

DOI: 10.3969/j.issn.1004-4949.2026.06.030

基于成纤维细胞及3D表皮模型的胶原蛋白与依克多因修复光致皮肤损伤的体外评价

彭芳芳¹, 吴田田², 金柱¹, 吴黎明³, 赵磊¹, 陈帆¹

(1. 西安博和医疗科技有限公司, 陕西 西安 710199;

2. 西安博鸿生物技术有限公司, 陕西 西安 710199;

3. 陕西佰傲再生医学有限公司, 陕西 西安 710029)

[摘要]目的 探究胶原蛋白与依克多因联用对光致皮肤损伤的体外修复作用。方法 以UVA诱导成纤维细胞光损伤模型, 设空白对照组、阴性对照组、阳性对照组(槲皮素)及样品组, 采用免疫荧光法检测Collagen I、Collagen III水平; 构建3D表皮皮肤模型并予以UVB造模, 随机分为空白对照组、阴性对照组、阳性对照组(WY14643、地塞米松)及样品组, 通过H&E染色、免疫荧光及ELISA法检测晒伤细胞数、炎症因子(IL-1 α 、TNF- α)及炎症介质(PGE₂)水平。结果 与空白对照组相比, 阴性对照组Collagen I、Collagen III显著降低($P<0.01$); 相较于阴性对照组, 阳性对照组、样品组Collagen I、Collagen III显著升高($P<0.01$), 提升率分别为92.50%、100.00%。与空白对照组相比, 阴性对照组晒伤细胞数量及IL-1 α 、TNF- α 、PGE₂水平极显著升高($P<0.001$); 相较于阴性对照组, 阳性对照组晒伤细胞数量显著降低($P<0.01$), IL-1 α 、TNF- α 、PGE₂水平均极显著降低($P<0.001$); 样品组晒伤细胞数量及IL-1 α 、TNF- α 、PGE₂水平均极显著降低($P<0.001$), 其中样品组晒伤细胞抑制率为73.91%, IL-1 α 、TNF- α 、PGE₂抑制率分别为69.29%、55.36%、52.80%。结论 胶原蛋白与依克多因联用可有效促进胶原合成、减轻光损伤炎症反应, 对体外光损伤皮肤具有良好修复作用。

[关键词] 胶原蛋白; 依克多因; 体外皮肤模型; 光损伤修复

[中图分类号] R622

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-4949(2026)06-0118-04

In Vitro Evaluation of Collagen Combined with Ectoine in Repairing Photo-induced Skin Damage Based on Fibroblasts and 3D Epidermal Model

PENG Fangfang¹, WU Tiantian², JIN Zhu¹, WU Liming³, ZHAO Lei¹, CHEN Fan¹

(1. Xi'an Bohe Medical Technology Co., Ltd., Xi'an 710199, Shaanxi, China;

2. Xi'an Bohong Biotechnology Co., Ltd., Xi'an 710199, Shaanxi, China;

3. Shaanxi Bio-Regenerative Medicine Co., Ltd., Xi'an 710029, Shaanxi, China)

[Abstract]Objective To explore the in vitro repair effect of collagen combined with ectoine on photo-induced skin damage.

Methods A UVA-induced photo-damage model of fibroblasts was established, including blank control group, negative control group, positive control group (quercetin) and sample group. The levels of Collagen I and Collagen III were detected by immunofluorescence. A 3D epidermal skin model was constructed and induced by UVB, then randomly divided into blank control group, negative control group, positive control group (WY14643, dexamethasone) and sample group. Hematoxylin-Eosin (H&E) staining, immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the number of sunburned cells, levels of inflammatory factors (IL-1 α , TNF- α) and inflammatory mediator (PGE₂). **Results** Compared with the blank control group,

第一作者: 彭芳芳(1994.1-), 女, 陕西咸阳人, 硕士, 主要从事护肤品及医疗器械研发工作

通讯作者: 金柱(1991.3-), 男, 陕西汉中, 硕士, 中级工程师, 主要从事护肤品及医疗器械研发工作

the levels of Collagen I and Collagen III in the negative control group were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the negative control group, the levels of Collagen I and Collagen III in the positive control group and sample group were significantly increased ($P<0.01$), with the increase rates reaching 92.50% and 100.00%, respectively. Compared with the blank control group, the number of sunburned cells and the levels of IL-1 α , TNF- α and PGE₂ in the negative control group were extremely significantly increased ($P<0.001$). Compared with the negative control group, the number of sunburned cells in the positive control group was significantly decreased ($P<0.01$), and the levels of IL-1 α , TNF- α and PGE₂ were extremely significantly decreased ($P<0.001$). The number of sunburned cells and the levels of IL-1 α , TNF- α and PGE₂ in the sample group were extremely significantly decreased ($P<0.001$), with the inhibition rates of 73.91% for sunburned cells, 69.29% for IL-1 α , 55.36% for TNF- α and 52.80% for PGE₂ in the sample group. **Conclusion** The combination of collagen and ectoine can effectively promote collagen synthesis, reduce the inflammatory response of photo-damage, and has a good repair effect on in vitro photo-damaged skin.

[Key words] Collagen; Ectoine; In vitro skin model; Photo-damage repair

皮肤 (skin) 作为人体最大的器官, 是抵御外界刺激的第一道屏障, 皮肤的损伤老化受到内外因素的共同影响^[1]。除遗传等先天因素外, 皮肤损伤与环境因素密切相关, 其中紫外线为主要因素^[2], 紫外线照射影响着皮肤细胞成分及组织结构变化, 进而引起皮肤屏障受损等损伤表现^[3]。长期的紫外线照射会加速胶原蛋白的降解, 诱发皱纹、干燥等一系列皮肤问题^[4]。胶原蛋白作为最丰富的细胞外基质 (ECM) 结构蛋白, 对维持皮肤健康具有重要作用。研究表明^[5-7], 重组胶原蛋白能够促进皮肤成纤维细胞的增殖和迁移, 从而加速皮肤损伤的修复。依克多因是一种氨基酸衍生物, 易与水分子形成氢键, 形成的“保护层”能够降低外部刺激对皮肤细胞的刺激, 缓解不良症状。本研究通过成纤维细胞实验、体外皮肤模型实验, 探讨胶原蛋白与依克多因联合应用对光损伤皮肤的修复功效, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验设备 CO₂培养箱 (Thermo, 150I)、超净工作台 (苏净安泰, SW-CJ-2F)、酶标仪 (BioTek, Epoch)、UVA辐照仪 (飞利浦)、倒置显微镜 (Olympus, CKX53)、荧光显微镜 (Olympus, BX43)、正置显微镜 (Olympus, BX53)。
1.2 实验试剂与样品 3D表皮皮肤模型 (EpiKutis[®])、

成纤维细胞 (批号: Fb230131), 广东博溪生物科技有限公司。DMEM培养液 (Gibco)、PBS (索莱宝)、新生牛血清 (NBS, 兰州荣晖)、槲皮素 (阿拉丁)、多聚甲醛 (Biosharp)、Collagen I 抗体 (CST)、Collagen III 抗体 (武汉三鹰)、EpiGrowth 培养液 (广东博溪陕西分公司)、WY14643 (Sigma)、地塞米松 (中检所)、二甲苯 (国药)、苏木精 (碧云天)、伊红 (碧云天) TNF- α 抗体 (Abcam)、IL-1 α ELISA试剂盒 (Abcam)、PGE₂ ELISA试剂盒 (ENZO)。样品: 医用重组胶原蛋白修复液 (西安博和医疗科技有限公司, 陕械注准20242140220)。

1.3 方法

1.3.1 成纤维细胞胶原含量测试 细胞复苏后, 铺板率约60%时, 将细胞接种至24孔板, 置CO₂培养箱 (37 °C、5% CO₂) 中孵育过夜。据测试分组 (表1) 进行给药, 空白及阴性对照组每孔加入1 ml培养液; 阳性对照组每孔加入1 ml含槲皮素的培养液; 样品组每孔加入1 ml样品。给药后放入CO₂培养箱培养24 h。根据分组进行UVA辐照, 结束后置CO₂培养箱培养24 h。通过免疫荧光法检测 (4%多聚甲醛固定细胞30min, 荧光显微镜观察并拍照), 收集图片后用Image-Pro[®]Plus软件进行分析。计算胶原含量提升率, 提升率=(样品组-阴性对照组)/阴性对照组 \times 100%。

表1 测试分组

组别	样品名称	给药浓度	刺激条件	检测模型	检测指标	检测方法
空白对照组	/	/	/			
阴性对照组	/	/	UVA	成纤维细胞	Collagen I	免疫荧光
阳性对照组	槲皮素	300 nmol/L	(30 J/cm ²)		Collagen III	
样品组	重组胶原蛋白修复液	原液				



1.3.2 3D表皮皮肤模型测试 根据表2测试分组, 将EpiKutis 3D表皮皮肤模型转移到6孔板中(提前添加0.9 ml EpiGrowth培养液), 随机分为空白、阴性、阳性对照组和样品组, 每组重复3次。按照表2测试分组进行UVB辐照, 结束后空白组和阴性对照组更换培养液, 阳性对照1组更换含WY14643的培养液, 阳性对照2组更换含地塞米松的培养液, 样品组更换培养液, 样品采用表面给药的方式进行, 置于CO₂培养箱(37 ℃、5% CO₂)中孵

育24 h。组织形态测试: 取检测模型, 4%多聚甲醛固定24 h后, HE染色, 显微镜拍照观察, 采集图片并分析晒伤细胞数量。ELISA测试: 孵育结束后, 收集3D表皮皮肤模型培养液至离心管, 待测样品冷冻保存于-80 ℃冰箱, 按照ELISA试剂盒说明书检测IL-1 α、TNF- α、PGE₂水平。计算提升率、抑制率, 提升率=(样品组-阴性对照组)/阴性对照组 × 100%; 抑制率=(阴性对照组-样品组)/阴性对照组 × 100%。

表2 测试分组

实验分组	样品名称	给药浓度	刺激条件	检测模型	检测指标	检测方法
空白对照组	/	/	/			
阴性对照组	/	/			①组织形态	① H&E
阳性对照1组	WY14643 50 μ M	50 μ M	UVB (600 mJ/cm ²)	EpiKutis®	② TNF- α	②免疫荧光
阳性对照2组	地塞米松	0.01% (m/v)			③ IL-1 α、PGE ₂	③ ELISA
样品	重组胶原蛋白修复液	原样				

注: 阳性对照1组为组织形态检测的阳性对照, 阳性对照2组为TNF- α、IL-1 α、PGE₂检测的阳性对照。

1.4 统计学方法 采用SPSS 28.0统计学软件进行数据分析, 计数资料以[n (%)]表示, 行χ²检验; 计量资料以(x̄ ± s)表示, 行t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, P < 0.001表示统计学意义极显著。

(P < 0.001), 说明测试刺激条件有效; 与阴性对照组相比, 阳性对照组IL-1 α水平显著降低(P < 0.01), TNF- α水平极显著下降(P < 0.001), 样品组IL-1 α、TNF- α水平极显著降低(P < 0.001), 抑制率分别为69.29%、55.36%, 见表4。

2 结果

2.1 成纤维细胞胶原含量测试结果 与空白对照组相比, 阴性对照组Collagen I、Collagen III显著降低(P < 0.01), 说明测试刺激条件有效; 相较于阴性对照组, 阳性对照组及样品组Collagen I显著升高(P < 0.01), 提升率分别为97.50%、92.50%, 见表3。

表3 Collagen I、Collagen III相对IOD值(x̄ ± s)

组别	Collagen I	Collagen III
空白对照组	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.10
阴性对照组	0.40 ± 0.01 ^{##}	0.36 ± 0.05 ^{##}
阳性对照组	0.79 ± 0.14 ^{**}	0.74 ± 0.04 ^{**}
样品组	0.77 ± 0.07 ^{**}	0.72 ± 0.07 ^{**}

注: 与空白对照组比较, ^{##}P < 0.01; 与阴性对照组比较, ^{**}P < 0.01。

2.2 3D表皮皮肤模型测试结果

2.2.1组织形态测试结果 空白对照组、阴性对照组、阳性对照组、样品组晒伤细胞数量分别为0、(23 ± 3)(6 ± 2)(6 ± 1)个。与空白对照组相比, 阴性对照组晒伤细胞数量极显著升高(P < 0.001), 说明测试刺激条件有效; 与阴性对照相比, 阳性对照组晒伤细胞数量显著降低(P < 0.01), 样品组晒伤细胞数量极显著降低(P < 0.001), 抑制率为73.91%。

表4 TNF- α、IL-1 α 相对 IOD 值(x̄ ± s)

组别	TNF- α	IL-1 α
空白对照组	1.00 ± 0.13	4.57 ± 0.35
阴性对照组	2.89 ± 0.16 ^{###}	28.95 ± 2.91 ^{###}
阳性对照组	1.06 ± 0.06 ^{***}	13.31 ± 0.67 ^{**}
样品组	1.29 ± 0.07 ^{***}	8.89 ± 0.26 ^{***}

注: 与空白对照组比较, ^{###}P < 0.001; 与阴性对照组比较, ^{**}P < 0.01; 与阴性对照组比较, ^{***}P < 0.001。

2.2.2炎症因子测试结果 与空白对照组相比, 阴性对照组的IL-1 α、TNF- α水平极显著升高

2.2.3 炎性介质测试结果 空白对照组、阴性对照组、阳性对照组、样品组PGE₂相对IOD值分别为(228.34 ± 17.71)(474.65 ± 6.29)(268.86 ± 6.82)(224.05 ± 4.29)。与空白对照组相比,阴性对照组的PGE₂水平极显著升高($P < 0.001$),说明测试刺激条件有效;与阴性对照组相比,阳性对照组的PGE₂水平极显著降低($P < 0.001$),样品组PGE₂水平极显著降低($P < 0.001$),抑制率为52.80%。

3 讨论

紫外线照射皮肤可诱发成纤维细胞衰老、炎症反应、胶原纤维降解等一系列损伤^[8-10]。胶原蛋白作为细胞外基质的核心组成成分,在创面修复中具有关键作用^[11]。近年来,重组胶原蛋白因其良好的生物相容性,在皮肤修复类产品中广泛应用^[12]。但单一胶原蛋白对皮肤损伤的修复效果存在局限性,联合保湿抗炎成分依克多因,能够协同促进光损伤皮肤的创面修复。

本研究结果显示,经UVA辐照后Collagen I、Collagen III显著升高。Collagen I作为皮肤真皮的主要结构蛋白,占胶原总量的80%~90%,为皮肤提供机械强度;Collagen III与Collagen I协同作用,维持皮肤弹性和修复能力^[13]。两者比例的提升表明联合应用能够有效促进细胞外基质重建,加速创面愈合。同时,依克多因的环状结构络合水分子形成氢键,保护了酶、DNA等生物大分子^[14],其独特的“水合壳”机制能够在细胞周围形成稳定的保护膜,减少UVA诱导的活性氧产生,抑制脂质过氧化反应,从而阻断氧化应激信号通路的激活^[15]。3D表皮皮肤模型测试结果显示,日晒伤细胞个数显著降低,抑制率为73.91%,表明联合应用对UVB诱导的角质形成细胞凋亡具有显著保护作用,这与依克多因减少日晒伤细胞形成的能力一致。IL-1 α 、TNF- α 、PGE₂的分泌均得到有效抑制,抑制率分别为69.29%、55.36%、52.80%,说明该组合不仅能够减轻急性炎症反应,还可能通过下调促炎因子表达,阻断炎症级联反应,防止慢性炎症导致的皮肤光老化。

综上所述,胶原蛋白与依克多因联合应用对光损伤皮肤具有显著修复作用,可提高UVA辐照后I型、III型胶原蛋白水平,促进成纤维细胞修复;且抗炎抑制作用突出,二者可协同发挥细胞

保护与基质修复作用,有效减轻皮肤炎症反应。

[参考文献]

- [1]李利.抗皮肤老化类护肤品在面部年轻化中的应用专家共识(2023)[J].中国皮肤性病杂志,2023,37(12):1335-1340.
- [2]巴哈尔古力·加帕尔,王春艳,阿丽米热·伊力哈木,等.化学换肤联合OPT强脉冲光治疗面部皮肤光老化的临床疗效[J].中国美容整形外科杂志,2025,36(6):321-323,328.
- [3]郑博文,高碧钰,范培艳,等.雪莲花抗皮肤光老化的应用研究进展[J].皮肤病与性病,2024,46(4):242-244.
- [4]许诗蒙.多功能耗牛胶原蛋白水光针的开发及其在皮肤光老化中的应用[D].兰州:兰州大学,2025.
- [5]Liu T,Hao J,Lei H,et al.Recombinant collagen for the repair of skin wounds and photo-aging damage[J].Regen Biomater,2024,11:rbac108.
- [6]黄杰鸿,李利红,李雪梅,等.强脉冲光联合酵母重组胶原蛋白凝胶治疗面部糖皮质激素依赖性皮炎疗效观察[J].中国美容医学,2024,33(1):99-102.
- [7]李滨,赵健烽,冯丽萍,等.重组胶原蛋白在表皮修复中的作用机理研究[J].生物学通报,2022,57(2):54-59.
- [8]Ansary TM,Hossain MR,Kamiya K,et al.Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging[J].Int J Mol Sci,2021,22(8):3974.
- [9]Salminen A,Kaarniranta K,Kauppinen A.Photoaging:UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin[J].Inflamm Res,2022,71(7-8):817-831.
- [10]Gromkowska-Kępa KJ,Puścion-Jakubik A,Markiewicz-Żukowska R,et al.The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging-review of in vitro studies[J].J Cosmet Dermatol,2021,20(11):3427-3431.
- [11]吴晓勇,赵丽琴.医用重组胶原蛋白联合CO₂点阵激光治疗皮肤瘢痕的临床疗效[J].山东医药,2024,64(28):97-100.
- [12]许妍,荀珊,高艺菲,等.重组胶原蛋白对非剥脱激光术后屏障修复的临床研究[J].中国医疗美容,2025,15(1):2-6.
- [13]Biskanaki F,Kefala V,Lazaris C A,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.
- [14]王志华,任姝静,黄思玲,等.依克多因的护肤功效研究进展[J].香料香精化妆品,2024(2):51-54,88.
- [15]Załęska I,Goik U,Goik T,et al.The Influence of Ectoine on the Skin Parameters Damaged by a CO₂ Laser[J].Molecules,2025,30(11):2470.