

## 珍珠贝外套膜酶解产物促进皮肤创伤愈合效果研究

杨发明<sup>1</sup>, 林海生<sup>1,2</sup>, 秦小明<sup>1,2</sup>, 章超桦<sup>1,2</sup>, 曹文红<sup>1,2</sup>, 高加龙<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 国家贝类加工技术研发分中心(湛江), 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省海洋生物制品工程实验室, 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东 湛江 524088)

**摘要:** 为进一步拓宽马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 的高值化利用途径, 文章探讨了马氏珠母贝外套膜酶解产物体外抗菌活性、促凝血作用以及对小鼠软组织开放性创伤愈合效果。结果表明, 珍珠贝外套膜酶解产物具有一定的促凝血作用, 但对 13 种测试菌无抑制作用; 涂抹给药 6 d 后, 给药组小鼠的创伤愈合率显著高于阴性对照组 ( $P<0.05$ ), 与阳性对照组无显著差异 ( $P>0.05$ ); 给药组的第 14 天愈合率达 100%, 疤痕缩小率显著高于阴性对照组 ( $P<0.05$ )。生化指标测试结果显示, 与 2 个对照组相比, 马氏珠母贝外套膜酶解产物能够抑制炎症因子 IL-6 生成; 与阴性对照组相比, 其可极显著促进 IL-10 分泌; 与阴性对照组相比, 给药组皮肤组织中 FGF-2 含量无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 阳性对照组 EGF 含量显著高于其他组 ( $P<0.05$ ); 而 TGF- $\beta$  和 CCND1 含量均显著高于阴性对照组 ( $P<0.05$ )。综上, 马氏珠母贝外套膜酶解产物具有一定促凝血、抑制炎症作用并促进生长因子分泌, 从而加快小鼠软组织开放性创伤愈合, 对浅表瘢痕增生具有一定的抑制作用。

**关键词:** 马氏珠母贝外套膜酶解产物; 抑菌性; 促创伤愈合; 促凝血活性; 抑制炎症

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Effect of enzymatic hydrolysis from mantle of pearl oyster on skin wound healing

YANG Faming<sup>1</sup>, LIN Haisheng<sup>1,2</sup>, QIN Xiaoming<sup>1,2</sup>, ZHANG Chaohua<sup>1,2</sup>, CAO Wenhong<sup>1,2</sup>, GAO Jialong<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang), Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Guangdong Provincial Engineering Laboratory for Marine Biological Products, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of Guangdong Higher Education Institution, South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** In order to promote the high value utilization of pearl oyster (*Pinctada martensii*), we were determined explore the antibacterial activity and procoagulant activity of enzymatic hydrolysis from its mantle (EHM), and the effects of EHM on open wound healing of skin of mice. Results showed that EHM possessed of procoagulant activity in mice but had no antibacterial activity against 13 tested strains. Compared with the negative control group, the healing rate of wound of mice increased significantly after skin ap-

收稿日期: 2019-04-05; 修回日期: 2019-06-10

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-49); 广东海洋大学博士启动项目 (R17082); 广东海洋大学“海之帆”起航计划大学生科技创新培育项目 (230419038); 广东普通高等学校水产品高值化加工与利用创新团队项目 (GDOU2016030503); 广东省应用型科技研发专项资金项目 (2016B020235002)

作者简介: 杨发明 (1995—), 男, 硕士研究生, 从事海洋功能活性物质研究。Email: yangfm0123@163.com

通信作者: 秦小明 (1964—), 男, 博士, 教授, 从事水产品精深加工、贝类活性物质研究。E-mail: xiaoming0502@21cn.com

plication with EHM for 6 d ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference with comparison with the positive control group ( $P>0.05$ ). The healing rate was 100% on 14<sup>th</sup> day for the drug group, and the scar contraction rate was significantly higher than that of the negative control group ( $P<0.05$ ). Biochemical indicators test indicated that EHM had significant inhibition effect on inflammatory factor IL-6 ( $P<0.05$ ); compared with the negative control group, it could promote IL-10 secretion in wound tissues significantly ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference in FGF-2 content in skin tissue of the drug groups ( $P>0.05$ ), and EGF content in the positive control group was significantly higher than that in the other groups ( $P<0.05$ ). However, there was no significant difference in the contents of FGF-2 and EGF between the drug groups ( $P<0.05$ ). In summary, EHM has procoagulant, anti-inflammatory and promotional effects, which can accelerate the open wound healing of soft tissue in mice and has a certain inhibitory effect on superficial scar hyperplasia.

**Key words:** enzymatic hydrolysis from mantle of *Pinctada martensii*; bacteriostatic; promote wound healing; procoagulant activity; inhibit inflammation

发达国家患有创伤疾病的人约占总人口的 1.5%，其花费占有所有医疗费用的 2%~4%<sup>[1]</sup>。皮肤是动物最大的器官，具有防止水分流失和为人体提供物理与化学保护的双重功能<sup>[2]</sup>。导致皮肤损伤的原因很多，包括急性创伤、慢性伤口、外科手术和一些遗传性疾病<sup>[3]</sup>。皮肤创伤愈合涉及 4 个连续且重叠的过程：止血、发炎、增殖和重塑<sup>[4]</sup>，而当皮肤愈合过程受到破坏时，将导致慢性伤口的发生、发病率的增加和生活质量显著下降。在美国，受慢性伤口影响的患者有  $650 \times 10^4$  人。据估计，美国每年消耗  $250 \times 10^8$  美元用于治疗慢性伤口<sup>[5]</sup>。因此，加速皮肤创伤愈合对身体健康至关重要。传统的创伤愈合活性物质，主要包括生长因子、细胞因子、从植物中获得的化合物，以及其他免疫调节因子，但是，很难将这些转化为临床创伤愈合的疗法<sup>[6]</sup>。与高成本且存在安全性和递送问题的药物相比，具有高活性、特异性和稳定性的生物活性肽在相关研究领域引起了研究人员的关注<sup>[7]</sup>。

马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)，又称合浦珠母贝，19 世纪 90 年代末在日本首次实现人工珍珠生产工业化<sup>[8]</sup>，其因生产优质珍珠的能力而闻名于世，占海水珍珠产量的 90% 以上<sup>[9]</sup>，是中国南方沿海地区培育珍珠的主要贝种<sup>[10]</sup>。珍珠主要通过人工“插核手术”，由外套膜的细胞增殖形成珍珠囊，分泌珍珠质而形成，且整个培育过程会伴随贝体的抗炎免疫反应，因此珍珠贝的外套膜在珍珠形成中起着重要的作用<sup>[11]</sup>。目前，珍珠贝肉经采珠后多被废弃，导致经济附加值不高，关于其药用和保健价值鲜有报道。珍珠贝外套膜主要营养成分是蛋白质，其中多为胶原蛋白<sup>[12]</sup>，因此充分开发利用马氏珠母贝外套膜功能非常必要，本文采用酶法制备马氏珠母贝外套膜酶解产物 (enzymatic hydrolysis

from mantle of pearl oyster, EHM) 进行皮肤创伤愈合功能作用的研究，为进行深入研究提供理论基础和方向。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

马氏珍珠贝肉采自 2018 年 6 月湛江雷州市流沙养殖场，取其外套膜。EHM 为实验室自制，基本性质为：加酶量为  $1\ 000\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  (原料) 蛋白的 EHM 水解度为 23.4%，EHM 的蛋白质含量为  $0.556\ 6\ \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，其中肽含量占 21.81%。云南白药购于云南白药集团；SPF 级昆明小鼠体质量 ( $20 \pm 2$ ) g，雄性，购于山东省济南朋悦实验动物繁育有限公司，实验单位使用许可证编号 SYXK (粤) 2014 - 0053 (广东海洋大学实验动物室)；中性蛋白酶 ( $30\ 000\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ ，广西南宁庞博生物工程有限公司)；IL-6 (白介素-6)、IL-10 (白介素-10)、TGF- $\beta$ 1 (转化生长因子  $\beta$ 1)、FGF-2 (碱性成纤维细胞生长因子)、EGF (表皮细胞生长因子)、Cyclin D1 (细胞生长周期素 D1) 和羟脯氨酸测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)；抗菌实验所需菌株由课题组林海生老师提供。

Lynx 6000 型高速冷冻离心机、Varioskan Flash 多功能酶标仪 (Thermo 公司)；BSA224S-CW 型万分之一电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]；FE28 型 pH 计 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]；DF-101T 集热氏恒温加热磁力搅拌器 (上海精宏实验设备有限公司)；FDU-1110 型冷冻干燥机 (上海爱朗仪器有限公司)；SW-CJ-2FD 型双人超级操作台 (苏州净化设备有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 EHM 制备工艺 EHM 为实验室自制，主要提取工艺参考左光扬等<sup>[13]</sup>。蛋白质含量测定采用

凯氏定氮法参考 GB 5009.5—2016; 肽含量测定参考汪志华等<sup>[14]</sup>采用双缩脲法。

1.2.2 EHM 体外抗菌实验 采用微量径向扩散法<sup>[15]</sup>验证其抗菌活性。将 100  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  细菌悬浮液移液到无菌胰蛋白酶解酪蛋白大豆琼脂培养基中, 涡旋, 倒入培养皿中。然后将 5  $\mu\text{L}$  样品移液到 2.0 mm 直径的孔中, 并将培养皿在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 20 h。测量透明抑制区的直径, 精确至 0.1 mm。同时, 采用半数稀释法<sup>[15]</sup>验证其抗菌活性。将 100  $\mu\text{L}$  质量浓度为 30  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 EHM 稀释液等分试样装入 96 孔微量培养板中, 然后向每个孔中加入 50  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  菌液和 50 mL TSB-3.0% 氯化钠 (NaCl)。35  $^{\circ}\text{C}$  温育 24 h 后通过观察每个孔的浊度记录细菌的生长条件。

1.2.3 EHM 体表促凝血实验 用断尾法<sup>[16]</sup>, 设阴性对照组、阳性对照组 (云南白药粉产品) 和给药组 (EHM 冻干粉), 每组 5 只雄性 KM 小鼠, 剪除距尾尖 0.5 cm 处, 用已称量的无菌滤纸吸取出血量并开始用秒表计时, 每 30 s 换一张滤纸, 不出血后进行称质量和记录出血时间。

1.2.4 动物实验 动物分组及造模。将体质量为 (20 $\pm$ 2) g 清洁级 KM 系雄性小鼠 60 只, 随机分为阴性对照组、云南白药阳性对照组和给药组。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉小鼠, 在其背部脱毛, 制造直径约 0.8 cm 的全皮层创伤模型, 并分笼单独饲养。给药组每天涂抹 30~35 mg 质量浓度为 1.43  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  膏状 EHM (肽含量为 2~2.5 mg), 阳性对照组每天涂抹 2~3 mg 云南白药, 阴性对照组不处理。隔天对创面观察, 拍照, 测量伤口大小, 并记录结果。

1.2.5 愈合率 每隔 2 d 用游标卡尺测量创面直径大小 1 次, 计算伤口愈合率公式为: 伤口愈合率=(第 0 天的伤口测量值-第  $n$  天的伤口测量值)/第 0 天的伤口测量值 $\times 100\%$ ; 瘢痕缩小率=(第 0 天的伤口测量值-第 14 天的伤口测量值)/第 0 天的伤口测量值 $\times 100\%$ 。

1.2.6 创面组织中炎症因子、生长因子和羟脯氨酸含量检测 小鼠创面组织匀浆液制备<sup>[17]</sup>, 分装保藏于 -80  $^{\circ}\text{C}$ , 分别按试剂盒说明书进行相关指标的测定。

1.2.7 数据统计分析 每组实验至少重复 3 次, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。组间比较采用 LSD 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 体外抗菌实验

采用微量径向扩散法和半数稀释法对马氏珠母贝生活环境中中和创伤感染常见的 13 种菌 [G+菌 (6 种) 有金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*)、格氏乳球菌 (*Lactococcus garviea*)、无乳链球菌 (*S. agalactiae*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*); G-菌 (7 种) 有大肠杆菌 (*E. coli*)、铜绿假单胞菌 (*P. Aeruginosa*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血性弧菌 (*V. Parahemolyticus*)、海藻希瓦氏菌 (*Shewanella alga*)、哈氏弧菌 (*V. harveyi*)、嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)] 进行体外抗菌实验。结果显示, EHM 无抗菌活性, 且研究发现只有马氏珠母贝抗菌肽基因<sup>[18]</sup>、通过浸泡和注射菌株诱导的方式, 以及从外套膜和鳃组织<sup>[19]</sup>、血清<sup>[20]</sup>中提取获得抗菌肽; 现在尚未发现可直接通过酶解马氏珠母贝外套膜的方式获得抗菌物质, 这与本研究结果一致。表明其不含抗菌物质, 在小鼠皮肤创伤愈合过程中, 不能起到抗菌防感染的作用。

### 2.2 体表促凝血实验

EHM 对体表创口的出血时间和出血量的影响见表 1。云南白药阳性对照组与给药组均显著好于阴性对照组 ( $P < 0.05$ ), 其中云南白药阳性对照组促凝血效果最佳。这表明 EHM 具有一定的促凝血作用, 可在后续实验进行深入的机理研究。目前, 研究发现白鹤藤<sup>[21]</sup>、三七和紫珠草<sup>[22]</sup>、藕节<sup>[23]</sup>等陆

表 1 马氏珠母贝外套膜酶解产物对小鼠断尾创口的出血时间和出血量的影响

Table 1	Effect of EHM on bleeding time and blood loss of tail wound of mice	$\bar{X} \pm \text{SD}, n=5$
组别 group	出血时间/min bleeding time	出血量/g amount of bleeding
阴性对照组 negative control	5.05 $\pm$ 0.79 <sup>c</sup>	0.015 2 $\pm$ 0.001 9 <sup>c</sup>
阳性对照组 positive control	0.94 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	0.005 4 $\pm$ 0.001 7 <sup>b</sup>
给药组 drug group	1.97 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	0.009 6 $\pm$ 0.001 8 <sup>a</sup>

注: 同列中标有不同小写字母者表示组间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 标有相同小写字母者表示组间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 下表、后图同此

Note: Different and same letters within the same row indicate significant ( $P < 0.05$ ) and insignificant different ( $P > 0.05$ ), respectively. The same case in the following tables and figures.

生植物提取物具有促凝血活性, 而海洋贝类的相关提取物尚无发现具有促凝血作用, EHM 可能会为促凝血研究和相关产品的开发提供新的方向和来源。

### 2.3 涂抹 EHM 对小鼠皮肤创伤愈合作用的影响

**2.3.1 创面形态变化观察** 各组愈合情况见图 1。造模后第 2 天, 各实验组动物皆已结痂, 无液体渗出, 创面变化明显。第 4、第 6 天, 2 个对照组创面无液体渗出, 结痂逐渐变厚, 阳性对照组效果明显。给药组创面开始出现较硬结痂, 创面不平整, 创面边缘皮肤收缩明显。第 8 天 2 个对照组伤口开始缩痂, 创面呈暗红色, 阳性对照组部分掉痂。给药组创面完全掉痂, 呈肉红色新生皮肤。第 10 天 2 个对照组伤口结痂部分脱落, 阴性对照组疤痕面积变化小, 阳性对照组缩痂明显。给药组创面皮肤渐趋于正常皮肤。第 12 天各组皆已完全掉痂, 并进一步缩痂。阳性对照组二次掉痂, 给药组愈合处开始长出毛发。第 14 天对照组的多数伤口直径小于 2 mm, 给药组伤口直径均为 0 mm。2 个对照组创面呈现肉红色新生皮肤, 新生肉色组织较粗糙。给药组较对照组愈合情况良好, 创面新生皮肤光

滑, 无瘢痕生成, 与正常皮肤无异。这表明给药组在掉痂及瘢痕收缩方面效果明显。

**2.3.2 愈合率** 造模后 6 d 给药组的创伤愈合率与阴性对照组差异显著 ( $P < 0.05$ , 表 2); 造模后 10 d 给药组创伤愈合率较阴性对照组高出 50% ( $P < 0.05$ ); 第 14 天给药组较阴性对照组高 20% ( $P < 0.05$ ), 愈合率达 100%; 给药组瘢痕缩小率较阴性对照组高出 21% ( $P < 0.05$ , 图 2)。

云南白药粉由名贵药材制成, 具有化瘀止血、活血止痛、解毒消肿之功效, 可通过加快止血, 促进血液循环以实现促进创伤愈合<sup>[24]</sup>。创伤愈合后期 (8~14 d) 即重塑期, 胶原蛋白起主要作用<sup>[17]</sup>。EHM 也具有一定促凝血效果, 从而有利于加快创伤愈合, 这与愈合率结果一致。阳性对照组与给药组创伤愈合速率逐渐无显著性差异, 但给药组伤口全部愈合, 瘢痕较小, 几乎达到无痕状态。这说明 EHM 更具有一定的愈合、抑制浅表瘢痕增生的优势。目前, 鸭胚蛋酶解物<sup>[25]</sup>、海参胶原低聚肽<sup>[26]</sup>和罗非鱼皮胶原蛋白肽<sup>[27]</sup>已被证明可提高愈合率, 从而促进创伤愈合, 而马氏珠母贝外套膜主要由蛋白质组成, 且其胶原蛋白所占比例最高, 类型是与鱼皮、陆源胶原蛋白所不同的类 V 型, 具有

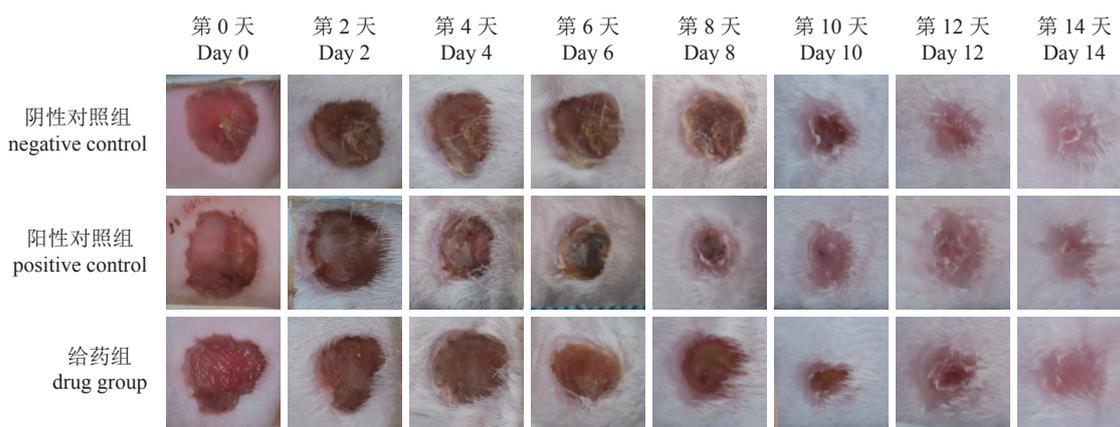


图1 给药组对小鼠创面的影响

Fig.1 Effect of drug group on wound of mice

表2 马氏珠母贝外套膜酶解产物对小鼠皮肤创伤愈合的影响

组别 group	第0天 Day 0	第6天 Day 6	第10天 Day 10	第14天 Day 14
阴性对照组 negative control	0±0.00	14.17±2.89 <sup>b</sup>	35.86±8.66 <sup>b</sup>	80.42±6.17 <sup>b</sup>
阳性对照组 positive control	0±0.00	35.83±6.88 <sup>a</sup>	56.67±17.02 <sup>a</sup>	92.92±6.41 <sup>a</sup>
给药组 drug group	0±0.00	28.33±6.88 <sup>a</sup>	87.50±11.11 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>

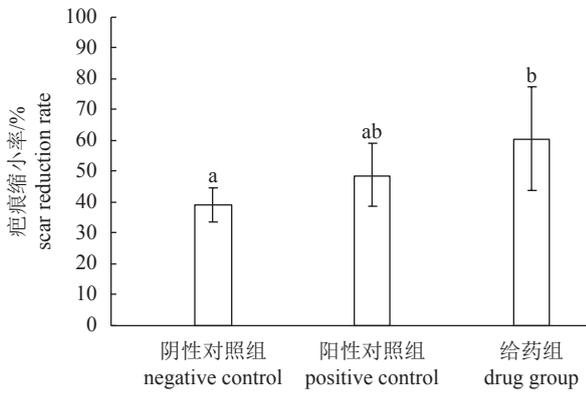


图2 第14天马氏珠母贝外套膜酶解产物对小鼠皮肤创伤瘢痕生成的影响

Fig.2 Effect of EHM on scar formation of skin wounds of mice on Day 14

不同的功能活性<sup>[12]</sup>。如 EHM 的基本性质结果所示,其主要成分也是蛋白质,且其中小分子肽含量高,使其具有膜透过性好、激活细胞活性、修复人体变性细胞等生物活性<sup>[28]</sup>,推测 EHM 具有相关功能活性肽起主要作用,从而有利于皮肤创伤愈合及瘢痕缩小。

**2.3.3 炎症因子测定** 炎症是可溶性因子和细胞之间复杂的相互作用的结果,在损伤后,组织驻留的巨噬细胞会立即引发局部炎症反应<sup>[29]</sup>。在炎症阶段结束时减少中性粒细胞和相关分子模式,导致组织微环境发生改变。炎性巨噬细胞表型在下一愈合阶段时会变成主要的抗炎细胞类型,促纤维化的表型并分泌 TGF- $\beta$  和肿瘤坏死因子等,这些生长因子将刺激增生阶段的开始,其中将发生纤维组织形成、基质沉积、血管生成和再上皮化过程<sup>[30]</sup>。炎症的消退对于防止慢性愈合过程的发展至关重要,慢性愈合过程最终可导致肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩形成。

已经获得了广泛的表面标记且具有超过 20 年研究基础的巨噬细胞可被分为两大子集: M1 和 M2 型巨噬细胞<sup>[30]</sup>。由 M1 型巨噬细胞分泌的 IL-6 属于促炎症因子;由 M2 型巨噬细胞分泌的 IL-10 属于抑制炎症因子<sup>[31]</sup>。EHM 具有显著抑制 IL-6 分泌的作用 ( $P < 0.05$ );第 5、第 7 天,给药组与 2 个对照组相比,IL-10 含量呈现极显著差异 ( $P < 0.01$ , 图 3)。结果表明,EHM 具有抑制炎症的作用。研究表明,砂仁叶油<sup>[32]</sup>、蜂蜜及蜂蜜中酚酸<sup>[33]</sup>、姜黄素<sup>[34]</sup> 等陆生动植物提取物可通过抑制炎症反应,加快创伤愈合并提高愈合效果,这与愈合率和

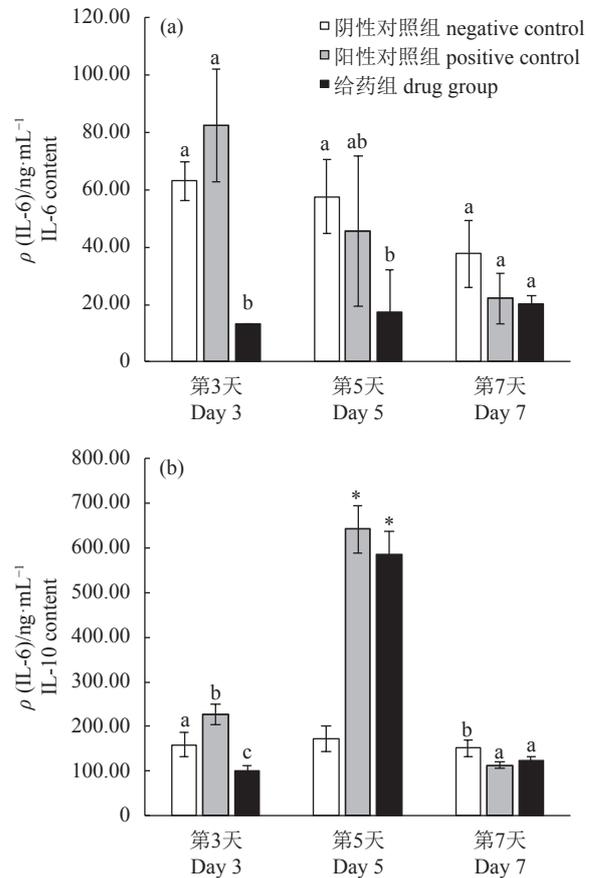


图3 马氏珠母贝外套膜酶解产物对创伤皮肤组织中炎症因子的影响

\*. 组间有极显著差异 ( $P < 0.01$ )

Fig.3 Effect of EHM on inflammatory factors in wound skin tissue

\*. very significant difference among groups ( $P < 0.01$ )

瘢痕缩小率结果一致。因此, EHM 通过抑制炎症因子分泌,更有利于促进皮肤创伤愈合,缩短愈合时间,提高愈合质量。

**2.3.4 生长因子测定** 生长因子是生物活性多肽,参与愈合过程的所有阶段<sup>[35]</sup>。各实验组 FGF-2 含量无显著差异 ( $P > 0.05$ , 表 3);与阴性对照组 TGF- $\beta$  含量相比,给药组皆呈现显著差异 ( $P < 0.05$ );给药组 CCND1 含量显著高于其他实验组 ( $P < 0.05$ );给药组 EGF 含量较阴性对照组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

FGF-2 对成纤维细胞的生长和分化以及血管平滑肌细胞、内皮细胞的增殖,细胞外基质代谢、生长和中胚层来源细胞的运动具有刺激作用。它能够增加肉芽组织形成的速度和程度,并刺激愈合过程<sup>[36]</sup>。EGF 与皮肤及其附属物的形成、成熟、再生和修复密切相关,并促进血管生成,促进伤口修

表3 马氏珠母贝外套膜酶解产物对创伤皮肤组织中生长因子的影响

组别 group	Tab.3 Effect of EHM on growth factors in wound skin tissue on Day 7				$\bar{X}\pm SD; \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
	成纤维细胞生长因子2 FGF-2	转化生长因子 $\beta$ TGF- $\beta$	细胞生长周期素1 CCND1	表皮生长因子 EGF	
阴性对照组 negative control	36.58 $\pm$ 2.65 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.67 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	131.37 $\pm$ 59.51 <sup>a</sup>	
阳性对照组 positive control	28.72 $\pm$ 5.65 <sup>a</sup>	1.55 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	1 674.34 $\pm$ 913.78 <sup>b</sup>	
给药组 drug group	32.60 $\pm$ 5.00 <sup>a</sup>	2.09 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	6.60 $\pm$ 1.63 <sup>b</sup>	660.59 $\pm$ 376.41 <sup>a</sup>	

复, 在创伤修复的各个阶段发挥积极的生物学作用<sup>[37]</sup>。但结果显示, 与阴性对照组相比, 涂抹 EHM 对 FGF-2 和 EGF 分泌无显著性促进作用, 这表明连续涂抹给药后第 7 天, 对这 2 种生长因子作用尚不明显。TGF- $\beta$  帮助单核细胞转化为巨噬细胞, 然后加速肉芽组织的重塑并促进创伤愈合生长因子的释放, 促进细胞外基质 (ECM) 合成和伤口收缩<sup>[38]</sup>。CCND1 主要功能是促进细胞增殖<sup>[39]</sup>。由此可推测, 涂抹 EHM 促进创面愈合的过程中可通过加速细胞因子 TGF- $\beta$  的分泌促进纤维细胞分泌胶原、增加胞外基质沉积、新血管形成。且 Muthukumar 等<sup>[40]</sup> 研究发现 TGF- $\beta$  表达在第 4 天最多并且持续到第 8 天, 这与本研究结果一致。同时也通过加速细胞周期调控蛋白 CCND1 的表达促进成纤维细胞等细胞周期向分裂期转化从而加速细胞的有丝分裂<sup>[41]</sup>, 实现同愈合率结果一致的创伤愈合效果。

2.3.5 羟脯氨酸含量测定 伤口愈合后重塑阶段持续时间很长。在该阶段, 基质细胞协调伤口中细胞外分子的更新, 导致组织强度增加, 胶原蛋白的沉积在伤口重塑中起重要作用<sup>[42]</sup>, 可通过测定羟脯氨酸含量来反映胶原蛋白含量的变化情况。造模后 14 d 给药组较阴性对照组有显著差异 ( $P<0.05$ ), 但含量较低 (表 4)。结果表明, 涂抹 EHM 不能显著促进胶原蛋白的分泌、沉积及交联的作用, 而这与照片、愈合率及瘢痕缩小率结果不相符, 需要后续实验通过将测定指标调整为 Masson 染色等手段, 进行结果验证和原因解释。

### 3 结论

通过涂抹给药 EHM 研究表明, 其具有一定促凝血、抑制炎症作用并促进生长因子分泌, 从而加快小鼠软组织开放性创伤愈合, 对浅表瘢痕增生具有一定的抑制作用。这为进一步分离纯化 EHM, 进行其作用机理的研究和阐释提供了理论依据和研究基础。

表4 马氏珠母贝外套膜酶解产物对创伤皮肤组织中羟脯氨酸的影响

组别 group	Tab.4 Effect of EHM on hydroxyproline in wound skin tissue		$\bar{X}\pm SD; \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
	造模后时间/d post-moulding time		
	7	14	
阴性对照组 negative control	7.58 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	13.10 $\pm$ 2.11 <sup>b</sup>	
阳性对照组 positive control	4.60 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	23.86 $\pm$ 2.73 <sup>b</sup>	
给药组 drug group	4.10 $\pm$ 0.89 <sup>ac</sup>	10.28 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	

### 参考文献:

- [1] GOTTRUP F. Trends in surgical wound healing[J]. Scand J Surg, 2008, 97(3): 220-225.
- [2] HASSAN W U, GREISER U, WAN W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2014, 22(3): 313-325.
- [3] AHMED T A, SUSO H P, MAQBOOL A A. Processed eggshell membrane powder: bioinspiration for an innovative wound healing product[J]. Mat Sci Eng C, 2019, 95(1): 192-203.
- [4] JEE C H, EOM N Y, JANG H M, et al. Effect of autologous platelet-rich plasma application on cutaneous wound healing in dogs[J]. J Vet Sci, 2016, 17(1): 79-87.
- [5] SEN C K, GORDILLO G M, ROY S, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy[J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(6): 763-771.
- [6] LAROUCHE J, SHEORAN S, MARUYAMA K, et al. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets[J]. Adv Wound Care, 2018, 7(7): 209-231.
- [7] LI X J, WANG Y, ZOU Z R, et al. OM-LV20, a novel peptide from odorous frog skin, accelerates wound healing *in vitro* and *in vivo*[J]. Chem Biol Drug Design, 2018, 91(1): 126-136.
- [8] NAGAI K. A history of the cultured pearl industry[J]. Zool Sci, 2013; 30(10): 783-793.
- [9] SOUTHGATE P C, LUCAS J S. The pearl oyster[M]. Oxford: Elsevier, 2008: 544.
- [10] 苗东亮, 纪丽丽, 李世杰, 等. 马氏珠母贝贝肉与贝壳成分研究 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(7): 1439-1443.
- [11] 张博, 孟子豪, 刘宝锁, 等. 插核手术损伤对合浦珠母贝抗氧化免疫水平的影响 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(5): 72-77.

- [12] 张雪莹. 珍珠贝外套膜胶原蛋白肽的抗氧化作用及其对 MCT3T-E1 成骨细胞的保护作用研究 [D]. 海口: 海南大学, 2015: 21.
- [13] 左光扬, 章超桦, 高加龙, 等. 企鹅珍珠贝肉酶解产物的制备及其醒酒作用的初步研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(15): 145-148, 152.
- [14] 汪志华, 王毅梅, 蔡广霞, 等. 大米肽含量的快速测定方法 [J]. 食品科学, 2011, 32(12): 169-173.
- [15] LIN H S, ISHIZAKI S, NAGASHIMA Y, et al. Exploration of the antibacterial proteins in pearl oyster *Pinctada fucata* induced by bacterial inoculation[J]. Fish Sci, 2017, 83(3): 489-498.
- [16] 程沁园. 壳聚糖止血活性及其生物安全性评价研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2013: 11.
- [17] 赵秉江. 黄芪多糖促进皮肤伤口愈合的作用及其相关机制的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2017: 16.
- [18] 郭华阳. 合浦珠母贝遗传选育及两种免疫基因研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2011: 66-93.
- [19] 于文媛. 马氏珠母贝抗菌肽的初步分离及抗菌活性分析 [D]. 海口: 海南大学, 2011: 24-34.
- [20] 朱家萍, 雷倩楠, 梁海鹰. 马氏珠母贝血清抗菌肽的初步分析 [J]. 生命科学研究, 2015, 19(5): 397-401, 421.
- [21] 王利. 白鹤藤止血活性及化学成分的研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017: 1-30.
- [22] 王秀琴, 伍素华, 苏踊跃, 等. 部分中草药促凝作用筛选的实验研究 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(23): 2149-2151.
- [23] 陈菊. 藕节功能性成分的提取分离及产品开发 [D]. 无锡: 江南大学, 2009: 12-26.
- [24] 唐德胜, 张秋娟. 云南白药的神奇功效 [J]. 中国伤残医学, 2013, 21(1): 108.
- [25] 张宇. 鸭胚蛋白酶解物促进创伤愈合性能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 17-56.
- [26] 李林, 李迪, 徐腾, 等. 海参胶原低聚肽对糖尿病小鼠术后伤口愈合的促进作用 [J]. 中国食物与营养, 2017, 23(7): 71-75.
- [27] HU Z, YANG P, ZHOU C X, et al. Marine Collagen peptides from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): characterization and wound healing evaluation[J]. Mar Drug, 2017, 15(4): 1-11.
- [28] ZIELINS E R, ATASHROO D A, MAAN Z N, et al. Wound healing: an update[J]. Regen Med, 2014, 9(6): 817-830.
- [29] MINUTTI C M, KNIPPER J A, ALLEN J E, et al. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing[J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 61: 3-11.
- [30] RODRIGUES M, GURTNER G C. Black, white and gray: macrophages in skin repair and disease[J]. Curr Pathobiol Rep, 2017, 5(4): 333-342.
- [31] MATEJUK A. Skin immunity[J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2018, 66(1): 45-54.
- [32] 黄凤婷, 万绵洁, 张丹雁. 砂仁叶油的化学成分分析及促进创面愈合作用研究 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(4): 466-470.
- [33] 黄涛. 蜂蜜及蜂蜜中酚酸成份对创伤大鼠皮肤修复作用的研究 [D]. 荆州: 长江大学, 2016: 5-54.
- [34] 刘怀金. 姜黄素对运动性伤口愈合的作用机制 [J]. 体育科技文献通报, 2012, 20(1): 22-23, 56.
- [35] PATEL S, SRIVASTAVA S, SINGH M R, et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108615.
- [36] GURTNER G C, WERNER S, BARRANDON Y, et al. Wound repair and regeneration[J]. Nature, 2008, 453(7193): 314-321.
- [37] QIN Q J, NIU J Y, WANG Z X, et al. *Astragalus membranaceus* inhibits inflammation via phospho-P38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B pathways in advanced glycation end product-stimulated macrophages[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(7): 8379-8387.
- [38] SONG Y L, WU C Y, ZHANG X H, et al. A short peptide potenti ally promotes the healing of skin wound[J]. Biosci Rep, 2019, 39(3): 1-19.
- [39] DEMIDOVA-RICE T N, HAMBLIN M R, HERMAN I M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery. Part II: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery[J]. Adv Skin Wound Care, 2012, 25(8): 349-370.
- [40] MUTHUKUMAR T, ANBARASU K, PRAKASH D, et al. Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing *Macrotyloma uniflorum* plant extract-In vivo wound healing[J]. Colloid Surface B, 2014, 121(1): 178-188.
- [41] LI L K, HAI J, LI Z Q, et al. Resveratrol modulates autophagy and NF- $\kappa$ B activity in a murine model for treating non-alcoholic fatty liver disease[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 63: 166-173.
- [42] HE X J, NIU X Y, LI J, et al. Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides[J]. J Exp Integr Med, 2012, 2(1): 15-27.