

基于多肽组学的美洲大蠊肽类组分分析及促创面修复活性多肽筛选

廖倩¹, 庞兰¹, 石金凤^{1,2}, 李佳鑫¹, 钟雪梅¹, 傅超美¹, 耿福能^{3*}, 章津铭^{1*}

1. 成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室, 省部共建西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137
2. 成都医学院, 四川 成都 610500
3. 四川好医生攀西药业有限责任公司 药用美洲大蠊四川省重点实验室, 四川 凉山 615000

摘要: **目的** 鉴定美洲大蠊 *Periplaneta americana* 中丰富的多肽类成分, 寻找具有促创面修复活性多肽。**方法** 通过超滤技术从美洲大蠊中初步提取多肽成分, 使用超高效液相色谱-高分辨质谱联合技术快速纯化鉴定多肽的氨基酸序列, 使用 PeptideRanker 在线工具对鉴定多肽进行活性预测, 应用 Autodock 4.2 分子对接软件初步预测鉴定多肽与创面修复相关靶蛋白结合作用强弱, 最后通过体外实验验证筛选肽段的活性。**结果** 共鉴定出属于 34 个前体蛋白的 449 个多肽序列, 选择相对丰度和评分较高的 5 条多肽, 氨基酸序列分别为 AGFAGDDAPR、DFIR、PGPIN、IGF、TLF, 分子对接结果分析发现 DFIR、PGPIN、IGF、TLF 与胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶、细胞内非受体酪氨酸激酶/信号转导与转录激活子、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/一氧化氮合酶等相关信号通路上的胞外信号调节激酶 2、丝裂原活化蛋白激酶、酪氨酸激酶、一氧化氮合酶等 8 个靶蛋白能够有效对接, 体外实验结果表明在 0.1~10 μmol/L 浓度下, 合成的 DFIR、PGPIN、IGF、TLF 对人脐静脉内皮 HUVEC 细胞和小鼠成纤维 L929 细胞 2 种细胞模型的增殖和迁移有不同程度的促进作用, 说明 DFIR、IGF、PGPIN 及 TLF 具有潜在的促创面修复活性。**结论** 超高效液相色谱-高分辨质谱联合技术为美洲大蠊多肽类成分的分析鉴定提供有力的支持, 多肽的分析鉴定同时为美洲大蠊促创面修复活性成分的探索提供了新的思路。

关键词: 美洲大蠊; 多肽; 超高效液相色谱-高分辨质谱联合技术; 多肽组学; 创面修复活性; 增殖; 迁移

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)07-2085-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.018

Analysis of peptide components of *Periplaneta americana* based on peptomics and screening of peptides for promoting wound repair

LIAO Qian¹, PANG Lan¹, SHI Jin-feng^{1,2}, LI Jia-xin¹, ZHONG Xue-mei¹, FU Chao-mei¹, GENG Fu-neng³, ZHANG Jin-ming¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Characteristic Traditional Chinese Medicine Resources Jointly Built by the Province and the Ministry, Key Laboratory of Standardization of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Pharmacy School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China
3. Key Laboratory of Sichuan Province for Medicinal *Periplaneta Americana*, Good Doctor Pharmaceutical Group, Chengdu 610032, China

Abstract: Objective To identify the abundant peptides in *Periplaneta americana* (PA) and search for peptides with the activity of promoting wound repair. **Methods** Peptide components were extracted preliminarily from PA by ultrafiltration technology, and the amino acid sequence of the peptides were quickly purified and identified using the combined technology of ultra-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. PeptideRanker online tool was used to predict the activity of the peptides, and the Autodock 4.2 molecular docking software was used to predict and identify the binding effect of the peptides with the target

收稿日期: 2021-10-13

基金项目: 国家药品监督管理局中药材质量检测评价重点实验室开放课题: 基于多肽组学的动物药美洲大蠊药材质量评价体系(2020NMPA-CDDC01)

作者简介: 廖倩, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物新制剂、新剂型与新技术。Tel: 18408287854 E-mail: 1825095269@qq.com

*通信作者: 章津铭, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药新制剂与新剂型研究。Tel: 13551043885 E-mail: cdutcmzjm@126.com

耿福能, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药新制剂与新剂型研究。Tel: (028)61800231 E-mail: haoyishenggnf1956@126.com

proteins related to wound repair. Finally, the activity of the screened peptides was verified through experiments *in vitro*. **Results** A total of 449 peptide sequences belonging to 34 precursor proteins were identified, and five peptides with higher intensity and scores were selected, the amino acid sequences were AGFAGDDAPR, DFIR, PGPIN, IGF and TLF, respectively. Analysis of molecular docking results showed that DFIR, PGPIN, IGF and TLF were effectively docked with 8 target proteins including extracellular regulated protein kinases 2, mitogen-activated protein kinase, Janus kinase 2, and endothelial nitric oxide synthase in extracellular regulated protein kinases/mitogen-activated protein kinase, Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B/endothelial nitric oxide synthase and other related signaling pathways. Meanwhile, the results showed that the Synthetic DFIR, PGPIN, IGF and TLF at the concentration of 0.1—10 $\mu\text{mol/L}$ had different promotion effects on the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and mouse fibroblasts (L929) cell models. It indicated that the four peptides of DFIR, IGF, PGPIN and TLF may have an impact on wound repair. **Conclusion** The combined technology of ultra-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry provided strong support for the analysis and identification of the peptide components of PA. The analysis and identification of peptides also provided new ideas for the exploration of the active ingredients of PA to promote wound repair.

Key words: *Periplaneta americana* (L.); peptides; the combined technology of ultra-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry; peptidomics; wound repair activity; proliferation; migration

传统动物类中药美洲大蠊 *Periplaneta americana* (L.)为昆虫纲有翅亚纲蜚蠊目蜚蠊科大蠊属昆虫, 又称“蜚蠊”, 是现今最古老、适应性和生命力最强的昆虫类动物之一, 是蟑螂中目前能入药的唯一品种。美洲大蠊作为药用, 始载于《神农本草经》, 主血瘀癥坚寒热, 破积聚, 喉咽痹, 内寒, 无子^[1]。现代研究表明其具有抗炎、抗肿瘤、促进组织修复、保肝、抗氧化等多种药理作用^[2-3], 在我国白族和彝族民间素有将美洲大蠊“研末外敷”作为金创药用于治疗各种创伤的用法, 美洲大蠊全虫超微细粉(美洲大蠊精粉)也被广泛用于组织修复^[4]。以美洲大蠊为原料制备所得的单味成方制剂康复新液, 临床用于瘵血阻滞、胃痛出血、胃及十二指肠溃疡等体表、腔道创面治疗已有 40 余年, 疗效显著。20 世纪 80 年代, 用于对越自卫反击战中受伤士兵的创面治疗, 被授予“全军优质产品”称号。现代研究表明, 美洲大蠊中含有核苷、氨基酸、多肽、多糖等活性成分, 一般认为美洲大蠊中多元醇和氨基酸等成分具有促进血管生成、抑制炎症和增加生长因子表达等作用^[5-6]; 美洲大蠊分离所得多糖可通过促进胶原沉积、M2 巨噬细胞极化和血管生成来加速糖尿病大鼠的伤口愈合^[7]。

然而, 动物药素来被誉为“血肉有情之品”, 含有丰富的蛋白质、多肽组分。药用动物来源的多肽已被证明具有多种药理活性, 如鹿茸中含有刺激软骨生长及成骨样细胞增殖的多肽、抗炎肽、抗氧化肽等^[8]; 少棘蜈蚣中含有抗微生物肽、抗肿瘤肽、镇痛肽等^[9]。已有研究者发现美洲大蠊中多肽组分具有抗菌、神经保护、寄主防御、抗病毒、抗肝癌

等活性^[2], 有专利报道从美洲大蠊中筛选分离得到多种具有促创面修复作用的多肽组分^[10-12]。然而, 动物类药材中多肽成分复杂, 基质干扰较大, 目前多采用的柱分离等方法纯化分离效果较差, 且耗时耗力, 难以对动物药中多肽组分的结构和生物活性进行深入研究。

近年来, 基于高分辨质谱技术的多肽组学不断发展, 为动物多肽类成分研究提供了新的思路和技术支持。已有研究者将多肽组学应用于动物类中药多肽成分的鉴定, 刘睿等^[13]从海螵蛸中鉴定出来源于肌动蛋白、组蛋白、微管蛋白等蛋白的 168 个多肽类成分; 王玉团等^[14]对比羚羊角角壳和骨塞样品中的蛋白质和多肽, 发现两者蛋白质和多肽在数量和种类上均存在明显差异。本研究采用基于纳升超高效液相色谱-高分辨质谱联合分析的多肽组学技术, 对美洲大蠊中多肽组分进行高通量质谱鉴定和表征; 并通过活性预测和分子对接技术, 初步筛选与组织修复通路相关的多肽组分; 最后, 通过体外试验初步验证筛选肽段活性, 为美洲大蠊促修复多肽类活性成分的挖掘和开发利用提供新研究思路。

1 仪器与材料

Ultimate 3000 毛细管高效液相色谱仪、Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ 电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Concentrator plus 真空离心浓缩仪, 德国 Eppendorf 公司; Sartorius BP211d 分析天平, 瑞士 Sartorius 公司; Microfuge 22R Centrifuge 低温高速离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; BPH-9042 恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; D1008

掌上离心机、MX-S 涡旋仪, 美国 Scilogex 公司。

Pierce 定量比色肽分析试剂盒, 美国 Thermo Fisher Science 公司; 石油醚, 分析纯, 成都市科隆化学有限公司; 乙腈, 质谱级, Fisher Chemical 公司; 甲酸(质谱级)、碳酸氢铵(质谱级)、二硫苏糖醇(DTT, 分析纯)和碘乙酰胺(IAA, 分析纯)购自 Sigma-Aldrich 公司; DMEM 培养基和 MEM 培养基购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; 胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司; 马血清购自北京索莱宝科技有限公司; 胰酶购自博士德生物科技有限公司; CCK-8 试剂购自兰杰柯科技有限公司; 超纯水经 Millipore 纯水系统纯化; 美洲大蠊干燥虫体来自四川好医生攀西药业有限责任公司, 经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为蜚蠊科大蠊属昆虫美洲大蠊 *P. americana* (L.) 的干燥虫体。

2 方法与结果

2.1 样品前处理

2.1.1 分子筛分离 取美洲大蠊干燥虫体用打粉机粉碎过 40 目筛, 加入石油醚加热回流去除油脂, 60 °C 烘干。取 1 mg 粉末溶于 1 mL ddH₂O 配制成 1 mg/mL 样品溶液。取 300 μL 美洲大蠊虫体溶液至截留相对分子质量为 3000 的超滤管中, 于 4 °C、12 000 r/min 转速下离心 10 min, 将小于相对分子质量 3000 的多肽样品收集于 1.5 mL EP 管中, 即为美洲大蠊多肽样品(PAP)。

2.1.2 肽段定量 采用 Pierce 定量比色肽分析试剂盒对样品多肽质量浓度进行计算。具体操作如下, 配制质量浓度为 1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6 μg/mL 的标准品溶液。分别取 20 μL 标准品及样品于微孔板中, 每孔中加入 180 μL 工作试剂。在微孔板振荡器上混合 30 s 后, 于 37 °C 孵育 15 min。冷却至室温后, 在多功能酶标仪上测量 480 nm 处的吸光度(A)。制备标准曲线并计算样品质量浓度。

2.1.3 还原烷基化 取 20 μg PAP 肽段样品并加入 ddH₂O 溶液至 100 μL, 加入 DTT 溶液使其终浓度为 10 mmol/L, 于 56 °C 水浴中还原 1 h。加入 IAA 溶液使其终浓度为 50 mmol/L, 避光反应 40 min, 使用自填脱盐柱脱盐, 于 45 °C 真空离心浓缩仪中挥干溶剂。

2.2 LC-MS/MS 检测

2.2.1 毛细管液相色谱条件 Ultimate 3000 毛细管高效液相色谱仪, 预柱为 Acclaim PepMap RPLC C₁₈

(300 μm×5 mm, 5 μm), 分析柱为 Acclaim PepMap RPLC C₁₈ (150 μm×150 mm, 1.9 μm); 进样体积为 5 μL, 流动相 A 为 0.1%甲酸和 2%乙腈水溶液, 流动相 B 为 0.1%甲酸和 80%乙腈水溶液, 线性梯度洗脱: 0~2 min, 4%~8% B; 2~45 min, 8%~28% B; 45~55 min, 28%~40% B; 55~56 min, 40%~95% B; 56~66 min, 95% B; 体积流量 600 nL/min; 分析时间 66 min。

2.2.2 质谱条件 选用 Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ 质谱仪进行肽段分析。一级质谱参数: 分辨率 *m/z* 70 000; 自动增益控制(AGC)目标 3×10⁶; 最大驻留时间(IT) 40 ms; 扫描范围: *m/z* 100~1500。二级质谱参数: 分辨率 *m/z* 17 500; AGC 目标 1×10⁵; 最大 IT 60 ms; Top N: 20; 碰撞能量(NCE/stepped NCE) 27%。

使用 Byonic 软件检索, 选择美洲大蠊蛋白数据库, 检索参数设置为半胱氨酸碘乙酰化固定修饰, 甲硫氨酸氧化可变修饰, N-端乙酰化; 允许 3 个点误切; 非酶切; 其他为默认参数, 检索所得分值有显著意义(*P*<0.01), 被认定为有效鉴定结果。

2.3 美洲大蠊多肽分析及其前体蛋白鉴定

美洲大蠊经过超滤得到相对分子质量小于 3000 的多肽, 多肽质量浓度为 (3.17±0.03) μg/μL。通过 LC-MS 进行分析, 总离子流色谱图(total ion current, TIC) 如图 1 所示, 共得到 43 743 张二级质谱图, 其中鉴定出 449 条多肽的氨基酸序列, 通过美洲大蠊蛋白数据库检索出这 449 条多肽来自 34 个前体蛋白。前体蛋白及多肽数量分布如表 1 所示, 离子通道相关蛋白(A0A5J6D2E5、D0E0C1、M4N9U7、T1UL18、Q5YJT9、Q8I9V1、A0A5J6D278、A0A0K1U4A8、H6TY10、R4I597) 是前体蛋白中的主要一类蛋白, 参与美洲大蠊 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 等离子的跨膜转运过程, 离子通道蛋白的总肽段数占比 48.11%。其次为卵黄原蛋白(Q9U8M0、Q9BPS0), 为卵黄蛋白的前体及美洲大蠊胚胎和幼体早期发育主要的营养来源。

PA 鉴定肽段相对分子质量结果如图 2 所示。结果显示肽段相对分子质量的分布集中在 100~500 阶段, 相对分子质量在 1000 以下的肽段占比达到 96.88%。在鉴定的多肽中以 3 肽、4 肽和 5 肽的数量较多, 分别占 28.06%、40.98%、14.70% (图 3)。另外对鉴定肽段的末端氨基酸及连接的前导肽段/后续肽段进行分析(图 4), 鉴定肽段的 C 端分布较

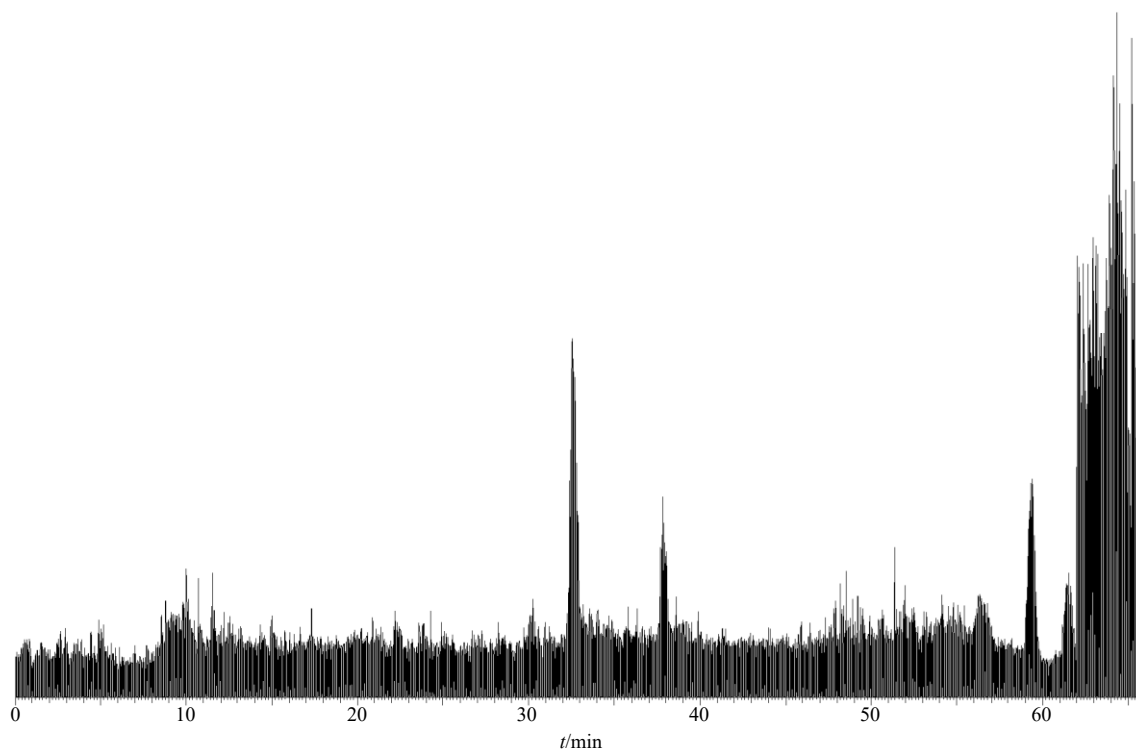


图 1 PAP 总离子流色谱图

Fig. 1 TIC of PAP

表 1 PAP 前体蛋白及鉴定肽段数汇总

Table 1 Summary of PAP precursor protein and number of identified peptides

| 蛋白质编号 | 肽段数量 | 蛋白质名称 | 蛋白质编号 | 肽段数量 | 蛋白质名称 |
|------------|------|--------------------------|------------|------|----------------------|
| A0A5J6D2E5 | 79 | 压电型机械敏感离子通道组件 | B6EBG4 | 4 | 毛蛋白 |
| D0E0C1 | 35 | 钠离子通道蛋白 | M4M1A8 | 4 | 尾蛋白 |
| M4N9U7 | 21 | 类瞬时受体电位样通道蛋白 | K7ZK01 | 10 | 20-羟基蜕皮激素受体 |
| T1UL18 | 28 | 类钾离子通道 | Q25637 | 20 | 周期昼夜节律蛋白 |
| Q5YJT9 | 15 | 瞬时受体电位 γ 阳离子通道 | A0A059WCP0 | 5 | β -半乳糖苷酶 |
| Q8I9V1 | 17 | BK 离子通道 | A0A2P0XIG6 | 1 | 转醛酶 |
| A0A5J6D278 | 11 | 离子通道蛋白 | A0A6M3QTF8 | 3 | 1-磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸磷酸二酯酶 |
| A0A0K1U4A8 | 1 | 烟碱型乙酰胆碱受体 $\beta 1$ 变体 A | A0A7G8KUX8 | 2 | 细胞色素 c 氧化酶亚基 II |
| H6TY10 | 3 | 烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 4$ 亚基 | Q5EXZ5 | 3 | 细胞色素 c 氧化酶亚基 II |
| R4I597 | 6 | 烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 1$ 亚基 | A0A2P0XIF9 | 1 | 微绒毛样蛋白过敏原 |
| Q9U8M0 | 64 | 卵黄原蛋白-1 | A0A2P0XIE9 | 6 | 丝氨酸蛋白酶突变原 |
| Q9BPS0 | 20 | 卵黄原蛋白-2 | A0A0B5ED10 | 4 | Wnt 蛋白 |
| A0A2R4CIH4 | 19 | 肌动蛋白 | B6EBG3 | 5 | Notch 蛋白 |
| A0A0K1ZFW3 | 4 | 类紫外线视蛋白 | A0A2P0XIZ1 | 1 | 肌球蛋白轻链过敏原变体 |
| V6DNI7 | 2 | 无脊椎动物型多巴胺受体蛋白 | A0A5J6D2C6 | 17 | 触觉转导离子通道 |
| V6DQH9 | 18 | 代谢型 GABA-B 受体亚型 2 | I7C6J7 | 4 | 酪胺 β 羟化酶 |
| M4GWU0 | 10 | D2 样多巴胺受体 | D0UT69 | 6 | ThiF 结构域蛋白 |

多的氨基酸残基依次为甘氨酸 (G)、丝氨酸 (S)、丙氨酸 (A)、苏氨酸 (T); N 端分布最多的氨基酸为丝氨酸 (S), 其次为丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)、苏氨酸 (T); 鉴定肽段的前导肽段和后续肽段的氨

基酸残基分布也很广泛, 说明美洲大蠊体内分布多种类型的剪切酶作用在不同的位点。进一步对氨基酸的亲水性进行分析 (图 5), 通过统计亲水性氨基酸共出现 996 次, 包括丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、

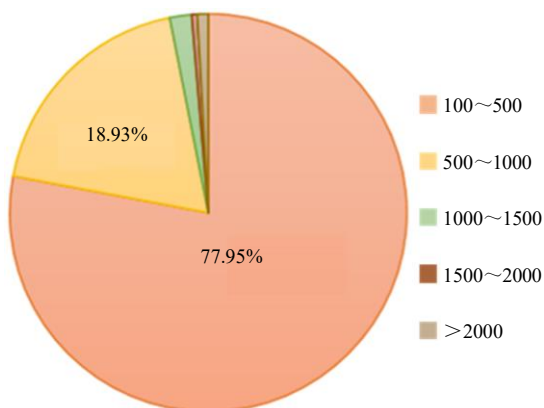


图2 PAP 相对分子质量分布情况

Fig. 2 Molecular weight distribution of PAP

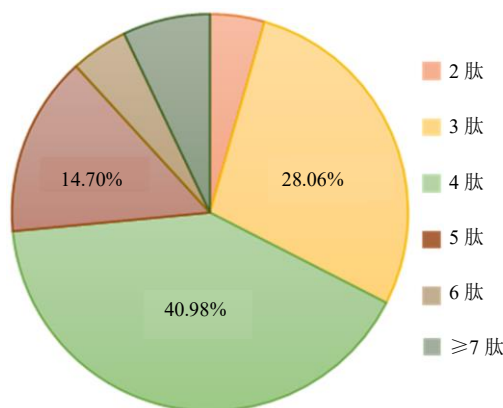
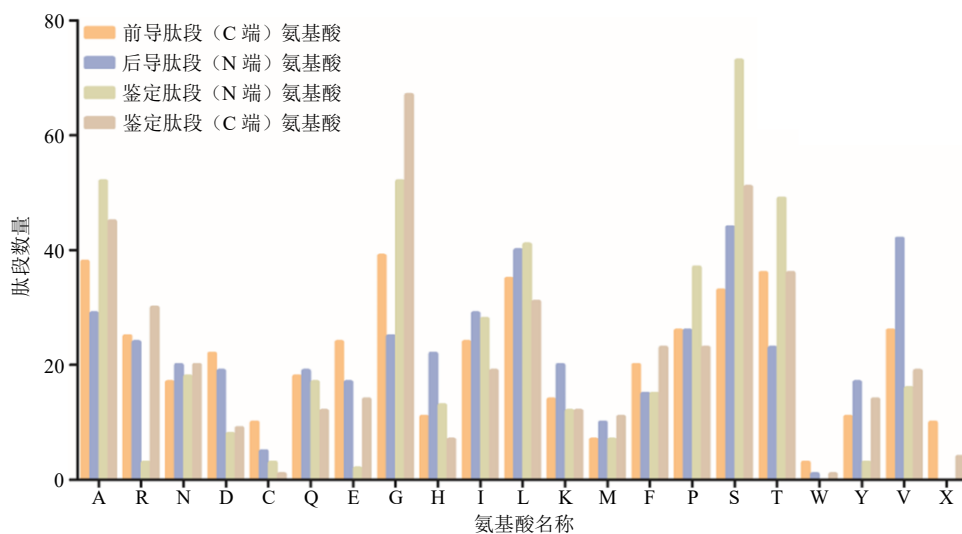


图3 不同种类 PAP 分布情况

Fig. 3 Distribution of different types of PAP



A-丙氨酸 R-精氨酸 N-天冬酰胺 D-天冬氨酸 C-半胱氨酸 Q-谷氨酰胺 E-谷氨酸 G-甘氨酸 H-组氨酸 I-异亮氨酸 L-亮氨酸 K-赖氨酸 M-甲硫氨酸 F-苯丙氨酸 P-脯氨酸 S-丝氨酸 T-苏氨酸 W-色氨酸 Y-络氨酸 V-缬氨酸 X-未知氨基酸, 图5同

A-alanine R-arginine N-asparagine D-aspartate C-cysteine Q-glutamine E-glutamic acid G-glycine H-histidine I-isoleucine L-leucine K-lysine M-methionine F-phenylalanine P-proline S-serine T-threonine W-tryptophan Y-lysine V-valine X-unknown amino acid, same as Fig 5

图4 PAP 末端氨基酸分布情况

Fig. 4 Distribution of amino acids at end of PAP

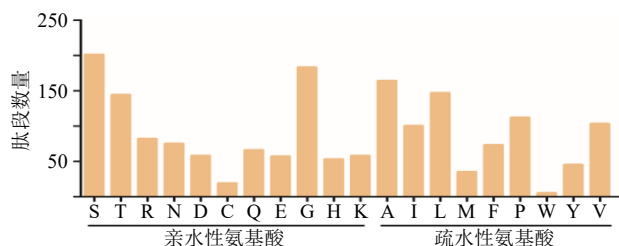


图5 PAP 中亲水性/疏水性氨基酸统计结果

Fig. 5 Statistical results of hydrophilic/hydrophobic amino acids in PAP

精氨酸 (R)、天冬酰胺 (N)、天冬氨酸 (D)、半胱氨酸 (C)、谷氨酰胺 (Q)、谷氨酸 (E)、甘氨酸 (G)、组氨酸 (H)、赖氨酸 (K); 疏水性氨基酸共出现 784 次, 包括丙氨酸 (A)、异亮氨酸 (I)、亮

氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、苯丙氨酸 (F)、脯氨酸 (P)、色氨酸 (W)、络氨酸 (Y)、缬氨酸 (V), 说明美洲大蠊中相对分子质量小于 3000 的多肽更偏向于亲水性。

2.4 多肽筛选及活性预测

通过美洲大蠊蛋白数据库共检索出 449 条肽段, 其中评分 ≥ 100 的肽段共有 29 条, 相对丰度 > 0 的多肽共有 220 条, 同时满足相对丰度大于 0 及评分大于 100 的肽段共有 13 条。使用在线工具 PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 对这 13 条肽段的生物活性进行预测, 活性评分高于 0.5 则被标记为具有生物活性, 13 条多肽的氨基酸序列及评分结果如表 2 所示, 评分大于 0.5 的肽段

表 2 PAP 活性评分结果

Table 2 Activity score results of PAP

| 肽段氨基酸序列 | 评分 | 肽段氨基酸序列 | 评分 |
|------------|-----------|---------|-----------|
| IGF | 0.948 319 | VMVL | 0.219 242 |
| TLF | 0.743 966 | LVL | 0.174 931 |
| DFIR | 0.697 692 | LNSI | 0.144 604 |
| PGPIN | 0.649 743 | LGLSER | 0.126 928 |
| AGFAGDDAPR | 0.561 859 | TAPSK | 0.124 739 |
| VGRPR | 0.461 116 | ITIIK | 0.099 899 |
| LILR | 0.334 562 | | |

共有 5 条, 氨基酸序列分别为 IGF、TLF、DFIR、PGPIN、AGFAGDDAPR。将这 5 条肽段的氨基酸序列输入 BIOPEP 数据库 (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) 搜索是否有相匹配的已知功能肽段, 结果并未搜索到相匹配的肽段。

2.5 分子对接

美洲大蠊具有养阴生肌的功效, 在烧烫伤、慢性创面、溃疡等多种创面上应用发挥功效, 为了预测多肽是否为美洲大蠊用于创面修复的活性成分, 课题组选择了几个与炎症相关的通路蛋白, 分别为胞外信号调节激酶 2 (extracellular regulated protein kinases 2, ERK2)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、酪氨酸激酶 (Janus kinase 2, JAK2) 及与血管生成相关的通路蛋白, 分别为胞内磷脂酰肌醇激酶 (phosphoinositide 3-kinase α , PI3K- α)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOs)、血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 作为靶蛋白^[15-18]。使用 PDB 蛋白数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 搜索靶蛋白, 下载 PDB 格式的 2D 结构文件。使用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索氨基酸, 下载 sdf 格式的 2D 结构文件^[19]。通过 ChemDraw 19.0 软件将氨基酸连接成多肽序列并使用 Chem3D 19.0 软件获得多肽的 3D 结构文件, 选择最低能量构象并保存为 mol 格式文件。采用 AutoDock 软件包 (Molecular Graphics Laboratory of The Scripps Research Institute, Version 1.5.6 Sep-17-14) 对靶蛋白及多肽进行前处理后使用拉马克遗传算法 (Lamarckian genetic algorithm) 进行分子对接, 遗传算法中所有参数均为默认值。

分子对接结果如表 3 所示, 结合能 (binding

energy) 小于 0 kJ/mol 为有效对接, 该值越小说明多肽与靶蛋白的相互作用越稳定。AGFAGDDAPR 与所有靶标蛋白结合后结合能几乎都大于 0 kJ/mol, 说明它与靶标蛋白不能有效对接。DFIR 与 ERK2、MAPK、JAK2、VEGFR2、PKC 结合能小于 0 kJ/mol。其他 3 种多肽和 8 个靶蛋白都能有效结合, PGPIN 与 VEGFR2 的结合能小于 -17 kJ/mol, IGF 与 ERK2、MAPK、JAK2、PKC 的结合能小于 -20 kJ/mol, TLF 与 ERK2、PKC 的结合能小于 -20 kJ/mol。TLF 与 PKC 蛋白的结合能最小, 为 -28.92 kJ/mol, 通过 Pymol 软件构建 TLF 与 PKC 蛋白的结合能最小的 3D 结合模型, 如图 6 所示, TLF 可以与 PKC 蛋白的 4 个位点 (LYS393、GLY392、ASP419、ASP421) 的氨基酸残基形成氢键, 产生较强结合力。

2.6 促创面修复活性初步考察

2.6.1 细胞培养 人脐静脉内皮 HUVEC 细胞用含有 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青霉素-链霉素 (PS) 的 DMEM 培养基培养。小鼠成纤维 L929 细胞用含有 10% 马血清、1% PS 的 MEM 培养基中培养。细胞在 37 °C 的含有 5% CO₂ 培养箱中孵育, 当传至 3~8 代时用于接下来的试验。

2.6.2 肽段合成 将筛选得到的肽段 TLF、IGF、PGPIN、DFIR, 由上海波泰生物科技有限公司进行合成, 得到 4 个肽段样品 (质量分数 > 95%)。

2.6.3 细胞增殖实验 HUVEC、L929 细胞分别以 5×10^3 个/孔的密度种在 96 孔板上, 在培养箱中过夜使其贴壁。吸除原有培养基, 每个孔分别加入 100 μ L 新鲜的含有不同浓度 (0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μ mol/L) TLF、IGF、PGPIN、DFIR 肽段的培养基。在培养箱中孵育 24 h 后吸除含药培养基, 每孔加入 100 μ L 含有 10 μ L CCK8 试剂的培养基, 避光处理 0.5 h, 用酶标仪测定其在 450 nm 波长下的吸光度 (A) 值。同时设对照组 (添加培养基)。计算不同浓度下的细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_0 - A_n) / A_0$$

A_0 表示对照组的吸光度值, A_n 表示不同肽段 n 浓度的吸光度值

结果如表 4、5 所示。在 0.1~10.0 μ mol/L 浓度下, TLF 和 IGF 2 个肽段对 HUVEC 细胞增殖没有显著性的促进作用, PGPIN 的浓度与 HUVEC 细胞增殖呈现正相关, 在 10.0 μ mol/L 浓度下可显著促进 HUVEC 细胞增殖 ($P < 0.05$)。DFIR 浓度在 0.1、

表 3 PAP 和靶蛋白相互作用结果

Table 3 Results of interaction between PAP and target protein

| PDB ID | 对接蛋白 | 肽段氨基酸序列 | 结合能/(kJ·mol ⁻¹) | PDB ID | 对接蛋白 | 肽段氨基酸序列 | 结合能/(kJ·mol ⁻¹) |
|--------|----------------|------------|-----------------------------|--------|--------|------------|-----------------------------|
| 1HZM | ERK2 | AGFAGDDAPR | >0 | 3D0E | Akt2 | AGFAGDDAPR | >0 |
| | | DFIR | -3.73 | | | DFIR | >0 |
| | | IGF | -21.39 | | | IGF | -11.34 |
| | | PGPIN | -17.96 | | | PGPIN | -4.86 |
| | | TLF | -21.05 | | | TLF | -11.09 |
| 4D3R | MAPK | AGFAGDDAPR | >0 | 3NOS | eNOs | AGFAGDDAPR | >0 |
| | | DFIR | -15.99 | | | DFIR | >0 |
| | | IGF | -21.10 | | | IGF | -15.82 |
| | | PGPIN | -11.72 | | | PGPIN | -2.55 |
| | | TLF | -15.24 | | | TLF | -13.77 |
| 3UGC | JAK2 | AGFAGDDAPR | >0 | 3VHE | VEGFR2 | AGFAGDDAPR | >0 |
| | | DFIR | -4.56 | | | DFIR | -4.48 |
| | | IGF | -20.97 | | | IGF | -12.10 |
| | | PGPIN | -9.04 | | | PGPIN | -17.16 |
| | | TLF | -19.80 | | | TLF | -15.74 |
| 3QK0 | PI3K- α | AGFAGDDAPR | >0 | 1XJD | PKC | AGFAGDDAPR | >0 |
| | | DFIR | >0 | | | DFIR | -3.31 |
| | | IGF | -11.34 | | | IGF | -23.78 |
| | | PGPIN | -9.96 | | | PGPIN | -14.90 |
| | | TLF | -16.07 | | | TLF | -28.92 |

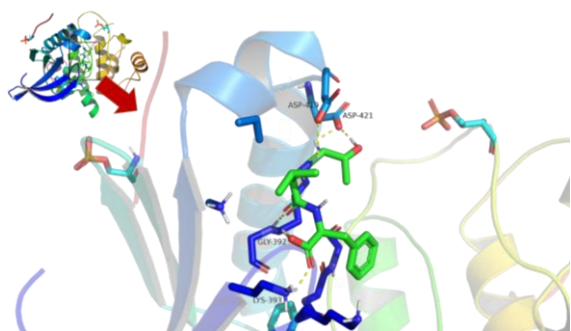


图 6 多肽 TLF 与靶蛋白 PKC 的结合位点

Fig. 6 Binding site of peptide TLF and target protein PKC

0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可显著促进 HUVEC 细胞增殖 ($P < 0.05$)。在 0.1~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, IGF 和 DFIR 2 个肽段对 L929 增殖没有显著性影响, 但 TLF 在 0.1、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下能显著促进 L929 细胞的增殖 ($P < 0.05$), PGPIN (1.0 $\mu\text{mol/L}$) 能显著促进 L929 细胞的增殖 ($P < 0.05$)。

2.6.4 细胞划痕试验 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种在 12 孔板上, 培养箱中过夜使其贴壁。吸除原有培养基, 用 200 μL 枪头在孔板底部划一条直线, PBS 清洗 2~3 次除去划掉的死细胞, 分别加入含

表 4 TLF、PGPIN、IGF、DFIR 孵育 24 h 后对 HUVEC 细胞增殖影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effects of TLF, PGPIN, IGF and DFIR on HUVEC proliferation after 24 h treatment ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 肽段氨基酸序列 | 细胞增殖率/% | | | | | |
|---------|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| | 对照 | 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| TLF | 102.15 \pm 3.43 | 95.59 \pm 2.15 | 95.43 \pm 6.94 | 111.20 \pm 10.97 | 99.50 \pm 12.67 | 99.01 \pm 11.66 |
| PGPIN | 102.15 \pm 3.43 | 102.27 \pm 6.01 | 101.68 \pm 7.09 | 112.27 \pm 12.97 | 112.68 \pm 4.48 | 119.33 \pm 5.99* |
| IGF | 102.15 \pm 3.43 | 91.60 \pm 9.71 | 101.39 \pm 5.31 | 94.46 \pm 5.94 | 101.17 \pm 8.48 | 97.96 \pm 3.47 |
| DFIR | 102.15 \pm 3.43 | 121.91 \pm 15.79* | 121.89 \pm 19.11* | 106.10 \pm 8.20 | 96.66 \pm 6.17 | 90.58 \pm 3.94 |

与对照组比较: * $P < 0.05$, 表 5~7 同

* $P < 0.05$ vs control group, same as tables 5-7

表 5 TLF、PGPIN、IGF、DFIR 孵育 24 h 后对 L929 细胞增殖影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effects of TLF, PGPIN, IGF and DFIR on L929 proliferation after 24 h treatment ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 肽段氨基酸序列 | 细胞增殖率/% | | | | | |
|---------|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| | 对照 | 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| TLF | 100.88 ± 6.12 | 122.17 ± 4.35* | 107.06 ± 7.3 | 123.56 ± 9.58* | 114.93 ± 13.41* | 97.21 ± 10.74 |
| PGPIN | 100.88 ± 6.12 | 113.38 ± 10.19 | 112.60 ± 11.78 | 115.40 ± 11.88* | 106.15 ± 1.64 | 112.85 ± 7.90 |
| IGF | 100.88 ± 6.12 | 97.25 ± 6.12 | 93.55 ± 4.45 | 96.76 ± 7.28 | 100.27 ± 6.93 | 108.91 ± 6.47 |
| DFIR | 100.88 ± 6.12 | 90.89 ± 4.33 | 100.34 ± 3.47 | 91.22 ± 2.48 | 107.59 ± 5.35 | 105.12 ± 14.96 |

有 TLF、IGF、PGPIN、DFIR 肽段 (1.0 $\mu\text{mol/L}$) 的低血清 (1%) 培养基, 此时间点作为 0 h。在 0、24、48 h 用显微镜在 40 倍镜下观察并拍照, 通过 Image J 1.46r 软件测定划痕面积, 计算不同时间点的划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (W_0 - W_t) / W_0$$

W_0 表示 0 h 的划痕面积, W_t 表示 t h 的划痕面积

采用划痕试验考察所筛选肽段对 HUVEC 细胞迁移的影响, 代表图片如图 7 所示, 划痕愈合率结果如表 6 所示。与对照组相比, 4 个肽段 (1 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 24 h 后, 对 HUVEC 细胞的迁移影响都不大; 处理细胞 48 h 后, IGF 能显著促进 HUVEC 细

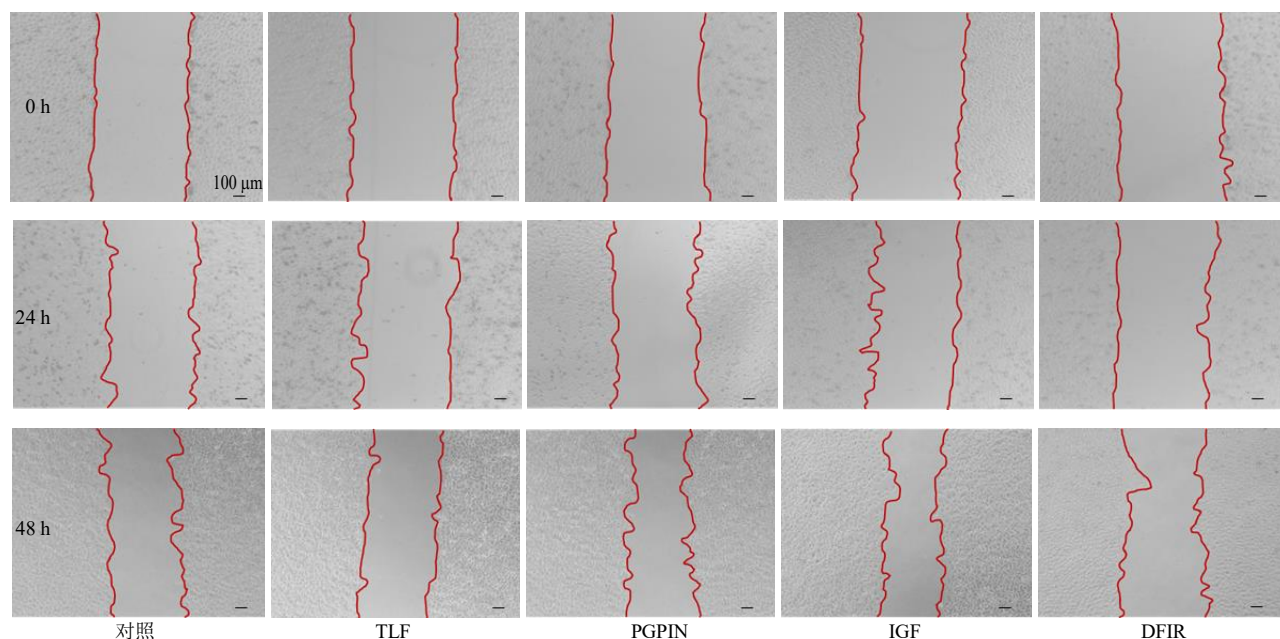


图 7 TLF、PGPIN、IGF、DFIR (1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 HUVEC 细胞划痕愈合影响代表性图片

Fig. 7 Representative images of effects of TLF, PGPIN, IGF, and DFIR (1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on scratch healing of HUVEC cells

表 6 TLF、PGPIN、IGF、DFIR (1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 HUVEC 细胞划痕愈合率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 TLF, PGPIN, IGF, DFIR (1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the scratch healing rate of HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 肽段氨基酸序列 | 划痕愈合率/% | |
|---------|--------------|---------------|
| | 24 h | 48 h |
| 对照 | 24.00 ± 8.10 | 33.58 ± 3.27 |
| TLF | 13.29 ± 0.43 | 34.08 ± 2.20 |
| PGPIN | 14.68 ± 1.73 | 37.29 ± 2.67 |
| IGF | 20.14 ± 4.33 | 44.00 ± 2.46* |
| DFIR | 10.51 ± 1.10 | 29.08 ± 2.69 |

胞的迁移 ($P < 0.05$)。

采用划痕试验验证筛选肽段对 L929 细胞迁移的影响, 代表图片如图 8 所示, 划痕愈合率结果如表 7 所示。与对照组相比, 4 个肽段 (1 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 24 h 后, 都显著促进了 L929 细胞的迁移 ($P < 0.05$); 48 h 时, PGPIN 显著促进 L929 细胞迁移作用 ($P < 0.05$)。由此提示, 预测筛选所得这几条多肽具有一定的促创面修复相关作用。

3 讨论

传统中医认为动物药为“血肉有情之品”和“行走通窜之物”, 是中药 3 大来源之一。据《中国动物

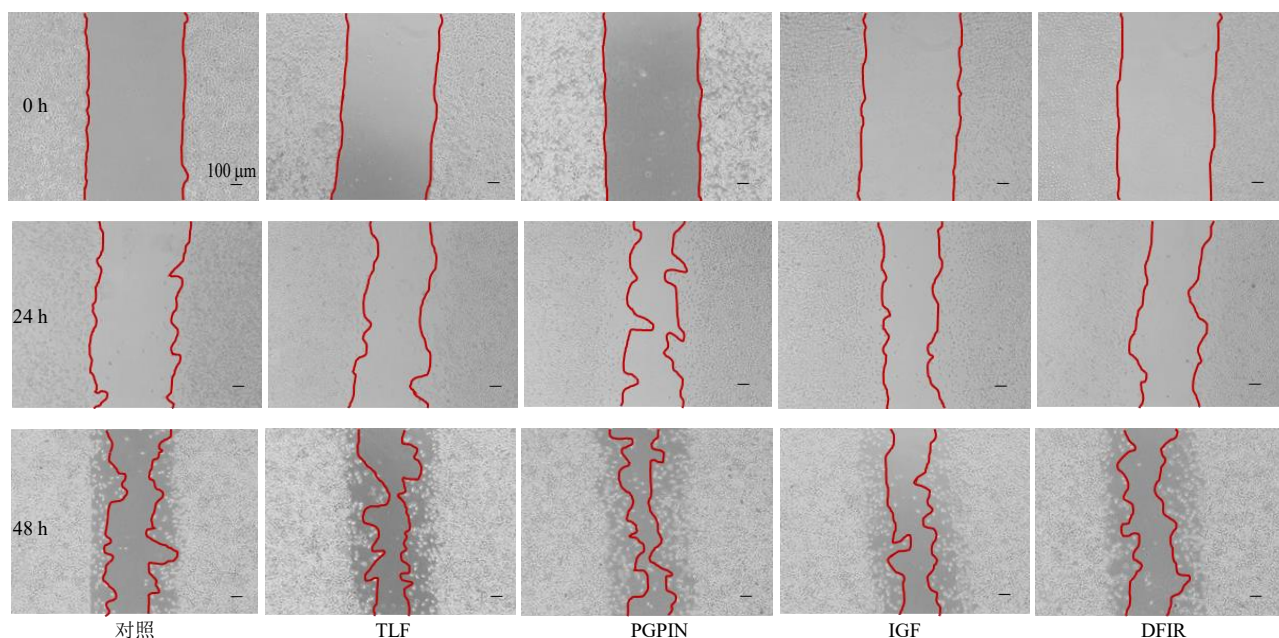


图 8 TLF、PGPIN、IGF、DFIR (1.0 μmol·L⁻¹) 对 L929 细胞划痕愈合影响代表性图片

Fig. 8 Representative images of effects of TLF, PGPIN, IGF, and DFIR (1.0 μmol·L⁻¹) on scratch healing of L929 cells

表 7 TLF、PGPIN、IGF、DFIR (1.0 μmol·L⁻¹) 对 L929 细胞划痕愈合率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 TLF, PGPIN, IGF, DFIR (1.0 μmol·L⁻¹) on scratch healing rate of L929 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 肽段氨基酸序列 | 划痕愈合率/% | |
|---------|----------------|----------------|
| | 24 h | 48 h |
| 对照 | 10.68 ± 7.19 | 39.92 ± 4.18 |
| TLF | 37.03 ± 3.50* | 58.46 ± 12.01 |
| PGPIN | 46.20 ± 1.46* | 59.35 ± 10.69* |
| IGF | 46.05 ± 5.32* | 58.43 ± 6.27 |
| DFIR | 37.34 ± 13.77* | 55.73 ± 2.98 |

药资源》统计,我国药用动物资源约 2215 种,约占全部中药资源的 18%。动物药在我国应用历史悠久,临床功效独特且疗效显著,在治疗某些疾病方面具有植物药无法替代的优势。动物药主要是以蛋白、多肽成分作为其活性物质基础,然而目前所采用的质控指标大多为氨基酸、核苷等小分子次生代谢产物,缺乏物种专属性,且尚不清楚与药效的关联性。目前美洲大蠊常采用的“小分子指标成分”无法代表和控制“大分子为物质基础的动物药”。

如何快速高效的分离鉴定蛋白/多肽组成和结构,是目前动物药物物质基础探析的关键。多肽的分离方法包括超临界流体萃取法、膜分离法、色谱法、电泳法及分子印迹技术等^[20-21]。超滤技术是膜分离法的一种,使用超滤膜操作简单,选择性高、能耗低,对性质相似组分有很好的分离效果,适合动物

多肽的初级分离。色谱法能够高效分离纯化多肽,是目前动物多肽分离纯化的主要技术手段。多肽分离技术的发展带动了多肽序列结构研究,多肽结构的鉴定有助于了解活性多肽作用机制,有助于促进活性多肽的开发利用。多肽鉴定方法包括 N 末端序列测定法、质谱法、核磁共振法。质谱法通过测定离子质荷比完成分析,通过质谱图确定被测物质量,具有快速、高灵敏度的优势^[22]。近年来,基于高分辨质谱技术蛋白质/多肽组学的出现,为发现和鉴定生物体蛋白/多肽提供了更加高效的方法,达到对蛋白质/多肽的快速鉴定和高通量筛选,还能用于翻译后修饰(糖基化、甲基化)的分析。将蛋白/多肽组学应用于动物药物物质基础研究,是从药用动物的整体蛋白分子水平研究其蛋白组成表达模式和功能模式,探究药用动物生长发育的规律和药效作用机制的有效方式。

创面修复是一个复杂的生理过程,包括止血期、炎症期、增殖期及重塑期。在炎症期,伤口中过多的巨噬细胞和中性粒细胞会导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度产生,ROS 的过度产生会造成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)受损及成纤维细胞的衰老。成纤维细胞是增殖期最活跃的细胞之一,通过迁移形成肉芽组织,填充伤口中缺损组织,提供新的 ECM 并产生大量胶原蛋白以增强 ECM 的拉伸强度。内皮细胞负责血管新生,是创面修复的关键环节之一,通过增殖和迁移形成

新的血管和毛细血管对再生组织的营养输送及重建血流供应至关重要^[23-24]。有研究发现美洲大蠊乙醇提取物可以显著提升 HUVEC 细胞的迁移能力及形成更丰富的毛细血管样结构并能显著提高人成纤维细胞活力呈浓度依赖性^[25]。因此,本实验采用 L929 和 HUVEC 作为细胞模型,验证筛选的肽段的创面修复活性。

本实验使用超滤膜初步分离出美洲大蠊中相对分子质量小于 3000 的多肽组分,采用毛细管高效液相色谱法对多肽进一步纯化,使用 Q-Exactive UHMR 混合四极轨道测量质谱仪鉴定出来自于美洲大蠊离子通道蛋白、卵黄蛋白原等前体蛋白的 449 个多肽序列。通过分子对接技术,预测其中的 4 条多肽(TLF、PGPIN、IGF、DFIR)能与 ERK/MAPK、JAK/STAT、PI3K/AKT/eNOS 等相关信号通路的 ERK2、MAPK、JAK2、eNOS 等 8 个靶点蛋白有效对接。通过对这 4 条多肽促进 HUVEC 和 L929 2 种细胞模型的增殖和迁移作用的考察,提示这几条多肽可能具有潜在促创面修复作用。本实验为美洲大蠊及其制剂中促修复多肽类活性成分分析提供了方法和思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 任犀然.《神农本草经》[M].北京:北京联合出版公司,2016:380.
- [2] 高阳阳,耿福能,陈思敏,等.美洲大蠊的有效成分及相关药理学研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(4):240-250.
- [3] 高洁,沈咏梅,岳碧松.美洲大蠊药理作用及其临床疗效的研究进展[J].中药药理与临床,2018,34(4):203-208.
- [4] 于福德.美洲大蠊精粉在肛周脓肿术后患者中的应用效果[J].中国民康医学,2020,32(15):98-99.
- [5] Tian M, Dong J Y, Wang Z T, et al. The effects and mechanism of Kangfuxin on improving healing quality and preventing recurrence of gastric ulcer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111513.
- [6] 吕娜,李广志,王钧箴,等.美洲大蠊化学成分及生物活性的研究进展[J].现代生物医学进展,2017,17(16):3184-3190.
- [7] Wang T, Liao Q, Wu Y H, et al. A composite hydrogel loading natural polysaccharides derived from *Periplaneta americana* herbal residue for diabetic wound healing [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 3846-3857.
- [8] 王响,鞠贵春.鹿茸多肽的研究进展[J].野生动物学报,2020,41(2):518-522.
- [9] 李钟杰,袁亚萍,王勇.少棘蜈蚣多肽药用价值的研究进展[J].中草药,2021,52(3):857-863.
- [10] 叶文才,王磊,刘忠,等.一种促进组织修复的新多肽和美洲大蠊总多肽提取物及应用:中国,CN106699849B [P].2020-06-02.
- [11] 叶文才,王磊,刘忠,等.一种促进组织修复的美洲大蠊新多肽及应用:中国,CN106977586B [P].2020-06-16.
- [12] 叶文才,王磊,范春林,等.一种美洲大蠊组织修复因子 PA1 及其应用:中国,CN111484549A [P].2020-08-04.
- [13] 刘睿,魏爽,王欣之,等.海螵蛸蛋白质、肽类物质基础研究[J].中国中药杂志,2020,45(16):3883-3889.
- [14] 王玉团,石峰,杭宝建,等.基于蛋白质组学技术的羚羊角的研究与分析[J].中国现代中药,2019,21(8):1045-1048.
- [15] 李依洋,杨珍,张晓娜,等.基于分子对接及网络药理学的托里消毒散精简方促糖尿病创面愈合作用机制研究[J].中草药,2018,49(14):3298-3308.
- [16] 郑爱甜.MEBT/MEBO 对糖尿病溃疡创面自噬 mTOR 信号通路 PI3K、Akt、mTOR 的影响 [D].右江:右江民族医学院,2019.
- [17] 陈海军.当归补血复合微囊经 JAK2/STAT3 信号传导途径促进组织创伤修复机制的研究 [D].南京:南京中医药大学,2016.
- [18] 李建学.芦荟多糖通过 VEGFR-2 介导的 PKC 信号通路调控血管内皮细胞增殖和促进创面愈合的作用机制 [D].福州:福建医科大学,2016.
- [19] 古环.基于分子对接的山柰苷对帕金森细胞模型的保护作用及其机制研究 [D].长春:吉林大学,2019.
- [20] 王晨旭,张宇辰,关薇薇.海洋动物多肽的提取分离方法研究进展[J].广州化工,2019,47(17):27-29.
- [21] 付文鹏,杨永寿,肖培云.动物源活性蛋白多肽的分离纯化方法研究进展[J].天然产物研究与开发,2019,31(5):916-921.
- [22] 高威芳,何魁芳,朱鹏,等.活性多肽序列结构分析鉴定技术的研究进展[J].生物技术,2016,26(2):199-204.
- [23] 何秀娟,张金超,刘青武,等.免疫细胞调控创面愈合的研究进展[J].医学研究杂志,2019,48(9):13-16.
- [24] Jun L W, Pit Foong C, Abd Hamid R. *Ardisia crispa* root hexane fraction suppressed angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and *in vivo* zebrafish embryo model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109221.
- [25] Chen Z J, Hu Y C, Li J, et al. A feasible biocompatible hydrogel film embedding *Periplaneta americana* extract for acute wound healing [J]. *Int J Pharm*, 2019, 571: 118707.

[责任编辑 郑礼胜]