

圆二色谱法分析金属离子对鲍鱼脯氨酰内肽酶的作用

李越¹, 颜龙杰¹, 翁凌^{1,2}, 章骞^{1,2}, 曹敏杰^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 使用原核表达系统表达了皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 脯氨酰内肽酶 (prolyl endopeptidase, PEP), 并对其进行高度纯化。SDS-PAGE 结果表明, 该酶的相对分子质量约为 85 ku, 其二级结构主要由 α -螺旋(28.3%)、反向平行结构(17.4%)、平行结构(8.70%)、 β 转角(19.0%)、无规卷曲(28.5%) 组成。选取 PEP 特异性荧光底物 Suc-Gly-Pro-MCA 测定其活性, 并选取了多种常见金属盐溶液对其进行抑制作用分析。结果发现, Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^{+} 和 Pb^{2+} 能够抑制 PEP 的活性。利用圆二色谱法, 对金属离子作用下 PEP 的二级结构变化进行分析和计算。分析结果表明, 不同金属离子对 PEP 的作用效果不同: Al^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 在影响 PEP 结构时也影响其活性; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对 PEP 的结构和活性均不产生明显影响, 而 Ag^{+} 和 Pb^{2+} 可在不影响 PEP 二级结构的前提下抑制其活性。

[关键词] 脯氨酰内肽酶; 皱纹盘鲍; 金属离子; 圆二色谱; 抑制剂

[中图分类号] Q 51

Effect of Metal Ions on the Activity of a Prolyl Endopeptidase from *Haliotis discus hannai* Using Circular Dichroism Spectrum

LI Yue¹, YAN Longjie¹, WENG Ling^{1,2}, ZHANG Qian^{1,2}, CAO Minjie^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National & Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

Abstract: Purified recombinant PEP from abalone (*Haliotis discus hannai*) was obtained using a prokaryotic expression system, with a relative molecular mass of 85 ku. The secondary structure of PEP mainly contained of α -helix-28.3%, antiparallel-17.4%, parallel-8.70%, β -turn-19.0% and random coil-28.5%. The measurement of enzyme activity was based on a specific fluorogenic substrate Suc-Gly-Pro-MCA and a variety of common metal salts solution was selected for the inhibition assay. The results showed that the enzyme activity of PEP was strongly inhibited by Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{+} and Pb^{2+} . The secondary structure of PEP treated with metal ions was analyzed using circular dichroism spectrum. The influence of various metal ions on the PEP activity was different. In comparison, Al^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} had an impact on both enzyme activity and the secondary structure, while Ca^{2+} and Mg^{2+} did not influence the secondary structure and activity obviously. Ag^{+} as well as Pb^{2+} revealed a strong inhibition on enzyme activity while less influence on the secondary structure.

Keywords: prolyl endopeptidase; *Haliotis discus hannai*; metal ions; circular dichroism spectrum; inhibitors

[收稿日期] 2018-04-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31471640, 31701676); 农业部贝类产业技术体系项目(CARS-49); 福建省科技计划项目(2017N5011)

[作者简介] 李越(1992—), 男, 硕士生, 从事食品生物技术研究。通信作者: 曹敏杰(1964—), 男, 教授, 主要从事酶学、蛋白质化学及水产品深加工研究。E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

0 引言

脯氨酰内肽酶 (prolyl endopeptidase, PEP, EC 3.4.21.26) 是丝氨酸蛋白酶家族中的一种大型胞浆酶。PEP 对底物的分解特征是能够识别肽链中的脯氨酸残基并实施切割, 该酶与多个肌醇循环相关的生理过程有关, 如精氨酸血管加压素和促甲状腺激素释放激素的代谢等^[1]。PEP 不同于典型丝氨酸蛋白酶的特征在于其所作用的底物长度具有一定的限制, 其所能作用的底物长度不超过 33 个氨基酸^[2-3]。限制 PEP 作用底物长度的因素除了底物自身性质外, PEP 独特的结构亦是重要的影响因素^[4]。PEP 作为分子量较大的蛋白酶, 其冗长的一级结构赋予了其折叠为复杂且精巧的三级结构的能力。PEP 除了催化三联体所在的核心催化区之外, 还具有一个大部分由 β 折叠特征结构所构成的“螺旋桨”结构, 该结构含有 7 个大致呈中心对称的“桨叶”, 与核心催化区通过两个“铰链”结构连接, 形成了将典型的丝氨酸蛋白酶的催化三联体包裹在中心的“匣式”外观^[5]。由于该结构精密复杂, 较长底物中所含有的脯氨酸残基并不能顺利通过“匣式”结构的周边抵达核心区域, 导致了 PEP 对底物长度限制这一性质。这种“匣式”结构广受关注, 并已被深入研究^[6]。

先前关于 PEP 的研究多集中在哺乳动物和细菌真菌等领域, 有关人 PEP 在直肠癌检测中的应用潜力^[7]揭示了 PEP 在医学领域的深度挖掘价值。近年报道的水生生物中 PEP 研究多集中在鱼类^[8-9], 而对贝类 PEP 的研究尚未见报道。鲍鱼作为我国重要的高端水产动物, 其可食部分腹足具有丰富的蛋白质。关于水产动物在贮藏过程中肌原纤维蛋白和胶原蛋白降解相关酶类, 已有丝氨酸蛋白酶^[10]、半胱氨酸蛋白酶^[11]和金属蛋白酶^[12]等。而 PEP 由于其对底物大小的限制, 难以在胶原蛋白和肌原纤维蛋白降解的初期发挥作用。在活体中, 作为胞浆酶的 PEP 应参与胶原蛋白和肌原纤维蛋白的新陈代谢。而对 PEP 活性的抑制作用, 除了较为经典的 Z-脯氨醛与 SUAM-14746 这两种 PEP 特异性抑制剂外, 金属离子、脂肪酸^[13]、合成小肽^[14]对 PEP 的抑制作用亦被发现。对蛋白酶而言, 金属离子具有多重作用效应, 不仅可以作为金属蛋白酶中的必需基团促进其活性, 也可以通过与非金属蛋白酶中活性区域发生可逆或非可逆的结合来抑制其活性^[15]。

本文使用 NCBI 数据库中的皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 脯氨酰内肽酶全长序列 (KY214290) 中的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 对其进行体外表达, 获取高表达、有活性的皱纹盘鲍 PEP (Hdh-PEP) 后, 探讨了几种金属离子对该酶的抑制作用。使用圆二色谱分析确定不同金属离子对 Hdh-PEP 结构的影响, 通过配套软件计算出其二级结构的比例变化并作出比较。通过不同金属离子对 Hdh-PEP 的作用效果进行分析, 初步预测了金属离子的作用机理, 为阐明金属离子对 PEP 的作用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 表达菌株

Hdh-PEP 表达菌株 (Hdh-PEP-*E. coli* BL21 (DE3)) 为实验室自保种。沿用原核表达体系, 含有以 pET-28a 为载体的皱纹盘鲍 PEP 表达载体, 并能够可靠表达具活性的 Hdh-PEP。完整序列由 NCBI 数据库获取 (GenBank Accession: KY214290)。

1.2 主要试剂

磷酸氢二钠/磷酸二氢钠 (AR) 和其他无机金属盐类购自上海化学试剂公司; 咪唑 (AR) 购自陇西试剂有限公司; β -巯基乙醇购自 AMRESCO 试剂公司。镍离子亲和纯化系统 (Ni-NTA) 购自美国 GE Healthcare 生物公司。荧光底物 Suc-Gly-Pro-MCA 购自日本 PEPTIDE 试剂公司; 酵母粉, 蛋白胨购自英国 OXOID 生物公司。

1.3 实验方法

1.3.1 Hdh-PEP 的体外表达和纯化

使用酵母粉、蛋白胨和氯化钠配制成总体积为 500 mL 的标准 LB 液体培养基, 调节 pH 值为 7.0 并密封灭菌。冷却至室温后将表达菌株接种至培养基中并加入终质量浓度为 50 mg/L 的卡那霉素, 于 37 ℃、200 r/min 的条件下培养 6 h 至 A_{600} 值为 0.6 左右后, 18 ℃、90 r/min 摇床继续培养 30 min。之后迅速于超净台内加入异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 使其终浓度为 0.2 mmol/L, 18 ℃、90 r/min 诱导表达 15 h。

将诱导后的细胞离心收集, 弃去培养基后, 用溶菌缓冲液 (25 mmol/L PBS, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 5 mmol/L β -巯基乙醇, pH = 8.0) 重悬细胞。将重悬均匀的细胞悬浮液使用超声波破碎装置处理, 处理后的液体在 4 ℃ 下离心, 将上清上样于已用缓冲液平衡的 Ni-NTA 柱上。上样完毕后, 使用缓冲液流洗 3 h 直至杂蛋白洗净。换用洗脱液进行目的蛋白洗脱, 带有组氨酸标签的重组蛋白即被洗脱下来。依照洗脱时间收集不同组分进行蛋白质浓度的测定, 并收集蛋白质浓度较高的组分。

1.3.2 Hdh-PEP 的活性测定

选取对 PEP 专一的荧光底物 Suc-Gly-Pro-MCA 进行性质测定。酶活力测定参照 Wang 等^[9]的方法, 使用 25 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH = 6.0), 在 20 ℃ 下反应 10 min 后, 加入终止液 (V(甲醇): V(水): V(异丙醇) = 35: 30: 35) 终止反应。在 380 nm 的激发波长下, 利用荧光分光光度计测量其在 450 nm 发射波长下的荧光强度, 根据荧光强度值标定酶活力。

1.3.3 金属离子对 Hdh-PEP 活性的抑制作用测定

金属盐溶液将统一以 1 mmol/L 对应金属离子的最终浓度加入酶液中。以不添加金属离子的酶液作为对照。添加金属离子的酶液按照活性测定方法进行测定。

1.3.4 Hdh-PEP 的圆二色谱分析

将纯化后的 Hdh-PEP 使用超纯水于 4 ℃ 下进行透析并调整蛋白质质量浓度至 0.2 g/L。以超纯水作为空白对照, 扫描波长范围 180 ~ 260 nm, 步长 1 nm。每个样品扫描 3 次, 将平均值进行作图分析。通过 CDNN 软件计算出各二级结构占比。

1.3.5 金属离子对 Hdh-PEP 影响的圆二色谱分析

将金属盐溶液加入到 PEP 中, 使其最终浓度为 1 mmol/L, 并在 4 ℃ 下放置 30 min。同时, 将 1 mL 酶液在 60 ℃ 下加热 30 min 作为高温失活处理组 (HT), 以未经处理的酶液作为对照。将样品进行圆二色谱分析, 通过 CDNN 软件计算出各处理组中 PEP 二级结构的占比。

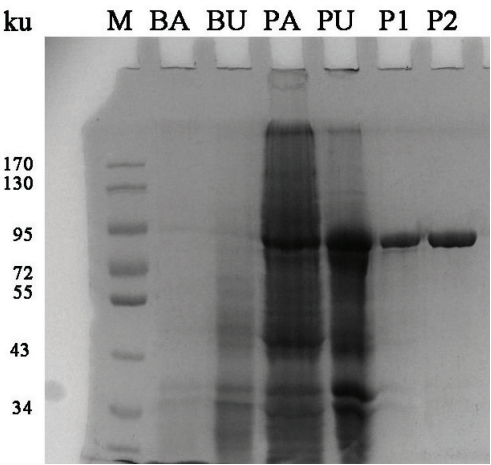
2 结果与分析

2.1 Hdh-PEP 的表达与纯化

使用 Hdh-PEP 表达菌株成功诱导表达并纯化得到了高纯度重组 PEP (见图 1)。本研究的目的蛋白 PEP 相对分子质量为 80.3 ku, 表达载体自带的 His 标签以及载体序列所编码的肽段序列相对分子质量为 5.1 ku, 因此, 表达蛋白的理论相对分子质量为 85.4 ku。诱导表达的目的蛋白在超声破碎后的菌液上清液中大量存在, 经 Ni^{2+} 亲和层析柱后, 得到高度纯化 (见图 1 泳道 P2), 用于进一步研究。

2.2 Hdh-PEP 的二级结构与三级结构预测

以 NCBI 数据库中已登录的 Hdh-PEP 的原始序列



说明: M—标准蛋白; BA—空载体菌株全菌液; BU—空载体菌株上清液; PA—表达菌株全菌液; PU—表达菌株上清液; P1— Ni^{2+} 柱 1 号纯化结果; P2— Ni^{2+} 柱 2 号纯化结果

Notes: M—standard protein; BA—pET28a induced by IPTG; BU—supernatant of pET28a bacterial lysates; PA—pET28a-PEP induced by IPTG; PU—supernatant of pET28a-PEP bacterial lysates; P1—sample 1 of purified recombinant protein; P2—sample 2 of purified recombinant protein

图 1 Hdh-PEP 体外表达结果的 SDS-PAGE
Fig.1 SDS-PAGE analysis of the recombinant Hdh-PEP

为基础，根据在线软件 Prot Param tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测，Hdh-PEP 的理论相对分子质量为 85.4 ku（含重组表达时载体自带标签），等电点为 5.93。运用 Softberry 在线分析其二级结构(<http://www.softberry.com/>)，初步模拟结果表明，Hdh-PEP 主要由 4 种二级结构原件构成，其中， α 螺旋占 27.05%， β 折叠占 28.47%， β 转角占 10.06%，无规则卷曲占 34.42%。其中，大量的 β 折叠和 β 转角集中出现在 Hdh-PEP 序列的前部，即“匣式”外观中的 N 端 β 螺旋桨型结构域。而 α 螺旋集中出现在序列后部，即催化区域。在此基础上，使用 SWISS-MODEL 在线建模，对 Hdh-PEP 进行三级结构的初步模拟。模拟结果显示，Hdh-PEP 呈现出经典的 PEP 匣式结构（见图 2），其三级结构明显由两个分界清晰的结构域组成。与图 2a 即 Fulop 等^[5]对猪 PEP 的结构模拟结果相比，图 2b 中 Hdh-PEP 的三级结构与其基本相似，但在结构细节上仍有区别。

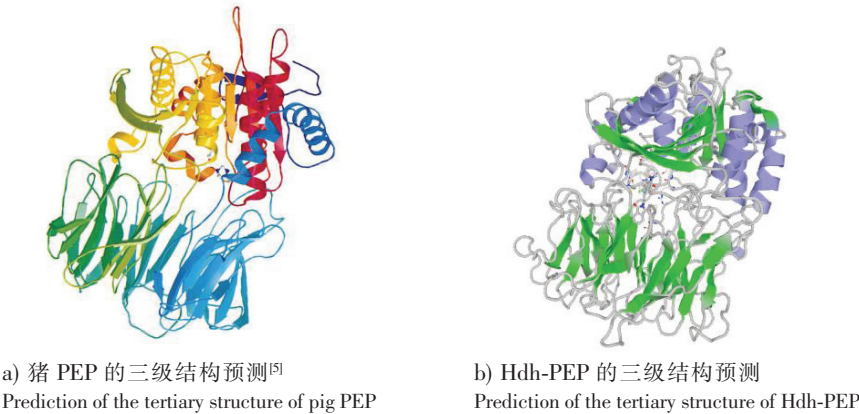


图 2 以 SWISS-MODEL 为基础的 PEP 的三级结构预测

Fig.2 Prediction of the tertiary structure of Hdh-PEP based on SWISS-MODEL

2.3 不同金属离子对 Hdh-PEP 的抑制效果

不同金属离子对 Hdh-PEP 的作用效果见图 3。由图 3 可见， Na^+ 和 Mg^{2+} 对 Hdh-PEP 的活性没有产生影响。 Ca^{2+} 作为多种蛋白酶的激活因子^[15]，对 Hdh-PEP 同样产生了促进作用，其相对酶活力增加了约 10%。 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 和 Pb^{2+} 在终浓度为 1 mmol/L 时对 Hdh-PEP 活性产生强烈的抑制作用，各组的相对酶活力基本消失。肖琳琳等^[13]对鲈鱼 PEP 的研究表明， Cu^{2+} 是 PEP 的混合型抑制剂，能够有效抑制 PEP 的活性。

2.4 Hdh-PEP 的圆二色谱分析

利用圆二色谱对 Hdh-PEP 进行波长范围为 180 ~ 260 nm 扫描后，汇总数据作图。由图 4 可见，Hdh-PEP 在波长 190 nm 处出现正吸收峰，在 200 nm 处峰值变为负值。将图 4 所示的点阵序列数据导入软件 CDNN，计算出 Hdh-PEP 的二级结构占比。结果表明，在 Hdh-PEP 的二级结构中， α - 螺旋占比 28.3%，反向平行结构占比 17.4%，平行结构占比 8.70%， β 转角占比 19.00%，无规卷曲占比 28.50%。相比于软件预测的结果，圆二色谱扫描结果中的 Hdh-PEP 含有更多的 β - 转角结构与更少的无规卷曲结构，但其共同特征均为 β - 折叠与 β - 转角元素占据较多的结构比例，与三级结构模拟中体现出的 Hdh-PEP 的结构特征相符。

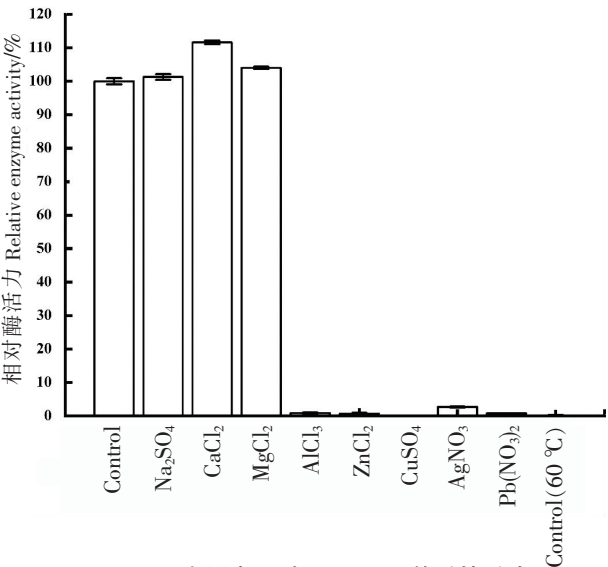


图 3 不同金属离子对 Hdh-PEP 的活性影响

Fig.3 Effect of different metal ions on Hdh-PEP activity

2.5 金属离子对 Hdh-PEP 构型变化的圆二色谱分析

对不同金属离子存在下的 Hdh-PEP 进行圆二色谱扫描分析, 按照无抑制作用和有抑制作用对金属离子进行分组。由图 5 可见, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 Hdh-PEP 无抑制作用的离子均未在与其共孵育后体现出与对照组相比的图形改变, 总体趋势与原酶相近。说明这两种金属离子并未对 Hdh-PEP 的整体结构产生较大影响。结合节 2.3 结果, Ca^{2+} 对 Hdh-PEP 的活性具有约 10% 的促进作用, 说明 Ca^{2+} 可通过直接作用于活性中心的方式促进酶活性。

图 6 为具有抑制效果的金属离子对 Hdh-PEP 影响的圆二色谱图。与对照组相比, 金属离子组的图线均在扫描范围内产生了偏移, 说明其抑制效果与 PEP 的构象变化有关。本组中, 在 60 ℃ 失活温度下处理过样品的圆二色谱图的变化最为明显。各实验组的构象变化均通过 CDNN 软件计算后总结于表 1 中。

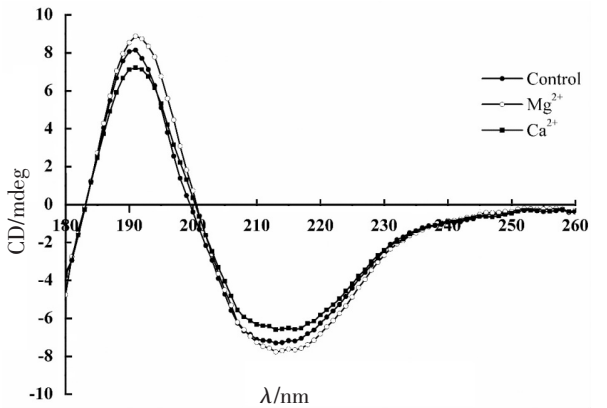


图 5 无抑制效果金属离子对 Hdh-PEP 影响的圆二色谱图

Fig.5 Circular dichroism assay of Hdh-PEP in the presence of metal ions without inhibitory activity

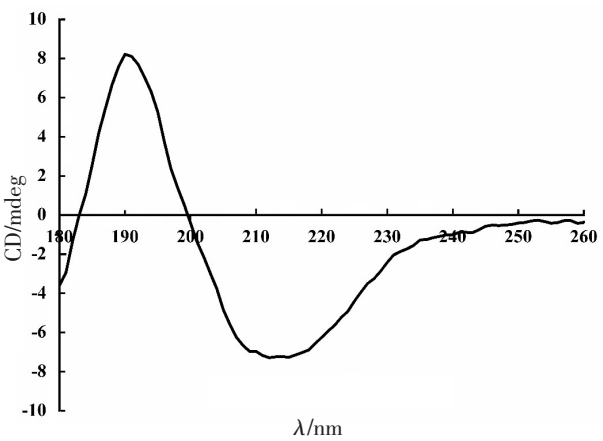


图 4 Hdh-PEP 的圆二色谱图

Fig.4 Circular dichroism assay of Hdh-PEP

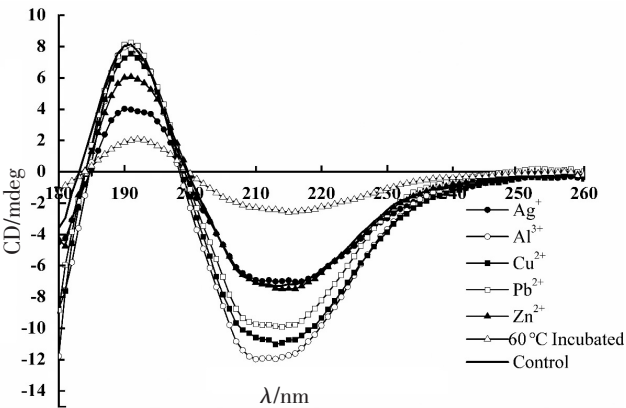


图 6 具抑制效果金属离子对 Hdh-PEP 影响的圆二色谱图

Fig.6 Circular dichroism assay of Hdh-PEP in the presence of metal ions with inhibitory activity

表 1 不同条件处理后 Hdh-PEP 的二级结构占比

Tab.1 Secondary structure percentage of Hdh-PEP with various treatments

	占比 Percentage/%								
	Control	Mg^{2+}	Ca^{2+}	60 ℃	Ag^+	Al^{3+}	Cu^{2+}	Pb^{2+}	Zn^{2+}
α 螺旋 α-helix	28.3	29.7	29.5	27.0	28.3	27.1	28.0	28.6	27.1
反向平行 Antiparallel	17.4	13.6	14.1	17.6	17.3	20.5	18.4	17.6	18.2
平行 Parallel	8.7	8.9	8.8	9.5	8.8	8.8	8.7	8.5	9.3
β 转角 β-turn	19.0	18.2	18.3	18.9	19.0	19.6	19.2	19.1	19.1
无规卷曲 Random coils	28.5	30.5	30.1	32.0	28.8	27.9	28.0	27.5	30.8

3 讨论

PEP 作为一种大型胞浆酶, 因与多个激素代谢和神经系统失调进程相关, 受到广泛关注。但 PEP

在生物体内含量低,利用天然蛋白研究其酶学特性有较大难度。本研究采用体外表达法获取了大量具有活性的 Hdh-PEP,并研究了多种较常见的金属离子对其的抑制效果。对不同情况下 Hdh-PEP 的相对活性、圆二色谱数据和二级结构变化情况进行综合分析,可以得出以下结论:在无金属离子存在下,60 ℃作用下的 Hdh-PEP 失活伴随着 α 螺旋的减少和无规则卷曲的增加,表明该温度下 Hdh-PEP 已出现了结构上的损坏,导致其活性降低; Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Ag^{+} 虽然能够强烈抑制 Hdh-PEP 的活性,但在二级结构占比方面和对照组相比并无明显变化,说明这 3 种金属离子作用于 Hdh-PEP 使其失活的机理并非破坏其二级结构,而是倾向于与活性中心结合或是干扰其三级结构,从而使 Hdh-PEP 丧失活性。

Al^{3+} 作为具抑制效果组中相对原子质量最小的金属离子,却依旧有着较强的抑制作用,且 Al^{3+} 的加入使 Hdh-PEP 中的反向平行结构明显增加,表明 Al^{3+} 的抑制作用在一定程度上是由干扰 Hdh-PEP 的结构所引起的。此外, Al^{3+} 作为多种退行性神经疾病的诱因^[17],其毒性多体现在和铁促自由基的竞争过程以及对抗氧化酶系统的抑制作用^[18], Al^{3+} 在强烈抑制 Hdh-PEP 活性的同时,明显增加了 Hdh-PEP 的反向平行结构比例,在一定程度上反映了其结合能力对酶结构的影响。

值得注意的是, Mg^{2+} 与 Ca^{2+} 虽不会抑制 Hdh-PEP 活性,却明显影响了 Hdh-PEP 的二级结构,且与对照组相比均呈现反向平行结构减少而 α 螺旋和无规则卷曲增加的趋势。这一差异并未在圆二色谱图中体现得较为明显。实际上, PEP 对底物限制的一个重要因素即是“匣式”结构中富含 β 折叠结构的“螺旋桨”结构。 Mg^{2+} 与 Ca^{2+} 的作用可能通过解离部分 β 折叠结构改善了该结构域的通透性,其详细作用机理和应用潜质值得进一步挖掘。有文献报道, Ag^{+} 既可以通过与酶活性中心结合影响其活性,也会通过改变酶的构象破坏其活性^[17]。在本研究中, Ag^{+} 并未显著影响 Hdh-PEP 的二级结构比例,其作用或为破坏 Hdh-PEP 活性中心与底物的结合路径,从而抑制酶活力。 Pb^{2+} 作为细胞毒性离子,对 Hdh-PEP 产生强烈抑制效果,但 Hdh-PEP 的二级结构占比并无明显变化,提示 Pb^{2+} 可能是通过结合 Hdh-PEP 的活性区域来抑制其活性的。

Zn^{2+} 作为生物体的必需元素之一,在很多金属离子相关酶类中充当辅基,维持多种蛋白酶在细胞质中的结构与功能。但 Zn^{2+} 的低浓度长期暴露会在水生生物体内累计可观的毒性^[19]。本研究中, Zn^{2+} 作用下的 Hdh-PEP 产生了近似于高温失活的构象变化。据此推测, Zn^{2+} 可作用于 Hdh-PEP 使其部分结构被破坏,从而使其丧失活性。

4 结论

金属离子的抑制作用与其生物毒性似乎直接相关,而对蛋白酶的抑制作用的详细机制却具有多样性。本研究通过圆二色谱法对常见金属离子作用下的 Hdh-PEP 进行二级结构含量分析,通过与对照组和 60 ℃失活组的比较,初步推测了各金属离子在影响其活性时的作用机制。今后拟通过测定酶动力学参数等详细指标,对特定金属离子的抑制机理进行探讨,为 PEP 的生理功能研究提供理论基础。

[参考文献]

- [1] GARCIA-HORSMAN J A. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease [J]. *Neuropeptides*, 2007, 41(1): 1-24. DOI:10.1016/j.npep.2006.10.004.
- [2] MORIYAMA A, NAKANISHI M, SASAKI M. Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates [J]. *Journal of Biochemistry*, 1988, 104: 112-118. DOI:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122404.
- [3] YOSHIMOTO T, NISHIMURA T, KITA T, et al. Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain [J]. *Journal of Biochemistry*, 1983, 94: 1179-1190. DOI:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134463.
- [4] GASS J, KHOSLA C. Prolyl endopeptidases [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64: 345-355.
- [5] FULOP V, BOCSKEI Z, POLGAR L. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis [J]. *Cell*, 1998, 94(2): 161-170. DOI:10.1016/S0092-8674(00)81416-6.

- [6] KAROL K, TOMASZ R, REINIS D. Molecular dynamics, crystallography and mutagenesis studies on the substrate gating mechanism of prolyl oligopeptidase [J]. *Biochimie*, 2012, 94(6): 1398-1411. DOI:10.1016/j.biochi.2012.03.012.
- [7] GORKA L, ITXARO P, LORENA B. Prolyl endopeptidase activity is correlated with colorectal cancer prognosis [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2014, 11(2): 199-208. DOI:10.7150/ijms.7178.
- [8] YOSHIDA K, INABA K, OHTAKE H. Purification and characterization of prolyl endopeptidase from the Pacific herring, *Clupea pallasii*, and its role in the activation of sperm motility [J]. *Development Growth & Differentiation*, 1999, 41(2): 217-225. DOI:10.1046/j.1440-169x.1999.00424.x.
- [9] WANG M X, ZHONG C, CAI Q F, et al. Study on a prolyl endopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 2211-2218. DOI:10.1016/j.procbio.2012.08.016.
- [10] WU G P, CHEN S H, LIU G M, et al. Purification and characterization of a collagenolytic serine proteinase from the skeletal muscle of red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2010, 58(9): 5730-5736.
- [11] LADRAT C, VERREZ-BAGNIS V, NOËL J, et al. Milli-Calpain from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle: purification, characterization of its activity and activation *in vitro* [J]. *Marine Biotechnology*, 2002, 4(1): 51-62.
- [12] WU J L, GE S Y, CAI Z X, et al. Purification and characterization of a gelatinolytic matrix metalloproteinase from the skeletal muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Food Chemistry*, 2014, 145(7): 632-638. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.08.055.
- [13] 肖琳琳, 翁凌, 钟婵, 等. 罗非鱼脯氨酸内肽酶的分离及抑制剂对其的作用机制 [J]. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2017, 22(1): 10-20.
- [14] KUMAR R, BAVI R, JO M G, et al. New compounds identified through *in silico* approaches reduce the α -synuclein expression by inhibiting prolyl oligopeptidase *in vitro* [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1-14. DOI:10.1038/s41598-017-11302-0.
- [15] 李静, 张剑, 赵永祥. 金属离子对蛋白酶作用的研究进展 [J]. *日用化学工业*, 2017, 47(6): 345-351.
- [16] 刘成, 韩宏岩, 张颖, 等. 银离子对辣根过氧化物酶的影响 [J]. *生物技术*, 2006(4): 49-52.
- [17] KURLAND L T. Amylotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin [J]. *Trends in Neurosciences*, 1988, 11(2): 51-58. DOI:10.1016/0166-2236(88)90163-4.
- [18] SUMATHI T. Protective role of cynodon dactylon in ameliorating the aluminium-induced neurotoxicity in rat brain regions [J]. *Biological Trace Element Research*, 2011, 144(1/3): 843-853. DOI:10.1007/s12011-011-9029-6.
- [19] 卢斌, 柯才焕, 王文雄. 低浓度镉、锌暴露对白氏文昌鱼的毒性累积及其几种重要酶活性的影响 [J]. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 2012, 51(4): 767-773.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)