

天冬氨酸和谷氨酸及其甘氨酸二肽调控Caco-2细胞钙离子吸收的研究

刘佳琛, 李 奕, 程永强, 唐 宁

Regulation of Calcium Absorption in Caco-2 Cells by Aspartic Acid, Glutamic Acid and Their Glycine Dipeptides

LIU Jiachen, LI Yi, CHENG Yongqiang, and TANG Ning

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090215>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

纳豆激酶微胶囊制备及其释放与Caco-2细胞模型吸收的评价

Preparation and Release of Nattokinase Microcapsules and Evaluation of Absorption in Caco-2 Cells Model

食品工业科技. 2019, 40(10): 115-121 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.019>

谷氨酸棒状杆菌高效发酵谷氨酸的关键分子机理研究进展

Research Progress on Key Molecular Mechanism of High Yield Glutamic Acid Fermentation by *Corynebacterium glutamicum*

食品工业科技. 2019, 40(5): 311-315,321 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.053>

胶束化对Caco-2上皮细胞叶黄素吸收和转运的影响

Effect of Micellization on Lutein Absorption and Transportation in Caco-2 Epithelial Cells

食品工业科技. 2019, 40(20): 304-309 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.049>

聚谷氨酸修饰电极测定食品中的麦芽酚

Determination of maltol in food by cyclic voltammetry with the poly glutamic acid modified electrode

食品工业科技. 2017(11): 305-308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.11.050>

复合菌固态发酵猪骨素产谷氨酸发酵条件优化

Optimization of fermentation conditions for Glutamic acid production by mixed starter cultures in solid state fermentation

食品工业科技. 2017(10): 185-188 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.10.027>

732阳离子交换树脂对全细胞谷氨酸脱羧酶活性的促进机制

Mechanism of 732 Cation-Exchange Resins on the Promotion of Whole Cells' Glutamate Decarboxylase Activity

食品工业科技. 2018, 39(20): 105-111 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.20.018>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘佳琛, 李奕, 程永强, 等. 天冬氨酸和谷氨酸及其甘氨酸二肽调控 Caco-2 细胞钙离子吸收的研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(14): 97-105. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090215

LIU Jiachen, LI Yi, CHENG Yongqiang, et al. Regulation of Calcium Absorption in Caco-2 Cells by Aspartic Acid, Glutamic Acid and Their Glycine Dipeptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(14): 97-105. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090215

· 研究与探讨 ·

天冬氨酸和谷氨酸及其甘氨酸二肽调控 Caco-2 细胞钙离子吸收的研究

刘佳琛, 李奕, 程永强, 唐宁*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 为了探究天冬氨酸和谷氨酸及其甘氨酸二肽对钙离子吸收的影响机理, 本文利用等温滴定量热技术、电化学、Caco-2 细胞模型结合量子化学计算 (密度泛函理论) 对天冬氨酸和谷氨酸及其甘氨酸二肽与钙离子的相互作用进行了探究。结果表明, 天冬氨酸和谷氨酸通过焓和熵驱动的放热反应与钙离子形成复合物, 而其形成的二肽则是通过熵驱动的吸热反应与钙离子结合。此外, 二肽比单独的氨基酸表现出更强的钙离子结合能力。量子化学计算表明, 氨基酸/二肽中的羧基为钙离子的主要结合位点, 在碱性条件下, 会导致钙离子结合位点转移, 氨基也可以参与钙离子结合。Caco-2 细胞吸收实验表明, 天冬氨酸和谷氨酸及其二肽均可促进钙的吸收, 其中甘氨酸-谷氨酸二肽 (Gly-Glu) 的促进效果最好, 促钙吸收率为 1.33 ± 0.115 。此外, 促钙吸收能力与钙离子结合能力之间没有明确的相关性, 与其电子亲和力的关系更为密切。研究结果解释了天冬氨酸、谷氨酸及其甘氨酸二肽与钙之间的相互作用, 为进一步开发钙补充剂提供科学依据。

关键词: 天冬氨酸, 谷氨酸, 甘氨酸, Caco-2 细胞模型, 钙吸收, 量子化学计算

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)14-0097-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090215



本文网刊:

Regulation of Calcium Absorption in Caco-2 Cells by Aspartic Acid, Glutamic Acid and Their Glycine Dipeptides

LIU Jiachen, LI Yi, CHENG Yongqiang, TANG Ning*

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to investigate the mechanism of aspartic acid, glutamic acid and their glycine dipeptides on calcium ion uptake, the isothermal titration calorimetry technique, electrochemistry, and Caco-2 cell model combined with quantum mechanical calculation (density functional theory) were used to investigate the interactions between aspartic acid and glutamic acid, as well as their glycine dipeptides. The results showed that aspartic acid and glutamic acid form complexes with calcium ions through exothermic reactions driven by enthalpy and entropy, while their dipeptides interacted with calcium ions by entropy-driven endothermic reactions. In addition, dipeptides exhibited stronger calcium binding capacity than the single amino acids. Quantum chemical calculations showed that the carboxyl groups in the amino acid/dipeptide were the main binding site of calcium ions, while under alkaline conditions, the amino group could also participate in calcium binding, leading to a calcium binding site shift. Caco-2 cell uptake experiments showed that aspartic acid, glutamic acid and their dipeptides could promote calcium absorption. Among them, Gly-Glu dipeptide had the best promotion effect, and the calcium absorption rate was 1.33 ± 0.115 . Furthermore, there was no clear correlation between the ability to promote calcium absorption and the ability to bind calcium ions. However, it was more closely related to its electron affinity. The results elucidated the interactions between aspartic acid, glutamic acid and their glycine dipeptides and calcium ions,

收稿日期: 2023-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32001687)。

作者简介: 刘佳琛 (1993-), 女, 硕士, 研究方向: 营养与食品安全, E-mail: snnuljc@163.com。

* 通信作者: 唐宁 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品化学, E-mail: ningtang@cau.edu.cn。

providing scientific basis for further development of calcium supplements

Key words: aspartic acid; glutamic acid; glycine; Caco-2 cell model; calcium absorption; quantum chemical calculations

钙是一种人体必需的矿物质元素,参与人体许多重要的生理功能,如肌肉、神经和心脏的正常运作,以及骨骼和牙齿的形成和维护^[1]。为了维持人体正常的钙水平,摄入含有良好钙源的饮食(如乳制品和钙强化食品)非常重要^[2]。然而缺钙引起的骨质疏松症却影响着全球数百万人,尤其是女性和老年人更容易患上骨质疏松症,而且风险会随着年龄的增长而增加^[3-4]。在这种情况下,需要摄入钙补充剂来帮助人们满足对钙的需求^[5]。

钙在肠道中的吸收主要通过两种途径:一种是依赖维生素 D 并需要能量的跨细胞途径;另一种是依赖于基于浓度梯度的被动扩散的细胞旁途径^[6]。这两种途径的吸收都取决于肠道中的可溶性钙的浓度^[7]。然而,可溶性钙的浓度很容易受到其他饮食因素的影响,例如磷酸盐和草酸盐,这些食物组分会与钙离子发生沉淀反应并抑制其吸收^[8]。传统的钙补充剂如碳酸钙往往补钙效果不佳,因为它们更容易在肠道中沉淀,且临床研究表明,服用这些钙补充剂也会产生副作用^[9-10],如对胃肠刺激性强,有引起结石的风险。近年来,研究表明食源性钙离子结合肽可有效促进钙吸收,而且不会引起不良反应^[11]。另外,这些肽可以在人体内被迅速吸收,可开发成非常有前景的钙补充剂^[12-13]。虽然近年来,针对钙离子结合肽的研究有了一定的进展,但是大部分集中于从各种食源性蛋白中鉴定钙离子结合肽^[14-16],而对其钙离子结合机理、促钙吸收机理及其影响因素均未完全阐明。

此外,之前的研究表明相关蛋白质或者钙离子结合肽中的天冬氨酸和谷氨酸在与钙离子结合上发挥着主要作用^[17]。因此,在本研究中,选择天冬氨酸、谷氨酸以及其形成的甘氨酸肽来研究与钙离子的相互作用以及对 Caco-2 细胞钙吸收能力的影响,并揭示其物化性质和促钙吸收率之间的相关性。本研究可为基于促钙吸收的肽设计提供有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甘氨酸-天冬氨酸二肽(Gly-Asp, 纯度 ≥ 98%)、甘氨酸-谷氨酸二肽(Gly-Glu, 纯度 ≥ 98%)、甘氨酸(纯度 ≥ 99%)、L-天冬氨酸(纯度 ≥ 98%)、L-谷氨酸(纯度 ≥ 99%)、甘氨酸钠盐二水合物(纯度 ≥ 98%)、L-天冬氨酸钠盐一水合物(纯度 ≥ 99%)、L-谷氨酸单钠盐一水合物(纯度 ≥ 98%)、氯化钙六水合物(纯度 ≥ 98%) 默克 Sigma-Aldrich 公司; 盐酸、氢氧化钠、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐等(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; Caco-2 细胞系 植物源功能食品北京市重点实验室保存细胞; 胎牛血清、12 孔 Transwell 细胞培养板 Corning 公司; DMEM 高糖培养基、DPBS 缓冲液、HBSS 缓冲液 北京索莱宝

科技有限公司; 0.25% EDTA 胰蛋白酶(2500 mg/L) Thermo Fisher Scientific 公司。

ME204 型电子分析天平 梅特勒托利多科技(中国)有限公司; FE28 型 pH 计 美国 METTLER TOLEDO 公司; Nano-ITC 等温滴定量热仪 美国 TA 仪器公司; 972124 钙离子复合电极 上海仪电科学仪器股份有限公司; Millicell-ERS 细胞电阻仪 默克 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 钙离子结合的热力学参数测定 氨基酸和甘氨酸二肽与钙离子结合的热力学参数测定参照之前的实验方法^[18],采用带有金样品池的 Nano-ITC 进行等温滴定量热实验。在进行滴定前,所有样品通过脱气站脱气处理 15 min。然后将氨基酸或甘氨酸二肽(0.01 mol/L,溶于 0.1 mol/L pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液)注入样品池中,将氯化钙(0.1 mol/L,溶于 0.1 mol/L pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液)吸入进样注射器。进样注射器以 250 r/min 的速度搅拌样品池中的溶液,以确保快速混合。在 25 s 内将 2.5 μL 钙注入样品池中,并留出一定时间间隔,以确保信号在两次注射之间返回到基线。然后将氯化钙滴定到缓冲液中进行对照实验,并将获得的信号从最终分析中减去。将所得数据通过 NanoAnalyze 进行分析拟合,获得其化学计量数(n)、结合常数(K_a)、焓变(ΔS)、焓变(ΔH)等热力学参数,此外,吉布斯自由能(ΔG)的计算方式如式(1):

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T \Delta S \quad \text{式 (1)}$$

1.2.2 钙离子活度测定 溶液中的钙离子活度使用钙离子选择性电极进行测定。测定前分别使用 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-3} 以及 1.0×10^{-2} mol/L 的 CaCl_2 标准水溶液在 25 °C 下对复合钙离子选择性电极进行校准。钙离子活度 $a_{\text{Ca}^{2+}}$ 则可以根据校准溶液测量的电极电位(以 mV 为单位)与校准溶液的 $\text{pCa} = -\log a_{\text{Ca}^{2+}}$ 之间所呈现的线性关系(能斯特方程)中计算得^[19]。标准溶液中的钙离子活度 $a_{\text{Ca}^{2+}}$ 可根据活度与浓度之间的关系计算如式(2)所示:

$$a_{\text{Ca}^{2+}} = [\text{Ca}^{2+}] \times \gamma_{\text{Ca}^{2+}} \quad \text{式 (2)}$$

式中, $\gamma_{\text{Ca}^{2+}}$ 是根据戴维斯方程计算的活度系数,如式(3)所示:

$$\log \gamma_{\text{Ca}^{2+}} = -A_{\text{DH}} z^2 \times \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.3I \right) \quad \text{式 (3)}$$

式中, A_{DH} 是 Debye-Hückel 常数,在 25 °C 时, A_{DH} 的数值为 0.51;对于水溶液, z 是钙离子的电荷,值为 2; I 是离子强度。离子强度计算如式(4)所示:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2 \quad \text{式(4)}$$

式中, C 是离子浓度(mol/L), 包括溶液中存在的所有离子浓度和调整 pH 所加入的 NaOH。

1.2.3 量子力学-密度泛函理论计算 氨基酸与甘氨酸二肽与钙离子的结合位点以及结合后的最优构型通过密度泛函理论(DFT)计算进行研究。所有量子力学计算均使用 Gaussian 16 进行^[20]。密度泛函理论采用 Becke 的三参数混合交换泛函以及 Lee-Yang-Parr 相关性(B3LYP)结合 6-311G(d, p) 基组进行几何优化和频率计算。溶剂效应则通过对可极化连续介质(IEFPCM)模型应用积分方程形式来呈现。分析计算出的频率以确保优化的结构对应于势能超面上的局部最小值。

1.2.4 Caco-2 细胞培养 将复苏后的 Caco-2 细胞接种于 25 cm² 透气细胞培养瓶中, 加入 5 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后换液, 用 DPBS 清洗细胞 2~3 遍并更换新鲜培养基。细胞生长至 90%~100% 融合状态时, 加入含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶 1 mL 消化 4 min, 待细胞开始大部分脱落时加入 4 mL 新鲜培养基终止消化, 用移液枪反复吹打, 使细胞呈现单个均匀分散状态后进行传代, 传代比率 1:5。

1.2.5 钙离子吸收实验 取对数生长期细胞(10~15 代)接种在 12 孔 Transwell 细胞培养板中, 接种密度为 3×10⁵~4×10⁵/mL, 上室加入 0.5 mL 细胞悬液, 下室加入 1.5 mL DMEM 培养基(含 10% 胎牛血

清, 1% 非必需氨基酸)。前 7 d 隔天换液, 第 8 d 开始每天换液。使用 Millicell-ERS 细胞电阻仪测量培养在 Transwell 细胞培养板中的 Caco-2 单层细胞膜电阻值, 根据公式计算细胞跨膜电阻值。当细胞跨膜电阻值高于 500 Ω·cm² 且相对稳定时, 表明细胞已形成了致密的单层膜。吸弃旧培养基, 用不含钙镁的 HBSS 缓冲液清洗 Transwell 上、下室 2~3 次, 上室加入 0.5 mL 已过 0.22 μm 无菌滤膜的待吸收样品, 下室加入 1.5 mL HBSS 缓冲液, 置于培养箱中培养 2 h 后取出。从下室吸取溶液, 采用电感耦合等离子体发射光谱方法检测下室钙含量, 并利用式(5)计算钙吸收率, 式(6)计算促钙吸收率:

$$\text{钙吸收率} = \frac{c_{\text{下室}} \times V_{\text{上室}}}{c_{\text{总}} \times V_{\text{总}}} \quad \text{式(5)}$$

式中: $c_{\text{下室}}$ 为下室钙浓度(mol/L); $V_{\text{下室}}$ 为下室钙体积(L); $c_{\text{总}}$ 为总钙浓度(mol/L); $V_{\text{总}}$ 为总钙体积(L)。

$$\text{促钙吸收率} = \frac{\text{样品钙吸收率}}{\text{氯化钙吸收率}} \quad \text{式(6)}$$

1.3 数据处理

使用 Gaussian 16 进行量子化学计算, R 4.0 进行主成分分析(PCA)和离子强度的迭代计算, 所有数据均为 3 次重复的平均结果, 以平均值±标准差来表示。

2 结果与分析

2.1 氨基酸及其甘氨酸二肽结合钙离子的热力学研究

热力学可以研究热过程如何帮助化学系统达到

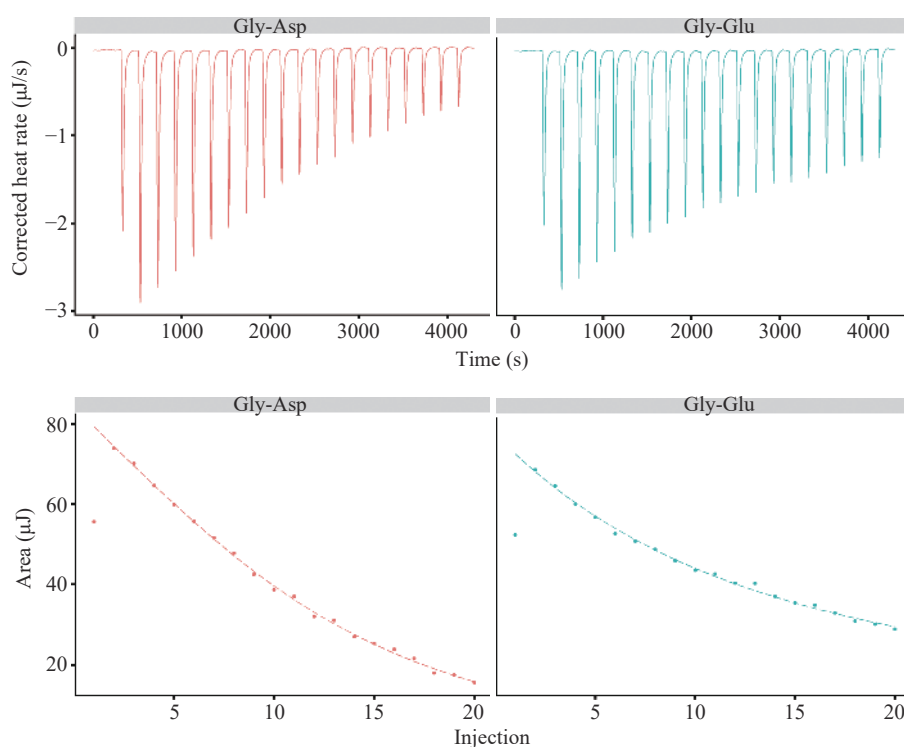


图 1 25 °C 时钙离子与二肽 Gly-Asp 和 Gly-Glu 结合的等温滴定量热曲线及对曲线积分的拟合

Fig.1 Isothermal titration calorimetry curves and fitting model after curves integration of binding calcium to Gly-Asp and Gly-Glu dipeptide at 25 °C

表 1 通过等温量热滴定测定的氨基酸及其甘氨酸二肽的钙离子结合热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters of amino acids and their glycine dipeptides binding with calcium determined by isothermal titration calorimetry

样品	$K_d(\text{mol/L})$	n	$\Delta H(\text{kJ/mol})$	$K_a(\text{L/mol})$	$\Delta S(\text{J/mol}\cdot\text{K})$	$\Delta G(\text{kJ/mol})$
GlyNa	$(1.17\pm 0.89)\times 10^{-3}$	0.36 ± 0.05	-0.41 ± 0.16	853	54.73	-16.73
AspNa	$(6.38\pm 3.33)\times 10^{-4}$	0.1 ± 0.15	-1.78 ± 1.15	157	36.06	-12.53
GluNa	$(9.97\pm 6.98)\times 10^{-3}$	0.1 ± 0.21	-2.54 ± 1.94	100	29.79	-11.42
Gly-Asp	$(3.99\pm 3.88)\times 10^{-3}$	0.48 ± 0.1	0.63 ± 0.53	251	48.03	-13.7
Gly-Glu	$(1.3\pm 0.62)\times 10^{-2}$	0.1 ± 0.22	3.68 ± 2.37	77	48.44	-10.76

注: K_d : 解离常数; n : 化学计量数; ΔH : 结合焓; ΔS : 结合熵; ΔG : 吉布斯自由能; K_a : 结合常数。

平衡, 以及在没有外部干预的情况下是否能实现真正的稳定^[21-22], 热力学参数可以更好的揭示氨基酸和肽与钙离子结合的过程。通过等温量热滴定仪对这一过程进行了测定 ($\text{pH}7.4$, $25\text{ }^\circ\text{C}$), 结果如图 1 和表 1 所示。由表 1 可知, 氨基酸和二肽均可以和钙离子自发地 ($\Delta G<0$) 形成复合物, 但氨基酸与钙离子结合是焓驱动和熵驱动的放热反应 ($\Delta H<0$, $\Delta S>0$), 而甘氨酸二肽与钙离子结合则是熵驱动的吸热反应 ($\Delta H>0$, $\Delta S>0$), 这一结果与之前的研究结果相似^[23-24]。通过对结合反应产生的热量进行积分 (以甘氨酸二肽为例, 如图 1 所示) 并进行相应的拟合得到钙结合常数^[25], 结果如表 1 所示。通过拟合得到的热力学参数描述强结合反应时较为准确 ($K_a>1000\text{ L/mol}$), 而较小的焓变绝对值则表明氨基酸与甘氨酸二肽与钙离子属于弱结合, 所以表 1 中得到的钙离子结合常数并不是非常准确, 需进一步修正。

2.2 基于离子活度的钙离子结合常数计算

根据 2.1 结果, 团队建立了通过溶液中钙离子活度来测定钙离子结合常数的方法。在水溶液中, 氨基酸和甘氨酸二肽与钙离子的结合主要为 1:1 结合, 用式(7)进行描述:



式中, L^- 为氨基酸或者甘氨酸二肽; CaL^+ 是形成的复合物。基于钙离子活度的钙离子结合常数可通过式(8)进行计算:

$$K_a = \frac{\alpha_{\text{CaL}^+}}{\alpha_{\text{Ca}^{2+}}\alpha_{\text{L}^-}} = \frac{[\text{CaL}^+]\gamma_{\text{CaL}^+}}{\alpha_{\text{Ca}^{2+}}[\text{L}^-]\gamma_{\text{L}^-}} \quad \text{式 (8)}$$

式中, $\alpha_{\text{Ca}^{2+}}$ 为溶液中的钙离子活度 (mol/L), 可通过校准后的钙离子选择性电极直接测得, 复合物

浓度 $[\text{CaL}^+]$ 可以通过加入的总钙浓度 $c_{\text{Ca}^{2+}}$ 计算, 如式(9)所示:

$$[\text{CaL}^+] = c_{\text{Ca}^{2+}} - [\text{Ca}^{2+}] = c_{\text{Ca}^{2+}} - \frac{\alpha_{\text{Ca}^{2+}}}{\gamma_{\text{Ca}^{2+}}} \quad \text{式 (9)}$$

式中, $c_{\text{Ca}^{2+}}$ 为总钙浓度 (mol/L); $[\text{Ca}^{2+}]$ 为游离钙浓度 (mol/L)。式(8)中游离的配体浓度 $[\text{L}^-]$ 可以通过加入的氨基酸或甘氨酸二肽的总量 c_{L^-} 进行计算:

$$[\text{L}^-] = c_{\text{L}^-} - [\text{CaL}^+] = c_{\text{L}^-} - c_{\text{Ca}^{2+}} + \frac{\alpha_{\text{Ca}^{2+}}}{\gamma_{\text{Ca}^{2+}}} \quad \text{式 (10)}$$

式中, 相应的离子活度系数 γ 可通过式(3)进行计算, 对溶液中初始离子强度 I 进行如下估算:

$$I = \frac{1}{2}(c_{\text{Ca}^{2+}} \times 4 + c_{\text{L}^-}) \quad \text{式 (11)}$$

基于计算得到初始的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 、 $[\text{L}^-]$ 、 $[\text{CaL}^+]$ 等浓度后, 可对溶液中的离子强度 I 重新进行如下更为精准的计算:

$$I = \frac{1}{2}([\text{Ca}^{2+}] \times 4 + [\text{CaL}^+] + [\text{L}^-] + c_{\text{Na}^+} + c_{\text{OH}^-}) \quad \text{式 (12)}$$

得到新的离子强度后, 对式(3)、式(9)、式(10)、式(12)进行循环计算, 直到根据式(12)得到的离子强度不再变化为止, 最终可通过式(8)计算出基于钙离子活度的钙离子结合常数。通过此方法获得的钙离子结合常数如表 2 所示。相较于氨基酸, 肽有着更高的钙离子结合能力, 这一结果与之前的研究结果相一致^[17,26]。天冬氨酸 (103 L/mol) 与钙离子的结合能力要高于谷氨酸 (65 L/mol), 其形成的甘氨酸二肽也表现出了同样的趋势。此外, 团队对其钠盐的钙离子结合能力也进行了测定, 结果表明它们在中性环境下

表 2 钙离子和氨基酸及其钠盐和二肽在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 水溶液体系中的热力学参数Table 2 Thermodynamic parameters in the Calcium-amino acid/dipeptide solution systems at $25\text{ }^\circ\text{C}$

样品	pH	$T_{\text{Ca}^{2+}}(\text{mol/L})$	$T_{\text{L}^-}(\text{mol/L})$	$[\text{Ca}^{2+}](\text{mol/L})$	$\alpha_{\text{Ca}^{2+}}$	I	$\gamma_{\text{Ca}^{2+}}$	$[\text{L}^-](\text{mol/L})$	$[\text{CaL}^+](\text{mol/L})$	$K_a(\text{L/mol})$
Gly	7.2	0.001	0.01	0.00070	0.00055	0.0030	0.79	0.048	0.00030	9
Asp	7.4	0.001	0.01	0.00065	0.00041	0.012	0.64	0.0084	0.00035	103
Glu	7.2	0.001	0.01	0.00074	0.00048	0.012	0.64	0.0083	0.00026	65
AspNa	7.4	0.001	0.1	0.00045	0.00017	0.10	0.37	0.099	0.00055	34
GluNa	7.2	0.001	0.1	0.00048	0.00018	0.10	0.37	0.099	0.00052	29
Gly-Asp	7.6	0.001	0.01	0.00058	0.00038	0.011	0.65	0.0084	0.00042	132
Gly-Glu	7.1	0.001	0.01	0.00059	0.00038	0.012	0.64	0.0084	0.00041	128

注: $T_{\text{Ca}^{2+}}$ 为总钙浓度; T_{L^-} 为配体总浓度。

的钙离子结合能力要普遍低于氨基酸形式。这是由于羧基的 pK_a 不同导致,氨基酸在水溶液中的自然解离需要用 NaOH 调节来达到中性 pH,之前的研究表明 pH 升高会增强氨基酸的钙离子的结合能力^[27-30]。

2.3 量子力学计算

除了钙离子结合常数外,揭示钙离子与肽的结合位点有助于更好的设计钙离子结合肽的序列^[31]。因此,利用量子化学计算中的密度泛函理论(DFT/B3LYP/6-311G(d, p))对氨基酸和甘氨酸二肽与钙离子形成复合物的最优结构进行探究^[26]。通过对复合物的所有构型进行优化,结合焓变值来确定最优结构,最终所得最优结构如图 2 所示,其中图 2(a)为复合物中氨基酸/二肽中羧基去质子化和氨基质子化形式,图 2(b)为复合物中氨基酸/二肽中羧基去质子化和氨基去质子化形式。从图 2(a)中可知,在自然解离状态下,C 端和侧链羧基为钙离子的主要结合位

点,一般情况下 C 端羧基与钙离子形成二齿配位复合物,如果侧链羧基也参与钙离子的结合,则通过单齿配位的形式参与结合。而在碱性条件下(氨基和羧基去质子化, $pH > pK_a$),如图 2(b)所示,钙与氨基酸的结合位点发生明显转移,去质子化的氨基开始参与钙离子结合,这一结果与之前的量子化学计算结果相吻合^[26,32]。此外,在甘氨酸二肽中,C 端羧基仍然是钙离子结合的主要位点。结合位点的差异性可能是造成钙离子与其结合时热力学性质不同的原因之一。

此外,利用相同机组计算了氨基酸和甘氨酸二肽最优构型下的相关特性,并在表 3(自然解离:氨基质子化和羧基去质子化)和表 4(氨基和羧基去质子化, $pH > pK_a$)中进行了总结,用于探究与钙离子结合和促钙吸收相关的物化特性。根据硬软路易斯酸碱(HSAB)理论,热力学上更倾向于“硬硬”“软软”的组合,因此该理论可用来预测金属-配体复合物的热

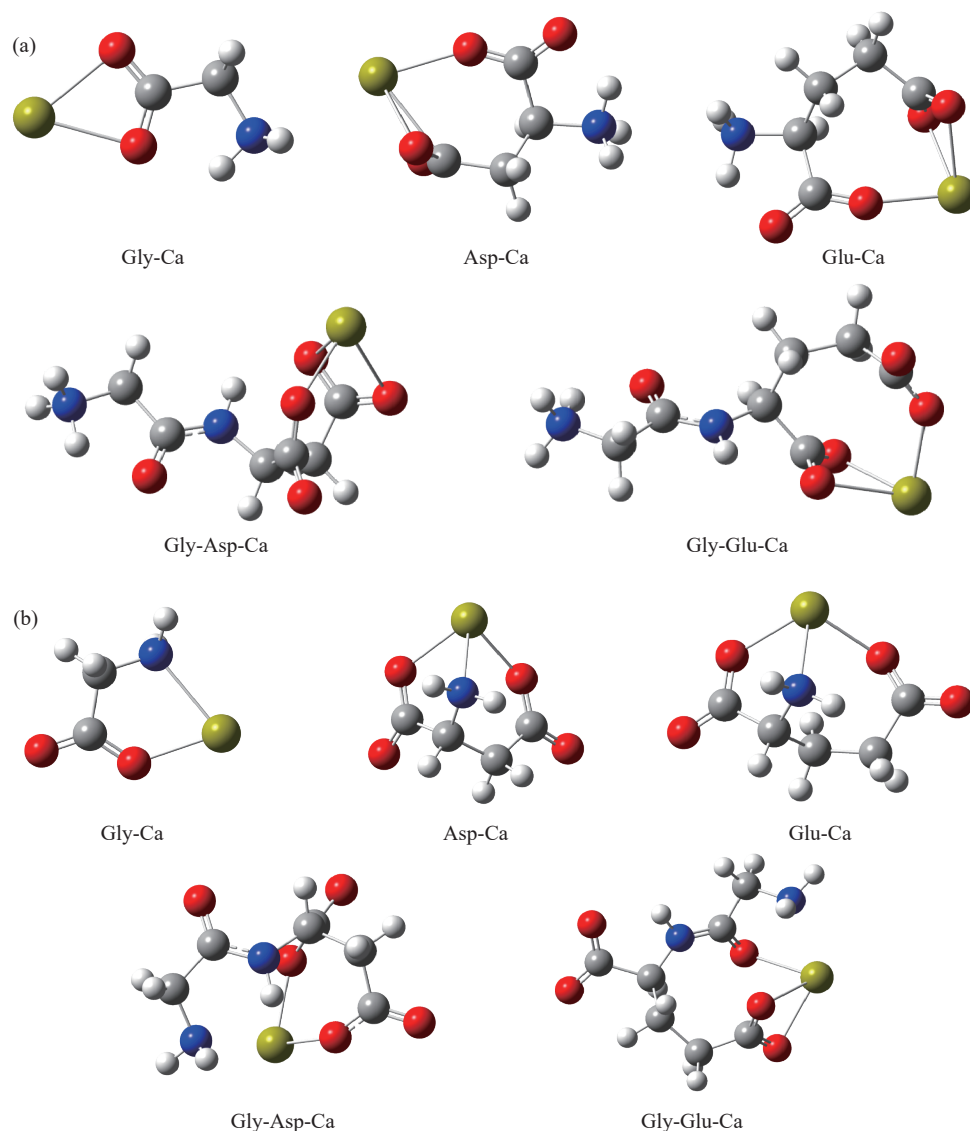


图 2 利用密度泛函理论优化的 1:1 结合最优钙-氨基酸/二肽复合物构型

Fig.2 Optimized 1:1 binding structures of calcium-amino acid/dipeptide complexes with amino acid/dipeptide in zwitterionic forms

注: (a)为兼性离子形式; (b)为去质子化形式。

表 3 配体在兼性离子形式下的 DFT 计算描述符

Table 3 DFT-calculated parameters of ligands in zwitterionic forms

样品	μ (D)	极化性 (a.u.)	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	E_{Gap} (eV)	CP (eV)	化学硬度 (eV)	化学软度 (eV)	亲电性 (eV)	IP (eV)	EA (eV)	$E_{thermal}$ (kcal/mol)	ΔC (cal/mol K)	熵 (cal/mol K)	电荷	$\Delta H_{binding}$ (kJ/mol)
Gly	12.08	42.49	-6.56	0.57	-7.12	2.99	3.56	0.14	1.74	1.26	6.56	-0.57	53.97	17.13	72.72	-93.36
Asp	16.04	78.32	-5.67	0.72	-6.39	2.47	3.19	0.16	1.56	0.95	5.66	-0.72	75.12	30.47	93.80	-170.48
Glu	17.70	93.18	-5.50	0.75	-6.25	2.38	3.12	0.16	1.54	0.90	5.50	-0.75	93.81	35.34	103.70	-186.52
Gly-Asp	30.66	119.64	-5.56	0.20	-5.77	2.68	2.88	0.17	1.53	1.25	5.56	-0.20	113.28	45.17	115.49	-180.23
Gly-Glu	41.63	133.99	-5.32	0.037	-5.36	2.64	2.68	0.19	1.51	1.30	5.32	-0.037	131.91	50.59	124.60	-200.37

注： μ 为偶极矩； E_{HOMO} 为最高占据分子轨道能； E_{LUMO} 为最低未占分子轨道能； E_{Gap} 为HOMO-LUMO能隙；IP为电离势；CP为化学势；EA为电子亲和力； $E_{thermal}$ 为热能； ΔC 为热容量； $\Delta H_{binding}$ 为钙结合焓；表4同。

表 4 配体在去质子化的形式下的 DFT 计算描述符

Table 4 DFT-calculated parameters of ligands in deprotonated forms

样品	μ (D)	极化性 (a.u.)	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	E_{Gap} (eV)	CP (eV)	化学硬度 (eV)	化学软度 (eV)	亲电性 (eV)	IP (eV)	EA (eV)	$E_{thermal}$ (kcal/mol)	ΔC (cal/mol K)	熵 (cal/mol K)	电荷	$\Delta H_{binding}$ (kJ/mol)
Gly	4.53	44.76	-5.29	1.75	-7.04	1.77	3.52	0.14	0.45	5.29	-1.75	45.11	17.14	73.52	1.66	-154.24
Asp	8.27	80.84	-5.22	1.77	-7.00	1.72	3.50	0.14	0.42	5.22	-1.77	66.51	30.08	94.46	1.49	-252.30
Glu	8.08	96.17	-5.24	1.45	-6.68	1.89	3.34	0.15	0.54	5.24	-1.45	84.89	35.12	103.88	1.48	-239.10
Gly-Asp	11.39	121.82	-5.32	0.83	-6.15	2.24	3.07	0.16	0.82	5.32	-0.83	104.09	45.29	118.84	1.47	-225.64
Gly-Glu	19.90	136.26	-5.27	0.79	-6.06	2.24	3.03	0.17	0.83	5.27	-0.79	122.71	50.66	125.43	1.45	-217.16

力学稳定性^[33-35]。钙作为一种路易斯硬酸，意味着它对电负性较高、体积较小的硬碱配体有偏好，与硬度较低的配体有较高的稳定性常数^[36]。因此，利用式(13)~式(16)进行了计算：

$$\chi = -\mu = -\frac{E_{HOMO} + E_{LUMO}}{2} \quad \text{式 (13)}$$

$$\eta = \frac{I + A}{2} = -\frac{E_{LUMO} - E_{HOMO}}{2} \quad \text{式 (14)}$$

$$\omega = \frac{\chi^2}{2\eta} \quad \text{式 (15)}$$

$$\sigma = \frac{1}{2\eta} \quad \text{式 (16)}$$

式中： E_{HOMO} 为最高占据分子轨道能； E_{LUMO} 为最低未占分子轨道能； χ 为电负性，表示吸引电子的能力； μ 为化学势； I 为电离势； A 为电子亲和力； η 为化学硬度； ω 为亲电性指数； σ 为化学软度；

从表 3 和表 4 可知，在两种形态下的氨基酸和甘氨酸二肽，具有相对较低硬度的配体具有较高钙离子结合能力，这一结果与硬软路易斯酸碱理论相一致。另外，通过 Mulliken 电荷分布分析可知，具有较强钙离子结合能力的配体与钙形成的复合物中的钙离子的 Mulliken 电荷相对较低。而 $\Delta H_{binding}$ 与表 2

中的钙离子结合常数没有表现出较高的相关性，这可能是由于天冬氨酸和谷氨酸及其形成的二肽与钙离子结合时涉及到多个功能基团，将溶液调节到中性环境后功能基团的不同形态分布较为复杂，虽然能看出一定的趋势，但有待进一步研究。而在氨基和羧基去质子化的形式下，通过密度泛函计算的天冬氨酸与钙离子的结合能力要强于谷氨酸，与表 2 中的结果一致，表明在碱性条件下，氨基在氨基酸和二肽与钙离子的结合中也起非常重要的作用。

2.4 氨基酸及其甘氨酸二肽促钙吸收的构效关系研究

为进一步探究氨基酸及其二肽对钙离子吸收率的影响，建立 Caco-2 细胞吸收模型测定其促钙吸收能力，结果如表 5 所示。

由表 5 可知，甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酸及其二肽均有一定的促钙吸收作用。其中，甘氨酸-谷氨酸二肽表现出最高的促钙吸收能力，促钙吸收率为 1.33，其次为天冬氨酸(1.30)和甘氨酸(1.19)，而谷氨酸(1.01)表现出最低的促钙吸收率。有研究表明，与 $CaCl_2$ 相比(对照组)，Glu-Tyr-Gly-Ca 明显增加了钙转运且转移的钙量随着 Glu-Tyr-Gly-Ca 的剂量而增加^[37]。对促钙吸收率和钙离子结合能力进行相关性分析，结果并没有表现出相关性，这一结果与之前磷

表 5 氨基酸和甘氨酸二肽的钙吸收率和相应的促钙吸收率(氯化钙为对照)和钙结合焓

Table 5 Calcium absorption and corresponding calcium absorption promotion factor ($CaCl_2$ as a control), and calcium-binding enthalpy

样品	钙吸收率	促钙吸收率	K_a (L/mol)	$\Delta H_{binding-1}$ (kJ/mol)	$\Delta H_{binding-2}$ (kJ/mol)
Gly	0.0175±0.001	1.19±0.080	9	-93.36	-154.24
Asp	0.0191±0.0003	1.30±0.027	103	-170.48	-252.3
Glu	0.0148±0.001	1.01±0.060	65	-186.52	-239.1
Gly-Asp	0.0171±0.001	1.16±0.086	132	-180.23	-225.64
Gly-Glu	0.0196±0.002	1.33±0.115	128	-200.37	-217.16

注： $\Delta H_{binding-1}$ 为兼性离子形式下的钙结合焓； $\Delta H_{binding-2}$ 为去质子化形式下的钙结合焓。

酸化肽的研究结果相一致^[11,38]。进一步对氨基酸和甘氨酸二肽的所有性质进行主成分分析,结果如图 3 所示。在自然解离状态下,氨基酸和二肽的特征具有明显区别,主成分 1 和主成分 2 总共解释了 94.5% 的性质变化,其中主成分 1 占 73.3%,主成分 2 占 21.2%。主成分 1 与化学硬度和结合焓变呈负

相关,与钙离子结合常数和极化率呈正相关。主成分 2 与 LUMO 能量呈负相关,与亲电性呈正相关。结合常数的变化与极化率和熵变呈相关性,而促钙吸收率则与电子亲和性更相关。而针对碱性条件下的去质子化状态,如图 4 所示,虽然前 2 个主成分解释的总变量有所下降(91.1%),但结论与兼性离子状态

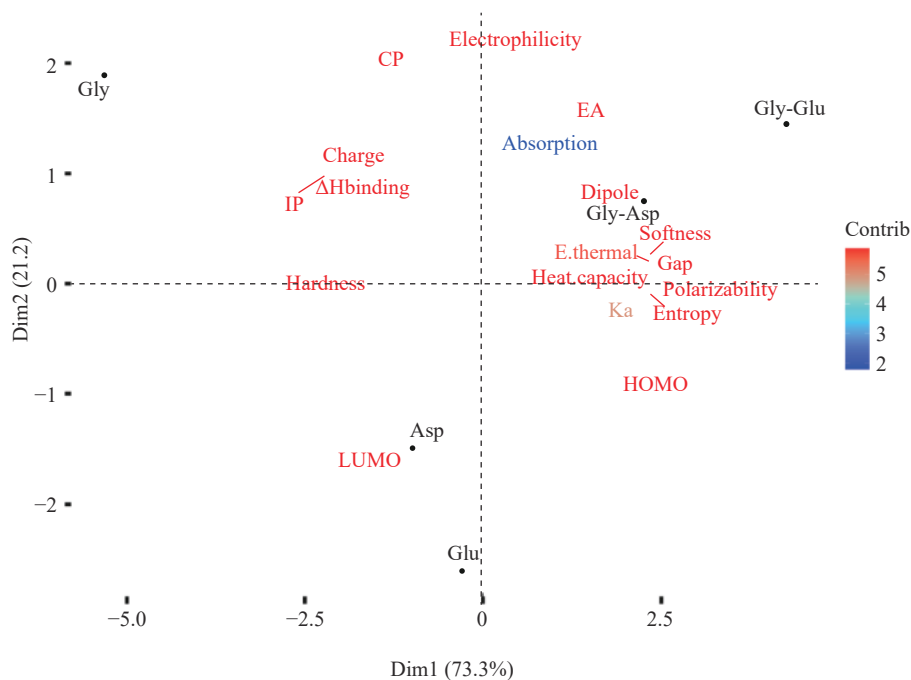


图 3 氨基酸及其甘氨酸二肽在兼性离子形式下的主成分分析

Fig.3 Principal component analysis of amino acids/dipeptides in zwitterionic forms

注: Electrophilicity 为亲电性; CP 为化学势; EA 为电子亲和力; Absorption 为钙吸收率; Charge 为电荷; $\Delta H_{\text{binding}}$ 为钙结合焓; IP 为电离势; Dipole 为偶极矩; Hardness 为化学硬度; Softness 为化学软度; E.thermal 为热能; Gap 为 HOMO-LUMO 能隙; Heat capacity 为热容量; Polarizability 为极化性; Entropy 为熵; K_a 为结合常数; HOMO 为最高占据分子轨道能; LUMO 为最低未占分子轨道能,图 4 同。

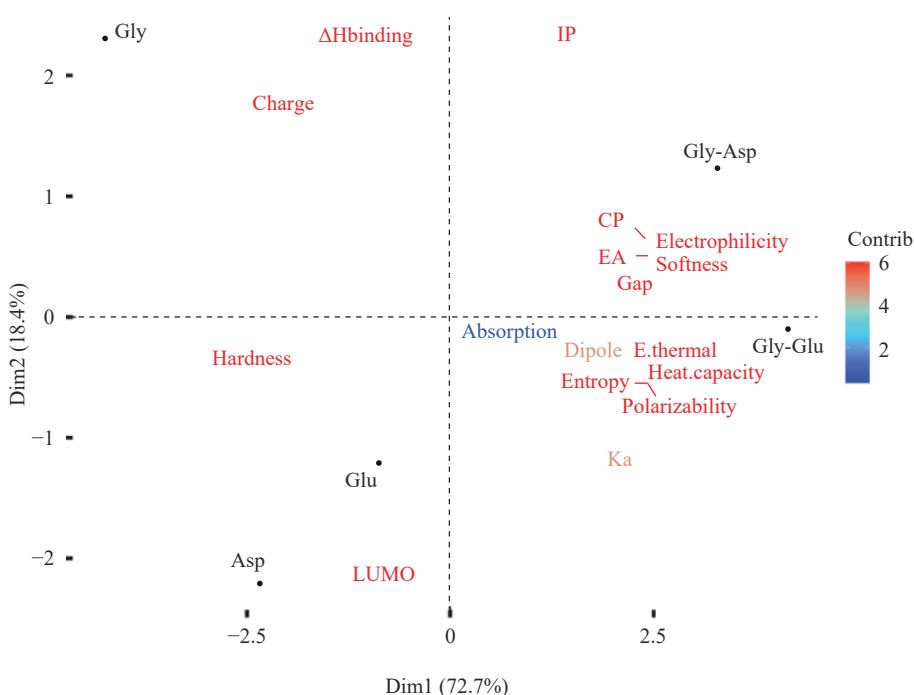


图 4 氨基酸及其甘氨酸二肽在去质子化形式下的主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of amino acids/dipeptides in deprotonated forms

的结论相似,且促钙吸收率与其他性质没有表现出一定的相关性。这可能是由于促钙吸收率本身对主成分分析的贡献率较低,而且在 pH=7.4 的中性条件下,兼性离子状态占主要比例。

3 结论

本文通过热力学、电化学、Caco-2 细胞模型实验结合量子化学理论计算,揭示了天冬氨酸和谷氨酸及其形成的甘氨酸二肽影响钙吸收的机制。氨基酸与钙离子结合是通过焓驱动和熵驱动的放热反应,而肽则通过熵驱动的吸热反应自发地与钙离子结合形成复合物。相较于氨基酸,其形成的二肽与钙离子具有更强的钙离子结合能力(Gly-Asp 132 L/mol 和 Gly-Glu 128 L/mol)。氨基酸和肽主要通过羧基与钙离子结合,但是碱性条件下,氨基酸有明显的钙离子结合位点转移,氨基也参与钙离子结合。Caco-2 细胞模型吸收实验表明所测定的氨基酸和甘氨酸二肽均有一定的促钙吸收能力,但促钙吸收能力与钙离子结合能力没有表现出相关性,与电子亲和性更为相关。实验结果可为钙补充剂的研发提供理论依据。未来应更有针对性地设计具有高促钙吸收能力的促钙吸收肽,更深入的研究其促钙吸收机制。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] MARTÍNEZ DE VICTORIA E. Calcium, essential for health[J]. *Nutrición Hospitalaria*, 2016, 33(4): 26–31.
- [2] MASOTTI F, CATTANEO S, STUKNYTĖ M, et al. Analytical advances in the determination of calcium in bovine milk, dairy products and milk-based infant formulas[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 103: 348–360.
- [3] REID I R. Osteoporosis: evidence for vitamin D and calcium in older people[J]. *Drug and Therapeutics Bulletin*, 2020, 58(8): 122–125.
- [4] ALFARIS N A, ALKEHAYEZ N M, ALMUSHAWAH F I, et al. Vitamin D deficiency and associated risk factors in women from riyadh, saudi arabia[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 20371.
- [5] STRAUB D A. Calcium supplementation in clinical practice: A review of forms, doses, and indications[J]. *Nutrition in Clinical Practice*, 2007, 22(3): 286–296.
- [6] PU F, CHEN N, XUE S H. Calcium intake, calcium homeostasis and health[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2016, 5(1): 8–16.
- [7] CIVITELLI R, ZIAMBARAS K, WARD W E. Calcium, magnesium, and vitamin D absorption; metabolism and deficiency[M]. Amsterdam: *Encyclopedia of Gastroenterology* (Second Edition), 2020: 418–423.
- [8] CORTE-REAL J, BOHN T. Interaction of divalent minerals with liposoluble nutrients and phytochemicals during digestion and influences on their bioavailability—a review[J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 285–293.
- [9] CORMICK G, BELIZÁN J M. Calcium intake and health[J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1606.
- [10] ZHANG H, ZHAO L, SHEN Q, et al. Preparation of cattle bone collagen peptides-calcium chelate and its structural characterization and stability[J]. *LWT*, 2021, 144: 111264.
- [11] SUN N, WU H T, DU M, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 58: 140–148.
- [12] ZHANG M H, LIU K L. Calcium supplements and structure-activity relationship of peptide-calcium chelates: A review[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2022, 31(9): 1111–1122.
- [13] CAI X X, LIN J P, WANG S Y. Novel peptide with specific calcium-binding capacity from *Schizochytrium* sp. protein hydrolysates and calcium bioavailability in Caco-2 Cells[J]. *Marine Drugs*, 2016, 15(1): 3.
- [14] LIN Y L, CAI X X, WU X P, et al. Fabrication of snapper fish scales protein hydrolysate-calcium complex and the promotion in calcium cellular uptake[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 65: 103717.
- [15] LUO J Q, YAO X T, SOLADOYE O P, et al. Phosphorylation modification of collagen peptides from fish bone enhances their calcium-chelating and antioxidant activity[J]. *LWT*, 2022, 155: 112978.
- [16] SUN N, WANG Y X, BAO Z J, et al. Calcium binding to herring egg phosphopeptides: Binding characteristics, conformational structure and intermolecular forces[J]. *Food Chemistry*, 2020, 310: 125867.
- [17] VAVRUSOVA M, SKIBSTED L H. Calcium binding to dipeptides of aspartate and glutamate in comparison with orthophosphoserine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(22): 5380–5384.
- [18] TANG N, LIU J C, CHENG Y Q. Effects of zinc binding on the binding of epigallocatechin gallate (green tea) to bovine serum albumin and myoglobin[J]. *Food Chemistry*, 2021, 357: 129750.
- [19] VAVRUSOVA M, GARCIA A C, DANIELSEN B P, et al. Spontaneous supersaturation of calcium citrate from simultaneous isothermal dissolution of sodium citrate and sparingly soluble calcium hydroxycarboxylates in water[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(6): 3078–3088.
- [20] TANG N, SKIBSTED L H. Zinc Bioavailability from phytate-rich foods and zinc supplements. modeling the effects of food components with oxygen, nitrogen, and sulfur donor ligands[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(39): 8727–8743.
- [21] GLÖCKNER S, KLEBE G. Simultaneous determination of thermodynamic and kinetic data by isothermal titration calorimetry[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2021, 1865(2): 129772.
- [22] GHAI R, FALCONER R J, COLLINS B M. Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research—survey of the literature from 2010[J]. *Journal of Molecular Recognition*: JMR, 2012, 25(1): 32–52.
- [23] DUDEV T. How theoretical evaluations can generate guidelines for designing/engineering metalloproteins with desired metal affinity and selectivity[J]. *Molecules*, 2022, 28: 249.
- [24] LUO M N, XIAO J, SUN S W, et al. Deciphering calcium-binding behaviors of casein phosphopeptides by experimental approaches and molecular simulation[J]. *Food & Function*, 2020, 11: 5284–5292.
- [25] SI K, GONG T T, DING S Y, et al. Binding mechanism and bioavailability of a novel phosvitin phosphopeptide (Glu-Asp-Asp-

- pSer-pSer) calcium complex[J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134567.
- [26] TANG N, SKIBSTED L H. Calcium binding to amino acids and small glycine peptides in aqueous solution; toward peptide design for better calcium bioavailability[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(21): 4376–4389.
- [27] LIU X C, LIU J, SKIBSTED L H. Temperature effect on calcium binding to aspartate and glutamate[J]. *Food Research International*, 2022, 159: 111625.
- [28] SAJADI S A A. Metal ion-binding properties of L-glutamic acid and L-aspartic acid, a comparative investigation[J]. *Natural Science*, 2010, 02: 85–90.
- [29] BRETTI C, CIGALA R M, GIUFFRÈ O, et al. Modeling solubility and acid-base properties of some polar side chain amino acids in NaCl and $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ aqueous solutions at different ionic strengths and temperatures[J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2018, 459: 51–64.
- [30] FOX S, BÜSCHING I, BARKLAGE W, et al. Coordination of biologically important alpha-amino acids to calcium (II) at high pH; insights from crystal structures of calcium alpha-aminocarboxylates[J]. *Inorganic Chemistry*, 2007, 46(3): 818–824.
- [31] JOSHUA A T, LEE C C, OPEOLU A J, et al. Metal-binding peptides and their potential to enhance the absorption and bioavailability of minerals[J]. *Food Chemistry*, 2023, 428: 136678.
- [32] JIANG Y, LIU X C, DE ZAWADZKI A, et al. Binding of calcium to l-serine and o-phospho-l-serine as affected by temperature, pH and ionic strength under milk processing conditions[J]. *International Dairy Journal*, 2021, 112: 104875.
- [33] PÉREZ P, CONTRERAS R, VELA A, et al. Relationship between the electronic chemical potential and proton transfer barriers[J]. *Chemical Physics Letters*, 1997, 269(5): 419–427.
- [34] CAMPODÓNICO P R, ANDRÉS J, AIZMAN A, et al. Proton transport catalysis in intramolecular rearrangements: A density functional theory study[J]. *Chemical Physics Letters*, 2008, 464(4): 271–275.
- [35] MIGLIORE A, POLIZZI N F, THERIEN M J, et al. Biochemistry and theory of proton-coupled electron transfer[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(7): 3381–3465.
- [36] GEERLINGS P, DE PROFT F, LANGENAEKER W. Conceptual density functional theory[J]. *Chemical Reviews*, 2003, 103(5): 1793–1874.
- [37] QI L W, ZHANG H R, GUO Y J, et al. A novel calcium-binding peptide from bovine bone collagen hydrolysate and chelation mechanism and calcium absorption activity of peptide-calcium chelate[J]. *Food Chemistry*, 2023, 410: 135387.
- [38] TENENBAUM M, DERACINOIS B, DUGARDIN C, et al. Identification, production and bioactivity of casein phosphopeptides—A review[J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111360.