

基于“多肽组-修饰组”比较分析鹿皮与鹿皮胶物质基础

刘睿^{1,2,3}, 朱悦^{1,3}, 郑云枫^{1,3}, 赵明^{1,3}, 刘逊⁴, 黄勇⁵, 徐浩坤⁵,
段金廛^{1,3*}

(1. 南京中医药大学, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学, 江苏省海洋药用生物资源研究与开发重点实验室, 江苏 南京 210023; 3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 4. 苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009; 5. 贵州广济堂药业有限公司, 贵州 贵阳 550014)

摘要: 胶原蛋白为胶类药物主要物质基础, 鹿皮在高温煎煮熬制加工成鹿皮胶的过程中胶原蛋白的部分氨基酸位点会发生羟基化与脱酰胺修饰, 本文基于“多肽组-修饰组”结合的研究思路系统比较了鹿皮与鹿皮胶的蛋白质肽类物质基础。采用纳升液相-串联质谱法分析鉴定鹿皮与鹿皮胶中蛋白质类、肽类成分组成, 并进一步比较鹿皮与鹿皮胶的修饰数量与修饰位点。结果表明, 鹿皮胶的羟基化修饰与脱酰胺修饰数量均显著多于鹿皮, 提示在高温熬制加工过程中, 鹿皮胶原蛋白的部分氨基酸位点发生了修饰, 这些修饰与胶原蛋白的特定氨基酸结构单元、亲疏水性等因素有关, 鹿皮胶原蛋白发生修饰的阶段与机制有待后续研究阐释。本文为鹿皮胶物质基础研究、加工过程及胶原蛋白修饰的相关性研究提供了重要理论依据, 有利于开展鹿皮胶工艺优化、质量标准提升等研究。

关键词: 多肽组; 修饰组; 鹿皮; 鹿皮胶; 物质基础

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1882-07

Comparative analysis of chemical constituents of deer hide and deer hide gelatin by "peptidomics-modifications" methods

LIU Rui^{1,2,3}, ZHU Yue^{1,3}, ZHENG Yun-feng^{1,3}, ZHAO Ming^{1,3}, LIU Xun⁴, HUANG Yong⁵,
XU Hao-kun⁵, DUAN Jin-ao^{1,3*}

(1. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Research and Development in Marine Bio-resource Pharmaceutics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 4. Suzhou Vocational Health College, Suzhou 215009, China; 5. Guizhou Guangjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550014, China)

Abstract: Collagen is the main constituent of gelatinous Chinese medicine, with deer hide gelatin (Cervi Corii Colla, DHG) made from deer hide (DH) through a complex thermal and high-pressure processing procedure. During this procedure some amino acids in collagen undergo hydroxylation and deamidation. In the present study, comparative analysis of proteins and peptides in DH and DHG was carried out using "peptidomics-modifications" methods.

收稿日期: 2020-01-30; 修回日期: 2020-03-14.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2018YFC1706100); 国家自然科学基金面上项目 (81973450); 江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师 (2016年); 江苏省“333工程”第三层次 (2016年); 贵州省科技攻关项目 [2019]2771号; 贵州省科技计划项目 [2020]4Y090号; 中华中医药学会“青年人才托举工程”(QNRC2-C14); 江苏省高等学校自然科学研究项目 (19KJB360020).

*通讯作者 Tel: 86-25-85811116, Fax: 86-25-85811116, E-mail: dja@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0081

Nano-LC-MS/MS was used to analyze proteins and peptides in DH and DHG, and the number and sites of modification were determined as well. The amount of hydroxylation and deamidation that occurred in DHG was significantly greater than that in DH, suggesting that under thermal and high-pressure processing these modifications occurred more frequently on certain amino acids in collagen, and might be correlated with hydrophobicity. The occurrence and mechanism of hydroxylation and deamidation in DH processing procedures should be explored in further research. The present study provides important evidence of the chemical constituents and the correlation of processing procedures with these modifications, and also suggests some investigative ideas for DHG processing optimization and improvement of quality standards.

Key words: peptidomics; modifications; deer hide; deer hide gelatin; chemical constituent

鹿皮胶 (*Cervi Corii Colla*) 以梅花鹿 (*Cervus nippon* T.) 或马鹿 (*Cervus elaphus* L.) 的皮为原料经熬制、浓缩、干燥而成, 鹿皮胶味咸, 性温, 归肝、肾经, 具滋阴润燥、补血止血等功效^[1]。《本草纲目》有关于鹿皮 (deer hide, DH) 的记载: “补气; 涩精; 敛疮”。《四川中药志》记载鹿皮“补气, 涩虚滑。治妇女白带, 崩漏, 肾虚滑精及涂一切疮漏”^[2]。现代研究表明, 鹿皮胶具有补血、调节免疫及抗疲劳作用^[3]。

胶原蛋白是动物体内一类重要的蛋白质, 约占动物总蛋白的30%, 主要分布在皮肤、结缔组织、骨骼等部位, 胶原蛋白为鹿皮及鹿皮胶的主要成分。胶原蛋白来源的肽类成分具有抗氧化、抗衰老、皮肤保护等多种功效^[4]。胶原蛋白的基本结构单元为“甘氨酸-氨基酸X-氨基酸Y (Gly-Xaa-Yaa)”, 其中Xaa与Yaa多为脯氨酸 (Pro) 或羟脯氨酸 (Hyp)。Pro的羟基化、天门冬酰胺 (Asn) 和谷氨酰胺 (Gln) 的脱乙酰化为胶原蛋白主要的修饰类型。

翻译后修饰 (post-translational modifications, PTMs) 通常指蛋白质在生物体信号通路传导、生理生化反应过程中特定位点氨基酸发生的化学变化^[5]。动物药在生产加工、煎煮熬制、体内消化作用等过程中, 部分氨基酸位点会发生化学反应与化学变化, 称之为“修饰”。因而, 课题组基于“动物药修饰组 (modifications in animal-derived TCMs)”的研究思路, 围绕胶类动物药蛋白质、肽类成分在炮制加工、提取熬制过程发生的化学修饰、修饰类别、修饰位点、修饰数量等开展定性与定量研究^[6]。本文比较了鹿皮在熬制加工成鹿皮胶的过程中多肽类成分物质组成及其氨基酸修饰类别、修饰位点、修饰数量等变化, 探讨加工熬制过程中鹿皮蛋白质/肽类成分氨基酸位点修饰的变化规律, 以期对胶类动物药物质基础研究提供科学依据及应用基础。

材料与amp;方法

仪器与材料 戴安 U3000 NanoRSLC 纳升液相系统 (美国 DIONEX 公司); Thermo Q Exactive Plus

Orbitrap 质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); BP 211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司); Rotavapor R-210 旋转蒸发仪 (瑞士 BUCHI 公司); 离心浓缩仪、Freezone 4.5 plus 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司)。

碳酸氢铵, 胰蛋白酶 (Promega 质谱测序级), 乙腈、甲醇、甲酸等质谱用试剂均为质谱级 (德国 Merck 公司)。Seppack C18 固相萃取小柱 (Waters 公司); 多肽测定试剂盒 (美国, Thermo 公司)。鹿皮由贵州广济堂药业有限公司提供, 为鹿科动物马鹿的皮。

鹿皮与鹿皮胶样品的制备 从整张鹿皮上随机切割4块鹿皮, 每块鹿皮剪至3.0×3.0 cm²大小, 充分浸泡5~7天, 经过焯皮、洗皮、高温熬制化皮 (温度为117~120 °C) 后, 除去皮渣和油脂, 将熬制液合并, 提沫、浓缩、干燥后得到鹿皮胶样品 (DHG), 分别编号为鹿皮胶1~鹿皮胶4 (DHG-1~DHG-4)。从洗皮处理后的4块鹿皮样品上分别切割约0.5×0.5 cm²大小的鹿皮样品, 冷冻干燥后得到鹿皮样品 (DH), 编号为DH-1~DH-4。

DH 与 DHG 样品的酶解 参照2015版《中国药典》的方法, 稍作修改, 取干鹿皮样品0.1 g, 加入液氮充分研磨后, 加入1% 碳酸氢铵溶液50 mL, 超声处理30 min, 得鹿皮提取液; 另取鹿皮胶样品0.1 g, 加1% 碳酸氢铵溶液50 mL, 超声处理30 min, 10 000 r·min⁻¹离心后, 得鹿皮胶提取液。分别取鹿皮提取液和鹿皮胶提取液100 μL, 置于2 mL离心管中, 加入0.1 μg·μL⁻¹的胰蛋白酶溶液20 μL, 摇匀, 37 °C恒温酶解12 h, 加入10% TFA溶液60 μL终止反应, 用Seppak C18固相萃取小柱脱盐, 用离心浓缩仪干燥, 分别得到鹿皮酶解物和鹿皮胶酶解物, 采用多肽试剂盒测定多肽总量后置于-20 °C保存, 备用。

nano-LC MS/MS 分析 戴安 U3000 NanoRSLC 纳升液相系统, 色谱柱为5 μm Reprosil C18AQ (75 μm×150 mm), LC-MS/MS 系统分析样品。用初始流动相分别将鹿皮酶解物和鹿皮胶酶解物样品复溶至多肽浓度为1 μg·μL⁻¹, 上样2 μL, 流速400 nL·min⁻¹, 流动相A

(乙腈-甲酸-水, 2:0.2:98), 流动相 B (乙腈-甲酸-水, 80:0.2:20), 2%~30% B 线性梯度洗脱 150 min。Thermo Q Exactive Plus Orbitrap 质谱仪用于肽段分析, 喷雾电压为 2.5 kV, 离子传输毛细管温度为 200 °C; 质谱一级全扫描范围为 m/z 300~2 000, 分离宽度为 3 Da; 串联质谱分析采用一级质谱数据依赖的二级质谱扫描模式, 依次选取一级质谱中离子强度最高的 5 个离子进行碰撞诱导解离 (CID) 二级串联质谱, 每个样品重复进样 1 次。采用 Xcalibur 软件进行数据采集。

DH 与 DHG 的蛋白质、肽类成分鉴定及修饰情况分析 二级质谱数据采用 PEAKS 8.5 软件进行搜库鉴定分析, 分别检索劳亚兽总目 (Laurasiatheria) 蛋白质库、自制胶原蛋白库, 检索参数设置为: 前体离子误差 10 ppm; 子离子误差 1 Da; PTMs 的设置参数为: 可变翻译后修饰选择氧化修饰 (+15.99 Da); N-端乙酰化 (+42.01 Da); 脱酰胺 (+0.98 Da); 羟基化 (+15.99 Da)。允许 2 个位点误切, 假阳性率 (FDR) \leq 1%; 样品搜库选择胰蛋白酶酶切方式; 其他参数为默认参数, 在上述检索条件下所得分值有显著性意义 ($P < 0.05$) 被认定为有效的鉴定结果。对 DH 与 DHG 中主要的 PTMs 进行系统比较与分析。

结果

1 DH 与 DHG 蛋白质、肽类成分的鉴定

DH 与 DHG 样品中共鉴定 98 个蛋白质类成分, 其中以胶原蛋白为主, 鉴定得到的源于胶原蛋白的肽段占全部肽段数量的 90% 以上。根据鉴定得到的胶原蛋白种类, 自行构建胶原蛋白数据库, 即含有鹿科来源的胶原蛋白 I 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL1A1), I 型胶原 $\alpha 2$ 链 (COL1A2), III 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL3A1), II 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL2A1), XI 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL11A1), VII 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL7A1), IV 型胶原 $\alpha 5$ 链 (COL4A5), IV 型胶原 $\alpha 3$ 链 (COL4A3), IV 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL4A1), XVII 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL17A1) 和 X 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL10A1) 的全部氨基酸序列, 进行搜库检索, 以比较 DH 与 DHG 中胶原蛋白类成分的共性与差异。从鹿皮样品 DH-1~DH-4 中共鉴定了 4 636 个肽段信息, 从鹿皮胶样品 DHG-1~DHG-4 中共鉴定了 4256 个肽段信息。DH 与 DHG 鉴定的所有肽段中, 35.1% 的肽段仅在 DH 样品中, 29.3% 的肽段仅在 DHG 样品中, 两者重叠部分占全部鉴定肽段的 35.6%。

2 DH 与 DHG 羟基化和脱酰胺修饰比较

以自建胶原蛋白库进行搜索鉴定, 结果表明 DH 与 DHG 的胶原蛋白主要为 COL1A1、COL1A2、COL3A1 与 COL2A1, 在鉴定的肽段中, 主要发生羟基化与脱酰

胺修饰两类修饰。在 DH 熬制成 DHG 后, 羟基化和脱酰胺修饰的数量显著变化 ($P < 0.05$; $P < 0.01$), 如表 1 所示, 以单位数量肽段 (100 个肽段) 发生羟基化与脱酰胺修饰的数量为指标进行统计, 结果表明 DHG 发生羟基化与脱酰胺的数量均显著多于 DH ($P < 0.01$)。在 DH 样品中每 100 个肽段发生 142.5 个羟基化修饰与 16.3 个脱酰胺修饰; 而经过高温高压煎煮熬制及浓缩干燥后的 DHG 样品, 每 100 个肽段中发生羟基化与脱酰胺修饰的数量提升至 150.5 与 20.5 个。

Table 1 Number of identified peptides and peptides with PTMs. PTMs: Post-translational modifications; DH: Deer hide; DHG: Deer hide gelatin. ** $P < 0.01$ vs DH

Sample (n = 4)	Number of identified peptides	Number of PTMs per 100 peptides	
		Hydroxylation	Deamidation
DH	2 892 \pm 8	142.5 \pm 0.4	16.3 \pm 0.7
DHG	2 746 \pm 37**	150.5 \pm 2.3**	20.5 \pm 0.5**

COL1A1、COL1A2、COL3A1 与 COL2A1 为构成 DH 与 DHG 样品的主要胶原蛋白, 因此, 以 DH 与 DHG 样品中 4 种胶原蛋白的鉴定肽段 (identified peptides) 数量、蛋白覆盖肽段 (coverage peptides) 数量、肽谱匹配 (peptide spectrum matches, PSM) 数量为指标进行对比分析, 结果见表 2, 用每 100 个肽段中发生羟基化和脱酰胺修饰的 PSM 数量来比较 DH 和 DHG 中 4 种胶原蛋白修饰数量的变化。

Table 2 Number of identified peptides and peptides with post-translational modifications in collagens. PSM: Peptide spectrum matches; COL1A1: Collagen type I $\alpha 1$ chain; COL1A2: Collagen type I $\alpha 2$ chain; COL3A1: Collagen type III $\alpha 1$ chain; COL2A1: Collagen type II $\alpha 1$ chain. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DH

Collagen type	Sample (n = 4)	Number		Number of PSM with PTMs per 100 peptides	
		Identified peptide	Coverage peptide	Hydroxylation	Deamidation
COL1A1	DH	1 316 \pm 37	651 \pm 22	145.0 \pm 0.3	18.9 \pm 1.4
	DHG	1 331 \pm 13	669 \pm 10	191.7 \pm 3.3**	27.3 \pm 0.3**
COL1A2	DH	1 043 \pm 9	598 \pm 16	150.4 \pm 1.2	34.7 \pm 1.0
	DHG	944 \pm 10**	568 \pm 13*	180.8 \pm 3.8**	62.5 \pm 1.4**
COL3A1	DH	466 \pm 30	252 \pm 6	151.9 \pm 1.9	16.4 \pm 0.5
	DHG	398 \pm 10*	233 \pm 7*	183.6 \pm 1.7**	29.6 \pm 0.7**
COL2A1	DH	177 \pm 8	97 \pm 7	133.7 \pm 4.8	26.0 \pm 1.4
	DHG	175 \pm 4	99 \pm 5	152.9 \pm 3.7**	28.8 \pm 3.1

DHG 样品中鉴定得到的源于 COL1A2 与 COL3A1 的肽段数量显著多于 DH 样品, 为了排除鉴定肽段数量不同对 PTMs 数量统计的干扰, 以单位数量肽段 (100 个肽段) 发生羟基化和脱酰胺修饰的 PSM 数量来比较 DH 熬制前后 PTMs 数量的变化。结果如表 2 所示, 源于 COL1A1、COL1A2、COL3A1 及 COL2A1 的肽

段中, DHG 样品肽段发生羟基化修饰的 PSM 均显著高于 DH ($P < 0.01$); DHG 样品肽段发生脱酰胺修饰的 PSM 均显著高于 DH ($P < 0.01$)。表明在 DH 加工熬制过程中发生了较多的羟基化和脱酰胺修饰。

3 DH 与 DHG 羟基化修饰的对比分析

对 COL1A1、COL1A2、COL3A1 与 COL2A1 的所有 Pro 羟基化修饰在 DH 与 DHG 中的分布与变化情况进行对比与分析, 以每 1 000 个肽段中发生羟基化修饰的数量作为指标统计 Gly-Xaa-Yaa 为胶原蛋白的基本结构, 通常含有 Pro 的结构主要分为 3 类: Gly-Xaa-Pro, Gly-Pro-Yaa 及 Gly-Pro-Pro, 因此, 应重点比对 DH 与 DHG 中这 3 类含 Pro 的胶原蛋白基本结构上发生羟基化修饰的差异与规律。

结果见表 3, 从所有肽段 Pro 羟基化修饰的比较来看, DHG 的 Gly-Ala-Pro、Gly-Asn-Pro 与 Gly-Thr-Pro 结构单元 Pro 发生修饰的数量显著低于 DH ($P < 0.05$; $P < 0.01$); 而结构单元 Gly-Arg-Pro、Gly-Val-Pro 及 Gly-Pro-Pro 的 Xaa 位 Pro 发生羟基化修饰的数量显著高于 DH ($P < 0.05$; $P < 0.01$)。DHG 样品中源于 COL1A1 的结构单元 Gly-Phe-Pro、Gly-Leu-Pro、Gly-Val-Pro 及 Gly-Pro-Pro 的 Xaa 位 Pro 发生羟基化修饰的数量显著高于 DH ($P < 0.05$; $P < 0.01$); 源于 COL1A2 的结构单元 Gly-Glu-Pro、Gly-Phe-Pro、Gly-His-Pro、Gly-Gln-Pro、Gly-Arg-Pro 及 Gly-Pro-Pro 的 Xaa 位 Pro 发生羟基化修饰的数量显著高于 DH ($P < 0.05$; $P < 0.01$); 源于 COL3A1 的结构单元 Gly-Met-Pro 及 Gly-Arg-Pro 的 Pro 发生羟基化修饰的数量显著高于 DH ($P < 0.05$; $P < 0.01$); 源于 COL2A1 的结构单元 Gly-Glu-Pro、Gly-Phe-Pro、Gly-Leu-Pro 的 Pro 发生羟基化修饰的数量显著高于 DH ($P < 0.05$; $P < 0.01$)。

DHG 样品的结构单元 Gly-Phe-Pro、Gly-Val-Pro 及 Gly-Pro-Pro 的 Xaa 位的 Pro 发生的羟基化修饰数量显著多于 DH 样品; 此外, 尽管全部肽段的 Gly-Phe-Pro 结构单元 Pro 羟基化修饰在 DH 与 DHG 样品中未见差异, 但是在 COL1A1、COL1A2 及 COL2A1 来源的肽段的 Gly-Phe-Pro 结构单元中, DHG 的羟基化数量均显著高于 DH ($P < 0.05$)。对所有 Gly-Xaa-Yaa 结构单元的亲疏水性分析结果如表 3 的 GRAVY (grand average of hydropathicity) 值所示, GRAVY 为负值则表示该结构单元亲水, 正值则表明疏水, 其中仅 Gly-Phe-Pro、Gly-Ile-Pro、Gly-Leu-Pro 与 Gly-Val-Pro 为负值, 表明这 4 个结构单元为疏水性结构单元, 除了 Gly-Ile-Pro 未表现出显著性差异外, 其他结构单元在全部肽段或部分胶原蛋白来源肽段比较中均表现出显著性差异, 结果提示, 羟基化修饰可能与结构单元的亲疏水性相关。

尽管 Gly-Arg-Pro 为亲水结构单元 (GRAVY = -2.167),

但 DHG 样品中该结构单元的羟基化数量显著增加, 这可能与含有 N 端 Hyp (N-Hyp) 肽段数量减少有关: 在 DHG 样品处理过程中, 由于羟基化修饰可能影响胰蛋白酶切割效率, 使其切割 Arg-Hyp 之间酰胺键的效率低于 Arg-Pro, 因此 Gly-Arg-Hyp 结构单元漏切数量增加, 从而导致 Gly-Arg-Hyp 数量增加 (即表现出 Gly-Arg-Pro 结构单元的羟基化增加, $P < 0.01$), N-Hyp 肽段的数量显著降低 ($P < 0.05$; $P < 0.01$)。此外, Gly-Asn-Pro 结构单元的羟基化数量的变化, 可能与其 Xaa 位 Asn 发生脱酰胺修饰而导致 Gly-Asn-Pro 数量减少, Gly-Asp-Pro 数量增加有关。

结果提示, 在 DHG 样品中, 结构单元 Gly-Xaa-Pro 的 Pro 发生羟基化修饰与 Xaa 疏水性有关, Val、Leu 及 Phe 均为疏水性氨基酸, Xaa 位置氨基酸的疏水性可能促进 Pro 羟基化的形成, 这一推测有待后续研究的证实。表 3 统计结果表明, DH 与 DHG 样品的 Gly-Pro-Yaa 结构单元中 Pro 羟基化的数量没有差异, 但是 Gly-Pro-Pro 结构单元 Xaa 位 Pro 发生羟基化的数量 DHG 显著高于 DH。根据统计可初步判断, Yaa 位的 Pro 有利于 Xaa 位 Pro 羟基化的发生, 这也有待后续研究的验证。

以 COL1A2 的肽段 Gly₅₄₂~Arg₅₇₁ 为例, 在 DH 样品中, 鉴定到的肽段序列为 GEQGPAGPP (+15.99) GFQGLPGPAGTAGEAGKPGER (-10 lgP = 86.8), 而在 DHG 样品中, 鉴定得到的肽段序列为 GEQGPAGPP (+15.99) GFQGLP (+15.99) GPAGTAGEAGKPGER (-10 lgP = 88.6), 其结构单元 Gly-Leu-Pro 中的 Pro₅₅₆ 发生了羟基化修饰, 当 Xaa 位为 Leu 时可能有利于 Yaa 位 Pro 的羟基化, 如图 1 所示, 为两者 MS/MS 图谱对比。

以 COL1A1 的肽段 Gly₂₄₄~Arg₂₅₂ 为例, 在 DH 样品中, 鉴定到的肽段序列为 GPPGPQ (+0.98) GAR 与 GPP (+15.99) GPQGAR, 仅 Pro₂₄₆ 发生了羟基化修饰, 而在 DHG 样品中, 鉴定得到的肽段序列包括 GP (+15.99) P (+15.99) GPQGAR、GPP (+15.99) GPQ (+0.98) GAR、GP (+15.99) PGP (+15.99) QGAR 及 GPP (+15.99) GPQGAR, 其 Pro₂₄₅、Pro₂₄₆、Pro₂₄₈ 均发生了羟基化修饰, 提示 Yaa 位的 Pro 有利于 Xaa 位的 Pro 羟基化。

以 COL1A1 的肽段 Gly₅₉₈~Lys₆₁₁ 为例, 在 DH-1 样品中, 共鉴定到含有 6 个含 Gly-Val-Hyp 结构单元的肽段, 而 DHG-1 样品中, 共鉴定到 23 个含 Gly-Val-Hyp 结构单元的肽段, 提示 Xaa 为 Val 时有利于 Yaa 位 Pro 的羟基化。

4 DH 与 DHG 脱酰胺修饰的对比分析

DH 与 DHG 中发生脱酰胺修饰的氨基酸是 Asn 与 Gln, 无论是所有肽段还是来源于 COL1A1、COL1A2、

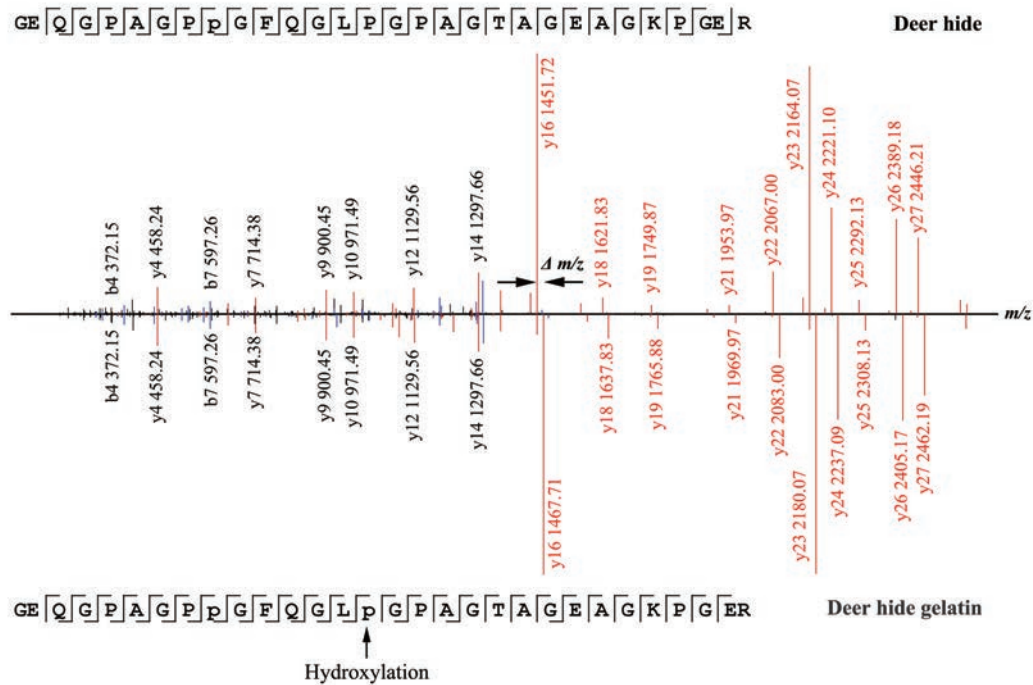


Figure 1 Comparison of MS/MS spectra of peptide and hydroxylated peptide

COL3A1 与 COL2A1 的肽段, DHG 发生脱酰胺修饰均显著多于 DH。在 DH 加工熬制成 DHG 的过程中发生脱酰胺修饰的类型的统计结果见表 4, 以单位数量肽段 (每 1000 个肽段) 发生脱酰胺修饰的百分比为指标。DHG 单位肽段中 Asn 发生脱酰胺修饰的数量显著高于 DH ($P < 0.01$), 而 Gln 发生脱酰胺修饰的数量无显著性差别。DH 样品中 Asn 发生脱酰胺修饰的比例为 24.3%, 而 DHG 样品中的 Asn 脱酰胺修饰达到了 41.3%, Gln 发生脱酰胺修饰的比例在 DH 和 DHG 样品中无明显变化。

Table 4 Number of deamidation types in collagens. ** $P < 0.01$ vs DH

Type	Sample (n = 4)	Number of Deamidation per 1000 peptides	
		Asn	Gln
All collagens	DH	87.1 ± 4.7	76.2 ± 2.8
	DHG	124.4 ± 1.6**	80.9 ± 4.4
COL1A1	DH	45.3 ± 4.6	93.1 ± 3.9
	DHG	66.1 ± 2.4**	95.3 ± 7.0
COL1A2	DH	143.8 ± 5.8	63.5 ± 2.2
	DHG	217.6 ± 7.7**	64.6 ± 3.7
COL3A1	DH	61.8 ± 5.1	36.7 ± 4.6
	DHG	91.0 ± 3.0**	43.2 ± 4.6
COL2A1	DH	71.8 ± 11.1	93.9 ± 16.7
	DHG	59.9 ± 10.5	97.3 ± 10.1

讨论

羟基化和脱酰胺修饰在胶类动物药中为常见 PTMs^[7], 本文以鹿皮及鹿皮胶为研究对象, 将相同来

源的生鹿皮与鹿皮胶经过粉碎、提取、酶切、LC-MS/MS 分析鉴定后, 获得生鹿皮与鹿皮胶的全部酶解肽段序列及 PTMs 信息。对羟基化和脱酰胺修饰进行了全面系统的分析与比较, 寻找鹿皮在加工熬制成鹿皮胶的过程中羟基化与脱酰胺修饰的变化规律。

本文研究表明, 鹿皮加工熬制成鹿皮胶后, 羟基化与脱酰胺修饰的数量显著增加, 修饰位点存在一定规律性, 然而加工过程中修饰发生的反应机制, 以及加工前后特定修饰肽段的绝对/相对定量的研究仍有待后续研究。基于本研究的数据的充分归纳总结, 可得出以下结论: 在鹿皮熬制加工过程中 ① 羟基化与脱酰胺修饰的数量显著增加; ② 发生羟基化修饰的结构单元 Gly-Xaa-Pro 中, Xaa 多数为疏水性氨基酸, 如 Val、Phe、Leu 等, Xaa 位氨基酸的疏水性有利于 Yaa 位 Pro 发生羟基化; ③ 结构单元 Gly-Pro-Pro 的 Xaa 位 Pro 易发生羟基化修饰; ④ 脱酰胺修饰主要发生在 Asn 上, Gln 发生脱酰胺修饰数量较少。

I 型胶原蛋白为动物皮肤中主要的胶原类型, 由两条 $\alpha 1$ 链与一条 $\alpha 2$ 链形成三股螺旋结构, 胶原蛋白本身不溶于水, 但经过高温煎煮熬制, 胶原蛋白发生变性、溶胀、降解等化学/物理变化后, 得到胶原蛋白或胶原肽溶液。对于胶类动物药来说, 加工熬制过程是可溶性蛋白质、多肽释放的过程。此外, 加工熬制过程增加的部分氨基酸位点的修饰数量, 也参与了胶原蛋白类成分水溶性变化过程, 如羟基化和脱酰胺这两类修

饰的共同特点都是形成-OH基团, Asn脱酰胺后形成Asp, -NH₂转变为-OH, 而Pro发生羟基化后变为Hyp, 即在Pro的五元环3-或4-位上引入-OH^[8], -OH基团的引入一定程度上增加了肽类分子与水形成氢键的趋势, 有利于改善肽段水溶性。胶类成分的熬制过程, 增加了胶原蛋白、胶原肽的溶出, 胶类动物药中可溶性肽类成分具有造血、提高免疫、抗疲劳等功效^[9], 提示胶类的熬制加工步骤对于胶类动物药功效的发挥具有积极作用。

在质量控制方面, 基于“多肽组-修饰组”比较分析结果丰富了鹿皮胶专属性鉴别与含量测定的指标性成分, 有利于鹿皮胶的质量控制标准的提升。以鹿皮胶专属性肽段SGETGASGPPGFAGEK为例^[7], 其中含有2个可发生羟基化修饰的Pro位点, 则该专属性肽段的不同修饰形态均可作为专属性成分用于鉴别, 即肽段SGETGASGP(+15.99)PGFAGEK、SGETGASGPP(+15.99)GFAGEK、SGETGASGP(+15.99)P(+15.99)GFAGEK均为专属性成分; 含量测定方面, 将不同修饰形态的专属性/指标性肽段的总量作为含量测定的限度具有更好的科学性。针对当前市场阿胶药材质量控制难的问题, 也可以通过“修饰组”的系统分析, 在明确阿胶专属性肽段的基础上^[10], 分析鉴定其可能的修饰类型, 以所有修饰肽段的总量为指标规定含量限度, 从而制定更合理可靠的鉴别与含量测定方法, 提升阿胶质量标准。

本文研究以鹿皮及鹿皮胶为研究对象, 采用“多肽组-修饰组”结合的分析策略, 不仅全面分析鹿皮样品中肽类成分的物质组成, 并深入揭示肽段可能发生的修饰类型与修饰规律, 这一方法具有较好的普适性: 胶类动物药尽管基源动物不同, 但本质上仍然是胶原蛋白发生变性、降解、溶出、修饰等一系列变化, 可通过“多肽组-修饰组”分析过程中同源蛋白质数据库的构建来完善本研究思路与方法。因此, 本文研究对胶类动物药的物质基础、质量标准等研究具有重要借鉴意义。

作者贡献: 刘睿负责实验方案的设计与论文撰写; 朱悦、

郑云枫、赵明负责实验方案的修改与完善; 刘逊、黄勇、徐浩坤负责样品采集与处理; 段金殿对论文进行整体设计与指导。

利益冲突: 研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Zhang L, Wang YH, Liu C, et al. Chemical quality analysis and evaluation of donkey hide gelatin and deer skin gelatin [J]. Food Sci (食品科学), 2018, 39: 57-63.
- [2] Tan XH, Liu DC. Current status and prospect of deer skin glue research [J]. J Shandong Norm Univ (山东师范大学学报), 2011, 26: 99-100, 104.
- [3] Li D, Li HY, Huang XW, et al. Effect of deer hide gelatin on cyclophosphamide induced anemia mice [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med (长春中医药大学学报), 2010, 26: 652-653.
- [4] Sibilla S, Godfrey M, Brewer S, et al. An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: scientific background and clinical studies [J]. Open Nutraceuticals J, 2015, 8: 29-42.
- [5] Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 255-261.
- [6] Liu R, Zhao M, Duan JA. Ideas and strategies for investigating the bioactive constituents of animal derived traditional Chinese medicines based on integrated "proteomics/peptidomics-modifications" methods [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1735-1743.
- [7] Liu R, Huang Y, Xu H, et al. A strategy for identifying species-specific peptide biomarkers in deer-hide gelatin using untargeted and targeted mass spectrometry approaches [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1092: 32-41.
- [8] Zhang T, Song SZ, Liu R. Investigation on identifying collagen from Colla Corii Bovis using nano LC-MS/MS method [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2020, 66: 105-109.
- [9] Wu H, Ren C, Yang F, et al. Extraction and identification of collagen-derived peptides with hematopoietic activity from Colla Corii Asini [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 182, 129-36.
- [10] 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.