

南瓜籽多肽的制备及其对人体皮肤细胞的体外作用

王培宇, 孙培冬

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:以南瓜籽为原料制备南瓜籽蛋白。分别采用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶-胰蛋白酶、碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解南瓜籽蛋白得到南瓜籽多肽。结果表明:碱性蛋白酶-胰蛋白酶酶解南瓜籽蛋白,水解度为27.23%、多肽产率为39.20%,均为5种酶解产物中最高;碱性蛋白酶-胰蛋白酶酶解制备的南瓜籽多肽中小于1 000 Da的多肽含量高达92.72%,其具有较好的促进人体皮肤细胞增殖的性能及清除自由基作用,可降低细胞内活性氧含量,在人体皮肤细胞受到氧化损伤时,能起到良好的修复作用。

关键词:南瓜籽;多肽;酶解法;细胞增殖;活性氧

中图分类号:TS201.4;TQ936

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)06-0097-05

Preparation of pumpkin seed polypeptide and its effects on human skin cells in vitro

WANG Peiyu, SUN Peidong

(School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Using pumpkin seeds as raw materials, pumpkin seed protein was prepared. Five polypeptides were prepared respectively by enzymatic hydrolysis of pumpkin seed protein with alkaline protease, trypsin, flavor protease, alkaline protease - trypsin and alkaline protease - flavor protease. The results showed that among the five hydrolysates, the degree of hydrolysis (DH) and the yield of polypeptide with alkaline protease - trypsin were the highest (the DH value 27.23% and the yield of polypeptide 39.20%). Because the content of less than 1 000 Da polypeptide in the pumpkin seed polypeptide prepared by alkaline protease - trypsin was as high as 92.72%, so it had a good performance in promoting human skin cell proliferation. In addition, it could scavenge free radicals and reduce the content of intracellular reactive oxygen species, so it could repair cells when human skin cells were damaged by oxidation.

Key words: pumpkin seed; polypeptides; enzymatic hydrolysis; cell proliferation; reactive oxygen species

人体在正常生理过程中,体内自由基处于动态平衡,但生活节奏的加快、不良的饮食睡眠习惯、环境污染等会产生过多的自由基,打破这种平衡导致氧化应激。活性氧(ROS)是自由基的重要组成部分,过量的ROS会威胁细胞内氧化还原反应的有序进行,加速细胞老化甚至凋亡,进而影响人体健康。皮肤细胞由于还受到紫外线照射,更容易陷入ROS

过剩的状态,造成氧化损伤。因此,抗氧化在近年来成为了人们研究的重要课题,天然抗氧化剂的开发日益受到重视^[1-2]。

生物活性多肽不仅具有良好的抗氧化性能,而且具有优越的生物相容性、易吸收、健康安全等特点,成为全球天然抗氧化物研究热点。南瓜籽含丰富的油脂和蛋白质,营养丰富,尤其是其蛋白质中含多种人体必需的氨基酸,是制备多肽的优质蛋白质原料。张淑蓉等^[3]使用木瓜蛋白酶制备南瓜籽蛋白多肽,其抗氧化活性可达到V_C的20%以上。范三红等^[4]使用酸性蛋白酶制备南瓜籽多肽,采用超滤技术截留的相对分子质量小于4 ku组分清除自由

收稿日期:2019-10-15;修回日期:2020-03-02

作者简介:王培宇(1994),男,在读硕士,研究方向为天然产物与化妆品化学(E-mail)17851313553@163.com。

通信作者:孙培冬,副教授,硕士(E-mail)sunpeidong2004@126.com。

基能力优于截留的相对分子质量 10 ku 组分。目前,关于南瓜籽多肽报道^[5-7]多集中于抗氧化活性,抗氧化指标也停留在化学方法,未从细胞水平进行评价。

本文以不同的酶水解南瓜籽蛋白,得到 5 种南瓜籽多肽,经抗氧化性和细胞增殖活性测定筛选,并建立人体皮肤细胞氧化损伤模型,探究南瓜籽多肽对人体皮肤细胞体外作用机制,为南瓜籽多肽的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

南瓜籽,原产地内蒙古,巴彦淖尔市大嫂食品有限责任公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),Sigma 公司;人皮肤成纤维细胞(HSF)、人永生角质形成细胞(HaCat),北纳创联生物科技有限公司;高糖培养液(DMEM)、磷酸盐缓冲液(PBS)、0.25%胰酶、青霉素-链霉素双抗,Thermo-Fisher 公司;胎牛血清,Gibco 公司;活性氧检测试剂盒,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),碧云天生物技术;二甲基亚砜(DMSO)、氢氧化钠等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, Lyoquest Plus-85 冷冻干燥器, Waters 1525EF 高效液相色谱仪,日本东曹 TSKgel 2000SW_{XL} 凝胶色谱柱(300 mm × 7.8 mm), Tecan Infinite 200 Pro 多功能酶标仪, MCO-15AC 细胞培养箱, SW-CJ-2FD 超净工作台, Olympus Ckx41 倒置生物显微镜, CARY Eclipse 荧光分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 南瓜籽多肽的制备

参照文献[8-9]的方法制备南瓜籽蛋白和南瓜籽多肽。用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶-胰蛋白酶、碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解南瓜籽蛋白。不同酶解产物制备条件见表 1。在加入蛋白酶之前,调节蛋白质分散液温度及 pH 至表 1 对应值。单酶酶解时间为 4 h;双酶酶解过程中,第一种蛋白酶酶解 2 h 后灭活,再用第二种蛋白酶酶解 2 h。酶解期间滴加 0.5 mol/L NaOH 溶液维持溶液 pH 不变。酶解结束,待混合液冷却至室温,加入 1 mol/L HCl 调节 pH 至等电点,离心收集上清液,冷冻干燥得多肽。由上述 5 种酶酶解所得南瓜籽多肽分别命名为 JX、Y、F、JX-Y、JX-F。采用

pH-Stat 法^[10]对水解度进行测定并按式(1)计算各多肽产率。

$$\text{多肽产率} = \frac{\text{多肽的质量}}{\text{蛋白的质量}} \times 100\% \quad (1)$$

表 1 不同酶解产物制备条件

项目	JX	Y	F	JX-Y	JX-F
温度/°C	50	37	50	50-37	50-50
pH	9.0	7.5	7.0	9.0-7.5	9.0-7.0
时间/h	4	4	4	2-2	2-2
酶底质量比	0.025:1				
底物质量浓度/(mg/mL)	0.05				

1.2.2 多肽相对分子质量分布的测定

将 5 种南瓜籽多肽溶解于超纯水中。根据相对分子质量不同的多肽在葡聚糖凝胶柱中流出时间的差异,测定各多肽相对分子质量分布。

1.2.3 多肽抗氧化性能测定

参考文献[11]中方法,分别测定多肽质量浓度为 10 mg/mL 时 DPPH·、·OH、O₂⁻·清除率,以考察多肽抗氧化性能。

1.2.4 多肽对细胞增殖的影响

采用 MTT 法考察 5 种南瓜籽多肽在 0.2 mg/mL 时对人皮肤成纤维细胞(HSF)及 1.6 mg/mL 时对人永生角质形成细胞(HaCat)的增殖活性。取处于对数生长期的 HSF 和 HaCat 细胞,以 20 × 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL(空白组除外),培养箱中孵育 24 h 后,移除孔中培养液。以 DMEM 为溶剂分别配制 0.2 mg/mL 及 1.6 mg/mL 的样品溶液,每孔加入 100 μL 样品溶液孵育 24 h,以 100 μL DMEM 代替样品作为对照组。移除孔中溶液,使用 PBS 冲洗 2 次,每孔加入 100 μL 0.5 mg/mL MTT 溶液,并向不含细胞的孔中加入 100 μL 0.5 mg/mL MTT 溶液作为空白组,置于培养箱中孵育 4 h^[12]。孵育结束后每孔中加入 100 μL DMSO,充分振荡 5 min,使用酶标仪测定其在 490 nm 处的吸光值(OD),按式(2)计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = \frac{(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}})}{(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 H₂O₂ 诱导皮肤细胞氧化损伤模型建立

H₂O₂ 可以使细胞产生活性氧,打破细胞内活性氧动态平衡,诱导细胞衰老甚至凋亡。取处于对数生长期的 HSF 和 HaCat 细胞,以 20 × 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL(空白组除外),培养箱中孵育 24 h 后,移除孔中培养液。以 DMEM 为溶剂分别配制不同浓度的 H₂O₂ 溶液,每孔加入 100 μL H₂O₂ 溶液孵育 1 h,以 100 μL DMEM 代替 H₂O₂

作为对照组。移除孔中溶液并使用 PBS 冲洗 2 次,每孔加入 100 μL DMEM 溶液,置于培养箱中孵育 24 h^[13-14]。按 1.2.4 方法测定吸光值,按式(2)计算细胞活力。选择细胞活力约 70% 时为最佳损伤条件。

1.2.6 多肽对氧化损伤细胞的修复作用

使用 1.2.5 中建立的 HSF、HaCat 损伤模型评价 JX-Y 对氧化损伤细胞的修复作用。接种细胞置于培养箱中孵育 24 h 后,移除孔中培养液,向含有 HSF、HaCat 细胞的孔中分别加入 100 μL 1.4、2.8 mmol/L H_2O_2 溶液,孵育 1 h,以 100 μL DMEM 代替 H_2O_2 作为对照组。移除孔中溶液并使用 PBS 冲洗 2 次,每孔加入 100 μL 以 DMEM 为溶剂配制的不同质量浓度的 JX-Y 溶液,置于培养箱中孵育 24 h。按 1.2.4 方法测定吸光值,按式(2)计算细胞活力。

1.2.7 细胞内活性氧(ROS)测定

使用活性氧检测试剂盒测定 HSF 内活性氧水平。使用 1.2.5 中建立的损伤模型,加入以 DMEM 为溶剂配制的 0.2 mg/mL 的 JX-Y 溶液,孵育 24 h,以 100 μL DMEM 溶液代替 JX-Y 溶液作为模型组。移除孔中培养液,胰酶消化、离心收集细胞。细胞中加入以 DMEM 为溶剂配制的 10 $\mu\text{mol/L}$ 荧光探针溶液,使细胞浓度达到 20×10^3 个/mL,孵育 30 min。离心并使用 PBS 冲洗 2 次,除去未进入细胞的荧光探针。使用荧光分光光度计测定样品在激发波长 488 nm、发射波长 525 nm 处的荧光强度^[15-16]。

2 结果与分析

2.1 南瓜籽多肽的制备

水解度指蛋白被分解为多肽的程度,通常作为蛋白水解程度的指标^[17]。南瓜籽蛋白水解结果如图 1 所示。

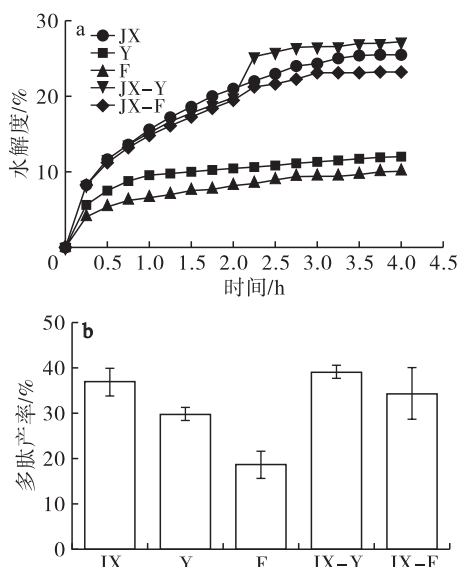


图 1 南瓜籽蛋白水解结果

从图 1a 可以看出,随着酶解时间的延长,水解度逐渐趋于平稳,4 h 后 JX、Y、F、JX-Y、JX-F 的水解度分别为 25.20%、12.02%、10.11%、27.23%、23.24%,其中 JX-Y 水解度最高。图 1b 显示,JX-Y 产率最高,达 39.20%。由此可见,使用碱性蛋白酶-胰蛋白酶可以得到更多的南瓜籽多肽。

2.2 南瓜籽多肽相对分子质量分布

由于葡聚糖凝胶特殊的网状结构,相对分子质量大的多肽先从凝胶柱中流出。根据多肽出峰情况进行峰面积积分,得出不同相对分子质量范围内多肽含量,结果见表 2。

表 2 5 种酶解产物不同相对分子质量范围的多肽含量

酶解产物	多肽含量/%		
	<1 000 Da	1 000 ~6 000 Da	>6 000 Da
JX	84.60	10.13	5.27
Y	67.27	21.29	11.44
F	54.77	22.51	22.72
JX-Y	92.72	6.13	1.15
JX-F	87.09	9.32	3.59

由表 2 可见,5 种酶解反应使南瓜籽蛋白链被不同程度、不同部位地切割,成功制得南瓜籽多肽,其中相对分子质量小于 1 000 Da 的多肽在 JX-Y 中占比最高,达 92.72%。

2.3 南瓜籽多肽的抗氧化性能

采用 DPPH \cdot 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率考察 5 种南瓜籽多肽的抗氧化能力,结果如图 2 所示。

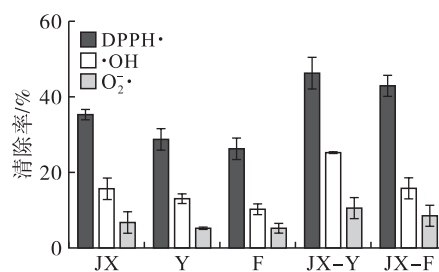


图 2 5 种南瓜籽多肽的抗氧化性能

从图 2 可以看出,抗氧化能力由小到大依次为 $\text{F} < \text{Y} < \text{JX} < \text{JX-F} < \text{JX-Y}$,其中 JX-Y 抗氧化性能最优,在其质量浓度为 10 mg/mL 时,对 DPPH \cdot 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率分别为 46.27%、25.37%、10.57%。相对分子质量小的多肽具有较小的空间位阻,可以提供更多的电子与自由基发生反应,将其转化为更稳定的产物^[18]。由于双酶酶解产物小分子多肽含量高,因此在清除自由基、抗氧化方面更具优越性。

2.4 南瓜籽多肽对细胞增殖的影响

HSF、HaCat 是人体皮肤细胞的重要组成部分,其中 HSF 位于皮肤真皮层,HaCat 位于表皮层。南瓜籽多肽对细胞增殖的影响如图 3 所示。

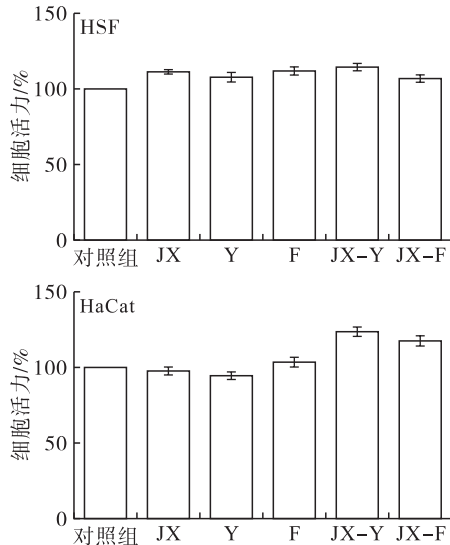


图 3 南瓜籽多肽对细胞增殖的影响

由图 3 可见,5 种南瓜籽多肽中 JX - Y 促进细胞增殖性能最优,HSF、HaCat 细胞活力分别达到 116.15%、121.02%。

2.5 H_2O_2 作用下 HSF、HaCat 细胞活力

H_2O_2 作用下细胞活力如图 4 所示。

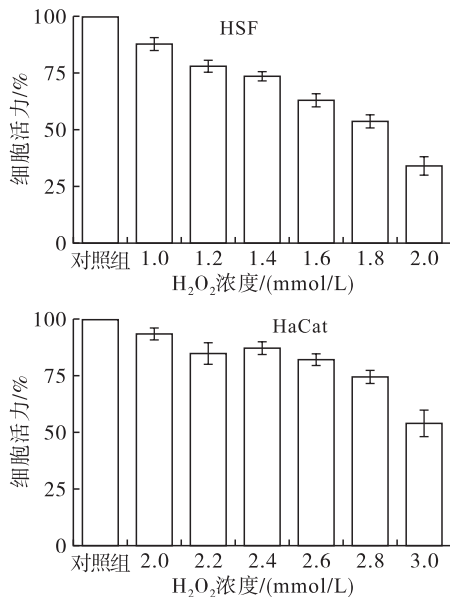


图 4 H_2O_2 作用下细胞活力

由图 4 可见,氧化损伤细胞 1 h 时,细胞活力随着 H_2O_2 浓度增加而降低,其中 H_2O_2 浓度分别为 1.4、2.8 mmol/L 时,HSF、HaCat 细胞活力为 72.21%、72.65%,接近 70%。因此,分别以 1.4、2.8 mmol/L H_2O_2 作用 HSF、HaCat 细胞 1 h 建立氧化损伤模型。

2.6 南瓜籽多肽对氧化损伤细胞的修复作用

在 5 种南瓜籽多肽中,由于 JX - Y 抗氧化性能和促进细胞增殖性能均优于其他多肽,因此进一步考察 JX - Y 对 H_2O_2 诱导的 HSF 及 HaCat 氧化损伤修复作用,结果如图 5 所示。

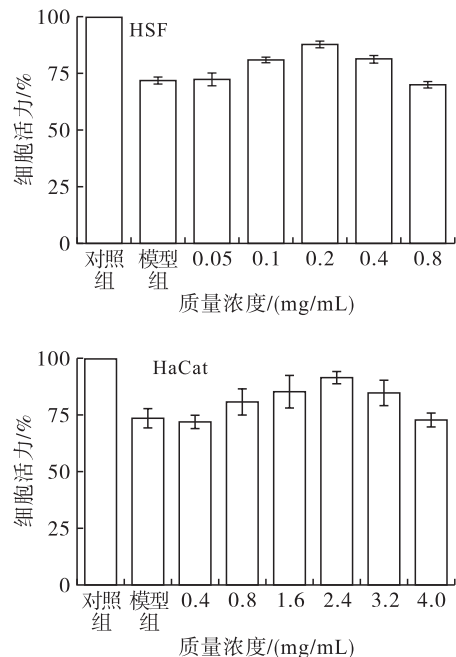


图 5 JX - Y 对 H_2O_2 诱导的细胞损伤修复作用

从图 5 可以看出,1.4 mmol/L H_2O_2 作用的 HSF 细胞活力仅为 72.69%,加入 JX - Y 孵育 24 h 后,提高了细胞活力,当 JX - Y 质量浓度为 0.2 mg/mL 时细胞活力达到最高,为 86.54%。但当 JX - Y 质量浓度继续提高至 0.8 mg/mL 时,细胞活力低于模型组,说明 JX - Y 浓度过高并不利于 HSF 的生长。

从图 5 还可以看出,2.8 mmol/L H_2O_2 作用的 HaCat 细胞活力为 73.65%,加入 JX - Y 孵育 24 h 后,同样提高了细胞活力,当 JX - Y 质量浓度为 2.4 mg/mL 时细胞活力达到最高,为 91.54%。但当 JX - Y 质量浓度为 4.0 mg/mL 时,细胞活力低于模型组,这与 HSF 的表现相似。HaCat 和 HSF 不同的是 HSF 更易受到 H_2O_2 的影响,HaCat 需要更高的多肽质量浓度提高细胞活力。

2.7 南瓜籽多肽对细胞内 ROS 水平的影响

JX - Y 在低质量浓度时对 HSF 细胞影响较为明显,因此选择 HSF 为代表测定细胞内 ROS 水平。不同组别细胞内 ROS 水平如图 6 所示。

由图 6 可见,HSF 中加入 1.4 mmol/L H_2O_2 氧化损伤 1 h 后,细胞内 ROS 水平相比于对照组明显增加,达到 163%,0.2 mg/mL JX - Y 溶液的加入使

细胞内 ROS 水平降低至 124%，表明南瓜籽多肽清除了细胞内过多的 ROS，缓解了细胞的氧化应激。

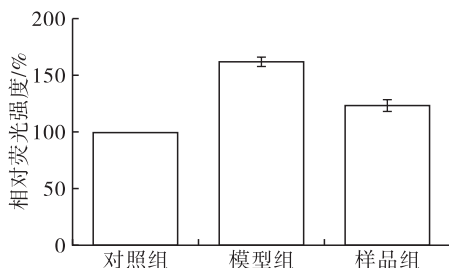


图6 不同组别细胞内 ROS 水平

3 结论

本文以南瓜籽为原料制备南瓜籽蛋白,采用酶解法酶解南瓜籽蛋白得到5种南瓜籽多肽,其中通过碱性蛋白酶-胰蛋白酶酶解制备的多肽(JX-Y)水解度、多肽产率最高,分别为27.23%、39.20%,其中相对分子质量小于1000 Da的多肽含量高达92.72%,同时其对DPPH·、·OH、O₂⁻·清除率最高,分别为46.27%、25.37%、10.57%(JX-Y质量浓度为10 mg/mL)。由于多肽相对分子质量越小越易被细胞吸收利用,因此JX-Y促进人体皮肤细胞增殖性能最优。当HSF、HaCat细胞被H₂O₂氧化损伤后,添加0.2 mg/mL JX-Y溶液不仅可以显著提高细胞活力,而且相较于损伤组细胞内ROS降低了39个百分点,缓解氧化应激,从而达到修复损伤细胞的效果。综上所述,通过碱性蛋白酶-胰蛋白酶酶解法制备的南瓜籽多肽不仅具有体外抗氧化性能,而且可以促进人体皮肤细胞增殖以及通过清除细胞内过多ROS途径修复细胞损伤。

参考文献:

[1] SAMALOVA M, MEYER A J, GURR S J, et al. Robust anti-oxidant defences in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* confer tolerance to the host oxidative burst[J]. *New Phytol*, 2013, 201(2): 556-573.

[2] EBERLEIN M, SCHEIBNER K A, BLACK K E, et al. Anti-oxidant inhibition of hyaluronan fragment-induced inflammatory gene expression[J]. *J Inflamm*, 2008, 5(1): 20.

[3] 张淑蓉, 武瑜, 梁叶星, 等. 南瓜籽仁蛋白多肽的酶法制备和抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(3): 241-244.

[4] 范三红, 王亚云, 胡雅喃, 等. 南瓜籽蛋白酶解液的超滤分离及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(20): 109-113.

[5] 刘艳荣. 南瓜籽蛋白制备及其活性多肽的研究[D]. 太原:山西大学, 2011.

[6] ZIMECKI M, KRUZEL M L. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value[J]. *J Exp Ther Oncol*, 2007, 6(2): 89-106.

[7] ERIC B D, DEOG H O, BYONG H L. Bioactive peptides[J]. *Foods*, 2017, 6(5): 1-21.

[8] 朱洁莲, 唐蔚, 宁奇, 等. 南瓜籽蛋白酶解产物的制备及其抗氧化性的研究[J]. *应用化工*, 2016, 45(1): 140-143.

[9] KIMATU B M, ZHAO L, BIAO Y, et al. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*), protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions[J]. *Food Chem*, 2017, 230: 58-67.

[10] 陈晓飞, 李锋, 周伏忠, 等. 鹰嘴豆分离蛋白的酶解工艺研究[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(33): 400-404.

[11] 唐蔚, 宁奇, 孙培冬. 南瓜籽抗氧化肽的制备及分离纯化[J]. *中国油脂*, 2016, 41(2): 20-24.

[12] 纪漫, 孙培冬. 龙眼核活性脂质的分析及其细胞增殖活性研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(8): 87-91.

[13] PARK J M, LEE J S, LEE K R, et al. *Cordyceps militaris* extract protects human dermal, fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis, and premature senescence[J]. *Nutrients*, 2014, 6(9): 3711-3726.

[14] SUN Y, ZHOU C, HUANG S, et al. Selenium polysaccharide SPMP-2a from pleurotus geesteranus alleviates H₂O₂-induced oxidative damage in HaCat cells[J]. *Biomed Res Int*, 2017(1): 1-9.

[15] 程亚军, 刘滢, 曹培让, 等. 煎炸棕榈油的理化性质及其中的极性组分对HepG2细胞的影响[J]. *中国油脂*, 2018, 43(11): 21-25, 30.

[16] 董训赞, 车绕琼, 赵永腾. 黄腐酸对单针藻 *Monoraphidium* sp. FXY-10 油脂积累及 *me-pepc*、*accD* 基因表达量的影响[J]. *中国油脂*, 2018, 43(7): 108-112.

[17] 季晓彤, 孙培冬. 桃仁多肽的分离及其抗氧化性能研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(7): 77-81.

[18] 齐希光, 陆晓婷, 张晖, 等. 不同分子量黑籽瓜种子多肽抗氧化能力的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(9): 74-80.