



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112996499 A

(43) 申请公布日 2021. 06. 18

(21) 申请号 201980071748.1

(22) 申请日 2019.10.31

(30) 优先权数据

10-2018-0132216 2018.10.31 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2019/014547 2019.10.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/091440 KO 2020.05.07

(71) 申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔市

(72) 发明人 徐永锡 李庸植 金亨子 秦昶培

(74) 专利代理机构 北京铭硕知识产权代理有限公司 11286

代理人 习瑞恒 李盛泉

(51) Int.Cl.

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 8/368 (2006.01)

A61K 8/9789 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

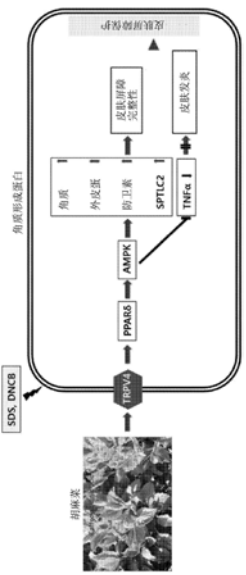
权利要求书2页 说明书18页 附图14页

(54) 发明名称

含有3,5-二咖啡酰奎宁酸作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用组合物

(57) 摘要

本发明涉及皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用组合物，导入从胡麻菜(Aster glehni)提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)作为化妆品组合物及药剂学组合物的有效成分，从而改善皮肤屏障损伤，缓解皮肤炎症，具有对过敏性皮炎的预防及改善效果。



1. 一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用药学组合物。

2. 根据权利要求1所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用药学组合物,其中,

所述3,5-二咖啡酰奎宁酸从胡麻菜提取物分离。

3. 根据权利要求2所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用药学组合物,其特征在于,

所述胡麻菜提取物借助于选自由碳数1至4的醇、包含碳数1至4的醇的水溶液、二氯甲烷、丙酮及丙酮水溶液构成的组的某一种提取溶剂而提取。

4. 根据权利要求3所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用药学组合物,其特征在于,

所述胡麻菜提取物为借助于选自由乙酸乙酯、己烷、氯仿及丁醇构成的组的某一种而追加分馏的分馏提取物。

5. 根据权利要求1所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用药学组合物,其特征在于,

所述组合物增加瞬时受体阳离子通道亚家族V成员4、过氧化物酶体增殖物活化的受体 $\delta$ 及5'AMP活化的蛋白激酶的表达。

6. 根据权利要求1所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用药学组合物,其特征在于,

所述组合物减少肿瘤坏死因子- $\alpha$ 的表达。

7. 根据权利要求1所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用药学组合物,其特征在于,

所述皮肤炎症为过敏性皮炎。

8. 一种包含权利要求1至7的任一项的组合物的液剂、软膏剂、乳霜剂、乳液剂、喷雾剂、贴剂、凝胶剂或气雾剂剂型的外用剂组合物。

9. 一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用化妆品组合物。

10. 根据权利要求9所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用化妆品组合物,其中,

所述3,5-二咖啡酰奎宁酸分离自胡麻菜提取物。

11. 根据权利要求9所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用化妆品组合物,其特征在于,

所述胡麻菜提取物借助于选自碳数1至4的醇、包含碳数1至4的醇的水溶液、二氯甲烷、丙酮及丙酮水溶液的某一种提取溶剂而提取。

12. 根据权利要求9所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用化妆品组合物,其特征在于,

所述胡麻菜提取物为借助于选自由乙酸乙酯、己烷、氯仿及丁醇构成的组的某一种而追加分馏的分馏提取物。

13. 根据权利要求9所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和和用化妆品组合物,

其特征在于，

所述皮肤炎症为过敏性皮炎。

14. 一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用保健功能食品组合物。

15. 根据权利要求14所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用保健功能食品组合物，其中，

所述3,5-二咖啡酰奎宁酸分离自胡麻菜提取物。

16. 根据权利要求15所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用保健功能食品组合物，其特征在于，

所述胡麻菜提取物借助于选自碳数1至4的醇、包含碳数1至4的醇的水溶液、二氯甲烷、丙酮及丙酮水溶液的某一种提取溶剂而提取。

17. 根据权利要求15所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用保健功能食品组合物，其特征在于，

所述胡麻菜提取物为借助于选自由乙酸乙酯、己烷、氯仿及丁醇构成的组的某一种而追加分馏的分馏提取物。

18. 根据权利要求14所述的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用保健功能食品组合物，其特征在于，

所述皮肤炎症为过敏性皮炎。

19. 一种包括将3,5-二咖啡酰奎宁酸对个体用药的步骤的皮肤屏障损伤改善及/或皮肤炎症治疗方法。

20. 一种用于制备皮肤屏障损伤改善及/或皮肤炎症治疗用药剂的3,5-二咖啡酰奎宁酸的用途。

## 含有3,5-二咖啡酰奎宁酸作为有效成分的皮肤屏障损伤改善 用及/或皮肤炎症缓和用组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用组合物,更详细而言,涉及一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用组合物。

### 背景技术

[0002] 皮肤还被称为外皮,由表皮、真皮及皮下组织(皮下)三种主要层构成。特别是表皮为皮肤的外侧区域,其结构由4层构成,可以分为基底层、棘层、颗粒层及角质层(皮肤最外侧的薄层)。角质细胞是构成表皮的主要细胞,通过角化而有助于构成身体防御屏。在棘层中,角质细胞生产角质1和10(ke ratin1和10),角质10是桥粒的主要成分。一般而言,皮肤屏障意味着角质层,由角质细胞、角质层、角膜上皮细胞及角质细胞间脂质构成。角质层由谷氨酰胺转移酶、外膜蛋白、兜甲蛋白及丝聚蛋白构成,其形成角质细胞间脂质(intercorneocyte lipid)的多层结构,从而发挥完整的皮肤屏障作用。角质细胞间脂质包括神经酰胺、胆固醇、游离脂肪酸及胆固醇硫酸盐,其中,神经酰胺含量最高。皮肤屏障的主要功能是阻止体液损失、毒素攻击、病原菌侵入(Department of Dermatology, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine Hokkaido University. Shimizu's Textbook of Dermatology. <http://www.derm-hokudai.jp/shimizu-dermatology/ch01> (13.02.2017); H.H. Jang, S.N. Lee, Asian J Beauty Cosmetol, 14, 339, 2016)。因此,皮肤屏障的损伤不仅导致皮肤外层的单纯机械破坏,而且由于多样病原菌侵透而会引起严重的免疫反应。作为阴离子性界面活性剂的十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sul fate: SDS)一般不仅引起皮肤刺激,而且,SDS作为洗涤剂,还诱发皮肤表面极性、皮肤屏障解体及表皮脂质萃出。另外,SDS增加从角质层的经皮水分损失,诱发炎症。

[0003] 过敏性皮炎(AD)虽然最初在幼儿期发生,但成人中也有出现。一般而言,AD是一种以免疫球蛋白E(IgE)生产增加、湿疹皮肤病变再发、炎症免疫细胞浸润及皮肤屏障缺陷为特征的慢性瘙痒症炎症性皮肤病,根本原因几乎尚不了解,随着工业化的发展,AD的发生日益增加。因此,找到对AD的有效治疗方法非常紧迫,在社会经济层面十分重要。2,4-二硝基氯苯(2,4-Dinitrochlorobenzene(DNCB))被认为是诱发接触性皮炎和AD的代表性物质(Medscape. Atopic Dermatitis. <http://emedicine.medscape.com/article/1049085-overview#a4> (15.02.2017); T. Bieber, N Engl J Med., 358, 1483, 2008)。

[0004] 胡麻菜(Aster glehni(AG))在韩国传统医学中一直被用于治疗发热、疼痛、痰及咳嗽。以往也报告了AG的其他效果。AG的乙酸乙酯提取物抑制黑色素细胞中黑色素生物合成相关的酪氨酸酶和酪氨酸酶相关蛋白质1的蛋白质表达,在另外的研究中,报告了AG的乙酸乙酯提取物具有抗氧化效果和抑制与炎症相关的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的蛋白质表达的效果(Y. Fujii et al., Skin Pharmacol Physiol., 22 240, 2009)。

[0005] 另一方面,从胡麻菜(Aster glehni)提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-

dicafeoylquinic acid) 具有皮肤屏障损伤改善或皮肤炎症缓解效果尚不了解。

[0006] 因此,本发明人为了预防及改善过敏等疾病而寻找具有皮肤屏障损伤改善及/或皮肤炎症缓解效果的组合物,经过锐意努力,终于发现从胡麻菜(*Aster glehni*)提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)具有优秀的皮肤屏障损伤改善及/或皮肤炎症缓解效果,从而完成了本发明。

## 发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明的目的在于提供一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用药学组合物。

[0009] 本发明的另一目的在于提供一种包含3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)作为有效成分的液剂、软膏剂、乳霜剂、乳液剂、喷雾剂、贴剂、凝胶剂或气雾剂剂型的外用剂组合物。

[0010] 本发明的又一目的在于提供一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用化妆品组合物。

[0011] 本发明的又一目的在于提供一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用保健功能食品组合物。

[0012] 技术方案

[0013] 为了达成所述目的,本发明提供一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用药学组合物。

[0014] 本发明还提供一种包含3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)作为有效成分的液剂、软膏剂、乳霜剂、乳液剂、喷雾剂、贴剂、凝胶剂或气雾剂剂型的外用剂组合物。

[0015] 本发明还提供一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用化妆品组合物。

[0016] 本发明还提供一种含有3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用保健功能食品组合物。

[0017] 本发明还提供一种包括将3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)对个体用药的步骤的皮肤屏障损伤及/或皮肤炎症的预防或治疗方法。

[0018] 本发明还提供一种用于制备皮肤屏障损伤及/或皮肤炎症预防或治疗用药剂的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)的用途。

[0019] 作为本发明的一个体现例,所述3,5-二咖啡酰奎宁酸可以从胡麻菜(*Aster glehni*)提取物分离的。

[0020] 作为本发明的另一体现例,所述3,5-二咖啡酰奎宁酸可以从胡麻菜提取物的乙酸乙酯分馏物获得的。

[0021] 有益效果

[0022] 本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicafeoylquinic acid)从天然物分离,无

副作用,导入所述化合物作为化妆品组合物或药剂学组合物的有效成分,从而改善皮肤屏障损伤,缓解皮肤炎症,具有对过敏性皮炎等炎症性皮肤病疾病的预防、治疗及改善效果。

## 附图说明

[0023] 图1是对胡麻菜乙酸乙酯提取物的HPLC分析色谱图结果。(1) 5-CQA:5-咖啡酰奎宁酸(5-caffeoylquinic acid), (2) 3,4-DCQA:3,4-二咖啡酰奎宁酸(3,4-dicaffeoylquinic acid), (3) 3,5-epi-DCQA:3,5-表-二咖啡酰奎宁酸(3,5-epi-dicaffeoylquinic acid), (4) 3,5-DCQA:3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid), (5) 4,5-DCQA:4,5-咖啡酰奎宁酸(4,5-dicaffeoylquinic acid), (6) 3,5-DCQA-Me:3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯(methyl 3,5-dicaffeoylquinic acid), (7) 4,5-DCQA-Me:4,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯(methyl 4,5-dicaffeoylquinic acid)。

[0024] 图2a及图2b是在经胡麻菜提取物、SDS、DNCB及GSK0660处理HaCaT细胞中执行对PPAR $\delta$ 、AMPK及SPTLC2的免疫印迹分析的结果(Ctrl为未处理对照组,DNCB为DNCB处理组,D+AG为DNCB+AG处理组,D+A+GSK为DNCB+AG+GSK0660处理组,SDS为SDS处理组,S+AG为SDS+AG处理组,S+A+GSK为SDS+AG+GSK0660处理组)。

[0025] 图3a至图3d是在以胡麻菜提取物、SDS、DNCB及GSK0660处理的HaCaT细胞中执行对角质、外皮蛋白、防卫素及TNF $\alpha$ 的免疫细胞化学检查的结果(Ctrl为未处理对照组,DNCB为DNCB处理组,D+AG为DNCB+AG处理组,D+A+GSK为DNCB+AG+GSK0660处理组,SDS为SDS处理组,S+AG为SDS+AG处理组,S+A+GSK为SDS+AG+GSK0660处理组)。

[0026] 图4a及图4b是在经TRPV4和AMPK拮抗剂处理的HaCaT细胞中执行对角质、外膜蛋白、防卫素及TNF $\alpha$ 的免疫组织化学染色的结果。

[0027] 图5是在经3,5-DCQA处理的HaCaT细胞中执行对TRPV4、AMPK、PPAR $\delta$ 及SPTLC2的免疫印迹的结果。

[0028] 图6a及图6b是在经3,5-DCQA处理的HaCaT细胞中对角质、外膜蛋白、防卫素及TNF $\alpha$ 执行免疫组织化学染色的结果。

[0029] 图7是胡麻菜提取物在角质细胞中的作用机制的原理图(箭头意味着活化,水平线意味着抑制,双竖直线意味着切断)。

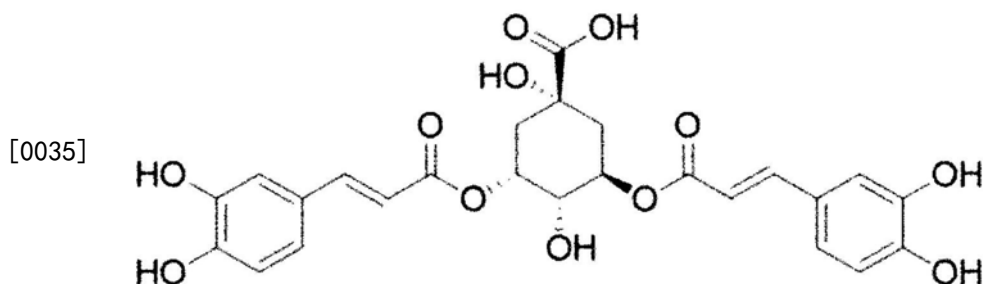
[0030] 最佳实施方式

[0031] 在本发明中确认了经3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)处理的细胞相比只以SDS或DNCB处理的对照组细胞,PPAR $\delta$ 、磷酸化AMPK、SPTLC2、角质、外膜蛋白及防卫素的蛋白质表达增加,在只以SDS或DNCB处理的细胞组中增加了的TNF $\alpha$ 表达,在追加添加从胡麻菜提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸的细胞组中减少。从利用拮抗剂处理的研究结果确认了在AG的作用路径中,生物标志的调节效果机制相关作用效果的顺序为TRPV4 $\rightarrow$ PPAR $\delta$  $\rightarrow$ AMPK,从胡麻菜提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸通过TRPV4 $\rightarrow$ PPAR $\delta$  $\rightarrow$ AMPK路径的依次调节,可以缓和SDS或DNCB导致的角质形成细胞的损伤。

[0032] 因此,本发明一种观点涉及一种含有从胡麻菜(Aster glehni)提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用药学组合物。

[0033] 下述化学式1为3,5-二咖啡酰奎宁酸的结构式。

[0034] [化学式1]



[0036] 本发明中使用的术语“皮肤屏障”，作为皮肤最外层的表皮上部层，意味着由角质形成细胞构成的角质层。是对毒性物质或微生物、机械性刺激、紫外线最重要的第一道防线，发挥抑制通过皮肤的电解质或水分损失、提供皮肤能够执行正常功能的环境的功能。

[0037] 本发明中使用的术语“皮肤屏障损伤改善”，意味着强化位于皮肤最外侧的角质层屏障功能，治疗及改善皮肤屏障损伤。

[0038] 在本发明的皮肤屏障损伤治疗及改善功能中，作为皮肤屏障(skin barrier)中的表皮最外层的角质层(stratum corneum)主要由无核的扁平角质细胞(corneocyte)构成。皮肤屏障角质细胞通过正常表皮细胞的分裂及分化过程而得以保持，由角质细胞所合成的诸如神经酰胺、胆固醇及脂肪酸的细胞间脂质形成的多层脂质膜(multi lamella lipid layer)发挥防御膜作用，使得皮肤内水分无法蒸发。另一方面，这些细胞间脂质中的 $\omega$ -羟基神经酰胺通过化学共价键而与作为角质细胞(corneocyte)外廓侧蛋白质的外膜蛋白(involucrin)连接，形成角质细胞脂质膜(corneocyte lipid envelope,CLE)，从而发挥使多层脂质膜形态的细胞间脂质在物理上稳定的作用，发挥治疗及改善屏障损伤的作用。

[0039] 本发明的组合物通过皮肤涂覆传递给角质层，促进角质细胞的分化，不仅具有增加表皮层厚度的效果，而且恢复皮肤屏障损伤的效果优秀，可以有用地用于因皮肤屏障损伤而诱发的皮肤疾病的治疗及预防。作为因所述皮肤屏障损伤而诱发的皮肤疾病，有过敏性皮炎(atopic dermatitis)、皮肤干燥症(xeroderma)、银屑病(psoriasis)、鱼鳞癣(ichthyosis)、痤疮等，但并非限于此。

[0040] 本发明的术语“皮肤屏障损伤改善用”，是全部包括改善皮肤保护及皮肤状态、缓解皮肤保护及皮肤炎症反应、改善免疫疾病效能或改善皮肤屏障功能、缓解皮肤刺激、皮肤细胞增殖及再生效能、抗氧化效能、增进胶原合成效能等的概念。

[0041] 在本发明中，所谓皮肤炎症缓解，意味着改善及治疗诸如皮肤炎症、瘙痒症等的皮肤烦恼。

[0042] 在本发明中，所谓“炎症缓解”，是指抑制炎症，所述炎症作为生物体组织对某种刺激的防御反应之一，是指导致组织变质、循环障碍和渗出、组织增殖三种发病的复杂病变。更具体而言，炎症是先天性免疫的一部分，象在其他动物中一样，人的先天性免疫识别在病原体特异性地存在的细胞表面模式。吞噬细胞将具有此类表面的细胞识别为异己并攻击病原体。如果病原菌突破身体的物理屏障而进入，则出现炎症反应。炎症反应是形成针对伤口部位入侵微生物的敌对环境的非特异性防御作用。在炎症反应中，当出现伤口或外部感染体进入体内时，负责初期阶段免疫反应的白细胞聚集并表达细胞因子。因此，细胞内细胞因子的表达量成为炎症反应活化的指标。

[0043] 作为与炎症相关的皮肤疾病示例，有过敏性皮炎、银屑病，因辐射线、化学物质、烧

伤等触发的红斑性疾病,酸烧伤,大疱性皮肤病,地衣型疾病,过敏引起的瘙痒,脂溢性湿疹,玫瑰痤疮,寻常型天疱疮,多形渗出性红斑,结节性红斑,龟头炎,外阴炎,诸如斑秃的炎性脱发,皮肤T细胞淋巴瘤等,但不限于此。

[0044] 本发明中使用的术语“预防”,意味着借助于本发明的药学组合物给药来抑制皮肤屏障损伤或皮肤炎症反应,或延迟因此导致的疾病发病的所有行为。

[0045] 本发明中使用的术语“治疗”,意味着借助于本发明的药学组合物给药来使皮肤屏障损伤或因炎症反应导致的皮肤疾病病情有所好转或出现有利改变的所有行为。

[0046] 本发明中使用的术语“改善”,意味着至少使得与治疗状态相关的参数,例如症状程度减小的所有行为。

[0047] 本发明的术语“提取物”,意味着从胡麻菜分离得到的物质。

[0048] 在本发明中,其特征可以在于,所述胡麻菜提取物借助于选自碳数1至4的醇、包含碳数1至4的醇的水溶液、二氯甲烷、丙酮及丙酮水溶液的某一种提取溶剂而提取。

[0049] 在本发明中,其特征可以在于,所述胡麻菜提取物为借助于选自由乙酸乙酯、己烷、氯仿及丁醇构成的组的某一种而追加分馏的分馏提取物。

[0050] 所述提取可以通过本领域已知的提取方法,例如通过冷浸、热水提取、超声波提取、还流冷却提取等方法来执行,但不限于此。提取温度可以由从业人员采用适宜于提取方法的多样温度范围,例如,可以在20℃至100℃下执行,但不限于此。另外,提取时间会因提取方法而异,从业人员可以采用适宜的提取时间,不限于此,但可以在约1小时至10日范围内单次或多次执行。优选地,所述提取可以在室温下以上述提取溶剂约每2时提取2~3次,以此方式执行。

[0051] 在本发明中,其特征可以在于,所述组合物增加TRPV(transient receptor potential cation channel subfamily V member 4:瞬时受体阳离子通道亚家族V成员4)、PPAR- $\delta$ (Peroxisome proliferator-activated receptor-delta:过氧化物酶体增殖物活化的受体 $\delta$ )及AMPK(5'AMP-activated protein kinase:5'AMP活化的蛋白激酶)的表达。

[0052] 在本发明中,PPAR $\delta$ 和AMPK参与细胞生存和抗炎症反应。神经酰胺是皮肤屏障中重要、主要的脂质成分,丝氨酸棕榈酰转移酶(serine palmitoyltransferase)是在神经酰胺生物合成中促进速度限制阶段(rate limiting step)的酶。另外,TRPV4被认为在角质细胞中参与细胞间连接(intercellular junction)的形成。SPTLC2为丝氨酸棕榈酰转移酶的长链碱基亚基。

[0053] 本发明的一种形态旨在以AG以及SDS或DNCB处理的HaCaT细胞中评价PPAR $\delta$ 、AMPK及SPTLC2的蛋白质表达程度。结果确认了AG提取物相比只以DNCB及SDS处理的细胞组,增加对PPAR $\delta$ 、P-AMPK、SPTLC2及TRPV4的蛋白质表达(图2a及图2b)。

[0054] 在本发明中,其特征可以在于,所述组合物减少TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ :肿瘤坏死因子- $\alpha$ )表达。

[0055] 在本发明的另一形态中,确认了在只以SDS或DNCB处理的细胞组中增加的TNF $\alpha$ 表达,在追加添加AG提取物的细胞组中减少(图3d)。

[0056] 在本发明中,为了明确探究AG对皮肤屏障保护的效果和机制,在以SDS或DNCB处理的HaCaT细胞中,测量了与皮肤屏障保持相关的生物标志的表达程度。特别是调查了过氧化物酶体增殖物活化受体 $\delta$ (peroxisome proliferator-activated receptor $\delta$ :PPAR $\delta$ )、AMP

活化蛋白激酶 (AMPK)、瞬时受体阳离子通道亚家族V成员4 (TRPV4) 的作用,调节因子的表达是否对AG的皮肤保护作用机制发挥重要作用。

[0057] 结果确认了咖啡酰奎宁酸化合物丰富的AG提取物,通过在以SDS或DNCB处理的人角质细胞HaCaT细胞中依次调节的TRPV4-PPAR $\delta$ -AMPK路径,可以保护皮肤屏障,确认了由于通过TNF $\alpha$ 抑制的抗炎作用而保护皮肤屏障(图7)。

[0058] 在本发明中,防卫素为由多样细胞类型而生成的抗菌、抗菌及抗病毒阳离子小的肽,包括 $\alpha$ 、 $\beta$ 及 $\theta$ 防卫素三种亚科。在角化细胞中, $\beta$ -防卫素是主要分泌的亚型。

[0059] 在本发明中,作为核受体的PPAR $\delta$ 减轻诸如肥胖及粥样动脉硬化的代谢性疾病。PPAR $\delta$ 保护皮肤屏障的效果研究如下:PPAR $\delta$ 配体治疗在胎鼠外植培养模型中刺激角质层形成及透过性屏障发育,而在PPAR $\delta$ 敲除小鼠中,表皮完整性受到损伤,炎症增加。一般而言,AMPK不仅改善代谢综合征,而且与减少炎症相关,受PPAR $\delta$ 调节。活化的AMPK在HaCaT细胞中,抑制紫外线辐射诱导的基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase1:MMP1)的增加,在人角质细胞中,通过借助于芹菜素的mTOR信号路径抑制而参与自体吞噬调节。

[0060] 在本发明中,因SDS或DNCB而减少的角质、外膜蛋白及对防卫素的蛋白质表达,因AG提取物而增加。另外,因SDS或DNCB而升高的TNF $\alpha$ 表达,通过AG处理而正常化。PPAR $\delta$ 及AMPK的表达相比SDS或DNCB单独给药,因AG提取物处理而增加。另外,AG提取物的效果因PPAR $\delta$ 拮抗剂而抵消,因此认为,AG对角质形成细胞的效果被PPAR $\delta$ 所左右。

[0061] 除PPAR $\delta$ 及AMPK之外,TRPV4也发表了对维持或保护皮肤屏障的重要作用。TRPV4一般被认为是钙离子( $\text{Ca}^{++}$ )-透过性阳离子转运体,对诸如浮肿的机械应力作出反应。从皮肤科领域来看,TRPV4通过强化紧密连接(tight junction)而保护皮肤屏障,在以黄芩素(baicalein)治疗的HaCaT细胞中增加角质合成。TRPV4发挥作为 $\text{Ca}^{++}$ 转运的体作用,这暗示在角质细胞(角化细胞:keratinocytes)中参与钙信号传递。 $\text{Ca}^{++}$ 一般在细胞中作为信号分子发挥作用,刺激诸如角质1/10、外膜蛋白、兜甲蛋白及参与角化细胞分化的谷氨酰胺转移酶1的生物标志物的表达。而且, $\text{Ca}^{++}$ 促进丝聚合蛋白原(profilaggrin)向丝聚蛋白(filaggrin)的转换。如果皮肤屏障损伤,则 $\text{Ca}^{++}$ 梯度消失,兜甲蛋白、丝聚蛋白及外膜蛋白的表达降低。

[0062] 因此,本发明可以提供一种包含3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)作为有效成分的炎症性皮肤病预防、治疗或改善用组合物,可以提供一种包括将所述3,5-二咖啡酰奎宁酸对个体给药的步骤的炎症性皮肤病预防或治疗方法。

[0063] 在本发明中,所谓个体,只要是具有包括角质层的皮肤屏障的哺乳类,则不限制,但优选地可以为人类。在本发明中,其特征可以在于,所述炎症性皮肤病为过敏性皮炎。

[0064] 本发明的另一观点涉及一种包含所述组合物的液剂、软膏剂、乳霜剂、乳液剂、喷雾剂、贴剂、凝胶剂或气雾剂剂型的外用剂组合物。

[0065] 本发明的组合物以在药学上有效的量给药。本发明使用的术语“在药学上有效的量”,意味着按可用于医学治疗的合理的收益/风险比率足以治疗疾病的量,有效用量水平可以根据包括个体种类及严重程度、年龄、性别、药物活性、对药物敏感度、给药时间、给药途径及排出比率、治疗期、同时使用药物的要素及其他医学领域熟知的要素来决定。本发明的组合物可以作为个别治疗剂而给药,或与其他治疗剂联合给药,可以与以往治疗剂依次或同时给药。而且,可以单一或多重给药。全部考虑所述要素,在无副作用的前提下,以能够

以最小限度的量获得最大效果的量来进行给药极为重要,可以由从业人员容易地决定。

[0066] 本发明的药学组合物可以包括药剂学上可接受的载体,可以根据各种通常方法,制剂成散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂和气雾剂等口服剂型、外用剂、栓剂及灭菌注射液的形态。

[0067] 所述药剂学上可接受的载体包括本领域常用的载体,例如包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻朊酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、水、甲基羟基苯甲酸酯、丙基羟基苯甲酸酯、滑石粉、硬脂酸镁及矿物油等,但不限于此。另外,本发明的药学组合物包括填充剂、增量剂、结合剂、湿润剂、崩解剂、界面活性剂稀释剂或赋形剂、其他药学上可接受的添加剂。

[0068] 本发明的药学组合物制剂成口服固体制剂时,包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等,这种固体制剂可以包括至少一种以上赋形剂,例如淀粉、碳酸钙(calcium carbonate)、蔗糖或乳糖、明胶等,包括诸如硬脂酸镁、滑石粉的润滑剂等,但不限于此。

[0069] 本发明的药学组合物制剂成口服用液体形式时,包括悬浮液、内容液剂、乳剂、糖浆剂,包括水、液体石蜡等稀释剂、润湿剂、甜味剂、芳香剂、防腐剂等,但不限于此。

[0070] 本发明的药学组合物制剂成非口服用制剂时,包括无菌水溶液、非水性溶剂、悬浮剂、乳剂、冻干制剂、栓剂,作为非水性溶剂、悬浮剂,包括丙二醇(propylene glycol)、聚乙二醇、诸如橄榄油的植物油、诸如油酸乙酯的可注射的酯等,但不限于此。作为栓剂的基质,可以使用维比索尔(witepsol)、聚乙二醇、吐温(tween) 61、可可脂、月桂酸酯、甘油明胶等,但不限于此。

[0071] 本发明的药学组合物可以根据需要的方法经口给药或非经口给药(例如静脉内、皮下、腹膜内或局部给药),给药量因患者状态及体重、疾病程度、药物形态、给药途径及时间而不同,可以由从业人员适宜地选择。

[0072] 本发明的药学组合物中含有的从胡麻菜(Aster glehni)提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)的给药量,因患者状态及体重、年龄、疾病程度、药物形态、给药途径及时间而不同,可以由从业人员适宜地选择。例如,从胡麻菜提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸可以每日按1至2000mg/kg,优选地,可以按10至2000mg/kg的用量给药,所述给药也可以每日一次或分成多次给药。

[0073] 本发明的又一观点涉及一种含有从胡麻菜(Aster glehni)提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用化妆品组合物。

[0074] 在本发明中,其特征可以在于,所述胡麻菜提取物借助于在碳数1至4的醇、包含碳数1至4的醇的水溶液、二氯甲烷、丙酮及丙酮水溶液中选择的一种提取溶剂而提取。

[0075] 在本发明中,其特征可以在于,所述皮肤炎症为过敏性皮炎。

[0076] 在本发明中,其特征可以在于,所述组合物增加TRPV(transient receptor potential cation channel subfamily V member 4:瞬时受体阳离子通道亚家族V成员4)、PPAR- $\delta$ (Peroxisome proliferator-activated receptor-delta:过氧化物酶体增殖物活化的受体 $\delta$ )及AMPK(5'AMP-activated protein kinase:5'AMP活化的蛋白激酶)的表达。

[0077] 在本发明中,其特征可以在于,所述组合物减少TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor-

alpha:肿瘤坏死因子- $\alpha$ )的表达。

[0078] 本发明的又一观点涉及一种含有从胡麻菜 (*Aster glehni*) 提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid) 作为有效成分的皮肤屏障损伤改善用及/或皮肤炎症缓和用保健功能食品组合物。

[0079] 在本发明中,其特征可以在于,所述胡麻菜提取物借助于在碳数1至4的醇、包含碳数1至4的醇的水溶液、二氯甲烷、丙酮及丙酮水溶液的中选择的某一种提取溶剂而提取。

[0080] 在本发明中,其特征可以在于,所述皮肤炎症为过敏性皮炎。

[0081] 在本发明中,其特征可以在于,所述组合物增加TRPV (transient receptor potential cation channel subfamily V member 4:瞬时受体阳离子通道亚家族V成员4)、PPAR- $\delta$  (Peroxisome proliferator-activated receptor-delta:过氧化物酶体增殖物活化的受体 $\delta$ ) 及AMPK (5'AMP-activated protein kinase:5'AMP活化的蛋白激酶) 的表达。

[0082] 在本发明中,其特征可以在于,所述组合物减少TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha:肿瘤坏死因子- $\alpha$ ) 的表达。

[0083] 在本发明中,术语“保健功能食品”意味着使用保健功能食品相关法律第6727号规定的具有对人体有用的功能性的原料或成分而制造或加工的食品,所谓“功能性”,意味着以针对人体结构及功能调节营养素或获得对生理学作用等保健用途有用的效果为目的而摄取。

[0084] 本发明的食品组合物可以包含通常的食品添加物,只要没有其他规定,是否适宜作为所述“食品添加物”,按照食品医药品安全厅批准的食品添加物规范的总则及一般试验法等,根据相应品种相关规格及基准来判定。

[0085] 作为所述“食品添加物规范”收录的品种,可以例如酮类、甘氨酸、柠檬酸钾、烟酸、肉桂酸等化学合成物,柿色素、甘草提取物、结晶纤维素、高粱色素、瓜尔胶等天然添加物,L-谷氨酸钠制剂、面类碱添加剂、防腐剂、焦油色制剂等混合制剂。

[0086] 本发明的食品组合物出于皮肤屏障损伤改善及/或皮肤炎症缓解目的,相对于组合物总重量,可以包含从胡麻菜 (*Aster glehni*) 提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid) 0.01至95重量%,优选地,可以包含1至80重量%。

[0087] 另外,本发明的食品组合物以皮肤屏障损伤改善及/或皮肤炎症缓解为目的,特别是以过敏性皮炎的预防及/或改善为目的,可以制造及加工成片剂、胶囊、粉末、颗粒、液态、丸剂等形态。

[0088] 例如,所述片剂形态的保健功能食品可以将从胡麻菜提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸或与赋形剂、结合剂、崩解剂及其他添加剂的混合物,以通常方法形成颗粒后,加入润滑剂进行压缩成型,或将所述混合物直接压缩成型。另外,所述片剂形态的保健功能食品可以根据需要而含有苦味剂等,也可以根据需要而以适当的包衣剂进行包衣。

[0089] 在胶囊形态的保健功能食品中,硬胶囊剂可以在通常的硬胶囊中填充从胡麻菜提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸及与赋形剂等添加剂的混合物或其粒状物或经包衣的粒状物而制备,软胶囊剂可以将从胡麻菜提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸及与赋形剂等添加剂的混合物填充于明胶等胶囊基质中而制备。所述软胶囊剂可以根据需要而含有甘油或山梨糖醇等可塑剂、着色剂、防腐剂等。

[0090] 丸剂形态的保健功能食品可以将从胡麻菜 (*Aster glehni*) 提取物分离的3,5-二

咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid)、赋形剂、结合剂、崩解剂等混合物通过适当方法成型而制备,根据需要,可以利用白糖或适当的包衣剂进行包衣,或利用淀粉、滑石粉或适当物质上丸衣。

[0091] 颗粒形态的保健功能食品可以将从胡麻菜 (*Aster glehni*) 提取物分离的3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid)、赋形剂、结合剂、崩解剂等混合物以适当方法制备成粒状,根据需要,可以含有香味剂、苦味剂等。颗粒形态的保健功能食品在使用12号 (1680 $\mu$ m)、14号 (1410 $\mu$ m) 及45号 (350 $\mu$ m) 筛子进行如下粒度试验时,全量穿过12号筛而留于14号筛者可以为全体量的5.0%以下,或穿过45号筛者可以为全体量的15.0%以下。

[0092] 所述赋形剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、苦味剂、香味剂等相关术语定义记载于本行业公知的文献,其功能等相同或类似。

### 具体实施方式

[0093] 下面通过实施例,更详细地说明本发明。这些实施例只用于对本发明举例,不得解释为本发明的范围由这些实施例所限定,这是本行业的技术人员不言而喻的。

[0094] 实施例1:胡麻菜提取物制备

[0095] 购入2012年11月在郁陵岛 (N37°30', E130°52') 脱去外皮晾干的胡麻菜 (*Aster glehni*:AG), 获得陆昌洙名誉教授 (庆熙大学药理学系,首尔) 的确认,凭证标本 (971-12A-P) 保管于韩国科学技术研究院植物标本箱。

[0096] 为了获得甲醇-可溶性提取物,在室温下用70L的甲醇将切碎的12kg AG提取3次。将2.6kg的干燥提取残余物悬浮在水中,然后依次用乙酸乙酯分配。减压蒸发乙酸乙酯分馏物,得到41.0g残余物。使用2996PDA检测器 (254nm, Waters, Worcester, MA, 美国), 通过反相高速液相色谱法 (Waters 1500系列系统) 分析AG的乙酸乙酯分馏物。

[0097] 为了分离,将10 $\mu$ L样品在30℃下注入Luna C18柱 (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6mm, Phenomenex, Torrance, CA, 美国)。流动相 (mobile phase) 使用乙腈 (acetonitrile) 及1%磷酸 (phosphoric acid) 的梯度溶液 (gradient)。梯度系统为20%乙腈 (0分钟)、20%乙腈 (0-10分钟)、30%乙腈 (10-20分钟)、40%乙腈 (20-30分钟)、80%乙腈 (30-40分钟) 及100%乙腈 (40-50分钟)。流动相的流速为1.0ml/min。提取过程及HPLC分析所使用的有机溶剂从西格玛奥德里奇公司 (St. Louis, MO, U.S.A.) 购入。

[0098] 结果,从AG提取的乙酸乙酯分馏物主要包含5-咖啡酰奎宁酸 (5-caffeoylquinic acid)、3,4-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-dicaffeoylquinic acid)、3,5-表二咖啡酰奎宁酸 (3,5-epi-dicaffeoylquinic acid)、3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA))、4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-dicaffeoylquinic acid)、3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (methyl 3,5-dicaffeoylquininate) 及4,5-二咖啡酰基奎宁酸甲酯 (methyl 4,5-dicaffeoylquininate) (图1)。确认了3,5-DCQA在AG乙酸乙酯分馏的7种咖啡酰奎宁酸化合物中最丰富。

[0099] 在以下实施例中,AG提取物使用了AG甲醇提取物的乙酸乙酯分馏物。

[0100] 实施例2:皮肤角质形成细胞 (HaCaT) 的培养

[0101] 将HaCaT细胞 (人角质形成细胞) 在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中,在含有10%胎牛血清 (FBS) 和1%抗生素-抗菌溶液的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM) 中进行培养。每48-72小

时将细胞培养基替换为新鲜的DMEM培养基。将5至17代的HaCaT细胞,在8-孔腔式载玻片中,按每孔 $1 \times 10^4$ 细胞的密度,或在含有10%牛胎血清及1%抗生素-抗菌剂的DMEM中的6孔培养孔板中,按每孔 $1 \times 10^6$ 细胞密度,铺展于孔板。将细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养器中培养24小时至48小时后,将培养基更换为含有1%牛胎血清的DMEM。然后,利用包含AG提取物(50μg)及PPARδ拮抗剂GSK0660(西格玛奥德里奇公司)的DNCB5μM(西格玛奥德里奇公司,美国密苏里州路易斯)或SDS30μM(西格玛奥德里奇公司)将细胞处理24小时。另外,3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA))进行1μM处理。HaCaT细胞由孙常旭博士处赠予。用于细胞培养的所有试剂购自威健公司(WELGENE Inc.,韩国大邱)。所有试剂的浓度为最终浓度。

[0102] 实施例3:胡麻菜提取物处理时,观察经DNCB或SDS处理的HaCaT细胞内PPARδ、AMPK、SPTLC2及TRPV4的蛋白质表达

[0103] 为了在以AG及SDS或DNCB处理的HaCaT细胞中,评价PPARδ、AMPK及SPTLC2的蛋白质表达程度,按实施例2的处理条件处理后,执行免疫印迹(Western blot)。

[0104] 样品的蛋白质浓度根据考马斯亮蓝法(Bradford法)进行评价。将10μg的提取蛋白质载入10%十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶,在硝酸纤维素膜上执行蛋白质印迹90分钟。将膜用5%脱脂乳封闭过夜,并用TBS-T在10分钟期间洗涤3次。使一抗在室温下与膜结合2小时。PPARδ的一抗购自艾博抗(Abcam)。全部及磷酸化形态的AMPK的一抗购自细胞信号技术公司(Cell Signaling Technology, Inc.,美国马萨诸塞州丹佛斯)。丝氨酸棕榈酰转移酶2(SPTLC 2)的一抗购自诺伟思公司(Novus),β-actin(β肌动蛋白)的一抗购自圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)。一抗的稀释条件如下。PPARδ为1:500,AMPK、P-AMPK(Thr172中)及SPTLC 2为1:1000,β-actin为1:800。在10分钟期间用TBS-T洗涤3次后,使二抗(圣克鲁斯生物技术公司)在室温下与膜结合1小时。二抗的稀释条件如下。抗兔PPARδ、AMPK、p-AMPK及SPTLC 2的IgG抗体为1:5000,β-actin的抗鼠IgG抗体为1:5000。在10分钟期间用TBS-T洗涤3次后,再在10分钟期间执行一次TBS洗涤,将化学发光基质及增强剂溶液(伯乐(Bio-Rad)公司,美国加利福尼亚州赫拉克勒斯)应用于膜,测量蛋白质表达状态。图像使用柯达GBX显影液及定影剂(锐珂医疗公司(CARESTREAM HEALTH, INC.),美国纽约州罗彻斯特)手动处理后,使用ImageJ程序进行分析。β-actin用作使载入的蛋白质正常化所需的正常对照组。

[0105] 结果,与只以DNCB或SDS处理的情形相比,在处理AG提取物的细胞中,可以确认PPARδ、P-AMPK、SPTLC2及TRPV4的表达增加,与AG提取物一起处理作为PPARδ拮抗剂的GSK0660时,可以确认PPARδ、P-AMPK及SPTLC2的表达增加现象钝化(图2a及图2b)。从所述结果可知,AG提取物在角质细胞中增加TRPV4的表达,从而依次激活TRPV4-PPARδ-AMPK路径。

[0106] 实施例4:胡麻菜提取物处理时,观察经DNCB或SDS处理的HaCaT细胞的角质、外膜蛋白、β-防卫素及TNFα表达

[0107] 为了评价诸如角质和外膜蛋白的皮肤屏障成分与炎症性细胞因子TNFα以及作为代表性β-防卫素之一的β-防卫素1的表达,以实施例2的处理条件进行处理后,执行免疫细胞化学(immunocytochemistry(ICC))。

[0108] 将腔式载玻片的细胞用冰冷的甲醇固定15分钟。使固定的细胞与含有0.3%正常血清的0.3%双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液反应5分钟,在细胞中去除过氧化物酶活性。用PBS洗涤5分钟

后,将细胞利用稀释20分钟的正常血清切断非特异性抗原后,与稀释的一抗反应1小时。外膜蛋白及TNF $\alpha$ 的一抗购自诺伟思公司(Novus,利特尔顿,CO 80120,美国)。 $\beta$ -防卫素1的一抗购自圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology, Inc,美国德克萨斯州达拉斯)。广谱角质(pan-keratin)的一抗购自自艾博抗(Abcam,英国剑桥)。经PBS洗涤后,使二抗与细胞反应30分钟。经PBS洗涤后,使预先混合的VECTASTATIN ABC试剂溶液与细胞反应30分钟。用PBS洗涤细胞后,与DAB基质溶液反应,直至出现适宜的颜色变化时为止。利用自来水洗涤3分钟后,将细胞用苏木精进行复染。用自来水冲洗细胞,在空气中晾干后,最后进行固封。免疫细胞化学试剂盒(包含二抗)购自矢量实验室公司(Vect or laboratories,美国加利福尼亚州伯灵格姆)。

[0109] 将蛋白提取物在10%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,然后吸到硝酸纤维素膜上。使硝酸纤维素膜依次与一抗和二抗结合后,使化学发光暴露在X射线胶片上。用Image J程序分析X射线胶片的带密度。固定载玻片腔的HaCaT细胞,利用角质、外膜蛋白、防卫素及TNF $\alpha$ 抗体进行免疫细胞化学染色。图像以200倍率拍摄。图像的密度用Image J程序分析。结果用平均 $\pm$ SEM显示。值借助于非配对T检验(unpaired t-test)而进行统计性分析。所有实验反复三次。

[0110] 结果,AG提取物增加了因DNCB和SDS而减少的角质、外膜蛋白及 $\beta$ -防卫素1的蛋白质表达。但是,增加的蛋白质表达被PPAR $\delta$ 拮抗剂GSK0660抵消。因DNCB和SDS而增加的TNF $\alpha$ 表达被AG提取物减少,AG提取物的改善效果被GSK0660消除(图3a至图3d)。

[0111] 实施例5:观察HaCaT细胞中角质、外膜蛋白、 $\beta$ -防卫素及TNF $\alpha$ 表达

[0112] 为了调查TRPV4和AMPK对皮肤屏障成分、防御及炎症相关生物标志表达造成的影响,利用免疫细胞化学染色法,在以TRPV4和AMPK的拮抗剂进行处理的HaCaT细胞中,调查了对角质、外膜蛋白、 $\beta$ -防卫素及TNF $\alpha$ 的蛋白质表达。

[0113] 以TRPV4及AMPK的拮抗剂进行处理,在以TRPV4、PPAR $\delta$ 及AMPK的拮抗剂进行处理的HaCaT细胞中,执行对TRPV4、AMPK及PPAR $\delta$ 的免疫印迹。将载玻片腔的HaCaT细胞固定,利用角质、外膜蛋白、防卫素及TNF $\alpha$ 的抗体进行免疫细胞化学染色。图像按200倍率拍摄。图像密度利用Image J程序进行分析。将蛋白提取物在10%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,然后吸附于硝酸纤维素膜。使硝酸纤维素膜依次与一抗和二抗结合后,使化学发光暴露在X射线胶片上。用Image J程序分析X射线胶片的带密度。图像的密度用Image J程序分析。结果用平均 $\pm$  SEM显示。值借助于非配对T检验(unpaired t-test)而进行统计性分析。所有实验反复三次。

[0114] 结果,在HaCaT细胞中,相比对照组,TNF $\alpha$ 蛋白质表达因TRPV4拮抗剂或AMPK拮抗剂而增加。但是,在相同条件下,角质、外膜蛋白及 $\beta$ -防卫素1的蛋白质表达比对照组显著减少(图4a及图4b)。

[0115] 实施例6:在HaCaT细胞中观察TRPV4、PPAR $\delta$ 及AMPK的蛋白质表达与TRPV4、PPAR $\delta$ 及AMPK拮抗剂的相关性

[0116] 为了了解作为TRPV4、PPAR $\delta$ 及AMPK的主要调节因子的启动顺序,在以TRPV4、PPAR $\delta$ 或AMPK的拮抗剂处理的HaCaT细胞中,通过免疫印迹测量了TRPV4、PPAR $\delta$ 及AMPK的蛋白质表达程度。

[0117] 结果,在以TRPV4拮抗剂治疗的HaCaT细胞中,对TRPV4、PPAR $\delta$ 及p-AMPK的所有蛋白

质表达显著减少。PPAR $\delta$ 拮抗剂处理虽然降低对PPAR $\delta$ 及p-AMPK的蛋白质表达,但不改变TRPV4蛋白质表达。作为AMPK拮抗剂的化合物C只针对p-AMPK减少了蛋白质表达,但不改变TRPV4及PPAR $\delta$ 的蛋白质表达造成影响(图4a及图4b)。

[0118] 实施例7:在3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid,3,5-DCQA)处理时,观察HaCaT细胞的TRPV4、PPAR $\delta$ 、AMPK及SPTLC2的蛋白质表达

[0119] 在3,5-二咖啡酰奎宁酸处理时,为了观察HaCaT细胞的TRPV4、PPAR $\delta$ 、AMPK及SPTLC2的蛋白质表达,以实施例2的处理条件进行处理后,执行免疫印迹。

[0120] 结果,在HaCaT细胞中,与AG乙酸乙酯提取物一样,3,5-DCQA增加对PPAR $\delta$ 、AMPK及SPTLC2的蛋白质表达(图5)。

[0121] 实施例8:在3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid,3,5-DCQA)处理时,在HaCaT细胞中观察角质、外膜蛋白、 $\beta$ -防卫素及TNF $\alpha$ 表达

[0122] 在3,5-二咖啡酰奎宁酸处理时,为了观察HaCaT细胞的角质、外膜蛋白、 $\beta$ -防卫素及TNF $\alpha$ 的蛋白质表达,以实施例2的处理条件进行处理后,执行免疫组织化学染色法。

[0123] 将蛋白提取物在10%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,然后吸到硝酸纤维素膜上。使硝酸纤维素膜与一抗和二抗结合并依次照射后,使化学发光暴露在X射线胶片上。用Image J程序分析X射线胶片的带密度。固定载玻片腔的HaCaT细胞,利用角质、外膜蛋白、防卫素及TNF $\alpha$ 抗体进行免疫细胞化学染色。图像以200倍率拍摄。图像的密度用Image J程序分析。结果用平均 $\pm$ SEM显示。值借助于非配对T检验(unpaired t-test)而进行统计性分析。所有实验反复三次。

[0124] 结果,在HaCaT细胞中,3,5-DCQA处理增加了与皮肤屏障完整性相关的角质、外膜蛋白及 $\beta$ -防卫素1的蛋白质表达,但与皮肤炎症相关的TNF $\alpha$ 表达减少(图6a及图6b)。

[0125] 因此,相比DNCB及SDS治疗组,TRPV4蛋白质水平因AG提取物而增加,TRPV4拮抗剂在角质细胞中抵消了AG的效果,因而可知TRPV4参与皮肤屏障的维持。

[0126] 从以PPAR $\delta$ 、AMPK及TRPV4的拮抗剂处理的HaCaT细胞获得的实验结果,显示出AG可以通过TRPV4 $\rightarrow$ PPAR $\delta$  $\rightarrow$ AMPK路径的依次调节而保护角质形成细胞。另外,AG提取物的7种咖啡酰奎宁酸中最丰富的3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid),在与HaCaT细胞的皮肤屏障完整性和炎症相关的生物标志物表达中,表现出与乙酸乙酯提取物同等的效果,因而表明AG提取物的功能起因于咖啡酰奎宁酸化合物。

[0127] 确认了咖啡酰奎宁酸化合物丰富的AG提取物,通过在以SDS或DNCB处理的人角质细胞HaCaT细胞中的TRPV4-PPAR $\delta$ -AMPK路径的依次限制,可以保护皮肤屏障(图7)。

[0128] 统计

[0129] 数据用平均 $\pm$ SE(标准误差测量)显示,两组间统计上的显著差异用与GraphPad Prism软件的非配对T检验(unpaired t-test)来计算。 $p < 0.05$ 的值视为显著。

[0130] 制备例1:包含3,5-二咖啡酰奎宁酸作为有效成分的药学组合物及保健功能食品组合物

[0131] <制备例1>药制剂的制备

[0132] <1-1>散剂的制备

[0133] 3,5-二咖啡酰奎宁酸 2g

[0134] 乳糖 1g

[0135] 混合上述成分,填充于气密袋而制备了散剂。

[0136] <1-2>片剂的制备

3,5-二咖啡酰奎宁酸 100 mg

[0137] 玉米淀粉 100 mg

乳糖 100 mg

硬脂酸镁 2 mg

[0138] 混合上述成分后,根据通常片剂的制备方法进行压片而制备了片剂。

[0139] <1-3>胶囊剂的制备

3,5-二咖啡酰奎宁酸 100 mg

[0140] 玉米淀粉 100 mg

乳糖 100 mg

硬脂酸镁 2 mg

[0141] 混合上述成分后,根据通常的胶囊剂制备方法,填充于明胶胶囊而制备了胶囊剂。

[0142] <1-4>丸剂的制备

3,5-二咖啡酰奎宁酸 1 g

乳糖 1.5 g

[0143] 甘油 1 g

木糖醇 0.5 g

[0144] 混合上述成分后,根据通常的方法,制备成每丸4g。

[0145] <1-5>颗粒的制备

3,5-二咖啡酰奎宁酸 150 mg

大豆提取物 50 mg

[0146] 葡萄糖 200 mg

淀粉 600 mg

[0147] 混合上述成分后,添加30%乙醇100mg,在摄氏60℃下干燥而形成颗粒后填充于袋中。

[0148] <制备例2>食品的制备

[0149] <2-1>面粉食品的制备

[0150] 相对于面粉100重量份,将本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸0.5~5.0重量份添加于面粉,利用该混合物,制备了面包、蛋糕、曲奇、饼干及面食。

[0151] <2-2>汤或肉汁(gravies)的制备

[0152] 相对于汤或肉汁100重量份,将本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸0.1~5.0重量份添加于汤或肉汁,制备了用于增进健康的肉加工制品、面食的汤或肉汁。

[0153] <2-3>牛肉酱(ground beef)的制备

[0154] 相对于牛肉酱100重量份,将本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸10重量份添加于牛肉酱,制备了用于增进健康的牛肉酱。

[0155] <2-4>乳制品(dairy products)的制备

[0156] 相对于牛奶100重量份,将本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸5~10重量份添加于牛奶,利用所述牛奶,制备了诸如黄油和冰淇淋的多样乳制品。

[0157] <2-5>膳食的制备

[0158] 将糙米、大麦、糯米、薏米以公知方法糊化干燥并烘烤后,用粉碎机制备成粒度60目的粉末。

[0159] 将黑豆、黑芝麻、紫苏以公知方法蒸熟、干燥并烘烤后,用粉碎机制备成粒度60目的粉末。

[0160] 将本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸在真空浓缩机中减压浓缩,将利用喷雾、热风干燥机干燥获得的干燥物,用粉碎机粉碎成粒度60目而获得干燥粉末。

[0161] 将以上制备的谷物类、干果类及3,5-二咖啡酰奎宁酸按如下比例配合而制备。

[0162] 谷物类(糙米40重量%、薏米15重量%、大麦20重量%),

[0163] 干果类(紫苏7重量%、黑豆8重量%、黑芝麻7重量%),

[0164] 3,5-二咖啡酰奎宁酸(3重量%),

[0165] 灵芝(0.5重量%),

[0166] 地黄(0.5重量%)

[0167] <制备例3>饮料的制备

[0168] <3-1>保健饮料的制备

[0169] 将诸如液态果糖(0.5%)、低聚糖(2%)、砂糖(2%)、食盐(0.5%)、水(75%)的辅材与本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸5g均质配合并瞬间杀菌后,将其包装于玻璃瓶、塑料瓶等小包装容器而制备。

[0170] <3-2>蔬菜汁的制备

[0171] 将本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸5g添加于番茄或胡萝卜汁1,000ml而制备了蔬菜汁。

[0172] <3-3>果汁的制备

[0173] 将本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸1g添加于苹果或葡萄汁1,000ml而制备了果汁。

[0174] 制备例2:包含3,5-二咖啡酰奎宁酸作为有效成分的皮肤外用剂组合物及化妆品组合物

[0175] 作为发明的剂型示例,列举了皮肤外用软膏、柔肤化妆水、收敛化妆水、营养化妆水、按摩霜、精华素及贴片,但本发明的化妆品组合物的剂型不得解释为限定于此,从业人员可以在本发明范围内进行通常的变化。

[0176] 剂型例1:皮肤外用软膏

[0177] 如下表1所示,根据通常方法制备了含有3,5-二咖啡酰奎宁酸的皮肤外用软膏。

[0178] **【表1】**

[0179]

| 编号 | 成分          | 含量（重量%） |
|----|-------------|---------|
| 1  | 3,5-二咖啡酰奎宁酸 | 10      |
| 2  | 癸二酸二乙酯      | 8       |
| 3  | 鲸蜡          | 5       |
| 4  | 聚氧乙烯油基醚磷酸酯  | 6       |
| 5  | 苯甲酸钠        | 适量      |
| 6  | 凡士林         | 余量      |
| 7  | 合计          | 100     |

[0180] 剂型例2:柔肤化妆水

[0181] 【表2】

[0182]

| 编号 | 成分       | 含量（%） |
|----|----------|-------|
| 1  | 甘油       | 5.00  |
| 2  | 1,3-丁二醇  | 3.00  |
| 3  | PEG 1500 | 1.00  |
| 4  | 尿囊素      | 0.10  |
| 5  | DL-泛醇    | 0.30  |
| 6  | EDTA-2Na | 0.02  |
| 7  | 二苯甲酮-9   | 0.04  |
| 8  | 乙醇       | 10.00 |

[0183]

|    |             |      |
|----|-------------|------|
| 9  | 辛基十二醇聚醚-16  | 0.20 |
| 10 | 聚山梨酯20      | 0.20 |
| 11 | 3,5-二咖啡酰奎宁酸 | 5.0  |
| 12 | 防腐剂、香料、色素   | 微量   |
| 13 | 蒸馏水         | 余量   |

[0184] 剂型例3:收敛化妆水

[0185] 【表3】

[0186]

| 编号 | 成分          | 含量（%） |
|----|-------------|-------|
| 1  | 甘油          | 2.00  |
| 2  | 1,3-丁二醇     | 2.00  |
| 3  | 尿囊素         | 0.10  |
| 4  | DL-泛醇       | 0.30  |
| 5  | EDTA-2Na    | 0.02  |
| 6  | 二苯甲酮-9      | 0.04  |
| 7  | 乙醇          | 15.00 |
| 8  | 聚山梨酯20      | 0.20  |
| 9  | 3,5-二咖啡酰奎宁酸 | 3.0   |
| 10 | 柠檬酸         | 微量    |

|    |           |    |
|----|-----------|----|
| 11 | 防腐剂、香料、色素 | 微量 |
| 12 | 蒸馏水       | 余量 |

[0187] 剂型例4:营养化妆水

[0188] 【表4】

|        |    |             |       |
|--------|----|-------------|-------|
| [0189] | 编号 | 成分          | 含量(%) |
|        | 1  | 鲸蜡硬脂醇       | 1.00  |
|        | 2  | 硬脂酸甘油酯      | 0.50  |
|        | 3  | 聚山梨酯60      | 1.00  |
|        | 4  | 花生四烯酸       | 0.30  |
|        | 5  | 辛酸十六烷基酯     | 6.00  |
|        | 6  | 角鲨烷         | 4.00  |
|        | 7  | 紫花油         | 4.00  |
|        | 8  | 丁二醇         | 4.00  |
|        | 9  | 甘油          | 4.00  |
|        | 10 | 卡波姆         | 0.10  |
|        | 11 | 三乙醇胺        | 0.10  |
|        | 12 | 3,5-二咖啡酰奎宁酸 | 1.00  |
|        | 13 | 防腐剂、香料、色素   | 微量    |
|        | 14 | 蒸馏水         | 余量    |

[0190] 剂型例5:精华素

[0191] 【表5】

|        |    |             |       |
|--------|----|-------------|-------|
| [0192] | 编号 | 成分          | 含量(%) |
|        | 1  | 甘油          | 10.00 |
|        | 2  | 甜菜碱         | 5.00  |
|        | 3  | PEG 1500    | 2.00  |
|        | 4  | 尿囊素         | 0.10  |
|        | 5  | DL-泛醇       | 0.30  |
|        | 6  | EDTA-2Na    | 0.02  |
|        | 7  | 二苯甲酮-9      | 0.04  |
|        | 8  | 羟乙基纤维素      | 0.10  |
|        | 9  | 羧乙烯基聚合物     | 0.20  |
|        | 10 | 三乙醇胺        | 0.18  |
|        | 11 | 辛基十二醇       | 0.30  |
|        | 12 | 辛基十二烷-16    | 0.40  |
|        | 13 | 乙醇          | 6.00  |
|        | 14 | 3,5-二咖啡酰奎宁酸 | 5.00  |
|        | 15 | 防腐剂、香料、色素   | 微量    |
|        | 16 | 蒸馏水         | 余量    |

[0193] 剂型例6:贴片

[0194] 【表6】

| 编号 | 成分          | 含量(%) |
|----|-------------|-------|
| 1  | 聚乙烯醇        | 15.00 |
| 2  | 纤维素胶        | 0.15  |
| 3  | 甘油          | 3.00  |
| 4  | PEG 1500    | 2.00  |
| 5  | 环糊精         | 0.15  |
| 6  | DL-泛醇       | 0.30  |
| 7  | 尿囊素         | 0.10  |
| 8  | 甘草酸单铵盐      | 0.20  |
| 9  | 烟酰胺         | 0.40  |
| 10 | 乙醇          | 5.00  |
| 11 | PEG 40氢化蓖麻油 | 0.30  |
| 12 | 3,5-二咖啡酰奎宁酸 | 1.00  |
| 13 | 防腐剂、香料、色素   | 微量    |
| 14 | 蒸馏水         | 余量    |

[0196] 实施例9:确认本发明的化妆品组合物的皮肤屏障功能改善效果

[0197] 确认了本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸在皮肤屏障损伤后强化脂质屏障恢复。

[0198] 受试者选择健康良好、无任何皮肤科疾病的皮肤正常的10名志愿者。将他们的皮肤屏障按如下步骤,借助于胶带剥离,损伤前臂内侧(forearm)部位,直至经皮水分散失量达到30g/m<sup>2</sup>/h左右时为止。然后,评价TEWL(Tr ansepidermal water loss,经皮水分散失)后,在志愿者前臂,每日2次,每次30分钟,将20μl浓度的制备例2的外用软膏剂分别涂覆于9cm<sup>2</sup>面积。涂覆后7天内,每日测量TEWL,测量TEWL减少的程度,从而评价了皮肤屏障功能恢复的程度。效能评价中使用的恢复率根据下式1进行测量。

[0199] [式1]

[0200] 
$$Br(\text{损伤恢复率}) = (1 - (Bt=i - Bt=0) / (Bt=d - Bt=0)) \times 100$$
[0201]  $Bt=i$  = 各时间的皮肤屏障损伤后TEWL测量值[0202]  $Bt=0$  = 皮肤屏障损伤前的TEWL测量值[0203]  $Bt=d$  = 皮肤屏障损伤后的TEWL测量值

[0204] 结果如表7所示,相比不含3,5-二咖啡酰奎宁酸的乳霜(比较剂型例),涂覆了含有本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸的乳霜(剂型例)的皮肤的皮肤屏障恢复率在1天后高出19.6%,3天后高出17.7%左右。由此确认了本发明的3,5-二咖啡酰奎宁酸对受损皮肤屏障的恢复效能卓越。

[0205] 【表7】

|               | 恢复率 (%) |      |      |      |
|---------------|---------|------|------|------|
|               | 1天      | 3天   | 4天   | 7天   |
| 剂型例(皮肤外用剂组合物) | 48.5    | 69   | 83.2 | 95.3 |
| 比较剂型例(比较列)    | 28.9    | 51.3 | 68.4 | 82.5 |

[0207] 以上详细记述了本发明内容的特定部分,这种具体记述只是优选的实施形态,并

非由此限制本发明的范围,这是本行业的技术人员不言而喻的。因此,本发明的实质性范围由附带的权利要求项及其等价物所定义。

[0208] 产业上的可利用性

[0209] 本发明确认了从天然物分离的化合物的皮肤屏障改善与炎症性皮肤病预防及治疗效果,本发明的组合物在强化皮肤物理屏障同时,有望通过缓解皮肤炎症,应用于用于预防、治疗或改善炎症性皮肤病的医药品、医药外品、化妆品、功能性食品等多样领域。

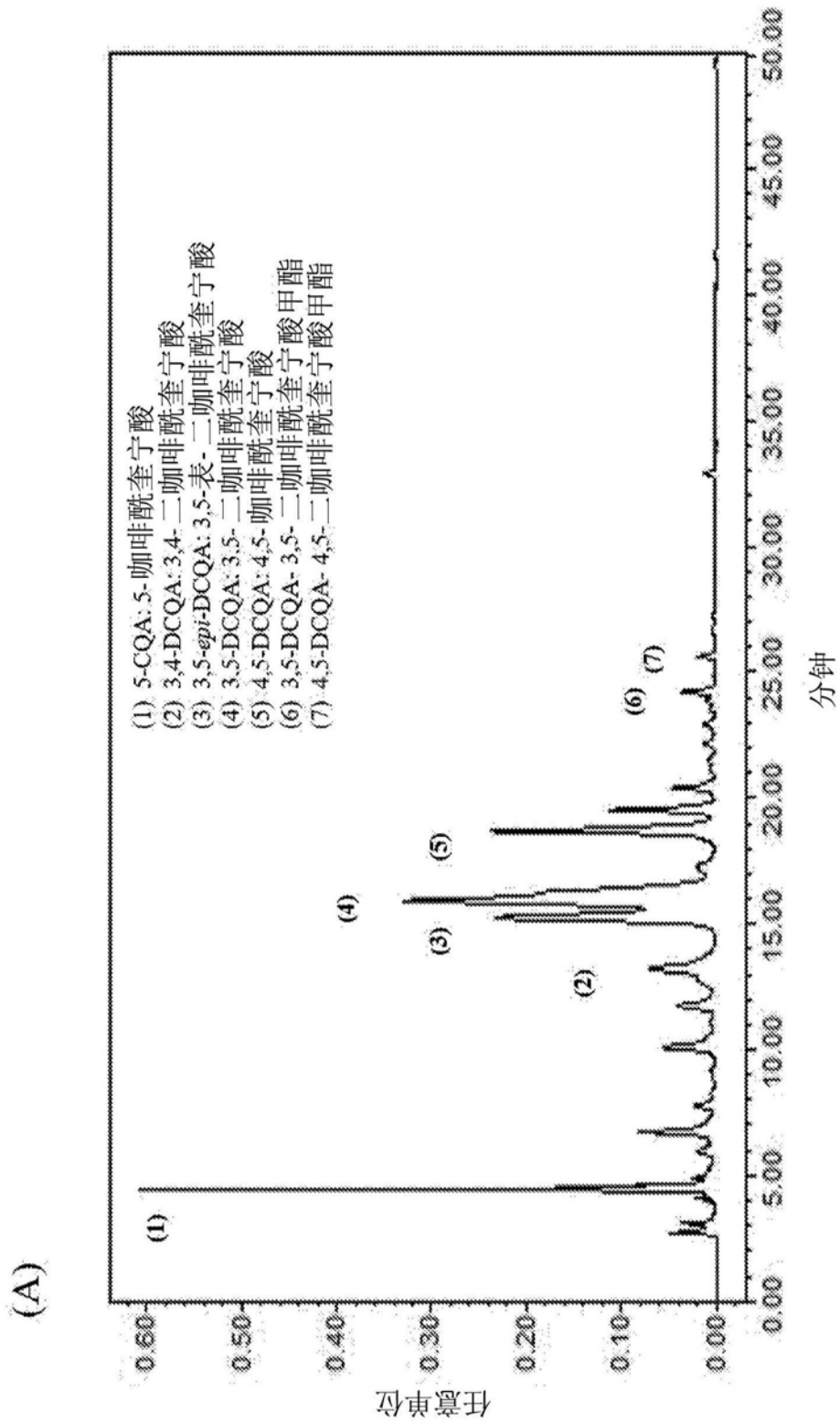


图1a

(B)

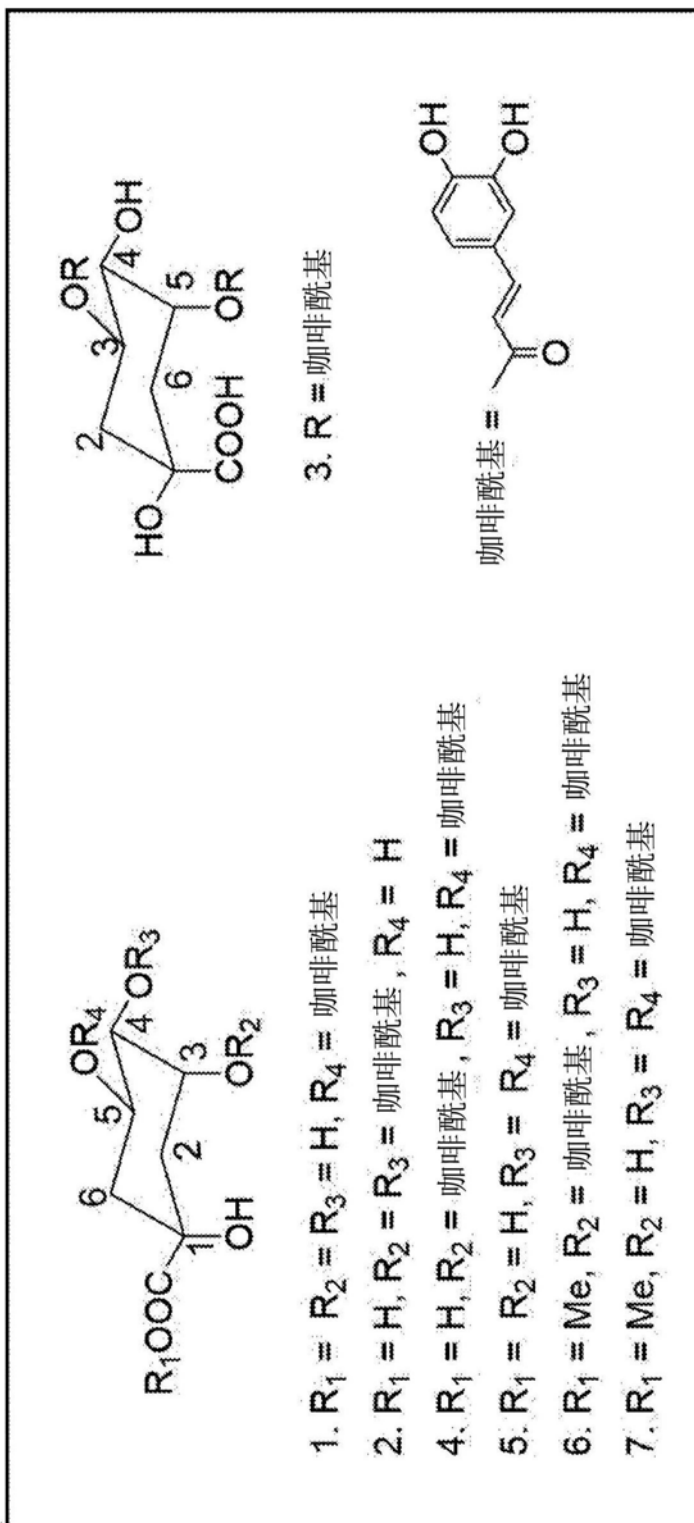


图1b

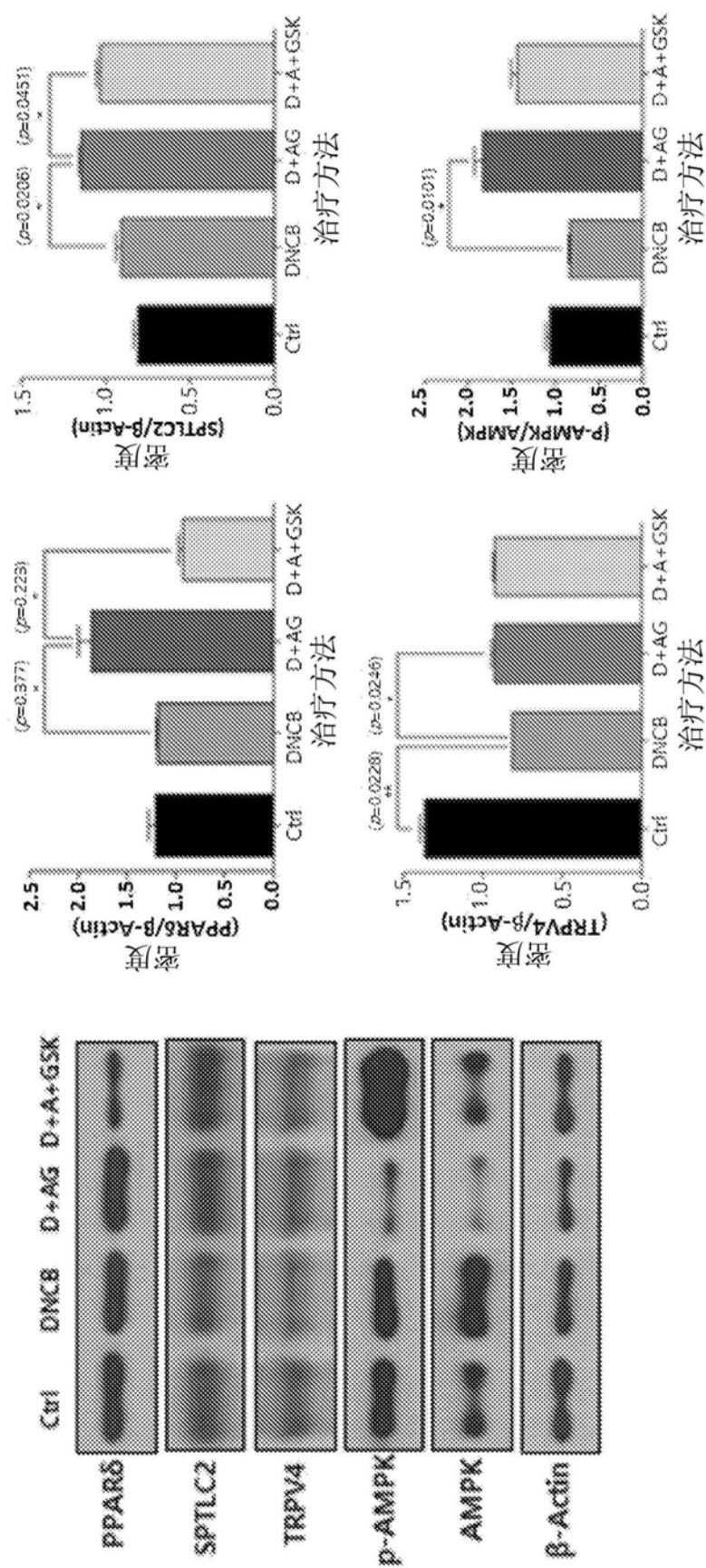


图2a

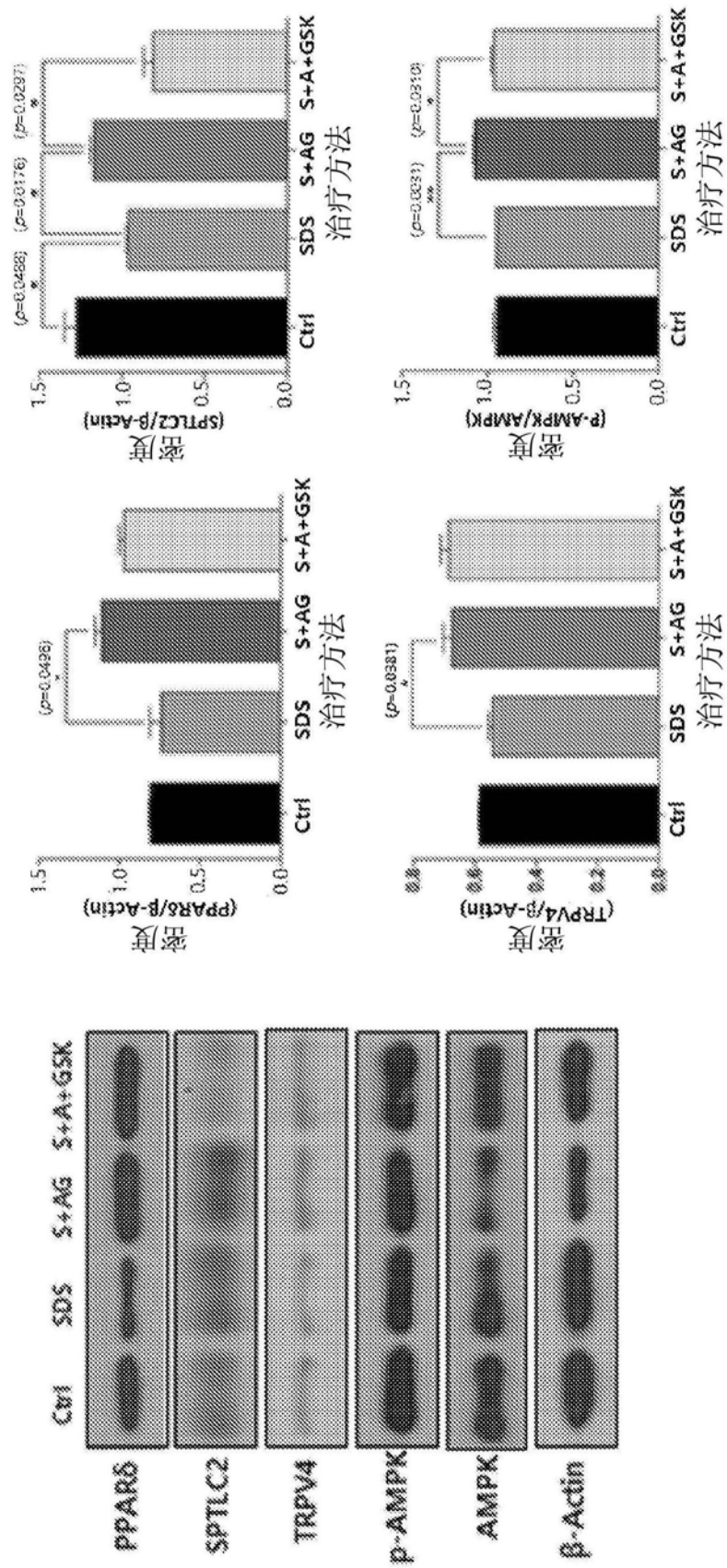


图2b

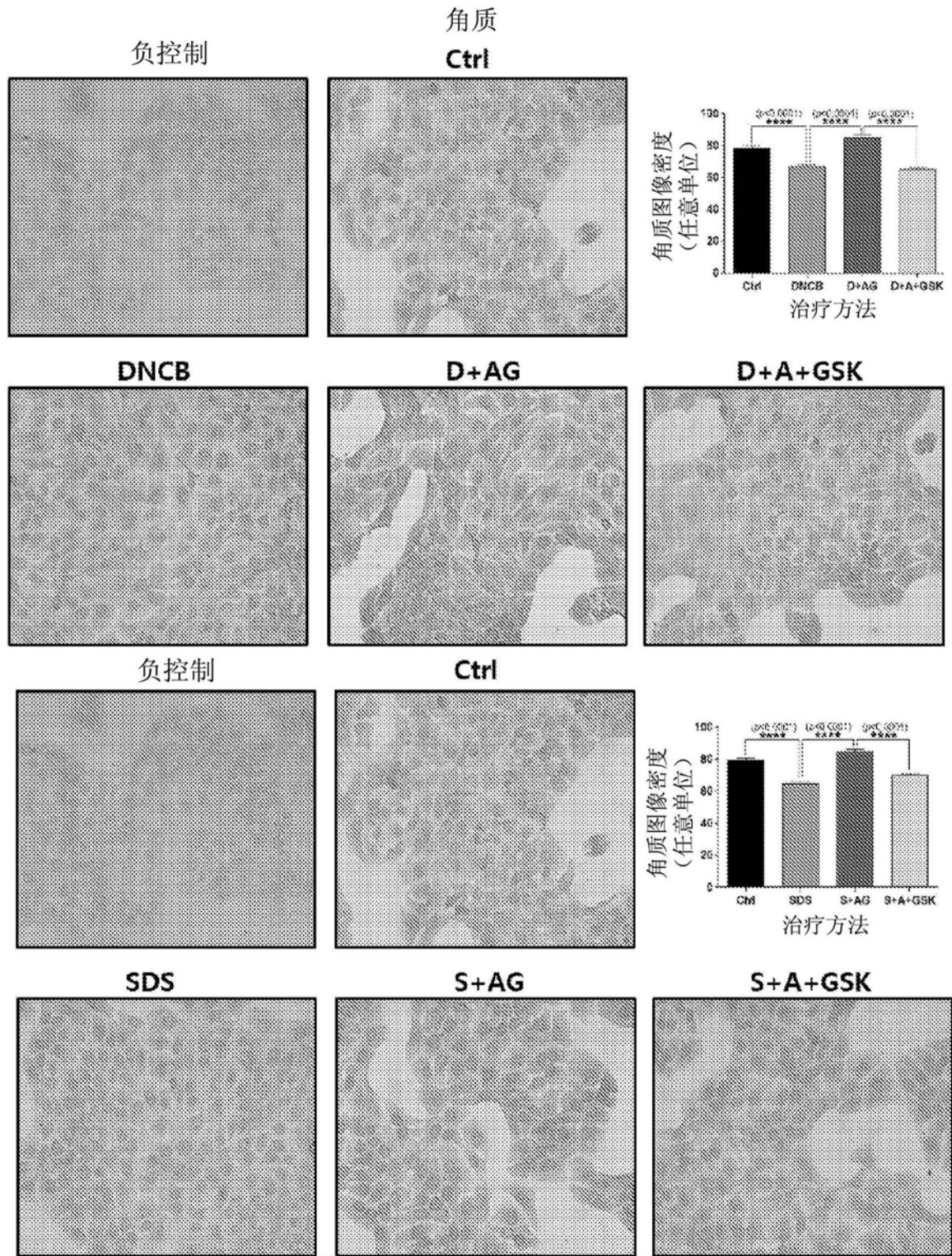


图3a

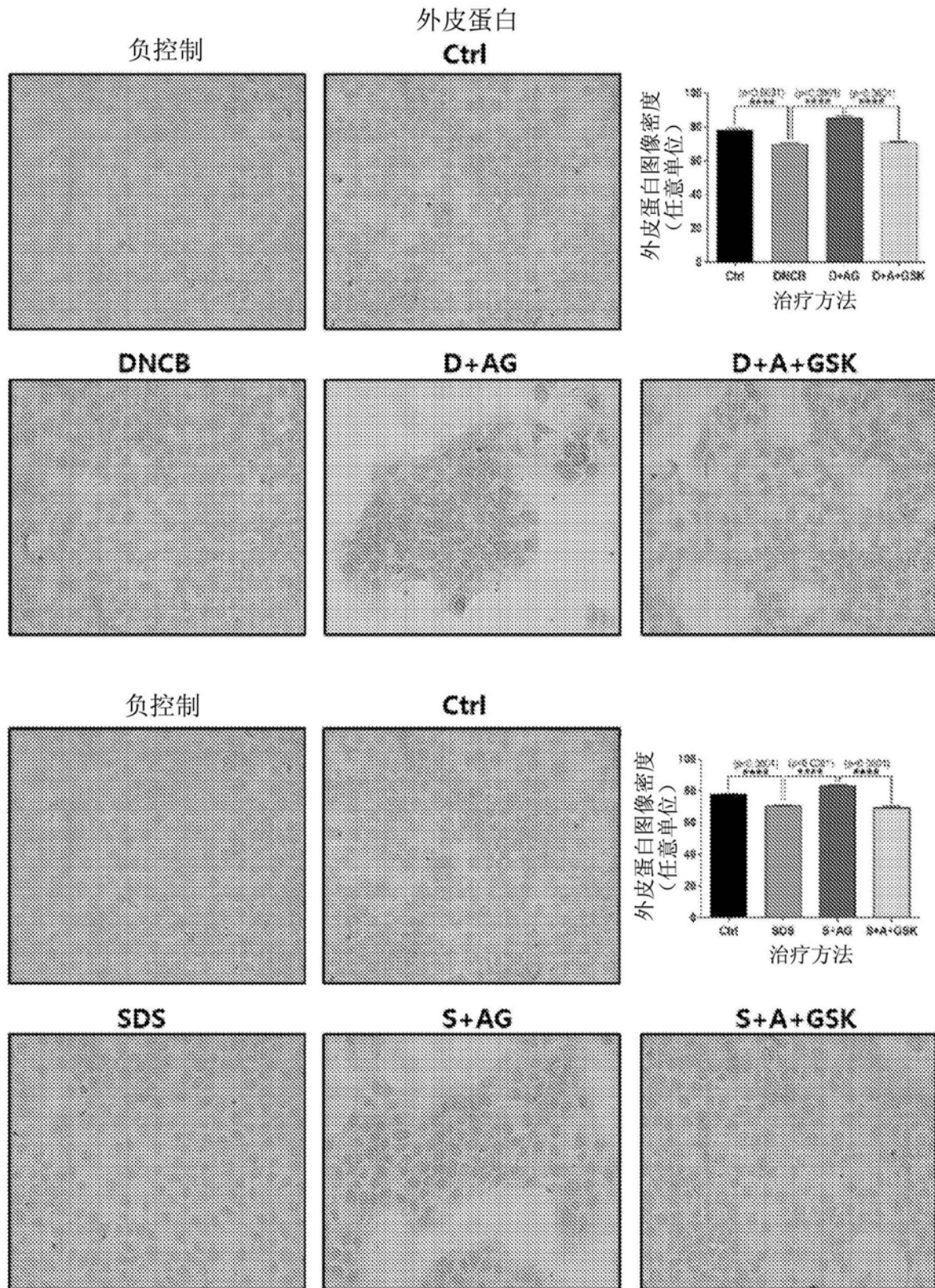


图3b

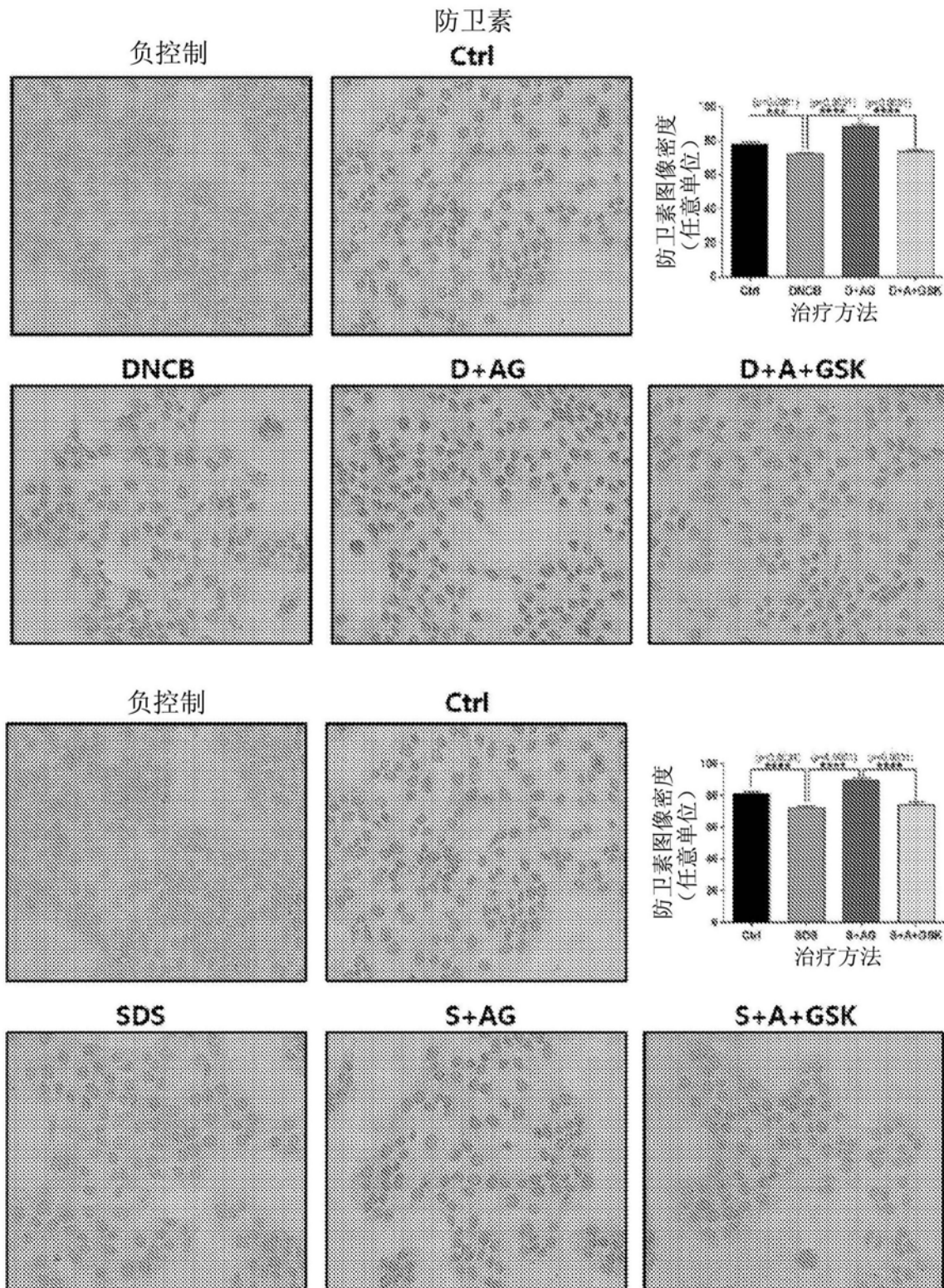


图3c

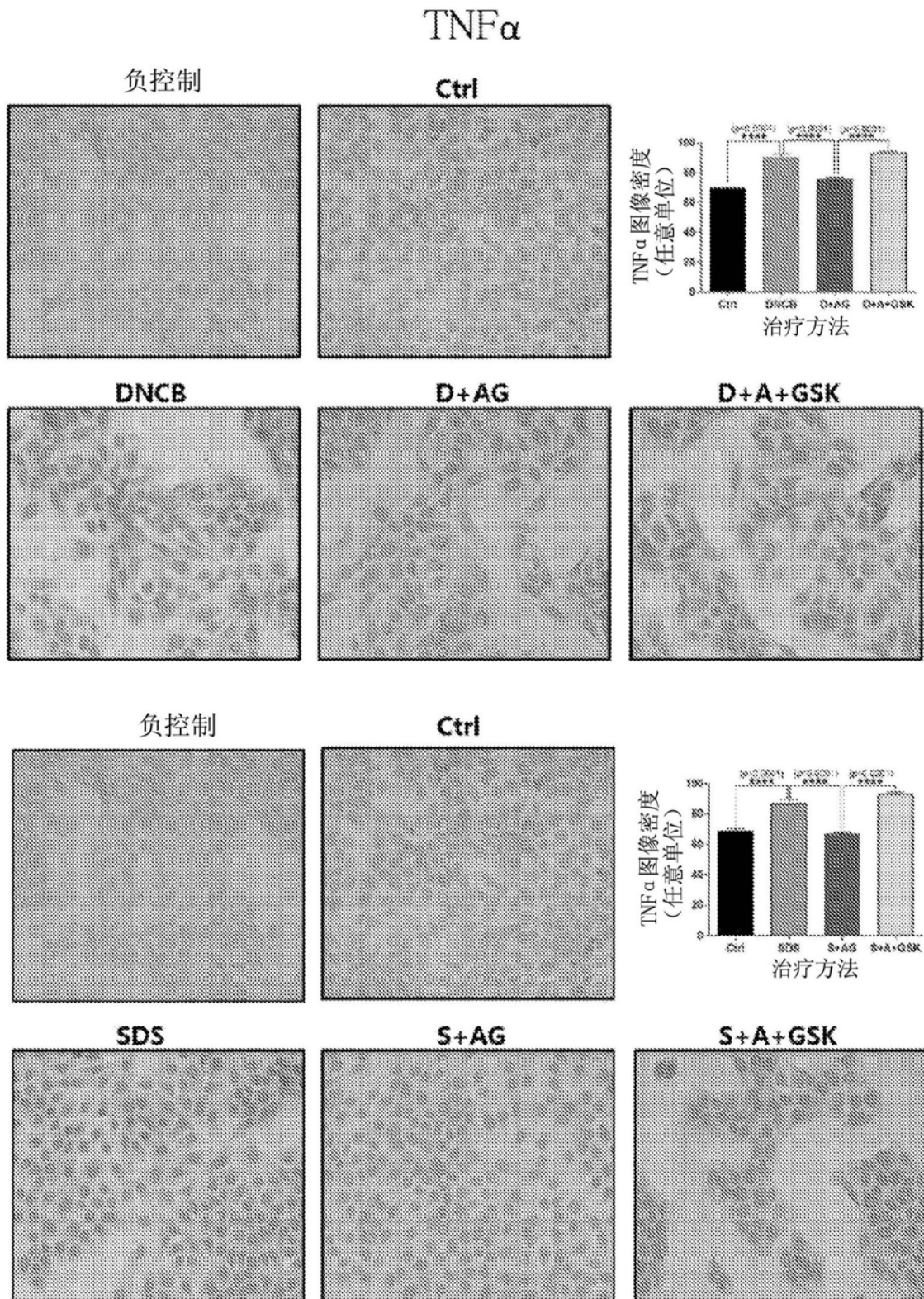


图3d

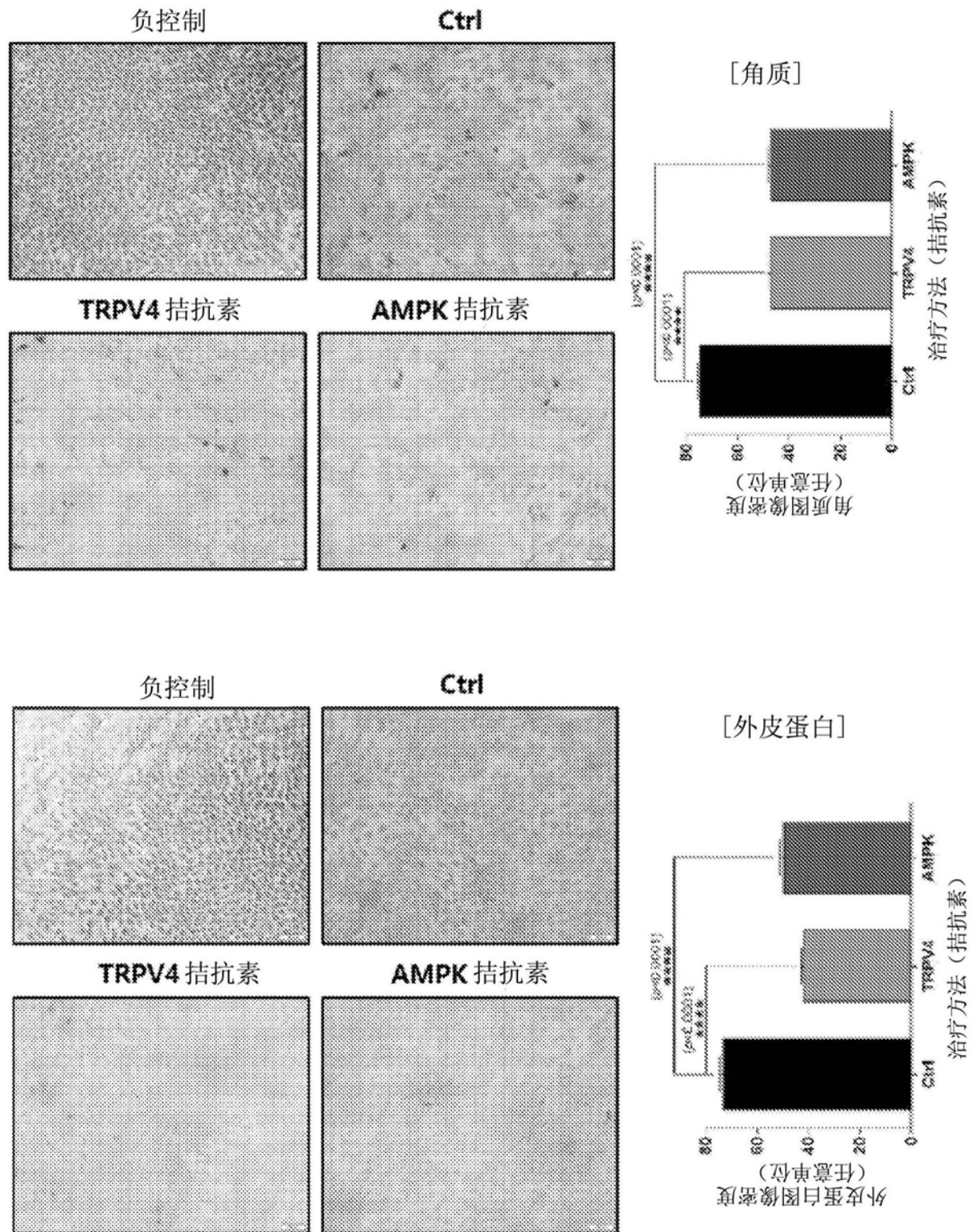


图4a

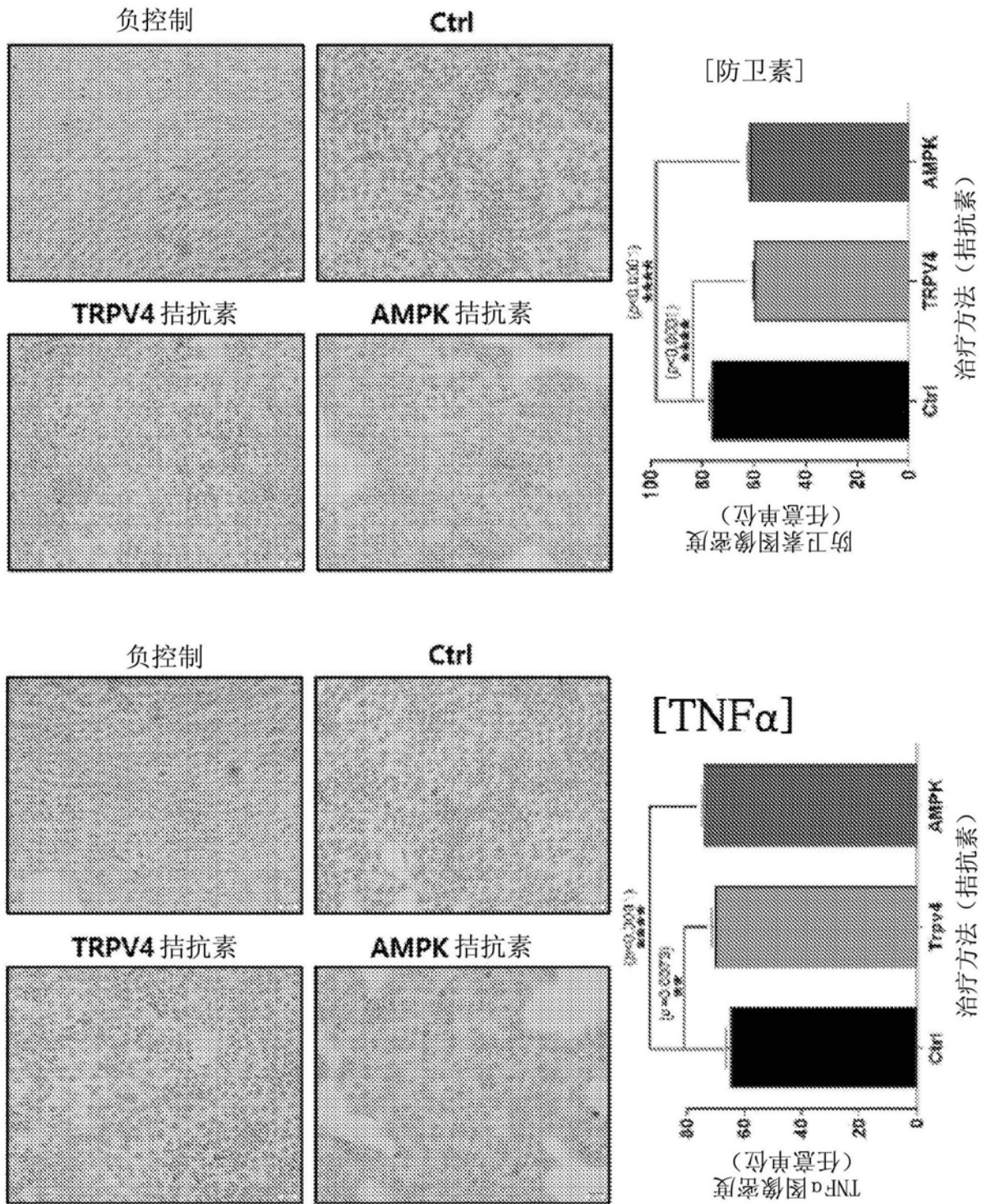


图4b

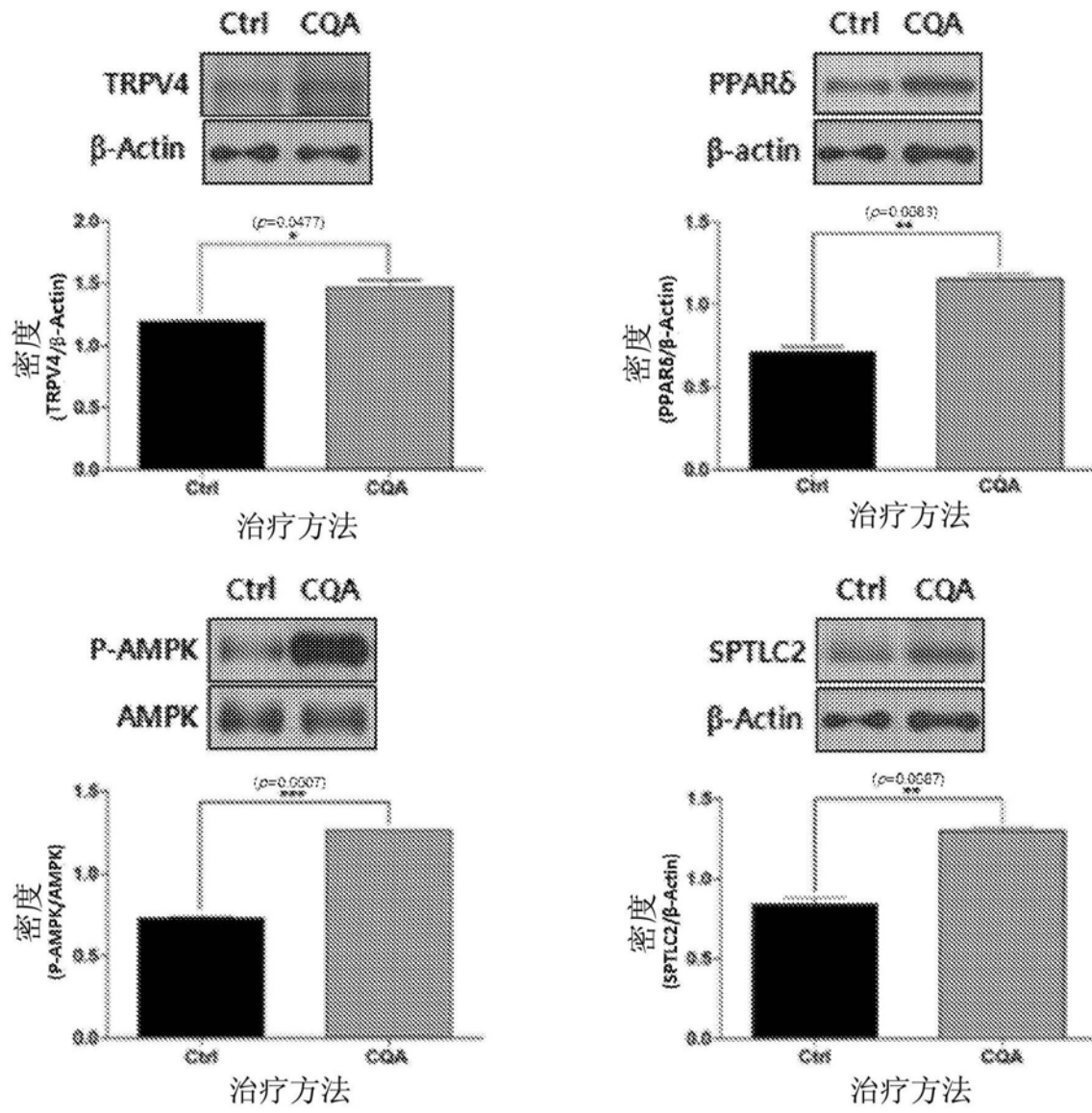


图5

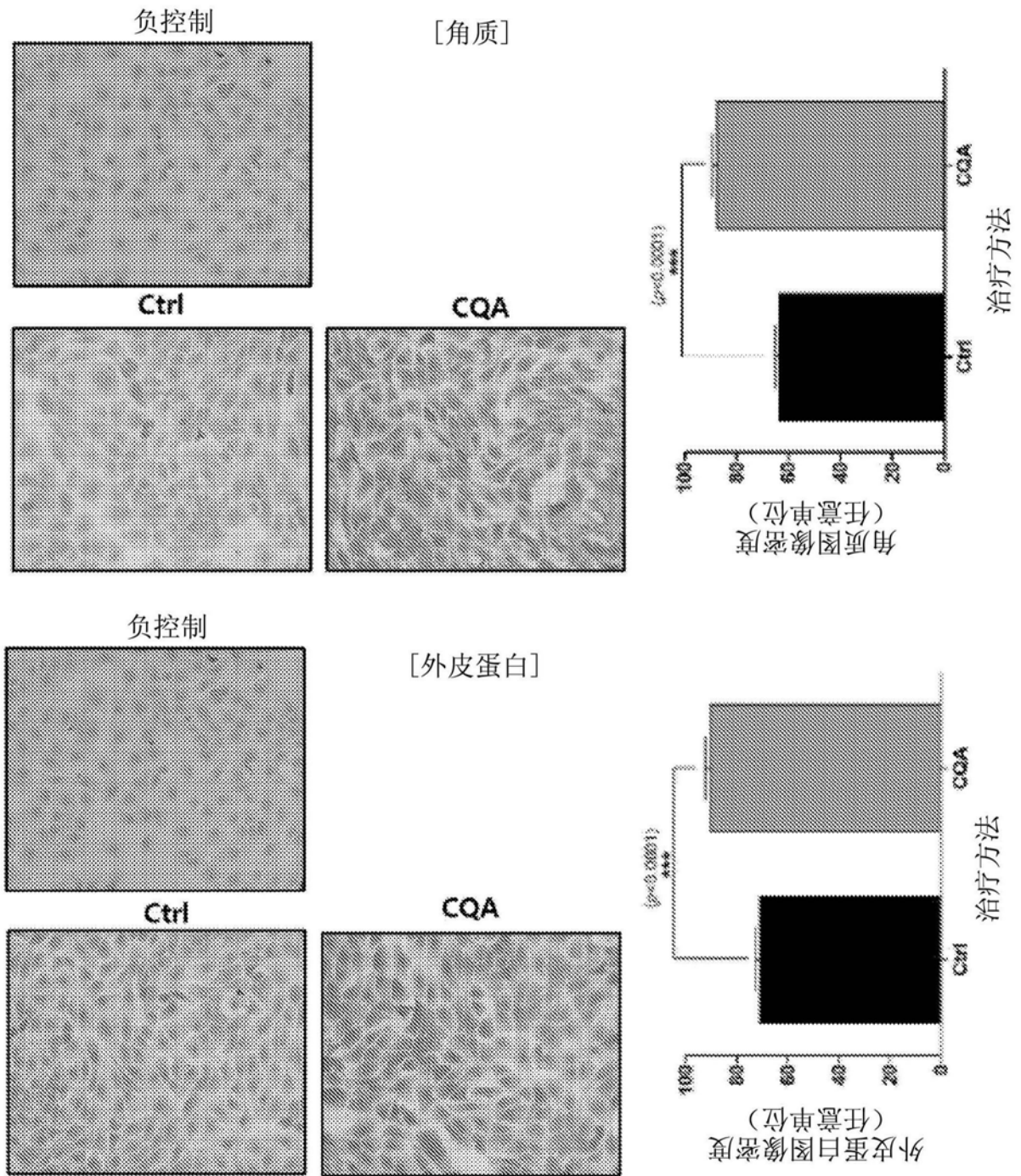


图6a

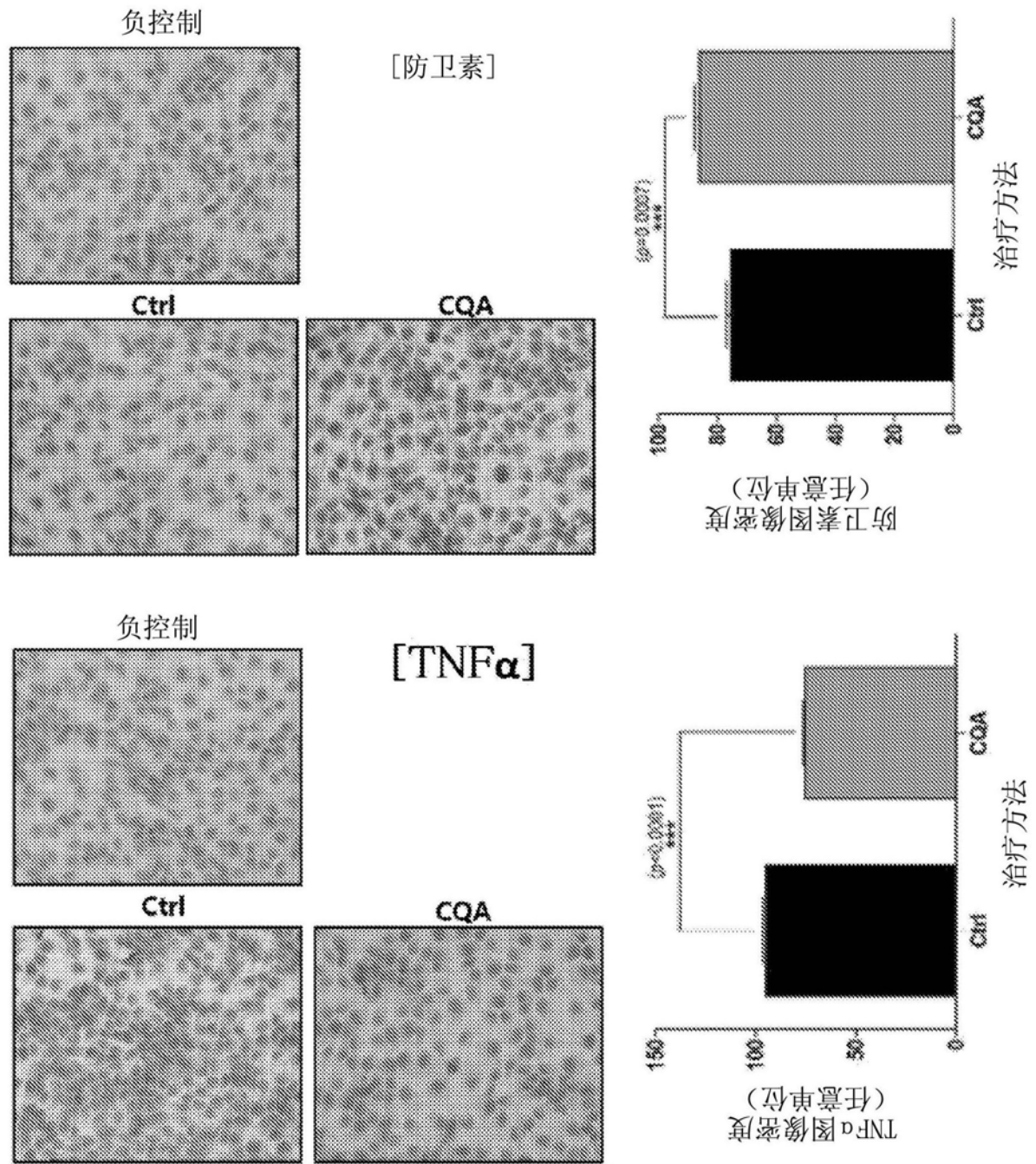


图6b

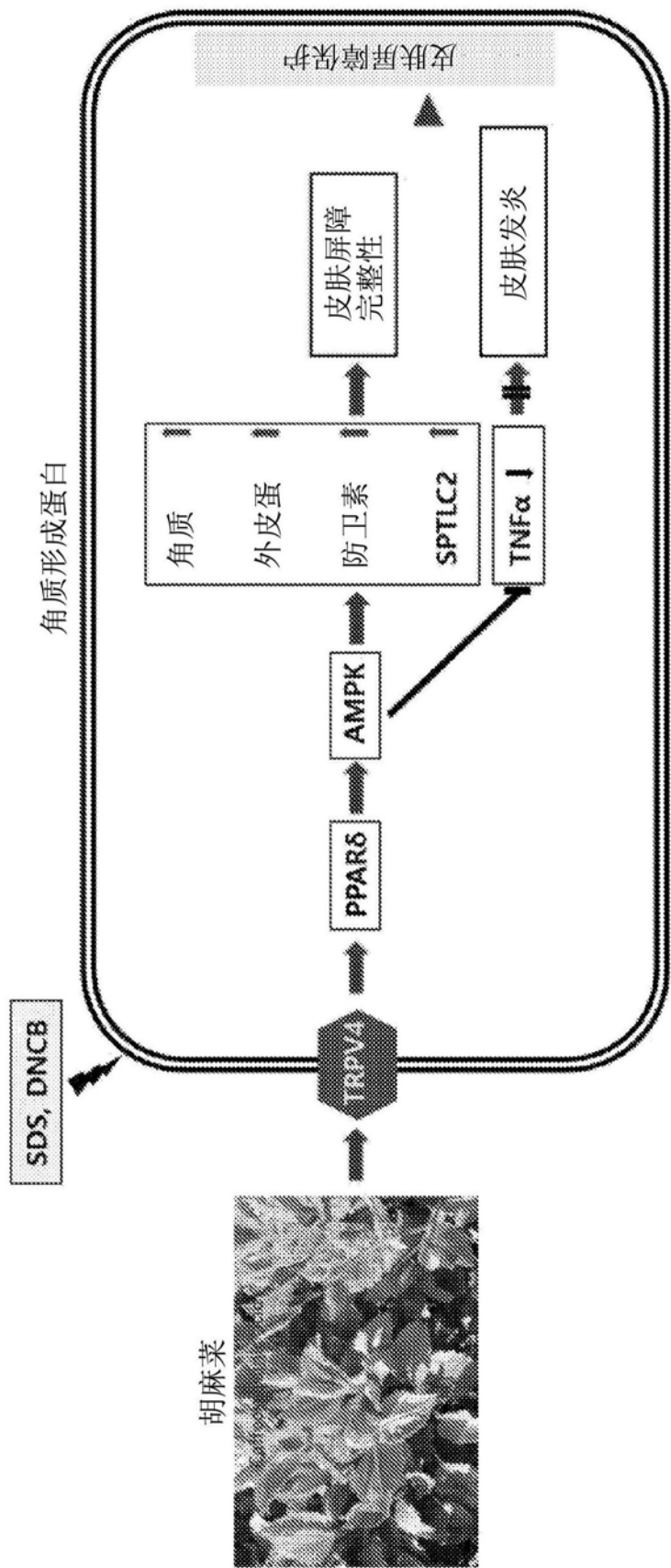


图7