

鱼皮来源胶原三肽的提取和功效研究

林琳^{1*}, 王珍珍^{1,2}, 徐思伟¹, 陈丽¹, 王蕊蕊¹

(1. 上海科黛生物科技有限公司, 上海, 201703;)

2. 南京彼得理生物科技有限公司, 江苏南京, 210031)

DOI:10.61369/CDCST.2026010008

摘要: 本研究旨在制备一种高活性的鱼皮来源胶原三肽, 并系统评估其理化特性、体外抗炎活性及临床舒缓功效。采用复合蛋白酶(脯氨酸内切蛋白酶:碱性蛋白酶37071:木瓜蛋白酶=30:40:30)酶解鱼皮, 并通过超滤、浓缩、喷雾干燥制备胶原三肽粉末。利用液相色谱-质谱联用法测定特征性三肽GPH含量, 凝胶渗透色谱分析分子量分布。通过CCK-8法确定细胞安全浓度后, 在LPS诱导的Raw264.7细胞炎症模型中, 采用qPCR技术检测胶原三肽对炎症因子IL-1 β 、IL-6、IL-8 mRNA表达的抑制作用。最后, 通过0.3%烟酸甲酯诱导的人体皮肤红斑模型, 客观评价其退红效果。所制备的胶原三肽中GPH含量为3.2%, 数均相对分子质量为467 Da, 其中相对分子质量<1000 Da的组分占比为89.26%, 该区间以二肽、三肽及游离氨基酸等低分子组分为主。细胞实验表明, 在0.125%~0.25%的安全浓度范围内, 胶原三肽能剂量依赖性地显著抑制炎症因子的基因表达, 尤其对IL-1 β 的抑制效果突出。临床测试证实, 0.5%的胶原三肽溶液可在10min内快速起效, 并在1h内将皮肤的红斑自然消退率提升约一倍。本研究成功制备出一种高纯度、小分子量的胶原三肽, 并在临幊上验证了其显著的舒缓退红功效, 作为一种优质的活性原料在功能性日化品中具有广阔的应用前景。

关键词: 胶原三肽提取; 功效研究; 抗炎; 烟酸甲酯模型; 舒缓修护

作者简介: 林琳, 上海科黛(毕生之研)生物科技有限公司研发总监, 工程师, 毕业于上海师范大学, 深耕化妆品研发20年, 具有丰富的产品开发和生产经验。E-mail: lin.lin@corday.tech。



林琳

胶原蛋白是动物体内含量最丰富的结构蛋白, 约占人体蛋白质总量的30%, 广泛分布于皮肤、骨骼、肌腱、血管等结缔组织中, 对维持组织结构的完整性和机械强度具有关键作用^[1]。随着年龄增长, 人体胶原蛋白合成能力下降, 尤其是皮肤中的I型胶原蛋白流失加快, 导致皮肤松弛、皱纹形成及关节退化等问题。传统的胶原蛋白补充方式(如口服大分子胶原蛋白)因分子量较大(>300 kDa), 生物利用度低, 需经胃肠道消化分解为小分子肽(如二肽、三肽)才能被吸收^[2, 3]。胶原三肽(Collagen Tripeptide, CTP)是由三个氨基酸组成的短肽, 典型序列为甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸(Gly-Pro-Hyp, GPH), 其分子量小(约300 Da), 可直接通过肠道吸收进入血液循环, 鞭向作用于皮肤、软骨等组织, 促进胶原合成, 具有更高的生物活性^[4]。传统胶原蛋白主要来源于猪皮、牛皮等陆生动物组织, 但存在人畜共患病风险(如疯牛病、口蹄疫)、宗教禁忌及分子量较大等问题^[5]。相比之下, 鱼皮胶原蛋白具有一定优势, 包括安全性高:深海鱼类(如三文鱼、鳕鱼)受环境污染较少, 无哺乳动物相关病原体风险;分子量更小:鱼胶原蛋白的热稳定性较低, 更易被酶解为小分子肽, 吸收效率更高;可持续性:鱼皮是水产加工的主要副产物, 全球年产量超200万吨, 但多数被废弃或制成低值饲料, 资源利用率低。利用鱼皮提取胶原三肽可实现高

值化利用, 符合循环经济理念^[6, 7]。

随着环境污染、紫外线辐射及生活压力增加, 皮肤敏感、屏障受损等问题日益突出, 消费者对具有舒缓修复功效的护肤成分需求激增。胶原三肽(Collagen Tripeptide, CTP)作为胶原蛋白的最小活性单元(相对分子质量约300 Da), 因其优异的透皮吸收性和生物活性, 在抗衰老、保湿等领域已有较多研究, 但在舒缓修复方向的系统性探索仍较缺乏^[8-10]。本研究旨在填补这一空白, 深入探讨CTP对皮肤屏障修复、炎症抑制及神经舒缓的作用机制, 并开发针对敏感肌的高效修复配方。该研究对于胶原三肽应用到日化领域, 特别是作用于皮肤, 有一定的参考价值。

1. 实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂:水, GB/T 6682规定的一级水, 自制;鳕科鱼皮, 来自辽宁大连;脯氨酸内切蛋白酶, Sigma-Aldrich;碱性蛋白酶37071, 20万U/g酶活力, 酶制剂生物技术公司;木瓜蛋白酶, 80万U/g酶活力, 南宁市庞博生物工程有限公司;乙腈、甲酸, 质谱纯, Thermo Fisher Scientific;甘氨酸脯氨酸羟脯氨酸(Gly-Pro-Hyp)标准品, 纯度≥98%, Sigma-Aldrich; Raw264.7细胞,

YS1617C, ATCC; Trizol试剂, 上海超研生物科技有限公司; FastStart SYBR Green预混剂, Sigma-Aldrich。

仪器: 超滤系统, Ultracel® 系列再生纤维素超滤膜, 3 kDa 截留分子量 (NMWL), 适用于蛋白浓缩、脱盐和纯化, Merck (Sigma-Aldrich); 真空浓缩仪, Bionoon VAC-P1型, 上海般诺生物科技有限公司; 喷雾干燥机, YPG型, 江苏太阳臣干燥科技有限公司; ME204E型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo; FiveEasy Plus型 pH计, 瑞士 Mettler Toledo; Research Plus型 移液器 (100-1000 μ L), 德国 Eppendorf; 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾离子源, Waters; 色谱柱, Atlantis T3 C18 Column(15cm \times 2.1mm \cdot 5 μ m), Waters; 实时荧光定量PCR仪, QuantStudio5, Thermo Fisher Scientific; 核酸定量仪, JP-Keebio10000, 上海嘉鹏; Mexameter®MX18, 黑色素和血红素测试探头, 德国 Courage+khazaka; Visia-CR, 面部图像分析仪, 美国 Canfield。

1.2 实验方法

1.2.1 胶原三肽的制备方法

将鱼皮解冻, 刮去残留的鱼肉和脂肪, 用清水冲洗干净。然后将其剪成小块 (约0.5cm \times 0.5cm), 以增大反应面积。使用0.1mol/L NaOH浓度的碱液浸泡, 去除脂质和部分杂蛋白。然后用清水洗至中性。将处理好的鱼皮在酸性溶液 (乙酸或柠檬酸溶液, pH: 2.5~3.0) 中浸泡, 使其充分溶胀, 破坏部分交联结构, 便于酶解。将预处理后的鱼皮按10%的稀释浓度加入到反应容器中, 并用磷酸盐缓冲液 (pH=8.0) 调节液体系。酶解温度为50~55°C, pH: 8.0~8.5, 酶添加总量为底物干重的2%。酶按照脯氨酸内切蛋白酶 (30%)、碱性蛋白酶37071 (40%)、木瓜蛋白酶 (30%) 的质量比配制复合酶。将该复合酶均匀加入到反应体系中, 缓慢搅拌, 开始计时。酶解4~6h, 期间需持续监测pH值, 使用酸或碱维持pH稳定。酶解结束后, 迅速将反应体系升温至90~95°C, 并保持10~15min, 以彻底钝化所有蛋白酶的活性, 终止反应。将灭活后的酶解液冷却至室温, 然后进行高速离心 (8000 r/min, 15min)。取上清液, 弃去底部不溶物和沉淀。将上清液依次通过微滤膜和超滤膜进行处理。使用分子量截留 (MWCO) 为1~3 kDa的超滤膜。目的是去除大分子的多肽和未完全酶解的蛋白质, 收集滤过液, 其中主要含有二肽、三肽和少量游离氨基酸。将超滤得到的滤过液进行真空浓缩或反渗透浓缩, 减少体积。采用喷雾干燥技术, 将浓缩液制成易于保存和

运输的胶原三肽粉末。

1.2.2 GPH含量测试

特征性三肽 GPH分子量小, 可直接被小肠快速吸收或通过皮肤吸收, 吸收率较高^[11]。它具有良好的pH稳定性和温度稳定性, 在体内能稳定存在一段时间而不被轻易分解^[12]。

参考医药行业标准 YY/T 1805.3-2022《组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第3部分: 基于特征多肽测定的胶原蛋白含量检测——液相色谱-质谱法》^[13], 采用液相色谱质谱联用法测试GPH (Gly-Pro-Hyp, 甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸) 含量。流动相为0.1%甲酸水溶液和含有0.1%甲酸的95%乙腈水溶液, 采用梯度洗脱, 0~5min: 100% (0.1%甲酸水溶液), 10min: 80%:20% (含有0.1%甲酸的95%乙腈水溶液), 15min: 60%:40%, 20~25min: 20%:80%, 25.1~35min: 100% (0.1%甲酸水溶液)。流速0.35 mL/min, 柱温40°C, 进样体积5 μ L。质谱仪喷雾电压为4.0kV, 干燥气温度300°C, 喷雾压力241.3kPa, 干燥气流速8L/min, 扫描模式为母离子扫描模式 (Precursor Scan) 特征性GPH碰撞能量为20eV, 特征碎片离子为[Gly-Pro-46]⁺, m/z 127, 母离子扫描范围 (m/z) 为189~337m/z。

1.2.3 分子量测试

参考国家标准 GB 31645-2018《食品安全国家标准 胶原蛋白肽》附录A对制备得到的胶原三肽进行分子量的测定^[14]。

1.2.4 qPCR测试

首先采用CCK-8方法筛选细胞安全存活的样品浓度。将生长状态良好、处于对数生长期的Raw264.7细胞消化、重悬。进行细胞计数, 用完全培养基调整细胞悬液浓度。将细胞悬液接种到96孔板中, 每孔加入100 μ L。接种密度为 5×10^3 ~ 1×10^4 个细胞/孔, 轻轻晃动培养板使细胞分布均匀, 将其置于37°C、5% CO₂培养箱中培养24h, 让细胞充分贴壁。24h后, 吸去各孔中的旧培养基。设置空白对照组为仅含100 μ L无血清培养基 (含细胞, 不含药物), 实验组为加入100 μ L用无血清培养基配制的不同浓度的胶原三肽溶液。药物处理结束后, 小心地在每孔中加入10 μ L的CCK-8溶液, 继续孵育。孵育结束后, 从培养箱中取出96孔板, 使用酶标仪, 在450nm波长下测定每孔的吸光度 (OD值) 并计算细胞存活率^[15]。

在qPCR实验中, 利用LPS诱导的小鼠巨噬细胞系

Raw264.7建立体外炎症模型，通过qPCR技术检测胶原三肽处理后，关键炎症因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8* 的 mRNA 表达水平变化，以评估其抗炎活性。将生长状态良好的 Raw264.7 细胞消化、重悬，以密度 1×10^5 细胞/毫升接种于细胞培养板 24 孔板。置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜，使细胞充分贴壁（约 80% 融合度）。设置模型对照组为含 LPS (2 μ g/mL) 的培养基，实验组为含 LPS (2 μ g/mL) 及不同浓度胶原三肽的培养基，阳性对照组为含 LPS (2 μ g/mL) 及地塞米松 (1 μ mol/L) 的培养基。将细胞培养板放回培养箱，继续培养。处理结束后，弃去培养基，用预冷的 PBS 轻柔清洗细胞 1~2 次。每孔加入 500 μ L 的 Trizol 试剂，充分吹打裂解细胞。参照 Trizol 试剂说明书进行氯仿分离、RNA 沉淀和洗涤，最后用无 RNase 水溶解 RNA。使用核酸定量仪检测 RNA 浓度与纯度 (A₂₆₀/A₂₈₀ 比值约在 1.8~2.0 之间)。使用逆转录试剂盒，将各组提取的总 RNA (如 1) 逆转录为 cDNA。反应体系与程序参照试剂盒说明书进行。使用 SYBR Green 法参照表 1 中的引物序列进行 qPCR 扩增。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量^[16]。

表 1 各炎症因子相关基因的引物序列

基因	引物名称	序列 (5' → 3')
<i>IL-1β</i>	IL-1 β -M-F-1	TGCAGGCTTCGAGATGAAC
	IL-1 β -M-R-1	GGGATTGTCGTTGCTTGTC
<i>IL-6</i>	IL-6-M-F-1	ACCAAGACCATCCAACCTCATC
	IL-6-M-R-1	TTCTGACCACAGTGAGGAATG
<i>IL-8</i>	IL-8-M-F-1	CATCCAGAGCTTGAGTGAGA
	IL-8-M-R-1	GTTAGCCTGCCTTGTCA
内参基因	GAPDH-M-F	TCAGTCACGGGGGACATAAA
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i> -M-R	GGGGCTGTACTGCTTAACCGAG

1.2.5 临床测试

1.2.5.1 实验材料准备

配制 0.3% 烟酸甲酯 (Methyl Nicotinate) 溶液，溶剂生理盐水 (视实验需求调整)。本研究共招募 30 名健康成年人 (18~50 岁) 作为受试者，男女各半。样本量基于预实验效应量估算，满足常规统计学要求。所有受试者均签署知情同意书，受试者无皮肤病史、无烟酸过敏史，前臂屈侧无破损或炎症。

1.2.5.2 实验操作步骤

皮肤预处理：清洁前臂屈侧皮肤（避免使用含酒精的清洁剂）。标记实验区域（通常 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ），避免重复刺激同一部位。烟酸甲酯刺激：使用滤纸片或微针贴片（直径约 1 cm）浸渍 0.3% 烟酸甲酯溶液，贴敷于标记区域，待泛红稳定 30min 后，空白组区域涂抹溶剂去离子水，实验组区域涂抹含 0.5% 胶原三肽稀释水溶液，监测在 10min、30min 和 1h 时间点的

红斑值和 *a** 值（代表颜色在红-绿轴上的位置，+*a** 方向表示红色，-*a** 方向表示绿色）。面部图像，测试设备为 Visia-CR 分析整个面部。使用 IPP 软件分析 Visia-CR 的单侧面部图片的皮肤红色区 *a** 值；使用设备 Mexameter®MX18 进行单侧面部分析皮肤血红素检测（红斑指数）。

1.2.6 统计学方法

数据分析用 GraphPad Prism8.0 进行统计，结果用平均值 Mean \pm 标准差 SD 表示。各组间比较用配对样本 t-test 统计分析，统计分析均为双尾。当 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 时认为有显著差异，在图像中分别用 “*”、“**” 和 “***” 表示；当 $P \geq 0.05$ 时，无显著性差异，在图像中用符号 “n.s.” 表示。

2. 结果与讨论

2.1 理化测试：GPH 含量和相对分子质量

表 2 结果显示，采用高精度的液相色谱-质谱联用法检测，最具生物活性的甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸三肽占总成分的 3.2%。数均相对分子质量 467 Da 和重均相对分子质量 479 Da，两者非常接近，表明相对分子质量分布较为集中、均匀。表 3 中的结果表明，该胶原三肽主要组分的相对分子质量在 189~500 Da 和 <189 Da 的组分是主体，分别占 25.96% 和 37.65%，合计超过 63%。次要组分的相对分子质量在 500~2000 Da 的组分（二肽至十肽左右）占比约 32.87%。极微量组分的相对分子质量大于 2000 Da 的较大分子肽段占比极低（约 3.52%），且完全不含 >10,000 Da 的大分子蛋白质。

表 2 胶原三肽的 GPH 含量和平均相对分子质量

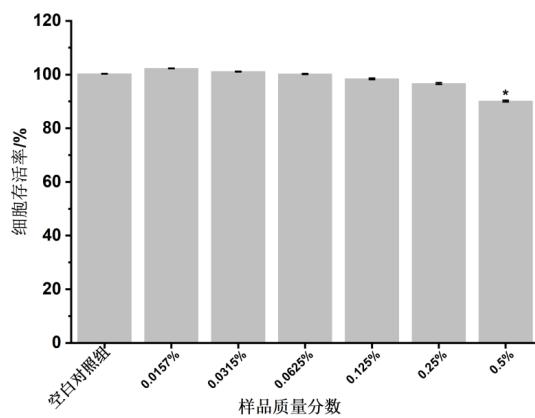
检测项目	检测方法	检测结果
GPH 含量 %	液相色谱质谱联用法	3.2
总平均相对分子质量 (数均相对分子质量) /Da	GB 31645-2018 附录 A	467
总平均相对分子质量 (数均相对分子质量) /Da	GPC/UV	479

表 3 胶原三肽的相对分子质量范围

相对分子质量 范围 /Da	峰面积百分比 /% ($\lambda 220\text{nm}$)	数均相对分子 质量 (M _n) /Da	重均相对分子质量 (M _w) /Da
>10,000	0	0	0
5000~10000	0.07	5479	5508
3000~5000	1.11	3563	3626
2000~3000	2.34	2351	2382
1000~2000	9.33	1337	1372
500~1000	23.54	629	642
189~500	25.96	232	250
<189	37.65	/	/

2.2 qPCR 测试结果

通过 CCK-8 法检测了不同浓度胶原三肽对小鼠巨噬细胞 (Raw264.7) 细胞活力的影响, 以评估其细胞毒性 (图 1)。细胞存活率以空白对照组的活力为 100% 进行标准化计算。在低浓度区间 (0.0157% ~ 0.125%) , 胶原三肽对细胞活力没有显著影响, 各浓度组的细胞存活率在 98.42% ~ 102.3% 之间波动, 与空白对照组无异。在中等浓度 (0.25%) , 细胞存活率开始出现轻微下降 (96.67%) , 但通常认为这种程度的下降不具有生物学意义上的毒性。在最高测试浓度 (0.5%) , 细胞存活率出现统计学上的显著下降 (90.13%, $P < 0.05$) , 表明在此浓度下, 胶原三肽对 Raw264.7 细胞的增殖或活力产生了轻微的抑制效应。

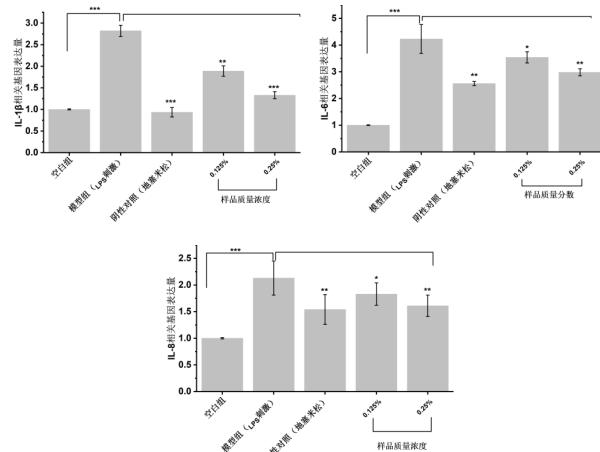


注: 数据以均值 \pm 标准差表示, $n=3$ 。* $P < 0.05$ vs. 空白对照组 (0% 浓度)。

图 1 不同浓度胶原三肽对 Raw264.7 细胞存活率的影响

本实验通过 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 (Raw264.7) 建立体外炎症模型, 并使用 qPCR 技术检测了关键炎症因子 *IL-1 β* 、*IL-6* 和 *IL-8* 的 mRNA 相对表达水平。结果显示 (图 2) , 与空白组相比, LPS 刺激 (模型组) 显著诱导了三种炎症因子 mRNA 的表达, 其中 *IL-6* 的上调幅度最大 (4.23 倍) , 其次是 *IL-1 β* (2.82 倍) 和 *IL-8* (2.13 倍) , 具有极其显著性差异 ($P < 0.001$)。地塞米松 (DEX) 作为阳性对照, 有效抑制了 LPS 诱导的炎症因子表达, 尤其是对 *IL-1 β* 的抑制效果最强, 使其表达水平甚至略低于空白组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。胶原三肽呈现剂量依赖性抑制, 在 0.125% 浓度下, 胶原三肽对三种炎症因子均表现出明显的

抑制作用。在 0.25% 浓度下, 抑制作用进一步增强, 呈现出清晰的剂量依赖性 (即浓度越高, 抑制效果越强) , 并且均有显著性差异 ($P < 0.05$)。



注: 数据以均值 \pm 标准差表示, $n=3$ 。与模型组 (LPS) / 空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 胶原三肽对 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

2.3 临床测试

本实验通过 0.3% 烟酸甲酯在人体前臂诱导暂时性、可控的皮肤红斑 (发红) 模型, 以评估 0.5% 胶原三肽溶液的舒缓退红功效。主要使用红斑值 (反映皮下血红蛋白浓度) 和 a^* 值 (反映肉眼可见的红度) 两项客观指标进行评价。如表 4、表 5 结果所示, 在刺激前 (T_0) , 空白组与实验组的红斑值和 a^* 值均处于相近水平, 表明实验起始点一致, 具有可比性。即时反应 (T_1 , 10min) 时候, 空白组的两项指标均轻微上升 (红斑值 +1.24%, a^* 值 +3.69%) , 表明烟酸甲酯的血管扩张效应在持续。而实验组的两项指标均出现下降 (红斑值 -4.00%, a^* 值 -5.34%) , 提示胶原三肽在涂抹后 10min 内即开始起效, 迅速抑制了红斑的发展。持续效果 (T_2 持续 30min 与 T_3 持续 1h) , 两组的两项指标均呈下降趋势, 表明皮肤自身具有一定的修复能力。然而, 实验组的下降幅度显著大于空白组。在实验终点 (T_3 持续 1h) , 实验组的红斑值和 a^* 值下降率 (-27.32%, -34.67%) 远超空白组 (-14.96%, -27.23%) 。

表 4 烟酸甲酯刺激模型测试结果后接 - 红斑值

红斑值	T_0 均值	T_1 均值 (10min)	T_2 均值 (30min)	T_3 均值 (1h)	5min 红斑值变化率 /%	30min 红斑值变化率 /%	1h 红斑值变化率 /%
					(T_1-T_0)	(T_2-T_0)	(T_3-T_0)
空白组	230.400 ± 20.17	233.266 ± 23.21	218.532 ± 19.82	195.934 ± 17.77	1.24 ± 0.14	-5.15 ± 0.17	-14.96 ± 1.02
对照组	240.132 ± 18.86	230.534 ± 22.20	206.666 ± 17.89	174.534 ± 18.05	-4.00 ± 0.20	-13.94 ± 0.14	-27.32 ± 0.98

表5 烟酸甲酯刺激模型测试结果 (Mean \pm SD) $-a^*$ 值

a^* 值	T_0 均值	T_1 均值 (10min)	T_2 均值 (30min)	T_3 均值 (1h)	5min a^* 值变化率 /% (T_1-T_0)	30min a^* 值变化率 /% (T_2-T_0)	1h a^* 值变化率 /% (T_3-T_0)
空白组	10.136 \pm 1.62	10.510 \pm 1.33	8.588 \pm 1.54	7.376 \pm 1.11	3.69 \pm 0.10	-15.27 \pm 1.87	-27.23 \pm 2.31
对照组	10.632 \pm 1.89	10.064 \pm 1.47	8.444 \pm 1.71	6.946 \pm 1.03	-5.34 \pm 0.13	-20.58 \pm 1.90	-34.67 \pm 2.43

3. 结论

该胶原三肽相对分子质量<189 Da (37.65%)，这部分主要是游离氨基酸，是构建肽链的基本原料，可以被身体直接利用；189~500 Da (25.96%)这是产品的黄金组分，这个区间正好是二肽和三肽的相对分子质量范围（一个氨基酸残基分子量约为100~150 Da），间接证明了酶解工艺的彻底和高效。极低的大相对分子质量>3000 Da的组分仅占1.18%，且>5000 Da的组分几乎为零 (0.07%)，这说明产品中几乎不含不易吸收的大分子肽段和未酶解完全的胶原蛋白，极大地降低了过敏风险并保证了高吸收率。并且，数均相对分子质量467 Da和重均相对分子质量479 Da均远低于传统胶原蛋白（数万至数十万道尔顿），甚至低于很多普通的胶原蛋白肽（通常2000~5000 Da）。由此表明，相对分子质量越小，胶原三肽的吸收速度和效率远高于普通大分子胶原，具有较高的生物利用度。相对分子质量<1000 Da的组分占总量的89.26%，该区间以二肽、三肽及游离氨基酸等低分子组分为主，虽然可能包含少量稍大的低聚肽，但整体上证实了产物具有高度的酶解和水解特性。

LPS通过与细胞表面的Toll样受体4结合，激活下游的NF- κ B和MAPK这两条关键的炎症信号通路。它们的激活会启动IL-1 β 、IL-6、IL-8等炎症因子的转录。胶原三肽及其降解产物（二肽、游离氨基酸）可能通过抑制NF- κ B抑制蛋白的降解，或抑制MAPK通路中关键蛋白的磷酸化，来阻断这些信号通路的活化，从而在源头上减少炎症因子的转录。地塞米松作为糖皮质激素，通过直接与胞内受体结合，进而抑制炎症基因的转录，作用非常强力且广泛。胶原三肽作为一种天然来源的活性肽，其作用可能更侧重于信号通路的特定环节，提供了一种不同于激素的、更为温和的抗炎途径。它对IL-1 β 的卓越抑制效果提示它可能对该因子的转录调控有特别的作用。在LPS诱导的Raw264.7细胞炎症模型中，胶原三肽展现出强大且剂量依赖性的抗炎作用，能够显著下调关键炎症因子IL-1 β 、IL-6和IL-8的mRNA表达水平，该作用机理很可能与其抑制NF- κ B和/

或MAPK等核心炎症信号通路的激活有关。本研究制备的产物相对分子质量分布显示，除三肽区间 (189~500 Da, 25.96%)外，还含有相当比例的<189 Da (37.65%，主要为氨基酸)和500~1000 Da (23.54%，可能为四肽-七肽)组分。尽管组分多样，但考虑到核心目标活性成分甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸 (GPH) 三肽被成功制备并检测 (含量3.2%)；酶解工艺旨在最大化产生低相对分子质量肽段，尤其是三肽；并且“胶原三肽”在学术和产业界常被用作富含此类短肽的胶原蛋白水解产物的通用名称。因此，本研究继续使用“胶原三肽”来指代该产品，以强调其小分子特性和核心活性组分。在临床测试中，数据清晰地表明，0.5%的胶原三肽溶液具有显著的舒缓退红功效。它不仅能在早期 (10min) 迅速抑制红斑的加剧，更能在此后长达1h的时间内，持续、加速地促进红斑消退。并且，红斑值和 a^* 值的变化趋势高度一致，从不同维度 (皮下生理和表面色度) 共同证实了胶原三肽的效果，增强了实验结果的可靠性和说服力。在1h这个时间点，胶原三肽将皮肤的自然消退率提升了约一倍 (红斑值消退率从-14.96%提升至-27.32%)。这证明了其强大的辅助修复能力。研究表明，胶原三肽及其衍生物能够抑制关键炎症因子的表达和释放，例如白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6和肿瘤坏死因子- α 。通过抑制这些炎症信号，胶原三肽可以间接减少前列腺素等血管舒张介质的产生，从而从源头上减轻血管扩张和炎症性发红。由于炎症反应过程中会产生大量的活性氧，这些物质会加剧组织损伤和血管通透性，延长红斑持续时间。胶原三肽已被证实具有清除自由基和抗氧化的活性。它能够中和活性氧，减轻氧化应激对皮肤血管和组织的损伤，从而辅助红斑的消退。由此推测，胶原三肽作为一种新型舒缓、修复类原料应用到日用化学品中。

参考文献

- [1] 钟晓艳, 赵雅静, 李海蓝, 等. 鱼鳞鱼皮制备胶原蛋白肽研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(20):5.

- [2] SONTAKKE S. B., JUNG J. H., PIAO Z., et al. Orally Available Collagen Tripeptide: Enzymatic Stability, Intestinal Permeability, and Absorption of Gly-Pro-Hyp and Pro-Hyp[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(38):7127-33.
- [3] 刘冬艳, 尹利端, 秦松, 等. 鱼皮胶原多肽口服生物利用度研究[J]. *生物学杂志*, 2016, 33(5):4.
- [4] 李亚楠, 邹炯, 宋璐璐, 等. 胶原三肽生物活性及其应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(3):5.
- [5] XU N., PENG X. L., LI H. R., et al. Marine-Derived Collagen as Biomaterials for Human Health[J]. *Front Nutr*, 2021, 8702108.
- [6] JAFARI H., LISTA A., SIEKAPEN M. M., et al. Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering[J]. *Polymers (Basel)*, 2020, 12(10).
- [7] MANJUDEVI M., KAMARAJ M., ARAVIND J., et al. Application of the circular economy to fish scale waste[J]. *Sustainable Chemistry for the Environment*, 2024: 8100170.
- [8] HAKUTA AMIKO, YAMAGUCHI YUKIE, OKAWA TOMOKO, et al. Anti-inflammatory effect of collagen tripeptide in atopic dermatitis[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2017, 88(3):357-364.
- [9] LEE Y. I., LEE S. G., JUNG I., et al. Effect of a Topical Collagen Tripeptide on Antiaging and Inhibition of Glycation of the Skin: A Pilot Study[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23:3.
- [10] LU SHAN, ZHANG SILU, WANG YUN, et al. Anti-skin aging effects and bioavailability of collagen tripeptide and elastin peptide formulations in young and middle-aged women[J]. *Journal of Dermatologic Science and Cosmetic Technology*, 2024, 1(2):100019.
- [11] SONTAKKE SNEHA B., JUNG JIN-HEE, PIAO ZHE, et al. Orally Available Collagen Tripeptide: Enzymatic Stability, Intestinal Permeability, and Absorption of Gly-Pro-Hyp and Pro-Hyp[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(38):7127-7133.
- [12] 贾建萍, 周彦钢, 鲁健章, 等. 三文鱼胶原肽的制备及其抗氧化活性的研究[J]. *中国食品学报*, 2010 (4):6.
- [13] 全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会. YY/T 1805.3-2022, 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第3部分: 基于特征多肽测定的胶原蛋白含量检测——液相色谱-质谱法[S]. 北京: 国家药品监督管理局, 2022.
- [14] 国家卫生健康委员会与国家市场监督管理总局. GB 31645-2018, 食品安全国家标准 胶原蛋白肽[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生健康委员会国家市场监督管理总局, 2018.
- [15] FAN J., SCHIEMER T., VASKA A., et al. Cell via Cell Viability Assay Changes Cellular Metabolic Characteristics by Intervening with Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway[J]. *Chem Res Toxicol*, 2024, 37(2):208-211.
- [16] LIVAK KENNETH J. and SCHMITTGEN THOMAS D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.

Extraction and Efficacy Studies of Collagen Tripeptides Derived from Fish Skin

Lin Lin^{1,2}, Wang Zhen-zhen², Xu Si-wei¹, Chen Li¹, Wang Ruirui¹

(1. Shanghai Corday Biotechnology Co., LTD, Shanghai 201703;

2. Nanjing Baudry Biotechnology Co., LTD, Nanjing, Jiangsu 210031)

Abstract : This study aimed to prepare a highly active collagen tripeptide (CTP) derived from fish skin and systematically evaluate its physicochemical properties, in vitro anti-inflammatory activity, and clinical soothing efficacy. Fish skin was enzymatically hydrolyzed using a complex protease system (Proline-specific Endopeptidase : Alkaline Protease 37071 : Papain = 30:40:30). The resulting hydrolysate was processed via ultrafiltration, concentration, and spray drying to produce CTP powder. The characteristic tripeptide Gly-Pro-Hyp (GPH) content was determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), and the molecular weight distribution was analyzed by gel permeation chromatography (GPC). After determining the cytocompatible concentration range via the CCK-8 assay, the inhibitory effect of CTP on the mRNA expression of inflammatory factors *IL-1 β* , *IL-6*, and *IL-8* was investigated in an LPS-induced Raw264.7 cell inflammation model using quantitative PCR (qPCR). Finally, the erythema-reducing effect was objectively evaluated in a human skin erythema model induced by 0.3% methyl nicotinate. The prepared CTP contained 3.2% GPH and had a number-average molecular weight of 467 Da. Components with molecular weight <1000 Da accounted for 89.26% of the total content, primarily consisting of low-molecular-weight species such as dipeptides, tripeptides, and free amino acids. Cell experiments showed that within the safe concentration range of 0.125%~0.25%, CTP dose-dependently and significantly inhibited the gene expression of inflammatory factors, with a particularly pronounced effect on *IL-1 β* . Clinical tests confirmed that a 0.5% CTP solution acted rapidly within 10 minutes and doubled the natural regression rate of skin erythema within 1 hour. This study successfully prepared a high-purity, low-molecular-weight collagen tripeptide. It demonstrated significant anti-inflammatory effects in vitro and its notable clinical efficacy in soothing and reducing redness was validated, indicating its broad application potential as a high-quality active ingredient in functional cosmetics and personal care products.

Keywords : collagen tripeptide extraction; efficacy study; anti-inflammatory activity; methyl nicotinate model; soothing and repair