

家蝇蛹多肽的制备及促伤口愈合活性评价

张思晨^{1,2}, 孙婷婷¹, 赵志敏^{1,2}, 何国瑞², 杨得坡^{1,2}

(1. 中山大学药学院, 广州 510006; 2. 广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广州 510006)

摘要:为了确定酶解法制备家蝇蛹多肽(PHP)的工艺条件,并初步评价PHP的促伤口愈合活性,以家蝇(*Musca domestica* L.)蛹为原料,采用蛋白酶酶解法制备PHP,通过单因素实验优化酶解法制备PHP的工艺条件,并在细胞水平上评价PHP的促伤口愈合活性。结果表明,10种蛋白酶酶解法制备的PHP中,胃蛋白酶酶解法制备的PHP得率最高,其次是风味蛋白酶酶解法制备的PHP(PHF)。另外,PHF的多肽含量及水解度均最高。单因素实验结果表明,制备PHF的最佳条件为酶解温度60℃、加酶量8 000 U/g、酶解时间4 h,在此条件下制得的PHF得率最高、水解最完全。细胞实验结果显示,不同蛋白酶酶解法制备的PHP具有不同程度促进HaCaT细胞增殖及迁移的作用。其中,PHF(分子质量主要分布在500~1 300 Da之间)促伤口愈合活性最佳。同时,PHF可显著促进RAW264.7细胞转化生长因子TGF-β1及炎症细胞因子TNF-α、IL-6的表达。综上,风味蛋白酶酶解法是一种制备高得率、高多肽含量及高水解度的PHP的方法,PHF具有促进伤口愈合的潜力。

关键词:家蝇蛹;多肽;酶解法;细胞增殖;细胞迁移;伤口愈合

中图分类号:Q969.92;Q966 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)05-0047-07

Preparation and evaluation of wound healing – promoting activity of peptides from housefly pupa

ZHANG Sichen¹, SUN Tingting¹, ZHAO Zhimin^{1,2}, HE Guorui², YANG Depo^{1,2}

(1. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat – sen University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to determine the process conditions for preparing peptides from housefly pupa (PHP) using enzymolysis method and evaluate the wound healing – promoting activity of PHP, PHP were prepared with enzymolysis methods using pupa of *Musca domestica* L. as the raw material. The single factor experiment was designed to optimize the preparation process of PHP and the wound healing – promoting activity of PHP was studied at the cellular level. The results showed that among the PHP prepared with ten proteases, the yield of PHP prepared with pepsin was the highest, followed by flavourzyme hydrolysis (the peptide was referred to as PHF). In addition, PHF showed the highest peptides content and degree of hydrolysis. The results of single factor experiment displayed that PHF presented the highest yield and degree of hydrolysis under the conditions of temperature 60℃, enzyme dosage 8 000 U/g, and time 4 h. Besides, PHP prepared with different proteases had different degrees of promoting proliferation and migration of HaCaT cells, among them, PHF (molecular weight mainly

distributed between 500 Da and 1 300 Da) exhibited the best wound healing – promoting activity. Meantime, PHF significantly promoted the expression of transforming growth factor TGF – β1 and inflammatory cytokines TNF – α, IL – 6 in RAW264.7 cells. In conclusion, the enzymolysis method with flavourzyme contributes to prepare

收稿日期:2021-05-12;修回日期:2021-12-20

基金项目:2020年广东省级乡村振兴战略专项“南药(肉桂)产业技术体系创新团队建设项目”(2020KJ142)

作者简介:张思晨(1994),女,硕士研究生,主要从事昆虫活性肽研究(E-mail)zhangsch3@mail2.sysu.edu.cn。

通信作者:杨得坡,教授,博士生导师(E-mail)lssydp@mail.sysu.edu.cn。

PHP with high - yield, high - peptides content, and high - degree of hydrolysis, and PHF has the potential to promote wound healing.

Key words: housefly pupa; peptides; enzymolysis method; cell proliferation; cell migration; wound healing

家蝇(*Musca domestica* L.),为环裂亚目丽蝇科蝇属完全变态昆虫,一生经历卵、蛹、幼虫和成虫四个阶段,其幼虫和蛹富含油脂、蛋白质等营养成分^[1]。家蝇与其他近缘昆虫的干燥幼虫和蛹壳合称为五谷虫。据《本草求原》等传统中医典籍记载,五谷虫经干燥研磨后,可外用治疗疔、痈等感染创面^[2]。目前,国内外均有将五谷虫用于伤口愈合治疗的基础研究和临床研究,研究对象涵盖五谷虫活蛆^[3]、多肽^[4]、溶菌酶^[5]、脂肪酸^[6]等。另外,其他来源的肽如墨西哥黄唇鱼肉寡肽^[7]、青蛙抗菌肽^[8]、大豆蛋白源肽^[9]、神经肽^[10]等活性肽都被证实具有促进伤口愈合的活性。

伤口愈合是一个复杂的生物学过程,是恢复皮肤屏障完整性的关键。愈合过程分为止血、炎症、增殖和重塑四个阶段,这四个阶段相互重叠、高度协调^[11]。伤口形成后不久,凝血形成,在血小板迅速聚集的过程中释放生长因子如转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$),生长因子在伤口早期迅速招募炎症细胞^[12-13],炎症细胞表达关键的生长因子和介质,不断促进修复过程。伤口形成后几小时内,角质形成细胞开始迁移并增殖以愈合伤口^[14]。因此,角质形成细胞的迁移与增殖、生长因子等的表达,对于促进伤口愈合十分重要。鉴于多肽生物活性和安全性高的优点,一些多肽类药物在促伤口愈合方面的研发成为近年来的热门领域之一。家蝇蛹与幼虫相似,含有十分丰富的生物活性肽类物质。但家蝇蛹多肽(peptides from housefly pupa, PHP)是否也具有促伤口愈合活性还未见报道,故本研究以家蝇蛹为对象,利用酶解法制备 PHP 并评价 PHP 的促伤口愈合活性,以期家蝇蛹的高效资源开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

家蝇蛹,广东盈亨生物科技有限公司提供。碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、菠萝蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、 α -糜蛋白酶、复合蛋白酶,北京索莱宝科技有限公司;邻苯二甲醛,上海麦克林生化科技有限公司;人永生角质形成细胞株(HaCaT),武汉大学中国典型培养

物保藏中心;小鼠单核巨噬细胞株(RAW264.7),中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青霉素及链霉素,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),派普泰克生物科技(苏州)有限公司;酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,欣博盛生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

油浴锅;pH 计;冷冻干燥机,德国 Christ 公司;多功能酶标仪,德国 BMG 公司;UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(配备 355 nm Nd:YAG 激光器),德国 Bruker Daltonics 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PHP 的酶解法制备及得率计算

以正己烷为溶剂,采用索氏提取法对家蝇蛹进行脱脂得到脱脂家蝇蛹粉。准确称量 10 g 脱脂家蝇蛹粉于锥形瓶中,按料液比 1:20 加入双蒸水混匀,于 4 °C 冷提 10 min,随后于 100 °C 油浴锅中加热 10 min 使蛋白质变性,冷却至酶解温度后,使用 NaOH 溶液/HCl 溶液调节至一定 pH,立即加入一定量的蛋白酶,酶解一定时间。酶解结束后于 100 °C 灭酶活 10 min,冷却至室温后转移提取液至离心管中,于 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,冷冻干燥,即得 PHP。PHP 得率按照下式计算。

$$R = (m_1 - m_2) / m_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: R 为 PHP 得率; m_1 为干燥的多肽质量,g; m_2 为加酶量,g; m_0 为脱脂家蝇蛹粉质量,g。

1.2.2 PHP 中多肽含量及水解度测定

采用邻苯二甲醛(OPA)法测定多肽含量及水解度。OPA 法的原理是在碱性介质中 OPA 能与游离的氨基发生反应生成具有荧光性的异吲哚衍生物,在 340 nm 处有特征吸收^[15]。OPA 试剂配制参考 Church 等^[16]的方法。

通过谷胱甘肽标准曲线测定多肽的含量。具体方案为:配制系列梯度质量浓度的谷胱甘肽标准溶液(0.500、0.250、0.125、0.063、0.031、0.016、0.000 mg/mL),分别取 20 μ L 谷胱甘肽标准溶液与

150 μL OPA 试剂混匀,精确控制反应时间为 2 min,在 340 nm 波长处检测吸光度,以去离子水作为对照,绘制谷胱甘肽质量浓度(x) - 吸光度(y)标准曲线,拟合得到标准曲线方程($y = 1.599x + 0.039$, $R^2 = 0.9999$);将待测样品配成 1 mg/mL 的溶液,检测方法同谷胱甘肽标准溶液组,再根据标准曲线方程计算多肽含量。

通过丝氨酸标准溶液测定水解度^[15]。具体方案为:准确配制质量浓度为 1 mg/mL 的丝氨酸标准溶液,取 20 μL 丝氨酸标准溶液与 150 μL OPA 试剂混匀,精确控制反应时间为 2 min,在 340 nm 波长处检测吸光度,以去离子水作为对照;将样品配成 1 mg/mL 的溶液,检测方法同标准溶液组,按照下列公式计算水解度。

$$D = h/h_{\text{tot}} \times 100\% \quad (2)$$

$$h = [(A_2 - A_0)/(A_1 - A_0) \times 0.9516 \times 1 - \beta]/\alpha \quad (3)$$

式中: D 为水解度; h 为多肽水解过程中裂解的肽键数; h_{tot} 为总肽键数,取指定值 7.6; A_2 、 A_1 、 A_0 分别为样品组、丝氨酸标准溶液组、对照组的吸光度; α 、 β 分别取指定值 1.00、0.40。

1.2.3 PHP 对 HaCaT 细胞增殖的影响

将 HaCaT 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素、链霉素的 DMEM 培养基,在含有 5% CO_2 及饱和湿度条件的 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱里进行培养。取对数生长期细胞,以 2×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板,待细胞完全贴壁生长后,实验组给予 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHP 处理,空白对照组给予同体积的磷酸盐缓冲液(PBS)处理,以 0.4 ng/mL EGF 作为阳性对照。培养 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞数。按照下式计算细胞增殖率。

$$R_1 = A_1/A_0 \times 100\% \quad (4)$$

式中: R_1 为细胞增殖率; A_1 为实验组吸光度; A_0 为空白对照组吸光度。

1.2.4 PHP 对 HaCaT 细胞迁移的影响

采用经典划痕实验检测 PHP 对 HaCaT 细胞迁移的影响。取对数生长期的 HaCaT 细胞(细胞培养方法见 1.2.3),以 2×10^5 个/孔的密度接种于 12 孔细胞培养板,待细胞完全贴壁生长后,弃掉旧培养基,加入含 0.5% 胎牛血清的培养基饥饿处理 12 h。使用 10 μL 无菌枪头在细胞层垂直划痕,建立体外细胞创伤模型,用 PBS 反复冲洗至划痕区域干净。实验组给予 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHP 处理,空白对照组给予同体积的 PBS 处理,以 0.4 ng/mL EGF 作为阳性对

照。分别于给药后 0、24、48 h 于显微镜下拍照。利用 Image J 软件进行指定划痕区域愈合面积计算,按照下式计算迁移率。

$$R_2 = (S_0 - S_x)/S_0 \times 100\% \quad (5)$$

式中: R_2 为细胞迁移率; S_0 为 0 h 时的划痕面积; S_x 为 24 h 或 48 h 时的划痕面积。

1.2.5 PHP 对 RAW264.7 细胞 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 表达的影响

RAW264.7 细胞培养方法同 HaCaT 细胞(见 1.2.3 方法)。取对数生长期细胞,以 5.5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板。待细胞贴壁后,实验组分别给与 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PHP 处理,空白对照组给予同体积 PBS 处理,以 0.4 ng/mL EGF 作为阳性对照。培养 12 h 后收集细胞上清液,采用 ELISA 试剂盒检测 TGF- β 1、IL-6、TNF- α 含量。

1.2.6 PHP 分子质量分布分析

将样品溶于双蒸水,制成质量浓度为 1 mg/mL 的 PHP 溶液,采用基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)检测分子质量分布。分析条件:离子源加速电压 1 为 20.00 kV,加速电压 2 为 17.85 kV,离子延时提取 140 ns,正离子谱检测,质量扫描范围(m/z)为 500~4 000、1 000~20 000。

1.2.7 数据分析

所有实验均重复 3 次,实验结果以“平均值 \pm 标准偏差”表示,用 GraphPad Prism 7.0.4 软件处理数据。以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

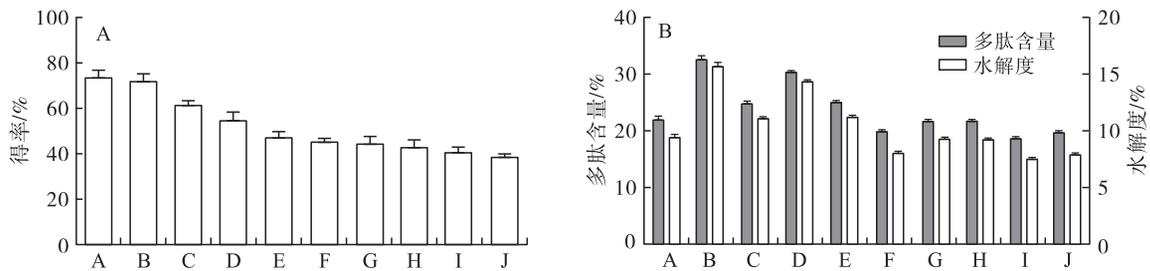
2 结果与分析

2.1 PHP 制备酶的筛选

按 1.2.1 方法,采用不同的蛋白酶,在加酶量 8 000 U/g、酶解时间 1 h 以及不同蛋白酶酶解温度和 pH(具体见表 1)条件下制备 PHP,比较不同蛋白酶对 PHP 得率、多肽含量及水解度的影响,结果如图 1 所示。

表 1 不同蛋白酶酶解条件

蛋白酶	酶解温度/ $^\circ\text{C}$	pH
胃蛋白酶	37	2.0
风味蛋白酶	53	7.0
复合蛋白酶	50	7.5
中性蛋白酶	40	7.0
碱性蛋白酶	45	9.5
胰蛋白酶	37	8.0
木瓜蛋白酶	65	7.0
酸性蛋白酶	45	3.0
菠萝蛋白酶	53	7.0
α -糜蛋白酶	25	7.8



注:A~J分别表示胃蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶、菠萝蛋白酶、 α -糜蛋白酶。

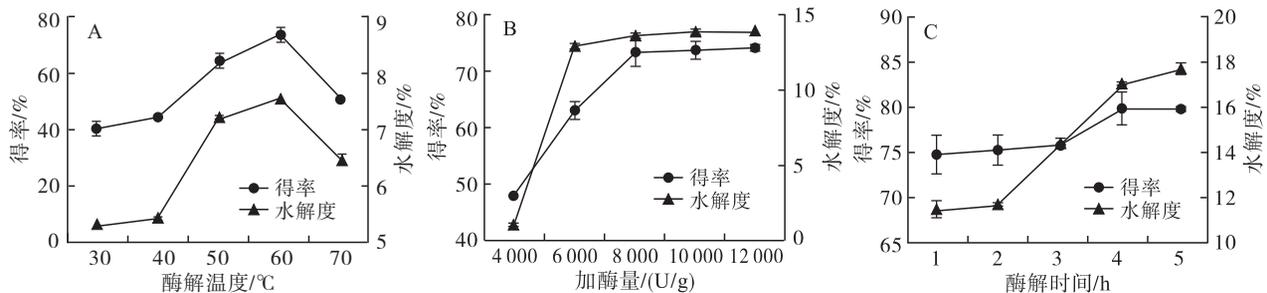
图1 不同蛋白酶对 PHP 得率、多肽含量及水解度的影响

由图 1A 可见,胃蛋白酶酶解制备的 PHP 得率最高,为(74.71 ± 2.11)%,其次是风味蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶,PHP 得率分别为(72.82 ± 2.38)%、(62.19 ± 1.31)%和(55.59 ± 2.78)%。由图 1B 可见,风味蛋白酶酶解制备的 PHP 多肽含量及水解度最高,分别为(32.67 ± 0.42)%和(15.79 ± 0.25)%。另外,中性蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶及胃蛋白酶也能制备出较高多肽含量及水解度的 PHP。综上,风味蛋白酶酶解法是一

种能够制备高得率、高多肽含量及高水解度 PHP 的方法。

2.2 风味蛋白酶酶解制备家蝇蛹多肽 (peptide hydrolyzed with flavourzyme from housefly pupa, PHF) 工艺优化单因素实验

采用单因素实验,考察酶解温度、加酶量和酶解时间对 PHF 得率及水解度的影响,结果如图 2 所示。



注:固定条件为 pH 7.0、酶解时间 30 min、加酶量 8 000 U/g、酶解温度 60 °C,优化时改变单一因素条件。

图2 酶解温度、加酶量和酶解时间对 PHF 得率、水解度的影响

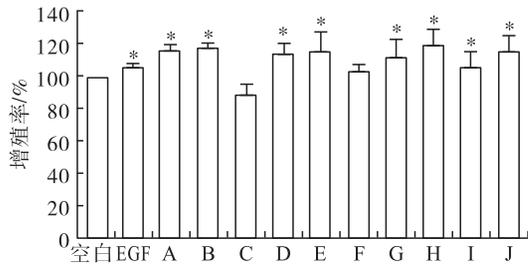
由图 2A 可见,酶解温度从 30 °C 上升到 60 °C 时,PHF 得率及水解度显著增加,60 °C 时 PHF 得率及水解度分别为(73.27 ± 2.48)%、(7.57 ± 0.20)%,但当酶解温度升高至 70 °C 时,PHF 得率及水解度明显降低。这可能与酶的活性有关,反应温度过低会大大降低体系内分子运动程度,从而降低蛋白酶与底物的碰撞概率,反应温度过高会导致蛋白酶全部或部分丧失催化活性^[17]。由图 2B 可见:当加酶量从 4 000 U/g 增加至 8 000 U/g 时,PHF 得率及水解度增长迅速;当加酶量从 8 000 U/g 增加至 12 000 U/g 时,PHF 得率增长缓慢,水解度基本不变。由图 2C 可见:酶解时间从 1 h 延长至 4 h 时,PHF 得率从(74.85 ± 2.08)%增加至(79.45 ± 1.77)%,水解度从(11.47 ± 0.37)%增加至(17.04 ± 0.04)%;酶解时间从 4 h 延长至 5 h 时,PHF 得率不变,水解度增加不足 0.5 百分点,可见酶解时间过长(>4 h)并不能使 PHF 得率更高。综上,确定制

备 PHF 的最佳工艺条件为:酶解温度 60 °C,加酶量 8 000 U/g,酶解时间 4 h。在最佳条件下,PHF 得率为(79.45 ± 1.77)%,水解度为(17.04 ± 0.04)%。

2.3 PHP 对 HaCaT 细胞增殖的影响

HaCaT 细胞是伤口愈合过程中发挥重要功能的细胞,是再上皮化的关键细胞。不同蛋白酶酶解(酶解条件如表 1 所示)制备的 PHP 对 HaCaT 细胞增殖的影响如图 3 所示。

由图 3 可见,不同蛋白酶酶解制备的 PHP 对 HaCaT 细胞均无显著的毒性作用。与空白对照组比较,除复合蛋白酶、胰蛋白酶外,其余 8 种蛋白酶制备的 PHP 及 EGF 均能不同程度地促进 HaCaT 细胞的增殖($P < 0.05$)。其中,酸性蛋白酶酶解制备的 PHP 促进 HaCaT 细胞增殖的作用最强,增殖率为(121.85 ± 8.07)%,其次是风味蛋白酶、胃蛋白酶酶解制备的 PHP,HaCaT 细胞增殖率分别为(118.38 ± 2.36)%、(116.96 ± 2.79)%。



注:A~J分别表示胃蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶、菠萝蛋白酶、 α -糜蛋白酶制备的PHP,下同。与空白对照组比较,*表示 $P < 0.05$ 。

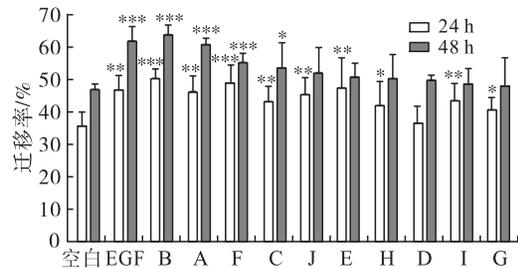
图3 不同蛋白酶酶解制备的 PHP 对 HaCaT 细胞增殖的影响

2.4 PHP 对 HaCaT 细胞迁移的影响

不同蛋白酶酶解制备的 PHP 对 HaCaT 细胞迁移的影响如图4所示。

由图4可见,与空白对照组比较,风味蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、复合蛋白酶酶解制备的 PHP 及 EGF 作用于 HaCaT 细胞 24、48 h 时,细胞迁移率均具有显著性的提升($P < 0.05$), α -糜蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶、酸性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解制备的 PHP 作用于 HaCaT 细胞 24 h 时,细胞的迁移率显著增加($P < 0.05$),而中性蛋白酶酶解制备的 PHP 处理组在 24、48 h 时的细胞迁移率均无显

著变化。其中,PHF 促进 HaCaT 细胞迁移的活性最佳,其作用的 HaCaT 细胞在 24、48 h 的迁移率分别为 $(50.59 \pm 2.68)\%$ 和 $(63.87 \pm 2.16)\%$ 。此时,空白对照组在 24、48 h 的迁移率分别为 $(35.93 \pm 3.97)\%$ 、 $(46.88 \pm 1.81)\%$ 。因此,后续对 PHF 进一步研究。

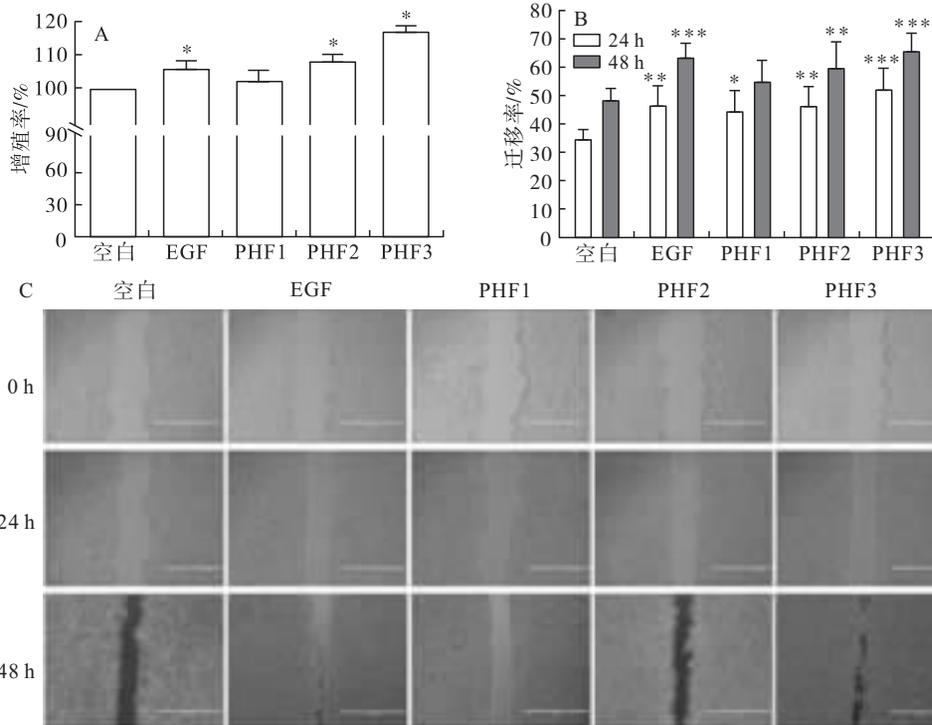


注:与空白对照组比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图4 不同蛋白酶酶解制备的 PHP 对 HaCaT 细胞迁移的影响

2.5 PHF 对 HaCaT 细胞增殖与迁移的影响

为了进一步探究 PHF 的促伤口愈合活性,评估了 PHF 在不同质量浓度 (PHF1, 50 $\mu\text{g/mL}$; PHF2, 100 $\mu\text{g/mL}$; PHF3, 200 $\mu\text{g/mL}$) 下对 HaCaT 细胞增殖与迁移的影响,结果如图5所示。



注:A、B 分别为 PHF 对 HaCaT 细胞增殖、迁移的影响;C 为 PHF 对 HaCaT 细胞迁移影响的定性分析,标尺 1 000 μm ;与空白对照组比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图5 PHF 对 HaCaT 细胞增殖与迁移的影响

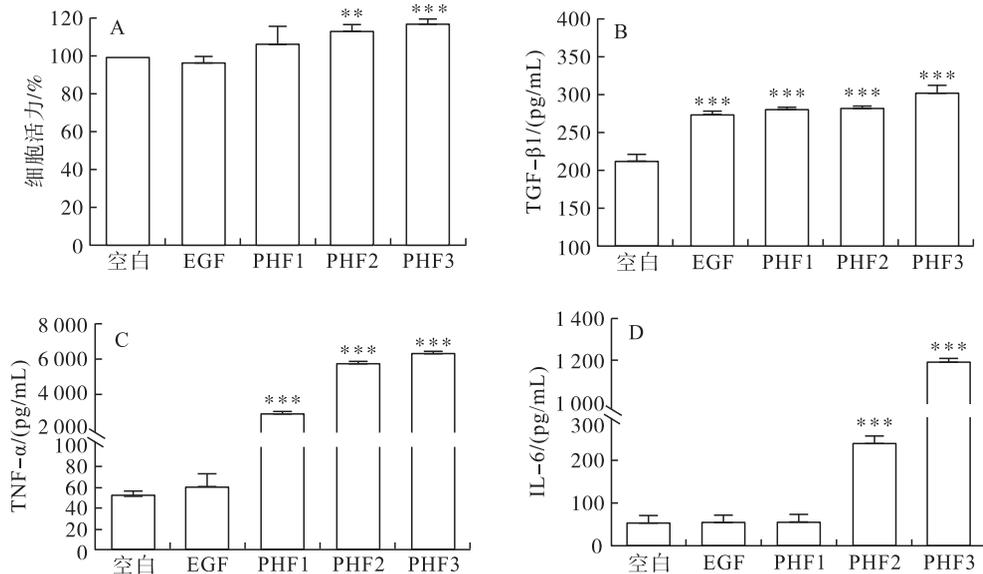
由图 5A 可见,与空白对照组比较,100、200 $\mu\text{g/mL}$ PHF 处理组的 HaCaT 细胞增殖率均有显著

提升($P < 0.05$),分别提升至(108.20 ± 1.62)%和(117.26 ± 1.20)%。由图 5B 可见,与空白对照组比较,PHF 在 24 h 时以浓度依赖的方式促进 HaCaT 细胞的迁移,100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHF 处理组 HaCaT 细胞在 48 h 时的迁移率均具有显著性的提升($P < 0.01$),且 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHF 促 HaCaT 细胞迁移活性优于阳性对照组。由图 5C 可见,给药之后,HaCaT 细胞逐步迁移至划痕部位,48 h 时,200

$\mu\text{g}/\text{mL}$ PHF 处理组 HaCaT 细胞迁移至部分融合。以上结果表明 PHF 能有效促进伤口的愈合。

2.6 PHF 对 RAW264.7 细胞 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 表达的影响

进一步检测了不同质量浓度的 PHF 对 RAW264.7 细胞活力及细胞因子 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 表达的影响,结果如图 6 所示。



注:与空白对照组比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图 6 PHF 对 RAW264.7 细胞活力及细胞因子 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 表达的影响

由图 6A 可见,与空白对照组相比,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PHF 及 EGF 对 RAW264.7 细胞的活力无显著影响,而中、高质量浓度(100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 PHF 可显著提升 RAW264.7 细胞的活力。

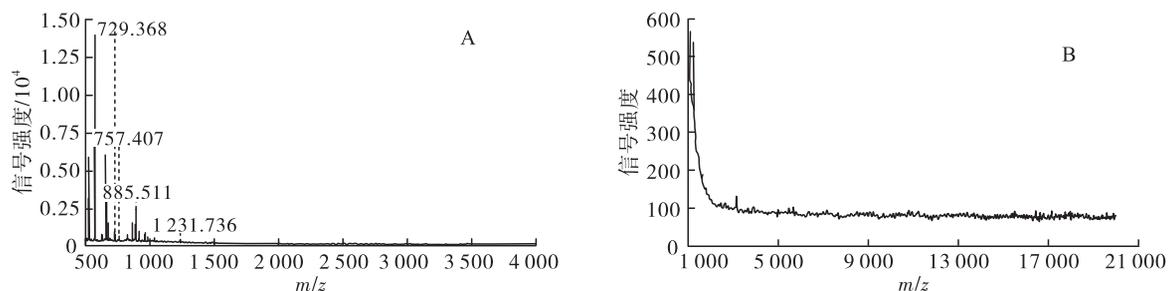
TGF- β 1 是皮肤伤口愈合的关键转化生长因子。已有研究表明,由 T 细胞释放的 TGF- β 通过调节细胞增殖、迁移、分化、细胞外基质产生和免疫调节,对伤口愈合产生多效作用^[18-19]。He 等^[20]报道蛙类来源的肽在巨噬细胞中通过诱导 TGF- β 1 的表达,显著激活下游依赖 TGF- β 的 Smad 信号通路,进而促进伤口愈合。由图 6B 可见,PHF 以浓度依赖的方式显著促进 RAW264.7 细胞中 TGF- β 1 的表达,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PHF 给药后,细胞上清液中 TGF- β 1 的水平增加至(304.00 ± 8.00)pg/mL(空白对照组的水平为(214.77 ± 5.82)pg/mL)。结果说明 PHF 可诱导 TGF- β 1 的表达进而促进伤口愈合。

由图 6C 可见,PHF 以浓度依赖的方式显著促进小鼠巨噬细胞中 TNF- α 的表达,50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PHF 给药后,细胞上清液中 TNF- α 的水

平分别增加至($3\ 003.94 \pm 14.37$)、($5\ 788.39 \pm 6.74$)、($6\ 384.50 \pm 26.23$)pg/mL(空白对照组的水平为(53.94 ± 2.55)pg/mL)。由图 6D 可见,与空白对照组相比,100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PHF 显著促进了小鼠巨噬细胞中 IL-6 的表达,表达水平分别提升至 4.42、21.52 倍。然而,与空白对照组相比,阳性对照组 EGF 对炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6 的表达没有显著差异,表明 EGF 不影响伤口愈合过程中的炎症期。结果说明 PHF 促进了 RAW264.7 细胞中炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6 的表达,激活了伤口愈合过程中的炎症信号。

2.7 PHF 的分子质量分布

采用 MALDI-TOF-MS 分析 PHF 的分子质量分布,结果如图 7 所示。由图 7A 可见,信号峰在 m/z 范围为 500~1 300 时较为集中,信号最强的质子峰在 m/z 为 560 左右。由图 7B 可见, m/z 在 2 000 及以上时,基本无信号峰。以上结果说明,PHF 的分子质量主要集中在 500~1 300 Da。按照氨基酸残基平均分子质量 110 Da 估算,PHF 主要为含有 4~11 个氨基酸的多肽。



注:A. m/z 范围为 500 ~ 4 000; B. m/z 范围为 1 000 ~ 20 000。

图7 PHF在不同质荷比(m/z)范围的一级质谱图

3 结论

本研究以家蝇蛹为原料,用10种不同蛋白酶酶解法制备家蝇蛹多肽(PHP),结果表明风味蛋白酶酶解法对于制备高得率、高水解度和高多肽含量的PHP具有较好的优势。细胞实验结果显示多种蛋白酶酶解制备的PHP对HaCaT细胞均有较好的促增殖活性及促迁移活性。其中,PHF(分子质量主要分布在500~1300 Da之间)可能通过促进转化生长因子TGF- β 1及炎性细胞因子TNF- α 、IL-6的表达,以影响细胞增殖、迁移及炎症信号的传递从而加速伤口愈合。研究结果提示PHF具有被开发成新型天然促伤口愈合剂的潜力。今后将进一步对PHF进行纯化,以明确发挥活性的多肽单体。

参考文献:

- [1] 黄靖怡,柯德森. 家蝇幼虫耐高温抗氧化蛋白的筛选及其功能研究[J]. 中国油脂,2020,45(2): 69-75.
- [2] 赵其光. 本草求原[M]. 广州:广东科技出版社,2009:189.
- [3] 李寒,邢爱婷,孙晓红,等. 五谷虫生物清创包联合中药软膏治疗糖尿病足溃疡1例护理[J]. 上海护理,2021,21(1): 68-70.
- [4] 刘睿,段金彪. 具有促进组织修复的家蝇多肽及其制备方法与应用:CN202010142284.3[P]. 2020-06-12.
- [5] VALACHOVA I, TAKAC P, MAJTAN J. Midgut lysozymes of *Lucilia sericata*: new antimicrobials involved in maggot debridement therapy[J]. Insect Mol Biol, 2014, 23(6): 779-787.
- [6] ZONG J, JIANG J, SHI P, et al. Fatty acid extracts facilitate cutaneous wound healing through activating AKT, ERK, and TGF- β /Smad3 signaling and promoting angiogenesis [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(2): 478-492.
- [7] 来梦婕,陈玉峰,张英,等. 墨西哥黄唇鱼鱼肉胶原肽促进小鼠伤口愈合作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(8): 272-278.
- [8] WU J, YANG J, WANG X F, et al. A frog cathelicidin peptide effectively promotes cutaneous wound healing in mice[J]. Biochem J, 2018, 475(17): 2785-2799.
- [9] ZHAO F, LIU W, YU Y, et al. Effect of small molecular weight soybean protein-derived peptide supplementation on attenuating burn injury-induced inflammation and accelerating wound healing in rat model [J]. RSC Adv, 2019, 9(3): 1247-1259.
- [10] CANIMDAT E M D. Effects of calcitonin gene-related peptide on wound contraction in denervated and normal rat skin: a preliminary report [J]. Plast Reconstr Surg, 1998, 101(7): 1887-1890.
- [11] REINKE J M, SORG H. Wound repair and regeneration [J]. Eur Surg Res, 2012, 49(1): 35-43.
- [12] MARTIN P, PARKHURST S M. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis [J]. Development, 2004, 131(13): 3021-3034.
- [13] ADAM J S, RICHARD A F C. Cutaneous wound healing [J]. New Engl J Med, 1999, 341(10): 738-746.
- [14] FALANGA V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot [J]. Lancet, 2005, 366(9498): 1736-1743.
- [15] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. J Food Sci, 2001, 66(5): 642-646.
- [16] CHURCH F C, HAROLD E S, DAVID H P, et al. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins [J]. J Dairy Sci, 1983, 66(6): 1219-1227.
- [17] 邓乾春,陈春艳,潘雪梅,等. 白果活性蛋白的酶法水解及抗氧化活性研究 [J]. 农业工程学报, 2005, 21(11): 155-159.
- [18] PENN J W, GROBBELAAR A O, ROLFE K J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review [J]. Int J Burns Trauma, 2012, 2(1): 18-28.
- [19] LICHTMAN M K, OTERO V M, FALANGA V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis [J]. Wound Repair Regen, 2016, 24(2): 215-222.
- [20] HE X Q, YANG Y, MU L X, et al. A frog-derived immunomodulatory peptide promotes cutaneous wound healing by regulating cellular response [J/OL]. Front Immunol, 2019, 10: 2421 [2021-05-12]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02421>.