DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230621

·论　著·

鲤鱼鱼精蛋白水解肽促进口腔细胞增殖和抑制炎症

张廷彬[1]，冯埭堉[1]，张　霞[1]，刘良叙[2]，潘　磊[1*]
1. 中国人民解放军海军第九〇五医院口腔科，上海 200052
2. 上海交通大学生命科学技术学院，上海 200240

［摘要］ **目的**　考察鲤鱼鱼精蛋白水解肽（PHP）对口腔溃疡的治疗潜力。**方法**　利用CCK-8 法测定不同浓度（20、40、80、160 μg/mL）的PHP 对人口腔上皮细胞（HOEC）和人口腔角质形成细胞（HOK）增殖的影响，并利用脂多糖（LPS）诱导炎症，通过检测细胞增殖率以及炎症因子（*IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α*）mRNA 表达观察PHP 的抗炎能力，通过细胞划痕实验模拟PHP 对口腔溃疡愈合的影响。**结果**　PHP 在 20～160 μg/mL 范围内可浓度依赖性地促进 HOEC 和 HOK 的增殖，其中 160 μg/mL PHP 可使 HOEC 和 HOK 的细胞增殖率分别比对照组提高（32.05±3.82）% 和（74.23±17.26）%（均 P＜0.01）。PHP 在 40～160 μg/mL 范围内可逆转 LPS 对细胞增殖的抑制，其中 160 μg/mL PHP 可使 HOEC 和 HOK 的细胞增殖率分别比 LPS 组提高（53.14±9.18）% 和（76.45±8.16）%（均 P＜0.01）；40～160 μg/mL PHP 可浓度依赖性地降低 HOK 细胞内炎症因子的 mRNA 表达水平，其中 160 μg/mL PHP 组促炎因子 *IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* 的 mRNA 表达量分别为 LPS 组的（46.48±4.42）%、（80.01±2.68）% 和（31.40±3.78）%（均 P＜0.01）。细胞划痕实验显示，160 μg/mL PHP 可有效促进 HOEC 和 HOK 的迁移，细胞迁移率分别为 LPS 组的（1.84±0.17）倍（P＜0.05）和（2.34±0.10）倍（P＜0.01）。**结论**　PHP 能够促进口腔细胞的增殖和迁移，具有明显的抗炎活性，表现出加快口腔溃疡愈合的潜力。

［关键词］　鱼精蛋白水解肽；口腔溃疡；细胞增殖；抗炎活性；伤口愈合
［引用本文］　张廷彬，冯埭堉，张霞，等. 鲤鱼鱼精蛋白水解肽促进口腔细胞增殖和抑制炎症［J］. 海军军医大学学报，2026，47（9）：1199-1207. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230621.

Carp protamine hydrolytic peptide promotes oral cell proliferation and inhibits inflammation

ZHANG Tingbin[1], FENG Shuangyu[1], ZHANG Xia[1], LIU Liangxu[2], PAN Lei[1*]
1. Department of Stomatology, No. 905 Hospital of PLA Navy, Shanghai 200052, China
2. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

［**Abstract**］　**Objective**　To investigate whether protamine hydrolytic peptide (PHP) from carp has a positive effect for treatment of oral ulcers. **Methods**　The cell counting kit-8 assay was used to determine the effects of PHP at different concentrations (20, 40, 80, 160 μg/mL) on the proliferation of human oral epithelial cells (HOEC) and human oral keratinocytes (HOK). Lipopolysaccharide (LPS) was used to induce inflammation, and the anti-inflammatory effects were evaluated by cell proliferation rates and the mRNA expression levels of inflammatory factors interleukin (*IL*)-*6*, *IL-1β*, and tumor necrosis factor α (*TNF-α*). A cell scratch assay was performed to simulate the effect of PHP on oral ulcer healing. **Results**　PHP promoted the proliferation of HOEC and HOK in a concentration-dependent manner within the range of 20-160 μg/mL. Compared with the control group, 160 μg/mL PHP increased the cell proliferation rates of HOEC and HOK by (32.05±3.82)% and (74.23±17.26)%, respectively (both P＜0.01). Moreover, compared with the LPS group, PHP reversed the LPS-induced inhibition of cell proliferation, with increases being (53.14±9.18)% and (76.45±8.16)% in HOEC and HOK, respectively (both P＜0.01). PHP at 40-160 μg/mL concentration-dependently reduced the mRNA expression levels of inflammatory factors in HOK; in the 160 μg/mL PHP group, the mRNA expression levels of pro-inflammatory factors *IL-6*, *IL-1β*, and *TNF-α* in HOK were only (46.48±4.42)%, (80.01±2.68)%, and (31.40±3.78)% of those in the LPS group, respectively (all P＜0.01). The cell scratch assay showed that 160 μg/mL PHP could effectively enhance the cell migration rates of HOEC and HOK, which were (1.84±0.17)-fold (P＜0.05) and (2.34±0.10)-fold (P＜0.01) that of the LPS group,

［收稿日期］ 2023-11-11　　［接受日期］ 2024-10-30
［作者简介］ 张廷彬，住院医师. E-mail: kqztbin@163.com
*通信作者（Corresponding author）. E-mail: pl20231110@163.com

respectively. **Conclusion**　PHP can promote the proliferation and migration of oral cells, and exhibits significant anti-inflammatory activity, indicating its potential to accelerate oral ulcer healing.

［**Key words**］　protamine hydrolytic peptide; oral ulcer; cell proliferation; anti-inflammatory activity; wound healing

［**Citation**］　Zhang T, Feng S, Zhang X, et al. Carp protamine hydrolytic peptide promotes oral cell proliferation and inhibits inflammation[J]. Acad J Naval Med Univ, 2026, 47(9): 1199-1207. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230621.

口腔溃疡是一种常见的溃疡性损伤病症，发作时疼痛剧烈，严重者还会影响饮食、说话，对日常生活造成极大不便[1]。目前，口腔溃疡的治疗方法主要包括口服药物、局部用药、口腔护理和营养补充等。但现有的治疗方法存在一些局限性，如局部用药可能在使用过程中造成不便，而营养补充在疗效和安全性方面也面临一定挑战[2]。因此，探索口腔溃疡的新疗法具有重要意义。

水解肽是由蛋白质分子水解而产生的短肽链分子，更容易被人体吸收且具有抗氧化、抗炎和促细胞增殖等生物活性，这些特性使得水解肽在医疗、保健、美容和食品工业等领域备受关注[3-5]。据报道，燕麦蛋白的木瓜蛋白酶水解物具有抗氧化活性，可有效清除 ABTS 阳离子自由基和螯合铁离子[6]。一些来自动物产品、海洋生物和植物的水解肽具有抑制血管紧张素转换酶和抗高血压活性，其活性与酶解程度和肽序列的组成密切相关，并且低分子量的肽在体内更容易被吸收[7]。鱼精蛋白是一种从鱼类精巢中提取得到的蛋白质，鱼精蛋白水解肽（protamine hydrolytic peptide，PHP）则是从鱼精蛋白中通过酶解或其他加工方法获得的短肽分子。鱼精蛋白与肝素类抗凝血药物（如肝素）结合后能够中和它们的抗凝血作用，常用于体外循环心脏手术[8-9]。鉴于水解肽具有抗炎和促细胞增殖等生物活性，PHP 可能对口腔溃疡具有潜在的治疗作用，但目前关于 PHP 应用于治疗口腔溃疡的研究尚未见报道。

人口腔上皮细胞（human oral epithelial cell，HOEC）和人口腔角质形成细胞（human oral keratinocyte，HOK）是口腔黏膜的主要细胞类型，它们对口腔黏膜的稳态维持和功能发挥具有关键作用[10-11]。HOEC 作为口腔黏膜的第一道防线，可以保护口腔黏膜不受外界刺激和微生物感染的侵害[12]。HOK 是伤口修复所必需的细胞[13]。研究表明，组织损伤后 HOK 被激活，产生成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子、TGF-β 等生长因子和许多细胞因子，这些因子对伤口愈合至关重要[14-15]。选择 HOEC 和 HOK 作为体外细胞模型，有助于更准确地研究 PHP 对口腔溃疡的作用效果。本研究以 HOEC 和 HOK 作为研究对象，观察 PHP 的促细胞增殖、抗炎及促细胞划痕愈合能力，初步探究 PHP 在治疗口腔溃疡方面的潜力，为口腔溃疡的治疗提供新思路。

1　材料和方法

1.1　*鱼精蛋白的提取及水解肽制备*　购买市售新鲜、性成熟的雄性鲤鱼，取其精巢，使用研磨机将组织充分搅碎，然后称取 10 g 新鲜组织，用 50 mL PBS（pH 7.4）重悬。利用超声破碎仪在冰上超声破碎 30 min，超声条件为功率 600 W、超声 6 s、降温 9 s，再利用均质机在 80 MPa 压力下破碎 3 个循环，最后在 4 ℃下 14 530×*g* 离心 10 min，收集上清并冻干，得到鱼精蛋白粗蛋白（protamine crude protein，PCP）。

使用胃蛋白酶（10%，37 ℃，pH 2.0）、碱性蛋白酶（10%，50 ℃，pH 9.0）和木瓜蛋白酶（10%，55 ℃，pH 6.5）分别对 PCP 酶解 2 h 以获得 3 种不同的水解肽。酶解结束后在 90 ℃水浴中灭酶 15 min。冷却至室温后，在 4 ℃下 14 530×*g* 离心 10 min，收集上清液并冻干获得 PHP，储存于 −20 ℃冰箱备用。

1.2　*PHP 的表征*　首先通过 SDS-PAGE 对 PHP 分子量范围进行判定，蛋白上样量为 50 μg，电泳条件为 120 V 电泳 70 min，然后用考马斯亮蓝染色液室温染色 1 h，再用去离子水脱色 3 次。

采用甲醛滴定法对水解肽的水解度进行测定[16]。取 1 mL 样品溶液（1 mg/mL），加水稀释至 10 mL，用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 8.2，然后加入 2 mL 中性甲醛混匀，用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液滴定至 pH 为 9.2，记录所消耗的 NaOH 溶液体积，以未经酶解的样品液为空白对照。按公式计算水解度：水解度（%）$=C(V_1-V_0)\times 0.014/N\times 100\%$。式中，$C$ 为 NaOH 溶液浓度（mol/L），

V_1 为水解后消耗的 NaOH 溶液体积（mL），V_0 为水解前消耗的 NaOH 溶液体积（mL），0.014 为氮的毫克当量，N 为样品底物中的总氮含量（g）。

1.3　细胞培养　HOEC 购自浙江美森细胞生物科技有限公司，HOK 和小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 购自青旗（上海）生物技术发展有限公司。细胞培养基为含 10% FBS 的 DMEM，细胞放置于 37 ℃、5% CO_2 且湿润的恒温培养箱中培养，当细胞融合度达 80%～90% 时用 0.25% 的胰酶消化液进行消化后传代。

1.4　细胞增殖率测定　将 HOK 和 HOEC 按照 5 000/ 孔的密度接种于 96 孔板，培养 24 h 待细胞贴壁后，弃掉旧培养基并用 PBS 清洗 2 次，加入含有不同浓度 PCP 和 PHP（浓度梯度为 0、20、40、80、160 μg/mL）的培养基，孵育 24 h。然后弃掉旧培养基，用 PBS 清洗 2 次，加入 100 μL DMEM 和 10 μL CCK-8，在培养箱中孵育 1 h，最后在 450 nm 波长处测定光密度（D）值。按公式计算细胞增殖率：细胞增殖率（%）＝（$D_{实验孔}-D_{空白孔}$）/（$D_{对照孔}-D_{空白孔}$）×100%。同法检测 RAW 264.7 细胞增殖率。

1.5　抗炎效果测定　将 HOK 和 HOEC 按照 5 000/ 孔的密度接种于 96 孔板。培养 24 h 待细胞贴壁后，弃掉旧培养基并用 PBS 清洗 2 次，按照分组分别加入相应的培养基处理，即对照组（细胞培养基）、脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）组（含 10 μg/mL LPS 的细胞培养基）和实验组（含 10 μg/mL LPS 及 40、80、160 μg/mL PCP 或 PHP 的细胞培养基），孵育 24 h。然后弃掉旧培养基，用 PBS 清洗 2 次，加入 100 μL DMEM 和 10 μL CCK-8 试剂，在培养箱中孵育 1 h，最后在 450 nm 波长处测定 D 值，计算细胞增殖率。

1.6　炎症因子 mRNA 检测　用不同浓度药物处理 RAW 264.7 和 HOK 24 h 后，收集细胞，按照说明书，使用 RNA fast 200 总 RNA 极速抽提试剂盒（上海飞捷生物技术有限公司）提取总 RNA，然后用 StarScript Ⅲ All-in-one RT Mix with gDNA Remover（北京康润诚业生物科技有限公司）进行基因组 DNA 去除和反转录合成 cDNA。按照 2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix 试剂盒（北京康润诚业生物科技有限公司）说明书进行预混，然后使用 ABI QuantStudio 6 Flex（美国 ABI 公司）进行 qPCR。循环方案如下：95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s，40 个循环；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s。β- 肌动蛋白（*Homo sapiens*）正向引物为 5′-TTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3′，反向引物为 5′-TGCTGTCACCTTCACCGTTCC-3′；*IL-6*（*Homo sapiens*）正向引物为 5′-TGGGGCTGCTCC-TGGTGTTG-3′，反向引物为 5′-GAGGTGAGTGG-CTGTCTGTG-3′；*IL-1β*（*Homo sapiens*）正向引物为 5′-ACCACCACTACAGCAAGGGGC-3′，反向引物为 5′-TGGGCAGGGAACCAGCATCT-3′；*TNF-α*（*Homo sapiens*）正向引物为 5′-CCCGAGTGAC-AAGCCTGTAG-3′，反向引物为 5′-GATGGTGTGG-GTGAGGAGCA-3′；β- 肌动蛋白（mouse）正向引物为 5′-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3′，反向引物为 5′-ATGTCACGCACGATTTCC-3′；*IL-1β*（mouse）正向引物为 5′-GGCTGGACTGTTTCTAATGC-3′，反向引物为 5′-ATGGTTTCTTGTGACCCTGA-3′；*TNF-α*（mouse）正向引物为 5′-AGTCCGGGCAGG-TCTACTTT-3′，反向引物为 5′-TCACTGTCCCAGC-ATCTTGT-3′。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.7　细胞划痕实验　首先用笔在 6 孔板背后均匀地划 5 条横线，然后取处于对数生长期的 HOEC 和 HOK，按照 60 000/ 孔的密度接种于 6 孔培养板。24 h 后，用 200 μL 枪头垂直于背后的横线划痕。用 PBS 冲洗细胞 3 次，以除去漂浮的细胞，加入含不同浓度 PHP 的培养基。分别在 0 h 和 24 h 时用倒置显微镜拍照，每孔拍摄 3 张照片。使用 ImageJ 1.8.0 软件计算划痕面积均值。细胞迁移率（%）＝（初始划痕面积－t 时刻划痕面积）/ 初始划痕面积 ×100%。

1.8　统计学处理　使用 Prism 9.0 软件进行数据分析。所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析或独立样本 t 检验。检验水准（α）为 0.05。

2　结　果

2.1　PHP 的表征　由图 1 可见，大部分 PCP 的分子量在 12 000～95 000 之间（1～3 泳道）；经过蛋白酶消化之后的水解肽分子量明显下降，可以看出木瓜蛋白酶的水解效果最好，绝大部分蛋白分子量＜17 000（10～12 泳道）。甲醛滴定法测定水解度结果显示，胃蛋白酶和碱性蛋白酶的水解度分别为（36.46±2.18）% 和（39.38±1.43）%，而木瓜蛋白酶的水解度高达（47.83±4.59）%，与胃蛋白酶比较差异有统计学意义（P＜0.05）。此外，与胃蛋白酶和碱性蛋白酶相比，木瓜蛋白酶的成本

更低，反应条件不需要酸性或碱性环境，操作更简单，因此本研究后续选取木瓜蛋白酶制备 PHP。

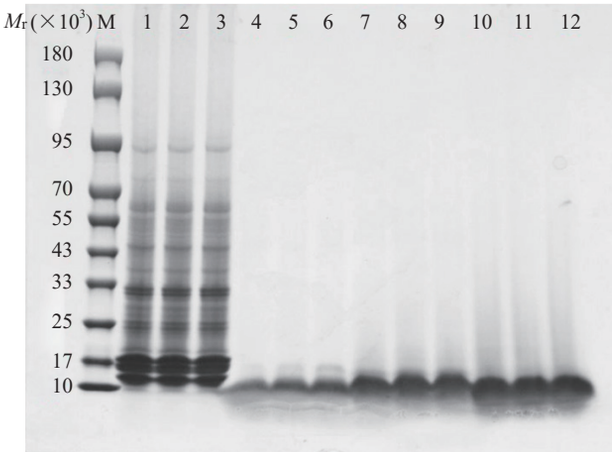

图 1　不同蛋白酶对鲤鱼鱼精蛋白的水解效果

Fig 1　Effect of different proteases on hydrolysis of carp protamine

Carp protamine was enzymatically hydrolyzed using pepsin, alkaline protease, and papain. The molecular sizes of the hydrolysates were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. M: Protein marker (Genesand, China), with a molecular weight range of 10 000-180 000; Lanes 1-3: Unhydrolyzed carp protamine; Lanes 4-6: Carp protamine hydrolyzed by pepsin; Lanes 7-9: Carp protamine hydrolyzed by alkaline protease; Lanes 10-12: Carp protamine hydrolyzed by papain.

2.2　PHP 对 HOEC 和 HOK 增殖的影响　由图 2 可见，PCP 和 PHP 都能够在 20～160 μg/mL 范围内浓度依赖性地促进 HOEC 和 HOK 增殖。其中，与对照组（0 μg/mL）相比，160 μg/mL PCP 和 PHP 对 HOK 的细胞增殖率提升达（59.24±8.71）% 和（74.23±17.26）%（图 2A），对 HOEC 的细胞增殖率提升达（34.70±5.47）% 和（32.05±3.82）%（图 2B）。值得注意的是，对于 HOK，在 20、40 μg/mL 时，PHP 的效果分别比 PCP 提高了（25.64±11.87）%、（26.41±4.95）%（均 $P<0.01$），说明小分子水解肽对 HOK 的增殖促进作用更强。

2.3　PHP 对细胞抗炎能力的影响　如图 3 所示，与对照组相比，LPS（10 μg/mL）可使 HOK 和 HOEC 的细胞增殖率明显下降（均 $P<0.05$），说明 LPS 会导致细胞发生炎症从而抑制细胞增殖。40～160 μg/mL 的 PCP 和 PHP 均可浓度依赖性地逆转 LPS 对 HOK 和 HOEC 增殖的抑制效果。与 LPS 组相比，160 μg/mL PCP 可使 HOK 的细胞增殖率提高（64.25±3.58）%（$P<0.01$，图 3A），而 160 μg/mL PHP 可使 HOK 的细胞增殖率提高（76.45±8.16）%（$P<0.01$，图 3B）；同样，160 μg/mL 的 PCP 可使 HOEC 的细胞增殖率提高（29.19±3.55）%（$P<0.01$，图 3C），而 160 μg/mL PHP 可使 HOEC 的细胞增殖率提高（53.14±9.18）%（$P<0.01$，图 3D）。

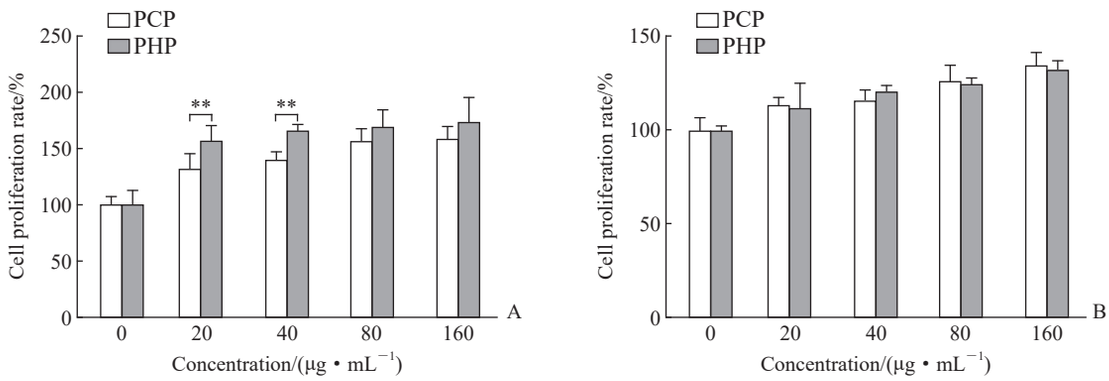

图 2　鲤鱼鱼精蛋白及其水解肽促进 HOK（A）和 HOEC（B）增殖

Fig 2　Carp protamine and its hydrolytic peptides enhance the proliferation of HOK (A) and HOEC (B)

$n=3$, $\bar{x}\pm s$. $^{**}P<0.01$. HOK: Human oral keratinocyte; HOEC: Human oral epithelial cell; PCP: Protamine crude protein; PHP: Protamine hydrolytic peptide.

为方便比较 HOK 和 HOEC 的抗炎效果差异，将图 3A 和图 3B 整合成图 3E，将图 3C 和图 3D 整合成图 3F，可见在 HOK 中 PHP 浓度为 40、80、160 μg/mL 时抗炎效果优于 PCP（均 $P<0.05$，图 3E），在 HOEC 中 160 μg/mL 的 PHP 抗炎效果优于 PCP（$P<0.01$，图 3F）。上述结果说明，PCP 和 PHP 可有效提高 HOK 和 HEOC 的抗炎能力，并且分子量更小的 PHP 抗炎效果比 PCP 更明显。

2.4　PHP 对 HOK 炎症因子 mRNA 表达的影响　与对照组相比，LPS（10 μg/mL）可使 HOK 的炎症因

子 *IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 分别升高（62.00±16.10）%、（37.84±2.95）% 和（187.23±44.07）%（均 $P<0.01$），说明 LPS 诱导了细胞内炎症。而 PHP 可浓度依赖性地降低 HOK 细胞内炎症因子的 mRNA 表达水平，其中 160 μg/mL PHP 组 *IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达水平分别为 LPS 组的（46.48±4.42）%、（80.01±2.68）% 和（31.40±3.78）%（均 $P<0.01$），说明 PHP 抗炎效果显著。见图 4。

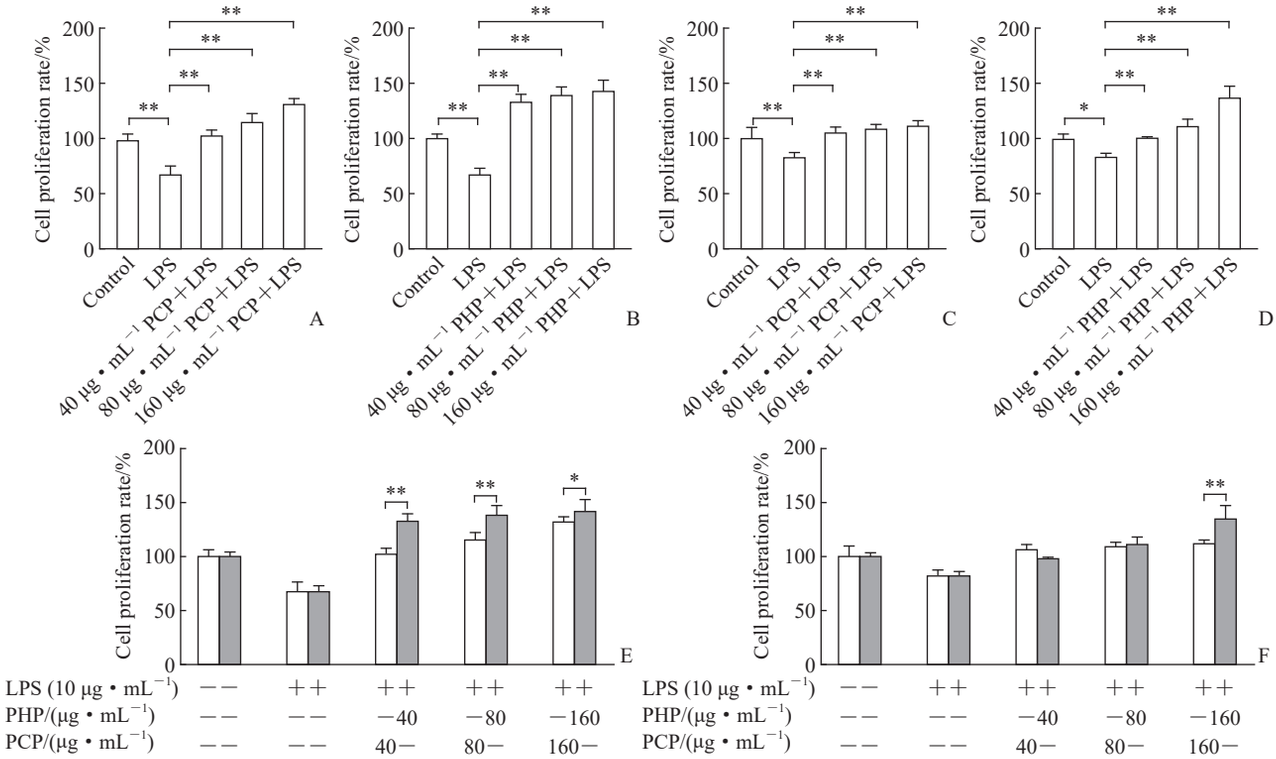

图 3　鲤鱼鱼精蛋白及其水解肽可提高 HOK 和 HOEC 对 LPS 的抵抗力

Fig 3　Carp protamine and its hydrolytic peptide enhance the resistance of HOK and HOEC to LPS

A, B: Effects of PCP (A) and PHP (B) on the proliferation of LPS-stimulated HOK; C, D: Effects of PCP (C) and PHP (D) on the proliferation of LPS-stimulated HOEC; E: Comparison of cytoprotective effects between PCP and PHP in LPS-treated HOK; F: Comparison of cytoprotective effects between PCP and PHP in LPS-treated HOEC. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. HOK: Human oral keratinocyte; HOEC: Human oral epithelial cell; LPS: Lipopolysaccharide; PCP: Protamine crude protein; PHP: Protamine hydrolytic peptide.

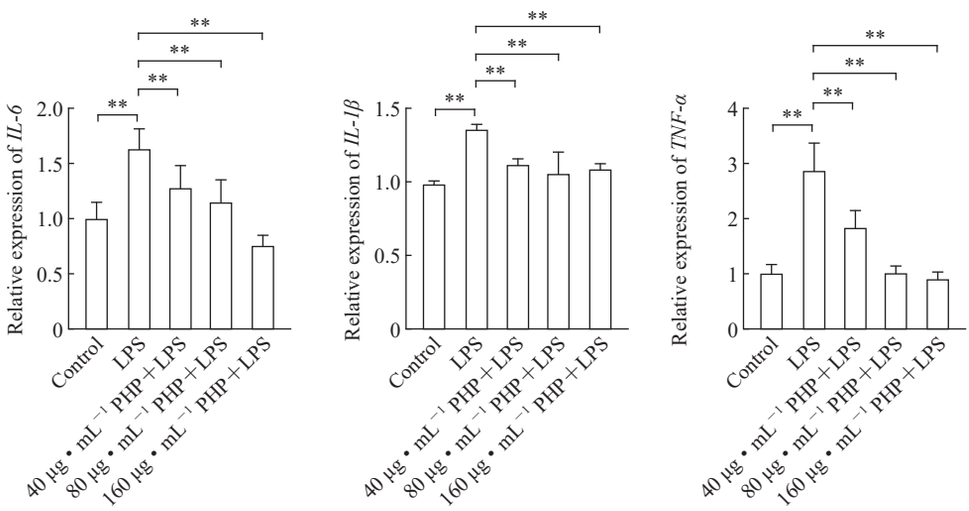

图 4　PHP 可降低 HOK 炎症因子 mRNA 表达水平

Fig 4　PHP reduces the mRNA expression levels of inflammatory factors in HOK

$n=3$, $\bar{x}\pm s$. $^{**}P<0.01$. PHP: Protamine hydrolytic peptide; HOK: Human oral keratinocyte; LPS: Lipopolysaccharide; IL-6: Interleukin 6; IL-1β: Interleukin 1β; TNF-α: Tumor necrosis factor α.

2.5　PHP 对 RAW 264.7 细胞增殖及炎症因子 mRNA 表达的影响　与对照组（0 μg/mL）相比，PHP 在 20～160 μg/mL 范围内能够促进 RAW 264.7 细胞增殖，其中 80 μg/mL 效果最好，细胞增殖率比对照组提高了（148.58±5.66）%（P<0.01，图 5A）。此外，LPS（10 μg/mL）诱导 RAW 264.7 细胞内 *IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达增加，造成细胞炎症；而 PHP 可以逆转 LPS 诱导的 *IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达增加，说明 PHP 具有抗炎效果（图 5B、5C），与在 HOK 中得到的结果一致。

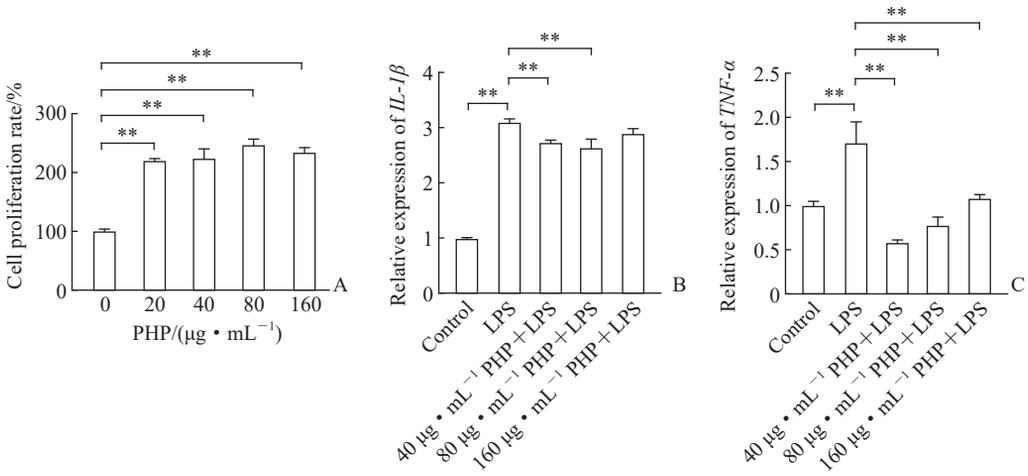

图 5　PHP 促进 RAW 264.7 细胞增殖（A）并降低 LPS 诱导的炎症因子 mRNA 表达水平（B、C）

Fig 5　PHP increases RAW 264.7 cell proliferation (A) and reduces the expression levels of inflammatory factors (B, C)

n=3, $\bar{x}\pm s$. $^{**}P$<0.01. PHP: Protamine hydrolytic peptide; LPS: Lipopolysaccharide; IL-1β: Interleukin 1β; TNF-α: Tumor necrosis factor α.

2.6　PHP 促进 HOEC 和 HOK 迁移　细胞划痕实验结果显示，对于 HOEC，对照组培养 24 h 时的细胞迁移率可达（25.70±3.53）%，而 LPS 组（10 μg/mL）的细胞迁移率仅为（16.56±1.76）%，说明 LPS 可能通过诱导炎症抑制细胞迁移，影响伤口愈合；160 μg/mL PHP 可逆转 LPS 对 HOEC 迁移的抑制作用，细胞迁移率达到（30.50±2.91）%，是 LPS 组的（1.84±0.17）倍（P<0.05，图 6A、6B）。

对于 HOK，细胞划痕实验也可以得到类似的结果，培养 24 h 后，与对照组相比，LPS 组细胞迁移明显受到抑制，细胞迁移率为（15.52±0.97）%，仅为对照组的（51.83±3.25）%，而 80 μg/mL 和 160 μg/mL PHP 处理的 HOK 的细胞迁移率分别为（30.55±1.71）% 和（36.26±1.55）%，是 LPS 组的（1.97±0.11）倍和（2.34±0.10）倍（均 P<0.01，图 6C、6D）。上述结果说明，PHP 可逆转 LPS 对 HOK 和 HOEC 迁移的抑制作用，可能有助于促进口腔溃疡的愈合。

3　讨　论

口腔溃疡是一种常见的口腔疾病，通常表现为口腔黏膜表面的圆形溃疡，常伴有疼痛和不适感[17]。口腔溃疡的发病率极高，虽然不是严重疾病，但对患者的日常生活造成了极大的困扰。目前常用的治疗方法如口服抗炎药物或局部喷涂药物，尽管能够减轻疼痛和促进愈合，但可能带来刺激感或过敏反应[2]。本研究结果表明，鲤鱼 PHP 能促进 HOEC 和 HOK 增殖、抑制炎症反应，并能促进其迁移。

水解肽是由蛋白质分子通过水解反应而产生的小分子肽链。与低分子有机药物相比，生物活性肽药物具有多项优势，蛋白质被分解成小分子肽链后毒性风险降低、更容易被机体吸收，并且由于半衰期很短而不会在组织中蓄积[18]。研究发现利用胃蛋白酶水解牛乳铁蛋白得到的肽组分可有效促进成骨细胞的增殖，对治疗骨质疏松症具有积极作用[19]。鱼类副产品衍生的肽，特别是来自脱脂鲈鱼皮肤的水解胶原蛋白，能促进成骨细胞的增殖，可能是抗骨质疏松剂的安全来源[20]。此外，有研究指出，胶原肽可诱导成纤维细胞和角质形成细胞增殖和前胶原 1α 的表达，升高 TGF-β 和血管内皮生长因子水平，抑制 LPS 诱导的炎症反应，可用于改善皮肤健康[21]。

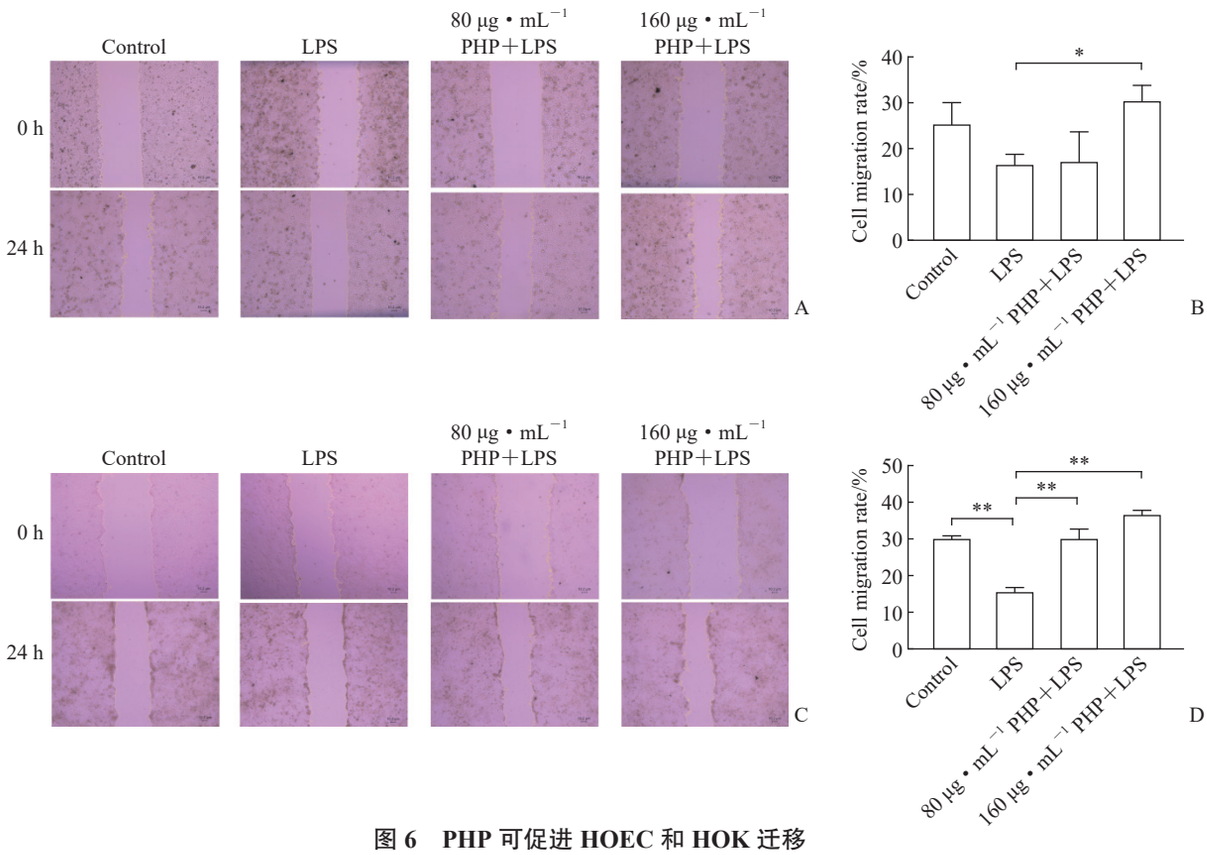

图 6　PHP 可促进 HOEC 和 HOK 迁移

Fig 6　PHP promotes HOEC and HOK migration

A 200 μL pipette tip was used to create scratches, and photographs were taken at 0 and 24 h to observe the impact of PHP on the migration rates of HOEC and HOK. A: Representative photograph of HOEC migration; B: The cell migration rate based on healing area of HOEC quantified using ImageJ software; C: Representative photograph of HOK migration; D: The cell migration rate based on healing area of HOK quantified using ImageJ software. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. PHP: Protamine hydrolytic peptide; HOEC: Human oral epithelial cell; HOK: Human oral keratinocyte; LPS: Lipopolysaccharide.

口腔溃疡的一个重要特点是溃疡面不易愈合，有些患者的口腔溃疡可能持续 2 周甚至更久，因此促进口腔细胞增殖对口腔溃疡的愈合具有积极作用。口腔上皮屏障是将宿主与环境分开和抵御病原体、外源性物质、机械应力的第一道防线[22]。HOEC 是由正常口腔黏膜细胞通过转染人端粒反转录酶得到的永生化细胞系。HOK 是由正常人口腔角质形成细胞通过转染重组人乳头瘤病毒 16 型得到的永生化细胞系[23]。口腔黏膜细胞和口腔角质形成细胞均是口腔上皮屏障的重要组成部分，因此 HOEC 和 HOK 这 2 种细胞系被广泛应用于口腔疾病实验的体外研究。本研究选用 2 种细胞模型来探究 PHP 对口腔溃疡的影响，从而提高实验结果可信度。本实验结果表明，PHP 能促进 HOEC 和 HOK 增殖，在 24 h 内细胞增殖率最大可比对照组提高（32.05±3.82）% 和（74.23±17.26）%，说明 PHP 可能有助于加速口腔溃疡的愈合。

炎症是导致口腔溃疡的重要因素之一[24]。LPS 是一种存在于细菌外膜上的分子复合物，具有强烈的免疫活性，可以引发宿主免疫系统的激活和炎症反应，常用于诱导炎症[25]。本研究结果表明 LPS 会导致 HOEC 和 HOK 的细胞增殖率下降，但 PHP 可有效逆转 LPS 对细胞增殖的抑制。同时，本研究还利用 qPCR 对促炎症基因 *IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* 的 mRNA 表达量进行了测定，结果发现 LPS 会诱导炎症基因的表达，但 PHP 可浓度依赖性地降低炎症基因的表达，该效果在 HOK 和 RAW 264.7 细胞系中都得到了验证，说明 PHP 具有出色的抗炎能力。水解肽的抗炎活性已在既往研究[26]中得到验证。Hu 等[27]发现，水解酪蛋白可以通过抑制颗粒酶 B 的生物学活性和细胞毒性，降低颗粒酶 B 介导的炎症反应。Kim 等[28]同样发现，水解酪蛋白得到的肽组分可抑制一氧化氮的产生，并且细胞因子（IL-6α、IL-3 和 TNF-α）的产生低于 LPS 组。

Xu 等[29]采用碱性蛋白酶和中性蛋白酶水解脱脂核桃粕蛋白制备的水解肽具有良好的抗炎活性，对 4 种炎症介质（一氧化氮、TNF-α、IL-6 和 IL-1β）的抑制率分别为（63.65±2.64）%、（68.25±2.19）%、（42.52±2.01）% 和（59.39±2.21）%。本研究采用细胞划痕实验模拟口腔溃疡愈合过程，结果发现 LPS 诱导炎症后会降低细胞的迁移率，抑制伤口愈合，但 PHP 却能逆转 LPS 对细胞迁移的抑制，进一步说明 PHP 具有出色的抗炎效果并能促进伤口愈合。

目前 PHP 促进愈合和抗炎的作用机制仍不清楚，但关于天然活性肽的研究提供了一些参考。有研究发现，用碱性蛋白酶和风味酶水解制备的蛋清肽能够通过刺激细胞膜热激蛋白 90α 分泌，促进皮肤成纤维细胞迁移和小鼠皮肤伤口愈合[30]。张洪轶[31]研究发现，蛋清源多肽 KR-9 能够通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路促进人牙龈成纤维细胞增殖、迁移，从而促进口腔软组织修复。程敏君[32]研究发现，海参酶解物能够通过激活 TGF-β/Smad 通路诱导前胶原合成，从而促进 SD 大鼠皮肤创面愈合。在抗炎机制上，Marcone 等[33]研究表明，由酪蛋白水解得到的生物活性肽能够通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 依赖性机制抑制 NF-κB 通路激活，从而发挥抗炎作用。Noh 等[34]发现，从柑橘中分离得到的新型环肽柑橘素Ⅺ能够抑制 NF-κB 通路的活化，从而抑制一氧化氮的产生并下调诱导型一氧化氮合酶和环氧化酶 2 等促炎基因的表达，具有良好的抗炎作用。有研究发现 *Phorphyra columbina* 的蛋白水解物能够抑制大鼠巨噬细胞和淋巴细胞促炎因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的表达，并且通过 T 淋巴细胞中的 JNK、p38 MAPK 和 NF-κB 依赖性途径诱导抗炎因子 IL-10 表达[35]。上述研究表明，生物活性肽可通过多种途径促进伤口愈合，其抗炎机制很可能与 NF-κB 通路有关，但 PHP 的确切作用机制仍需进一步探究。本研究仅在细胞模型上探究了 PHP 的功效，存在一定的局限性。未来可以进一步对 PHP 进行分离纯化和结构鉴定，在小鼠口腔溃疡模型上探究 PHP 的体内促伤口愈合及抗炎效果，并结合转录组学、蛋白质组学等方法探究其作用机制。

本研究证明了 PHP 能有效促进口腔细胞增殖、迁移，并且具有出色的抗炎作用，有望作为口腔溃疡治疗的候选药物，为天然生物活性肽应用于口腔溃疡治疗提供了新的依据，可能会为口腔黏膜健康的维护和治疗带来新突破。

[参 考 文 献]

[1] Kulkarni R, Alawi F, Sollecito T P, et al. Chronic symptomatic oral ulcers[J]. J Am Dent Assoc, 2021, 152(11): 948-953. DOI: 10.1016/j.adaj.2020.09.028.

[2] Schemel-Suárez M, López-López J, Chimenos-Küstner E. Oral ulcers: differential diagnosis and treatment[J]. Med Clin, 2015, 145(11): 499-503. DOI: 10.1016/j.medcli.2015.04.017.

[3] Kviatkovsky S A, Hickner R C, Ormsbee M J. Collagen peptide supplementation for pain and function: is it effective?[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2022, 25(6): 401-406. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000870.

[4] Mora L, Toldrá F. Special issue: food bioactive peptides[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 15985. DOI: 10.3390/ijms232415985.

[5] Yang Y, Tao G, Liu P, et al. Peptide with angiotensin Ⅰ-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(19): 7891-7895. DOI: 10.1021/jf0705670.

[6] Esfandi R, Willmore W G, Tsopmo A. Peptidomic analysis of hydrolyzed oat bran proteins, and their *in vitro* antioxidant and metal chelating properties[J]. Food Chem, 2019, 279: 49-57. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.110.

[7] Lee S Y, Hur S J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants[J]. Food Chem, 2017, 228: 506-517. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.039.

[8] Boer C, Meesters M I, Veerhoek D, et al. Anticoagulant and side-effects of protamine in cardiac surgery: a narrative review[J]. Br J Anaesth, 2018, 120(5): 914-927. DOI: 10.1016/j.bja.2018.01.023.

[9] Al-Mondhiry H, Pierce W S, Basarab R M. Protamine-induced thrombocytopenia and leukopenia[J]. Thromb Haemost, 1985, 53(1): 60-64. DOI: 10.1055/s-0038-1661237.

[10] Xie Z, Shi J, Zong M, et al. Isolation and culture of primary human gingival epithelial cells using Y-27632[J]. J Vis Exp, 2021(177). DOI: 10.3791/62978.

[11] Iglesias-Bartolome R, Uchiyama A, Molinolo A A, et al. Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(451): eaap8798. DOI: 10.1126/scitranslmed.aap8798.

[12] Groeger S, Jarzina F, Domann E, et al. Porphyromonas gingivalis activates NFκB and MAPK pathways in

human oral epithelial cells[J]. BMC Immunol, 2017, 18(1): 1. DOI: 10.1186/s12865-016-0185-5.

[13] Shi J, Han C, Chen D, et al. High glucose induces late differentiation and death of human oral keratinocytes[J]. Curr Issues Mol Biol, 2022, 44(9): 4015-4027. DOI: 10.3390/cimb44090275.

[14] Gröne A. Keratinocytes and cytokines[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2002, 88(1/2): 1-12. DOI: 10.1016/S0165-2427(02)00136-8.

[15] Uchi H, Terao H, Koga T, et al. Cytokines and chemokines in the epidermis[J]. J Dermatol Sci, 2000, 24(Suppl 1): S29-S38. DOI: 10.1016/s0923-1811(00)00138-9.

[16] Zhu Z, Yin H, An Y. Antioxidant activity of silk fibroin peptide hydrolyzed by pancreatin[J]. Adv Mater Res, 2014, 1081: 110-114. DOI: 10.4028/www.scientific.net/amr.1081.110.

[17] Bascones-Martínez A, Figuero-Ruiz E, Esparza-Gómez G C. Oral ulcers[J]. Med Clin, 2005, 125(15): 590-597. DOI: 10.1157/13080655.

[18] Kim I S, Yang W S, Kim C H. Beneficial effects of soybean-derived bioactive peptides[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8570. DOI: 10.3390/ijms22168570.

[19] Wen P, Zhang W, Wang P, et al. Osteogenic effects of the peptide fraction derived from pepsin-hydrolyzed bovine lactoferrin[J]. J Dairy Sci, 2021, 104(4): 3853-3862. DOI: 10.3168/jds.2020-19138.

[20] Chotphruethipong L, Binlateh T, Hutamekalin P, et al. Impact of hydrolyzed collagen from defatted sea bass skin on proliferation and differentiation of preosteoblast MC3T3-E1 cells[J]. Foods, 2021, 10(7): 1476. DOI: 10.3390/foods10071476.

[21] Brandao-Rangel M A R, Oliveira C R, da Silva Olímpio F R, et al. Hydrolyzed collagen induces an anti-inflammatory response that induces proliferation of skin fibroblast and keratinocytes[J]. Nutrients, 2022, 14(23): 4975. DOI: 10.3390/nu14234975.

[22] Groeger S E, Meyle J. Epithelial barrier and oral bacterial infection[J]. Periodontol 2000, 2015, 69(1): 46-67. DOI: 10.1111/prd.12094.

[23] Park N H, Min B M, Li S L, et al. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus[J]. Carcinogenesis, 1991, 12(9): 1627-1631. DOI: 10.1093/carcin/12.9.1627.

[24] Qi X, Lin W, Wu Y, et al. CBD promotes oral ulcer healing via inhibiting CMPK2-mediated inflammasome[J]. J Dent Res, 2022, 101(2): 206-215. DOI: 10.1177/00220345211024528.

[25] Yang W Y, Meng X, Wang Y R, et al. PRDX6 alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation and ferroptosis in periodontitis[J]. Acta Odontol Scand, 2022, 80(7): 535-546. DOI: 10.1080/00016357.2022.2047780.

[26] de Medeiros A F, de Queiroz J L C, Maciel B L L, et al. Hydrolyzed proteins and vegetable peptides: anti-inflammatory mechanisms in obesity and potential therapeutic targets[J]. Nutrients, 2022, 14(3): 690. DOI: 10.3390/nu14030690.

[27] Hu X, Zhong Y, Lambers T T, et al. Anti-inflammatory activity of extensively hydrolyzed casein is mediated by granzyme B[J]. Inflamm Res, 2019, 68(8): 715-722. DOI: 10.1007/s00011-019-01254-8.

[28] Kim D Y, Yoo J S, Cho Y A, et al. Calcium solubilization ability and anti-inflammatory effects of hydrolyzed casein[J]. Food Sci Anim Resour, 2021, 41(4): 687-700. DOI: 10.5851/kosfa.2021.e29.

[29] Xu Y, Feng Y, Yang Y, et al. Isolation, identification and molecular docking of anti-inflammatory peptides from walnut (*Juglans regia* L.) meal hydrolysates[J]. Food Funct, 2023, 14(13): 6093-6105. DOI: 10.1039/d3fo00768e.

[30] Li Y, Zhang H, Zhang S, et al. Egg White peptide KPHAEVVLR promotes skin fibroblasts migration and mice skin wound healing by stimulating cell membrane Hsp90α secretion[J]. Process Biochem, 2020, 92: 29-36. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.03.004.

[31] 张洪轶. 蛋清源多肽KPHAEVVLR促进口腔软组织修复及机制的研究[D]. 长春：吉林大学，2023.

[32] 程敏君. 海参酶解物促SD大鼠皮肤创面愈合的研究[D]. 无锡：江南大学，2021.

[33] Marcone S, Haughton K, Simpson P J, et al. Milk-derived bioactive peptides inhibit human endothelial-monocyte interactions via PPAR-γ dependent regulation of NF-κB[J]. J Inflamm (Lond), 2015, 12(1): 1. DOI: 10.1186/s12950-014-0044-1.

[34] Noh H J, Hwang D, Lee E S, et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin Ⅺ, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 163: 106-112. DOI: 10.1016/j.jep.2015.01.024.

[35] Cian R E, López-Posadas R, Drago S R, et al. A *Porphyra columbina* hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF-κB, and p38 and JNK dependent mechanism[J]. Food Chem, 2012, 134(4): 1982-1990. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.134.

［本文编辑］　尹　荼