

## 基于液相色谱-串联质谱技术的阿胶粉蛋白组分分析及其 抗氧化活性评价

解晓<sup>1</sup> 李聪<sup>1</sup> 张建岭<sup>1</sup> 陈智杰<sup>1</sup> 陶春香<sup>2</sup> 扶美梅<sup>3\*</sup>  
尤惠琳<sup>4</sup> 郭金山<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>(东阿阿胶健康产业科技有限公司,聊城市功能性食品研究开发重点实验室,  
营养健康消费品聊城市工程研究中心,聊城 252201)

<sup>2</sup>(中国科学院长春应用化学研究所,中国科学院高性能合成橡胶及其复合材料重点实验室,长春 130022)

<sup>3</sup>(南方医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室,国家药品监督管理局化妆品安全评价重点实验室,  
广东省药品监督管理局化妆品安全与功效关键技术重点实验室,广州 510515)

<sup>4</sup>(广东粤港澳大湾区黄埔材料研究院,再生医学与修复材料中心,广州 511363)

**摘要** 阿胶中含有多种具有生物活性的蛋白质,这些成分使阿胶在保健方面展现出多重功效。本研究运用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法,对阿胶粉中的蛋白质组成进行了系统鉴定与分析,鉴定出多种功能蛋白,包括多种中间纤维蛋白、胶原蛋白、免疫调节蛋白以及多种抗氧化相关蛋白。进一步通过使用人真皮成纤维细胞(HSF)评估阿胶粉的细胞毒性、增殖及迁移能力。结果表明,阿胶粉在实验质量浓度范围内(0.156~20 mg/mL)无显著细胞毒性,并能促进HSF细胞增殖和迁移,初步表明了阿胶粉在皮肤修复领域的潜力。为探究阿胶的抗氧化应激活性,进一步采用过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导细胞氧化应激模型,检测阿胶粉对细胞内活性氧(ROS)的清除能力及抗氧化酶活性的影响。实验表明,经阿胶粉预处理后,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的ROS水平被显著抑制,同时细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性均有所提升,这证实其抗氧化作用与增强内源性抗氧化防御系统有关。蛋白质组学分析进一步揭示,阿胶粉可能通过调控热休克蛋白B家族、胆绿素还原酶B、血红蛋白亚基 $\alpha$ 以及核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路相关蛋白的表达,调控机体氧化应激,在一定程度上减轻细胞氧化应激损伤。综上,本研究阐明了阿胶的蛋白质组成及验证其在抗氧化应激中的作用与机制,这为拓展阿胶在皮肤修复与抗衰老领域的应用奠定了科学基础。

**关键词** 阿胶粉;蛋白质组学;活性氧清除;氧化应激

中图分类号:O636

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2026)03-0396-15

阿胶(Asini corii colla, ACO)作为中国传统中药的代表性产品,已有2000多年的药用历史,在《神农本草经》等经典医籍均记载其具有补血止血、滋阴润燥等功效。现代药理学研究揭示,阿胶富含胶原蛋白、肽、功能性蛋白质及多种微量元素等。这些成分使其在治疗贫血、免疫调节、抗氧化与抗衰老等方面均表现出显著的生物活性<sup>[1]</sup>。然而,阿胶复杂的蛋白质组成与其药理活性的分子关联机制尚未完全阐明,特别是抗氧化防御和细胞修复方面仍不完全清楚,这严重制约了阿胶现代化研究与产业化发展<sup>[2]</sup>。

近年来,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术已成为解析复杂生物样本蛋白质组成的金标准<sup>[3]</sup>。该技术具有高灵敏度、高分辨率和高通量等优势,使得对中药这种多组分复杂体系进行全面的蛋白质分析成为可能,为阐明传统药物的生物活性成分提供了表征手段<sup>[4]</sup>。LC-MS/MS技术已成功应用于人参、灵芝和冬虫夏草等名贵中药的研究。在相关研究中,李青等<sup>[5]</sup>基于高效液相色谱法,通过分析皂苷比例与规律建立了人参提取物的鉴别体系;刘高强等<sup>[6]</sup>则利用超高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)技术,解析了灵芝发酵菌体的胞内脂质构成;另外,张朝凤等<sup>[7]</sup>围绕野生冬虫夏草的多种成分,采用高效液相色谱(HPLC)技术进行了定量分析与综合评价,并构建了其品质评级模型。然

2025-09-03 收稿;2025-11-28 接受

东阿阿胶健康产业科技有限公司横向项目(No. DEEJ-YB-2024-10-190)资助

\*E-mail: fmm05037726@163.com; jsguo4127@163.com

而,对中药的成分分析与功能验证相结合的深入研究才是当前研究的重中之重。

氧化应激作为多种病理生理过程的核心机制,已被证实是众多疾病发生发展和机体衰老的共同病理基础<sup>[8]</sup>。氧化应激损伤效应具有显著的组织特异性。例如,在皮肤系统中,氧化应激通过损害皮肤成纤维细胞的功能,导致皮肤中胶原蛋白合成减少以及降解胶原蛋白的基质金属蛋白酶(MMP)活性异常升高,这一过程已被确认为皮肤光老化和病理性瘢痕形成的关键分子事件<sup>[9]</sup>;在神经系统,氧化应激诱导的神经元膜脂质过氧化与 $\beta$ 淀粉样蛋白沉积形成恶性循环,不仅加速阿尔茨海默病的病理进程,还会破坏血脑屏障的结构完整性,并加重神经炎症反应<sup>[10]</sup>;在心血管领域,常见疾病动脉粥样硬化斑块的形成与发展氧化修饰的低密度脂蛋白(ox-LDL)密切相关,而心肌细胞的氧化损伤也构成了心力衰竭发展的重要环节<sup>[11]</sup>。鉴于氧化应激在多系统疾病中的核心作用,其调控机制研究已成为当代生命科学领域的前沿热点。

当前国际上对动物胶类药物的研究主要集中在猪皮、鱼皮和牛皮等的提取物的理化性质和临床应用<sup>[12]</sup>。相比之下,对于驴皮提取物—阿胶的研究较为粗浅,并未形成较为系统化的研究。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳及三合一高分辨质谱等技术,苏宁等<sup>[13]</sup>解析出阿胶所含的核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖和光蛋白聚糖等多种小分子蛋白聚糖与活性蛋白。另一项研究中,Li等<sup>[14]</sup>聚焦于鹿皮胶与阿胶的蛋白组学差异,并采用4D-label-free技术进行比较。李聪等<sup>[15]</sup>基于功能成分表征、体外抗氧化和细胞实验的角度,发现阿胶和阿胶糕不同提取物具有抗皮肤衰老的功效。绰尔鹏等<sup>[16]</sup>系统评估了阿胶糕中酚类物质的改善肤色功效,发现其提取物可有效抑制酪氨酸酶活性并减少细胞黑色素生成。段小波等<sup>[17]</sup>则揭示了阿胶及阿胶肽降低人脐静脉内皮细胞(HUVEC)氧化应激的机制,可能与改善细胞增殖、提升抗氧化酶活性、促进血管内皮生长因子表达及NO分泌有关。然而,这些研究并未将阿胶蛋白质组的系统性解析出的成分分析与功能验证相结合,另一方面是对信号通路调控的认识较为模糊,阿胶通过何种途径调控氧化应激是不清晰的。

为深入探究阿胶的蛋白质组成及其在皮肤修复与抗氧化方面的作用机制,本研究采用综合策略,将基于LC-MS/MS的蛋白质组学分析与体外细胞实验相结合。一方面全面解析阿胶粉的蛋白质组成,识别其中与胶原合成及氧化应激调节相关的关键功能性蛋白质;另一方面评估阿胶粉对人皮肤成纤维细胞(HSFs)的细胞毒性、增殖与迁移能力的影响,以明确其在组织修复方面的潜力;然后,进一步通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化应激模型,考察阿胶粉的抗氧化效果,包括对细胞内活性氧(ROS)水平,以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等关键抗氧化酶活性的影响。在此基础上,结合蛋白质组学数据深入分析,预期阐明阿胶粉中如热休克蛋白B家族、胆绿素还原酶B(BLVRB)、血红蛋白亚基 $\alpha$ 等关键蛋白以及NF- $\kappa$ B信号通路等在组分-靶点-通路级联调控网络中的作用机制,从而系统揭示阿胶在缓解氧化损伤中的多靶点作用原理。本研究旨在通过传统知识与现代蛋白质组学、细胞生物学方法的结合,为阿胶在皮肤修复与抗衰老领域的精准应用提供科学依据与实践指导。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

TSQ Altis型液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(赛默飞世尔科技公司);UltiMate 3000型快速分离四元系统液相色谱(UHPLC,赛默飞世尔科技公司);Q-Exactive HF-X型质谱仪(LC-MS,赛默飞世尔科技公司);XS205型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);CPA225D型分析天平(德国赛多利斯公司);IKA A11型高速粉碎机(德国艾卡公司);KQ-500DE型超声波提取仪(上海精密科学仪器有限公司);3-18KS型高速冷冻离心机(德国西格玛奥德里奇公司);Vortex-Genie 2型涡旋混合器(美国Scientific Industries公司);DK-8D型恒温水浴槽(上海一恒科学仪器有限公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水系统(上海纳锘实业有限公司);THZ-82A型气浴恒温振荡器(天津赛得利斯实验仪器制造厂);超滤离心管(截留相对分子质量 $1.0 \times 10^4$ ,美国密理博公司);HR50-II A2型生物安全柜(青岛海尔生物医疗有限公司);TD4型低速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);BB150型二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技公司);Ts2-FL型倒置荧光显微镜(尼康仪器有限公司);Infinite® 200 PRO型多功能酶标仪(瑞士TECAN公司)。

阿胶粉(批号:20240802)东阿阿胶股份有限公司提供;胰蛋白酶(序列分析纯)购自美国Promega公司;乙腈(质谱级)及甲酸(质谱级)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;碳酸氢铵(优级纯)购自国药集团化学试剂有限公司;三氯乙酸(分析纯)及丙酮(分析纯)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;阿胶对照药材由北检检测技术有限公司提供,符合《中国药典》2015年版规范;Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM,含4.5 g/L葡萄糖)、青霉素-链霉素(10000 U/mL)、胰酶(0.25%)和胎牛血清(FBS,100%)购自美国Gibco公司;磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L)购自北京普西唐生物科技有限公司;生育酚(VE,98%)和过氧化氢( $H_2O_2$ ,33%)均购自广州化学试剂厂;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂和吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双荧光染色试剂盒均购自武汉亚科因生物技术有限公司;ROS活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司;SOD、CAT和GPX试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。永生化人真皮成纤维细胞系(HSF)购自赛百慷上海生物技术股份有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 阿胶粉特征肽(驴源特异性标志物)分析

#### 1.2.1.1 样品处理

取8 mg冷冻阿胶粉碎样品溶解后定容至2 mL,缓慢加入等体积30%三氯乙酸溶液,振荡混匀后于4 °C静置20 min。随后,将样品于7000×g下离心5 min后弃去上清液;沉淀部分使用2 mL冰丙酮洗涤2次并离心弃去上清液。随后加入10~20 mL 1%(质量分数)碳酸氢铵溶液,经超声处理使其充分溶解,得到阿胶粉提取液。该提取液经0.22 μm滤膜过滤后,取400 μL滤液与40 μL胰蛋白酶溶液(1 mg/mL)混合,于37 °C恒温酶解16 h。同时,将阿胶对照品按相同流程处理,并配制质量浓度为0.25~2.0 mg/mL的标准工作液用于同步酶解。

#### 1.2.1.2 LC-MS/MS分析

采用Waters ACQUITY UPLC BEH  $C_{18}$ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以含0.1%甲酸的水溶液的A相和含0.1%甲酸的乙腈溶液的B相为流动相,流速0.3 mL/min,柱温30 °C。梯度洗脱程序设定为:0~1.0 min维持5% B相;1.0~4.5 min线性升至30% B相;5.6~6.6 min升至95% B相;6.7 min恢复至5% B相并平衡至8.0 min。进样量5 μL。质谱分析在电喷雾正离子模式(ESI<sup>+</sup>)下,采用多反应监测(MRM)进行扫描。离子源参数经优化:喷雾电压3500 V,离子源温度300 °C。监测离子对为:定量离子对591.8/910.5(碰撞能量22 eV),定性离子对591.8/556.3(碰撞能量22 eV)。

#### 1.2.1.3 定量与定性

**定量分析** 以标准溶液浓度为横坐标,定量离子对(591.8/910.5)的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,并据此通过外标法进行含量计算。

**定性确认** 试样特征肽的鉴定满足如下条件:保留时间与标准品的偏差不超过±2.5%,且离子丰度比的相对偏差符合规定标准。样品中阿胶含量的测定实验由北检检测技术有限公司依据《DB37/T 4010-2020》执行(报告编号:BJ-20250507187)。方法定量限为0.02 mg/mL,加标回收率95.0%~107.9%,批内及批间相对标准偏差(RSD)分别≤15%和≤20%。

### 1.2.2 阿胶粉蛋白质组成鉴定分析

#### 1.2.2.1 样品处理

**未酶解阿胶样品(S1)** 准确称取50 mg阿胶粉,使用1%碳酸氢铵溶液对阿胶粉进行超声溶解,并定容至5 mL。取上述溶液1.0 mL,过0.22 μm滤膜,精密量取200 μL滤液至2 mL超滤离心管滤膜管中,使用离心力为15000×g的离心机在4 °C离心10 min,随后收集下层滤液。

**酶解阿胶样品(S2)** 同样称取50 mg阿胶粉,使用5 mL体积的1%碳酸氢铵溶液溶解。随后,取1.0 mL溶解的阿胶溶液使用0.22 μm滤膜过滤,并精密量取200 μL滤液至2 mL超滤离心管滤膜管中,加胰蛋白酶溶液(1 mg/mL)20 μL,混匀,37 °C恒温酶解16 h,使用离心力为15000×g的离心机,4 °C离心10 min,收集下层滤液。

#### 1.2.2.2 浓缩复溶

将上述S1和S2阿胶处理样品冷冻干燥,随后将这2个样品用30 μL流动相A(体积分数2%乙腈,体

积分数0.1%甲酸)重新溶解,随后在20000×g离心力下离心10 min后,取上清进样上机测试。

### 1.2.2.3 液相和质谱分析

液相条件 采用UltiMate 3000 UHPLC进行分离,样品首先经trap柱进行富集与脱盐,随后进入自装C18分析柱(350 mm×150 μm, 1.8 μm)分离。流动相为:A相(2%乙腈+0.1%甲酸)与B相(98%乙腈+0.1%甲酸)。具体洗脱程序按表1的梯度进行,柱温设定为25 °C,流速为500 nL/min,进样量为5 μL。

表1 梯度洗脱组分比

Table 1 Gradient elution component ratio

Time/min	A(0.2% acetonitrile-0.1% formic acid)/%	B(98% acetonitrile-0.1% formic acid)/%
0	95	5
2	95	5
43	75	25
47	65	35
49	20	80
51	20	80
60	95	5

质谱条件 实验在数据依赖采集DDA模式下运行,关键参数设置如下:离子源电压为1.9 kV;一级全扫描( $m/z$  350~1500)分辨率设为60000;二级质谱起始 $m/z$ 固定为100;分辨率15000。二级碎裂的母离子筛选条件为:电荷2+到6+,峰强度超过10000的强度排在前三的母离子。离子碎裂模式为HCD,碎片离子在Orbitrap中进行检测。动态排除30 s。AGC设置为:一级 $3 \times 10^6$ ,二级 $1 \times 10^5$ 。

## 1.2.3 阿胶粉生物相容性

### 1.2.3.1 阿胶浸提液的制备

将5 g阿胶粉溶于10 mL超纯水中,使用0.22 μm滤膜过滤除菌,制成500 mg/mL阿胶粉浸提液,备用。

### 1.2.3.2 细胞毒性

处于指数生长期的HSF细胞,制备成单细胞悬液后,以每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞的密度接种至96孔板。随后将培养板置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育24 h,待细胞充分贴壁后更换新的培养液。另外,使用完全培养基(含有10%血清)制备的不同浓度的阿胶粉溶液再孵育24 h。去除培养基后,用PBS清洗1~2次,向每个孔中加入CCK-8溶液,置于37 °C细胞培养箱中,继续孵育1 h。最后,使用酶标仪检测各孔在450 nm的吸光度值(OD值)。

### 1.2.3.3 细胞增殖

将重悬好的HSF细胞接种于24孔板中,孵育使细胞贴壁。更换培养基,使用完全培养基(体积分数2%血清)配制0.15625、0.625和2.5 mg/mL阿胶粉溶液,将使用完全培养基培养的细胞作为对照。在培养箱中放置1、3和5 d后,进行CCK8测定和AO/EB染色<sup>[18]</sup>。

### 1.2.3.4 细胞迁移

细胞划痕 HSF细胞接种于24孔板中,待细胞达到100%汇合后,使用1000 μL移液器吸头垂直划痕,并用PBS清洗细胞碎片,再用完全培养基(2%血清)配制0.15625、0.625和2.5 mg/mL阿胶粉溶液培养细胞24和48 h,然后通过倒置荧光显微镜记录孔板内划痕不同时间点的图像<sup>[19]</sup>。在进行细胞划痕实验时,将培养基更换为含2% FBS的培养基,以降低血清对细胞迁移的背景刺激,从而更特异地评估阿胶的作用。

Transwell侵袭实验 将不同浓度的阿胶溶液添加到24孔板中,再将Transwell小室放入24孔板中,确保小室和培养基之间不存在气泡,然后再将细胞接种于小室内,孵育24 h后。取出Transwell小室,使用棉签轻轻将小室内部的表面细胞擦除,PBS洗涤3次,然后使用4%(质量分数)多聚甲醛对细胞进行30 min固定,继而以结晶紫溶液染色15 min。最后,在显微镜下观察和拍摄侵袭细胞的图像,然后将小室浸入30%冰醋酸中洗脱,并测量570 nm处的OD值<sup>[20]</sup>。

## 1.2.4 阿胶粉对细胞氧化应激的影响

为了进一步评价阿胶粉的抗氧化活性,将HSF细胞接种于24和6孔板中培养至细胞24 h贴壁后,

分别加入含有不同浓度阿胶粉的DMEM完全培养基,以VE作为阳性对照,再孵育24 h后,随后加入400  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 刺激细胞2 h。24孔板中加入制备的DCFH-DA反应溶液避光孵育30 min,再采用倒置荧光显微镜在24孔板中进行细胞观察和拍照。同时,收集6孔板中的细胞,根据试剂盒的说明,测定SOD、CAT和GPX抗氧化酶的活性<sup>[21]</sup>。

### 1.2.5 统计学分析

细胞分析量化均在高分辨率图像的基础上,通过Image J软件完成。除非特别说明,所有实验均独立重复至少3次( $n \geq 3$ )。采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析,两两比较采用 $t$ 检验,三组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 阿胶粉特征肽(驴源特异性标志物)

通过LC-MS/MS对样品中阿胶特征肽(驴源特异性标志物)进行定性与定量分析。典型色谱图如图1所示,定性离子对(591.8/556.3)与定量离子对(591.8/910.5)在保留时间4.26 min处均呈现显著峰响应,且离子丰度比符合《DB37/T 4010-2020》标准要求(保留时间偏差 $\leq \pm 2.5\%$ ,相对离子丰度偏差 $\leq \pm 20\%$ ),确证样品中阿胶粉成分的可靠性。基于外标法标准曲线,最终计算得出样品中阿胶含量为39.3%。

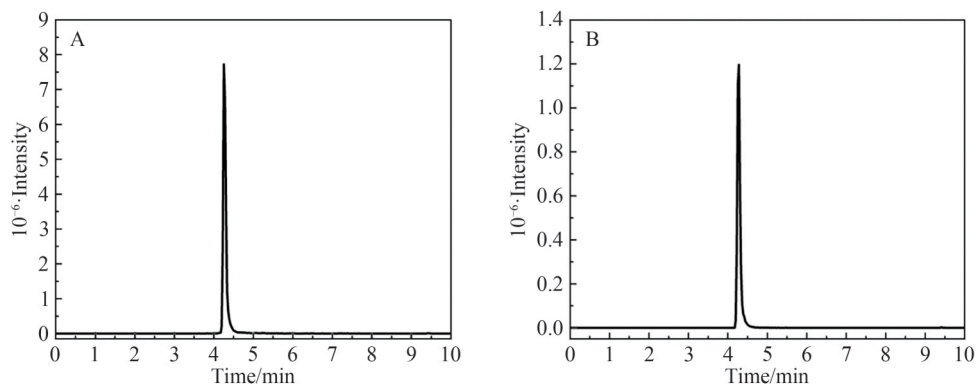


图1 样品中阿胶特征肽成分的定性离子(A)与定量离子(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of qualitative (A) and quantitative ions (B) of the donkey-source characteristic peptide component in the sample

### 2.2 阿胶粉蛋白质组成鉴定分析

#### 2.2.1 LC-MS/MS分析

采用DDA模式,对S1和S2阿胶粉样品使用高分辨率质谱进行蛋白质组成鉴定,得到多肽片段指纹谱图(图2),导入UNIPROT数据库中,进行马源/驴源蛋白质数据库筛选鉴定,S1共得到谱图45074张,通过搜索引擎完成鉴定后,匹配到的谱图数量是4张,只鉴定到角蛋白84(KRT84),1个肽段MAAVGPHPIR。S2中共得到谱图44160张,鉴定匹配到的谱图数量是3821张,共鉴定到35个蛋白,44个肽段(表2)。S2鉴定中包括7种角蛋白、3种胶原蛋白、2种含有免疫球蛋白样结构的蛋白、2种S100蛋白、2种肌球蛋白、3种IF杆状结构域蛋白和16种其他功能蛋白。通过该鉴定分析能看出东阿阿胶当中的驴源/马源蛋白基本不是以游离态的形式存在于产品当中。通过高分辨率LC-MS/MS技术对阿胶蛋白质组的系统性分析,包括结构蛋白、免疫调节蛋白和抗氧化相关蛋白在内的多种功能蛋白质类别被鉴别出。阿胶富含多种中间纤维蛋白(如角蛋白15、39、85等)和胶原蛋白(主要为I型和VI型胶原)。这些结构蛋白不仅构成阿胶的主要基质成分,其降解产物可能通过提供氨基酸原料和生物活性肽段,参与组织修复和细胞外基质重塑。阿胶蛋白质组数据还鉴定出多种含有免疫球蛋白样结构域的蛋白质,包括但不限于免疫球蛋白超家族成员、细胞黏附分子及补体系统相关蛋白,显示阿胶具有免疫调节的潜力。同时,进一步发现阿胶含有丰富的抗氧化系统相关蛋白,包括可维持蛋白质正确折叠和促进损伤蛋白清除来减轻氧

化应激的热休克蛋白B家族,参与胆绿素/胆红素氧化还原循环发挥双重抗氧化作用的胆绿素还原酶B (BLVRB),以及具有过氧化物酶样活性的血红蛋白亚基 $\alpha$ 等,这些蛋白共同构成了阿胶的抗氧化防御网络,可通过协同作用增强细胞的氧化应激抵抗能力。这些多种蛋白的发现不仅证实了阿胶作为复杂蛋白质库的传统认知,更为重要的是,为理解其“多成分-多靶点-多通路”的作用模式提供了实验依据。特别是抗氧化相关蛋白的鉴定,为后续活性成分的定向分离和功能验证研究指明了方向。

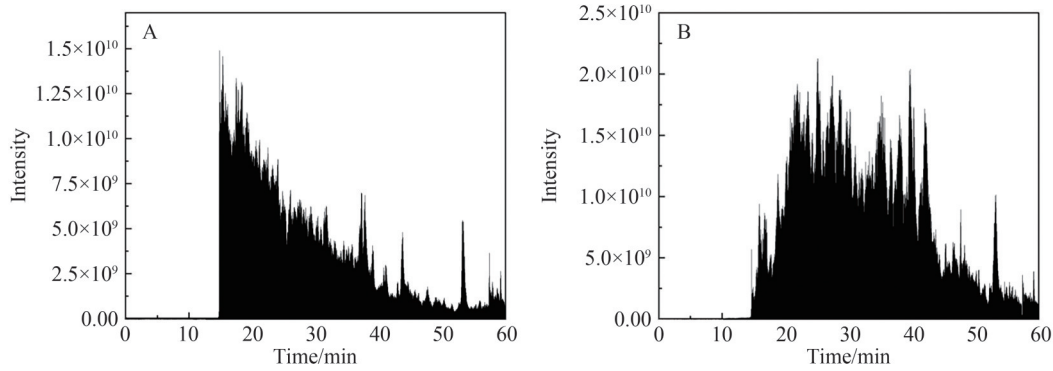


图2 东阿阿胶未酶解(相对分子质量 $1.0 \times 10^4$ )及以下样品的总离子流图(A)和东阿阿胶酶解后(相对分子质量 $1.0 \times 10^4$ )及以下样品的总离子流图(B)

Fig. 2 Total ion current chromatogram of unenzymatically hydrolyzed dong-E Asini corii colla (A) and total ion current chromatogram of enzymatically hydrolyzed dong-E Asini corii colla (B) ( $M_w \leq 1 \times 10^4$ )

表2 S2鉴定出的蛋白组分分析结果

Table 2 Analysis results of protein components identified in S2

Pathway ID	Proteins	Number of peptide segments	Peptide matching map	Peptide relative molecular mass	Peptide sequence
P01959	Hemoglobin subunit alpha	1	1	15 192.9	FLSTVSTVLTSK
P35747	Albumin	1	1	68 536.2	TVFDQFTPLVEEPK
A0A3Q2HP18	Heat shock protein B family member 6 (HSPB6)	2	2	16 996.8	HEERPDEHGYIAR; VVGEHVEVHAR
A0A3Q2IC86	EF-hand domain-containing protein	2	2	188 977.1	EFGDVLIR; QYLEEEELQQR
A0A8C4KT88	Protein S100	1	1	11 305.5	TEAEASVIGHELPHK
A0A8C4KU15	Protein S100	2	2	11 734.7	ALDVMVSTFHK; ELPSFLGK
A0A8C4KW94	Desmoplakin	1	1	98 434.9	VMGNQVFPEVTR
A0A8C4L337	Keratin 39	2	2	55 591.6	ADLEAQLQSLK; YEAEVSLR
A0A8C4L453	Immunoglobulin-like domain-containing protein	1	1	42 567.6	EPQVYVLAHPDELK
A0A8C4L8M0	Tropomyosin 1	1	1	40 872.8	SIDDELELYAQK
A0A8C4LCA2	Collagen type VI alpha 2 chain	2	2	107 325.2	DYDSLQPSFFDR; EKDYDSLQPSFFDR
A0A8C4LF88	BPI fold containing family A member 2	1	1	26 938.4	ASLELQTDVIR
A0A8C4LHC7	Keratin, type I cytoskeletal 14	1	1	52 113.7	VVSTHEQVLR
A0A8C4LKF1	Keratin, type I cytoskeletal 17	1	1	48 016.9	TIVEEVQDGR
A0A8C4LSE8	IF rod domain-containing protein	3	3	53 274.3	RYEEEVSLR; WQLYQNR; YEEEVSLR
A0A8C4LSH3	Keratin 85	3	3	60 475.0	LEAAVAEAEQQGEAALTDAR; SDLEANVEALVEESSFLK
A0A8C4LSI1	Keratin 84	1	1	62 358.4	MAAVGPHPIR
A0A8C4M581	Myosin-2	1	1	222 648.8	TLALLFSGAQTADAEGGGVK

Continued on the next page

Continued from previous page

Pathway ID	Proteins	Number of peptide segments	Peptide matching map	Peptide relative molecular mass	Peptide sequence
A0A8C4MCM7	Desmocollin 4	1	1	113 727. 6	IISQEPAGAPMFILNR
A0A8C4PFM4	Globin domain-containing protein	1	1	16 182. 3	FFDSFGDLSNPAAVMGNPK
A0A8C4PJ20	Keratin 15	1	1	49 402. 4	LAGIGTGEVSLGGGSGGK
A0A8C4PTT8	Binding immunoglobulin Protein	1	1	72 164. 4	FEELNMDLFR
A0A9L0J7I9	Collagen type VI alpha 1 chain	1	1	108 945. 3	VPSYQELLDGVFYQSVSR
A0A9L0RZQ4	Collagen type I alpha 2 chain	1	1	116 870. 2	MGLMGPR
A0A9L0TQW9	IF rod domain-containing protein	1	1	59 937. 5	LEAAVSQAEQQGEAALSDAK
F6X6A6	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase	1	1	17 855. 7	VNPTVFFDIAVDGEPLGR
A0A9L0JCK5	IF rod domain-containing protein	1	1	53 832. 2	LEVAVSQAEQQGEAALSDAK
A0A8C4L2C5	Small ribosomal subunit protein eS28	1	1	7 818. 1	EGDVLTLLESER
F7CYP1	Serine protease inhibitor domain-containing protein	1	1	46 822. 1	GTEAAGATIVEAIR
A0A3Q2I2H1	Immunoglobulin-like domain-containing protein	1	1	10 624. 0	PGGPPVTVIYK
A0A8C4MBM1	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	1	1	40 502. 3	EEIEAFVQELR
Q6X9Z5	Large ribosomal subunit protein P2	1	1	11 696. 8	NIEDVIAQGIGK
A0A3Q2KYZ9	Keratin-associated protein 7-1	1	1	9 125. 1	PWCGSGSGFGYSTY
A0A9L0JDB8	Biliverdin reductase B	1	1	21 957. 3	IALFGATGR
A0A8C4L4K0	SH3 domain-containing protein	1	1	321 654. 4	LLAPLEIAK

### 2.2.2 蛋白质基因本体论 (Gene ontology, GO) 分类结果分析

GO 是一个国际化的基因功能分类系统,通过该方法对阿胶粉酶解样品(S2)进行分别描述基因的分子功能(Molecular function)、细胞组成(Cellular component)和参与的生物过程(Biological process)。由图 3 可知,根据分子功能分析,阿胶中执行结合作用和构成细胞结构的蛋白丰富,结合功能蛋白达 21 个,结构分子活性有 17 个。由细胞组成上来看,细胞基本结构及细胞器组成相关蛋白占主导,细胞部分、细胞和细胞器相关蛋白数均超过 25。根据生物过程进行分析,阿胶蛋白涉及细胞内基础生理活动及调控过程活跃,在细胞过程和生物过程调控的蛋白数分别为 21 和 16 个。进一步分析发现具有催化活性的蛋白数为 3,对刺激的反应蛋白数为 14,涉及新陈代谢过程的蛋白数为 10,与免疫相关的蛋白数为 4,涉及细胞增殖和细胞死亡的蛋白数为 2 等。基于 GO 对东阿阿胶酶解样品的分析表明,其蛋白在分子功能、细胞组成和生物过程方面呈现出特定的分布特征。这揭示了东阿阿胶中的蛋白在维持细胞结构稳定、执行结合功能以及参与细胞基础生理活动和调控等方面具有重要作用,为深入探究东阿阿胶的生物学功效及作用机制提供了关键的蛋白层面信息支撑。

### 2.2.3 蛋白质真核生物直系同源群组(KOG)分类结果分析

KOG 数据库是广泛使用的蛋白功能注释工具。本研究通过将阿胶酶解样品中鉴定到的蛋白质序列与 KOG 数据库进行 BLAST 比对,获得了如图 4 所示的注释结果。所有蛋白依其功能可划分为 4 大类:细胞过程与信息传导、信息储存与处理、代谢相关和功能表征不明显。其中,细胞过程与信息传导中,凸显细胞核心生命活动及蛋白修饰相关的蛋白占比高,核结构和细胞周期控制、细胞分裂和染色体分配的功能蛋白均有 9 个,翻译后修饰、蛋白质周转和分子伴侣的蛋白数有 8 个。信息储存和处理、代谢相关这 2 个类别涉及的蛋白较少,而在功能表征不明显方面,存在一定数量功能有待深入探究的蛋白,仅一般功能预测的蛋白就有 7 个,功能未知的蛋白有 1 个。KOG 注释分析表明,阿胶蛋白在细胞核心生命活动与蛋白修饰方面功能突出,而信息储存处理、代谢相关功能较弱,同时存在部分功能待解蛋白,将进行后续深入研究。

### 2.2.4 蛋白质 KEGG 分类结果分析

为了进一步了解阿胶蛋白在生物学途径中发挥的作用,对阿胶酶解样品(S2)进行了 KEGG 通路分析,为后续探究阿胶蛋白功效研究提供相应的一些依据,如图 5 所示。根据 KEGG 分析,阿胶酶解样品

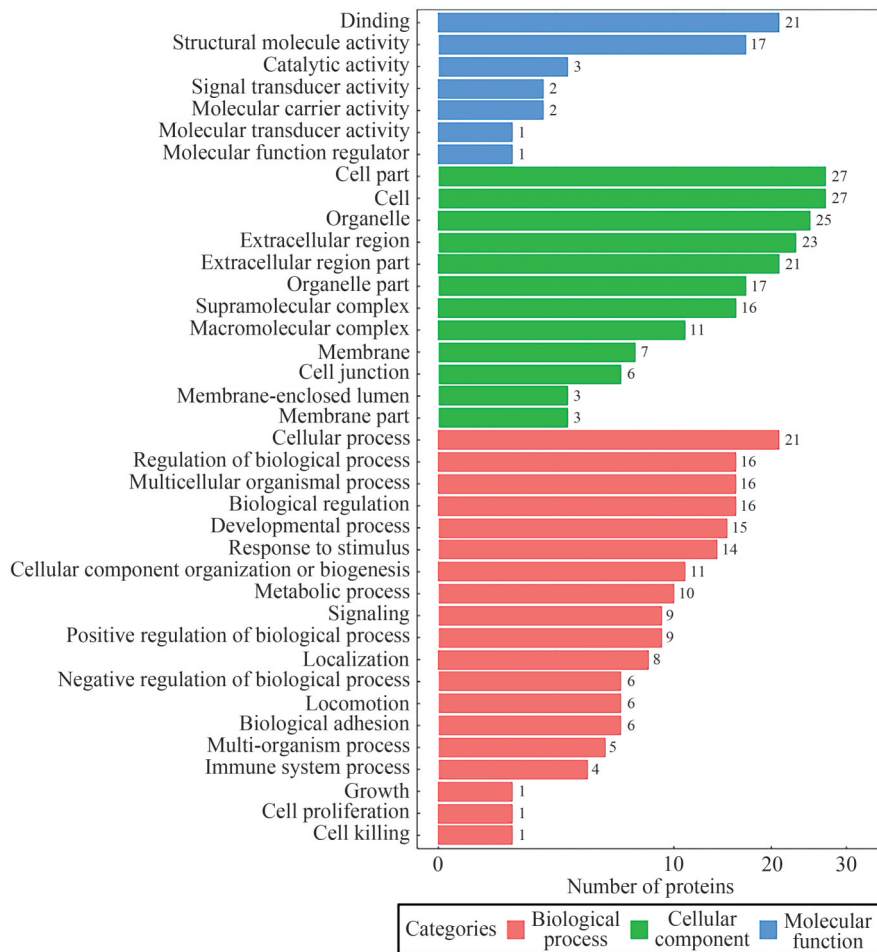


图 3 S2 的基因本体功能注释

Fig. 3 Gene ontology functional annotation of S2

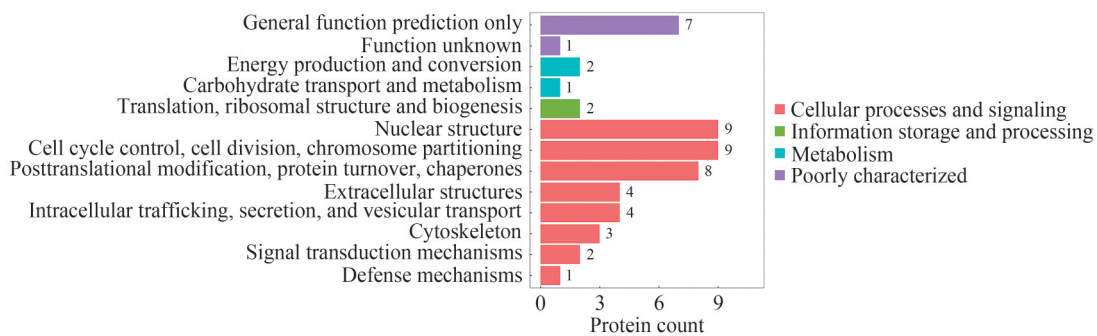


图 4 S2 的 KOG 分析柱状图

Fig. 4 KOG analysis bar chart of S2

中的蛋白的功能主要涉及有细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、代谢和生物系统领域<sup>[22]</sup>。根据生物过程分析,细胞基本生命活动相关蛋白有一定分布,但数量差异明显,生物细胞群落相关蛋白为 5 个,细胞生长和死亡、运输和分解代谢这类功能蛋白数量为 1 个,在环境信号感知和传导方面,信息传导的蛋白就有 5 个,信号分子与相互作用的蛋白有 3 个。阿胶蛋白主要涉及人类疾病和生物系统这 2 方面分布比较多,人类疾病中涉及多种疾病类型,寄生虫感染性疾病和病毒感染性疾病蛋白数均为 4 个,癌症概述、心血管疾病蛋白数均为 2 个。在机体系统中,显示出内分泌、免疫等机体系统相关蛋白比较丰富,内分泌系统蛋白数量为 7 个,涉及免疫系统蛋白的数量为 6 个,消化系统的蛋白有 3 个。

综上,KEGG通路分析揭示阿胶蛋白广泛参与多领域生物学过程,为阐释其在疾病应对及机体系统调节等方面的功效提供了重要线索。

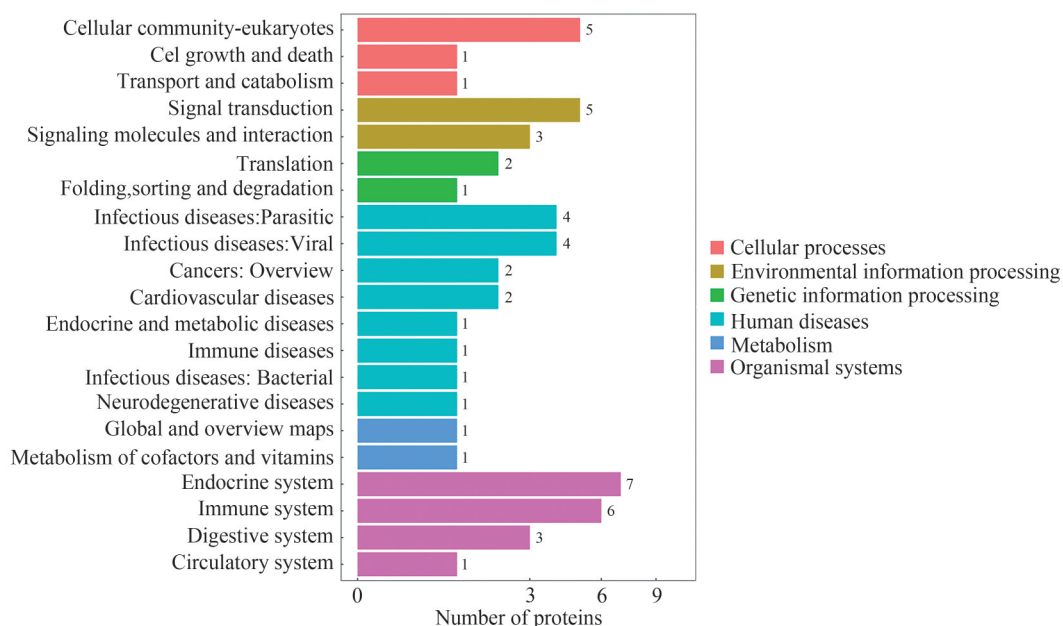


图5 S2的KEGG分析柱状图

Fig. 5 KEGG analysis bar chart of S2

## 2.3 阿胶生物相容性分析

### 2.3.1 细胞毒性分析

为评估阿胶粉(ACO)的生物安全性及其对细胞活力的影响,使用HSF对阿胶不同浓度梯度进行细胞毒性实验,由图6可以看出,在0.156~20 mg/mL的质量浓度范围内,各浓度阿胶粉溶液均没有细胞毒性,细胞存活率均维持在100%以上。

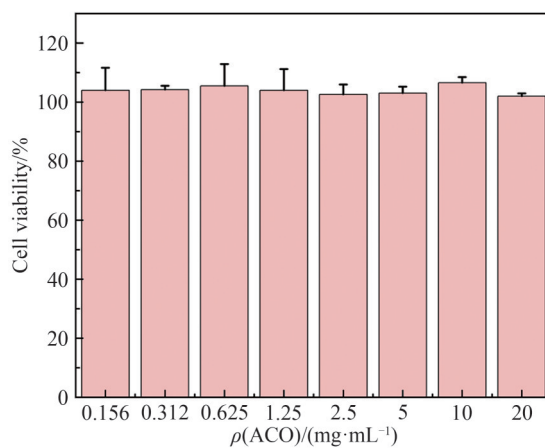


图6 不同浓度阿胶的细胞毒性( $n=3$ )

Fig. 6 Cytotoxicity of Asini corii colla with different mass concentrations ( $n=3$ )

### 2.3.2 阿胶促进细胞增殖

为探究阿胶粉对细胞长期增殖的影响,测定了不同质量浓度(0.156、0.625和2.5 mg/mL)的阿胶粉处理1、3和5 d后细胞活力的变化。不同阿胶粉浓度的增殖结果如图7A所示。由图7B中可知,各组阿胶粉溶液未对细胞产生毒性,其中,各浓度的阿胶组均促进了HSF细胞的增殖,且2.5 mg/mL的阿胶粉溶液促增殖能力最好,第5天时细胞增殖率为220.9%。其次是0.625 mg/mL浓度的阿胶粉组,第5天时

细胞增殖率为207.4%。浓度最低的0.156 mg/mL组第5天时细胞增殖率也高达197.15%。因此,阿胶粉溶液具有良好的促增殖能力,并且随着阿胶浓度的增大,促增殖效果提升,这也与在GO分类结果分析中发现涉及细胞增殖和细胞死亡的蛋白相关。

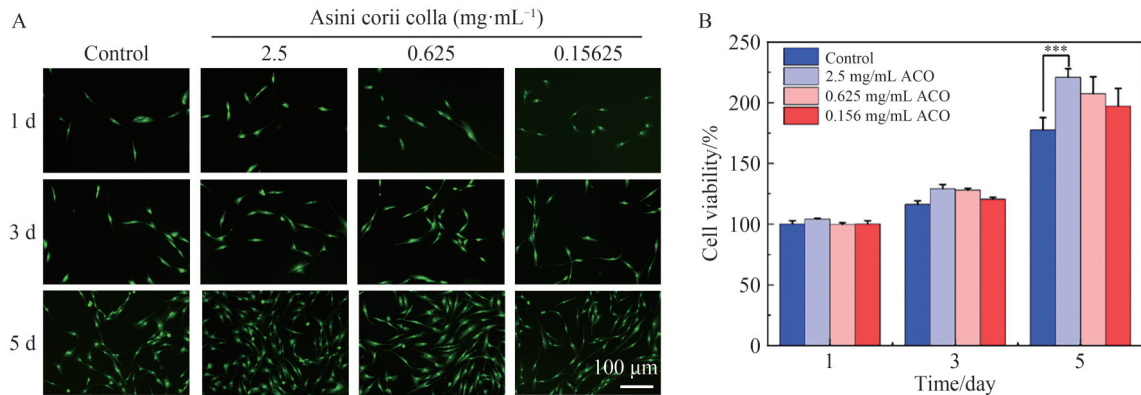


图7 (A)不同浓度阿胶的细胞增殖代表性活/死染色图像和(B)对应的细胞活力( $n=3$ )。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

Fig. 7 (A) Representative live/dead staining images of cell proliferation and (B) the corresponding cell viability at different concentrations of Asini corii colla ( $n=3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

### 2.3.3 阿胶粉促进细胞迁移

为了评估阿胶对细胞迁移能力的影响,通过划痕实验和Transwell实验检测了不同浓度阿胶粉处理后的细胞迁移率。如图8所示,所有阿胶粉组和空白组的细胞迁移率有明显差异,阿胶粉组细胞迁移率明显高于空白组。2.5和0.625 mg/mL 阿胶组48 h后细胞迁移率均达到94%以上,阿胶粉质量浓度

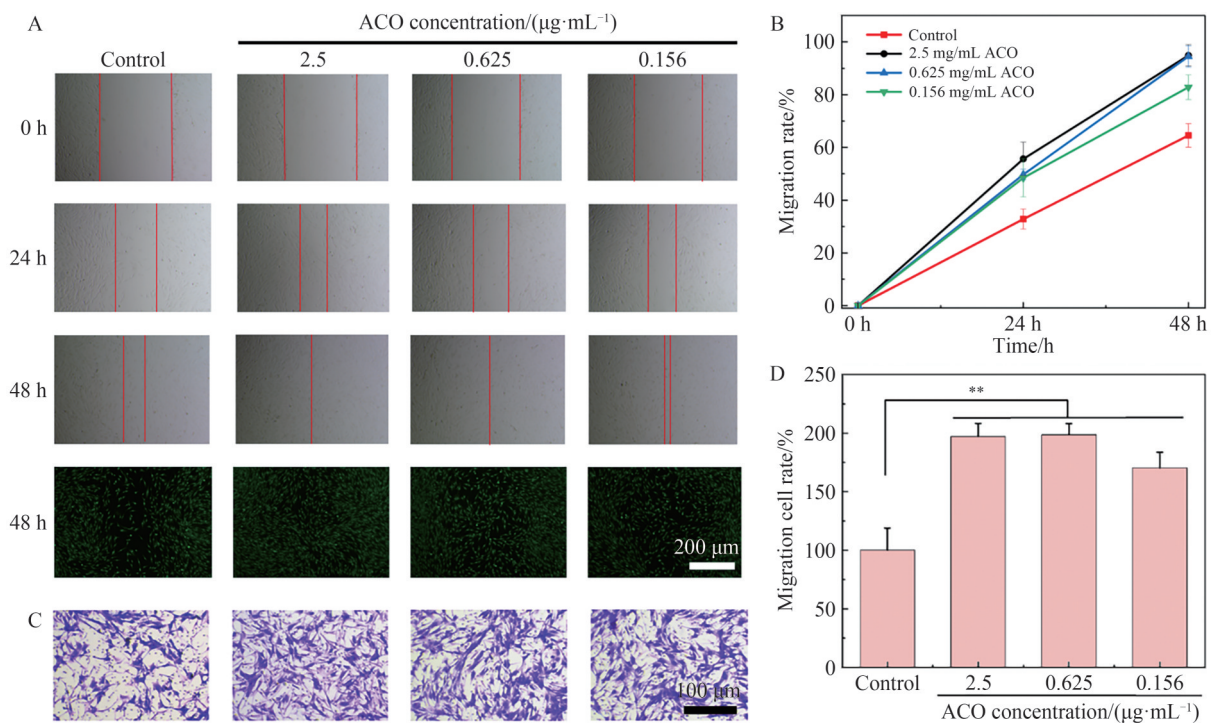


图8 阿胶促进细胞迁移。通过 HSF 细胞划痕实验获得的(A)细胞迁移图像和(B)定量细胞迁移率( $n=3$ )。

Transwell 迁移实验会获得的(C)代表性图像和(D)的定量迁移率( $n=3$ )。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

Fig. 8 Asini Corii Colla promotes cell migration. (A) cell migration images and (B) quantitative cell migration rates obtained by HSF cell scratch test ( $n=3$ ). (C) representative images and (D) quantitative migration rates of HSF cells transwell migration assay ( $n=3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

最低的 0.156 mg/mL 在 48 h 的迁移率也高达 82.79%, 而对照组在 48 h 的迁移率仅为 64.55%。Transwell 实验结果进一步证明阿胶粉具有良好的促迁移侵袭效果。以上结果表明,阿胶粉可以有效地增强细胞的增殖、迁移和侵袭能力。阿胶粉表现出的这种促迁移活性,很可能归因于阿胶中鉴定的某些小分子活性肽。这些肽段可以被成纤维细胞膜上的受体识别,模拟细胞外基质的信号,从而激活与细胞骨架重排和运动相关信号通路,最终促进细胞的迁移。

## 2.4 阿胶粉对细胞氧化应激的影响

### 2.4.1 阿胶粉抑制细胞产生 ROS

作为一种强氧化性活性氧,  $H_2O_2$  被广泛用于诱导细胞损伤模型。但其生物活性比很多活性氧均低,可以轻易透过细胞膜,继而与细胞内铁离子通过 Fenton 反应生成高活性自由基,导致细胞内一系列氧化应激反应<sup>[23]</sup>,更进一步参与细胞凋亡过程<sup>[24]</sup>。抗氧化剂可打断由  $H_2O_2$  引发的自由基链式反应,或进入细胞内直接中和 ROS,从而实现清除目的<sup>[25]</sup>。通过使用 ROS 检测试剂盒,根据细胞的荧光强弱的变化来评估阿胶粉的抗氧化能力。如图 9A 和 9B 所示,与正常对照组相比,  $H_2O_2$  模型组的细胞内 ROS 荧光强弱水平显著升高了 19.1%。而用阿胶粉处理的细胞的 DCFH 荧光强度显著低于对照组和阳性对照组 ( $H_2O_2$ ), 并且强度随阿胶粉浓度成比例降低。值得注意的是, 2.5 mg/mL 阿胶粉组 (与  $H_2O_2$  模型组相比下降 22.5%) 效果几乎媲美 VE 组 (与  $H_2O_2$  模型组相比下降 24.5%), 验证了阿胶粉对细胞内 ROS 的清除活性。

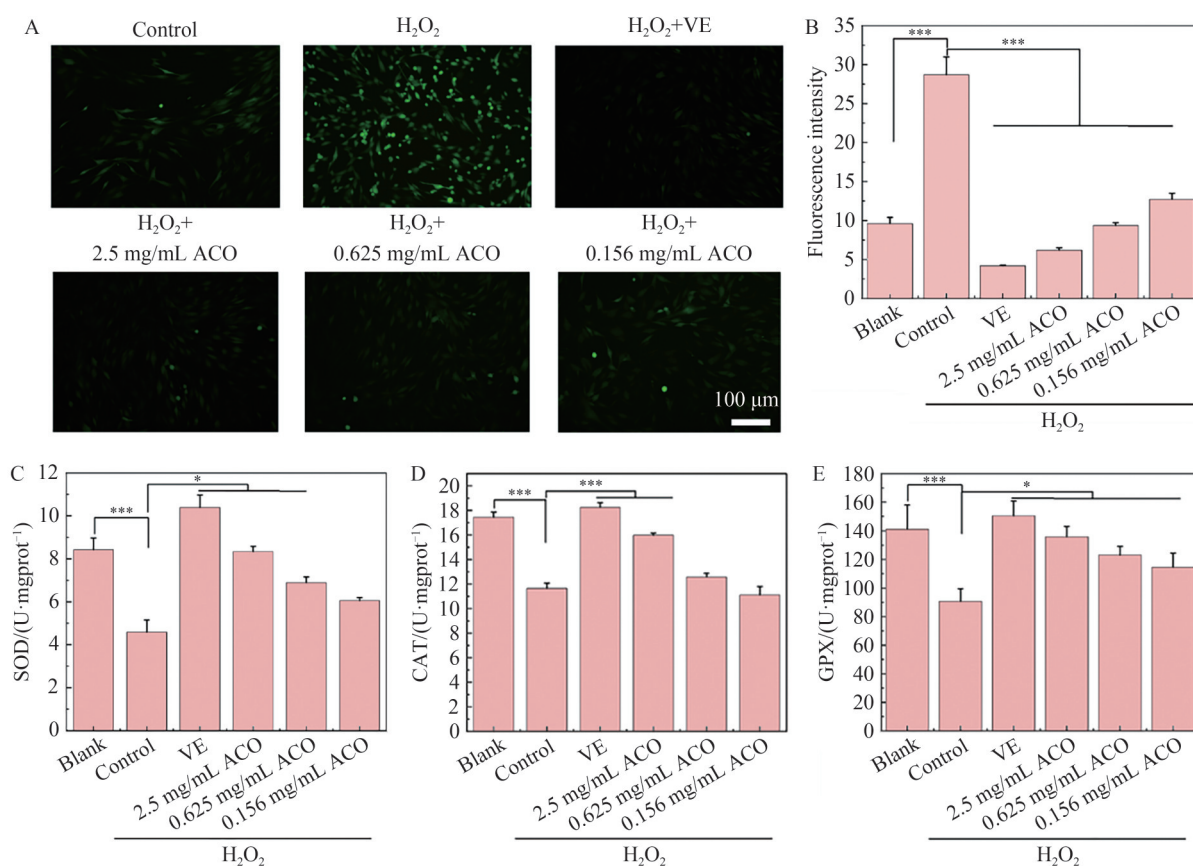


图 9 阿胶抑制氧化应激。(A)用活性氧(ROS)检测试剂盒对 HSF 细胞进行了氧化抑制的荧光图像和(B)相对荧光强度的测定 ( $n=3$ )。代表性抗氧化酶(C) SOD、(D) CAT、(E) GPX 的定量结果 ( $n=3$ )。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

Fig. 9 Inhibition of oxidative stress by Agaricus. (A) Fluorescence images of oxidative inhibition and (B) relative fluorescence intensities of HSF cells using a reactive oxygen species (ROS) assay kit ( $n=3$ ). Quantitative results of representative antioxidant enzymes (C) superoxide dismutase image (SOD), (D) catalase (CAT) and (E) glutathione peroxidase (GPX) ( $n=3$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

#### 2.4.2 阿胶粉促进细胞抗氧化酶的产生

作为生物体内重要的抗氧化金属酶,SOD可以通过催化超氧阴离子自由基的歧化反应以维持氧化平衡,该反应将其转化为氧气和过氧化氢<sup>[26]</sup>。另一种重要的抗氧化酶CAT可以催化分解过氧化氢为水和氧气,进而使细胞免于过氧化氢的损伤<sup>[27]</sup>。而GPX可以催化GSH与过氧化物的反应,生成GSSG和无毒的羟基化合物,维持细胞稳态<sup>[28]</sup>。总之体内ROS可被体内的这3种抗氧化酶(如SOD、CAT、GPX)清除。因此,SOD、CAT和GPX表达水平的升高对于减少体内的氧化应激很重要。对抗氧化酶的ELISA检测分析结果进一步印证了阿胶粉的抗氧化效应。如图9C、9D和9E所示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理细胞内3种酶活性显著下降,而阿胶粉预处理则能有效逆转这一趋势,所有浓度阿胶粉组均提升了细胞抗氧化酶的表达,其中,2.5 mg/mL阿胶粉组细胞内抗氧化酶活性与未处理组接近。因此,说明阿胶粉能够减轻过氧化氢对细胞的刺激,促进细胞抗氧化酶的产生,有效缓解体内氧化应激。

#### 2.4.3 阿胶粉缓解氧化应激机制探讨

从ROS清除实验和抗氧化酶活性检测实验结果可知,阿胶粉不仅能直接清除细胞内过多的ROS,还能增强细胞内在的抗氧化防御酶系统,从而有效缓解氧化应激损伤。而从阿胶粉蛋白组分分析结果中,发现了可维持蛋白质正确折叠和促进损伤蛋白清除来减轻氧化应激的热休克蛋白B家族、参与胆绿素/胆红素氧化还原循环发挥双重抗氧化作用的胆绿素还原酶B(BLVRB),以及具有过氧化物酶样活性的血红蛋白亚基 $\alpha$ 等,其中能特异性催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>转化为H<sub>2</sub>O的类过氧化物酶活性在细胞实验中也通过了验证。值得注意的是,这些蛋白组分在阿胶中呈现协同作用:HSPB家族主要针对蛋白质氧化损伤进行修复,BLVRB负责维持氧化还原平衡,而HBA则直接参与活性氧的清除。这种多靶点、多层次的抗氧化体系,不仅从分子水平阐明了阿胶的传统药用价值,也为开发新型抗氧化制剂提供了理论支撑。而从阿胶蛋白质KEGG分类结果中,关注到一条比较主要的当前研究比较热门的信号通路—NF- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路。NF- $\kappa$ B经典通路与抗氧化系统之间存在复杂的双向调控关系。NF- $\kappa$ B作为重要的转录调控因子,既可以被氧化应激激活,又能通过调控下游靶基因参与抗氧化防御。另外,NF- $\kappa$ B的转录调控一方面可诱导促炎因子的表达进而加强炎症反应,间接增加ROS产生;另一方面又能上调多种抗氧化蛋白的表达,包括线粒体超氧化物歧化酶(Mn-SOD/SOD2)、铁蛋白(Ferritin)和血红素加氧酶-1(HO-1)等,形成负反馈调节机制。而阿胶能够抑制活性氧的产生、上调SOD等NF- $\kappa$ B调控的抗氧化酶表达。因此,基于肽组学数据的分析和文献比对提出的科学假设,提示阿胶可能通过“抑制NF- $\kappa$ B促炎功能-保留NF- $\kappa$ B抗氧化功能”的双重调节模式发挥作用。这种选择性调控特征与阿胶“滋阴润燥”的传统功效高度吻合,也为解释其既抗炎又抗氧化的药效特点提供了分子层面的依据。而后续利用Western Blot、免疫荧光等技术验证NF- $\kappa$ B等关键信号通路蛋白的活化状态,将是下一步揭示阿胶具体分子机制的首要任务。

### 3 结论

对驴皮胶(阿胶)进行了全面的蛋白质组学特征分析,并推测其在人类皮肤成纤维细胞中的抗氧化机制,为皮肤修复和抗衰老疗法提供了新见解。与以往主要关注阿胶粗略生化组成或比较笼统的性能研究不同,本文整合了基于液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)的蛋白质组学和功能细胞试验,建立了其蛋白质成分与细胞抗氧化反应之间的直接联系。识别出多种功能性蛋白,包括胶原蛋白、免疫调节剂和氧化还原调节因子,不仅证实了传统上对阿胶疗效的主张,还为其观察到的生物活性提供了分子基础。这项研究的关键进展在于证明了阿胶的抗氧化效果不仅是通过被动清除活性氧(ROS)实现的,而是通过激活内源性防御系统,包括多种抗氧化蛋白的产生,相关信号通路的调控。此外,在非细胞毒性质量浓度(0.156~20 mg/mL)下促进人皮肤成纤维细胞(HSF)增殖和迁移,强调了阿胶在真皮组织中既具有保护作用又具有再生作用的特点。通过对阿胶的鉴定与分析,可以将阿胶定位为开发针对氧化应激相关皮肤老化或慢性伤口管理药物辅助剂的有前途的天然成分,为进一步开发阿胶在当代保健品以及化妆品应用中的潜力。

## 参 考 文 献

- [1] 杨帅, 鲁婷婷, 周祖英, 等. 阿胶化学成分和药理作用及质量控制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(8): 806-816.  
YANG S, LU T T, ZHOU Z Y, et al. Research progress on chemical components, pharmacological effects and quality control of Asini corii colla[J]. Chin New Drug J, 2023, 32(8): 806-816.
- [2] 曲媛鑫, 付英杰. 阿胶化学成分、质量控制及药理作用研究进展[J]. 特产研究, 2023, 45(3): 136-143.  
QU Y X, FU Y J. Research progress on chemical components, quality control and pharmacological effects of Asini corii colla[J]. Spec Wild Eco Anim Plant Res, 2023, 45(3): 136-143.
- [3] SANTOS A D, AMARAL JUNIOR A T D, FRITSCHKE-NETO R, et al. Proteome analysis of phytomonas serpens, a phytotparasite of medical interest[J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0204818.
- [4] 杨松柏, 尹健, 侯旭晖. 中药复杂体系的多组学分析技术研究进展[J]. 特产研究, 2024, 46(6): 178-185.  
YANG S B, YIN J, HOU X H. Research progress on multi-omics analysis technologies for traditional chinese medicine complex systems[J]. Spec Wild Eco Anim Plant Res, 2024, 46(6): 178-185.
- [5] 李青, 许伟沂, 彭丽诗, 等. 人参和西洋参提取物中皂苷组分比例分析及其在参类产品鉴别中的应用研[J]. 食品科技, 2024, 49(5): 225-233.  
LI Q, XU W Y, PENG L S, et al. Analysis of saponin component proportions in extracts of panax ginseng and american ginseng and their application in identification of ginseng products[J]. Food Sci Technol, 2024, 49(5): 225-233.
- [6] 郝宏伟, 陈意琪, 何姣, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱鉴定灵芝中脂质成分[J]. 菌物学报, 2023, 42(5): 1175-1184.  
HAO H W, CHEN Y Q, HE J, et al. Identification of lipid components in Ganoderma lucidum by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry[J]. Mycosystema, 2023, 42(5): 1175-1184.
- [7] 孙思阳, 吕伟超, 陈刚, 等. 冬虫夏草的多成分含量综合评价分析[J]. 中国药剂学杂志, 2025, 23(2): 100-108.  
SUN S Y, LV W C, CHEN G, et al. Comprehensive evaluation and analysis of multiple component contents in cordyceps sinensis[J]. Chin Pharm J, 2025, 23(2): 100-108.
- [8] GUO J, HUANG X, DOU L, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments[J]. Signal Transduction Targeted Ther, 2022, 7(1): 391.
- [9] PAPACCIO F, ARINO A D, CAPUTO S, et al. Focus on the contribution of oxidative stress in skin aging[J]. Antioxidants, 2022, 11(6): 1121.
- [10] BAI R, GUO J, YE X Y, et al. Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease[J]. Ageing Res Rev, 2022, 77: 101619.
- [11] FORSTERMANN U, XIA N, LI H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Circ Res, 2017, 120(4): 713-735.
- [12] NTASI G, SBRIGLIA S, PITOCCHI R A O, et al. Proteomic characterization of collagen-based animal glues for restoration[J]. J Proteome Res, 2022, 21(9): 2173-2184.
- [13] 廖峰, 樊雨梅, 帖航, 等. 阿胶蛋白质组学研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 122-129.  
LIAO F, FAN Y M, TIE H, et al. Proteomic study of Asini corii colla[J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(10): 122-129.
- [14] 林伟欣, 李树奇, 杨莹莹, 等. 基于4D-label-free技术的鹿皮胶与阿胶蛋白组分的对比研究[J]. 食品工业, 2024, 45(8): 250-254.  
LIN W X, LI S Q, YANG Y Y, et al. Comparative study on protein components of deer skin glue and Asini corii colla based on 4D-label-free technology[J]. Food Ind, 2024, 45(8): 250-254.
- [15] 李聪, 季萌萌, 孟苓凤, 等. 阿胶和阿胶糕不同极性溶剂提取物抗皮肤衰老功效探究[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(17): 82-92.  
LI C, JI M M, MENG L F, et al. Investigation on the anti-aging effects of different polarity solvent extracts of Asini corii colla and asini corii colla cake on skin[J]. Food Ferment Ind, 2025, 51(17): 82-92.
- [16] 绰尔鹏, 孟苓凤, 李聪, 等. 阿胶糕提取物对小鼠黑色素瘤细胞代谢的影响[J]. 食品科技, 2025, 50(4): 222-230.  
CHUO E P, MENG L F, LI C, et al. Effect of Asini corii colla cake extract on metabolism of mouse melanoma cells[J]. Food Sci Technol, 2025, 50(4): 222-230.
- [17] 段小波, 杜芬, 王延涛, 等. 阿胶和阿胶肽对血管内皮细胞氧化损伤的作用研究[J]. 安徽农业科学, 2025, 53(8): 162-167, 180.

- DUAN X B, DU F, WANG Y T, et al. Study on the effect of Asini corii colla and Asini corii colla peptide on oxidative damage of vascular endothelial cells[J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2025, 53(8): 162-167, 180.
- [18] FU M M, ZHAO Y T, WANG Y, et al. On-demand removable self-healing and pH-responsive europium-releasing adhesive dressing enables inflammatory microenvironment modulation and angiogenesis for diabetic wound healing[J]. *Small*, 2023, 19(3): e2205489.
- [19] WU M, ZHAO Y T, TAO M H, et al. Malate-based biodegradable scaffolds activate cellular energetic metabolism for accelerated wound healing[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(44): 50836-50853.
- [20] WU K K, FU M M, ZHAO Y T, et al. Anti-oxidant anti-inflammatory and antibacterial tannin-crosslinked citrate-based mussel-inspired bioadhesives facilitate scarless wound healing[J]. *Bioact Mater*, 2023, 20: 93-110.
- [21] WANG Y, ZHAO Y T, MA S Y, et al. Injective programmable proanthocyanidin-coordinated zinc-based composite hydrogel for infected bone repair[J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(6): e2302690.
- [22] GU T, ZHOU J, LIU Y, et al. *Faucicola mancuensis* isolated from human respiratory tract and its genomic characteristics[J]. *BMC Microbiol*, 2025, 25(1): 587.
- [23] ZOU S Q, ZHU X F, ZHANG L R, et al. Biomineralization-inspired synthesis of cerium-doped carbonaceous nanoparticles for highly hydroxyl radical scavenging activity[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2018, 13(1): 76.
- [24] SONG X L, ZHANG J J, LI J, et al. Acetylated polysaccharides from *pleurotus geesteranus* alleviate lung injury *via* regulating NF- $\kappa$ B signal pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2810.
- [25] ZHANG Q, YANG W B, LIU J C, et al. Identification of six flavonoids as novel cellular antioxidants and their structure-activity relationship[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4150897.
- [26] CHENG C S, GU Q H, ZHANG J K, et al. Phenolic constituents, antioxidant and cytoprotective activities, enzyme inhibition abilities of five fractions from *vaccinium dunalianum* wight[J]. *Molecules*, 2022, 27(11): 3432.
- [27] ZHAO X, CUI Y J, BAI S S, et al. Antioxidant activity of novel casein-derived peptides with microbial proteases as characterized *via* Keap1-Nrf2 pathway in HepG2 cells[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(8): 1163-1174.
- [28] SHEN Y, SHEN Z, LI P, et al. Protective activity of *Malus doumeri* leaf extract on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury in H9C2 rat cardiomyocytes[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 1005306.

## Proteomic Analysis and the Antioxidant Activity Evaluation of Asini Corii Colla Powder Based on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Technology

XIE Xiao<sup>1</sup>, LI Cong<sup>1</sup>, ZHANG Jian-Ling<sup>1</sup>, CHEN Zhi-Jie<sup>1</sup>, TAO Chun-Xiang<sup>2</sup>, FU Mei-Mei<sup>3\*</sup>,  
YOU Hui-Lin<sup>4</sup>, GUO Jin-Shan<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>(Liaocheng Key Laboratory of Functional Food Research and Development, Liaocheng Engineering Research Center for Nutrition and Health Consumer Products, Dong'e Ejiao Health Industry Technology Co., Ltd., Liaocheng 252201, China)

<sup>2</sup>(CAS Key Laboratory of High-Performance Synthetic Rubber and Its Composite Materials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

<sup>3</sup>(Department of Histology and Embryology, NMPA Key Laboratory for Safety Evaluation of Cosmetics, GDMPA Key Laboratory of Key Technologies for Cosmetics Safety and Efficacy, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

<sup>4</sup>(Regenerative Medicine and Tissue Repair Research Center, Huangpu Institute of Materials, Guangzhou 511363, China)

**Abstract** Asini corii colla contains multiple bioactive proteins, endowing it with multifaceted health benefits. This study employed liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to systematically identify and analyze the protein composition of Asini corii colla powder, identifying various functional proteins including

multiple intermediate filament proteins, collagens, immunomodulatory proteins, and antioxidant-related proteins. Further evaluation of Asini corii colla powder's cytotoxicity, proliferation, and migration effects was conducted using human dermal fibroblasts (HSF). Results indicated no significant cytotoxicity within the tested concentration range (0.156~20 mg/mL), while promoting HSF proliferation and migration, suggesting preliminary potential for Asini corii colla powder in skin repair applications. To investigate the antioxidant stress activity of Asini corii colla, this study further employed a hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) induced cellular oxidative stress model to evaluate the effects of Asini corii colla powder on intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity and antioxidant enzyme activity. Experiments demonstrated that pre-treatment with Asini corii colla powder significantly suppressed  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced ROS levels while enhancing intracellular superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities. This confirms its antioxidant effects are associated with strengthening the endogenous antioxidant defense system. Proteomics analysis further revealed that Asini corii colla powder may regulate oxidative stress by modulating the expression of proteins associated with the heat shock protein B family, biliverdin reductase B, hemoglobin subunit  $\alpha$ , and nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) signaling pathways, thereby mitigating cellular oxidative stress damage to a certain extent. In summary, this study elucidates the protein composition of Asini corii colla and validates its role and mechanisms in combating oxidative stress, laying a scientific foundation for expanding its applications in skin repair and anti-aging.

**Keywords** Asini corii colla; Proteomics; Reactive oxygen species scavenge; Oxidative stress

Received 2025-09-03; Accepted 2025-11-28

Supported by the Industry-sponsored Project with Dong'e Ejiao Health Products Co., Ltd. (No. DEEJ-YB-2024-10-190)