

菊黄东方鲀精巢源多肽的制备及其抗疲劳肽的虚拟筛选

邬佳臻¹, 陈小娥¹, 林冰冷², 郑伟林², 李水根³, 苏永昌⁴, 潘南⁴, 陈晓婷⁴, 陈婷茹⁴, 刘智禹^{4*}, 刘淑集^{4*}
(1. 浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江舟山 316022) (2. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002)
(3. 福建省水产技术推广总站, 福建福州 350002) (4. 福建水产研究所, 国家海水鱼类加工技术研发分中心(厦门), 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建厦门 361013)

摘要: 为实现菊黄东方鲀 (*Takifugu flavidus*) 精巢副产物的高值化利用, 本研究以其为原料, 采用酶解技术制备精巢源多肽 (TFPPs), 通过单因素实验结合响应面法优化工艺参数, 并系统探究其抗氧化活性及潜在抗疲劳机制。首先确定选用木瓜蛋白酶进行酶解, 其最优工艺参数为酶解时间 4 h、酶解温度 55 ℃、加酶量 10 000 U·g⁻¹、液料比 15:1 (mL·g⁻¹), 此条件下水解度达 42.31%; 采用不同截留分子质量的超滤膜分级纯化, 获得 3 个超滤组分, 体外抗氧化实验表明, TFPPs-1 (1 kDa) 组分抗氧化活性最优, 其对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除率的 IC₅₀ 分别为 8.94、12.15、7.58 mg·mL⁻¹; 进一步采用 LC-MS/MS 鉴定 TFPPs-1, 获得 2 085 条肽序列, 以 Keap1 (Kelch-like ECH-associated Protein 1, kelch 样 ECH 相关蛋白 1)、LDH (Lactate Dehydrogenase, 乳酸脱氢酶)、CK (Creatine Kinase, 肌酸激酶) 等与抗氧化及抗疲劳关键蛋白为靶点, 利用计算机虚拟筛选及分子对接技术研究抗疲劳肽, 结果显示, DD6、DK6、FR6 和 FD7 等 4 条肽通过氢键、疏水作用方式等与靶点蛋白均具有较强的结合能力, 结合能介于 -9.5~-6.7 kcal·mol⁻¹, 小于 -5 kcal·mol⁻¹, 推测其通过调控 Keap1/Nrf2 抗氧化通路、抑制 LDH 活性减少乳酸积累、调节 CK 活性优化能量代谢发挥抗疲劳功能。综上, 本研究为河鲀精巢的高值化利用及精巢源抗疲劳肽的开发提供了技术支撑与理论依据。

关键词: 菊黄东方鲀精巢; 酶解; 多肽; 抗疲劳; 分子对接
文章编号: 1673-9078(2026)06-58-74 **DOI:** 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.1512

Preparation of *Takifugu flavidus* Protamine Peptides and Virtual Screening of Anti-fatigue Peptides

WU Jiazhen¹, CHEN Xiao'e¹, LIN Bingling², ZHENG Weilin², LI Shuigen³, SU Yongchang⁴, PAN Nan⁴,
CHEN Xiaoting⁴, CHEN Tingru⁴, LIU Zhiyu^{4*}, LIU Shuji^{4*}
(1.Department of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China) (2.College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China) (3.Fujian Fisheries Technical Extension Station, Fuzhou 350002, China) (4.Fisheries Research Institute of Fujian, National Research and Development Center for Marine Fish Processing (Xiamen), Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361013, China)

引文格式:
邬佳臻,陈小娥,林冰冷,等.菊黄东方鲀精巢源多肽的制备及其抗疲劳肽的虚拟筛选[J].现代食品科技,2026,42(6):58-74.
WU Jiazhen, CHEN Xiao'e, LIN Bingling, et al. Preparation of *Takifugu flavidus* protamine peptides and virtual screening of anti-fatigue peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 58-74.

收稿日期: 2025-10-25; 修回日期: 2026-01-16; 接受日期: 2026-01-21
基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2026R1013002); 国家重点研发计划项目 (2023YFD2401504); 福建省科技计划农业引导性 (重点) 项目 (2025N0070); 福建省促进海洋与渔业产业高质量发展专项资金项目 (FJHYF-L-2023-22; FJHYF-L-2023-28)
作者简介: 邬佳臻 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工与综合利用, E-mail: wjz46080@163.com
通讯作者: 刘智禹 (1971-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 水产品加工与综合利用, E-mail: negroliu@163.com; 共同通讯作者: 刘淑集 (1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 水产品加工与综合利用, E-mail: cute506636@163.com

Abstract: To achieve the high-value utilization of byproducts from the testes of *Takifugu flavidus*, we used testes of these fish as raw material and adopted enzymatic hydrolysis technology to prepare protamine peptides (TFPPs). Process parameters were optimized based on single-factor experiments combined with response surface methodology, and antioxidant activity and potential anti-fatigue mechanisms were systematically investigated. Papain was selected for enzymatic hydrolysis, for which the established optimal conditions were as follows: hydrolysis time, 4 h; temperature, 55 °C; enzyme dosage, 10 000 U·g⁻¹; and liquid-to-solid ratio, 15:1 (mL·g⁻¹). Under these conditions, a 42.31% hydrolysis was achieved. Ultrafiltration membranes with different molecular weight cutoffs were used for fractionation and purification, resulting in three ultrafiltration fractions. *In vitro* antioxidant experiments revealed that the TFPP-1 fraction (<1 kDa) was characterized by the strongest antioxidant activity, with IC₅₀ values of 8.94, 12.15, and 7.58 mg·mL⁻¹ for the rates of DPPH, hydroxyl, and superoxide anion radical scavenging, respectively. Further identification of TFPP-1 using liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry yielded 2,085 peptide sequences. Key proteins associated with antioxidant and anti-fatigue activities, such as kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), lactate dehydrogenase (LDH), and creatine kinase (CK), were selected as targets. Computer-aided virtual screening and molecular docking techniques were employed to examine the anti-fatigue peptides, with the results indicating that four peptides (DD6, DK6, FR6, and FD7) were characterized by strong binding to target proteins via hydrogen bonding and hydrophobic interactions; binding energies ranged from -9.5 to -6.7 kcal·mol⁻¹, which are all less than -5 kcal·mol⁻¹. It was hypothesized that these peptides have anti-fatigue effects by regulating the Keap1/Nrf2 antioxidant pathway, inhibiting LDH activity to reduce lactate accumulation, and modulating CK activity to optimize energy metabolism. In conclusion, the findings of this study will provide technical support and a theoretical basis for the high-value utilization of pufferfish testes and the development of testis-derived anti-fatigue peptides.

Key words: *Takifugu flavidus* testes; enzymatic hydrolysis; peptide; anti-fatigue; molecular docking

河鲀 (*Tetraodontidae*), 俗称河豚鱼, 属硬骨鱼纲、鲀形目、鲀科鱼类。随着现代水产养殖技术迭代及河鲀毒性调控关键技术突破, 其体内河鲀毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 显著受控, 已实现产业化安全养殖^[1-3]。菊黄东方鲀是福建养殖的重要经济品种, 其鱼肉高蛋白、低脂肪, 富含矿物质和必需氨基酸, 深受市场青睐^[4]。其中河鲀精巢作为核心副产物之一属无毒级别, 占河鲀体质量比例可达 20%, 其营养价值高, 富含蛋白质、氨基酸及多种生物活性物质, 但因其特殊气味, 利用率极低^[5]。相关研究表明, 鱼类精巢有“养精固气”保健功效, 在抑菌及保鲜等方面有潜在生理活性^[6-8], 为其后续高值化开发利用菊黄东方鲀精巢提供理论依据与研究方向。

鱼精蛋白是鱼类精巢中富含精氨酸的碱性小分子蛋白质, 具有抗菌、抗凝血等多种功能, 已在食品防腐、医药制剂等领域广泛应用^[9-12]。菊黄东方鲀精巢组织天然富含鱼精蛋白, 为酶解后产生具有特殊序列和功能的活性肽提供了独特的蛋白质前体。鱼精巢源多肽是经酶解技术定向水解鱼精蛋白或鱼精巢组织所得小分子肽段, 是开发河鲀精巢高价值产品的核心方向。已有研究证明, 高水解度水解物比低水解度水解物更显著的抗疲劳效果^[13]。鱼精巢源多肽分子量降低, 水溶性和人体消化率更高, 还可能在酶解中暴露新活性位点, 展现新的生物活性。已有研究证实, 鱼精巢源多肽在抗氧化、抗疲劳、神经保护等方面具有显著的活性^[14,15]。

疲劳是机体长期体力或脑力活动后产生的复杂生理心理综合征^[16], 若长期疲劳会危害健康, 诱发慢性疾病。因此从天然资源中筛选安全、高效的抗疲劳活性成分, 成为食品科学与医药领域的研究热点之一。在众多关于疲劳发生机制的学说中, “自由基理论”阐释的疲劳机理是目前学界广泛关注的研究方向之一。该理论表明力竭性运动使机体过量生成和蓄积内源性自由基, 这些自由基可攻击骨骼肌细胞及生物大分子, 造成氧化损伤, 破坏细胞膜结构完整, 损害组织器官生理功能, 从而引发运动性疲劳。抗疲劳小分子肽来源广泛、安全性高, 在功能性食品和辅助治疗药物开发中具有产业化前景^[17]。由于分子量较小, 且富含疏水氨基酸和支链氨基酸, 有一定的疏水性, 具有较好的抗氧化效果, 同时可通过提高能量储备、清除代谢产物、减轻氧化应激等途径发挥缓解疲劳作用。目前已有大量研究表明, 抗疲劳功效与抗氧化活性密切相关, 多种海洋源活性肽如海参肽、甲鱼肽、牡蛎肽等^[18-20]都在抗氧化和抗疲劳方面有着良好的生物活性。

氧化应激与自由基积累是诱发运动性疲劳的关键机制之一。Keap1 激活 Nrf2 通路, 启动下游抗氧化基因表达, 降低运动后乳酸等代谢产物及氧化损伤标志物积累, 改善能量代谢状态。这既减轻氧化应激对细胞的损害, 又维持运动中的能量与代谢平衡, 发挥抗疲劳作用。所以, 靶向调控 Keap1/Nrf2 通路是对抗运

动性疲劳的重要策略^[21]。目前, 自由基产生被视为引发运动性疲劳的关键因素, 探寻有效抗氧化策略是应对疲劳的重要环节。短时间高强度运动可使血清乳酸、CK 等代谢产物水平升高, CK 持续高表达易引发机体局部组织损伤, LDH 可催化丙酮酸向乳酸转化, 降低肌肉收缩效率, 诱发体力衰竭。因此, 筛选并鉴定可靶向抑制 CK 与 LDH 活性的多肽, 有望为运动性疲劳恢复提供新策略^[22]。

本研究以菊黄东方鲀精巢为原料, 采用酶解技术制备菊黄东方鲀精巢源多肽 (Takifugu flavidus Protamine Peptides, TFPPs), 并通过单因素实验与响应面法对酶解工艺参数进行优化以提高水解度, 旨在高效释放具有生物活性的小分子肽段。采用超滤膜分离技术对 TFPPs 进行分级分离, 并利用 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除实验等体外抗氧化模型, 进行抗氧化活性评价, 明确活性最优, 最具抗疲劳潜力的肽段组分。在此基础上, 应用液相色谱串联质谱联用技术 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 进行肽序列鉴定, 构建 TFPPs 的肽序列数据库; 基于抗氧化与抗疲劳通路的交集, 结合生物信息学技术进行虚拟筛选, 选出潜在具有抗疲劳活性的候选肽段; 进一步通过分子对接技术, 将候选肽段与抗疲劳相关靶点蛋白进行对接分析与模拟, 预测候选肽段的抗疲劳活性及其作用机制, 为高值化开发精巢源抗疲劳肽类产品提供实验依据和理论支撑, 同时为鱼类精巢副产物的资源化利用拓展新路径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菊黄东方鲀精巢, 福建鸿鲀水产养殖有限公司; 胰蛋白酶 ($2.5\times10^5\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)、木瓜蛋白酶 ($6.0\times10^5\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)、碱性蛋白酶 ($6.0\times10^5\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)、中性蛋白酶 ($6.0\times10^5\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)、胃蛋白酶 ($1.0\times10^4\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$), 南宁庞博生物工程有限公司; 甲醛、氢氧化钠、盐酸、氢氧化钠标准液 ($0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 分析纯等, 上海沪氏试验器材股份有限公司; 分析纯浓硫酸, 广西西江化工有限责任公司; 高效凯氏定氮催化剂片, 北京金元兴科科技有限公司; DPPH 自由基清除能力试剂盒、羟基自由基清除能力试剂盒、超氧阴离子清除能力试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司; 其余药品均为国产分析纯。

BSA 224S 电子天平 (精度 0.1 mg), 赛多利斯科学仪器北京有限公司; MM12 绞肉机, 广东韶关市食品机械厂; Digestor 2508 消化炉和 Kjeltac 8400 自动

凯氏定氮仪, 丹麦福斯有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; 陶瓷膜 ($5\text{ }\mu\text{m}$)、超滤膜 (1 、 3 、 10 kDa)、纳滤膜, 福美科技有限公司; ST85B3-1 真空冷冻干燥机, 美国 Milirock 公司; M200 Pro 多功能酶标仪, 瑞士 TECAN Infinite 公司; 96 孔紫外酶标板 YA0602, 北京索莱宝科技有限公司; Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菊黄东方鲀精巢的预处理

参照张家源等^[23]的方法并稍作修改, 采购菊黄东方鲀精巢, 运回实验室置于 $-20\text{ }\text{C}$ 冰箱储存备用。实验前取出冷冻的菊黄东方鲀精巢, 在室温下流水冲洗解冻, 待解冻完全后, 去除表面结缔组织, 洗净备用。

1.2.2 菊黄东方鲀精巢源多肽的制备

按照一定液料比将超纯水和预处理后的菊黄东方鲀精巢进行匀浆 2 min , 制得匀浆液。加入一定量的蛋白酶充分混匀, 用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 或 HCL 调节 pH 值, 置于蛋白酶最适温度的恒温水浴锅中酶解一定的时间, 其间不断搅拌。随后立即将酶解液于沸水浴 ($100\text{ }\text{C}$) 下灭酶 10 min 。待冷却至室温后, $4\text{ }\text{C}$ 、 $8\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 收集上清液, 即得菊黄东方鲀精巢源多肽 (TFPPs)。

1.2.3 最佳蛋白酶的筛选

称取经过预处理后的菊黄东方鲀精巢 (蛋白含量为 $16.6\text{ g}/100\text{ g}$), 按液料比 $20:1\text{ (mL}\cdot\text{g}^{-1})$ 的比例加入超纯水匀浆。达到蛋白酶最适酶解温度后, 用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 或 HCL 调节 pH 值至各蛋白酶的最佳值 (表 1), 每克精巢加入 5 000 U 蛋白酶, 在恒温水浴酶解 5 h 。结束用沸水浴灭酶 10 min , 冷却后 $4\text{ }\text{C}$ 、 $8\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 取上清液冷冻干燥。以水解度作为考察指标, 比较 5 种蛋白酶对菊黄东方鲀精巢源多肽水解度的影响。

表 1 不同蛋白酶酶解菊黄东方鲀精巢的工艺参数
Table 1 Parameters for enzymatic hydrolysis of Takifugu flavidus testis

蛋白酶种类	酶解温度/ C	初始 pH 值	酶活力/ $(\text{U}\cdot\text{g}^{-1})$	液料比 ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	酶解时间/h
木瓜蛋白酶	55	6.5	6.0×10^5	20:1	5
胰蛋白酶	45	8.0	2.5×10^5	20:1	5
胃蛋白酶	37	2.0	1.0×10^4	20:1	5
中性蛋白酶	50	7.0	6.0×10^5	20:1	5
碱性蛋白酶	50	9.5	6.0×10^5	20:1	5

1.2.4 单因素实验设计

在筛选出最适蛋白酶的基础上，以水解度作为考察指标，分别研究不同酶解温度（30、40、50、60、70 ℃）、不同 pH 值（4.5、5.5、6.5、7.5、8.5）不同加酶量（2 500、5 000、7 500、10 000、12 500 U·g⁻¹）、不同液料比（4:1、8:1、12:1、16:1、20:1, mL·g⁻¹）和不同酶解时间（2、3、4、5、6 h）等 5 个因素对菊黄东方鲀精巢源多肽酶解效果的影响。考察某一因素时，其他因素条件固定为：温度 50 ℃，pH 值 7，液料比 20:1 (mL·g⁻¹)，加酶量 5 000 U·g⁻¹。

1.2.5 响应面优化试验设计

根据单因素试验结果，采用 Box-Behnken 设计 4 因素 3 水平试验，对菊黄东方鲀精巢酶解效果影响较显著的因素为：酶解时间（A）、酶解温度（B）、加酶量（C）、液料比（D）为自变量，水解度为响应值。响应面试验因素水平见表 2。

表 2 响应面实验设计的因素与水平

Table 2 Factors and levels of the response surface design				
experiment				
水平	A 酶解时间/h	B 酶解温度/℃	C加酶量/(U·g ⁻¹)	D 液料比(mL·g ⁻¹)
-1	3	40	7 500	8:1
0	4	50	10 000	12:1
1	5	60	12 500	16:1

1.2.6 超滤膜分级分离

在最佳酶解工艺条件下制备的酶解液，首先用陶瓷膜进行分离，去除其中的杂质和无机盐等物质。接着依次采用 10、3、1 kDa 等不同截留分子量大小的超滤膜进行分级分离，收集所得组分 TFPPs-1 (<1 kDa)、TFPPs-2 (1~3 kDa)、TFPPs-3 (3~10 kDa) 3 个组分，分别将这 3 个组分进行纳滤（截留分子量大小为 150 Da）浓缩，后冷冻干燥成不同分子量的 TFPPs。

1.2.7 蛋白质含量的测定

参考 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中的第一法 凯氏定氮法。

1.2.8 水解度的测定

氨基酸态氮质量分数测定采用 GB 5009.235-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》中甲醛滴定法进行测定。用凯氏定氮法来测定底物样品中氨基质量分数。水解度的计算见公式：

$$I=\frac{M}{N}\times100\%$$

式中：
I——水解度，%；

$$M\text{——酶解液中氨基态氮质量分数，\%。}$$

$$N\text{——原料样品中总氮质量分数，\%。}$$

M ——酶解液中氨基态氮质量分数，%。
 N ——原料样品中总氮质量分数，%。

1.2.9 抗氧化活性测定

1.2.9.1 DPPH 自由基清除率

参照上海酶联生物科技有限公司提供的 DPPH 自由基清除能力检测试剂盒说明书中的方法测定。DPPH 自由基清除率计算见公式：

$$O=(1-\frac{A-A_1}{A_0})\times100\%$$

式中：

$$O\text{——DPPH 自由基清除率，\%；}$$

$$A\text{——测定管在 515 nm 处的吸光度；}$$

$$A_1\text{——对照管在 515 nm 处的吸光度；}$$

$$A_0\text{——空白管在 515 nm 处的吸光度。}$$

O ——DPPH 自由基清除率，%；
 A ——测定管在 515 nm 处的吸光度；
 A_1 ——对照管在 515 nm 处的吸光度；
 A_0 ——空白管在 515 nm 处的吸光度。

1.2.9.2 羟基自由基清除率

参照上海酶联生物科技有限公司提供的羟基自由基清除能力检测试剂盒说明书中的方法测定。羟基自由基清除率计算见公式：

$$P=\frac{B-B_1}{B_0-B_1}\times100\%$$

式中：

$$P\text{——羟基自由基清除率，\%；}$$

$$B\text{——测定管在 536 nm 处的吸光度；}$$

$$B_1\text{——对照管在 536 nm 处的吸光度；}$$

$$B_0\text{——空白管在 536 nm 处的吸光度。}$$

P ——羟基自由基清除率，%；
 B ——测定管在 536 nm 处的吸光度；
 B_1 ——对照管在 536 nm 处的吸光度；
 B_0 ——空白管在 536 nm 处的吸光度。

1.2.9.3 超氧阴离子自由基清除率

参照上海酶联生物科技有限公司提供的超氧阴离子清除能力检测试剂盒说明书中的方法测定，超氧阴离子自由基清除率计算见公式：

$$Q=\frac{C_1-C}{C_1}\times100\%$$

式中：

$$Q\text{——超氧阴离子清除率，\%；}$$

$$C_1\text{——对照管在 530 nm 处的吸光度；}$$

$$C\text{——样品测定管在 530 nm 处的吸光度。}$$

Q ——超氧阴离子清除率，%；
 C_1 ——对照管在 530 nm 处的吸光度；
 C ——样品测定管在 530 nm 处的吸光度。

1.2.10 液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 鉴定肽序列

取适量样本经 C18 除盐柱进行除盐。将样品经由配备在线纳喷离子源的 LC-MS/MS 分析。整套系统为串联 EASY-nanoLC 1200 的 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)。共上样 1 μL 样品 (C18 色谱柱：20 cm×75 μm i.d, 1.9 μm particle size)，以 60 min 的梯度分离样品，柱流量控制在 300 nL·min⁻¹，柱温为 40 ℃，电喷雾电压 2 kV，梯度从 4% 的 B 相起始，在 53 min 以非线性梯度升高

61

到 39%，40 s 内升高到 50%，再 40 s 内升高到 95%，维持 340 s。质谱仪在数据依赖采集模式下运行，自动在 MS 和 MS/MS 采集间切换。

质谱参数设置如下：(1) MS：扫描范围 m/z ：100~1 500；分辨率为 120 000；Normalized AGC target：200%；最大注入时间：100 ms；(2) HCD-MS/MS：分辨率为 50 000；Normalized AGC target：200%；最大注入时间：86 ms；碰撞能量：25%、30%、35%；动态排除时间：30 s。联质谱图经过 PEAKS Studio version 10.6 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) 分析。数据库设置为 uniprot-*Takifugu flavidus* (2025, 29296 entries) 序列，设置 none 酶解。搜库参数碎片离子质量容许误差：0.02 Da，母离子质量容许误差：10 ppm，可变修饰：Oxidation (M) 15.99，Deamidation (NQ) 0.98，Hydroxylation (KP) 16。蛋白卡值为至少含 1 unique peptide；肽段卡值为 $-10 \lg P \geq 20$ 。

1.2.11 肽的生物信息学预测分析

通过在线软件 Peptide Ranker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker>) 预测菊黄东方鲀鱼精肽生物活性；通过 Innovagen (<http://www.innovagen.com/proteomics-tools>) 预测肽的溶解性；采用在线工具 ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred>) 预测肽段毒性；利用 Expasy (http://web.expasy.org/compute_pi/) 预测肽的分子量和等电点 (PI)；使用 Allergylab (<https://sortaller.gzhmu.edu.cn/>) 预测肽的致敏性。AdmetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/predict/>) 在线系统，通过研究多肽的人体肠道吸收 (Human intestinal absorption, HIA)、血脑屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB)、CYP 代谢和急性口服毒性对活性肽进行筛选。

1.2.12 分子对接

通过 ChemDraw 20.0 软件绘制多肽的 3D 结构，并进行能量优化，导出为 Mol2 格式。优化后导入 AutoDocktools v1.5.6 加氢、计算电荷、分配电荷、设置可旋转键。从 RCSB 蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中下载受体分子 Keap1 (PDB ID：4IQK)，LDH (PDB ID：7EPM)，CK (PDB ID：3B6R) 晶体结构，使用 PyMol 软件对受体蛋白进行预处理，包括去除受体中所含配体和水分子，并用 AutoDock 软件 (V1.5.6) 进行加氢、计算电荷分布以及指定蛋白质类型处理。AutoDock vina1.1.2 分别进行对接，Keap1 对接盒子的中心： $x=-49.55$ ， $y=0.43$ ， $z=-16.96$ ，设定对接盒子的尺寸： $60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$ ；LDH 对接盒子的中

心： $x=-71.29$ ， $y=38.11$ ， $z=-1.50$ ，设定对接盒子的尺寸： $80 \text{ \AA} \times 80 \text{ \AA} \times 80 \text{ \AA}$ ；CK 对接盒子的中心： $x=-18.50$ ， $y=2.78$ ， $z=-18.10$ ，设定对接盒子的尺寸： $60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 80 \text{ \AA}$ 。通过选择 Vina 对接确定的最高亲和力得到的结果，将结合能 $\leq -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 视为对接成功，使用 Pymol 和 Discovery Studio 4.5 进行可视化、分析和处理。

1.3 数据处理

相同试验下，每组试验均重复 3 次，结果表示为平均值 $\pm$ SD 值，采用 IBM SPSS Statistics 26 进行单因素方差分析和显著性检验，运用邓肯检验 (Duncan's test) 进行多重比较，使用 Graph Pad Prism 8.0 作图。利用 Design-Expert 11 软件进行响应面试验设计与结果分析。

2 结果与分析

2.1 最佳蛋白酶的筛选

蛋白酶筛选是菊黄东方鲀精巢源多肽制备关键环节。选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶及胰蛋白酶共 5 种蛋白酶，在最适条件下对菊黄东方鲀精巢酶解，以水解度评估效果。从图 1 可知，水解度由高到低为胰蛋白酶 $\geq$ 木瓜蛋白酶 $\geq$ 胃蛋白酶 $>$ 碱性蛋白酶 $>$ 中性蛋白酶。胰蛋白酶水解度最高，达 37.36%，与木瓜、胃蛋白酶无显著差异 ($P > 0.05$)，均效果较好，显著高于中性和碱性蛋白酶。木瓜蛋白酶酶解性能优异，因其作用底物氨基酸范围广、酶切位点丰富，酶解效率高，且最适作用环境为中性，生产成本低于胰蛋白酶^[24]。因此，综合水解效果和经济效益，选木瓜蛋白酶用于后续实验。研究证明，在制备鲟鱼精蛋白多肽^[25]、山羊奶酪蛋白肽^[26]以及海马肽^[27]实验中，木瓜蛋白酶均为最佳蛋白酶。

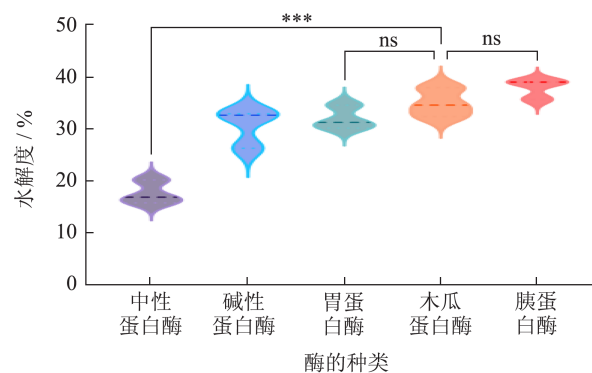


图 1 不同蛋白酶对菊黄东方鲀精巢水解度的影响

Fig.1 Effects of different proteases on the degree of hydrolysis of *Takifugu flavidus* testis

2.2 响应面优化试验结果

2.2.1 响应面实验设计及结果

基于菊黄东方鲀精巢源多肽酶解工艺的前期单因素实验结果，选用木瓜蛋白酶，筛选出对水解度影响显著的4个关键工艺参数作为优化变量，分别为酶解时间（A）、酶解温度（B）、加酶量（C）及液料比（D），以水解度为响应值，采用响应面法设计多因素协同优化试验，旨在明确各因素交互作用对TFPPs酶解效率的影响，并确定最优工艺组合。本试验构建的四因素三水平响应面试验方案，实验设计与对应的水解度测定结果如表3所示。通过对实验数据进行多元二次回归拟合分析，建立水解度（Y）与酶解时间（A）、酶解温度（B）、加酶量（C）、液料比（D）之间的二次回归方程，具体表达式如下：

表3 响应面实验设计及结果

Table 3 Experimental design and results of response surface					
试验组别	A/h	B/℃	C/(U·g ⁻¹)	D/(mL·g ⁻¹)	水解度/%
1	-1	-1	0	0	24.95
2	1	-1	0	0	33.86
3	-1	1	0	0	33.18
4	1	1	0	0	34.55
5	0	0	-1	-1	23.44
6	0	0	1	-1	22.97
7	0	0	-1	1	32.18
8	0	0	1	1	34.42
9	-1	0	0	-1	24.39
10	1	0	0	-1	25.34
11	-1	0	0	1	31.74
12	1	0	0	1	35.77
13	0	-1	-1	0	29.07
14	0	1	-1	0	29.41
15	0	-1	1	0	31.46
16	0	1	1	0	32.15
17	-1	0	-1	0	26.67
18	1	0	-1	0	28.72
19	-1	0	1	0	27.01
20	1	0	1	0	30.09
21	0	-1	0	-1	28.90
22	0	1	0	-1	24.40
23	0	-1	0	1	33.53
24	0	1	0	1	41.59
25	0	0	0	0	39.69
26	0	0	0	0	41.40
27	0	0	0	0	39.69
28	0	0	0	0	39.34
29	0	0	0	0	38.66

$$Y=39.76+1.70A+1.12B+0.718\ 2C+4.98D-1.88AB+0.257\ 0AC+0.770\ 9AD+0.085\ 6BC+3.14BD+0.678\ 6CD-5.34A^2-2.74B^2-6.42C^2-5.04D^2$$

该回归方程可用于定量描述各工艺参数及其交互作用对TFPPs水解度的影响规律，为后续工艺参数的显著性检验、交互作用分析及最优工艺条件求解提供数学模型支撑。

表4 回归模型方差分析

Table 4 Regression model ANOVA						
差来源	自由度	平方和	均方差	F值	P值	显著性
模型	864.24	14	61.73	41.32	<0.000 1	显著
A-酶解时间	34.68	1	34.68	23.21	0.000 3	**
B-酶解温度	15.17	1	15.17	20.16	0.006 6	**
C-加酶量	6.19	1	6.19	4.14	0.061 2	
D-液料比	298.01	1	298.01	199.49	<0.000 1	**
AB	14.20	1	14.20	9.51	0.008 1	**
AC	0.264 1	1	0.264 1	0.176 8	0.680 5	
AD	2.38	1	2.38	1.59	0.227 8	
BC	0.029 3	1	0.029 3	0.019 6	0.890 6	
BD	39.51	1	39.51	26.45	0.000 1	**
CD	1.84	1	1.84	1.23	0.285 5	
A ²	184.62	1	184.62	123.58	<0.000 1	**
B ²	48.66	1	48.66	32.57	<0.000 1	**
C ²	297.26	1	297.26	178.90	<0.000 1	**
D ²	164.46	1	164.46	110.09	<0.000 1	**
残差	20.91	14	1.49			
失拟项	16.83	10	1.68	1.65	0.333 2	不显著
纯误差	4.09	4	1.02			
总计	885.15	28				
R ²	0.976 4	R ² _{ad}	0.952 7	C.V.%	3.86	

注：** 差异极显著，P<0.01；* 差异显著，P<0.05。

上述二次回归方程定量反映了酶解时间（A）、酶解温度（B）、加酶量（C）、液料比（D）4个因子与水解度（响应值Y）之间的非线性关系，为进一步验证模型可靠性及各因子影响效应，对回归方程进行方差分析，具体结果如表4所示。该二次回归模型的F值为41.32，P<0.000 1，表明该模型高度显著，可有效描述各因子与水解度之间的关系；模型中各显著性的P值均小于0.05，进一步证实了模型在统计学显著性。

通过对比各因子的F值（或标准化回归系数），确定4个因子对水解度的影响强度由强到弱依次是D（液料比）>A（酶解时间）>B（酶解温度）>C（加酶量），其中液料比作为最关键影响因子，其调控作用需

重点关注。同时 A、B、D 等 3 个单因子，酶解时间与酶解温度的交互作用 (AB)、酶解温度与液料比的交互作用 (BD)，以及酶解时间的二次项 (A^2)、酶解温度的二次项 (B^2)、加酶量的二次项 (C^2)、液料比的二次项 (D^2) 对响应面的影响极显著 ($P < 0.01$)；C 及其他交互作用 (AC、BC、CD) 对水解度的影响不显著 ($P > 0.05$)，这与前面单因素实验中加酶量超过阈值后水解度提升有限的结果一致。

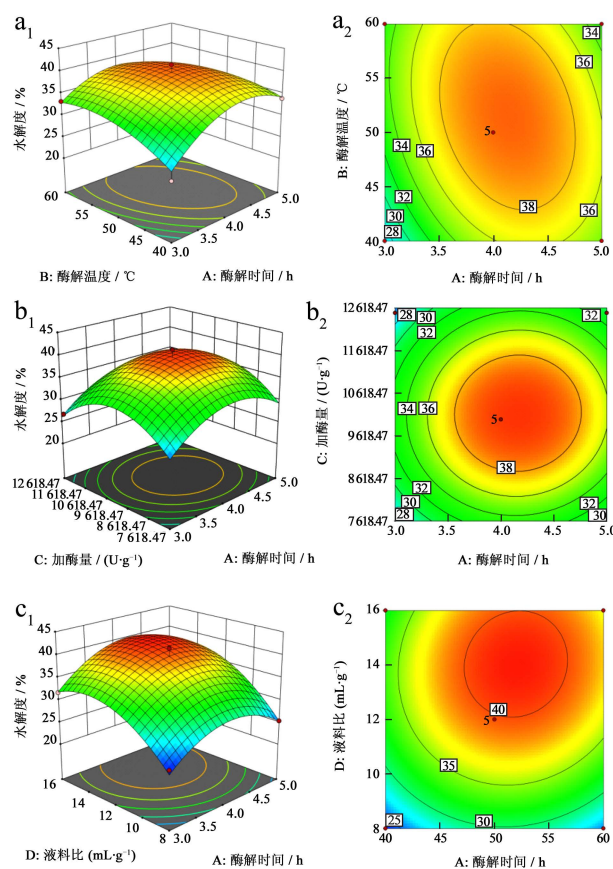
此外，模型失拟项不显著 ($P > 0.05$)，表明模型不存在显著失拟现象；模型决定系数 $R^2=0.9764$ ，说明该模型可解释 97.64% 的响应值变异，方程的拟合程度较好，预测值与实测值之间具有高度的相关性，具备良好的理论预测能力。综上，采用的 Box-Behnken 响应面设计科学合理，构建的二次回归模型可靠有效，可用于菊黄东方鲀精巢源多肽酶解工艺的优化，为通过调控关键工艺参数提升 TFPPs 水解度提供了坚实的统计学与数学依据。

2.2.2 交互作用分析

为直观揭示各因子间的交互作用对水解度的影响规律，基于构建的二次回归模型，在固定其余 2 个因子为中心水平的条件下，绘制两因子的三维响应面图及对应的等高线图 (图 2)，通过曲面形态与等高线特征量化分析因子间的交互效应。由图 2a 中的 3D 响应曲面图可知，曲面整体呈开口向下的抛物面形态，表明在实验范围内存在使水解度达到最大值的交互作用点；等高线图中，沿酶解时间 (A) 的颜色梯度 (蓝色 → 红色) 变化速率显著快于酶解温度 (B) 方向，且响应面在酶解时间维度的坡度更陡，这一现象表明，在两者的交互作用中，酶解时间对水解度的影响更强，与方差分析中“酶解时间影响强度优于酶解温度”的结论一致。图 2b 等高线形态趋近于圆形，表明酶解时间与加酶量之间的交互作用不显著 ($P < 0.05$)。响应面同样呈现开口向下的特征，等高线沿酶解时间方向的颜色过渡更明显，曲面在该方向的倾斜度更大；而加酶量方向的颜色变化平缓，曲面波动较小。这说明酶解时间对水解度的影响显著强于加酶量，进一步验证了加酶量在超过阈值后对水解度提升贡献有限的规律。图 2c 的等高线形态趋近于圆形，表明酶解时间与液料比之间的交互作用不显著 ($P > 0.05$)，但从曲面坡度与颜色梯度来看，液料比方向的曲面倾斜更陡，颜色变化速率更快，说明液料比对水解度的独立影响强度显著高于酶解时间，与“液料比为最关键影响因子”的结论相符。图 2d 的响应面开口向下，等高线呈以酶解温度为长轴的狭长椭圆形，沿酶解温度方向的颜色梯度变化更显著，曲面倾斜度更大；随着加酶量

和酶解温度的协同增加，水解度先升高后降低，且酶解温度的变化对水解度峰值位置的影响更突出。这表明在两者的交互作用中，酶解温度的调控效应占主导，加酶量的影响相对较弱。图 2e 中，等高线呈典型的椭圆形，结合方差分析结果 ($P < 0.05$)，证实酶解温度和液料比存在显著交互作用；沿液料比方向的颜色梯度变化速率远快于酶解温度方向，响应面在液料比维度的坡度更陡峭，说明液料比在两者的交互作用中对水解度的影响更强，是该交互体系中的核心调控因子。图 2f 的等高线图趋近于圆形，表明加酶量和液料比的交互作用不显著 ($P > 0.05$)；但响应面在液料比方向的波动幅度显著大于加酶量方向，颜色梯度变化更明显，进一步印证了液料比对水解度的独立影响强度远高于加酶量。

综上三维响应面与等高线分析结果，各因子对水解度的影响强度次序为：液料比 (D) > 酶解时间 (A) > 酶解温度 (B) > 加酶量 (C)，这与方差分析中 F 值排序结果一致。在因子交互作用方面，酶解温度 (B) 与液料比 (D) 的交互效应最为显著，其余因子间交互作用较弱或不显著，该结论与方差分析中“BD 项极显著 ($P < 0.01$)”的结果高度吻合。上述分析不仅直观量化了因子间的交互规律，更进一步验证了响应面模型的有效性与可靠性，为后续最优工艺参数的确定提供了直观依据。



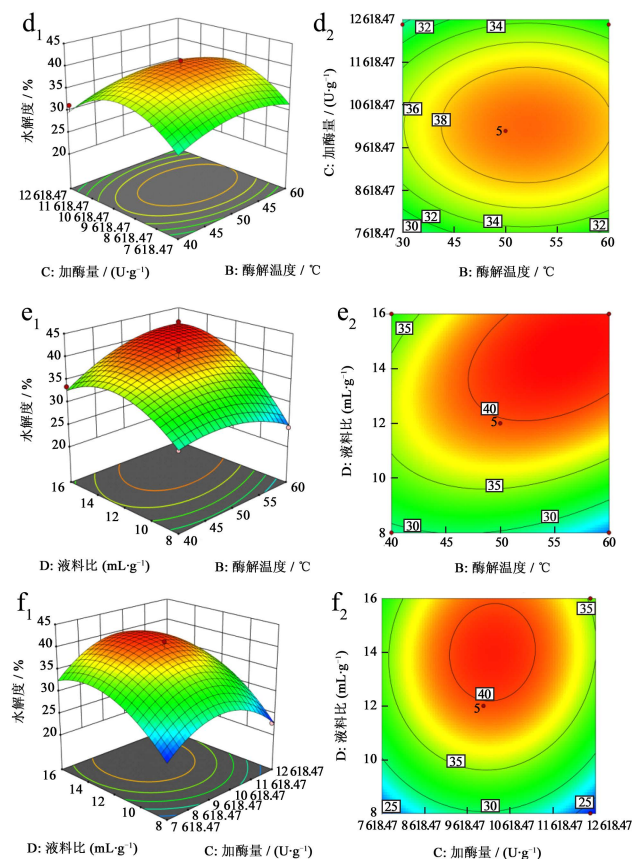


图2 交互作用的响应面图和等高线图

Fig.2 Interaction response surface and contour plots

2.2.3 模型的验证

为验证响应面回归模型的预测可靠性及最优工艺参数的实际可行性,基于上述水解度(Y)与各因子间的二次回归模型,采用 Design-Expert 11 软件对酶解时间(A)、酶解温度(B)、加酶量(C)、液料比(D) 4 个关键参数进行预测分析。结果显示,理论层面的最优酶解工艺参数为:酶解时间 4.11 h、酶解温度 55.62 °C、加酶量 10 224.09 U·g⁻¹、液料比 14.74:1,在此参数组合下,模型预测的水解度理论值为 41.91%。考虑到实际生产中仪器精度及操作便利性,需对理论参数进行工程化调整,最终确定的实际可操作工艺参数为:酶解时间 4 h、酶解温度 55 °C、加酶量 10 000 U·g⁻¹、液料比 15:1 (mL·g⁻¹)。为验证优化后工艺参数的有效性及模型拟合度,在上述实际参数条件下进行 3 次平行酶解实验,测得水解度均值为 42.31%。对“模型预测值(41.91%)”与“实际测定均值(42.31%)”进行单因素方差分析,结果显示两者无显著性差异($P > 0.05$),表明构建的响应面回归模型具有优异的拟合效果与预测精度,调整后的工艺参数可准确反映理论最优条件,具备实际应用价值。

2.3 菊黄东方鲀精巢源多肽超滤组分分离及其抗氧化活性测定

超滤作为一种高效的分离技术被广泛地应用于生物活性肽水解产物的分级纯化,其核心原理是根据分子质量的差异实现目标组分的精准分离,进而获得特定分子质量范围的多肽组分。分子质量较小的肽段通常因结构特性更易暴露活性位点而表现出更优异的生物活性。本实验以菊黄东方鲀精巢源粗肽为研究对象,经超滤技术按分子质量差异分离得到 3 个分级组分,分别记为 TFPPs-1、TFPPs-2 和 TFPPs-3,并通过 DPPH 自由基清除实验、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除实验及超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除实验,系统评价粗肽及各超滤组分的体外抗氧化活性,结果如图 3 所示。由图可知,所有测试组分均表现出一定的抗氧化活性,且 TFPPs 各组分对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除率均随样品质量浓度的升高而显著增加,呈现良好的剂量-效应正相关关系($P < 0.05$)。李苏心^[28]的研究发现,经提纯后的 GCP 具有可观的体外抗氧化活性且低分子量肽与自由基的相互作用效果更为突出。

抗疲劳功效与抗氧化活性密切相关,生物活性肽可以通过提供能量,清除过量自由基,来减轻氧化损伤,以增强抗氧化能力,通过多种信号通路发挥抗疲劳作用^[29]。史晋源^[19]发现,甲鱼肽可以激活 Nrf2/Keap1 信号通路相关蛋白表达抑制机体氧化应激,从而缓解疲劳;Lin 等^[20]发现牡蛎肽可以减少氧化应激,通过激活 AMPK 和 HO-1 提升运动耐力;陈玉峰等^[30]发现金枪鱼肽可通过上调腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ - 辅激活因子 1- α (PGC-1 α) 基因而起到抗疲劳的作用,并提示 Nrf2/Keap1-ARE 也发挥影响。

进一步分析各组分的抗氧化能力差异发现,TFPPs-1 组分的综合抗氧化活性显著优于其他两个超滤组分及粗肽($P < 0.05$),其对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的半数清除质量浓度 IC_{50} 分别为 8.94 mg·mL⁻¹、12.15 mg·mL⁻¹ 和 7.58 mg·mL⁻¹。根据现有学术评价标准,当某种物质对 DPPH 的清除率 IC_{50} 值小于 10 mg·mL⁻¹ 时,可判定该物质具有较强的体外抗氧化性,由此可见 TFPPs-1 组分具备优异的抗氧化潜力。Chi 等^[31]发现,其在对蓝鳍金枪鱼酶解物的超滤分离研究中发现分子量小于 1 kDa 的肽段对 DPPH 自由基的清除能力显著高于分子质量更大的组分。这可能是由于小分子肽段因空间结构更简单、分子体积更小,不仅能为自由基提供更多可转移的电子,

还可暴露更多活性位点基团,从而更易与自由基发生氧化还原反应或络合反应,促使自由基转化为更加稳定的非活性物质,最终表现出更强的自由基清除能力。此外,王怡菊等^[32]发现南极磷虾活性肽分子量最小的组别抗氧化效果最好 DPPH 自由基和羟基自由基的清除率均为所有分级组分中最高;左依瑾^[33]研究也发现分子质量小于 1 kDa 和大于 10 kDa 的罗非鱼抗氧化肽组分具有较强的抗氧化活性,其中小分肽段的活性优势更为突出。综上所述,结合后续实验对高活性组分深入研究的需求,最终确定选择 TFPPs-1 组分进行后续实验的核心研究对象。

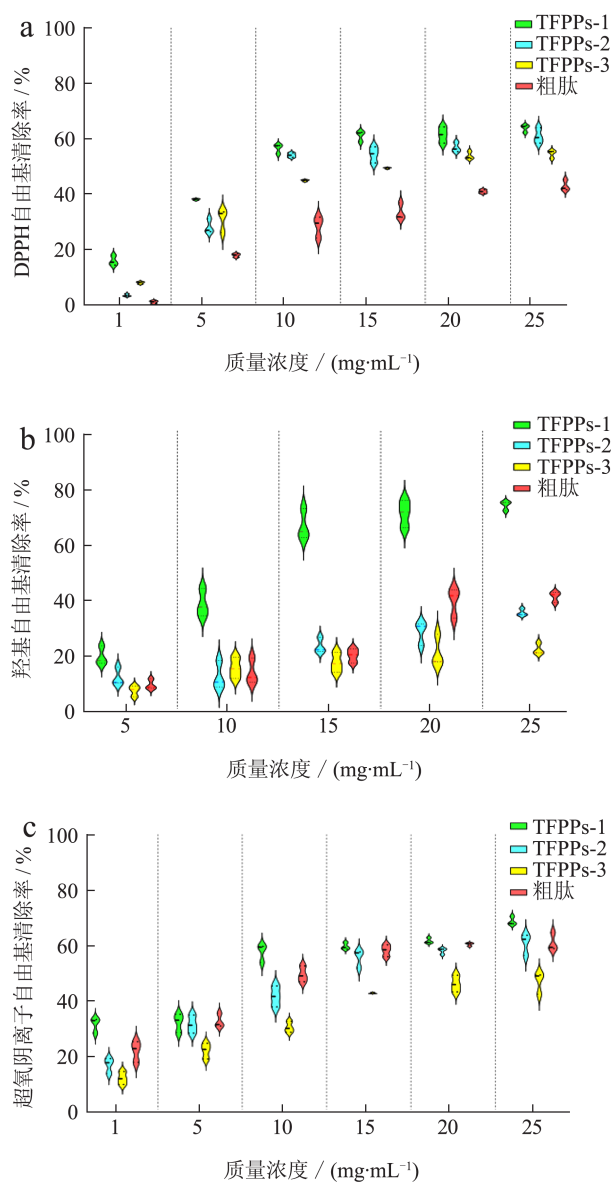


图 3 超滤后各组分抗氧化活性

Fig.3 Antioxidant activity of the fractions after ultrafiltration

2.4 TFPPs-1组分鉴定肽序列的生物信息学分析

采用液相色谱-串联质谱 (Liquid Chromatography

-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 技术对 TFPPs-1 组分进行氨基酸序列检测,共鉴定得到 2 085 条特异性肽序列。对肽段长度分布特征分析显示,其主要集中在 3~10 个氨基酸残基范围内,该长度区间的肽段通常更易通过生物膜屏障,具备良好的生物利用度基础^[34]。氨基酸组成分析结果表明,在鉴定的肽序列中,亮氨酸 (Leucine, Leu)、异亮氨酸 (Isoleucine, Ile)、缬氨酸 (Valine, Val)、天冬氨酸 (Aspartic Acid, Asp) 的出现频率较高,其中,Leu、Ile、Val 作为支链氨基酸,是机体能量代谢的重要底物,且在促进运动后肌肉修复、缓解运动疲劳方面具有明确作用;总体上疏水性氨基酸的占比较高,说明疏水性较强,有抗氧化潜力;芳香族氨基酸出现频率也较高,其本身是强效的天然抗氧化剂,可以间接发挥抗疲劳作用。Asp 则能通过调节细胞内氧化还原平衡,辅助提升谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 水平,进而增强机体抗氧化能力,延缓氧化应激介导的衰老进程^[35-37]。将支链氨基酸、芳香族氨基酸和疏水性氨基酸综合考虑作为特定氨基酸初步判断肽段潜力,上述氨基酸组成特征提示,TFPPs-1 组分中的肽序列可能同时具备抗疲劳与抗氧化的双重潜在功能。

为系统挖掘目标肽序列的生物活性潜力,采用多维度生物信息学工具进行系列预测分析,通过在线预测平台 Peptide Ranker 对所有鉴定肽序列进行生物活性评分,筛选标准设定为评分 >0.5 (该阈值为行业公认的潜在生物活性肽筛选临界值),最终获得符合条件的 2~9AARs 短肽序列集合;将上述筛选得到的潜在活性肽序列导入在线工具 Innovagen Peptide Property Calculator,对其水溶性特征进行预测,结果显示目标肽段均具有良好的水溶性,为后续体外活性验证及制剂开发提供了可行性依据。利用 ToxinPred 在线软件对潜在活性肽进行毒性预测,结果显示所有肽段均无毒性风险。同时通过 Allergylab 平台进行致敏性分析,证实目标肽段不具备致敏性,初步保障了其作为功能性成分的安全性;借助 ExPASy ProtParam 工具对潜在活性肽的分子质量及等电点进行计算,相关理化参数结果如表 5 所示,为后续分离纯化工艺优化提供关键参考;将目标肽段转化为简化分子线性输入规范 (Simplified Molecular-Input Line-Entry System, SMILES) 格式,上传至 AdmetSAR 在线系统,对其人体肠道吸收 (Human Intestinal Absorption, HIA)、血脑屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB) 穿透能力、细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 酶代谢特征及急性口服毒性 (Acute Oral Toxicity) 进行预测,具体药代动力学属性数据如表 6 所示。

表 5 肽段的致敏性、毒性及物理化学性质
Table 5 The allergenicity, toxicity and physicochemical properties of peptides

肽段序列	活性评分	特定氨基酸占比/%	水溶性	毒性	等电点	分子量/Da	致敏性
APDPNRMF	0.94	12.50	亲水	无毒	5.88	947.08	非过敏原
DHFLFD	0.80	50.00	亲水	无毒	4.20	792.85	非过敏原
DHKFDL	0.59	50.00	亲水	无毒	5.21	773.84	非过敏原
DWHFSK	0.74	16.67	亲水	无毒	6.74	818.89	非过敏原
FDEFFR	0.93	16.67	亲水	无毒	4.37	859.94	非过敏原
FDFHPVD	0.65	42.86	亲水	无毒	4.20	875.94	非过敏原
FLFDKPV	0.65	42.86	亲水	无毒	5.84	865.03	非过敏原
GGDDSFNTF	0.75	44.44	亲水	无毒	3.56	858.94	非过敏原
IFRPDNF	0.79	28.57	亲水	无毒	5.84	908.02	非过敏原
LIDDHFL	0.63	71.43	亲水	无毒	4.20	871.99	非过敏原

表 6 多肽吸收、分布、代谢、排泄和毒性
Table 6 Peptide ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity)

肽序列	BBB	HIA	CYP450 2C9	CYP450 2D6	CYP450 3A4	口服毒性
APDPNRMF	0.99-	0.68+	0.85	0.90	0.97	(Ⅲ) 0.58
DHFLFD	0.84-	0.80+	0.88	0.93	0.87	(Ⅲ) 0.65
DHKFDL	0.92-	0.75+	0.91	0.95	0.96	(Ⅲ) 0.66
DWHFSK	0.77-	0.62+	0.87	0.88	0.88	(Ⅲ) 0.66
FDEFFR	0.57+	0.72-	0.90	0.88	0.83	(Ⅲ) 0.60
FDFHPVD	0.996-	0.57+	0.83	0.95	0.75	(Ⅲ) 0.70
FLFDKPV	0.995-	0.65+	0.89	0.93	0.77	(Ⅲ) 0.65
GGDDSFNTF	0.89-	0.63+	0.94	0.84	0.80	(Ⅲ) 0.67
IFRPDNF	0.99-	0.82+	0.82	0.90	0.79	(Ⅲ) 0.60
LIDDHFL	0.87-	0.80+	0.90	0.94	0.79	(Ⅲ) 0.62

注：(1) BBB+, 预测可通过, 可能适用于中枢神经靶点; BBB-, 预测不能通过, 可能有助于避免中枢副作用。(2) HIA+, 预测吸收良好, 可能适合口服给药; HIA-, 预测吸收不良, 可能需要考虑注射及其他途径给药途径。(3) 根据美国 EPA 的标准, 第 3 类 (Ⅲ) 包括 LD₅₀ 值大于 500 mg·kg⁻¹ 但小于 5 000 mg·kg⁻¹ 的化合物。

上述多维度生物信息学分析结果, 全面揭示了 TFPPs-1 组分中肽序列的结构特征、潜在功能及安全性, 为后续针对性筛选高活性目标肽段、开展体外功能验证及推动其在功能性食品或保健品领域的应用提供了重要理论支撑。

2.5 分子对接

2.5.1 TFPPs-1组分活性肽与靶标蛋白的分子对接分析

分子对接作为计算机辅助药物设计与虚拟筛选领域的核心技术, 能够通过模拟小分子配体与靶标蛋白的空间结合模式及相互作用能, 高效筛选天然产物中具有潜在靶向活性的生物活性肽, 为后续体外功能验

证提供精准的候选分子库^[38]。在分子对接研究中, 结合能的绝对值越大 (即数值越小), 表明小分子配体与靶标蛋白的空间契合度及相互作用强度越高, 其形成稳定复合物的能力越强。选取前期筛选得到的综合结合能最高的 4 条潜在活性肽, 如图 4 所示: DHFLFD (DD6)、DWHFSK (DK6)、FDEFFR (FR6) 和 FDFHPVD (FD7)。DK6 和 FD7 序列此前文献中未曾被报道, 且通过检索 BIOPEP 数据库^[39], 两个肽段的氨基酸序列未发现, 因此表明为全新的潜在功能性多肽。分别与 Keap1 (抗氧化通路关键蛋白)、LDH (能量代谢与疲劳相关酶) 及 CK (肌肉能量代谢关键酶) 抗氧化及抗疲劳相关的关键靶标蛋白进行分子对接分

析。对接结果显示: 4 条活性肽与 Kcap1 蛋白的结合能介于 $-9.5 \sim -9.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 之间; 与 LDH 蛋白的结合能介于 $-8.8 \sim -6.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 之间; 与 CK 蛋白的结合能介于 $-8.0 \sim -7.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 之间, 提示这 4 条肽均能与靶标蛋白形成较强的稳定结合, 具备潜在的靶向调节活性。

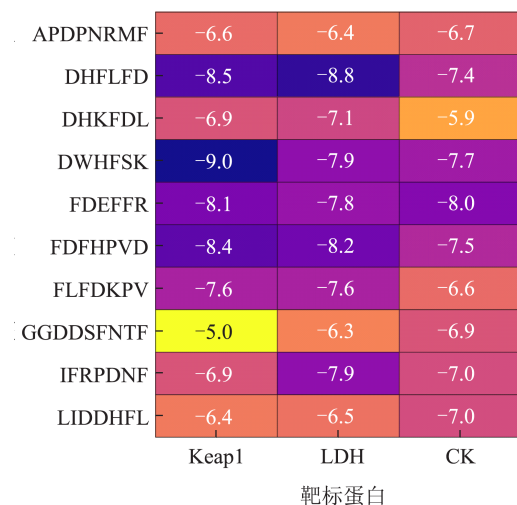


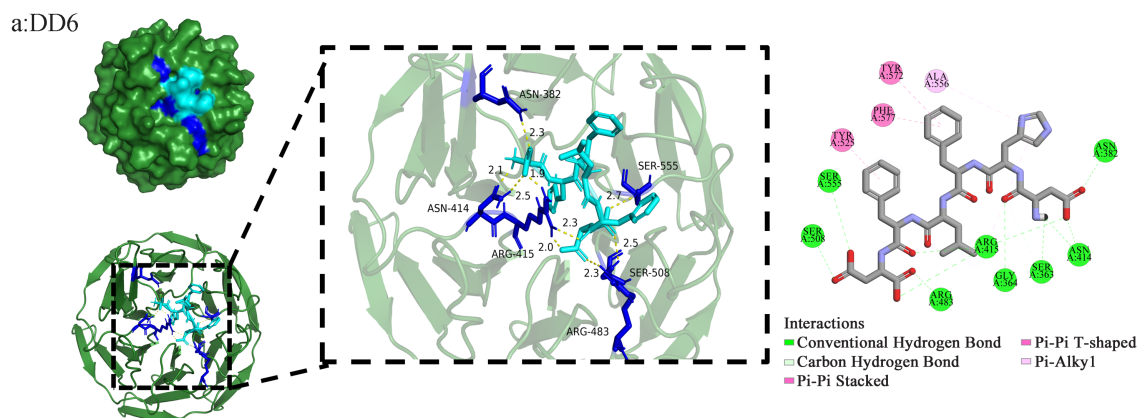
图 4 分子对接结合能热力图

Fig.4 Molecular docking binding energy heatmap

抗氧化肽可通过多种机制抑制调控机体的氧化应激，其中 Keap1/Nrf2 信号通路是机体抵御氧化损伤的核心防御通路——正常生理状态下，Nrf2 与 Keap1 结合并处于失活状态；当机体受到氧化应激刺激时，Keap1 构象发生改变，Nrf2 解离后进入细胞核，启动下游超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶的表达，从而增强机体抗氧化能力^[40]。因此，活性肽与 Keap1 蛋白的结合能力及结合模式，是评估其抗氧化潜力的关键指标。活性肽与 Keap1 蛋白的分子对接结合模式图如图 5 所示，DD6 肽能够与 Keap1 蛋白活性位点的氨基酸残基 Ser555、Ser508、Arg483、

Arg415、Gly362、Ser363、Asn414、Asn382 形成氢键相互作用；与 Tyr525、Phe577、Tyr572、Ala556 形成疏水相互作用；同时与 Ser363 通过碳氢相互作用^[41]进一步增强结合稳定性（图 5a）；DK6 肽能够通过氢键与 Keap1 活性位点的 Val604、Leu557、Ile559、Arg415、Ser555、Gln530、Arg483 结合；通过疏水相互作用与 Phe577、结合；并通过碳氢相互作用与 Gly558 形成额外稳定作用（图 5b）；FR6 能够与 Keap1 活性位点的 Ile416、Leu365、Ser555、Arg415、Arg483、Gln530 形成氢键相互作用，与 Ala556 形成疏水相互作用；与 Leu557、Gly509、Gly462 则通过碳氢相互作用结合（图 5c）；FD7 能够与 Keap1 活性位点的 Gln530、Ser555、Arg415、Asn414、Ser363 形成氢键相互作用；与 Ala556、Tyr525、Tyr334、Phe577、Tyr572 形成疏水相互作用；同时通过碳氢相互作用与 Arg380 结合，进一步巩固复合物稳定性（图 5d）。

此外，通过 Keap1 蛋白与活性肽的表面结合图（图 5）可观察到，活性肽分子能完全嵌入 Keap1 蛋白的活性口袋，二者空间结构契合度较高，无明显空间位阻，进一步验证了结合模式的合理性。已有研究表明，疏水氨基酸是维持 Keap1-Nrf2 复合物结合的核心作用力来源，特别是 Keap1 蛋白活性口袋中的 Tyr334、Arg380、Arg415、Arg483、Asn382、Tyr525 和 Tyr572 等残基^[42]，直接参与与配体分子的疏水相互作用及氢键结合。Xu 等^[43]研究发现，姜辣素与姜烯酮能够自发地与 KEAP1 蛋白的活性位点相互作用，该活性位点由特定残基 Arg415、Phe478、Arg483、Phe577、Tyr572、Tyr334、Tyr525 组成。DD6、DK6、FR6、FD7 条活性肽均能与上述关键残基形成特异性相互作用，进一步提示其具备通过调控 Keap1/Nrf2 信号通路在体内发挥抗氧化活性的潜力。



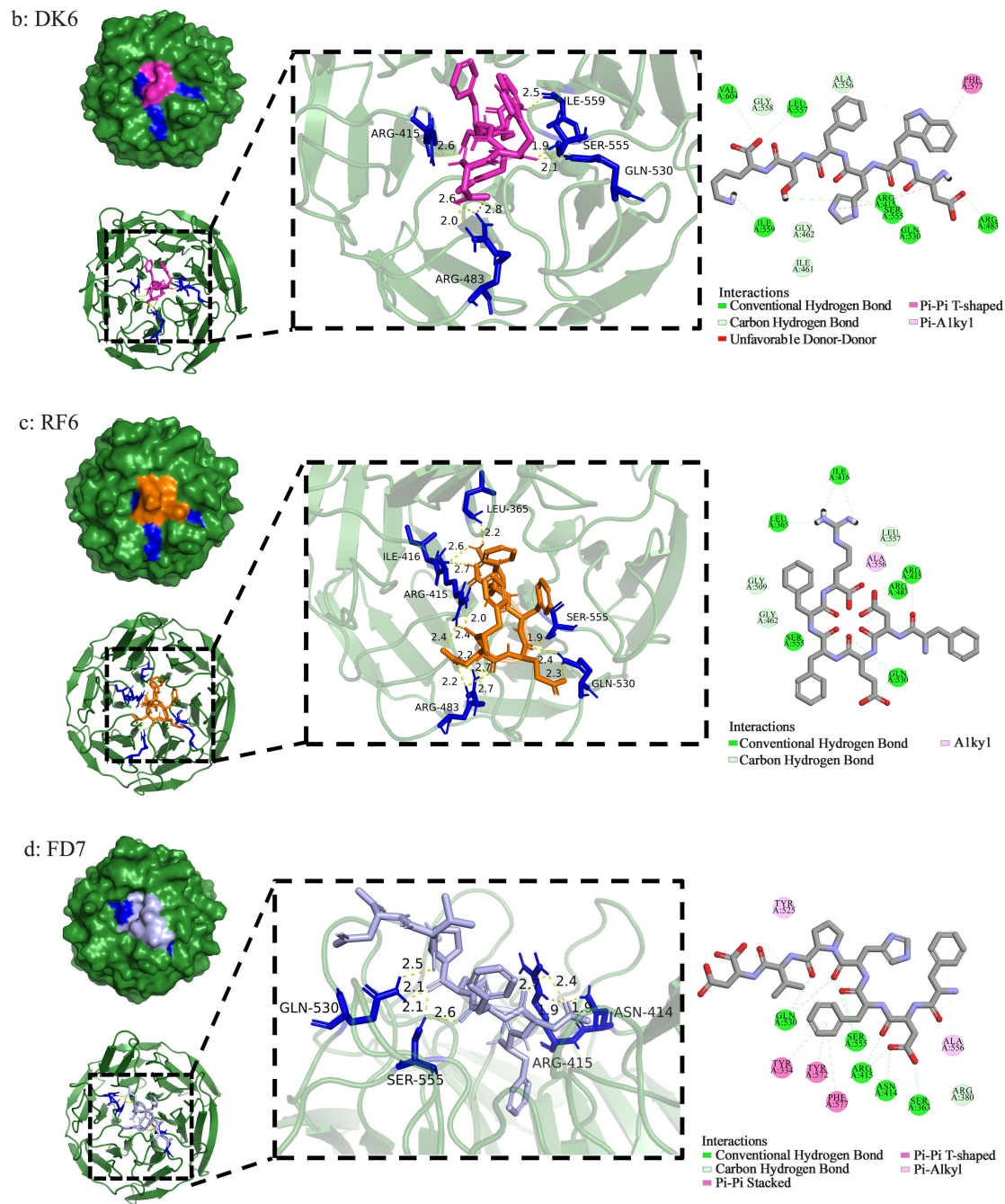


图 5 4 条活性肽分别与 Keap1 (PDB ID:4IQK) 活性位点相互作用的 3D 和 2D 模式图

Fig.5 3D and 2D mode maps of the four active peptides interacting with the active site of Keap1 (PDB ID: 4IQK)

2.5.2 TFPPs-1组分活性肽与LDH蛋白的分子对接及抗疲劳潜力分析

乳酸脱氢酶作为糖酵解代谢途径的关键限速酶，其核心功能是催化丙酮酸还原为乳酸，并伴随烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）氧化为NAD⁺[44]。当机体处于高强度运动或缺氧状态时，LDH活性升高会导致乳酸在肌肉组织中大量积累，引发肌肉pH值下降、收缩效率降低，最终导致体力衰竭，因此抑制LDH活性是筛选抗疲劳活性分子的重要靶点。

通过分子对接技术，进一步分析 DD6、DK6、

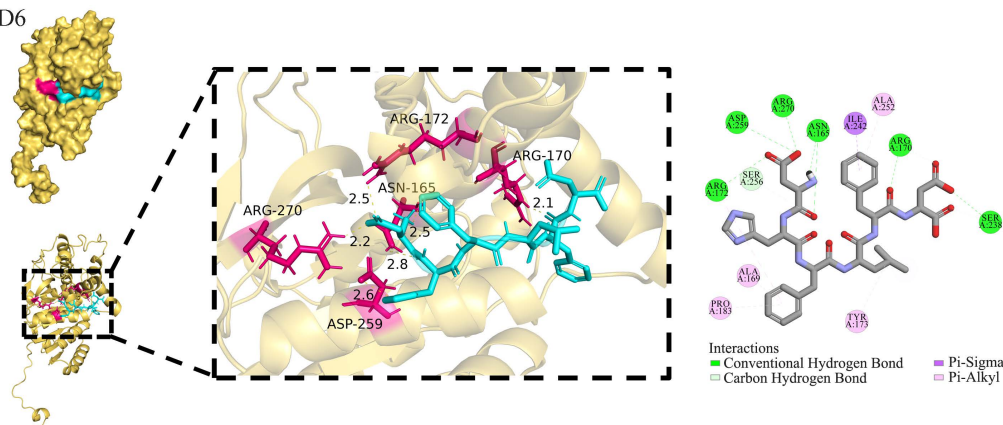
FR6、FD7 等 4 条活性肽与 LDH 蛋白的结合模式，如图 6 所示，4 条活性肽均能精准靶向 LDH 蛋白的活性口袋区域，通过氢键、碳氢相互作用及疏水相互作用等非共价相互作用形成稳定复合物，具体结合特征如下：DD6 肽能够与 LDH 蛋白活性位点氨基酸残基 Arg172、Arg259、Arg270、Asn165、Arg170、Ser238 形成氢键相互作用；与 Pro183、Ala169、Tyr173、Ala252、Ile242、Asp259 形成疏水相互作用；同时与 Ser256 通过碳氢相互作用增强结合稳定性（图 6a）；DK6 肽能够与 LDH 蛋白活性位点的氨基酸残基 Ser238、

Arg170、Asp259、Asn165、Met258 形成氢键相互作用；还能与 Lys43、Tyr173、Ala169、Leu255 形成疏水相互作用，通过疏水性氨基酸侧链的范德华力进一步巩固复合物结构（图 6b）；FR6 肽能够与 LDH 蛋白的氢键结合活性位点为 Ser238、Arg170、Asn165、Arg270、Val271；与 Arg172、Pro183、Ala169、Leu255 形成疏水相互作用，此外与 Ser256 形成的碳氢相互作用进一步提升了结合稳定性（图 6c）；FD7 肽能够与 LDH 蛋白的氨基酸残基 Asn165、Arg170、Arg270、Arg172 形成氢键相互作用；与 Ala169、Leu255、Pro183 形成疏水相互作用，通过氨基酸残基侧链的疏水堆积效应维持复合物稳定（图 6d）。值得注意的是，本研究中 4 条活性肽均与 LDH 蛋白的 Arg170、Arg172、Arg270、Asn165、Pro183 和 Ala169 等关键残基形成特异性相互作用^[45]，而上述残基正是维持 LDH 酶活性中心构

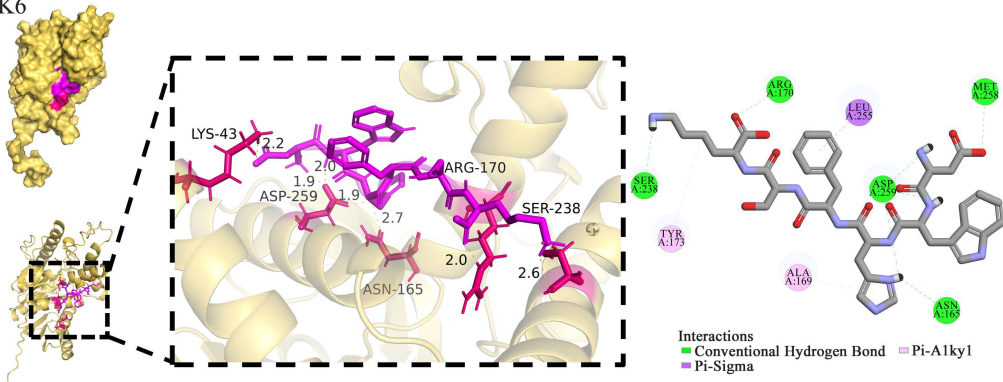
象、结合底物（丙酮酸）及辅酶（NADH）的核心位点——活性肽通过与这些残基结合，可竞争性抑制底物与 LDH 的结合，或诱导酶活性中心构象改变，进而降低 LDH 催化活性，减少乳酸生成。曾巧辉等^[22]发现鱼源四肽 PTIW 可以通过与 LDH 蛋白序列中的 Arg270、Ser256 形成氢键，同时与 Arg172、Ser4405、Arg270、Thr184、Pro183、Thr184、Trp189、Val271、Pro273、His272、Asp259、Asn165、Ser168、Ala169 等氨基酸残基形成疏水作用，从而实现对 LDH 活性的抑制。

结合 4 条活性肽与 LDH 分子对接的结合能介于 $-8.4 \sim -6.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 间，具备较强结合能力以及本部分结合模式分析可知，DD6、DK6、FR6、FD7 等 4 条肽序列可通过靶向调控 LDH 活性发挥抗疲劳作用，具备在体内实现抗疲劳功能的潜在应用价值。

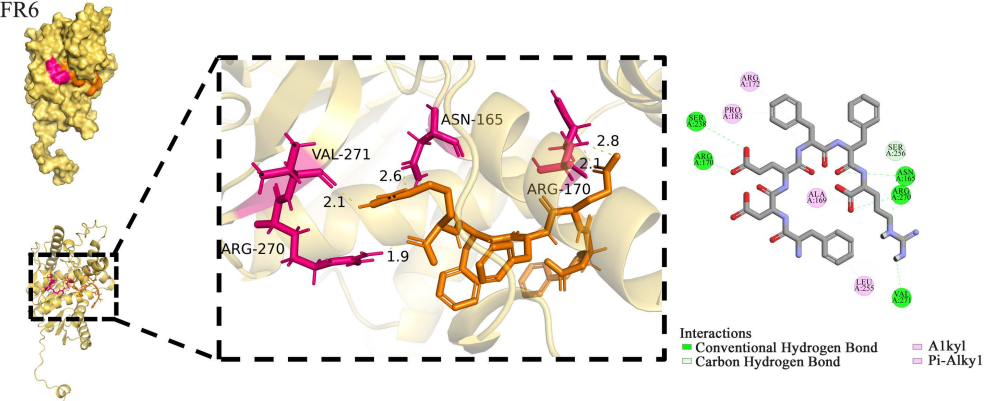
a: DD6



b: DK6



c: FR6



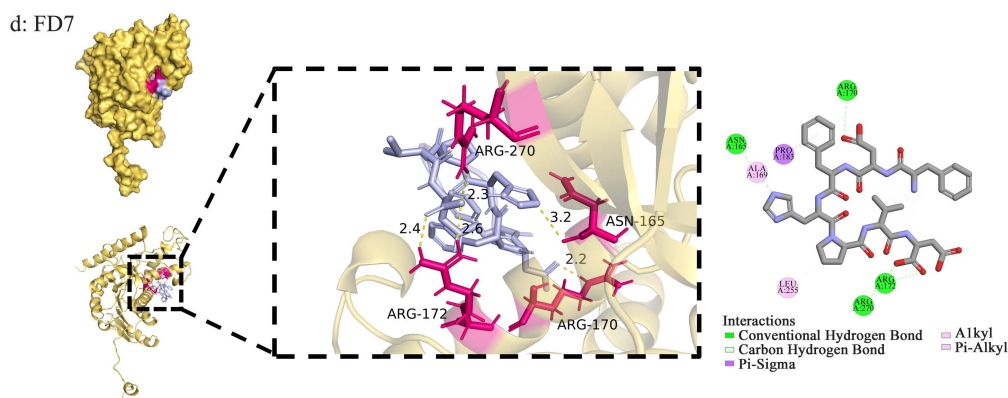


图 6 4 条活性肽分别与 LDH (PDB ID:7EPM) 活性位点相互作用的 3D 和 2D 模式图

Fig.6 3D and 2D mode maps of the four active peptides interacting with the active site of LDH (PDB ID:7EPM)

2.5.3 TFPPs-I 组分活性肽与 CK 蛋白的分子对接及抗疲劳潜力分析

肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 作为肌肉能量代谢通路中的核心酶类, 在短时间高强度运动或长时间耐力运动过程中, 骨骼肌纤维在机械牵拉、能量耗竭及氧化应激的共同作用下, 细胞膜通透性增加甚至破损, 导致大量 CK 释放进入血液, 从而使血清 CK 活性显著升高。这种升高的幅度和持续时间, 直接与运动强度、肌肉损伤程度及疲劳程度呈正相关。若运动负荷超出机体耐受阈值, CK 活性将持续处于高水平, 提示肌肉损伤加重, 此时疲劳状态也将从生理性疲劳转变为病理性疲劳, 表现为肌肉酸痛、收缩效率下降、运动能力显著减退^[46-48]。因此, 抑制 CK 活性异常升高成为开发抗疲劳活性分子的重要方向。

通过分子对接技术, 系统分析 DD6、DK6、FR6、FD7 条活性肽与 CK 蛋白的结合模式, 结果如图 7 所示。4 条活性肽均能精准靶向 CK 蛋白的活性口袋区域, 通过氢键、碳氢相互作用和疏水相互作用等非共价相互作用形成稳定复合物。其中, DD6 肽能够与 CK 蛋白活性位点的氨基酸残基 Arg236、Arg132、Glu232、His191、Leu193、Asn286 形成氢键相互作用; 与 Ile238、Trp228、Val198 形成疏水相互作用; 同时与 Arg130 通过碳氢相互作用增强结合稳定性 (图 7a); DK6 肽能够与 CK 蛋白活性位点的氨基酸残基 Arg130、Arg132、Glu232、His191、Arg236、Arg341、Arg320、Asn286 形成氢键相互作用, 通过氢键的强极性作用提升配体与蛋白的结合亲和力; 还能与 Pro197 形成疏水相互作用, 借助氨基酸侧链的疏水堆积效应维持复合物构象稳定; 此外, 与 Arg292 形成的碳氢相互作用进一步补充结合作用力, 增强整体结合稳定性 (图 7b); FR6

肽能够与 CK 蛋白的氢键结合位点为 Asn286、Ser285、Arg96、Arg341、His191、Arg132、Glu232、Leu193、Arg130, 多位点氢键结合显著提升配体与蛋白的结合强度; 疏水相互作用涉及 Leu201 和 Leu202, 通过疏水性氨基酸侧链的范德华力减少复合物内部的极性冲突, 维持结合构象稳定 (图 7c); FD7 肽能够与 CK 蛋白活性位点的氨基酸残基 Arg236、Arg132、Glu232、Ser285、Ser199、Asp195 形成氢键相互作用, 通过氢原子的静电吸引实现配体与蛋白的精准结合; 与 Cys283、Leu201、Pro197、Val198 形成疏水相互作用, 借助氨基酸残基的疏水特性增强配体与蛋白活性口袋的适配性, 进一步提升复合物稳定性 (图 7d), Narek 等^[49]研究中也提示 Cys283 为起抑制作用的重要氨基酸残基。本研究中 4 条活性肽均与 CK 蛋白的 His191、Arg130、Arg132、Arg236、Arg320、Cys283、Glu232 等关键残基形成特异性相互作用——上述残基是 CK 蛋白活性中心的核心组成部分^[50], 其中 His191 直接参与酶催化反应中的质子转移过程, Arg130、Arg132、Arg236 等碱性氨基酸残基则负责结合底物 (肌酸 /ATP) 的极性基团, Glu232、Cys283 则通过维持活性中心构象保障酶催化效率。活性肽通过与这些关键残基结合, 可竞争性抑制底物与 CK 的结合, 或诱导酶活性中心构象发生改变, 减少疲劳积累。

结合 4 条活性肽与 CK 分子对接的结合能介于 $-8.0 \sim -7.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 间, 具备较强的配体—蛋白结合能力, 以及本部分结合模式分析可知, DD6、DK6、FR6、FD7 等 4 条肽序列可通过靶向调控 CK 活性参与肌肉能量代谢调节, 具备在体内发挥抗疲劳功能的潜在应用价值。

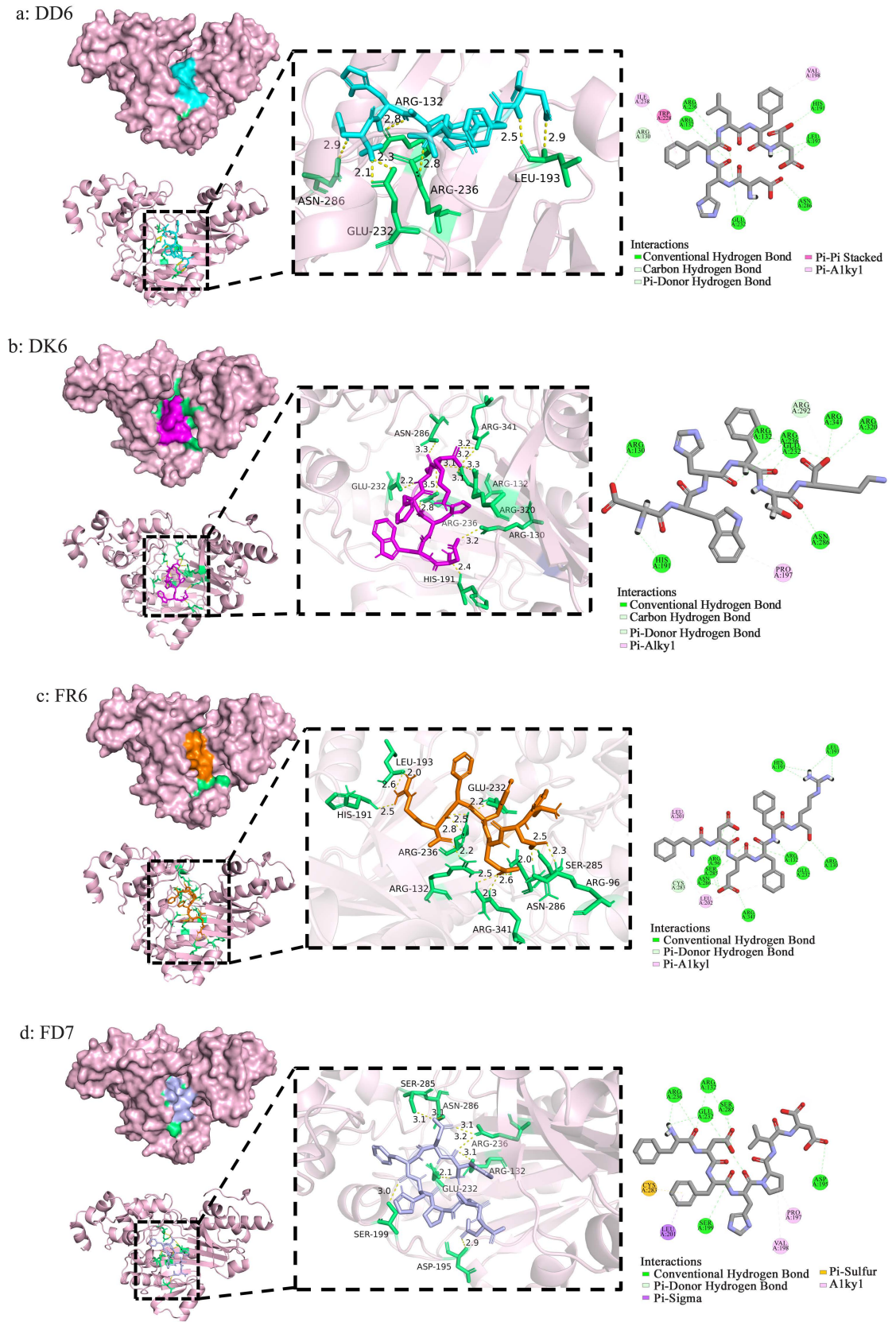


图 7 4 条活性肽分别与 CK (PDB ID: 3B6R) 活性位点相互作用的 3D 和 2D 模式图

Fig.7 3D and 2D mode maps of the four active peptides interacting with the active site of CK(PDB ID:3B6R)

3 结论

本研究利用菊黄东方鲀加工副产物精巢资源开展高值化开发研究，为海洋源抗疲劳功能肽的创新研发提供理论支撑。本研究通过响应面法优化确立了木瓜蛋白酶水解制备菊黄东方鲀精巢多肽（TFPPs）的最优工艺；进而应用多级膜分离技术精准锁定分子量<1 kDa的小分子肽 TFPPs-1，经 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除实验验证其体外抗氧化活性，这一结果与“小分子肽因活性位点暴露充分、易与自由基反应”的普遍规律一致，也为后续抗疲劳活性肽的筛选锁定了核心研究对象。结合 LC-MS/MS 鉴定与生物信息学分析，成功筛选出 DD6、DK6、FR6、FD7 四条潜在具备高生物活性的目标肽段，其中 DK6 和 FD7 为首次发现。分子对接结果揭示，这些肽段可通过与 Keap1、LDH、CK 等关键靶标蛋白的活性中心形成稳定结合，推测其通过推测其可通过“激活抗氧化通路—减少乳酸积累—优化能量代谢”的协同机制发挥抗疲劳功能，为阐明海洋源功能肽的作用机制提供了新的分子线索。综上，本研究不仅为鱼类精巢副产物的资源化利用提供了新路径，更通过明确具体候选分子与潜在作用路径，为菊黄东方鲀源抗疲劳功能产品的高值化开发提供了支撑。未来可进一步开展体内动物实验，系统验证目标肽段的抗疲劳功效与安全性；同时推动实验室成果向功能性食品、保健品等实际产品转化，为菊黄东方鲀源抗疲劳功能性食品或保健品的开发奠定了理论与实验基础。

参考文献

[1] 谢瑞彬,李会,张娟,等. 鲉毒鱼毒素检测及物种鉴定技术研究进展[J]. 食品科学,2022,43(5):306-315.

[2] 李晓雅,桑亚新,孙纪录,等. 养殖河鲀加工技术及其副产物综合利用研究进展[J]. 食品研究与开发,2023,44(1):202-210.

[3] LAGO J, RODRÍGUEZ L P, BLANCO L, et al. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: distribution, toxicity, origin and therapeutical uses [J]. Marine Drugs, 2015, 13(10): 6384-6406.

[4] 陈晓婷,罗朝世禧,刘淑集,等. 养殖菊黄东方鲀鱼头汤风味料工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报,2024,15(2):93-104.

[5] 谢安,魏蔚. 鱼精蛋白的应用现状及存在的问题[J]. 中国胸心血管外科临床杂志,2016,23(1):78-82.

[6] 刘淑集,廖登远,李水根,等. 菊黄东方鲀精巢醇提物(AETT)的抗疲劳作用与毒理安全性[J]. 广东海洋大学学报,2021,41(4):93-98.

[7] 张家源,陈舜胜,张洪才. 暗纹东方鲀鱼精蛋白的纯化及抑菌活性研究[J]. 食品与机械,2020,36(1):171-174,197.

[8] 张家源. 暗纹东方鲀鱼精蛋白的提取纯化及保鲜效果研究[D]. 上海:上海海洋大学,2020.

[9] MEI D L, CHENG F F, LI Y F, et al. Optimization and preparation

of polysaccharide-protamine microspheres with enhanced hemostatic and antibacterial properties for wound healing [J]. Marine Drugs, 2025, 23(4): 160-160.

[10] 黄慧,吴丽芳,廖星星,等. 肝素—鱼精蛋白抗凝方案优化对晚期肝衰竭人工肝治疗术后出血风险及凝血功能的影响[J]. 临床合理用药,2025,18(27):15-18.

[11] BOUKORTT F O, AURÉLIE G, PROSR L J, et al. Fish protein improves the total antioxidant status of streptozotocin-induced diabetes in spontaneously hypertensive rat [J]. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2004, 10(11): BR397-404.

[12] LI N, ZHENG Y X, XU J R, et al. Squid-derived protamine: A natural basic protein and its PEGylated derivative as anti-cancer agents in hepatocellular carcinoma [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 318(P3): 145044.

[13] ZHAO C Y, GONG Y R, ZHENG L, et al. The degree of hydrolysis and peptide profile affect the anti-fatigue activities of whey protein hydrolysates in promoting energy metabolism in exercise mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(6): 3010-3021.

[14] 王勇刚,朱锋荣,韩福森,等. 鱼精多肽在抗氧化和抗疲劳方面的作用研究[J]. 食品科技,2007,7:245-248.

[15] ZHOU M J, ZHENG L, FENG S Y, et al. Novel insights into the molecular mechanism of arginine-rich peptides from skipjack tuna milt as effective acetylcholinesterase inhibitors and neuroprotective agents [J]. Food Chemistry, 2025, 493(P1): 145667.

[16] LI X M, XI Q N, YE C L, et al. Meta-synthesis of patient experiences with chronic fatigue syndrome [J]. Fatigue: Biomedicine, Health & Behavior, 2025, 13(2): 115-134.

[17] SI X X, SI Y Y, LU Z, et al. Mechanisms of fatigue and molecular diagnostics: The application of bioactive compounds in fatigue relief research [J]. Food Bioscience, 2025, 68: 106523.

[18] 范梦琪,阎光宇,陈万浩,等. 抗氧化介导的抗疲劳海参肽的制备及其活性功能研究[J]. 中国食品学报,2025,25(10):139-150.

[19] 史晋源. 甲鱼肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究[D]. 杭州:浙江大学,2021.

[20] LIN S T, ZHANG Y N, YE P, et al. Oyster (ostrea plicatula gmelin) peptides improve exercise endurance capacity via activating AMPK and HO-1 [J]. Journal of the American Nutrition Association, 2024, 43(5): 437-451.

[21] 顾佩菲,刁建华,朱慧佳,等. 黑果花楸果实水提物抗运动性疲劳及肝脏Keap1/Nrf2通路机制[J]. 卫生研究,2025,54(6):990-994.

[22] 曾巧辉,林妙鑫,丁瑶,等. 基于计算机模拟探究鱼类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶源活性肽抗运动疲劳的功效[J]. 现代食品科技,2023,39(9):205-214.

[23] 张家源,张洪才,陈舜胜. 暗纹东方鲀鱼精蛋白的提取工艺优化研究[J]. 渔业科学进展,2020,41(5):168-176.

[24] HOQUE M A, GROSS R A, KOFFAS M A G. Papain expression in the escherichia coli cytoplasm by T7-promoter engineering and co-expression with human protein disulfide isomerase (PDI) and thiol peroxidase (GPx7) genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(1): e0211924.

[25] 饶丹华. 鲟鱼精蛋白与多肽的分离纯化及性质研究[D]. 武汉:武汉工程大学,2017.

- [26] MO L, WANG S, WU B Q, et al. Identification and exploration of sleep-enhancing peptides from goat milk casein by peptidomics and virtual screening [J]. Food Research International, 2025, 221(P2): 117333-.
- [27] GUO Z B, LIN D Q, GUO J J, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of sea horse (*Hippocampus*) peptides [J]. Molecules, 2017, 22(3): 482.
- [28] 李苏心.草鱼鱼鳔胶原肽的制备、纯化及抗氧化活性研究[D].上海:上海海洋大学,2024.
- [29] ZHAO R Y, WU R M, JIN J J, et al. Signaling pathways regulated by natural active ingredients in the fight against exercise fatigue-a review [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1269878.
- [30] 陈玉峰,余悦,黄照蒙,等.金枪鱼肽抗疲劳功效研究及其作用机制初探[J].食品工业科技,2025,46(23):402-410.
- [31] CHI C F, WANG B, WANG Y M, et al. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 1-10.
- [32] 王怡菊,房文红,马丽艳,等.南极磷虾抗氧化肽的分离纯化及结构鉴定[J].海洋渔业,2024,46(5):646-656.
- [33] 左依瑾.罗非鱼皮抗氧化肽分离纯化过程对其结构及活性的影响[D].大连:大连海洋大学,2024.
- [34] ZAHID M, ROBBINS P D. Cell-Type specific penetrating peptides: therapeutic promises and challenges [J]. Molecules, 2015, 20(7): 13055-13070.
- [35] JACKMAN S R, WITARD O C, PHILP A, et al. Branched-Chain amino acid ingestion stimulates muscle myofibrillar protein synthesis following resistance exercise in humans [J]. Frontiers in Physiology, 2017, 8: 390.
- [36] 彭烁.罗非鱼抗氧化肽的制备及其抗疲劳功效研究[D].湛江:广东海洋大学,2022.
- [37] LU S C. Regulation of glutathione synthesis [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2008, 30(1): 42-59.
- [38] 沈嘉森,苏永昌,林河通,等.ACE抑制肽的制备、构效关系及活性评价研究进展[J].渔业研究,2022,44(1):100-108.
- [39] 陈琪.骆驼胎盘抗氧化肽的筛选及活性研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2023.
- [40] ZHENG M, ZHANG F L, GONG X, et al. Ginseng peptide extract alleviates nicotine-induced oxidative stress and apoptosis in human aortic endothelial cells by preserving the balance of the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. International Immunopharmacology, 2025, 159: 114901.
- [41] 陈俊伟.基于生物信息学鉴定特发性肺纤维化内质网应激相关基因及潜在治疗药物[D].广州:南方医科大学,2025.
- [42] MARCOTTE D, ZENG W K, HUS J C, et al. Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, 21(14): 4011-4019.
- [43] XU T T, TAO M F, LI R, et al. The ameliorative effects of ginger against heat-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science and Human Wellness, 2026, 15: 448.
- [44] ZENG S Y, WANG Y Q, YING M F, et al. Elucidating the kinetic and thermodynamic insight into regulation of glycolysis by lactate dehydrogenase and its impact on tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation in cancer cells [J]. ELife, 2024, 13: RP99576.
- [45] TAN H, WANG H L, MA J H, et al. Identification of human LDHC4 as a potential target for anticancer drug discovery [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2022, 12(5): 2348-2357.
- [46] STEDGE H L, ARMSTRONG K. The effects of intermittent pneumatic compression on the reduction of exercise-induced muscle damage in endurance athletes: a critically appraised topic [J]. Journal of Sport Rehabilitation, 2021, 30(4): 668-671.
- [47] ECHEGARAY M, RIVERA M A. Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and cardiorespiratory endurance: genetic and molecular evidence [J]. Sports Medicine (Auckland, N.Z.), 2001, 31(13): 919-934.
- [48] DAHLSTEDT A J, KATZ A, TAVI P, et al. Creatine kinase injection restores contractile function in creatine-kinase-deficient mouse skeletal muscle fibres [J]. The Journal of Physiology, 2003, 47(2): 395-403.
- [49] DARABEDIAN N, JI W Z, FAN M Y, et al. Depletion of creatine phosphagen energetics with a covalent creatine kinase inhibitor [J]. Nature Chemical Biology, 2023, 19(7): 815-824.
- [50] BONG S M, MOON J H, NAM K H, et al. Structural studies of human brain-type creatine kinase complexed with the ADP-Mg²⁺-NO³⁻-creatine transition-state analogue complex [J]. FEBS Letters, 2008, 582(28): 3959-3965.