



厦门大学学报(自然科学版)
Journal of Xiamen University(Natural Science)
ISSN 0438-0479,CN 35-1070/N

《厦门大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目: 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对人永生表皮角质形成细胞 HaCAT 生理生化活性的影响

作者: 许新恒, 王悦, 吕鹏飞, 王童欣, 王堡焯, 庄江兴, 陈清西

收稿日期: 2019-06-27

网络首发日期: 2019-10-24

引用格式: 许新恒, 王悦, 吕鹏飞, 王童欣, 王堡焯, 庄江兴, 陈清西. 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对人永生表皮角质形成细胞 HaCAT 生理生化活性的影响. 厦门大学学报(自然科学版).
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20191024.1115.006.html>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

条纹斑竹鲨鱼皮多肽对人永生化表皮角质形成细胞 HaCAT 生理生化活性的影响

许新恒¹, 王悦², 吕鹏飞¹, 王童欣¹, 王堡焯¹, 庄江兴³, 陈清西¹✉

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361102; 2. 厦门肽王基因科技有限公司, 福建 厦门 361000; 3. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361102)

✉通信作者 chenqx@xmu.edu.cn

摘要 通过细胞活力、增殖、迁移、细胞周期、胞内活性氧(ROS)和抗氧化能力的检测,分析条纹斑竹鲨(又称狗鲨, *Chiloscyllium plagiosum*)鱼皮多肽对人永生化表皮角质形成细胞(HaCAT细胞)的作用。实验结果显示:随着多肽作用浓度的增加,HaCAT细胞活力显著提升,最大达到144%;细胞单克隆增殖能力明显增强;细胞划痕迁移愈合速率增加;细胞周期无显著变化;胞内ROS显著降低,最低可达49.1%;在H₂O₂氧化损伤下细胞活力明显恢复,活力最高达到119%。上述结果表明条纹斑竹鲨鱼皮多肽对HaCAT细胞的多项生理生化活性具有促进作用,可为其开发作为功能性皮肤敷料提供理论依据。

关键词 条纹斑竹鲨; 鱼皮多肽; HaCAT细胞; 活性氧; H₂O₂氧化损伤保护

中图分类号 Q516 文献标志码 A DOI: 10.6043/j.issn.0438-0479.201906029

Effects of hydrolytic peptides from *Chiloscyllium plagiosum* skin on physiological and biochemical activities of human immortalized keratinocytes (HaCAT cells)

XU Xinheng¹, WANG Yue², LÜ Pengfei¹, WANG Tongxin¹,

WANG Baoxuan¹, ZHUANG Jiangxing³, CHEN Qingxi¹✉

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. Tekwon Genetic Technology Co., Ltd., Xiamen 361000, China; 3. College of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract In this study, bio-effects of hydrolytic peptides powder from *Chiloscyllium plagiosum* sharks (white-spotted bamboo sharks) skin on human immortalized keratinocytes (HaCAT cells) were investigated in aspect of cell activity, proliferation, migration, cell cycle, intracellular reactive oxygen species (ROS) and oxidative protection assay. The results showed that the activity of HaCAT cells increased significantly after exposed to the peptides, and the maximum activity was increased to the rate of 144%. The ability of cell monoclonal proliferation was significantly enhanced. The wound healing rate of cell scratches increased. There was no significant change in cell cycle. Intracellular ROS decreased significantly, with the minimum reaching 49.1%. Under the oxidative damage of H₂O₂, cell activity was significantly restored with the peptides treatment, the highest activity reaching 119%. This research indicates that *C. plagiosum* skin hydrolytic peptides can promote multiple physiological and biochemical activities of HaCAT cells, providing a theoretical basis for the application at functional skin dressings.

Key words *Chiloscyllium plagiosum*; shark skin peptide; HaCAT cells; reactive oxygen species; oxidative protection against H₂O₂

鱼类胶原蛋白及其水解产物由于其生物安全性、可降解性和多种的生物功效,在化妆品、医用敷料和医疗器械等方面有广泛的应用前景。Muthukumar 等^[1]发现在鱼鳞胶原海绵内混入植物提取物,

收稿日期: 2019-06-27

基金项目: 厦门海洋经济发展专项(17GYY011HJ05)

网络首发时间: 2019-10-24 13:44:12 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20191024.1115.006.html>

抗菌效果较好, 提出其可用于烫伤或创伤治疗方面的开发。Zhang 等^[2]发现鱼皮胶原水解多肽促进通过老年小鼠骨骼重构来改善骨质疏松。

海洋鱼类蛋白资源储备丰富, 具有高生物安全性, 是蛋白资源开发的主要方向之一。国内外大量的研究发现, 海洋鱼类胶原蛋白和水解多肽具有抗氧化、低免疫排异性、抗炎和抗癌等生物学功效^[3-5]。目前鱼类在工业食品加工过程中产生大量鱼皮、鱼鳍等下脚料, 造成约物质含量 60% 的浪费^[6], 研究表明这些下脚料蛋白含量尤其是胶原蛋白含量很高, 具有较大的开发潜力^[7]。

条纹斑竹鲨 (*Chiloscyllium plagiosum*), 俗称狗鲨, 属于软骨鱼纲须鲨目须鲨科斑竹鲨属, 是一种暖水性小型鲨鱼, 栖息在海底暗礁珊瑚环境, 在我国南海和东海有较多分布^[8]。条纹斑竹鲨蛋白含量高, 肉质鲜美, 长期受到我国沿海人民的喜爱, 同时也是民间药材和观赏鱼类^[9]。目前, 针对条纹斑竹鲨的国内外研究主要集中于生殖、运动、肝再生、基因组学和养殖等方面^[8,10-12], 未见关于条纹斑竹鲨鱼皮多肽生物活性的报道, 同时在条纹斑竹鲨科研成果转化应用方面进展缓慢。本研究提取条纹斑竹鲨鱼皮多肽制成冻干粉, 通过检测细胞活力、增殖、迁移、细胞周期、胞内活性氧 (ROS) 和抗氧化能力等指标, 研究其对永生表皮角质形成细胞 (HaCAT 细胞) 生物学活性的影响, 以期对日后功能性皮肤敷料的开发提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

条纹斑竹鲨由厦门肽王基因科技有限公司提供, 于闽南近海海域捕捞, 活体送达实验室, 敲击头部致死尽快剥皮。HaCAT 细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

细胞培养试剂: DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 优级胎牛血清 (澳大利亚 AusGeneX 公司), 青霉素-链霉素混合液 (美国 Hyclone 公司), Trypsin-EDTA 消化液 (美国 Hyclone 公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Amresco 公司)。

检测试剂: 噻唑兰 (MTT, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 姬姆萨染料 (上海生工生物工程有限公司), ROS 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术研究所), 碘化丙啶染色剂 (PI, 上海生工生物工程有限公司)。

其他试剂: 木瓜蛋白酶来自上海生工生物工程有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

酶联免疫检测仪 (Thermo Fisher MULTISKAN GO, Thermo 公司), 冷冻干燥器 (FREEZONE18, LABCONCO 公司), 超低温冰箱 (Forma 902-VL7S, Thermo 公司), 相差倒置显微镜 (Nikon TE2000, Nikon 公司), 流式细胞仪 (Beckman Coulter FC500, Beckman 公司), CO₂ 气体培养箱 (Thermo Fisher Forma 3111, Thermo 公司)

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

在 DMEM 培养基中加入胎牛血清至终体积分数为 10%, 添加青链霉素混合液至终体积分数 1%, 以此配成完全培养基, 每 2~3 d 为 HaCAT 细胞更换培养基, 于温度 37 °C, CO₂ 浓度 5% (体积分数) 的培养箱中培养。

传代: 当细胞生长至汇合度大于 70% 时按 1:3 的比例传代, 用消化液于 37 °C 消化细胞约 8~10 min, 加入完全培养基停止消化, 移液器吹打使细胞完全悬浮, 收集悬液, 270 g 离心 3 min (下文称为常规离心), 弃去上清, 完全培养基重悬细胞并分皿。后文提及的消化收集步骤同上。

冻存: 消化并收集细胞, 用含 20% (体积分数) 胎牛血清的 DMEM 培养基与 DMSO 按 9:1 的体积比配成的冻存液重悬细胞, 将细胞移入细胞冻存管, 放入程序降温盒中, 置于 -80 °C 超低温冰箱冻存。

复苏: 水浴快速将细胞恢复到室温, 常规离心除去冻存液, 加入完全培养基, 重悬细胞转移至细

胞培养皿，放入培养箱内，培养至细胞贴壁完全后，再次更换培养基，之后 2~3 d 更换一次培养基。

1.3.2 条纹斑竹鲨鱼皮多肽的制备

将条纹斑竹鲨活体敲击头部致死尽快剥下皮肤，尽量剔除与皮肤相连的肉，然后将皮肤剪成约 1 cm×1 cm 小片，每 100 g 皮肤组织加入 1 L 10%（体积分数，下同）异丙醇水溶液浸泡 12 h 以除去脂类物质，期间每隔 3~4 h 猛烈振荡一次。之后更换新的 10% 异丙醇水溶液并再浸泡 12 h，振荡操作同上。倒去浸泡液，用超纯水冲洗直至无异丙醇气味。将组织在 1 L 超纯水中煮沸 30 min，期间不断搅拌并补充超纯水，使体积维持在 1 L。冷却后，将组织和清汤匀浆 3 min 形成匀浆液。然后用稀 HCl 调节 pH 至 5.0，超纯水定容体积至 1 L。向匀浆液中加入 5 g 木瓜蛋白酶，置于 50 °C 恒温环境下酶解 4 h，然后煮沸 20 min 以停止酶解。所得酶解液以 12000 r/min 离心 25 min，分离上清和沉淀，得到淡青色澄清透明液体，冻干后获得白色多肽粉末。

1.3.3 细胞活力检测

消化收集指数生长期的 HaCAT 细胞，以 1×10^4 个/孔的细胞数目铺入 96 孔板，每孔含 100 μ L 完全培养基，各组设置 5 个平行孔，放入细胞培养箱。待细胞贴壁后，阴性对照组加入 100 μ L 完全培养基，即多肽浓度为 0 mg/mL，细胞正常培养；多肽剂量组加入 100 μ L 用完全培养基溶解的多肽粉末，使各组终浓度分别达到 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 3.0 和 4.0 mg/mL；另有空白对照组为既无细胞也无多肽的 200 μ L 完全培养基，用于消除培养基颜色带来的背景误差。培养箱中孵育细胞 24 h 后，每孔加入 20 μ L 5 mg/mL MTT，继续孵育 4 h 后吸出所有液体，每孔加入 150 μ L DMSO，然后在酶标仪内先振荡 5 min，490 nm 下检测吸光度（OD）值，计算 HaCAT 细胞活力：

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{剂量组OD} - \text{空白对照组OD}}{\text{阴性对照组OD} - \text{空白对照组OD}} \times 100\%$$

1.3.4 细胞单克隆增殖实验

消化收集指数生长期的 HaCAT 细胞，用完全培养基稀释浓度至 2000 个/mL，并充分吹打使细胞分布均匀，去除细胞间黏连，每个 6 cm 培养皿接种 5 mL，贴壁过夜。用终浓度分别为 0, 0.5, 1 和 2 mg/mL 的条纹斑竹鲨鱼皮多肽处理细胞，置于培养箱中孵育 14 d，使其形成细胞单克隆集落。弃去培养基，PBS 洗涤细胞一遍，无水甲醇固定 20 min，吸去甲醇，加入吉姆萨染液室温染色 20 min，吸去染液，PBS 洗 3 遍，自然风干，拍摄集落。

1.3.5 细胞划痕迁移实验

将 HaCAT 细胞铺于 6 孔板，每孔 2 mL，使贴壁后细胞汇合度达到 90%~100%。待细胞贴壁后用 10 μ L 无菌枪头在孔板内表面垂直沿直线划痕，使得划痕宽度均匀一致，且力度控制在不刮损内表面，防止因表面损伤而不利于细胞向此处迁移。PBS 清洗 2 遍细胞，加入不含血清的 DMEM 培养基后在显微镜下拍摄划痕。用终浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 4.0 mg/mL 的条纹斑竹鲨鱼皮多肽处理细胞，维持细胞培养在不含血清 DMEM 培养基中，36 h 后在相同倍数下再次拍摄划痕。对比处理前后划痕位置的变化情况，检测细胞迁移能力。

1.3.6 细胞周期变化检测

消化收集指数生长期的 HaCAT 细胞，接种 2 mL 于细胞 6 孔板，使细胞贴壁后汇合度约为 40%，培养箱孵育过夜。各组分别用终浓度为 0, 0.1, 0.5, 1.0 和 2.0 mg/mL 的多肽作用于细胞 24 h，收集上清中漂浮的死细胞，与消化后收集的活细胞混合，重悬于 EP 管中，常规离心，PBS 洗一遍，再次离心后用 -20 °C 预冷的 70%（体积分数）乙醇重悬，静置于 4 °C 约 1 h。常规离心，收集沉淀，PBS 洗涤 2 次，确认无乙醇气味后，用 500 μ L PBS 重悬细胞。加入 5 μ L 10 mg/mL PI 染液和 2.5 μ L 20 mg/mL RNase A，避光室温孵育 20 min，300 目尼龙网过滤细胞，上样至流式细胞仪检测细胞周期的变化。

1.3.7 细胞 ROS 检测

用碧云天活性氧检测试剂盒检测，将 HaCAT 细胞以 30%~50% 的汇合度接种进 6 孔板，置于细胞

培养箱孵育至完全贴壁。用 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 和 2.0 mg/mL 浓度的条纹斑竹鲨鱼皮多肽处理贴壁细胞 48 h 后, 消化收集细胞, PBS 洗涤 2 遍。按照 1:1000 用无血清培养基稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。悬浮细胞于稀释好的 DCFH-DA 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。每隔 3~5 min 振荡混匀。离心去除 DCFH-DA, 用无血清培养基洗涤细胞 1 次, 无血清培养基重悬, 300 目尼龙网过滤后, 使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长于流式细胞仪检测荧光。

1.3.8 细胞氧化损伤检测

细胞铺板方法同 1.3.3 小节步骤。细胞贴壁后加入条纹斑竹鲨鱼皮多肽使终浓度分别为 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0 和 4.0 mg/mL, 每个浓度设置 6 个平行, 同时设置空白对照组(细胞正常培养, 多肽和 H_2O_2 均用等体积完全培养基替代), 处理细胞 24 h。加入终浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 损伤细胞 12 h。之后吸去全部培养基, 更换完全培养基 200 μL , 每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL , 培养箱孵育 4 h 后弃去, 加入 DMSO 150 μL /孔, 在酶标仪上振荡使蓝色甲臞充分溶解, 并在 490 nm 下检测 OD 值。根据 1.3.3 小节中细胞活力计算公式得出相对细胞活力, 检测多肽对损伤的保护效果。

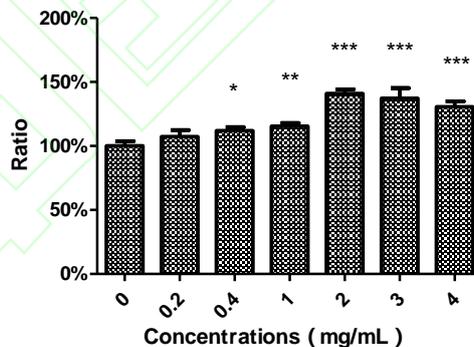
1.3.9 统计学分析

采用 Graphpad Prism 软件制作图形, SPSS 22.0 进行单因素 ANOVA 和 LSD 多重比较方法分析对照组同各组的平均值差异和其显著水平, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异很显著, $p < 0.001$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对细胞活力的影响

当条纹斑竹鲨鱼皮多肽处理细胞 24 h 后, 发现随着多肽浓度的上升, 细胞活力总体呈增加趋势(图 1), 该结果说明条纹斑竹鲨鱼皮多肽对 HaCAT 细胞活力具有促进作用, 其中 2 mg/mL 条纹斑竹鲨鱼皮多肽促进作用最强, 可以使细胞活力提升 44%。



与对照组相比, *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$

图 1 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对 HaCAT 细胞活力的作用

Fig. 1 Effects of peptides from skin of *C. plagiosum* on viability of HaCAT

2.2 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对细胞单克隆增殖的影响

单细胞无法肉眼可见, 只有持续分裂至一定数量才能被肉眼观察, 所以观察到的集落越多代表细胞单克隆增殖能力越强。条纹斑竹鲨鱼皮多肽作用细胞持续 14 d 后用吉姆萨染色, 发现多肽处理后的 HaCAT 细胞单克隆集落存活数量明显增多, 其中 1.0 mg/mL 效果最显著, 2.0 mg/mL 效果有所下降, 但仍然高于 0.5 mg/mL (图 2), 这表明在多肽作用下, 单细胞存活能力和集落增殖能力都相对对照组更强。

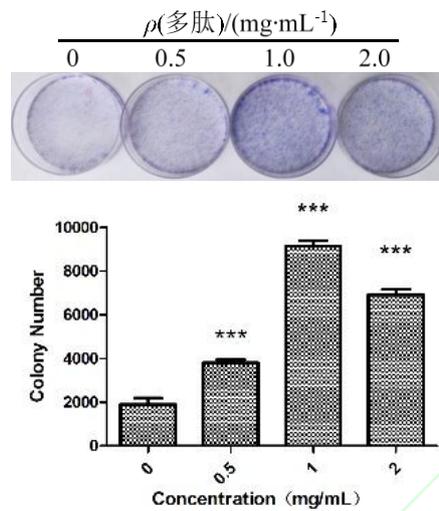
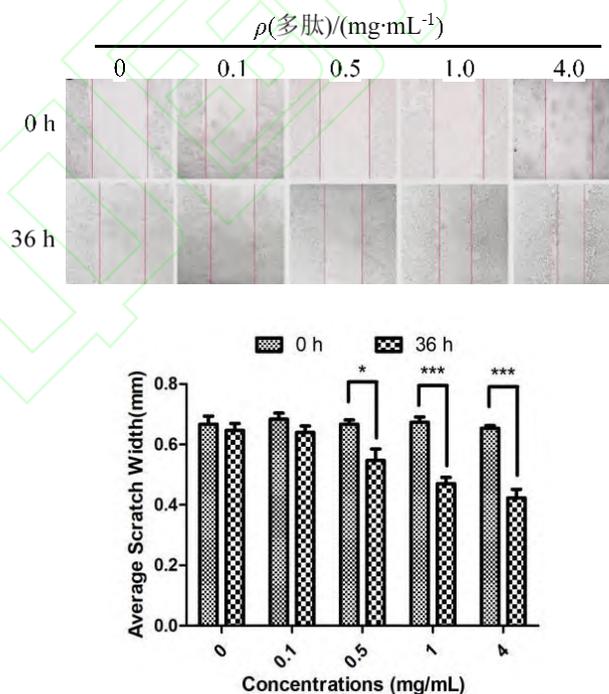


图 2 狗鲨鱼皮多肽对 HaCAT 细胞增殖的影响
Fig. 2 Effects of peptides from skin of *C. plagiosum* on proliferation of HaCAT

2.3 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对细胞划痕迁移的影响

采用血清饥饿法培养细胞时，细胞由于缺乏有丝分裂因子等生长因子的作用将不会持续分裂，细胞周期被阻断在 G₀ 期^[13]，细胞划痕的愈合此时将取决于细胞的迁移^[14]。随着多肽浓度的增加，细胞逐渐向划痕内迁移使得划痕变窄（图 3），表明条纹斑竹鲨鱼皮多肽具有促进 HaCAT 细胞迁移的作用，且在多肽浓度 0~4 mg/mL 内迁移距离与浓度呈现正相关。

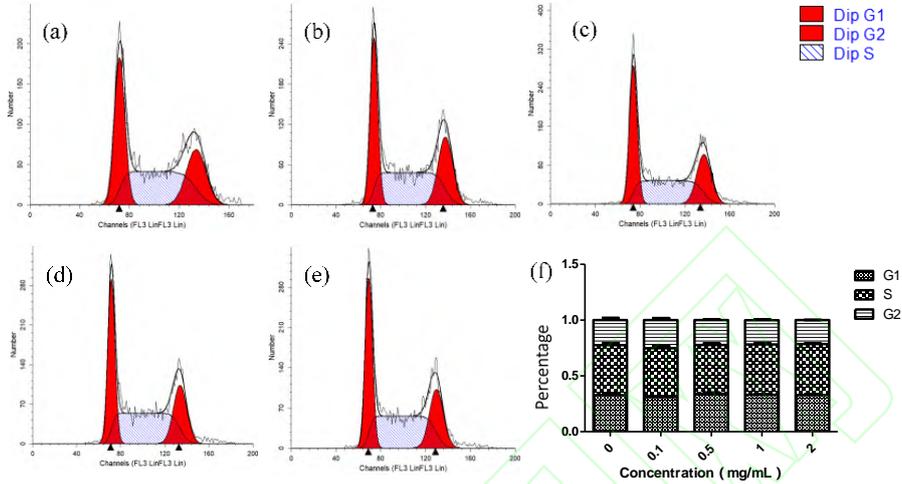


36 h 拍摄的划痕与 0 h 位置相同；柱状图所示为 0 h 和 36 h 各组划痕平均宽度；与对照组相比，*表示 $p < 0.05$ ，***表示 $p < 0.001$ 。

图 3 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对 HaCAT 细胞划痕愈合的影响
Fig. 3 Effects of peptides from skin of *C. plagiosum* on scratch healing of HaCAT

2.4 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对细胞周期的影响

如图 4 所示，不论药物浓度如何变化，HaCAT 细胞的周期时相分布没有发生显著变化，各多肽剂量组与对照组比较并无差异，这一结果表明条纹斑竹鲨鱼皮多肽在 24 h 内没有抑制细胞有丝分裂的作用，也没有导致细胞的异常增生。

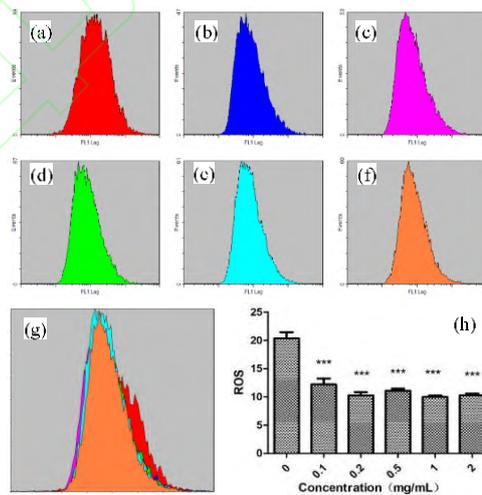


(a)~(e)流式图中 G1 期为左侧较高的红色峰，G2 期为右侧较低红色峰；a. 0 mg/mL，b. 0.1 mg/mL，c. 0.5 mg/mL，d. 1 mg/mL，e. 2 mg/mL；(f)柱状图显示各组 3 个时相分布比例。

图 4 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对细胞周期的作用
Fig.4 Impact of peptides from skin of *C. plagiosum* on cell cycle of HaCAT

2.5 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对细胞 ROS 的影响

如图 5 所示，在多肽作用细胞 48 h 后，流式细胞仪检测发现胞内 ROS 显著降低，在浓度为 0.1 mg/mL 时效果就呈现出极显著差异 ($p < 0.01$)，浓度达到 0.2 mg/mL 时 ROS 相对含量进一步降低，之后随着浓度的增加，ROS 相对含量在对照组 50% 的水平波动，最低达到 49.1% (1 mg/mL 时)。结果说明，条纹斑竹鲨鱼皮多肽能显著降低细胞内 ROS，效果先随浓度提升而增强，后趋于稳定，稳定最低浓度为 0.2 mg/mL。

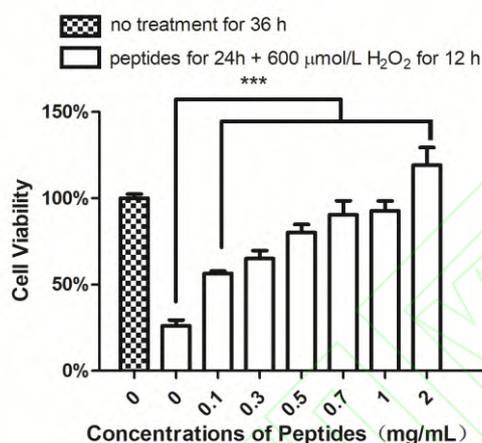


(a)~(f)流式图中 a. 0 mg/mL，b. 0.1 mg/mL，c. 0.2 mg/mL，d. 0.5 mg/mL，e. 1.0 mg/mL，f. 2.0 mg/mL；(g)图(a)~(f)的叠加；(h)柱状图统计各浓度下 ROS 相对含量。

图 5 狗鲨鱼皮多肽对胞内 ROS 含量的影响
Fig.5 Variation of intracellular ROS of HaCAT treated with peptides from skin of *C. plagiosum*

2.6 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对细胞氧化损伤的保护作用

如图 6 所示, 在没有加入多肽时, $600 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$ 损伤细胞可导致细胞活力降低至 $26.08\% \pm 5.84\%$, 在各多肽剂量组中, 随着多肽浓度的增加, 细胞活力相较于对照组显著增加, 当浓度达到 0.7 mg/mL 及以上时, 细胞活力接近阴性对照组, 其中 2 mg/mL 组的细胞活力甚至高于未进行 H_2O_2 损伤处理的正常培养组, 达到 119% ($p < 0.05$)。结果表明条纹斑竹鲨鱼皮多肽具有保护细胞免受外源氧化损伤的作用, 效果呈现浓度正相关。



多肽作用细胞 24 h 后无需弃去, 直接加入 H_2O_2 至终浓度 $600 \mu\text{mol/L}$ 再处理 12 h; ***表示 $p < 0.001$ 。

图 6 条纹斑竹鲨鱼皮多肽对受 H_2O_2 氧化损伤的 HaCAT 细胞的作用
Fig.6 Effects of peptides from skin of *C. plagiosum* on HaCAT treated with H_2O_2

3 讨论

条纹斑竹鲨鱼皮多肽作为一种海洋鱼类蛋白, 富含胶原蛋白水解成分, 具有多种生物活性作用。本研究中 MTT 试验表明条纹斑竹鲨鱼皮多肽促进细胞活力。由于 MTT 试剂在线粒体中可被琥珀酸脱氢酶还原, 能有效反映出琥珀酸脱氢酶活性, 而琥珀酸脱氢酶作为 TCA 循环关键酶和线粒体内膜标志酶, 有效反应细胞呼吸代谢活力。这暗示细胞活力的提升可由细胞数量增多 (酶总量增多) 和酶活力增强两个方面体现。通过单克隆增殖实验, 本研究结果表明多肽能促进细胞分裂, 使细胞数量增多。这说明条纹斑竹鲨鱼皮多肽促进细胞活力提升的原因之一是促进细胞数量增加, 而其是否促进酶活力的增强需通过酶学活性试验进一步研究。

划痕实验是探索细胞体外薄层迁移的标准性实验, 能够反映出细胞群集体协同运动的能力, 而细胞群集体协同运动发生在胚胎形态建成、组织损伤和肿瘤转移等多种进程中^[14]。本研究中划痕实验结果显示, 条纹斑竹鲨鱼皮多肽具有显著促进细胞向划痕处愈合的能力, 且随着浓度增加而增强, 这表明在多肽作用下细胞的迁移运动能力得到增强。

结合单克隆增殖和细胞周期实验的结果, 条纹斑竹鲨鱼皮多肽各浓度组细胞单克隆集落在 14 d 后出现肉眼可见的差异, 但 24 h 内对细胞周期时相分布没有显著影响, 可以得出条纹斑竹鲨鱼皮多肽可无毒副、温和且持续地促进细胞增殖。参考国内外其他研究, 细胞周期时相检测通常使用在凋亡和周期蛋白通路激活/抑制等较为剧烈的应激情况下^[15,16], 可能由于方法灵敏度的限制, 在本研究中细胞周期的变化达不到直观差异的水平。

ROS 包括超氧自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 (OH^{\cdot}) 等, 其中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 是细胞内最主要的两种 ROS^[17]。除外源性 ROS 以外, 细胞呼吸过程中产生内源性 ROS, 大约 1%~2% 的电子在传递过程中泄露出来形成 ROS^[18]。通常情况下细胞具有抗氧化机制清除过多的 ROS, 防止其对细胞造成损伤, 但随着细胞的衰老, 线粒体功能衰弱, 膜结构破损, 产生的 ROS 会上升, 进而加

速细胞衰老^[19]。因此,清除胞内 ROS 对维持细胞活力至关重要。本研究结果表明条纹斑竹鲨鱼皮多肽能有效清除内源性 ROS,高浓度可使内源性 ROS 低于 50%,并保护细胞免受外源性 ROS 损伤,维持细胞活性。

4 结 论

本研究得出条纹斑竹鲨鱼皮多肽对 HaCAT 细胞主要具有以下作用:1)较短时间(24 h)内促进细胞活力,效果显著,细胞数量增加是活力上升原因之一;2)可较长时间(14 d)促进细胞增殖,作用效果温和而持续;3)促进细胞划痕迁移,提示可促进创伤愈合;4)24 h 内对细胞周期时相分布无明显影响,提示对细胞无毒副作用,并非通过细胞应激促进增殖;5)细胞内源性 ROS 清除;6)保护细胞免受外源性 ROS 损伤。综上所述,条纹斑竹鲨鱼皮多肽有望被开发为一款安全的新型皮肤敷料,与其他医药有效成分结合,应用于创伤修复。

参考文献:

- [1] MUTHUKUMAR T, ANBARASU K, PRAKASH D, et al. Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing *Macrotyloma uniflorum* plant extract-In vivo wound healing[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2014, 121: 178-188.
- [2] ZHANG L, ZHANG S, SONG H, et al. Effect of Collagen Hydrolysates from Silver Carp Skin (*Hypophthalmichthys molitrix*) on Osteoporosis in Chronologically Aged Mice: Increasing Bone Remodeling[J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1434-1446.
- [3] DAI-HUNG N, THANH-SANG V, DAI-NGHIEP N, et al. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(4): 378-383.
- [4] JUNG-AE K, SE-KWON K. Bioactive peptides from marine sources as potential anti-inflammatory therapeutics[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2013, 14(3): 177-182.
- [5] HSU K C, LI-CHAN E C Y, JAO C L. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(2): 617-622.
- [6] HALIM N R A, YUSOF H M, SARBON N M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 51: 24-33.
- [7] 陈秀丽. 鲨鱼皮胶原蛋白防海水浸泡生物医用材料研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017: 1-2.
- [8] 刘宏良. 条纹斑竹鲨人工繁殖技术[J]. *中国水产*, 2005(9): 48-50.
- [9] 刘丽华. 闽南近海条纹斑竹鲨 (*Chiloscyllium plagiosum* Bennett, 1830) 脂肪酸的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2006: 25.
- [10] NAU M R, O'BRIEN J K, SCHMITT T L, et al. Diagnostic assessment of reproductive status in white-spotted bamboo sharks (*Chiloscyllium plagiosum*) [J]. *Animal Reproduction Science*, 2018, 197: 48-57.
- [11] 黄良敏, 谢仰杰, 吴蜀丰, 等. 条纹斑竹鲨的驯养试验[J]. *水产科技情报*, 2006, 33(01): 19-22.
- [12] CHENG D, CHEN Y, LU C, et al. Preliminary profiling of microRNA in the normal and regenerating liver of *Chiloscyllium plagiosum* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 2017, 24: 60-67.
- [13] DAVIS P K, HO A, DOWDY S F. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells[J]. *Biotechniques*, 2001, 30(6): 1322-1331.
- [14] JONKMAN J E, CATHCART J A, XU F, et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy[J]. *Cell Adh Migr*, 2014, 8(5): 440-451.
- [15] PHYU S M, SMITH T A D. Combination treatment of cancer cells with pan-Akt and pan-mTOR inhibitors: effects on cell cycle distribution, p-Akt expression level and radiolabelled-choline incorporation[J]. *Investigational New Drugs*, 2019, 37(3): 424-430.
- [16] LI J, MI G, XIAOYUAN L, et al. LINC01127 promotes the development of ovarian tumors by regulating the cell cycle[J]. *American journal of translational research*, 2019, 11(1): 406-417.
- [17] RHEE S G, BAE Y S, LEE S R, et al. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation[J]. *Sci STKE*, 2000, 2000(53): 1-6.
- [18] 秦勇. 细胞内 ROS 水平改变对细胞活性及相关信号传导途径的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 1-2.
- [19] BRUNK U T, TERMAN A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(8): 1996-2002.