用于伤口愈合的蹄甲多肽有效组分筛选及温敏凝胶制备研究

赵怡馨[1], 卢灵芝[2], 杨再清[2], 吴明星[2], 何　浩[2], 杨小红[2], 刘　萍[2], 林　萍[3], 杨荣平[1,2*], 柯秀梅[4*]

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137;　2. 西南大学药学院/中医药学院, 重庆 400715;　3. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046;　4. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

摘要: 副产品猪蹄甲在中医药理论中, “辟一切恶疮”, 具有止血、凝血和抗炎等药理作用, 提示对皮肤创伤可能有积极作用。本研究通过酶解法从猪蹄甲中酶解出不同分子质量的蹄甲多肽 (hoof nails peptides, HNPs), 采用创面愈合试验从低于 10 kDa (HNP I)、3～10 kDa (HNP II) 和高于 10 kDa (HNP III) 3 个分子质量 HNPs 中筛选出具有较强促进成纤维细胞增殖和胶原蛋白修复能力的组分, 通过创面愈合率、H&E 和 Masson 染色评估创面愈合形态及胶原沉积情况, ELISA 检测转化生长因子 β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 和内皮血管生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 水平, 并将最佳组分制备成能适应不规则伤口的温敏凝胶, 评估该凝胶流变学特性、相变温度及内部结构。结果发现 HNP II 组分伤口愈合率较空白基质组显著提高 ($P < 0.05$), 组织中生长因子 TGF-β1、VEGF 表达水平显著提高 ($P < 0.05$); 将对创面修复能力最强的 HNP II 组分制备的温敏凝胶具有良好的生物相容性, 为蹄甲多肽制剂的开发和应用提供试验支持。动物实验经西南大学实验动物伦理委员会批准, 且实验均按相关指导原则和规定进行, 批准号: IACUC-20231218-01。

关键词: 猪蹄甲; 多肽; 凝胶; 伤口愈合; 流变性

中图分类号: R943　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2025)06-1930-08

Identification of active hoof nail peptides for wound healing and development of temperature-sensitive gels

ZHAO Yi-xin[1], LU Ling-zhi[2], YANG Zai-qing[2], WU Ming-xing[2], HE Hao[2], YANG Xiao-hong[2], LIU Ping[2], LIN Ping[3], YANG Rong-ping[1,2*], KE Xiu-mei[4*]

(*1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;　2. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;　3. College of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;　4. College of Pharmacy, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China*)

Abstract: Pig hoof nails represent an underutilized byproduct of pork processing. According to traditional Chinese medical theory, pig hoof nails are believed to contain compounds that may exhibit pharmacological properties such as promoting hemostasis, aiding coagulation, and reducing inflammation, which could potentially benefit the healing of skin wounds. In this study, different molecular masses of hoof nail peptides (HNPs) were extracted from porcine hoof nails. Wound healing assays were employed to identify HNPs that significantly promote fibroblast proliferation and collagen synthesis across three molecular weight ranges: less than 10 kDa (HNP I), 3−10 kDa (HNP II), and more than 10 kDa (HNP III). We formulated HNP II into a temperature-sensitive gel designed to conform to uneven wound surfaces. This supports the development and application of hoof nail

收稿日期: 2024-09-10;　修回日期: 2024-12-25.

*通讯作者 E-mail: rongpingyang@swu.edu.cn; 191009@cqmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1025

peptide formulations. The animal operation was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Southwest University (No: IACUC-20231218-01). All experiments were conducted in accordance with relevant guidelines and regulations.

Key words: pig trotter; peptide; gel; wound healing; rheological property

皮肤是人体最大的器官, 对机体内外环境起着连接和物理屏障双重作用, 由表皮和下层真皮组成[1]。在日常生活中, 皮肤不可避免会受到损伤[2], 一旦受损, 皮肤对有害刺激的防御能力就会丧失, 从而导致一系列的不良反应, 如感染、休克, 甚至死亡。而伤口愈合是一个复杂过程, 经历出血、炎症、增殖和重塑4个阶段[3,4], 每个过程在皮肤修复重建中都起着至关重要的作用[5]。目前临床上创面修复的药物包括小分子化合物和生长素类, 这些药物往往不稳定、难以合成、成本高甚至可能导致伤口过度修复[6]。因此开发低成本高活性的药物至关重要。研究发现, 动物多肽由于良好的生物相容性、物理学功能、生物活性、特异性[7]和营养功能, 在皮肤创伤的治疗中发挥多种药理作用, 如从废母鸡肌肉中提取的具有抗炎作用的生物活性肽[8]、用于伤口愈合的口服鳕鱼胶原蛋白肽[9]、抗氧化增强免疫活性的姬松茸多肽[10], 以及来自青蛙皮肤具有潜在的促进伤口愈合活性的胶原肽[11]等。同时, 动物来源多肽易生产、价格便宜, 被认为是皮肤伤口愈合的潜在药物[12]。

猪蹄甲又称之为豕甲、猪悬蹄, 为猪科猪属动物猪 (*Sus scrofa domestica Brisson*) 的干燥蹄甲, 被《神农本草经》列为下品。《本草纲目》记载猪蹄甲具有化痰定喘、解毒生肌的功效。据报道, 猪蹄甲主要含角蛋白、肽类、氨基酸类、酯类、糖类、甾体化合物及无机盐等成分[13], 具有止血、促凝血[14]、泌乳[15]、抗微循环障碍[16]、抗炎[17]等药理作用。多肽作为猪蹄甲的主要成分之一, 含有丰富的氨基酸成分, 该成分对创面修复可能有积极作用, 而关于该成分相关的药理作用却鲜有报道。

本研究采用超滤法分离不同组段的蹄甲多肽, 构建皮肤创面模型筛选止血及创面愈合效果最好的组段并将其加载到温敏凝胶中, 采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 和傅里叶红外光谱表征凝胶, 同时考察其流变学特征和生物相容性。该研究旨在为蹄甲多肽制剂开发和应用提供试验支撑。

材料与方法

试药 猪蹄甲购自珈祁堂, 由西南大学药学院专家鉴定为来源于猪科动物猪 (*Sus scrofa domestica Brisson*) 的蹄甲; 胰蛋白酶 (批号: S10032) 购自上海源叶生物科技有限公司; 云南白药 (批号: PCF2301) 购自云南白药集团有限公司; 泊洛沙姆407 (批号: 2231104005)、泊洛沙姆188 (批号: 1229P021)、聚乙二醇6000 (批号: 1228W031) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 转化生长因子β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 试剂盒 (批号: 202310)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 试剂盒 (批号: 202310) 购自上海源桔生物科技中心; 钙黄绿素-AM/PI (批号: 24088221)、CCK-8试剂盒 (批号: 23363120) 购自Biosharp白鲨生物; 小鼠成纤维细胞 (L929) 购自中国科学院上海库;

动物 SPF雄性小鼠, 体重20 ± 2 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [许可证号: SCXK (湘) 2019-0004]。动物实验获西南大学实验动物伦理委员会的批准 (批准号IACUC-20231218-01)。

仪器 高速离心机 (TG16-WS, 湖南湘仪有限公司); 傅里叶变换红外扫描仪 (Spectrum Two, PerkinElmer股份有限公司); 模块化旋转黏度测定仪 (MCR302, 奥地利安东帕仪器公司); 荧光倒置显微镜 (尼康Ti-s, 日本尼康); 氨基酸分析仪 (L-880011000, 日本日立); 酶标仪 (ELX808, 美国基因有限公司); 扫描电镜 (Phenom PRO, 美国菲诺姆公司)。

样品制备 猪蹄甲清洗后烘干, 粉碎, 与水按1∶4比例 (*w*/*v*) 的固液比混合, 调节pH 6.5, 加入胰蛋白酶。加热到60 ℃, 酶解2 h, 取出, 加热至100 ℃灭活后离心取上清液, 得到蹄甲多肽液 (HNPs)。先后采用10和3 kDa的超滤管对液体进行超滤, 得到 < 10 kDa (HNP I)、3～10 kDa (HNP II) 和 > 10 kDa (HNP III) 的样品, 冷冻干燥。

分子质量测定 采用凝胶渗透色谱法 (gel permeation chromatography, GPC) 测定分子质量 (Mw)。称取冷冻干燥的多肽样品适量, 将样品在水中进行溶解, 质量浓度5 mg·mL^{-1}, 溶解之后过0.45 μm的滤膜, 待用。色谱条件: 0.1 mol·L^{-1} $NaNO_3$ + 0.05%NaN_3溶解于纯净水中, 流速0.6 mL·min^{-1}, 进样量20 μL; TSK凝胶色谱柱。利用GPC软件拟合计算出样品Mw。

不同分子质量HNPs对小鼠创面作用的比较 将体重25～30 g的健康成年雄性KM小鼠置于控制温度为24 ± 1 ℃的室内, 光照/黑暗循环12 h, 并喂食标准鼠

类食物和水, 适应性喂养1周。将小鼠随机分为5组, 每组12只, 分别为空白基质组 (取泊洛沙姆407, 泊洛沙姆188和PEG6000适量加入蒸馏水制备成温敏型空白凝胶)、HNP组、HNP I组、HNP II组、HNP III组 (含药组分别称取药物30 mg·mL^{-1}于空白凝胶基质中涂抹给药)。采用戊巴比妥 (50 mg·kg^{-1}) 麻醉小鼠, 用剃毛器将小鼠背部皮肤剃光并消毒, 采用6 mm打孔器切下小鼠皮肤, 建立小鼠全切创伤模型。每日早晚在小鼠背部涂抹给药2次, 持续给药直至伤口愈合, 每次给予凝胶0.2 mL。造模当天对伤口进行观察拍照, 后每隔2天对创面进行拍照至12天、测量创面大小并记录, 根据公式 (1) 计算创面愈合百分比。

$$\text{创面愈合率} = (D_0 - D_n) / D_0 \times 100\% \quad (1)$$

其中, D_0为造模当天创面面积, D_n为第n天创面面积。

组织学评估 分别在造模后第3、7和12天处死小鼠, 取皮肤放在4%的多聚甲醛溶液中固定24 h, 分别用H&E和Masson染色法对小鼠皮肤进行染色, 采用尼康Ti-s010801显微镜进行观察并拍摄。

ELISA检测生长因子 将收集到的皮肤组织进行匀浆, 在4 ℃下10 000 r·min^{-1}离心15 min, 取上清液, 根据说明书要求, 采用ELISA试剂盒对小鼠皮肤中的VEGF和TGF-β1进行定量分析。

HNP II的氨基酸组成 精密称取HNP II组分50.2 mg于水解管中, 加入10 mL浓盐酸 (6 mol·L^{-1}) 进行酸水解, 通入氮气将试管中的空气排尽后密封, 110 ± 1 ℃下处理22 h, 取1 mL, 调节温度至60 ℃, 恒温水浴蒸干裂解液, 加入0.02 mol盐酸4 mL稀释4倍, 用0.22 μm滤膜滤过, 在日立L-8800氨基酸分析仪上分析其组成。

温敏凝胶制备 课题组前期已经对温敏凝胶处方进行优化, 本次实验在前期实验基础上制备凝胶并对凝胶的性质进行表征。称取21% (*w*/*v*) P407、4% (*w*/*v*) P188和2% (*w*/*v*) PEG6000于西林瓶中, 加入3%的HNP II的溶液, 溶胀过夜, 得到HNP II-Gel。

扫描电子显微镜 将温敏型原位凝胶制成冻干粉, 取适量凝胶粉末, 喷金, 加速电压3.0 kV, 采用场发射扫描电镜观察凝胶表面的微观结构形态及其孔径大小。

流变学研究

应变扫描分析 采用流变仪研究HNP II-Gel的流变特性, 分析凝胶在不同剪切速率和温度下的储能模量 (G′) 和损耗模量 (G″)。取适量HNP II-Gel置于平行上, 在振荡扫描模式下, 设置扫描条件为: 应变范围0.01%～100%, 角频率10 rad·s^{-1}, 温度35 ℃, 测试凝胶的G′和G″之间的关系曲线。

相变温度测定 取适量HNP II-Gel置于平板上, 设置温度变化为20～50 ℃, 升温速率为2 ℃·min^{-1}, 测试G′、G″随温度变化的曲线, 测定相变温度, 曲线交点处温度即视为胶凝温度。

频率扫描分析 在振荡扫描模式下, 设置扫描条件, 温度设定为35 ℃, 应变为1%, 在0.01～100 Hz对HNP II-Gel进行扫描。

傅里叶红外分析 将HNP II提取液、Gel空白基质液和HNP II-Gel溶液冻干, 粉碎成粉末, 用傅里叶红外光谱仪在400～4 000 cm^{-1}内进行投射扫描测试。

细胞相容性实验 通过CCK-8法检测水凝胶对小鼠成纤维细胞 (L929) 的细胞毒性。以细胞活力为评价指标, 对水凝胶进行细胞毒性试验。首先, 将水凝胶浸泡在DMEM培养基中24 h, 得到水凝胶提取物, 稀释至不同质量浓度50、100、200、500 μg·mL^{-1}; 取对数生长阶段的L929细胞, 以每孔5×10^{3}个细胞接种在96孔板中, 并在完全培养基DMEM (补充有10%胎牛血清和1%青霉素) 中培养数小时后, 用水凝胶提取物替换每个孔的完全培养基100 μL以继续培养24、48 h。向每个孔中加入10 μL CCK-8溶液2 h后于450 nm处测定吸光度值 (A)。根据公式 (2) 计算L929的细胞存活率 (CV)。

$$\text{CV}\ (\%) = (A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100\% \quad (2)$$

其中, A_s为加药实验组吸光度值; A_b为空白组的吸光度值; A_c为对照组的吸光度值。

对L929细胞进行活/死染色测定, 对L929细胞进行预处理后, 按照每毫升1×10^{4}个细胞接种在24孔板中, 分别用不同质量浓度 (50、100、200、500 μg·mL^{-1}) 的水凝胶500 μL孵育24、48 h。将培养基吸出, 加入钙黄绿素AM和PI一起孵育20 min。通过荧光倒置显微镜观察细胞的染色情况。

统计学分析 实验数据以均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。采用SPSS 26软件进行非参数Wilcoxon检验, P值小于0.05具有统计学意义。

结果

1 分子质量测定

进一步对超滤后的不同分子质量多肽组分进行测定, 发现HNP I、HNP II、HNP III的重均分子质量分别为8.104×10^3、9.435×10^3、3.142×10^4, 其分布范围分别为90%、72.53%和56.76%。Mw/Mn反映样品间分子质量分布的宽度, 值越大, 表示分子质量分布越广, 值越小, 表示分子质量分布越窄越集中, 其中HNP II和HNP III的数均分子量/重均分子量 (Mw/Mn) < 2.0, 说明两者均具有较窄的分子质量分布区间, 而HNP I由于是

HNP II与 < 3 kDa的结合, 因此其分子质量分布较宽。

2 不同分子质量HNPs对小鼠创面的影响

2.1 不同分子质量HNPs的小鼠伤口愈合率 在给药后的第3、5、7、10、12天对创面部位进行拍照记录, 结果表明, 各组小鼠创面面积随着时间的推移均呈现出不同程度的愈合 (图1)。通过对各组小鼠伤口愈合率进行计算 (图2A), 在第3天小鼠创面开始结痂, 创面边缘皮肤开始收缩, 与空白基质组 (control) 相比, 局部给予HNP II组可显著促进创面愈合 ($P < 0.05$), 愈合率达到 (43.1 ± 0.14)%。第7天开始, HNP II组愈合率达到 (84.3 ± 0.07)%, 与空白基质组相比有显著提高 ($P < 0.05$), 且优于HNP组。第12天, HNP II组处理的小鼠皮肤组织基本愈合。纵观整个皮肤组织愈合期间, 各给药组的伤口愈合效果都较空白基质组 (control) 好, 其中HNP II组表现出了最佳的创面愈合效果。

为了探讨不同分子质量HNPs对伤口愈合的作用机制, 测定了VEGF和TGF-β1的水平。在第3天和第7天, 不同分子质量的HNPs组VEGF (图2B) 和TGF-β1

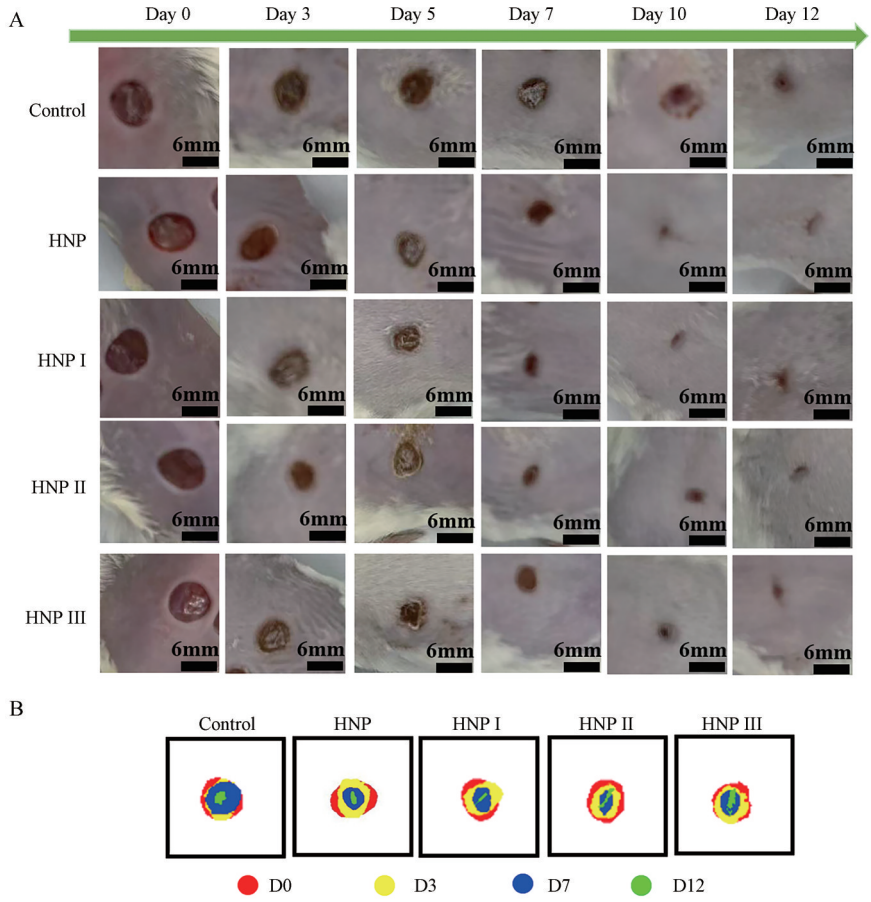


Figure 1 Effects of different molecular weight hoof nails peptides (HNPs) on wound healing. A: Wound healing pictures of mice in each group; B: Image J calculation of wound size in different treatment groups

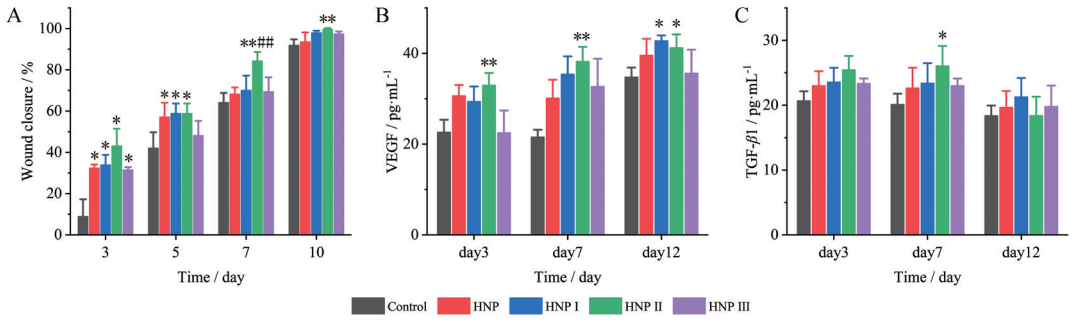


Figure 2 Effect of different molecular weight HNPs on mouse traumatic skin cytokines. A: Percentage of wound healing (calculated every 2 days); B: Vascular endothelial growth factor (VEGF); C: Transforming growth factor-β1 (TGF-β1). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* control group (blank substrate group); $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* HNP group

(图2C) 的表达均高于空白基质组。其中, HNP II组显著促进了VEGF和TGF-β1的表达 ($P < 0.05$)。在第12天时, 小鼠伤口基本愈合, 各组的VEGF和TGF-β1无显著性差异。即HNP II可以提高愈合过程中VEGF和TGF-β1的水平。

2.2 组织学评估 皮肤组织H&E染色结果如图3所示, 给药第3天, 空白基质组、HNP组、HNP I组、HNP II组、HNP III组创面均出现一定程度的炎症细胞浸润, 其中HNP I和HNP II组的炎症细胞浸润比空白基质组少。第7天各组开始陆续出现血管组织, 在第12天内, HNP II恢复最好, 毛囊再生明显, 没有明显的炎症细胞浸润。皮肤组织Masson染色结果如图4所示, 给药第7天, 胶原纤维含量增加, 与其他组相比, HNP II组胶原沉积最显著, 表明HNP II组可以显著促进再上皮化和伤口愈合。

3 HNP II氨基酸分析

HNP II的氨基酸组成和含量如表1所示, 在HNP II中发现16种氨基酸, 每50 mg HNP II含谷氨酸2.86 mg、甘氨酸3.02 mg、异亮氨酸1.87 mg, 这三者占比最高, 其中必需氨基酸 (不含色氨酸) 占总氨基酸的35.85%, 支链氨基酸占总氨基酸的18.43%, 疏水氨基酸占总氨基酸的31.81%, 亲水氨基酸占总氨基酸的29.71%。HNP II氨基酸含量丰富, 具有较高的营养价值, 可以为创面提供营养环境, 从而促进创面修复。表1为HNP II的氨基酸组成分布。

4 温敏凝胶的表征

4.1 扫描电镜 如图5A所示, 水凝胶在室温下呈液态。当温度高于35 ℃时, 水凝胶溶液可以从溶液完全转变为凝胶状态; 当环境温度低于35 ℃时, 水凝胶又会恢复到溶液状态。通过SEM观察不同倍镜下的凝胶表面微观结构形态及其孔径大小, 发现空白凝胶如图5B所示, 结构较松散, 内部存在有大量孔隙, 呈多孔相连的网架状, 该结构有利于对药物进行包埋, 促进药物在凝胶中释放; 负载肽的载药凝胶如图5C所示, 原有的孔隙结构变得光滑, 质地紧密且孔隙较少, 表明HNP II与凝胶接触紧密, 能很好地填充在凝胶的孔隙中。

4.2 流变学分析 在频率扫描的过程中 (图5D、E), G′的曲线始终高于G″, 样品以弹性形变为主, 且未表

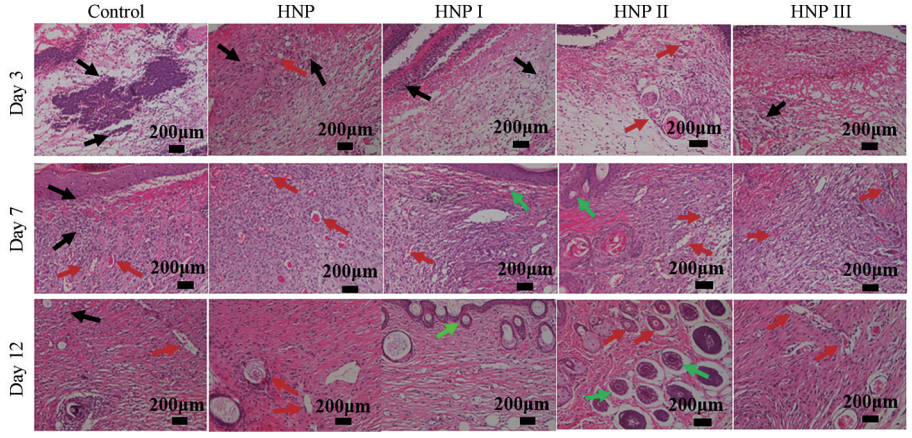


Figure 3 Tissue H&E staining results after different times of skin wound administration. Black arrows represent inflammatory factors, red arrows represent neovascularisation and green arrows represent hair follicles

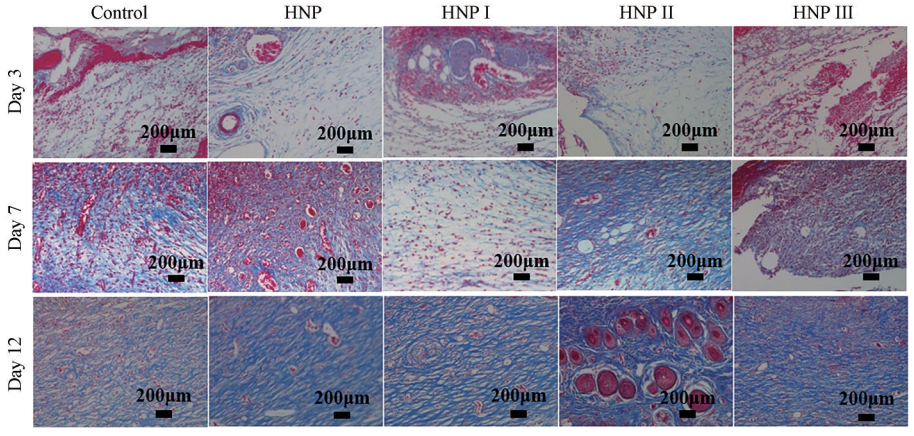


Figure 4 Masson staining results of tissues after different times of administration of drugs to skin wounds

Table 1 Distribution of amino acid composition of HNP II (50 mg)

Amino acid	Contain/mg	Percent/%
Aspartic acid	1.79	9.58
Threonine	0.82	4.39
Serine	1.72	9.16
Glutamic acid	2.86	15.27
Glycine	3.02	16.13
Alanine	0.14	0.76
Valine	0.82	4.38
Methionine	0.36	1.92
Leucine	0.76	4.06
Isoleucine	1.87	9.99
Tyrosine	0.92	4.89
Phenylalanine	0.84	4.48
Lysine	1.19	6.38
Histidine	0.04	0.26
Arginine	1.32	7.03
Proline	0.24	1.33

现出频率依赖性, 说明凝胶拥有稳定的三维状结构。如图5F、G所示, 当温度达到35 ℃左右时, G′与G″相交, 交点即为凝胶相变温度。在此相变温度之前, 样品G′ (损耗模量) > G′ (储能模量), 样品呈现流体性质, 当G′ = G″时, 样品凝胶结构开始形成, 随后G′ > G″, 凝胶状态区域稳定。结果表明, 当温度达到35 ℃时, 凝胶由液体转变为稳定的凝胶固体状态, 可以通过皮肤与环境温度差给药。这些结果表明, 水凝胶在体温下可实现原位凝胶的转变, 用作伤口敷料时, 通过皮肤与环境温度差给药可快速覆盖和凝胶以封闭伤口, 阻止外界细菌进入, 提高治疗效果。

4.3 傅里叶红外光谱 傅里叶红外光谱图如图5H所示, Gel空白凝胶在3 200～3 500 cm^{-1}处表现为-OH伸缩振动, 1 300～1 500 cm^{-1}为-CH_3的不对称变角峰, HNP II在1 500～1 600 cm^{-1}波段区间有酰胺二带特征峰, 1 600～1 700 cm^{-1}波段区间为酰胺一带特征峰, 该波段与蛋白质二级结构有关。HNP II-Gel的特征光谱中均观察到上述特征峰, 表明HNP II已被加载到水凝胶中。

5 细胞相容性试验

采用CCK-8评估L929细胞在不同质量浓度HNP II-Gel下的细胞活力。水凝胶的毒性小对于细胞保持健康和活性至关重要。如图5I所示, L929细胞在50～500 μg·mL^{-1}不同质量浓度的浸提物下表现出100%以上的高活力, 验证了该水凝胶作为伤口敷料具有生物安全性。与对照组相比, 不同水凝胶质量浓度下的细胞在持续孵育24和48 h后, 其存活率都较高。对于活死细胞染色 (图5J), 大多数细胞在与不同质量浓度的水凝胶下孵育都表现出活力。同时, 未观察到细胞形态的显著变化。结果表明该水凝胶没有细胞毒性。在体应用中具有良好的细胞相容性。

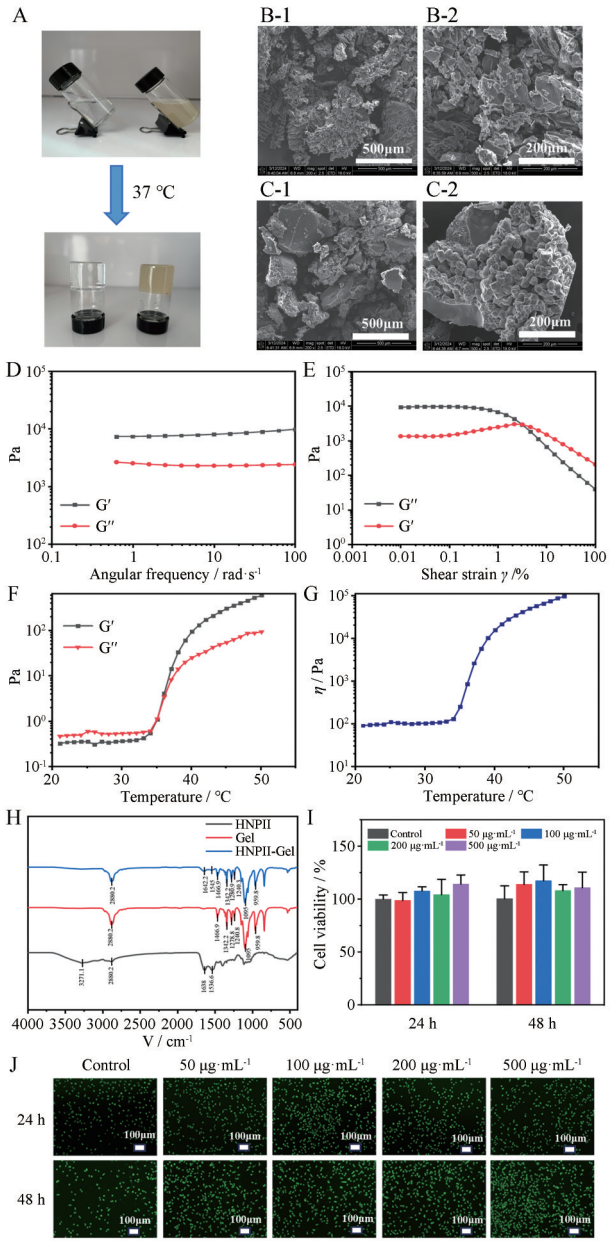


Figure 5 Characterization of HNP II temperature-sensitive gels. A: Exterior morphology of HNP II temperature-sensitive gel; B, C: Internal structure of the gel (B-1: Gel 200×; B-2: Gel 500×; C-1: HNP II-Gel 200×; C-2: HNP II-Gel 500×); D: Frequency scanning results; E: Viscoelastic intervals; F, G: Images of temperature sensitivity *versus* temperature change; H: Fourier infrared spectrograms; I: Effect of HNP II on L929 cell viability; J: Staining diagram of L929 cells

讨论

伤口愈合经历止血、炎症、增殖和重塑4个阶段[18], 如不及时处理会造成一系列并发症甚至导致死亡[19]。

在伤口愈合过程中, 通过刺激胶原蛋白的合成有利于促进伤口愈合, 多肽作为一种大的蛋白质分子, 酶解后会产生生物活性, 当皮肤受到创伤时, 多肽可以充当假的胶原蛋白降解肽, 在成纤维细胞中发送虚假信号来合成胶原纤维。因此, 多肽经常作为创面修复常用的材料之一[20]。然而, 单一使用活性肽具有较差的机械性能且容易降解[21], 因此本研究筛选了蹄甲多肽的有效组分并将其负载到温敏凝胶中, 以增加其机械性能和稳定性。

通过对蹄甲多肽组分进行筛选发现, HNP II组分对于创面修复的作用最为显著, 其原因可能是与其提供的营养成分有关。营养被认为是伤口愈合的关键因素, 在创伤过程中保持良好的营养至关重要[22]。从营养的角度分析发现HNP II含有许多特定有效的氨基酸, 其必需氨基酸 (不含色氨酸) 占总氨基酸的35.85%, 其中谷氨酸占15.27%, 有研究发现谷氨酸可以促进伤口愈合[23], 为机体提供必需的氮源, 促使肌细胞内蛋白质合成, 它被用作细胞增殖的能量来源, 可以促进淋巴细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和上皮细胞的增殖以及胶原纤维的合成[24,25], 且其消耗与创伤的严重程度成正比。因此, 推测HNP II可能是由于其丰富的氨基酸含量为伤口愈合提供了极好的营养支持, 从而更有助于伤口的愈合。

胶原蛋白和血管生成在创面愈合过程中也至关重要。皮肤受到创伤后, 血管能将氧气和营养物质输送至创伤部位, 帮助伤口愈合[26], 这一过程是一个复杂的过程, 需要多种细胞因子的参与[27]。VEGF作为形成新血管的重要细胞因子之一, 能促进血管内皮细胞的增殖, 产生新血管[28], 血管的生成与VEGF的表达呈正相关, 是血管生成的有效刺激物之一[29-31]。在本研究中, HNP II在第3天就出现了新生血管组织, 表明较其他组分可更快地促进VEGF诱导新血管的形成。除了VEGF以外, TGF-β1在炎症、血管生成、再上皮化和结缔组织再生中也起重要作用。胶原蛋白沉积一般通过TGF-β1刺激成纤维细胞产生肉芽组织来增强胶原的合成[32], TGF-β1是肌成纤维细胞产生和血管平滑肌细胞分化的主要细胞因子, 若其过度表达则会导致瘢痕增生[33,34]。HNP II能适当促进TGF-β1表达从而促进胶原蛋白沉积, 同时又可防止瘢痕的形成。在本研究中, 作者发现猪蹄甲中的蹄甲多肽可以通过刺激VEGF的表达来增加血管生成, 上调TGF-β1的水平来促进肉芽组织形成和成纤维细胞的快速增殖从而加速皮肤伤口的愈合过程, 提高愈合效果。

理想的伤口敷料需要有足够的透气性、吸水性和极大的柔韧性等要求[35]。在众多敷料中, 聚合物水凝胶质地柔软, 具有良好的亲水性、生物相容性和机械性能, 且不与水混溶, 因此聚合物水凝胶被认为是伤口敷料有前途的候选材料之一。本研究结合HNP II与P407、P188构建了一种含多肽成分的温敏性凝胶, 该凝胶的多孔结构可作为物质交换的输送系统, 在伤口部位释放。温敏性凝胶通过皮肤温度可由液体状态变为凝胶固体状态从而均匀覆盖在不规则的创面上, 将皮肤与外部环境分离开, 从而降低创面感染风险。生物相容性对于直接接触血液和创面的伤口敷料至关重要[36], 作者发现HNP II-Gel水凝胶具有良好的生物相容性, 可作为创面愈合医学材料。本研究以猪蹄甲为原料, 筛选出效果最优的多肽组分 (HNP II), 并将其制备成适应创面的原位凝胶, 具有制备简单、生物相容性好、可根据温度进行反应等优点, 为蹄甲多肽在创面修复方面的应用提供了试验支撑。

作者贡献: 赵怡馨负责文章撰写; 卢灵芝负责方法论; 杨再清负责数据管理; 吴明星负责文献修改; 何浩负责审编; 杨小红负责形式分析; 刘萍负责文献资料收集; 林萍负责调查研究; 杨荣平负责监督、构思; 柯秀梅负责审编。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019, 146: 344-365.

[2] Shiny PJ, Vimala Devi M, Felciya SJG, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of poly-3-hydroxybutyric acid-sodium alginate as a core-shell nanofibrous matrix with arginine and bacitracin-nanoclay complex for dermal reconstruction of excision wound [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 168: 46-58.

[3] Rujirachotiwat A, Suttamanatwong S. Curcumin upregulates transforming growth factor-β1, its receptors, and vascular endothelial growth factor expressions in an *in vitro* human gingival fibroblast wound healing model [J]. BMC Oral Health, 2021, 21: 535.

[4] Cao XQ, Wang Y, Wu CY, et al. Cathelicidin-OA1, a novel antioxidant peptide identified from an amphibian, accelerates skin wound healing [J]. Sci Rep, 2018, 8: 943.

[5] Sui HL, Wang F, Weng ZB, et al. A wheat germ-derived peptide YDWPGGRN facilitates skin wound-healing processes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 524: 943-950.

[6] Wang XK, Duan HC, Li M, et al. Characterization and mechanism of action of amphibian-derived wound-healing-promoting peptides [J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 15: 11: 1219427.

[7] Song YL, Wu CY, Zhang XH, et al. A short peptide potentially promotes the healing of skin wound [J]. Biosci Rep, 2019, 39: BSR20181734.

[8] Yu WL, Field CJ, Wu JP. Purification and identification of anti-inflammatory peptides from spent hen muscle proteins hydrolysate [J]. Food Chem, 2018, 253: 101-107.

[9] Yang TT, Zhang K, Li BF, et al. Effects of oral administration of peptides with low molecular weight from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) on cutaneous wound healing [J]. J Funct Foods, 2018, 48: 682-691.

[10] Zou XG, Chi Y, Cao YQ, et al. Preparation process optimization of peptides from *Agaricus blazei* Murrill, and comparison of their antioxidant and immune-enhancing activities separated by ultrafiltration membrane technology [J]. Foods, 2023, 12: 251.

[11] Li XJ, Wang Y, Zou ZR, et al. OM-LV20, a novel peptide from odorous frog skin, accelerates wound healing *in vitro* and *in vivo* [J]. Chem Biol Drug Des, 2017, 91: 126-136.

[12] Skibska A, Perlikowska R. Signal peptides-promising ingredients in cosmetics [J]. Curr Protein Pept Sci, 2021, 22: 716-728.

[13] Ren HX, Hu ZY, Bi LJ, et al. Discussion on the active ingredients of pig's trotters extracts [J]. Chin J Biochem Pharm (中国生化药物杂志), 1986, 11: 83-87.

[14] Gao E, Li HZ, Kang B. Exeperimental research on stypticity and accelerated therombosis of preparation of pig toe nail [J]. Acta Academ Med Weifang (潍坊医学院学报), 1991, 13: 16-18.

[15] Bian ZK, Hu GC, Lv XS. Lectogenic action of porcine leg nail [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 1991, 26: 663-665.

[16] Zhang DW, Fu M, Peng XW, et al. Experimental study on the effect of pig's trotters and *mains pen-tadactyla linnaeus* against bone marrow microcirculation disorders in mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36: 1364-1367.

[17] Chen YM, Su Y. Optimization of microwave processing technology of pig nail by orthogonal test [J]. Health Med Res Pract (保健医学研究与实践), 2023, 20: 29-33.

[18] Shi ZJ, Yao C, Shui YJ, et al. Research progress on the mechanism of angiogenesis in wound repair and regeneration [J]. Front Physiol, 2023, 14: 1284981.

[19] Pandey A, Momin M, Chando A. Silver sulfadiazine loaded breathable hydrogel sponge for wound healing [J]. Drug Metab Pers Ther, 2020. DOI: 10.1515/dmpt-2020-0124.

[20] Davison-Kotler E, Marshall WS, García-Gareta E. Sources of collagen for biomaterials in skin wound healing [J]. Bioengineering (Basel), 2019, 6: 56.

[21] Leikina E, Mertts MV, Kuznetsova N, et al. Type I collagen is thermally unstable at body temperature [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99: 1314-1318.

[22] Brown KL, Phillips TJ. Nutrition and wound healing [J]. Clin Dermatol, 2010, 28: 432-439.

[23] Arribas-López E, Zand N, Ojo O, et al. The effect of amino acids on wound healing: a systematic review and meta-analysis on arginine and glutamine [J]. Nutrients, 2021, 13: 2498.

[24] Arnold M, Barbul A. Nutrition and wound healing [J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117: 42s-58s.

[25] Campos ACL, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008, 11: 281-288.

[26] Liu WJ, Zhang GL, Wu JR, et al. Insights into the angiogenic effects of nanomaterials: mechanisms involved and potential applications [J]. J Nanobiotechnology, 2020, 18: 9.

[27] Forough S, Hamideh M, Simzar H, et al. Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Sci Rep, 2022, 12: 18529.

[28] Wong VW, Crawford JD. Vasculogenic cytokines in wound healing [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 190486.

[29] Bitto A, Minutoli L, Altavilla D, et al. Simvastatin enhances VEGF production and ameliorates impaired wound healing in experimental diabetes [J]. Pharmacol Res, 2008, 57: 159-169.

[30] Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors [J]. FEBS Lett, 2006, 580: 2879-2887.

[31] Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells [J]. Am J Pathol, 2004, 164: 1935-1947.

[32] Hsu I, Parkinson LG, Shen Y, et al. Serpina3n accelerates tissue repair in a diabetic mouse model of delayed wound healing [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1458.

[33] Zhao X, Wu H, Guo BL, et al. Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing [J]. Biomaterials, 2017, 122: 34-47.

[34] Yuan RH, Dai XM, Li YS, et al. Exosomes from miR-29a-modified adipose-derived mesenchymal stem cells reduce excessive scar formation by inhibiting TGF-β2/Smad3 signaling [J]. Mol Med Rep, 2021, 24: 758.

[35] Huang CG, Teng JJ, Liu W, et al. Modulation of macrophages by a phillyrin-loaded thermosensitive hydrogel promotes skin wound healing in mice [J]. Cytokine, 2024, 177: 156556.

[36] Shi A, Li JL, Qiu XY, et al. TGF-β loaded exosome enhances ischemic wound healing *in vitro* [J]. Theranostics, 2021, 11: 6616-6631.