

蛋白质中氨基酸外消旋化的研究进展

张欣然^{1,2,3}, 李 博^{1,2,3*}, 狄 斌^{1,2,3**}(中国药科大学¹药物分析学教研室;²蛋白质化学与结构生物学重点实验室;³药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘 要 蛋白质结构中 L-氨基酸可通过外消旋化转化为 D-氨基酸, 蛋白质中氨基酸的外消旋化可影响蛋白质的空间结构和功能, 并证实与一些疾病的发生相关。随着分析仪器技术的不断发展, 蛋白质中氨基酸外消旋化分析方法及检测技术也在不断地更新。本文综述了蛋白质中氨基酸外消旋化与疾病的关系、影响外消旋化的因素以及氨基酸外消旋化的检测方法, 并对蛋白质中氨基酸外消旋化的研究方向进行了展望。

关键词 蛋白质; 氨基酸; 外消旋化; 影响因素; 检测方法; 进展

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)04-0407-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170404

引用本文 张欣然, 李博, 狄斌. 蛋白质中氨基酸外消旋化的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(4): 407-415.

Cite this article as: ZHANG Xinran, LI Bo, DI Bin. Advances in racemization of protein amino acid[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(4): 407-415.

Advances in racemization of protein amino acid

ZHANG Xinran^{1,2,3}, LI Bo^{1,2,3*}, DI Bin^{1,2,3**}

¹Department of Pharmaceutical Analysis; ²Key Laboratory on Protein Chemistry and Structural Biology; ³MOE Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The presence of D-amino acid in proteins is thought to be a result of racemization of L-amino acid, which may influence the space structure and the functions of proteins and the connection to the occurrence of some diseases has been demonstrated. Recently, tremendous advancement in instrumental techniques has brought the rapid development to analytical methods and detecting techniques in the research on racemization of protein amino acid. The advances in the relationship between racemization of protein amino acid and diseases, the influence factors on racemization of protein amino acid and the analytical techniques are reviewed in this article, and the research directions of racemization of protein amino acid are also given.

Key words protein; amino acid; racemization; influence factors; detecting techniques; advances

生物体中蛋白质均由 L-氨基酸通过肽键构成, 但目前已原核、真核生物、动物及人体的蛋白质中发现少量 D-氨基酸的存在。目前认为, 蛋白质中 D-氨基酸是 L-氨基酸通过外消旋化(racemization)所产生的, 这种外消旋化被认为是一种蛋白质翻译后修饰(post-translational modification, PTM)类型^[1], 以天冬氨酸的外消旋化为主, 丝氨酸、谷氨酸次之^[2]。

蛋白质中氨基酸的外消旋化可影响其空间结构和功能, 并证实与一些疾病的发生相关^[3-4]。近年来, 体内外实验发现, 蛋白质中氨基酸发生外消旋化受到自由基^[5]、pH^[6]、酶^[7]和温度^[6]等多种因素的影响。随着分析仪器技术的不断发展, 蛋白质中氨基酸外消旋化分析方法及检测技术也在不断更新, 关于蛋白质中氨基酸的外消旋化程度及外消旋化位点评价方法的研究和应用众多。因此, 蛋白

质中氨基酸的外消旋化研究是蛋白质组学、生物药物研究、疾病研究领域的重要课题。

本文综述了用于蛋白质中氨基酸外消旋化的与疾病的关系、影响外消旋化的因素以及氨基酸外消旋化的检测方法,并对蛋白质中氨基酸外消旋化的研究方向进行了展望。

1 蛋白质中氨基酸外消旋化与疾病的关系

蛋白质中 L-氨基酸转化为 D-氨基酸,可导致其回转半径^[5]、分子内氢键^[8]及高级结构^[9]等的变化,可能导致含有 D-氨基酸的蛋白质比 L 型与受体结合的亲和力和选择性更强^[4]。由于蛋白质中 L-氨基酸发生外消旋化的速率较慢、半衰期较长,因此 D-氨基酸在人体中的积累通常随年龄的增加而增加,且组织中更新周期长的蛋白,如脑、晶状体、骨等组织中一些蛋白的外消旋化较为明显。

蛋白质中 L-氨基酸外消旋化产生的 D-氨基酸在一些病变组织中较正常蛋白显著增加^[3-4],因此,蛋白质中氨基酸外消旋化与特定疾病的发生存在关联。

1.1 白内障

白内障发生的机制仍未知,有一种学说认为是由于晶状体蛋白发生异常的聚合,导致光散射而不能在视网膜上正常地聚光,从而导致白内障的发生^[10]。Kenzo 等^[11]发现白内障患者的晶状体球蛋白中 D-天冬氨酸与 L-天冬氨酸的比值显著高于正常晶状体的球蛋白,进一步研究也证实,晶状体球蛋白的 58 位天冬氨酸在发生外消旋化后肽键更难断裂,从而导致晶状体浑浊症状的发生。Fujii 等^[12]在体外实验中发现晶状体蛋白中天冬氨酸发生外消旋化使晶状体蛋白异常聚集,降低了晶状体的溶解性和透明度,并最终导致白内障。

1.2 阿尔茨海默病

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病,特征是大脑内 β -淀粉样蛋白的沉积^[13]。Satoco 等^[3]发现 β -淀粉样蛋白里丝氨酸的外消旋化增加了它的聚合率,加速了神经元细胞的恶化,可能与 AD 的发病机制有关。

Lu 等^[14]指出 AD 在组织病理学上的特征是神经斑和微管蛋白的大量聚集,其中,微管蛋白中的 265 位天冬氨酸极易发生外消旋化,可能与 AD 的

发生有紧密的联系。Tambo 等^[15]也发现 AD 患者的 β -淀粉样蛋白中含有大量的 D-天冬氨酸和 D-丝氨酸,并证明可能是体内自由基积累导致外消旋化。

1.3 肺气肿相关疾病

肺气肿 (chronic emphysema) 是指肺实质中终末细支支气管远端的气道弹性减退,过度膨胀、充气和肺容积增大或同时伴有气道壁破坏的病理状态。肺实质的正常结构和功能取决于弹性纤维,Shapiro 等^[16]发现在人体正常温度下,随着年龄的增长,肺部弹性纤维中天冬氨酸以一个可以预测的速率发生外消旋化,D-天冬氨酸的量在患有慢性肺气肿的老人的肺部中积累得最多。

Koizumi 等^[17]研究了慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 患者肺组织中含有 D-天冬氨酸的异常蛋白,发现 4 种异常蛋白 (抗增殖蛋白、抗氧化蛋白、谷胱甘肽硫转移酶和血清淀粉样蛋白 P 成分) 中 D-天冬氨酸的量高达 30%,而正常组织中仅 7%。

1.4 动脉粥样硬化

人主动脉的老化和退化主要由主动脉内侧变薄及弹性蛋白干重的降低引起^[18],主动脉的老化和退化导致内膜纤维组织增生、复合糖类积累,进而导致动脉壁增厚变硬、血管腔狭窄,引发动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)。

Powell 等^[19]将不溶性弹性蛋白从人主动脉中分离出来,测定其中胶原蛋白和复合糖蛋白中的 D-天冬氨酸的积累量,发现胶原蛋白中 D-天冬氨酸的量随着年龄增长而积累,在青少年中仅含 3%,而 80 岁左右的人群则上升至 13%;复合糖蛋白中 D-天冬氨酸的量也由 3% 上升至 6%;因此认为外消旋化与动脉粥样硬化症的发生有一定的关联。

1.5 软骨退化

软骨退化 (degenerative disorders of articular cartilage) 是一种关节退行性病变。人软骨组织中天冬氨酸较易发生外消旋化^[20],其中蛋白多糖是关节软骨细胞外基质的主要组成部分,可以抵抗压力,防止关节软骨超负荷。Maroudas 等^[21]比较了来自 21 岁与 55 岁个体的股骨踝软骨的不同区域中 D-天冬氨酸与 L-天冬氨酸的比值,证明了 D-天冬氨酸在年长者关节软骨中含量较高,而其中蛋白

多糖中外消旋化发生得最多,认为天冬氨酸外消旋化的量可以作为年龄的标记物以及软骨退化疾病的生物标记物。

Matzenauer 等^[20]通过体外实验发现会厌软骨组织中 D-天冬氨酸的量随年龄增长而增多,并以此为标记物估计死者的死亡年龄。

2 蛋白质中氨基酸外消旋化的影响因素

基于蛋白质中氨基酸发生外消旋化与多种疾病相关,研究蛋白质中氨基酸外消旋化的影响因素对于疾病的及早发现、预防等具有重要意义。众多学者通过体内外实验发现,蛋白质中氨基酸外消旋化受到氨基酸种类、自由基、pH、酶和温度等多种因素的影响。

2.1 氨基酸种类

蛋白质中不同的氨基酸发生外消旋化的速率不同,以天冬氨酸为主,丝氨酸、谷氨酸次之。天冬氨酸发生外消旋化的过程中会形成琥珀酰亚胺碳负离子中间体,中间体的形成受到分子内部的协同作用力的影响,速率较快,因此外消旋化速率最快;而其他氨基酸发生外消旋化不经过中间体,外消旋化速率只因自身官能团和取代基的不同而产生差异,均低于天冬氨酸^[2]。

2.2 自由基

蛋白质暴露在自由基环境中时生理活性受到损伤^[22-23],关于自由基(尤其是羟基)作用下蛋白质生理活性降低的报道众多,主要机制是自由基对蛋白质中氨基酸 α 碳原子的进攻^[24]。

Sheykhkarimli 等^[5]通过分子动力学和二维傅里叶变换等方法计算模拟,发现自由基对胸腺五肽中氨基酸发生外消旋化存在促进作用,其中天冬氨酸最易受到自由基的影响发生外消旋化,同时使胸腺五肽的结构发生最大的变化。

Tambo 等^[15]在体外对 β -淀粉样蛋白进行自由基刺激,发现处理 24 h 后 D-天冬氨酸和 D-丝氨酸的量可以与 AD 患者的 β -淀粉样蛋白中二者的量相当;并同法用自由基清除剂处理进行对照,发现有效抑制了外消旋化的发生。

2.3 其他因素

除了上述因素之外,众多体外实验还发现,pH、酶和温度也影响蛋白质中氨基酸的外消旋化。

多肽和蛋白质中氨基酸在 pH 呈碱性时易发

生外消旋化。Conrad 等^[6]分别在 pH 3.0、pH 7.4 及 pH 10.0 的条件下处理相同的含天冬氨酸的肽段,发现外消旋化随着碱性增强而增多,pH 3.0 条件下几乎不发生外消旋化。

外消旋化酶(racemase)可以催化蛋白质中氨基酸发生外消旋化。Ran 等^[5]验证了丝氨酸外消旋酶对 L-丝氨酸的高选择性和专一性,并将酶处理结果与 D-丝氨酸进行对比验证。

高温可以促进蛋白质中氨基酸发生外消旋化。Geiger 等^[25]通过体外实验对比了 37、70 和 85 °C 条件下处理肽段时天冬氨酸的外消旋化转化速率常数,证明了外消旋化速率受到高温的影响。Conrad 等^[6]也通过类似实验得出相同的结论。

但由于人体正常生理环境中几乎不会出现这些促进外消旋化发生的因素,因此这些影响因素目前只停留在体外研究阶段;体内研究更应着重关注氨基酸种类、自由基以及一些其他可能产生影响的生理因素。

3 蛋白质中氨基酸外消旋化的检测方法

目前,蛋白质中氨基酸外消旋化检测的难点主要由于 D-氨基酸与 L-氨基酸分子量完全一致,蛋白质组学分析中常用的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MADLI-TOF-MS)、液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)等方法都无法测定。近年来,关于蛋白质中氨基酸外消旋化程度及外消旋化位点评价方法的研究和应用众多,主要包括蛋白质酸水解后氨基酸的测定、蛋白质酶水解后肽段的测定以及蛋白质和多肽的免疫学测定。

3.1 蛋白质酸水解后氨基酸的测定

蛋白质和多肽经过传统的酸水解处理解离成游离的氨基酸,氨基酸经过柱前衍生化处理后通过仪器分析的手段定量分离分析 D/L 型氨基酸的比值,得出蛋白质和多肽中氨基酸的外消旋化程度,这种方法对仪器设备要求不高,多年来被广泛使用,是最传统、经典的外消旋化测定方法^[26]。该方法仅适用于 D-氨基酸总量的测定,无法确定 D-氨基酸是在蛋白质哪些位点上发生了外消旋化;且由于酸水解过程通常在高温环境(100 °C 左右)中进行,处理一定时间则会引起蛋白质中氨基酸额外发生外消旋化,使测定结果略有偏差^[27]。

常用的仪器分析手段有 GC、HPLC、LC-MS、胶

束电动毛细管色谱 (MECC) 等。

3.1.1 气相色谱法 利用气相色谱法分离分析氨基酸衍生化产物,常用的衍生化试剂为 *N*-三氟乙酰基-*O*-异丙基酯 (*N*-TFA-*O*-isopropyl esters),衍生化制备可挥发的 *N*-三氟乙酰基-*D/L* 氨基酸异丙基酯,该衍生物在手性毛细管硅胶色谱柱上分离,可以实现一次性分离和定量所有氨基酸^[27-30]。

Powell 等^[19]将不溶性弹性蛋白从人主动脉中分离出来,酸水解处理后,以酸性异丙醇/三氟乙酸酐为衍生化试剂,利用气相色谱法成功测定其中胶原蛋白和复合糖蛋白中的 *D*-天冬氨酸的积累量,认为外消旋化与动脉粥样硬化症的发生有一定的关联。

该方法需要手性毛细管柱,且该固定相填料易受有氧环境影响,使用寿命短^[29]。此外,羧脯氨酸衍生物可能会与 *L*-天冬氨酸共洗脱出来^[31]。针对蛋白质酸水解过程中可能出现的天冬氨酸外消旋化,Man 等^[30]将天冬氨酸标准品在 6 mol/L DCl 中水解处理,同法衍生化处理后气相色谱-质谱联用技术分析测定酸水解过程中出现的天冬氨酸外消旋化,作为空白组,同时在计算过程中扣除该值。

3.1.2 高效液相色谱法 高效液相色谱法具有分离效率高、选择性好、分析速度快、操作自动化和应用范围广的特点,目前是 *D/L* 型氨基酸衍生物分离检测首选的主要手段,操作简便、对仪器设备要求较低,灵敏度较高。当使用 HPLC 作为分析仪器时,最常用的衍生化试剂是邻苯二甲醛 (*O*-phthalaldehyde, OPA) 和 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸 (*N*-acetyl-*L*-cysteine, ACcys),在碱性条件下,OPA 与 ACcys 迅速同 *D/L* 氨基酸反应,生成非对映异构体异茛衍生物,该衍生物的分离不需要手性柱,在普通十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱 (C_{18} 柱) 上就可以分离^[20,32-36]。Fujii 等^[2]针对白内障患者晶状体蛋白中发生外消旋化的天冬氨酸,同时应用这两种衍生化试剂,利用高效液相色谱法,在荧光检测器上测定 *D/L* 型天冬氨酸的比值。

对于蛋白质酸水解过程中发生的外消旋化,Sivan 等^[33]做了空白组,在对样品外消旋化的程度评价中,将空白组中外消旋化对应的峰面积扣除。Csapo 等^[37]证明了更短的酸水解时间、更高的水解温度会引起更少的外消旋化。

OPA 虽为最经典的衍生化试剂,但具有比较明显的劣势是其不能与含有亚氨基的氨基酸 (如

脯氨酸) 反应。Visser 等^[38]采用手性衍生化试剂 2,3,4,6-四乙酰基- β -*D*-吡喃葡萄糖基异硫氰酸酯 (2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -*D*-glucopyranosyl isothiocyanate, GITC), GITC 容易和胺基反应且比较稳定,可广泛用作柱前衍生试剂分离胺类异构体。

Terezic 等^[36]与 Johnson 等^[39]通过实验比较了 HPLC 与 GC 用于分析氨基酸产物的优劣,发现与 GC 相比, HPLC 检测出的外消旋化程度更小,因为用于 GC 的氨基酸衍生化过程会导致一定量的外消旋化。因此,尽管两种方法都准确可靠,但 HPLC 具备更多优势,比如更短的分析时间和更高的灵敏度,不需要使用手性色谱柱,且定量限要远低于 GC,更适用于痕量样品的分析、痕量的外消旋化转化的分析。

3.1.3 液相色谱-质谱联用技术 液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 将高分离性能的 LC 技术与能够获取丰富化学结构信息的 MS 技术相结合,可直接对 *D/L* 型氨基酸衍生物进行分离分析,定量测定蛋白质的外消旋化程度,灵敏度高、专属性强。与以紫外检测器为检测手段的 HPLC 法相比,MS 检测技术提供了更快速、有效的未知化合物鉴定,省去了分离与纯化过程,有效节约了时间。

关于用于 LC-MS 分析的衍生化试剂的报道很多,Hess 等^[40]利用手性衍生化试剂 GITC,结合电喷雾质谱,在普通 C_{18} 柱上高灵敏度、准确地测定了 *D/L* 型天冬氨酸的含量和比值,结果准确可靠。

Li 等^[41]利用 NBD-Cl (7-chloro-4-nitrobenzoxadiazole) 为衍生化试剂,以 LC-MS/MS 为分离检测手段,在手性选择性色谱柱上成功分离分析了商品化片剂中的 9 对 *D/L* 型氨基酸。

3.1.4 胶束电动毛细管色谱 毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 是一类以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力的新型液相分离技术。作为一种有力的分离技术,优势众多,包括较高的分离效率、较短的分析时间、所需样品和试剂量少等^[42-44]。毛细管电泳使分析化学得以从微升水平进入纳升水平,被广泛用来分离生物分子,比如蛋白质、核酸、多肽和氨基酸^[45-47]。

CE 常用来分离在缓冲液中带电的离子,通常只加入缓冲液或部分添加剂,若加入表面活性剂也要求其浓度不能达到临界胶束浓度。与普通 CE 不同的是,MECC 是在缓冲液中加入离子型表面活

性剂(如十二烷基硫酸钠),形成胶束,被分离物质在水相和胶束相(准固定相)之间发生分配并随电渗流在毛细管内迁移,达到分离。理论上说,利用 MECC,中性分子在胶束中具有较高的分配系数,可以得到较好的分离^[48-49],因此适用于 D/L 型氨基酸衍生物的分离分析。利用 D/L 型氨基酸衍生化后在胶束相中的分配性质的差异,将二者拆分。

Otsuka 等^[50]利用 MECC,使用 dansylate(DNS)和乙酞苯硫脲(phenylthiohydantoin, PTH)两个衍生化试剂,分别采用了甘草酸和 β -七叶素两个手性表面活性剂,成功分离 9 对 D/L 氨基酸。

Hiroyuki 等^[51]采用 GITC 为手性衍生化试剂,衍生化条件较为温和,一次性完成超过 10 对 D/L 型氨基酸的 GITC 衍生物的分离分析,展现了 MECC 的超强分离能力。

3.2 蛋白质酶水解后肽段的测定

与蛋白质酸水解后测定氨基酸相比,蛋白质酶水解的条件比较温和,较低的反应温度、较短的酶解时间均不会引起蛋白质中氨基酸额外发生外消旋化^[32];部分方法不仅可以评价外消旋化程度,还可以确定发生外消旋化的 D-氨基酸的位点,对于进一步研究蛋白质结构改变对生理功能的影响具有重要的意义。蛋白质酶水解后测定肽段的方法通常对质谱设备要求较高,因此适用于具备仪器设备条件、需要测定发生外消旋化的位点的蛋白质。

3.2.1 商品化酶识别-液质联用技术 已有商品化的蛋白酶可以特异性地识别天冬氨酸的 4 种异构体($L\alpha$ 、 $D\alpha$ 、 $L\beta$ 和 $D\beta$),比如天冬氨酸 N 端内切酶(Asp-N endoproteinase)只切割 $L\alpha$ -天冬氨酸残基的 N 端,蛋白异天冬氨酰甲基转移酶(protein isoaspartyl-methyltransferase, PIMT)只切割含有 $L\beta$ -天冬氨酸的肽段, D-天冬氨酸内切酶(D-aspartic acid endopeptidase, 又名 paenidase)只切割 $D\alpha$ -天冬氨酸残基的 N 端。

该方法存在一定的局限性,有的酶不能充分酶解肽段^[12],比如距离肽链 N 终端 3 个氨基酸范围内的 $L\alpha$ -天冬氨酸残基, Asp-N endoproteinase 不能识别; paenidase 有时也不能切割 $D\alpha$ -天冬氨酸残基的 N 端,且导致这一现象的原因未知;商品化酶的消耗量大、成本高,不同酶的不同酶解条件和酶解顺序需要复杂的摸索。但与繁琐的酸水解-氨基酸衍生化方法相比,这种简便易行的方法仍是一个不

错的选择,适用于需要同时测定天冬氨酸 4 种异构体的蛋白质样品。

Zomber 等^[52]是最早使用 Asp-N endoproteinase 的课题组,用来检测炭疽杆菌保护性抗体中天冬酰胺的脱酰胺化及天冬氨酸的异构化。Maeda 等^[53]将 LC-MS 和上述 3 种商业化酶相结合,快速、全面地鉴别白内障患者晶状体蛋白中的天冬氨酸 4 种异构体。

3.2.2 合成肽段对照-液质联用技术 将含有外消旋化氨基酸的蛋白质酶解处理后直接用 LC-MS/MS 测定,比较质荷比相同但保留时间不同的肽段(如分别含有 D-天冬氨酸和 L-天冬氨酸,但其他氨基酸相同的肽段),然后通过已合成的含有 D-氨基酸的肽段对照品来确定含有 D-氨基酸的具体肽段,从而确定蛋白质中 D-氨基酸的具体位点。该方法准确度高、特异性强,对于确定蛋白质中外消旋化位点具有很大优势。

Sadakane 等^[54]证明了此方法涉及的酶解过程不会额外引起异构化,且检测限可低至 0.3%,而对比了酸水解过程则会额外引起 2%~5%的异构化率;2016 年, Fujii 等^[12]应用该方法研究了白内障患者晶状体蛋白中天冬氨酸的外消旋化,也与传统酸水解测定的外消旋化进行了对比,证明了此方法的简便易行、准确可靠,通过空白组证明了在蛋白质酶解过程中不会额外引起外消旋化。该方法可能存在的唯一劣势是合成成本高、合成技术要求高。

Fujii 课题组近年来多次利用该合成肽段对照法结合 HPLC 测定白内障患者晶状体蛋白中天冬氨酸的外消旋化程度^[54-56],其中 Aki 等^[54]利用此方法定量测定了天冬氨酸由 L 型转化为 D 型的一级速率常数,结果准确可靠。

3.2.3 自由基导向解离与碰撞诱导解离串联质谱 将自由基导向解离(radical directed dissociation, RDD)与碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)相结合的串联质谱方法,也可用于天冬氨酸外消旋化的定量测定。将含有外消旋化氨基酸的蛋白质酶解处理后,对肽段进行共价修饰,掺入发色团(如对碘苯甲酸);共价修饰后的 D/L 型异构肽段在液相色谱上的分离度得到提高,同时也更适用于 RDD,经过 RDD 解离为 D/L 型异构自由基肽段;D/L 型异构自由基肽段作为 CID 的母离

子,被解离为二级子离子,通过选择离子监测模式对 D/L 型异构自由基肽段进行定量测定。

已经有报道表明 RDD 是用于识别异构体的灵敏度最高的方法,同时更具灵活性,可以根据电荷的不同状态进行解离^[57]。单独的 CID 虽然可以分析丰度较低的肽段,但识别异构体的能力略弱。该方法的劣势是,在共价修饰操作中样品损失和实验复杂程度增加。

2014 年, Tao 等^[58]成功利用该方法定量测定了白内障患者 α 晶状体蛋白中发生外消旋化和差向异构化的 D-天冬氨酸和异天冬氨酸,对比验证了异构肽段经过共价修饰后在液相上分离度明显提高,再经过 RDD 和 CID 裂解进入质谱检测,灵敏度得到改善。

3.2.4 液质联用-离子迁移质谱

离子迁移质谱 (ion mobility spectrometry, IMS) 是离子迁移分离与质谱联用的一种新型二维质谱分析技术,离子迁移分离原理是基于离子在漂移管中与缓冲气体碰撞时的碰撞截面不同,离子可按大小和形状进行分离。经过 30 多年的发展,离子迁移质谱已配有多种最新的离子源及质量分析器,理论研究也日渐成熟,并在蛋白质、多肽及复杂化合物异构体分析方面越发显示出独特的优势,正在发展成为一种新型的重要分析工具^[59]。

D/L 型异构肽段被液相色谱分离后,进入质谱 CID 被裂解为碎片,碎片离子进入 IMS,通过对比 D/L 型异构肽段中差异氨基酸的不同到达时间,确定发生异构化的氨基酸位点。已有报道表明 D/L 型异构肽段因为构型的差异,在 IMS 中表现出不同的迁移能力^[60]。待分析物可以较快地一次完成分析,数据处理过程简单、直接。但此方法不能确定 D/L 型异构肽段在 IMS 中到达的先后顺序,只能确定发生异构化的位点,可以广泛应用于确定蛋白质中发生外消旋化的 D-氨基酸的位点。

Jia 等^[61]报道了利用 LC-MS/MS-IMS 技术用于快速、准确定位差向异构肽段中特定位点的 D-型氨基酸,并成功定位了甲壳动物高血糖激素中发生外消旋化的 D-苯丙氨酸的位点(如图 1)。And 等^[62]还通过对比发现,通过化学方法断裂酰胺键会引起 3%~15% 的外消旋化,而文中所用方法在前处理酶解过程中不存在外消旋化的干扰,检测灵敏度高、专属性强。

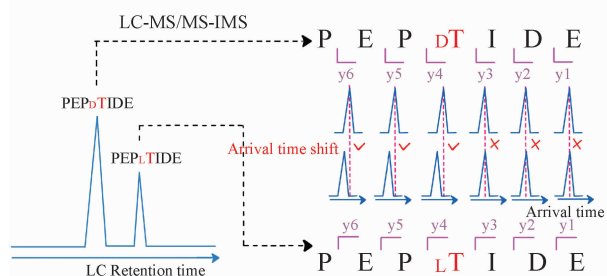


Figure 1 Workflow for localization of D-amino acids in peptides^[61]

By comparing the arrival time distributions between the two sets of fragment ions, the position of D-amino acid can be determined; ✓, arrive time shift; ✗, no shift

3.3 蛋白质和多肽的免疫学测定

蛋白质中氨基酸外消旋化的检测除了色谱、质谱方法之外,临床上也有免疫学检测手段——酶联免疫吸附测定法(ELISA),其最大的优势是可以简便快速地高通量筛选病人的样本^[63],省去了色谱法复杂的前处理过程,检测限低、灵敏度高。

除此之外,该方法还具有其他优势。其所用抗体具有序列特异性、立体选择性,可以选择性地针对一个特定抗原表位、定量测定一个特定多肽序列中氨基酸的外消旋化,因此可以区分出样本序列中氨基酸的不同,从而确定组织样本中蛋白质发生外消旋化的位点;也避免了传统酸水解操作中额外引起的外消旋化。

但由于含有外消旋化氨基酸的抗原表位不一定可以确定为疾病的生物标记物,因此商品化的 ELISA 试剂盒的种类极少。目前已经实现商品化的 ELISA 试剂盒是用于定量测定人尿液中的生物标记物 I 型胶原羧基端交联肽(type I C-telopeptide, CTX-I)中天冬氨酸的外消旋化转化率。Cloos 等^[64]利用该试剂盒定量测定了不同人群晨尿中 CTX 中的 α L/ α D 值,结果显示不同人群体内天冬氨酸外消旋化转化率由高往低依次是变形性关节炎患者、骨质疏松症患者、健康人群,并且转化率在不同人群中都是年龄增长依赖型的;证明了这种对人体非损伤性的测定方法对于估算骨组织中天冬氨酸外消旋化转化率以及协助代谢性骨疾病的诊断具有重要意义。

4 展望

随着分析技术的不断发展,蛋白质中氨基酸外消旋化的研究策略已经愈发多样化。提高分析效

率、降低分析过程中外消旋化的干扰、实现灵敏专属的测定将成为蛋白质中氨基酸外消旋化分析方法的发展方向。简便易行、易于推广的外消旋化位点及外消旋化评价方法将不断涌现,有助于更全面深入地研究蛋白质翻译后修饰对其生理功能的影响。发现并研究更多与蛋白质中氨基酸外消旋化相关的疾病,以及研究 D-氨基酸修饰蛋白是否可以作为疾病潜在的生物标记物具有重要的意义。

参考文献

- [1] Friedrich MG, Lam J, Truscott RJW. Degradation of an old human protein[J]. *J Biol Chem*, 2012, **287**(46):39012–39020.
- [2] Fujii N, Harada K, Momose Y, et al. d-Amino acid formation induced by a chiral field within a human lens protein during aging[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **263**(2):322–326.
- [3] Nishimura S, Murasugi T, Kubo T, et al. RS-4252 inhibits amyloid β -induced cytotoxicity in HeLa cells[J]. *Pharmacol Toxicol*, 2003, **93**(1):29–32.
- [4] Hooy MYS, Raftery MJ, Truscott RJW. Racemization of two proteins over our lifespan; deamidation of asparagine 76 in γ S crystallin is greater in cataract than in normal lenses across the age range[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, **53**(7):3554–3561.
- [5] Sheykhkarimli D, Choo KL, Owen M, et al. Molecular ageing: free radical initiated epimerization of thymopentin—a case study[J]. *J Chem Phys*, 2014, **140**(20):205102.
- [6] Conrad U, Fahr A, Scriba GKE. Kinetics of aspartic acid isomerization and enantiomerization in model aspartyl tripeptides under forced conditions[J]. *J Pharm Sci*, 2010, **99**(10):4162–4173.
- [7] Ran I, Yoshihisa Y, Tojo Y, et al. Localization of serine racemase and its role in the skin[J]. *J Invest Dermatol*, 2014, **134**(6):1618–1626.
- [8] Mahtaj LG, Feizpour A, Kianmehr M, et al. The effect of carvedilol on systemic inflammation in guinea pigs model of COPD induced by cigarette smoke exposure[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, **67**(1):140–145.
- [9] Velmurugan P, Jonnalagadda RR, Sankaranarayanan K, et al. Does I to D-amino acid substitution trigger helix \rightarrow sheet conformations in collagen like peptides adsorbed to surfaces[J]. *Mater Sci Eng C*, 2015, **57**:249–256.
- [10] Wegener A, Höck A, Scheidemann-Wesp U, et al. Radiation effects on light scattering and cataract formation in the lenses of interventional radiologist and cardiologists[J]. *Acta Ophthalmol*, 2014, **92**(s253):1772–1773.
- [11] Aki K, Okamura E. D- β -aspartyl residue exhibiting uncommon high resistance to spontaneous peptide bond cleavage[J]. *Scient Rep*, 2016, **6**:21594.
- [12] Fujii N, Takata T, Fujii N, et al. Isomerization of aspartyl residues in crystallins and its influence upon cataract[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1860**(1):183–191.
- [13] Maderna E, Cattaneo C, Cacciatore F, et al. Divergent cognitive status with the same Braak stage of neurofibrillary pathology: does the pattern of amyloid- β deposits make the difference[J]? *J Alzheimer's Disease*, 2015, **43**(2):375–379.
- [14] Lu M, Shaler TA. Isomerization and autolysis at specific amino acid residues of the tau protein and its relations to Alzheimer's disease[J]. *Biophys J*, 2014, **106**(2):473a–474a.
- [15] Tambo K, Yamaguchi T, Kobayashi K, et al. Racemization of the aspartic acid residue of amyloid- β peptide by a radical reaction[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, **77**(2):416–418.
- [16] Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, et al. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon[J]. *J Clin Invest*, 1991, **87**(5):1828–1834.
- [17] Koizumi R, Ogasawara M, Sasaki N, et al. Involvement of aspartic acid racemization and isomerization in the pathogenesis of COPD[J]. *Eur Respir J*, 2013:246.
- [18] Mimura J, Itoh K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Free Radical Biol Med*, 2015, **88**:221–232.
- [19] Powell JT, Vine N, Crossman M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta[J]. *Atherosclerosis*, 1993, **97**(2/3):201–208.
- [20] Matzenauer C, Reckert A, Ritz-Timme S. Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in elastic cartilage of the epiglottis[J]. *Int J Legal Med*, 2014, **128**(6):995–1000.
- [21] Maroudas A, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R, et al. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **350**(1):61–71.
- [22] Adamska I, Klopptech K, Ohad I. The effect of free radical enhancers and scavengers on accumulation of early light-inducible protein during light stress[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2014, **48**(3/4):391–396.
- [23] Mandy C, Green, Laura J, Dubnicka, Alex C, Davis, et al. Thermodynamics and kinetics for the free radical oxygen protein oxidation pathway in a model for β -structured peptides[J]. *J Phys Chem A*, 2016, **120**(16):2493.
- [24] Gebicki JM, Nauser T, Domazou A, et al. Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological significance[J]. *Amino Acids*, 2010, **39**(5):1131–1137.
- [25] Geiger T, Clarke S. Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation[J]. *J Biol Chem*, 1987, **262**(2):785–794.
- [26] Miyamoto T, Sekine M, Ogawa T, et al. Generation of enantiomeric amino acids during acid hydrolysis of peptides detected by the liquid chromatography/tandem mass spectroscopy[J]. *Chem Biodiv*, 2010, **7**(6):1644–1650.
- [27] Man EH, Fisher GH, Payan IL, et al. D-aspartate in human brain[J]. *J Neurochem*, 1987, **48**(2):510–515.

- [28] Zhu H, Feng PJW. Explanation of enantioseparation of amino acid derivatives in gas chromatography [J]. *Mol Simul*, 2011, **37** (15): 1–8.
- [29] Ritz TS, Collins MJ. Racemization of aspartic acid in human proteins [J]. *Ageing Res Rev*, 2002, **1** (1): 43–59.
- [30] Hayase F, Kato H, Fujimaki M. Racemization of amino acid residues in casein roasted with glucose and/or methyl linoleate [J]. *Agricul Biol Chem*, 2014, **43** (12): 2459–2465.
- [31] Waite ER, Collins MJ, Duin ACTV. Hydroxyproline interference during the gas chromatographic analysis of D/L aspartic acid in human dentine [J]. *Deutsche Zeitschrift Für Die Gesamte Gerich-tliche Medizin*, 1999, **112** (2): 124–131.
- [32] Garde E, Heidejorgensen MP, Hansen SH, *et al.* Age-specific growth and remarkable longevity in narwhales (monodon monoceros) from West Greenland estimated by aspartic acid racemiza-tion [J]. *J Mammal*, 2015, **88** (1): 49–58.
- [33] Sivan SS, El BV, Merkher Y, *et al.* Longevity of elastin in human intervertebral disc as probed by the racemization of aspartic acid [J]. *Biochim Et Biophys Acta*, 2012, **1820** (10): 1671–1677.
- [34] Lin X, Huang P, Chen J, *et al.* Simultaneous determination of hepatoma-associated tyrosine and valine amino acid enantiomers by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *J Chongqing Med Univ* (重庆医科大学学报), 2014, **39** (12): 1718–1722.
- [35] Zhang KK. Alpha-crystallin Racemization and its role in human age-related cataract (α 晶状体蛋白外消旋化对年龄相关性白内障发病的影响研究) [D]. *Shanghai: Fudan University*, 2014.
- [36] Terezie Benesová, Ales Honzátko, Pilin A, *et al.* A modified HPLC method for the determination of aspartic acid racemization in collagen from human dentin and its comparison with GC [J]. *J Sep Sci*, 2004, **27** (4): 330–334.
- [37] Csapo J, Csapo-Kiss Z, Wagner L, *et al.* Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids [J]. *Anal Chim Acta*, 1997, **339** (1/2): 99–107.
- [38] Visser WF, Verhoeven-Duif NM, Ophoff R, *et al.* A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of D-amino acids in body fluids [J]. *J Chromatogr A*, 2011, **1218** (40): 7130–7136.
- [39] Johnson BJ, Miller GH. Archaeological applications of amino acid racemization [J]. *Archaeometry*, 1997, **39** (2): 265–287.
- [40] Karakawa S, Shimbo K, Yamada N, *et al.* Simultaneous analysis of d-alanine, d-aspartic acid, and d-serine using chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the rat plasma and tissues [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, **115**: 123–129.
- [41] Li X. Simultaneous quantitation of nine kinds of (D)- and (L)-amino acid enantiomers by HPLC-MS/MS; application to the quality control of amino acid tablets [J]. *Anal Meth*, 2015, **7** (20): 8817–8825.
- [42] Tubaon RMS, Rabanes H, Haddad PR, *et al.* Capillary electrophoresis of natural products: 2011–2012 [J]. *Electrophoresis*, 2014, **35** (1): 190–204.
- [43] Guo W, Cai Z, Fung Y. Capillary Electrophoresis [M] // Encyclopedia of microfluidics and nanofluidics. *Springer New York*, 2015, **28** (12): 269–280.
- [44] Zhong XF, Zhang ZC, Jiang S, *et al.* Recent advances in coupling capillary electrophoresis-based separation techniques to ESI and MALDI-MS [J]. *Electrophoresis*, 2014, **35** (9): 1214–1225.
- [45] Han X, Wang Y, Aslanian A, *et al.* In-line separation by capillary electrophoresis prior to analysis by top-down mass spectrometry enables sensitive characterization of protein complexes [J]. *J Proteo Res*, 2014, **13** (12): 6078–6086.
- [46] Lian DS, Zhao SJ. Capillary electrophoresis based on the nucleic acid detection in the application of human disease diagnosis [J]. *Clin Lab*, 2014, **60** (8): 1253–1268.
- [47] María DC, Fanny O, Silvia GG, *et al.* Design, synthesis, and characterization of new cyclic d, l-α-alternate amino acid peptides by capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2016, **502**: 8–15.
- [48] Wu Y, Li J, Zhao S, *et al.* Simultaneous determination of 11 food additives by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Food Anal Meth*, 2016, **9** (3): 589–595.
- [49] Zhao Y, Xu L. Chiral separation of d, l-p-hydroxyphenylglycine by ligand exchange micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Chromatographia*, 2015, **78** (9/10): 717–721.
- [50] Otsuka K, Terabe S. Enantiomeric separation by micellar electrokinetic chromatography [J]. *TAC Trends Anal Chem*, 1993, **12** (4): 125–130.
- [51] Hiroyuki N, Tsukasa F, Masaaki M. Resolution of optical isomers of 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC)-derivatized DL-amino acids by micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Microcolumn Sep*, 2005, **2** (5): 234–240.
- [52] Zomber G, Reuveny S, Garti N, *et al.* Effects of spontaneous deamidation on the cytotoxic activity of the *Bacillus anthracis* protective antigen [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (48): 39897–39906.
- [53] Maeda H, Takata T, Fujii N, *et al.* Rapid survey of four Asp isomers in disease-related proteins by LC-MS combined with commercial enzymes [J]. *Anal Chem*, 2015, **87** (1): 561–568.
- [54] Sakaue H, Takata T, Fujii N, *et al.* Alpha B- and βA3-crystallins containing d-aspartic acids exist in a monomeric state [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2015, **1854** (1): 1–9.
- [55] Sadakane Y, Yamazaki T, Nakagomi K, *et al.* Quantification of the isomerization of Asp residue in recombinant human αA-crystallin by reversed-phase HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, **30** (6): 1825–1833.
- [56] Aki K, Fujii N, Fujii N. Kinetics of isomerization and inversion of aspartate 58 of αA-Crystallin peptide mimics under physiological conditions [J]. *PLoS ONE*, 2013, **8** (3): e58515.
- [57] Tao Y, Quebbemann NR, Julian RR. Discriminating d-amino

- acid-containing peptide epimers by radical-directed dissociation mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(15): 6814–6820.
- [58] Tao Y, Julian RR. Identification of amino acid epimerization and isomerization in crystallin proteins by tandem LC-MS[J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(19): 9733–9741.
- [59] Baker ES, Burnum-Johnson KE, Jacobs JM, et al. Advancing the high throughput identification of liver fibrosis protein signatures using multiplexed ion mobility spectrometry[J]. *Mol Cell Proteom*, 2014, **13**(4): 1119–1127.
- [60] Shvartsburg AA, Creese AJ, Smith RD, et al. Separation of a set of peptide sequence isomers using differential ion mobility spectrometry[J]. *Encyclopedia Microfluid Nanofluid*, 2011, **83**(18): 6918–6923.
- [61] Jia C, Lietz CB, Yu Q, et al. Site-specific characterization of (D)-amino acid containing peptide epimers by ion mobility spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(6): 2972–2981.
- [62] And CMA, Zubarev RA. Distinguishing and quantifying peptides and proteins containing d-amino acids by tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2005, **77**(14): 4571–4580.
- [63] Got PA, Scherrmann JM. Stereoselectivity of antibodies for the bioanalysis of chiral drugs[J]. *Pharm Res*, 1997, **14**(11): 1516–1523.
- [64] Cloos PA, Fledelius C. Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized; a biological clock of protein aging with clinical potential[J]. *Biochem J*, 2000, **345**(3): 473–480.

· 新药信息 ·

2017 年世界新药研发的挑战与预测(1)

1. 新药上市数量迎“丰年”

目前全球约有 700 个新药进入临床研究,其中 70 多个进入临床Ⅲ期试验,估计今年不少于 40 个新药可能获得批准。这些药物的疗效和安全性将具有很高的市场需求性,适应证人群广泛、竞争产品少,或成为治疗某一疾病的标准治疗药物。其中,抗肿瘤药占有较大比重,有 6 个新药或将上市:阿斯利康的 PD-L1 免疫检查点抑制剂 durvalumab 试图与 tremelimumab 组合作为治疗肺癌的一线疗法;Niraparib 是继 Lynparza, Rubraca 之后的第 3 个 PARP(DNA 修复酶)抑制类药物,在治疗卵巢癌Ⅲ期临床试验中显著增加了患者无进展生存期;诺华 CDK 4/6CDK4/6 抑制剂 ribociclib 与 letrozole 组合作为一线疗法,在治疗 HR+、HER2-乳腺癌临床Ⅲ期试验中降低患者 44% 死亡风险;强生的治疗前列腺癌新非甾体抗雄激素 apalutamide,预计今年有把握上市;Kite 制药的 CAR-T 产品是有发展潜力的 KTE-C19 药物,预计将成为该公司第一款上市的 CAR-T 疗法;Puma 生物制药的 neratinib 是一种能够同时抑制 HER2 和 EGFR 激酶功能的酪氨酸激酶抑制剂,在 HER2+乳腺癌患者的临床Ⅲ期试验中减少疾病 33% 的复发或死亡风险,但其严重的消化道副作用值得关注。

除此之外,皮肤病治疗药物有 4 个或将上市:赛诺菲和再生元合作开发的 Dupixen 能够阻断 IL-4 和 IL-13 细胞因子的单抗 dupilumab,将用于治疗中重度过敏性皮炎;辉瑞收购加州生物制药公司 Anacor,支撑 Eucrisa 软膏被批准治疗轻度至中度湿疹;罗氏治疗多发性硬化病的药物 Ocrevus 有望成为治疗原发性多发性硬化症的第一个药物;强生的 guselkumab 是一种靶向 IL-23 的单克隆抗体,对中重度银屑病疗效显著。

类风湿性关节炎治疗药物有两个:强生的一种实验性人抗细胞白介素-6 单克隆抗体 sirukumab 以及礼来公司的口服 JAK 激酶抑制剂 baricitinib。另外,诺和诺德的 GLP-1 类似物 semaglutide,在治疗Ⅱ型糖尿病具有高心血管风险患者的Ⅲ期临床试验中表明,可以整体减少心血管疾病的风险。梯瓦制药的 deutetrabenazine,在后期比亨廷顿舞蹈症发病人迟发型运动障碍临床试验中获得可喜数据,有望成为囊泡单胺转运蛋白 2 抑制剂的新药。

2. 新药研发局势风云多变

多个疾病领域的药物研发中,其研发模式、路径多样,面对着许多问题。不同激励政策的出台和调整,催生“随行就市”的研发策略。2016 年上市的新药超过 40% 是孤儿药,为其研发打了强心剂。快速审评路径批准的新药在 60% 左右,却忽视了上市后安全和疗效的跟踪研究,甚至频繁更换适应证。

生物相似药上市速度极慢,研发门槛抬高是否有利于其代替原研药尚有复杂因素值得探讨;有些需求中药的发展较慢,如被忽视的抗生素研发,形势紧迫,新药研发刻不容缓。美国出现无敌细菌,又新出现超级细菌,现阶段抗生素的耐药性并未引起药界重视;由于作用机制研究的难点,近十年基本无新的抗抑郁药物来代替目前疗效减价的老药。

结合中国医药行业的现状及近两年的药政改革,对于创新药、改良型新药及仿制药三种药物类型研发,利用全球药物研发的特点及最新进展,如何给中国药企带来机遇值得探讨。

(来源:科学网,本刊有删节)