

兜唇石斛发酵多肽抗氧化活性与氨基酸结构的关系

林丹霓¹, 黄君婷¹, 钟玉鸣², 王琴^{1,3}, 肖更生^{1,3}, 刘祎帆^{1,3*}

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510550)

(2. 仲恺农业工程学院资源与环境学院, 广东广州 510550)

(3. 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东广州 510550)

摘要: 前期采用微生物固态发酵法获得兜唇石斛多肽 DPP, 通过液相质谱发现 DDDY、DYDD、MAK、AVTF、RSS、MLCA 六条多肽序列。为进一步研究 DPP 抗氧化功能与其氨基酸结构的关系, 该研究借助 QSAR 模型, 采用体外抗氧化实验、人肝癌细胞 (HepG2) 的 CAA 试验和红细胞溶血试验评价多肽的抗氧化能力, 通过相关性分析研究氨基酸结构对抗氧化活性的影响。结果表明: 六条合成多肽及母肽均具有抗氧化活性 ($P < 0.05$)。其中 MLCA 表现出最强的 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力、铁还原力和红细胞溶血保护能力, IC_{50} 分别为 0.89、0.99、1.34、0.68 mg/mL; AVTF 的细胞抗氧化活性最强, EC_{50} 为 0.02 mg/mL。供氢供电子氨基酸以及疏水性氨基酸有助于 DPP 的抗氧化活性。N 端氨基酸为 Met, N 端第二位为 Leu、Val 或 C 端第三位为 Leu 是各位点的有利氨基酸残基。另外, 还发现 Ala 可以促进多肽的抗氧化作用, Tyr 位置的改变对多肽的抗氧化能力的影响较小。该研究为深入探究抗氧化肽的构效关系提供了理论依据, 为抗氧化肽的进一步研究奠定基础。

关键词: 兜唇石斛; 多肽; 抗氧化功能; QSAR 模型; HepG2 细胞; 红细胞溶血; 相关性分析; 构效关系

文章编号: 1673-9078(2023)10-139-150

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1558

Relationship between the Oxidative Activity and Amino Acid Structure of Fermented Polypeptides from *Dendrobium aphyllum*

LIN Danni¹, HUANG Junting¹, ZHONG Yuming², WANG Qin^{1,3}, XIAO Gengsheng^{1,3}, LIU Huifan^{1,3*}

(1. College of Light Industry and Food Technology, Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou 510550, China) (2. College of Resources and Environment, Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou 510550, China) (3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, Guangzhou 510550, China)

Abstract: The polypeptide DPP of *Dendrobium aphyllum* was obtained by microbial solid-state fermentation and sequenced by HPLC-MS/MS in our previous research, revealing six polypeptide sequences: DDDY, DYDD, MAK, AVTF, RSS, and MLCA. The relationship between the antioxidant function of DPP and its amino acid structure was investigated herein. To this end, the quantitative structure-activity relationship (QSAR) model was applied and an *in vitro* cellular antioxidant activity assay with HepG2 cells and erythrocyte hemolysis assay were performed to evaluate the antioxidant capacity of the peptide. Additionally, correlation analyses were performed to assess the effect of amino acid structure on the antioxidant activity. The results showed that all six synthetic peptides and DPP exhibited antioxidant activity ($P < 0.05$). Among them, MLCA showed the strongest DPPH and ABTS radical scavenging ability, iron-reducing power, and erythrocyte hemolysis protection. The IC_{50} was 0.89, 0.99, 1.34, and 0.68 mg/mL, respectively. Meanwhile, the AVTF peptide exhibited the strongest cellular antioxidant activity with an EC_{50} of 0.02 mg/mL. Hydrogen- and electron-donating amino acids and hydrophobic amino acids

引文格式:

林丹霓, 黄君婷, 钟玉鸣, 等. 兜唇石斛发酵多肽抗氧化活性与氨基酸结构的关系[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10): 139-150

LIN Danni, HUANG Junting, ZHONG Yuming, et al. Relationship between the oxidative activity and amino acid structure of fermented polypeptides from *Dendrobium aphyllum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 139-150

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 广州市基础研究计划基础与应用研究基础项目 (B32020712); 广东省普通高校特色创新项目--特色创新项目 (自然科学) (KA21031F8)

作者简介: 林丹霓 (2001-), 女, 本科在读, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: blessing_01271@qq.com

通讯作者: 刘祎帆 (1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物开发, E-mail: lm_zkng@163.com

contributed to the antioxidant activity of DPP. The favorable amino acids at each point included: Met as the N-terminal amino acid; Leu or Val as the second amino acid at the N-terminal; Leu as the third amino acid at the C-terminus. In addition, Ala contributed to the antioxidant activity of the peptides, whereas changes in the Tyr position had minimal impact on the antioxidant activity. This study establishes a theoretical framework for comprehensive investigation of the structure-activity relationship between antioxidant peptides, laying the foundation for further research on antioxidant peptides.

Key words: *Dendrobium aphyllum*; peptide; antioxidant; QSAR model; HepG2 cell; erythrocyte hemolysis; correlation analysis; structure-activity relationship

多肽是一段由多个氨基酸通过肽键连接而形成的具有特殊生理性功能的氨基酸序列,有着抗氧化^[1]、降血压^[2]、促进钙吸收^[3]等众多生物活性,在生命活动中发挥着举足轻重的作用。此前,已有相关研究报道称多肽链中的疏水性氨基酸、酸性氨基酸和芳香族氨基酸的含量及其在链中所处位置与多肽的抗氧化能力有关,是其抗氧化能力的重要影响因素。

兜唇石斛是兰科石斛属的附生植物,因其适应能力强,繁殖速度快,生长条件简单且具有较高的药用价值等优势,广受种植者青睐。当前,关于石斛天然产物的研究多聚集在多糖、生物碱等领域^[4],石斛多肽的相关研究甚少。本团队在前期研究中以兜唇石斛为原料,选用乳酸杆菌 *Lactobacillus amylolyticus* L6 对兜唇石斛固态发酵,得到粗多肽收率为 18.23%,抗氧化实验发现兜唇石斛 <1 ku 的多肽组分具有理想的抗氧化活性^[5],并通过分离纯化获得了 DPP 肽段。

在前期研究中使用 HPLC-ESI-MS/MS 对 DPP 的氨基酸序列进行鉴定,得到 Asp-Asp-Asp-Tyr (DDDY)、Asp-Tyr-Asp-Asp (DYDD)、Met-Ala-Lys (MAK)、Ala-Val-Thr-Phe (AVTF)、Arg-Ser-Ser (RSS)、Met-Leu-Cys-Ala (MLCA) 六条短肽^[5]。因此,本研究在此基础上,通过 Fmoc 多肽合成法分别合成这六条多肽,利用色谱分析以及质谱分析对合成多肽进行纯度和结构的验证。通过 QSAR 模型, DPPH、ABTS⁺ 自由基清除实验和铁还原力实验测定六条合成多肽的体外抗氧化能力。利用 CAA 模型测定六条合成多肽及母肽对人肝癌细胞 HepG2 的细胞抗氧化活性,通过人红细胞抗氧化实验评价六条多肽及母肽对由 AAPH 自由基引起的红细胞溶血后的保护作用,并借助相关性分析研究兜唇石斛抗氧化肽的构效关系。本研究的发现阐述了多肽氨基酸结构与其抗氧化活性的潜在联系,为新型抗氧化肽的研发提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

兜唇石斛样本,中国云南省西双版纳 GAP 基地;

乳酸杆菌 *Lactobacillus amylolyticus* L6 菌株,华南理工大学食品科学与工程实验室;人肝癌细胞 HepG2,中国广州中山大学医学院;MTS 细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒,Bebo 生物技术有限公司;DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;磷酸缓冲溶液,美国 Thermo Fisher Scientific Inc.;2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 AAPH,上海阿拉丁有限公司;2',7'-二乙酰二氯荧光素 DCFH-DA、胎牛血清,美国 Gibco 公司;其他有机、无机试剂均为国产分析纯。

1.2 兜唇石斛多肽组分的分离纯化

根据刘祎帆^[5]的方法,利用乳杆菌 *Lactobacillus amylolyticus* L6 对兜唇石斛进行固态发酵。对新鲜样品预处理后,准确称 20 g 兜唇石斛粉末分别置于 4 个培养皿中。蒸馏水润湿,保持体积分数 50% 的含水量,121 °C 灭菌 15 min。后接种无菌样品(体积分数 10% 接种量),将乳酸菌 *Lactobacillus amylolyticus* L6 悬浊液均匀撒在已润湿兜唇石斛粉末上,封口条封好,37 °C 下培养 48 h。发酵完成后 60 °C 干燥,并迅速 -20 °C 保存。然后以 1:10 的料液比溶于蒸馏水中,翻搅 30 min。待完全溶解后,离心(3 500 r/min, 10 min) 3 次,每次取上清液并再加水离心。-40 °C 下贮存后冻干。得到兜唇石斛多肽粗样,立即冷冻于 -20 °C 以待用。将冻干得到的粗样以 10 mg/mL 溶于蒸馏水中。分别用纯水,0.05、0.15 mol/L 的 NaCl 溶液对样品洗脱。于 220 nm 处分析收集各组分离洗脱液。在此基础上,分别通过浓缩、透析和冷冻干燥获得 DPP 肽组分。

1.3 多肽序列 DDDY、DYDD、MAK、AVTF、

RSS、MLCA 的合成

采用刘映君等^[6]的方法合成六条短肽。C 端第一个氨基酸分别为 DDDY : Fmoc-Tyr(tBu)-OH+DCM+DIEA ; DYDD : Fmoc-Asp(otbu)-OH ; MAK : Fmoc-Lys(Boc)-OH ; AVTF : Fmoc-Phe-OH ; RSS : Fmoc-Ser(tbu)-OH ; MLCA : Fmoc-Ala-OH。C 端第二个氨基酸分别为

DDDY: Fmoc-Asp(otbu)-OH+HOBT+DIC; DYDD: Fmoc-Asp(otbu)-OH; MAK: Fmoc-Ala-OH; AVTF: Fmoc-Thr(tbu)-OH; RSS: Fmoc-Ser(tbu)-OH; MLCA: Fmoc-Cys(trt)-OH。

1.4 合成肽的结构鉴定

溶解方法为质量分数 5% HAC+8% ACN+87% H₂O。进样量为 0.2 μL。源类型为 ESI 模式，去溶剂

气体流量为 1.50 L/min，去溶剂气温度为 250 ℃。偏离周期为+4.5 kV。

1.5 合成肽的纯度鉴定

流动相为体积分数 0.1%三氟乙酸水溶液-乙腈。用 1 mL/min 的流速进行洗脱。检测波长为 214 nm。

1.6 建立 QSAR 模型

表 1 抗氧化肽数据库信息表

Table 1 Antioxidant peptide database information table

No.	Peptide	ORAC	No.	Peptide	ORAC
3	WYSL	4.52	15	LGFEYY	7.25
4	WNIP	15.47	16	VIPMGL	2.89
5	GWNI	13.9	17	AGWNIPIGT	5.25
6	YVEEL	0.799	18	LSKAQSDFG	-1.4
7	MHIRL	0.306	19	YAEERYPIL	3.8
8	SALAM	2.66	20	LVEKGDVAFI	-0.07
9	WYSLA	4.59	21	WYSLAMAASDI	2.621
10	AGWNI	8.55	22	IEWEGIESGSVEQA	0.73
11	LGFEY	9.79	23	AIEWEGIESGSVEQA	0.95
12	GWNIP	6.19	24	IAAEVYEHTEGSTTSY	2.39
13	WYSLAM	7	25	PIAAEVYEHTEGSTTSY	1.68
14	AGWNIP	7.64	26	IANNEADAIISLDGGQVFEAG	0.43

QSAR 建模提供了一种寻找抗氧化肽结构与其清除自由基活性关系的数学表达式的方法，可用于预测具有高活性的结构。参考 Li 等^[7]的研究报道，利用 VHSE 作为氨基酸结构描述符，采用 TTPN 法对肽段进行处理后，对 ORAC 数据库中的抗氧化肽段进行定量 SAR 建模，预测六条合成多肽的抗氧化活性。

1.7 体外抗氧化试验

1.7.1 DPPH 自由基的清除率测定

根据 Kimatu 等^[8]的方法，评价清除 DPPH 自由基能力。取七个多肽样品溶液（每个样品质量浓度梯度分别为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL）与 4 mL 0.12 mmol/L DPPH 混合均匀，而后在避光处静置 30 min。在 517 nm 处读取对照品和样品的吸光度。以等浓度梯度等体积的维生素 C（Vc）和加入等量超纯水的样品作为阳性和阴性对照。DPPH 自由基的清除率计算公式如下：

$$C = \left(A_{c_1} - \frac{A_{s_1}}{A_{c_1}} \right) \times 100\%$$
 (1)

式中：

C——为 DPPH 自由基清除率，%；

A_{c1}——为对照品吸光度值；

A_{s1}——为样品吸光度值。

1.7.2 ABTS⁺自由基的清除率测定

根据 Luo 等^[9]的方法，评价清除 ABTS⁺自由基能力。其中取七个样品溶液（每个样品质量浓度梯度分别为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL）与 4 mL 0.12 mmol/L ABTS 混匀。

1.7.3 还原力的测定

根据 Moktan 等^[10]的方法，评价样品铁还原力。其中用 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释七个样品（每个样品浓度梯度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL）。

1.8 红细胞溶血试验

本实验评估了六条合成多肽及 DPP 对于由 AAPH 诱导的红细胞溶血的保护作用。将成人血液样本使用 PBS(pH 值 7.4)洗涤 3 次，离心洗涤血样(3 500 r/min，10 min，4 ℃)，获得红细胞。将样品溶液分为五级浓度梯度：0.375、0.75、1.5、3、6 mg/mL。用 4 倍 PBS 稀释红细胞悬浮液。随后把 200 mL 的红细胞悬浮液添加至 200 mL 样品分级溶液中。空白对照为 200 mL PBS 溶液。将混合物在 37 ℃下静置 30 min 后，添加 400 mL 0.2 mmol/L AAPH 溶液，轻晃温育 2 h。然后用 3.2 mL PBS 稀释并离心。于 540 nm 处检测上清液

的吸光度。将超纯水加入上述红细胞悬浮液中,达到100%溶血。溶血抑制率计算公式如下:

$$HI = \left(1 - \frac{As_2}{Ac_2}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

HI——为红细胞溶血抑制率, %;

Ac_2 ——为完全溶血组吸光度值;

As_2 ——为样品处理组吸光度值。

1.9 细胞抗氧化活性(CAA)实验

1.9.1 HepG2 细胞培养

将HepG2细胞培育在DEME完全培养基(DMEM培养基、胎牛血清和双抗体积比例为89:10:1)中,于37℃、体积分数为5% CO₂的增湿环境中培养。两天替换一次培养基。

1.9.2 细胞活力测定

把对数生长期的HepG2铺在96孔板,每孔细胞数目为 1×10^6 个。37℃、 $\phi=5\%$ CO₂培养24 h,去掉上清液,将细胞用PBS洗涤1遍。用S40(25、50、100、200、400 μg/mL)和L40(25、50、100、200、400 μg/mL)分别培养HepG2细胞(每个质量浓度进行三次重复);在空白对照组中添进100 μL的完全培养基,在标准对照组中加入不同质量浓度(100、200、300、400、500 μg/mL)的槲皮素培养基(使用0.22 μm无菌滤膜过滤),随后在37℃,5% CO₂的增湿环境中培养24 h。取出平板,每孔中添加10 μL MTS,继续培养4 h。于490 nm处检测OD值As(DMEM+细胞+样品)、Ab(DMEM+样品)和Ac(DMEM+细胞)。与对照组比较,在样品的OD值降低小于10%的情况下,在此浓度范围内的试样不会对HepG2产生细胞毒性,能用于CAA测定。细胞毒性计算公式如下:

$$CS = \frac{As_3 - Ab}{Ac_3 - Ab} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

CS——为细胞存活率, %;

As_3 ——为DMEM+细胞+样品组吸光度值;

Ab ——为DMEM+样品组吸光度值;

Ac_3 ——为DMEM+细胞组吸光度值。

1.9.3 CAA 测定

根据Wolfe等^[11]的方法,测定细胞抗氧化活性。将样本用DMEM培养基配制并稀释至适当质量浓度(分别为50、100和200 μg/mL),后与DCFH-DA

(25 μmol/L) 1:1 混合。分别将含有DCFH-DA的100 μL样品溶液添加到96孔板中培养1 h,用PBS洗涤平板3次。将100 μL AAPH(600 μmol/L)依次加入于每个细胞孔中。将96孔板置于酶标仪中测荧光强度。激发波长为485 nm、发射波长为535 nm。每隔五分钟读一次,持续1 h。每个96孔板配备一个控制孔(DMEM+DCFH-DA)。计算时间-荧光值曲线下的积分面积。计算:纵坐标是对数[CAA单位/(100-CAA单位)],横坐标是对数浓度,得到线性回归方程,从而得到样品和槲皮素的EC₅₀值。样品的CAA值表示为槲皮素当量。

1.10 相关性分析

为探究多肽抗氧化活性与不同氨基酸位点之间的关系,采用Spearman相关性对其进行检验,并运用R语言“ggcor”程序包绘制相关性热图,使用R语言“cirilize”程序包绘制弦图。

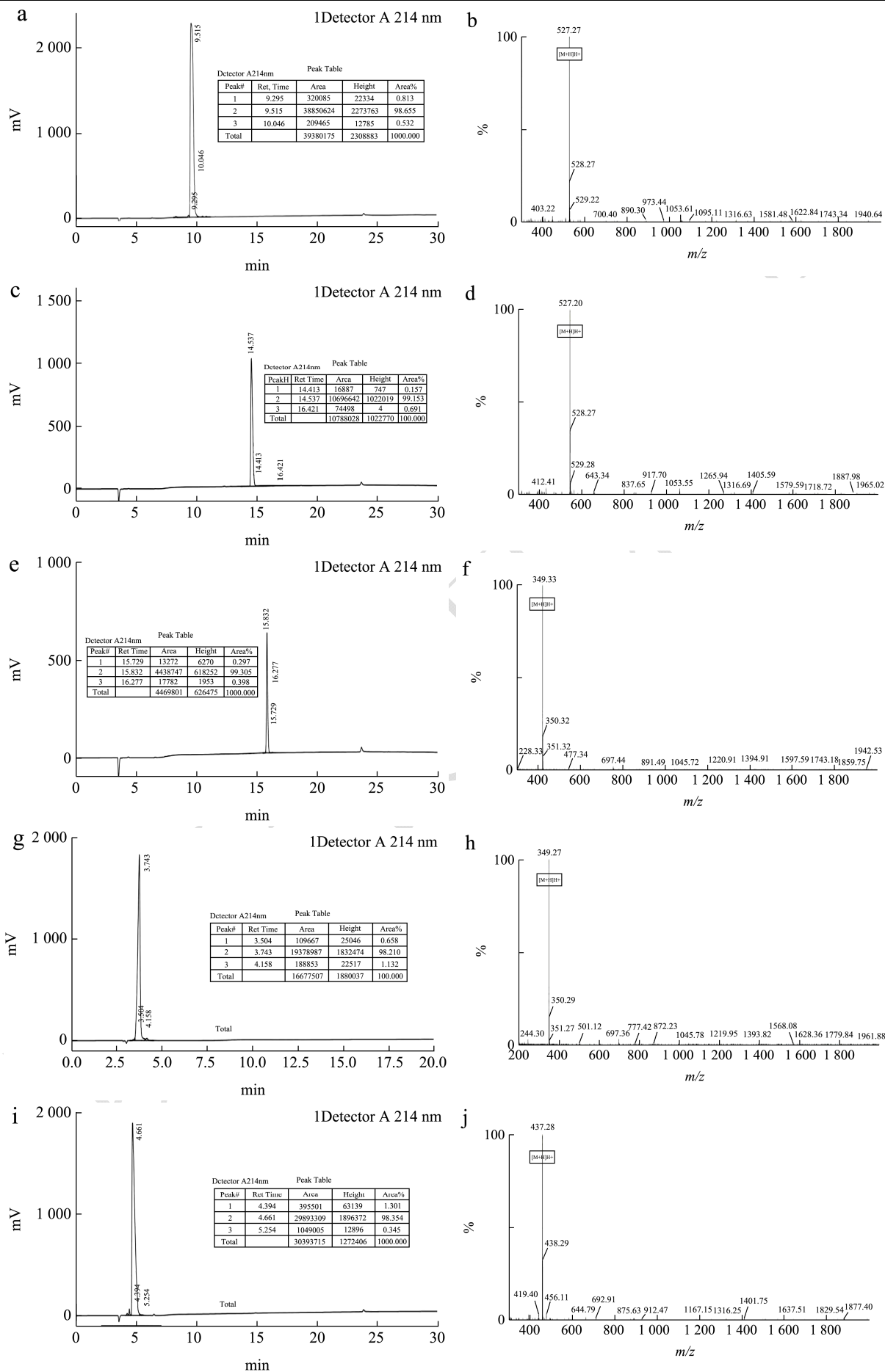
1.11 数据分析

以上实验重复3次,结果用平均值±标准差(mean±SD)表示。通过SPSS 22.0软件、Origin 2017软件和R语言“ggcor”、“cirilize”程序包对数据进行处理和绘图应用,采用邓肯多重分析法进行差异显著分析(SPSS Inc., Chicago, IL)。根据分析结果,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 合成肽序列及纯度的鉴定

合成多肽DDDY、DYDD、MAK、RSS、AVTF、MLCA的HPLC纯度鉴定如图1(a、c、e、g、i和k)所示。经高效液相色谱检测,六条多肽的色谱图中主峰所占百分比极大,仅存有少数杂质峰出现于图中,通过各峰面积的计算,分别得出六条色谱图中主峰占总峰面积的98.66%、98.23%、98.35%、98.21%、99.30%和99.15%,即合成多肽DDDY、DYDD、MAK、RSS、AVTF、MLCA得率分别为98.66%、98.23%、98.35%、98.21%、99.30%和99.15%,纯度很高。由图1(b、d、f、h、j和l)质谱分析可知,多肽DDDY、DYDD、MAK、RSS、AVTF、MLCA的相对分子质量分别为526.44、526.44、348.46、348.35、436.50、436.58。



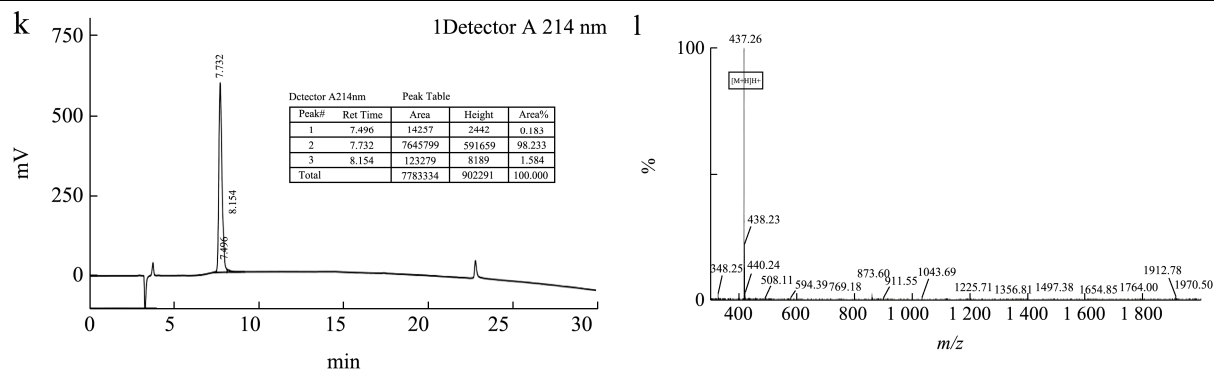


图1 多肽 DDDY、DYDD、MAK、RSS、AVTF、MLCA 的色谱图(a、c、e、g、i & k)和质谱图(b、d、f、h、j & l)

Fig.1 HPLC analysis (a, c, e, g, i & k) and ESI-MS profiles (b, d, f, h, j & l) of DDDY, DYDD, MAK, RSS, AVTF, MLCA

2.2 QSAR 模型预测结果

以 VHSE 为氨基酸描述子建模, 预测六条合成多肽有无抗氧化能力, 模型预测准确度达到 99%。由图 2 预测结果可知, 六条合成多肽都具有抗氧化活性。多肽的抗氧化能力与其氨基酸的组成、排列顺序、构象、分子量和疏水性等因素密切相关。其中氨基酸组成和氨基酸序列对抗氧化能力的影响最大^[12]。六条抗氧化肽中含有多种抗氧化氨基酸, 疏水性氨基酸^[13]和芳族氨基酸^[14](如 Ala、Val、Asp、Leu、Met、Tyr 和 Phe) 可以贡献大量电子, 有助于增强食物蛋白衍生肽的抗氧化活性^[15], Arg 中的胍基和 Ser 中的羟基可快速猝灭未配对电子, 阻碍氧化反应^[16], 认为这些氨基酸是多肽表现出抗氧化活性的结构基础。

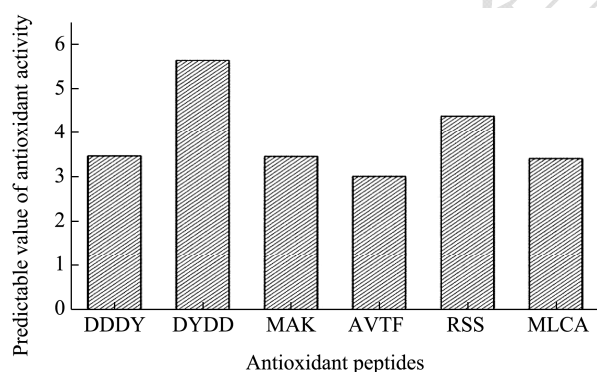


图2 合成多肽抗氧化性预测结果

Fig.2 Prediction results of antioxidant activity of the peptides

2.3 体外抗氧化能力的测定

2.3.1 DPPH 自由基清除率测定结果

DPPH 自由基的清除率愈高, 表示样品的抗氧化能力愈强。六条合成多肽及母肽的 DPPH 自由基清除率如图 3。由图可知, 在试验质量浓度 (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL) 范围内, 六种合成多肽及母肽对 DPPH 自由基的清除率与其质量浓度具有量效关系。MLCA 表现出很强清除 DPPH 自由基活性, 其清除能力最强,

接近对照组 Vc, IC₅₀ 值为 0.89 mg/mL。其次为母肽 DPP, IC₅₀ 值为 1.36 mg/mL。DYDD 与 DDDY 活性大小相近, IC₅₀ 值分别为 2.01 mg/mL、2.03 mg/mL。其余多肽的 DPPH 自由基清除活性相对较弱且活性相近。这与陈敏等^[17]燕麦多肽的 DPPH 自由基清除率与浓度呈正相关, IC₅₀ 值为 9.11 mg/mL 的研究结果相符。

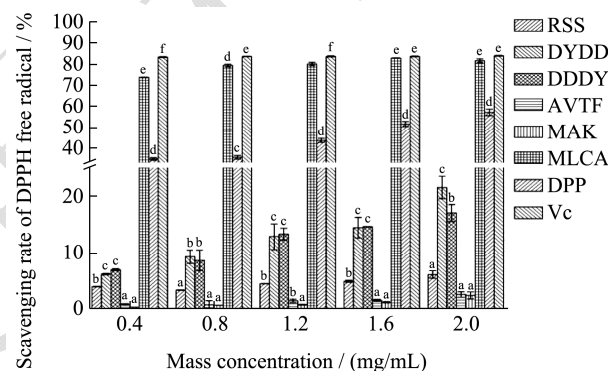


图3 六条合成多肽及母肽对 DPPH 自由基清除作用

Fig.3 Ability of the peptides to scavenge free radicals of DPPH radical scavenging activity

注: 不同字母代表组间差异有统计学意义 $P < 0.05$, 下同。

2.3.2 ABTS⁺自由基清除率测定结果

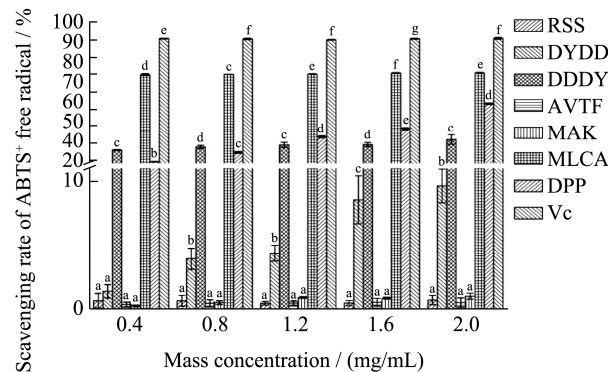


图4 六条合成多肽及母肽对 ABTS⁺自由基清除作用

Fig.4 Ability of the peptides to scavenge free radicals of ABTS⁺ radical scavenging activity

ABTS⁺自由基清除率愈高, 表示样品的抗氧化活性愈强。六种合成多肽及母肽对 ABTS⁺自由基的清除率

如图4所示。由图可知,六种合成多肽及母肽对ABTS⁺自由基的清除率与其质量浓度具有量效关系。在试验质量浓度(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)范围内,MLCA的ABTS⁺自由基清除能力最强,IC₅₀值为0.99 mg/mL;DDDY的ABTS清除能力略强于DYDD,二者IC₅₀值分别为1.66、2.20 mg/mL;而MAK、RSS、AVTF清除ABTS活性相对较弱且活性相近。这与刘小芳等^[18]南极磷虾蛋白肽的ABTS⁺自由基清除能力与浓度呈正相关,IC₅₀值为0.32 mg/mL的研究结果相符。

2.3.3 铁还原能力测定结果

样品吸光度愈大,还原力愈强,抗氧化能力愈好。如图5所示,多肽的还原能力与其质量浓度具有量效关系。六条合成多肽中,MLCA的铁离子还原能力最强,IC₅₀值为1.34 mg/mL。其次为母肽DPP,其余合成多肽的铁还原力相对较差且能力相近。这与张芳艺等^[19]草菇多肽铁还原力与其质量浓度呈正相关;于丽娜等^[20]磷酸化改性花生分离蛋白-多肽膜铁还原力IC₅₀值为13.93 mg/mL的研究结果相符。

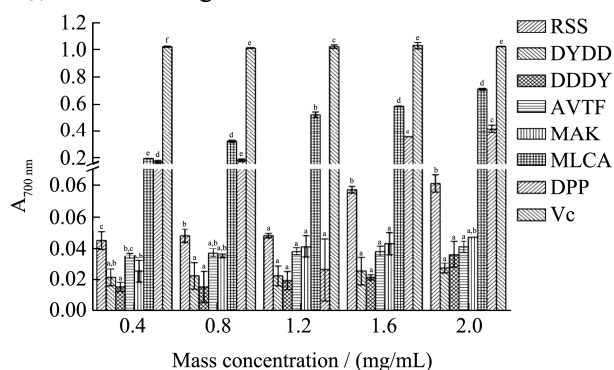


图5 六条合成多肽及母肽的铁还原力

Fig.5 The ferric ion reducing antioxidative power

2.4 对红细胞溶血的抑制作用

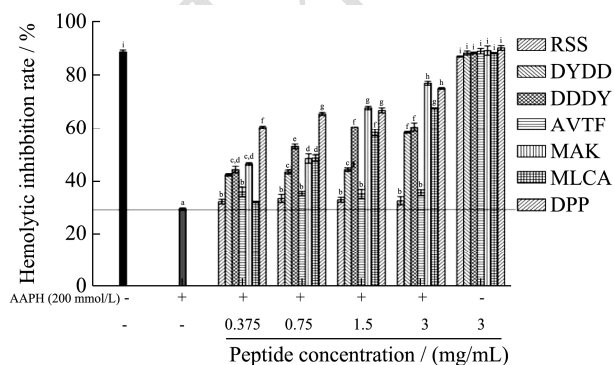


图6 六种合成多肽及母肽对人红细胞溶血的抑制率

Fig.6 Protective effects of the peptides on AAPH-induced erythrocyte hemolysis activity

通过六条合成多肽及母肽对AAPH自由基引起的红细胞溶血模型的保护作用研究发现,在相同孵育条

件下,空白对照组的红细胞溶血抑制率最高,为88.74%;仅用等体积的六种合成多肽及母肽对人红细胞处理,其抑制率与空白对照组相近;AAPH组的抑制率为29.53%。使用六种合成多肽及母肽对人红细胞进行预处理,溶血抑制率相较于AAPH组均有升高,表明六条合成多肽对红细胞溶血均有保护作用,红细胞溶血的抑制活性与其质量浓度具有量效关系。其中MLCA与MAK的保护作用较强,IC₅₀值分别为0.68 mg/mL、0.79 mg/mL,表明保护AAPH诱导的氧化损伤效果好。张丽娜等^[21]研究得出鱼籽多肽的红细胞溶血抑制活性与其质量浓度呈正相关,IC₅₀值为1.00 mg/mL。这与本实验结果相似。

2.5 对HepG2细胞增殖的影响

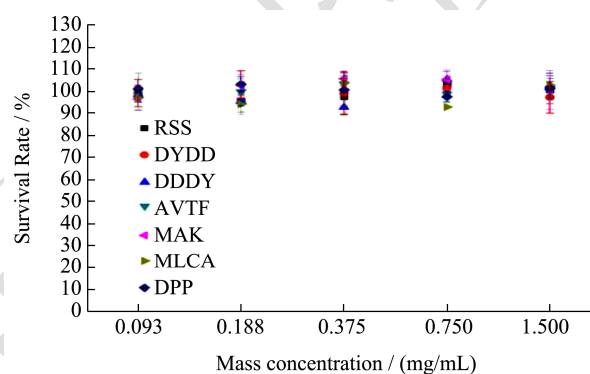


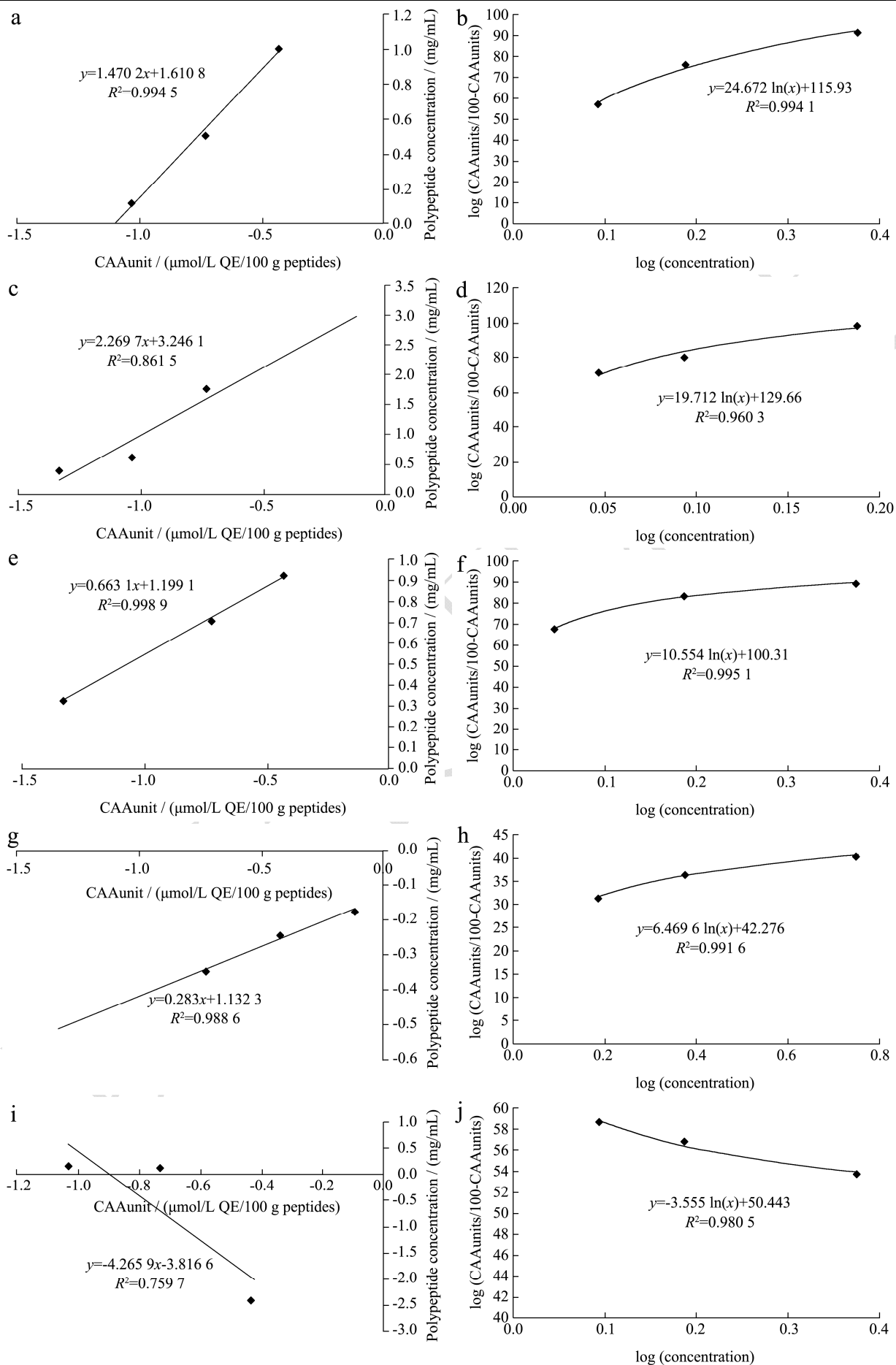
图7 HepG2细胞的存活率

Fig.7 The cell survival rate of HepG2 cells

根据图7所示,浓度范围在0.093、0.188、0.375、0.75、1.5 mg/mL之间的7种多肽对HepG2细胞的存活率均在90%~110%的范围之间,说明该浓度范围的六条多肽样品对HepG2无细胞毒性,因此选择0.09375、0.1875、0.375、0.75和1.5 mg/mL的7种多肽进行细胞抗氧化实验。

2.6 细胞抗氧化活性分析

在CAA实验中,用不同浓度的七条多肽处理HepG2细胞。如图8所示,本实验中,槲皮素的EC₅₀经计算后为20.52 mg/mL;多肽DPP、RSS、AVTF、MAK、MLCA、DYDD和DDDY的EC₅₀值分别为0.08、0.04、0.02、2.93、1.34、0.40和0.63 mg/mL,其CAA值分别为252.68、254.12、176.13、54.87、42.44、87.77和105.26 μmol/L QE/100 g peptides。这与刘祎帆^[5]兜唇石斛多肽<1 ku组分的CAA值为63.46 μmol/L QE/100 g peptides,EC₅₀值为2.88 mg/mL的研究结果相近。六条合成多肽及母肽均具有保护细胞免受氧化损伤的能力,其中AVTF和RSS相较其他合成多肽具有较强的细胞抗氧化能力。



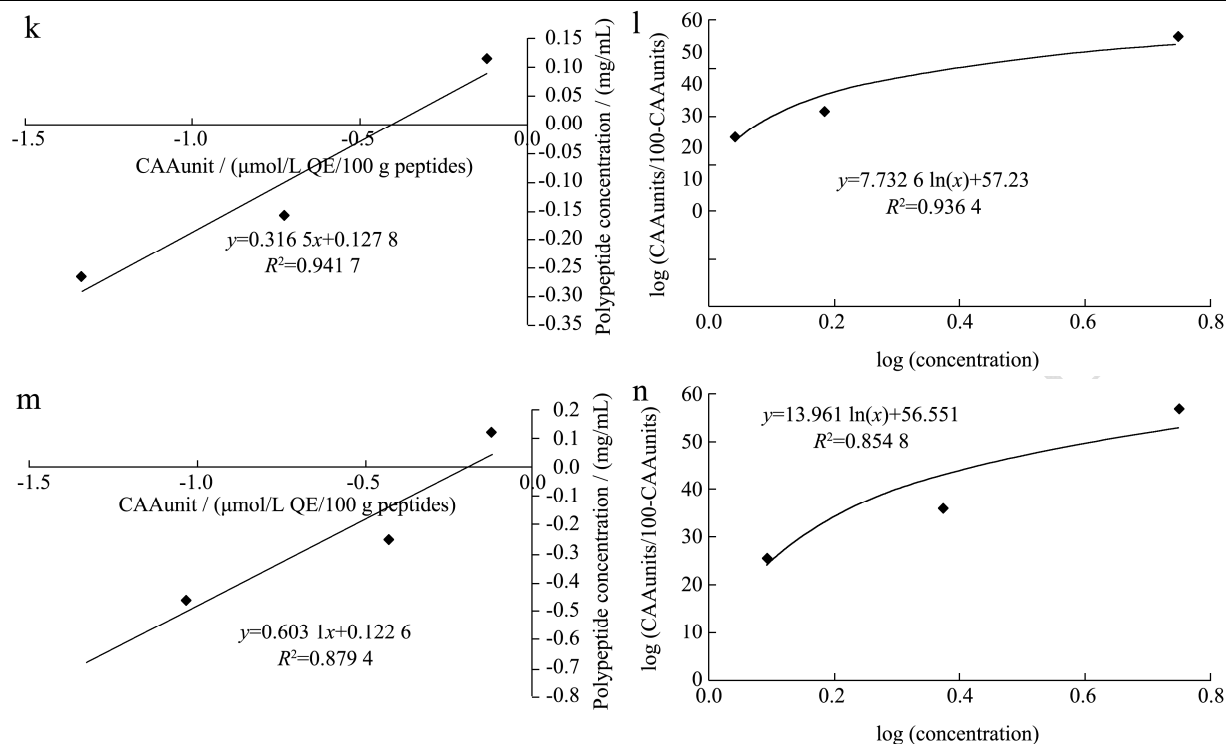


图8 细胞抗氧化CAA实验中CAAunit与多肽浓度之间的关系图(a、c、e、g、i、k和m); log(浓度)与log(CAAunits/100-CAAunits)之间的关系图(b、d、f、h、j、l和n)

Fig.8 The cellular antioxidant activity (CAA) assay of peptides in HepG2 cells; The calculated CAA dose-response curves to peptides (a, c, e, g, i, k & m); The calculated log (concentration) dose-response curves to log (CAA units/100-CAA units) (b, d, f, h, j, l & n) for the peptides

2.7 抗氧化活性与各氨基酸位点的相关性分析

多肽的抗氧化能力是其一级序列中全部氨基酸协同作用的结果,其抗氧化活性与每个氨基酸残基有着密切关系^[22],抗氧化氨基酸残基的存在是决定多肽最终抗氧化能力的核心要素^[23]。进一步探究各位点氨基酸残基对抗氧化肽活性的贡献,结果见图9。图9a弦图总体描绘了各抗氧化活性实验结果与不同氨基酸位点之间的联系和比例。N2位点对DPPH自由基的清除和ABTS⁺自由基的清除有较大贡献,C3位点与DPPH自由基清除活性、铁还原力以及红细胞溶血保护作用存在关联,N1位点也与铁还原力有关联,C1、C3、N3、N2和N1位点均对细胞抗氧化活性有一定贡献。使用VHSE描述子对合成多肽进行结构表征,具体展示氨基酸残基对抗氧化活性的影响,结果如图9b、c所示。以8个VHSE描述子(VHSE1~VHSE8)对各氨基酸位点进行结构表征。6肽可以产生48个结构变量,变量用VHSE_{i,j}表示。其中,i为VHSE描述子序号,j为氨基酸残基位点。颜色梯度表示Pearson相关系数。C3、N1、N2位点与DPPH、ABTS⁺自由基清除活性、铁还原力和红细胞溶血保护作用呈显著正相关关系,C1、C3、N3、N2、N1位点与细胞抗氧

化活性之间呈显著正相关关系($P < 0.05$)。N端氨基酸残基相比于C端氨基酸残基对抗氧化活性的影响更大。这与Wu等^[24]表明的位于N端的氨基酸比位于C端的氨基酸表现出更强的抗氧化能力的结论相符。

MLCA在DPPH、ABTS⁺自由基清除实验、铁还原力和红细胞溶血保护作用研究中均表现出极强的抗氧化活性,可能与其N端的Met残基、C端第三位Leu残基以及Ala残基有关,高含量的疏水性氨基酸能够提高其在脂质中的溶解度,有利于清除自由基^[25]。Met可被氧化,甲硫氨酸亚砷还原酶可将其产物甲硫氨酸亚砷还原为Met^[26],起到抗氧化作用;Leu、Val、Ala等疏水性氨基酸能够当作芳香残基侧链上自由基过氧化的供氢体,增强肽的抗氧化性^[27]。Xiao等^[23]通过Biopharma Finder 2.0软件生成鉴定出22种包含抗氧化氨基酸残基的肽,证明了含有Met、Leu、Phe、Val、Tyr的多肽有着潜在的抗氧化活性;Zhang等^[28]发现疏水性氨基酸如Leu、Ala和Val在牛骨胶原蛋白肽(BBCP)中含量丰富,通过促进与脂质中自由基的相互作用而显著促进抗氧化活性;Xu等^[16]研究发现Cys、Tyr、Met、Phe及Pho都有助于CFMTY和CTGTPYC表现出显著抗氧化活性。此外,有研究指出,在N端或C端第三位含有Met、Leu、Tyr和Phe

等疏水性氨基酸的多肽抗氧化功能更强^[29]；Mirzaei等^[30]发现 VLSTSFPPK(VL-9)、VLSTSPFPPF(VF-9)、VLSTSFPPW(VW-9)、VLSTSFPPY(VY-9)的N端Val和Leu对多肽的自由清除活性有贡献；陈楠^[22]通过SWR-MLR模型算得抗氧化三肽中2位氨基酸为Val、Leu是各位点的有利氨基酸残基。在三个体外抗氧化实验中，MAK与AVTF的抗氧化活性相近；在红细胞溶血保护研究中，MAK表现出更强的保护能力，而在CAA试验中，AVTF则表现出更强的细胞抗氧化能力，这可能因为AVTF中含有较高含量的疏水性氨基酸。疏水性氨基酸可以通过帮助分子创造有利的疏水环境，显著增强抗氧化肽的活性^[31]。根据相关

性分析可知，位于N端的Met和N2位点的Ala对MAK的抗氧化活性有所贡献，AVTF的抗氧化活性主要来自Ala、Val与Phe残基。Ala在MLCA、MAK和AVTF三条肽中对抗氧化活性都有一定贡献。将DYDD与DDDY进行对比，两条肽具有相似的氨基酸组成。酸性氨基酸Asp有助于抗氧化活性^[32]，含酚羟基的Tyr可供应质子淬灭自由基^[33]。和Tyr相邻的Asp中羧酸根有吸电子效用，可以加强Tyr提供质子的能力^[34]。而从各实验结果及相关性分析来看，DYDD与DDDY的抗氧化活性不相上下，Tyr位置的改变对二者抗氧化活性的影响较弱。

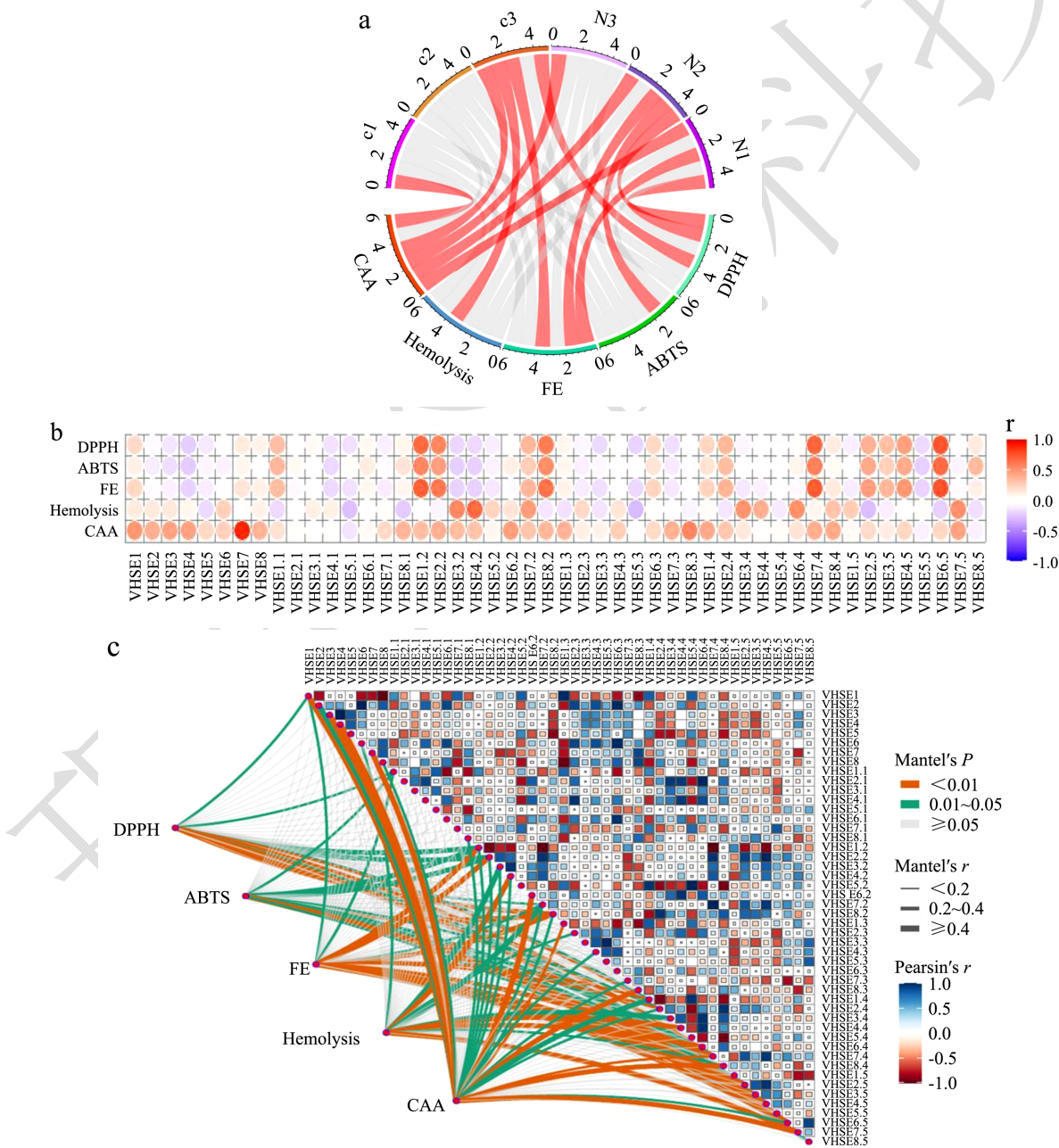


图9 多肽抗氧化活性与每个氨基酸位点之间的相关性弦图 (a) 和热图 (b、c)

Fig.9 The chord diagram (a) and heatmap (b, c) of the correlation between antioxidant activity of the peptides and each amino acid

3 结论

本研究以兜唇石斛发酵多肽为研究对象, 采用 Fmoc 多肽合成法分别合成六条短肽 DYDD、DDDY、MAK、MLCA、AVTF、RSS, 通过 QSAR 模型、三种体外抗氧化试验、红细胞模型和 CAA 模型综合评价合成多肽的抗氧化能力, 并利用相关性分析进一步探究各位点氨基酸残基对抗氧化肽活性的贡献。结果表明, 六条合成多肽均具有抗氧化活性, 其中 MLCA 表现出较强的 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力、铁还原力和红细胞溶血保护能力, IC₅₀ 分别为 0.89、0.99、1.34、0.68 mg/mL; AVTF 的细胞抗氧化活性最强, EC₅₀ 为 0.02 mg/mL。供氢供电子氨基酸以及疏水性氨基酸是影响多肽抗氧化功能的核心因素。结合相关性分析发现, 当多肽 N 端含有 Met 氨基酸残基, N 端第二位含有 Leu、Val 或 C 端第三位为 Leu 时, 其抗氧化活性会更强。此外, 还发现 Ala 可以促进多肽的抗氧化作用, Tyr 位置的改变对多肽的抗氧化能力的影响较弱。该研究探讨了兜唇石斛多肽抗氧化性与结构的关系, 为进一步研究抗氧化肽奠定了基础。

参考文献

- [1] 范三红,王娇娇,李佳妮,等.辣椒红色素和辣椒碱体内抗氧化活性及降血脂功能[J].食品科学,2021,42(5):201-207.
- [2] Mirzaei M, Mirdamadi S, Safavi M. Structural analysis of ACE-inhibitory peptide (VL-9) derived from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysate [J]. Journal of Molecular Structure, 2020, 1213: 128199.
- [3] Tao H, Lu Y, Guo D, et al. A pivotal peptide (Val-Ser-Glu-Glu) from duck egg white promotes calcium uptake and structure-activity relationship study [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 48: 448-456.
- [4] Zhao Y L, Wang S L, Li X Y. Studies on the polysaccharides of *Dendrobium aphyllum* [J]. Acta Botanica Yunnanica, 1994, 16: 392-396.
- [5] 刘伟帆.兜唇石斛免疫活性多糖及抗氧化肽的结构鉴定及功能表征[D].广州:华南理工大学,2018.
- [6] 刘映君,李素芬,王琴,等.抗菌肽 Met-Ala-Lys 对铜绿假单胞菌细胞膜的作用机制[J].现代食品科技,2019,35(6):56-63.
- [7] Li Y W, Li B. Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties [J]. J Theor Biol, 2013, 318: 29-43.
- [8] Kimatu B M, Zhao L, Biao Y, et al. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions [J]. Food Chemistry, 2017, 230(SEP. 1): 58-67.
- [9] Luo Q L, Tang Z H, Zhang X F, et al. Chemical properties and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 219-227.
- [10] Moktan B, Saha J, Sarkar P K. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus-fermentation* to kinema [J]. Food Research International, 2008, 41(6): 586-593.
- [11] Wolfe K L, Liu R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 8896-8907.
- [12] Zou T B, He T P, Li H B, et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins [J]. Molecules, 2015, 21(1): 72.
- [13] Phongthai S, Rawdkuen S. Fractionation and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Cereal Chemistry, 2020, 97(2): 316-325.
- [14] Sanjukta S, Padhi S, Sarkar P, et al. Production, characterization and molecular docking of antioxidant peptides from peptidome of kinema fermented with proteolytic *Bacillus* spp [J]. Food Research International, 2021, 141: 110161.
- [15] Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2000, 11(3): 128-131.
- [16] Xu B, Wang X, Zheng Y, et al. Novel antioxidant peptides identified in millet bran glutelin-2 hydrolysates: Purification, *in silico* characterization and security prediction, and stability profiles under different food processing conditions [J]. LWT, 2022, 164: 113634.
- [17] 陈敏,何远清,马超月,等.酶法制备燕麦多肽的工艺条件优化及分析[J].食品工业,2022,43(10):109-115.
- [18] 刘小芳,黄岳磊,李雅婷,等.南极磷虾蛋白肽的抗氧化活性及稳定性研究[J].食品科技,2022,47(11):114-120.
- [19] 张芳艺,罗小芳,黄惠芸,等.草菇子实体多肽提取工艺及其抗氧化活性[J].菌物学报,2023,42(2):584-596.
- [20] 于丽娜,王明清,杜德红,等.响应面法优化磷酸化改性花生分离蛋白-多肽膜的制备工艺[J].中国油料作物学报,2019, 41(1):130-143.
- [21] 张丽娜,董新亮,王利涛,等.鱼籽多肽降糖及抗氧化活性评价[J].食品科技,2019,44(8):235-240.

- [22] 陈楠.抗氧化三肽的定量构效关系及抗氧化作用分子机理研究[D].重庆:重庆大学,2018.
- [23] Xiao C, Toldrá F, Zhao M, et al. *In vitro* and in silico analysis of potential antioxidant peptides obtained from chicken hydrolysate produced using alcalase [J]. Food Research International, 2022, 157: 111253.
- [24] Wu D, Li M, Ding J, et al. Structure-activity relationship and pathway of antioxidant shrimp peptides in a PC12 cell model [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 70: 103978.
- [25] Zhou Y, She X, Chen Z, et al. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) protein-derived antioxidant peptides: Mechanisms of action and structure-activity relationship in Caco-2 cell models [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6): 1580-1590.
- [26] Hernández-ledesma B, Dávalos A, Bartolomé B A, et al. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(3): 588-593.
- [27] Phongthai S, Rawdkuen S. Fractionation and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion [J]. Cereal Chemistry, 2020, 97(2): 316-325.
- [28] Zhang C, Du B, Song Z, et al. Antioxidant activity analysis of collagen peptide-magnesium chelate [J]. Polymer Testing, 2023, 117: 107822.
- [29] Wattanasiritham L, Theerakulkait C, Wickramasekara S, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein [J]. Food Chemistry, 2016, 192: 156-162.
- [30] Mirzaei M, Mirdamadi S, Safavi M, et al. Synthesis, *in vitro* and cellular antioxidant activity evaluation of novel peptides derived from *Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate: Structure-function relationship [J]. Amino Acids, 2019, 51(8): 1167-1175.
- [31] Tyagi A, Chelliah R, Banan-mwine Daliri E, et al. Antioxidant activities of novel peptides from *Limosilactobacillus reuteri* fermented brown rice: A combined *in vitro* and in silico study [J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134747.
- [32] Filleria S G, Nardo A E, Paulino M, et al. Peptides derived from the gastrointestinal digestion of amaranth 11S globulin: Structure and antioxidant functionality [J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2021, 3: 100053.
- [33] Vásquez P, Zapata J E, Chamorro V C, et al. Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera hydrolysates subjected to simulated gastrointestinal digestion and intestinal absorption [J]. LWT, 2022, 154: 112834.
- [34] 徐力,李相鲁,吴晓霞,等.一种新的玉米抗氧化肽的制备与结构表征[J].高等学校化学学报,2004,3:466-469.