

# 重组 III 型人源化胶原蛋白化妆品的体外抗衰功效研究

陈传秀<sup>1,2</sup>

(1. 功能蛋白山西省重点实验室, 山西太原, 030032;  
2. 山西锦波生物医药股份有限公司, 山西太原, 030032)

**摘要:** 为评估重组 III 型人源化胶原蛋白化妆品增强细胞活性、促进胶原以及透明质酸合成的功效, 以成纤维细胞为研究模型, 通过细胞划痕实验研究了成纤维细胞自身的增殖和迁移能力和 I 型胶原、III 型胶原、IV 型胶原、VII 型胶原含量的变化情况及对分泌到细胞外的 I 型胶原和透明质酸含量进行了分析。结果表明: 重组人源化胶原蛋白产品对 I 型胶原、III 型胶原、IV 型胶原、VII 型胶原基因水平的表达都有显著的提升, 对 I 型胶原蛋白水平也有显著的提升。可见重组人源化胶原蛋白化妆品能够通过促进细胞活性和极性而达到抗衰的功效。

**关键词:** 重组 III 型人源化胶原蛋白; 成纤维细胞; 细胞划痕; 抗衰

**作者简介:** 陈传秀, 硕士, 山西锦波生物医药股份有限公司董事长特别助理, 致力于功能蛋白的应用转化研究, E-mail: chenchuanxiu@jinbo-biomed.com。



人体的衰老在表现上主要表现为皮肤状况的改变, 如松弛、起皱等。皮肤的状况直接影响体表的美观和精神状态。胶原蛋白是支撑皮肤的重要元素, 我们皮肤中的胶原蛋白系统会逐渐老化, 无法支撑我们皮肤的丰盈饱满。

胶原蛋白合成的减少和降解的增加是皮肤衰老的主要原因<sup>[1, 2]</sup>。提高皮肤中胶原蛋白的含量, 有助于皮肤对抗衰老, 恢复皮肤弹性。胶原主要是由皮肤真皮层的成纤维细胞产生的, 对于成纤维细胞产生胶原的分子机制科学家已经给出了比较明确的答案, 其最关键的分子机制是 TGF- $\beta$ -Smad 信号通路的调节。成纤维细胞的活力强弱也是影响胶原含量变化的一个主要原因, 随着年龄的增加, 细胞的代谢能力逐渐减弱, 从而合成胶原的能力也逐渐降低。随着年龄的增加以及外界因素的影响, 细胞自噬能力逐渐降低, 那么机体内错误折叠的蛋白很难被吞噬清除掉, 进一步抑制了胶原的合成。另外胶原有生成也有流失, 导致胶原流失的一个关键的分子机制是 AP-1 的激活, 其可以诱导金属蛋白酶 MMP 的生成, 进而将皮肤组织中的胶原降解掉, 最终导致胶原含量降低。

重组人源化胶原蛋白<sup>[3, 4]</sup>是由 DNA 重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段, 或是含人胶原蛋白功能片段的组合。本研究中所用胶原蛋白为重组 III 型人源化胶原蛋白, 其相关结构数据已经被收录蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中, 收录编号为 6A0C 和 6A0A, 其没有细胞毒性, 其比市售的 I 型人胶原蛋白具有更强的网络黏附性<sup>[5]</sup>。

衰老皮肤皱纹形成的主要原因是皮肤真皮层胶原蛋白与

透明质酸合成量的减少或降解的增加, 胶原蛋白和透明质酸都是由真皮层的成纤维细胞分泌合成的, 因此本项目以成纤维细胞为研究模型, 首先通过细胞划痕实验检测成纤维细胞自身的增殖和迁移能力, 因为成纤维细胞的活性直接影响到胶原蛋白和透明质酸的合成, 其次基于成纤维细胞分别进行 I 型胶原、III 型胶原、IV 型胶原、VII 型胶原这几个关键胶原基因水平含量变化情况的检测, 同时对分泌到细胞外的 I 型胶原和透明质酸含量的进行定量分析, 从而判定待测活性物是否有增强细胞活性、促进胶原以及透明质酸合成的功效。

## 1. 实验部分

### 1.1 材料、试剂与仪器

重组 III 型人源化胶原类护肤品 (由山西锦波生物医药股份有限公司提供), 其功效成分为重组 III 型人源化胶原蛋白分子量: 45-75kDa; DMEM (Gibco)、PBS (北京索莱宝科技有限公司)、MTT (Sigma)、DMSO (Sigma)、RNAisoPlus (湖南艾科瑞生物工程有限公司)、反转录试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司)、荧光染料 (湖南艾科瑞生物工程有限公司)、TGF- $\beta$  1 (Peprotech)。

CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo, 150I)、超净工作台 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司, SW-CJ-1F)、普通 PCR 仪 (杭州博日科技有限公司)、荧光定量 PCR 仪 (BioRad, CFX-96)、倒置显微镜 (Olympus, CKX53)

### 1.2 检测指标意义

细胞迁移是正常细胞的基本功能之一, 是机体正常生

长发育的生理过程，也是活细胞普遍存在的一种运动形式，细胞迁移能力的强弱能够反映细胞活性的强弱，而成纤维细胞活性的强弱与其分泌胶原的能力相关。

I型和III型胶原构成皮肤主要的支撑结构—螺旋网状结构，螺旋网状结构是保障皮肤丰盈饱满，富有弹性的基本结构。I型胶原约占成人胶原总量的80%。促进胶原I的合成（转录、翻译及分泌）是抗衰老的一种主要手段。

III型胶原含量约占成人胶原总量的15%，虽然其含量远远低于胶原I，但是胶原III含量的减少也是诱发衰老的主要原因，因此促进胶原III的合成（转录、翻译及分泌）是抗衰老的另一个措施。

IV型胶原是真表皮处DEJ区的关键蛋白成分，真表皮连接在衰老发生过程中起着关键的作用，连续的紫外照射后DEJ区的胶原IV发生显著性的减少，因此促进IV型胶原的合成（转录、翻译及分泌）也是抗衰老的重要措施。

与IV型胶原类似，VII型胶原也是真表皮连接处DEJ区的一个关键的蛋白，连续的紫外照射后DEJ区的VII型胶原也发生显著性的减少，因此促进VII型胶原的合成（转录、翻译及分泌）也是抗衰老至关重要的手段。

胶原类物质由成纤维合成后分泌到细胞外，然后在细胞外发挥其生理功能，因此在细胞外可以检测到成纤维细胞分泌的大量的胶原蛋白。

透明质酸是一种酸性粘多糖，是由成纤维细胞在透明质酸合酶的介导下合成的，它是一种多功能的基质，可以保湿、改善皮肤营养代谢，使皮肤柔嫩光滑，去皱增加弹性，减缓肌肤衰老，同时又是良好的透皮吸收促进剂。然而在内外因素的影响下，透明质酸会发生显著性的降解，主要是由透明质酸酶介导的降解，因此促进透明质酸的分泌能够达到一定的抗衰老功效。

### 1.3 实验分组

表1 细胞划痕实验分组

序号	组别	培养条件	检测模型	检测方式
1	溶剂对照组	无血清培养基		
2	阳性对照组	无血清培养基+EGF (10ng/mL)		
3	精华原液	无血清培养基+精华原液	成纤维细胞	细胞迁移率、细胞划痕
4	精华面膜	无血清培养基+精华面膜		
5	蛋白喷	无血清培养基+蛋白喷雾		
6	蛋白霜	无血清培养基+蛋白霜		

表2 相关基因和蛋白检测实验分组

序号	实验分组	培养条件	检测模型	检测指标及方法
1	空白对照组	—		
2	阳性对照组	血清培养基+TGFβ		
3	精华原液	血清培养基+精华原液	成纤维细胞	1.衰老相关基因 RT-PCR
4	精华面膜	血清培养基+精华面膜		2.胶原/透明质酸 ELISA
5	蛋白喷雾	血清培养基+蛋白喷雾		
6	蛋白霜	血清培养基+蛋白霜		

## 2. 实验过程

### 2.1 细胞划痕实验

(1) 常规培养细胞，调整细胞密度为3.0~5.0x10<sup>4</sup>个/mL,使用带有2孔插入物的24孔细胞培养板，每孔接种70μL,返回培养箱培养18~24h至细胞融合。

(2) 小心用镊子取出培养板中的培养插入物，培养插入物2孔之间形成一道平整的无细胞区域。用PBS清洗细胞层3次，去除脱落的细胞。

(3) 每孔加入1mL含不同浓度的测试样品的培养液，同时在镜下采集图像，记为0h，标记所采集的位置。

(4) 12h后，在所标记的相同位置，采集图片，记为12h。

(5) 数据分析：采用IPP图像分析软件，分析每个图像划痕区域的面积，以0h为100%，计算相对面积

### 2.2 基于人成纤维细胞细胞外基质（ECM）合成/降解相关基因表达量的检测

(1) 细胞接种：复苏细胞后，待铺板率达到60%左右时，接种细胞至6孔板，CO<sub>2</sub>培养箱(37℃ 5%CO<sub>2</sub>)中孵育过夜。

(2) 配液：按照测试分组配置受试物工作液。

(3) 给药：根据测试分组，待6孔板中细胞铺板率达到40%~60%时，进行分组给药，每组设3个复孔。空白对照组每孔加入2mL培养液，阳性对照组每孔加入2mL含有TGF-β1的培养液，样品组每孔加入2mL,含有相应待测样品的培养液。给药完成后将6孔板放置在CO<sub>2</sub>培养箱(37℃、5%CO<sub>2</sub>)中孵育24h。

(4) 收集细胞：孵育结束后，1mL/孔PBS清洗两

次，每孔加入1mLAGRNAexPro Reagent，吹打裂解细胞后，收样。

(5) 基因表达检测：提取RNA，反转录至cDNA后，进行荧光定量PCR检测，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行结果计算。

(6) 上调率计算：上调率(%)=(样品组-空白对照组)/空白对照组\*100%。

(7) 结果统计分析：应用GraphPadPrism作图，结果表示为Mean±SD。各组间比较采用t-test统计分析。统计分析均为双尾。 $P<0.05$ 认为具有显著差异， $P<0.01$ 认为具有极显著差异。

### 2.3 基于人成纤维细胞I型胶原和透明质酸含量的检测

(1) 细胞接种：复苏细胞后，待铺板率达到60%左右时，接种细胞至6孔板，CO<sub>2</sub>培养箱(37℃ 5%CO<sub>2</sub>)中孵育过夜。

(2) 配液：按照测试分组配置受试物工作液。

(3) 给药：根据测试分组，待6孔板中细胞铺板率达到40%~60%时，进行分组给药，每组设3个复孔。空白对照组每孔加入2mL培养液，阳性对照组每孔加入2mL含有TGF-β1的培养液，样品组每孔加入2mL含有相应待测样品的培养液。给药完成后将6孔板放置在CO<sub>2</sub>培养箱(37℃、5%CO<sub>2</sub>)中孵育24h。

(4) 收集细胞：孵育结束后，1mL/孔PBS清洗两次，每孔加入1mLAGRNAexPro Reagent，吹打裂解细胞后，收样。

(5) 检测：ELISA检测培养结束后，收集细胞培养液于15 mL Eppendorf管中，4℃、1000xg离心取上清，用于透明质酸和I型胶原检测。

(6) 计算：上调率(%)=(样品组-空白对照组)/空白对照组\*100%。

(7) 结果统计分析：各组间比较采用t-test统计分析。统计分析均为双尾。 $P<0.05$ 认为具有显著差异， $P<0.01$ 认为具有极显著差异。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 细胞划痕实验

与对照组相比，精华原液、精华面膜、蛋白喷雾和蛋白霜分别作用于成纤维细胞后，细胞迁移率均显著升高，提升率分别达到了44.17%、62.55%、112.49%和56.36%，

说明4个样品均具有促进细胞迁移的作用。细胞迁移能力可以体现出细胞极性和活性的强弱，因此实验结果可以得到四种产品都能够通过促进细胞活性和极性而达到抗衰的功效。

表3 细胞划痕实验结果

组别	相对迁移率平均值			提升率	
	Mean	SD	P-value	Mean	SD
1 溶剂对照组	1.000	0.098	/	/	/
2 阳性对照组	1.723	0.049	0.000	72.27%	4.95%
3 精华原液	1.442	0.088	0.006	44.17%	8.76%
4 精华面膜	1.625	0.111	0.000	62.55%	11.08%
5 蛋白喷雾	2.215	0.152	0.000	112.49%	15.19%
6 蛋白霜	1.564	0.068	0.001	56.36%	6.80%

### 3.2 基于人成纤维细胞细胞外基质(ECM)合成/降解相关基因检测结果

表4 阳性对照TGF-β1的ECM基因检测结果

Gene names	mRNA fold change					提升率	
	BC		PC		P-value	Mean (%)	SD (%)
	Mean	SD	Mean	SD			
I型胶原	1.001	0.066	1.305	0.032	0.002	30.50	3.18
III型胶原	1.003	0.085	1.990	0.083	0.000	98.99	8.31
IV型胶原	1.009	0.165	2.276	0.089	0.000	127.64	8.91
VII型胶原	1.007	0.143	3.477	0.057	0.000	247.68	5.74

与对照组相比，阳性对照TGF-β1在50ng/mL的条件下，人成纤维细胞外基质合成相关基因I型胶原表达量显著上升，提升率为30.50%，III型胶原表达量上升，提升率为98.99%，IV型胶原表达量上升，提升率为127.64%，VII型胶原表达量上升，提升率为247.68%。由此可见TGF-β1具有显著性的促进ECM合成的作用。

表5 精华原液的ECM基因检测结果

Gene names	mRNA fold change					提升率	
	BC		PC		P-value	Mean (%)	SD (%)
	Mean	SD	Mean	SD			
I型胶原	1.001	0.066	1.372	0.014	0.001	37.19	1.38
III型胶原	1.003	0.085	1.367	0.058	0.004	36.71	5.80
IV型胶原	1.009	0.165	1.802	0.067	0.002	80.18	6.70
VII型胶原	1.007	0.143	1.739	0.101	0.002	73.92	10.13

与对照组相比，精华原液作用于人成纤维细胞后，胞外基质合成相关基因I型胶原表达量显著上升，提升率为37.19%，III型胶原表达量上升，提升率为36.71%，%Colla-

gen IV 表达量上升, 提升率为 80.18%, VII 型胶原表达量上升, 提升率为 73, 92%。由此可见精华原液能够促进 ECM 相关基因的表达, 从而实现抗衰老功效。

表 6 精华面膜的 ECM 基因检测结果

Gene names	mRNA fold change					提升率	
	BC		PC		P-value	Mean (%)	SD (%)
	Mean	SD	Mean	SD			
I 型胶原	1.001	0.066	1.372	0.061	0.001	52.39	6.13
III 型胶原	1.003	0.085	1.367	0.049	0.003	36.67	4.88
IV 型胶原	1.009	0.165	1.802	0.086	0.006	58.47	8.56
VII 型胶原	1.007	0.143	1.739	0.018	0.007	43.57	1.80

与对照组相比, 精华面膜作用于人成纤维细胞后, 胞外基质合成相关基因 I 型胶原表达量显著上升, 提升率为 52.39%, III 型胶原表达量上升, 提升率为 36.67%, Collagen IV 型胶原 表达量上升, 提升率为 58.47%, VII 型胶原表达量上升, 提升率为 43.57%。由此可见精华面膜能够促进 ECM 相关基因的表达, 从而实现抗衰老功效。

表 7 蛋白喷雾的 ECM 基因检测结果

Gene names	mRNA fold change					提升率	
	BC		PC		P-value	Mean (%)	SD (%)
	Mean	SD	Mean	SD			
I 型胶原	1.001	0.066	1.394	0.061	0.001	39.38	3.06
III 型胶原	1.003	0.085	1.459	0.049	0.001	45.93	2.38
IV 型胶原	1.009	0.165	1.673	0.086	0.003	67.33	5.01
VII 型胶原	1.007	0.143	1.749	0.018	0.001	74.93	5.26

与对照组相比, 蛋白喷雾作用于人成纤维细胞后, 胞外基质合成相关基因 I 型胶原 表达量显著上升, 提升率为 39.38%, III 型胶原 表达量上升, 提升率为 45.93%, Collagen IV 型胶原 表达量上升, 提升率为 67.33%, VII 型胶原表达量上升, 提升率为 74.93%。由此可见蛋白喷雾能够促进 ECM 相关基因的表达, 从而实现抗衰老功效。

表 8 蛋白霜的 ECM 基因检测结果

Gene names	mRNA fold change					提升率	
	BC		PC		P-value	Mean (%)	SD (%)
	Mean	SD	Mean	SD			
I 型胶原	1.001	0.066	1.241	0.005	0.003	24.06	0.52
III 型胶原	1.003	0.085	1.230	0.013	0.010	23.02	1.30
IV 型胶原	1.009	0.165	1.326	0.050	0.033	32.64	5.04
VII 型胶原	1.007	0.143	1.469	0.029	0.005	46.91	2.95

与对照组相比, 蛋白霜作用于人成纤维细胞后, 胞外

基质合成相关基因 I 型胶原 表达量显著上升, 提升率为 24.06%, III 型胶原 表达量上升, 提升率为 23.02%, IV 型胶原 表达量上升, 提升率为 32.64%, VII 型胶原表达量上升, 提升率为 46.91%。由此可见蛋白霜能够促进 ECM 相关基因的表达, 从而实现抗衰老功效。

### 3.3 基于人成纤维细胞 I 型胶原和透明质酸检测结果

表 9 I 型胶原检测结果

组别	I 型胶原含量 (ng/mL)			提升率	
	Mean	SD	P-value	Mean	SD
1 BC	71.433	1.478	/	/	/
2 PC	97.764	5.154	0.001	36.87	7.22
3 蛋白霜	94.555	5.145	0.002	32.38	7.20
4 蛋白喷雾	109.587	2.753	0.000	53.42	3.85
5 精华原液	110.310	2.081	0.000	54.43	2.91
6 精华面膜	107.158	4.936	0.000	50.02	6.91

与对照组相比, 蛋白霜 / 蛋白喷雾 / 精华原液、精华面膜作用于成纤维细胞后, I 型胶原蛋白含量显著升高, 提升率分别为 32.38%、53.42%、54.43% 和 50.02%。

表 10 透明质酸检测结果

组别	透明质酸含量 (ng/mL)			提升率	
	Mean	SD	P-value	Mean	SD
1 BC	740.145	26.581	/	/	/
2 PC	1154.839	37.606	0.000	52.17	4.96
3 蛋白霜	1188.575	33.653	0.000	56.61	4.43
4 蛋白喷雾	1252.969	60.361	0.000	65.10	7.95
5 精华原液	1282.633	66.830	0.000	69.01	8.81
6 精华面膜	1272.589	45.029	0.000	67.68	5.93

与对照组相比, 蛋白霜 / 蛋白喷雾 / 精华原液、精华面膜作用于成纤维细胞后, 透明质酸含量显著升高, 提升率分别为 56.61%、65.10%、69.01% 和 67.68%。

## 4. 实验结论

胞外基质 ECM<sup>[6]</sup> 的流失是诱发皮肤衰老皱纹产生的直接原因, 本实验采用成纤维细胞, 分别从基因和蛋白水平检测胞外基质 ECM 含量的变化情况, 同时探究了细胞的极性和活性对成纤维细胞分泌 ECM 的能力的影响, 因此本实验也进行了细胞迁移能力的检测。

精华原液实验组 I 型胶原、III 型胶原、IV 型胶原、VII 型胶原基因水平的表达都有显著性的提升, 提升率分别为 37.19%、36.71%、80.18%、73.92%。I 型胶原蛋白水平

也有显著提升,提升率为54.43%,透明质酸的提升率达到69.01%,细胞迁移率的提升率为112.49%,由此可见精华原液具有非常显著的抗衰除皱的功效。

精华面膜实验组 I 型胶原、III 型胶原、IV 型胶原、VII 型胶原基因水平的表达都有显著性的提升,提升率分别为52.39%、36.67%、58.47%、43.57%。蛋白水平也有显著提升,提升率为50.02%,透明质酸的提升率达到67.68%,细胞迁移率的提升率为56.36%,由此可见精华面膜具有抗衰除皱的功效。

蛋白喷雾实验组 I 型胶原、III 型胶原、IV 型胶原、VII 型胶原基因水平的表达都有显著性的提升,提升率分别为39.38%、45.93%、67.33%、74.93%。蛋白水平也有显著提升,提升率为53.42%,透明质酸的提升率达到65.10%,对细胞迁移率的提升率为62.55%,由此可见蛋白喷雾具有抗衰除皱的功效。

蛋白霜实验组 I 型胶原、III 型胶原、IV 型胶原、VII 型胶原基因水平的表达都有显著性的提升,提升率分别为24.06%、23.02%、32.64%、46.91%。蛋白水平也有显著提升,提升率为32.38%,对透明质酸的提升率达到56.61%,

细胞迁移率的提升率为44.17%,由此可见蛋白霜具有一定的抗衰除皱的功效。

重组人源化胶原蛋白是合成生物学的产物,本身代表着前沿的科技手段,还有着广阔的应用空间有待被开发,能够成为化妆品一块亮眼“招牌”。本研究为有“中国原料”光环的重组人源化胶原蛋白的应用奠定一定的基础。

#### 参考文献

- [1]E.C. Naylor et al. Molecular aspects of skin ageing[J].Maturitas69 (2011) 249–256.
- [2]Shin J.W. et al.Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 21–26.
- [3].《重组胶原蛋白生物材料命名指导原则》解读, (nifdc.org.cn).
- [4].国家药监局关于发布重组胶原蛋白生物材料命名指导原则的公告(2021年第21号)(nmpa.gov.cn)
- [5].Hua C, Zhu Y, Xu W, et al.Characterization by high-resolution crystal structure analysis of a triple-helix region of human collagen type III with potent cell adhesion activity[J].Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019(4).DOI:10.1016/j.bbrc.2018.12.018.
- [6].Franco A C, Célia Avelaira,Cláudia Cavadas.Skin senescence: mechanisms and impact on whole-body aging[J].Trends in Molecular Medicine, 2022, 28(2):97–109.DOI:10.1016/j.molmed.2021.12.003.

## Study on Anti-aging Effect of Recombinant Type III Humanized Collagen Cosmetics in Vitro

Chen Chuan-xiu<sup>1,2</sup>

(1. Shanxi Key Laboratory Of Function Protein. Taiyuan, Shanxi, 030032;

(2. Shanxi Jinbo Bio-Pharmaceutical Co., Ltd. Taiyuan, Shanxi, 030032)

**Abstract :** In order to evaluate the efficacy of recombinant type III humanized collagen cosmetics in enhancing cell activity and promoting collagen and hyaluronic acid synthesis, this study took fibroblasts as the research model and studied the proliferation and migration ability of fibroblasts themselves and the changes in the content of type I collagen, type III collagen, type V collagen and type IV collagen through cell scratch experiment. The contents of type I collagen and hyaluronic acid secreted outside the cell were analyzed. The external type I collagen and hyaluronic acid content was analyzed. The results showed that recombinant humanized collagen products can significantly increase the gene expression of type I collagen, type III collagen, type IV collagen, and type VII collagen gene levels, and also significantly enhance the level of type I collagen. These can be seen that recombinant humanized collagen can achieve anti-aging effect by promoting cell activity and polarity.

**Keywords :** recombinant humanized type III collagen; fibroblast cells; cell scratch; anti-aging