基于 Caco-2 细胞模型对 DPP-IV 抑制肽 IPQVS 的活性评价研究

徐斐然[1,2,3]，徐宝才[1,2]，鞠兴荣[*3]

（1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院，安徽 合肥 230601；2. 合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心，安徽 合肥 230601；3. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要：基于 Caco-2 细胞模型研究了二肽基肽酶-4（DPP-IV）抑制肽（IPQVS）的活性，评价了小肠吸收与降解作用对 DPP-IV 抑制活性的影响。测定了 IPQVS 和其降解肽片段 PQVS、QVS、VS 的表观渗透系数（Papp），分别为（1.35±0.09）×10^{-6}、（1.46±0.18）×10^{-6}、（0.95±0.08）×10^{-6}、（3.01±0.15）×10^{-6} cm/s。其中，IPQVS 主要是通过胞吞的形式跨 Caco-2 细胞单层转运，IPQVS 以剂量依赖型方式抑制 Caco-2 细胞单层中的 DPP-IV 活性，不会影响 DPP-IV 中 mRNA 的表达（P>0.05），其 IC_{50} 为（101.66±6.02）μmol/L，数值高于体外化学底物法测量值。分子对接结果表明 DPP-IV 和 IPQVS 降解产物（PQVS 和 QVS）的结合弱于 IPQVS，结合的位点也发生了明显减少，这极大限制了 IPQVS 的 DPP-IV 抑制活性。

关键词：二肽基肽酶-4（DPP-IV）；IPQVS；Caco-2 细胞模型；吸收降解

中图分类号：TS 201.4　**文章编号**：1673-1689（2021）12-0026-9　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.12.004

Activity Evaluation of DPP-IV Inhibitory Peptide IPQVS Using Caco-2 Cell Monolayers

XU Feiran[1,2,3]，*XU Baocai*[1,2]，*JU Xingrong*[*3]

（1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: The activity of inhibitory peptide (IPQVS) of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV) was studied based on the Caco-2 cell model, and the effects of intestinal absorption and degradation on the inhibitory activity of DPP-IV were evaluated. The apparent absorption rate (Papp) values of IPQVS and their degraded peptide fragments were measured as (1.35±0.09)×10^{-6} cm/s, (1.46±0.18)×10^{-6} cm/s, (0.95±0.08)×10^{-6} cm/s and (3.01±0.15)×10^{-6} cm/s, respectively. IPQVS was mainly transported across Caco-2 cell monolayers through endocytosis. IPQVS inhibited the DPP-IV activity in the Caco-2 cell monolayer in a dose-dependent manner, and mRNA expression in DPP-IV was not affected (P>0.05). The IC_{50} value was (101.66±6.02) μmol/L, which was higher than that measured *in vitro* by chemical substrate method. The results of molecular docking showed that the binding of

收稿日期：2021-07-28

基金项目：国家“十三五”重点研发计划项目（2016YFD0400206）；合肥工业大学共性技术研发平台 A 类研究项目（PA2021GDGP0062）。

*通信作者：鞠兴荣（1957—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品科学与工程研究。E-mail：xingrongju@163.com

DPP-IV with the degradation products of IPQVS, i.e., PQVS and QVS, was weaker than binding with IPQVS, and the binding sites were also significantly reduced, which greatly restricted the DPP-IV inhibitory activity of IPQVS.

Keywords: dipeptidyl peptidase-4(DPP-IV), IPQVS, Caco-2 cell model, absorption and degradation

当前，基于反应底物甘氨酰-脯氨酰-对硝基苯（Gly-Pro-*p*-nitroanilide）的体外酶促法测定 IPQVS 的活性存在不足与局限性。其主要体现在肠道中的若干环境因素可能会限制寡肽对 DPP-IV 的抑制活性，例如，小肠消化酶的水解作用会破坏寡肽的一级序列结构，寡肽在小肠上皮细胞中的渗透率会影响 DPP-IV 抑制反应的进行[1-2]，此外，大多体外实验使用的 DPP-IV 源自猪胰腺，与人类 DPP-IV 存在少许差异。

文献报道，分化的人类结肠癌细胞系（Caco-2 细胞）中 DPP-IV 的 mRNA 表达水平较高，接近于正常人体小肠细胞的表达水平，重要的是该细胞系分化后还可以形成拥有紧密连接蛋白的致密单层与小肠细胞肠腔侧刷状缘绒毛结构[3]。此外，Caco-2 细胞分化为极化的肠上皮细胞后可以表达与人肠上皮细胞相同的刷状边缘酶、肽酶、碱性磷酸酶和二糖酶等[4]。因此，Caco-2 细胞单层模型是一种成熟的包括抑制剂在内的众多口服药物的筛选工具，通过它可以研究药物的吸收率、降解和转化[5-6]。近年来，有大量关于活性寡肽的小肠吸收与转运机制的研究，其中就包括利用 Caco-2 细胞单层模型鉴定并研究鸡蛋蛋白源 DPP-IV 抑制肽 IRDLLER、YAEERYP 和 IRNVLQPS[7]；鳙鱼蛋白源 DPP-IV 抑制肽 IADHFL[8]。

在先前研究中[9]，菜籽蛋白源 IPQVS 被证实具有出色的 DPP-IV 抑制活性（IC_{50}=(52.16±5.91) μmol/L）。基于分化的 Caco-2 细胞模型对 IPQVS 的 DPP-IV 抑制活性进行测定，阐明其在模拟小肠上皮细胞中的吸收与降解机制，使用分子对接方法揭示小肠吸收、肠肽酶降解作用对 IPQVS 活性的影响及规律。这项研究的创新之处在于使用了体外 Caco-2 细胞单层模型，该模型不仅更准确地测定了 IPQVS 的活性，还提供了其在小肠中吸收、降解的相关参数。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氢氧化钠、盐酸、Tris-HCl：中国国药集团公司产品；人体结肠癌细胞系 Caco-2 细胞株：中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心产品；胎牛血清（FBS）、胰蛋白酶（含体积分数 0.25% 的 EDTA）、DMEM 1x（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）高糖（4.5 g/L *D*-葡萄糖）培养基：美国 Gibco 公司产品；重组人类 DPP-IV（EC 3.4.14.5）、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐（MTT）、TRIzol 试剂、Diprotin A（Ile-Pro-Ile，纯度≥95%）：美国 Sigma 公司产品；三氟乙酸（TFA）、乙腈、甲醇均为色谱级：德国 Merck 公司产品；无 RNA 酶水：国药集团化学试剂有限公司产品；FMOC 固相合成的 IPQVS 及其降解产物 PQVS、QVS、VS：合肥国肽生物有限公司产品；DPP-IV GloTM 测定试剂盒、siRNA（DPP-IV）、Lipofectamine 2000 转染试剂、普通细胞培养板、离心管（50、15、2 mL）：美国 Thermo Fisher 公司产品；12 孔 Transwell® 培养板（聚酯膜，孔径 0.4 μm，膜面积 1.12 cm^2）、25 cm^2 密封盖细胞培养皿、0.22 μm 有机微孔滤膜：美国康宁公司产品。

Beckman Coulter J6 冷冻离心机：贝克曼库尔特有限公司产品；SX-500 快速自动高压灭菌锅：日本 Tomy Digital Biology 公司产品；FE20K 精密 pH 计：梅特勒仪器公司产品；SpectraMax M2e 多功能酶标仪：美国 Molecular Devices 公司产品；7500 实时荧光定量 PCR 仪：美国 AB SCIEX 公司产品；Class II Type B2 生物安全柜、3701 型二氧化碳恒温培养箱、超低温冰箱：美国 Thermo Fisher 公司产品；凝胶成像系统：美国 UVP imagaing 公司产品；LSM700 激光共聚焦显微镜：德国 Zeiss 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 Caco-2 细胞吸收实验 将 Caco-2 细胞以

5×10^4 个/cm^2 的密度接种在 Transwell® 细胞培养平板的插入物(上室,AP 侧,即基底内侧)上,在 12 孔细胞培养板的上下室的每个孔中加入 0.5 mL DMEM,每隔 1 d 更换细胞培养基。培养 21 d 后,Caco-2 细胞完全分化为致密单层结构。在进行跨细胞转运实验测定之前,通过用 Millicell ERS-2 测量跨上皮电阻(TEER)来评估 Transwell® 上室中细胞单层的完整性与致密性。跨膜电阻值 TEER 高于 400 Ω 的 Caco-2 细胞单层可以被用于模拟小肠上皮细胞吸收、转运实验。丢弃完全分化的细胞单层中的培养基,使用 PBS 洗涤细胞单层两次。随后,将 0.5 mL 含 IPQVS 或其降解产物的 HBSS 溶液(最终浓度为 5 mmol/L)添加到 AP 侧,并将 1.5 mL 不含测试样品的 HBSS 溶液添加到 BL 侧(基底外侧)。Caco-2 细胞单层模拟小肠上皮细胞吸收、转运实验共进行 120 min,在 90 min 时从 Caco-2 细胞单层的 AP 侧回收培养液,在 120 min 时从 Caco-2 细胞单层的 BL 侧回收培养液,进行液质联用(HPLC-MS)分析。为了确定 IPQVS 及其降解产物经 Caco-2 细胞吸收的机制,在 Caco-2 细胞单层中添加了降低细胞间紧密连接的松弛素 D(0.5 μg/mL)、转胞吞抑制剂渥曼青霉素(500 nmol/L)和肽转运蛋白 1(PepT1)竞争抑制剂 Gly-Pro(10 mmol/L)。以上试剂与 Caco-2 细胞单层培养 1 h 后,在 AP 侧添加 5 mmol/L IPQVS 或其降解产物。Papp 计算公式如下:

$$Papp=(dM_R(t)\times dt^{-1})/(A\times C_{d0})$$

式中:Papp 为表观渗透系数,cm/s;C_{d0} 是 Transwell® 小室 AP 侧的初始肽浓度,mmol/L;M_R 是 Transwell® 小室 BL 侧转运后寡肽的浓度,mmol/L;t 是时间,s;A 是 Transwell® 小室 AP 侧细胞单层的表面积,cm^2。

1.2.2 细胞培养与毒性实验 复苏一瓶 Caco-2 细胞(2.0 mL),将其置于型号为 T75 的细胞培养瓶中,培养液为含有 FBS(体积分数 10%)、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μg/mL)的 DMEM,每 2 d 更换一次培养液。将 Caco-2 细胞在体积分数为 5%的 CO_2 及 37 ℃的细胞培养箱中孵育。当细胞生长至瓶底面积的 80%~90%,使用胰蛋白酶(含体积分数 0.25%的 EDTA)以 1:2 或 1:3 的分流比对细胞进行传代,每次传代的密度限定为 1×10^5 个/cm^2。使用的 Caco-2 细胞均在第 10 至 25 代。通过 MTT 比色分析法[10]对 Caco-2 细胞相对活力进行了测定。将 Caco-2 细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种在 96 孔板中,并在体积分数 5%的 CO_2 及 37 ℃环境中孵育。培养 21 d 后,移出培养基,分别用 200 μL 含有不同浓度(0.5、2.0、5.0 mmol/L)的 IPQVS 及其降解产物,以及 Diprotin A 培养基替换,进一步孵育 2 h 或 24 h。仅加入DMEM 的孔作为对照组。再将 200 μL MTT(5.0 mg/mL)加入每个孔,Caco-2 细胞在 37 ℃下继续孵育 4 h。接着除去含有 MTT 的培养基,并向每个孔中加入150 μL 的 DMSO 溶液。将 96 孔板放置在台式振荡器上振荡 0.5 h。最后,在酶标仪中于 570 nm 处测量 96 孔板吸光度。与对照相比,细胞相对活力降低超过 10%的肽样品浓度被认为具有细胞毒性。

1.2.3 DPP-IV 抑制活性测定 参照文献[11]进行 DPP-IV 抑制率的测定。整个实验在 37 °C 恒温条件下进行,使用 Diprotin A 作为阳性对照物。实验组为 50 μL 含有反应底物 Gly-Pro-*p*-nitroanilide 的测试样品,底物最终浓度 0.2 mmol/L。阴性对照包含 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0,50 μL)和反应底物。通过添加 DPP-IV(质量浓度 0.002 5 mg/mL)来引发反应,反应 1 h 后立即加入 1 mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0)中止反应。所有试剂和样品均在 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中稀释。使用酶标仪在 405 nm 下读取 96 孔板的吸光度。不同样品中 DPP-IV 的 IC_{50} 通过测试样品浓度对数值-相对活性的函数作图,计算 50%DPP-IV 被抑制所需的测试样品浓度。参考已有的对体外 DPP-IV 活性的研究[9],使用 DPP-IV GloTM 测定试剂盒评估 IPQVS 的抑制活性。将 Caco-2 细胞以 5×10^4 个/cm^2 的密度接种到 12 孔 Transwell® 板中,用 25~250 μmol/L IPQVS 或其降解产物处理 Caco-2 细胞 24 h。然后使用 BCA 蛋白质分析试剂盒评估每个样品的蛋白质质量浓度,使用 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)调节最终体积,将 Caco-2 细胞提取物和上清液中的蛋白质质量浓度归一化。使用上层培养液和细胞裂解液的混合物测量 DPP-IV 的含量。使用酶标仪在 10 min 内测量吸光度,该吸光度与 DPP-IV 活性成正比。将处理样品与对照样品进行比较,对照组样品中仅含有加入 DMEM 的细胞裂解物和细胞上清液。

1.2.4 DPP-IV 基因表达分析 使用 Lipofectamine 2000 和不含血清的优化 DMEM 培养基配置得到混合物(siRNA(DPP-IV)浓度为 40 pmol/L)。取出接种了 Caco-2 细胞的 6 孔板,用 PBS 清洗两次,再用不含血清的优化 DMEM 培养基清洗一次。吸弃清洗

液,每孔加入不含血清的优化 DMEM 培养基,再加 0.5 mL 含 siRNA(DPP-IV)的混合液。轻轻摇匀,放入细胞培养箱孵育 6 h (体积分数 5% CO_2,37 ℃)。6 h 后吸弃孔板中液体,换入正常的含血清培养液继续孵育 24 h,再用不同浓度的 IPQVS 处理 Caco-2 细胞 24 h,随后 Caco-2 细胞可用于后续实验。通过蛋白质印迹法结果可以表征 siRNA 对 DPP-IV 基因的沉默效率[12]。

1.2.5 免疫荧光实验 用 250 μmol/L IPQVS 和 50 μmol/L Diprotin A 处理 Caco-2 细胞单层,再用 D-PBS 洗涤 3 次,用体积分数 4%的多聚甲醛水溶液固定 10 min,用体积分数 0.5%Triton X-100 在 25 ℃下放置 5 min。在 25 ℃下用体积分数 5%的牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h 后,将 Caco-2 细胞单层与一抗(浓度比 1:50,在体积分数 5%BSA 中稀释)在 4 ℃下孵育过夜。接下来,将一抗吸弃,用 PBST 溶液洗涤 Caco-2 细胞 3 次,将山羊抗鼠 FITC 二抗的稀释液加入,25 ℃下避光孵育 2 h。二抗孵育完毕以后,以 PBST 洗涤 Caco-2 细胞 3 次,将 DAPI 染色液加入,25 ℃下避光孵育 10 min。最后用 PBST 洗涤 Caco-2 细胞 3 次,使用激光共聚焦显微镜获取 Caco-2 细胞单层图像。

1.2.6 模拟分子对接 使用分子对接软件(MOE)对 IPQVS 及其代谢物进行分子对接并优化到 DPP-IV(PDB ID:1X70)的结合位点。对接口袋与已发表的文章一致[13-15]。DPP-IV 的 3D 结构可从 RCSB 蛋白质数据库 (www.rcsb.org) 下载。使用 Accelrys Discovery Studio 1.1.2 版软件来去除水分子并优化肽的空间结构。选择产生的具有最小结合能的构象进行分析,并使用 PyMOL 软件生成分子结构。根据一级配体的位置,确定 DPP-IV 活性位点的坐标为 center_x =-10.733,center_y =12.416 和 center_z = 68.829,其中 size_x=20,size_y=20,size_z=20。使用活性位点和底物之间的总相互作用能评估最终稳定肽-底物复合物的分数。

1.3 数据处理

所有实验至少重复 3 次,采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析,两组间比较应用 t 检验,多组间比较应用单因素方差分析。

表格中结果以平均数±标准偏差(SD)表示,图中数据以平均数±标准误差表示。以 P<0.05 作为具有统计学意义的差异判定。

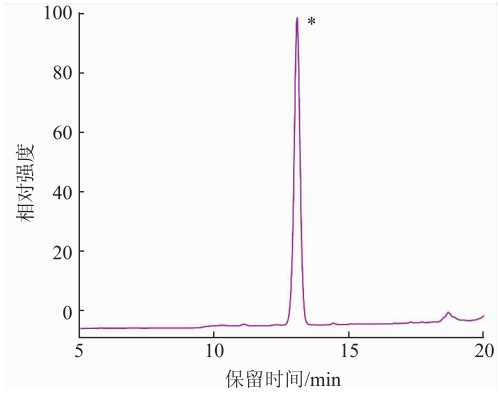
2 结果与分析

2.1 IPQVS 及其降解产物在 Caco-2 细胞模型中的吸收

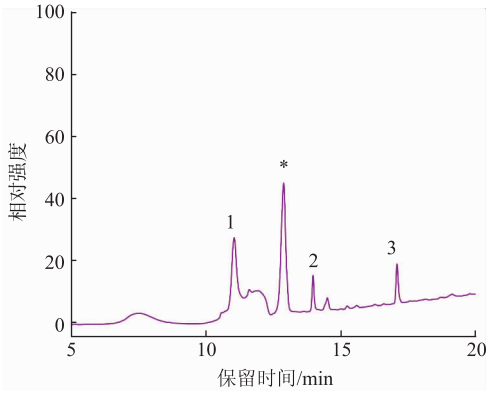
IPQVS 在 Caco-2 细胞单层(经过 21 d 培养)上孵育 90 min 后,52%的 IPQVS 在 Transwell® 的上室 AP 侧保持结构完整,然而转运至下室 BL 侧并保留其原始结构的只占初始量的 2.7%,见图 1 (a)~(c)。Transwell® 小室的 AP 侧和 BL 侧发现了 IPQVS 的 3 个主要降解片段,经 HPLC-MS 鉴定 IPQVS(保留时间为 12.90 min)降解的 3 个肽片段分别是 PQVS(保留时间为 11.07 min)、QVS(保留时间为 13.99 min)和 VS(保留时间为 17.10 min)。表 1 为 IPQVS 及其降解产物跨小肠上皮细胞转运的相关数据,IPQVS 的 Papp 为(1.35±0.09)×10^{-6} cm/s,降解肽 PQVS、QVS、VS 的 Papp 分别为(1.46±018)×10^{-6}、(0.95±0.08)×10^{-6}、(3.01±0.15)×10^{-6} cm/s。不难发现,氨基酸残基数越少的寡肽在小肠吸收上更具优势。如图 1(d)所示,细胞松弛素 D 显著增加了 IPQVS 及其降解产物的吸收量(P<0.05),表明细胞旁路均是 4 条肽的吸收方式。其中疏水性最强的 IPQVS 与二肽 VS 的吸收量在渥曼青霉素预处理的情况下被显著抑制,表明转胞吞作用可能也是它们的吸收方式。值得注意的是,VS 存在 3 种可能的吸收途径(细胞旁路、胞吞转运和 PepT1 转运),这主要因为其氨基酸残基数小于 3,且为疏水性氨基酸。

2.2 IPQVS 及其降解产物对 Caco-2 单层细胞的毒性

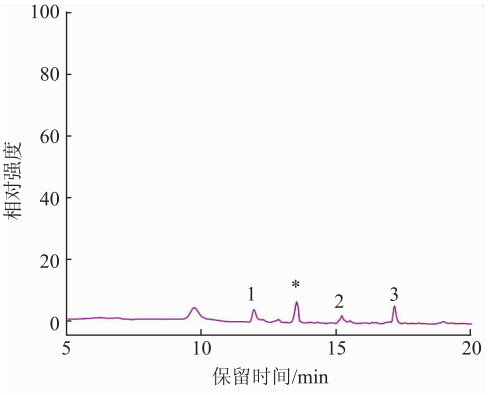
用不同浓度(0.5、2.0、5.0 mmol/L)的 IPQVS 处理单层 Caco-2 细胞后,使用 MTT 法确定单层 Caco-2 细胞相对活力。如图 2(a)所示,浓度为 5.0 mmol/L 的 PQVS、QVS、VS 持续作用 24 h 会显著降低 Caco-2 细胞的相对活力 (P<0.05);浓度为 2.0 mmol/L 及以上的 Diprotin A 作用 24 h 对单层 Caco-2 细胞有毒性,细胞相对活力均低于 90%。但是,同样浓度的上述寡肽作用于 Caco-2 细胞 2 h,细胞相对活力没有显著降低(见图 2(b),P>0.05)。因此,使用浓度为 5.0 mmol/L 的寡肽 IPQVS 及其降解产物进行 2 h 的模拟小肠上皮细胞吸收实验是安全且无生物毒性的。鸡蛋蛋白源降血压肽 LKP 和 IQW 模拟小肠上皮细胞吸收、转运实验的结果与上述相似,Caco-2 细胞与目标肽 (浓度为 2.0、5.0



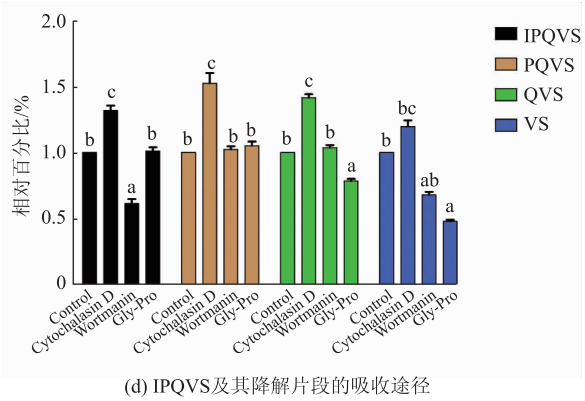
(a) Transwell®板AP侧溶液中初始IPQVS色谱图



(b) 90 min后Transwell®板AP侧溶液中IPQVS及其降解片段色谱图



(c) 120 min后Transwell®板BL侧溶液中IPQVS及其降解片段色谱图

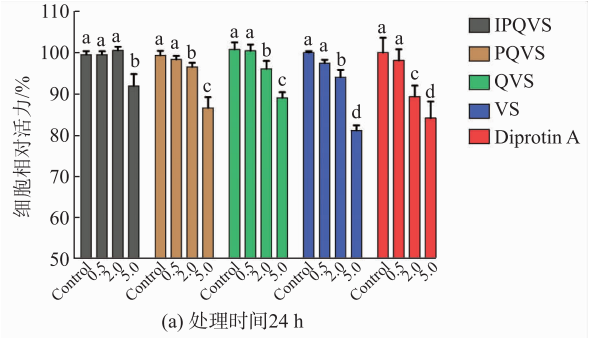


(d) IPQVS及其降解片段的吸收途径

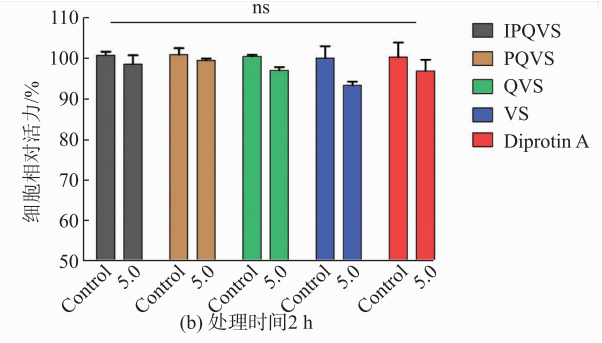
* 代表 IPQVS,1 代表 PQVS,2 代表 QVS,3 代表 VS;Control 为对照组,Cytochalasin D 为细胞松弛素 D,Wortmanin 为渥曼青霉素,Gly-Pro 为 PepT1竞争抑制剂二肽(甘氨酸-脯氨酸);不同小写字母表示数值存在显著性差异(P<0.05)。

图 1　IPQVS 跨 Caco-2 细胞单层膜吸收作用的分析

Fig. 1　Analysis of the transepithelial transport of IPQVS across Caco-2 cell monolayer



(a) 处理时间24 h



(b) 处理时间2 h

Control 为对照组,不同小写字母表示数值存在显著差异(P<0.05),ns 表示不存在显著差异(P>0.05)。

图 2　MTT 法检测 IPQVS 及其降解产物在 Caco-2 细胞中的细胞毒性

Fig. 2　Cytotoxicity of IPQVS and its degradation products in Caco-2 cells by MTT assay

mmol/L)的短时间共同孵育(2 h)不会诱导细胞毒性[16]。

2.3　基于 Caco-2 细胞单层对 IPQVS 的 DPP-IV 抑制活性

如图 3(a)及表 1 所示,IPQVS 以剂量依赖型方式抑制 Caco-2 细胞单层中的 DPP-IV 活性,IC_{50} 为(101.66±6.02) μmol/L,数值高于体外化学底物法测量值。Diprotin A 的 IC_{50} 也从(3.62±0.37) μmol/L 增加至 (12.18±0.36) μmol/L。当 IPQVS 的浓度超过 250 μmol/L 时,抑制率曲线趋于平缓。图 3(d)表明浓度为 250 μmol/L 的 IPQVS 在 Caco-2 细胞单层

中孵育 60、90、180、360 min 后，细胞内 DPP-IV 的相对活性分别降低了 36.49%、42.37%、62.71%和 64.70%。IPQVS 调节 DPP-IV 基因表达的能力亦在 Caco-2 细胞单层上进行了测试。如图 3(b)所示，蛋白质印迹法结果表明 siRNA(DPP-IV)显著降低了 Caco-2 细胞中 DPP-IV 的表达。与对照组相比，siRNA(DPP-IV)组 DPP-IV 的 mRNA 表达水平下降了 50%以上，并具有统计学意义(P<0.01)。不难发现，IPQVS 不会影响 Caco-2 细胞单层中 DPP-IV 的 mRNA 表达。

IPQVS 及其降解产物在体外对 DPP-IV 的 IC_{50} 如表 1 所示，其中 PQVS 和 VS 的 IC_{50} 分别为(120.74±8.60) μmol/L 和 (68.59±4.28) μmol/L，均高于 IPQVS，QVS 的体外 IC_{50} 甚至超过了 500 μmol/L。Caco-2 细胞实验中，PQVS (IC_{50}=(195.69±6.37) μmol/L)和 QVS(IC_{50}>500 μmol/L)对 DPP-IV 的抑制活性显著低于 IPQVS。VS 在 Caco-2 细胞单层模型测定中的 IC_{50} 小于 IPQVS，但由于 VS 含量是 IPQVS 降解产物中最低的，所以并不能改变 IPQVS 在 Caco-2 细胞单层模型中 DPP-IV 抑制率降低的结果。免疫荧光是研究细胞内源蛋白酶表达的一种有效方法[17]。如图 4 所示，与对照组相比，浓度为 250 μmol/L 的 IPQVS 和 50 μmol/L Diprotin A 能够使 Caco-2 细胞单层的 DPP-IV 对应的荧光强度下降 60%以上(P<0.01)。此外，两者处理后的 Caco-2 细胞边缘和培养空隙中的绿色荧光亮度大幅降低(见图 4(a))。

结合表 1 中 IPQVS 及其降解产物对 DPP-IV 的 IC_{50}，推测 IPQVS 在 Caco-2 细胞模型中对 DPP-IV 抑制活性降低的原因是在小肠吸收过程中发生了降解作用，新产生的肽段碎片 PQVS 和 QVS 的 DPP-IV 抑制活性较 IPQVS 发生了不同程度的降低。同样，有研究者发现乳源 DPP-IV 抑制肽 LPYPY 在 Caco-2 细胞单层模型中的降解产物 YPY、LP、YP 的抑制活性均不如 IPQVS，其中抑制活性最强的二肽 YP 的酶抑制率相较于 IPQVS 也下降了 63%[18]。当然，也有特殊的肽被发现，来自鳙鱼蛋白的 DPP-IV 抑制肽 IADHFL 产生了相反的现象，其片段 IADHF 不仅具有更好的 DPP-IV 抑制活性，而且还具有减弱 DPP-IV 基因表达的能力[8]。

表 1　IPQVS 及其降解产物的鉴定、抑制活性及 Papp

Table 1　Amino acid reside sequence, IPQVS activity, and Papp value of IPQVS and its degradation products

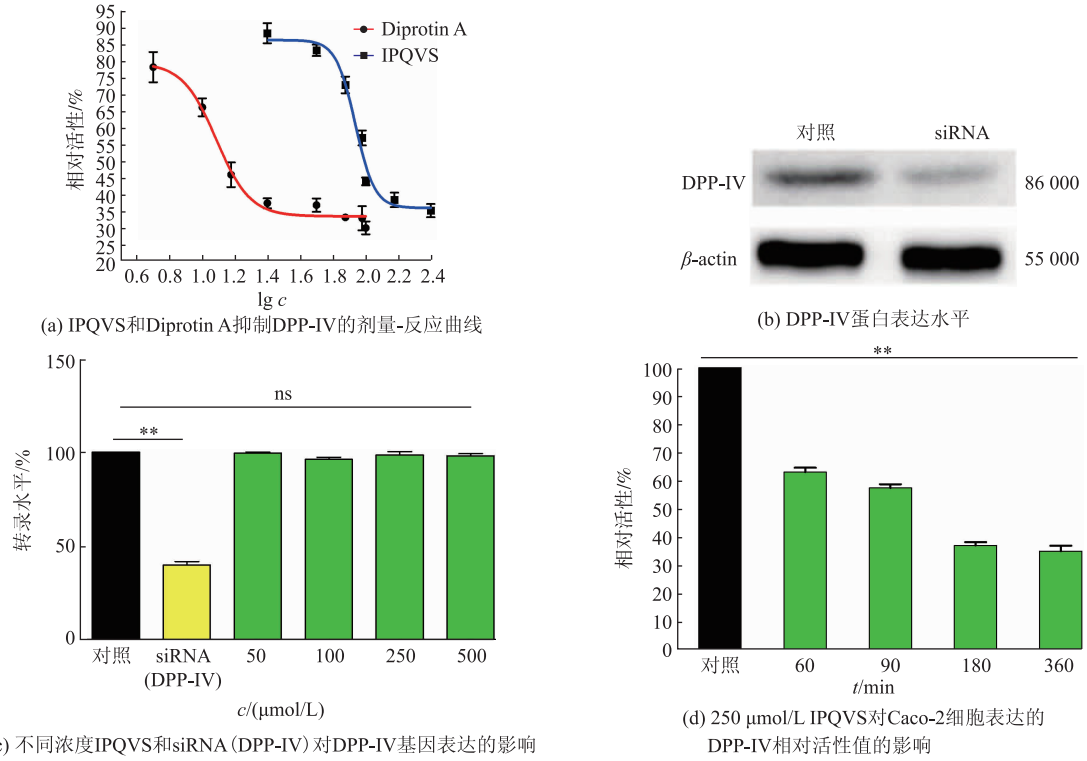
组别	序列	相对分子质量	保留时间/min	IC_{50}/(μmol/L)		Papp/(cm/s)
				体外	Caco-2 细胞单层	
1	IPQVS	542.622 6	13.08	52.16±5.91^{a}	101.66±6.02^{c}	(1.35±0.09)×10^{-6}
2	PQVS	429.470 2	12.90	120.74±8.60^{c}	195.69±6.37^{d}	(1.46±0.18)×10^{-6}
3	QVS	332.354 7	13.99	>500	>500	(0.95±0.08)×10^{-6}
4	VS	204.223 5	17.10	68.59±4.28^{a}	87.92±5.80^{b}	(3.01±0.15)×10^{-6}

注：不同小写字母表示数值存在显著性差异(P<0.05)。

2.4　IPQVS 及其降解产物与 DPP-IV 的分子对接

分子对接实验结果揭示了 IPQVS 及其降解产物与 DPP-IV 之间的相互作用和关键结合位点信息。表 2 中详细列出了 4 条寡肽(IPQVS、PQVS、QVS 和 VS)的分子建模参数与对接信息。IPQVS 和 DPP-IV 相互作用并形成的复合物具有最高的亲和力绝对值。4 条肽的结合能分别为-8.95、-7.99、-6.87、-8.24 kJ/mol。Pymol 3D 图上标记了分子间能量低于-2.0 kJ/mol 的结合位点(见图 5)。IQPVS 与 DPP-IV 的氨基酸残基位点 Arg125、Tyr631、His740、Glu205 和 Glu206 形成了 5 个氢键；此外，IPQVS 的 N 端与 Glu205 形成了离子键。IPQVS 的 3 种降解产物和 DPP-IV 之间的氨基酸残基相互作用位点的数量相对于 IPQVS 发生了减少，特别是对于 QVS，其氨基酸作用位点的数量最少(仅 Glu205 和Glu206)，见图 5(c)。IPQVS 活性在小肠细胞中衰减的现象与先前报道的 DPP-IV 抑制肽 ELHQEEPL 一致[19]。

IPQVS 的降解产物 PQVS、QVS 与 DPP-IV 相互作用中的氢键、π-Cation(阳离子和芳香性体系之间的相互作用)数量减少，进而导致它们与 DPP-IV 之间结合能的绝对值降低。说明 IPQVS 在肠道吸收过程中无法维持其体外原有的 DPP-IV 抑制活性，原因可能是 Caco-2 细胞中包括二肽基肽酶在内的氨基肽酶、内肽酶等肠肽酶会破坏其原有结构[20-21]。



(a) IPQVS和Diprotin A抑制DPP-IV的剂量-反应曲线

(b) DPP-IV蛋白表达水平

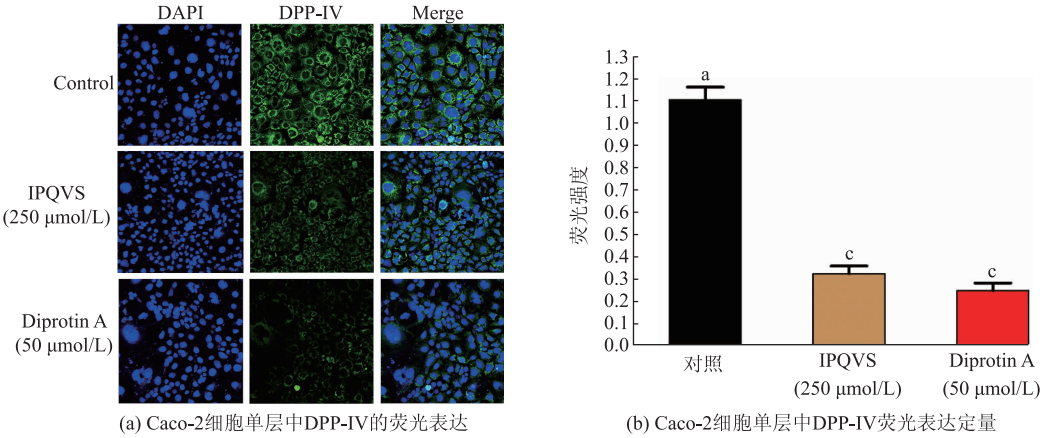
(c) 不同浓度IPQVS和siRNA(DPP-IV)对DPP-IV基因表达的影响

(d) 250 μmol/L IPQVS对Caco-2细胞表达的DPP-IV相对活性值的影响

c 代表样品浓度,** 表示数值存在显著性差异(P<0.05),ns 表示数值不存在显著性差异(P>0.05)。

图 3　IPQVS 对体外 Caco-2 细胞中 DPP-IV 活性的影响

Fig. 3　Effects of IPQVS on DPP-IV activity *in vitro* in Caco-2 cell



(a) Caco-2细胞单层中DPP-IV的荧光表达

(b) Caco-2细胞单层中DPP-IV荧光表达定量

DAPI 为细胞核染色(蓝色荧光),DPP-IV 为绿色荧光,Merge 为 DAPI 与 DPP-IV 的融合显示,Control 为对照;不同小写字母表示数值存在显著性差异(P<0.05)。

图 4　激光共聚焦扫描显微镜的二维荧光检测与定量分析

Fig. 4　Confocal laser scanning microscopy depicting two-dimensional fluorescence detection and quantification

另外，前文涉及的 Caco-2 细胞实验与分子对接实验相结合的方法对 DPP-IV 的筛选与鉴定具有快速、简便且精准的优势[15]。尽管模拟分子对接技术已作为标准化计算工具广泛应用于 DPP-IV 抑制肽的筛选与研究中,但仍需通过体内实验验证预测[22]。

表 2　计算模型对接能量得分和相互作用结果

Table 2　Computational-modeling energy scores and interaction results

酶类型	描述	IPQVS	PQVS	QVS	VS
DPP-IV (PDB ID:1X70)	净电荷 (pH=7.0)	0	0	0	0
	结合能/ (kJ/mol)	−8.95	−7.99	−6.87	−8.24
	氨基酸残基反应数量	12	9	5	10
	关键氨基酸残基	Glu205, His740, Glu206, Arg125, Tyr631	Glu205, His740, Tyr662, Tyr547	Glu205, Glu206	Glu205, Glu206, Tyr547

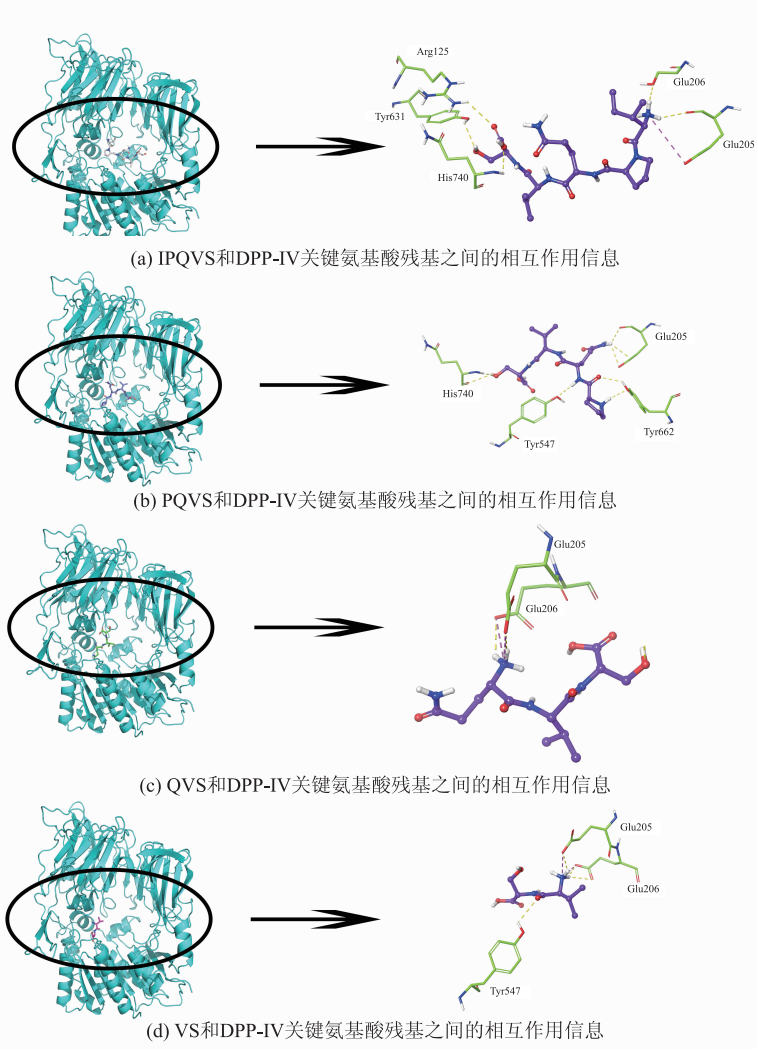


图 5　分子对接结果的 Pymol 3D 图

Fig. 5　Pymol 3D graphs for the information of molecular docking

3 结　语

基于 Caco-2 细胞研究了 DPP-IV 抑制肽 IPQVS 的活性与小肠吸收机制，主要从 IPQVS 在 Caco-2 细胞单层中的 DPP-IV 抑制活性较体外化学底物法的测定结果显著降低这一现象入手，揭示了其小肠吸收途径、表观渗透系数，评价了其降解肽片段对 DPP-IV 抑制活性的影响。总体来说，Caco-2 细胞模型可被作为一种全面评价 IPQVS 活性的有效生物技术与工具。

参考文献:

[1] DING L,WANG L Y,YU Z P,et al. Digestion and absorption of an egg white ACE-inhibitory peptide in human intestinal Caco-2 cell monolayers[J]. **International Journal of Food Science and Nutrition**,2016,67(2):111-116.

[2] XIE N N,LIU S S,WANG C,et al. Stability of casein antioxidant peptide fractions during *in vitro* digestion/Caco-2 cell model: characteristics of the resistant peptides[J]. **European Food Research and Technology**,2014,239(4):577-586.

[3] DARMOUL D,LACASA M,BARICAULT L,et al. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1992,267(7):4824-4833.

[4] 郑惠娜,章超桦,吉宏武,等. 马氏珠母贝高F值寡肽在Caco-2细胞中吸收的初步研究[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(4):613-617.

[5] HILGERS A R,CONRADI R A,BURTON P S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa[J]. **Pharmaceutical Research**,1990,7(9):902-910.

[6] 张颖. 牛、羊乳酪蛋白源DPP-Ⅳ抑制肽的制备、鉴定及抑制机理研究[D]. 北京:中国农业大学,2016.

[7] WANG L Y,DING L,DU Z Y,et al. Hydrolysis and transport of egg white-derived peptides in Caco-2 cell monolayers and everted rat sacs[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2019,67(17):4839-4848.

[8] ZHANG C,LIU H G,CHEN S W,et al. Evaluating the effects of IADHFL on inhibiting DPP-IV activity and expression in Caco-2 cells and contributing to the amount of insulin released from INS-1 cells *in vitro*[J]. **Food and Function**,2018,9(4):2240-2250.

[9] XU F R,YAO Y J,XU X Y,et al. Identification and quantification of DPP-IV-inhibitory peptides from hydrolyzed-rapeseed-protein-derived napin with analysis of the interactions between key residues and protein domains[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2019,67(13):3679-3690.

[10] XU F R,ZHANG J,WANG Z G,et al. Absorption and metabolism of peptide WDHHAPQLR derived from rapeseed protein and inhibition of HUVEC apoptosis under oxidative stress[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2018,66(20):5178-5189.

[11] NONGONIERMA A B,FITZGERALD R J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates[J]. **Peptides**,2013,39(1):157-163.

[12] FAN H B,XU Q B,HONG H,et al. Stability and transport of spent hen-derived ACE-inhibitory peptides IWHHT,IWH,and IW in human intestinal Caco-2 cell monolayers[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2018,66(43):11347-11354.

[13] LAMMI C,ZANONI C,ARNOLDI A,et al. Peptides derived from soy and lupin protein as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors:*in vitro* biochemical screening and *in silico* molecular modeling study[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2016,64(51):9601-9606.

[14] TROTT O,OLSON A J. AutoDock Vina:improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function,efficient optimization,and multithreading[J]. **Journal of Computational Chemistry**,2010,31(2):455-461.

[15] 戚兴保,郑珩,方慧生. 多肽与蛋白质对接的研究进展[J]. 计算机与应用化学,2010,27(6):747-750.

[16] XU Q B,FAN H B,YU W L,et al. Transport study of egg-derived antihypertensive peptides (LKP and IQW) using Caco-2 and HT29 coculture monolayers[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2017,65(34):7406-7414.

[17] SHAW G,BANKER G A,WEBER K. An immunofluorescence study of neurofilament protein expression by developing hippocampal neurons in tissue culture[J]. **European Journal of Cell Biology**,1985,39(1):205-216.

[18] LACROIX I M,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 and Function**,2017,8(2):701-709.

[19] XU F,MEJIA E G,CHEN H,et al. Assessment of the DPP-IV inhibitory activity of a novel octapeptide derived from rapeseed using Caco-2 cell monolayers and molecular docking analysis[J]. **Journal of Food Biochemistry**,2020,44(10):1-13.

[20] DING L,WANG L Y,ZHANG T,et al. Hydrolysis and transepithelial transport of two corn gluten derived bioactive peptides in human Caco-2 cell monolayers[J]. **Food Research International**, 2018,106:475-480.

[21] JIN R,SHANG J Q,TENG X Y,et al. Characterization of DPP-IV inhibitory peptides using an *in vitro* cell culture model of the intestine[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69(9):2711-2718.

[22] TU M,CHENG S,LU W,et al. Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein:sequence,structure,and functions[J]. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**,2018,105:7-17.