

墨藻胶对皮肤水合及屏障功能的促进作用研究

卢伊娜, 杨雅迪, 谢智勇, 田 军
(上海珈叶实业有限公司, 上海 201100)

摘要:选择 14 例健康受试者对墨藻胶的保湿性能进行评价,发现连续使用墨藻胶 7 d 即可显著提升皮肤水分含量 (CM),降低经皮水分散失 (TEWL)。用墨藻胶处理角质细胞 24 h 后,通过实时荧光定量 PCR 技术与表皮水合及屏障相关的 6 个基因的 mRNA 表达水平,结果表明,墨藻胶可显著上调内披蛋白 (INV)、转谷酰胺酶 - 1 (TG - 1)、丝聚蛋白 (FLG) 和半胱天冬酶 - 14 (CASP - 14) 的 mRNA 表达水平。墨藻胶通过调节与表皮角化细胞套膜形成相关的基因表达,促进 FLG 降解成天然保湿因子,增强皮肤水合活性,改善皮肤屏障。

关键词:保湿化妆品添加剂;墨藻胶;皮肤屏障

中图分类号:TQ658.2 文献标识码:A 文章编号:1001 - 1803(2017)12 - 0709 - 04

DOI:10.13218/j.cnki.csdc.2017.12.011

Promoting effect of Gmoist Sea - Gel on skin hydration and barrier function

LU Yi - na, YANG Ya - di, XIE Zhi - yong, TIAN Jun
(Shanghai Greaf Biotech Co., Ltd., Shanghai 201100, China)

Abstract:The moisturizing performance of Gmoist Sea - Gel (GSG) was evaluated based upon 14 healthy volunteers. It was found that skin moisture content (CM) markedly increased and TEWL effectively decreased after Gmoist Sea - Gel (GSG) applied for 7 d. Then using real - time fluorescence quantitative PCR technology, HaCaT cells were cultured with GSG to study six genes expression level related to skin hydration and barrier function. Results show that GSG significantly promotes the INV, TG - 1, FLG and CASP - 14 mRNA's expression after 24 hour's treatment. GSG can upgrade cornified cell envelope related genes expression, promote the degradation of filaggrin into natural moisturizing factors to strengthen skin hydration and barrier function.

Key words:moisturizing cosmetic additive; Gmoist Sea - Gel; skin barrier

皮肤的屏障功能主要包括对物理、化学、生物及水分等的通透功能。正常的皮肤含水量为 20% ~ 35%,当皮肤含水量降至 10% 以下时,屏障功能即受损。皮肤屏障功能下降,会导致许多皮肤病如皮肤瘙痒症、特异性皮炎、银屑病、痤疮及干燥性皮肤的产生^[1-4]。

角质形成细胞在从基底层向上移至角质层的过程中,细胞器和细胞核消失,细胞膜间发生广泛的交联形成不溶性的坚韧外膜——角化细胞套膜 (CE)。同时,角质形成细胞合成多种脂类和与脂代谢相关的酶,通过板层小体将这些脂类和酶转运至颗粒层和角质层之间,与 CE 一起构成屏障功能的主要结构^[5,6]。兜甲蛋白 (LOR)、内披蛋白 (INV)、转谷酰胺酶 - 1 (TG - 1) 和丝聚蛋白 (FLG) 等是 CE 形成的重要结构蛋白^[7,8]。

并且 FLG 可在半胱天冬酶 - 14 (CASP - 14) 的作用下被分解成游离的氨基酸形成天然保湿因子 (NMFs),调节皮肤水合功能^[9]。水通道蛋白 (AQP) 是特异性转运水的蛋白家族,能显著增加细胞膜对水的通透性,参与水的分泌、吸收及细胞内外平衡的调节。研究^[10]表明水通道蛋白 - 3 (AQP - 3) 的甘油转运功能对皮肤的保湿、弹性及损伤后的屏障修复功能起着关键性的作用。墨角藻为一种褐藻,具有抗病毒、抗微生物、抗凝血、抗肿瘤、抗氧化和抗炎等作用。本研究将水提法获得的墨角藻提取物制备成墨藻胶,通过人体临床试验测定墨藻胶的保湿性能,再于角质细胞上对上述 6 个基因的 mRNA 表达水平进行研究,来阐述墨藻胶对皮肤水合及屏障的作用。

收稿日期:2017 - 09 - 18;修回日期:2017 - 12 - 06

作者简介:卢伊娜(1984 -),女,湖南人,硕士,电话:(021)64092975 - 8018, E - mail:inna@greif.com.cn。

通讯联系人:谢智勇,博士,电话:(021)64092975 - 8011, E - mail:berny@greif.com.cn。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

墨藻胶,上海珈叶实业有限公司;透明质酸粉末(分子量 160 万),新疆阜丰生物科技有限公司;人角质细胞(HaCaT),北纳创联(苏州)有限公司;DMEM 培养液、FBS、青霉素-链霉素、胰酶、PureLink[®]总 RNA 提取试剂盒、TaqMan[®]引物、TaqMan[®]RNA-to-CT[™]一步法试剂盒,美国 Thermo Fisher 公司;噻唑蓝(MTT)粉末,美国 Sigma 公司。CM-825 皮肤水分测试探头、TM-300 皮肤水分散失测试探头及 MPA 6 主机,德国 CK 公司;MultiSkán FC 酶标仪、Qubit 核酸定量仪,美国 Thermo Fisher 公司;ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪,上海兽医研究所大仪器平台。

$$CM \text{ 变化率} = [(CM_{\text{使用后}}/CM_{\text{使用前}} - 1)_{\text{墨藻胶组}} - (CM_{\text{使用后}}/CM_{\text{使用前}} - 1)_{\text{未处理组}}] \times 100\%$$

$$TEWL \text{ 变化率} = [(TEWL_{\text{使用后}}/TEWL_{\text{使用前}} - 1)_{\text{墨藻胶}} - (TEWL_{\text{使用后}}/TEWL_{\text{使用前}} - 1)_{\text{未处理组}}] \times 100\%$$

1.2.2 细胞活性测定

细胞活性采用 MTT 法^[13]进行测定。将 HaCaT 细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中孵育 24 h,之后加入不同质量分数的墨藻胶继续孵育 24 h。然后弃去 DMEM 培养液,加入 300 μ L 0.5 g/L 的 MTT 溶液,在 37 $^{\circ}$ C 下继续反应 3 h。弃去含 MTT 的培养液,加入 150 μ L DMSO 溶解细胞孔内的甲瓩颗粒,于酶标仪 490 nm 处检测吸光度(A)。细胞活性 = $A_{\text{墨藻胶组}}/A_{\text{未处理组}} \times 100\%$ 。

1.2.3 基因表达检测

将 HaCaT 细胞以 3×10^5 /孔接种于 6 孔板中孵育 24 h,之后加入不同质量分数的墨藻胶继续孵育 24 h。利用 PureLink[®]总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,测定核酸浓度及完整性,再以 500 ng 总 RNA 为模板,按照 TaqMan[®]RNA-to-CT[™]一步法试剂盒所提供的

1.2 实验方法

1.2.1 人体试验评价

选择正常健康受试者 14 人,其中男性 5 人,平均年龄约 31 岁;女性 9 人,平均年龄约 29 岁。测试期间温度为 (20 ± 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为 30%~60%。确定左右手前臂内侧为测试区域,面积为 3 cm \times 3 cm,共标记 3 个区域,分别为未处理组、质量分数为 10% 的墨藻胶组和质量分数为 0.2% 的透明质酸组,按 (2.0 ± 0.1) mg/cm² 的用量每天早晚使用 2 次,应用 CM-825 皮肤水分测试探头和 TM-300 皮肤水分散失测试探头分别检测使用前、使用 7 和 14 d 后各个区域的皮肤水分含量(CM)和经皮水分散失(TEWL)。每个区域分别检测 5 个点,取平均值^[11,12]。CM 和 TEWL 变化率通过以下公式计算:

方法,于 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上检测实时荧光值(CT)。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,根据相对定量法($2^{-\Delta\Delta CT}$)分别计算靶标基因 INV、LOR、FLG、CASP-14、TG-1 和 AQP-3 的相对表达量^[14-16]。 $-\Delta\Delta CT = (CT_{\text{靶标基因}} - CT_{\text{GAPDH}})_{\text{墨藻胶组}} - (CT_{\text{靶标基因}} - CT_{\text{GAPDH}})_{\text{未处理组}}$ 。

1.2.4 数据分析

采用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行统计分析,采用配对 *t* 检验对数据进行显著性分析。 $P < 0.05$ 认定为差异显著, $P < 0.01$ 认定为差异极其显著。

2 结果与讨论

2.1 墨藻胶提高 CM 及降低 TEWL 的作用

图 1 为不同时间下的 CM 和 TEWL 变化率。由图 1

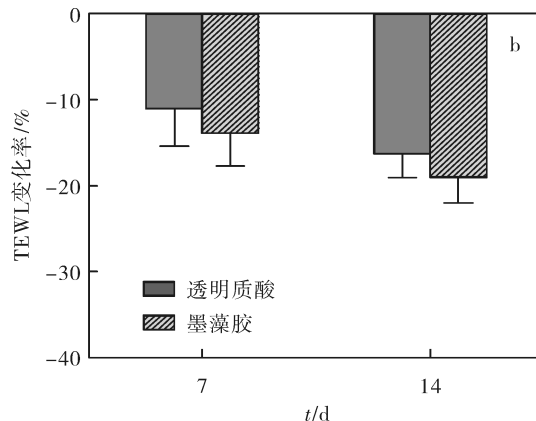
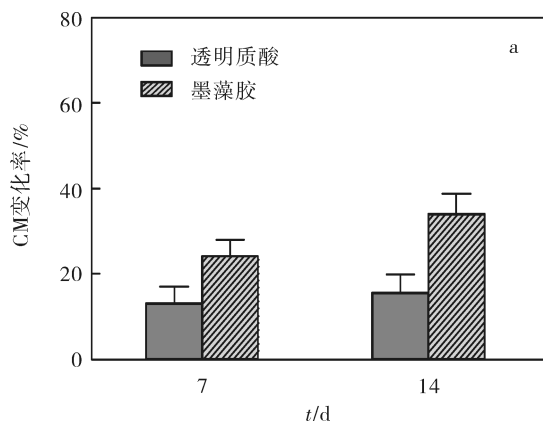


图 1 不同时间下的 CM 和 TEWL 变化率

Fig. 1 Changes of CM and TEWL at different time

可知,连续使用 7 d 后,相比于未处理组,墨藻胶能显著提高 CM,降低 TEWL。使用 14 d 后,墨藻胶持续提高 CM,降低 TEWL,其 CM 与使用前相比增加了 34.04% ($P < 0.01$),TEWL 与使用前相比降低了 19.06% ($P < 0.01$);且与透明质酸组相比,墨藻胶对 CM 的提高效果更强($P < 0.01$)。因此,墨藻胶具有明显提高皮肤含水量,修复皮肤屏障的保湿性能。

表 1 GSG 对 HaCaT 细胞活性的影响

Tab. 1 Effect of GSG on the activity of HaCaT cells

	$w(\text{墨藻胶})/\%$				
	0	0.3	1	3	10
细胞活性/ $\%$	100.0 \pm 0.6	98.62 \pm 11.81	53.07 \pm 8.73	13.25 \pm 1.89	2.83 \pm 0.77

2.3 墨藻胶对 CE 形成的刺激作用

将质量分数为 0.1% 和 0.3% 的墨藻胶加入 HaCaT 细胞共培养 24 h 后,收集细胞提取总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 仪对 LOR、INV、FLG 和 TG-1 的 mRNA 表达量进行测量,结果见图 2。由图 2 可知,0.3% 的墨藻胶处理细胞后,INV、FLG 和 TG-1 的 mRNA 表达量与未处理组相比分别增加了 2.1,1.0 和 0.6 倍($P < 0.05$),LOR 的 mRNA 表达量也有升高,与未处理组相比增加了 0.4 倍,但无显著差异。而其他研究显示,INV、LOR、FLG 和 TG-1 等 mRNA 表达量的增多,可促进 CE 的形成,增强皮肤屏障^[6,7]。

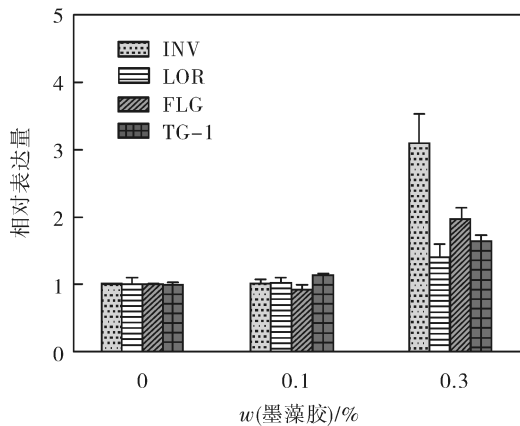


图 2 墨藻胶促进 CE 结构蛋白的 mRNA 表达

Fig. 2 GSG promotes the mRNA expression level of CE related proteins

2.4 墨藻胶对 NMFs 的刺激作用

NMFs 承担着皮肤保湿的重要任务,它吸收水分并且保持皮肤中的水合作用。而 NMFs 中的吡咯烷酮羧酸 (PCA) 和尿刊酸 (UCA) 主要来自于角质层中 FLG 的完全降解。因此,在皮肤的水合作用中,FLG 的降解比合成更加重要,而 CASP-14 是 FLG 降解中起关键作用的因子^[13,14]。研究发现,质量分数为 0.3%

2.2 墨藻胶对 HaCaT 细胞的毒性作用

不同质量分数的墨藻胶处理 HaCaT 细胞 24 h 后,MTT 法检测细胞活性发现,1% 的墨藻胶使 HaCaT 细胞活性降为 53.07%,而 0.3% 的墨藻胶对 HaCaT 细胞活性影响不大,结果见表 1。因此,选用质量分数为 0.3% 以下的墨藻胶对后续的基因表达进行分析。

的墨藻胶会显著上调 HaCaT 细胞中的 CASP-14 的 mRNA 表达,与未处理组相比增加了 3.3 倍($P < 0.05$,图 3),表明墨藻胶对于 FLG 降解成 NMFs 也有促进作用。

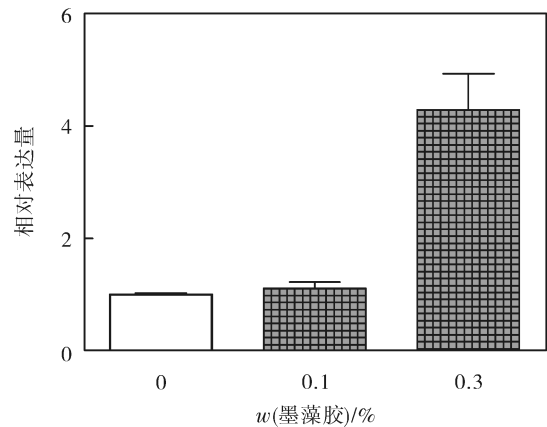


图 3 墨藻胶促进 CASP-14 的 mRNA 表达

Fig. 3 GSG promotes the mRNA expression level of CASP-14

2.5 墨藻胶对 AQP-3 的刺激作用

AQP-3 对皮肤水合及屏障功能也起着重要作用^[15,16]。如图 4 所示,与未处理组相比,质量分数为

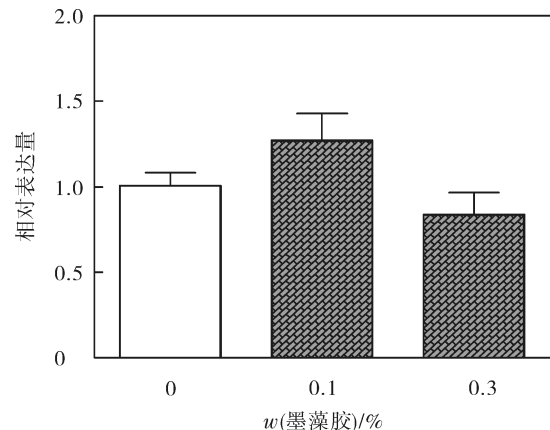


图 4 墨藻胶对 AQP-3 mRNA 表达的影响

Fig. 4 Influence of GSG on the mRNA expression level of AQP-3

0.1%的墨藻胶上调 AQP-3 的 mRNA 表达量至 1.27 倍,0.3%的墨藻胶下调 AQP-3 的 mRNA 表达量至 0.84 倍,但均无显著差异,说明墨藻胶并不具备明显促进 AQP-3 表达的作用。

3 结论

1)持续使用墨藻胶 7 d 即可显著增加皮肤 CM、降低 TEWL,使用 14 d 后相比透明质酸,墨藻胶具有更好地提升皮肤含水量的作用。

2)基因表达研究显示,墨藻胶不仅能够显著提高与 CE 形成相关的 INV、FLG 和 TG-1 的 mRNA 表达水平,还能显著上调 FLG 降解酶——CASP-14 的 mRNA 表达水平。

3)墨藻胶通过调节 CE 形成及 FLG 降解,促进皮肤水合、修复皮肤屏障,可作为一种天然植物类保湿剂在化妆品中广泛应用。

参考文献:

[1] 王学名,江以宏,周玉田,等. 化妆品皮肤保湿功能评价方法的研究[J]. 日用化学工业,2002,32(2):72-75.
 [2] 杜小豪,徐卫,杜雪洁. 护肤产品的保湿功能评价[J]. 日用化学工业,2000,30(3):47-52.
 [3] 高茂强,朱英华,刘之力,等. 表皮通透的屏障功能及其调节[J]. 中国皮肤性病学杂志,2008,22(4):250-253.
 [4] 何黎. 皮肤屏障与保湿[J]. 实用医院临床杂志,2009,6(2):25-27.
 [5] Mao-Qiang M, Feingold K R, Jain M, et al. Extracellular processing of phospholipids is required for barrier homeostasis [J]. Journal of Lipid Research, 1995, 36(9):1925-1935.
 [6] Jamnik M, Simon M N, Steven A C. Cornified cell envelope assembly: a model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density [J]. J Cell Sci, 1998, 111(8):1051-1060.

[7] Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(4):328-340.
 [8] Ginger R S, Blachford S, Rowland J, et al. Filaggrin repeat number polymorphism is associated with a dry skin phenotype [J]. Arch Dermatol Res, 2005, 297(6):235-241.
 [9] Hoste E, Kemperman P, Devos M, et al. Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2011, 131(11):2233-2241.
 [10] 熊正方,刘慧姝. 水通道蛋白 3 功能的研究动态[J]. 中华生物医学工程杂志,2008,14(5):391-393.
 [11] 中华人民共和国工业和信息化部. 化妆品保湿功效评价指南: QB/T 4256-2011 [S]. 北京:中国标准出版社,2011.
 [12] 余慧,李琼,张婉萍,等. 3 种保湿剂对皮肤性能影响研究[J]. 日用化学工业,2013,43(2):139-143.
 [13] Woo S K, Rhim D B, Kim C, et al. Effect of standardized boesenbergia pandurata extract and its active compound panduratin a on skin hydration and barrier function in human epidermal keratinocytes [J]. Prev Nutr Food Sci, 2015, 20(1):15-21.
 [14] Grether-Beck S, Felsner I, Brenden H, et al. Urea uptake enhances barrier function and antimicrobial defense in humans by regulating epidermal gene expression [J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(6):1561-1572.
 [15] Fernández J R, Webb C, Rouzard K, et al. N-Acetylglutaminoyl-S-farnesyl-L-cysteine (SIG-1191): an anti-inflammatory molecule that increases the expression of the aquaglyceroporin, aquaporin-3, in human keratinocytes [J]. Arch Dermatol Res, 2017, 309(2):103-110.
 [16] Tito A, Bimonte M, Carola A, et al. An oil-soluble extract of *Rubus idaeus* cells enhances hydration and water homeostasis in skin cells [J]. International Journal of Cosmetic Science, 2015, 37(6):588-594.

(编辑:杨旭)

《日用化学工业》报道重点

表面活性剂

- 1) 两亲分子有序组合体及应用基础研究;
- 2) 新型/“绿色”表面活性剂的制备工艺、清洁生产和产品性能;
- 3) 表面活性剂领域的新理论、新概念、新方法、新观点和新技术等;
- 4) 表面活性剂在各领域(如造纸、皮革、纺织、化妆品、农药、医药、油田等)的应用技术,特别是在高新技术领域(如生命科学、生态与环境工程、纳米材料、脂质体等)中的应用。

洗涤用品及洗涤助剂

- 1) 无磷及低磷洗涤剂的配制、性能与应用;
- 2) 多功能洗涤剂(如抑菌、消毒、加酶、加香、漂白、柔软、防污)和专用洗涤剂(如家庭及个人清洁剂、工业及公共设施用

清洗剂等)的配方技术;

- 3) 洗涤用品的国内外技术、市场现状及发展趋势;
- 4) 新型助剂的研发与应用等。

化妆品、口腔卫生用品

- 1) 功能性新产品(如防晒、美白、抗衰老、去斑、去皱、去牙石、除臭、除烟渍等)的研制及其产品的功效、药理、病理作用的研究;
- 2) 化妆品、口腔卫生用品的国内外技术、市场现状及发展趋势。

香精香料

- 1) 香料的合成及性能等;
- 2) 天然香料的提取及性能等;
- 3) 香精的配制技术及在日化工业中的应用。