

•基础研究•

•论著•

## 海藻糖敷料对激光损伤兔皮肤屏障功能的修复及体外促细胞生长、迁移和抗炎作用研究

肖敏<sup>1</sup>, 陈重华<sup>2,3,4</sup>, 王燕<sup>2,3,4</sup>, 李里<sup>1</sup>, 朱炜炜<sup>1</sup>

[1.四川大学华西医院临床药理学部(药剂科) 四川 成都 610041; 2.四川大学华西药学院靶向药物及释药系统教育部重点实验室 四川 成都 610041; 3.四川大学华西药学院四川省天然药物重点实验室 四川 成都 610041; 4.四川大学华西药学院四川省精细化工技术研究中心 四川 成都 610041]

**[摘要]**目的: 探究海藻糖敷料对激光损伤兔动物模型皮肤的修复作用, 并探索其体外促细胞生长、迁移和抗炎作用。方法: 试验兔脊柱两边各脱毛4个区域, 随机分为正常组(N)、模型组(M)、对照组(P)和实验组(T)。除正常组外, 其余各组使用激光照射造模; 对照组及实验组分别使用透明质酸敷料及海藻糖敷料贴敷。于第0天、第3天、第7天、第14天和第21天对创面进行红斑和焦痂、水肿程度评分, 以评价海藻糖敷料对皮肤修复效果。以L929细胞及HaCaT细胞为研究对象探索海藻糖敷料体外促细胞生长、迁移和抗炎作用。将细胞分为空白组(培养基)、正常组(细胞液+培养基)、对照组(细胞液+培养基+透明质酸)及实验组(细胞液+培养基+海藻糖)。使用MTT比色法检测各组L929细胞24 h、48 h及72 h增殖率, 划痕试验检测各组L929细胞6 h、12 h和24 h迁移率; 使用TNF- $\alpha$ 及IFN- $\gamma$ 诱导HaCaT细胞建立炎症反应模型后, 24 h后检测各组IL-6、IL-8和MDC表达水平。结果: 创面给予敷料后7 d, 实验组水肿评分[(1.1 $\pm$ 0.3)分]较模型组[(1.2 $\pm$ 0.4)分]显著降低( $P<0.05$ ); 第14天, 相较于模型组, 实验组及对照组水肿、红斑焦痂评分有下降趋势但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。病理结果显示, 对照组、实验组较模型组第14天炎细胞浸润微有减少。细胞实验结果显示, 与正常组相比, 对照组和实验组4 h、48 h及72 h的细胞增殖率均有明显增加; 与正常组相比, 对照组及实验组6 h、12 h和24 h的细胞迁移率均有明显增加( $P<0.05$ ); 与细胞炎症模型组相比, 实验组细胞上清液中IL-6、IL-8和MDC的表达水平明显降低( $P<0.01$ )。结论: 海藻糖敷料对激光所致兔皮肤屏障受损创面的组织炎症、愈合有一定修复作用; 其机制可能与其能促进细胞增殖、细胞迁移及抑制炎症的功能相关。

**[关键词]**海藻糖; 激光术; 皮肤修复; 细胞增殖; 细胞迁移; 炎症

**[中图分类号]**R751.05 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2024)11-0001-05

## Research of the Effects of Trehalose Dressing on Skin Repair after Laser Surgery in Rabbits and Its Effects on Cell Proliferation, Migration and Anti-inflammatory in Vitro

XIAO Min<sup>1</sup>, CHEN Zhonghua<sup>2,3,4</sup>, WANG Yan<sup>2,3,4</sup>, LI Li<sup>1</sup>, ZHU Weiwei<sup>1</sup>

[1. Department of Pharmacy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China; 2. Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery System (Sichuan University) Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China; 3. Sichuan Engineering Laboratory for Plant-Sourced Drug, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China; 4. Sichuan Research Center for Precision Industrial Technology, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China]

**Abstract:** **Objective** To evaluate the effects of trehalose dressing on skin repair after laser surgery in rabbits, and to explore its effects on cell proliferation, migration and anti-inflammatory in vitro. **Methods** Four areas of hair were removed on each side of the spine in rabbits, which were randomly divided into normal group (N), model group (M), control group (P) and experimental group (T). Except for the normal group, rabbits in the rest of the groups were irradiated by laser. The control group and the experimental group was treated by hyaluronic acid dressing and trehalose dressing respectively. To evaluate the effect of trehalose dressings on skin repair, erythema, eschar and edema was scored on day 0, 3, 7, 14, 21. L929 cells and HaCaT cells were used to explore effects of trehalose on cell proliferation, migration and anti-inflammatory in vitro. Cells were divided into blank group (cell culture medium, CCM), normal group (cell+CCM), control group (cell+CCM+ hyaluronic

acid) and experimental group (cell+CCM+trehalose). The growth of L929 cells was assayed by MTT method at 24h,48h and 72 h. The migration of L929 cells was assayed by cell scratch experiment at 6 h,12 h and 24 h. Level of IL-6, IL-8 and MDC was tested after TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  induced inflammation in HaCaT cells after 24h. **Results** On the 7th day, the edema score ( $1.1\pm0.3$ ) in the experimental group was significantly lower than that in the model group ( $1.2\pm0.4$ ) ( $P<0.05$ ). On the 14th day, the edema, erythematous and eschar score of the experimental group and the control group had a downward trend compared with the model group, but there were no significant difference ( $P>0.05$ ). The pathological results showed that, on the 14th day, the control group and the experimental group were slightly reduced in inflammatory cell infiltration compared with the model group. Results of cell experiment showed that compared with the normal group, proliferation rate of L929 cells was significantly increased in control group and experimental group at 24 h, 48 h and 72 h ( $P<0.05$ ). Compared with the normal group, migration rate of L929 cells was significantly increased in control group and experimental group at 6 h,12 h and 24 h ( $P<0.05$ ). Compared with the cellular inflammatory model group, level of IL-6, IL-8 and MDC was significantly decreased in experimental group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Trehalose have a certain repair effect on tissue inflammation and healing of laser-induced rabbit skin damage which may be related to its ability to promote cell proliferation, cell migration, and inhibit inflammation.

**Key words:** trehalose; laser surgery; skin repairing; cell proliferation; cell migration; inflammation

近年来, 激光治疗广泛用于去除色斑、瘢痕痤疮治疗、除皱及改善光老化等皮肤问题。因其微创、治疗痛苦小、治疗效果佳等优势已成为医疗美容领域的热点<sup>[1]</sup>。但激光治疗术后会形成类似轻度烧伤的创面, 引起皮肤红斑、水肿, 甚至渗血、脱屑、色素沉着、瘢痕形成等<sup>[2]</sup>。创伤修复过程中, 成纤维细胞是参与修复的重要细胞, 该细胞的增殖与迁移是组织修复与纤维化的重要病理基础<sup>[3]</sup>。表皮角质形成细胞 (HaCaT细胞) 为构成皮肤表皮的主要细胞, 主要起到抵御外源性损伤的作用, 当皮肤受到刺激后, HaCaT细胞会产生多种细胞因子, 诱导炎症级联反应<sup>[4]</sup>; 若炎症因子过度活化, 则会使成纤维细胞向组织局部大量迁移、侵袭, 这是形成组织瘢痕及组织纤维化的主要因素之一<sup>[5]</sup>。

海藻糖是由两个葡萄糖分子通过 $\alpha, \alpha-1, 1$ 糖苷键连接的非还原性二糖, 具有非特异性的抗脱水、抗冷冻、抗高渗保护、抗氧化、保湿等功能<sup>[3]</sup>, 目前已广泛用于日化产品中, 在激光术后皮肤修复方面可能具有一定作用。本研究使用激光制造兔皮肤屏障损伤模型, 评价海藻糖皮肤损伤修复作用; 并以小鼠上皮炎成纤维细胞 (L929细胞) 为研究对象探索其体外对成纤维细胞增殖、迁移影响, 以HaCaT细胞为研究对象, 探索其体外抗炎作用, 为海藻糖敷料用于激光术后皮肤修复提供理论依据。

## 1 资料和方法

1.1 试验动物及细胞、主要试剂与仪器: 普通级新西兰兔14只, 2.0~2.5 kg, 雌雄各半, 由邳州市东方养殖有限公司提供, 合格证号为SCXK (苏) 2017-0002。L929细胞 (小鼠上皮炎成纤维细胞) 由四川大学华西药学院孙逊教授实验室赠予。HaCaT细胞 (人永生角质形成细胞) 由四川大学基础医学与法医学院张舒羽教授赠予。DMEM培养基, 批号319-005-CL, WISENT (Canada); 二甲亚砜 (DMSO), 批号2094C359, Amresco (USA); Penicillin-

Streptomycin, 批号SK180925, MRC (Netherlands); 胎牛血清, 批号10099, Gibco Thermo Fisher Scientific, Inc.; DMEM, 批号319-005-CL, WISENT (Canada); 胰酶, 批号SNT-001, 尚恩生物 (中国武汉); 海藻糖敷料 (产品名称: 皮肤修护无菌敷料, 陕械注准20212140098, 211201, 西安德诺海思); 透明质酸敷料 (产品名称: 皮肤修护敷料, 陕械注准20142140032, 211148, 陕西佰傲再生医学); MTT (HY-15924, 美国MCE); 人白细胞介素6 (IL-6); 酶联免疫分析试剂盒 (SP10234, 塞培生物); 人巨噬细胞来源的趋化因子 (MDC) 酶联免疫分析试剂盒 (SP10226, 塞培生物); IFN- $\gamma$  蛋白 (HY-P7025, 美国MCE); TNF- $\alpha$  蛋白 (HY-P7058, 美国MCE); 家用激光笔, 型号DH-006, 广州市白云区韩大电子厂造; 切片机, Leica Rm2235、Leica-Asp200型全自动封闭式组织脱水机、Leica-EG1160型石蜡包埋机、Leica HI1220型病理组织烤片机, 均由德国徕卡公司生产; ST-360酶标仪 (上海科华); SW-CJ型洁净工作台 (苏州安泰); MC0-15AC型二氧化碳孵箱 (日本Sanyo); OBSERVER D1/AX10 cam HRC倒置显微荧光镜 (德国卡尔蔡司); BDS 300倒置生物显微镜 (重庆奥特); L500台式低速离心机 (湖南湘仪); DK-8AXX电热恒温水槽 (上海恒科)。

## 1.2 方法

1.2.1 皮肤修复试验: 14只新西兰兔, 脊柱两边各脱毛4个区域 ( $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ ), 随机分为正常组 (N)、模型组 (M)、对照组 (P) 和实验组 (T)。除正常组外, 其他组使用激光笔 $90^\circ$  垂直于背部脱毛区域照射, 每次照射前在照射部分涂抹冷凝胶进行保护, 最终使皮肤出现灼伤, 呈较严重红斑, 形成浅表性损伤。造模后, 按照分组贴敷样品: 对照组贴透明质酸敷料, 实验组贴海藻糖敷料, 正常及模型组不做处理, 每次贴敷20 min, 第1周每天贴敷1次, 之后第10天贴敷1次, 共计9次。参考《化妆品安全技术规

范》(2015年版)“皮肤刺激性/腐蚀性试验”评分标准,于0 d、3 d、7 d、14 d和21 d对创面进行红斑和焦痂、水肿程度评分,以考察创面恢复情况。在各观察点进行创面及周围皮肤全层皮下组织取材,福尔马林液固定,石蜡包埋并切片后进行HE染色,光学显微镜下观察皮肤屏障损伤修复及炎症恢复情况。

1.2.2 MTT比色法检测L929细胞增殖率: L929细胞培养于含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基中,保持培养箱37℃、5% CO<sub>2</sub>、pH值7.2~7.4,相对湿度95%~98%;取处于对数生长期的L929细胞,胰酶消化、离心,调整细胞浓度约为1×10<sup>4</sup>个/毫升。分别设空白组(仅含培养基)、正常组(细胞液+培养基)、对照组(细胞液+培养基+透明质酸原液)、实验组(细胞液+培养基+海藻糖原液),其中透明质酸原液及海藻糖原液:培养基=1:9(V/V)。

于空白组孔中加入200 μl培养基,其余组各孔中加入200 μl细胞液,置孵箱孵育过夜,待细胞贴壁后,弃去每孔(除空白组)中的培养基。加样孔分别加入已经配好的样液200 μl。加样完成后CO<sub>2</sub>孵箱中放置24 h、48 h、72 h后每孔加入MTT 20 μl,继续孵育3 h后弃去含MTT的细胞培养液,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl后置摇床低速震荡10~15 min,使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪490 nm处测定各孔吸光度OD值,计算细胞增殖率<sup>[7]</sup>:细胞增殖率=(加样组OD值-正常组OD值)/正常值OD值×100%。

1.2.3 划痕试验检测L929细胞迁移力: L929细胞培养同1.2.2。将细胞接种到12孔板中(1×10<sup>4</sup>个/孔),分为:正常组(细胞液+培养基)、对照组(细胞液+培养基+透明质酸原液)及实验组(细胞液+培养基+海藻糖原液)。置孵箱孵育,待其完全贴壁且长满孔板后,用1 ml注射器针头沿孔板中轴垂直划线,用PBS清洗3次去除脱落细胞。更换无血清培养基培养和含样品无血清培养基培养24 h,于0、6、12、24 h在10倍光学显微镜下拍照。用PS软件测量0、6、12、24 h后的划痕面积,计算细胞迁移率<sup>[7]</sup>:细胞迁移率=固定划痕区细胞移行总面积/初始划痕面积×100%。

1.2.4 IL-6、IL-8和MDC表达水平测定<sup>[8]</sup>: 使用TNF-α及IFN-γ诱导HaCaT细胞,建立细胞炎症模型,检测各组IL-6、IL-8及MDC的表达水平。HaCaT细胞培养方法同上述L929细胞。分为空白组(培养基)、正常组(细胞液+培养基)、模型1组(细胞液+培养基+TNF-α)、模型2组(细胞液+培养基+IFN-γ)、实验1组(细胞液+培养基+TNF-α+海藻糖原液)、实验2组(细胞液+培养基+IFN-γ+海藻糖原液)。

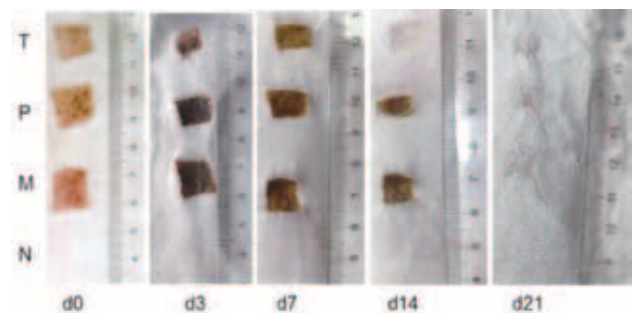
将HaCaT细胞接种于六孔板中,10<sup>6</sup>个/孔,37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下过夜培养。细胞贴壁后,弃培养基,PBS清洗2次,加入不含血清DMEM培养基2 ml。模型组和实验组均先加入TNF-α及IFN-γ造模,终浓度均为10 ng/ml,正常组及空白组加入等量PBS。实验组中取海藻糖敷料原液,按1:9比例加入细胞培养基中。37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养24 h后

收集细胞培养上清液。按ELISA试剂盒说明书检测上清液中IL-6、IL-8和MDC表达水平。

1.3 统计学分析: 数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用单因素方差分析比较多组之间的平均数。作图使用Graph pad Prism 5.0,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 皮肤修复影响: 激光造创后,皮肤肉眼可见较严重淡褐红色灼伤斑,3 d内红斑颜色加深、结痂并伴有轻微水肿,第4~7天持续伴有红斑结痂和水肿,第8天痂壳开始逐渐脱落,创面范围慢慢缩小,水肿程度徐徐减轻,第21天红斑结痂、水肿消失,创面完全愈合。见图1。创面给予敷料后7 d,模型组和对照组水肿评分比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),实验组水肿评分显著低于模型组( $P < 0.05$ )。第14天,相较于模型组,对照组及实验组水肿评分有下降趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );相较于模型组,对照组及实验组红斑焦痂评分也有下降趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1~2。病理结果显示:造创后第0天,模型组表皮和部分真皮凝固性坏死,真皮胶原纤维肿胀,结构紊乱,可见极少量炎细胞浸润,说明激光照射可损伤皮肤结构,并引发炎症,提示造模成功。模型组、对照组和实验组在造创后第3天均可见表皮和部分真皮凝固性坏死,大量炎细胞浸润及部分肉芽组织填充;第7天出现部分上皮化和角质化;第14天三组均完全上皮化及角化,对照组、实验组较模型组炎细胞浸润微有减少;第21天三组均有较多毛囊和胶原纤维形成。见图2。



注: N. 正常组; M. 模型组; P. 对照组; T. 实验组

图1 激光损伤兔皮肤屏障后创面愈合情况

表1 激光损伤兔皮肤屏障后红斑焦痂评分变化 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

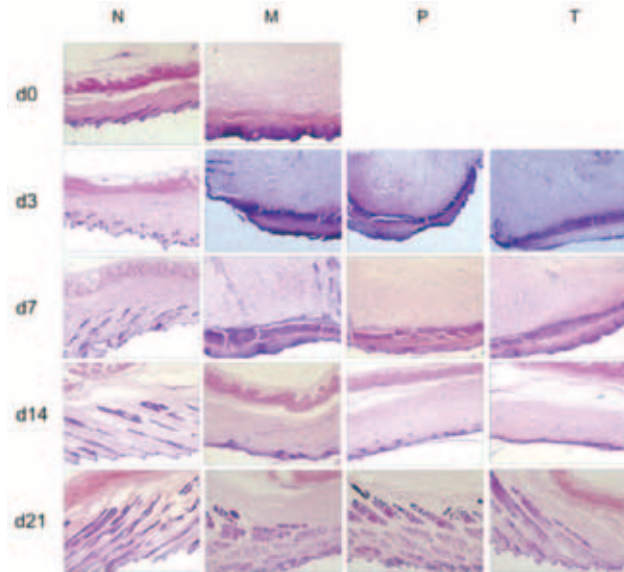
时间	正常组	模型组	对照组	实验组
造模前	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
d0敷药后	0.00±0.00 <sup>a</sup>	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
d3敷药后	0.00±0.00 <sup>a</sup>	3.13±0.34	3.13±0.34	3.13±0.34
d7敷药后	0.00±0.00 <sup>a</sup>	3.85±0.49	3.90±0.31	3.85±0.49
d14敷药后	0.00±0.00 <sup>a</sup>	2.00±0.97	1.75±1.18	1.31±0.48
d21	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

注: <sup>a</sup>表示与同时段其他三组相比,  $P < 0.05$ 。



表2 激光损伤免皮肤屏障后水肿评分变化 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

时间	正常组	模型组	对照组	实验组
造模前	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
d0敷药后	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
d3敷药后	0.00±0.00 <sup>a</sup>	1.54±0.51	1.50±0.51	1.42±0.50
d7敷药后	0.00±0.00 <sup>a</sup>	1.20±0.41	1.20±0.41	1.10±0.31 <sup>a</sup>
d14敷药后	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.50±0.52	0.31±0.48	0.25±0.45
d21	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

注: <sup>a</sup>表示与同时段其他三组相比,  $P < 0.05$ 。

注: N.正常组; M.模型组; P.对照组; T.实验组

图2 造创后第1、3、7、14和21天各组皮肤病理切片(HE染色, 40×)

2.2 细胞增殖率影响: 在24 h、48 h及72 h, 对照组、实验组的细胞增殖率均高于正常组(均 $P < 0.05$ ), 对照组与实验组细胞增殖率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表3。

表3 各组L929细胞增殖率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

给样时间	正常组/%	对照组/%	实验组/%
24 h	0.00±0.00	8.47±2.25*	12.60±3.21***
48 h	0.00±0.00	13.26±1.31***	14.64±2.96***
72 h	0.00±0.00	9.36±4.42*	11.53±5.26**

注: 与同时段正常组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

2.3 细胞迁移力影响: 在6 h、12 h和24 h, 对照组、实验组的细胞迁移力均高于正常组(均 $P < 0.05$ ), 对照组与实验

组细胞迁移力比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表4。

表4 各组L929细胞迁移率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

给样时间	正常组/%	对照组/%	实验组/%
0 h	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
6 h	0.00±0.00	0.36±0.17*	0.51±0.09*
12 h	0.03±0.05	1.42±0.33*	1.32±0.07*
24 h	0.23±0.40	2.27±0.13*	2.53±0.14*

注: \*表示与同时段正常组相比,  $P < 0.05$ 。

2.4 炎症因子影响: 与正常组相比, 模型1组细胞上清液中IL-6、IL-8和MDC的表达水平明显升高(均 $P < 0.001$ ), 与模型1组相比, 实验1组细胞上清液中IL-6、IL-8和MDC的表达水平明显降低(均 $P < 0.001$ ), 实验1组与正常组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与正常组相比, 模型2组细胞上清液中IL-6、IL-8和MDC的表达水平明显升高(均 $P < 0.001$ ), 与模型2组相比, 实验2组细胞上清液中IL-6、IL-8和MDC的表达水平也明显降低( $P < 0.01$ )。见表5。

### 3 讨论

选择性光热作用理论是激光治疗的理论基础, 运用激光器发出特定的波长的光波, 作用于皮肤靶组织, 光能在皮肤靶组织中被吸收并转化为热能, 使靶组织被破坏或剔除。虽然激光治疗具有疗效好、副作用小、治疗安全性高等优点, 但术后护理措施不恰当, 红斑、感染、色素沉着、瘢痕形成等不良反应风险将增加。针对激光术后的护理, 除了常规的冰敷、防晒等措施外, 市场上能确切缓解激光术后皮肤损伤及促进皮肤修复的产品较少<sup>[10]</sup>。目前, 该类产品主要以含透明质酸的产品为主, 少部分产品以含胶原蛋白、甘油等为主; 且大部分的医用功能性敷料不含有修复液, 因此在促进创面细胞恢复方面无明显优势<sup>[11]</sup>。

在高温、高压、干燥等恶劣条件下, 海藻糖可通过稳定细胞膜、维持蛋白质等大分子物质的活性, 继续维持生命过程和有机体生物学特征, 因此它有“生命之糖”的称号。该功能使得海藻糖可用于疫苗、血清、细胞甚至器官的保存。其膜保护机制主要有三种假说: 水替代学说、玻璃转换学说及优先排阻学说<sup>[12]</sup>。水替代学说认为海藻糖通过替代细胞膜中的水分与膜上磷脂等结构结合来维持细胞的结构; 玻璃转换学说认为海藻糖会在高温下形成运动微

表5 各组HaCaT细胞IL-6、IL-8及MDC的表达水平

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

指标	TNF- $\alpha$			IFN- $\gamma$		
	正常组/%	模型1组/%	实验1组/%	正常组/%	模型2组/%	实验2组/%
IL-6	100.00±0.00	131.80±3.29***	102.69±5.58***	100.00±0.00	127.64±6.12***	104.25±2.36***
IL-8	100.00±0.00	136.62±8.56***	103.02±2.60***	100.00±0.00	119.88±3.96***	104.01±1.45**
MDC	100.00±0.00	129.78±3.13***	100.16±2.09***	100.00±0.00	125.78±3.53***	102.40±2.33***

注: 与正常组相比, \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型1组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型2组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

弱、扩散系数低的玻璃态，从而保护蛋白质的高级结构；优先排阻学说认为海藻糖不是直接结合生物分子而是将残留水阻滞在生物分子之间来发挥作用<sup>[12]</sup>。同时，有研究报道了海藻糖还具有促细胞生长的作用，但其机制尚不清楚<sup>[13]</sup>。因此，海藻糖敷料可能对激光术后皮肤修复具有一定效果。本实验将兔使用激光造模后，评估其对创面水肿、红斑及焦痂效果，结果显示：造创后7 d，实验组较模型组水肿评分明显降低，而对照组水肿评分降低不明显；造创后14 d，实验组及对照组较模型组炎细胞浸润均微有减少；上述结果提示海藻糖敷料较透明质酸在激光术后皮肤水肿修复效果更佳，同时可能有促进炎症消退的作用。

伤口的愈合包含止血期、炎症期、上皮形成期、纤维增生期和成熟期<sup>[14-15]</sup>。在炎症反应阶段，中性粒细胞、巨噬细胞等移行至伤口处，同时炎症反应因子释放，导致组织水肿；炎症期通常在3 d内结束，感染等因素可造成炎症期延长、伤口愈合减慢<sup>[16]</sup>。在上皮形成阶段，基底细胞增殖和上皮细胞移行是两个重要事件，该过程最终形成上皮浅层，阻挡细菌和其他异物<sup>[17]</sup>。

本文从细胞生长、迁移及炎症因子水平影响方面进行进一步研究。结果显示，海藻糖组细胞增殖率及迁移率相较于正常组均有明显升高，IL-6、IL-8及MDC的表达水平均较细胞炎症模型组显著降低，提示海藻糖敷料促进激光术后皮肤修复的机制可能为：①促进上皮细胞的增殖与迁移；②抑制炎症因子如IL-6、IL-8和MDC等的释放，减轻炎症反应，加速皮肤修复。因此，海藻糖敷料对于激光术后皮肤修复可能具有一定效果。

#### 参考文献

- [1] 赵文鲁, 王华清. 多激光联合技术在面部美容方面的应用[J]. 世界复合医学, 2021,7(7):4-7.
- [2] 孙林潮, 高天文. 现代激光美容存在的问题与对策[J]. 中国美容医学, 2005,14(5):604-606.
- [3] 张钰莹, 单颖. 激活素A对L929成纤维细胞迁移、侵袭及细胞因子分泌的影响[J]. 免疫学杂志, 2022,38(1):22-29.

- [4] 马梦圆, 程紫萍, 孙鲁宁, 等. 兰索拉唑致皮肤炎症的机制研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022,42(2):178-183.
- [5] 刘宗利, 王乃强, 刘峰, 等. 海藻糖在日化领域的应用研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2015,23(2):18-20.
- [6] 李笃军, 阚氏海, 唐善. 阿司匹林和吡哆美辛抑制胃癌细胞株MGC803细胞增殖实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016,23(20):1351-1354.
- [7] Sudsai T, Wattanapiromsakul C, Tewtrakul S. Wound healing property of isolated compounds from Boesenbergia kingii rhizomes[J]. J Ethnopharmacol, 2016,184:42-48.
- [8] 陈颖. 血清白介素-6、白介素-8、超敏C反应蛋白测定在急性冠脉综合征中的临床意义[J]. 中国社区医师(综合版), 2007,21(20):116.
- [9] 陈鹏, 杨时昕. 应用激光治疗炎症后色素沉着的研究进展[J]. 中国美容医学, 2021,30(7):176-181.
- [10] 马骁. 透明质酸钠和胶原蛋白在激光术后皮肤护理品中的应用研究[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [11] 韦克基, 陆银玲, 韦雪莲. 医用促愈功能性敷料联合点阵激光治疗痤疮凹陷性瘢痕的疗效及对患者生活质量的影响[J]. 中国美容医学, 2023,32(1):95-98.
- [12] 刘念, 曾添翼, 江凌, 等. 新型功能性低聚糖海藻糖的制备和应用开发进展[J]. 生物加工过程, 2020,18(5):650-657.
- [13] 任舒文, 管华诗. 海洋生物活性提取物在化妆品中的应用[J]. 中国海洋药物, 2007,116(2):47-51.
- [14] Diegelmann R F, Evans M C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing[J]. Front Biosci, 2004,9:283-289.
- [15] Koh T J, DiPietro L A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage[J]. Expert Rev Mol Med, 2011,13:e23.
- [16] Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, et al. Vimentin is secreted by activated macrophages[J]. Nat Cell Biol, 2003,5(1):59-63.
- [17] Darby I A, Hewitson T D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis[J]. Int Rev Cytol, 2007,257:143-179.

[收稿日期] 2023-01-17

本文引用格式: 肖敏, 陈重华, 王燕, 等. 海藻糖敷料对激光损伤兔皮肤屏障功能的修复及体外促细胞生长、迁移和抗炎作用研究[J]. 中国美容医学, 2024,33(11):1-5.

#### · 告作者和读者 ·

### 关于中英文摘要书写格式的要求

本刊中的论著文稿正文前应附 300 字以内的中英文摘要，包括目的、方法、结果、结论四要素，并采用第三人称撰写，不得使用“作者”、“我们”等主语。关键词 5 ~ 8 个，撰写应正确选用中国医科院情报所出版《医学主题词注释字顺表》(MeSHAAL)内所列的词语，必要时可采用自由词语，每个词组(汇)间用分号(;)隔开。英文摘要要与中文摘要基本对应，略有扩展以便对外交流。英文摘要格式要求：文题中实词首字母为大写，作者需要全部列出，姓名及省、市名用汉语拼音，姓氏每个字母均大写，名字首字母大写。文题及单位用英文书写，英文关键词均小写，不能使用缩写词，应与中文关键词序一致。

希望作者读者在投稿或(和)修改稿件时，按上述要求认真补充完整，并注意规范使用医学专业词汇。

•论 著•

## 植物水杨酸/苦杏仁酸/壬二酸共载纳米乳的制备及祛痘功效研究

黄晓东<sup>1</sup>, 罗丹<sup>2,3</sup>, 陈璇<sup>4</sup>, 王曦<sup>2,3</sup>, 洪延涵<sup>2,3</sup>, 刘卫<sup>3,4</sup>

(1.广州悦荟化妆品有限公司 广东 广州 510440; 2.武汉百思凯瑞生物科技有限公司 湖北 武汉 430075; 3.华中科技大学国家纳米药物工程技术研究中心 湖北 武汉 430075; 4.华中科技大学生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074)

**[摘要]目的:** 通过纳米载体技术将植物水杨酸、苦杏仁酸及壬二酸等活性成分进行包载,制备植物水杨酸/苦杏仁酸/壬二酸共载纳米乳(植酸素,产品批号:20220623),对其理化性质、体外透皮性能、抑菌活性及祛痘控油功效进行评价。**方法:** 采用纳米电位粒径分析仪测试植酸素的粒径、PDI及电位;采用Franz扩散池法进行离体猪皮的透皮实验;建立痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌活性抑制的实验方法;建立LPS诱导的细胞炎症模型及采用油红O法观察植酸素对SZ95细胞分泌油脂的影响。**结果:** 测得植酸素粒径为 $(37.5 \pm 0.2)$  nm, PDI为 $(0.131 \pm 0.008)$ , Zeta电位为 $(-25.1 \pm 1.2)$  mV。体外透皮实验结果表明,活性成分经纳米载体包裹后具有良好的皮肤渗透性及皮肤储留能力;抑菌实验结果表明,植酸素可抑制痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌活性;细胞功效实验结果表明,与游离活性成分比较,植酸素可显著抑制RAW264.7细胞分泌炎症因子,抑制SZ95细胞分泌细胞脂滴。**结论:** 植物水杨酸、苦杏仁酸及壬二酸经纳米载体包裹后得到的植酸素共载纳米乳,具有良好的体外透皮性能、抑菌活性及祛痘控油功效,在祛痘控油护肤品领域有良好的应用前景。

**[关键词]** 植物水杨酸/苦杏仁酸/壬二酸; 共载纳米乳; 透皮实验; 抑菌活性; 祛痘控油

**[中图分类号]** TQ658 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2024) 11-0006-05

## Preparation and Efficacy of Plant Salicylic Acid/Mandelic Acid/Azelaic Acid Co-delivery Nanoemulsion

HUANG Xiaodong<sup>1</sup>, LUO Dan<sup>2,3</sup>, CHEN Xuan<sup>4</sup>, WANG Xi<sup>2,3</sup>, Hong Yanhan<sup>2,3</sup>, LIU Wei<sup>3,4</sup>

(1.Guangzhou YueHui Cosmetics Co., Ltd., Guangzhou 510440,Guangdong, China; 2. Wuhan Bestcarrier Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 430075, Hubei, China; 3. National Engineering Research Center for Nanomedicine, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430075, Hubei, China; 4. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China )

**Abstract: Objective** The active ingredients such as plant salicylic acid, mandelic acid and azelaic acid were encapsulated by nanocarrier technology to prepare plant salicylic acid/mandelic acid/azelaic acid co-delivery nanoemulsion ( SMA, Batch number: 20220623 ), and evaluate its physicochemical properties, in vitro transdermal properties, antibacterial activity and acne and oil control efficacy. **Methods** The particle size, PDI and potential of phytochemicals were measured by nanopotential particle size analyzer. Transdermal experiments on isolated porcine skin were conducted by Franz diffusion cell method. Experimental methods for the inhibition of the activity of Propionibacterium acnes and Staphylococcus aureus were established. LPS-induced cellular inflammation model and the effect of phytochemicals on the secretion of oil by SZ95 cells were observed by oil red O method. **Results** The particle size of SMA was  $(37.5 \pm 0.2)$  nm, the PDI was  $(0.131 \pm 0.008)$ , and the zeta potential was  $(25.1 \pm 1.2)$  mV as measured by a nanopotential particle size analyzer. The results of in vitro transdermal experiments show that the active ingredients have good skin permeability and skin storage capacity after being wrapped by nano carriers. The results of antibacterial experiments showed that SMA could inhibit the activity of Propionibacterium acnes and Staphylococcus aureus. The results of cell efficacy experiments showed that SMA could significantly inhibit the secretion of inflammatory factors by RAW264.7 cells and the secretion of cytosolic lipid droplets by SZ95 cells compared with free active ingredients. **Conclusion** The phytatin co-loaded nano-emulsion, which was coated with plant salicylic acid, amygdalic acid and azelaic acid by nano-carrier, has good in vitro transdermal property, antibacterial activity and anti-acne and oil-control effect, and has a good application prospect in the field of anti-acne and oil-control skin care products.

**Key words:** plant salicylic acid/mandelic acid/azelaic acid; co-delivery nanoemulsion; transdermal experiment; antibacterial activity; acne and oil control

通信作者: 刘卫, 教授、博士生导师; 研究方向为纳米载药系统、现代制剂技术等领域的研究。E-mail: wliu@hust.edu.cn

第一作者: 黄晓东, 研究员; 研究方向为化妆品原料、配方与功效方向的研究。E-mail: shym001@mfsj1908.com



痤疮是皮肤科最常见的毛囊皮脂腺慢性炎症性疾病,当代社会,人们对皮肤管理愈来愈重视,而使用某些美妆产品、接触刺激性生化试剂、日常作息不规律及不良的饮食习惯等都很可能引起痤疮。近年来植物水杨酸也被逐渐应用于痤疮的治疗,并取得了较好的疗效。苦杏仁酸对于皮肤粉刺内等各种需氧菌和厌氧菌有抑制和杀灭作用<sup>[1]</sup>。壬二酸可抑制雄激素的活性,减少油脂分泌<sup>[2]</sup>。目前,市面上祛痘控油产品中极少能安全有效祛痘,这主要是因为大多祛痘活性成分如植物水杨酸、壬二酸溶解性差,部分有机酸对皮肤、黏膜存在一定刺激性,使得这些活性成分在护肤品中很难达到有效浓度。其次,活性成分较难渗透进入角质层到达皮脂腺发挥作用,导致祛痘功效大大降低。为了克服游离祛痘活性成分的缺点、提高其生物利用度,亟待研究开发稳定、低刺激的经皮共递送纳米载体,使其有效发挥护肤功效。基于本团队前期祛痘控油纳米载体研发工作基础,将植物水杨酸、苦杏仁酸和壬二酸三种功效成分科学组合,实现协同增效<sup>[3-5]</sup>。本研究构建了植物水杨酸/苦杏仁酸/壬二酸共载纳米乳-植酸素,对其理化性质、皮肤渗透性能、抑菌能力及祛痘控油功效等进行系统研究和评价,以期新型祛痘控油护肤品开发提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料:植物水杨酸,奇华顿香精香料公司;苦杏仁酸,默克公司;壬二酸,南京珍唯康生物科技有限公司;丁二醇,日本大赛璐;1,3-丙二醇,陶氏化学(中国)有限公司;辛酸/癸酸甘油三酯,英国禾大化工公司;PEG-40氢化蓖麻油,德国巴斯夫公司;DMEM培养基,Hyclone;胎牛血清,BHI培养基,LB培养基,Gibco;琼脂,上海源叶生物;其它试剂,国药集团化学试剂有限公司;白细胞介素1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)和前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) ELISA试剂盒,江苏酶免实业有限公司;罗丹明B(RhoB),拉丁试剂(上海)有限公司;猪皮来源于芝罘区有容生物工作室;痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌来源于中国工业微生物菌种保藏中心。小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)来源于中国科学院昆明细胞库、人皮脂腺细胞(SZ95)由德国Zouboulls教授馈赠。

1.2 实验仪器:BOCL 101液相色谱仪,日本岛津公司;Zetasizer/Nano-ZS90纳米电位粒径分析仪,英国Malvern公司;YP10002电子天平,上海越平科学仪器有限公司;AH-BASIC超高压纳米均质机,安拓思纳米技术(苏州)有限公司;SHJ-A6水浴恒温磁力搅拌器,金坛市亿能实验仪器厂;Tecna G220透射电子显微镜,荷兰FEI公司;Axio Lab A1显微镜,蔡司中国公司;超净工作台,苏净集团安泰公司;BB150 CO<sub>2</sub>培养箱,美国Thermo公司;Victor多标记分析仪,珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司。

## 1.3 实验方法

1.3.1 制备方法:按处方量称取植物水杨酸、壬二酸、辛酸/癸酸甘油三酯、丁二醇、1,3-丙二醇和PEG-40 氢化蓖麻油等加入烧杯作为油相,40℃加热搅拌20 min待完全溶解;称取处方量的苦杏仁酸加入到纯化水中作为水相,加热到40℃,搅拌至完全溶解;将油相以1滴/秒的速度滴加至水相中并在40℃、800 r/min的转速下不断搅拌,采用高压均质机进行匀质,即得植物水杨酸/苦杏仁酸/壬二酸共载纳米乳(植酸素20220623)。

## 1.3.2 理化性质表征

1.3.2.1 粒径与PDI:取适量植酸素,超纯水稀释一定倍数,使样液的平均光强为200~300。用Zetasizer/Nano-ZS90纳米电位粒径分析仪分别测定其粒径和PDI,粒径测定角度为90°,测试温度为25℃。

1.3.2.2 微观形貌:取植酸素以超纯水稀释适当倍数,取1滴置于覆有Formvar膜的铜网上,自然干燥后滴加1滴2%磷钨酸溶液负染1~2 min,用滤纸吸干多余液体,晾干后置透射电子显微镜下观察其微观形貌。

## 1.3.3 透皮实验

1.3.3.1 累积透过量 and 皮肤滞留量的测定:将皮肤固定于接收室和供给室之间,取5%植酸素复配精华和游离活性物(与植酸素同剂量活性物)复配精华各0.5 g于供给室中,以质量分数30%丙二醇的生理盐水为接收液,37℃下搅拌扩散。于4、8、12、24 h取0.5 ml接收液,HPLC分析,计算不同时间活性物单位面积累积透过量。24 h后,皮肤研磨成匀浆液,离心取上清液HPLC分析,计算特定活性物的单位面积皮肤滞留量。本实验中测定的活性物为水杨酸和苦杏仁酸。

1.3.3.2 激光共聚焦显微镜观察皮肤渗透:采用垂直式Franz扩散池法进行离体猪皮的透皮实验<sup>[6]</sup>。用RhoB替代活性成分制备得到RhoB纳米载体,将皮肤固定于接收室和供给室之间,取5%罗丹明B纳米载体复配精华和游离罗丹明B(与罗丹明B纳米载体同剂量活性物)复配精华各0.5 g于供给室中,以质量分数30%丙二醇的生理盐水为接收液,37℃下搅拌扩散。于15 min、30 min、60 min和120 min后轻轻擦去皮肤上的残留样品,取下目标区域内的皮肤,将样品冷冻切片,通过激光共聚焦显微镜观察切片,挑选有代表性的区域拍照。

1.3.4 纸片扩散法测定抑菌圈:采用纸片琼脂扩散法检测游离活性物和植酸素抑菌功效。用接种环沾取少许已活化的痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌,加入无菌生理盐水,调整细菌浓度与0.5麦氏比浊管( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml)相似。将2 ml菌液均匀涂布在培养基平板上,固定好后,将圆形滤纸片( $d=6.00$  mm)贴到培养基表面,垂直滴加5  $\mu$ l植酸素和游离活性物(与植酸素同剂量活性物,活性物为水杨酸、苦杏仁酸和壬二酸的混合物)至滤纸片上。把贴好药敏纸片的平皿放进37℃温箱培养,培养过夜后取出平板,用游标卡尺测量抑菌环的直径。

1.3.5 炎症因子检测:将RAW264.7细胞以 $1 \times 10^5$ 个/毫升的

密度接种于24孔板中,每孔500  $\mu$ l,培养24 h。将细胞分为空白对照组、模型组和给药组,除对照组外其余各组细胞加入2  $\mu$ g/ml的LPS制备细胞炎症模型,给药组加入不同浓度植酸素(浓度为50、100、200 mg/L)和游离成分溶液(与植酸素同剂量活性物),于37℃继续孵育24 h。收集上层培养液,按照ELISA试剂盒的说明书分别检测IL-1 $\alpha$ 、IL-6、IL-8和PGE<sub>2</sub>的表达量。

1.3.6 细胞内脂质含量观察:细胞内脂质含量的测定采用油红O染色法<sup>[7]</sup>。将SZ95细胞以 $1 \times 10^5$ 个/毫升的密度接种于24孔板中,每孔500  $\mu$ l,培养24 h。将细胞分为空白对照组、模型组和给药组,除对照组外,每孔加100  $\mu$ mol/L的棕榈酸制备高油脂分泌细胞模型,给药组加入浓度为100 mg/L的植酸素和游离成分溶液(与植酸素同剂量活性物),于37℃继续孵育24 h。弃去DMEM培养基,加入4%的多聚甲醛溶液,室温固定15 min后,弃去多余溶液,再加入0.5%的油红O溶液(异丙醇溶解),在室温下染色15 min。PBS轻洗2次,拍照观察脂质含量。

1.4 统计学分析:数据结果采用SPSS 20.0软件进行统计学处理,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,使用ANOVA法评估两组结果差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 理化性质表征:制得的植酸素共载纳米乳为浅黄色透明澄清液体,其中植物水杨酸载药量为20%,苦杏仁酸载药量为7%,壬二酸载药量为3%。采用纳米电位粒径分析仪测得其粒径为 $(37.5 \pm 0.2)$  nm, PDI为 $(0.131 \pm 0.008)$ , Zeta电位为 $(-25.1 \pm 1.2)$  mV。采用透射电子显微镜观察到植酸素的微形貌,在透射电镜下呈较为规整的球形,且粒径大小均一,未见明显的纳米乳聚集现象。见图1。

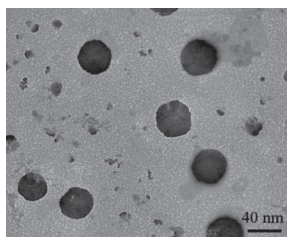
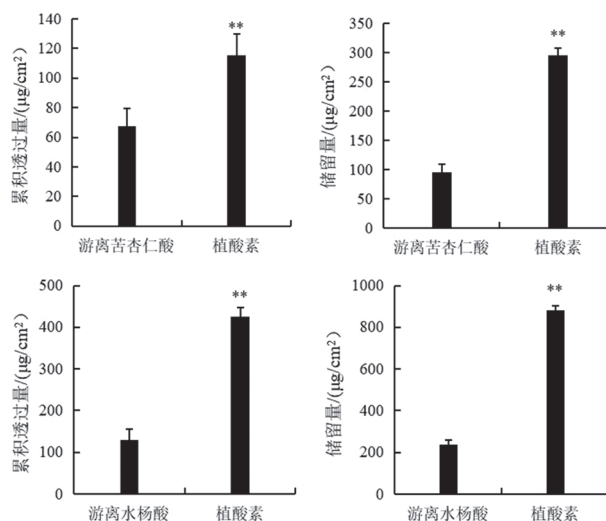


图1 植酸素透射电镜图

### 2.2 体外透皮实验

2.2.1 皮肤累积透过量和储留量:计算植酸素中苦杏仁酸、水杨酸单位面积皮肤累积透过量和储留量,游离活性物、植酸素中苦杏仁酸24 h单位面积皮肤累积透过量分别为 $67.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $115.64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,皮肤储留量分别为 $94.92 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $294.78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;游离活性物、植酸素中水杨酸24 h单位面积皮肤累积透过量分别为 $129.89 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $425.15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,皮肤储留量分别为 $237.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $879.85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

与游离活性物比较,植酸素中苦杏仁酸、水杨酸单位面积皮肤累积透过量分别提高了71.41%、227.33%,皮肤储留量分别提高了210.57%、271.12%,说明活性成分经纳米载体包裹后能有效促进皮肤渗透能力和在皮肤中的高浓度储留,提高其生物利用率。见图2。



注: \*\*表示与游离活性物相比,  $P < 0.01$

图2 皮肤累积透过量和皮肤储留量

2.2.2 激光共聚焦显微镜观察皮肤渗透结果:激光共聚焦显微镜观察游离RhoB、RhoB纳米载体渗透行为,随着时间的延长,皮肤的荧光渗透深度和荧光强度逐渐增加。渗透相同时间,RhoB纳米载体在皮肤中荧光强度明显强于游离RhoB,且RhoB纳米载体在皮肤中渗透深度更深。结果表明,纳米载体能够促进包载成分快速渗透皮肤。见图3。

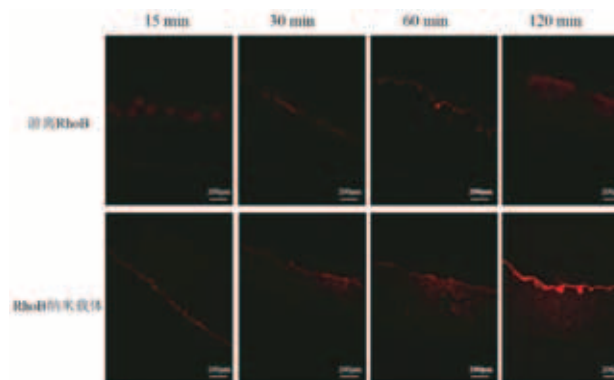


图3 激光共聚焦显微镜观察皮肤渗透

2.3 抑菌实验结果:采用纸片扩散法测得游离活性物和植酸素对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌直径,痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌圈的平均大小分别为6.52 mm和7.16 mm。加入同剂量植酸素后,痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌圈的平均大小分别为8.76 mm和9.08 mm。说明植酸素抑制痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌效果优于同剂量游离活性物。见表1、图4。



表1 纸片扩散法测定抑菌圈大小

样品	抑菌圈直径/mm	
	痤疮丙酸杆菌	金黄色葡萄球菌
游离活性物	6.52	7.16
植酸素	8.76	9.08

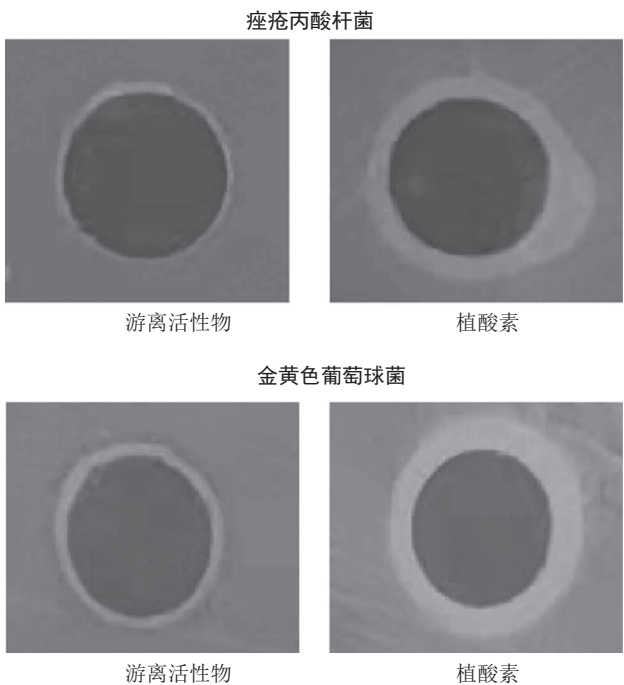
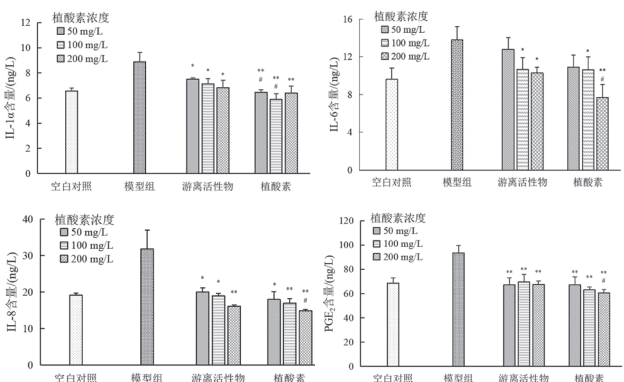


图4 纸片扩散法测定抑菌圈

2.4 炎症因子检测结果：与模型组相比，游离活性物和植酸素能显著降低IL-1 $\alpha$ 、IL-6、IL-8和PGE<sub>2</sub>水平（ $P<0.05$ ）。与游离活性物比较，植酸素能显著减低IL-1 $\alpha$ 、IL-6、IL-8及PGE<sub>2</sub>水平（ $P<0.05$ ）。说明植酸素较同剂量游离活性物具有更好的抗炎功效。见图5。



注：\*表示与模型组相比， $P<0.05$ ；\*\*表示与模型组相比， $P<0.01$ ；\*\*\*表示与游离活性物相比， $P<0.05$ ；\*\*\*表示与游离活性物相比 $P<0.01$

图5 炎症因子检测结果

2.5 细胞内脂质含量观察：与对照组相比，棕榈酸刺激SZ95细胞后模型组细胞脂滴多而大。游离活性物和植酸素

细胞脂滴较模型组少，且植酸素较游离活性物细胞脂滴更少。说明植酸素较同浓度游离活性物具有更好的控油功效。见图6。

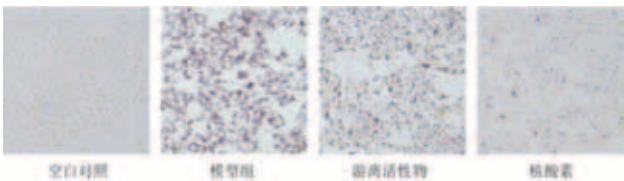


图6 细胞内脂质含量观察

### 3 讨论

痤疮是皮肤科常见的毛囊皮脂腺慢性炎症性疾病，痤疮形成原理大致可分为以下几步：首先，毛孔周围的皮肤在雄激素的作用下角质变厚，同时皮脂腺分泌大量皮脂；其次，随着角质变厚，毛孔逐渐被堵塞，皮脂不能顺利排出，并不断累积，形成角质栓也叫微粉刺；最后，细菌在角质栓里过度繁殖，形成炎症丘疹、脓疱、结节和囊肿等多种皮肤炎症<sup>[8-9]</sup>。据调查，约85%的人群在青春期发生过不同程度的痤疮，同时，快节奏的现代生活带来的无规律作息、不良饮食习惯与外界压力等因素，导致痤疮的频繁发生。痤疮多见于头面部等皮脂腺较丰富部位，不仅会导致皮肤损伤和永久性瘢痕产生，更对人们的自我感知、社交和心理健康产生不良影响。

当前，使用外用祛痘类化妆品是预防和治疗痤疮的主流手段之一，祛痘产品中功效成分的种类、祛痘机制、安全性等是决定产品祛痘效果和消费者满意度的关键。天然植物提取物是基于物理、化学与生物学相结合分离提取技术，从植物原材料中获得的，具有一种或多种功效的植物产品，被广泛应用于化妆品、医药食品等领域。由绿色，安全，天然的功效成分构成的产品更为消费者所热衷。然而，市面上的祛痘产品极少能够实现安全、高效的祛痘效果，其原因是部分祛痘功效成分不稳定，易降解失活，在化妆品中很难达到有效浓度；更重要的，由于皮肤的屏障功能，活性成分较难渗透进入角质层到达皮脂腺发挥作用，导致祛痘功效大大降低。

植物水杨酸是一种脂溶性的有机酸，存在于自然界的柳树皮、白桦树皮及甜桦树中，具有剥脱角质，光滑皮肤，清除粉刺痤疮、改善毛孔堵塞的功效，容易穿透皮肤的脂质屏障，具有很强的溶解皮肤表面油脂的作用。同时，水杨酸有较强的抗炎作用，对多种转录因子和炎症刺激信号有调节作用，可影响细胞生长、分化、凋亡和炎症反应等<sup>[10-12]</sup>。苦杏仁酸可溶解角质间的构成形物质，软化皮肤角质层使角质层脱落，对于皮肤粉刺内等各种需氧菌和厌氧菌有抑制和杀灭作用<sup>[13]</sup>。壬二酸别名杜鹃花酸，含有9个碳原子的天然直链饱和二羧酸，研究表明，壬二酸可以竞争性抑制产生二氢睾酮的酶过程，抑制活性氧自由基的产生等，从而使皮肤细胞功能恢复，达到

治疗痤疮的作用。同时,壬二酸是一种抗角质化剂,对角质形成细胞具有抗增殖细胞抑制作用,并调节表皮分化的早期和终末期<sup>[14-15]</sup>。

近年来,纳米载体技术已被广泛应用于药物和功能性化妆品的经皮传递。与传统的乳剂相比,纳米乳具有各种优点,如比表面积大、稳定性高、流变学可调,因为其尺寸小(20~200 nm)<sup>[16]</sup>。由于纳米乳对亲水性和疏水性药物都有很好的封装作用,因此是很有吸引力的药物输送系统。此外,通过将药物装入纳米大小的颗粒,药物的溶解度和渗透性大大增加,这进一步导致了生物利用度的提高<sup>[17-18]</sup>。此外,纳米乳的制备过程简单明了,不需要特殊设备,是工业化大规模生产的理想选择。纳米载体技术已经在化妆品领域得到了广泛的应用。因此,为了克服游离祛痘活性成分的缺点、提高其生物利用度,亟待研究开发稳定、低刺激的经皮共递送纳米载体,使其有效发挥护肤功效。

本研究将植物水杨酸、苦杏仁酸及壬二酸共载于纳米载体中,制备了植酸素共载纳米乳,其粒径均一,微观形貌规整。体外透皮实验结果表明,植酸素能有效促进活性成分的透皮吸收和在皮肤中的高浓度储留,提高其生物利用率。抑菌实验结果表明,植酸素可抑制痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌活性,效果优于同剂量游离活性物。细胞实验结果表明,植酸素能有效抑制RAW264.7细胞分泌相关炎症因子,能抑制SZ95细胞分泌细胞脂滴,且抗炎控油效果优于同浓度游离活性物。本研究提示,植物水杨酸、苦杏仁酸及壬二酸经纳米载体包裹后得到的植酸素共载纳米乳,在高性能祛痘控油化妆品领域具有良好的应用前景。

#### [参考文献]

- [1]Śłocka R, Świdorski G, Nasiłowska J, et al. Research on the electron structure and antimicrobial properties of mandelic acid and its alkali metal salts[J]. *Int J Mol Sci*, 2023,24(4):3078.
- [2]彭冠杰,李扬思,何水莲,等.超分子壬二酸的斑马鱼模型美白功效研究,2022,45(12):36-39.
- [3]刘卫,冯年平.经皮给药纳米技术[M].北京:中国医药科技出版社,2020:67.
- [4]鲁旺旺,陈家铃,苏沙沙,等.丹皮酚/羟基积雪草苷/肝素钠纳米载体皮肤渗透及抗炎修复研究[J].*精细与专用化学品*, 2022,30(10):41-46.
- [5]陈家铃,吴航航,何益飞,等.水杨酸纳米乳的制备、体外释放行

为及抑菌活性研究[J].*精细与专用化学品*,2022,30(3):16-21.

- [6]Tian L W, Luo D, Chen D, et al. Co-delivery of bioactive peptides by nanoliposomes for promotion of hair growth[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022,72,103381.
- [7]陈仁德,李勇军.10种中草药对临床常见致病菌体外抗菌作用的实验[J].*抗感染药学*, 2018,15(2):196-198.
- [8]姜晓铮,曹蒙,王焱.痤疮瘢痕的治疗新进展[J].*中国美容医学*,2022,31(2):186-189.
- [9]丛林.控释三酸修护敷料治疗面部轻中度寻常痤疮及改善皮肤屏障的功效评价[J].*中国美容医学*, 2020,29(10):89-92.
- [10]彭柔,田兰馨,慈雪,等.超分子水杨酸在皮肤美容中的应用研究进展[J].*现代医药卫生*,2019,35(14):2154-2157.
- [11]Al-Talib H, Al-Khateeb A, Hameed A, et al. Efficacy and safety of superficial chemical peeling in treatment of active acne vulgaris[J]. *An Bras Dermatol*, 2017,92(2):212-216.
- [12]何淑娟,胡蝶,李元宝,等.超分子水杨酸与阿达帕林治疗轻中度寻常痤疮的疗效对比研究[J].*中国美容医学*,2022,31(4):1-4.
- [13]Haibo L, Haiyan Y, Jun X, et al. Topical azelaic acid, salicylic acid, nicotinamide, sulphur, zinc and fruit acid (alpha-hydroxy acid) for acne[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020,5(5):CD011368.
- [14]许勇,韩晶,俞灵,等.高效液相色谱法同时测定化妆品中壬二酸及其衍生物壬二酰二甘氨酸钾的含量[J].*上海预防医学*, 2022,34(12):1250-1256.
- [15]Sieber M A, Hegel J K. Azelaic acid: Properties and mode of action[J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2014,27(Suppl 1):S9-S17.
- [16]Zhang B, Lei M, Huang W, et al. Improved storage properties and cellular uptake of casticin-loaded nanoemulsions stabilized by whey protein-lactose conjugate[J]. *Foods*, 2021,10(7): 1640.
- [17]Chen B H, Stephen Inbaraj B. Nanoemulsion and nanoliposome based strategies for improving anthocyanin stability and bioavailability[J]. *Nutrients*, 2019,11(5):1052.
- [18]Abd E, Benson H A E, Roberts M S, et al. Minoxidil skin delivery from nanoemulsion formulations containing eucalyptol or oleic acid: enhanced diffusivity and follicular targeting[J]. *Pharmaceutics*, 2018,10(1):19.

[收稿日期]2023-05-17

本文引用格式:黄晓东,罗丹,陈璇,等.植物水杨酸/苦杏仁酸/壬二酸共载纳米乳的制备及祛痘功效研究[J].*中国美容医学*, 2024,33(11):6-10.

· 告作者和读者 ·

### 投稿数字写作须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》,本刊采用三位分节法(小数点前≥4位数字时,每三位一组,组间空1/4字距),不用千分撇分节法(如3,216改为3 216)。但序数词、年份、页数、仪表型号、部队番号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字,凡属计数数值,一律用阿拉伯数字表示。

## 一款中药复方防脱抑菌洗发剂的安全性及功效评价

殷英, 姚敏娜, 郭超, 王艳华, 李锐莉, 丁一, 王婧雯

(空军军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710032)

**[摘要]**目的: 评价含有中药复方提取物的一款防脱抑菌洗发剂的安全性及功效。方法: 以丹参、黄芩、人参、侧柏叶、姜根五种中药提取物为原料, 制备一款防脱抑菌洗发产品, 按照相关标准和方法进行感官、理化、卫生指标评价; 采用急性眼刺激试验、急性皮肤刺激试验、人体皮肤斑贴试验对洗发剂进行安全性评价; 通过马拉色菌抑菌性能测试、产品使用前后脱发计数、整体毛发密度视觉评估和受试者自评, 考察洗发剂的抑菌防脱功效。结果: 研制的洗发剂感官、理化、卫生各项指标均符合国家标准; 产品通过安全性评价, 未发生不良反应; 对马拉色菌的抑菌率大于50%; 产品使用前后防脱效果差异有统计学意义, 且100%的受试者整体认同该产品。结论: 该洗发产品性能优良, 对人体安全无刺激, 抑菌及防脱效果显著, 具有良好的市场应用前景。

**[关键词]** 中药复方; 洗发剂; 防脱; 抑菌; 安全性评价

**[中图分类号]** R275.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2024) 11-0011-06

## Safety and Efficacy Evaluation of A Hair Loss Control and Antibacterial Shampoo Containing A Combination of Traditional Chinese Medicine

YIN Ying, YAO Minna, GUO Chao, WANG Yanhua, LI Ruili, DING Yi, WANG Jingwen

(Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the safety, antibacterial efficacy and hair loss control effect of a shampoo containing Chinese herbal compound extracts. **Methods** Five kinds of traditional Chinese medicine extracts such as Salvia miltiorrhiza, Scutellaria baicalensis, Ginseng, Cacumen Biotae and Ginger Root were used as raw materials for preparing a hair loss control and antibacterial shampoo. First, evaluation of the sensory, physical and chemical, and hygienic indicators of the shampoo in accordance with relevant standards and methods. Then, the safety evaluation of the shampoo was carried out by acute eye irritation test, acute skin irritation test, and human skin patch test. Finally, the antibacterial and hair loss control efficacy of shampoo product were investigated through Malassezia antibacterial ability test, hair loss counts, visual assessment of overall hair density, and subjects' self-evaluation after using the product. **Results** The sensory, physical and chemical, and hygienic indicators of the shampoo were in line with the national standards. The product passed safety evaluation with no adverse reactions; The antibacterial rate of the shampoo against Malassezia was greater than 50%. The difference in hair loss control effect between before and after use of the product was significant, and 100% of the subjects approved of the product overall. **Conclusion** The shampoo has excellent performance. It is safe and non-irritating to human skin, while the antibacterial and hair loss control effects are remarkable. These means the product has a good market application prospect.

**Keywords:** traditional Chinese medicine compound; shampoo; hair loss control; antibacterial; safety evaluation

随着社会的发展, 脱发发生率逐年攀升, 防脱生发的需求日益增多。脱发常常是多因素共同作用的结果, 其中脂溢性皮炎是最常见的因素之一。脂溢性脱发发病机制尚未完全明确, 主要与遗传易感性、性腺激素分泌失调、局部炎症反应等有关, 目前尚缺乏有效治疗手段<sup>[1-3]</sup>。常见治疗方法主要有毛发移植、药物治疗以及使用头皮护理产品, 但手术治疗存在创伤大、费用高、毛囊获取有限、炎症并发症等缺点<sup>[4]</sup>, 非那雄胺、米诺地尔等药物因治疗周期

长, 易导致皮肤刺激、多毛症、心动过速、性功能障碍等不良反应而受到限制<sup>[5-6]</sup>。因此, 大多数人倾向于生活中日常防护, 头皮护理产品如洗发水等作为和头发接触最多的日用品, 在解决毛发问题上有一定便利性, 防脱洗发剂作为功能型洗发水的一种, 顺势成为当前研究热点。

我国传统中药应用于脱发治疗已有悠久历史, 研究发现医书中记载的具有防脱功效的中草药主要通过促进头皮血液循环、改善毛囊生长发育, 以及抑菌抗炎等而发挥

基金项目: 陕西省中医药传承创新暨“秦药”开发重点科学研究项目(编号: 21zyyqy)

通信作者: 王婧雯, 副主任药师; 研究方向为中药皮肤防护制剂研发。E-mail: wangjingwen8021@163.com

第一作者: 殷英, 主管药师; 研究方向为中药皮肤防护制剂研发。E-mail: yinying0736@126.com



药效<sup>[7]</sup>。因此,本文以丹参、黄芩、人参、侧柏叶、姜根提取物为主要药效成分,按照特定比例复配一款新的防脱抑菌洗发剂,采用家兔急性眼刺激试验、急性皮肤刺激试验、人体皮肤斑贴试验对洗发剂进行安全性评价;通过马拉色菌抑菌性能测试、产品使用前后脱发计数、整体毛发密度视觉评估,并结合受试者感官评价,考察洗发剂的抑菌、防脱、清洁、柔顺、蓬松等功效。本研究可为所配洗发剂的安全性及防脱抑菌功效提供基础数据,以期开发出具有防脱抑菌双重功效的安全、稳定的洗发产品。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂与材料:月桂醇聚醚硫酸酯钠[巴斯夫(中国)有限公司]、月桂醇硫酸酯铵[巴斯夫(中国)有限公司]、椰油酰胺丙基甜菜碱(广州星业科技股份有限公司)、椰油酰胺MEA(巴斯夫(中国)有限公司)、乙二醇二硬脂酸酯[巴斯夫(中国)有限公司]、泛醇(山东巨荣生物工程有限公司)、吡罗克酮乙醇胺盐(南京斯拜科生化实业公司)、吡哆素(广州中广生物科技有限公司)、蚕丝胶蛋白(兰州沃特莱斯生物科技有限公司)、瓜尔胶羟丙基三甲基氯化铵(科普新材料有限公司)、聚季铵盐-7(广州和顺化工有限公司)、PEG120甲基葡萄糖二油酸酯[巴斯夫(中国)有限公司]、丹参提取物(西安绿天生物技术有限公司)、黄芩提取物(西安绿天生物技术有限公司)、人参提取物(西安绿天生物技术有限公司)、侧柏叶提取物(广州美懿生物科技有限公司)、姜根提取物(广州美懿生物科技有限公司)、向日葵籽油(江西御美化妆品有限公司)、山茶籽油(江西御美化妆品有限公司)、生育酚(巴斯夫(中国)有限公司)、苯甲酸钠(河南千志商贸有限公司)、苯氧乙醇(广州中广生物科技有限公司)、EDTA二钠(南通奥凯生物技术开发有限公司)、柠檬酸(潍坊英轩实业有限公司)、氯化钠(天津市津东天正精细化学试剂厂)、去离子水等。以上原料均为化妆品级。

1.2 主要仪器与设备:电动搅拌器(上海科兴仪器有限公司)、电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)、BSA124S电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、温度计(常州双诚热工仪表厂)、PB-10 pH计(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、SNB-2粘度计(上海精密科学仪器有限公司)、恒温恒湿培养箱(美国Thermo Scientific)、A-006生物安全柜(美国Thermo Scientific)、超净工作台(苏州净化设备有限公司)、A-023手持式裂隙灯(上海博览光电仪器有限公司)、佳能数码相机[佳能(中国)有限公司]、Photomax头发生长分析管理系统(北京金宏帆商贸有限责任公司)等。

1.3 试验菌株及试验动物:马拉色菌第5代(西安国联质量检测技术股份有限公司);新西兰兔购于陕西君行生物科技有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2017-001,动物质量合格证号:61003200000958,动物使用许

可证号:SYXK(陕)2021-009],适应饲养7 d,温度:21℃~24℃,相对湿度:55%~67%。

### 1.4 受试者纳入和排除标准

1.4.1 纳入标准:18~60岁,健康男性或女性;头发长度5~40 cm;有脱发困扰或者头发稀疏的受试者,且按60次梳发法脱发计数大于10根、2周洗脱期后仍大于10根者;近1个月内没有进行过染发、烫发、定型等特殊美发处理者;能够阅读和理解知情同意书的所有内容,并自愿签署知情同意书;试验期间同意不使用任何对结果有影响的化妆品、药物和保健品。

1.4.2 排除标准:妊娠或哺乳期女性,或近期有备孕计划者;重度雄激素源性脱发、斑秃、炎症瘢痕性脱发或其他患有头皮/毛发疾病患者;患有精神类或心理疾病者;有长期睡眠、情绪控制障碍者;近3个月内使用过具有防脱发功效的化妆品或其他具有此类功效或生发功效的产品者;近6个月内服用过或局部使用过任何影响头发生长的药物者;曾接受过头发移植治疗者;头发卷曲者;体质高度敏感者;近2个月内参加过其他临床试验者;临床评估认为不适合参加试验者。

本次共纳入30名受试者,最终完成30名,男15名,女15名,年龄35~59岁,平均年龄为46.64岁。

### 1.5 方法

1.5.1 洗发剂配方:参照洗发水的配制原则,通过原料的配伍、实验和筛选,本实验最终采用的洗发剂配方见表1,该配方以月桂醇聚醚硫酸酯钠为主要表面活性剂,中药复方添加质量分数0.5%丹参提取物、0.5%黄芩提取物、0.4%人参提取物、0.3%侧柏叶提取物、0.3%姜根提取物,pH调节至5.5~6.0,此外,还添加了去屑止痒剂吡罗克酮乙醇胺盐,以及多种发用调理剂如泛醇、蚕丝胶蛋白、向日葵籽油、山茶籽油等改善毛发柔顺度。

1.5.2 洗发剂的配制工艺:将瓜尔胶羟丙基三甲基氧基氯化铵在冷水中预分散,待分散均匀后加入EDTA二钠,搅拌均匀,加热至70℃;依次加入表面活性剂月桂醇聚醚硫酸酯钠、月桂基硫酸铵、椰油酰胺丙基甜菜碱;保持70℃加入椰油酰胺MEA、乙二醇二硬脂酸酯,至完全熔化,保温20 min;加入吡罗克酮乙醇胺盐搅拌均匀;降温至40℃,加入聚季铵盐-7、PEG120甲基葡萄糖二油酸酯搅拌均匀,再加入生育酚、山茶籽油、向日葵籽油搅拌均匀;再依次加入预溶解好的各种提取物混合物(丹参、黄芩、人参、侧柏叶、姜根),以及吡哆素,搅拌30 min;降至室温,加入蚕丝胶蛋白、泛醇、苯甲酸钠、苯氧乙醇搅拌均匀;搅拌30~40 min,测pH值,用柠檬酸调节pH值为5.5~6.0,氯化钠调节到适宜黏度,成品出料。

1.5.3 洗发剂感官、理化、卫生指标评价:参考国家标准(GB/T 29679-2013)要求及《化妆品安全技术规范》2015版规定,对所制洗发剂的外观、色泽、香气、耐热、耐寒、pH值、泡沫高度、有效物含量、细菌总数、霉菌和酵母菌总数、耐热大肠菌群等各项指标进行评价。

表1 洗发剂配方

原料	样品含量/%
水	至100
月桂醇聚醚硫酸酯钠	10
月桂醇硫酸酯铵	5
椰油酰胺丙基甜菜碱	5
椰油酰胺MEA	1.5
乙二醇二硬脂酸酯	1.5
丁二醇	0.9
氯化钠	0.8
泛醇	0.65
苯氧乙醇	0.5
丹参提取物	0.5
黄芩提取物	0.5
苯甲酸钠	0.45
人参提取物	0.4
侧柏叶提取物	0.3
姜根提取物	0.3
吡罗克酮乙醇胺盐	0.3
吡哆素	0.3
蚕丝胶蛋白	0.3
瓜尔胶羟丙基三甲基氯化铵	0.27
聚季铵盐-7	0.2
PEG120甲基葡萄糖二油酸酯	0.2
向日葵籽油	0.15
山茶籽油	0.1
生育酚	0.1
EDTA二钠	0.1
柠檬酸	0.05

1.5.4 洗发剂的安全性评价

1.5.4.1 急性眼刺激试验：依据《化妆品安全技术规范》（2015年版）第6章5法，试验使用3只家兔，做30 s冲洗试验，轻轻拉开家兔的下眼睑，滴入所制洗发剂0.1 ml于家兔一侧眼结膜囊中，使上下眼睑被动闭合1 s，至第30秒时，用足量、流速较快但又不会引起动物眼损伤的水流冲洗30 s，另一侧眼睛不处理作自身对照。于滴入所制洗发剂后1 h、24 h、48 h、72 h以及第4天和第7天对动物眼睛进行检查。

1.5.4.2 急性皮肤刺激试验：依据《化妆品安全技术规范》（2015年版）第6章4法，试验前24 h，将4只家兔背部脊柱两侧背毛剪掉，用剃毛器剃去残留被毛，不可损

伤表皮，去毛范围约3 cm×3 cm。试验时取所制洗发剂0.5 ml，直接涂抹在每兔一侧去毛皮肤上，然后用纱布（2.5 cm×2.5 cm）和一层玻璃纸覆盖，再用无刺激性胶布固定。敷贴2 h；另一侧皮肤不处理，作正常对照。试验结束后用温水除去残留洗发剂，分别于清除洗发剂后1 h、24 h、48 h、72 h观察涂抹部位皮肤有无红斑和水肿形成，根据反应程度按皮肤刺激反应评分标准进行评分。计算所有受试动物各时点的皮肤刺激反应评分总积分及积分均值。取24 h、48 h、72 h各观察时点最高积分均值，判断皮肤刺激强度。

1.5.4.3 人体皮肤斑贴试验：选用合格的斑试器材，以封闭性斑贴试验方法，将所制洗发剂约0.020~0.025 g置于斑试器内，外用低致敏胶带贴敷于受试者背部，24 h后去除洗发剂，分别于去除后0.5 h、24 h、48 h观察皮肤反应，参考《化妆品安全技术规范》（2015年版）中皮肤反应分级标准记录结果，见表2。

1.5.5 洗发剂的功效评价

1.5.5.1 抑菌性能测试：依据GB 15979-2002《一次性使用卫生用品卫生标准》附录C C4溶出性抗（抑）菌产品抑菌性能试验方法检验。将马拉色菌24 h斜面培养物用PBS洗涤，制成菌悬液，分别在每个被试样品和对照品内滴加100 μl，混合均匀后开始计时，作用2、5、10、20 min，用无菌镊分别将0.5 ml样品投入含5 ml PBS的试管内，充分混匀，适当稀释后取0.5 ml，置于平皿，用凉至40℃~45℃的营养琼脂培养基15 ml作倾注，转动平皿使其充分均匀，琼脂凝固后翻转平板，（35±2）℃培养48 h，作活菌菌落计数。抑菌率=（对照样品平均菌落数-被试样品平均菌落数）/对照样品平均菌落数×100%。评价标准为抑菌率≥50%~90%，产品有抑菌作用，抑菌≥90%，产品有较强抑菌作用。

1.5.5.2 产品使用前后脱发计数人体测试：受试者每次来访前（48±4）h内不能洗发，访视当天不能自行梳发。每次到达试验机构适应环境30 min后，技术人员采用相同规格的梳子（梳齿密度适中，齿间距0.9~1.1 mm，梳齿长度为2.0~3.0 cm，梳子长度不少于10 cm），按照从左前到左后，右前到右后的顺序，匀速梳理60次（左右各30次）。收集脱落头发，并进行计数。

1.5.5.3 产品使用前后整体毛发密度视觉评估人体测试：受试者剃发1.5 cm×1.5 cm区域并修剪（头顶偏颞侧），

表2 皮肤不良反应分级标准

反应程度	评分等级	皮肤反应
-	0	阴性反应
±	1	可疑反应，仅有微弱红斑
+	2	弱阳性反应（红斑反应）；红斑、浸润、水肿、可有丘疹
++	3	强阳性反应（疱疹反应）；红斑、浸润、水肿、丘疹、疱疹；反应可超出受试区
+++	4	极强阳性反应（融合性疱疹反应）；明显红斑、严重浸润、水肿、融合性疱疹；反应超出受试区

Photomax拍照并用Trichoscan分析局部毛发密度、数量，受试者使用测试产品4周、8周后皮肤科医生视觉评估及图像评估整体头发密度（整头加头顶区），参考表3记录头发密度分级评分结果。

表3 头发密度分级评分表

分级	描述
0	无头发
1	极稀疏，头皮清晰可见
2	稀疏，容易看到头皮
3	偏稀疏，可见头皮
4	中等密度，可见少量头皮
5	偏稠密，可见极少量头皮
6	稠密，头皮隐约可见
7	非常稠密，头皮几乎不可见

1.5.5.4 受试者自评：受试者使用测试产品4周、8周后到访分别完成问卷调查，对产品使用感受进行自我评估，统计好评率。1分表示非常不认同；2分表示比较不认同；3分既否定也不认同；4分表示比较认同；5分表示非常认同。

1.6 统计学分析：应用SPSS 24.0统计分析软件进行数据的统计分析。计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，并进行正态分布检验，若测试数据为正态分布，则采用 $t$ 检验方法进行统计分析；若测试数据为非正态分布，则采用秩和检验方法进行统计分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 洗发剂感官、理化、卫生指标评价：结果显示，研制的防脱抑菌洗发剂的感官、理化、卫生各项指标均符合国家标准（GB/T 29679-2013）要求及《化妆品安全技术规范》2015版规定。见表4。

表4 洗发剂指标评价

指标名称	标准要求	检测结果	单项评价
感官指标			
外观	无异物	无异物	合格
色泽	符合规定色泽	淡黄色	合格
香气	符合规定香气	符合规定香气	合格
理化指标			
耐热	$(40\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 保持24 h，恢复室温后无分层现象	无分层、沉淀、变色现象	合格
耐寒	$(-8\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 保持24 h，恢复室温后无分层现象	无分层、沉淀、变色现象	合格
pH (25℃)	成人产品：4.0~9.0	6.28	合格
泡沫 (40℃) /mm	非透明型： $\geq 50$	90	合格
有效物含量/%	成人产品： $\geq 10.0$	18.17	合格
卫生指标			
细菌总数/ (CFU/g)	成人产品： $\leq 100$	$\leq 10$	合格
霉菌和酵母菌总数/ (CFU/g)	成人产品： $\leq 50$	$\leq 10$	合格
耐热大肠菌群/g	不得检出	未检出	合格

2.2 洗发剂的安全性评价

2.2.1 急性眼刺激试验：结果显示，在观察期内，3只家兔的角膜、虹膜均未出现眼损害现象，其中一只家兔在24 h观察时出现结膜充血的现象，最高积分均值为0.33，且积分在72 h内均降至0。根据《化妆品安全技术规范》（2015年版）第6章5法中眼刺激分级标准判定，防脱抑菌洗发剂对家兔的急性眼刺激性属微刺激性。急性眼刺激试验结果显示不同时间点角膜、虹膜、结膜水肿及结膜充血积分值均为0。

2.2.2 急性皮肤刺激试验：结果显示，在观察期内，所有受试动物皮肤均未出现红斑，也均无水肿形成。根据《化妆品安全技术规范》（2015年版）第6章4法中皮肤刺激强度分级，防脱抑菌产品对家兔的急性皮肤刺激性属无刺激性。急性皮肤刺激性试验结果显示不同时间点红斑、水肿、总积分及积分均值均为0。

2.2.3 人体皮肤斑贴试验：防脱抑菌洗发剂人体皮肤斑贴试验结果显示，皮肤不良反应分级按照《化妆品安全技术规范》（2015年版）中规定的“人体试用试验安全性评价”中皮肤不良反应分级标准来判断，30名受试者观察区域皮肤反应均为0级，说明皮肤未发生不良反应。见表5。

表5 人体皮肤斑贴试验结果 (名)

组别	受试人数	观察时间	斑贴试验不同分级反应人数				
			0	1	2	3	4
受试物	30	0.5 h	30	0	0	0	0
		24 h	30	0	0	0	0
		48 h	30	0	0	0	0
对照品	30	0.5 h	30	0	0	0	0
		24 h	30	0	0	0	0
		48 h	30	0	0	0	0

2.3 洗发剂的功效评价

2.3.1 抑菌性能测试：结果显示，洗发剂作用时间2 min，



即对马拉色菌的抑菌率 $>50\%$ ，根据GB 15979-2002《一次性使用卫生用品卫生标准》附录C C4判定所制产品具有抑菌作用。当洗发剂作用时间10 min，抑菌率 $>90\%$ ，说明产品有较强抑菌活性。见表6。

表6 马拉色菌抑菌性能测试结果 ( $\bar{x}\pm s$ )

作用时间	平均菌落数/(cfu/ml)	抑菌率/%
2 min	$8.85\times 10^3$	68.83
	$9.40\times 10^3$	67.47
	$9.00\times 10^3$	69.59
5 min	$5.00\times 10^3$	82.20
	$5.10\times 10^3$	82.17
	$5.20\times 10^3$	81.88
10 min	$2.18\times 10^3$	92.30
	$2.19\times 10^3$	92.47
	$2.26\times 10^3$	92.10
20 min	$1.25\times 10^3$	95.66
	$1.28\times 10^3$	95.57
	$1.27\times 10^3$	95.67

2.3.2 洗发剂使用前后脱发计数人体测试：结果显示，使用防脱抑菌洗发剂4周后，与使用前相比，受试者脱发计数改善率为14.23%，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )；使用样品8周后，与使用前相比，受试者脱发计数改善率为27.76%，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )。见表7。

表7 脱发计数人体测试结果 ( $\bar{x}\pm s$ )

测试时间	脱发计数/根			脱发计数改善率/%	与使用前对比P值
	最大值	最小值	均值±标准差		
使用前	26.00	13.00	$20.07\pm 4.50$	-	-
使用样品4周	23.00	10.00	$17.21\pm 4.48$	14.23	$<0.001$
使用样品8周	20.00	9.00	$14.50\pm 3.84$	27.76	$<0.001$

注：改善率=（使用前测试值-使用样品N天测试值）/使用前测试值 $\times 100\%$ 。

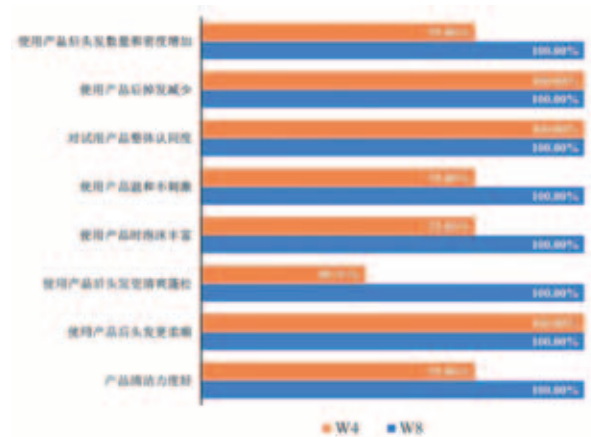
2.3.3 洗发剂使用前后整体毛发密度视觉评估人体测试：结果显示，使用防脱抑菌洗发剂4周后，与使用前相比，受试者整体毛发密度视觉评估改善率为21.15%，差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )；使用防脱抑菌洗发剂8周后，与使用前相比，受试者整体毛发密度视觉评估改善率为42.31%，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )。见表8。

表8 整体毛发密度视觉评估人体测试结果 ( $\bar{x}\pm s$ )

测试时间	最大值	最小值	均值±标准差	改善率/%	与使用前对比P值
使用前	4.00	3.00	$3.71\pm 0.47$	-	-
使用样品4周	5.00	4.00	$4.50\pm 0.52$	21.15	0.002
使用样品8周	6.00	5.00	$5.29\pm 0.47$	42.31	$<0.001$

注：改善率=（使用样品N天测试值-使用前测试值）/使用前测试值 $\times 100\%$ 。

2.3.4 受试者自评：受试者使用洗发剂后的主观评估结果显示，使用防脱抑菌洗发剂56 d后，100%的受试者整体认同该产品，认为使用产品后掉发减少，头发数量和密度增加，且清洁、柔顺、蓬松等功效也得到认可。安全评估结果同样显示，受试者使用洗发剂56 d，皮肤均未出现不良反应，100%的受试者认为该产品温和不刺激。



注：W4、W8认同度为使用样品4周、8周后“4分比较认同”和“5分非常认同”的百分比之和

图1 使用产品后受试者自评结果

### 3 讨论

脂溢性脱发是一种多因素引起的慢性疾病，发病机制尚未完全明确，中药提取物因其多成分、多靶点、多途径的治疗优势，在防脱产品开发中具有良好的应用前景。赵海婷等<sup>[7]</sup>对近20年中医药治疗脱发的方剂进行统计，发现补虚药、清热药、活血化瘀药是目前中药防脱生发研究的重点领域，约占70%。本研究以丹参、黄芩、人参、侧柏叶、姜根提取物为主要药效成分进行配伍，参照洗发水的配制原则，通过大量的实验和筛选，最终按照特定比例复配出一款新的防脱抑菌洗发剂。

其中丹参是经典的活血化瘀类中药。根据中医理论，当血脉瘀滞、血行不畅可使新血难生、毛窍瘀阻、毛发失养而细软枯泽、松动脱落，活血化瘀类中药则可通过改善毛囊微循环来发挥祛瘀生新、濡养毛发的作用。现代药理研究发现，在睾酮诱导的小鼠病理脱发模型中，丹参水提物能有效促进毛发再生，其作用机制可能与平衡激素水平、抗氧化和促进血管内皮生长因子表达有关<sup>[8]</sup>。丹参酮也对二氢睾酮诱导的雄激素性秃发大鼠模型有治疗作用，且可调节大鼠的血清雌二醇水平<sup>[9]</sup>。

黄芩属于清热燥湿药，现代药理研究已证实黄芩中的有效成分如黄芩素、黄芩苷等均具有显著的抑菌活性<sup>[10]</sup>。马拉色菌是皮肤科感染性疾病的常见真菌，脂溢性皮炎的发生与发展也与马拉色菌属的感染密切相关<sup>[11]</sup>。本研究对研制的洗发剂进行抑菌性能测试，发现产品作用时间仅2 min，即对马拉色菌的抑菌率 $>50\%$ ，作用时间10 min，抑

菌率>90%，说明产品有较强的抑菌活性，可改善毛发生长条件，防止脱发。邢飞<sup>[12]</sup>研究亦发现黄芩苷还可通过激活毛囊经典Wnt/ $\beta$ -catenin通路和增加毛囊真皮乳头细胞活性促进毛发生长。

人参属于补虚药，作为补益药之上品，具有滋养头皮、防脱固发的潜力<sup>[13]</sup>。Kim SN等<sup>[14]</sup>研究发现人参皂苷可通过与米诺地尔类似的作用机制促进头发生长。侧柏叶是中医药治疗脱发的外用方中使用频率次数最高的组方药之一，现代研究表明侧柏叶中的总黄酮及挥发性成分都具有防脱生发的效果<sup>[15]</sup>，范娜<sup>[16]</sup>研究发现侧柏叶挥发油可通过激活PI3K-Akt、Wnt/ $\beta$ -catenin等多条信号通路刺激毛囊从休止期到生长期的转换，促进毛囊发育，从而促进毛发生长。姜根中的提取物则可以刺激头皮局部血液循环，增加毛囊的营养供给，改善毛囊的新陈代谢和毛发生长<sup>[17]</sup>。

我国中草药资源丰富，中医理论底蕴深厚，以中草药为原料的洗发护发产品具有绿色天然、副作用小、疗效显著的特点。目前防脱生发中药研究多为单味药提取物及中药活性单体成分，少有中药复方，然而单一中草药在体外培养毛发生长方面起到的促进作用有限，且根据中医互补理论，采用中草药复配方式是更有效的。本研究将各功效活性成分科学配比，协同增效，人体功效评价结果也证实所研制的洗发剂使用前后防脱效果显著，且100%的受试者整体认同该产品，认为使用产品后掉发减少，头发数量和密度增加，是一款性能优良，对人体无刺激，具有抑菌和防脱双重功效的安全、稳定的洗发产品，具有广阔的市场应用前景。

#### [参考文献]

- [1]李瑛,李忻红.中药方剂在治疗脂溢性脱发中的应用[J].光明中医,2022,37(12):2145-2148.
- [2]徐玲玲,玄敏,李挺,等.中药治疗脂溢性脱发的药理及实验模型研究概述[J].中国药师,2022,25(2):330-335.
- [3]雷鸣,范金财.雄源遗传性脱发的病因研究及相关治疗进展[J].中国美容医学,2008,17(12):1812-1815.

- [4]Saad S, Cavelier-Balloy B, Smadja J, et al. Inflammatory complications after hair transplantation: Report of 10 cases[J]. J Cosmet Dermatol, 2022,21(11):5938-5941.
- [5]Gupta A K, Venkataraman M, Talukder M, et al. Finasteride for hair loss: a review[J]. J Dermatolog Treat, 2022,33(4):1938-1946.
- [6]Gupta A K, Talukder M, Williams G. Comparison of oral minoxidil, finasteride, and dutasteride for treating androgenetic alopecia[J]. J Dermatolog Treat, 2022,33(7):2946-2962.
- [7]赵海婷,郑琴,章德林,等.中药及其活性成分防脱生发的研究进展[J].中草药,2022,53(22):7254-7263.
- [8]张志毕,董超,马娇,等.丹参水提物对小鼠病理脱发模型毛发的再生影响[J].昆明医科大学学报,2016,37(11):23-27.
- [9]胡嘉元,李铭,底君,等.丹参酮治疗雄激素性秃发大鼠模型的研究[J].中国麻风皮肤病杂志,2021,37(3):143-147,156.
- [10]李倩,晋玲,崔治家,等.中药黄芩抑菌作用研究进展[J].西部中医药,2023,36(2):137-140.
- [11]祝行行,蒋文静,朱威.脂溢性皮炎病因机制的研究进展[J].实用皮肤病学杂志,2017,10(1):41-43.
- [12]邢飞.中药活性成分黄芩苷促进毛发生长的相关机制研究[D].武汉:武汉大学,2018.
- [13]李晓敏,高晴晴,赵余庆.人参提取物及皂苷类成分在皮肤护理及护发方面的研究进展[J].中草药,2021,52(16):5078-5088.
- [14]Kim S N, Kim S, Hong Y D, et al. The ginsenosides of Panax ginseng promote hair growth via similar mechanism of minoxidil[J]. J Dermatol Sci, 2015,77(2):132-134.
- [15]张瑞峰,曾阳,刘力宽,等.侧柏叶的化学成分与药理学作用研究进展[J].中国野生植物资源,2021,40(4):53-56.
- [16]范娜.侧柏叶促毛发生长的药效物质基础及其作用机制[D].西安:西北大学,2022.
- [17]陈坚生,雷登凤,高合意.生姜在化妆品中的应用现状[J].香料香精化妆品,2018,16(1):72-75,81.

[收稿日期]2023-07-14

本文引用格式:殷英,姚敏娜,郭超,等.一款中药复方防脱抑菌洗发剂的安全性及功效评价[J].中国美容医学,2024,33(11):11-16.

#### · 告作者和读者 ·

### 《中国美容医学》来稿要求

①论著类文稿字数限制在5 000字以内，有中英文摘要，英文表述的内容与中文对应，包括英文文题，全部作者姓名、单位及邮编，英文摘要要符合英文表达习惯，注意正确的语态、时态，关键词5~8个。

②临床总结（经验交流）类文稿要求与论著相同。综述类文章需指导老师或本专业权威专家审校后投寄，其余要求及书写格式同论著类文稿。

③为数据检索之便并与国际接轨，所有文章应有中英文摘要，除综述与教学类文章为提示性摘要外，其余均为结构性摘要。

## 三七提取物在抗衰老护肤品中的应用探究

石秀芹<sup>1,2,3</sup>, 吴迪<sup>1,2,3</sup>, 李国庆<sup>1,2</sup>, 翟文丽<sup>1,2,3</sup>, 安全<sup>1,2,3</sup>, 霍彤<sup>1,2,3</sup>

(1.云南白药集团健康产品有限公司 云南 昆明 650000; 2.东亚肌肤健康研究中心 北京 100048; 3.北京睿途检测技术有限公司 北京 100048)

**[摘要]**目的: 研究三七提取物在化妆品中的抗衰老功效应用。方法: 通过体外人皮肤成纤维细胞培养, 使用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和UVA刺激建立氧化应激和光老化模型, 验证三七提取物的抗氧化、抗衰老功效, 并进一步在人体中验证三七提取物的抗皱功效。结果: 三七提取物能通过显著降低细胞内ROS和MDA含量、促进CAT酶活性, 保护细胞免受H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的氧化应激损伤; 同时能通过显著提高细胞中I型胶原蛋白和透明质酸的含量, 保护细胞免受UVA引起的光老化。并且面部皱纹明显的人群在使用三七提取物制备的护肤品4周后皮肤皱纹数量、皱纹深度、皱纹面积、皱纹长度得到显著改善。结论: 三七提取物具有较好的抗衰老功效, 在护肤品中具有较高的应用价值。

**[关键词]**三七提取物; 抗衰老; 抗氧化; 抗皱; 化妆品

**[中图分类号]**TQ658 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2024)11-0017-05

## Application of Radix Notoginseng Root Extract in Anti-aging Skin Care Products

SHI Xiuqin<sup>1,2,3</sup>, WU Di<sup>1,2,3</sup>, LI Guoqing<sup>1,2</sup>, ZHAI Wenli<sup>1,2,3</sup>, AN Quan<sup>1,2,3</sup>, HUO Tong<sup>1,2,3</sup>

(1.Yunnan Baiyao Group Health Products Co. LTD, Kunming 650000, Yunnan, China; 2.East Asian Skin Health Research Center, Beijing 100048, China; 3.Beijing Ruier Testing Technology Co., LTD, Beijing 100048, China)

**Abstract:** **Objective** To study the anti-aging effect of Radix Notoginseng root extract in cosmetics. **Methods** In vitro human skin fibroblast culture, oxidative stress and photoaging model was established using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UVA stimulation to verify the antioxidant and anti-aging effects of Panax Notoginseng root extract. The anti-wrinkle effect of Radix Notoginseng extract was further verified in human body. **Results** Panax Notoginseng root extract can significantly reduce the contents of ROS and MDA in cells, promote the activity of CAT enzyme, and protect cells from oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It also protects cells from UVA-induced photoaging by significantly increasing the content of type I collagen and hyaluronic acid in cells. In addition, the number, depth, area and length of wrinkles of the skin of people with obvious facial wrinkles were significantly improved after 4 weeks using the skin care products prepared by Radix Notoginseng root extract. **Conclusion** Panax Notoginseng root extract has good anti-aging effect and has high application value in skin care products.

**Keywords:** radix notoginseng root; anti-aging; antioxidant; anti-wrinkle; cosmetics

三七(Panax Notoginseng)是我国著名的中药材,其主要药用部位为根,主要活性成分是皂苷<sup>[1]</sup>。已有大量研究表明,三七在临床中能治疗高血压、高血脂方面有较高的应用价值<sup>[2]</sup>。此外,随着消费者越来越追求化妆品成分的功效性、天然性以及可持续性。很多研究者将三七引入到化妆品天然功效原料的研究中来。有研究通过建立了衰老动物模型,对三七提取物的抗衰老功效进行研究,结果表明三七提取物可提高D-半乳糖诱导的衰老小鼠皮肤中的胶原蛋白,并且能显著提高皮肤组织中的氧化酶活性<sup>[3]</sup>。

然而,人体皮肤的衰老最直观的表现是皱纹的产生<sup>[4]</sup>,紫外线辐射是最常见的一种能引发皮肤光老化的外界因素<sup>[5]</sup>,UVA的过度暴露会导致皮肤氧化应激和损伤,包括皮肤过早老化、DNA损伤、基因突变甚至皮肤癌<sup>[6]</sup>。此外,活性氧和

自由基在机体内堆积也会导致组织细胞损伤,造成氧化应激并引起衰老和不正常的细胞死亡<sup>[7]</sup>。由此可见,开发具有抗衰老功效的天然植物功效原料势在必得,消费者首选抗衰老护肤品已经成为必然趋势。

因此,本研究通过体外H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的人皮肤成纤维细胞氧化应激模型和UVA诱导的光老化模型研究三七提取物的抗衰老功效,并将三七提取物制备成护肤品在面部皱纹明显的人群中验证其功效,为其在抗衰老护肤品中的应用奠定基础。

### 1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂与仪器:三七提取物(产品批号:20220618JKF31;云南白药集团文山七花有限责任公司

通信作者:霍彤,研发工程师;主要研究方向为植物功效成分开发、绿色化妆品技术发展与应用及生物医用材料等。E-mail: huotong@ynbyjk.com

第一作者:石秀芹,研发工程师;主要研究方向为皮肤生理学、分子生物学、微生物学、化妆品安全与功效研究等。E-mail: MaggieAGZ@163.com



司)；DMEM培养基、双抗、胰酶(Gibco)；胎牛血清(Hyclone)；75瓶/6孔板/96孔板(Corning)；CCK-8、PBS、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、PMSF、过氧化氢酶检测试剂盒、MDA检测试剂盒(北京百瑞极生物科技有限公司)；抗坏血酸(aladdin)；COL-1检测试剂盒(南京建成科技有限公司)；HA检测试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司)；电子分析天平[梅特勒~托利多仪器(上海)有限公司]；智能恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司)；CO<sub>2</sub>培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)；冷冻高速离心机, Beckman Coulter, Allegra X-30R；倒置显微镜(Olympus CKX53)；UV紫外灯箱(spectroline XX-15A/FC)；干燥箱/培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)；皮肤皱纹分析系统Primos(LMI Technologies GmbH Canfield, 加拿大)；皮肤水分测试仪Corneometer CM825(德国CK)；酶标仪, HBS-1096A(南京德铁实验设备有限公司)

## 1.2 实验方法

1.2.1 CCK8法测定三七提取物对成纤维细胞活力的影响：将对数生长期良好的细胞以 $5 \times 10^3$ 个/100  $\mu$ l的密度接种于96孔板中，于37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中过夜。分别加入不同浓度(0%、0.31%、0.62%、1.25%、2.5%、5%、10%、20%、40%)三七提取物处理细胞，培养24 h。每孔加入10  $\mu$ l CCK-8试剂，于37℃继续孵育1 h，测定OD<sub>450</sub> nm值，计算细胞活力。

1.2.2 三七提取物抗氧化损伤活性测定：将 $1 \times 10^6$ 个成纤维细胞/孔接种到6孔板中培养24 h后进行分组处理。三七提取物组：用1%的三七提取物处理细胞24 h；VC组：用50  $\mu$ g/ml的VC处理细胞24 h；模型组：不用任何样品处理，培养24 h；随后三组均用2 000  $\mu$ mol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理1 h，加入DMEM继续培养过夜后，最后加入200  $\mu$ l的裂解液裂解，收集上清做后续检测。空白组为正常培养未经处理的细胞，用同样的裂解方式获得上清液。

将收集到的上清液进行抗氧化损伤能力测试，根据碧云天过氧化氢酶检测试剂盒测定过氧化氢酶(CAT)活性；根据碧云天脂质氧化(MDA)检测试剂盒测定丙二醛(MDA)含量；根据碧云天活性氧检测试剂盒测定活性氧(ROS)的含量；具体实验步骤按照说明书操作。

1.2.3 三七提取物抗光老化活性测定：将 $1 \times 10^6$ 个成纤维细胞/孔接种到6孔板中培养24 h后进行分组处理。三七提取物组：用1%的三七提取物处理细胞6 h；VC组：用50  $\mu$ g/ml的VC处理细胞6 h；模型组：不用任何样品处理，培养6 h；随后用辐射量为10 J/cm<sup>2</sup>的UVA刺激细胞，最后加入200  $\mu$ l的裂解液裂解，收集上清做后续检测。空白组为正常培养未经处理的细胞，用同样的裂解方式获得上清液。

将收集到的上清液进行抗光老化能力测试，参考ELISA试剂盒检测步骤测定上清液中I型胶原蛋白(CoL-I)的含量和透明质酸(HA)含量，具体实验步骤按照说明书操作。

1.2.4 人体功效测试：根据赫尔辛基宣言，志愿者的

选择遵循人体测试的医学和伦理学标准(伦理批号：SECCR2023-149-01)，所有志愿者的测试都必须出于志愿者本人自愿，并在测试前签署知情同意书。志愿者在签署知情同意书之前，测试人员需要告知志愿者本次测试的目的、可能的利益、潜在的风险和问题以及相关的权利和义务。

1.2.4.1 产品配方及制备工艺：制备产品配方见表1。分别称取A、B相物料，搅拌条件下缓慢将B相加入A相液体中，充分搅拌分散均匀，得到A/B混合溶液；称取C相物料，加入A/B相中，浸泡分散均匀，得到A/B/C混合溶液；称取F相物料，加入搅拌锅中；将E相物料缓慢撒在F相表面，待E相物料自行浸润、无明显白点后，称取D相物料，加入搅拌锅中；将混合均匀的A/B/C相加入搅拌锅中，抽真空至-0.07 MPa左右，开启搅拌，转速35 rpm，开启蒸汽加热至75℃~80℃；称取G相物料，加热至75℃~80℃，真空抽入搅拌锅中，搅拌转速35 rpm，均质转速3 000 rpm，均质10 min；降温至45℃以下，称取H相，溶解均匀后，真空抽入搅拌锅中，搅拌转速35 rpm，搅拌10 min；关闭搅拌，破真空，双层滤网过滤(200目)出料，所得产品用于后续人体功效测试。

表1 产品配方组成

组分	标准中文名称	原料含量/%
A	甘油	2.00
	1,2-戊二醇	1.90
B	黄原胶	0.17
	透明质酸钠	0.13
C	水	15.00
D	对羟基苯乙酮	0.50
E	丙烯酸(酯)类/C10-30 烷醇丙烯酸酯交联聚合物	0.25
F	水	100.00
	EDTA 二钠	0.05
G	角鲨烷	4.00
	聚二甲基硅氧烷	2.00
	氢化卵磷脂	0.80
H	三七(PANAX NOTOGINSENG)根提取物	0.13
	水	3.00

1.2.4.2 产品安全性测试：参考《化妆品安全技术规范》(2015版)<sup>[8]</sup>第七章人体皮肤斑贴试验，选择18~60岁受试者作为受试对象，胰岛素依赖性糖尿病患者，正在接受治疗的哮喘或其他慢性呼吸系统疾病患者，体质高度敏感者，哺乳期或妊娠妇女除外。检测产品引起人体皮肤不良反应的潜在可能性。将样品放入斑试器小室内，用量约为0.02 ml。对照孔为蒸馏水做空白对照，将加有样品的斑试器贴敷于受试者前臂曲侧，用手掌轻压使之均匀地贴敷于皮肤上，持续24 h。分别于去除受试物斑试器后30 min、24 h、48 h按照表2标准观察皮肤反应，并记录结果。

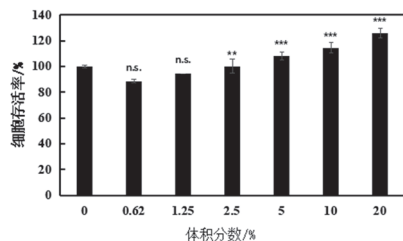
表2 皮肤不良反应分级标准

反应程度	评分等级	皮肤反应
-	0	阴性反应
±	1	可疑反应, 仅有微弱红斑
+	2	弱阳性反应(红斑反应); 红斑、浸润、水肿、可有丘疹
++	3	强阳性反应(疱疹反应); 红斑、浸润、水肿、丘疹、疱疹反应超出受试区
+++	4	极强阳性反应(融合性疱疹反应); 明显红斑、严重浸润、水肿、融合性疱疹; 反应超出受试区

1.2.4.3 产品抗皱功效测试: 测试方法及受试者招募参考《化妆品抗皱功效测试方法》(T/ZHCA006-2019)<sup>[9]</sup>, 选取32名鱼尾纹等级 $\geq 2$ 分的中国女性, 年龄35~65岁, 测试区域无明显影响测试结果的干扰因素: 胎记、痘、抓痕、痣等, 哺乳期、妊娠期或计划生育期妇女; 过敏体质、过敏性皮炎, 正在接受皮肤科治疗等人群除外。测试环境温度 $(21.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ , 测试环境湿度 $(50 \pm 10)\%$ 。受试者连续使用产品4周, 分别于第0周, 2周, 4周时使用Primos拍照并分析鱼尾纹程度参数(数量、深度、面积、长度)。测试之前使用清水清洁面部肌肤, 清洁完成后进入恒温恒湿间内静坐30 min。30 min后对参加试验的受试者进行拍照。并在第4周回返时进行受试者问卷调查自评产品使用感受, 问卷设置5分制(1: 不满意, 2: 较不满意, 3: 一般, 4: 满意, 5: 完全满意)。满意度 $= (4\text{分人数} + 5\text{分人数}) / \text{总人数} \times 100\%$

## 2 结果

2.1 三七提取物对成纤维细胞活力的影响: 通过选取不同浓度梯度的三七提取物探究其对成纤维细胞活力的影响, 结果显示, 细胞存活率均在88%以上, 说明三七提取物对细胞无毒性, 且当三七提取物浓度在5%及以上时细胞存活率超高了100%, 当浓度为20%时, 成纤维细胞存活率高达126.09%, 说明三七提取物对成纤维细胞具有促进细胞增殖的作用。见图1。

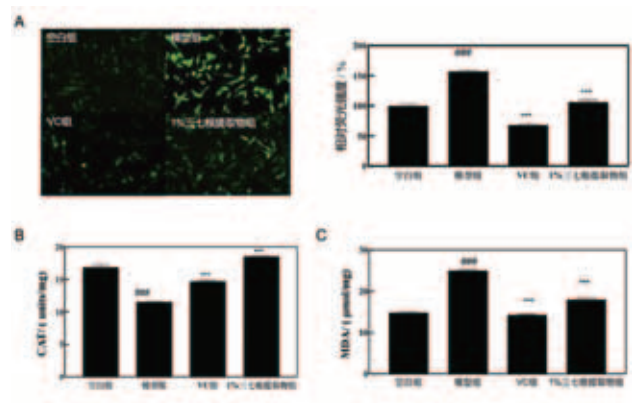


注: \*表示与使用前相比,  $P < 0.05$ ; \*\*表示与使用前相比,  $P < 0.01$ ; \*\*\*表示与使用前相比,  $P < 0.001$

图1 三七提取物对成纤维细胞活力的影响检测

2.2 三七提取物的抗氧化损伤作用: 结果显示, 模型组相对荧光强度显著高于空白组, 说明细胞内ROS含量显著增高, 模型建立成功。1%三七提取物组、VC组与模型组相比, 相对荧光强度均显著降低, 说明1%三七提取物能显著

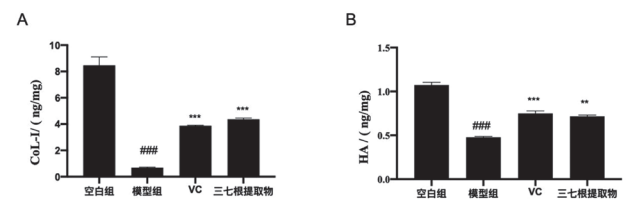
降低细胞内ROS含量(见图2A); 与空白组相比, 模型组CAT活力显著降低, 1%三七提取物组、VC组与模型组相比, CAT活力均显著提高, 且1%三七提取物组高于VC组, 说明1%三七提取物能显著提升CAT活力, 且效果优于阳性对照VC(见图2B); 模型组中MDA含量显著高于空白组, 而经1%三七提取物和VC处理后, MDA含量均显著降低, 说明1%三七提取物能降低MDA含量从而阻断细胞被 $\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化损伤(见图2C)。



注: A. 活性氧含量; B. 过氧化氢酶(CAT)活性; C. 丙二醛(MDA)含量。\*\*\*表示与空白组相比,  $P < 0.001$ ; \*\*表示与模型组相比,  $P < 0.001$

图2 四组ROS、MDA含量及CAT活性检测结果比较

2.3 三七提取物的抗光老化作用: 结果显示, 经UVA辐射的模型组中, I型胶原蛋白(CoL-I)的含量显著下降, 经VC和1%三七提取物处理的细胞, 能够显著增加细胞中的I型胶原蛋白含量, 且1%三七提取物刺激I型胶原蛋白表达的能力优于阳性对照组VC, 见图3A。UVA诱导的光老化模型中, HA含量显著降低, 经VC和三七提取物处理后细胞中HA含量显著增加。见图3B。

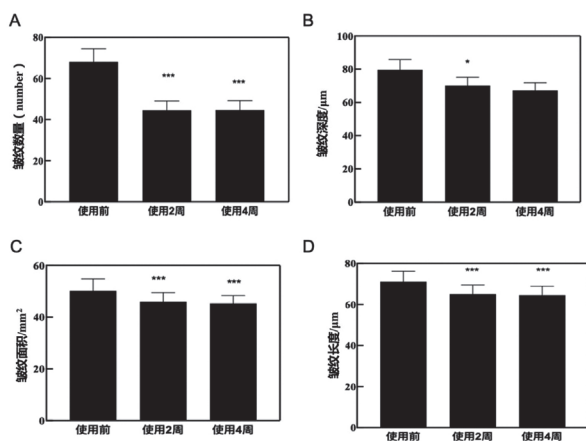


注: A. I型胶原蛋白(CoL-I)的含量; B. 透明质酸(HA)含量。\*\*\*表示与空白组相比,  $P < 0.001$ ; \*\*表示与模型组相比,  $P < 0.01$ ; \*\*\*表示与模型组相比,  $P < 0.001$

图3 四组CoL-I、HA含量检测结果比较

2.4 含三七提取物护肤品的安全性：最终完成24 h皮肤封闭型斑贴测试的受试者共45例，在去除斑试器30 min、24 h、48 h后，含三七提取物的护肤品均未对皮肤产生不良反应。

2.5 含三七提取物护肤品的抗皱功效：皮肤在内源性衰老的过程中，通常表现为细小皱纹产生，本研究通过32名眼角有明显皱纹的受试者连续使用含三七提取物的护肤品后使用皮肤快速光学成像系统primos评价产品的抗皱功效，结果显示，在使用产品4周后，眼角皱纹数量、皱纹深度、皱纹面积、皱纹长度都得到了显著改善，而这种显著性变化甚至在使用14 d后就有体现。其中皱纹数量由使用前68.13减少到使用28 d后44.64，见图4A；皱纹深度使用前为79.63  $\mu\text{m}$ ，使用28 d后为67.19  $\mu\text{m}$ ，见图4B；皱纹面积使用前为50.13  $\text{mm}^2$ ，使用28 d后为45.27  $\text{mm}^2$ ，见图4C；皱纹长度使用前为71.16  $\mu\text{m}$ ，使用28 d后为64.59  $\mu\text{m}$ ，见图4D；使用该产品后可以观察到肉眼可见的皱纹变化，效果图见图5。



注：A. 使用前后皱纹数量变化；B. 使用前后皱纹深度变化；C. 使用前后皱纹面积变化；D. 使用前后皱纹长度变化。\*表示与模型组相比， $P < 0.05$ ；\*\*\*表示与模型组相比， $P < 0.001$

图4 三七提取物护肤品使用前后的抗皱功效比较

在评估皱纹参数变化的同时，本研究也通过都受试者的自我评估进一步明确产品的功效，结果显示，32名受试者使用产品4周后，受试者对产品的满意度为100%。对皱纹深度改善效果满意度为81.3%，对皱纹长度改善效果的满意度为84.4%，对皱纹面积改善效果的满意度为75%。84.4%认为细纹问题得到改善，87.5%的受试者认为使用产品后皱纹、纹路等整体效果得到改善，受试者自我评估的结果和仪器测试的皱纹参数结果保持一致。

### 3 讨论

UVA的辐射是导致皮肤光老化的主要原因，紫外线UVA可以达到肌肤的真皮层，导致弹性纤维和胶原蛋白纤维被破坏，对真皮层的成纤维细胞损伤作用尤其明显，是皮肤衰老的原因。因此本研究使用了UVA和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 刺激成



示例1



示例2

图5 三七提取物护肤品受试者使用前后

表3 受试者自我评估满意度调查结果 (n=32)

评估指标	使用产品4周后	
	频数 (4分+5分)	满意度/%
整体保湿效果	31	96.9
皱纹深度改善效果	26	81.3
细纹问题改善	27	84.4
使用后皮肤更具有弹力	29	90.6
使用后皮肤变细腻	30	93.8
使用时有舒缓的感觉	32	100.0
皱纹长度改善的效果	27	84.4
皱纹面积改善的效果	24	75.0
使用后皮肤变得饱满有光泽	30	93.8
皱纹、纹路整体改善效果	28	87.5
对产品的满意度	32	100.0

纤维细胞建立两种氧化应激和光损伤模型，评估三七提取物的抗衰作用。

ROS在细胞信号传导和体内平衡中具有重要作用，ROS的急剧增加会对细胞结构造成严重损伤，也叫氧化



应激,过量的ROS会引起细胞凋亡<sup>[10]</sup>。有大量研究表明ROS与衰老密切相关,过量的ROS通过对DNA造成损伤,引起细胞功能紊乱,最终导致衰老<sup>[11]</sup>。然而生物体在衰老过程中机体氧化应激水平降低,代谢产物丙二醛(MDA)增多,抗氧化酶活力减弱,机体产生和清除自由基的平衡被破坏,使自由基堆积,加速衰老<sup>[12]</sup>。本研究通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激成纤维细胞来建立细胞氧化损伤模型进而研究三七提取物的抗氧化损伤作用。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导成纤维细胞损伤是目前研究应用比较广泛的一种氧化损伤模型体外细胞培养模型,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>极易透过细胞膜与细胞内铁离子反应生成高活性自由基,是用来研究各类细胞氧化损伤的一种重要工具<sup>[13-14]</sup>。

有研究证明,皮肤衰老与真皮胶原蛋白的含量和性质有关。随着年龄增长控制DNA合成的抑制物增多,致使rRNA、tRNA、mRNA含量逐渐下降,胶原蛋白合成进一步减少导致皮肤老化<sup>[15]</sup>。此外,透明质酸是皮肤组织的重要成分之一,额外给皮肤补充透明质酸能起到独特的保护皮肤作用,可保持皮肤滋润光滑、细腻柔嫩、富有弹性,具有防皱、抗皱、美容保健和恢复皮肤生理功能的作用<sup>[16]</sup>。因此透明质酸也是应用在护肤品中应用比较广泛的一种成分。

本研究证实了三七提取物能够促进成纤维细胞的增殖,并且在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导成纤维细胞损伤模型中,三七提取物能显著降低细胞内ROS和MDA含量,同时能够促进CAT酶活性,保护细胞免受H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的氧化应激损伤;在UVA诱导的成纤维细胞光老化模型中,三七提取物能显著提高I型胶原蛋白和透明质酸的含量,保护细胞免受UVA引起的光老化,由此可见,三七根提取可以通过促进I型胶原蛋白和透明质酸的合成来保护皮肤免受紫外线引起的衰老。与此同时,一款产品除了具备功效性外还需要具备超高安全性,在临床应用中不会给肌肤带来风险。本研究还将三七提取物制备成了护肤品,并通过人体试验表明,该产品应用在人体中具有安全性,说明该产品安全无刺激,可以应用在后续的抗皱功效测试中。并且在临床抗衰老功效方面,使得由于皮肤衰老造成面部皱纹增加的人群在使用产品28 d后,皮肤皱纹数量、皱纹深度、皱纹面积、皱纹长度得到显著改善,见图6。整体来看该产品在改善皱纹方面有很显著的效果,说明三七提取物在抗衰老、抗皱产品方向具有很好的应用前景。

因此,三七提取物是一种抗衰老功效显著的活性原料,在抗衰老护肤品中具有较高的应用价值。

#### [参考文献]

- [1]鲍嘉敏,宋永嘉,张立创,等.三七总皂苷对血管生成影响的研究进展[J].中成药,2021,43(10):2759-2765.
- [2]谭辉.三七的化学成分和药理作用研究[J].中国中医药现代远程教育

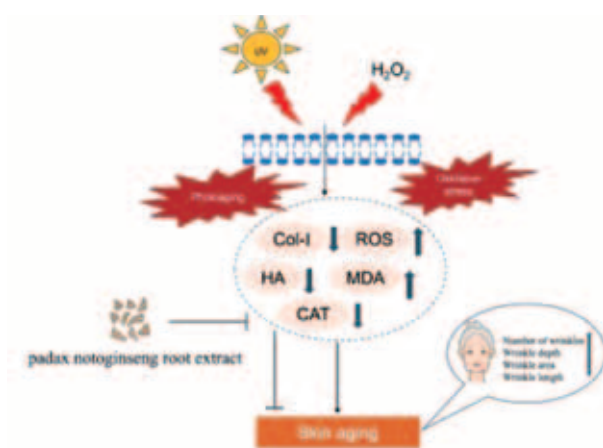


图6 三七提取物的抗衰老功效

育,2017,15(17):140-142.

- [3]高思宇,霍彤,李学涛,等.三七提取物的抗衰老功效性研究[J].日用化学工业,2020,50(11):783-787,798.
- [4]何葆华.面部皮肤老化形成[J].健康人生,2019,225(6):8-10.
- [5]谢璟.杨梅黄酮对紫外线诱导的皮肤光老化保护作用及潜在机制研究[D].青岛:山东大学,2019.
- [6]陈旭,周治君.皮肤光老化:UVA诱导的光损伤和皮肤类型[J].中华皮肤科杂志,2018,51(7):2.
- [7]宋奇,艾连中,鲁红岩,等.巴马长寿饮食模式在衰老小鼠模型中的抗氧化应激效果[J].食品科学,2018,39(19):147-153.
- [8]国家食品药品监督管理总局.化妆品安全技术规范(2015年版)[S].2015年第268号
- [9]浙江省保健品化妆品行业协会.T/ZHCA 006-2019,化妆品抗皱功效测试方法[S].北京:中国标准出版社,2019.
- [10]崔慧萍,周薇,郭长虹.植物过氧化物酶体在活性氧信号网络中的作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2017,33(3):7.
- [11]周建敏,刘鑫玉,刘远莉,等.ROS在肿瘤细胞中的调控作用及相关的抗肿瘤策略[J].生命的化学,2022,42(12):8.
- [12]杨善岚,吴磊,涂嘉欣,等.自由基致衰老的研究进展[J].中华疾病控制杂志,2022,26(5):589-594.
- [13]Shi X, Cheng W, Wang Q, et al. Exploring the protective and reparative mechanisms of g. lucidum polysaccharides against H2O2-induced oxidative stress in human skin fibroblasts[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2021,14:1481-1496.
- [14]唐玉莲,蒋新元.鞣花酸的抗氧化性及其对PC-12细胞氧化损伤的保护作用研究[J].中国食品添加剂,2023,34(1):8.
- [15]王文成,张亚文,马瑞,等.时序性老化中皮肤形态学的变化及MMP1、MMP12定量分析研究[J].宁夏医科大学学报,2022,44(5):459-465.
- [16]曲文杰.透明质酸在皮肤护理上的应用[J].中国化妆品,2020,421(8):94-97.

[收稿日期]2023-04-13

本文引用格式:石秀芹,吴迪,李国庆,等.三七提取物在抗衰老护肤品中的应用探究[J].中国美容医学,2024,33(11):17-21.