

海参肽的分离纯化及其对 NIH/3T3 细胞胶原蛋白分泌的影响

宋淑亮¹, 王欢¹, 梁浩¹, 吉爱国^{1,2}

(1. 山东大学(威海)海洋学院, 山东威海 264209) (2. 山东大学药学院, 山东济南 250012)

摘要: 本论文从刺参中分离纯化得到一种海参肽, 并研究其对 NIH/3T3 细胞增殖和胶原蛋白分泌的影响。采用活性追踪的方法从新鲜刺参中通过离子交换层析、凝胶层析分离纯化得到海参肽 SP12, 采用 MTT 法检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞的增殖作用; 采用流式细胞术检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞细胞周期的影响; 采用羟脯氨酸测定试剂盒的方法检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞胶原蛋白分泌的影响; 采用 Western Blot 及 RT-PCR 的方法, 在蛋白水平及基因水平上检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞 I 型胶原蛋白、MMP-1 及 TIMP-1 表达的影响。结果表明 SP12 能显著提高 NIH/3T3 细胞的增殖率, 能促进 NIH/3T3 细胞由 G1 期向 S 期转变, 增加其胶原蛋白的分泌量, 且在 0~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内均呈剂量依赖性。在蛋白水平和基因水平, SP12 均能显著促进 I 型胶原蛋白及 TIMP-1 的表达, 抑制 MMP-1 的表达, 这可能是 SP12 促进 NIH/3T3 细胞胶原蛋白分泌的作用机制。

关键词: 多肽; 增殖; 胶原蛋白; NIH/3T3 细胞; 刺参

文章编号: 1673-9078(2017)3-22-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.004

Isolation and Purification of Sea Cucumber Peptide and Its Impact on the Secretion of Collagen by NIH/3T3 Cells

SONG Shu-liang¹, WANG Huan¹, LIANG Hao¹, JI Ai-guo^{1,2}

(1. Marine College, Shandong University Weihai, Weihai 264209, China)

(2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: A sea cucumber peptide, SP12, was isolated and purified from *Stichopus japonicus*, and its impact on NIH/3T3 cell proliferation and secretion of type I collagen was studied. SP12 was purified by ion exchange chromatography and gel filtration chromatography from fresh *Stichopus japonicus* using a cell activity tracking method. The effect of SP12 on NIH/3T3 cell proliferation was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, and its impact on cell cycle progression was determined by flow cytometry. The effect of SP12 on collagen secretion by NIH/3T3 cells was measured by hydroxyproline kit, and its impact on the expression of type I collagen, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in NIH/3T3 cells was measured at the protein and gene levels by western blot and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results clearly demonstrate that SP12 can considerably enhance the proliferation rate of NIH/3T3 cells and promote progression from G1 phase to S phase. In a range of 0~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SP12 enhanced collagen secretion by NIH/3T3 cells in a dose-dependent manner. At the protein and genetic levels, SP12 considerably promoted the expression of type I collagen and TIMP-1, and inhibited the expression of MMP-1; this might be the mechanism underlying SP12 promotion of collagen secretion by NIH/3T3 cells.

Key words: peptide; proliferation; collagen; NIH/3T3 cells; *Stichopus japonicus*

衰老是生命体活动进程中的必经阶段, 是生物体发育成熟后, 受遗传和环境因素影响的逐渐发生的不可逆的衰退过程^[1]。皮肤衰老, 主要表现为皮肤松弛

收稿日期: 2016-03-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81371455)

作者简介: 宋淑亮 (1981-), 男, 高级实验师, 研究方向: 海洋活性物质

通讯作者: 吉爱国 (1956-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物与生化药

和皱纹, 身体暴露部位的皮肤变得粗糙, 皱纹加深加粗; 表皮结构异常、色素沉着、色斑、弹性降低、血管扩张和表皮角化不良等一系列皮肤问题。皮肤衰老的主要原因是成纤维细胞增殖率降低和真皮层变薄。真皮的细胞外基质对维持皮肤功能起关键作用, 胞外基质主要由基质、胶原蛋白和弹性蛋白组成, 其中 80% 是由胶原蛋白构成的, 然而 I 型胶原占总胶原的 85%, 因此, 提高成纤维细胞的增殖率和 I 型胶原蛋白的表

大量对延缓皮肤衰老至关重要^[2]。因此找到一种能促进皮肤中胶原蛋白合成且副作用低的化妆品功效成分对于祛皱化妆品的研究具有十分重要的意义^[3]。而海参的修复再生功能,是其一个重大生理特征:如快速使伤口愈合、修复受损的胃肠和修复免疫系统等,无不体现海参的强大修复再生特征。研究开发海参中的活性成分对海参的开发及其在祛皱化妆品中的应用对海参产业的发展具有积极的意义。

海参属于棘皮动物门(*Echinodermata*)海参纲(*Holothurioidea*)^[4],是重要的海洋无脊椎动物。近几年来,国内外在海参的生物活性物质及其药理作用等方面的研究较多,已经先后从几十种海参中分离获得了多种活性物质,包括多肽、蛋白质、多糖、脂类、三萜皂苷、凝集素、神经肽和糖肽^[5]。研究发现不同的海参品种呈现多种不同的生物及药理活性,其中包括抗氧化、抗关节疼痛、抗癌、抗炎、抗菌、抗血管生成、抗凝血、抗高血压、抗血栓、提高免疫力和促进伤口愈合等^[6]。我们在前期对刺参多肽的研究过程中^[7],发现刺参粗多肽具有促进 NIH/3T3 细胞增殖的现象。因此,本课题以市售的新鲜刺参为原料,采用复合酶酶解技术、凝胶及离子交换柱层析技术分离得到促进 NIH/3T3 细胞增殖的海参肽 SP12,并以此为原料研究 SP12 对 NIH/3T3 细胞的增殖和胶原蛋白分泌的影响,为海参肽的开发及其在化妆品中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠胚胎 NIH/3T3 细胞(NIH/3T3),购买于中国科学院细胞库(上海);鲜刺参,购自威海市水产市场;木瓜蛋白酶, Solarbio 公司;碱性蛋白酶, Solarbio 公司; DEAE Sepharose fast flow, 美国 GE 公司; G10 Sephadex, 美国 GE 公司; S200 Sephadex, 美国 GE 公司; 超低分子量蛋白电泳试剂盒, 中科瑞泰生物科技有限公司; 高糖 DMEM 培养基粉末, 美国 GIBCO 公司; bFGF, Invitrogen 公司; 胰蛋白消化酶, 美国 Invitrogen; 胎牛血清, 美国 GIBCO; TGF- β 1, 美国 Sigma 公司; PI, 北京中杉金桥公司; RNA 酶, 碧云天; 羟脯氨酸测定试剂盒, 南京建成生物科技有限公司; β -actin 引物、COLA1 引物、MMP-1 引物和 TIMP-1, 南京金斯瑞金生物科技有限公司; cDNA 扩增试剂盒, Thermo 公司; cDNA 低分子量 marker, solarbio 公司; RIPA 细胞裂解液(强), 碧云天生物试剂公司; 蛋白酶抑制剂, 美国 Amresco 公司; β -actin 一抗, 中杉金

桥生物科技有限公司; BCA 试剂盒, 碧云天生物试剂公司; 蛋白 Marker, 加拿大 Fermentas 公司; 山羊抗兔 IgG(H+L)HRP 和山羊抗小鼠 IgG(H+L)HRP, 北京康为世纪生物科技有限公司。其他实验用到的试剂均是国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 海参肽的制备及分离纯化

取新鲜刺参用清水洗净后,取其体壁并剪碎,向剪碎的刺参体壁中加入约刺参质量两倍的双蒸水,匀浆得刺参匀浆液。将上述匀浆液放置于 50 °C 恒温水浴中,并加入匀浆液 3 倍体积的 pH 为 7.0 的 0.1 M 的磷酸缓冲液以及刺参体壁质量 1% 的复合酶(该复合酶是碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶按活力单位比为 3:3:4 的混合物)^[8],酶解 12 h。

酶解结束后,室温离心(5000 r/min, 10 min),取上清。然后将上清液通过截留分子量为 6000 的中空纤维膜组件,收集滤过液。将滤过液浓缩并冷冻干燥即得刺参粗多肽干粉, -20 °C 保存备用。

取适量刺参粗多肽溶解后,在 AKTA explorer 10 上用 DEAE 阴离子交换层析柱进行分离,采用 2 M 氯化钠线性洗脱,紫外 280 nm 检测,收集不同组分后进行细胞活性检测。

取 DEAE 阴离子交换层析柱分离获得的活性峰在 AKTA explorer 10 上进行 S200 凝胶柱层析分离, 0.15 M NaCl 洗脱,紫外 280 nm 检测,收集不同组分后进行细胞活性检测,获得的活性组分命名为 SP12。

取适量 SP12 进行超低分子量蛋白电泳分析,分析方法按超低分子量蛋白电泳试剂盒(中科瑞泰生物科技有限公司)方法进行,最后使用凝胶成像仪系统拍照并保存。

1.2.2 SP12 促进 NIH/3T3 细胞增殖的活性检测

NIH/3T3 细胞铺满培养瓶底面积 80% 时,消化后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 4×10^4 个/mL 左右。向 96 孔板各孔内加入 100 μ L 的细胞悬液,等细胞完全贴壁后,吸净培养基,同时加入 100 μ L 含 0.4% FBS 的维持培养基,使细胞生长速度同步 24 h。吸净孔内的旧培养基,空白对照组加入 100 μ L 维持培养基,阳性对照组加入 10 ng/mL 的 bFGF 100 μ L,实验组每孔分别加入含不同浓度 SP12 (1.25、2.5、5、10 和 20 μ g/mL) 的维持培养基 100 μ L,每个浓度均设 6 个复孔。培养 48 h 后,每孔各加入 MTT 试剂 10 μ L,孵育 4 h 后,吸净孔内培养基,并每孔加入 DMSO 试剂 100 μ L,紫色结晶完全溶解后使用酶标仪测定各孔的

吸光度值,测定波长为 570 nm,参比波长为 630 nm,比较各组吸光度值,并分析结果^[9]。

1.2.3 SP12 对 NIH/3T3 细胞周期的影响

NIH/3T3 细胞融合度达到 80%左右,经胰酶消化,调整细胞密度为 4×10^4 个/mL,均匀接种于 6 孔板内,细胞完全贴壁后,吸净旧培养基,加入含 0.4%FBS 的维持培养基,培养 24 h 后,吸净旧培养基,分别加入含药物浓度为 0、bFGF (10 ng/mL)、2.5 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL 和 20 μ g/mL 的维持培养基。培养 48 h 后收集细胞,离心 (1000 r/min, 3 min)。然后用 PBS 重悬离心,重复两次。弃上清,加入 150 μ L PBS 悬起细胞,再缓慢加入 350 μ L 无水乙醇至 70%乙醇,于 4 $^{\circ}$ C 条件下固定 12 h。然后加入 PBS,离心 (1000 r/min, 3 min),重复两次。弃上清,加 10 mg/mL RNase 1.5 μ L,使其终浓度为 150 μ g/mL,铝箔封好,37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min。每管中加入 1 μ L PI (10 mg/mL),4 $^{\circ}$ C 温度下保存 1 h,最后加入 300 μ L PBS,上流式检测。

1.2.4 SP12 对 NIH/3T3 细胞胶原蛋白分泌的影响

NIH/3T3 细胞融合度达到 80%左右,经胰酶消化,

调整细胞密度为 4×10^4 个/mL,均匀接种于 6 孔板内,细胞完全贴壁后,吸净旧培养基,加入含 0.4% FBS 的维持培养基,同步细胞生长状态,细胞培养箱内培养 24 h 后,吸净旧培养基,分别加入含药物浓度为 0、TGF- β 1 (10 ng/mL)、5 μ g/mL、10 μ g/mL 和 20 μ g/mL 的维持培养基。48 h 后分别收集每孔培养基,采用羟脯氨酸测定试剂盒(南京建成生物科技有限公司)的方法来检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞胶原蛋白分泌的影响。

1.2.5 SP12 对 NIH/3T3 细胞中 I 型胶原蛋白、MMP-1 和 TIMP-1 在 mRNA 水平表达的影响

NIH/3T3 细胞融合度达到 85%左右,经胰酶消化,调整细胞密度为 4×10^4 个/mL,均匀接种于 6 孔板内,细胞完全贴壁后,吸净旧培养基,加入含 0.4% FBS 的维持培养基,同步细胞生长状态,细胞培养箱内培养 24 h 后,吸净旧培养基,分别加入 100 μ L 浓度为 0、TGF- β 1 (10 ng/mL)、2.5 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL 的药品。培养 48 h 后提取总 RNA,使用 RT-PCR 法检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞中 I 型胶原蛋白 (COL1A1)、MMP-1 和 TIMP-1 在 mRNA 水平表达的影响,各引物序列见表 1。

表 1 COL1A1、MMP-1、TIMP-1 和 β -actin 的引物序列表

Table 1 Primers for COL1A1, MMP-1, TIMP-1, and β -actin

Gene	Base Number/bp	Primer Sequence	T _m / $^{\circ}$ C
COL1A1	378	Forward: 5'-ACAGAGGCATAAAGGGTCA-3'	56
		Reverse: 5'-CAAGGTCACGGTCACGAA-3'	
MMP-1	155	Forward: 5'-TGGACCTGGAGGAAATCTTGC-3'	49.6
		Reverse: 5'-AGAGTCCAAGAGAATGGCCGA-3'	
TIMP-1	534	Forward: 5'-CCTTCTGCAATTCGACCTC-3'	61
		Reverse: 5'-CGGGCAGGATTCAGGCTAT-3'	
β -actin	252	Forward: 5'-AGACCTTCAACACCCAG-3'	56
		Reverse: 5'-CACGATTTCCCTCTCAGC-3'	

1.2.6 SP12 对 NIH/3T3 细胞内 I 型胶原蛋白、MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达的影响

NIH/3T3 细胞融合度达到 80%左右,经胰酶消化,调整细胞密度为 4×10^4 个/mL,均匀接种于 6 孔板内,细胞完全贴壁后,吸净旧培养基,加入含 0.4% FBS 的维持培养基,同步细胞生长状态,细胞培养箱内培养 24 h 后,吸净旧培养基,分别加入 100 μ L 浓度为 0、TGF- β 1 (10 ng/mL)、2.5 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL 的药品。培养 48 h 后收集细胞提取蛋白,使用 Western Blot 法检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞 I 型胶原蛋白 COL1A1、MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达影响情况。

1.2.7 数据统计分析

每组实验重复 3 次以上,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用

SPSS 20.0 统计软件,采用 t 检验考察显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 海参肽的分离纯化

称取清洗干净后的新鲜刺参体壁 300.12 g,经复合酶酶解,超滤等纯化得刺参粗多肽冻干粉 16.5 g,为浅棕色粉末状固体,得率为 5.5%。

刺参粗提物经 DEAE 阴离子交换层析柱分离后的图谱见图 1,经细胞活性检测收集增殖活性较高的 1 号峰(命名为 SP1),收集 SP1 峰洗脱液,浓缩脱盐,冻干,备用。

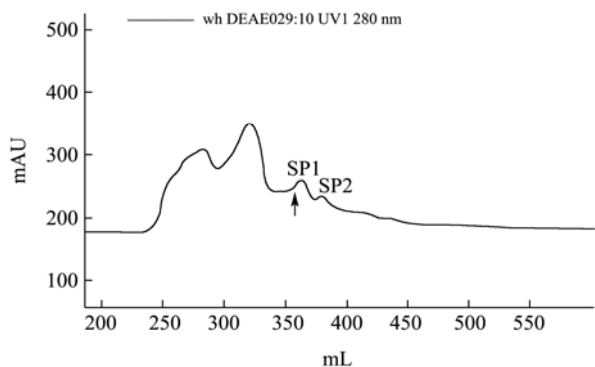


图1 刺参粗提物经 DEAE 阴离子交换层析柱分离结果图

Fig.1 DEAE anion exchange chromatogram of crude sea cucumber extract

注: 2 M NaCl 线性洗脱, 检测波长: 280 nm, SP1 为活性峰。

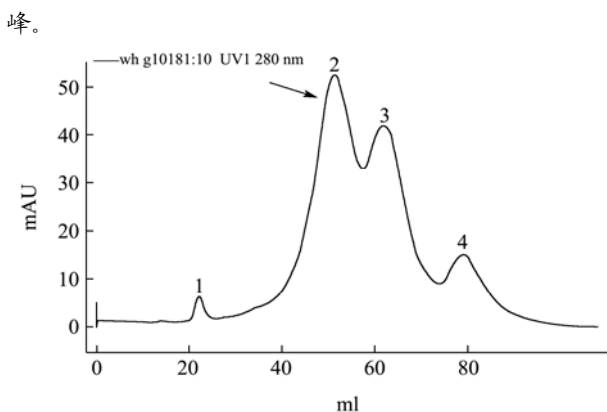


图2 SP1 经 S200 凝胶层析分离结果图

Fig.2 S200 gel column chromatogram of SP1

注: 0.15 M NaCl 等度洗脱, 检测波长: 280 nm, 2 为活性峰。

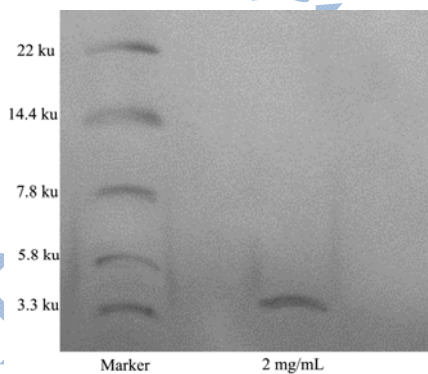


图3 SP12 的超低分子量电泳结果图

Fig.3 Electrophoretogram of the super low molecular weight protein in SP12

从图2可以看出SP1经S200凝胶层析分离后, 主要

分为4个组峰: SP11、SP12、SP13和SP14。分别收集四个组峰, 冻干浓缩, 取适量进行细胞增殖活性检测, 其中SP12增殖活性最好。

采用超低分子量蛋白电泳试剂盒对 SP12 进行电泳纯度分析, 结果见图3, 从图3可以看出, SP12 多肽经超低分子量蛋白电泳分析后呈现单一条带, 这表明该多肽的纯度较高。利用 quantity one 软件定量分析该多肽的分子量, 结果显示 SP12 多肽的分子量约为 3.87 ku。

2.1.2 SP12 促进 NIH/3T3 细胞增殖的活性检测

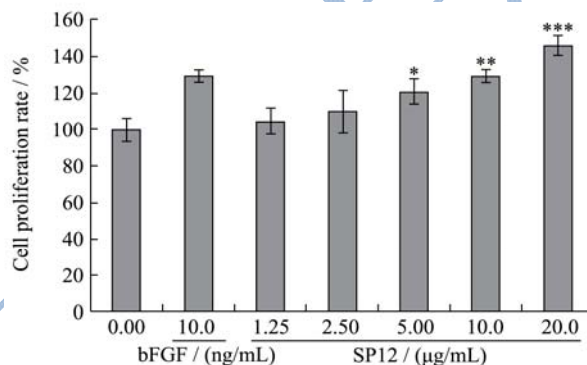


图4 SP12 对 NIH/3T3 细胞增殖率的影响

Fig.4 Effect of SP12 on the proliferation of NIH/3T3 cells

注: n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs 对照组。

采用 MTT 法检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞增殖率的影响。图4的结果表明, 当 SP12 浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 空白对照组相比其增殖活性为 45.6%左右, 活性较强, 与空白对照组相比具有显著差异。SP12 能显著促进 NIH/3T3 细胞的增殖, 且随着浓度的升高, 增殖率也升高, 在 0~20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈现剂量依赖性。

2.1.3 SP12 对 NIH/3T3 细胞周期的影响

图5结果显示, 空白对照组中处于 G0/G1 期的细胞所占比例为 71.60% (图5a), S 期的细胞所占比例为 25.1%, 表明大多数细胞处于静止期。bFGF 及 SP12 作用 48 h 后, 细胞 DNA 合成期 (S 期) 的比例显著增加, 而 G0/G1 期比例明显减少。当 SP12 浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 48 h 后, G0/G1 期的细胞所占比例为 21%, S 期的细胞所占比例为 74.2% (图5f)。这表明, 加入 SP12 后, S 期细胞比例显著升高, G1 期细胞比例显著降低, SP12 是通过使细胞从 G1 期向 S 期的转变来促进 NIH/3T3 细胞增殖的。

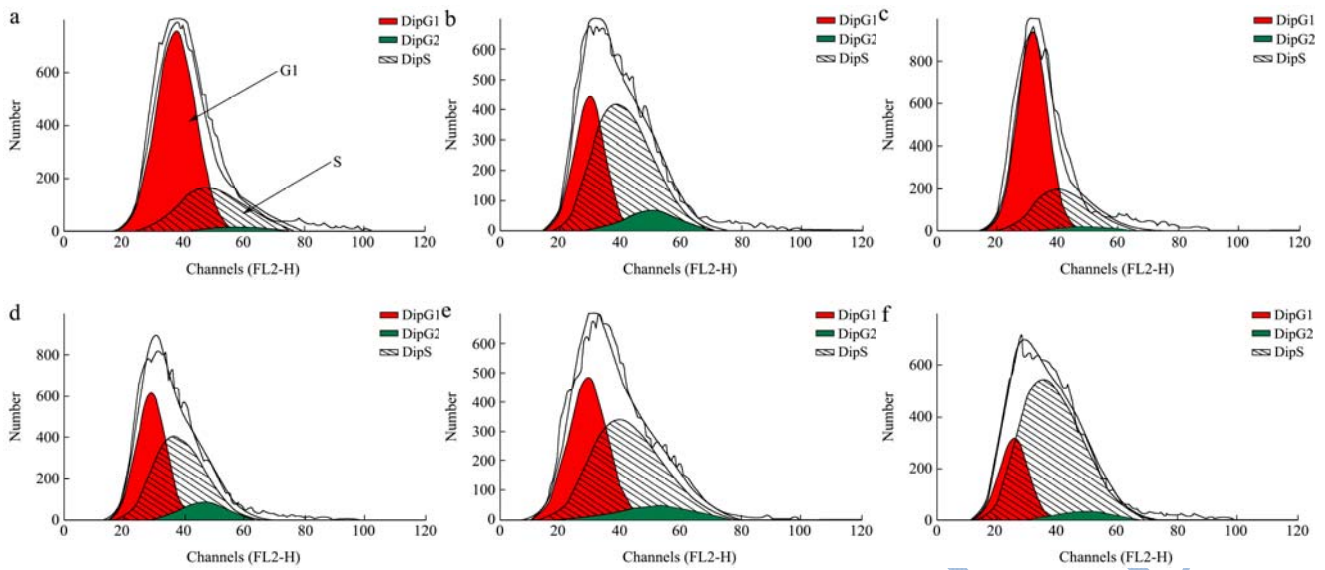


图5 流式细胞仪检测 SP12 对 NIH/3T3 细胞周期的影响

Fig.5 Effects of SP12 on cell cycle progression of NIH/3T3 cells determined by flow cytometry

注: a 表示对照组; b 表示 10 ng/mL bFGF; c 表示 2.5 μg/mL SP12; d 表示 5 μg/mL SP12; e 表示 10 μg/mL SP12; f 表示 20 μg/mL SP12.

2.1.4 SP12 对 NIH/3T3 细胞胶原蛋白分泌的影响

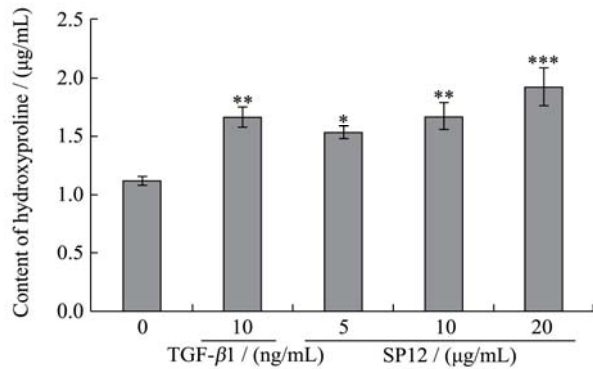


图6 SP12 对 NIH/3T3 胶原蛋白分泌的影响

Fig.6 Effect of SP12 on the collagen secretion activity of NIH/3T3 cells

注: n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs 对照组.

从图6可以看出,阳性对照药 TGF-β1 及 SP12 均能提高细胞羟脯氨酸的含量,且效果显著,随着 SP12 用药浓度增加,胶原蛋白表达量逐渐升高。由于羟脯氨酸在胶原蛋白中占 13.4%,是胶原蛋白特征性成份之一^[10],因此可以通过检测羟脯氨酸的含量间接反映胶原蛋白的量。由上图可知,空白组羟脯氨酸的含量为 1.12 μg/mL,而 SP12 浓度为 20 μg/mL 作用 48 h 后,羟脯氨酸的含量为 1.92 μg/mL,与空白组相比具有显著差异。上图也间接反映出 SP12 能促进 NIH/3T3 细胞表达胶原蛋白,且在 0~20 μg/mL 浓度范围内呈剂量依赖性。

2.1.5 SP12 对 NIH/3T3 细胞中 I 型胶原蛋白、

MMP-1 和 TIMP-1 在 mRNA 水平表达的影响

采用 RT-PCR 法检测了经 SP12 作用 48 h 后 NIH/3T3 细胞 I 型胶原蛋白、MMP-1 和 TIMP-1 在 mRNA 水平表达情况的变化。结果如下:

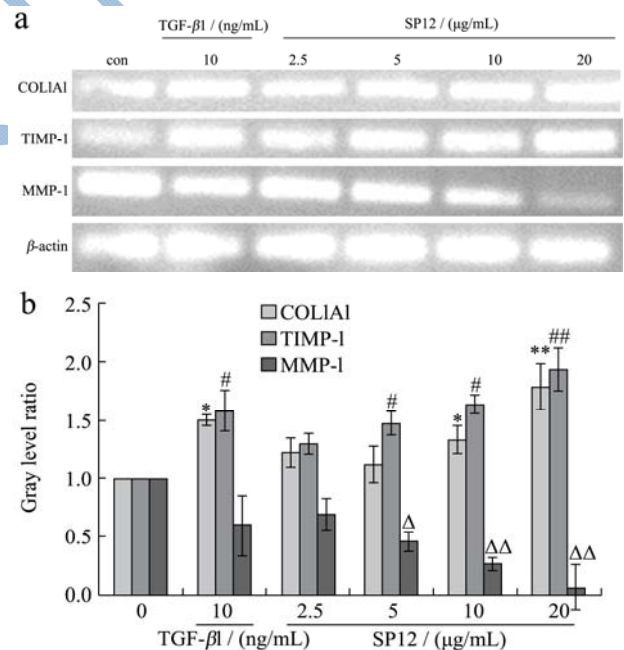


图7 SP12 对 NIH/3T3 细胞中 Col1A1、MMP-1 和 TIMP-1 mRNA 表达的影响

Fig.7 Effect of SP12 on the mRNA expression of Col1A1, MMP-1, and TIMP-1 in NIH/3T3 cells after 48 h

注: a 表示 RT-PCR 结果; b 表示 a 图的灰度值, n=3; “*”、“#”和“▲”表示 $p < 0.05$; “***”、“###”和“▲▲”表示 $p < 0.01$, vs 对照组。

从图 7 RT-PCR 结果来看, SP12 作用 48 h 后, MMP-1 在 mRNA 水平的表达变化有所减少, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的减弱的强度最为明显; 而作用 48 h 后, I 型胶原蛋白和 TIMP-1 在 mRNA 水平的表达随 SP12 浓度的升高逐渐升高, 且在 0~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内呈剂量依赖性。这与 Western Blot 的检测结果一致。

2.1.6 SP12 对 NIH/3T3 细胞内 I 型胶原蛋白、MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达的影响

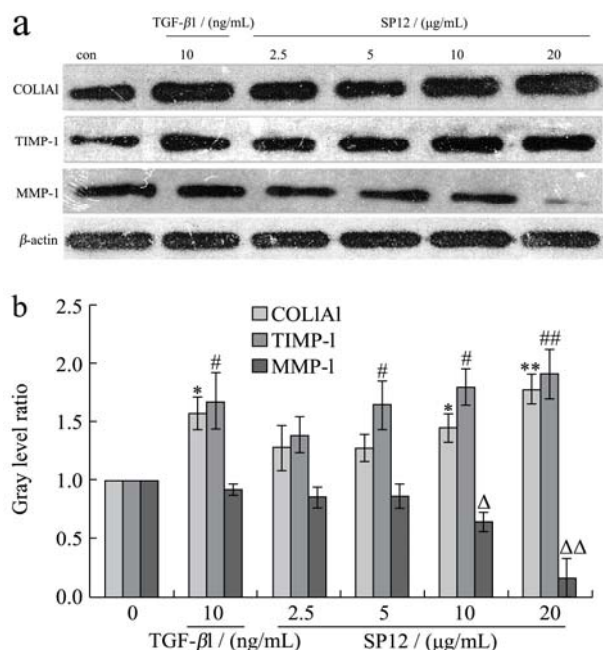


图 8 SP12 对 NIH/3T3 细胞中 Col1A1、MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达的影响

Fig.8 Effect of SP12 on the protein expression of Col1A1, MMP-1, and TIMP-1 in NIH/3T3 cells

注: a 表示 Western Blot 结果; b 表示 a 图的灰度值, n=3; “*”、“#”和“▲”表示 $p<0.05$; “**”、“##”和“▲▲”表示 $p<0.01$; vs 对照组。

从图 8 Western Blot 结果来看, SP12 作用 48 h 后, 细胞内的 MMP-1 蛋白的表达量显著减少, 且随着作用浓度的升高, 表达水平依次降低; COL1A1 和 TIMP-1 蛋白的表达量显著增加, 且在 0~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内呈剂量依赖性。

2.2 讨论

海参的重要药用价值及其生物活性物质的研究工作已有许多报到, 目前海参产品开发主要以食用为主, 少有其他方面的开发应用。朱洪珍^[1]等采用酶解的方法制备了海参胶原蛋白肽。研究了分子量小于 10 ku 的海参胶原蛋白肽的护肤活性。在最佳工艺条件下制得的分子量小于 10 ku 海参胶原蛋白多肽的保湿率和吸湿率分别达到 81.63%和 6.11%。姜春芳等采用双酶

解(中性蛋白酶和动物蛋白水解酶)的方法, 通过单因素实验得到了促进人皮肤纤维母细胞的增殖和胶原合成的酶解产物。结果显示白肛海参体壁用双酶水解工艺得到的酶解物对人皮肤纤维母细胞的增殖和胶原蛋白的产生均具有促进作用^[12]。本论文的研究结果显示: 海参肽不仅有促进成纤维细胞增殖的能力, 而且可以通过促进 TIMP-1 表达并抑制 MMP-1 的表达, 从而促进胶原蛋白的分泌, 这对海参肽在化妆品中应用提供了有利的依据。

成年以后真皮层中成纤维细胞活性逐渐下降, 胶原蛋白的总含量逐年减少; 同时, 胶原纤维密度、稳定性增大, 不易被酶分解^[13,14]。一般婴儿及青年人皮肤中 I 型胶原含量约占 85%, 而衰老的皮肤中 I 型胶原的表达量会逐年减少。随着胶原蛋白的不断降解真皮层会变得越来越薄, 从而引起皱纹、松弛、色斑和下垂等一系列皮肤问题。上述实验研究表明: 海参肽 SP12 具有促进成纤维细胞增殖的活性, 在此基础上, 以活性海参肽为主要原料, 开发设计一系列具有抗皱修复作用的海参肽化妆品产品, 不仅符合现代化妆品趋于天然产品的发展趋势, 而且有利于海参产业的多元化发展, 对海参产业的发展具有积极的引导作用, 将海参的高值化开发利用提供一种新的途径, 提高海参产业的抗风险能力。

3 结论

本论文以市售的新鲜刺参为原料, 采用复合酶解法, 利用超滤、阴离子交换柱层析和凝胶柱层析等一系列分离纯化手段, 以 NIH/3T3 细胞增长率为检测指标, 分离得到具有显著促进 NIH/3T3 细胞增殖的刺参多肽 SP12, 其分子量为 3.87 ku, 纯度为 97.4%, 并进一步探索了 SP12 对 NIH/3T3 细胞周期、胶原蛋白分泌以及 I 型胶原蛋白、MMP-1 和 TIMP-1 表达的影响, 结果表明: SP12 能促进 NIH/3T3 细胞由 G1 期向 S 期转变, 从而促进细胞的增殖; 能通过促进 TIMP-1 并抑制 MMP-1 的表达, 从而促进胶原蛋白的表达。

参考文献

- [1] 邓薇. 抗衰老与抗衰老市场概述[J]. 日用化学品科学, 2011, 34(5):1-5
DENG Wei. Aging and anti-aging market overview [J]. Detergent & Cosmetics, 2011, 34(5): 1-5
- [2] 张云青, 尹颂超, 关蕾, 等. 紫薇提取物面部去皱作用的研究[J]. 中国美容医学, 2014, 23(10):820-823
ZHANG Yun-qing, YIN Song-chao, GUAN Lei, et al. The Study of *Lagerstroemia Indica* extractive on facial wrinkle [J].

- Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2014, 23(10): 820-823
- [3] 董萍,杨永鹏,郝林琳,等.活性生物多肽类化合物在皮肤美容与抗衰老化妆品中的应用研究进展[J].中国化妆品, 2014,3:70-80
DONG Ping, YANG Yong-peng, HAO Lin-lin, et al. The application research progress of active biological polypeptide compound on skin beauty and anti-aging cosmetics [J]. China Cosmetics Review, 2014, 3: 70-80
- [4] PENG Zhe, HOU Hu, BU Lin, et al., Nonenzymatic softening mechanism of collagen gel of sea cucumber (a *Postichopus Japonicus*) [J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2015, 39(6): 2322-2331
- [5] 张梅秀,王锡昌,刘源.海参生物活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2012,24:1151-1159
ZHANG Mei-xiu, WANG Xi-chang, LIU Yuan. Advances on the research of sea cucumber biological activities [J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24: 1151-1159
- [6] Peck L K, Mashitah M. Jewel of the seabed: sea cucumbers as nutritional and drug candidates [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2012, 63(5): 616-636
- [7] 吉爱国,宋淑亮,梁浩.一种化妆品添加剂及其制备方法与应用:中国,201210007434.5[P]2012-1-11
JI Ai-guo, SONG Shu-liang, LIANG Hao. The Sea cucumber peptide sugar, preparation method and application of a cosmetics additive: China, 201210007434.5 [P] 2012-1-11
- [8] 李伟,佟长青,曲敏,等.海参糖肽、制备方法及其在制备化妆品中的应用:中国,201210248315.9[P] 2012-7-18
LI Wei, TONG Chang-qing, QU Min, et al. The sea cucumber peptide sugar, preparation method and application in the preparation of cosmetics: China, 201210248315.9 [P] 2012-7-18
- [9] LI Feng-feng, LIU Shen, OUYANG Yuan-ming, et al. Effect of celecoxib on proliferation, collagen expression, ERK1/2 and SMAD2/3 phosphorylation in NIH/3T3 fibroblasts [J]. European Journal of Pharmacology, 2012, 678(1-3): 1-5
- [10] Rodriguez-Pinon M, Tasende C, Casuriaga D, et al. Collagen and matrix metalloproteinase-2 and-9 in the ewe cervix during the estrous cycle [J]. Theriogenology, 2015, 84(5): 818-826
- [11] 朱洪珍,刘淑集.海地瓜中具吸湿保湿特性的胶原蛋白肽提取工艺研究[J].福建水产,2011,12(5):24-29
ZHU Hong-zhen, LIU Shu-ji. Study on extracting collagen peptides with characters of moisture retention and absorption capacity from *Acaudina Molpadioides* [J]. Journal of Fujian Fisheries, 2011, 12(5): 24-29
- [12] 姜春芳,蔡江佳,苏秀榕.白肛海地瓜双酶水解物的制备及其对人皮肤细胞的生长和胶原蛋白合成的作用[J].食品工业科技,2014,3:23-28
JIANG Chun-fang, CAI Jiang-jia, SU Xiu-rong. Preparation of acaudina leucoproata Dual-enzymatic hydrolysates and influence on collagen synthesis of human dermal fibroblasts [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 3: 23-28
- [13] Yasui Takeshi, YONETSU Makoto, TANAKA Ryosuke, et al. *In vivo* observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr: Forsterite laser [J]. Journal of Biomedical Optics, 2013, 18(3): 031108
- [14] XIA Wei, QUAN Taihao, Hammerberg, et al. A mouse model of skin aging: fragmentation of dermal collagen fibrils and reduced fibroblast spreading due to expression of human matrix metalloproteinase-1 [J]. Journal of Dermatological Science, 2015, 78(1): 79-82