

酶解发酵牡丹花肽光损伤修护作用研究

李配配, 李 昊, 赵思雨, 王子慧, 李欣航, 徐晓明
(杭州花凝香生物科技有限公司, 浙江 杭州 310000)

摘 要: 采用酶解发酵技术制备牡丹花多肽 (PAFPs), 并对PAFPs进行光损伤修护功效及安全性进行研究。结果表明, PAFPs富含213种小分子肽, 分子量小于1 000 Da的组分占比高达94.22%, 细胞划痕实验结果显示, PAFPs能显著促进HaCaT细胞划痕的愈合; 在UVB诱导的光损伤模型中, PAFPs可以有效提升HaCaT细胞活力, 并显著降低基质金属蛋白酶 (MMP-1) 和活性氧自由基 (ROS) 水平; 同时采用鸡胚绒毛尿囊膜试验 (HET-CAM) 验证PAFPs的安全性, PAFPs在5 mg/mL以下无刺激性。综上, 牡丹花多肽 (PAFPs) 展现出潜在的修护和抗光损伤潜能。

关键词: 牡丹花; 修护; 光损伤; 酶解发酵

中图分类号: TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7264 (2026) 05-035-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7264.2026.05.006

牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr) 属芍药科, 芍药属多年生落地灌木。牡丹花是我国特有的传统名花, 素有“花中之王”美称, 不仅具有观赏价值, 在医药和化妆品领域也展现出巨大潜力^[1]。现代研究表明, 牡丹花富含蛋白质、糖、维生素C、氨基酸、黄酮及多酚物质等^[2,3], 具有抗氧化、抗炎、清除自由基、美白及免疫调节等生物活性^[4-6]。曾贝贝等^[7]研究表明, 牡丹酶解肽具有美白、抗糖化、抗氧化等作用, 张玉芝等^[8]研究了牡丹花发酵液具有DPPH、超氧阴离子等自由基清除能力, 以及抑制酪氨酸酶活性等作用。此外, 还有研究显示牡丹花瓣提取物能延长秀丽隐杆线虫寿命, 具有一定抗衰老作用^[9]。针对酶解发酵牡丹花肽修护功效和皮肤光防护领域的研究较少, 在本研究中, 采用酶解发酵工艺制备牡丹花肽 (PAFPs), 基于多肽成分分析、分子量、紫外吸收等特性, 进一步确定其物理化学性质, 以及通过角质形成细胞 (HaCaT) 划

痕实验、UVB诱导的HaCaT细胞光损伤及活性氧自由基 (ROS)、基质金属蛋白酶 (MMP-1) 等水平变化, 评估牡丹花肽体外光损伤修护作用, 为牡丹花肽在化妆品中应用提供依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

永生生化表皮角质细胞 (HaCaT), 浙江美森细胞科技有限公司; DMEM培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素 (PS), 美国赛默飞世尔科技公司; CCK-8试剂盒, 苏州优逸兰迪生物科技有限公司; MMP-1 ELISA试剂盒, 武汉华美生物工程有限公司; ROS试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司。

纳升级高效液相色谱仪 (EASY-nLC1200)、高分辨质谱 (Q-Exactive HF)、细胞计数仪, 美国赛默飞世尔科技

收稿日期: 2025-07-16

第一作者简介: 李配配 (1991-), 女, 河北人, 电话: 13001135600, E-mail: shaoshang@eastgarden.com。

通信作者: 徐晓明 (1986-), 男, 高级工程师, 电话: 15268123433, E-mail: sansheng@eastgarden.com。

公司; CO₂培养箱、生物安全柜, 力康生物医疗科技控股有限公司; 荧光倒置显微镜, 日本OLYMPUS公司; 多功能酶标仪, 瑞士帝肯 (Tecan) 公司; Bio-SUN紫外照射仪, VILBERLOURMAT公司; 紫外分光光度计 (Cary 60 UV-Vis), 安捷伦科技 (中国) 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PAFPs的制备

牡丹花, 选自山东菏泽。花经粉碎后, 加入pH 10.00的水中; 300 W超声搅拌3 h; 过滤得滤液, 滤液调节pH值至4.00; 过滤得沉淀, 调节pH值至7.00; 加入中性蛋白酶; 温度50 °C, pH 8.00, 反应时间3 h; 接种双歧杆菌发酵, 37 °C反应时间24 h; 过滤后, 滤液经活性炭吸附及超滤分级, 最后喷雾干燥得牡丹花肽PAFPs原料。采用凯式定氮法测试原料氮含量, LC-MS/MS分析多肽成分并进行紫外光谱扫描。

1.2.2 细胞安全浓度测试

HaCaT采用10%FBS、1%PS的DMEM完全培养基中常规传代。将HaCaT细胞以 2×10^4 个/孔密度接种至96孔板, 37 °C、5%CO₂条件下培养过夜后, 弃上清, 每孔加入100 μL含/不含样品的完全培养基, 不含样品的完全培养基作为空白对照组(BC)。培养24 h后, 每孔添加CCK-8检测液10 μL, 继续孵育60 min后, 使用酶标仪测定450 nm处吸光度, 记录A₄₅₀值。细胞活力计算公式: 细胞活力=样品组A值/空白对照组A×100%。选取细胞活力大于90%的样品组进行后续实验。

1.2.3 细胞划痕测试

HaCaT细胞稀释至密度为 5×10^5 个/mL接种于6孔板中, 2 mL/孔, 接种完毕后置于37 °C、5%CO₂培养箱中培养24 h; 取出6孔板, 用枪头在6孔板底部划1条纵向直线, 并用PBS缓慢清洗3遍, 去掉脱离细胞。空白对照组加入无血清培养基, 阳性对照组加入含10% FBS的培养基, 样品组加入含样品的无血清培养基, 加样结束后置于37 °C、5%CO₂培养箱中培养24 h。加样后0 h、24 h将6孔板中的划痕置于显微镜下拍照, 并计算划痕面积A。划痕愈合率计算公式为: 划痕愈合率=[A(0 h)-A(24 h)]/A(0 h)×100%。

1.2.4 UVB诱导的 HaCaT损伤测试

HaCaT细胞以 2×10^4 个/孔密度接种至96孔板上。置于37 °C、5%CO₂培养箱中培养过夜, 去除培养基, 每孔补充含或不含样品的完全培养基 (200 μL/孔), 然后放置于紫外照射仪上UVB

辐射 (30 mJ/cm², 光谱峰值312 nm), 辐射后于37 °C、5%CO₂条件下继续培养24 h。

光损伤细胞活力: 按照1.2.2步骤每孔添加CCK-8检测液10 μL进行活力检测。

MMP-1检测: 收集细胞上清液, 4 °C条件下, 4 000 r/min离心15 min, 严格按照ELISA试剂盒说明书进行检测。

ROS检测: 细胞培养操作同上, 培养24 h后去除培养基, 用PBS清洗细胞3次, 设置空白对照组(BC)、模型组(MC)、样品组, 每组平行3个复孔, 各实验分组加入荧光探针(DCFH-DA), 100 μL/孔, 37 °C、5%的CO₂培养箱中孵育30 min, 取出96孔板, 用PBS清洗细胞3次, 每孔加入200 μL含或不含样品的基础培养基, MC和样品组进行30 mJ/cm² UVB照射, 然后在37 °C、5%CO₂的培养箱中孵育60 min。计时结束后, 用酶标仪检测激发波长488 nm、发射波长525 nm下的荧光强度。ROS相对含量=样品组荧光强度/空白对照组荧光强度×100%, 清除率=(模型组ROS相对含量-样品组ROS相对含量)/模型组ROS相对含量×100%。

1.2.5 安全性评价

选择灵敏度高、可替代动物试验的鸡胚绒毛尿囊膜试验(HET-CAM)对PAFPs进行眼刺激的强弱测试^[10]。阴性对照组BC选用0.9%的氯化钠溶液, 阳性对照组PC选用0.1 mol/L氢氧化钠溶液。质量浓度5 mg/mL牡丹花肽300 μL作用于CAM上, 开动秒表, 观察记录作用5 min内出血、血管溶解、凝血出现的初始时间(s)。按下式计算每个鸡胚的刺激评分^[11]计算公式为: $IS = (301 - S_H) \times 5 \div 300 + (301 - S_L) \times 7 \div 300 + (301 - S_C) \times 9 \div 300$ 。

式中, S_H: 出血时间, S_L: 血管融解时间, S_C: 凝血时间。刺激性分类: IS<1, 无刺激性; 1≤IS<5, 轻刺激性; 5≤IS<9, 中度刺激性; IS≥10, 强刺激性/腐蚀性。

2 结果与讨论

2.1 PAFPs 成分分析及紫外吸收光谱

2.1.1 PAFPs成分分析

牡丹花肽为白色或米白色粉末, 采用凯式定氮法测试PAFPs中总氮含量为16.2%。多肽鉴定通过LC-MS/MS分析, 鉴定样品中总离子流图见图1。结果显示PAFPs含有213种短肽, 其中分子量小于1 000 Da占比94.22%。肽段丰度值较高的前10位如表1。

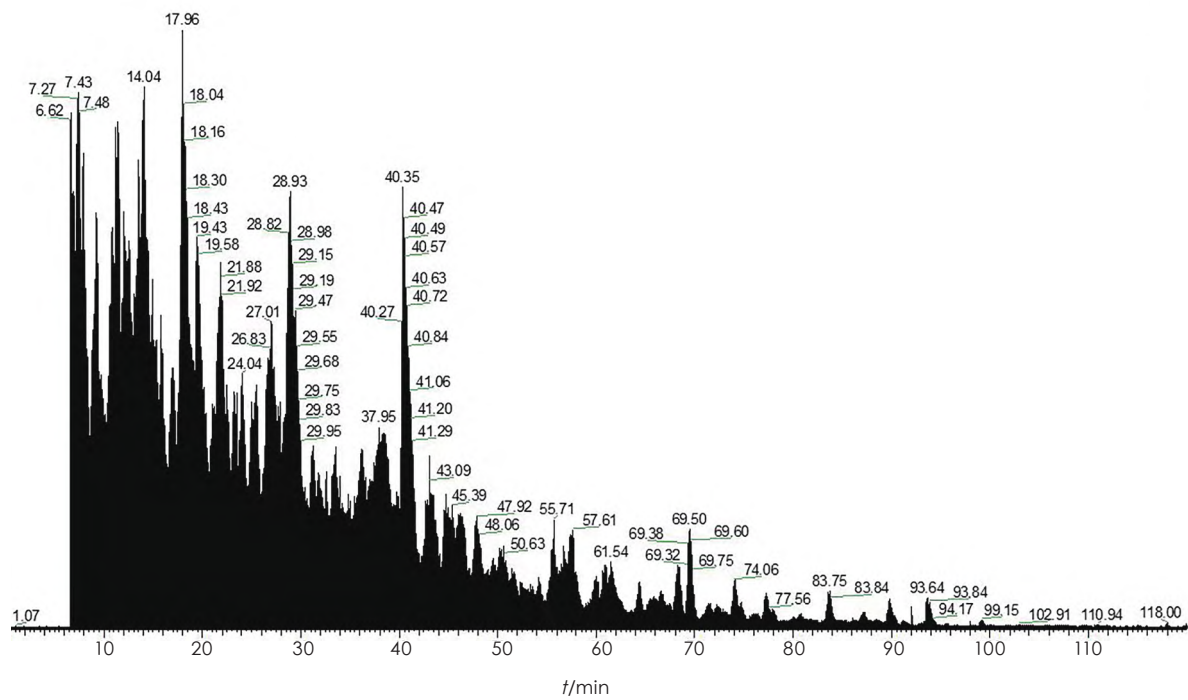


图1 PAFPs总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) of PAFPs

表1 PAFPs丰度值数据检索部分结果

Tab. 1 Partial results of abundance data for PAFPs

肽段注释序列	该肽段归属的主蛋白名称	肽段理论分子量/Da	丰度值	保留时间/min
[S].VELSTN.[D]	A0A1U9XQV4	662.335 55	1 077 767 168	18.373 9
[Q].PELALGVEAH.[T]	A0A0C4Y428	1 035.546 94	201 135744	30.316 9
[L].DGEDVI.[D]	A0A6G8QTD2	647.288 26	174 426 173.5	38.341 7
[G].EDVTDV.[K]	Q94KP7	677.298 83	163 299 984	17.233 6
[T].AVPGGAPLS.[T]	E7CYR2	768.425 03	150 739 120	24.527 2
[N].SVLESIGG.[G]	A0A1U9XQV3	761.403 96	148 546 896	30.445
[M].II AVPT.[G]	B0FAA5	613.391 94	138 269 264	38.697 3
[P].FATPL.[E]	A0A6M8AZ75	548.307 88	105 678 704	40.968 1
[P].EDIAPN.[K]	A0A2L0E720	658.304 25	193 021 456	22.814 7
[N].LTDDDV.[V]	C7SJ62	677.298 83	169 214 496	16.657 5

2.1.2 PAFPs紫外吸收光谱

验证PAFPs对UV是否具有强吸收。由图2可知, 10 mg/mL PAFPs水溶液, 在200~249 nm吸收呈强下降趋势, 在300 nm处吸光度仅0.09。

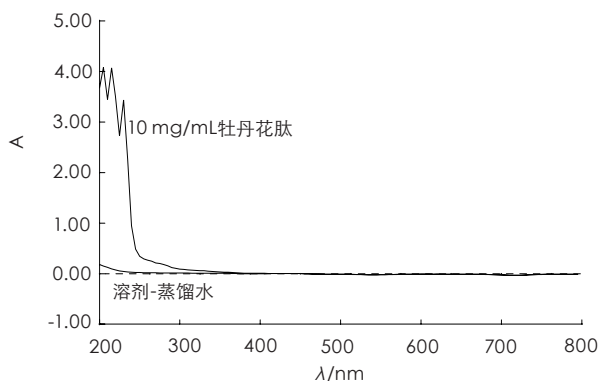


图2 PAFPs紫外吸收光谱
Fig. 2 UV absorption spectrum of PAFPs

2.2 PAFPs 细胞毒性测试

HaCaT细胞经不同浓度PAFPs处理24 h, 细胞活力如图3所示。由图3可知, PAFPs最高上样浓度1 mg/mL下, 细胞活力大于90%。1 mg/mL及以下浓度对HaCaT细胞无明显增殖或细胞毒性影响。选取适当浓度进行后续测试。

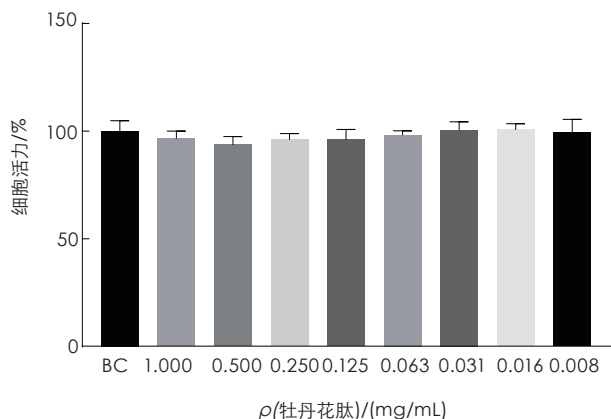


图3 PAFPs对HaCaT细胞毒性测试
Fig. 3 Cytotoxicity assay of PAFPs on HaCaT Cells

2.3 PAFPs 划痕测试

如图4所示, PAFPs在一定浓度下具有良好的生物学作用, 在测试浓度范围内 (1~100 $\mu\text{g/mL}$), PAFPs展示出促进细胞迁移能力, 加快HaCaT细胞划痕愈合; 当质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 促进HaCaT细胞迁移效果最显著, 划痕愈合率高达80.94%。

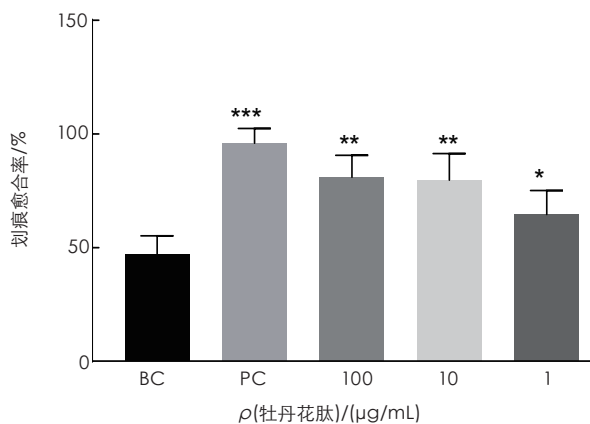


图4 细胞划痕愈合测试结果

Fig. 4 Results of the cell scratch wound healing assay

2.4 PAFPs 缓解 UVB 诱导的 HaCaT 损伤

如图5所示, NC组HaCaT细胞经UVB紫外线照射后, 细胞活力明显下降, 与BC组有显著性差异, 表示紫外造成细胞损伤或凋亡。与NC组相比, 样品组处理细胞并经UVB紫外线照射后, 在质量浓度100 $\mu\text{g/mL}$ 下, 显著提升了HaCaT细胞活力, 提升率为16.67%。

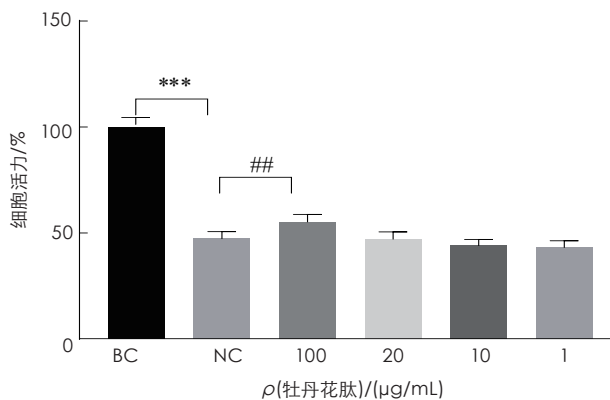


图5 PAFPs对UVB诱导的HaCaT细胞活力的影响

Fig. 5 Effect of PAFPs on the viability of UVB-induced HaCaT cells

紫外线UVB诱导的皮肤光老化的主要机制包括引起氧化应激^[12]、刺激炎症反应、基质金属蛋白酶 (MMPs) 的异常表达等。皮肤细胞过度暴露于紫外线UVB辐射会导致细胞内活性氧 (ROS) 大量积累^[13]。过量的ROS可以引起皮肤光老化的炎症级联反应, 如由NF- κ B、TNF- α 介导的炎症途径引起的光老化^[14]。此外, ROS对胶原蛋白代谢的调节至关重要, 可以导致人皮肤中至少3种MMPs的表达增加, 从而导致胶原降解和细胞凋亡^[15]。

如图6, HaCaT细胞在UVB照射后ROS含量显著增加, 在200 $\mu\text{g/mL}$ 和400 $\mu\text{g/mL}$ PAFPs作用下, ROS自由基清除率明显升高。如图7, 100, 200和 400 $\mu\text{g/mL}$ PAFPs作用下MMP-1含量显著降低。

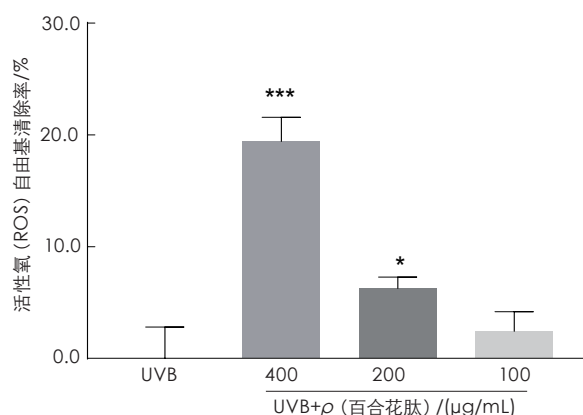


图6 PAFPs对UVB诱导的HaCaT细胞ROS清除率影响

Fig.6 Effect of PAFPs on ROS scavenging rate in UVB-induced HaCaT cells

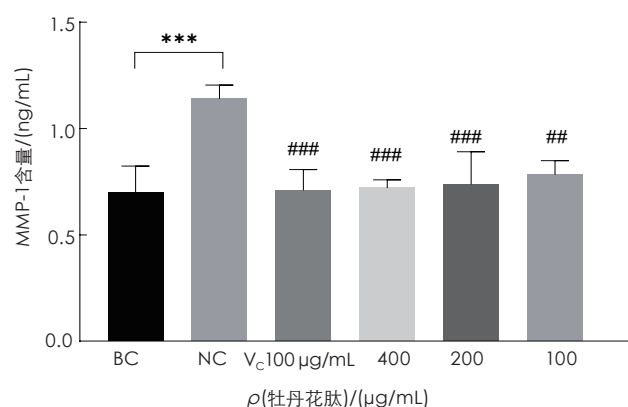


图7 PAFPs对UVB诱导的HaCaT细胞MMP-1含量影响

Fig.7 Effect of PAFPs on MMP-1 levels in UVB-induced HaCaT cells

2.5 鸡胚刺激性

如表2所示, BC组接触CAM 5 min内, 均未见出血、血管溶解或凝血现象。5 mg/mL的牡丹花肽作用CAM 5 min, 未出现出血、血管溶解或凝血现象, 刺激积分IS为0分。牡丹花肽在一定浓度下无眼刺激性。

表2 PAFPs鸡胚刺激性实验结果

Tab.2 Results of the hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) assay for PAFPS

受试物	IS	结论	受试5 min图片
BC	0	无刺激	
PC	17.03	强刺激	
PAFPs	0	无刺激	

3 结论

通过酶解-发酵协同技术制备PAFPs, 该方法富集得到的多肽中肽段分子量小于1 000 Da部分占94.33%, 为其透皮吸收提供一定理论基础。HaCaT细胞实验结果表明, PAFPs能显著促进细胞迁移。在UVB照射诱导的细胞光损伤模型中, PAFPs有效降低了活性氧(ROS)和基质金属蛋白酶-1(MMP-1)水平, 显著提升受损细胞活力。综上, PAFPs具有显著的皮肤修护与抗光损伤的潜力。

参考文献:

- [1] 赵宣. 芍药属牡丹组(*Paonia* sect. *Moutan*)种间关系及栽培牡丹的起源[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [2] 邵玉如, 乔琦. 牡丹花活性成分及功效的研究进展[J]. 北方园艺, 2025(4): 124-129.
- [3] 闫慧娇, 王志伟, 赵恒强, 等. 菏泽牡丹花HPLC特征图谱研究及8种成分的测定[J]. 中草药, 2017, 48(9): 1866-1871.
- [4] 陈佳龄, 张凯, 孙永, 等. 牡丹花水提液清除羟自由基及抑制酪氨酸酶活性的研究[J]. 日用化学工业(中英文), 2014, 44(12): 692-694, 713.
- [5] MA L, JIAO K, LUO L, et al. Characterization and macrophage immunomodulatory activity of two polysaccharides from the flowers of *Paonia suffruticosa* Andr[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124: 955-962.
- [6] 余昊阳, 熊智, 郭一荣, 等. 牡丹花蕾提取物体外抗氧化、美白活性研究[J]. 日用化学品科学, 2017, 40(6): 24-29.
- [7] 曾贝贝, 吕静, 鲁杏茹, 等. 牡丹花酶解肽的理化性质及促进皮肤健康功效[J]. 食品工业科技, 2024, 45(22): 314-321.
- [8] 张玉芝, 张永涛, 王海涛, 等. 牡丹花发酵液功效活性检测及安全性评价[J]. 香料香精化妆品, 2022(5): 5-10, 23.
- [9] WANG S, XUE J, ZHANG S, et al. Composition of peony petal fatty acids and flavonoids and their effect on *Caenorhabditis elegans* lifespan[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 155: 1-12.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准: SN/T 2329-2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [11] 陆泽安, 郑赛华, 吴越, 等. 鸡胚绒毛尿囊膜试验用于化妆品的体外眼刺激性评价[J]. 日用化学品科学, 2013, 36(9): 20-26.
- [12] GU Y, HAN J, JIANG C, et al. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 59: 101036.
- [13] HWANG E, PARK S, LEE H J, et al. Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(12): 1778-1788.
- [14] CUI B, WANG Y, JIN J, et al. Resveratrol Treats UVB-

Induced Photoaging by Anti-MMP Expression, through Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiapoptotic Properties, and Treats Photoaging by Upregulating VEGF-B Expression[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 6037303.

[15] GROMKOWSKA-KEPKA K J, PUSCION-JAKUBIK A, MARKIEWICZ-ZUKOWSKA R, et al. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging-review of in vitro studies[J]. J Cosmet Dermatol, 2021, 20(11): 3427-3431.

Study on the photodamage-repairing effects of enzymatically fermented Peony flower peptides

LI Peipei, LI Hao, ZHAO Siyu, WANG Zihui, LI Xinhang, XU Xiaoming
(Hangzhou Huaningxiang Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310000, China)

Abstract: Peony flower peptides (PAFPs) were prepared via enzymatic fermentation, and their photodamage-repairing efficacy and safety were evaluated. PAFPs were found to be rich in 213 small peptides, with 94.22% of components having a molecular weight below 1 000 Da. In a HaCaT cell scratch assay, PAFPs significantly promoted wound closure. In a UVB-induced photodamage model, PAFPs enhanced HaCaT cell viability and markedly reduced matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) levels and reactive oxygen species (ROS) production. Safety assessment using the hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) assay indicated that PAFPs at concentrations below 5 mg/mL were non-irritating. These results demonstrate that PAFPs have potential for skin repair and photoprotection.

Key words: Peony flower; skin repair; photodamage; enzymatic fermentation

(本文编辑 张 静)

~~~~~  
(上接第19页)

## Preparation and characterization of a quercetin microemulsion

GAO Chenglong  
(Shanghai Forest Cabin Cosmetics Group Co., Ltd., Shanghai 201612, China)

**Abstract:** Quercetin has attracted considerable attention in various fields due to its excellent biological activities; however, its extremely low solubility limits its bioavailability. In this study, a 2% quercetin microemulsion (QRME) was prepared using a low-energy emulsification method, and its stability, antioxidant and antiglycation activities, cellular effects, and bioavailability were investigated. The results showed that QRME exhibited stronger 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity than Vitamin E acetate, and its antiglycation activity was 42.1 times higher than that of decarboxylated carnosine. The skin retention of quercetin after 8 h was  $(3.25 \pm 0.186) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . In addition, 0.027 mg/mL QRME increased cellular adenosine triphosphate (ATP) levels by 196.99% and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) levels by +63.02%. These results indicate that QRME exhibits excellent performance in antioxidant and antiglycation activities, transdermal absorption, and enhancement of cellular energy metabolism, which may help expand the cosmetic applications of quercetin.

**Key words:** quercetin; microemulsion; antioxidant and antiglycation; adenosine triphosphate (ATP); nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)

(本文编辑 张 静)