



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106470670 A

(43)申请公布日 2017.03.01

(21)申请号 201580035624.X

(22)申请日 2015.07.03

(30)优先权数据

1456385 2014.07.03 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.12.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/065254 2015.07.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/001430 FR 2016.01.07

(71)申请人 科学发展实验室

地址 法国库伯瓦

(72)发明人 C·博杜安 S·勒克莱尔-比安费

P·姆西卡 S·布雷迪夫

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 李媛

(51)Int.Cl.

A61K 8/64(2006.01)

A61K 8/9789(2017.01)

A61Q 19/06(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

羽扇豆肽提取物和皮肤紧实度

(57)摘要

本发明涉及羽扇豆肽提取物用于预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度的用途。有利地,羽扇豆肽提取物可以预防脂肪团的出现和/或减少皮肤脂肪团。

1. 羽扇豆肽提取物用于预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度优选身体皮肤的用途。

2. 根据权利要求1所述的羽扇豆肽提取物的用途,其进一步用于预防皮肤凹陷的发生或减少皮肤凹陷。

3. 羽扇豆肽提取物用于重塑身体轮廓的用途。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述羽扇豆肽提取物包含相对于肽提取物的总干重至少80重量%的肽。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述羽扇豆肽提取物的肽具有小于10000Da的分子量。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中肽提取物包含以重量计小于4%的糖和/或包含以重量计小于1%的脂质。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中肽提取物的肽具有大于130Da的分子量。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中肽提取物为白羽扇豆lupinus albus的肽提取物。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中可以使用包括以下步骤的方法获得羽扇豆肽提取物:

(a) 提取羽扇豆蛋白质级分;

(b) 将在步骤(a)中获得的蛋白质级分水解,优选通过酶水解;

(c) 回收经水解的肽提取物。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其为局部应用或经由口服途径施用。

11. 化妆品组合物用于预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度优选身体皮肤的用途,所述化妆品组合物包含以干重计0.001至30%,有利地以重量计0.05至0.2%的羽扇豆肽提取物。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中化妆品组合物进一步包含胶凝剂、防腐剂、抗氧化剂、溶剂、香料、填充剂、化学或矿物过滤剂、颜料、螯合剂、气味吸收剂、温泉水和/或着色材料。

羽扇豆肽提取物和皮肤紧实度

技术领域

[0001] 本发明涉及羽扇豆肽提取物(extrait peptidique de lupin)用于预防皮肤紧实度(fermeté)的降低或增加皮肤紧实度的用途。有利地,羽扇豆肽提取物可以预防凹陷的发生和/或减少皮肤凹陷。

背景技术

[0002] 真皮是皮肤的三个组成层之一,其被包含在表皮和下皮层之间。真皮是支撑皮肤的结缔组织,并且其主要由成纤维细胞产生的细胞外基质(MEC)组成,所述成纤维细胞为真皮的主要细胞群体。

[0003] 细胞外基质由蛋白质纤维(胶原蛋白和弹性蛋白)和超原纤维(extra-fibrillaire)基质组成,所述超原纤维基质也被称作基本物质,其尤其包含结构糖蛋白(纤连蛋白)和蛋白聚糖/葡萄糖胺聚糖。胶原蛋白(其为占多数的I型胶原蛋白(真皮胶原蛋白的85-90%)和III型胶原蛋白(真皮胶原蛋白的10-15%))占约70%的MEC组分。胶原蛋白赋予真皮紧实度和耐压性(皮肤的机械强度)。弹性蛋白纤维赋予其弹性性质。

[0004] 尽管胶原蛋白对于维持皮肤紧实度是必需的,但是也不应忽视表皮-真皮连接(JDE)的作用。JDE是一种复杂结构,其将真皮与表皮分开。它的主要功能是提供用于表皮与真皮的粘附的机械支撑,并作为两个区之间的扩散屏障和交换区域。尤其通过锚定蛋白质例如IV型胶原蛋白或层粘连蛋白5,确保表皮与真皮的粘附。当真皮与表皮的粘附变差时,皮肤失去紧实度,并且表皮松弛并起皱。

[0005] 糖化是在皮肤水平,特别是在真皮的众所周知的现象。其为胺基团(特别是形成蛋白质的氨基酸例如赖氨酸的胺基团)与还原糖(如葡萄糖或核糖)之间的自发的非酶反应。

[0006] 在真皮中,葡萄糖特别地与胶原蛋白和/或弹性蛋白反应,以产生化合物,所述化合物引起所谓的“晚期糖基化终产物”,其缩写熟知为“AGE”。这些化学修饰并非对胶原蛋白和/或弹性蛋白的性质没有后果。例如,AGE诱导胶原蛋白纤维之间的分子桥接的形成。这些桥通过使胶原蛋白纤维更坚硬而使其机械性质变坏。

[0007] 因此,糖化现象可以影响真皮细胞外基质的蛋白质(如胶原蛋白),从而使其代谢和机械性质变坏。

[0008] 在皮肤水平,由于糖化使胶原纤维的组织 and 真皮成纤维细胞的功能(如在胶原蛋白网格内收缩的能力)变坏,因此观察到组织紧实度和弹性的降低。皮肤失去其紧实度并变得松弛。因此,蛋白质特别是胶原蛋白的糖化导致对皮肤有害的后果。这些后果可以被明显地看到,并且可能或多或少是难看的。特别地,较少结构化的、较不紧实的真皮组织对位于下皮层中的脂肪细胞的生长具有较小的阻力,产生被称作“桔皮”的凹陷外观。

[0009] 因此,需要寻找允许预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度的试剂。有利地,所述试剂将允许预防皮肤凹陷的发生或减轻皮肤的桔皮外观,特别是在具有脂肪团的人中。

发明内容

[0010] 本发明涉及羽扇豆肽提取物用于预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度优选身体皮肤的用途。

[0011] 本发明还涉及化妆品组合物用于预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度优选身体皮肤的用途,所述化妆品组合物包含以干重计0.001至30%的羽扇豆肽提取物。

附图说明

[0012] 图1和2:在GlasBox®系统中拉紧的真皮等同物(dermeéquivalent)中,成纤维细胞产生的收缩力。

[0013] 图3:I型胶原蛋白的表达(真皮)。

[0014] 图4:III型胶原蛋白的表达(真皮)。

[0015] 图5:IV型胶原蛋白的表达(JDE)。

[0016] 图6:层粘连蛋白5的表达(JDE)。

具体实施方式

[0017] 已知羽扇豆肽提取物具有抗金属蛋白酶活性,特别是抗胶原酶活性和抗明胶酶活性。基于该活性,已经提出利用其来治疗与胶原蛋白的过度破坏和/或支撑组织的过度破坏相关的疾病。例如,已经提出使用羽扇豆肽提取物治疗关节炎,牙周病,皮肤损伤,炎症性疾病,与愈合缺陷相关的疾病、牙釉质侵袭、肿瘤或病理性血管生成,或者治疗由于皮肤的固有老化引起的皮肤损伤,由于日光辐射的作用或由于烟草、污染和压力的有害作用引起的老化。

[0018] 出乎意料地,本发明人已发现,羽扇豆肽提取物具有降低甚至抑制蛋白质糖化(特别是胶原蛋白的糖化)的性质,刺激胶原蛋白I、III和IV(为真皮细胞外基质和真皮-表皮连接的三种主要的大分子)的表达的性质,和刺激成纤维细胞的收缩力的性质。

[0019] 本发明利用这些新性质的优点,因此涉及羽扇豆肽提取物用于预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度的用途。有利地,本发明的羽扇豆肽提取物被用作抗糖化剂。

[0020] 通过抑制胶原蛋白的糖化并且通过刺激胶原蛋白I和III的表达,羽扇豆肽提取物有助于强化细胞外基质。细胞外基质被强化,皮肤获得紧实度。此外,通过刺激胶原蛋白IV的合成,羽扇豆肽提取物有助于强化真皮和表皮的粘附。最后,通过保护真皮对抗可收缩性纤维的收缩性的降低,羽扇豆肽提取物有助于强化皮肤的紧实度。因此,羽扇豆肽提取物在预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度方面特别有效,特别是与面部皮肤相比身体皮肤的紧实度。相比于面部皮肤,身体皮肤较少暴露于外部侵袭,但它也有它的敌人:久坐的生活方式、体重变化、怀孕,激素变化……这些现象可导致皮肤紧实度或张力的降低,造成不招人喜爱的疾病的发作,如皮肤松弛、凹陷、脂肪团。

[0021] 术语脂肪团是指一种局部的皮肤疾病,其由皮下脂肪突出至真皮中引起,导致结构的和建筑学的改变,其视觉上的特征在于不规则的凹陷。

[0022] 本发明的肽提取物被有利地用作特定的身体护理产品,特别是用作纤体产品,或用于其身体紧实和轮廓重塑作用,调色和抗松弛作用,抗脂肪团和/或抗凹陷作用。

[0023] 此外,细胞外基质被强化,真皮组织对脂肪细胞的生长变得更加有阻力。因此,阻碍了凹陷的发生。因此,羽扇豆肽提取物被证明在预防皮肤凹陷的发生和/或减少皮肤凹陷

方面特别有效。

[0024] 根据Kligman等人的评价视黄醇对脂肪团的功效的研究(J Dermatolog Treat, 1999;10 119-25),这种功效主要与真皮的重构和增加的微血管化有关。

[0025] 因此,在真皮上强化皮肤结构并提升皮肤紧实度的作用似乎对改善脂肪团的外观是最重要的。

[0026] 用于本发明的羽扇豆肽提取物包含相对于肽提取物的总干重至少80重量%的肽,典型地相对于肽提取物的总干重80至100重量%的肽。

[0027] 肽提取物基本上不含糖和脂质。

[0028] 相对于肽提取物的总干重,糖含量典型地小于以干重计4%,优选为0甚至1至3重量%。

[0029] 相对于肽提取物的总干重,脂质含量典型地小于以干重计1%。

[0030] 羽扇豆肽提取物可以选自来源于羽扇豆的肽提取物,所述羽扇豆属于白羽扇豆(lupinus albus)、黄羽扇豆(lupinus luteus)、南美羽扇豆(lupinus mutabilis)及其混合的物种。优选地,肽提取物为白羽扇豆(lupin blanc doux)(lupinus albus)(例如Ares变种)的肽提取物。Ares变种的羽扇豆具有低的生物碱含量。

[0031] 可以使用包括以下步骤的方法获得羽扇豆肽提取物:

[0032] (a) 提取羽扇豆蛋白质级分;

[0033] (b) 将在步骤(a)中获得的蛋白质级分水解;

[0034] (c) 回收肽提取物。

[0035] 典型地经由酶水解进行水解。特别地,可以使用蛋白酶(例如Alcalase®(NOVO NORDISK)或Prolyve 1000(LYVEN))进行酶水解。可以在50至60℃范围的温度进行酶水解,持续2小时至4小时的时间。

[0036] 肽提取物的肽有利地具有130至10000Da范围的,优选130至3500Da范围的,更优选300至3500Da范围的分子量。

[0037] 根据本发明的一个特定的特征,肽提取物的40至55%的肽具有300至1200Da范围的分子量,和/或所述肽提取物的25至40%的肽具有1200至3500Da范围的分子量。

[0038] 可以通过渗滤,优选在具有10.000道尔顿至15000道尔顿范围的截留阈值的超滤模块中,纯化在步骤(b)中获得的肽提取物。超滤允许去除蛋白质。因此,制备肽提取物的方法可以包括超滤步骤。其还可以包括纳米过滤步骤,例如在具有100至300Da,或130至300Da范围的截留阈值的纳米过滤模块中。纳米过滤允许去除游离氨基酸或矿物盐。

[0039] 在包装前,可以将肽提取物进行无菌微过滤(0.2μm),然后:

[0040] -在层流中,分装至无防腐剂的无菌容器中;或

[0041] -在被分装至“干净的”容器中之前,通过加入防腐剂使其微生物稳定化。可以使用的防腐剂包括例如对羟基苯甲酸酯和/或苯氧乙醇的混合物(例如0.5%Phenonip)。优选不含对羟基苯甲酸酯的混合物,例如苯氧乙醇(1%)、柠檬酸(0.5%)、抗坏血酸(0.08%)混合物;或

[0042] -通过喷雾干燥或冷冻干燥使其稳定化,以获得干燥形式的肽提取物,所述肽提取物可以被包装在防潮湿和微生物污染的密封小袋中。

[0043] 因此,制备肽提取物的方法可以进一步包括在步骤(c)中获得的经水解的肽提取

物通过水的全部或部分蒸发的浓缩步骤。

[0044] 可以通过喷雾干燥或冷冻干燥(无论是否存在基质如麦芽糖糊精的情况下)进行干燥。优选地,不存在基质的情况下通过冷冻干燥实现干燥。

[0045] 可以按以下方式实现蛋白质级分的提取:

[0046] i) 使用合适的溶剂从羽扇豆种子中提取脂质,并回收羽扇豆蛋白质和糖类级分;

[0047] ii) 通过超滤提取蛋白质级分,并回收所述蛋白质级分。

[0048] 在步骤i)中使用的溶剂有利地选自无毒食品溶剂,特别是乙醇。优选从羽扇豆种子以磨碎的羽扇豆饼,或微粉化的羽扇豆粉的形式,实现脂质的提取。还可以使用己烷进行提取。

[0049] 在一些实施方案中,羽扇豆肽提取物具有下表A中给出的氨基酸组成(相对于氨基酸总重量的重量百分比):

[0050] 表A

[0051]	氨基酸	相对于氨基酸总重量的重量%
	ASP	11.3
	GLU	23.2
	SER	5.1
	HIS	1.7
	GLY	3.4
	THR	3.2
	ALA	2.8
	ARG	10.3
[0052]	TIR	6.1
	CYS-CYS	2.4
	VAL	3.8
	MET	0.2
	PHE	16.0
	ILE	3.3
	LEU	7.9
	LYS	3.7
	PRO	4.4

[0053] 羽扇豆肽提取物旨在用于化妆品(非治疗)用途,优选皮肤的局部应用或经由口服途径施用。

[0054] 羽扇豆肽提取物可以被配制为化妆品组合物的形式。因此,本发明还涉及包含羽扇豆肽提取物的化妆品组合物用于预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度,特别是与面

部皮肤相比身体皮肤的用途。有利地,包含羽扇豆肽提取物的化妆品组合物可以用于预防凹陷的发生或减少皮肤凹陷,特别是在具有脂肪团的人中。

[0055] 化妆品组合物可以包含相对于组合物的总重量以重量计0.001至30%,优选0.01至5%,优选以干重计0.05至5%的羽扇豆肽提取物。有利地,本发明的组合物包含相对于组合物的总重量以重量计0.01至0.2%,更有利地以重量计0.05至0.2%,典型地以重量计0.01至0.15%,特别地以重量计0.05至0.15%的羽扇豆肽提取物。所述浓度可以形成羽扇豆肽提取物的有效浓度。

[0056] 此外,化妆品组合物可以含有在化妆品领域中使用的常规佐剂,如胶凝剂例如亲水性或亲脂性胶凝剂、防腐剂、抗氧化剂、溶剂、香料、填充剂、化学或矿物过滤剂、颜料、螯合剂、气味吸收剂、温泉水和/或着色材料。这些不同的佐剂的量为在化妆品中常规使用的量。例如,每种佐剂的量可以为相对于化妆品组合物的总重量以重量计0.01%至20%。

[0057] 化妆品组合物可以进一步包含活性成分,所述活性成分选自紧实剂、排水剂、调色剂、紧固剂或其混合物。每种活性成分的单独的量可以为相对于化妆品组合物的总重量以重量计0.01%至20%。

[0058] 化妆品组合物可以为在化妆品领域中常用的任何形式,特别是适用于外部局部应用的任何形式。因此,化妆品组合物可以为水醇或油溶液、水包油或油包水或多重乳剂、水性或油凝胶、液体、糊剂或固体无水产品、或利用小球的油在水相中的分散体的形式,所述小球可以为聚合纳米颗粒如纳米球和纳米胶囊,或离子型和/或非离子型的脂质囊泡。化妆品组合物可以或多或少是流动性的,为霜剂、软膏、乳液、洗剂、药膏、精华素、糊剂、泡沫剂、气雾剂或棒的形式。

[0059] 当化妆品组合物为乳剂时,脂肪相的比例可以为相对于化妆品组合物的总重量以重量计5%至80%,优选以重量计5%至50%。在化妆品组合物中使用的油、乳化剂和共乳化剂选自在化妆品领域中常规使用的那些。组合物中可以含有乳化剂和共乳化剂,其比例为相对于化妆品组合物的总重量以重量计0.3%至30%,优选以重量计0.5%至20%。油可以选自矿物油、植物油(杏油、向日葵籽油、李子油)、动物油、合成油、硅油和氟化油(全氟聚醚)。脂肪醇如鲸蜡醇、脂肪酸或蜡如蜂蜡也可以被用作脂肪。乳化剂和共乳化剂可以选自脂肪酸和聚乙二醇的酯(如PEG-40硬脂酸酯或PEG-100硬脂酸酯),脂肪酸和多元醇的酯(如硬脂酸甘油酯和去水山梨糖醇三硬脂酸酯)。

[0060] 在一些实施方案中,化妆品组合物可以为凝胶形式。所述凝胶可以特别地用作抗凹陷纤维凝胶。例如,本发明的凝胶可以具有以下组成:

[0061]		相对于组合物的总重量的 重量 %
	水	QSP
	乙醇	1至50%
	咖啡因	1至10%
	卡波姆	0至2%
	pH调节剂	0至2%
	甘油	1至5%
	羽扇豆肽	0.05至5%
	防腐剂	0至2%

[0062] 在一些实施方案中,化妆品组合物可以被用作紧实身体护理。例如,所述组合物可以具有以下组成:

[0063]		相对于组合物的总重量的 重量%
	水	QSP
[0064]	乙醇	1至50%
	咖啡因	1至10%
	乳化剂	1至10%
	pH调节剂	0至2%
	甘油	1至5%
	羽扇豆肽	0.05至5%
	防腐剂	0至2%
	油	5至20%
	黄原胶	0至2%
	鲸蜡醇	0至2%

[0065] 羽扇豆肽提取物和包含所述提取物的化妆品组合物可以用于预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度。例如,羽扇豆肽提取物或包含所述提取物的化妆品组合物可以用在化妆品处理方法中,以预防皮肤紧实度的降低或增加皮肤紧实度,所述方法包括向皮肤尤其是身体皮肤应用羽扇豆肽提取物,特别是有效浓度的羽扇豆肽提取物或包含所述提取物的组合物。

[0066] 羽扇豆肽提取物或包含所述提取物的化妆品组合物还可以用在化妆品身体紧实处理方法中,所述方法包括向皮肤应用羽扇豆肽提取物,特别是有效浓度的羽扇豆肽提取物或包含所述提取物的组合物。所获得的紧实允许轮廓的重塑。

[0067] 羽扇豆肽提取物和含有所述提取物的化妆品组合物可以用于预防凹陷的发生和/或减轻皮肤的凹陷外观。换言之,羽扇豆肽提取物允许减轻“桔皮”外观,所述“桔皮”外观可以存在于具有脂肪团的人的皮肤中。从而使皮肤光滑。例如,羽扇豆肽提取物或包含所述提取物的化妆品组合物可以用在化妆品处理方法中,以预防凹陷的发生和/或减轻皮肤的凹

陷外观,所述方法包括向皮肤尤其是身体皮肤应用羽扇豆肽提取物,特别是有效浓度的羽扇豆肽提取物或包含所述提取物的组合物。

[0068] 如上面所描述的化妆品处理方法也是本发明的主题。

[0069] 实施例

[0070] 下面实施例中使用的肽提取物为由科学发展实验室(Laboratoires Expanscience)所提供的那些,商品名为ACTIMP®(粉末)或ACTIMP®1.9.3(液体)。

[0071] 其可以按以下方式制备。

[0072] 1. 羽扇豆肽提取物的制备

[0073] 磨碎的脱脂的羽扇豆饼的制备

[0074] 将羽扇豆种子磨碎,并使用乙醇提取脂质。

[0075] 羽扇豆蛋白质的提取和纯化

[0076] 该步骤包括在碱性pH下可溶性级分的水溶解,然后分离不溶物。

[0077] 由磨碎的脱脂的羽扇豆饼,在pH 9.0(通过加入氢氧化钠调节pH),以1/10的粉/水比例(p/p)提取蛋白质。将溶液在搅拌下在环境温度温育一小时。通过脱水将饼的不溶性部分与可溶性部分分离。洗涤获得的饼。在具有10,000道尔顿的截留阈值的超滤模块中,将含有蛋白质和可溶性糖的可溶性级分渗滤,以将蛋白质(截留物)与可溶性糖(超滤液)分离。

[0078] 通过酶水解的肽的生产和纯化:

[0079] 将含有蛋白质的超滤截留物调节为100g/l的浓度,然后在pH 8.0在Alcalase#(NOVO NORDISK)的存在下在55℃水解约3h。水解后,通过在85℃水解15min使酶变性。溶液一旦冷却,就通过加入盐酸将其中和。在具有10000道尔顿的截留阈值的超滤模块中,通过渗滤纯化所得的肽。将所得的溶液纳米过滤以脱盐(除去氯化钠),以将肽级分浓缩。使用3%活性炭使肽的溶液脱色(在50℃持续1小时),通过过滤将碳去除。

[0080] 肽级分的灭菌和稳定化:

[0081] 在包装前,将溶液进行无菌微过滤(0.2μm),然后可以:

[0082] -在被分装至“干净的”容器中之前,通过加入不含对羟基苯甲酸酯的混合物(苯氧乙醇(1%)、柠檬酸(0.5%)、山梨酸(0.08%))使其微生物稳定化(由科学发展实验室销售的(由10%羽扇豆肽构成的)Actimp®1.9.3)

[0083] -通过冷冻干燥使其稳定化,以获得干燥形式的肽,所述肽被包装在防潮湿和微生物污染的密封小袋中(由科学发展实验室销售的Actimp®粉末)。

[0084] 因此,干燥提取物和活性部分具有以下特征:

[0085] -外观:均质的、不吸湿的粉末;

[0086] -颜色:灰白色;

[0087] 化学组成:

[0088] -总糖含量(用蒽酮分析):<4%

[0089] -氯化物含量(Kit SIGMA ref:955-30):<6%

[0090] -水含量(100℃,4h):<8%

[0091] -肽含量:>80%

[0092] -pH(20g/l的溶液):7.06

[0093] -溶解度(渗透水):>100g/L

[0094] 表1-水解产物的氨基酸组成

[0095]

氨基酸	P.M.A.A.	以 mM 计的 浓度	以 mg/l 计的 浓度	粉末中的%	%/总 AA
-----	----------	---------------	-----------------	-------	--------

[0096]

ASP	133.1	2.078	276.582	9.9	11.3
GLU	147.1	3.858	567.438	20.3	23.2
SER	105.1	1.196	125.647	4.5	5.1
HIS	155.2	0.270	41.904	1.5	1.7
GLY	75.1	1.114	83.624	3.0	3.4
THR	119.1	0.664	79.023	2.8	3.2
ALA	89.1	0.763	67.983	2.4	2.8
ARG	174.2	1.447	251.980	9.0	10.3
TYR	181.2	0.829	150.215	5.4	6.1
CYS-CYS	240.3	0.247	59.234	2.1	2.4
VAL	117.1	0.792	92.743	3.3	3.8
MET	149.2	0.029	4.327	0.2	0.2
PHE	165.2	1.044	172.469	6.2	7.0
ILE	131.2	0.621	81.410	2.9	3.3
LEU	131.2	1.481	194.307	6.9	7.9
LYS	146.2	0.626	91.448	3.3	3.7
PRO	115.1	0.935	107.619	3.8	4.4

2447.952

总计

87.4%

[0097] 在上面描述的测试中,将肽提取物溶解于培养介质中,以使其可以以0.1%、0.2%和/或2%的浓度应用于细胞和外植体。

[0098] 2.羽扇豆肽提取物对糖化的作用的证明

[0099] 检查在合成的胶原蛋白纤维中的AGE的非酶插入,所述胶原蛋白纤维由在体外培养的人真皮成纤维细胞沉积而成。使用放射性探测方法,所述方法基于在细胞外基质的蛋白质中掺入氚标记的葡萄糖。

[0100] 在维生素C的存在下培养正常的人真皮成纤维细胞,以刺激胶原蛋白的合成。然后,对细胞进行不同的操作(冷冻/解冻/加热),以使所有酶活性失活。

[0101] 在37℃,在不存在氧的情况下(在处理7天后进行快速再氧合),在上面描述的0.2和2%羽扇豆肽提取物、1mg/ml氨基胍HCl(对照)、0.2%葡萄糖和³H-葡萄糖放射性标记物的存在下,将获得的基质层处理15天。

[0102] 在温育后,使用离液缓冲液提取细胞外基质的蛋白质(主要是胶原蛋白),用三氯乙酸沉淀,并收集在过滤器上。通过液体闪烁测量掺入MEC纤维中的放射性。

[0103] 使用单因素方差分析,然后使用Dunnett检验,对结果进行统计分析,并在下表中给出:

[0104] $[^3\text{H}]$ -葡萄糖对非酶糖化的作用

	$[^3\text{H}]$ -葡萄糖掺入 (cpm)	糖化的抑制
对照	5527 $\pm$ 464	
[0105] 1 mg/ml 氨基胍	1219 $\pm$ 92	-78% p<0.001
0.2%羽扇豆肽提取物	4466 $\pm$ 655	-19% ns
2%羽扇豆肽提取物	3338 $\pm$ 465	-40% p<0.05

[0106] 结果显示了羽扇豆肽提取物对抗糖化的保护作用。

[0107] 羽扇豆肽提取物保护真皮的细胞外基质对抗糖化。因此,羽扇豆肽提取物能够预防基质的硬化,以保持皮肤的弹性和紧实度(胶原蛋白的生物力学性质的保护)。

[0108] 3. 羽扇豆肽提取物对收缩力的作用的证明

[0109] 含有成纤维细胞的真皮等同物的模型允许评价成纤维细胞与胶原蛋白纤维之间的相互作用的质量。这些真皮等同物的自由收缩/紧缩由细胞的动力学活性造成,所述细胞对胶原网络施加张力。

[0110] 评价羽扇豆肽提取物对真皮等同物的收缩的作用。为了诱导成纤维细胞失去收缩力的条件,用衰老的所谓“老化的”成纤维细胞(根据Hayflick模型通过连续传代获得)接种真皮等同物。

[0111] 通过混合成纤维细胞(对于正常的真皮等同物为第8代,或对于“老化的”真皮等同物为第17代)与胶原蛋白溶液,制备“老化的”或正常的真皮等同物。

[0112] 在完全胶化后,用10ng/ml的TGF β (对照)或0.1%羽扇豆肽提取物处理真皮等同物,并温育4天。

[0113] 在第1、3和4天(J1、J3和J4)拍摄真皮等同物,以测量它们的表面积用于确定收缩。

[0114] 使用学生t检验,对结果进行统计分析,并在下表中给出。

[0115] 正常的真皮等同物或“老化的”真皮等同物的收缩的改变

[0116]

		对照 (正常的 DE)	对照 (“老化的” DE)	TGFβ 10 ng/ml	0.1%羽扇豆肽 提取物
J1	以 mm ² 计的面积 (平均 ± SEM)	284.9 ± 2.9	282.7 ± 6.2	264.6 ± 5.5	243.1 ± 3.9
	“老化的” 对照%	101	100	94	86 (p<0.01)
J3	以 mm ² 计的面积 (平均 ± SEM)	283.6 ± 11.6	300.1 ± 13.1	285.9 ± 6.7	248.5 ± 1.5
	“老化的” 对照%	95	100	95	83 (p<0.05)

[0117]

J4	以 mm ² 计的面积 (平均 ± SEM)	205.0 ± 5.3	237.7 ± 2.6	201.3 ± 8.4	217.5 ± 2.7
	“老化的” 对照%	86 (p<0.01)	100	85 (p<0.05)	92 (p<0.01)

[0118] 总的来说,“老化的”真皮等同物(DE)的收缩小于正常的DE的收缩(“老化的”DE的表面积更大),反映了由细胞老化诱导的成纤维细胞/胶原蛋白纤维相互作用的减弱。

[0119] TGFβ刺激“老化的”DE的收缩,这种刺激在4天的处理时间后变得显著;该结果验证了该分析。

[0120] 在处理的第1天,0.1%羽扇豆肽提取物就显著刺激“老化的”DE的收缩。

[0121] 其允许在早期抵消老化对真皮等同物的“松弛”的作用。

[0122] 在此处,羽扇豆肽提取物抑制由细胞的老化诱导的真皮等同物的“松弛”。

[0123] 通过保护真皮对抗收缩的降低,羽扇豆肽提取物有助于维持皮肤的弹性性质以获得“紧致”作用,并且有助于维持皮肤紧实度。

[0124] 4.羽扇豆肽提取物对等长力的作用的证明

[0125] 研究了羽扇豆肽提取物对等长力的作用,所述等长力由拉紧的真皮等同物中的真皮成纤维细胞产生(GlasBox[®]模型)。

[0126] GlasBox[®]系统(Growing LAttice Study BOX)允许在拉紧的真皮等同物中,测量由成纤维细胞产生的收缩力。这些表明成纤维细胞在基质重组中的活性。

[0127] 在GlasBox[®]系统中,真皮等同物在两个载玻片(其也用作传感器)之间在张力下生长:在由成纤维细胞产生的紧缩力的影响下,载玻片发生变形。其转化为应变仪的电阻的变化。实时测量该变化,所述变化指示在真皮等同物中产生的力。

[0128] 通过将正常的人真皮成纤维细胞与胶原蛋白溶液混合,制备真皮等同物。将该混合物倒入GlasBox[®]的矩形孔中。

[0129] 在形成凝胶后,加入含有或不含0.1%羽扇豆肽提取物的介质。

[0130] 在24小时中测量等长力。

[0131] 使用双因素方差分析,然后使用Fisher检验,对结果进行统计分析,并在图1和2中给出。

[0132] 总的来说,0.1%羽扇豆肽提取物显著增强了由成纤维细胞产生的力。特别地,这

种增强在曲线的第一部分更加显著(测量1小时后直至5.75小时)。

[0133] 这显示了羽扇豆肽提取物的紧致作用,特别是在通过成纤维细胞的基质重组的早期阶段。

[0134] 羽扇豆肽提取物显著刺激在拉紧的真皮等同物中由成纤维细胞产生的力。这些结果证明了羽扇豆肽提取物对抗皮肤紧实度和弹性降低的紧致作用。

[0135] 5. 羽扇豆肽提取物对胶原蛋白I、III和IV和层粘连蛋白5的表达的作用的证明

[0136] 在人皮肤外植体中评价羽扇豆肽提取物的活性:通过免疫染色分析真皮细胞外基质(胶原蛋白I和III)的标记物和表皮-真皮连接(胶原蛋白IV、层粘连蛋白5)的标记物。

[0137] 将0.2%羽扇豆肽提取物应用至保持存活的正常人皮肤的外植体的表面。

[0138] 在处理7至10天后,收集皮肤外植体,并冷冻在-80℃,或固定并包裹在石蜡中。

[0139] 在皮肤切片上进行真皮基质或表皮-真皮连接的不同标记物的免疫染色:

[0140] 将胶原蛋白I和IV和层粘连蛋白5在冷冻切片上染色,并在荧光(FITC)下检测,将细胞核用碘化丙啶复染色。

[0141] 将胶原蛋白III在石蜡切片上染色,并使用过氧化物酶检测。

[0142] 在显微镜下观察染色,并通过图像分析将其定量。

[0143] 使用学生t检验对染色强度的变化进行统计学分析。

[0144] 结果在图3至5中给出。

[0145] 在处理7天和10天(J7和J10)后,羽扇豆肽提取物诱导胶原蛋白I的染色的增强(图3)。

[0146] 通过图像分析,在乳突真皮中的胶原蛋白I染色的定量

	胶原蛋白 I (表面%)			
	J7		J10	
[0147] 对照外植体	28.0 ± 7.2		21.9 ± 6.4	
0.2%羽扇豆肽提取物	37.7 ± 7.6	+34% p<0.05	44.2 ± 6.8	+102% p<0.001

[0148] 在处理7天和10天后,羽扇豆肽提取物诱导胶原蛋白III的染色的增强(图4)。

[0149] 通过图像分析,在乳突真皮中的胶原蛋白III染色的定量

	胶原蛋白 III (表面%)			
	J7		J10	
[0150] 对照外植体	30.9 ± 12.2		28.3 ± 8.1	
0.2%羽扇豆肽提取物	51.3 ± 12.4	+66% p<0.01	49.8 ± 9.6	+76% p<0.001

[0151] 在处理7天和10天后,羽扇豆肽提取物诱导JDE中胶原蛋白IV的染色的增强(图5)。

[0152] 通过图像分析,在JDE中的胶原蛋白IV染色的定量

		胶原蛋白 IV (表面%)		
		J7		J10
[0153]	对照外植体	22.0 ± 3.5		14.1 ± 4.0
	0.2%羽扇豆肽提取物	29.8 ± 8.3	+35% p<0.05	44.9 ± 14.5 +219% p<0.001

[0154] 在处理7天和10天后,羽扇豆肽提取物诱导JDE中层粘连蛋白5的染色的增强(图6)。

[0155] 通过图像分析,在JDE中的层粘连蛋白5染色的定量

		在 J7 的层粘连蛋白 5 (表面%)	
[0156]	对照外植体	18.4 ± 5.1	
	0.2%羽扇豆肽提取物	24.2 ± 4.4	+31% p<0.05

[0157] 羽扇豆肽提取物在皮肤外植体的局部应用刺激了胶原蛋白I和III(真皮细胞外基质的两种主要大分子)的表达,并且刺激了胶原蛋白IV和层粘连蛋白5(表皮-真皮连接的标记物)的表达。

[0158] 因此,羽扇豆肽提取物能够强化表皮-真皮连接和真皮细胞外基质,从而提升皮肤紧实度和张力的性质。

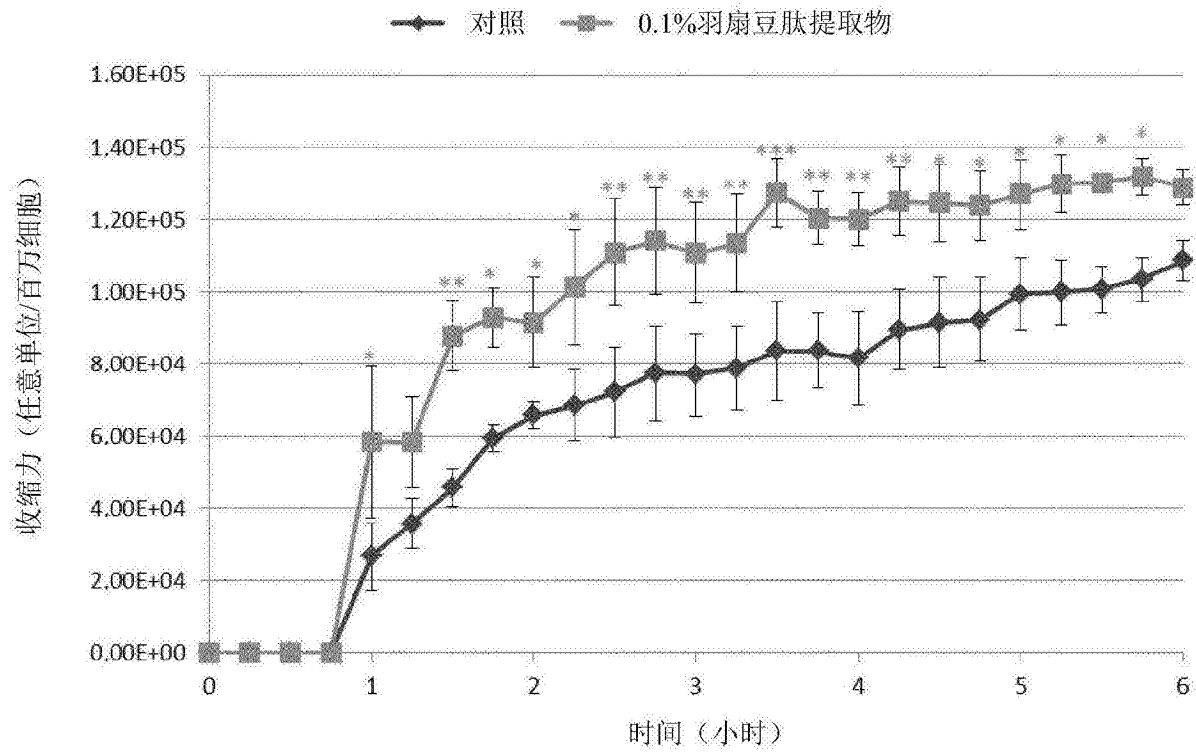


图1

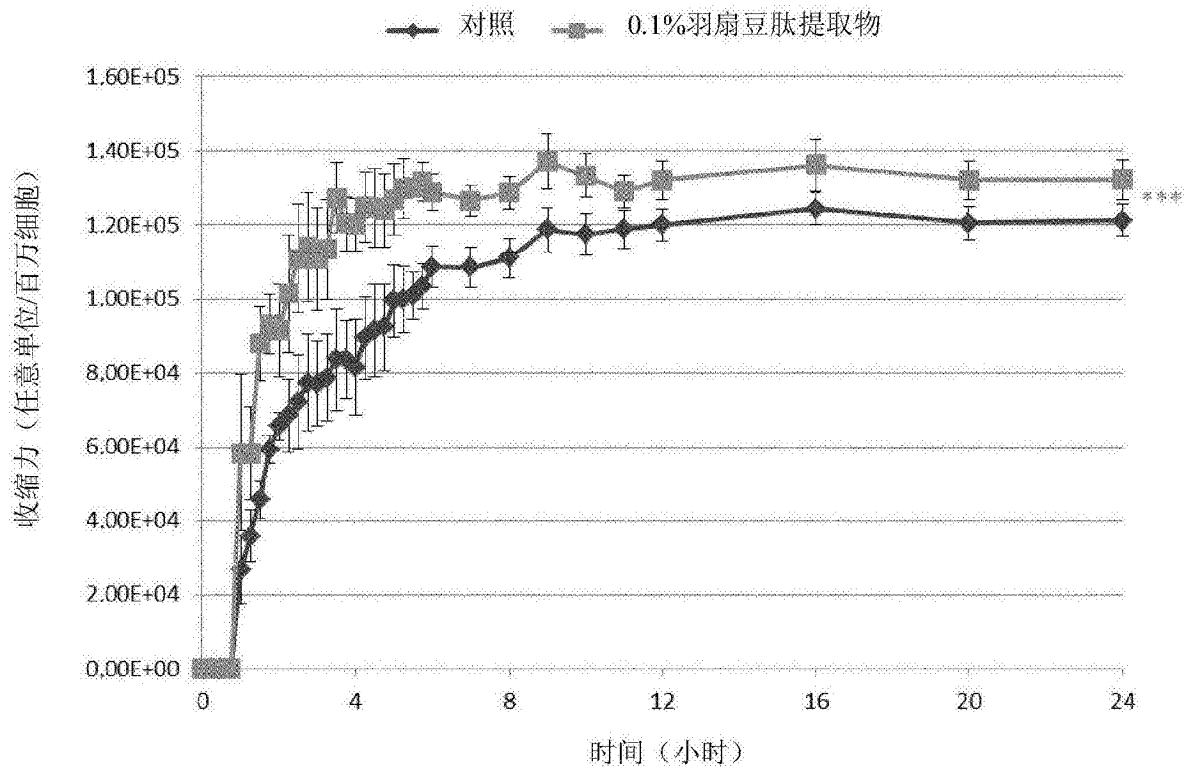


图2

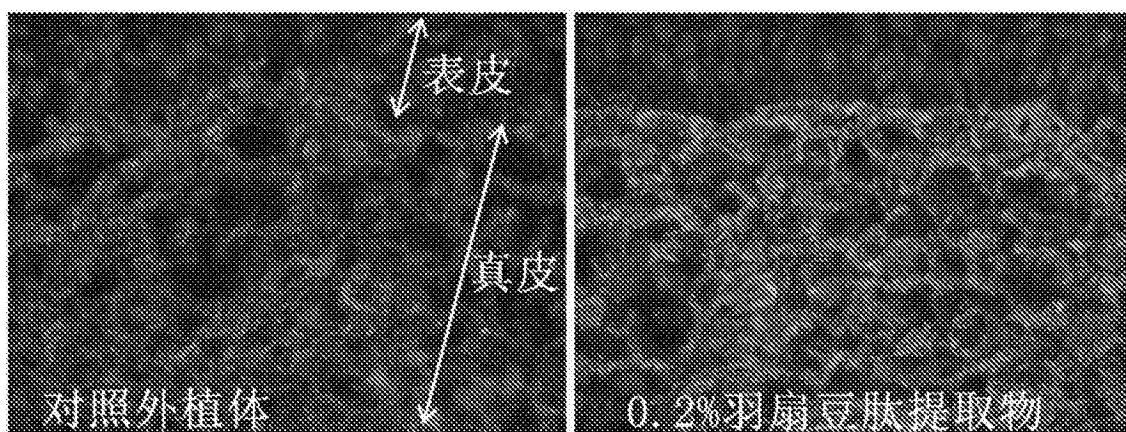


图3

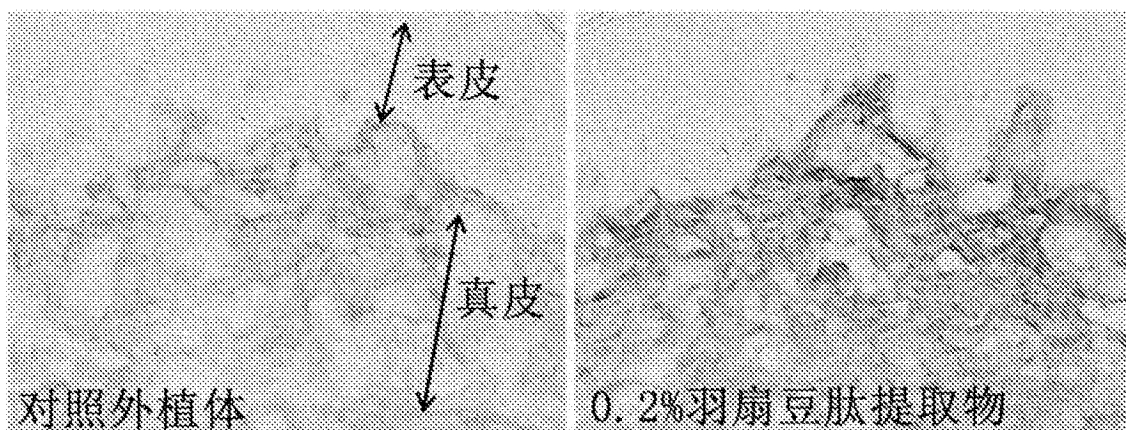


图4

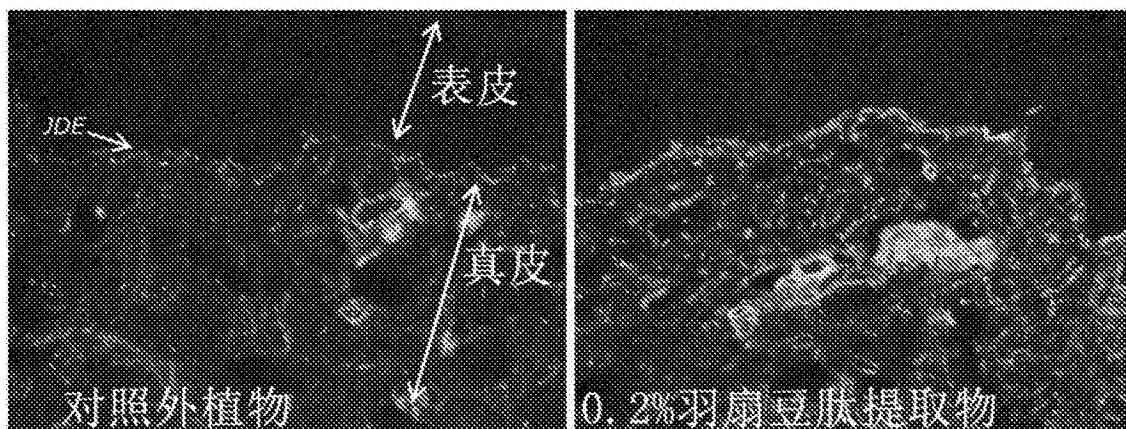


图5

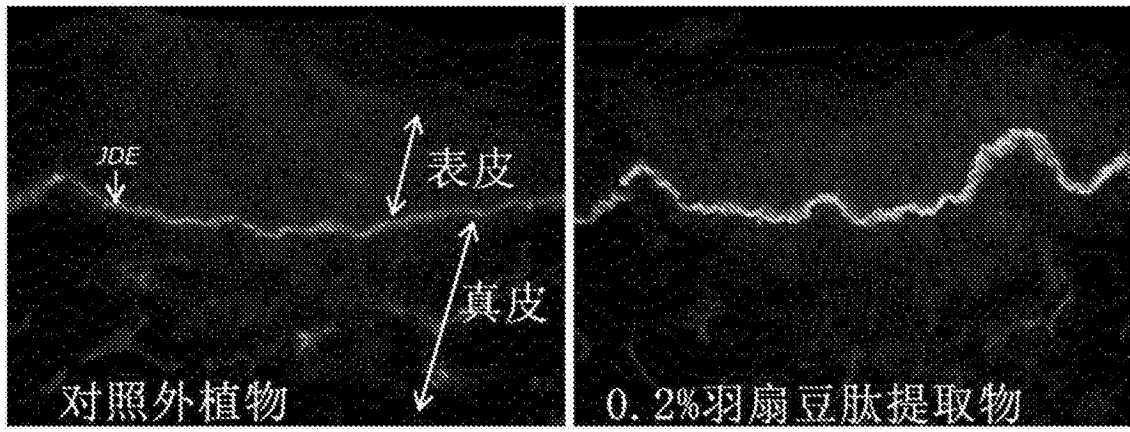


图6