ),利用PyMol软件分别将受体和配体8TZ(C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>O,结构见图1a),8UN(C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>,结构见图1b)分离,并保存为PDB文件。8TZ作为蛋白酶激活受体2的拮抗剂,结合在受体外表面附近一个完全闭塞的口袋中,其主要与PAR2氨基酸序列上的Asp228、Tyr82和His135形成氢键,从而稳定受体的无活性状态以防止激动剂的活化变构。抑制剂8UN具有高度的亲脂性,主要通过疏水作用与受体结合在蛋白螺旋表面偏远的变构位点上,从而限制激动剂结合后受体激活所需的螺旋间构象重排。

### 1.2 BIOPEP-UWM 分析

根据Yao等<sup>[5]</sup>采用的方法,将从NCBI数据库获得食用藻中常见的11种蛋白质序列导入BIOPEP-UWM数据库中,预测被胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶这三种肠胃酶的作用情况,模拟人体胃肠道消化的过程。将模拟人体胃肠消化所得的理论肽进一步分析获得潜在生物活性肽,并且对其进行更深一层的分析。

人体对螺旋藻蛋白的消化能力可以通过理论水解度TDH来进行表示。

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

式中:

TDH——蛋白质水解过程中被裂解的肽键数与给定蛋白质的总肽键数之比, %;

D——蛋白质中肽键总数;

d——氢的数目<sup>[17]</sup>。

### 1.3 食用藻蛋白质源多肽的活性分析

使用Peptide Ranker服务器评估螺旋藻蛋白酶解产物的生物学活性,并对小分子肽进行综合评分筛选。在相应数据库中输入寡肽的氨基缩写序列可得到介于0~1的评分,评分越高说明该寡肽的生物活性越高。在本研究中,当预测的肽段分数超过0.50时,则可以认为该肽段具有潜在生物活性。



$F$ ——出现频率;

$N$ ——蛋白链内高亲和寡肽的数量;

$L$ ——蛋白链的长度。

### 1.6 分子对接结果的可视化

利用 PyMol 软件对受体和寡肽进行处理, 构建对接复合物的三维空间结构以及分子间作用力。通过 LigPlus (版本号: V.2.2) 分析高亲和力寡肽与 PAR2 受体结合的疏水残基和氢键作用<sup>[17]</sup>。

### 1.7 数据分析

所有数据均采用 Excel 软件进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 计算机模拟酶解食用藻蛋白的结果分析

根据蛋白质在食用藻中含量高、活性强、研究广

泛的原则, 从 NCBI 数据库中筛选食用藻来源的代表性蛋白质, 利用 BIOPEP-UWM 数据库模拟胃肠道消化酶(胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶)水解上述筛选的蛋白质。结果如表 1 所示。

挑选螺旋藻、小球藻、紫菜、江蓐以及裙带菜等五种市场上常见的高营养价值的食用藻类, 根据每种酶均有其固定的切割位点这一特性, 采用 NCBI 和 BIOPEP-UWM 数据库处理、模拟酶水解可得到, 水解度 TDH 基本上大于 30%, 最高不超过 50%; 水解后的产物主要是氨基酸和寡肽, 其中, NADH 脱氢酶和 4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶的水解度较高, 分别达到了 49.13%和 43.63%, 另外, 水解度最低的则是裙带菜的核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶只有 28.24%; 水解后发现产生多肽数量最多的是 4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶可达到 121, 其次是热休克蛋白 70 为 118; serpin 家族蛋白产生高活性肽数量最多为 46, 4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶和别藻蓝蛋白均为 41。

表 1 食用藻类蛋白质情况

Table 1 Introduction of edible algae protein

藻类	蛋白质名称	序列号	TDH/%	多肽数量	高活性肽数量
螺旋藻	藻蓝蛋白	pdb 2BV8	33.30	75	13
	腺苷酸环化酶	pdb 1XG0	35.45	49	10
	藻胆蛋白裂解酶	pdb 5TJF	36.57	40	7
	4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶	WP_006618130.1	43.63	121	41
	serpin 家族蛋白	WP_152088311.1	40.95	100	46
	金属硫蛋白	WP_043468030.1	30.36	12	6
	热休克蛋白 70	KDR54311.1	35.59	118	22
小球藻	超氧化物歧化酶	EKD06032.1	41.58	55	17
	精氨酸脱羧酶	EKD08081.1	36.46	90	20
	DNA 核酸内切酶	pdb 2NVA	42.77	39	5
紫菜	主要衣壳蛋白	ABA99997.1	37.90	93	20
	连接器 3	pdb 5A78	36.28	76	16
	LR3 支架蛋白	pdb 7LJ0	32.27	65	12
	LR6 支架蛋白	pdb 6KGX	33.49	49	10
江蓐	藻红蛋白	pdb 7LIZ	31.77	101	21
	NADH 脱氢酶	pdb 6NCL	49.13	89	20
	光敏色素 C 氧化酶	ASK51653.1	36.76	67	20
裙带菜	别藻蓝蛋白	ASK51475.1	33.02	66	41
	核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶	pdb 2BW7	28.24	17	6

生物信息学 (Bioinformatics) 是综合运用生物学、信息科学的各种知识和工具, 对复杂的生物数据进行获取、处理、存储、分发、分析和解释, 从而得到我们能够理解和接受的各种知识的一种技术。生物信息学工具在近年来发展飞速, 在活性肽发掘研究中有着广泛应用<sup>[19]</sup>。步营等在研究抗 SARS-CoV-2 海洋活性

肽时运用了 PeptideRanker 和 ToxinPred 等生物信息学工具<sup>[18]</sup>。当前, 各种数据库与多肽理化性质预测工具如在线工具 Innovagen 软件以及预测活性肽的吸收 (Adsorptin)、分布 (Distribution)、代谢 (Metabolism)、排泄 (Excretion) 和毒性 (Toxicity) 的 AdmetSAR 软件等都在活性肽的模拟筛选发挥着重要作用<sup>[18-20]</sup>。对

比传统的生物活性肽研究方法，利用生物信息学技术可以节省获得活性肽构效关系的成本，实现了天然活性肽的快速高通量筛选。同时，生物质谱中的液相色谱-

飞行时间串联质谱以及四级杆线性离子阱质谱被逐渐应用于生物活性肽的结构分析，并辅以质谱数据解析软件 ProteinPilot，缩短了活性肽结构表征的周期<sup>[21]</sup>。

表 2 藻类蛋白结合蛋白酶激活受体 2 的寡肽序列和频率

Table 2 Oligopeptide sequence and frequency of algal protein binding PAR 2

蛋白质名[序列长度]	筛选结果[数量]	F 值/%
藻蓝蛋白[334]	DAF[1], GEF[1], CAR[1], QGPN[1]	1.20
腺苷酸环化酶[221]	SDF[1], EF[1]	0.90
藻胆蛋白裂解酶[176]	IGR[1]	0.70
4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶[503]	EF[2], PR, DW[2]	1.10
serpin 家族蛋白[421]	DW[2], SM[1], EF[1]	1.00
金属硫蛋白[57]	无	0
热休克蛋白 70[532]	DW[1], DPR[1]	0.30
超氧化物歧化酶[203]	DAF[1], DF[1]	1.50
连接器 3[318]	DF[1], AEGDF[1], PR[1], EPCGPY[1]	1.30
主要衣壳蛋白[439]	DW[1], PAGR[1], TDW[1]	0.70
LR3 支架蛋白[345]	PR[1], EPCGPY[1], EF[1]	0.90
LR6 支架蛋白[428]	SCR[1], EF[1], PAR[1]	0.70
藻红蛋白[322]	GIDGPF[1], DAF[2], GCSR[2]	1.50
精氨酸脱羧酶[374]	PR[1], DF[1], IDQW[1], DSSF[1], DIGGGL[1], IGDW[1]	1.60
DNA 核酸内切酶[174]	无	0
NADH 脱氢酶[345]	DF[2], DSW[1], SM[1]	0.90
光敏色素 C 氧化酶[303]	DF[1], PR[1], ACEF[1], DISAW[1]	1.30
别藻蓝蛋白[323]	AGDPSIL[1], SM[1]	0.60
核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶[82]	DITF[1]	1.20

表 3 模拟水解获得的高活性寡肽及有效抑制蛋白酶激活受体 2 活性的小分子寡肽

Table 3 Highly active oligopeptides obtained by simulated hydrolysis and small molecule oligopeptides that effectively inhibit protease-activated receptor 2 activity

寡肽序列	活性打分	水溶性	毒性	疏水性	亲水性	分子量
AGDPSIL	0.63	Good	无毒	0.09	0.54	671.84
AACIR	0.53	Good	-	-	-	-
SCR	0.67	Good	无毒	-0.66	-0.93	364.44
DADW	0.65	Good	-	-	-	-
IAPDM	0.62	Good	-	-	-	-
EF	0.60	Good	无毒	-0.01	-0.35	294.32
PAR	0.60	Good	无毒	-0.53	-1.43	342.42
DF	0.94	Good	无毒	-0.05	-0.35	280.29
CDM	0.83	Good	-	-	-	-
PR	0.79	Good	无毒	-0.92	-3.05	271.33
GR	0.77	Good	-	-	-	-
ACEF	0.73	Good	无毒	0.06	0.72	450.56
CDGAAL	0.59	Good	-	-	-	-
DISAW	0.57	Good	无毒	0.07	0.22	590.69
GIDGPF	0.90	Good	无毒	0.15	0.23	604.74
DAF	0.80	Good	无毒	0.05	0.37	351.38
CR	0.87	Good	-	-	-	-

续表 3

寡肽序列	活性打分	水溶性	毒性	疏水性	亲水性	分子量
GPR	0.87	Good	-	-	-	-
DQF	0.74	Good	-	-	-	-
EPCGPY	0.68	Good	无毒	-0.09	-0.98	664.80
EIPPM	0.67	Good	-	-	-	-
AEGDF	0.50	Good	无毒	-0.06	-0.56	537.58
CDR	0.60	Good	-	-	-	-
IGAPDM	0.60	Good	-	-	-	-
DPAGGGDPVL	0.51	Good	-	-	-	-
SDF	0.77	Good	无毒	-0.12	-0.50	367.38
DW	0.93	Good	无毒	-0.17	-2.20	319.33
DPR	0.60	Good	无毒	-0.85	-3.20	386.43
GEW	0.74	Good	-	-	-	-
DSF	0.73	Good	-	-	-	-
GIGDL	0.56	Good	-	-	-	-
SADVW	0.52	Good	-	-	-	-
VDF	0.51	Good	-	-	-	-
PSR	0.50	Good	-	-	-	-
IGR	0.53	Good	无毒	-0.29	-0.13	344.45
TDW	0.57	Good	无毒	-0.18	-1.70	420.45
GDL	0.55	Good	-	-	-	-
DSW	0.73	Good	无毒	-0.20	-1.73	406.42
SM	0.63	Good	无毒	0	0.55	236.30
IGDW	0.84	Good	无毒	0.14	-0.08	489.58
CN	0.63	Good	-	-	-	-
DIGGGL	0.61	Good	无毒	0.17	0.60	530.67
IDQW	0.60	Good	无毒	-0.08	-0.85	560.66
CDDPN	0.54	Good	-	-	-	-
DGL	0.53	Good	-	-	-	-
DSSF	0.52	Good	无毒	-0.16	-0.57	454.47
SGIPPR	0.78	Good	-	-	-	-
PDIDQPR	0.55	Good	-	-	-	-
DGM	0.75	Good	-	-	-	-
DITF	0.55	Good	无毒	0.11	0.77	494.59
DVW	0.58	Good	-	-	-	-
IQADF	0.52	Good	-	-	-	-
AGDW	0.86	Good	-	-	-	-
PEF	0.72	Good	-	-	-	-
QEPF	0.68	Good	-	-	-	-
DVF	0.55	Good	-	-	-	-
GEF	0.72	Good	无毒	0.05	-0.37	351.39
CAR	0.65	Good	无毒	-0.49	-0.07	348.44
DM	0.61	Good	-	-	-	-
QGPN	0.54	Good	无毒	-0.31	-2.25	414.47
GCSR	0.60	-	无毒	-0.46	-0.80	421.51
PAGR	0.63	-	无毒	-0.35	-1.18	399.49

注：活性打分大于 0.5 时，则认为该肽段具有潜在的生物活性。

## 2.2 食用藻源蛋白酶解活性预测结果

使用 Peptide Ranker 工具来分析通过水解得到的寡肽,并筛选出具有潜在活性的寡肽,从而开展后续更深入的研究。筛选出的活性潜力较高、水溶性好的寡肽如表 3 所示。由表 3 可知,蛋白质 serpin 家族蛋白(46)来源的且具有理论活性的寡肽数量是最多,其次是 4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶(41)。活性预测得分位于前三的寡肽分别是 DF、DW 和 GIDGPF 分子量分别为 280.29、319.33 和 604.74,肽段的生物活性并没有随分子量的增大而增大,其它肽段没有展现出肽段的生物活性随分子量的增大而降低,所以肽段的分子量与生物活性没有直接的相关性。可以看到预测得分较高的寡肽多集中在含有 2~3 个氨基酸序列小分子肽之间。水溶性好的多肽都含有极性氨基酸。

蛋白质和多肽是食用藻类中重要的生物营养物质,具有多种保健功效和生物活性,如促进外源营养成分的消化和吸收、抗光老化、抗肿瘤、抗氧化等<sup>[22]</sup>。大部分寡肽被肽酶再次水解为二肽和三肽,由 PepT1 转运至细胞内,而后被细胞内肽酶水解为游离氨基酸,进而通过细胞途径和载体转运系统完整吸收进入体循环。多数被吸收的小分子肽都被血管内皮组织肽酶和可溶性血浆肽酶分解为氨基酸<sup>[1]</sup>。

目前,影响口服肽生物利用度的两个重要因素是肽对胃肠道酶降解的抵抗及其通过肠细胞定向运输的效率。肠道中二肽和三肽的主要转运途径是 PepT1 介导的转运系统,四肽和五肽则主要通过细胞旁紧密连接途径转运<sup>[23]</sup>。一些报道发现,某些具有 2~8 个氨基酸残基的肽可抑制 DPP-IV,其活性受序列长短、疏水性、氨基酸组成等各种因素影响<sup>[24]</sup>。因此,现有研究往往选用肽链长度在 2~8 之间的寡肽开展蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 分子对接研究。

使用在线工具 Innovagen 和 ToxinPred 程序来分别对筛选出来的具有生物化学潜力的寡肽进行水溶性预测以及预测所选肽段的毒性、测定分子量等其他理化数据,具体结果如表 3 所展示。结果发现所选用的寡肽均无毒无害,这很有可能和构成肽段的氨基酸的种类以及其结构相关。采用 ToxinPred 对所选寡肽进行毒性预测,发现所挑选的肽段均无毒,可进一步用作食品药品方面的研究。另外,肽段的亲水性的负值越大代表其亲水能力越强;正值越大则代表其疏水能力越强<sup>[26]</sup>。

## 2.3 分子对接结果分析

近年来,分子对接(Molecular Docking)技术作

为探究关蛋白-配体的结合状态、食品功能性成分作用位点、农兽药作用机理的一种新兴技术,因能克服科学实验存在的局限性,在食品领域的应用日益广泛。Auwal 等使用 Schrödinger 软件对石头鱼蛋白的水解产物抑制肽与血管紧张素转化酶(Angiotensin Converting Enzyme, ACE)进行分子对接,从分子水平上解释了这些抑制肽的 ACE 抑制作用。步营借助 Discovery Studio 软件筛选抗 SARS-CoV-2 海洋活性肽,并分析了分子间的相互作用<sup>[18]</sup>。该技术利用计算机模拟程序把配体小分子放在受体活性位点处,按照几何互补和能量互补的原则,通过打分函数筛选出配体与受体间的最佳结合模式<sup>[27]</sup>。

HPEPDOCK (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/>)是一款模拟蛋白-多肽对接的在线工具。Weng 等<sup>[28]</sup>测试了 14 种常见对接软件,包括:三个蛋白-蛋白对接软件(ZDOCK、FRODOCK and HawkDock),三个蛋白-小分子对接软件(GOLD、Surflex-Dock and AutoDock Vina),以及八个蛋白-多肽对接软件(GalaxyPepDock、MDockPeP、HPEPDOCK、CABS-dock、pepATTRACT、DINC、AutoDock CrankPep (ADCP)、HADDOCK peptide docking)。发现在全局对接中,HPEPDOCK 的表现优于其他的对接软件,因此,本研究选择 HPEPDOCK 软件进行分子对接。基于该软件,本研究最终筛选出四个分子对接评分 $\leq -150$ 的寡肽(PAGR、PAR、IDQW、DISAW),且将这四个寡肽认为是的具有较高蛋白酶激活受体 2 抑制潜力超高亲和肽。

将经过胃肠道消化模拟水解酶切后且通过生物信息学工具筛选的寡肽与蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 进行分子对接。对接得分 $< -100$ 被认为是具有亲和能力的寡肽,用  $F$  值来评价食源性藻类蛋白质对蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 的潜在抑制能力。结果表 2 所示,发现小球藻的精氨酸脱羧酶蛋白的  $F$  值最高为 1.60%,其次是超氧化物歧化酶和藻红蛋白,均为 1.50%。 $F$  值越高,说明这三种食用藻蛋白的蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 的潜在抑制能力优于本文研究的其他食用藻蛋白,酶解后更容易获得高亲和力的寡肽,这三种蛋白广泛存在于常见食用藻类中,相对含量较高,它们是筛选蛋白酶激活受体 2 抑制肽的主要优势。

### 2.3.1 分别以抑制剂 8TZ 和 8UN 为参照的对接结果

在 HPEPDOCK 软件中分别以抑制剂 8TZ 和 8UN 为参照,经过胃肠道消化模拟和水解酶切后且通过生物信息学工具筛选的寡肽与蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 进行分子对接,分子对接结果如表 5 所示。

表5 分子对接结果

Table 5 Results of molecular docking

以 8TZ 为参照		以 8UN 为参照	
肽段序列	对接分数	肽段序列	对接分数
DW	-131.14	DW	-122.18
TDW	-138.53	TDW	-128.26
DSW	-141.45	DSW	-128.85
IDQW	-130.45	IDQW	-152.95
IGDW	-116.79	IGDW	-138.87
ACEF	-104.97	ACEF	-114.64
PR	-136.99	PAGR	-113.76
EF	-114.17	DSSF	-107.94
SM	-100.36	IAPDM	-112.22
DF	-103.16	DISAW	-154.48
SCR	-135.92	AEGDF	-105.13
PAR	-163.93	GIDGPF	-141.11
DAF	-118.19	EPCGPY	-138.87
GEF	-108.99	DIGGGL	-104.56
CAR	-142.12	AGDPSIL	-121.04
SDF	-115.84		
DPR	-101.87		
IGR	-140.81		
QGPN	-117.97		
GCSR	-138.29		
PAGR	-165.80		

本研究通过 LigPlus 软件分析研究螺旋藻蛋白源寡肽与 PAR2 的结合能力, 以及参与相互作用的疏水残基和氢键和以抑制剂 8TZ 为参照的对接结果发现, 分子对接分数最高的寡肽是来自精氨酸脱羧酶的 PAGR (-165.80), 且多肽主要与其 PAR2 氨基酸序列

上的 His227、Leu151 形成氢键相互作用, 以及与 Ile327、Tyr82、His135、Leu78、Tyr134、Cys226、Ile152、Lys131、Thr334、Trp127、Phe155、Ser124、Phe155、Asn158、Asn336、Phe128、Asp228 形成疏水作用。另外, PAGR 与抑制剂 8TZ 有 8 个相同结合位点 (Ile327、His227、Asp228、His135、Leu78、Tyr82、Phe155、Cys226), 其中有 5 个是相同的疏水残基位点 (Ile327、His135、Leu78、Phe155、Cys226); PAR 与抑制剂 8TZ 形成 8 个相同的疏水作用位点 (Tyr82、His227、Leu78、Phe155、Phe327、Cys226、Lys131、Tyr134) 和一个相同的氢键 (Asp228), 综合认为 PAR 成为 PAR2 抑制肽的潜力较高。

以抑制剂 8UN 为参照的对接结果发现, 对接分数最高的寡肽是来自蛋白质光敏色素 C 氧化酶的 DISAW (-154.48), 且多肽主要与其 PAR2 氨基酸序列上的 Ala157、Cys161、Leu123、Phe154、Tyr210、Trp199、Leu203、Ile202、Leu196、Leu200 形成疏水相互作用, 没有形成氢键作用。而 IDQW 与抑制剂 8UN 形成由 8 个疏水氨基酸残基 (Cys161、Asn158、Ala157、Leu123、Leu203、Trp199、Phe154、Ala120) 参与的疏水相互作用。因此, 综合认为寡肽 DISAW 相较 IDQW 对 PAR2 的抑制潜力无明显差异。

### 2.4 分子对接结果的可视化

根据以上的分子对接结果, 将分子对接评分 ≤ -150 的寡肽视为超高亲和, 使用 PyMol 软件对受体和寡肽进行处理, 构建对接复合物的三维空间结构以及分子间作用力。LigPlus 软件分析超高亲和力寡肽与 PAR2 受体结合的疏水残基和氢键作用, 分析结果如表 6、图 2~5 所示。

表6 超高亲和寡肽与蛋白酶激活受体的相互作用力

Table 6 Interactions between ultrahigh affinity oligopeptides and protease activated receptors

配体	疏水作用	氢键作用
8TZ	Phe155、His227、Cys226、Trp141、Tyr134、Lys131、Leu330、Ile327、Leu78	His135、Tyr82、Asp228
PAGR(8TZ)	Ile327、Tyr82、His135、Leu78、Tyr134、Cys226、Ile152、Lys131、Thr334、Trp127、Phe155、Ser124、Asn158、Asn336、Phe128、Asp228	His227、Leu151
PAR(8TZ)	Tyr82、His135、Leu330、Trp127、Lys131、Tyr134、Leu154、Phe128、Tyr156、Cys226、His227、Ser124、Leu78、Phe155、Cys331、Ile152、Ile327、Leu151	Asp228
8UN	Asn158、Trp199、Ala157、Cys161、Ala120、Leu203、Val211、Tyr210、Leu123、Phe154	无
IDQW(8UN)	Cys161、Asn158、Ala157、Leu123、Leu203、Trp199、Phe154、Ala120、Leu200、Leu196、Ser195、Ile112、Asn116	无
DISAW(8UN)	Ala157、Cys161、Leu123、Phe154、Tyr210、Trp199、Leu203、Ile202、Leu196、Leu200	无

注: 括号内为分子对接时作为参照的小分子配体。



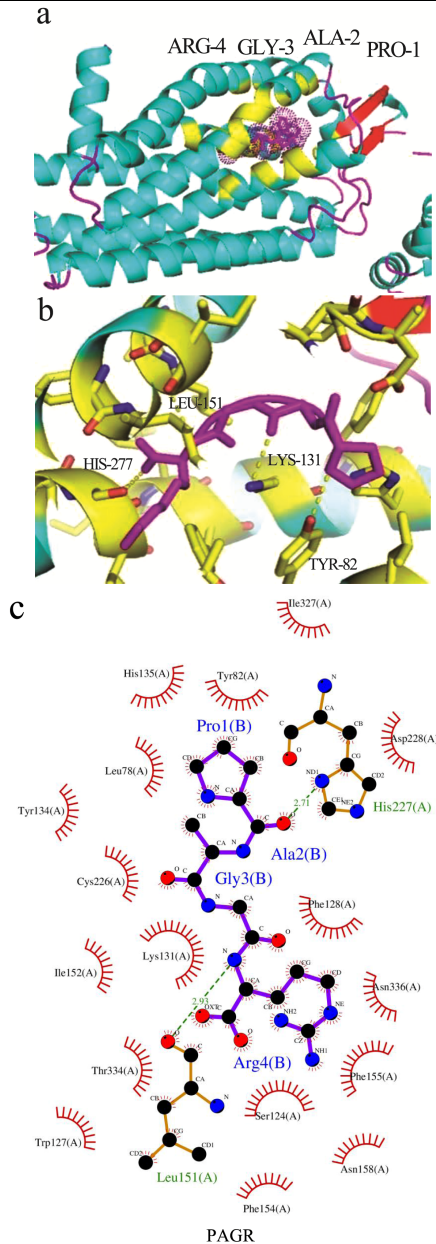


图2 蛋白酶激活受体2 (PAR2) 与超高亲和肽 PAGR 结合的图像  
Fig.2 Image of PAR2 binding to the ultra-high affinity peptide with sequence of PAGR

注: a 为结合的位置; b 为结合的氢键作用力; c 为结合的2D 结构。下图同。

分子对接是依据配体和受体之间的“钥匙与锁”的识别关系来模拟小分子配体和大分子受体之间的相互作用力, 其从分子层面来解释 PAR2 与 PAGR、PAR、IDQW 以及 DISAW 的作用机制。计算机分子模拟技术作为强大的科学研究工具, 可研究分子间相互作用, 指导新产品的研发。利用分子对接技术可以清晰地了解活性肽和受体蛋白的对接位点及二者之间存在的相互作用力, 从而分辨出肽段的生物活性和有效性<sup>[29]</sup>。PAR2 具有规范的跨膜螺旋结构, 目前已有研究表明 PAR2 拮抗剂可以有效通过抑制受体激活和信号传导

所需的结构重排、阻断激活配体进入结合位点两种方式发挥作用<sup>[8]</sup>。

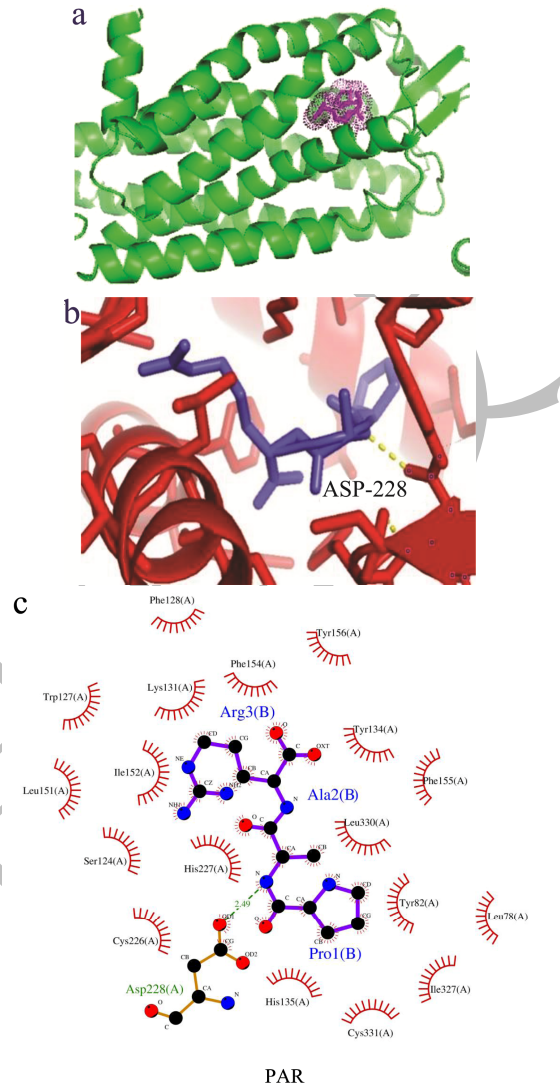
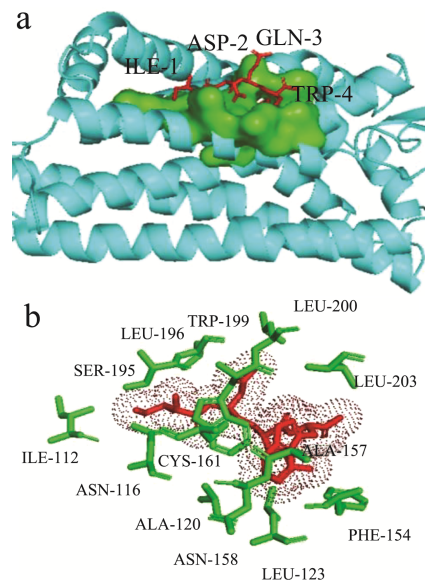


图3 蛋白酶激活受体2 (PAR2) 与超高亲和肽 PAR 结合的图像  
Fig.3 Image of PAR2 binding to the ultra-high affinity peptide with sequence of PAR



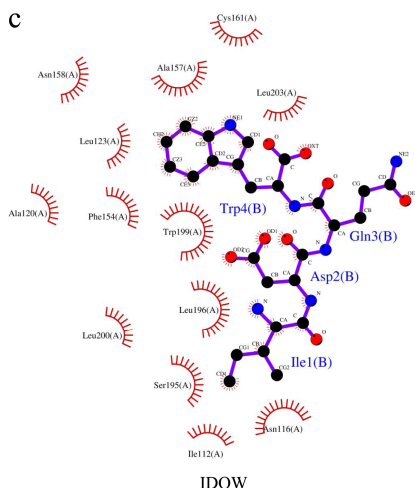


图4 蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 与超高亲和肽 IDQW 结合的图片  
Fig.4 Image of PAR2 binding to the ultra-high affinity peptide with sequence of IDQW

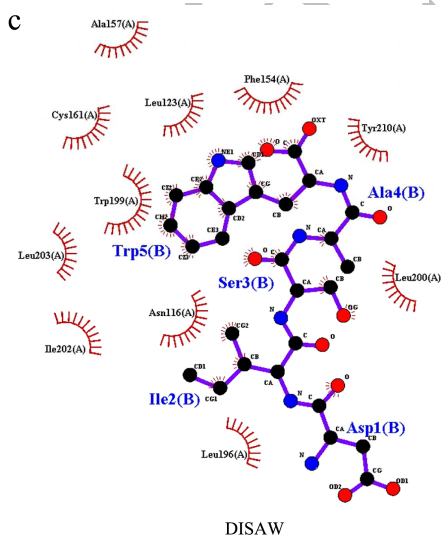
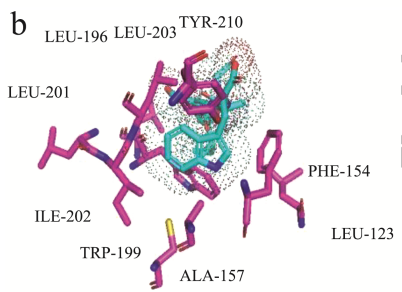
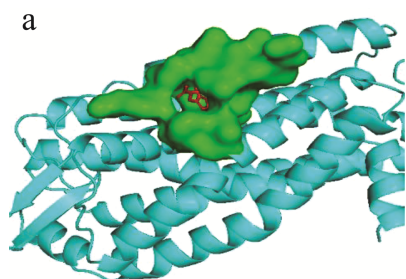


图5 蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 与超高亲和肽 DISAW 结合的图片  
Fig.5 Image of PAR2 binding to the ultra-high affinity peptide with sequence of DISAW

### 3 结论

食用藻类被认为是绿色健康的食品，其蛋白质含量高于 10%，其中螺旋藻蛋白更是符合人体氨基酸比例需求的优质蛋白，且蛋白质含量超过藻干粉质量的 65% 以上。但我国当下藻类产业链的附加价值不高，综合经济效益逐年下降。基于目前活性多肽的研究路线基本上遵循蛋白质提取→酶解条件优化→活性多肽分离纯化→活性测定→结构鉴定研究途径，不仅耗时费力，而且在反复分离纯化过程中活性肽含量损失严重。因此，生物信息学协同实际实验手段开发活性生物肽的方法正成为当前的研究热点。

本研究主要利用生物数据库以及基于计算机模拟的多肽-蛋白分子对接技术，模拟酶解食用藻类来源的蛋白质制备小分子活性肽，预测分析寡肽片段的生物活性，并开展其水溶性和毒性等理化性质评估，最后开展小分子寡肽与蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 晶体结构的分子对接研究，从而筛选与蛋白酶激活受体 2 结合能力较高的食用藻蛋白质源寡肽，理论上分析小分子寡肽抑制蛋白酶激活受体 2 的潜在活性和作用机制。结果显示，食用藻蛋白源寡肽 PAGR、PAR、IDQW、DISAW 与蛋白酶激活受体 2 具有较高的结合潜力。研究成果为藻类蛋白的开发利用以及蛋白酶激活受体 2 (PAR2) 抑制剂的发掘提供参考依据，也为未来的体内和体外实验研究提供了理论指导。

### 参考文献

- [1] 王宁,令狐恩强.寡肽吸收的研究进展[J].中华胃肠内镜电子杂志,2018,5(4):167-173.
- [2] 黄婷婷,严彩红,王玲,等.小分子肽口服营养补充在重型新型冠状病毒肺炎患者中的应用[J].中国食物与营养,2021,27(3):76-80.
- [3] 汤道玲,袁海星,徐强.小分子活性肽的营养研究进展[J].中国牧业通讯,2004,24:62-64.
- [4] Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: marine pharmacology [J]. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2016, 8(2): 83-91.
- [5] Yao Y S, Luo Z, Zhang X W. In silico evaluation of marine fish proteins as nutritional supplements for COVID-19 patients [J]. Food & Function, 2020, 11(6): 5565-5572.
- [6] Ramos-Romero S, Torrella J R, Pages T, et al. Edible microalgae and their bioactive compounds in the prevention and treatment of metabolic alterations [J]. Nutrients, 2021, 13(2): 563.
- [7] Parmar H, Hati S, 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.
- [8] 李超,胡晋红.以蛋白酶活化受体 2 为靶点的药物研究进展[J].*药理学报*,2016,51(3):362-366.
- [9] 安国松,高永红.蛋白酶激活受体 2 与骨癌患者疼痛程度的相关性研究[J].*中国肿瘤临床与康复*,2021,28(10):1216-1219.
- [10] 宋佳,李昕,张晓岚.蛋白酶激活受体在免疫炎症性疾病中的研究进展[J].*胃肠病学和肝病学杂志*,2022,31(2):230-233.
- [11] 李宇佳,陆红丽,黄旭,等.蛋白酶激活受体 2 对糖尿病小鼠结肠运动的影响[J].*上海交通大学学报(医学版)*,2019,39(11):1255-1260.
- [12] Macfarlane S R, Seatter M J, Kanke T, et al. Proteinase-activated receptors [J]. *Pharmacological Reviews*, 2001, 53(2): 245-282.
- [13] Aleena A, Pan Wenan, Joann T. GPCRs in cancer: Protease-activated receptors, endocytic adaptors and signaling [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1886.
- [14] Coughlin S R, Camerer E. Participation in inflammation [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 111(1): 25-27.
- [15] Zheng Y, Jin R, Zhang X, et al. The considerable environmental benefits of seaweed aquaculture in China [J]. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, 2019, 33: 1203-1221.
- [16] Yang X X, Wang K, Liu Q, et al. Discovery of monoamine oxidase A inhibitory peptides from hairtail (*Trichiurus japonicus*) using *in vitro* simulated gastrointestinal digestion and *in silico* studies [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 101: 104032.
- [17] 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.
- [18] 步营,刘瑛楠,何玮,等.基于分子对接技术筛选抗 SARS-CoV-2 海洋活性肽的研究[J].*包装与食品机械*,2021, 39(4):18-23.
- [19] 叶贤江,苏志琛,林晓娟,等.基于生物信息学与分子对接技术对坛紫菜降血压肽的筛选及活性分析[J].*食品科学*,2021, 42(24):140-148.
- [20] 石嘉恂,梁富强,张太,等.基于生物信息学稻米半胱氨酸蛋白酶抑制剂来源生物活性肽的虚拟筛选及分子对接研究[J].*中国粮油学报*,2021,36(2):1-8.
- [21] Jimsheena V K, Gowda L R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion [J]. *Food Chemistry*, 2010, 125(2): 561-569.
- [22] 曾巧辉.螺旋藻蛋白源生物活性肽的制备及其抗皮肤光老化机理研究[D].广州:华南理工大学,2016.
- [23] Seong Min H, Mitsuru T, Riho K, et al. Structural design of oligopeptides for intestinal transport model [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(10): 2072-2079.
- [24] Kska P, Stadnik J. Structure-activity relationships study on biological activity of peptides as dipeptidyl peptidase IV inhibitors by chemometric modeling [J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2020, 95(2): 291-301.
- [25] 何泽贺,陈笑迎,郭明珠,等.大鳞副泥鳅蛋白中血管紧张素转化酶抑制肽的计算机模拟评估[J].*食品研究与开发*,2022, 43(3):42-50.
- [26] Auwal S M, Zainal Abidin N, Zarei M, et al. Identification, structure-activity relationship and *in silico* molecular docking analyses of five novel angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from stone fish (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0197644.
- [27] Cynthia, Chatterjee, Stephen, et al. Soybean bioactive peptides and their functional properties [J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1211-1211.
- [28] Weng G, Gao J, Wang Z, et al. Comprehensive evaluation of fourteen docking programs on protein-peptide complexes [J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2020, 16(6): 3959-3969.
- [29] 张颖.牛、羊乳酪蛋白源 DPP-IV 抑制肽的制备、鉴定及抑制机理研究[D].中国农业大学,2016.