



动物模型评价化妆品原料美白功效的研究

秦瑶^{1,2}, 程树军¹, 黄健聪¹, 张俊宾²

(1. 广东检验检疫技术中心, 广州 510623; 2. 广州市华代生物科技有限公司, 广州 510130)

【摘要】 目的 建立化妆品原料美白功效评价动物模型并应用。方法 紫外线连续照射7 d造成豚鼠皮肤黑化模型,在褐色无毛部位连续涂抹样品30 d。Maxmeter 仪检测皮肤黑色素指数(MI)和红色素指数(EI)的变化。安乐处死动物后取皮肤组织,多聚甲醛固定、石蜡切片,多巴胺染色和氮银染色,对组织切片进行图像分析。结果 UV照射豚鼠皮肤后,MI指数升高,组织学观察显示黑色素颗粒增大和表皮层分布增多。经白藜芦醇-熊果苷复配美白原料测试,皮肤颜色MI指数显著下降,EI指数升高。组织学显示呈多巴胺染色阳性的黑色素颗粒明显抑制,氮银染色区域在表皮内的分布下降。结论 利用紫外线造成实验动物皮肤黑化模型,运用皮肤生物物理学检测和组织学染色分析技术可以用于美白化妆品原料的功效评价和机制研究。

【关键词】 化妆品; 动物模型; 美白; 组织化学; 白藜芦醇

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)07-0021-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.005

Whitening efficacy assessment for cosmetic materials in animal model

QIN Yao^{1,2}, CHENG Shu-jun¹, HUANG Jian-cong¹, ZHANG Jun-bin²

(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623;

2. Guangzhou Chn-Alt Biotechnology Co, 510130)

【Abstract】 Objective To establish the assessment method for whitening efficacy of cosmetic materials by animal model and applications. **Methods** Guinea pigs were irradiate with UVB for 7 days to induce skin darkening model thereafter to assess the whitening efficacy of cosmetic materials at brown part through treatment 30 days continuously. The levels of melanin index(MI) and erythem index(EI) were analysed by Maxmeter MX18. The skin tissues were stripped, paraformaldehyde fixed and paraffin sections following the animal euthanasia. The morphological observed and image analysis were detected following Dopamine or Fontana-Masson histochemical staining. **Results** The MI index of skin and melanin granular in the section of guinea pig were increased significantly after UVB radiation. Following the resveratrol-arbutin blend treatment, it was showed that MI index were decreased, the melanin granular significantly inhibit by dopamine positive staining and Fontan-Masson positive staining distribution in the epidermal were decreased obviously. **Conclusions** The skin biophysics detecting combine histochemical staining and image analysis through UV induced skin darkening animal model, which could be used for the assessment of whitening efficacy of cosmetic materials and mechanism research of melanogenesis.

【Key words】 Cosmetics; Animal model; Whitening; Histochemical; Resveratrol

皮肤美白剂的研发及其功效评价方法与黑色素形成生物学机制的认识密切相关。近年来,随着

[基金项目] 国家科技支撑计划(2011BAI15B03)。

[作者简介] 秦瑶(1979-),女,工程师,从事化妆品安全和功效评价方法研究,E-mail: chnalt@sohu.com.

[通讯作者] 程树军(1971-),男,博士,研究员,E-mail: chengciq@sohu.com.

对人体黑色素形成通路、基因调控、信号传导等生物学机制的深入了解,以及体外培养技术、分子生物学技术和皮肤生物物理学检测技术的发展,美白剂的评价逐渐倾向于采取以机制为导向的组合评价策略^[1]。体外酶抑制法用于原料初筛,细胞法用于机制研究和初筛^[2],人体临床试验用于配方或成品的功效确认等^[3]。虽然角质细胞摄取试验、3D 皮肤模型等新的非整体动物的体外方法在原料筛查阶段已得到应用^[1,4],但尚不能完全模拟化妆品活性成份在体内功效作用的复杂机制。动物法能较好地弥补上述几种方法的不足,基于动物模型的美白评价方法可以在体外初筛的基础上起到进一步明确作用效果的作用^[1],成为整合运用体外方法、体内动物试验和临床评估化妆品美白功效的重要环节。本文选取花色豚鼠为实验动物,建立紫外线诱发皮肤黑化模型,利用皮肤生物物理检测技术,结合组织化学染色及图像分析技术对皮肤内的黑色素颗粒定量,应用于美白化妆品的功效评价。

1 材料和方法

1.1 试剂及配制

L-多巴、白藜芦醇、熊果苷和戊巴比妥钠(购自 Sigma 公司),氯化金、核固红、五水合硫代硫酸钠(均购自国药集团化学试剂有限公司),硝酸银(购自天津市赢达稀贵化学试剂厂),伊红苏木素试剂盒和中性树胶封片剂(广州维格斯生物科技有限公司),多聚甲醛和氨水(广州化学试剂厂)。其余试剂均为市售分析纯。白藜芦醇(RV),先用乙醇溶解,再用无菌水加温稀释,配成终浓度为 0.05mM 的溶液,熊果苷(AB),先用无菌水 50℃ 溶解,再配成 5 mM 的溶液,熊果苷-白藜芦醇(AR)溶液,上述 RV 溶液和 AB 溶液等比例混合。

1.2 仪器设备

皮肤光毒性试验仪(Hope-med 8130A 型,天津合普公司),肤色测定仪(德国 CK 公司 mexmeter 18),生物组织脱水机(Leica TP 1020)、染色机(Leica ST 5010)和石蜡切片机(Leica RM 2255),显微镜及照相系统(德国 Leica DM2000),Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司)。动物实验用斑试器购自广州国裕医学有限公司,直径 2 cm,容积 1 mL。

1.3 实验动物

普通级健康成年棕黄色 Hartly 豚鼠,雌性,30

只,体重(250 ± 20) g。购自广东省医学动物中心,动物合格证【SCXK(粤)2008-0002】。实验在广东检验检疫技术中心进行,使用许可证【SYXK(粤)2008-0086】。

1.4 皮肤黑化模型

随机选择 10 只豚鼠制作模型,取棕色皮肤部位,去除被毛,经 UVB 紫外线照射,波长为 310 nm,累计照射总量 5000 mJ/cm²。每天照射 1 次,每次 1 h,持续 7 d,未照射部位以斑试器覆盖。定时检测皮肤 MI 和 EI 指数,停止照射 7 d 后,处死动物取皮肤组织。

1.5 原料美白作用评价

20 只动物随机分为 2 组,美白剂组 10 只,空白对照组 10 只。美白剂组先经紫外线照射成皮肤黑化模型,在每只豚鼠背部取相对独立的 4 块区域作为给药区,分别为 AB 组、RV 组、AR 组和对照组。取封闭式斑试器,将受试物约(0.8 ± 0.2) mL 置于斑试器内,与皮肤直接接触,固定斑试器,敷用时间为 6 h,试验结束后用温水清除残留受试物。模型对照区域每次涂抹 0.9% 生理盐水 1 mL。连续给药 5 周,安乐处死动物后取皮肤组织。

1.6 皮肤颜色测定

造模前、造模后、试用产品前及使用产品后用 mexmeter 仪检测红色素指数(EI)和黑色素指数(MI),基于单光谱反射和吸收的原理,获得皮肤 EI 和 MI 含量数据。

1.7 组织学染色

所取皮肤组织经 10% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡切片,分别进行如下组织化学染色。L-多巴染色:切片经脱蜡处理 0.1% L-多巴溶液中 37℃ 浸泡 4 h,镜下观察染色变化,PBS 冲洗,蒸馏水冲洗,HE 复染。Fontana-Masson 氨银染色:切片经脱蜡处理和水洗后,置于氨银溶液中,60℃ 水浴放置 60 min,用 0.1% 氯化金染色 10 min,去离子水冲洗,再用 5% Na₂S₂O₃ 溶液浸泡 5 min,分别用自来水和去离子水冲洗,最后用 0.2% 核固红染色 5 min,去离子水冲洗。常规脱水,二甲苯透明和中性树胶封片。

1.8 图像分析

对染色后组织学切片进行显微拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件对图像进行如下分析。参考文献对 L-多巴染色的黑色颗粒进行分级^[5],1 级:基底细胞和棘层偶见黑素颗粒;2 级:黑素颗粒分布以基底层为主,且分布不连续;3 级:基底细胞和棘层均可

见呈连续带状分布的黑素颗粒; 4 级: 基底细胞和棘层可见大量呈连续带状分布的黑素颗粒, 且角质细胞内可见较多黑素帽(附着于细胞核的黑素颗粒呈帽状); 5 级: 表皮全层密布黑素颗粒, 可见较多黑素帽。参考文献对氨银染色的组织切片进行光密度分析^[6], 并作修改。光密度/黑色素细胞面积(L/M): 指黑素颗粒占黑色素细胞面积的百分率, 表明黑色素细胞内黑素颗粒的含量。光密度/表皮细胞面积(L/K): 指黑素颗粒占表皮角质层细胞面积的百分率, 表明黑素颗粒迁移到角质层的含量。光密度/表皮层面积(L/E): 指黑素颗粒占全部表皮层的面积的百分率, 表明黑素颗粒在表皮中的含量。每个样品随机拍摄 30 张照片进行处理和分析。

1.9 统计学处理

数据采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 两组间数据比较采用 t 检验, P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 紫外线皮肤黑化模型

紫外线照射前后, 肤色测定和多巴染色、氨银染色结果见表 1。棕色皮肤经 UVB 照射后, MI 显著升高, EI 指数明显下降。组织化学染色显示黑素含量均明显增大, 黑素颗粒染分级接近 5 级。L/M、L/K 和 L/E 的值照射前后相比均具有显著性差异。表明采用累计总量达 5000 mJ/cm² 左右的 UVB 照射, 可以造成豚鼠皮肤黑化模型。

2.2 美白功效比较

紫外线造模后皮肤分别涂抹熊果苷(AB)、白藜芦醇(RV)和熊果苷-白藜芦醇复配物(AR), 皮肤颜色指数测定、L-多巴染色黑素颗粒分级和氨银染色图像分析结果见表 2。L-多巴和氨银组织化学染色见图 1 和图 2(图 1, 图 2, 彩插 5)。

皮肤颜色测试表明, 美白剂组与模型组比较, MI 明显降低, EI 明显升高, 复合化合物组(AR)比单一 AB 组和 RV 组皮肤 MI 下降更显著。RV 对 EI 指数的改善较 MI 指数明显, 提示 RV 对红色素提升效果优于 AB。黑素颗粒分级结果表明 AR 组分级明显下调。

表 1 UVB 照射前后皮肤测试结果比较

Tab.1 Skin test results compared before and after irradiation

观察指标 observation index	照射前 before irradiation	照射后 after irradiation
黑色素指数 melanin index(MI)	362.5 ± 35.4	437.5 ± 27.8**
红色素指数 erythem index(EI)	264.0 ± 24.2	212.0 ± 27.3**
黑素颗粒染色分级 melanin granules staining grading	3.2 ± 0.9	4.6 ± 0.7**
光密度/黑色素细胞面积 optical density/melanocyte(L/M)	0.236 ± 0.048	0.351 ± 0.042**
光密度/表皮细胞面积 optical density/epidermal cell(L/K)	0.164 ± 0.018	0.212 ± 0.051**
光密度/表皮层面积 optical density/epidermis layer(L/E)	0.105 ± 0.012	0.173 ± 0.045*

注: 照射前后对比 **P < 0.01。

Note: compared before and after irradiation expose **P < 0.01.

表 2 不同美白剂配方效果比较

Tab.2 Compare the effect of different whitening agent

观察指标 Observation index	模型对照 Model group	空白对照 Control group	熊果苷组 Arbutin group(AB)	白藜芦醇组 Resveratrol group(RV)	熊果苷-白藜芦醇复配组 Arbutin-resveratrol group(AR)
黑色素指数 Melanin index(MI)	425 ± 25.6 ^{△△}	378 ± 21.7**	384 ± 24.4**	397 ± 23.1**	361 ± 20.8**
红色素指数 Erythem index(EI)	223 ± 19.7 ^{△△}	256 ± 22.5**	241 ± 21.7**	254 ± 20.8**	278 ± 26.0**
黑素颗粒染色分级 Melanin granules staining grading	4.5 ± 0.5 ^{△△}	3.0 ± 1.0**	2.5 ± 0.5**	3.0 ± 1.0**	2.0 ± 0.5** ^{△△}
光密度/黑色素细胞面积 Optical density/melanocyte(L/M)	0.342 ± 0.037 ^{△△}	0.241 ± 0.034**	0.267 ± 0.027**	0.295 ± 0.030** [△]	0.234 ± 0.022**
光密度/表皮细胞面积 Optical density/epidermal cell(L/K)	0.202 ± 0.026 ^{△△}	0.160 ± 0.021**	0.137 ± 0.020** [△]	0.102 ± 0.017**	0.088 ± 0.014**
光密度/表皮层面积 Optical density/epidermis layer(L/E)	0.169 ± 0.021 ^{△△}	0.098 ± 0.014**	0.135 ± 0.021** [△]	0.124 ± 0.014** [△]	0.101 ± 0.019**

注: 与模型组比较* P < 0.05, **P < 0.01, 与空白组比较[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01。

Note: compared with UV model group * P < 0.05, **P < 0.01, compared with control group [△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01.

组织化学图像分析表明, 美白剂组与模型组相比, 皮肤内黑素含量显著降低, L/M、L/E、和 L/K 均

有不同程度下降,统计数据具有显著性差异,以 AR 组各指标下降最为显著。相比之下,AB 组对 L/M 的下降较 RV 组明显,而 RV 对 L/E 和 L/K 的影响较显著。提示使用白藜芦醇 30 d 后,对表皮细胞内黑色素颗粒的含量影响较显著,而 AB 对黑色素细胞内颗粒的合成影响较明显。

3 讨论

利用动物模型研究美白剂的功效和作用机制是美白产品研发的重要依据,本文利用紫外线造成豚鼠皮肤黑化模型,运用皮肤临床检测、组织化学染色及图像分析等多种技术手段研究美白剂的功效,把临床监测和组织学显微分析相结合,提高了动物模型的使用效率。

把无创性皮肤定量检测仪用于动物皮肤颜色变化的检测,提供了一种客观动态的评价方法,但与人体临床试验一样,也应保持检测环境的恒温、恒湿和光线稳定^[3]。利用图像分析软件对组织切片进行黑素颗粒分级和黑素含量分析应控制染色的质量和不同染色方法之间的对比。本文观察了两种染色方法对检测结果的影响,结果表明,组合染色法能对不同美白剂之间的效果差异较好地区分,复合使用熊果苷-白藜芦醇,能显著提高美白效果,所得结果均具有显著性差异。L-多巴染色适合黑素颗粒的分级,该方法利用黑素细胞内的多巴氧化酶对多巴氧化进行染色,而多巴氧化酶特异性地存在于黑素细胞内,刘荣等认为多巴染色法的特异性和灵敏度更高一些^[6]。氮银染色法是因为黑素具有还原性,能将氧氧化银氨液内的银离子还原成金属银而成黑色,适合对整张切片的光密度进行分析。这两种方法的缺点是特异性不强,近年来,分子生物学研究发现,多种美白剂和抗氧化剂与黑色素形成中的 MITF、HMB45 等有关,因此,如果补充 MITF、S100 以及 HMB45 等表征黑色素细胞的特异标志物的免疫组化方法可提高动物模型应用于作用机制的研究^[7]。

人体皮肤黑色素的形成是一个非常复杂的生物学过程,由于不同美白剂的作用机制差异很大,不同试验体系获得的结果可能存在差异^[8]。如体外蘑菇酪氨酸酶测试白藜芦醇抑制活性是曲酸的 40 倍,小鼠 B16 细胞的研究也表明白藜芦醇去色素效果可能与其抑制 MITF 和酪氨酸酶启动子活性有关^[2],但用正常人黑色素细胞没有得出相同的研究

结论^[9]。白藜芦醇经证实的主要生物学作用是下调血管活性肽(如内皮缩血管肽 ET-1)活性^[10],而 ET-1 是重要的促黑素合成和黑素细胞增生的分裂原。RV 还可调节凋亡信号通路,对抗因紫外线照射诱发皮肤细胞内自由基升高引起的损伤作用^[11]。经研究证实白藜芦醇对表皮细胞的保护作用是通过与表皮细胞膜特异性的多酚受体结合^[12],而对黑色素细胞的作用是直接抑制其活性而不影响其基因表达。熊果苷虽是氢醌的衍生物,其细胞毒性较氢醌低,是公认的抑制黑色素合成和转运的化合物,它通过竞争性和可逆性地与酪氨酸酶结合而抑制黑色素的形成,并不影响酪氨酸酶的 RNA 转录^[13],而且高剂量使用反而可能引起黑色素的异常增生,因而其在产品中的使用浓度通常控制在 5% 以内。本文研究表明,单纯使用白藜芦醇对于皮肤的美白效果不如熊果苷,采用二者联合复配,不仅可降低熊果苷的使用浓度,而且美白效果有显著提高,红细胞指数明显上升,表皮细胞内黑素颗粒下降明显。提示在肤色变白的同时,复配后通过血红素的变化间接影响肤色。推测白藜芦醇所起作用可能与对抗因紫外线造成的氧化应激和自由基损伤,缓解毛细血管紧张程度和抑制黑素颗粒向表皮细胞的转运有关。

从天然植物中开发化妆品活性原料已成为一种潮流^[14],而且多种生物活性物质配合使用可明显相互促进各自本身的功效,如防晒产品中添加保湿剂提高防晒指数,美白产品中添加抗氧化剂提高美白功效等^[15]。本研究结果也表明,复合使用熊果苷-白藜芦醇能显著提高美白效果,使组织中的黑素颗粒生成和分布明显减少。本研究表明使用动物模型试验对于整体水平美白功效评价是有价值的,为下一步人体临床试验确认美白效果提供依据。

参考文献:

- [1] 程树军,步犁,潘芳.基于黑色素形成机制的美白化妆品功效体外检测方法[J].中国卫生检验杂志,2012,22(3):665-668.
- [2] Solano F, Briganti S, Picardo M, et al. Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects [J]. Pigment Cell Res, 2006, 90, 550-571.
- [3] Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, et al. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter, the DermaSpectrometer and the Mexameter [J]. Skin Res Technol, 2000, 6(4): 230-238.

(下转第 35 页)

很大的偏差。

Yaksh 等^[1]首先创建了蛛网膜下腔置管的动物模型,其建立解决了以往置管模型的一系列问题,包括多次给药时需要反复穿刺、难以确定药物是否注射入蛛网膜下腔等。但此种方法术后死瘫率较高。有文献^[5]报道称,术后死亡通常发生在 30 min 内,解剖动物发现死亡多为脊髓受压或损伤所致。也有文献^[6]报道 Yaksh 法置管后一周大鼠平均体重均降低,因此人们开始寻找更有效的置管方法。吴世民等^[7]提出了新型大鼠鞘内置管模型的制作方法,于 L₃₋₄ 间隙鞘内置管,结果发现与 Yaksh 法相比,该模型术后肢体发生瘫痪率明显降低,且注药后的起效时间、有效时间和有效百分率均无差异。随后翁莹琪等^[8]又将吴世民的方法加以改进,提出了改良小鼠腰段蛛网膜下腔置管法。

本实验数据显示经寰枢椎蛛网膜下腔置管法与 Yaksh 法相比可以明显降低术后死瘫率;且体重恢复较快;与腰椎置管法相比对行为学(PWT 值和 TF 值)影响较小且不影响药效。

综上所述,经寰枢椎蛛网膜下腔置管法既有效解决了 Yaksh 法术后死瘫率高等问题,且与腰椎置管法相比又可以明显改善术后并发症,提示其可作为一种安全有效的新型鞘内置管方法。

参考文献:

- [1] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space [J]. *Physiol Behav*, 1976, 17(6): 1031-1036.
- [2] Milligan ED, Hinde JL, Mehmert KK, et al. A method for increasing the viability of the external portion of lumbar catheters placed in the spinal subarachnoid space of rats [J]. *J Neurosci Methods*, 1999, 90(1): 81-86.
- [3] Jasmin L, Ohara PT. Long-term intrathecal catheterization in the rat [J]. *J Neurosci Methods* 2001, 110(1-2): 81-89.
- [4] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [5] Poon YY, Chang AY, Ko SF, et al. Catheterization of the thoracic spinal subarachnoid space in mice [J]. *J Neurosci Methods* 2011, 200(1): 36-40.
- [6] Serpell MG, DeLeo JA, Coombs DW, et al. Intrathecal catheterization alone reduces autotomy after sciatic cryoneurolysis in the rat [J]. *Life Sci*, 1993, 53(25): 1887-1892.
- [7] 吴世民, 张咸伟. 大鼠鞘内置管模型的制作 [J]. *中国现代医生* 2008, 46(15): 118-119.
- [8] 翁莹琪, 郭曲练, 王锴, 等. 改良小鼠腰段蛛网膜下腔置管法 [J]. *实验动物与比较医学* 2010, 30(2): 136-140.

(修回日期)2013-04-22

(上接第 24 页)

- [4] Van Gele M, Geusens B, Speeckaert R, et al. Development of a 3D pigmented skin model to evaluate RNAi-induced depigmentation [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(9): 773-775.
- [5] 张敏, 李春阳, 王金玉, 等. 不同中波紫外线对豚鼠皮肤色素沉着及 α -黑素细胞刺激素表达的影响 [J]. *山东大学学报(医学版)* 2011, 49(3): 59-63.
- [6] 刘荣, 孙建宁, 郭亚健. 化妆品原料美白功效动物评价应用研究 [J]. *中国美容医学* 2011, 20(8): 1259-1262.
- [7] Park H Y, Wu C, Yonemoto L, et al. MITF mediates cAMP induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes [J]. *Bio Chemical Journal*, 2006, 395(3): 571-578.
- [8] Schiaffino MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and Pathology [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(7): 1094-1104.
- [9] Newton R, Cook A, Roberts D, et al. Post-transcriptional regulation of melanin biosynthetic enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127, 2216-2227.
- [10] Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, et al. Endothelin-1

synthesis reduced by red wine [J]. *Nature*, 2001, 414: 863-864.

- [11] Schiaffino MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(7): 1094-1104.
- [12] Bastianetto S, Dumont Y, Duranton A, et al. Protective Action of Resveratrol in Human Skin: Possible Involvement of Specific Receptor Binding Sites [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12935.
- [13] Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration [J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10: 4066-4087.
- [14] Smit N, Vicanova J, Pavel S. The Hunt for Natural Skin Whitening Agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10: 5326-5349.
- [15] Buonocore D, Lazzaretti A, Tocabens P, et al. Resveratrol-procyanidin blend: nutraceutical and antiaging efficacy evaluated in a placebo-controlled, double-blind study [J]. *Clinical Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2012, 5: 159-165.

(修回日期)2013-03-26