

鳗鱼皮胶原蛋白水解物对结肠炎的改善作用

李鹤年, 胡雨嘉, 张弛, 林婕, 郭静科, 刘树滔*

(福州大学生物工程研究所 福州 350002)

摘要 溃疡性结肠炎(UC)是一种特发性肠道疾病,发病率不断上升,且治疗药物都存在不同程度的副作用。研究发现胶原蛋白肽可缓解 UC 症状,并且安全、健康。然而,目前研究主要局限于 UC 的预防作用,缺少对其治疗作用的研究。鳗鱼皮富含胶原蛋白,而鳗鱼头一般在加工中被丢弃,造成资源浪费,目前缺少对鳗鱼皮胶原蛋白水解物的研究。本研究尝试利用鳗鱼头中的鱼皮提取胶原蛋白并进行水解,希望得到对 UC 具有治疗作用的鳗鱼皮胶原蛋白水解物(CH),提高鳗鱼加工副产物的利用价值。研究发现鳗鱼皮所含胶原蛋白丰富,占鱼皮湿重的 27.87%,纯度较高且主要为 I 型胶原蛋白,可作为胶原蛋白的优质来源。对胶原蛋白进行酶解,得到具有抗氧化活性的 CH,并给药 UC 模型小鼠,结果显示:与阳性对照和模型组相比,CH 可以安全健康地降低 UC 模型小鼠的 DAI 评分至 0,并改善结肠状态;结肠组织病理切片表明 CH 可以恢复黏膜上皮完整性,减轻炎性细胞浸润;结肠组织氧化应激指标表明 CH 可以降低结肠组织 MDA 含量(0.75 nmol/mg pro)和 MPO 活性(0.11 U/g tissue),并通过提高 GSH 含量(22.92 umol/g pro)和 SOD(693.61 U/g pro)、CAT(1.69 U/g pro)、GPx(141.29 U/g pro)3 种抗氧化酶活性来提高结肠组织抗氧化能力,降低氧化应激水平,从而治疗 UC。

关键词 鳗鱼皮; 胶原蛋白; 溃疡性结肠炎; 抗氧化

文章编号 1009-7848(2023)04-0096-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.010

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种特发性肠道疾病,特征在于结肠黏膜内同时存在活动性炎症和溃疡,临床症状主要表现为便血、持续性腹泻,严重的 UC 表现为结肠远端存在大面积溃疡,包括结肠出血和胃肠道穿孔等症状^[1]。就目前医疗水平而言,UC 仍是一种无法完全治愈的疾病,且发病率持续上升,损害了患者的身体健康,降低其生活质量,已成为全球性医疗问题^[2]。

UC 的治疗药物主要有 5-氨基水杨酸^[3]、皮质内固醇^[4]以及多种抗氧化剂,如超氧化物歧化酶(SOD)^[5]、多酚类化合物^[6]等对 UC 都有改善作用。其中柳氮磺吡啶(Salicylazosulfapyridine, SASP)是最广泛使用的 5-ASA 类药物,然而其只能缓解 UC 症状,并不能治愈黏膜溃疡,长期使用会产生毒副作用。鉴于此,研发新型药物或者功能食品协助或取代传统药物将成为今后的研究重点。

胶原蛋白是细胞外基质的一种结构蛋白,是动物结缔组织中的主要成分,对皮肤及多种组织器官具有重要作用^[7-8]。胶原蛋白肽是胶原蛋白通过酶水解的产物,结构形式通常表示为(Gly-X-Y),分子质量较小,不易发生蛋白水解消化,且可以轻松穿过肠壁,进而在肠内被吸收,因此在体内研究中显示出更高的效价^[9]。

在最近的研究中,胶原蛋白及其水解物显示出对 UC 不同程度的预防作用,且安全、健康。例如,明胶及其水解物 Pro-Hyp 和 Gly 对于结肠炎具有不同的改善作用,遵循 Pro-Hyp>Gly>明胶的顺序,Pro-Hyp 二肽可以更好地作用于肠道来改善结肠炎,并且作用效果优于明胶及氨基酸^[10]。通过姜蛋白酶水解明胶生成的明胶水解物,被证实可以通过抑制 NF- κ B 活化和促炎因子产生来缓解 UC^[11]。鱼鳞胶原蛋白肽可以通过减少结肠组织损伤和抑制黏膜炎症因子来预防 UC^[12]。胶原蛋白及其水解物逐渐成为食疗或者天然化合物改善健康的研究热点^[13-15],然而,关于 UC 的研究主要为胶原蛋白水解物对 UC 的预防作用,仍缺少对 UC 治疗作用的研究,即出现 UC 症状后再给药治疗。本研究尝试利用胶原蛋白水解物探究对 UC 的治疗作用。

收稿日期: 2022-04-22

基金项目: 国家重点研发计划专项(2016YFD0400202);福建省科技厅产业技术开发与应用计划区域发展项目(2018N3009);福州市高校产学研合作项目(2017-G-104)

第一作者: 李鹤年,男,硕士生

通信作者: 刘树滔 E-mail: stliu@fzu.edu.cn

目前国内鳗鱼生产加工技术成熟,产品种类丰富^[16-17]。然而,对鳗鱼加工副产物的利用仍有限。鳗鱼加工过程中的副产物,如鱼头、鱼骨等尚未被开发利用,通常被用作低值饲料或被丢弃,造成资源浪费。本研究选择鳗鱼加工副产物——鳗鱼头上的鱼皮作为提取胶原蛋白的原料,利用酶提法提取,研究鳗鱼皮中胶原蛋白的含量、理化性质。使用胃蛋白酶和胰蛋白酶水解鳗鱼皮胶原蛋白,测定水解物的抗氧化活性。通过动物实验分析鳗鱼皮胶原蛋白水解物对 UC 模型小鼠结肠组织指标的影响,探究鳗鱼皮胶原蛋白水解物对 UC 的改善作用,从而提高鳗鱼加工副产物的生物和利用价值。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

海鳗鱼头,福州市长乐聚泉食品有限公司。

葡聚糖硫酸钠(Dextran sulphate sodium, DSS),MP Biomedicals 公司;胰蛋白酶、胃蛋白酶,美国 Amersco 公司;柳氮磺吡啶(SASP),aladdin 公司;丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶(CAT)、微量还原型谷胱甘肽(GSH)、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 鳗鱼皮胶原蛋白的提取与表征

1.2.1 鳗鱼皮胶原蛋白的提取 刮取鳗鱼头的鱼皮,经 0.1 mol/L NaOH 和体积分数 10%的异丙醇预处理后,用胃蛋白酶和 0.5 mol/L 乙酸提取 24 h,10 000×g,4 ℃离心后保留上清液,收集沉淀并再次使用 0.5 mol/L 乙酸提取,重复 2 次。收集 3 次所得上清液,加入研磨的 NaCl 过夜,离心后收集沉淀物并依次使用 0.1 mol/L 乙酸和一级水各透析 48 h,冻干后得到鳗鱼皮胶原蛋白^[18]。

1.2.2 SDS-PAGE 分析 配制 1 mg/mL 的鳗鱼皮胶原蛋白溶液,与样品缓冲液以 1:1 的体积比混合煮沸 5 min。电泳电压 220 V,7.5%分离胶,5%浓缩胶。

1.2.3 紫外吸收光谱分析 配制 1 mg/mL 的鳗鱼皮胶原蛋白溶液,使用紫外分光光度计在 190~400 nm 波长处扫描。

1.2.4 傅里叶变换红外光谱分析 取鳗鱼皮胶原

蛋白加入干燥 KBr,压薄片后进行样品扫描。

1.2.5 氨基酸组成分析 取鳗鱼皮胶原蛋白加入 6 mol/L HCl 水解 24 h,使用氨基酸分析仪进行分析。

1.3 鳗鱼皮胶原蛋白水解物的制备

取鳗鱼皮胶原蛋白配制成胶原蛋白溶液,调节 pH 值至 2.0,加入胃蛋白酶(酶与底物的质量比为 1:25),在 37 ℃下振荡水解 3 h。再将溶液 pH 值调至 7.5,加入胰蛋白酶(酶与底物的质量比为 1:25),在 37 ℃下振荡水解 3 h。水解结束后,沸水加热 10 min 终止反应。4 ℃,4 000 r/min 条件下离心 15 min。取上清液冷冻干燥后,得到鳗鱼皮胶原蛋白水解物(Collagen hydrolysate, CH)。

参照国标《多肽抗氧化性测定 DPPH 和 ABTS 法》(GB/T 39100-2020)测定鳗鱼皮胶原蛋白水解物的抗氧化活性。

1.4 鳗鱼皮胶原蛋白水解物对 UC 的治疗作用

1.4.1 实验动物处理 将 25 只 ICR 雄性小鼠首先进行适应性喂养,待体质量达到(22±2) g 后,开始实验。造模期间,除 Control 组小鼠自由饮用一级水以外,其它组小鼠自由饮用 3 g/100 mL DSS。7 d 后根据小鼠 DAI 评分和体质量重新分为 5 组($n=5$),所有小鼠自由饮用一级水,并按照表 1 标准每天按时灌胃给药。

表 1 灌胃给药标准

Table 1 Intra-gastric administration standard		
分组	灌胃药品	剂量
Control	生理盐水	10 mL/kg
Model	生理盐水	10 mL/kg
SASP	SASP	500 mg/kg
H-CH	CH	500 mg/kg
L-CH	CH	200 mg/kg

1.4.2 疾病活动指数评分(Disease activity index, DAI) 整个实验周期内,每天记录小鼠的体质量和粪便状态,统计小鼠的存活率,依据表 2 进行评分。DAI 评分为 3 个指标评分的平均值。

1.4.3 结肠密度 给药治疗结束后,对小鼠进行解剖,剪取肛门边缘至回盲部的结肠,拍照记录结肠形态,量取长度并称重,计算结肠密度^[19],见式(1)。

结肠密度(g/cm)=结肠质量/结肠长度 (1)

1.4.4 结肠大体损伤评分 对小鼠结肠大体形态表现,根据表3标准评分^[20]。

1.4.5 结肠组织病理切片 取结肠段进行脱水和石蜡包埋,苏木精和伊红染液进行染色观察。

1.4.6 氧化应激和抗氧化指标测定 结肠组织匀浆采用BCA试剂盒测定蛋白浓度,按照试剂盒说明书测定MDA、SOD、GPx、CAT、GSH、MPO含量。

1.5 数据处理

利用GraphPad Prism 8、Origin 2021以及SPSS对数据进行处理,所有结果以“平均值±标准误差”表示,做单因素方差分析(ANOVA)并进行Duncan检验,以 $P<0.05$ 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 鳗鱼皮胶原蛋白及其水解物的理化性质分析

2.1.1 SDS-PAGE分析 鳗鱼皮胶原蛋白由 α_1 和 α_2 链及其高分子交联二聚体(β 链)和三聚体(γ 链)组成。电泳图谱中显示 α_1 链的分子质量大约为135 ku,也可以清楚地看到 β 链(约275 ku)和 γ 链存在,与其它I型胶原蛋白的结构相似^[21-22]; α_2 链以下无其余明显电泳条带,表明所提取的鳗鱼皮胶原蛋白纯度较高。

2.1.2 紫外光谱分析 鳗鱼皮胶原蛋白在225 nm左右波长处有最大吸收峰,该吸收峰所包含的基因主要有C=O、-COOH和CO-NH₂基团,主要由电子 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁产生。鳗鱼皮胶原蛋白在280 nm波长处无吸收峰,表明芳香族氨基酸含量较低,所提取的胶原蛋白纯度较高。

2.1.3 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析 鳗鱼皮胶原蛋白在红外光谱上的主要特征吸收峰有酰胺A带(3350.41 cm⁻¹)、酰胺B带(2924.92 cm⁻¹)、酰胺I带(1658.82 cm⁻¹)、酰胺II带(1551.07 cm⁻¹)以及酰胺III带(1239.04 cm⁻¹)。酰胺I带主要与C=O的伸缩振动有关,酰胺II带代表N-H的弯曲振动,酰胺III带代表C-H的伸缩振动^[23]。其中酰胺I带与蛋白质的二级结构有关,红外光谱表明胶原蛋白具有完整的二级结构^[24],酰胺II带与酰胺III带证实了鳗鱼皮胶原蛋白三螺旋结构的

表2 DAI评分

评分	体质量下降率/%	粪便性状	便血情况
0	<1	成型颗粒	无出血
1	1~5	半稀便,不黏	隐血
2	6~10	附肛门	
3	11~15	稀便或汤样、	肉眼可见红
4	>15	水样	色血迹

表3 结肠大体损伤评分

大体形态表现	评分
正常结肠形态	0
肠壁轻度增厚,无出血	1
肠壁中度增厚并充血	2
肠壁明显增厚变硬并充血	3
肠壁明显增厚变硬、充血并粘连	4

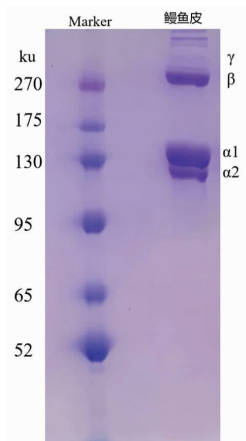


图1 SDS-PAGE电泳图

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis

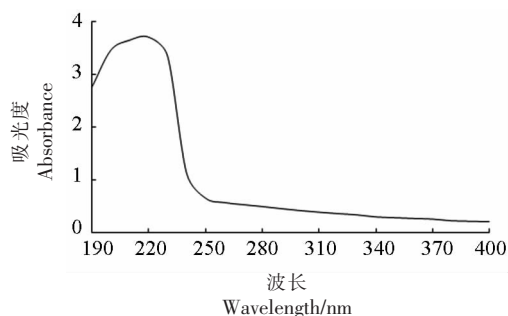


图2 胶原蛋白紫外吸收光谱

Fig.2 UV absorption spectra of collagen

存在^[25]。扫描结果表明胶原蛋白的结构未被破坏,具有完整的三螺旋结构。

2.1.4 氨基酸组成分析 甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸和谷氨酸是鳗鱼皮胶原蛋白中含量最高的氨基酸,其中甘氨酸含量为 28.67%,大约每 3 个氨基酸残基就包含 1 个 Gly,胶原蛋白的三螺旋结构也正是依赖于此。甘氨酸和脯氨酸在胶原蛋白中所占比例为 2:1,脯氨酸约占氨基酸总量的 13.45%。色氨酸无法检测出,原因是酸水解过程遭到破坏;且胱氨酸含量为 0,这也符合胶原蛋白的氨基酸组成。与 UV 光谱相对应,芳香族氨基酸含量较少,如苯丙氨酸和酪氨酸。精氨酸所占比例为 9.28%,含量较高。与其它来源的胶原蛋白相比,部分氨基酸比例相似。

2.1.5 鳗鱼皮胶原蛋白水解物 DPPH 清除率 鳗鱼皮胶原蛋白经 2 种酶依次水解后所得到的水解物对 DPPH 具有浓度依赖性的清除效果,随着浓度升高,清除率逐渐增大,表明所得的鳗鱼皮胶原蛋白水解物具有一定的抗氧化活性,可以进行后续 UC 治疗实验。

2.2 鳗鱼皮胶原蛋白水解物对 UC 的改善作用

2.2.1 DAI 评分 经 7 d 的 DSS 造模,各组小鼠的 DAI 评分到达一定水平,出现了不同程度的稀便和便血情况,表明造模成功。造模成功后,以不同样品灌胃给药,与模型组相比,CH 的治疗均可以在不同程度上改善 DSS 诱导的 UC,降低小鼠 DAI,缓解小鼠腹泻便血等病理学特征;小鼠精神状态逐渐变好,行动更为敏捷,毛发等体态特征逐渐改善。SASP 虽然也可以在一定程度上改善 UC,但是由于自身药物的副作用,小鼠在治疗阶段末期出现了 DAI 评分回弹现象。同时,SASP 组在治疗阶段也发生了小鼠死亡的现象,死亡率为 33.33%,进一步验证了 SASP 药物的毒副作用。

2.2.2 体质量变化率 所有 DSS 造模组在造模阶段均出现体质量减轻的情况,之后开始平缓上升。从第 8 天开始,H-CH 组和 Control 组的体质量均呈上升趋势,Model 组虽在小鼠自身自愈能力的作用下也平缓上升,但是与初始体质量相比,上升变化显著变小,其体内 UC 炎症仍持续存在,影响小鼠进食和体能。SASP 组体质量变化率趋势与 DAI 评分的情况类似,同样再次出现体质量减轻的情

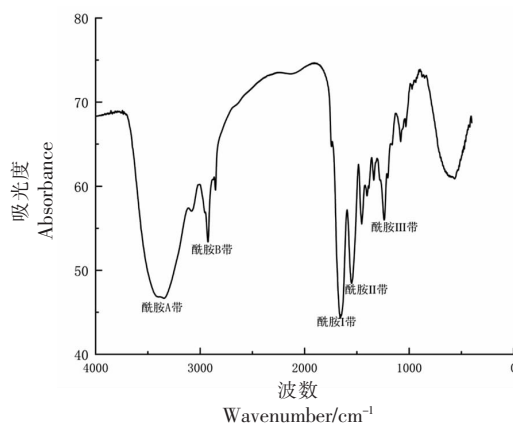


图 3 胶原蛋白红外吸收光谱

Fig.3 FTIR spectrum of collagen

表 4 鳗鱼皮胶原蛋白氨基酸组成

Table 4 Amino acid composition of collagen in eel skin

氨基酸种类	氨基酸含量/ %	氨基酸种类	氨基酸含量/ %
天门冬氨酸	6.04	异亮氨酸	1.12
苏氨酸	2.72	亮氨酸	2.64
丝氨酸	3.76	酪氨酸	0.31
谷氨酸	10.35	苯丙氨酸	2.21
甘氨酸	28.67	赖氨酸	4.05
丙氨酸	11.62	组氨酸	1.27
胱氨酸	0.00	精氨酸	9.28
缬草氨酸	1.95	脯氨酸	13.45
蛋氨酸	0.51		

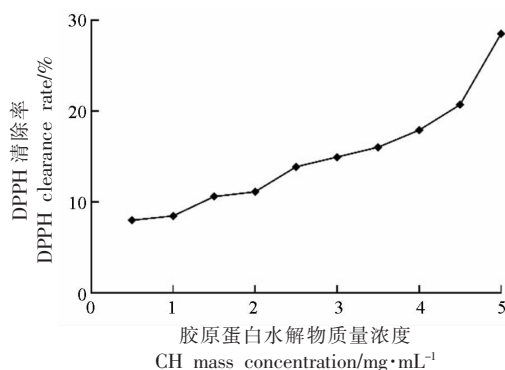


图 4 DPPH 清除率

Fig.4 DPPH clearance rate

况,原因可能是来自药物本身的副作用,进而影响小鼠的精神状态和食欲,引起体质量再次降低。通过分析小鼠 14 d 的体质量变化率,表明 CH 对于 DSS 诱导的 UC 具有很好的改善作用。

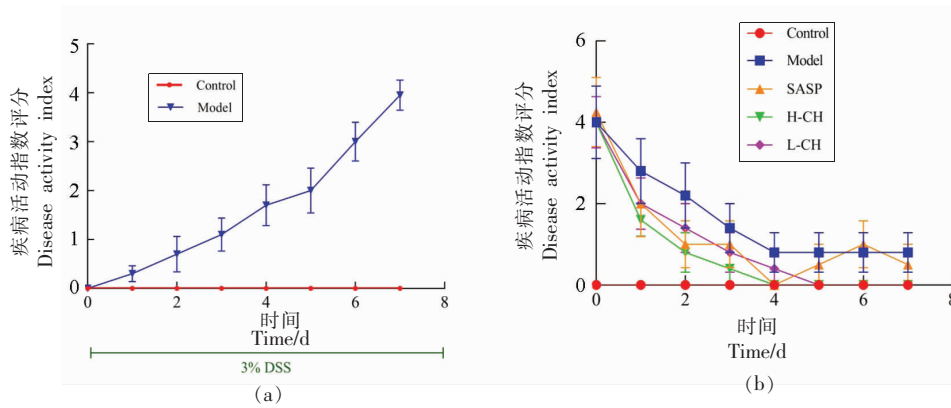


图5 小鼠造模阶段(a)和治疗阶段(b)DAI评分

Fig.5 DAI scores of mice during modeling (a) and treatment (b)

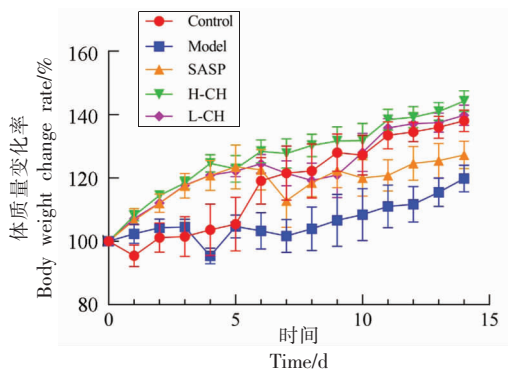
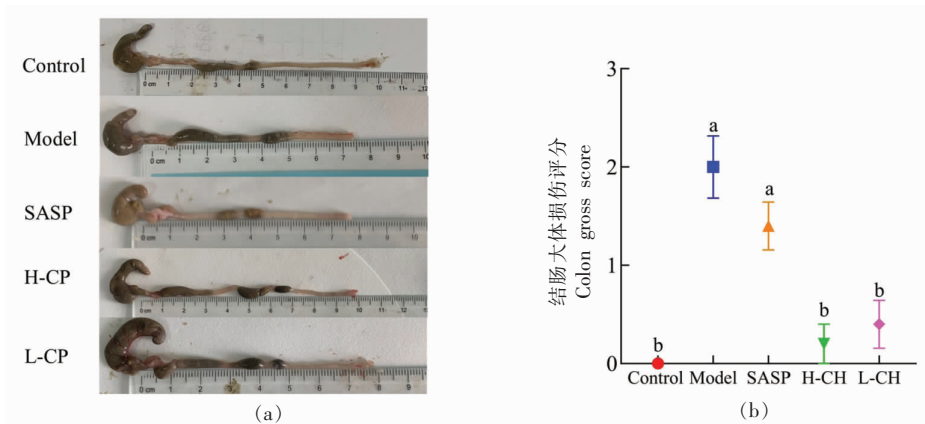


图6 体质量变化率

Fig.6 Body weight change rate

2.2.3 结肠组织形态和大体损伤评分 结肠损伤是UC最直观的体现。Control组结肠细长,无肿胀充血现象,肠道内容物成颗粒状;而Model组结肠出现充血肿胀现象,黏膜粗糙,结肠内容物不成型,肠壁增厚、变硬。经CH和SASP治疗后,结肠状态明显优于Model组,结肠长度恢复,肠壁状态好转,尤其是H-CH组结肠已接近正常结肠组织形态,表明CH可以恢复结肠组织形态。



注:小写字母不同代表差异显著($P < 0.05$);图8、10~12同。

图7 小鼠的结肠组织形态(a)和大体损伤评分(b)

Fig.7 Morphology (a) and gross damage score (b) of mice colon tissue

2.2.4 结肠长度和密度 UC可以导致结肠缩短和结肠密度升高,因此结肠长度和密度可以评估结肠损伤情况。DSS诱导后,Model组小鼠较正常小鼠结肠明显缩短,经H-CH治疗后,结肠长度显著增加,然而L-CH组及SASP组无明显变化,表

明500 mg/kg的CH可以显著改善UC引起的结肠缩短现象。CH给药可以降低UC模型小鼠的结肠密度,CH组结肠密度显著低于Model组;SASP组结肠密度虽降低,但无显著性差异。

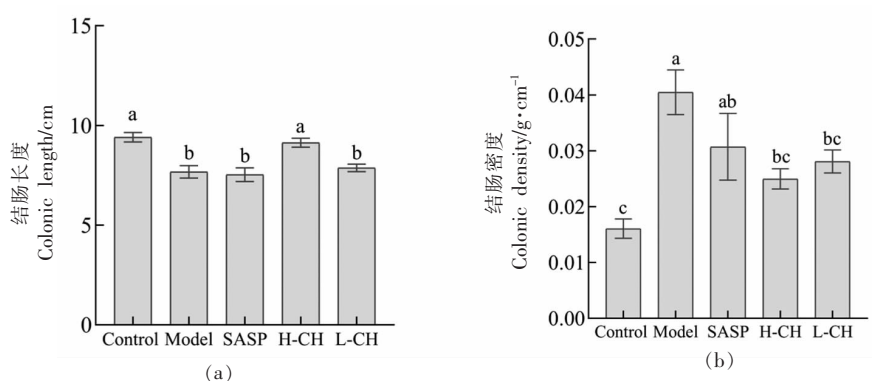


图 8 小鼠结肠长度(a)和结肠密度(b)

Fig.8 Length (a) and density (b) of mice colon tissue

2.2.5 结肠组织病理切片 CH 组结肠组织表现较好,与 Control 组最为相似,隐窝结构清晰,黏膜层、黏膜肌层结构完整,腺体排列整齐并分布着大量杯状细胞。而 Model 组表现为结肠黏膜及黏膜

下层浸润大量炎性细胞,隐窝变形甚至消失,杯状细胞几乎耗竭,结肠组织结构溃疡且出现完整性缺失。CH 的治疗可以显著改善结肠组织损伤,且效果优于 SASP。

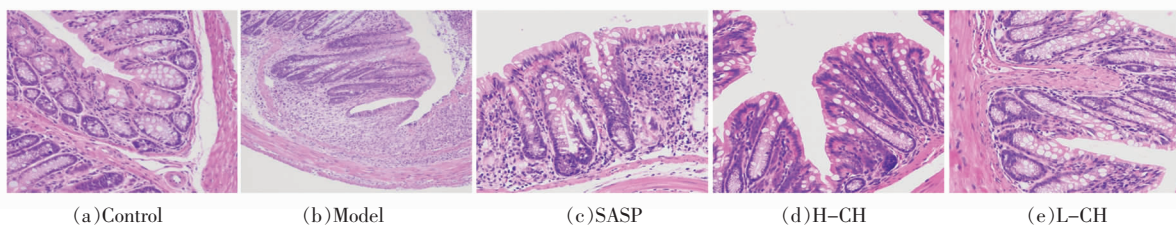


图 9 结肠组织病理切片(200×)

Fig.9 Pathological sections of colon tissue (200×)

2.2.6 结肠组织 MPO 酶活 髓过氧化物酶(MPO)是一种富含于中性粒细胞、巨噬细胞中的血红素蛋白,用来评估炎性细胞的浸润程度,可以作为急性炎症的标志^[26]。DSS 处理后,结肠组织 MPO 酶活显著增加,补充 CH 可以显著降低 MPO 酶活,然而 SASP 未能显著降低 MPO 酶活,表明 CH 治疗可以降低结肠内 MPO 酶活,减少炎性细

胞的浸润。

2.3 鳗鱼胶原蛋白水解物对结肠组织氧化应激指标的影响

2.3.1 结肠组织 MDA 含量 丙二醛(MDA)是脂质过氧化的终产物之一,自由基作用于细胞膜脂质发生过氧化反应进而生成丙二醛,其含量可以反应结肠组织过氧化损伤程度^[27]。在 UC 模型中,

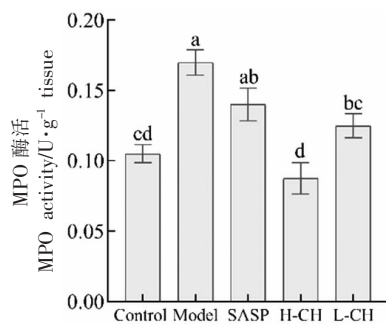


图 10 结肠组织 MPO 酶活

Fig.10 Activity of MPO in colon

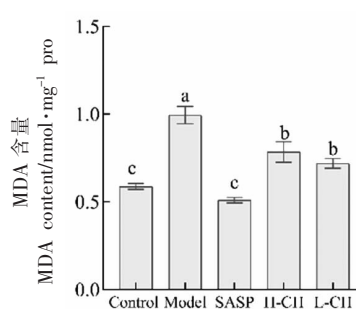


图 11 结肠组织 MDA 含量

Fig.11 Content of MDA in colon

MDA 含量显著上升, SASP 和 CH 的治疗可以显著降低结肠组织 MDA 含量, 即 SASP 和 CH 可以减轻结肠组织过氧化损伤程度, 保护结肠组织。

2.3.2 结肠组织抗氧化指标 谷胱甘肽(GSH)是一种三肽, 包含谷氨酸、半胱氨酸以及甘氨酸, 具有抗氧化作用。UC 可以导致结肠组织 GSH 含量显著降低, 原因是通过增加 GSH 消耗速率来保护机体免受活性氧的损害。SASP 和 CH 的补充可以

显著提高结肠组织 GSH 含量, 进而继续发挥抗氧化作用。SOD、CAT 以及 GPx 是 3 种内源性抗氧化酶, 可以清除体内过量的活性氧。DSS 诱导可使 3 种抗氧化酶活性降低, 导致机体抗氧化能力降低, 更易受氧化应激损伤。补充 CH 可以提高 GPx 以及 CAT 的活性; H-CH 可显著提高 SOD 活性, SASP 与 L-CH 则无明显提高。

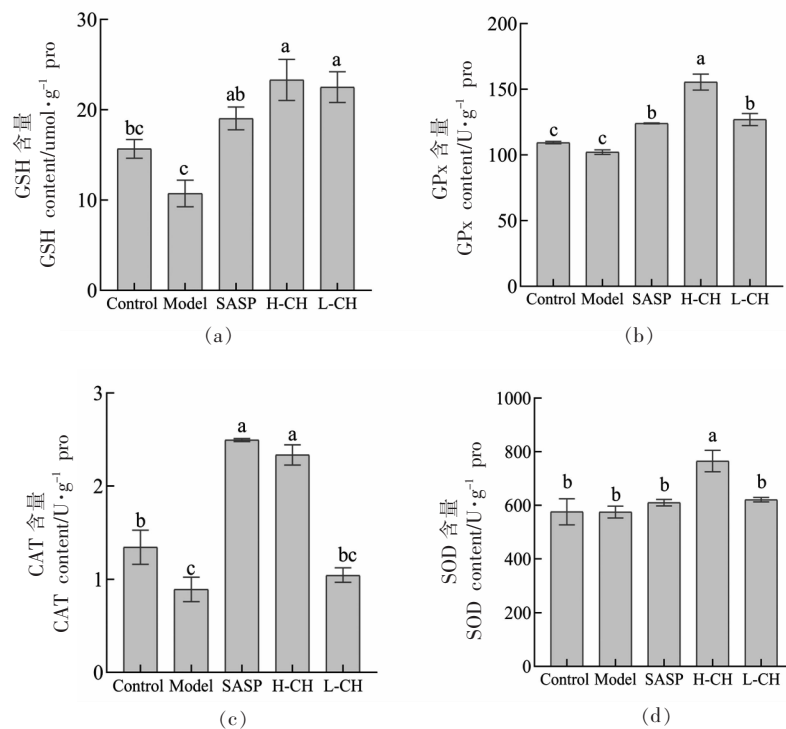


图 12 结肠组织 GSH(a)、GPx(b)、CAT(c)和 SOD(d)含量
Fig.12 GSH (a), GPx (b), CAT (c) and SOD (d) content in mice colon

3 讨论与结论

本研究利用鳗鱼生产加工过程中的副产物鳗鱼头, 刮取鱼头上的鱼皮, 利用酶提法提取胶原蛋白并进行表征。氨基酸组成分析表明鳗鱼皮胶原蛋白为典型的胶原蛋白氨基酸组成, SDS-PAGE 以及 FTIR 结果表明所提取的胶原蛋白保留了完整的三螺旋结构, 且纯度较高。通过酸水解法测定了鳗鱼皮中的 Hyp 含量, 并转化为胶原蛋白含量, 结果显示鳗鱼皮中胶原蛋白含量为 278.71 mg/g, 占鱼皮湿重的 27.87%, 表明鳗鱼皮是胶原蛋白的丰富来源。其次, 本研究利用胃蛋白酶和胰蛋白酶对胶原蛋白进行水解, 得到鳗鱼皮胶原蛋白水解物, 通过测定 DPPH 清除率, 表明鳗鱼皮胶原蛋白

水解物具有抗氧化活性。使用 DSS 对小鼠造模, 使其成为 UC 模型, 并给药鳗鱼皮胶原蛋白水解物进行治疗。结果显示: 鳗鱼皮胶原蛋白水解物可以降低 UC 模型小鼠的 DAI 评分, 恢复结肠长度, 降低结肠密度; 通过结肠组织病理切片分析, 鳗鱼皮胶原蛋白水解物可以恢复 UC 模型小鼠结肠黏膜上皮的完整性, 减轻炎性细胞在黏膜下层的浸润; 同时可以降低结肠组织 MPO 活性和 MDA 含量, 减轻结肠组织过氧化损伤; 提高结肠组织 GSH 含量和 SOD、CAT、GPx 活性, 进而提高结肠组织抗氧化能力, 降低肠道内氧化应激, 发挥保护肠道、抑制炎症的作用。

目前, 关于胶原蛋白肽治疗 UC 的研究主要

集中于 UC 预防^[10,11,28],即实验动物尚未发生 UC 明显症状前,就给予胶原蛋白水解物。而本研究通过 DSS 诱导小鼠先产生 UC 症状,即小鼠出现体质量减轻,腹泻便血等症状后,再给药。结果显示,鳗鱼皮胶原蛋白水解物可以改善 UC 模型小鼠的肠道相关指标,提高结肠组织抗氧化性,减轻氧化应激。这种治疗更接近 UC 的实际治疗,相比于现有研究具有更好的市场价值。

虽然胶原蛋白肽对 UC 的治疗机制尚未完全明确,但是目前比较明确的是氧化应激是导致 UC 的主要因素,而提高抗氧化酶的表达是减轻肠道氧化应激的主要途径。例如,Deng 等^[11]发现胶原蛋白肽可以通过激活 Nrf2 通路来上调抗氧化酶的表达,从而去除过量的 ROS 和抑制 NF- κ B 的表达,并进一步抑制炎症因子的产生,减少炎症细胞浸润,维持黏膜上皮和肠道屏障的完整性,达到改善 UC 的效果。Chen 等^[29]的研究显示胶原蛋白肽可以通过 MLCK-p-MLC 通路和 Nrf2 通路提高 ZO-1 和 Occludin 转录和表达,保证 TJ 的完整性来修复肠道屏障。本研究也证实了具有抗氧化活性的鳗鱼皮胶原蛋白水解物可以通过提高结肠组织的抗氧化酶含量来减轻氧化应激并改善 UC。

以上结果表明,通过胃蛋白酶和乙酸所提取的鳗鱼皮胶原蛋白可以通过水解生成具有抗氧化活性的水解物,进而改善溃疡性结肠炎小鼠的结肠氧化应激状态,安全、无害治疗溃疡性结肠炎。这些结果同时也为鳗鱼加工副产物在食品、生物产业的应用提供更加广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] SILVERBERG M S, SATSANGI J, AHMAD T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology[J]. *Can J Gastroenterol*, 2005, 19(Suppl A): 5A-36A.
- [2] KAPLAN G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2015, 12(12): 720-727.
- [3] MARSHALL J K, THABANE M, STEINHART A H, et al. Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(1): CD004115.
- [4] TRAVIS S P, STANGE E F, LEMANN M, et al. European evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: Current management[J]. *J Crohns Colitis*, 2008, 2(1): 24-62.
- [5] KRUIDENIER L, VAN MEETEREN M E, KUIPER I, et al. Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(6): 753-765.
- [6] TOPCU-TARLADACALISIR Y, AKPOLAT M, UZ Y H, et al. Effects of curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis: The roles of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2013, 16(4): 296-305.
- [7] 侯虎, 孙江, 毛家楠, 等. 海参胶原纤维形态及胶原蛋白理化性质研究[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(7): 1491-1495.
- [8] HOU H, SUN J, MAO J N, et al. Collagen fibers morphology and physical and chemical properties of collagen of sea cucumber[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(7): 1491-1495.
- [8] 陈国梁, 贺翠莲. 胶原蛋白的研究进展[J]. *延安大学学报(自然科学版)*, 2000, 19(2): 78-81.
- [8] CHEN G L, HE C L. Research progress of collagen[J]. *Journal of Yan'an University (Natural Science Edition)*, 2000, 19(2): 78-81.
- [9] YAMAMOTO S, HAYASAKA F, DEGUCHI K, et al. Absorption and plasma kinetics of collagen tripeptide after peroral or intraperitoneal administration in rats[J]. *Bioence Biotechnology and Biochemistry*, 2015, 79(12): 1-8.
- [10] SUQIN Z, MIN H, GUANGXIN F, et al. Gelatin versus its two major degradation products, prolyl-hydroxyproline and glycine, as supportive therapy in experimental colitis in mice[J]. *Food Science & Nutrition*, 2018, 6: 1023-1031.
- [11] DENG Z, CUI C, WANG Y, et al. FSGHF3 and peptides, prepared from fish skin gelatin, exert a protective effect on DSS-induced colitis via the Nrf2 pathway[J]. *Food & Function*, 2020, 11: 414-423.
- [12] AZUMA K, OSAKI T. Fish scale collagen peptide protects colon inflammation an experimental ulceration

- tive colitis mouse model[C]. Hong Kong: 2014 International Conference on Food and Nutrition Technology, 2014, 72: 9.
- [13] QIU W J, CHEN X, TIAN Y Q, et al. Protection against oxidative stress and anti-aging effect in *Drosophila* of royal jelly-collagen peptide[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 135: 110881.
- [14] AZUMA K, OSAKI T, ITOH N, et al. Fish scale collagen peptide protects colon inflammation an experimental ulcerative colitis mouse model[J]. International Conference on Food and Nutrition Technology IPCBEE, 2014, 72: 41-49.
- [15] CHEN Q R, HOU H, WANG S K, et al. Effects of early enteral nutrition supplemented with collagen peptides on postburn inflammatory responses in a mouse model[J]. Food & Function, 2017, 8(5): 1933-1941.
- [16] 尹乐. 烤鳗加工条件下胶原蛋白结构变化与品质功能调控机制[D]. 福州: 福州大学, 2018.
YIN L, Changes of collagen structure and quality function regulation mechanism under processing condition of roasted eel[D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2018.
- [17] 袁媛, 袁永明, 代云云, 等. 国内外鳗鱼产业发展现状及趋势分析[C]. 中国水产学会. 西安: 2018年中国水产学会学术年会论文摘要集, 2018: 1.
YUAN Y, YUAN Y M, DAI Y Y, et al. Status and development trends of eel industry home and abroad[C]. China Society of Fisheries. Xi'an: Collection of Abstracts of the 2018 Annual Meeting of Chinese Fisheries Society, 2018: 1.
- [18] ARUMUGAM G, SHARMA D, BALAKRISHNAN R M, et al. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin[J]. Sustainable Chemistry & Pharmacy, 2018, 9: 19-26.
- [19] LUK H H, KO J K, FUNG H S, et al. Delineation of the protective action of zinc sulfate on ulcerative colitis in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 443(1/2/3): 197-204.
- [20] NISHIMOTO M, SAKAMOTO R, MIZUTA S, et al. Identification and characterization of molecular species of collagen in ordinary muscle and skin of the Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Food Chemistry, 2005, 90(1): 151-156.
- [21] MORALES J, MONTERO P, MORAL A. Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(6): 2142-2148.
- [22] PAYNE K J, VEIS A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies[J]. Biopolymers, 1988, 27(11): 1749.
- [23] FRIESS W, LEE G. Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices[J]. Biomaterials, 1996, 17(23): 2289-2294.
- [24] GÓMEZ-GUILLÉN M C, TURNAY J, FERNÁNDEZ-DÍAZ M D, et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study[J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(1): 25-34.
- [25] KIM J J, SHAJIB M S, MANOCHA M M, et al. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD[J]. J Vis Exp, 2012(60): 3678.
- [26] RAHAL A, KUMAR A, SINGH V, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 761264.
- [27] YAMAMOTO S, HAYASAKA F, DEGUCHI K, et al. Absorption and plasma kinetics of collagen tripeptide after peroral or intraperitoneal administration in rats[J]. Bioence Biotechnology and Biochemistry, 2015, 79(12): 1-8.
- [28] 季昀. 羟脯氨酸对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎的缓解作用及机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
JI Y. The role and mechanisms for hydroxyproline in a meliorating intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in mice[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018.
- [29] CHEN Q R, GAO X, ZHANG H W, et al. Collagen peptides administration in early enteral nutrition intervention attenuates burn-induced intestinal barrier disruption: Effects on tight junction structure[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 55: 167-174.

The Effect of Collagen Hydrolysate of Eel Skin on the Improvement of Colitis

Li Henian, Hu Yujia, Zhang Chi, Lin Jie, Guo Jingke, Liu Shutao*

(*Institute of Biotechnology Fuzhou University, Fuzhou 350002*)

Abstract Ulcerative colitis (UC) is an idiopathic intestinal disease with an increasing incidence, and all the therapeutic drugs have different degrees of side effects. Studies have found that collagen peptide can relieve the symptoms of UC, and is safe and healthy. However, the current research is mainly limited to the prevention effect of UC, and there is still a lack of research on the therapeutic effect of UC. Eel skin is rich in collagen, but eel head is generally discarded in processing, resulting in a waste of resources. Meanwhile, there is a lack of research on eel skin collagen hydrolysates. In this study, collagen was extracted from eel skin and hydrolyzed in the hope of obtaining eel skin collagen hydrolysate (CH) with therapeutic effect on UC, so as to improve the utilization value of eel processing by-products. It was found that eel skin contained abundant collagen, accounting for 27.87% of the wet weight of the skin. The extracted collagen was of high purity and mainly type I collagen, and eel skin could be used as a high-quality source of collagen. Collagen was enzymatically hydrolyzed to obtain eel skin collagen hydrolysate (CH) with antioxidant activity, and CH was administered to DSS induced UC mouse model. The results showed that CH could safely and healthily reduce DAI score to 0 and improve colon status in UC Model mice compared with Positive control group and Model group. Pathological sections of colon tissue showed that CH could restore the integrity of mucosal epithelium and reduce inflammatory cell infiltration. Oxidative stress index of colon tissue showed that CH could reduce MDA content (0.75 nmol/mg protein) and MPO activity (0.11 U/g tissue) in colon tissue, and improve the antioxidant capacity of colon tissue and reduce oxidative stress level by increasing GSH content (22.92 $\mu\text{mol/g pro}$) and activities of SOD (693.61 U/g pro), CAT (1.69 U/g pro) and GPx (141.29 U/g pro) antioxidant enzymes, so as to treat UC.

Keywords eel skin; collagen; ulcerative colitis; antioxidant