医药与日化原料

山茶籽多肽制备及其抗老修护功效

孙泽东，李广涛*，王伊朋，高宏旗
（上海林清轩生物科技股份有限公司，上海 201612）

摘要：以超临界 CO_2 萃取脱油后山茶籽为原料，通过碱提酸沉工艺对山茶籽蛋白进行了提取，再使用蛋白酶进行酶解制备了山茶籽多肽液。采用单因素实验优化了山茶籽蛋白提取和酶解工艺，通过液相色谱-质谱联用仪对山茶籽多肽液中多肽及氨基酸组成进行了分析。采用体外测试探究了山茶籽多肽液在化妆品中抗老（抗氧化、抗糖化、抗皱）和修护（划痕）的能力。结果表明，在料液比（g∶mL）1∶30、碱提 pH=9.5、提取温度 60 ℃、提取时间 2 h、酸沉 pH=3.5 的条件下，山茶籽蛋白提取率为 5.05%；在木瓜蛋白酶为酶解酶、加酶量为 3000 U/g、酶解时间 2 h、底物质量分数 2%的条件下，山茶籽蛋白酶解物水解率为 31.56%。山茶籽多肽液中总肽含量为 0.47908%，主要为多肽长度 4~8 肽的短肽，总数均相对分子质量（简称分子量）为 850.56 Da，分子量<2000 Da 的多肽占比为 99.56%。山茶籽多肽液含有除异亮氨酸（Ile）外的其余 7 种成年人必需氨基酸，占总氨基酸含量的 40.55%。质量分数 8%的山茶籽多肽液对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除率为 71.76%±0.34%；质量分数 1%的山茶籽多肽液对晚期糖化终产物的抑制率为 32.63%±0.78%；质量分数 0.25%的山茶籽多肽液对人正常皮肤成纤维细胞中 MMP-1 的相对表达率为 56.96%±0.82%，Ⅲ型胶原蛋白相对表达率为 120.45%±0.24%，Ⅳ型胶原蛋白相对表达率为 113.24%±0.17%，Ⅴ型胶原蛋白相对表达率为 138.33%±2.72%；质量分数 0.05%的山茶籽多肽液内，斑马鱼 collala 基因相对表达率为 122.64%±2.07%；质量分数 0.4%的山茶籽多肽液内人永生化角质形成细胞细胞迁移率为 40.95%±0.36%。

关键词：山茶籽；多肽；酶解；抗老；修护；医药原料
中图分类号：R284.2；TQ658 **文献标识码：**A **文章编号：**1003-5214 (2025) 10-2232-11

Preparation of *Camellia* seed polypeptide and its anti-aging and repairing effect

SUN Zedong, LI Guangtao*, WANG Yipeng, GAO Hongqi
（*Shanghai Forest Cabin Biological-Tech Co., Ltd., Shanghai* 201612, *China*）

Abstract: *Camellia* seed protein was extracted by alkali extraction and acid precipitation process from deoiled *Camellia* seed which was obtained by supercritical CO_2 extraction, and then enzymatically hydrolyzed with protease to obtain *Camellia* seed polypeptide solution. The extraction and enzymatic hydrolysis process of *Camellia* seed protein was optimized by single factor experiments, while the composition of polypeptide and amino acid in *Camellia* seed polypeptide solution was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry. The anti-aging (anti-oxidation, anti-glycation, anti-wrinkle) and repairing (scratch) effect of *Camellia* seed polypeptide solution in cosmetics was further evaluated by *in vitro* test. The results showed that under optimum extraction conditions of solid-liquid ratio (g : mL) 1∶30, alkali extraction pH=9.5, extraction temperature 60 ℃, extraction time 2 h, acid precipitation pH=3.5, the extraction rate of *Camellia* seed protein was 5.05%. Under optimal conditions of papain used as enzyme, enzyme content 3000 U/g, enzymatic hydrolysis time 2 h, and substrate mass fraction 2%, the hydrolysis rate of *Camellia* seed protein hydrolysate was 31.56%. The total peptide content in *Camellia* seed polypeptide solution was 0.47908%, mainly composed of short peptides with a peptide length of 4~8

收稿日期：2024-10-31; **定用日期：**2025-01-09; **DOI:** 10.13550/j.jxhg.20240830
作者简介：孙泽东（1997—），男，硕士生，E-mail：sunzedong97@163.com。**联系人：**李广涛（1987—），男，硕士，工程师，E-mail：1946270040@qq.com。

peptides. The number-average relative molecular mass (molecular mass) was 850.56 Da, and the proportion of polypeptide with molecular mass less than 2000 Da was 99.56%. The polypeptide solution of *Camellia* seeds contained 7 essential amino acids for adults except isoleucine (Ile), accounting for 40.55% of the total amino acid content. The scavenging rate of *Camellia* seed polypeptide solution with mass fraction 8% for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical was 71.76%±0.34%. The inhibition rate of *Camellia* seed polypeptide solution with mass fraction 1% on advanced glycation end products was 32.63%±0.78%. The relative expression rate of MMP-1 in human skin fibroblasts was 56.96% ± 0.82%, that of type Ⅲ collagen was 120.45%±0.24%, that of type Ⅳ collagen was 113.24%±0.17%, and that of type Ⅴ collagen was 138.33%±2.72% when the mass fraction of *Camellia* seed polypeptide solution was 0.25%. The relative expression rate of zebrafish collala gene was 122.64%±2.07% in mass fraction 0.05% *Camellia* seed polypeptide solution. The migration rate of human immortalized keratinocyte cells in mass fraction 0.4% *Camellia* seed peptide solution was 40.95%±0.36%.

Key words: *Camellia* seed; polypeptide; enzymolysis; anti-aging; repair; drug materials

红山茶，又称山茶，山茶科（*Theaceae*）山茶属（*Camellia* L.）植物[1-3]。山茶的花、叶、籽中含有丰富的化学成分和次生代谢产物，具有抗皱、修护、抗氧化以及美白等功效，被广泛应用于化妆品中[4]。目前，山茶籽主要用于榨取茶油，脱油后的山茶籽用于养殖以及廉价出口，还处于初级加工阶段，深加工产业较为薄弱，资源浪费较为严重[5-6]。

山茶籽中含有茶皂素、多糖、蛋白质、黄酮类、多酚类等天然化合物。其中，茶皂素具有抗炎、抗氧化活性[7-8]；茶籽多糖具有抗氧化活性[9-10]；茶籽蛋白具有抗氧化、提高免疫、抗炎、改善痤疮症状[11-13]等作用。植物蛋白质在生物酶解条件下，水解生成多肽及氨基酸等物质，具有很高的营养价值与功能特性，酶解后产生的多肽更容易被人体吸收[14-15]。胶原蛋白是细胞外基质中主要的结构蛋白，在皮肤中如弹簧般支撑着皮肤，但随着年龄的增长，肌肤胶原蛋白减少，而外界环境刺激（紫外光照等）会促进胶原蛋白分解，皮肤便不再柔软，失去弹性和光泽，出现色斑和皱纹，导致固有的屏障功能受损[16-18]。补充胶原蛋白，刺激胶原蛋白再生是保持皮肤弹性、淡化细纹的关键。生物活性多肽具有抗皱、修护、抗氧化等活性,近年来被作为原料广泛添加到化妆品中。

本文拟以超临界 CO_2 萃取脱油后山茶籽为原料，通过碱提酸沉工艺对山茶籽蛋白进行提取，然后使用蛋白酶进行酶解制备山茶籽多肽液，并从抗氧化、抗糖化、修护和抗皱方面研究其修护、抗老功效，以期为山茶籽在化妆品中的应用提供参考。

1　实验部分

1.1　材料、试剂与仪器

山茶籽（粉碎后使用），上海林清轩生物科技有限公司；人正常皮肤成纤维细胞（HSF）、人永生化角质形成细胞（HaCaT），武汉大学细胞保藏中心；野生型 AB 系斑马鱼,广州鲁比生物科技有限公司;cDNA 合成试剂盒，东洋纺（上海）生物科技有限公司。

木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶，南宁东恒华道生物科技有限责任公司；1,3-丁二醇、1,2-戊二醇，山东海科新源材料科技股份有限公司；乙二胺四乙酸二钠（EDTA-2Na），阿克苏诺贝尔化学品有限公司；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）、氨基胍、胰蛋白酶、胎牛血清二硫苏糖醇（DTT）、碘乙酰胺（IAM）、乙腈（ACN）、吐温 20（Tween 20）、二甲基亚砜（DMSO）、噻唑蓝溴化四唑（MTT）、多聚甲醛（质量分数 4%）、曲拉通 X-100（Triton X-100）、4',6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）、Ⅲ型胶原蛋白一抗、Ⅳ型胶原蛋白一抗、Ⅴ型胶原蛋白一抗，德国 Sigma-Aldrich 公司；青霉素-链霉素溶液（100×），上海碧云天生物技术股份有限公司；胎牛血清（FBS），浙江天杭生物科技股份有限公司；基质金属蛋白酶-1 一抗、荧光标记二抗、DEPC 水〔用焦碳酸二乙酯处理过并经高温高压灭菌的超纯水（一级水）〕，安徽白鲨生物科技有限公司；总 RNA 抽提试剂（Trizol）、磷酸盐缓冲液（PBS 10×, pH 7.4），美国 ThermoFisher 公司；三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇，上海泰坦科技股份有限公司；SYBR Green 荧光染料，北京康润诚业生物科技有限公司；DMEM 培养基，美国 Cytiva 公司；三氟乙酸（TFA，质量分数 0.1%），迪信泰检测科技(北京)有限公司；表皮细胞生长因子（EGF），美国 MedChemExpress 生物科技公司；去离子水，自制。

FE28 Standard 型 pH 计，瑞士 Mettler-Toledo 公司；EnSpire 型多功能酶标仪，珀金埃尔默企业管理（上海）有限公司；MCO-18AC 型 CO_2 细胞培养箱，日本 SANYO 公司；DMi8 型倒置生物显微镜，德国 Leica-microsystems 公司；Z-A-D5 型五层单排独立养殖单元，上海海圣生物实验设备有限公司；SZ680

型连续变倍体式显微镜，重庆奥特光学仪器有限公司；ZXSD-A1090 型生化培养箱，上海智城分析仪器制造有限公司；Easy nLC 1200 型液相色谱-Orbitrap Exploris 480 型质谱联用仪（LC-MS），美国 Thermo Fisher Scientific 公司；CFX96 TOUCH T100 型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）分析仪，美国 Bio-Rad 公司；HT300R 型高速台式冷冻离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 山茶籽脱油

取粉碎后山茶籽 100 g，通过超临界 CO_2 萃取脱油。超临界 CO_2 萃取条件为：萃取 2.0 h，萃取压力 25 MPa，萃取温度 50 ℃，无水乙醇 20 g。将脱油后山茶籽于 50 ℃下烘干至恒重，记为脱油山茶籽，备用。

1.2.2 山茶籽蛋白提取

采用碱提酸沉法提取山茶籽蛋白，通过单因素实验优化山茶籽蛋白提取工艺。称取 5 g 脱油山茶籽，按照料液比（g∶mL）1∶20 加入去离子水，使用浓度 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节溶液 pH=9.0，在提取温度 60 ℃下提取 2 h，提取结束后，过滤，得到上清液，然后使用浓度 1 mol/L 的盐酸调节上清液 pH=3.5，离心取沉淀物，经去离子水洗涤至中性，干燥后得到 0.245 g 浅棕色山茶籽蛋白粉末。并根据式（1）计算山茶籽蛋白提取率（%）。

$$提取率/\% = m_1/m_0 \times 100 \quad (1)$$

式中：m_0、m_1 分别为脱油山茶籽、山茶籽蛋白粉末，g。

1.2.3 山茶籽多肽液制备

以山茶籽蛋白粉为底物，用去离子水配制底物质量分数为 2%的水溶液，分别采用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶在一定温度下对山茶籽蛋白进行酶解反应一定时间，加酶量 3000 U/g（表 1）。酶解结束后，于 90 ℃灭酶活 15 min，冷却至室温后调 pH=7，过滤，取上清液即得山茶籽酶解液。称取山茶籽酶解液 100.00 g，加入去离子水 24.47 g、1,3-丁二醇 22.50 g、1,2-戊二醇 3.00 g、EDTA-2Na 0.03 g，配成山茶籽多肽液，稀释至蛋白质量分数为 0.45%~0.55%，其中 1,3-丁二醇、1,2-戊二醇、EDTA-2Na 的质量分数（以山茶籽多肽液质量计）分别为 15%、2%、0.02%。并根据式（2）计算山茶籽蛋白酶解产物水解度（%）。酶解液的总氨基氮含量采用凯氏定氮法测定，游离氨基酸含量采用茚三酮法测定。茚三酮法通过检测溶液内游离氨基酸、具有游离 α-氨基和 α-羧基的肽段和茚三酮在高温下反应产生的蓝紫色物质的含量，测定结果反映的是溶液内整体的游离氨基酸含量，所以数值整体偏高[19]。蛋白经蛋白酶水解产生大量短肽及游离氨基酸，在此基础上对水解度测试方式进行调整，通过茚三酮法测定酶解前后上清液中游离氨基酸的含量，得到酶解过程中产生的游离氨基酸的含量（即酶解前后上清液中游离氨基酸含量的差值）。

$$水解度/\% = m_3/m_2 \times 100 \quad (2)$$

式中：m_2、m_3 分别为总氨基氮含量、酶解过程中产生的游离氨基酸含量，mg。

表 1 不同蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 Optimum enzymatic hydrolysis conditions of different proteases

蛋白酶种类	酶解条件		
	温度/℃	pH	时间/h
木瓜蛋白酶	55	7	4
中性蛋白酶	50	7	4
碱性蛋白酶	55	9	4

1.3 表征与测试

粗蛋白含量测定：参照 GB/T 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》进行。游离氨基酸含量测定：参照 GB/T 8314—2013 的茚三酮法进行。黄酮含量测定：参照 DB43/T 476—2009《植物源性食品中总黄酮的测定》进行。多酚含量测定：参照 GB/T 8313—2008《茶叶中茶多酚的检测》进行。总糖含量测定：参照 SNT 4260—2015《出口植物源食品中粗多糖的测定》进行。总肽含量测定：参照 Q 31/0116000385C018—2020《总肽含量测定》进行。

1.4 单因素实验

1.4.1 山茶籽蛋白提取条件考察

按照 1.2.2 节山茶籽蛋白的提取条件，分别固定其他条件，考察料液比（g∶mL，1∶10、1∶20、1∶30、1∶40、1∶50）、碱提 pH（7.0、8.0、9.5、10.0、11.0）、提取温度（40、50、60、70 ℃）、提取时间（0.5、1、2、3 h）和酸沉 pH（3.1、3.3、3.5、3.7、3.9）对山茶籽蛋白提取率的影响。

1.4.2 山茶籽蛋白酶解条件考察

按照 1.2.3 节山茶籽蛋白的酶解条件，固定最适酶解温度和 pH，考察木瓜蛋白酶加酶量（500、1500、3000、4000、5000 U/g）、酶解时间（0.5、1、2、3、4 h）和山茶籽蛋白质量分数（0.5%、1%、2%、3%、4%）对山茶籽蛋白酶解产物水解度的影响。

1.5 多肽测序实验

（1）样品溶解：用移液器准确移取 2000 μL 山茶籽多肽液至 10 kD 超滤管中，于 4 ℃离心（12000 r/min）10 min，取相对分子质量<10 kDa 的部分，冻干（–80~–85 ℃下冻干至无明显水分），再经 100 μL 去离子水复溶。

（2）还原烷基化：用移液枪准确移取 1 μL 的

DTT（1 mol/L）溶液加入上述复溶的样品中，使 DTT 终浓度为 10 mmol/L，于 56 ℃水浴中还原 1 h。再用移液枪准确移取 2 μL 的 IAM（1 mol/L）溶液加入样品中，使 IAM 终浓度为 20 mmol/L，暗处室温反应 40 min。然后用移液枪准确移取 1 μL 的 DTT（1 mol/L）溶液加入样品中，使 DTT 终浓度为 10 mmol/L，以中和未反应的 IAM。

（3）脱盐：取还原烷基化的样品溶液通过 C18 Stage-tip（是一种填充 Empore 膜片的微量移液管）脱盐，洗脱溶剂为质量分数 2%的乙腈溶液，将样品洗脱液于 45 ℃真空干燥至恒重，取恒重样品用质量分数 0.1%的三氟乙酸溶液定容至 200 ng/mL，进行液相分析。

（4）液相色谱条件：色谱柱 Reprosil-Pur 120 C18-AQ（75 μm×250 mm×1.9 μm），流动相 A 为质量分数0.1%的三氟乙酸溶液,流动相B为质量分数0.1%的三氟乙酸和 80%的乙腈混合溶液,流速 600 nL/min，分析时间为 35 min，具体色谱条件见表 2。

表 2　液相色谱条件

Table 2　Liquid chromatography conditions

时间/min	体积分数/%	
	A 相	B 相
0	96	4
2	96	4
20	68	32
23	45	55
25	5	95
30	100	0
35	96	4

（5）MS 条件：全扫描范围为 100~1500 *m*/*Z*，一级质谱分辨率设为 60000，AGC 为 Custom（AGC 为 Custom 自定义的自动增益控制设置），Maximum IT（离子注入时间，将离子从离子源注入到质量分析器中所需的时间）为 50 ms。二级质谱分辨率设为 15000，AGC 为 Custom，Maximum IT 为 22 ms，肽段碎裂碰撞能量设为 32,生成质谱检测原始数据，最后经 PEAKS Denovo 方法进行多肽序列解析。

1.6　抗氧化性能测试

在透明 96 孔板中加入 150 μL 以去离子水配制的不同质量分数（1%、2%、4%、8%）的山茶籽多肽液，再加入 50 μL 浓度为 0.4 mmol/L 的 DPPH 溶液，每组均设 3 个复孔。充分混匀后，室温暗处反应 30 min 后，使用多功能酶标仪检测其在 520 nm 下的吸光度（OD 值）。以去离子水为空白，以 V_C 为阳性对照，根据式（3）计算 DPPH 自由基清除率（%）。

$$自由基清除率/\%=[1-(OD_1-OD_2)]/[1-(OD_3-OD_2)]\times 100 \quad (3)$$

式中：OD_1、OD_2、OD_3 分别为样品组、空白组、对照组的 OD 值。

1.7　抗糖化性能测试

参考文献[3]抗糖化性能测试方法检测晚期糖基化终产物（AGEs）含量。设置阳性对照组为质量分数 0.01%氨基胍，以去离子水配制的不同质量分数（1%、10%）的山茶籽多肽液为样品组，每组均设 3 个复孔。

1.8　基于 HSF 细胞的抗皱功效测试

1.8.1　MTT 细胞活力测定

将对数生长期的 HSF 细胞接种于 96 孔板中（5×10^3 个/孔），于 MCO-18AC 型 CO_2 细胞培养箱中孵育过夜（37 ℃、CO_2 体积分数 5%）使细胞贴壁生长。设置分组：样品组（配制质量分数分别为 0.0625%、0.125%、0.25%、0.5%、1%的山茶籽多肽液，以培养基质量计）；空白组（不含细胞和样品的培养基）；阴性对照组（含细胞，不含样品的培养基）。给药培养 72 h。培养完毕后，每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液（质量浓度 5 g/L），孵育 4 h，弃上清，加入 150 μL 的 DMSO，使用多功能酶标仪检测溶液在 570 nm 处的 OD 值。根据式（4）计算细胞存活率（%）。

$$细胞存活率/\%=(OD_1-OD_2)/(OD_3-OD_2)\times 100 \quad (4)$$

式中：OD_1、OD_2、OD_3 分别为样品组、空白组、阴性对照组的 OD 值。

1.8.2　基质金属蛋白酶-1（MMP-1）和胶原蛋白表达率测定

将处于对数生长期的 HSF 细胞加入 DMEM 培养基（质量分数 10%的胎牛血清）配成细胞悬液。在配有盖玻片的培养皿中每孔加入 2 mL 细胞悬液，置于细胞培养箱（37 ℃、CO_2 体积分数 5%）中培养。设置 4 个分组：样品组（经 UVA 照射后质量分数 0.0625%、0.125%和 0.25%的山茶籽多肽液处理的 HSF 细胞）、空白组（正常培养的 HSF 细胞）、阴性组（经 UVA 照射的 HSF 细胞）和阳性组（经 UVA 照射后用质量浓度 50 μg/mL V_C 和质量浓度 3.5 μg/mL V_E 处理的 HSF 细胞）。UVA 光照射 60 s，弃去培养基，阳性组和样品组每孔分别加入 2 mL 含对应含量样品的 DMEM 培养基（质量分数 10%的 FBS），在细胞培养箱（37 ℃、CO_2 体积分数 5%）内培养 24 h。每孔用 1 mL 质量分数 4%的多聚甲醛室温固定 20 min，配制质量分数 0.5%的 TritonX-100，室温透膜 15 min。PBS 清洗后，室温封闭 1 h，弃去封闭液，于 4 ℃孵育一抗过夜，于 37 ℃避光孵育荧光二抗 1 h，PBS 清洗后，DAPI 室温避光孵育 5 min。取出玻片，用封片液封闭固定过夜，在倒置生物显微镜下拍摄图片，用 Image J 软件进行图像分析，计算

细胞数，并分析 MMP-1 以及Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型胶原蛋白表达率。

1.8.3 基于斑马鱼Ⅰ型胶原蛋白表达率测试

收集 3 dpf 的野生型 AB 系斑马鱼幼鱼，将幼鱼置于 6 孔板中，每孔 20 尾幼鱼，设置分组为：空白组（去离子水）、阳性组（质量浓度 0.5 g/L 石斛多糖）、样品组（去离子水配制质量分数 0.0125%、0.025%和 0.05%山茶籽多肽液）。每孔加入上述分组的溶液 5 mL，每孔设 3 个复孔。于生化培养箱培养 24 h 后，分别收集所有幼鱼并用双蒸水分别清洗幼鱼 2 次。随后，提取斑马鱼 RNA（将幼鱼置于装有 DEPC 水 2 mL 离心管中漂洗后转移至干净的 EP 管中；加入 200 μL Trizol 研磨至组织裂解，补加 Trizol 至 1 mL，室温放置 5 min；每管加入 200 μL 三氯甲烷，剧烈振荡 15 s，室温放置 3 min；于 4 ℃、4000 r/min 离心 15 min，取上层水相至新的 EP 管中；加入 500 μL 异丙醇，室温放置 10 min，于 4 ℃、4000 r/min 离心 10 min；去除上清液，加入 1 mL 质量分数 75%乙醇洗涤，离心后去上清液，室温干燥沉淀至恒重，加入 30 μL DEPC 水使 RNA 溶解），使用 cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA，在实时荧光定量 PCR 分析仪上检测 collala 基因在 mRNA 水平的变化，评价山茶籽多肽液对Ⅰ型胶原蛋白表达的影响。所有实验步骤均遵循实验动物护理和使用指南（2010/63/EU，由欧洲议会和理事会批准）。

1.9 基于 HaCaT 细胞的修护功效测试

1.9.1 HaCaT 细胞的 MTT 细胞活力测定

将 HaCaT 细胞接种在 96 孔板中（5×10^3 个/孔），在 DMEM 培养基（质量分数 10%的 FBS）中培养。设置分组：样品组（以培养基配制不同质量分数的山茶籽多肽液，质量分数分别为 0.05%、0.10%、0.20%、0.40%、0.80%）、空白组（不含细胞和样品的培养基）、阴性对照组（含细胞，不含样品的培养基）。每组均设 3 个复孔。待细胞铺板率达到 40%~60%时给药，于培养箱（37 ℃、CO_2 体积分数 5%）中培养 24 h 后，每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液（质量浓度 5 g/L），孵育 4 h，弃去上清液，加入 DMSO 到 96 孔板中溶解，使用多功能酶标仪检测溶液在 570 nm 处的 OD 值，根据式（4）计算细胞存活率（%）。

1.9.2 细胞划痕实验

参考文献[15]的细胞划痕实验方法，设置空白组、阳性对照组（质量浓度 5 ng/mL 的表皮细胞生长因子）、样品组（用培养基配制质量分数 0.4%的山茶籽多肽液），每组均设 3 个复孔。在 DMi8 型倒置生物显微镜下拍摄 0、24 h 的划痕间距（d，mm）图片，用 Image J 软件进行图像分析，根据式（5）计算细胞迁移率（%）。

$$细胞迁移率/\%=\frac{d_{0\,h}-d_{24\,h}}{d_{0\,h}}\times100 \qquad (5)$$

式中：$d_{0\,h}$、$d_{24\,h}$ 分别为 0 h 时划痕宽度、24 h 时划痕宽度，mm。

1.10 数据分析

采用 GraphPad Prism 8.0 作图，结果以“算数平均值±标准偏差”表示，各组间比较采用 *t*-test 统计分析，统计分析均为双尾。$P<0.01$ 为有显著统计学差异，$P<0.001$ 为有极其显著的统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 山茶籽蛋白提取条件

图 1 为不同提取条件对山茶籽蛋白提取率的影响。

从图 1a 可以看出，随着料液比（g∶mL）从 1∶10 降至 1∶30，山茶籽蛋白提取率逐渐增加，当料液比为 1∶30 时，山茶籽蛋白提取率为 4.93%±0.06%。料液比为 1∶40、1∶50 时，山茶籽蛋白提取率趋于平缓。因此，选择料液比 1∶30 进行后续实验。

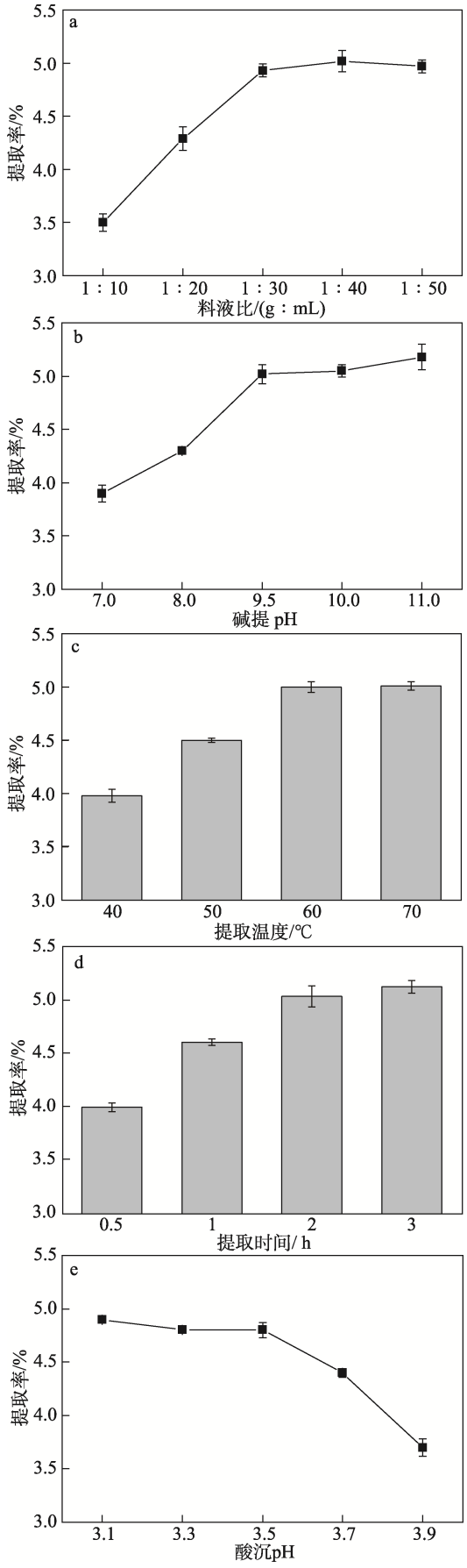
从图 1b 可以看出，随着 pH 从 7.0 增至 9.5，山茶籽蛋白的提取率逐渐增加，当 pH=9.5 时，山茶籽蛋白的提取率为 5.02%±0.09%。继续提高 pH，山茶籽蛋白提取率没有显著提升，这是由于 pH 太高会对提取容器产生腐蚀，因此，选择碱提 pH=9.5 进行后续实验。

从图 1c 可以看出，随着提取温度从 40 ℃升至 60 ℃，山茶籽蛋白提取率逐渐增加，当提取温度为 60 ℃时，山茶籽蛋白提取率为 5.00%±0.05%。继续提高提取温度至 70 ℃，山茶籽蛋白提取率没有显著提升。因此，选择提取温度 60 ℃进行后续实验。

从图 1d 可以看出，随着提取时间从 0.5 h 升至 2 h，山茶籽蛋白提取率呈线性增加趋势，当提取时间为 2 h 时山茶籽蛋白提取率为 5.04%±0.10%，继续延长提取时间至 3 h，山茶籽蛋白提取率没有明显增加。因此，选择提取时间 2 h 进行后续实验。

从图 1e 可以看出，酸沉 pH 在 3.1~3.5 时，山茶籽蛋白提取率变化不大，这是因为，酸沉 pH 的增加，会增加山茶籽蛋白的溶解性，蛋白在等电点时（pH=3.5）沉淀。继续增加酸沉 pH 至 3.7 和 3.9，山茶籽蛋白提取率显著降低。因此，选择酸沉 pH=3.5 进行后续实验。

在得到的最佳提取工艺，即料液比（g∶mL）1∶30、碱提 pH=9.5、提取温度 60 ℃、提取时间 2 h、酸沉 pH=3.5 条件下进行实验，山茶籽蛋白提取率为 5.05%。经测定，蛋白质是山茶籽蛋白的主要成分，其质量分数为 46.05%，除此之外，总糖、黄酮和多酚的质量分数分别为 27.02%、5.67%和 5.37%。



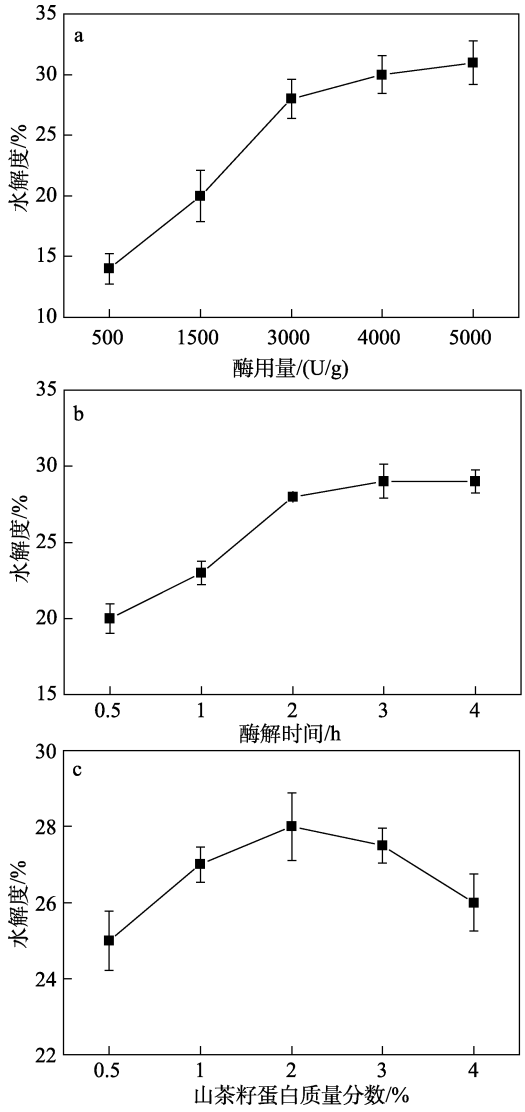
a—料液比；b—碱提 pH；c—提取温度；d—提取时间；e—酸沉 pH

图 1　各单因素对山茶籽蛋白提取率的影响

Fig. 1　Effect of different single factors on extraction rate of *Camellia* seed protein

2.1.2　山茶籽蛋白酶解条件

不同蛋白酶之间的酶解切点不同，会有不同的水解度，影响山茶籽蛋白酶解产物的肽组成和功效。按 1.2.3 节步骤，采用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解山茶籽蛋白，经测定，所得山茶籽蛋白酶解产物的水解度分别为 29.73%±0.86%、10.67%±1.20%和 13.55%±0.47%。因此，后续选用木瓜蛋白酶作为山茶籽蛋白酶解的最适用酶。图 2 为不同酶解条件对山茶籽蛋白酶解产物水解度的影响。



a—酶用量；b—酶解时间；c—底物质量分数

图 2　各单因素对山茶籽蛋白酶解产物水解度的影响

Fig. 2　Effects of different single factors on degree of hydrolysis o *Camellia* seed protein hydrolysates

从图 2a 可看出，当酶用量<3000 U/g 时，随着酶用量的增加，山茶籽蛋白酶解产物水解度迅速增加；当酶用量>3000 U/g 后，随着酶用量的持续增加，山茶籽蛋白酶解产物水解度变化不明显。因此，从经济角度出发，选择较适的酶用量为 3000 U/g。

从图 2b 可以看出，在酶解时间 2 h 内，随着酶

解时间的延长，山茶籽蛋白酶解产物水解度持续增加；当酶解时间>2 h 后，随着酶解时间的延长，山茶籽蛋白酶解产物水解度的增加趋于平缓。因此，选择最佳酶解时间为 2 h。

从图 2c 可以看出，随着底物质量分数的增加，山茶籽蛋白酶解产物的水解度呈现先增加后减小的趋势。当底物质量分数为 2%时，山茶籽蛋白酶解产物的水解度最高，为 28.00%±0.89%。因此，选择最佳的底物质量分数为 2%。

在得到的山茶籽蛋白最佳酶解工艺，即以木瓜蛋白酶为酶解酶、加酶量为 3000 U/g、酶解时间 2 h、底物质量分数 2%条件下进行验证实验，山茶籽蛋白酶解物的水解度为 31.56%。

2.2　多肽测序结果分析

图 3 为山茶籽多肽液中多肽片段测序结果。

经测定，山茶籽多肽液中总肽含量为 0.47908%。从图 3 可以看出，山茶籽多肽液中多肽片段主要为多肽长度 4~8 个的短肽，表明山茶籽蛋白被木瓜蛋白酶酶解成较短肽的多肽片段。

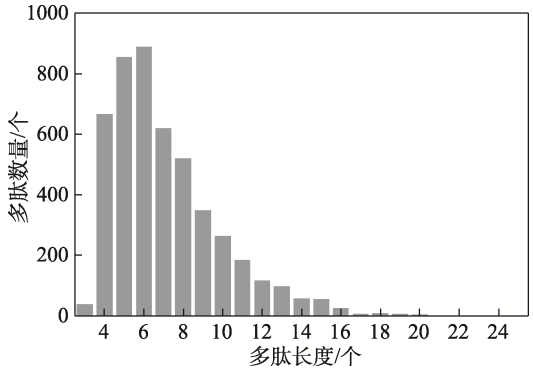


图 3　山茶籽多肽液中多肽分布图

Fig. 3　Peptide distribution diagram of *Camellia* seed polypeptide solution

表 3 为山茶籽多肽液中多肽片段的相对分子质量测定结果。可以看出，山茶籽多肽液是小分子多肽混合物，其总数均相对分子质量（简称分子量）为 850.56 Da，相对分子质量<2000 Da 的多肽占比为 99.56%。

表 3　山茶籽多肽液中多肽片段的相对分子质量

Table 3　Relative molecular mass distribution of polypeptide in *Camellia* seed polypeptide solution

相对分子质量/Da	占比/%	分子量/Da
0~500	8.50	460
500~1000	65.30	726
1000~1500	21.12	1185
1500~2000	4.64	1656
>2000	0.44	2334

每种氨基酸都有着不同的理化性质和对应功能，对于肽段来说，氨基酸序列组成决定了肽段的理化性质和功能。表 4 为山茶籽多肽液的氨基酸组成。

表 4　山茶籽多肽液氨基酸组成和总氨基酸含量占比

Table 4　Amino acid composition and content proportion of *Camellia* seed polypeptide solution

氨基酸种类	氨基酸名称	含量占比/%
必需氨基酸	亮氨酸（Leu）	13.70
	苯丙氨酸（Phe）	7.06
	缬氨酸（Val）	6.48
	赖氨酸（Lys）	5.24
	苏氨酸（Thr）	3.21
	甲硫氨酸（Met）	2.80
	色氨酸（Trp）	2.06
	异亮氨酸（Ile）	0
非必需氨基酸	脯氨酸（Pro）	8.39
	谷氨酸（Glu）	6.51
	天冬氨酸（Asp）	5.84
	甘氨酸（Gly）	5.33
	丙氨酸（Ala）	5.13
	谷氨酰胺（Gln）	4.88
	天冬酰胺 Asn）	4.81
	丝氨酸（Ser）	4.46
	酪氨酸（Tyr）	3.86
	半胱氨酸（Cys）	1.38
半必需氨基酸	精氨酸（Arg）	6.96
	组氨酸（His）	1.89

注：含量占比为各氨基酸含量占总氨基酸含量的百分比。

从表 4 可以看出，山茶籽多肽液中含有除 Ile 外的其他 7 种成年人必需氨基酸（Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Val），其含量占比为 40.55%，10 种非必需氨基酸含量占比为 50.59%，两种半必需氨基酸含量占比为 8.85%。表明山茶籽多肽液具有一定的营养及功效价值[20]。

2.3　山茶籽多肽液活性功效测定结果

2.3.1　抗氧化能力分析

过量的自由基会广泛损伤细胞和组织，降低皮肤组织活力，使其失去弹性、产生皱纹，并加速衰老的进程。通过清除自由基，可以达到抗氧化和抗衰老效果[21-23]。图 4 为山茶籽多肽液质量分数对 DPPH 自由基清除率的影响。

从图 4 可以看出，随着山茶籽多肽液质量分数的增加，DPPH 自由基清除率呈线性增长趋势。当山茶籽多肽液质量分数为 8%时，DPPH 自由基清除率达到 71.76%±0.34%，表明山茶籽多肽液具有一定的抗氧化和抗衰老效果。

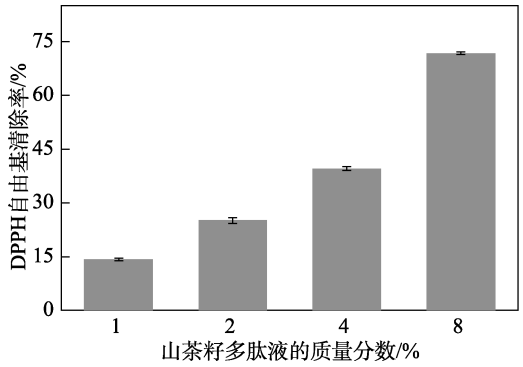


图 4　不同质量分数山茶籽多肽液的 DPPH 自由基清除率

Fig. 4　DPPH free radical scavenging rates of *Camellia* seed polypeptide solutions with different mass fractions

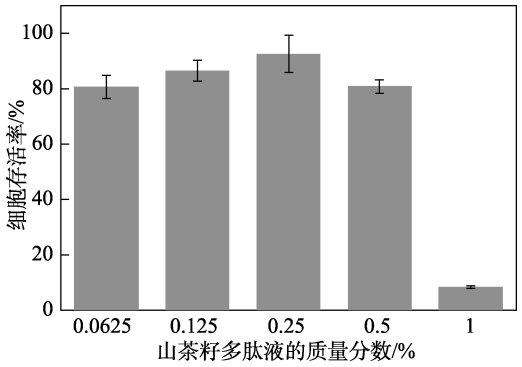


图 6　山茶籽多肽液质量分数对 HSF 细胞存活率的影响

Fig. 6　Effect of mass fraction of *Camellia* seed polypeptide solution on survival rate of HSF cells

2.3.2　抗糖化能力分析

图 5 为质量分数 0.01%的氨基胍和不同质量分数的山茶籽多肽液的 AGEs 抑制率。

糖基化是还原糖（如葡萄糖）与蛋白质、脂质或核酸之间的非酶促反应，形成 AGEs。AGEs 会减少细胞外基质合成，使皮肤组织充盈度减小、弹性下降，导致皱纹加速出现，同时也会诱导产生大量自由基，导致皮肤衰老[24-25]。从图 5 可以看出，质量分数 1%的山茶籽多肽液对 AGEs 的抑制率为 32.63%±0.78%，具有抑制 AGEs 的能力。

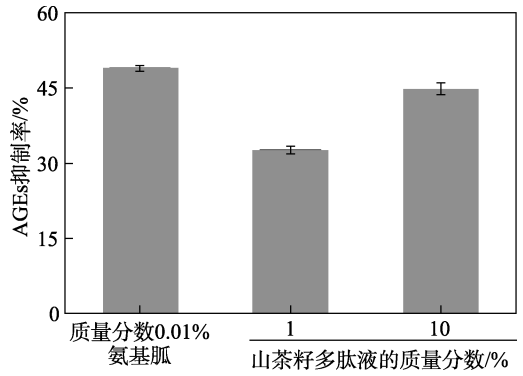


图 5　质量分数 0.01%的氨基胍和不同质量分数山茶籽多肽液的 AGEs 抑制率

Fig. 5　AGEs inhibition rate of mass fraction 0.01% aminoguanidine and *Camellia* seed polypeptide solutions with different mass fractions

2.3.3　抗皱功效分析

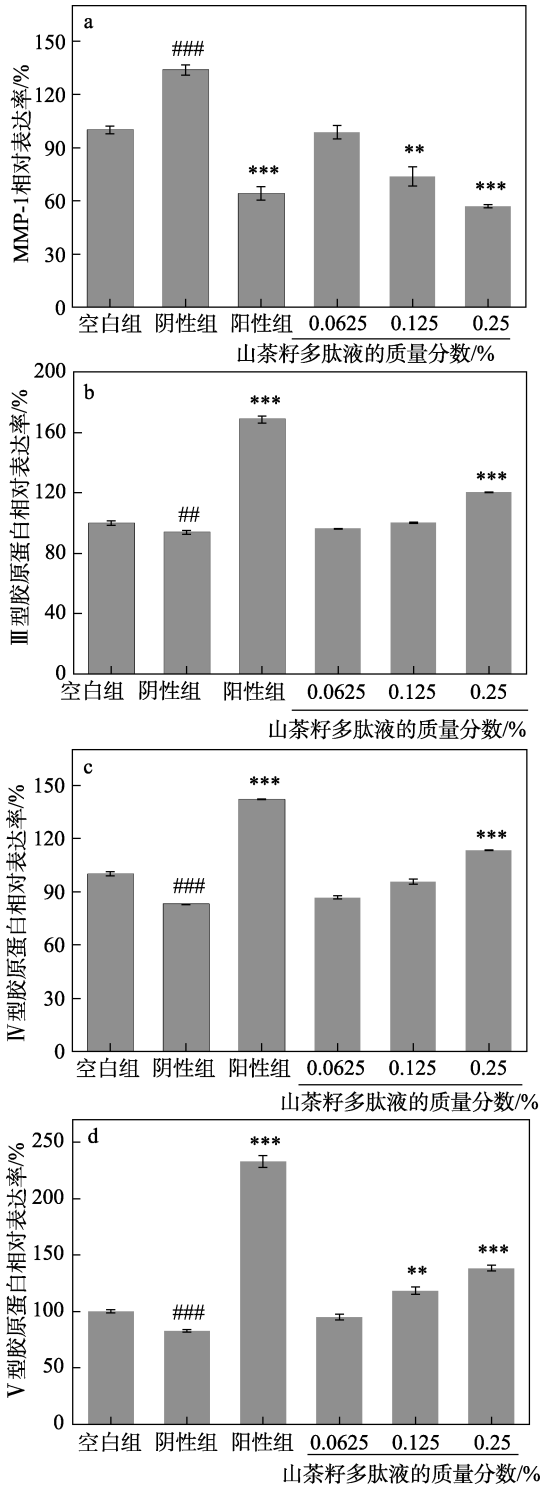
图 6 为不同质量分数山茶籽多肽液对 HSF 细胞存活率的影响。从图 6 可以看出，当山茶籽多肽液质量分数为 0.0625%~0.5%时，HSF 细胞存活率均>80%，山茶籽多肽液并未体现出明显的细胞毒性；当山茶籽多肽液质量分数为 1%时，HSF 细胞存活率仅为 8.47%±0.48%，山茶籽多肽液表现出明显的细胞毒性。因此，后续实验选择质量分数 0.0625%~0.25%的山茶籽多肽液进行相关功效测试。

图 7 为不同质量分数的山茶籽多肽液对 MMP-1 和Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型胶原蛋白表达率的影响。

胶原蛋白是一种主要存在于动物体内的结构蛋白，可以使皮肤具有弹性和紧致感，促进皮肤保水能力。MMP-1 能够剪短胶原蛋白的纤维结构，导致胶原蛋白的降解和组织重塑，造成皮肤松弛、皱纹出现等衰老迹象，通过减少 MMP-1 的活性，可以延缓皱纹的形成和皮肤衰老[26-28]。从图 7a 可以看出，当山茶籽多肽液质量分数为 0.25%时，HSF 细胞中 MMP-1 的相对表达率为 56.96%±0.82%，与空白组相比，MMP-1 相对表达率显著降低，表明山茶籽多肽液能够抑制 HSF 细胞中 MMP-1 的相对表达，具有抗皱和抗衰功效。

Ⅲ型胶原蛋白主要分布在皮肤真皮、心血管、胃肠道等部位，主要功能是维持组织弹性和基本结构，在维持皮肤、肌腱等结构的弹性和年轻态方面具有重要作用，随着年龄增长会大幅流失[29-30]。从图 7b 可以看出，质量分数 0.25%的山茶籽多肽液对 HSF 细胞Ⅲ型胶原蛋白相对表达率为 120.45%±0.24%，与空白组相比同比增加了 20.45%，表明山茶籽多肽液能促进 HSF 细胞Ⅲ型胶原蛋白的显著表达，具有抗皱功效。

Ⅳ型胶原蛋白是基底膜致密层的重要组成成分，可以维持基底膜的稳定性，对其起到支撑作用。一定紫外光辐射刺激将会诱导真皮细胞内基质金属蛋白酶表达升高，进而降解Ⅳ型胶原蛋白，最后发生基底膜的损伤甚至断裂，导致皱纹产生[31-32]。从图 7c 可以看出，质量分数 0.25%的山茶籽多肽液对 HSF 细胞中Ⅳ型胶原蛋白相对表达率为 113.24%±0.17%，与空白组相比同比增加了 13.24%，表明山茶籽多肽液能促进 HSF 细胞Ⅳ型胶原蛋白的显著表达，具有抗皱功效。



与空白组比较，#表示 $P<0.05$，##表示 $P<0.01$，###表示 $P<0.001$；与阴性组比较，*表示 $P<0.05$，**表示 $P<0.01$，***表示 $P<0.001$，下同

a—MMP-1；b—Ⅲ型胶原蛋白；c—Ⅳ型胶原蛋白；d—Ⅴ型胶原蛋白

图 7　不同质量分数山茶籽多肽液中 MMP-1 和Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型胶原蛋白表达率

Fig. 7　Expression rates of MMP-1 and type Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ collagen in *Camellia* seed polypeptide solutions with different mass fractions

Ⅴ型胶原蛋白主要存在于结缔组织中，是组织特异性胶原基质（由Ⅰ型和Ⅲ型形成的胶原基质）组装的关键决定因素，撑起了皮肤的基本轮廓[29,33]。Ⅴ型胶原蛋白的表达量直接影响着Ⅰ型胶原纤维的形态和数量[34]。Ⅴ型胶原蛋白的缺失会导致皮肤弹性过度综合征，使皮肤缺乏弹性、皱纹增加[35]。从图 7d 可看出，质量分数 0.25%的山茶籽多肽液对 HSF 细胞中Ⅴ型胶原蛋白相对表达率为 138.33%±2.72%，与空白组相比同比增加了 38.33%，表明山茶籽多肽液能促进 HSF 细胞Ⅴ型胶原蛋白的显著表达，具有抗皱功效。

图 8 为不同质量分数山茶籽多肽液对斑马鱼 col1a1a 基因表达率的影响。

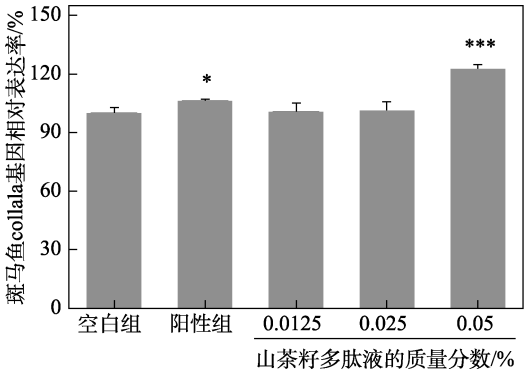


图 8　不同质量分数山茶籽多肽液中斑马鱼 collala 基因表达率

Fig. 8　Collala gene expression rates of zebrafish in *Camellia* seed polypeptide solutions with different mass fractions

胶原蛋白是人体皮肤中主要的胞外基质，其中Ⅰ型胶原蛋白的含量最多，皮肤皱纹的出现与胶原蛋白的正常合成和表达密切相关。斑马鱼具有与人高度保守的调控胶原蛋白的相关基因 col1a1a[36]。从图 8 可以看出，当山茶籽多肽液质量分数为 0.05%时，斑马鱼 col1a1a 基因相对表达率为 122.64%±2.07%，与空白对照组相比增加了 22.64%，说明 0.05%的山茶籽多肽具有显著促进 col1a1a 基因表达的作用，具有抗皱效果。

综合山茶籽多肽液抗皱功效测试结果，推测山茶籽多肽液可能的功效机理为：Gln 作为人体中含量最丰富的氨基酸，约占体内游离氨基酸的 60%，能为细胞正常代谢提供必要的氮源，参与谷胱甘肽的合成，促进蛋白质的合成，起到抗老修护的效果[37-38]；山茶籽多肽液中疏水性氨基酸（Trp、Phe、Tyr、Leu、Ala、Pro、Met）含量占比为 43.00%（表 4），其侧链上的芳香残基可促进多肽与自由基相互作用，不仅可清除自由基还有助于发挥抗衰效果[39-40]。

2.3.4　*修护功效分析*

图 9 为不同质量分数的山茶籽多肽液对 HaCaT 细胞存活率的影响。从图 9 可以看出，质量分数

0.05%~0.40%山茶籽多肽液内，HaCaT 细胞存活率均>98%，山茶籽多肽液并未体现出明显的细胞毒性；质量分数 0.8%的山茶籽多肽液内，HaCaT 细胞存活率<90%，山茶籽多肽液表现出细胞毒性。因此，选择质量分数 0.4%山茶籽多肽液开展修护功效测试。

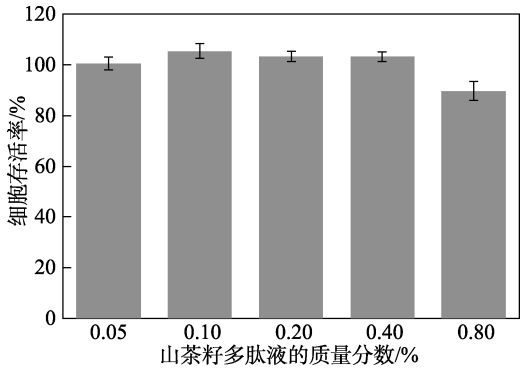
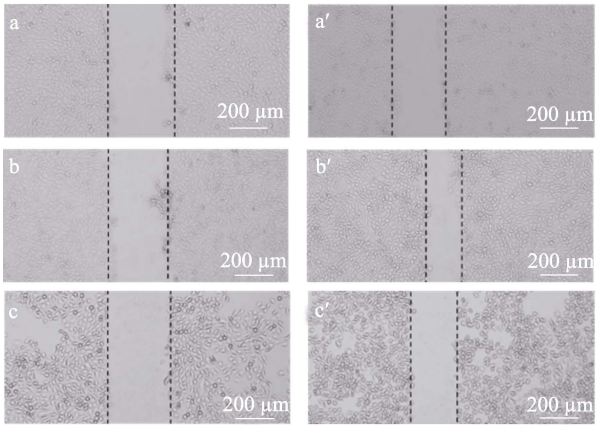


图 9　山茶籽多肽液质量分数对角质形成细胞存活率的影响

Fig. 9　Effect of mass fraction of *Camellia* seed polypeptide solution on survival rate of keratinocytes

图 10 和图 11 分别为质量分数 0.4%山茶籽多肽液内 HaCaT 细胞的划痕实验结果和迁移率。



a、b、c—0 h；a'、b'、c'—24 h

图 10　空白组（a、a′）、阳性组（b、b′）和质量分数 0.4%山茶籽多肽液（c、c′）内 HaCaT 细胞不同时间的划痕实验结果

Fig. 10　Sratch test results of HaCaT cells in blank group (a, a′), positive group (b, b′) and mass fraction 0.4% *Camellia* seed polypeptide solution (c, c′) at different time

从图 10 可以看出，与空白组相比，阳性组划痕宽度最小，质量分数 0.4%山茶籽多肽液划痕宽度略大于阳性组。说明，质量分数 0.4%山茶籽多肽液可提高 HaCaT 细胞伤口愈合能力。HaCaT 细胞是构成表皮层的重要细胞，当皮肤发生表皮损伤时，HaCaT 细胞会受到刺激而迁移，对受损部分进行修复。因此，通过测定样品处理后细胞迁移率，评价受试物是否具有修护功效[41]。从图 11 可以看出，质量分数 0.4%山茶籽多肽液内 HaCaT 细胞迁移率为 40.95%±0.36%，与空白组相比，山茶籽多肽液可以显著促进细胞增殖、分化和迁移，具有修护功效。

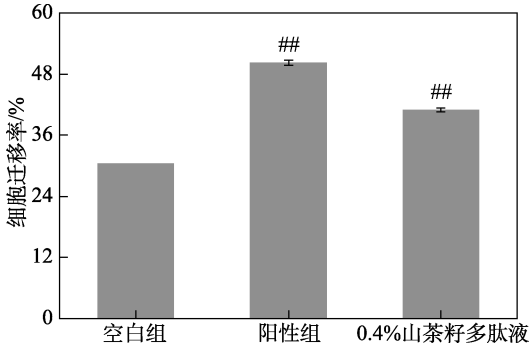


图 11　质量分数 0.4%山茶籽多肽液对 HaCaT 细胞的迁移率

Fig. 11　Migration rate of HaCaT cells by mass fraction 0.4% *Camellia* seed polypeptide solution

3　结论

以经超临界 CO_2 萃取脱油后山茶籽为原料，通过提取、酶解制备山茶籽多肽液，体外测试表明，其具有抗氧、抗糖、抗皱以及修护功效。

（1）单因素实验优化的山茶籽蛋白提取工艺条件为：料液比 1∶30、碱提 pH=9.5、提取温度 60 ℃、提取时间 2 h、酸沉 pH=3.5，在此条件下，山茶籽蛋白提取率为 5.05%。单因素优化的山茶籽蛋白酶解的优化条件为：以木瓜蛋白酶为酶解酶、加酶量为 3000 U/g、酶解时间 2 h、底物质量分数 2%。在此条件下，山茶籽蛋白酶解物水解度为 31.56%。

（2）经测定，山茶籽多肽液中总肽含量为 0.47908%，主要为多肽长度 4~8 肽的短肽。其总数均分子量为 850.56 Da，相对分子质量低于 2000 Da 的多肽占比为 99.56%。山茶籽多肽液中含有除 Ile 外的其余 7 种成年人必需氨基酸，其含量占比为 40.55%，10 种非必需氨基酸含量占比为 50.59%，两种半必需氨基酸含量占比为 8.85%。

（3）山茶籽多肽液质量分数为 8%时，DPPH 自由基清除率为 71.76%±0.34%；质量分数 1%山茶籽多肽液具有抑制 AGEs 的能力，抑制率为 32.63%±0.78%；当山茶籽多肽液质量分数为 0.25%时，HSF 细胞中 MMP-1 的相对表达率为 56.96%±0.82%，Ⅲ型胶原蛋白相对表达率为 120.45%±0.24%，Ⅳ型胶原蛋白相对表达率为 113.24%±0.17%，Ⅴ型胶原蛋白相对表达率为 138.33%±2.72%；当山茶籽多肽液质量分数为 0.05%时，斑马鱼 col1a1a 基因相对表达率为 122.64%±2.07%；质量分数为 0.4%的山茶籽多肽液内 HaCaT 细胞迁移率为 40.95%±0.36%。

本文制备的山茶籽多肽液具有抗衰和修护功效，可以为山茶籽蛋白的深加工以及化妆品行业的应用提供参考。后续将对山茶籽多肽液中发挥功效的活性多肽单一肽段的分离纯化及其功能活性做进一步研究。

参考文献：

[1] KUANG X K (邝雪琨), ZHENG Q (郑倩), KONG Q B (孔庆博), *et al*. Research progress on phylogeny and classification of *Camellia* [J]. Acta Horticulturae Sinica (园艺学报), 2024, 51(1): 53-66.

[2] ZHANG H D (张宏达). Flora of China[M]. Beijing: Science Publishing Group (科学出版集团), 1998.

[3] HU X (胡昕), LI G T (李广涛), GAO H Q (高宏旗). Study on the ability of anti-aging of *Camellia* flower and leaf extract in cosmetics [J]. Chinese Wild Plant Resources (中国野生植物资源), 2024, 43(2): 26-32.

[4] TEIXEIRA A M, SOUSA C. A review on the biological activity of *Camellia* species[J]. Molecules, 2021, 26(8): 2178.

[5] LIU X (刘翔). Study on flavor and safety of enzymatic hydrolysis of *Camellia* seed meal and its products from Maillard reaction[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2021.

[6] XIAO Y L (肖雅丽). Study on the preparation on of tea seed cake protein and its functional and digestion and absorption properties[D]. Yangzhou: Yangzhou University (扬州大学), 2021.

[7] ZHANG X L (张雪莉). Study on ultrasonic-assisted extraction and anti inflammatory activity of tea sapanin form *Camellia* seed cake[D]. Nanjing: Jiangsu University (江苏大学), 2022.

[8] SI X Y (司喜艳). Study on extraction, purification and application of tea saponins from *Camellia* seed meal[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology (河南工业大学), 2022.

[9] XIE Y Y (谢妍祎), WU S X (吴苏喜), TAN C B (谭传波), *et al*. Study on recovery and antioxidant activity of *Camellia* seed polysaccharide from defatted aqueous fluid[J]. Cereals & Oils (粮食与油脂), 2021, 34(10): 41-45.

[10] GONG J J (龚吉军), LI Z H (李忠海). Preparation of tea-seed peptide and study on its antioxidant activity *in vitro*[J]. Agriculture and Technology (农业与技术), 2006(6): 74-77.

[11] SUN Y (孙英). Study on the extraction, purification and antioxidant activity of peptide from *Camellia* seeds meal[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2013.

[12] ZHAO Y H (赵延华). The research on extraction protein and biological activity of hydrolysate derived from *Camellia oleifera* abel seed meal[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology (中南林业科技大学), 2012.

[13] SHAO L (邵丽), WANG L Z (王理壮), MA L J (马来记), *et al*. A preparation method of *Camellia* seed polypeptide and its application in acne: CN117925763A[P]. 2024-04-26.

[14] LIU D D, CHEN M, ZHU J S, *et al*. A two-stage enzymolysis method and its application in exerting antioxidant activity of walnut protein[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 889434.

[15] GOIIY M K, MA H L, DUAN Y Q, *et al*. Enzymolysis of walnut (*Juglans regia* L.) meal protein: Ultrasonication-assisted alkaline pretreatment impact on kinetics and thermodynamics[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(8): e12948.

[16] QUAN T H. Human skin aging and the anti-aging properties of retinol[J]. Biomolecules, 2023, 13(11): 1614.

[17] GELSE K, POSCHL E, AIGNER T. Collagens-structure, function, and biosynthesis[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55(12): 1531-1546.

[18] RICARD-BLUM S. The collagen family[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, 3(1): a004978.

[19] LI Y L (李云亮). Comparison of methods for determining the degree of hydrolysis in the enzymatic digestion of chicken minced protein[J]. China Feed (中国饲料), 2025(1): 126-132.

[20] HU X Q (胡晓倩), GUI Z K (桂子康), DENG J W (邓军伟), *et al*. Preparation and function evaluation of bioactive peptides in hairy tofu of fermented soybean curd[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2023, 23(3): 217-228.

[21] PITTAYAPRUEK P, MEEPHANSAN J, PRAPAPAN O, *et al*. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 868.

[22] KAMMEYER A, LUITEN R M. Role of matrix metalloproteinases in skin aging[J]. Ageing Research Reviews, 2015, 21: 16-29.

[23] ZHANG S T (张舒婷), LI L (李丽), DING Y L (丁依琳), *et al*. Extraction of polysaccharide from dendrobium officinale and its application in whitening and moisturizing skin care products[J/OL]. Fine Chemicals (精细化工), 2024, DOI: 10.13550/j.jxhg.20240620.

[24] PENG L W, LAI J X, HE C F, *et al*. Research progress of nonenzymatic glycosylation and skin aging[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2010, 30(20): 3027-3029.

[25] LUAN F, ZENG J S, YANG Y, *et al*. Recent advances in *Camellia oleifera* abel: A review of nutritional constituents, biofunctional properties, and potential industrial applications[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 75: 104242.

[26] AMER R I, EZZAT S M, ABOREHAB N M, *et al*. Downregulation of MMP-1 expression mediates the anti-aging activity of citrus sinensis peel extract nanoformulation in UV induced photoaging in mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 138: 111537.

[27] WLASCHEK M, MAITY P, MAKRANTONAKI E, *et al*. Connective tissue and fibroblast senescence in skin aging[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2021, 4(141): 985-992.

[28] CHOU H Y, LEE C, PAN J L, *et al*. Enriched astaxanthin extract from *Haematococcus pluvialis* augments growth factor secretions to increase cell proliferation and induces MMP-1 degradation to enhance collagen production in human dermal fibroblasts[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 955.

[29] PU S Y, HUANG Y L, PU C M, *et al*. Effects of oral collagen for skin anti-aging: A systematic review and meta-analysis[J]. Nutrients, 2023, 15(9): 2080.

[30] SUN T Y, ZHANG L X, FENG J L, *et al*. Characterization of cellular senescence in doxorubicin-induced aging mice[J]. Experimental Gerontology, 2022, 163: 111800.

[31] WU Y X, GE G X. Complexity of type Ⅳ collagens: From network assembly to function[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 400(5): 565-574.

[32] MATSUURA-HACHIYA Y, ARAI K Y, MURAGUCHI T, *et al*. Type Ⅳ collagen aggregates promote keratinocyte proliferation and formation of epidermal layer in human skin equivalents[J]. Experimental Dermatology, 2018, 27(5): 443-448.

[33] TRIVERO J, CORALLO K, PERNODET N. The importance of Nrf-2 technology combined with powerful collagen boosters to rebuild youthful skin and essential collagen: Types Ⅰ, Ⅲ, and Ⅴ [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2024, 144(8): S101.

[34] WENSTRUP R J, FLORER J B, BRUNSKILL E W, *et al*. Type Ⅴ collagen controls the initiation of collagen fibril assembly[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(51): 53331-53337.

[35] HE S N (何淑女), ZHANG L Y (张玲燕), LIU J P (刘吉鹏), *et al*. Mutation analysis of COL5A1 gene in classic Ehlers-Danlos syndrome[J]. China Journal of Leprosy and Skin Diseases (中国麻风皮肤病杂志), 2024, 40(8): 538-544.

[36] MIAO M, BRUCE A E E, BHANJI T, *et al*. Differential expression of two tropoelastin genes in zebrafish[J]. Matrix Biology, 2007, 26(2): 115-124.

[37] LIANG G R (梁国瑞), WANG Y (王影), ZHANG Y (张莹), *et al*. Application of glutamine enriched nutrition therapy in clinical practice[J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use (中国临床合理用药杂志), 2015, 8(2): 172-173.

[38] YAN B (严斌). Prepartion of glutamine peptide from high substrate concentration of wheat protein and its intestinal repair function[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (中国农业科学院), 2017.

[39] SU Z Y (苏梓盈), LU X L (陆旭丽), DAI Y P (代亚萍), *et al*. Optimization of preparation process of antioxidant peptides from goldenpompano (*Trachinotus ovatus*) skin by response surface method and its composition analysis[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2024, 45(23): 198-207.

[40] LI Y F (李雲凤). Preparation, anti-aging activity and mechanism of antler polypeptide[D]. Changchun: Changchun university of technology (长春工业大学), 2024.

[41] GRADA A, OTERO-VINS M, PRIETO-CASTRILLO F, *et al*. Research techniques made simple: Analysis of collective cell migration using the wound healing assay[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2017, 137(2): 11-16.