

三斑海马蛋白肽 ACE 抑制活性的研究

徐克寒¹, 申铨日^{1,*}, 陈国华²

(1.海南大学食品学院, 海南海口 570228; 2.海南大学海洋学院, 海南海口 570228)

摘要: 本文通过三斑海马酶解液的制备、ACE 抑制活性肽的分离和体外消化模型的建立研究了三斑海马蛋白肽的 ACE 抑制活性。利用碱性蛋白酶制备得到具有 ACE 抑制活性的三斑海马酶解液, 经葡聚糖凝胶层析分离纯化后, 得到具有较高 ACE 抑制活性的组分(其 IC₅₀ 为 0.91 mg/mL); 通过对该组分的氨基酸组成和体外消化模型分析, 发现该组分中疏水性氨基酸的含量为 50.48%, 消化酶作用后, 显著提高 ACE 抑制活性, 经判断, 该组分中的蛋白肽为前体型抑制剂。

关键词: 三斑海马, ACE 抑制, 酶解液

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of enzymatic hydrolysate from three-spot *hippocampus*

XU Ke-han¹, SHEN Xuan-ri^{1,*}, CHEN Guo-hua²

(1.College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China;

2.College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In this paper, the ACE-inhibitory activity of three-spot *hippocampus* peptides were evaluated by studying the preparation technique of three-spot *hippocampus* enzymatic hydrolysate, screening chromatography separation of ACE-inhibitory peptides and establishing the model. The enzymatic hydrolysate with ACE-inhibitory activity was prepared by alkaline protease, and then separated and purified by gel filtration chromatography. After determination, the lower molecular fraction exerted the highest ACE-inhibitory activity (IC₅₀ was 0.91 mg/mL). The composition of amino acids in it was analyzed, and the test result indicated that the content of hydrophobic amino acids was 50.48%. In addition, it was suggested that the ACE-inhibitory peptides acted as 'prodrug-type' inhibitor after establishing the model of artificial gastrointestinal digestion. ACE-inhibitory activity was increased significantly under condition of digestive enzyme digestion.

Key words: three-spot *hippocampus*; ACE-inhibitory activity; hydrolysate

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)15-0096-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.15.012

海马 (*Hippocampus*) 隶属于海龙科, 是我国传统的名贵中药材, 性温、味甘咸, 具有温肾壮阳、散结消肿的功效, 可用于治疗阳痿、遗尿、肾虚作喘、症瘕积聚、跌扑损伤及痈肿疔疮^[1]。近年来, 国内外研究表明, 海马活性成分丰富, 含有甾体类、蛋白质、脂肪酸类、磷脂类等, 其中蛋白质含量高达 67.90%~73.56% (干重), 并具有温肾壮阳、抗疲劳、延缓衰老、抗肿瘤、抗炎等活性^[2-3], 应用前景广泛。目前, 过度捕捞导致海马濒危, 迫切需要更多地了解其独特的生物生理学和药理学特性, 以合理利用这一珍贵物种^[4]。

高血压已成为世界第一杀手, 高血压患者也逐渐出现年轻化, 安全、有效地治疗高血压迫在眉睫。血管紧张素转化酶 (Angiotensin-I converting enzyme, ACE) 为二肽羧基蛋白酶, 是人体调节血压过程中尤

为重要的一种蛋白酶。在人体肾素-血管紧张素系统中, ACE 将不具有生理活性的血管紧张素-I 转化为血管紧张素-II, 促使血管收缩、醛固酮分泌以及 Na 和水的保留, 从而升高血压^[5]; 另外, 在人体胰舒血管素-激肽系统中, ACE 降解舒缓激肽, 使其丧失舒张血管的功能, 从而升高血压^[6]。因此, 若能有效的抑制 ACE 活性, 将有利于降低人体血压。目前, 已从多种不同的动物及植物体内分离得到 ACE 抑制肽^[7], 如三文鱼、金枪鱼、海藻、大豆、奶制品等, 但是关于海马 ACE 抑制活性的研究尚未见报道。

因此, 本研究以三斑海马为原料, 采用蛋白酶酶解法, 并利用葡聚糖凝胶层析进行初步分离, 获得具有较高 ACE 抑制活性的组分, 并对该组分进行氨基酸组成分析及体外消化实验, 为进一步海马活性研

收稿日期: 2014-11-05

作者简介: 徐克寒 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工, E-mail: 793874992@qq.com。

* 通讯作者: 申铨日 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 海洋生物资源利用、食品科学, E-mail: shenxuanri2009@163.com。

基金项目: 十二五国家科技支撑计划课题 (2013BAB01B04)。

究提供依据及参考,以期提高海马的利用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

三斑海马干品 广州市天泽贸易有限公司;胰蛋白酶(250 U/mg)、碱性蛋白酶(2000 U/mg)、木瓜蛋白酶(6000 U/mg)、胃蛋白酶(2100 U/mg) 南宁庞博有限公司;ACE、马尿酸-组氨酰-亮氨酸(HHL)、猪胃蛋白酶(806.3 U/mg protein)、牛胰凝乳蛋白酶(40 U/mg protein)、牛胰蛋白酶(12132 U/mg protein) 美国SIGMA公司;Sephadex G-25 北京瑞达恒辉科技发展有限公司;其他试剂 均为国产分析纯或色谱纯。

旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;HL-2 恒流泵 南京普阳科学仪器研究所;HD-5 电脑紫外检测仪 南京大学;PHS-3C 精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司;TDL-60B 低速台式离心机 上海安亭科学仪器厂;FD5512 冷冻干燥机 韩国 ilShin;电子天平 上海梅特勒-托利多仪器有限公司;紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;Agilent1100 高效液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 三斑海马酶解液的制备 将三斑海马干品粉碎,称取一定质量三斑海马粉末置于烧杯中。选择碱性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶四种酶,酶解条件为料液比 1:15 (g:mL)、加酶量 1.0% (酶/底物蛋白质, w/w),并按表 1 的酶解 pH 和温度下酶解 6 h。100 °C 灭酶 10 min 后,抽滤,收集滤液,并进行离心,取上清液,获得三斑海马酶解液,适当浓缩后冷冻干燥,制得三斑海马酶解液冻干粉,隔氧隔氧保存。

表 1 四种蛋白酶的酶解条件^[8]

Table 1 Hydrolysis parameters of four commercial enzymes^[8]

酶类型	酶解 pH	酶解温度(°C)
碱性蛋白酶(Alcalase)	9.5	60
胃蛋白酶(Pepsin)	2.6	37
胰蛋白酶(Trypsin)	8.5	37
木瓜蛋白酶(Papain)	5.7	55

1.2.2 ACE 抑制率的测定 采用 Liu^[8]的方法测定 ACE 抑制率。取 30 μL 试样、250 μL 5 mmol/L 底物 HHL 溶液(溶于含 0.6 mol/L NaCl 的硼酸缓冲液, pH 8.3)置于螺口试管中,混匀,于 37 °C 水浴 5 min 后,向螺口试管中加入 0.06 U/L ACE 溶液(溶于硼酸缓冲液, pH 8.3),混匀,于 37 °C 水浴 60 min 后,加入 1 mol/L HCl 终止反应,充分混匀后,加入 1.5 mL 乙酸乙酯萃取反应生成的马尿酸,离心 3000 r/min、10 min,移取 1 mL 上层溶液置于磨口试管中,真空浓缩干燥蒸干乙酸乙酯后,加 3 mL 蒸馏水置于试管中复溶马尿酸,于 228 nm 波长处测定吸光度值。ACE 抑制率按下列公式计算:

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = \frac{E_c - E_s}{E_c - E_B} \times 100$$

其中, E_s - 试样组的吸光度值; E_c - 空白组的吸光度值; E_B - 加入 ACE 之前提前加入 HCl 组的吸光度值。

1.2.3 ACE 抑制肽的分离纯化 选择 Sephadex G-25 凝胶用于分离。凝胶预处理后,填装至 2 cm × 100 cm 的层析柱中,平衡 3~4 h,流速调节至 1 mL/min,上样(试样溶于蒸馏水,浓度为 25 mg/mL,上样量为 2 mL),以蒸馏水为洗脱液进行洗脱。检测波长为 280 nm,按峰进行收集,多次收集后,将收集液浓缩并冷冻干燥,适当条件下保存。

1.2.4 氨基酸组成分析 对经过 Sephadex G-25 层析分离得到 ACE 抑制活性最高的组分进行氨基酸含量分析,按照 GB/T22492-2008 进行检测。

1.2.5 体外消化实验 采用陈飞平^[9]的实验方法,并稍作改进。将经过 Sephadex G-25 层析分离得到 ACE 抑制活性最高的组分用蒸馏水配成浓度为 2 mg/mL 的溶液,用 1 mol/L HCl 调节 pH2,加入 1% (w/v) 胃蛋白酶,于 37 °C 振荡保温 2 h,在 100 °C 下灭酶 5 min,冷却至室温后,5000 r/min 离心 20 min,取 1 mL 上清液用于测定 ACE 抑制率,剩余上清液用 1 mol/L NaOH 调节 pH8.3,加入 2% (w/v) 胰凝乳蛋白酶,于 37 °C 振荡保温 2.5 h,在 100 °C 下灭酶 5 min,冷却至室温后,5000 r/min 离心 20 min,取 1 mL 上清液用于测定 ACE 抑制率,剩余上清液用胰蛋白酶处理,方法同胰凝乳蛋白酶处理方法,完成后取上清液用于测定 ACE 抑制率。

1.3 统计分析

采用 originPro 8 软件对数据进行统计分析,两组间的数据比较采用 T-检验, $p < 0.05$ 表示差异有显著意义, $p < 0.01$ 表示差异有极显著意义。

2 结果与讨论

2.1 三斑海马酶解液 ACE 抑制肽的制备

蛋白酶的选择对制备活性多肽尤为重要,它的酶切位点会影响多肽的骨架,使酶解液呈现出强弱不同的 ACE 抑制活性。本研究选取了四种商业用酶,为碱性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶,分别对三斑海马进行酶解,探讨其酶解液的 ACE 抑制活性。分别称取一定质量的四种酶解物冻干粉,配置成浓度为 1 mg/mL 的溶液,测定酶解液的 ACE 抑制率,实验结果见图 1。结果表明,四种酶解液都表现出一定的 ACE 抑制活性,其中碱性蛋白酶酶解液(SHP)的 ACE 抑制率最高,为 37.75%。通常情况下,ACE 抑制肽为短肽,并含有疏水性氨基酸残基^[10],而碱性蛋白酶是一种丝氨酸型的内切酶,倾向于形成以疏水性氨基酸为末端的肽^[11],并且,碱性蛋白酶能切开蛋白质分子内部肽链-CO-NH-生成分子量较小的多肽。因此,选择碱性蛋白酶酶解液做进一步的分离纯化。

2.2 三斑海马 ACE 抑制肽的分离纯化

ACE 抑制肽的理化性质和生物活性主要取决于其分子量大小及氨基酸序列^[12]。葡聚糖凝胶层析是依据蛋白质分子量大小进行分离的技术,分子量大的物质先出峰,分子量小的物质后出峰。选取

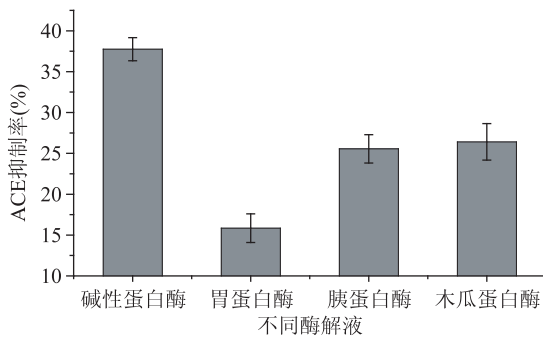


图1 不同酶解液的 ACE 抑制率

Fig.1 ACE-inhibitory activity

of the different three-spot hippocampus hydrolysates

Sephadex G-25 对 SHP 进行分离,获得分子量大小不同的组分。用蒸馏水以 1 min/mL 的流速进行洗脱,得到如图 2 的层析谱图。由图 2 可知,SHP 通过 Sephadex G-25 凝胶分离得到 6 个峰,分别为 SHP1、SHP2、SHP3、SHP4、SHP5 和 SHP6。

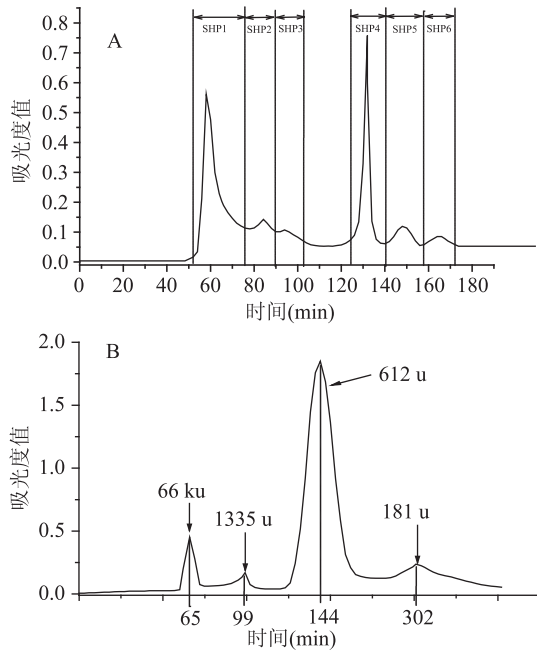


图2 SHP(A)和标准蛋白(B)的葡聚糖凝胶层析谱图

Fig.2 Gel filtration chromatography of SHP(A) and protein marker(B) on a Sephadex G-25 column

按峰收集,分别测定浓度为 1 mg/mL 收集液的 ACE 抑制率。从图 3 显示的结果可知,组分 SHP5 的 ACE 抑制率最高,为 57.45%, IC_{50} 为 0.91 mg/mL。经 Sephadex G-25 凝胶分离的 SHP5 与 SHP 相比,ACE 抑制率明显提高。将 SHP 葡聚糖凝胶层析谱图与标准蛋白谱图进行对比,可以判断 SHP5 的分子量小于 1000 u,与大多 ACE 抑制肽的分子量小于 1500 u^[13] 的研究成果相符。

2.3 氨基酸组成分析

ACE 抑制肽通常含有疏水性氨基酸残基,并且 ACE 抑制肽 C 端的三个氨基酸序列会影响多肽与结合 ACE 的能力,若该位置含有疏水性氨基酸,则该肽极有可能具有较高的 ACE 抑制活性^[14];也有研究者发现 ACE 抑制肽 C 端氨基酸为芳香族氨基酸或脯

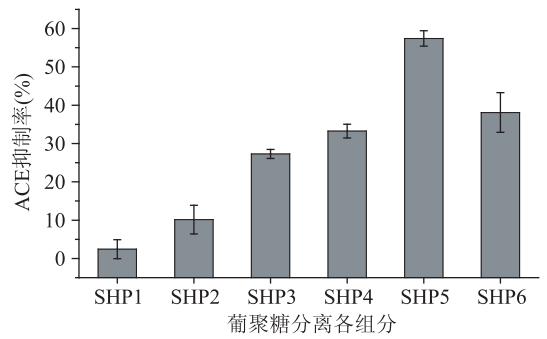


图3 SHP 葡聚糖凝胶分离各组分的 ACE 抑制率

Fig.3 ACE-inhibitory activity of the

fractions on gel filtration chromatography

氨酸,或 N 端为疏水性氨基酸(除脯氨酸)时,ACE 抑制肽活性较强^[15]。从表 2 可知,SHP5 的疏水性氨基酸和芳香族氨基酸分别占总氨基酸含量的 50.48%、7.78%,与 A. Alemán^[16] 从乌贼皮胶原蛋白分离得到 ACE 抑制活性最高的组分(分子量小于 1000 u)的疏水性氨基酸含量为 54.6% 的结果近似。组分 SHP5 中丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸和缬氨酸的含量较高。目前,诸多研究发现 ACE 抑制肽中含有丙氨酸、谷氨酸和甘氨酸,如海蜇 (IGDEPLANYL)^[17]、海参 (MEGAQEAQGD)^[18] 及海虾 (IFVPAF)^[19] 等。但氨基酸序列对 ACE 抑制活性的影响较大,需要更深入的研究。

表2 SHP5 的氨基酸组成分析

Table 2 Amino acid compositions of component SHP5

氨基酸名称	含量(g/100 g)	氨基酸名称	含量(g/100 g)
天门冬氨酸	2.585	胱氨酸	0.214
谷氨酸	3.935	缬氨酸	3.933
丝氨酸	2.168	蛋氨酸	2.738
组氨酸	1.670	苯丙氨酸	3.415
甘氨酸	9.996	异亮氨酸	2.875
苏氨酸	2.545	亮氨酸	6.018
精氨酸	3.412	赖氨酸	3.089
丙氨酸	7.267	脯氨酸	2.703
酪氨酸	1.239	总氨基酸	59.80

2.4 体外消化实验

体外消化实验是通过模拟人体胃肠道消化,考察物质能否抗消化酶的消化。对 SHP5 进行体外消化模拟实验,依次采用胃蛋白酶(P)、胰凝乳蛋白酶(C)和胰蛋白酶(T)酶解,每步测定消化液的 ACE 抑制率。从图 4 可知,在体外消化模拟实验中,SHP5 经胃蛋白酶消化后,ACE 抑制率显著提高,从 55.48% 提高至 76.65%;再经胰凝乳蛋白酶消化后,ACE 抑制率再次提高,提高至 93.75%;最后经胰蛋白酶消化后,ACE 抑制率基本不变,为 93.24%。实验结果表明,该组分经消化后 ACE 抑制活性显著提高,抑制率提高了 37.76%,表明 SHP5 为前体型抑制剂,口服后在人体内具有降低血压的活性。

3 结论

本研究对三斑海马的降血压活性进行探讨,发

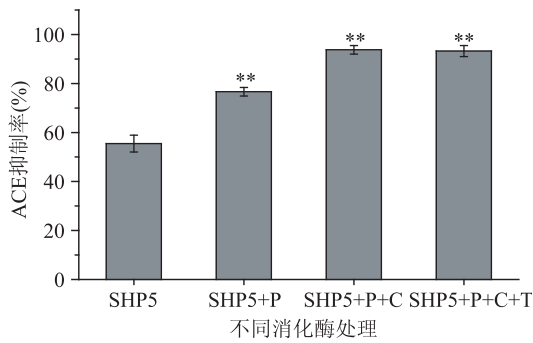


图4 SHP5 消化酶处理后的 ACE 抑制率

Fig.4 ACE-inhibitory activity of component SHP5 treated by digestive enzyme

注:与 SHP5 相比较, ** 表示差异显著($p < 0.05$)。

现三斑海马碱性蛋白酶酶解液具有较高的 ACE 抑制活性。该酶解液经葡聚糖凝胶层析分离后,分离组分 SHP5(分子量 < 1 ku)的 ACE 抑制率最高, IC_{50} 为 0.91 mg/mL。实验结果还表明,该分离组分中疏水性氨基酸、丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸和亮氨酸含量较高,且其经消化酶作用后 ACE 抑制活性显著提高。今后,有待于对该分离组分的消化液进行深入的分析研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] Ryu B, Qian Z J, Kim S K. SHP-1, a novel peptide isolated from seahorse inhibits collagen release through the suppression of collagenases 1 and 3, nitric oxide products regulated by NF- κ B/p38 kinase[J]. Peptides, 2010, 31(1): 79-87.
- [3] 姜素芬, 吉爱国, 梁浩, 等. 我国海马的研究进展[J]. 中药材, 2007(7): 884-887.
- [4] Qian Z-J, Ryu B, Kim M-M, et al. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of the extracts from seahorse, Hippocampus kuda Bleeler[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009, 13(6): 705-715.
- [5] Apud G R, Vvquero M J, Rollan G, et al. Increase in antioxidant and antihypertensive peptides from Argentinean wines by Oenococcus oeni[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 163(2-3): 166-170.
- [6] Pihlanto A, Johansson T, M Kinen S. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme and lipid peroxidation by fermented rapeseed and flaxseed meal[J]. Engineering in Life Sciences, 2012,

(上接第 95 页)

- evaluation of a turbidimetric technique[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 6: 716-723.
- [10] Agyare K K, Kwaku A, Xiong Y L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23: 72-81.
- [11] Akkermans C, Vader Goot A J, Venema P, et al. Micrometer-Sized Fibrillar Protein Aggregates from Soy Glycinin and Soy Protein Isolate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 9877-9882.

12(4): 450-456.

- [7] Ahmed A M, Muguruma M. A review of meat protein hydrolysates and hypertension[J]. Meat Sci, 2010, 86(1): 110-118.
- [8] Liu Z, Shen X R, Yu Y, et al. Optimization of the Extraction of Coconut Protein and the Evaluation of Antioxidant and ACE Inhibitory Activities of its Enzymatic Hydrolysates[J]. Advanced Materials Research, 2012(535): 2330-2334.
- [9] 陈飞平. 芡籽 ACE 抑制肽的分离纯化及其性质评价[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [10] Norris R, Casey F, Fitzgerald R J, et al. Predictive modelling of angiotensin converting enzyme inhibitory dipeptides[J]. Food Chemistry, 2012, 133(4): 1349-1354.
- [11] 胡松青, 张婷婷, 郭莎莎, 等. 鱼鳞明胶 ACE 抑制肽的制备及其活性研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(11): 1491-1494.
- [12] Kim S - K, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review[J]. Journal of Functional Foods, 2010, 2(1): 1-9.
- [13] Zhao Y, Li B, Liu Z, et al. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(12): 1586-1591.
- [14] Wilson J, Hayes M, Carney B. Angiotensin - I - converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products[J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 235-244.
- [15] 曹文红, 章超桦. 食品蛋白降血压肽及其酶法制备(二)[J]. 食品科技, 2002(5): 11-13.
- [16] Alem N A, G Mez - Guill N M C, MONTERO P. Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Food Research International, 2013, 54(1): 790-795.
- [17] Morinaga Y, Iwai K, Tomita H, et al. Chemical nature of a new antihypertensive peptide derived from jellyfish[J]. Food science and technology research, 2010, 16(4): 333-340.
- [18] Zhao Y, Li B, Dong S, et al. A novel ACE inhibitory peptide isolated from Acaudina molpadioidea hydrolysate[J]. Peptides, 2009, 30(6): 1028-1033.
- [19] Hai-Lun H, Xiu-Lan C, Cai-Yun S, et al. Analysis of novel angiotensin - I - converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp Acetes chinensis[J]. Journal of Peptide Science, 2006, 12(11): 726-733.

- [12] María J Martínez, Víctor M. Pizones Ruiz-Henestrosa, Cecilio Carrera Sánchez, et al. Foaming and surface properties of casein glycomacropeptide-gelatin mixtures as affected by their interactions in the aqueous phase[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 33: 48-57.
- [13] 王金梅. 大豆蛋白热聚集行为及界面、乳化性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012, 1-24.
- [14] Zhang T, Jiang B, Mu W.M., et al. Emulsifying properties of chickpea protein isolates: Influence of pH and NaCl[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23: 146-152.