



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101410089 B

(45) 授权公告日 2011. 12. 07

(21) 申请号 200780011381. 1 *A61Q 19/08* (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 03. 27 (56) 对比文件

(30) 优先权数据 CN 1499957 A, 2004. 05. 26,
0602628 2006. 03. 27 FR JP 4266807 A, 1992. 09. 22,

(85) PCT申请进入国家阶段日 审查员 林瀚云
2008. 09. 27

(86) PCT申请的申请数据
PCT/FR2007/000527 2007. 03. 27

(87) PCT申请的公布数据
W02007/110511 FR 2007. 10. 04

(73) 专利权人 碧欧特莫林简易股份公司
地址 法国蓬里约

(72) 发明人 尼科莱·麦琪德彻

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
代理人 王达佐 韩克飞

(51) Int. Cl.
A61K 8/97 (2006. 01)
A61K 8/44 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 3 页

(54) 发明名称

由阿魏酸精氨酸盐和微藻提取物组成的化妆品活性成分及其应用

(57) 摘要

本发明涉及由微藻提取物和阿魏酸精氨酸盐组成的新颖化妆品活性成分,其用于激活蛋白酶体和产生硫氧还蛋白的应用,包含其的化妆品组合物以及这样的化妆品组合物用于抗皮肤衰老的应用。

1. 化妆品活性成分,其包含阿魏酸精氨酸盐和进行氧化应激处理后植物抗毒素富集的栅藻属微藻提取物,所述阿魏酸精氨酸盐与所述栅藻属微藻提取物的重量比为 1 : 199。
2. 权利要求 1 所述的化妆品活性成分用于制备局部使用的化妆品组合物的应用。
3. 用于局部使用的化妆品组合物,其包含在生理学上可接受的介质中的权利要求 1 所述的化妆品活性成分,其特征在于所述化妆品活性成分的量 of 所述化妆品组合物总重量的 0.1%至 2%。

由阿魏酸精氨酸盐和微藻提取物组成的化妆品活性成分及其应用

[0001] 本发明涉及由微藻提取物和阿魏酸精氨酸盐 (ferrulate d' arginine) 组成的新颖化妆品活性成分,其用于激活蛋白酶体和产生硫氧还蛋白的应用,包含其的化妆品组合物,以及这样的化妆品组合物用于抗皮肤衰老的应用。

[0002] 生物体的不同生理功能的渐进的不可逆的衰退称为衰老,是由各种遗传因子控制的复杂过程,但也与外部环境的影响相关。

[0003] 临床上,反映衰老的征兆如下:外表有皱纹和细纹、皮肤和皮下组织松弛、皮肤失去弹性、皮肤肌理缺乏张力,以及变得暗淡并失去光辉的皮肤黄化。

[0004] 这些征兆中,有些更具体地与内在或生理衰老即与时间的流逝相关的衰老有关,然而其它征兆更具体地是由于外在衰老,即通常由环境(各种形式的污染:废气、吸烟、工厂烟尘、化学制品等)引起的衰老;这种衰老更具体地涉及光诱导的衰老,其因暴露于日光、灯或任何其它辐射而产生。

[0005] 因内在或生理衰老产生的皮肤变化是涉及内源性因素的遗传性程序化衰老。年复一年,由于真皮产生越来越少的胶原和弹性蛋白纤维,皮肤失去弹性。因此,结缔组织逐渐衰退,皮肤逐渐松弛。表皮自我更新的能力也趋于减少,由于其新陈代谢发生改变,后产生的表皮变得更干燥和更薄。内源性衰老因素之一是激素生成减少,导致组织、细胞和器官功能逐渐减退。诸如生长激素 (HGH)、睾酮、DHEA 和褪黑激素的激素在 20 岁以前大量产生,并且它们促进细胞更新。

[0006] 相反,外在衰老导致组织病理学变化,例如弹性物质在真皮浅层中的过度蓄积和胶原纤维的变性。

[0007] 衰老机制之一是自由基的过度产生,所述自由基将不同的细胞成分作为目标:蛋白、脂质、糖和 DNA。某些外部影响使它们开始反应,因为它们不断地寻找其能够与之结合的其它分子。然后,它们攻击胶原纤维、细胞膜和皮肤的脂肪层。它们改变了细胞的遗传特性,以至于降低了新皮肤细胞的质量。

[0008] 身体通过抵抗这些氧化反应的酶系统(抗氧化剂)来保护自身不受这些攻击。

[0009] 但是从 20 岁起,天然防御机制逐渐减弱,以至于皮肤不再能够独立进行自身防御。

[0010] 受损蛋白的蓄积构成细胞衰老的特征之一。

[0011] 因此,随着年龄的增长,受损蛋白的蓄积提出了负责消除这些蛋白的蛋白水解系统的有效性,特别是蛋白酶体系统的有效性,这不仅在改变的、特别是氧化蛋白的消除中涉及,而且在细胞内蛋白的连续更新中涉及。

[0012] 1956 年,Harman 在“衰老的自由基理论”中提出,由活性氧引起的对不同细胞成分的损伤代表了衰老过程中的重要因素。因此,细胞衰老将取决于活性氧的产生、抗氧化防御和负责消除受损细胞成分的系统的有效性。

[0013] 根据改变的性质,受损蛋白能够被修复或降解。(cf. 图 1)。

[0014] 唯一已知的修复机制是能够还原二硫桥的硫氧还蛋白 (T)- 硫氧还蛋白还原酶

(TR) 系统,和能够还原甲硫氨酸亚砷(甲硫氨酸的氧化产物)的胱甲硫氨酸亚砷还原酶。

[0015] 过去已经显示出,硫氧还蛋白防止 UVB 诱导的皮肤损伤。

[0016] 在正常状态下,TR 在 NADPH 的存在下还原氧化型硫氧还蛋白。还原型硫氧还蛋白作为硫氧还蛋白过氧化物酶的电子供者用,从而将 H_2O_2 还原为 H_2O 。TR 是抗自由基损伤的强抗氧化剂。

[0017] 整合到细胞膜和细胞溶质中的 TR 的存在已经在人的皮肤中证明。

[0018] 在受 UVA 辐射的人皮肤成纤维细胞中已经显示出,由于辐射,硫氧还蛋白防止了线粒体膜电位的损失、细胞的 ATP 含量的损耗和细胞活性的损失 (Didier et al., Free Radical Biology and Medicine(自由基生物学和医学), Vol. 31, No. 5, p585-598, 2001)。

[0019] 还显示出,在由 UVA 引起的氧化应激状态下,硫氧还蛋白防止了由 UVA 诱导的 DNA 损伤 (Didier et al., Free Radical Biology and Medicine(自由基生物学和医学), Vol. 30, No. 5, p537-546, 2001)。因此,硫氧还蛋白对维持基因组的完整性也很重要。

[0020] 其它类型损伤的消除通过蛋白酶体依赖的蛋白细胞内降解途径进行。

[0021] 蛋白酶体系统由催化复合物、20S 蛋白酶体和若干影响其活性和特异性的调控因子构成。蛋白酶体位于哺乳动物细胞的细胞溶质和细胞核中。20S 蛋白酶体由 α 型或 β 型基因编码的 14 种不同亚基组成,并且排列成 7 个亚基的 4 个环的圆柱形堆栈。根据细胞的新陈代谢,存在不同的蛋白酶体亚基(例如,20S、19S、26S 和 PA28),其单独或相互联合起作用。实际上,它们能够是蛋白酶体亚基或类似的蛋白酶体,其性质取决于细胞的新陈代谢。

[0022] 被称为蛋白酶体的这种蛋白水解复合物优选在碱性、疏水和酸性残基的羧基末端水平上剪切蛋白。这些肽酶活性通过 3 种不同的 β 亚基来保持,并被定位于结构内部。

[0023] 19S 调节复合体与 20S 蛋白酶体结合形成 26S 蛋白酶体,其确保泛素化蛋白的降解。

[0024] 随着年龄的增长,发生受损蛋白的蓄积,这是一种看起来可能促进蛋白酶体系统有效性减少的现象。

[0025] 特别是,一方面,在表皮活组织检查以及培养中的角质形成细胞中,蛋白的羰基含量已经显示出与年龄相关的增加,另一方面,已经显示出来源于携带羰基的蛋白的碳水化合物和脂质的加合物的修饰。由于蛋白酶体的量的减少,氧化蛋白的量随年龄增长的增加伴随着蛋白酶体活性的降低 (Petropoulos et al., J.Gerontol A Biol Sci 2000 ;55A : B220-7)。

[0026] 两项最新研究,一项是关于大鼠骨骼肌细胞有丝分裂后的衰老,另一项是关于人成纤维细胞,其中通过微阵列研究了 6000 种基因的表达,已经显示出细胞衰老过程中小于 1% 的基因的表达的改变,包括蛋白酶体系统的表达减少的基因。(Lee et al., Science 1999 ;285 :1390-3 and Lee et al., Science 2000 ;287 :2486-92)

[0027] 对于在老年供者的细胞中所分析的 3 种蛋白酶体亚基 (X、N3 和 C2),转录物的表达也已经显示出减少,但是,4 名百岁老人的培养细胞的表达和蛋白酶体活性水平仍然与青年供者的培养细胞相近。(Chondrogianni et al., Exp Gerontol 2000 ;35: 721-8)。

[0028] 所有的这些结果清楚地表明,随着年龄的增长,蛋白酶体活性降低。

[0029] 衰老机制还涉及其它种类的“修饰”蛋白。这些是所谓的“糖化”蛋白。糖化是通

过用“氨基”型基团经过美拉德反应来缩合还原糖所引发的蛋白的翻译后修饰。所得产物通常被称为高级糖基化终产物 (AGEs)。两种主要的糖化产物羧甲基赖氨酸 (CML) 和戊糖苷在衰老过程中蓄积, 并且在诸如糖尿病的病理学中以渐进的方式蓄积。

[0030] 糖化产物的毒性是已知的。被提出作为其有害影响的实例包括, 例如酶活性的改变、蛋白的交联和聚集体的形成、内皮基底膜界面的改变、对蛋白水解的敏感性的降低、不能识别分子信号和胞吞作用以及免疫原性的改变。

[0031] 蛋白的糖化促进了它们的可氧化性, 糖化蛋白能够与氧发生反应形成氧自由基, 其有害影响之前已经说明。

[0032] 这些糖化蛋白不能被破坏或者从其蓄积的细胞中释放, 并被证明通过蛋白酶体来抵抗降解。糖化在生物体的各处都有影响, 特别是通过引起细胞和组织损伤以及组织加速衰老在某些疾病的发生中起重要作用。

[0033] 因此, 需要开发活性成分来避免蛋白的糖化及其在细胞体系中的蓄积。

[0034] 通常, 获取用于局部使用的能够延缓皮肤衰老的制剂特别受关注, 特别是通过提高蛋白酶体活性和通过减少糖化蛋白的量。

[0035] 专利申请 FR 2 822 701 描述了将褐指藻属藻类 (微藻) 的提取物用作提高蛋白酶体活性的化妆品制剂, 并且用于制备化妆品组合物, 所述化妆品组合物保护皮肤抵抗 UV 暴露的有害作用, 或用于防止和 / 或延缓皮肤衰老效应。

[0036] 专利申请 EP 0 629 397 A1 描述了抗自由基和抗炎的化妆品组合物, 其包括小球藻 (*Chlorella*)、栅藻 (*Scenedesmus*) 和螺旋藻 (*Spirulina*) (ARL) 的萃取液以及生咖啡的提取物。

[0037] 因此, 申请人已经开发出由与三个目的相应的化合物的协同组合产生的活性成分。

[0038] 第一目的对应于提高蛋白酶体活性以促进依赖后者的蛋白的消除的需要。第二目的对应于刺激硫氧还蛋白以协同方式产生的需要。最后, 第三目的对应于显著减少糖化蛋白的产生并因此减少其在细胞中蓄积的需要。

[0039] 令人惊讶的是, 申请人发现了由阿魏酸精氨酸盐和微藻提取物组成的新颖化妆品活性成分, 其激活蛋白酶体和硫氧还蛋白的产生, 同时避免蛋白糖化。

[0040] 包含该活性成分的用于局部使用的新型化妆品制剂也形成本发明的一部分, 并且能够用于减缓皮肤衰老。

[0041] 本发明的主要目的在于包含阿魏酸精氨酸盐和微藻提取物的化妆品活性成分。

[0042] “微藻”表示未分化的单细胞或多细胞微型藻类, 与生命周期包括分化阶段的“巨藻”相对。

[0043] “微藻提取物”表示来源于微藻并且能够用于本发明的化妆品活性成分的任何细胞提取物。这样的提取物能够是例如, 细胞内的、细胞膜或脂质提取物。

[0044] 微藻菌株在包含诸如锰、铜、硅、硼、硫的微量元素和水解蛋白的标准培养基中培养, 全部在 pH 7 至 8、通常 25°C 至 30°C 的促进其生长的温度下培养。当生长是最适条件, 即当培养基中的细胞数目将不再增长时, 回收培养基并离心。然后, 如果合适, 通过在每升培养基中加入 1ml 至 5ml 过氧化氢 (H₂O₂) 或通过臭氧对该离心的培养物实施氧化应激, 所述臭氧使用臭氧发生器通过空气与 UV 反应产生。然后将因此获得的生物量再次离心, 回收沉

淀 (pellet)。

[0045] 阿魏酸精氨酸盐是来自精氨酸的合成分子。其产生方法详细描述于实施例 1 中。

[0046] 因此, 申请人意外发现, 用这样的化合物的组合能够提高蛋白酶体活性, 以促进依赖于后者的蛋白的消除, 同时以协同方式刺激硫氧还蛋白的产生。这种提高比仅用微藻提取物好很多。

[0047] 另外, 本发明的化妆品活性成分能够显著减少糖化蛋白的产生, 并因此减少其在细胞中的蓄积。此外, 糖化蛋白的减少也引起蛋白酶体活性的提高, 使得受损蛋白显著地大量消除。

[0048] 申请人已经观察到, 通过用 0.005% 至 0.02% 的阿魏酸精氨酸盐处理细胞能够使糖化蛋白减少 50%。这代表在细胞中抑制 50% 的糖化蛋白形成所需的含量。

[0049] 实际上, 该活性成分似乎具有与藻类提取物和阿魏酸精氨酸盐结合的特殊优势, 当与皮肤接触时, 阿魏酸精氨酸盐由于皮肤酶系统而分解成精氨酸和阿魏酸。

[0050] L- 精氨酸是一种碱性氨基酸, 通过避免蛋白的糖化作用而对皮肤细胞具有再生效果, 但是仍然具有缺点, 例如与空气中的氧接触变得不稳定, 并且其降解成细胞毒性产物。然而, 阿魏酸是能够吸收紫外线的抗氧化剂。因此, 申请人指出, 阿魏酸精氨酸盐复合物 (或阿魏酸 / 精氨酸复合物) 增加了所形成的精氨酸的稳定性, 并由此提高这种精氨酸的活性。因此, 这样的阿魏酸精氨酸盐复合物特别地导致精氨酸在组织中的生物利用度增加, 特别是当直接应用于皮肤时。

[0051] 通过存在于细胞, 例如诸如角质形成细胞、成纤维细胞或黑色素细胞类型的人或动物皮肤细胞中未水解的氧化蛋白水平的减少, 观察到了与仅用微藻提取物相比, 本发明的活性成分提高了蛋白酶体活性。该减少通常在 10% 至 25% 之间。

[0052] 此外, 阿魏酸精氨酸盐的存在, 与优选植物抗毒素富集 (如下) 的微藻提取物相结合, 使得与单独的微藻提取物相比, 细胞中硫氧还蛋白的产生增加。

[0053] 因此, 例如, 以包含其的产品的重量计, 使用 0.005% 至 0.1% 的量逐渐增加的阿魏酸精氨酸盐, 优选 0.005% 至 0.05%, 特别是 0.005% 至 0.02%, 0.995% 至 0.90% 的微藻提取物, 优选 0.995% 至 0.95%, 特别是 0.995% 至 0.98%, 能够显示出, 与按照以重量计的上述值单独包含在相同产品中的微藻提取物相比, 能够使硫氧还蛋白的产生增加约 4% 至 20%, 优选 4% 至 10%, 特别是 4% 至 8%。这构成了本发明的决定性优势。例如, “包含其的产品” 表示下文定义的化妆品组合物。

[0054] 在本发明的一具体实施方案中, 根据本发明的活性成分的微藻提取物植物抗毒素富集, 通过例如将该微藻置于应激状态, 优选由 H_2O_2 或臭氧引起的氧化应激, 如上所述。

[0055] 植物抗毒素是所谓的“防御”化合物, 其由植物合成, 特别地, 由微藻在被置于应激状态, 优选置于氧化应激状态下时合成。这些植物抗毒素在性质上能够不同: 抗生素、酶、酚。在本发明中, 包括酶系统, 例如, 铁氧还蛋白 -NADP+ 氧化还原酶 (FNR)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶。

[0056] 在本发明的一优选实施方案中, 本发明的活性成分的微藻提取物源自绿藻纲微藻。它们是在湖和池塘中发现的绿藻, 其叶绿素含量高。在特别优选的方式中, 所使用的微藻属于栅藻属和 tetracystis 属, 前者为淡水藻类。

[0057] 根据本发明的活性成分的精氨酸盐与微藻提取物的重量比优选为 1 : 1 至

1 : 199, 优选 1 : 19 至 1 : 99, 更优选 1 : 30 至 1 : 50, 特别优选 1 : 19。

[0058] 本发明的另一目的涉及根据本发明的活性成分用于激活诸如角质形成细胞、成纤维细胞或黑色素细胞类型的人或动物的皮肤细胞的蛋白酶体的体外 (in-vitro) 或离体 (ex-vivo) 的应用。这种激活在本发明的活性成分的存在下通过增加氧化蛋白的降解反映出来。

[0059] 本发明的另一目的涉及根据本发明的活性成分用于刺激硫氧还蛋白产生的体外或离体的应用。

[0060] 本发明的另一目的涉及根据本发明的活性成分用于制备用于局部使用的化妆品组合物的应用。

[0061] 有益地, 以化妆品组合物的总重计, 该活性成分的量 0.1% 至 2%, 优选 0.5% 至 2%, 特别是 1% 至 2%。

[0062] 用于局部使用的这样的化妆品组合物的实例包括洗剂类型的溶液或分散体、水包油 (O/W) 或油包水 (W/O) 乳剂、乳膏和凝胶。更特别地, 它们能够是用于保护面部、身体和手的组合物或洗剂、日霜、防晒霜、洗面奶、抗皱霜和沐浴组合物。除本发明的活性成分之外, 所有的这些组合物有利地含有用于皮肤的化妆品组合物所用的标准活性成分和常规赋形剂。可以提及的包括维生素 E 亚油酸酯、润滑药、香料、防腐剂、着色剂、乳化剂、增稠剂, 以及滤光剂, 如果适合。

[0063] 本发明的另一目的涉及用于局部使用的在生理学可接受的介质中包含本发明活性成分的化妆品组合物以及这样的组合物用于抗皮肤衰老的应用, 这种组合物能够对应于例如乳膏剂、洗剂、凝胶和面膜或上述其它形式。

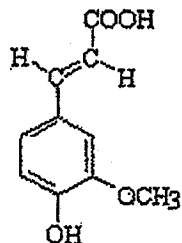
[0064] 化妆品组合物的实例含有 1% 的本发明的化妆品活性成分、2% 的甘油、0.80% 的卡波姆、2.00% 的失水山梨糖醇硬脂酸酯、2.00% 的聚山梨酯 60、8.00% 的辛基十二烷醇、0.80% 的 **Trisamino®**, 剩余部分为去离子水。百分数以相对于组合物总重的重量表示。

[0065] 下面的实施例解释本发明, 不限制其范围。

[0066] 实施例 1 : 阿魏酸精氨酸盐产生方法

[0067] 通过将精氨酸 ($\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$) 和阿魏酸 (= 3-甲氧基 4-羟基肉桂酸) 混合, 产生阿魏酸精氨酸盐。

[0068]



[0069] 阿魏酸

[0070] 在粉末混合机 (**Lödige**) 中以 20rpm 充分混合两种粉末约 48 小时。

[0071] 实施例 2 : 细胞培养

[0072] 角质形成细胞的原代培养物如下获得: 人皮肤活组织检查, 然后通过酶消化细胞膜以在添加 EGF (“表皮生长因子”) 的 KGM 培养基 (完全培养基, 不含血清, 其中钙的终浓度为 0.05mM) 中保存细胞内介质。

[0073] 在不同的传代 (P2、P4、P6 和 P8) 和 UVB 辐射之后,研究这些细胞以评估本发明的活性成分对衰老细胞的影响。在本发明的框架中,术语“传代”在细胞培养领域具有标准意义。传代 P1 表示原代培养细胞达到融合所需的时间。此后,在以上定义的介质中实施培养基 P1 的次培养,以达到融合所需的时间定义传代 P2,等等,使得能够定义传代 P4、P6 和 P8。

[0074] 用来自 15 岁供者和来自 62 岁供者的角质形成细胞进行试验,将所述 15 岁供者的角质形成细胞作为最佳蛋白酶体活性的参照,所述 62 岁供者的蛋白酶体系统功能的有效性低于 15 岁供者。辐射 15 岁供者的细胞以测量蛋白酶体能力,并且将其与 62 岁供者的蛋白酶体能力相比较。实际上,UVB 辐射引起蛋白酶体系统的功能衰退。

[0075] 在如上定义的用“产品 B”代表的活性成分的存在下,在添加 EGF 的 KGM 培养基中培养这些角质形成细胞,所述“产品 B”包括:

[0076] -99.5% 的已经如上所述用 H_2O_2 或臭氧进行过氧化应激的栅藻属微藻的提取物,和

[0077] -0.5% 的阿魏酸精氨酸盐。

[0078] 也在仅包含产品 A 的活性成分的存在下培养这些角质形成细胞,所述产品 A 代表已经进行过上述氧化应激的栅藻属微藻的纯提取物。

[0079] 在不存在产品 A 或 B 的情况下进行相同的试验(所谓的“对照”样品)。

[0080] 在添加 EGF 的 KGM 的培养基中进行角质形成细胞的三种培养:

[0081] • 正常生理状态:培养的细胞来自 15 岁供者

[0082] • 生理学细胞衰老状态:培养的细胞来自 62 岁供者

[0083] 光诱导衰老状态:培养的细胞来自 15 岁供者,以 $100-150\text{mJ}/\text{cm}^2$ 的量级对培养基进行 UVB 辐射。UVB 源以 UV 灯 (Biosun, Viber Lourmat-法国) 的方式获得,辐射波长约 315nm。

[0084] 实施例 3:细胞活性测量

[0085] 在传代 P2、P4、P6 和 P8 研究在实施例 2 的条件下获得的细胞。不同的传代能够发现供者的细胞衰老和由不同的细胞传代之后的培养条件引起的衰老。实际上,在将细胞从表皮中除去后,从培养起点(“对照”样品)即已观察到细胞活性的差异。在不同的细胞传代之后这种差异被强化。

[0086] 通过测量细胞活性研究了细胞衰老的影响,所述细胞活性通过蓝色甲臞结晶物 (MMT) 的还原试验来评估。四唑盐 (MTT) 具有通过细胞的线粒体的琥珀酸脱氢酶被还原为蓝色甲臞结晶物的性质。在三羧酸循环中发挥重要作用的这种酶催化琥珀酸脱氢变为延胡索酸。

[0087] 这种酶的活性通过还原 MTT 来测量,所述酶是一种牢固粘附于线粒体内膜的黄素蛋白。在 595nm 下采用常规装置例如配备数据处理计算机系统的分光光度计通过分光光度法测量吸光度(或光密度),所述吸光度(或光密度)与琥珀酸脱氢酶的活性直接相关,所述活性本身与细胞活性相关。吸光度值升高时,细胞活性增加。

[0088] 研究了实施例 2 中的三种培养条件。

[0089] 单独用产品 A 重复相同的实验,所述产品 A 代表已经经历之前定义的氧化应激的栅藻属微藻的纯提取物。

[0090] 正常生理状态下的结果(15 岁供者)

[0091]

	对照 (%V)	P2 (%V)	P4 (%V)	P6 (%V)	P8 (%V)
无产品 A 的活性(%)	100	97	93	79	69
1%产品 A 的活性(%)	100	95	94	81	74

[0092]

	对照 (%V)	P2 (%V)	P4 (%V)	P6 (%V)	P8 (%V)
无产品 B 的活性(%)	100	95	91	79	63
1%产品 B 的活性(%)	100	95	94	83	75

[0093] 生理学衰老状态下的结果 (62 岁供者)

[0094]

	对照 (%V)	P2 (%V)	P4 (%V)	P6 (%V)	P8 (%V)
无产品 A 的活性(%)	100	84	66	48	41
1%产品 A 的活性(%)	100	87	70	51	47

[0095]

	对照 (%V)	P2 (%V)	P4 (%V)	P6 (%V)	P8 (%V)
无产品 B 的活性(%)	100	88	69	56	51
1%产品 B 的活性(%)	100	93	77	71	61

[0096] 光诱导衰老状态下的结果 (15 岁供者 +UVB 100mJ/cm² 下的培养)

[0097]

	对照 (%V)	P2 (%V)	P4 (%V)	P6 (%V)	P8 (%V)
无产品 A 的活性(%)	100	74	62	48	33
1%产品 A 的活性(%)	100	81	68	57	45

[0098]

	对照 (%V)	P2 (%V)	P4 (%V)	P6 (%V)	P8 (%V)
无产品 B 的活性(%)	100	86	78	59	48
1%产品 B 的活性(%)	100	93	81	66	54

[0099] %V : %活性,

[0100] %产品 A 和 B :每 100g 培养基中产品 A 或 B 的含量。

[0101] 结果表明,在不同的传代中,细胞活性降低,在 62 岁供者的情况下比在 15 岁供者

的情况下更快。

[0102] 此外,来源于 15 岁供者的细胞在 UVB 辐射后细胞活性的减少与 62 岁供者的生理减少相当。

[0103] 用产品 B 处理的细胞的活性显著地高于用产品 A 处理的细胞的活性,与衰老条件无关:

[0104] - 无论是否是在培养期间发生的细胞衰老(15 岁供者)。

[0105] - 无论是否是依赖于细胞初始状态并在培养期间持续的细胞衰老(62 岁供者),

[0106] - 或者是光诱导的细胞衰老。

[0107] 实施例 4:三个蛋白酶体亚基 20S、26S 和 PA28 的各自纯化

[0108] 在该实施例的框架中,20S、26S 和 PA28 蛋白酶体代表亚基。

[0109] 将细胞的提取物在 10000g 下于 4°C 离心 16 小时,所述细胞在根据之前的实施例 2 定义的培养基中在对应于正常生理细胞(15 岁供者)和正常衰老细胞(62 岁供者)的两种生理状态下培养。

[0110] 将沉淀溶解于 Tris-HCl 缓冲液(25mM, pH7.5)中,然后加载至 CNBr 琼脂糖柱(其上植入待纯化的针对人蛋白酶体的亚基的单克隆抗体),其预先用 Tris-HCl 缓冲液(25mM, pH 7.5)平衡。然后用相同缓冲液冲洗柱,再用含有 2M NaCl(pH 8)的 Tris-HCl 洗脱蛋白酶体亚基,并于 4°C 透析 16 小时(或加载至凝胶滤过柱(PD10 Sephadex))。

[0111] 将纯化的蛋白酶体亚基的样品与变性上样缓冲液(SDS 0.1%)混合,然后于 100°C 孵育 5 分钟。通过 12% 的丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离包含在洗脱液中的蛋白。于室温下以 80V 的恒压进行 30 分钟的迁移,然后在 120V 下进行 2 小时。

[0112] 实施例 5:在实施例 2 的三种培养条件下,通过测量三种蛋白酶体亚基(20S、26S、PA28)的活性来测量蛋白酶体活性

[0113] 蛋白酶体的肽酶活性通过使用由合成肽形成的底物来测量,所述合成肽的 N 末端被封闭,C 末端通过异肽键连接到荧光基团 7-氨基-4-甲基-香豆素(MCA)上。这些与肽连接时无荧光性的基团在蛋白酶剪切后的游离状态下变得有荧光性。将混合物于 37°C 用肽底物以终体积 200 μ l 孵育 30 分钟,所述混合物含有代表实施例 4 的沉淀的 50 μ g 总蛋白匀浆,或者 3 μ g 纯化的蛋白酶体(在 25mM Tris-HCl 中, pH 7.5)。

[0114] 反应由加入 300 μ l 诸如盐酸的酸或乙醇来终止。加入 2ml 蒸馏水后,使用可商购的酶标仪测量荧光,MCA 的激发和发射波长为 350/440nm。蛋白酶体活性被测定为总活性,即在实验开始时、加入底物之前测定的活性,与粗提取物的残余活性,即在底物起反应后和纯化后的活性之间的差异。

[0115] 活性以存在于细胞提取物中的总蛋白的蛋白酶体 /min/mg 的 ng 来表示。

[0116] 正常生理状态下的结果(15 岁供者,传代 P2)

[0117]

	20S 蛋白酶体 (nmol/min/m)	26S 蛋白酶体 (nmol/min/mg)	PA28 蛋白酶体复合物 (nmol/min/mg)
底物	10.5 ± 0.5	74.2 ± 2.5	345.0 ± 25.2
底物+0.1%的产品 B	9.1 ± 0.4	75.8 ± 5.1	361.2 ± 21.7
底物+0.5%的产品 B	12.0 ± 1.8	83.2 ± 7.8	362.5 ± 10.2
底物+1%的产品 B	11.8 ± 1.2	87.2 ± 10.2	370.5 ± 24.3

[0118] 生理衰老状态下的结果 (62 岁供者)

[0119]

	20S 蛋白酶体 (nmol/min/m)	26S 蛋白酶体 (nmol/min/mg)	PA28 蛋白酶体复合物 (nmol/min/mg)
底物	7.3 ± 0.7	52.7 ± 4.0	180.2 ± 18.1
底物+0.1%的产品 B	8.4 ± 0.3	63.0 ± 4.2	198.0 ± 10.5
底物+0.5%的产品 B	9.6 ± 1.4	69.4 ± 5.6	228.6 ± 13.1
底物+1%的产品 B	12.0 ± 1.1	76.2 ± 2.3	264.2 ± 18.4

[0120] 光诱导衰老状态下的结果 (15 岁供者, UVB 100mJ/cm²)

[0121]

	20S 蛋白酶体 (nmol/min/m)	26S 蛋白酶体 (nmol/min/mg)	PA28 蛋白酶体复合物 (nmol/min/mg)
底物	6.2 ± 0.4	54.8 ± 7.2	195.7 ± 21.2
底物+0.1%的产品 B	8.5 ± 1.1	63.7 ± 2.4	227.1 ± 17.4
底物+0.5%的产品 B	11.4 ± 1.7	70.2 ± 3.5	244.3 ± 13.6
底物+1%的产品 B	12.1 ± 1.4	81.2 ± 8.2	269.3 ± 11.8

[0122] 结果表明,三种蛋白酶体亚基在正常生理状态下的活性大于在生理和光诱导衰老状态下的活性。

[0123] 用产品 B 处理细胞导致衰老状态下的三个蛋白酶体亚基的活性的重建。恢复活性以达到非衰老生理状态下测定的总体水平。

[0124] 结果在图 2、3 和 4 中具体给出,其代表:

[0125] 图 2:15 岁供者

[0126] 图 3:62 岁供者

[0127] 图 4:15 岁供者 + 光诱导衰老状态 (UVB)

[0128] 上述三幅附图示出样品的荧光测量作为所采集的纯化流份的函数。

[0129] 实施例 6:在实施例 2 的三种培养条件下,通过测定未水解的氧化蛋白的量来测量蛋白酶体的活性

[0130] 使用 Oxyblot® 试剂盒 (氧化保护检测试剂盒, Chemicon International) 进行氧化蛋白的检测。将角质形成细胞的细胞溶质提取物,即在根据实施例 2 定义的酶消化之后获得的细胞内提取物,在产品 B 的存在下用 2,4-二硝基苯肼处理 15 分钟,然后用每孔沉积 10 μg 蛋白的量通过 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离。随后,将凝胶转移到

硝化纤维素膜上 (Nitrocellulose Hybond)。形成的胺类用针对 2,4-[α] 二硝基苯基基团 (Sigma, Ref D-9656) 的兔多克隆抗体进行免疫检测。为了检测泛素化或被加合物 4- 羟基-2- 丙烯醛修饰的蛋白, 在 12% 的聚丙烯酰胺凝胶上沉积 20 μ g 蛋白, 并且使用针对泛素的多克隆抗体来显影相应的蛋白印迹。用与过氧化物酶偶联的兔二抗进行抗原-抗体复合物的检测。

[0131] 用之前定义的产品 A 进行相同的实验。

[0132] 正常生理状态下的结果 (15 岁供者)

[0133]

	量 (unit/mm ²)	1%产品 A 存在下的量 (unit/mm ²)
对照 (P1)	22 ± 1.1	15 ± 2.0
P2	26 ± 1.4	21 ± 1.4
P4	37 ± 2.8	29 ± 3.2
P6	51 ± 4.1	41 ± 4.2
P8	64 ± 4.0	55 ± 6.0

[0134]

	量 (unit/mm ²)	1%产品 B 存在下的量 (unit/mm ²)
对照 (P1)	18 ± 2.0	12 ± 0.6
P2	21 ± 1.5	17 ± 1.2
P4	31 ± 4.2	27 ± 1.7
P6	45 ± 3.4	36 ± 2.4
P8	57 ± 4.0	45 ± 3.2

[0135] 生理衰老状态下的结果 (62 岁供者)

[0136]

	量 (unit/mm ²)	1%产品 A 存在下的量 (unit/mm ²)
对照 (P1)	100 ± 7.6	90 ± 10.2
P2	131 ± 15.2	113 ± 7.8
P4	183 ± 13.7	151 ± 10.0
P6	251 ± 21.1	205 ± 13.7
P8	375 ± 12.3	321 ± 15.2

[0137]

	量 (unit/mm ²)	1%产品 B 存在下的量 (unit/mm ²)
对照(P1)	90 ± 10.7	79 ± 4.2
P2	123 ± 11.2	95 ± 10.2
P4	170 ± 9.7	134 ± 8.4
P6	233 ± 14.6	187 ± 11.1
P8	349 ± 21.2	285 ± 13.2

[0138] mm²:培养基的 mm²。

[0139] 结果表明,产品 B 导致 15 岁供者和 62 岁供者中氧化蛋白的量明显减少。在用产品 B 进行实验的情况下效果更明显。估计这些蛋白的量与单独使用产品 A 的情况相比,能够减少约 12%至 15%。

[0140] 实施例 7:硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 活性的测量

[0141] 来自根据实施例 2 培养的用产品 B 处理或未处理(对照)的细胞的细胞提取物中的 TrxR 活性,通过与与硫氧还蛋白 (Trx) 反应后采用双缩脲法测量 TrxR 浓度并与纯化的 TrxR 的已知活性相比较来确定。

[0142] 将与 50 μg 蛋白相应的体积的每一细胞提取物用 HEPES、80mM pH 7.5, 0.9mg/ml NADPH、6mM EDTA、2mg/ml 胰岛素和 10 μM 大肠杆菌的 Trx 的混合物于 37°C 以 120 μL 的终体积孵育 20 分钟。反应通过加入 500 μL 溶于盐酸胍 6M/Tris-Cl 0.2M (pH 8.0) 中的 DTNB(二硫代-双-硝基苯甲酸)(0.4mg/ml) 来终止。包含除 Trx 以外的每一物质的对照样品采用与各样品相同的方式来孵育和处理。

[0143] 在 412nm 下测量吸光度,并且从样品的吸光度值中减去相应对照的值。

[0144] 使用来自纯化的小牛胸腺的 TrxR 绘制标准曲线,所述小牛胸腺具有确定的比活度。

[0145] 将样品的吸光度值与标准曲线进行比较,推断出活性。

[0146] 用产品 A 进行相同的实验。

[0147] 活性用存在于细胞提取物中的总蛋白的 TrxR/mg 的 ng 来表示。

[0148] 正常生理状态下的结果(15 岁供者)

[0149]

	活性(总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	208.2 ± 5.8	
0.5%的产品 A	218.3 ± 8.2	+5
1%的产品 A	228.0 ± 10.1	+10
2%的产品 A	235.4 ± 9.2	+13
	活性(总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%

对照	208.2±5.8	
0.5%的产品 B	220.2±8.3	+6
1%的产品 B	238.0±10.1	+14
2%的产品 B	251.0±9.8	+21

[0150] 在硫氧还蛋白还原酶抑制剂丙烯醛的存在下,正常生理状态下的结果(15岁供者)

[0151]

	活性(总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	208.2±5.8	
丙烯醛(25 μM)	130.8±11.4	-37
丙烯醛(25 μM)+0.5%的产品 B	139.0±12.5	+6
丙烯醛(25 μM)+1%的产品 B	149.2±10.1	+14
丙烯醛(25 μM)+2%的产品 B	160.4±13.8	+23

[0152]

	活性(总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	208.2±5.8	
丙烯醛(25 μM)	130.8±11.4	-37
丙烯醛(25 μM)+0.5%的产品 A	141.0±15.2	+8
丙烯醛(25 μM)+1%的产品 A	145.6±10.0	+11
丙烯醛(25 μM)+2%的产品 A	155.8±13.8	+19

[0153] 丙烯醛(25 μM):培养基中丙烯醛的浓度。

[0154] 生理衰老状态下的结果(62岁供者)

[0155]

	活性(总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	132.0±8.1	
0.5%的产品 A	144.8±10.1	+9

1%的产品 A	160.6±11.0	+21
2%的产品 A	170.3±9.7	+28
	活性 (总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	132.0±8.1	
0.5%的产品 B	148.8±10.2	+13
1%的产品 B	159.4±9.3	+21
2%的产品 B	176.6±11.0	+34

[0156] 应当注意,与不包含产品 B 的对照相比,如上定义的细胞提取物中产品 B 的存在增加了硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 的活性。另外, TrxR 的活性的增加与所添加的产品 B 的量成比例。

[0157] 使用产品 B 的活性大于单独用产品 A 处理这样的细胞提取物时的活性。

[0158] 光诱导衰老状态下的结果 (15 岁供者, UVB 100mJ/cm² 下的培养)

[0159]

	活性 (总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	208.2±5.8	
UVB	246.3±22.3	+18
UVB+0.5%的产品 A	241.0±12.0	+16
UVB+1%的产品 A	259.0±16.2	+24
UVB+2%的产品 A	270.4±13.7	+30

[0160]

	活性 (总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	208.2±5.8	
UVB	246.3±22.3	+18
UVB+0.5%的产品 B	251.8±11.2	+21
UVB+1%的产品 B	267.2±9.7	+28
UVB+2%的产品 B	278.5±11.4	+34

[0161] 在上述的应用中得出了相同的结论。

[0162] 实施例 8 :硫氧还蛋白水平的测量

[0163] 来自根据实施例 2 培养的细胞的细胞提取物中硫氧还蛋白的水平通过 ELISA 来测量,所述细胞用产品 B 或仅用产品 A 处理或未处理(对照)。

[0164] 用每孔 100 μ l pH 9.6 的碳酸盐缓冲液中的抗 Trx 单克隆抗体 2G11 克隆 (5 μ g/ml ;BD Pharmingen) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 96 孔板 16 小时。用含有 0.05%吐温 20 的 PBS(PBS-T) 冲洗该板,并用 200 μ l 含有 3% BSA 的 PBS(PBS-BSA) 封闭 1 小时。孔用 PBS-T 冲洗 4 次,并用 100 μ l 含 1mMDTT(二硫苏糖醇)的 PBS-TB 于 4 $^{\circ}$ C 孵育样品或标准 Trx2 小时以上,所述样品或标准 Trx 以连续的方式稀释。板用铝箔覆盖。孔用 PBS-T 冲洗 4 次,然后用 75ng/ml 羊抗人 Trx(IMCO Co) 的生物素化 IgG 100 μ l 于室温下在定轨摇床中孵育 1 小时。

[0165] 然后用 PBS-T 冲洗孔 4 次,并用 100 μ l PBS-BSA-T(0.1% BSA,0.05%吐温 20) 中与碱性磷酸酶 (AX02-0402X ;1 : 4000) (Amersham Biosciences) 结合的链霉亲和素在定轨摇床中孵育。

[0166] 板在 PBS-T 中冲洗 4 次,并用 pH 9.0、含 0.5mM $MgCl_2$ 和 0.02% NaN_3 的二乙醇胺中的磷酸对硝基苯酯 (Sigma Chem Co) 孵育 40 分钟。

[0167] 在 405nm 下测量吸光度。

[0168] 在范围 100ng/ml 至 0.41ng/ml 中,使用人重组体 Trx(IMCO Co) 作为标准品。

[0169] 水平以存在于细胞提取物中的总蛋白的 Trx/mg 的 ng 来表示。

[0170] 正常生理状态下的结果 (15 岁供者)

[0171]

	水平 (总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	87.6 \pm 7.6	
0.5%的产品 A	90.0 \pm 4.2	+3
1%的产品 A	94.0 \pm 4.7	+7
2%的产品 A	98.8 \pm 10.2	+13

[0172]

	水平 (总蛋白的 TrxR/mg 的 ng)	%
对照	87.6 \pm 7.6	
0.5%的产品 B	88.4 \pm 2.7	+1
1%的产品 B	95.7 \pm 7.6	+9
2%的产品 B	99.8 \pm 5.3	+14

[0173] 在硫氧还蛋白抑制剂 N-乙酰基-半胱氨酸 (NAC) 的存在下,正常生理状态下的结果 (15 岁供者)

[0174]

	水平 (总蛋白的 Trx/mg 的 ng)	%
对照	87.6±7.6	
NAC (10mM)	59.8±8.1	-32
NAC (10mM)+0.5%的产品 A	60.2±2.8	+1
NAC (10mM)+1%的产品 A	61.4±3.3	+3
NAC (10mM)+2%的产品 A	63.1±6.0	+6
	水平 (总蛋白的 Trx/mg 的 ng)	%
对照	87.6±7.6	
NAC (10mM)	59.8±8.1	-32
NAC (10mM)+0.5%的产品 B	60.4±5.4	+1
NAC (10mM)+1%的产品 B	61.0±3.1	+2
NAC (10mM)+2%的产品 B	65.4±9.2	+9

[0175] 生理衰老状态下的结果 (62 岁供者)

[0176]

	水平 (总蛋白的 Trx/mg 的 ng)	%
对照	61.6±4.2	
0.5%的产品 A	65.9±6.0	+7
1%的产品 A	68.9±2.6	+12
2%的产品 A	74.5±4.2	+21

[0177]

	水平 (总蛋白的 Trx/mg 的 ng)	%
对照	61.6±4.2	
0.5%的产品 B	66.9±5.8	+9
1%的产品 B	70.4±8.3	+14
2%的产品 B	77.3±10.2	+25

[0178] 光诱导衰老状态下的结果 (15 岁供者, UVB 100mJ/cm² 下的培养)

[0179]

	水平 (总蛋白的 Trx/mg 的 ng)	%
对照	87.6 ± 7.6	
UVB	93.4 ± 9.4	+7
UVB+0.5%的产品 A	95.8 ± 9.0	+9
UVB+1%的产品 A	100.7 ± 12.4	+15
UVB+2%的产品 A	109.1 ± 13.3	+25

[0180]

	水平 (总蛋白的 Trx/mg 的 ng)	%
对照	87.6 ± 7.6	
UVB	93.4 ± 9.4	+7
UVB+0.5%的产品 B	94.8 ± 7.7	+8
UVB+1%的产品 B	106.5 ± 10.0	+22
UVB+2%的产品 B	114.1 ± 13.0	+30

[0181] 在产品 B 存在下观察到的硫氧还蛋白水平的增加高于单独使用产品 A 获得的增加。

[0182] 实施例 9 : 由实施例 2 的应激条件下培养的细胞产生的植物抗毒素的酶活性的测量

[0183] 铁氧还蛋白 -NADP+ 氧化还原酶 (FNR) 的活性通过基于细胞色素 C 的还原的比色法测定。

[0184] 用分光光度计在 550nm 的波长下测量的细胞色素 C 的还原, 与酶的活性直接成比例。

[0185] pH 7.5, 25°C 时, 在铁氧还蛋白和 NADPH 的存在下, 一单元 FNR 每分钟还原 1 毫摩尔的细胞色素 C。

[0186] 超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性通过其抑制由黄嘌呤 - 黄嘌呤氧化酶系统产生的超氧负离子流的能力来评价。在 560nm 处, 由该系统产生的超氧自由基还原四唑氮蓝 (NBT) 以稳定蓝色甲贖结晶物。SOD 的酶单位与能够在 NBT 的还原中诱导 50% 抑制的植物提取物的量对应。

[0187] 谷胱甘肽还原酶将还原型谷胱甘肽再生为变得可被细胞利用的谷胱甘肽。

[0188] 结果:

[0189]

植物抗毒素	Units/ml 产品的活性,约:
SOD	20
CuZn SOD	3.5
谷胱甘肽还原酶	0.5
FNR	2.5

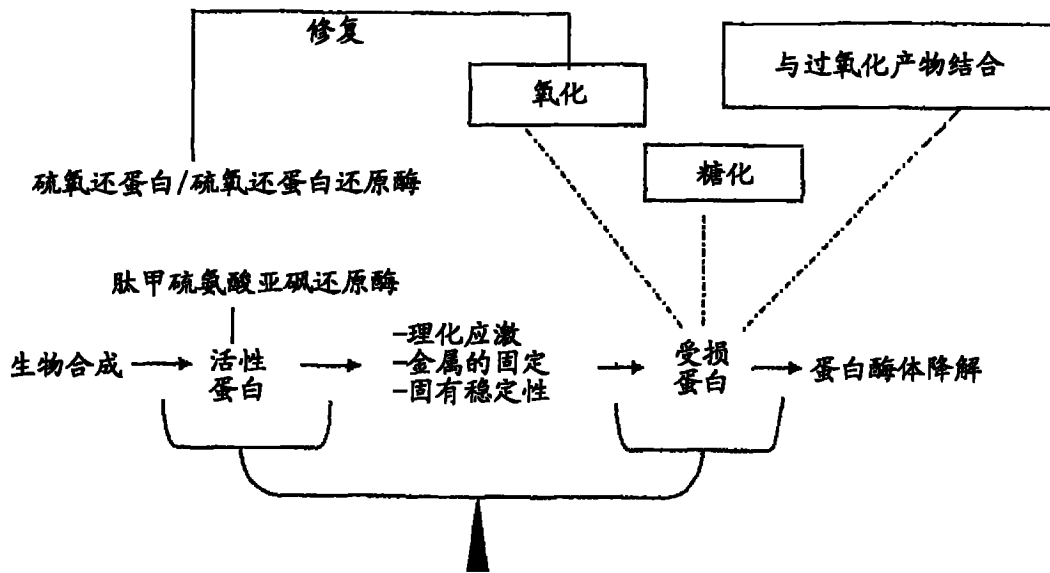


图 1

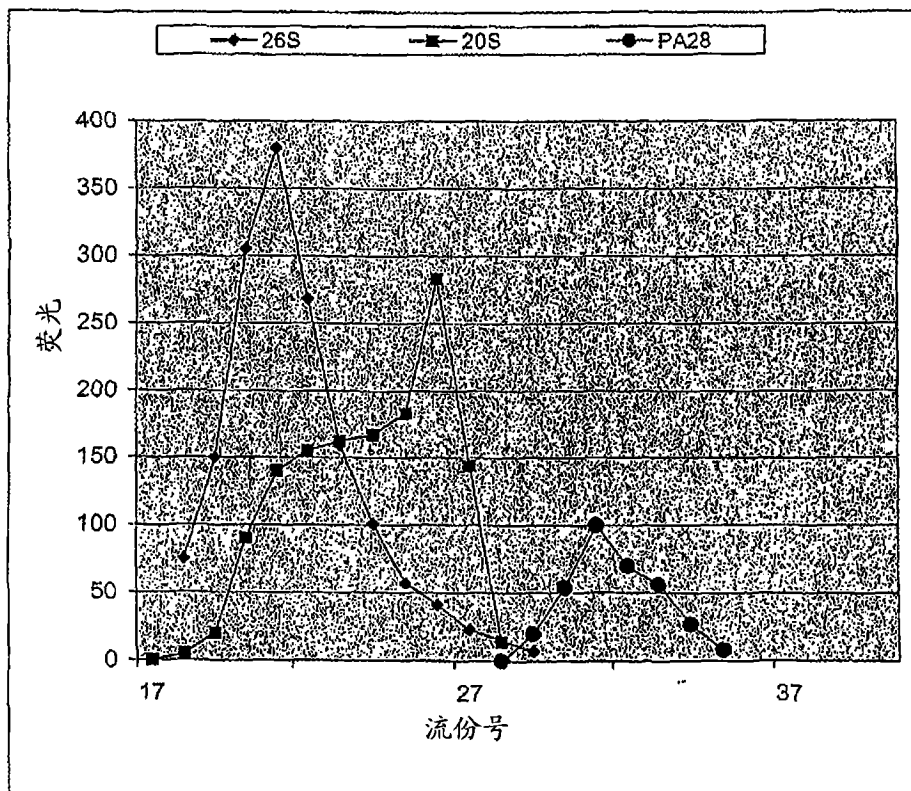


图 2

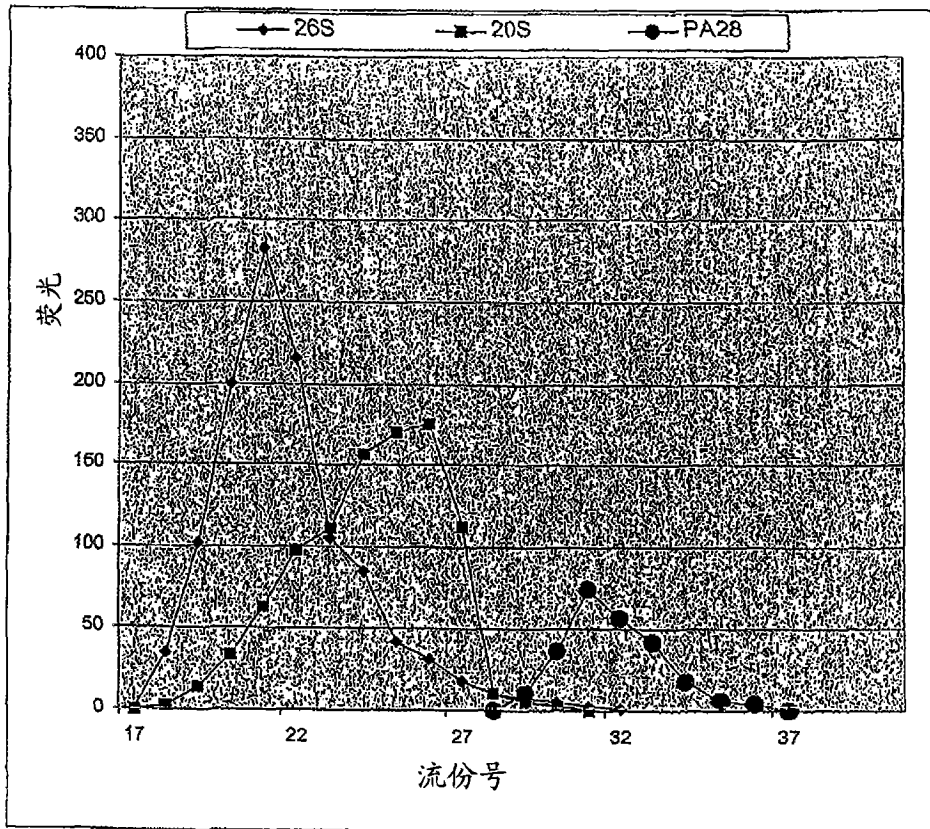


图 3

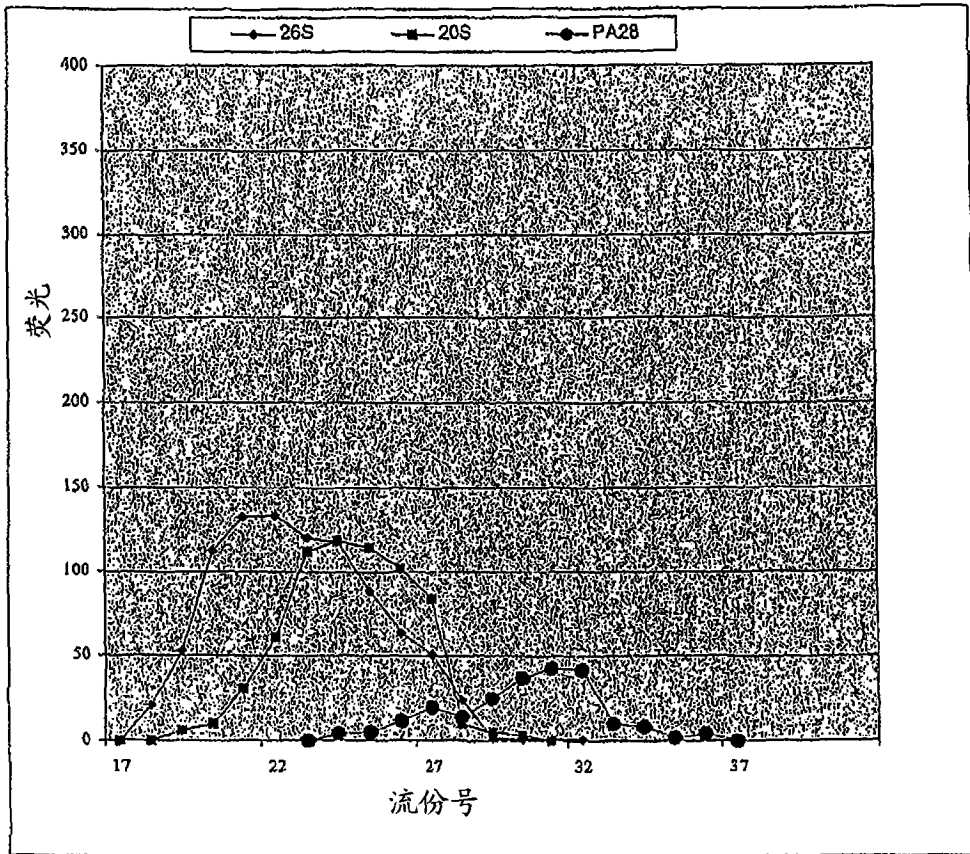


图 4