

魚鱗膠原胜肽活化纖維母細胞及經皮吸收之探討

蔡慧君* · 李京樺 · 吳純衡

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘 要

口服膠原胜肽可提高真皮層纖維母細胞的密度，促進膠原纖維直徑及密度的增生，進而改善膚質。但若採外敷的方式，膠原胜肽須穿越皮膚屏障才能活化真皮層的纖維母細胞，以促進膠原蛋白的合成。然而有關胜肽經皮吸收的相關研究付之闕如，因此本研究先以細胞實驗評估魚鱗膠原蛋白水解胜肽（魚鱗膠原胜肽）對纖維母細胞之活化作用，再以裸鼠皮進行胜肽的經皮吸收試驗來探討胜肽對皮膚的穿透量。魚鱗經酵素水解之膠原胜肽在蛋白濃度為 200 µg/ml 時，對纖維母細胞之賦活作用為 150%；對膠原蛋白合成促進作用約達 250%。此外，魚鱗膠原胜肽，以超過濾分離成平均分子量分別為 4500 Da、3500 Da、2000 Da 和 1300 Da 等四種樣品，再以 FRANZ 型擴散管 (Franz type diffusion cell) 及組織切片探討螢光標識膠原胜肽對裸鼠皮的穿透量，結果顯示，所有魚鱗膠原胜肽組皆可以經皮吸收到達真皮層，其中以平均分子量 3500 Da 和 4500 Da 胜肽組之單位面積累積穿透量較高。另將螢光標識魚鱗膠原胜肽所穿透之裸鼠皮，再以雙光子雷射顯微影像觀察裸鼠真皮層中膠原胜肽的穿透形態，在胜肽平均分子量為 4500 Da 和 3500 Da 之試驗組其分子形態較長、多皺折並呈現捲曲狀；平均分子量為 2000 Da 及 1300 Da 之試驗組的分子形態較短、少皺折，而呈現直鏈狀。綜合以上結果顯示，魚鱗膠原胜肽可經皮吸收同時活化真皮層的纖維母細胞並促進膠原蛋白合成，而胜肽的分子構形可能是影響經皮吸收的關鍵因子之一。

關鍵字：魚鱗、膠原胜肽、裸鼠皮、經皮吸收

前 言

膠原蛋白 (collagen) 為人體結締組織中主要的結構蛋白質，而生物體中有多种不同形態的結締組織，例如骨頭、肌腱、軟骨、皮膚等，因此存在於各部位之膠原蛋白也衍生出多種不同的形態 (Gelse *et al.*, 2003)。然而不同形態的膠原蛋白其組成分子的比例不僅具有組織專一性，同時不同類型的膠原蛋白也不會構成同一條纖維，例如第一型 (type I) 膠原蛋白通常是粗厚的帶狀纖維，主要存在於皮膚、韌帶和骨頭等結締組織中。第二型膠原蛋白則形成薄的、非帶狀的纖維，並聚集形成網狀結構，廣存於軟骨組織中。第三型膠原蛋白則與糖蛋白結合構成網狀纖維，除此之外，尚有多種類

型的膠原蛋白廣存在於身體的各部位組織中 (Ronald, 1979)。由於膠原蛋白大量的存在於人體，並且是構成人體結締組織的重要成分，因此膠原蛋白廣被應用做為生醫用材，例如以膠原蛋白製成的組織取代物，可修補膝關節內側半月板的缺陷，減緩膝關節的變形 (Linke *et al.*, 2006)；以膠原蛋白和葡萄糖胺做成的細胞支架，目前研究正以體外實驗 (*in vitro*) 來觀察細胞在支架間的流動及締結效果，未來將應用在細胞間質幹細胞的培養或是整形外科 (Brendan *et al.*, 2007)。另以膠原蛋白為基底所製成的皮膚取代物，可應用在燒燙傷病人的皮膚治療 (Wisser and Steffes, 2003)；而膠原蛋白製成的皮膚填充物，則可以注射方式來填平皮膚上的凹陷或皺褶 (Bennett and Henderson, 2003)。

經皮吸收 (transdermal permeation) 是一種廣泛應用於檢驗產品或藥劑在不同批次間品質的均一性或是新製劑的生物利用性。由美國 FDA 所頒

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-2677; e-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw

布的 SUPAC-SS 指導原則中指出，半固體局部用製劑（如乳膏、油膏、凝膠等）在其量產放大或是產品製程改變時，均需進行體外經皮吸收試驗，來確保產品品質的一致性和等效性。而利用改良過的 FRANZ 型擴散管 (Franz type diffusion cell) 和人工膜（或是皮膚）來進行樣品的經皮吸收試驗則是一種簡單且再現性高的方法 (Gondaliya and Pundarikakshudu, 2003; Patriarca *et al.*, 2007)。因此本試驗以 MTT 法探討魚鱗酵素水解膠原胜肽對纖維母細胞之賦活效果及膠原蛋白合成促進作用，另以裸鼠皮經 FRANZ 型擴散管進行螢光標識魚鱗膠原胜肽 (collagen peptide) 的經皮吸收試驗，以探討膠原胜肽對皮膚的單位面積穿透量及其穿透深度，另由組織切片及螢光顯微鏡觀察經皮吸收後膠原胜肽之型態。

材料與方法

一、不同分子量魚鱗膠原胜肽之製備

吳郭魚鱗先以流水洗淨，再經脫腥、酵素水解之魚鱗膠原胜肽 (吳與蔡, 2006)，分別以超過濾膜 (ultrafiltration membranes, Millipore) 5 KDa、3 KDa、1 KDa 和 0.5 KDa 進行區分，再收集和凍乾製備平均分子量分別為 4500 Da、3500 Da、2000 Da 和 1300 Da 的膠原胜肽粉末。另未經超過濾膜處理之魚鱗膠原胜肽為混合組。

二、MTT 法分析膠原胜肽對纖維母細胞之賦活效果及膠原蛋白合成促進作用

(一) 細胞培養

人類纖維母細胞 (human embryonic skin fibroblast line CCL-110) 和老鼠纖維母細胞 (mouse embryonic fibroblast line STO) 分別以 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 及 MEME (Minimum Essential Medium Eagle's) 培養基 (含 10% FBS) 於 37 °C、5% CO₂ 濃度下進行繼代培養。

(二) 細胞活化試驗 (MTT assay)

人類及老鼠纖維母細胞以 1500 rpm，離心 5 min 收集後，以細胞計數器 (Sequoia-Turner Cell-dyn 300) 計算細胞密度，再根據此數值將細胞調整為 2×10^5 cells/ml，並加入魚鱗膠原胜肽 20 µL/well 於 96 well 培養盤中，隨後加入含細胞之培養液 (100 µL/well)，置於 37 °C、5% CO₂ 培養箱培養 48 hrs 後，加入 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT) 和 Yolk Lipoprotein (YLP) 等比例之混合物，於 37 °C 反應 4 hrs 後，取出震盪 2 min，於 570 nm (Dyne-Exmrx ELISA 96 wells plate reader) 測定吸光值。

(三) 纖維母細胞的膠原蛋白合成能力之評估法

利用 ELISA 之評估方法，進行纖維母細胞的膠原蛋白合成能力評估，並以 TaKaRa 公司生產之 Procollagen type I C-peptide (PIP) 之市售套組，可用來檢測膠原蛋白之生成量。取 Antibody-POD conjugate solution 100 µl 加入 96 well 培養盤中，再加入 20 µl 經培養 3 天之纖維母細胞之培養液及標準溶液後，於 37 °C 下培養 3 hrs，以 washing buffer 400 µl/well，反覆清洗 4 次，清洗後將 well 輕輕拍乾，再加入 100 µl substrate solution 放置室溫下反應 15 min 後，加入 stop solution 後以波長 450 nm 測定吸光值。

三、螢光標識魚鱗膠原胜肽之經皮吸收試驗

(一) BCA (bicinchoninic acid)TM Protein (Pierce Product No. 23227) Assay

1. 試驗液配製 (pH 7.4 Phosphate Buffer)

秤取 13.60 g 之 potassium phosphate monobasic、7.56 g 之 sodium chloride 及 0.47 g sodium azide，加入約 2000 mL 的 dist. water 中，以 sodium hydroxide 溶液調整 pH 值至 7.4，定容至 2 L。

2. 樣品溶液

秤取魚鱗膠原胜肽 15 mg，加入 pH 7.4 phosphate buffer 以超音波振盪使之完全溶解並定量至 20 mL，魚鱗膠原胜肽最終濃度為 750 ppm。

3. 標準品溶液

取 2 mg/ml (2000 ppm) albumin standard ampules 做為 stock solution。

4. Working Reagent (WR) 配製

取 25 mL BCA™ reagent A 與 0.5 mL BCA™ reagent B (50:1, reagent A : reagent B), 混合均勻。

5. 操作步驟

分別取 25 μ L 標準品溶液及樣品溶液置於 microplate 中, 加入 200 μ L WR 至每個 well 中, 振盪 plate 30 sec 使 plate 中的溶液混合均勻。蓋上 microplate 的蓋子, 於室溫下培養 2 hrs, 再用酵素免疫偵測儀測定檢品於 570 nm 的吸光值。

(二) 經皮吸收試驗操作步驟

1. 試驗方法

將裸鼠皮於室溫下解凍並以拭鏡紙擦拭多餘的水分後, 置於 FRANZ (Franz type diffusion cell) 型擴散管, 將魚鱗膠原胜肽溶於試驗液 (pH 7.4 phosphate buffer) 並定量體積後放入 donor 端, 另定量體積之 phosphate buffer 放入 receptor 端後, 在室溫 (37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C) 下以轉速 250 stirring/min 開始進行穿透試驗。

2. 採樣分析

分別於試驗第 1、2、3、4、6 和 24 hrs 進行採樣, 採樣時係由 receptor 端吸取 1 mL 測試溶液以 0.45 μ m 濾膜過濾後, 再以 BCA™ Protein Assay Kit 偵測穿透裸鼠皮後的魚鱗膠原胜肽含量 (每次取樣後, 隨即補入 1 mL pH 7.4 phosphate buffer 至 receptor 端)。

3. 計算公式

累積穿透量 (μ g) = [濃度 (ppm) $\times$ 初始體積]

$$+ \sum_{n=1}^n (\text{濃度} \times \text{取樣體積})$$

單位面積累積穿透量 (μ g/cm²) = $\frac{\text{累積穿透藥量}}{\text{單位面積}}$

(單位面積 = 0.66 cm²)

其中, 濃度為所得面積代入檢量線所得之 ppm 值; 初始體積為 diffusion cell 中初始試驗液之 mL 數。

(三) 以螢光染劑 (Sigma FITC1 Fluoro Tag™ FITC Conjugation Kit) 進行魚鱗膠原胜肽之螢光標識 – 依 FluoroTag™ FITC labeling 方法

1. 配製 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.0), 作為溶解 FITC (fluorescein isothiocyanate) 與共軛反應用溶液。

2. 配製 PBS, 用來平衡 Sephadex C-25 管柱, 並沖提管柱中螢光標識的魚鱗膠原胜肽。

3. 樣品溶液

秤取 collagen peptide 樣品約 25 mg, 加入 pH 7.4 phosphate buffer 以超音波振盪使之完全溶解並定量至 5 mL, 終濃度約為 750 ppm。

4. 共軛反應步驟

取 2 mL 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate buffer, 至 FITC 樣品瓶中以超音波震盪直到 FITC 完全溶解。

5. 魚鱗膠原胜肽螢光標識反應步驟

取樣品溶液 1 mL 加入共軛反應溶液 0.25 mL, 在室溫下以低轉速攪拌 2 hrs, 再以 PBS 為移動相, 以 Sephadex G-25 管柱分離收集螢光標識魚鱗膠原胜肽。

四、螢光標識魚鱗膠原胜肽對皮膚的穿透深度之觀察

將螢光標識魚鱗膠原胜肽在 37 $^{\circ}$ C 經 24 hrs 穿透之裸鼠皮, 以包埋劑 (SAKURA Tissue-Tek OCT No.4583) 包裹後置於 -20 $^{\circ}$ C 下冷凍, 待樣品硬化後以冷凍切片機 (Leica CM1900) 切成 20 μ m 薄片並置於載玻片上, 先以固定劑 (95%酒精與 5%醋酸) 浸漬 20 sec 後, 再以 PBS 浸漬清洗 20 sec 待乾, 再將玻片置於蘇木素 (hematoxylin) 中染色約 1 min, 以清水流洗 1 min 後, 再將玻片依序置於 50%、70%、90%、100% 酒精中各 30 sec, 待玻片於空氣中乾燥後, 最後於玻片上滴入封片膠, 蓋上蓋玻片, 以螢光顯微鏡 (OLYMPUS BX51, Tokyo, Japan) 放大倍率 100x 觀察。

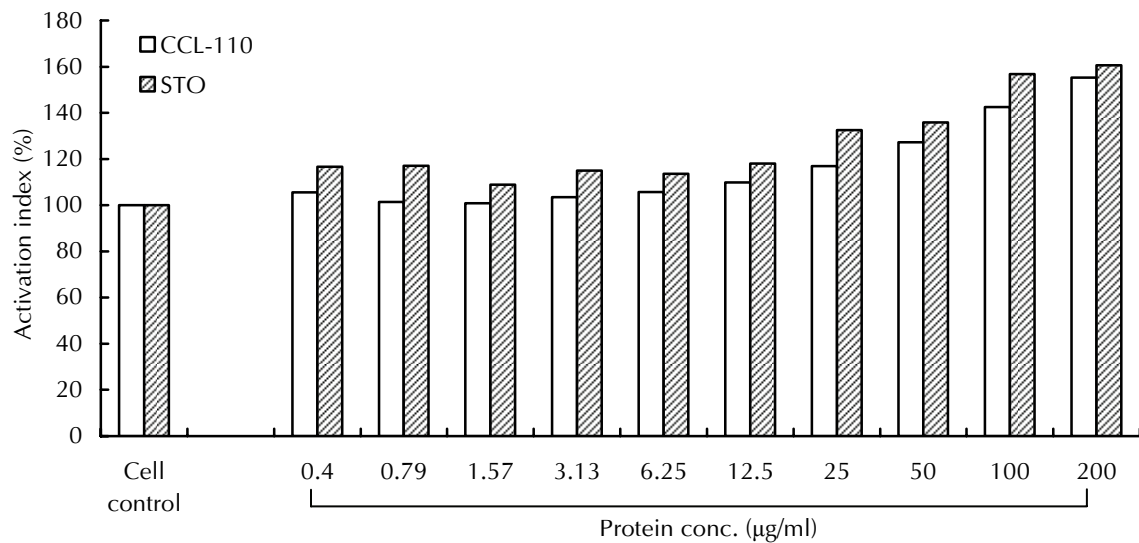


Fig. 1 Effect of the concentration of fish scale collagen peptide on the activation activity of human embryonic skin fibroblast line CCL-110 and mouse embryonic fibroblast line STO.

五、螢光標識魚鱗膠原胜肽對皮膚的穿透型態之觀察

將螢光標識魚鱗膠原胜肽穿透後之裸鼠皮平貼於載玻片上，以單光子雷射共軛焦及雙光子雷射顯微影像處理 (Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System, Germany；商借於台大貴重儀器中心雙光子雷射共軛焦顯微鏡室，Confocal Microscope Lab, Instrumentation Center，NTU) 觀察魚鱗膠原胜肽經皮吸收之型態。

六、統計分析

實驗數據以 SAS (statistical analysis system) 套裝 GLM (general linear model procedure) 軟體作單向變異數分析 (one-way analysis of variance)，並以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異，顯著水準定在 0.05。

結果與討論

一、魚鱗膠原胜肽對纖維母細胞之賦活效果與膠原蛋白的合成促進作用

皮膚是由表皮層、真皮層和皮下組織所構成

(Wicket and Visscher, 2006)，其中真皮層係由纖維母細胞所產生的膠原蛋白和彈力蛋白等纖維來組織支撐皮膚的結構，使得皮膚緊實並具有彈性。本試驗以 MTT assay 探討魚鱗膠原胜肽對人類纖維母細胞 (STO) 和老鼠纖維母細胞 (CCL-110) 之賦活效果及膠原蛋白合成促進作用之結果顯示，將魚鱗膠原胜肽分別加入 2 種纖維母細胞中共同培養時，其纖維母細胞之賦活作用隨膠原胜肽濃度之增加而遞增且有劑量依存性，此顯示魚鱗膠原胜肽對 2 種纖維母細胞皆有賦活效果，且當胜肽濃度為 200 µg/ml 時，其賦活作用最高達 150% (Fig. 1)。另自顯微鏡下觀察纖維母細胞均平坦貼附於培養盤底面，其細胞型態呈現樹突狀，且細胞間緊密連接 (Fig. 2a, b)，當加入魚鱗膠原胜肽共同培養 24 hrs 後在顯微鏡下觀察，則可發現纖維母細胞產生伸展及黏附現象，經 48 hrs 培養後其賦活及黏附現象愈加明顯 (Fig. 2c, d)。

以 ELISA 測定魚鱗膠原胜肽對人類纖維母細胞 (STO) 之膠原蛋白合成促進作用，其結果如 Fig. 3 所示，膠原胜肽之蛋白濃度不僅在高濃度下 (200 µg/ml) 對纖維母細胞之膠原蛋白合成促進作用約達 250%，即使在低濃度 (50 µg/ml) 時亦有明顯之合成促進效果。

Maquart *et al.* (1988) 研究中發現，在纖維母細胞培養基中加入銅三胜肽，可刺激細胞合成膠

原蛋白，進而達成撫平細紋的功效；此外小山等 (1995) 指出銅三胜肽可促進纖維母細胞生長，以作為傷口治療用藥。另 Kau *et al.* (1993) 將五胜肽和 TGF β -1 生長因子一起加入纖維母細胞中進行培養，結果發現兩者對細胞間質 (ECM, extra cellular matrix) 的合成量具有加乘的效果。由以上結果顯示，魚鱗膠原胜肽對纖維母細胞也具有賦活效果並可促進膠原蛋白之合成增生。

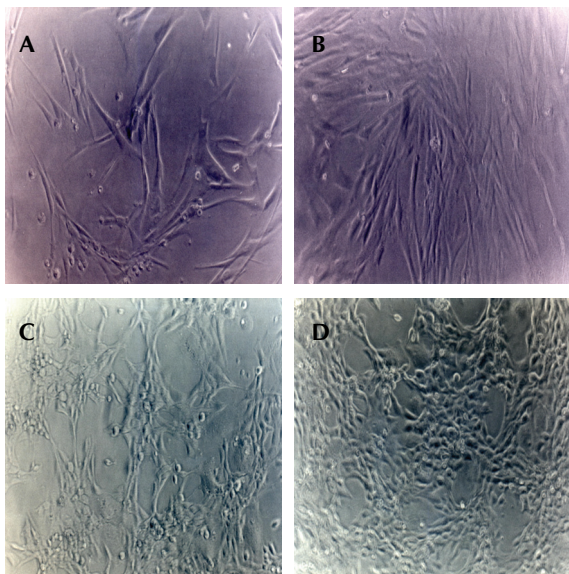


Fig. 2 Microscopy images of fibroblasts ST0 and CCL-110 treated with or without the fish scale collagen peptide. A. Fibroblasts ST0 blank; B. Fibroblasts ST0 were treated with collagen peptide; C. Fibroblasts CCL-110 blank; D. Fibroblasts CCL-110 were treated with collagen peptide.

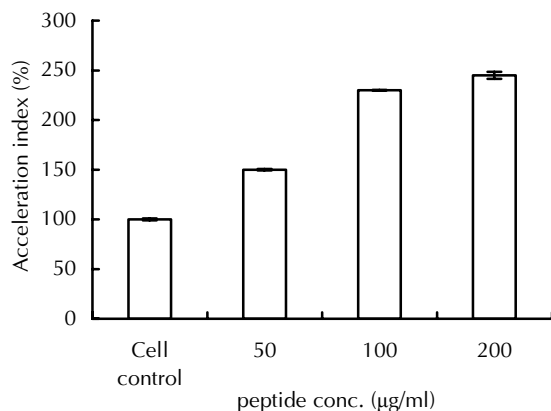


Fig. 3 Effect of the concentration of fish scale collagen peptide on the collagen synthesis of human fibroblasts.

二、不同分子量之魚鱗膠原胜肽的經皮吸收試驗

研究發現以口服的方式攝入膠原胜肽，能增加皮膚真皮層中纖維母細胞的密度，有效促進膠原纖維的合成，並增厚膠原纖維的直徑及密度，另對於頭髮及指甲等皮膚衍生物也有改善的效果 (Matsuda *et al.*, 2006)。此外，另一研究證實，以酵素製備小分子量的膠原胜肽，經由口服方式不僅能活化真皮層的纖維母細胞，促進皮膚內膠原纖維束的形成，使得角質層的水分增加，達到保溼與維持皮膚彈性的效果。同時小分子量的膠原胜肽也可減少因紫外線照射皮膚後對膠原纖維束的破壞，減緩皮膚光老化的發生 (Tanaka and Hasegawa, 2005)。

皮膚最外層為角質層，其具有防止體內水分蒸散及抵禦異物入侵體內之重要的屏障功能。然而也由於角質層之物理性屏障存在，所以大分子膠原蛋白對皮膚之滲透率極低，難以活化真皮層中纖維母細胞，達到皮膚彈性的改善效果。目前有關胜肽的經皮吸收相關研究付之闕如，而本實驗經 MTT 分析結果顯示，魚鱗膠原胜肽對纖維母細胞具有賦活效果並可促進膠原蛋白之合成。故續將魚鱗膠原胜肽，經過濾膜 5 KDa、3 KDa、1 KDa 和 0.5 KDa 進行區分、收集和凍乾成膠原胜肽分子量分別為 500 Da 以下、500 ~ 1000 Da、1000 ~ 3000 Da 和 3000 ~ 5000 Da 等膠原胜肽粉末，經管柱層析分析其平均分子量依序為 1300 Da、2000 Da、3500 Da 和 4500 Da。未經過濾膜處理之魚鱗膠原胜肽粉末視為混合組。

將螢光標識不同分子量之魚鱗膠原胜肽以 FRANZ 型擴散管進行裸鼠皮經皮吸收試驗，並分別於第 1、2、3、4、6 和 24 hrs 採樣，以 BCA™ Protein Assay Kit 偵測穿透裸鼠皮後的膠原胜肽含量，結果如 Fig. 4 所示，以平均分子量 3500 Da 和 4500 Da 胜肽組於經皮吸收 4 hrs 後，其單位面積累積穿透量高於其他各試驗組，且於 24 hrs 累積穿透量最高，平均值分別為 1986 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 1825 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。而未經過濾膜處理之混合組 (mixture) 組，其單位面積累積穿透量最低僅 1010 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。然各組間可能因標準差 (standard division) 值高，經統計分析無顯著差異。

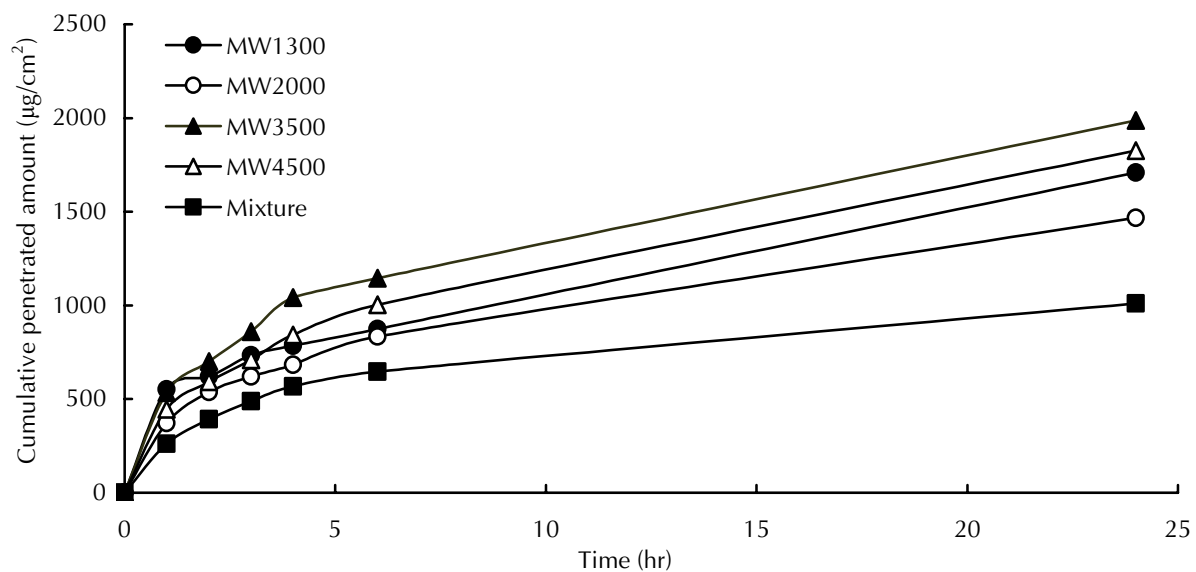


Fig. 4 Transdermal permeation of different size of collagen peptide across nude mouse skin. The collagen peptides were separated into four fractions, which average molecular weight was 4,500 Da (Δ); 3,500 Da ($\blacktriangle$); 2,000 Da ($\circ$) and 1,300 Da ($\bullet$), respectively. The mixture ($\blacksquare$) is unfractional sample.

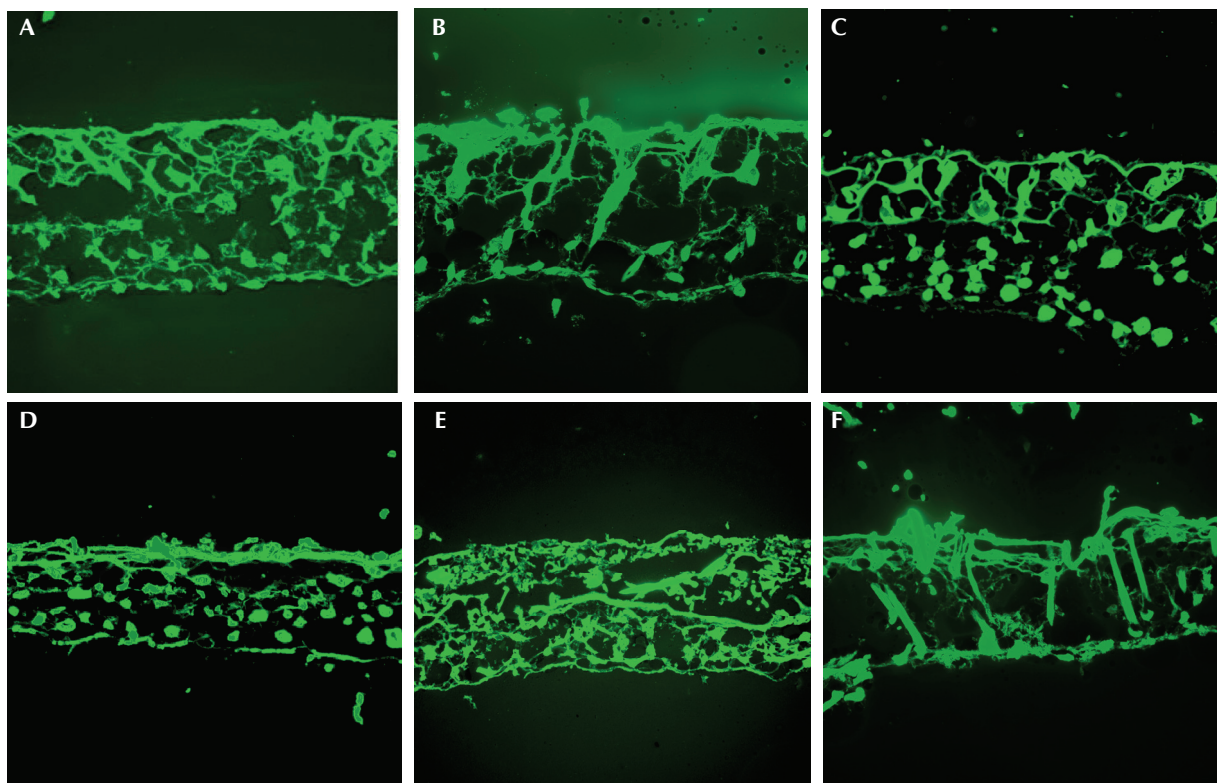


Fig. 5 Fluorescence microscope images of nude mouse skin tissue treated with different sizes of fish scale collagen peptides. A. 1,300 Da; B. 2,000 Da; C. 3,500 Da; D. 4,500 Da; E. unfractional mixture sample; F. blank.

三、螢光標識魚鱗膠原胜肽對皮膚的穿透深度及其型態之觀察

將螢光標定魚鱗膠原胜肽在 37 °C 下穿透 24

hrs 之裸鼠皮，經冷凍組織切片以螢光顯微鏡觀察魚鱗膠原胜肽對裸鼠皮的穿透深度，結果由影像圖 (Fig. 5) 中可看出，膠原胜肽成螢光小點分布於裸鼠皮組織橫切片的下方，其中以平均分子量

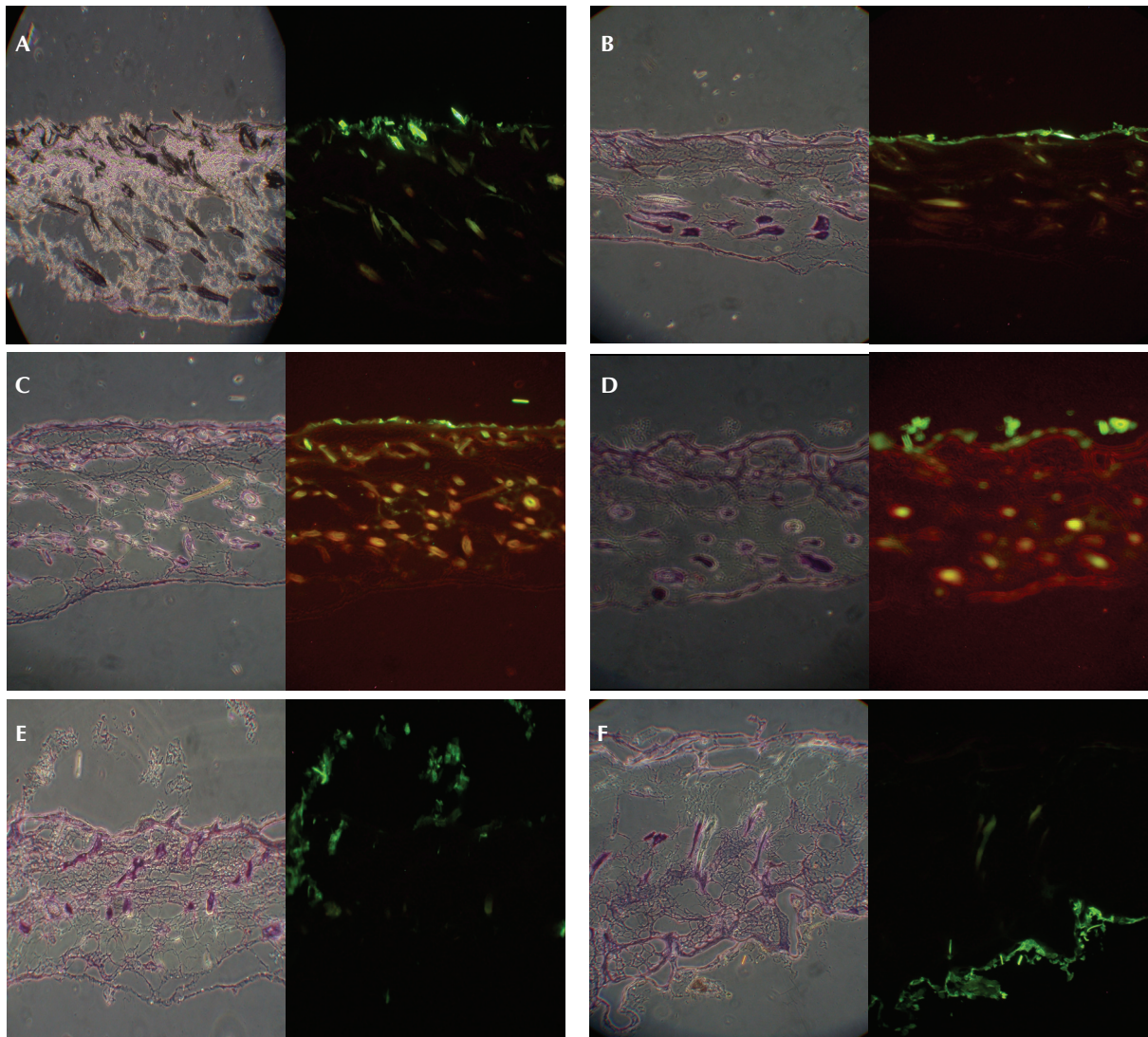


Fig 6 Fluorescence microscope images of nude mouse skin tissue treated with different sizes of collagen peptides and then stained with haematoxylin. A. 1,300 Da; B. 2,000 Da; C. 3,500 Da; D. 4,500 Da; E. unfractional mixture sample; F. blank. The left image represented without fluorescence.

3500 Da (5c) 及 4500 Da (5d) 分布量較多亦較廣，其次為 1300 Da (5a) 及 2000 Da (5b)，而混合組之膠原胜肽螢光小點則大都分布於裸鼠皮組織橫切片的上方 (5e)，至於對照組之影像圖中則未顯現出膠原胜肽的螢光小點。

將上述之冷凍組織切片再行蘇木素染色，以比對螢光標識魚鱗膠原胜肽穿透至裸鼠皮的相對位置，結果如 Fig. 6。在螢光影像圖 (右) 中可以清楚看出魚鱗膠原胜肽平均分子量分別為 3500 Da (6c) 及 4500 Da (6d) 的組織切片影像中有多量且明顯的螢光點分布，相較於無螢光之影像 (圖左) 觀察顯示，其螢光點所在的相對位置應為裸鼠皮的真皮層。而魚鱗膠原胜肽平均分子量分別為

1300 Da (6a) 及 2000 Da (6b) 之螢光點亦可達裸鼠皮的真皮層中，但其螢光點量比前 2 組少。另混合組之裸鼠皮組織切片影像圖則類似空白組其螢光點之分布量最少。

四、螢光標識魚鱗膠原胜肽對皮膚的穿透型態之觀察

雷射共軛焦顯微鏡是研究細胞動力學的新利器，藉由雷射激發多重染色的細胞檢體，在掃描器及軟體支援下，可做不同深度與連續性時間之影像掃描分析，因而能了解細胞立體以及作用時間分布之差異性，並可精確的找出細胞內各分子

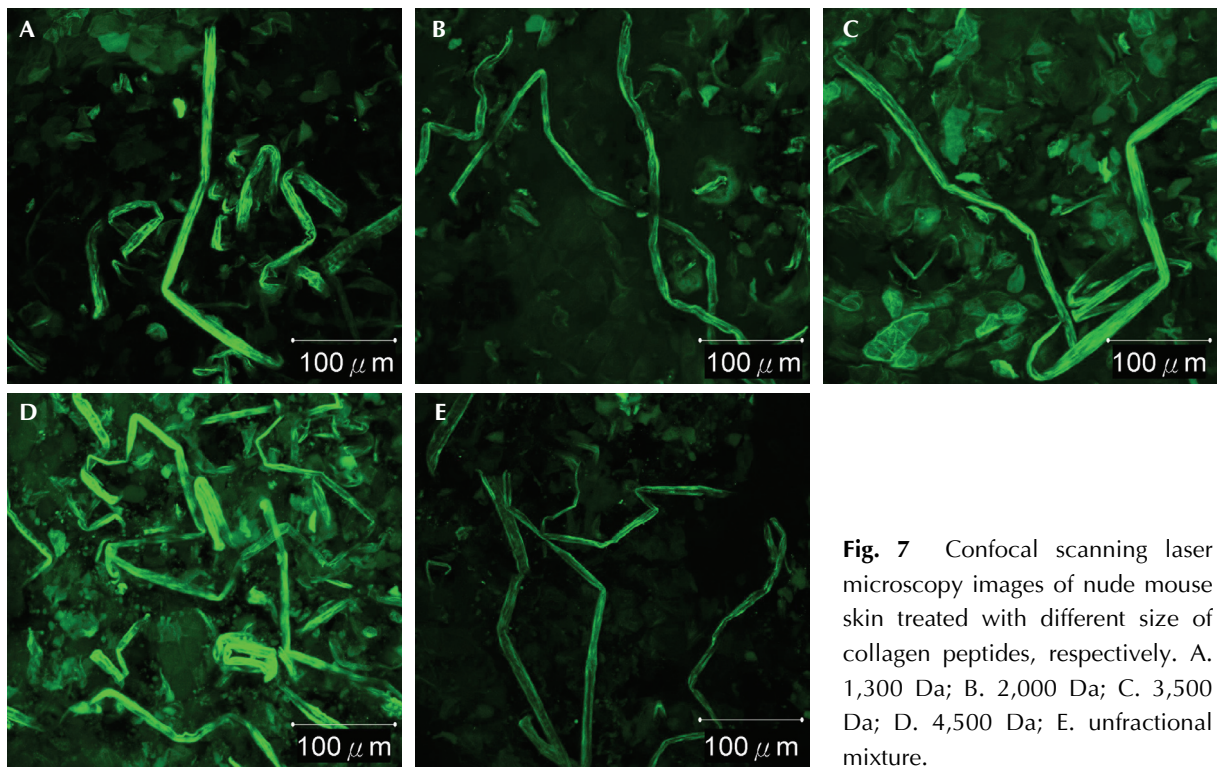


Fig. 7 Confocal scanning laser microscopy images of nude mouse skin treated with different size of collagen peptides, respectively. A. 1,300 Da; B. 2,000 Da; C. 3,500 Da; D. 4,500 Da; E. unfractional mixture.

間物質的傳遞過程與細胞內微組織的功能。

將螢光標識魚鱗膠原胜肽所穿透的裸鼠皮，以雷射共軛焦顯微鏡觀察位於真皮層的胜肽型態結果如 Fig. 7。魚鱗膠原胜肽其平均分子量為 3500 Da (7d) 及 4500 Da (7e) 的胜肽分子形態較長、有多處皺折且分子構形呈現捲曲狀。平均分子量為 1300 Da (7a) 及 2000 Da (7b) 的魚鱗膠原胜肽之分子形態較短、皺折少，而分子構形呈現直鏈狀。另混合組之胜肽分子構形也以直鏈型居多 (7e)。

由以上結果顯示，所有魚鱗膠原胜肽組皆可經皮吸收到達真皮層，其中以分子量分別為 3500 Da 和 4500 Da 的胜肽組對裸鼠皮的單位面積累積穿透量最高，同時經由螢光顯微照相圖觀察出，真皮層中有較多量的膠原胜肽螢光點分布。然依 Tanaka and Hasegawa (2005) 研究指出，以魚皮膠原蛋白經酵素處理、超過濾及膠過濾法分離製成平均分子量為 460 Da 及 950 Da 之膠原胜肽對 Yucatan Micropig 皮膚具有高度滲透性，可從表皮層滲入到真皮層甚至達皮下組織，而平均分子量為 3,500 Da 及 11,000 Da 之膠原胜肽則僅存在表皮層，幾乎無滲透入真皮層。又將滲透後之皮膚切片進行羧脯氨酸 (hydroxyproline; Hyp) 定量分析結果顯示，經皮吸收 24 hrs 後，以平均分子量

950 Da 組其真皮層中 Hyp 含量 (約 7.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 顯著高於其他各試驗組。此結果與本試驗所觀察的現象不同，推測係因魚鱗膠原蛋白經酵素水解後，破壞了蛋白質的四級、三級構造，而產生具有二級結構的膠原胜肽，而胜肽係由胺基酸分子間以胜肽鍵 ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$) 及分子內的氫鍵共同鍵結構成蛋白質的二級結構，而多胜肽鏈間的氫鍵及旋轉的立體障礙使得二級結構具有旋體 (α -helix)、摺板 (β -sheets) 和彎曲 (turn) 等不同構形，呈現不規則彎曲的狀態 (Crisma *et al.*, 2006 ; Rotondi and Gierasch, 2006)。然而膠原蛋白的胺基酸組成中含有 35% 的甘胺酸和 25% 脯胺酸與羧脯胺酸，甘胺酸殘基對於蛋白質的旋體結構有很好的彎曲能力，而脯胺酸的環狀結構迫使 ψ (表示 α 碳與羧基碳之間可旋轉的角度) 及 ϕ (α 碳與羧基氮的氮原子形成的旋轉角度) 偏離形成 α -helix 所需之值。同時也由於膠原蛋白的甘胺酸和脯胺酸含量很高，多肽鏈必須每 3 個胺基酸之間有 1 個甘胺酸以維持結構的穩定度，因此膠原胜肽遂形成構造層次介於二級和三級之間的超旋體立體結構。

本試驗中由雷射共軛焦顯微鏡所觀察到的魚鱗膠原胜肽的分子構形，平均分子量分別為 3500 Da 及 4500 Da 的分子形態較長、有多處皺折且分

子構形呈現捲曲狀。推測其結構可能介於蛋白質二級結構的彎曲構形或三級結構的球體構形，因此易通過皮膚細胞到達真皮層，使得經皮吸收 24 hrs 後有較高的單位面積累積穿透量。而平均分子量較小的膠原胜肽 (MW 2000 Da 及 MW 1300 Da) 之顯微鏡影像圖顯現其分子形態較短、皺折少，分子構形呈現直鏈狀，推測因其直鏈構形，使得該胜肽穿透皮膚時，其多肽鏈之胺基酸殘基上的荷電 (charge) 較多裸露而易與細胞膜作用，造成該胜肽穿透皮膚細胞的立體障礙，進而影響經皮吸收的速率，使其經皮吸收 24 hrs 之單位面積累積穿透量較低。又本試驗中以超過濾膜區分所製備的各試驗組，係為具有平均分子量的胜肽混合物，而非單一分子量胜肽，此可能是本試驗與其他報告指出分子量小的胜肽較易達真皮層的結果之不同所在。另本試驗係在探討分子量與經皮吸收之相關研究中，首先討論分子構形對經皮吸收之影響，而分子量、分子構形及經皮吸收三者之關係則待進一步研究。

結 論

本試驗中所有魚鱗膠原胜肽組皆可經皮吸收到達真皮層，並活化纖維母細胞以促進膠原蛋白之合成增生，而各試驗組中以平均分子量 3500 Da 和 4500 Da 的胜肽組其經皮吸收後單位面積累積穿透量最高，24 hrs 的平均值分別為 1986 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 1825 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。由以往的研究已證實分子量大小與經皮吸收的穿透量有關，然而經由本試驗則可進一步發現，除分子量的大小外，分子的構形可能也是影響經皮吸收的因素之一。

參考文獻

- 小山政養, 高橋美樹子, 柳川政美 (1995)。L-リシルーグリシルーL-ヒスチジンおよびこれを含む有する創傷治療劑。日本專利特開平 07-316192。
- 吳純衡, 蔡慧君 (2006) 魚鱗膠原蛋白及其製造方法。中華民國專利發明, 第 I 263678 號。
- Bennett, M. L. and R. L. Henderson (2003) Introduction to cosmetic dermatology. *Curr. Probl. Dermatol.*, 15: 43-83
- Brendan, A. H., L. H. Janet, C. C. M. S. Emillio and J. G. Lorna (2007) Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta Biomater.*, 3: 463-474.
- Crisma, M., F. Formaggio, A. Moretto and C. Toniolo (2005) Peptide helices based on α -amino acids. *Biopolymers*, 84: 3-12
- Gelse, K., E. Poschl and T. Aigner (2003) Collagen-structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55: 1531-1546.
- Gondaliya, D. and K. Pundarikakshudu (2003) Studies in formulation and pharmacotechnical evaluation of controlled release transdermal delivery system of Bupropion. *AAPS Pharm Sci. Tech.*, 4: 1-9
- Linke, R. D., M. Ulmer and A. B. Imhoff (2006) Replacement of the meniscus with a collagen implant (CMI). *Oper. Prthop. Traumatol.*, 18: 453-462.
- Kau, K., A. B. Juan, R. Rajendra, A. H. Kang and J. M. Seyer (1993) A pentapeptide from Type I procollagen promotes extracellular matrix production. *J. Biol. Chem.*, 268: 9941-9944.
- Matsuda, N., Y. Koyama, H. Ueda, T. Watanabe, T. Araya, S. Irie and K. Takehana (2006) Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 52: 211-215.
- Maquart, F. X., L. Pickart, M. Laurent, P. Gillery, J. C. Monboisse and J. C. Borel (1988) Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine- Cu^{2+} . *FEBS.*, 238: 343-346.
- Patriarca, M. T., K. Z. Goldman, J. M. D. Santos, V. Petri, R. S. Simoes, J. M. Soares, M. J. Simoes and E. C. Baracat (2007) Effects of topical estradiol on the facial skin collagen of postmenopausal women under oral hormone therapy: a pilot study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 130: 202-205
- Ronald, J. C. and S. B. Richard (1979) Comparison of mammalian collagen and elasmobranch elastoidin fiber structures, based on electron density profiles. *J. Mol. Biol.*, 130: 215-229
- Rotondi, K. S. and L. M. Gierasch (2006) Natural polypeptide scaffolds: β -sheets, β -turns, and β -hairpins. *Biopolymers*, 84: 13-22
- Tanaka, H. and S. Hasegawa (2005) Skin permeable collagen peptide preventing wrinkle formation induced by photoaging. *Bio Industry*, 22: 18-23
- Wickett, R. R. and M. O. Visscher (2006) Structure and function of the epidermal barrier. *Am. J. Infect. Control*, 34: 98-110.
- Wisser, D. and J. Steffes (2003) Skin replacement with a collagen based dermal substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma. *Burns*, 29: 375-380.

Study on the Fibroblasts Activation and Transdermal Permeation of Collagen Peptides from Fish Scales

Huey-Jine Chai^{*}, Jing-Hua Li and Chung-Heng Wu

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Oral collagen peptide could raise the density of the fibroblasts and increase the diameter and density of collagen fiber in derma of the skin to improve the skin quality. If the collagen peptide was directly applied to the skin, it must pass through the skin to activate the fibroblasts of dermis and to promote the collagen synthesis. In this study, the bioactivities of collagen peptides including activation ability of the fibroblasts and permeation ability of the skin were investigated. Collagen peptides were extracted and protease hydrolyzed from fish scales. The proliferation activities of the skin fibroblast induced by collagen peptides were evaluated by MTT assay. When the concentration of collagen peptides was 200 µg/mL, the proliferation activities of fibroblasts could be enhanced to 150% and the collagen synthesis ability could be increased to 250%. Four types of molecular weight (Mw) 4500, 3500, 2000 and 1300 Da were used for the investigating of the transdermal permeation ability through the Franz type diffusion cell model. The results showed that all sizes of the peptide samples could permeate into dermis. However, those at average Mw 3500 Da and 4500 Da collagen peptides had the higher amount of transdermal permeation than the others. In order to study the permeation of collagen peptides in the nude mice skin, the collagen peptides were labeled with fluorescence dye and then observed by confocal scanning laser microscopy. The fluorescence images showed that the collagen peptides ranging with Mw 3500 Da and 4500 Da had longer, more folding and coiling shapes, while those at average Mw 2000 Da and 1300 Da showed the shorter, less folding and straight shapes. These results suggested that application of the fish scales collagen peptides on skin could also activate fibroblasts and accelerate the collagen synthesis in the dermis to improve skin quality.

Key words: fish scales, collagen peptide, nude mouse skin, transdermal permeation

*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan, TEL: (02) 2462-2101; Fax: (02) 2462-3306; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw