

大米发酵液的保湿修护功效机理研究

伏庆红¹ 张家蓉¹ 朱志贤¹ 陈国宝¹ 陈保华^{2*}

1 甘肃泛植制药有限公司 2 兰州大学化学化工学院

DOI:10.12238/bmtr.v6i5.10067

[摘要] 通过筛选川藏高原雪山线附近土壤中酵母菌(海拔3700m),纯化分离出19个菌株,选取对紫外线抵抗能力强,胞外酶较为单一的菌株作为大米发酵液的菌株。以优质有机大米为原料,通过分段控温、控氧的方式进行发酵,得到富含多种活性成分的大米发酵液。体外功效评价显示,该大米发酵液具有保湿、修护、美白、抗氧化等功效作用^[1],本文旨在基于角质成形细胞模型,进一步研究其保湿、修护功效的机理,即研究大米发酵液对透明质酸(HA)含量、2型透明质酸合成酶(HAS2)、丝聚蛋白(FLG)、谷氨酰胺转氨酶(TGM1)的基因表达的影响,同时进行了大米发酵液中各种组分及其含量分析和分子量分布分析。

[关键词] 大米发酵液; 组分分析; 保湿; 修护; 机理研究

中图分类号: TQ920.6 **文献标识码:** A

Study on the moisturizing and repairing mechanism of Rice ferment filtrate

Qinghong Fu¹ Jiarong Zhang¹ Zhixian Zhu¹ Guobao Chen¹ Baohua Chen^{2*}

1 Gansu Fanzhi Pharmaceutical Co., Ltd 2 The Chemical Engineering, Lanzhou University

[Abstract] By screening the yeasts in the soil near the snow-mountain line of the Sichuan-Tibet Plateau (at an altitude of 3700m), 19 strains were purified and isolated. The strain with strong ultraviolet resistance and single extracellular enzyme was selected as the strain of Rice ferment filtrate. Using high quality organic rice as raw material, the fermentation broth rich in many kinds of active ingredients was obtained by controlling temperature and oxygen in sections. In vitro efficacy evaluation showed that, the rice fermentation liquid has the functions of moisturizing, repairing, whitening and anti-oxidation^[1], this article is intended to be based on a keratinocyte model, the mechanism of its moisturizing and repairing effects was further studied. In order to study that effect of Rice ferment filtrate on the content of hyaluronic acid (HA), the expression of type 2 hyaluronic acid synthase (HAS2), fibroin (FLG) and transglutaminase (TGM1) gene, at the same time, the content and molecular weight distribution of various components in Rice ferment filtrate were analyzed.

[Key words] Rice ferment filtrate; Component analysis; Moisturizing; Repair; Mechanism research

引言

目的: 探讨大米发酵液的保湿、修护功效机理。方法: 基于角质层细胞, 考察大米发酵产物滤液对透明质酸(HA)含量、2型透明质酸合成酶(HAS2)、丝聚蛋白(FLG)、谷氨酰胺转氨酶(TGM1)的基因表达的影响; 采用凝胶渗透色谱仪GPC进行分子量分布分析; 参照相关国家标准进行各种组分及其含量分析。[结果] 与空白对照组相比, 供试样品大米发酵液-1.0%组的HA含量、FLG基因表达量、TGM1基因表达量、HAS2基因表达量均显著上调, 且上调率分别为31.88%、14.00%、14.00%、19.00%; 供试样品Mw分子量介于189~2848, 其重均分子量Mw、数均分子量Mn、分散系数PD分别为534、474、1.12658; 供试样品中含有6种成人人

体必需氨基酸和4种非必需氨基酸, 且含有组氨酸和精氨酸, 此外, 含有0.38%总氨基酸, 0.116mg/100g维生素B₂、52 μg/100g维生素B₃、0.23mg/L总酚、82.5mg/100g葡萄糖、0.23g/100g总糖。结论: 大米发酵液具有保湿功效与上调角质层细胞的HAS2基因表达量和HA含量密不可分; 大米发酵液具有修护功效与角质层细胞的FLG、TGM1的基因表达量上调密切相关; 大米发酵液的保湿、修护功效则与其所含的氨基酸类、糖类、酚类、维生素类息息相关。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品: 大米发酵液(甘肃泛植制药有限公司)。

表1 大米发酵液对 HA 含量、FLG、TGM1、HAS2 基因表达的影响

HA含量						FLG 基因				TGM1 基因				HAS2基因			
组别	平均浓度 (ng/mL)	SD	P-value	提升率	组别	Mean	SD	P-value	上调率	Mean	SD	P-value	上调率	Mean	SD	P-value	上调率
BC	420.3	13.59	/	/	BC	1	0.08	/	/	1	0.01	/	/	1	0.01	/	/
PC(TGF-β 1)	525.86	26.11	0.003**	/	PC(CaCl2)	1.34	0.04	0.002**	/	2.65	0.3	0.001**	/	1.24	0.05	0.001**	/
大米发酵液-1.0%	554.3	23.81	0.001**	31.88%	大米发酵液-1.0%	1.14	0.04	0.0431**	14.00%	1.14	0.05	0.007**	14.00%	1.19	0.03	0.000**	19.00%

主要试剂：角质形成细胞(广东博溪生物科技有限公司)；KC2500(广东博溪生物)；PBS(索莱宝)；RNAiso Plus(艾科瑞生物)；反转录试剂盒(艾科瑞生物)；荧光染料(艾科瑞生物)；CaCl₂(国药)；HAELISA试剂盒(Abcam)；TGF-β 1(Peprotech)。

主要设备：CO₂培养箱(Thermo, 1501)、超净工作台(苏州安泰, SW-CJ-1F)、普通PCR仪(博日)、荧光定量PCR仪(BioRad, CFX-96)、酶标仪(BioTek, Epoch)。

1.2 方法

1.2.1 保湿、修护功效实验

基于角质形成细胞, 分别通过检测供试样品对透明质酸(HA)含量、HAS2基因表达和FLG、TGM1基因表达的影响, 来评价供试样品的保湿功效和修护功效。

接种：按2.5x10⁵个/孔的接种密度接种细胞至6孔板, 培养箱(37℃、5%CO₂)中孵育过夜。

配液：大米发酵液按1%进行配制, PC(0.3mM CaCl₂)用于FLG、TGM1、HAS2的阳性对照；PC(100 ng/mL TGF-β 1)用于HA的阳性对照。

待6孔板中细胞铺板率达到40%~60%时, 进行分组给药, 每孔给药量为2mL, 每组设3个复孔, 培养箱(37℃、5%CO₂)中孵育24h。

基因表达检测：培养24h后, 吸弃旧液, PBS清洗两次, 每孔加入1mLRNAisoPlus, 吹打裂解细胞后, 收样。提取RNA, 反转录至cDNA后, 进行荧光定量PCR检测, 采用2^{-△△CT}方法进行结果计算。

ELISA检测：根据ELISA检测试剂盒的操作说明书进行检测分析。

1.2.2 分子量测试

使用凝胶渗透色谱仪GPC进行测定。

1.2.3 组分测定

组分测定包括氨基酸、维生素、总酚和总糖。

1.2.4 结果统计分析

应用GraphPad Prism作图, 结果表示为Mean±SD。各组间比较采用t-test统计分析。统计分析均为双尾。与BC组相比, P<0.05认为具有显著差异, *表示; P<0.01认为具有极显著差异, 用**表示。

2 实验结果

2.1 大米发酵液对透明质酸(HA)的影响

如表1、图1所示, 与BC组相比, PC(TGF-β 1)组和供试样品大米发酵液-1.0%组的HA含量均显著上升, 且供试样品组提升率为

31.88%。说明本次测试阳性对照有效, 供试样品大米发酵液-1.0%对增加角质层细胞的HA含量有积极地作用。

2.2 大米发酵液对FLG、TGM1、HAS2基因表达的影响

如表1、图2所示, 与BC组相比, PC(CaCl₂)组和供试样品大米发酵液-1.0%组的FLG、TGM1、HAS2基因表达量均有显著上调, 且供试样品的上调率分别为14.00%、14.00%、19.00%, 说明本次测试阳性对照有效, 供试样品大米发酵液-1.0%对增加角质层细胞的FLG、TGM1、HAS2基因表达有促进作用。

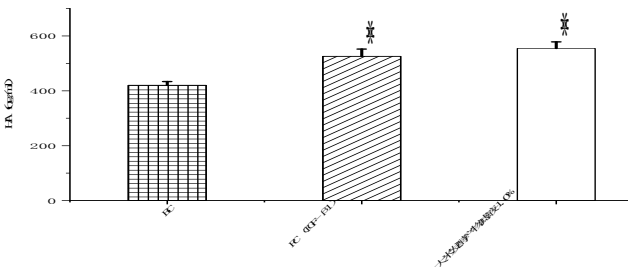


图1 HA含量结果柱状图

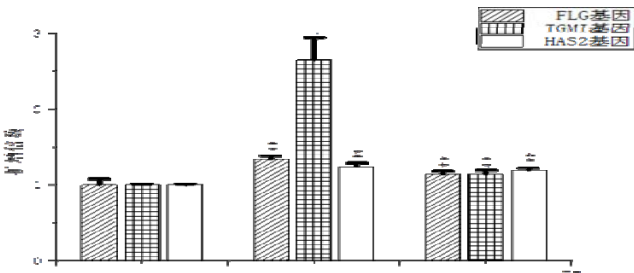


图2 大米发酵液对FLG、TGM1、HAS2基因表达的影响

2.3 大米发酵液的分子量分布范围测试

由图3可知, 供试样品中的重均分子量Mw=534, 数均分子量Mn=474, 分散系数PD=1.12658。表明大米发酵液各组分布均匀, 稳定性能良好。如表3所示, Mw分子量介于189~2848, 75%的组分子量小于700D, 利于皮肤吸收。

表2 大米发酵液的分子量分布范围

分子量分布范围				
Mw 分子量	189-398	398-488	489-585	585-2848
占比%	25	25	25	25

表 3 大米发酵液组分表

序号	检验项目	实测值	序号	检验项目	实测值
1	苯丙氨酸 (mg/mL)	0.024	11	苏氨酸 (mg/mL)	0.0038
2	蛋氨酸 (mg/mL)	0.006	12	异亮氨酸 (mg/mL)	0.0096
3	脯氨酸 (mg/mL)	0.0021	13	组氨酸 (mg/mL)	0.00042
4	甘氨酸 (mg/mL)	0.018	14	总氨基酸 (mg/mL)	3.8
5	谷氨酸 (mg/mL)	0.0087	15	维生素B ₂ (mg/100g)	0.116
6	精氨酸 (mg/mL)	0.013	16	维生素B ₃ (μg/100g)	52
7	赖氨酸 (mg/ml)	0.013	17	葡萄糖 (mg/ml)	0.825
8	酪氨酸 (mg/mL)	0.011	18	总糖 (mg/ml)	2.3
9	亮氨酸 (mg/mL)	0.03	19	总酚 (mg/L)	456.4
10	缬氨酸 (mg/mL)	0.19			

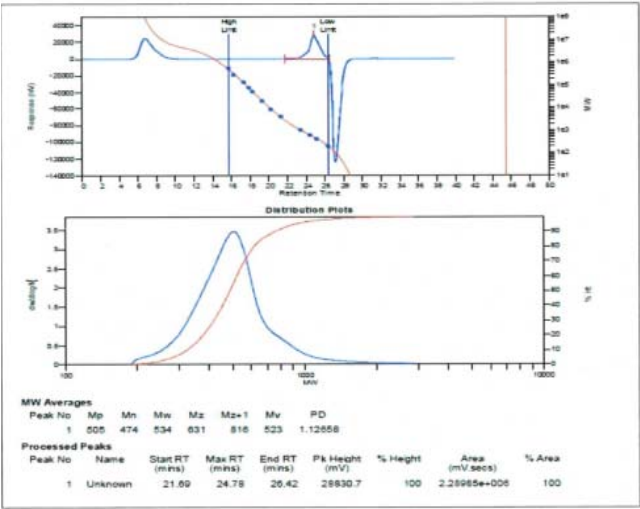


图3 大米发酵液的GPC测试结果

2.4大米发酵液的组分测试

如表3所示,大米发酵液中含有6种成人人体必需氨基酸和4种非必需氨基酸,还有组氨酸和精氨酸,游离氨基酸总量约0.33mg/ml,总氨基酸含量约3.8mg/ml。由此可见大部分氨基酸以小分子肽形式存在。其中,精氨酸具有保持皮肤水分、柔滑肌肤、减少皮屑剥落和抗炎的作用。此外,大米发酵液中含有0.116mg/100g维生素B₂、52 μg/100g维生素B₃、0.23mg/L总酚、0.825mg/ml葡萄糖、2.3ml/ml总糖,由此可见糖以小分子寡聚糖形式存在。

3 讨论与分析

HA是一种理想的保湿成分^[2],而透明质酸合酶-2(HAS2)是透明质酸最广泛表达的酶,也是合成透明质酸的关键酶^[3]。基于角质形成细胞,本文考察了大米发酵液的保湿、修护作用机理。实验表明,1.0%(v/v)大米发酵液能够显著提升角质层细胞的透明质酸(HA)含量(提升率31.88%)和显著上调HAS2基因表达量(上调率为19.00%),说明1.0%(v/v)大米发酵液能够通过上调HAS2基因表达量及提升透明质酸(HA)含量达到保功效。

FLG和TGM1是与皮肤屏障功能密切相关的表皮结构蛋白之一。FLG及其降解产物有助于皮肤水化、pH平衡、表皮屏障完整性和微生物防御。FLG缺乏会造成天然保湿因子(NMF)水平下降,导致角质层水合作用减少,经表皮水分流失(TEWL)增加,致使皮肤干燥^[4]。TGM1基因表达,参与ε-(γ-谷氨酰)赖氨酸的交联作用,以抵抗蛋白酶的水解作用,影响皮肤细胞的正常代谢和角质层的形成,有助于防止水分流失并保护机体免受外界环境的侵害^[5]。实验表明,1.0%(v/v)大米发酵液作用后,角质层细胞的FLG、TGM1基因表达量均显著上调,上调率分别为14.00%、14.00%,说明1.0%(v/v)大米发酵液能够通过上调FLG、TGM1基因表达量,以发挥其修护功效。

大米发酵液具有保湿和修护作用,与其所含组分氨基酸类(10种)、糖类、酚类、维生素类等息息相关。氨基酸利于皮肤吸附水分并锁住水分,以保持皮肤的水润度和弹性,也能促进皮肤细胞的新陈代谢、再生、修复,及减少细纹、皱纹等老化现象,且氨基酸还具有一定的抗氧化能力和抗炎作用(如精氨酸)。此

外,大米发酵液所含分子量介于189~2848,更容易渗透到皮肤中,从而达到更好的护肤效果。

[参考文献]

[1]陈保华,朱志贤,陈国宝.多功效原料大米发酵液的开发及其功效评价[J].中国化妆品,2022(04):104-109.

[2]吴卫炜.化妆品常用保湿剂保湿吸湿性能研究[J].化工管理,2018(5):2.

[3]Yang H, Zhu L, Gu Y, et al. Berberine inhibits low shear stress-induced glycocalyx degradation via modulating AMPK and p47phox/Hyal2 signal pathway[J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 856: 172413-172426.

[4]Anna Dębińska, Matteo Megna, New Treatments for Atopic Dermatitis Targeting Skin Barrier Repair via the

Regulation of FLG Expression[J]. J Clin Med. 2021, 10(11):2506.

[5]张三泉,高歆婧,丘文苑,等.TGM1基因表达沉默对角质形成细胞分化及角质化包膜形成相关蛋白表达的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2016,30(2):5.

作者简介:

伏庆红(1973--),女,甘肃会宁人,毕业于兰州大学,执业中药师,执业药师,从事药品质量管理,天然产物开发应用。

*通讯作者:

陈保华(1962--),男,山东莘县人,兰州大学教授,博士生导师,研究方向:机化学、应用化学、食品、化妆品和药品等领域。中国化学会会员,甘肃省营养学会理事,《中华医药研究》杂志常务编委。