

SOFW

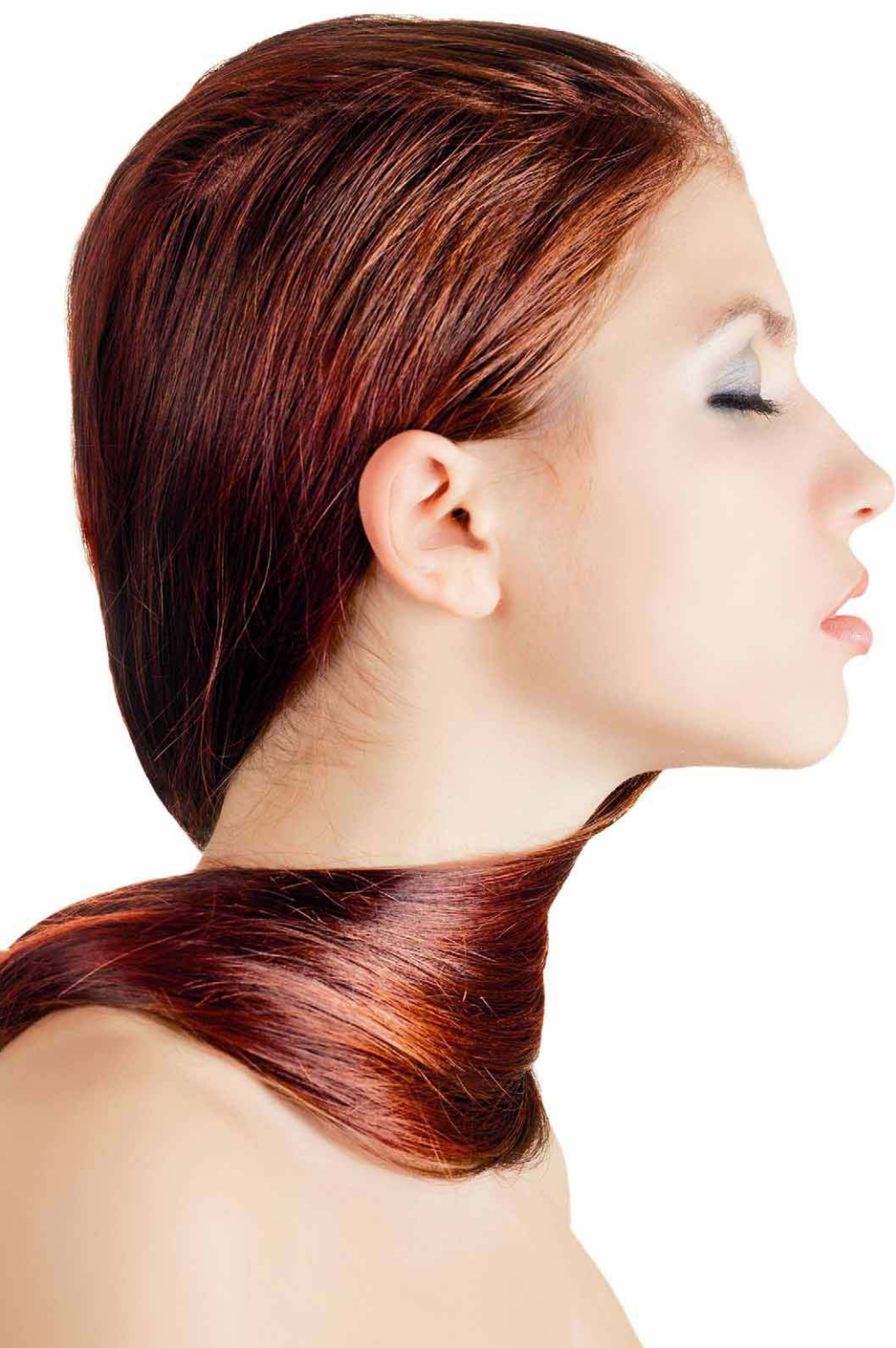
JOURNAL

2-2009

中文版

应用科学类国际性期刊

· 个人护理品 · 洗涤剂 · 专用品



一种新的抗老化护肤途径

皂树皮三萜皂角苷—
天然成泡剂

自然与技术交融—
天然化妆品成分银椒甙

制备纳米粒子的新的
分散技术

超越感官益处的硅氧烷

提升表皮屏障功能的
双重途径

镶木地板的保护及护理

一步一步地 —
REACH的要求以及它们在
欧洲表面活性剂行业中的
执行

Arunasiri Iddamalgodan*, Kiyotaka Tanaka, Kenichi Ito, Hiroyuki Kojima

一种新的抗老化护肤途径： 抗老化过程中控制肥大细胞类胰蛋白酶和NF-κB活性的重 要性

■ 光老化和肥大细胞类胰蛋白酶

我们发现在紫外线照射后皮肤肥大细胞的数量会增加，而且肥大细胞的调控体被释放至真皮基底中。类胰蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶，它贮存在肥大细胞分泌的颗粒中，与肝磷脂蛋白聚糖复合在一起。最近的研究揭示，肥大细胞中类胰蛋白酶的含量要高于组胺，它具有胰岛素样的酶活性(Schwartz等报道, 1987年)。也有证据表明，通过纤维粘连蛋白裂解，肥大细胞类胰蛋白酶参与了病灶点真皮-表皮分离作用(Kaminska等报道, 1999年)。最近已有报导肥大细胞中所含的类胰蛋白酶的量显著上升是由于皮肤照射紫外线所致(Bosset等, 2003年报道)。我们的研究表明，类胰蛋白酶降解了基底膜中的IV型胶原蛋白和真皮基底中的I型胶原蛋白。

■ 结果

基底金属蛋白酶9(pro MMP9)的活化作用和IV型胶原蛋白的降解作用

基底金属蛋白酶活性的提高被认为是光老化皮肤的一个特征。MMPs是有降解性酶的大家族成员，胶原酶(MMP1)、明胶酶A(MMP2)、明胶酶B(MMP9)和基质分解素1(MMP3)的联合作用被认为在皮肤基底降解作用中起到重要作用。并且两种酶MMP2和MMP9能降解基底膜中的成

分，松弛纤维网络结构。近期报道表明，肥大细胞类胰蛋白酶具有明胶酶样活性，我们研究了类胰蛋白酶对IV型胶原蛋白的降解作用和基底金属蛋白酶9的活化过程(Iddamalgodan等

2007年报道)。

IV型胶原蛋白是基底膜基质的主要组分。基底膜对表皮细胞的健康生长起重要作用，并且它作为硬实组织维护了真皮。我们的研究揭示，肥大

引言

老化是受到某些因素影响的所有生命有机体的基础生物学过程特征。老化皮肤的特点是皮肤出现皱纹、松弛和色素沉着，它由几种环境应力因素引发。皮肤老化可以分成两种主要类型：内在老化，通常由基因决定，外因性老化，由环境暴露，主要是紫外光造成。我们研究团队研究了两种不同的新颖目标，它们与光老化过程密切相关。

肥大细胞类胰蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶，贮存在肥大细胞分泌颗粒中，与肝磷脂蛋白聚糖复合在一起。也有证据表明，通过纤维粘连蛋白裂解，病灶点真皮-表皮出现分离，肥大细胞类胰蛋白酶参与了基底膜的破坏过程。最近，已有报道说肥大细胞中所含类胰蛋白酶的数量显著上升是因为皮肤经太阳光照射引起。我们已发现了类胰蛋白酶降解了基底膜中的IV型胶原蛋白以及真皮基底层中的I型胶原蛋白。它也能激发皮肤基底金属蛋白酶(proMMPs)的降解。汉荊老鹳草(*Geranium robertianum*)提取物通常被称为“Herb Robert”，显示出有相应的类胰蛋白酶抑制活性，被用来进一步研究类胰蛋白酶调控皮肤光老化的作用。

转录因子Kappa B(NF-κB)是与炎症相关的一种转录因子。已确定NF-κB是由发炎细胞因子激发，且引发了基础纤维原细胞生长因子(bFGF)。我们以前的报告清晰地证明UVB引发的皮肤光老化过程可归咎于NF-κB的活化。我们发现洋蓟(*Cynara scolymus*)叶提取物，通常称为“朝鲜蓟”是一种有效的NF-κB活性抑制剂。洋蓟苦素被认定为朝鲜蓟中具有高NF-κB抑制活性的活性化合物。

细胞类胰蛋白酶能激活明胶酶B(图1), 降解IV型胶原蛋白, 这表明它是防止基底膜损伤的重要目标物。

用IV型胶原蛋白酶谱法检测了IV型胶原蛋白的降解作用(图2)。由于在电泳胶中IV型胶原蛋白酶谱中包含有IV型胶原蛋白, 测到的IV型胶原蛋白的菌致分解为未用考马斯亮蓝着色的谱带(白色谱带)。我们也使用蛋白质印迹分析方法研究了IV型胶原蛋白的降解作用, 图3中列出了降解的IV型胶原蛋白碎片, 用类胰蛋白酶培养后, IV型胶原蛋白分裂成两种碎片, 预先用肥大细胞类胰蛋白酶培养的类胰蛋白酶进一步将它们降解成几种碎片。

I型胶原蛋白的降解作用

将源于人体皮肤的I型胶原蛋白(Sigma-Aldrich产品)溶于1 mol/L乙酸中, 用50 mmol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.2)调节其浓度至1 mg/mL。将胶原蛋白溶液(10 μL)、16 ng/mL类胰蛋白酶溶液(10 μL)和测试样品溶液(10 μL)混合在一起, 于37°C下培养1小时。反应完全之后, 将反应混合物用8.5% SDS-PAGE(Bio-Rad产品)电泳。电泳胶用考马斯亮蓝着色分析胶原蛋白的破碎分裂情况。

图4中列出了研究的类胰蛋白酶对I型胶原蛋白的降解作用。第1栏展示了完整的胶原蛋白, 第二栏显示了用类胰蛋白酶培养1小时的I型胶原蛋白样品。用类胰蛋白酶处理的I型胶原蛋白结果令完整的胶原蛋白链降解生成看得见的1/4碎片。然而, 用汉荭老鹤草提取物预先培养的类胰蛋白酶表现出显著降低类胰蛋白酶活性, 其结果与亮肽素相似, 是一种知道的类胰蛋白酶抑制剂。

讨论I

肥大细胞长期以来与不同情况下ECM(细胞外基质)发生的改变关联。在本研究中, 我们证明, 类胰蛋白酶能损害ECM, 直接造成ECM中



图1 类胰蛋白酶对MMP9的活化作用

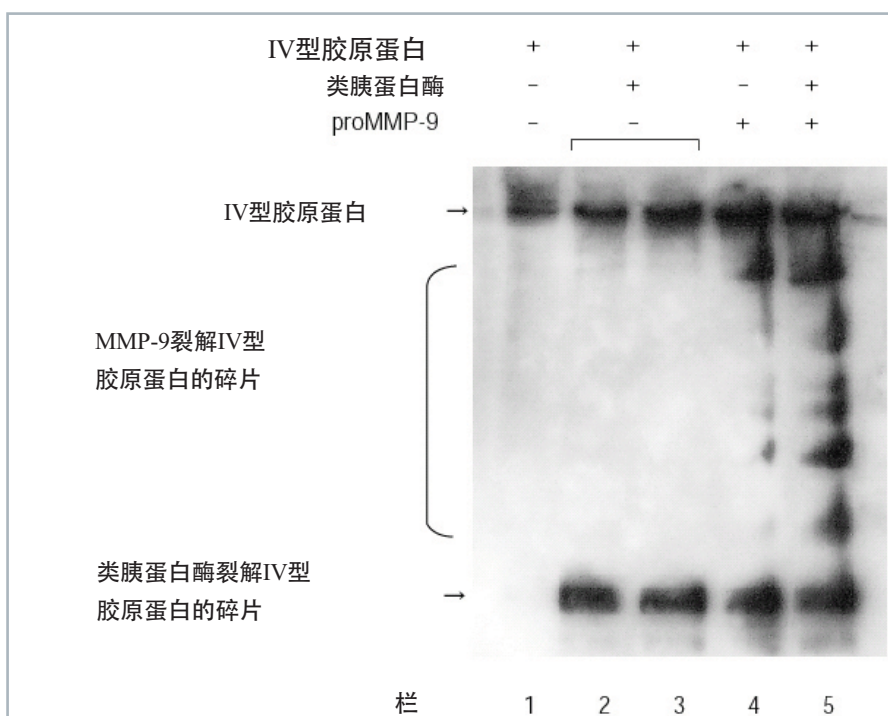


图2 由类胰蛋白酶引发的IV型胶原蛋白的降解。用蛋白质印迹分析法鉴定了降解的IV型胶原蛋白的碎片

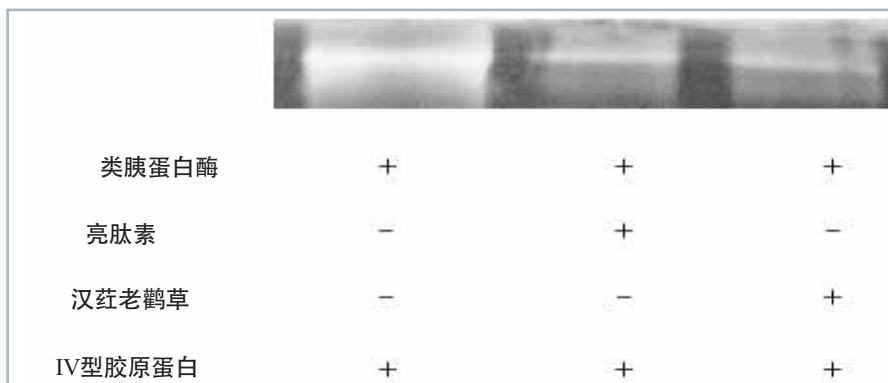


图3 类胰蛋白酶对IV型胶原的降解作用。用IV型胶原蛋白酶谱法检测了汉荭老鹤草提取物对IV型胶原的抑制作用

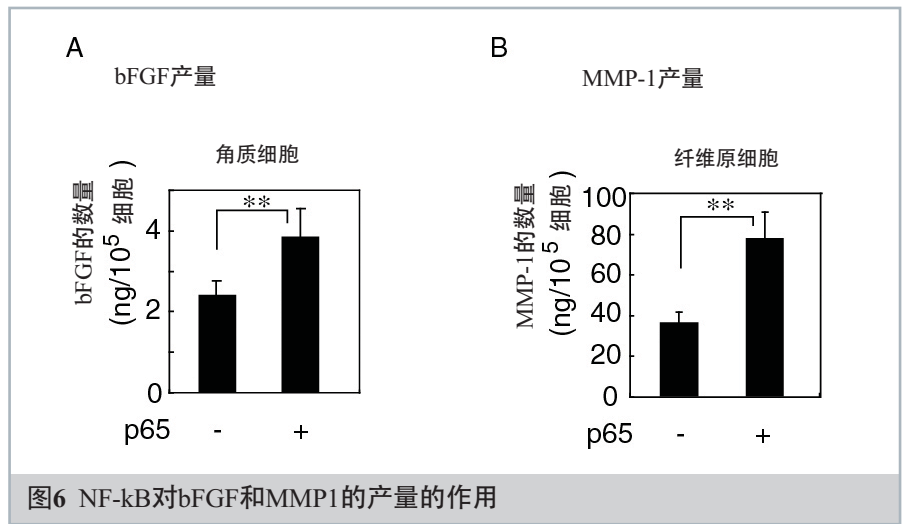
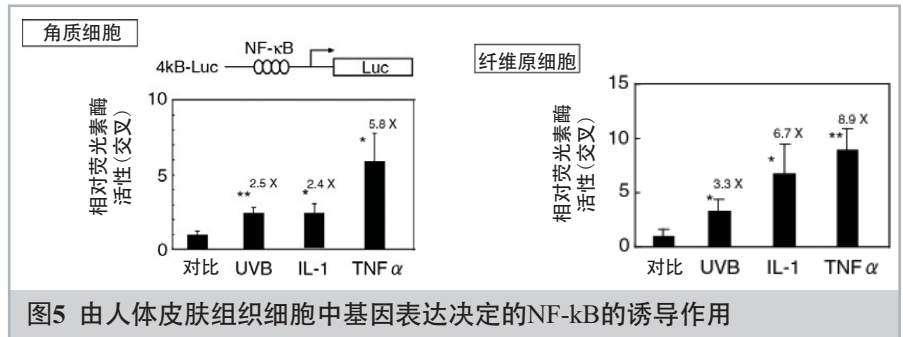
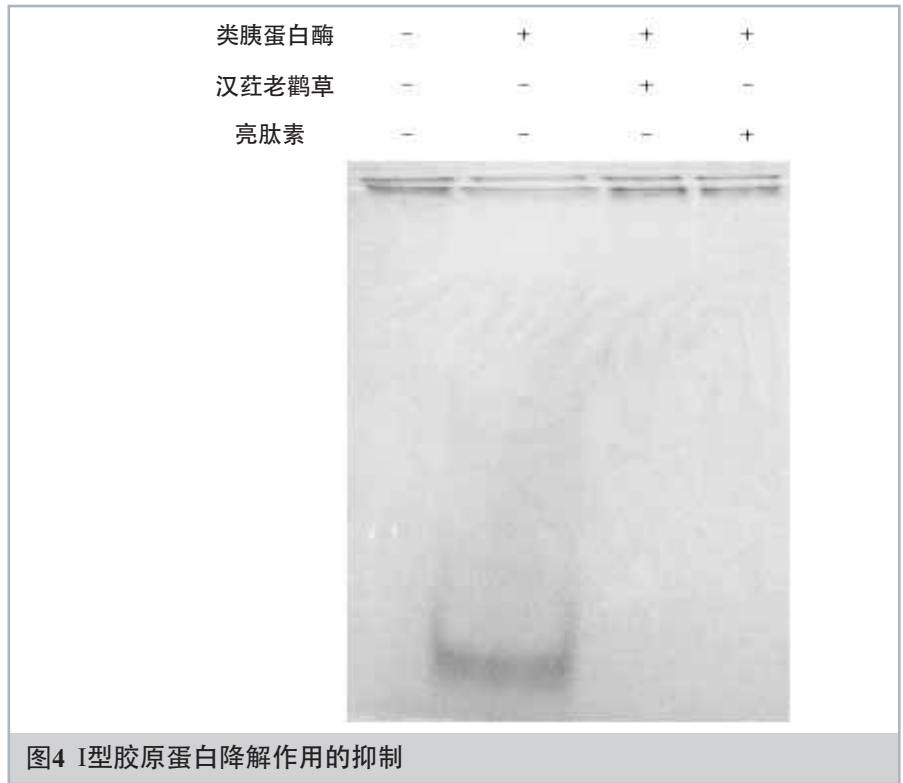
成分的降解。基于我们的发现和其它近期研究结果表明，类胰蛋白酶能成为炎症和ECM损伤的关键性调控成分。结论是，肥大细胞类胰蛋白酶能参与ECM的损伤，可能会造成基底膜的毁坏。因此，类胰蛋白酶将是一种针对皮肤组织变化和光老化的最有希望的目标。这个发现也表明，汉荖老鹤草提取物能作为一种天然植物成分，通过肥大细胞类胰蛋白酶防止了光老化过程中ECM降解作用。

■ 光老化和NF-kB

转录因子Kappa B (NF-kB) 是与炎症有关的转录因子。已有充分的证据表明，转录因子Kappa B是由发炎细胞因子活化，并引发基础纤维原细胞生长因子(bFGF)。全世界都在研究NF-kB的抑制剂，由于过度的NF-kB表达在许多疾病情况下均能发现，例如，癌症、风湿病和牛皮癣。我们以前的报告(Tanaka等2005年发表)清楚地证明，UVB引发的皮肤光老化过程归咎于NF-kB的活化。紫外线照射的皮肤的特征是有细和粗皱纹、皮肤粗糙、干燥、松弛和有色素沉着(Chung 2003年报道)。微观上看，这些变化能用角质细胞过度分化和胶原蛋白纤维的降解来解释。有充分证据的是一种转录因子，转录因子kB(NF-kB)在紫外线照射下活化，并引发各种基因，包括IL-1和TNF- α ，接着激发了信号转导通路活化NF-kB(图5)，这形成了一个错误的循环(Okamoto等1997年报道)。

NF-kB对bFGF和MMP 1的诱导作用

早期的研究表明，紫外线引发的皮肤变异是由bFGF和MMP 1调控的(Chung 2003年报导)。如图6所列，当p65在角质细胞和纤维原细胞中过度表达时，bFGF的产量和MMP 1产量明显提高。这可能涉及的NF-kB在紫外线调控的皮肤光老化中引发



的MMP 1和bFGF情况已在以前的报告中有报导 (Barchowsky等2000年报道)，图6中列出的我们研究结果也证实了使用细胞组织方法的这些结果。

朝鲜蓟提取物对NF-κB活性的抑制作用

我们筛选了超过200种植物提取物，发现洋葱叶提取物，通常称为朝鲜蓟，是一种有效的NF-κB活性抑制剂。洋葱苦素被认定为朝鲜蓟的活性化合物，具有很高的NF-κB抑制活性。如图7所列，朝鲜蓟提取物被发现具有强烈的抑制NF-κB转录的作用。当将朝鲜蓟加到293细胞培养中，NF-κB调控基因表达作用呈现出由剂量决定抑制作用大小的关系。

朝鲜蓟提取物对bFGF产量的抑制作用

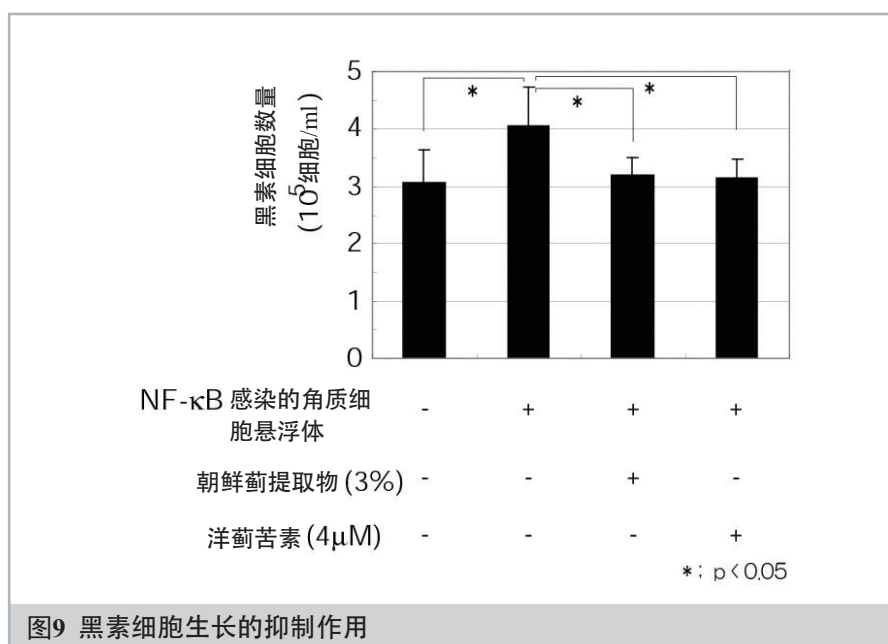
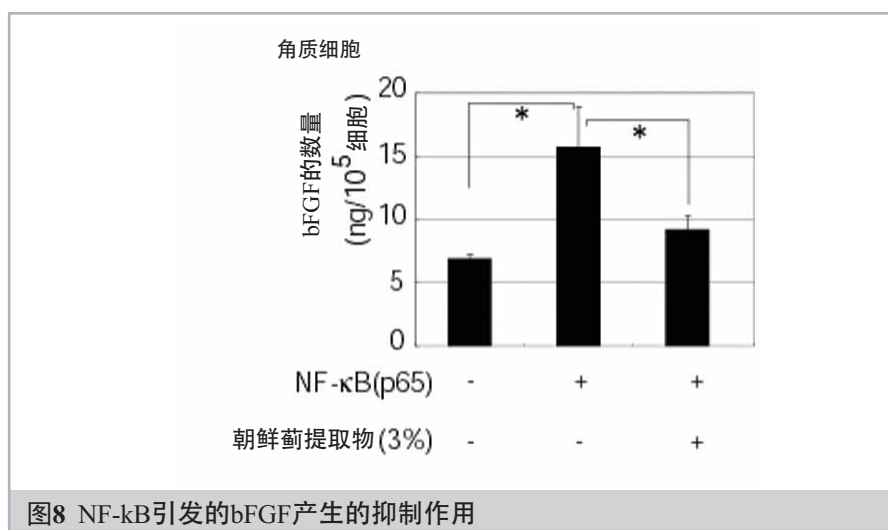
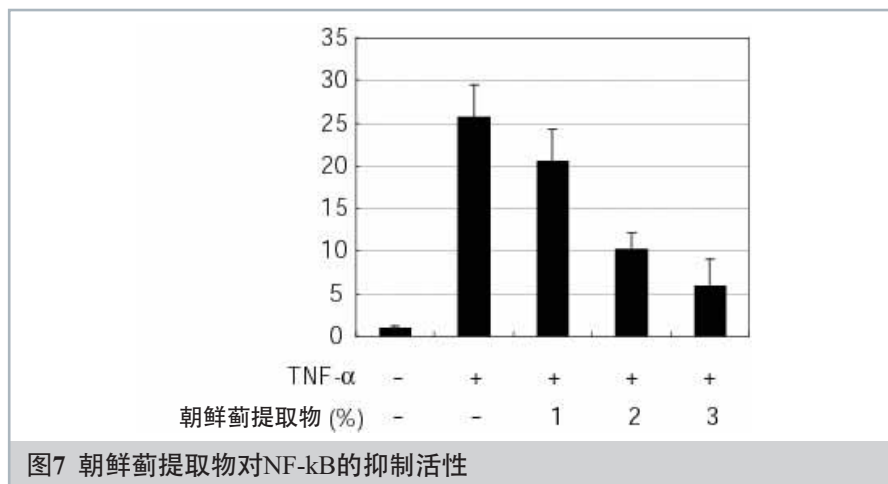
由于以前已表明，bFGF的产量由UVB引发，UVB的照射引发了角质细胞中的IL-1和TNF-α，我们验明，如果p65过度表达，模仿NF-κB活化，会引发bFGF的产量。朝鲜蓟提取物能抑制过度表达的NF-κB从角质细胞生成bFGF的产量(图8)。

对黑素细胞生长的抑制作用

如图9所列，用Kera-p65的培养物上清液培养后观察到黑素细胞生长明显增加。当用朝鲜蓟提取物或洋葱苦素培养时，黑素细胞的生长促进作用得到废止。

讨论II

洋葱即大家众知的“朝鲜蓟”，是欧洲一种普通植物。我们发现其提取物能抑制NF-κB转录，其活性化合物是洋葱苦素。这些发现表明朝鲜蓟通过控制bFGF的产量令角质化过程正常化，表皮正常的结构有助于恢复水份的持留性。朝鲜蓟提取物和洋葱苦素抑制了由角质细胞中NF-κB活化造成的黑素细胞的增殖。这些结果表明，朝鲜蓟抑制了总的黑色素产量，



它通过NF-kB活化作用控制了黑素细胞的增殖。基于上述发现，我们确认NF-kB是老化过程中一个重要的因子，NF-kB抑制剂能在抗光老化护肤中起到关键的作用。

■ 结论

基于我们对肥大细胞类胰蛋白酶和NF-kB的发现，我们认为，两种因子将是抗老化护肤中的重要机理。直到现在，基底金属蛋白酶(MMPs)被认为是对付皮肤光老化过程中皮肤老化的主要目标。然而，丝氨酸蛋白酶样的类胰蛋白酶也表现出对表皮胶原蛋白(I型)以及基底膜胶原蛋白(IV型)的降解作用。它也能活化proMMPs，表明类胰蛋白酶能直接或间接地损伤细胞外基质。NF-kB抑制剂能通过减轻表皮厚度、黑素细胞的生长和改善皮肤可见毛孔方式防止皮肤光老化。因此，类胰蛋白酶抑制剂和NF-KB抑制剂将是抗老化皮肤治疗中新颖的成分。

参考文献

- (1) Iddamalgoda A., Le QT., Ito K., Tanaka K., Kojima H., Kido H., Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins. Arch Dermatol Res (2007, Epub ahead of print)
- (2) Schwartz LB, Irani AM, Roller K, Castells MC and scheinman NM. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. J Immunol 138: 2611-2615, 1987
- (3) Kaminska R, Helisalmi P, Harvima JR, Naukkarinen A, Horsmaheimo M, and Harvima IT. Focal Dermal-Epidermal Separation and Fibronectin Cleavage in Basement Membrane by Human Mast Cell Tryptase. J Invest Dermatol 113:567-573, 1999
- (4) Bosset S, M.Bonnet-Duquenois M, Barre P, Chalon A, Kurfurst R, Bonte F, Schnebert

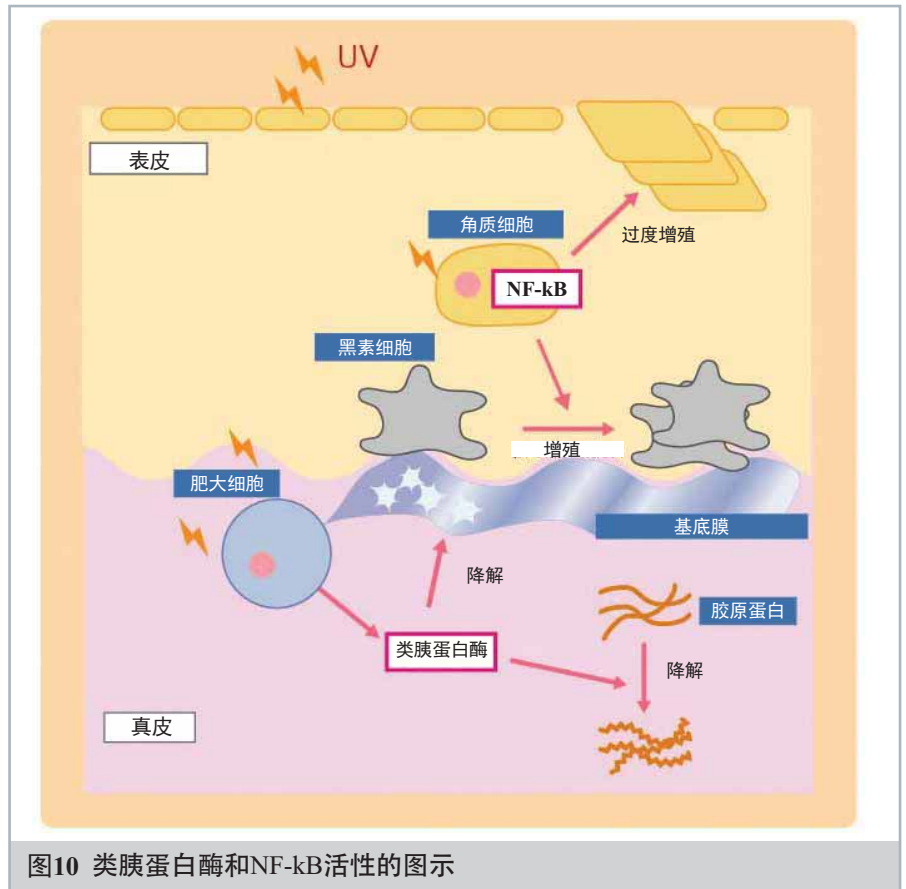


图10 类胰蛋白酶和NF-kB活性的图示

S, Le Varlet and Nicolas J.F. Photoaging shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. Br J Dermatol 149: 826-835, 2003

- (5) Tanaka K, Hasegawa J, Asamitsu K, and Okamoto T. J Pharmacol Exp Ther 315:624-630,2005
- (6) Brachowsky A, Frleta D, Vincenti MP. Integration of the NF-kB and mitogen activated protein kinase/AP-1 pathway at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. Cytokine 12: 1469-1479, 2000.
- (7) Chung JH. Photoaging in Asians. Photodermatol Photoimmunol Photomed 19: 109-121, 2003.
- (8) Okamoto T, Sakurada S, Yang JP, and Merin JP. Regulation of NF-kB and Disease Control: Identification of a novel serine kinase and thioredoxin as effectors for signal transduction pathway for NF-kB activation. Curr Top Cell Regul 35:149-161, 1997.

*作者地址：

Arunasiri Iddamalgoda博士

B.V.Sc., M.Sc., PhD

Visiting Professor Tokai Gakuin

University

Manager/ Head

Dept. of Research & Development

Ichimaru Pharcos Co.Ltd

318-1 Asagi, Motosu City,

Gifu 501-0475, 日本

Email : arunasiri@ichimaru.co.jp