

# Nano LC-MS/MS 从具有增强小鼠记忆作用的人参组分中鉴定 22 种新肽

罗浩铭<sup>1</sup>, 陈英红<sup>2</sup>, 洪 铁<sup>2</sup>, 姜瑞芝<sup>2</sup>, 王 颖<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>长春中医药大学, 长春 130117; <sup>2</sup>吉林省中医药科学院中医药基础所, 长春 130012

**摘要:**在我们先前的研究中发现人参非皂苷部分具有改善小鼠记忆活性。为确定活性组分, 实验采用对人参水提物经超滤、透析、Sephadex G-15 凝胶柱层析分离纯化, 通过 UV 对糖与蛋白的监测, 得到 P1、P2 两部分。药理实验结果表明, P2 经腹腔注射给药 7 d, 40 mg/kg, 能明显改善小鼠记忆获得障碍和小鼠记忆巩固障碍。P2 采用纳升级超高效液相-质谱联用仪(Nano LC-MS/MS)进行结构分析, 首次从人参中得到 22 种新肽, 且具有辅助改善学习记忆的作用。

**关键词:** 人参; LC-MS/MS; 增强记忆活性; 肽

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.8.009

## Structural Identification of 22 Novel Peptides from Ginseng Component with Memory-enhancement Effect Using by Nano LC-MS/MS

LUO Hao-ming<sup>1</sup>, CHEN Ying-hong<sup>2</sup>, HONG Tie<sup>2</sup>, JIANG Rui-zhi<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Changchun University of Chinese Traditional Medicine, Changchun 130117, China; <sup>2</sup> Jilin Academy of Chinese Medicine and Material Medica Science, Changchun 130012, China

**Abstract:** Our previous study showed that *Panax ginseng* aqueous extract showed memory-enhancement effect on mice. In this study, two ginseng components (named P1 and P2) were separated from the aqueous extract of *P. ginseng* through ultrafiltration, dialysis and Sephadex G-15 column chromatography. Their memory-enhancement effect was tested by Morris water maze and step-down experiments. The results of pharmacologic experiment showed that P2 improved the disturbance of memory acquisition and consolidation in mice by i. p. at the dose of 40 mg/kg for 7 days. Hence, P2 was the active site of the ginseng aqueous extract with memory-enhancement effect. The structural identification of P2 by nano-ultra performance liquid chromatography coupled to LTQ Orbitrap Elite mass spectrometry (Nano LC-MS/MS) was undertaken, the MS/MS ion spectra were evaluated through Uniprot all species sequence database and Proteome Discoverer software, then 22 novel peptides were firstly identified from *P. ginseng*.

**Key words:** *Panax ginseng*; LC-MS/MS; memory-enhancement activity; peptide

人参为名贵中药材, 据《神农本草经》记载, 具有补五脏, 安精神, 定魂魄, 止惊悸, 除邪气, 明目开心益智作用。现代研究表明, 人参中主要含有 2 大类有效成分, 即皂苷类成分和多糖类成分, 文献报道, 人参中的皂苷成分是发挥人参功效的主要成分之一, 具有增强学习记忆功能, 改善认知功能作用<sup>[1-5]</sup>。然而, 随着对人参研究不断深入, 近年来人们发现, 人参水提物也显示出具有改善记忆的生物

活性。胡胜全等报道, 人参水提取物对于 A $\beta$  诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡具有神经保护作用<sup>[6]</sup>。Kurimoto H 等报道, 红参的非皂苷部分通过口服可以提高老龄大鼠的学习与记忆功能等<sup>[7]</sup>。王盛民等报道, 人参及膨化制品人参水提物对记忆获得、记忆巩固和记忆再现障碍均具有明显的改善作用<sup>[8]</sup>。但至今对人参非皂苷部分改善记忆作用的活性物质仍未见报道。在我们先前的研究中, 从人参根中分离得到非皂苷部分, 进行药理活性筛选实验, 结果表明其对东莨菪碱所致小鼠记忆障碍具有显著改善作用<sup>[9]</sup>。

本实验针对人参水提物改善记忆的活性物质进

收稿日期: 2016-02-16 接受日期: 2016-05-31

基金项目: 国家自然科学基金(81473326); 吉林省卫生计生青年科研课题(2014Q011)

\* 通讯作者 Tel: 86-431-86058667; E-mail: wangying02231@sina.com

行筛选,经分离纯化,得到的 P2 部分, P2 经腹腔注射给药 7 d, 40 mg/kg, 能明显改善小鼠记忆获得障碍和小鼠记忆巩固障碍。LC-MS/MS 检测, 鉴定出 22 种肽的一级结构。因此, 通过本项研究, 进一步验证了人参非皂苷具有改善记忆活性。本研究成果将为人参的有效利用和开发提供了科学依据。

## 1 材料与仪器

人参水提物购自吉林宏久生物科技有限公司。L-色氨酸购自北京鼎国生物科技有限公司, 维生素 B12 购自美国 Gen-view 科技公司, 抑肽酶购自美国 Amresco 公司, 细胞色素 C 和牛血清白蛋白购自美国 Sigma 公司。

实验动物由小鼠吉林大学实验动物中心提供, 动物合格证号: (吉)2008-0005。

中空纤维超滤设备购自吉林市金赛科技开发公司。Morris 水迷宫购于泰盟科技有限公司。DT-200 小鼠跳台测试仪购于杭州雷琪实验器材有限公司。752 紫外分光光度计购自上海精密科学仪器有限公司。高效液相色谱系统(日本岛津公司): 10AT-VP 泵, 示差折光检测器, SRT SEC-100 色谱柱(美国 Sepax 科技公司), GPC 软件。液相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo Fisher 科技公司), 其中液相为纳升级液相色谱型号 Easy-nLC1000, 质谱仪为台式高分辨质谱(LTQ Orbitrap Elite)。

## 2 实验方法

### 2.1 多肽组分的制备

人参水提取物加水溶解后, 通过中空纤维超滤设备进行超滤(截留分子量 10 kDa), 得超滤分离液, 此分离液兑水透析(截留分子量 100 Da), 透析 48 h 后, 取透析内液继续通过 Sphadex G-15 凝胶色谱柱进行分离, 色谱柱规格为  $\Phi 2.0 \times 110$  cm, 流动相为 pH7.0 磷酸钠缓冲溶液, 流速为 0.3 mL/min。采用苯酚硫酸法测定洗脱液糖含量, 取洗脱液测定  $A_{280\text{ nm}}$  为蛋白含量, 以洗脱体积为横坐标, 糖与蛋白含量为纵坐标绘制洗脱曲线(见图 1), 收集得到两部分(分别命名为 P1 与 P2)。

### 2.2 水迷宫实验

雄性小鼠 40 只随机分为四组: 对照组、模型组、P1 和 P2 组。P1 和 P2 为腹腔注射给药, 剂量为 40 mg/kg, 给药 7 d。

除对照组和模型组给与等体积的水外, 各组小

鼠每天固定时段给药一次。定位航行训练持续 4 d。训练期间将小鼠面向池壁放入水中, 自由游泳最长时限 120 s 后, 置于水下隐藏的平台上休息 10 s, 使其认知水池中的水下平台为逃生点。小鼠每天被训练 4 次, 共 6 d, 并且每天逃生平台都置于水池中一个固定点。

航行训练后的第 5、6、7 d, 给药后 30 min 进行测试, 除对照组腹腔注射生理盐水 10 mL/kg, 其余各组小鼠均在训练前腹腔注射东莨菪碱 2 mg/(kg · d)。观察记录小鼠在 120 s 内找到平台所用的时间(逃避潜伏期), 共四个象限, 取平均值。第 8 d 进行空间探索试验, 撤除平台, 使小鼠在无平台情况下寻找记忆中的平台, 游泳 120 s, 记录小鼠跨平台次数。在整个测试过程中, 水池周围参照物包括实验者本身位置不变<sup>[10,11]</sup>。

### 2.3 跳台实验

分组与给药同 2.2 项。末次给药 1 h 后, 首先将小鼠置于跳台仪上, 适应环境 5 min 后, 轻放于平台上, 当小鼠从跳台上跳下四肢接触铜栅时, 即给予 32 V 电流电压刺激。记录小鼠逃避至平台上的潜伏期, 并记录 5 min 内的触电次数(错误次数), 作为学习成绩。24 h 后进行记忆成绩测试, 将小鼠置平台上, 记录其停留在安全平台上的潜伏期及其 3 min 内受电击次数(错误次数), 若小鼠停留在平台上超过 3 min, 其潜伏期以 180 s 计。

### 2.4 数据统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件中单因素方差分析进行均值比较, 以  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

### 2.5 纯度与分子量分布测定

采用高效液相凝胶色谱分析系统, 以 L-色氨酸、蛋白酶抑制剂、VB12、细胞色素 C、牛血清白蛋白作为对照品制作标准曲线, 用 GPC 软件计算分子量的分布。

色谱柱: Sepax SRT SEC-100 (7.8 mm × 300 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 磷酸盐 (pH 7.0); 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测器: 示差折光检测器。

### 2.6 Nano LC-MS/MS 测定

UPLC 条件: 色谱柱为德国迈克 ReproSil-Pur C18 柱 (3  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ , 4.6 mm × 250 mm)。流动相为 0.1% 甲酸 (A), 乙腈-水 (80:20, 含 0.1% 甲酸) (B), 梯度洗脱: 0 ~ 1 min, 0~5% B; 1 ~ 12 min, 5% ~ 65% B; 12 ~ 31 min, 65% ~ 23% B; 31 ~ 46 min, 23% ~ 40% B; 46 ~ 51 min, 40% ~ 50% B; 51 ~ 52

min, 50% ~ 90% B; 52 ~ 62 min, 90% B。流速 0.3 mL/min, 进样量 4  $\mu$ L。

质谱条件: EASY-Spray 纳流电喷雾离子源, 毛细管电压 2.0 kV, 毛细管温度 275  $^{\circ}$ C, S-Lens: 60%, 扫描范围  $m/z$  400 ~ 30 000, 碎裂模式为高能碰撞诱导解离 HCD (NCE 33%)。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 通过 Sephadex G-15 凝胶柱分离制备多肽

通过 Sephadex G-15 凝胶柱对多肽进行分离制备, 如图 1 所示, 洗脱图显示两个峰, 收集 250 mL 到 350 mL, 与 375 mL 到 450 mL 洗脱液, 浓缩冻干, 分别命名为 P1 与 P2。P2 与 P1 比较, 分子量与糖含量均较低。

#### 3.2 水迷宫实验

水迷宫实验结果 (表 1) 显示, 模型组的逃避潜伏期显著长于对照组 ( $P < 0.05$ ), 跨平台次数极显著少于对照组 ( $P < 0.01$ ), 因此模型建立成功。与模

表 1 水迷宫实验的逃避潜伏期与跨平台次数测定结果 ( $\bar{X} \pm SD, n = 10$ )

Table 1 The escape latency and platform crossing times of water maze experiment ( $\bar{X} \pm SD, n = 10$ )

| 组别<br>Group                    | 第五天逃避潜伏期 (秒)<br>Escape latency<br>(s) on 7 <sup>th</sup> day | 第六天逃避潜伏期 (秒)<br>Escape latency<br>(s) on 8 <sup>th</sup> day | 第七天逃避潜伏期 (秒)<br>Escape latency<br>(s) on 9 <sup>th</sup> day | 跨平台次数 (次)<br>Platform crossing times (T) |
|--------------------------------|--|--|--|--|
| 对照 Control                     | 36.21 $\pm$ 4.97   | 17.34 $\pm$ 4.07   | 7.82 $\pm$ 1.32  | 3.14 $\pm$ 0.74                          |
| 记忆障碍模型<br>Memory de? cit model | 42.86 $\pm$ 10.18  | 24.59 $\pm$ 7.20   | 8.51 $\pm$ 0.89 <sup>#</sup>                                 | 0.44 $\pm$ 0.24 <sup>##</sup>            |
| P1                             | 39.22 $\pm$ 8.60   | 22.30 $\pm$ 8.12   | 11.29 $\pm$ 2.37   | 0.20 $\pm$ 0.12                          |
| P2                             | 27.82 $\pm$ 7.53   | 12.90 $\pm$ 2.05 <sup>*</sup>                                | 8.20 $\pm$ 2.15 <sup>*</sup>                                 | 2.28 $\pm$ 0.68 <sup>*</sup>             |

注: 与对照组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with memory deficit model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

#### 3.3 跳台实验

跳台实验测定结果见表 2, 模型组的潜伏期显著少于对照组 ( $P < 0.05$ ), 错误次数显著多于对照组, 因此模型建立成功。与模型组比较, P2 可显著

表 2 跳台实验潜伏期与错误次数测定结果 ( $\bar{X} \pm SD, n = 10$ )

Table 2 The escape latency and error times of step-down test ( $\bar{X} \pm SD, n = 10$ )

| 组别<br>Group                    | 跳台潜伏期 (秒)<br>Step-down latency (s) | 错误次数 (次)<br>Error times (T)  |
|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| 对照 Control                     | 135.00 $\pm$ 17.96                 | 0.77 $\pm$ 0.28              |
| 记忆障碍模型<br>Memory de? cit model | 55.57 $\pm$ 26.39 <sup>#</sup>     | 2.14 $\pm$ 0.45 <sup>#</sup> |
| P1                             | 111.89 $\pm$ 25.07                 | 1.88 $\pm$ 0.26              |
| P2                             | 128.50 $\pm$ 21.89 <sup>*</sup>    | 0.50 $\pm$ 0.22 <sup>*</sup> |

注: 与对照组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

Note: compared with control group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; compared with memory deficit model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

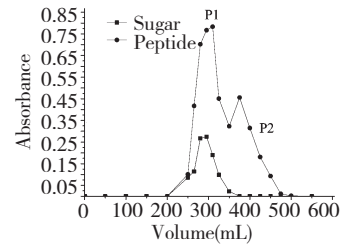


图 1 Sephadex G-15 凝胶柱洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of Sephadex G-15 gel chromatography  
注: Sugar (糖): 苯酚硫酸法检测于 490 nm 处吸收值; Peptide (肽): 214 nm 处吸收值

Note: Sugar: absorbance at 490 nm from the phenol-sulfuric acid assay; Peptide: absorbance at 214 nm.

型组比较, P1 组的逃避潜伏期虽稍短些但差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 而且其跨平台次数也较少, 因此 P1 不具有增强小鼠学习记忆的活性。P2 组的逃避潜伏期显著短于模型组 ( $P < 0.05$ ), 跨平台次数也显著多于模型组 ( $P < 0.05$ ), 因此 P2 可显著增强小鼠的学习记忆。

增加潜伏期 ( $P < 0.05$ ), 减少错误次数 ( $P < 0.05$ ), 而 P1 此作用无显著。因此在此表明 P2 具有增强小鼠学习记忆的作用, 而 P1 不具有。

### 3.4 22 个新肽的结构鉴定

HPLC 测定显示 P2 为单一峰(如图 2 所示), GPC 计算其分子量分布在 4867 Da。

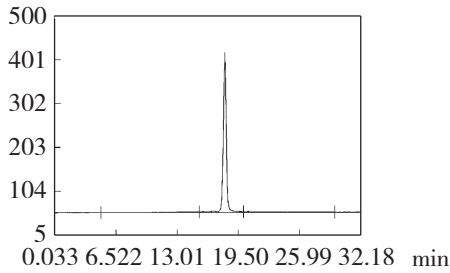


图 2 P2 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of P2

P2 通过 Nano LC-MS/MS 分析, 鉴定出 22 个新的氨基酸序列(见表 3)。以氨基酸序列 FLEQQN-QVLQTKWELLQQVNTSTGT 的分析为例, 如图 3 所示。MS/MS 中多肽裂解为 b 与 y 离子, b 离子是-

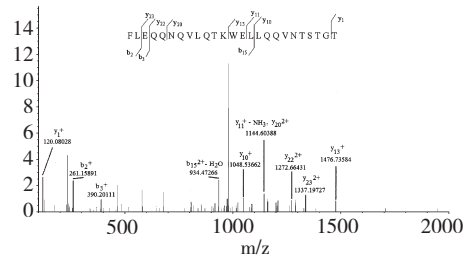


图 3 序列 FLEQQN-QVLQTKWELLQQVNTSTGT 的正离子 MS/MS 图谱

Fig. 3 MS/MS spectra of FLEQQN-QVLQTKWELLQQVNTSTGT

CO-NH-之间 C-N 键断裂左侧的离子, 而 y 对应是该键断裂后右侧的离子。根据 MS/MS 图谱中产生的正离子模式的碎片离子峰, 用 Proteome Discoverer 软件分析并通过 UniProt 全物种序列库进行搜索, 测得其一级序列。如图 4 所示为角蛋白全序列, 在此序

表 3 LC-MS/MS 分析结果

Table 3 Results of LC-MS/MS analysis

| 序列<br>Sequence                               | 蛋白组分<br>Protein group<br>Accessions | [M + H] <sup>+</sup> (Da) | 保留时间<br>(液相, 分)<br>RT (LC, min) |
|--|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEQSALGK     | G3QY98                              | 4467.2                    | 56.78                           |
| FLEQQN-QVLQTKWELLQQVNTSTGT                   | Q7Z794                              | 2933.5                    | 51.66                           |
| LQLYSDDDEEDEEEEE                             | P54256                              | 2561.9                    | 35.51                           |
| AKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNQ         | G3QY98                              | 4176.3                    | 59.08                           |
| KADTLGTFQIESRAQMSMLPRLKPAKFYDLVIQVAIV        | Q8UAY9                              | 4178.3                    | 57.58                           |
| KADTLGTFQIESRAQMAMLPRLKPKTFYDLVVQVAIV        |                                     | 4178.3                    | 57.58                           |
| RKKKVICGMSGG                                 | Q9CLA3                              | 1279.7                    | 57.52                           |
| EASSGDEGSYNPH                                | Q8LJT8                              | 1349.5                    | 20.16                           |
| GIPQVEVTFDIDANGIVHVS AK                      |                                     | 2309.2                    | 56.66                           |
| KQVMLGITK                                    | A9KJL3                              | 1017.6                    | 54.32                           |
| TIVTEIGKILKT                                 | Q8KRA0                              | 1315.8                    | 56.42                           |
| HTGKAKTISGITFPDGENGKVIKVFKEKMGMTQSGNGYFLETV  | Q07741                              | 4902.4                    | 57.18                           |
| MELINVSELGEEMDFKVFKDAVNNDGQVKAIVAKGAADQYTRKD |                                     | 4902.4                    | 57.18                           |
| RVRFTSPHPRDFTDDVIAAMAETPNVMPQLHMPLQSGSDRILR  |                                     | 4902.4                    | 57.18                           |
| ADGTATVMAIGTAHPPHFPQDTYADVFRATNSEHKVELKKKF   |                                     | 4902.4                    | 57.18                           |
| PISDVWARFALQTISRHFRAVYAPDDLEARSQMHLASTMAGV   |                                     | 4902.4                    | 57.18                           |
| GIAKEEAEEIKAALAEAGAKVEIK                     | P05392                              | 2526.4                    | 55.85                           |
| SAIDYVTKKLG                                  | B7GYR8                              | 1194.7                    | 48.90                           |
| KVVFGPYSGS                                   | A4VP83                              | 1040.5                    | 39.42                           |
| LGFRPYLGMPRERTALPLDMAQEP                     | Q9LXV5                              | 2758.4                    | 41.98                           |
| IGSGTVVDPKVLGELAMLASNDIDASG                  |                                     | 2758.4                    | 41.98                           |
| NMSSACVHF                                    | Q02323                              | 1011.4                    | 38.81                           |

```

      10          20          30          40          50
MSHQFSSQSA FSSMSRRVYS TSSSAGSGGG SPAVGSVCYA RGRCGGGGYG
      60          70          80          90         100
IHGRGFGRSRS LYNLGGRSI SINLMGRSTS GFCQGGGVGG FGGRRGFGVG
      110         120         130         140         150
STGAGGFGGG GFGGAGFGTS NFGLGGFGPY CPPGGIQEVT INQSLEPLH
      160         170         180         190         200
LEVDPEIQRI KTQEREQIMV LNNKFASFID KVRFLEQQNQ VLQTKWELLO
      210         220         230         240         250
QVNTSTGTNN LEPLLENYIG DLRRQVDLLS AEQMRQNAEV RSMQDVVEDY
      260         270         280         290         300
KSKYEDEINK RTGSENDVAV LKKDVAAYV SKVDLESRVD TLTGEVNFLK
      310         320         330         340         350
YLFLTELSQV QTHISDTNVI LSMDNRLSLD LDSIIDAVRT QYELIAQRSK
      360         370         380         390         400
DEAEALYQTK YQELQITAGR HGDDLKNSKM EIAELNRTVQ RLQAEISNVK
      410         420         430         440         450
KQIEQMQLI SDAEERGEQA LQDAWQKLQD LEEALQSQKE ELARLLRDYQ
      460         470         480         490         500
AMLGVKLSLD VEIATYRQLL EGEESRMSGE LQSHVSISVQ NSQVSVNGGA
      510         520         530         540         550
GGGGSYSGGG YGGGSGGGYG GGRSYRGGGA RGRSGGGYGS GCGGGGGSYG

```

图 4 UniProt 数据库搜索结果

Fig. 4 The searching result from UniProt database

列中找到与质谱数据匹配部分,突出放大标记序列即为目标结构。根据质谱分析,其 C 端为 Thr, N 端为 Phe。

## 4 结论

本实验针对人参水提物进行了分离纯化和改善记忆的活性物质筛选实验,结果表明,通过 Sephadex G-15 凝胶柱纯化所得组分 P2,具有显著改善东莨菪碱所致小鼠记忆障碍的作用,采用 LC-MS/MS 对其进行结构研究,得到 22 个全新结构的氨基酸序列。此研究结果验证了人参水溶性成分仍是不可忽视的活性成分,对于以往人参皂苷具有改善记忆的活性物质给予新的启示,未来人参非皂苷类成分如人参多糖、人参糖肽等的生物活性研究将得到关注,本实验研究结果为人参的有效利用和开发提供了科学依据。

### 参考文献

1 Liu HL (刘慧琳). Ginsenoside Rb1 attenuates chronic hypobaric hypoxia-induced cognitive deficits. Xi'an: Fourth Military Medical University(第四军医大学), MSc. 2013.

2 Zou XF (邹雪飞), Yu B (于波), Ni XH (倪小虎). The effect of ginsenoside on alcohol-induced learning and memory disruption in rats. *Heilongjiang Med* (黑龙江医药), 2008, 21(5):35-37.

3 Zhao Y (赵莹), Liu JP (刘金平), Lu D (卢丹), et al. Improvement effect of ginsenoside Re on learning and memory abilities of natural apolexis rats and its mechanisms. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm* (中药新药与临床药理), 2007, 18:20-22.

4 Liu M (刘忞), Zhang JT (张均田). Ameliorating age-related alterations of ginsenoside Rg1 in open-field behavioral activity and motor responses in old rats. *Chin Pharmacol J* (中国药理学杂志), 1996, 31:464-467.

5 Li N (李娜), Wang LM (王利民). Effect of ginsenoside Rg1 on Alzheimer's disease of model rats. *J Binzhou Med Univ* (滨州医学院学报), 2007, 30:325-327.

6 Hu SQ (胡胜全), Yu HM (余惠旻), Liu TS (刘塔斯), et al. Neuroprotective effects of water extract of ginseng on SH-SY5S cell apoptosis induced by amyloid- $\beta$  peptide. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2009, 20:257-259.

(下转第 1232 页)