

利用蚓激酶制备猪血蛋白来源的ACE抑制肽及其降血压活性

全召莉¹, 陈如扬¹, 赖富饶¹, 闵甜¹, 吴晖^{1*}, 贺萍^{2*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东阳江 529568)

摘要: 为了研究蚓激酶作为蛋白水解酶在活性肽开发中的可行性, 研究猪血蛋白 ACE 抑制肽的降血压活性及其作用机制。该文从蚯蚓中提取纯化, 得到了酶活为 $43\ 125.87\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白的蚓激酶, 利用其制备猪血蛋白 ACE 抑制肽。分离纯化后得到 ACE 抑制活性为 91.30% 的多肽, 记为 PBEP-M。通过 Ang II 诱导 HUVEC 细胞建立损伤模型, 采用 CCK-8 法测定 PBEP-M 对 HUVEC 细胞的毒性, 使用试剂盒测定 ET-1、NO 和 ROS 细胞因子分泌量, 通过 Western Blot 法检测 ACE-Ang II-AT1-R 通路中与血压调控相关的蛋白含量。实验结果表明, PBEP-M 质量浓度在 $62.5\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内, 对细胞有显著的增殖作用。质量浓度 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PBEP-M 处理组可显著增加 NO 的分泌, 相比于 Ang II 组提升了 84.00%; 且可显著抑制 ET-1 和 ROS 的分泌, 相比于 Ang II 组分别降低了 53.66%、36.94%。同时 PBEP-M 可以显著抑制 ACE-Ang II-AT1-R 通路中 ACE、Renin 和 AT1-R 的表达, 相比于 Ang II 组分别降低了 76.76%、83.96% 和 89.05%, 并且 PBEP-M 可以显著促进 eNOS 蛋白的表达, 相比于 Ang II 组提升了 8.77 倍。本研究为蚓激酶作为一种蛋白水解酶应用在活性肽的开发中提供了理论基础, 也为畜禽血液深加工提供了新的思路 and 方向。

关键词: 蚓激酶; 猪血蛋白; ACE 抑制肽; 人脐静脉内皮细胞; 内皮功能障碍

文章编号: 1673-9078(2026)06-178-187

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0390

Preparation of Angiotensin-converting Enzyme-inhibitory Peptides from Porcine Blood Proteins using Lumbrokinase and Their Antihypertensive Activity

TONG Zhaoli¹, CHEN Ruyang¹, LAI Furao¹, MIN Tian¹, WU Hui^{1*}, HE Ping^{2*}

(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Yangjiang 529568, China)

Abstract: The feasibility of using lumbrokinase as a protease in the development of bioactive peptides was investigated, together with the assessment of antihypertensive activity of angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides derived from porcine blood proteins and clarification of their underlying mechanisms of action. Lumbrokinase was extracted from earthworms and purified, yielding an enzyme preparation exhibiting an activity of $43\ 125.87\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein. The enzyme was used to prepare

引文格式:

全召莉,陈如扬,赖富饶,等.利用蚓激酶制备猪血蛋白来源的ACE抑制肽及其降血压活性[J].现代食品科技,2026,42(6): 178-187.

TONG Zhaoli, CHEN Ruyang, LAI Furao, et al. Preparation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from porcine blood proteins using lumbrokinase and their antihypertensive activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 178-187.

收稿日期: 2025-03-19; 修回日期: 2025-05-23; 接受日期: 2025-05-24

基金项目: 广东省重点研发计划项目 (2022B0202020003)

作者简介: 全召莉 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性产物, E-mail: Tongzhaoli2000@163.com

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性产物, E-mail: fehwi@scut.edu.cn; 共同通讯作者: 贺萍 (1994-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: hepingscut@163.com

ACE-inhibitory peptides from porcine blood proteins. After separation and purification, an ACE-inhibitory peptide with an ACE inhibition rate of 91.30% was obtained and designated PBEP-M. An angiotensin (Ang) II-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) damage model was established. The toxicity of PBEP-M towards HUVECs was determined using the CCK-8 assay; the secretion levels of endothelin 1 (ET-1), nitric oxide (NO), and reactive oxygen species (ROS) was measured using ELISA kits; and the expression of ACE-Ang II-Ang II receptor type 1 (AT1-R) pathway-related proteins was analyzed using western blotting. PBEP-M significantly promoted cell proliferation at concentrations of 62.5~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($P<0.05$). At 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, PBEP-M significantly increased NO secretion by 84.00% compared with the level in the Ang II group ($P<0.05$). In addition, PBEP-M significantly reduced the secretion of ET-1 and ROS by 53.66% and 36.94% respectively ($P<0.05$ vs. Ang II group). Furthermore, PBEP-M significantly reduced the expression of ACE, renin, and AT1-R by 76.76%, 83.96%, and 89.05%, respectively ($P<0.05$ vs. Ang II group). Moreover, PBEP-M enhanced eNOS expression by 8.77 times ($P<0.05$ vs. Ang II group). This study provides a theoretical foundation for the application of lumbrokinase as a protease in the development of bioactive peptides and offers new insights for advancing the deep processing of livestock and poultry blood.

Key words: lumbrokinase; porcine blood protein; ACE-inhibitory peptide; human umbilical vein endothelial cells; endothelial dysfunction

蚯蚓属环节动物门寡毛纲蚯蚓科动物，参环毛蚓 (*E.Perrier*) 是一种广泛分布于中国南部地区的蚯蚓，又被称为“广地龙”。先前的研究表明，广地龙具有抗炎、抗菌、抗纤维化、抗血栓等功效^[1-3]，这些功能活性都与蚯蚓体内的蚓激酶等活性蛋白酶类密切相关。蚓激酶是一组具有纤溶活性蛋白酶的总称，包括纤维蛋白溶酶、纤维蛋白溶酶原激活物以及类似组织型纤维蛋白溶酶原激活物组分。蚓激酶除了能够抑制血小板凝集、修复血管内皮受损细胞外，还与纤维蛋白具有特殊的亲和力，能够跟踪血栓^[4]，直接降解血栓中的纤维蛋白^[5]，是治疗心血管疾病的新型药。

畜禽血液一直是畜禽屠宰和加工中的主要副产物，除鹿血、鹿茸血等珍贵血资源，其余畜禽血液基本作为废弃物舍弃而浪费，造成了一定程度的资源浪费与环境污染。猪血具有较高的营养价值，更是一种具有发展前景的潜在功能性食品，喷雾干燥猪血已被用作促进动物生长的膳食补充剂^[6]，猪血蛋白质调节肠道屏障和防御机制的功能也被证明^[7,8]。但猪血中含量较高的血红蛋白结构较为特殊，亚基间彼此掩盖形成独特的封闭型结构。加之血纤维蛋白会束缚血液中的血红蛋白，使其在食品加工生产中，无可避免地存在消化率低和水解度低的缺陷。因此利用蚓激酶特异性水解纤维蛋白的特性，可以提高富含纤维蛋白的猪血粉的水解度以挖掘功能活性肽。高血压是心脑血管疾病的重要危险因素。血管紧张素转换酶 (ACE) 是血压调节系统的关键因子之一，是抗高血压药物研究的重要靶点。使用血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 是降低高血压的有效疗法。然而，临床使用的 ACEI 药物都具有不同程度的副作用^[9]。因此，安全性高、来源广、成本低的食源性 ACE 抑制肽更容易被消费者接受。它

的天然来源及生物活性使其成为传统 ACE 抑制药物极具潜力的替代品。

在本研究中，从新鲜参环毛蚓中提取纯化，得到了酶活为 43 125.87 U·mg⁻¹ 蛋白的蚓激酶，利用其对猪血红蛋白进行水解。探究了猪血红蛋白水解物和纯化各组分的体外 ACE 抑制活性。并用 Ang II 诱导 HUVEC 细胞损伤模型，探究猪血红蛋白 ACE 抑制肽对损伤细胞的保护作用；进一步通过检测相关调节因子 NO、ET-1 和 ROS 等含量的变化以及高血压相关通路指标蛋白表达量的变化，评估猪血红蛋白 ACE 抑制肽对 HUVEC 细胞的保护作用及其对 RAS 系统的影响。为猪血红蛋白的精深加工奠定基础，为以食源性蛋白为原料的功能性食品的开发提供重要依据，也为蚓激酶作为蛋白水解酶在食品中的工业化应用提供深加工思路以及技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

5% 2,4,6- 三硝基苯磺酸 (Trinitro Benzene Sulfonic Acid, TNBS) 溶液、马尿酸-组氨酸-亮氨酸 (Hippuryl-His-Leu-OH, HHL)、马尿酸 (Hippuric Acid, Hip)、兔肺血管紧张素转换酶 (ACE)，购自美国 Sigma-Aldrich 公司；磷酸盐缓冲液 (pH 值 8.2)、琼脂糖、纤维蛋白原、凝血酶、硼酸盐缓冲液 (pH 值 8.3) 和卡托普利 (Captopril)，购自上海源叶生物科技有限公司；硫酸铵、苯甲酸钠、氯化钠、盐酸和氢氧化钠，购自广州化学试剂厂；DEAE Sepharose Fast Flow，购自上海新睿生物科技有限公司；Sephadex G-75，购自北京索莱宝科技有限公司；三氟乙酸 (Trifluoroacetic Acid, TFA)，购自上海阿拉丁生化科

技股份有限公司; 乙腈 (Acetonitrile, ACN), 购自天津市科密欧化学试剂有限公司; HUVEC 细胞, 购于尚恩生物; Ori Cell 完全培养基, 购于赛业生物科技有限公司; 胰酶 (Trypsin 0.25% EDTA), 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 双抗 (青霉素 / 链霉素) 溶液和细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CCK-8), 购于大连美仑生物技术有限公司; 血管紧张素 II (Ang II), 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; NO 检测试剂盒和 ROS 检测试剂盒, 购于上海碧云天生物技术有限公司; ET-1 检测试剂盒, 购于江苏酶免实业有限公司; ACE Antibody、Renin Antibody、AT1-R Antibody、eNOS Antibody 和 β -Actin Antibody, 购于武汉博士德生物工程有限公司; 用于 HPLC 研究的试剂为 HPLC 级, 其余化学品均为分析级。

1.2 仪器与设备

DF-0191S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; HH-4 型恒温水浴锅, 白塔金昌实验仪器厂; 818 型 pH 计, 香港希玛仪器仪表有限公司; Victor 3 多微孔板检测仪, 新加坡 PerkinElmer 公司; Waters 2695 型液相色谱, 美国 Waters 公司; Heracell 150i 型二氧化碳培养箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; HL-2B 型蠕动泵, 上海精科实业有限公司; BSZ-160F 型自动收集器, 上海精科实业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 蚓激酶的制备

1.3.1.1 蚓激酶的提取与纯化

新鲜参环毛蚓 → 低温匀浆 → 37 °C 自溶 8 h → 离心取上清液 → (NH₄)₂SO₄ 沉淀 → 离心取上清液 → 超滤浓缩 → 冷冻干燥 → DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子层析柱分离纯化 → Sephadex G-75 凝胶柱分离纯化 → 冷冻干燥

1.3.1.2 蚓激酶活性的测定

将 0.01 mol·L⁻¹ 的 PBS (pH 值 7.8) 与生理盐水按 1:17 (V/V) 的比例混合配制得到工作溶液。用工作溶液配制质量分数为 1.5% 的琼脂糖溶液和质量分数为 0.2% 的纤维蛋白原溶液各 140 mL。将两者按 1:1 (V/V) 比例混合的同时加入适量凝血酶溶液, 搅拌混匀后立即倒入培养皿中, 室温水平放置。反应 1 h 后用打孔器打孔, 每孔加入样品或标准品 10 μ L, 加盖后置于 37 °C 培养箱恒温孵育 16 h, 用游标卡尺测量溶解圈垂直两直径, 以蚓激酶标品活性为横坐标, 标品垂直半径乘积对数为纵坐标绘制标准曲线, 代入样品垂直半径计算蚓激酶活性。

1.3.1.3 蚓激酶的质谱分析

样品经过胶内酶解、肽段提取等步骤后进行质谱

检测。质谱分析使用 Thermo 公司的 Q Exactive™ 液质联用系统进行。肽段样品通过自动进样器吸入后结合至 C18 捕获柱, 接着被洗脱至分析柱进行分离。MS/MS 采集的条件设置为母离子信号大于 3e6, 电荷数为 +2~+7。离子重复采集的排除时间设置为 35 s。根据蚓激酶数据库匹配肽段, 解析质谱数据。

1.3.2 蚓激酶对猪血蛋白的水解

猪血蛋白与蒸馏水以 1:15 (m/V) 比例混合均匀。用 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 调节料液 pH 值至 7, 水浴预热后, 加入底物质量分数 2% 的蚓激酶, 置于磁力搅拌器中反应 1 h。酶解完成后, 将酶解液加热至 95 °C, 保持 15 min, 灭活蚓激酶。将灭酶后的酶解液冷却后, 离心, 得到上清液和沉淀, 收集上清液, 真空冷冻干燥得到粉末后于 -40 °C 冰箱保存, 记为 PBEP。

1.3.3 水解度 (DH) 及分子量的测定

采用三硝基苯磺酸法 (TNBS 法), 并进行调整。精准称取一定量的 PBEP 配制质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的样品溶液, 将溶液稀释 100 倍。取 1 mL 样品稀释液, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 值 8.2) 和 1 mL 体积分数为 0.05% 的 TNBS 溶液, 立刻振荡摇匀, 在 50 °C 下避光水浴 60 min。水浴结束后加入 2 mL 的 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液终止反应, 最后加入 5 mL 去离子水, 至于暗处冷却后, 340 nm 波长测定吸光度值。以 L-亮氨酸绘制标准曲线, 计算出 α -氨基酸含量。水解度的测定公式为:

$$DH = \frac{h_s - h_0}{h_t - h_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

DH——水解度, %;

h_s ——猪血蛋白酶解物氨基酸含量, mmol·L⁻¹;

h_0 ——猪血蛋白液氨基酸含量, mmol·L⁻¹;

h_t ——猪血蛋白完全水解液氨基酸含量, mmol·L⁻¹。

分子量测定采用 HPLC 法, 按照 GB/T 22729-2008 进行测定。以细胞色素 C (MW12384)、抑肽酶 (MW6500)、杆菌肽 (MW1422)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW189) 为标准品, 称取样品 100 mg 置于 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 超声 5 min, 离心后微孔过滤膜后供进样。

1.3.4 体外 ACE 抑制活性评价

将 10 μ L ACE 溶液 (0.1 U·mL⁻¹) 和 50 μ L 待测样品混合均匀后在 37 °C 下孵育 5 min。随后, 加入 40 μ L 的底物 (HHL, 6.5 mmol·L⁻¹) 在 37 °C 下孵育 60 min 后, 加入 100 μ L 的盐酸 (1 mol·L⁻¹) 终止反应。用 0.22 μ m 膜过滤

后,用反相高效液相色谱定量反应体系中马尿酸(HA)的浓度。在对照组和空白组中,ACE抑制肽样品被硼酸盐缓冲液取代。另外,在空白组中,在开始反应前加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸 $100\text{ }\mu\text{L}$ 使酶失活。计算公式为:

$$R = \frac{A-B-A_0}{A-A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R ——猪血红蛋白ACE抑制肽对ACE的抑制率, %;

A ——对照组中马尿酸的峰面积, $\text{mAU}\cdot\text{s}$;

B ——实验组中马尿酸的峰面积, $\text{mAU}\cdot\text{s}$;

A_0 ——空白组中马尿酸的峰面积, $\text{mAU}\cdot\text{s}$ 。

1.3.5 PBEP的分离纯化

将PBEP配制质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜后连续进行两次超滤,分子量被分为 <3 、 $3\sim 10$ 和 $>10\text{ ku}$ 三个组分。测定3个组分的ACE抑制率,收集ACE抑制活性最高的组分透析脱盐,透析截留量为 100 u ,将透析液冷冻干燥后配制质量浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液并用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后加入Sephadex G-25层析柱。用超纯水进行洗脱,洗脱液用自动收集器收集,之后利用紫外分光光度计于 220 nm 处测量吸光值,收集出现峰值处的洗脱液,冻干后测其ACE抑制活性,将纯化得到的活性最高的猪血红蛋白ACE抑制肽记为PBEP-M。

1.3.6 HUVEC细胞的培养

1.3.6.1 HUVEC细胞的接种

将含有 1 mL 细胞悬液的冻存管从液氮罐中取出,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中迅速摇晃解冻,加入提前预热好的 5 mL 完全培养基混合均匀后 $1\text{ }100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 。随后立即弃去上清液,加入 5 mL 完全培养基,用移液枪轻轻吹打混匀细胞,然后将细胞悬液置于T25培养瓶中,交叉交叉法轻轻混匀后置于二氧化碳培养箱中,在 CO_2 培养箱中培养 24 h ,使细胞贴壁生长,当细胞生长至密度达到 $80\%\sim 90\%$ 时,消化细胞得到细胞悬液,对其进行计数,稀释一定倍数后,接种至孔板中。

1.3.6.2 猪血红蛋白ACE抑制肽对细胞毒性的测定

取对数生长期的HUVEC细胞,以每孔 1.0×10^4 个细胞的数量接种于96孔板,用完全培养基在 CO_2 培养箱中培养 24 h 。随后弃去上清液,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 不同质量浓度(62.5 、 125 、 250 、 500 、 $1\text{ }000$ 、 $2\text{ }000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的PBEP-M培养液,以不加任何试剂的完全培养基为阴性对照,再培养 24 h 。弃上清液,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 体积分数为 10% 的CCK-8试剂,培养 1 h 后于波长 450 nm 测定吸光值。以不含样品的组为阴性对照组,以只有 $100\text{ }\mu\text{L}$ 体积分数为 10% 的CCK-8试剂组为空白组,

计算相对细胞活力。

1.3.6.3 建立Ang II损伤HUVEC细胞模型

设正常对照组、Ang II组(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 $10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$),空白组(只含有完全培养基)。称取 5 mg Ang II粉末,溶于 $478\text{ }\mu\text{L}$ PBS缓冲液中,配制成浓度为 $1\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,以此为母液,将其稀释到所需浓度。取对数生长期的HUVEC细胞,以每孔 1.0×10^4 个细胞的数量接种于96孔板。

正常对照组:细胞在培养箱中培养 24 h 后,弃去原培养基,重新加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 培养基继续培养。

Ang II组:细胞在培养箱中培养 24 h 后,弃去原培养基,分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度的(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 $10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Ang II培养基,继续干预 24 h 。之后弃上清液,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 体积分数为 10% 的CCK-8试剂,培养 1 h 后于波长 450 nm 处测定吸光值,计算相对细胞活力。

1.3.7 HUVEC细胞因子的测定

为了进一步探究猪血红蛋白ACE抑制肽的降压机制,设置四个组别。

对照组:细胞接种培养 24 h 后,弃去原培养基,重新加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 培养基继续培养 24 h ; Ang II组:细胞接种培养 24 h 后,倒掉培养基,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 浓度为 $10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Ang II培养基损伤HUVEC细胞 24 h ; Ang II+Pep组:细胞接种培养 24 h 后,倒掉培养基,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 浓度为 $10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Ang II培养基损伤HUVEC细胞 24 h 之后倒掉培养基再加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度为 $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的猪血红蛋白ACE抑制肽PBEP-M孵育 24 h ; Pep组:细胞接种培养 24 h 后,倒掉培养基,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度为 $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的猪血红蛋白ACE抑制肽PBEP-M孵育 24 h 。然后测定4组HUVEC细胞上清液中NO、ET-1和ROS的含量。

1.3.7.1 细胞NO含量的测定

取对数生长期细胞,以每孔 1.0×10^4 个细胞的数量接种于透明底黑色96孔板,用完全培养基在 CO_2 培养箱中培养 24 h ,随后弃去上清液。按照四个组别:对照组、Ang II组、Ang II+Pep组和Pep组,分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样品进行培养,随后利用NO荧光探针DAF-FM DA试剂盒对细胞内的NO进行定量测定,具体方法参照试剂盒说明书。

1.3.7.2 细胞ROS含量的测定

取对数生长期细胞,以每孔 1.0×10^4 个细胞的数量接种于透明底黑色96孔板,用完全培养基在 CO_2 培养箱中培养 24 h ,随后弃去上清液。按照四个组别:对照组、Ang II组、Ang II+Pep组和Pep组,分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样品进行培养,随后利用ROS荧光探针

DCFH-DA 对细胞内的 ROS 进行定量测定，具体方法参照试剂盒说明书。

1.3.7.3 细胞ET-1含量的测定

取对数生长期细胞，以每孔 1.0×10^4 个细胞的数量接种于 96 孔板，用完全培养基在 CO₂ 培养箱中培养 24 h，随后弃去上清液。按照四个组别：对照组、Ang II 组、Ang II+Pep 组和 Pep 组，分别加入 100 μL 样品进行培养，随后采用 ELISA 试剂盒测定细胞培养上清液中 ET-1 的含量，具体方法参照试剂盒说明书。

1.3.8 Western-Blot法检测HUVEC细胞内关键蛋白的表达量

用 PBS 冲洗细胞 2~3 次后，加入适当体积的 RIPA 裂解液于培养瓶内反应 5 min 后用细胞刮刀将细胞刮下，转移到 1.5 mL 离心管中，冰上裂解 30 min，期间用移液器吹打，确保细胞完全裂解。然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min，收集上清，得到总蛋白溶液。电泳、转膜后进行抗体孵育，孵育完成后放置脱色摇床上快速洗脱。将洗脱完的 PVDF 膜取出放在吸水纸上，稍微吸干膜上面的液体，将膜放在化学发光仪搁板上，加入混合好的 ECL 发光液，让液体完全浸没膜，待反应 1 min 之后，用吸水纸，吸干上面多余的液体，放入化学发光仪中，按照预设程序开始化学发光，曝光完成之后，保存原始图为 TIFF 格式。

1.3.9 数据处理

所有试验均做 3 组平行，结果以平均值 $\pm$ 标准方差 (mean $\pm$ SD) 表示。使用 SPSS 26.0 软件进行显著性差异分析，将 $P<0.05$ 视为差异显著；使用 Origin 2022 进行制图。

2 结果与讨论

2.1 蚓激酶的制备

蚯蚓体腔内含有丰富的纤维蛋白溶解酶，在特定条件下可以水解自身氨基酸实现自溶。如图 1a 所示，新鲜参环毛蚓首先进行自溶，自溶在蚓激酶的提取过程中可以起到初步除杂的作用。研究结果表明，在蚓激酶的粗提中引入自溶后，上清液蛋白质质量浓度由 3 237.43 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下降到 2 998.39 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，而蚓激酶活性由 28 610.28 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 上升到 30 116.15 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。自溶结束后 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min，取上清液于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴，加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 调节饱和度，使其饱和度达到 30%，静置 6 h 后用高速冷冻离心机以 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min，取上清液进行超滤，收集分子量大于 10 ku 的组分。将超滤后得到的蚓激酶粗提物经 DEAE-Sephadose Fast Flow 阴离子柱进行纯化，结果如图 1b 所示，根据 5 个峰的出峰顺序分别命名为 F1、F2、F3、F4、F5，收集各洗脱峰测定其蚓激酶活性。洗脱峰 F1-F3 均检测出蚓激酶活性，其中 F2 的活性最高，其比活力为 36 268.31 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白；其次为 F3，比活力为 10 344.35 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白；F1 活性最弱，其比活力为 5 601.97 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白。收集 F2 的洗脱组分透析冻干之后进行 Sephadex G-75 葡聚糖凝胶柱分离纯化。结果如图 1c，分离得到 2 个峰，依次命名为 S1、S2，测定各峰的蚓激酶活性，其中 S1 组分未检测出蚓激酶活性，S2 组分活性最高为 43 125.87 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白，相较 F2 组分蚓激酶活性提升了 18.91%。S2 组分即为纯化得到的蚓激酶，收集 S2 组分用于质谱分析及后续的猪血蛋白酶解实验。

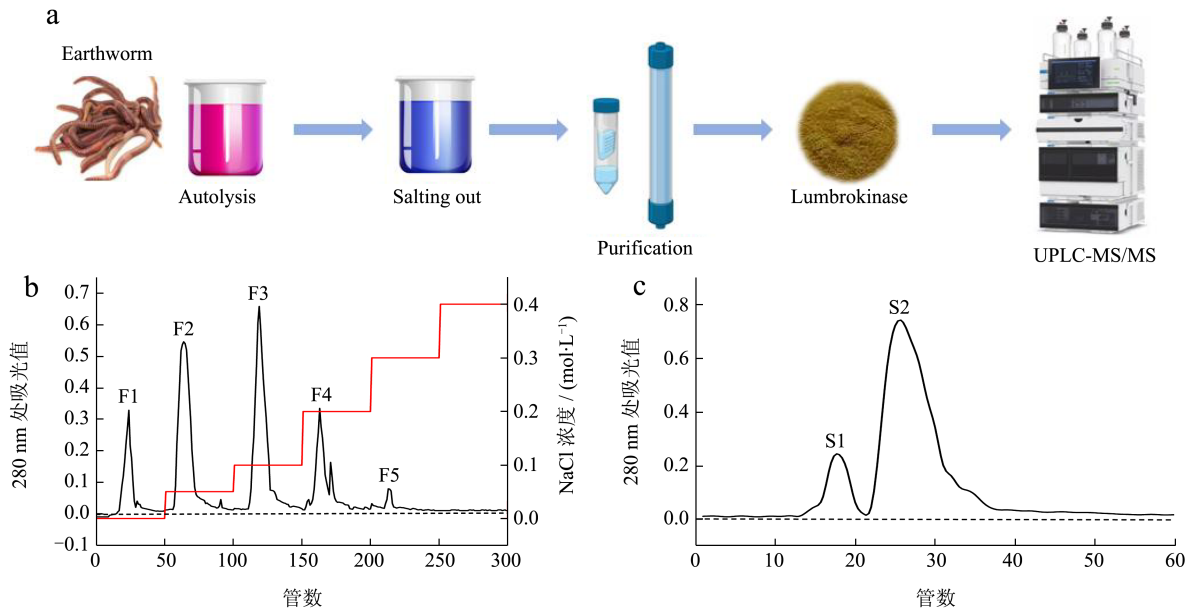


图 1 蚓激酶提取流程及柱层析纯化图

Fig.1 The process of the lumbrokinase extraction and column chromatography purification diagram

注：a. 蚓激酶提取流程图；b. 蚓激酶的 DEAE Sepharose F F 阴离子柱洗脱谱图；c. F2 组分的 Sephadex G-25 洗脱谱图。

2.2 蚓激酶的质谱分析鉴定结果

对组分 S2 经质谱得到的原始文件转换处理后，检索 NCBI 的蚓激酶数据库，得到 20 种可能的蚓激酶。其中有 15 种酶发现于赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*)，其余 5 种发现于双胸蚓 (*Lumbricus bimastus*)、掘穴环爪蚓 (*Perionyx excavatus*) 及 *synthetic construct*。这可能是因为赤子爱胜蚓与参环毛蚓都属于蚯蚓科的不同物种，由于它们的进化关系相对接近，它们的蚓激酶序列可能会存在较高的同源性，尤其是保守的功能区域，这可能导致它们在基因数据库中被标注为同一类酶。

2.3 猪血红蛋白的水解度和分子量分布

此前少有研究将蚓激酶作为一种蛋白酶应用在酶解过程中，本研究为了进一步证明蚓激酶对富含纤维蛋白的猪血红蛋白样品的酶解效果，将蚓激酶和胰酶在同样条件下对猪血红蛋白进行酶解。相较于胰酶酶解物 14.05% 的水解度，蚓激酶酶解物水解度为 16.51%。此外，如图 2 分子量分布结果显示，与胰酶酶解物相比，经蚓激酶酶解后小分子量 (<3 ku) 的比例从 87.97% 增加到 96.91%。表明在一定程度上，蚓激酶相较于胰酶对富含纤维蛋白的猪血纤维蛋白有更好的酶切作用。研究表明，由 2~20 个氨基酸残基组成的小肽更有可能具有生物活性^[10]。由于猪血红蛋白酶解物中存在许多小分子物质，所以其具有开发功能性食品的潜力。

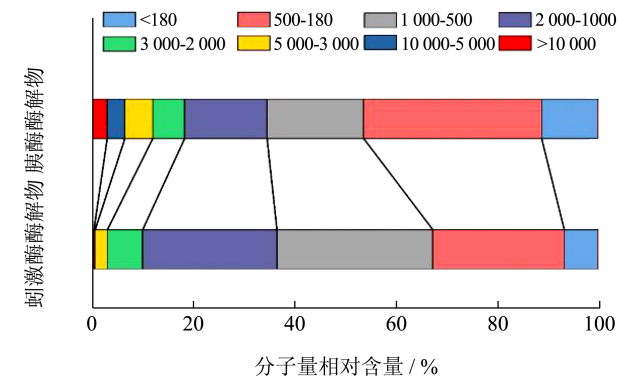


图 2 蚓激酶和胰酶水解物的分子量分布

Fig.2 Molecular weight distribution of earthworm thrombin and trypsin hydrolysates

2.4 猪血红蛋白的ACE抑制活性

初步测定了蚓激酶与胰酶酶解物的 ACE 抑制活性。如图 3 所示，蚓激酶酶解物在 1 mg·mL⁻¹ 和 0.5 mg·mL⁻¹ 质量浓度下，ACE 抑制率分别为 80.63% 和 74.34%，显著 ($P<0.05$) 高于胰酶酶解物在 1 mg·mL⁻¹ 和 0.5 mg·mL⁻¹ 质量浓度下 ACE 抑制率 (分别为

71.94%、65.84%)。这可能是因为蚓激酶倾向于切割疏水性氨基酸，生成的短肽富含疏水性氨基酸，更易与 ACE 活性中心结合。同时蚓激酶酶解生成的短肽长度适中，且 C 端常为芳香族氨基酸或脯氨酸，符合 ACE 抑制肽的结构特征。

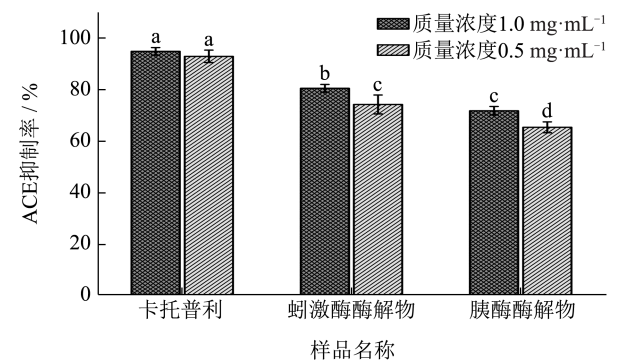


图 3 蚓激酶和胰酶水解物 ACE 抑制活性

Fig.3 ACE inhibitory activity of Lumbricinase and pancreatin hydrolysates

注：不同的小写字母表示各试验组间具有显著差异 ($P<0.05$)。下同。

2.5 猪血红蛋白的分离纯化

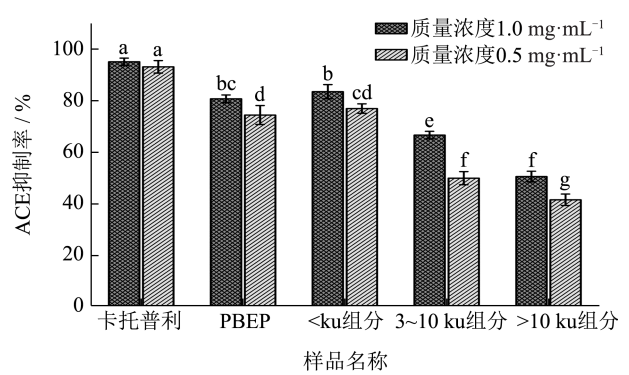


图 4 猪血红蛋白超滤纯化组分的 ACE 抑制率

Fig.4 ACE inhibitory activity of the ultrafiltration-purified components of porcine blood protein peptides

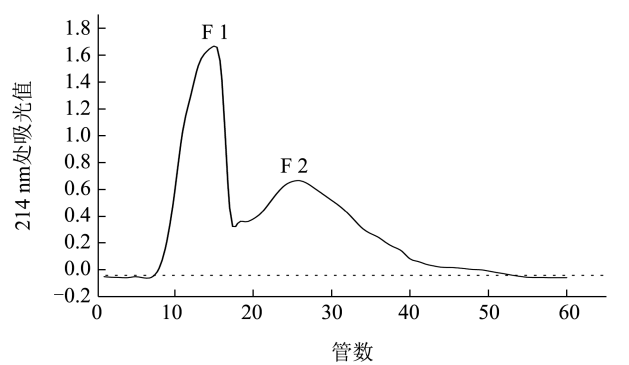


图 5 PFEP-3 组分的 Sephadex G-25 色谱图

Fig.5 Chromatogram of PFEP-3 component on Sephadex G-25

分子量是生物活性肽纯化过程中需要关注的关键指标之一, ACE 抑制肽大多具有低分子量。因此, 进行初步的基于分子量的分离是非常必要的。PBEP 依次经过 10 ku 和 3 ku 超滤膜, 分离得到 3 种组分: PBEP-1 (>10 ku)、PBEP-2 (3~10 ku) 和 PBEP-3 (<3 ku)。如图 4 所示, 在质量浓度 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下, 不同分子量的组分之间的 ACE 抑制活性存在显著性差异 ($P < 0.05$)。PBEP-3 的 ACE 抑制活性最高 (83.41%), 其次是 PBEP-2 (66.56%) 和 PFEP-1 (50.46%)。结果表明, 分子量低于 3 ku 的多肽为 PBEP 的主要活性成分。这与许多 ACE 抑制肽相关的研究结果一致, 来自牛初乳免疫球蛋白^[11]、鸡肌肉蛋白^[12]和鳗鱼骨胶原^[13]的较低分子量的多肽组分表现出最强的 ACEI 活性。这可能与 ACE 结合位点的空间大小有关, 高分子量肽的低抑制活性主要是由于它们难以与靶标的活性位点结合^[14], 而分子量较小的多肽较易穿过酶的空腔结构, 进入酶促反应的活性位点并与之结合, 表现出更强的 ACE 抑制活性^[15]。因此, 我们选择分子量低于 3 ku 组分进行进一步纯化。

用 Sephadex G-25 进行进一步的分离纯化。结果如图 5, 分离得到 2 个峰。根据出峰顺序依次命名为 F1、F2。测定 F1 和 F2 的 ACE 抑制活性, 在质量浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下, ACE 抑制率分别为 23.41% 和 91.30%; 在质量浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, ACE 抑制率分别为 7.62% 和 79.30%。F2 组分活性显著高于从金枪鱼加工副产物^[16]、核桃分离蛋白^[14]以及小黄鱼副产物^[17]中分离纯化得到的组分。F2 组分 ACE 活性显著超过 F1 ($P < 0.05$), 可能是猪血红蛋白 ACE 抑制肽活性主要贡献成分。因此收集 F2 组分探究猪血红蛋白 ACE 抑制肽对 HUVEC 细胞的影响。

2.6 猪血红蛋白ACE抑制肽对HUVEC细胞的毒性

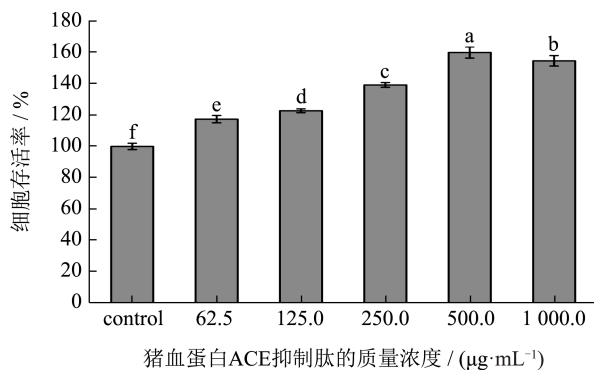


图 6 猪血红蛋白 ACE 抑制肽对 HUVEC 细胞存活率的影响

Fig.6 Effects of porcine blood protein ACE inhibitory peptides on viability of HUVEC cells

通过 CCK-8 法评估猪血红蛋白 ACE 抑制肽对 HUVEC 细胞存活率的影响, 结果如图 6 所示, 猪血红蛋白 ACE 抑制肽质量浓度在 $62.5\sim 1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围时, 相比于对照组, HUVEC 细胞存活率均超过 100%, 由此可见, 当猪血红蛋白 ACE 抑制肽质量浓度在 $62.5\sim 1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 对细胞有显著的增殖作用 ($P < 0.05$)。且在猪血红蛋白 ACE 抑制肽质量浓度为 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时增殖作用最强, 达到 159.65%。

2.7 建立Ang II损伤HUVEC细胞模型

不同浓度的 Ang II 溶液孵育 24 h 后对 HUVEC 细胞的影响如图 7 所示, 随着 Ang II 浓度的增大, 细胞活性呈现下降趋势。虽然存在一定的差异, 但 Ang II 浓度在 $10^{-7}\sim 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内时, 细胞总体存活率仍然相对较高; 当 Ang II 浓度达到 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞活力出现大幅度下降。Ang II 浓度为 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 24 h 时, 细胞活力为 74.32%, 当 Ang II 的浓度增加至 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞活力下降至 62.12%。因此选择 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 24 h 作为 Ang II 损伤细胞的条件。

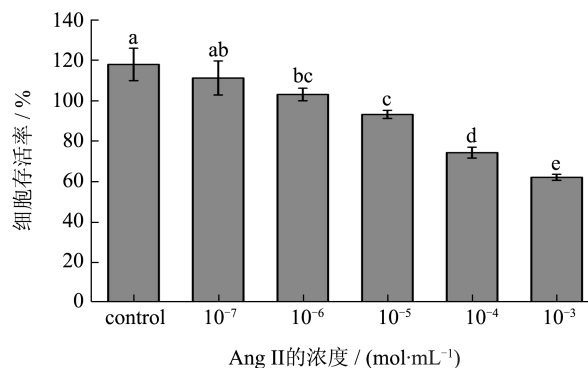


图 7 Ang II 溶液损伤对 HUVEC 细胞存活率的影响

Fig.7 Effect of Ang II solution-induced damage on viability of HUVEC cells

2.8 猪血红蛋白ACE抑制肽对HUVEC中NO、ET-1和ROS的影响

内皮素是由内皮细胞分泌和合成的生物活性肽, 由 13 个基因组编码的 21 个氨基酸组成, ET-1 是内皮素亚型的一种, 能促进血管收缩, 引起血压升高^[18]。一氧化氮 (NO) 是强效的血管舒张剂, 可以通过激活血管平滑肌细胞中的鸟苷酸环化酶 (GC), 提高细胞内 cGMP (环鸟苷酸) 的水平, 导致血管平滑肌放松, 从而引起血管扩张, 降低血压。除此之外 NO 还具有抗血小板聚集作用, 减少血栓的形成, 保持血管内皮的平滑和顺畅流动, 有助于维持血管通畅和正常血压^[19]。ROS 也是血管疾病的关键调控因子, 长期的氧化应激与高血压的发生密切相关。氧化应激可能通

过增加血管收缩、减少血管舒张反应以及引发局部炎症等机制,推动高血压的发展^[20]。

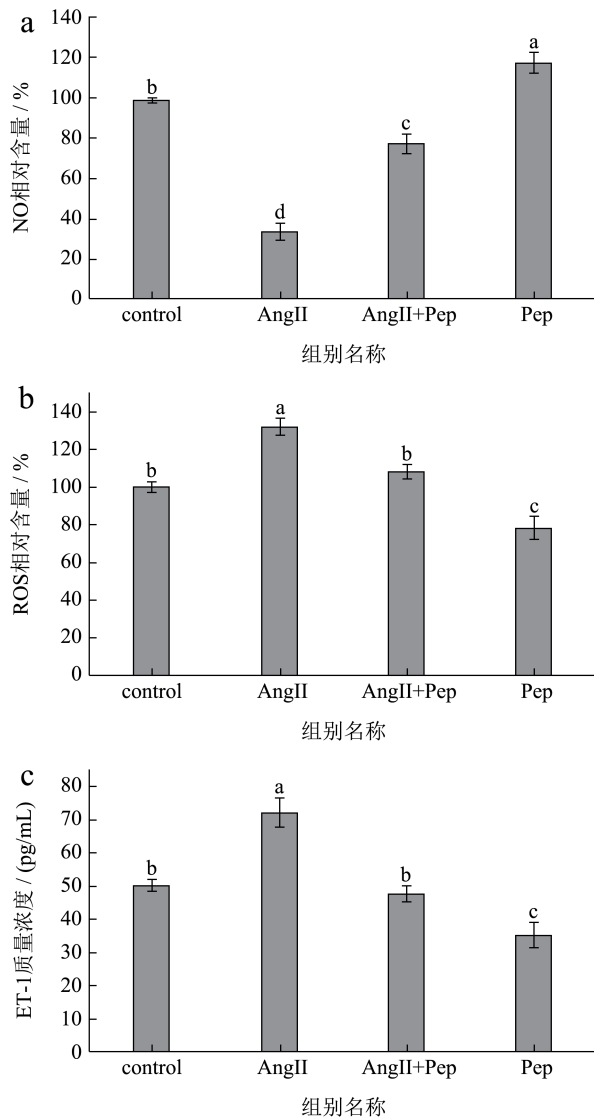


图8 猪血蛋白ACE抑制肽对Ang II损伤的HUVEC细胞中NO、ET-1和ROS含量的影响

Fig.8 Effect of porcine blood protein ACE inhibitory peptides on the levels of NO, ET-1, and ROS in Ang II-damaged HUVEC cells

如图8a所示,与对照组相比,Ang II组HUVEC细胞分泌的NO量显著降低。Ang II损伤后再与猪血蛋白ACE抑制肽孵育24 h,该组NO的相对含量恢复至77.66%。而且相较于对照组,ACE抑制肽处理24 h更能刺激NO的分泌,NO相对含量达到117.33%。如图8b所示,Ang II损伤后细胞中ET-1的含量显著增加,相比于对照组增加了21.97%;而再经猪血蛋白ACE抑制肽处理24 h后,ET-1的释放量又恢复至对照组水平。Pep组的ET-1含量相对于对照组降低了14.97% ($P < 0.05$)。如图8c所示,ROS的相对含量与ET-1

相对含量趋势相同,Ang II损伤后细胞中ROS的含量显著增加;Ang II+Pep组ROS的释放量恢复至对照组水平,Pep组的ROS含量相对于对照组显著降低。

这些结果与先前研究类似,Ang II的干预会导致HUVEC细胞中的NO表达量减少,而使ET-1及ROS的表达量增加^[21-23]。猪血蛋白ACE抑制肽则可以促进NO的表达并抑制ROS及ET-1的产生,从而保护HUVEC免受Ang II诱导的损伤。

2.9 猪血蛋白ACE抑制肽对HUVEC中血压调控相关蛋白表达的影响

ACE-Ang II-AT1-R轴是RAS系统的重要组成部分,对心血管疾病有密切的影响,主要介导血管收缩、增殖和炎症。ACE是系统中重要调节因子,可将循环系统中的Ang I转化为具有心肌收缩作用的Ang II引起血压升高^[24,25]。肾素(Renin)在血压调节过程中也扮演着重要的角色,肾素可以作用于血液中的血管紧张素原,将其转化为Ang I^[26]。Ang II 1型受体(AT1-R)是Ang II的主要作用靶点,Ang II通过与AT1-R结合,激活多条信号通路,最直接的作用是引起血管平滑肌收缩,导致血管狭窄,从而增加外周阻力,升高血压^[27]。内皮型一氧化氮合酶(eNOS)位于血管内皮细胞中,可以催化L-精氨酸转化为NO。

因此采用蛋白免疫印迹法对HUVEC细胞中调节血压有关基因的蛋白表达量进行研究,图9展示了猪血蛋白ACE抑制肽对HUVEC细胞中ACE、AT1-R、Renin、eNOS的蛋白表达水平调控结果。相比于对照组,经Ang II刺激后细胞中ACE、AT1-R和Renin的表达水平显著升高($P < 0.05$),分别升高了0.19、0.85和0.12;与Ang II组相比,500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度的猪血蛋白ACE抑制肽处理24 h后显著下调了ACE、AT1-R和Renin的表达水平($P < 0.05$),分别下降了0.36、1.00和0.16。同时经Ang II损伤再用猪血蛋白ACE抑制肽孵育24 h后,ACE、AT1-R和Renin表达量也恢复到了对照组水平,无显著差异($P > 0.05$)。与对照组相比,经Ang II处理后细胞中eNOS的表达水平显著降低,降低了0.04;与Ang II组相比,500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度的猪血蛋白ACE抑制肽处理24 h后eNOS的表达水平显著上调($P < 0.05$),增加了0.20。经Ang II损伤后再用猪血蛋白ACE抑制肽孵育后eNOS表达量也显著高于对照组。这些结果表明,猪血蛋白ACE抑制肽的处理可以显著降低Ang II刺激后ACE、AT1-R和Renin的表达,同时增加eNOS的表达,催化L-精氨酸转化为NO,共同发挥调节血压的作用。

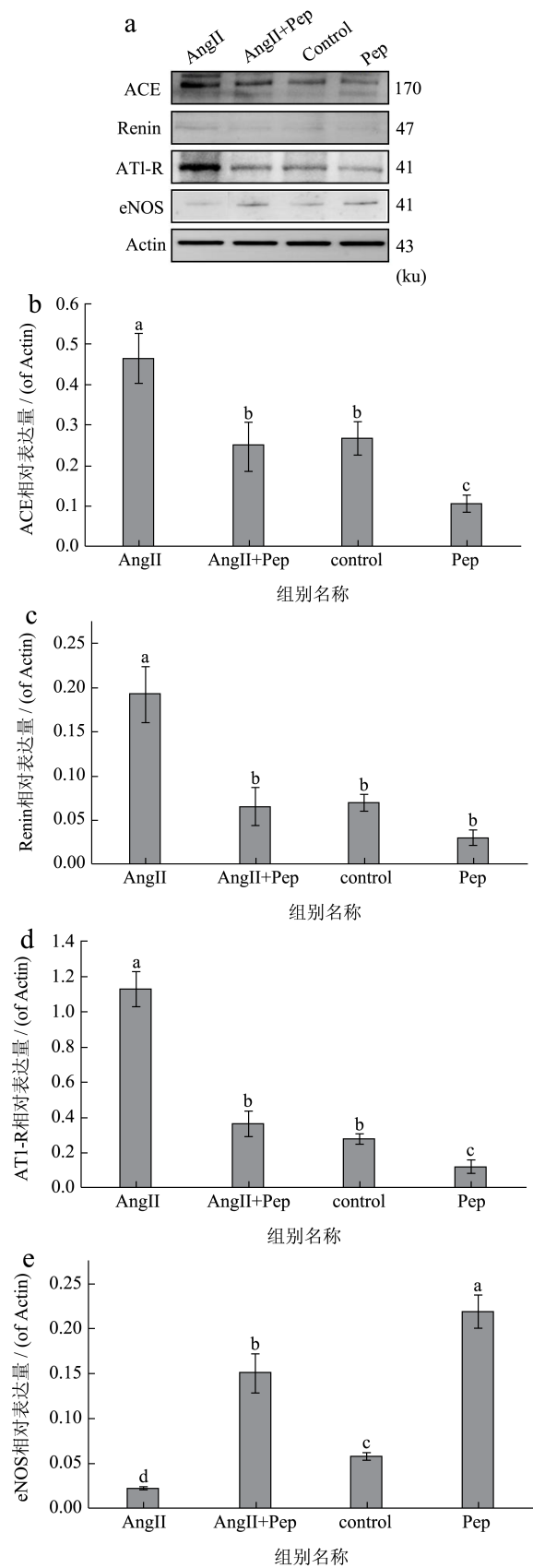


图9 HUVEC 细胞中 ACE、Renin、AT1-R 和 eNOS 的 Western Blot 结果

Fig.9 Western Blot results of ACE, Renin, AT1-R, and eNOS in HUVEC cells

3 结论

本研究以猪血蛋白为原料，结合蚓激酶溶解纤维蛋白的特性，将其应用在猪血蛋白的酶解过程中，得到了具有 ACE 抑制活性的酶解产物。且与胰酶相比，产物水解度与体外 ACE 抑制活性显著升高。经过分离纯化，从中获得了 ACE 抑制活性较高的猪血蛋白小分子肽。实验结果表明，猪血蛋白 ACE 抑制肽对 HUVEC 细胞无毒性作用，且对 Ang II 诱导的 HUVEC 细胞有保护作用。猪血蛋白 ACE 抑制肽可以增加 NO 的分泌量并且抑制收缩因子 ET-1 的释放和 ROS 的产生；同时猪血蛋白 ACE 抑制肽可以显著抑制 ACE-Ang II-AT1-R 轴中 ACE、Renin 和 AT1-R 的表达并且促进 eNOS 蛋白的表达，从而改善内皮损伤，发挥调节血压的作用。本研究为蚓激酶作为一种蛋白水解酶应用在活性肽的开发中提供了理论基础及数据支持；此外也为畜禽血液深加工提供了新的思路和方向。

参考文献

[1] SHI Q, WANG X, LIU J, et al. Anti-asthma effect of an active components group from decoction of pheretima aspergillum and its chemical composition characterized by liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR, 2019, 18(2): 867.

[2] ZHANG T, WANG C, SONG A, et al. Water extract of earthworms mitigates mouse liver fibrosis by potentiating hepatic LKB1/Nrf2 axis to inhibit HSC activation and hepatocyte death [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 321: 117495.

[3] WANG X, YAN D. Microplate-based antithrombin activity bioassay for shuxuetong injection through aptamer-thrombin capturing coupled with chromogenic substrate hydrolysis [J]. Microchemical Journal, 2021, 165: 106099.

[4] 陈莹.临床疗效导向的中医药RCT设计与实践[D].北京:北京中医药大学,2022.

[5] 夏梦瑶,李艳灵,魏艳平,等.蚓激酶的药理作用研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(12):4641-4646.

[6] 郭秀云,张开臣,孟庆丰,等.饲用血粉加工工艺及其产品质量研究进展[J].中国家禽,2019,41(19):50-54.

[7] PEREZBOSQUE A, MIRO L, POLO J, et al. Dietary plasma protein supplements prevent the release of mucosal proinflammatory mediators in a rat model of intestinal inflammation [J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2007, 51: 91-92.

[8] MIRO L, GARCIAJUST A, AMAT C, et al. Dietary animal plasma proteins improve the intestinal immune response in senescent mice [J]. Nutrients, 2017, 9(12): 1346.

[9] MA M Z, FENG Y H, MIAO Y L, et al. Revealing the sequence characteristics and molecular mechanisms of ACE inhibitory peptides by comprehensive characterization of 160000 tetrapeptides [J]. Foods, 2023, 12(8): 1573.

- [10] ZAKY A A, SIMALGANDARA J, EUN JB, et al. Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 8: 815640.
- [11] WU C L, NI Z F, KUANG X Y, et al. Novel multitarget ACE inhibitory peptides from bovine colostrum immunoglobulin G: cellular transport, efficacy in regulating endothelial dysfunction, and network pharmacology studies [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(8): 4155-4169.
- [12] FAN H, WU J. Purification and identification of novel ACE inhibitory and ACE2 upregulating peptides from spent hen muscle proteins [J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128867.
- [13] XIANG H, HUANG H, SHAO Y Q, et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from eel (*Anguilla japonica*) bone collagen: preparation, identification, molecular docking, and protective function on HUVECs [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2024, 11: 1462656.
- [14] TANG H, WANG C, CAO S, et al. Novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from walnut protein isolate: separation, identification and molecular docking study [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(12): e14411.
- [15] DING Q, SHEIKH A R, CHEN Q, et al. Understanding the mechanism for the structure-activity relationship of food-derived ACEI peptides [J]. *Food Reviews International*, 2023, 39(4): 1751-1769.
- [16] QIAO Q Q, LUO Q B, SUO S K, et al. Preparation, characterization, and cytoprotective effects on HUVECs of fourteen novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysate of tuna processing by-products [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 868681.
- [17] ZHU W Y, WANG Y M, SUO S K, et al. Isolation, identification, molecular docking analysis, and cytoprotection of seven novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from miiuy croaker byproducts-swim bladders [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 977234.
- [18] MOMOSE N, FUKUO K, MORIMOTO S, et al. Captopril inhibits endothelin-1 secretion from endothelial cells through bradykinin [J]. *Hypertension*, 1993, 21(6_pt_2): 921-924.
- [19] DHARMASHANKAR K, WIDLANSKY M E. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions [J]. *Current Hypertension Reports*, 2010, 12(6): 448-455.
- [20] ZHANG M, XU Y, JIANG L. Sulforaphane attenuates angiotensin II-induced human umbilical vein endothelial cell injury by modulating ROS-mediated mitochondrial signaling [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2020, 39(5): 734-747.
- [21] SHAO M F, ZHAO W, SHEN K, et al. Peptides from harpadon nehereus bone ameliorate angiotensin II-induced HUVEC injury and dysfunction through activation of the AKT/eNOS and Nrf2 pathway [J]. *Acs Omega*, 2023, 8(44): 41655-41663.
- [22] CAI S, PAN N, XU M, et al. ACE inhibitory peptide from skin collagen hydrolysate of takifugu bimaculatus as potential for protecting HUVECs injury [J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(12): 655.
- [23] SHI HX, YANG J, YANG T, et al. Alpha-asarone protects endothelial cells from injury by angiotensin II [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 2014: 682041.
- [24] NAZEER R, JOSHI I, JANAGARAJ K, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by-catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101770.
- [25] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1971, 20(7): 1637-1648.
- [26] RAMLAL A, NAUTIYAL A, BAWEJA P, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides and isoflavonoids from soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1068388.
- [27] OTHMAN N S, HISAM N S N, AZLI A A M, et al. *Persicaria minor* (Huds.) opiz exhibits antihypertensive effects by inhibiting the angiotensin-converting enzyme/angiotensin II type 1 receptor pathway in human endothelial cells [J]. *Life-Basel*, 2024, 14(11): 1486.