

## ACE 抑制肽的合成及其活性研究

任 锦, 曹 刚, 张瑞洁, 李大为, 魏婷婷, 钦传光\*

(西北工业大学生命学院, 陕西 西安 710072)

**摘要:** 为研究血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制肽体外抑制 ACE 活性以期筛选出有降压作用的先导物, 采用 Fmoc 固相合成法合成 ACE 抑制肽, 经反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 分离纯化, 采用质谱对其进行鉴定, 并使用 RP-HPLC 法直接测定 ACE 抑制肽对 ACE 的体外抑制活性。合成的 6 个八肽经 RP-HPLC 纯化后, 质谱分析结果与理论值一致。活性评价结果表明 6 号八肽 (抗 SARS 肽) 对 ACE 的抑制作用最明显, 其  $IC_{50}$  为  $3.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 由此可见抗 SARS 肽 (AVLQSGFR-OH) 是一个具有降压作用的先导物, 具有进一步研究的意义。

**关键词:** ACE 抑制肽; 固相合成; 降压药物

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 01-0058-06

## Synthesis and activity of ACE inhibitory peptides

REN Jin, CAO Gang, ZHANG Rui-jie, LI Da-wei, WEI Ting-ting, QIN Chuan-guang\*

(Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

**Abstract:** To find anti-hypertensive lead drug, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides were synthesized and their effects on inhibiting ACE activity were investigated. ACE inhibitory peptides were synthesized *via* Fmoc solid-phase synthesis, isolated and purified through reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), and identified by mass spectrometry. A RP-HPLC analysis method was used to test ACE inhibitory activity *in vitro* of these ACE inhibitory peptides. Six octapeptides were successfully synthesized, and the analytical results of mass spectrum were consistent with their theoretically calculated data. Among these synthetic octapeptides, the anti-SARS (severe acute respiratory syndromes) octapeptide had the most obvious ACE inhibitory activity with an  $IC_{50}$  value of  $3.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . So octapeptide AVLQSGFR-OH (anti-SARS peptide) was found to be the strongest candidate for potential development as an anti-hypertensive drug and had the implication of further study.

**Key words:** ACE inhibitory peptide; solid-phase synthesis; anti-hypertensive drug

血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 是一种多功能酶, 它在体内肾素-血管紧张素系统 (RAS) 和激肽释放酶-激肽系统 (KKS) 中对血压的调节起着重要作用。RAS 是调节血压的重要内分泌系统, 其中的肾素能将血管紧张素原水解, 释

放出血管紧张素 I (AngI), ACE 能水解 AngI 羧基末端的二肽 His-Leu 生成血管紧张素 II (AngII), 其是已知最强的收缩血管物质之一, 它可以使血管平滑肌收缩迅速引起升压效应。KKS 是人体内源性降压系统, 激肽释放酶作用于无活性的激肽原生成具有血管舒张功能的激肽, ACE 在 KKS 中能使缓激肽失活转变为没有活力的缓释肽, 使 KKS 处于抑制状态, 导致血管收缩占优势, 血压升高。RAS 和 KKS 在血压调节方面是一对相互拮抗的体系, 其平衡对维持正常血压有重要作用。平衡失调是高血压发病

收稿日期: 2010-06-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20672086, 20802057); 国家人事部回国留学人员科技基金资助 (国人厅发[2007]170号); 西北工业大学基础科研基金资助 (JC200824).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-29-88491840, E-mail: qinchg@nwpu.edu.cn

的重要因素之一, 而 ACE 在 RAS 和 KKS 中对血压调节起重要作用, 因此抑制 ACE 活性对降低血压很重要<sup>[1]</sup>。

近年来, 高血压在世界范围内成日趋严重的态势, 已经成为生命“第一杀手”, 防治高血压成为全球医务界面临的一项艰巨任务。调查显示高血压患者中大多数使用合成 ACE 抑制剂如卡托普利 (catopril) 等药物来治疗高血压。这类药物具有作用时间短、停药后血压易反弹等缺点, 且药物吸收排泄速度快, 会引起咳嗽、丧失味觉、肾脏损伤及血管神经性水肿等副作用<sup>[2-5]</sup>。从天然食物中分离的 ACE 抑制肽 (也称降压肽) 虽然降压效果没有合成药物明显, 但其对正常血压无影响、没有毒副作用。ACE 抑制肽是生物活性肽的一种, 一般只包括几个氨基酸残基<sup>[6]</sup>, 可以快速的通过消化黏膜进入血液循环, 起到降压功能。所以, ACE 抑制肽作为一种新的降压药物受到人们的广泛关注。

目前 ACE 抑制肽主要通过酶水解食品蛋白来获得<sup>[7, 8]</sup>, 其分离纯化方法比较复杂, 并且天然提取资源有限, 成本昂贵<sup>[9, 10]</sup>。ACE 抑制肽多为分子量较小的短肽, 从酶解产物中分离得到并进行了序列分析后, 可用肽的固相合成法来大批量生产用以研究其 ACE 抑制活性<sup>[11]</sup>或其他活性<sup>[12]</sup>(抑菌及抗癌活性), 这样比直接从酶解产物中分离纯化可能更经济实惠, 也可以满足药物生产的需要<sup>[13]</sup>, 这也是近年来的研究趋势。本文采用 Fmoc 固相合成法合成了 6 个八肽, 其序列如表 1 所示, 并对其进行了体外抑制 ACE 活性研究。其中 1~3 号八肽<sup>[14]</sup>是从昆虫中提取分离出来的天然产物, 研究表明这 3 种八肽具有抑制 ACE 的活性。4 号八肽为血管紧张素 A II 肽酰胺, 即体内此反应体系的产物, 本文研究其对 ACE 活性的影响。6 号八肽 AVLQSGFR-OH 是 Chou 等<sup>[15]</sup>在进行严重急

性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndromes, SARS) 冠状病毒主蛋白酶 (SARS. CoV M<sup>pm</sup>) 与配基 (KZ7088 和 AVLQSGFR) 的对接研究中提出的抗 SARS 八肽, 5 号为抗 SARS 八肽酰胺 AVLQSGFR-NH<sub>2</sub>。5 号和 6 号八肽未见报道其具有抑制 ACE 的活性, 但作者发现其序列符合 ACE 抑制肽构效关系的原则, 因此推测其应该具有 ACE 抑制活性, 所以也将其合成做 ACE 抑制活性研究。以 5 号和 6 号八肽为例, 八肽的固相合成见合成路线 1。

**Table 1** The ACE inhibitory peptide sequences and entry numbers

No.	Sequence
1	TAGFIPRL-NH <sub>2</sub>
2	SPPFAPRL-NH <sub>2</sub>
3	GTSFTPRK-NH <sub>2</sub>
4	DRVYIHPT-NH <sub>2</sub>
5	AVLQSGFR-NH <sub>2</sub>
6	AVLQSGFR-OH

## 结果与讨论

### 1 合成 ACE 抑制肽的分析与鉴定

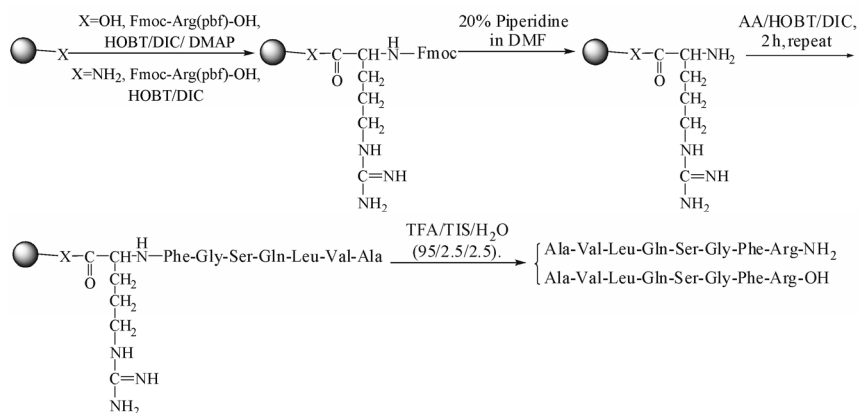
ACE 抑制肽的合成数据如表 2 所示。目标产物的产率大于 65%, 多数纯度大于 90%。

ACE 抑制肽的 RP-HPLC 色谱图如图 1 所示。质谱分析结果与理论值相符 (表 2)。

### 2 合成 ACE 抑制肽的体外抑制 ACE 活性分析

马尿酰组氨酰亮氨酸 (Hippury-L-Histidyl-L-Leucine, HHL) 特征吸收峰面积与浓度关系如图 2 所示, 线性回归方程为  $y = 6 \times 10^7 x + 2 \times 10^6$ , 其相关系数  $R^2 = 0.963 2$ 。

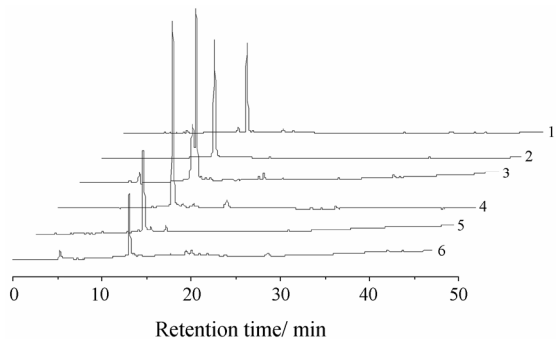
图 3 为无抑制剂时 HHL 与 ACE 作用的 RP-HPLC 图谱, 其中保留时间为 13.5 min 的特征吸收峰为马尿



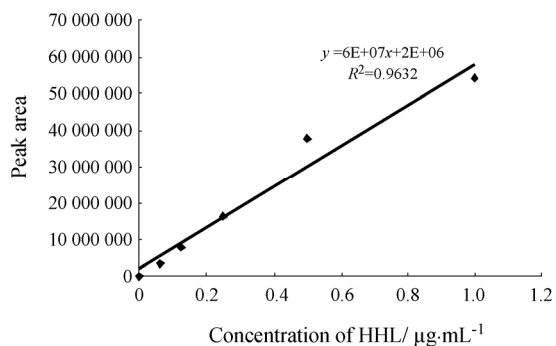
**Scheme 1** Solid-phase synthesis scheme of ACE inhibitory peptide

**Table 2** Data of synthetic ACE inhibitory peptide

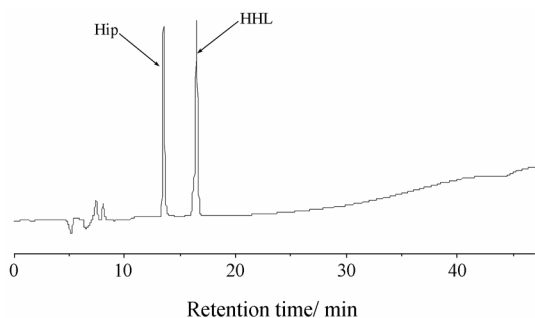
No.	Sequence	Rt /min	M <sub>w</sub> (Calcd.)	M <sub>w</sub> (Found)	Yield /%	Purity /%
1	TAGFIPRL-NH <sub>2</sub>	13.5	872.52	872.91	80.2	89.6
2	SPPFAPRL-NH <sub>2</sub>	12.35	882.51	883.12	68.4	92.1
3	GTSFTPRK-NH <sub>2</sub>	13.1	891.49	892.3	78.1	75.8
4	DRVYIHPT-NH <sub>2</sub>	12.5	1 044.55	1 045.05	64.9	95.1
5	AVLQSGFR-NH <sub>2</sub>	11.45	875.5	875.51	75.4	98.0
6	AVLQSGFR-OH	13.26	876.6	877.4	71.9	97.8



**Figure 1** The RP-HPLC profile of synthetic ACE inhibitory peptide



**Figure 2** Linear relationship between concentration of HHL and its peak area in RP-HPLC analysis

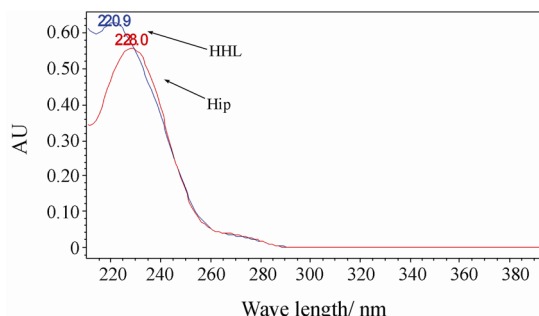


**Figure 3** RP-HPLC profile after reaction of HHL with ACE

酸 (Hip), 保留时间为 16.5 min 的特征吸收峰为过量的 HHL。

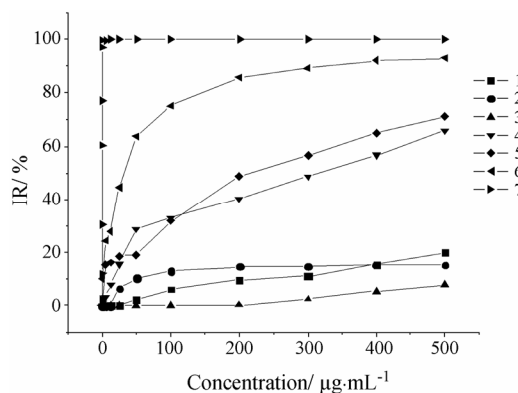
图 4 为 Hip 与 HHL 的吸收光谱图, 其中红色线条为 Hip 特征吸收峰对应的光谱图, 在 228 nm 处有

特征吸收, 符合 Hip 的特征吸收波长。蓝色线条是底物 HHL 在 220.9 nm 的光谱图, 可见 HHL 在 220.9 nm 有吸收峰, 因此 HPLC 检测时采用 220.9 nm 作为检测波长合理。



**Figure 4** Absorption spectrum of Hip and HHL

图 5 为不同浓度下 6 个八肽及阳性对照卡托普利对 ACE 的抑制曲线。测定 ACE 抑制活性所用的 6 个八肽经过半制备高效液相色谱纯化。从图中可以明显看出, 1、2、3 号八肽对 ACE 的抑制作用不明显, 4 号和 5 号八肽的抑制率在所检测的浓度范围内变化较大, 6 号八肽及 7 号阳性对照对 ACE 的抑制作用非常明显。4 号八肽为血管紧张素 A II 肽酰胺, 即为体内此反应体系的产物, 由此可以推测体系内产物的增加抑制了正反应的进行, 其 IC<sub>50</sub> 为 3.1 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>。5 号和 6 号八肽分别是抗 SARS 八肽酰胺和抗 SARS 八肽, 此序列本是为了抑制 SARS 冠状病毒的复制, 本文发现其具有明显的 ACE 抑制活性, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 2.4 × 10<sup>-4</sup> 和 3.4 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>。7 号为阳性对照卡托普利, 本文所采用的检测方法测得其 IC<sub>50</sub> 为 9.2 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup>, 文献<sup>[10]</sup>报道其 IC<sub>50</sub> 范围为 7.5 × 10<sup>-10</sup> ~ 2.2 × 10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup>, 阳性对照卡托普利的 IC<sub>50</sub> 在此范围内。



**Figure 5** Inhibitory effect of 6 synthetic octapeptides and catopril at different concentrations against ACE

ACE 抑制肽的构效关系 (SAR) 研究表明<sup>[16]</sup>, 不同多肽底物与 ACE 的相互作用受多肽 C 端三肽序列影响很大。ACE 倾向于和 C 端含有疏水性氨基酸 (芳香族氨基酸 Pro、Phe、Trp、Tyr) N 端为脂肪族氨基酸的底物或者竞争性抑制剂结合, 且 C 端精氨酸上的胍基的正电荷可以增加 ACE 抑制肽的活性。同时, 多肽的亲水-疏水性也是影响其活性的重要因素。亲水性多肽的活性一般较低或者没有活性, 因为这些多肽很难接近 ACE 的活性中心的疏水“口袋”。6 号八肽 AVLQSGFR-OH, 该序列 C 端含有芳香族氨基酸苯丙氨酸 (F) 及带有胍基的精氨酸 (R), 且该序列 N 端 AVL 都为脂肪族氨基酸, 疏水性好, 这些特点都符合 ACE 抑制肽构效关系的原则, 这是该序列具有明显 ACE 抑制活性的原因, 另外, Gan 等<sup>[17]</sup>用固相合成法合成了此序列, 并进行了抗 SARS 冠状病毒活性和细胞毒性实验, 研究发现其是目前所报道的化合物中抑制 SARS 冠状病毒的复制最有效且在所检测的细胞和浓度范围内未发现其具有细胞毒性。因此, 该序列既可以抑制 SARS 冠状病毒的复制又具有 ACE 抑制活性, 但是该序列为什么会具有这两种活性, 这两者之间有没有联系? 目前仅知道 2000 年才发现的血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 与 ACE 是同源的, 也参与 RAS, 已确定 ACE2 是 SARS 冠状病毒的功能性受体<sup>[18]</sup>, SARS 冠状病毒在感染过程中第一步是 SARS 冠状病毒的 S 蛋白与细胞内的 ACE2 结合<sup>[19]</sup>。这方面的问题还需要进一步探索。

## 小结

本文成功合成了 6 个八肽, 并在体外测试了它们对 ACE 的抑制活性, 发现 6 号抗 SARS 八肽 AVLQSGFR-OH 具有明显的 ACE 抑制活性, 但对其抑制 ACE 的作用和机制还需做更深入的研究。

## 实验部分

**试剂** Fmoc-Thr(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ser-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、DIC、HOBT、PYBOP、苯甲硫醚、DIEA, 均为分析纯, 购自上海吉尔生化公司; DMF 纯度  $\geq 99.99\%$ , 北京博迈杰公司; Rink amide-AM resin ( $0.51 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 100~200 mesh)、Wang resin ( $0.85$

$\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 100~200 mesh) 购自上海吉尔生化公司; TFA、DCM、甲醇、乙腈均为色谱纯, 购自 Fisher Scientific;  $\text{N}_2\text{H}_4$ 、ACE、HHL、卡托普利购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

**仪器** 宁波新芝 HS-3 垂直混合器; Bio-Spin 空柱; 美国 Waters 2996-2695 高效液相色谱仪; 英国 AXIMA-CFR<sup>TM</sup> plus MALDI-TOF Mass Spectrometer 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪; 日立 M-3310 型紫外可见分光光度计。

## 1 ACE 抑制肽的固相合成

1~5 号八肽具体合成步骤 ( $X = \text{NH}_2$ , 以 5 号肽为例): ① 树脂活化, 准确称取 100 mg Rink amide-AM resin, 加入适量三氯甲烷 ( $\text{CHCl}_3$ ) 溶胀 30 min 使树脂充分活化, 然后分别用  $\text{CHCl}_3$  和 DMF 洗涤树脂备用。② 脱 Fmoc 保护, 向已经活化好的树脂中加入适量的 20% 哌啶-DMF ( $v/v$ ) 溶液脱除树脂上氨基的 Fmoc 保护基团, 反应 15 min, 重复一次, 完成后用 DMF 洗涤树脂。③ Kaiser test 检验, 挑取少许树脂进行 Kaiser test, 检验自由氨基的存在。如果反应阳性 (树脂为蓝紫色), 则 Fmoc 保护基团已脱除, 如果反应阴性 (树脂为白色), 则 Fmoc 保护基团未脱除, 需重复第②步操作。④ 连接第一个氨基酸残基 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 到树脂上, 将 Fmoc-Arg(Pbf)-OH ( $0.204 \text{ mmol}$ )、HOBT ( $0.204 \text{ mmol}$ ) 溶于 DMF 中预反应 10 min, 而后加入到已脱除 Fmoc 保护的树脂中, 再向其中加入 DIC ( $0.204 \text{ mmol}$ ), 反应 2 h, 完成后用 DMF 洗涤数次, 挑取微量树脂做第一次 Kaiser test 检测, 若反应阴性直接脱除树脂上连接的第一个氨基酸  $\alpha$ -氨基的 Fmoc 保护基团, 操作同第②步, 结束后做第 2 次 Kaiser test 检测, 反应阳性直接连接下一个氨基酸, 反应阴性重复脱树脂上连接的第一个氨基酸  $\alpha$ -氨基的 Fmoc 保护基团, 操作同第 2 步。若第一次 Kaiser test 检测反应为阳性则重复连接该次氨基酸。⑤ 肽链的延长, 脱去树脂上 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的 Fmoc 保护以后, 重复第 4 步依次将 Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ser-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ala-OH 偶联到树脂上, 至此肽链合成完毕。然后分别用 DMF、二氯甲烷、甲醇充分洗涤树脂, 干燥保存。⑥ 剪切, 向树脂中加入剪切液 (TFA-TIS-水 = 95 : 2.5 : 2.5) 反应 2~3 h, 收集滤液, 用氮气吹使得 TFA 挥发, 加入冷乙醚, 在冰中静置 15 min 以上, 高速离心, 条件为  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min, 重复两次, 收集沉淀, 将沉淀置真空干燥塔内完全干燥, 即得粗品。

6号八肽具体合成步骤 ( $X = OH$ ): 准确称取 100 mg Wang resin ( $0.85 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 100~200 mesh), 加入适量  $\text{CHCl}_3$  使树脂充分活化, 然后分别用  $\text{CHCl}_3$  和 DMF 洗涤树脂备用。将 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0.34 mmol)、HOBT (0.34 mmol) 溶于  $\text{NMP-CH}_2\text{Cl}_2 = 1:7$  ( $v/v$ ) 中, 再加入 DIC (0.34 mmol) 预反应 10 min, 将此混合溶液加到备好的树脂中, 再向树脂中加入催化剂 DMAP (0.034 mmol), 于  $35^\circ\text{C}$  恒温摇床中反应过夜, 完后洗涤树脂。第一个氨基酸 Arg 偶联到树脂上后, 依次向树脂中加入适量的二氯甲烷、乙酸酐 (3.4 mmol) 和吡啶 (3.4 mmol) 反应 4~5 h, 封住树脂上未与第一个氨基酸反应的羟基基团。此后经过第一次 Kaiser test 检测、脱 Fmoc 保护、第二次 Kaiser test 检测确定第一个氨基酸的 Fmoc 基团脱掉后其他步骤同 5 号八肽步骤的⑤和⑥。

## 2 合成八肽的分析纯化与鉴定

本文选用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 对固相合成的八肽样品进行分析与纯化, 色谱条件为: Kromasil  $\text{C}_{18}$  ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) 色谱柱; 流动相为超纯水 (A)-乙腈 (B) (各含体积分数为 0.1% 的 TFA), 梯度模式: 2~27 min, 80% A~20% A, 27~37 min, 20% A~0 A; 流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长 220 nm, 自动进样。收集主要组分。

合成的八肽样品的相对分子质量采用英国 AXIMA-CFRM plus MALDI-TOF Mass Spectrometer 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪和美国 Waters Quattro Premier XE 电喷雾质谱仪进行相对分子质量鉴定。

## 3 合成八肽的体外抑制 ACE 活性的测定

目前有关 ACE 抑制肽的体外抑制 ACE 活性研究多采用高效液相色谱分析法<sup>[20]</sup>, 这种方法是在 1971 年 Cushman 等建立的紫外分光光度法<sup>[21]</sup>的基础上发展而来的。ACE 在  $37^\circ\text{C}$ 、pH 8.3 的条件下催化分解 AngI 的模拟物 HHL 产生 Hip, 该物质在紫外 228 nm 处具有特征吸收峰。当加入 ACE 抑制肽时, ACE 对 HHL 的催化分解作用受到抑制, Hip 的生成量减少, 通过高压液相色谱仪及色谱柱检测加入 ACE 抑制肽前后所生成 Hip 量的差别即可算出抑制活性的大小。该方法具有灵敏度高、准确性好的特点。本文采用此方法测定所合成八肽的体外抑制 ACE 活性。

配制溶液:  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 8.3 硼酸缓冲液 ( $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl),  $100 \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$  ACE 溶液,  $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HHL 溶液, 终浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

的肽溶液和阳性对照卡托普利溶液。

$100 \mu\text{L}$  肽溶液和  $100 \mu\text{L}$  HHL 在  $37^\circ\text{C}$  培养 5 min, 加入  $150 \mu\text{L}$  ACE  $37^\circ\text{C}$  培养 1 h, 加入  $250 \mu\text{L}$   $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸中止反应,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸缓冲液做对照。三肽 HHL 在 ACE 的催化下快速地分解产生 Hip 和二肽 His-Leu (简称 HL)。当加入 ACE 抑制肽样品时, ACE 的活性受到抑制, Hip 和二肽 HL 的生成量减少, 因此可通过 HPLC 测定 Hip 的生成量来评价 ACE 抑制肽对 ACE 活性的抑制率。计算公式为:

$$\text{IR} = (A - B) / A \times 100\% \quad (1)$$

式 (1) 中, IR 为 ACE 抑制肽样品对 ACE 的抑制率 (%);  $A$  为空白对照组中 Hip 的峰面积;  $B$  为添加 ACE 抑制肽组中 Hip 的峰面积。

RP-HPLC 色谱条件同合成肽的分离纯化, Hip 在 228 nm 波长处有最大吸收, HHL 在 210~250 nm 波长处有较宽的吸收峰, 因此 HPLC 检测时可以采用 228 nm 作为检测波长。在 228 nm 检测 Hip 的峰面积。

## References

- [1] Zeng XB, Wang HY, Lin YC. The bioactivity and its research on bioactive peptide in food [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2004, 25: 151-155.
- [2] Zhao YH. Application of angiotensin invertase inhibitor in cardiovascular diseases [J]. Her Med (医药导报), 1999, 18: 4-5.
- [3] Jung K, Kim IH, Han D. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 93: 75-81.
- [4] Suh HJ, Whang JH, Bae SH, et al. Preparation of angiotensin I converting enzyme inhibitor from corn gluten [J]. Process Biochem, 2003, 38: 1239-1244.
- [5] Valentini H, Hentachel H. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a clinical toxicological evaluation [J]. Clin Use Germany, 1998, 1: 31-34.
- [6] Yao J, Chen QS, Gong SS. Research status of probiotics antihypertensive peptides and trends of domestic and international new production development [J]. Food Sci (食品科学), 2007, 9: 590-594.
- [7] Zhang LM, Yuan QP. Isolation and purification of angiotensin converting enzyme inhibitors from *Grifola frondosa* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 639-640.
- [8] Papadimitriou CG, Vafopoulou-Mastrojiannaki A, Silva SV, et al. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep

- milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity [J]. *Food Chem*, 2007, 105: 647–656.
- [9] Jiang JL, Ren FZ. Determination methods of antihypertensive peptides derived from food [J]. *China Dairy Ind (中国乳品工业)*, 2006, 34: 36–39.
- [10] Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 51: 75–87.
- [11] Yuan HL. Synthesis and Activity of ACE-Inhibitory Peptides (ACE 抑制肽的合成及生物活性) [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2007.
- [12] Jang A, Jo C, Kang KS, et al. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides [J]. *Food Chem*, 2008, 107: 327–336.
- [13] He HL, Chen XL, Sun CY, et al. Research progress in inhibitory peptides of angiotensin converting enzyme [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2004, 24: 7–11.
- [14] Zhao R, Gu QQ, Guan HS. Progress in study of natural biological polypeptides [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 1999, 12: 84–91.
- [15] Chou KC, Wei DQ, Zhong WZ. Binding mechanism of coronavirus main proteinase with ligands and its implication to drug design against SARS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308: 148–151.
- [16] Li GH, Le GW, Shi YH, et al. Angiotensin I—converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects [J]. *Nutr Res*, 2004, 7: 469–486.
- [17] Gan YR, Huang H, Huang YD, et al. Synthesis and activity of an octapeptide inhibitor designed for SARS coronavirus main proteinase [J]. *Peptides*, 2006, 27: 622–625.
- [18] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus [J]. *Nature*, 2003, 426: 450–454.
- [19] Ho TY, Wu SL, Chen JC, et al. Design and biological activities of novel inhibitory peptides for SARS-CoV spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction [J]. *Antivir Res*, 2006, 69: 70–76.
- [20] Wu JP, Ding XL. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides [J]. *Food Res Int*, 2002, 35: 367–375.
- [21] Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung [J]. *Biochem Pharmacol*, 1971, 20: 1637–1648.