

孙晨松, 陈雯祺, 陈盈盈, 等. 基于分子对接虚拟筛选含酪氨酸残基的 ACE 抑制三肽 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 20–27. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030111

SUN Chensong, CHEN Wenqi, CHEN Yingying, et al. Virtual Screening of ACE Inhibitory Tripeptides Containing Tyrosine Residues Based on Molecular Docking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 20–27. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030111

· 未来食品 ·

基于分子对接虚拟筛选含酪氨酸残基的 ACE 抑制三肽

孙晨松, 陈雯祺, 陈盈盈, 王 硕, 游清徽*
(江西师范大学生命科学学院, 江西南昌 330022)

摘要:为获得含酪氨酸残基的 ACE 抑制三肽, 借助在线 Novopro 数据库构建 C 端为酪氨酸的三肽进行虚拟筛选, 得到具有 ACE-C 结构域选择性抑制的三肽, 预测其生物活性、水溶性、肠胃吸收性、代谢和毒性等性质, 运用分子对接计算出与血管紧张素转化酶 (angiotensin-I converting enzyme, ACE) 具有高度亲和力的四种 ACE 抑制肽 RWY、FRY、YRY 和 RFY 并进行体外 ACE 抑制活性测定, 探讨结合位点与作用关系。结果表明, 经筛选得到的四种三肽 RWY、FRY、YRY、RFY 具有明显的 ACE 抑制活性, IC_{50} 值分别为 228.67、113.10、272.61、101.00 $\mu\text{mol/L}$ 。分子对接虚拟结果显示, RWY、FRY、YRY、RFY 均与 S_1' 口袋高度亲和, 产生氢键相互作用, 其中与 S_1' 口袋结合产生 2 条氢键的 RFY 的抑制效果最佳。本文利用生物信息学原理, 针对性筛选 ACE-C 结构域选择性抑制的酪氨酸三肽, 为 ACE 抑制肽的高速筛选提供新的可能性。

关键词:酪氨酸, ACE-C 结构域, ACE 抑制三肽, 分子对接

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)16-0020-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030111

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

SUN Chensong, CHEN Wenqi, CHEN Yingying, WANG Shuo, YOU Qinghui*

(College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: In order to obtain ACE inhibitory tripeptides containing tyrosine residues, the online Novopro database was used to construct tripeptides with tyrosine at the C-terminus for virtual screening to obtain tripeptides with selective inhibition of ACE-C domains, and predict their biological activity, water solubility, gastrointestinal absorbability, metabolism, and toxicity and other properties. The four ACE inhibitor peptides with high affinity to angiotensin-converting enzyme (ACE) were calculated by molecular docking, and the *in vitro* ACE inhibitory activity was determined to explore the relationship between binding sites and effects. The results showed that the four selected tripeptides RWY, FRY, YRY, and RFY had significant ACE inhibitory activity, with IC_{50} values of 228.67, 113.10, 272.61, and 101.00 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The virtual results of molecular docking showed that RWY, FRY, YRY, and RFY all had high affinity with S_1' pocket and produce hydrogen bond interactions. Among them, RFY combined with S_1' pocket to produce two hydrogen bonds had the best inhibitory effect. This article used bioinformatics principles to screen tyrosine tripeptides selectively inhibited by the ACE-C domain, providing new possibilities for high-speed screening of ACE inhibitor peptides.

Key words: tyrosine; ACE-C domain; ACE inhibitory tripeptide; molecular docking

收稿日期: 2021-03-10

基金项目: 国家科技重大专项子课题 (2018ZX09721002-008); 国家自然科学基金项目 (41967055); 江西省教育厅科学研究项目 (GJJ170199); 江西师范大学教学改革研究课题 (JXSDJG16078)。

作者简介: 孙晨松 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能性多糖和寡糖的制备以及生物学活性研究, E-mail: 1227650147@qq.com。

* 通信作者: 游清徽 (1978-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 壳聚糖药用辅料的制备及应用研究, E-mail: qinghuiyou@jxnu.edu.cn。

血管紧张素转化酶(angiotensin-I converting enzyme, ACE)是一种金属肽酶,具有调控人体血压的特殊作用,在哺乳动物各类组织和血浆中大量存在,尤其广泛分布于肺,脑,肾及雄性动物的性器官中^[1]。因其在调节血压中具有重要作用,近年来深受研究人员的青睐。ACE 抑制剂被报道能有效控制高血压,并应用于药物研发。但目前市面上已被注册的 ACE 抑制剂药物大多为化工合成,如赖诺普利、卡托普利、贝那普利等,这些药物成本高、对环境不友好,并且效能有限,临床上经常引起味觉障碍、皮疹、肾功能异常等不良反应^[2]。因此,鉴于对环境友好和人体安全考虑,寻找更具优势的 ACE 抑制剂刻不容缓。

目前关于 ACE 抑制剂研究的焦点是食源性多肽,食源性多肽因强大的生物活性及较低的毒副作用等性质而被大量应用于生物学实验,但由于机体的酶解消化作用使多肽的结构发生改变影响了多肽的稳定性,导致食源性多肽的体内 ACE 抑制活性不显著^[3]。肠腔内的代谢活性是限制肽类药物吸收的主要障碍;同时,机体的自我更新、调节和稳定限制了多肽类生物大分子的进入,相比之下亚单位足够小的短肽(二肽、三肽)更容易被机体吸收^[4]更利于机体各类组织器官的利用。ACE 具有同源性高度相似的两个活性结构域:C-结构域和 N-结构域,且两者生物活性有所不同^[5-6],C-结构域具有更好的血压调节作用^[7]。已有研究表明 ACE 抑制剂的活性效果与 C-结构域前四个氨基酸序列有重要关联,且 C 端为 Tyr 或 Cys 为最优结构^[8],近期已有文献对二肽的含酪氨酸残基 ACE 抑制剂进行虚拟筛选^[9],但其种类相对较少,参考范围有限。因此本文为了获取更广泛的数据支撑,在张钦^[9]的研究基础上,借助 NovoPro 工具,模拟人体内环境,筛选出 C-结构域特异性抑制且含酪氨酸残基的三肽,对其体外活性进行评估,并运用分子对接找到其结合靶点,阐明作用机制。为 ACE 抑制剂的研发提供更全面的数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

血管紧张素转化酶(ACE) 美国 Sigma-Aldrich 公司; N-[3-(2-咪喃基)丙烯酰]-L-苯丙氨酸甘氨酸(FAPGG)、活性肽(纯度 80%) 生工生物工程(上海)股份有限公司; 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 上海阿达玛斯公司。

SpectraMAX M2 多功能酶标仪 美国 Molecular Devices 公司; SPX-60BSH 生化培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司; XW-80A 旋涡混合器 海门市其林贝尔制造有限公司; LeDock 分子对接软件 南京大学; 电子天平 AUW120D 日本岛津公司; 紫外检测专用酶标板 德国 Greiner 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 C 端含酪氨酸的三肽配体库的建立 在 Novo-pro 数据库 (<https://www.novoprolabs.com/tools/con->

[vert-peptide-to-smiles-string](https://www.novoprolabs.com/tools/con-vert-peptide-to-smiles-string))^[10] 中得到所有末端为酪氨酸的三肽结构 SMILES 序列, MOE 软件^[11] 采用 Amber10:EHT 力场进行分子力学优化和能量优化并得到 mol2 格式文件,共 400 种。

1.2.2 分子对接 通过 PDB 数据库^[12] 获取人 ACE-赖洛普利复合物的三维结构数据(PDB ID:1O86)。首先去除配体结构,水分子和杂原子,再用 PDB2PQR 软件^[13] 和 VMD 软件^[14] 加氢修饰和优化,最终根据默认数值构建催化位点的对接口袋参数。以 C 端为酪氨酸的三肽为分子探针,利用 LeDock 软件^[15] 把构建的口袋参数与 ACE 受体进行分子对接。根据结合能结果筛选出 ACE 抑制的有效肽序列。

1.2.3 生物活性和水溶性预测 利用 PeptideRanker 在线系统^[16] 预测分子对接筛选评分高的三肽的潜在生物活性 (http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/peptideranker.php), 评分大于 0.5 则表示有生物活性,用 Innovagen 程序(<http://www.innovagen.com/proteomics-tools>)的“Peptide property calculator”工具预测前述有活性三肽的水溶性。

1.2.4 ADMET 性质预测 利用 admetSAR^[17-18] 预测生物活性大于 0.5 且水溶性好的三肽的 ADMET (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSar1/predict/>) 性质,主要包括人体肠道吸收(human intestinal absorption, HIA)、血脑屏障穿透(blood-brain barrier penetration, BBB)和急性口服毒性。将筛选得到具有良好生物活性、水溶性和 ADMET 性质的活性肽与在线数据库 BIOPEP-UWM 和 AHTPDB (<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/>)中已被收录的 ACE 抑制肽进行对比,将未被研究报道的活性肽进行后续研究。

1.2.5 ACE 抑制肽的合成 采用 FMOC 固相合成^[19] 法制备肽 RWY、FRY、YRY 和 RFY。所得到的肽纯度为 80%,均经过脱盐处理。

1.2.6 肽的 ACE 抑制活性检测 利用多功能酶标仪测定 ACE 抑制活性。以 FAPGG 作为 ACE 底物,通过紫外专用酶标板在 340 nm 下测定吸光值,具体操作方法如骆琳等^[20] 稍作改进,配制缓冲液(80 mmol/L HEPES 300 mmol/L NaCl)并调节 pH 至 8.3。配制 1 mmol/L 的 FAPGG 作为底物,操作步骤如表 1。

表 1 ACE 抑制率的测定
Table 1 Determination of ACE inhibition rate

试剂	对照组(μL)	抑制组(μL)
ACE(0.1 U/mL)	40	40
FAPGG(1 mmol/L)	50	50
缓冲液	40	0
ACE抑制剂	0	40

添加各组组分后立即在 340 nm 下检测第一次吸光值,37 °C 恒温培养箱下反应 30 min 后测第二次吸光值,把对照组反应前后的吸光值差值记为 A,抑制组的差值记为 B,则肽的 ACE 抑制率 $Q(\%) = 100(A-B)/A \times 100$,测定不同浓度组分肽的 ACE 抑

制率, 每组平行至少做6次。

1.3 数据处理

多次重复实验过程, 利用 Microsoft Excel 和 Pymol 整理数据和作图并用 Spss Statistics 软件预测三肽 IC₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 C端含酪氨酸三肽对接结果及生物活性预测

根据 LeDock 分子对接结合能结果, 选取分值大于-9.5 的三肽, 在此基础上根据 ACE-赖洛普利复合物配体结合效率淘汰掉打分小于-0.294 的三肽, 最终得到了 77 个与 ACE 靶点结合较好的三肽。

PeptideRanker 服务器可预测肽是否有生物活性, 其评定结果越接近 1 则说明可能拥有用的生物活性越强, 其评定活性的最低标准为 0.5。因此, 从前述步骤筛选出的 77 个三肽中进一步淘汰 28 个, 余下 49 个具备生物活性潜能的三肽。利用 Innovagen 进行水溶性的筛选, 最终得到 12 个水溶性好的三肽结果见表 2。

2.2 三肽 ADMET 性质预测

admetSAR 是开源可读, 并且实时更新的数据库, 它可根据活性肽的 SMILES 序列预测其吸收、代谢和毒性等与环境 and 人类健康相关的性质。预测三肽的 ADMET 特性可作为有效的 ACE 抑制肽筛选

的重要依据。本次对三肽的血脑屏障渗透性(BBB)、胃肠吸收性(HIA)、Caco-2 通透性、药物毒性、艾姆斯毒性和致癌物进行了预测。三肽的 ADMET 特性的预测结果如表 3。

吸收和代谢是影响口服利用度的最重要因素, 更好的治疗药物, 不仅要有 BBB、HIA 和 Caco-2 通透性的正参数, 而且需要 5 种 CYP450 的代谢抑制参数^[21]。BBB 是保障中枢神经内环境稳定的重要结构, 其对进入脑组织的大部分物质具有选择和限制性, 因此所筛选的三肽必须具备良好的血脑屏障渗透性才能有效的发挥抑制作用^[22]。HIA 标志着三肽在体内的吸收利用程度。结果表明, 其中三肽 RWY、FRY、YRY、RFY、PRY 被标记为 BBB+, HIA+, 表明五种三肽血脑屏障渗透率高且胃肠吸收好。作为肠上皮细胞系中的重要细胞, Caco-2 细胞的研究与药物在机体内的代谢和吸收关系重大, 其渗透性越好, 越容易被机体利用^[23]。CYP450 是药物代谢中占据主导作用的酶, 若其被抑制, 则药物代谢减弱甚至对人体造成不良影响^[24]。上述五种三肽的 Caco-2 渗透性良好, 并且根据 CYP450 的预算值推测其均无毒, 此外也未检测出艾姆斯毒性和致癌物。最后将五种三肽与数据库 BIOPEP(<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/>)所发现的活性序列进行对比, 只有

表 2 肽序列打分、配体结合效率及生物活性评分

Table 2 Peptide sequence score, ligand binding efficiency and biological activity score

肽序列	自由能(kcal/mol)	配体结合效率	生物活性评分
RRY	-12.3	-0.353	0.54
RWY	-12.2	-0.322	0.92
FRY	-11.0	-0.313	0.94
RMY	-10.8	-0.338	0.74
CRY	-10.8	-0.362	0.79
YRY	-10.7	-0.296	0.58
RFY	-10.3	-0.296	0.94
PRY	-10.1	-0.325	0.76
RLY	-10.1	-0.316	0.55
GRY	-10.0	-0.357	0.73
MRY	-10.0	-0.314	0.77
RCY	-9.7	-0.323	0.75

表 3 肽序列 ADMET 性质预测

Table 3 Prediction of the properties of peptide sequence ADMET

肽序列	ADMET性质					
	BBB	HIA	Caco-2渗透性	药物毒性	艾姆斯毒性	致癌物
RRY	+	-	+	-	-	-
RWY	+	+	+	-	-	-
FRY	+	+	+	-	-	-
RMY	-	+	+	-	-	-
CRY	-	-	+	-	-	-
YRY	+	+	+	-	-	-
RFY	+	+	+	-	-	-
PRY	+	+	+	-	-	-
RLY	-	+	+	-	-	-
GRY	-	-	+	-	-	-
MRY	-	+	+	-	-	-
RCY	-	-	+	-	-	-

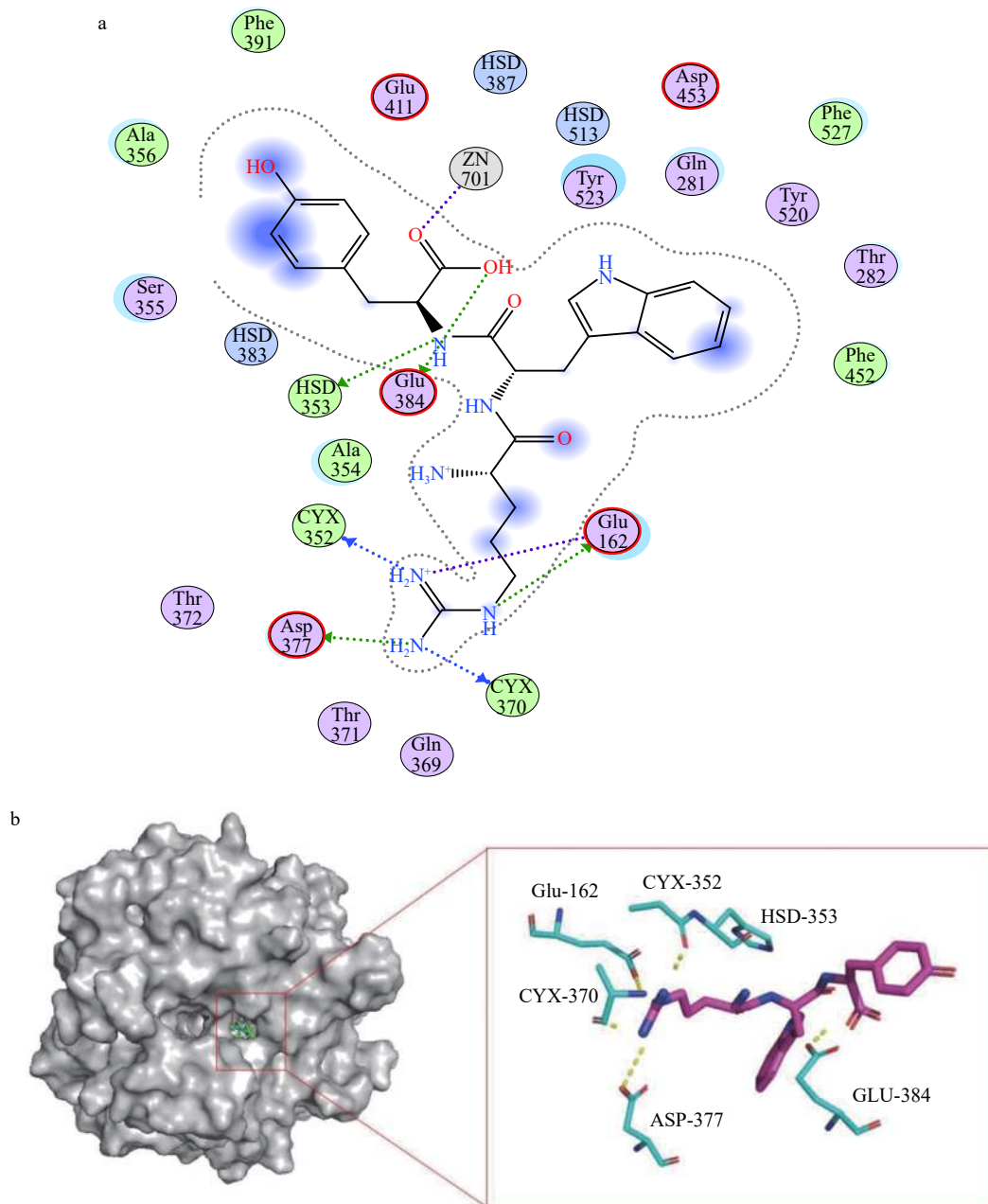


图 1 ACE 与 RWY 分子对接作用图

Fig.1 Diagram of molecular docking between ACE and RWY

注: a: 平面示意图; b: 3D 效果图及氢键; 图 2 ~ 图 4 同。

肽 PRY 被报道过是 ACE 抑制剂 IC_{50} 值为 $2.5 \mu\text{mol/L}$, 其余四种三肽均为首次发现的 ACE 抑制肽。经 Fmoc 固相合成的肽 RWY、FRY、YRY、RFY 利用多功能酶标仪检测 ACE 抑制率, FRY、RWY、RFY、YRY 的 IC_{50} 值分别为 113.10、228.67、101.00 和 $272.61 \mu\text{mol/L}$ 。

2.3 分子对接机制

一般而言, 根据对接分数和分值评定的高低不足以作为抑制活性唯一的验证标准^[25], 为进一步阐明分子间的相互作用机制, 本文利用 Pymol 软件对筛选出的四个三肽与 ACE 之间的相互作用结果进行了分析。

如图 1a 结果所示, 三肽 RWY 分别与 Glu162

($2.84\text{\AA}/2.91\text{\AA}$)、CYX352(2.61\AA)、CYX370(2.90\AA)、Asp377(3.58\AA)、HSD353(3.28\AA)、Glu384(2.59\AA) 这一系列 ACE 的氨基酸残基之间形成了 7 个距离不同的氢键, 其中与 Glu162 形成了 2 条重叠的氢键, 因此未在平面图显示完全, CYX 为二硫键参与的 Cys, HSD 为 His 的一种形态。RWY 与 Glu384 结合的键长最短, 键能最大, 结合最牢固。

如图 2a 所示, 三肽 FRY 与 HSD353(2.82\AA)、Glu384($3.51\text{\AA}/3.02\text{\AA}/3.29\text{\AA}$)、HSD387(2.66\AA)、Glu 411($3.74\text{\AA}/3.12\text{\AA}$)、Glu162(3.12\AA)、Glu376(2.60\AA)、Asp415($3.22\text{\AA}/2.81\text{\AA}$) 等这些氨基酸残基之间形成距离不同的 11 个氢键, 其中 Glu384 和 Asp415 残基分别都有两条氢键重叠。

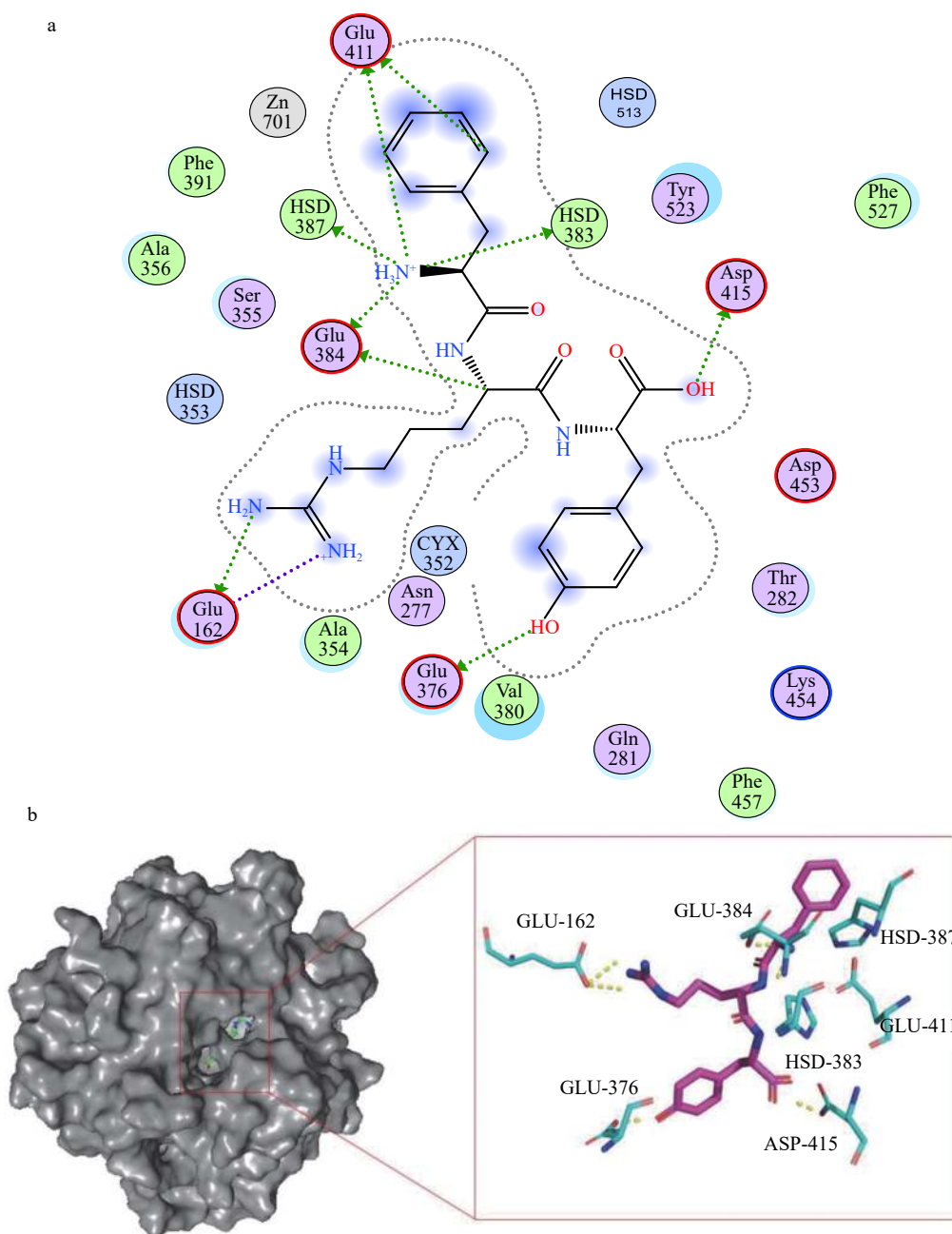


图2 ACE与FRY分子对接作用图

Fig.2 Diagram of molecular docking between ACE and FRY

如图3a结果所示,三肽YRY与HSD353(2.63Å/2.93Å)、Asp377(2.95Å)、Glu162(2.95Å)、Glu384(3.45Å)、Asp453(2.97Å)、HSD513(2.94Å)等这些氨基酸残基之间形成7条氢键。

如图4a结果所示,三肽RFY与氨基酸残基Glu162(2.64Å/3.13Å)、Cys370(2.62Å/2.89Å)、Asp377(3.10Å)、Ala356(2.69Å)之间形成6条氢键,并与His387(3.79Å)形成pi-pi共轭键。

已有大量研究表明,ACE存在三个活性口袋,即 S_1 、 S_2 和 S_1' ,氨基酸残基Ala354、Glu384和Tyr523存在于 S_1 口袋,Gln281、His353、Lys511、His513和Tyr520存在于 S_2 口袋,Glu162存在于 S_1' 口袋^[26-28];此外ACE的活性位点Zn(II)在影响ACE的活性中也起到重要作用,活性中心Zn(II)与His383、His387

和Glu411相互协调。肽和ACE残基通过主要的相互作用力(如范德华力)和某些次要的相互作用力(如氢键、疏水作用力和静电作用力)连接在一起,氢键是形成稳定肽ACE复合物的主要作用力^[29]。RWY和ACE的氨基酸残基Glu162、HSD353、Glu384之间形成4条氢键,说明RWY与 S_1' 口袋、 S_2 口袋和 S_1 口袋均有相互作用,FRY与氨基酸残基HSD383、HSD387、Glu411、Glu384和Glu162之间形成8条氢键,由此可知FRY通过Zn(II)中心、 S_1 和 S_1' 口袋抑制ACE活性,YRY则与残基HSD353、HSD513、Glu162和Glu384间构建5条氢键,与 S_2 、 S_1' 和 S_1 口袋存在相互作用,RFY与残基Glu162形成2条氢键,与His387形成pi-pi共轭键,则说明RFY和 S_1' 和 S_1 口袋存在相互作用。表4中列出了抑制肽,

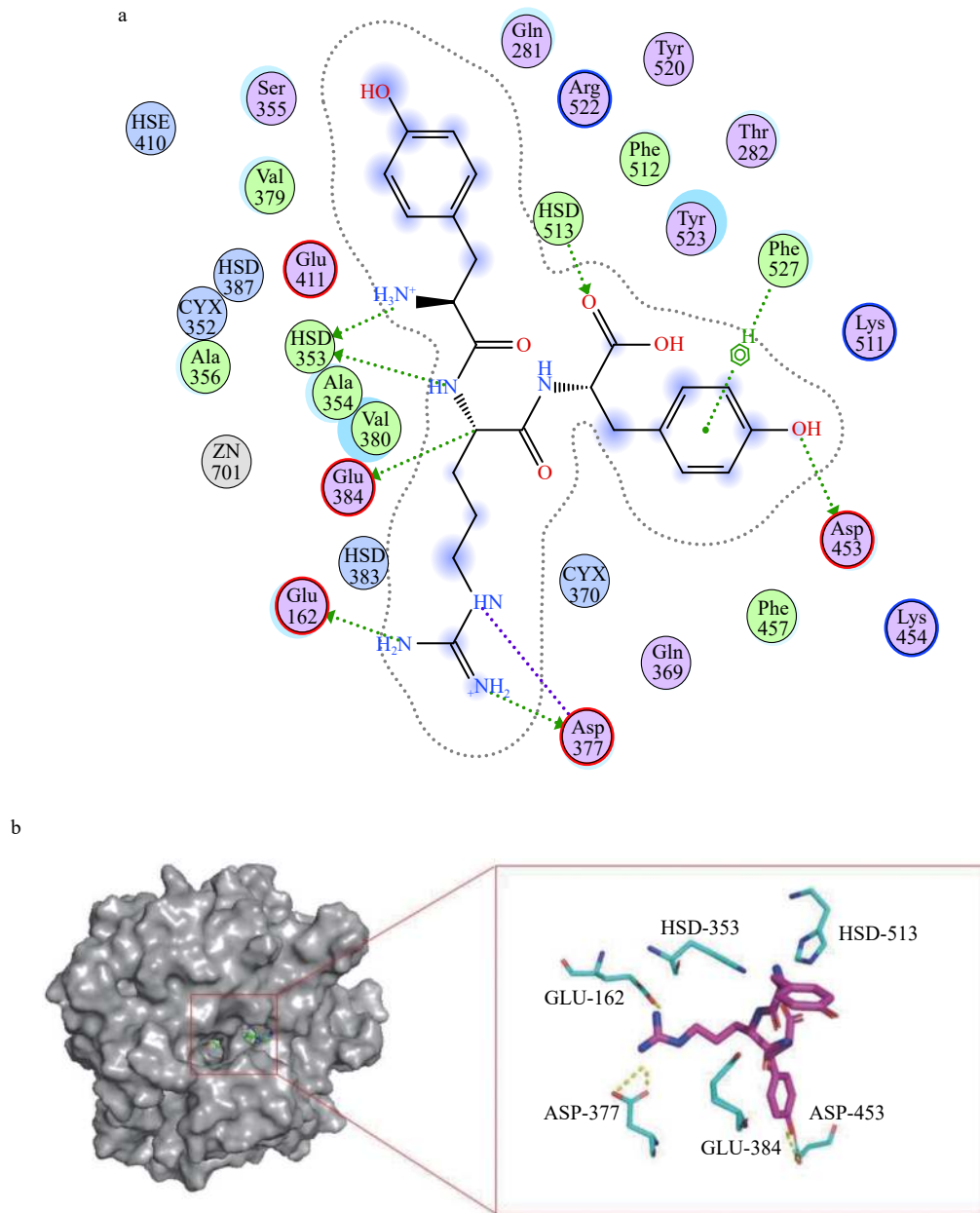


图 3 ACE 与 YRY 分子对接作用图

Fig.3 Diagram of molecular docking between ACE and YRY

表 4 赖诺普利、抑制肽与 ACE 口袋中氨基酸残基相互作用

Table 4 Lisinopril, inhibitory peptides interact with amino acid residues in the ACE pocket

活性口袋	ACE氨基酸残基	赖诺普利	RWY	FRY	YRY	RFY
S ₁	His383	+	-	+	-	-
	His387	+	-	+	-	+
	Glu411	+	-	+	-	-
	Ala354	+	-	-	-	-
	Tyr523	+	-	-	-	-
	Glu384	+	+	+	+	-
	Gln281	-	-	-	-	-
S ₂	His353	-	+	-	+	-
	Lys511	-	-	-	-	-
	His513	+	-	-	+	-
S ₁ '	Tyr520	+	-	-	-	-
	Glu162	-	+	+	+	+

注: “+”表示与ACE的氨基酸残基存在相互作用,“-”表示与氨基酸残基没有相互作用。

药物赖诺普利与口袋中氨基酸残基之间的相互作用, 筛选出的四种抑制肽都与 S₁'口袋相互作用, 且唯一

与 S₁'口袋形成 2 条氢键的 RFY 表现出最优体外 ACE 抑制活性, 说明 S₁'口袋可能在 ACE 抑制活性

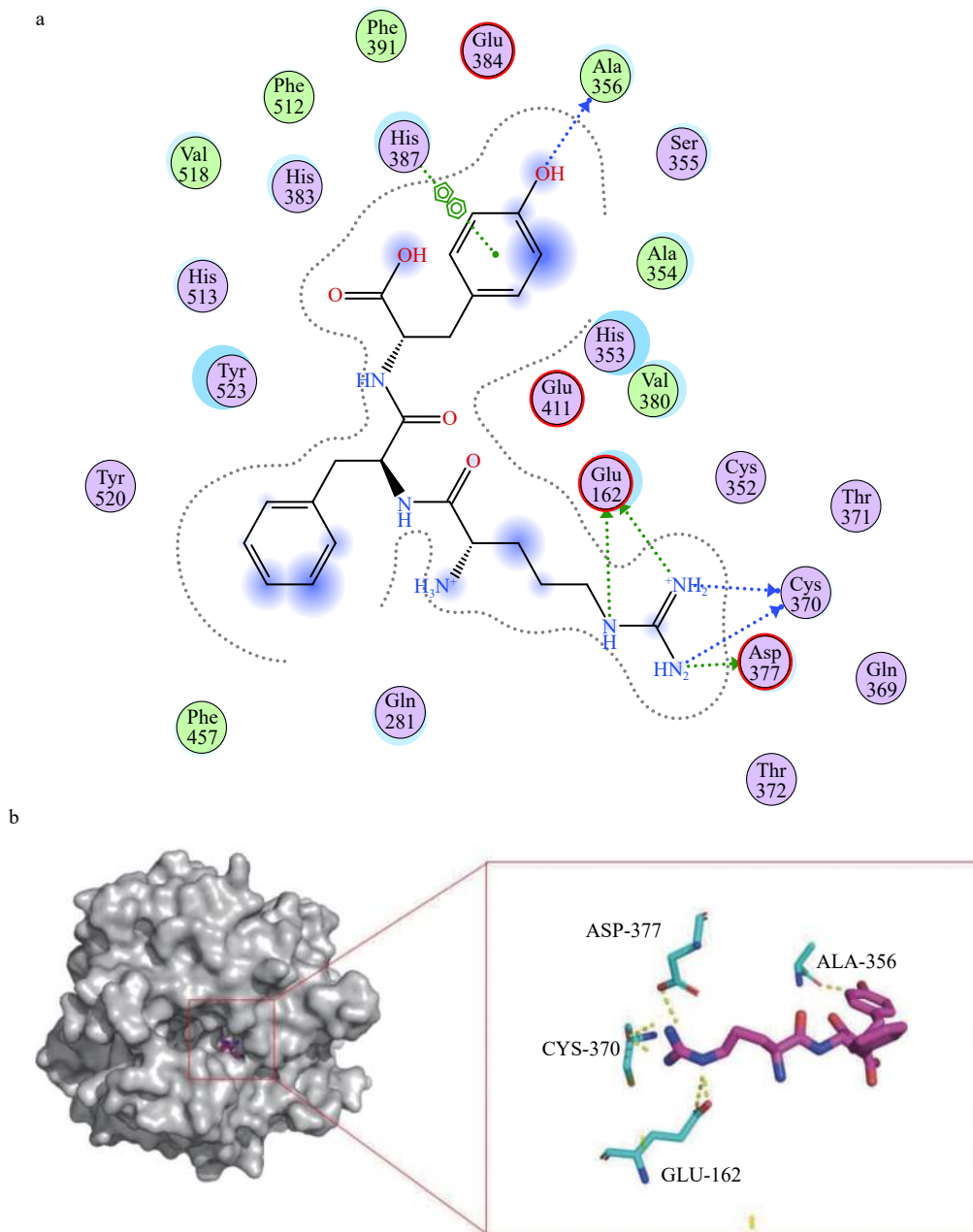


图 4 ACE 与 RFY 分子对接作用图

Fig.4 Diagram of molecular docking between ACE and RFY

中发挥重要作用,这与于志鹏等^[30]研究结果相似。虽然这些抑制肽的 ACE 抑制活性不及阳性药物赖诺普利($IC_{50}=1.2 \mu\text{mol/L}$)^[31],但相比于许多已发现的 ACE 活性短肽,如 IVF($IC_{50}=3390 \mu\text{mol/L}$)^[32],VKK($IC_{50}=1045 \mu\text{mol/L}$)^[33]筛选出的抑制肽仍具备很大优势。

3 结论

利用生物信息学手段,以 C 端为酪氨酸残基的 ACE 抑制三肽为研究对象,进行高通量筛选,并对筛选结果的生物活性、水溶性和生物毒性进行进一步优化得到存在 ACE 抑制可能性的肽 RWY、FRY、YRY、RFY。经体外实验验证四者都具备良好的 ACE 抑制活性, IC_{50} 值分别为 228.67、113.10、272.61、101.00 $\mu\text{mol/L}$,分子对接结果显示 ACE 活性口袋 S_1' 中的氨基酸残基 Glu162 与 RWY、FRY、YRY

及 RFY 都存在氢键作用力,RFY 与 Glu162 存在 2 条氢键作用力,这可能是 RFY 表现出相对较高的抑制活性的原因。虽然与临床药物赖诺普利相比这些三肽表现出相对较低的 ACE 抑制活性,然而有研究指出食源性 ACE 抑制肽类相比之下由于较低的副作用而更安全^[34]因此应用前景极大。本文的筛选方法避免了传统方法耗时、低效、盲目等缺点,其有效性也得到了证实,大大减少了实验工作量,而实现抑制肽的高产量制备则是接下来的重点研究方向。

参考文献

[1] 张靖, 苏琳, 要铎, 等. 内源性血管紧张素转化酶抑制肽研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 241-247.
 [2] Yu F, Zhang Z, Luo L, et al. Identification and molecular docking study of a novel angiotensin-i converting enzyme inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of cyclina sinensis[J].

- Marine Drugs, 2018, 16(11): 411.
- [3] Kaiser S, Martin M, Lunow D, et al. Tryptophan-containing dipeptides are bioavailable and inhibit plasma human angiotensin-converting enzyme *in vivo*[J]. *International Dairy Journal*, 2016, 52: 107–114.
- [4] 鹿广昌, 陈庆森, 胡志和, 等. 蛋白质的消化吸收及其功能评述[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 375–391.
- [5] Bernstein K E, Shen X Z, Gonzalez-Villalobos R A, et al. Different *in vivo* functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE)[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2011, 11(2): 105–111.
- [6] Regulska K, Stanisz B, Regulski M, et al. How to design a potent, specific, and stable angiotensin-converting enzyme inhibitor [J]. *Drug Discovery Today*, 2014, 19(11): 1731–1743.
- [7] Bernstein K E, Ong F S, Blackwell W B, et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme[J]. *Pharmacological Reviews*, 2013, 65(1): 1–46.
- [8] Wu J, Aluko R E, Nakai S. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acid residues[J]. *QSAR & Combinatorial Science*, 2006, 25(10): 873–880.
- [9] 张钦. 含酪氨酸寡肽对血管紧张素转化酶 (ACE) 的结构域选择性抑制作用研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2018.
- [10] 孔子艺, 王鹏, 朱军生, 等. 利用 mtCOI PCR-RFLP 技术鉴别草地贪夜蛾与其他 3 种形态相近昆虫 [J]. *生物安全学报*, 2020, 29(1): 16–22.
- [11] 曲晓虹, 纪玮佳, 王卓亚, 等. 基于结构的小分子对接软件的评估与应用研究 [J]. *中国海洋药物*, 2018, 37(4): 23–30.
- [12] Natesh R, Schwager S L, Sturrock E D, et al. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme–lisinopril complex [J]. *Nature*, 2003, 421(6922): 551–554.
- [13] Dolinsky T J, Nielsen J E, Mccammon J A, et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(Suppl_2): W665–W667.
- [14] 何雪峰. 蛋白质结构虚拟现实可视化和对接程序开发 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [15] 黄梦楠. α -葡萄糖苷酶抑制剂的虚拟筛选和分子动力学模拟 [D]. 大连: 大连理工大学, 2016.
- [16] Mooney C, Haslam N J, Pollastri G, et al. Towards the improved discovery and design of functional peptides: Common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45012.
- [17] Cheng F, Li W, Zhou Y, et al. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52(11): 3099–3105.
- [18] Yang H, Lou C, Sun L, et al. AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties [J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(6): 1067–1069.
- [19] Behrendt R, White P, Offer J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis [J]. *Journal of Peptide Science*, 2016, 22(1): 4–27.
- [20] 骆琳, 丁青芝, 马海乐. 96 孔板法用于高通量血管紧张素转化酶抑制剂体外检测 [J]. *分析化学*, 2012, 40(1): 129–134.
- [21] Wang J Y, Chen H, Wang Y Y, et al. Network pharmacological mechanisms of *Vernonia anthelmintica* (L.) in the treatment of vitiligo: Isorhamnetin induction of melanogenesis via up-regulation of melanin-biosynthetic genes [J]. *BMC Systems Biology*, 2017, 11(1): 1–12.
- [22] 黄嫣嫣, 赵睿. 基于血脑屏障靶向多肽的脑神经分析化学研究进展 [J]. *分析化学*, 2019, 47(10): 1629–1638.
- [23] 黄海智, 陈健乐, 程焕, 等. Caco-2 细胞模型预测活性物质吸收代谢的研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2015, 15(1): 164–172.
- [24] 陆免林, 苏联麟, 季德, 等. CYP450 酶与中药代谢相互作用及酶活性测定的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(18): 3524–3529.
- [25] Dider S, Ji J, Zhao Z, et al. Molecular mechanisms involved in the side effects of fatty acid amide hydrolase inhibitors: A structural phenomics approach to proteome-wide cellular off-target deconvolution and disease association [J]. *NPJ Systems Biology and Applications*, 2016, 2(1): 16023.
- [26] Lin K, Zhang L, Han X, et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 32: 266–277.
- [27] Abdelhedi O, Nasri R, Mora L, et al. *In silico* analysis and molecular docking study of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from smooth-hound viscera protein hydrolysates fractionated by ultrafiltration [J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 453–463.
- [28] Yu Z, Chen Y, Zhao W, et al. Identification and molecular docking study of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Salmo salar* using *in silico* methods [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(10): 3907–3914.
- [29] Xie J, Chen X, Wu J, et al. Antihypertensive effects, molecular docking study, and isothermal titration calorimetry assay of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from *Chlorella vulgaris* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(6): 1359–1368.
- [30] 于志鹏, 樊玥, 赵文竹, 等. 鸡蛋蛋白 ACE 抑制肽的筛选、鉴定及其作用机制 [J]. *食品科学*, 2020, 41(12): 129–135.
- [31] Yu Y, Hu J, Miyaguchi Y, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin [J]. *Peptides*, 2006, 27(11): 2950–2956.
- [32] Miguel M, López-fandino R, Ramos M, et al. Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats [J]. *British Journal of Nutrition*, 2005, 94(5): 731–737.
- [33] Tsai J, Lin T C, Chen J L, et al. The inhibitory effects of freshwater clam (*Corbicula fluminea* Muller) muscle protein hydrolysates on angiotensin I converting enzyme [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(11): 2276–2281.
- [34] Panyayai T, Sangsawad P, Pacharawongsakda E, et al. The potential peptides against angiotensin-I converting enzyme through a virtual tripeptide-constructing library [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2018, 77: 207–213.