

天麻提取物的皮肤屏障修复功效及安全性评价

王玮恋¹, 张影¹, 周雯², 李琪琳¹, 高文红³, 李丽^{1*}

(1. 北京工商大学北京市植物资源重点实验室, 北京 100048) (2. 云南省林业双中心, 云南昆明 650200)
(3. 润芳可(上海)生物科技有限公司, 上海 2014992)

摘要: 该研究采用热回流法制备天麻提取物(GEE), 通过0.15 J中波紫外线(UVB)辐射人角质形成细胞(HaCaT)的细胞模型及人体保湿性功效评价, 探究了GEE对受损屏障的修复作用。研究表明, 当GEE样品质量浓度为200 μg/mL时, 细胞相对生存活力为89.79%, 此时对TNF-α和PGE₂的抑制率分别为16.30%、24.51%, 使ROS含量下降32.70%, FLG与AQP3 mRNA表达量分别上调65.79%、189.60%, 且两种蛋白含量分别增加17.86%、16.73%。同时, 由鸡胚绒毛尿囊膜实验可知, 质量浓度小于等于7 mg/mL的GEE样品均无明显刺激; 人体斑贴实验及保湿功效评价证明, 含0.5% (质量分数) GEE的凝胶样品对皮肤无不良反应, 相比空白组能提高14.28%皮肤水分含量, 降低15.09%水分散失量。因此, GEE可通过降低ROS含量, 抑制TNF-α和PGE₂的分泌, 上调AQP3、FLG的mRNA表达量并增加两种蛋白含量, 以及提高皮肤保湿能力来发挥屏障修复功效, 并且刺激性低安全性高, 作为舒缓、修复类原料应用有良好市场前景。

关键词: 天麻; 人角质形成细胞; 皮肤屏障; 安全性

文章编号: 1673-9078(2024)12-32-40

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1469

Skin Barrier Repairing Efficacy and Safety Evaluation of *Gastrodia elata* Extract

WANG Weilian¹, ZHANG Ying¹, ZHOU Wen², LI Qilin¹, GAO Wenhong³, LI Li^{1*}

(1. Beijing Key Lab of Plant Resource Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China) (2. Yunnan Forestry Double Center, Kunming 650200, China)
(3. Revacl (Shanghai) Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 201499, China)

Abstract: *Gastrodia elata* extract (GEE) was prepared using the thermal reflux method and its ability to repair damaged skin barrier was investigated using a HaCaT cell model irradiated with 0.15 J medium-wave ultraviolet B, as well as its moisturizing efficacy was evaluated in humans. At a GEE concentration of 200 μg/mL, the relative cell survival viability was 89.79%, with the inhibition rates of tumor necrosis factor (TNF)-α and prostaglandin E₂ (PGE₂) being 16.30% and 24.51%, respectively. The reactive oxygen species (ROS) content decreased by 32.70%, thereby upregulating the expression of filaggrin (FLG) and aquaporin 3 (AQP3) mRNA by 65.79% and 189.60%, with the protein contents both increasing by 17.86% and 16.73%, respectively. Moreover, the chick embryo chorionic allantoic membrane assay showed that the GEE samples with a concentration ≤7 mg/mL caused no considerable irritation. Furthermore, the human patch test

引文格式:

王玮恋,张影,周雯,等.天麻提取物的皮肤屏障修复功效及安全性评价[J].现代食品科技,2024,40(12):32-40.

WANG Weilian, ZHANG Ying, ZHOU Wen, et al. Skin barrier repairing efficacy and safety evaluation of *Gastrodia elata* extract [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 32-40.

收稿日期: 2023-12-11

作者简介: 王玮恋(1999-), 女, 硕士, 研究方向: 化妆品植物原料功效评价, E-mail: wangweilian999@163.com

通讯作者: 李丽(1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 化妆品原料功效研究, E-mail: lili2212@163.com

and moisturizing efficacy evaluation indicated that the gel samples containing 0.5% (mass fraction) GEE caused no adverse reactions on human skin, increased the skin moisture content by 14.28%, and decreased moisture loss by 15.09% compared with that of the blank group. Therefore, GEE exerts barrier repair efficacy by reducing ROS content, inhibiting TNF- α and PGE₂ secretion, upregulating AQP3 and FLG mRNA expression, increasing AQP3 and FLG protein content, and improving skin moisture. Owing to its low irritation and high safety, EGG shows promising potential as a soothing and rejuvenating ingredient.

Key words: *Gastrodia elata*; HaCaT cells; skin barrier; safety

天麻是兰科植物天麻 (*Gastrodia elata* Bl.) 的干燥茎块, 作为药食同源的名贵中药材, 其性味甘平、无毒, 具有平抑肝阳、息风止痉、镇静安眠等功效, 在《神农本草经》和《本草纲目》中均有记载^[1,2]。现代药理表明, 天麻含有天麻素、天麻多糖等多种活性成分, 具有抗炎、抗氧化、神经保护等药理作用^[3], 还可以促进胶原蛋白的合成, 阻止紫外线引起的皮肤光老化^[4,5]。

角质层是皮肤屏障功能的基础, 角质形成细胞正常状态下生成的氧代谢产物活性氧 (ROS) 含量较低, 而在中波紫外线 (UVB) 辐射后 ROS 会大幅度增加, 引起氧化应激产生细胞氧化损伤^[6,7], 并促使细胞释放大量肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和前列腺素 E2 (PGE₂) 等炎症因子, 从而引发皮肤炎症损伤, 造成泛红、痛痒等问题^[8,9], 破坏皮肤屏障。同时, 对于屏障受损的皮肤, UVB 等外界刺激更易进入皮肤引发炎症反应, 进一步加重屏障受损程度^[10,11]。另一方面, 丝聚蛋白 (FLG) 是角质层的骨架, 在半胱天冬酶-14 (caspase-14) 作用下 FLG 又能够水解生成天然保湿因子 (NMF), 维持角质层的保湿功能^[12-14]。水通道蛋白 3 (AQP3) 除与皮肤水合功能相关外, 还能够上调 FLG 等多种屏障蛋白的表达, 同样与皮肤屏障密切相关^[15]。研究表明, UVB 能够下调 FLG、AQP3 的基因表达量, 破坏屏障结构完整性^[16,17]。人角质形成细胞 (HaCaT) 是一种永生化细胞, 具有与正常人角质形成细胞 (KCs) 相似的生物学特性, 可基于 HaCaT 细胞进行皮肤屏障相关研究^[16]。

本研究采用热回流法提取天麻, 使用 UVB 照射 HaCaT 细胞构建屏障损伤模型, 通过检测 GEE 对炎症因子 PGE₂、TNF- α 分泌量、细胞内 ROS 含量及 FLG、AQP3 基因表达与蛋白含量的影响, 探索其对 UVB 诱导的皮肤屏障损伤的修复能力, 同时检测了 GEE 的眼刺激性和人体安全性及保湿性功效评价, 为天麻在保湿、修复化妆品领域的安全应

用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

本实验所用的鲜天麻药材, 品种为乌天麻 (*Gastrodia elata* Bl. form. *glauca* S. Chow), 产地为云南昭通。

角质形成细胞, 浙江美森细胞科技有限公司; DMEM 培养基、Trypsin-EDTA、FBS, 美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒、FBS, 北京百瑞极生物科技有限公司; 人 PGE₂ ELISA 试剂盒, 上海威奥生物科技有限公司; 逆转录试剂盒, 北京兰易科技有限公司; qPCR 试剂盒, 北京春雷杰创生物科技有限公司; 白莱杭鸡 SPF 级受精鸡胚, 北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司; AQP3 抗体; FLG 抗体, 美国 Cell Signaling Technology 公司; 活性氧检测试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司。

D3024R 离心机高速冷冻离心机, 美国 Scilogex 公司; SMA-1000 分光光度计, 美林恒通 (北京) 仪器有限公司; Light Cycler 96 实时荧光定量 PCR 仪, 瑞士 Roche 公司; Infinite M200 Pro 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; XDS-3 倒置显微镜, 重庆留辉科技有限公司; Heracell 150i CO₂ 培养箱, 赛默飞世尔科技有限公司; 130C- I 净化工作台, 北京赛伯乐科技有限公司; KN-4006B 紫外线光疗器, 徐州市科诺医学仪器设备有限公司; Corneometer CM825、Tewameter TM300, 德国 CK 公司; CKX53 倒置显微镜, 日本奥林巴斯公司。

1.2 实验方法

1.2.1 天麻提取物制备

将鲜天麻药材洗净去皮, 切片, 置于 50 °C 干燥箱烘干至恒重, 后将药材粉碎, 精确称取 50 g 天麻粉末, 置于三颈烧瓶中, 按料液比 1:15 (*m/m*)

加入去离子水, 加热回流 3 h, 抽滤, 收集滤液, 冷冻干燥得到 GEE 冻干粉。

1.2.2 GEE对细胞相对生存活力的影响

以每毫升 1×10^5 个的密度接种细胞于 96 孔板, 每孔接入 100 μL 细胞液, 置于培养箱 (37°C , 5% CO_2) 孵育 24 h 后, 弃上层培养液, 加入 200、300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 由 DMEM 培养基溶解的 GEE 溶液, 作用 24 h 后, 弃上清, 每孔加入 100 μL 无血清培养基之后再加 10 μL CCK-8 溶液, 培养 2 h 后于 450 nm 测量吸光度。

1.2.3 UVB屏障损伤细胞模型建立

1.2.3.1 UVB对细胞相对生存活力的影响

以每毫升 1×10^5 个的密度接种细胞于 96 孔板, 每孔接入 100 μL 细胞液, 培养 12 h 使细胞贴壁, 弃培养基, PBS 清洗后每孔加入 100 μL , UVB 模型组分别进行 0.06、0.08、0.1、0.12、0.15 J 能量辐射, 空白组无需辐射。然后利用 CCK-8 法测定 UVB 照射后的细胞存活率, 筛选合适的 UVB 辐射剂量。

1.2.3.2 UVB对TNF- α 分泌的影响

以每毫升 4.0×10^5 个的密度接种细胞于 48 孔板, 每孔接入 0.5 mL 细胞液, 培养 12 h 使细胞贴壁, 弃上清, PBS 清洗后, UVB 模型组进行 0.1、0.12、0.15 J 的 UVB 辐射, 辐射后每孔再接入 0.5 mL 无血清培养基, 培养 18 h。收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 含量。

1.2.4 检测GEE对PGE₂、TNF- α 分泌的抑制作用

以每毫升 4.0×10^5 个的密度接种细胞于 48 孔板, 每孔接入 0.5 mL 细胞液, 培养 12 h 贴壁, 弃上清, PBS 清洗后, 进行 UVB 辐照 (剂量为 0.15 J), 加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GEE 溶液样品孵育 18 h 后, 收集上清液按照相应 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 及 PGE₂ 含量。

1.2.5 检测GEE对ROS含量的降低作用

UVB 辐射及样品作用细胞后, 弃上清, 加入 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DCFH-DA 适量, 培养箱孵育 20 min, 用无血清培养基清洗 3 次, 用倒置显微镜观察拍照, 并用 Image J 分析荧光强度。

1.2.6 检测GEE对FLG、AQP3 mRNA表达量的调控作用

UVB 辐射及样品作用细胞后, 使用 Trizol 试剂提取 RNA, 随后逆转录, 具体操作参照说明书。引物根据 NCBI 中发布的基因序列, 通过 Primer

Express 软件设计, 内参基因是 *GAPDH*, 具体序列见表 1。检测细胞 mRNA 表达水平, 反应在 QPCR 仪上进行, PCR 设置程序见表 2。

表 1 *GAPDH*、*FLG*、*AQP3*基因引物序列

Table 1 *GAPDH*、*FLG*、*AQP3* gene primer sequences

基因名称	引物方向	引物序列
<i>GAPDH</i> (homo)	F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	R	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
<i>FLG</i> (homo)	F	GGACAGGAACAATCATCGGGG
	R	CAACCTCTCGGAGTCGTCTG
<i>AQP3</i> (homo)	F	CCGTGACCTTTGCCATGTG
	R	CGAAGTGCCAGATTGCATCATAA

表 2 PCR设置程序

Table 2 PCR setup program

程序	温度/ $^\circ\text{C}$	时间
Pre-incubation	95	3 min
Amplification (40 cycles)	95	3 s
	60	20 s
Melting Curves	95	15 s
	60	15 s
	95	15 s

1.2.7 检测GEE对FLG、AQP3蛋白含量的影响

UVB 辐射及样品作用细胞培养后, 使用 4% (质量分数) 的多聚甲醛溶液固定细胞, 室温静置 15 min, 再按通透, 封闭, 一抗孵育, 二抗孵育, 染细胞核, 淬灭的免疫荧光检测步骤进行实验, 通过荧光显微镜采集细胞图片并使用 Image J 分析荧光强度。

1.2.8 GEE的眼刺激性安全评价

通过鸡胚绒毛尿囊膜实验检测 GEE 的刺激性。阴性对照采用 0.9% (质量分数) NaCl 溶液, 阳性对照采用 0.1 mol/L NaOH 溶液, GEE 样品配置质量浓度为 3、5、7 mg/mL, 选取 9 日龄鸡胚, 敲除蛋壳保证绒毛尿囊膜 (CAM) 完整暴露, 将 300 μL 受试物滴加至 CAM 表面, 3 min 后洗去, 观察出血、凝血和血管融解情况并按终点评分法进行评分。

1.2.9 GEE配方的皮肤安全性评价

制备含有将 GEE 冻干粉的凝胶样品, 配方如表 3 所示, 将凝胶样品放入斑试器, 空白组不放样品。招募 30 名测试人员, 将斑试器贴于受试者小臂内测, 24 h 后取下, 待 30 min 后压痕消失, 观察并记录皮肤表现, 并根据表 4 进行评分。

表 3 凝胶样品配方成分表

Table 3 Gel sample formulation ingredient list

组相	原料	标准中文名称	添加量 /%
A	U20	丙烯酸(酯)类/C10-30 烷醇丙烯酸酯交联聚合物	0.8
	去离子水	去离子水	To 100
	丁二醇	丁二醇	2
	甘油	甘油	4
	海藻糖	海藻糖	3
B	EDTA-2Na	EDTA-2Na	0.05
	天麻多糖 冻干粉	天麻 (GASTRODIA ELATA) 提取物	0.5
	去离子水	去离子水	10
C	NaOH(10%)	氢氧化钠	1.8
	MTI	甲基异噻唑啉酮/碘丙炔醇 丁基氨甲酸酯	0.15

表 4 皮肤封闭斑贴试验皮肤反应分级标准

Table 4 Criteria for grading skin reactions to skin-closure patch tests

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

1.2.10 GEE的人体保湿性功效评价

在 30 名志愿者小臂内测 (3 cm×3 cm), 分别涂抹含有 GEE 冻干粉的凝胶样品及无 GEE 的空白样品, 用量均为 0.02 g。试验始终控制在温度 (20±2)℃, 相对湿度 (50%±10%) 使用采用德国 CK 公司的 MPA10 系统的 Corneometer 探头和 Tewameter 探头在第 0、1、2、4 小时分别检测测试区域的水分含量与水分散失量, 并记录数据。

1.3 统计学方法

检测结果采用 GraphPad Prism Program 软件作图, 运用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 样品对细胞相对生存活力的影响

对于制备所得的 GEE 样品, 通过 CCK-8 法检测其对细胞相对生存活力的影响, 为后续实验选择合适的样品质量浓度。实验结果如图 1 所示, GEE 样品作用于 HaCaT 细胞后, 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞相对生存活力为 89.79%, 即在此质量浓度下 GEE 样品对细胞无毒或低毒, 在 300 $\mu\text{g/mL}$ 及 400 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率分别为 75.08%、66.89%, 均呈现出轻微毒性。因此, 选择 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 GEE 溶液进行后续细胞实验。

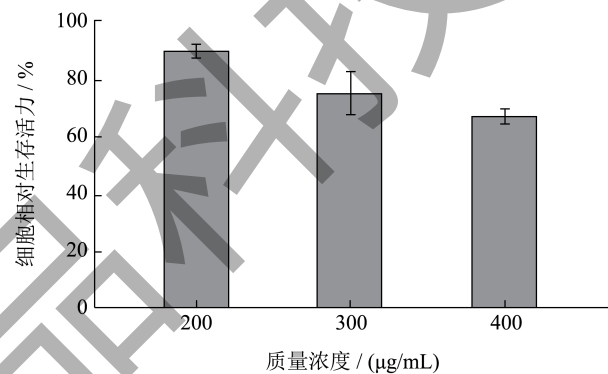


图 1 不同质量浓度 GEE 溶液作用下细胞相对生存活力

Fig.1 Relative cell survival viability in the presence of different mass concentrations of GEE solutions

2.2 UVB诱导的HaCaT细胞屏障损伤模型建立

使用不同剂量的 UVB 辐照 HaCaT 细胞, 细胞相对生存活力如图 2 所示, 随着 UVB 辐射剂量的增加, 细胞相对生存活力逐渐降低, 但当辐射剂量达到 0.15 J 时, 细胞生存活力为 81.75%, 对细胞无毒或低毒性。

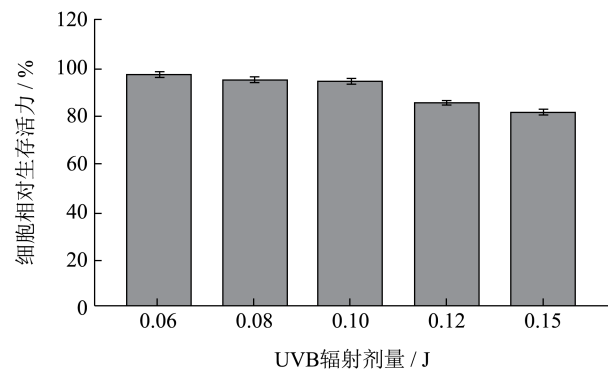


图 2 不同剂量 UVB 辐照下的细胞相对生存活力

Fig.2 Relative cell viability under different doses of UVB irradiation

TNF- α 是由角质形成细胞分泌的一种常见的炎症因子, 通过 ELISA 检测不同剂量 UVB 对 TNF- α 分泌量的影响, 结果如图 3 所示, UVB 辐照损伤细胞后, 辐射剂量大于 0.1 J 时可增加 TNF- α 分泌量, 当辐射剂量达到 0.15 J 时 TNF- α 含量由 25.69 pg/mL 增加至 48.47 pg/mL, 具有极显著差异性 ($P < 0.001$), 表明 0.15 J 的 UVB 对 HaCaT 细胞具有更强的损伤作用。

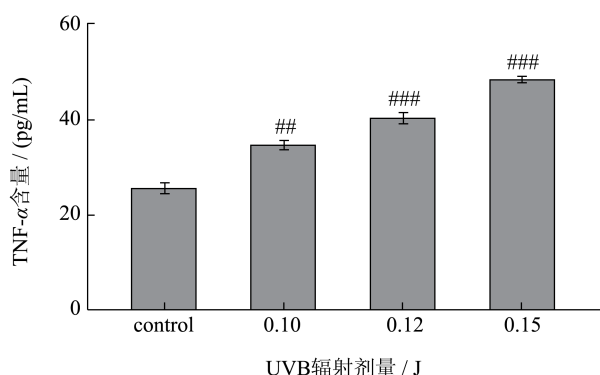


图 3 不同剂量 UVB 辐照下对 TNF- α 分泌量的影响

Fig.3 Effects of different doses of UVB irradiation on TNF- α secretion

注: ## 代表 UVB 模型组与空白组相比 $P < 0.01$; ### 代表 UVB 模型组与空白组相比 $P < 0.001$ 。

综合图 2、图 3 结果可知, 最终选取 0.15 J 的 UVB 辐照培养 HaCaT 细胞以建立屏障损伤细胞模型。

2.3 样品对 PGE₂、TNF- α 分泌的抑制作用

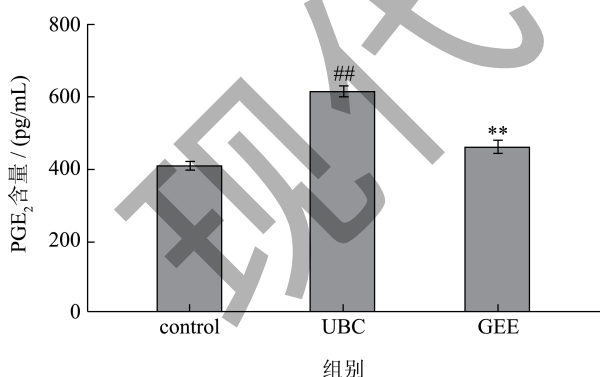


图 4 各实验组别的 PGE₂ 分泌量

Fig.4 PGE₂ secretion by experimental group

注: ## 代表 UVB 模型组与空白组相比 $P < 0.01$; ** 代表样品组与 UVB 模型组相比 $P < 0.01$ 。

皮肤持续暴露在 UVB 下会引发炎症和光损伤, 释放大量 TNF- α 和 PGE₂ 等促炎细胞因子^[18], 使人

体产生瘙痒、刺痛等不适感, 由此引起的抓挠行为也会进一步加重皮肤破损程度。现有报道中, 已有众多植物提取物被证实能够抑制紫外线辐射导致的 TNF- α 、PGE₂ 等炎症因子的合成和释放, 从而发挥抗炎、修复皮肤的作用^[18-20]。

探究 GEE 对 UVB 刺激后 PGE₂、TNF- α 分泌的抑制作用, 结果如图 4、图 5 所示, 与 UVB 模型组相比, GEE 溶液作用后损伤细胞内的两种炎症因子含量均有降低作用, 其对 PGE₂ 的抑制率为 24.51%, 具有显著抑制作用 ($P < 0.01$); 对 TNF- α 的抑制率为 16.30%, 具有统计学差异 ($P < 0.05$), 表明 GEE 在 UVB 诱导的 HaCaT 细胞损伤中有良好抗炎症损伤作用。

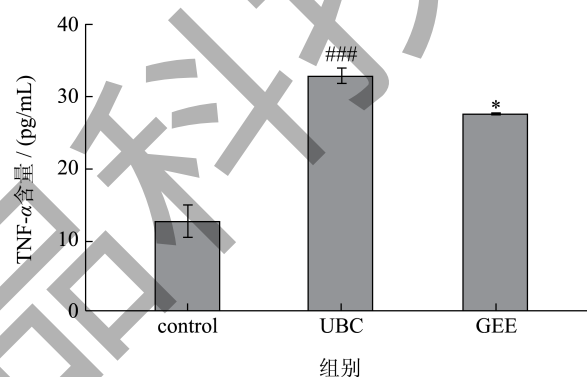


图 5 各实验组别的 TNF- α 分泌量

Fig.5 TNF- α secretion by experimental group

注: ### 代表 UVB 模型组与空白组相比 $P < 0.001$; * 代表样品组与 UVB 模型组相比 $P < 0.05$ 。

2.4 样品对 ROS 水平的降低作用

Gan 等^[21]研究表明 UVB 暴露可导致 HaCaT 细胞中和线粒体中 ROS 积累, 三磷酸腺苷 (ATP) 作用后可降低 ROS 水平, 进而抑制 UVB 诱导的 HaCaT 细胞光损伤。Gan 等^[22]基于紫外线诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤模型, 测定细胞内和线粒体 ROS 及相关蛋白的含量, 发现咖啡因可减少 ROS 的积累, 并促进有利蛋白表达, 从而提高 HaCaT 细胞在氧化损伤后的存活率。

因此, 通过荧光探针检测 GEE 对细胞 ROS 含量的降低作用, 可反映其抗氧化损伤能力。实验结果见图 6、图 7, 与 UVB 模型组相比, GEE 处理后的 ROS 含量下降 32.70%, 证明 GEE 可显著降低 ROS 水平 ($P < 0.01$), 减轻 UVB 引起的氧化损伤, 具有较强的修复能力。

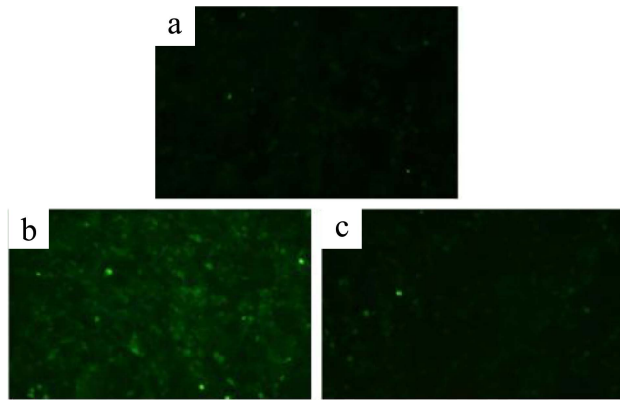


图 6 各实验组别的 ROS 荧光探针检测结果

Fig.6 Results of ROS fluorescent probe detection by experimental groups

注: a 为 control, b 为 UVB, c 为 GEE。

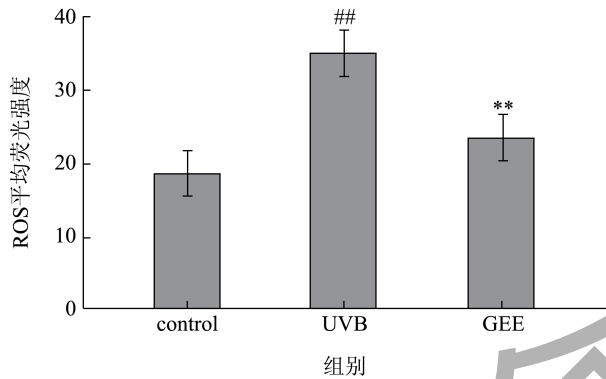


图 7 各实验组别的 ROS 相对荧光强度

Fig.7 Relative fluorescence intensity of ROS by experimental groups

注: ## 代表 UVB 模型组与空白组相比 $P < 0.01$; ** 代表样品组与 UVB 模型组相比 $P < 0.01$ 。

2.5 样品对 FLG、AQP3 mRNA 表达量的调控作用

FLG、AQP3 是两种与皮肤屏障相关的重要蛋白, Jing 等^[23]发现甘露糖基赤藓糖醇脂质可通过上调 FLG、兜甲蛋白 (LOR)、转谷氨酰胺酶 -1 (TGM1) 的基因表达量和蛋白含量, 保护 HaCaT 细胞免受 UVB 的损伤。Li 等^[24]通过动物实验证明人参低聚糖提取物能改善 UVB 诱导的 FLG、AQP3 蛋白水平的降低, 同时发现该提取物会增加 HaCaT 细胞中 FLG 和 AQP3 mRNA 水平和蛋白含量, 缓解皮肤干燥和脱屑症状, 修复 UVB 引起的皮肤屏障损伤。

探究 GEE 作用于 UVB 损伤的 HaCaT 细胞后, 是否能够上调 FLG、AQP3 mRNA 表达量。qRT-PCR 检测结果如图 8 所示, 与 UVB 模型组相比, GEE 对

FLG mRNA 表达量上调 65.79%, 对 AQP3 mRNA 表达量上调 189.60%, 均有显著差异 ($P < 0.01$)。

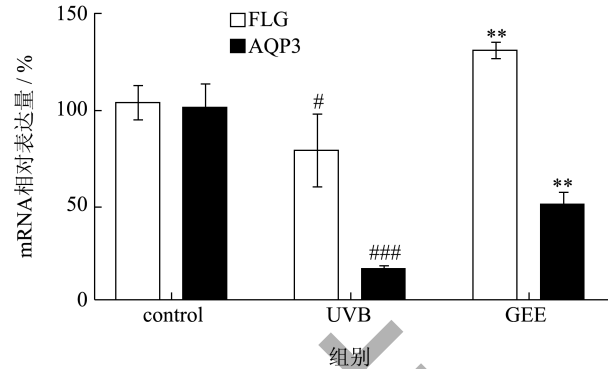


图 8 各实验组别的 FLG、AQP3 mRNA 相对表达量

Fig.8 Relative expression of FLG, AQP3 mRNA by experimental groups

注: # 代表 UVB 模型组与空白组相比 $P < 0.05$; ### 代表 UVB 模型组与空白组相比 $P < 0.001$; ** 代表样品组与 UVB 模型组相比 $P < 0.01$ 。

2.6 样品 FLG、AQP3 蛋白含量的影响

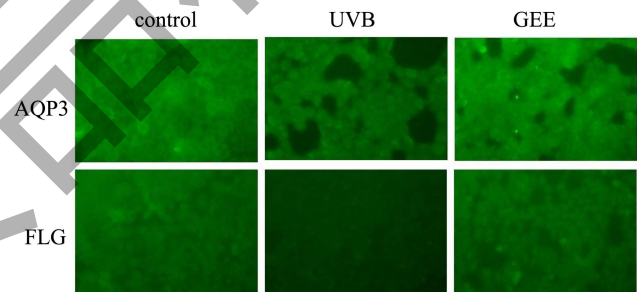


图 9 各实验组别的 FLG、AQP3 免疫荧光染色结果

Fig.9 Immunofluorescence staining results of FLG and

AQP3 in each experimental group

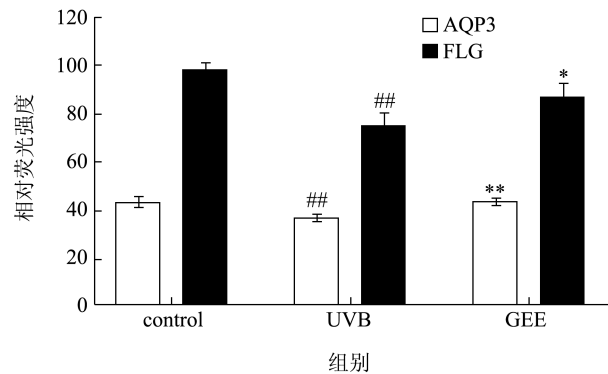


图 10 各实验组别的 FLG、AQP3 相对荧光强度

Fig.10 Relative fluorescence intensity of FLG and AQP3 in each experimental group

注: # 代表 UVB 模型组与空白组相比 $P < 0.01$; * 代表样品组与 UVB 模型组相比 $P < 0.05$; ** 代表样品组与 UVB 模型组相比 $P < 0.01$ 。

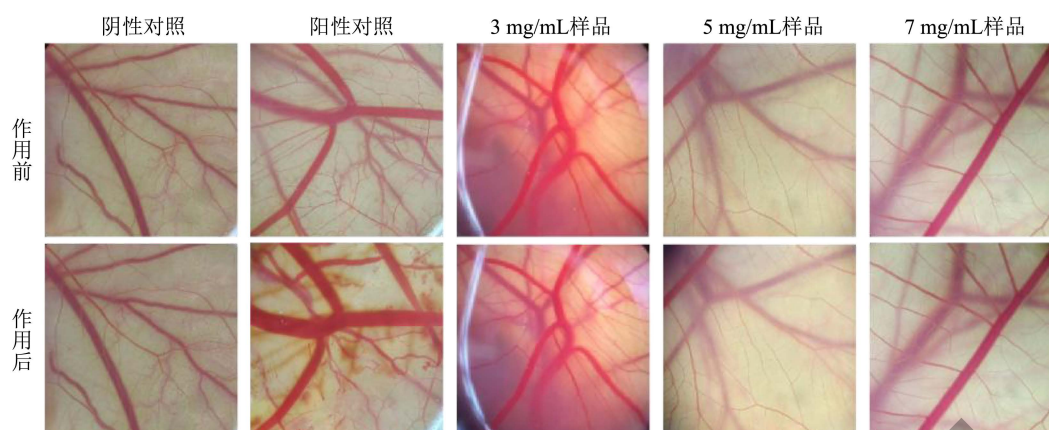


图 11 鸡胚绒毛尿囊膜试验结果

Fig.11 Results of the chick embryo chorionic villus allantoic membrane test

采用免疫荧光法从蛋白水平检测 GEE 对屏障相关蛋白 FLG、AQP3 含量的影响,结果如图9、10所示,相比于 UVB 模型组,加入 GEE 样品后 HaCaT 细胞膜上的 FLG、AQP3 荧光强度均上升,数据表明 FLG、AQP3 含量分别增加 17.86% ($P<0.01$)、16.73% ($P<0.05$),从而加固皮肤屏障。

2.7 GEE的眼刺激性安全评价

鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 表面含有丰富的血管,现常作为化妆品兔眼刺激性试验的替代模型应用^[25]。GEE 的试验结果如图 11 所示,按终点评分法的评估标准,阳性对照组有明显出血等现象,ES 评分为 14;阴性对照组无异常现象,ES 评分为 0;3 个样品组 CAM 血管结构清晰,无出血、凝血、血管溶解现象,ES 评分均为 0,这表明质量浓度小于等于 7 mg/mL 的 GEE 溶液,属于无/轻刺激性。

2.8 GEE配方的皮肤安全性评价

将 GEE 添加至配方中,通过皮肤斑贴试验探究含有 GEE 的凝胶样品对人体皮肤安全性是否有影响,检测结果见表 5,30 名测试人员在 24 h 后揭下斑贴后,样品组与空白组均无不良反应,皮肤表现均正常,这表明该 GEE 凝胶样品安全性较高,可安全应用于人体。

表 5 人体斑贴试验结果

Table 5 Human patch test results

试验组别	测试时长/h	各级皮肤反应人数				
		0	1	2	3	4
样品组	24	30	0	0	0	0
空白组	24	30	0	0	0	0

2.9 GEE人体保湿性功效评价

健康的皮肤屏障具有良好的保湿性能,皮肤水分含量可反映皮肤的水合功能强弱,皮肤水分散失量则代表水分经皮肤表面的蒸发量,二者都是评估皮肤屏障功能的重要指标。各样品涂抹后 4 h 内不同时间的水分含量及水分散失量检测结果如图 12、13 所示,与初始值相比,GEE 样品组在 4 h 后皮肤水分含量上升 47.58% ($P<0.001$),水分散失量下降 17.26% ($P<0.01$);与未添加 GEE 的空白组相比,GEE 样品组 4 h 后皮肤水分含量高 14.28% ($P<0.001$),水分散失量的降低 15.09% ($P<0.05$)。因此,涂抹含有 0.5% (质量分数) GEE 的样品能够有效提高皮肤水分含量并减少水分散失量,增强皮肤的保湿能力,进而修复受损皮肤屏障。

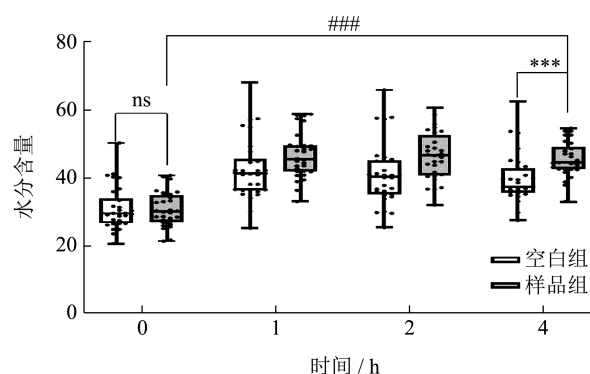


图 12 样品组与空白组在 0、1、2、4 h 的水分含量

Fig.12 Moisture content of sample group and blank group at 0, 1, 2 and 4 h

注: ns 代表空白组与样品组初始数值无差异性;### 代表样品组与初始数值相比 $P<0.001$;*** 代表样品组与空白组相比 $P<0.001$ 。

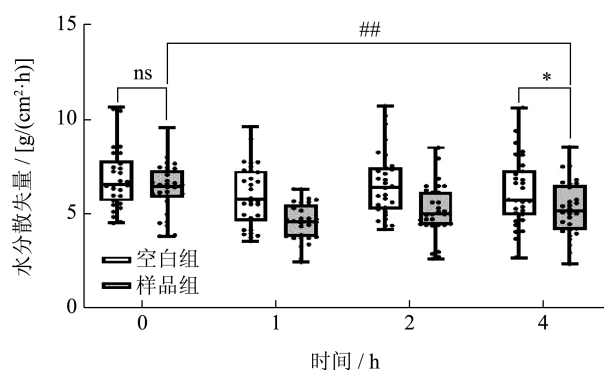


图 13 样品组与空白组在 0、1、2、4 h 的水分散失量

Fig.13 Moisture loss of the sample group and the blank group at 0, 1, 2 and 4 h

注: ns 代表空白组与样品组初始数值无差异性; ## 代表样品组与初始数值相比 $P < 0.01$; * 代表样品组与空白组相比 $P < 0.05$ 。

3 结论

本研究以天麻为研究对象,通过热回流法获得 GEE, 并对其修复功效及安全性研究。研究表明,与 UVB 诱导的屏障损伤细胞模型组相比, GEE 可有效减少 UVB 刺激后 HaCaT 细胞中 TNF- α 、PGE₂ 的分泌,降低细胞内 ROS 水平,减轻氧化及炎症损伤,并且能够显著上调 AQP3、FLG mRNA 表达并增加两种蛋白含量,加固屏障结构。

此外,鸡胚绒毛尿囊膜试验及人体斑贴试验表明, GEE 无明显刺激性,可安全应用于人体,后经人体保湿功效评价证明, GEE 可增强皮肤的保湿功能,促进屏障修复。因此,热回流法制备的 GEE 对皮肤屏障受损有较强的修复作用,且安全性高,在保湿、修复类化妆品领域有很大应用前景。

参考文献

- [1] 安中原,钟斌.天麻的化学成分与药理活性研究概况[J].海峡药学,2017,29(6):22-24.
- [2] 柳威,邓林华,祁东利,等.天麻及其有效成分的药理作用概述[J].中药药理与临床,2021,37(4):240-244.
- [3] ZHU H, LIU C, HOU J, et al. *Gastrodia elata* Blume polysaccharides: A review of their acquisition, analysis, modification, and pharmacological activities [J]. Molecules, 2019, 24(13): 2436.
- [4] SONG E, CHUNG H, SHIM E, et al. *Gastrodia elata* Blume extract modulates antioxidant activity and Ultraviolet A-Irradiated skin aging in human dermal

fibroblast cells [J]. Journal of Medicinal Food, 2016, 19(11): 1057-1064.

- [5] HWANG E, NGO H, YANG J E, et al. Evaluation of protective effect of cyclodextrin gluconotransferase-treated *Gastrodia elata* Blume extract on ultraviolet B-induced premature skin aging [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2019, 17(10): 1969-1975.
- [6] SEGER J A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2006, 116(5): 1150-1158.
- [7] VISARUT B, DLIY R, ASHWINI M, et al. Insights into antioxidant activities and anti-skin-aging potential of callus extract from *Centella asiatica* (L.) [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 13459.
- [8] IDRIS H T, NAISMITH J H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s) [J]. Microscopy Research and Technique, 2000, 50(3): 184-195.
- [9] LEE H H, MOON Y H, SHIN J S, et al. A novel mPGES-1 inhibitor alleviates inflammatory responses by downregulating PGE₂ in experimental models [J]. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 2019, 144: 106347.
- [10] KUBO A, NAGAO K, AMAGAI M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2012, 122 (2): 440.
- [11] CESAR L C, ELENA A O, MAVIL L C, et al. Protein kinases and transcription factors activation in response to UV-radiation of skin: Implications for carcinogenesis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(1): 142-172.
- [12] 廖倩,于春水,汪瀚文.皮肤屏障中分化蛋白的研究进展[J].实用皮肤病学杂志,2017,10(6):354-356.
- [13] MALIK K, HEITMILLER K D, CZARNOWICKI T. An update on the pathophysiology of atopic dermatitis [J]. Dermatologic Clinics, 2017, 35(3): 317-326.
- [14] SCHRADER A, SIEFKEN W, KUEPER T, et al. Effects of glyceryl glucoside on AQP3 expression, barrier function and hydration of human skin [J]. Skin Pharmacology and Physiology, 2012, 25(4): 192-199.
- [15] GREYHERBECK S, FELSNER I, BRENDEN H, et al. Urea uptake enhances barrier function and antimicrobial defense in humans by regulating epidermal gene expression [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2012, 132(6): 1561-1572.
- [16] 史云容,张峻岭,康元.葡萄籽提取物原花青素对UVA照射HaCaT细胞表达AQP3、Caspase-14和BH mRNA的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2020,34(6):640-643.

- [17] XIE H F, LIU Y F, LIU L S, et al. Protective role of AQP3 in UVA-induced NBSFs apoptosis via Bcl2 up-regulation [J]. Archives of Dermatological Research, 2013, 305(5): 397-406.
- [18] QU L P, WANG F F, CHEN Y Y. Protective effect and mechanism research of *Phyllanthus emblica* Linn. fruit extract on UV-induced photodamage in keratinocytes [J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2023, 22(8): 1945-1959.
- [19] KIM Y, SIM J, JEON K, et al. Fermented black ginseng extract prevents UVB-induced inflammation by regulating the nc886-PKR pathway in human keratinocytes [J]. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 2023, 40: e12927.
- [20] LEE K S, CHO E, WEON J B, et al. Inhibition of UVB-Induced inflammation by *Laminaria japonica* extract via regulation of nc886-PKR Pathway [J]. Nutrients, 2020, 12(7): 1958.
- [21] GAN C X, LIU T T, JIA X R, et al. ATP supplementation suppresses UVB-induced photoaging in HaCaT cells via upregulation of expression of SIRT3 and SOD2 [J]. Skin Research and Technology, 2023, 29(3): e13303.
- [22] GAN C X, HU C J, WANG L T, et al. Protective effect of caffeine on UV-induced oxidative damage in HaCaT cells and its mechanism [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(2): 286-292.
- [23] JING C X, GUO J L, LI Z Z, et al. Screening and research on skin barrier damage protective efficacy of different mannosylerythritol lipids [J]. Molecules, 2022, 27(14): 4648.
- [24] LI Z Z, JIANG R, JING C X, et al. Protective effect of oligosaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer against UVB-induced skin barrier damage in BALB/c hairless mice and human keratinocytes [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 283: 114677.
- [25] 陈梓灵, 徐颖愉, 刘香梅, 等. 洗洁精对鸡胚绒毛尿囊膜血管的刺激性评价 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(5): 398-401.