DOI:10.12441/spyswjs.20250318002 [文章编号] 1673-1689(2026)02-0151-12

牛初乳素及其与胶原蛋白肽协同作用对胶原蛋白合成代谢的调控研究

李玲宇[1] 毛丙永[1] 唐 鑫[1] 张秋香[1] 赵建新[1] 崔树茂[1] 陈 朝[2*]

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122; 2. 天美健生物科技(北京)股份有限公司,北京 100101)

摘要:【目的】探究牛初乳素及其与胶原蛋白肽复配对胶原蛋白合成代谢的调控作用。**【方法】**通过细胞试验评估牛初乳素对人皮肤成纤维(HSF)细胞Ⅰ型胶原蛋白(COL Ⅰ)分泌量和赖氨酸羟化酶1(LH1)、基质金属蛋白酶1(MMP-1)、基质金属蛋白酶3(MMP-3)活性,以及人源转化生长因子β1(*TGFB1*)基因表达的影响。构建*D*-半乳糖诱导的胶原蛋白流失小鼠模型,研究口服牛初乳素及其与胶原蛋白肽复配对小鼠皮肤Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅶ型胶原蛋白质量分数、鼠源转化生长因子β1(TGF-β1)质量分数和MMP-3、脯氨酸羟化酶(P4H)、赖氨酰氧化酶(LOX)、LH1活性的调控作用。**【结果】**在细胞水平上,牛初乳素能够促进HSF细胞分泌COL Ⅰ,显著提升LH1活性,抑制MMP-1和MMP-3活性,并上调*TGFB1*基因表达。在*D*-半乳糖诱导的胶原蛋白流失小鼠模型中,口服牛初乳素可提升小鼠皮肤Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅶ型胶原蛋白质量分数,提升LOX活性和TGF-β1水平,抑制MMP-3活性;与胶原蛋白肽复配后,P4H、LOX、LH1活性及TGF-β1水平均显著提升,皮肤胶原蛋白质量分数提升效果更为显著。**【结论】**牛初乳素在体外及体内模型中均能通过调控胶原蛋白合成代谢提高其质量分数,与胶原蛋白肽具有协同增效作用。该研究为牛初乳素在改善胶原蛋白代谢方面的应用提供了理论依据,并为食源性胶原蛋白补充剂的开发提供了参考。

关键词:胶原蛋白;牛初乳素;胶原蛋白肽;合成代谢

Regulation of Collagen Synthesis and Metabolism by Bovine Colostrum Bioactive Components and Their Combination with Collagen Peptides

LI Lingyu[1] *MAO Bingyong*[1] *TANG Xin*[1] *ZHANG Qiuxiang*[1] *ZHAO Jianxin*[1]
CUI Shumao[1] *CHEN Chao*[2*]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Tianmeijian Biotechnology (Beijing) Co., Ltd., Beijing 100101, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to investigate the regulatory effects of bovine colostrum bioactive components and their combination with collagen peptides on collagen synthesis and metabolism. [**Method**] Cell experiments were conducted to evaluate the effects of bovine colostrum bioactive components on type I collagen (COL I) secretion, lysyl hydroxylase 1 (LH1), matrix metalloproteinase 1 (MMP-1), and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) activities, as well as human transforming growth factor β1 (*TGFB1*) gene expression in human skin fibroblasts (HSF). Subsequently, a mouse model of collagen loss induced by *D*-galactose was established to investigate the regulatory effects of oral administration of bovine colostrum bioactive components and their combination with collagen peptides on the mass fractions of type I, III, IV, and VII collagen, mass fraction of mouse transforming growth factor β1(TGF-β1), and activities of MMP-3, prolyl

基金项目:江苏省高校“青蓝工程”资助项目。
通信作者:陈朝(1983—),男,硕士,主要从事营养与免疫相关研究。E-mail:15901269060@163.com
收稿日期:2025-03-18 **修回日期:**2025-04-30

4-hydroxylase (P4H), lysyl oxidase (LOX), and LH1 in the mouse skin. [**Result**] At the cellular level, bovine colostrum bioactive components promoted COL I secretion in HSFs, significantly increased LH1 activity, inhibited MMP-1 and MMP-3 activities, and upregulated *TGFB1* gene expression. In the mouse model of *D*-galactose-induced collagen loss, oral administration of bovine colostrum bioactive components increased the mass fractions of type I, III, IV, and VII collagen, enhanced the LOX activity and elevated TGF-β1 level, and inhibited the MMP-3 activity in the mouse skin. Moreover, the combination of bovine colostrum bioactive components with collagen peptides significantly enhanced the activities of P4H, LOX, and LH1, as well as the TGF-β1 level, resulting in a more pronounced increase in collagen mass fraction in the skin. [**Conclusion**] Bovine colostrum bioactive components can enhance the collagen mass fraction both *in vitro* and *in vivo* by regulating collagen synthesis and metabolism. Their combination with collagen peptides exhibits a synergistic effect. These findings provide a theoretical basis for the application of bovine colostrum bioactive components in improving collagen metabolism and offer a reference for the development of food-derived collagen supplements.
Keywords: collagen; bovine colostrum bioactive component; collagen peptide; synthesis and metabolism

胶原蛋白是人体主要的结构性蛋白质，约占人体总蛋白质的30%，是构成皮肤真皮层的主体[1]。其生物合成过程主要包括脯氨酸和赖氨酸残基的羟基化、糖基化修饰以及胞外共价交联3个关键步骤，最终形成独特的三螺旋结构[2]。该结构赋予胶原蛋白优异的机械强度和抗拉伸性能，对维持细胞外基质稳定、保障组织强度和弹性具有重要作用。但随着年龄的增长或受紫外线等环境因素的影响，体内胶原蛋白合成减少、降解增加，导致真皮层变薄、弹性下降，皮肤出现皱纹、松弛及干燥等现象[3]。因此，提升皮肤胶原蛋白含量是缓解皮肤衰老的有效策略。

目前，补充胶原蛋白的主要方式是口服外源性胶原蛋白类产品，但其大分子特性易被胃肠道消化酶分解，且消化后含羟脯氨酸的短肽在体内的生物响应信号较弱[4]。因此，口服经人工水解制备的小分子胶原蛋白肽已成为目前的研究主流。蒲春宏等[5]研究表明，摄入鱼源胶原蛋白肽可促进细胞COL I的合成，但其作用时效与效率受机体自身代谢能力的限制。如口服胶原蛋白水解物后，其中关键的脯氨酰羟脯氨酸在体内的滞留时间不足2 h，显著降低了其生物利用度和实际功效[6]。基于此，目前的研究策略逐渐从单纯外源性补充转向内源性调控，即通过激活胶原蛋白合成通路或抑制其降解酶活性，增强机体自身胶原蛋白代谢能力，并探索其与外源性胶原蛋白肽的协同增效潜力。

牛初乳是指健康母牛分娩后72 h内所分泌的乳汁，其脂肪、蛋白质、维生素等含量显著高于成熟乳，而乳糖含量相对较低[7]。牛初乳素是以牛初乳为原料，经加工、脱脂、脱盐后提取的活性成分并冻干成粉末。因其富含维生素、表皮生长因子和转化生长因子等多种与皮肤修复相关的活性因子，在保障皮肤健康方面展现出良好的应用潜力[8]。有研究表明，牛初乳素可在体外调控成纤维细胞的生长增殖，并抑制基质金属蛋白酶的表达，从而间接促进胶原蛋白的分泌[9]。然而，目前关于牛初乳素如何调控胶原蛋白代谢及其关键作用靶点的研究尚不充分。本研究创新性地结合HSF细胞试验和*D*-半乳糖诱导胶原蛋白流失小鼠模型，探讨牛初乳素对胶原蛋白合成的调控作用及相关分子靶点，同时评估其与胶原蛋白肽复配的协同效应，以期为牛初乳素在改善胶原蛋白代谢方面的研究提供参考，并为开发靶向胶原蛋白代谢的功能性食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPF级BALB/c小鼠（8周龄雄性、体质量20~25 g）：北京维通利华实验动物技术有限公司；HSF细胞：中国科学院昆明细胞库；*TGFB1*引物：生工生物工程（上海）股份有限公司；CCK-8试剂、RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、染料法荧光定量PCR检测试剂盒：南京诺维赞生物科技股份有限公司；*D*-半乳糖：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；人源及鼠源ELISA检测试剂盒：南京森贝伽生物科技有限公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒：上海

碧云天生物技术股份有限公司；牛初乳素样品、胶原蛋白肽样品（有效成分为鱼胶原蛋白肽）：江苏天美健大自然生物工程有限公司。

1.2　仪器与设备

基因扩增仪：C1000 Touch™型，美国Bio-Rad公司；荧光定量PCR仪：CFX96型，美国Bio-Rad公司；酶标仪：3020型，美国Thermo Fisher Scientific公司；高通量组织研磨仪：SCIENTZ-48型，宁波新芝生物科技股份有限公司；多功能皮肤测定仪：MPA580型，德国Courage+Khazaka公司；数字切片扫描仪：PANNORMIC MIDI型，匈牙利3DHISTECH公司。

1.3　细胞试验设计

1.3.1　细胞培养

HSF细胞复苏后，使用DMEM完全培养基于37 ℃、体积分数5% CO_2培养箱中培养。当细胞在24 h培养周期内增殖至90%汇合度时，采用胰蛋白酶消化液进行消化，并按体积比1∶2进行传代。

1.3.2　细胞毒性检测

采用CCK-8法检测细胞活力。将对数生长期的HSF细胞以3 000个/孔的密度接种于96孔板，培养24 h。将10 mg/mL的牛初乳素溶液经0.22 μm水系滤膜除菌后，用无血清DMEM基础培养基进行2倍梯度稀释，获得0.31~10.00 mg/mL的牛初乳素溶液；更换细胞培养液为上述含牛初乳素的培养基，继续孵育24 h。按10 μL/孔添加CCK-8试剂，避光反应2 h后，使用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度，设置无细胞培养基组为空白组。细胞活力根据式（1）计算[10]。

$$D=\frac{A-C}{B-C}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

D——细胞存活率，%；

A——试验组吸光度；

B——对照组吸光度；

C——空白组吸光度。

1.3.3　细胞试验分组与处理

试验共设4组，各组牛初乳素质量浓度分别为0、0.62、1.25、2.50 mg/mL。将对数生长期的HSF细胞以1×10^4个/孔的密度接种于6孔板，于37 ℃、体积分数5% CO_2培养箱中培养24 h。弃去原培养基，每孔加入2 mL含不同质量浓度牛初乳素的DMEM基础培养基，培养24 h。

1.3.4　细胞样品处理与ELISA检测

细胞干预结束后，收集细胞培养上清液，采用ELISA试剂盒检测上清液中COL I质量及MMP-1、MMP-3活性。用PBS清洗细胞，经胰蛋白酶消化后离心收集细胞沉淀；将细胞沉淀用蛋白酶抑制剂重悬，反复冻融（−80 ℃速冻和4 ℃缓融）3次以裂解细胞，获得细胞裂解物[11]，并按照ELISA试剂盒说明书检测LH1活性。

1.3.5　*TGFB1*基因表达检测

*TGFB1*基因表达的测定参照文献[12]的方法并稍加修改。使用RNA提取试剂盒提取HSF细胞总RNA，通过测定OD_{260}/OD_{280}值评估RNA纯度；将mRNA逆转录为cDNA，以SYBR Green qPCR Master Mix进行扩增，引物序列见表1。以*GAPDH*为内参基因，使用$2^{-\Delta\Delta C_t}$法计算*TGFB1*基因的mRNA相对表达量。

表1　引物序列

Table 1　Primer sequences

基因	引物序列（5′—3′）
GAPDH	F：ACCACAGTCCATGCCATCAC
	R：TCCACCACCCTGTTGCTGTA
TGFB1	F：GCAACAATTCCTGGCGATACCTC
	R：CCTCCACGGCTCAACCACTG

1.4　动物试验设计

1.4.1　试验分组及造模方法

选取25只SPF级BALB/c小鼠，均为8周龄雄性，体质量20~25 g。动物试验方案及操作经江南大学实验动物实验伦理委员会批准（批准号：JN.No20240415b1040720）。将小鼠随机分为空白组、模型组、胶原蛋白肽组、牛初乳素组及复配组，每组5只，参照文献[13]的方法并稍加修改建立模型。小鼠适应性喂养1周后，除空白组外，其余各组小鼠每日于颈后部皮下注射0.2 mL 500 mg/kg（以小鼠体质量计）的*D*-半乳糖溶液，连续注射8周。造模期间，各组小鼠每日灌胃0.2 mL相应的样品进行干预，分组与具体处理方式见表2。末次干预12 h后，对小鼠实施禁食处理，随后对小鼠实施安乐死并采集生物样本。

1.4.2　皮肤水分与弹性测定

完成8周建模后，对小鼠背部皮肤进行无菌脱毛处理。使用皮肤水分测定仪和皮肤弹性测定仪

表2 动物分组及处理方式

Table 2 Animal grouping and treatments

组别	处理方式
空白组	生理盐水
模型组	生理盐水
胶原蛋白肽组	1 820 mg/kg胶原蛋白肽
牛初乳素组	182 mg/kg牛初乳素
复配组	1 820 mg/kg胶原蛋白肽+182 mg/kg牛初乳素

测定小鼠背部皮肤的水分和弹性。检测时通过体位固定确保探头与检测区域垂直，其中皮肤弹性以参数R2（总弹性）表示[14]。皮肤水分测定共进行7次，剔除最大值和最小值后，取剩余5次测定结果的平均值作为该小鼠皮肤水分体积分数差值[15]。

1.4.3 皮肤组织样本处理及胶原蛋白检测

取小鼠背部皮肤组织，加入4 ℃预冷的PBS，采用高通量组织研磨仪制备质量分数10%的组织匀浆，随后于4 ℃、3 000 r/min条件下离心10 min，收集上清液于−80 ℃冻存备用[16]。使用BCA法测定皮肤组织匀浆中的总蛋白质质量浓度。按照ELISA试剂盒说明书操作，检测III型胶原蛋白（COL III）、IV型胶原蛋白（COL IV）、VII型胶原蛋白（COL VII）和COL I的质量，并使用总蛋白质质量对测定结果进行标准化。

1.4.4 皮肤组织胶原蛋白代谢酶活性检测

按照ELISA试剂盒说明书检测P4H、LOX、LH1、MMP-3活性，并使用总蛋白质质量对测定结果进行标准化。

1.4.5 皮肤组织抗氧化能力及相关酶活性测定

按照ELISA试剂盒说明书检测皮肤组织匀浆中谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、过氧化氢酶（CAT）、超氧化物歧化酶（SOD）、P4H、LOX、LH1和MMP-3活性，并使用总蛋白质质量对测定结果进行标准化。

1.4.6 小鼠皮肤组织学分析

取1 cm×1 cm的背部皮肤样本，经体积分数10%的中性缓冲福尔马林固定48 h后，委托武汉赛维尔生物科技有限公司完成石蜡包埋、切片及Masson三色染色[16]。使用数字切片扫描仪获取图像并对结果进行分析。

1.5 数据统计与分析

采用GraphPad Prism 9.0软件对结果进行数据处理与统计分析，数据以平均值±标准差表示。采用Student's *t*-test和ANOVA进行差异显著性分析，$P<0.05$表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 牛初乳素对胶原蛋白的体外调控效果

2.1.1 牛初乳素对HSF细胞存活率的影响

HSF细胞是皮肤中胶原蛋白合成与分泌的主要功能细胞，其细胞活力对胶原蛋白的代谢调控至关重要[17]。本研究首先检测了不同质量浓度牛初乳素对细胞活力的影响，见图1。与空白组相比，当牛初乳素质量浓度≤2.50 mg/mL时，HSF细胞活力维持在100%左右；随着牛初乳素质量浓度的升高，细胞存活率呈下降趋势；当质量浓度升至10.00 mg/mL时，细胞活力显著降低。为保证后续试验结果不受牛初乳素毒性的影响，确定牛初乳素的最高质量浓度为2.50 mg/mL。

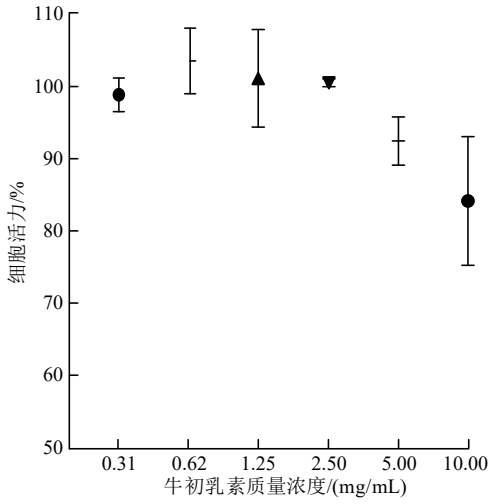


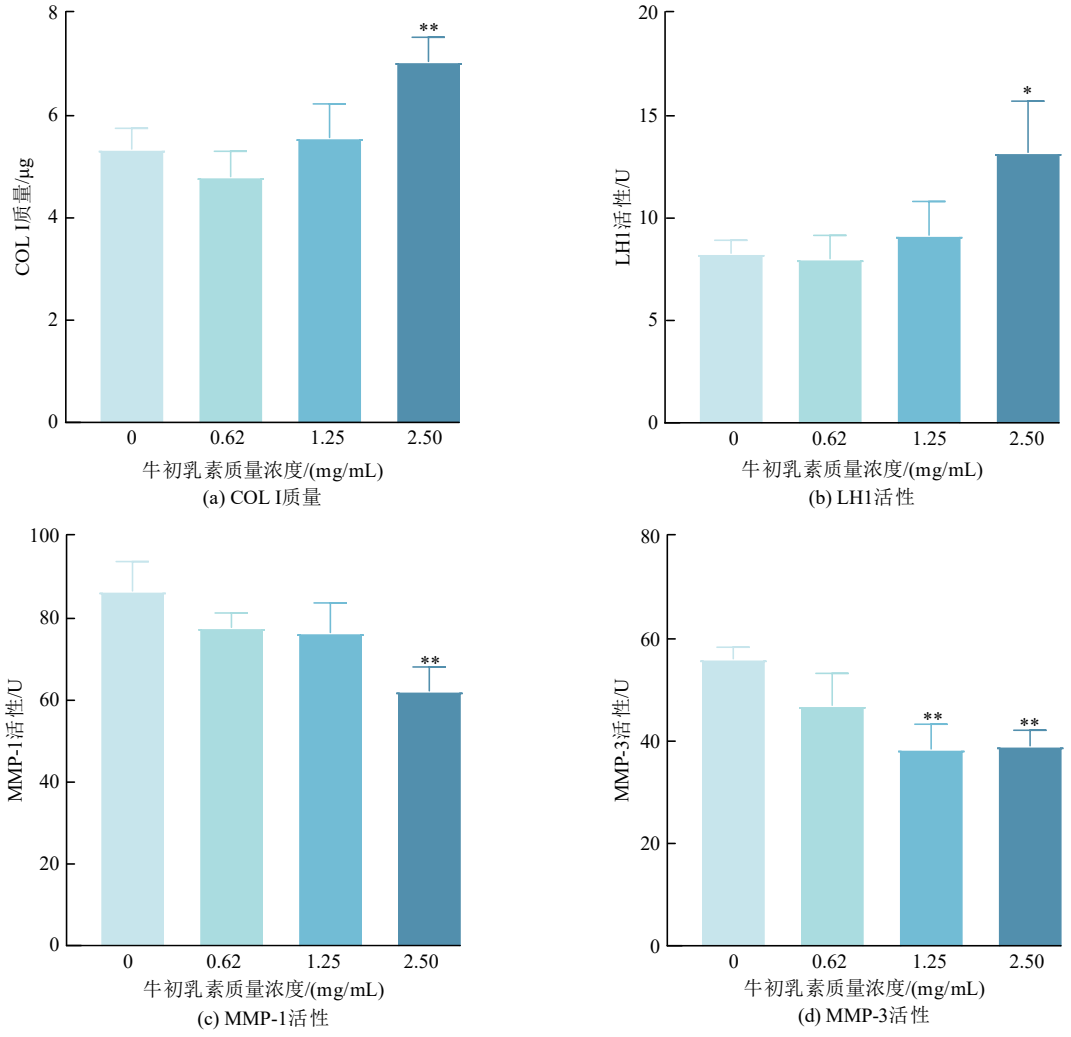
图1 牛初乳素对HSF细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of bovine colostrum bioactive components on HSF viability

2.1.2 牛初乳素对HSF细胞胶原蛋白合成代谢的调控作用

COL I是皮肤中最主要的胶原蛋白类型，其结构稳定、强度高，可形成强韧的纤维网络以支撑皮肤结构、维持皮肤紧致度[18-19]。LH1是胶原蛋白合成的关键酶之一，能够催化赖氨酸残基ε-氨基的羟基化反应，生成5-羟基赖氨酸，进而促进胶原蛋白分子间交联结构的形成，增强胶原蛋白的稳定性[20]。此外，基质金属蛋白酶（MMPs）是催化胶原蛋白降解的主要酶类，其中MMP-1和MMP-3是参与该降解过程的关键亚型[21]。

为了探究牛初乳素对HSF细胞胶原蛋白合成代谢的调控作用，本研究测定了细胞分泌的COL I质量及相关酶的活性，见图2。当牛初乳素质量浓度达到2.50 mg/mL时，与空白组相比，细胞分泌的COL I质量高度显著增加（P<0.01），LH1活性显著提升（P<0.05），其对MMP-1、MMP-3活性均表现出高度显著抑制作用（P<0.01）。当牛初乳素质量浓度为1.25 mg/mL时，已对MMP-3活性产生高度显著抑制效果（P<0.01）。上述结果表明，牛初乳素可通过激活胶原蛋白合成关键酶LH1活性调控HSF细胞，同时有效抑制MMP-1、MMP-3活性，从而促使COL I质量增加。此外，牛初乳素对MMP-3活性的抑制作用更为明显。



*—与空白组相比差异显著（P<0.05）；**—与空白组相比差异高度显著（P<0.01）。

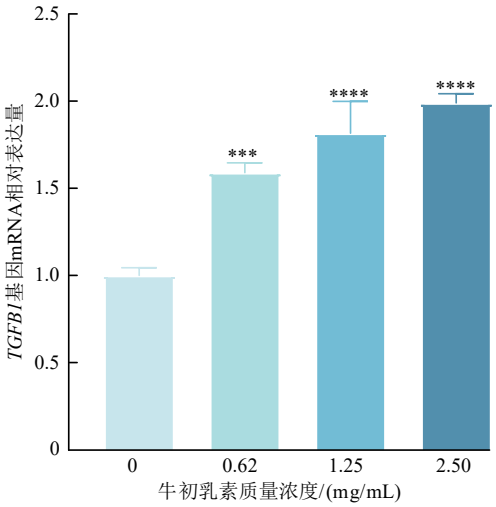
图2　牛初乳素对细胞胶原蛋白质量及相关代谢酶活性的影响

Fig. 2　Effects of bovine colostrum bioactive components on the mass of collagen and the activities of related metabolic enzymes in cells

2.1.3　牛初乳素对HSF细胞中*TGFB1*基因mRNA表达的影响

TGF-β是与胶原蛋白代谢关系最为密切的细胞因子之一，可通过促进成纤维细胞的增殖、迁移等过程推动胶原蛋白的合成[22]。TGF-β/Smad通路是TGF-β信号传导的经典途径，也是调控胶原蛋白合成的关键通路，该通路不仅可直接调控胶原蛋白基因的转录，还能通过调节MMPs的基因表达，增强胶原蛋白在细胞外基质中的沉积与稳定性[23]。TGF-β1是TGF-β家族中研究最广泛、生物活性最强的成员，在上述调控过程中发挥了重要作用[24]。因此，本研究检测了牛初乳素对HSF细胞中

*TGFB1*基因mRNA表达的影响，见图3。牛初乳素可极其显著促进*TGFB1*基因的表达（$P<0.000\ 1$），表明其对HSF细胞胶原蛋白合成的调控作用包含上调*TGFB1*基因mRNA表达这一机制。



—与空白组相比差异极显著（$P<0.001$）；*—与空白组相比差异极其显著（$P<0.000\ 1$）。

图3 牛初乳素对HSF细胞中*TGFB1*基因mRNA表达的影响

Fig. 3 Effects of bovine colostrum bioactive components on the mRNA level of *TGFB1* gene in HSFs

2.2 牛初乳素、胶原蛋白肽及其复配对小鼠皮肤胶原蛋白的调控效果

2.2.1 小鼠体质量变化

在喂养过程中，空白组小鼠健康状况良好，行动灵敏且富有活力，被毛光滑且有光泽，表明其生理功能正常。相比之下，模型组小鼠行动迟缓，明显缺乏活力，部分小鼠出现胡须易脱落、易折断现象，说明其生理状态发生明显衰退，该现象与*D*-半乳糖诱导的衰老模型典型特征相符[25-26]。小鼠体质量变化见图4，结果显示，各组小鼠体质量均稳步增长，且组间未观察到显著差异。

2.2.2 小鼠皮肤水分与弹性结果

D-半乳糖在体内代谢可增加活性氧（ROS）的生成，诱发氧化应激反应，破坏胶原蛋白网络结构，进而导致皮肤干燥、脆弱及弹性下降[27]。如图5所示，模型组小鼠皮肤水分和弹性均极显著低于空白组（$P<0.001$）。与模型组相比，胶原蛋白肽组皮肤水分高度显著升高（$P<0.01$），弹性显著升高（$P<0.05$）；牛初乳素组对小鼠皮肤水分和弹性有一定改善作用，但效果未达显著水平（$P>0.05$）；复配组对皮肤弹性的改善效果极显著（$P<0.001$），且优于各单独干预组。上述结果表明，胶原蛋白肽与牛初乳素协同作用能有效改善模型小鼠皮肤水分减少和弹性下降问题。

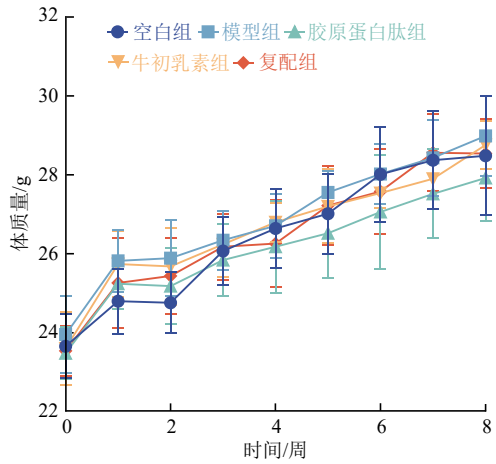


图4 小鼠体质量变化

Fig. 4 Changes in body mass of mice

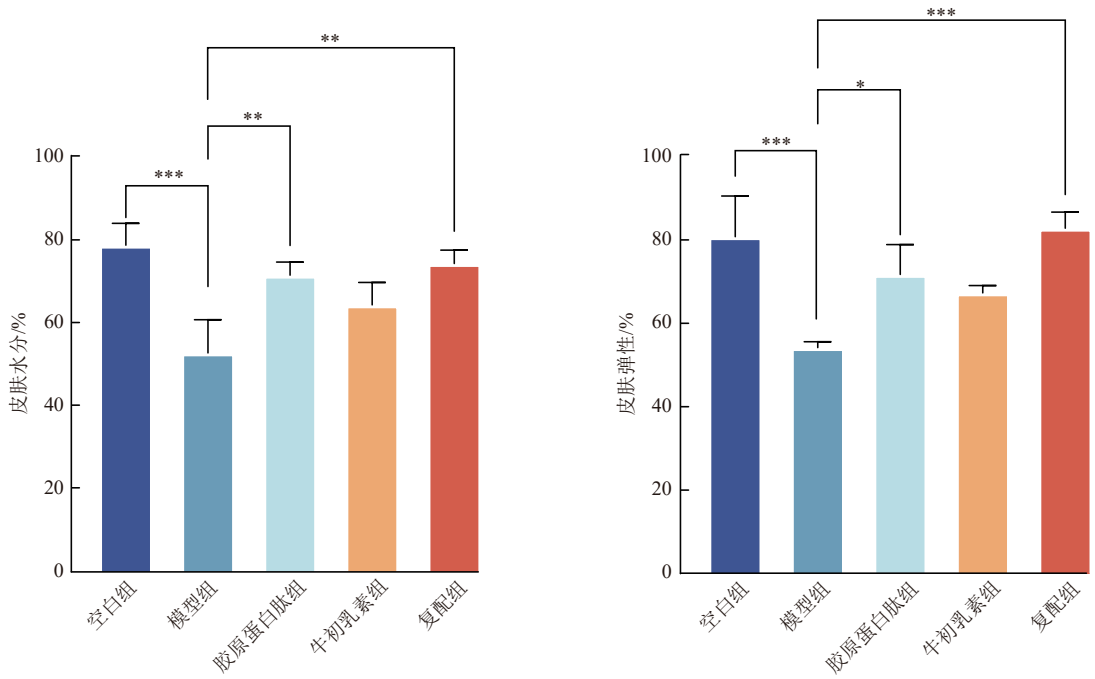
2.2.3 小鼠皮肤胶原蛋白的结构

由图6可知，空白组小鼠真皮层胶原蛋白纤维排列紧密、分布均匀，呈连续的蓝色束状结构。相比之下，模型组小鼠真皮层胶原蛋白纤维明显稀疏、断裂或呈碎片化，胶原束间空隙增大。与模型组相比，胶原蛋白肽组、牛初乳素组及复配组的胶原蛋白稀疏、断裂且排列紊乱程度减轻，胶原蛋白结构更加清晰完整。

2.2.4 小鼠皮肤胶原蛋白水平结果

皮肤真皮层和基底膜中包含多种类型的胶原蛋白，除含量最丰富的COL I外，COL III、COL IV和COL VII在维持皮肤紧致度、弹性和结构稳定方面同样发挥了重要作用。COL III是真皮层中重要的胶原蛋白类型，与COL I协同作用，其纤维结构相对松散、柔韧，有助于提升皮肤弹性[28]。COL IV是基底膜的主要结构成分，其形成的网状结构可为基底膜提供稳定支撑，从而维持皮肤结构完整性及屏障功能[29]。COL VII主要分布于皮肤基底膜带，是表皮与真皮之间的连接分子，能够增强两者之间的附着力，防止皮肤松弛等衰老症状的出现[30]。为评估不同干预方式对胶原蛋白的影响，本研究检测了小鼠背部皮肤中上述4种类型的胶原蛋白质量分数，见图7。

与空白组相比，模型组各型胶原蛋白质量分

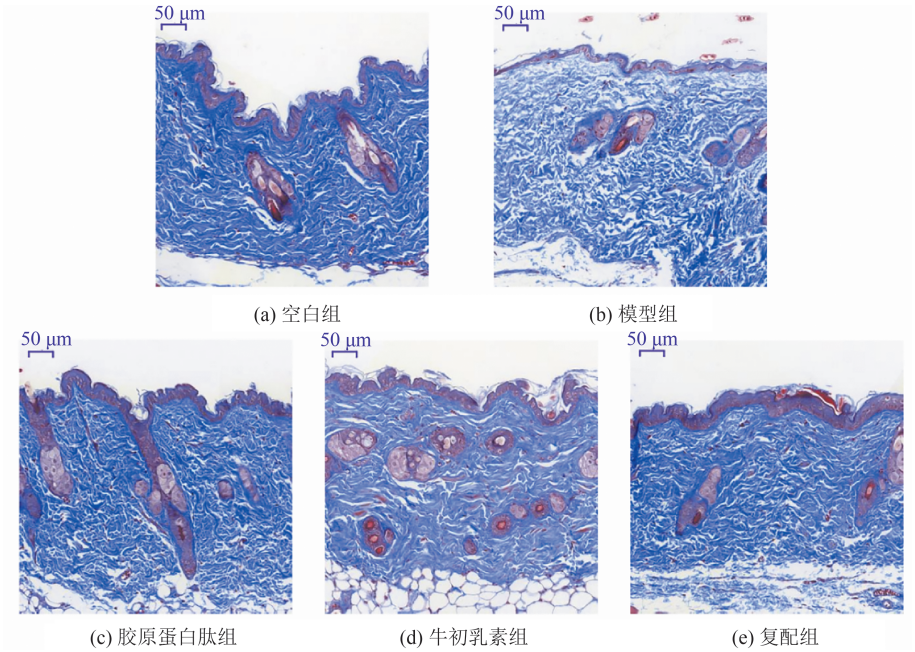


(a) 小鼠皮肤水分　　(b) 小鼠皮肤弹性

*—与模型组相比差异显著（P<0.05）；**—与模型组相比差异高度显著（P<0.01）；***—与模型组相比差异极显著（P<0.001）。

图 5　小鼠皮肤水分和弹性结果

Fig. 5　Skin moisture and elasticity in mice



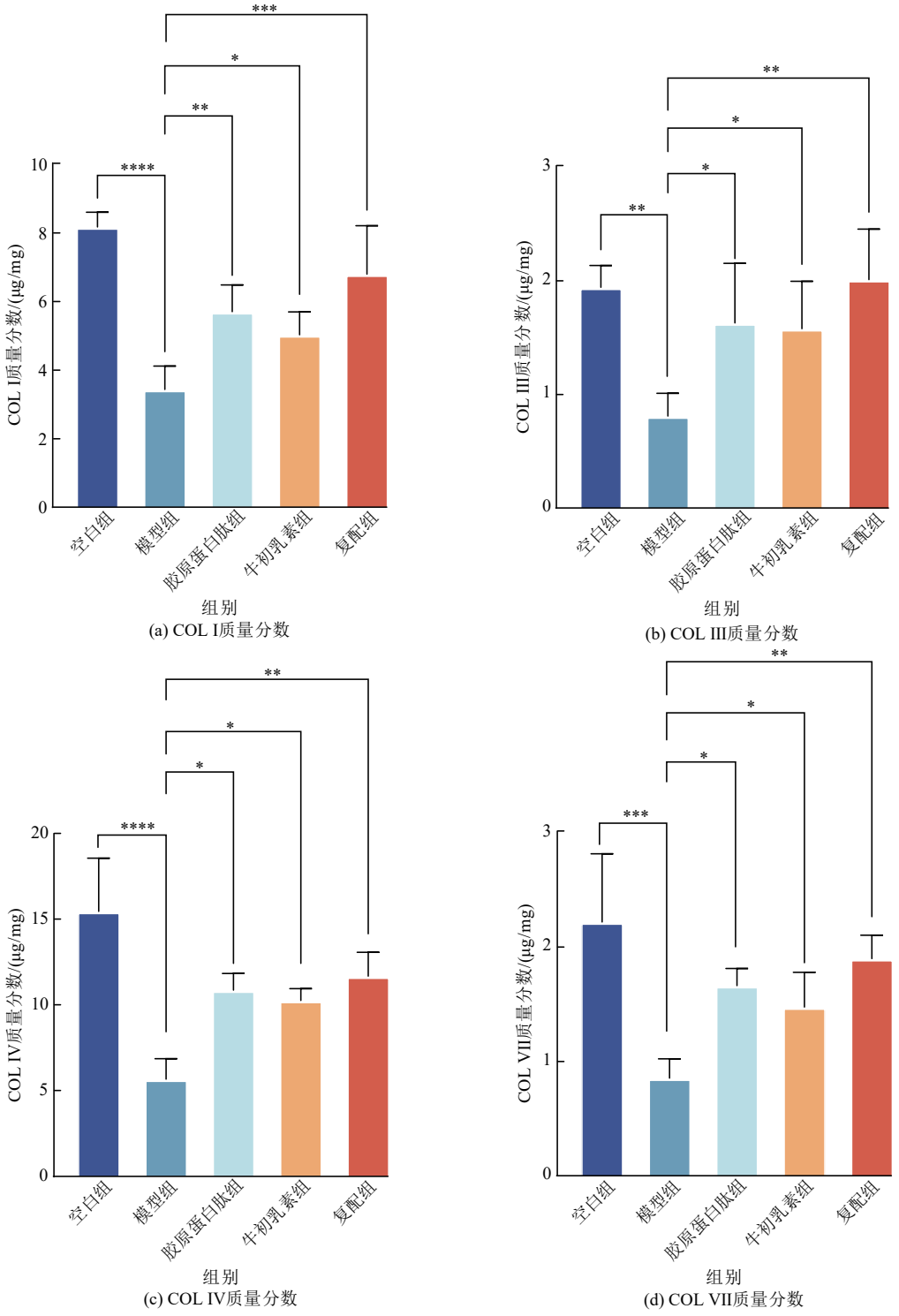
(a) 空白组　(b) 模型组

(c) 胶原蛋白肽组　(d) 牛初乳素组　(e) 复配组

图 6　小鼠皮肤组织 Masson 染色切片图

Fig. 6　Masson-stained sections of mouse skin tissue

数均出现不同程度的降低，这与*D*-半乳糖建模所致胶原蛋白代谢紊乱的特征相符[31]。与模型组相比，胶原蛋白肽干预可高度显著提升小鼠皮肤中COL I质量分数（P<0.01），牛初乳素对COL I的流失也具有显著改善作用（P<0.05），该趋势与细胞试验结果一致；且两者复配后，改善效果极显著（P<0.001）。胶原蛋白肽和牛初乳素对COL III、COL IV和COL VII的流失均表现出显著改善效果



*—与模型组相比差异显著(P<0.05);**—与模型组相比差异高度显著(P<0.01);***—与模型组相比差异极显著(P<0.001);****—与模型组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

图 7　小鼠皮肤中Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅶ型胶原蛋白质量分数

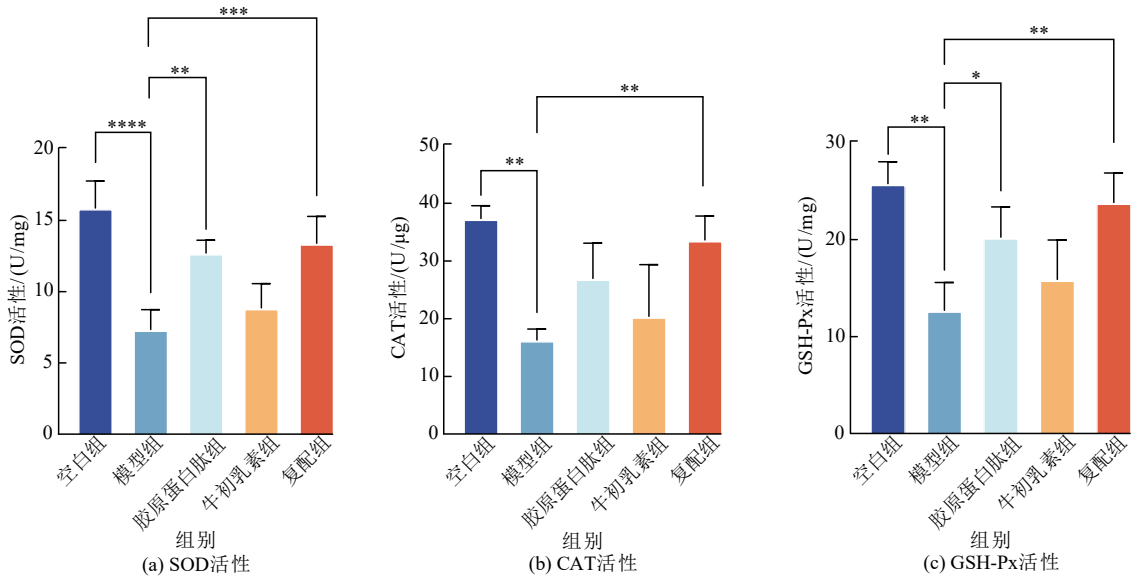
Fig. 7　Mass fractions of type I, III, IV and VII collagen in the mouse skin

(P<0.05),且复配后效果均高度显著(P<0.01)。综上所述,牛初乳素与胶原蛋白肽对小鼠皮肤中COL Ⅰ、COL Ⅲ、COL Ⅳ和COL Ⅶ这4种胶原蛋白的流失均有不同程度的改善作用,能够有效提升皮肤中胶原蛋白水平,且两者复配后均表现出协同增效效应。

2.2.5　小鼠皮肤抗氧化能力结果

在*D*-半乳糖诱导的小鼠模型中，GSH-Px、CAT和SOD等抗氧化酶的活性普遍下降，导致机体抗氧化能力减弱、ROS过量积累，进而加剧氧化应激[32]。ROS可通过氧化反应对胶原蛋白的分子结构造成损伤，降低胶原蛋白的稳定性和功能；同时，氧化应激会激活MMPs，加速胶原蛋白降解。因此，提升皮肤的抗氧化能力可保护胶原蛋白的完整性，进而提升皮肤中胶原蛋白的水平[33]。

由图8可知，模型组小鼠GSH-Px、CAT、SOD的活性均显著低于空白组，该结果与*D*-半乳糖诱导的胶原蛋白流失小鼠模型特征一致[34]。与模型组相比，胶原蛋白肽可高度显著提高SOD活性（$P<0.01$），显著提高GSH-Px活性（$P<0.05$）；牛初乳素对这3种酶的活性无显著改善作用（$P>0.05$）；复配组能极显著提升SOD活性（$P<0.001$），高度显著提高GSH-Px和CAT活性（$P<0.01$）。综上所述，胶原蛋白肽可提升皮肤中SOD和GSH-Px活性，牛初乳素在提升皮肤抗氧化能力方面的效果有限，而两者复配后对SOD、GSH-Px和CAT活性展现出协同提升作用。



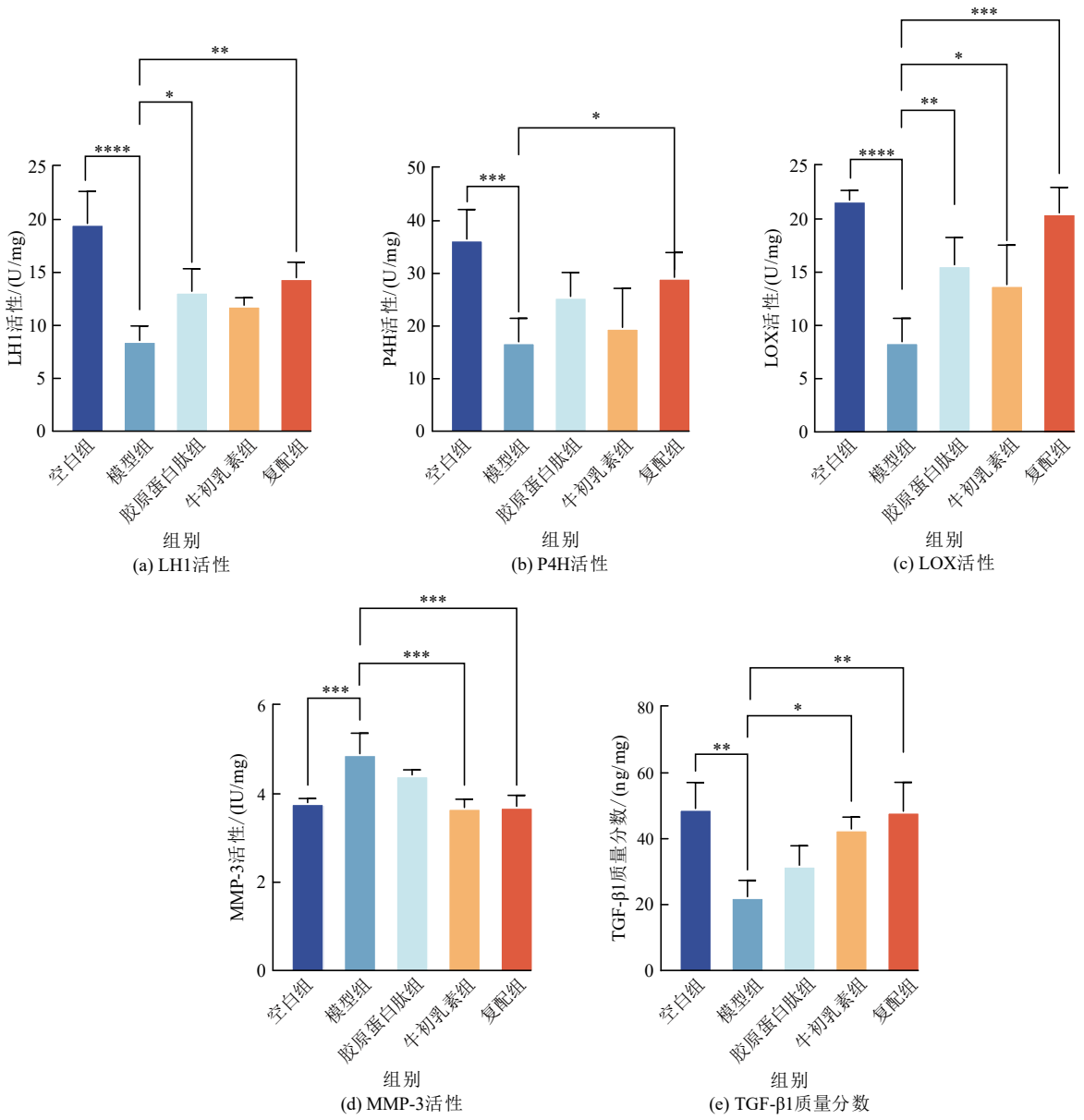
*—与模型组相比差异显著（$P<0.05$）；**—与模型组相比差异高度显著（$P<0.01$）；***—与模型组相比差异极显著（$P<0.001$）；****—与模型组相比差异极其显著（$P<0.000\ 1$）。

图8　小鼠皮肤抗氧化能力结果

Fig. 8　Antioxidant capacity of mouse skin

2.2.6　小鼠皮肤胶原蛋白合成代谢调控机制

为探究牛初乳素在体内调控胶原蛋白合成的靶点及其与胶原蛋白肽的协同作用机制，本研究测定了小鼠皮肤胶原蛋白合成降解酶的活性及TGF-β1质量分数，见图9。胶原蛋白合成过程涉及3种关键酶，其中P4H可催化脯氨酸羟化[35]，LH1可催化赖氨酸羟化[36]，两者共同确保胶原蛋白正确折叠为稳定的三螺旋结构；LOX则是参与胶原蛋白胞外共价交联的关键酶。由于胶原蛋白中半胱氨酸含量较低，其结构稳定性主要依赖LOX催化赖氨酸残基ε-氨基氧化为醛基，进而与相邻赖氨酸的氨基或羟赖氨酸的羟基缩合，形成共价交联，从而维持原纤维稳定[37-38]。结果表明，模型组P4H、LH1和LOX活性均显著低于空白组。与模型组相比，胶原蛋白肽可显著提升LH1活性（$P<0.05$），高度显著提升LOX活性（$P<0.01$）；牛初乳素也可显著提高LOX活性（$P<0.05$）；而复配组对3种酶活性提升的效果更加显著。此外，模型组MMP-3活性较空白组极显著升高（$P<0.001$）；与模型组相比，胶原蛋白肽对其无显著调控效果，而牛初乳素组和复配组的MMP-3活性均极显著降低（$P<0.001$）。另外，与模型组相比，胶原蛋白肽对小鼠皮肤中TGF-β1质量分数无显著影响，牛初乳素能够显著提高TGF-β1质量分数（$P<0.05$），而复配组的提升效果高度显著（$P<0.01$）。



*—与模型组相比差异显著（P<0.05）；**—与模型组相比差异高度显著（P<0.01）；***—与模型组相比差异极显著（P<0.001）；****—与模型组相比差异极其显著（P<0.000 1）。

图 9　胶原蛋白合成降解酶的活性和 TGF-β1 质量分数

Fig. 9　Activities of enzymes involved in collagen synthesis and degradation and mass fraction of TGF-β1

3　结论

牛初乳素可通过调节胶原蛋白合成代谢提升胶原蛋白质量，进而缓解皮肤胶原蛋白流失。HSF 细胞试验结果显示，2.50 mg/mL 牛初乳素能通过提高 LH1 活性，抑制 MMP-1、MMP-3 活性，提高 *TGFB1* 基因的 mRNA 基因表达，从而提升 COL I质量。*D*-半乳糖诱导的胶原蛋白流失小鼠模型的体内试验结果表明，牛初乳素可提高 LOX 活性、抑制 MMP-3 活性并提高 TGF-β1 质量分数，增加小鼠内源性Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅶ型胶原蛋白质量分数，改善皮肤胶原蛋白结构紊乱，推测 MMP-3 和 TGF-β1 是其关键作用靶点。另外，在 *D*-半乳糖诱导的胶原蛋白流失小鼠模型中，胶原蛋白肽与牛初乳素具有协同增效作用。胶原蛋白肽为胶原蛋白合成提供原料，可激活 P4H、LH1、LOX 等关键酶，提升 SOD 和 GSH-Px 活性，增强皮肤抗氧化能力。牛初乳素与胶原蛋白肽复配后，对 GSH-Px、CAT、SOD、P4H、LH1、LOX、MMP-3 活性及 TGF-β1 水平均具有正向调控作用，且对 GSH-Px、SOD、P4H、

LH1、LOX、TGF-β1的调控效果优于单独干预组，可进一步提高4种胶原蛋白的质量分数，其中对COL I的提升效果尤为显著。由于皮肤中80%~85%的胶原蛋白为COL I，因此复配组小鼠的皮肤水分与弹性也得到显著改善。该复配体系通过增强抗氧化能力、促进胶原蛋白合成、减少胶原蛋白降解，有效缓解了*D*-半乳糖诱导的胶原蛋白流失小鼠模型的皮肤胶原蛋白流失问题。本研究为牛初乳素作为食源性胶原蛋白补充原料提供了数据支持，同时拓展了其在皮肤抗衰老领域的应用潜力。然而，牛初乳素作用于MMP-3和TGF-β1的具体分子机制，以及复配体系中各成分的最佳比例尚未明确。未来的研究可着重阐明相关分子机制并优化复配比例，以期获得更佳的应用效果。

参考文献

[1] DIERCKX S，PATRIZI M，MERINO M，et al. Collagen peptides affect collagen synthesis and the expression of collagen，elastin，and versican genes in cultured human dermal fibroblasts[J]. Frontiers in Medicine，2024，11：1397517.

[2] TVAROŠKA I. Glycosylation modulates the structure and functions of collagen：a review[J]. Molecules，2024，29（7）：1417.

[3] HE T Y，FISHER G J，KIM A J，et al. Age-related changes in dermal collagen physical properties in human skin[J]. PLoS One，2023，18（12）：e0292791.

[4] KLEINNIJENHUIS A J，VAN HOLTHOON F L，MAATHUIS A J H，et al. Non-targeted and targeted analysis of collagen hydrolysates during the course of digestion and absorption[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry，2020，412（4）：973-982.

[5] 蒲春宏，王荣昌，华中杰，等. 基于光损伤皮肤成纤维细胞模型的鱼胶原蛋白肽修复性能研究. 日用化学工业（中英文），2024，54（11）：1375-1381.
PU C H，WANG R C，HUA Z J，et al. Study on the repair performance of fish collagen peptides based on the UVA induced fibroblast photodamage model [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics，2024，54（11）：1375-1381.（in Chinese）

[6] TAGA Y，IWASAKI Y，SHIGEMURA Y，et al. Improved *in vivo* tracking of orally administered collagen hydrolysate using stable isotope labeling and LC-MS techniques[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2019，67（16）：4671-4678.

[7] 杨洋. 牛初乳功能特性及应用研究进展[J]. 中国奶牛，2022（10）：45-50.
YANG Y. Research progress on the functional properties and application of bovine colostrum[J]. China Dairy Cattle，2022（10）：45-50.（in Chinese）

[8] 韩立华，朱师晨，Mike WEISER，等. 牛初乳营养组成和功能特性研究进展[J]. 食品科学，2023，44（13）：397-407.
HAN L H，ZHU S C，WEISER M，et al. Research advances in the nutrient composition and functional characteristics of bovine colostrum[J]. Food Science，2023，44（13）：397-407.（in Chinese）

[9] HAN G，KIM H，KIM D E，et al. The potential of bovine colostrum-derived exosomes to repair aged and damaged skin cells[J]. Pharmaceutics，2022，14（2）：307.

[10] HAN S Y，LI H X，LUO F，et al. Inhibitory effect of seawater pearl hydrolysate on UVA-induced photoaging of human skin fibroblasts[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine，2022，2022：1558288.

[11] DURA B，CHOI J Y，ZHANG K R，et al. scFTD-seq：freeze-thaw lysis based，portable approach toward highly distributed single-cell 3′ mRNA profiling[J]. Nucleic Acids Research，2019，47（3）：e16.

[12] ZUCHA D，KUBISTA M，VALIHRACH L. Tutorial：guidelines for single-cell RT-qPCR[J]. Cells，2021，10（10）：2607.

[13] WANG W，LIU F，XU C，et al. *Lactobacillus plantarum* 69-2 combined with galacto-oligosaccharides alleviates *D*-galactose-induced aging by regulating the AMPK/SIRT1 signaling pathway and gut microbiota in mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2021，69（9）：2745-2757.

[14] AHN Y，JOO SUH H，HONG K B，et al. Oral intake of milk ceramides improves skin hydration，elasticity，and wrinkles around the eyes：a 12-week，randomized，double-blind，placebo-controlled trial [J]. Journal of Functional Foods，2024，113：106008.

[15] LEE H Y，KIM E J，CHO D Y，et al. Photoprotective effect of fermented and aged mountain-cultivated ginseng sprout（*Panax ginseng*）on ultraviolet radiation-induced skin aging in a hairless mouse model[J]. Nutrients，2023，15（7）：1715.

[16] 郑雪丽，毛丙永，唐鑫，等. 植物乳植杆菌CCFM1296及后生元对小鼠透明质酸和衰老的影响[J]. 食品与发酵工业，2023，49（24）：228-234.
ZHENG X L，MAO B Y，TANG X，et al. Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1296 and its postbiotics on mice hyaluronic acid content and senescence[J]. Food and Fermentation Industries，2023，

49(24):228-234.(in Chinese)

[17] NI H, LIU C, KONG L L, et al. Preparation of injectable porcine skin-derived collagen and its application in delaying skin aging by promoting the adhesion and chemotaxis of skin fibroblasts[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 126718.

[18] BISKANAKI F, KEFALA V, LAZARIS A C, et al. Aging and the impact of solar ultraviolet radiation on the expression of type I and type VI collagen[J]. Cosmetics, 2023, 10(2): 48.

[19] LIU H L, DONG J J, DU R N, et al. Collagen study advances for photoaging skin[J]. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 2024, 40: e12931.

[20] ISHIKAWA Y, TAGA Y, ZIENTEK K, et al. Type I and type V procollagen triple helix uses different subsets of the molecular ensemble for lysine posttranslational modifications in the rER[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2021, 296: 100453.

[21] LARONHA H, CALDEIRA J. Structure and function of human matrix metalloproteinases[J]. Cells, 2020, 9(5): 1076.

[22] MELITON A Y, CETIN-ATALAY R, TIAN Y F, et al. Mitochondrial one-carbon metabolism is required for TGF-β-induced glycine synthesis and collagen protein production[J]. bioRxiv, 2023, 11: 566074.

[23] LIU Z H, LI Y Q, SONG H D, et al. Collagen peptides promote photoaging skin cell repair by activating the TGF-β/Smad pathway and depressing collagen degradation [J]. Food & Function, 2019, 10(9): 6121-6134.

[24] 王一帆, 郭建波, 邵宝仪, 等. TGF-β1/SMAD在糖尿病肾病中的作用机制与研究进展[J]. 四川大学学报(医学版), 2023, 54(6): 1065-1073.
WANG Y F, GUO J B, SHAO B Y, et al. The role of TGF-β1/SMAD in diabetic nephropathy: mechanisms and research development[J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences), 2023, 54(6): 1065-1073.(in Chinese)

[25] AZMAN K F, ZAKARIA R. *D*-Galactose-induced accelerated aging model: an overview [J]. Biogerontology, 2019, 20(6): 763-782.

[26] YAMAMOTO H, SHIMOMURA N, OURA K, et al. Nacre extract from pearl oyster shell prevents *D*-galactose-induced brain and skin aging[J]. Marine Biotechnology, 2023, 25(4): 503-518.

[27] DECHA N, THONGLAM J, MEESANE J, et al. Dual functional profluorescent nitroxides for the detection of reactive oxygen species and inhibition of collagen degradation during reassembly [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2024, 22(6): 1254-1268.

[28] GAO J P, GUO Z H, ZHANG Y, et al. Age-related changes in the ratio of Type I/III collagen and fibril diameter in mouse skin[J]. Regenerative Biomaterials, 2023, 10: rbac110.

[29] MAJEWSKI G P, SINGH S, BOJANOWSKI K. Olive leaf-derived PPAR agonist complex induces collagen IV synthesis in human skin models[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2021, 43(6): 662-676.

[30] NAKAMURA T, YOSHIDA H, OTA Y, et al. SPARC promotes production of type IV and VII collagen and their skin basement membrane accumulation[J]. Journal of Dermatological Science, 2022, 107(2): 109-112.

[31] WANG N, YU Q Y, WANG D L, et al. Synergistic antiaging effects of jujube polysaccharide and flavonoid in *D*-galactose-induced aging mice[J]. Food Science and Technology, 2022, 42: e46222.

[32] OYEBODE O T, ABOLAJI A O, OLUWADARE J O, et al. Apigenin ameliorates *D*-galactose-induced lifespan shortening effects *via* antioxidative activity and inhibition of mitochondrial-dependent apoptosis in *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 69: 103957.

[33] YOKOI K, YASUMIZU Y, OHKURA N, et al. Increased anti-oxidative action compensates for collagen tissue degeneration in vitiligo dermis[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2023, 36(5): 355-364.

[34] HU T T, CHEN R, QIAN Y, et al. Antioxidant effect of *Lactobacillus fermentum* HFY02-fermented soy milk on *D*-galactose-induced aging mouse model [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(5): 1362-1372.

[35] MURTHY A V, SULU R, LEBEDEV A, et al. Crystal structure of the collagen prolyl 4-hydroxylase (C-P4H) catalytic domain complexed with PDI: toward a model of the C-P4H $\alpha_2\beta_2$ tetramer [J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(12): 102614.

[36] LI H, XU H C, WEN H Y, et al. Lysyl hydroxylase 1 (LH1) deficiency promotes angiotensin II (Ang Ⅱ)-induced dissecting abdominal aortic aneurysm [J]. Theranostics, 2021, 11(19): 9587-9604.

[37] ARONOFF M R, HIEBERT P, HENTZEN N B, et al. Imaging and targeting LOX-mediated tissue remodeling with a reactive collagen peptide[J]. Nature Chemical Biology, 2021, 17(8): 865-871.

[38] ELLINGSON A J, PANCHERI N M, SCHIELE N R. Regulators of collagen crosslinking in developing and adult tendons[J]. European Cells & Materials, 2022, 43: 130-152.