鱼皮胶原肽对人皮肤角质细胞生长的影响

陈俊，叶燕军，王宝周，翁武银
（集美大学食品与生物工程学院，福建厦门 361021）

摘要：本文考察了鲨鱼皮胶原酶解物(SH)、罗非鱼皮胶原酶解物(TH)及其分离组分对人皮肤角质细胞(HaCat 细胞)生长的影响。结果发现，在细胞生长对数期阶段，添加 0.05 mg/mL 或 0.20 mg/mL 的 SH 可以明显促进 HaCat 细胞增殖，然而当 SH 的浓度提高至 1.00 mg/mL 时 HaCat 细胞却没有出现显著的增殖。虽然 TH 也可以促进 HaCat 细胞增殖，但 TH 浓度对细胞增殖却没有显著的影响。另一方面，不管是鲨鱼皮胶原酶解物还是罗非鱼皮胶原酶解物，利用 Sephadex G-15 凝胶层析分离获得的组分比单组分 Gly-Tyr 二肽和酪氨酸具有更好的促进细胞增殖能力，在抑制细胞的 MDA 生成和提高细胞的 SOD 活力甚至优于谷胱甘肽。这些结果表明，鱼皮胶原制备的酶解物通过凝胶层析分离的组分拥有优越的促进人皮肤角质细胞生长的能力，作为抗氧化肽具有替代谷胱甘肽应用在化妆品的潜力。

关键词：胶原酶解物；罗非鱼皮；鲨鱼皮；抗氧化活性；细胞生长；角质细胞

文章篇号：1673-9078(2015)3-55-59 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.010

Effect of Fish Skin Collagen Peptides on Cell Viability of Human Skin Keratinocytes

CHEN Jun, YE Yan-jun, WANG Bao-zhou, WENG Wu-yin
(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: This study investigated the effects of shark skin collagen hydrolysates (SH), tilapia skin collagen hydrolysates (TH), and their isolated fractions on the viability of human skin keratinocyte (HaCat). The HaCat cell viability, determined with the MTT method, was increased notably with the addition of 0.05 mg/mL or 0.20 mg/mL SH during the exponential growth phase. However, when the concentration of the added SH was increased to 1.00 mg/mL, no significant proliferation of HaCat was observed. The HaCat cell viability with the addition of TH was higher than that of the control (without the addition of TH), but TH concentrations did not significantly influence the viability. On the other hand, the HaCat cell viability with addition of the fractions, which were isolated from SH or TH by Sephadex G-15, was much higher than that with the addition of dipeptide (Gly-Tyr) or Tyr. Compared to the sample with added GSH, the MDA content was lower and the SOD activity was higher with the added isolated fractions irrespective of fish skin collagen hydrolysates. Based on these results, it was concluded that the fractions isolated from fish skin collagen hydrolysates by Sephadex G-15, can effectively promote the proliferation of HaCat and have great potential to replace GSH as antioxidative peptides in the cosmetics industry.

Key words: collagen hydrolysates; tilapia skin; shark skin; antioxidant activities; cell viability; keratinocytes

随着年龄的增长，胶原之间的非正常交联导致皮肤细胞生存环境改变，不仅合成胶原的速率出现降低，而且新合成胶原的降解速率会出现加快，结果使胶原蛋白过度流失，皮肤就会显现出干燥、粗糙、松弛等衰老现象。在皮肤衰老过程中，伴随角质细胞的老化，皮肤表皮将会出现劣质化，导致皱纹增生[1~2]。近年来有研究表明，小分子量的胶原肽不仅具有良好的吸水性和溶解性[3]，还具有促进皮肤成纤维细胞的增殖[4]，提高皮肤中谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶等抗氧化酶的表达，延缓皮肤衰老等功能[5~6]。而且，服用胶原蛋白后人体血液中的胶原肽含量会出现明显的增加，研究表明可能是胶原肽促进皮肤细胞的增殖[7]。因此，利用胶原肽制备的化妆品将会改善皮肤细胞的生存环境，促进皮肤组织的新陈代谢，同时提高皮肤细胞的密度产生张力，增强皮肤弹性，达到延缓皮肤衰老的功效。

在前期研究中，我们利用复合蛋白酶对鲨鱼皮和

收稿日期：2014-12-03
基金项目：厦门市科技计划项目(3502Z20131152)；福建省杰出青年科学基金项目(2014J06013)；厦门市海洋经济发展专项资金(13CZP003HJ05)
作者简介：陈俊（1977-），男，硕士，研究方向：海洋生物活性物质的提取与利用
通讯作者：翁武银（1974-），男，博士，教授，研究方向：蛋白质化学和水产加工副产物综合利用

罗非鱼皮进行酶解，获得了分子量分布为 150~2000 u 的胶原酶解物。经过 Sephadex G-15 凝胶层析、RP-HPLC 分离和质谱分析，发现分子量分布在 350 u 附近的鱼皮胶原肽组分抗氧化活性最强，而且还发现不管是鲨鱼皮还是罗非鱼皮制备的胶原肽，都是二肽（Gly-Tyr）和氨基酸（Tyr）在抗氧化活性中起到关键的作用[8]。另一方面，人皮肤永生化角质细胞（HaCat 细胞）模型具有人体正常皮肤上皮结构，可模拟人的皮肤细胞并被应用于化妆品对皮肤抗衰老的研究。有报道表明，添加抗氧化活性物质可以促进人体皮肤角质形成细胞的增殖，增加表皮厚度，延缓皮肤衰老[9]。然而，有关鱼皮抗氧化胶原肽对 HaCat 细胞的生长和增殖影响却尚未见报道。

因此，本文将利用鲨鱼皮胶原酶解物、罗非鱼皮胶原酶解物及其凝胶柱层析分离组分，以及 Gly-Tyr 和 Tyr，探讨不同鱼皮来源的胶原酶解物对 HaCat 细胞生长和增殖的影响，为利用鱼皮胶原肽研发护肤化妆品提供参考。

1 材料与方法

1.1 原料

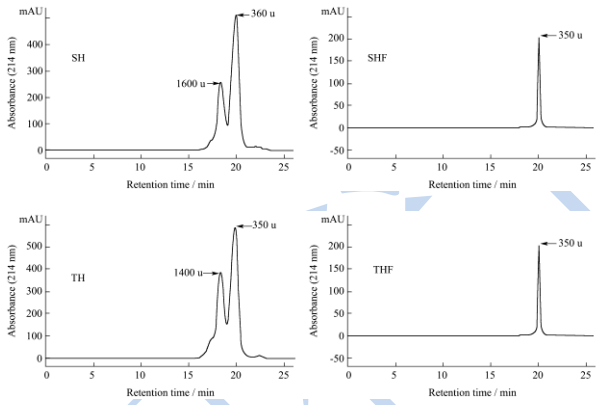


图 1 鱼皮胶原酶解物的高效液相图谱

Fig.1 High performance liquid chromatography of fish skin collagen hydrolysates

注：SH：鲨鱼皮胶原酶解物；TH：罗非鱼皮胶原酶解物；SHF：Sephadex G-15 凝胶柱层析分离组分；THF：Sephadex G-15 凝胶柱层析分离组分。以下图 3~图 6 同。

鲨鱼皮胶原酶解物（SH）及其 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离组分（SHF），罗非鱼皮胶原酶解物（TH）及其 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离组分（THF）：均实验室自制，分子量分布参见图 1，其中 THF 和 SHF 的分子量分布没有明显的差异，主要抗氧化成分都是 Gly-Tyr 和 Tyr[8]；Gly-Tyr：上海波泰生物科技有限公司，纯度>98%；Tyr：国药集团上海试剂有限公司；人皮肤永生化角质细胞(HaCat 细胞；KCB200442YJ)：北京北纳创联生物技术研究院；DMEM 高糖基础培养基，胎牛血清(FBS)：美国 Gibco 公司；双抗(Penicillin/Streptomycin)，0.25% 胰蛋白酶：美国 Corning 公司；MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒：北京索莱宝科技有限公司；二甲基亚砜(DMSO)：美国 MP 生物科技有限公司；0.4%台盼蓝：美国 Sigma 公司；总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒，丙二醛(MDA)测试盒：南京建成生物工程研究所；还原型谷胱甘肽(GSH)：上海捷瑞生物工程有限公司；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器和设备

UV-8000A 型紫外分光光度计：上海元析仪器有限公司；Agilent 1200 型高效液相色谱仪：美国 Agilent 公司；EVOS 型倒置显微镜：美国 AMG 公司；FLUOstar OPTIMA(0413)型多功能酶标仪：德国 BMG 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

HaCat 细胞置于含 10% FBS 和 1%双抗的 DMEM 培养液中，放在二氧化碳培养箱（37 ℃、5% CO_2、饱和湿度）中进行培养，每隔 2~3 d 换培养液一次，待细胞融合率达 90%时，用 0.25%胰蛋白酶消化，并进行传代培养，取对数期生长状态良好的细胞供以下实验使用。

1.3.2 细胞生长曲线的测定

细胞生长曲线参考 Hou 等[10]报道的方法进行测定。HaCat 细胞以 1×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板中，放在二氧化碳培养箱中预培养 24 h，然后加入含不同浓度的鲨鱼皮胶原肽或罗非鱼皮胶原肽的培养液，继续培养一段时间，期间每隔 2 d 换培养液一次，培养结束后，弃去培养液，在各孔加入 100 μL MTT (0.5 mg/mL)，继续培养 4 h，然后弃去培养液，加入 110 μL DMSO 溶解蓝紫色结晶，用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测各孔的吸光值。

1.3.3 不同活性成分对细胞生长的比较

根据上述细胞生长曲线，在同一浓度（0.2 mg/mL）下用 MTT 法比较不同活性成分对 HaCat 细胞生长的影响，其中细胞培养时间为 4 天。

1.3.4 细胞蛋白含量的测定

细胞蛋白含量的测定参考 Torita 等[11]的方法进行。HaCat 细胞以 1×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板中，加样培养 4 d 后，弃去培养液，用含有 0.5 mg/mL NaCl 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）漂洗 2 遍，然后

加入 200 μL 20% SDS 溶液裂解细胞，利用 Lowry 法测定蛋白含量。

1.3.5 细胞 MDA 和 SOD 含量的测定

细胞的 MDA 及 SOD 含量测定参考洪新宇等[12]的方法进行。HaCat 细胞以 1×10^6 个/孔密度接种于 24 孔板中，放在二氧化碳培养箱中预培养至细胞融合率达 80%时，饥饿处理 24 h，然后换含不同活性成分的培养液继续培养 24 h，利用 MDA 试剂盒测定培养液中 MDA 含量；同时收集细胞，在冰浴条件下超声 3 min 裂解细胞，利用 SOD 试剂盒测定细胞的 SOD 含量。

1.3.6 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析，同时进行 Duncan 组间比较，$P<0.05$ 为差异显著。每项指标测定数据至少采用 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 鱼皮胶原酶解物对 HaCat 细胞生长的影响

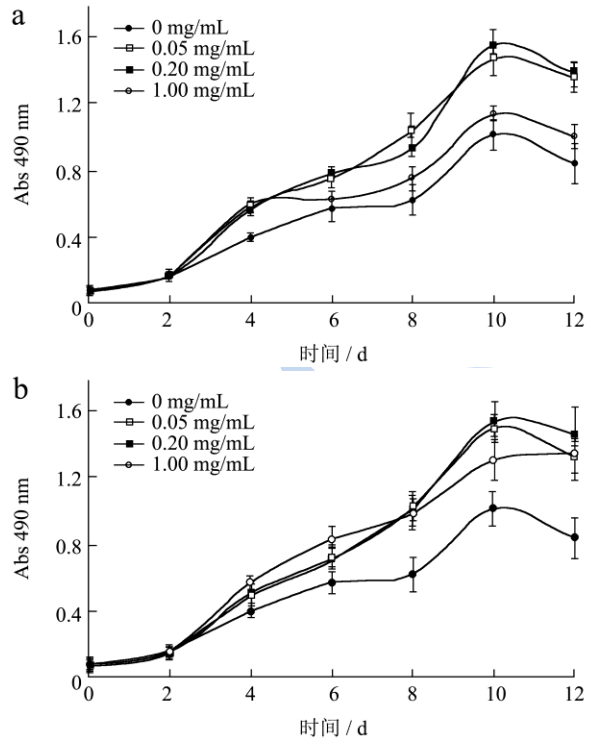


图 2 鱼皮胶原酶解物对 HaCat 细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of fish skin collagen hydrolysates on the growth of HaCat cells

注：a: 鲨鱼皮胶原肽，b: 罗非鱼皮胶原肽。

图 2 显示了鲨鱼皮胶原酶解物（SH）和罗非鱼皮胶原酶解物（TH）对 HaCat 细胞生长的影响。由图可知，HaCat 细胞在 0~2 d 生长较为缓慢，处于潜伏期，从第 4 d 开始迅速增殖，进入对数生长期，在第 10 d 细胞数达到最高，接着开始进入衰老期。这与 Wang 等[13]报道的 HaCat 细胞生长规律类似。不管是 SH 还是 TH，在 HaCat 细胞生长潜伏期，胶原酶解物的添加对细胞的生长都没有明显的影响。在 HaCat 细胞对数生长期，低浓度的 SH 可以明显促进细胞的增殖，但高浓度的 SH 对细胞却没有显著的促进增殖作用。另一方面，不管是低浓度还是高浓度的 TH，添加胶原酶解物都可以促进细胞的显著增殖，但不同浓度之间却没有发现差异。在 HaCat 细胞衰老期，胶原酶解物对细胞增殖的影响趋势与对数生长期类似。有研究表明，Pro-Hyp 胶原二肽作为一种成纤维细胞生长促进因子，随着 Pro-Hyp 浓度的增加成纤维细胞的增殖能力会出现先上升后下降的趋势[14]。Chung 等[15]研究绿茶提取物对 HaCat 细胞抗衰老的影响，结果也发现低浓度的绿茶提取物可以促进 HaCat 细胞生长，而高浓度的绿茶提取物对细胞的促生长能力却出现下降。因此，图 2 的结果表明本研究制备的 SH 和 TH 也都含有 HaCat 细胞生长促进因子，具有抗皮肤表皮细胞衰老的功能。

2.2 不同活性组分对 HaCat 细胞生长的比较

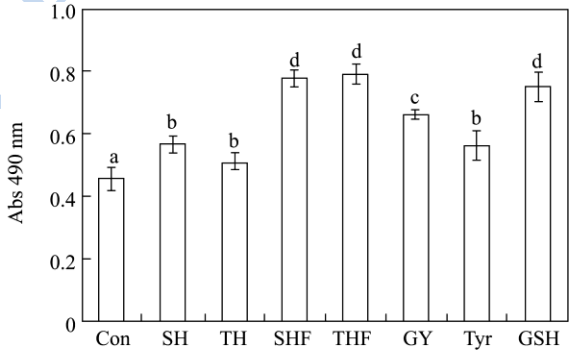


图 3 不同活性组分对 HaCat 细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of active components on the growth of HaCat cells

图 3 显示了鱼皮胶原酶解物及其分离组分、Gly-Tyr 和 Tyr 等不同活性组分对 HaCat 细胞增殖能力的影响。由图可知，添加各种活性组分都可以显著促进 HaCat 细胞的增殖（$p<0.05$）。其中，SH、TH 和 Tyr 促进细胞增殖能力最低，Gly-Tyr 较好，而 SHF、THF 和谷胱甘肽(GSH)都具有良好的促 HaCat 细胞增殖能力。在前期研究中已经发现，不管是在 SHF 还是在 THF 中，Gly-Tyr 和 Tyr 都是它们的主要抗氧化活性成分[8]。GSH 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的含有巯基的天然三肽，在清除细胞内活性氧自由基起到关键作用[16]，也是国际化妆品原料目录中的一种

主要成分。虽然 Gly-Tyr 和 Tyr 的促细胞生长增殖能力稍微弱于 GSH，但 SHF 和 THF 的促细胞增殖能力和 GSH 一致，表明罗非鱼皮或鲨鱼皮胶原酶解物利用 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离获得的组分可以替代 GSH 应用在化妆品中。

2.3 细胞蛋白含量

为了进一步验证各活性组分对 HaCat 细胞增殖能力的影响，对细胞中的蛋白含量进行了测定，结果如图 4 所示。与未添加组相比较，各活性组分提高 HaCat 细胞中蛋白含量的效果分别为:（SH，TH）<Tyr <（GY，GSH）<（SHF，THF）。这个趋势基本类似于各活性成分对 HaCat 细胞增殖能力的影响。Torita 等[11]也报道了扇贝壳水提物可以提高角质细胞中的蛋白含量和角质细胞的增殖能力。因此，图 4 的结果再次验证了罗非鱼皮或鲨鱼皮制备的胶原肽分离组分具有良好的促 HaCat 细胞增殖能力。

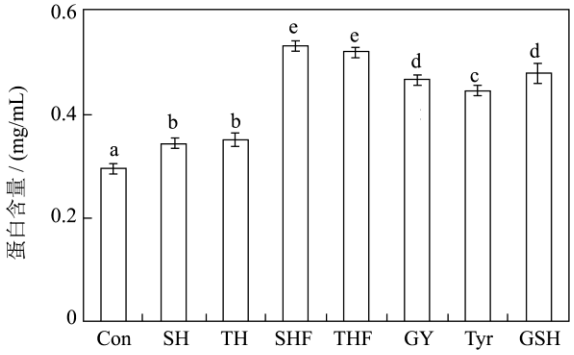


图 4 不同活性组分对 HaCat 细胞蛋白含量的影响

Fig.4 Effect of active components on the protein content of HaCat cells

2.4 细胞 MDA 含量

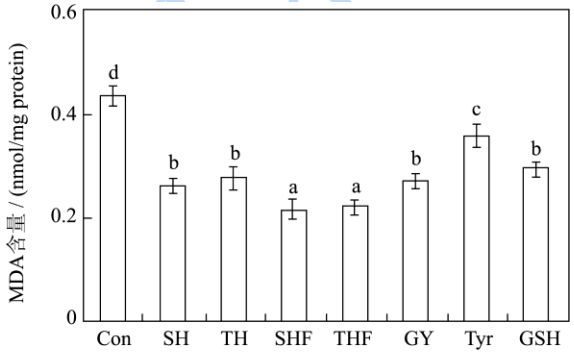


图 5 不同活性组分对 HaCat 细胞 MDA 含量的影响

Fig.5 Effect of active components on the MDA content of HaCat cells

为了明确抗氧化活性成分对 HaCat 细胞的影响，对细胞 MDA 含量进行检测，结果如图 5 所示。由图可知，添加 SH、TH、GY 和 GSH 虽然都可以降低饥饿处理后细胞产生的 MDA 含量，但它们之间却没有发现显著的差异。另一方面，添加 SHF 和 THF 对 MDA 的抑制能力明显高于其他添加组。从前期研究可知 SHF 和 THF 的体外抗氧化活性与 GSH 接近，其中 DPPH 清除能力优于 GY，羟自由基清除能力弱于 GY，但都明显优于于 SH 和 TH[8]。然而，在本研究中 SHF 和 THF 添加组的 MDA 含量明显低于 GY 和 GSH 添加组（图 5），表明了抗氧化组分对细胞 MDA 产生的综合抑制效果明显优于单一成分。

2.5 细胞总 SOD 活力

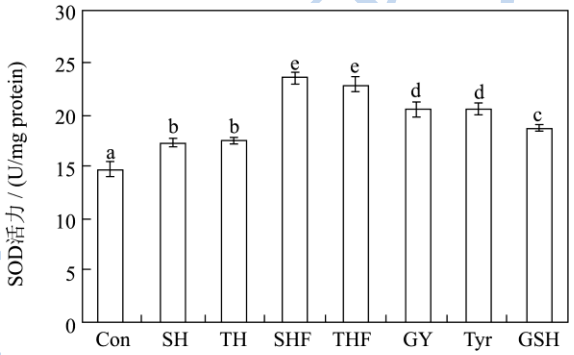


图 6 不同活性组分对 HaCat 细胞 SOD 活力的影响

Fig.6 Effect of active components on the SOD activity of HaCat cells

为了进一步阐明各活性组分对 HaCat 细胞的抗氧化作用，对细胞抗氧化酶 SOD 活力进行测定，结果如图 6 所示。由图可知，细胞经饥饿处理后 SOD 活力较低，通过添加各活性成分后细胞 SOD 活力都得到一定程度的提高，其中 SHF 和 THF 添加组的细胞 SOD 活力明显高于其他添加组，再次表明抗氧化组分在 HaCat 细胞中的综合作用优于单一成分。根据图 5 和图 6 的结果，发现 HaCat 细胞在生长过程中经过饥饿处理后 MDA 含量明显增加，SOD 活力出现下降，但通过添加鱼皮胶原酶解活性组分可显著提高细胞总 SOD 活力，有效防止因自由基引起的氧化损伤。

机体在正常生理状态下，活性氧不断产生的同时也被不断清除，但如果人体内自由基的数量超出活性氧清除能力范围，就会破坏细胞结构，引起脂质过氧化产生的 MDA 等脂质过氧化物与蛋白质、核酸或脂类交联形成难溶物质，从而破坏细胞膜和蛋白质，甚至导致 DNA 突变，干扰人体正常的代谢活动。随着机体的衰老，体内 SOD 等抗氧化酶类逐渐减少，自由基容易发生堆积。因此人体有必要补充一些天然抗氧化剂增强机体保护屏障。Kim 等[17]报道显示，胶原肽相比其它来源的抗氧化肽具有更好的抑制脂质过氧

化作用效果。在本研究中，鱼皮胶原酶解物不仅具有抑制 HaCat 细胞内氧化应激水平而发挥其抗氧化保护作用（图 5，6），而且还具有促 HaCat 细胞增殖能力的功能（图 3，4），今后在化妆品的应用中效果将可能优于 GSH。

3 结论

研究了鲨鱼皮和罗非鱼皮制备的胶原酶解物对 HaCat 细胞生长的影响，结果发现两者都具有促进 HaCat 细胞增殖的作用，在低浓度时两者对细胞促增殖效果没有明显的差异，然而在高浓度时鲨鱼皮胶原酶解物对细胞增殖效果弱于罗非鱼皮胶原酶解物。另一方面，利用 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离获得的胶原肽组分对 HaCat 细胞氧化损伤保护效果优于胶原肽中的主要成分 Gly-Tyr 和酪氨酸，甚至优于 GSH。因此，鱼皮胶原肽的分离纯化产物作为化妆品原料将比 GSH 更有优势。

参考文献

[1] Varani J, Warner R L, Gharaee-Kermani M, et al. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2000, 114(3): 480-486

[2] Campisi J. The role of cellular senescence in skin aging [C]//Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. Nature Publishing Group, 1998, 3(1): 1-5

[3] 祝婧,刘磊,张名位,等.不同分子量海鲈鱼胶原蛋白肽组分的功能特性比较[J].现代食品科技,2014,30(12):113-118
ZHU Jing, LIU Lei, ZHANG Ming-wei, et al. Comparative study on functional properties of sea bass collagen peptides (sbcp) with different molecular weight [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 2014,30(12):113-118

[4] 宋芹,陈封政,颜军,等.一种胶原蛋白寡肽促进皮肤胶原蛋白与透明质酸合成的研究[J].食品工业科技,2013,34(1): 105-107
SONG Qin, CHEN Feng-zheng, YAN Jun, et al. Study on the effect of collagen oligopeptide on synthesis of hyaluronic acid and collagen [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(1): 105-107

[5] Sun L, Zhang Y, Zhuang Y. Antiphotoaging effect and purification of an antioxidant peptide from tilapia (*Oreochromis niloticus*) gelatin peptides [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 154-162

[6] Matsuda N, Koyama Y, Hosaka Y, et al. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2006, 52(3): 211-215

[7] Ohara H, Matsumoto H, Ito K, et al. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(4): 1532-1535

[8] Weng W Y, Tang L L, Wang B Z, et al. Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (Prionace glauca) skin gelatin hydrolysates [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 11: 342-351

[9] Borawska M H, Czechowska S K, Markiewicz R, et al. Cell viability of normal human skin fibroblast and fibroblasts derived from granulation tissue: effects of nutraceuticals [J]. Journal of Medicinal Food, 2009, 12(2): 429-434

[10] Hou J, Zhang H, Yuan X, et al. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation [J]. Lasers in Surgery and Medicine, 2008, 40(10): 726-733

[11] Torita A, Liu Y C, Hasegawa Y. Photoprotective activity of scallop shell water-extract in keratinocyte cells [J]. Fisheries Science, 2004, 70(5): 910-915

[12] 洪新宇,朱云龙,陈林根,等.竹茹提取物黄酮和内酯延缓皮肤细胞衰老的效能[J].日用化学工业,2003,33(5):302-304
HONG Xin-yu, ZHU Yun-long, CHEN Lin-gen, et al. Efficacy of flavone and lactone in caulis bambusae extract on delaying of skin-cell aging [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2003, 33(5): 302-304

[13] Wang Y, Ren J, Xia K, et al. Effect of mitomycin on normal dermal fibroblast and HaCat cell: an in vitro study [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2012, 13(12): 997-1005

[14] Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, et al. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts [J]. The Journal of Dermatology, 2010, 37(4): 330-338

[15] Chung J H, Han J H, Hwang E J, et al. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes [J]. The FASEB Journal, 2003, 17(13): 1913-1915

[16] Yang C T, Yang Z L, Zhang M F, et al. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced cytotoxicity and inflammation in HaCat cells through inhibition of

ROS/NF-κB/COX-2 pathway [J]. Plos One, 2011, 6(7): e21971

[17] Kim S K, Byun H G, Ito H, et al. Purification and characterization of antioxidative peptides from bovine skin [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 34(3): 214-219

现代食品科技