

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 7/48
A61K 31/41
A61P 17/00
A61P 17/06
A61P 17/10



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97112973.8

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 29 日 [11] 授权公告号 CN 1208045C

[22] 申请日 1997.4.25 [21] 申请号 97112973.8 [30] 优先权 [32] 1996. 4.25 [33] US [31] 638074 [71] 专利权人 尤尼利弗公司 地址 荷兰鹿特丹 [72] 发明人 S·P·格兰格 A·V·罗林斯 I·R·斯各特 审查员 张 伟	[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 代理人 杨九昌
权利要求书 1 页 说明书 21 页	

[54] 发明名称 含有脂肪酸酰胺、唑类化合物和视黄醇或视黄酯的护肤组合物

[57] 摘要

脂肪酸酰胺和唑类化合物以及视黄醇或视黄酯联合可协同增加角化细胞增殖并协同抑制角化细胞分化。 视黄醇或视黄酯与视黄酸酰胺和唑类化合物联合的作用类似于用视黄酸治疗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 皮肤调理组合物, 含有
- (a)0.001%至10%的视黄醇;
- 5 (b)0.0001%至50%的唑类化合物, 该唑类化合物选自苯咪丁酮、咪康唑、联苯苄唑、克霉唑、益康唑;
- (c)0.0001%至50%的脂肪酸酰胺, 该脂肪酸酰胺选自亚油酰单乙醇酯、亚油酰二乙醇酯、棕榈油酰单乙醇酯、棕榈油酰二乙醇酯、椰子油酰单乙醇酯、椰子油酰二乙醇酯; 以及
- 10 (d)化妆品用载体。
2. 调理皮肤的美容方法, 该方法包括在皮肤表面局部涂敷权利要求1的组合物。
3. 模拟视黄酸对皮肤作用的美容方法, 该方法包括在皮肤上涂敷权利要求1的组合物。

15

含有脂肪酸酰胺、唑类化合物和
视黄醇或视黄酯的护肤组合物

5

本发明涉及含有脂肪酸酰胺、唑类化合物和视黄醇或视黄酯的护肤组合物。

视黄醇（维生素A）是一种内源性化合物，其天然产生于人体，为正常表皮细胞分化所必需。天然的和合成的维生素A衍生物已广泛用于治疗各种皮肤疾患，并已用作皮肤修复剂或再生剂。视黄酸已被用来治疗各种皮肤疾病，例如粉刺、皱纹、牛皮癣、老年斑和变色。参见Vahlquist, A等, J. Invest. Dermatol., Vol. 94, Holland D.B.和Cunliffe, W. J. (1990)第496 - 498页; Ellis, C.N.等 “Pharmacology of Retinols in Skin” , Vasek, karger, Vol. 3, (1989),第249 - 252页; Lowe, N.J.等, “Pharmacology of Retinols in Skin” , Vol. 3, (1989),第240 - 248页; PCT专利申请WO93/19743。视黄醇和视黄酯如乙酸视黄酯和棕榈酸视黄酯都比视黄酸易于配制/稳定。不幸的是，视黄醇和视黄酯在使皮肤受益方面不如视黄酸。本发明部分基于以下发现，即将某些视黄醇或视黄酯与脂肪酸酰胺及唑类化合物结合可协同增加角化细胞增殖并抑制分化。联合应用脂肪酸酰胺和唑类化合物及视黄醇或视黄酯的效应类似于视黄酸的效应。这种效应不仅比视黄醇/视黄酯和脂肪酸酰胺或者视黄醇/视黄酯与唑类化合物的效应大，而且这三种成分可彼此协同而促进视黄酸的反应。因此，脂肪酸酰胺和视黄醇或视黄酯的混合物可模拟视黄酸，但是比视黄酸易于使用。

Thornfeldt（美国专利5057501）公开了一种用含有倍半萜化合物和约0.025%至约35%的单脂肪酸、酯或酰胺的组合物治疗丘疹鳞屑性和湿疹性疾病的方法。该组合物也可含有类视黄酸; Thornfeldt说明某些类视黄酸s, 例如异维生素A酸、全反视黄酸、阿维A（所有这些都是视黄酸的立体形式）以及阿维A酯（三甲氧基苯基视黄酸的酯）已被证实对丘疹鳞屑性疾病有效。PCT申请WO/9325177（Procter and Gamble）公开了局部用于皮肤的组合物，其含有特殊类型的无环甲酰胺冷冻剂，可包含类视黄酸如视黄酸及其衍生物（例如顺式和反式）。PCT申请WO/9403156（Rhone Poulenc）公开了含有亚油酸

或衍生物作为活性成分的局部用组合物来治疗和预防impure皮肤（例如受丘疹、脓包或粉刺影响的皮肤）；该组合物也可含有0.025-0.1重量%的全反视黄酸。欧洲专利申请0388275（Pierre Fabre Cosmetique）公开了用于治疗脂溢性皮炎的组合物，其含有烷基甲酰胺和锌盐（可以是视黄酸锌）。

- 5 Klaus等（美国专利5216148）公开了特殊复合甲酰胺在治疗和预防瘤、皮肤病和皮肤老化中的用途。Van Scott等（美国专利4380549）和Yu等（美国专利4363815）公开了用羧酸或其酰胺治疗粉刺、皮肤干燥、气皮、鳞状皮肤。EP582458公开了N,N-(1,4C烷基)月桂酰胺的用途。EP559304公开了含有至少25个碳原子的烃链的酰胺用作皮肤光滑剂的用途。Beauquey等（美国专利
- 10 5308551）公开了含有一种皮肤清洗和调理组合物，其含有一种8-16C脂肪酸的1-4C烷醇酰胺组分。英国专利说明书1126289（Hoffman-La Roche）公开了一种储备维生素制剂，其含有维生素A醇或维生素A酯、乳化剂和选自醇或单羧酸二烷基酰胺（例如N,N-二乙基乙酰胺、N,N-二甲基乙酰胺或N,N-二甲基甲酰胺）的溶剂。早一些提交的欧洲专利申请0742005（Unilever;优先权日为
- 15 1995年5月8日），1996年11月13日公开（在本申请优先权日后），公开了联合使用脂肪酸酰胺和视黄醇或视黄酯。所有上述文献都没有提及唑类化合物。

- 含有类视黄酸和唑类化合物的组合物已有描述。参见如Yusuf等，CA 2101101, Cauwenbergh, 美国专利5476852和Keyhani, PCT申请WO9505852。但
- 20 是这些文献都未提及脂肪酸酰胺。

含有唑类化合物和脂肪酸酰胺的组合物也是已知的。但是这些组合物中不包含任何类视黄酸。参见例如WO95/17175；EP0347199；美国专利4867971；以及美国专利5348736。

- 上述文献都没有公开基于脂肪酸酰胺、唑类化合物和视黄醇或视黄酯这
- 25 三种成分协同组合的皮肤调理组合物。上述文献都没有提到需要一种视黄酸的有效替代物。

本发明包括一种皮肤调理组合物，其含有：

- (a)0.001%至约10%的视黄醇或视黄酯；
- (b)0.0001%至约50%的唑类化合物；
- 30 (c)0.0001%至约50%的脂肪酸酰胺，其中脂肪酸含有至少6个碳原子；以

及

(d)化妆品用载体。

本文所用术语“调理”是指预防和治疗皮肤干燥、光致损皮肤、皱纹出现、老年斑、老化皮肤，增进角质层弹性并改善肤质。可用美容方法使用该组合物以改善皮肤脱屑和表皮增殖及分化。

本发明也包括本发明组合物在生产用于治疗皮肤起皱、干燥、脱落、老化、光致损伤及治疗皮肤病（例如粉刺或牛皮癣）的药物中的用途。

本发明另外提供了促进皮肤角化细胞增殖和分化的美容方法，该方法包括在皮肤上施用上述本发明组合物。

10 本发明产品中脂肪酸酰胺和唑类化合物的存在可显著改善视黄醇或视黄酯的作用，即脂肪酸酰胺和唑类化合物联合施用可显著增进视黄醇或视黄酯影响细胞增殖和分化的能力。当单独使用脂肪酸酰胺或唑类化合物时，对改善皮肤没有或几乎没有作用；只有当酰胺和唑类化合物与视黄醇或视黄酯联合使用时才会显著改善皮肤。简而言之，本发明是基于（至少部分基于）所发现的视黄醇或视黄酯、脂肪酸酰胺和唑类化合物之间协同的相互作用。

在本发明的一个优选的实例中，酰胺是 C_8 - C_{24} 脂肪酸酰胺，特别优选 C_8 - C_{24} 脂肪酸的一或二烷醇酰胺，唑类化合物是苯咪丁酮。

20 根据本发明，由于在含有视黄醇或视黄酯的组合物中含有有效量的脂肪酸酰胺和唑类化合物，组合物的作用显著改善。或者，在含有脂肪酸酰胺和唑类化合物的组合物中含有低水平的视黄醇或视黄酯与不含酰胺和唑类化合物的类似制剂的作用相同。

除非另外说明，所有的百分数都是最终组合物的重量百分数。

25 本发明组合物最主要的成分是选自视黄醇或视黄酯的化合物。术语“视黄醇”包括视黄醇的以下异构体：全反式视黄醇、13-顺式视黄醇、11-顺式视黄醇、9-顺式视黄醇、3,4-二氢视黄醇。优选的异构体是全反式视黄醇、13-顺式视黄醇、3,4-二氢视黄醇和9-顺式视黄醇。最优选的是全反式视黄醇，因为其具有广泛的商用性。

30 视黄酯是视黄醇的酯。术语“视黄醇”如上所定义。适用于本发明的视黄酯为视黄醇的 C_1 - C_{30} 酯、优选 C_2 - C_{20} 酯、最优选 C_2 、 C_3 、和 C_{16} 酯，因为它们都是更常用。视黄酯的实例包括（但不局限于）：棕榈酸视黄酯、甲酸视黄

酯、乙酸视黄酯、丙酸视黄酯、丁酸视黄酯、戊酸视黄酯、异戊酸视黄酯、己酸视黄酯、庚酸视黄酯、辛酸视黄酯、壬酸视黄酯、癸酸视黄酯、十一烷酸视黄酯、十二烷酸视黄酯、十三烷酸视黄酯、十四烷酸视黄酯、十五烷酸视黄酯、十七烷酸视黄酯、硬脂酸视黄酯、异硬脂酸视黄酯、十九烷酸视黄酯、二十烷酸视黄酯、二十二烷酸视黄酯、亚油酸视黄酯、油酸视黄酯、乳酸视黄酯、甘醇酸视黄酯、羟基辛酸视黄酯、羟基十二烷酸视黄酯、酒石酸视黄酯。

优选用于本发明的酯选自棕榈酸视黄酯、乙酸视黄酯和丙酸视黄酯，因为它们都是商业上最常用的并且最便宜。也优选亚油酸视黄酯，因为其具有优良的效应。

用于本发明组合物中的视黄醇或视黄酯的量约为0.001%至约10%，优选约0.01%至约1%，最优选约0.01%至约0.5%。

本发明组合物中另一重要的成分是脂肪酸酰胺。优选地，脂肪酸酰胺含有至少6个碳原子。适当的脂肪酸包括饱和和不饱和、直链或支链脂肪酸。适当的脂肪酸优选含有8至24个碳原子，优选12至20个碳原子，最优选12至18个碳原子，因为长链脂肪酸酰胺更适于调理皮肤。在本发明最优选的实例中，使用必需脂肪酸的酰胺，因为必需脂肪酸可为皮肤提供营养。必需脂肪酸的实例包括（但不限于）：亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、 γ -亚麻酸、高 γ -亚麻酸及其混合物。最优选亚油酸，因为其也是神经酰胺的前体。

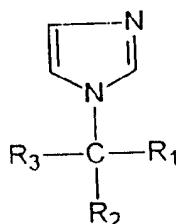
适用于本发明的酰胺可以是简单酰胺（即含有 $-\text{CONH}_2$ 基团的酰胺）、N-烷基酰胺、N,N-二烷基酰胺、单烷醇酰胺和二烷醇酰胺。适当的烷基或烷醇基含有1至30个碳原子，优选1至20个碳原子，最优选1至8个碳原子。本发明优选的酰胺为单和二烷醇酰胺，特别是必需脂肪酸的酰胺。烷醇酰胺比烷基酰胺更易得。

优选的脂肪酸酰胺选自亚油酸、棕榈酸和椰子油的单和二乙醇酰胺。

本发明组合物中酰胺的含量范围为约0.0001%至约50%，优选约0.01%至约10%，最优选约0.1%至约5%。

本发明组合物中第三种重要的成分是唑类化合物。用于本发明的唑类化合物具有如下通式：

5



其中 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地选自氢、巯基(SH)、硫羟基或含有1至12个碳原子的烷基、芳基、用1-5个卤原子取代的芳基、含有氮原子和/或氧原子的杂环基团以及其混合物。

- 10 最优选苯咪丁酮、米康唑、联苯苄唑、益康唑和克霉唑。同样适用于本发明的有1,2,4-三唑、辛基三唑、酮康唑、伊曲康唑、氟康唑、特康唑、硫康唑、利阿唑、氯苯硫康唑及其混合物。

本发明组合物中唑类化合物的含量为约0.0001%至约50%，优选约0.001%至约10%，最优选约0.1%至约5%。

15

化妆品用赋形剂

本发明组合物中也可含有化妆品用赋形剂作为稀释剂、分散剂或载体以使当组合物用于皮肤时组合物中各活性成分易于分散。

- 20 非水或者除水以外的赋形剂可以包括液体或固体润肤剂、溶剂、润湿剂、增稠剂和粉剂。特别优选的非水载体为聚二甲基硅氧烷和/或聚二甲基苯基硅氧烷。本发明的聚硅氧烷可以是25℃下粘度为约10至10,000,000mm²/s(厘沱)范围内的任意聚硅氧烷。特别需要的是低和高粘度聚硅氧烷的混合物。这些聚硅氧烷可从General Electric公司以Vicasil、SE和SF商标获得，还有Dow Coming公司的200和550系列。本发明组合物中聚硅氧烷的用量占组合物重量的5%至95%，优选25%至90%。

化妆品用赋形剂一般占组合物重量的5%至99.9%，优选25%至80%，并且在不含其它化妆品佐剂的情况下使组合物均衡。以赋形剂重量计，赋形剂中优选含水量至少为80%，在本发明组合物中，水优选至少占50%，最优选占组合物的60~80%(重量)。

可选择的护肤材料和化妆品佐剂

- 30 可含有油或油性物质及乳化剂以形成油包水乳剂或水包油乳剂，其主要

取决于所用乳化剂的亲水亲油平衡值（HLB）的平均值。

本发明组合物优选含有防晒剂。防晒剂包括常用于阻挡紫外线的物质。化合物实例为PABA、肉桂酸酯和水杨酸酯的衍生物。例如可使用甲氧基肉桂酸辛酯和2-羟基-4-甲氧基二苯酮（也称羟苯酮）。甲氧基肉桂酸辛酯和2-羟基-4-甲氧基二苯酮可分别以商标Parsol MCX和Benzophenone-3购得。用于乳剂中的防晒剂的确切含量取决于防止太阳紫外线照射所需的程度。

另外一种可优选选用的成分选自必需脂肪酸（EFAs），即形成所有细胞原生质膜所必需的脂肪酸，在角化细胞EFA缺乏时会使细胞过度增殖。补充EFA可矫正这种现象。EFAs也可增强表皮脂类的生物合成并提供形成表皮屏障所需的脂类。必需脂肪酸优选选自亚油酸、 ν -亚麻酸、高- ν -亚麻酸、伽伦巴酸、二十碳-(n-6,9,13)-三烯酸、花生四烯酸、 ν -亚麻酸、二十碳五烯酸、己烯酸及其混合物。

本发明化妆品组合物中通常会含有润肤剂。这些润肤剂的含量为组合物总重量的约0.5%至约50%，优选约5%和30%之间。润肤剂可按照普通化学种类分类为酯、脂肪酸和醇、多元醇和烃。

酯可以是单酯或二酯。适用的脂肪酸二酯的实例包括己二酸二丁酯、癸二酸二己酯、dimerate二异丙酯和琥珀酸二辛酯。适用的支链脂肪酸酯包括豆蔻酸2-乙基己酯、硬脂酸异丙酯和棕榈酸异硬脂酯。适用的三元酸酯包括三亚油酸三异丙酯和柠檬酸三月桂酯。适用的直链脂肪酸酯包括棕榈酸月桂酯、乳酸肉豆蔻酯、eurcate油酯和油酸硬脂酯。优选的酯包括辛酸/癸酸椰油酯（辛酸椰油酯和癸酸椰油酯的混合物）、十四烷基醚乙酸丙二醇酯、己二酸二异丙酯和辛酸十六烷醇酯。

适当的脂肪醇和酸包括10至20个碳原子的化合物。特别优选的化合物是例如十六烷基、十四烷基、棕榈酸及硬脂醇和硬脂酸。

作为润肤剂的多元醇是直链和支链烷基多羟基化合物。例如优选丙二醇、山梨醇和甘油。也可使用聚合多元醇如聚丙二醇和聚乙二醇。丁二醇和丙二醇也特别优选为渗透增进剂。

作为润肤剂的典型烃类是12至30碳原子的烃链。具体的实例包括矿物油、凡士林、角鲨烯和异链烷烃。

本发明化妆品组合物中其它有效成分有增稠剂。增稠剂的用量通常为组

合物重量的0.1至20%，优选0.5%至10%。增稠剂的实例有交联聚丙烯酸酯物质，可从B.F.Goodrich公司以商标Carbopol获得。可使用胶如占吨胶、角叉菜胶、明胶、刺梧桐树胶、果胶和刺槐豆胶。在某些条件下，用作聚硅氧烷或润肤剂的物质也可起增稠作用。例如，大于10厘泡的聚硅氧烷胶和硬脂酸甘油酯等酯类物质都具有双重作用。

本发明的化妆品组合物可加有粉剂。这些粉剂包括白垩、滑石粉、漂白土、高岭土、淀粉、绿粘土、化学改性的硅酸镁铝、有机改性的蒙脱土、水合硅酸铝、烟硅石、琥珀酸辛烯酯淀粉铝及其混合物。

也可将其它少量辅助成分加入该化妆品组合物中。这些成分包括着色剂、遮光剂和香精。这些少量辅助成分的含量为组合物重量的0.001%至20%。

组合物的应用

本发明组合物主要是用作人体皮肤表面局部涂敷的产品，特别是作为调理和使皮肤光滑以及防止或减少皱纹或老化皮肤出现的制剂。

在使用时，从适当容器或涂敷器中将少量组合物如1至100毫升涂敷到皮肤暴露区，如果需要，可用手或手指或适当装置将其在皮肤上涂开和/或擦入皮肤。

20

产品剂型与包装

本发明的局部皮肤调理用组合物可配制成乳液、膏霜或凝胶。可将组合物包装在适合其粘度的适当容器中并由消费者使用。例如，乳液或膏霜可包装在瓶中或滚珠式涂敷器中，或者抛射剂助推式气溶胶装置或者装有指压式抽吸器的装置中。当组合物是膏霜时，其可简单地装在不变形的瓶中或挤压容器中，例如软管或带盖广口瓶。组合物也可包含在胶囊中，例如美国专利5063507中所述，其在此作为参考。

本发明还提供了一种含有本文所述化妆品用组合物的密闭容器。

以下特殊实施例进一步阐明本发明。

30

材料和方法

细胞培养:

从经胰蛋白酶处理的人新生表皮中分离人角化细胞, 使其在Dulbecco Modification Eagle (DME) Hams F12(1:1)培养基/10%小牛血清中生长, 其中含有照射3T3小鼠成纤维细胞来分化角化细胞集落。细胞在上述条件下生长直至其二次传代, 冷冻备用。将冷冻后的二次传代角化细胞解冻, 置于上述培养基中培养5天, 然后移入以不含血清的MCDB 153-培养基为主的角化细胞生长培养基(KGM)中(来自Clonetics公司, San Diego, CA), 其中含有0.15mM Ca; 或者移入GIBCO的不含血清的角化细胞培养基(KSFM)中(含有0.09mM Ca)。第7天, 当80-90%细胞融合时, 将其用胰蛋白酶处理并置于不含血清的培养基中以便不同实验使用。

胸苷检测

³H-胸苷结合和角化细胞的增殖

通过培养角化细胞结合³H-胸苷来检测角化细胞增殖。胸苷是DNA单体的四种脱氧核苷之一, DNA是动物王国中遗传信息的广泛信息库。在身体细胞如角化细胞分裂前, 进行细胞分裂的细胞的全部染色体组都被复制。这包括细胞大规模的DNA合成并使两个子细胞获得完全相同的遗传物质拷贝。当合成DNA以备细胞分裂的角化细胞培养基中含有³H-胸苷时, 标记的核苷就会结合到新合成的DNA中。³H-胸苷结合到细胞群的程度与细胞群合成DNA的速率成正比, 因此可指示细胞的增殖。

将角化细胞(如上培养的)置于24孔板中, 1毫升培养基中的密度为每孔40000个细胞。培养4天或直至60-70%的细胞融合时, 更换培养基。培养基更换24小时后将测试化合物(三份)加到孔中, 4小时后每孔中加入1 μ Ci ³H-胸苷(每50 μ l培养基)。将细胞继续培养24小时。从细胞中移去培养基, 加入10%冰冻三氯乙酸(TCA), 将板在冰上培养30分钟。用5% TCA将细胞洗涤5次, 将其溶于500微升0.1M NaOH中至少1小时(通常过夜)。用0.1M HCl中和制剂; 将50微升的细胞制剂用于测定总蛋白质含量。通过液闪计数900微升细胞制剂来测定³H标记的DNA的每分钟分裂(DPM)。胸苷结合结果以DPM/ μ g蛋白质表示。

谷氨酰转移酶测试

谷氨酰转移酶测试和角化细胞分化

在表皮终末分化过程中，在细胞外周的内表面形成一个15nm厚的蛋白质层，称作角质层（CE）。CE由许多不同蛋白质组成，它们通过形成N^ε-(γ-谷氨酸基)赖氨酸异二肽键而交联在一起，这种肽键的形成通过表皮中至少两种不同的谷氨酰转移酶（TGases）的作用被催化。在表皮的分化层中都富含TGase I，特别是在颗粒层中，但在未分化的基础表皮中没有。因此，TGase I是表皮角化细胞分化的有用标识物，高的TGase I水平表示更加分化的状态。基于ELISA的TGase I测试（使用TGase I抗体）可用于评价培养的角化细胞的分化状态，如下实施例所述。

- 10 将角化细胞（如上培养的）置于96孔板中，200微升培养基的密度为每孔3000个细胞。培养4天后，将培养基更换为含有测试化合物的培养基（每个试验6份）。将细胞继续培养72小时，然后吸出培养基，将板储存在-70℃。从冷冻器中移出板，用PBS洗涤细胞。加入100微升灭菌水，通过在-70℃冷冻然后解冻而将细胞冷冻破碎。将细胞于室温用PBS/3%BSA（洗涤缓冲剂，牛血清白蛋白）培养1小时，然后用新制的等分洗涤缓冲剂漂洗。然后用50微升来自Amersham（小鼠）原代抗体单克隆抗人谷氨酰转移酶（IgG）（在洗涤缓冲剂中稀释1:300）培养细胞1小时，然后在37℃用洗涤缓冲剂漂洗两次。然后将细胞与50微升第二代抗体（Feb fragment，从Amersham得到的过氧化物酶共轭的抗-小鼠IgG，用洗涤缓冲剂稀释1:200）一起在37℃培养1小时。用底物溶液（4毫克邻苯二胺在10毫升0.1M的柠檬酸盐缓冲液中的3.3微升30%双氧水，pH 5.0）于室温暗处（铝箔下）培养5分钟。加入50微升4N硫酸终止反应。在板阅读器中读出样品在492nm的吸收。在六份样品中，四份用两种抗体处理，两份仅用第二代抗体处理（即，测定与Ab酶共轭的本底结合）。从每一处理所得读数减去本底测定TGase水平，测定接触两种Ab的各份的平均±s.d.。
- 25 s.d.。

DNA检测

- 处理后细胞所检测的TGase-1水平可以受细胞数目影响，即，细胞数目越多，所检测的TGase-1的水平越高。将TGase-1的水平标准化为相同孔中细胞的DNA含量，以消除由于细胞数目不同所带来的变化。DNA数量是细胞数目
- 30 DNA含量，以消除由于细胞数目不同所带来的变化。DNA数量是细胞数目

- (包括角化细胞数目)特别有用的指示物,因为每个细胞实际上都有完全相同的染色体组,因此都具有相同的DNA数量。这样,细胞壁的DNA总量与细胞壁的细胞数目成正比。DNA数量可用于将TGase数据标准化为细胞数目。
- 将角化细胞置于96孔板中,200微升培养基中的密度为每孔3000个细胞。
- 5 培养4天后,将培养基更换为含有测试化合物的培养基(每个试验6份)。将细胞继续培养72小时,然后吸出培养基,将板储存在-70℃至少1.5小时。从冷冻器中移出板,将细胞用冷却的1:1乙醇/丙酮溶液固定30分钟。每孔中加入100微升Hoechst染料(10ug/ml终浓度),培养15分钟,盖好,然后在荧光计中读数(ex.360nm,em.460nm)。除去染料溶液,用PBS漂洗孔以备TGase检测。
- 10 测。

实施例1

视黄酸改变角化细胞分化状态比视黄醇更有效

- 15 A.加入不同浓度视黄酸或视黄醇24小时后测定对结合³H-胸苷/ug可溶蛋白的作用。结果如表1A所示。

表1A

视黄酸(RA)和视黄醇(ROH)对角化细胞胸苷结合的作用

处理	平均胸苷结合/ μg蛋白质±s.d(对照)	相对于对照的 p 值	相对于2.5×10 ⁻⁷ M 的 p 值	相对于2.5×10 ⁻⁶ M 的 p 值	相对于2.5×10 ⁻⁵ M 的 p 值
对照	2094±140 (100%)	-	0.202	0.501	0.203
2.5×10 ⁻⁷ MRA	2475±116 (118%)	0.005	0.032	0.004	0.002
2.5×10 ⁻⁷ M ROH	2218±73 (106%)	0.202	-	0.021	0.005
2.5×10 ⁻⁶ M RA	2686±72 (128%)	0.001	0.001	0.001	0.001
2.5×10 ⁻⁶ M ROH	2034±46 (97%)	0.501	0.021	-	0.121
2.5×10 ⁻⁵ M RA	2556±80 (122%)	0.001	0.006	0.001	0.001
2.5×10 ⁻⁵ M ROH	1977±19 (94%)	0.203	0.005	0.121	-

20 n=3

所有测试视黄酸的浓度，即， $2.5 \times 10^{-7}M$ 、 2.5×10^{-8} 和 $2.5 \times 10^{-9}M$ 都比乙醇对照组及用 $2.5 \times 10^{-7}M$ 、 2.5×10^{-8} 和 $2.5 \times 10^{-9}M$ 视黄醇处理组显著增加角化细胞的增殖，并且其是剂量依赖方式的。这点与视黄酸比视黄醇对上皮细胞增殖具有更大的刺激作用相一致。

5

B.加入视黄酸和视黄醇后测定对谷氨酰转移酶水平的作用。结果如表1B示。

表1B
视黄酸（RA）和视黄醇（ROH）对角化细胞谷氨酰转移酶水平的作用

处理	平均TCase/DNA $\times 10^{-4}$ $\pm S.D$ (对照)	相对于对照 的p值	相对于 $2.5 \times 10^{-7}M$ 的p值	相对于 $2.5 \times 10^{-8}M$ 的p值	相对于 $2.5 \times 10^{-9}M$ 的p值
对照	2.44 $\pm$ 0.24 (100%)	-	0.001	0.001	0.001
$2.5 \times 10^{-7}MRA$	0.16 $\pm$ 0.11 (7%)	0.001	0.001	0.001	0.001
$2.5 \times 10^{-7}M ROH$	1.14 $\pm$ 0.22 (47%)	0.001	-	0.001	0.001
$2.5 \times 10^{-8}M RA$	1.34 $\pm$ 0.40 (55%)	0.001	0.2	0.001	0.001
$2.5 \times 10^{-8}M ROH$	1.89 $\pm$ 0.30 (77%)	0.001	0.001	-	0.001
$2.5 \times 10^{-9}M RA$	1.87 $\pm$ 0.49 (77%)	0.001	0.001	0.784	0.001
$2.5 \times 10^{-9}M ROH$	2.70 $\pm$ 0.59 (>100%)	0.001	0.001	0.001	-

10 n=3

所有测试视黄酸的浓度，即， $2.5 \times 10^{-7}M$ 、 2.5×10^{-8} 和 $2.5 \times 10^{-9}M$ 都比乙醇对照组及用 $2.5 \times 10^{-7}M$ 、 2.5×10^{-8} 和 $2.5 \times 10^{-9}M$ 视黄醇处理组显著降低角化细胞的分化。视黄酸和视黄醇对谷氨酰转移酶水平的降低是剂量依赖性的。这点与视黄酸比视黄醇对上皮细胞分化具有更大的抑制作用相一致。

15

实施例2

亚油酰二乙醇酰胺（亚油酰-DEA）、BIFONAZOLE和视黄醇协同增加角化细胞的增殖并抑制分化

20 A.加入测试化合物24小时后测定对结合³H-胸苷/ μg 可溶蛋白的作用并将三个独

立的实验合并结果标准化为其分别的乙醇对照。结果如表2A所示。

表2A
视黄醇、BIFONAZOLE和亚油酰-DEA对角化细胞胸苷结合的作用

处理	平均胸苷结合/ μ g蛋 白质 $\pm$ s.d(对照)	相对于对照的 p 值	相对于 2.5×10^{-8} ROH的 p 值	相对于 2.5×10^{-8} RA的 p 值	相对于(*, @)的 p 值
对照	4368 $\pm$ 250 (100%)	-	0.105	0.008	*=0.103 @=0.039
2.5×10^{-8} M RA	5569 $\pm$ 248 (127%)	0.008	0.002	-	*=0.158 @=0.085
2.5×10^{-8} M 视黄醇	4856 $\pm$ 217 (111%)	0.105	-	0.038	*=0.600 @=0.403
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-8} M LADEA	5027 $\pm$ 366 (115%)	0.103	0.600	0.158	- @=0.936
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-8} M 联苯苄唑	5052 $\pm$ 202 (116%)	0.039	0.403	0.085	*=0.936 -
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-8} M LADEA+ 10^{-8} M联苯苄唑	5670 $\pm$ 68 (130%)	0.011	0.029	0.142	*=0.153 @=0.048

5 n=3

*=相当于 2.5×10^{-8} M ROH + 10^{-8} M LADEA的p值

@=相当于 2.5×10^{-8} M ROH + 10^{-8} M 联苯苄唑的p值

2.5 $\times$ 10⁻⁹M的视黄酸与乙醇对照组及2.5 $\times$ 10⁻⁹M的视黄醇处理组相比，对
角化细胞胸苷结合分别显著增加了27 %和16 %。2.5 $\times$ 10⁻⁹M的视黄醇 + 10⁻⁸M
10 亚油酰-DEA和2.5 $\times$ 10⁻⁹M的视黄醇 + 10⁻⁹M 联苯苄唑与视黄醇本身相比对
角化细胞增殖具有边缘刺激作用。但是，2.5 $\times$ 10⁻⁹M的视黄醇 + 10⁻⁸M亚油酰-
DEA + 10⁻⁹M 联苯苄唑的联合则比乙醇及2.5 $\times$ 10⁻⁸M视黄醇处理组对角化细胞
增殖分别显著增加了30 %和19 %。2.5 $\times$ 10⁻⁹M的视黄醇 + 10⁻⁸M亚油酰-DEA +
10⁻⁹M 联苯苄唑的联合也比2.5 $\times$ 10⁻⁹M的视黄醇 + 10⁻⁸M亚油酰-DEA以及2.5 $\times$
15 10⁻⁹M的视黄醇 + 10⁻⁹M 联苯苄唑处理组显著增加角化细胞的增殖。因此，脂

肪酸酰胺、bifonazole和视黄醇可协同将角化细胞的增殖增加至很类似视黄酸刺激作用的水平。

B.用测试化合物处理72小时后测定对谷氨酰转移酶1 (TG 1) 水平标准化为细胞DNA含量的作用, 如表2b所示。

表2B
视黄醇、联苯苄唑和亚油酰-MEA对角化细胞TGase的作用

处理	平均TGase/DNA $\times 10^{-4}$ $\pm$ s. d (对照)	相对于对照 的 p 值	相对于 2.5×10^{-8} ROH的 p 值	相对于 2.5×10^{-8} RA的 p 值	相对于 10^{-8} LAMEA+ 联苯苄唑的 p 值
对照	0.132 ± 0.027 (100%)	—	0.066	0.001	0.010
2.5×10^{-8} MRA	0.017 ± 0.010 (13%)	0.001	0.001	—	0.001
2.5×10^{-8} M 视黄醇	0.111 ± 0.023 (84%)	0.066	—	0.001	0.001
10^{-8} MLA-MEA + 10^{-8} 联苯苄唑	0.165 ± 0.026 (125%)	0.010			
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-8} M LA- MEA+ 10^{-8} 联苯苄唑	0.056 ± 0.047 (42%)	0.001	0.010	0.037	—

2.5×10^{-8} M的视黄酸非常有效地抑制角化细胞TG1水平至13 % 对照水平。

10 2.5×10^{-8} M的视黄醇及 10^{-8} M LAMEA + 10^{-8} M 联苯苄唑都对角化细胞TG1水平没有抑制作用。但是, 2.5×10^{-8} M的视黄醇 + 10^{-8} M LAMEA + 10^{-8} M 联苯苄唑则可抑制角化细胞TG1至42 % 的对照水平。因此, 脂肪酸酰胺和联苯苄唑可协同抑制角化细胞分化, 与视黄酸的作用类似。

15 实施例3

亚油酰-DEA、苯咪丁酮和视黄醇协同增加角化细胞的增殖并抑制分化

A.测定亚油酰-DEA、苯咪丁酮和视黄醇对结合³H-胸苷的作用。结果如表3A所示。

5

表3A
视黄醇、苯咪丁酮和亚油酰-DEA对角化细胞胸苷结合的作用

处理	平均胸苷结合/ μ g蛋白 $\pm$ s.d(对照)	相对于对照的 p 值	相对于 2.5×10^{-7} ROH的 p 值	相对于 2.5×10^{-7} RA的 p 值	相对于(*, @)的 p 值
对照	3713 $\pm$ 61 (100%)	-	0.275	0.001	*=0.024 @=0.048
2.5×10^{-7} MRA	4845 $\pm$ 95 (130%)	0.001	0.001	-	*=0.006 @=0.004
2.5×10^{-8} M 视黄醇	3788 $\pm$ 57 (102%)	0.275	-	0.001	*=0.043 @=0.090
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-8} M LADEA	4140 $\pm$ 160 (112%)	0.024	0.043	0.006	- @=0.626
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-8} M 联苯苄唑	4056 $\pm$ 160 (109%)	0.048	0.090	0.004	*=0.626 -
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-8} M LADEA+ 10^{-8} M联苯苄唑	4781 $\pm$ 196 (129%)	0.002	0.002	0.097	*=0.023 @=0.015

n=3

*=相当于 2.5×10^{-8} M ROH + 10^{-8} M LADEA的p值

10 @=相当于 2.5×10^{-8} M ROH + 10^{-8} M 苯咪丁酮的p值

2.5 $\times$ 10⁻⁷M的视黄酸与乙醇对照组及2.5 $\times$ 10⁻⁸M的视黄醇处理组相比，对角化细胞胸苷结合分别显著增加了30 %和28 %。2.5 $\times$ 10⁻⁸M的视黄醇 + 10⁻⁸M亚油酰-DEA和2.5 $\times$ 10⁻⁸M的视黄醇 + 10⁻⁹M苯咪丁酮与对照组及视黄醇本身相比对角化细胞增殖具有显著刺激作用。但是，2.5 $\times$ 10⁻⁸M的视黄醇 + 10⁻⁸M亚油酰-DEA + 10⁻⁹M苯咪丁酮的联合则比乙醇及2.5 $\times$ 10⁻⁸M视黄醇处理组对角化

15

细胞增殖分别显著增加了29 %和27 %。 2.5×10^{-8} M的视黄醇 + 10^{-8} M亚油酰-DEA + 10^{-9} M苯咪丁酮的联合与 2.5×10^{-8} M的视黄醇 + 10^{-8} M亚油酰-DEA以及 2.5×10^{-8} M的视黄醇 + 10^{-9} M苯咪丁酮处理组相比对角质化细胞增殖分别显著增加了17 %和20 %。因此，亚油酰-DEA和苯咪丁酮可协同将角质化细胞的增殖增加至很类似视黄酸刺激作用的水平。

B.用测试化合物处理72小时后测定对标准化为细胞DNA含量的谷氨酰转移酶1 (TG1) 水平的作用，如表3b所示。

表3B
视黄醇、苯咪丁酮和亚油酰-DEA对角质化细胞TGase水平的作用

处理	平均Tgase/DNA $\times 10^{-4} \pm \text{sd}(\text{对照})$	相对于对照 的p值	相对于 2.5×10^{-8} M ROH的p值	相对于 2.5×10^{-8} M ROH+LADEA的p值	相对于 2.5×10^{-8} M ROH+苯咪丁酮的p值
对照	1.52 ± 0.51 (100%)	-	0.001	0.395	0.150
2.5×10^{-8} M RA	0.44 ± 0.71 (29%)	0.001	0.001	0.001	0.001
2.5×10^{-8} M RA	0.84 ± 0.59 (55%)	0.001	0.001	0.001	0.001
2.5×10^{-8} M 视黄醇	1.96 ± 0.33 (129%)	0.001	-	0.001	0.001
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-9} M LA-DEA	1.59 ± 0.28 (105%)	0.395	0.001	-	0.360
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-9} M 苯咪丁酮	1.66 ± 0.42 (109%)	0.150	0.001	0.360	-
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-9} M LA-DEA+ 10^{-9} M 苯咪丁酮	1.27 ± 0.51 (83%)	0.015	0.001	0.001	0.001
2.5×10^{-8} M ROH+ 10^{-9} M LA-DEA+ 10^{-9} M 苯咪丁酮	1.10 ± 0.40 (72%)	0.001	0.001	0.001	0.001

10 n=6

2.5×10^{-7} M的视黄酸非常有效地抑制角质化细胞TG1水平至29 %对照水平，而更稀释的 2.5×10^{-9} M视黄酸不那么有效，但是仍可抑制TG1水平至55 %。 2.5×10^{-9} M的视黄醇， 2.5×10^{-9} M视黄醇 + 10^{-8} M LADEA以及 2.5×10^{-9} M视黄醇 + 10^{-8} M苯咪丁酮都对角质化细胞TG1水平没有抑制作用。但是， 2.5×10^{-9} M的视黄醇 + 10^{-8} M LADEA + 10^{-8} M苯咪丁酮则可抑制角质化细胞TG1至83 %的对照水

平。这种抑制作用显著高于对照、单独的ROH、ROH + LADEA和ROH + 苯咪丁酮，这表明ROH、LADEA和苯咪丁酮这三种成分可协同抑制角化细胞TG1水平。当苯咪丁酮浓度增加10倍时，即 2.5×10^{-9} M的视黄醇 + 10^{-8} M LADEA + 10^{-7} M苯咪丁酮，则这一作用还会增加，该联合可抑制TG1水平至72%对照。

- 5 因此，视黄醇、脂肪酸酰胺和苯咪丁酮可协同抑制角化细胞分化，与视黄酸的作用类似。

实施例4

克霉唑、亚油酰-MEA（“LAMEA”）和视黄醇协同增加角化细胞的增殖

10

测定加入测试化合物24小时后对结合 3 H-胸苷/ μ g可溶蛋白的作用，结果如表4所示标准化为对照。

表4

视黄醇、亚油酰-MEA和克霉唑对角化细胞胸苷结合的作用

处理	平均胸苷结合/ μ g蛋白 白质 $\pm$ s. d (对照)	相对于对照的 p 值	相对于 2.5×10^{-9} 3 ROH的 p 值	相对于 2.5×10^{-9} 3 RA的 p 值	相对于(*, @)的 p 值
对照	1.00 ± 0.11 (100%)	—	0.041	0.001	*=0.152 @=0.099
2.5×10^{-9} M RA	1.28 ± 0.09 (128%)	0.001	0.002	—	*=0.001 @=0.041
2.5×10^{-9} M 视黄醇	1.13 ± 0.09 (113%)	0.041	—	0.002	*=0.176 @=0.853
2.5×10^{-9} M ROH + 10^{-8} M LAMEA	1.08 ± 0.09 (108%)	0.152	0.176	0.001	— @=0.587
2.5×10^{-9} M ROH + 10^{-8} M 克霉素	1.12 ± 0.12 (112%)	0.099	0.853	0.041	*=0.587 —
2.5×10^{-9} M ROH + 10^{-8} M LAMEA + 10^{-8} M克霉素	1.29 ± 0.09 (129%)	0.001	0.003	0.572	*=0.001 @=0.039

15

n=3

*=相当于 2.5×10^{-9} M ROH + 10^{-8} M LADEA的p值

@=相当于 2.5×10^{-9} M ROH + 10^{-8} M 克霉唑的p值

5 2.5×10^{-9} M的视黄酸与乙醇对照组及 2.5×10^{-9} M的视黄醇处理组相比，对
角化细胞胸苷结合分别显著增加了28%和15%。 2.5×10^{-9} M的视黄醇 + 10^{-8} M
亚油酰-MEA和 2.5×10^{-9} M的视黄醇 + 10^{-8} M克霉唑与对照组相比对角化细胞增
殖都有刺激作用，但是这种作用没有视黄醇本身大。但是， 2.5×10^{-9} M的视黄
醇 + 10^{-8} M亚油酰-MEA + 10^{-8} M克霉唑的联合则比乙醇对照组及 2.5×10^{-9} M视
10 黄醇处理组对角化细胞增殖分别显著增加了29%和16%。最出乎意料的是，
 2.5×10^{-9} M的视黄醇 + 10^{-8} M亚油酰-MEA + 10^{-8} M克霉唑的联合也比 2.5×10^{-9} M
的视黄醇 + 10^{-8} M亚油酰-MEA以及 2.5×10^{-9} M的视黄醇 + 10^{-8} M克霉唑处理组
对角化细胞增殖分别显著增加了21%和17%。因此，视黄醇、亚油酰-MEA和
克霉唑可协同将角化细胞的增殖增加至很类似视黄酸刺激作用的水平。

15 实施例1-4说明了视黄酸以剂量依赖方式增加皮肤角化细胞胸苷的结合
并降低谷氨酰转移酶I的水平。换句话说，视黄酸可增加角化细胞增殖并降低
角化细胞分化。在实施例1-4中，视黄酸用作阳性对照和参考化合物，与其
它分析化合物相比较。在抑制角化细胞分化方面，视黄醇明显不如视黄酸有
效，在增加角化细胞增殖方面则完全无效。

20 但是，实施例1-4中意外的结果是视黄醇通过将其或视黄酯与脂肪酸酰
胺和唑类化合物联合后对培养后角化细胞的作用可增加至接近视黄酸的
水平，尽管唑类化合物和脂肪酸酰胺单独的作用很小。上述这些结果表明，脂
肪酸酰胺和唑类化合物联合可与视黄醇或视黄酯协同增加角化细胞增殖并降
低角化细胞分化，模拟视黄酸的作用。

25 本项研究的意外结果是，视黄醇通过将其与脂肪酸酰胺和唑类化合物联
合后对培养后角化细胞的作用可增加至接近视黄酸作用的水平。该作用不仅
比视黄醇 + 脂肪酸酰胺或者视黄醇 + 唑类化合物的作用大，而且这三种成分
可彼此协同促进视黄酸样反应。

30 实施例6-11描述了本发明的局部用组合物。该组合物可按常规方法制
备。其适用于美容。该组合物特别适用于起皱、粗糙、干燥、起皮、老化和/

或紫外线损伤的皮肤以改善皮肤外观和质感，也适用于健康皮肤以防止或延缓肤质恶化。

实施例6

5 本实施例描述了本发明组合物的高内相油包水乳剂。

	%w/w
视黄醇	0.5
咪康唑	1
亚油酰-二乙醇酰胺	5
全氢化的可可油	3.9
Brij92 [*]	5
有机皂土38	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
丁基化羟基甲苯	0.01
香料	qs
水	to 100

* Brij92是聚氢乙烯(2)油基醚

实施例7

本实施例说明了本发明组合物的水包油膏霜。

	%w/w
视黄醇	0.15
克霉素	2
椰子酰二乙醇酰胺	1
矿物质	4
Brij56*	4
Alfol 16RD*	4
三乙醇胺	0.75
丁烷-1,3-二醇	3
黄厚胶	0.3
香料	qs
丁基化羟基甲苯	0.01
水	to 100

*Brij56是十六烷醇POE(10)

Alfol 16RD 是十六烷醇

5 实施例8

本实施例说明了本发明组合物的醇性乳液。

	%w/w
棕榈酸视黄醇	0.15
亚油酰单乙醇酰胺	0.1
苯咪丁酮	1
乙醇	40
香料	qs
丁基化羟基甲苯	0.01
水	to 100

实施例9

本实施例说明了含有本发明组合物的另一醇性乳剂。

	%w/w
视黄醇	0.15
棕榈酰单乙醇酰胺	0.1
苯咪丁酮	2
乙醇	40
抗氧化剂	0.1
香料	qs
水	to 100

实施例10

本实施例说明了本发明组合物的防晒霜。

	%w/w
视黄醇	0.01
亚油酰单乙醇酰胺	0.1
苯咪丁酮	0.1
硅油200cts	7.5
单硬脂酸甘油酯	3
鲸蜡硬脂醇	1.6
聚氧乙烯-(20)-十六烷醇	1.4
黄厚酸	0.5
Parsol 1789	1.5
甲氧基肉桂酸辛	7
香料	qs
着色剂	qs
水	to 100

实施例11

本实施例说明了本发明的非水皮肤护理组合物。

	%w/w
棕榈酸视黄醇	0.15
亚油酰二乙醇酰胺	1
咪康唑	0.1
Silicone gum SE-30 ¹	10
Silicone fluid 345 ²	20
Silicone fluid 344 ³	55.79
角鲨烯	10
亚油酸	0.01
胆固醇	0.03
2-羟基-正辛酸	0.7
维生素正亚油酸酯	0.5
植物油	0.5
乙醇	2

1 分子量至少为50000且在25℃的粘度至少为10000厘沱的二甲基聚硅氧烷聚合物，来自GEC

5 2环二甲基硅氧烷五聚物，来自Dow Corning公司。

3二甲基硅氧烷四聚物，来自Dow Corning公司。