

高效液相色谱-串联质谱法测定小鼠肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白含量

高建萍^{1,2}, 张 扬¹, 邢芳毓¹, 王俊杰¹, 徐 军¹,
孔英俊^{1,2}, 罗 希^{1,2}, 张贵锋^{1,2}

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190;

2. 中国科学院大学化学工程学院, 北京 100049)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法测定小鼠肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白含量。首先识别小鼠 I、Ⅲ型胶原蛋白特征多肽,分别为 GSEGPQGVR、GPSGFR。采用子离子及保留时间定性,以 GLAGMK 为内标对小鼠肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白含量进行分析。结果表明,2 个特征多肽在 1~500 mg/L 浓度范围内的线性关系良好,相关系数均大于 0.99,精密度相对标准偏差小于 3.7%,加标回收率在 86%~118%之间。小鼠生长过程中,肝、肺、肾中 I 型胶原蛋白的比例呈增加趋势, I、Ⅲ型胶原蛋白总量呈先增加后降低的趋势。该方法前处理简便高效、精密度高、重现性好,可用于小鼠肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白的精确定量。

关键词:高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS);肝;肺;肾; I 型胶原;Ⅲ型胶原

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2022)04-0454-09

doi:10.7538/zpxb.2021.0190

Determination of Type I and Type Ⅲ Collagen of Liver, Lung and Kidney in Mouse by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

GAO Jian-ping^{1,2}, ZHANG Yang¹, XING Fang-yu¹, WANG Jun-jie¹, XU Jun¹,
KONG Ying-jun^{1,2}, LUO Xi^{1,2}, ZHANG Gui-feng^{1,2}

(1. National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. School of Chemical and Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Collagen is the main component of extracellular matrix, accounting for 25%-30% of total protein. Currently, 28 types of collagen have been identified in mammals. The variation of different types of collagen in different tissues is related to age, disease and biological function. Type I and Ⅲ collagen are the main components in liver, lung and kidney, and their content and ratio are related to inflammation and canceration.

Sirius red staining and immunoassay are the traditional method for collagen detection. However, sirius red staining is a semi-quantitative method and immunoassay is not suitable for the determination of collagen content in tissues. In this study, a method of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed for the determination of type I and Ⅲ collagen in liver, lung and kidney of mouse. The marker peptides of mouse type I and Ⅲ collagen were identified and the sequences were GSEGPQGVR and GPSGFR, respectively. The product ions and retention time were used to identify the collagen. The peptide GLAGMK was used as the internal substance to quantitate the content of type I and Ⅲ collagen in liver, lung and kidney. The results showed that the linear relationship of these two marker peptides was good in the concentration range of 1-500 mg/L, the relative coefficient was more than 0.99, RSD of the assay precision was less than 3.7%, and the recovery of standard addition was between 86% and 118%. The ratios of type I collagen in liver, lung and kidney were all increased during the growth of mouse. From 0 to 1st week, the ratio of type I collagen increased rapidly, but they increased slowly from 6th to 12th week. The ratio of type I collagen was the highest in the kidney, and it was the lowest in the lung. The total content of type I and Ⅲ collagen increased firstly and then decreased during the growth of mouse. The result was consistent with the trend of total collagen content in liver, lung and kidney, which was measured by hydroxyproline method. The total amount of type I and Ⅲ collagen was the highest in the kidney, and it was the lowest in the liver. This method is simple, efficient, replicable and highly stable, and can be used for accurate quantification of type I and Ⅲ collagen in liver, lung and kidney of mouse. This study provides an auxiliary analytical method for the diagnosis of collagen-related diseases.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); liver; lung; kidney; type I collagen; type Ⅲ collagen

胶原蛋白是由 3 条链形成的右手螺旋结构,是动物组织细胞外基质中的主要结构蛋白,约占蛋白总量的 25%~30%^[1],广泛存在于皮肤、骨骼、跟腱及结缔组织中^[2-4],是肝、肺、肾等内脏的重要组成部分^[5-7]。目前,文献^[8-9]报道的胶原蛋白有 28 种,不同组织中的蛋白类型及含量各不相同,不同类型胶原蛋白的含量变化与年龄、疾病及其生物机能息息相关。肝硬化组织中胶原蛋白含量是正常肝组织的 4~7 倍,最高可达近 10 倍。I 型和Ⅲ型胶原是肝包膜、门静脉间质、窦周间隙和纤维隔膜中最丰富的胶原。在正常新鲜的肝脏组织中,I 型/Ⅲ型胶原蛋白的比例小于 1,而在肝硬化组织中的比例显著增大^[10-11];I 型和Ⅲ型胶原蛋白约占肺胶原蛋白总量的 90%,肺纤维化组织中 I 型胶原蛋白含量及 I 型/Ⅲ型胶原蛋白比例显著增

大^[9,12];有研究表明^[13],在肾炎和肾小球硬化的过程中,I、Ⅲ型胶原蛋白的沉积均显著增加。因此,建立组织中不同类型胶原蛋白的定量检测方法可为相关疾病的诊断提供理论基础。

不同来源、不同类型的胶原蛋白结构及理化性质无明显差异,难以实现不同类型胶原蛋白的定量分析^[14-15]。传统的羟脯氨酸法是测定胶原蛋白水解液中羟脯氨酸的含量,再换算为胶原蛋白含量,但仅用于测定胶原蛋白总量,无法定量分析不同类型的胶原蛋白,且羟脯氨酸在胶原蛋白中的比例受物种、年龄和组织部位的影响^[16]。目前,常用的胶原蛋白定量检测方法有天狼星红染色法^[17]、酶联免疫(ELISA)法^[18]、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法^[19]等。其中,天狼星红染色法通过酸性染料与胶原纤维反应使其产生双折光现象,从而通过偏

液光区分不同类型的胶原纤维,通过颜色深浅和面积大小进行定量,该方法属于相对定量,而且胶原纤维的双折光会随时间的推移而减弱,容易出现假阳性结果;ELISA 法利用抗原和抗体特异性结合显色检测不同类型的胶原,此方法操作繁琐,存在非特异性吸附,难以定量组织中的胶原;孙坤等^[20]利用 HPLC-MS 法定量检测牛 I 型胶原蛋白,该方法特异性强,但应用选择离子监测进行外标法定量不适用于分析基质复杂的样品。

本研究拟利用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法测定小鼠肝、肺、肾组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白含量,考察 I、Ⅲ型胶原蛋白含量及比例随年龄的变化情况,并验证 HPLC-MS/MS 法的专一性、准确性及可靠性,以期为动物组织中不同类型胶原蛋白含量的分析提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与装置

Orbitrap(Exploris 480)和 TSQ Quantum ACCESS MAX 三重四极杆质谱仪:美国 Thermo Fisher 科技有限公司产品,配备采集软件 Xcalibur 4.4 和数据处理软件 Protein Discoverer 2.4;LGJ-100F 真空冷冻干燥机:北京松源华兴科技发展有限公司产品;HC-2518R 高速冷冻离心机:安徽中科中佳科学仪器有限公司产品;MYP19-2 磁力搅拌器:上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司产品。

1.2 材料与试剂

小鼠(C57BL/6N,雄性):购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

乙腈、甲酸:色谱纯,德国 Merck 公司产品;胰蛋白酶(V5111):序列纯,美国 Promega 公司产品;特征多肽和内标肽:纯度>98%,由上海强耀公司合成;其他试剂均为分析纯。

1.3 样品前处理

1.3.1 杂蛋白去除 分别取 0、1、3、6、9、12、15、18 周龄的小鼠,每个周龄 10 只,将小鼠脱臼处死后,取各周龄小鼠的肝、肺、肾,称重;将新鲜的肝、肺、肾组织按质量比 1:10 加入 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.2, 含 5% 曲拉通-100)中,于 4 ℃ 低速搅拌 24 h,期间换

液 2 次,水洗除去残留的 Tris-HCl 溶液,冻干、称重、待用。

1.3.2 酶解 称取 5 mg 冻干样品,加入 5 mL NH_4HCO_3 缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0),于 60 ℃ 水浴变性反应 30 min,取出冷却;取 1 mL 冷却后的样品与胰蛋白酶混合(100 μL , 20 μg),于 37 ℃ 恒温反应器中酶解 18 h,以 10 000 r/min 离心 10 min,待用。

1.4 特征多肽识别

1.4.1 实验条件 色谱条件:Peptide BEH C18 柱(2.1 mm×150 mm×1.7 μm);流动相 A 为水(含 0.1% 脂肪酸),B 为 60% 乙腈(含 0.1% 脂肪酸);梯度洗脱为 0~60 min(5%~40% B),60~85 min(40%~90% B),85~98 min(90% B),98~100 min(90%~5% B),100~110 min(5% B);流速 0.2 mL/min。

质谱条件:离子源喷雾电压 3.5 kV;毛细管温度 320 ℃;鞘气流速 19.8 mL/min;辅助气流速 34 kPa;正离子扫描模式;扫描事件 1 为全扫描,质量扫描范围 m/z 400~2 000,分辨率 60 000,射频透镜电压为最大值的 45%,归一化的最大增益电压 300%,最大离子注入时间 100 ms;扫描事件 2 为 data dependent MS/MS,分辨率为 15 000,隔离窗口为 m/z 1.6,最大离子注入时间 200 ms,归一化的最大增益电压 100%,碰撞能量 30%,循环时间 2 s。

1.4.2 数据处理 采用 Protein Discoverer 2.4 软件对数据进行搜库,并通过 Blast 序列比对的方法确定小鼠 I、Ⅲ型胶原蛋白特征多肽。

1.5 定量分析

1.5.1 标准样品配制 分别准确称取 10.0 mg I、Ⅲ型胶原特征多肽,混合后用 NH_4HCO_3 缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0)配制成不同浓度的标准溶液。以相同方法配制内标肽溶液,其信号响应与样品相当。将内标肽分别与 I、Ⅲ型胶原特征多肽混合溶液、样品酶解液混合(1:1, V/V),以 10 000 r/min 离心 10 min,待用。

1.5.2 实验条件 色谱条件:Zorbax C18 柱(2.1 mm×150 mm×5 μm);流动相 A 为水(0.1% 甲酸),B 为 60% 乙腈水溶液(0.1% 甲酸);梯度洗脱为 0~3 min(5%~25% B),3~7 min(25%~100% B),7~8 min(100% B),8~8.1 min(100%~5% B),8.1~10 min(5% B);流

速 0.3 mL/min;柱温 30 ℃;上样量 5.0 μL。

质谱条件:离子源喷雾电压 3.5 kV,毛细管温度 320 ℃,蒸发温度 350 ℃,鞘气流速 19.8 mL/min,辅助气流速 55 kPa,正离子扫描模式,选择反应监测(SRM)模式: m/z 310.67>466.34(多肽 GPSGFR)、 m/z 443.76>613.29(多肽 GSEGPQGVR)、 m/z 288.66>406.18(内标肽 GLAGMK)。

1.5.3 数据处理 按式(1)计算试样中 I、Ⅲ型胶原蛋白含量:

$$X_i = \frac{C_i \times X \times V \times M_1}{m \times M_2 \times n \times 1\,000} \quad (1)$$

式中, X_i 表示试样中 I、Ⅲ型胶原蛋白含量; C_i 表示质谱法测得的小鼠 I、Ⅲ型胶原蛋白特征多肽浓度; V 表示样品最终定容体积; M_1 表示 I 型或Ⅲ型胶原蛋白的分子质量; M_2 表示 I 型或Ⅲ型胶原蛋白特征多肽的分子质量; m 表示最终样液代表的试样质量; X 表示酶解后样品稀释倍数; n 表示 I 型或Ⅲ型胶原换算系数,列于表 1。

根据式(2)、(3)计算 I、Ⅲ型胶原蛋白比例:

$$\text{I 型胶原蛋白比例} = \frac{X_{\text{I}}}{X_{\text{I}} + X_{\text{Ⅲ}}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\frac{\text{Ⅲ型胶原蛋白比例}}{1 - \text{I 型胶原蛋白比例}} \quad (3)$$

表 1 I、Ⅲ型胶原换算系数

Table 1 Conversion coefficients of type I and Ⅲ collagen

胶原类型	所属肽链	换算系数
Collagen type	Peptide chain	Conversion coefficient (n)
I 型	α1 链	2
I 型	α2 链	1
Ⅲ 型	α1 链	3

1.6 统计学分析

采用 SAS 9.3 统计软件处理数据,并用 $X \pm S$ (标准偏差)表示,对各组数据进行单因素方差分析,组间比较采用 SNK-q 检验, $P \leq 0.05$ 表示差异统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 小鼠肝、肺、肾中特征多肽识别

小鼠肝、肺、肾中胶原蛋白酶解产物的总离子流图示于图1。小鼠 I 型和Ⅲ型胶原蛋白存

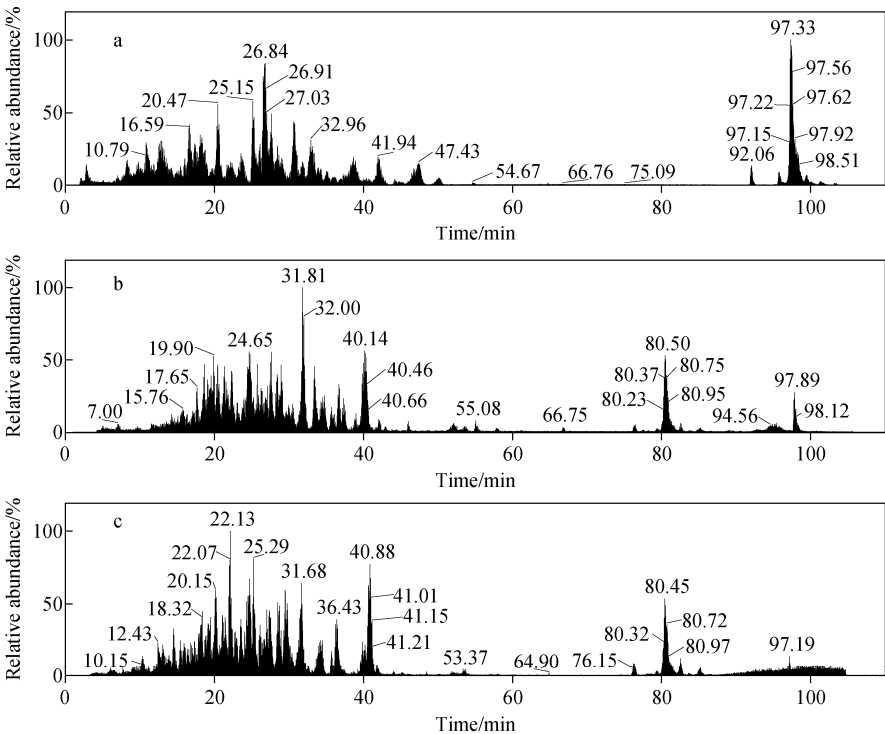


图 1 小鼠肝(a)、肺(b)、肾(c)酶解产物的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of the digestion from liver (a) , lung (b) and kidney (c) in mouse

在大量的局部相同序列和部分差异序列,其中差异序列可作为Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白的特征多肽。利用 Protein Discoverer 软件检索得到的质谱图,并对小鼠Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白的氨基酸序列进行比对。小鼠肾脏中 m/z 443.722 的一级和二级质谱图示于图 2,其二级碎片离子与多肽 GSEGPQGVR 的理论碎片一致(X_{corr} 2.956)。通过 Blast 多序列比对,多肽 GSEGPQGVR 只存

在于小鼠的Ⅰ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链中,因此,其可作为小鼠Ⅰ型胶原蛋白的特征多肽。采用同样方法鉴定到 5 种Ⅰ型和 2 种Ⅲ型胶原特征多肽,列于表 2。

用于Ⅰ、Ⅲ型胶原定量分析的特征多肽应满足以下条件:1) 在所有样本中均能检测到;2) 属于胶原蛋白三螺旋结构的一部分;3) 属于胰蛋白酶特异性酶切肽段,不存在漏切位点;4) 特征多肽的 HPLC-MS/MS 色谱峰重复性

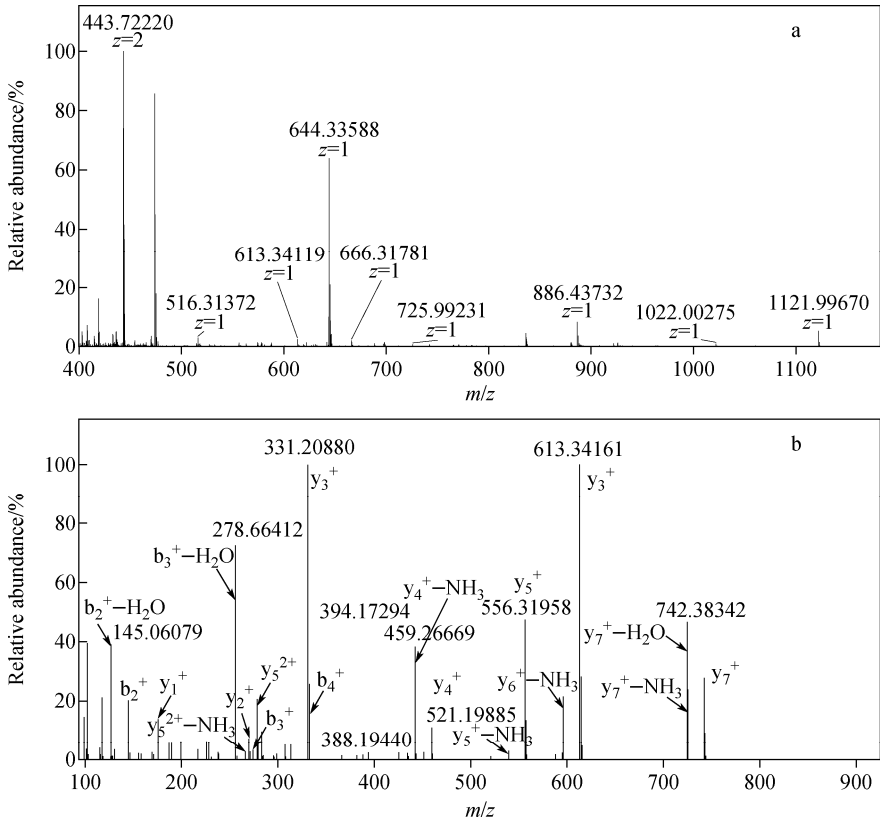


图 2 小鼠肾脏中 m/z 443.722 的一级(a)和二级(b)质谱图

Fig. 2 MS (a) and MS/MS (b) spectra of ion m/z 443.722 detected in mouse kidney

表 2 小鼠肝、肺、肾中识别的特征多肽

Table 2 Identified marker peptides of the liver, lung and kidney in mouse

胶原类型 Collagen type	特征肽序列 Sequence of marker peptide	分子质量 Molecular weight	电荷数 Charge	质荷比 m/z
Ⅰ型 $\alpha 1$ 链	GPAGPQGPR	835.4	2	418.7
Ⅰ型 $\alpha 1$ 链	GSEGPQGVR	885.4	2	443.7
Ⅰ型 $\alpha 1$ 链	GETGPAGPAGPIGPAGAR	1531.8	3	511.6
Ⅰ型 $\alpha 2$ 链	GVVGPQGAR	839.5	2	420.8
Ⅰ型 $\alpha 2$ 链	GPAGPSGPVVK	922.5	2	462.3
Ⅲ型 $\alpha 1$ 链	GAPGPQGPR	835.4	2	418.7
Ⅲ型 $\alpha 1$ 链	GPSGFR	619.3	1	620.3

符合要求;5) 所选特征多肽必须为特定胶原类型特有,即在 SwissProt/NCBIInr 数据库中不存在任何其他蛋白质^[19-21]。根据以上条件,本研究分别选择 GSEGPQGVR、GPSGFR 作为小鼠 I、Ⅲ型胶原蛋白定量分析的特征多肽。小鼠肝、肺、肾组织基质较复杂,为排除基质对定量结果的影响,采用内标法分析胶原蛋白含量,设计符合胶原蛋白氨基酸序列特征 G(甘氨酸)-X-Y 的内标肽 GLAGMK;通过 Swis-sProt/NCBIInr 数据库检索,多肽 GLAGMK 不存在于小鼠体内;此多肽与目标肽的保留时间接近,且在 HPLC-MS/MS 谱图中信号稳定。因此,选择多肽 GLAGMK 作为小鼠 I、Ⅲ型胶原蛋白定量分析的内标肽。

2.2 分析方法验证

2.2.1 标准曲线、线性范围、定量限、检出限

利用内标法定量分析小鼠肝、肺、肾中的 I、Ⅲ型胶原蛋白,并考察多肽 GSEGPQGVR 和 GPSGFR 的线性范围、检出限、定量限。

用 0.05 mol/L NH₄HCO₃ 溶液配制 1、5、10、50、100、250、500 mg/L 的特征多肽 GSEG-PQGVR 和 GPSGFR 混标溶液,并与内标肽 GLAGMK 按体积比 1:1 混合,按照 1.5 节方法进行定量分析。多肽 GSEGPQGVR、GPSGFR 和内标肽GLAGMK的色谱图示于图 3,保留时

间分别为 5.21、5.74、6.45 min。多肽 GSEG-PQGVR 和 GPSGFR 的最小检出浓度分别为 8、5 μg/L。以特征多肽峰面积与内标肽峰面积比值为横坐标,特征多肽浓度为纵坐标,得到线性回归方程,列于表 3。特征多肽 GSEG-PQGVR 和 GPSGFR 在 1~500 mg/L 浓度范围内的线性关系良好。

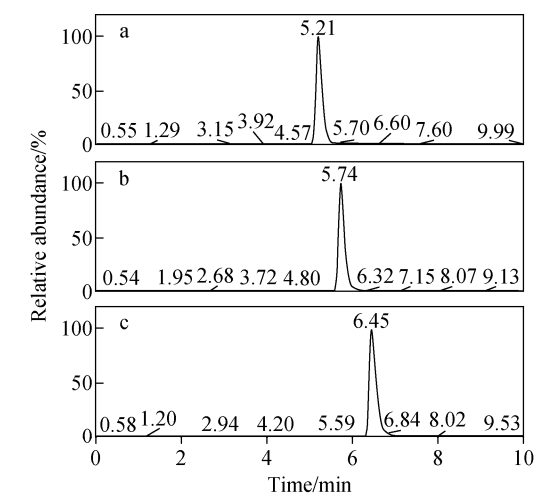


图 3 特征多肽 GSEGPQGVR(a)、GPSGFR(b)、内标肽 GLAGMK(c)的色谱图
Fig. 3 Chromatograms of marker peptide GSEGPQGVR (a), GPSGFR (b) and internal peptide GLAGMK (c)

表 3 I 型和Ⅲ型胶原蛋白特征多肽的定量标准曲线
Table 3 Standard curves of the type I and Ⅲ collagen marker peptide

特征多肽序列 Marker peptide sequence	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	线性范围 Linearity range/ (mg/L)	检出限 Limit of detection/ (μg/L)	定量限 Limit of quantitation/ (μg/L)
GSEGPQGVR	y=0.000885x+0.07385	0.9972	1~500	8	12
GPSGFR	y=0.002517x+0.04585	0.9995	1~500	5	9

2.2.2 回收率、精密度和稳定性 向已知浓度的肝、肺、肾基质样品中添加相应浓度的特征多肽,GSEGPQGVR 和 GPSGFR 的添加量分别为 500、300 ng,每个样品重复 3 次,计算平均添加回收率和相对标准偏差,列于表 4。结果表明,2 种特征多肽的添加回收率在 86%~118% 之间,相对标准偏差小于 4%。其中,肝、肺、肾样品的回收率分别为 112%~118%、93%~109%、86%~87%。

分别取 50 μg/L 特征多肽 GSEGPQGVR 和 GPSGFR,按 1.5 节方法进行 6 次重复实验。特征多肽 GSEGPQGVR 和 GPSGFR 的峰面积标准偏差分别为 2.24%、3.62%,表明本方法的精密度良好,能够满足检测要求。
将肝、肺、肾 3 种组织酶解产物于-20 ℃保存,分别于 1、7、14 天对 I、Ⅲ型胶原特征多肽 GSEGPQGVR 和 GPSGFR 进行检测,结果列于表5。可见,不同组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白特征

表 4 I、Ⅲ型胶原蛋白特征多肽的加标回收率及相对标准偏差

Fig. 4 Standard addition recovery and relative standard deviation of type I and Ⅲ collagen marker peptide

特征多肽 Marker peptide	添加水平 Addition level/ng	肝 Liver		肺 Lung		肾 Kidney	
		平均回收率 Average recovery/ %	相对标准偏差 Relative standard deviation/%	平均回收率 Average recovery/ %	相对标准偏差 Relative standard deviation/%	平均回收率 Average recovery/ %	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
GSEGPQGVR	500	112.58	1.02	108.79	2.18	86.78	3.65
GPSGFR	300	117.58	1.89	92.56	1.67	86.24	2.65

多肽的峰面积 RSD 均低于 4%，表明该方法较稳定。

表 5 肝、肺、肾组织酶解产物放置不同天数后，I、Ⅲ型胶原蛋白特征多肽峰面积相对标准偏差

Table 5 Relative standard deviation of type I and Ⅲ collagen marker peptide after the hydrolysates of liver, lung and kidney with different days

特征多肽 Marker peptide	相对标准偏差 RSD/%		
	肝 Liver	肺 Lung	肾 Kidney
GSEGPQGVR	3.21	2.75	3.02
GPSGFR	2.62	2.84	2.58

2.3 小鼠生长过程中,肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白比例的变化

取新鲜的小鼠肝、肺、肾组织,按照 1.3 节方法除杂,取 5.0 mg 冻干后的组织样品,酶解,利用 1.5 节方法对 0~18 周小鼠肝、肺、肾组织样品中的 I 型和Ⅲ型胶原蛋白特征多肽含量进行分析,并根据式(1)计算 I、Ⅲ型胶原蛋白含量,根据式(2)计算 I 型胶原蛋白的比例,结果示于图 4。可见,肝中 I 型胶原蛋白的比例在 0~1 周呈迅速增加,1~3 周基本不变,3~15 周快速增加,15~18 周略有下降;肺中 I 型胶原蛋白的比例在 0~6 周内呈快速增加的趋势,6~12 周基本平稳,12~18 周缓慢增加;肾中 I 型胶原蛋白的比例在 0~1 周呈迅速增加的趋势,1~6 周增加速度缓慢,6~15 周基本平稳,15~18 周开始增加。

综上所述,小鼠生长过程中,肝、肺、肾中 I 型胶原蛋白的比例均呈增加趋势,即第 0~1 周呈快速增加趋势,第 6~12 周呈平稳趋势。3 种脏器中 I 型胶原蛋白的比例由高到低大致为肾>肝>肺。相反,肝、肺、肾中Ⅲ型胶原蛋

白的比例均呈下降趋势,即第 0~1 周快速下降,第 1~6 周缓慢下降,第 6~12 周呈平稳趋势,第 12~18 周缓慢下降。3 种脏器中Ⅲ型胶原蛋白的比例由高到低依次为肺>肝>肾。

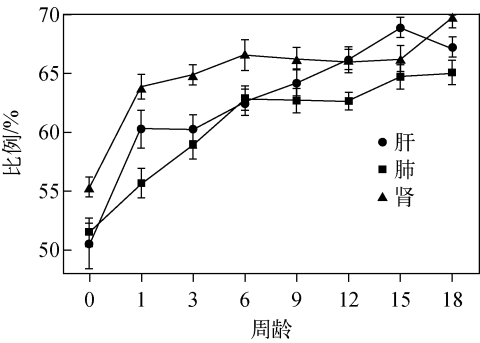


图 4 小鼠生长过程中,肝、肺、肾中 I 型胶原蛋白比例的变化

Fig. 4 Ratio changes of type I collagen in liver, lung and kidney during growth of mouse

2.4 小鼠生长过程中,肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白总量的变化

根据 2.3 节得到的 I、Ⅲ型胶原蛋白含量,分析小鼠生长过程肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白总量的变化,示于图 5。结果表明,在 0~9 周内,肝中 I、Ⅲ型胶原蛋白总量随周龄的增加而显著增加($p<0.01$),第 9 周达到最高值 8.07 mg/g,9 周之后开始缓慢下降,第 18 周的 I、Ⅲ型胶原蛋白总量为 5.38 mg/g;在 0~6 周内,肺中 I、Ⅲ型胶原蛋白总量随周龄的增加而显著增加($p<0.01$),第 6 周达到最高值 37.62 mg/g,6 周之后开始下降,第 18 周的 I、Ⅲ型胶原蛋白总量为 25.71 mg/g,6~18 周下降显著($p<0.01$);在 0~9 周内,肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白总量随周龄的增加而增加,其中 0~1 周和 1~3 周之间均呈显著增加趋势($p<$

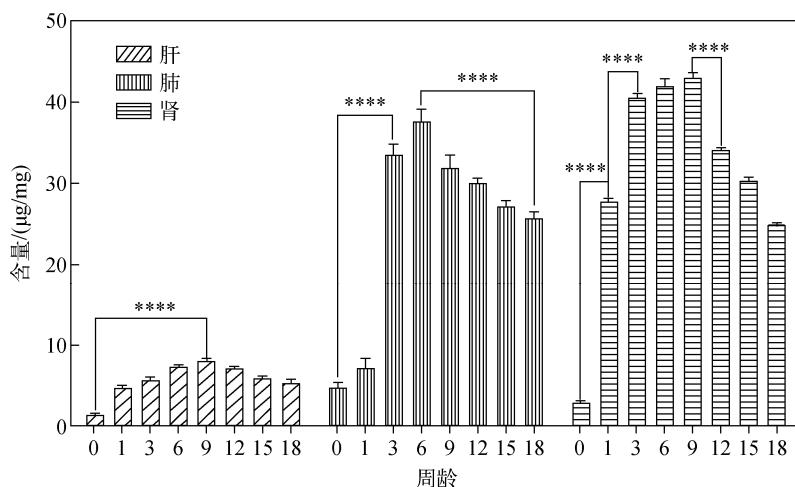


图5 小鼠生长过程中,肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白总量的变化

Fig. 5 Total contents of type I and type III collagen in liver, lung and kidney during growth of mouse

0.01), 3~9周缓慢增加,第9周达到最高值 43.10 mg/g,9周之后开始迅速下降,其中第9~12周下降显著($p < 0.01$),第18周的 I、Ⅲ型胶原蛋白总量为 25.01 mg/g,低于第1周的胶原蛋白含量。

综上所述,小鼠生长过程中,肝、肺、肾中 I、Ⅲ型胶原蛋白总量均呈先增加后降低的趋势,与羟脯氨酸法测得的变化趋势一致^[22]。3种脏器中, I、Ⅲ型胶原蛋白总量由高到低的顺序为肾>肺>肝。

3 结论

本研究建立了 HPLC-MS/MS 法测定小鼠肝、肺、肾中的 I、Ⅲ型胶原特征多肽含量,并考察了方法的添加回收率、精密度、稳定性等。结果表明,该方法灵敏度高、准确度高、稳定性好,可用于组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白特征多肽含量的测定。随着小鼠周龄的增加,肝、肺、肾中 I 型胶原蛋白比例呈增加趋势, I、Ⅲ型胶原蛋白总量呈先增加后降低的趋势。该研究可为与胶原蛋白有关的疾病诊断提供辅助方法。

参考文献:

[1] PRASHANT K B, PADMA B D. Collagen and collagenolytic proteases: a review[J]. Biocatal Agric Biotechnol, 2018, 15: 43-55.
[2] ARAI K Y, HARA T, NAGATSUKA T, KUDO C, TSUCHIYA S, NOMURA Y, NISHIY-

AMA T. Postnatal changes and sexual dimorphism in collagen expression in mouse skin[J]. Plos One, 2017, 12(5): 1-21.

[3] NIEMINEN H J, YLITALO T, KARHULA S, SUURONEN J P, KAUPPINEN S. Determining collagen distribution in articular cartilage using contrast enhanced micro-computed tomography[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23: 1 613-1 621.
[4] 宋唯一,刘国民,袁海波,彭传刚,徐坤,殷德辉,曹洪倩,李娟. 正交试验法提取鼠尾腱胶原工艺的优化[J]. 吉林大学学报, 2015, 41(4): 858-863.
SONG Weiyi, LIU Guomin, YUAN Haibo, PENG Chuan'gang, XU Kun, YIN Dehui, CAO Hongqian, LI Juan. Optimization of extraction of rat tail tendon collagen process by orthogonal test[J]. Journal of Jilin University, 2015, 41(4): 858-863(in Chinese).
[5] QU Z X, LI F, MA C D, LIU J, LI S D, WANG W L. Effects of gentiana scabra bage on expression of hepatic type I, III collagen proteins in Paragonimus skrjabini rats with liver fibrosis[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(1): 60-63.
[6] 王晓静,牛艳慧,李宁,高勇,贾晨光. 特发性肺纤维化肺活检组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白的表达及意义[J]. 河北医科大学学报, 2011, 32(7): 812-813.
WANG Xiaojing, NIU Yanhui, LI Ning, GAO Yong, JIA Chenguang. Expression and significance of type I and III collagen in pulmonary

- biopsy tissue of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Journal of Hebei Medical University, 2011, 32 (7): 812-813(in Chinese).
- [7] OMIREENI E, SIDDIQI N J, ALHOMIDA A S. Biochemical and histological studies on the effect of sodium fluoride on rat kidney collagen [J]. J Saudi Chem Soc, 2010, 14(4): 413-416.
- [8] VARANI J, DAME M K, RITTIE L, FLIGIEL S E, KANG S, FISHER G J, VOORHEES J J. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation[J]. Am J Pathol, 2006, 168(6): 1 861-1 868.
- [9] 聂莉,程德云,朱刚艳,刘淑华,樊莉莉,张勇. 龙血竭对肺纤维化大鼠肺组织转化生长因子 β 1mRNA及I型胶原蛋白表达的影响[J]. 河北中医, 2010(7): 1 071-1 074.
- NIE Li, CHENG Deyun, ZHU Gangyan, LIU Shuhua, FAN Lili, ZHANG Yong. Effect of the dragon blood on TGF- β 1 mRNA and collagen I expression in lungs of rats with pulmonary fibrosis[J]. Hebei JTCM, 2010(7): 1 071-1 074(in Chinese).
- [10] ROJKIND M, GIAMBRONE M A, BIEMPI-CAL L. Collagen types in normal and cirrhotic liver[J]. Gastroenterology, 1979, 76(4): 710-719.
- [11] CHEN W, ROCK J B, YEARSLY M M, FERRELL L D, FRANKEL W L. Different collagen types show distinct rates of increase from early to late stages of hepatitis C-related liver fibrosis[J]. Hum Pathol, 2014, 45: 160-165.
- [12] GERRIETS E J, REISER K M, LAST J A. Lung collagen cross-links in rats with experimentally induced pulmonary fibrosis[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1 316: 121-131.
- [13] 杨政,白云凯. I、IV型胶原和肾脏疾病[J]. 国际泌尿系统杂志, 2005, 25(5): 78-84.
- YANG Zheng, BAI Yunkai. Type I and IV collagen and kidney disease[J]. Int J Urol Nephrol, 2005, 25(5): 78-84(in Chinese).
- [14] YASMIN H, KABASHIMA T, RAHMAN MS, SHIBATA T, KAI M. Amplified and selective assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions[J]. Sci Rep, 2014, 4: 4 950.
- [15] KITAMURA A, ISHIDA Y, KUBOTA H, PACK C G, HOMMA T, ITO S, ARAKI K, KINJOM K, NAGATA K. Detection of substrate binding of a collagen-specific molecular chaperone HSP47 in solution using fluorescence correlation spectroscopy[J]. Biochem Bioph Res Commun, 2018, 497(1): 279-284.
- [16] MARIA L D S C, SPINELLI E, RODRIGUES S V. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay[J]. Food Chem, 2015, 173(15): 619-623.
- [17] BROWN S R, CLEVELAND E M, DEEKEN C R, HUITRON S S, DAVIS K G. Type I/type III collagen ratio associated with diverticulitis of the colon in young patients[J]. J Surg Res, 2017, 207: 229-234.
- [18] SONG H, ZHANG S, ZHANG L, LI B. Effect of orally administered collagen peptides from bovine bone on skin aging in chronologically aged mice[J]. Nutrients, 2017, 9(11): 1 209.
- [19] PATARIDIS S, ECKHARDT A, MIKULIKOVA K, SEDLAKOVA P, MIKSIK I. Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS [J]. J Sep Sci, 2008, 31(20): 3 483-3 488.
- [20] 孙坤,杨帆,孔英俊,康跻耀,曹玮,杨小雁,查圣华,张贵锋,王明林. 基于生物质谱的胶原蛋白定量检测方法[J]. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1 660-1 668.
- SUN Kun, YANG Fan, KONG Yingjun, KANG Jiyao, CAO Wei, YANG Xiaoyan, ZHA Sheng-hua, ZHANG Guifeng, WANG Minglin. Collagen quantitation by detection of marker peptides with HPLC-MS[J]. Chin J Biotech, 2015, 31 (11): 1 660-1 668(in Chinese).
- [21] PATARIDIS S, ECKHARDT A, MIKULÍKOVÁ K, SEDLÁKOVÁ P, MIKIK I. Determination and quantification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS[J]. Curr Anal Chem, 2009, 5(4): 316-323.
- [22] 高建萍,张扬,邢芳毓,孔英俊,张贵锋. 小鼠生长过程中肝,肺,肾胶原蛋白与MMP-1含量变化[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2): 646-654.
- GAO Jianping, ZHANG Yang, XING Fangyu, KONG Yingjun, ZHANG Guifeng. Changes of collagen and MMP-1 in liver, lung, kidney during growth of mice[J]. Chin J Biotech, 2021, 37 (2): 646-654(in Chinese).
- (收稿日期:2021-11-11;修回日期:2022-03-01)