

# 食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽：构效关系、安全性及生物利用度研究进展

李志明<sup>1,2</sup>, 张舒<sup>1,2</sup>, 孟维洪<sup>1,2</sup>, 张家瑜<sup>1,2</sup>, 张东杰<sup>1,2,3,\*</sup>

(1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 2.国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319; 3.黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 黑龙江 大庆 163319)

**摘要:** 2型糖尿病是全球高发的代谢性疾病之一,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂是有效防治和管理该疾病的口服药物。食源性生物活性肽是 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的潜在来源, 研究证实其具有一定的降血糖活性, 可通过抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性对餐后血糖进行有效控制, 从而干预并调控2型糖尿病, 其在降糖肽产品开发中具有巨大前景。目前, 食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的构效关系、安全性及生物利用度评估尚鲜有系统性的探究策略, 无法为其研究开发提供更多证据和积极作用。本文通过收集整理近年来已成功鉴定的食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽, 并对其结构特征、毒性、过敏性及生物利用度(胃肠消化酶抗性、黏液渗透性、小肠上皮细胞中转运效率及肝脏代谢)进行系统性综述, 以期合理开发食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽以及相关功能性食品的深加工提供参考。

**关键词:** 食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽; 结构特征; 毒性; 致敏性; 生物利用度

## Food-Derived $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Peptides: Research Progress on Structure-Activity Relationship, Safety and Bioavailability

LI Zhiming<sup>1,2</sup>, ZHANG Shu<sup>1,2</sup>, MENG Weihong<sup>1,2</sup>, ZHANG Jiayu<sup>1,2</sup>, ZHANG Dongjie<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China;

3. Key Laboratory of Agro-products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Daqing 163319, China)

**Abstract:** Type II diabetes mellitus (T2DM) is one of the most prevalent metabolic diseases worldwide and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors are oral medications that are effective in the prevention and management of T2DM. Food-derived bioactive peptides are potential sources of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, which have shown to have hypoglycemic activity and can effectively control postprandial blood glucose by inhibiting  $\alpha$ -glucosidase activity, thus intervening and regulating T2DM, and have great prospects in the development of hypoglycemic peptide products. At present, there is no systematic strategy for exploring the structure-activity relationship, safety and bioavailability of food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides, hampering their research and development. In this paper, we systematically review the structural characteristics, toxicity, allergenicity, and bioavailability (gastrointestinal digestive enzyme resistance, mucus permeability, transit efficiency in small intestinal epithelial cells and liver metabolism) of food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides that have been successfully identified in recent years. This review is expected to provide a theoretical reference for the rational development of food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides and the further processing of related functional foods.

**Keywords:** food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides; structural features; toxicity; allergenicity; bioavailability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220822-258

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)15-0298-12

收稿日期: 2022-08-22

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFE0206300); 黑龙江省“头雁”团队项目(黑政规[2019]2号);

黑龙江省自然科学基金研究团队项目(TD2020C003);

黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2022-Y43; YJSCX2022-Z04)

第一作者简介: 李志明(1998—)(ORCID: 0000-0003-1295-3055), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。

E-mail: lizhiming1998@126.com

\*通信作者简介: 张东杰(1966—)(ORCID: 0000-0003-3536-8422), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。

E-mail: byndzdj@126.com

引文格式:

李志明, 张舒, 孟维洪, 等. 食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽: 构效关系、安全性及生物利用度研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(15): 298-309. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220822-258. <http://www.spkx.net.cn>

LI Zhiming, ZHANG Shu, MENG Weihong, et al. Food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides: research progress on structure-activity relationship, safety and bioavailability[J]. Food Science, 2023, 44(15): 298-309. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220822-258. <http://www.spkx.net.cn>

由胰腺 $\beta$ 细胞功能受损、胰岛素代谢紊乱所导致的糖尿病是世界性代谢紊乱疾病, 血糖偏高和血脂持续异常是该疾病的主要病理特征, 可分为1型、2型 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 和妊娠型。其中T2DM占患病人群的90%以上<sup>[1]</sup>, 近十年来, 全世界糖尿病患病人数持续攀升, 预计至2046年, 全球T2DM患病人数将增至6.42亿。针对T2DM的病理学特点, 现已开发了各类口服降糖药用以预防、治疗T2DM, 干预途径主要包括两种: 一是有针对性地提升胰岛细胞活性, 促进胰岛素分泌, 从而间接降低血糖 (双胍类、磺脲类、二肽基肽 (dipeptidyl peptidase, DPP) IV酶抑制剂、胰高血糖素样肽1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 激动剂等); 二是延缓摄入体内的碳水化合物转换为葡萄糖的速率以阻碍葡萄糖进入体循环, 从而对餐后血糖进行直接调控 ( $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂)<sup>[2]</sup>。相较于第一种间接血糖调控机制, 抑制肠道内碳水化合物消化酶活性可对T2DM患者血糖进行直接干预, 不涉及胰岛细胞及代谢靶器官, 可一定程度缓解患者胰岛素代谢压力, 改善受损的胰岛 $\beta$ 细胞功能, 所以采用有效的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂来控制血糖异常现已成为预防、治疗T2DM的重要策略之一<sup>[3]</sup>。大量研究已证实, 一些食品源生物活性成分 (肽、酚类、萜类等) 具备优异的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制潜能<sup>[4]</sup>, 其中由食源蛋白制备的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽具有营养属性, 因其生物利用度高、T2DM治疗效果明显、与传统 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂相比副作用低等特点受到研究界的广泛关注, 食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的制备与研究已成为热点。

多肽的氨基酸组成、序列、分子质量、链长、净电荷等显著影响其功能特性和生理活性, 同时, 不同的多肽构型和分子特征与其动力学行为、靶向生物药理功效、化学稳定性、生物利用度、半衰期、毒性和过敏性等性质皆存在特定的关联<sup>[5]</sup>。早在2018年, Ibrahim团队<sup>[6]</sup>将筛选的43条食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽通过归类统计, 总结了 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的结构特点和作用机制, 包括: 1) 链长3~6; 2) N端含OH (Ser、Tyr、Thr) 或碱性氨基酸 (Lys、Arg、His); 3) C端出现Ala或Met; 4) Pro靠近C端, 最好位于倒数第二位; 5) 在pH 7.0时净电荷为0或+1; 6) 以氢键、静电相互作用为主, 可忽略疏水相互作用。这几条规律被多数 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽研究人员所引用, 作为筛查、鉴别高活性

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的“黄金准则”, 具有指导性意义。但是, 近些年针对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的定量构效关系 (quantitative structure-activity relationship, QSAR) 探究发现了许多之前未提及的结构特征, 肽与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶之间的分子相互作用机制也与上述观点部分冲突或重叠度低。比如, Gallego等<sup>[7]</sup>制得的大麻蛋白肽 (LR和PLMLP) 在 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制方面有优异表现, 但质谱结果显示其肽链上Leu是靶酶活性降低的关键氨基酸残基; Mollica等<sup>[8]</sup>发现所筛选的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽可通过氢键、亲水/疏水相互作用等形式实现对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制。这些发现在Ibrahim等<sup>[6]</sup>总结的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽特征和肽-酶结合模式中均未提及。

其次, 与非肠道给药 (注射、鼻腔、肺部等) 的肽疗法不同, 作为食物、营养药品和补充剂配方的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽通常口服后经口腔-胃腔-肠腔-肝门静脉而进入体循环, 受到消化酶、肽酶、代谢酶的侵扰, 导致生物可及性较低, 在人体血液中的浓度维持在极低的水平 (nmol/L), 远低于体外所测定的浓度 (约1~100  $\mu$ mol/L)<sup>[9]</sup>。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶大量聚集在小肠黏膜上皮细胞处,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽到达作用位点之前需耐受胃肠腔的酶屏障 (胃/胰/糜蛋白酶) 和严峻的pH环境、穿透覆盖在小肠上皮细胞上的黏液层, 进而引发肽-靶酶分子生化反应<sup>[10]</sup>。“逃逸”或“多余”的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽可根据电荷、亲/疏水等特点与构成肠黏膜的肠道细胞、微褶细胞 (M细胞) 特异性受体结合, 抵抗外排转运体 (P-glycoprotein, P-gp) 后经多途径转运入肝门静脉系统, 在肝门静脉系统中, 大量细胞色素P-450 (cytochrome P-450, CYP-450) 代谢酶催化亲脂性肽多种功能基团的N—和O—, 使其脱烷基化、甲基化、乙酰化及葡萄糖醛酸化。最终释放并进入体循环的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽还具有抑制DPP IV酶活性、促胰高血糖素样肽-1分泌、清除脂质堆积等功能<sup>[11]</sup>, 全方位立体、多角度地干预T2DM。通过酶法/发酵法制得的新肽是否会携带具有过敏潜力甚至毒性的序列至今尚未阐明,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的安全性评估面临诸多挑战。基于此, 本文在Ibrahim等<sup>[6]</sup>研究的基础上, 使用ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com>, [2022-08]) 搜寻关键词“ $\alpha$ -glucosidase”和“peptide”, 使用中国知网 (<https://www.cnki.net>, [2022-08]) 高级检索关键词

“ $\alpha$ -葡萄糖苷酶”和“肽”整理相关文献,归纳出近6年(2016年1月—2022年8月)已实验验证的具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力的食源性肽序列62条,供本综述参考分析;采用在线工具ToxinPred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>)预测肽段分子质量、净电荷(pH 7.0)、理论等电点(pI)、疏水性和毒性;采用Allergen FP v.1.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>)分析肽段致敏性;采用ADMETlab (<https://admet.scbdd.com/home/index/>)和SwissADME (<https://www.swissadme.ch/index.php>)等工具较全面地评估 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的生物利用度。旨在进一步补充 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的结构特性,并运用生物信息学

方法深入阐述具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽结构特征的系列肽段具有安全隐患的概率,以及其对胃肠腔环境、黏液等生化及物理屏障的穿透能力,以期侧面反映其开发成高品质、多功能降糖肽的潜力。

## 1 构效关系

1.1 链长、分子质量、氨基酸组成、序列与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的关系。

如表1所示,有32条 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )小于阿卡波糖( $IC_{50}=201 \mu\text{mol/L}$ ),抑制活力排名前5位的

表1 食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的结构特征、抑制活性、毒性及致敏性  
Table 1 Structural properties, inhibitory activity, toxicity and allergenicity of food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides

序号	肽序列	来源	链长	分子质量/Da	净电荷(pH 7.0)	pI	疏水性	$IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	与肽结合的酶残基	毒性	致敏性	参考文献
1	LLPLPVLK		8	892.32	+1	9.11	0.18	237.43	—	—	—	
2	SWLRL	大豆蛋白	5	673.88	+1	10.11	-0.12	182.05	—	—	—	[1]
3	WLRL		4	586.79	+1	10.11	-0.08	165.29	—	—	—	
4	LDLQR		5	643.81	0	6.19	-0.42	8 590	氢键: E443、R334、Q603、D203、D542	—	+	
5	AGGFR	小麦胚芽蛋白	5	506.62	+1	10.11	-0.12	8 660	D542	—	+	[24]
6	LDNFR		5	663.79	0	6.19	-0.40	3 410	Q603	—	+	
7	GSR	大豆蛋白	3	318.36	+1	10.11	-0.62	20.4	氢键: D282、D518、D616	—	—	[29]
8	EAK		3	346.41	0	6.35	-0.49	520.2	氢键: H674、D518、R600、D616、D282	—	+	
9	*HP	玉米谷蛋白	2	235.70	+0.1	7.1	-0.24	5 515.49	范德华力: D215、E277、E352、R213、H351、R442、E315、Y72、E411、F178; 氢键: E277、H351、E277	—	—	[30]
10	LQAFEPLR	燕麦球蛋白	8	973.25	0	6.36	-0.15	36.7	氢键: D472、D571、H629、D355、H629、D355、R555、D231、W435、F479	—	+	[31]
11	EFLLAGNNK		9	1 005.27	0	6.35	-0.10	70.3	氢键: D472、D571、F479	—	+	
12	FEI		3	407.50	-1	4.00	0.24	40.3	—	—	+	
13	FKN	鹰嘴豆蛋白	3	407.50	+1	9.11	-0.38	78.12	—	—	+	[32]
14	FGKG		4	407.52	+1	9.11	-0.04	42.14	—	—	+	
15	MEE		3	407.47	-2	3.80	-0.33	31.61	氢键: D518、G4、R600、K3	—	+	
16	IQAEGGLT	藜麦蛋白	8	787.99	-1	4.00	0.04	109.48	—	—	+	[33]
17	LAHMIVAGA	发芽藜麦乳汁	9	882.22	+0.5	7.10	0.25	11 787.02	—	—	+	[34]
18	KDLQL		5	615.80	0	6.19	-0.29	10 725.46	—	—	—	
19	WH	杏仁油生产残渣蛋白	2	341.39	+0.5	7.10	-0.02	16.99	—	—	—	[35]
20	WS		2	291.32	0	5.88	0.05	17.03	—	—	—	
21	TAELLPR		7	799.03	0	6.36	-0.19	538.58	—	—	+	
22	CGKKFVR		7	837.14	+3	10.07	-0.37	621.23	—	—	+	
23	AVPANLVDLNVPALLK	黑茶蛋白	16	1 647.23	0	6.19	0.08	625.08	—	—	+	[36]
24	VVDLVFFAAAK		11	1 179.57	0	6.19	0.21	33.92	P395、L393、V269、E396、E271、R257、F297、M281、L278、D322	—	+	
25	GVPMPNK		7	742.00				204.20	—	—	+	
26	LRSELAAWSR	螺旋藻蛋白	10	1 188.48				112.93	T168、L144、I146、G149、R10、W8	—	+	[37]
27	RNPFVFAPILLTVAAR		16	1 773.33				92.77	—	—	—	
28	PGGV	条斑紫菜蛋白	4	328.42				18 600	—	—	—	[38]
29	CSSY		4	458.52				522.86	—	—	—	
30	YSPR		4	521.61				283.72	—	—	+	
31	SAAP	大鲵蛋白	4	344.40				194.54	—	—	+	[39]
32	PGGP		4	326.40				194.79	—	—	+	
33	LGGGN		5	416.51				103.19	—	—	+	
34	GPPGPA	大鲵皮肤胶原蛋白	6	494.62				606.98	—	—	+	[40]
35	HNKPEVEVR		9	1 107.36				56	K156、S157、D242、D307、P312	—	—	
36	ARDASVLK	甲鱼蛋白	8	859.09				195	Y158、S240、D242、E277、T310、P312、R315、D352、E411	—	+	[41]
37	SGTLLHK		7	754.99				289	D215、E277、D307、D352	—	—	

续表1

序号	肽序列	来源	链长	分子质量/Da	净电荷 (pH 7.0)	pI	疏水性	IC <sub>50</sub> / (μmol/L)	与肽结合的酶残基	毒性	致敏性	参考文献
38	EEEEYPDL		8	965.08	-4	3.51	-0.23	5 580	—	—	—	
39	LGVGG	伊比利亚干腌火腿	5	401.54	0	5.88	0.31	6 360	—	—	+	[3]
40	GGLGP		5	399.52	0	5.88	0.19	8 710	—	—	—	
41	VTGRFAGHPAAQ	蛋黄蛋白	12	1 211.51	+1.5	10.11	-0.07	301.83	—	—	—	[20]
42	YINQMPQKSREA		12	1 464.83	+1	8.93	-0.38	310.58	—	—	—	
43	QPHQLPP	干酪	8	913.16	+0.5	7.10	-0.19	899	氢键: R428、W710、D568、Q771、N448	—	+	[42]
44	TPVVVPPF		8	588.15	0	5.88	0.23	4 330	氢键: E361、E443、R428	—	—	
45	IPP	奶酪	3	325.44	0	5.88	0.20	764.5	—	—	+	[43]
46	QPGR	家蚕蛋白	4	456.55	+1	10.11	-0.59	65.8	氢键: K776、F535	—	+	
47	QPPT		4	441.53	0	5.88	-0.25	560	K776	—	+	[44]
48	NSPR		4	472.54	+1	10.11	-0.68	250	K776	—	—	
49	SQSPA		5	488.55	0	5.88	-0.21	20	R520、K519、D777	—	+	
50	FDPFPK		6	749.93	0	6.19	-0.12	7.94	—	—	+	
51	GKDAVIV	蝗虫	7	700.93	0	6.19	0.06	22.76	—	—	+	
52	AIGVGAIER		9	885.16	0	6.36	0.05	14.74	—	—	—	
53	IIAPPER	蟋蟀	7	795.04	0	6.36	-0.12	28.77	—	—	—	
54	LAPSTIK		7	728.98	+1	9.11	-0.01	62.60	—	—	+	[45]
55	KVEGDLK	蟋蟀蛋白	7	788.01	0	6.42	-0.33	23.33	—	—	—	
56	NYVADGLG	黄粉虫	8	807.97	-1	3.80	0.04	25.23	—	—	+	
57	AAAPVAVAK		9	797.07	+1	9.11	0.13	13.71	—	—	—	
58	AGDDAPR	黄粉虫蛋白	7	700.78	-1	4.21	-0.37	27.80	—	—	—	
59	*PL	荧光假单胞菌	2	210.27	0	5.88	0.23	4 600	疏水相互作用: Y158、D242、V232、D233、F314、R315、Y316、N415; 亲水相互作用: S157、S240和S241; 氢键: S157	—	—	[46]
60	*PV		2	196.25	0	5.88	0.24	3 400	—	—	—	
61	*PF		2	244.29	0	5.88	0.6	1 600	—	—	—	
62	STYV	泡盛曲霉	4	468.55	0	5.88	0.03	12.01	—	—	+	[47]

注: A.丙氨酸 (Ala); V.缬氨酸 (Val); L.亮氨酸 (Leu); I.异亮氨酸 (Ile); F.苯丙氨酸 (Phe); M.甲硫氨酸 (Met); P.脯氨酸 (Pro); W.色氨酸 (Trp); G.甘氨酸 (Gly); S.丝氨酸 (Ser); T.苏氨酸 (Thr); N.天冬氨酸 (Asn); Q.谷氨酰胺 (Gln); Y.酪氨酸 (Tyr); C.半胱氨酸 (Cys); D.天冬氨酸 (Asp); E.谷氨酸 (Glu); H.组氨酸 (His); K.赖氨酸 (Lys); R.精氨酸 (Arg); 表4同。\*表示环肽。IC<sub>50</sub>值单位为μmol/L, 与文献中不统一时根据分子质量进行转化, 下同。毒性、致敏性列中, +代表有毒、有致敏性; -代表无毒、无致敏性。

多肽依次是FDPFPK (IC<sub>50</sub>=7.94 μmol/L)、STYV (IC<sub>50</sub>=12.01 μmol/L)、AAAPVAVAK (IC<sub>50</sub>=13.71 μmol/L)、AIGVGAIER (IC<sub>50</sub>=14.74 μmol/L)、WH (IC<sub>50</sub>=16.99 μmol/L)。这62条α-葡萄糖苷酶抑制肽链长位于2~16之间, 由2~9个氨基酸残基组成的多肽数量占总数的90.32%, 研究频率最高的是四肽(10个)、五肽(9个)和七肽(9个), 其中链长3~7范围内的多肽具有更高的α-葡萄糖苷酶抑制活性 (IC<sub>50</sub><80 μmol/L), 提示该链长区间的多肽有更强的抑制潜能。α-葡萄糖苷酶抑制肽不同分子质量片段频率如表2所示。经过统计分析可知, 62条α-葡萄糖苷酶抑制肽中, 分子质量小于600 Da的α-葡萄糖苷酶抑制肽出现频率高达48.39%, 说明其是α-葡萄糖苷酶抑制肽的主流分子质量; 且IC<sub>50</sub><20 μmol/L的α-葡萄糖苷酶抑制肽平均分子质量为574.57 Da (表3), 说明分子质量低于600 Da的α-葡萄糖苷酶抑制肽活性更高。事实上, 由于肽与α-葡萄糖苷酶有效亲和力的要求, 过长的肽段对二者的结合效果存在负面影响。Ibrahim等<sup>[12]</sup>研究发现, α-葡萄糖苷酶抑制肽 (如SAPA、SCPA、SEPA等) 与α-葡萄糖苷酶活性位点的结合自由能 (-36.37~-26.75 kJ/mol)

接近或大于SPA基序 (-28.01 kJ/mol), 这个结果证实了短肽有益于降低肽-酶结合自由能, 提升对α-葡萄糖苷酶的抑制效果。本文所分析的α-葡萄糖苷酶抑制肽的链长在3~7之间, 与Ibrahim等<sup>[6]</sup>总结的链长3~6不同, 从两方面考虑: 一是链长在3~7之间的α-葡萄糖苷酶抑制肽满足与α-葡萄糖苷酶的结合要求; 二是研究发现这两类α-葡萄糖苷酶抑制肽 (六肽和七肽) 的抑制效果差异不显著。例如, 吴彤<sup>[13]</sup>所筛查的核桃蛋白源α-葡萄糖苷酶抑制肽中六肽LVVDHL和七肽LDVVDHL在质量浓度1.5 mg/mL时对α-葡萄糖苷酶活性的抑制率分别为20.4%和19.4%, 并无显著性差异 (P>0.05)。

表2 α-葡萄糖苷酶抑制肽不同分子质量片段频率

Table 2 Frequency of different molecular-mass segments of α-glucosidase inhibitory peptides

分子质量范围/Da	<500	500~700	700~900	900~1 000	>1 000
频率/%	41.94	12.90	27.42	4.84	12.90

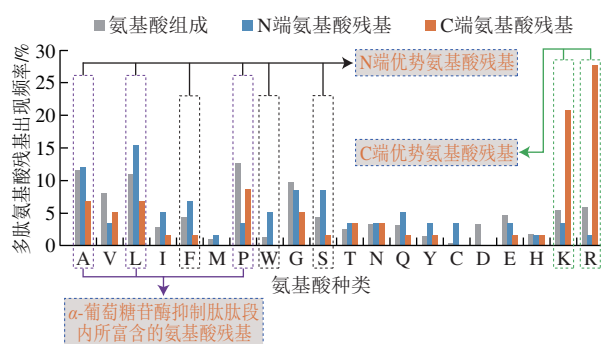
表3 不同IC<sub>50</sub>值的α-葡萄糖苷酶抑制肽平均分子质量

Table 3 Average molecular masses of α-glucosidase inhibitory peptides with different half maximal inhibitory concentration

IC <sub>50</sub> / (μmol/L)	<20	<50	<200	<500	<1 000	>1 000
平均分子质量/Da	574.57	658.61	692.84	723.86	718.62	491.53

如图1所示, Pro、Leu、Ala在 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的氨基酸组成上占重要地位, 在其肽段上的出现频率最高。Pro除在增强 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的抑制能力中显示重要作用外, 在与血管紧张素转化酶(angiotensin I converting enzyme, ACE)、DPP IV酶催化/活性位点键合上也占有独特优势<sup>[14-15]</sup>。Ibrahim等<sup>[12]</sup>证实 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽SEPA、SVPA中Pro的官能团C=O分别与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶位点Arg526的亚氨基和Lys286的氨基通过氢键耦合。多项研究表明Pro的环亚胺结构可使整条肽链发生折叠, 出现构象不规则变化, 进而造成肽链结构约束, 这可能是其发挥功效的关键因素<sup>[16]</sup>。一般来说, Pro位置越靠近C端, 其抑制活性越强。Leu在缓解T2DM胰岛素抵抗症状、提升胰岛素作用强度、恢复 $\beta$ 胰岛细胞生理活性上发挥重要作用<sup>[17-18]</sup>, 是 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽筛查的参考氨基酸之一。含大量Leu的大豆蛋白肽(LLPLPVLK)<sup>[1]</sup>和核桃蛋白肽(LPLLR)<sup>[19]</sup>表现出高效的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, 适合出现在N端(图1)。同时, Ala也可显著提升 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的活性, 蛋黄蛋白肽YINQMPQKSRE ( $IC_{50}=1.21$  mmol/L)在引入Ala后(YINQMPQKSREA,  $IC_{50}=0.31$  mmol/L)  $IC_{50}$ 值大幅下降, 抑制活性显著提升<sup>[20]</sup>。本文认为Pro、Leu、Ala是 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽组成上的重要氨基酸残基。在其他研究中也已经证实Pro、Leu、Ala对胰岛素分泌有显著改善作用。研究发现, 在胰腺 $\beta$ 细胞系和原代胰岛细胞的体外实验中, Pro、Leu、Ala、Arg和Gln都展示出了不同程度的促胰岛素作用<sup>[21]</sup>; 并且, 在只摄入Leu、Ala、Ile、Phe和Arg时, 人体内胰岛素分泌量显著升高<sup>[22]</sup>。这些证据表明, Pro、Leu、Ala不仅是保证 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽活性的分子基础, 更是利用抗糖尿病活性肽管理和预防T2DM的关键因子。今后应重点研究并解析Pro、Leu、Ala对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽活性的影响, 以期对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的高效率筛查提供参考(图2)。氨基酸序列是影响生物活性肽生理活性的关键结构性质, 氨基酸组成相同但序列不同的多肽功能特性和活性存在显著区别<sup>[23]</sup>。由图1可知, Ala、Ser在N端出现频率较高, 符合Ibrahim等<sup>[6]</sup>的研究结果。此外, 本文中活性最强(FDPFPK ( $IC_{50}=7.94$   $\mu$ mol/L))和较强(WH ( $IC_{50}=16.99$   $\mu$ mol/L)、WS ( $IC_{50}=7.94$   $\mu$ mol/L))的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽N端出现芳香族氨基酸残基(Phe和Trp), 推测这两类氨基酸残基有增强 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力的作用。C端碱性氨基酸Arg和Lys的出现频率极高(分别为27.59%和20.69%)。肽段C端Arg的存在可提高肽-酶结合稳定性, 保证肽与酶关键活性氨基酸残基的强结合, 从而提高其抑制活性。例如, 小麦胚芽蛋白源 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽LDLQR中C端Arg残基与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶Asp443和Asp542存在氢键键合作用, 氢键键长(2.1 Å)远短于传统平均氢键距离(3.5 Å)<sup>[24]</sup>。Lys在活

性排名前3位的FDPFPK、AAPVAVAK中均有出现, 提示Lys也是保证 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的必要氨基酸残基。



A. 丙氨酸 (Ala); V. 缬氨酸 (Val); L. 亮氨酸 (Leu); I. 异亮氨酸 (Ile); F. 苯丙氨酸 (Phe); M. 甲硫氨酸 (Met); P. 脯氨酸 (Pro); W. 色氨酸 (Trp); G. 甘氨酸 (Gly); S. 丝氨酸 (Ser); T. 苏氨酸 (Thr); N. 天冬酰胺 (Asn); Q. 谷氨酰胺 (Gln); Y. 酪氨酸 (Tyr); C. 半胱氨酸 (Cys); D. 天冬氨酸 (Asp); E. 谷氨酸 (Glu); H. 组氨酸 (His); K. 赖氨酸 (Lys); R. 精氨酸 (Arg)。

图1  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽氨基酸残基组成

Fig. 1 Composition of amino acid residues of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides

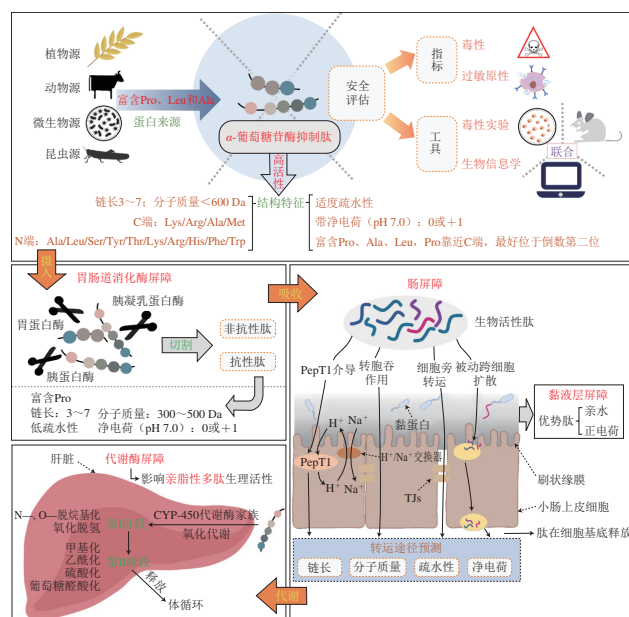


图2 食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽结构特征、安全性和生物利用度  
Fig. 2 Structural characteristics, safety and bioavailability of food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides

在了解上述 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽氨基酸组成规律后, 通过氨基酸分析等方法了解亲本蛋白的氨基酸组成, 能在一定程度上判断该底物开发成 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的潜力(图2)。燕麦蛋白的Pro、Leu、Ala、Arg相对含量均处于较高水平(分别为6.59%、8.39%、6.90%和6.39%), 由其制备得到的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽GDVVALPA和DVVALPAG的“Pro+Ala+Leu”占比达50%<sup>[25]</sup>, 已被证明是制备 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的

优质蛋白来源。依据此思路,提高亲本蛋白Pro、Leu、Ala等氨基酸的含量有助于制得高活性的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽。植物性蛋白来源中的薏仁醇溶蛋白(Pro所占摩尔比为8.21%~8.3%,Leu为16.64%~17.09%,Ala为11.03%~11.12%)<sup>[26]</sup>和菜籽饼粕蛋白(Pro含量为3 468.70  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ ,Leu为4 308.65  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ ,Ala为22 410.17  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )<sup>[27]</sup>,和富含Pro的鱼类胶原蛋白<sup>[28]</sup>都可作为生产 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的优质原材料,亟待开发与研究。

## 1.2 净电荷、等电点、疏水性与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的关系

如表1所示,62条 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽净电荷范围在-4~+3,其中高活性的多肽为0或+1,与Ibrahim等<sup>[6]</sup>的结果一致。此外,高电荷肽AEEYDPDL(电荷为-4,IC<sub>50</sub>=5 580  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )和CGKKFVR(电荷为+3,IC<sub>50</sub>=621.23  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性远低于其他多肽,可见高电荷会大幅削弱其抑制活性。本文同时发现,多肽等电点对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的影响微乎其微(Pearson相关系数 $r=-0.160$ )。

根据相关性分析可知,疏水性与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的相关性较低(Pearson相关系数 $r=0.207$ ),Ibrahim等<sup>[6]</sup>也论证了这一点。但最近几年的研究也表明, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶分子的结合存在大量疏水相互作用模式,在燕麦肽<sup>[25]</sup>、荧光假单胞菌环肽<sup>[46]</sup>和油麻子肽<sup>[48]</sup>的肽-酶结合模式中都证明了这一点。另外,其他非共价作用力也积极参与肽-酶作用过程,Mollica等<sup>[8]</sup>借助计算机辅助筛选出的4个小肽均通过多种方式(氢键、亲水相互作用、疏水相互作用、 $\pi$ -阳离子相互作用)与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶相互作用。以上结果与多肽的亲水/疏水性平衡、特有酸碱性质(pH值和净电荷)所支配的构象能量平衡、结合位姿密切相关。

## 2 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的安全性

### 2.1 毒性

基于ToxinPred服务器中1 805个有毒肽、3 593个无毒肽构建肽数据集,采用支持向量机(support vector machine, SVM)监督机器学习算法<sup>[49]</sup>(输入SVM阈值=0.0)对所选62条 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的毒性进行预测,由表1可知,全部多肽均无毒。作为膳食蛋白制备的食源活性肽,对其安全性的评价仍存在争议,尤其是利用新基底、新加工工艺和非消化酶配制及提取的新肽,其安全性在实验室阶段尚未得到充分论证<sup>[50]</sup>。目前,除针对各肿瘤细胞的体外毒性实验外<sup>[51]</sup>,关于食物蛋白源形成毒性蛋白的证据有限,但通过对有毒活性肽的结构参数进行研究,现已初步了解到有毒活性肽的部分结构特征。现有的证据表明,有毒活性肽可能具有以下特征<sup>[49,52]</sup>: 1)肽段中带有LKL、KWK、FKK、KKLL

和CYCR序列; 2)肽段中出现以聚谷氨酰胺(poly Q)为基序的重复序列; 3)肽段中出现以Cys为基序的蝎毒素样结构域(识别的基序为CN37CN3-6CN0-5CN1-4CN4-13C,“C”表示Cys,“N”表示氨基酸,“3~7”表示氨基酸的潜在数量)的重复序列。活性肽除具有上述结构表征而表现出毒害作用外,其服用剂量和持续服用时间等因素也不容忽视。研究表明,辣木籽蛋白源 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽KETTTIVR经过软件拟合预测并无毒性,但Wang Xuefeng等<sup>[53]</sup>在红细胞毒性实验中发现当多肽质量浓度超过4 mg/mL时,细胞溶血率高达7.18%,表明其在高质量浓度下可对红细胞产生药物毒性。综上,即使本文发现 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽不含有毒肽的结构特征,但如将 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽作为功能性产品干预T2DM,还需进行系统和完整的体内和临床试验,以便进一步保证其安全性。

### 2.2 致敏性

本文使用Allergen FP v.1.0服务器对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的致敏性进行预测,该web服务器内包含2 427个过敏原和2 027个非过敏原的蛋白质数据集,数据集的蛋白质中氨基酸序列由5个E-描述符(E1:氨基酸疏水性;E2:氨基酸分子质量;E3:氨基酸的螺旋形成倾向;E4:氨基酸相对丰度;E5: $\beta$ 链的形成倾向)所描述,同时使用自动交叉协方差(auto-cross covariance, ACC)的蛋白质序列挖掘工具<sup>[54]</sup>对数据集内蛋白质的序列长度进行统一,判别系数“Tanimoto”将蛋白质区分为过敏原或非过敏原。通过上述预测模型,有35条 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽被鉴定为潜在过敏原,这些多肽与数据集内已知的过敏原具有类似的氨基酸组成或肽基序,并带有抗原表位<sup>[55]</sup>。作为过敏原的蛋白或多肽(有B细胞表位)被免疫球蛋白E(immunoglobulin E, IgE)抗体识别并结合后触发IgE与肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面Fc $\epsilon$ R受体的交联反应,进而激发免疫,释放炎症介质、前列腺素和白三烯,进而引发过敏<sup>[56]</sup>。由表1可知,被鉴定为过敏原的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽链长度在3~16范围内,以三肽、四肽、七肽和八肽为主。但一般来说,过敏肽以长链居多,短肽因缺乏三级结构,IgE与Fc $\epsilon$ R受体的交联能力较差,不易诱发过敏反应<sup>[57]</sup>,Yap等<sup>[58]</sup>利用AlgPred在线平台对180条抗糖尿病肽进行致敏性预测,筛选出了54条过敏肽,链长在12~23之间。目前没有足够的证据完整表述过敏肽的基序,现主要通过一些数据库对待测肽段的过敏潜力进行初步预测,可用的数据库包括Allergome(<http://www.allergome.org/>)、WHO/IUIS(<http://www.allergen.org/>)、过敏原蛋白结构数据库(structural database of allergenic proteins, SDAP)(<http://fermi.utmb.edu/SDAP/>)、BIOPEP-UWM数据库(<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>)和Allergen FP v.1.0在线平台

([www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP/](http://www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP/))等。例如,有研究者通过BIOPEP-UWM数据库成功预测了多条 $\kappa$ -酪蛋白过敏肽(RPKHPIKHQG、NENLLRFFVA和FFVAPFPEVFGK)<sup>[59]</sup>; Singh等<sup>[60]</sup>通过Allergen FP v.1.0在线平台对玉米、大麦、小麦等谷物贮藏蛋白所制得的二肽(PF、AF、SF、QF、IF、KF、WA和WQ)进行致敏性预测,发现均不存在过敏性。另外,从表1中可以观察到,这35条过敏肽中有12条具有胃肠道消化酶抗性,比例达到1/3以上。有报道称,具有胃肠道消化酶抗性的多肽更易引发机体过敏,原因在于胃肠道消化酶抗性肽一般具有紧凑结构,保护了致敏抗原表位的完整构象,尤其是当肽段中带有足够数量的半胱氨酸时,由于其形成的二硫键所产生的强大空间位阻,不仅有助于阻止水解物的切割效应,也会对过敏肽的抗原表位进行保护<sup>[61]</sup>。

当食物亲本蛋白本身就是潜在过敏原时,该蛋白会携带能引发过敏等不良反应的B细胞表位,其在活性肽制备过程中也不可避免地被释放,但可以通过蛋白酶水解、菌种发酵、加热、辐射、高静水压(high hydrostatic pressure, HHP)等方式<sup>[62]</sup>破坏IgE与表位的结合以降低食源蛋白的致敏性。主要原理是通过加工处理破坏抗原表位,或使表位构象发生改变,进而降低抗原性。目前对蛋白抗原性消减领域研究最多的是 $\beta$ -伴大豆球蛋白,已有文献指出,热处理<sup>[63]</sup>、HHP<sup>[64]</sup>、超高压处理<sup>[65]</sup>均可通过改变 $\beta$ -伴大豆球蛋白的二、三、四级结构,影响其免疫原性,同时也暴露出更多的疏水区域,打断其二硫键,有利于蛋白被消化酶水解,破坏多处线性抗原表位。尽管有研究指出,过敏源的主要特征(尤其是带有过敏潜力的活性肽结构特征)未被完整描述,但通过上述途径可在一定程度上避免产生带有致敏原性的活性肽。本文的分析结果提示未来在进行 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的研究时,需格外关注所制得 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的致敏性。

### 3 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的生物利用度

#### 3.1 胃肠道消化酶的抗性

采用ExPasy在线平台的“PeptideCutter”工具([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/))模拟胃肠道消化酶的水解,选用胃蛋白酶(pH 1.3)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶对62条 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的消化酶抗性进行考察,并通过BioPEP-UWM数据库([https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start\\_biopep.php](https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start_biopep.php))的“搜索活性片段”功能将释放的肽序列进行生理活性匹配(表4)。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽在进入消化系统后,会面临胃肠腔内不稳定环境和酶降解的生物屏障,pH值的波动影响多肽的电离程度、降解作用和传递效率<sup>[66]</sup>,接触的消化酶和肽酶主要

有胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰弹性酶、羧肽酶A/B和刷边肽酶(羧肽酶M和氨基肽酶A/N/P/W),切割后不可逆地改变多肽结构和生物活性。活性肽在胃肠环境下的抗性主要体现在两个方面:一是肽段本身缺乏消化酶的切割位点;二是由于特定氨基酸残基组成和序列干扰酶活性位点的空间或静电排列,从而阻止酶切反应的发生。本文所研究的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽中有25条对胃肠道消化酶耐受,其中链长在3~7的肽段占76%,这25条胃肠道消化酶抗性肽平均分子质量为554.56 Da,且大部分肽段分子质量在300~500 Da之间。大多数抗性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽含有Pro残基(如PGGP、QPHQLPP和IPP等),推测Pro可通过环化邻近氨基酸侧链使其回到肽主链,从而保证肽的刚性结构,进而限制蛋白水解酶对邻近氨基酸残基的切割作用<sup>[16]</sup>,考虑到电荷性质、疏水性等特性,本文总结了关于胃肠道消化酶抗性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽可能的结构特征(图2): 1)链长3~7; 2)分子质量300~500 Da; 3) pH 7.0时净电荷为0或+1; 4)低疏水性; 5)肽段中出现数量较多的Pro。上述归纳的具有胃肠道消化酶抗性的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的结构特点与Ahmed等<sup>[67]</sup>总结的胃肠道内稳定肽(主要是ACE抑制肽、抗氧化肽)的序列特征一致,在符合胃肠道内稳定肽结构特征普遍性的同时保证了胃肠道消化酶抗性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的独特性。

表4  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的胃肠道消化酶抗性及其裂解肽生物活性、Caco-2渗透性、肠道吸收率、生物利用度评分

Table 4 Gastrointestinal digestive enzyme resistance, Caco-2 permeability, intestinal absorption rate, bioavailability scores of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides

序号	肽序列	抗胃肠道消化 (计算机模拟)	Caco-2渗透性 ( $\lg P_{app}$ )	人体肠道 吸收率	生物利用度 综合评分
1	LLPLPVLK	LL <sup>13</sup> -PLPVL-K	-5.844	0.249	0.17
2	SWLRL	SW <sup>1</sup> -L-R-L	-6.384	0.253	0.17
3	WLRL	W-L-R-L	-6.217	0.379	0.17
4	LDLQR	L-D-L-QR	-6.498	0.282	0.17
5	AGGFR	AGG-F-R	-6.845	0.244	0.17
6	LDNFR	L-DN <sup>1</sup> -F-R	-6.834	0.307	0.17
7	GSR	耐受	-6.421	0.191	0.17
8	EAK	耐受	-6.283	0.255	0.55
9	*HP	耐受	-5.018	0.650	0.55
10	LQAFPELR	L-QA <sup>4</sup> -F-EP <sup>146</sup> -LR	-6.381	0.213	0.17
11	EFLLAGNKK	E-F-L-L-AGNKK	-6.381	0.330	-
12	FEI	F-EI <sup>24</sup>	-6.151	0.473	0.11
13	FKN	F-K-N	-6.337	0.248	0.55
14	FGKG	F-GK <sup>2</sup> -G	-6.287	0.215	0.55
15	MEE	耐受	-6.331	0.341	0.11
16	IQAEGGLT	IQAEGG-L-T	-6.391	0.294	0.11
17	LAHMIVAGA	L-AHMIVAGA	-6.174	0.338	0.17
18	KDLQL	K-D-LQ <sup>3</sup> -L	-6.244	0.305	0.17
19	WH	W-H	-6.119	0.526	0.55
20	WS	W-S	-6.048	0.296	0.55
21	TAELLPR	TAE-LL <sup>13</sup> -PR <sup>24</sup>	-6.387	0.170	0.17
22	CGKKFVR	CGK-K-F-VR <sup>12</sup>	-6.627	0.247	0.17

续表4

序号	肽序列	抗胃肠消化 (计算机模拟)	Caco-2渗透性 (lg $P_{app}$ )	人体肠道 吸收率	生物利用度 综合评分
23	AVPANLVDLNVPALLK	AVPAN-L-VD <sup>1</sup> -L-NVPAL-L-K	-6.202	0.201	-
24	VVDLVFFAAAK	VVD-L-V-F-F-AAAK	-6.235	0.343	-
25	GVPMPNK	耐受	-6.245	0.238	0.17
26	LRSELAAWSR	L-R-SEL-AAW-SR	-6.325	0.241	-
27	RNPFVFAPTLLIIVAAR	R-NPF-V-F-APTLL-L-TVAAR	-6.230	0.161	-
28	PGGV	耐受	-5.940	0.287	0.55
29	CSSY	耐受	-6.873	0.286	0.17
30	YSPR	Y-SPR	-6.916	0.163	0.17
31	SAAP	耐受	-6.162	0.204	0.55
32	PGGP	耐受	-5.809	0.146	0.55
33	LGGGN	L-GGGN	-6.422	0.301	0.17
34	GPPGPA	耐受	-6.188	0.176	0.55
35	HNKPEVEVR	耐受	-6.585	0.172	-
36	ARDASVLK	AR <sup>2</sup> -DASV-L-K	-6.363	0.233	0.17
37	SGTLLHK	SGT-L-L-HK <sup>24</sup>	-6.386	0.233	0.17
38	AEEEEYDPL	耐受	-6.454	0.228	0.11
39	LGVGG	L-GVGG	-5.988	0.329	0.17
40	GGLGP	GG <sup>12</sup> -LGP <sup>2</sup>	-6.076	0.248	0.55
41	VTGRFAGHPAAQ	VTGR-F-AGHPAAQ	-6.539	0.150	-
42	YINQMPQKSREA	Y-INQMPQK-SR-EA <sup>15</sup>	-6.523	0.205	-
43	QPHQLPP	耐受	-6.742	0.229	0.17
44	TPVVVPPF	耐受	-6.010	0.212	0.17
45	IPP	耐受 <sup>27</sup>	-5.251	0.411	0.55
46	QPGR	耐受	-6.631	0.134	0.17
47	QPPT	耐受	-6.377	0.161	0.55
48	NSPR	耐受	-7.046	0.14	0.17
49	SQSPA	耐受	-6.908	0.166	0.17
50	FDPFK	F-DPFK	-6.592	0.108	0.17
51	GKDAVIV	GR <sup>2</sup> -DAVIV	-6.282	0.327	0.17
52	AIGVGAIER	耐受 <sup>28,9,10</sup>	-6.301	0.337	0.17
53	IIAPPER	耐受 <sup>28,9,10</sup>	-6.383	0.288	0.17
54	LAPSTIK	耐受 <sup>28,9,10</sup>	-6.284	0.267	0.17
55	KVEGDLK	K-VEGD-L-K	-6.454	0.290	0.17
56	NYVADGLG	NY <sup>12</sup> -VADG-L-G	-6.487	0.325	0.11
57	AAAPVAVAK	耐受 <sup>28,9,10</sup>	-6.219	0.222	0.17
58	AGDDAPR	耐受 <sup>28,9,10</sup>	-7.123	0.18	0.17
59	*PL	P-L	-4.493	0.762	0.55
60	*PV	耐受	-4.458	0.768	0.55
61	*PF	P-F	-4.653	0.808	0.55
62	STYV	STY-V	-6.638	0.334	0.17

注：抗胃肠消化列已释放的肽段右上角标注显示其生理活性，1. DPP IV抑制剂；2. ACE抑制剂；3. 葡萄糖摄取刺激肽；4. DPP III抑制剂；5.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂；6. 肾素抑制剂；7. 抗炎肽；8. 抗氧化肽；9.  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂；10. 胰脂肪酶抑制剂。生物利用度综合评分列中，—表示该肽段SMILES字符串超过200，SwissADME无法运行。加粗的肽段表示其在计算机模拟消化酶水解后仍能保持完整肽段结构。

### 3.2 小肠黏液层的渗透

黏液层是覆盖肠道上皮的保护性屏障，可分为外层黏液（松散黏液）和内层黏液（坚硬黏液）<sup>[68]</sup>，黏液属于一种水凝胶，覆盖有黏蛋白、脂类、细胞碎片和细菌等物质<sup>[69]</sup>，该屏障主要通过两种机制调控多肽渗透效率<sup>[70]</sup>：一是多肽与带负电荷黏蛋白特异性结合；二是由黏蛋白纤维构成的网状结构阻隔多肽的渗透。其中，黏蛋白是黏液的主要功能成分，其主体构成是质量分数

占50%~80%的糖蛋白，由于其末端唾液酸和硫酸盐基团的存在，使黏蛋白在黏液中携带负电荷<sup>[71]</sup>。由于上述黏液层的特点使得亲水性和带净正电荷的多肽在跨越该屏障时占优势（图2）。Sun Xiaohong等<sup>[72]</sup>通过体外模型发现阳离子肽（KIPAVF、KMPV）和高度亲水的零电荷肽（MANT、TNGQ和PASL）与黏蛋白有强结合活性，而高疏水指数的未带电肽（YMSV、QIGLF）与黏蛋白结合能力较弱。对照本文总结的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽结构特征，疏水性、0或+1净电荷状态使 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽在黏液层渗透时会有阻力，今后可考虑搭配食品级渗透增强剂（柠檬酸、脂肪酸和壳聚糖等）<sup>[73]</sup>以提升其渗透效率。

### 3.3 肠道运输的途径

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽在小肠黏膜处发挥 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的同时，也具有对 $\alpha$ -淀粉酶、DPP IV酶和葡萄糖转运体（glucose transporter, GLUT）家族等抗糖尿病靶标的抑制功能，在体内吸收并进入体循环后通过多种途径协同调控T2DM，这种现象已在体外抗T2DM靶酶活性抑制实验、细胞及动物实验中得到了验证<sup>[19,74]</sup>。据此推测，未能与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶充分接触并反应的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽可根据其分子质量、氨基酸组成和净电荷等结构特征通过以下一种或多种途径穿越小肠上皮细胞层进入到下一循环，如PepT1介导的渗透、细胞旁运输、转胞吞作用和被动跨细胞扩散。表5总结了关于生物活性肽转运途径的特征信息<sup>[75]</sup>。在表4中，本文借助ADMETlab在线平台预测了62条 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的Caco-2渗透性和肠道吸收率。其中，人肠道Caco-2细胞通常用于体外测定多肽的口服生物利用度，且为降低体内与体外实验的区间误差，常采用Caco-2与分泌黏液的人结肠直肠癌上皮细胞HT-29共培养<sup>[76]</sup>。如表4所示，4个环肽Cyclo（PL）、Cyclo（PV）、Cyclo（PF）和Cyclo（HP）的Caco-2渗透性（推荐值：最佳lg  $P_{app}$ 应大于-5.15）和人体肠道吸收率明显高于其他 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽，生物利用度评分也都在0.55的高水平。一般来说，具有较强构象弹性的环肽可通过细胞旁转运，并且其Caco-2细胞渗透性显著高于线形肽，Pauletta等<sup>[77]</sup>的环六肽Ac-Trp-Ala-Gly-Gly-X-Ala-NH<sub>2</sub>细胞转运实验也证明了这一点。有研究发现，链长与表现渗透系数（ $P_{app}$ ）呈反比，Hong等<sup>[78]</sup>研究报道的 $P_{app}$ 排序为Gly-Sar>Gly-SarSar>Gly-Sar-Sar-Sar>Gly-Sar-Sar-Sar-Sar，和Osborne等<sup>[79]</sup>报道 $\beta$ -酪啡肽-7（YPPFGPI）的 $P_{app}$ 远低于 $\beta$ -乳球蛋白二肽（YL）都体现了这种关联，但在本文分析中并未体现这一点，这可能涉及了其他因素（电荷、疏水性等）。多肽的氨基酸序列也会影响其生物利用度。具体来说，C端氨基酸带正电和N端出现Cys、Leu、Met、Pro、Val和Ile有助于提升其渗透性<sup>[80-81]</sup>。



依据以上分析和各转运途径特点,可在一定程度上了解并判断已筛查的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽所采用的转运途径和转运效率,进一步明确其在体内吸收、分布、代谢和排泄(absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME)情况(图2)。

表5 生物活性肽在肠道上皮细胞中的转运

转运机制	特点	多肽特性
PepT1介导	PepT1为高容量/低亲和载体; H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> 交换器维持肠腔(pH 5.5~6.0)与上皮细胞(pH 7.0)之间的质子平衡; PepT1有12个跨膜区(transmembrane regions, TMs), TM7和TM10影响H <sup>+</sup> 结合; PepT1与二肽/三肽结合位点为Ile165、Trp306、Trp440、Phe441; 3种状态为外向识别、闭塞运输、内向释放	仅运输二肽和三肽; 有效识别短链、中性电荷和疏水性多肽; 不能结合具有极端体积或两个正电荷的二肽; PepT1倾向结合带极性的氨基酸残基; 多肽的高疏水性可增强其与PepT1的结合亲和力
细胞旁转运	细胞旁转运面积约0.02 m <sup>2</sup> ; 由紧密连接(tight junctions, TJs)介导, TJs由胞质紧密黏连蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)、闭合蛋白(occludin)和连接蛋白(claudin)构成; 可避免多数肽酶对多肽的降解	倾向运输亲水性、低分子量多肽; Tj1倾向运输带负电荷多肽, 对带正电荷多肽具有选择特异性; 对小肽(二肽/三肽)有高转运效率; 可运输小于27个氨基酸残基的多肽(Caco-2细胞)
转胞吞作用	能量依赖型; 转运过程为胞内摄取、胞内转运、基底外侧分泌	长链肽(不少于4个氨基酸残基); 高疏水性; 带+3净电荷的多肽; 多肽运输效率随净电荷增大(0、+2和+3)而增大
被动跨细胞扩散	能量不依赖型; 转运过程为细胞被动摄取、细胞膜运输和基底外侧分泌	高疏水性

### 3.4 代谢酶屏障

多肽通过肠屏障和抵抗P-gp后转经肝门静脉系统,肝屏障中存在大量代谢酶,可针对性灭活亲脂类物质<sup>[82]</sup>。代谢酶属于CYP-450家族,包括CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A4这些参与多肽代谢的人类CYP酶,其对分子的初级代谢起关键作用,整个过程被称为首过代谢<sup>[83]</sup>。在这个过程中,多肽物质通过CYP-450家族与功能性氧化酶混合反应催化以实现多种官能团羟基化,从而完成生物转化<sup>[84]</sup>,期间涉及N—和O—脱烷基化、甲基化、乙酰化和硫酸化等反应,最终影响多肽的生物活性。但是,对于 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽在此阶段生物利用度的研究明显不足,作为进入血液循环的关键一环,深入探究该屏障对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽活性的影响规律有助于阐明 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽作为多功能降糖肽的结构潜力和应用前景。

## 4 结语

随着T2DM患病率的逐年上升,近些年人们将对治疗手段或替代药物的关注放在天然食物活性成分的提取或制备上,食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽在预防和干预T2DM中已展现出巨大的潜力。明晰高活性食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的结构特点有助于更有效率、更有针对性地进行食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽段的筛选,并进一步分析和判断其安全性、生物利用度等生物学特点。

尽管现阶段关于高活性食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的结构特征有一定的研究,但大都停留在氨基酸组成及排序、分子量、疏水性等结构参数的单一解释上,未建立起整合各结构特性的构效关系研究体系。研究肽-酶分子作用机制的工具主要借助于分子对接技术,未积累足够数据填补生化实验与虚拟对接之间的信息误差,未来研究可运用X射线晶体学、表面等离子体共振等新兴技术深入探究食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的作用模式。此外,在该类活性肽的研究与开发中,人们将目光集中到了制备工艺的优化、活性的提升及作用机制的解析上,而忽视了对其安全性的评价和对毒性肽及过敏肽结构特征的系统性总结,本文对该方面进行了初步探讨,但未深入讨论食物蛋白提取、预处理和制备过程中导致肽的分解、外消旋和环化等其他情形,这些局限使其作为功能性食品或药物的安全性和功效无法得到保证。目前,关于该抑制肽的活性研究虽较多,但均停留在体外验证阶段,对体内吸收部分未能充分考虑。其次,小肠上皮细胞刷状缘是肽发挥活性的重要场所,在研究时易被忽视,外翻肠套实验可在体外模拟情况下顾及到该部位<sup>[24]</sup>,从而使实验结果更接近人体真实情况。未来也需多关注食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽摄入后在胃肠道、小肠黏膜、小肠上皮细胞及肝脏代谢等过程中的活性保持、转运效率、代谢组学等情况,这不仅可以了解其在各转运阶段降解、代谢及受损的状况,也可为明确食源性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的多功能研究提供数据支撑,以促进降糖肽的开发利用。

### 参考文献:

- WANG R, ZHAO H, PAN X, et al. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from soy protein[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(5): 1848-1856. DOI:10.1002/fsn3.1038.
- 徐斐然. 菜籽蛋白肽介导胰高血糖素样肽-1调节血糖机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020: 2. DOI:10.27169/d.cnki.gwqgu.2020.001059.
- MORA L, GONZÁLEZ-ROGEL D, HERES A, et al. Iberian dry-cured ham as a potential source of  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory peptides[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 67: 103840. DOI:10.1016/j.jfff.2020.103840.
- DI STEFANO E, OLIVIERO T, UDENIGWE C C. Functional significance and structure-activity relationship of food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitors[J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 20: 7-12. DOI:10.1016/j.cofs.2018.02.008.
- YANG F, XU C, HUANG M, et al. Molecular characteristics and structure-activity relationships of food-derived bioactive peptides[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(9): 2313-2332. DOI:10.1016/s2095-3119(20)63463-3.
- IBRAHIM M A, BESTER M J, NEITZ A W H, et al. Structural properties of bioactive peptides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2018, 91(2): 370-379. DOI:10.1111/cbdd.13105.

- [7] GALLEGO M, MORA L, TOLDRÁ F. The relevance of dipeptides and tripeptides in the bioactivity and taste of dry-cured ham[J]. Food Production, Processing and Nutrition, 2019, 1(1): 1-14. DOI:10.1186/s43014-019-0002-7.
- [8] MOLLICA A, ZENGIN G, DURDAGI S, et al. Combinatorial peptide library screening for discovery of diverse  $\alpha$ -glucosidase inhibitors using molecular dynamics simulations and binary QSAR models[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2019, 37(3): 726-740. DOI:10.1080/07391102.2018.1439403.
- [9] MATSUI T, TAMAYA K, SEKI E, et al. Absorption of Val-Tyr with *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity into the circulating blood system of mild hypertensive subjects[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(9): 1228-1230. DOI:10.1248/bpb.25.1228 DOI:10.1248/bpb.25.1228.
- [10] WANG B, XIE N, LI B. Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and *in vitro* bioavailability: a review[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12571. DOI:10.1111/jfbc.12571.
- [11] IBRAHIM M A, SEREM J C, BESTER M J, et al. Multiple antidiabetic effects of three  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides, PFP, YPL and YPG: dipeptidyl peptidase-IV inhibition, suppression of lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes and scavenging activity on methylglyoxal[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122: 104-114. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.152.
- [12] IBRAHIM M A, BESTER M J, NEITZ A W, et al. Rational *in silico* design of novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides and *in vitro* evaluation of promising candidates[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 107: 234-242. DOI:10.1016/j.biopha.2018.07.163.
- [13] 吴彤. 核桃降血糖活性肽的分离纯化、结构鉴定及降血糖作用机理研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020: 24-25. DOI:10.27163/d.cnki.gjlnu.2020.000082.
- [14] FAN H, LIAO W, WU J. Molecular interactions, bioavailability, and cellular mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12572. DOI:10.1111/jfbc.12572.
- [15] HIKIDA A, ITO K, MOTOYAMA T, et al. Systematic analysis of a dipeptide library for inhibitor development using human dipeptidyl peptidase IV produced by a *Saccharomyces cerevisiae* expression system[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 430(4): 1217-1222. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.073.
- [16] VANHOOF G, GOOSSENS F, DA MEESTER I, et al. Proline motifs in peptides and their biological processing[J]. The FASEB Journal, 1995, 9(9): 736-744. DOI:10.1096/fasebj.9.9.7601338.
- [17] 刘锐. 亮氨酸干预大鼠不同阶段胰岛素抵抗的代谢组学及线粒体调控机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017: 3-8.
- [18] BENDER K, NEWSHOLME P, BRENNAN L, et al. The importance of redox shuttles to pancreatic  $\beta$ -cell energy metabolism and function[J]. Biochemical Society Transactions, 2006, 34(5): 811-814. DOI:10.1042/bst0340811.
- [19] WANG J, WU T, FANG L, et al. Anti-diabetic effect by walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.)-derived peptide LPLLR through inhibiting  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase, and alleviating insulin resistance of hepatic HepG2 cells[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 69: 103944. DOI:10.1016/j.jff.2020.103944.
- [20] ZAMBROWICZ A, POKORA M, SETNER B, et al. Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization[J]. Amino Acids, 2015, 47(2): 369-380. DOI:10.1007/s00726-014-1869-x.
- [21] DIXON G, NOLAN J, MCCLENAGHAN N, et al. A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal  $\beta$ -cell line BRIN-BD11-the functional significance of *L*-alanine[J]. Journal of Endocrinology, 2003, 179(3): 447. DOI:10.1677/joe.0.1790447.
- [22] POWER O, HALLIHAN A, JAKEMAN P. Human insulinotropic response to oral ingestion of native and hydrolysed whey protein[J]. Amino Acids, 2009, 37(2): 333-339. DOI:10.1007/s00726-008-0156-0.
- [23] MAESTRI E, PAVLICEVIC M, MONTORSI M, et al. Meta-analysis for correlating structure of bioactive peptides in foods of animal origin with regard to effect and stability[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(1): 3-30. DOI:10.1111/1541-4337.12402.
- [24] LIU W, LI H, WEN Y, et al. Molecular mechanism for the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of wheat germ peptides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(50): 15231-15239. DOI:10.1021/acs.jafc.1c06098.
- [25] FUENTES L R, RICHARD C, CHEN L. Sequential alcalase and flavourzyme treatment for preparation of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitory peptides from oat protein[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104829. DOI:10.1016/j.jff.2021.104829.
- [26] 刘星. 薏仁米主要营养成分近红外光谱快速测定及理化性质研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2016: 77-78. DOI:10.27307/d.cnki.gsjtu.2016.004777.
- [27] 秦晓佩, 余筱洁, 杨华, 等. 菜籽饼粕蛋白模拟胃肠消化过程抗氧化研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(1): 21-26.
- [28] WANG T Y, HSIEH C H, HUNG C C, et al. Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: a comparison between warm- and cold-water fish[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19: 330-340. DOI:10.1016/j.jff.2015.09.037.
- [29] JIANG M, YAN H, HE R, et al. Purification and a molecular docking study of  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory peptides from a soybean protein hydrolysate with ultrasonic pretreatment[J]. European Food Research and Technology, 2018, 244(11): 1995-2005. DOI:10.1007/s00217-018-3111-7.
- [30] 樊红秀. 玉米蛋白组氨酸-脯氨酸环二肽的高效制备技术及其降血糖功效研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016: 93-94.
- [31] WANG F, ZHANG Y, YU T, et al. Oat globulin peptides regulate antidiabetic drug targets and glucose transporters in Caco-2 cells[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 42: 12-20. DOI:10.1016/j.jff.2017.12.061.
- [32] QUINTERO-SOTO M F, CHÁVEZ-ONTIVEROS J, GARZÓN-TIZNADO J A, et al. Characterization of peptides with antioxidant activity and antidiabetic potential obtained from chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolyzates[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(7): 2962-2977. DOI:10.1111/1750-3841.15778.
- [33] VILCACUNDO R, MARTÍNEZ-VILLALUENGA C, HERNÁNDEZ-LEDESMA B. Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 531-539. DOI:10.1016/j.jff.2017.06.024.
- [34] OBAROAKPO J U, LIU L, ZHANG S, et al.  $\alpha$ -Glucosidase and ACE dual inhibitory protein hydrolysates and peptide fractions of sprouted quinoa yoghurt beverages inoculated with *Lactobacillus casei*[J]. Food Chemistry, 2019, 299: 124985. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.124985.

- [35] GU X, GAO T, HUO Y, et al. Identification and characterization of two novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from almond (*Armeniaca sibirica*) oil manufacture residue[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 134: 110215. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110215.
- [36] ZHAO B, SU K, MAO X, et al. Separation and identification of enzyme inhibition peptides from dark tea protein[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 99: 103772. DOI:10.1016/j.bioorg.2020.103772.
- [37] HU S, FAN X, QI P, et al. Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56: 333-341. DOI:10.1016/j.jff.2019.03.024.
- [38] 黄钦钦, 田亚平. 条斑紫菜蛋白酶解液 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和DPP-IV抑制活性的表征及肽成分分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 110-116. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191014-114.
- [39] RAMADHAN A H, NAWAS T, ZHANG X, et al. Purification and identification of a novel antidiabetic peptide from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) protein hydrolysate against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(Suppl 3): S3360-S3372. DOI:10.1080/10942912.2017.1354885.
- [40] ZHOU M, REN G, ZHANG B, et al. Screening and identification of a novel antidiabetic peptide from collagen hydrolysates of Chinese giant salamander skin: network pharmacology, inhibition kinetics and protection of IR-HepG2 cells[J]. Food & Function, 2022, 13(6): 3329-3342. DOI:10.1039/d1fo03527d.
- [41] QIU L, DENG Z, ZHAO C, et al. Nutritional composition and proteomic analysis of soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) egg and identification of oligopeptides with alpha-glucosidase inhibitory activity[J]. Food Research International, 2021, 145: 110414. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110414.
- [42] WEI G, ZHAO Q, WANG D, et al. Novel ACE inhibitory, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides identified from fermented rubing cheese through peptidomic and molecular docking[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 159: 113196. DOI:10.1016/j.lwt.2022.113196.
- [43] MARTINI S, SOLIERI L, CATTIVELLI A, et al. An integrated peptidomics and *in silico* approach to identify novel anti-diabetic peptides in Parmigiano-Reggiano cheese[J]. Biology, 2021, 10(6): 563. DOI:10.3390/biology10060563.
- [44] ZHANG Y, WANG N, WANG W, et al. Molecular mechanisms of novel peptides from silkworm pupae that inhibit  $\alpha$ -glucosidase[J]. Peptides, 2016, 76: 45-50. DOI:10.1016/j.peptides.2015.12.004.
- [45] ZIELIŃSKA E, KARAŚ M, BARANIAK B, et al. Evaluation of ACE,  $\alpha$ -glucosidase, and lipase inhibitory activities of peptides obtained by *in vitro* digestion of selected species of edible insects[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(7): 1361-1369. DOI:10.1007/s00217-020-03495-y.
- [46] LOZANO-GONZÁLEZ M, OVALLE-MAGALLANES B, RANGEL-GRIMALDO M, et al. Antidiabetic *in vitro* and *in vivo* evaluation of cyclodipeptides isolated from *Pseudomonas fluorescens* IB-MR-66e[J]. New Journal of Chemistry, 2019, 43(20): 7756-7762. DOI:10.1039/c9nj00645a.
- [47] SINGH B, KAUR A. Antidiabetic potential of a peptide isolated from an endophytic *Aspergillus awamori*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(2): 301-311. DOI:10.1111/jam.12998.
- [48] WANG X F, FAN Y, XU F, et al. Characterization of the structure, stability, and activity of hypoglycemic peptide from *Moringa oleifera* seed protein hydrolysates[J]. Food & Function, 2022, 13(6): 1481-1494. DOI:10.1039/d1fo03413h.
- [49] GUPTA S, KAPOOR P, CHAUDHARY K, et al. *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins[J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e73957. DOI:10.1371/journal.pone.0073957.
- [50] LIU L, LI S, ZHENG J, et al. Safety considerations on food protein-derived bioactive peptides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 96: 199-207. DOI:10.1016/j.tifs.2019.12.022.
- [51] SCHAAFSMA G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2009, 63(10): 1161-1168. DOI:10.1038/ejcn.2009.56.
- [52] CHAUDHARY K, KUMAR R, SINGH S, et al. A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 1-13. DOI:10.1038/srep22843.
- [53] WANG Xuefeng, FAN Yaozhu, XU Feiran, et al. Characterization of the structure, stability, and activity of hypoglycemic peptides from *Moringa oleifera* seed protein hydrolysates[J]. Food & Function, 2022, 13(6): 3481-3494. DOI:10.1039/d1fo03413h.
- [54] WOLD S, JONSSON J, SJÖRSTRÖ M, et al. DNA and peptide sequences and chemical processes multivariately modelled by principal component analysis and partial least-squares projections to latent structures[J]. Analytica Chimica Acta, 1993, 277(2): 239-253. DOI:10.1016/0003-2670(93)80437-p.
- [55] SAHA S, RAGHAVA G P S. AllPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Suppl 2): W202-W209. DOI:10.1093/nar/gkl343.
- [56] KUBO M. Mast cells and basophils in allergic inflammation[J]. Current Opinion in Immunology, 2018, 54: 74-79. DOI:10.1016/j.coi.2018.06.006.
- [57] LARCHÉ M. Immunotherapy with allergen peptides[J]. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2007, 3(2): 1-7. DOI:10.1186/1710-1492-3-2-53.
- [58] YAP P G, GAN C Y. *In vivo* challenges of anti-diabetic peptide therapeutics: gastrointestinal stability, toxicity and allergenicity[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 161-175. DOI:10.1016/j.tifs.2020.09.005.
- [59] DZIUBA M, DĄBEK P M. Peptides, specific proteolysis products, as molecular markers of allergenic proteins: *in silico* studies[J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2013, 12(1): 101-111.
- [60] SINGH P P, GUPTA V, PRAKASH B. Recent advancement in functional properties and toxicity assessment of plant-derived bioactive peptides using bioinformatic approaches[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(20): 4503-4521. DOI:10.1080/10408398.2021.2002807.
- [61] APOSTOLOVIC D, STANIC-VUCINIC D, DE JONGH H H J, et al. Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 1-12. DOI:10.1038/srep29249.
- [62] CUADRADO C, CHENG H, SANCHIZ A, et al. Influence of enzymatic hydrolysis on the allergenic reactivity of processed cashew and pistachio[J]. Food Chemistry, 2018, 241: 372-379. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.08.120.
- [63] LI T, BU G, XI G. Effects of heat treatment on the antigenicity, antigen epitopes, and structural properties of  $\beta$ -conglycinin[J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128962. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128962.
- [64] BU G, LI T, ZHAO Y, et al. Effects of high hydrostatic pressure combined with heat treatment on the antigenicity and conformation of  $\beta$ -conglycinin[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(5): 1065-1072. DOI:10.1007/s00217-020-03472-5.
- [65] XI J, LI Y. The effects of ultra-high-pressure treatments combined with heat treatments on the antigenicity and structure of soy glycinin[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 56(10): 5211-5219. DOI:10.1111/ijfs.15297.
- [66] KOZIOLEK M, GRIMM M, BECKER D, et al. Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using

- the Intellicap<sup>®</sup> system[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104(9): 2855-2863. DOI:10.1002/jps.24274.
- [67] AHMED T, SUN X, UDENIGWE C C. Role of structural properties of bioactive peptides in their stability during simulated gastrointestinal digestion: a systematic review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 120: 265-273. DOI:10.1016/j.tifs.2022.01.008.
- [68] NETSOMBOON K, BERNKOP-SCHNÜRCH A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 98: 76-89. DOI:10.1016/j.ejpb.2015.11.003.
- [69] PLAPIED L, DUHEM N, DES RIEUX A, et al. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface science*, 2011, 16(3): 228-237. DOI:10.1016/j.cocis.2010.12.005.
- [70] VARUM F J O, VEIGA F, SOUSA J S, et al. Mucus thickness in the gastrointestinal tract of laboratory animals[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 64(2): 218-227. DOI:10.1111/j.2042-7158.2011.01399.x.
- [71] SCHÖMIG V J, KÄSDORF B T, SCHOLZ C, et al. An optimized purification process for porcine gastric mucin with preservation of its native functional properties[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(50): 44932-44943. DOI:10.1039/c6ra07424c.
- [72] SUN Xiaohong, ABIOYE R O, OKAGU O D, et al. Peptide-mucin binding and biosimilar mucus-permeating properties[J]. *Gels*, 2021, 8(1): 1. DOI:10.3390/gels8010001.
- [73] SUN X, ACQUAH C, ALUKO R E, et al. Considering food matrix and gastrointestinal effects in enhancing bioactive peptide absorption and bioavailability[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103680. DOI:10.1016/j.jff.2019.103680.
- [74] WANG J, DU K, FANG L, et al. Evaluation of the antidiabetic activity of hydrolyzed peptides derived from *Juglans mandshurica* Maxim. fruits in insulin-resistant HepG2 cells and type 2 diabetic mice[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2018, 42(3): e12518. DOI:10.1111/jfbc.12518.
- [75] XU Q, HONG H, WU J, et al. Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 86: 399-411. DOI:10.1016/j.tifs.2019.02.050.
- [76] SHANI-LEVI C, ALVITO P, ANDRÉS A, et al. Extending *in vitro* digestion models to specific human populations: perspectives, practical tools and bio-relevant information[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 60: 52-63. DOI:10.1016/j.tifs.2016.10.017.
- [77] PAULETTI G M, OKUMU F W, BORCHARDT R T. Effect of size and charge on the passive diffusion of peptides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway[J]. *Pharmaceutical Research*, 1997, 14(2): 164-168. DOI:10.1023/a:1012040425146.
- [78] HONG S M, TANAKA M, KOYANAGI R, et al. Structural design of oligopeptides for intestinal transport model[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(10): 2072-2079. DOI:10.1021/acs.jafc.6b00279.
- [79] OSBORNE S, CHEN W, ADDEPALLI R, et al. *In vitro* transport and satiety of a  $\beta$ -lactoglobulin dipeptide and  $\beta$ -casomorphin-7 and its metabolites[J]. *Food & Function*, 2014, 5(11): 2706-2718. DOI:10.1039/c4fo00164h.
- [80] WANG B, LI B. Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using Caco-2 cell model[J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 1-8. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.08.106.
- [81] DING L, WANG L, YU Z, et al. Importance of terminal amino acid residues to the transport of oligopeptides across the Caco-2 cell monolayer[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(35): 7705-7712. DOI:10.1021/acs.jafc.7b03450.
- [82] VERMA S, GOAND U K, HUSAIN A, et al. Challenges of peptide and protein drug delivery by oral route: current strategies to improve the bioavailability[J]. *Drug Development Research*, 2021, 82(7): 927-944. DOI:10.1002/ddr.21832.
- [83] SONESSON A, BRADY K, BJØRNSDOTTIR I, et al. Meeting report: 1<sup>st</sup> workshop of the peptide ADME discussion group[J]. *Xenobiotica*, 2021, 51(1): 122-125. DOI:10.1080/00498254.2020.1729447.
- [84] SHAO C Y, SU B H, TU Y S, et al. CypRules: a rule-based P450 inhibition prediction server[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(11): 1869-1871. DOI:10.1093/bioinformatics/btv043.