

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/366
A61K 7/48



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 01809634.4

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1209106C

[22] 申请日 2001.5.14 [21] 申请号 01809634.4
[30] 优先权
[32] 2000. 5. 18 [33] FR [31] 00/06384
[86] 国际申请 PCT/FR2001/001454 2001.5.14
[87] 国际公布 WO2001/087254 法 2001.11.22
[85] 进入国家阶段日期 2002.11.18
[71] 专利权人 欧莱雅
地址 法国巴黎
[72] 发明人 达尼埃尔·迪什 若泽·科托维奥
菲利普·卡特鲁
审查员 盛 倩

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司
代理人 程金山

权利要求书 2 页 说明书 16 页

[54] 发明名称 作为防污染化妆品试剂的鞣花酸的应用

[57] 摘要

本发明涉及鞣花酸作为化妆品防污染剂在局部施用中的应用，和一种保护生物体免受污染影响的化妆品处理方法。

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

1. 鞣花酸，它的盐，它的金属络合物和衍生自羟基的单酰基或多酰
5 基衍生物作为用于捕集有毒气体的化妆品试剂和/或作为重金属螯合化妆
品试剂和/或作为用于防止由多环芳烃引起的接触性超敏反应的化妆品试
剂在局部施用中的非治疗性应用。

2. 鞣花酸，它的盐，它的金属络合物和衍生自羟基的单酰基或多酰
基衍生物在制备或用于制备适于局部施用的非治疗性防污染化妆品组合
10 物时的应用。

3. 如同权利要求 1 或 2 中所要求的应用，其特征在于，所述鞣花酸
盐包含碱金属盐或碱土金属盐，胺盐，具有锌和铜的金属络合物，单酰
基或包含饱和的或不饱和的含 2-22 个碳原子的酰基的多酰基衍生物。

4. 如同权利要求 3 中所要求的应用，其特征在于，相对于组合物的
15 总重量，所述化妆品组合物包含 0.001%-10%的鞣花酸，它的盐，它的金
属络合物和衍生自羟基的单酰基或多酰基衍生物。

5. 如同权利要求 4 中所要求的应用，其特征在于，相对于组合物的
总重量，所述化妆品组合物包含 0.01%-5%的鞣花酸，它的盐，它的金属
络合物和衍生自羟基的单酰基或多酰基衍生物。

6. 如同权利要求 2 中所要求的应用，其特征在于，所述组合物含有
20 至少一种化合物，所述的化合物选自花色素，包含硫醚官能团的化合物，
亚砷或砷，麦角硫因，重金属螯合剂，抗氧化剂。

7. 如同权利要求 2 所要求的应用，其特征在于，所述组合物还包含
一种化妆品可接受的介质，其由水，或化妆品可接受的有机溶剂，或水
25 和化妆品可接受的有机溶剂组成。

8. 权利要求 7 中所要求的应用，其特征在于，所述有机溶剂选自亲
水有机溶剂，两亲溶剂和亲油有机溶剂，或它们的混合物。

9. 如同权利要求 7 或 8 中所要求的应用，其特征在于，所述有机溶
剂选自单官能或多官能醇，聚乙二醇，氧乙烯化的聚乙二醇，聚丙二醇
30 酯，山梨醇，二烷基异山梨醇，乙二醇醚，聚丙二醇醚和脂肪族酯。

10. 如同权利要求 7 中所要求的应用, 其特征在于, 所述有机溶剂为所述组合物的总重量的 5%-98%。

11. 如同权利要求 2 中所要求的应用, 其特征在于, 所述组合物还包含至少一种脂肪相。

5 12. 如同权利要求 11 中所要求的应用, 其特征在于, 相对于所述组合物的总重量, 所述脂肪相为 0-50%。

13. 如同权利要求 2 中所要求的应用, 其特征在于, 所述组合物还包含至少一种添加剂, 其选自标准含水的或亲油胶凝剂和/或增稠剂, 亲水或亲油活性剂, 防腐剂, 抗氧化剂, 日用香料, 乳化剂, 保湿剂, 着色
10 剂, 脱色剂, 溶角蛋白剂, 维生素, 润肤剂, 螯合剂, 表面活性剂, 聚合物, 酸化或碱化剂, 增量剂, 自由基清除剂, 神经酰胺, 防晒剂, 防紫外线剂, 驱虫剂, 减肥剂, 染料, 杀菌剂和去头屑剂。

14. 如同权利要求 2 中所要求的应用, 其特征在于, 所述组合物以含水、含水-醇或含油溶液, 水包油或油包水或多重乳液, 含水或含油凝胶,
15 液态、糊状或固态无水产品或使用内孢囊将油分散在含水相中的分散液形式存在。

15. 如同权利要求 2 中所要求的应用, 其特征在于, 所述组合物具有白色或有色膏, 软膏, 乳剂, 乳液, 浆液, 膏状, 摩丝或固体的外观。

16. 一种保护人体免受污染影响的非治疗性化妆处理方法, 其特征在于,
20 于, 它是将化妆用的有效量的鞣花酸, 它的盐, 它的金属络合物, 衍生自羟基的它的单酰基或多酰基衍生物施用于皮肤上。

17. 一种保护人体免受污染影响的化妆处理方法, 其特征在于, 它是将权利要求 2 中限定的组合物施用于皮肤上。

作为防污染化妆品试剂的鞣花酸的应用

5

本发明实质上涉及鞣花酸，它的盐，它的金属络合物，衍生自羟基的它的单醚或聚醚，单酰基或多酰基衍生物和它的碳酸酯或氨基甲酸酯衍生物作为防污染化妆品试剂的一种新应用。

城市污染由各种类型的化学产品，异生素和颗粒构成。

10 三种主要种类的污染物对皮肤和毛发产生有害的作用：气体，重金属和颗粒，这些颗粒是其上吸附了大量有机化合物的燃烧残渣。

最先并且直接暴露于环境有毒试剂的是最外面的组织。皮肤被直接并且经常暴露于前氧化环境中。氧化剂的环境来源包括氧气，太阳的紫外线照射以及，在被污染的空气中，臭氧，氧化氮和氧化硫。由民用和工业燃烧的一级和二级产物如单环的和多环的芳烃代表的大气污染物也是氧化应力的主要来源。皮肤对氧化应力的作用特别敏感，并且最外层作为抗氧化损伤屏障。在大多数环境中，与角蛋白物质反应后，氧化剂多半被中和，但形成的反应产物可能对细胞和组织产生化学侵蚀。

20 作为皮肤屏障的角质层是空气和皮肤组织的接触部位。脂质/蛋白质两相结构是这种皮肤屏障功能的决定性因素。这些元素可与氧化剂反应，并被损伤，这将促进脱皮现象。臭氧诱导的脂质过氧化反应可以两种方式损伤皮肤：

1) 角质层的脂质的氧化和降解可损伤角质层的屏障功能。外脂和蛋白结构的分布似乎是很多皮肤病的触发因素（牛皮癣，遗传过敏性皮炎和刺激性皮炎）。

2) 在皮肤上层中脂质氧化产物的增加的形成能触发皮肤毗邻层中化学侵蚀。臭氧（O₃）与不饱和脂质的反应涉及对双键的加成反应。这个过程将脂链的裂解、醛氢过氧化物和过氧化氢的形成引入第二阶段。这是一种被自由基介导的特殊的机制，其不同于通常描述的脂过氧化作用机制。

30 被臭氧诱导的二级或三级脂氧化产物，其比具有更长生存期的臭氧更惰

性，可以增长臭氧的作用。由于它们相对的稳定性，脂质氧化和过氧化产物即胆甾醇氧化物和醛具有在不直接暴露于 O_3 的较远的部位损伤细胞的潜能。

在角质表层上的有效的氧化侵蚀可促使下层发炎的过程，导致吞噬细胞5 的反射增进，其通过产生氧化剂，将放大最初的氧化过程。

在城市污染中，伴随的暴露于 O_3 和紫外线，可导致协同的氧化应力。同样地，认为在臭氧和燃烧衍生的有机化合物之间存在协同作用。

重金属组成另一类污染物。

作为基本的养分，以微量的形式存在的金属离子是身体必需的。例如，10 涉及多肽的几种功能如酶促，结构和免疫功能需要金属辅因子。

然而，其它金属离子，特别是重金属离子，当它们处于非生理浓度时，可能损伤这些功能。因此，过度曝射在金属的环境可导致毒性效应。

在工业化国家进行的生态学研究显示存在于大气中的金属量正在增加。伴随着被污染食物的摄食和暴露于大气金属，这导致人体组织中重金15 属含量的增加。

重金属蓄积的作用可能是极端危险的，并且它们的毒性部分归因于损伤蛋白质的三级和四级结构，这导致降低它们的催化活性。被损伤的蛋白质可能变得具有抗原性，并引起免疫反应。

而且，来自于空气中存在的污染物颗粒的金属如锌，铜，钴，镁，汞20 或镍的蓄积引起儿童的记忆障碍。

导致金属毒性效应的另一个机制是在非生理浓度下，重金属对天然生理辅因子的竞争性取代。因此，控制大气中污染物重金属对于预防与暴露于金属有关的疾病是必需的。

由于重金属对环境的污染增加和在生态系中它们普遍存在，皮肤、毛发和可及粘膜提供最大的接触面积，从而促进金属的蓄积和随后吸收入25 人体。

存在于工业制造产品，化学制品，珠宝，衣服，药品，色料和清洁产品中的某些金属和金属化合物在皮肤组织中的初级刺激反应，变态反应和致癌性反应中被涉及。

30 环境中作为主要罪魁祸首的金属是铜，钴，锌，镁，汞，镍和铅。

由金属引发的皮炎引起的皮疹是困扰暴露于大量的某些金属离子环境中的人们的一个难题。暴露于镍环境大部分是由于在珠宝制品、表带和衣物纽扣中频繁使用这种金属。由于皮炎的发展对镍过敏是在某些职业中存在的工业危害。金属沉积在毛发上是一种不可避免的现象。

- 5 毛发是金属的强大吸收体。毛发对金属的结合是如此牢固，使得一旦这些被结合的金属被纤维的阴离子部位捕获，它们难以被取出来。毛发结合金属的程度通常取决于几种因素，如纤维的大小，它的孔隙率和暴露时间。金属如铜，铅和铁可干扰化学处理如毛发的染色和长效卷发。

- 10 对于这些重金属粒子，毛发也是一个优选的结合部位。这是由于角蛋白纤维包含结合阳离子重金属并蓄积它们的阴离子部位。某些化妆品包含金属如镁，铜或铁。由角蛋白纤维吸收的这些金属可能干扰化学处理如染色，漂白或长效卷发效果。如美国专利 US-5 635 167 所描述，这些相互作用可能在染色或沉淀过程中导致出现问题。

- 15 已证实某些重金属能渗透入皮肤并蓄积 (A. B. G. Landsdown. Critical Reviews in Toxicology, 1995, 25: 397-462)。在高浓度下，它们可诱导：膜脂质上的氧化机制，直接的细胞毒性，容易导致细胞坏死和细胞亲核物质的烷基化，这些可能引起过敏现象或致癌作用。

- 20 另一大类污染物由颗粒形式的燃烧残渣组成，在这些颗粒上吸附了大量有机化合物，特别是多环芳烃 (PAHs)。这些被吸附到由城市空气携带的颗粒和灰尘的表面上的多环芳烃可渗透到皮肤组织，并且在那里被生物转化。它们在肝脏中的新陈代谢，其在参考文献中被详细描述，导致单羟基的代谢物（解毒途径），环氧化物和二醇环氧化物 (toxifying 途径) 的形成。在皮肤中可观察到相似的现象。已知这些化合物对皮肤具有致癌和致免疫作用。

- 25 在美容和治疗的处理过程中已预见一些方案，其通过用具有含硫基团的化合物来保护组织，所述化合物具有重金属螯合剂的性质，例如欧洲专利 0 557 042 A1 中的金属硫蛋白和欧洲专利申请 0 914 815 A1 中的具有含硫基团的氨基酸化合物。

- 30 英国专利申请 2 333 705 提及组合物中乙二胺二琥珀酸对于治疗重金属诱导的皮肤刺激的应用。

而且，文献 EP-A-0 496 173 描述了含鞣花酸的五倍子提取物结合鞣酸和水解鞣质，来防止自由基的有害作用。所述文献也预见了一种作为防晒剂以免受紫外线 B 照射的化妆品应用，紫外线 B 导致皮肤的老化。

很多现有专利基本上覆盖了鞣花酸由于它的除色素，防紫外线，抗癌和抗炎性能而产生的应用。

因此提出的问题是使皮肤免受在城市污染中遇到的、单独或联合作用的气体、重金属和有机化合物和它们的有害作用，所述有机化合物是燃烧残渣。

目前已非常令人惊讶地发现，鞣花酸，它的盐，它的金属络合物，衍生自羟基的它的单醚或聚醚衍生物，它的单酰基或多酰基衍生物以及它的碳酸酯或氨基甲酸酯衍生物在局部施用中的应用，使得保护角质蛋白物质，皮肤和覆盖物免受气体，重金属和作为燃烧残渣的有机化合物的有害作用成为可能。

本申请人已发现鞣花酸使得保存和保护角质蛋白物质，皮肤和覆盖物免受污染的有害作用成为可能。

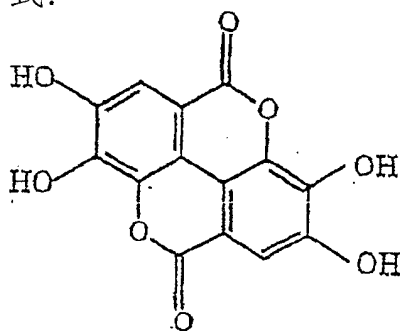
鞣花酸显示出作为一种分子的主要的价值，即对抗污染对皮肤的有害作用是有利的。它具有一个在低浓度下行使抗各种污染物的作用的优点。

鞣花酸，也称为 2,3,7,8-四羟基-(1)苯并吡喃(5,4,3-cde)(1)苯并吡喃-5,10-二酮，是一种众所周知的属于多酚基团的分子，并存在于植物界。可参考 Merck Index 20th 版(1996), No. 3588。

文献 FR-A-1 478 523 公开了一种纯化鞣花酸的方法，还公开了用这种方法获得的纯化的鞣花酸。

鞣花酸具有下列化学式：

25



其包含四个稠环。

鞣花酸是可在市场上买到的，尤其可购自法国 Sigma 公司。

本发明的一个主题是鞣花酸，它的盐，它的金属络合物，衍生自羟基的它的单醚或聚醚衍生物，它的单酰基或多酰基衍生物以及它的碳酸酯或氨基甲酸酯衍生物作为防污染化妆品试剂，在局部施用中的一种应用。

表述“防污染化妆品试剂”表示一种保护皮肤和角质物质的试剂，以便防止、削弱和/或抑制有毒气体如臭氧、金属和作为燃烧残渣的有机化合物的有害作用。

将鞣花酸和它的衍生物用作化妆品试剂来捕集有害气体和/或用作重金属螯合化妆品试剂和/或用作化妆品试剂来防止尤其是由多环芳烃引起的接触性过敏反应。

10 本发明的一个主题还是鞣花酸和它的衍生物在制备或为了制备用于局部施用的防污染化妆品组合物的应用。

在本发明的上下文中，鞣花酸盐，特别包含金属盐，尤其是它的碱金属或碱土金属如钠和钙盐，铵盐如甲基谷氨酰胺，二乙醇胺，三乙醇胺，胆碱和双-三乙胺盐，氨基酸盐，尤其是碱性氨基酸如精氨酸，赖氨酸和鸟氨酸的盐，金属络合物，特别包含具有锌和铜的金属络合物，单酰基或多酰基衍生物，特别包含饱和的或不饱和的含 2-22 个碳原子的酰基。优选这些酰基对应于乙酸，棕榈酸，油酸，亚麻酸，花生四烯酸，硬脂酸，巴西烯酸，芥酸，山嵛酸，和（所有 Z）-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸。上述提及的单醚或多醚衍生物是，特别是，含 1-4 个碳原子的烷氧基衍生物，或鞣花酸的一个或多个羟基与糖或糖链的缩合衍生物。特别是 3-甲氧基鞣花酸或其与糖如葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖和半乳糖的单醚或多醚衍生物。

上述提及的醚或酰基衍生物可用那些本领域的技术人员熟知的多酚的醚化或酰基化方法获得。某些也可通过从植物中提取来获得。

相对于组合物的总重量，在本发明中使用的化妆品组合物将有利地包含 0.001%-10%和优选 0.01%-5%重量的鞣花酸，它的盐，它的金属络合物，衍生自羟基的它的单醚或多醚，单酰基或多酰基衍生物和它的碳酸酯或氨基甲酸酯衍生物。

这个组合物还包含至少一种其它的防污染化合物。

所述化合物可尤其选自花色素和/或它的衍生物，包含一个硫醚官能团的化合物，亚砷或砷，麦角硫因（ergothionine）和/或它的衍生物，重

金属螯合剂如 N,N'-联苄基亚乙基-二胺-N,N'-二乙酸衍生物, 抗氧化剂, 和雨久花科植物的细胞提取物。

在本发明中使用的化妆品组合物还可包含化妆品可接受的介质, 其更特别地由水和/或任选的化妆品可接受的有机溶剂组成。

5 它们可选自亲水有机溶剂, 两亲溶剂和亲油有机溶剂或它们的混合物。

在亲水有机溶剂中, 可提及的是, 例如线性或支化的、含 1-8 个碳原子的低级单醇, 如乙醇, 丙醇, 丁醇, 异丙醇和异丁醇, 含 6-80 个环氧乙烷的聚乙二醇, 多元醇如丙二醇, 异戊二醇, 丁二醇, 甘油, 山梨醇, 10 单烷基或二烷基异山梨醇, 其中的烷基包含 1-5 个碳原子, 如二甲基异山梨醇, 乙二醇醚, 如二甘醇一甲基醚或一乙基醚, 和丙二醇醚, 例如二丙二醇甲醚。

可提及的两亲有机溶剂包括多元醇如丙二醇 (PPG) 衍生物, 如聚丙二醇的酯和脂肪酸的酯, PPG 的衍生物和脂肪族醇的衍生物, 例如 PPG-23 15 油基醚和 PPG-36 油酸盐。

可提及的亲油有机溶剂有例如包括脂肪族酯如己二酸二异丙酯, 己二酸二辛酯和苯甲酸烷基酯。

优选有机溶剂选自单官能团或多官能团醇, 任选氧乙烯化的聚乙二醇, 聚丙二醇酯, 山梨醇和它的衍生物, 二烷基异山梨醇, 乙二醇醚和聚 20 丙二醇醚, 和脂肪族酯。

有机溶剂可为组合物总重量的 5%-98%。

为使在本发明中使用的组合物更适于使用, 更柔软以便应用, 更有营养和更软化, 在这些组合物的介质中加入脂肪相是可能的。

相对于组合物的总重量, 优选脂肪相为 0-50%。

25 该脂肪相可包含一种或多种油, 优选选自以下物质:

- 挥发的或不挥发的, 线性、支化的或环状的, 有机修饰的或非有机修饰的, 水溶或脂溶的硅氧烷;
- 矿物油如液态石蜡和液态矿脂;
- 动物来源的油如全氢化角鲨烯;
- 30 - 植物来源的油如甜杏仁油, 鳄梨油, 蓖麻油, 橄榄油, 霍霍巴油,

芝麻油，花生油，澳洲坚果油，葡萄子油，菜子油或椰子油；

- 合成油如 purcellin oil 和异链烷烃；
- 氟代油和全氟代油；
- 脂肪酸酯如 purcellin oil。

5 所述油相还可包含作为脂族物质的一种或多种脂肪族醇，脂肪酸或蜡（石蜡，聚乙烯蜡，巴西棕榈蜡或蜂蜡）。

按照已知的方式，在本发明中使用的组合物还可包含在化妆品中普遍使用的辅助剂，如标准含水或亲油胶凝剂和/或增稠剂，亲水或亲油活性剂，防腐剂，抗氧化剂，日用香料，乳化剂，保湿剂，着色剂，脱色剂，
10 溶角蛋白剂，维生素，润肤剂，螯合剂，表面活性剂，聚合物，酸化或碱化剂，增量剂，自由基清除剂，神经酰胺，防晒剂，尤其是防紫外线剂，昆虫拒斥剂，减肥剂，染料，杀菌剂和去头屑剂。

这些各种辅助剂的用量是那些在本领域中常规使用的用量。

不必说，本领域中的技术人员会注意选择按照本发明加入组合物中的
15 任选的化合物，使得本发明组合物的内在优点性能不被、或基本上不被预期的附加物不利地影响。

按照本发明使用的组合物可以通常用于局部施用的任何形式存在，尤其是以含水、含水-醇或含油溶液，水包油或油包水或多重乳状液，含水或含油凝胶，液态、糊状或固态无水产品或使用内孢囊将油分散在含水相
20 中的分散液形式存在，所述这些内孢囊可以是聚合物纳米颗粒如纳米球和纳米胶囊，或最好是离子和/或非离子型的类脂囊。

在本发明中使用的组合物可以是程度不同的流体，并且可具有白色或有色膏，软膏，乳剂，乳液，浆液，膏状，摩丝或固体的外观。

它们可任选以气溶胶形式施用于皮肤上。

25 它们也可以固体形式施用，例如以棒状形式施用。

它们也可用作护理产品和/或化妆品。

按照本发明的组合物可具有 3-8，优选 5-7 的 pH 值。

本发明的另一个主题是保护人体免受污染影响的化妆处理方法，其是将化妆有效量的鞣花酸，它的盐，它的金属络合物，衍生自羟基的它的单
30 醚或聚醚，它的单酰基或多酰基衍生物以及它的碳酸酯或氨基甲酸酯衍生

物施用于皮肤。

按照本发明的另一种保护人体免受污染影响的化妆处理方法是如上述说明对皮肤施用本发明的化妆品组合物。

下列实施例实质上是意图举例说明本发明的，而非限制本发明。

5

实施例

1. 对臭氧作用的保护

原理：

10 臭氧具有氧化细胞组分的能力，尤其是产生羰基化的蛋白质和类脂氢过氧化物。类脂氢过氧化物的定量是一种测量由将皮肤组织暴露于这种污染物诱导的氧化应力的方法。它们含量的降低指示鞣花酸的保护作用。

细胞类型和培养：

对获自整形外科的人角质细胞的单层培养进行研究。在 500 μ l 培养基中，以 25000 细胞/cm² 的标准，将细胞接种到 48 孔培养皿的 D-3 上。
15 在 37°C，5%CO₂ 的湿润气氛中进行培养。

用鞣花酸对角质细胞（D-1）进行预处理：

用鞣花酸（100 μ M 终浓度）对角质细胞预处理 24 小时。

掺入氧化应力标记，DCFH-DA（2,7-二氯荧光生双乙酸酯）：

氢过氧化物组成一种细胞内应力标记。用荧光技术检测并定量氢过氧化物（Lebel C. P., Ischiropoulos H. and Bondy S. C. (1992) Evaluation of the probe 2,7-dichlorofluorescein as an indicator of Reactive Oxygen Species formation and oxidative stress. Chem. Res. Toxicol. : 5: 227-231）。

在存在细胞内氢过氧化物和过氧化物酶的条件下，DCFH 被氧化成荧光 2,7-二氯荧光黄（DCF）。

25 然后用磷酸盐缓冲的盐水（PBS）洗涤用鞣花酸预处理 24 小时的细胞，并与在培养基中配制的浓度为 320 μ M 的 DCFH-DA 溶液（500 μ l/孔）接触 30 分钟。

暴露于臭氧中：

30 用 PBS 缓冲液再次洗涤细胞，然后与在 PBS 中配制的浓度为 200 μ M

的鞣花酸溶液接触。随后在湿润气氛、37℃培养箱中，将它们暴露于臭氧（10ppm）中。

臭氧诱导的类脂氢过氧化物的测量：

- 5
- 暴露于臭氧中不同的时间：0，5，10 和 20 分钟之后，测量由于氢过氧化物的产生引起的荧光 DCF 的形成（485nm 激发屏蔽和 530nm 发射屏蔽）。

结果：

- 10
- 在缺失和存在 200μM 鞣花酸的条件下，臭氧对培养的人角质细胞的毒性作为暴露时间的函数。

存在鞣花酸的条件下观测到的荧光， 表示为每次相对于未保护的对照样的%		
接触 5 分钟 观测的荧光% ±SEM	接触 10 分钟 观测的荧光% ±SEM	接触 20 分钟 观测的荧光% ±SEM
28.2±3.3	36.3±3.4	52.3±4.4

- 15
- 每次，将未保护的对照组的荧光值设为 100%。然后将存在鞣花酸的条件下得到的数值表示为相对于这个对照数值的百分数。鞣花酸明显地降低臭氧诱导的应力。暴露 5 分钟这个保护作用处于最大限度（诱导的应力下降 71.8%）。暴露 20 分钟后保护作用仍然明显（诱导的应力下降 47.7%）。

在体外，从生物模型开始，使用培养的人角质细胞，我们发现：

- 20
- 在我们的试验条件下，一种大气污染物的典型试剂如臭氧，导致出现足够的应力；
 - 鞣花酸对由这种污染物诱导的作用发挥高度明显的保护作用。

2. 对重金属的细胞毒性的保护
原理：

重金属如镉，镍，铅，汞等各种器官包括皮肤的细胞具有细胞毒性作用。通过中性红结合试验测定细胞生存力的技术使得证明鞣花酸对镉的毒性的细胞保护作用成为可能。

5 细胞的培养和培养条件：

对获自整形外科的人角质细胞的单层培养进行研究。在 100 μ l 培养基中，以 25000 细胞/cm² 的标准，将细胞接种到 96 孔培养皿的 D-3 上。在 37℃ 的富含 5%CO₂ 的湿润气氛中进行培养。

10 细胞的处理：

最初，用增加浓度（0，10，25，50，75，100，150 和 200 μ M）的氯化镉（CdCl₂）处理细胞 24 小时，以便确定它的细胞毒性。在第二阶段，在存在鞣花酸（200 和 100 μ M 的浓度，相当于对细胞无毒性的鞣花酸的最大剂量和最大剂量的一半）的条件下，用相同浓度的 CdCl₂ 处理细胞 24 小时。

细胞生存力的测定：

在处理的结尾，通过中性红结合试验（POS 55/006）和在 550nm 处读数确定细胞生存力（参考文献: Borenfreund, E and Puerner, J. A. (1984) A Simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. Tissue Culture Methods; 9: 7-9）。

用 PBS 缓冲液漂洗细胞以去除处理溶液，然后在中性红溶液（100 μ l）中于 37℃ 培养三小时，该中性红溶液在培养基中配制成 0.5mg/ml 的浓度。然后 PBS 缓冲液漂洗细胞，随后在甲醛/钙溶液中固定一分钟。然后用乙醇/乙酸溶液（100 μ l/孔）萃取中性红。通过在分光光度计上读数 550nm 处的光密度，确定萃取的数量。

然后计算诱导细胞生存力下降 50%（IC-50）的 CdCl₂ 的浓度。

结果：

30 缺失或存在两个浓度 100 和 200 μ M 鞣花酸的条件下，氯化镉对培养

的人角质细胞的细胞毒性（n=4）。

氯化镉的 IC-50		
不含鞣花酸 平均值±SEM	含鞣花酸 平均值±SEM	
	100μM	200μM
39±1.2μM	99±2.9μM	167±9.8μM

IC-50 为 39μM 的单独氯化镉显示足够的毒性。在存在鞣花酸的条件
下，氯化镉的细胞毒性大大的降低（其相应于 IC-50 增加）：

- 5
- 在 100μM 鞣花酸条件下，细胞毒性降低约 2.5 倍；
 - 在 200μM 鞣花酸条件下，细胞毒性降低约 4.3 倍；
- 在体外从生物模型开始，使用培养的人角质细胞，我们发现：
- 10
- 在我们的试验条件下，一种大气污染物（重金属）的典型试剂如氯化镉，产生高的毒性；
 - 鞣花酸对这种污染物的毒性发挥细胞保护作用。

3. 对由多环芳烃（PAHs）的皮肤代谢诱导的亲核体的烷基化的保护
原理：

15

吸附到由城市大气传送的颗粒和灰尘表面上的多环芳烃（PAHs）可
渗透到皮肤组织，并在那里被生物转化。在肝脏中它们的代谢，其在文献
中被详细描述，导致单羟基代谢物（解毒途径）、环氧化物和二醇环氧化物
（toxifying 途径）的形成。在皮肤中遵循相同的途径。环氧化物和二醇
环氧化物的 toxifying 途径产生亲核体（蛋白质和 DNA）的烷基化，其通
过研究放射标记（¹⁴C-苯并-[a]芘）的 PAH 的新陈代谢来测量对这些大分
20 子的共价结合而被证实是可能的。连续或重复暴露于污染物之后，在蛋白
质被烷基化的情况下，它的潜在毒性可引起接触性超敏反应。

研究的原理是通过测量共价结合于蛋白质的放射性，证实鞣花酸对由
于放射标记的 B[a]P 的皮肤新陈代谢产生的烷基化的活性种的保护作用。

25

研究和培养的细胞类型：

对获自整形外科的人角质细胞的单层培养进行研究。以 53000 细胞/cm² 的标准，将细胞接种在 6 孔培养皿的 D-3 上。在 37℃，富含 5%CO₂ 的湿润气氛中进行培养。

5 细胞的处理：

将细胞与共培育的 ¹⁴C-B[a]P (20μM) 和购自法国 Sigma 的鞣花酸 (100μM) 接触 24 小时。接触之后，用 PBS 缓冲液洗涤细胞，在相同的缓冲液 (0.5ml) 中刮除，然后在液氮中冷冻，并保存于 -80℃ 直至分析。

10 共价结合细胞蛋白质的测量：

按照 Hoellinger 等的方案，采用在 96 孔微量培养板中进行过滤的方法 (H. Hoellinger, M. Sonnier, J. Gray, T. A. Connors, J. Pichon 和 N. H. Nam. In vitro covalent binding of cismethrin, bioresmethrin and their common alcohol to hepatic proteins. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1985, 77, 11-18)，测量细胞蛋白质的共价结合。

用 10%高氯酸 (50μl) 在微量培养板孔中沉淀细胞蛋白质的等分部分 (200μl)。然后将培养板移至一个真空下的过滤系统，其中通过空吸吸出孔的内容物，并且蛋白质保留在滤膜上，用溶剂乙酸乙酯 (3×200μl)，丙酮 (200μl)，乙醇 (200μl) 和 PBS 缓冲液 (200μl) 洗涤。这一系列洗涤的目的是从蛋白质中去除未共价结合的任何放射活性物质。分别回收微量培养板过滤器，并在 37℃ 下，于 1N 氢氧化钠 (400μl) 中消化保留在它们表面的蛋白质 24 小时。随后取样分析蛋白质，并计算溶液的放射活性。

结果表示为每毫克蛋白质结合 B[a]P 的毫微摩尔数 (nmol)。

25

结果：

在缺失和存在 100μM 浓度的鞣花酸的条件下，苯并(a)芘对培养的人角质细胞的共价结合 (n=4)。

30

B(a)P 共价结合

不含鞣花酸	含鞣花酸
在每 mg 蛋白质的 nmol B(a)P 中	在每 mg 蛋白质的 nmol B(a)P 中
平均值±SEM	平均值±SEM
$0.28 \pm 0.07 \mu\text{M}$	$0.09 \pm 0.02 \mu\text{M}$

单独的苯并(a)芘在 $20 \mu\text{M}$ 的浓度下显示具有共价结合至角质细胞蛋白质的相当大的反应性，为每毫克蛋白质结合 0.28 nmol 的 B(a)P。在存在鞣花酸的条件下，B(a)P 的反应性大大降低（反应性减少约 3.1 倍）。

使用来自人上皮的细胞（角质细胞 / 皮肤），从体外生物模型开始，我们发现：

- 在我们的试验条件下，一种大气污染物的典型试剂（PAH）如苯并(a)芘产生与它的代谢能力有关的潜在的毒性，以产生烷基化的物种；
- 鞣花酸发挥对由这种污染物诱导的这种形式的毒性的保护作用。

配方实施例

实施例 1：按照通常的制备技术，混合下列组分以制备一种乳液。

局部施用的组合物

鞣花酸的钠盐	5g
用 50 mol 环氧乙烷氧乙烯化的聚乙二醇	3g
单甘油二硬脂酸酯（monodiglyceryl stearate）	3g
液态矿脂	24g
鲸蜡醇	5g
水	适量 100g

实施例 2：同样地，使用下列化合物，按照标准技术制备乳液：

鞣花酸的二乙醇胺盐	1g
棕榈酸辛酯	10g
异硬脂酸甘油酯	4g
Purcellin oil	23g
维生素 E	1g
甘油	3g
水	适量 100g

实施例 3：同样地，使用下列化合物，按照标准技术制备乳液。

5

3-甲氧基鞣花酸	0.01g
棕榈酸辛酯	10g
异硬脂酸甘油酯	4g
液态矿脂	20g
山梨醇	2g
维生素 E	1g
甘油	3g
水	适量 100g

实施例 4：同样地，使用下列化合物，按照标准技术制备乳液：

单乙酰基鞣花酸	0.5g
棕榈酸辛酯	10g
异硬脂酸甘油酯	4g
液态矿脂	24g
维生素 E	1g
甘油	3g
水	适量 100g

实施例 5：从下面组分开始，配制下列组合物：

鞣花酸的钙盐	1.5g
霍霍巴油	13g
甲基异丙基对-苯甲酸基苯甲酸酯	0.05g
山梨酸钾	0.3g
环戊二烯并二甲基硅氧烷	10g
十八烷醇	1g
硬脂酸	4g
聚乙二醇硬脂酸酯	3g
维生素 E	1g
甘油	3g
水	适量 100g

5 实施例 6：从下面组分开始，配制下列组合物：

络合锌的鞣花酸	1g
霍霍巴油	13g
甲基异丙基对-苯甲酸基苯甲酸酯	0.05g
山梨酸钾	0.3g
环戊二烯并二甲基硅氧烷	10g
十八烷醇	1g
N,N'-双(3-羟苄基)乙二胺-N,N'-二乙 酸	0.01g
硬脂酸	4g
聚乙二醇硬脂酸酯	3g
维生素 E	1g
甘油	3g
水	适量 100g

实施例 7：从下面组分开始，配制下列组合物：

鞣花酸的胆碱盐	0.5g
霍霍巴油	13g
甲基异丙基对-苯甲酸基苯甲酸酯	0.05g
山梨酸钾	0.3g
环戊二烯并二甲基硅氧烷	10g
十八烷醇	1g
硬脂酸	4g
水风信子的细胞提取物	0.05g
聚乙二醇硬脂酸酯	3g
维生素 E	1g
甘油	3g
水	适量 100g

- 5 通过这个方法获得水风信子 (*Eichhornia crassipes*) 的细胞提取物：
 用水洗涤 12 水风信子茎 (12 water hyacinth stems)，然后粗排水。在切碎
 机 (切碎处理机) 中处理后，获得了 700g 的磨料。加入 700ml 的 H_2O ，
 然后加入 300ml 的 MilliQ H_2O 。在切碎处理机中进一步处理 5 分钟，在 8000
 10 5.43g 的冻干产物。