

阿胶多肽的高分辨质谱鉴定及活性研究

熊雅茹^{1,2,3,4}, 傅红^{1,4}, 杨方^{2,3*}

¹福州大学生物科学与工程学院,福州 350108;²福州海关技术中心,³福建省检验检疫技术研究重点实验室,福州 350001;
⁴福州大学福建省海洋酶工程重点实验室,福州 350108

摘要:建立了液相色谱-高分辨质谱分析阿胶中功能肽的方法,并进行了体外活性验证研究。阿胶经炖化、胰蛋白酶酶解, C₁₈ SPE 柱净化,以 UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪检测, MaxQuant 软件分析质谱结果,所得肽段在 UniProt 上进行 BLAST 序列对比鉴定。结果表明,3 次重复分析得到的 63 条共有肽中,具有明确蛋白及种属来源的肽 19 条。根据多肽活性构效关系,选择 9 条可能具有活性的阿胶多肽进行抗氧化活性、抗凝血活性测定,结果显示 9 条多肽均具有不同程度的抗氧化活性,其中 5 条具有抗凝血活性。本文所建立的方法快速有效,为揭示阿胶多肽结构与活性的关系提供技术支持。

关键词:阿胶多肽;炖化;抗氧化活性;抗凝血活性;高分辨质谱

中图分类号:TS207.3

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)8-1348-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.8.010

Identification and activity study of donkey-hide gelatin polypeptide by high resolution mass spectrometry

XIONG Ya-ru^{1,2,3,4}, FU Hong^{1,4}, YANG Fang^{2,3*}

¹College of Biological Sciences and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

²Technology Center of Fuzhou Customs; ³Fujian Key Laboratory for Technology Research of Inspection and Quarantine, Fuzhou 350001, China;

⁴Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China

Abstract: In this paper, a method for the identification of functional peptides in donkey-hide gelatin by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry was established. In addition, the *in vitro* activity verification was carried out. After stewing, trypsin hydrolysis and purification with C₁₈ SPE column, donkey-hide gelatin was detected by UPLC-Q-Exactive quadrupole-electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometer, and analyzed by MaxQuant software. The peptide segments were identified by BLAST sequence comparison on UniProt. The results showed that among 63 consensus peptides obtained from three repeated analyses, there were 19 peptides with clear protein and species origin. According to the structure-activity relationship of peptide activity, nine peptides that may be active were selected for antioxidant activity and anticoagulant activity determination. The results showed that nine peptides all had different degrees of antioxidant activity, of which five of them had anticoagulant activity. The method established in this paper is rapid and effective, and provides technical support for revealing the relationship between the structure and activity of donkey-hide gelatin polypeptide.

Key words: donkey-hide gelatin polypeptide; stewing; antioxidant activity; anticoagulant activity; high resolution mass spectrometry

阿胶是我国具有免疫调节及改善营养性贫血功能的药食同源产品,为驴的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶^[1]。性味甘平,具有补血、止血、滋

阴润燥的功效,另可作肿瘤的辅助治疗。生物学的基础研究证明,蛋白质是人体新陈代谢中极为重要的营养物质,其降解产物生物活性肽及氨基酸更具广泛的生理调节功能^[2,3]。多肽的活性与其氨基酸组成及排列密切相关。已有研究发现,疏水性氨基酸对多肽的生物活性起着关键的作用, N 端连接

收稿日期:2020-02-06 接受日期:2020-06-22

基金项目:国家重点研发专项(2017YFF0211000)

* 通信作者 Tel:86-532-88963253; E-mail:yafag@sina.com

Tyr、Phe 等疏水性氨基酸时更有利于清除自由基^[4],而在抗凝肽 C 末端上添加疏水性氨基酸会增强抗凝效果^[5]。

阿胶中蛋白含量约为 60% ~ 80%,主要由胶原蛋白、血清白蛋白等相对分子质量较大的蛋白质组成,不易被人体消化吸收。Fu^[6]提出“阿胶的主要生物活性物质是阿胶含有的胶原蛋白经胃蛋白酶、胰蛋白酶降解后的能被机体吸收且有良好生物相容性的阿胶低肽”的工作假说,并对阿胶低肽制剂进行安全性检查、药效学研究及质量标准研究。Pang^[7]研究发现阿胶经酶解后,相对分子质量减小且具有显著的补血升白作用。Zhang 等^[8]通过超高效液相色谱四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术鉴别鱼胶原蛋白粉的真伪。高分辨质谱联用技术是近年来用于研究蛋白质及多肽的有效方法,能直接对酶解产物进行准确快速的分析鉴定^[9]。阿胶中的大分子物质经酶解后得到的多肽及氨基酸类物质可能对人体意义较大,本文在前人研究基础上,建立了采用 UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术鉴定阿胶中肽的方法,并随机选择了鉴定的多肽进行抗氧化活性、抗凝血活性等功能试验,为印证阿胶功效提供技术手段与科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

DIONEX UltiMate 3000 超高效液相色谱(美国 Dionex 公司);四极杆静电场轨道阱高分辨质谱仪(Q/Exactive)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);全自动定氮仪(Kjeltec 8400 Analyzer Unit);CR21N 台式冷冻离心机(日立公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);UV-2700 紫外-可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司)。

阿胶(北京同仁堂);胰蛋白酶(厦门泰京生物技术有限公司);胃蛋白酶、N-[3-(2-咪喃基)丙烯酰]-L-苯丙氨酰-甘氨酸-甘氨酸(血管紧张素转换酶,FAPGG)、凝血酶、纤维蛋白原(人)、血管紧张素转化酶(ACE)(美国 Sigma-Aldrich 公司);卡托普利、抗坏血酸 VC、过硫酸钾、邻二氮菲均为分析纯(国药集团);法华林钠片(Orion Corporation);ABTS、DPPH(上海麦克林生化科技有限公司);Tris(生工生物工程股份有限公司);乙腈、甲酸、甲醇均为色谱纯(Thermo Fisher 公司);三氯乙酸(分析纯,国药集团);C₁₈ Tips(100 μL)(Thermo Scientific 公

司);C₁₈ SPE 固相萃取柱(500 mg/3 mL)(美国 Supelco 公司)。

1.2 实验条件

1.2.1 阿胶前处理

炖化:参考文献^[7,10],取过 80 目筛的阿胶粉 1.5 g,加 20 倍量去离子水溶解,80 °C 炖化 30 min,冷却至室温,冷藏过夜。4 °C、18 000 rpm 离心 5 min,取上清液用脱脂棉抽滤,滤纸二次过滤,加去离子水补足 30 mL,得阿胶炖化液。

酶解:阿胶炖化液 30 mL 置于小烧杯中,10% NaOH 溶液调节 pH = 7.5,分别加入 5×10⁵ U 胰蛋白酶、复合胰蛋白酶-胃蛋白酶于 40 °C 水浴酶解 4 h 后,沸水浴 10 min 灭酶活,4 °C、18 000 rpm 离心 10 min,取上清液备用^[11]。

净化:C₁₈ SPE 柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 去离子水活化,取酶解液 3 mL 过柱,用 3 mL 甲醇洗脱,重复 3~4 次,收集洗脱液,45 °C 氮吹至近干,用 3 mL 1% 甲酸溶液复溶,过 0.45 μm 滤膜^[8],上机待测。再用 C₁₈ Tips 柱处理酶解液作对照试验。

1.2.2 高效液相质谱试验条件

色谱条件:Hypersil GOLD UPLC C₁₈ 色谱柱(2.1 × 100 mm,1.9 μm);柱温:30 °C;流动相:A:0.1% 甲酸水,B:乙腈,洗脱梯度:0~50 min,乙腈 10% → 90%;50~55 min,乙腈 90%;55~56 min,乙腈 90% → 10%;56~60 min,乙腈 10%;流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL。

质谱条件:扫描模式:Full MS/dd-MS²,分析时长 60 min,检测方式:正离子,母离子扫描范围:100~1 500 *m/z*,一级质谱分辨率:70 000 at *m/z*,AGC target:1e6,一级 Maximum IT:100 ms,Number of scan ranges:1,动态排除:40.0 s 一次,MS² Activation Type:HCD,Isolation window:0.4 *m/z*,二级质谱分辨率:17 500 at *m/z* 200,Microscans:1,二级 Maximum IT:50 ms,碰撞能量:30 eV,Underfill ratio:0.1%。电喷雾离子源:载气为高纯氮气(纯度 > 99.5%),鞘气流速 40 个单位(arb),辅气流速 15 个单位,吹扫气流速 0 个单位;喷雾电压 3.2 kV;碰撞池采用梯度碰撞能量:25%、35%、55%;毛细管温度 320 °C,离子透镜电压频率为 60,辅气热源温度 350 °C。

1.2.3 数据分析

采用 MaxQuant(版 1.6.1.0)进行数据分析。搜索针对包含来自 Uniprot 的阿胶(uniprot-donkey-hide gelatin.fasta)的蛋白质序列(<https://www.uni->

prot. org, 2018 年 11 月 3 日下载) 数据库。蛋白 FDR 设置为 0.01; 最小氨基酸长度设置为 3; 可变修饰设为 N-Acetyl 和 Oxidation (M); 固定化修饰设置为 Carbamidomethyl (C); 酶的设置分别选择非专一性和专一性, 其中专一性酶设置为胰蛋白酶; 最大裂解丢失设置为 2, 所有常见的污染物和相反的命中被删除^[12]。

1.2.4 肽段抗氧化活性与抗凝血活性测定

多肽委托上海波泰生物技术有限公司合成, 通过 RPLC-MS 检测其纯度为 98% 以上。ABTS 自由基清除活性参考 Wang^[13] 的方法进行测定, DPPH 自由基清除活性参考 Liu 等^[14] 的方法进行测定, 羟基自由基清除活性参考 Xu^[15] 的方法进行测定, 抗凝血活性参考 Wang^[16] 的方法进行测定。并用抗坏血酸 VC、法华林钠片做阳性对照实验。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件优化

2.1.1 炖化

炖化和未炖化的阿胶经相同复合酶解过程, UPLC-Q-Exactive 三次重复分析, 炖化阿胶检测出多

肽序列 58 条, 其中有 13 条能找到对应生物种属, 见表 1; 未炖化阿胶检测出多肽序列 50 条, 有 12 条能匹配到对应蛋白种属。炖化阿胶与未炖化阿胶重叠检测到的多肽共 29 条, 其中 6 条能匹配到对应种属, 分别是 QASSAVRDSGHR、ANKGFLEEV R、LSSPATLNSR、YEVEINRR、NHQLTVTRGSQK 和 YENELCLR。炖化阿胶共鉴定出了 8 种角蛋白、1 种凝血酶原、1 种纤溶酶原、1 种凝胶溶蛋白。而未炖化阿胶共鉴定出了 7 种角蛋白、1 种凝血酶原、1 种纤维蛋白原。

阿胶中由于蛋白质比例占 80%, 故较难消化吸收, 这正与中医上指出的阿胶“滋腻碍胃”相吻合^[6]。对于消化功能差的病人, 单纯的口服阿胶不仅不会达到应有的药效, 反而会增重胃肠负担。本实验中炖化阿胶检测到更多序列, 也从另一方面说明, 生活中人们服用阿胶都是经过炖煮, 高温使得阿胶中的蛋白进一步分解成氨基酸、多肽等易于消化吸收的小分子物质, 从而发挥功效。因此后续优化阿胶酶解的实验中, 均使用炖化后阿胶。

表 1 炖化阿胶 3 次酶解活性肽段

Table 1 Three times enzymatic hydrolysis of active peptides of stewied donkey-hide gelatin

序号 No.	序列 Sequence	蛋白质 Protein	生物种属 Organism
1	AALKTASDFISK	Gelsolin	<i>Rattus norvegicus</i> (rat)
2	LSSPATLNSR	Cationic trypsin	<i>Canis lupus familiaris</i> (dog)
3	MPYNFLPLSLSCR	Keratin, type I cuticular Hα1	<i>Pan troglodytes</i> (chimpanzee)
4	NHQLTVTRGSQK	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	<i>Bos taurus</i> (bovine)
5	QASSAVRDSGHR	Filaggrin	<i>Homo sapiens</i> (human)
6	TREEINELNRMIIQR	Keratin, type II cuticular 87	<i>Mus musculus</i> (mouse)
7	YENELCLR	Keratin, type I cytoskeletal 24	<i>Homo sapiens</i>
8	YEVEINRR	Keratin, type II cytoskeletal 74	<i>Homo sapiens</i>
9	YQCLKGTGK	Plasminogen	<i>Bos taurus</i>
10	AKQDMARQLR	Keratin, type II cuticular Hb4	<i>Mus musculus</i>
11	ANKGFLEEV R	Prothrombin	<i>Bos taurus</i>
12	IQHQDWTGGKEFKCK	Uncharacterized protein	<i>Cervus elaphus hippelaphus</i> (European red deer)
13	TKFETEQALR	Keratin, type I cytoskeletal 14	<i>Gallus gallus</i> (chicken)

2.1.2 酶解

人体消化过程关键酶为胰蛋白酶、胃蛋白酶, 本实验选用胰蛋白酶单独酶解、胰蛋白酶-胃蛋白酶复合酶解两种方式模拟消化过程对炖化阿胶进行酶解

优化。结果表明, 单独酶解效果优于复合酶解效果, 胰蛋白酶单独酶解后 3 次重复分析共检测到了 63 条肽段, 其中 19 条具有明确蛋白来源, 如表 2 所示; 而复合酶解检测到 58 条序列, 12 条具有明确蛋白

来源。

经酶解优化后的检测结果明显更丰富,检测到了更多种类的蛋白,其活性也多种多样。如检测到的载脂蛋白具有胆固醇转运蛋白活性,参与脂蛋白代谢等生物过程;激肽原具有半胱氨酸型内肽酶抑制剂活性的分子功能,参与炎症反应等生物过程。

检测的阿胶多肽主要集中在 6 ~ 25 个氨基酸之间,最长的多肽是 TTTIRQFTSSSSIKGSSGLGGSSR,存在于 *Rattus norvegicus*、*Pan troglodytes* 当中,参与各种皮肤附件的形成和维持,最短的肽段有 TEELNR、AAPSRR、PGQSPR 等。综合分析,胰蛋白酶单独酶解炖化阿胶效果更好。

表 2 阿胶胰蛋白酶 3 次酶解活性肽段

Table 2 Three times enzymatic hydrolysis of active peptides by trypsin of donkey-hide gelatin

序号 No.	序列 Sequence	蛋白质 Protein	生物种属 Organism
1	AQYEEIANR	Keratin, type II cytoskeletal 5	<i>Pan troglodytes</i> (chimpanzee)
2	GFEVQVTELK	Keratin, type I cytoskeletal 20	<i>Mus musculus</i> (mouse)
3	GPCRPGGGR	Keratin, type II cuticular Hb2	<i>Homo sapiens</i> (human)
4	LSSPATLNSR	Cationic trypsin	<i>Canis lupus familiaris</i> (dog)
5	QHASQVLIRR	Vitamin K-dependent protein S	<i>Bos taurus</i> (bovine)
6	RYEVEINR	Keratin, type II cytoskeletal 74	<i>Homo sapiens</i>
7	SHHEDRAGHGSAESSR	Filaggrin	<i>Homo sapiens</i>
8	TTTIRQFTSSSSIKGSSGLGGSSR	Keratin, type I cytoskeletal 17	<i>Rattus norvegicus</i> (rat)
9	YEVEINRR	Keratin, type II cytoskeletal 74	<i>Homo sapiens</i>
10	CTTPPSSGPKYQCLK	Plasminogen	<i>Bos taurus</i>
11	DTDLDFPDEKLR	Cartilage oligomeric matrix protein	<i>Homo sapiens</i>
12	GKQSPWEQALGRFWDYLR	Apolipoprotein E	<i>Bos taurus</i>
13	TKFETEQALR	Keratin, type I cytoskeletal 14	<i>Gallus gallus</i> (chicken)
14	TYFPHFDLSHGSAQVK	Hemoglobin subunit alpha-1/2	<i>Ovis aries</i> (sheep)
15	TYSLEPLFEAYISRLR	Keratin, type II cytoskeletal 1	<i>Bos mutus</i> (wild yak)
16	VRLVRGPHR	Uncharacterized protein	<i>Bos taurus</i>
17	KTVESSLKTSITY	Keratin, type II cytoskeletal 78	<i>Homo sapiens</i>
18	MDNPDTFYSLKYQIK	Kininogen-1	<i>Bos taurus</i>
19	YQCLKGTGK	Plasminogen	<i>Bos taurus</i>

2.2 净化条件选择

C_{18} 对非极性、弱极性以及中等极性化合物具有广泛的保留,采用 C_{18} SPE 可以较好的保留胰蛋白酶酶切后的多肽,而将其他盐类物质脱除,适用于多肽质谱鉴定的前处理^[17]。本文比较了 C_{18} Tips、 C_{18} SPE 两种净化材料的效果,对比 3 次重复检测结果表明阿胶酶解产物经 C_{18} SPE 处理后比 C_{18} Tips 处理后多得到 27 条肽段,且多来源于酶原、角蛋白等,两种固相萃取柱的结果交叉匹配到 5 条序列,这可能是由于 C_{18} Tips 过负载造成的,本文最终采用 C_{18} SPE 净化。经优化试验后,液质联用分析阿胶炖化液酶解产物的总离子流图如图 1 所示。

2.4 阿胶多肽功能的筛选

阿胶具有补血、止血、改善钙代谢平衡、调节免疫功能、抗疲劳等药理作用^[18]。动物类中药的有效成分以蛋白多肽为主,因此活性蛋白多肽具有重要的医疗保健价值^[23]。近年研究表明,除营养功能外,蛋白质酶解产物中的一些短肽还具有广泛的生理调节功能,如促进钙吸收、降血压、降低胆固醇、免疫调节等。以胶原的适度降解产物为原料,通过不同种类的酶和催化方式,可制备具高抗氧化性的胶原肽^[19]; Yao 等^[20] 研究发现阿胶对休克时血液粘滞性的增加有明显抑制作用,一定程度维持了有效循环血量,利于微循环恢复正常。

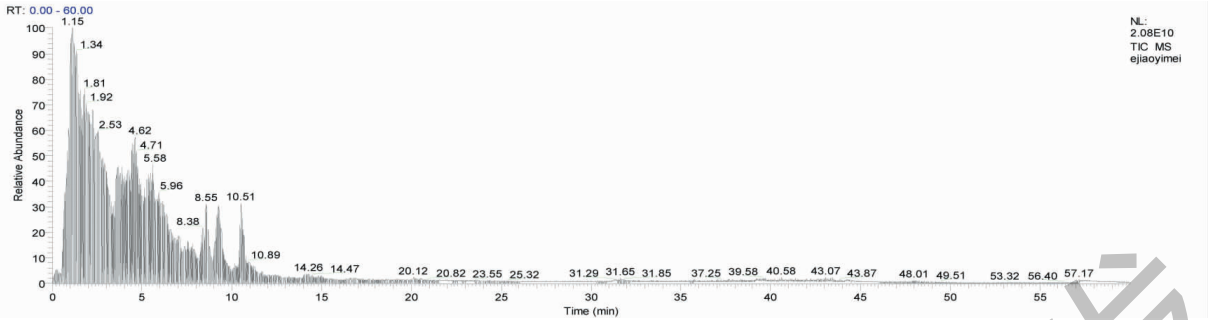


图1 阿胶胰蛋白酶酶解产物的总离子流谱图

Fig. 1 Total ion flow spectrogram of trypticase of donkey-hide gelatin

有研究报道,疏水性氨基酸对多肽的抗氧化性起着关键作用,疏水性氨基酸含量越高,其抗氧化能力越强^[14]。目前一些肽类化合物已被发现具有显著的抗凝血活性,部分活性肽的结构也得到进一步的鉴定。有研究实验表明多肽 C 末端上的氨基酸疏水性越强,其抗凝血效果越好^[5]。

UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨

质谱连用仪分析,将本实验所得肽段在 UniProt 上进行 BLAST 序列对比,挑选 C 端具有强疏水性氨基酸如 Leu(L)、Phe(F)、Tyr(Y)或参与纤维蛋白溶解等生物过程的肽段做体外抗凝血活性实验,挑选 N 末端具有疏水性氨基酸或序列中疏水氨基酸比例较高的肽段做体外抗氧化活性实验^[21]。从三次重复检测结果中筛选并验证 9 条肽段活性,结果如下表 3 所示。

表 3 肽段序列分析

Table 3 Peptide sequence analysis

序列 Sequence	蛋白质 Protein	生物种属 Organism	肽段长度 Peptide length	疏水氨基酸占比 Hydrophobic amino acid ratio(%)
QHASQVLIRR	Vitamin K-dependent protein S	<i>Bos taurus</i> (bovine)	10	40.00
CTTPPPSSGPKYQCLK	Plasminogen	<i>Bos taurus</i>	16	50.00
FAAFIDK	-	-	7	71.43
IAVGGFR	-	-	7	57.14
MDNPDTFYSLKYQIK	Kininogen-1	<i>Bos taurus</i>	15	40.00
YQCLKGTGK	Plasminogen	<i>Bos taurus</i>	9	33.33
ANKGFLEEVIR	Prothrombin	<i>Bos taurus</i>	10	40.00
LASYLDK	-	-	7	57.14
LYEEEIR	-	-	7	42.86

2.5 阿胶多肽的体外活性实验

2.5.1 ABTS 自由基清除活性

由图 2 可知,9 条肽段均具有 ABTS 自由基清除活性。在 0.5 ~ 2.5 mg/mL 范围内,多肽浓度升高,清除作用渐强。ABTS 自由基清除能力从大到小依次是 YQCLKGTGK、CTTPPPSSGPKYQCLK、LYEEEIR、LASYLDK、MDNPDTFYSLKYQIK、ANKGFLEEVIR、QHASQVLIRR、FAAFIDK、IAVGGFR。其中多肽 YQCLKGTGK 的 ABTS 自由基清除力最高,2.5 mg/mL 时为 82.41% ± 0.41%,0.5 mg/mL 时清除率已经远大于 50%。

2.5.2 DPPH 自由基清除活性

由结果可知,9 条肽段均具有 DPPH 自由基清除活性,在 0.5 ~ 2.5 mg/mL 范围内呈现良好线性关系。当多肽溶液浓度为 2.5 mg/mL 时,DPPH 自由基清除能力从大到小依次是 YQCLKGTGK、CTTPPPSSGPKYQCLK、QHASQVLIRR、IAVGGFR、LASYLDK、MDNPDTFYSLKYQIK、FAAFIDK、ANKGFLEEVIR、LYEEEIR。其中多肽 YQCLKGTGK 的 DPPH 自由基清除力最高,2.5 mg/mL 时为 64.74% ± 0.36%,半抑制浓度(IC₅₀值)远小于 0.5 mg/mL,详细结果见图 3。

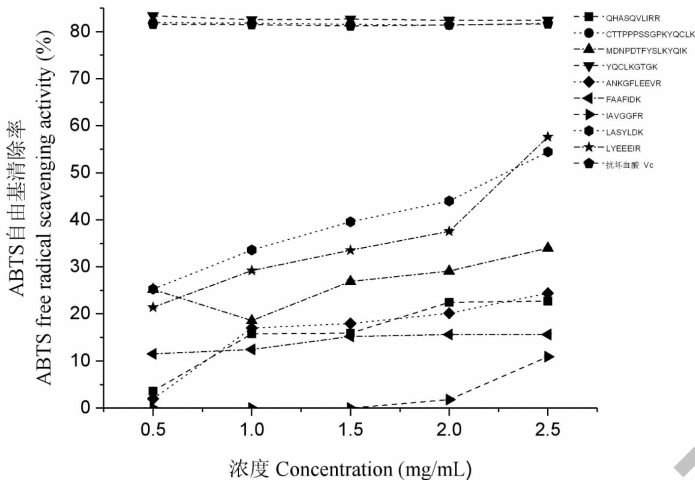


图2 多肽及阳性对照组对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 2 Scavenging ability of peptides and positive control group to ABTS free radicals

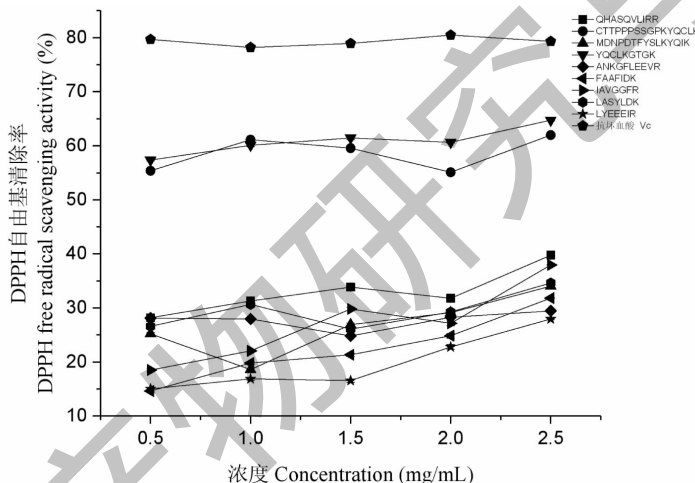


图3 多肽及阳性对照组对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 3 Scavenging ability of peptides and positive control group to DPPH free radicals

2.5.3 羟基自由基清除活性

结果显示,5条多肽表现出羟基自由基清除活性,且随浓度升高,清除作用越强。浓度为2.5 mg/mL时,羟基自由基清除能力从大到小依次是YQ-CLKGTGK、CTTTPSSGPKYQCLK、MDNPDTFYSLKYQIK、FAAFIDK、ANKGFLEEV。多肽YQ-CLKGTGK的半抑制浓度(IC_{50} 值)远小于0.5 mg/mL,2.5 mg/mL时羟基自由基清除率高达 $95.62\% \pm 0.20\%$ 。未表现出羟基自由基清除活性的肽段有QHASQVLIRR、IAVGGFR、LASYLDK和LYEEEIR,具体结果见图4。

2.5.4 抗凝血活性

结果表明,5条多肽表现出抗凝血活性,随着浓

度升高,对凝血酶抑制活性越强。浓度为2.5 mg/mL时,抗凝血活性从大到小依次是MDNPDTFYSLKYQIK、QHASQVLIRR、LYEEEIR、LASYLDK、CTTTPSSGPKYQCLK,见图5。多肽MDNPDTFYSLKYQIK的半抑制浓度(IC_{50} 值)约为1.9 mg/mL,2.5 mg/mL时抗凝血活性高达 $80.78\% \pm 0.22\%$ 。未表现出抗凝血活性的肽段有YQCLKGTGK、ANKGFLEEV、FAAFIDK和IAVGGFR。

2.6 多肽活性与结构分析

选出的9条多肽都具有一定强度的抗氧化活性,对比阳性对照组的L-抗坏血酸结果,抗氧化能力较强的序列为YQCLKGTGK和CTTTPSSGPKYQCLK。肽段CTTTPSSGPKYQCLK的C末端是

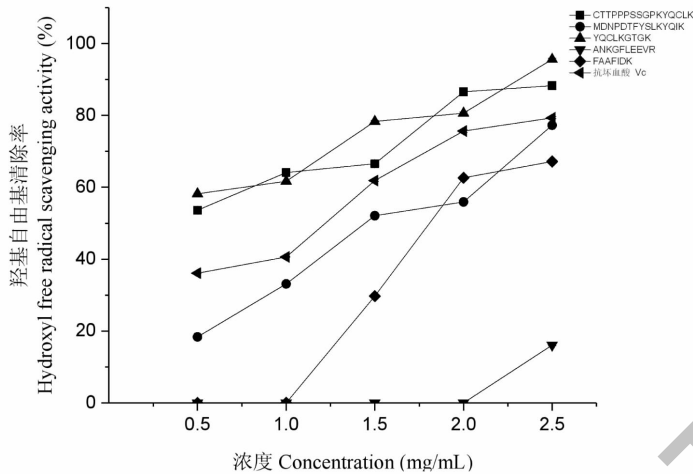


图4 多肽及阳性对照组对羟基自由基的清除能力

Fig. 4 Scavenging ability of peptides and positive control group to hydroxyl free radicals

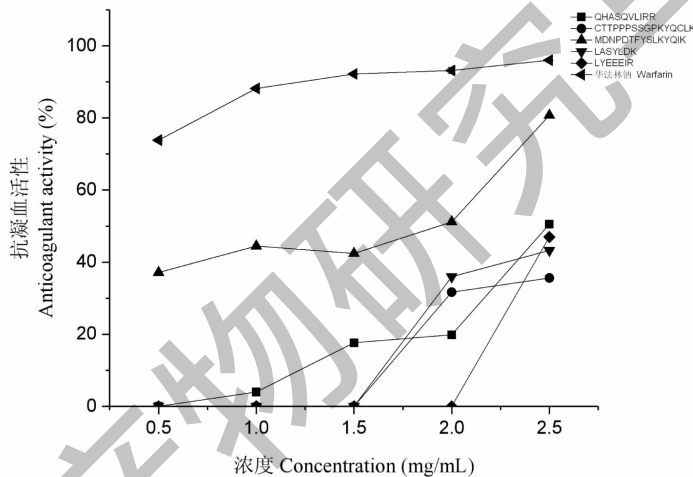


图5 多肽及阳性对照组的抗凝血活性

Fig. 5 Anticoagulant activity of peptides and positive control group

脂肪族氨基酸 Leu(L)、碱性氨基酸 Lys(K), 序列中含有大量的疏水性氨基酸 Pro(P)、Lys(K)、Tyr(Y)。肽段 YQCLKGTGK 的 N 末端是芳香族氨基酸酪氨酸 Try(Y), C 末端是碱性氨基酸 Lys(K), 序列中含有疏水性氨基酸 Leu(L)、Lys(K), 且对 3 类自由基清除能力最强。IAVGGFR、LASYLDK、LYEEEIR 的 N 末端是疏水性氨基酸亮氨酸 Leu(L), 且疏水性氨基酸含量均达到 40.00% 以上, 表明多肽的抗氧化活性与 N 末端氨基酸的组成以及多肽链疏水性氨基酸的占比有一定联系^[22]。将抗氧化活性最强的多肽 YQCLKGTGK、CTPPSSGPKYQCLK 在 Uniprot 上进行蛋白质 Blast, 所得结果见图 6, 该多肽存在于 Plasminogen 第 281、289、268 ~ 284 位,

其生物详细信息见表 4。

结果显示, 具有抗凝血活性的 5 条多肽分别是 MDNPDTFYSKYQIK、QHASQVLIRR、LYEEEIR、LASYLDK 和 CTPPPSSGPKYQCLK。这可能和其 C 端均连接了 2 个或以上数量的疏水氨基酸有关, 此前有研究实验表明在抗凝肽的 C-端添加上疏水性越强的氨基酸, 其抗凝血效果得到显著提高^[5], 且 MDNPDTFYSKYQIK、LYEEEIR、LASYLDK 和 CTPPPSSGPKYQCLK 4 条多肽中疏水氨基酸占比均 40% 以上, 对比阳性对照组得到的结果相一致。在 UniProt 中对这两条肽段进行 BLAST 搜索, 可知 MDNPDTFYSKYQIK 具有内肽酶活性负调节等功能, QHASQVLIRR 具有刺激纤维蛋白溶解等功能。

表 4 肽段 MaxQuant 分析结果

Table 4 Analysis results of peptides by MaxQuant

序列 Sequence	蛋白编号 Proteins ID	位点 Position	蛋白质 Protein	生物种属 Organism
YQCLKGTGK	CON__P06868	281-289	Plasminogen	<i>Bos taurus</i>
CTTPPPSSGPKYQCLK	CON__P06868	268-284	Plasminogen	<i>Bos taurus</i>

10	20	30	40	50
MLPASPKMEH KAVVFLLLLF LKSGGLDLLD DYVNTQGASL LLSLRKNLAG	60	70	80	90
RSVEDCAAKC EEETDFVCRA FQYHSKEQQC VVMAENSKNT PVFRMRDVL	110	120	130	140
YEKRIYLLEC KTGNGQTYRG TTAETKSGVT CQKWSATSPH VPKFSPEKFP	160	170	180	190
LAGLEENYCR NPDNDENGPW CYTTPDKRY DYCDIPECED KCMHCSEGENY	210	220	230	240
EGKIAKTMSG RDCQAWDSQS PHAHGYIPSK FPNKLNLMNY CRNPDGEP RP	260	270	280	290
WCFTTDPQKR WEFCDIPRCT TTPPPSSGPKY QCLKGTGK NY GGTVAVTE SG	310	320	330	340
HTCQRWSEQT PHKHNRTPEN FPCKNLEENY CRNPNGEKAP WCYTTNSEVR	360	370	380	390
WEYCTIPSCE SSPLSTERMD VPVPEQTPV PQDCYHGNGQ SYRGTSSTII	410	420	430	440
TGRKCQSWSS MTPHRHLKTP ENYPNAGLTM NYCRNPDADK SPWCYTTDPR	460	470	480	490
VRWEFCNLKK CSETEQVPA APQAPGVENP PEADCMIGTG KSYRGKKATT	510	520	530	540
VAGVPCQEWA AQEPHQHSIF TPETNPQSG LERNYCRNPDG DVNGPWCYTM	560	570	580	590
NPRKPFDYCD VPQCESSFDC GPKKVEPKKC SGRIVGGCVS KPHSWPWQVS	610	620	630	640
LRRSSRHFCG GTLISPKWVL TAAHCLDNIL ALSFYKVLG AHNEKVRQES	660	670	680	690
VQEIPVSRLF REPSQADIAL LKLSRPAIIT KEVIPACLPP PNYMVAARTE	710	720	730	740
CYITGWGETQ GTFEGELLKE AHLVPIENKV CNRNEYLDGR VKPTLCAHG	760	770	780	790
LIGGTDSCQG DSGGPLVCFE KDKYILQGV TSWGLGCARP N KPGVYVVRVSP	810			
YVPWIEETMR RN				

图 6 Plasminogen 氨基酸排列图

Fig. 6 Amino acid alignment of plasminogen

3 结论

本文用酶解阿胶炖化液联合 UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪分析的方式,研究阿胶中多肽结构与其对应生物活性的关系。3 次重复质谱鉴定,检测出 63 条多肽,其中有 19 条明确生物来源,分子功能与生物活性呈多样性。根据分析结果与多肽活性构效关系,挑选出 9 条阿胶多肽进行体外活性测定,结果显示 9 条多肽均具有抗氧化活性,5 条序列具有抗凝血活性。多肽的抗氧化、抗凝血活性是多种因素共同作用的结果,其中末端氨基酸的种类,肽链中氨基酸的组成以及肽链长度对肽段活性均有一定的影响,这一结果为揭示阿胶多肽结构与功能的关系奠定基础。

参考文献

- Wei D, Wang Y, Zhang T, et al. Clinical study of high dose of donkey-hide gelatin in the treatment of thrombocytopenia after chemotherapy for advanced cancer [J]. J Chengdu Univ

- Tradit Chin Med (成都中医药大学学报), 2002(1): 23-24.
- Zhang SQ. A study on major constituent proteins of raw material of ejiao and their bioactivities [D]. Fuzhou: Fuzhou University (福州大学), 2005.
- Wang B, Xiao XY, Cheng XR, et al. Study on relative molecular mass distribution of protein and peptide in donkey-hide glue by gel exclusion chromatography [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2009, 29: 1886-1891.
- Hang G, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein [J]. Food Chem, 2009, 113(1): 238-245.
- Zavalova LL, Basanova AV, Baskova IP. Fibrinogen-Fibrin system regulators from bloodsuckers [J]. Biochemistry (Moscow), 2002, 67(1): 157-166.
- Fu YJ. Studies on the Ejiao low Mol. Wt. peptide and its preparation [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine (山东中医药大学), 2010.
- Pang MM, Li M, Tian CY, et al. Distribution of relative molecular mass of asini corii colla hydrolyzate and investigation of its blood enrichment and leukogenic effect [J]. Chin J Exp

- Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2017,23(12):13-17.
- 8 Zhang XM,Zhang HW,Wang MF,et al. Identification of fish collagen powders by high resolution mass spectrometry[J]. Food Safe Qual Detec Technol(食品安全质量检测学报),2015,6:906-913.
 - 9 Selamassakul O,Laohakunjit N,Kerdchoechuen O,et al. Isolation and characterisation of antioxidative peptides from bromelain-hydrolysed brown rice protein by proteomic technique[J]. Process Biochem,2018;S1359511317317713.
 - 10 Xuan GD. Studies on antioxidative activity peptide and angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibitory peptide derived from the hydrolyzation of RD protein with protease and extraction of rice dregs(RD) protein[D]. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学),2006.
 - 11 Hao CY. Preparation of walnut protein optimization and determination of antioxidant activity[D]. Taiyuan: Shanxi University(山西大学),2014.
 - 12 Zhang Y,Zhao P,Dong Z,et al. Comparative proteome analysis of multi-layer cocoon of the silkworm,*Bombyx mori*[J]. PLoS One,2015,10(4):e0123403.
 - 13 Wang JQ. Study on the effects of dry/moist glycosylation on the physicochemical and antioxidant properties of whey protein-inulin complex[D]. Changchun: Jilin University(吉林大学),2018.
 - 14 Liu WY,Xu SS,Gu RZ,et al. Separation and identification of antioxidant peptides derived from marine collagen oligopeptides[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2017,38(6):101-105.
 - 15 Xu XB. Study on enhancing antioxidant activity of bioactive peptides from Colla Corii Asini(Ejiao)[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology(北京化工大学),2018.
 - 16 Wang ZW. Enzymatic preparation and anticoagulant activity of rapeseed peptides[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology(河南工业大学),2014.
 - 17 Feng XD,Zhang YJ,Wang G,et al. Determination of chloramphenicol residue in wuji baifeng pills by HPLC-MS/MS with HLB solid-phase extraction[J]. Chin Pharm Affair(中国药事),2016,30:1009-1014.
 - 18 Guo CH,et al. Structural theory of pharmacological action of Ejiao[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志),1999,24(1):55-57.
 - 19 Du BW,Xu XB,Guo SW,et al. Preparation of a high-antioxidant hydrolysate from Colla Corii Asini[J]. J Beijing Univ Chem Technol(北京化工大学学报),2019,46(6):15-20.
 - 20 Yao DF,Zhang YF,Zhou YF,et al. Effects of Ejiao on hemodynamics,rheology and microcirculation in dogs with endotoxic shock[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志),1989,14(1):44-46.
 - 21 Shi F,Hang BJ,Chi LL,et al. Discovery of marker peptide of donkey for identification of donkey-hide gelatin[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2017,37:2272-2278.
 - 22 Wang J,Sun B,Cao Y,et al. Protection of wheat bran feruloyl oligosaccharides against free radical-induced oxidative damage in normal human erythrocytes[J]. Food Chem Toxicol,2009,47:1591-1599.
 - 23 Fu WP,Yang YS,Xiao PY,et al. Research progress on isolation and purification methods of animal-derived active proteins and polypeptides[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:916-921.
-
- (上接第1362页)
- 14 Zhao YL. Study on the chemical constituents and its anti-inflammation activities of *Terminalia chebula*[D]. Chongqing: Third Military Medical University(第三军医大学),2016.
 - 15 Li XC,Elsohly HN,Hufford CD,et al. NMR assignments of ellagic acid derivatives[J]. Magn Reson Chem,1999,37:856-859.
 - 16 Zhang YY,Zeng HT,Yuan YJ,et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Tibetan medicine *Terminalia chebula*[J]. J China Pharm(中国药房),2018,29:2002-2006.