

贝壳珍珠层蛋白的酸化-高压提取、 酶解产物制备及功效

罗 哲¹, 徐嘉欣¹, 梁兴唐², 苗建银^{1*}

(1. 华南农业大学 食品学院 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东 广州 510642; 2. 北部湾大学 石油与化工学院, 广西 钦州 535011)

摘要: 以马氏珠母贝贝壳珍珠层为原料, 采用酸化-高压联用技术提取珍珠层蛋白。以珍珠层蛋白提取率为指标, 通过单因素和响应面实验优化了贝壳珍珠层蛋白的提取工艺。经蛋白酶酶解制备了贝壳珍珠层蛋白酶解产物, 并对其氨基酸组成、抗炎活性和皮肤修复活性进行了评价。结果表明, 在盐酸浓度 0.18 mol/L、碱液料液比 (g : mL) 1 : 4.9、NaOH 溶液质量分数 1.00%、提取温度 65 °C、提取时间 3 h、酸沉 pH=3.5、静置时间 32 h 的最佳提取工艺条件下, 贝壳珍珠层蛋白提取率为 17.31%±0.84%。以菠萝蛋白酶酶解 3 h 制备的贝壳珍珠层蛋白酶解产物无细胞毒性且有利于巨噬细胞增殖, 质量浓度为 800 µg/mL 的贝壳珍珠层蛋白酶解产物对细胞 NO 释放量的抑制率可达 51.85%±1.39%, 能够抑制促炎因子 IL-6 和 TNF-α 释放水平, 同时上调抗炎因子 IL-10 的释放水平, 表现出良好的抗炎活性。贝壳珍珠层酶解产物中含有 17 种氨基酸, 其中 8 种人体必需氨基酸的总相对含量为 32.626%, 7 种疏水性氨基酸的总相对含量为 34.513%, 3 种带正电荷氨基酸的总相对含量为 16.173%。贝壳珍珠层酶解产物可显著提高成纤维细胞 L929 的细胞增殖和细胞迁移, 并且可以提高 H₂O₂ 诱导下的细胞活力, 抑制活性氧的产生, 表现出良好的皮肤修复活性。

关键词: 贝壳珍珠层; 蛋白提取; 工艺优化; 抗炎活性; 皮肤修复活性; 氨基酸分析; 中药现代化技术

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1003-5214 (2026) 05-1067-12

Acidification-high pressure extraction of shell nacre protein with preparation and efficacy evaluation of its enzymatic hydrolysis products

LUO Zhe¹, XU Jiabin¹, LIANG Xingtang², MIAO Jianyin^{1*}

(1. Guangdong Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China; 2. School of Petroleum and Chemical Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, Guangxi, China)

Abstract: The shell nacre protein was extracted from the nacre layer in the *Pinctada martensii* shell by a combined technology of acidification-high pressure, with the extraction process optimized through single-factor and response surface experiments using the protein extraction rate as index. The protease hydrolysis products of the shell nacre protein were then prepared, and evaluated for its amino acid composition, anti-inflammatory activity as well as skin repair activity. The results showed that under the optimal extraction conditions of hydrochloric acid concentration 0.18 mol/L, alkali material-liquid ratio (g : mL) 1 : 4.9, mass fraction of NaOH solution 1.00%, extraction temperature 65 °C, extraction time 3 h, acid precipitation pH 3.5 and resting time 32 h, the extraction rate of shell nacre protein was 17.31%±0.84%. The enzymatic hydrolysate of the shell nacre protein produced via bromelain hydrolysis for 3 h showed no cytotoxicity and was beneficial to the macrophage proliferation. The inhibitory rate of the hydrolysate with a concentration of 800 µg/mL on NO release reached up to 51.85%±1.39%. Meanwhile, the hydrolysate

收稿日期: 2025-04-17; 定用日期: 2025-06-20; DOI: 10.13550/j.jxhg.20250273

基金项目: 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21220065)

作者简介: 罗 哲 (2000—), 男, 硕士生, E-mail: zheluo0816@163.com。联系人: 苗建银 (1981—), 男, 副教授, E-mail: Miaojoy8181@scau.edu.cn。

exhibited activities of inhibition against the pro-inflammatory factors IL-6 and TNF- α , and up-regulation of the anti-inflammatory factor IL-10 release, thus demonstrating good anti-inflammatory performance. The enzymatic hydrolysate of the shell nacre contained 17 kinds of amino acids. Among them, the total relative content of 8 kinds of essential amino acids for the human body was 32.626%, the total relative content of 7 kinds of hydrophobic amino acids was 34.513%, while that of 3 kinds of positively charged amino acids was 16.173%. The shell nacre active peptides could significantly improve cell proliferation and cell migration of fibroblasts L929, and improve cell viability induced by H₂O₂, inhibit ROS production, and exhibit good skin repair activity.

Key words: shell nacre; protein extraction; process optimization; anti-inflammatory activity; skin repair activity; amino acid analysis; modernization technology of traditional Chinese medicine

马氏珠母贝又称珍珠母,在中国沿海地带分布丰富,也是中国著名珍珠品种南珠的育珠贝^[1]。马氏珠母贝贝壳的结构从外到内一般分为 3 层:角质层、棱柱层和珍珠层^[2]。珍珠层不仅与珍珠同质同源且富含多种功能活性物质,具有安神、美白、消炎等功效,在传统医学领域也被作为外用内服的中医药材应用于医药研究^[3-5]。此外,《本草纲目》里称南珠贝壳珍珠层为真珠,其气味甘,无毒,涂面令人润泽好颜色,除面痘,解痘疗毒,可见珍珠层研究价值极高。然而,目前珍珠层尚未得到有效利用,附加值较低,造成资源严重浪费^[6]。

目前,从贝壳珍珠层提取蛋白的方法主要有酸提法^[7]、水提法^[8]等。其中,酸提法操作简便,但浸提时间较长且过酸的环境易使蛋白质过度水解,造成珍珠层中活性成分流失;水提法虽然安全系数较高,提取易控制,但由于珍珠层所含蛋白为壳角蛋白,其结构稳定,水溶液难以破坏。总体来说,现有提取珍珠层蛋白的工艺方法较为单一,亟需开发一种在保留珍珠层蛋白功能活性的前提下增高其得率的提取方法。

近年来,随着人们对传统药物局限性的深入认识和自身健康意识的提高,安全无毒且易被人体吸收的生物酶解产物受到广泛关注^[9-11]。这些生物酶解产物大都从天然蛋白中水解获得,低浓度下就能发挥活性,如免疫调节肽^[12]、降血压肽^[13]、抗氧化肽^[14]等已被证实具有良好的功能活性效果。

本文拟以马氏珠母贝贝壳珍珠层为原料,采用酸化-高压联用技术提取珍珠层蛋白,通过单因素和响应面法优化提取工艺,然后利用蛋白酶水解珍珠层蛋白制备贝壳珍珠层酶解产物,最后对酶解产物进行抗炎活性和皮肤修复活性评价,以期马氏珠母贝贝壳珍珠层活性成分研究提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

马氏珠母贝贝壳珍珠层,北海黑珍珠海洋生物

科技有限公司;木瓜蛋白酶(8×10^5 U/g)、胰蛋白酶(4000 U/g)、胃蛋白酶(3000 U/g)、菠萝蛋白酶(6×10^5 U/g)、中性蛋白酶(2×10^5 U/g)、碱性蛋白酶(2×10^5 U/g),南宁庞博生物工程有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;小鼠巨噬细胞(RAW264.7)、小鼠成纤维细胞(L929),中科院上海细胞所。

噻唑蓝(MTT),上海麦克林生化科技股份有限公司;2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA),上海碧云天生物技术股份有限公司;脂多糖(LPS)、二甲基亚砜(DMSO),美国 Sigma 公司;氢氧化钠、盐酸(浓度 1 mol/L),天津市大茂化学试剂厂。所用化学品和试剂均为分析纯。

L530 型台式低速自动平衡离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;S-433D 型全自动氨基酸分析仪,赛卡姆(北京)科学仪器有限公司;2300 型多功能酶标仪,美国 Perkin Elmer 公司;EVO-MA-15 型扫描电子显微镜(SEM),德国 Carl Zeiss 公司。

1.2 方法

1.2.1 珍珠层蛋白提取

首先,将马氏珠母贝贝壳珍珠层粉碎后过 200 目筛,得到珍珠层粉;然后,将珍珠层粉按固液比(g:mL,下同)1:3 加入浓度为 0.3 mol/L 的盐酸进行酸化处理,静置 12 h 后,经高压(110 kPa)处理(121 °C, 20 min),随后于 4000 r/min 离心 10 min,弃上清液,收集的沉淀物按料液比 1:5 加入质量分数 1.00% 的氢氧化钠溶液在 65 °C 下提取 3 h,抽滤,得到滤液,用浓度为 1 mol/L 的盐酸将滤液 pH 调至 3.7,放置在 4 °C 下静置 24 h,得到珍珠层蛋白提取液。最后,将珍珠层蛋白提取液于 4000 r/min 离心 10 min,得到的沉淀即珍珠层蛋白粗提物,记为 A&P-PPCE。

首先,将马氏珠母贝贝壳珍珠层粉按料液比 1:5 加入质量分数 1.00% 的氢氧化钠溶液处理 3 h,抽滤,得到滤液。然后,用浓度为 1 mol/L 的盐酸将滤液

的 pH 调至 3.7, 放置在 4 °C 下静置 24 h, 得到珍珠层蛋白提取液。最后, 将珍珠层蛋白提取液于 4000 r/min 离心 10 min, 得到的沉淀即非酸化-高压珍珠层蛋白粗提物, 记为 PPCE。

根据式 (1) 计算珍珠层蛋白提取率 (%)。

$$\text{蛋白提取率}/\% = m_{\text{粗}}/m_{\text{总}} \times 100 \quad (1)$$

式中: $m_{\text{粗}}$ 为 A&P-PPCE 或 PPCE 干燥后质量, g; $m_{\text{总}}$ 为采用凯氏定氮法测定的珍珠层中总蛋白质的质量, g。

1.2.2 蛋白酶解产物制备

称取 5 mg 珍珠层蛋白粗提物, 加入 5 mL 去离子水后, 用浓度为 0.1 mol/L 的盐酸调至一定 pH, 按酶底百分比 (蛋白酶质量占珍珠层蛋白粗提物质量的百分数, 下同) 0.3% 加入蛋白酶, 水浴加热酶解 3 h, 期间每 15 min 搅拌 1 次。酶解完成后, 于 95 °C 水浴灭酶 10 min, 冷却至室温, 于 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 -20 °C 冷冻干燥 12 h 后, 得到贝壳珍珠层蛋白酶解产物冻干粉, 置于 -20 °C 保存备用。

1.3 结构表征与性能测试

SEM 测试: 取经酸化-高压处理前后的贝壳珍珠层粉, 将其均匀地涂抹在连接至装载平台的双面导电胶带的标本架上, 在真空环境下喷金镀膜 5 min, 采用低位二次电子 (LEI) 模式, 工作电流 20 μ A, 电子加速电压 5.0 kV。

采用 GB 5009.124—2016 测定贝壳珍珠层酶解产物中各种氨基酸的组成及含量。

1.4 因素影响实验

1.4.1 贝壳珍珠层蛋白提取单因素实验

按照 1.2.1 节中, A&P-PPCE 的制备方法和步骤, 考察盐酸浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L)、碱液料液比 (1:3、1:4、1:5、1:6、1:7)、氢氧化钠溶液质量分数 (0.25%、0.50%、1.00%、2.00%、4.00%)、提取温度 (45、50、55、60、65、70、75 °C)、提取时间 (1、2、3、4、5 h)、酸沉 pH (3.3、3.5、3.7、3.9、4.1) 和静置时间 (8、16、24、32、48 h) 对珍珠层蛋白提取率的影响。单因素实验考察时, 非考察因素以盐酸浓度 0.3 mol/L、碱液料液比 1:5、氢氧化钠溶液质量分数 1.00%、提取温度 55 °C、提取时间 3 h、酸沉 pH=3.7 静置时间 24 h 为准。

1.4.2 贝壳珍珠层蛋白提取响应面实验

为确定贝壳珍珠层蛋白最佳提取工艺, 在单因素实验基础上, 应用 Design expert V8.0.6 软件设计三因素三水平的实验方案, 选取盐酸浓度、碱液料液比、酸沉 pH 为自变量, 珍珠层蛋白提取率为响应值, 其他条件为: 氢氧化钠溶液质量分数 1.00%、

提取温度 65 °C、提取时间 3 h、静置时间 32 h。响应面因素和水平设计见表 1。

表 1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平	因素		
	A 盐酸浓度/(mol/L)	B 碱液料液比/(g:mL)	C 酸沉 pH
-1	0.1	1:4	3.3
0	0.2	1:5	3.5
1	0.3	1:6	3.7

1.4.3 酶解工艺因素实验

按照 1.2.2 节方法和步骤, 以 NO 抑制率为评价指标, 在不同蛋白酶的最适条件 (表 2) 下进行酶解制备酶解产物, 考察不同蛋白酶对酶解产物 NO 抑制率的影响。

表 2 不同蛋白酶的最适反应条件

Table 2 Optimal reaction conditions for different proteases

蛋白酶	最适酶解温度/°C	最适酶解 pH
菠萝蛋白酶	55	7.0
木瓜蛋白酶	55	6.5
胃蛋白酶	37	2.0
中性蛋白酶	45	7.0
碱性蛋白酶	50	9.0
胰蛋白酶	40	8.0

按照 1.2.2 节方法和步骤, 以 NO 抑制率为评价指标, 选取已确定的最佳蛋白酶, 探究不同酶解时间 (1、2、3、4、5 h) 对贝壳珍珠层蛋白酶解产物 NO 抑制率的影响。

1.5 抗炎活性评价实验

1.5.1 细胞培养

将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 接种于 7 mL 含质量分数 10% FBS 的 DMEM 培养基 (简称完全培养基) 中, 置于 CO₂ 体积分数 5%、37 °C 细胞培养箱中培养 (后文同此孵育条件), 待细胞生长至对数生长期进行传代。

1.5.2 RAW264.7 细胞增殖率测定

参考文献[15]并略作改动, 采用 MTT 法测定细胞存活率, 每组设置 3 个平行复孔。首先, 取对数生长期小鼠巨噬细胞 RAW264.7 接种在 96 孔板中生长, 孵育 12 h, 弃掉原液。然后, 实验组加入 100 μ L 不同质量浓度的贝壳珍珠层蛋白酶解产物 (用完全培养基配制, 质量浓度为 100、200、400、800 μ g/mL), 空白对照组以 100 μ L 完全培养基孵育 24 h, 每孔加入 100 μ L MTT (质量浓度为 0.5 g/L), 避光孵育 4 h 后, 弃 MTT 溶液。随后, 每孔加入 150 μ L 的 DMSO 溶解甲醛晶体, 振荡 10 min, 用酶标仪测定每孔溶液在 490 nm 处的吸光度。根据式 (2) 计算细胞增

殖率 (%)

$$\text{细胞增殖率}/\% = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 为实验组吸光度; A_0 为空白对照组吸光度。

1.5.3 NO 释放量测定

参考文献[16]方法并略作改动, 每组设置 3 个平行复孔。首先, 取对数生长期小鼠巨噬细胞 RAW264.7 接种在 48 孔板中生长, 孵育 12 h。然后, 空白对照组和模型组继续以 200 μL 完全培养基孵育, 实验组加入 200 μL 贝壳珍珠层蛋白酶解产物(质量浓度为 100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)孵育 12 h 后, 吸掉原培养基, 空白对照组加入完全培养基, 模型组和实验组加入 200 μL 质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液, 孵育 24 h。随后, 收集上清液, 以每孔 50 μL 加入 96 孔板上。接着, 每孔依次加入 50 μL Griess Reagent I 试剂和 50 μL Griess Reagent II 试剂, 振荡混合均匀后, 用酶标仪测定每孔溶液在 540 nm 处的吸光度。最后, 采用 NO 试剂盒检测细胞培养基上清液中的 NO 释放量。根据式 (3) 计算 NO 抑制率 (%)。

$$\text{NO 抑制率}/\% = \frac{A_2 - A_1}{A_2 - A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_2 为模型组吸光度; A_1 为实验组吸光度; A_0 为空白对照组吸光度。

1.5.4 炎症因子水平测定

参考文献[17]方法并稍作修改, 每组设置 3 个平行复孔。首先, 取对数生长期巨噬细胞 RAW264.7 接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后, 弃掉原液。然后, 实验组加入 500 μL 含不同质量浓度贝壳珍珠层蛋白酶解产物的完全培养基, 空白对照组和模型组加入 500 μL 完全培养基, 阳性对照组为地塞米松, 继续培养 24 h 后, 弃掉原液。随后, 空白组加入 500 μL 全培养基, 其余组加入 LPS (质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液, 继续培养 24 h。最后, 取上清液, 采用 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中 IL-10、IL-6 和 TNF- α 的水平。

1.6 皮肤修复活性评价实验

1.6.1 L929 细胞存活率测定

取对数生长期小鼠成纤维细胞 L929 接种在 96 孔板中生长, 其余操作步骤同 1.5.2 节。根据式 (4) 计算细胞存活率 (%)。

$$\text{细胞存活率}/\% = (A_1' - A_0' / A_0') \times 100 \quad (4)$$

式中: A_1' 为实验组吸光度; A_0' 为空白组吸光度。

1.6.2 细胞划痕实验

参考文献[18]方法并略作改动, 取对数生长期小鼠成纤维细胞 L929 接种至 6 孔板, 置于 CO_2 体积分数 5%、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育过夜。在 6 孔板底部划一条中线, 在三等分点处用 200 μL 枪头于单层

融合细胞上划出两条垂直于中线的划痕, 用 DMEM 培养基冲洗每个孔以去除细胞碎片。去除后, 实验组加入 1 mL 不同质量浓度的贝壳珍珠层蛋白酶解产物孵育 24 h, 空白对照组加入含质量分数 2% FBS 的完全培养基继续孵育 24 h。孵育结束后, 用显微镜观察细胞状况并拍照记录以及对比分析酶解产物对细胞迁移能力的作用效果。

1.6.3 H_2O_2 对 L929 细胞存活率的影响

参考文献[19]方法并略作改动。首先, 取对数生长期小鼠成纤维细胞 L929 接种至 96 孔板, 孵育 12 h。然后, 加入 100 μL 贝壳珍珠层蛋白酶解产物处理 24 h, 弃掉原液, 每孔加入 100 μL 的 H_2O_2 (浓度 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 避光孵育 24 h。随后, 每孔加入 100 μL 的 MTT (质量浓度 0.5 g/L), 避光孵育 4 h, 弃掉 MTT 溶液。再在每孔加入 150 μL 的 DMSO 溶解甲醛晶体, 振荡 10 min。最后, 用酶标仪测定每孔溶液在 490 nm 下的吸光度。

1.6.4 活性氧 (ROS) 释放量测定

参考文献[20]方法并稍作修改。首先, 取对数生长期成纤维细胞 L929 接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后, 弃掉原液。然后, 样品组加入 500 μL 含不同质量浓度贝壳珍珠层蛋白酶解产物的完全培养基, 空白对照组和模型组加入 500 μL 完全培养基, 继续培养 24 h, 弃掉原液。随后, 空白组加入 500 μL 完全培养基, 其余组加入 H_2O_2 (浓度 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 溶液, 继续培养 24 h。再用完全培养基将 DCFH-DA 稀释 1000 倍后, 弃掉原液。最后, 按每孔加入 500 μL DCFH-DA 溶液, 避光孵育 30 min 后, 在荧光倒置显微镜下进行拍摄。

1.7 数据处理

所有实验数据以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示。统计图在 Origin 2019 软件下完成, 响应面实验设计和结果分析在 Design expert V8.0.6 下进行, 实验结果用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 珍珠层蛋白提取工艺考察

2.1.1 提取工艺条件的影响

按 1.2.1 节进行提取, 图 1A 为 A&P-PPCE 和 PPCE 的提取率。

从图 1A 可以看出, 经过酸化-高压联用技术处理后, 贝壳珍珠层蛋白提取率有明显提高。未经酸化高压处理, 直接使用碱提酸沉法蛋白提取率为 9.91% $\pm$ 0.44%, 而经酸化-高压处理后, 再使用碱提酸沉法蛋白提取率显著提高到 13.72% $\pm$ 0.64%。这可能是因为, 经过酸化-高压处理后, 贝壳珍珠层钙质与

蛋白的紧密连接结构和分子间化学作用力被一定程度破坏,从而使蛋白质更容易析出,进而提高提取率。

图 1B 和 C 分别为酸化-高压处理前后贝壳珍珠层粉的 SEM 图。

从图 1B 和 C 可以看出,经酸化-高压处理过的珍珠层粉的结构发生了明显改变,变得更为疏松多孔,这会增大后续与提取液的接触面积,使提取反应更加充分。与文献[21]报道的提取出的珍珠层蛋白质量占珍珠层总质量的 0.021%相比,本文提取出的珍珠层蛋白质量可占到珍珠层粉总质量的 0.171%。因此,后续选择通过酸化-高压处理技术开展贝壳珍珠层蛋白的提取工艺优化。

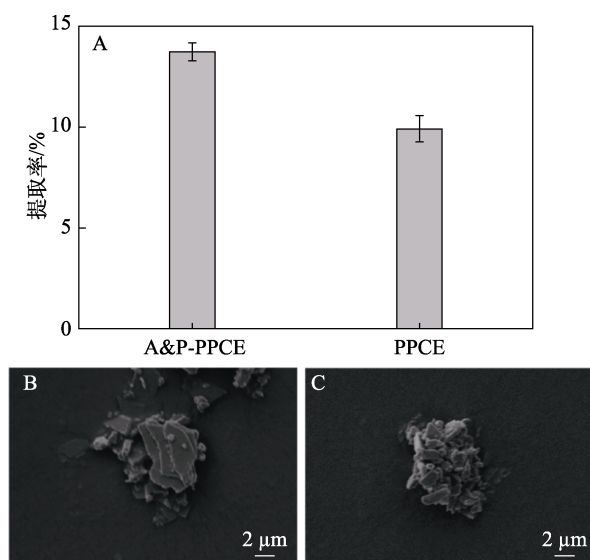


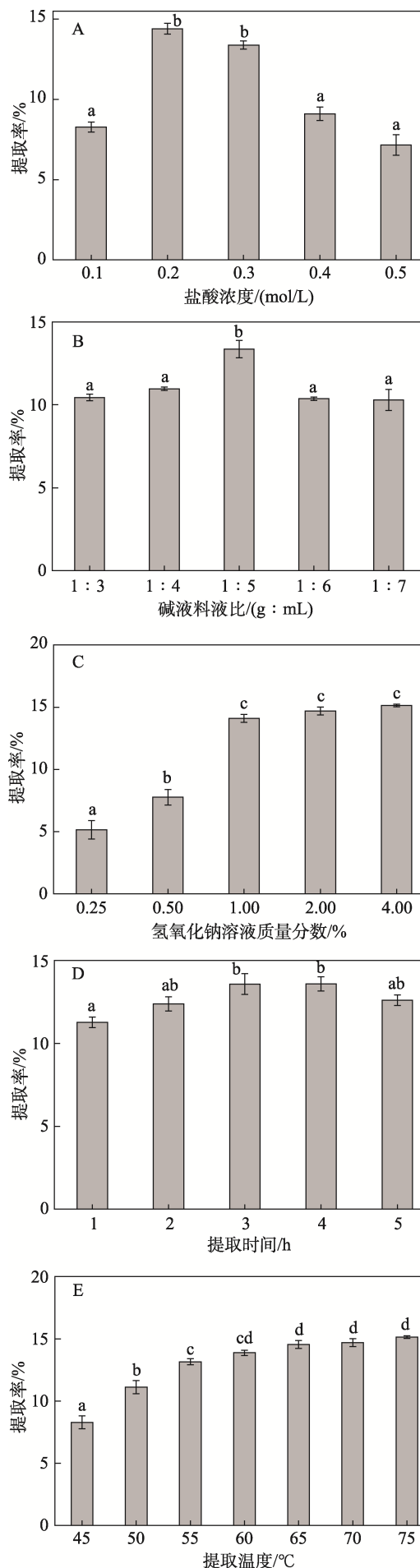
图 1 不同提取工艺条件对贝壳珍珠层蛋白提取率的影响 (A); 酸化-高压处理前 (B) 后 (C) 贝壳珍珠层粉的 SEM 图

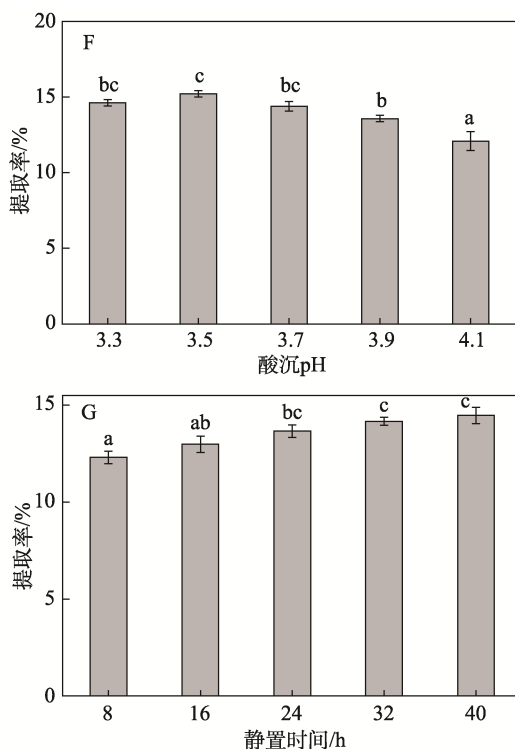
Fig. 1 Effect of different extraction process conditions on extraction rate of shell nacre protein (A); SEM images of shell nacre protein powder before (B) and after (C) acidified high-pressure treatment

2.1.2 单因素实验结果与分析

图 2 为贝壳珍珠层蛋白提取单因素考察结果。

从图 2A 可以看出,当盐酸浓度为 0.2 mol/L 时,珍珠层蛋白提取率达到最高值,之后随着盐酸浓度的增加珍珠层蛋白提取率下降,当盐酸浓度为 0.5 mol/L 时,珍珠层蛋白提取率达到最低值,这可能是因为,加入盐酸后,样品溶胀增强,结构蓬松程度增加,有利于钙离子的溶出,进而促进珍珠层蛋白质的提取^[22],随着盐酸浓度的增大,碳酸钙与盐酸反应会逐渐趋于完全,再增加盐酸浓度,也不能溶出更多的钙,反而会降低蛋白质的提取。同时,高浓度盐酸也会破坏蛋白结构。综合考虑,选取盐酸浓度为 0.2 mol/L。





柱状图上不同小写字母表示数据间差异显著 ($P < 0.05$), 下同
A—盐酸浓度; B—碱液料液比; C—氢氧化钠溶液质量分数; D—
提取时间; E—提取温度; F—酸沉 pH; G—静置时间

图 2 不同因素对贝壳珍珠层蛋白提取率的影响

Fig. 2 Influence of different factors on extraction rate of shell nacre protein

从图 2B 可以看出, 随着碱液料液比的减小, 珍珠层蛋白质提取率先增加后下降, 这可能是因为, 随着碱液料液比的减小, 液体占比增大, 接触面积增加, 蛋白质分散效率提高, 所以蛋白提取率增加。但碱液料液比继续减小, 会对溶出的珍珠层蛋白具有稀释作用, 导致蛋白质浓度降低, 进而影响提取率^[23]。同时将增加废水处理的成本。综合考虑, 选取碱液料液比为 1 : 5。

从图 2C 可以看出, 随着氢氧化钠溶液质量分数的不断增大, 珍珠层蛋白提取率升高。这是因为, 在碱性环境中, 蛋白质分子间具有相互排斥作用, 溶液的分散性、溶解性会更好; 此外, 碱液会对蛋白质分子的次级键起到破坏作用。但当氢氧化钠溶液质量分数 > 1.00% 后, 贝壳珍珠层蛋白的提取率上升趋于平缓。综合考虑, 氢氧化钠溶液质量分数为 1.00%。

从图 2D 可以看出, 随着提取时间的增加, 珍珠层蛋白提取率先增加后下降。当提取时间 > 4 h 后, 珍珠层蛋白提取率略有下降, 这可能是因为, 蛋白质长时间处于碱性条件可能会导致蛋白质的过度水解和变性^[24]。因此, 提取时间以 3 h 为宜。

从图 2E 可以看出, 随着提取温度的升高, 珍珠层蛋白提取率呈上升趋势, 当温度 ≥ 65 °C 后, 珍珠

层蛋白提取率上升趋于平缓, 这可能是因为, 随着提取温度逐渐升高, 蛋白质分子的空间结构伸展, 进而促使蛋白质分子的溶解^[25], 但提取温度继续升高, 会导致蛋白质发生热变性或者部分水解, 影响蛋白质的提取。综合考虑, 提取温度选择 65 °C。

从图 2F 可以看出, 随着 pH 的增加, 珍珠层蛋白提取率呈现先升高后降低的趋势, 当 pH=3.5 时, 蛋白提取率最大。这是因为, 在等电点 (pH=3.5) 时, 蛋白质分子颗粒在溶液中同电荷的相互排斥作用大大减弱, 其颗粒极易相互碰撞凝聚, 从而沉淀析出^[26], 此时, 溶液中蛋白质的溶解度最小。因此, 选取最佳酸沉 pH 为 3.5。

从图 2G 可以看出, 随着静置沉淀时间的增长, 珍珠层蛋白提取率逐渐上升, 但升幅较平缓, 根据显著性分析来看, 静置时间为 32 h, 提取率已没有显著性差异, 综合考虑, 选取静置时间为 32 h。

2.1.3 响应面实验结果与分析

采用 Design expert V8.06 软件对表 3 中的数据 进行二项式拟合, 并对模型进行方差分析 (表 4), 得到二项式拟合方程为:

$$Y = 16.23 - 1.15A - 0.13B + 0.30C - 0.11AB + 0.073AC - 0.89BC - 3.32A^2 - 1.09B^2 - 1.65C^2$$

($P < 0.001$, $R^2 = 0.9641$)

表 3 响应面实验设计与结果

Table 3 Design and results of response surface experiment

序号	编码值			实际值			提取率(Y)/%
	A	B	C	盐酸浓度/(mol/L)	碱液料液比/(g : mL)	酸沉 pH	
1	0	1	1	0.2	1 : 6	3.7	12.83
2	0	0	0	0.2	1 : 5	3.5	15.52
3	0	0	0	0.2	1 : 5	3.5	15.82
4	-1	1	0	0.1	1 : 6	3.5	12.98
5	0	1	-1	0.2	1 : 6	3.3	14.62
6	0	-1	1	0.2	1 : 4	3.7	14.17
7	0	0	0	0.2	1 : 5	3.5	16.56
8	1	-1	0	0.3	1 : 4	3.5	10.89
9	0	0	0	0.2	1 : 5	3.5	17.16
10	-1	-1	0	0.1	1 : 4	3.5	13.73
11	0	-1	-1	0.2	1 : 4	3.3	12.38
12	-1	0	-1	0.1	1 : 5	3.3	12.23
13	1	0	1	0.3	1 : 5	3.7	10.44
14	1	0	-1	0.3	1 : 5	3.3	9.10
15	1	1	0	0.3	1 : 6	3.5	9.70
16	-1	0	1	0.1	1 : 5	3.7	13.28
17	0	0	0	0.2	1 : 5	3.5	16.11

从表 4 可以看出, 模型 P 值为 0.0003, 差异极显著; 失拟项 P 值为 0.3687 > 0.05, 差异不显著; 变异系数 (CV) 为 5.2% < 10%, 表明该模型的实验值

与预测值线性相关,具有较高的可靠性。通过对回归方程的显著性分析可以看出,盐酸浓度对珍珠层蛋白提取的影响最为明显,通过 F 值大小可以得出,影响珍珠层蛋白提取结果的主次顺序为:盐酸浓度>酸沉 pH>碱液料液比。因此,该模型可以用于对珍珠层蛋白提取工艺的结果进行分析和预测。

表 4 方差分析结果
Table 4 Analysis results of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	90.79	9	10.09	20.86	0.0003	***
A	18.27	1	18.27	37.76	0.0005	***
B	0.14	1	0.14	0.28	0.6133	○
C	0.71	1	0.71	1.48	0.2637	○
AB	0.048	1	0.048	0.10	0.7610	○
AC	0.021	1	0.021	0.043	0.8408	○
BC	3.20	1	3.20	6.63	0.0368	*
A^2	46.50	1	46.50	96.15	<0.0001	***
B^2	4.96	1	4.96	10.26	0.0150	*
C^2	11.44	1	11.44	23.65	0.0018	**
残差	3.39	7	0.48	—	—	—
失拟项	1.73	3	0.58	1.39	0.3687	○
纯误差	1.66	4	0.42	—	—	—
总和	94.17	16	—	—	—	—

注:“***”表示差异极显著 ($P<0.001$);“**”表示差异高度显著 ($P<0.01$);“*”表示差异显著 ($P<0.05$);“○”表示差异不显著 ($P>0.05$);“—”代表无相关数据。

采用 Design expert V8.06 软件绘制蛋白提取率、盐酸浓度、酸沉 pH、碱液料液比的三维曲面图,结果如图 3 所示。

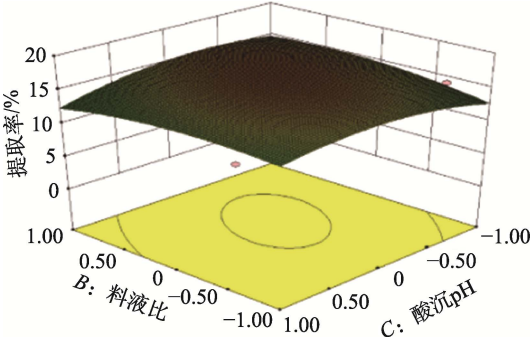
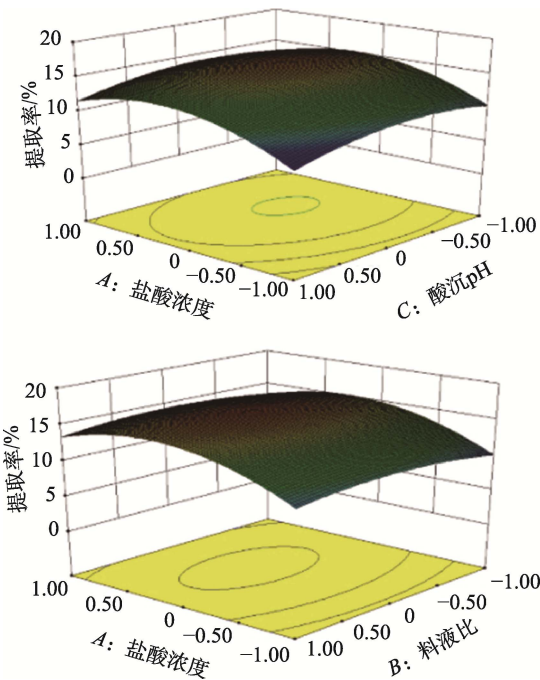


图 3 盐酸浓度、酸沉 pH、碱液料液比相互作用对蛋白提取率影响的三维曲面图
Fig. 3 Three-dimensional surface diagrams of effect of the interaction among hydrochloric acid concentration, acid precipitation pH and alkali material-liquid ratio on protein extraction rate

响应面可以直观地体现各参数之间的相互作用。3D 曲面图表面越陡峭,表明交互作用越显著;曲面图越平缓,表明交互作用越弱。从图 3 可以看出,盐酸浓度对蛋白提取率的影响较大,表现为曲线较陡;酸沉 pH、碱液料液比对蛋白提取率的影响较小,表现为曲线相对平滑。经 Design expert V8.0.6 软件分析得到的最佳提取条件为:盐酸浓度 0.178 mol/L、碱液料液比 1 : 4.9、酸沉 pH=3.52。在此条件下,珍珠层蛋白提取率理论值为 16.42%。

考虑到实际操作,将模型优化的提取条件修正为:盐酸浓度 0.18 mol/L、碱液料液比 1 : 4.9、氢氧化钠溶液质量分数 1.00%、提取温度 65 ℃、提取时间 3 h、酸沉 pH=3.5、静置时间 32 h,在该条件下进行 3 次重复验证实验,蛋白质提取率为 17.31%±0.84%,与模型预测值(16.42%)接近。证实该回归模型可靠性高,具有较高的重现性。经优化后提取出的蛋白质量占贝壳珍珠层粉总质量的 0.216%,高于报道的水提取法提取的珍珠层蛋白所占比例(0.2%)^[8]。

2.2 贝壳珍珠层酶解产物制备条件考察

2.2.1 蛋白酶筛选

图 4 为不同蛋白酶酶解处理制备的贝壳珍珠层酶解产物的质量浓度对 RAW264.7 细胞增殖率的影响。

从图 4 可以看出,各样品组在质量浓度 100~800 μg/mL 范围内对 RAW264.7 巨噬细胞没有明显影响,表明酶解产物对巨噬细胞不存在细胞毒性,且与空白对照组相比,贝壳珍珠层酶解产物能够显著促进巨噬细胞的生长。因此,后续 NO 释放量活性评价实验在此质量浓度范围内开展。

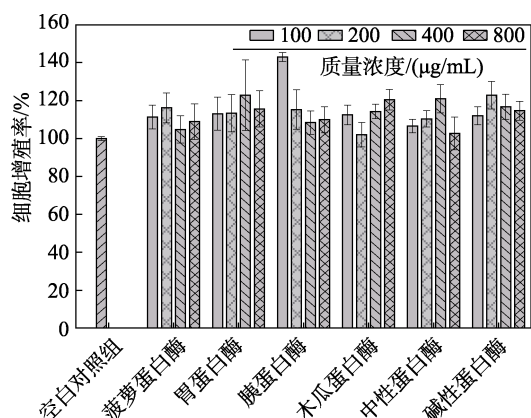
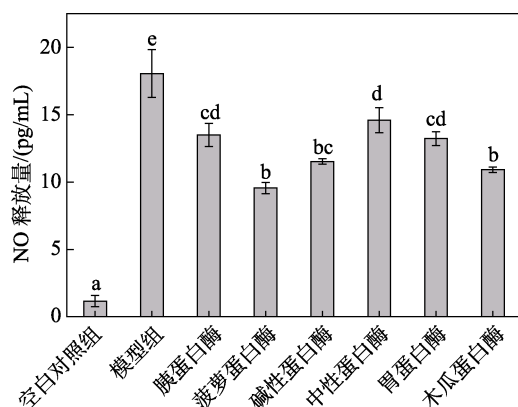


图 4 不同蛋白酶酶解处理制备的贝壳珍珠层酶解产物的质量浓度对 RAW264.7 细胞增殖率的影响

Fig. 4 Effect of shell nacre hydrolysis products on proliferation rate of RAW264.7 cells under different protease enzymatic treatments

图 5 为不同蛋白酶酶解处理制备的贝壳珍珠层酶解产物对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响。



柱状图上不同小写字母表示数据间差异显著 ($P < 0.05$), 下同
图 5 不同蛋白酶酶解处理制备的贝壳珍珠层酶解产物对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig. 5 Effect of shell nacre hydrolysis products on NO release from RAW264.7 cells under different proteolytic enzymatic treatments

NO 具有多种生理和病理功能, 既有广泛的合成分布, 又有多种作用机制, 在炎症和免疫中发挥着重要作用, 成为抗炎活性评价和免疫调节活性评价中重要的观察指标^[27]。从图 5 可以看出, 不同蛋白酶水解制备的珍珠层蛋白酶解产物对 NO 释放量的影响有所差异。由于酶具有专一性, 且不同酶的酶切位点不一样^[28], 导致 NO 释放量也不同。与空白对照组相比, 模型组巨噬细胞在 LPS 诱导下 NO 分泌量显著升高, 表明细胞炎症模型成功建立。经质量浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ 的珍珠层酶解产物孵育后, NO 释放量明显降低。其中, 木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶处理组细胞 NO 抑制率分别为 $43.20\% \pm 0.69\%$ 和 $51.85\% \pm 1.39\%$ 。因此, 选取菠萝蛋白酶为最适蛋白

酶。相比同质量浓度下鲟鱼酶解产物对巨噬细胞 NO 释放量的抑制率 ($< 15\%$)^[29], 珍珠层酶解产物具有良好的抗炎活性。

2.2.2 酶解时间的影响

图 6 为菠萝蛋白酶酶解处理不同时间制备的贝壳珍珠层酶解产物对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响。

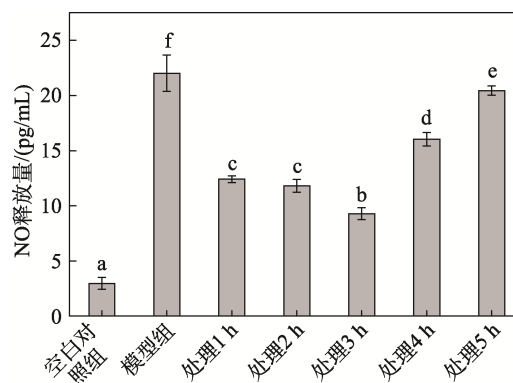


图 6 菠萝蛋白酶酶解处理不同时间制备的贝壳珍珠层酶解产物对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig. 6 Effect of shell nacre hydrolysis products on NO release from RAW264.7 cells at different enzymatic times

从图 6 可以看出, 当酶解时间为 1~3 h 时, NO 释放量随着酶解时间的增加而不断减小, 在酶解 3 h 时 NO 释放量达到最低; 随着酶解时间增加至 5 h, NO 释放量又明显升高。这可能是因为, 酶解前期酶解反应尚未完全, 随着酶解时间的增加, 酶与底物接触充分, 水解出更多具有抗炎活性的肽段, 但酶解时间过长造成过度水解, 导致酶解催化位点及底物含量逐渐减少, 从而影响抗炎活性^[30]。综合考虑, 选择酶解时间为 3 h。

2.3 珍珠层酶解产物氨基酸组成分析

表 5 为贝壳珍珠层酶解产物中氨基酸相对含量的测试结果。

从表 5 可以看出, 珍珠层酶解产物含有 17 种氨基酸, 含有人体必需氨基酸 (组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸) 除色氨酸外的 8 种, 总相对含量为 32.626%。酶解产物中疏水性氨基酸的存在与炎症调节有着密切联系, 特别是在 N 端或者 C 端, 疏水氨基酸的存在可能改善多肽与细胞膜之间的相互作用, 促进其抗炎作用^[31]。珍珠层酶解产物含有 7 种疏水氨基酸 (甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸) 总相对含量为 34.513%。带正电荷氨基酸 (精氨酸、赖氨酸、组氨酸) 3 种总相对含量为 16.173%, 特别是含有精氨酸和赖氨酸的酶解产物对其抗炎活性也有一定作用。多肽可以通过与各自的趋化因子受体结合来调节免

疫抗炎反应^[32]。已有研究表明,精氨酸和脯氨酸的存在具有促进伤口愈合的作用^[33]。综上所述,珍珠层酶解产物有良好的抗炎活性潜力。

表 5 贝壳珍珠层酶解产物的氨基酸组成及相对含量
Table 5 Amino acid composition of shell nacre hydrolysis products

氨基酸类型	氨基酸种类	相对含量/%
人体必需氨基酸	苏氨酸 (Thr)	0.750
	缬氨酸 (Val)	3.327
	蛋氨酸 (Met)	1.277
	异亮氨酸 (Ile)	2.718
	亮氨酸 (Leu)	6.852
	苯丙氨酸 (Phe)	7.094
	组氨酸 (His)	8.192
	赖氨酸 (Lys)	2.416
疏水氨基酸	缬氨酸 (Val)	3.327
	甘氨酸 (Gly)	6.104
	丙氨酸 (Ala)	4.713
	亮氨酸 (Leu)	6.852
	异亮氨酸 (Ile)	2.718
	苯丙氨酸 (Phe)	7.094
	脯氨酸 (Pro)	3.705
	精氨酸 (Arg)	5.565
带正电荷氨基酸	赖氨酸 (Lys)	2.416
	组氨酸 (His)	8.192
	天冬氨酸 (Asp)	17.689
其他	丝氨酸 (Ser)	1.341
	谷氨酸 (Glu)	9.978
	半胱氨酸 (Cys)	3.222
	酪氨酸 (Tyr)	14.241

2.4 贝壳珍珠层酶解产物对炎症因子释放的影响

图 7 为菠萝蛋白酶酶解处理 3 h 制备的不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对炎症因子 IL-10、IL-6 和 TNF-α 的水平影响。

巨噬细胞在受到 LPS 刺激后会活化进而分泌大量的炎症因子。体内长期持续高水平的炎症因子存在会诱导多种慢性炎症性疾病,因此,通过抑制炎症因子的分泌来缓解炎症反应成为公认的策略^[34]。IL-6 和 TNF-α 作为代表性的促炎细胞因子,一直以来都被作为抗炎活性评价中重要的观察对象^[35]。

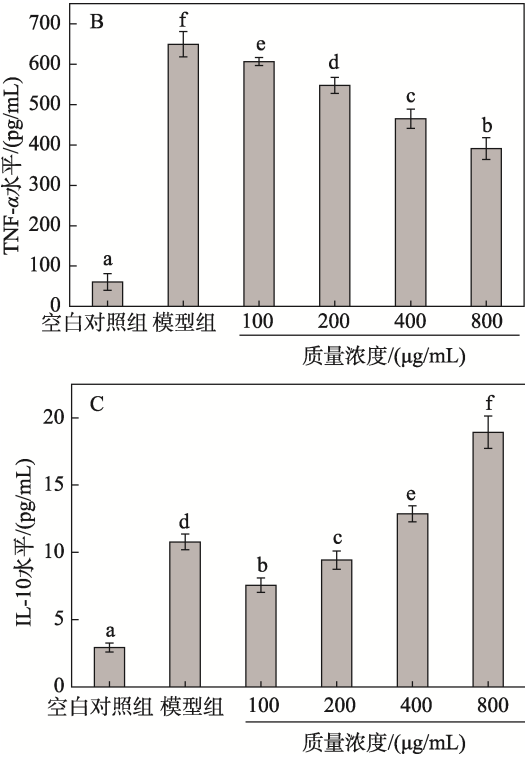
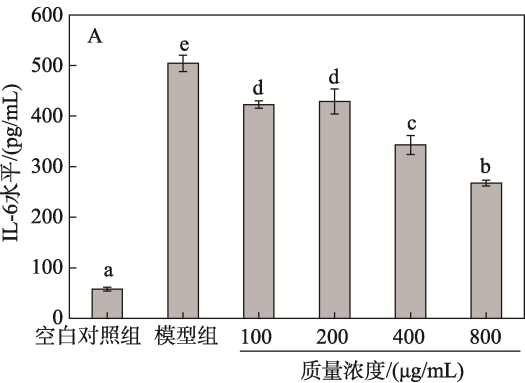


图 7 不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对炎症因子 IL-6 (A)、TNF-α (B) 及抗炎因子 IL-10 (C) 释放量的影响

Fig. 7 Effects of shell nacre hydrolysis products with different mass concentrations on release amount of cytokine IL-6 (A), TNF-α (B) and cytokine IL-10 (C)

从图 7 可以看出,经过 LPS 诱导后,模型组 RAW264.7 细胞炎症因子 IL-6 (图 7A) 和 TNF-α (图 7B) 水平显著上升并明显高于空白对照组。

然而,在加入贝壳珍珠层酶解产物处理后,炎症因子 IL-6 (图 7A) 和 TNF-α (图 7B) 水平与贝壳珍珠层酶解产物质量浓度呈负相关,这也与 NO 的释放量趋势一致。当质量浓度为 800 μg/mL 时,珍珠层酶解产物对 IL-6 和 TNF-α 的抑制率最低,分别为 53.08%±1.06%、43.94%±4.62%。结果表明,珍珠层酶解产物能够通过抑制促炎细胞因子的分泌来有效调节炎症反应。

巨噬细胞分泌的 IL-10 通常被认为是抗炎细胞因子,可以通过抑制 NO 和促炎细胞因子的产生而抑制感染的持续性,在炎症过程中起着重要的调节作用。从图 7C 可以看出,在贝壳珍珠层酶解产物干预下,IL-10 分泌量显著上调,这与文献^[36]报道的鲟鱼软骨抗炎肽上调 IL-10 释放量的结果一致,都通过促进抗炎因子的释放来表现抗炎活性。

2.5 贝壳珍珠层酶解产物对皮肤修复作用

2.5.1 对 L929 细胞增殖率的影响

图 8 为菠萝蛋白酶酶解处理 3 h 制备的不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对 L929 细胞增殖率的影响。

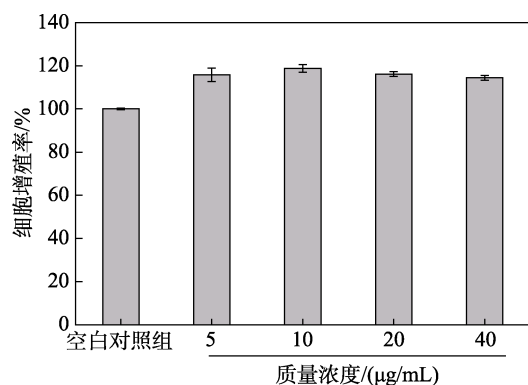


图 8 不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对 L929 细胞增殖率的影响

Fig. 8 Effect of shell nacre hydrolysis products on proliferation rate of L929 cells

在参与皮肤修复的各种细胞类型中,成纤维细胞是最经典的细胞类型,且成纤维细胞的增殖和迁

移是促进皮肤创面愈合的关键^[37]。从图 8 可以看出,在质量浓度为 5~40 μg/mL 的范围内,珍珠层酶解产物对 L929 细胞均无细胞毒性,且在质量浓度为 5~40 μg/mL 的范围内对细胞有促增殖作用。

2.5.2 对 L929 细胞迁移作用的影响

图 9 为菠萝蛋白酶酶解处理 3 h 制备的不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对 L929 细胞迁移的影响。

从图 9 可以看出,与空白对照组相比,质量浓度为 5~40 μg/mL 范围内的贝壳珍珠层酶解产物均能显著增加 L929 细胞的迁移,但当质量浓度 >10 μg/mL 后,迁移效果减弱。这可能是因为,蛋白质量浓度的升高会影响趋化因子与成纤维细胞表面受体的结合,从而抑制细胞的增殖,减弱了迁移作用^[38]。

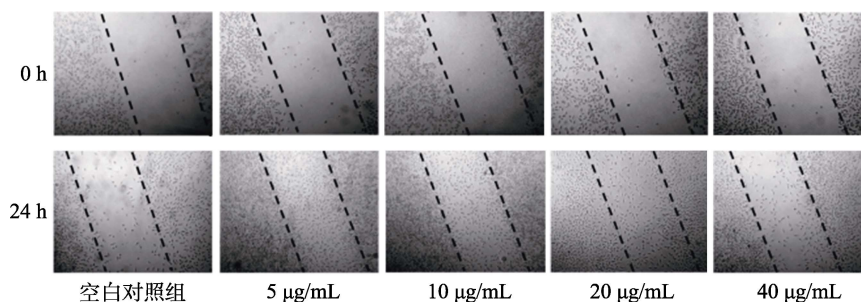


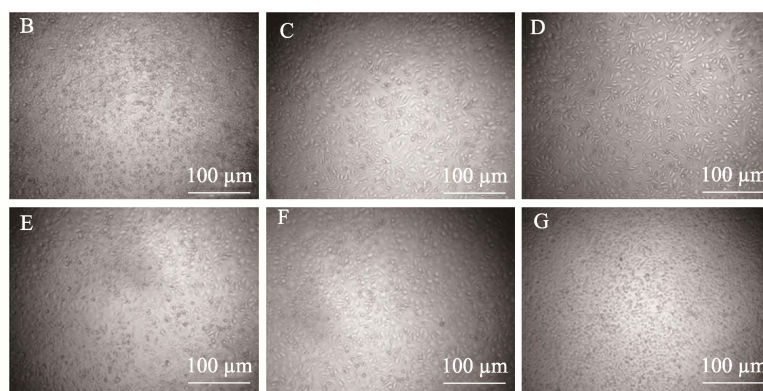
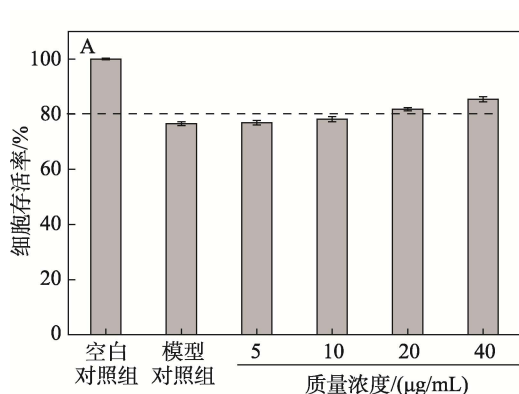
图 9 不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对 L929 细胞迁移的影响

Fig. 9 Effect of shell nacre hydrolysis products on migration of L929 cells

2.5.3 对 H₂O₂ 诱导下 L929 细胞存活率的影响

图 10 为菠萝蛋白酶酶解处理 3 h 制备的不同质

量浓度贝壳珍珠层酶解产物对 H₂O₂ 诱导下 L929 细胞存活率和细胞形态的影响。



B—空白对照组; C—模型对照组; D—5 μg/mL 实验组; E—10 μg/mL 实验组; F—20 μg/mL 实验组; G—40 μg/mL 实验组

图 10 不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对 H₂O₂ 诱导下 L929 细胞存活率 (A) 和细胞形态 (B~G) 的影响

Fig. 10 Effect of shell nacre hydrolysis products on survival rate of H₂O₂-induced injury of L929 cells (A) and cell morphology (B~G)

从图 10 可以看出,模型组 L929 细胞的存活率经 200 μmol/L 的 H₂O₂ 刺激后显著降低(图 10A),且大部分细胞开始收缩(图 10C),表明 L929 细胞发生严重损伤。经贝壳珍珠层酶解产物干预后,L929

细胞存活率提高,两者呈现正相关性。在质量浓度为 40 μg/mL 的贝壳珍珠层酶解产物干预下,L929 细胞存活率可达 85.4%±0.9%。此外,还可发现,贝壳珍珠层酶解产物可有效逆转 H₂O₂ 所导致的细胞

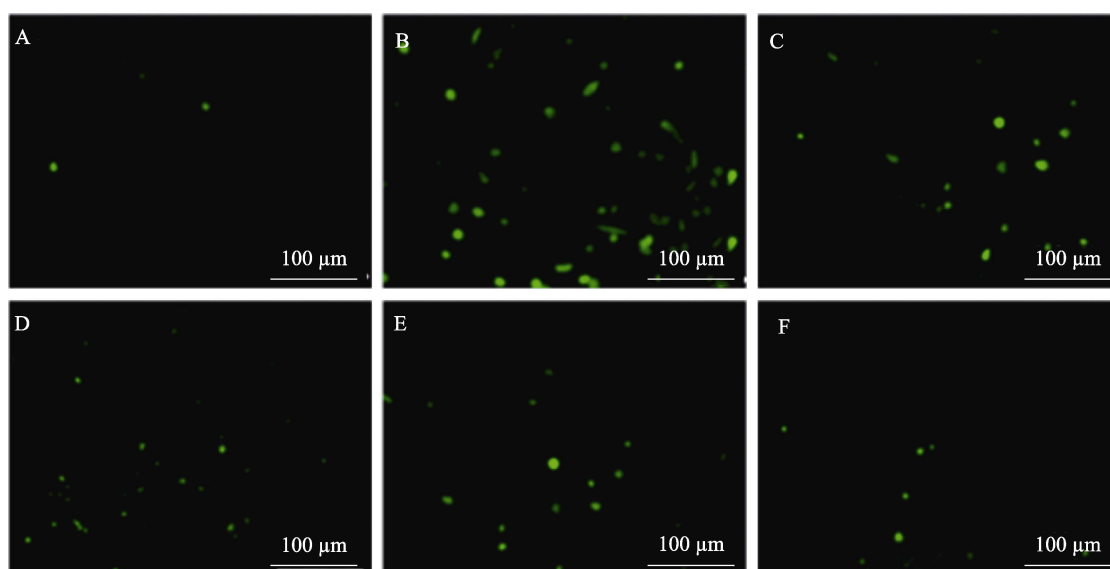
损伤形态变化(图 10D~G), 大多数细胞形态逐渐恢复到与空白对照组(图 10B)相同的水平。结果表明, 贝壳珍珠层蛋白酶解产物可以保护 L929 细胞免受由 H_2O_2 诱导的细胞损伤, 表现出良好的皮肤修复潜力。

2.5.4 对 H_2O_2 诱导下 L929 细胞 ROS 释放量的影响

图 11 为菠萝蛋白酶酶解处理 3 h 制备的不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对 H_2O_2 诱导下 L929 细胞 ROS 释放量荧光图片。

过量 ROS 的产生会导致细胞氧化应激, 引发细胞凋亡以及衰老, 进而导致细胞增殖和迁移能力的减弱; 并且, 当 ROS 过度积累时会导致成纤维细胞

减少细胞外基质的分泌, 影响皮肤修复^[39]。因此, ROS 常作为皮肤修复过程中重要的观察因子。DCFH-DA 是一种用于细胞内 ROS 检测的特异性荧光探针, 可穿透细胞膜与细胞内 ROS 特异性结合, 从而产生荧光信号。从图 11 可以看出, 在 H_2O_2 刺激下, 模型组(图 11B) ROS 释放量明显增多, 显著高于空白对照组(图 11A), 表明氧化应激模型建立成功。经不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物干预后, ROS 释放量明显降低(图 11C~F), 两者呈现负相关性。结果表明, 贝壳珍珠层酶解产物可以抑制 L929 成纤维细胞中 ROS 的形成, 有效保护 L929 细胞免受氧化损伤。



A—空白对照组; B—模型对照组; C—5 $\mu\text{g/mL}$ 实验组; D—10 $\mu\text{g/mL}$ 实验组; E—20 $\mu\text{g/mL}$ 实验组; F—40 $\mu\text{g/mL}$ 实验组

图 11 不同质量浓度贝壳珍珠层酶解产物对 H_2O_2 诱导下 L929 细胞 ROS 释放量荧光图片

Fig. 11 Fluorescence images of reactive oxygen species release in H_2O_2 -induced L929 cells at different mass concentrations of shell nacre hydrolysis products

3 结论

以贝壳珍珠层为原料, 采用酸化-高压联用技术提取贝壳珍珠层蛋白, 在单因素实验基础上, 结合响应面实验建立工艺的回归模型, 通过细胞炎症评价模型考察贝壳珍珠层蛋白酶解产物的抗炎活性。采用皮肤成纤维细胞模型研究酶解产物的皮肤修复活性。

(1) 通过响应面实验得到的贝壳珍珠层蛋白提取工艺的回归模型显著, 回归方程拟合度较好。得到的最优工艺条件为: 盐酸浓度 0.18 mol/L、碱液料液比 1 : 4.9、氢氧化钠溶液质量分数 1.00%、提取温度 65 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 3 h、酸沉 pH=3.5、静置时间 32 h。在此条件下, 贝壳珍珠层蛋白提取率为 17.31% $\pm$ 0.84%。

(2) 经菠萝蛋白酶对贝壳珍珠层蛋白进行酶解 3 h, 制备的贝壳珍珠层蛋白酶解产物能够调节促炎

介质及炎症因子的释放水平, 显示出良好的抗炎活性。

(3) 酶解产物能够促进皮肤成纤维细胞 L929 的增殖及迁移, 并且可以缓解 H_2O_2 对细胞的损伤, 表现出较强的皮肤修复效果。贝壳珍珠层蛋白酶解产物中含有丰富的疏水性氨基酸和带正电荷的氨基酸, 这在一定程度上促进了其抗炎能力。

本文为贝壳珍珠层资源的高值化利用提供了新思路。后续将进一步对贝壳珍珠层蛋白酶解产物进行分离纯化、结构鉴定, 并深入研究其抗炎作用机制。

参考文献:

- [1] WEI M F, QIU H M, ZHOU J, *et al.* The anti-photoaging activity of peptides from *pinctada martensii* meat[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(12): 770.
- [2] CHENG M Q, LIU M, CHANG L R, *et al.* Overview of structure, function and integrated utilization of marine shell[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 870: 161950.
- [3] HU Y Y (胡玉莹), YANG G Y (杨贵雅), CHEN A Z (陈安珍), *et al.* Research progress on Chinese marine medicine *margaritifera concha*[J].

- Modern Chinese Medicine (中国现代中药), 2024, 26(12): 2189-2196.
- [4] QIAO Y H (乔艺涵), MENG X D (孟雪丹), SUO Y R (索亚然), *et al.* Construction of amino acid fingerprint and determination of amino acid content of pearl layer powder[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology (世界科学技术-中医药现代化), 2019, 21(7): 1353-1363.
- [5] OMACHI T, MATSUYAMA N, HASEGAWA Y. Nacre extract from pearl oyster suppresses LPS-induced depression and anxiety[J]. Journal of Functional Foods, 2023, 100: 105373.
- [6] LIU W C (刘文春). The current situation of nacre powder production[J]. Jiangxi Fishery Science and Technology (江西水产科技), 2018(2): 20-21.
- [7] FUNABARA D, MIYASHITA N, NAGAI K, *et al.* Electroextraction of insoluble proteins from the organic matrix of the nacreous layer of the Japanese pearl oyster, *pinctada fucata*[J]. Methods and Protocols, 2019, 2(2): 37.
- [8] XING H R, YANG F M, SUN S J, *et al.* Green efficient ultrasonic-assisted extraction of abalone nacre water-soluble organic matrix for bioinspired enamel remineralization[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2022, 212: 112336.
- [9] XIA W, GAO Y, FANG X J, *et al.* Simulated gastrointestinal digestion of walnut protein yields anti-inflammatory peptides[J]. Food Chemistry, 2024, 445: 138646.
- [10] MA C H, LONG H Y, YANG C H, *et al.* Anti-inflammatory role of pilose antler peptide in LPS-induced lung injury[J]. Inflammation, 2017, 40(3): 904-912.
- [11] WANG X (汪雄), ZHAO Y (赵燕), XU M S (徐明生), *et al.* Research progress in the preparation, isolation, identification and anti-inflammatory mechanism of anti-inflammatory peptides derived from food[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2017, 38(15): 335-341.
- [12] ZENG Y, CHENG H Y, SHEN J P, *et al.* Response surface optimization of active peptides of rana spinosa (*Quasipaa spinosa*) meat process and evaluation of immunomodulatory activity[J]. Journal of Food Measurement & Characterization, 2024, 18(4): 2573-2586.
- [13] ZHOU Y F, XU Y X, TIAN T G, *et al.* Antihypertensive and antioxidant effects of food-derived bioactive peptides in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Science & Nutrition, 2024, 12(10): 8200-8210.
- [14] TIAN X Y, ZHANG Z R, ZHAO Y Q, *et al.* Isolation and characterization of antioxidant peptides from dairy cow (*Bos taurus*) placenta and their antioxidant activities[J]. Antioxidants, 2024, 13(8): 913.
- [15] SHEN J P, ZENG M J, HUANG P T, *et al.* Purification and activity evaluation of novel anti-inflammatory peptides from pearl oyster (*Pinctada martensii*) hydrolysates[J]. Food & Function, 2023, 14(9): 4242-4253.
- [16] LIN H S, SHEN W Q, JIANG Y, *et al.* Anti-inflammatory activity of peptides from rudites philippinarum in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells and mice[J]. Foods, 2024, 13(6): 883.
- [17] YANG Y L, ZHU L Y, GUO Z T, *et al.* Yak bone collagen-derived anti-inflammatory bioactive peptides alleviate lipopolysaccharide-induced inflammatory by inhibiting the NF- κ B signaling pathway and nitric oxide production[J]. Food Bioscience, 2023, 52: 102423.
- [18] VEERARAGHAVAN V P, PERIADURAI N D, KARUNAKARAN T, *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Scutellaria barbata* and coating on the cotton fabric for antimicrobial applications and wound healing activity in fibroblast cells (L929)[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(7): 3633-3640.
- [19] WUNNOO S, SERMWITTAYAWONG D, PRAPARATANA R, *et al.* *Quercus infectoria* gall ethanolic extract accelerates wound healing through attenuating inflammation and oxidative injuries in skin fibroblasts[J]. Antioxidants, 2024, 13(9): 1094.
- [20] CAO X P, CHEN Y F, ZHANG J L, *et al.* Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its *in vitro* antioxidant activity[J]. Phytomedicine, 2017, 34: 76-84.
- [21] WANG X F (王雪峰). Acquisition and identification of nacreous proteins and their interactions with calcium ions[D]. Changsha: National University of Defense Technology (国防科学技术大学), 2014.
- [22] ZHAO Q Y (赵琼瑜), HU J (胡鉴), LI C Y (李彩燕), *et al.* Ultrasound-assisted decalcification process optimization of carapace of Chinese soft-shelled turtle and biochemical characterization of collagen[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2022, 43(22): 39-51.
- [23] XUE L (薛蕾), WANG H B (王海滨). Optimization of extraction conditions for grape seed protein and study on its antioxidative peptides[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2022, 47(9): 176-182.
- [24] YANG W Q (杨文清), LUO K (罗凯), CHEN Y B (陈耀兵). Optimization of extraction process and functional properties of idesia polycarpa maxim. protein[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association (中国粮油学报), 2024, 39(3): 89-97.
- [25] YUAN L T (袁莉婷), LIU Y D (刘玉德), SHI W T (石文天), *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted alkaline extraction of kelp protein by response surface method[J]. China Food Additives (中国食品添加剂), 2021, 32(4): 23-33.
- [26] WEI P (卫萍), ZHANG Y Y (张雅媛), YOU X R (游向荣), *et al.* Optimization of alkali-extraction and acid-precipitation extraction of micro-endosperm corn protein by response surface methodology and its composition analysis[J]. China Oils and Fats (中国油脂), 2022, 47(8): 40-45.
- [27] MARASINGHE C K, JUNG W K, JE J Y. Anti-inflammatory action of ark shell (*Scapharca subcrenata*) protein hydrolysate in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophages[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(12): e14493.
- [28] SHEN J P (沈金鹏), WANG K W (王珂雯), HUANG P T (黄潘翎), *et al.* Preparation, amino acid composition and anti-inflammatory activity of hydrolyzed peptides from *Pinctada martensii*[J]. Food and Machinery (食品与机械), 2023, 39(2): 132-139.
- [29] CHU Q (储倩). Preparation of ethanol-soluble polypeptide from sturgeon cartilage and anti-inflammatory activity[D]. Zhenjiang: Jiangsu University (江苏大学), 2021.
- [30] GAO R C, SHEN Y, SHU W H, *et al.* Optimization of enzymatic conditions of sturgeon muscles and their anti-inflammatory potential[J]. Journal of Food Quality, 2020, 2020(8): 1-12.
- [31] RIVERA-JIMÉNEZ J, BERRAQUERO-GARCÍA C, PÉREZ-GÁLVEZ R, *et al.* Peptides and protein hydrolysates exhibiting anti-inflammatory activity: Sources, structural features and modulation mechanisms[J]. Food & Function, 2022, 13(24): 1251-1254.
- [32] LUEANGSAKULTHAI J, PHOSRI S, THEANSUNGNOEN T, *et al.* Novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) hemoglobin hydrolysate[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2018, 65(3): 455-466.
- [33] RAYNAUD-SIMON A, BELABED L, NAORU G L, *et al.* Arginine plus proline supplementation elicits metabolic adaptation that favors wound healing in diabetic rats[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2012, 303(10): R1053-R1061.
- [34] CHALAMAIAH M, YU W L, WU J P. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 205-222.
- [35] GUHA S, MAJUMDER K. Structural-features of food-derived bioactive peptides with anti-inflammatory activity: A brief review[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12531.
- [36] YUAN L, CHU Q, YANG B, *et al.* Purification and identification of anti-inflammatory peptides from sturgeon (*Acipenser schrenckii*) cartilage[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(6): 2175-2183.
- [37] UCHINAKA A, KAWAGUCHI N, BAN T, *et al.* Evaluation of dermal wound healing activity of synthetic peptide SVVYGLR[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 491(3): 714-720.
- [38] BORALDI F, LOFARO F D, BONACORSI S, *et al.* The role of fibroblasts in skin homeostasis and repair[J]. Biomedicine, 2024, 12(7): 1586.
- [39] TANG R (唐蓉), GONG S (龚舒), LIU T K (刘天开), *et al.* Extraction, purification and inhibition activity on HepG2 proliferation of *Ficus hirtavahl* flavonoids[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2026, 43(1): 144-154..