

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241030008

引用格式: 吴松霞, 郑硕磊, 安颖, 等. 金枪鱼胶原低聚肽抑制皮肤细胞黑色素生成及抗氧化损伤作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 91-101.

WU SX, ZHENG SL, AN Y, *et al.* Study on the inhibition of melanogenesis and antioxidant damage of tuna skin collagen oligo-peptide [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 91-101. (in Chinese with English abstract).

# 金枪鱼胶原低聚肽抑制皮肤细胞黑色素生成及 抗氧化损伤作用研究

吴松霞<sup>1</sup>, 郑硕磊<sup>2</sup>, 安颖<sup>1</sup>, 李嘉鑫<sup>1</sup>, 王玉梅<sup>2\*</sup>, 王斌<sup>2\*</sup>

(1. 生命科学大健康研究院, 浙江平太荣生物科技有限公司, 舟山 316104;

2. 浙江海洋大学食品与药学学院, 舟山 316022)

**摘要:** **目的** 研究金枪鱼胶原低聚肽(tuna skin collagen oligo-peptide, TSCP)对黑色素生成的抑制作用及其对Hacat细胞氧化损伤的保护效果。**方法** 通过研究TSCP对B16-f10细胞黑色素和酪氨酸酶生成的影响, 对B16-f10细胞抗氧化活性分析, 及对双氧水(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导Hacat细胞氧化损伤的保护作用, 揭示TSCP对黑色素生成的抑制作用及对Hacat细胞氧化损伤的保护机制。**结果** TSCP在0.01~1.00 mg/mL质量浓度范围内对B16-f10细胞无明显毒性, 并能显著抑制酪氨酸酶活性和黑色素生成。在1.00 mg/mL质量浓度下, TSCP将黑色素含量降低至83.79%±4.31% ( $P<0.01$ ), 酪氨酸酶活力降低至78.14%±6.95% ( $P<0.001$ )。同时, TSCP显著降低了B16-f10细胞内的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)水平, 1.00 mg/mL质量浓度下ROS含量下降至53.5%±4.4% ( $P<0.001$ ), 呈现出良好的抗氧化效果。此外, TSCP能够提升细胞内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活力[(16.62±0.62) U/mg prot,  $P<0.001$ ], 降低氧化应激标志物丙二醛(malondialdehyde, MDA)的水平[(0.352±0.051) U/mg prot,  $P<0.001$ ], 并增强谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的含量[(284.55±4.99) ng/mL,  $P<0.01$ ]。在Hacat细胞模型中, TSCP同样无显著毒性, 且在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化损伤模型中, TSCP可显著提高细胞存活率, 并抑制细胞凋亡, 1.00 mg/mL TSCP处理后细胞存活率提高至73.66%±5.48% ( $P<0.01$ )。

**结论** TSCP具有显著的抑制黑色素生成和抗氧化活性, 展现出在皮肤美白和抗氧化治疗中的潜在应用价值。

**关键词:** 金枪鱼胶原低聚肽; 黑色素生成; 抗氧化; Hacat细胞; 氧化损伤

## Study on the inhibition of melanogenesis and antioxidant damage of tuna skin collagen oligo-peptide

WU Song-Xia<sup>1</sup>, ZHENG Shuo-Lei<sup>2</sup>, AN Ying<sup>1</sup>, LI Jia-Xin<sup>1</sup>,  
WANG Yu-Mei<sup>2\*</sup>, WANG Bin<sup>2\*</sup>

收稿日期: 2024-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(82073764)

第一作者: 吴松霞(1993—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为海洋资源综合利用。E-mail: 603427375@qq.com

\*通信作者: 王玉梅(1989—), 女, 硕士, 实验师, 主要研究方向为海洋药物。E-mail: Wangyumei731@163.com

王斌(1977—), 男, 教授, 主要研究方向为海洋药学、海洋生物资源综合利用。E-mail: wangbin@zjhou.edu.cn

(1. Great Health Research Institute of Life Sciences, Zhejiang Pingtaorong Biotechnology Co., Ltd., Zhoushan 316104, China; 2. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the inhibitory effects of tuna skin collagen oligo-peptide (TSCP) on melanin production and oxidative damage protection in Hacat cells. **Methods** Through investigated the effects of TSCP on melanin and tyrosinase production in B16-f10 cells, analyzed the antioxidant activity in B16-f10 cells, and assessed its protective effect against hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) induced oxidative damage in Hacat cells, the inhibitory mechanism of TSCP on melanin production and its protective mechanism against oxidative damage in Hacat cells were revealed. **Results** The experimental results showed that TSCP exhibits no significant cytotoxicity to B16-f10 cells at concentrations ranging from 0.01 to 1.00 mg/mL, and significantly inhibited tyrosinase activity and melanin production. At a concentration of 1.00 mg/mL, TSCP significantly reduced melanin content to  $83.79\% \pm 4.31\%$  ( $P < 0.01$ ) and tyrosinase activity to  $78.14\% \pm 6.95\%$  ( $P < 0.001$ ). TSCP also significantly reduced the levels of reactive oxygen species (ROS) in B16-f10 cells. At 1.00 mg/mL, the ROS levels decreased to  $53.5\% \pm 4.4\%$  of the control group ( $P < 0.001$ ), indicating potent antioxidant potential. Additionally, TSCP increased the activity of superoxide dismutase (SOD) to  $(16.62 \pm 0.62)$  U/mg prot ( $P < 0.001$ ) and reduced malondialdehyde (MDA) content to  $(0.352 \pm 0.051)$  U/mg prot ( $P < 0.001$ ). Glutathione peroxidase (GSH-Px) levels were also elevated, reaching  $(284.55 \pm 4.99)$  ng/mL at 1.0 mg/mL ( $P < 0.01$ ). In the Hacat cell model, TSCP similarly exhibited no significant toxicity and, in the  $H_2O_2$ -induced oxidative damage model, significantly improved cell viability and suppressed apoptosis. At 1.00 mg/mL, TSCP improved cell survival to  $73.66\% \pm 5.48\%$  ( $P < 0.01$ ), compared to the model group. **Conclusion** TSCP can inhibit melanin production, reduce oxidative stress, providing a foundation for its potential applications in skin whitening and antioxidant therapies.

**KEY WORDS:** tuna skin collagen oligo-peptide; melanin production; antioxidant; Hacat cells; oxidative damage

## 0 引言

黑色素生成是由一系列复杂的生物化学过程驱动的,其中酪氨酸酶是关键的限制酶。酪氨酸酶的活性直接影响黑色素的产生和沉积,过度的黑色素沉积不仅会引起皮肤色素沉着等美观问题,还与多种皮肤病症有关,如黄褐斑、老年斑等<sup>[1]</sup>。近年来,研究表明天然多肽在抑制酪氨酸酶活性和减少黑色素生成方面具有显著的潜力,尤其是在美肤产品中的应用逐渐受到重视<sup>[2]</sup>。

胶原蛋白肽作为一种来源于海洋的功能性肽,逐渐成为研究的热点。胶原蛋白肽不仅在抗氧化方面表现出色,还能够通过抑制酪氨酸酶活性,调节黑色素生成途径<sup>[3]</sup>。近年来的研究发现,胶原蛋白肽能显著降低黑色素的合成,并在小鼠模型中显示出减缓色素沉着的效果,如: TU 团队的研究表明,草鱼鱼鳞胶原蛋白肽能够显著抑制 B16-F10 黑色素瘤细胞中酪氨酸酶的活性,降低黑色素生成,同时上调抗氧化酶的表达水平<sup>[1]</sup>。此外, KYUNGHEE 团队通过构建小鼠模型发现,外用发酵的鱼胶原蛋白能够显著减轻紫外线引起的皮肤色素沉着,改善皮肤光老化现象<sup>[4]</sup>。这使得胶原蛋白肽在皮肤护理和美容领域的应用前景更为广阔<sup>[5]</sup>。此外,胶原蛋白肽对氧化应激的调控作用也引起了

广泛关注。氧化应激不仅是多种皮肤老化和色素沉着的主要原因,还会引发一系列细胞损伤<sup>[6]</sup>。Hacat 细胞作为人角质形成细胞的经典模型,广泛用于研究皮肤细胞的抗氧化机制和防护功能<sup>[7-8]</sup>。研究表明,海洋鱼类副产品蛋白肽(DP, KGYSSYICDK)能够清除体内的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),增强细胞内抗氧化酶[如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)]的活性,并减少脂质过氧化产物[如丙二醛(malondialdehyde, MDA)]的生成,DP 以剂量依赖的方式抑制了  $\alpha$ -黑素细胞刺激素( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH)诱导的 B16F10 黑色素瘤细胞中的酪氨酸酶活性并减少了黑色素生成。此外, DP 还能够通过抑制氧化应激诱导的炎症因子表达,从而减轻细胞损伤和衰老过程<sup>[9]</sup>。

海洋生物来源的胶原肽,尤其是金枪鱼胶原低聚肽(tuna skin collagen oligo-peptide, TSCP),展现出极大的应用潜力,现有研究多集中于 TSCP 对氧化应激的保护作用及其在美容领域的应用潜力,然而, TSCP 通过调控黑色素生成和抗氧化应激的具体机制仍需深入探讨。因此,本研究旨在利用 B16-F10 细胞模型和双氧水(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )诱导的 Hacat 细胞氧化损伤模型,进一步探讨 TSCP 抑制酪

氨酸酶活性、减少黑色素生成及增强抗氧化酶水平的机制。这将为开发基于 TSCP 的皮肤美白和抗衰老产品提供理论依据, 同时也为拓展其在功能性护肤品中的应用潜力提供新的视角<sup>[10-11]</sup>。未来的研究应聚焦于其在皮肤健康中的具体作用及机制, 以推动其在现代皮肤护理产品中的应用<sup>[12-13]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与设备

DGG-9070AD 恒温烘箱(上海森信实验仪器有限公司); RB29NFSBIS 低温冰箱[三星电冰箱(中国)有限公司]; Heracell 150i 细胞孵育箱、Revco ULT Freezer-86 °C U410 冰箱、Multisjan F 酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; HH-W420 恒温水箱(金坛市白塔新宝仪器厂); TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); TI-S 倒置式荧光生物显微镜(日本尼康株式会社)。

### 1.2 材料与试剂

Hacat 细胞系(中国武汉尚恩生物技术有限公司); TSCP 黄白色粉末(平均分子量 556 Da, 低聚肽含量 96.8%, 浙江平太荣生物科技有限公司); NaOH、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(中国医药集团有限公司);  $\alpha$ -熊果苷[阿拉丁试剂(上海)有限公司]; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK8)试剂盒(亚科因生物科技有限公司); N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)、 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 曲拉通 X-100 (TritonX-100)、L-酪氨酸(L-tyrosine, L-Tyr)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、25% 乙二胺四乙酸-胰蛋白酶、高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液(附带 PMSF: 蛋白酶抑制剂)、Hoechst 33258 (北京索莱宝科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒[爱必信(上海)生物技术有限公司]; SOD、MDA、ROS 试剂盒(南京建成生物工程研究所); GSH-Px、醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1)试剂盒(上海酶联生物技术有限公司); B16-F10 细胞专用培养基、Hacat 细胞专用培养基、B16-F10 细胞系(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 供试品和对照品

将 TSCP 溶解于 PBS 中, 按 0.01、0.10、0.50 和 1.00 mg/mL 的浓度梯度稀释后, 临用前配制, 分别用于 B16-f10 和 Hacat 细胞。B16-f10 细胞实验中,  $\alpha$ -熊果苷作为对照品, 质量浓度为 0.01 mg/mL; Hacat 细胞实验中, NAC 对照品质量浓度为 0.3260 mg/mL。给药体积根据培养容器的大小调整, 分别为 96 孔板的 20  $\mu$ L、6 孔板的 200  $\mu$ L 以及 90 mm 培养皿的 600  $\mu$ L。细胞种板后 24 h 给药, B16-f10 细胞经过 48 h 检测, Hacat 细胞则在暴露于 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 h 后再进行 24 h 给药, 并进行后续检测。

#### 1.3.2 细胞毒性实验

##### (1) TSCP 对 B16-f10 细胞存活率的影响

通过 B16-f10(小鼠皮肤黑色素瘤细胞)进行细胞的毒性实验。TSCP 的质量浓度设置为: 0.01、0.10、0.50、1.00 mg/mL, 把细胞种于 96 孔板中, 24 h 后进行给药, 给药 48 h 后利用 CCK8 的实验方法, 进行细胞毒性实验。

##### (2) $\alpha$ -熊果苷对 B16-f10 细胞存活率的影响

实验步骤同上 1.3.2(1)。

#### 1.3.3 TSCP 对 B16-f10 细胞黑色素和酪氨酸酶生成的影响

##### (1) TSCP 对抑制黑色素生成的影响

取 B16-f10 细胞接种于含有专用培养基的 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温箱中孵育, 培养过夜后弃掉上清液。分为实验组和空白组, 实验组加入 20  $\mu$ L 不同质量浓度的 TSCP (0.01、0.10、0.50 和 1.00 mg/mL)或(0.01 mg/mL)  $\alpha$ -熊果苷, 空白组加入 20  $\mu$ L PBS 缓冲液。继续培养 48 h 后, 把细胞收集到无菌的 EP 管中 2500 r/min 转速离心 5 min, 弃上清, 使用 PBS 缓冲液清洗 3 次后, 向每个 EP 管内加入 NaOH(含有 10% DMSO), 再加纯水, 将混合液吹打均匀后转至 96 孔板内, 在酶标仪 490 nm 处测定吸光度值, 将每组均设定 3 个复孔。

##### (2) TSCP 对抑制酪氨酸酶生成的影响

本研究通过 B16-f10(小鼠皮肤黑色素瘤细胞)进行抑制酪氨酸酶的实验。TSCP 的质量浓度以及  $\alpha$ -熊果苷的浓度由上述的毒性实验筛选出来, 分别为 1.00 mg/mL, 0.01 mg/mL, 接着通过给药与未给药的测得的酪氨酸酶的含量, 验证 TSCP 抑制酪氨酸酶的能力。取 B16-F10 细胞接种在 96 孔板中, 将其置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温箱中孵育, 培养过夜。分为实验组和空白组, 实验组加入 20  $\mu$ L 不同质量浓度的 TSCP (0.01、0.10、0.50 和 1.00 mg/mL)或  $\alpha$ -熊果苷(0.01 mg/mL), 空白组加入 20  $\mu$ L PBS 缓冲液, 每组设置 3 个复孔。继续培养 48 h 后弃上清, 用 PBS 缓冲液进行 3 次冲洗, 再在每个孔内加入含 1%体积分数的 TritonX-100 的溶液, 将 96 孔板用封口膜封好, 置于-80 °C 的冰箱内 60 min 后, 将培养板室温放置使细胞融化裂解后, 向每个孔内加入 L-Tyr。将培养板放入已预热的 37 °C 空气浴内反应 1 h, 在酶标仪上 490 nm 处测定其吸光度值。

#### 1.3.4 TSCP 对 B16-f10 细胞抗氧化活性分析

##### (1) TSCP 对 B16-f10 细胞 ROS 含量的影响

取 B16-f10 细胞接种于 96 孔培养板中, 置于细胞孵育恒温箱中孵育 24 h。细胞分组及给药同 1.3.2, 后弃去培养液用 PBS 洗涤 2 次, 加入 10  $\mu$ mol/L DCFH-DA 荧光探针溶液, 孵育 1 h 后, 用 PBS 洗涤 2 次, 放置于暗室中, 通过荧光倒置显微镜观察、拍摄细胞荧光情况。使用酶标仪测定其光强(激发波长为 485 nm/发射波长为 535 nm)。

##### (2) TSCP 对 B16-f10 细胞 SOD 活力的影响

细胞分组及给药同 1.3.2, 实验步骤见表 1。计算公式见(1)~(2)。

表 1 SOD 活力测定操作表(μL)

试剂	对照孔	对照空白孔	测定孔	测定空白孔
待测样本	-	-	20	20
蒸馏水	20	20	-	-
酶工作液	20		20	-
酶稀释液	-	20	-	20
底物应用液	200	200	200	200
混匀, 37 °C 孵育 20 min, 波长 450 nm, 酶标仪读数				

注: -代表无此操作, 表 2~4 同。

SOD 抑制率/%=

$$\frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{测定空白}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{SOD 活力} = \frac{\text{SOD 抑制率}}{50\%} \times \frac{0.24}{0.02 \times C_{\text{待测样本}}} \quad (2)$$

注: SOD 活力, U/mg prot; 0.24 为反应体系, mL; 0.02 为稀释倍数, mL;  $C_{\text{待测样本}}$ , mg/mL prot。

(3) TSCP 对 B16-f10 细胞 MDA 含量的影响  
细胞分组及给药同 1.3.2, 实验步骤见表 2。

表 2 MDA 含量试剂盒测定操作表(mL)

试剂	空白管	标准管	测定管	对照管
10 nmol/mL 标准品	-	0.1	-	-
无水乙醇	0.1	-	-	-
测试样品	-	-	0.1	0.1
试剂一	0.1	0.1	0.1	-
混匀(摇动几下离心管架)				
试剂二应用液	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂三应用液	1.5	1.5	1.5	-
50%冰醋酸	-	-	-	1.5

离心管盖好后, 刺出小孔, 振荡混匀, 95 °C 水浴 40 min, 取出后流水冷却, 离心取上清, 在 532 nm 处测其吸光度值, 计算公式见(3)。

$$\text{MDA 含量} = \frac{\text{OD}_{\text{标准}} - \text{OD}_{\text{测定}}}{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times \frac{C_{\text{标准品}}}{C_{\text{待测样本}}} \quad (3)$$

注: MDA 含量, mmol/grot;  $C_{\text{标准品}}$  为 10 nmol/mL,  $C_{\text{待测样本}}$ , mg/mL prot。

(4) TSCP 对 B16-f10 细胞 GSH-Px 活力的影响  
细胞分组及给药同 1.3.2, 实验步骤见表 3、4。

混匀后, 静置 15 min, 在紫外波长 412 nm 处测吸光度值。计算公式如(4):

$$\text{GSH-Px 酶活力} = \frac{\text{OD}_{\text{非酶管}} - \text{OD}_{\text{酶管}}}{\text{OD}_{\text{标准管}} - \text{OD}_{\text{空白管}}} \times \frac{C_{\text{标准品}} \times 5 \times \text{取样量} \times \text{样本蛋白含量}}{\text{反应时间}} \quad (4)$$

注:  $C_{\text{标准品}}$  为 20 μmol/L; 5 为稀释倍数。

表 3 GSH-Px 活力测定操作表(μL)

试剂	非酶管	酶管
1 mmol/L GSH	100	100
待测样本	-	100
37 °C 水浴预温 5 min, 试剂一应用液提前 37 °C 预温		
试剂 1 应用液	50	50
37 °C 水浴反应 5 min		
试剂 2 应用液	1000	1000

表 4 GSH-Px 活力测定操作表(μL)

试剂	空白管	标准管	非酶管	酶管
GSH 标准品溶剂应用液	1 000	-	-	-
20 mol/L GSH 标准液	-	1 000	-	-
上清液	-	-	1 000	-
试剂 3 应用液	1 000	1 000	1 000	1 000
试剂 4 应用液	250	250	250	250
试剂 5 应用液	50	50	50	50

### 1.3.5 TSCP 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 Hacat 细胞氧化损伤的保护作用

#### (1) 对 Hacat 细胞的毒性实验

为评估 TSCP、NAC 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 Hacat 细胞的毒性, 实验通过不同药物浓度进行细胞存活率测试。首先, 将 Hacat 细胞接种于 96 孔板中, 24 h 后分别给予 0.01、0.10 和 1.00 mg/mL 质量浓度的 TSCP, 24 h 后通过 CCK8 试剂盒检测细胞存活率, 筛选出合适浓度。其次, NAC 毒性实验采用相同方法, 质量浓度设置为 0.0815、0.1630、0.2510 和 0.3260 mg/mL。最后, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度分别为 100、125、150 和 200 μmol/L, 检测其对 Hacat 细胞的毒性作用, 方法同上。

#### (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 Hacat 细胞氧化损伤模型的建立

本研究利用上述实验筛选出 150 μmol/L 浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为细胞的半数致死量, 因此选用 150 μmol/L 浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 进行诱导 Hacat 细胞氧化损伤模型的建立。首先将细胞种于 96 孔板中, 孵育 24 h 后给予 150 μmol/L 浓度 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 继续培养 4 h 后, 吸去 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 建立 Hacat 细胞氧化损

伤模型。

### (3) TSCP 对 HacaT 细胞氧化损伤的保护效应

将 HacaT 细胞接种到 96 孔板后, 将细胞标记为实验组、模型组和空白组, 孵育 24 h 后更换培养基。向空白组和模型组加入 20  $\mu\text{L}$  完全培养基, 实验组分别添加 0.01、0.10 和 1.00 mg/mL 的 20  $\mu\text{L}$  TSCP, 继续孵育 24 h。再次更换培养基, 加入完全培养基(空白组)或 150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ (模型组和实验组), 继续培养 24 h 后, 采用细胞增殖-毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8)检测细胞存活率。

### (4) TSCP 对 HacaT 细胞氧化损伤模型的抗凋亡、抗衰老及抗氧化酶分析

**Hoechst 33258 实验:** 将细胞接种于 6 孔板中, 孵育 24 h 后给予 150  $\mu\text{mol/L}$  (0.005 mg/mL) 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 继续孵育 4 h 后, 吸去  $\text{H}_2\text{O}_2$  后加入 200  $\mu\text{L}$  TSCP, 再孵育 24 h 后, 吸去培养基, 用 PBS 润洗 3 遍, 加入 1 mL 染色液。继续培养 20~30 min。弃染色液, 用 PBS 或培养液洗涤 2~3 次后进行荧光检测。

**$\beta$ -半乳糖苷酶:** 将细胞接种于 6 孔板中, 孵育 24 h 后给予 150  $\mu\text{mol/L}$  (0.005 mg/mL) 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 继续孵育 4 h 后, 吸去  $\text{H}_2\text{O}_2$  后加入 200  $\mu\text{L}$  TSCP, 继续孵育 24 h 后, 吸除细胞培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 1 毫升  $\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 15 min。吸除细胞固定液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 3 min。吸除 PBS, 每孔加入 1 mL 染色工作液, 37  $^\circ\text{C}$  孵育过夜, 而后在普通光学显微镜下观察。

**抗氧化酶检测:** 将细胞接种于 6 孔板中, 孵育 24 h 后给予 150  $\mu\text{mol/L}$  (0.005 mg/mL) 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 继续孵育 4 h 后, 吸去  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 加入 200  $\mu\text{L}$  TSCP, 再孵育 24 h 后, 吸取上清液, 进行 ELISA 试剂盒的检测。

## 1.4 数据处理

每组实验均进行 3 次重复( $n=3$ ), 结果以平均值 $\pm$ 标准偏

差表示。使用 Origin 19 进行数据可视化, 并通过 SPSS 22.0 软件中的单因素方差分析进行统计检验, 差异分析采用 Duncan 多重比较法。显著性水平设定为  $P<0.05$  为显著差异,  $P<0.01$  为极显著差异,  $P<0.001$  为强极显著差异。

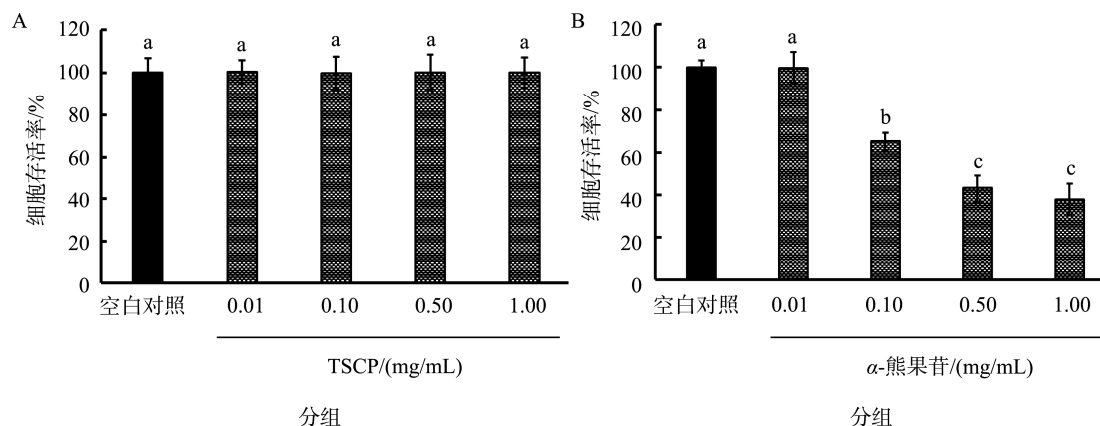
## 2 结果与分析

### 2.1 TSCP 对小鼠体重和摄食量的影响

从图 1A 可知, TSCP 在 0.01~1.00 mg/mL 质量浓度下, 各组 B16-f10 细胞的存活率均在 100%左右, 与空白组相较无显著差异。因此, TSCP 在检测浓度下, 对 B16-f10 细胞无显著毒性, 故采用最高质量浓度 1.00 mg/mL 进行后续实验。图 1B 可知,  $\alpha$ -熊果苷在 0.01 mg/mL 的质量浓度下, 细胞的存活率为 99.69% $\pm$ 7.25%, 与空白组相较无显著差异, 对细胞无毒性, 但质量浓度增加到 0.10、0.50 和 1.00 mg/mL 的时候, 细胞的存活率显著下降到 65.33% $\pm$ 4.14%、43.29% $\pm$ 6.34%和 37.89% $\pm$ 7.54%,  $P<0.05$ 。因此以 0.01 mg/mL  $\alpha$ -熊果苷进行后续实验。

### 2.2 TSCP 对 B16-f10 细胞内黑色素生成、酪氨酸酶活力的影响

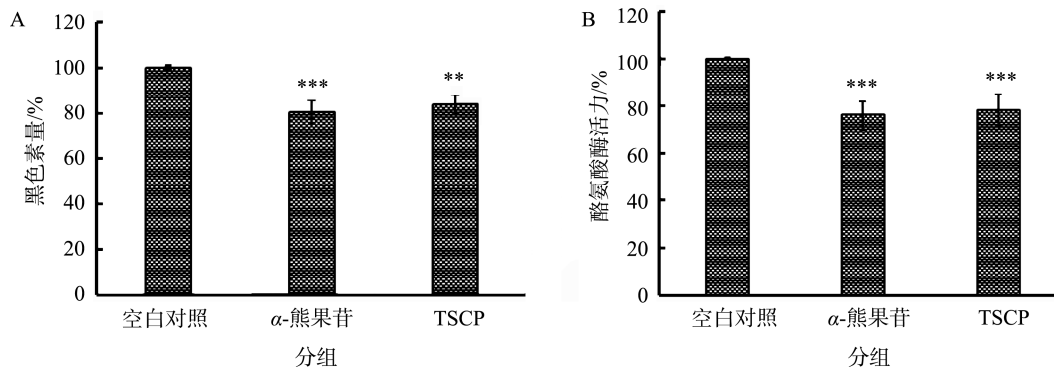
由图 2A 可知, 给药 1.0 mg/mL 的 TSCP 后, B16-f10 细胞内黑色素的含量下降到 83.79% $\pm$ 4.31%, 与正常组有显著的差异( $P<0.01$ ), 说明 TSCP 对黑色素的生成有比较强的抑制能力。由图 2B 可知, 给药 1.0 mg/mL 的 TSCP 后, B16-f10 细胞内酪氨酸酶的活力与空白组相比下降到 78.14% $\pm$ 6.95%, 抑制率为 21.86% $\pm$ 6.95%, 与正常组有强极显著的差异( $P<0.001$ )。说明 TSCP 对酪氨酸酶的活力有较高的抑制能力。TSCP 的抗黑色素生成和抑制酪氨酸酶活性的机制可能是通过其抗氧化特性和对关键酶活性的调控作用实现, 这为其在护肤和美白领域的潜在应用提供了理论基础。



注: 不同字母代表组间有显著性差异( $P<0.05$ ), 图 6 同。

图 1 TSCP(A)、 $\alpha$ -熊果苷(B)对 B16-f10 细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of TSCP (A) and  $\alpha$ -arbutin (B) on the survival rates of B16-f10 cells



注: 与空白对照组相比, \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , 图 3~5, 7~8 同。

图 2 TSCP 对 B16-f10 细胞内黑色素生成(A)、酪氨酸酶活力(B)的影响

Fig.2 Effects of TSCP on melanogenesis (A) and tyrosinase activities (B) in B16-f10 cells

### 2.3 TSCP 对 B16-f10 细胞内 ROS 含量的影响

如图 3A 所示, 经过 ROS 荧光探针染色处理后, 空白组显示出明显的绿色荧光信号, 表明细胞内 ROS 水平较高。相较于空白组, 处理后的  $\alpha$ -熊果苷组显著减少了绿色荧光的强度, 指示细胞内 ROS 的产生显著降低。此外, 随着 TSCP 浓度的增加, TSCP 组的荧光面积和强度逐步减弱, 进一步反映了细胞内 ROS 含量的减少。根据图 3B, 在给予  $\alpha$ -熊果苷后, ROS 水平降至空白组的  $29.4\% \pm 2.2\%$  ( $P < 0.001$ ), 显示出  $\alpha$ -熊果苷在降低 ROS 活性方面具有显著效果。图 3B 的进一步的定量分析显示, 当 TSCP 质量浓度为  $0.10 \text{ mg/mL}$  时, ROS 含量极显著下降至空白组的  $74.0\% \pm 4.8\%$  ( $P < 0.01$ ); 而在  $1.00 \text{ mg/mL}$  质量浓度下, ROS 含量进一步降低至空白组的  $53.5\% \pm 4.4\%$  ( $P < 0.001$ )。综上所述结果表明, TSCP 在中高浓度下对 B16-f10 细胞内 ROS 活性具有显著抑制作用, 并呈现量效依赖性, 提示其在抗氧化治疗中的潜在应用价值。

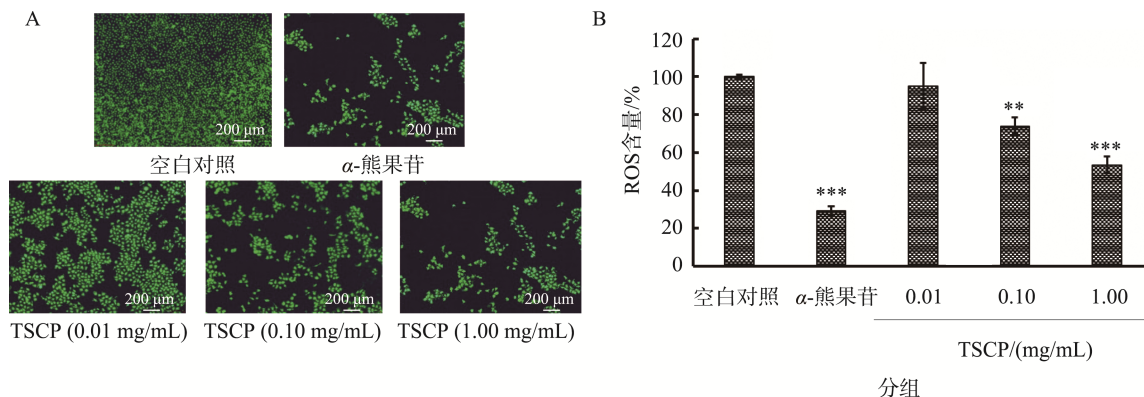
### 2.4 TSCP 对 B16-f10 细胞内 SOD、MDA、GSH-Px 活力或含量的影响

从图 4A 可知, 当给予阳性药  $\alpha$ -熊果苷后, B16-f10 细胞

内 SOD 的活力为  $(19.37 \pm 0.99) \text{ U/mg prot}$ , 较空白组 ( $14.84 \pm 0.11$ )  $\text{U/mg prot}$  有强极显著的上升 ( $P < 0.001$ ), 因此,  $\alpha$ -熊果苷提高了 SOD 的活力。给药  $0.1 \text{ mg/mL}$  TSCP 时, 细胞内 SOD 的活力为  $(15.81 \pm 0.51) \text{ U/mg prot}$ , 与空白组相比有极显著的上升 ( $P < 0.01$ ), 当给药质量浓度达到  $1.0 \text{ mg/mL}$  时, SOD 的活力为  $(16.62 \pm 0.62) \text{ U/mg prot}$ , 与空白组相比有强极显著上升 ( $P < 0.001$ )。

从图 4B 可见, 当给予  $\alpha$ -熊果苷后 MDA 的含量为  $(0.438 \pm 0.045) \text{ nmol/mg prot}$ , 较空白组 ( $0.626 \pm 0.018$ )  $\text{nmol/mg prot}$  有显著的下降 ( $P < 0.05$ ), 因此,  $\alpha$ -熊果苷有一定的降低 B16-f10 细胞内 MDA 含量的效果。而 TSCP 在质量浓度为  $0.01 \text{ mg/mL}$  与  $0.10 \text{ mg/mL}$  时 MDA 的含量分别为  $(0.462 \pm 0.043) \text{ nmol/mg prot}$  和  $(0.45 \pm 0.062) \text{ nmol/mg prot}$ , 与空白组相比有显著的下降 ( $P < 0.05$ ), 当给药质量浓度达到  $1.00 \text{ mg/mL}$  时, MDA 的含量为  $(0.352 \pm 0.051) \text{ nmol/mg prot}$ , 与空白组相比有强极显著下降 ( $P < 0.001$ )。

从图 4C 可知, 当给予阳性药  $\alpha$ -熊果苷后, 细胞内 GSH-Px 的含量为  $(288.43 \pm 2.90) \text{ ng/mL}$ , 较空白组 ( $256.93 \pm 1.40$ )  $\text{ng/mL}$  有极显著的上升 ( $P < 0.01$ ), 说明阳性药  $\alpha$ -熊果苷



注: A. 荧光染色效果图; B. 数据定量统计图。

图 3 DCFH-DA 染色法测定 B16-f10 细胞内 ROS 含量变化

Fig.3 Measurement of intracellular ROS levels in B16-f10 cells using the DCFH-DA staining method

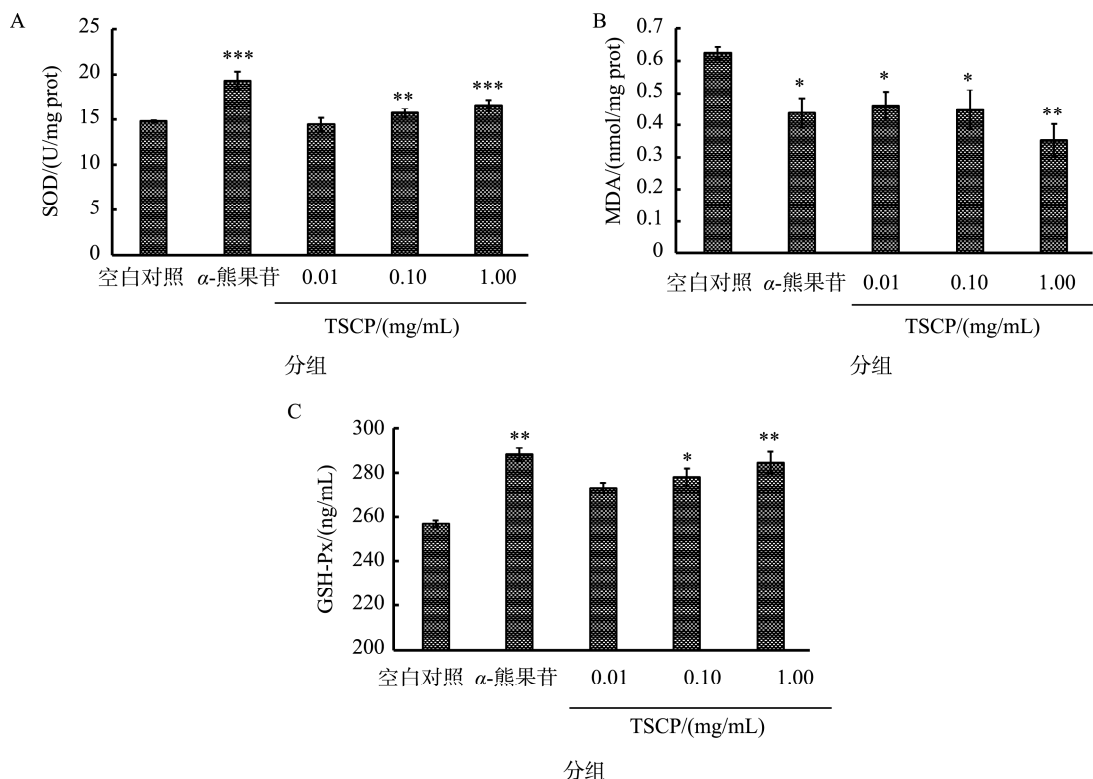


图 4 TSCP 对 B16-f10 细胞内 SOD (A)、MDA (B)、GSH-Px (C) 活力或含量的影响

Fig.4 Effects of TSCP on the activity or levels of SOD (A), MDA (B) and GSH-Px (C) in B16-f10 cells

有提高细胞内 GSH-Px 含量的作用; 在给予 0.10 mg/mL 的 TSCP 后, 细胞内 GSH-Px 的含量为(278.05±3.84) ng/mL, 与空白组相比有显著上升( $P < 0.05$ ); 当给药的 TSCP 质量浓度达到 1.00 mg/mL 时, GSH-Px 的含量为(284.55±4.99) ng/mL, 与空白组相比有极显著的上升( $P < 0.01$ )。因此, TSCP 在 0.10~1.00 mg/mL 质量浓度时具有较为显著提高 B16-f10 细胞内 GSH-Px 含量的效果。

综上, TSCP 在抗氧化方面展现了显著效果, 能够显著提高 B16-F10 细胞内 SOD 和 GSH-Px 的活性, 同时降低

MDA 含量, 表明其在增强抗氧化酶活性和减少脂质过氧化方面具有重要作用<sup>[14]</sup>。此外, TSCP 还有效抑制了酪氨酸酶的活性, 抑制黑色素的生成, 从而可能通过调节抗氧化和黑色素合成路径, 发挥护肤和抗衰老作用<sup>[15-16]</sup>。这些效果可能与 TSCP 中丰富的氨基酸成分和其生物活性密切相关, 具有作为功能性护肤成分的潜力<sup>[17]</sup>。

### 2.5 TSCP、NAC 对 HacaT 细胞存活率的影响

利用 CCK8 的实验检测 TSCP 在 0.01、0.10 和 1.00 mg/mL 质量浓度下对 HacaT 细胞的毒性, 结果如图 5A 所示,

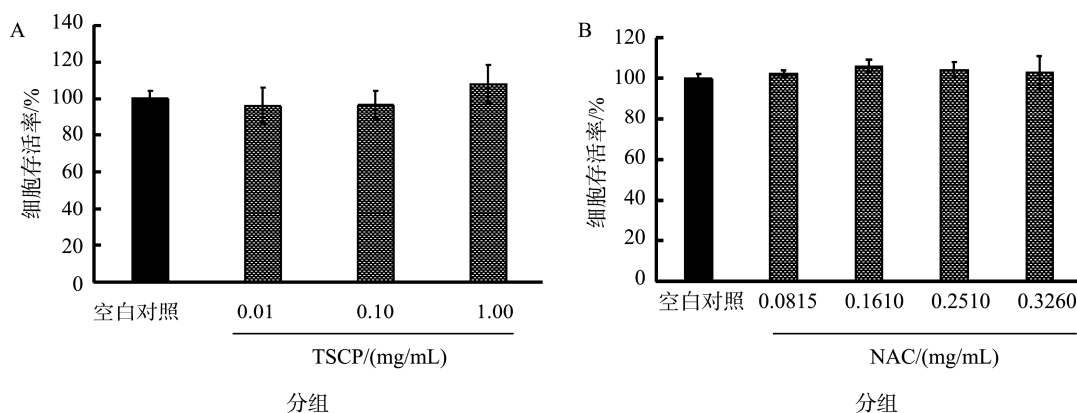


图 5 TSCP (A)、NAC (B) 对 HacaT 细胞存活率的影响

Fig.5 Effects of TSCP (A) and NAC (B) on the survival rate of HacaT cells

在检测的 TSCP 浓度范围内, 细胞存活率均大于 95%, 与正常组相比无显著性差异( $P>0.05$ )。因此, 以 0.01、0.10 和 1.00 mg/mL 的 TSCP 质量浓度进行后续实验。类似的, NAC 在 0.0815~0.3260 mg/mL 质量浓度范围内对 HacaT 细胞的毒性, 结果如图 5B 所示: NAC 处理 HacaT 细胞的存活率都在 100% 上下浮动, 且与正常组相比无显著差异( $P>0.05$ )。因此, 为使结果更为显著, 选择 0.3260 mg/mL 的 NAC 药物质量浓度进行后续实验。

## 2.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HacaT 细胞存活率的影响

建模时, 利用 CCK8 的法检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 100~200  $\mu$ mol/L 浓度范围内对 HacaT 细胞的毒性, 结果如图 6 所示: 随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增加, HacaT 细胞的存活率逐渐降低, 当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 150  $\mu$ mol/L 时, 细胞存活率为 51.13% $\pm$ 1.32%。因此, 选择 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度 150  $\mu$ mol/L 建立 HacaT 细胞氧化损伤模型。

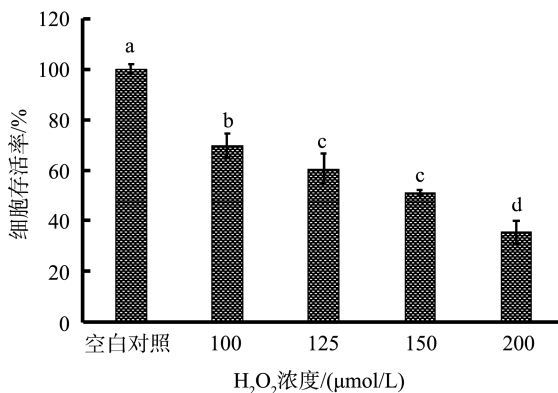


图 6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HacaT 细胞存活率的影响

Fig.6 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the survival rates of HacaT cells

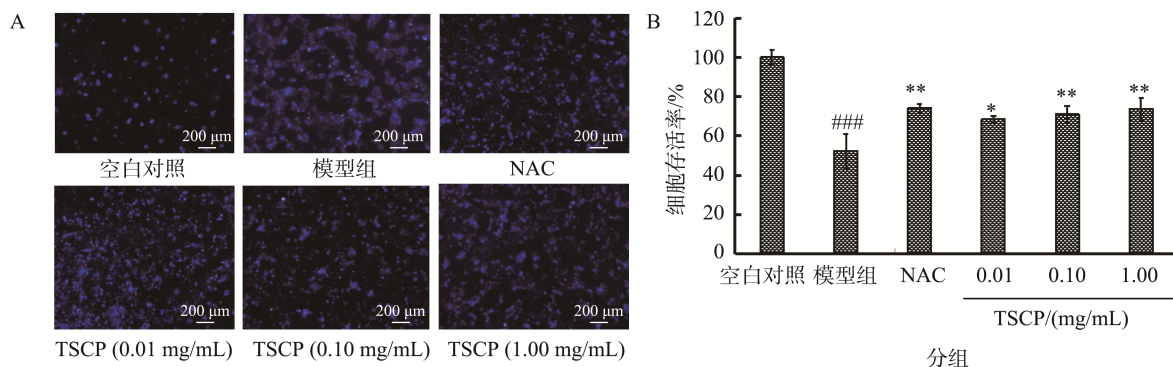
## 2.7 TSCP 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HacaT 细胞凋亡的影响和对氧化损伤 HacaT 细胞的保护作用

从图 7A 可知, 当给予 150  $\mu$ mol/L 浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后, 模

型组细胞的细胞核出现大量的固缩, 变形, 说明有大量的细胞凋亡; 而 TSCP 在 0.01、0.10 和 1.00 mg/mL 质量浓度下给药时, 细胞核固缩变形大量减少。表明 TSCP 可以一定程度减少细胞的凋亡, 具有一定的抑制氧化损伤 HacaT 细胞凋亡的能力。从图 7B 可知, 当给予 150  $\mu$ mol/L 浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后, 模型组的存活率为 52.30% $\pm$ 8.83%, 给予 0.3260 mg/mL 的 NAC 后, 细胞存活率提高到 74.15% $\pm$ 2.18%, TSCP 在 0.01、0.10 和 1.00 mg/mL 质量浓度下, 氧化损伤 HacaT 细胞的存活率剂量依赖性地分别提高到 68.50% $\pm$ 1.62%、70.96% $\pm$ 4.516% 和 73.66% $\pm$ 5.48%, 且与模型组具有显著差异( $P<0.05$ )。因此, 可以发现 TSCP 具有一定的抗氧化保护作用, 可剂量依赖性地修复 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤对 HacaT 细胞造成的伤害, 有助于减轻氧化应激所导致的细胞损伤与凋亡。

## 2.8 TSCP 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 HacaT 细胞衰老的影响

图 8A 结果显示, 150  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 模型组细胞中观察到大量蓝绿色荧光, 表明细胞发生显著的衰老现象。而在添加阳性对照 NAC (0.3260 mg/mL) 后, 细胞中蓝绿色荧光明显减少, 提示 NAC 能够有效减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞衰老。类似地, 随着 TSCP 浓度的增加, 细胞内蓝绿色荧光逐渐减少, 与空白组相比差异显著, 说明 TSCP 能够与 NAC 相似, 显著减缓 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的细胞衰老。进一步从图 8B 的定量分析可以看出, 150  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理导致模型组  $\beta$ -半乳糖苷酶含量显著增加, 达到 68.36% $\pm$ 1.26%, 相较于正常组的 23.4% $\pm$ 0.9% 呈强极显著升高( $P<0.001$ ), 这表明大量细胞进入衰老状态。而经 0.3260 mg/mL NAC 处理后,  $\beta$ -半乳糖苷酶含量强极显著降低至 33.08% $\pm$ 1.18% ( $P<0.001$ )。在给予不同质量浓度的 TSCP 处理后,  $\beta$ -半乳糖苷酶含量分别为 44.43% $\pm$ 1.62%、42.58% $\pm$ 1.35% 和 36.66% $\pm$ 1.48%, 与模型组相比均强极显著降低( $P<0.001$ ),



注: 与空白对照组相比,  $###P<0.001$ ; 与模型组相比,  $***P<0.001$ ,  $**P<0.01$  和  $*P<0.05$ , 下图同。

图 7 Hoechst 33342 法分析 TSCP 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HacaT 细胞凋亡的影响(A)和 TSCP 对氧化损伤 HacaT 细胞的保护作用(B)

Fig.7 Analysis of the effects of TSCP on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in HacaT cells using the Hoechst 33342 staining method (A) and the protective effects of TSCP on oxidative stress-damaged HacaT cells (B)

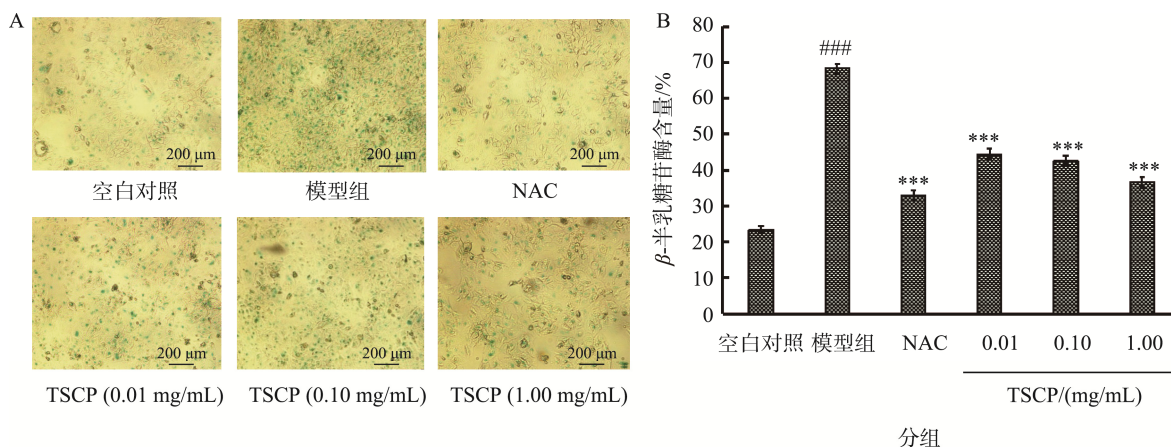


图 8 TSCP 缓解  $H_2O_2$  的氧化损伤造成的 Haca 细胞衰老直观图(A)和定量图(B)

Fig.8 Visualization of the alleviation of  $H_2O_2$ -induced oxidative damage and aging in Haca cells by TSCP (A) and the corresponding quantitative analysis (B)

并呈现剂量依赖性递减趋势。这表明 TSCP 能够有效抑制  $H_2O_2$  诱导的 Haca 细胞衰老, 展现出显著的抗衰老活性。综上所述, TSCP 在减缓氧化应激引起的细胞衰老方面具有显著的作用, 并且其抗衰老效果在一定范围内呈现剂量依赖性。

这一现象与已有文献的研究结果一致。例如, GEACHAN 等<sup>[18]</sup>发现胶原蛋白能够减缓  $H_2O_2$  诱导的细胞衰老, 类似地, CHI 等<sup>[19]</sup>也指出, 海洋多肽通过减轻氧化应激, 表现出抗衰老效果。与这些研究相比, TSCP 在减缓细胞衰老方面展现出了剂量依赖性, 这表明其抗衰老活性不仅与其化学成分有关, 还与其在细胞中的活性物质浓度密切相关。此外, TSCP 的抗衰老作用可能通过抑制氧化应激引发的损伤和调节衰老相关信号通路来实现。

## 2.9 TSCP 对氧化损伤 Haca 细胞内抗氧化酶 HO-1 和 NQO1 含量的影响

HO-1 是一种在氧化应激状态下上调的抗氧化酶, 能够通过分解血红素生成具有抗氧化和抗炎作用的代谢产物, 保护细胞免受氧化损伤。NQO1 是一种关键的抗氧化酶, 通过催化氧化还原反应减少细胞内氧化应激, 从而保护细胞免受氧化损伤。从图 9A 可以看出,  $150 \mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  处理后, 模型组细胞内抗氧化酶 HO-1 的含量显著下降至  $(17.81 \pm 0.13) \text{ ng/mL}$ , 而空白组的 HO-1 含量为  $(26.95 \pm 1.15) \text{ ng/mL}$ , 两者之间存在强极显著差异 ( $P < 0.001$ ), 这表明  $H_2O_2$  诱导了严重的氧化损伤, 导致细胞内抗氧化防御能力降低。经  $0.3260 \text{ mg/mL}$  的 NAC 处理后, HO-1 的含量强极显著上升至  $(24.79 \pm 1.16) \text{ ng/mL}$  ( $P < 0.001$ ), 证明 NAC 具有较强的抗氧化作用。给予  $0.01$ 、 $0.10$  和  $1.00 \text{ mg/mL}$  的 TSCP

后, HO-1 的含量分别为  $(22.51 \pm 1.32)$ 、 $(24.45 \pm 1.20)$  和  $(25.59 \pm 1.33) \text{ ng/mL}$ , 均与模型组相比极显著增加 ( $P < 0.01$ ), 表明 TSCP 具有明显的抗氧化活性, 能够提升细胞的抗氧化防御能力。同时, 从图 9B 还可以看出,  $H_2O_2$  处理后模型组 NQO1 的含量也显著下降至  $(8.89 \pm 0.23) \text{ ng/mL}$ , 较空白组  $(13.31 \pm 0.10) \text{ ng/mL}$  有强极显著差异 ( $P < 0.001$ ), 提示氧化应激导致了 NQO1 活性降低。经  $0.3260 \text{ mg/mL}$  NAC 处理后, NQO1 含量恢复至  $(12.78 \pm 0.44) \text{ ng/mL}$  ( $P < 0.001$ )。在 TSCP 处理组中, 随着质量浓度增加, NQO1 的含量逐渐上升,  $0.01$ 、 $0.10$  和  $1.00 \text{ mg/mL}$  TSCP 处理组的 NQO1 含量分别为  $(11.15 \pm 0.68)$ 、 $(11.76 \pm 0.56)$  和  $(12.35 \pm 0.09) \text{ ng/mL}$ , 强极显著高于模型组 ( $P < 0.001$ )。这一结果表明, TSCP 具有促进 NQO1 表达的能力, 从而增强细胞的抗氧化能力。

这些结果表明, TSCP 可能通过上调 HO-1 和 NQO1 的表达, 增强细胞的抗氧化防御机制, 从而减轻氧化损伤和炎症的产生, 具有较强的抗氧化作用和细胞保护效果。这与已有研究结果相类似, FUNES 等<sup>[20]</sup>研究表明, HO-1 对氧化应激引起的细胞损伤具有保护作用, 并在多种病理条件下表现出抗炎特性。特别是在一些慢性炎症性疾病中, HO-1 的上调被认为能够减轻细胞的氧化损伤, 从而缓解疾病的进展。YUAN 等<sup>[21]</sup>讨论了 Nrf2/HO-1 途径在氧化应激和慢性肠炎中的作用。Nrf2 激活能够增强 HO-1 的表达, 促进抗氧化反应, 减轻肠道的炎症反应。这一机制为治疗炎症性肠病提供了新的思路, 并表明 Nrf2/HO-1 通路在防止氧化应激损伤方面具有广泛的应用潜力。这些发现支持了 TSCP 在抗氧化应激和衰老防护中的潜力, 并为其在皮肤护理和抗衰老领域的应用提供了实验依据。

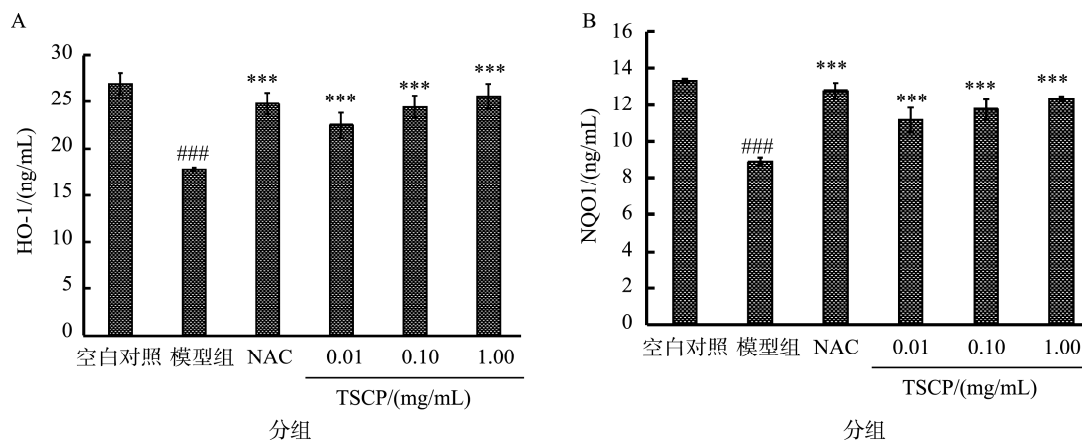


图9 TSCP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化损伤Hacat细胞内HO-1(A)和NQO1(B)含量的影响

Fig.9 Effects of TSCP on the levels of HO-1 (A) and NQO1 (B) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Hacat cells

### 3 讨论

#### 3.1 TSCP对B16-f10细胞内抗氧化指标的影响

本研究发现, TSCP能调节抗氧化酶SOD、氧化应激标志物MDA以及抗氧化酶GSH-Px, 显示出其具有良好的抗氧化性能, 这为TSCP在抗氧化领域的应用提供了有力的支持。

WANG等<sup>[22]</sup>的研究指出, 红唇鱼鳞胶原肽在相似浓度下显著提高了细胞内SOD活性, 达到(16.50±0.47) U/mg prot, 同时具有显著的细胞保护作用。此外, GONZÁLEZ-SERRANO等<sup>[23]</sup>的研究表明, 普通鲤鱼副产物胶原肽在0.10 mg/mL时可提升SOD活性至(15.70±0.60) U/mg prot。这些对比表明, TSCP对SOD活力的提升与其他研究一致, 中高浓度的TSCP具有良好的提高SOD活力的能力并呈量效依赖性, 展现出良好的抗氧化潜力。类似地, SUN等<sup>[24]</sup>的研究指出, 海洋红藻来源的蛋白水解产物中的抗氧化肽在相同浓度下显著降低了MDA含量至0.36±0.04 U/mg prot, 这进一步验证了TSCP在降低B16-f10细胞内MDA水平方面的显著效果, 且在高浓度下效果更为显著, 表明TSCP在抑制氧化应激标志物MDA方面具有显著作用。SIVARAMAN等<sup>[25]</sup>研究表明, 鱼胶原肽水解产物在相同浓度下可将GSH-Px活性提升至(283.12±3.54) ng/mL, 这与WANG等<sup>[26]</sup>的结果一致, 进一步支持了TSCP在0.10~1.00 mg/mL质量浓度范围内显著提升GSH-Px水平的能力。

#### 3.2 TSCP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Hacat细胞凋亡的保护作用

本研究发现, TSCP可以显著提高H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞内HO-1和NQO1的表达水平, 表明其在抗氧化应激中具有重要作用。WANG等<sup>[26]</sup>研究表明, 南极磷虾蛋白水解产物中的抗氧化肽在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞模型中能够显著恢复HO-1的含量, 表明其对氧化应激损伤具有显著的保护作用。本研究中1.0 mg/mL TSCP组的HO-1含量达到(25.59±1.33) ng/mL,

说明TSCP具有优于其他抗氧化肽的潜在应用价值。张佳怡等<sup>[27]</sup>的研究同样发现, 鹿茸肽在体外具有抗氧化活性, 在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Hacat细胞模型中显著提高了HO-1的表达水平, 进一步验证了抗氧化肽通过调控HO-1的表达来减轻氧化应激损伤的机制。此外, 鱼源抗氧化肽的结构与功能关系研究表明, 其在氧化应激条件下通过激活Nrf2/HO-1信号通路实现了细胞的抗氧化保护作用<sup>[28]</sup>。这一机制与本研究的结果一致, 本研究中1.00 mg/mL TSCP处理后, HO-1的含量显著升高, 显示出良好的抗氧化能力。NQO1的表达与氧化应激的减轻密切相关, LAMMINPÄÄ等<sup>[29]</sup>的研究指出, 海洋来源的生物活性成分能够显著提高Nrf2信号通路相关基因(包括NQO1)的表达, 从而改善细胞抗氧化能力。此外, CAI等<sup>[30]</sup>的研究表明, 河豚皮胶原水解产物中的ACE抑制肽能够显著提升NQO1的水平, 有助于减轻氧化应激损伤。本研究中, 1.00 mg/mL TSCP组的NQO1水平为(12.35±0.09) ng/mL, 与上述文献结果基本一致, 进一步证明了TSCP的抗氧化活性及其通过调控Nrf2/HO-1信号通路减轻氧化应激损伤的机制。

综上所述, 本研究结果与文献报道的抗氧化肽作用机制一致, TSCP能够显著提升H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞内HO-1和NQO1的表达, 说明其通过激活细胞的内源性抗氧化系统, 在减轻氧化应激和保护细胞方面表现出良好的作用, 其效力在多项文献对比中均表现突出, 表明其作为天然抗氧化剂的潜在应用价值。

### 4 结论

本研究证实了TSCP在抑制黑色素生成方面的显著效果。TSCP通过增强Hacat细胞内抗氧化酶活性以及降低氧化应激标志物的水平, 有效缓解了氧化损伤。这些发现表明, TSCP具有作为一种天然美白成分的潜力, 为相关皮肤护理产品的研发提供了理论基础。考虑到TSCP的天然来

源, 未来的研究还应关注其在综合皮肤治疗方案中的应用潜力, 或与其他天然成分的协同效应, 为促进皮肤健康和美丽提供更为安全有效的解决方案。

### 参考文献

- [1] HU Z, SHA X, ZHANG L, *et al.* Effect of grass carp scale collagen peptide FTGML on cAMP-PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in B16F10 melanoma cells and correlation between anti-melanin and antioxidant properties [J]. *Foods*, 2022, 11(3): 391.
- [2] LIU Y, QIN D, WANG H, *et al.* Effect and mechanism of fish scale extract natural hydrogel on skin protection and cell damage repair after UV irradiation [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2023, 225: 113281..
- [3] 杨环毓, 杜鹃, 冯凤琴. 3 种肽对细胞氧化损伤的保护作用及促细胞增殖能力比较[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(9): 332–338.
- YANG HY, DU J, FENG FQ. Comparison of the protective effects of 3 kinds of peptides against oxidative cell damage and cell proliferation-promoting ability [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(9): 332–338.
- [4] BYUN KA, LEE SY, OH S, *et al.* Fermented fish collagen attenuates melanogenesis via decreasing UV-induced oxidative stress [J]. *Marine Drugs*, 2024, 22(9): 421.
- [5] SONG B, LIU D, LIU TC, *et al.* The combined effect of commercial tilapia collagen peptides and antioxidants against UV-induced skin photoaging in mice [J]. *Food & Function*, 2023, 14(13): 5936–5948.
- [6] XIN, X., YANG, J., LIU, G., *et al.* Effects of collagen peptides from cod (*Gadus*) skin on delaying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence of 2BS cells [J]. *Journal of aquatic food product technology*, 2024, 33(4), 291–302.
- [7] HE YL, LIN L, ZHENG H, *et al.* Potential anti-skin aging effect of a peptide AYAPE isolated from *Isochrysis zhanjiangensis* on UVB-induced HaCaT cells and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced BJ cells [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2022, 233: 112481.
- [8] PARK C, CHA HJ, HONG SH, *et al.* Protective effect of phloroglucinol on oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis through activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in HaCaT human keratinocytes [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(4): 225.
- [9] LEE SG, HWANG JW, KANG H. Antioxidant and skin-whitening efficacy of a novel decapeptide (DP, KGYSSYICDK) derived from fish by-products [J]. *Marine Drugs*, 2024, 22(8): 374.
- [10] ZHANG X, ZHUANG H, WU S, *et al.* Marine bioactive peptides: anti-photoaging mechanisms and potential skin protective effects [J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2024, 46(2): 990–1009.
- [11] SONG HH, HONG KB, KIM S, *et al.* Effects of fish collagen on hairless mice skin photoaging induced by ultraviolet irradiation via regulation of the TGF- $\beta$  signaling pathway: Anti-photoaging effect of fish collagen in UVB-induced hairless mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 105: 105554.
- [12] 王共明, 张健, 李来好, 等. 仿刺参精、卵多肽体外抗氧化及对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导巨噬细胞氧化损伤的保护作用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(15): 4933–4941.
- WANG GM, ZHANG J, LI LH, *et al.* Antioxidative effects of *Apostichopus japonicus* sperm and egg polypeptide in vitro and their protective effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced macrophage oxidative damage [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(15): 4933–4941.
- [13] EOM SJ, KIM JH, RYU AR, *et al.* Skin improvement effects of ultrasound-enzyme-treated collagen peptide extracts from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) skin in an in vitro model [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(17): 9300.
- [14] XU B, DONG Q, YU C, *et al.* Advances in research on the activity evaluation, mechanism and structure-activity relationships of natural antioxidant peptides [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(4): 479.
- [15] SIAHAAN EA, PANGESTUTI R, KIM SK, *et al.* Potential cosmetic active ingredients derived from marine by-products [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(12): 734.
- [16] NURILMALA M, HIZBULLAH HH, KARNIA E, *et al.* Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) skin [J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(2): 98.
- [17] ALVES AL, MARQUES ALP, MARTINS E, *et al.* Cosmetic potential of marine fish skin collagen [J]. *Cosmetics*, 2017, 4(4): 39.
- [18] GEAHCHAN S, BAHARLOUEI P, RAHMAN A. Marine collagen: A promising biomaterial for wound healing, skin anti-aging, and bone regeneration [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(1): 61.
- [19] CHI CF, WANG B. Marine bioactive peptides—structure, function and application [J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(5): 275.
- [20] FUNES SC, RIOS M, AYLEEN, *et al.* Naturally derived heme-oxygenase 1 inducers and their therapeutic application to immune-mediated diseases [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1467.
- [21] YUAN L, WANG Y, LI N, *et al.* Mechanism of action and therapeutic implications of Nrf2/HO-1 in inflammatory bowel disease [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(8): 1012.
- [22] WANG WY, ZHAO YQ, ZHAO GX, *et al.* Antioxidant peptides from collagen hydrolysate of redlip croaker (*Pseudosciaena polyactis*) scales: Preparation, characterization, and cytoprotective effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-damaged HepG2 cells [J]. *Marine drugs*, 2020, 18(3): 156.
- [23] GONZÁLEZ-SERRANO DJ, HADIDI M, VARCHEH M, *et al.* Bioactive peptide fractions from collagen hydrolysate of common carp fish byproduct: Antioxidant and functional properties [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(3): 509.
- [24] SUN KL, GAO M, WANG YZ, *et al.* Antioxidant peptides from protein hydrolysate of marine red algae *Euclima cottonii*: preparation, identification, and cytoprotective mechanisms on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damaged HUVECs [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 21(13): 791248.
- [25] SIVARAMAN K, SHANTHI C. Role of fish collagen hydrolysate in attenuating inflammation—An *in vitro* study [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(9): e13876.
- [26] WANG YZ, ZHAO YQ, WANG YM, *et al.* Antioxidant peptides from antarctic krill (*Euphausia superba*) hydrolysate: preparation, identification and cytoprotection on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 86: 104701.
- [27] 张佳怡, 李春楠, 金泽成, 等. 鹿茸肽的酶解工艺优化及其体外抗蓝光活性评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(16): 386–394.
- ZHANG JY, LI CN, JIN ZC, *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis process of antler antler peptide and evaluation of anti-blue light activity *in vitro* [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(16): 386–394.
- [28] 左依瑾, 于子淇, 申雪晴, 等. 鱼源抗氧化肽的结构与其功能关系研究进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(14): 419–429.
- ZUO YJ, YU ZQ, SHEN XQ, *et al.* Research progress on the relationship between structure and function of fish derived antioxidant peptides [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(14): 419–429.
- [29] LAMMINPÄÄ I, AMEDEI A, PAROLINI C. Effects of marine-derived components on cardiovascular disease risk factors and gut microbiota diversity [J]. *Marine Drugs*, 2024, 22(11): 523.
- [30] CAI S, PAN N, XU M, *et al.* ACE inhibitory peptide from skin collagen hydrolysate of Takifugu bimaculatus as potential for protecting HUVECs injury [J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(12): 655.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)