

大鲵皮肤水溶性蛋白质成分分析及活性鉴定

宋为嘉¹, 杨 辉², 王 慧¹, 陈永庆¹, 耿 硕¹, 熊冬梅¹, 杨 菁³, 李忠虎⁴, 王立新^{1*}

(1.西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2.扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225007;
3.三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室, 中国三峡长江三峡集团有限公司中华鲟研究所, 湖北 宜昌 443100;
4.陕西华鲟生物科技有限公司, 陕西 城固 723200)

[摘 要] 该试验旨在研究大鲵(*Andrias davidianus*)皮肤水溶性蛋白成分及其活性, 揭示大鲵皮肤黏液的蛋白组分, 鉴定具有潜在功能活性的蛋白质。通过物理和化学刺激的方法收集大鲵皮肤黏液, 制备大鲵皮肤黏液水溶性蛋白样品, 并通过 SDS-PAGE 垂直电泳、细菌凝集试验、氧化物清除效率试验以及蛋白质谱 Label-free 分析大鲵皮肤黏液水溶性蛋白的成分以及活性。结果表明: 大鲵皮肤黏液中含有多种水溶性蛋白, 分子量介于 10~300 kDa 之间, 其中 50 kDa 分子量以上蛋白条带较为丰富, 在 100 kDa 分子量以上含有较多蛋白, 14 kDa 以下蛋白含量较少。大鲵皮肤黏液水溶性蛋白对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABST)2 种自由基具有清除能力, 说明其具有一定的抗氧化活性。大鲵皮肤黏液水溶性蛋白对大肠杆菌和嗜水气单胞菌 2 种细菌具有较强的凝集作用, 暗示大鲵皮肤水溶性蛋白具有一定的抗菌活性。蛋白质谱 Label-free 分析表明这些蛋白是由 66 种蛋白质组成; 通过分子注释有 20 种蛋白与免疫抗病功能相关, 2 种蛋白与抗氧化活性相关。研究揭示大鲵皮肤黏液水溶性蛋白含有 66 种蛋白, 分子量介于 10~300 kDa, 活性鉴定结果显示大鲵黏液水溶性蛋白具有抗氧化活性和抗菌活性。

[关键词] 大鲵; 皮肤黏液; 水溶性蛋白; 活性鉴定; 抗氧化活性

[中图分类号] R284.2; S917.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1005-5228(2021)10-0056-08

doi:10.3969/j.issn.1673-1182.2021.10.009

大鲵(*Andrias davidianus*)是中国特有的两栖类动物, 属于两栖纲有尾目隐鳃鲵科。大鲵体长可达 1.5 m, 最大体重可超过 50 kg, 是世界上现存最大的两栖类^[1]。由于环境污染和过度捕捞, 致使野生大鲵数量急剧下降, 被列为国家二级保护动物, 并列入濒临绝种野生动植物国际贸易公约(CITES)附录 I 中^[2]。大鲵具有极高的食用价值, 其肌肉富含水分, 肉质鲜美, 肌肉中总氨基酸含量 18.64%, 并且其中含有大量必需氨基酸, 符合人体需求^[3]。从大鲵肌肉提取出的大鲵油中含有 2 种多不饱和脂肪酸, 具有抗氧化活性, 能够提高机体免疫力, 对人体具有保健功能^[4]。大鲵作为药材具有悠久的历史, 其药用价值在《本草纲目》早有记载。大鲵身体多个部分均可入药, 包括皮肤及其分泌的黏液。中

医认为, 大鲵具有生血、明目等功效; 现代医学认为, 食用大鲵可以清除体内自由基、减少对机体造成损伤, 还能够促进人体抗癌因子的产生, 提高免疫力从而降低癌症发生几率^[5]。

大鲵皮肤具有辅助呼吸、调节水分、抵御捕食者、抵抗微生物入侵、排泄、生殖等功能, 是保护大鲵免受伤害、适应生存环境的重要器官。大鲵皮肤上的黏液主要由 2 种腺体分泌。一种是黏液腺, 可分泌粘糖蛋白, 这是大鲵皮肤黏液主要成分。黏液覆盖在皮肤表面, 形成一层天然的护盾, 维持皮肤水平衡, 从而保护皮肤不受外界环境伤害^[6]。另一种是颗粒腺, 能够分泌出药理活性物质, 抵御微生物和捕食者^[7], 被称作“毒腺”。皮肤黏液有多种作用。有研究表明, 腹腔注射大鲵皮肤分泌物能够使小鼠死

[收稿日期] 2021-06-17 **修改日期:** 2021-10-08

[基金项目] 陕西省科技攻关(2012K01-18); 三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室开放课题项目(SXSN/4508)

[作者简介] 宋为嘉(1995—), 男, 辽宁瓦房店人, 在读硕士研究生, 主要从事鱼类种质资源保护研究。E-mail: sonvega@nwfufu.edu.cn

* **[通讯作者]** 王立新(1968—), 男, 陕西南郑人, 博士生导师, 主要从事鱼类种质资源保护研究。E-mail: fisherwanglx@nwsuaf.edu.cn

亡,低剂量注射黏液到小鼠皮肤也能够导致水肿和疼痛,说明大鲵皮肤分泌物具有复杂的毒性作用^[8]。此外,大鲵皮肤黏液具有抗氧化^[9]、促进伤口愈合^[10]、保护肝脏免受酒精^[11]以及四氯化碳^[12]等物质的损伤以及抗菌^[13]、抑制癌症^[14]等功能。此外,大鲵皮肤具有抗氧化、促进伤口愈合、保护肝脏免受酒精和四氯化碳等物质损伤、抗菌、抑制癌症等功能。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大鲵购自陕西省留坝县,所有样本均为人工养殖的大鲵第二代。体重为 508.4 ± 10.5 g。试验大鲵在室内水箱中暂养,水箱内水面略低于大鲵背部,以保证大鲵可顺利浮出水面呼吸;水箱内放少量泥鳅供大鲵自由采食;试验期间定期换水,保持大鲵生存水质良好。在采集皮肤黏液样品期间大鲵身体状态良好,体质健康,无任何异样。

1.2 黏液的采集

轻轻取出大鲵置于操作台上,待大鲵稳定下来,用沾湿毛巾或纱布盖住大鲵头部。用消毒针管吸75%酒精 1 mL,轻轻喷洒于大鲵背部,喷洒 2~3 次,待大鲵背部皮肤产生白色分泌物并发出刺激性气味时,用消毒的移液枪头轻轻刮取分泌物,然后将枪头与分泌物一同放到 15 mL 离心管中,收集的分泌物用灭菌水进行溶解,充分混匀。在 4 ℃ 条件下,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清,保存于-20 ℃。同一只大鲵不宜连续多次收集分泌物,以防造成损伤。

1.3 黏液样品水溶性蛋白质含量测定

配置 1 mg/mL 牛血清白蛋白标准溶液,用 PBS 稀释至 0、20、40、60、80、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 。添加 5 倍体积的考马斯亮蓝蛋白显色液混合,室温静置 5 min,检测 595 nm 波长处吸光值,重复测量 3 次,取平均值,建立标准曲线和回归方程,计算样品浓度。

1.4 细菌凝集反应

采用大肠杆菌(*E.coli*)和嗜水气单胞菌(*A.hydrophilia*)检测大鲵皮肤黏液蛋白细菌凝集活性。37 ℃ 条件下培养大肠杆菌、嗜水气单胞菌至对数生长期。6 000 r/min 离心保留沉淀,使用无菌 PBS 稀释细菌至 3×10^7 CFU/mL。将细菌与终浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 的样品混合均匀涂布到无抗固体培养基中。对照组添加等体积 PBS 缓冲液。培养 6 h 后使用光学显微镜观察细菌凝集情况。

1.5 大鲵皮肤黏液水溶性蛋白质样品抗氧化活性检测

1.5.1 DPPH 清除能力检测 将 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的 DPPH 与不同浓度的样品混合,加入蒸馏水定容至 5 mL,使样品终浓度分别为 10、50、100、200 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 。在室温下静置 30 min 后,测定其在 515 nm 下的吸光值。添加等体积的 PBS 作为对照组。并使用公式 $(1 - \text{试验组}/\text{对照组})\times 100\%$ 计算 DPPH 清除率。

1.5.2 ABTS 清除能力检测 准确称取 0.384 g ABTS 与 0.134 g 过硫酸钾于试管中,加入蒸馏水,定容至 100 mL。轻轻摇晃混匀,在避光处放置过夜。取 10 mL 该溶液,用分光光度计测量其在 734 nm 下的吸光值,加入蒸馏水进行稀释,将其稀释为吸光值为 0.7 左右的溶液,记为 A。取 0.5 mL、1 mL、2 mL、4 mL 浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的大鲵皮肤分泌蛋白溶液样品,加入 3 mL 溶液 A,加入蒸馏水定容至 10 mL。室温静置 15 min 后,用分光光度计测定在 734 nm 下的吸光值。添加等体积 PBS 作为对照组。大鲵皮肤黏液蛋白对 ABTS 的清除率计算方式为 $(1 - \text{试验组}/\text{对照组})\times 100\%$ 。

1.5.3 NO 清除能力检测 准确称取 0.2980 g SNP 溶于纯水中并定容至 10 mL。量取 1 mL SNP 溶液,分别加入 0.5、1、2、4 mL 浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的大鲵皮肤黏液蛋白样品溶液,加入蒸馏水定容至 5 mL,在 25 ℃ 水浴锅中保温 2.5 h,取出后立即加入等体积的 Griess 试剂,在 540 nm 下测定吸光值。添加等体积的 PBS 作为对照组。最终计算的清除率 $=[(A-B)/(C-1)]\times 100\%$ 。其中,A 为 SNP 与样品共存时的吸光值,B 为样品在 540 nm 下的吸光度,C 为 SNP 在 540 nm 下的吸光值。

1.6 蛋白质谱分析

将大鲵黏液水溶性蛋白质样品送至北京邦非科技有限公司进行质谱鉴定。使用 Gene Ontology (GO)数据库对基因的分子功能(Molecular Function, MF)、以及参与的生物过程(Biological Process, BP)进行鉴定和分析。随后使用 KEGG PATHWAY 数据库进行分析确定蛋白质参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 电泳结果

电泳结果显示大鲵皮肤黏液样品中含有多种蛋白质,样品在 14~100 kDa 分子量范围内得到一定的分离,其中在 50 kDa 分子量以上蛋白条带较为丰

富,100 kDa 分子量以上有可见的较高丰度的蛋白条带,小于 14 kDa 的蛋白质含量较低(图 1)。

2.2 大鲵皮肤黏液水溶性蛋白质样品活性检测

2.2.1 细菌凝集试验结果 试验结果表明,与对照组相比,大肠杆菌和嗜水气单胞菌在大鲵皮肤黏液水溶性蛋白质作用下发生明显的凝集反应(图 2),表明大鲵皮肤黏液水溶性蛋白质对大肠杆菌及嗜水

气单胞菌具有抑制作用。

2.2.2 对 NO、DPPH 和 ABTS 清除结果 大鲵皮肤黏液水溶性蛋白质对 NO、DPPH 和 ABTS 清除结果见图 3。大鲵皮肤黏液蛋白质对 DPPH 与 ABTS 具有较强的清除能力,且清除率随大鲵皮肤黏液蛋白质的浓度升高显著升高,到浓度增加到 200 $\mu\text{g/mL}$ 后,清除率升高趋于平缓,到 400 $\mu\text{g/mL}$ 其清除率已经接近 100%;样品对 NO 也有一定的清除能力,但效果并不理想,当蛋白质浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率接近 40%,并且浓度进一步升高清除率却没有显著变化。

2.3 蛋白质谱结果

大鲵皮肤黏液水溶性蛋白质经 Q-Exactive HF 质谱仪分析,共鉴定出 66 种蛋白质,其中分子量最大的是蜷曲受体-8 相关多区域蛋白(Frizzled-8),达 277.5 kDa,分子量最小的是动力蛋白轻链(Dynein light chain),分子量仅 10.3 kDa(表 1)。以上蛋白经 GO 功能鉴定,共发现 20 种免疫相关蛋白,包括热休克蛋白 70、硒结合蛋白、泛素、钙调蛋白、泛素结合酶、钙结合蛋白、小泛素化改性剂、Rab(Ras-like in rat barin)蛋白、泛素结合酶 E2、泛素碳末端

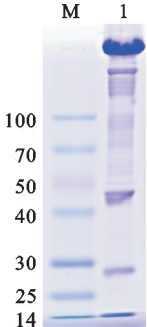


图 1 大鲵皮肤黏液样品 SDS-PAGE 电泳结果
M. Blue Plus Protein Marker(14 kDa-100 kDa);
1. 大鲵皮肤黏液样品

Fig. 1 SDS-PAGE results of skin mucus samples from Chinese giant salamander
M. Blue Plus Protein Marker(14 kDa-100 kDa);
1. skin mucus samples of Chinese giant salamander

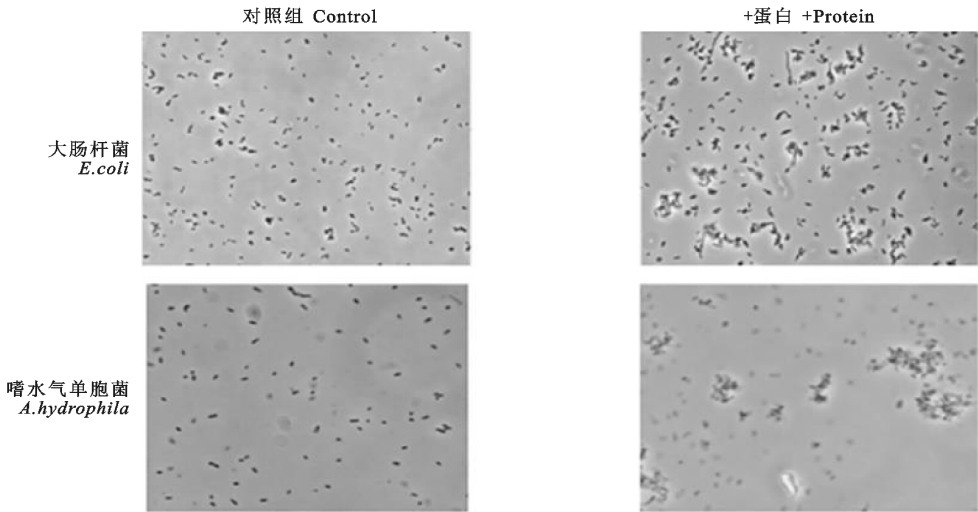


图 2 细菌凝集试验结果
Fig.2 Results of bacterial agglutination experiment between samples and control group

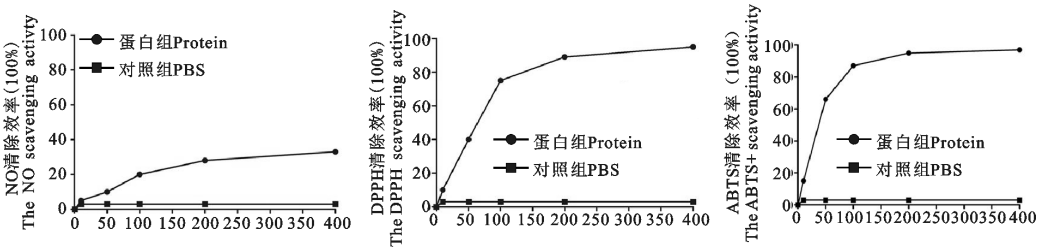


图 3 大鲵皮肤黏液水溶性蛋白质对 NO、DPPH、ABTS 的清除效果
Fig. 3 The NO, DPPH and ABTS scavenging activity

表 1 大鲵皮肤黏液蛋白鉴定结果

Table 1 Identification results of skin mucous water-soluble protein

蛋白名称 Name of protein	登录号 Accession	分子量/kDa Molecular weight	等电点 PI
热休克蛋白 70 HSP 70	Q6AZH8	71.3	5.58
延长因子 1α(片段) Elongation factor 1-α (fragment)	A1L3K0	50.9	9.13
延长因子 1α 卵母细胞形成 Elongation factor 1-α,oocyte form	P17508	50.2	9.16
肌动蛋白 Actin	P53505	41.8	5.48
硒结合蛋白 1 SBP-1	Q6DCH7	52.5	5.81
α 心肌肌动蛋白 1 Actin α cardiac muscle 1	P04751	42.0	5.39
LOC100036902	A1L2N5Q	42.1	5.49
泛素 Ubiquitin	6GMC1	18.0	9.64
L-乳糖脱氢酶 L-lactate dehydrogenase	Q9W5Z7	36.4	8.06
精氨酸琥珀酸裂解酶 Argininosuccinate lyase	Q66J94	49.4	7.99
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 L 型 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase L homeolog	Q8AY70	35.9	8.25
钙调蛋白 Calmodulin	P62155	16.8	4.22
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Gapd-prov protein	Q7ZY52	35.8	8.05
α-烯醇酶 Alpha-enolase	P08734	47.5	6.24
GTP-结合蛋白 GTP-binding nuclear protein	P52301	24.4	7.88
泛素结合酶 Ubiquitin-conjugating enzyme	Q4QR35	17.8	8.66
磷脂酰肌醇转移蛋白 PITP	Q5XHE1	31.0	7.77
核苷二磷酸激酶 Nucleoside diphosphate kinase	P70010	17.5	6.57
膜联蛋白 A1 2S 同源 Annexin A1 2S homeolog	Q7SZ98	37.6	6.60
果糖二磷酸醛缩酶 FBPA	O12975	39.4	8.29
钙结合蛋白 Calcium-binding protein	Q6PAB4	39.2	8.40
谷胱甘肽转移酶 Gstm2-prov protein	Q7SZ23	25.4	7.83
角蛋白 I 型 Keratin type I	P05782	29.9	5.06
磷酸丙糖异构酶 TPI	Q7ZWN5	26.7	7.36
钙依赖膜结合蛋白 Copine III L homeolog	Q3B8L6	59.3	6.73
小泛素化改性剂 Small ubiquitin-related modifier	Q6GPW2	10.9	5.50
精氨酸琥珀酸合成酶 Argininosuccinate synthase	Q7ZWM4	46.7	7.69
膜联蛋白 A4 S 同源 Annexin A4 S homeolog	Q6GND2	36.0	8.21
角蛋白 18 Keratin18	Q3KQ13	43.0	5.20
腺苷高半胱氨酸酶 B AHCY B	O93477	47.7	6.40
Rab 蛋白(片段) RAB35 protein (fragment)	A3KNC5	27.9	8.59
异柠檬酸脱氢酶 IDH	Q640H5	46.8	6.14
蜷曲受体-8 相关多区域蛋白 Frizzled-8 associated multidomain protein	Q6EHH9	277.5	6.30
过氧化物酶 2 Peroxiredoxin 2	G3GBS3	22.4	7.01
西梅脱寡肽酶 Thimet oligopeptidase	Q9PTV2	78.1	6.38
锚蛋白 Asb15-prov protein	Q6DCL0	65.7	5.19
F-肌动蛋白 F-actin	Q6PA24	32.1	5.67
磷酸甘油酸激酶 PGK	Q6DD48	44.6	7.06
泛素结合酶 E2 Ube2n-prov protein	Q7SZ88	17.1	6.57
乙醇脱氢酶 ADH	Q6DKD6	40.1	7.49
泛素碳末端水解酶 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Q3B8B3	24.8	6.00
膜联蛋白 A7 S 同源 Annexin A7 S homeolog	Q66J40	54.8	7.96
晶体状蛋白 Crystallin	Q6GR36	36.2	5.96
微管可折叠辅助因子 A Microtubule foldable auxiliary factors A	A1L2W4	35.8	5.60
乳酸谷胱氨肽裂解酶 Lactoylglutathione lyase	Q6DFI5	21.6	5.81
ADP 核糖基化因子 Arf-1 protein	A1L3K6	20.7	6.80
肌动蛋白轻链 Dynein light chain	Q5M781	10.3	7.37
g32066-prov 蛋白质 g32066-prov protein	Q8AVE9	36.8	6.25
金属蛋白酶抑制剂 2 MPI2	Q66IW0	24.7	6.71
角蛋白 62 Keratin 62	A1L2T3	60.7	5.72
α-氨基脂肪半醛脱氢酶 α-amino fat gallic dehydrogenase	Q66J16	55.1	6.68
延长因子 Elongation factor	Q52MA1	95.3	6.83

(续表 1)

蛋白名称 Name of protein	登录号 Accession	分子量/kDa Molecular weight	等电点 PI
晶状体丝状蛋白 Lens filamentous protein	Q6DKC1	74.7	5.16
天冬氨酸转移氨酶 Aspartate aminotransferase	Q7ZTK9	46.0	7.44
NEDD8-泛素缀合酶 NEDD8-conjugating enzyme	Q6DCZ9	20.9	7.27
泛素缀合酶 Ubiquitin-conjugating enzyme	A5PKP9	16.7	7.37
Rab GDP α 分离抑制剂 Rab GDP dissociation inhibitor alpha	Q642Q8	50.7	5.03
过氧化氢酶 CAT	Q5PPT1	29.9	6.54
丙酮酸激酶 Pyruvate kinase	Q92122	57.5	6.99
S-(羟甲基)谷胱甘肽脱氢酶 S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	Q4V813	40.0	7.05
丝状肌动蛋白成帽蛋白 CapZ- β	A1DPL0	30.7	6.01
白介素增强子结合因子 3-A Interleukin enhancer-binding factor 3-A	Q2TAV5	98.2	8.59
6-磷酸葡萄糖异构酶 Glucose-6-phosphate isomerase	Q6GP33	62.1	7.47
ATP 合成酶催化亚基 ATP Synthesis enzymes catalyze subgroups	Q4KLX0	68.5	5.74
细胞分裂周期 23 L Cell division cycle 23 L homeologQ6AZH8	Q7T0N9	67.4	7.40

表 2 大鲈皮肤黏液水溶性蛋白参与的生物学过程

Table 2 Biological process of skin mucous water-soluble protein

%

生物学过程 Biological Process	比例 Proportion
糖酵解 Glycolytic process	15.91
小 GTP 酶介导信号转导 Small GTPase mediated signal transduction	9.09
钩端肌动蛋白丝加帽 Barbed-end actin filament capping	4.54
蛋白质泛素化 Protein ubiquitination	4.54
蛋白转运 Protein transport	4.54
糖异生 Gluconeogenesis	4.54
葡萄糖代谢过程 Glucose metabolic process	4.54
尿素循环 Urea cycle	2.27
核糖体大亚基核出口 Ribosomal large subunit export from nucleus	2.27
核糖体小亚基核出口 Ribosomal small subunit export from nucleus	2.27
眼睛发育 Eye development	2.27
糖代谢过程 Carbohydrate metabolic process	2.27
乙醇氧化磷酸戊糖-分流 Ethanol oxidation pentose-phosphate shunt	2.27
三羧酸循环 Tricarboxylic acid cycle	2.27
异柠檬酸代谢过程 Isocitrate metabolic process	2.27
GTP 合成过程 GTP biosynthetic process	2.27
UTP 合成过程 UTP biosynthetic process	2.27
CTP 合成过程 CTP biosynthetic process	2.27
RNA 聚合酶 II 启动子转录调控 Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2.27
细胞蛋白翻译检测过程 Tanslation cellular protein modification process	2.27
泛素依赖-蛋白质代谢过程 Ubiquitin-dependent protein catabolic process	2.27
细胞的氨基酸代谢过程 Cellular amino acid metabolic process	2.27
精氨酸合成过程 Arginine biosynthetic process	2.27
脂肪酸代谢过程 Fatty acid metabolic process	2.27
单碳代谢过程 One-carbon metabolic process	2.27
细胞内蛋白质运输 Intracellular protein transport	2.27
微管基本过程 Microtubule-based process	2.27
微管蛋白复杂装配 Tubulin complex assembly	2.27

水解酶、ADP 核糖基化因子(ADP-ribosylation factor, ARF)、金属蛋白酶抑制剂 2、NEDD8-泛素缀合酶、GTP(三磷酸鸟苷)-结合蛋白、泛素缀合酶、白介素增强子结合因子、蜷曲受体-8 相关多区域蛋白 Frizzled-8、钙依赖膜结合蛋白、Rab GDP α 分离抑制剂,占蛋白总数的 30.3%;以及 2 种抗氧化相关蛋白,包括过氧化氢酶和过氧化物酶 2 等,占蛋白总数的 3.03%。

以上蛋白经蛋白 GO Biological Progress 注释,发现 66 种蛋白参与 30 种生物学过程。其中参与糖酵解和小 GTP 酶介导信号转导的蛋白最多,分别占总蛋白的 15.91%和 9.09%(表 2)。KEGG 注释结果显示,66 种蛋白主要参与 30 种生化代谢途径和信号转导途径,其中主要包括氨基酸的生物合成(9.9%)、糖酵解(9.9%)、碳代谢(8.9%)、泛素介导的蛋白水解(7.9%)。

3 讨 论

3.1 大鲵皮肤黏液水溶性蛋白的免疫功能

许多鱼类及两栖类皮肤具有一种非特异免疫系统,能够抵御外来病原体的入侵,并且具有一定的广谱性,可以对很多病原体起到抑制或杀灭的作用。大鲵皮肤是抵抗外源入侵的第一道防线,在抵抗病原体入侵中发挥重要功能^[15]。大鲵皮肤中含有大量的活性物质,包括生物胺、生物碱、类固醇、蛋白质和多肽等^[16],这些物质在皮肤功能发挥上扮演着重要角色,是宝贵的生物资源。

本试验发现大鲵皮肤黏液水溶性蛋白能够凝集大肠杆菌和嗜水气单胞菌,可能具有抗菌功能。在大鲵皮肤水溶性蛋白的质谱结果中发现了 20 种免疫相关蛋白,很可能与大鲵皮肤抵御病原微生物入侵的功能有关。这些蛋白包含有很多泛素化相关蛋白,包括泛素、泛素结合酶、泛素碳末端水解酶、NEDD8-泛素缀合酶、泛素缀合酶等。蛋白泛素化是由泛素激活酶、泛素活化酶和泛素连接酶 3 种酶通过活化、结合和连接 3 步级联反应对靶蛋白进行修饰进而降解靶蛋白的过程^[17]。有研究显示,当机体受到细菌等病原体侵袭时,泛素可以通过介导促凋亡蛋白 Bcl-2 的降解从而抑制巨噬细胞的凋亡,进而维持机体的免疫应答^[18],巨噬细胞会释放泛素连接酶激活下游 NF- κ B 信号通路促进炎症因子的表达,从而清除病原微生物^[19]。大鲵皮肤黏液中也有多种与小 GTP 酶信号转导相关蛋白,包括 Rab 蛋白、ADP 核糖基化因、GTP-结合蛋白、Rab GDP α

分离抑制剂。小 GTP 酶包括 Ras (Rat sarcoma viral oncogene homology)、Rho (Ras homolog gene family)、Arf、Ran (a small nuclear GTP-binding protein)和 Rab 等五个家族,参与调节细胞和细胞-基质的相互作用、调节动态肌动蛋白重排、细胞内转运等多种功能^[20]。中性粒细胞作为先天免疫系统的一部分,是抵御病原体的第一道防线^[21],多种小 GTP 酶能够调节其粘附、传播、极化、趋化、富集、吞噬以及自噬^[20]等多种功能。有研究表明,Rab27 蛋白使中性粒细胞快速向感染处富集,释放炎症因子杀死病原微生物^[22],Rab5 能够调节中性粒细胞的吞噬活性清除入侵的细菌^[23]。除此之外,热休克蛋白在诱导先天免疫和适应性免疫都发挥着重要作用^[24-25]。硒结合蛋白与口臭、癌症和精神分裂症等疾病有关^[26],钙结合蛋白与肿瘤细胞迁移^[27]、血管生成以及炎症^[28]有关。

3.2 大鲵皮肤黏液水溶性蛋白的抗氧化性能

大鲵皮肤黏液水溶性蛋白表现出显著的氧化物的清除能力。本研究发现大鲵皮肤黏液分泌蛋白对 DPPH、NO、ABTS 等物质具有较好的清除效果,说明其具有良好的抗氧化作用。根据蛋白质谱结果,抗氧化性很可能是由过氧化氢酶和过氧化物酶 2 发挥的。除了这 2 种抗氧化酶,大鲵皮肤黏液水溶性蛋白中可能还有其它的抗氧化物质,例如 HSP70 能够抑制氧化后的蛋白积累并促进氧化蛋白质的降解^[29]以减少机体氧化损伤。有研究表明大鲵皮肤炮制酒能够提高谷胱甘肽的含量及 SOD 活性,从而提升机体抗氧化能力,降低过度饮酒引起的氧化应激反应^[30]。从不同育龄大鲵的皮肤黏液中提取出的低聚糖肽 also 具有良好的抗氧化性,对羟自由基和 DPPH 具有较高的清除率^[31]。抗氧化活性物质去除的自由基等氧化物是机体代谢过程中产生的^[32],此外当机体收到病原体感染发生炎症时,也会产生自由基^[21],这些自由基会对机体正常组织造成损伤,延缓组织愈合。大鲵皮肤黏液中的抗氧化物质能够清除这些自由基,这可能会对大鲵伤口愈合和机体代谢有着重要作用。例如在红瘰疣螈皮肤中发现一种短肽能够促进伤口的愈合^[33],涂抹大鲵皮肤制作的药膏能够促进小鼠背部烧伤愈合^[10],这些都说明两栖类有尾目的黏液能够促进伤口愈合,而这些很可能与皮肤中的抗氧化活性物质有关。

4 结 论

本试验发现大鲵皮肤黏液水溶液中含有 66 种

水溶性蛋白,其中 20 种蛋白与免疫抗病功能相关,2 种蛋白与抗氧化活性相关,参与免疫和代谢在内的多种生理过程,并且具有明显的抗菌活性和抗氧化活性。

参考文献:

- [1] 牟洪民,李媛,姚俊杰,等. 大鲵生物学研究的新进展[J]. 水产科学,2011,30(8): 513-516.
- [2] 章克家,王小明. 大鲵,你还好吗[J]. 森林与人类,2001(3):43-45.
- [3] 王立新,郑尧,艾闯,等. 中国大鲵肌肉、尾脂营养成分分析与评价[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(2): 67-74.
- [4] 李林强,咎林森,任正东. 中国大鲵油脂脂肪酸组成、抗氧化及流变性研究[J]. 中国粮油学报,2009,24(9): 82-86.
- [5] 李莉,王锡昌,刘源. 中国养殖大鲵的食用、药用价值及其开发利用研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(9):454-458.
- [6] TOLEDO R C, JARED C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A Physiology,1993,105(4): 593-608.
- [7] BARRA D, SIMMACO M. Amphibian skin: A promising resource for antimicrobial peptides[J]. Trends in Biotechnology, 1995,13(6):205-209.
- [8] GUO W T, AO M Z, LI W, et al. Major biological activities of the skin secretion of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* [J]. Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences, 2012,67(1/2): 86-92.
- [9] 曲敏. 大鲵黏液低聚糖肽的制备,性质和生物活性及应用研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2012.
- [10] 陈曦,王杨科,陈德经. 大鲵皮肤药膏和大鲵黏液药膏烫伤药理试验研究[J]. 湖北农业科学,2012,51(13): 2 797-2 800.
- [11] 刘旭东,张玉超,杨亮,等. 大鲵皮肤泡制酒抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发,2017(11): 194-198.
- [12] 曲敏,田丽冉,佟长青,等. 大鲵低聚糖肽对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 食品工业科技,2013,34(14): 350-352.
- [13] 肖冰,和七一,张康,等. 两栖类动物皮肤分泌抗菌肽的研究进展[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版),2012,29(2): 24-29.
- [14] 徐伟良,陈德经,刘宇,等. 大鲵皮肤黏液糖蛋白的提取纯化及抗肺癌活性研究[J]. 中国生化药物杂志,2015(8): 44-47.
- [15] DUDA T F, DAMIEN V, PIERRE N. Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides[J]. Molecular Biology & Evolution, 2002(6): 858.
- [16] STEBBINS R C, COHEN N W. A natural history of amphibians[M]. Princeton, New Jersey, U. S. A.: Princeton University Press, 1997.
- [17] ZINNGREBE J, MONTINARO A, PELTZER N, et al. Ubiquitin in the immune system[J]. EMBO Reports, 2014, 15(1):28-45.
- [18] CHANG S C, DING J L. Ubiquitination by SAG regulates macrophage survival/death and immune response during infection[J]. Cell Death and Differentiation, 2014, 21(9): 1 388-1 398.
- [19] 王艳,肖意传. 蛋白质泛素化在免疫调节中的作用与研究进展[J]. 生命科学,2016,28(2):231-238.
- [20] CHU J Y, MCCORMICK B, VERMEREN S. Small GTPase-dependent regulation of leukocyte-endothelial interactions in inflammation[J]. Biochemical Society Transactions, 2018,46(3):649-658.
- [21] NATHAN C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities[J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(3): 173-182.
- [22] SINGH R K, FURZE RC, BIRRELL M A, et al. A role for Rab27 in neutrophil chemotaxis and lung recruitment[J]. BMC Cell Biology, 2014,15:39.
- [23] PERSKVIST N, ROBERG K, KULYTÉ A, et al. Rab5a GTPase regulates fusion between pathogen-containing phagosomes and cytoplasmic organelles in human neutrophils[J]. Journal of Cell Science, 2002,115(6):1 321-1 330.
- [24] ASEA A. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70 role of toll-like receptor (Tlr) 2 and Tlr4 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(17): 15 028-15 034.
- [25] VABULAS R M, AHMAD-NEJAD P, GHOSE S, et al. HSP70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(17): 15 107-15 112.
- [26] 贾义,代杰,张亮亮,等. 硒结合蛋白 1 的生物功能及其与疾病的关系[J]. 生物化学与生物物理进展,2019, 46(2): 128-137.
- [27] ISMAIL T M M, BENNETT D, PLATT-HIGGINS A M, et al. S100A4 elevation empowers expression of metastasis effector molecules in human breast cancer [J]. Cancer Research, 2016, 77(3):158.
- [28] AMBARTSUMIAN N, KLINGELHOFFER J, GRIGORIAN M. The multifaceted S100A4 protein in cancer and inflammation [J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.), 2019, 1929:339-365.
- [29] 樊欣,彭仁. 热休克蛋白 70:生物学功能与作用机制研究进展[J]. 生命科学,2019, 31(3):270-278.
- [30] 刘旭东,张玉超,杨亮,等. 大鲵皮肤泡制酒抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发,2017, 38(11): 185-189.
- [31] 王茁. 不同育龄大鲵皮肤粘液中低聚糖肽抗氧化活性研究[J]. 陕西农业科学,2015(8): 34-36.
- [32] YIN H, XU L, PORTER N A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis[J]. Chemical Reviews, 2011, 111(10): 5 944.
- [33] MU L X, TANG J, LIU H, et al. A potential wound-healing-promoting peptide from salamander skin [J]. FASEB Journal, 2014,28(28): 3 919-3 929.

Composition Analysis and Activity Identification of Skin Soluble Protein of *Andrias davidianus*

SONG Weijia¹, YANG Hui², WANG Hui¹, CHEN Yongqing¹, GENG Shuo¹,
XIONG Dongmei¹, YANG Jing³, LI Zhonghu⁴, WANG Lixin^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225007, China;

3. Hubei Key Laboratory of Three Gorges Project for Conservation of Fishes, Chinese Sturgeon Research Institute, China Three Gorges Corporation, Yichang, Hubei 443100, China;

4. Shaanxi Huani Biological Technology Co., Ltd., Chenggu, Shanxi 723200, China)

Abstract: To study the components and activities of water-soluble proteins of the skin mucus in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) and provide a reference for the further development of biological resources of skin mucus, in this study, the skin mucus was collected by physical and chemical stimulation methods to prepare samples of water-soluble proteins. The composition and activity of water-soluble proteins in the skin mucus of the salamander were analyzed by SDS-PAGE vertical electrophoresis assay, bacterial agglutination assay, oxide removal efficiency assay, and Label-free protein spectrum. Results showed the mucus of Chinese giant salamander contained various water-soluble proteins, with molecular weight ranging from 10~300 kDa. Among them, protein bands for molecular weight above 50 kDa were more abundant, that above 100 kDa had more proteins, and that below 14 kDa contained less protein. The water-soluble protein from the skin mucus of *Andrias davidianus* has the scavenging ability to 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and 2,2-binazo-bis (3-ethyl-benzothiazole-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABST), indicating that it has certain antioxidant activity. Besides, the skin mucus water-soluble protein of *Andrias davidianus* has strong agglutination effect on *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila*, suggesting that the skin water-soluble protein of Salamander has certain antibacterial activity. Label-free analysis of protein spectrum showed that these proteins are composed of 66 proteins, and 20 proteins are related to immune resistance, and 2 proteins are related to antioxidant activity through molecular annotation. The water-soluble proteins in the skin mucus of the salamander contain 66 kinds of proteins with molecular weights ranging from 10-300 kDa. The results of activity identification suggest that the water-soluble proteins in the skin mucus of the salamander have antioxidant and antibacterial activities.

Key words: Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*); skin mucus; water-soluble protein; activity identification; antioxidant activity