

重组人源胶原蛋白对D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用及机制研究

李 佳, 安苗青, 吕晨豪, 郭荣香, 杜 冰, 贺 庆

Anti-aging Effects and Mechanisms of Recombinant Human-derived Collagen on Aging Mouse Induced by D-Galactose

LI Jia, AN Miaoling, L Chenhao, GUO Rongxiang, DU Bing, and HE Qing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070013>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

沙棘多糖对D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用

Antioxidant Effects of *Hippophae rhamnoides* Polysaccharide on Aging Mouse Induced by D-galactose

食品工业科技. 2020, 41(4): 293-297,306 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.050>

红树莓花色苷对D-半乳糖衰老模型小鼠的保护作用

Protective Effects of Red Raspberry Anthocyanins on D-galactose Induced Mice Aging

食品工业科技. 2019, 40(6): 279-284 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.047>

夏黑葡萄花青素抗氧化活性及对D-半乳糖衰老模型小鼠的保护作用

Antioxidant Activity of Summer Black Grape Anthocyanin and Its Protective Effect on D-galactose Induced Aging Mice

食品工业科技. 2020, 41(3): 22-26,32 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.03.005>

D-手性肌醇对高糖导致氧化损伤线虫延缓衰老的作用及机制

Anti-aging Effects and Underling Mechanism of D-chiro-inositol on Glucose-Induced Oxidative Damage in *Caenorhabditis elegans*

食品工业科技. 2019, 40(2): 282-286 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.02.049>

苦丁茶黄酮提取物对D-半乳糖致小鼠衰老的改善作用

Improvement effects of Kuding tea flavonoids extracts on D-galactose induced mice aging

食品工业科技. 2017(16): 303-308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.057>

农大4号'欧李果实花色苷对D-半乳糖致衰老小鼠保护作用研究

Protection Effect of Anthocyanins from the Chinese Dwarf Cherry 'Nongda No 4' on Aging Mouse by D-galactose

食品工业科技. 2020, 41(17): 292-296,307 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.049>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李佳, 安苗青, 吕晨豪, 等. 重组人源胶原蛋白对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(10): 343–352. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070013

LI Jia, AN Miaoqing, LÜ Chenhao, et al. Anti-aging Effects and Mechanisms of Recombinant Human-derived Collagen on Aging Mouse Induced by D-Galactose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(10): 343–352. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070013

· 营养与保健 ·

重组人源胶原蛋白对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用及机制研究

李 佳¹, 安苗青², 吕晨豪², 郭荣香², 杜 冰^{2,*}, 贺 庆^{1,*}

(1. 江苏艾兰得营养品有限公司, 江苏泰州 214500;

2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510000)

摘 要: 为探究重组人源胶原蛋白 (recombinant human-derived collagen, RHC) 的抗衰老作用及机制, 通过 300 mg/kg D-半乳糖腹腔注射构建衰老小鼠模型, 并采用不同剂量 RHC 进行干预, 研究衰老模型小鼠皮肤透明质酸、胶原蛋白、脂褐素、羟脯氨酸含量、抗氧化酶活性、与表皮细胞增殖分化和胶原蛋白合成相关的关键基因、蛋白的表达量等变化。结果表明, 与衰老模型组 (SLM) 相比, 小鼠经过 RHC 干预后, 皮肤的褶皱程度明显减轻, 胶原蛋白含量和含水量显著增加 ($P<0.05$), 超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 含量增加, 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量显著减少 ($P<0.0001$)。与 SLM 组相比, RHC 处理组的抗氧化指标, 如谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 含量显著增加, 而脂褐素含量、病理评分均有所降低, 且不同剂量处理组之间也有一定的差异性。此外, RHC 处理组小鼠皮肤中的关键基因 (*EGFR*、*TIMP-1*、*COL1A2*、*COL3A1*、*TGF- β I*、*TGF- β II*) 的表达水平呈上升趋势, *MMP-1*、*MMP-3* 基因和蛋白的表达降低。综上所述, RHC 具有良好的抗皮肤衰老作用, 其作用机制可能通过抗氧化、以及改善 *EGFR*、*TGF* 信号通路, 调节 *MMPs* 和 *TIMPs* 动态平衡, 促进表皮细胞的增殖分化和胶原蛋白合成从而起到延缓皮肤衰老的作用。

关键词: 重组人源胶原蛋白, D-半乳糖, 衰老模型, 抗衰老, 脂褐素

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)10-0343-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070013

本文网刊:



Anti-aging Effects and Mechanisms of Recombinant Human-derived Collagen on Aging Mouse Induced by D-Galactose

LI Jia¹, AN Miaoqing², LÜ Chenhao², GUO Rongxiang², DU Bing^{2,*}, HE Qing^{1,*}

(1. Jiangsu Aland Nutrition Co., Ltd., Taizhou 214500, China;

2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510000, China)

Abstract: In order to explore the anti-aging effect and mechanism of recombinant human-derived collagen (RHC), the aging mouse model was constructed through 300 mg/kg D-galactose intraperitoneal injection, and different doses of RHC were used to study the changes of hyaluronic acid, collagen, lipofuscin, hydroxyproline content, antioxidant enzyme activity, key genes and protein expression related to epidermal cell proliferation and differentiation and collagen synthesis. The results showed that compared with the aging model group (SLM), the intervention groups that was gavaged RHC had significantly less skin folds, higher collagen content ($P<0.05$) and superoxide dismutase (SOD), while lower malondialdehyde (MDA) content in the skins ($P<0.0001$). Compared with the SLM group, antioxidant indicators such as glutathione peroxidase (GSH-Px) content were increased in the RHC intervention groups, while lipofuscin content and

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2020A1515011268)。

作者简介: 李佳 (1988-) (ORCID: 0000-0002-5188-0816), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: lijia01@alandgroup.com。

* 通信作者: 杜冰 (1973-) (ORCID: 0000-0002-5301-2756), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品新原料的开发, E-mail: gzdubing@163.com。

贺庆 (1978-) (ORCID: 0000-0001-8106-8581), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生药学, E-mail: heqing@alandgroup.com。

pathological scores were reduced, and significant effect were also observed. In addition, the expression levels of key genes and protein (*EGFR*, *TIMP-1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *TGF- β I*, *TGF- β II*) were increased, while those of *MMP-1*, *MMP-3* in the skin of mouse were decreased in the RHC intervention groups. In conclusion, RHC has a good anti-aging effect on the skin, and its mechanism may be related to increase antioxidant effect, promote the *EGFR*, *TGF* pathway, and modulate the expression balance of *MMPs* and *TIMPs*, promote the proliferation and differentiation of epidermal cells, and the synthesis of collagen.

Key words: recombinant human-derived collagen; D-galactose; aging model; anti-aging; lipofuscin

衰老是机体随着年龄增长而发生的一种退行性变化过程^[1],受多种因素调控,涉及机体的不同组织与细胞^[2],其中,皮肤衰老是其重要的表现形式,如皱纹出现、皮肤干燥、角化过度以及色素沉着^[3]。此外,老年斑^[4]的出现也标志着组织和细胞进入衰老阶段。Ogrodnik 等^[5]认为衰老是损伤与改变的过程和稳定替换与修复过程相互作用的结果,但以上两个过程均涉及基因作用、氧消耗率、代谢率及自由基的产生。大量证据表明^[6],正常的衰老过程是由一个活性氧(ROS)诱导的多步骤过程。另外,线粒体功能障碍也是衰老的特征之一^[7],据相关研究报道,可以通过抗氧化和延长端粒的方式延缓细胞衰老^[8]。目前发现,白藜芦醇^[9]、雷帕霉素^[10]、姜黄素^[11]等药物具有抗衰老的作用,但都存在一些局限性,主要表现为生物利用率低。因此,寻找和探索新的抗衰老药物就显得尤为重要。

胶原蛋白又称胶原质,主要从动物组织中提取,并通过基因工程菌进行高密度发酵得到^[12]。是一种能够在一定程度上延缓细胞衰老的蛋白肽^[13],它主要包括动物胶原蛋白和重组人源胶原蛋白(recombinant human-derived collagen, RHC)两种。重组人源胶原蛋白(RHC)是根据人胶原蛋白的特性进行优化或引入特殊功能的氨基酸序列,通过重组表达得到的具有类似胶原蛋白特性的蛋白^[14]。它具有独特的化学结构,与动物源的胶原蛋白相比,重组型人源胶原蛋白具有良好的生物相容性与生物降解性^[15-16],在生物医用材料、美容化妆品、食品保健等领域有着广阔的应用前景^[17-18]。重组人源胶原蛋白(RHC)作为一种新型胶原蛋白,与人的皮肤细胞同根同源,具有基因亲和性,可以外源地给予皮肤补充胶原蛋白,连接皮肤因创伤和感染造成的皮肤纤维断裂,抑制黑色素生成,抑制瘢痕,加速皮肤愈合^[19]。郭亚媛^[20]通过 HE 染色实验发现,小鼠经 RHC/TG-cell 处理后,发现其能够促进损伤皮肤的修复,能够使缺损皮肤在短时间内再生,促进成纤维细胞分泌细胞生长所需的生长因子。另外,牛佳玮等^[21]通过给小鼠灌胃恭城油茶发现恭城油茶能够较好的抑制肝损伤从而进一步延缓衰老。

现阶段国内外对重组人胶原蛋白的研究都集中在骨修复^[22]、皮肤创面敷料^[23]、肌腱修复^[24]、药物输送^[25-26]、和美容^[27]等方面,对于抗衰老方面的研究鲜有,且对其抗衰老机制尚不清楚,因此本实验以 D-半

乳糖衰老小鼠为衰老模型,通过测定皮肤中衰老基础指标、抗氧化酶活性及关键基因和蛋白的表达来探究 RHC 胶原蛋白的抗衰老机制,为开发以 RHC 胶原蛋白为原料的新型保健食品奠定了试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

重组人源胶原蛋白(RHC) 由江苏江山聚源生物技术有限公司提供;胶原蛋白 由深圳金富源生物科技有限公司提供,嘉丽达产品,纯度为 91.9%;SPF 级 KM 雌性小鼠 体重 18~22 g,由广东省医学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(粤)2018-0002,实验动物质量合格证号:NO.44007200092153;饲料 由广东省医学实验动物中心提供,许可证号:粤饲证(2019)05073,合格证号:NO.44200300022730。小鼠饲养于本单位屏障实验室,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2018-0137;ELISA Kit 试剂盒 上海碧云天生物试剂有限公司;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)试剂盒、ELISA 抗氧化酶试剂盒 均由南京建成生物工程研究所提供;多聚甲醛 由济南腾博化工有限公司提供;二甲苯 由东莞市新都化工有限公司提供;巴比妥钠 纯度为 99%,由湖北成丰化工有限公司提供。

PHS2-25 超低温冰箱 青岛海尔;POWER/PAC 3000 电泳仪 美国 Bio-Rad;Varioskan Lux 多功能酶标仪 无锡华卫德朗仪器有限公司;H2050R 冷冻离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司;赛多利斯电子天平 上海精密仪器仪表有限公司;HistoStar 组织包埋机 沈阳恒松科技有限公司;HM340E 病理切片机 深圳市汇沃科技有限公司;TPJ-A 组织摊片机 金华市益迪医疗设备有限公司;奥斯微专业金相光学显微镜 东莞市瑞显光学仪器有限公司;Bio-Rad 凝胶成像系统 伯乐生命医学产品(上海)有限公司(bio-rad);检测试剂盒均由客户提供,包括皮肤组织中透明质酸、羟脯氨酸和脂褐素,血清炎症因子和血清抗氧化指标的检测试剂盒。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及处理 参照 Kong 等^[28]的实验造模方法稍作修改,如表 1,将 72 只 SPF 级 KM 雌性小鼠随机分为 6 组,每组 12 只,分别为 NC 正常对照组、SLM 衰老模型组、RHC 低、中、高剂量组,

300 mg/kg 的 DC 胶原蛋白干预组;其中,NC 对照组小鼠每日于颈背处皮下注射等体积 0.85% 生理盐水;SLM 组小鼠每日于颈背处皮下注射 300 mg/kg 的 D-半乳糖,其余各组每日皮下注射 300 mg/kg 的 D-半乳糖造模后,每天早上一次性经口灌胃给药相应胶原蛋白,低、中、高剂量分别为 50、500、1000 mg/kg;连续灌胃 6 周,一周称量一次小鼠体重,根据体重计算给药体积(0.1 mL/10 g)。

表 1 实验分组与设计
Table 1 Experimental group and design

编号	组别	受试物	剂量 (mg/kg)	给药 方式	给药 周期	小鼠 数量
NC	正常对照组	—	—	ig	6 周	12 只
SLM	衰老模型组	—	—	ig	6 周	12 只
LRHC	RHC 低剂量	RHC 低剂量	50	ig	6 周	12 只
MRHC	RHC 中剂量	RHC 中剂量	500	ig	6 周	12 只
HRHC	RHC 高剂量	RHC 高剂量	1000	ig	6 周	12 只
DC	胶原蛋白干预组	胶原蛋白	1000	ig	6 周	12 只

注: ig 表示经口灌胃。

1.2.2 血清及皮肤组织匀浆的制备 参照 Kong 等^[28] 的实验方法稍作修改,使用 1% 巴比妥钠(3.5 μ L/g) 麻醉各组小鼠,用眼球采血法将全血放置 2 mL EP 管中,4 $^{\circ}$ C 冰箱内静置 2 h 后,在低温冷冻离心机以 3500 r/min 离心 15 min,取上清液分装并放置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱内保存备用;

剪取 2 cm \times 2 cm 背部皮肤,剪去皮下组织,用预冷生理盐水冲洗干净,剪成 2 块,一部分放置于固定液中,另一部分放于封口袋中于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中冻存;

1.2.3 皮肤中透明质酸、羟脯氨酸、胶原蛋白、脂褐素含量的测定 参照薛文等^[29] 的方法,采用 ELISA Kit 分别测定皮肤组织中透明质酸、羟脯氨酸、胶原蛋白、脂褐素含量 I 型和 III 型胶原蛋白的含量。

1.2.4 RHC 对小鼠皮肤组织中抗氧化指标测定 参照钟召兵^[30] 的方法稍作修改,采用 ELISA 抗氧化酶试剂盒检测皮肤组织上清液中抗氧化酶活性。

1.2.5 RHC 对小鼠关键基因表达水平测定 参照林才云等^[31] 的方法,用 Trizol 法提取皮肤组织 RNA,采用 5 \times PrimeScript RT Master Mix 进行逆转录合成 cDNA,SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒进行 qPCR,分别测定 *MMP-1*、*MMP-3*、*TIMP-1*、*EGFR*、*COL3A1*、*COL2A1* 基因表达量。

1.2.6 RHC 对小鼠的关键蛋白表达水平测定 提取小鼠皮肤总蛋白,以 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转膜 2 h 至甲醇处理后的聚丙烯二氟乙烯膜(PVDF) 上,转膜,置于摇床,用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 封闭液封闭 1 h,然后加入一抗 β -actin(1:50000)、MMP-1(1:500)、MMP-3(1:500)、TIMP-1(1:500)、EGFR(1:500)室温孵育 2 h,采用 TBS-T 洗 5 次,每次 15 min,加入二抗(1:2000)室温孵育 1 h,TBS-T

洗 5 次,每次 15 min,最后加入 ECL 显色液显色。将显影得到的条带进行灰度分析,以 β -actin 为内参,以 MMP-1、MMP-3、TIMP-1、EGFR 各条带与内参条带灰度值的比值表示蛋白表达水平。

1.2.7 组织病理学观察 参照康俞莉等^[32] 方法及表 2 皮肤损伤评分标准对小鼠皮肤进行病理评分。取材:切取试验小鼠一部分皮肤组织,迅速用 4% 多聚甲醛中性液固定 24 h。将固定好的组织取出置于通风橱内,用手术刀修平整,放于对应标签脱水盒内。

表 2 皮肤损伤评分标准
Table 2 Score standard of skin injury

皮肤病理学改变	积分	最高分
A.棘层肥厚(a)		
轻度(表皮为正常厚度1.5~3倍)	1	3
中度(表皮为正常厚度3~4倍)	2	
重度(表皮为正常厚度4倍以上)	3	
B.过度角化		
(b)颗粒层增厚	1	1
(c)角层增厚	1	1
C.其他表皮改变		
(d)颗粒层缺乏	1	1
(e)角化不全	1	1
(f)表皮细胞空泡化或细胞内水肿或基底细胞液化变性	1	1
(g)海绵形成		
棘细胞间水肿	1	2
水疱形成	2	
D.表皮坏死		
(h)表皮坏死		
轻度(占表皮切面的1/3以下)	8	15
中度(占表皮切面的1/3~2/3)	10	
重度(占表皮切面的2/3以上)	15	
E.真皮变化		
(i)真皮结缔组织血管扩张充血或水肿	1	1
(j)胶原纤维变性或解离	1	1
(k)真皮炎细胞浸润		
轻度	1	3
中度	2	
重度	3	

脱水浸蜡:将脱水盒放入脱水机内的吊篮,用乙醇梯度脱水:75% 乙醇 4 h,85% 乙醇 2 h,90% 乙醇 2 h,95% 乙醇 1 h。紧接着用无水乙醇 I 和无水乙醇 II 各洗脱 30 min,随后用 50% 乙醇和 50% 二甲苯、二甲苯 I、二甲苯 II 各浸泡 10 min,使其保持透明。最后,用 65 $^{\circ}$ C 融化石蜡 I、65 $^{\circ}$ C 融化石蜡 II、65 $^{\circ}$ C 融化石蜡 III 各浸渍 1 h。

包埋:将融化的蜡置于包埋框内,待蜡凝固前将组织从脱水盒内取出按照包埋面的要求放入包埋框。-20 $^{\circ}$ C 冻台冷却,待蜡块凝固后取出修整。

切片:将修整好的蜡块置于石蜡切片机切片,厚 4 μ m。将组织切片于 40 $^{\circ}$ C 摊片机内温水上展平,用载玻片捞起,60 $^{\circ}$ C 烘箱内烤片,直至烤化后取出。

HE 染色观察:石蜡切片脱蜡:二甲苯 I 20 min \rightarrow

二甲苯Ⅱ 20 min→无水乙醇Ⅰ 5 min→无水乙醇Ⅱ 5 min→75%酒精 5 min, 自来水清洗; 苏木素染色: 切片分别置于苏木素染液染 3~5 min, 自来水洗, 分化液分化, 自来水洗, 返蓝液返蓝, 流水冲洗; 伊红染色: 切片依次由 85%、95% 的梯度酒精脱水 5 min 后, 置于伊红染液中染色 5 min; 脱水封片: 切片依次置于无水乙醇Ⅰ 5 min→无水乙醇Ⅱ 5 min→无水乙醇Ⅲ 5 min→二甲苯Ⅰ 5 min→二甲苯Ⅱ 5 min 透明, 中性树胶封片; 显微镜镜检, 图像采集分析。

1.3 数据处理

数据处理采用 Origin 8.1, 采用 GraphPad Prism 8 做图, 采用 ANOVA 对数据的差异性进行分析, 结果表示为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 RHC 对小鼠体重和皮肤胶原蛋白及水分含量的影响

NC 组小鼠毛色顺滑、光亮, 行为正常; SLM 组小鼠则毛色缺乏光泽, 有精神萎靡现象、行为活动迟缓等衰老体征, 当小鼠经过 RHC 干预后这些衰老症状有所改善。小鼠体重增长情况是反应生命体征的一个重要指标^[28], 在实验过程中各组小鼠体重缓慢增长, 各组间体重并无明显差异(图 1A), 表明 RHC 胶原蛋白对小鼠生长发育无不良影响; 胶原蛋白对补充皮肤水分起着至关重要的作用, 可以促进作为保湿成分的透明质酸的生成, 令皮肤更加水分充盈, 从而帮助肌肤吸取大量的水分^[28]; 当皮肤组织细胞的水分减少, 会导致细胞皱缩、老化、组织缺水、萎缩, 从而加速衰老^[29]。如图 1B 显示, 与 NC 组相比, SLM 组小鼠皮肤胶原蛋白含量显著降低($P<0.05$), 表明其衰老程度高于 NC 组, 与 SLM 组相比, 其他剂量组胶原蛋白含量略有增加, 且与 RHC 浓度呈现一定的剂量依赖性。如图 1C 所示, 经过 RHC 样品干预后的小鼠其皮肤的水分含量与 SLM 组相比显著增加($P<0.05$), 且随着 RHC 浓度的增加呈现一定的剂量依赖性。熊慧等^[33]采用干燥法测定小鼠皮肤水分含量发现九龙虫可以明显改善衰老小鼠皮肤水分含量, 与该实验得出类似的结论。表明 RHC 不仅可以增加小鼠皮肤胶原蛋白含量的增加, 也可以增加水分含量, 具有一定抗衰老效果。

2.2 RHC 对小鼠皮肤透明质酸、羟脯氨酸、脂褐素、胶原蛋白含量的影响

透明质酸是一种粘多糖, 具有特殊的保水作用, 能够促进创口愈合、改善皮肤营养代谢、防止衰老^[34], 羟脯氨酸是构成皮肤胶原蛋白的特有成分之一, 能够促进皮肤纤维细胞的生长, 有效反映出皮肤的衰老程度^[35]; 脂褐素, 又称老年色素, 在机体内不能被降解和胞吐, 当皮肤组织细胞的水分减少时会导致细胞皱缩、老化、萎缩, 从而产生脂褐素^[36]。胶原蛋白对补充皮肤水分起着至关重要的作用, 可以促进作

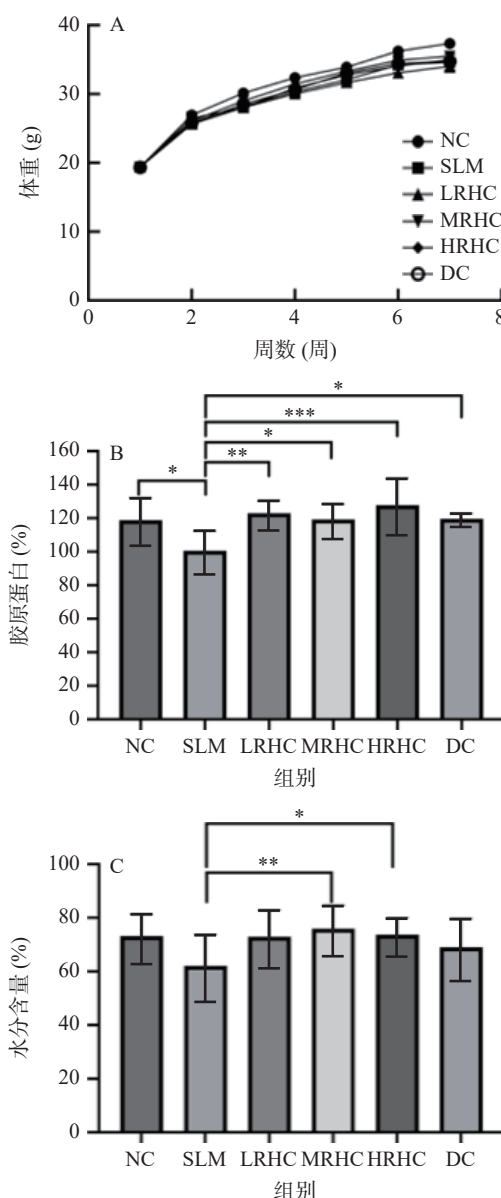


图1 RHC 对小鼠体重和皮肤胶原蛋白及水分含量的影响

Fig.1 Effects of RHC on body weight, skin collagen and moisture content of mice

注: 与模型组相比: * $P<0.05$ 显著, ** $P<0.01$ 极显著, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; 图 2~图 6 同。

为保湿成分的透明质酸的生成, 从而帮助肌肤吸取大量的水分, 令皮肤更加水润充盈^[37], 而 I 型胶原蛋白决定皮肤轮廓、III 型胶原蛋白决定皮肤弹性及细腻程度。研究结果如图 2 所示, 与 NC 组相比, SLM 组羟脯氨酸、胶原蛋白含量、脂褐素含量、I 型胶原蛋白含量有显著差异($P<0.05$, $P<0.001$), 表明 D-半乳糖衰老小鼠模型造模成功; 在图 2C 和图 2D 中, 与 NC 组相比, SLM 组脂褐素含量显著升高($P<0.0001$), I 型胶原蛋白含量显著降低($P<0.0001$); 与 SLM 组相比, RHC 低、中、高剂量组和 DC 组脂褐素含量显著降低($P<0.0001$)。该结果与伍春^[38]在研究党参多糖多抗老小鼠的影响中的结果类似。图 2E 中 SLM 组与 RHC 中剂量组相比具有差异性($P<0.05$), RHC 低、中、高剂量组虽有先增后减的趋势, 但没有

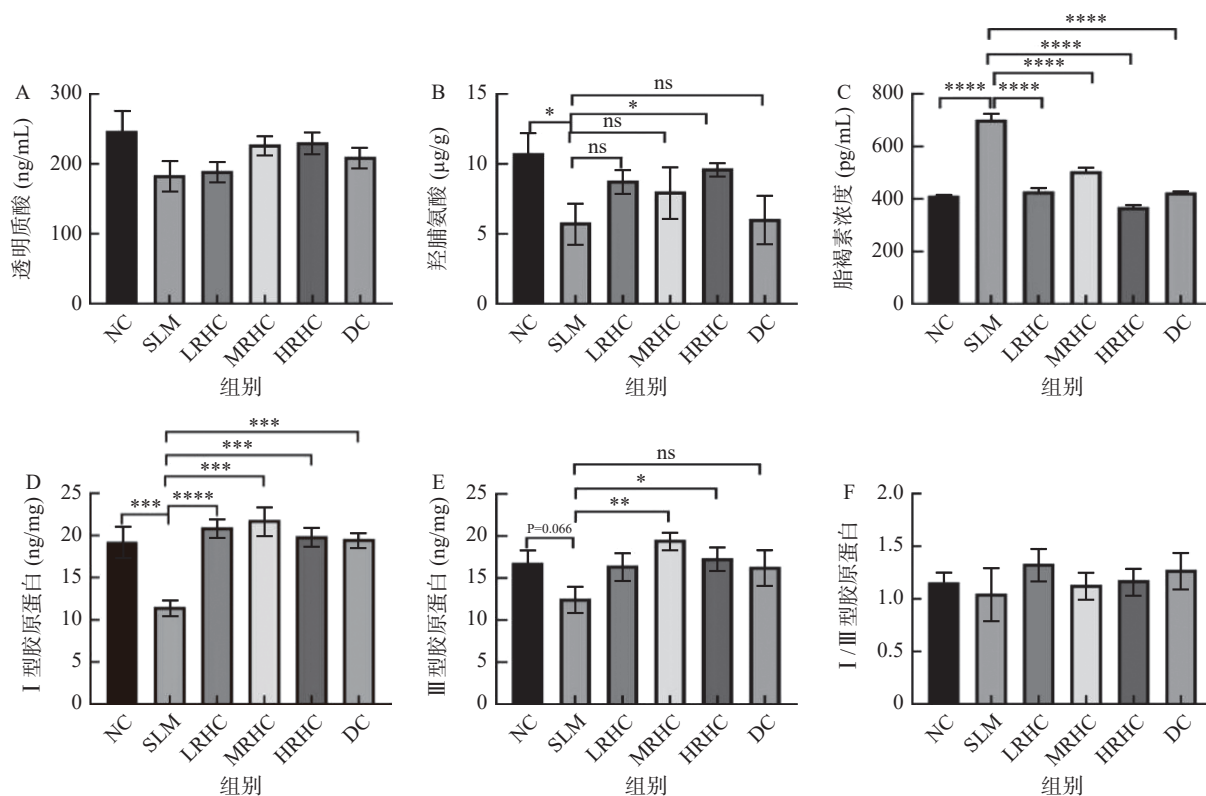


图 2 RHC 对小鼠皮肤透明质酸、羟脯氨酸、胶原蛋白、脂褐素含量的影响

Fig.2 Effects of RHC on the contents of hyaluronic acid, hydroxyproline, collagen and lipofuscin in mouse skin

注: ns 表示没有显著性差异; 图 3~图 5 同。

显著性差异。初步表明 RHC 胶原蛋白能够促进皮肤中透明质酸、羟脯氨酸和胶原蛋白的产生,减少皮肤脂褐素积累,缓解皮肤衰老。

2.3 皮肤组织抗氧化指标的测定

大量研究表明 D-半乳糖注射诱导能够加速小鼠衰老,正常情况下集体会产生氧化应激,产生 MDA

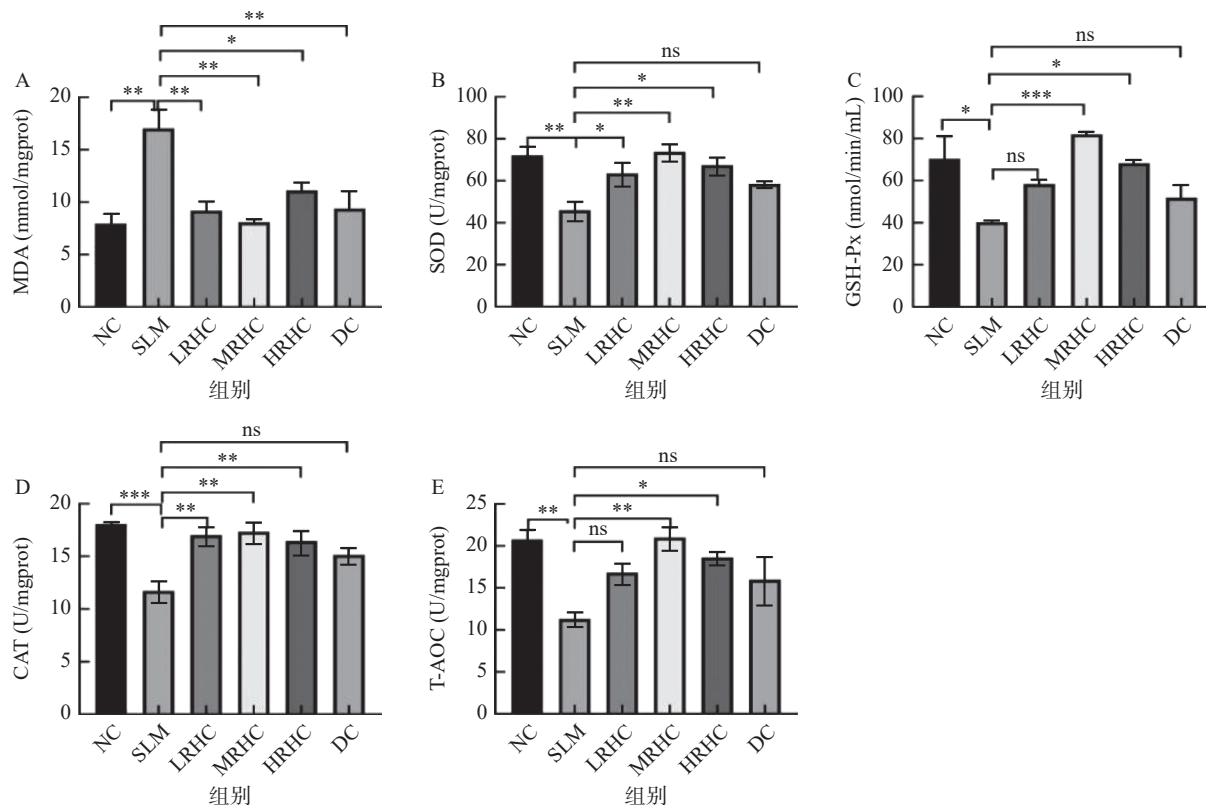


图 3 RHC 对小鼠皮肤组织抗氧化指标的测定

Fig.3 Determination of antioxidant indexes of mouse skin tissue by RHC

及其他脂质过氧化,MDA的分解产物会引起细胞的损伤,因此MDA是衡量脂质过氧化反应的重要指标;机体内SOD是抗氧化系统中发挥主要作用的酶,它们作为抗氧化机制下游的酶能够间接反应机体被自由基攻击程度^[35],GSH-Px参与体内GSH催化反应,清除机体内过量的氧自由基,是衡量抗氧化能力大小的因素之一,增强酶活性,产生自由基^[35]。由图3A结果显示,与NC组相比,SLM组小鼠皮肤匀浆中MDA含量显著增加($P<0.0001$),且SLM组与添加了RHC的中、高剂量组相比都具有显著性($P<0.0001$)。由图3B可知,SLM组与NC组相比SOD值显著降低($P<0.01$),RHC低、中、高剂量组与SLM组相比显著升高,且中剂量组效果最好。由图3C可知,添加了RHC的低、中、高剂量组与NC组相比具有显著性($P<0.05$)。有相关研究表明,党参能使高强度训练后的大鼠心肌线粒体SOD活性增强,MDA含量显著减少,显示出较好的抗氧化作用^[39],与本实验的研究结果类似。在图3D和3E中,SLM组小鼠皮肤匀浆中CAT和T-AOC活性显著低于NC组($P<0.0001$)。图3D中,与SLM

组相比,MRHC组CAT的含量显著升高($P<0.001$),HRHC组与DC组相比也具有显著差异性($P<0.01$),而LRHC、MRHC、HRHC之间呈现出先增后减的趋势,但没有显著差异性;图3E中,与SLM组相比,LRHC、MRHC、HRHC的含量显著升高($P<0.001$),且添加了RHC的低、中、高剂量组随着剂量的增加呈现出先增后减的趋势,此结果与王岚等^[40]的研究结果类似。表明RHC胶原蛋白能够增强机体内抗氧化酶活性,清除体内自由基,降低过氧化物代谢产物丙二醛含量,提高机体抗氧化能力,从而延缓衰老。

2.4 RHC对小鼠关键基因表达水平测定

EGFR因子作为ErbB受体家族中的一种跨膜蛋白受体因子,调控细胞的增殖、分化和凋亡;基质金属蛋白酶MMP家族中MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7和MMP-9被视为修复损伤和减缓细胞凋亡中正常组织重构的重要因子;TIMP-1是基质金属蛋白酶的抑制剂,TIMPs家族抑制MMPs家族功能,两者共同维护细胞外基质稳态^[36]。许多临床实验已经证实MMPs过表达与癌症的高敏感性和致死率有关,这预示着MMPs同疾病发展的早期和末

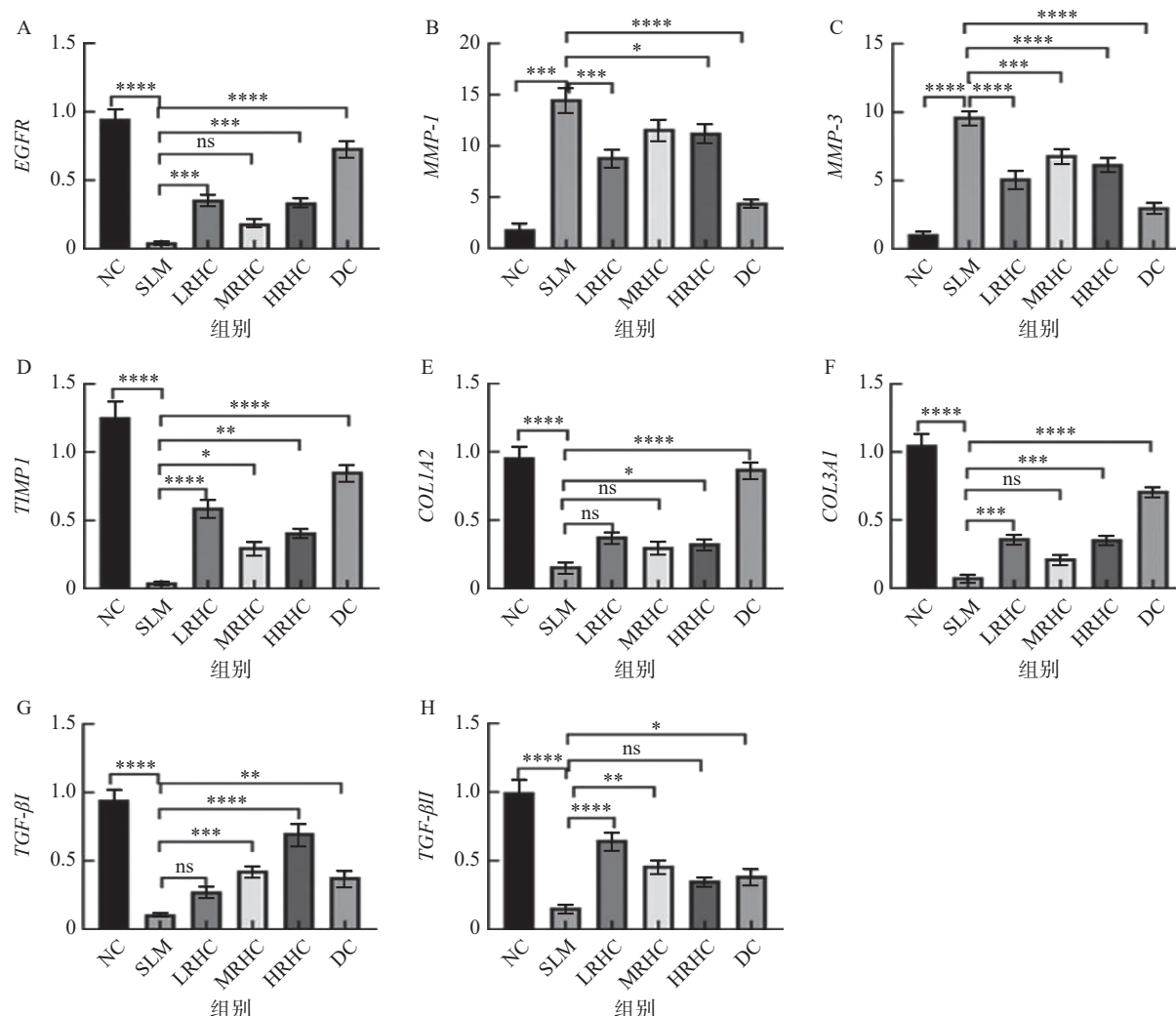


图4 RHC对小鼠关键基因的表达量

Fig.4 Expression of key genes in mice

期都有关系^[37];COL1A2 可激活 NF- κ B 信号通路,促进抗凋亡基因表达上调,促进皮肤成纤维细胞的凋亡,又有研究发现 TGF- β 能够通过激活细胞发生自噬,促进 COL 纤维蛋白表达^[38]。

结果如图 4 所示,与 NC 组相比,SLM 组小鼠 *EGFR*、*TMP-1*、*COL1A2*、*COL3A1*、*TGF- β I* 和 *TGF- β II* 基因表达显著升高($P<0.0001$),与 SLM 组相比,*EGFR*、*TMP-1*、*COL3A1*、*TGF- β II* 基因表达显著升高($P<0.001$),表明 RHC 胶原蛋白能够促进皮肤表皮细胞增值,维护内源性抑制物的动态平衡,

且对纤维细胞的生长、分化和免疫功能具有调节作用。与 NC 组相比,SLM 组小鼠的 *MMP-1* 和 *MMP-3* 均显著升高($P<0.0001$),但经过 RHC 干预后其表达量均呈显著下降趋势,伍春^[38] 通过研究也得出了与本实验类似的结论。表明 RHC 胶原蛋白能够促进表皮细胞的增殖分化,改善细胞衰老。

2.5 RHC 对小鼠关键蛋白表达水平测定

EGFR 调控的信号通路对细胞的生长、增殖和分化等生理过程发挥重要的作用,EGFR 蛋白的表达能够促进上皮细胞、成纤维细胞和胶质细胞的生长、

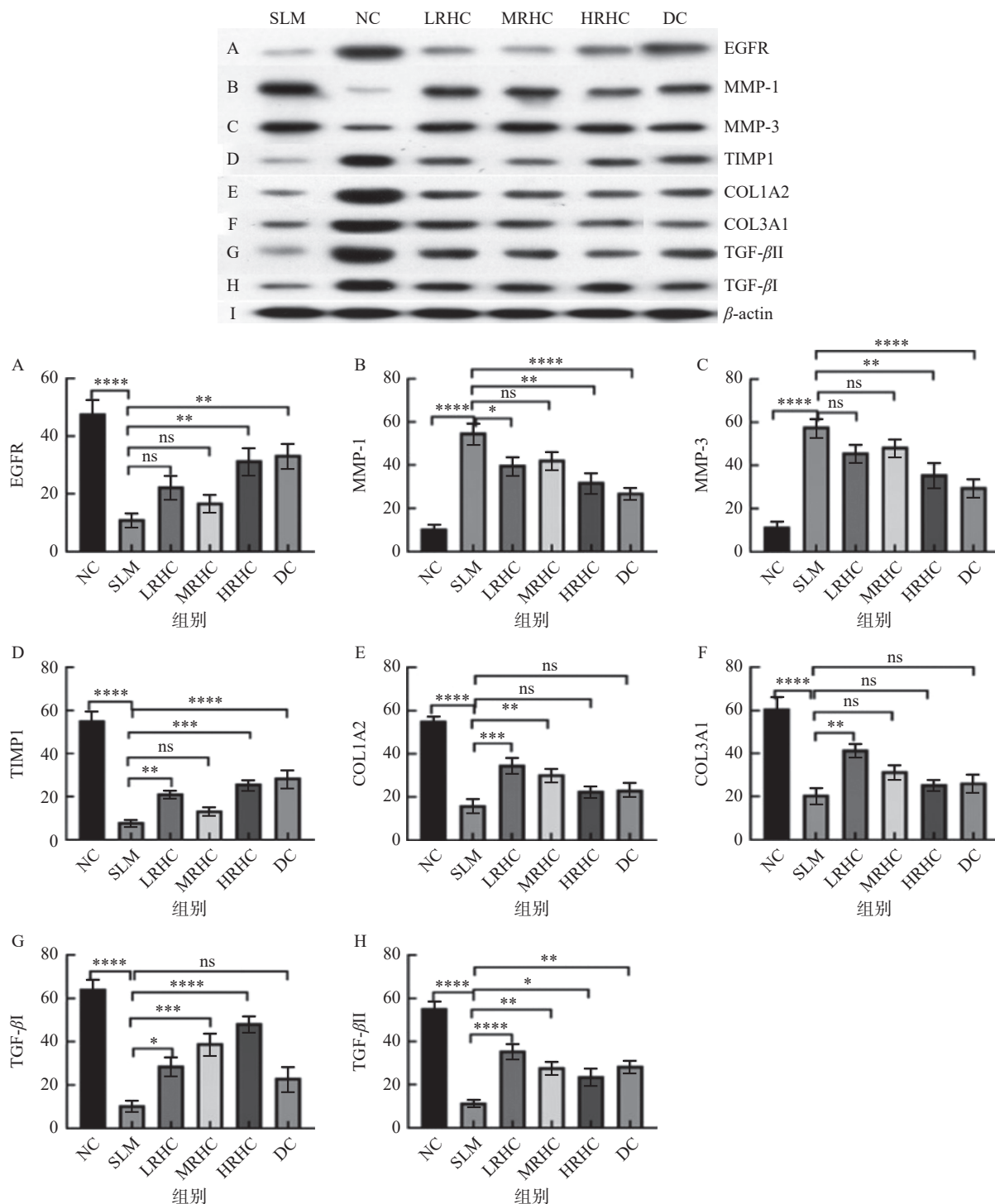


图 5 RHC 对小鼠关键蛋白表达水平测定

Fig.5 RHC expression level of mice

增值和分化^[41];基质金属蛋白酶家族(Matrix metalloproteinases, MMPs)具有多种生物调节作用,能够参与细胞增殖、凋亡、血管生成过程^[42],在细胞外基质及组织的重塑和皮肤的正常生理及病理过程扮演重要角色;而组织金属蛋白酶抑制物(Tissue metalloproteinase inhibitors, TIMPs)作为 MMPs 的内源性抑制物,它的过量表达与胶原酶活性的降低有密切关系;又有研究表明 *COL1A2* 和 *COL3A1* 基因的表达与胶原蛋白的合成量有密切的关系,且能够促进真皮成纤维细胞的增殖^[43];TGF- β 是一类多功能的细胞因子,能够调节细胞生长和分化,促进细胞外基质的合成以及促进表皮细胞的增值^[44]。

结果如图 5 所示,与 NC 组相比,SLM 组小鼠皮肤中 EGFR、TMP-1、COL1A2、COL3A1、TGF- β I 和 TGF- β II 的表达量显著降低($P<0.0001$),但经过 RHC 干预后其表达量较模型组显著升高,表明 RHC 能够促进表皮细胞的增殖分化,促进机体胶原蛋白的合成,调节机体体内促凋亡蛋白的表达。与 NC 组相比,SLM 组小鼠皮肤中 MMP-1 和 MMP-3 蛋白表达量显著升高($P<0.0001$),表明 RHC 胶原蛋白在一定程度上可以调节上述机体内与胶原蛋白合成相关蛋

白的表达水平,促进胶原蛋白的合成,从而能够延缓皮肤衰老。

2.6 组织病理评分

小鼠皮肤组织切片病理及积分如图 6 所示,图 6A 显示 NC 组小鼠皮肤表皮层结构完整规则,细胞分层清晰,表皮与真皮界限清晰,真皮纤维组织排列呈波浪形,排列有序,分布均匀且胶原纤维束状排列整齐。图 6B 中,与 NC 组相比,SLM 组小鼠皮肤组织切表皮层角质层增厚且不规则,角化不全,表皮中度坏死,细胞层纤维组织排列紊乱,且病理组织积分较 NC 组显著升高(图 6F, $P<0.05$)。图 6C~图 6E 显示,经过 RHC 干预后,小鼠皮肤组织均有所改善,表皮结构基本恢复,但仍可见表皮角质层增厚,发现在 HRHC 组修复效果更加明显。另外,由图 6F 可以看出,SLM 组的评分与 NC 组和 RHC 的不同剂量组相比都具有显著性($P<0.05$),同时 RHC 剂量组与胶原蛋白干预组相比也有显著性($P<0.05$),马作霖^[45]通过研究不同乳清粉对小鼠抗衰老的研究中发现乳清粉可改善衰老机体肝脏的慢性炎症,本实验的研究结果与此类似。

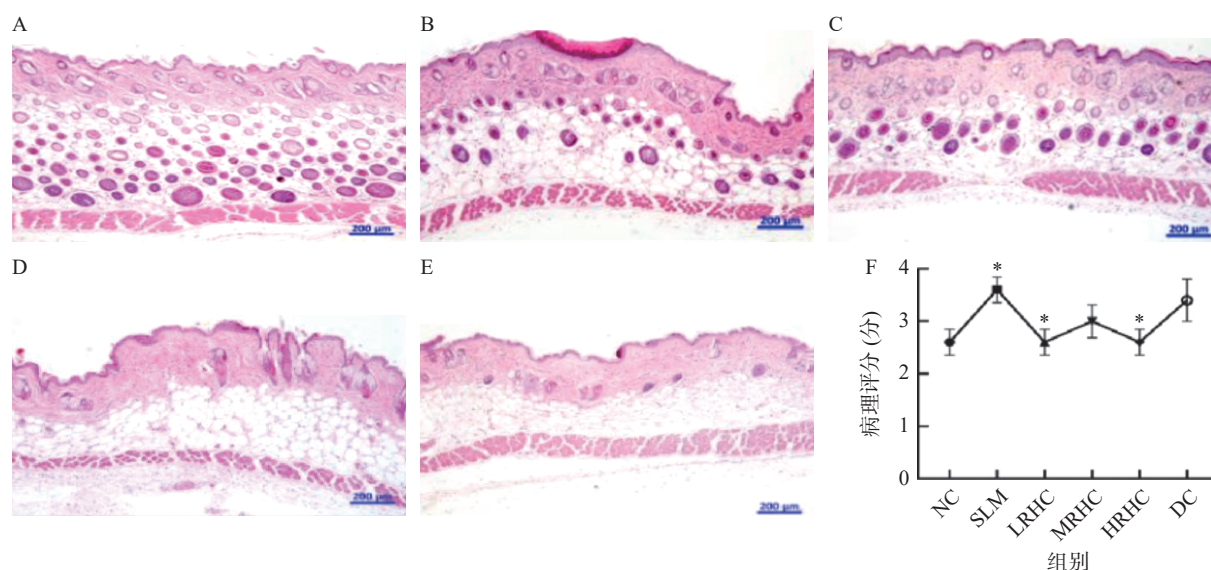


图 6 组织切片病理及评分

Fig.6 Pathology and integral of tissue sections

注: A. NC 组; B. SLM 组; C. LRHC 组; D. MRHC 组; E. HRHC 组; F. 对照组和各剂量处理组的病理评分。

3 结论

本研究利用 D-半乳糖构建的衰老小鼠为模型,评价了 RHC 的抗衰老作用。结果表明,RHC 胶原蛋白具有显著的抗皮肤衰老功效,中剂量和高剂量的 RHC 能够显著降低脂褐素水平,提高羟脯氨酸、透明质酸和胶原蛋白含量;并且能够显著降低皮肤组织中 MDA 含量,提高 SOD、GSH-Px、CAT 和 T-AOC 活性,与此同时能够促进 EGFR、TMP-1、COL1A2、COL3A1、TGF- β I 和 TGF- β II 蛋白的表达量,促进表皮细胞的增值、胶原蛋白的合成及修复皮肤表面

损伤,从而起到延缓皮肤衰老的作用。RHC 作为一种人工合成的蛋白肽,在促进和加快细胞生长、增殖、合成蛋白质或多肽物质、缓解皮肤衰老和创伤修复方面有重要作用,但皮肤抗衰老作用机制较为复杂,尽管该研究针对 RHC 对 D-半乳糖致衰老小鼠的皮肤抗衰老作用进行了大量研究,为后续研究提供了一定的数据支撑,但仍有不足之处,后续可以在该研究基础上采用分子生物学、基因技术等手段深入研究。

参考文献

[1] TURNHEIM K. When drug therapy gets old: Pharmacokinetic

- ics and pharmacodynamics in the elderly[J]. *Experimental Gerontology*, 2003, 38(8): 843–853.
- [2] 魏姝玥, 王海英, 李爱兰, 等. 脂肪干细胞对 D-半乳糖致裸鼠皮肤老化的拮抗作用及对皮肤恢复功能的影响[J]. *中国美容医学*, 2020, 29(1): 62–67. [WEI Z Y, WANG H Y, LI A L, et al. Antagonistic effect of adipose-derived stem cells on skin aging induced by D-galactose in nude mice and its effect on skin recovery[J]. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*, 2020, 29(1): 62–67.]
- [3] CHATTOPADHYAY S, RAINES R T. Review collagen-based biomaterials for wound healing[J]. *Biopolymers*, 2014, 101(8): 21–33.
- [4] 蔡东联. 不可忽视老年斑的危害[J]. *求医问药*, 2012(10): 41. [CAI D L. Don't ignore the dangers of age spots[J]. *Seek Medical*, 2012(10): 41.]
- [5] OGRODNIK M, SALMONOWICZ H, GLADYSHEV V N. Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: Relevance for clearance of senescent cells[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(1): e12841.
- [6] KUDRYAVTSEVA A V, KRASNOV G S, DMITRIEV A A, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 44879–44905.
- [7] TERMAN A, KURZ T, NAVRATIL M, et al. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 12(4): 503–535.
- [8] SARETZKI G. Telomeres, telomerase and ageing[J]. *Subcellular Biochemistry*, 2018, 9: 221–308.
- [9] DAVALLI P, MITIC T, CAPORALI A, et al. ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 3565127.
- [10] AUNG-HTUT M T, AYER A, BREITENBACH M, et al. Oxidative stresses and ageing[J]. *Subcell Biochem*, 2012, 57: 13–54.
- [11] GOMEZ-LINTON D R, ALAVEZ S, ALARCON-AGUILA A, et al. Some naturally occurring compounds that increase longevity and stress resistance in model organisms of aging[J]. *Biogerontology*, 2019, 20(5): 583–603.
- [12] 米钰, 惠俊峰, 范代娣, 等. 类人胶原蛋白生物相容性实验研究[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2004, 34(1): 66–72. [MI Y, HUI J F, FAN D D, et al. The biocompatibility of human-like collagen[J]. *Journal of Northwest University (Natural Science Edition)*, 2004, 34(1): 66–72.]
- [13] YOON D, YOON D, CHA H J, et al. Enhancement of wound healing efficiency mediated by artificial dermis functionalized with EGF or NRG1[J]. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 2018, 13(4): 45007.
- [14] 余建军, 赵铤. 重组类人胶原蛋白研究应用进展[J]. *日用化学科学*, 2022, 45(2): 48–51. [YU J J, ZHAO H. Progress in the research and application of recombinant human collagen[J]. *Daily Chemicals Science*, 2022, 45(2): 48–51.]
- [15] YUAN T, ZHANG L, LI K F, et al. Collagen hydrogel as an immunomodulatory scaffold in cartilage tissue engineering[J]. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 2014, 102(2): 337–344.
- [16] AN B, LIN Y S, BRODSKY B, et al. Collagen interactions: Drug design and delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 97: 69–84.
- [17] JIA Q, LUO Y. The selective roles of chaperone systems on overexpression of human-like collagen in recombinant *Escherichia coli*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(11): 1667–1675.
- [18] TANG Y, YANG X, HANG B, et al. Efficient production of hydroxylated human-like collagen via the co-expression of three key genes in *Escherichia coli* origami (DE3)[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(7): 1458–1470.
- [19] 齐志峰, 郑双进, 张晓瑜, 等. 射频联合重组人源胶原蛋白凝胶修复面部皮肤屏障功能的研究[J]. *中国医疗美容*, 2020, 10(3): 48–52. [QI Z F, ZHENG S J, ZHANG X Y, et al. Radiofrequency combined with recombinant human collagen-gel to repair the function of facial skin barrier[J]. *China Medical Cosmetology*, 2020, 10(3): 48–52.]
- [20] 郭亚媛. 重组人胶原蛋白水凝胶复合纤维细胞修复皮肤缺损的实验研究[D]. 西安: 西北大学, 2019. [GUO Y Y. The study of recombinant human collagen hydrogel containing fibroblasts repairing skin defect[D]. Xi'an: Northwest University, 2019.]
- [21] 牛佳玮, 莫玲, 王子钰, 等. 恭城油茶减轻 D-半乳糖致小鼠衰老的氧化应激[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(4): 1–6. [NIU J W, MO L, WANG Z C, et al. Gongcheng oil tea attenuates oxidative stress in d-galactose-induced aging mice[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2021, 37(4): 1–6.]
- [22] XIAO LIAN F, XIAO FANG Z, SHI QI L, et al. Preparation of aminated fish scale collagen and oxidized sodium alginate hybrid hydrogel for enhanced full-thickness wound healing[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 626–637.
- [23] JING C, PAN W, YAN NAN L, et al. Double crosslinked HLC-CCS hydrogel tissue engineering scaffold for skin wound healing[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 625–635.
- [24] LEI H, CHEN HUI ZHU, DAI DI F. Optimization of human-like collagen composite polysaccharide hydrogel dressing preparation using response surface for burn repair[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 239.
- [25] HUI Z, YU XIAO L, CAN WEN C, et al. Responsive drug-delivery microcarriers based on the silk fibroin inverse opal scaffolds for controllable drug release[J]. *Applied Materials Today*, 2020, 19(C): 100540.
- [26] FAROKHI M, MOTTAGHITALAB F, REIS R L, et al. Functionalized silk fibroin nanofibers as drug carriers: Advantages and challenges[J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 321(C): 324–347.
- [27] 宋晓娟. 类人胶原蛋白治疗颜面再发性皮炎疗效观察及研究[J]. *吉林医学*, 2016, 37(9): 2259–2260. [SONG X J. Study on the efficacy of human-like collagen in the treatment of facial reoccurring dermatitis[J]. *Jilin Medical Journal*, 2016, 37(9): 2259–2260.]
- [28] KONG S Z, LI J C, LI S D, et al. Anti-aging effect of chitosan oligosaccharide on d-galactose-induced subacute aging in mice[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(6): 181.
- [29] 薛文, 秦菊, 努尔买买提·阿穆提, 等. 不同 ELISA 和 AGID 试剂盒检测马传染性贫血病毒抗体的比较[J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(7): 103–107. [XUE W, QIN J, NURMAIMAITI A, et al. Comparison of different ELISA and AGID kits for equine infectious anemia virus antibodies[J]. *Chinese Animal Quarantine*, 2022, 39(7): 103–107.]
- [30] 钟召兵. 澳洲进口与中国本地荷斯坦牛血清抗氧化指标和微量元素含量比较研究[J]. *中国奶牛*, 2022(7): 16–19. [ZHONG Z B. Comparative study on antioxidant index and trace element content of Australian imported and local Holstein cattle in China[J]. *Chinese Dairy Cows*, 2022(7): 16–19.]

- [31] 林才云, 王联珠, 许加超, 等. 培养条件对副溶血性弧菌 AI-2 活性及其合成关键基因表达水平的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(9): 2924–2929. [LIN C Y, WANG L Z, XU J C, et al. Effects of culture conditions on AI-2 activity of *V. parahaemolyticus* and the expression levels of key genes for synthesis[J]. Food Safety and Quality Testing Journal, 2020, 11(9): 2924–2929.]
- [32] 康俞莉, 赵颖, 章强强. 荧光原位杂交法观察小鼠皮肤组织切片中型无绿藻感染的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2014, 47(9): 646–649. [KANG Y L, ZHAO Y, ZHANG Q Q. Observation of medium-free green algae infection in mouse skin tissue sections by fluorescence in situ hybridization[J]. The Chinese Journal of Dermatology, 2014, 47(9): 646–649.]
- [33] 熊慧, 戴丹菊, 杨家林, 等. 九龙虫对衰老小鼠皮肤的影响[J]. 鄂州大学学报, 2021, 28(5): 108–110. [XIONG H, YANG J L, LIU D H, et al. Effects of Kowloon worm on skin of aged mice[J]. The Journal of Ezhou University, 2021, 28(5): 108–110.]
- [34] 颜泽清, 娄红军, 王元. 透明质酸对犬皮肤水分的改善效果研究[J]. 中国工作犬业, 2019(9): 14–15. [YAN Z Q, LOU H J, WANG Y. Study on the effect of hyaluronic acid on the improvement of skin moisture in dogs[J]. China Working Dog, 2019(9): 14–15.]
- [35] TOMOKO, ASAI T, OIKAWA F, et al. Food-derived collagen peptides, Prolyl-Hydroxyproline (Pro-Hyp), and Hydroxyprolyl-Glycine (Hyp-Gly) enhance growth of primary cultured mouse skin fibroblast using fetal bovine serum free from hydroxyprolyl peptide[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 21(1): 229.
- [36] GILCHREST B A, GARMYS M, YEAR M. Aging and photoaging effect gene expression in cultured human keratinocyte[J]. Arch Dermatol, 1994, 130(1): 82–86.
- [37] 李卫, 元发芝. 皮肤衰老及抗衰老研究进展[J]. 中华医学美容美容杂志, 2004, 10(1): 60–61. [LI W, YUAN F Z. Advances in skin ageing and anti-ageing research[J]. Chinese Journal of Medical Aesthetics and Cosmetology, 2004, 10(1): 60–61.]
- [38] 伍春. 党参多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠皮肤抗氧化作用及基因表达谱的影响[D]. 兰州: 甘肃中医学院, 2014. [WU C. Effect of Dangshen polysaccharide on skin antioxidant effect and gene expression profile of D-galactose-induced aging mice[D]. Lanzhou: College of Traditional Chinese Medicine, 2014.]
- [39] 王振富. 党参对大强度训练大鼠心肌线粒体抗氧化能力的影响[J]. 江苏医药, 2011, 37(13): 1515–1518. [WANG Z F. Effect of Dangshen on the antioxidant capacity of myocardial mitochondria in intensively trained rats[J]. Jiangsu Medicine, 2011, 37(13): 1515–1518.]
- [40] 王岚, 张帆, 王艳, 等. 甘肃党参水提物对 D-半乳糖所致衰老小鼠脑组织 SOD、MDA 影响的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(2): 148–149. [WANG L, ZHANG F, WANG Y, et al. Experimental study on the effect of Gansu Dangshen water extract on brain tissue SOD and MDA in aging mice caused by D-galactose[J]. Chinese TCM Science and Technology, 2010, 17(2): 148–149.]
- [41] WILSON J, BALKWILL F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment[J]. Seminars in Cancer Biology, 2002, 12(2): 113–120.
- [42] SHEN B C, LIEN H C, H N, et al. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer[J]. Cancer Research, 2003, 63(10): 6537–6542.
- [43] NIETO N. 335 Kupffer cells induce a fibrogenic response by transactivating the COL1A1 and COL1A2 promoters and by decreasing collagen I degradation[J]. Journal of Hepatology, 2006, 44(S2): S129–S129.
- [44] QUAN T, HE T, KANG S, et al. Ultraviolet Irradiation alters transforming growth factor β /smad pathway in human skin *in vivo* [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2002, 119(2): 499–506.
- [45] 马作霖. 乳清粉调节 D-半乳糖诱导衰老小鼠肠道菌群结构及抗衰老作用研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021. [MA Z L. Study on intestinal flora structure and anti-aging effect of D-galactose [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2021.]