

• 药剂与工艺 •

基于“蛋白质组-修饰组”研究砂炒炮制对穿山甲蛋白质类成分的影响

刘睿^{1,2,3}, 刘逊⁴, 赵明^{1,3}, 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

摘要:目的 基于蛋白质、肽类物质组成及修饰组成的变化, 研究砂炒炮制对穿山甲物质基础的影响。方法 采用 Nano LC-MS/MS 对炮制前后穿山甲蛋白质、肽类组成及变化进行分析鉴定, 对鉴定的蛋白质、肽类发生的脱酰胺修饰与氧化修饰进行比较。结果 穿山甲主要由角蛋白、连接蛋白、桥粒蛋白等结构蛋白及促进角质致密结构形成的异构酶类组成。穿山甲经炮制后, 可溶性蛋白质、肽类的鉴定数量未见明显变化, 难溶性蛋白质鉴定数量显著降低; 炮制后蛋白质、肽类的脱酰胺修饰数量显著增加; 炮制后 I 型、II 型角蛋白的鉴定肽段数量显著增加, Asn 与 Gln 发生脱酰胺修饰的数量显著增加; 穿山甲炮制前后鉴定肽段的相对分子质量分布及亲疏水性无显著变化。结论 尽管炮制会降低穿山甲整体蛋白质鉴定的数量, 但可显著增加角蛋白的鉴定肽段数量, 可显著提高蛋白质、肽类成分的脱酰胺修饰数量。结果提示炮制过程有利于角蛋白等结构蛋白的蛋白质、肽类成分的溶出与释放。为穿山甲物质基础研究, 炮制对角质类动物药物质基础的影响研究等提供依据, 也为穿山甲替代资源寻找与评价提供研究思路与方法。

关键词: 穿山甲; 蛋白质组; 修饰组; 物质基础; 脱酰胺修饰; 砂炒炮制; 蛋白质; Nano LC-MS/MS; 肽类; 角蛋白; 连接蛋白; 桥粒蛋白; 结构蛋白; 异构酶

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3416-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.008

Effect of high temperature sand fried processing on protein in *Manis Squama* based on “Proteomics-Modifications” methodsLIU Rui^{1,2,3}, LIU Xun⁴, ZHAO Ming^{1,3}, 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 Pharmaceuticals, 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

Abstract: Objective To study the effect of high temperature sand fried processing on the chemical constituents in *Manis Squama* based on the changes of proteins, peptides, and modifications. **Methods** Nano LC-MS/MS was used to analyze and identify proteins and peptides in *Manis Squama* before and after processing. The PTMs including deamidation and oxidation occurred in *Manis*

收稿日期: 2020-02-10

基金项目: 国家重点研发计划资助 (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); 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)

作者简介: 刘睿, 副研究员, 从事动物药资源化学研究。Tel: (025)85811524 E-mail: liurui@njucm.edu.cn

***通信作者** 段金廛, 教授, 博士生导师, 从事中药资源化学与资源循环利用。Tel: (025)85811291 E-mail: dja@njucm.edu.cn

Squama during processing were also investigated. **Results** The results showed that *Manis Squama* consisted of keratins, connexin, desmoplakin, and some isomerases, which can promote the keratinous structure formation. After processing, the number of identified proteins and peptides in soluble fraction did not show significant change, while the number of proteins and peptides in in-soluble fraction were decreased significantly. The number of deamidation was increased significantly, and the number of deamidation on Asn and Gln in Keratins was increased significantly. There were no significantly change on molecular weight distribution and GRAVY value. **Conclusion** High temperature sand fried processing can decrease the protein and peptide identifications of *Manis Squama*, but significantly increase the identifications from Keratins and other structural proteins, and significantly increase the number of deamidation, which might help to increase the releasing and dissolution of soluble proteins and peptides. In this study, we provided important evidences on revealing the effect of processing on the chemical constituents changing in *Manis Squama*, also provided ideas and methods for searching and evaluation of *Manis Squama* alternative resources.

Key words: *Manis Squama*; proteomics; modifications; material basis; deamidation; sand fried processing; protein; Nano LC-MS/MS; peptide; keratin; connexin; desmoplakin; structural protein; isomerase

穿山甲 *Manis Squama* 为鲛鲤科穿山甲属动物穿山甲 *Manis pentadactyla* Linnaeus 的鳞甲, 味咸, 微寒, 归肝、胃经, 具活血消癥、通经下乳消肿排脓、搜风通络的功效^[1-3]。临床可用于妇科疾病、前列腺疾病及儿科疾病等方面^[4]。穿山甲通常为炮制后使用,《中国药典》2015 年版收载的炮制品有炮山甲与醋山甲, 传统炮制方法一般需在温度 210~250 °C 下砂炒数分钟^[5], 前期研究表明, 穿山甲高温砂炒炮制过程会促进一系列环二肽的形成^[6], 包括 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽、*D*-丝-*L*-酪氨酸环二肽及 *L*-甘-*L*-酪氨酸环二肽, 且其中 *L*-丝-*L*-酪氨酸环二肽具有显著的延长凝血时间、促进乳腺上皮细胞增殖及镇痛活性^[7-9]。

研究发现穿山甲炮制前后蛋白质类成分鉴定数量差异显著, 高温砂炒后穿山甲中鉴定出的蛋白质数量显著减少^[8], 表明高温炮制可能破坏了蛋白质结构并使得部分蛋白质发生非特异性降解而难以被检测出来。穿山甲的高温炮制一方面会降解蛋白质从而减少蛋白质的鉴定数量, 另一方面, 高温炮制会破坏蛋白质原有结构, 使其部分氨基酸位点发生化学反应与化学变化, 从而影响蛋白质或降解肽段的性质。

蛋白质的翻译后修饰 (post-translational modifications, PTMs) 是生物机体对翻译后的蛋白质进行化学修饰, 以改变蛋白质的理化性质, 从而影响蛋白质在体内的生物活性^[10]。而动物药类中药在加工炮制、体内消化过程中, 部分氨基酸位点发生的化学变化, 称之为“修饰”。为此, 本课题组提出“动物药修饰组 (modifications in animal-derived TCMs)”的概念, 即围绕动物药中蛋白质、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^[11]。本实验以穿山甲为研究对象, 基于“蛋白质组-修饰组”的研究思路与方法, 对炮制前后蛋白质肽类成分组成, 氨基酸修饰类型、修饰位点及修饰数量等开展系统地比较研究, 以阐明穿山甲物质基础, 为穿山甲及角质类动物药加工炮制机制研究提供科学依据, 也为穿山甲替代资源的寻找与评价提供方法与应用基础。

1 材料

1.1 仪器

戴安 U3000 Nano RSLC 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; CentriVap 离心浓缩仪、Freezone 4.5 plus 冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司。

1.2 试剂

穿山甲样品为苏州卫生职业技术学院馆藏标本, 经南京中医药大学药学院段金廛教授鉴定为鲛鲤科穿山甲属动物穿山甲 *Manis pentadactyla* Linnaeus 的鳞甲。碳酸氢铵、二硫苏糖醇 (DTT)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、碘乙酰胺 (IAA)、Tris 碱, 购自南京翼飞雪生物科技有限公司; 胰蛋白酶 (质谱测序级) 购自美国 Promega 公司, 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, 美国 Waters 公司; BCA 蛋白测定试剂盒、多肽测定试剂盒, 美国 Thermo 公司。

2 方法与结果

2.1 穿山甲炮制

取净穿山甲 3 个批次 (MS-1~MS-3), 大小分开, 分别用砂炒至鼓起, 洗净, 干燥, 得炮山甲

(PMS-1~PMS-3)^[1]。穿山甲与炮山甲粉碎过 200 目筛, 保存。

2.2 穿山甲样品的提取与制备

穿山甲主要含有角质类成分, 提取方法参照前期研究^[12], 稍作改动。提取流程如图 1 所示, 取穿山甲样品 (MS-1~MS-3)、炮山甲样品 (PMS-1~PMS-3) 各 10 mg, 每个样品加入 1 mL 提取液 (含

4% SDS, 20 mmol/L DTT 的 Tris 缓冲液), 在 65 °C 水浴孵育过夜, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液为穿山甲提取液, 沉淀部分重复上述提取步骤 2 次, 将 3 次提取液合并, 分别为穿山甲提取液 (MSs-1~MSs-3) 与炮山甲提取液 (PMSs-1~PMSs-3), 沉淀部分用 PBS 反复洗涤 3 次, 分别为穿山甲渣 (MSp-1~MSp-3) 与炮山甲渣 (PMSp-1~PMSp-3)。

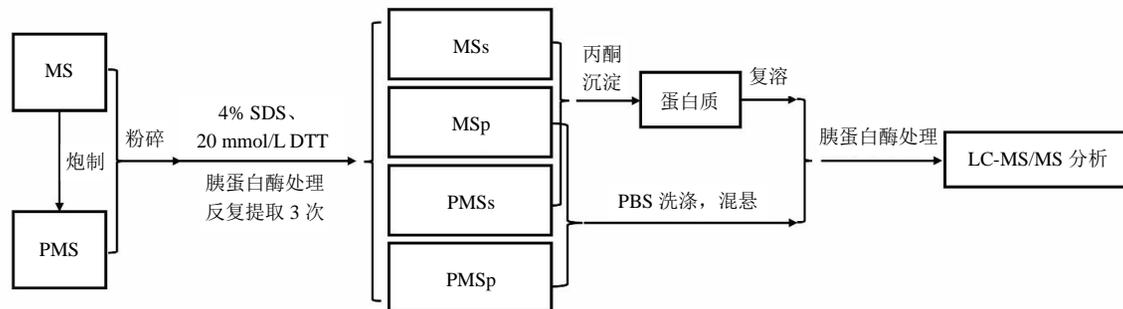


图 1 穿山甲样品提取制备流程

Fig. 1 Scheme for *Manis Squama* extracting and preparing

测定穿山甲提取液样品 (MSs-1~MSs-3、PMSs-1~PMSs-3) 蛋白质质量浓度, 每个样品中取 200 μg 蛋白质总量的提取液, 分别加入 3 倍体积的丙酮, 至于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 4 h 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 用丙酮洗涤 1 次, 挥干丙酮。加入 200 μL 裂解液 (含 8 mol/L 尿素的 Tris 缓冲液, pH 8) 充分溶解蛋白后, 加入 pH 8 的 Tris 缓冲液 1 400 μL 稀释, 按质量百分比加入 1% 胰蛋白酶, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育过夜; 穿山甲渣样品 (MSp-1~MSp-3、PMSp-1~PMSp-3) 用 pH 8 的 Tris 缓冲液混悬, 扣除提取液中蛋白质总量后, 按质量百分比加入 1% 胰蛋白酶, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育过夜。穿山甲提取液酶解样品与穿山甲渣酶解样品脱盐, 干燥, 纯水复溶后测定多肽总量, 取 20 μg 多肽溶液, 再次干燥后用初始流动相复溶至多肽质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 待进样。

2.3 基于 Nano LC-MS/MS 的蛋白组分析

戴安 U3000 Nano RSLC 纳升液相系统, 色谱柱为 Reprosil C18AQ (150 mm \times 75 μm , 5 μm), LC-MS/MS 系统分析样品。将穿山甲样品进样, 上样量为 2 μL , 体积流量 400 nL/min, 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), 线性梯度洗脱: 0~150 min, 2%~30% B。Thermo Q-Exactive Plus Orbitrap 质谱仪用于进行肽段分析, 喷雾电压为 2.5 kV, 离子传输毛细管温度为 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$; 质谱一级全扫描范围为 m/z 300~2 000,

分离宽度为 m/z 3; 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。获得的 MS/MS 图谱采用 PEAKS 8.5 软件进行搜库鉴定分析, 检索劳亚兽总目 (Laurasiatheria) 蛋白质库, 检索参数设置为前体离子误差 1.0×10^{-5} ; 子离子误差 m/z 1; 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 (Trypsin) 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。

从各穿山甲样品中鉴定得到的肽段与蛋白质数量如表 1 所示, MSs 共鉴定到 254 个蛋白质和 2 648 个肽段, MSp 共鉴定到 640 个蛋白质和 7 618 个肽段, PMSs 共鉴定到 226 个蛋白质和 2 754 个肽段, PMSp 共鉴定到 181 个蛋白质和 2 368 个肽段; MS 样品共鉴定到 705 个蛋白质和 8 628 个肽段, PMS 样品共鉴定到 257 个蛋白质和 3 327 个肽段; PMSs 中鉴定的蛋白质与肽段数量与 MSs 比没有显著性差异 ($P>0.05$), 而 PMSp 中鉴定的蛋白质、肽段数量与 PMSs 比则显著减少 ($P<0.01$); PMS 中鉴定的蛋白质、肽段数量显著少于 MS ($P<0.01$)。尽管炮制过程使穿山甲蛋白质与肽段的鉴定总数减少, 但是对于穿山甲提取液中可溶性蛋白质与肽段的鉴定数量无显著改变。

表 1 各穿山甲样品中鉴定得到的肽段与蛋白质数量

Table 1 Number of identified proteins and peptides from each *Manis Squama* sample

序号	肽段数量					蛋白质数量				
	1	2	3	汇总	总数	1	2	3	汇总	总数
MSs	1 537	1 644	2 008	2 648	8 628	149	151	201	254	705
MSp	5 423	4 423	5 359	7 618		504	436	521	640	
PMSs	1 671	1 766	1 924	2 754	3 327	129	150	172	226	257
PMSp	1 431	1 540	1 683	2 368		109	127	133	181	

MSs 中鉴定的蛋白质主要为 I 型角蛋白(keratin, type I)、II 型角蛋白(keratin, type II)、连接蛋白(junction plakoglobin)、延长因子(elongation factor)、桥粒蛋白(plakophilin)、桥粒黏附蛋白(desmoglein)、14-3-3 蛋白(14-3-3 protein)等; MSp 中鉴定的蛋白质除了上述主要的结构蛋白外,还发现蛋白二硫键异构酶(protein disulfide-isomerase), 肽基脯氨酸顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase), 谷氨酰胺 γ -谷氨酰转移酶(protein-glutamine γ -glutamyltransferase) 等与角蛋白结构形成相关的蛋白酶。

通过绘制韦恩图对 MSs、MSp、PMSs 及 PMSp 样品蛋白质与肽段进行比较分析, 如图 2 所示, 4 个样品重叠部分共有 112 个蛋白质, 其中以角蛋白(18 个)、核糖体蛋白(ribosomal protein, 25 个)、翻译起始因子(eukaryotic translation initiation

factor, 6 个)、14-3-3 蛋白(3 个)等结构蛋白或参与合成的蛋白质为主。在 MSp 中鉴定出的特异性蛋白数量最多(达 427 个), 而在 PMSp 样品中差异蛋白质的数量显著减少(仅 8 个); 在肽段的韦恩图中可见相似比例的分布情形。韦恩图的结果提示, 除去 MSp 中鉴定出的差异蛋白质与肽段外, 大部分的蛋白质或肽段分布在重叠部分, 之所以炮制后的 PMSp 样品蛋白质与肽段数量均显著减少, 可能由于高温炮制的破坏导致部分蛋白质鉴定缺失。

2.4 穿山甲样品脱酰胺与氧化修饰的对比分析

获得的 MS/MS 图谱采用 PEAKS 8.5 软件进行修饰类型、修饰位点与修饰数量进行分析时, 将 PTMs 的参数设置为可变翻译后修饰选择氧化修饰(oxidation, $m/z + 15.99$); 脱酰胺(deamidation, $m/z + 0.98$); PTMs 的得分 Ascore 设置为 ≥ 20 被认定为有效的修饰结果。

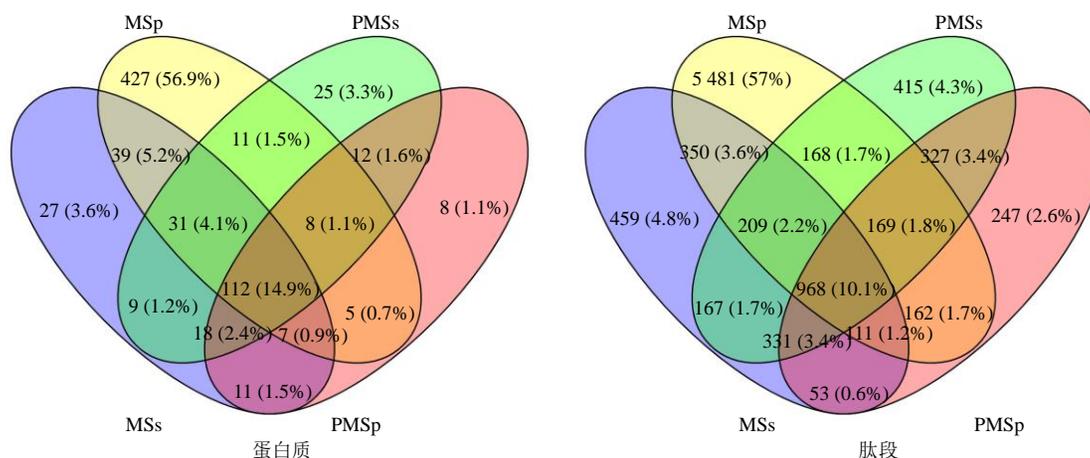


图 2 穿山甲中鉴定的蛋白质、肽段韦恩图

Fig. 2 Venn diagram comparison of identified proteins and peptides from *Manis Squama* samples

穿山甲在炮制过程中主要发生脱酰胺与氧化修饰, 炮制前后脱酰胺与氧化修饰的比例显著变化 ($P < 0.05$), 如表 2 所示, MS 样品中 Asn 发生脱酰胺修饰的比例为 18.52%, Gln 发生脱酰胺修饰的比例为 10.83%, Met 发生氧化修饰的比例为 37.56%;

经过高温炮制后的 PMS 样品中各修饰比例分别变化为 25.60%、12.60%与 22.69%。穿山甲炮制后脱酰胺修饰比例上升, 其中 Asn 发生脱酰胺修饰的比例显著升高 ($P < 0.05$), Gln 发生脱酰胺修饰的比例升高, 但未表现出显著性差异; 炮制后氧化修饰

表 2 穿山甲样品炮制前后脱酰胺与氧化修饰的比例
Table 2 Percentage of deamidation and oxidation in *Manis Squama* samples

PTMs	脱酰胺/%		氧化/%
	Asn	Gln	Met
MS	18.5±1.3	10.8±0.7	37.6±5.0
PMS	25.6±1.8*	12.6±0.6	22.7±3.9*

与 MS 比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs MS

的比例显著下降 ($P < 0.05$)。

2.5 穿山甲 I 型与 II 型角蛋白修饰比例与修饰位点的对比分析

角蛋白、连接蛋白、桥粒蛋白等结构蛋白为穿山甲的主要蛋白质类型,以 I 型、II 型角蛋白为例,统计比较穿山甲炮制前后脱酰胺修饰数量、氧化修饰数量、肽段覆盖率(coverage)、鉴定肽段(identified

peptides)数量、唯一肽段(unique peptides)数量、肽谱匹配(peptide spectrum matches, PSM)数量的差异,其中修饰的数量以单位数量肽段(100 个肽段)含有羟基化与脱酰胺修饰的 PSM 数量进行统计,结果见表 3。

由表 3 可见, I 型、II 型角蛋白炮制后脱酰胺数量均显著高于炮制前 ($P < 0.05$ 、 0.01),而氧化修饰未见显著性差异,表明在炮制过程中角蛋白发生了大量的脱酰胺修饰;表 3 炮山甲样品鉴定的角蛋白肽段数量均显著多于炮制前 ($P < 0.01$)。鉴定肽段数量、唯一肽段数量及肽段覆盖率越高,提取获得的蛋白质、肽段的信息越多,则鉴定结果越准确,因此,这些指标也间接反映了样品前处理时蛋白质、多肽提取的效率。在相同的提取条件下,炮制后的样品能鉴定到更多的蛋白质和肽段,提示炮制也许可促进角质类蛋白质的溶出。

表 3 I 型、II 型角蛋白炮制前后修饰的变化

Table 3 Comparison of PTMs on type I and type II keratin before and after processing

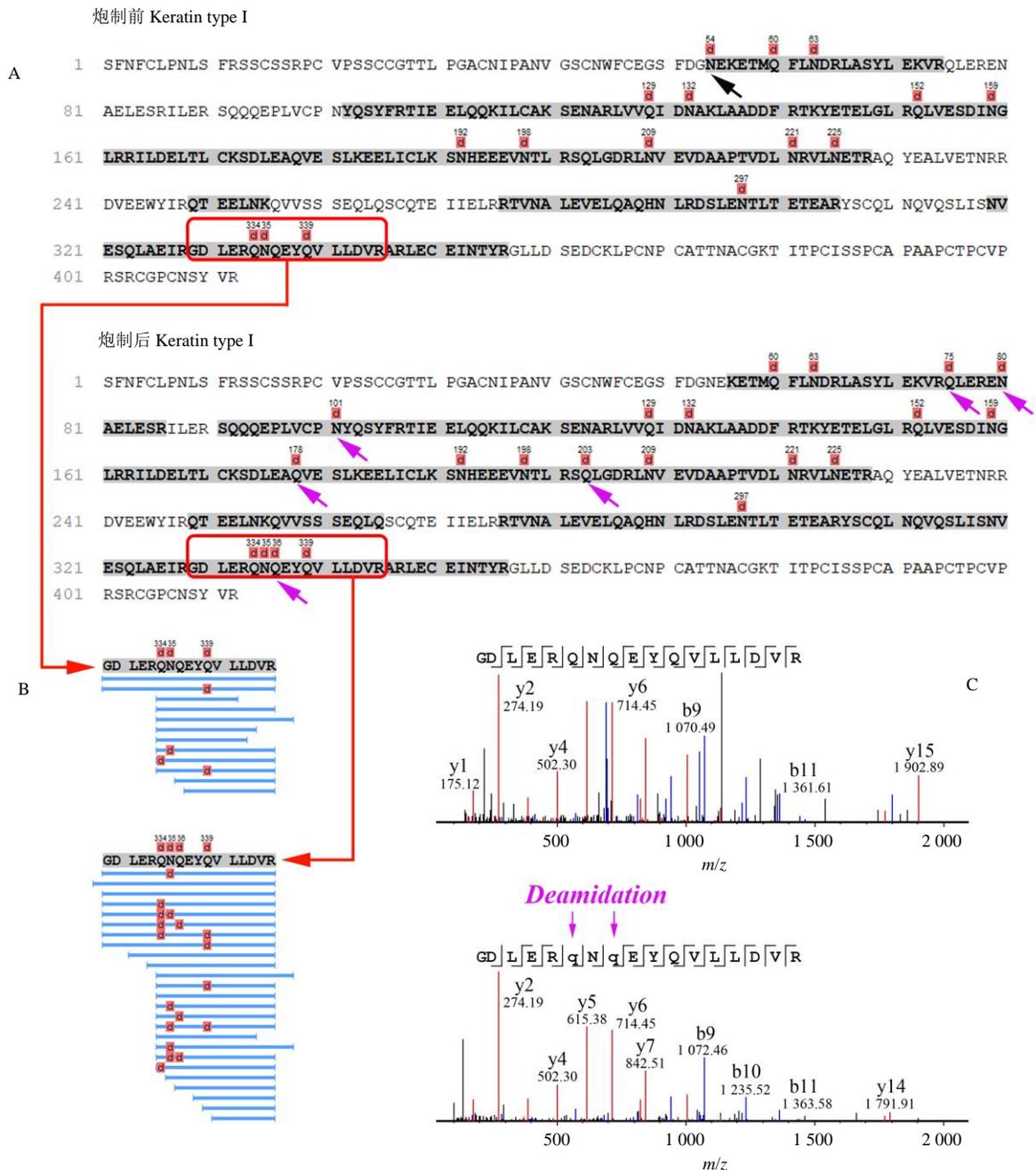
蛋白类型	样品	每 100 个肽段中含 PTMs 的 PSM 数		覆盖率/%	肽段	唯一肽段
		脱酰胺	氧化			
I 型角蛋白	MSs	143.2±16.8	27.5± 0.5	56.3±3.3	82.3±4.2	37.7±1.7
	MSp	141.6±25.9	24.1± 9.9	47.0±5.7	34.3±5.2	14.3±1.7
	PMSs	314.5±45.5**	27.0± 7.0	59.7±3.9	103.0±2.9**	40.3±1.2
	PMSp	397.6±65.2##	39.1± 2.1	55.7±3.7	95.0±7.1##	38.0±2.2##
II 型角蛋白	MSs	79.2± 5.0	20.0± 1.5	58.7±0.5	97.0±3.6	25.7±1.9
	MSp	77.2± 7.1	32.3±10.6	41.7±3.1	40.3±2.1	10.3±1.2
	PMSs	170.9±32.6*	19.0± 2.9	56.3±2.4	120.7±3.8**	31.7±2.1*
	PMSp	220.3±20.4##	15.2± 0.8	48.7±0.5#	111.7±5.0##	32.0±3.3##

与 MSs 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 MSp 比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs MSs; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs MSp

以 I 型角蛋白炮制前后的变化为例说明脱酰胺位点、肽段数量、PSM 及肽段序列的差异。如图 3 所示,紫色箭头表示炮制后的 I 型角蛋白较炮制前新出现的脱酰胺修饰位点,包括 Gln₇₅、Asn₈₀、Asn₁₀₁、Gln₁₇₈、Gln₂₀₃ 与 Gln₃₃₆。以胰蛋白酶酶切后形成的肽段 GDLERQNQEYQVLLDVR 为例,在炮制前的样品中,仅测到 GDLERQNQEYQVLLDVR 与 GDLERQNQEYQ(+0.98)VLLDVR 2 条肽段;而炮制后的样品中,测到了序列相同但是含有不同脱酰胺修饰的肽段共 7 个,除了炮制前检测到的肽段 GDLERQNQEYQVLLDVR 与 GDLERQNQEYQ(+0.98)VLLDVR 外,还包括 GDLERQN(+0.98)QEYQVLLDVR、GDLERQ(+0.98)NQEYQVLLDVR、

GDLERQ(+0.98)N(+0.98)QEYQVLLDVR、GDLERQ(+0.98)NQ(+0.98)EYQVLLDVR 与 GDLERQ(+0.98)NQEYQ(+0.98)VLLDVR,分别在 Gln₃₃₄、Asn₃₃₅、Gln₃₃₆ 及 Gln₃₃₉ 发生了不同组合的脱酰胺修饰。如图 3-C 所示,比较 MS/MS 图谱可以看出,根据 b 离子或 y 离子的偏差,可准确计算出脱酰胺修饰的位点,序列 GDLERQNQEYQVLLDVR 的 b₅⁺、b₆⁺、b₇⁺、b₈⁺、b₉⁺分别为 571.29、699.34、813.39、941.44、1 070.49;而序列 GDLERQ(+0.98)NQ(+0.98)EYQVLLDVR 的 b₅⁺、b₆⁺、b₇⁺、b₈⁺、b₉⁺分别为 571.29、700.33、814.37、943.41、1 072.46,两者 (b₆⁺-b₅⁺) 值分别为 128.05 与 129.04,表明肽段的 6 位 Gln 发生了修饰,两者 (b₇⁺-b₆⁺) 值相同,



A-I 型角蛋白炮制前后脱酰胺修饰位点比较, 紫色箭头表示脱酰胺修饰的差异位点; B-以 Gln₃₃₆ 差异位点为例, 含有脱酰胺修饰的肽谱匹配对比; C-炮制前后肽段 Gln₃₃₄ 与 Gln₃₃₆ 位点发生脱酰胺修饰的对比

A-comparison of deamidation sites on Keratin type I before and after processing, purple arrows represent the sites; B-take Gln₃₃₆ site for example, the comparison of PSM contained deamidation; C-comparison of deamidation occurred on Gln₃₃₄ and Gln₃₃₆ sites of Keratin type I before and after processing

图 3 炮制前后 I 型角蛋白脱酰胺修饰比较

Fig. 3 Comparison of deamidation on Keratin type I before and after processing

表明 7 位 Asn 未发生修饰, (b₈⁺-b₇⁺) 值分别为 128.05 与 129.04, 则表明 8 位 Gln 也发生了修饰, 从而明确脱酰胺修饰的位点。图 3 结果表明炮制后角蛋白修饰数量显著增加, 相同氨基酸序列上发生不同位点修饰使得肽段鉴定数量也明显增加。

2.6 穿山甲肽段相对分子质量与亲疏水性分布的对比分析

对 MS 与 PMS 样品中鉴定的全部肽段的相对分子质量 (molecular weight, *M_w*) 与亲疏水性 (hydropathicity) 分布进行比较分析, 亲疏水性以

grand average of hydropathicity (GRAVY) 值表示, GRAVY 为负值则表示该结构单元亲水, 正值则表明疏水。结果如图 4 所示, M_w 分布方面, 除了 MSp 的肽段数量在 <800 部分较高 (19.5%) 与 >2 000 部分较低 (7.3%) 外, MSs、PMSs 与 PMSp 肽段的 M_w 分布基本一致, 即 <800 部分占比为 11.8%~14.8%, 800~1 000 部分为 16.8%~17.2%, 1 000~1 500 部分为 38.6%~40.8%、1 500~2 000 部分为 15.4%~17.7%, >2 000 部分为 13.2%~14.2%。穿山甲肽段的亲疏水性分布也基本一致, MSs 与 MSp 中亲水性肽段比例分别为 64.5%与 62.7%, 稍低于 PMSs 与 PMSp 的 66.4%与 66.3%。总的说来穿山甲炮制前后样品鉴定肽段的相对分子质量与亲疏水性分布无明显差别, 表明炮制过程对蛋白质及肽段亲疏水性无影响。

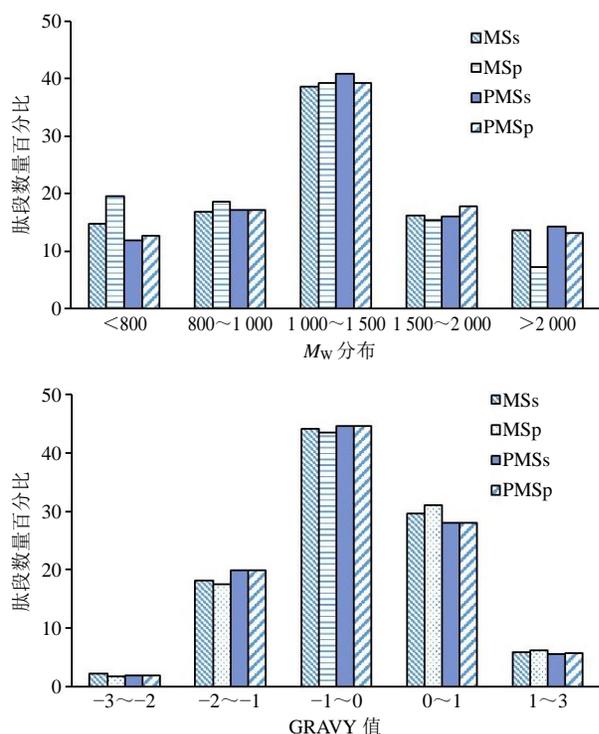


图 4 穿山甲肽段的相对分子质量分布与 GRAVY 值分布
Fig. 4 MW and GRAVY distribution of identified peptides from *Manis Squama* samples

3 讨论

角蛋白作为外胚层细胞的结构蛋白, 广泛存在于生物体的组织结构中, 是结缔组织极其重要的结构蛋白质, 起着保护机体的作用^[13-14]。穿山甲的蛋白质类物质基础主要由角蛋白、连接蛋白、桥粒蛋白等结构蛋白以及促进角质致密结构形成的异构酶类组成。角蛋白等结构蛋白稳定性好, 水溶性差,

因此穿山甲以结构蛋白为主的物质基础难以溶出释放发挥功效^[15]。传统用法及中医临床使用时, 通常穿山甲生品不入药, 需炮制后方可入药。为此, 本实验基于“蛋白质组-修饰组”结合的研究思路与方法, 系统比较研究穿山甲炮制前后蛋白质、肽类成分的变化, 深入阐释了炮制过程对氨基酸修饰的影响, 以期从蛋白质类成分变化的角度阐释穿山甲炮制规律及可能机制^[16]。

本实验以穿山甲炮制前后样品为研究对象, 经过蛋白质提取、酶切、LC-MS/MS 分析鉴定后, 获得穿山甲与炮山甲全部酶解肽段序列及 PTMs 信息, 对脱酰胺修饰进行了全面系统的分析与比较, 研究穿山甲炮制过程中脱酰胺修饰的规律。前期研究报道炮制可促进穿山甲一系列活性环二肽的形成, 本实验通过比较蛋白质炮制前后的组成与修饰的差异探讨炮制的规律与影响。

炮制对穿山甲的影响包括: (1) 尽管炮制对穿山甲可溶性蛋白质无明显影响, 但可显著降低药渣中难溶性蛋白质数量, 这可能有利于穿山甲可溶蛋白的溶出; (2) 炮制可显著提高穿山甲蛋白质、肽类成分的脱酰胺修饰数量, 显著提高角蛋白类结构蛋白肽段的鉴定数量, 提高角蛋白 Asn 与 Gln 的脱酰胺修饰数量。本研究从蛋白质修饰的角度探讨了炮制对穿山甲物质基础的影响, 高温炮制使 Asn 与 Gln 转变成 Asp 与 Glu, $-NH_2$ 转变为 $-OH$, 提高穿山甲中以角蛋白为主的结构蛋白的肽段鉴定数量, 结果提示, 穿山甲的炮制可能通过增加蛋白质修饰的发生促进蛋白质、肽类成分的溶出与释放, 然而修饰肽段相对含量、修饰发生的阶段与发生机制仍不明确, 有待后续进一步深入研究。

炮制对穿山甲蛋白质类成分的变化也可能影响传统功效的发挥, 通过本实验的系统研究, 对揭示穿山甲功效物质基础提出了新的研究思路, 也为穿山甲替代资源的寻找与评价研究提供新的方法, 具有重要的理论和现实意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 吴芝园, 巢建国, 刘 逊. 四种穿山甲属动物的生药学研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(2): 25-28.
- [3] 尹 艳, 刘 逊, 王 兵, 等. 中药穿山甲的 DNA 分子鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2078-2084.
- [4] 王 妍, 张国民, 哈 伟. 穿山甲应用及炮制研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(3): 280-284.

- [5] 刘 逊, 庞博文, 王亚琼, 等. HPLC 法同时测定穿山甲炮制品中 3 个主要环二肽成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(8): 1450-1456.
- [6] 刘 逊, 汪明志, 吴芝园, 等. 不同炮制火候对砂炒穿山甲性状和环二肽类成分的影响 [J]. 中药材, 2019, 42(4): 778-781.
- [7] 刘 逊, 张华峰, 刘雪梅, 等. 4 种不同基原穿山甲炮制品的鉴定 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 585-588.
- [8] 刘 逊, 刘 睿, 赵呈雷, 等. 穿山甲高温砂炒炮制增效机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1603-1609.
- [9] Luo J Y, Yan D, Zhang D, *et al.* Substitutes for endangered medicinal animal horns and shells exposed by antithrombotic and anticoagulation effects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136(1): 210-216.
- [10] Mann M, Jensen O N. Proteomic analysis of post-translational modifications [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 255-261.
- [11] 刘 睿, 赵 明, 段金廛. 基于“蛋白质/肽组学-修饰组学”研究动物药功效物质基础的思路与方法 [J]. 药学学报, 2020, [2020-03-13]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2019-1035>.
- [12] Liu R, Wang F, Huang Q, *et al.* Available sustainable alternatives replace endangered animal horn based on their proteomic analysis and bio-effect evaluation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36027.
- [13] Wang B, Yang W, Sherman V R, *et al.* Pangolin Armor: overlapping, structure, and mechanical properties of the keratinous scales [J]. *Acta Biomater*, 2016, 41: 60-74.
- [14] Shavandi A, Silva T H, Bekhit A A, *et al.* Keratin: dissolution, extraction and biomedical application [J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(9): 1699-1735.
- [15] 贾如琰, 何玉凤, 王荣民, 等. 角蛋白的分子构成、提取及应用 [J]. 化学通报, 2008(4): 265-271.
- [16] 杨 彬, 高文远, 张艳军. 基于转录组学-蛋白质组学-多肽组学整合关联分析策略的动物药蛋白多肽类成分研究思路及方法 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1033-1038.