(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104007057 A
(43)申请公布日 2014.08.27

(21)申请号 201410054223.6

(22)申请日 2014.02.18

(30)优先权数据
2013-033567 2013.02.22 JP

(71)申请人 株式会社芳珂
地址 日本神奈川县横滨市中区山下町 89 番地 1

(72)发明人 石渡潮路 加藤惠美子 高桥美奈子

(74)专利代理机构 北京连和连知识产权代理有限公司 11278
代理人 王淑丽

(51)Int.Cl.
G01N 17/00(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
G01N 21/31(2006.01)
A61B 10/02(2006.01)

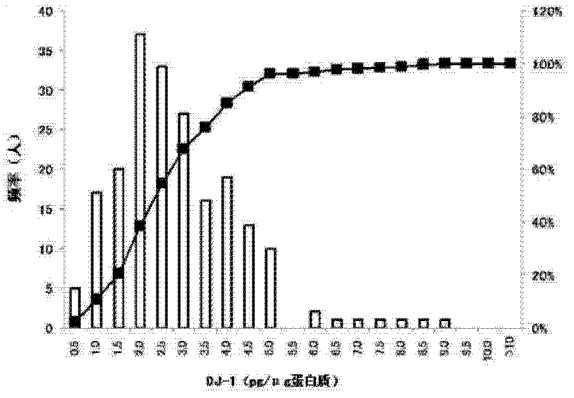
权利要求书1页 说明书10页 附图9页

(54)发明名称

皮肤应激蓄积量的评价方法

(57)摘要

本发明的课题在于提供一种使用生物化学指标的新颖的评价方法，其不会对使用者造成负担，可评价肌肤的应激蓄积量，并且可简便且确切地评价是否为敏感性肌肤。本发明通过胶带剥离法等采集皮肤角质层，并通过测定其中所含有的 DJ-1 表达量来评价应激蓄积量。



CN 104007057 A

1. 一种人类皮肤的应激蓄积量的评价方法，其特征在于，将皮肤角质层的 DJ-1 表达量与预先或同时测定的正常人类皮肤的 DJ-1 表达量进行对比。

2. 根据权利要求 1 所述的评价方法，其特征在于，具备下述工序：采集工序，采集受试者的评价对象部位的角质层；测定工序，测定所述采集工序所采集的角质层中的 DJ-1 表达量；和对比工序，将所述测定工序所测定的 DJ-1 表达量与具有健康肌肤者的所述评价对象部位角质层中的 DJ-1 表达量进行对比。

3. 根据权利要求 1 或 2 中所述的评价方法，其特征在于，具备下述工序：采集工序，采集受试者的评价对象部位的角质层；测定工序，测定所述采集工序所采集的角质层中的 DJ-1 表达量；和对比工序，将所述测定工序所测定的 DJ-1 表达量与样本组的所述评价对象部位角质层中的 DJ-1 表达量分布进行对比。

4. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的评价方法，其特征在于，采集皮肤角质层的工序通过胶带剥离法进行。

5. 根据权利要求 1 ～ 4 中任一项所述的评价方法，其特征在于，人类皮肤的应激蓄积量为紫外线损伤或氧化所导致的应激蓄积量。

皮肤应激蓄积量的评价方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人类皮肤的应激蓄积量的评价方法。

背景技术

[0002] 人类皮肤时常与外界接触并受到各种刺激。其刺激的代表性例子为紫外线。紫外线即使在未在外观上给肌肤造成太大变化的情况下，仍会诱发皮肤细胞的DNA断裂或胶原蛋白的变性等，而成为皮肤老化的原因，经常持续性地对肌肤造成应激。此外，对女性而言，洗脸、化妆等日常行为也会对皮肤造成刺激，这些刺激会作为潜在的应激而蓄积于肌肤。而且，对于这些刺激(应激)的抵抗力若因某种原因而减少时，即认为是敏感性肌肤。此种紫外线或氧化等导致的皮肤外界刺激的蓄积量在本发明中称为皮肤的应激蓄积量。另一方面，敏感性肌肤是指虽无明显的皮肤病变但容易导致不利、有害反应的肌肤。而且，作为此种敏感性肌肤的原因，据说是由于当应激的蓄积达到一定程度，肌肤的敏感性就会提高。此外，敏感性肌肤对外界刺激的抵抗力较健康肌肤低，可谓容易产生皮肤问题的肌肤。近年来，意识到敏感性肌肤的女性有增加的趋势，在化妆品等方面也越来越期望有刺激更小的产品。

[0003] 在化妆品的销售现场，由美容专家进行问诊并评价肌肤应激的蓄积状况和是否为敏感性肌肤，从而选择对肌肤造成应激(刺激)较小的化妆品。然而，近年来由于邮购销售等化妆品专家不在场的销售方法逐渐普及，因此，期望可判定肌肤的应激状态，并且即使不是专家也能简便地评价敏感性肌肤的程度。若此可行，即使不依靠专家的问诊，也可通过评价使用者肌肤的应激状态和是否为敏感性肌肤来自行选择适合的化妆品。此外，可简单地选择更适合使用者肌肤的化妆品、化学焕肤(chemical peeling)剂，据此，可避免皮肤的炎症等的肌肤问题、副作用，而且可更加提高化妆品带来的护肤作用、化学焕肤的施行等的有益性。如上所述，人们正在寻求一种方法，即使不依靠美容专家的问诊也能评价皮肤的外界刺激暴露过程(肌肤应激的蓄积量)，并且客观地判别是否为敏感性肌肤。

[0004] 在专利文献1中公开了以下方法，在皮肤上涂布化妆品，然后将剥离出的皮肤角质层回收并进行观察以评价皮肤的敏感性。然而，该方法需对每种化妆品全都进行检查，此外，无法评价使用者肌肤的应激蓄积量。

[0005] 在专利文献2中公开了以下方法，在皮肤上涂布如辣椒素酯类物质(Capsinoids)的刺激性物质来评价是否为敏感性肌肤。然而，使用如辣椒素酯类物质的刺激性强的物质的试验方法对受试者来说也并不优选。

[0006] 在专利文献3中公开了以下方法，测定脸部角质层的钙卫蛋白(calprotectin)存在量来评价是否为敏感性肌肤。

[0007] 本申请人发现具有抗氧化作用的DJ-1蛋白质(别名PARK-7蛋白质)作为特应性皮炎标记物有用故而提出了专利申请(专利文献4)。另一方面，近年来逐渐表明该DJ-1蛋白质可作为各种疾病的标记物来利用。专利文献4公开了特异性识别氧化型DJ-1蛋白质的抗体。其次，提出了通过使用该抗体测定氧化型DJ-1来诊断阿尔茨海默病、帕金森病的方法。此外，专利文献5公开了通过测定脑脊液、血液等的DJ-1蛋白质来诊断脑损伤性疾病

的方法。此外，专利文献 6 提出了通过测定 DJ-1 蛋白质来诊断糖尿病性视网膜病的方法和试剂。

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献 1 ：日本特开平 10-295648 号公报

[0010] 专利文献 2 ：日本特开 2005-296007 号公报

[0011] 专利文献 3 ：日本专利第 4469762 号公报

[0012] 专利文献 4 ：WO2007 / 046463 号公报

[0013] 专利文献 5 ：日本特表 2007-506086 号公报

[0014] 专利文献 6 ：日本特开 2009-168819 号公报

发明内容

[0015] 如上所述，期望有评价紫外线或氧化等导致的肌肤应激的蓄积量并客观地评价是否为敏感性肌肤的方法。优选该评价方法并非以外科方式取出皮肤或对皮肤造成刺激等的给使用者造成负担的方法。本发明的课题在于提供不会对使用者造成负担，且可评价肌肤的应激蓄积量的使用生物化学指标的新颖的评价方法。

[0016] 本发明由以下内容构成。

[0017] （1）一种人类皮肤的应激蓄积量的评价方法，其特征在于，将皮肤角质层的 DJ-1 表达量与预先或同时测定的正常人类皮肤的 DJ-1 表达量进行对比。

[0018] （2）根据（1）所述的评价方法，其特征在于，具备下述工序 ：采集工序，采集受试者的评价对象部位的角质层 ；测定工序，测定所述采集工序所采集的角质层中的 DJ-1 表达量 ；和对比工序，将所述测定工序所测定的 DJ-1 表达量与具有健康肌肤者的所述评价对象部位角质层中的 DJ-1 表达量进行对比。

[0019] （3）根据（1）或（2）中所述的评价方法，其特征在于，具备下述工序 ：采集工序，采集受试者的评价对象部位的角质层 ；测定工序，测定所述采集工序所采集的角质层中的 DJ-1 表达量 ；和对比工序，将所述测定工序所测定的 DJ-1 表达量与样本组的所述评价对象部位角质层中的 DJ-1 表达量分布进行对比。

[0020] （4）根据（1）～（3）中任一项所述的评价方法，其特征在于，采集皮肤角质层的工序通过胶带剥离法进行。

[0021] （5）根据（1）～（4）中任一项所述的评价方法，其特征在于，人类皮肤的应激蓄积量为紫外线损伤或氧化所导致的应激蓄积量。

[0022] 根据本发明的评价方法，可通过测定角质层中的 DJ-1 表达量来评价肌肤的应激蓄积量。进而，由于本发明的评价方法以胶带剥离法等简便的操作方法来采集评价试样，所以受试者的负担较少且任何人均可简便地进行评价。此外，因为其为生物化学的试验方法，由任何人进行测定皆可得到相同的结果，因此不需要如以往一样通过与专家面谈的方式进行咨询。

附图说明

[0023] 图 1 为表示 HaCaT 细胞负荷过氧化氢所导致的氧化应激且测定细胞内蛋白量的结果的图。

[0024] 图 2 为表示 HaCaT 细胞负荷过氧化氢所导致的氧化应激且测定细胞内 DJ-1 量的结果的图。

[0025] 图 3 为表示测定 HaCaT 细胞负荷过氧化氢所导致的氧化应激时的释放到培养液中的 DJ-1 量的结果的图。

[0026] 图 4 为研究对 BSO 所导致的蛋白生成产生影响的图。

[0027] 图 5 为研究 BSO 所导致的培养人表皮角化细胞的谷胱甘肽生成浓度的图。

[0028] 图 6 为表示负荷谷胱甘肽生成抑制剂即 BSO 与过氧化氢所导致的应激的人表皮角化细胞分泌到细胞培养液中的 LDH 量的图。

[0029] 图 7 为表示负荷谷胱甘肽生成抑制剂即 BSO 与过氧化氢所导致的应激的人表皮角化细胞的细胞内蛋白量的图。

[0030] 图 8 为表示负荷谷胱甘肽生成抑制剂即 BSO 与过氧化氢所导致的应激的人表皮角化细胞的细胞内 DJ-1 量的图。

[0031] 图 9 为表示负荷谷胱甘肽生成抑制剂即 BSO 与过氧化氢所导致的应激的人表皮角化细胞分泌到细胞培养液中的 DJ-1 量的图。

[0032] 图 10 为表示培养人表皮角化细胞照射 UVB24 小时后的细胞内蛋白量且表示根据 UVB 照射量的蛋白量减少的图。

[0033] 图 11 为表示培养人表皮角化细胞照射 UVB24 小时后的细胞内 DJ-1 量且表示根据 UVB 照射量的 DJ-1 量增加的图。

[0034] 图 12 为表示培养人表皮角化细胞照射 UVB24 小时后的培养上清中的 DJ-1 量且表示根据 UVB 照射量的 DJ-1 量增加的图。

[0035] 图 13 为表示人背部照射 UVB（应激负荷）后的 DJ-1 的测定结果且意味着照射所导致的应激持续残留于皮肤角质层的图。

[0036] 图 14 为表示肌质的问卷调查结果与相对应的 DJ-1 量的图。

[0037] 图 15 为表示习惯性地照射紫外线经历的问卷调查结果与相对应的 DJ-1 量的图。

[0038] 图 16 为表示随机抽选的 205 名女性的皮肤 DJ-1 分布的图。柱状图表示 DJ-1 的单位角质层蛋白的浓度及人数。折线图表示其人数的累计。

具体实施方式

[0039] 以下，关于本发明进行详细说明。

[0040] 本发明评价方法的特征在于以皮肤角质层中的 DJ-1 的存在量为指标。

[0041] DJ-1 是分子质量为 21kDa 的细胞内蛋白质。如上所述，其被鉴定为与帕金森病有关的蛋白质，之后表明其与皮肤创伤愈合过程中的再上皮化（re-epithelialization）有关。此外，从其立体结构提示也可作为蛋白酶发挥作用。

[0042] 本发明使用敏感性肌肤、健康肌肤这样的用语。敏感性肌肤是指虽无明显的皮肤病变但容易导致不利、有害反应的肌肤。此外，其对外界刺激的抵抗力较健康肌肤低，也可谓容易产生斑疹、肌肤粗糙等皮肤问题的肌肤。另一方面，健康肌肤是指不会表现出如上所述的敏感性肌肤性质的健康且正常的肌肤。

[0043] 此外，角质层是指位于皮肤最上层的组织。角质层具有保护皮肤不受来自体外的异物、刺激的作用。

[0044] 本发明中的评价对象部位只要是可得到角质层的部分，则可包含任意部位，作为主要的部位，可列举面部、颈部、上臂部，根据以往的方法可得到来自这些部位的皮肤的角质层。但是，如前所述，由于外科摘取皮肤等的方法会给使用者造成负担，故优选胶带剥离、摩擦等可简便地得到角质层的方法。

[0045] 如此准备的各试样中的DJ-1表达量可通过以往已知的方法进行测定。例如，基于与DJ-1的抗体的反应，可使用酶免疫分析法、放射免疫分析法、蛋白质印迹法等的方法。

[0046] 将DJ-1从各试样用其自身已知的生物化学方法，例如通过冻融法、超声波破碎法、匀浆法等来制备可溶性组分，并在提取后快速测定。

[0047] 由于蓄积了应激的肌肤或敏感性肌肤的角质层中的DJ-1表达量显著较健康肌肤高，因此以角质层中的DJ-1表达量的多少为指标，可简便地评价应激蓄积量或肌肤是否为敏感性肌肤。本发明所使用的角质层可通过胶带剥离法等使用角质胶带仅采集角质层表层部分的简单的方法进行采集。此外，本发明可不对皮肤造成紫外线或化学物质等的刺激来测定DJ-1的表达量。因此，可不对使用者造成负担来评价使用者肌肤的应激蓄积量。特别是可简单地选择更适合使用者肌肤的化妆品或化学焕肤剂，据此，可避免皮肤的炎症等肌肤问题或副作用，并进一步发挥化妆品带来的护肤作用。

[0048] 本发明的评价方法由下述工序构成：采集工序，采集角质层；测定工序，测定所述采集工序所采集的角质层中的DJ-1表达量；和对比工序，将所述测定工序所测定的DJ-1表达量与健康肌肤角质层中的DJ-1表达量进行对比。此外，本发明的评价方法由下述工序构成：采集工序，采集角质层；测定工序，测定所述采集工序所采集的角质层中的DJ-1表达量；和对比工序，将所述测定工序所测定的DJ-1表达量与样本组角质层中的DJ-1表达量分布进行对比。以下，对该评价方法进行说明。

[0049] 首先，将上述所测定的DJ-1表达量与健康肌肤角质层中的DJ-1表达量进行对比。此外，也可测定受试者的某一评价对象部位角质层中的DJ-1表达量，再将所测定的DJ-1表达量与具有健康肌肤者的同一评价对象部位角质层中的DJ-1表达量进行对比。通过使用来自多名具有健康肌肤者的数据平均值，可更为客观地评价具有健康肌肤者的角质层的DJ-1表达量。

[0050] 或者，也可测定受试者的某一评价对象部位角质层中的DJ-1表达量，再将所测定的DJ-1表达量与样本组的同一评价对象部位角质层中的DJ-1表达量分布进行对比。通过使用样本组的DJ-1表达量分布可更为客观地进行评价。

[0051] 如此对比后的结果为，当所测定的DJ-1表达量显著较健康肌肤的DJ-1表达量大时，或是相较于样本组的DJ-1表达量分布而判断为DJ-1表达量大时，即可评价为应激的蓄积大。该健康肌肤的试样可从测定DJ-1者采集，也可从与测定DJ-1者的不同者采集。此外，该样本组优选以统计上有效的规模来进行随机抽取，但也优选根据不同目的例如按照性别、年龄来抽取样本组。

[0052] 此外，当受试者的某一评价对象部位角质层中的DJ-1表达量显著较具有健康肌肤者的同一评价对象部位角质层中的DJ-1表达量大时，或是相较于样本组的同一评价对象部位角质层中的DJ-1表达量分布而判断为DJ-1表达量大时，也评价为应激的蓄积大。此外，当该数值显著高时则评价为具有敏感性肌肤。

[0053] 即，可根据所测定的DJ-1表达量的程度来评价应激蓄积的程度。当所测定的DJ-1

表达量相较于健康肌肤或者样本组的表达量分布而被判断为显著多时，该肌肤表现出较强的敏感性肌肤的性质，并且其对外界刺激的抵抗力相较于健康肌肤或样本组的平均值而显著低，极易发生皮肤问题的可能性高。

[0054] 通过试验例、实施例对本发明进行说明。且本发明不限定于下述实施例。

[0055] 实施例

[0056] 试验例 1

[0057] 测定氧化应激所导致的来自皮肤细胞中的 DJ-1 量的变化。制作用于确认 DJ-1 功能的敲低了 DJ-1 基因的细胞，并进行氧化应激负荷试验。

[0058] 使用来自人细胞株即 HaCaT 细胞（J.Cell Biol.106:761-771(1988).）（购自 DKFZ(Deutsches Krebsforschungszentrum)），确认氧化应激与 DJ-1 蛋白的关系。此外，通过 siRNA 抑制 DJ-1 基因的表达（敲低），确认 DJ-1 蛋白表达量的变化。

[0059] （1）HaCaT 细胞培养及过氧化氢（H_2O_2）处理所导致的氧化应激的负荷及 siRNA 处理导致的 DJ-1 基因的敲低操作

[0060] 将 HaCaT 细胞用 PBS(-) 洗涤后，通过胰蛋白酶处理剥离细胞，以 1200rpm 离心 3min 得到细胞。使用含 10%FBS 的 DMEM 培养基进行培养，以 5000cells/cm^2 的密度接种到培养瓶中，每隔 2 ～ 3 天在亚融合（subconfluent）的状态下进行传代。

[0061] 将 HaCaT 细胞用含 10%FBS 的 DMEM 培养基以 2.1×10^5cells/well 接种到 12 孔板中并培养 24 小时后，将 siRNA（终浓度 3nM、Hs_PARK7_6FlexiTube siRNA,SI02662107,Qiagen 公司制）、转染试剂（2μl/well、HiPerFect Transfection Reagent,301707,Qiagen 公司制）与所述培养基混合，在室温下放置 10 分钟。接着添加 100μl/well 的该混合液。未处理的细胞作为对照。

[0062] 另外，作为敲低操作的阴性对照，使用 AllStars 阴性对照 siRNA（Qiagen 公司制）进行同样的操作。

[0063] 培养 48 小时后，添加 H_2O_2（Wako 制）0、250、500、750、1000μM，24 小时后回收培养上清，将细胞用 PBS(-) 洗涤后，添加 100μl/well 的细胞裂解液（50mM Tris-HCl,1mM Na_3VO_4,0.4%NP-40,120mM NaCl），从而得到细胞溶解液。

[0064] （2）细胞蛋白量的测定

[0065] 使用 BCA protein kit（Thermo Scientific 公司制）测定细胞溶解液的蛋白量。根据试剂盒实验指南进行测定。

[0066] （3）DJ-1 表达量的测定

[0067] 使用 DouSet Park7/DJ-1ELISA kit（R&D 公司制）测定上清中及细胞溶解液中的 DJ-1 量。根据试剂盒实验指南进行测定。

[0068] （4）结果

[0069] 过氧化氢（H_2O_2）所导致的应激负荷的各细胞的细胞蛋白量如图 1 所示。另外，培养上清中的 DJ-1 量、细胞溶解液（细胞内）的 DJ-1 量分别如图 2、图 3 所示。且测定结果用每 3 个孔的平均值 ± 标准偏差（S.D.）表示。

[0070] H_2O_2 浓度依赖性地使细胞内蛋白量减少。

[0071] 另外，可确认 H_2O_2 作为强的应激而对细胞造成影响。

[0072] 进而，培养液的 H_2O_2 浓度在 750μM 的条件下，用 DJ-1siRNA 处理后的敲低细胞与

阴性对照相比，细胞内蛋白量显著减少。(图 1)。

[0073] 无论在哪种细胞中，当培养液中的 H_2O_2 浓度为 1000μM 时，细胞中的 DJ-1 量均增加。

[0074] 另一方面，培养液中的 H_2O_2 浓度低时培养上清中的 DJ-1 量也增加。

[0075] 可确认过氧化氢所导致的氧化应激在细胞内外均使 DJ-1 增加(图 2、3)。

[0076] 进而，无论培养液中是否有 H_2O_2，阴性对照的细胞(非敲低细胞)与对照相比细胞内 DJ-1 量均增加。认为这是转染处理所产生的影响。

[0077] 通过 DJ-1siRNA 处理，细胞中的 DJ-1 量与阴性对照相比降低约 40%。

[0078] 从以上的试验可知，在来自人类皮肤的 HaCaT 细胞中，为了应对应激而生成 DJ-1，其生成量因 siRNA 干扰而被抑制。

[0079] 试验例 2

[0080] 根据试验例 1 可确认 DJ-1 基因为了应对应激而表达 DJ-1。接着，使用人表皮角化细胞(角质形成细胞)初代培养细胞，测定氧化应激所导致的 DJ-1 量的变化。另外，测定如下角化细胞的 DJ-1 量的变化，即改善氧化所导致的细胞损伤的谷胱甘肽生成能力降低且应激抵抗力降低的角化细胞。

[0081] (1)谷胱甘肽合成抑制剂所导致的氧化应激抵抗力降低的细胞的制作

[0082] 将人表皮角化细胞(Lonza 公司)用 PBS(-) 洗涤后，通过胰蛋白酶处理剥离细胞，以 1200rpm 离心 3min 得到细胞。使用 EpiLife 培养基(Life Technologies)进行培养，以 5000 ～ 7000cells/cm^2 的密度接种到培养瓶中，每隔 4 ～ 7 天在亚融合的状态下进行传代。

[0083] 将人表皮角化细胞以 1×10^5cells/35mm dish 接种到 EpiLife 培养基(Gibco 公司)中，培养至成为约 5 成的细胞密度。

[0084] 使用谷胱甘肽合成抑制剂 L-Buthionine-sulfoximine (BSO:Sigma-Aldrich 公司)，确定首先导致谷胱甘肽合成抑制的最适 BSO 浓度。

[0085] 将 BSO 添加到细胞培养液中，24 小时后用胰蛋白酶处理细胞并回收，进行谷胱甘肽测定。将检测不到谷胱甘肽的 BSO 浓度作为接下来的氧化应激试验条件。

[0086] (2)过氧化氢(H_2O_2)所导致的氧化应激负荷试验的实施

[0087] 将人表皮角化细胞(Gibco 公司)以 1×10^5cells/35mm dish 接种到 EpiLife 培养基(Gibco 公司)中，培养至成为约 5 成的细胞密度。接着，添加 BSO 使成为上述(1)所确定的 BSO 浓度(50μM 或 100μM)，进一步经过 24 小时后，添加过氧化氢使成为 0、0.5、1mM。添加过氧化氢后进一步培养 24 小时，回收培养上清。另外，将细胞用 PBS(-) 洗涤后用 100μl 细胞裂解液进行回收。

[0088] 使用所得到的培养上清及细胞测定 LDH (乳酸脱氢酶)量、蛋白量、DJ-1 量。

[0089] (3)蛋白定量

[0090] 使用 BCA protein kit (Thermo Scientific 公司制)测定细胞溶解液的蛋白量。

[0091] (4)LDH 的测定

[0092] 使用 Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH)(Roche Applied Science 公司)测定培养上清中的 LDH。根据试剂盒实验指南进行测定，用 490nm 处的吸光度表示。

[0093] (5)DJ-1 表达量的测定

[0094] 使用 DuoSet Park7/DJ-1ELISA kit (R&D 公司制)测定上清中及细胞溶解液中的

DJ-1 量。根据试剂盒实验指南进行测定。

[0095] (6)谷胱甘肽测定

[0096] 将通过胰蛋白酶处理回收的细胞用PBS(-)洗涤，用100μl的MES buffer再混悬。通过超声波处理1分钟作为细胞溶解液，使用Gluthathione Assay Kit(Cayman Chemical公司)测定谷胱甘肽量。根据试剂盒实验指南进行测定。

[0097] (7)结果

[0098] 添加了BSO的细胞中的蛋白量如图4所示，谷胱甘肽量如图5所示。

[0099] 另外，添加过氧化氢所导致的应激负荷的细胞培养上清中的LDH量如图6所示，DJ-1量如图7所示。

[0100] 另外同样地，细胞中的蛋白量如图8所示，DJ-1量如图9所示。

[0101] 表明对蛋白质生成没有影响且抑制谷胱甘肽生成的BSO浓度为50μM或100μM。其次，表明在该浓度下谷胱甘肽生成被抑制的细胞因过氧化氢导致的氧化应激而使LDH的释放被促进(图6)、蛋白质量减少(图7)。

[0102] 另外，可确认DJ-1也依赖于过氧化氢的浓度而上升(图8、图9)。

[0103] 从以上的试验例1、试验例2的结果表明，DJ-1反映了伴随人表皮氧化的应激，其生成量受谷胱甘肽生成能力、基因干扰导致的复制低下的影响。另外，可知越是没有氧化应激抵抗力的细胞越是生成DJ-1。即，判断为细胞的抵抗力降低时DJ-1增加。

[0104] 试验例3

[0105] 与试验例2同样，使用人表皮角化细胞(角质形成细胞)初代培养细胞，测定紫外线照射所导致的DJ-1量的变化。

[0106] (1)人表皮角化细胞的培养及紫外线的照射方法

[0107] 将人表皮角化细胞(Gibco公司)以1×10^5cells/35mm dish接种到EpiLife培养基(Gibco公司)中，在培养第3天将细胞用PBS(-)洗涤后加入1ml PBS(-)，使用三共电气制的灯，将UVB以0.2mW/cm^2的强度照射10、20、30mJ/cm^2。照射后更换成培养基，培养24小时后回收培养上清，将细胞用200μl细胞裂解液回收，与试验例1、试验例2同样地进行蛋白定量、DJ-1量的测定。

[0108] (2)结果

[0109] 培养上清中的蛋白量如图10所示。另外，培养细胞中的DJ-1量如图11所示，上清中的DJ-1量如图12所示。

[0110] 人表皮角化细胞照射UVB，24小时后的DJ-1量依赖于UVB的照射光线量而受到损伤且蛋白量减少。另一方面，细胞内、细胞外的DJ-1量均增加，尤其是培养上清中的增加量较大。

[0111] 根据以上的试验例1～3，表明人表皮角化细胞的DJ-1值反映了应激的水平。

[0112] 试验例4

[0113] 由于试验例1～3表明在人表皮角化细胞中DJ-1反映了应激，所以对是否反映人实际的皮肤应激进行试验。即作为应激对人类皮肤直接照射紫外线，从而观察、测定DJ-1表达量的变化。

[0114] (1)试验方法

[0115] ＜紫外线照射＞

[0116] 具有健康肌肤的10名男性的背部使用紫外线照射装置(DERMARAY、Terumo Clinical Supply Co.,Ltd.制),照射20、40、60、80、100mJ/cm^{2}紫外线。根据照射次日的红斑确定最小红斑量(Minimum Erythema Dose:MED)。使用该值在背部照射相当于0、0.5、1.0MED的紫外线,且在照射7、14天后使用角质层测试片(ASAHIBIOMED公司)通过胶带剥离法采集角质层。

[0117] <角质层中DJ-1测定>

[0118] 在放入了玻璃珠与500μl T-PER缓冲液(Thermo scientific公司)的试管中,放入采集了角质层的角质层测试片,用漩涡混匀器振荡25分钟来提取角质层蛋白。各样品的蛋白量用BCA protein Assay Kit (Thermo Scientific公司)进行测定。测定为在10μl角质层样品中加入200μl按照试剂A:试剂B=50:1混和的液体,在60℃孵育30分钟后,测定562nm处的吸光度。同时,用牛血清白蛋白(BSA)制作标准曲线。从该标准曲线与吸光度的值计算蛋白量。

[0119] 角质层提取液中所包含的DJ-1量使用Human Park7/DJ-1DuoSet (R&D systems公司)进行定量。

[0120] (2)结果

[0121] 单位蛋白的DJ-1测定结果如图13所示。紫外线照射7、14天后与非照射部位相比,照射0.5、1.0MED紫外线的部位角质层中DJ-1量显著增加。

[0122] 表明通过测定DJ-1可确认人类皮肤应激的状态。

[0123] 试验例5

[0124] 由于试验例1～3表明了在人表皮角化细胞中DJ-1反映了应激,所以对是否反映人实际的皮肤应激进行试验。即通过调查问卷对肌质(敏感性)进行提问,并对比其回答与脸颊中DJ-1量。

[0125] (1)试验方法

[0126] <调查问卷>

[0127] 对具有健康肌肤的575名女性关于肌质(敏感性)进行提问,使其回答“不敏感”、“稍敏感”、“敏感”中的任一种。

[0128] <角质层采集>

[0129] 从做了调查问卷的具有健康肌肤的575名女性的脸颊部使用角质层测试片(ASAHIBIOMED公司)通过胶带剥离法采集角质层。

[0130] <角质层中DJ-1测定>

[0131] 在放入了玻璃珠与500μl T-PER缓冲液(Thermo scientific公司)的试管中,放入采集了角质层的角质层测试片,用漩涡混匀器振荡25分钟来提取角质层蛋白。各样品的蛋白量用BCA protein Assay Kit (Thermo Scientific公司)进行测定。测定为在10μl角质层样品中加入200μl按照试剂A:试剂B=50:1混和的液体,在60℃孵育30分钟后,测定562nm处的吸光度。同时,用牛血清白蛋白(BSA)制作标准曲线。从该标准曲线与吸光度的值计算蛋白量。

[0132] 角质层提取液中所包含的DJ-1量使用Human Park7/DJ-1DuoSet (R&D systems公司)进行定量。

[0133] (2)结果

[0134] 调查问卷的结果如下，非敏感：281 名、稍敏感：193 名、敏感：101 名。每位调查问卷回答者的单位蛋白的 DJ-1 测定结果如图 14 所示。可知越敏感 DJ-1 量越高。

[0135] 试验例 6

[0136] 由于试验例 1 ～ 3 表明了在人皮肤角化细胞中 DJ-1 反映了应激，所以对是否反映人实际的皮肤应激进行试验。即通过调查问卷进行如下提问，以往是否有海上运动等习惯性地照射紫外线的经历，并对比其回答与脸颊中 DJ-1 量。

[0137] (1) 试验方法

[0138] ＜调查问卷＞

[0139] 对具有健康肌肤的 386 名女性进行如下提问，以往是否有海上运动等习惯性地照射紫外线的经历，使其回答“无”、“有”中的任一种。

[0140] ＜角质层采集＞

[0141] 从做了调查问卷的具有健康肌肤的 386 名女性的脸颊部使用角质层测试片 (ASAHIBIOMED 公司) 通过胶带剥离法采集角质层。

[0142] ＜角质层中 DJ-1 测定＞

[0143] 在放入了玻璃珠与 500μl T-PER 缓冲液 (Thermo scientific 公司) 的试管中，放入采集了角质层的角质层测试片，用漩涡混匀器振荡 25 分钟来提取角质层蛋白。各样品的蛋白量用 BCA protein Assay Kit (Thermo Scientific 公司) 进行测定。测定为在 10μl 角质层样品中加入 200μl 按照试剂 A: 试剂 B=50:1 混和的液体，在 60℃孵育 30 分钟后，测定 562nm 处的吸光度。同时，用牛血清白蛋白 (BSA) 制作标准曲线。从该标准曲线与吸光度的值计算蛋白量。

[0144] 角质层提取液中所包含的 DJ-1 量使用 Human Park7/DJ-1DuoSet (R&D systems 公司) 进行定量。

[0145] (2) 结果

[0146] 调查问卷的结果如下，无：223 名、有：163 名。每位调查问卷回答者的单位蛋白的 DJ-1 测定结果如图 15 所示。可知越是具有习惯性地照射紫外线经历的回答者 DJ-1 量越高。

[0147] 试验例 7

[0148] 为了掌握人类皮肤的应激蓄积状态，以大量受试者为对象来测定角质层的 DJ-1。

[0149] (1) 试验方法

[0150] 1) 试验试样的采集

[0151] 将随机抽选的 205 名女性作为对象，从脸颊通过胶带剥离法采集角质层样品。样品为 1 个部位采集 1 枚

[0152] 2) 皮肤角质层中 DJ-1 测定方法

[0153] 通过与试验例 4 同样的方法进行。

[0154] 在放入了玻璃珠与 500μl T-PER 缓冲液 (Thermo scientific 公司) 的试管中，放入采集了角质层的角质层测试片，用漩涡混匀器振荡 25 分钟来提取角质层蛋白。各样品的蛋白量用 Pierce BCA protein Assay Kit (Thermo Scientific 公司) 进行测定。测定为在 10μl 角质层样品中加入 200μl 按照试剂 A: 试剂 B=50:1 混和的液体，在 60℃孵育 30 分钟后，测定 562nm 处的吸光度。同时，用牛血清白蛋白 (BSA) 制作标准曲线。从该标准曲

线与吸光度的值计算蛋白量。

[0155] 角质层提取液中所包含的DJ-1量使用Human Park7/DJ-1DuoSet（R&D systems,DY3995E）进行定量。

[0156] （2）结果

[0157] 测定结果如图16所示。

[0158] 如图16所示，DJ-1的表达量分布于从0.3pg/μg总蛋白质到超过5.0pg/μg总蛋白质的值为止的大范围。平均值为2.6pg/μg总蛋白质。与该频率分布相比而判断为DJ-1的表达量大的标准可自由地进行设定，例如，将平均值为2.6pg/μg总蛋白质以上的值判断为DJ-1的表达量大。或者，由于2.3pg/μg总蛋白质的累积频率为约50％，所以也可将超过2.3pg/μg总蛋白质的值判断为DJ-1的表达量大。其次，可判断为DJ-1的表达量越大则人类皮肤的应激蓄积量越大。

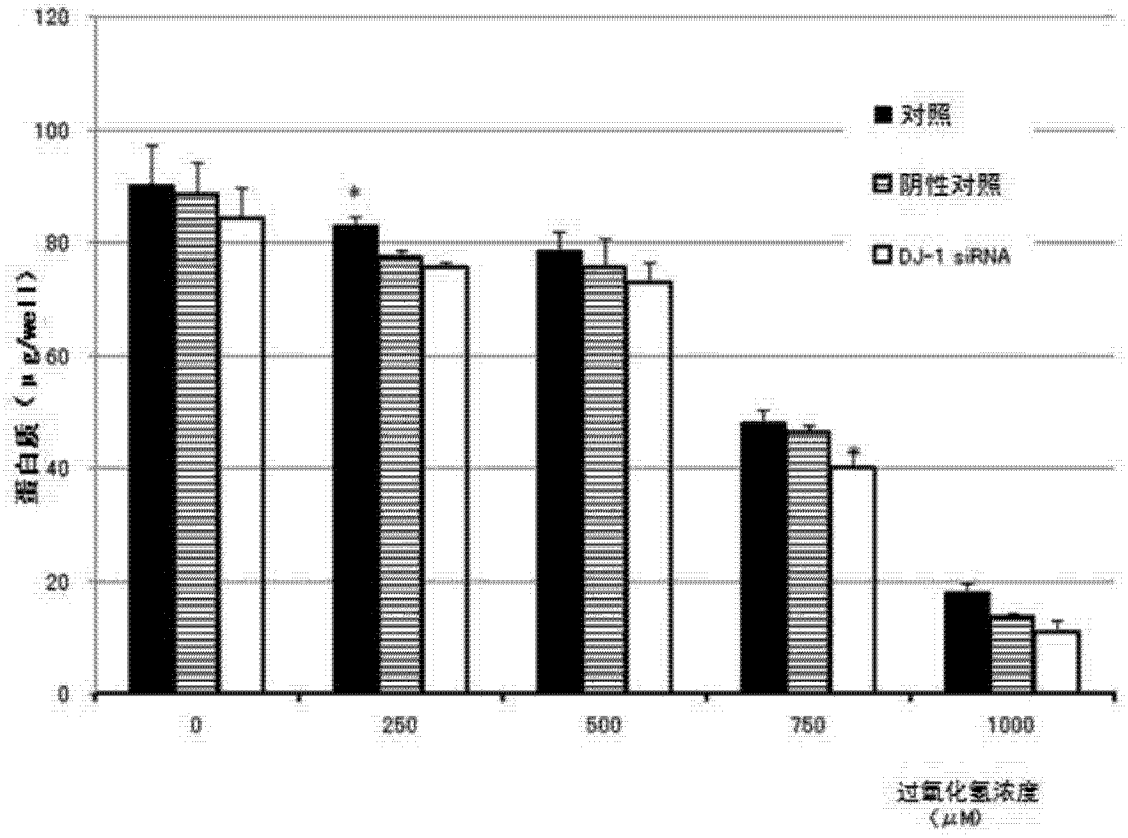

120
100
80
60
40
20
0
蛋白质（μg/well）
对照
阴性对照
DJ-1 siRNA
*
*
0
250
500
750
1000
过氧化氢浓度
（μM）

图 1

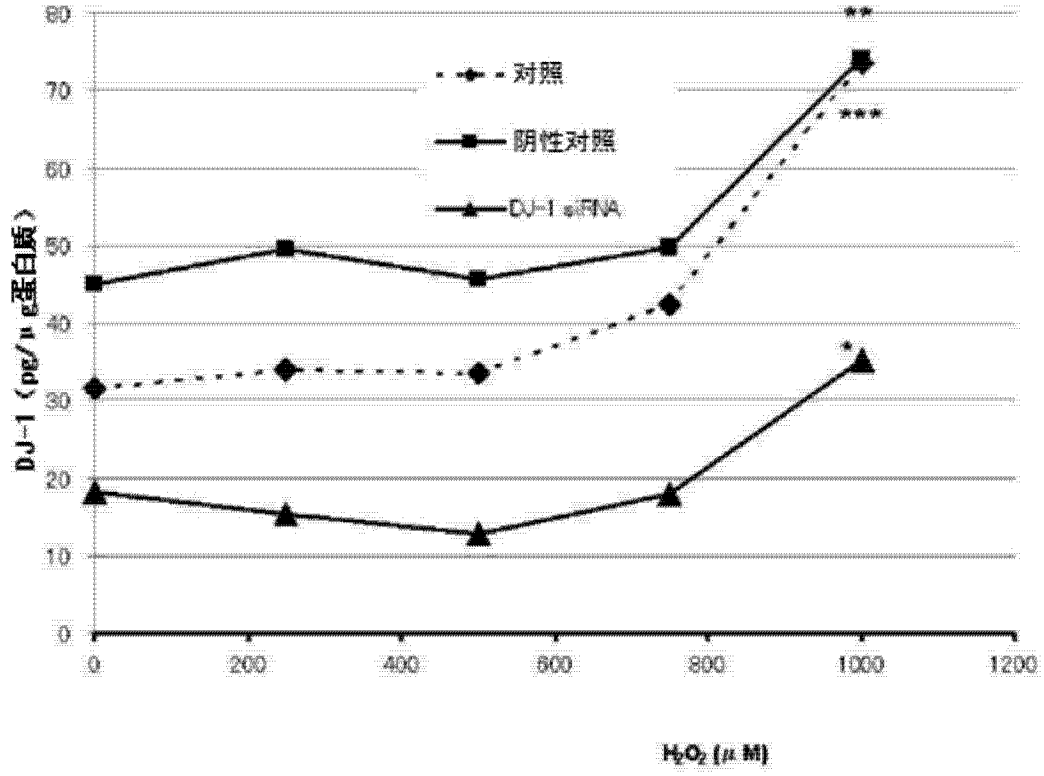

对照
阴性对照
DJ-1 siRNA
DJ-1（pg/μg蛋白质）
H2O2 (μM)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
200
400
600
800
1000
1200
*
**
***

图 2

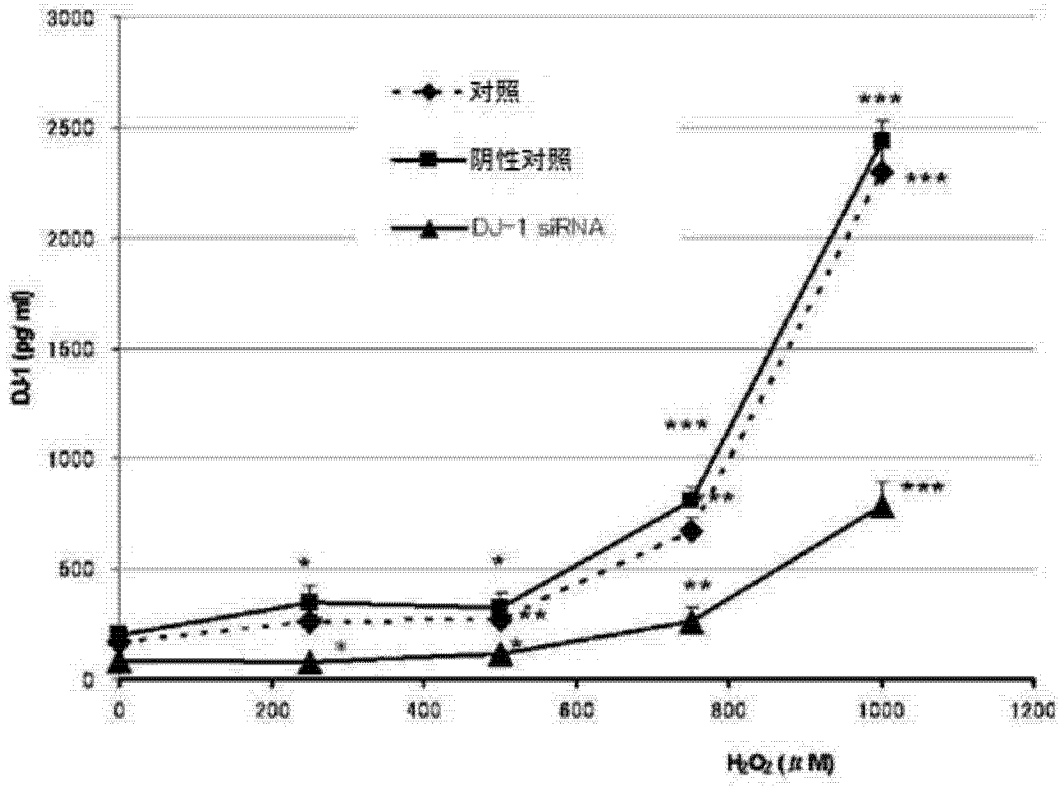

对照
阴性对照
DJ-1 siRNA
DJ1 (pg/ml)
H2O2 (μM)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0
200
400
600
800
1000
1200
*
**
***

图 3

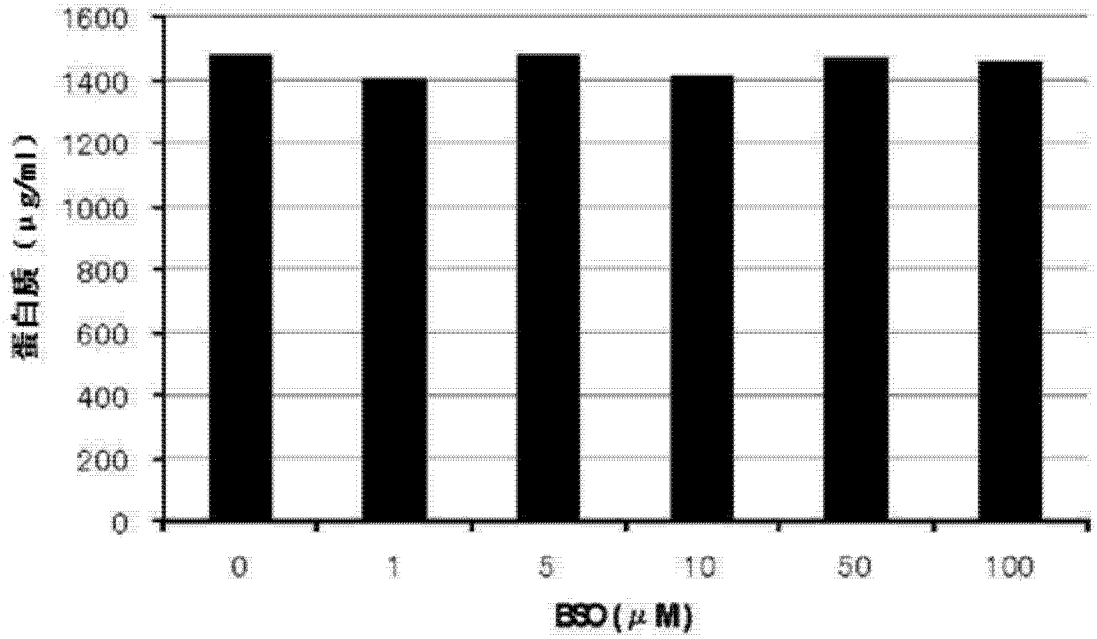

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
蛋白质（μg/ml）
0
1
5
10
50
100
BSO（μM）

图 4

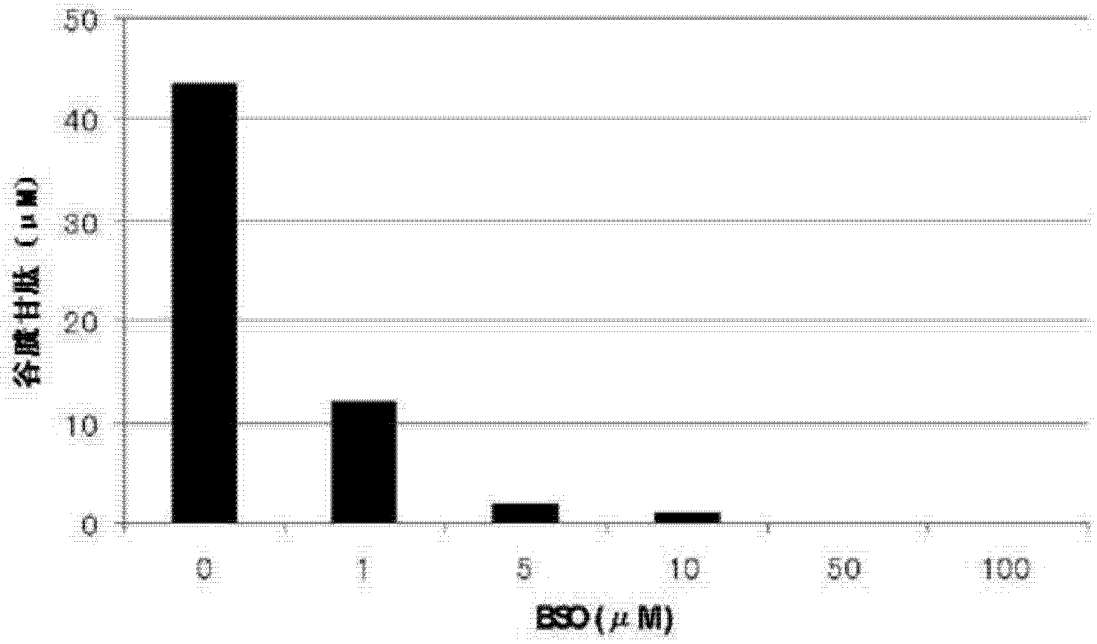

50
40
30
20
10
0
谷胱甘肽（μM）
0
1
5
10
50
100
BSO（μM）

图 5

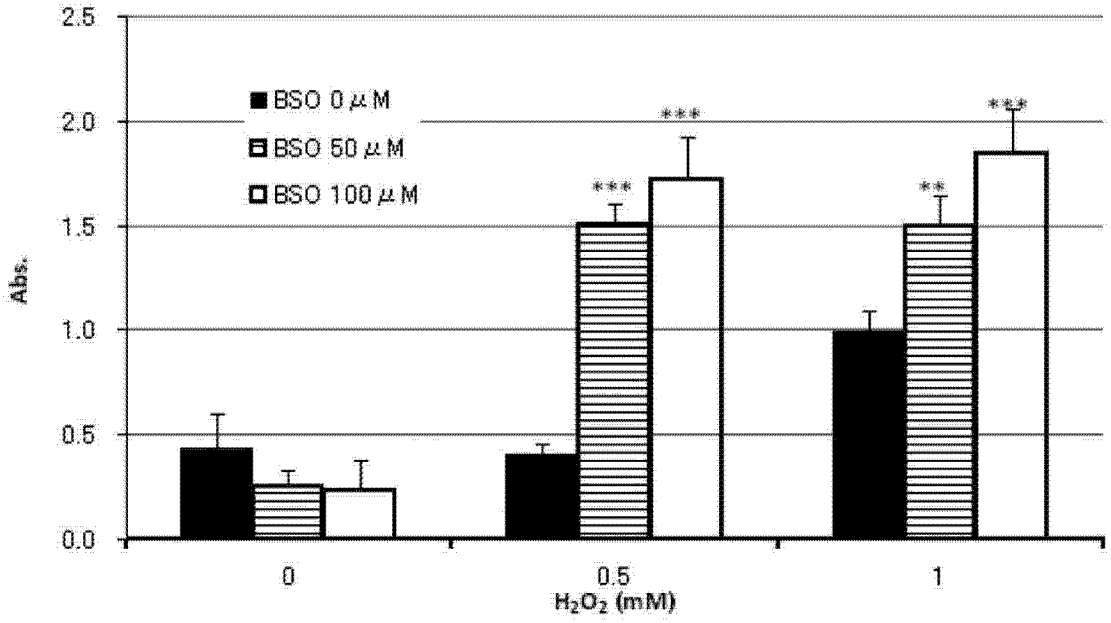

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Abs.
BSO 0μM
BSO 50μM
BSO 100μM
***
***
**
***
0
0.5
1
H2O2 (mM)

图 6

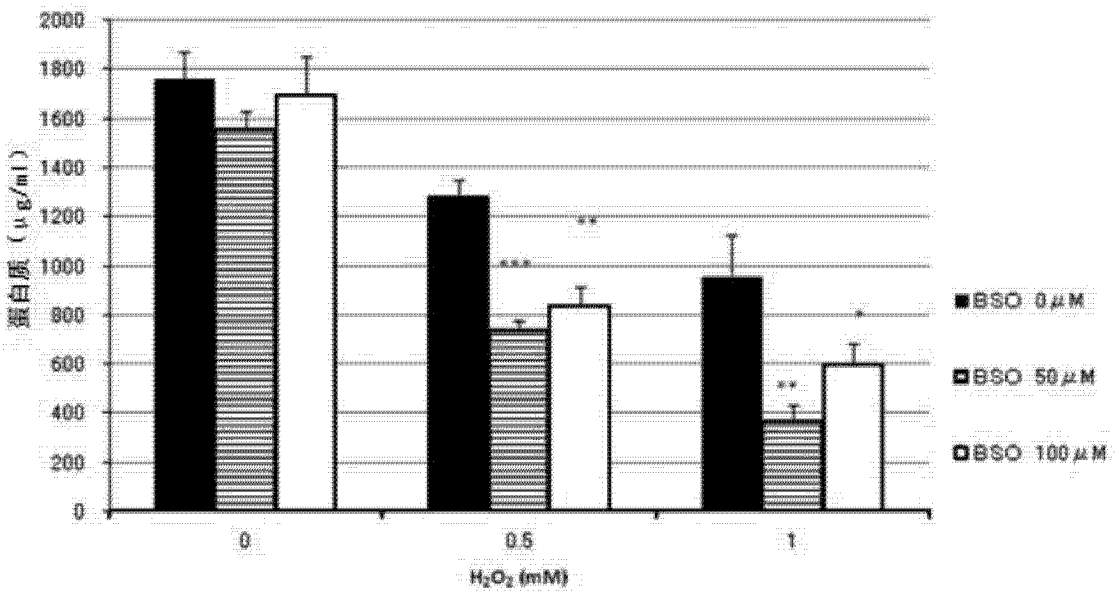

2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
蛋白质（μg/ml）
***
**
**
*
BSO 0μM
BSO 50μM
BSO 100μM
0
0.5
1
H2O2 (mM)

图 7

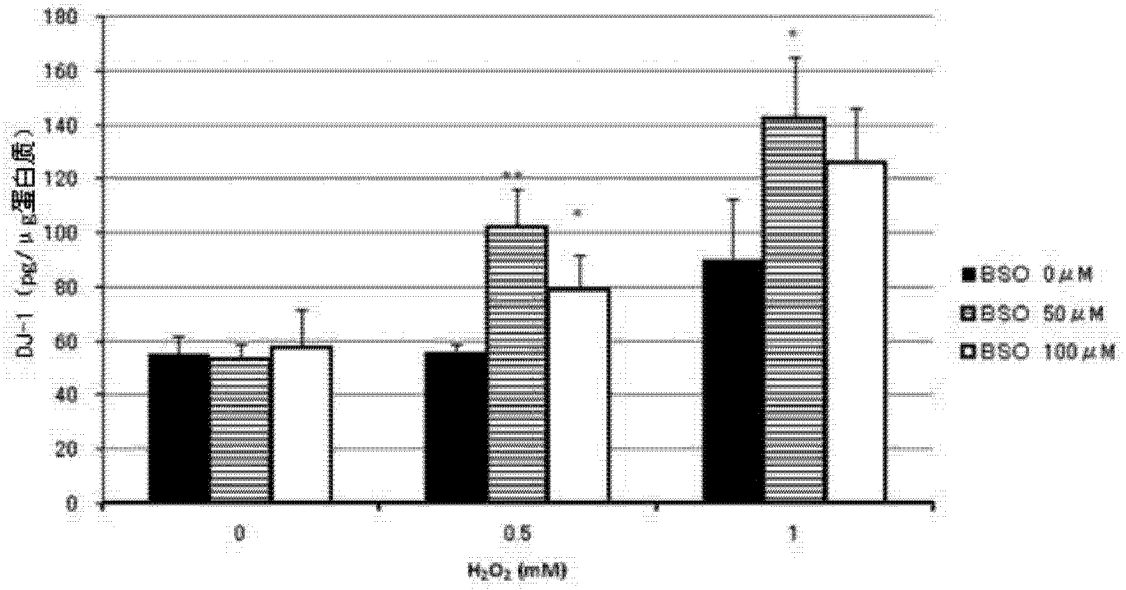

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
DJ-1 (pg/μg蛋白质)
0
0.5
1
H2O2 (mM)
BSO 0μM
BSO 50μM
BSO 100μM

图 8

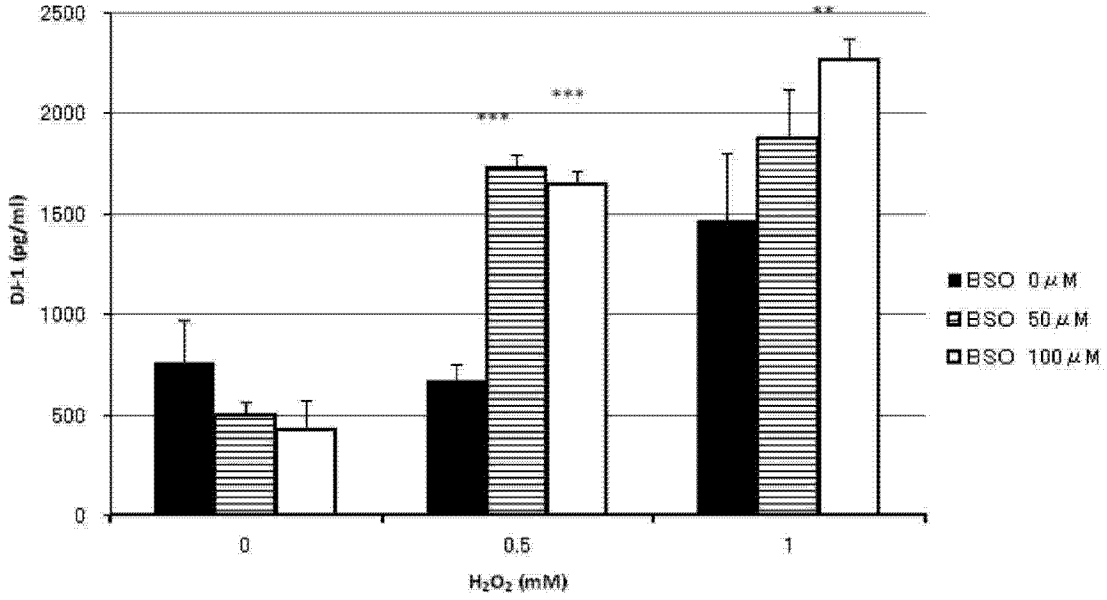

2500
2000
1500
1000
500
0
DJ-1 (pg/ml)
0
0.5
1
H2O2 (mM)
BSO 0μM
BSO 50μM
BSO 100μM

图 9

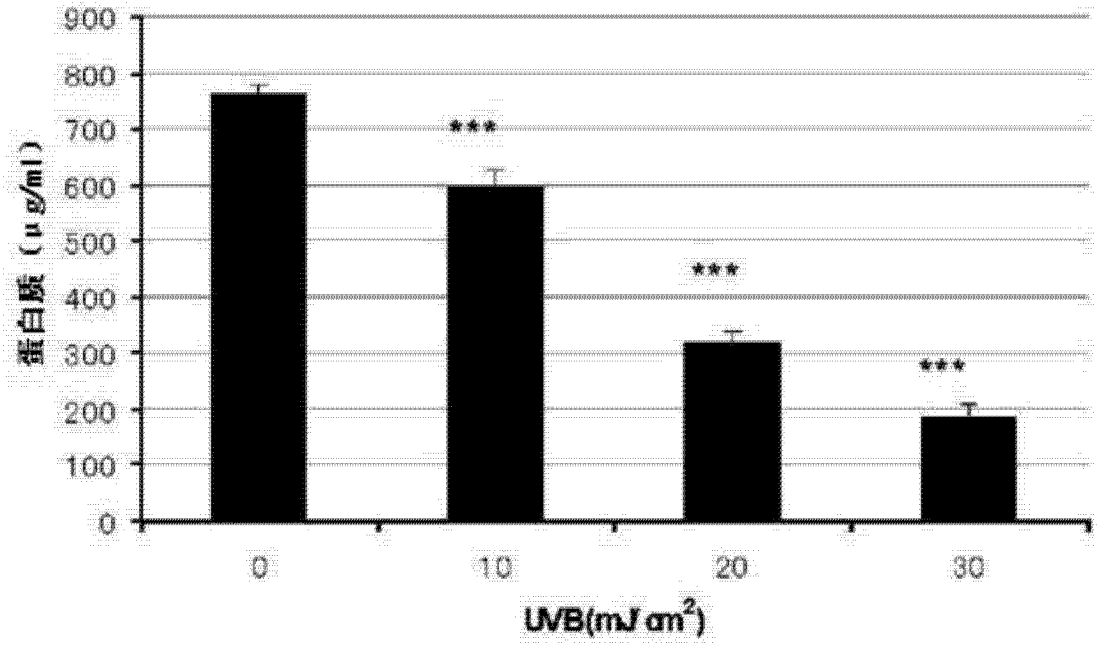

900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
蛋白质（μg/ml）
***
***
***
0
10
20
30
UVB(mJ cm²)

图 10

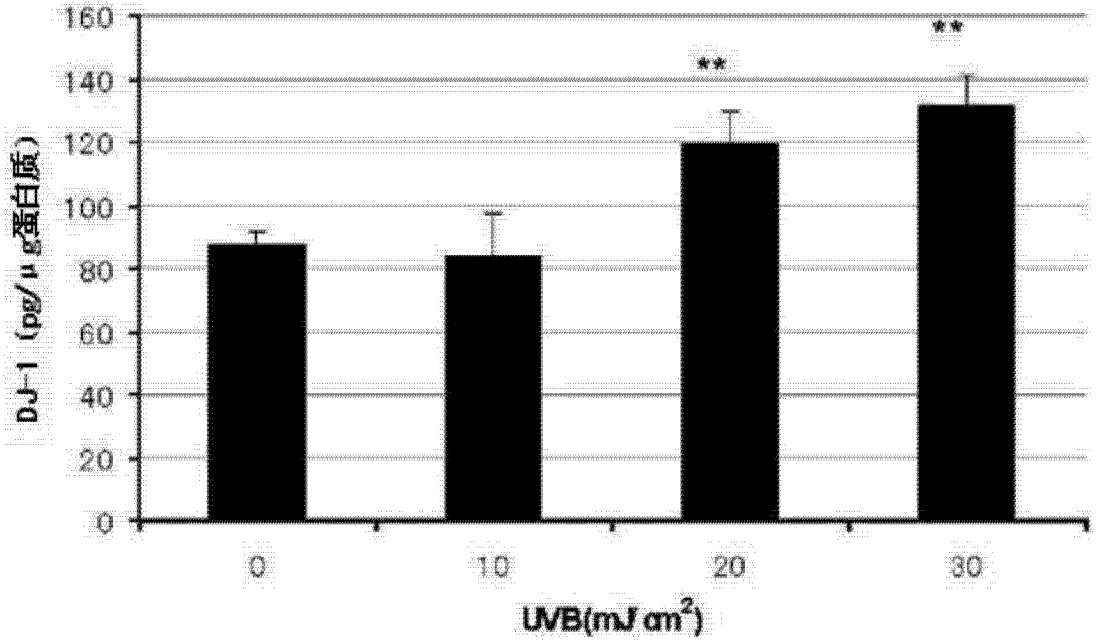

160
140
120
100
80
60
40
20
0
DJ-1（pg/μg蛋白质）
**
**
0
10
20
30
UVB(mJ cm²)

图 11

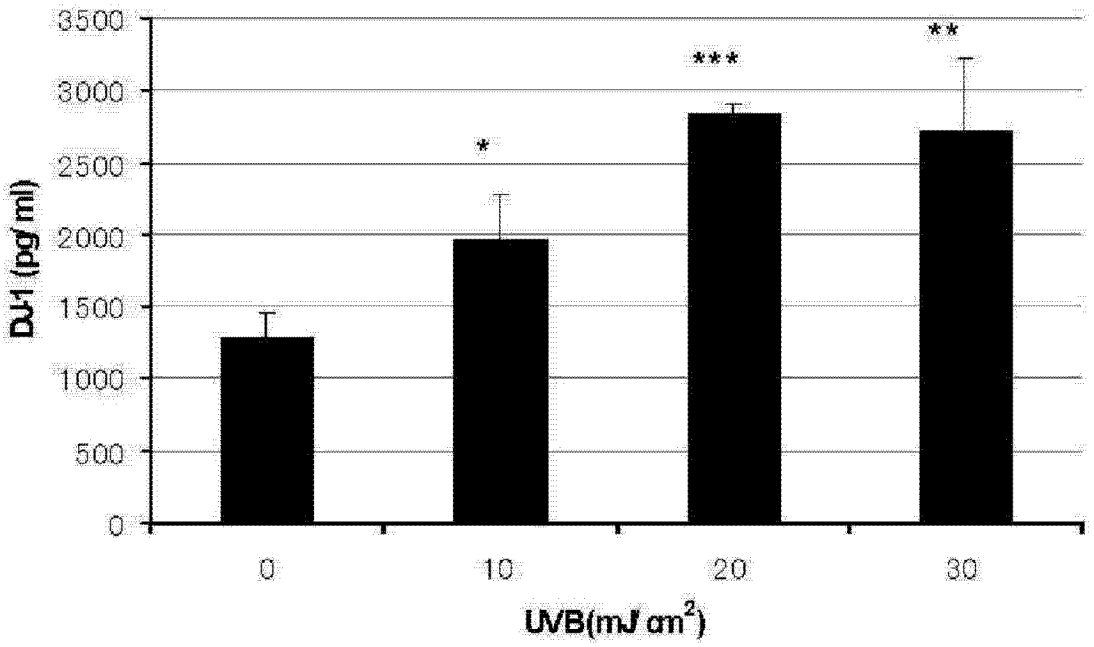

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
DJ-1 (pg/ml)
*
***
**
0
10
20
30
UVB(mJ/cm²)

图 12

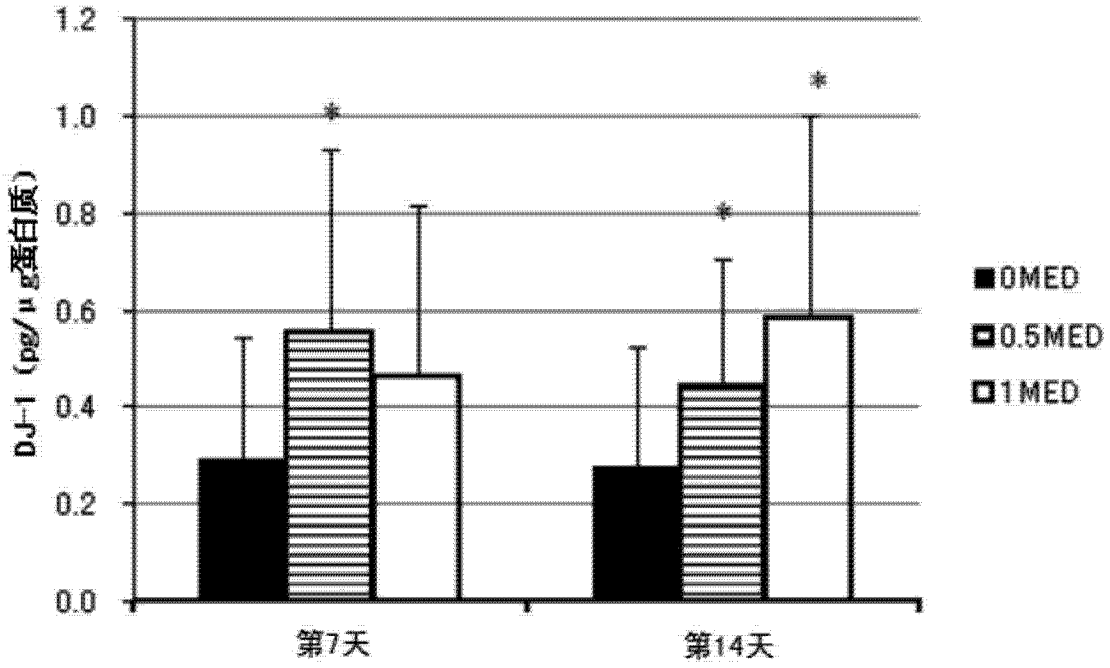

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DJ-1 (pg/μg蛋白质)
*
*
*
第7天
第14天
0MED
0.5MED
1MED

图 13

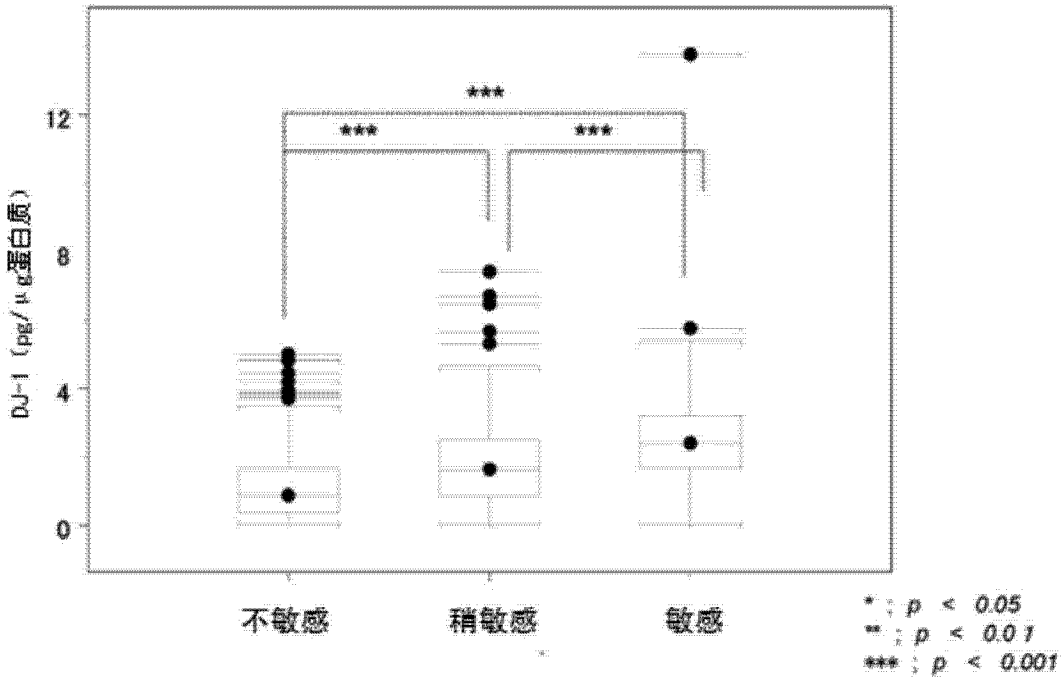

***
***
***
12
8
4
0
DJ-1（pg/μg蛋白质）
不敏感
稍敏感
敏感
* ; p < 0.05
** ; p < 0.01
*** ; p < 0.001

图 14

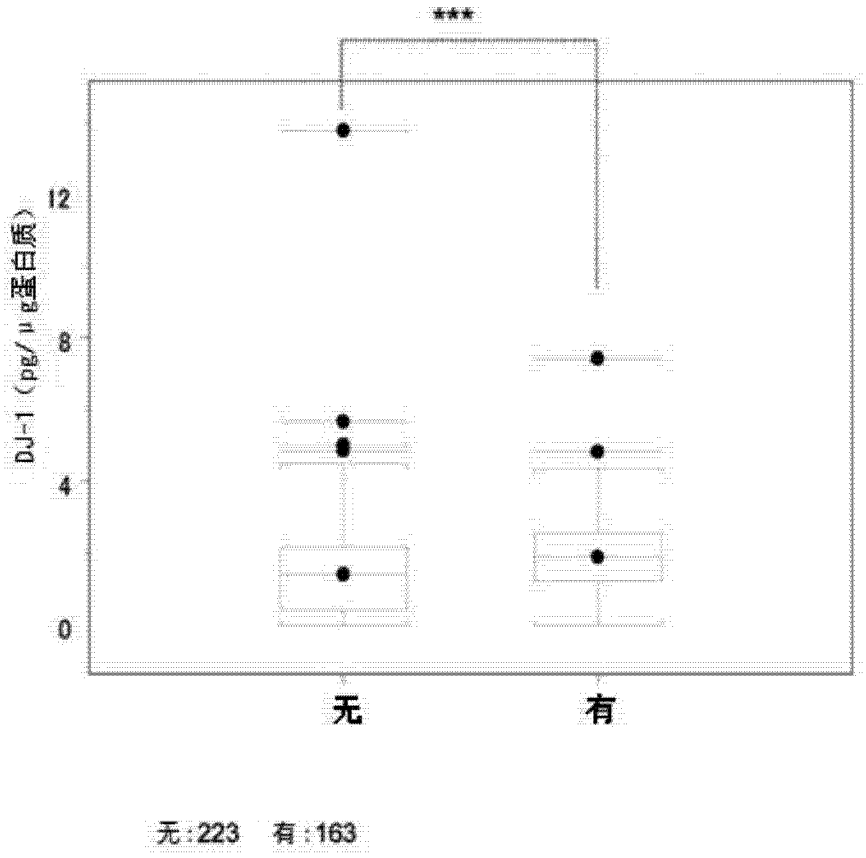

***
12
8
4
0
DJ-1（pg/μg蛋白质）
无
有
无:223 有:163

图 15

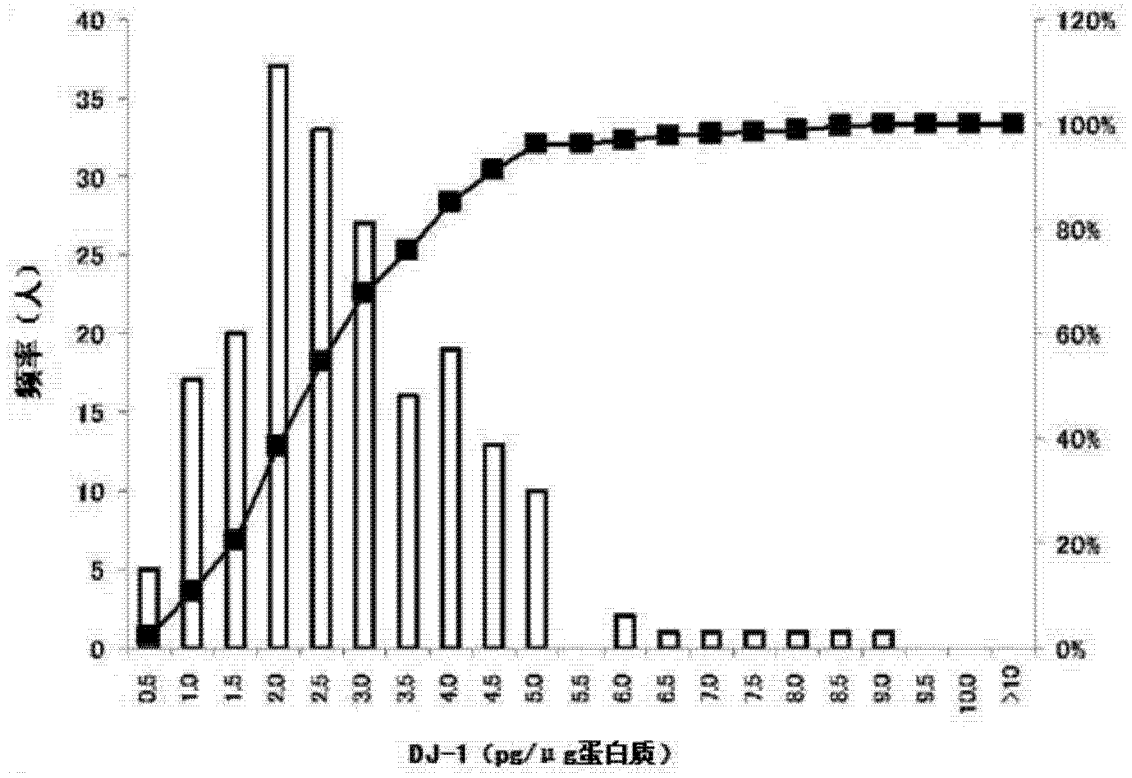

40
35
30
25
20
15
10
5
0
频率（人）
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
>10
DJ-1（pg/μg蛋白质）

图 16