DOI：10.3969/j.issn.1004-4949.2022.13.002

PDRN的工艺改进及其功效研究

于甜甜，杨 燕，赵珊珊，郭 凯，殷金岗，林梦君，崔本文，姬胜利
（润辉生物技术<威海>有限公司，山东 威海 264207）

【摘 要】目的 改进和优化PDRN生产工艺，并评估改进工艺后，自制PDRN产品质量和功效。**方法** 采用酶解法生产制备PDRN，提高胰蛋白酶酶解鱼精蛋白的温度，缩短酶解时间；延长脱氧核糖核酸酶解时间，运用改进后的方法生产3批PDRN，对比3批产品的质量稳定性；并对其中一批进行功效研究，建立体外LPS刺激小鼠巨噬细胞模型以及划痕试验，研究PDRN抗炎和促进伤口愈合的能力，抗炎功效研究分为空白对照组（DMEM）、阴性对照组（DMEM+LPS）、阳性对照组（DMEM+地塞米松+LPS）和样品组（DMEM+PDRN+LPS），对比4组对炎症因子（IL-6和TNF-α）的抑制情况；促进伤口愈合功效研究分为空白对照组（RPMI1640）和样品组（RPMI1640+PDRN），对比2组促成纤维细胞迁移情况，以此评估其促进伤口愈合能力。**结果** 酶解法制备的PDRN，三批收率分别为10.23%、11.61%和11.22%，增色效应为36.01%、32.04%和42.82%；与NC组比较，0.313 mg/ml、0.625 mg/ml和1.250 mg/ml样品组的IL-6表达量降低（$P<0.05$）；0.625 mg/ml和1.250 mg/ml样品组的TNF-α表达量降低（$P<0.05$）。与BC组比较，0.1 mg/ml的PDRN对划痕区域的细胞迁移有一定的促进作用，可减小划痕面积，而5 mg/ml的PDRN细胞划痕面积无减小趋势。**结论** 酶解法提高了PDRN产品的收率，且改进后生产工艺生产的PDRN具有抗炎及促伤口愈合的功效，且作用效果明显。

【关键词】多聚脱氧核糖核酸；PDRN；抗炎；伤口愈合
中图分类号：TQ658 **文献标识码：**A **文章编号：**1004-4949（2022）13-0007-06

Study on Process Improvement and Effects of PDRN

YU Tian-tian, YANG Yan, ZHAO Shan-shan, GUO Kai, YIN Jin-gang, LIN Meng-jun, CUI Ben-wen, JI Sheng-li
(ReaLi Tide Biological Technology <Weihai> Co., Ltd., Weihai 264207, Shandong, China)

【Abstract】Objective To improve and optimize the PDRN production process, and evaluate the quality and efficacy of PDRN products after the improved process. **Methods** PDRN was prepared by enzymatic hydrolysis to increase the temperature of protamine hydrolysis and shorten the hydrolysis time. Prolonging the deoxyribonucleic acid enzymolysis time, using the improved method to produce 3 batches of PDRN, comparing the quality stability of 3 batches of products ; the anti-inflammatory effect of PDRN was studied by establishing a mouse macrophage model stimulated by LPS in vitro and scratch test. The anti-inflammatory effect of PDRN was divided into blank control group (DMEM), negative control group (DMEM+LPS), positive control group (DMEM+dexamethasone+LPS) and sample group (DMEM+PDRN+LPS). The inhibition of inflammatory factors (IL-6 and TNF-α) was compared among the four groups. The study of promoting wound healing efficacy was divided into blank control group (RPMI1640) and sample group (RPMI1640+PDRN). The migration of fibroblasts in the two groups was compared to evaluate its ability to promote wound healing. **Results** The yields of three batches of PDRN prepared by enzymatic hydrolysis were 10.23%, 11.61% and 11.22%, respectively, and the hyperchromic effects were 36.01%, 32.04% and 42.82%, respectively. Compared with NC group, the expression of IL-6 in 0.313mg/ml,0.625mg/ml and 1.250 mg/ml sample groups decreased ($P<0.05$). The expression of TNF-α in 0.625 mg/ml and 1.250 mg/ml sample groups decreased ($P<0.05$). Compared with BC group, 0.1 mg/ml PDRN could

第一作者：于甜甜（1990.10-），女，山东威海人，硕士，中级工程师，主要从事化妆品方面研究
通讯作者：姬胜利（1963.10-），男，山东济南人，博士，教授，主要从事多肽、多糖药物研究
引用格式：于甜甜,杨燕,赵珊珊,等.PDRN的工艺改进及其功效研究[J].医学美学美容,2022,31(13):7-12.
收稿日期：2022-05-16 **修回日期：**2022-05-29

promote the migration of cells in the scratch area and reduce the scratch area, while 5 mg/ml PDRN had no decreasing trend. **Conclusion** Enzymatic hydrolysis improves the yield of PDRN products, and the PDRN produced by the improved production process has anti-inflammatory and wound healing effects, and the effect is obvious.

【**Key words**】Polydeoxyribonudeotide; PDRN; Anti-inflammatory; Wound healing

皮肤衰老是多种因素引起的退行性过程，与慢性炎症有着密切联系[1]。随着年龄的增长，体内氧化还原平衡能力失调，激活促炎信号通路，导致促炎介质（如IL-1、IL-6和TNF-α等）水平不断提高[2]。多聚脱氧核糖核酸（polydeoxyribonudeotid，PDRN）来自于三文鱼精子，是分子量在50～1500 KDa的脱氧核糖核酸聚合物，具有组织修复、抗炎、促血管生长等多种活性功能[3]。在韩国、日本、欧洲等国家，PDRN已广泛应用于医药、化妆品、医疗器械等各个领域中[4]。PDRN由脱氧核糖核酸酶酶解，产生单脱氧核苷酸或寡脱氧核苷酸，通过激活嘌呤能受体，来刺激成纤维细胞增殖、迁移、血管生成以及核酸的合成，从而促进伤口愈合[5-7]。PDRN还是一种A2A受体激动剂，该受体的刺激可以减少炎症细胞因子的分泌[8]，有效抑制IL-6和TNF-α的表达[9]，同时可以降低瘢痕的形成[10]。PDRN的制备方法有很多，但大多都存在一定的缺陷。现有制备PDRN技术的提取收率低，在较高温度下使用酸降解DNA降低分子量的过程中需高温反应条件以及加碱中和和超声波分解破碎过程中产生局部高温，易发生美拉德反应，导致产品颜色发黄，影响产品质量。润辉生物技术<威海>有限公司对上述制备方法进行了改进，采用了温和的酶切法制备PDRN，此方法可以去除部分导致过敏反应的嘌呤碱基，增加产品的安全性，同时可提高收率，解决高温易降解、产品易泛黄等问题[11]。本研究主要对PDRN的工艺改进及其功效进行分析，现报道如下。

1　材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器材料 PDRN（批号：RN01-211211），润辉生物技术<威海>有限公司；地塞米松（批号：WXBD3340V），Sigma；脂多糖（LPS，批号：820F036），北京索莱宝科技有限公司；DMEM高糖基础培养基（批号：WH0021D231），武汉普诺赛生命科技有限公司；胎牛血清（批号：21090701），浙江天杭生物科技有限公司；CCK-8细胞毒性及细胞增殖试剂盒，上海碧云天生物科技有限公司；Mouse IL-6 ValukineTMELISA（批号：600404），R&D；Mouse TNF-alpha ValukineTM ELISA（批号：600409），R&D；小鼠单核巨噬细胞（RAW 264.7），武汉普诺赛生物科技有限公司；L929小鼠成纤维细胞，武汉普诺赛生物科技有限公司；RPMI1640培养基，Gibco；胰蛋白酶（批号：2022020401），安琪酵母。仪器：搪瓷反应釜（淄博庆冠化工设备销售有限公司）；紫外可见分光光度计（上海棱光技术有限公司）；万能粉碎机（江阴市祥达机械制造有限公司）；生物安全柜（苏州安泰空气技术有限公司）；多功能酶标仪（Thermo）；二氧化碳培养箱（Thermo）；台式冷冻离心机（Sigma）；生物显微镜（上海光学仪器一厂）；数显恒温水浴锅（常州朗越仪器制造有限公司）；倒置显微镜（上海光学仪器一厂）。

1.2 PDRN制备工艺 在专利报道的基础上[11]，对关键步骤进一步优化，以控制PDRN分子量范围和双链的完整性，保持高生物活性。溶液配制：混合盐溶液1：0.15 mol/L的NaCl，0.03 mol/L的柠檬酸钠，0.5%的$NaHSO_3$，pH为8.0；混合盐溶液2：0.15 mol/L的NaCl，0.03 mol/L的柠檬酸钠，pH为8.0；混合盐溶液3：0.15 mol/L的NaCl，0.5 mmol/L的EDTA。

1.2.1鱼精巢预处理 将冷库内冷冻保存的约500 g大马哈鱼鱼精巢取出，于室温下解冻；再用去离子水洗涤2次；最后使用粉碎机对鱼精巢进行粉碎处理，将鱼精巢彻底粉碎成浆糊状。

1.2.2鱼精细胞收集 将1.2.1中得到的浆糊状处理物按照1∶2（m/v）的比例加入混合盐溶液1中，于室温搅拌5 h，将上述溶液以6000 rpm的转速离心15 min，弃上清，再使用混合盐溶液2将沉淀洗涤5次，离心获得含鱼精细胞的沉淀物。

1.2.3酶解鱼精细胞中的鱼精蛋白 在37 ℃下，将含鱼精细胞的沉淀物按照1∶25（m/v）的比例加入混合盐溶液3中搅拌均匀；按照鱼精巢原料质量与胰蛋白酶质量为250∶1的比例加入至反应体系中，并在50 ℃下酶解10 h。

1.2.4鱼精巢DNA上清液收集 在步骤1.2.3的反应体

系中加入鱼精巢原料重量9%的SDS、最终浓度为1.6 mol/L的NaCl，持续搅拌3～5 h后离心沉淀，收集上清液。

1.2.5鱼精巢DNA收集 将步骤1.2.4中的洗脱液按照2.5∶1的体积比加入至预先冷却的无水乙醇中搅拌，使絮状的DNA析出，并漂浮于溶液上层；将上述的DNA取出，采用75%乙醇水溶液洗涤、离心5次，将得到的DNA沉淀粉碎，经冻干处理得到DNA白色固体。

1.2.6 PDRN获取 将步骤1.2.5中的DNA溶解在37 ℃的去离子水中，形成10 g/L的溶液；将脱氧核糖核酸酶加入至反应体系中形成3 mg/L的溶液，并在37 ℃下反应2 h；加入9%的SDS（w/v）、终浓度为1.6 mol/L的NaCl溶液，继续搅拌4 h后离心除沉淀，收集上清液；上清液按照体积比为2∶1的比例加至预冷的无水乙醇中搅拌0.5 h，将溶液以6000 rpm的转速离心1 h，弃上清；用75%乙醇水溶液将沉淀洗涤、离心4次后，将得到的DNA沉淀粉碎，进行冻干得到白色固体，即为PDRN。

采用上述制备工艺生产PDRN，计算其收率，并对其性状、蛋白质、细菌内毒素、含量、收率以及增色效应等进行观察和检验。

1.3 细胞毒性及功效研究试验方法

1.3.1细胞毒性检测方法 按照96孔板布局，在每个细胞孔中加入100 μl细胞悬液，每孔中的细胞量为1×10^4个细胞。于37 ℃、5%的CO_2、湿润条件下培养24 h。根据细胞毒性试验进行试验设计，设置3个组：空白对照组、溶剂对照组、样品组，试验设计见表1。小鼠单核巨噬细胞以DMEM培养基作为受试物溶剂，样品组设置5个样品浓度：0.078、0.156、0.313、0.625和1.250 mg/ml。每个浓度设置3个重复孔，干预24 h后，采用CCK-8法进行检测，孵育时间为2 h，于450 nm检测吸光值。计算相对细胞活力，相对细胞活力大于70.00%时，说明样品对细胞无毒性。相对细胞活力（A_s-A_b）/（A_n-A_b）×100%，其中：As为样品组吸光值；An为溶剂对照组吸光值；Ab为空白组吸光值。

1.3.2抗炎功效评价 通过体外建立LPS刺激小鼠巨噬细胞模型[12，13]，加入样品干预刺激过程，考察样品是否能抑制炎性因子IL-6和TNF-α的分泌，从而达到抗炎功效。LPS溶液：称取LPS粉末5 mg，溶于1 ml培养基中，混匀，0.22 μm滤膜过滤除菌，得5 mg/ml母液，-20 ℃冰箱保存。临用前用培养基稀释至1 μg/ml。取处于对数生长期的Raw264.7细胞，以1×10^5个/ml密度接种于24孔板，在37 ℃、5%的CO_2条件下培养24 h，加入样品，每孔1 ml，试验设计见表2。继续培养24 h，使用Mouse IL-6 Valukine TMELIAS和Mouse TNF-alpha ValukineTM ELISA试剂盒分别检测细胞中的IL-6和TNF-α的含量。结果判断：样品组与NC组相比，样品组的IL-6和TNF-α表达量显著降低，即可表明样品具有一定抗炎功效。

1.3.3促伤口愈合功效评价 通过划痕试验[14]，考察样品对L929小鼠成纤维细胞迁移能力的影响，以评价样品是否具有促伤口愈合的能力。取处于对数生长期的L929细胞以3×10^5个/ml接种于24孔板，在37 ℃、5%的CO_2条件下培养24 h，加入样品，每孔1 ml，试验设计见表3。继续培养36 h，倒置显微镜下观察细胞迁移情况并拍照，愈合率用Image J软件进行分析。细胞迁移率（%）=（1-$\frac{加药后划痕面积}{初始划痕面积}$）×100%。

表1 细胞毒性试验设计

组别	是否有细胞接种	样品名称
空白对照组（BC）	否	/
溶剂对照组（NC）	是	/
样品组	是	PDRN

表2 抗炎功效评价试验设计

组别	样品名称	浓度	刺激条件
空白对照（BC）	DMEM	100%	/
阴性对照（NC）	DMEM	100%	1 μg/ml的LPS
阳性对照（PC）	地塞米松	0.1 mg/ml	1 μg/ml的LPS
样品组1	PDRN	0.313 mg/ml	1 μg/ml的LPS
样品组2	PDRN	0.625 mg/ml	1 μg/ml的LPS
样品组3	PDRN	1.250 mg/ml	1 μg/ml的LPS

表3　促伤口愈合功效试验设计

组别	样品名称	浓度
空白对照（BC）	RPMI1640	100%
样品组1	PDRN	0.1 mg/ml
样品组2	PDRN	5 mg/ml

1.4 统计学方法 本研究数据采用originPro8.0软件进行分析，计算每个处理组的平均值（Mean）、标准差（SD）和变异系数（CV），使用单向方差分析（ANOVA）进行统计学检验，方差齐性使用Levene检验，多重比较使用Fisher LSD检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义，$P<0.01$表示统计学意义显著。

2　结果

2.1 自制PDRN检验结果 自制PDRN三批收率均大于10.00%，增色效应大于30.00%，分子量在100～300 KDa范围内，检验结果见表4。

表4　PDRN检验结果

检测项目	检验结果		
	RN01-211211	RN01-211230	RN01-220225
产量（g）	51	58	56
收率（%）	10.23	11.61	11.22
性状	白色粉末	白色粉末	白色粉末
含量（%）	94.03	93.14	94.59
增色效应（%）	36.01	32.04	42.82
细菌内毒素（EU/mg）	2.5	2	3
蛋白质含量（%）	0.40	0.56	0.78
分子量范围（KDa）	150～250	100～130	200～300

2.2 细胞毒性试验结果 以PDRN的浓度为横坐标，相对细胞活力值为纵坐标，绘制相对细胞活力曲线，结果显示随着PDRN浓度增加，相对细胞活力逐渐降低，样品浓度在1.250 mg/ml时，相对细胞活力为86.53%，见图1。

2.3 抗炎功效的评价结果 与NC组比较，0.313 mg/ml、0.625 mg/ml和1.250 mg/ml样品组的IL-6表达量降低（$P<0.05$），且在试验设计的三个样品浓度下，样品的浓度与IL-6表达量呈剂量依赖型关系，见图2。与NC组比较，0.625 mg/ml和1.250 mg/ml样品组的TNF-α表达量降低（$P<0.05$），且在试验设计的3个样品浓度下，样品的浓度与TNF-α表达量呈剂量依赖型关系，见图3。

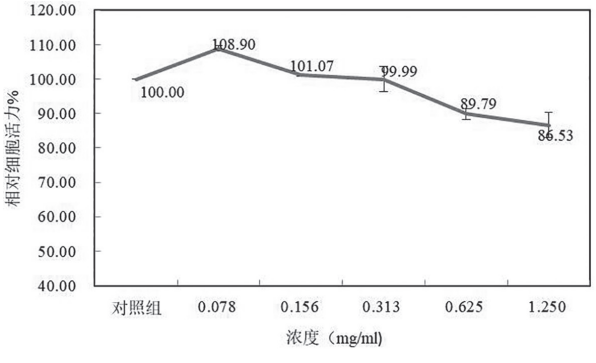
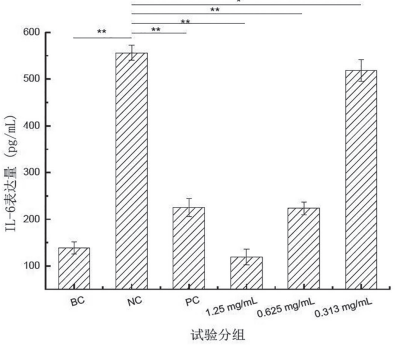
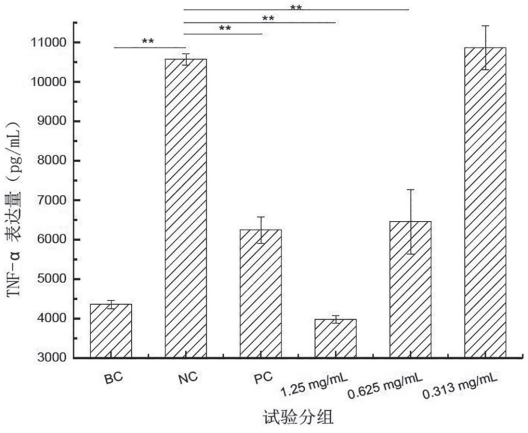


图1　相对细胞活力曲线



注：*$P<0.05$；**$P<0.01$

图2　不同处理对IL-6含量的影响



注：$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$

图3 不同处理对TNF-α含量的影响

2.4 促伤口愈合功效的评价结果 与BC组比较，0.1 mg/ml的PDRN对划痕区域的细胞迁移有一定的促进作用，可减小划痕面积；5 mg/ml的PDRN细胞划痕面积无减小趋势，见表5、图4。

表5 划痕面积和细胞迁移率结果

组别	T0划痕面积（像素）	T36h划痕面积（像素）	细胞迁移率（%）
空白对照	699780	602378	13.92
0.1 mg/ml样品组	656891	456781	30.46
5 mg/ml样品组	678001	579782	14.49

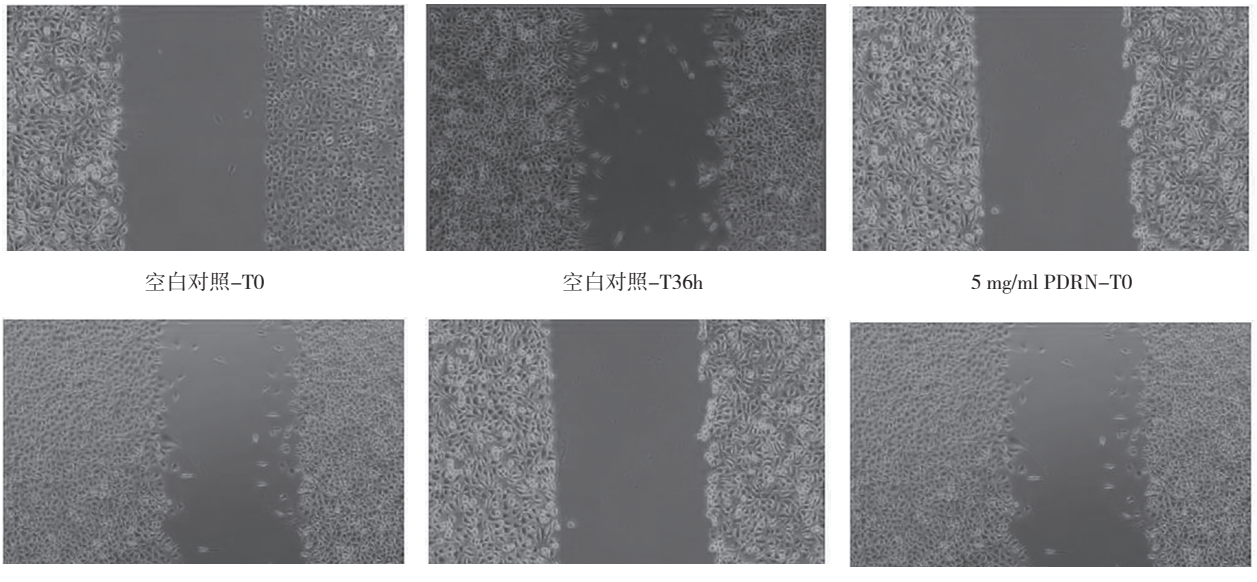


图4 不同试验分组的检测结果

3 讨论

目前，PDRN在国外广泛应用于各领域，对PDRN的质量要求也越来越高[15-18]。润辉生物技术<威海>有限公司依托于天然海洋生物资源，对PDRN工艺进行研究、改进，以提高PDRN的产品质量为目的，提高产品收率、降低经济成本。PDRN具有多种活性功能，其抗炎、舒缓、促修复功能尤为强大，国内化妆品市场尚未全面开放应用，本研究旨在为其开发利用提供依据。

本研究对三批自制PDRN进行了考察检验，结果显示酶解法制备的PDRN，三批收率分别为10.23%、11.61%和11.22%，增色效应为36.01%、32.04%和42.82%，提示其收率大幅度提高，增色效应符合要求，与经典分子量（50~1500 KDa）[19]相比，自制PDRN的分子量范围稳定的控制在100～300 KDa，并且解决了高温易泛黄的问题，保证质量的同时还提高了产品的安全性。细胞毒性试验结果显示，与NC组比较，0.625 mg/ml和1.250 mg/ml样品组的TNF-α表达量降低（$P<0.05$），提示PDRN在0.078~1.250 mg/ml的浓度范围内，相对细胞活力为86.53～108.90%，大于70.00%，因此

上述浓度范围内未表现出细胞毒性。抗炎功效评价结果显示，与NC组比较，0.313 mg/ml、0.625 mg/ml和1.250 mg/ml样品组的IL-6表达量降低（$P<0.05$），提示0.313 mg/ml、0.625 mg/ml和1.250 mg/ml的PDRN可以有效抑制炎症因子IL-6的表达量，并且0.625 mg/ml和1.250 mg/ml的PDRN可以有效抑制TNF-α的表达量。促伤口愈合功效评价结果表明，0.1 mg/ml的PDRN具有明显的促成纤维细胞迁移的能力，而5 mg/ml的PDRN具有明显抑制成纤维细胞迁移的能力，因此在较低浓度时，PDRN表现出促进伤口愈合的能力。

综上所述，改进后生产工艺生产的PDRN具有抗炎及促伤口愈合的功效，且作用效果明显。

参考文献：

[1]Castellini C,Belletti S,Govoni P,et al.Anti inflammatory property of PDRN—an in vitro study on cultured macrophages[J].Advances in Bioscience and Biotechnology,2017,8(1):13-26.

[2]Chung HY,Cesari M,Anton S,et al.Molecular inflammation:underpinnings of aging and age-related diseases[J].Ageing Research Reviews,2009,8(1):18-30.

[3]Squadrito F,Bitto A,Irrera N,et al.Pharmacological activity and clinical use of PDRN[J].Frontiers in Pharmacology,2017,8:224.

[4]Kim TH,Heo SY,Oh GW,et al.Applications of Marine Organism-Derived Polydeoxyribonucleotide:Its Potential in Biomedical Engineering[J].Marine Drugs,2021,19(6):296.

[5]Buffoli B,Favero G,Borsani E,et al.Sodium-DNA for bone tissue regeneration:An experimental study in rat calvaria[J].BioMed Research International,2017:7320953.

[6]Colangelo MT,Galli C,Guizzardi S.The effects of polydeoxyribonucleotide on wound healing and tissue regeneration:a systematic review of the literature[J].Regenerative Medicine,2020,15(6):1801-1821.

[7]Yu M,Lee JY.Polydeoxyribonucleotide improves wound healing of fractional laser resurfacing in rat model[J].Journal of Cosmetic and Laser Therapy,2017,19(1):43-48.

[8]Han JH,Jung J,Hwang L,et al.Anti inflammatory effect of polydeoxyribonucleotide on zoledronic acid pretreated and lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells[J].Experimental and Therapeutic Medicine,2018,16(1):400-405.

[9]Kim SE,Ko IG,Jin JJ,et al.Polydeoxyribonucleotide exerts therapeutic effect by increasing VEGF and inhibiting inflammatory cytokines in ischemic colitis rats[J].BioMed Research International,2020:2169083.

[10]Jeong W,Yang CE,Roh TS,et al.Scar prevention and enhanced wound healing induced by polydeoxyribonucleotide in a rat incisional wound-healing model[J].International Journal of Molecular Sciences,2017,18(8):1698.

[11]姬胜利,殷金岗,杨燕,等.一种高效的外用PDRN的制备方法及其应用:中国,CN112315836A[P].2021.

[12]张艳云,卢永波,胡成新,等.化妆品舒缓功效测试-体外TNF-α炎症因子含量测定脂多糖诱导巨噬细胞RAW264.7测试方法[Z].上海日用化妆品行业协会,2021.

[13]Nam SY,Kang SW,Kim J,et al.Anti-inflammatory effects of porcine placenta in forced swimming tested fatigue mice and RAW264.7 cells[J].Cell Med,2017,7(4):20.1-20.6.

[14]Koo Y,Yun Y.Effects of polydeoxyribonucleotides (PDRN) on wound healing:Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)[J].Materials Science and Engineering,2016,69:554-560.

[15]Lee JH,Han JW,Byun JH,et al.Comparison of wound healing effects between Oncorhynchus keta-derived polydeoxyribonucleotide (PDRN) and Oncorhynchus mykiss-derived PDRN[J].Arch Craniofac Surg,2018,19(1):20-34.

[16]Lee DW,Hyun H,Lee S,et al.The Effect of Polydeoxyribonucleotide Extracted from Salmon Sperm on the Restoration of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw[J].Mar Drugs,2019,17(1):51.

[17]Kim J,Chun S,Ohk SO,et al.Amelioration of alcohol-induced gastric mucosa damage by oral administration of food-polydeo xyribonucleotides[J].Mol Med Rep,2021,24(5):790.

[18]Ko IG,Jin JJ,Hwang L,et al.Adenosine A2A receptor agonist polydeoxyribonucleotide ameliorates short-term memory impairment by suppressing cerebral ischemia-induced inflammation via MAPK pathway[J].PLoS One,2021,16(3):e0248689.

[19]Hwang KH,Kim JH,Park EY,et al.An effective range of polydeoxyribonucleotides is critical for wound healing quality[J].Molecular Medicine Reports,2018,18(6):5166-5172.