



孙彦庆,杜芬,朱宗敏,等. 大黄鱼鱼鳔低聚肽的制备及其延缓皮肤衰老的研究[J]. 轻工学报,2025,40(1):107-119.
SUN Y Q, DU F, ZHU Z M, et al. Preparation of swim bladder peptide of *Pseudosciaena crocea* and its study on delaying skin aging [J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(1): 107-119. DOI:10.12187/2025.01.013

大黄鱼鱼鳔低聚肽的制备及其延缓皮肤衰老的研究

孙彦庆¹, 杜芬², 朱宗敏¹, 冯晓梅³, 尚丽丽¹, 曹婉秀³, 刘楚怡^{2,3}

1. 青岛黛优佳生物科技有限公司, 山东 青岛 266001;
2. 青岛海洋生物医药研究院, 山东 青岛 266073;
3. 中国海洋大学 医药学院, 山东 青岛 266100

摘要:以超氧阴离子自由基清除率为指标,采用单因素试验和响应面试验筛选制备大黄鱼鱼鳔低聚肽(HSBP),并利用人皮肤永生角质形成细胞(HaCaT细胞)建立氧化损伤模型,检测 HSBP 对胶原蛋白、透明质酸分泌及抗氧化酶、 β -半乳糖苷酶活力的影响,评价其氧化损伤修复活性;建立 3D 重组人表皮屏障损伤模型,分析 HSBP 对其组织形态学和皮肤屏障相关蛋白表达的影响,综合评价其延缓皮肤衰老的作用。结果表明:HSBP 的最佳制备工艺为酶解时间 4 h、酶解温度 50 ℃、pH 值 7.5、菠萝蛋白酶添加量 3400 U/g,在此工艺下,超氧阴离子自由基清除率为 65.6%;HSBP 的重均分子量为 480 Da,无刺激性、无致敏性且无细胞毒性;HSBP 能显著促进体外培养的氧化损伤细胞分泌透明质酸、I 型胶原蛋白和 IV 型胶原蛋白,同时提高超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性;此外,HSBP 还能降低丙二醛和 β -半乳糖苷酶的含量,显著提高屏障损伤模型丝聚蛋白、兜甲蛋白、谷氨酰胺转移酶 I 和水通道蛋白 3 的表达量,有效修复屏障损伤的皮肤组织状态,并明显增加活细胞层数。因此,HSBP 能有效保护氧化损伤皮肤细胞并修复皮肤屏障损伤,起到延缓皮肤衰老的作用。

关键词:大黄鱼鱼鳔;低聚肽;氧化损伤;皮肤屏障损伤;皮肤衰老

中图分类号:TS254.9 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2025)01-0107-13

0 引言

随着我国老龄化社会程度的加剧和人民生活水平的提高,延缓衰老的重要性越来越受到人们的关注^[1]。皮肤是人体最大的器官,也是保护人体的

外部屏障,而衰老在皮肤中的表现最为直观^[2]。随着年龄的增长,人类皮肤中的胶原纤维会逐渐破碎流失,使皮肤组织萎缩、塌陷、变薄、干燥和粗糙,这些变化都是皮肤衰老的外在表现^[3-4]。皮肤的主要结构成分——胶原蛋白的退化已被认为是光老化

收稿日期:2024-06-21;修回日期:2024-08-29;出版日期:2025-02-15

基金项目:国家重点研发计划项目(2023YFF1105305);中国工程院院地合作重大咨询研究项目(20220118);中央引导地方科技发展资金项目(YDZX2023090)

作者简介:孙彦庆(1977—),男,内蒙古自治区鄂尔多斯市人,青岛黛优佳生物科技有限公司工程师,主要研究方向为功效原料及化妆品研发。E-mail:bennyavon@163.com

通信作者:刘楚怡(1986—),女,黑龙江省大庆市人,中国海洋大学教授级高级工程师,博士,主要研究方向为功能蛋白活性肽及功能制品。E-mail:liucy@ouc.edu.cn

和自然皮肤老化的重要标志^[5-6]。随着机体的衰老,皮肤细胞的形态和功能也会发生相应改变,其中包括角质细胞活力和分化能力下降及脂质合成减少^[7-8],导致皮肤屏障功能受损,修复能力降低,从而加速机体的衰老^[9-10]。因此,寻找延缓衰老的高活性成分已成为学术界的重要课题。

鱼胶,也称为花胶,由鱼鳔干制获得,其食用历史可追溯至《齐民要术》中的记载^[11]。传统医学理论认为,大黄鱼鱼鳔具有很高的药用价值,是滋补名品,被称为海洋人参^[12]。大黄鱼鱼鳔中的蛋白质含量较高,主要为胶原蛋白,且富含钙、锌、铁、硒等矿物质^[13-14],脂肪含量较低,具有改善神经系统功能、延缓衰老、提高机体免疫力^[15-17]等作用。目前,大黄鱼鱼鳔多以冻鲜品、干制品的形式销售,附加值较低,资源浪费严重,若通过酶工程技术及系列精制工艺将大黄鱼鱼鳔中大分子的胶原蛋白水解制成小分子的胶原肽,甚至是相对分子质量小于1 kDa的低聚肽,则可以更好地提高其透皮吸收性,更大程度地发挥其应用价值。

胶原肽因具有活性高、生物相容性好、易吸收等优点,被广泛应用于延缓衰老产品的开发^[18]。近年来,国内外对胶原肽应用于延缓衰老领域的研究不断深入,特别是在抗氧化、抗光老化、舒敏修复、屏障损伤修复等方面^[19-20]。基于此,本研究拟利用单因素试验结合响应面试验筛选制备大黄鱼鱼鳔低聚肽(Swim Bladder Peptide of *Pseudosciaena Crocea*, HSBP),在安全性评价的基础上,利用氧化损伤人皮肤细胞模型和3D重组人表皮屏障损伤模型,从胶原蛋白和透明质酸(HA)分泌、抗氧化酶和 β -半乳糖苷酶活力、组织形态学、皮肤屏障相关蛋白表达等角度,探索HSBP在皮肤氧化损伤和屏障损伤修复方面的作用机制,以期为后续延缓衰老产品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

干制大黄鱼鱼鳔,市售;人皮肤永生化角质形成细胞(HaCaT细胞),中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心;3D重组皮肤EpiKutis,广州博

溪生物有限公司;无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)级BALB/c成年小鼠(质量18~22 g,雌性),济南彭悦实验动物有限公司;胎牛血清(Gbico),美国Life Technologies Corporation公司;PBS缓冲液,武汉赛维尔生物科技有限公司;CCK-8试剂盒(细胞增殖及毒性检测试剂盒)、小鼠BrdU-Elisa试剂盒、人I型胶原蛋白(COL I)ELISA科研试剂盒、人III型胶原蛋白(COL III)ELISA科研试剂盒、人IV型胶原蛋白(COL IV)ELISA科研试剂盒、HA酶联免疫分析试剂盒,晶美生物科技有限公司;DMEM高糖培养基、青链霉素混合液(100 $\times$)细胞培养专用、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性检测试剂盒、丙二醛(MDA)含量检测试剂盒、胰蛋白酶消化液(0.25%)、超氧阴离子含量检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、菠萝蛋白酶、苏木素伊红(HE)染色试剂盒、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒,北京索莱宝生物科技有限公司;己基肉桂醛、十二烷基硫酸钠(Sodium Lauryl Sulfate, SLS)、谷胱甘肽(L-Glutathione, GSH)、H₂O₂,美国Sigma-Aldrich公司;TsingriZzol总RNA提取试剂、转录试剂盒SynScript® III RT SuperMix for qPCR、ArtiCanCEO SYBR qPCR Mix,擎科生物技术有限公司。若无特指,所用试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

YDS-35-125型贮存型生物液氮容器,成都金凤液氮容器有限公司;CCL-170B-8型二氧化碳培养箱,新加坡艺思高科技有限公司;ME204E型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;HWS-12型电热恒温水浴锅、DHP-9052型恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;TDZ5-WS型离心机,湘潭湘仪仪器有限公司;Spark型多功能酶标仪,瑞士帝肯集团;T100型PCR仪,美国伯乐生命医学产品有限公司;WPC-P25型微孔板离心机,杭州奥盛仪器有限公司;LightCycler® 96型荧光定量PCR仪,瑞士罗氏生命医学有限公司;CKX53型倒置显微镜,奥林巴斯株式会社;BONA-GM-18H型有机膜分离实验机,山东博纳生物科技集团;Agilent 1260高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 HSBP 制备及表征 1) 大黄鱼鱼鳔匀浆制备。取一定量的干制大黄鱼鱼鳔,清洗除沙后,隔水蒸 15 min,用自来水泡发 48 h 后,切成小块,称其质量;按照 $m(\text{大黄鱼鱼鳔}):V(\text{超纯水})=1:4$ 的比例向大黄鱼鱼鳔小块中加入超纯水,搅碎、均质,得到大黄鱼鱼鳔匀浆,以超氧阴离子自由基清除率为响应值,进行酶解单因素和响应面筛选试验。

2) HSBP 酶解单因素筛选试验。pH 值:加入 3000 U/g 菠萝蛋白酶,分别调节 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0,在 45 °C 酶解 4 h;酶添加酶量:调节 pH 值至 7.0,分别加入 1000 U/g、2000 U/g、3000 U/g、4000 U/g 和 5000 U/g 菠萝蛋白酶,在 45 °C 酶解 4 h;酶解温度:调节 pH 值至 7.0,加入 3000 U/g 菠萝蛋白酶,分别在 30 °C、35 °C、40 °C、45 °C 和 50 °C 酶解 4 h;酶解时间:调节 pH 值至 7.0,加入 3000 U/g 菠萝蛋白酶,在 45 °C 分别酶解 2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h。各试验组酶解完成后,于 100 °C 条件下灭酶 5 min,采用超氧阴离子试剂盒,分别考查 pH 值、酶添加量、酶解温度和酶解时间对 HSBP 的超氧阴离子自由基清除率的影响。

3) HSBP 酶解响应面筛选试验。在单因素试验的基础上,调节 pH 值至 7.5^[21],选取优化因素为酶解时间(A/h)、酶解温度($B/^\circ\text{C}$)和菠萝蛋白酶添加量($C/(U\cdot g^{-1})$),同样以超氧阴离子自由基清除率为响应值(Y),设计三因素三水平响应面试验。

4) HSBP 精制。以优化条件制备得到 HSBP 粗酶解液后,按照总体积的 0.1% 加入活性炭,于 55 °C 条件下脱色 30 min,过滤,并过 0.45 μm 膜,冷却后,于 10 000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液,过 0.45 μm 膜后,使用有机膜分离实验机(参数设置为温度 25 °C、压力 0.21 ~ 0.26 MPa、流速 0.45 mL/s)将 HSBP 过 200 Da 有机膜,收集浓液,喷雾干燥处理后,备用。

5) HSBP 相对分子质量分布测定。使用 TSK GEL G3000PWL 色谱柱,通过高效液相色谱仪测定 HSBP 的相对分子质量分布,并通过凝胶渗透色谱分析(Gel Permeation Chromatography, GPC)软件分析 HSBP 的重均分子量及各相对分子质量区间的

蛋白分布情况^[22]。

6) HSBP 透皮吸收性测定。按照文献[23]方法测定 HSBP 的透皮吸收性。每组设置 3 个平行,采用改良 Franz 扩散池,制备去除皮下脂肪的离体小鼠皮肤,以表皮向上方向固定在供给池与接受池之间,透皮面积为 1.77 cm²,接受液体积为 12 mL。以 0.5% (若无特指,百分数均指质量分数)的叠氮化钠生理盐水为接受液,于 32 °C、600 r/min 条件下进行透皮吸收实验,用生理盐水配制 1% 的 HSBP 生理盐水为受试液,用 BCA 试剂盒检测 12 h 和 24 h 时透过皮肤的 HSBP 含量,按照下式计算相应累计透过量。

$$Q_n = \frac{VC_n + V_0 \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{A}$$

其中, Q_n 表示 t 时间样品单位面积累计透过量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$; A 表示渗透面积,取值 1.77 cm²; C_n 表示 t 时间浓度测定值; C_i 表示 t 时间之前浓度测定值; V 表示接受液总体积,取值 12 mL; V_0 表示取样体积,取值 1 mL。

1.3.2 HSBP 的皮肤刺激性和致敏性评价 依据《化妆品-体外皮肤刺激性测试方法(SIT)》(T/SHRH 008—2018)^[24]中的方法,利用体外重组表皮模型对 HSBP 进行皮肤刺激性评价。设计阴性对照组(无菌 PBS 缓冲液)、阳性对照组(质量分数 5% 的 SLS)和 HSBP 样品组,给药方式为先加入 25 μL PBS 缓冲液润湿模型内表面,再称取 25 mg HSBP 均匀铺展于模型表面。按照标准方法进行皮肤刺激实验,读取 OD_{570} ,计算相对组织活力,并按照标准方法进行刺激分离标准评价。

按照《化妆品皮肤过敏试验-局部淋巴结法》(SN/T 4029—2014)中的 BrdU-Elisa 方法,并参考文献[25-26],对 HSBP 进行皮肤致敏性评价。取 20 只 SPF 级 Balb/c 成年小鼠,每组 4 只,随机分为 5 组,分别按照 HSBP 推荐剂量的 1 倍、5 倍和 10 倍(分别为 1%、5%、10% 的 HSBP 溶液)设置 3 个受试物剂量组,以溶剂为阴性对照,按照标准要求,以 25% 的已基肉桂醛为阳性对照组。分别于实验第 1 d、2 d 和 3 d 在小鼠双耳背部涂抹 25 μL 对应受试物,并于第 5 d 给每只小鼠腹腔注射 0.5 mL BrdU 标记液,标记 24 h 后

处死小鼠,取小鼠耳部双侧淋巴结,加入1 mL PBS 缓冲液后研磨,过200目筛网,得单细胞悬液,并用PBS 缓冲液定容至14 mL。使用小鼠 BrdU-Elisa 试剂盒检测该单细胞悬液的细胞增殖情况,于370 nm 和492 nm 处测试吸光度,并按照下式计算 BrdU 标记指数和刺激指数(Stimulation Index, SI)。

$$\text{BrdU 标记指数} = (\text{受试物 } OD_{370} - \text{空白 } OD_{370}) /$$

$$(\text{受试物 } OD_{492} - \text{空白 } OD_{492})$$

$$SI = \text{受试物组 BrdU 标记指数均值} /$$

$$\text{溶剂对照组 BrdU 标记指数均值}$$

1.3.3 HSBP 的 HaCaT 细胞毒性评价 将 HaCaT 细胞以每孔 100 μL 、 4×10^4 个的密度接种于 96 孔板中,每组 3 个平行,置于二氧化碳培养箱(温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、二氧化碳体积分数 5%,若无特指,后续条件相同)中过夜培养。24 h 后,向空白孔和对照组中加入新鲜的 DMEM 完全培养基(DMEM 高糖培养基、青链霉素混合液和胎牛血清体积分数分别为 89.5%、0.5% 和 10.0%),实验组分别加入含有 HSBP(质量浓度分别为 0.05 g/L、0.10 g/L、0.20 g/L、0.50 g/L 和 1.00 g/L)的新鲜 DMEM 完全培养基,放入二氧化碳培养箱中孵育 48 h。使用 CCK-8 试剂盒测定各孔 450 nm 处吸光度,计算细胞活力(%) (样品组细胞 OD_{450} 与阴性对照组细胞 OD_{450} 的比值)。

1.3.4 氧化损伤 HaCaT 细胞活力测定 利用 1×10^{-3} mol/L H_2O_2 建立 HaCaT 细胞衰老模型。取生长状态良好的 HaCaT 细胞,将细胞浓度调整至 1×10^4 个/mL,将该 HaCaT 细胞以每孔 100 μL 的量接种于 96 孔板中,每组 3 个平行,置于二氧化碳培养箱中培养。当细胞生长面积达到 50% 左右时,向除空白对照组外的各孔中加入 10 μL 含有 1×10^{-3} mol/L H_2O_2 的 DMEM 高糖培养基,诱导刺激 2 h 后,吸出并弃掉 96 孔板中所有液体,再向空白对照组和氧化损伤模型组各孔中加入 100 μL DMEM 完全培养基,向 HSBP 干预组中加入 100 μL 含有 HSBP 的 DMEM 完全培养基,使 HSBP 的最终质量浓度分别为 0.05 g/L、0.10 g/L、0.20 g/L、0.50 g/L 和 1.00 g/L。将各组置于二氧化碳培养箱中继续培养 24 h,使用 CCK-8 试剂盒测定各孔 450 nm 处的吸光度,计算细胞活力(%) (样品组细胞 OD_{450} 与阴性对照组

细胞 OD_{450} 的比值)。

1.3.5 HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞胶原、透明质酸分泌的影响 本实验设置空白对照组(NC)、模型对照组(MC)、阳性对照组(PC)和 HSBP 干预组(H)。取 1 mL 生长状态良好的 HaCaT 细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于 6 孔板中,每组 3 个平行,置于二氧化碳培养箱中培养。当细胞生长面积达到 50% 左右时,分别向 MC 组、PC 组和 H 组每孔中加入 100 μL 含有 1×10^{-3} mol/L H_2O_2 的 DMEM 高糖培养基,诱导刺激 2 h 后,吸出弃掉 6 孔板中所有液体,再向 NC 组和 MC 组 6 孔板中每孔加入 1 mL DMEM 完全培养基,向 H 组每孔加入 1 mL 含有质量浓度 0.1 g/L HSBP 的 DMEM 完全培养基,向 PC 组每孔加入 1 mL 含有质量浓度 0.1 g/L GSH 的 DMEM 完全培养基,将各组置于二氧化碳培养箱中培养 48 h 后,利用 COL I ELISA 科研试剂盒、COL III ELISA 科研试剂盒、COL IV ELISA 科研试剂盒和 HA 酶联免疫分析试剂盒,通过双抗体夹心 ELISA 法测定各组 HaCaT 细胞分泌的 COL I、COL III、COL IV 及 HA 含量。

1.3.6 氧化损伤 HaCaT 细胞抗氧化指标测定 按照 1.3.5 实验设计进行造模及给药处理后,置于二氧化碳培养箱中培养 48 h,吸出并弃掉 6 孔板中所有液体,向每孔中加入 100 μL 胰蛋白酶消化液(0.25%)消化细胞,在消化过程中随时观察细胞的状态,当细胞从孔板底脱落,且由贴壁状态变为悬浮状态时,再向每孔中加入 1 mL DMEM 高糖培养基停止消化反应;使用吸管反复吹打获得细胞悬液,吸出每孔中所有细胞悬液置于各自离心管中,于 1200 r/min 条件下离心 10 min,弃掉上清液,收集沉淀,获得各组细胞;按照 SOD 活性检测试剂盒(WST-1 法)、GSH-Px 活性检测试剂盒和 MDA 含量检测试剂盒要求,测定 SOD 活力、GSH-Px 活力和 MDA 质量浓度,分析 HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞抗氧化指标的影响。

1.3.7 氧化损伤 HaCaT 细胞 β -半乳糖苷酶阳性率测定 按照 1.3.5 实验设计进行造模及给药处理,置于二氧化碳培养箱中培养 24 h 后,吸出并弃掉 6 孔板中所有液体,按照 β -半乳糖苷酶染色试剂盒说

说明书中的方法,对不同处理组的细胞进行固定和染色,染色工作液需用现配。固定完成后,将孔板周围密封,置于恒温培养箱中孵育过夜,注意染色过程不能在二氧化碳培养箱中进行。除去染色液后,加入 2 mL PBS 缓冲液,置于倒置显微镜下,选取 5 个区域进行蓝色染色细胞计数,计算阳性细胞在总细胞数量中的占比。

1.3.8 HSBP 的修复皮肤屏障损伤功效评价 将 3D 重组皮肤 EpiKutis 加入 6 孔板中,设置 NC 组、MC 组、PC 组和 H 组,每组 3 个重复。MC 组、PC 组和 H 组每孔加入 25 μ L 2 g/L SLS 溶液进行屏障损伤模型造模,24 h 后,使用无菌 PBS 缓冲液洗净 EpiKutis 表面,取 25 μ L 0.1 g/L HSBP 溶液缓慢滴加于 H 组模型表面,PC 组和 MC 组以同样方式滴入 25 μ L 0.1 g/L GSH 溶液和 25 μ L 无菌 PBS 缓冲液,NC 组在造模及给药阶段均加入 25 μ L 无菌 PBS 缓冲液。给药结束后,将各组 3D 重组皮肤置于二氧化碳培养箱中培养 24 h。孵育完成后,收集各组重组皮肤培养液,环切取下重组皮肤模型,进行后续 RNA 提取、蛋白表达情况分析、ELISA 法检测及组织切片染色。

1.3.9 HSBP 对 SLS 刺激的重组皮肤组织形态学的分析 按照 1.3.8 实验设计进行造模及给药处理后,将各组重组皮肤置于二氧化碳培养箱中培养 24 h;孵育完成后,环切取下重组皮肤模型,切片,进行 HE 染色,观察重组皮肤模型的组织形态。

1.3.10 SLS 刺激的重组皮肤屏障蛋白表达的测定 按照 1.3.8 实验设计进行造模及给药处理后,将各组重组皮肤置于二氧化碳培养箱中培养 24 h;孵育完成后,环切取下重组皮肤模型,向其中加入 1 mL Trizol 总 RNA 提取试剂进行 RNA 提取。以擎科逆转录试剂盒 SynScript[®] III RT SuperMix for qPCR 进行逆转录扩增,反转录得到的 cDNA 产物经 2 倍稀释后作为 qPCR 模板,根据检测基因设计引物,引物序列见表 1,以擎科 ArtiCanCEO SYBR qPCR Mix 进行扩增,计算各实验组的基因表达量。

1.4 数据统计与处理

采用 Graphpad Prism 9.5 软件分析实验数据并绘图;实验数据均以(平均值 $\pm$ 标准差)表示;采用 t

检验分析两组数据之间的差异性;实验数据均由 2 次及以上重复实验得出。* ($P < 0.05$)、** ($P < 0.01$)、*** ($P < 0.001$)、**** ($P < 0.0001$) 表示在不同置信区间内差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 HSBP 的制备工艺优化结果分析

在评估胶原肽延缓衰老功效时,其减轻皮肤氧化应激能力是一个关键指标^[27-28],因此,本文选择超氧阴离子自由基清除率作为响应值,体外以抗氧化能力为指标,对延缓衰老功效的胶原肽进行初步筛选。HSBP 制备的单因素试验结果见图 1。由图 1 可知,当酶解温度为 45 $^{\circ}$ C、酶解时间为 2 h、pH 值为 7.5、酶添加量为 4000 U/g 时,超氧阴离子自由基清除率最高。

在此基础上,通过 Design-Expert 软件对响应面试验数据进行分析及回归拟合,得到回归方程:

$$Y = 61.65 + 0.24A + 0.20B + 3.27C + 0.058AB - 0.84AC - 0.57BC - 5.89A^2 - 10.15B^2 - 4.19C^2$$

方差分析见表 2,该数学模型 F 值为 9.05 ($P = 0.0042 < 0.01$),达到极显著水平,说明该方程的实验点与结果相吻合,而失拟项的 F 值为 0.93 ($P = 0.5033 > 0.05$),差异不显著,表明方程没有失拟因素,回归模型与实际实验拟合较好,模型能够反映真实情况。因此,可利用此模型确定 HSBP 的制备工艺。图 2 为各因素交互作用的响应面图。由图 2 可知,任意两个因素之间均存在相对明显的交互作用,其中酶解温度与酶解时间之间的交互作用最为明显。

表 1 屏障相关蛋白引物序列

Table 1 Primers sequence of barrier associated proteins

引物名称	引物序列(5'to3')	产物大小/bp
1-FLG-F	AGGCTCCTTCAGGCTACATTC	208
1-FLG-R	GGATTCTTCAGGATTGCGGA	
2-LOR-F	GGCACCAGATGGGCTTAGAG	108
2-LOR-R	AGAACTAGATGCAGCCGGAG	
3-AQP3-F	CCTTCTTGGGTGCTGGAATAGTT	197
3-AQP3-R	GGCCAGCACACACAGATAAG	
4-TGM1-F	ACGACACAGACACATCCCTTAC	250
4-TGM1-R	TTCATGTAGACCAGGCCATCTCTT	
β -actin-F	CCTTCCTGGGCATGGAGTC	189
β -actin-R	TGATCTTCATTGTGCTGGGTG	

根据响应面试验结果,确定 HSBP 的最佳制备工艺为酶解时间 3.99 h、酶解温度 50 ℃、pH 值 7.5、菠萝蛋白酶添加量 3 391.09 U/g,此时超氧阴离子自由基清除率的理论值为 65.28%。考虑实际制备过程中的可操作性,调整最佳制备工艺为酶解时间 4 h、酶解温度 50 ℃、pH 值 7.5、菠萝蛋白酶添加量为 3400 U/g,以调整后的制备工艺进行 3 次平行验证实验,超氧阴离子自由基清除率平均为 65.60%,测定值稳定、偏差小,证明该结果合理可靠,且 HSBP 的超氧阴离子自由基清除率优于文献报道的明太鱼胶原肽(4.42 mg/mL)^[29]和海参胶原肽(10 mg/mL)^[22]。

2.2 HSBP 的表征分析

对 HSBP 的相对分子质量分布进行分析,HSBP 的重均分子量为 480 Da,其中 < 0.5 kDa 占比 71.045%,0.5 ~ 1.0 kDa 占比 21.448%,1.0 ~ 3.0 kDa 占比仅 7.550%。

HSBP 的透皮吸收实验结果见表 3。由表 3 可知,当 HSBP 给药质量浓度为 5 g/L、10 g/L 和 20 g/L 时,随着时间的延长,其透过量均逐渐增加,24 h 后,3 个给药质量浓度下 HSBP 的透过量分别达到 $(2\,486.87 \pm 108.37) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $(3\,918.01 \pm 124.75) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $(5\,445.69 \pm 157.47) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。该结果与文献[30]中的报道较一致,且其 24 h 累计透过量优于文

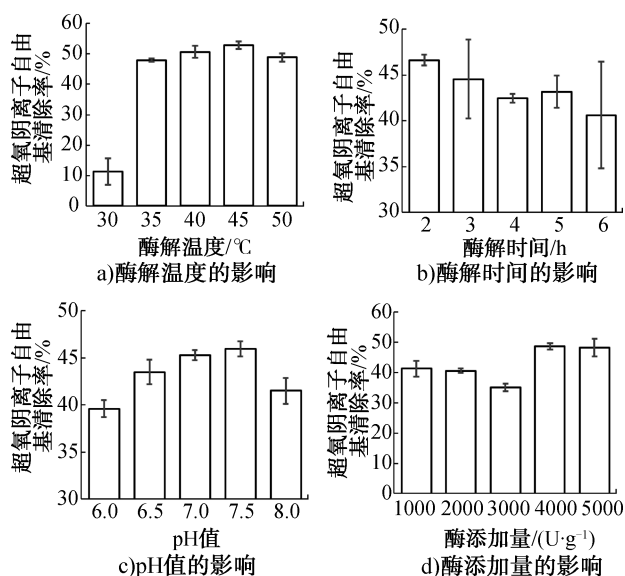


图 1 HSBP 制备的单因素试验结果

Fig. 1 Results of single factor experiments for the preparation of HSBP

献报道的鹿筋胶原肽和海蜇胶原肽^[23],表明 HSBP 具有较好的透皮性。

2.3 HSBP 的皮肤刺激性和致敏性评价结果分析

HSBP 的皮肤刺激性评价结果见表 4。由表 4 可知,HSBP 对体外重组 3D 皮肤细胞增殖有促进作用,且无细胞毒性。细胞存活率均高于 50%,说明 HSBP 对皮肤基本无刺激性。

HSBP 的皮肤致敏性评价结果见表 5。由表 5 可知,分别涂抹 3 d 1%、5%和 10%的 HSBP 后,3 个剂量组的小鼠均未观察到异常临床体征,但涂抹 25%己基肉桂醛的阳性对照从涂抹第 1 d 起,小鼠的耳廓就已出现明显红肿的过敏症状。按照判断标准($SI \geq 1.6$ 判定为致敏阳性, $SI < 1.6$ 判定为无致敏性)^[25]可判断 HSBP 无致敏性。

2.4 HSBP 的 HaCaT 细胞毒性评价结果分析

不同质量浓度 HSBP 对 HaCaT 细胞活力的影响见图 3。由图 3 可知,与对照组相比,HSBP 在 0.05~1.00 g/L 范围内的细胞活力均在 100%以上,表明 HSBP 对 HaCaT 细胞无毒性,且当质量浓度为 0.10 g/L 时,HSBP 对 HaCaT 的细胞活力具有显著促进作用($P < 0.05$)。因此,后续实验中选择 0.10 g/L 作为 HSBP 和对 HaCaT 细胞相关实验的给药质量浓度。

2.5 HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞活力的影响分析

不同质量浓度 HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞

表 2 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	807.89	9	89.77	9.05	0.004 2	**
A	0.46	1	0.46	0.047	0.835 0	
B	0.31	1	0.31	0.031	0.864 4	
C	85.45	1	85.45	8.61	0.021 9	
AB	0.014	1	0.01	0.00	0.971 5	
AC	2.81	1	2.81	0.28	0.611 0	
BC	1.32	1	1.32	0.13	0.726 5	
A ²	146.03	1	146.03	14.72	0.006 4	
B ²	433.86	1	433.86	43.73	0.000 3	
C ²	74.01	1	74.01	7.46	0.029 3	
残差	69.45	7	9.92			
失拟项	28.56	3	9.52	0.93	0.503 3	不显著
纯误差	40.88	4	10.22			
总和	877.33	16				

活力的影响见图 4。由图 4 可知,与对照组相比,HSBP 在 0.05 ~ 1.00 g/L 范围内的细胞活力均在 100% 以上,无明显细胞毒性,后续实验中选择 0.10 g/L 作为 HSBP 对 H₂O₂ 实验的给药质量浓度;与氧化损伤模型组相比,添加不同质量浓度 HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞活力均有显著 ($P <$

0.01) 促进作用。

2.6 HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞胶原蛋白和 HA 分泌的影响分析

HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞胶原蛋白和 HA 分泌的影响见图 5。由图 5a)—b) 可知,与阴性对照组相比,氧化损伤 HaCaT 细胞分泌的 COL I 质量浓度极显著降低 ($P < 0.0001$),仅为正常细胞的 67.63%,说明皮肤细胞发生氧化损伤后,细胞中的 COL I 分泌量会显著下降;当添加 0.10 g/L HSBP 后,与模型组相比,HSBP 组 COL I 质量浓度较模型组极显著提高了 68.44% ($P < 0.0001$),且高于 GSH 对照组;阴性对照组 COL III 质量浓度显著高于模型组 ($P < 0.001$),说明氧化损伤会显著降低 HaCaT 细胞的 COL III 分泌量;阳性对照组与 HSBP 组的 COL III 质量浓度均没有显著提高 ($P > 0.05$),说明 GSH 和 HSBP 在促进氧化损伤皮肤 COL III 分泌方面效果均不显著。因此,HSBP 能够极显著促进氧化损伤皮肤 COL I 的分泌,但对 COL III 分泌的促进效果不显著。

表 3 HSBP 的透皮吸收实验结果

Table 3 Transdermal absorption performance of HSBP

给药质量 浓度/ (g · L ⁻¹)	Q _a / (μg · cm ⁻²)		
	6 h	12 h	24 h
5	1 359.72±126.35	1 820.29±89.56	2 486.87±108.37
10	1 523.01±105.48	2 141.34±135.47	3 918.01±124.75
20	2 669.49±113.57	3 292.13±142.20	5 445.69±157.47

表 4 HSBP 的皮肤刺激性评价结果

Table 4 Skin irritation evaluation results of HSBP

组别	相对组织活力平均值/%	判断(≤50%有刺激性)
HSBP	92.40±13.62	无刺激性(NI)
阴性对照	100.00±22.41	无刺激性(NI)
阳性对照	8.59±1.47	刺激性(I)

表 5 HSBP 的皮肤致敏性评价结果

Table 5 Skin sensitization evaluation results of HSBP

组别	质量分数/%	BrdU 标记指数	SI	致敏性判断
阴性对照	—	0.155±0.025	1.000	—
HSBP	1	0.166±0.036	1.070	无致敏性
	5	0.193±0.018	1.245	
	10	0.204±0.029	1.316	
阳性对照	25	0.305±0.048	1.968	致敏阳性

注:—表示无需统计或判断。

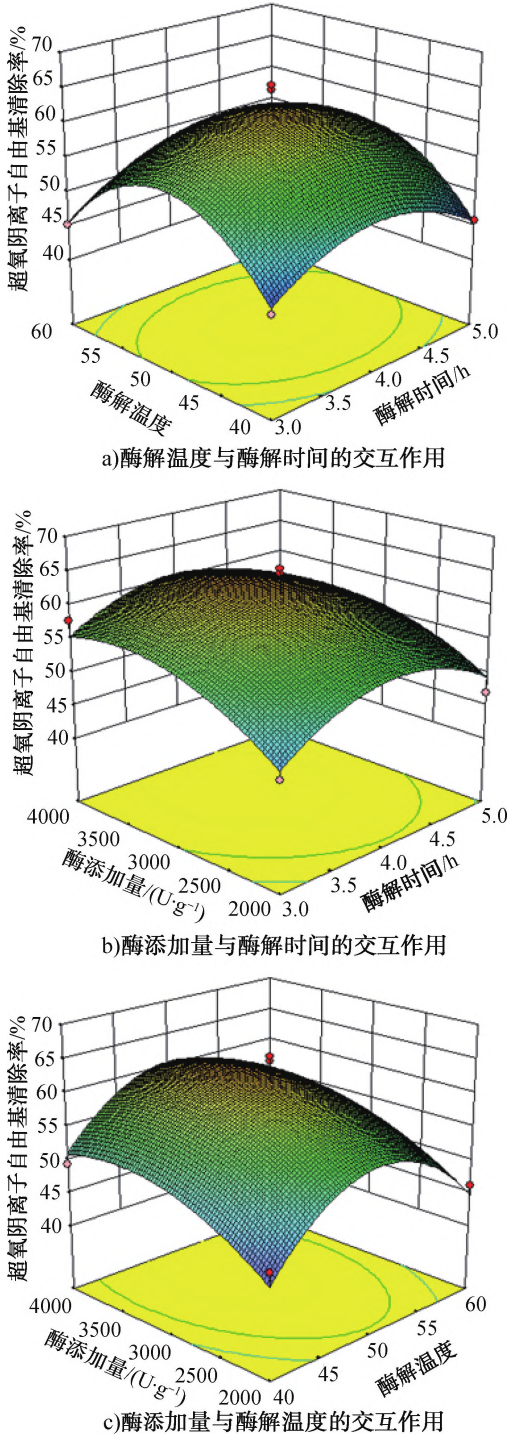


图 2 各因素交互作用的响应面图

Fig. 2 Response surface plot of the interactive effects of factors

由图 5c) 可知,与空白组相比,模型组 COL IV 的质量浓度显著下降 ($P < 0.0001$),说明人类皮肤细胞氧化损伤后,其 COL IV 分泌量显著下降;GSH 对氧化损伤皮肤细胞 COL IV 的分泌没有显著促进作用 ($P > 0.05$);而 HSBP 能够显著促进氧化损伤细胞 COL IV 分泌 ($P < 0.01$),使其分泌量增加。

由图 5d) 可知,与阴性对照组相比,模型组 HA 质量浓度显著下降 ($P < 0.05$);经 HSBP 处理后,氧化损伤 HaCaT 细胞 HA 质量浓度极显著提高 ($P < 0.0001$),相较于模型组提升了 37.45%,HA 质量浓度甚至回升至氧化损伤前水平,达到阴性对照组 HA 质量浓度的 115%,说明 HSBP 能显著促进氧化损伤皮肤细胞内 HA 的分泌。

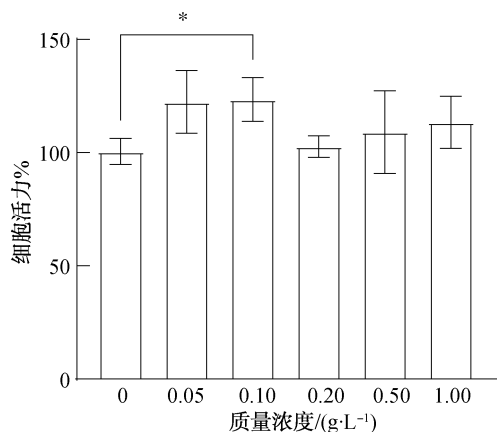


图 3 不同质量浓度 HSBP 对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of HSBP on HaCaT cell viability

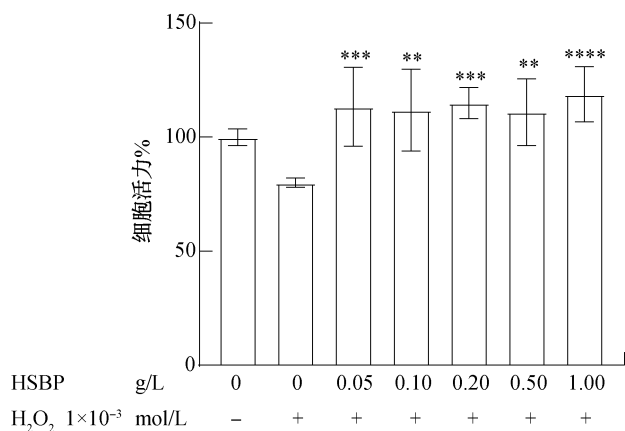


图 4 不同质量浓度 HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞活力的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of HSBP on the viability of oxidized HaCaT cells

2.7 HSBP 对氧化损伤 HaCaT 细胞抗氧化指标和 β -半乳糖苷酶的影响分析

HSBP 对氧化损伤 HaCaT 抗氧化指标和 β -半乳糖苷酶的影响见图 6。由图 6a) — c) 可知,与空白组相比,模型组的 SOD 和 GSH-Px 活力显著降低 ($P < 0.0001$),MDA 的含量显著升高 ($P < 0.0001$);与模型组相比,HSBP 组细胞的 SOD 酶活力和 GSH-Px 活力均极显著升高 ($P < 0.0001$),MDA 含量显著降低 ($P < 0.0001$),阳性对照 GSH 组与 HSBP 组相似,其 SOD 酶活力升高到与空白组无显著性差异 ($P > 0.05$) 水平;说明 HSBP 能有效抑制氧化损伤细胞的过氧化程度,提高 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量,增强皮肤细胞的抗氧化防御能力。

由图 6d) 可知,经 H_2O_2 诱导的氧化损伤 HaCaT 细胞 β -半乳糖苷酶阳性染色率极显著上升 ($P < 0.0001$),上升至氧化损伤前的 4.29 倍。HSBP、GSH 组被染色细胞数量均极显著下降 ($P < 0.0001$),分别下降至模型组的 55.75% 和 50.20%。 β -半乳糖苷酶是细胞衰老特异性标志物^[30],因此,HSBP 能有效地保护氧化损伤 HaCaT 细胞,起到延缓衰老的作用。

2.8 HSBP 对 SLS 刺激的重组皮肤组织形态学的影响分析

经 HE 染色后,对各组重组皮肤的组织微观生理学结构进行分析,结果见图 7。由图 7 可知,SLS 刺激后,皮肤屏障变得疏松,活细胞层厚度显著降低,而经 HSBP 处理后,活细胞层厚度显著增加,且对皮肤基底的损伤也有明显改善作用;SLS 刺激后,皮肤角质层变得疏松,且发生明显断裂等现象,说明质量浓度为 2 g/L 的 SLS 已对皮肤屏障造成损伤,而经 HSBP 处理后,角质层的疏松程度得到明显改善。因此,HSBP 的修复皮肤屏障作用优于 GSH。

2.9 HSBP 对 SLS 刺激的重组皮肤屏障蛋白表达影响分析

HSBP 对 SLS 刺激的重组皮肤屏障蛋白表达的影响见图 8。由图 8a) 可知,屏障损伤使细胞中丝聚蛋白 (Filaggrin, FLG) 的表达量显著降低,经过 HSBP 处理后,其 FLG 表达量得到极显著提升 ($P <$

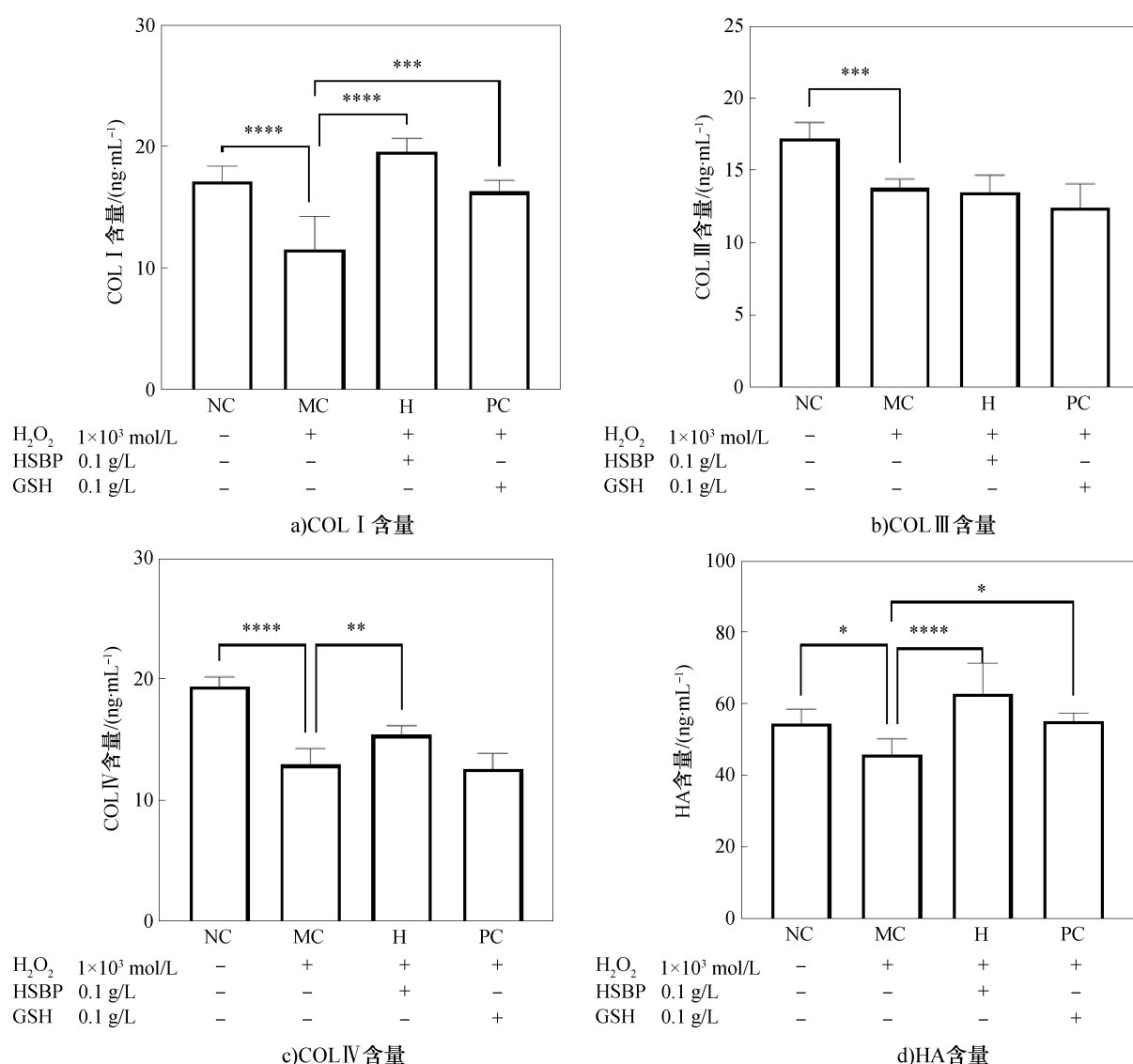


图5 HSBP对氧化损伤HaCaT细胞胶原蛋白和HA分泌的影响

Fig. 5 Effects of HSBP on collagen and HA in oxidation-damaged HaCaT cells

0.000 1),说明 HSBP 能够通过改善 FLG 表达量修复细胞屏障。FLG 是由丝聚蛋白原通过 Caspase-14 酶的作用去磷酸化后形成的,是皮肤屏障的重要结构性组成,主要存在于角质层中,在表皮分化过程中,能够促进角质形成细胞角质包膜,并最终在表皮角质层被水解成小分子物质,这些小分子物质是天然保湿因子,能促进表皮的水合作用,同时也有助于表皮屏障的形成^[31-32]。因此,HSBP 能够通过改善 FLG 表达量来修复皮肤细胞屏障,并发挥保湿作用。

由图 8b)可知,经 HSBP 处理后,屏障损伤模型的兜甲蛋白(Loricrin, LOR)表达量得到极显著提升($P<0.000\ 1$),甚至恢复至屏障损伤前水平。LOR

是角质化包膜组装过程的关键成分,约占角质化包膜的 80%,对皮肤屏障起着加固作用。因此,HSBP 能通过修复角质化包膜组装过程,进而修复皮肤屏障损伤。

谷氨酰胺转移酶 1 (Transglutaminase1, TGM1) 蛋白表达量的降低也是皮肤屏障功能弱化的另一个关键指标。由图 8c)可知,与空白组相比,模型组中 TGM1 表达量显著下降($P<0.001$),经 HSBP 处理后,其表达量得到极显著提升($P<0.000\ 1$),甚至恢复至屏障损伤前水平。TGM1 参与角质包膜形成过程中谷氨酰-赖氨酸之间的交联反应,并能抵抗蛋白酶的水解作用,是形成角质包膜的关键蛋白,也是皮肤屏障功能的物质基础。因此,在皮肤屏障

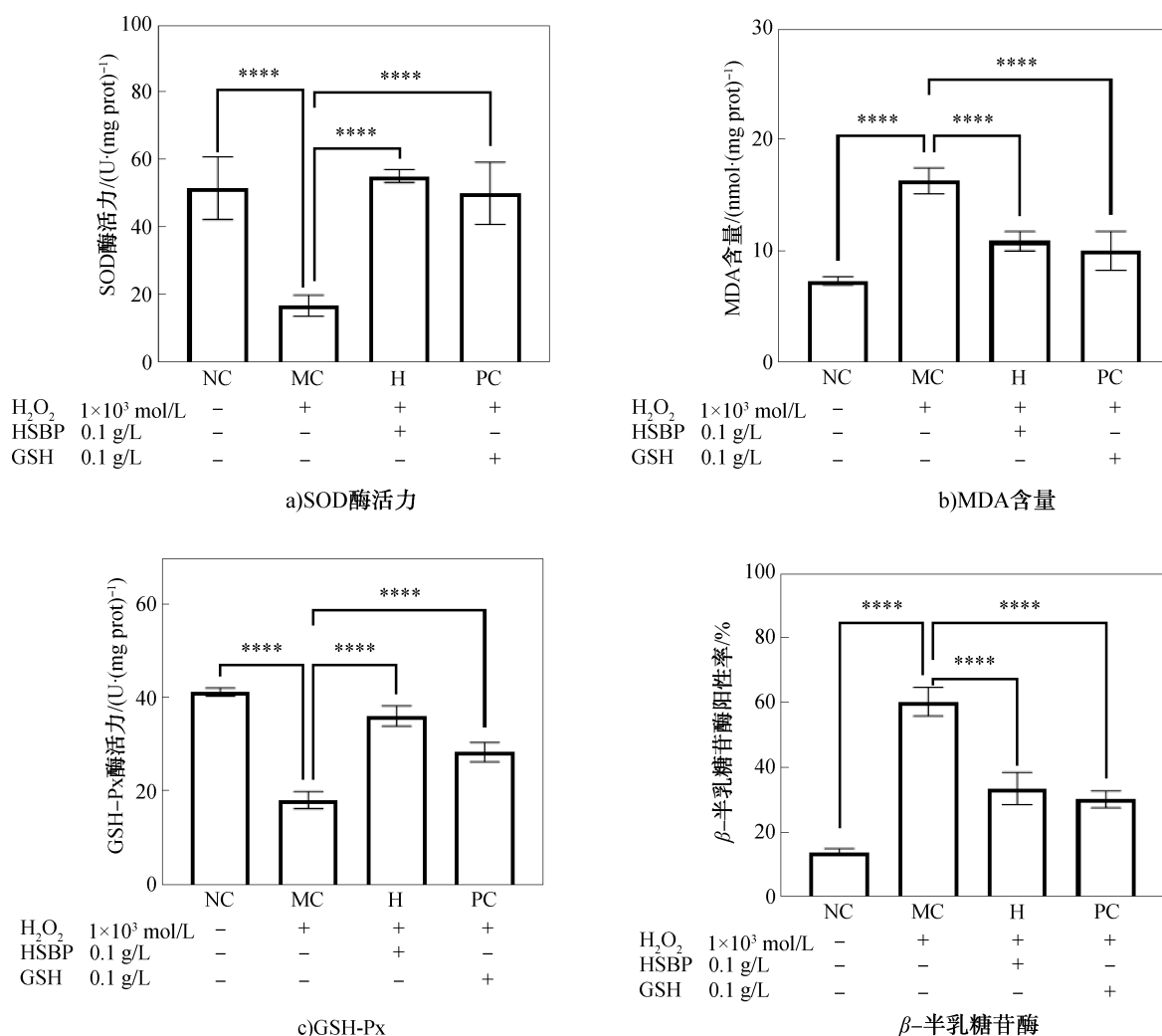


图6 HSBP对氧化损伤HaCaT抗氧化指标和β-半乳糖苷酶的影响

Fig. 6 Effects of HSBP on antioxidant indexes and β-galactosidase in oxidative damage of HaCaT

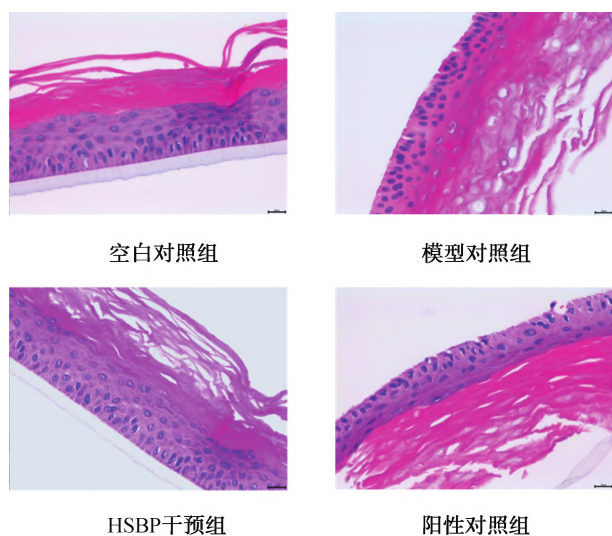


图7 重组皮肤组织切片的HE染色图

Fig. 7 HE stained sections of reconstituted skin tissue

损伤的情况下, HSBP能够显著改善TGM1的表达量, 并通过增强角质包膜的稳定性和抵抗蛋白酶的水解作用, 为皮肤屏障功能的恢复提供物质基础, 进而促进皮肤屏障的修复。

由图8d)可知, 模型组中水通道蛋白3(AQP3)的表达量显著下降($P < 0.0001$), 经HSBP处理后, 其表达量得到显著提升($P < 0.0001$), 达到模型组的2倍, 说明在屏障损伤发生过程中, HSBP可显著提高AQP3表达量, 通过增强皮肤保水能力来修复皮肤屏障损伤。

3 结论

本文通过单因素试验和响应面试验制备HSBP, 得到HSBP的最佳制备工艺为酶解时间4 h、

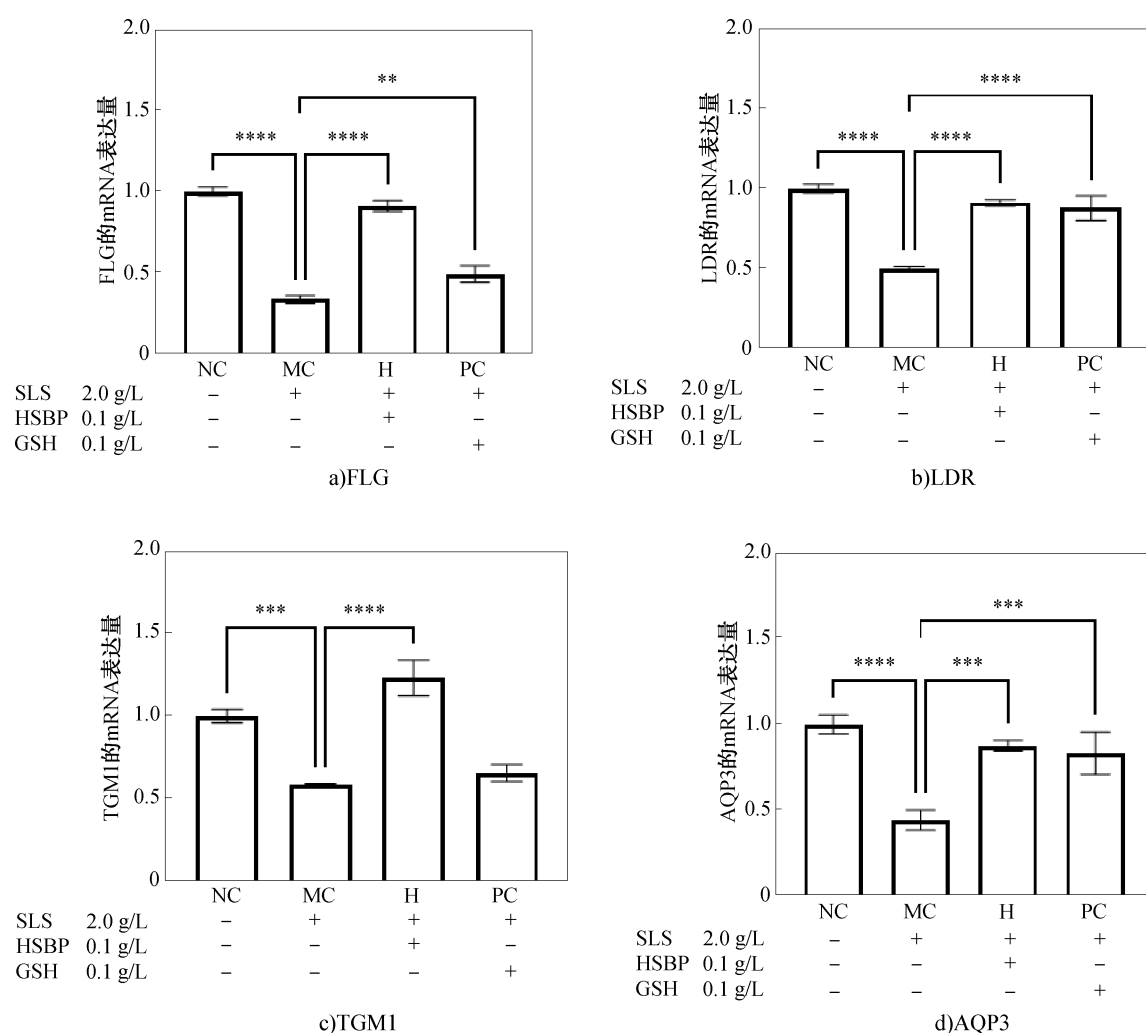


图8 HSBP对SLS刺激的重组皮肤屏障蛋白表达的影响

Fig. 8 Expression of recombinant skin barrier associated proteins stimulated by HSBP in response to SLS

酶解温度 50 ℃、pH 值 7.5、菠萝蛋白酶添加量 3400 U/g,在此工艺下,超氧阴离子自由基清除率为 65.6%,重均分子量为 480 Da。安全性评价证实了 HSBP 无刺激性、无致敏性且无细胞毒性;进而从胶原蛋白分泌、抗氧化、组织形态学和皮肤屏障相关蛋白表达等角度,综合评价 HSBP 延缓皮肤衰老的作用机制,发现在 0.05 ~ 1.00 g/L 质量浓度下,HSBP 对 HaCaT 细胞基本无毒性,能显著促进氧化损伤 HaCaT 细胞 COL I、COL IV 和 HA 的分泌,提高 SOD 和 GSH-Px 酶活力,降低 MDA 和 β -半乳糖苷酶表达量。在皮肤屏障损伤的修复方面,HSBP 能有效修复 SLS 导致的皮肤屏障损伤,显著改善 LOR、FLG、TGM1 和 AQP3 表达量,有助于恢复皮肤组织状态,使细胞排列整齐,并显著改善活细胞层数,从而起到修复皮肤屏障损伤作用。因此,HSBP

能有效保护氧化损伤的 HaCaT 细胞,且具有显著的修复皮肤屏障活性,可起到延缓皮肤衰老的作用。本文研究结果可为后续 HSBP 的工程化及产业化开发提供技术支持,并为 HSBP 在修复皮肤屏障及延缓衰老护肤产品中的应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] WYSS-CORAY T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation[J]. Nature, 2016, 539(7628): 180-186.
- [2] 张博文,张静洁,赵若春,等. 2023 年衰老生物学研究及相关产业发展态势[J]. 生命科学, 2024, 36(1): 55-62.
- [3] 杨艺辉,任利文,郑湘锦,等. 抗衰老靶点及药物的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(16): 1282-1290.
- [4] LEE H, HONG Y J, KIM M. Structural and functional changes and possible molecular mechanisms in aged skin

- [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22 (22): 12489.
- [5] 马永庆, 严建刚, 魏颖, 等. Nahlsgen 和胶原肽对人皮肤成纤维细胞的保护作用 and 胶原蛋白合成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(19): 86-91.
- [6] SONG H D, ZHANG S Q, ZHANG L, et al. Ingestion of collagen peptides prevents bone loss and improves bone microarchitecture in chronologically aged mice [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 1-7.
- [7] TAGA Y, KUSUBATA M, OGAWA-GOTO K, et al. Collagen-derived X-Hyp-Gly-type tripeptides promote differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 46: 456-462.
- [8] 王奕欣, 周成霞, 李利. 光电术后皮肤屏障功能修复的现状与挑战[J]. 皮肤科学通报, 2023, 40(6): 656-661.
- [9] LI J, LI Y, LIN S J, et al. Collagen peptides from *Acaudina molpadioides* prevent CCl₄-induced liver injury via Keap1/Nrf2-ARE, PI3K/AKT, and MAPKs pathways [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(5): 2185-2196.
- [10] 况昕珏, 易帆, 杨笑笑, 等. 基于皮肤本态的敏感人群皮肤差异及衰老特征研究[J]. 日用化学品科学, 2024, 47(3): 43-54, 60.
- [11] 林秋甘, 林国彬, 杨光义. 鱼鳔的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(5): 709-712.
- [12] 陈良辉, 刘亚群, 林敏, 等. 鱼胶营养成分、功能及其应用研究[J]. 江苏调味副食品, 2023, 40(4): 4-9.
- [13] SUO H Y, SONG J L, ZHOU Y L, et al. Induction of apoptosis in HCT-116 colon cancer cells by polysaccharide of *Larimichthys crocea* swim bladder [J]. Oncology Letters, 2015, 9(2): 972-978.
- [14] 周斯仪, 屈义, 钟赛意, 等. 鱼鳔的功效因子及其开发利用研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(11): 208-211.
- [15] DONG Y, DAI Z Y. Physicochemical, structural and antioxidant properties of collagens from the swim bladder of four fish species [J]. Marine Drugs, 2022, 20 (9): 550.
- [16] RONG H, ZHANG H R, NING L J, et al. The transforming growth factor beta (TGF- β /Smads) pathway regulates collagen synthesis and deposition in swim bladder of Chu's croaker (*Nibea coibor*) stimulated by proline [J]. Aquaculture, 2022, 558: 738360.
- [17] JIANG X H, ZHAO X, LUO H L, et al. Therapeutic effect of polysaccharide of large yellow croaker swim bladder on lupus nephritis of mice [J]. Nutrients, 2014, 6 (3): 1223-1235.
- [18] 杨晓东, 张杨, 张寿, 等. 胶原蛋白肽的提取及应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 469-476.
- [19] RONG H, ZHANG Y L, HAO M L, et al. Effects of dietary hydroxyproline on collagen metabolism, proline 4-hydroxylase activity, and expression of related gene in swim bladder of juvenile *Nibea diacanthus* [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(6): 1779-1790.
- [20] 韩丹, 李欣航, 杨盼盼, 等. 修复皮肤屏障功能的方法及应用[J]. 日用化学品科学, 2020, 43(7): 46-49, 59.
- [21] 张嫚, 张国治, 张康逸, 何梦影. 超声辅助酶解法制备小麦 ACE 抑制肽及其稳定性研究[J]. 轻工学报, 2024, 39(5): 29-39.
- [22] WANG Q T, WANG G M, LIU C Y, et al. The structural characteristics and bioactivity stability of *Cucumaria frondosa* intestines and ovum hydrolysates obtained by different proteases [J]. Marine Drugs, 2023, 21(7): 395.
- [23] 刘楚怡, 隋海松, 车帅, 等. 海蜇、牛骨和鲑鱼皮胶原肽的透皮吸收性能研究[J]. 日用化学工业, 2017, 47 (3): 164-167, 177.
- [24] 上海日用化学品行业协会. 化妆品-体外皮肤刺激性测试方法 (SIT): T/SHRH 008—2018 [S]. 上海: 全国团体标准信息平台, 2018.
- [25] 陈宁, 黄泽愉, 孙晓, 等. 局部淋巴结试验 (LLNA: BrdU-ELISA) 对 14 种化学物刺激和致敏性的评价 [J]. 毒理学杂志, 2022, 36(2): 157-162.
- [26] OECD. Test No. 442B: Skin sensitization: Local lymph node assay: BrdU-ELISA or-FCM (Appendix IA). OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 4. [S]. Paris: OECD Publishing, 2018.
- [27] HUANG J J, LI H L, XIONG G Q, et al. Extraction, identification and anti-photoaging activity evaluation of collagen peptides from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin [J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 173: 114384.
- [28] 祝钧, 吉冲, 邱静, 等. 虚拟筛选在化妆品功效原料发现中的应用进展[J]. 轻工学报, 2023, 38(1): 119-126.
- [29] 辛炫英, 李美瑶, 张雨嫣, 等. 明太鱼胶原蛋白提取工艺优化及其体外抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(21): 114-122.
- [30] 张鹤, 董颖, 魏星华, 等. 鹿筋胶原蛋白多肽透皮吸收试验研究[J]. 食品工业, 2017, 38(10): 136-139.
- [31] 石径, 姜燕飞, 赵春月. 白藜芦醇延缓皮肤衰老的作用功效及应用研究进展[J]. 轻工学报, 2024, 39(3): 119-126.
- [32] GRUBER R, ELIAS P M, CRUMRINE D, et al. Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function [J]. The American Journal of Pathology, 2011, 178(5): 2252-2263.

Preparation of swim bladder peptide of *Pseudosciaena crocea* and its study on delaying skin aging

SUN Yanqing¹, DU Fen², ZHU Zongmin¹, FENG Xiaomei², SHANG Lili¹, CAO Wanxiu³, LIU Chuyi^{2,3}

1. Qingdao Daiyoujia Biotechnology Co., Ltd., Qingdao 266001, China;

2. Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266073, China;

3. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266100, China

Abstract: Using the superoxide anion radical scavenging rate as an indicator, single-factor experiments and response surface methodology were employed to optimize the preparation of peptides from swim bladder of *Pseudosciaena crocea* (HSBP). The HaCaT cell line, an immortalized human keratinocyte cell line, was employed to establish an oxidative damage model to evaluate the effects of HSBP on collagen and hyaluronic acid secretion, as well as the activities of antioxidant enzymes and β -galactosidase, to assess its oxidative damage repair activity. The 3D recombinant human epidermal barrier injury model was established to study the effects of HSBP on its tissue morphology and the expression of skin barrier related proteins, and to comprehensively evaluate its delaying aging effect on skin. The results showed that the optimal preparation conditions for HSBP were: enzymatic hydrolysis time of 4 hours, 50 °C, pH value of 7.5, and a bromelain addition of 3400 U/g. Under these conditions, the superoxide anion radical scavenging rate was 65.6%. The molecular weight of HSBP was 480 Da, with no irritation, sensitization, or cytotoxicity. HSBP could significantly promote the secretion of hyaluronic acid, type I and type IV collagen in oxidation-damaged cells, increase the activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase (GSH-Px), decrease the contents of malondialdehyde and β -galactosidase, and significantly increase the expressions of LOR, FLG, TGM1 and AQP3 in barrier damaged models, effectively repair the barrier damaged skin tissue, and significantly increase the number of viable cell layers. Therefore, HSBP could effectively protect skin cells from oxidative damage and repair skin barrier injury, thereby delaying skin aging.

Key words: swim bladder of *Pseudosciaena crocea*; peptide; oxidative damage; skin barrier damage; skin aging

[责任编辑:王晓波]

(上接第 106 页)

the original aroma of cigarette tobacco. The chemical compositions of American and Brazilian TASs were obviously different from that of domestic tobacco and Zimbabwean tobacco. The contents of total polyphenols, total acids and total plant alkaloids of TASs from the United States and Brazil were higher than those of domestic and Zimbabwe TASs, while the total sugars content were lower than those of domestic and Zimbabwe TASs. Six TAS samples of different origins could be divided into three categories: United States and Brazil, Yunnan and Sichuan, Hunan and Zimbabwe. The content of Damarone in volatile components of TASs was high and the threshold was low, which contributed the most to the flavor of the sample. In addition, 2-acetyl pyrroline, violonone, megalotrienone IV, megalotrienone II, megalotrienone I, phenylacetaldehyde, nonylaldehyde, 4-vinyl guaiacol and linalsol which had high ROAV were the main contributors to the aroma of TASs.

Key words: tobacco alkali spice; tobacco origin; cigarette flavoring; volatile; ROAV

[责任编辑:吴晓亭]