

食源血管紧张素转化酶抑制肽研究进展

周育^{1,2}, 韩三青^{1,2}, 王茹茹^{1,2}, 谢忠稳^{1,2*}

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 高血压是心血管疾病最重要的危险因素。血管紧张素转换酶 (Angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制肽是预防和治疗高血压的生物活性物质, 食源 ACE 抑制肽在高血压预防和治疗中起着重要作用。主要介绍了动物、植物和微生物发酵食品源 ACE 抑制肽降高血压的研究进展, 并根据文献中分子对接的研究结果分析 ACE 抑制肽与 ACE 之间相互作用的分子机制, 阐述降高血压作用的其他途径, 讨论 ACE 抑制肽降高血压的临床研究进展。

关键词: 食源; ACE 抑制肽; 高血压; 机制

中图分类号: Q95-3; R459.3; Q51

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)05-0751-10

Research advance of food-derived angiotensin converting enzyme inhibitory peptides

ZHOU Yu^{1,2}, HAN Sanqing^{1,2}, WANG Ruru^{1,2}, XIE Zhongwen^{1,2}

(1. School of Tea and Food Science Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The most important risk factor of cardiovascular diseases is hypertension. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptide is an effective target for the prevention and treatment of hypertension, so food-derived ACE inhibitor peptide plays an important role in the disease prevention and treatment. The recent advance in the hypertensive effects and molecular mechanisms of ACE inhibitory peptides derived from animal, plant and microbial fermented foods was summarized, and the interaction between this ACE inhibitory peptides and ACE by a flexible molecular docking tool was analyzed. In addition, its antihypertensive mechanisms beyond ACE inhibition were also reviewed. Finally, the current clinical studies of food-derived ACE inhibitory peptides to reduce hypertension were also discussed.

Key words: food-derived; ACE inhibitory peptide; hypertension; mechanisms

心血管疾病是世界上最主要死亡原因之一, 高血压是导致心血管疾病死亡最主要的风险因素^[1]。目前, 全世界超过 10 亿成年人患有高血压^[2]。肾素-血管紧张素系统 (renin angiotensin system, RAS) 是血压的主要调节因子, 也是高血压治疗的靶标系统之一^[3]。血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 又称为肽基二肽酶 A 或者二肽基羧肽酶 (EC.3.4.15.1), 在高血压发生、发展过程中具有重要的作用。在经典的 RAS 中, ACE 的核心作用是在血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I) 的 C 端切割下二肽 (His-Leu), 产生有活性的八肽血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)^[4]; Ang II 与 AT1R

受体结合导致血管平滑肌细胞收缩, 它还刺激醛固酮的释放, 以增加肾脏对水和盐的保留, 刺激心肌细胞的过度生长和心脏成纤维细胞的胶原合成, 从而导致心脏重塑, 该经典途径称为 ACE-Ang II-AT1R 轴^[5]。ACE 还作用于缓激肽, 缓激肽是激肽释放酶-激肽系统 (kallikrein kinin system, KKS) 的重要组成成分, ACE 通过切割缓激肽 C 末端的二肽 (Phe-Arg), 使其失活, 间接抑制血压调节过程中一氧化氮产生, 发挥灭活血管舒张剂的作用^[6-7]。因此, ACE 将起双重作用: 血管收缩剂 (Ang II) 的活化和血管舒张剂 (缓激肽) 的失活。

ACE 抑制已被证明是预防和治疗高血压的有

收稿日期: 2019-02-27

基金项目: 农产品营养与质量安全安徽省人才团队重点项目资助。

共同第一作者简介: 周育, 教授。E-mail: microbes@ahau.edu.cn 韩三青, 硕士研究生。E-mail: 1532754312@qq.com

* 通信作者: 谢忠稳, 教授, 博士生导师。E-mail: zhongwenxie@ahau.edu.cn

效治疗靶点,商业化 ACE 抑制药物广泛用于治疗高血压。ACE 抑制药物是一种治疗降低高血压的药物。目前,市场上的药物都是人工合成的普利类 ACE 抑制剂,如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、莫西普利、培哌普利和喹那普利等,研究表明单一的 ACE 抑制剂对高血压治疗的有效性为 40%~50%,当与利尿剂一起使用时达到 80%~90%^[8]。此外,长期服用一些 ACE 抑制剂类药物会导致一些副作用,如干咳、味觉障碍和皮疹^[9-11]。另一个严重的问题是 0.1%~0.5% 的患者服用人工合成的 ACE 抑制剂会导致血管性水肿并且可能危及生命;ACE 抑制剂也会导致胎儿病,胎儿病的特点是羊水过少、宫内发育迟缓、无尿、低钙质、肾发育不良、肾功能衰竭、先天性畸形和死亡^[12-13]。动植物以及微生物发酵食物来源的 ACE 抑制肽与化学合成 ACE 抑制药物相比具有高选择性、高安全性、高稳定性、高耐受性和高生物利用度等特点。这些食源 ACE 抑制肽,对消费者来说更自然、更安全,可以作为日常饮食的一部分,具有更低的医疗保健成本^[14]。

近年来,饮食干预已被广泛认为具有巨大的预防高血压的潜力。抑制高血压的饮食方法(dietary approaches to stop hypertension, DASH)是著名的降血压饮食策略之一。在韩国^[15]、中国^[16]、美国^[17]、和英国^[18]人群中的研究已经确定 DASH 是预防和控制高血压的一组有效的饮食方法。其中功能性食品来预防或治疗高血压越来越受到重视,通过分析食物中的天然成分以及研究它们的生理功能和作用机制,研究者发现很多生物体中都存在生物活性肽,生物界仍然是最有希望的生物活性肽来源。谷物、蔬菜、水果、肉类、鸡蛋、海产品、蘑菇和乳酸菌都是有潜力被开发出 ACE 抑制肽的食品来源^[19-20]。本文在前人大量研究工作的基础上,综述了 ACE 抑制肽的食物来源、生物活性成分以及 ACE 与 ACE 抑制肽之间的分子作用机制等研究进展。

1 动物食品源的 ACE 抑制肽

近年来,从动物源食品中分离出了一系列具有良好功能的 ACE 抑制肽。研究表明肉类蛋白质是功能性生物活性肽的良好来源。肉类蛋白质水解产物产生了大量的氨基酸多肽,其中一些具有很强的 ACE 抑制活性。Banerje 等研究了来自牛跟腱胶原的 ACE 抑制活性肽,通过细菌胶原酶水解牛跟腱胶原,水解产物再进行分离和纯化,最后获得两种具有 ACE 抑制能力的生物活性肽 D1 和 E2^[21]。Escudero 等发现,在模拟胃肠道消化条件下的猪肉可以产生

ACE 抑制肽,将水解产物进行反相色谱,分离出具有 ACE 抑制活性的组分,通过质谱鉴定获得最强的 ACE 抑制肽为 KAPVA ($IC_{50}=46.56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 PTPVP ($IC_{50}=256.41 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[22]。Mirdhayati 等从山羊肉蛋白质水解产物的水溶物中鉴定出新型 ACE 抑制肽,即 Phe-Gln-Pro-Ser (478 Da), IC_{50} 为 $27.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,并通过体内实验研究其降高血压活性。单次灌胃 Phe-Gln-Pro-Ser 给予 SHR 大鼠,在 8 h 后血压降低了 (10.6 ± 1.58) mmHg。该结果表明,山羊肉的蛋白质水解物具有降高血压潜力^[23]。以上研究也表明肉类蛋白质可能有更好的营养保健功能,并可能有助于找到满足高血压患者需求的 ACE 抑制活性肽。

富含蛋白质的蛋产品、蚕蛹和血液也被用来筛选 ACE 抑制肽。Liu 等从鸡蛋清蛋白中鉴定出 ACE 抑制肽 Arg-Val-Pro-Ser-Leu (RVPSL),其 50%抑制浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[24]。Yu 等也发现来自卵清蛋白水解产物的新型 ACE 抑制肽, Thr-Asn-Gly-Ile-Ile-Arg (TNGIIR), 50%抑制浓度约为 $70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[25]。Yours 等从蛋黄蛋白中分离出 ACE 抑制肽,SDNRNQGY、IQVPL 和 KGLWE,三者均显示出高效的 ACE 抑制活性^[26]。Wu 等使用胃肠道内肽酶水解蚕蛹蛋白质,鉴定出新的 ACE 抑制肽 Ala-Ser-Leu,其 IC_{50} 值为 $102.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[27]。Wang 等从牛血红蛋白水解产物的脱盐部分中鉴定出 4 种二肽 TY、FD、FL 和 FG。其中 TY 和 FL 的 IC_{50} 值分别为 (96.43 ± 6.17) 和 (290.66 ± 57.92) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[28]。

近年来海洋生物资源的开发研究逐渐成为全球性热点。Neves 等以鲑鱼明胶为材料分离出具有 ACE 抑制活性的肽,并鉴定出鲑鱼明胶的主要活性成分为 4 种肽序列 (Gly-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Val、Gly-Pro-Val-Ala、Pro-Pro 和 Gly-Phe) 和两种游离氨基酸 (Arg 和 Tyr)^[29]。Balti 等从墨鱼肌肉中鉴定出新的 ACE 抑制肽,共分离出 9 种 ACE 抑制肽,其中最有效肽的结构被鉴定为 Val-Glu-Leu-Tyr-Pro, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给 SHR 大鼠,给药 6 h 后大鼠收缩压 (Systolic blood pressure, SBP) 降低了 20 mmHg^[30]。Rawendra 等从未受精的甲鱼卵中分离并鉴定了一种 ACE 抑制三肽 (IVR),体外测定 IVR 的 IC_{50} 值低至 (0.81 ± 0.03) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,通过 0.1 和 1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ IVR 灌胃干预 SBP 为 (223 ± 3.0) mmHg 的 SHR 大鼠,在干预 2 h 后显示出最大降高血压活性,1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 干预的 SHR 大鼠 SBP 降为 (183 ± 1.3) mmHg,0.1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 干预的 SHR 大鼠 SBP 降为 (188 ± 1.79) mmHg^[31]。表 1 列出了主要的动物食品源 ACE 抑制肽。

表 1 动物源 ACE 抑制肽及其生物学活性
Table 1 Animal origin ACE inhibitory peptides and their biological activities

来源 Source	制备 Preparation	肽序列 Peptide sequence
牛腱胶原 Bovine tendon collagen	细菌胶原酶 Bacterial collagenase	AKGANGAPGIAGAPGFPGARGPSGPQGPSGPP, PAGNPGADGQPGAKGANGAP
猪 Pork	胃蛋白酶 Pepsin, 胰蛋白酶 Trypsin	KAPVA, PTPVP
山羊 Goat	内切蛋白酶 Endo-proteinase, 复合蛋白酶 Protease complex	FQPS
鸡蛋蛋清 Egg white protein	碱性蛋白酶 Alcalase	TNGIIR
蚕蛹 Silkworm pupa	胃蛋白酶 Pepsin, 胰蛋白酶 Trypsin	ASL
牛血红蛋白 Bovine hemoglobin	胃蛋白酶 Pepsin, 胰蛋白酶 Trypsin	TY FL
鲑鱼明胶 Salmon gelatin	Corolase PP	GGPAGPAV, GPVA, PP, GF, R, Y
墨鱼 Cuttlefish	<i>B. mojavensis</i> A21, 墨鱼肝胰脏来源粗酶 Cuttlefish hepatopancreas	VELYP
甲鱼 Soft-shelled turtle	嗜热菌蛋白酶 Thermolysin	IVR
鸡脚 Chicken foot	复活蛋白酶 Protamex [®]	-
蛤仔 Ruditapes philippinarum	纳豆芽孢杆菌 <i>Bacillus natto</i>	VISDEDGVTH
轮虫 Rotifer	碱性蛋白酶 Alcalase	DDTGHDFQDTGEAM
带鱼骨架 Ribbonfish backbone	酸性蛋白酶 Acid protease	LY
水母性腺 Jellyfish gonad	中性蛋白酶 Neutral protease	SY
蜥蜴鱼 Lizard fish	中性蛋白酶 Neutral protease	SPRCR
虾 Shrimp	褐绒盖牛肝菌 <i>Xerocomus badius</i>	CC, CR
泥鳅 Loach	菠萝蛋白酶 Bromelain	AHLL

半抑制浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC_{50}	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (BW) Dose	收缩压下降/ mmHg SBP reduction	参考 Reference
51.10±1.15	-	-	[21]
46.56, 256.41	1	33.72±8.01, 25.66±6.84	[22]
27.0	2.39	10.6±1.58	[23]
70	-	-	[24]
102.15	-	-	[27]
96.43±6.17, 290.66±57.92	-	-	[28]
1912.46~98.04	50	22.16±4.34	[29]
5.22	10	20	[30]
0.81±0.03	0.1	35±1.21	[31]
-	1	40±1.7	[31]
-	55	26.33±2.1	[32]
8.16	85	30.45±1.65	[32]
9.64	32	显著降低	[33]
5.6	-	-	[34]
1164.179	10	18.7±0.7	[35]
41±1	-	-	[36]
4.37±0.07, 475.95±0.11	-	-	[37]
40.3	-	-	[38]
40.3	30	显著降低	[39]

2 植物食品源的 ACE 抑制肽

植物源食品也是天然 ACE 抑制肽的丰富来源。其中, 谷物和坚果类蛋白水解产物中含有丰富的 ACE 抑制肽。Chen 等从大米蛋白水解产物中纯化了

两种 ACE 抑制肽, 分别为 Val-Asn-Pro (VNP) 和 Val-Tyr-Pro (VWP), 单次口服给予 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 VNP 和 VWP 都可显著降低 SHR 大鼠的 SBP, 并且降高血压的功效可以持续最少 8 h ^[40]。Shi 等从花生蛋白中鉴定出 ACE 抑制肽, 并通过体外和体内实验分析

其降高血压活性,多个剂量花生肽灌胃 SHR 大鼠 3 h 后,每个剂量干预的 SHR 大鼠的 SBP 下降都超过了 20 mmHg^[41]。Liu 等从长白山榛子蛋白水解产物中分离出新型 ACE 抑制肽 YLVR, SHR 大鼠口服该活性肽实验结果显示, 10 mg·kg⁻¹ YLVR 短期干预造成 SBP 下降了 39.97 mmHg; 在慢性实验中, 干预了 3 周后, YLVR (10 mg·kg⁻¹)组大鼠的 SBP 从 176.97 降

至 149.67 mmHg^[42]。Han 等人使用两种螯合的生物信息学方法鉴定源自油籽蛋白的 ACE 抑制肽, PeptideRanker 较准的平均分数证实含油种子蛋白质是生物活性肽的重要潜在资源, 超过 105 种肽的得分超过 0.8, 这些肽都能够抑制 ACE 的酶活性, 且其中的 65 种目前未记录在 BIOPEP 数据库中^[43]。

表 2 植物源 ACE 抑制肽及其生物学活性

Table 2 Plant origin ACE inhibitory peptides and their biological activities

来源 Source	制备 Preparation	肽序列 Peptide sequence
大米 Rice	碱性蛋白酶 Alcalase, 胰蛋白酶 Trypsin	VNP, VWP
花生 Peanut	碱性蛋白酶 Alcalase 胃蛋白酶 Pepsin	KLYMRP
榛子 Hazelnut	胰蛋白酶 Trypsin 糜蛋白酶 Chymotrypsin	YLVR
松茸 <i>Tricholoma matsutake</i>	蒸馏水 Distilled water	WALKGYK
诃子果实 Fruit of <i>Terminalia chebula</i> Retz.	胃蛋白酶 Pepsin	DENSKF
长茎葡萄蕨藻 <i>Caulerpa lentillifera</i>	嗜热菌蛋白酶 Thermolysin	FDGIP, AIDPVRA
龙须菜 <i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	胰蛋白酶 Trypsin	FQIN [M(O)] CILR, TGAPCR
花椰菜 Cauliflower	SDS, EDTA, 胰蛋白酶 Trypsin	FFAPYAPNFPFK
啤酒糟 Brewers, spent grain	Corolase PP, 胃蛋白酶 Pepsin	IVY, ILDL
薏仁种子 Adlay seed	胃蛋白酶 Pepsin	GAAGGAF
苦瓜种子 Bitter melon seed	嗜热菌蛋白酶 Thermolysin	VSGAGRY

半抑制浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC ₅₀	剂量/mg·kg ⁻¹ (BW) Dose	收缩压下降/mmHg SBP reduction	参考 Reference
6.4, 4.5	5	29, 38	[40]
0.0058	100, 500, 1000	>20	[41]
15.42	10	39.97	[42]
0.40	25, 50	18 36	[44]
28.13	-	-	[45]
58.89±0.68, 65.76±0.92	-	-	[46]
9.64±0.36, 23.94±0.82	10	34, 28	[47]
0.461	-	-	[49]
80.4±11.9, 96.4±8.36	-	-	[50]
14.19	15	27.50	[51]
8.64±0.60	2	40.33±5.86	[52]

蘑菇是用于治疗多种疾病的生物活性蛋白质和 ACE 抑制肽的良好来源。Geng 等分离和鉴定了来自松茸的 ACE 抑制肽, WALKGYK, 以 25 和 50 mg·kg⁻¹ (BW)剂量干预 SHR 大鼠, 2 h 后大鼠的 SBP 分别降低了 18 和 36 mmHg。因此, 松茸可以用作功能性食物预防高血压相关疾病^[44]。Sornwatana 等人发现灵芝蛋白水解产物具有 ACE 抑制活性, 该产

物灌胃 SHR 大鼠 4 h 后, SHR 的 SBP 显著降低了 34.3 mmHg, 随后从水解产物中共鉴定了 11 种肽, 其中 4 种显示出对 ACE 的有效抑制^[45]。

海洋植物也是 ACE 抑制肽的重要来源。Joel 等人从长茎葡萄蕨藻 (*Caulerpa lentillifera*) 中鉴定出 ACE 抑制肽, 其中嗜热菌蛋白酶水解产物显示出最强的 ACE 抑制肽活性, 氨基酸片段分别为 FDGIP

(FP-5) 和 AIDPVRA (AA-7)。此外, 抑制动力学显示 FP-5 和 AA-7 都是竞争性抑制剂^[46]。Deng 等从海洋植物龙须菜中筛选出两种新的 ACE 抑制肽, FQIN [M(O)] CILR 和 TGAPCR, 以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (BW) 剂量灌胃 SHR 大鼠, 这两种肽都显著降低了 SHR 的 SBP 和舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)^[47]。

除了从谷物、坚果、蘑菇以及藻类植物分离 ACE 抑制肽外, 植物废弃的副产品也是潜在的 ACE 抑制肽来源。García 等人从樱桃种子的蛋白质水解产物中鉴定出 ACE 抑制肽, 其中来自嗜热菌蛋白酶的水解产物具有最强的降压活性^[48]。Zenezini 等人研究了源自花椰菜副产品的 ACE 抑制肽, 其中 FFAPYAPNFPFK 是活性最高的抑制肽, 这表明花椰菜副产品的蛋白质水解产物具有预防或治疗高血压的潜在价值^[49]。植物食品源的 ACE 抑制肽是素食者的首选, 用于功能食品开发潜力巨大。表 2 总结了主要的植物食品源 ACE 抑制肽。

3 微生物发酵食品源的 ACE 抑制肽

益生菌菌株发酵的乳制品也是 ACE 抑制肽的来源之一。由于许多乳品发酵剂培养物的高度蛋白水解性质, 在发酵乳制品的生产过程中可以预期形成生物活性肽。Gonzalez 等研究了双歧杆菌 MF 20/5 发酵的乳制品, 从中鉴定出新颖的 ACE 抑制肽 LVYPFP 和 LPLP。研究表明使用这种益生菌菌株发酵的乳制品具有广泛的健康功能, 包括降低高血压^[53]。Chen 等人研究了 259 株瑞士乳杆菌菌株发酵的乳制品, 其中 37 株菌的 ACE 抑制活性超过 50%; 来自西藏的新型益生菌 *Lactobacillus helveticus* 菌株 H9 (IMAU60208) 产生的发酵乳具有很强的体外 ACE 抑制活性 (86.4 ± 1.5)%, 鉴定出的 ACE 抑制肽序列分别为 Val-Pro-Pro 和 Ile-Pro-Pro; 动物实验表明 SHR 大鼠在单次口服 H9 发酵乳 6 至 12 h 后, 显著降低了收缩压、舒张压和平均血压; 长期干预实验发现, 连续每天摄入 H9 发酵乳 7 周后, 对 SHR 大鼠产生了显著的降压作用, 收缩压和舒张压分别降低 12 和 10 mmHg, 该菌株是未来高血压预防性功能食品开发的宝贵资源^[54]。

近期研究发现通过优化发酵条件获得的发酵食品也表现出很好的 ACE 抑制活性。Wu 等开发了一种乳酸菌发酵的固态全谷物燕麦, 该产品中富含 ACE 抑制肽; 其中植物乳杆菌与米曲霉共组合发酵的燕麦比在单独培养时显示出更好的生长性能, 蛋白质水解获得更多的多肽, 显示更好的 ACE 抑制活性。这项研究拓宽了我们对全谷燕麦产品的开发以

及真菌混合固态发酵在蛋白质降解和释放 ACE 抑制肽能力的认识^[55]。Chen 等从纳豆芽孢杆菌发酵的菲律宾蛤仔中分离出一种高效的 ACE 抑制肽, 氨基酸序列为 VISDEDGVTH, 使用 $32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃干预高血压模型大鼠, 干预 2 d 后大鼠的舒张压、收缩压和平均血压显著下降。研究表明 VISDEDGVTH 多肽可作为降高血压保健食品的功能性成分^[33]。

4 ACE 抑制肽的制备

4.1 ACE 抑制肽的体外水解方法

食物源蛋白主要通过酶水解释放出小肽发挥 ACE 抑制活性。胃肠道消化过程中, 可以产生 ACE 抑制肽, 胃肠道消化蛋白酶如胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶是主要负责产生多肽的蛋白酶; 在实验中, 可以使用特定的胃肠道消化蛋白酶和受控的 pH 和温度条件来模拟胃肠消化, 检测消化后的水解蛋白 ACE 抑制活性, 如猪骨骼肌肌钙蛋白^[22]、蚕蛹蛋白^[29]、牛血红蛋白^[30]、啤酒糟蛋白^[41]、薏仁谷蛋白^[44]和诃子果实蛋白^[48]都是使用胃肠道消化蛋白酶。此外, 不同来源 (例如微生物、植物或动物) 的商业蛋白酶也用于水解食物源粗蛋白, 其中来自枯草芽孢杆菌和地衣形芽孢杆菌的中性蛋白酶和碱性蛋白酶是最常用的酶, 如鸡蛋清^[25]、圆形臂尾轮虫^[28]、水母性腺^[36]、蜥蜴鱼^[37]、花生^[42]和榛子^[43]中 ACE 抑制肽的制备; 动物来源的蛋白酶, 如 Balti 等使用来自墨鱼肝脏的粗酶制剂水解墨鱼肌肉蛋白制备 ACE 抑制肽^[32]; 植物来源的蛋白酶, 如菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶也是制备 ACE 抑制肽的常见酶^[39]。与其他酶 (胰蛋白酶或胃蛋白酶) 相比, 这些商业蛋白酶显示出更广泛的特异性, 从多种区域切割肽键并且经常充当内肽酶, 或作为外肽酶从 N-和 C-末端位点水解氨基酸^[56]。Li 等使用 6 种蛋白酶, 胃蛋白酶、 α -胰凝乳蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶来水解泥鳅蛋白, 经过实验发现菠萝蛋白酶的水解产物具有最高的 ACE 抑制性活性^[39]。

在产生食源蛋白水解产物后, 应使用不同的纯化技术来获得 ACE 抑制肽。纯化技术包括盐析、超滤、葡聚糖凝胶层析、离子交换色谱、高效液相色谱、快速蛋白液相色谱系统和固定化金属亲和层析等^[40-52]。其中最常用的方法是 HPLC/FPLC, 因为随后纯化的分级样品可直接用于生物活性的测定, 或者纯化后的成分冷冻干燥并检查它们的 ACE 抑制活性^[42]。活性肽的鉴定可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF / TOF-MS)、纳升液相色谱-电喷雾电离串联质谱(nanoLC-ESI-MS / MS)、液相二级质谱(LC-MS / MS)、三重四级杆-飞行时间质谱(Q-TOF MS)和埃德曼(Edman)降解等技术以确定分子量、氨基酸组成和序列^[22-30]。最后对潜在生物活性肽进行选择 and 合成,并体外和体内确认其生物活性。该经典方法的主要缺点是可选择的样品范围有限、纯化过程费时、活性肽产率低以及筛选单独肽困难等^[57]。

4.2 ACE 抑制肽的化学合成方法

目前基于现代化学连接方法的化学合成也用于制备 ACE 抑制肽^[58]。Pinheiro-Júnior 等研究一种来自 *Lachesis muta rhombeata* 毒液的 ACE 抑制肽,使用自动化固相肽合成仪合成肽,使用 Fmoc-Pro-Wang 树脂通过 Fmoc (N-(9-苄基)甲氧基羰基)化学手动合成该活性肽,体外测定 IC_{50} 为 $(4.25 \pm 0.10) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,体内研究表明,合成肽在正常血压和高血压大鼠中均诱导血压降低^[59]。Jallapally 等设计、化学合成并评价了一系列新的 2-丁基-4-氯-1-甲基咪唑衍生的肽模拟物的 ACE 抑制活性^[60]。Wang 等基于化学特征的药效团,通过常规固相化学合成 3 种 ACE 抑制肽,并进行高效液相色谱分析和纯化^[61]。任锦等使用 Fmoc 固相合成法合成 6 个八肽,最终筛选出一种高效的 ACE 抑制肽^[62]。

4.3 ACE 抑制肽的生物信息学方法

生物信息学工具和肽数据库的计算机分析越来越多地被用作 ACE 抑制肽制备的替代方案。食源 ACE 抑制肽的释放,可以通过模拟基于蛋白酶特异性切割鉴定蛋白质序列的酶促水解能力来预测,这种筛选可提供有效生物活性肽的潜在生产信息,指示在蛋白质序列中加密的生物活性肽的出现,还指示具有高释放生物活性肽序列的可能性蛋白酶的类和特异性,进而可用于进一步化学或重组 DNA 合成新型生物活性肽^[57]。现在已经有适当的 ACE 抑制肽数据库,如 BIOPEP (Bioactive Peptides)、UniProt (Universal Protein Knowledgebase) 和 TrEMBL (Swiss-Prot 的一个增补本) 数据库等,计算机模拟蛋白水解产生的肽可以与数据库中的生物活性肽进行匹配,用于预测生物活性^[63]; AHTPDB (抗高血压肽数据库),如 ACEpepDB, BIOPEP 和 EROP-Moscow 数据库提供有关抗高血压肽的信息,包括序列、 IC_{50} 、来源和分子量等,但是这些数据库不包括水解处理条件^[64]。另外开放式访问的 PeptideRanker (能够对大型肽组进行排序,并根据

结构模式预测生物活性的可能性)^[65]、Pepsite2 (预测肽与靶酶之间的相互作用)^[66]和 BLAST (用于评估蛋白质序列的显著相似性/同源性)^[67]服务器也极大地提高了计算机筛选这些特定肽活性的准确性和可靠性,如油籽蛋白^[46]、牛奶^[68]、粗大麦^[69]和大米^[70]中的 ACE 抑制肽生成都是来自计算机模拟研究。此外,食品行业可以通过组学技术(串联质谱的肽技术, Peptidomics)和生物信息学方法整合来预测食品制造过程中内源性蛋白酶释放的生物活性肽序列,Udenigwe 等研究骨骼肌酶引起的蛋白水解可导致肉类加工过程中寡肽的释放,通过详细的肽谱分析揭示可能的活性序列,从而提高特定抗高血压用途的肉类产品质量^[71-72]。

5 ACE 抑制肽的分子作用机制

了解 ACE 和 ACE 抑制肽之间的分子作用机制,将有助于筛选更有效的 ACE 肽抑制剂。ACE 活性位点中有 3 个不同的亚位点称为 S1、S'1 和 S'2。C 末端含有疏水性氨基酸残基或竞争性抑制剂的 ACE 抑制肽更倾向于与这 3 个亚位点相互作用。ACE 的 Zn 离子位于 S1 和 S'1 之间,通过从酰胺键中酮基得到电子,从而参与底物肽键的水解,最终导致肽键的裂解和二肽 (His-Leu) 的释放。S'1 易于与疏水性残基相互作用,S'2 口袋可以在底物 C-末端位置选择性地结合 P 或 L^[73]。Banerje 等人研究了牛跟腱胶原蛋白来源的两个 ACE 抑制肽。分子对接模型显示,两种肽 C-末端的疏水性残基与 ACE 结合,且在 C 末端存在独特三联体 GX'Y',其中 X'通常是 P、L、I 或 A,Y'通常是 P,这种相互作用可能导致与酶的结合更紧密,从而使二者的亲和力增加,可以竞争性地抑制 ACE 活性^[21]。

ACE 和抑制肽之间的多个氢键相互作用,可以稳定非催化酶-肽复合物的结构,进而促进 ACE 抑制肽的活性。Tu 等鉴定了来自酪蛋白的新型混合型 ACE 抑制肽,表现出高效的抑制活性;该肽总共与 ACE 残基有 15 个氢键作用,分别为 5 个 (LYS118, ASP121, GLU123, GLU403, ARG522) 和 10 个 (ASN66, LYS118, ASP121, GLU123, ARG124, TRP220, TYR360, SER516, SER517, ARG522),多个氢键的相互作用显著地增加了 ACE 和该肽复合物的稳定性^[74]。

亮氨酸 (Leu) 可以显著抑制 ACE 活性。Lee 和 Hur 报道了类似的结果,他们发现几种具有低 IC_{50} 值的 ACE 抑制肽都含有疏水残基 Leu,包括鸡胸肌的 KPLL、牛肌肉蛋白的 VLAQYK 和大豆的

DLP^[75]。Liu 等通过分子对接模型阐述了榛子来源的 ACE 抑制肽 (AVKVL、YLVR 和 TLVGR) 与 ACE 之间的分子作用方式, 3 种肽在 C-或 N-末端的活性中心都具有 Leu, 可以显著抑制 ACE 活性。另外 YLVR 的分子对接研究揭示, His-383 和 Tyr-523 也可形成阳离子- π 相互作用; 阳离子- π 相互作用是重要的非共价分子相互作用, 键合能量很大。在以前的研究中, 只有氢键被认为在抑制剂与 ACE 的结合中发挥重要作用, 但该结果表明阳离子- π 相互作用对结合的贡献与氢键和静电键的贡献一样重要, 可以增加 ACE-肽复合物的结构稳定性^[42]。

目前的研究结果已经证明有效的 ACE 抑制肽应具有疏水性 N-末端残基, 中间带正电荷的残基和 C-末端芳香族残基^[76]。Priyanto 等研究苦瓜来源的 ACE 抑制活性肽 (VY-7) 的序列与上述假定的理想 ACE 抑制肽完全匹配, 因为 VY-7 在其 N-末端具有脂肪族和疏水性残基, 中间具有碱性精氨酸残基, 并且 C 末端具有芳香族酪氨酸^[52]。

6 食源降高血压活性肽作用的其他途径

源自食物蛋白质的降高血压活性肽通过各种机制表现出降高血压作用, 迄今为止 ACE 抑制是活性肽可以调节 RAS 系统并发挥抗高血压作用的主要机制, 所以 ACE 抑制肽的研究最为广泛; 但除了通过 ACE 抑制肽调控血压外, 降高血压活性肽还可以通过其他途径调控血压^[1], 如降高血压活性肽可以与 RAS 系统相关的肾素、Ang II 受体、精氨酸-一氧化氮途径、内皮素系统和 Ca^{2+} 通道相互作用。最近的一些研究表明, 食品蛋白质的水解产物和肽可以作为肾素抑制剂、AT1R 受体阻断剂和钙通道阻断剂^[77-80]。富含精氨酸的亚麻籽活性肽干预能显著降低自发性高血压大鼠的 SBP, 血管内皮中较高水平的精氨酸可能潜在地诱导血管舒张, 用于高血压治疗^[81]。Doyen 等鉴定出 8 种牛乳铁蛋白 B 衍生的活性肽, 可以体外抑制内皮素转换酶 (ECE), 同时也抑制内皮素-1 诱导的血管收缩^[82]。此外, 降高血压肽还可以调节交感神经系统, 从而控制血压。阿片受体存在于中枢神经系统中, 它们通过增加交感神经系统的活动参与血压的调节^[83]。来自胃蛋白酶/胰蛋白酶消化 α -lactorphin 的降高血压肽 (YGLF) 已显示通过与阿片受体结合来降低 SHR 的血压^[84]。

7 食源 ACE 抑制肽降血压的临床研究

临床试验对于评估食品源 ACE 抑制肽在人体中的功效非常重要。Fitzgerald 等评估了乳糖肽 IPP

和 VPP 在人群中的降血压功能, 研究表明, 在标准化的安慰剂对照试验中, 摄入富含酪蛋白衍生的降高血压肽 (RYLGY 和 AYFYPEL) 的酸奶 6 周后, 受试者包括 (1 194 名) 的 SBP 显著降低了 12 mmHg^[85]。Kawasaki 等将沙丁鱼肌肉衍生的二肽 (VY) 用于人体临床试验, 29 名高血压患者的随机双盲安慰剂对照试验显示, 治疗 4 周后, SBP 和 DBP 分别降低了 9.3 和 5.2 mmHg, 且没有检测到副作用^[78]。Crippa 等人通过随机、双盲安慰剂对照试验研究半脂肪奶酪 Grana Padano 释放的 ACE 抑制肽在 30 名轻度-中度高血压患者中的抗高血压作用, 其中膳食与 Grana Padano 奶酪的整合食品导致受试人群血压显著的降低, 24 h 平均下降 (相对于安慰剂) 的 SBP 为 3.5 mmHg, DBP 为 2.4 mmHg^[86]。Li 等研究了豌豆蛋白水解物中 ACE 抑制肽 (< 3 kDa) 的降血压作用, 在为期 3 周的随机双盲安慰剂对照交叉人体干预试验 (7 名志愿者) 中, 分别在第 2 周和第 3 周获得 5 和 6 mmHg 的 SBP 显著 ($P < 0.05$) 减少 (超过安慰剂)^[87]。食品源 ACE 抑制肽的药代动力学和药效学在啮齿动物和人类中可能是不同的, 因此, 需要更多来自不同种族的志愿者进行临床研究来评估食品源 ACE 抑制肽的降高血压功效。

8 小结与展望

本文综述了动物、植物和微生物发酵食品源 ACE 抑制肽的研究进展, 总结了 ACE 抑制肽降血压的分子机制和临床研究的现状。目前, 高血压在世界范围内流行。NCD-RisC 的数据显示 1975 年至 2015 年的 40 年间, 世界上成年人的高血压患者从 5.9 亿增加到 11.3 亿^[88]。近年来的统计数据表明我国 35~75 岁的成年人中 44.7% 人群患有高血压, 只有 30.1% 的高血压人群得到治疗, 而真正能控制血压的人群只有 7.2%^[89]。所以, 高血压的预防显得尤为重要。现在对筛选食源 ACE 抑制肽的研究较多, 但通过临床试验的 ACE 抑制肽仍然十分有限。今后, 需要进一步地研究和评估这些食源 ACE 抑制肽在人体临床研究中的生理功效。同时, 需要进一步研究 ACE 抑制肽降高血压的分子机制和药代动力学, 以及影响其稳定性和生物利用度的结构特征。另外, 目前对 ACE 抑制肽的研究通常在实验室进行, 今后需要进行放大/中试工厂规模的研究, 并建立有效的工业化规模生产。同时还要加强食源 ACE 抑制肽安全性研究和质量控制, 确保消费者安全。我们相信在不远的将来, 通过研究人员、食品制造商和营养学家们的共同努力, 一定会开发出 ACE

抑制肽的更多食物来源,提高其生物活性,并将其研制出保健食品。这种富含 ACE 抑制肽的降高血压功能性食品或膳食补充剂虽然不能替代治疗高血压的药物,但可以用于预防高血压。

参考文献:

- [1] GALLEGO M, MORA L, TOLDRÁ F. Health relevance of antihypertensive peptides in foods[J]. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 19: 8-14.
- [2] DALIRI E B M, LEE B H, OH D H. Current trends and perspectives of bioactive peptides[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(13): 2273-2284.
- [3] WILLIAMS B. Drug discovery in renin-angiotensin system intervention: past and future[J]. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2016, 10(3): 118-125.
- [4] DASKAYA-DIKMEN C, YUCETEPE A, KARBANCIOGLU-GULER F, et al. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants[J]. *Nutrients*, 2017, 9(4): 316.
- [5] CHO S, CHO H W, WOO K W, et al. *Nelumbo nucifera* receptaculum extract suppresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. *Molecules*, 2019, 24(9):E1647.
- [6] SILTARI A, KORPELA R, VAPAATALO H. Bradykinin-induced vasodilatation: Role of age, ACE1-inhibitory peptide, mas- and bradykinin receptors[J]. *Peptides*, 2016, 85: 46-55.
- [7] LAVOIE J L, SIGMUND C D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system: an endocrine and paracrine system[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6): 2179-2183.
- [8] OVANDO C A, DE CARVALHO J C, VINÍCIUS DE MELO PEREIRA G, et al. Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from *Spirulina*: A review[J]. *Food Rev Int*, 2018, 34(1): 34-51.
- [9] BHAT Z F, KUMAR S, BHAT H F. Antihypertensive peptides of animal origin: A review[J]. *Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(3): 566-578.
- [10] OGIHARA T, MIKAMI H, KATAHIRA K, et al. Comparative study of the effects of three angiotensin converting enzyme inhibitors on the cough reflex[J]. *Am J Hypertens*, 1991, 4(1_Pt_2): 46S-51S.
- [11] GU Y C, WU J P. LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins[J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2682-2690.
- [12] PRYDE P G, SEDMAN A B, NUGENT C E, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1993, 3(9): 1575-1582.
- [13] COOPER W O, HERNANDEZ-DIAZ S, ARBOGAST P G, et al. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(23): 2443-2451.
- [14] ALUKO R E. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides[J]. *Curr Opin Food Sci*, 2015, 4: 44-50.
- [15] KIM H, SONG H J, HAN H R, et al. Translation and validation of the dietary approaches to stop hypertension for Koreans intervention[J]. *J Cardiovasc Nurs*, 2013, 28(6): 514-523.
- [16] KIM H, ANDRADE F C D. Diagnostic status of hypertension on the adherence to the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet[J]. *Prev Med Rep*, 2016, 4: 525-531.
- [17] MADDOCK J, ZIAUDDEN N, AMBROSINI G L, et al. Adherence to a dietary approaches to stop hypertension (DASH)-type diet over the life course and associated vascular function: a study based on the MRC 1946 British birth cohort[J]. *Br J Nutr*, 2018, 119(5): 581-589.
- [18] BAI G Y, ZHANG J, ZHAO C S, et al. Adherence to a healthy lifestyle and a DASH-style diet and risk of hypertension in Chinese individuals[J]. *Hypertens Res*, 2017, 40(2): 196-202.
- [19] RODRIGUEZ-ITURBE B, PONS H, JOHNSON R J. Role of the immune system in hypertension[J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(3): 1127-1164.
- [20] SATOU R, PENROSE H, NAVAR L G. Inflammation as a regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2018, 20(12): 100.
- [21] BANERJEE P, SHANTHI C. Isolation of novel bioactive regions from bovine Achilles tendon collagen having angiotensin I-converting enzyme-inhibitory properties[J]. *Process Biochem*, 2012, 47(12): 2335-2346.
- [22] ESCUDERO E, TOLDRÁ F, SENTANDREU M A, et al. Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digest of pork meat[J]. *Meat Sci*, 2012, 91(3): 382-384.
- [23] MIRDHAYATI I, HERMANIANTO J, WIJAYA C H, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and antihypertensive activities of protein hydrolysate from meat of Kacang goat (*Capra aegagrus hircus*)[J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(10): 3536-3542.
- [24] LIU J B, YU Z P, ZHAO W Z, et al. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates[J]. *Food Chem*, 2010, 122(4): 1159-1163.
- [25] YU Z P, LIU B Q, ZHAO W Z, et al. Primary and secondary structure of novel ACE-inhibitory peptides from egg white protein[J]. *Food Chem*, 2012, 133(2): 315-322.
- [26] YOUSR M, HOWELL N. Antioxidant and ACE inhibitory bioactive peptides purified from egg yolk proteins[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 29161-29178.
- [27] WU Q Y, JIA J Q, YAN H, et al. A novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein: Biochemical characterization and molecular docking study[J]. *Peptides*, 2015, 68: 17-24.
- [28] WANG Y, JIANG Y Q, YIN Y G, et al. Identification and inhibitory mechanism of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine hemoglobin[J]. *Protein J*, 2017, 36(3): 166-173.
- [29] NEVES A C, HARNEDY P A, O'KEEFFE M B, et al. Peptide identification in a salmon gelatin hydrolysate with antihypertensive, dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidant activities[J]. *Food Res Int*, 2017, 100: 112-120.
- [30] BALTI R, BOUGATEF A, SILA A, et al. Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats[J]. *Food Chem*, 2015, 170: 519-525.
- [31] RAWENDRA R D S, AISHA, CHEN S H, et al. Isolation and characterization of a novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory tripeptide from enzymatic hydrolysis of soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) egg white: in vitro, in vivo, and in silico study[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(50): 12178-12185.
- [32] MAS-CAPDEVILA A, PONS Z, ALEIXANDRE A, et al.

- Dose-related antihypertensive properties and the corresponding mechanisms of a chicken foot hydrolysate in hypertensive rats[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1295.
- [33] CHEN Y Y, GAO X, WEI Y X, et al. Isolation, purification and the anti-hypertensive effect of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from *Ruditapes philippinarum* fermented with *Bacillus natto*[J]. *Food Funct*, 2018, 9(10): 5230-5237.
- [34] LEE J K, HONG S, JEON J K, et al. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *Brachionus rotundiformis*[J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(21): 5255-5259.
- [35] ZOU P, WANG J L, HE G Q, et al. Purification, identification, and in vivo activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, from ribbonfish (*Trichiurus haumela*) backbone[J]. *J Food Sci*, 2014, 79(1): C1-C7.
- [36] ZHANG Q, SONG C C, ZHAO J, et al. Separation and characterization of antioxidative and angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from jellyfish gonad hydrolysate[J]. *Molecules*, 2018, 23(1): 94.
- [37] WU S G, SUN J H, TONG Z F, et al. Optimization of hydrolysis conditions for the production of angiotensin-I converting enzyme-inhibitory peptides and isolation of a novel peptide from lizard fish (*Saurida elongata*) muscle protein hydrolysate[J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(5): 1066-1080.
- [38] GAO X J, LI X Q, YAN P S, et al. Identification and functional mechanism of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory dipeptides from *Xerocomus badius* cultured in shrimp processing waste medium[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1-9.
- [39] LI Y, ZHOU J Z, HUANG K H, et al. Purification of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide with an antihypertensive effect from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(5): 1320-1325.
- [40] CHEN J W, LIU S S, YE R, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: purification and characterization[J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(4): 1684-1692.
- [41] SHI A M, LIU H Z, LIU L, et al. Isolation, purification and molecular mechanism of a peanut protein-derived ACE-inhibitory peptide[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e111188.
- [42] LIU C L, FANG L, MIN W H, et al. Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.)(J). *Food Chem*, 2018, 245: 471-480.
- [43] HAN R X, MAYCOCK J, MURRAY B S, et al. Identification of angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from oilseed proteins using two integrated bioinformatic approaches[J]. *Food Res Int*, 2019, 115: 283-291.
- [44] GENG X R, TIAN G T, ZHANG W W, et al. A tricholoma matsutake peptide with angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24130.
- [45] SORNWATANA T, BANGPHOOMI K, ROYTRAKUL S, et al. Chebulin: *Terminalia chebula* Retz. fruit-derived peptide with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62(6): 746-753.
- [46] JOEL C, SUTOPO C, PRAJITNO A, et al. Screening of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from *Caulerpa lentillifera*[J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 3005.
- [47] DENG Z Z, LIU Y J, WANG J, et al. Antihypertensive effects of two novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from *Gracilariopsis lemaneiformis* (rhodophyta) in spontaneously hypertensive rats (SHRs)[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(9): 299.
- [48] GARCÍA M C, ENDERMANN J, GONZÁLEZ-GARCÍA E, et al. HPLC-Q-TOF-MS identification of antioxidant and antihypertensive peptides recovered from cherry (*Prunus cerasus* L.) subproducts[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(5): 1514-1520.
- [49] ZENEZINI CHIOZZI R, CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, et al. Identification of three novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from cauliflower by-products by multidimensional liquid chromatography and bioinformatics[J]. *J Funct Foods*, 2016, 27: 262-273.
- [50] CONNOLLY A, O'KEEFFE M B, PIGGOTT C O, et al. Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers' spent grain protein isolate[J]. *Food Chem*, 2015, 176: 64-71.
- [51] LI B, QIAO L S, LI L L, et al. Novel antihypertensive peptides derived from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *Ma-yuen* stapf) glutelin[J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 123.
- [52] PRIYANTO A D, DOERKSEN R J, CHANG C I, et al. Screening, discovery, and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from proteolytic hydrolysate of bitter melon seed proteins[J]. *J Proteomics*, 2015, 128: 424-435.
- [53] GONZALEZ-GONZALEZ C, GIBSON T, JAUREGI P. Novel probiotic-fermented milk with angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced by *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5[J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 167(2): 131-137.
- [54] CHEN Y F, LIU W J, XUE J G, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9[J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(11): 6680-6692.
- [55] WU H, RUI X, LI W, et al. Whole-grain oats (*Avena sativa* L.) as a carrier of lactic acid bacteria and a supplement rich in angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides through solid-state fermentation[J]. *Food Funct*, 2018, 9(4): 2270-2281.
- [56] TOLDRÁ F, REIG M, ARISTOY M C, et al. Generation of bioactive peptides during food processing[J]. *Food Chem*, 2018, 267: 395-404.
- [57] UDENIGWE C C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research[J]. *Trends Food Sci Tech*, 2014, 36(2): 137-143.
- [58] KENT S. Chemical protein synthesis: Inventing synthetic methods to decipher how proteins work[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(18): 4926-4937.
- [59] PINHEIRO-JÚNIOR E L, BOLDRINI-FRANÇA J, DE CAMPOS ARAÚJO L M P, et al. LmrBPP9: A synthetic bradykinin-potentiating peptide from *Lachesis muta* rhombeata venom that inhibits the angiotensin-converting enzyme activity in vitro and reduces the blood pressure of hypertensive rats[J]. *Peptides*, 2018, 102: 1-7.
- [60] JALLAPALLY A, ADDLA D, BAGUL P, et al. Design, synthesis and evaluation of novel 2-butyl-4-chloroimidazole derived peptidomimetics as angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(13): 3526-3533.

- [61] WANG Z L, ZHANG S S, JIN H W, et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides: Chemical feature based pharmacophore generation[J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(8): 3428-3433.
- [62] 任锦, 曹刚, 张瑞洁, 等. ACE 抑制肽的合成及其活性研究[J]. *药学学报*, 2011, 46(1): 58-63.
- [63] AGYEI D, TSOPMO A, UDENIGWE C C. Bioinformatics and peptidomics approaches to the discovery and analysis of food-derived bioactive peptides[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(15): 3463-3472.
- [64] LEE S Y, HUR S J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants[J]. *Food Chem*, 2017, 228: 506-517.
- [65] MONTONE C M, CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, et al. Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus* microalgae[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(15): 3573-3586.
- [66] TRABUCO L G, LISE S, PETSALAKI E, et al. PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(W1): W423-W427.
- [67] KESKA P, STADNIK J. Antimicrobial peptides of meat origin - an in silico and in vitro analysis[J]. *Protein Pept Lett*, 2017, 24(2): 165-173.
- [68] VUKIC V R, VUKIC D V, MILANOVIC S D, et al. In silico identification of milk antihypertensive di- and tripeptides involved in angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity[J]. *Nutr Res*, 2017, 46: 22-30.
- [69] GANGOPADHYAY N, WYNNE K, O'CONNOR P, et al. In silico and in vitro analyses of the angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeum vulgare*) protein concentrates[J]. *Food Chem*, 2016, 203: 367-374.
- [70] POOJA K, RANI S, PRAKASH B. In silico approaches towards the exploration of rice bran proteins-derived angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides[J]. *Int J Food Prop*, 2017, 20(2):2178-2191.
- [71] UDENIGWE C C, HOWARD A. Meat proteome as source of functional biopeptides[J]. *Food Res Int*, 2013, 54(1): 1021-1032.
- [72] DALLAS D C, GUERRERO A, KHALDI N, et al. Extensive in vivo human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides[J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(5): 2295-2304.
- [73] PATLAK M. From viper's venom to drug design: treating hypertension[J]. *FASEB J*, 2004, 18(3):421.
- [74] TU M L, LIU H X, ZHANG R Y, et al. Analysis and evaluation of the inhibitory mechanism of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide derived from casein hydrolysate[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(16): 4139-4144.
- [75] LEE S Y, HUR S J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants[J]. *Food Chem*, 2017, 228: 506-517.
- [76] FITZGERALD R J, MURRAY B A. Bioactive peptides and lactic fermentations[J]. *Int J Dairy Tech*, 2006, 59(2): 118-125.
- [77] RONG J M, JI H Z, WU X W, et al. Increased expression of chymase in inflammatory polyps in elderly patients with functional bowel disorder[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(2): 371-374.
- [78] KAWASAKI T, SEKI E, OSAJIMA K, et al. Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects[J]. *J Hum Hypertens*, 2000, 14(8): 519-523.
- [79] WANG Z Q, WATANABE S, KOBAYASHI Y, et al. Trp-His, a vasorelaxant di-peptide, can inhibit extracellular Ca^{2+} entry to rat vascular smooth muscle cells through blockade of dihydropyridine-like l-type Ca^{2+} channels[J]. *Peptides*, 2010, 31(11): 2060-2066.
- [80] FITZGERALD C, GALLAGHER E, DORAN L, et al. Increasing the health benefits of bread: Assessment of the physical and sensory qualities of bread formulated using a renin inhibitory *Palmaria palmata* protein hydrolysate[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2014, 56(2): 398-405.
- [81] YU Z P, YIN Y G, ZHAO W Z, et al. Antihypertensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide RVPSL on spontaneously hypertensive rats by regulating gene expression of the Renin-Angiotensin system[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(4): 912-917.
- [82] DOYEN A, UDENIGWE C C, MITCHELL P L, et al. Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes[J]. *Food Chem*, 2014, 145: 66-76.
- [83] FERNÁNDEZ-MUSOLES R, LÓPEZ-DÍEZ J J, TORREGROSA G, et al. Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction[J]. *Peptides*, 2010, 31(10): 1926-1933.
- [84] FEUERSTEIN G, SIREN L. The opioid peptides. A role in hypertension?[J]. *Hypertension*, 1987, 9(6): 561-565.
- [85] FITZGERALD R J, MURRAY B A. Bioactive peptides and lactic fermentations[J]. *Int J Dairy Technol*, 2010, 59(2): 118-125.
- [86] CRIPPA G, ZABZUNI D, BRAVI E, et al. Randomized, double blind placebo-controlled pilot study of the antihypertensive effects of Grana Padano D.O.P. cheese consumption in mild - moderate hypertensive subjects[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21):7573-7581.
- [87] LI H, PRAIRIE N, UDENIGWE C C, et al. Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(18): 9854-9860.
- [88] NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants[J]. *Lancet*, 2017, 389(10064): 37-55.
- [89] LU J P, LU Y, WANG X C, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in China: data from 1.7 million adults in a population-based screening study (China PEACE Million Persons Project)[J]. *Lancet*, 2017, 390(10112): 2549-2558.