

罗非鱼皮抗氧化肽联合维生素 C 对皮肤损伤的愈合作用

梁舒韵, 赵莉娜, 邓清月, 江虹锐*

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

摘要: 该研究利用秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 皮肤损伤模型, 研究了罗非鱼皮抗氧化肽 (Tilapia Skin Antioxidant Peptide, TSAP) 单独或联合维生素 C (Vitamin C, Vc) 饲喂线虫对其伤口愈合、生存率、体内活性氧 (ROS) 含量、丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 以及过氧化氢酶 (CAT) 的影响, 并利用分子对接技术解析 TSAP 与 Vc 的协同作用机理。结果表明, 与皮肤损伤模型组相比, TSAP 单独或联合 Vc 均能显著提高线虫的伤口愈合率和生存率 ($P<0.05$)。其中, TSAP 与 Vc 联合饲喂的线虫在伤口损伤 6 h 后的愈合率 (21.84%) 和损伤后 144 h 的生存率 (43.33%) 显著高于 TSAP 或 Vc 单独饲喂组 (其中 TSAP 组的伤口愈合率为 14.11%, 生存率为 20.00%; Vc 组的伤口愈合率为 14.40%, 生存率为 20.00%, $P<0.05$)。与皮肤损伤模型组、TSAP 组和 Vc 组相比, TSAP 与 Vc 联合饲喂线虫的细胞内 ROS (34.28%) 和 MDA 含量 (44.47%) 显著降低 ($P<0.05$), SOD (45.24%) 和 CAT 活力 (106.57%) 显著增加 ($P<0.05$); 分子对接结果表明, TSAP 与 Vc 通过 Gly3、Arg8 与烯二醇的氢键作用形成复合物, 对线虫损伤愈合产生协同作用。综上所述, TSAP 和 Vc 联合饲喂可调控线虫的氧化应激水平, 协同促进其伤口愈合。

关键词: 罗非鱼皮胶原蛋白; 抗氧化肽; 维生素 C; 伤口愈合; 秀丽隐杆线虫模型

文章编号: 1673-9078(2023)06-10-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0696

Synergistic Healing of Skin Injuries by Tilapia Skin Antioxidant Peptide and Vitamin C

LIANG Shuyun, ZHAO Lina, DENG Qingyue, JIANG Hongrui*

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was used to investigate the impact of combining tilapia skin antioxidant peptide (TSAP) with vitamin C (Vc) for healing skin injuries. The survival rate, reactive oxygen species (ROS) content, malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity, and catalase (CAT) activity of *C. elegans* were determined and the synergistic healing mechanism of TSAP and Vc was analyzed by molecular docking. The healing and survival rates of *C. elegans* in the treated groups (either TSAP alone or TSAP and Vc) were significantly higher than those in the control ($P<0.05$). The healing rate after 6 hours (21.84%) and survival rate after 144 hours (43.33%) obtained for *C. elegans* fed with TSAP and Vc were significantly higher than those of *C. elegans* fed with TSAP or Vc alone (healing rate of 14.11% and survival rate of 20.00% for TSAP-treated nematodes, $P<0.05$). Compared with the control, the intracellular ROS (34.28%) and MDA contents (44.47%) of *C. elegans* fed with TSAP and Vc decreased significantly ($P<0.05$), whereas the SOD (45.24%) and CAT activities (106.57%) significantly increased ($P<0.05$). Molecular docking analysis revealed that hydrogen bonds between Gly3, Arg8, and enediol enhance the synergistic healing effect.

引文格式:

梁舒韵, 赵莉娜, 邓清月, 等. 罗非鱼皮抗氧化肽联合维生素 C 对皮肤损伤的愈合作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 10-17.

LIANG Shuyun, ZHAO Lina, DENG Qingyue, et al. Synergistic healing of skin injuries by tilapia skin antioxidant peptide and vitamin C [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 10-17.

收稿日期: 2022-05-31

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目 (桂科 ZY21195013)

作者简介: 梁舒韵 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 654243104@qq.com

通讯作者: 江虹锐 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: hrjiang@gxu.edu.cn

Conclusively, it is revealed that combining TSAP with Vc has a synergistic effect in terms of oxidative stress level regulation and healing activity in *C. elegans*.

Key words: tilapia skin collagen; antioxidant peptide; vitamin C; wound healing; *Caenorhabditis elegans*

伤口愈合与细胞氧化还原平衡密切相关^[1], 活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 参与了伤口的发生、愈合过程, 当 ROS 过量时会造成上皮细胞的氧化应激损伤, 导致细胞凋亡或坏死从而抑制皮肤的愈合能力^[2]。抗氧化剂可以调控细胞的氧化应激反应, 使细胞内 ROS 达到伤口愈合所需要的水平, 从而加速伤口愈合^[3]。通过口服食源性抗氧化剂以促进机械损伤^[4]、紫外损伤^[5]、胃肠道黏膜糜烂^[6]等伤口的愈合逐渐被人们所关注。研究发现, 抗氧化剂之间具有协同效应, 两种或多种抗氧化剂复合后的抗氧化活性要比单一抗氧化剂有更好的抗氧化效率^[7]。饶胜其等^[8]发现鸡蛋清蛋白肽联合大豆蛋白肽对清除自由基有协同作用。李西栋等^[9]发现山楂原花青素和维生素 C (Vitamin C, Vc) 联合对减轻胰岛素引起的大鼠肝脏氧化应激反应的能力优于单独使用山楂原花青素。

罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 是我国淡水养殖的重要鱼种, 其加工鱼片已成为主要的出口水产品之一^[10]。罗非鱼皮作为加工副产品, 生产的胶原蛋白多肽具有安全高、易吸收的特点, 因此逐渐被用于功能性食品的开发和研究中^[11]。罗非鱼皮胶原蛋白中获得的抗氧化肽已被证实具有良好的抗氧化活性。夏光华等^[12]通过利用碱性蛋白酶和胰蛋白酶制备的罗非鱼皮多肽具有较强的清除自由基的能力。Zhang 等^[13]发现罗非鱼皮多肽通过提高抗氧化酶活力, 降低脂质过氧化保护糖尿病小鼠胰腺细胞免受氧化损伤。姜速峰等^[14]发现罗非鱼皮水解液可以促进 HaCaT 细胞的增殖和划痕愈合, 作用机制可能与其抗氧化活性有关。罗非鱼皮多肽主要通过减少炎症因子的表达^[15]和上调生长因子^[16]来促进皮肤损伤愈合。Vc 作为一种强还原剂和人体内多种酶的辅助因子, 因其在伤口愈合的细胞凋亡阶段^[17]、抗氧化过程^[18]、胶原合成^[19]等方面都发挥着重要的作用而被广泛地应用于皮肤损伤修复中。但是, 罗非鱼抗氧化肽联合 Vc 对皮肤损伤愈合是否具有协同作用及其作用机理还未见报道。

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 皮肤结构由单层多核上皮细胞组成^[20], 虽然其皮肤结构与哺乳动物不同, 但在创伤反应和修复方面表现出了很多相似之处^[21], 因此线虫已作为研究伤口愈合的模型生物之一^[22]。本研究以秀丽隐杆线虫为皮肤

损伤模型, 研究罗非鱼皮抗氧化肽 (Tilapia Skin Antioxidant Peptide, TSAP) 与 Vc 联合作用对线虫伤口愈合、生存率、细胞内 ROS 含量、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量以及抗氧化酶活性的影响, 并结合分子对接技术探讨 TSAP 与 Vc 协同抗氧化的作用机理, 为罗非鱼皮抗氧化肽的皮肤损伤修复功能食品的开发提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生型 N2 秀丽隐杆线虫、大肠杆菌 OP50 (尿嘧啶营养缺陷型), 美国线虫遗传中心。

罗非鱼皮抗氧化肽 (Tilapia Skin Antioxidant Peptide, TSAP, 一级结构 PMGLMGPR, 来源于罗非鱼胶原蛋白 α -2(I)链前体的 80~87 位), 纯度 $\geq 98\%$, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Vc (纯度 $\geq 99.7\%$), 国药集团化学试剂有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl, DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid), ABTS)、玻璃棉, 上海麦克林生化科技有限公司; 台盼蓝染色剂 (质量分数 0.4%), 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 5-氟-2'-脱氧尿苷, 上海阿拉丁生化科技有限公司; 微量丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒 (TBA 法)、总超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 测定试剂盒 (WST-1 法)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 盐酸左旋咪唑, 北京索莱宝科技有限公司; H_2DCF -DA 探针, 美国 Sigma 公司; BCA 试剂盒, 碧云天生物技术公司; 线虫生长培养基 (Nematode Growth Medium, NGM), 上海瑞楚生物科技有限公司; M9 缓冲液, 上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Centrifuge 5418R 台式高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Mgc-450hp-2 恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; YX280 高压蒸汽灭菌锅, 上海三申医疗器械有限公司; KQ3200B 超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司; Infinite M200 PRO 光

栅型多功能微孔板检测仪, 奥地利 TECAN 公司; S9E 体视显微镜, Leica 公司; DMi8 manual 倒置荧光显微镜, 德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 体外抗氧化活性测定

参照 Sompinit 等^[23]的方法测定样品 DPPH 自由基清除能力; 参照 Yang 等^[24]的方法测定 ABTS⁺自由基清除能力; 参考 Wang 等^[25]的方法测定羟基自由基清除能力。

1.3.2 线虫的同期化与实验分组

将线虫置于 NGM 培养基上, 于 21 °C 培养至产卵期, 待其产卵后, 挑出成虫。虫卵饲喂 OP50, 于 21 °C 培养 12 h。用 M9 缓冲液冲洗培养基上的线虫, 收集于 1.5 mL 离心管中, 经 600 r/min 离心 2 min, 弃上清, 重复清洗两次, 收集同期化线虫沉淀, 用于后续实验。

将 OP50-M9 缓冲液 (OD 值 2.00) 配制终浓度为 20 μg/mL 的 TSAP (TSAP 组)、20 μg/mL Vc (Vc 组) 以及 20 μg/mL TSAP+20 μg/mL Vc (TSAP+Vc 组) 溶液, 并吸取 200 μL 各实验组溶液分别涂布于 NGM 培养基上。将同期化线虫转移至实验组 NGM 培养基进行饲喂, 每集约 100 只线虫。经 21 °C 培养 46 h 后, 用 M9 缓冲液收集线虫于 1.5 mL 离心管中, 600 r/min 离心 2 min, 弃上清, 重复两次, 合并收集的线虫沉淀用于皮肤损伤实验及后续指标的测定。以经损伤处理的饲喂 OP50 的同期化线虫作为 Model 组; 以不进行损伤处理的饲喂 OP50 的同期化线虫作为 Control 组。

1.3.3 线虫的皮肤损伤

参考 Pooranachithra 等^[26]的方法稍作修改。吸取 25 μL 各实验组作用后的线虫沉淀 (密度约每微升 10 000 只) 并转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 25 μL 含有 0.25 g/mL 无菌玻璃棉碎片的 M9 缓冲液后, 冰浴超声 15 s, 于 600 r/min 离心 2 min, 弃上清, 重复两次, 收集损伤的线虫沉淀用于后续实验。

1.3.4 伤口愈合率的计算

从各实验组分别随机挑取 20 只线虫, 利用质量分数 0.01% 台盼蓝溶液于 20 °C 对线虫进行避光染色 15 min。染色后的线虫经 M9 缓冲液清洗 3 次, 于倒置显微镜分别观察损伤后 0 h 和 6 h 的线虫, 并计算台盼蓝染色面积。按式 (1) 计算伤口愈合率。

$$H = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

H ——伤口愈合率, %;

A_0 ——损伤后 0 h 的线虫台盼蓝染色面积;

A_1 ——损伤后 6 h 的线虫台盼蓝染色面积。

1.3.5 生存率的测定

参考 Pooranachithra 等^[22]的方法稍作修改。将线虫 ($n=10$) 挑至 24 孔板中, 每孔加入 500 μL 含 150 μmol/L 5-氟尿嘧啶的 M9 缓冲液并加入 10 μL 大肠杆菌菌液, 至 Model 组的生存率为零时, 记录各组线虫的存活数量。

1.3.6 ROS 含量的测定

将 100 μL H₂DCF-DA (100 μmol/L) 加入 100 μL 线虫中, 37 °C 避光孵育 30 min 后, 3 000 r/min 离心除去上清, 线虫沉淀经 M9 缓冲液清洗 3 次后, 于激发波长 485 nm、发射波长 530 nm 测定线虫细胞内 ROS 荧光强度, 并利用 BCA 试剂盒测定等量线虫沉淀的蛋白质含量, 对荧光强度进行归一化分析, 实验结果以 ROS 相对含量 (%) 表示。同时, 挑取 10 条经 H₂DCF-DA 染色后的线虫, 于 10 mmol/L 盐酸左旋咪唑麻醉后, 放置于质量分数 2% 琼脂糖垫上, 利用荧光倒置显微镜拍照。

1.3.7 抗氧化酶活力和 MDA 含量的测定

将 50 μL 线虫重悬于 500 μL 的 M9 缓冲液中, 用玻璃匀浆器于 4 °C 研磨 2 min。匀浆液经 10 000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 参照试剂盒说明书对线虫体内 MDA 含量、SOD、CAT 活力进行测定。

1.3.8 分子对接

Vc (CID:54670067) 的三维结构取自 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。TSAP 的结构利用 PEP-FOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) 进行预测。采用 AutoDock 4.0 进行分子对接, 并通过 PyMOL 软件对 TSAP 与 Vc 的相互作用进行可视化处理。

1.4 数据统计与分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行单因素方差分析, 数据以平均值±标准差表示, $P < 0.05$ 表示显著差异。Image J 软件对台盼蓝染色面积进行定量。实验结果图采用 Origin Pro 8.6.1 绘制。

2 结果与讨论

2.1 罗非鱼皮胶原蛋白肽 TSAP 的体外抗氧化活性

TSAP (0.1 mg/mL) 的 DPPH 自由基清除率、

ABTS⁺自由基清除率以及羟基自由基清除率分别为48.46%、90.66%和52.73%。相较于Ren等^[27]发现罗非鱼胶原蛋白抗氧化肽(KPFGSGAT)羟基自由基清除率IC₅₀浓度剂量(0.76 mg/mL), Wang等^[28]经分离纯化得到的黄鱼胶原蛋白抗氧化肽(GFPSG) ABTS⁺自由基清除率和DPPH自由基清除率的IC₅₀浓度剂量(分别为0.21、0.28 mg/mL), 本实验中TSAP的剂量浓度具有较高的自由基清除活性。

2.2 罗非鱼皮抗氧化肽联合 Vc 对皮肤损伤

愈合作用的影响

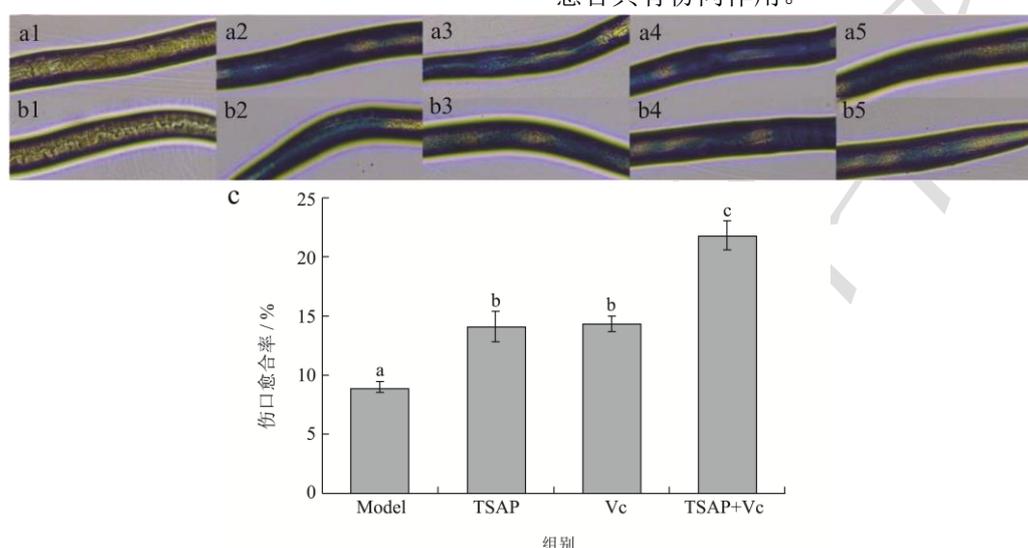


图1 TSAP 和 Vc 处理对线虫伤口愈合的影响

Fig.1 Effects of TSAP and Vc treatment on wound healing in *C. elegans*

注: a、b 分别为线虫经皮肤损伤后 0 h 和 6 h 的台盼蓝染色情况; c 为线虫的伤口愈合率。1~5 分别为 Control 组、Model 组、TSAP 组、Vc 组、TSAP+Vc 组。图 c 中柱上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 罗非鱼皮抗氧化肽联合 Vc 对线虫生存

率的影响

伤口愈合是机体生存的必要条件^[30]。如图 2 所示, 与 Control 组相比, 损伤后线虫的生存率随着时间的延长逐渐下降。损伤 24 h 时, 各给药组的生存率均显著高于 Model 组 ($P < 0.05$)。其中, Vc 组与 TSAP 组线虫的生存率在 144 h 观察期内无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明 Vc 和 TSAP 对保护线虫损伤致死的效果相近。144 h 时, Model 组线虫生存率为 0.00%, TSAP、Vc 以及 TSAP+Vc 组的线虫生存率分别为 20.00%、20.00% 和 43.33%。TSAP+Vc 组的生存率显著高于 TSAP 或 Vc 组 ($P < 0.05$)。Pooranachithra 等^[31]研究发现, 线虫的创伤愈合可以提高其生存率。本实验结果说明 TSAP、Vc 以及

台盼蓝作为一种不透膜的染料, 可对细胞膜受损的线虫进行特异性染色^[29]。线虫经玻璃棉损伤后, 其细胞膜受损处在台盼蓝染色下呈现蓝色(图 1 的 a2~a5)。损伤后 6 h, 各组线虫伤口均呈现不同程度的修复, 虫体受损处蓝色变浅(图 1 的 b2~b5)。与 Model 组相比, 经 TSAP、Vc 以及 TSAP+Vc 作用后的线虫伤口愈合率分别增加了 57.44%、60.74% 和 143.74% (图 1c), 说明 TSAP、Vc 以及 TSAP+Vc 都可以促进伤口愈合。其中, TSAP+Vc 组线虫的伤口愈合率显著高于 TSAP 或 Vc 组 ($P < 0.05$), 说明 TSAP 联合 Vc 对线虫伤口愈合具有协同作用。

TSAP+Vc 均能通过促进线虫皮肤损伤修复提高其生存率, TSAP 联合 Vc 在皮肤损伤修复的协同作用是提高线虫的生存率的重要原因。

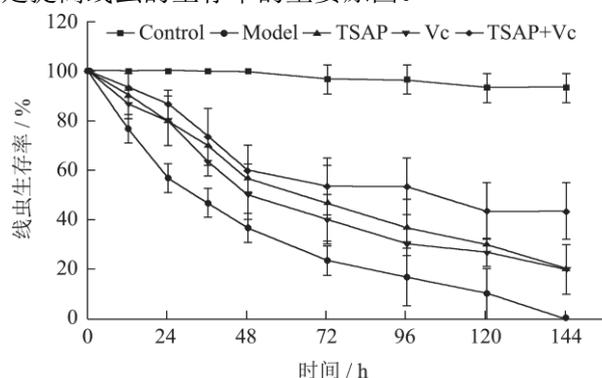


图2 TSAP 和 Vc 处理对线虫生存率的影响

Fig.2 Effects of TSAP and Vc treatment on survival rate in *C. elegans*

2.4 罗非鱼皮抗氧化肽联合 Vc 对细胞内 ROS 的影响

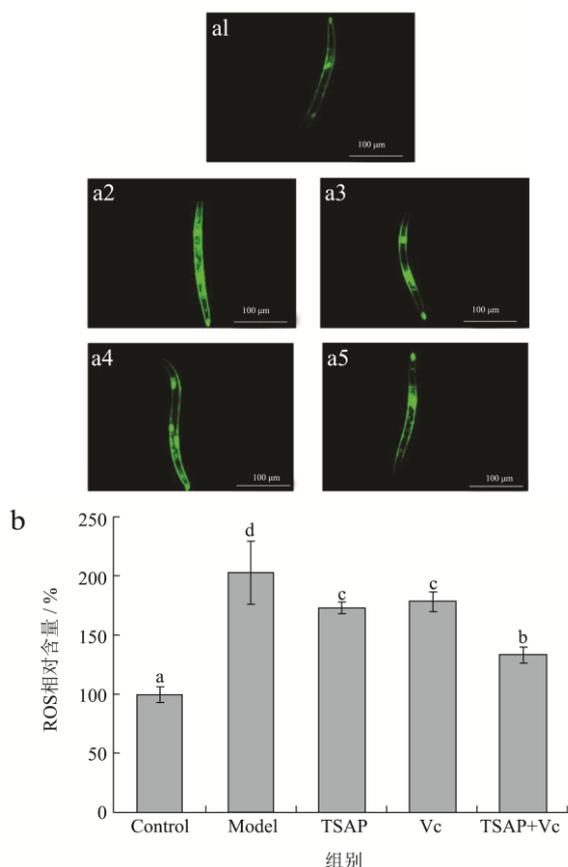


图3 TSAP和Vc对线虫细胞内ROS相对含量的影响

Fig.3 Effects of TSAP and Vc on intracellular ROS relative content in *C. elegans*

注：a 为皮肤损伤后的线虫荧光图像，a1~a5 分别为 Control 组、Model 组、TSAP 组、Vc 组、TSAP+Vc 组；b 为线虫的 ROS 相对含量。图 b 中柱上不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

探针 $H_2DCF-DA$ 自身不显荧光，进入细胞质后， $H_2DCF-DA$ 的酯基被细胞酯酶水解形成 H_2DCF ，继而与细胞内 ROS 反应生成高荧光产物 $DCF^{[32]}$ 。与 Control 组（图 3 的 a1）相比，Model 组的线虫呈现强绿色荧光（图 3 的 a2），ROS 相对含量为 203.51%（图 3b），说明受损线虫体内呈现高氧化应激。这是由于在伤口形成后，机体中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞等分泌大量的细胞炎症因子和 ROS，以保护机体组织不受细菌的侵入^[33]。过量 ROS 的产生会抑制伤口的愈合，因此 ROS 的稳态调节对伤口愈合至关重要^[34]。与 Model 组相比，经 TSAP、Vc 以及 TSAP+Vc 饲喂后的受损线

虫细胞内荧光强度减少（图 3 的 a3~a5），ROS 相对含量分别降低了 14.67%、13.80%、34.28%（图 3b），其中 TSAP+Vc 组的 ROS 相对含量显著低于 TSAP 组和 Vc 组 ($P<0.05$)，且降低 ROS 含量的能力大于 TSAP 组和 Vc 组单独作用的叠加效果，说明 TSAP 和 Vc 对降低线虫细胞内 ROS 含量具有协同作用。与本实验结果相似，Dong 等^[35]发现烟酰胺-水母肽（IVH）结合物可以降低高糖诱导损伤的 HaCaT 细胞中的 ROS 含量。在伤口愈合阶段，低水平的 ROS 对于伤口血管再生非常重要^[36]。结合本研究中 TSAP 和 Vc 对受损线虫伤口愈合的促进作用结果，说明 TSAP 和 Vc 可能通过协同降低线虫细胞内 ROS 含量抑制氧化应激以促进其皮肤损伤的愈合。

2.5 罗非鱼皮抗氧化肽联合 Vc 对体内 MDA 含量、SOD 以及 CAT 活力的影响

MDA 是脂质氧化的代谢产物，可作为细胞氧化损伤程度的指标^[37]。如图 4a 所示，与 Control 组相比，Model 组的 MDA 含量显著增加了 53.65% ($P<0.05$)。与 Model 组相比，TSAP、Vc 以及 TSAP+Vc 作用后线虫的 MDA 含量显著降低了 18.30%、19.83% 和 44.47% ($P<0.05$)，说明 TSAP 和 Vc 无论是单独作用还是联合作用都可以抑制线虫的脂质过氧化。其中，TSAP+Vc 组的 MDA 含量显著低于 TSAP 组和 Vc 组 ($P<0.05$)，且降低 MDA 含量的能力大于 TSAP 组和 Vc 组单独作用的叠加效果，说明 TSAP 联合 Vc 对缓解线虫氧化损伤具有协同作用。

在伤口愈合阶段，SOD 和 CAT 作为细胞中两种重要的抗氧化酶，在维持氧化还原平衡方面发挥着重要的作用^[38]。如图 4b、4c 所示，与 Control 组相比，Model 组体内 SOD 和 CAT 活力显著降低了 34.77% 和 51.01% ($P<0.05$)。与 Model 组相比，TSAP、Vc 以及 TSAP+Vc 作用下线虫体内 SOD 活力分别提高了 17.65%、20.32% 和 45.24%；CAT 活力分别提高了 49.08%、46.62% 和 106.57%。本实验中，TSAP、Vc 以及 TSAP+Vc 都可以提高线虫体内抗氧化酶活力，其中 TSAP+Vc 组线虫体内抗氧化酶活力显著高于 TSAP 和 Vc 组 ($P<0.05$)，且提高体内抗氧化酶活力的能力大于 TSAP 组和 Vc 组单独作用的叠加效果，说明 TSAP 联合 Vc 对提高体内抗氧化酶活力具有协同作用。

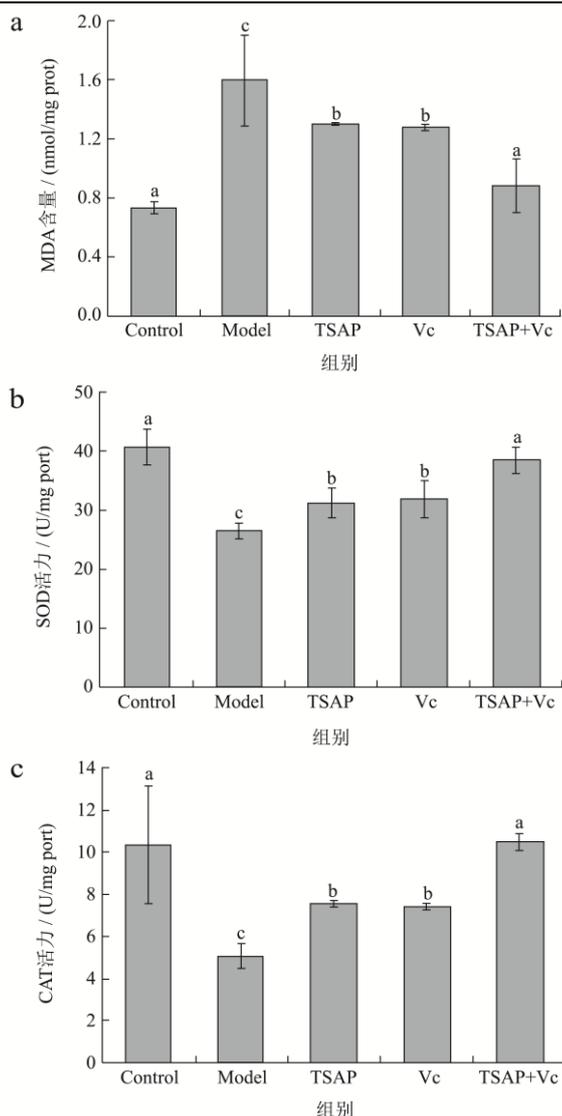


图4 TSAP和Vc处理对线虫抗氧化能力的影响

Fig.4 Effects of TSAP and Vc treatment on antioxidant capacity in *C. elegans*

注: a 为 MDA 含量, nmol/mg prot 表示每毫克蛋白 MDA 的含量 (nmol); b 为 SOD 活力, U/mg prot 表示每毫克蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U); c 为 CAT 活力, U/mg prot 表示每毫克蛋白每分钟分解 1 μmol 的过氧化氢的量为一个 CAT 活力单位 (U)。小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

本研究结果表明, 相对于单独饲喂 TSAP 或 Vc, TSAP 联合 Vc 饲喂的线虫细胞的抗氧化能力更强, 说明 TSAP 和 Vc 对线虫细胞的抗氧化活性具有协同作用。与本实验结果相类似, 刘成梅等^[39]发现罗非鱼皮多肽与 Vc 按 1:1 (*m/m*) 复配可以对缓解脂质氧化有协同作用。李翠莲等^[40]研究发现鹰嘴豆抗氧化肽和 Vc 具有极强的抗氧化协同效应。Gui 等^[41]研究发现, 菊花、大豆肽和胶原蛋白肽的混合物对提高紫外线诱导皮肤损伤小鼠的血清和皮肤中的 SOD 活

力, 降低 MDA 含量具有协同作用。皮肤损伤的愈合与氧化和抗氧化的平衡密不可分^[42], 使用抗氧化剂提高抗氧化酶活可以促进伤口的愈合^[43]。因此 TSAP+Vc 组对伤口愈合具有协同作用可能与两者联合作用提高线虫体内抗氧化酶活、降低 MDA 含量来减少氧化应激对皮肤损伤线虫的伤害有关。

2.6 罗非鱼皮抗氧化肽与 Vc 在分子水平上的协同抗氧化机理分析

分子对接结果表明, TSAP 的主要活性位点是 Gly3 和 Arg8 (图 5)。Vc 通过氢键与 TSAP 的氨基酸残基结合, 如 Gly3-Vc (键长: 2.00 Å), Arg8-Vc (键长: 1.90、1.90、2.20 Å)。氢键是分子间相互作用之一^[44], 对 TSAP 和 Vc 相互作用形成稳定复合物非常重要。Vc 作为一种良好的自由基清除剂, 可促进伤口愈合^[45], 但 Vc 的烯二醇结构易被氧化, 导致 Vc 稳定性差, 进而影响其抗氧化活性^[46]。候兵兵等^[47]研究发现尿嘧啶和腺嘌呤均可通过与 Vc 的烯二醇结构上的氢原子形成氢键以保护 Vc 的烯二醇结构上的羟基, 使其抗氧化能力增强。本实验中, TSAP 与 Vc 的烯二醇结构之间存在的氢键使 Vc 在环境中稳定, 能够更好的发挥其抗氧化活性, 这可能是 TSAP 与 Vc 具有抗氧化协同作用的原因。

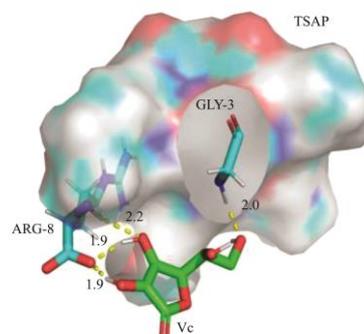


图5 TSAP和Vc的分子对接

Fig.5 Molecular docking of TSAP and Vc

注: 黑色字母表示 TSAP 的氨基酸残基, 黄色虚线表示氢键, 白色棍状表示 H 原子, 红色棍状表示 O 原子, 绿色表示 Vc 的 C 原子, 青色表示 TSAP 的 C 原子, 蓝色表示 TSAP 的 N 原子, 数字表示键长。

3 结论

本研究结果表明, TSAP联合Vc能够降低线虫的氧化应激水平从而促进损伤皮肤的愈合。分子对接结果推测, Vc的烯二醇结构与TSAP形成的氢键是二者在抗氧化方面具有协同作用的重要原因。本研究

结果为TSAP作为修复损伤皮肤功能性食品提供参考,并为TSAP和Vc复合物在皮肤损伤愈合方面的开发提供理论基础。

参考文献

- [1] Sen C K, Khanna S, Gordillo G, et al. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 957: 239-249.
- [2] Cai S, Lu C, Liu Z, et al. Derivatives of gecko cathelicidin-related antioxidant peptide facilitate skin wound healing [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 890: 173649.
- [3] Fitzmaurice S D, Sivamani R K, Isseroff R R. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products [J]. *Skin pharmacology and physiology*, 2011, 24(3): 113-126.
- [4] Ge H, Jiang Y, Ning Z, et al. Supplementation of egg white peptides on attenuating skin mechanical damage symptoms: a promising way to accelerate wound healing process [J]. *Food & Function*, 2021, 12(17): 7688-7698.
- [5] Meng F, Qiu J, Chen H, et al. Dietary supplementation with N-3 polyunsaturated fatty acid-enriched fish oil promotes wound healing after ultraviolet B-induced sunburn in mice [J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(7): 3693-3700.
- [6] Nielsen S, Purup S, Larsen L. Effect of casein hydrolysates on intestinal cell migration and their peptide profiles by LC-ESI/MS/MS [J]. *Foods*, 2019, 8(3): 91.
- [7] 黄克,崔春,赵谋明,等.天然抗氧化剂的增效作用及其对花生油抗氧化效果研究[J].*现代食品科技*,2012,28(9): 1139-1141.
- [8] 饶胜其,徐美玲,高璐,等.鸡蛋清蛋白酶解肽和大豆蛋白酶解肽的协同抗氧化活性[J].*食品科学*,2014,35(23):108-113.
- [9] 李西栋,孙绍霞,梁亚楠,等.山楂原花青素和Vc联合通过Wnt/ β -catenin通路减轻胰岛素抵抗大鼠肝脏氧化应激[J].*食品科学*,2021,42(17):186-192.
- [10] 吕敏,甘晖,何金钊,等.UVC-GA抑菌液对罗非鱼皮在0℃贮藏下微生物区系及品质的影响[J].*现代食品科技*,2021, 37(8):142-151.
- [11] Elbially Z I, Atiba A, Abdelnaby A, et al. Collagen extract obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) skin accelerates wound healing in rat model via up regulating VEGF, bFGF, and α -SMA genes expression [J]. *BMC Veterinary Research*, 2020, 16(1): 352-362.
- [12] 夏光华,申铨日,蔡锦红,等.三酶法制备罗非鱼鱼皮胶原蛋白抗氧化肽及活性研究[J].*食品科学*,2012,33(23):175-179.
- [13] Zhang R, Chen J, Jiang X, et al. Antioxidant and hypoglycaemic effects of tilapia skin collagen peptide in mice [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51(10): 2157-2163.
- [14] 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.
- [15] Xiong X, Liang J, Xu Y, et al. The wound healing effects of the tilapia collagen peptide mixture TY001 in streptozotocin diabetic mice [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(7): 2848-2858.
- [16] Mei F, Liu J, Wu J, et al. Collagen peptides isolated from *Salmo salar* and *Tilapia nilotica* skin accelerate wound healing by altering cutaneous microbiome colonization via upregulated NOD2 and BD14 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(6): 1621-1633.
- [17] Moores J. Vitamin C: a wound healing perspective [J]. *British Journal of Community Nursing*, 2013, Suppl: S6, S8-S11.
- [18] Oliva L, Dourado D M. Healing process of rat skin wounds treated with vitamin C and low-intensity laser therapy [J]. *Cureus*, 2020, 12(12): 11933.
- [19] Palmieri B, Vadala M, Laurino C. Nutrition in wound healing: investigation of the molecular mechanisms, a narrative review [J]. *Journal of Wound Care*, 2019, 28(10): 683-693.
- [20] Chisholm A D, Xu S. The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 2012, 1(6): 879-902.
- [21] Ma Y, Xie J, Wijaya C S, et al. From wound response to repair-lessons from *C. elegans* [J]. *Cell Regeneration*, 2021, 10(1): 5.
- [22] Pooranachithra M, Suruthi K, Prabhanand B J, et al. Survival upon *Staphylococcus aureus* mediated wound infection in *Caenorhabditis elegans* and the mechanism entailed [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 157: 104952.
- [23] Sompinit K, Lersiripong S, Reamtong O, et al. *In vitro* study on novel bioactive peptides with antioxidant and antihypertensive properties from edible rhizomes [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2020, 134: 110227.

- [24] Yang Q, Cai X, Yan A, et al. A specific antioxidant peptide: its properties in controlling oxidation and possible action mechanism [J]. Food Chemistry, 2020, 327: 126984.
- [25] Wang W, Zhao Y, Zhao G, et al. Antioxidant peptides from collagen hydrolysate of redlip croaker (*Pseudosciaena polyactis*) scales: preparation, characterization, and cytoprotective effects on H₂O₂-damaged HepG2 cells [J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 156.
- [26] Pooranachithra M, Bhaskar J, Balamurugan K. Wounding *Caenorhabditis elegans* with glass wool [J]. Bio-Protocol, 2021, 11(2).
- [27] Ren Y, Wu H, Chi Y, et al. Structural characterization, erythrocyte protection, and antifatigue effect of antioxidant collagen peptides from tilapia (*Oreochromis nilotica* L.) skin [J]. Food & function, 2020, 11(11): 1116-1149.
- [28] Wang B, Wang Y, Chi C, et al. Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Marine Drugs, 2013, 11(11): 4641-4661.
- [29] Meng X, Yang Q, Yu X, et al. Actin polymerization and ESCRT trigger recruitment of the fusogens syntaxin-2 and EFF-1 to promote membrane repair in *C. elegans* [J]. Developmental Cell, 2020, 54(5): 624-638.
- [30] Chisholm A D. Epidermal wound wealing in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Advances in Wound Care, 2015, 4(4): 264-271.
- [31] Pooranachithra M, Bhaskar J P, Murali D, et al. Unravelling the wound healing ability and mode of action of pyridine carboxamide oxime using *Caenorhabditis elegans* as potential prescreen wound model [J]. Life Sciences, 2019, 235: 116859.
- [32] Zhang B Q, Hu S J, Qiu L H, et al. Effects of *Astragalus membranaceus* and its main components on the acute phase endothelial dysfunction induced by homocysteine [J]. Vascul Pharmacol, 2007, 46(4): 278-285.
- [33] Clark RAF. Wound Repair: Overview and General Considerations [M]// Clark RAF. The molecular and cellular biology of wound repair. Boston: Springer, 1996: 3-50.
- [34] Schafer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair [J]. Pharmacological Research, 2008, 58(2): 165-171.
- [35] Son D, Yang D, Sun J, et al. A novel peptide, nicotinyloleucine-valine-histidine (NA-IVH), promotes antioxidant gene expression and wound healing in HaCaT cells [J]. Marine Drugs, 2018, 16(8): 262.
- [36] Roy S, Khanna S, Nallu K, et al. Dermal wound healing is subject to redox control [J]. Molecular Therapy, 2006, 13(1): 211-220.
- [37] Hu X, Wang Y, Zhao Y, et al. Antioxidant peptides from the protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle: purification, identification, and cytoprotective function on HepG2 cells damage by H₂O₂ [J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 153.
- [38] Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing [J]. Journal of Developmental Biology, 2015, 3(2): 57-70.
- [39] 刘成梅,梁汉蓉,刘伟.罗非鱼鱼皮多肽(TSP-I)抗氧化活性的研究[J].食品研究与开发,2007,28(11):148-151.
- [40] 李翠莲,方北曙,申双贵.鹰嘴豆抗氧化多肽与其它抗氧化剂的协同作用[J].中国农学通报,2008,24(10):57-60.
- [41] Gui M, Du J, Guo J, et al. Aqueous extract of *Chrysanthemum morifolium* enhances the antimelanogenic and antioxidative activities of the mixture of soy peptide and collagen peptide [J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2014, 4(3): 171-176.
- [42] Dunnill C, Patton T, Brennan J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process [J]. International Wound Journal, 2017, 14(1): 89-96.
- [43] Shukla A, Rasik A M, Patnaik G K. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound [J]. Free Radical Research Communications, 1997, 26(2): 93-101.
- [44] 赵磊,潘飞,周娜,等.提高黑米花色苷颜色稳定性辅色剂的筛选及其作用机制[J].食品科学,2021,42(14):16-23.
- [45] Pullar J, Carr A, Vissers M. The roles of vitamin C in skin health [J]. Nutrients, 2017, 9(8): 866.
- [46] Weber V, Coudert P, Rubat C, et al. Antioxidant properties of novel lipophilic ascorbic acid analogues [J]. The Journal of pharmacy and pharmacology, 2000, 52(5): 523-530.
- [47] 候兵兵,彭鹏,张萍,等.抗坏血酸与腺嘌呤和尿嘧啶的相互作用研究[J].化学研究与应用,2018,30(5):711-718.