

文章编号: 1674-5566(2023)06-1165-11

DOI: 10.12024/jsou.20220503872

不同方法提取方格星虫胶原蛋白及其酶解物对HaCaT细胞的影响

林海生^{1,2}, 冯畅¹, 王雯¹, 袁建军³, 陈洪彬³, 杨维⁴, 曾培斯¹,
郑梦琪¹, 范明珊¹, 杨海明¹, 邓旗^{1,2}

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034; 3. 泉州师范学院 近海资源生物技术福建省高校重点实验室, 福建 泉州 362000; 4. 海南翔泰渔业股份有限公司, 海南 澄迈 571924)

摘要: 以方格星虫(*Sipunculus nudus*)体壁为原料, 分别采用酸法、酶法和热水法提取胶原蛋白并对其理化性质进行分析; 通过检测氨基酸组成、紫外光谱、傅里叶红外光谱、SEM扫描电镜分析比较了3种胶原蛋白的特性, 并采用HaCaT细胞, 探讨3种酶解产物对其生长活力的影响。结果表明, 热水法提取胶原蛋白的提取得率高于其他两种方法, 3种胶原蛋白均含有胶原特征型氨基酸甘氨酸Gly、脯氨酸Pro和羟脯氨酸Hyp。紫外和红外光谱图显示, 3种胶原蛋白均在222 nm附近有明显的吸收峰, 且存在酰胺A、酰胺B的吸收峰和酰胺I、II、III的特征峰, 提示3种胶原蛋白均属于I型胶原蛋白, 具有三股螺旋结构。而扫描电镜结果显示, 相比于酶法和热水法, 酸法提取的胶原蛋白三股螺旋结构保持更为完整, 且较好地维持胶原纤维的原有结构。3种胶原蛋白酶解肽在50~100 μg/mL时, 能够显著提高正常和UVB损伤的HaCaT细胞活力, 表明方格星虫胶原蛋白的酶解产物在皮肤光老化修复方面具有较好的潜在应用前景。

关键词: 方格星虫; 胶原蛋白; HaCaT细胞; 理化性质; 酶解物; 提取方法

中图分类号: TS 254.9 **文献标志码:** A

胶原蛋白是一种高分子纤维状蛋白, 肽序列由核糖体产生, 经高尔基体修饰形成具有三股螺旋结构的前胶原, 最终在细胞外连接聚合成胶原纤维^[1]。胶原蛋白广泛存在于动物的皮、骨、软骨、肌腱等结缔组织, 常见的主要类型有I、II、III及IV型胶原蛋白^[2]。此外, 许多水产动物组织中含有丰富的胶原蛋白, 如鱼类(鱼皮、鱼骨、鱼翅)、棘皮动物(海胆、海参)、软体动物(鲍鱼、珍珠贝)等。从猪、牛等哺乳动物的骨、皮中提取的胶原蛋白脂肪含量较高, 且存在病毒如口蹄疫、疯牛病和激素等安全问题。相较于猪、牛胶原蛋白, 水产胶原蛋白分子量更小, 生物利用率更高, 且氨基酸组成与人体最为接近, 具有一定凝胶性、高度分散性和乳化性等功能特性, 极具开发潜力^[3]。

胶原蛋白在稀酸、稀碱溶液或热水条件下溶解性好, 不同提取方法得到的胶原蛋白得率和理化特性等方面的差异较大。温慧芳等^[4]采用酸法、酶法和热水法提取的鲷鱼皮胶原蛋白均为I型胶原蛋白; 周瑞等^[5]采用酶法提取暗纹东方鲷鱼皮胶原蛋白, 其提取率显著高于酸法和热水法, 酸法对鱼皮的胶原纤维结构保留最完整。天然形式的胶原蛋白本身不具备生物活性, 可控酶解技术对胶原蛋白进行降解后的小分子胶原肽已被证明具有广泛的生物活性, 如抗氧化^[6]、抗冻保护^[7]、增加骨密度^[8]等。水产小分子胶原肽还具备生物兼容性强、水溶性好、透皮吸收快等优点。近年来, 其在皮肤各类创伤修复中应用备受学者的关注^[9-10]。姜速峰等^[11]采用中性蛋白酶酶解罗非鱼皮胶原蛋白, 酶解物具有显著的体外抗

收稿日期: 2022-05-22 修回日期: 2022-07-19

基金项目: 广东海洋大学大学生创新创业训练计划项目(CXXL2020004); 湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2019A902); 近海资源生物技术福建省高校重点实验室开放性课题(2019IRB01); 国家重点研发计划-蓝色粮仓(2020YFD0901104)

作者简介: 林海生(1985—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为水产品精深加工。E-mail: haishenglin@163.com

通信作者: 邓旗, E-mail: dengqi1024@163.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

氧化活性和促进 HaCaT 细胞增殖的活性。HaCaT 细胞是主要的皮肤组织表皮层的角质形成细胞,可以使皮肤具有抵抗外界伤害的作用,而角质细胞的过度衰老凋亡是皮肤光老化的重要特征之一^[12-13]。

方格星虫 (*Sipunculus nudus*) 是北部湾沿海地区特色水产品资源之一,其富含蛋白质、脂肪、微量元素等多种营养成分,且含有多种活性物质,如多糖、纤溶活性蛋白、活性肽等,具有抗氧化、抗疲劳、抗辐射、预防血栓、促骨发育、提高免疫等功效^[14-19]。方格星虫全身遍布整齐的胶原纤维层,是提取水产胶原蛋白的一种优质原料^[17]。团队前期研究^[19-20]发现,方格星虫酶解产物具有提高免疫和促进创伤修复等作用。也有研究发现方格星虫酶解物具有一定抗氧化活性,然而,对皮肤抗光老化方面的基础研究较少,其活性物质因子和作用机制尚未十分明确。方格星虫胶原蛋白作为体壁重要组成物质,目前常用酸法和酶法提取胶原,制备胶原凝胶或酶解肽应用于创面愈合,尚未见对其理化性质开展系统的研究。本研究分别采用酸法、酶法和热水浸法从方格星虫体壁中提取胶原蛋白,系统比较分析这3种方法所提取胶原蛋白的理化性质,同时初步探讨其酶解肽对 HaCaT 细胞生长的影响,为方格星虫的利用和胶原蛋白高值化产品开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验用鲜活方格星虫于2021年1月购自广东省湛江市霞山水产批发市场;胃蛋白酶(猪胃黏膜, 1×10^4 U/g),上海源叶生物科技有限公司;L-羟脯氨酸标准品、异丙醇、冰乙酸、氢氧化钠、氯化钠等试剂均为国产分析纯,西陇科学股份有限公司;DMEM 基础培养基、胎牛血清, Gibco 生物公司;0.25%的胰酶, Hyclone 生物公司;CCK-8 试剂盒,日本同仁化学公司。

1.2 仪器与设备

UMVERSAL 320R 台式高速冷冻离心机,德国 Hettich 公司;835-50 氨基酸自动分析仪,日本日立公司;Spectrum 100 傅里叶变换红外光谱仪, Bruker 公司;Pyris1 DSC-7 全自动热分析仪,美国 TA 沃特斯;UVB 紫外辐射仪(灯管 9 W, 发射光谱在 285~350 nm, 峰值在 310~315 nm), 飞利浦

浦照明有限公司;Varioskan Flash 全自动酶标仪,美国 Thermo 公司;FD-551 大型立式冷冻干燥机,东京理化器械公司;DM2000 LED 荧光倒置显微镜,德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 原料前处理

将鲜活方格星虫进行清洗、去除内脏后,体壁用蒸馏水清洗后,剪碎至长度 0.4 cm,分装,4 °C 冷藏 12 h 后进行胶原蛋白提取。

1.3.2 胶原蛋白提取工艺

参照杨平等^[21]的方法,将预处理好的方格星虫与蒸馏水按质量体积比 1:20 的比例加入 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡并搅拌 24 h,除去脂肪和部分杂蛋白,8 000 r/min 离心 20 min,用蒸馏水清洗沉淀至中性,沉淀按质量体积比 1:20 加入 0.5 mol/L CH_3COOH 搅拌 24 h。8 000 r/min 离心 20 min,上清液加入 NaCl 至 0.8 mol/L,静置过夜,9 000 r/min 离心 15 min,取出沉淀,0.1 mol/L 的 CH_3COOH 复溶,透析 12 h,每 4 h 换一次透析液,用纯水透析至中性,冷冻干燥后得到的产物即为酸溶性胶原蛋白 (Acid-soluble collagen, ASC)。

参照郑志鸿等^[20]的方法,将预处理后的方格星虫加入 0.5 mol/L CH_3COOH 溶液中(质量体积比为 1:20),并加入质量分数为 2% 的胃蛋白酶,磁力搅拌 24 h,离心,加入 NaCl 于上清液中至终浓度为 0.9 mol/L,静置过夜,6 000 r/min 离心 20 min,取沉淀,复溶和透析与上述酸法相同,冷冻干燥后得到的产物即为酶溶性胶原蛋白 (Pepsin-soluble collagen, PSC)。

按照文献^[22]的研究方法,加碱除杂蛋白后加入异丙醇 $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ (质量体积比为 1:5),置于 60 °C 恒温水浴中进行脱脂,过滤,取滤渣,60 °C 干燥 4~6 h 后按料液比 1:20 加到 80 °C 纯水中,恒温水浴搅拌 9 h,过滤,取滤液,冷冻干燥后得到的产物即为热水溶性明胶 (Hot water soluble gelatin, HSG)。

1.3.3 胶原蛋白得率的测定

$$Y = 100\% \times m/M \quad (1)$$

式中:Y 为方格星虫胶原蛋白提取得率,%;m 和 M 分别为冻干胶原蛋白粉和提取用原料质量,g。

1.4 胶原蛋白理化性质分析

1.4.1 氨基酸组成测定

参照 GB5009.124—2016 测定氨基酸组成。

1.4.2 傅里叶红外光谱扫描

参照林海生等^[23]的方法。取适量冻干好的样品,按照质量比 1:20 加入无水溴化钾 KBr (120 °C, 4 h),于玛瑙钵体中研磨后进行压片,在 4 000~400 cm⁻¹ 波长范围进行红外光谱扫描,分辨率 4 cm⁻¹。

1.4.3 紫外光谱扫描

参照王雯等^[22]的方法,采用 0.1 mol/L CH₃COOH 配制 0.1 mg/mL 的胶原蛋白溶液,在 190~400 nm 波长下进行扫描。

1.4.4 扫描电镜观察

样品固定于导电胶后,真空喷金处理(加速电压 7.0 kV,喷金时间 400 s),用扫描电子显微镜观察 100、200 放大倍数下胶原薄片的微观结构和形态特征。

1.5 胶原蛋白肽制备

参考文献[24]的实验方案,将 ASC、PSC 和 HSG 分别加入中性蛋白酶进行酶解(物料比为 1:3,加酶量为 6 000 U/g,50 °C,3 h)。灭活蛋白酶后(90 °C,10 min),离心取上清液(10 000 r/min,20 min)获得 ASC 的酶解产物胶原肽(ASC-P)、PSC 的酶解产物胶原肽(PSC-P)和 HSG 的酶解产物胶原肽(HSG-P)。

1.6 胶原蛋白肽对 HaCaT 细胞的影响

在 T25 细胞培养瓶中培养 HaCaT 细胞长至 70%~80% 时,将细胞用 0.25% 的胰酶消化成细胞悬液后种植到 96 孔板上(1×10⁴ 个/孔),待细胞着壁后,吸干各孔培养基,用 PBS 清洗 2~3 遍细胞,并使得少部分液体残留于底部。用由 8 根并排排列的 UVB 紫外灯管(发射光谱 285~350 nm,峰值 310~315 nm)组成的辐射仪在距离孔板 16 cm 处照射 96 孔板,辐射 1 min 后立即加入 100 μL 含有不同质量浓度(0、10、50、100、500、1 000 μg/mL)的 3 种酶解产物胶原肽的 DMEM,分别记为 UVB、UVB-ASC-P、UVB-PSC-P、UVB-HSG-P 组。培养 24 h 后,用 CCK-8 试剂盒测定细胞活力^[25]。

1.7 数据分析

本实验采用 Microsoft Excel 2010 和 Matlab 2016a 软件进行作图分析,数据以平均值±标准差(Least Significant Difference, LSD)表示。

2 结果与分析

2.1 胶原蛋白提取效果

由表 1 可知:HSG 的得率明显高于 ASC、PSC

的得率。胶原蛋白经碱处理后,部分胶原纤维裸露出来,热水高温作用下,胶原蛋白分子三股螺旋结构遭到破坏,绝大多数胶原蛋白分解成大分子胶原蛋白单链^[22]。此外,胶原蛋白在酸的溶胀作用下,经胃蛋白酶降解其非胶原成分,使得酶的得率偏低。

表 1 方格星虫胶原蛋白得率
Tab. 1 Yield of collagen extracted from *Sipunculus nudus* n=3

样品 Sample	得率 Yield/%
酸溶性胶原蛋白 ASC	2.2 ±0.3 ^c
酶溶性胶原蛋白 PSC	5.0 ±0.3 ^b
热水溶性胶原蛋白 HSG	8.8 ±0.5 ^a

注:同列中标有不同字母者表示组间有显著性差异(P<0.05)。

Notes: The means with different letters within same column are significantly different between groups (P<0.05).

2.2 氨基酸组成与含量分析

由表 2 可知:ASC、PSC 和 HSG 均含有胶原蛋白的特征型氨基酸 Gly、Pro 和 Hyp。3 种方法提取的胶原 Gly 含量较少,与传统的高等生物胶原的氨基酸组成存在较大差别,ASC 更接近传统胶原 Gly-x-y 的结构特点,与海蜇(*Rhopilema esculentum* Kishinouye)等^[26]报道相近;而另外两种提取胶原不符合这个规律,与海绵(*Chondrosia reniformis*)等^[27]相似。

3 种不同方法的 Glu、Asp、Arg、Gly 含量较高,而 Met、His、Tyr、Phe、Ile 含量较低,Trp、Cys 均未检出,这一结果与越前水母(*Nemopilema nomurai*)^[28]、海蜇^[29]、暗纹东方鲀(*Tetrodontiformes fasciatus*)^[5]中胶原蛋白氨基酸组成相似,说明提取方法对胶原蛋白氨基酸组成无显著影响。

2.3 胶原蛋白光谱分析

紫外吸收光谱是分析胶原蛋白最简单的方法之一,生色基团(-COOH、-CONH₂和-C=O)具有强紫外吸收特性,使得胶原蛋白的三螺旋结构在 230 nm 处具有最大吸收峰^[30]。3 种胶原蛋白均在 225 nm 处有强吸收峰(图 1a),主要是由肽键 -C=O 的 n→π* 跃迁所贡献^[31],可由此初步判断 3 种方法提取的胶原蛋白均为 I 型胶原蛋白。ASC 与 PSC 在 260~280 nm 处有弱吸收峰,说明这两种胶原中含有一定比例的芳香族氨基酸,如 Phe,而 HSG 在 260~280 nm 处无明显吸收峰,说

明其芳香族氨基酸含量较少,与氨基酸结果(表2)分析一致。

3种方法提取的胶原蛋白特征吸收频率见图1b,均存在酰胺A、酰胺B的吸收峰和酰胺I、II、III的特征峰,符合胶原蛋白红外光谱的特征吸收

峰^[32],与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)外套膜^[30]、海参(*Stichopus japonicas*)^[33]、鱿鱼(*Doryteuthis singhalensis*)^[34]等胶原的红外特征光谱极为相似,说明ASC、PSC、HSG均具有三股螺旋结构,判断三者均为I型胶原蛋白。

表2 不同方法提取的胶原蛋白的氨基酸组成
Tab. 2 Amino acid composition of collagens extracted by different methods

氨基酸 Amino acid	酸性胶原蛋白 ASC/ (g/100g)	相对含量 Relative content/%	酶溶性胶原蛋白 PSC/ (g/100g)	相对含量 Relative content/%	热水溶性明胶 HSG/ (g/100g)	相对含量 Relative content/%
天冬氨酸 Asp [#]	3.77	7.92	10.02	13.26	3.52	10.26
苏氨酸 Thr [*]	1.70	3.57	3.82	5.06	1.47	4.29
丝氨酸 Ser	1.74	3.66	2.93	3.88	1.20	3.50
谷氨酸 Glu [#]	7.82	16.47	15.71	20.79	6.67	19.45
脯氨酸 Pro ^{&}	3.54	7.44	0.78	1.03	1.31	3.82
甘氨酸 Gly [#]	9.14	19.21	3.01	3.98	4.35	12.68
丙氨酸 Ala [#]	2.97	6.24	6.78	8.97	2.96	8.63
胱氨酸 Cys	-	-	-	-	-	-
缬氨酸 Val [*]	1.36	2.86	1.77	2.34	0.77	2.24
蛋氨酸 Met [*]	0.22	0.46	0.36	0.48	0	0
异亮氨酸 Ile [*]	1.17	2.46	2.73	3.61	0.88	2.57
亮氨酸 Leu [*]	2.16	4.54	9.01	11.93	2.70	7.87
酪氨酸 Tyr [#]	0.92	1.93	1.55	2.05	0.74	2.16
苯丙氨酸 Phe [#]	0.82	1.72	0.67	0.89	0.23	0.67
赖氨酸 Lys [*]	1.46	3.07	5.85	7.74	1.78	5.19
组氨酸 His [*]	0.30	0.63	0.68	0.90	0.12	0.35
精氨酸 Arg	4.70	9.88	8.94	11.83	3.87	11.28
羟脯氨酸 Hyp ^{&}	3.78	7.94	0.94	1.24	1.73	5.04

注:“-”表示没有胱氨酸数值;苏氨酸及蛋氨酸含量低,“0”表示其含量低于检出限;“#”表示呈味氨基酸;“*”表示必需氨基酸;“&”表示亚氨基酸。

Notes:“-” means no cystine value; The contents of threonine and methionine were low, and “0” indicated that the contents were below the detection limit; “#”, represents flavor amino acid; “*” denotes essential amino acid; “&” stands for sub-amino acid.

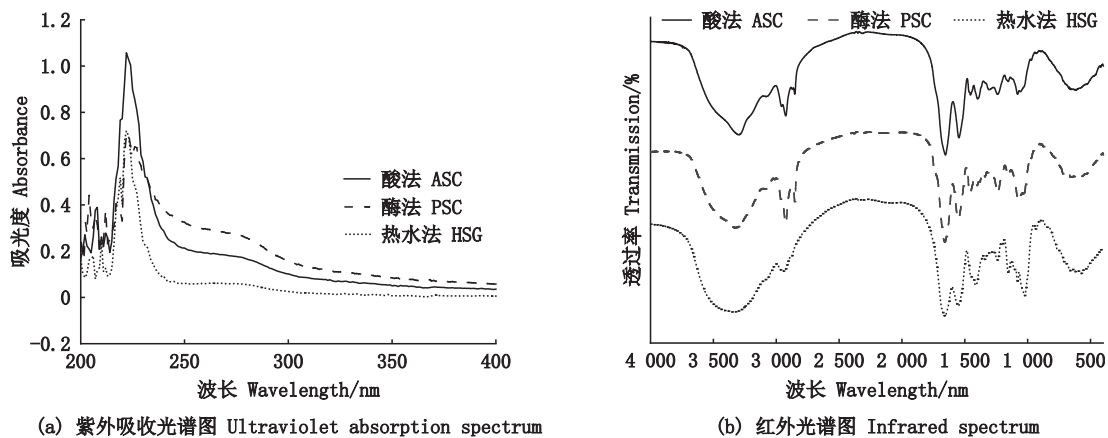


图1 方格星虫胶原蛋白的光谱分析
Fig. 1 Spectral analysis of collagens extracted from *S. nudus*

酰胺A带吸收峰通常出现在 $3\ 400\sim 3\ 440\ \text{cm}^{-1}$,主要是由于N-H伸缩振动产生,提取的3种胶原

蛋白在 $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$ 附近均出现吸收峰,推测酰胺A带向低波数红移,这是由于多肽中游离的N-H与

氢键形成了缔合体^[35],使吸收峰波数降低 100 cm^{-1} 左右。结果表明,ASC有更多N-H参与氢键形成。ASC、PSC和HSG的酰胺B带吸收峰均出现在 $2\ 930\text{ cm}^{-1}$ 附近,主要由C-H伸缩振动产生,代表 CH_2 的不对称伸展^[36],而 CH_2 是胶原蛋白三级结构的特征基团,说明3种胶原蛋白的三级结构均没有被破坏。

酰胺I带产生的吸收峰在 $1\ 658\text{ cm}^{-1}$,由蛋白质多肽骨架的C=O伸缩振动产生,这与蛋白质二级结构 α -螺旋有关^[37],推测ASC形成的氢键与相邻链间相互作用更多。酰胺II带出现在 $1\ 550\text{ cm}^{-1}$ 处,与C-N伸缩振动和N-H的弯曲振动共同作用有关, $1\ 455\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰广泛对应于脯氨酸和羟脯氨酸的吡咯烷环振动^[38]。HSG的酰胺I和酰胺II峰值高于ASC和PSC,表明HSG分子交联和有序度高^[39],由于存在的氢键较少,肽链的展开程度也更高^[27]。酰胺I带与酰胺III带共同证明方格星虫胶原较好地保持三股螺旋结构^[40]。

2.4 扫描电子显微镜分析

为表征形态特征,扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)和原子力显微镜(AFM)是获取胶原样品图像的有力工具。孔隙大小、孔隙度和比表面积被认为是生物材料的重要参数^[41]。将得到的3种胶原蛋白分别放大100、200倍进行观察,发现其结构均存在差异(图2),可根据其微观构象用于不同生物医学材料的选择^[23]。ASC呈多孔空间网状结构,胶原束的宽度和厚度各不相同,且分支相互缠绕在一起,说明ASC基本维持了胶原纤维的原有结构,与鲑鱼皮^[42]极为相似。在胃蛋白酶的作用下,PSC的胶原蛋白结构产生变化,网状结构不均匀,同时存在薄片状结构,与ASC的结构存在一定差别。HSG无明显网状结构,且基本呈现片状,说明热水处理使得胶原蛋白发生了变性和交联,呈现凝胶特性,该特性与周瑞等^[5]采用热水提取得到的暗纹东方鲑鱼皮胶原特性相似。

2.5 胶原蛋白肽对 HaCaT 细胞的影响

本研究初步探讨了胶原蛋白肽对正常 HaCaT 细胞和UVB诱导损伤 HaCaT 细胞的影响,以期探讨其抗皮肤光老化活性。质量浓度为 $50\sim 100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对于CT对照组,ASC-P和PSC-P的加入使 HaCaT 细胞的细胞活力有明显提高,且PSC-P细胞活力更高(图3a)。在较高质量浓度下($1\ 000\ \mu\text{g}/$

mL),ASC-P的加入对细胞活力仍具有明显提升。相比于文献报道的罗非鱼皮胶原酶解肽超滤组分($25\ \text{mg}/\text{mL}$)对 HaCaT 细胞生长促进活性^[11],本研究条件下,方格星虫胶原蛋白肽表现出较强的活性。与CT对照组相比,HaCaT细胞经UVB辐射后,细胞活力显著下降至59%左右,光老化的细胞模型造模成功(图3b)。将不同质量浓度的3种胶原蛋白肽加入UVB损伤的 HaCaT 细胞,孵化培育24 h后,不同浓度的PSC-P均能在一定程度提高UVB损伤的 HaCaT 细胞活力。在质量浓度 $100\sim 500\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,ASC-P和PSC-P作用显著($P<0.05$,图3b)。

3 讨论

3.1 胶原氨基酸组成特性及其结构特征

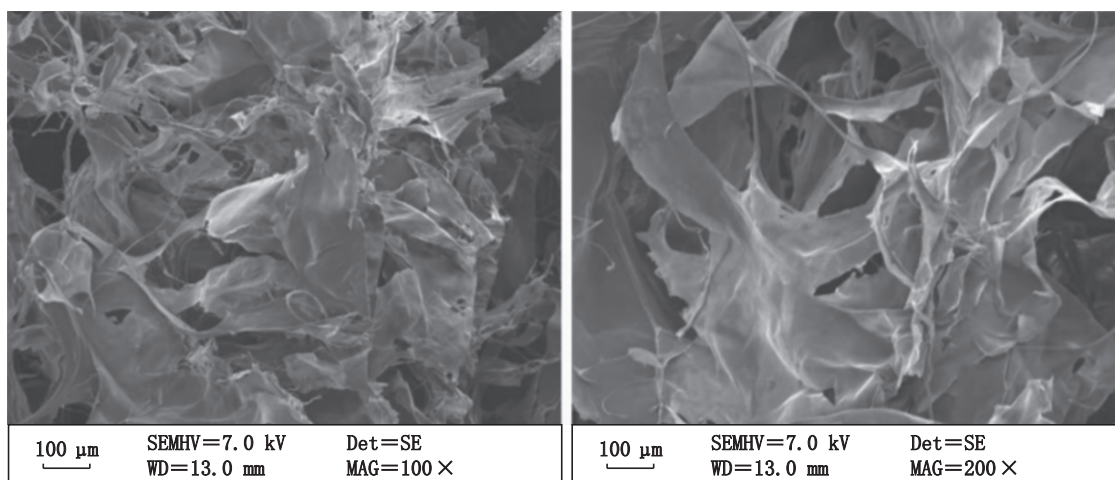
热水处理破坏蛋白质三级结构,使胶原蛋白分子中的部分氨基酸被水解,但对氨基酸组成影响较小。据报道,Lys和Hyl存在于胶原分子末端肽的交联中^[43],酶法处理使酶溶性胶原蛋白失去末端肽,Lys含量高于ASC和HSG,同时切断胶原肽间的共价交联键,导致PSC亚氨基酸含量明显低于ASC和HSG。此外,酶能有效降解酸提物的杂蛋白,导致3种胶原蛋白的氨基酸相对含量存在差异,如PSC的氨基酸总含量高于ASC和HSG。PSC的必需氨基酸相对含量较ASC和HSG高,其营养价值高于另外两种胶原蛋白。

Hyp和Pro,即亚氨基酸,由于吡咯烷环的存在降低了多肽链的自由度,增强了三螺旋,从而影响了分子的热稳定性,在保持胶原蛋白的结构完整性中起着重要作用^[44]。因此,预计ASC表现出比PSC和HSG更高的热稳定性,这对于胶原蛋白在工业应用方面具有较大优势。由于Gly负责 α 螺旋的形成,对胶原的构象起着关键作用。因此,高甘氨酸含量表明三螺旋构象的稳定性^[44]。结合Hyp和Pro含量,ASC具有更完整的三螺旋构象。His含量低可能表明抗原性低,因为His是组胺的前体,会引起不希望的过敏反应^[45],推测3种胶原均具有较低的抗原性,可作为胶原基试剂或材料应用于食品医药工业。

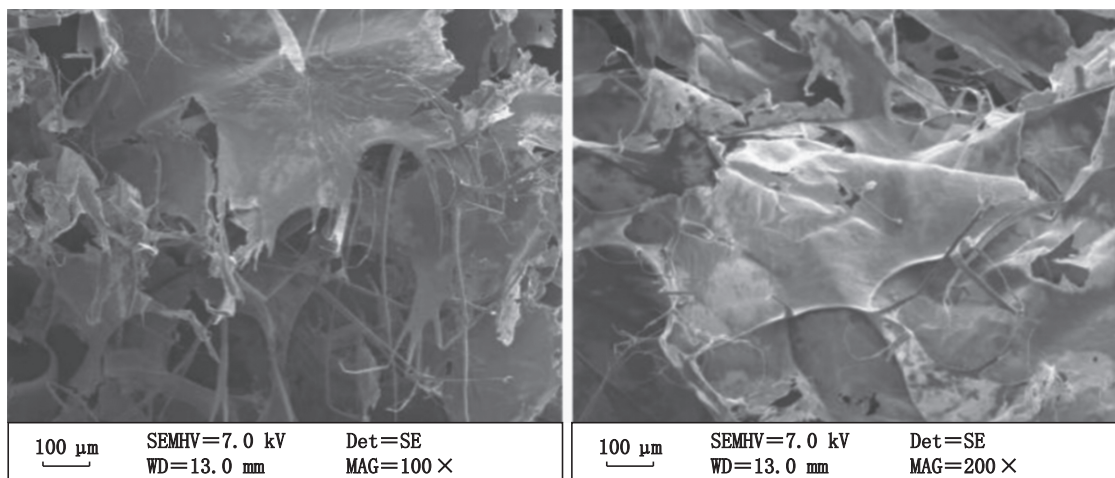
与鱼类等海洋脊椎动物不同,方格星虫胶原蛋白在氨基酸组成上不符合传统胶原的 $(\text{Gly-X-Y})_n$ 结构,这一结果与华贵栉孔扇贝^[22]、海绵^[27]等海洋无脊椎动物的胶原蛋白氨基酸组成较为相似。这种差异可能来源于不同物种存在的一

些结构和化学差异,也有推测来自海洋组织中其他的蛋白质如糖蛋白,研究证实糖蛋白与胶原蛋

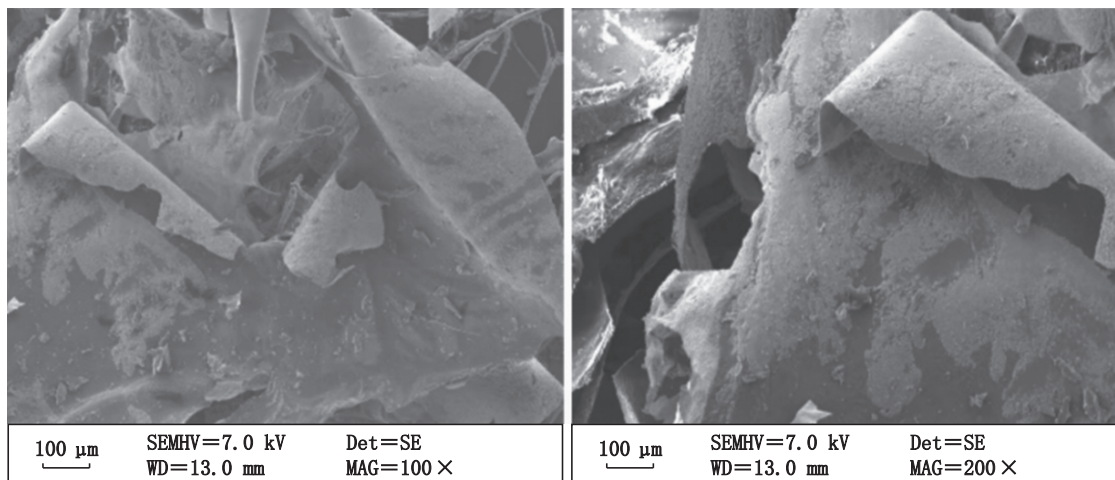
白紧密结合,并作为杂质出现,从而影响所提胶原蛋白的纯度^[46]。



(a) 酸溶性胶原蛋白 ASC



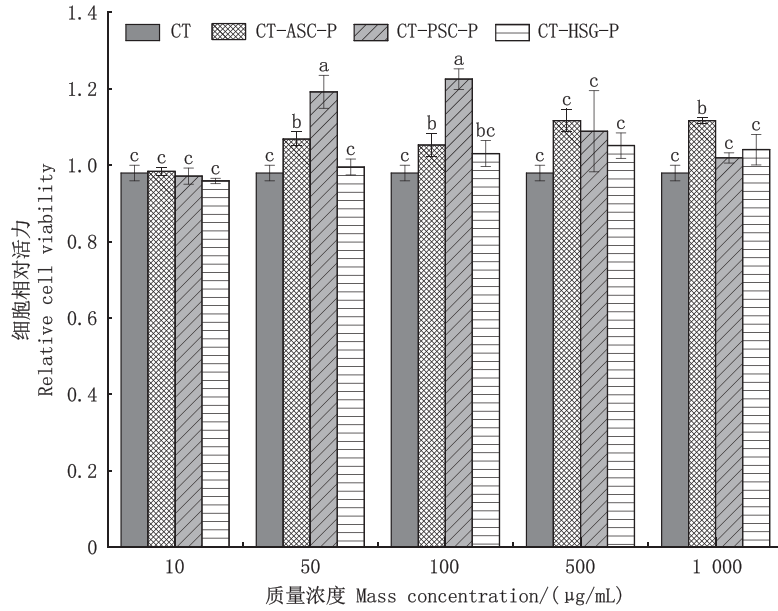
(b) 酶溶性胶原蛋白 PSC



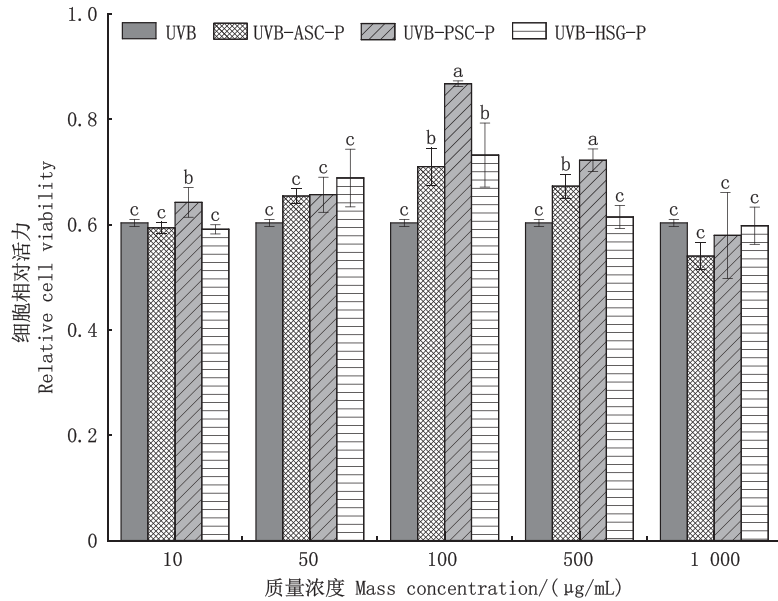
(c) 热水溶性明胶 HSG

图2 方格星虫胶原蛋白扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscope images of collagens extracted from *S. nudus*



(a) 正常HaCaT细胞 Normal HaCaT cells



(b) UVB损伤HaCaT细胞 UVB-irradiated HaCaT cells

同一质量浓度梯度中标有不同字母者表示组间有显著性差异($P < 0.05$), 标有相同字母者表示组间无显著性差异($P > 0.05$)。The means with different letters within same mass concentration gradient are significantly different between the groups at the 0.05 probability level, and the means with the same letters within the same column are not significant differences ($P > 0.05$).

图3 胶原蛋白酶解产物对HaCaT细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of collagen hydrolysates on the cell viability of HaCaT cells

酸法提取胶原蛋白得率为2.2%,酶法胶原蛋白得率为5.0%,热水法胶原蛋白得率为8.8%,热水法的得率最高且成本最低;提取的3种胶原蛋白均属于I型胶原蛋白且三股螺旋结构完整,酸法相比于酶法和热水法更为完整的保持胶原蛋白原有的三股螺旋结构;电镜结果显示,ASC和PSC都保留了纤维网状结构,但酸法提取的胶原蛋白结构分布相对均匀,其孔径大小可能与制备

过程中的含水量有关。胶原蛋白的孔隙形状、孔壁形态等其他结构特征在新组织形成方面具有重要意义。一般情况下,胶原蛋白作为药物载体具有均匀、规则的网络结构,以使药物分布均匀^[47]。综上所述,ASC可能作为一种合适的药物载体体系。

3.2 胶原蛋白肽对HaCaT细胞的影响

本研究结果表明,方格星虫胶原肽ASC-P和

PSC-P能够显著提高正常 HaCaT 细胞的细胞活力 ($P < 0.05$, 图 3a)。相比于文献报道的罗非鱼胶原蛋白酶解肽超滤组分 (25 mg/mL) 对 HaCaT 细胞生长促进活性^[11], 本研究条件下, 方格星虫胶原蛋白肽表现出较强的活性。参照文献[24]的 UVB 损伤 HaCaT 细胞条件 (35 mJ/cm² 辐射强度, 1 min) 建立 HaCaT 细胞损伤模型。该模型的细胞活力接近 60% 时, 细胞没有因 UVB 辐射而受损过重, 且细胞中与抗老化相关的蛋白仍有所表达^[25]。本研究建立的 UV 损伤 HaCaT 光老化细胞的活性为 59%, 符合理论模型 (图 3b)。在浓度为 100~500 $\mu\text{g/mL}$ 时, ASC-P 和 PSC-P 均能显著提高 UVB 损伤 HaCaT 的细胞活力 ($P < 0.05$): 在浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 3 种胶原蛋白肽均可显著提高细胞活力 ($P < 0.05$, 图 3b)。

海洋胶原蛋白肽以其独特的分子结构和较低的分子量、良好的保湿性能、适当的氨基酸构成和良好的皮肤相容性等优势, 已成功地应用于保湿型化妆品。目前市场上作为替代来源的海洋胶原蛋白肽主要为鱼胶原蛋白肽, 其总体保湿效果优于同类产品, 研究证明鱼胶原三肽具有促进人皮肤成纤维细胞胶原和透明质酸生成、改善皮肤弹性等作用^[48]; 另有研究发现海马胶原蛋白肽可诱导成纤维细胞的迁移和增殖, 增强小鼠皮肤细胞透明质酸合成的能力^[49]。在 UVB 损伤的 HaCaT 光老化细胞模型上, PSC-P 表现出最好的抗 UVB 诱导的皮肤光老化活性。提示其在抗皮肤光老化方面的潜力, 后续可通过进一步地分离、纯化, 通过动物实验探究其在抗皮肤光老化的活性。综合以上 3 种不同提取方法, 可根据研究需要选用不同提取方法开发胶原蛋白产品。

参考文献:

- [1] FASSINI D, WILKIE I C, POZZOLINI M, et al. Diverse and productive source of biopolymer inspiration: marine collagens [J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(5): 1815-1834.
- [2] SORUSHANOVA A, DELGADO L M, WU Z N, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(1): 1801651.
- [3] 苏秀榕, 孙蓓, 李研妍, 等. 星虫胶原蛋白的生物学特性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(1): 48-52. SU X R, SUN B, LI Y Y, et al. Biological characterization of collagen of Sipunculid [J]. *Natural Product Research and Development*, 2009, 21(1): 48-52.
- [4] 温慧芳, 陈丽丽, 白春清, 等. 基于不同提取方法的鲷鱼胶原蛋白理化性质的比较研究[J]. *食品科学*, 2016, 37(1): 74-81. WEN H F, CHEN L L, BAI C Q, et al. Comparative study on physical and chemical properties of collagens obtained by different extraction methods from the skin of the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris* [J]. *Food Science*, 2016, 37(1): 74-81.
- [5] 周瑞, 李若男, 周丽莎, 等. 暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的提取及其特性[J]. *水产学报*, 2020, 44(8): 1349-1359. ZHOU R, LI R N, ZHOU L S, et al. Extraction and characteristics of collagens from the skin of puffer fish (*Tetrodontiformes fasciatus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(8): 1349-1359.
- [6] 郭洪辉, 陈晖, 赵雪, 等. 罗非鱼鳞胶原肽螯合锌抗氧化及抑菌活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(20): 120-125. GUO H H, CHEN H, ZHAO X, et al. Antioxidant and antibacterial activities of collagen peptide chelated zinc from tilapia scales [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(20): 120-125.
- [7] 刘海冬, 刘伟, 刘永乐, 等. 鱼胶原肽对面包酵母及冷冻面团的抗冻保护作用[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(12): 70-74. LIU H D, LIU W, LIU Y L, et al. Cryoprotective effect of fish collagen peptides on baker's yeast and frozen dough [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(12): 70-74.
- [8] 刘翼波, 李博. 胶原肽预防骨质疏松症及其作用机制研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(9): 373-381. LIU Y B, LI B. A review of collagen peptides in preventing Osteoporosis and its mechanism [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(9): 373-381.
- [9] FELICIAN F F, YU R H, LI M Z, et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum* [J]. *Chinese Journal of Traumatology*, 2019, 22(1): 12-20.
- [10] 鲁震. 干鲑鱼皮胶原低聚肽对大鼠皮肤伤口愈合的影响[D]. 延吉: 延边大学, 2020: 17-20. LU Z. Effect of collagen oligopeptides from dried cod skin on skin wound healing in rats [D]. Yanji: Yanbian University, 2020: 17-20.
- [11] 姜速峰, 赵谋明, 江虹锐, 等. 罗非鱼皮胶原酶解物对 HaCaT 细胞生长的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 222-228. JIANG S F, ZHAO M M, JIANG H R, et al. Impact of tilapia skin hydrolysates on HaCaT cell growth [J]. *Food Science*, 2018, 39(13): 222-228.
- [12] 罗秀玲, 周源, 赵斌斌, 等. 光老化人角质形成细胞模

- 型的构建[J]. 广西医科大学学报, 2022, 39(2): 246-250.
- LUO X L, ZHOU Y, ZHAO B B, et al. Construction of photoaging human keratinocyte model [J]. Journal of Guangxi Medical University, 2022, 39(2): 246-250.
- [13] 陈慧贞, 李滢, 谢新强, 等. 益生菌对皮肤光老化的修复作用及其机制研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 882-894.
- CHEN H Z, LI Y, XIE X Q, et al. Research progress on the mechanism of the repair of skin photoaging by probiotics [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 882-894.
- [14] 徐艳, 谢一兴, 邹杰, 等. 方格星虫提取物的抗氧化活性及成分分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(21): 7-11.
- XU Y, XIE Y X, ZOU J, et al. Antioxidation activity and composition analysis of *Sipunculus nudus* extracts [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(21): 7-11.
- [15] SU J, JIANG L L, WU J N, et al. Anti-tumor and anti-virus activity of polysaccharides extracted from *Sipunculus nudus* (SNP) on Hepg2. 2. 15[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 87: 597-602.
- [16] 高春丽, 石特, 张俊玲, 等. 方格星虫多糖对人肠上皮细胞辐射损伤的保护作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2019, 37(3): 030301.
- GAO C L, SHI T, ZHANG J L, et al. Protective effects of *Sipunculus nudus* polysaccharide on radiation damage in human intestinal epithelial cells [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2019, 37(3): 030301.
- [17] 李映新, 黄晓亮, 许崇摇, 等. 光裸方格星虫纤溶酶对 FeCl₃ 诱导大鼠颈动脉血栓的抗栓作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(15): 1798-1802.
- LI Y X, HUANG X L, XU C Y, et al. Sandy on antithrombotic effect of fibrinolytic enzyme from *Sipunculus nudus* on the carotid artery thrombus induced by FeCl₃ in rats [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(15): 1798-1802.
- [18] 刘珍, 唐晓宁, 吴科锋, 等. 方格星虫低聚肽的分离、鉴定及其促骨发育作用评价[J]. 食品工业科技, 2021, 42(20): 334-341.
- LIU Z, TANG X N, WU K F, et al. Isolation and identification of oligopeptides from squares siphon worm and its effect on promoting bone growth [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(20): 334-341.
- [19] 孙瑞坤, 章超桦, 曾少葵, 等. 方格星虫酶解工艺优化及酶解物免疫活性[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(3): 54-61.
- SUN R K, ZHANG C H, ZENG S K, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of *Sipunculus nudus* L. and immunoassay of its enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(3): 54-61.
- [20] 郑志鸿, 章超桦, 林海生, 等. 方格星虫酶解物对小鼠皮肤创伤修复的作用[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(1): 97-103.
- ZHENG Z H, ZHANG C H, LIN H S, et al. Promoting the skin wound healing in mice using *Sipunculus nudus* hydrolysate [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2020, 40(1): 97-103.
- [21] 杨平, 刘影, 公丽艳, 等. 酸法和酶法提取草鱼鱼鳞胶原蛋白的特性分析[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 129-132.
- YANG P, LIU Y, GONG L Y, et al. Comparative analysis of collagen extracted from grass carp fish scale using acid and enzyme methods [J]. The Food Industry, 2018, 39(7): 129-132.
- [22] 王雯, 冯畅, 林海生, 等. 不同方法提取华贵栉孔扇贝外套膜胶原蛋白的特性分析[J/OL]. 大连海洋大学学报: 1-11 [2022-01-20]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?doi=10.16535/j.cnki.dlhyxb.2021-208>.
- WANG W, FENG C, LIN H S, et al. Characterization of collagen from mantle of *Chlamys nobilis* by different extraction methods [J/OL]. Journal of Dalian Ocean University: 1-11 [2022-01-20]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?doi=10.16535/j.cnki.dlhyxb.2021-208>.
- [23] 林海生, 王雯, 秦小明, 等. 不同方法提取马氏珠母贝外套膜胶原蛋白理化性质比较[J]. 广东海洋大学学报, 2022, 42(1): 106-112.
- LIN H S, WANG W, QIN X M, et al. Characterization of collagens from mantle of *Pinctada martensii* by different extraction methods [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2022, 42(1): 106-112.
- [24] 彭志兰, 冯畅, 陈贝贝, 等. 牡蛎蛋白酶解产物及其超滤组分抗皮肤光老化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13): 66-71.
- PENG Z L, FENG C, CHEN B B, et al. Anti-skin photoaging effect of enzymatic hydrolysate and their ultrafiltration fractions of oyster protein [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(13): 66-71.
- [25] XIAO Z B, LIANG P, CHEN J L, et al. A peptide YGDEY from tilapia gelatin hydrolysates inhibits UVB-mediated skin photoaging by regulating MMP-1 and MMP-9 expression in HaCaT cells [J]. Photochemistry and Photobiology, 2019, 95(6): 1424-1432.
- [26] 冯玲玲, 冯进, 李春阳. 海蜇 I 型胶原蛋白的提取及结构特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 15-21.
- FENG L L, FENG J, LI C Y. Extraction and structural characteristics of type I collagen from *Rhopilema esculenta* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 15-21.
- [27] SWATSCHEK D, SCHATTON W, KELLERMANN J, et al. Marine sponge collagen: isolation, characterization and

- effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2002, 53(1): 107-113.
- [28] 仇雷雷, 王博, 邹帅军, 等. 水母胶原蛋白的提取及性能研究[J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(6): 509-515.
- QIU L L, WANG B, ZOU S J, et al. Isolation and characterization of collagen from the jellyfish *Nemopilema nomurai* [J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2020, 38(6): 509-515.
- [29] 李玉芬, 郑明星, 朱凡, 等. 海蜇胶原蛋白的制备及理化性质研究[J]. *福州大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(2): 286-294.
- LI Y F, ZHENG M X, ZHU F, et al. Preparation and physicochemical properties of the jellyfish collagen [J]. *Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition)*, 2018, 46(2): 286-294.
- [30] 吴忠, 刘俊荣, 田元勇, 等. 虾夷扇贝外套膜胶原蛋白的提取与表征[J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(6): 678-684.
- WU Z, LIU J R, TIAN Y Y, et al. Extraction and characterization of collagen from yesso scallop *Patinopecten yessoensis* mantle [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(6): 678-684.
- [31] AHMAD M, BENJAKUL S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(3): 817-824.
- [32] 陈燕, 马军, 郑军, 等. 密斑刺鲀胶原蛋白的提取和成分分析[J]. *海南热带海洋学院学报*, 2019, 26(5): 12-17.
- CHEN Y, MA J, ZHENG J, et al. Extraction and preliminary performance analysis of collagen from spot-fin porcupine fish (*Diodon hystrix*) [J]. *Journal of Hainan Tropical Ocean University*, 2019, 26(5): 12-17.
- [33] SI L L, FAN Y, WANG Y K, et al. Thermal degradation behavior of collagen from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) using TG-FTIR analysis [J]. *Thermochimica Acta*, 2018, 659: 166-171.
- [34] VEERURAJ A, ARUMUGAM M, AJITHKUMAR T, et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*) [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 43: 708-716.
- [35] 瞿朝霞, 刘焱, 罗灿, 等. 草鱼鱼鳞、鱼皮和鱼骨酸溶性胶原蛋白特性对比研究[J]. *中国酿造*, 2014, 33(5): 116-119.
- QU Z X, LIU Y, LUO C, et al. Comparative study on acid soluble collagen of grass carp fish scale, skin and bone [J]. *China Brewing*, 2014, 33(5): 116-119.
- [36] AKITA M, NISHIKAWA Y, SHIGENOBU Y, et al. Correlation of proline, hydroxyproline and serine content, denaturation temperature and circular dichroism analysis of type I collagen with the physiological temperature of marine teleosts [J]. *Food Chemistry*, 2020, 329: 126775.
- [37] 纪书焕. 离子液体提取鲫鱼鱼鳞中羟基磷灰石和胶原蛋白的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019: 30.
- JI S H. Study on the extraction of hydroxyapatite and collagen in ionic liquid from crucian carp scales [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019: 30.
- [38] PAL G K, NIDHEESH T, SURESH P V. Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) [J]. *Food Research International*, 2015, 76(3): 804-812.
- [39] 高贵贤. 胶原蛋白的酶法交联及成膜特性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018: 26-27.
- GAO G X. Enzymatic cross-linking and film-forming properties of collagen [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018: 26-27.
- [40] LI Z R, WANG B, CHI C F, et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 31(1): 103-113.
- [41] KRISHNAMOORTHY J, RAMASAMY P, SHANMUGAM V, et al. Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast [J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2017, 10: 39-45.
- [42] 张强, 王倩倩, 陆剑锋, 等. 不同方法提取鲢鱼皮胶原蛋白的理化特性比较[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(5): 104-110.
- ZHANG Q, WANG Q Q, LU J F, et al. Comparison of physical and chemical characteristics of collagen from silver carp skin using different extraction methods [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 104-110.
- [43] CHENG X C, SHAO Z Y, LI C B, et al. Isolation, characterization and evaluation of collagen from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for use in hemostatic applications [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169731.
- [44] SALVATORE L, GALLO N, NATALI M L, et al. Marine collagen and its derivatives: versatile and sustainable bio-resources for healthcare [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 113: 110963.
- [45] KHONG N M H, YUSOFF F M, JAMILAH B, et al. Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes [J]. *Food Chemistry*, 2018, 251: 41-50.
- [46] FELICIAN F F, XIA C L, QI W Y, et al. Collagen from marine biological sources and medical applications [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2018, 15(5): e1700557.

- [47] 蔡路昀, 史航, 曹爱玲, 等. 鲽鱼骨胶原蛋白的结构及流变学特性[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 66-73.
CAI L Y, SHI H, CAO A L, et al. The structure and rheological characteristics of collagen from flounder bone [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 66-73.
- [48] 陈华, 易湘茜, 陈忻, 等. 海洋胶原蛋白肽的制备及生物活性研究进展[J]. 中国食物与营养, 2010(8): 57-60.
CHEN H, YI X X, CHEN X, et al. Advancement of the preparation and bioactivities of ocean collagen peptides [J]. Food and Nutrition in China, 2010(8): 57-60.
- [49] KAKOI C, UDO H, MATSUKAWA T, et al. Collagen peptides enhance hippocampal neurogenesis and reduce anxiety-related behavior in mice [J]. Biomedical Research, 2012, 33(5): 273-279.

Different methods of extracting collagen from *Sipunculus nudus* and its effect of enzymatic hydrolysate on HaCaT cells

LIN Haisheng^{1,2}, FENG Chang¹, WANG Wen¹, YUAN Jianjun³, CHEN Hongbin³, YANG Wei⁴, ZENG Yusi¹, ZHENG Mengqi¹, FAN Mingshan¹, YANG Haiming¹, DENG Qi^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 2. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 3. Key Laboratory of Inshore Resources Biotechnology, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, Fujian, China; 4. Hainan Xiangtai Fishery CO., LTD., Chengmai 571924, Hainan, China)

Abstract: The collagen was extracted by acid, enzymolysis and hot water methods respectively from the body wall of *Sipunculus nudus*, and their physicochemical properties were analyzed. The three collagen extracts were compared respectively by amino acid composition, UV spectroscopy, Fourier infrared spectroscopy and SEM scanning electron microscopy. The effects of the three collagen zynolytes on the growth viability of HaCaT cells were investigated. The results show that the extraction rate of collagen by hot water method is higher than the other two methods, and all three collagens contain the collagen characteristic amino acids Gly, Pro and Hyp. The UV and IR spectrograms show that all three collagens have obvious absorption peaks near 222 nm, and there are absorption peaks of amide A and amide B and characteristic peaks of amide I, II and III, suggesting that all three collagens belong to type I collagen with a three-stranded helical structure. And the results of scanning electron microscopy show that the three-stranded helical structure of collagen extracted by acid method is more complete and maintains the original structure of collagen fibers better than that of enzymatic method and hot water method. The collagen peptides extracts have the ability to significantly increase the viability of normal and UVB-damaged HaCaT cells in the range of 50–100 $\mu\text{g/mL}$, indicating that the enzymatic products of collagen of *Sipunculus nudus* have good potential applications in skin photoaging repair.

Key words: *Sipunculus nudus*; collagen; HaCaT cells; physicochemical properties; zynolyte; extraction method