

# 豌豆 ACE 抑制肽对诱导损伤的 EA.hy.926 细胞的保护作用

## Protective effects of the pea ACE inhibitory peptide on induced damage of EA.hy.926 cells

张 烁<sup>1,2</sup> 郑喜群<sup>1,2</sup> 刘晓兰<sup>3,4</sup> 王俊彤<sup>1,2</sup>

ZHANG Shuo<sup>1,2</sup> ZHENG Xi-qun<sup>1,2</sup> LIU Xiao-lan<sup>3,4</sup> WANG Jun-tong<sup>1,2</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 粮食副产物加工与利用教育部工程研究中心, 黑龙江 大庆 163319; 3. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 4. 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

(1. Food College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China; 2. Engineering Research Center of Ministry of Education for Grain By-product Processing and Utilization, Daqing, Heilongjiang 163319, China; 3. School of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China; 4. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

**摘要:**目的: 实现豌豆蛋白的高值化利用。方法: 以豌豆蛋白为原料, 采用双酶协同酶解法制备豌豆蛋白源 ACE 抑制肽, 以酶解时间和酶添加顺序为变量, 以 ACE 抑制率、水解度、可溶蛋白含量为指标确定豌豆 ACE 抑制肽的最佳酶解工艺。将最佳酶解工艺条件下制得的 ACE 抑制肽进行超滤分级, 探究分子量对 ACE 抑制活性的影响, 最后通过测定 ET-1、MDA 含量、SOD 和 NO 含量水平验证 ACE 抑制活性较高的豌豆肽对诱导损伤的 EA.hy.926 细胞的保护作用。结果: 双酶法制备豌豆 ACE 抑制肽的最佳工艺条件为底物质量浓度 100 mg/mL, 3.0% 的碱性蛋白酶在 pH 9.5、50 °C 条件下酶解 2.0 h 后加入 3.0% 的复合蛋白酶, 在 pH 7.0、50 °C 条件下继续酶解 2.0 h。此条件下的豌豆蛋白水解物 ACE 抑制率的 IC<sub>50</sub> 值为 1.141 mg/mL; 小于 2.5 kDa 的肽组分其 ACE 抑制活性最强, 且能显著减少 Ang-II 诱导损伤细胞的 ET-1、MDA 含量, 增加 SOD 和 NO 含量水平。

**结论:** 豌豆 ACE 抑制肽对 Ang-II 诱导损伤 EA.hy.926 细胞具有保护作用。

**关键词:** 豌豆蛋白; ACE 抑制肽; 酶解; 氨基酸分析; EA.hy.926 细胞

**Abstract:** **Objective:** This study aimed to realize the high-value utilization of pea protein. **Methods:** Using pea protein as raw material, ACE inhibitory peptide derived from pea protein was prepared by double-enzyme coordinated enzymatic hydrolysis method, and the ACE inhibition rate, hydrolysis degree and soluble protein content of the hydrolysate were used as indicators to determine the best enzymatic process for the pea ACE inhibitory peptide. Then the ACE inhibitory peptides produced under the optimal enzymatic digestion process were graded by ultrafiltration to explore the effect of molecular weight on the ACE inhibitory activity. Finally, the protective effect of the pea peptide with high ACE inhibitory activity against the injured EA.hy.926 cells was verified by measuring ET-1, MDA content, SOD and NO content levels. **Results:** The optimal preparation conditions of pea ACE inhibitory peptide by double-enzyme method were as follows: substrate concentration of 100 mg/mL, 3.0% alcalase enzymolysis for 2.0 h at pH 9.5 and 50 °C, and then adding 3.0% compound protease for 2.0 h at pH 7.0 and 50 °C. Under these conditions, the IC<sub>50</sub> value of ACE inhibition rate of pea protein hydrolysate was 1.141 mg/mL. Peptide components less than 2.5 kDa had the strongest ACE inhibitory activity and could significantly reduce ET-1, MDA content and increase SOD and NO

**基金项目:** 黑龙江省中央支持地方高校发展高水平人才项目(编号: 2020GSP08); 黑龙江省重点研发项目(编号: GA21B011)

**作者简介:** 张烁, 女, 黑龙江八一农垦大学在读硕士研究生。

**通信作者:** 郑喜群(1963—), 男, 黑龙江八一农垦大学教授, 博士。

E-mail: zhengxiqun@126.com

刘晓兰(1962—), 女, 黑龙江八一农垦大学教授, 博士。

E-mail: liuxiaolan001@126.com

**收稿日期:** 2022-03-22 **改回日期:** 2022-05-25

content levels of Ang-induced injured cells. **Conclusion:** The pea ACE inhibitory peptide was protective against Ang-induced damage to EA.hy.926 cells.

**Keywords:** pea protein; ACE inhibitory peptide; enzymolysis; amino acid analysis; EA.hy.926 cell

高血压是引发冠心病、中风和终末期肾病的主要危险因素<sup>[1-2]</sup>。据 WHO 统计,世界成人高血压患病率约 30%,中国高血压患病率为 17.5% 左右<sup>[3]</sup>。血管紧张素转换酶 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE; EC 3.4.15.1) 是一种锌离子金属羧肽酶,能够催化血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II,而血管紧张素 II 具有收缩血管的作用,导致血压升高。因此通过抑制血管紧张素转换酶或阻断血管紧张素 (AT1) 受体来调节肾素—血管紧张素系统是现阶段治疗高血压的主要方式<sup>[4]</sup>。现在已有很多的降压药物,如卡托普利、依那普利等,但长期使用这些合成抑制剂会对人体健康产生负面影响<sup>[5-6]</sup>。近年来,研究<sup>[7-8]</sup>发现食物中的活性肽能够通过抑制 ACE 来降低高血压患者的血压。活性肽分子量小,易于被人体消化吸收,因此可将食物蛋白质发展成为食源性 ACE 抑制肽辅助治疗高血压。

豌豆 (*Pisum sativum* L.) 不仅蛋白含量高 (约 25%), 还含有丰富的氨基酸。此外,豌豆蛋白的生物价和功效比均高于大豆蛋白。因此,豌豆蛋白是一种优质的植物蛋白<sup>[9]</sup>,可用于制备活性肽。研究拟以豌豆蛋白为原料,采用双酶协同酶解法制备豌豆蛋白源 ACE 抑制肽,以 ACE 抑制率为指标优化工艺条件,并在最佳工艺条件下探究豌豆肽对诱导损伤的 EA.hy.926 细胞的保护作用,以期开发豌豆肽辅助降血压产品提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

豌豆蛋白粉 (蛋白质含量为 76.07%): 山东健源生物工程股份有限公司;

风味蛋白酶 (10 030.42 U/mL)、碱性蛋白酶 (246 532.55 U/mL)、复合蛋白酶 (321 769.71 U/mL): 南宁东恒华道生物技术有限公司;

$\alpha$ -淀粉酶: 3 700 U/g, 北京奥博星生物技术责任有限公司;

血管紧张素转化酶 (ACE, 1 UNIT)、马尿酸组氨酰亮氨酸 (HHL)、二甲基亚砜 (DMSO): 美国 Sigma 公司;

EA.hy.926 细胞: 中国科学院上海生科院细胞库;

血管紧张素-II (Ang-II): 北京酷来博科技有限公司;

DMEM 高糖液体培养基、0.25% 胰蛋白酶-EDTA、台盼蓝染色液 (0.4%): 美国 Gibco 公司;

青霉素、链霉素: Solarbio 公司;

胎牛血清 (FBS): 杭州四季青生物工程材料有限公司;

NO 试剂盒、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定试剂盒: 南京建成生物工程研究所;

内皮素 (ET-1) 试剂盒: 上海酶联生物科技有限公司; 其他试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 仪器与设备

pH 计: FE28 型, 梅特勒—托利多 (上海) 仪器设备有限公司;

智能磁力搅拌器: ZNCL-GS 型, 予华仪器有限责任公司;

紫外可见分光光度计: 2J1-0013 型, 日本 HITACHI 公司;

酶联免疫检测仪: Cf72-8YW 型, 珀金埃尔默仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 豌豆肽的制备及理化指标测定 制备质量浓度为 100 mg/mL 的豌豆蛋白悬浮液, 按  $m_{酶} : m_{豌豆蛋白} = 1.5 : 100$  分别添加 Alcalase 碱性蛋白酶 (简称为 A)、Flavourzyme 风味蛋白酶 (简称为 F) 和 Protamex 复合蛋白酶 (简称为 P) 中的 2 种酶, 协同酶解, 得豌豆肽溶液, 反应总时长为 6 h, 酶解反应过程中每 30 min 取样, 灭酶、4 500 r/min 离心 15 min, 取其上清液测定水解度、可溶蛋白含量。

(1) 水解度的测定: 在豌豆肽水解过程中加入 1 mol/L 的 NaOH 保持最适 pH 并记录消耗的体积<sup>[10]</sup>, 根据式 (1) 计算水解度。

$$H = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH}}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

$H$ ——水解度, %;

$V_{NaOH}$ ——反应中消耗的碱体积, mL;

$N_{NaOH}$ ——反应中维持 pH 稳定时碱当量浓度, mol/L;

$\alpha$ —— $\alpha$ -氨基酸解离度;

$M_p$ ——反应体系中的蛋白总量, g;

$h_{tot}$ ——1 g 蛋白中肽键的克当量数, 7.8。

(2) 可溶蛋白含量的测定: 采用 Folin-酚法<sup>[11]</sup>。

1.3.2 ACE 抑制率的测定 根据 Cushman 等<sup>[12]</sup>的方法有所修改, 反应在 2 mL 的 PE 管中进行, 取 10  $\mu$ L 的样品水解液, 依次加入 5 mmol/L HHL 溶液 40  $\mu$ L、去离子水 50  $\mu$ L, 混匀, 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中预热 10 min, 加入 10  $\mu$ L ACE 并继续水浴 30 min。结束后向管中加入 140  $\mu$ L 1 mol/L HCl 和 750  $\mu$ L 乙酸乙酯 ( $-20^{\circ}$ C) 使反应停止, 涡旋振荡 30 s, 3 500 r/min 离心 5 min, 取出 500  $\mu$ L 酯

层,置于 80 °C 烘箱中烘干 30 min,加入 200 μL 的去离子水震荡 30 s,得样品组溶液,测定 280 nm 处的 OD 值。对照组不加 ACE,其余步骤同上。空白组用去离子水代替水解液,并在反应开始前加入 1 mol/L HCl 140 μL,其余步骤同样品组。

按式(2)计算 ACE 抑制率。

$$W_{ACE} = \frac{O_1 - O_2}{O_1 - O_3} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

$W_{ACE}$ ——ACE 抑制率, %;

$O_1$ ——对照组 OD 值;

$O_2$ ——样品组 OD 值;

$O_3$ ——空白组 OD 值。

1.3.3 酶解条件优化 将豌豆肽的蛋白质量浓度稀释至 2 mg/mL,测定双酶不同酶解时间以及双酶添加顺序下豌豆蛋白水解物的 ACE 抑制率。双酶协同酶解最长时间为 6 h。分步酶解时间形式为“(2+4,3+3,4+2) h”(例“A 2 h+P 4 h”指先用碱性蛋白酶酶解 2 h 再加入复合蛋白酶继续酶解 4 h),酶解过程中每隔 1 h 进行取样测定。

1.3.4 豌豆肽分子量对 ACE 抑制率的影响 采用优化后的最佳条件酶解豌豆蛋白,得到的蛋白水解物 4 500 r/min 离心 15 min,取上清液。依次选用 10,8.5,2.5 kDa 的超滤膜进行截留超滤,超滤后的各组分进行冷冻干燥,测定蛋白质量浓度,再配制成蛋白质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,测定其 ACE 抑制活性。

1.3.5 豌豆肽分子量对氨基酸组成的影响 超滤后的不同分子量豌豆肽的氨基酸组分测定按 GB/T 18246—2000 执行。

1.3.6 细胞试验 先将 EA.hy.926 细胞接种于 DMEM 完全培养基中,再将培养基放在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培

养箱中常规培养,当细胞密度达到 80% 左右时加入胰酶消化 1 min,1 300 r/min 离心 10 min 进行重悬,传代培养。将对数生长期的 EA.hy.926 细胞分为空白组、模型组、豌豆肽低剂量组(50 μg/mL)、豌豆肽中剂量组(100 μg/mL)、豌豆肽高剂量组(200 μg/mL)和阳性对照组(1.75 μg/mL 卡托普利)。空白组仅加入 DMEM 完全培养基,模型组加入 DMEM 完全培养基同步化后加入 2.221 μmol/L Ang-II 溶液刺激 12 h,样品组加入相应浓度的样品干预 24 h 后,加入 2.221 μmol/L Ang-II 溶液刺激 12 h。

1.3.7 细胞内相关含量水平的测定 按 1.3.6 方法培养细胞,待细胞单层生长面积达到 80% 后用胰酶消化并加入完全培养基终止,在 1 300 r/min 条件下离心 10 min 后进行超声破碎,得到细胞匀浆及其上清液,按照试剂盒的说明进行内皮素(ET-1)ELISA、MDA 含量、SOD 活力以及 NO 含量的测定。

#### 1.4 数据处理

采用 Origin 2021 与 SPSS 软件进行数据统计,所有试验均设 3 次以上平行,测定数据以平均数±标准差表示。图表中 \* 表示与模型组相比差异显著  $P < 0.05$ , \*\* 表示与模型组相比差异极显著  $P < 0.01$ ; # 表示与空白组相比差异显著  $P < 0.05$ , ## 表示与空白组相比差异显著  $P < 0.01$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶解条件优化

由表 1 可知,蛋白酶酶解时间对 ACE 抑制活性影响较大,A 酶解 2 h 的 ACE 抑制活性基本上优于 A 酶解 3 h 和 4 h 的,在此基础上,随着 P 酶解时间的延长,ACE 抑制活性呈先升高后降低的趋势。在 A 酶解 2 h 后 P 酶解 2 h 条件下,制备的水解物 ACE 抑制活性最高,为(96.49 ±

表 1 双酶酶解条件对 ACE 抑制率的影响

Table 1 Effects of double-enzymolysis conditions on ACE inhibition rate

试验号	酶解条件/h	ACE 抑制率/%	试验号	酶解条件/h	ACE 抑制率/%	试验号	酶解条件/h	ACE 抑制率/%
1	A 2+P 1	83.92±0.55	12	P 2+F 1	82.38±5.85	23	A 2+F 1	82.46±3.39
2	A 2+P 2	96.49±3.45	13	P 2+F 2	81.45±3.16	24	A 2+F 2	89.13±3.26
3	A 2+P 3	78.22±3.23	14	P 2+F 3	85.25±3.50	25	A 2+F 3	86.96±5.01
4	A 2+P 4	95.47±1.46	15	P 2+F 4	83.86±3.13	26	A 2+F 4	82.15±4.91
5	A 3+P 0	62.86±3.25	16	P 3+F 0	72.95±5.57	27	A 3+F 0	62.86±3.25
6	A 3+P 1	87.28±1.32	17	P 3+F 1	88.59±4.84	28	A 3+F 1	81.22±7.77
7	A 3+P 2	94.01±1.08	18	P 3+F 2	88.44±2.76	29	A 3+F 2	75.63±3.91
8	A 3+P 3	78.00±0.67	19	P 3+F 3	87.97±0.75	30	A 3+F 3	67.25±1.75
9	A 4+P 0	80.94±1.15	20	P 4+F 0	77.56±5.14	31	A 4+F 0	80.94±1.15
10	A 4+P 1	69.42±5.07	21	P 4+F 1	78.73±1.28	32	A 4+F 1	73.22±6.76
11	A 4+P 2	59.57±1.66	22	P 4+F 2	75.32±5.97	33	A 4+F 2	71.44±4.77

3.45)%;在 P 酶解 3 h 后 F 酶解 1 h 条件下,酶解效果最好,ACE 抑制率为(88.59±4.84)%;A 酶解 2 h 后用 F 进一步酶解,随着 F 酶解时间的延长,ACE 抑制活性呈先升高后下降的趋势,其中以 F 酶解 2 h 时效果最好,ACE 抑制活性为(89.13±3.26)%。综上,酶的添加顺序及酶解时间对 ACE 抑制活性有重要的影响。

选择 ACE 抑制率较高的酶解条件 A 2 h+P 2 h、P 3 h+F 1 h、A 2 h+F 2 h 制备豌豆肽并测定水解度和可溶蛋白含量。由表 2 可知,A 2 h+P 2 h 条件下水解度最高,可溶蛋白含量最低,说明酶解效果最好,可能是因为碱性蛋白酶酶解一定时间后蛋白分子结构舒展,暴露更多的肽键,有利于后期加入的酶对蛋白进一步酶解,此结果与徐珍珍等<sup>[13]</sup>采用双酶制备高活性的大米蛋白肽的结果一致。因此,最佳酶解条件为底物质量浓度 100 mg/mL,酶底质量比 1.5:100,碱性蛋白酶先酶解 2 h 再复合蛋白酶酶解 2 h,此条件下水解物的 IC<sub>50</sub> 值为 1.141 mg/mL,与已报道的其他食源性 ACE 抑制肽相比,如 α-乳白蛋白肽(IC<sub>50</sub> 为 3 130 μmol/L)、刺参蛋白肽(IC<sub>50</sub> 为 0.8 mg/mL)、大米蛋白肽(IC<sub>50</sub> 为 1.571 mg/mL)<sup>[14-16]</sup>,豌豆蛋白的双酶酶解产物具有较强的 ACE 抑制活性,表明豌豆蛋白是制备 ACE 抑制肽的良好植物蛋白来源。

2.2 酶解液超滤分级

由表 3 可知,经超滤分级后各组分多肽的 ACE 抑制活性有较明显的差异,其中,<2.5 kDa 的豌豆肽组分 ACE 抑制率效果最好,为 63.020%,8~10 kDa 组分的 ACE 抑制率最低,可能是由于多肽有很强的表面活性,容

表 2 双酶协同酶解的酶解效率与 ACE 抑制活性的影响  
Table 2 The effect of double-enzyme synergistic hydrolysis on enzymolysis efficiency and ACE inhibitory activity

酶解条件/h	水解度/%	可溶蛋白含量/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	ACE 抑制率/%
A 2+P 2	44.33±0.85	32.63±0.30	96.49±0.03
P 3+F 1	21.35±0.96	37.20±1.85	88.59±0.05
A 2+F 2	40.11±0.38	34.18±0.98	89.13±0.03

易吸附在超滤膜表面,导致未超滤组分的蛋白质回收率和生物活性降低,与贾聪等<sup>[17]</sup>研究结论芝麻中 ACE 高活性抑制肽分子质量集中在 3 kDa 以下相似。王晓杰等<sup>[18]</sup>研究也表明玉米 ACE 抑制肽的分子质量主要集中在 6 kDa 以下。综上,相对于大分子多肽,小分子多肽的 ACE 抑制活性更好。

2.3 氨基酸组成分析

由表 4 可知,不同分子量组分的豌豆肽氨基酸组成有差异,个别氨基酸因含量较低在不同分子量组分中未检测出来。豌豆肽的必需氨基酸占氨基酸总量的 30.57%,其中含量较高的为脯氨酸和谷氨酸,其次为天冬氨酸和精氨酸。有研究<sup>[19-20]</sup>表明,ACE 抑制活性与谷氨酸、天冬氨酸等氨基酸的存在以及氨基酸占比有关。

分子量<2.5 kDa 的豌豆 ACE 抑制肽的必需氨基酸含量最高,达到 41.14%,其中含量较多的是苯丙氨酸、精氨酸、脯氨酸、亮氨酸和酪氨酸,它们属于 ACE 抑制肽的 C-活动区域,能有效降低人体的血压<sup>[21]</sup>。因此,由豌豆蛋白制备的 ACE 抑制肽氨基酸组成均衡,营养价值较高。此外,豌豆 ACE 抑制肽序列中独特位置处的非极性氨基酸(如 Trp 和 Arg)可以通过阻止底物与活性位点的结合降低 ACE 活性<sup>[22]</sup>。<2.5 kDa 肽段的氨基酸中必需氨基酸与非必需氨基酸的比值从超滤前的 44.03% 上升到了 69.89%,疏水性氨基酸占比从超滤前的 24.88% 上升到了 37.23%,由此证明了影响 ACE 抑制活性的因素不仅与分子量有关,也与氨基酸组成相关。

2.4 ACE 抑制肽对 Ang-II 诱导损伤的 EA.hy.926 细胞的影响

2.4.1 ET-1 水平 内皮素(Endothelin-1, ET-1)参与大部分心血管疾病的发病过程,存于内皮细胞中<sup>[23]</sup>。ET-1 可以有效地降低一氧化氮合酶水平,从而降低 NO 水平,维持内皮细胞功能的稳态平衡<sup>[24]</sup>。采用豌豆肽和 Captopril 对 EA.hy 926 进行处理,用 Ang-II 溶液进行诱导刺激并培养 48 h,细胞分泌的 ET-1 含量如图 1 所示。

由图 1 可知,模型组的 ET-1 含量明显高于空白组,说明在 Ang-II 的刺激下细胞功能发生了变化,释放炎症因子,而豌豆肽剂量组的 ET-1 含量随着质量浓度的升高

表 3 豌豆蛋白酶解液超滤分级结果

Table 3 Results of ultrafiltration classification of pea protease hydrolysate

豌豆肽分子量/kDa	可溶蛋白含量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	总体积/mL	总蛋白/mg	ACE 抑制率/%	蛋白质回收率/%
超滤前	20.775	4 400.000	91 410.000	96.491	—
>10	47.400	700.000	33 180.000	71.841	42.185
8~10	2.850	40.000	114.000	42.324	0.145
5~8	3.000	110.000	330.000	56.913	0.420
2.5~5.0	3.825	340.000	1 300.500	59.372	1.653
<2.5	4.350	375.000	1 631.250	63.020	2.074

表 4 不同分子量豌豆肽的氨基酸组成与含量对比

Table 4 Comparison of amino acid composition and content of pea peptides with different molecular weights

氨基酸种类	豌豆肽分子量/kDa				
	<2.5	2.5~5.0	5~8	8~10	超滤前
Asp	4.13±0.01	2.59±0.01	3.25±0.01	1.91±0.00	9.41±0.02
Thr	2.07±0.01	1.42±0.01	1.42±0.01	1.50±0.01	2.84±0.01
Ser	4.57±0.02	3.50±0.01	3.49±0.01	2.47±0.01	3.88±0.02
Glu	7.71±0.04	6.70±0.01	7.58±0.01	7.65±0.01	15.47±0.04
Gly	2.53±0.00	1.97±0.00	1.96±0.00	1.97±0.00	3.08±0.01
Ala	4.36±0.02	2.83±0.00	2.75±0.00	2.43±0.01	3.06±0.01
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14±0.01
Val	3.81±0.02	2.49±0.00	2.41±0.00	2.72±0.01	3.64±0.02
Met	0.00	0.12±0.00	0.31±0.00	0.35±0.00	0.63±0.00
Ile	2.03±0.01	1.41±0.00	1.41±0.01	1.45±0.01	3.01±0.01
Leu	10.63±0.02	6.17±0.01	5.82±0.01	6.57±0.01	5.94±0.02
Tyr	10.18±0.03	6.72±0.01	6.63±0.01	8.27±0.01	2.98±0.01
Phe	16.30±0.03	11.98±0.01	11.77±0.02	13.87±0.01	4.69±0.02
Lys	6.19±0.01	6.39±0.00	6.80±0.01	6.05±0.01	5.65±0.01
His	2.34±0.00	0.42±0.00	5.08±0.01	0.79±0.00	2.77±0.01
Arg	12.00±0.03	21.27±0.01	16.77±0.02	13.18±0.01	6.32±0.02
Pro	10.09±0.04	10.95±0.01	11.28±0.01	15.51±0.02	11.56±0.03
必需氨基酸	40.03±0.10	29.86±0.03	29.63±0.05	32.17±0.06	25.77±0.09
必需氨基酸占比/%	41.14	34.39	33.51	37.25	30.57
必需氨基酸/非必需氨基酸/%	69.89	52.42	50.39	59.36	44.03
疏水性氨基酸占比/%	37.23	28.79	27.67	31.72	24.88

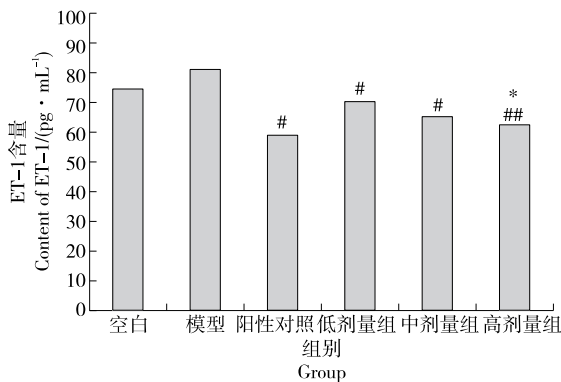


图 1 豌豆肽浓度对损伤细胞 ET-1 含量的影响

Figure 1 The effects of different concentrations of pea peptides on the ET-1 content in damaged cells

逐渐下降,当豌豆肽的质量浓度为 200 μg/mL 时,ET-1 含量达到最低,为 62.69 pg/mL ( $P < 0.01$ ),与李保宏等<sup>[25]</sup>的研究结果一致。综上,豌豆肽对 EA.hy926 细胞分泌 ET-1 有一定的抑制能力,且多肽浓度越高,抑制效果越好。

2.4.2 MDA 和 SOD 水平 由表 5 可知,模型组的 MDA 含量比空白组的高,经 Captopril 和低、中、高剂量豌豆肽处理后,损伤细胞中 MDA 含量明显下降,说明损伤细胞的脂质过氧化程度得到改善;随着豌豆肽浓度升高,MDA 含量逐渐下降,在 200 μg/mL 时,MDA 含量最低且优于 Captopril 组;低剂量豌豆肽对损伤细胞的 SOD 含量无明显影响,而 Captopril 组、豌豆肽中剂量组和高剂量组的 SOD 含量高于模型组,说明中高剂量豌豆肽可以增加细胞清除自由基的能力,此结果与郭耀东等<sup>[26]</sup>的研究结果一致。因此豌豆肽可以改善 Ang-II 诱导损伤的 EA.hy.926 细胞的氧化应激损伤,维持机体氧化还原的平衡。

2.4.3 NO 水平 由图 2 可知,模型组上清中的 NO 含量明显下降,而 NO 生成减少可导致内皮细胞损伤,说明在 Ang-II 的刺激下细胞血管功能出现障碍。与模型组相比,Captopril 组和低、中、高剂量豌豆肽组可以增加 NO 的生成,且呈浓度依赖性。有研究<sup>[27]</sup>表明,增加血管壁 NO 含量有利于改善内皮功能。综上,豌豆肽抑制了 Ang-II 致内皮细胞损伤的作用。



表 5 豌豆肽对损伤细胞 MDA 和 SOD 的影响  
Table 5 Effect of pea peptides on MDA and SOD in damaged cells

组别	MDA/(nmol · mg <sup>-1</sup> )	SOD/(U · mg <sup>-1</sup> )
空白组	4.10 ± 1.01	34.052 ± 4.72
模型组	13.94 ± 1.10	27.032 ± 2.88
Captopril 组	4.75 ± 0.82 * *	65.379 ± 3.54 * * * #
豌豆肽低剂量组	9.81 ± 1.06 * * * #	21.907 ± 3.07
豌豆肽中剂量组	6.97 ± 1.10 * * * #	43.648 ± 4.26 * * #
豌豆肽高剂量组	4.64 ± 0.80	79.248 ± 4.29 * * #

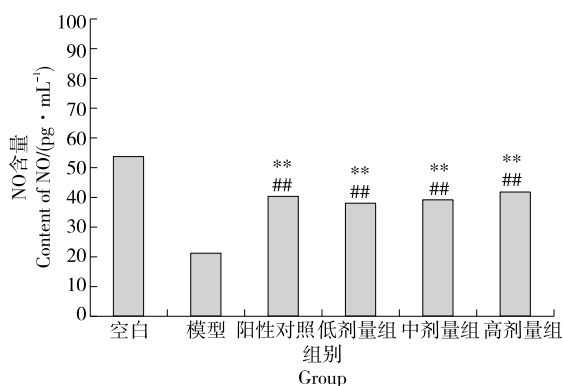


图 2 不同浓度的豌豆肽对损伤细胞 NO 含量的影响  
Figure 2 The effect of different concentrations of pea peptides on the NO content in damaged cells

### 3 结论

以豌豆蛋白为原料,利用碱性蛋白酶与复合蛋白酶两步酶解法制备豌豆蛋白源 ACE 抑制肽,在碱性蛋白酶酶解 2 h 后复合蛋白酶酶解 2 h,酶底质量比 1.5 : 100,底物质量浓度 100 mg/mL 的条件下制得的豌豆肽 ACE 抑制活性最好,IC<sub>50</sub> 值为 1.141 mg/mL。小于 2.5 kDa 的豌豆 ACE 抑制肽能缓解 Ang- II 对 EA.hy.926 细胞的损伤,显著降低 ET-1、MDA 含量,增加 SOD 和 NO 含量水平。因此,豌豆 ACE 抑制肽对 Ang- II 引起的 EA.hy.926 细胞损伤具有一定的保护作用。下一步将深入研究 ACE 抑制肽降血压作用的分子生物学机制。

#### 参考文献

[1] EGAN B M, ZHAO Y, AXON R N. US Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988—2008[J]. JAMA The Journal of the American Medical Association, 2010, 303(20): 2 043-2 050.

[2] WEI H, XIAO Y, TONG Y, et al. Therapeutic effect of angelica and its compound formulas for hypertension and the Complications: evidence mapping[J]. Phytomedicine, 2019, 59: 152767.

[3] 《中国心血管健康与疾病报告 2019》节选:高血压部分[J]. 中华高血压杂志, 2021, 29(3): 203-214.

China Cardiovascular Health and Disease Report 2019: Hypertension section[J]. Chinese Journal of Hypertension, 2021, 29(3): 203-214.

[4] 杨玉蓉. 西藏野桃仁酶解多肽的生物活性及其亚铁螯合物的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019: 5-7.

YANG Y R. Study on biological activity of enzymatic hydrolyzed polypeptide from Tibet wild peach kernel and its ferrous chelate[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2019: 5-7.

[5] RIVELLESE A A CICIOLA P, COSTABILE G, et al. The possible role of nutraceuticals in the prevention of cardiovascular disease[J]. High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention: The Official Journal of the Italian Society of Hypertension, 2019, 26(2): 101-111.

[6] LEE S Y, HUR S J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants[J]. Food Chemistry, 2017, 228: 506-517.

[7] RAFIQ S, GULZAR N, SAMEEN A, et al. Functional role of bioactive peptides with special reference to cheeses[J]. International Journal of Dairy Technology, 2020, 74(1): 1-16.

[8] 梁哈妮, 唐传核. 豌豆蛋白的功能特性研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1 640-1 644.

LIANG H N, TANG C H. Functional characterization of pea protein[J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(12): 1 640-1 644.

[9] 计红芳, 李莎莎, 张令文, 等. 豌豆蛋白对鸡肉糜热诱导凝胶品质特性与微观结构的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 74-79.

JI H F, LI S S, ZHANG L W, et al. Effect of pea protein on quality properties and microstructure of heat-induced gel of chicken batter[J]. Food Science, 2020, 41(4): 74-79.

[10] DIAO W R, HU Q P, FENG S S, et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from green Huajiao (Zanthoxylum schinifolium) against Selected foodborne pathogens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(25): 6 044-6 049.

[11] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.

[12] CUSHAMN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemistry Pharmacology, 1971, 20(7): 1 637-1 648.

[13] 徐珍珍, 于秋生, 陈天祥, 等. 大米蛋白肽的制备与 ACE 抑制活性分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 53-58.

XU Z Z, YU Q S, CHEN T X, et al. Preparation of rice protein peptides and analysis of ACE inhibitory activity[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(3): 53-58.

[14] 侯成杰, 裴彩清, 王彦茜, 等. α-乳白蛋白源 ACE 抑制肽快速筛选及验证[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 100-107.

HOU C J, NIE C Q, WANG Y Q, et al. Accurate screening and verification of α-lactalbumin-derived ace inhibitory peptides[J]. Food Science, 2021, 42(24): 100-107.

[15] 华鑫, 孙乐常, 万楚君, 等. 刺参 ACE 抑制肽制备及降压功效

- 分析[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 125-130.
- HUA X, SUN L C, WANG C J, et al. Preparation and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Food Science, 2018, 39(10): 125-130.
- [16] 封张萍, 岳阳, 刘东红, 等. 大米 ACE 抑制肽制备工艺优化和生物活性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 210-217.
- FENG Z P, YUE Y, LIU D H, et al. Optimization of preparation process and biological activity of rice ACE inhibitory peptide [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(2): 210-217.
- [17] 贾聪, 孟醒, 游静, 等. 低苦味芝麻 ACE 抑制肽的制备及氨基酸组成和结构分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(17): 172-178.
- JIA C, MENG X, YOU J, et al. Preparation amino acid composition and structure analysis of low bitterness sesame ACE inhibitory peptides [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(17): 172-178.
- [18] 王晓杰, 丛万锁, 刘晓兰, 等. 玉米 ACE 抑制肽的制备工艺及中试生产[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 158-164.
- WANG X J, CONG W S, LIU X L, et al. Preparation of ACE-inhibitory peptide from corn gluten meal and pilot-scale production [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(7): 158-164.
- [19] ZHENG L, DONG H, SU G. Radical scavenging activities of Tyr-, Trp-, Cys- and Met- Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 807-813.
- [20] 张江涛, 冯晓文, 秦修远, 等. 海洋蛋白低聚肽的抗氧化与降压作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 63-70.
- ZHANG J T, FENG X W, QIN X Y, et al. Antioxidation and blood pressure lowering effects of marine protein oligopeptides [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(11): 63-70.
- [21] 邵素娟, 丁方莉, 刘迪迪, 等. 食物蛋白源降血脂肽的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 323-326, 332.
- SHAO S J, DING F L, LIU D D, et al. Research progress of hypo-lipidemic peptides in dietary proteins source [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(1): 323-326, 332.
- [22] ASOODEH A, HOMAYOUNI-T M, SHABESTARIAN H, et al. Biochemical characterization of a novel antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Struthio camelus* egg white protein hydrolysis [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 24(2): 332-342.
- [23] ZHENG Y, LI Y, ZHANG Y. Purification, characterization, synthesis, in vitro ACE inhibition and in vivo antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 28: 48-58.
- [24] SHARMA P, DONG Y, SOMERS V K, et al. Intermittent hypoxia regulates vasoactive molecules and alters insulin-signaling in vascular endothelial cells [J]. Entific Reports, 2018, 8(1): 1-9.
- [25] 李保宏, 李忠原, 刘苗苗, 等. 无花果果实及乳浆对人黑色素瘤 A375 细胞的抑制作用及其作用机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(1): 39-49.
- LI B H, LI Z Y, LIU M M, et al. Study on the inhibitory effect of fig fruit and milk pulp on human melanoma A375 cells and its mechanism of action [J]. New Drugs in Chinese Medicine and Clinical Pharmacology, 2022, 33(1): 39-49.
- [26] 郭耀东, 张晓文, 马应卓, 梁旭华. 山茱萸多糖对脑微血管内皮细胞氧化损伤的保护作用研究 [J]. 陕西农业科学, 2021, 67(3): 77-82.
- GUO Y D, ZHANG X W, MA Y Z, et al. Study on the protective effect of *Cornus officinalis* polysaccharides on oxidative damage of cerebral microvascular endothelial cells [J]. Shaanxi Agricultural Science, 2021, 67(3): 77-82.
- [27] YUYUN M F, NG L L, ANDRÉ N G. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? [J]. Microvascular Research, 2018, 119: 7-12.

## 信息窗

### 中国科学家开发多酶组装策略助力人工体系高效合成

9月21日, 华中科技大学研究团队与西北大学合作, 在《Nature》杂志上在线发表了题为“Enantioselective [2+2]-cycloadditions with triplet photoenzymes”的研究论文。团队结合有机合成、基因工程、蛋白质工程、酶理论计算和结构生物学等交叉学科的前沿理论和技术, 将有机化学发展的二苯甲酮类三重态光敏剂定点插入到选定蛋白的手性空腔中, 构建了含非天然光催化活性中心的人工“三重态光酶”。该光酶具有能量转移催化的非天然功能和作用机制, 能催化底物从分子基态跃迁到激发态发生光反应, 从而高效催化吲哚衍生物的分子内[2+2]光环加成反

应, 构建高度张力环丁烷耦合的多环吲哚啉分子, 并获得大于99%的单一手性异构体。

该研究开发的人工三重态光酶集成了化学光催化剂的高效反应性和生物催化剂的精准选择性两者的优势, 为有机分子激发态反应的手性选择性调控提供了有效的手段, 也从根本上拓展了酶催化的反应类型。随着计算辅助的人工酶理性设计能力的不断提升和基因密码子拓展技术的进一步发展, 更多结构和性质独特的化学光敏剂将被引入蛋白创造新的非天然光酶。

(来源: <https://www.cifst.org.cn>)