

# 金枪鱼(*Thunnus* sp.)胰腺酶解液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的胰岛素瘤细胞(INS-1)氧化损伤的保护作用\*

王小凤<sup>1,2</sup> 申慧婷<sup>1,2</sup> 孙小玲<sup>3</sup> 于荣贤<sup>3</sup> 刘兵<sup>3</sup> 苏秀榕<sup>1</sup>

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波大学食品与药学学院 宁波 315211;

3. 深圳市荣格保健品有限公司 深圳 518118)

**摘要** 本文首先通过 MALDI-TOF/TOF-MS 技术, 测定金枪鱼(*Thunnus* sp.)胰腺酶解液中的多肽组分及其丰度, 确定 GQPVR、GLPPK 和 EHER 是其中的优势肽; 再利用 Discovery Studio 平台中的反向找靶和分子对接模块, 发现这些优势肽均可以与 Keap1 蛋白结合, 推测其可能具有抗氧化活性; 最后, 利用细胞实验对酶解液的抗氧化活性进行验证, 发现其对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤的胰岛素瘤细胞(INS-1)具有剂量依赖型保护效果, 高剂量和低剂量酶解液处理后细胞活力较模型组显著提高, 凋亡率从 79.17% 分别下降到 43.2% ( $P < 0.01$ ) 和 28.9% ( $P < 0.01$ ); 胰岛素的分泌量从 3.65 mIU/L 分别增加到 5.75 mIU/L ( $P < 0.01$ ) 和 4.95 mIU/L ( $P < 0.01$ )。Discovery Studio 的抗氧化功能预测和细胞学实验相结合的研究方法, 为酶解液的功能组分鉴定提供了新的思路。

**关键词** 金枪鱼(*Thunnus* sp.)胰腺; 酶解液多肽; 分子对接; 氧化损伤; 胰岛素瘤细胞

**中图分类号** Q955; Q789 **doi:** 10.11693/hyhz20190300053

活性肽是含有数个到数十个氨基酸的多肽类物质。目前的研究发现, 富含生物活性肽的酶解液具有药用价值, 例如, 牡蛎肽在降血糖、抗肿瘤等方面具备特殊的生理活性(方磊等, 2018); 扇贝裙边活性肽可以改善小鼠对血糖浓度的调节能力, 对机体的糖耐受能力具有一定的增强作用(延海莹等, 2018)。金枪鱼(*Thunnus* sp.)营养价值很高, 含有丰富的 DHA 和 EPA(马振华等, 2006), 但在加工过程会产生大量下脚料, 包括鱼头和内脏等, 其中胰腺作为金枪鱼主要的消化腺, 蛋白质含量丰富, 质量约占内脏下脚料的 27%(鳃除外)。为提高金枪鱼下脚料的利用率, 利用胰腺来制备生物活性肽、实现金枪鱼加工废弃物高值化利用。由于酶解液是组成、丰度和肽链长度均不同的多肽混合物, 传统借助细胞模型、动物模型等来筛选和验证多肽酶解液的功能, 是一项费时费力的

的工作(Han *et al.*, 2018)。因此, 迫切需要一种可以直接高通量预测酶解液中活性肽功能的策略, 减少酶解液功能筛选过程中的工作量和不确定性。Discovery Studio(以下简称 DS)是新一代分子建模软件。最近研究表明, 通过 DS 软件对灵芝次生代谢产物进行预测分析。董丽莎利用 DS 软件中 CDocker 模块将所得的优势肽与抗氧化相关的 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1(Keap1)进行分子对接, 研究黑线鳕鱼皮胶原蛋白酶解多肽对 UVB 诱导 HaCaT 光损伤的抑制作用, 并通过细胞实验得到验证(董丽莎等, 2018)。

本研究中以金枪鱼(*Thunnus* sp.)胰腺为原料, 制备酶解液, 利用 MALDI-TOF/TOF-MS 测定金枪鱼胰腺酶解液中的多肽组分及其丰度, 通过 Discovery Studio 软件预测优势肽的功能, 最后通过细胞实验进行验证, 为酶解液的功能组分鉴定提供了新的思路。

\* 2014 年海洋经济创新发展区域示范项目(2014—2016); 2016 年海洋经济创新发展区域示范项目(2016—2018)。王小凤, 硕士研究生, E-mail: 2604291946@nbu.edu.cn

通信作者: 苏秀榕, 教授, 博士生导师, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-14, 收修改稿日期: 2019-04-23

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

金枪鱼(*Thunnus sp.*)胰腺取于宁波今日食品有限公司; 胰岛素瘤细胞(INS-1)细胞株购于上海瑞路生物技术有限公司; RPMI-1640 培养基购于美国 Hyclone 公司; 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)购于美国 Gemini 公司; 二甲基亚砷(DMSO)购于美国 Amresco 公司; 噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl, MTT] 购于美国 Sigma 公司;  $\beta$ -巯基乙醇购于美国 Gibco 公司; AnnexinV-PI 双染凋亡检测试剂盒购于美国 BD Pharmingen 公司; 大鼠胰岛素(INS)ELISA 试剂盒购于宁波百川生物公司; 磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)、100U/mL 青霉素和 100 $\mu$ g/mL 链霉素、胰酶、RIPA 细胞裂解液和 Hanks 缓冲液购于上海碧云天公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 金枪鱼胰腺活性肽的制备** 将金枪鱼胰腺清洗、沥干后于组织搅碎机打碎, 经胰蛋白酶在酶浓度为 1.23%, 温度为 52.95 $^{\circ}$ C 条件下水解 1.75h, 随后 100 $^{\circ}$ C 加热 10min 灭酶活, 4000r/min 离心 10min 获得上清液, 采用 1kDa 的超滤膜(购于美国 Millipore 公司)截留酶解液, 制备低分子量多肽, 并在真空冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司)中冷冻干燥 24h 得到活性肽冻干粉(Han *et al.*, 2018)。用无糖 RPMI-1640 培养基溶解活性肽冻干粉并过滤除菌, 制成浓度为 10mg/mL 的储备液备用。

**1.2.2 多肽组成分析** 在质谱仪分析前, 将酶解产物加入 60 $\mu$ L 含有 0.2%甲酸和 2mmol/L 醋酸钠的甲醇/水(50/50, V/V)中, 将样品(0.5mL)直接置于 MALDI 板上, 并与等量体积的二羟基苯甲酸混合(Je *et al.*, 2009)。使用 MALDI-TOF/TOF 串联质谱(MALDI-TOF/TOF 购于美国 Applied Biosystem 公司)获得多肽质谱图。结果用 MASOT 数据库和 NCBI 分析得到多肽的序列。用一级质谱法测定其准确分子量, 用二级质谱法测定其氨基酸序列(董丽莎等, 2018)。

### 1.2.3 金枪鱼胰腺多肽功能预测

**1.2.3.1 构建多肽结构和反向找靶** 首先, 利用 DS 软件构建多肽的结构, 用 DS 中“构建和编辑蛋白”(“Build and Edit Protein”)模块将 1.2.2 获得的多肽氨基酸序列输入, 并通过“配体优化”(“Minimize Ligands”)模块中的 Full Minimization 功能将其能量最优化, 以获得最佳能量的多肽 3D 结构; 然后, 使用

DS 中的“准备配体”(“Prepare Ligands”)程序生成多个构象。该过程使用 DS 配体分析工具执行。在这项工作中, 我们使用 Pharma DB 作为目标数据库, 参数被设置为 PharmaDB 药效团的形状, 输入药物中最具选择性的药物团, 其他参数设置为默认值。

**1.2.3.2 分子对接** 从蛋白数据库(PDB)中获得具有 Fit-value 值大于 3 的药效团进行模拟对接。将 Fit-value 值大于 3 的蛋白在 DS 中打开后, 去水加氢, 并用“准备蛋白”(Prepare Protein)模块对蛋白进行预处理, 包括缺失的 loop 的补充, 在不同 pH 条件下的质子化状态等。该过程使用“分子对接”(Receptor-Ligand Interactions)模块的 CDOCKER 工具执行。在此过程中, 从 PDB 中下载蛋白作为受体, 将多肽设置为配体。配体受体复合物的能量评分决定了配体和受体蛋白是否结合。

### 1.2.4 多肽对 INS-1 细胞氧化损伤的作用

**1.2.4.1 细胞悬液的制备** INS-1 细胞用含 10%胎牛血清、50 $\mu$ mol/L 的巯基乙醇、1% 100U/mL 青霉素和 100 $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液(即为 10%FBS 培养基)于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中贴壁培养(CO<sub>2</sub> 培养箱购于上海精密仪器仪表有限公司)。每 2d 更换一次培养基, 当细胞生长到覆盖培养瓶底壁表面的 70%—80%时, 用 0.05%含 EDTA 的胰酶消化, 离心后计数, 调整到 10<sup>5</sup> 个/mL 备用。

**1.2.4.2 多肽对氧化损伤 INS-1 细胞增殖活性的作用** 对细胞进行分组, 分为正常对照组(10% FBS 的 INS 培养基 100 $\mu$ L/孔); 模型组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤组, 80 $\mu$ L 含 10% FBS 的 INS 培养基和 20 $\mu$ L 200 $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 活性肽高剂量组(HDAP, 1mg/mL 的酶解液 10 $\mu$ L、70 $\mu$ L 含 10% FBS 的 INS 培养基和 20 $\mu$ L 200 $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 和活性肽低剂量组(LDAP, 0.1mg/mL 的酶解液 10 $\mu$ L、70 $\mu$ L 含 10% FBS 的 INS 培养基和 20 $\mu$ L 200 $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。将 1.2.4.1 制备的处于对数生长期的细胞悬液接种于 96 孔培养板中, 每组细胞都有 3 个复孔, 培养 24h 后, 每孔加入 50 $\mu$ L 2mg/mL MTT, 4h 后弃培养液, 加入 150 $\mu$ L 二甲亚砷(DMSO), 在 570nm 波长处检测(酶标仪为美国 Molecular Devices 公司)测各孔吸光度值(董丽莎等, 2018)。

增殖率计算公式如下:

$$\text{增殖率} = \left( \frac{\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}} - 1 \right) \times 100\%$$

**1.2.4.3 多肽对氧化损伤 INS-1 细胞凋亡的影响** 将 INS-1 细胞按“1.2.4.2”项下分组处理, 以 10<sup>5</sup>/mL 接

种于 96 孔板, 培养 48h 后, 利用 AnnexinV-PI 双染凋亡检测试剂盒做细胞凋亡处理, 将样品于冰上避光放置, 并于 1h 内于激发波长 488nm, 发射波长 525nm 条件下利用流式细胞仪检测细胞凋亡水平(流式细胞仪购于美国 Beckman Coulter 公司), 并用 Modfit LT 软件分析凋亡率(李晔等, 2012)。

**1.2.4.4 多肽对氧化损伤 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响** 选取对数生长期的 INS-1 细胞, 按“1.2.4.2”项下分组处理, 按  $10^5$ /孔接种于 24 孔板中, 培养 24h 后去除原培养液, 以无糖 Hanks 液洗涤 3 次, 分别添加含 5.6mmol/L 或 16.7mmol/L 葡萄糖的 Hanks 液 50 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, 分别收集上清液, 采用 ELISA 法测定上清液中的胰岛素含量(郑书国等, 2015)。

**1.2.5 数据分析** 数据用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析, 结果以平均值 $\pm$ 标准差形式表示,  $P$  值小于 0.05 则认为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 金枪鱼胰腺酶解液多肽组成和丰度

利用 MALDI-TOF/TOF-MS 从胰蛋白酶的水解液中共检测到 988 个峰, 其中有 3 个相对较强的质谱峰, 其质核比 ( $m/z$ ) 分别为 556.2504、511.2240 和 570.2549。选择它们作为母离子进行二级质谱处理, 得到 3 个优势多肽, 分别为 G-PQV-R、G-LPP-K 和 E-HE-R(表 1 和图 1)。

表 1 金枪鱼胰腺酶解液多肽组成的测定  
Tab.1 Identification of the composition of polypeptides in enzymatic hydrolysate of the tuna pancreas

序号	MH <sup>+</sup> 理论值	MH <sup>+</sup> 实际值	峰面积	百分比 (%)	理论氨基酸序列
1	555.3129	555.2446	13979.94	0.8615	G-PQV-R
2	510.3166	510.2117	21644.74	1.3351	G-LPP-K
3	569.2558	569.2475	14979.42	0.9231	E-HE-R

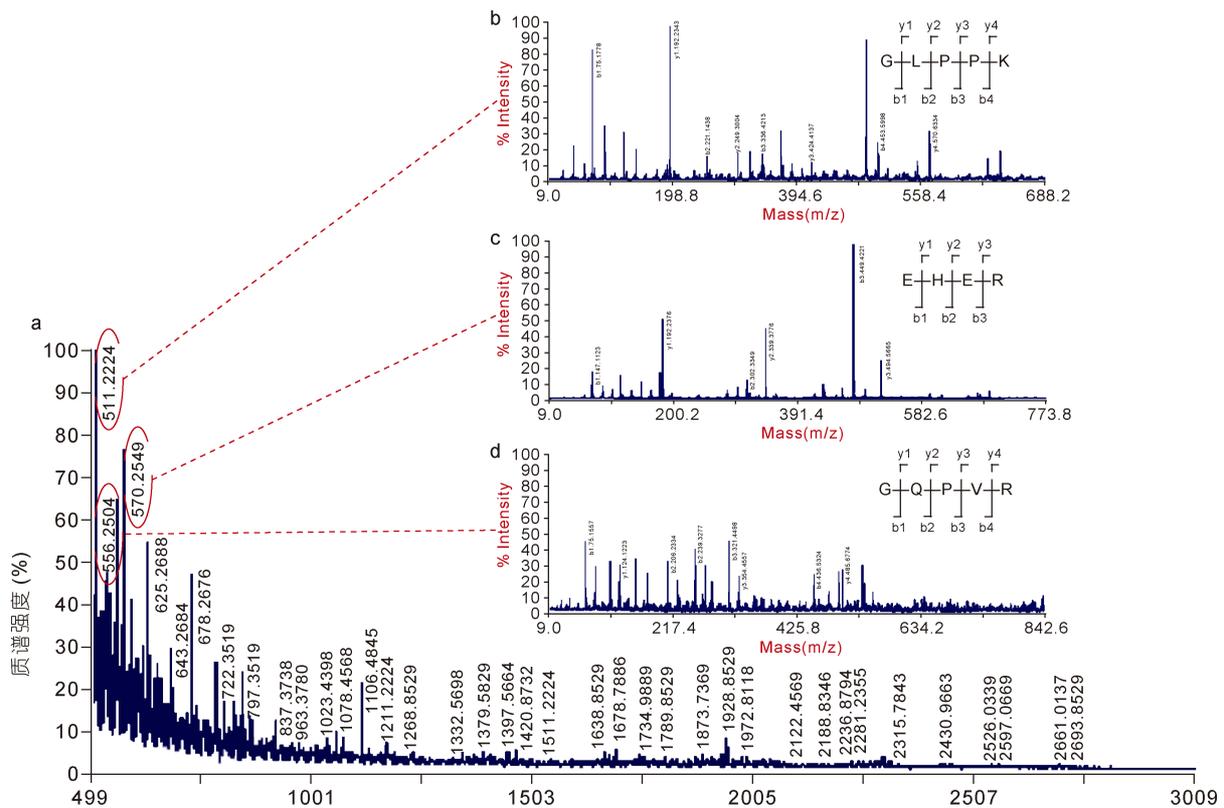


图 1 金枪鱼胰腺酶解液多肽的质谱分析图

Fig.1 The mass spectrometric analysis of polypeptides in the enzymatic hydrolysate of tuna pancreas

注: a. 一级质谱(MS); b. 质核比 511.2224 碎片的二级质谱; c. 质核比 570.2549 碎片的二级质谱; d. 质核比 556.2504 碎片的二级质谱

### 2.2 优势肽的反向找靶结果

通过 DS 软件的反向找靶功能, 对这三种多肽的活性进行筛选结果如表 2 所示, G-PQV-R 与编号为

5dad-02, 1m4d-05 和 1tyr-06 的药效团结合; G-LPP-K 与编号为 5dad-01 和 1o86-01 的药效团结合; E-HE-R 与编号为 5dad-01, 1m48-04 和 3d9k-08 的药效团结合

合。编号为 5dad 的药效团是 Keap1 蛋白,它是细胞氧化应激的重要调节因子。三种多肽均可与 Keap1

结合,且 Fit-value 值均为最高。因此,我们初步推测 Keap1 是三种优势多肽的潜在靶标蛋白。

表 2 反向找靶结果

Tab.2 The result of reverse docking

多肽序列	药效团编号	药效团	Fit-value	生物学功能
G-PQV-R	5dad-02	Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)	3.566	抗氧化
	1m4d-05	氨基糖苷类乙酰转移酶	3.25	氨基糖苷抗性
	1tyr-06	转甲状腺素蛋白	3.17	抑制肿瘤和炎症
G-LPP-K	5dad-01	Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)	3.69	抗氧化
	1o86-01	血管紧张素转化酶	3.33	治疗高血压
	5dad-01	Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)	3.62	抗氧化
E-HE-R	1m48-04	白细胞介素 2	3.28	调节免疫反应
	3d9k-08	SCAF8 蛋白	3.14	mRNA 加工

### 2.3 分子对接模块复筛预测的功能

经过反向找靶,初步推测优势多肽 G-PQV-R、G-LPP-K 和 E-HE-R 的靶标蛋白为 Keap1。为了进一步确认上述推测,使用 DS 软件中的分子对接模块,对 G-PQV-R、G-LPP-K 和 E-HE-R 与 Keap1 之间的相互作用进行验证。CDOCKER 分子对接主要根据受体与配体相互作用的能量(CDOCKER interaction energy, E<sub>CI</sub>),范德华力(van der Waals Energy, E<sub>VDW</sub>)等信息来确定结合程度。E<sub>CI</sub> 值越低表示分子对接过程中受体

与配体的相互作用越小,结合的越紧密。如表 3 所示,配体小分子 G-LPP-K 与受体蛋白结合所需的能量最低,结合最紧密。如图 2 可看出,参与 G-LPP-K 配体

表 3 分子对接结果

Tab.3 The results of molecular docking

多肽序列	-E <sub>CI</sub> (kJ/mol)	-E <sub>VDW</sub> (kJ/mol)	氨基酸残基数
G-PQV-R	114.329	34.9688	14
G-LPP-K	81.533	17.6716	16
E-HE-R	86.2967	13.4166	10

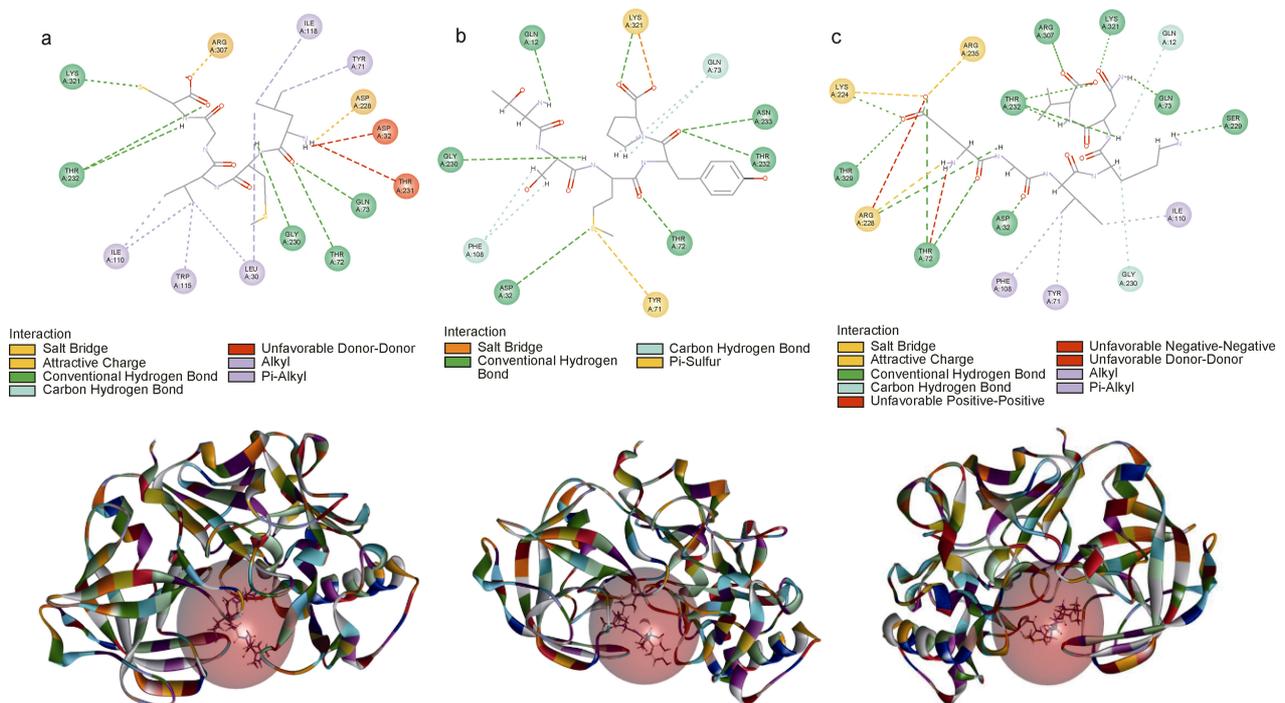


图 2 优势肽和靶标蛋白 Keap1 分子对接结果

Fig.2 Molecular docking results of dominant peptide and target protein Keap1

注: a. 优势肽 G-LPP-K 和靶标蛋白 Keap1 分子对接结果; b. 优势肽 E-HE-R 和靶标蛋白 Keap1 分子对接结果; c. 优势肽 G-PQV-R 和靶标蛋白 Keap1 分子对接结果

小分子与 Keap1 中的相互作用的氨基酸残基共 16 个, 其中配体小分子与赖氨酸, 精氨酸和天冬氨酸形成电荷吸引力, 与苏氨酸, 天冬氨酸, 精氨酸, 谷氨酰胺, 赖氨酸和丝氨酸形成氢键能, 与甘氨酸和谷氨酰胺形成碳氢键能, 与异亮氨酸, 酰胺酸和苯丙氨酸形成烷基键能和 PI 烷基键能; G-QPV-R 配体小分子与 Keap1 中的相互作用的氨基酸残基共 14 个, 其中配体小分子与精氨酸和天冬氨酸形成电荷吸引力, 与苏氨酸, 甘氨酸, 谷氨酰胺和赖氨酸形成氢键能, 与异亮氨酸, 酪氨酸, 亮氨酸和色氨酸形成烷基键能和 PI 烷基键能; E-HE-R 配体小分子与 Keap1 中的相互作用的氨基酸残基共 10 个, 其中配体小分子与天冬酰胺, 苏氨酸, 天冬氨酸, 甘氨酸和谷氨酰胺形成电荷吸引力, 与苯丙氨酸和谷氨酰胺形成碳氢键能。综上所述, 金枪鱼胰腺酶解液中的优势多肽可以通过多种作用力与靶标蛋白 Keap1 结合, 预测其具有抗氧化的活性功能。

2.4 抗氧化功能的研究

2.4.1 促进氧化损伤的 INS-1 细胞的增殖 与对照组(细胞活力为 100%±1.3%)相比, 模型组的细胞活力显著下降( $P<0.01$ ), 仅为对照组的 22%±2.3%; 经高、低剂量金枪鱼胰腺酶解液处理后, 细胞活力较模型组显著升

高( $P<0.01$ ), 且细胞活力随胰腺酶解液浓度的增加而增加。分别将细胞活力恢复到对照组的 63%±1.5%和 44%±2.8%(图 3)。金枪鱼胰腺酶解液可以增强氧化损伤的 INS-1 细胞的细胞活力, 对氧化损伤的 INS-1 细胞的增殖具有一定的促进作用。

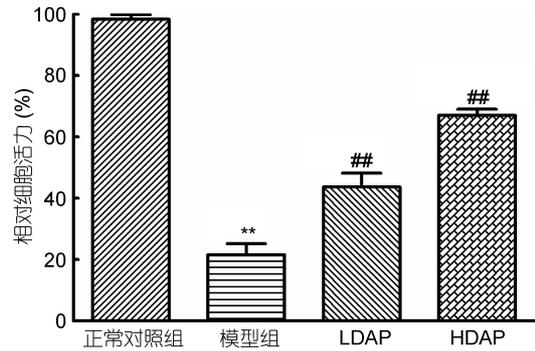


图 3 金枪鱼胰腺酶解液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 INS-1 细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of tuna pancreatic active peptide on the proliferation of INS-1 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

注: \*\*、 $P<0.01$  与正常对照组比较; ##、 $P<0.01$  与模型组比较

2.4.2 抑制氧化损伤 INS-1 细胞的凋亡 由图 4 可知, 与正常对照组(细胞凋亡率 6.43%±0.79%)相比,

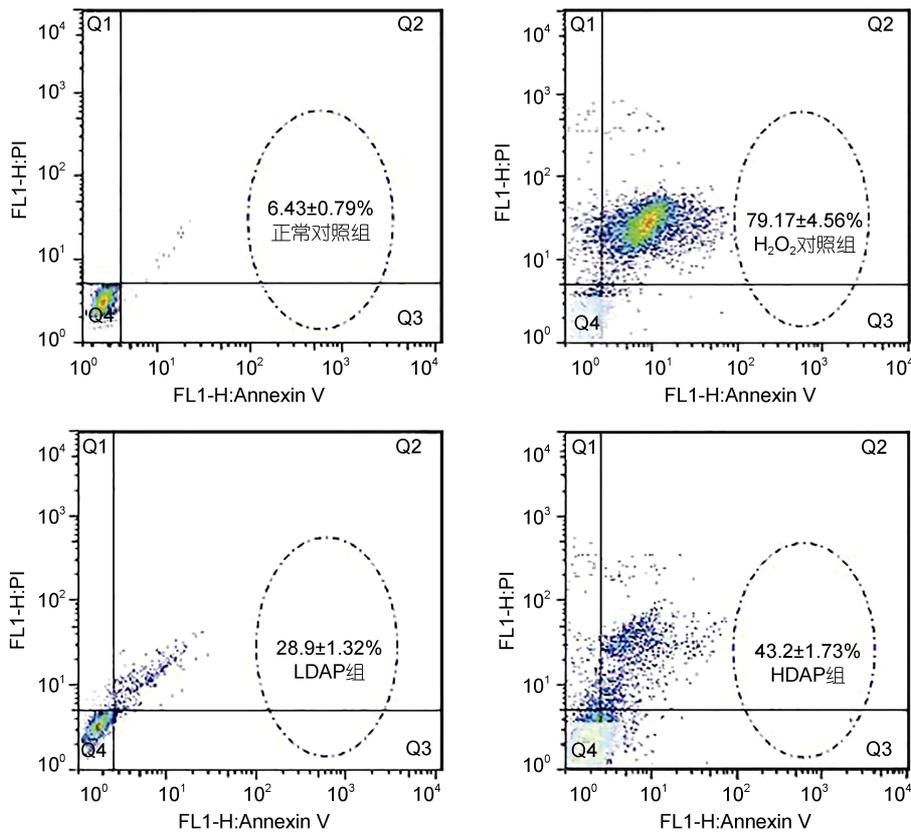


图 4 金枪鱼胰腺酶解液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 INS-1 细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of tuna pancreatic active peptide on INS-1 cells apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

模型组细胞凋亡率显著升高到 79.17%±4.56% ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 金枪鱼胰腺酶解液高剂量和低剂量处理使得细胞凋亡率显著降低, 分别降低到 43.2%±1.73% ( $P < 0.01$ )和 28.9%±1.32% ( $P < 0.01$ )。金枪鱼胰腺酶解液能够显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 INS-1 细胞凋亡。但是, 随着胰腺酶解液浓度的增加, 对细胞凋亡的抑制活性反而降低。

**2.4.3 改善氧化损伤的 INS-1 细胞的胰岛素分泌**  
胰岛素由人体胰岛分泌的。正常时, 葡萄糖摄入增加促进胰岛分泌胰岛素增多, 葡萄糖摄入不足胰岛素分泌会明显减少。由图 5 可知, 当葡萄糖浓度为 5.6mmol/L 时, 与正常对照组(24h 的胰岛素分泌量为 3.75±0.02mIU/L)相比, 模型组胰岛素分泌量显著减少到 2.65±0.35mIU/L ( $P < 0.01$ ), 金枪鱼胰腺酶解液高剂量和低剂量处理后, 胰岛素分泌量较模型组显著升高, 分别为 3.45±0.23mIU/L ( $P < 0.01$ )和 3.15±0.19mIU/L ( $P < 0.01$ )。当葡萄糖浓度为 16.7mmol/L 时, 与正常对照组(24h 胰岛素分泌量为 6.15±0.02mIU/L)相比, 模型组胰岛素分泌量显著减少到 3.65±0.24mIU/L ( $P < 0.01$ ), 金枪鱼胰腺酶解液高剂量和低剂量处理后, 胰岛素分泌量较模型组显著升高到 5.75±0.18mIU/L ( $P < 0.01$ )和 4.95±0.22mIU/L ( $P < 0.01$ )。随着葡萄糖摄入量增加, 胰岛素分泌水平整体增加, 金枪鱼胰腺酶解液能够显著改善氧化损伤的 INS-1 细胞的胰岛素分泌, 且改善效果呈剂量效应增加。

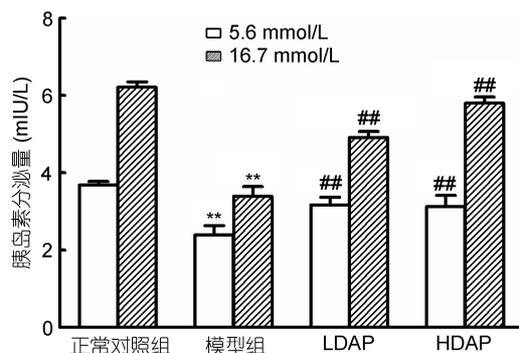


图 5 金枪鱼胰腺多肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响

Fig.5 Effect of tuna pancreatic active peptide on insulin secretion in INS-1 cells

注: 与正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对照组比较, ## $P < 0.01$

### 3 讨论

分子对接方法已成为药物设计中比较成熟的方法, 它能够准确预测蛋白质受体与配体间的结合位

点, 指导和解释实验现象(段爱霞等, 2009)。刘广斌等(2016)已通过 DS 模拟 Hsrad51 蛋白与多肽 brc4 的分子对接, 为研究 Hsrad51 蛋白与其他重复基元的分子对接以及相互作用提供了重要依据。成功预测独活寄生汤对 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  作用的活性成分(郑春松等, 2012)。反向找靶是研究多肽功能和药物作用活性位点的重要工具(Chen *et al*, 2014; Grienke *et al*, 2015)。通过反向找靶预测多肽功能, 如抗高血压、细胞生长调节、抗肿瘤活性、免疫系统调节等(Han *et al*, 2018)。

金枪鱼的胰腺质量约占内脏下脚料的 27%(鳃除外), 并且胰腺蛋白质含量丰富。其多肽 G-LPP-K, E-HE-R 和 G-QPV-R 为金枪鱼胰腺酶解液的优势肽, 反向找靶技术预测了 G-LPP-K, E-HE-R 和 G-QPV-R 三种多肽均可与 Keap1 结合, 细胞学实验结果表明, 金枪鱼胰腺酶解液高剂量和低剂量处理后, 细胞活力较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤组显著提高, 凋亡率从 79.17%分别下降到 43.2%和 28.9%; 胰岛素的分泌量从 3.65mIU/L 分别增加到 5.75mIU/L 和 4.95mIU/L。金枪鱼胰腺活性肽具有显著的抗氧化活性, 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 INS-1 细胞具有明显的保护作用, 促进 INS-1 细胞的胰岛素分泌。

大量研究表明氧化应激与多种慢性病和急性病有着密切的联系, 常见的有心血管疾病、癌症、神经紊乱、糖尿病、缺血再灌注和衰老(Ryoo *et al*, 2001)。而生物活性肽以多种方式发挥其抗氧化的特性, 包括清除自由基、抑制 ROS 的产生以及抑制促炎细胞因子的释放等(蔡江佳等, 2015; 童茜茜等, 2016)。金枪鱼胰腺酶解液使机体形成了一个复杂的氧化应激反应系统, 调控上游区域的抗氧化反应元件(ARE), 以缓解氧化损伤对机体的损伤(Itoh *et al*, 2003)。Nrf2 是调节氧化应激的关键转录因子(Stewart *et al*, 2003), Keap1-Nrf2/ARE 作为一种有效的抗氧化调节途径, 抑制 Keap1 活性激活 Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激, 在细胞防御和降低机体氧化应激中发挥了重要作用(Rubiolo *et al*, 2008)。因此, 多肽可以通过抑制 Keap1 的活性, 实现细胞抗氧化的目的。

多肽的特定生理功能与其分子结构中的氨基酸数量、组成、排列顺序及分子构象密切相关(Zhang *et al*, 2010)。在本实验中, 金枪鱼胰腺酶解多肽的分子对接结果显示, 与 Keap1 相互作用共同氨基酸有赖氨酸, 精氨酸, 天冬氨酸, 苏氨酸, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 甘氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, 苯丙氨酸。其中, 缬氨酸, 苯丙氨酸, 异亮氨酸为疏水性氨基酸, 天冬氨酸为酸性氨基酸, 其组成的独特的空间结构, 使得金

枪鱼胰腺酶解多肽较单独的疏水性氨基酸和酸性氨基酸, 具有更强的抗氧化性能(杨兵等, 2011; 王宁丽等, 2016; 张晶等, 2016)。

#### 4 结论

金枪鱼胰腺水解多肽 G-PQV-R、G-LPP-K 和 E-HE-R 能增强氧化损伤的 INS-1 细胞的细胞活力, 促进这些细胞的增殖, 抑制细胞凋亡, 改善氧化损伤的 INS-1 细胞的胰岛素分泌, 且改善效果呈剂量效应增加。

#### 参 考 文 献

- 马振华, 李 霞, 2006. 中西太平洋金枪鱼资源. 水产科学, 25(10): 537—540
- 王宁丽, 徐月敏, 刘 毅等, 2016. 鱼皮低聚肽氨基酸组成及抗氧化活性研究. 食品研究与开发, 37(2): 31—35
- 方 磊, 李国明, 徐姗姗等, 2018. 牡蛎生物活性肽的研究进展. 食品安全质量检测学报, 9(7): 1548—1553
- 延海莹, 刘盟梦, 乔乐克等, 2018. 扇贝裙边活性肽的制备及其降血糖活性研究. 食品工业, 39(3): 117—121
- 刘广斌, 赵东欣, 马 丽等, 2016. 计算机模拟 HsRAD51 蛋白与多肽 BRC4 分子对接. 化学研究, 27(1): 97—101
- 李 晔, 陈 蕾, 李 振等, 2012. 浙江枝吻纽虫 (*Dendrorhynchus zhejiangensis*) 凝溶胶蛋白基因的原核表达产物抗肿瘤活性的研究. 海洋与湖沼, 43(4): 756—760
- 杨 兵, 夏先林, 吴文旋, 2011. 不同水平的氨基酸对小香鸡免疫性能与抗氧化性能的影响. 江西农业学报, 23(8): 158—160, 171
- 张 晶, 张怡一, 徐斐然等, 2016. 菜籽多肽体外和细胞内抗氧化性评价及氨基酸分析. 食品科学, 37(13): 36—41
- 郑书国, 赵梦秋, 吴元洁等, 2015. 丹蛭降糖胶囊对波动高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡和胰岛素分泌的影响. 中成药, 37(4): 722—727
- 郑春松, 叶蕪芝, 许惠凤等, 2012. 分子对接法预测独活寄生汤对 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  作用的活性成分. 福建中医药大学学报, 22(4): 28—30
- 段爱霞, 陈 晶, 刘宏德等, 2009. 分子对接方法的应用与发展. 分析科学学报, 25(4): 473—477
- 董丽莎, 李妍妍, 张红燕等, 2018. 黑线鳕鱼皮胶原蛋白胰蛋白酶酶解多肽对 UVB 诱导 HaCaT 光损伤的抑制作用. 食品科学, 39(10): 185—192
- 童茜茜, 徐嘉杰, 王 峰等, 2016. 小球藻精油对人结肠癌细胞增殖和凋亡的作用. 中国食品学报, 16(5): 25—31
- 蔡江佳, 李 晔, 张云云等, 2015. 鱿鱼皮胶原蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 MC3T3-E1 损伤的修复作用. 中国食品学报, 15(1): 6—12
- Chen S J, Ren J L, 2014. Identification of a potential anticancer target of danshensu by inverse docking. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15(1): 111—116
- Grienke U, Kaserer T, Pfluger F *et al*, 2015. Accessing biological actions of *Ganoderma* secondary metabolites by *in silico* profiling. Phytochemistry, 114: 114—124
- Han J J, Tang S S, Li Y Y *et al*, 2018. *In silico* analysis and *in vivo* tests of the tuna dark muscle hydrolysate anti-oxidation effect. RSC Advances, 8(25): 14109—14119
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y *et al*, 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. Genes to Cells, 8(4): 379—391
- Je J Y, Lee K H, Lee M H *et al*, 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International, 42(9): 1266—1272
- Rubiolo J A, Mithieux G, Vega F V, 2008. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. European Journal of Pharmacology, 591(1—3): 66—72
- Ryoo Y W, Suh S I, Mun K C *et al*, 2001. The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. Journal of Dermatological Science, 27(3): 162—169
- Stewart D, Killeen E, Naquin R *et al*, 2003. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. Journal of Biological Chemistry, 278(4): 2396—2402
- Zhang J H, Zhang H, Wang L *et al*, 2010. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. Food Chemistry, 119(1): 226—234

## IN-SILICO ANALYSIS AND IN VIVO TESTS OF ANTI-OXIDATION EFFECT OF TUNA PANCREAS HYDROLYSATE ON INS-1 CELL

WANG Xiao-Feng<sup>1,2</sup>, SHEN Hui-Ting<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-Ling<sup>3</sup>, YU Rong-Xian<sup>3</sup>, LIU Bing<sup>3</sup>, SU Xiu-Rong<sup>1</sup>  
(1. *School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China*; 2. *College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China*; 3. *Shenzhen Rongge Health Products Co., Ltd., Shenzhen 518118, China*)

**Abstract** In this study, the MALDI-TOF/TOF-MS technique was used to determine the polypeptide components and their abundance in the pancreatic enzymatic hydrolysate, and GQPVR, GLPPK, and EHER were identified as the dominant peptides. The reverse lookup in the Discovery Studio platform was used. It was found that these dominant peptides can bind to Keap1 protein, suggesting that it may have antioxidant activity. The antioxidant activity of the enzymatic hydrolysate was verified in cell experiments, and its insulinoma of oxidative damage to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was found. The cell (INS-1) had a dose-dependent protective effect. The cell viability of the high-dose and low-dose enzymatic treatment groups was significantly higher than that of the model group, and the apoptotic rate decreased from 79.17% to 43.2% and to 28.9% ( $P<0.01$ ), respectively; insulin secretion increased from 3.65 to 5.75 and to 4.95 mIU/L, respectively ( $P<0.01$ ). The combination of the Discovery Studio functional predictive analysis and cytology experiments provides new insights into the functional component identification of enzymatic hydrolysates.

**Key words** tuna pancreas; enzyme hydrolysis; molecular docking; oxidative damage; insulinoma cells