

# 扇贝壳水提物对蛋白酶和成纤维细胞的体外作用研究

刘云春<sup>1</sup>, 阎旭<sup>1,2\*</sup>

(1. 大理学院基础医学院, 云南 大理 671000; 2. 大理学院药学与化学学院, 云南 大理 671000)

**[摘要]** 目的: 体外研究扇贝壳水提物的皮肤保护作用。方法: 提取扇贝壳的水溶性有机成分, 体外考察对皮肤保护相关的蛋白酶活性以及成纤维细胞 TIG-101 增殖 (MTT 法) 和胶原蛋白合成 (染色法) 的影响, 评价扇贝壳所含生物活性物质对皮肤的保护作用。结果: 扇贝壳水溶性有机成分可增强糜蛋白酶活性, 抑制弹性蛋白酶和胰蛋白酶活性, 并可促进皮肤上皮细胞增殖 ( $P < 0.05$ ) 和胶原蛋白合成增加 ( $P < 0.05$ )。结论: 扇贝壳水溶性有机成分具有保护皮肤组织的生物活性。

**[关键词]** 扇贝壳; 皮肤保护; 生物活性成分; 蛋白酶; 成纤维细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0190-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013150190

## Research *in vitro* on Protease and TIG-101 Cells of Scallop Shells Bioactive Components

LIU Yun-chun<sup>1</sup>, YAN Xu-yi<sup>2\*</sup>

(1. Pre-clinical College, Dali University, Dali 671000, China;

2. Pharmacy and Chemistry College, Dali University, Dali 671000, China)

**[Abstract]** **Objective:** The skin protection of scallop shells extract *in vitro* was studied. **Method:** There were some bioactive components in scallop shells. The extract of *Patinopecten yessoensis* scallop shell was used to evaluate the skin protection by observation of skin fibroblast cells TIG-101 (MTT assay) and collagen synthesis

**[收稿日期]** 20130217(003)

**[基金项目]** 大理学院博士科研启动基金 (KY0719202510)

**[第一作者]** 刘云春, 副教授, 博士, 主要从事医学生物化学与分子生物学研究, E-mail: jiyao812@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 阎旭一, 硕士, 主要从事药理学研究, E-mail: onemail@yahoo.cn

[3] 郭莉莉, 官志忠. 灯盏细辛的神经保护作用及机制 [J]. 山东医药, 2010, 50(31):109.

[4] 郭莉莉, 官志忠. 灯盏细辛提取物对痴呆大鼠学习记忆能力和胆碱酯酶活性的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10):182.

[5] 黄旖旎. NF- $\kappa$ B 的分子生物学活性及其在阿尔茨海默病中的作用 [J]. 中华现代内科学杂志, 2007, 4(2):123.

[6] Bisaglia M, Venezia V, Piccioli P, et al. Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF- $\kappa$ B activation [J]. Neurochem Int, 2002, 41(1):43.

[7] Lukiw W J, Zhao Y, Cui J G. An NF-kappaB-sensitive

micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(46):31315.

[8] Lee K S, Chung J H, Choi T K, et al. Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2009, 28(4):281.

[9] Lyudmila V, Boroviko V A, Svetlana L, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. Nature, 2000, 405(6785):458.

[10] 郭莉莉, 王永林, 黄勇, 等. 灯盏乙素对痴呆大鼠脑组织乙酰胆碱尼古丁受体蛋白及 mRNA 表达的作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(6):789.

[责任编辑 聂淑琴]

(direct red 80%)。 **Result:** The result indicated that the bioactive components of scallop shells could enhance the bioactivity of chymotrypsin, but had a strong inhibitory effect on the bioactivity of elastase and trypsin; enhance cell proliferation of the skin fibroblast ( $P < 0.05$ ) and collagen synthesis ( $P < 0.05$ )。 **Conclusion:** These results indicate that the components of the scallop shell contain the biological active substances that protect the skin tissue。

[ **Key words** ] *Patinopecten yessoensis* scallop shells; skin protection; bioactive component; protease; TIG-101 cells

随着人们生活水平的提高,食用和养殖扇贝的数量也逐年增加,而扇贝壳却被人们当作废弃物随意丢弃,造成了严重的环境污染和资源浪费,那么扇贝壳的再利用就显得尤为重要。扇贝壳含有的成分中95%以上是碳酸钙,有机成分不足5%,在日本和欧美的一些国家当中多把其作为墙壁涂料、土壤改良剂来加以利用。我国把珍珠粉作为美容原料及中药成分已广泛使用,但其却有着价格昂贵的缺点,而扇贝壳内层的结构和珍珠的结构形成机制相似。笔者使用扇贝壳的抽出成分,对与皮肤保护有关的蛋白酶活性的影响和对皮肤上皮细胞的增殖影响进行了体外作用评价。

## 1 材料

**1.1 扇贝壳成分的抽取** 取200 g扇贝*Patinopecten yessoensis*(本院刘云春副教授鉴定)贝壳粉碎后,装入透析袋(MD25),在5%的醋酸溶液中进行透析,溶解除去扇贝壳中的碳酸钙;再用脱离子水透析,除去醋酸;①然后收集透析袋中的成分进行离心,取上清液进行浓缩并冷冻干燥,得到扇贝壳的水溶性抽出成分;②除去醋酸的扇贝壳成分进行浓缩干燥后,加入70%甲醇溶解离心,取上清液浓缩干燥,得到扇贝壳的甲醇溶解成分。实验时,将抽出成分用去离子水溶解成不同浓度,作为水溶性样品进行体外作用评价。

**1.2 细胞株** TIG-101皮肤成纤维细胞株购于上海研吉生物有限公司。

**1.3 药品及试剂** 普通干粉培养基、PBS缓冲溶液、弹性蛋白酶(elastase)、胰蛋白酶(trypsin)、糜蛋白酶(chymotrypsin)、*N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide、HEPES-NaOH(pH 7.5)、BANP( $\alpha$ -*N*-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide,用DMSO溶解)、Tris-HCl(pH 8),以上试剂由HyClone公司和上海泛柯生物科技有限公司提供。

**1.4 仪器** CO<sub>2</sub>培养箱(美国SHELLAB),CX-31型生物显微镜(奥林巴斯),ELx800型酶标仪(Bio Tek)。

## 2 方法

### 2.1 相关蛋白酶的活性测定

**2.1.1 弹性蛋白酶活性的测定**<sup>[1]</sup> 使用96孔细胞培养板,每孔200  $\mu$ L反应液[弹性蛋白酶1  $\mu$ g, 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> HEPES-NaOH 40  $\mu$ L, 3 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> BANP 20  $\mu$ L,各种浓度的水溶性扇贝壳抽取成分(0.006,0.015,0.03,0.06 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>)140  $\mu$ L。对照用去离子水140  $\mu$ L],在室温下,波长405 nm处,在测定的瞬间加入弹性蛋白酶溶液,连续15 min测定反应液的吸光度(A)。

**2.1.2 胰蛋白酶活性的测定**<sup>[2]</sup> 使用96孔细胞培养板,每孔200  $\mu$ L反应液[胰蛋白酶5  $\mu$ g, 12.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl 40  $\mu$ L, 3 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> BANP 20  $\mu$ L,各种质量浓度的水溶性扇贝壳抽取成分(0.025,0.05,0.086 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>)140  $\mu$ L。对照用去离子水140  $\mu$ L],在室温下,波长405 nm处,在测定的瞬间加入胰蛋白酶溶液,连续15 min测定反应液的A。

**2.1.3 糜蛋白酶活性的测定**<sup>[3]</sup> 使用96孔细胞培养板,每孔200  $\mu$ L反应液[糜蛋白酶1.3  $\mu$ g, 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> HEPES-NaOH 40  $\mu$ L, 0.2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide 20  $\mu$ L,各种质量浓度的水溶性扇贝壳抽取成分(0.007,0.009,0.02 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>)140  $\mu$ L。对照用去离子水140  $\mu$ L],在室温下,波长595 nm处,在测定的瞬间加入糜蛋白酶溶液,连续15 min测定反应液的A。

### 2.2 TIG-101细胞培养及细胞增殖活性的测定

**2.2.1 TIG-101细胞的培养** 购置的TIG-101细胞,添加基础细胞培养液置于直径为10 cm的培养皿内,放入二氧化碳培养箱(37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>)培养1周,期间观察细胞的附着情况,3~4 d视情况置换培养液1次。

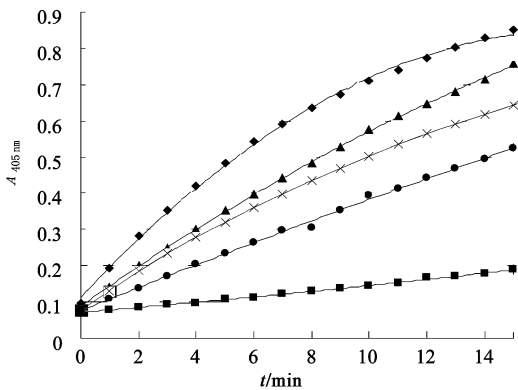
**2.2.2 TIG-101细胞增殖活性及胶原蛋白的测定** 使用96孔细胞培养板,最外围的孔内各加入PBS缓冲液150  $\mu$ L;把对数生长期的TIG-101细胞按每孔 $1 \times 10^4$ 的数量注入培养板孔穴内,并追加基础培养基溶液补足容积为每孔150  $\mu$ L;放入CO<sub>2</sub>培养箱(37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>)培养12 h后,镜下确认细胞附着情况;将PBS溶解的各浓度贝壳抽出成分10  $\mu$ L加入

孔穴内(每种浓度各加入 5 孔),对照加入等量的 PBS 溶液 10  $\mu\text{L}$ ;将培养板放回  $\text{CO}_2$  培养箱(37  $^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ ) 培养 24 h;培养结束后,MTT 法测定 TIG-101 细胞的增殖情况;胶原蛋白染色法(Direct Red 80%)测定 TIG-101 细胞胶原蛋白的含量。

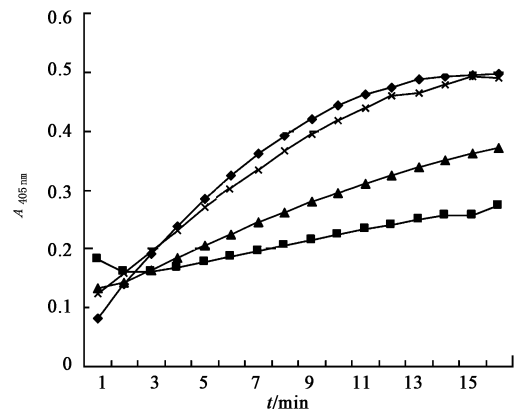
**2.3 数据统计** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 扇贝壳活性成分对弹性蛋白酶和胰蛋白酶活性的抑制作用** 与对照组比较,加入了扇贝壳抽出成分的反应液中的弹性蛋白酶活性受到了明显抑制,并呈现出浓度依存性,见图 1;胰蛋白酶的活性与弹性蛋白酶一样,受到扇贝壳活性成分的抑制,同样呈现浓度依存性,见图 2。



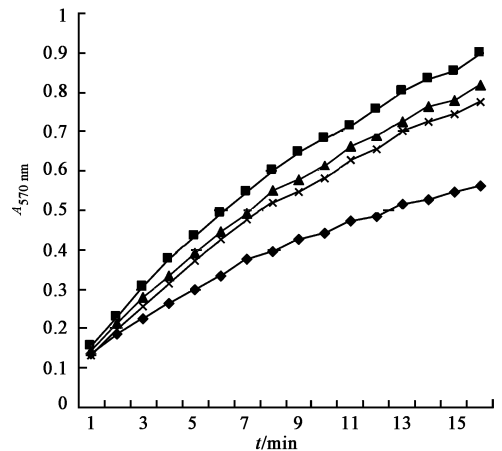
反应在无扇贝壳抽出成分时(◆),添加扇贝壳抽出成分分别为 0.006  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (▲),0.015  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (×),0.03  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (●),0.06  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (■)时,波长 405 nm 处的 A  
图 1 扇贝壳活性成分对弹性蛋白酶活性的抑制作用



反应在无扇贝壳抽出成分时(◆)和添加扇贝壳抽出成分分别为 0.025  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (×),0.05  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (▲),0.086  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (■)时,波长 405 nm 处的 A  
图 2 扇贝壳活性成分对胰蛋白酶活性的抑制作用

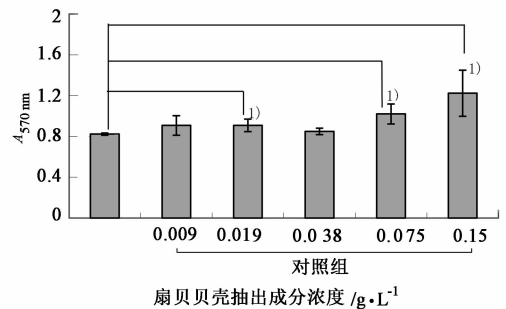
**3.2 扇贝壳活性成分促进糜蛋白酶活性的作用**

与对照组比较,加入了扇贝壳抽出成分的反应液中的糜蛋白酶活性增强,并呈现出浓度依存性,见图 3,而去除糜蛋白酶,添加扇贝壳抽出成分的反应液中,无活性显示,A 均在 0.1 以下。



反应在无扇贝壳抽出成分时(◆)和添加扇贝壳抽出成分分别为 0.007  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (×),0.009  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (▲),0.02  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (■)时,波长 595 nm 处的 A  
图 3 扇贝壳活性成分对糜蛋白酶活性的促进作用

**3.3 扇贝壳活性成分对皮肤成纤维细胞增殖活性作用** 采用 MTT 法对皮肤成纤维细胞的检测结果显示:添加扇贝壳抽出成分培养 24 h 后,在 0.019,0.075  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  处,与对照组相比,呈现明显的增殖作用( $P < 0.05$ ),见图 4。



皮肤成纤维细胞在添加了扇贝壳生物抽出成分后(浓度按横轴所示添加),培养 24 h 后,采用 MTT 法检测的结果<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。  
图 4 扇贝壳生物活性成分的细胞增殖活性作用( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**3.4 扇贝壳活性成分促进皮肤成纤维细胞胶原蛋白合成的作用** 采用胶原蛋白染色法,皮肤成纤维细胞在添加质量浓度为 6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  扇贝壳生物抽出成分,测定培养 24 h 后,TIG-101 细胞内胶原蛋白含量的检测结果显示:与对照组吸光度(A)为(0.080  $\pm$  0.004)相比,加入扇贝壳抽出成分 6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组 A 为(0.087  $\pm$  0.003),胶原蛋白含量明显增

加( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

生物体内一些蛋白酶在皮肤组织的新陈代谢方面起着很重要的生物活性作用<sup>[6-9]</sup>。糜蛋白酶能切断皮肤角化细胞之间的细胞桥粒的联系,加速皮肤角化细胞脱落,促进皮肤上皮细胞的新陈代谢。扇贝壳含有的生物活性成分,能增强糜蛋白酶的活性,在去除糜蛋白酶后,扇贝壳含有的生物活性成分并不能分解底物显示活性,这一结果提示扇贝壳的生物活性成分有着增强和促进糜蛋白酶活性的作用。扇贝壳的生物活性成分有望成为以促进皮肤角化脱落为主的化妆品的原料来加以利用。随着年龄的增大和紫外线的影响,导致生成大量的过氧化氢物和弹性蛋白酶,出现了由皮肤弹性蛋白减少而形成的皱纹、浮肿等皮肤老化现象。扇贝壳中含有的生物活性成分能明显阻碍弹性蛋白酶的活性,并有促进皮肤细胞增殖和胶原蛋白合成的作用,笔者的研究结果提示,扇贝壳的生物活性成分对皮肤弹性的恢复和维持起着积极的作用,是维持皮肤弹性、预防皮肤老化化妆品的理想原料之一。同时弹性蛋白酶抑制剂对临床医学上某些以弹性蛋白酶为致病因素的疾病也有预防和治疗的作用<sup>[10]</sup>。胰蛋白酶抑制剂同样是一种重要的生化药物和生化试剂,调节着生物体内许多重要的生命活动<sup>[11]</sup>,胰蛋白酶的活性增强是引起急慢性胰腺炎的原因之一<sup>[12-13]</sup>,扇贝壳含有的生物活性成分能明显阻碍胰蛋白酶的活性,对这些疾病在一定程度上能起到良好的预防作用。

#### [参考文献]

[1] Ito N, Iwamori Y, Hanaoka K, et al. Inhibition of pancreatic elastase by sulfated lipids in the intestinal mucosa[J]. *J Biochem*, 1998, 123(1):107.  
 [2] Vanderjagt D J, Freiburger C, Vu H T, et al. The trypsin inhibitor content of 61 wild edible plant foods of Niger[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2000, 55(4):335.

[3] Egelrud T, Lundström A. A chymotrypsin-like proteinase that may be involved in desquamation in plantar stratum corneum [J]. *Arch Dermatol Res*, 1991, 283(2):108.  
 [4] Almeida M J, Pereira L, Milet C, et al. Comparative effects of nacre water-soluble matrix and dexamethasone on the alkaline phosphatase activity of MRC-5 fibroblasts [J]. *J Biomed Mter Res*, 2001, 57(2):306.  
 [5] Almeida M J, Pereira L, Milet C, et al. Effect of water-soluble matrix fraction extracted from the nacre of *Pinctada maxima* on the alkaline phosphatase activity of cultured fibroblasts [J]. *J EXP Zool*, 2000, 288(4):327.  
 [6] Lundström A, Egelrud T. Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in reconstructed human epidermis and its suppression by retinoic acid[J]. *Acta Derm Venereol*, 1993, 73(3):181.  
 [7] Egelrud T. Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase that may be involved in desquamation [J]. *J Invest Dermatol*, 1993, 101(2):200.  
 [8] Horikoshi T, Arany I, Rajaraman S, et al. Isoforms of cathepsin D and human epidermal differentiation [J]. *Biochimie*, 1998, 80(7):605.  
 [9] Horikoshi T, Igarashi S, Uchiwa H, et al. Role of endogenous cathepsin D-like and chymotrypsin-like proteolysis in human epidermal desquamation [J]. *Br J Dermatol*, 1999, 141(3):453.  
 [10] 张瑞霞, 龙尧. 中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂在疾病中的作用[J]. *医学综述*, 2008, 14(6):919.  
 [11] 王善霞, 滑静, 张淑平, 等. 胰蛋白酶抑制剂在不同领域的研究概况 [J]. *北京农学院学报*, 2003, 18(2):152.  
 [12] 徐光辉, 石碧坚, 刘厚钰. 急性坏死性胰腺炎治疗的临床分析 [J]. *临床消化病杂志*, 1997, 9(2):52.  
 [13] 刘盈盈, 朱必凤, 彭凌, 等. 胰蛋白酶抑制剂的药用功能 [J]. *韶关学院学报*, 2006, 27(6):104.

[责任编辑 聂淑琴]