

太子参提取物促透明质酸透皮吸收作用研究

蒋 畅^{1,2}, 赵 立¹, 张继州¹, 阚永军¹, 胡 娟^{1,3*}

¹福建省中医药科学院, 福建 福州

²福建省特色药用植物工程技术研究中心, 福建 宁德

³福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州

收稿日期: 2022年5月9日; 录用日期: 2022年6月21日; 发布日期: 2022年6月28日

摘 要

目的: 采用体外透皮扩散试验探究太子参提取物对透明质酸(hyaluronic acid, HA)的透皮吸收促进作用。方法: 利用改良型Franz扩散池考察HA的体外经皮渗透量变化, 通过单位面积累计透过量及透皮吸收系数评价太子参提取物对HA透皮吸收的促进作用。结果: 在体外透皮吸收实验中, 透明质酸的单位面积累计透过量随时间变化线性递增, 符合零级动力学方程。与传统的透皮吸收促进剂月桂氮酮相仿, 太子参提取物对HA的透皮吸收起到积极的促进作用。结论: 本研究对太子参提取物促HA透皮吸收作用进行了分析探索, 为太子参在功能性护肤产品中的开发利用奠定基础。

关键词

太子参, 透明质酸, 透皮吸收

Study on the Effect of *Pseudostellaria Heterophylla* Extract on Promoting the Transdermal Absorption of Hyaluronic Acid

Chang Jiang^{1,2}, Li Zhao¹, Jizhou Zhang¹, Yongjun Kan¹, Juan Hu^{1,3*}

¹Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou Fujian

²The Engineering Technology Research Center of Characteristic Medicinal Plants of Fujian, Ningde Fujian

³The Second Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

Received: May 9th, 2022; accepted: Jun. 21st, 2022; published: Jun. 28th, 2022

*通讯作者。

文章引用: 蒋畅, 赵立, 张继州, 阚永军, 胡娟. 太子参提取物促透明质酸透皮吸收作用研究[J]. 生物医学, 2022, 12(3): 206-211. DOI: 10.12677/hjbm.2022.123025

Abstract

Objective: Using *in vitro* diffusion cell method to explore the extract of *Pseudostellaria Heterophylla* to promote the absorption of hyaluronic acid (HA). **Methods:** Use the improved Franz diffusion cell to investigate the changes in HA's transdermal absorption properties. **Results:** In the *in vitro* transdermal absorption experiment, the cumulative permeation amount per unit area of hyaluronic acid increased linearly with time, which conformed to the zero-order kinetic equation. Similar to the traditional transdermal absorption enhancer, lauroazone, the extract of *Pseudostellaria Heterophylla* has a positive effect on the transdermal absorption of HA. **Conclusion:** This study analyzed and explored the role of the extract of *Pseudostellaria Heterophylla* to the promotion of HA transparent skin, and laid the foundation for the development and utilization of *Pseudostellaria Heterophylla* in functional skin care products.

Keywords

Pseudostellaria Heterophylla, Hyaluronic Acid, Transdermal Absorption

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

透明质酸(hyaluronic acid, HA)又称玻尿酸,是一种由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰基-D-葡萄糖胺双糖单位通过 β -1,3和 β -1,4糖苷键交互连接构成的酸性黏多糖[1]。自1934年由Meyer和Palmer从牛眼玻璃体中首次提取分离成功以来,HA以其独特的保水保湿作用和极佳的生物相容性而受到功能性化妆品、医疗美容领域的广泛关注,被誉为理想的天然保湿因子(natural moisturizing factor, NMF) [2]。然而由于HA的相对分子质量较大,阻碍了对皮肤表面角质层的穿透,寻找合适的透皮吸收促进剂对HA的实际应用具有重要意义。

近年来,国内外科研团队寻找到多种对透皮吸收具有促进作用的中药成分,中药透皮吸收促进剂以其起效快、效果好、副作用小等特点,受到了多方面的关注[3]。太子参是石竹科植物孩儿参*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.的干燥块根,其味甘、微苦,性平;归脾、肺经;具有益气健脾,生津润肺的功效,含有多种氨基酸、微量元素、多糖、环肽、脂肪酸等活性成分[4]。

环肽是以太子参为代表的石竹科植物的特征成分,因其结构的特殊性而具有丰富的活性。文献报道小分子的环肽可促进胰岛素的经皮吸收,具有细胞穿透作用[5],富含阳离子氨基酸的细胞穿膜肽具有跨膜转运能力[6],这在化妆品等产业的应用中是极其重要的。本研究采用改良的Franz扩散池探究太子参提取物对HA的透皮吸收速率影响,并通过单位面积累计透过量及透皮吸收系数评价太子参提取物对HA透皮吸收的促进作用,为太子参在功能性护肤产品中的开发利用奠定基础。

2. 仪器与材料

2.1. 仪器设备

Milli-Q超纯水机,美国Millipore公司;AE240电子分析天平,瑞士Mettler Toledo公司;DK-S22电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;L-550台式离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;

R-100 旋转蒸发仪, 瑞士 BÜCHI 公司; TP-6 透皮扩散仪, 天津精拓仪器科技有限公司; DNP-9052 隔水式恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; Varioskan Flash 多功能酶标仪, 美国 Thermo Fisher 公司。

2.2. 试剂材料

本实验中使用的太子参产自福建柘荣; 生理盐水(250 mL/瓶, 产品编号: H35020290)购自福州海王福药制药有限公司; 透明质酸(纯度: 97%, 产品编号: H823435)、月桂氮酮(纯度: 97%, 产品编号: A800359)均由上海麦克林生化科技有限公司提供; 透明质酸(HA)测试盒(产品编号: H141-1-2)购自南京建成生物工程研究所。

2.3. 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 体重 $230 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

3. 实验方法

3.1. 太子参提取物的制备

将太子参粉碎, 过三号筛备用。称取 100 g 太子参粉末, 加入超纯水 1 L, 100℃ 恒温水浴加热回流提取 1 h, 冷却至室温后以 5000 rpm 转速离心 15 min 收集上清液, 将下层药渣重复提取一次。合并离心上清液, 减压浓缩后转移至 500 mL 容量瓶中定容, 即得。

3.2. 离体皮肤制备

SD 大鼠脱颈处死后用电推剪仔细脱去腹部绒毛, 分离腹部皮肤。使用纱布及脱脂棉球钝性分离皮下血管筋膜及脂肪组织, 生理盐水反复冲洗至洗液澄清无浑浊。修剪成适宜大小后浸泡于生理盐水中, 用于后续实验。

3.3. 供应室溶液配制

HA 溶液: 称取透明质酸 0.50 g, 加入 100 mL 生理盐水, 静置 2 h 后以玻璃棒充分搅拌溶解, 即得透明质酸浓度为 5 mg/mL 的 HA 溶液。

月桂氮酮-HA 溶液: 取上述 HA 溶液 50 mL, 加入月桂氮酮 250 μL , 磁力搅拌器辅助溶解均匀, 即得月桂氮酮浓度为 0.5% 的月桂氮酮-HA 溶液。

太子参提取物-HA 溶液: 称取透明质酸 0.50 g, 加入 3.1 项下所制太子参提取物溶液 50 mL, 静置 2 h 后以玻璃棒充分搅拌溶解, 即得太子参提取物-HA 溶液。

3.4. 体外透皮吸收实验

采用改良型 Franz 扩散池, 渗透面直径 1.5 cm, 有效渗透面积约 1.767 cm^2 , 接收室容积 15 mL。将离体皮肤固定于供应室与接收室之间, 锁紧螺母加以固定, 角质层面向供应室。接收室内加入生理盐水作为接收液, 检查皮肤与接受液之间的接触面是否已排除气泡, 确认真皮层与接受液完全接触后, 向各组供应室内分别加入 3.3 项下配制各溶液。将安装好的扩散池 37℃ 恒温 300 r/min 搅拌, 分别于实验开始后 1、2、4、6、8、12 共计 6 个时间点抽取接受室内溶液 1 mL 并以等量生理盐水补足接收室内溶液体积。接受液以 0.22 μm 滤膜过滤后供后续检测使用。

3.5. HA 含量测定

采用酶联免疫分析法测定上述 3.4 项下采集接受液中的透明质酸含量。向预先包被了抗体的酶标孔

中加入样本，再加入生物素标记的识别抗原，在 37℃ 下孵育 30 分钟，两者与固相抗体竞争结合形成免疫复合物，经 PBST 洗涤除去未结合的生物素抗原，然后加入亲和素-HRP，在 37℃ 下孵育 30 分钟，亲和素-HRP 与生物素抗原结合，洗涤后结合的 HRP 催化 TMB(四甲基联苯胺)成蓝色，随后在酸的作用下转化成黄色，在 450 nm 波长下有吸收峰，吸光值与样本中抗原的浓度成负相关。

3.5.1. HA 系列标准样配制

取 150 μL 标准品稀释液到 HA 标准品干粉管中，漩涡 30 秒使其充分溶解，即为标准品原液。取 5 支 0.5 mL 无酶 EP 管，每管加 150 μL 的标准品稀释液，分别标记上 400 ng/mL, 200 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL。取 150 μL 标准品原液加入标记 400 ng/mL 的管中，混匀后同样取出 150 μL ，加入下一管，以此类推直至最后一管。以标准品稀释液为 0 ng/mL 标准样，即得 HA 系列标准样。

3.5.2. 加样孵育

酶标板分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔仅加显色剂 A, B 和终止液用于调零，余孔分别加标准样或待测样品 50 μL ，然后加入生物素抗原工作液 50 μL ，注意不要产生气泡，将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，覆膜，于培养箱内 37℃ 恒温孵育 30 min。

3.5.3. 洗涤加酶

弃去孔内液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。每孔加 50 μL 亲和素-HRP，于培养箱内 37℃ 恒温孵育 30 min 后，弃去孔内液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。

3.5.4. 显色测定

依序每孔先加入显色剂 A 液 50 μL ，再加入显色剂 B 液 50 μL ，轻轻震荡混匀，于培养箱内 37℃ 恒温避光显色 10 min，依序每孔加终止溶液 50 μL 终止反应，终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。将样本送入酶标仪，以空白孔调零，在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度(OD 值)。通过 ELISA Calc 回归/拟合计算程序根据标准样浓度和对应 OD 值，计算出标准曲线的回归方程，将待测样品 OD 值代入计算，测定 HA 含量。

3.6. 数据处理

HA 的单位面积累计透过量及透皮速率常数通过以下公式计算：

$$Q_n = \frac{VC_n + V_s \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{A} \quad J = \frac{dQ_n}{dt}$$

式中 Q_n 表示 n 时间点 HA 的单位面积累计透过量； A 表示有效透皮扩散面积，本实验中为 1.767 cm^2 ； C_n 代表 n 时间接受液 HA 浓度的测定值， C_i 代表 n 时间点之前接受液 HA 浓度的测定值； V 表示接受池总体积，本实验中为 15 mL； V_s 表示接受池取样体积，本实验中为 1 mL。做 Q_n 对 t 的曲线得回归方程，其斜率 J 即为透皮速率常数。

4. 结果与讨论

各组不同时间点接受液中透明质酸浓度 ELISA 测定结果详见表 1，将数据代入上述 3.6 项下公式可得各样本透明质酸单位面积累计透过量(见表 2)，作 Q_n 对 t 的方程得到各组样品的透皮动力学方程如下：

$$\text{HA 组: } Q_n = 17.035t + 2.2957 \quad J = 17.035$$

太子参提取物-HA 组: $Q_n = 55.746t + 82.379$ $J = 55.746$

月桂氮酮-HA 组: $Q_n = 81.513t + 125.85$ $J = 81.513$

Table 1. HA concentration in receiving solution (ng/mL)

表 1. 接受液中透明质酸浓度(ng/mL)

采样时间	HA 组	太子参提取物-HA 组	月桂氮酮-HA 组
1 h	3.527	15.734	23.105
2 h	3.617	21.287	31.443
4 h	7.011	35.116	51.414
6 h	10.756	43.776	66.729
8 h	14.843	54.801	80.717
12 h	22.125	76.785	111.768

Table 2. Cumulative transmittance of HA per unit (ng/cm²)

表 2. 透明质酸单位面积累计透过量(ng/cm²)

采样时间	HA 组	太子参提取物-HA 组	月桂氮酮-HA 组
1 h	29.941	133.565	196.138
2 h	32.701	189.609	279.994
4 h	63.559	319.050	467.322
6 h	99.318	412.437	626.427
8 h	140.100	530.802	782.935
12 h	210.316	748.437	1092.206

由各组样品的动力学方程可知,在体外透皮吸收实验中,透明质酸的单位面积累计透过量随时间变化线性递增,符合零级动力学方程。与传统的透皮吸收促进剂月桂氮酮相仿,太子参提取物对 HA 的透皮吸收起到积极的促进作用,太子参提取物-HA 溶液组透明质酸的 12 小时累积透过量是 HA 溶液组的 3.5 倍。上述研究表明,太子参提取物对透明质酸的透皮吸收具有一定的促进作用。

随着经皮给药系统(transdermal delivery drug system, TDDs)的研究逐渐深入,众多实验证据证明化学促渗法、脂质载体法等用于突破角质层屏障的传统方法均对皮肤结构具有一定影响,长期使用或将影响皮肤正常生理功能,造成皮肤过敏、水油失衡等不良后果[7]。天然来源的中药透皮吸收促进剂,因毒副作用小、促透效果好、可实现“药辅合一”等优点,受到学者们的广泛关注[8]。研究表明,药材中所含的挥发油等脂溶性成份在促进药物透皮吸收的同时,通过调节炎症及氧化应激相关通路对皮肤微生态环境起到调控作用[9];生物碱类成分对芍药苷、阿魏酸、丁香苦苷等极性药物亦具有促透作用[10]。本实验对太子参提取物体外促透效果进行了初步评价,为后续深入研究其具体促透作用机制奠定基础。

基金项目

福建省公益类科研院所专项(2019R1003-7);福建省自然科学基金项目(2021J01913);福建省特色药用植物工程技术研究中心开放课题(PP201906)。

参考文献

- [1] Meyer, K. and Palmer, J.W. (1934) The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *Journal of Biological Chemistry*, **107**, 629-634. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)75338-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75338-6)
- [2] 蔡同凯, 刘谋治, 邓婕, 等. 透明质酸的作用机制及临床应用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2022, 40(2): 103-107.
- [3] 陆珊珊, 赵玉荣, 姚俊宏, 等. 中药挥发油透皮吸收促进剂制剂技术的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(10): 2477-2481.
- [4] Chen, J., Pang, W., Kan, Y., *et al.* (2017) Structure of a Pectic Polysaccharide from *Pseudostellaria heterophylla* and Stimulating Insulin Secretion of INS-1 Cell and Distributing in Rats by Oral. *International Journal of Biological Macromolecules*, **106**, 456-463. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.034>
- [5] Chen, Y., Shen, Y., Guo, X., *et al.* (2006) Transdermal Protein Delivery by a Co-administered Peptide Identified via Phage Display. *Nature Biotechnology*, **24**, 455-460. <https://doi.org/10.1038/nbt1193>
- [6] 常明明. 阳离子环肽对胰岛素经皮和跨膜促渗作用研究[D]: [博士学位论文]. 大连: 大连理工大学, 2018.
- [7] 武晏屹, 田硕, 白明, 苗明三. 基于皮肤功能特点的药物透皮吸收新思考[J]. 世界中医药, 2020, 15(3): 361-363.
- [8] 庞晓晨, 成睿珍, 赵静, 等. 中药透皮给药系统研究进展及其新剂型的应用[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(3): 286.
- [9] 应鹏云, 黄诗雨, 陈丽华, 等. 基于皮肤微生态环境中药挥发油作用特点分析[J]. 中成药, 2021, 43(8): 2141-2145.
- [10] 李倩, 高瑜, 邹佳, 等. 中药透皮吸收促进剂的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(1): 189-193.