

基于代谢组学分析一种复合肽对小鼠全层皮肤缺损模型愈合的改善作用

余婧婷, 程小英, 詹扬, 万建华, 李颖萌, 刘文君*

(江中药业股份有限公司科研中心 江西南昌 330096)

摘要: 研究了一种由小麦低聚肽、海洋鱼皮胶原低聚肽等组成的复合肽对小鼠全层皮肤缺损模型的愈合作用及其机制。成功构建小鼠全层皮肤缺损伤口模型后给予复合肽干预, 在治疗后第4、14天, 取小鼠背部皮肤分别进行HE染色观察伤口病理变化, CD34免疫荧光观察组织的血管生成情况。利用超高效液相色谱与质谱联用进行血清代谢组学检测, 进行代谢轮廓分析和OPLS-DA分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)综合分析。在造成创伤后的第4、6、8天, 复合肽组的伤口愈合率分别达到了为59%、74.1%、80.9%, 明显超过模拟组; 此外复合肽组的肉芽组织更加成熟, CD34阳性细胞的荧光数目也有所增长。在复合肽组中筛选出14个差异代谢物上调, 20个差异代谢物下调; KEGG分析显示复合肽组在牛磺酸和次牛磺酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成等6条通路中显著富集。该复合肽可以显著缩短小鼠全层皮肤缺损伤口的修复时间, 可能是通过促进毛细血管生成, 促进蛋白的合成来加速伤口愈合。

关键词: 复合肽; 伤口愈合; 代谢组学; 牛磺酸代谢

文章编号: 1673-9078(2024)10-125-135

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1142

Improvement Effect of a Composite Peptide on Wound Healing in a Mouse Full-thickness Skin Defect Model Based on Metabolomics Analysis

YU Jingting, CHENG Xiaoying, ZHAN Yang, WAN Jianhua, LI Yingmeng, LIU Wenjun*

(Research Center, Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330096, China)

Abstract: A mouse full-thickness skin defect model was established to analyze the healing effect of a composite peptide comprising wheat oligopeptide and marine fish skin collagen oligopeptide. On the 4th and 14th days after the intervention, pathological changes in the wound were assessed by subjecting the skin taken from the back of mice to H&E staining; the extent of angiogenesis was determined based on CD34 expression (estimated by immunofluorescence). Serum metabolomic profiles were obtained using ultra-high-performance liquid chromatography and mass spectrometry to screen for differential metabolites whose expression was significantly altered. Metabolic profile analysis, OPLS-DA analysis,

引文格式:

余婧婷,程小英,詹扬,等.基于代谢组学分析一种复合肽对小鼠全层皮肤缺损模型愈合的改善作用[J].现代食品科技,2024,40(10):125-135.

YU Jingting, CHENG Xiaoying, ZHAN Yang, et al. Improvement effect of a composite peptide on wound healing in a mouse full-thickness skin defect model based on metabolomics analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 125-135.

收稿日期: 2023-09-21

基金项目: 南昌市高层次科技创新人才“双百计划”(批准号: (2022) 321)

作者简介: 余婧婷(1996-), 女, 硕士, 研究方向: 药理学, E-mail: yujingting@crjz.com

通讯作者: 刘文君(1985-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 临床研究、药理学, E-mail: crjzliuwenjun@163.com

and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis were performed. On the 4th, 6th, and 8th days after the injury, the wound healing rates in the composite-peptide group reached 59%, 74.1%, and 80.9% respectively, which were significantly higher than those observed in the model group. Furthermore, the granulation tissue continued to mature, and higher counts of CD34-positive cells were observed in the composite-peptide group. Metabolomic analysis showed that among differentially expressed metabolites in the composite-peptide group, 14 were upregulated and 20 were downregulated. KEGG pathway analysis showed that the composite peptides were significantly enriched for six pathways, i.e., taurine and hypotaurine metabolism, arginine and proline metabolism, and primary bile acid biosynthesis (compared to the model group). Thus, composite peptides can reduce the repair time of full-thickness skin defects in mice, possibly by promoting capillary formation and protein biosynthesis to accelerate wound healing.

Key words: composite peptide; wound healing; metabolomics; taurine metabolism

皮肤作为人体最大的器官，具有保护内脏免受病原体入侵、调节体温、维持生理稳态等作用。由烧伤、外伤和慢性疾病引起的皮肤伤口（如压疮、糖尿病足、静脉溃疡）不仅对患者的生活质量和健康产生严重的负面影响，而且会造成重大的经济和社会负担。伤口的愈合过程复杂，一般包括止血、炎症、增殖和皮肤重塑四个步骤，这些步骤在时间和空间上均有重叠^[1]。然而，目前人们仍然缺乏对伤口愈合过程和机制的完整了解；尤其如何实现加快伤口愈合仍然是临床上面临的重大挑战。

胶原蛋白是动物结缔组织中的主要成分，在美妆、功能性食品、组织工程以及抗糖尿病药物等方面应用广泛^[2]。人们发现来自海洋动物的胶原蛋白由于其独特的生理功能和物化特性，在某些方面优于陆生动物胶原蛋白^[3]。鱼类、水母、海绵等海洋生物是海洋胶原蛋白的重要来源，海洋胶原蛋白肽（MCPs）是由海洋胶原蛋白通过化学或者酶的水解得到^[4]，而低分子量的 MCPs 比胶原蛋白更易于吸收。近年来 MCPs 的研究也取得了很大进展，主要涉及调节代谢和组织修复方面，包括改善糖尿病患者^[5]、高血压患者^[6]、肥胖者^[7]以及转基因小鼠^[8]的脂质代谢，以及促进伤口愈合和血管生成等^[9]。

初元复合肽特殊膳食营养液 I 型（简称复合肽）主要成分包括小麦低聚肽、海洋胶原蛋白肽和酪蛋白磷酸肽等。小麦低聚肽是从小麦蛋白水解物中获得的一种生物活性寡肽，具有抗炎^[10]、抗氧化^[11]作用；复合肽中的 MCPs 是由深海三文鱼皮为原料制成的小分子低聚肽，体外相关研究表明，MCPs 具有促进细胞增殖和迁移能力^[12]；体内研究表明，口服 MCPs 在切除全层皮肤的伤口动物模型中具有显著促进伤口愈合的作用^[13]。酪蛋白磷酸肽是磷酸化的肽，来源于酪蛋白的酶水解，可以加强矿物质元素的吸收和利用^[14]，促进骨胶原的生物合成^[15]。这

些小分子肽组合在一起，在伤口愈合的炎症期发挥抗炎抗氧化作用，在增殖期发挥促进细胞增殖的作用，在重塑期促进营养物质的吸收，协同发挥促进伤口愈合的作用。

尽管近年来在研究小分子肽方面有很多工作，但很少有研究系统地研究海洋胶原蛋白肽与其它肽类的组合物。本研究旨在评估初元 I 型复合肽对伤口愈合的影响，并通过代谢组学分析探究相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物实验材料和设备

初元复合肽特殊膳食营养液 I 型（江中药业），手术器械（上海医疗器械集团有限公司手术器械厂），高清工业相机（卡尔斯特）。

1.2 实验动物

雄性昆明小鼠，体质量 20~22 g，6~8 周龄，由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供，许可证号为 SCXK（苏）2018-0008。小鼠饲养在江中药业动物实验中心，许可证号为 SYXK（赣）2020-004，于清洁级环境中饲养。实验室温度（24±2）℃；相对湿度 45%~65%；光照周期：12 h（日）/12 h（夜）。所有动物实验均严格按照江中药业实验动物管理和伦理委员会的规定进行。

1.3 全层皮肤缺损模型的建立及药物干预

1.3.1 实验分组

将 32 只小鼠分为两组，分别为模型组和复合肽组，每组 16 只。

1.3.2 麻醉及脱毛

用异氟烷对小鼠进行麻醉，待小鼠麻醉后，使用剃毛器剃除小鼠背部毛发，使后背暴露约 2 cm×2 cm

的区域。之后在使用脱毛膏进行脱毛, 3~5 min 后, 用棉花沾温水将背部脱毛膏清洗干净, 随后再用干棉花擦干背部水分。

1.3.3 切除皮肤

使用碘伏在小鼠背部实验区域进行清洁消毒, 之后使用直径为 6 mm 皮肤取样器在小鼠背部(基本确保每只造模位置相同)旋转下压, 形成小缺口后, 使用眼科镊以及眼科剪将皮肤剔除, 形成直径为 6 mm 的圆形伤口。

1.3.4 伤口面积测量

将小鼠平放, 使用工业高清相机在同一高度进行拍照并进行初次伤口测量。

1.3.5 药物干预

模型组小鼠给予生理盐水灌胃, 阳性对照组给予雅培快愈素灌胃, 复合肽组给予初元 I 型灌胃。每两天进行伤口面积测量。采用异氟烷麻醉小鼠, 在同样的高度进行拍照, 进行伤口面积测量。

1.3.6 伤口愈合率 (Wound Healing Rate, WHR) 的计算

$$B = \frac{A_0 - A_n}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B ——伤口愈合率 (WHR), %;

A_0 ——造模后第 0 天伤口面积, mm^2 ;

A_n ——测量当天伤口面积 mm^2 ;

n ——造模后的天数。

1.3.7 取样

给药后 4 d、14 d 剪取小鼠整个创面的组织置于 4% 多聚甲醛固定; 14 d 小鼠眼眶取血, 留血样。

1.4 病理学和免疫组织化学分析

切除小鼠伤口处新生皮肤, 将皮肤组织固定于多聚甲醛中并包埋在石蜡中。制备石蜡包埋的皮肤的 5 μm 切片用于进一步实验。H&E 染色用于检查皮肤损伤。对于免疫荧光, 将切片与抗 CD34 蛋白抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育。所有结果均通过显微镜观察。

1.5 代谢组学分析

进行样品处理和代谢组学检测, 将来自模型组 M (N=8, N 为样本数量) 和复合肽组 CY (N=8) 的血清样品用提取液 (甲醇: 乙腈=1:1) 提取, 涡旋混匀 30 s, 冰上超声萃取 10 min, 将样品于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离

心 15 min, 取上清检测, 通过超高效液相色谱-质谱 (UHPLC-MS) 在正、负或极性离子模式下进行分析。采用 Vanquish 超高效液相色谱 (Thermo Fisher Scientific) 与 Thermo Q Exactive HFX 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific) 连接的液质联用系统, 进行样本检测。质谱在正、负离子 (ESI+ 和 ESI-) 模式下运行。采用的色谱柱为 Acquity UPLC BEH Amide 柱 (Waters, MA), 规格为 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm , 溶剂体系为水 (25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水, A 相): 乙腈 (B 相), 梯度洗脱程序为 0~3 min: 0~20% B, 3~9 min: 20%~60% B, 9~11 min: 60%~100% B, 100% B 维持 2.5 min, 13.5~13.6 min: 100% to 0% B, 0% B 维持 2.4 min。流速为 0.40 mL/min, 进样量 20 μL , 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。通过控制软件 (Xcalibur, Thermo) 进行数据采集。

使用 ProteoWizard 软件将原始 UHPLC-MS 数据文件转换为 MZXML 格式, 使用自主编写内核为 XCMS 的 R 程序包用于执行峰提取、对齐和保留时间校正。

1.6 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。数据均符合正态分布, 数据用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SEM) 表示, 采用 t 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 表示结果有显著差异, $P < 0.01$ 表示结果有极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 创面形态变化观察

小鼠全层皮肤缺损模型多用于研究各种干预对糖尿病创面愈合的影响^[6], 本研究采用在小鼠背部建立全层皮肤缺损模型, 来探究该复合肽对伤口愈合的影响。图 1 所示为每个时间点模型组和复合肽组小鼠背部的伤口照片。可以观察到, 在造模后第 2 天, 复合肽组的小鼠背部已开始结痂, 无组织液渗出; 而在造模后的第 4 天, 模型组小鼠的伤口才开始结痂。在造模后的第 4~10 天, 伤口进入快速愈合期, 随着时间进展创面的结痂不断变硬, 并且创缘皮肤有较明显的收缩。肉眼可以观察到, 复合肽组小鼠的伤口皮肤收缩速度优于模型组。在造模的第 12 天, 两组大部分的小鼠皆已掉痂, 创面四周开始生长毛发, 结痂进一步缩小。造模后第 14 天, 复合肽组小鼠已经出现新生皮肤, 未产生瘢痕。

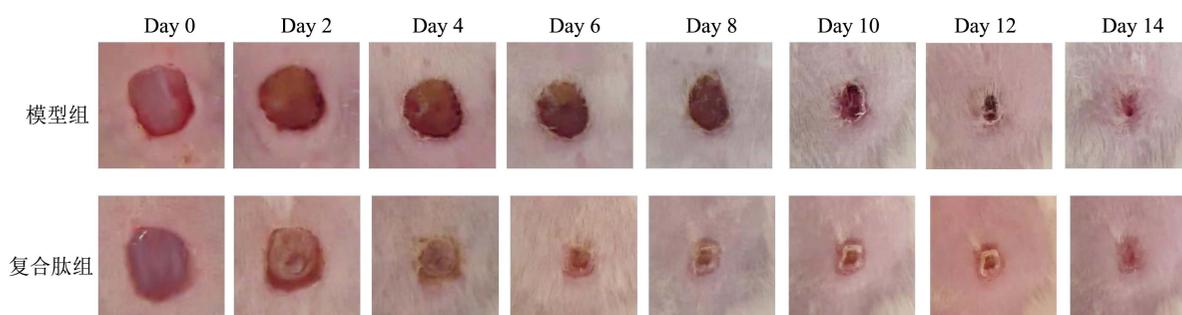


图1 全层皮肤缺损小鼠药物干预后各时间点创面愈合情况

Fig.1 Wound healing at various time points after drug intervention in mice with full-thickness skin defects

2.2 愈合率及瘢痕缩小率

造模时采用了直径6 mm的皮肤取样器在小鼠背部进行按压形成印记, 后续在沿着印记人工剪除多余皮肤组织, 由于人工操作的误差也许会使得初始创面的面积有差异, 因此我们采用了相点的愈合率表示创面愈合程度。WHR是指将原始创面面积减去相点创面面积, 再除以原始创面面积之后的百分比, 能够较为全面地比较每个时间点的伤口愈合情况^[17]。分别在第0、2、4、6、8、10、12、14天拍摄小鼠伤口, 并测量创面面积, 计算两组小鼠的WHR, 绘制伤口愈合折线图, 如图2所示。表1记录的是两组小鼠在各时间点WHR的均值。

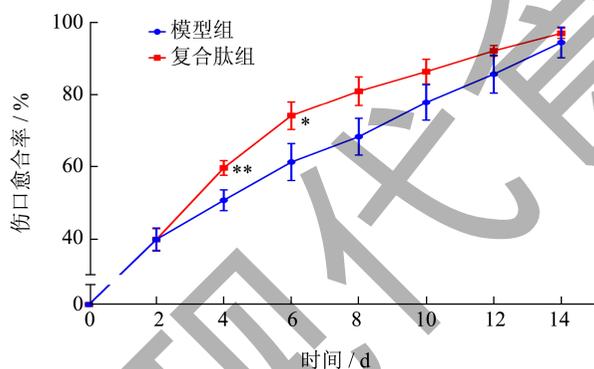


图2 伤口愈合率比较

Fig.2 Comparison of wound healing rates

由图2所知, 两组之间的伤口愈合率均在造模第2天已接近40%, 且未观察到显著性差异 ($P>0.05$)。在造模第4、6、8天, 复合肽组的愈合率持续显著高于模型组。在造模第14天, 两组伤口愈合率均达到90%以上, 伤口愈合过程基本结束, 两组之间无显著性差异 ($P>0.05$)。这些结果表明小鼠在出现创伤后给予该复合肽干预, 可以加快伤口愈合进程。

2.3 H&E染色观察小鼠伤口愈合情况

将复合肽干预治疗后第4天(图3a)和第14

天(图3b)的小鼠皮肤组织进行H&E染色, 从图a可以看到, 在第4天的时候两组伤口均未愈合完全, 在真皮组织全层中开始观察到肉芽组织。其中模型组中的肉芽组织发育不完全, 并伴有强烈的淋巴细胞炎症浸润和间质水肿; 相比之下, 复合肽组小鼠创面边缘的全层皮肤及皮下组织向中心移动, 创面逐渐减小, 虽然也存在不同程度的炎细胞浸润, 但与模型组相比肉芽组织更加成熟, 说明复合肽具有一定的促进伤口愈合作用。

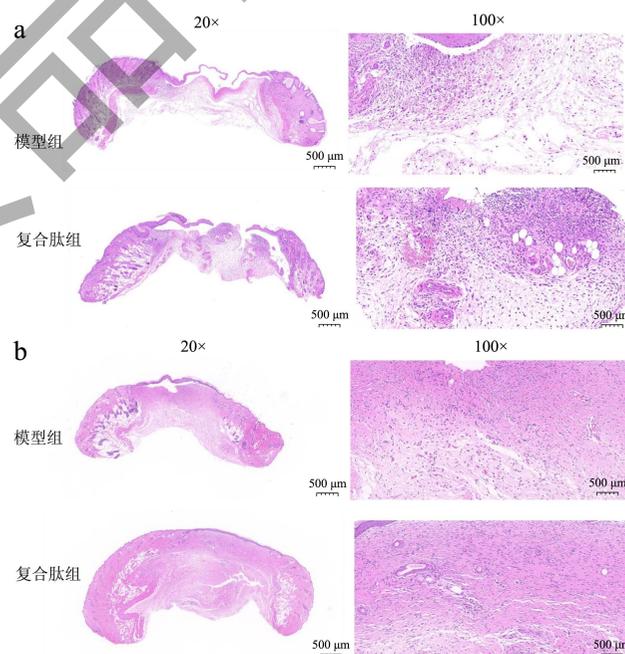


图3 药物干预后第4天(a)和第14天(b)伤口组织的H&E染色

Fig.3 H&E staining of wound tissue on the 4th day (a) and 14th day after drug intervention

2.4 皮肤组织中CD34的表达

CD34是一种在多种干/祖细胞中表达的细胞表面抗原, 是评估体内血管重建状况的经典标志物^[18]。如图4所示, 伤口愈合过程中均有一定量

的新生血管生成, 其中复合肽组的红色荧光较模型组多, 说明复合肽显著增加了新生血管的数量, 意味着复合肽可能促进了血管生成和血管网络重建。

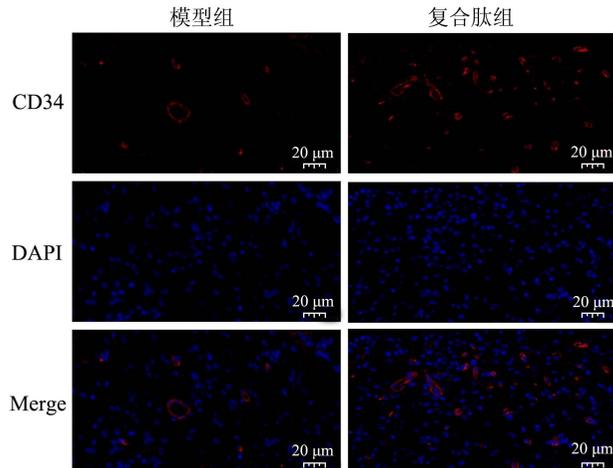


图4 伤口组织的 CD34 免疫荧光染色 (400×)

Fig.4 CD34 immunofluorescence staining of wound tissue (400×)

注: DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚) 用来标记细胞核, 显蓝色荧光; CD34 显红色荧光。

2.5 代谢组学分析

2.5.1 小鼠血清代谢轮廓分析

当机体受到刺激(营养因素、压力、环境、药物等)的干预而在体内产生或转化成不同的小分子物质, 代谢组学技术就可以通过现代分析平台对生物体液中的小分子进行记录、鉴定和定量^[19]。在过去十年中, 代谢组学技术不断发展并广泛应用于越来越多的领域, 包括农业、环境化学、生物技术, 特别是临床诊断、毒理学、营养学、药物进展以及健康和疾病管理学科中, 已成为组学技术发展最快的分支之一^[20]。

近年来, 代谢组学在营养学领域越来越受到关注。该复合肽的主要成分包括海洋胶原蛋白肽, 富含多种营养成分, 为了进一步探究该复合肽促进伤口愈合作用是否与其营养机制相关, 采用代谢组学技术分析模型组和复合肽干预后的小鼠血清。我们采用液质联用系统将样本分离, 并进行数据采集, 图5显示两组小鼠血清分别在正离子和负离子模式下的质谱代表图, 可以看到, 模型组和复合肽组小鼠血清样本中的各组分在两种离子模式下可以明显分离, 各组分的峰面积和保留时间有一定差异。

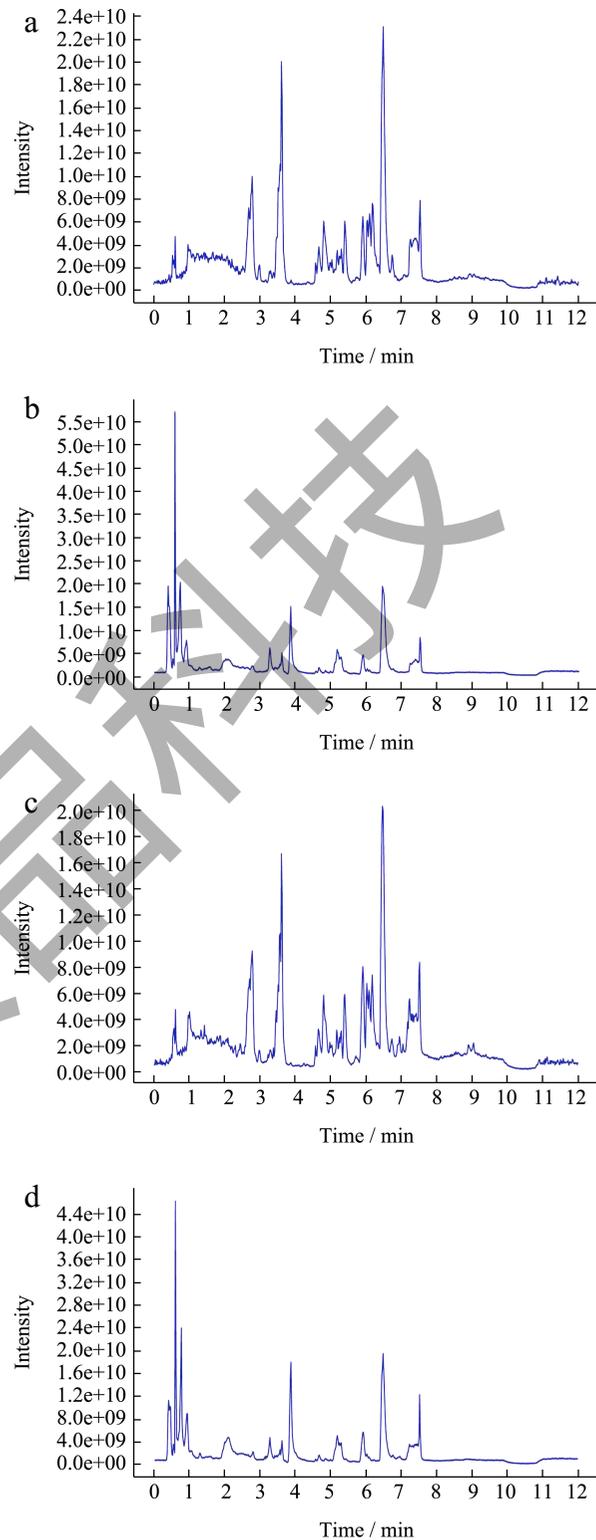


图5 模型组和复合肽组小鼠血清在正离子模式和负离子模式下的总离子流图

Fig.5 Total ion flow diagrams of serum from model group and complex peptide group mice in positive and negative ion modes

注: a、b 为模型组, c、d 为复合肽组, a、c 为正离子模式, b、d 为负离子模式。

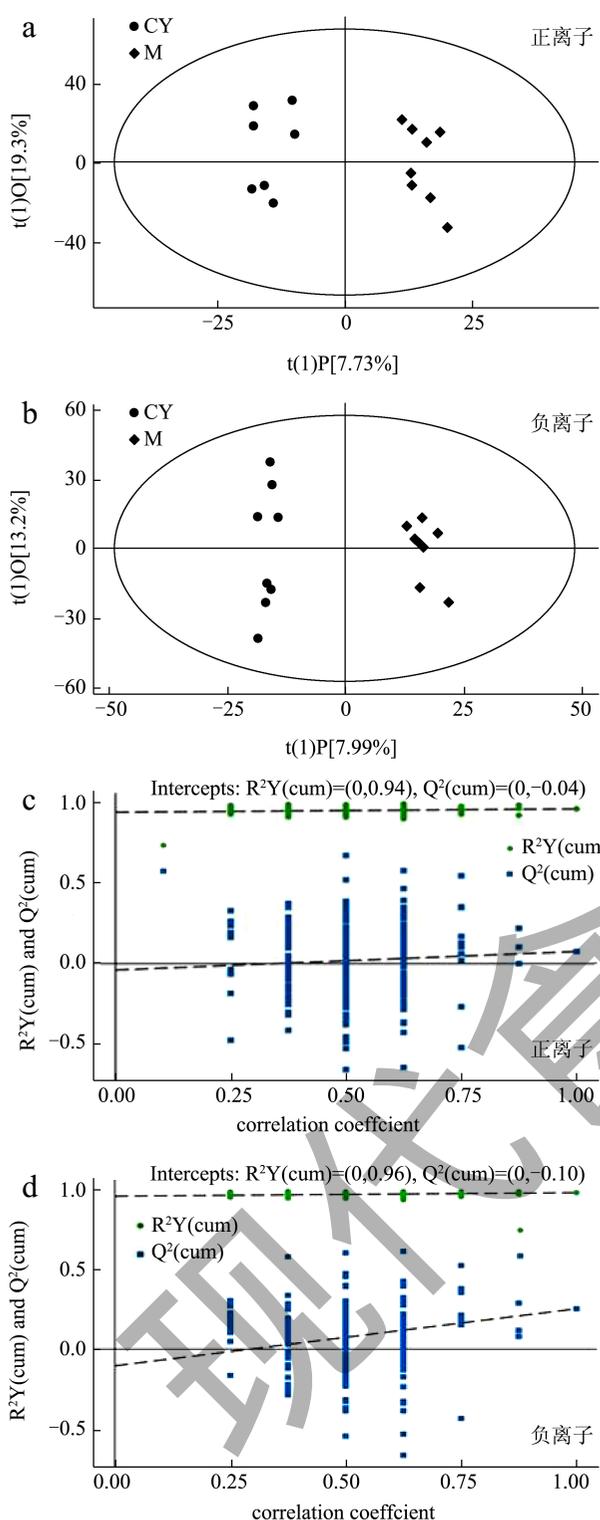


图6 复合肽对伤口愈合小鼠干预后血清代谢物的模式判别图
Fig.6 Pattern discrimination diagram of serum metabolites after complex peptide intervention in mice with full-thickness skin defect

注: (a、b) OPLS-DA 模型得分散点图; (c、d) OPLS-DA 置换检验。

2.5.2 血清代谢组学的初步分析

基于前面获得的样本代谢谱数据,对模型组和复合肽组间的差异进行正交偏最小二乘判别(OPLS-DA)分析,如图6a、6b所示,从OPLS-DA模型得分散点图中可以看出样本在两种离子模式下具有明显聚类,并且分离显著。说明与模型组相比,复合肽干预后的小鼠具有统计学上不同的血清代谢特征。为了评估该模型,进行了置换检验(图6c、6d),结果证实该模型既有效又具有预测性,可以较为好地检验模型组和复合肽组样本之间的差异。

2.5.3 差异代谢物筛选

为获取复合肽干预后血清样本中发生显著变化的代谢物,我们以投影中的变量重要度(VIP)>1,并以倍数变化(FC)>1.2或<0.8,且 $P<0.05$ 为阈值进行筛选,其中VIP值是从OPLS-DA结果获得, P 值由双尾学生 t 检验得出;最终鉴定出34种差异代谢物,脂质和类脂分子是最普遍的代谢物,代谢物中有14种相比于模型组上调,20种下调,具体信息见表1。

为了将这些差异代谢物更好地可视化展现出来,根据其特征进行层次聚类分析。如图7所示,这些代谢物以热力图进行展示,色块越红则表示含量越高,越蓝则表示含量越低。

众所周知,维持组织稳态对皮肤的伤口愈合至关重要。一些具有生物活性的脂质和细胞因子可以通过控制炎症启动免疫反应,在伤口愈合过程中起着重要作用^[21]。结合表1和图7,可以看到脂肪酸类、甘油磷脂类及鞘脂类生物活性脂质的水平显著升高。对这些差异代谢物定量分析,发现复合肽组中这些生物活性脂质的含量均显著高于模型组。由于生物活性脂质的作用主要发生在伤口愈合过程的炎症期^[22]。更有报道表明,局部使用脂肪酸类似物及其受体激动剂可以调节伤口愈合过程中的炎症和免疫反应^[23]。此外,差异代谢物中的D-甘露糖也具有抑制伤口愈合过程中的炎症反应的作用^[24]。由于复合肽在伤口愈合的第4天就开始显示出高水平的伤口愈合率,结合动物水平的结果,我们可以推断复合肽可以通过增加血清中的这些生物活性脂质及D-甘露糖的水平,在伤口愈合早期发挥抑制炎症水平的作用。

表 1 模型组和复合肽组血清中差异代谢物的筛选

Table 1 Screening of differential metabolites in serum of model group and complex peptide group

序号	代谢物		模型组 VS 复合肽组		
	英文名	中文名	VIP	P	FC
1	Allantoin	尿囊素	2.168 46	0.014 35	1.155 33
2	Sarcosine	肌氨酸	2.427 42	0.007 12	1.269 28
3	L-Proline	L-脯氨酸	2.067 78	0.024 44	1.281 28
4	Hydroxyphenyllactic acid	3-(4-羟基苯基)乳酸	2.441 15	0.012 94	1.293 42
5	2-Hydroxycinnamic acid	邻香豆酸	2.580 96	0.003 66	1.338 76
6	Succinic acid	琥珀酸	1.722 71	0.037 57	1.436 63
7	3-Hydroxycapric acid	3-羟基癸酸	2.692 9	0.002 41	1.453 48
8	Arecaidine	槟榔次碱	1.645 46	0.033 55	2.134 1
9	gamma-CEHC	有机杂环化合物	1.844 62	0.021 85	2.135 41
10	Mulberrin	桑皮素	1.984 55	0.047 94	2.685 43
11	3-Sulfinoalanine	L-半胱亚磺酸	2.415 5	0.000 65	0.265 52
12	N-Acetylleucine	N-乙酰-L-亮氨酸	2.265 06	0.004 89	0.589 81
13	Myristoleic acid	豆蔻脑酸	2.116 96	0.013 2	0.736 25
14	D-Mannose	D-甘露糖	2.059 03	0.047 96	0.736 64
15	Thioguanine	6-硫鸟嘌呤	1.846 28	0.048 42	0.773 71
16	3-(2-Furanyl)-2-propenal	2-呋喃丙烯醛	1.892 18	0.042 04	1.306 29
17	(9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid	亚麻酸及其衍生物	2.261 78	0.021 31	1.338 94
18	Creatine	肌酸	2.145 02	0.025 35	1.339 72
19	Thiomorpholine 3-carboxylate	氨基酸	1.864 34	0.043 38	1.395 74
20	L-phenylalanyl-L-hydroxyproline	L-苯丙氨酸-L-羟基脯氨酸	2.188 77	0.040 76	1.455 54
21	Ethoxyquin	乙氧基喹啉	2.558 1	0.018 05	1.483 79
22	Phenylacetyl glycine	苯乙酰甘氨酸	2.199 81	0.021 39	1.483 85
23	PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/P-18:1(11Z))	甘油磷脂类	2.441 05	0.016 36	1.493 63
24	DG(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)/0:0)	脂肪酰类	2.901 14	0.004 79	1.967 07
25	DG(14:1(9Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)	甘油脂类	2.834 02	0.001 73	2.416 57
26	Taurine	牛磺酸	1.986 69	0.020 57	0.484 28
27	Cervonyl carnitine	脂肪酸类	2.834 2	0.004 66	0.501 5
28	3-Methyldioxyindole	3-羟基-3-甲基-1H-吲哚-2-酮	2.592 06	0.013 34	0.561 98
29	PC(24:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	甘油磷脂类	1.925 95	0.022 47	0.649 03
30	SM(d17:1/24:0)	鞘脂类	2.494 88	0.007 93	0.694 18
31	SM(d18:1/22:0)	鞘脂类	2.544 78	0.006 53	0.706 2
32	Riboflavin	核黄素	2.046 53	0.022 47	0.723 14
33	PC(16:0/16:0)	甘油磷脂类	1.989 13	0.037 65	0.761 63
34	Phytosphingosine	植物鞘氨醇	2.040 6	0.041 79	0.779 33

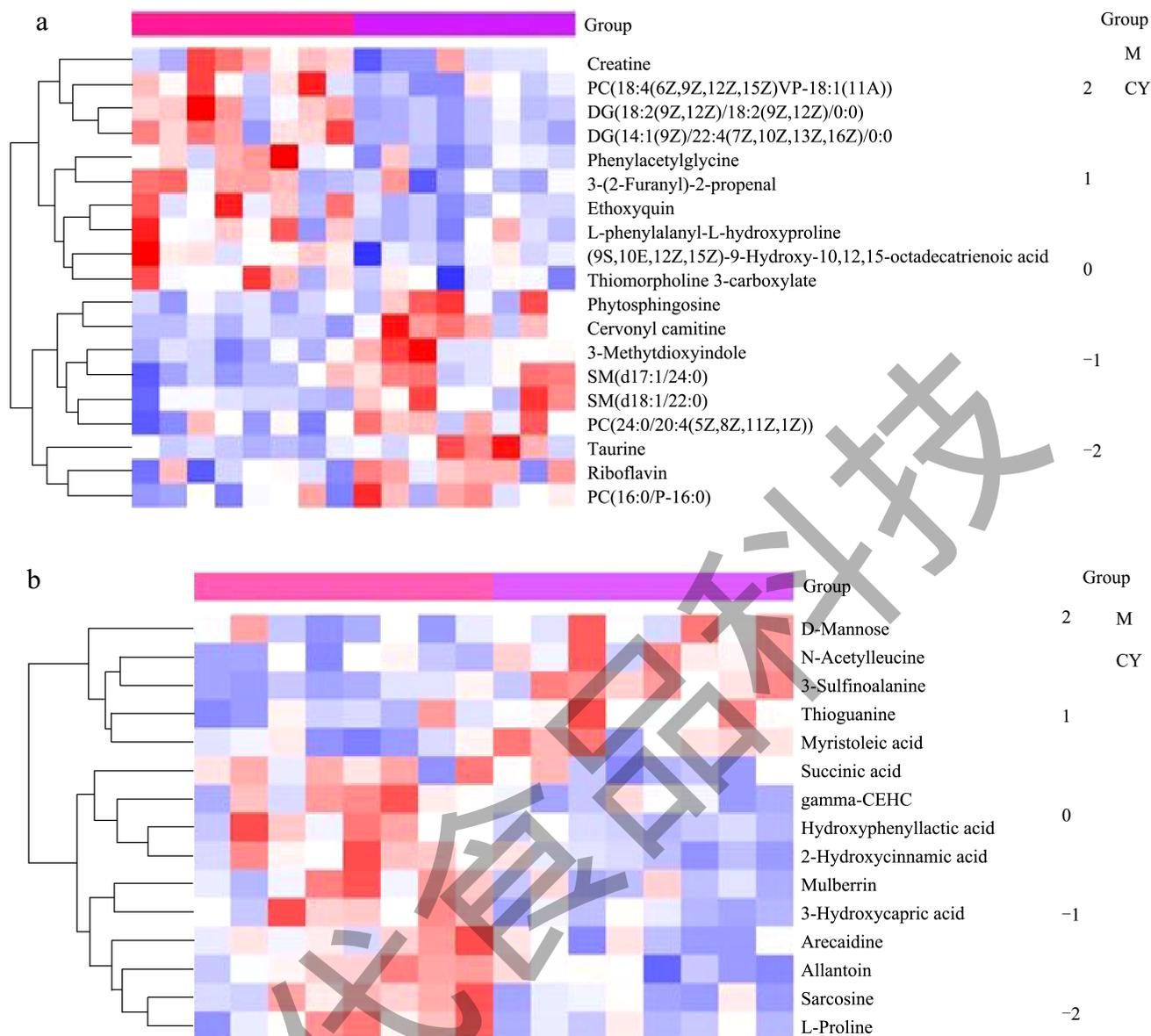


图 7 两组样本分别在 (a) 正离子、(b) 负离子模式下的层次聚类分析热力图

Fig.7 Thermal maps of hierarchical clustering analysis for two sets of samples in (a) positive and (b) negative ion mode

表 2 代谢通路信息

Table 2 Metabolic pathway information

Pathway	Total	Hits	Hits Cpd	Impact	P
牛磺酸和次牛磺酸代谢	8	2	L- 半胱亚磺酸, 牛磺酸	0.428 57	0.033 812
精氨酸和脯氨酸代谢	44	2	L- 脯氨酸, 肌酸	0.011 98	0.174 42
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	32	2	肌氨酸, 肌酸	0.060 83	0.206 77
初级胆汁酸生物合成	46	1	牛磺酸	0.029 76	0.181 7
柠檬酸循环 (TCA 循环)	20	1	琥珀酸	0.025 66	0.134 24
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	28	1	L- 半胱亚磺酸	0.023 13	0.183 23

注: Pathway——通路名称; Total——通路中代谢物总数; Hits——匹配的差异代谢物数量; Hits Cpd——命中该通路的差异代谢物名称; Impact——影响值。

2.5.4 代谢通路分析

随后对差异代谢物进行了 KEGG 分析, 进一步搜索并分析了小鼠的代谢途径数据库, 代谢途径分析结果显示在气泡图中 (图 8)。在进行富集和拓扑分析后, 标记了重要途径。这些结果表明, 几种代谢途径发生了显著变化, 包括牛磺酸和次牛磺酸代谢、核黄素代谢、鞘脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成、柠檬酸循环、半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 其中以牛磺酸和次牛磺酸的代谢通路, 富集程度最高, 说明该通路在复合肽促进伤口愈合的过程中具有重要作用。

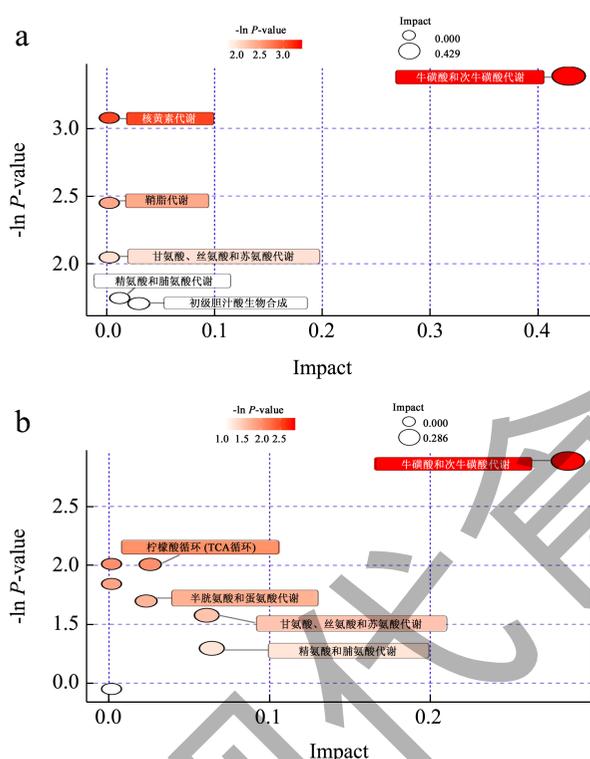


图 8 (a) 正离子和 (b) 负离子模式下的差异代谢物代谢通路分析

Fig.8 Analysis of differential metabolite metabolic pathways in (a) positive ion mode and (b) negative ion modes

以 $\text{Impact} \geq 0.001$ 为标准, 合并正、负离子的代谢通路, 得到 6 条代谢通路与复合肽促进伤口愈合密切相关, 这些通路具体信息如表 3 所示, 其中牛磺酸和次牛磺酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路匹配了两个差异代谢物。

由表 2 得知, 牛磺酸次牛磺酸以及半胱氨酸蛋氨酸代谢通路共同匹配的差异代谢物是 L- 半胱亚磺

酸, 而 L- 半胱亚磺酸是半胱氨酸代谢的中间产物。前期一项研究表明, 同型半胱氨酸代谢通路参与了雷珠单抗在调节小梁切除术后伤口愈合过程^[25]。Ho 等^[26]研究发现, 富含半胱氨酸的结构域的 Muc3 蛋白可以加速体内伤口愈合。在牛磺酸代谢途径中, 半胱氨酸可以在肝脏中通过脱羧酶和过氧化酶的作用下生成牛磺酸, 合成蛋白质以供应细胞内必须物质^[27]。此外, 含有牛磺酸的局部制剂也已被证明可以增强皮肤组织的伤口愈合^[28]。我们可以由此推断, 差异代谢物 L- 半胱亚磺酸可以通过合成牛磺酸, 一方面阻止了炎症中的过氧自由基, 从而避免对伤口的氧化破坏; 另一方面还能够促进蛋白质的合成, 促进伤口愈合进展。

在精氨酸和脯氨酸代谢通路中, 精氨酸降解能够产生脯氨酸和肌酸, 这两种代谢物也被鉴定为复合肽干预后显著改变的代谢物。由于这些氨基酸的关键性质, 精氨酸和脯氨酸代谢途径以及相关代谢物的变化可见于各种生理病理过程, 包括参与能量产生^[29], 皮肤损伤修复^[30]、加速骨折愈合^[31]等。除此之外, TCA 代谢可以合成 ATP, 提供维持机体生理功能所需能量, 而且是糖异生、脂肪合成以及氨基酸代谢等通路的重要枢纽, 参与胶原蛋白的合成^[32]。至于甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路与体内的氧化还原反应有关, 可以为机体提供能量, 发挥抗炎抗氧化的作用^[33]。

以上结果表明, 该复合肽可能是通过减少氧自由基, 促进重要蛋白的合成, 提高机体代谢水平, 为机体提供适宜的环境、材料以及所需能量, 从而加快伤口愈合过程。

3 结论

这项研究表明, 初元 I 型复合肽对伤口愈合的促进作用明显, 主要可能是通过调节伤口愈合初期的炎症反应, 主要通过激活牛磺酸次牛磺酸以及半胱氨酸蛋氨酸等代谢途径, 在伤口愈合过程中发挥抗氧化作用, 促进重要蛋白的合成, 供给细胞需要。本研究结果为后续进一步探讨该类型的海洋胶原蛋白肽复合物促进伤口愈合的作用机制提供了理论依据和研究思路。

参考文献

- [1] SINGER A J, CLARK R A. Cutaneous wound healing [J]. N Engl J Med, 1999, 341(10): 738-746.

- [2] ESER B E, GOZDE K I. Chapter 5-marine Collagen [M]. Atta ur Rahman (ed). Studies in natural products chemistry: Elsevier, 2021: 121-139.
- [3] SILVIPRIYA K, KUMAR K K, BHAT A, et al. Collagen: Animal sources and biomedical application [J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2015, 5(3): 123-127.
- [4] VIJAYKRISHNARAJ M, PRABHASANKAR P. Marine protein hydrolysates: Their present and future perspectives in food chemistry-a review [J]. RSC Advances, 2015, 5(44): 34864-34877.
- [5] ZHU C F, LI G Z, PENG H B, et al. Therapeutic effects of marine collagen peptides on chinese patients with type 2 diabetes mellitus and primary hypertension [J]. Am J Med Sci, 2010, 340(5): 360-366.
- [6] KIM S K, NGO D H, VO T S. Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents [J]. Adv Food Nutr Res, 2012, 65: 249-260.
- [7] ZHU C F, LI G Z, PENG H B, et al. Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in chinese patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2010, 35(6): 797-804.
- [8] CHEVRIER G, MITCHELL P L, RIOUX L E, et al. Low-molecular-weight peptides from salmon protein prevent obesity-linked glucose intolerance, inflammation, and dyslipidemia in *ldlr*^{-/-}/*apob*^{100/100} mice [J]. J Nutr, 2015, 145(7): 1415-1422.
- [9] ZHANG Z, WANG J, DING Y, et al. Oral administration of marine collagen peptides from chum salmon skin enhances cutaneous wound healing and angiogenesis in rats [J]. J Sci Food Agric, 2011, 91(12): 2173-2179.
- [10] YU L, LI R, LIU W, et al. Protective effects of wheat peptides against ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats: Vasodilation and anti-inflammation [J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2355.
- [11] YIN H, PAN X C, WANG S K, et al. Protective effect of wheat peptides against small intestinal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(9): 2019-2027.
- [12] YANG F, JIN S, TANG Y. Marine collagen peptides promote cell proliferation of nih-3t3 fibroblasts via nf-kappab signaling pathway [J]. Molecules, 2019, 24(22): 4201.
- [13] LIN H, ZHENG Z, YUAN J, et al. Collagen peptides derived from sipunculus nudus accelerate wound healing [J]. Molecules, 2021, 26(5): 1385.
- [14] LIU G, GUO B, SUN S, et al. Promoting the calcium-uptake bioactivity of casein phosphopeptides *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Nutr, 2021, 8: 743791.
- [15] HUANG W, LAO L, DENG Y, et al. Preparation, characterization, and osteogenic activity mechanism of casein phosphopeptide-calcium chelate [J]. Front Nutr, 2022, 9: 960228.
- [16] YAO M Y, ZHANG N, ZHANG Q, et al. effects of interleukin-4-modified gold nanozymes on the full-thickness skin defects in diabetic mice [J]. Chinese Journal of Burns, 2023, 39(1): 15-24.
- [17] JIANG H, XU Q, WANG X, et al. Preparation of antibacterial, arginine-modified ag nanoclusters in the hydrogel used for promoting diabetic, infected wound healing [J]. ACS Omega, 2023, 8(14): 12653-12663.
- [18] HASSANPOUR M, SALYBEKOV A A, KOBAYASHI S, et al. Cd34 positive cells as endothelial progenitor cells in biology and medicine [J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1128134.
- [19] HOTEA I, SIRBU C, PLOTUNA A M, et al. Integrating (nutri-)metabolomics into the one health tendency-the key for personalized medicine advancement [J]. Metabolites, 2023, 13(7): 800.
- [20] CARLOS G, DOS SANTOS F P, FROEHLICH P E. Canine metabolomics advances [J]. Metabolomics, 2020, 16(2): 16.
- [21] KENDALL A C, PILKINGTON S M, MASSEY K A, et al. Distribution of bioactive lipid mediators in human skin [J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(6): 1510-1520.
- [22] CALDER P C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man [J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(5): 1105-1115.
- [23] JARA C P, MENDES N F, PRADO T P D, et al. Bioactive fatty acids in the resolution of chronic inflammation in skin wounds [J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2020, 9(8): 472-490.
- [24] 潘自国.D-甘露糖提取纯化工艺研究[D].杭州:浙江大学, 2011.
- [25] MUNIRAH M S, HAMIMAH S A KADIR S, VASUDEVAN S. Important metabolites in maintaining folate cycle, homocysteine, and polyamine metabolism associated with ranibizumab treatment in cultured human tenon's fibroblasts [J]. Biomolecules, 2019,9(6): 243.
- [26] HO S B, DVORAK L A, MOOR R E, et al. Cysteine-rich domains of muc3 intestinal mucin promote cell migration, inhibit apoptosis, and accelerate wound healing [J]. Gastroenterology, 2006, 131(5): 1501-1517.
- [27] MEDINA M, URDIALES J L, AMORES-SANCHEZ M I. Roles of homocysteine in cell metabolism: Old and new

- functions [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(14): 3871-3882.
- [28] DEGIM Z, CELEBI N, SAYAN H, et al. An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation [J]. *Amino Acids*, 2002, 22(2): 187-198.
- [29] KULCZYNSKI B, SIDOR A, GRAMZA-MICHALOWSKA A. Characteristics of selected antioxidative and bioactive compounds in meat and animal origin products [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(9): 335.
- [30] MOSTAFAVINIA A, BIDRAM M, GOMI AVILI A, et al. An improvement in acute wound healing in rats by the synergistic effect of photobiomodulation and arginine [J]. *Lab Anim Res*, 2019, 35: 28.
- [31] SINHA S, GOEL S C. Effect of amino acids lysine and arginine on fracture healing in rabbits: A radiological and histomorphological analysis [J]. *Indian J Orthop*, 2009, 43(4): 328-334.
- [32] PALKA J, OSCILOWSKA I, SZOKA L. Collagen metabolism as a regulator of proline dehydrogenase/proline oxidase-dependent apoptosis/autophagy [J]. *Amino Acids*, 2021, 53(12): 1917-1925.
- [33] AON M A, BERNIER M, MITCHELL S J, et al. Untangling determinants of enhanced health and lifespan through a multi-omics approach in mice [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(1): 100-116 e104.

现代食品科技