

生姜蛋白酶水解产物中二肽基肽酶-IV抑制肽的虚拟筛选及活性分析

刘芬娣¹, 李婧铭², 陈洪娇², 李雪岩², 刘洋², 刘伟^{3*}

(1. 北京语言大学医院, 北京 100083) (2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

(3. 北京卫生职业学院中药与康复系, 北京 101101)

摘要: 根据生姜蛋白酶的水解特异性, 从其水解物中虚拟筛选出高活性肽段, 进行体外活性验证和体内吸收入血成分研究。利用 Peptide Ranker 和分子对接虚拟筛选出高活性肽段, 建立体外酶促反应体系测定活性肽对二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 的抑制活性 (IC_{50}), 并且在此基础上, 引入表面等离子体共振 (SPR) 技术深入研究 DPP-IV 与活性肽的相互作用, 并开展大鼠灌胃实验研究活性肽在胃肠道消化系统中的稳定性。通过计算机模拟, 虚拟筛选得到 Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly (GPSGPXGPXGPXG) DPP-IV 抑制肽。体外酶促实验表明 GPSGPXGPXGPXG 对 DPP-IV 具有较强的抑制作用, IC_{50} 为 457.3 $\mu\text{mol/L}$, SPR 实验进一步表明二者之间具有快速结合和快速解离的动力学过程, 但是大鼠体内实验提示, 该多肽无法维持胃肠道稳定性, 不是以原型形式被消化道吸收, 而是部分以二肽和三肽的形式进入血液循环系统, 包括 Pro-Hyp、Gly-Pro-Hyp 和 Pro-Hyp-Gly 等寡肽。该研究表明筛选得到的活性肽口服经消化道吸收后无法保持结构完整性, 会被体内的肽酶水解, 这为后续进行体内的药代动力学和药效学研究提供理论支撑。

关键词: 生姜蛋白酶; 虚拟筛选; 药靶结合动力学; 表面等离子体共振技术

文章编号: 1673-9078(2024)05-34-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0658

Virtual Screening and Activity Evaluation of Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Peptides from Ginger Protease Hydrolysates

LIU Fend¹, LI Jingming², CHEN Hongjiao², LI Xueyan², LIU Yang², LIU Wei^{3*}

(1. Beijing Language University Hospital, Beijing 100083, China)(2. Department of Chemistry of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)(3. Department of Traditional Chinese Medicine and Rehabilitation, Beijing Health Vocational College, Beijing 101101, China)

Abstract: Based on the hydrolysis specificity of ginger protease, highly bioactive peptide segments were virtually screened from the hydrolysates, followed by validation of *in vitro* activity and investigation of *in vivo* absorption into blood. First, highly active peptide segments were virtually screened through Peptide Ranker and molecular docking. Next,

引文格式:

刘芬娣, 李婧铭, 陈洪娇, 等. 生姜蛋白酶水解产物中二肽基肽酶-IV抑制肽的虚拟筛选及活性分析[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5): 34-42.

LIU Fendi, LI Jingming, CHEN Hongjiao, et al. Virtual screening and activity evaluation of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from ginger protease hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 34-42.

收稿日期: 2023-06-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (8197131426)

作者简介: 刘芬娣 (1974-), 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向: 中药有效部位分析、中药药理及中药临床合理应用研究, E-mail: dequanli@163.com

通讯作者: 刘伟 (1998-), 女, 硕士, 研究方向: 中药鉴定技术及食品研究, E-mail: L18811190305@163.com

an *in vitro* enzyme-catalyzed reaction system was established to determine the inhibitory activity (IC_{50}) of active peptides against dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). Based on this, surface plasmon resonance (SPR) was introduced to investigate the interactions between DPP-IV and active peptides. Finally, oral administration experiments in rats were conducted to study the stability of active peptides in the gastrointestinal tract. Through computer simulation, the DPP-IV inhibitory peptide Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly (GPSGPXGPXGPXG) was obtained via virtual screening. Moreover, the *in vitro* enzyme-catalyzed experiments showed that GPSGPXGPXGPXG has strong inhibitory effects against DPP-IV, with an IC_{50} of 457.3 $\mu\text{mol/L}$. SPR experiments further revealed fast binding and dissociation kinetics between the two peptides. However, *in vivo* experiments in rats suggested that GPSGPXGPXGPXG is not stable in the gastrointestinal tract and it is not absorbed intact, but it is partially absorbed into the circulatory system in the form of dipeptides and tripeptides, including oligopeptides like Pro-Hyp, Gly-Pro-Hyp, and Pro-Hyp-Gly. This study demonstrates that the bioactive peptides obtained via screening cannot maintain their structural integrity after oral absorption through the digestive tract and are hydrolyzed by peptidases in the body. The findings provide theoretical support for subsequent pharmacokinetic and pharmacodynamic studies *in vivo*.

Key words: ginger protease; virtual screening; drug-target binding kinetics; surface plasmon resonance technique

二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl Peptidase IV, DPP-IV) 是位于细胞表面的一种丝氨酸外肽酶, 可酶切去除多肽的 N 端 X-Pro 或 X-Ala 二肽^[1]。如图 1 所示, 在血糖调节的过程中, 胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP) 能通过促进胰岛 β 细胞的增殖和分化与抑制胰高血糖素分泌等方式, 促进胰岛素的合成和分泌, 从而降低肝脏中的葡萄糖浓度, 促进肌肉和脂肪细胞对葡萄糖的利用, 最终降低血糖水平^[2]。研究表明, GLP-1 和 GIP 促进胰岛素的分泌量至少占餐后总胰岛素分泌量的 50%。因 GLP-1 和 GIP 的 N 端第 2 个氨基酸为 Ala, 容易被 DPP-IV 降解而迅速失活, 失去促胰岛素分泌等活性^[3], 从而无法发挥血糖调节功能, 其半衰期很短 (约 1~2 min)。因此, 抑制 DPP-IV 活性已成为 2 型糖尿病治疗的重要方向之一^[4]。

食品来源的 DPP-IV 抑制肽因其安全性高、稳定性好及副作用少而受到广泛关注。越来越多的研究表明, 食物来源的蛋白质和多肽可以作为 DPP-IV 抑制剂的天然来源, 包括牛奶、燕麦和大米等^[5-7]。学者们通过对 DPP-IV 抑制肽构效关系分析发现, 其在结构组成上存在一定的规律。具体来说, N 端含有倒数第二个 Pro 或 Ala 残基的多肽可作为 DPP-IV 抑制剂^[8,9]。

酶解法反应条件温和, 具有重复性好、工艺简单、环境友好等优点, 是从食物蛋白质中生产制备多肽的最有效方法^[10]。其中, 酶的种类是影响活性肽生成的最主要因素。不同种类的蛋白酶具有不同的底物特异性和催化机制, 其在一蛋白质中裂解多肽链的特定位置时会释放出不同的氨基酸序列片段^[11,12]。生姜蛋白酶作为从生姜中提取的一种新

型胶原蛋白水解酶, 能将胶原蛋白大分子水解成小分子低聚肽, 然而, 目前其商业价值尚未得到充分开发。值得关注的是, 生姜蛋白酶能特异性识别 P_2 位点的 Pro 残基, 推测其水解生成的多肽符合 DPP-IV 抑制肽的结构特征, 且课题组前期研究发现, 生姜蛋白酶水解鱼皮明胶制备的酶解产物中, 鉴定的 136 条多肽具有上述结构特征的多肽比例为 40.44%。已有研究表明, Yuki 等^[13]根据生姜蛋白酶优先断裂 P_2 位的 Pro 残基, 其水解制备的新型面筋水解物中可作为 2 型糖尿病患者的功能性食品。传统 DPP-IV 抑制肽的筛选方法费时、费力、效率低。

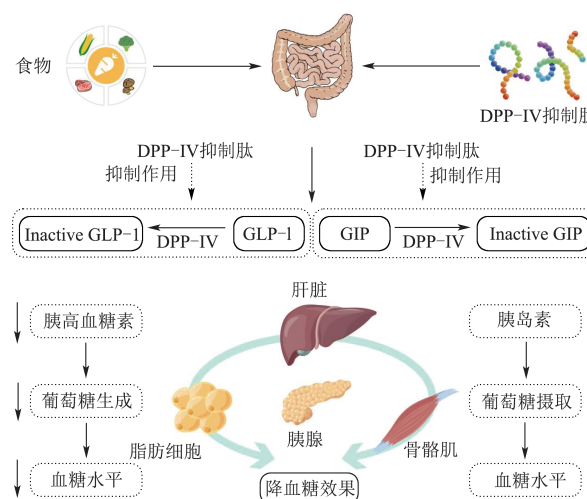


图 1 DPP-IV 抑制肽降血糖作用的机制

Fig.1 Mechanism of hypoglycaemic effect of DPP-IV inhibitory peptides

随着技术的发展, 生物信息学工具已被广泛用于筛选活性多肽^[14,15]。因此, 基于本课题组利用 LC-MS/MS 技术结合数据库分析方法鉴定的 136 条

肽段, 首先通过分子对接等方法虚拟筛选出最强的 DPP-IV 抑制肽, 然后开展酶抑制和动力学实验确定活性肽对 DPP-IV 的抑制作用和抑制类型, 接着利用表面等离子体共振 (SPR) 技术深入研究活性肽和 DPP-IV 的相互作用, 最后开展大鼠灌胃实验研究活性肽在体内的胃肠道稳定性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 生产许可证号: SCXK (京) 2019-0004。所有动物研究均遵循《北京中医药大学实验动物伦理委员会章程》, 并经北京实验动物中心动物伦理委员会批准 (批准号: BUCM-4-2021122801-4116)。大鼠饲养于昼夜节律光照条件下 (温度 25~27 °C, 相对湿度 50%~70%), 实验前适应性饲养 7 d, 自由进食进水。

1.2 实验仪器

MultiSkan FC 酶标仪, 美国 Thermo 公司; BT25S 电子天平, 德国 Sartorius 公司; FE28 型 pH 计, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; Biacore T200 表面等离子共振仪, 美国 GE Healthcare 公司; Vanquish Horizon 超高液相色谱仪, 美国 Thermo 公司; Q Exactive™ Plus 组合型四极杆 Orbitrap™ 质谱联用仪, 美国 Thermo 公司; KQ5200E 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; QL-866 涡旋混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 1-15PK 高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; LC-DCY-24SY 水浴氮吹浓缩仪, 上海力辰邦西仪器科技有限公司。

1.3 药物和试剂

Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly (批号 TP-WY-4728, 纯度: 95%), 购于上海淘普生物科技有限公司; Pro-Hyp (批号 P210414-L3, 纯度: 96.78%)、Gly-Pro-Hyp (批号 P210414-L4, 纯度: 98.66%) 和 Pro-Hyp-Gly (批号 P210414-L2, 纯度: 98.62%), 均购于南京莱昂生物科技有限公司; DPP-IV (Prospec, 批号 1022PDPP4)、甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺盐酸盐 (Gly-Pro-pNA, 批号 M0329C), 大连美仑生物技术有限公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 批号 0922S073), 北京索莱宝科技有限公司; 西格列汀

(批号 C12694673), 上海麦克林生化科技有限公司; 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na, 批号 20170314), 天津市光复科技发展有限公司; 三氟乙酸 (TFA, 色谱纯, 批号 192556) 和乙腈 (质谱纯, 批号 215625), 均购于美国 Thermo 公司; CM-5 芯片 (批号 10305570)、氨基偶联试剂盒 (批号 32174)、醋酸钠 pH 值 5.0 (批号 32429) 和 10×PBS-P+ 缓冲液 (批号 272707), 均购于美国 GE Healthcare 公司, 其他试剂均为实验室常规试剂。

1.4 方法

1.4.1 虚拟筛选

质谱采集的原始数据文件通过 PEAKS 软件进行数据分析, 共鉴定出 136 个肽段 (Supplementary Materials Table S1), 可从 <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27155001/s1> 获取, 利用 Peptide Ranker 在线网站对已鉴定肽段进行生物活性可能性分析, 选择 Score ≥ 0.9 的肽段作为潜在的生物活性肽。为了进一步评估这些肽段的生物特性, 将其提交给 ToxinPred 网站进行毒性分析。

选取 Peptide Ranker score ≥ 0.9 的肽段进行分子对接, 在 ChemDraw 21.0.0 中绘制多肽的 2D 结构, 将其复制到 Chem3D 21.0.0 中使用 MM2 力场进行能量最小化处理。Discovery Studio 2019 软件的 LibDock 模块用于分子对接。从 RCSB 蛋白质数据库中获得 DPP-IV 的晶体结构 (PDB ID: 6B1E, 活性部位结合抑制剂 Vidagliptin)。半径被设置为 12, 对接结果按 LibDock 分数排序。此外, 将原配体 (Vidagliptin) 对接到 DPP-IV (PDB ID: 6B1E) 的活性口袋中, 计算均方根偏差 (Root Mean Square Deviation, RMSD)。

1.4.2 DPP-IV抑制肽的体外活性及抑制类型的确定

采用以 Gly-Pro-pNA 为底物的发色底物法测定 DPP-IV 抑制活性。优化反应体系加酶量、底物浓度和反应时间等参数, 确定 DPP-IV 抑制肽体外筛选模型的反应条件, 随后检测化学合成肽的 DPP-IV 抑制活性, 待测多肽样品溶于 Tris-HCl 缓冲液中配制成一定浓度溶液。在 96 孔酶标板中, 40 μ L 待测样品与 20 μ L 3 mmol/L 的底物 (Gly-Pro-pNA), 混合均匀后在 37 °C 下孵育 10 min, 加入 40 μ L DPP-IV 酶液 (0.4 mg/L), 混匀后在 37 °C 精确反应 30 min, 使用酶标仪在 405 nm 波长下检测吸光值的变化。每组平行三次, 以西格列汀为阳性对照。

$$B = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}}}{A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{阴性空白对照}}}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B ——DPP-IV 抑制率, %;

$A_{\text{样品}}$ ——样品液 + 底物 + DPP-IV, Abs;

$A_{\text{样品空白}}$ ——样品液 + 缓冲液 + 底物, Abs;

$A_{\text{阴性对照}}$ ——DPP-IV + 缓冲液 + 底物, Abs;

$A_{\text{阴性空白对照}}$ ——缓冲液 + 底物, Abs。

以不同浓度的 Gly-Pro-pNA 为底物 (0.20、0.33、0.50、0.67 和 0.8 mmol/L), 分别加入不同浓度的抑制剂溶液, 根据优化的反应条件进行试验, 在 405 nm 下测定其吸光度值, 分别检测不同抑制剂浓度在不同底物浓度下的吸光度值, 再以反应速度的倒数对底物浓度的倒数作图。

1.4.3 基于 SPR 技术分析抑制肽与 DPP-IV 的相互作用

使用氨基偶联试剂, 流经 CM-5 芯片的通道以活化芯片表面, 将 DPP-IV 固定在 CM-5 芯片上, 直到响应值达到 8 000 RU, 芯片表面未反应部分使用乙醇胺封闭, 对于参比通道, 只活化封闭芯片表面, 不固定 DPP-IV, 以消除抑制肽与芯片表面的非特异性结合, 使用 Biacore T200 仪器以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将固定化的 DPP-IV 与不同浓度的多肽溶液接触, 进行结合动力学实验, 每次循环后, 用 0.1 mol/L NaOH 再生芯片表面。

1.4.4 DPP-IV 抑制肽体内入血二肽和三肽鉴定

1.4.4.1 计算机模拟胃肠道消化

采用 Peptide Cutter (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) 通过计算机模拟胃肠消化, 预测 DPP-IV 抑制肽在消化后的理论多肽序列, 模拟酶解的水解酶为胃蛋白酶 (pH 值 1.3) 和胰蛋白酶。

称取 GPSGPXGPXGPXG 适量, 去离子水溶解备用。随机选取 4 只禁食 12 h (不禁水) 的 SD 大鼠, 灌胃 2.4 g/kg, 分别于 0.5 和 1 h 从腹主动脉收集血液, 将给药收集后的血样和空白血样于 4 $^{\circ}\text{C}$, 860 \times g 离心 5 min 取上清, 血浆用三倍体积冰乙醇脱蛋白, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 14 000 \times g 离心 10 min 取上清液, 氮气吹干后, 0.01% TFA 复溶, 经 3K 超滤膜过滤后, 进行液质分析。

1.4.4.2 DPP-IV 抑制肽大鼠灌胃实验

液相条件: 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.01% TFA (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱 (0~4 min, 0% B; 4~9 min, 0%~25% B; 9~9.01 min, 25%~80% B; 9.01~10 min, 80% B; 10~13 min, 80%~0% B; 13~17 min, 0%B); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.3 mL/min; 进样体积: 6 μL 。

1.4.4.3 液质条件

质谱条件: 采用 Q Exactive Plus 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪, 电喷雾离子源 (HESI), 正离子检测模式; 扫描范围 50~750 m/z ; 辅助气温度 (Aux Gas Heater Temp): 400 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压 (Spray Voltage): +3.5 kV; 离子传输毛细管温度 (Capillary Temp): 320 $^{\circ}\text{C}$; 扫描模式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率为 70 000, dd-MS² 分辨率为 17 500; 碰撞能 (NCE) 为 20、40、60 eV。

注: X: Hyp。

表 1 多肽的生物活性预测与分子对接结果

Table 1 Predicted biological activity of peptides and molecular docking results

序号	修饰肽	分子式	长度	分子量	Peptide Ranker 打分	-Libdock 打分	ToxinPred	t_R/min
1	GPPGPPGPGP	C ₃₈ H ₅₆ N ₁₀ O ₁₁	10	828.413	0.95	197.269	Non-toxicity	18.70
2	GPXGPPGPGP	C ₃₈ H ₅₆ N ₁₀ O ₁₂	10	844.403	0.95	221.210	Non-toxicity	16.47
3	GPXGPXGPGP	C ₃₈ H ₅₆ N ₁₀ O ₁₃	10	860.392 9	0.95	196.026	Non-toxicity	13.71
4	GPSGPXGPXGPXG	C ₄₈ H ₇₁ N ₁₃ O ₁₈	13	1 117.489 1	0.94	236.877	Non-toxicity	12.46
5	GPSGFXGPK	C ₃₉ H ₅₈ N ₁₀ O ₁₂	9	858.418 6	0.94	211.328	Non-toxicity	13.97
6	PGXGGPXGPXG	C ₄₀ H ₅₉ N ₁₁ O ₁₅	11	933.404 4	0.94	211.979	Non-toxicity	10.87
7	GPXGLXGPXGPA	C ₄₇ H ₇₂ N ₁₂ O ₁₆	12	1 060.504 2	0.92	213.664	Non-toxicity	24.47
8	GPXGLXGPPGPA	C ₄₇ H ₇₂ N ₁₂ O ₁₅	12	1 044.514 2	0.92	197.316	Non-toxicity	28.12
9	GPPVPGPIGP	C ₄₂ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₁	10	886.491 2	0.90	162.707	Non-toxicity	34.97
10	GPXGLXGPPGTP	C ₄₈ H ₇₄ N ₁₂ O ₁₆	12	1 074.5247	0.90	213.004	Non-toxicity	28.56
11	SGPPVPGPIGP	C ₄₅ H ₇₁ N ₁₁ O ₁₃	11	973.523 3	0.90	178.782	Non-toxicity	35.79

注: X: Hyp。

2 结果与讨论

2.1 虚拟筛选

综合运用 LC-MS/MS 技术与计算机辅助分析方法,可高效地从酶解法生成的多肽混合物中鉴定和筛选出新型生物活性肽^[16]。Peptide Ranker 是通过内置 N 到 1 神经网络对肽段进行评分,该算法基于不同生物活性肽功能类别共有的一般特征来预测肽段的生物活性可能性^[17]。本研究设置活性评价阈值为 0.9,筛选得到 11 条肽段(见表 1)。为了评估已鉴定的肽段是否可作为药物设计的候选物,预测的 11 个肽段未显示任何毒性(见表 1)。

如果合成所有多肽序列以确认其活性,不仅费时而且成本昂贵,基于计算机模拟分析的分子对接策略已被广泛应用于筛选具有活性的食品蛋白衍生肽^[18]。DPP-IV 的催化结构域由 Ser 630、Asp 708 和 His 740 组成,其中 DPP-IV 有两个底物结合口袋(S1 和 S2)。S1 口袋由 Tyr 547、Ser 630、Tyr 631、Val 656、Trp 659、Tyr 662、Tyr 666、Asn 710、Val 711 和 His 740 等多个残基组成,其中 Ser 630 和 His 740 参与催化三联体的形成。S2 口袋涉及 Arg 125、Glu 205、Glu 206、Val 207、Ser 209、Arg 358 和 Phe 357 等关键氨基酸残基^[19,20]。

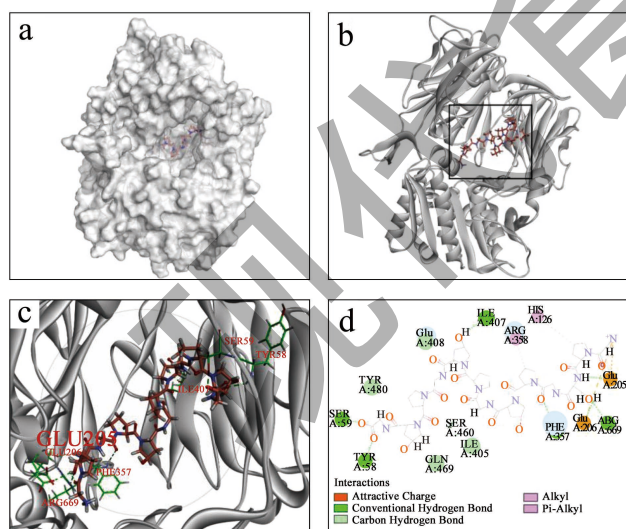


图 2 GPSGPXGPXGPXG (橙色显示) 和 DPP-IV 的分子对接结果

Fig.2 Molecular docking results for GPSGPXGPXGPXG (shown in orange) and DPP-IV

随后采用分子对接技术筛选并研究 11 个候选多肽与 DPP-IV 之间的相互作用。通过原配体 (Vidagliptin) 定义 DPP-IV 靶点的活性中心,包

括 S1 和 S2 口袋,计算对接后构象与原配体结构的 RMSD 为 1.85 Å,小于 2 Å,说明该对接方法及参数设置合理。将 11 候选多肽与受体进行对接,对接完成后,将结果按 LibDock Score 得分由大到小排序,评分越高,表示分子结合越稳定。见表 1 可知,活性肽 Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly (GPSGPXGPXGPXG) 的肽序列评分为 0.94,与 DPP-IV 的结合最为紧密,如图 2 所示, GPSGPXGPXGPXG 可与 DPP-IV S2 口袋的 Glu 205、Glu 206 和 Phe 357 形成氢键。此外末端羰基和 Hyp 的吡咯环分别与 Tyr 58、Ser 59 和 Ile 407 形成氢键。如上所述,这些相互作用力促进 GPSGPXGPXGPXG 与 DPP-IV 活性部位结合,从而发挥抑制作用^[21,22]。

据报道,使用计算机模拟酶解生成的蛋白质水解物中 X-Pro 和 X-Ala 型肽与体外 DPP-IV 抑制率呈正相关 ($r=0.70$)^[23]。Xu 等^[24]采用 OPLC-DA 和 Pearson 相关分析方法阐明鱼皮明胶水解物中 DPP-IV 抑制性肽的结构特征,根据多肽类型和多肽长度进行分类,发现与其他类型的多肽相比, X-Pro 型肽对水解物的 DPP-IV 抑制活性贡献更为显著,这一发现与 DPP-IV 抑制肽的特征相一致^[8,9]。X-Pro 是 DPP-IV 抑制肽中最常见的序列之一,在本研究中, GPSGPXGPXGPXG 序列中观察到 X-Pro,因此选择该条肽段进一步分析。

2.2 DPP-IV抑制肽的体外活性及抑制类型

西格列汀是广泛应用于临床治疗糖尿病的药物,在“1.4.2”下确定的酶促反应体系中,测其 IC_{50} 为 30.0 nmol/L,与文献报道相似^[25]。采用固相合成方法合成潜在 DPP-IV 抑制肽 GPSGPXGPXGPXG,其 IC_{50} 值为 457.3 μ mol/L (图 3a),说明其对 DPP-IV 具有一定的抑制活性。

采用 Lineweaver-Burk 图分析抑制模式(见图 3b),不同浓度的抑制肽 L-B 直线方程相交于第二象限,表明 GPSGPXGPXGPXG 对 DPP-IV 的抑制类型是混合型抑制 (V_{max} 降低和 K_m 增加),可以通过与 DPP-IV 的活性位点及催化位点之外的区域结合,表现出对 DPP-IV 的抑制活性。

研究人员^[26]提出 DPP-IV 抑制肽可以用于治疗 2 型糖尿病,而有的学者认为它是用于缓解 2 型糖尿病的补充剂,而不是抗糖尿病药物的替代品,这是由于已上市 DPP-IV 抑制剂的 IC_{50} 比这些多肽低数百倍^[27]。在本研究中,测定 GPSGPXGPXGPXG

的 IC_{50} 为 $457.3 \mu\text{mol/L}$, 这也与其他研究结果一致^[28], 例如, Gisela 等^[29]利用 LC-MS/MS 技术结合虚拟筛选, 从鸡血水解物中分离出多个 DPP-IV 抑制肽, 包括 GPF ($IC_{50}=0.94 \text{ mmol/L}$)、IGL ($IC_{50}=2.22 \text{ mmol/L}$) 和 GGGW ($IC_{50}=2.73 \text{ mmol/L}$)。

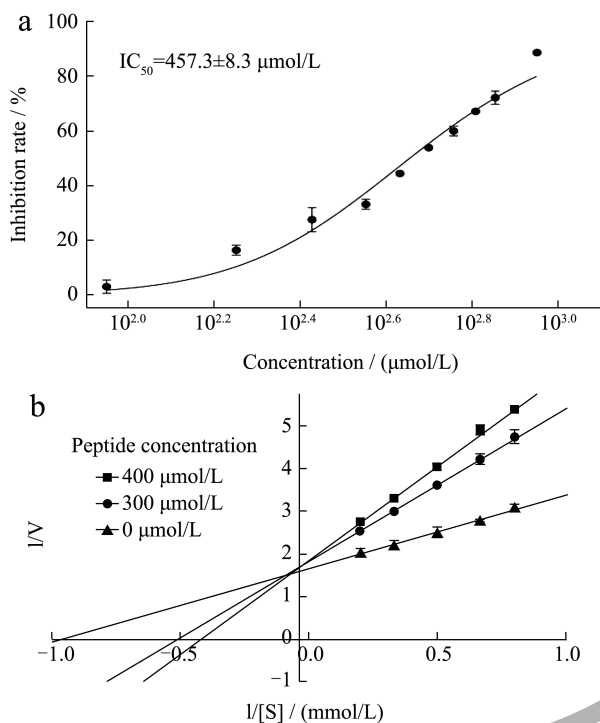


图3 GPSGPXGPXGPXG IC_{50} (a) 和抑制类型 (b)

Fig.3 GPSGPXGPXGPXG IC_{50} (a) and inhibition type (b)

2.3 基于SPR技术分析抑制肽与DPP-IV的相互作用

在药物发现中, 筛选活性化合物是非常重要的步骤, 传统筛选方法主要侧重于 IC_{50} 的优化。然而, IC_{50} 只能反映药物与靶标结合的平衡状态, 忽略了药物与靶标结合和解离的动力学过程^[30,31]。

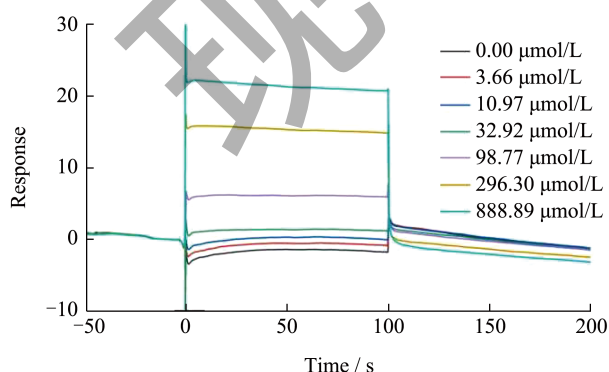


图4 DPP-IV 与 GPSGPXGPXGPXG 的 SPR 传感图

Fig.4 SPR sensing map of DPP-IV with GPSGPXGPXGPXG

本研究首次地将结合动力学参数引入到 DPP-IV 抑制剂的活性评价体系中, 利用 SPR 技术研究了抑

制肽与 DPP-IV 的结合动力学过程。图 4 直观展示了在不同浓度下, GPSGPXGPXGPXG 与 DPP-IV 的 SPR 传感图。随着抑制肽浓度的增加, SPR 动力学曲线呈现出明显的变化趋势, GPSGPXGPXGPXG 表现出对 DPP-IV 的高亲和力, 具有快速结合和快速解离的特点, 测得平衡解离常数 K_D 为 $259.8 \mu\text{mol/L}$, 与体外酶抑制实验测得的 IC_{50} 接近。

根据结构特征, 已上市的 DPP-IV 抑制剂可分为两大类: 拟肽类和非类肽类。例如已上市的维格列汀 (Vildagliptin) 和沙格列汀 (Saxagliptin) 是基于底物衍生的 Gly-Pro 双肽支架发现的拟肽类药物。此外, 地格列汀 ($IC_{50}=22 \text{ nmol/L}$) 是另一种基于吡咯烷的 DPP-IV 抑制剂, 已进入 III 期临床试验。一项先前的研究报道指出, 这些列汀类药物与 DPP-IV 的结合表现出强烈的相互作用, 具有快速结合和缓慢解离的过程, 它们在 DPP-IV 上具有相对较长的驻留时间^[32]。本研究提示 GPSGPXGPXGPXG 与 DPP-IV 之间具有快速结合和解离动力学特征。快速结合过程表明在低剂量下, DPP-IV 快速达到饱和状态, 但快速解离速率表明药物-靶标驻留时间较短, 从而推测抑制肽在体内持续时间较短。尽管 GPSGPXGPXGPXG 未像预期那样呈现出很强的 DPP-IV 抑制活性, 但其具有类似于吡咯烷类的 DPP-IV 抑制剂的结构特征, 可在此基础上, 进行结构修饰并设计合成一系列新型吡咯烷酮类似物, 以获得较长的药物靶标驻留时间, 用于后续的活性筛选和研发。总之, 与经典的活性评价方法 (IC_{50}) 相比, 药物-靶标的整个结合动力学过程更能全面客观地揭示它们之间的相互作用。

2.4 DPP-IV抑制肽体内入血二肽和三肽鉴定

采用 Peptide Cutter 在线网站设定胃蛋白酶 (pH 值 1.3) 和胰蛋白酶为水解酶, 初步探索 GPSGPXGPXGPXG 在胃肠道的水解产物。胃蛋白酶倾向于裂解含有苯丙氨酸和亮氨酸的肽键, 胰蛋白酶倾向于赖氨酸和精氨酸残基。计算机模拟酶解结果显示, 以上两种酶均不能水解 GPSGPXGPXGPXG, 表明其在胃肠道消化过程中可能保持良好的结构稳定性。但该结果不能完全反映体内的实际情况。

为此, 采用大鼠灌胃给药的方法, 探索 GPSGPXGPXGPXG 的体内吸收成分。在 0.5 h, 血浆中检测到 Pro-Hyp、Gly-Pro-Hyp 和 Pro-Hyp-Gly, 但在 1 h 未检测到, 提示 GPSGPXGPXGPXG 可被迅速吸收 (表 2)。LC-MS/MS 结果表明, GPSGPXGPXGPXG 对胃肠

道消化的耐受性较差,在进入血液循环之前不能保持原型形式,部分以二肽和三肽的形式被吸收。

表 2 大鼠灌胃GPSGPXGPXGPXG后入血二肽和三肽鉴定
Table 2 Identification of dipeptides and tripeptides in blood

after gavage of GPSGPXGPXGPXG in rats			
序号	多肽序列	0.5 h	1 h
1	Pro-Hyp	+	-
2	Gly-Pro-Hyp	+	-
3	Pro-Hyp-Gly	+	-
4	GPSGPXGPXGPXG	-	-

注: X: Hyp; +: detected; -: not detected.

尽管目前已鉴定和体外筛选到大量活性多肽,但对其在体内的消化、转运和生物利用度知之甚少。体外实验筛选出的活性肽,其 DPP-IV 抑制活性要转化为体内的情况,必须考虑多肽的生物利用度^[33]。有关多肽的生物利用度评价研究通常涉及细胞培养分析, Caco-2 单层细胞模型能更准确地模拟肠道生理条件,如细胞通透性和各种肠道刷状缘膜酶的表达,被广泛应用于多肽肠道吸收情况的评估^[34,35]。值得注意的是, Caco-2 单层细胞模型虽然能够模拟肠道生理条件,但仅作为一种体外实验方法,其结果需要在体内实验中加以验证。例如,一些较大的多肽,如 Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro^[36]、Trp-Gly-Ala-Pro-Ser-Leu^[37]和 Arg-Val-Pro-Ser-Leu^[38],已被证实可以通过细胞旁途径穿过 Caco-2 细胞单层。然而,口服胶原蛋白水解物或多肽后,血液中并不能检测到一定浓度的多肽序列(≥4 个氨基酸)^[39]。

人体消化是一个复杂的过程,涉及消化酶对膳食成分的协同水解作用。目前关于生物活性多肽的研究大多以体外实验为主,缺乏其在体内的吸收和代谢方面的研究。根据血清药物化学理论,只有被吸收到血液中的成分才有可能发挥生物活性。因此,在胃肠道消化后,生物活性肽应保持结构完整进入血液循环,才能发挥药理作用。目前尚不清楚多肽是否能以原型形式完整地到达靶点并产生明确的药理活性。研究已表明二肽和三肽能够穿过肠道内皮细胞并完整进入血液循环系统^[40-42]。

大鼠灌胃实验表明, GPSGPXGPXGPXG 部分以二肽和三肽的形式进入血液循环系统,因此,我们合理推测其他 DPP-IV 抑制肽口服后,经过胃肠道消化,可能也无法保持结构完整性。研究已表明 Pro-Hyp、Gly-Pro-Hyp 和 Pro-Hyp-Gly 可以通过

PepT1 转运蛋白在胃肠道被完整吸收,进入血液循环并分布在组织中^[39,43,44], PepT1 具有广泛的底物特异性^[45], PepT1 既不接受游离氨基酸,也不接受含有 ≥4 个氨基酸的多肽作为底物^[45,46]。因此,被胃、小肠和刷状缘的肽酶广泛水解后,生物活性肽的口服生物利用度通常非常低^[47]。这意味着,在设计 and 开发活性肽类药物时,需要充分考虑其在体内的药代动力学特性,并进行系统的体内研究以验证其生物利用度和药效学特征,以便更好地指导其临床应用和优化疗效。

3 结论

根据生姜蛋白酶的酶切特异性,本研究虚拟筛选出高活性肽段,建立了更全面、更科学的天然物质中 DPP-IV 抑制剂筛选评价指标体系,将结合动力学参数(药物与靶点的结合和解离过程)和体内吸收特性(生物活性肽口服后入血成分)引入到 DPP-IV 抑制剂活性评价体系中,深入了解 DPP-IV 抑制肽的抑制机制和抑制效果,并且研究其与 DPP-IV 的相互作用方式,体内实验表明活性肽不适合口服,未来的研究还需要进一步探究这些活性肽的生物利用度、生物稳定性和毒副作用等问题,以期更好地实现其在实际应用中的价值。

参考文献

- [1] LAMBEIR A M, DURINX C, SCHARPÉ S, et al. Dipeptidyl-peptidase iv from bench to bedside: An update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme dpp iv [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2003, 40(3): 209-294.
- [2] KARAGIANNIS T, AVGERINOS I, LIAKOS A, et al. Management of type 2 diabetes with the dual gip/glp-1 receptor agonist tirzepatide: A systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetologia*, 2022, 65(8): 1251-1261.
- [3] MÜLLER T D, FINAN B, BLOOM S R, et al. Glucagon-like peptide 1 (glp-1) [J]. *Mol Metab*, 2019, 30: 72-130.
- [4] SINGH A-K, JATWA R, PUROHIT A, et al. Synthetic and phytochemicals based dipeptidyl peptidase-iv (dpp-iv) inhibitors for therapeutics of diabetes [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19(10): 1036-1045.
- [5] RENDÓN-ROSALES M Á, TORRES-LLANEZ M J, MAZORRA-MANZANO M A, et al. *In vitro* and *in silico* evaluation of multifunctional properties of bioactive synthetic peptides identified in milk fermented with *Lactococcus lactis* nrrl b-50571 and nrrl b-50572 [J]. *LWT*, 2022, 154: 112581.

- [6] BLEAKLEY S, HAYES M, O' SHEA N, et al. Predicted release and analysis of novel ace-i, renin, and dpp-iv inhibitory peptides from common oat (*Avena sativa* L.) protein hydrolysates using in silico analysis [J]. *Foods*, 2017, 6(12): 108.
- [7] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Investigation of the potential of hemp, pea, rice and soy protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase iv (dpp-iv) inhibitory peptides [J]. *Food Digestion: Research and Current Opinion*, 2015, 6(1): 19-29.
- [8] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Learnings from quantitative structure activity relationship (qsar) studies with respect to food protein-derived bioactive peptides: A review [J]. *RSC Adv.*, 2016, 6: 75400-75413.
- [9] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Inhibition of dipeptidyl peptidase iv (dpp-iv) by proline containing casein-derived peptides [J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(4): 1909-1917.
- [10] ZHANG M K, ZHU L, WU G C, et al. Food-derived dipeptidyl peptidase iv inhibitory peptides: Production, identification, structure-activity relationship, and their potential role in glycemic regulation [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 12: 1-23.
- [11] JIA B L, LI Z Q, LIU J L, et al. A zinc-dependent protease amz-tk from a thermophilic archaeon is a new member of the archaemetzincin protein family [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1380.
- [12] CHEN Q H, HE G Q. Optimization of elastolysis conditions and elastolytic kinetic analysis with elastase from *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7(6): 482-490.
- [13] TAGA Y, HAYASHIDA O, KUSUBATA M, et al. Production of a novel wheat gluten hydrolysate containing dipeptidyl peptidase-IV inhibitory tripeptides using ginger protease [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017, 81(9): 1823-1828.
- [14] LAFARGA T, O'CONNOR P, HAYES M. Identification of novel dipeptidyl peptidase-iv and angiotensin-i-converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis [J]. *Peptides*, 2014, 59: 53-62.
- [15] LI-CHAN ECY. Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2015, 1: 28-37.
- [16] KIM B R, KIM H Y, CHOI I, et al. Dpp-iv inhibitory potentials of flavonol glycosides isolated from the seeds of *Lens culinaris*: In vitro and molecular docking analyses [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2018, 23(8): 1998.
- [17] MOONEY C, HASLAM N J, POLLASTRI G, et al. Towards the improved discovery and design of functional peptides: Common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45012.
- [18] MUDGIL P, KAMAL H, YUEN G C, et al. Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2018, 259: 46-54.
- [19] LIU R, ZHOU L, ZHANG Y, et al. Rapid identification of dipeptidyl peptidase-iv (dpp-iv) inhibitory peptides from ruditapes philippinarum hydrolysate [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2017, 22(10): 1714.
- [20] OJEDA-MONTES MJ, GIMENO A, TOMAS-HERNÁNDEZ S, et al. Activity and selectivity cliffs for dpp-iv inhibitors: Lessons we can learn from sar studies and their application to virtual screening [J]. *Med Res Rev*, 2018, 38(6): 1874-1915.
- [21] ZHAO L, ZHANG M X, PAN F, et al. In silico analysis of novel dipeptidyl peptidase-iv inhibitory peptides released from *Macadamia integrifolia* antimicrobial protein 2 (MiAMP2) and the possible pathways involved in diabetes protection [J]. *Curr Res Food Sci*, 2021, 4: 603-611.
- [22] ARAKI M, KANEGAWA N, IWATA H, et al. Hydrophobic interactions at subsite S1' of human dipeptidyl peptidase iv contribute significantly to the inhibitory effect of tripeptides [J]. *Heliyon*, 2020, 6(6): e04227.
- [23] WANG T Y, HSIEH C H, HUNG C H, et al. A study to evaluate the potential of an in silico approach for predicting dipeptidyl peptidase-iv inhibitory activity in vitro of protein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 431-438.
- [24] XU Q Y, ZHENG L, HUANG M T, et al. Exploring structural features of potent dipeptidyl peptidase iv (dpp-iv) inhibitory peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin by an integrated approach of multivariate analysis and gly-pro-based peptide library [J]. *Food Chemistry*, 2022, 397: 133821.
- [25] KANG B, SKONBERG D I, MYRACLE A D. Anti-hyperglycemic effects of green crab hydrolysates derived by commercially available enzymes [J]. *Foods*, 2020, 9(3): 258.
- [26] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Prospects for the management of type 2 diabetes using food protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase iv (dpp-iv) inhibitory activity [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2016, 8: 19-24.
- [27] LACROIX I, LI C E. Food-derived dipeptidyl-peptidase iv inhibitors as a potential approach for glycemic regulation-current knowledge and future research considerations [J].

- Trends in Food Science & Technology, 2016, 54: 1-16.
- [28] LI N, WANG L J, JIANG B, et al. Recent progress of the development of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 151: 145-157.
- [29] CARRERA-ALVARADO G, TOLDRÁ F, MORA L. DPP-IV inhibitory peptides GPF, IGL, and GGGW obtained from chicken blood hydrolysates [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14140.
- [30] COPELAND R A, POMPLIANO D L, MEEK T D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(9): 730-739.
- [31] SWINNEY D C. The role of binding kinetics in therapeutically useful drug action [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2009, 12(1): 31-39.
- [32] SCHNAPP G, KLEIN T, HOEVELS Y, et al. Comparative analysis of binding kinetics and thermodynamics of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and their relationship to structure [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(16): 7466-7477.
- [33] POWER O, NONGONIERMA A B, JAKEMAN P, et al. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase iv inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes [J]. *Proc Nutr Soc*, 2014, 73(1): 34-46.
- [34] WANG Z G, ZHAI X R, FANG J Y, et al. Peptide-calcium chelate from antler (*Cervus elaphus*) bone enhances calcium absorption in intestinal caco-2 cells and d-gal-induced aging mouse model [J]. *Nutrients*, 2022, 14(18): 3738.
- [35] BAO X L, YUAN X Y, LI X X, et al. Flaxseed-derived peptide, ippf, inhibits intestinal cholesterol absorption in caco-2 cells and hepatic cholesterol synthesis in hepg2 cells [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(1): e14031.
- [36] SHIMIZU K, SATO M, ZHANG Y, et al. The bioavailable octapeptide gly-ala-hyp-gly-leu-hyp-gly-pro stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(11): 6960-6965.
- [37] ZHANG H J, DUAN Y W, FENG Y L, et al. Transepithelial transport characteristics of the cholesterol-lowing soybean peptide, wgapsl, in caco-2 cell monolayers [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, 24(15): 2843.
- [38] DING L, WANG L Y, ZHANG Y, et al. Transport of antihypertensive peptide rvpsl, ovotransferrin 328-332, in human intestinal caco-2 cell monolayers [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(37): 8143-8150.
- [39] MINER-WILLIAMS W M, STE VENS B R, MOUGHAN P J. Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? [J]. *Nutrition Research Reviews*, 2014, 27(2): 308-329.
- [40] IWAI K, HASEGAWA T, TAGUCHI Y, et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(16): 6531-6536.
- [41] ICHIKAWA S, MORIFUJI M, OHARA H, et al. Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2010, 61(1): 52-60.
- [42] YAMAMOTO S, DEGUCHI K, ONUMA M, et al. Absorption and urinary excretion of peptides after collagen tripeptide ingestion in humans [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39(3): 428-434.
- [43] ADIBI S A. The oligopeptide transporter (pept-1) in human intestine: Biology and function [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(1): 332-340.
- [44] ABE M, HOSHI T, TAJIMA A. Characteristics of transmural potential changes associated with the proton-peptide co-transport in toad small intestine [J]. *The Journal of Physiology*, 1987, 394: 481-499.
- [45] DANIEL H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport [J]. *Annual Review of Physiology*, 2004, 66: 361-384.
- [46] VERMEIRSEN V, VAN CAMP J, VERSTRAETE W. Bioavailability of angiotensin i converting enzyme inhibitory peptides [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2004, 92(3): 357-366.
- [47] WANG L Y, DING L, DU Z Y, et al. Effects of hydrophobicity and molecular weight on the transport permeability of oligopeptides across caco-2 cell monolayers [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(5): e13188.