

## 大鼠肠囊外翻法分析核桃肽吸收特性及抗氧化肽筛选鉴定

李浩铭, 李维佳, 李 佳, 方 丽, 宋佳淇, 吴 丹, 闵伟红

### Analysis of Absorption Characteristics of Walnut Peptides by Everted Rat Sacs and Identification of Antioxidant Peptides

LI Haoming, LI Weijia, LI Jia, FANG Li, SONG Jiaqi, WU Dan, and MIN Weihong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030031>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 核桃多肽的抗氧化活性及其分子量、氨基酸组成特性研究

Study on Antioxidant Activity of Walnut Polypeptide and Its Molecular Weight, Amino Acid Composition Characteristic

食品工业科技. 2018, 39(13): 1-7,13 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.13.001>

#### 核桃肽制备工艺的优化及其改善记忆功能研究

Study on the Optimization of the Preparation Process of Walnut Peptide and the Improvement of Memory Function

食品工业科技. 2021, 42(11): 135-141 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040288>

#### 核桃肽NP-1对大鼠酒精性情绪及认知损伤的改善效应

The ameliorative effects of walnut peptide NP-1 on the alcoholic emotions and cognitive impairments in rats

食品工业科技. 2017(22): 300-305 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.22.058>

#### 基于分子对接虚拟筛选含酪氨酸残基的ACE抑制三肽

Virtual Screening of ACE Inhibitory Tripeptides Containing Tyrosine Residues Based on Molecular Docking

食品工业科技. 2021, 42(16): 20-27 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030111>

#### 核桃(Juglandaceae)种仁、叶、花粉抗氧化活性及成分鉴定

Antioxidant Activity and Compounds Identification of Kernels, Leaves and Pollen of Walnut(Juglandaceae)

食品工业科技. 2019, 40(20): 54-60 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.009>

#### 核桃多酚与蛋白质的作用方式及其抗氧化活性

Interaction between Walnut Polyphenols and Protein and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2019, 40(13): 23-28 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.13.004>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李浩铭, 李维佳, 李佳, 等. 大鼠肠囊外翻法分析核桃肽吸收特性及抗氧化肽筛选鉴定 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 337-345. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030031

LI Haoming, LI Weijia, LI Jia, et al. Analysis of Absorption Characteristics of Walnut Peptides by Everted Rat Sacs and Identification of Antioxidant Peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 337-345. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030031

· 营养与保健 ·

# 大鼠肠囊外翻法分析核桃肽吸收特性及 抗氧化肽筛选鉴定

李浩铭, 李维佳, 李 佳, 方 丽, 宋佳淇, 吴 丹\*, 闵伟红\*  
(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118)

**摘要:** 本研究通过大鼠肠囊外翻法探讨了 <3 kDa 核桃蛋白肽模拟胃肠消化产物的吸收特性, 以抗氧化能力 (DPPH 自由基清除率、ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率、Fe<sup>2+</sup> 螯合率) 和活性肽吸收率为指标筛选核桃肽在肠道吸收的最优条件, 并应用模拟分子对接技术和 Nano-HPLC-MS/MS 技术对吸收肽组分进行筛选和鉴定, 得到能够以完整形式被吸收并发挥抗氧化活性的新型核桃源肽。结果表明: 当核桃肽消化产物吸收浓度为 6 mg/mL, 吸收时间为 2 h 时, 其抗氧化活性最高且在小肠吸收率最高; 进一步通过 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定结果表明 0.5~1 kDa 活性肽数量最多, 其中位于 C 端/N 端氨基酸主要集中在 Pro、Thr、Leu, 鉴定出 33 条活性肽能够以完整形式被吸收, 穿过肠道屏障; 最后通过分子对接技术与 DPP-IV 相结合, 获得三条结合能最低的活性肽 NLRFPPL、NPDDEFPRQ、KGHLFPN, 其结合能分别为 -8.8、-8.6、-8.6 kcal/mol, 其中 KGHLFPN 抗氧化能力最强。综上, <3 kDa 核桃肽模拟胃肠道消化能够释放抗氧化活性更高且能够被小肠吸收的活性肽为 KGHLFPN, 本文为探索外源肽小肠吸收特性及筛选鉴定抗氧化肽提供新思路。

**关键词:** 核桃肽, 肠吸收, 抗氧化活性, 分子对接

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0337-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030031



本文网刊:

## Analysis of Absorption Characteristics of Walnut Peptides by Everted Rat Sacs and Identification of Antioxidant Peptides

LI Haoming, LI Weijia, LI Jia, FANG Li, SONG Jiaqi, WU Dan\*, MIN Weihong\*

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** This study investigated the absorption characteristics of <3 kDa walnut protein peptides simulating gastrointestinal digestion products using the everted rat sacs method. The optimal conditions for walnut peptide absorption in the intestine were selected based on antioxidant capacity (DPPH free radical clearance rate, ABTS<sup>+</sup> free radical clearance rate, Fe<sup>2+</sup> chelation rate) and active peptide absorption rate. The absorbed peptide components were screened and identified using simulated molecular docking technology and Nano-HPLC-MS/MS technology to obtain new walnut derived peptides that could be fully absorbed and had antioxidant activity. The results showed that when the absorption concentration of walnut peptide digestion product was 6 mg/mL, and the absorption time was 2 h, its antioxidant activity was the highest and the absorption rate in the small intestine was the highest. Further identification by Nano-HPLC-MS/MS showed that, the 0.5~1 kDa active peptide was the most numerous, with the C-terminal/N-terminal amino acids mainly concentrated in Pro, Thr, and Leu. Thirty-three active peptides were fully absorbed and crossed the intestinal barrier. By combining molecular docking technology with DPP-IV, the three active peptides NLRFPPL, NPDDEFPRQ, and KGHLFPN with the lowest binding

收稿日期: 2023-03-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32101934); 吉林省教育厅科学技术研究项目 (JKH20220346KJ)。

作者简介: 李浩铭 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 活性肽消化吸收与营养学评价, E-mail: 15568806443@163.com。

\* 通信作者: 吴丹 (1989-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 长白山野生资源开发与利用, E-mail: wudan@jlau.edu.cn。

闵伟红 (1971-), 女, 博士, 二级教授, 研究方向: 食源生物活性肽制备与开发研究, E-mail: minwh2000@jlau.edu.cn。

energies of -8.8, -8.6, and -8.6 kcal/mol, respectively were obtained. Among these, KGHLFPN displayed the strongest antioxidant capacity. In summary, simulating gastrointestinal digestion with <3 kDa walnut peptides could release the active peptide KGHLFPN, which had the highest antioxidant activity and could be absorbed by the small intestine. These findings would provide new ideas for studies exploring the intestinal absorption characteristics of exogenous peptides, and the screening and identification of antioxidant peptides.

**Key words:** walnut peptide; intestinal absorption; antioxidant activity; molecular docking

生物活性肽是由 2~20 个不同氨基酸组成、具有组织亲和力高、安全性好且在细胞内发挥较强生理活性的一类物质<sup>[1]</sup>。按照来源划分,生物活性肽可分为内源肽和外源肽。内源肽常以酶、激素等形式在机体中发挥生理作用<sup>[2]</sup>,但食物中摄取的外源肽不同于内源肽,其需要借助人体消化系统进入体内才能发挥活性功能<sup>[3]</sup>。外源肽的利用必须克服胃肠消化酶的分解和穿透小肠上皮细胞形成的肠道屏障<sup>[4]</sup>,许多长肽在胃的酸性条件下已被分解成短肽,无法完整进入小肠,而一些短肽已有研究证实其能耐受胃酸的条件,但小肠吸收率低,生物利用度低<sup>[5]</sup>。有研究证实小肠壁表面含有许多刷状缘肽酶,多肽必须成功抵抗刷状缘肽酶水解才能被完整吸收,二肽基肽酶(DPP-IV)是在肠道中密集分布且活性最高的刷状缘肽酶<sup>[6-7]</sup>,其是一种可裂解多肽 N 末端二肽的丝氨酸蛋白酶,当多肽残基末端倒数第二氨基酸是脯氨酸、羟基脯氨酸、脱氢脯氨酸或丙氨酸时,DPP-IV 与之结合能力较强<sup>[8]</sup>。Suzuki 等<sup>[9]</sup>研究发现,涉及甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸的肽键不易被大多数胃和胰蛋白酶水解。因此,含有脯氨酸、羟基脯氨酸、脱氢脯氨酸或丙氨酸的多肽可通过与 DPP-IV 结合而抵抗肠消化酶水解作用,从而以完整形式吸收。

氧化应激是指机体受到不同应激原刺激或病原菌感染时,产生大量自由基,特别是活性氧(reactive oxygen species, ROS)通过氧化还原机制对机体产生的氧化损伤<sup>[10]</sup>。氧化应激已被证明是许多常见疾病的发病诱因之一,如高血压<sup>[11]</sup>、慢性阻塞性肺病<sup>[12]</sup>等。因此,抗氧化剂的挖掘利用对人类健康至关重要。又因天然成分安全性更高,而使天然抗氧化剂的筛选成为抗氧化成分挖掘的新方向。核桃蛋白通过酶解纯化并筛选鉴定后得到特定核桃肽序列<sup>[13]</sup>,已有研究证实了某些特定核桃肽具有抗氧化<sup>[14]</sup>、改善记忆力<sup>[15]</sup>等生理功能。王薇等<sup>[16]</sup>通过酶水解法制备核桃蛋白水解物,并通过 ORAC 法和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞筛选出 3 条抗氧化肽 QGRPWG、PSRADIY 和 AYNIPVNIAR。然而,活性肽完整高效吸收是其发挥活性功能的前提,近几年活性肽的生理功能被不断拓展,但关于活性肽吸收与生理活性的关系及活性肽氨基酸组成与吸收的关系相关研究鲜有报道,探索活性肽的吸收特性及肽吸收与功能活性的关系成为众多学者关注的热点。目前,因体内动物消化吸收模型具有周期长、消耗大等特点,构建体外模拟消化吸收模型已成为研究者关于研究生物活性分子吸收问题的新方法<sup>[17-18]</sup>,已有许多学者通过建立体外大鼠外翻

肠囊模型进行了营养组分评价<sup>[19]</sup>,如矿物质<sup>[20]</sup>、脂肪酸<sup>[21]</sup>、糖醇<sup>[22-23]</sup>和黄酮物质<sup>[24]</sup>的吸收特性及生物利用度已有明确报道。丁龙<sup>[25]</sup>利用 Caco-2 细胞单层膜和外翻大鼠肠囊模型研究了蛋清蛋白模拟消化水解物混合肽的吸收情况。

因此,本研究通过大鼠肠囊外翻法和抗氧化活性测定研究了核桃肽消化产物的抗氧化活性和其吸收特性明确活性肽在肠道吸收的最优条件,继而利用 Nano-HPLC-MS/MS 和分子对接技术筛选鉴定出与 DPP-IV 稳定结合且能完整高效吸收的抗氧化活性肽,为核桃源高效吸收抗氧化肽开发利用奠定了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

核桃蛋白肽混合物 由脱脂核桃粕酶解超滤制得,分子量<3 kDa(纯度≥85%,氨基酸≥15%),由吉林农业大学发酵工程实验室自制<sup>[26]</sup>;健康雄性 Sprague Dawley(SD)大鼠 33 只 体质量 200~220 g,辽宁长生生物技术股份有限公司(生产许可证号:NO.SCXK(辽)2020-0001);5% w/v 水合氯醛 上海源叶生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、乙二胺四乙酸(EDTA)、谷胱甘肽(GSH) 美国 Sigma 有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

Fluoroskan Ascent FL 荧光酶标仪、串联 EASY-nanoLC1200 的 Orbitrap Fusion 质谱仪 美国赛默飞世尔科技有限公司;UNIC-7200 紫外分光光度计 成都泰盟科技有限公司;Allegra X-22 型台式高速离心机 北京东讯天地医疗仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 不同分子量核桃肽抗氧化性的测定

1.2.1.1 DPPH 自由基清除能力的测定 参照 Yang 等<sup>[27]</sup>的方法,向试管中加入 2 mL 核桃肽溶液和 2 mL 60 μmol/L 的 DPPH 溶液(乙醇溶解),混合均匀后避光放置 30 min,在 517 nm 波长下测吸光值。取同浓度的 GSH 作为阳性对照。清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH自由基清除率(\%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式中: A<sub>0</sub> 为用蒸馏水代替核桃肽溶液的空白吸光值; A<sub>1</sub> 为核桃肽溶液吸光值; A<sub>2</sub> 为不加 DPPH 溶液的对照吸光值。



1.2.1.2 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力的测定 参照 Song 等<sup>[28]</sup>的方法,制备 ABTS<sup>+</sup>自由基储备液:7 mmol/L 的 ABTS 水溶液和 2.49 mmol/L 的过硫酸钾水溶液等体积混合,避光放置 12~16 h,4 ℃ 保存。配制 ABTS<sup>+</sup>自由基工作液:加入 5 mmol/L 的 PBS 稀释,使溶液在 734 nm 波长下吸光度为 0.700±0.002。测定时,向 96 孔板每孔加入 10 μL 核桃肽溶液和 190 μL ABTS<sup>+</sup>自由基工作液,6 min 后于 734 nm 波长下测定吸光值。取同浓度的 GSH 作为阳性对照。清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式中: A<sub>0</sub> 为用蒸馏水代替核桃肽溶液的空白吸光值; A<sub>1</sub> 为核桃肽溶液吸光值; A<sub>2</sub> 为不加 ABTS 溶液的对照吸光值。

1.2.1.3 Fe<sup>2+</sup>螯合能力的测定 参照 Zhang 等<sup>[29]</sup>的方法,在试管中依次加入 0.5 mL 核桃肽溶液,1 mL 20 μmol/L 的 FeCl<sub>2</sub> 溶液和 1 mL 0.5 mmol/L 菲洛嗪,混匀后 25 ℃,水浴 20 min 后,于 562 nm 波长下测定吸光值。取同浓度的 EDTA 作为阳性对照。Fe<sup>2+</sup>螯合率的计算公式如下:

$$\text{Fe}^{2+}\text{螯合率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式中: A<sub>0</sub> 为用蒸馏水代替核桃肽溶液的空白吸光值; A<sub>1</sub> 为核桃肽溶液吸光值; A<sub>2</sub> 为不加菲洛嗪的对照吸光值。

1.2.2 构建大鼠离体肠囊外翻模型 本实验严格按照吉林农业大学实验动物中心(实验动物使用许可证:SYXK(吉)2018-0023)的建议进行(伦理审查受理号:20210311002)。参考 Wei 等<sup>[30]</sup>的方法并进行部分修改。将购买的 33 只大鼠随机分成 1 个空白组,5 个浓度组(2、4、6、8、10 mg/mL),保持 2 h 的孵育时间;5 个时间组(1、1.5、2、2.5、3 h),保持 6 mg/mL 的黏膜侧肽浓度,每组 3 只平行实验,适应性饲养 1 周,禁食 15 h 后开始实验。抓取大鼠待其状态平稳后腹腔注射 4% 水合氯醛(剂量:10 μL/g,以大鼠体重计算)麻醉,随后通过腹部切口快速取出大鼠小肠(十二指肠、空肠、回肠)并采用断头法处死大鼠,将小肠用预冷生理盐水清洗去除肠内容物后在 4 ℃,通入 95% O<sub>2</sub> 的缓冲液中将肠囊外翻,浆膜侧加入 1 mL KRB-IPA 缓冲液(pH7.4),肠囊两端扎紧,黏膜侧放入不同浓度分子量<3 kDa 核桃肽肠消化产物中,37 ℃ 恒温水浴处理相应时间后取出肠囊,收集肠囊浆膜侧溶液。空白组采用等量 KRB-IPA 缓冲液(pH7.4)替代分子量<3 kDa 核桃肽肠消化产物溶液。

1.2.3 肽吸收率测定 利用紫外可见光光度计在 270 nm 处测定大鼠离体肠囊外翻法收集的黏膜侧和浆膜侧样品肽浓度,并计算肽吸收率,计算公式如下:

$$\text{吸收率}(\%) = \frac{A_1}{(A_1 + A_2)} \times 100$$

式中: A<sub>1</sub> 为浆膜侧肽含量; A<sub>2</sub> 为黏膜侧肽含量。

1.2.4 核桃肽体外消化产物抗氧化能力测定 分别选取小肠的不同部位(十二指肠、空肠、回肠)、肽浓度(2、4、6、8、10 mg/mL)和转运时间(1、1.5、2、2.5、3 h)作为 3 个变量,测定核桃肽浆膜侧肽溶液抗氧化活性(考察核桃肽浓度对浆膜侧肽溶液抗氧化活性的影响时,以肽浓度为变量,控制转运时间为 2 h;考察转运时间对浆膜侧肽溶液抗氧化活性的影响时,以转运时间为变量,控制核桃肽浓度为 6 mg/mL)。

1.2.5 Nano-HPLC-MS/MS 分析 收集大鼠肠囊浆膜侧溶液,对其冷冻干燥制成粉末,并采用 C<sub>18</sub> 除盐柱进行除盐后,采用 Acclaim PepMap C<sub>18</sub>(75 μm×25 cm)分析柱;进样量 8 μL;流量 300 nL/min,流动相 A 相:0.1% 甲酸水溶液;B 相:含 0.1% 甲酸的乙腈溶液,柱温 40 ℃,电喷雾电压 2 kV。质谱参数设置如下:MS 扫描范围 100~1500 m/z,分辨率=70000,AGC target=3e6,最大注入时间 50 ms;HCD-MS/MS(top 20):分辨率=17500,隔离窗口=2 m/z,AGC target=1e5,最大注入时间 45 ms,碰撞能量为 28 ev,动态排除时间=30 s。

根据 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定得到的 de novo 表对肽浓度 6 mg/mL 吸收 2 h 十二指肠部分大鼠肠囊浆膜侧活性肽序列信息进行整理总结,分析可被吸收的肽结构特征。

1.2.6 分子对接 通过 Discovery Studio 2017 R2 (Biovia, San Diego, CA, USA)模拟大鼠外翻肠囊浆膜侧 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定后且具有抗氧化特征氨基酸的肽序列与 DPP-IV 的相互作用,并使用 CHARMm 力场使其能量最小化。DPP-IV 的晶体结构来源于 PDB 数据库(5T4B),可在 <https://www.rcsb.org> 获得。根据结合能得分,评估活性肽与 DPP-IV 结合的稳定性。

1.2.7 合成肽制备及抗氧化活性测定 委托合肥赛曼诺生物科技有限公司完成,采用固相合成技术对肽 NLRFPPL(Asn-Leu-Arg-Phe-Pro-Leu,纯度 98.65%)、KGHLFPN(Lys-Gly-His-Leu-Phe-Pro-Asn,纯度 98.07%)和 NPDDEFPRPQ(Asn-Pro-Asp-Asp-Glu-Phe-Arg-Pro-Gln,纯度 98.04%)进行分别合成。

具体方法同 1.2.1,分别配制 0.2 mg/mL 合成肽溶液,以 DPPH 自由基清除能力、ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力、Fe<sup>2+</sup>螯合能力为指标,比较 NLRFPPL、KGHLFPN、NPDDEFPRPQ 的抗氧化能力。

### 1.3 数据处理

每个实验至少平行重复三次,实验数据以平均值±标准差表示。采用单因素方差分析和 Duncancs 多重检验分析数据差异性,P<0.05 表示有差异性,具有统计学意义。数据处理采用 SPSS 20.0 软件分析,图形采用 Origin 9.0 软件绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同分子量核桃肽抗氧化能力测定

采用 DPPH、ABTS、FRAP 法测定了经脱脂核桃粕酶解超滤得到的不同分子量核桃肽(1 mg/mL)的抗氧化活性。如图 1A 所示,经过酶解超滤后分子量<3 kDa 核桃肽的 DPPH 自由基清除率(93.58%±0.85%)显著高于 3~10 kDa 核桃肽(87.01%±0.92%)和>10 kDa 核桃肽(84.04%±1.03%)( $P<0.05$ ),并与 1 mg/mL 谷胱甘肽 GSH(95.21%±0.75%)无显著差异( $P>0.05$ )。ABTS 在氧化剂作用下会氧化成绿色的 ABTS<sup>+</sup>自由基,有自由基清除剂存在时,ABTS<sup>+</sup>产生被抑制,通过测定吸光度即可得出样品清除 ABTS<sup>+</sup>自由基的能力;如图 1B 所示,ABTS<sup>+</sup>自由基清除率结果与 DPPH 相似,<3 kDa 核桃肽(82.35%±0.74%)显著高于 3~10 kDa 核桃肽(74.21%±0.72%)和>10 kDa 核桃肽(70.31%±1.03%)( $P<0.05$ )。FRAP 测定结果如图 1C 所示,Fe<sup>2+</sup>的存在会加速脂质氧化的过程,通过测定物质对 Fe<sup>2+</sup>螯合能力可以评估样品的抗氧化

能力。经过酶解超滤后分子量<3 kDa 核桃肽的 Fe<sup>2+</sup>螯合能力(93.46%±1.07%)显著高于 3~10 kDa 核桃肽(82.46%±1.15%)和>10 kDa 的核桃肽(85.05%±0.63%),并与 1 mg/mL EDTA(94.30%±0.87%)无显著差异( $P>0.05$ )。以上结果表明经过酶解后,分子量较小的肽组分被释放,分子量低的肽穿过肠道屏障能力更强,更利于发挥其活性,且小分子肽容易与脂质自由基反应,减少了自由基介导的脂质过氧化作用,从而具有更好的抗氧化活性。关海宁等<sup>[31]</sup>通过测定大豆分离蛋白水解肽 DPPH 自由基清除能力和 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力发现分子量与其抗氧化能力呈显著负相关。Liu 等<sup>[32]</sup>已证明低分子量肽组分比高分子量肽组分具有更高的抗氧化能力。因此,本文选择分子量<3 kDa 核桃肽进行后续试验。

### 2.2 核桃肽体外消化产物抗氧化能力测定

2.2.1 核桃肽浓度对浆膜侧肽溶液抗氧化活性的影响 分别采用 DPPH、ABTS、FRAP 法测定了经大鼠肠囊外翻实验后黏膜侧不同初始浓度的肽溶液对吸收后肠囊浆膜侧肽抗氧化活性的影响,结果如图 2 所示。由图 2A 可知,经过相同的转运时间,浆膜侧肽 DPPH 自由基清除率随黏膜侧肽浓度的增加而增加而后趋于稳定,在黏膜侧肽浓度为 6 mg/mL 时,DPPH 清除率在十二指肠(78.99%±1.76%)达到最高;图 2B 可得到相似结果,当转运时间相同时,浆膜侧肽 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率也随黏膜侧肽浓度的增加而提高,同样在浓度为 6 mg/mL 时,十二指肠浆膜侧肽 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率为最高(60.04%±1.22%),而后 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率无显著变化( $P>0.05$ )。图 2C 的 FRAP 测定结果也验证了图 2A、图 2B 的结果,在黏膜侧肽浓度增加到 6 mg/mL 时,Fe<sup>2+</sup>螯合率达到峰值,分别为十二指肠(84.67%±1.65%)、空肠(82.67%±1.37%)、回肠(79.36%±1.67%)。综上,核桃肽模拟肠消化产物初始浓度为 6 mg/mL 时,经肠囊外翻实验后浆膜侧肽的抗氧化能力最强。6 mg/mL 是核桃肽模拟肠消化产物小肠吸收发挥抗氧化活性的最佳浓度,而过量的肽可能受到肠道屏障的限制无法完成转运过程或被外排作用排出。然而,促进肽在肠道的吸收是提高其生物利用度的关键,抗氧化能力测定结果显示了十二指肠浆膜侧肽抗氧化能力均略高于空肠和回肠,但无显著差异。

2.2.2 不同转运时间对浆膜侧肽溶液抗氧化活性的影响 如图 3A 所示,保持相同的黏膜侧肽浓度,大鼠外翻肠囊浆膜侧肽溶液的 DPPH 自由基清除率随转运时间的增加而提高后趋于稳定,在转运 2 h 时达到最大值,分别为十二指肠(78.21%±1.25%)、空肠(73.26%±0.68%)、回肠(70.57%±1.16%)。由图 3B 也可知,ABTS<sup>+</sup>自由基清除率随转运时间的延长而增加,同样在 2 h 时达到最大值,分别为十二指肠(63.65%±1.49%)、空肠(55.76%±1.10%)、回肠

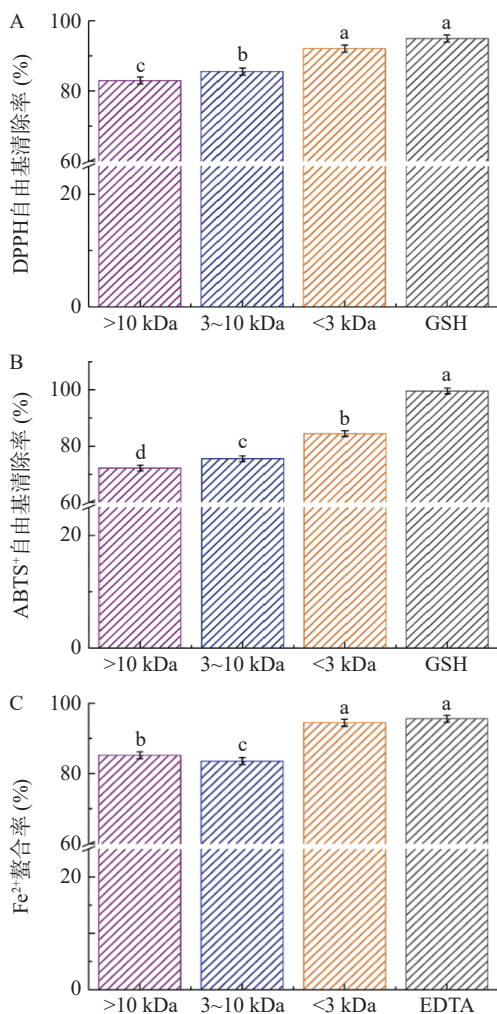


图 1 不同分子量核桃蛋白肽的抗氧化能力

Fig.1 Antioxidant capacity of walnut protein peptides with different molecular weights

注:图中不同小写字母表示不同组之间有显著性差异( $P<0.05$ );图 2~图 5、图 7 同。

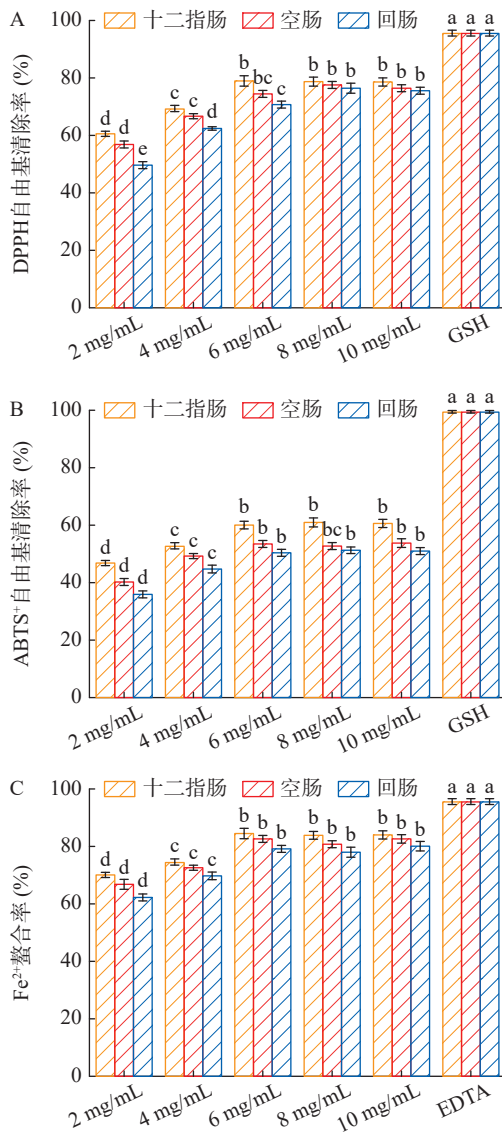


图 2 大鼠外翻肠囊黏膜侧肽浓度对浆膜侧肽溶液抗氧化活性的影响

Fig.2 Effect of the concentration of the peptide of the everted rat sacs mucosal side on the antioxidant activity of the serosal side peptide solution

(50.64%±1.16%)。图 3C 也可得到相似结果,在转运时间 2 h 时,Fe<sup>2+</sup>螯合率为最高值,而后无显著差异(P>0.05)。因此,2 h 为核桃肽模拟肠消化产物发挥抗氧化活性的最优时间。

综合图 2 和图 3 结果表明,6 mg/mL 是核桃肽体外模拟肠消化产物发挥抗氧化活性的最佳浓度,2 h 是其小肠吸收后发挥活性的最优时间。

### 2.3 核桃肽在大鼠外翻肠囊中的吸收情况

如图 4 所示,以大鼠外翻肠囊浆膜侧肽浓度为检测指标,保持相同的转运时间,肠囊黏膜侧肽浓度为 6 mg/mL 时十二指肠部分肽吸收率(49.63%±3.08%)显著高于空肠(17.30%±2.57%)和回肠(12.61%±2.06%)部分(P<0.05),同时肠囊黏膜侧 6 mg/mL 肽浓度小肠的吸收率达到最高值而后趋于稳定,表明 6 mg/mL 是核桃肽小肠吸收的初始饱和浓度。如图 5 所示,以核桃肽模拟肠消化产物不同

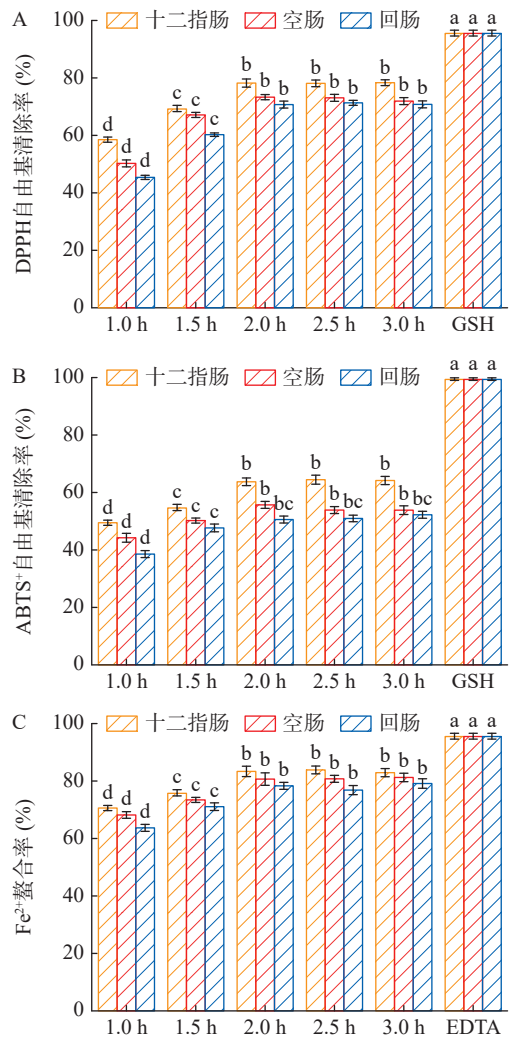


图 3 不同转运时间对大鼠外翻肠囊浆膜侧肽溶液抗氧化活性的影响

Fig.3 Effect of different transport time on the antioxidant activity of serosal side peptide solution of everted rat sacs

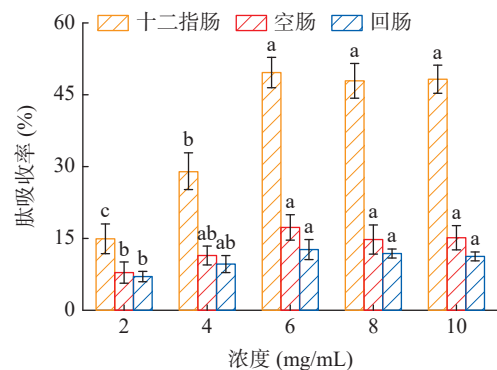


图 4 大鼠外翻肠囊不同黏膜侧肽浓度的肽吸收率

Fig.4 Peptide absorption rate of different mucosal side peptide concentrations in everted rat sacs

转运时间为单因素变量,对大鼠外翻肠囊浆膜侧肽浓度进行测定,转运时间 2 h 时,十二指肠肽吸收率(51.50%±2.93%)显著高于空肠肽吸收率(21.72%±3.48%)和回肠肽吸收率(13.29%±2.15%)(P<0.05),且转运时间 2 h 时小肠肽吸收率达到最大值而后趋于稳定,表明 2 h 是核桃肽小肠吸收的最优时间。



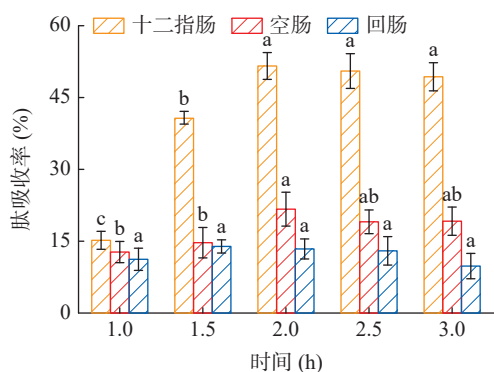


图 5 大鼠外翻肠囊不同转运时间的肽吸收率

Fig.5 Peptide absorption rate of different transport time in everted rat sacs

综上, 6 mg/mL 是核桃肽小肠吸收的初始饱和浓度, 2 h 是核桃肽小肠吸收的最大时间。小肠转运是动态平衡的过程, 物质在小肠吸收时也伴随少量的外排作用, 大鼠外翻肠囊浆膜侧和黏膜侧随肽浓度的增加, 时间的延长, 肠囊逐渐趋于饱和状态, 达到小肠吸收转运的最大量。

## 2.4 大鼠外翻肠囊浆膜侧肽组分 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定

2.4.1 大鼠外翻肠囊浆膜侧肽组分分子量分布 对肽浓度 6 mg/mL 吸收 2 h 十二指肠部分大鼠肠囊浆膜侧活性肽 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定结果的 de novo 表活性肽分子量进行整理总结, 由图 6 可知, 大鼠外翻肠囊浆膜侧分子量 >2 kDa 的肽序列 102 条, 分子量 1~2 kDa 的肽序列 6607 条, 分子量 0.5~1 kDa 的肽序列 16543 条, <0.5 kDa 的肽序列 2590 条, 大鼠肠囊浆膜侧核桃肽序列平均分子量 792 Da, 分子量 584 Da 的肽序列居多, 表明核桃肽在穿过大鼠小肠时发生分解, 大分子长肽与消化酶结合位点多于小分子肽, 因此大分子肽更易被分解为小分子短肽, 更有利于小肠吸收而发挥其活性。

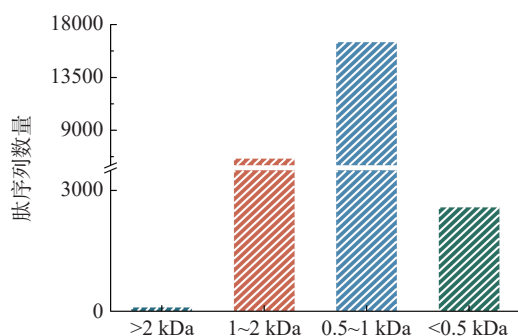


图 6 大鼠外翻肠囊浆膜侧不同分子量肽序列数量分布

Fig.6 Number distribution of peptide sequences with different molecular weights on serosal side of everted rat sacs

对肽浓度 6 mg/mL 吸收 2 h 十二指肠部分大鼠肠囊浆膜侧活性肽 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定结果的 de novo 表活性肽末端氨基酸组成进行整理总结, 由表 1 可知, 暴露于 C 端/N 端的 Pro、Thr、Leu 数量明显高于其他氨基酸, 表明肽经过消化吸收过程,

表 1 大鼠外翻肠囊浆膜侧肽序列末端氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition at the end of serosal side peptide sequence of everted rat sacs

氨基酸种类	C端氨基酸数量	N端氨基酸数量
Ala	2208	657
Cys	0	0
Asp	846	233
Glu	2216	1727
Phe	1224	476
Gly	482	474
His	238	1068
Ile	0	0
Lys	2222	2256
Leu	3493	2745
Met	619	577
Asn	751	828
Pro	1089	8796
Gln	800	1785
Arg	377	620
Ser	1183	582
Thr	5018	1262
Val	1865	1425
Trp	713	199
Tyr	319	107

与疏水性氨基酸相连的肽键更容易断裂, 疏水性氨基酸含量增加可能是其抗氧化能力提高的原因, 姜颖俊等<sup>[33]</sup>研究了绿豆抗氧化肽的制备, 也证明了绿豆肽的抗氧化活性与其氨基酸组成及疏水性结构密切相关。Chen 等<sup>[34]</sup>研究发现, His、Cys、Pro、Tyr、Lys 和 Arg 等是抗氧化肽中常见的氨基酸组成。因此, 活性肽抗氧化能力与疏水性氨基酸组成密切相关。

对肽浓度 6 mg/mL 吸收 2 h 十二指肠部分大鼠肠囊浆膜侧活性肽 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定结果的 de novo 表活性肽氨基酸组成进行整理总结。表 2 表明与肠囊黏膜侧肽序列对比后, 在肠囊浆膜侧鉴定出的 33 条可被小肠完整吸收的核桃源新型肽的 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定结果, 肽链长度方面, 共对比筛选出五肽 20 条, 四肽 7 条, 六肽 3 条, 七肽、九肽、十肽各 1 条; 氨基酸组成方面, 疏水性氨基酸显著多于亲水性氨基酸, 表明含有疏水性氨基酸短肽可能更有利于肽在小肠完整形式吸收。

综上, 活性肽的分子量随着消化吸收的进行而降低, 疏水性氨基酸等不断暴露。Beau 等<sup>[35]</sup>证明了低分子量(<1 kDa)肽具有高抗氧化活性, 这可能是由于低分子量肽更有利于人体肠道吸收。同时氨基酸组成也是影响肽抗氧化活性的关键因素。Chi 等<sup>[36]</sup>报道了疏水性氨基酸含量高的肽可以通过与细胞膜的疏水性相互作用顺利进入靶器官, 其丰富的电子可以用于淬灭自由基。因此, 低分子量且疏水性氨基酸含量高的短肽可能具有较高的抗氧化活性。

## 2.5 分子对接探究核桃肽与 DPP-IV 相互作用及抗氧化肽筛选鉴定

2.5.1 核桃肽与 DPP-IV 相互作用 有研究证实肽链中疏水性氨基酸对其抗氧化活性贡献最大, 且 P、

表 2 小肠完整形式吸收的核桃源新型肽 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定

Table 2 Identification of novel peptide from walnut in intestinal intact absorption by Nano-HPLC-MS/MS

氨基酸组成	氨基酸个数	疏水性氨基酸	亲水性氨基酸	分子量	C端/N端
Thr-Val-Pro-Lys	4	Val, Pro	Thr, Lys	443.2744	Thr/Lys
Trp-Leu-Pro-Phe	4	Trp, Leu, Pro, Phe	-	561.2951	Trp/Phe
Leu-Gly-Pro-Gln	4	Leu, Gly, Pro	Gln	413.2274	Leu/Gln
Trp-Ser-Pro-Lys	4	Trp, Pro	Ser, Lys	516.2697	Trp/Lys
Leu-Leu-Val-Arg	4	Leu, Val	Arg	499.3482	Leu/Arg
Leu-Gln-Pro-Val	4	Leu, Pro, Val	Gln	455.2744	Leu/Val
Arg-Pro-Trp-Gln	4	Pro, Trp	Arg, Gln	585.3023	Arg/Gln
Glu-Phe-Arg-Pro-Gin	5	Phe, Pro	Glu, Arg, Gln	409.2001	Glu/Gln
Lys-Leu-Phe-Pro-Leu	5	Leu, Phe, Pro	Lys	539.2139	Lys/Leu
Leu-Gly-Leu-Pro-Phe	5	Leu, Gly, Pro, Phe	-	545.3213	Leu/Phe
Met-Leu-Leu-Phe-Val	5	Met, Phe, Val	-	571.3403	Met/Val
Gln-Leu-Glu-Pro-Arg	5	Leu, Pro	Gln, Glu, Arg	641.3497	Gln/Arg
Tyr-Trp-Ser-Pro-Lys	5	Trp, Pro	Tyr, Ser, Lys	679.3329	Tyr/Lys
Phe-Gln-Leu-Pro-Arg	5	Phe, Leu, Pro	Gln, Arg	659.3755	Phe/Arg
Lys-Leu-Leu-Pro-Leu	5	Leu, Pro	Lys	582.4105	Lys/Leu
Leu-Pro-Leu-Leu-Glu	5	Leu, Pro	Glu	583.3581	Leu/Glu
Met-Pro-Leu-Asp-Val	5	Met, Pro, Leu, Val	Asp	686.3673	Met/Leu
Arg-Leu-Val-Pro-Arg	5	Leu, Val, Pro	Arg	639.418	Arg/Arg
Val-Ala-Leu-Pro-Leu	5	Val, Ala, Leu, Pro	-	511.337	Val/Leu
His-Val-Leu-Gly-Leu	5	Val, Leu, Gly	His	537.3275	His/Leu
Lys-Leu-Leu-Pro-Gln	5	Leu, Pro	Lys, Gln	597.3849	Lys/Gln
Leu-Leu-Arg-Pro-Val	5	Leu, Pro, Val	Arg	596.4009	Leu/Val
Tyr-Asp-Leu-Pro-His	5	Leu, Pro	Tyr, Asp, His	643.2966	Tyr/His
Val-Leu-Arg-Pro-Arg	5	Val, Leu, Pro	Arg	639.418	Val/Arg
Lys-Leu-Pro-Leu-Leu	5	Leu, Pro	Lys	582.4105	Lys/Leu
Leu-Arg-Phe-Pro-Leu	5	Leu, Phe, Pro	Arg	644.4009	Leu/Leu
Val-Val-Asp-Leu-His	5	Val, Leu	Asp, His	581.3173	Val/His
Leu-Pro-Glu-Asp-Val-Leu	6	Leu, Pro, Val	Glu, Asp	684.3694	Leu/Leu
Asn-Leu-Arg-Phe-Pro-Leu	6	Leu, Phe, Pro	Asn, Arg	758.4439	Asn/Leu
Trp-Ser-Pro-Ser-Gly-Arg	6	Pro, Gly	Trp, Ser, Arg	688.3293	Trp/Arg
Lys-Gly-His-Leu-Phe-Pro-Asn	7	Gly, Leu, Phe, Pro	Lys, His, Asn	853.4446	Lys/Asn
Asn-Pro-Asp-Asp-Glu-Phe-Arg-Pro-Gln	9	Pro, Phe	Asn, Asp, Glu, Arg, Gln	1116.4835	Asn/Gln
Ser-Leu-Pro-Asn-Phe-Gln-Pro-Ala-Pro-Met	10	Leu, Pro, Phe, Ala, Met	Ser, Asn, Gln	1116.5273	Ser/Met

注: 按照活性肽组成氨基酸个数由小到大顺序进行排序。

表 3 可完整形式吸收多肽与 DPP-IV 分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of absorbable peptides and DPP-IV

氨基酸序列	长度	分子量(Da)	稳定性	置信度(%)	结合能(kcal/mol)
GNPDDEFPRQ	10	1260.5371	稳定	85	-8.1
SLPNFQPAPM	10	1116.5273	不稳定	84	-7.9
IRPDEDRQE	9	1243.5792	不稳定	75	-6.7
NPDDEFPRQ	9	1116.4835	稳定	99	-8.6
NIPDTIAR	8	926.4821	不稳定	75	-7.7
KGHLFPN	7	794.4075	稳定	99	-8.6
SERPSYS	7	824.3664	稳定	70	-8.3
SPDQSYL	7	809.3443	不稳定	78	-6.6
VLLPSPK	7	752.4796	不稳定	97	-6.8
TVPGHFE	7	785.3708	稳定	85	-8.3
EPDVALL	7	755.4065	不稳定	80	-7.6
NLRFPL	6	758.4439	稳定	99	-8.8
QVRLPR	6	767.4766	稳定	77	-8
KLLPL	5	582.4105	不稳定	96	-7.3
KLPLL	5	582.4185	不稳定	90	-7.1
EVDL	4	474.2325	不稳定	76	-6.1
AGVF	4	392.2059	不稳定	82	-7.5
AGVI	4	358.2216	不稳定	64	-7.1
EFL	3	407.2056	不稳定	81	-6.7
IDF	3	393.1943	不稳定	94	-7.2
FDL	3	393.1902	不稳定	73	-7.5
IPR	3	384.2485	不稳定	84	-6.5
IPF	3	375.2158	不稳定	63	-7.5
EII	3	373.2213	不稳定	88	-6.5
EIL	3	373.2213	不稳定	92	-6.9
LDL	3	359.2056	不稳定	96	-6.1
IDL	3	359.2056	不稳定	71	-6.4
MPI	3	359.1879	不稳定	76	-5.5
FPF	3	409.2001	不稳定	60	-7.8

L、N、H 是抗氧化肽的特征性氨基酸, C 端第三个氨基酸为 W、Y、F、M、L、I 的肽链结构也有助于增强多肽抗氧化活性<sup>[37]</sup>。因此, 对肽浓度 6 mg/mL 吸收 2 h 十二指肠部分大鼠肠囊浆膜侧活性肽进行 Nano-HPLC-MS/MS 鉴定得到表 2 中 33 条小肠可完整形式吸收的核桃源新型肽, 从中选取 29 条具有特征性氨基酸的肽序列, 与 DPP-IV 进行分子对接得到表 3 结果。如表 3 所示, 3 条含有脯氨酸的肽 NLRFPL、KGHLFPN 和 NPDDEFPRQ 与 DPP-IV 的结合能最低分别为-8.8、-8.6 和-8.6 kcal/mol, 因此, NLRFPL、KGHLFPN 和 NPDDEFPRQ 是能够与 DPP-IV 位点结合的最稳定肽序列。陈静等<sup>[38]</sup>研究发现, 乳源肽中含有脯氨酸的肽 LPLP 和 QEPV 是通过与 DPP-IV 活性部位结合发挥其活性作用, 并推断含脯氨酸多肽的构型与 DPP-IV 活性位点结合相关。因此, NLRFPL、KGHLFPN 和 NPDDEFPRQ 具有脯氨酸(P)、特征疏水性氨基酸(L、N、H), 推测其抗氧化活性可能高于其他肽序列。

2.5.2 活性肽抗氧化能力测定 选取 0.2 mg/mL 的肽浓度, 分别对 3 种 DPP-IV 结合稳定的肽进行了抗氧化能力测定。由图 7A 可知, 以 GSH 为阳性对照, 3 种肽的 DPPH 自由基清除率分别为 KGHLFPN (66.32%±1.03%)、NLRFPL(60.21%±1.96%)、NPDD-



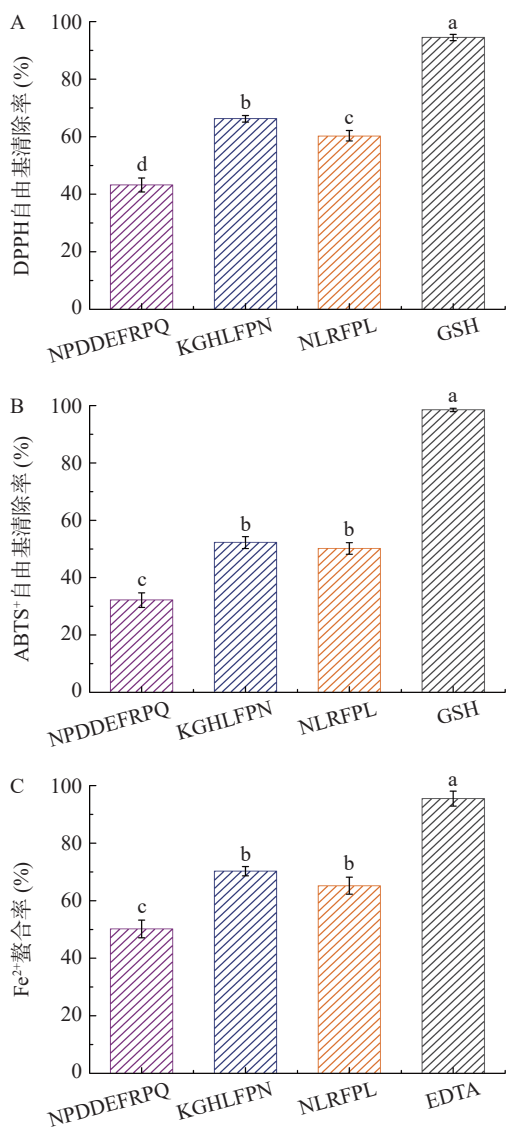


图7 DPP-IV 结合肽抗氧化能力测定

Fig.7 Determination of antioxidant capacity of DPP-IV binding peptide

EFRPQ(43.25%±2.43%), KGHLFPN 的 DPPH 自由基清除能力显著高于 NPDDEFPRQ 和 NLRFPPL( $P < 0.05$ )。由图 6B 可知, 3 种肽的 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率分别为 KGHLFPN(52.32%±2.03%)、NLRFPPL(50.21%±1.99%)、NPDDEFPRQ(32.25%±2.43%), KGHLFPN 的 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力显著高于 NPDDEFPRQ( $P < 0.05$ ), 略高于 NLRFPPL 但无显著差异( $P > 0.05$ )。由图 6C 可知, 以 EDTA 为阳性对照, 3 种肽的 Fe<sup>2+</sup>螯合率分别为 KGHLFPN(70.32%±1.53%)、NLRFPPL(65.21%±2.98%)、NPDDEFPRQ(50.25%±3.03%), KGHLFPN 的 Fe<sup>2+</sup>螯合能力显著高于 NPDDEFPRQ( $P < 0.05$ ), 略高于 NLRFPPL 但无显著差异( $P > 0.05$ )。因此, KGHLFPN 是抗氧化活性最佳的肽序列。

### 3 结论

本实验通过大鼠外翻肠囊法和抗氧化能力测定(DPPH 自由基清除率、ABTS<sup>+</sup>自由基清除率、Fe<sup>2+</sup>螯合率), 利用 Nano-HPLC-MS/MS 和模拟分子对接技

术, 筛选出核桃肽的小肠吸收最优条件为核桃肽消化产物浓度 6 mg/mL, 吸收时间为 2 h, 并筛选出与 DPP-IV 结合稳定且抗氧化能力最佳的核桃源肽 KGHLFPN, 为促进功能因子在小肠吸收进入血液循环作用于其靶点器官发挥生理活性奠定理论基础, 为开发小肠高效吸收的核桃源抗氧化肽提供理论参考。然而, 本研究并未继续探索核桃肽 KGHLFPN 的吸收机制, 因此核桃肽 KGHLFPN 吸收途径及吸收通路还有待进一步研究, 同时对核桃肽 KGHLFPN 的体内生理活性功能有待进一步探索。

### 参考文献

[1] ONUH J O, ALUKO R E. Metabolomics as a tool to study the mechanism of action of bioactive protein hydrolysates and peptides: A review of current literature[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91: 625-633.

[2] CHATTERTON D E W, RASMUSSEN J T, HEEGAARD C W, et al. *In vitro* digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(7-8): 373-383.

[3] 王丽雪, 解玉怀, 张桂国. 植物源性抗氧化剂的应用及其作用机制[J]. 动物营养学报, 2017, 29(5): 1481-1488. [WANG Lixue, XIE Yuhuai, ZHANG Guigu. Application and mechanism of phytogetic antioxidant[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(5): 1481-1488.]

[4] 王波. 酪蛋白抗氧化肽结构特征对其生物利用度的影响及其跨膜转运机制的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016. [WANG Bo. Effects of structural characteristics of casein antioxidant peptides on their bioavailability and transmembrane transport mechanism[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.]

[5] LACROIX I M E, CHEN X M, KITTS D D, et al. Investigation into the bioavailability of milk protein-derived peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity using Caco-2 cell monolayers[J]. Food & Function, 2017, 8(2): 701-709.

[6] HUANG F, NING M, WANG K, et al. Discovery of highly polar  $\beta$ -homophenylalanine derivatives as nonsystemic intestine-targeted dipeptidyl peptidase IV inhibitors[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 62(23): 10919-10925.

[7] 郑天鹏, 陈钰洁. 二肽基肽酶IV的分子生物学特点及其与免疫系统的关系研究进展[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(12): 1831-1834. [ZHENG Tianpeng, CHEN Yujie. Molecular characteristics of dipeptidyl peptidase IV and its relationship with immune system[J]. Modern Medicine and Hygiene, 2020, 36(12): 1831-1834.]

[8] 田文慧. 啤酒中血管紧张素转化酶及二肽基肽酶-IV抑制肽的筛选及活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2021. [TIAN Wen Hui. Screening and activity of angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptide in beer[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2021.]

[9] SUZUKI Y, ERICKSON R H, SEDLMAYER A, et al. Dietary regulation of rat intestinal angiotensin-converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1993, 264(6): G1153-G1159.

[10] 赵雪莉, 汪水平, 马春林, 等. 氧化应激对机体的危害及小檗碱的调控作用[J]. 饲料研究, 2019, 42(2): 99-103. [ZHAO Xueli, WANG Shuiping, MA Chunlin, et al. Effects of oxidative stress on the body and the regulation of Berberine[J]. Feed Research, 2019, 42(2): 99-103.]

[11] 郑东栋. 叔丁基过氧化氢诱导内皮细胞氧化应激损伤及细胞凋亡: NF- $\kappa$ B1/miR-144-3p/FOXO1 轴的作用[D]. 长春: 吉林大学

- 学, 2022. [ZHENG Dongdong. Oxidative stress injury and pyrodeath of endothelial cells induced by tert-butyl hydrogen peroxide: Role of NF- $\kappa$ B1/miR-144-3p/FOXp1 axis[D]. Changchun: Jilin University, 2022. ]
- [ 12 ] 焦雪. 血红素加氧酶-1 对香烟烟雾提取物诱导慢性肺阻塞性肺疾病的调控作用及机制研究[D]. 北京: 中国医科大学, 2022: 49-59. [ JIAO Xue. Regulation and mechanism of heme oxygenase-1 on chronic pulmonary obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke extract[D]. Beijing: China Medical University, 2022: 49-59. ]
- [ 13 ] LOBO V, PATIL A, PHATAK A, et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health[J]. *Pharmacognosy Reviews*, 2010, 4(8): 118-125.
- [ 14 ] YANG J, FANG L, LU H, et al. Walnut-derived peptide enhances mitophagy via JNK-mediated PINK1 activation to reduce oxidative stress in HT-22 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(8): 2630-2642.
- [ 15 ] ZHAO F, LIU C, FANG L, et al. Walnut-derived peptide activates PINK1 via the NRF2/KEAP1/HO-1 pathway, promotes mitophagy, and alleviates learning and memory impairments in a mice model[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(9): 2758-2772.
- [ 16 ] 王薇, 李亚娟, 蒋悦, 等. 核桃蛋白的酶解及脱色工艺优化[J]. *粮油食品科技*, 2022, 30(3): 105-112. [ WANG Wei, LI Yajuan, JIANG Yue, et al. Enzymatic hydrolysis and decolorization of Walnut protein[J]. *Science and Technology of Grain, Oil and Food*, 2022, 30(3): 105-112. ]
- [ 17 ] SARMENTO B, ANDRADE F, SILVA S B, et al. Cell-based *in vitro* models for predicting drug permeability[J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2012, 8(5): 607-621.
- [ 18 ] YANG H, ZHAI B, FAN Y, et al. Intestinal absorption mechanisms of araloside A in situ single-pass intestinal perfusion and *in vitro* Caco-2 cell model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106: 1563-1569.
- [ 19 ] SWAAN P W. Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways[J]. *Pharmaceutical Research*, 1998, 15: 826-834.
- [ 20 ] BRONNER F. Calcium absorption—a paradigm for mineral absorption[J]. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128(5): 917-920.
- [ 21 ] 邱燕燕, 余算, 原琦, 等. 猕猴桃籽油抗氧化活性及其脂肪酸组分的研究[J]. *农产品加工*, 2022(14): 1-4, 9. [ QIU Yanyan, YU Qian, YUAN Qi, et al. Study on antioxidant activity and fatty acid components of kiwifruit seed oil[J]. *Agricultural Products Processing*, 2022(14): 1-4, 9. ]
- [ 22 ] GAMBINI J, INGLÉS M, OLASO G, et al. Properties of resveratrol: *In vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015: 2-10.
- [ 23 ] BOISEN S, EGGUM B O. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals[J]. *Nutrition Research Reviews*, 1991, 4(1): 141-162.
- [ 24 ] 李涛, 刘婷, 周琼. 红藜种子黄酮物质的提取及体外抗氧化活性测定[J]. *湖北农业科学*, 2022, 61(18): 173-179. [ LI Tao, LIU Ting, ZHOU Qiong. Extraction of flavonoids from seeds of *Ceratoides chinensis* and determination of antioxidant activity *in vitro* [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2022, 61(18): 173-179. ]
- [ 25 ] 丁龙. 蛋清肽结构鉴定与完整吸收的构效关系研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018: 53-60. [ DING Long. Study on structure-activity relationship between structure identification and complete absorption of egg white peptide[D]. Changchun: Jilin University, 2018: 53-60. ]
- [ 26 ] 刘威. 核桃清蛋白及其抗氧化肽的分离纯化与功能性质研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017: 10-19. [ LIU Wei. Separation, purification and functional properties of Walnut albumin and its antioxidant peptides[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2017: 10-19. ]
- [ 27 ] YANG Y, TAO G, LIU P, et al. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(19): 7891-7895.
- [ 28 ] SONG W, KONG X, HUA Y, et al. Antioxidant and antibacterial activity and *in vitro* digestion stability of cottonseed protein hydrolysates[J]. *LWT*, 2020, 118: 108-120.
- [ 29 ] ZHANG J, LI M, ZHANG G, et al. Identification of novel antioxidant peptides from snakehead (*Channa argus*) soup generated during gastrointestinal digestion and insights into the anti-oxidation mechanisms[J]. *Food Chemistry*, 2021, 337: 179-191.
- [ 30 ] WEI G, ZHAO Q, WANG D, et al. Novel ACE inhibitory, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides identified from fermented rubbing cheese through peptidomic and molecular docking[J]. *LWT*, 2022, 159: 113-196.
- [ 31 ] 关海宁, 徐筱君, 孙薇婷, 等. 超高压协同酶法条件下不同分子量大豆分离蛋白水解肽乳化性及抗氧化性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(12): 3780-3786. [ GUAN Haining, XU Xiaojun, SUN Weiting, et al. Study on the emulsification and antioxidant activity of hydrolytic peptides of soybean protein isolate with different molecular weights under ultra-high pressure coenzyme method[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2022, 13(12): 3780-3786. ]
- [ 32 ] LIU M C, YANG S J, HONG D, et al. A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates[J]. *Chemistry Central Journal*, 2016, 10(1): 1-11.
- [ 33 ] 姜颖俊, 冯玉超, 张舒, 等. 绿豆抗氧化肽的制备及理化特性分析[J/OL]. *中国粮油学报*: 1-21 [2023-04-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2864.TS.20220610.1711.007.html>. [ JIANG Yingjun, FENG Yuchao, ZHANG Shu, et al. Preparation and physicochemical properties of antioxidant peptides from mung bean [J/OL]. *Journal of China Grain and Oil*: 1-21 [2023-04-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2864.TS.20220610.1711.007.html>. ]
- [ 34 ] CHEN N, YANG H, SUN Y, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates[J]. *Peptides*, 2012, 38(2): 344-349.
- [ 35 ] BEAU I, BERGER A, SERVIN A L. Rotavirus impairs the biosynthesis of brush-border-associated dipeptidyl peptidase IV in human enterocyte-like Caco-2/TC7 cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(3): 779-789.
- [ 36 ] CHI C F, CAO Z H, WANG B, et al. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight[J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 11211-11230.
- [ 37 ] WATTANASIRITHAM L, THEERAKULKAIT C, WICKRAMASEKARA S, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein[J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 156-162.
- [ 38 ] 陈静, 李婉如, 李阜烁, 等. 三种乳源生物活性肽的二肽基肽酶-IV抑制活性研究[J]. *中国乳品工业*, 2018, 46(2): 4-8. [ CHEN Jing, LI Wanru, LI Fusuo, et al. Study on the inhibitory activity of dipeptidyl peptidase IV of three milk bioactive peptides[J]. *China Dairy Industry*, 2018, 46(2): 4-8. ]