



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105555250 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201480042643. 0

A61Q 19/08(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 08. 04

A61K 8/97(2006. 01)

(30) 优先权数据

13179245. 9 2013. 08. 05 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 01. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/066723 2014. 08. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/018792 EN 2015. 02. 12

(71) 申请人 波利化学公司

地址 卢森堡卢森堡市

(72) 发明人 F·斯卡尔奇 G·约布 F·美兰

(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 8/34(2006. 01)

A61K 8/73(2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页

(54) 发明名称

用于皮肤抗老化处理的组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种含有与透明质酸和C₁-C₄烷醇组合的啤酒花提取物的组合物,及其作为人类皮肤的抗老化处理的用途。对于本发明的用途,所述新的组合物被局部施用。

1. 一种组合物,其含有:
 - a) 啤酒花*Humulus lupulus*提取物,
 - b) 透明质酸的酯,
 - c) C₁-C₄烷醇。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述提取物为液体、半固体或固体提取物。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述液体提取物为母酊剂。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其特征在于,所述提取物的量为以总组合物重量计的0.1至15%,优选0.2至5%。
5. 根据权利要求4所述的组合物,其特征在于,所述量为0.5至2.5%。
6. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述透明质酸的酯选自抗坏血酸透明质酸酯、棕榈酸透明质酸酯、透明质酸苄酯、丁酰基透明质酸酯钠、丁酰基/甲酰基透明质酸酯钠。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,透明质酸的酯的量为以总组合物重量计的0.01至5%,优选0.025至4%。
8. 根据权利要求7所述的组合物,其特征在于,所述量为0.04至2.0%。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述C₁-C₄烷醇为乙醇。
10. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,C₁-C₄烷醇的量为以总组合物重量计的0.5至15%,优选1至10%。
11. 根据权利要求10所述的组合物,其特征在于,所述量为3至7%。
12. 根据前述权利要求任一项所述的组合物,其特征在于,其进一步含有一种或多种以下成分:保湿剂、润肤剂、抗氧化剂、渗透促进剂例如脂质体囊泡和维生素;湿润剂、流变添加剂、乳化剂、润肤剂、防腐剂;天然、合成或半合成聚合物和共聚物、硅酮衍生物、具有增稠和柔光效果的粉末和填充剂。
13. 根据前述权利要求任一项所述的组合物,其用于处理和预防皮肤老化和/或皱纹的用途。
14. 根据权利要求13所述用途的组合物,其特征在于,所述处理的接受者为人。

用于皮肤抗老化处理的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种含有与透明质酸和C₁-C₄烷醇组合的啤酒花(*Humulus lupulus*)提取物的组合物,及其作为人类皮肤的抗老化处理(anti-ageing treatment)的用途。对于本发明的用途,所述新的组合物被局部施用。

背景技术

[0002] 老化过程是细胞衰老和相关的应对应激的能力下降的生理结果。这个不可逆过程导致身体内一些变化:其中之一涉及面部皱纹的出现。

[0003] 皮肤由两个主要层构成:外层是表皮,主要由角质细胞构成,负责形成对抗环境损害(病原体、热、UV辐射和失水)的屏障。内层,真皮,包含结缔组织,其由结构成分如胶原(负责皮肤紧致度)、弹性纤维(负责皮肤弹性)和细胞外基质(结构成分)构成。也有第三层皮下组织,其包含提供对身体绝缘的脂肪细胞。

[0004] 皱纹是由于损害生物分子功能的糖基化过程导致的皮肤的褶皱、隆起或皱折(Danby FW, "Nutrition and aging skin:sugar and glycation", Clin Dermatol 2010, 28(4):409-411)。老化过程不是皱纹出现的唯一原因,其他因素可以促进皱纹产生:它们是吸烟、阳光暴露、皮肤类型、环境因素和基因遗传(Demierre MF等人, "Public knowledge, awareness, and perceptions of the association between skin aging and smoking", J Am Acad Dermatol, 1999, 41(1):27-30)。

[0005] 皮肤皱纹的形成在于由于缺乏胶原或其变形、变薄和/或破碎(fractioning),由于皮肤的一些区域,尤其是脸的拉伸和反复的伸展,而导致的皮肤结构的损坏(Fisher GJ, "The Pathophysiology of Photoaging of the Skin" Cutis, 2005, 75(2S):5-9)。缺乏弹性在此过程中也起到重要作用。其下降和其因此失去弹性,引起皮肤体积的增加和如双下巴现象的出现。所有这些在皮肤架构中的组合变化引起皱纹的出现,并且皱纹的性质取决于皮肤和肌肉收缩的性质。这种退化过程的结果导致增强的皮肤脆性,表皮可获得的营养物质的量下降,干扰正常皮肤修复过程,因此带来更明显的皱纹和松弛过程。

[0006] 习惯性的面部表情和因此肌肉的永久收缩,引起皮肤由于如上所述的组织损失而产生皱纹。另外,重力作用是出现皱纹和皮肤松弛的原因。这引发双下巴和眼睑下垂。

[0007] 因此,由于各层中或纤维(主要是胶原)的不完善重构中结构物质的减少以及引起皱纹形成的其它多因素问题,老化是一个影响皮肤的不可逆过程。

[0008] 失去的组织(主要包括胶原纤维和弹性蛋白)的再生应该是皱纹的处理和预防的最佳目标。

[0009] 在现有技术中,有许多可通过医药的、外科的和美容学的解决方案,用于减轻皱纹的处理方法。这些处理方法旨在改变老化胶原的性质、拉伸皮肤、填充皮肤凹陷、或麻痹引起皮肤皱折的肌肉。

[0010] 医药处理方法中有:维生素A酸(视黄酸),其作用增加皮肤细胞的再生(turnover),但它们可能会产生红肿、脱皮和全身不适; α -羟基酸类,其渗透入皮肤层的顶

部,但仅产生细微的改善,并引起温和和暂时的刺激;抗老化精华(serum),其刺激皮肤重建表皮中的胶原和弹性蛋白网络,导致皮肤结构的更新、皮肤弹性的改善和皱纹的平滑。然而,缺点是相关的成本和以下事实:从动物源获得的这些化合物的实际组合物经常是没有明确说明的。

[0011] 在外科领域,有很多技术:分别利用旋转仪器和激光的磨皮术和激光换肤术,其作用于研磨皮肤。即使所有这些处理方法能够得到极好的改善,它们也能够产生显著的副作用,包括疤痕和皮肤颜色的永久性变化。

[0012] 整形外科手术(手术整容),放松脸部肌肉和使细纹消失的肉毒杆菌毒素的注射,增加体积以及拉平皱纹和褶皱的填料(由胶原或透明质酸和羟基磷灰石钙制成,或自体脂肪移植),加热和射频是提供老化处理很好的改善的另外的技术。这些改善持续几个月,然后它们必须重复以维持改善。再者,外科手术与组织再生过程相反,其仅作为美观的方法,而不具有皮肤回春的意义。

[0013] 化妆品中有:作用于抚平细纹和疤痕的表面的或更深的脱皮术(peel);作为温和的去角质剂的微晶磨皮术。这两种作用均与组织再生相反,大多是尝试通过阻挡最上面的皮层来改善皮肤凹陷。

[0014] 抗氧化剂提供防晒、中和负责胶原分解的自由基;通过该机制,抗氧化剂在预防皱纹形成的进一步恶化中可能非常重要。最后,保湿剂可以让皱纹看起来暂时不太突出,保持水润肌肤。

[0015] 总之,处理和预防皱纹形成的最好的产品应该在以下方面起作用:1)再生组织,主要是胶原,2)对抗氧化,3)保湿皮肤。

[0016] 临床和视觉评价(鼻唇沟和鱼尾纹水平上的皱纹级别、颧骨区域下垂、表面微起伏、皮肤暗沉和皮肤紧致),以及仪器评价,代表用于确定抗老化处理的功效所需要的方法(Grove GL等人,Optical Profilometry:an objective method for quantification of facial wrinkles J Am Acad Dermatol,21:631-637,1989)。鼻唇沟水平和眼睛周围区域上的皱纹,是通过两种参考的临床和照片量表,来确认是否存在皱纹和皱纹的等级来进行认定,将结果评分为0(无皱纹)至7(非常明显的皱纹)。类似地,根据临床照片量表,额下的下垂也被评分为0(无下垂-很规则的鸭蛋脸)至5(非常明显的下垂-极不规则的鸭蛋脸)(Monheit GD等人,Development and validation of a 6-point grading scale in patients undergoing correction of nasolabial folds with collagen implant.Dermatol Surg 2010;36:1809-1816)。基于照片量表,根据参考从1(非常规则)至4(非常不规则)的评分来评价脸颊以及表面微起伏。

[0017] 根据从1(具有光泽的皮肤)至4(非常不透明的皮肤)的评分来评价整个脸部的皮肤暗沉度;以及根据从0(非常重要)至4(非常弱)的评分来评价皮肤紧致度,即评估在脸颊(颧骨区域)水平,皮肤抗捏性、抗拉伸性和在捏后的恢复性。

[0018] 在现有技术中,啤酒花(Humulus lupulus)(通常称为酒花(hops))已知作为抗皱剂,尽管在一个非常高的含量使用,正如我们将在后文看到的。它是大麻科家族的一种植物种,是许多啤酒和其它酿造饮料的主要成分。酒花球果包含树脂苦味素(5-30%),主要是 α -苦味酸(葎草酮2-10%)和 β -苦味酸(蛇麻酮2-16%)和它们的氧化降解产物(2-甲基-3-丁烯-2-醇);多酚类缩合单宁(2-4%);挥发油(0.35-1.0%),主要是单萜和倍半萜(β -石

竹、法呢烯、葑草烯、 β -月桂烯);查尔酮(黄腐酚);黄酮(山奈酚、槲皮素、芦丁);酚酸;和氨基酸(Bradley,1992;Bruneton,1995;ESCOP,1997;Leung和Foster,1996;Newall等人,1996;Wichtl和Bisset,1994。对于药用目的,植物提取物是液体(例如,液体提取物和酊剂)、半固体(软提取物和油性树脂)或固体(干燥提取物)稠度的制剂,由它们的生产工艺(将被提取的草药的状态、溶剂、提取条件)和它们的规格定义。通过合适的方法(例如浸渍、渗滤),使用水、乙醇或其它符合药典的任何相关专题的合适的有机溶剂,来制备提取物。将被提取的草药可以经历预处理,例如,酶的失活、研磨或脱脂。(Ph.Eur.7.004/2008:0765)。

[0019] 酒花具有经久的草药使用历史,其中主要应用它们已知的对身体和精神的舒缓、镇静、滋补和平静作用(Schiller等人,Sedating effects of *Humulus lupulus* L. extracts, *Phytomedicine*.2006;13(8):535-41)。

[0020] W02007/085327A1公开了啤酒花提取物以低至避免任何雌激素前(pro-estrogenic)作用的啤酒花浓度预防绝经后妇女阴道干燥的阴道用途。在一篇论文中公开了啤酒花缓解皮肤老化迹象和导致皱纹不太明显或消失的作用,其中黄腐酚(从酒花植物中分离的黄酮类化合物之一)在两种不同的浓度(0.1%和1%)导致有效地改善皮肤结构和紧致度(Philips N等人,“Direct inhibition of elastase and matrixmetalloproteinases and stimulation of biosynthesis of fibrillar collagens,elastin,and fibrillins by xanthohumol”,*J Cosmet Sci*,2010,61(2):125-32)。黄腐酚代表啤酒花药物总含量的1%(Milligan SR等人,“The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop(*Humulus lupulus* L.)flavonoids”*J Clin Endocr Metab*,2000,85(12)4912-5),并且根据Philip文献的两种有效浓度非常高,而在抗皱霜中,简单地通过使用母酊剂或提取物不能够达到这样浓度。在所引用的现有技术中,为了达到对于皱纹的活性浓度,必须采用复杂而昂贵的提取方法。

[0021] 用来对抗皱纹的另一种成分是透明质酸。它是可在上皮和结缔组织中发现的人体的天然成分。它提供了三种主要的功能:保护关节之间的软骨免受机械损伤、保持它们水润和控制细胞迁移。它还可以在通过帮助白细胞对抗几种类型的感染来刺激免疫应答方面起到基本作用。由于其有效的生物水合性质及其再生性能,透明质酸被用作许多抗老化面霜和精华的主要成分,不过为了实质有效,其浓度必须要等于或高于0.1%(Pavicic T, Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment, *J Drugs Dermatol* 2011,10:990-1000)。

[0022] 乙醇是最常见的有机溶剂,被广泛用于家庭和工业中。通过使用乙醇或其它低分子量醇,即低级烷醇,如丙醇、异丙醇等获得类似的效果。由于乙醇和其它低级烷醇,具有通过使生物体的蛋白质变性和溶解它们的脂质而杀灭生物体的能力,能有效对抗许多细菌和真菌,因此被广泛用于直接暴露于人皮肤的产品中,如医疗湿巾和最常见的抗菌洗手液凝胶中。相反,乙醇以及丙醇或异丙醇,不被建议在针对皮肤回春/皱纹的组合物中使用,因为它们的脂质溶解作用和脱水作用可能会通过减薄和硬化皮肤而加剧皮肤老化和皱纹的出现。

发明内容

[0023] 现在已经令人惊讶地发现,当被应用于老化皮肤时,C₁-C₄烷醇如乙醇可以与啤酒花和透明质酸协同作用,并且由于胶原再生、抗氧化作用和保湿作用,而有助于获得抗老化作用。

[0024] 该协同组合的另一个优势是,其主成分处于非常低的浓度下,例如至多达到15重量%的啤酒花提取物时仍具有活性,因此含有较Philips N等人公开的低得多的黄腐酚剂量,避免了任何雌激素作用。类似地,所述组合在非常低浓度的透明质酸,至多达到5重量%下仍具有活性,节约了该成分的高成本。

[0025] 本发明的目的是一种含有与啤酒花提取物和透明质酸组合的C₁-C₄烷醇的组合物,及其作为人类皮肤的抗老化处理的用途。

[0026] 对于本发明的抗老化处理,低浓度的啤酒花与低浓度的透明质酸和C₁-C₄烷醇优选乙醇的组合以半固体或液体制剂的形式局部施用,该制剂可以为溶液、乳剂或混悬剂、霜剂、凝胶、精华和软膏的形式。它们通过直接应用于面部特别适合于获得抗老化作用。

[0027] 该啤酒花提取物可以是用新鲜的植物球果制得的液体、半固体或固体提取物,优选液体提取物,更优选酊剂,所谓的“母酊剂”(Ph.Eur.7.3,01/2012:2029)。可以通过于室温(优选20至25℃)将啤酒花的新鲜雌性球果浸渍于水和乙醇的溶液中20天至30天,获得该提取物。通常使用相对于乙醇重量比为35.0%至55.0%的水。

[0028] 啤酒花提取物可以0.1%至15%,优选0.2%至5%,更优选0.5%至2.5%的w/w浓度存在。

[0029] 透明质酸可以其本身或以药学上可接受的盐或酯的形式使用。药学上可接受的盐可以选自钠盐、钾盐、钙盐或与天然氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、蛋氨酸或天冬氨酸)形成的盐。药学上可接受的酯可以选自抗坏血酸透明质酸酯、棕榈酸透明质酸酯、透明质酸苄酯、丁酰基透明质酸酯钠、丁酰基/甲酰基透明质酸酯钠。

[0030] 优选的透明质酸的酯为丁酰基透明质酸酯钠、棕榈酸透明质酸酯和抗坏血酸透明质酸酯。

[0031] 透明质酸或其药学上可接受的盐或酯可以0.01%至5%,更优选0.025%至4%,最优选0.04%至2.0%的w/w浓度存在。

[0032] C₁-C₄烷醇可以0.5%至15.0%,更优选1.0%至10.0%,最优选3.0%至7.0%,甚至更加优选2.0%至6.0%的w/w浓度存在。其优选自乙醇、丙醇或异丙醇,其中乙醇是最优选的。

[0033] 药物组合物、医疗设备和化妆品可以根据常规技术制备,可以含有可接受的赋形剂、佐剂和/或载体,并且还可以含有(组合)具有互补性的或在任何情况下具有有益活性的一种或多种活性成分。

[0034] 可以与本发明目标的组合物组合使用的活性剂包括但不限于,保湿剂、润肤剂、抗氧化剂、和维生素;可以使用的赋形剂包括但不限于,湿润剂优选丙二醇、流变添加剂、乳化剂、润肤剂、防腐剂、渗透促进剂例如磷脂酰胆碱的脂质体囊泡;天然、合成和半合成聚合物和共聚物、硅酮衍生物、具有增稠和柔光效果(texturizing and soft-focus effects)的粉末和填充剂。

[0035] 优选的湿润剂丙二醇可以1%至50%,更优选2%至30%,最优选5%至20%的w/w浓度存在。

[0036] 优选的合成和半合成聚合物为被称为卡波姆的高分子量合成丙烯酸聚合物。术语卡波姆意指与聚烯基聚醚交联的丙烯酸均聚物。卡波姆具有吸附、保水和膨胀至其原体积的数倍的能力；其有助于将不溶性固体分散或悬浮于液体中。其还被用于阻止乳剂分离为其油和水的成分。卡波姆经常被用于控制化妆品和个人护理产品的稠度和流动性。

[0037] 卡波姆可以0.1%至2%，更优选0.25%至1.5%，最优选0.5%至1%的w/w浓度存在。

[0038] 根据本发明的组合物的例子包括：用于局部应用的霜、凝胶、软膏、溶液、乳剂、混悬剂。

[0039] 现在将通过以下实施例更全面地描述本发明的药物组合物和其用途。然而，应该注意只是以阐述的方式而非限制的方式提供这些实施例。

具体实施方式

[0040] 实施例1：

[0041] 以下列重量百分比(p.b.w.)(%)的组合物制备凝胶形式的制剂：

[0042]	丙二醇	12.00%
	变性乙醇	5.00%
	啤酒花水醇提取物	1.00%
	磷脂酰胆碱	0.85%
	卡波姆*	0.75%
	尼泊金甲酯钠	0.26%
	咪唑烷基脲	0.20%
	氢氧化钠	0.12%
	EDTA 二钠	0.10%
	透明质酸钠	0.05%
	尼泊金丙酯钠	0.03%
	维生素 E 醋酸酯	0.02%
	胆固醇	0.01%
	净化水	适量至 100.00%

[0043] *术语“卡波姆”意指与聚烯基聚醚交联的丙烯酸均聚物。

[0044] a)将下列成分溶解于净化水中(重量百分比)：丙二醇12%(重量百分比)-尼泊金甲酯钠0.26%-尼泊金丙酯钠0.03%-EDTA二钠0.10%-卡波姆0.75%。

[0045] b)将下列成分溶解于5%乙醇中(重量百分比)：维生素E醋酸酯0.02%-磷脂酰胆碱0.85%-胆固醇0.01%。

[0046] c)分别于60℃加热a)和b)并将其合并，用适当的涡轮混合器均质化；将化合物冷却至40℃并在温和搅拌下加入1%(重量百分比)啤酒花母酊剂；在总净化水的一部分中预

混合0.05%透明质酸钠,形成均质凝胶,将其在搅拌下加入化合物中。

[0047] d)将预混合于总净化水的一部分中的0.20%咪唑烷基脲和0.12%氢氧化钠在搅拌下顺序加入,并完全混合化合物,直至获得均质凝胶。

[0048] 比较实施例2

[0049] 为了通过生物学方法评价根据实施例1的组合物的协同活性,制备下述组合物:

[0050] 比较组合物2

[0051] 以下列重量百分比(%)的组合物制备凝胶形式的制剂:

[0052]	丙二醇	12.00%
	变性乙醇	5.00%
	磷脂酰胆碱	0.85%
	卡波姆*	0.75%
	尼泊金甲酯钠	0.26%
	咪唑烷基脲	0.20%
	氢氧化钠	0.12%
	EDTA 二钠	0.10%
	尼泊金丙酯钠	0.03%
	维生素 E 醋酸酯	0.02%
	胆固醇	0.01%
	净化水	适量至 100.00%

[0053] 比较组合物3

[0054] 以下列重量百分比(%)的组合物制备凝胶形式的制剂:

[0055]	丙二醇	12.00%
	变性乙醇	5.00%

	啤酒花水醇提取物	1.00%
	磷脂酰胆碱	0.85%
	卡波姆*	0.75%
	尼泊金甲酯钠	0.26%
	咪唑烷基脲	0.20%
[0056]	氢氧化钠	0.12%
	EDTA 二钠	0.10%
	尼泊金丙酯钠	0.03%
	维生素 E 醋酸酯	0.02%
	胆固醇	0.01%
	净化水	适量至 100.00%
[0057]	<u>比较组合物4</u>	
[0058]	以下列重量百分比(%)的组合物制备凝胶形式的制剂:	
	丙二醇	12.00%
	变性乙醇	5.00%
	磷脂酰胆碱	0.85%
	卡波姆*	0.75%
	尼泊金甲酯钠	0.26%
	咪唑烷基脲	0.20%
[0059]	氢氧化钠	0.12%
	EDTA 二钠	0.10%
	透明质酸钠	0.05%
	尼泊金丙酯钠	0.03%
	维生素 E 醋酸酯	0.02%
	胆固醇	0.01%
	净化水	适量至 100.00%
[0060]	<u>比较组合物5</u>	
[0061]	以下列重量百分比(%)的组合物制备凝胶形式的制剂:	
	丙二醇	12.00%
[0062]	啤酒花水醇提取物	1.00%
	磷脂酰胆碱	0.85%

	卡波姆*	0.75%
	尼泊金甲酯钠	0.26%
	咪唑烷基脲	0.20%
	氢氧化钠	0.12%
[0063]	EDTA 二钠	0.10%
	透明质酸钠	0.05%
	尼泊金丙酯钠	0.03%
	维生素 E 醋酸酯	0.02%
	胆固醇	0.01%
	净化水	适量至 100.00%

[0064] 与实施例1的组合物相比,比较组合物2不含酒花提取物和透明质酸,比较组合物3不含透明质酸,比较组合物4不含酒花提取物,最后,比较组合物5不含乙醇。根据实施例1的组合物是唯一含有酒花提取物、透明质酸和乙醇三者的组合物。

[0065] 实施例3

[0066] 为了测试根据实施例1的组合物对比实施例2的比较组合物2-5的不同抗氧化活性,在不同浓度(0.500-0.016mg/ml)下,在角质细胞于具有和不具有测试样品下,暴露于紫外光A(UVA)后,针对活性氧类(ROS)进行测试,通过中性红摄取(NRU)试验评价UVA应激后的细胞存活率:细胞存活分析使用具有和不具有测试样品的以单层培养的方式培养的人角质细胞。

[0067] 制备

[0068] 在伦理委员会的批准下,从预先计划的常规手术中,从小儿包皮获得人原代角质细胞。通过三次静置的孵育自真皮分离表皮,并将其胰蛋白酶化以产生单细胞悬浮液。

[0069] 在富含10%胎牛血清(v/v)和特定富集物(specific enrichments)的杜氏改良伊格尔培养基和哈姆F12培养基(Dulbecco's modified Eagle's and Ham's F12 media)(3:1)中培养角质细胞。

[0070] 这些细胞在培养中增殖直至形成细胞单层。在该研究中,将细胞接种于96孔板中,并在24小时内达到半融合(30,000细胞/孔)。一旦达到60-70%的融合,加入含有梯度稀释的测试样品的新鲜培养基。使用未处理的细胞作为阴性对照。在该阶段,使用不同稀释的测试化合物和对照处理细胞培养物以获得范围在0.5至0.016mg/ml的最终浓度。对于每个稀释,进行一式三份的测试。将产品溶解于培养基中。分别加入0.15mg/ml维生素C作为阳性对照。使用NRU分析检查部分细胞的存活率。然后将其余细胞暴露于4'(1J/cm²)、8'(2J/cm²)和12'(3J/cm²)。在暴露期结束时,考察细胞上清液中的ROS形成。在UVA暴露后和无UV暴露下确定细胞存活率。

[0071] 在将细胞暴露于测试样品之后,移除细胞培养基并在PBS中洗涤细胞。向每孔中加入二氯荧光黄(dichlorofluoresce)乙酸盐(DCA)溶液。DCA与培养基中的自由基反应,产生一种荧光衍生物,并且荧光计读数允许获得与细胞中ROS量有关的定量数据。

[0072] 如所描述的(Toxicol.Letters 1997-93:47-54),在合适的孵育后,弃去DCA溶液,然后细胞已经暴露于UVA辐射不同的时间并稍后不久在荧光计中读数。

[0073] NRU分析基于细胞吸收和结合中性红(NR)(一种活体染料)的能力。NRU是一种弱的阳离子染料,其通过非离子扩散机制渗透细胞膜,并且其累积在溶酶体中、在基质阴离子位点上。细胞膜和溶酶体膜的改变引起溶酶体脆弱和细胞中逐渐的不可逆的变化。由外源性物质诱导的这些变化,决定了NR摄取的下降,和与溶酶体连接性的下降。该方法能够区分活着的、损坏的或死亡的细胞。用梯度浓度的产品和中性红溶液(NR)孵育细胞。如果细胞膜损坏,则其将染料释放至培养基中。

[0074] 孵育后,用新鲜的培养基+NR培养基替换培养基,并于37℃孵育细胞4h。然后多次洗涤细胞以消除过量的染料废物,并在色度计中读数。

[0075] 以存活率表示结果:细胞存活率% = OD处理的细胞x 100/OD未处理的对照细胞。

[0076] 结果总结于表I,显示在亚毒性测试浓度(0.016mg/ml和0.031mg/ml),所研究的产品能够降低UVA应激(短时间暴露)后ROS的产生。

[0077] 表I

	组合物	mg/ml	4' UVA	8' UVA	12' UVA
	实施例 1	0.031	12.0	10.5	12.7
[0078]		0.016	<	14.0	19.4
	比较组合物 2	0.031	<	<	<
		0.016	<	<	<
	比较组合物 3	0.031	<	<	<
		0.016	<	13.6	11.7
	比较组合物 4	0.031	<	<	<
		0.016	12.8	11.2	<
	比较组合物 5	0.031	<	<	<
		0.016	<	<	<
	维生素 C	0.15	19.6	13.4	14.8

[0079] 选择<10%的ROS抑制为阈值,所测试产品的抗ROS作用相比于其它不含啤酒花、透明质酸和/或乙醇的制剂显示出优越性,甚至优于浓度高达测试产品10和5倍的对照(0.15mg/ml的维生素C)。

[0080] 实施例4

[0081] 为了测试根据实施例1的组合物对比实施例2的比较组合物2-5的不同胶原再生活性,通过接受测试组合物处理的人皮肤成纤维细胞中的胶原合成的体外评价,在不同浓度(2.50%、1.25%、0.63%)进行测试。通过比色分析测量从头合成(ex-novo synthesis)的胶原。

[0082] 制备

[0083] 在细胞培养基中稀释测试产品以达到被选定进行测试的最终浓度。用于初步细胞

毒性测试,于20%、10%、5%、2.50%、1.25%、0.63%和0.31%(w/v)测试产品。根据毒性数据($IC_{50}=6.79\%$,无细胞毒性),选择3种不同的无细胞毒性的浓度继续测试。所选定进行效力测试的浓度是2.50%、1.25%和0.63%(w/v)。细胞暴露于测试产品持续24和48小时。在每个实验时间结束时,测定新合成(neo-synthesis)的细胞外基质元素。

[0084] 通过定量染料结合法进行胶原合成的确定。该分析中使用的显色剂是天狼星红(直接红80)。这些基团与胶原的碱性氨基酸的侧链基团反应。在测定条件下,染料对胶原的特异性亲和力是由于拉长的染料分子变得与具有完整的三股螺旋构造的天然胶原的长链刚性的结构平行对齐(当胶原变性时,染料亲和力会大大降低)。通过使用已知的和增加的胶原浓度获得的标准曲线上的数据代入计算胶原浓度(20 μ l培养基中的 μ g)。该产品测试在所有测试浓度,在所有检测的实验时间,都在增加胶原合成的速度方面,得到相比于未处理的细胞(在用0.63%的研究产品处理48小时的细胞中的胶原含量,相比于未处理的细胞培养物中的胶原含量,二者之间的变化并不显著)和其它不含啤酒花、透明质酸和/或乙醇的制剂更为显著的效果。该增加有剂量依赖的趋势。结果总结于表II中。

[0085] 表II

[0086]

		胶原合成 %	
组合物	mg/ml	24h	48h
实施例 1	2.5%	56.2%	34.4%
	1.25%	76.7%	29.0%
	0.63%	43.6%	7.7%
比较组合物 2	2.5%	20.7%	48.9%
	1.25%	39.7%	20.0%
	0.63%	1.8%	12.3%
比较组合物 3	2.5%	17.1%	62.5%
	1.25%	21.3%	38.5%
	0.63%	0.8%	23.3%
比较组合物 4	2.5%	45.7%	22.2%
	1.25%	71.2%	15.2%
	0.63%	48.3%	11.8%
比较组合物 5	2.5%	13.9%	21.1%
	1.25%	9.2%	7.0%
	0.63%	8.1%	-1.4%