

微藻源甘油葡糖苷抗炎舒缓及屏障修护功效评价

李艳, 李新, 李日升, 刘海艳, 周晓峰, 段仰凯*
(青岛中科蓝智生物科技发展有限公司, 山东青岛, 266000)

摘 要: 微藻源甘油葡糖苷 (Glycerolglucoside, GG) 是一种具备多种功效的化妆品原料, 本文通过细胞实验和3D皮肤模型等实验研究了甘油葡糖苷的抗炎特性。结果表明, GG可显著降低LPS诱导RAW264.7细胞分泌的IL-1 β 和IL-6释放量, 证明了GG具有抗炎的作用。在GG浓度为3%时, 肥大细胞脱颗粒率降低了87.88%, 证明GG具有舒缓功效。基于3D表皮皮肤模型验证了GG可明显改善角质层疏松情况, 并能够降低炎症因子IL-1 α 和PGE2的表达量。通过TGM1&LOR基因表达结果显示, GG可以显著增强角质细胞屏障功能; 采用细胞迁移划痕实验同样证明了GG具有良好的细胞修复功效。

关键词: 微藻源; 甘油葡糖苷; 抗炎舒缓; 炎症因子; 细胞修护

作者简介: 李艳, 博士, 青岛中科蓝智生物科技发展有限公司研发负责人, 长期从事化妆品原料功效研究, E-mail: liyan@sderi.cn。

通讯作者简介: 段仰凯, 博士, 总经理, 长期从事微藻高附加值产品的生物合成机制及应用研究。E-mail: duanyk@qibebt.ac.cn。



医学上, 皮肤过敏反应也称之为变态反应, 是一种常见的皮肤病^[1,2], 是指机体受到某些抗原刺激时, 出现以生理功能紊乱或组织细胞损伤为主的异常特异性免疫应答^[3], 临床上主要表现为湿疹、荨麻疹、药疹、接触性皮炎和异位性皮炎等^[1,4]。皮肤产生过敏时会出现皮肤干燥、疼痛、瘙痒现象, 严重时更可能伴有红肿、疱疹等症状, 给患者的日常生活带来了很大影响^[5]。

微藻细胞将太阳能转化为化学能, 以化合物的形式储存起来^[6]。由于微藻在自然界中不断受到外界压力(暴露于紫外线、活性氧和自由基等), 因此它们进化出多种机制, 如通过产生具有生物活性的次级代谢产物(被称为“生物活性化合物”)^[7]抵抗这些不利条件来保护自己。这些生物活性化合物主要为多糖、多不饱和脂肪酸(PUFA)、蛋白质、肽、氨基酸、维生素、多酚、植物固醇等^[8]; 这些化合物具有多种作用, 如抗氧化、抗癌、抗菌、抗病毒和抗真菌活性以及免疫刺激作用^[9]。微藻化合物还具有抗炎作用, 可调节巨噬细胞功能以维持免疫系统的稳态。此外, 还有研究发现微藻提取物在肤色、细胞外基质稳态、痤疮管理、细胞更新、皮肤美白、炎症控制、血管生成诱导和氧化应激管理方面具有独特的作用^[10,11]。这引起了化妆品行业的关注, 并使其成为化妆品或药妆产品的重要研发方向和新兴热门成分^[12]。

天然甘油葡糖苷(Glycerolglucoside, GG)及其衍生物最早由科学家在高等植物中发现的^[13], 广泛存在于沙漠卷柏和新鲜百合中, 是由一分子葡萄糖和甘油通过 α -1, 2-糖苷键连接而成的糖苷类化合物。除高等植物外, 一

些微藻在高盐环境下也可以合成GG(特别是2-O- α -GG)^[14]。与高等植物的天然合成不同, 微藻源的GG合成严格受环境刺激诱导。在非胁迫条件下, 细胞中不会积累GG, 当遇到盐度升高的环境时, 微藻会改变细胞生理以应对盐胁迫, 在此期间GG的合成代谢被大大激活, GG迅速生成^[15]。微藻源甘油葡糖苷已经被应用到了抗炎舒缓配方中, 王等人^[3]将甘油葡糖苷加入到敏感乳液中研究发现能够有效舒缓皮肤过敏症状, 增强皮肤屏障功能; 郑等人^[16]在研究oligo-HA舒缓SDS对斑马鱼的刺激功效测试时将甘油葡糖苷作为阳性对照, 证明甘油葡糖苷具有明显的舒缓功效。然而, 目前关于GG的抗炎研究还相对较少, 没有形成系统研究。

在皮肤抗炎舒缓领域, 通过体外细胞实验分析炎症因子、屏障修护因子的表达、及应用3D皮肤模型研究化合物对皮肤细胞及皮肤屏障修护的作用, 是表征化妆品功效作用的常用手段。本文旨在通过细胞模型和3D皮肤模型等方式研究GG对皮肤炎症因子(如IL-1 β 、IL-6、IL-1 α 、PGE2等)、肥大细胞脱颗粒反应、以及皮肤屏障修护的作用, 以系统地探究GG在皮肤抗炎舒缓及屏障修护中的功效。

1. 材料与方法

1.1 主要材料

(1) 样品名称及来源: 甘油葡糖苷, 商品名: 安诺因™, 来自青岛中科蓝智生物科技发展有限公司。

(2) 实验模型

表1 实验模型

实验模型	功效评价指标	来源
小鼠巨噬细胞 RAW264.7	体外抗炎舒敏功效评估 (IL-1 β 、IL-6)	购自中国科学院细胞库
3D表皮皮肤模型	炎症因子 (IL-1 α 和 PGE2)	购自上海斯安肤诺生物科技有限公司
小鼠肥大细胞瘤细胞 (P815)	C48/80 刺激肥大细胞-脱颗粒	购自 ATCC
人皮肤永生角质细胞 (HaCaT)	细胞迁移、屏障基因 TGM1&LOR 表达	购自 ATCC

(3) 试剂

高糖 DMEM 培养液 (Gibco)、胎牛血清 (Gibco)、PBS (Gibco)、MTT (Sigma)、DMSO (国药)、胰蛋白酶 (Gibco)、脂多糖 (LPS) (InvivoGen)、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒 (Abnova)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (Elabscience)、地塞米松 (上海源叶)、多聚甲醛 (国药)、无水乙醇 (国药)、二甲苯 (国药)、苏木精 (碧云天)、伊红 (碧云天)、盐酸 (国药)、IL-1 α ELISA 试剂盒 (Abcam)、PGE2 ELISA 试剂盒 (Abcam)。

(4) 仪器

CO₂ 培养箱 (Thermo, 160i)、生物安全柜 (ESCO, LA2-6A1)、倒置显微镜 (徕卡, DMi8)、酶标仪 (Tecan, Spark)、微量振荡器 (其林贝尔, TS-92)、水浴锅 (比克曼, WB-6)、混匀仪 (瑞诚, TCS10)、超净工作台 (苏州安泰, SW-CJ-1F)、正置显微镜 (Olympus, BX53)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞毒性测试方法

收集对数生长期细胞, 按照细胞密度为 8×10^3 个/孔接种至 96 孔板, 每孔含培养液 100 μ L。在培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中培养 24h 后, 吸去培养基, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次, 然后按照实验孔、阴性对照孔、阳性对照孔、空白孔分别加入样品, 每组设置 3 个重复孔。

在培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中继续培养 24h, 然后进行细胞毒性试验, 在一定条件下读取吸光度 OD 值, 按照以下公式计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = \frac{\text{实验孔} - \text{空白孔}}{\text{阴性对照孔} - \text{空白孔}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 炎症因子 IL-1 β 模型测试方法

实验共分 4 组, 阴性对照组 (NC); LPS 模型组: 不经样品预处理, 只加 LPS 刺激; 样品组: 经过样品预处理

后 LPS 刺激; 阳性对照组 (PC): 经过 0.1mg/mL 地塞米松预处理后 LPS 刺激。

收集对数生长期细胞, 按照细胞密度为 4×10^5 个/孔接种至 12 孔板。在培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中培养 24h 后, 根据 GG 浓度为 0.05、0.19、0.75 (% , W/W) 设置浓度梯度加入样品。

加入样品后在培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中继续培养 2h 后, 模型组、样品组、阳性对照组加入 1 μ g/mL LPS, 放入细胞孵箱继续培养 24h。采用小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒, 取上清按照说明书进行培养液中 IL-1 β 含量的检测。

1.2.3 炎症因子 IL-6 模型测试方法

实验共分 4 组, 阴性对照组 (NC); LPS 模型组: 不经样品预处理, 只加 LPS 刺激; 样品组: 经过样品预处理后 LPS 刺激; 阳性对照组 (PC): 经过 0.1mg/mL 地塞米松预处理后 LPS 刺激。

收集对数生长期细胞, 按照细胞密度为 4×10^5 个/孔接种至 12 孔板。在培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中培养 24h 后, 根据 GG 浓度为 0.05、0.19、0.75 (% , W/W) 设置浓度梯度加入样品。

加入样品后在培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中继续培养 2h 后, 模型组、样品组、阳性对照组加入 1 μ g/mL LPS, 放入细胞孵箱继续培养 24h。采用小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒, 取上清稀释 10 倍后, 按照说明书进行培养液中 IL-6 含量的检测。

1.2.4 炎症因子 (IL-1 α 和 PGE2) 模型测试方法

基于蓝光急性损伤模型, 使用 3D 表皮皮肤模型, 通过检测样品作用后的组织形态、炎症因子 (IL-1 α 、PGE2) 含量的变化情况, 评价待测样品抵抗蓝光损伤的作用。

表2 抗蓝光测试实验设计

组别	浓度设置	检测模型	诱导条件	检测指标	检测方法
空白对照	--	--	--		
阴性对照	--			组织形态	H&E
阳性对照	地塞米松 0.01%	3D 表皮皮肤模型	蓝光 (60J/cm ²)	IL-1 α PGE2	ELISA
GG	0.50% 1.00%				

(1) 给药及辐照: 根据表 2 测试方案, 配制阳性标准品工作液及样品工作液。预备 24 孔板, 按照测试方案每孔加 400 μ L 相应表皮模型培养液, 模型转移至 24 孔板后,

将孔板转移至蓝光灯管正下方（照射剂量为 $60\text{J}/\text{cm}^2$ ）进行辐照。辐照结束后，将模型转移到相应的6孔板，每孔添加 0.9mL 相应表皮模型培养液，置于 CO_2 培养箱（ 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ ）中孵育 24h 。

（2）组织形态测试：取用于组织形态检测的模型，用 4% 的多聚甲醛进行固定处理，固定 24h 后，将模型环切取下，进行 H&E 染色检测，显微镜下拍照观察，采集图片并分析。

（3）炎症因子（ $\text{IL-1}\alpha$ 、 PGE_2 ）测试：给药孵育 24h 后，收集 3D 表皮皮肤模型培养液于 EP 管中，收集完后将用于 ELISA 检测的样品置于 -80°C 冰箱冷冻保存，根据 ELISA 试剂盒的操作说明书进行检测分析。

1.2.5 舒缓功效测试方法

实验分组具体设置如实验设计表 3 所示。

（1）细胞接种：按 1×10^5 个/孔的接种密度接种细胞至 24 孔板，培养箱（ 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ ）中孵育过夜。

（2）配液：按实验分组配制不同浓度的受试物工作液。

（3）给药：根据表 3 实验分组，待 24 孔板中细胞铺板率达到 $40\%\sim 50\%$ 时，进行分组给药，每组设 3 个复孔，每孔加入含有 1mL 不同浓度含待测样品的培养基。给药完成后将 24 孔板放置在培养箱（ 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ ）中培养 2h 。

（4） $\text{C48}/80$ 刺激：样品孵育 2h 后，弃液；根据实验分组，空白对照组加 1mL 无血清高糖 DMEM 培养液，阴性对照组添加 1mL 含有 $\text{C48}/80$ 的无血清高糖 DMEM 培养液，阳性对照组添加 1mL 含有 $\text{C48}/80$ 和色甘酸钠的无血清高糖 DMEM 培养液，样品组添加 1mL 含有 $\text{C48}/80$ 和相应样品给药浓度的无血清高糖 DMEM 培养液，给药结束后 $\text{C48}/80$ 刺激 45min ，冰浴终止反应。

（5）细胞形态观察：培养结束后，在倒置显微镜下，观察各组细胞脱颗粒情况，并拍照。照片采用 IPP 软件统计并计算细胞的脱颗粒率。

$$\text{脱颗粒率}\% = \frac{\text{脱颗粒细胞总数}}{\text{脱颗粒细胞总数} + \text{未脱颗粒细胞总数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.6 细胞迁移检测方法

收集对数生长期细胞，按照细胞密度为 2×10^5 个/孔接种至 24 孔培养板。在培养箱（ 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ ）中培养 24h 后，以 $200\ \mu\text{L}$ 枪头垂至于 24 孔板划出“损伤”后用 PBS 洗细胞 3 次，去除划下的细胞，加入无胎牛血清的培养基。根据细胞毒性结果加入待测物，用含 10% 胎牛血清培

表 3 实验设计表

实验分组	样品名称	样品体积分数	刺激条件	检测指标	检测模型	检测方法
空白对照	BC	/	/	细胞形态	肥大细胞	显微镜观察拍照
阴性对照	NC	/				
阳性对照	PC (色甘酸钠)	$1\text{mg}/\text{mL}$				
样品组	GG	0.02%	$\text{C48}/80$ ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$)	细胞形态	肥大细胞	显微镜观察拍照
		0.1%				
		0.5%				
		1%				
		2%				
		3%				

养基作为阳性对照，以加入 PBS 的细胞组作为阴性对照，选取 0.5% 、 1% 、 2% 和 3% 四个浓度进行加样，每组设置 3 个重复孔，放入培养箱（ 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ ）培养 24h 。运用倒置显微镜对迁移的各组细胞进行拍照，采用 ImageProPlus 软件计算出划痕面积的平均值，按照以下公式计算愈合率。

$$\text{愈合率}\% = \frac{\text{初始划痕面积} - \text{现划痕面积}}{\text{初始划痕面积}} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.7 屏障基因 TGM1&LOR 表达测试方法

（1）细胞接种：收集对数生长期细胞，按照细胞密度为 1×10^5 个/孔接种至 24 孔板。在培养箱（ 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ ）中培养 24h 。

（2）给药：根据细胞毒性结果，按照表 4 加入药物，以未处理细胞作为对照，每组设置 3 个重复孔。

表 4 浓度设定表

样品名称	浓度梯度设置 (%, v/v)	细胞	检测指标	检测方法
空白对照 (BC)	--			
GG	3	HaCaT	Tgm1&LOR	qRT-PCR
	2			
	1			

（3）检测：每孔中加入 0.5mL 裂解液，吹打裂解。提取 RNA，反转录至 cDNA 后，进行荧光定量 PCR 检测，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法进行结果计算。

2. 结果与分析

2.1 细胞毒性检测结果

细胞毒性是评估化妆品中提取物和发酵物对皮肤细胞代谢活性和表面活性影响的一个极其重要的指标。为了评估 GG 对皮肤细胞的影响，我们对小鼠巨噬细胞 RAW264.7、小鼠肥大细胞瘤细胞 (P815)、人皮肤永生角质细胞 (HaCaT) 进行了测试和分析。选用一定浓度范围的 GG，研究 GG 对细胞相对存活率的影响 (细胞活性 80% 以上)。根据细胞毒性测试结果显示，GG 在 0.02–1.5% (W/W) 浓度范围内未表现出小鼠巨噬细胞 RAW264.7 毒性；GG 在 0.02–3% (W/W) 浓度范围内未表现出小鼠肥大细胞瘤细胞 (P815) 毒性；GG 在 0.02–2.5% (V/V) 浓度范围内未表现出人皮肤永生角质细胞 (HaCaT) 毒性。

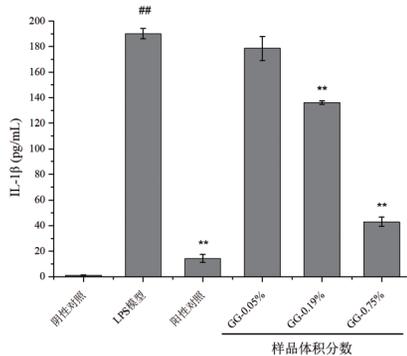
2.2 炎症因子 IL-1 β 模型检测结果

测试结果分析见表 5 和图 1。与阴性对照组相比，LPS 模型组的炎症因子 IL-1 β 分泌水平显著升高 ($p < 0.01$)，表明造模成功，该模型可用于评价受试物的抗炎舒缓作用。

与 LPS 模型组相比，GG 在 0.19% 和 0.75% 浓度时，对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌的 IL-1 β 释放量显著降低了 54.05、147.2 pg/mL。在 GG 浓度为 0.05% 时，降低了 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌的 IL-1 β 释放量 11.61 pg/mL，不具有显著性。实验证明 GG 在 0.19% 和 0.75% 浓度时具有抗炎舒缓的作用，且随 GG 升高抗炎舒缓效果越好。

表 5 IL-1 β 含量检测原始数据

样品名称	IL-1 β 含量 (pg/mL)	SD
阴性对照 (NC)	1.16	0.16
LPS 模型	190.13	3.98
阳性对照 (PC)	14.25	3.11
GG-0.05%	178.52	9.51
GG-0.19%	136.08	1.33
GG-0.75%	42.93	3.49



注：## 与阴性对比， $p < 0.01$ ；** 与 LPS 模型对比， $p < 0.01$

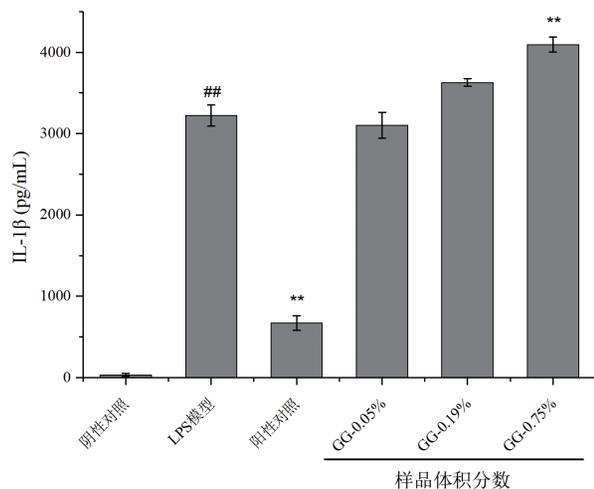
图 1 GG 对 IL-1 β 含量的影响

2.3 炎症因子 IL-6 模型检测结果

测试结果分析见表 6 和图 2，与阴性对照组相比，LPS 模型组的炎症因子 IL-6 分泌水平显著升高 ($p < 0.01$)，表明造模成功，该模型可用于评价受试物的抗炎舒缓作用。与 LPS 模型组相比，GG 在 0.05% 浓度时，对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌的 IL-6 释放量从 3221.65 pg/mL 降低到了 3102.30 pg/mL。但是，GG 在 0.19% 和 0.75% 浓度时，对 LPS 诱导炎症因子 IL-6 升高不具有显著作用，有可能 GG 是在低剂量对炎症因子 IL-6 表达起作用。

表 6 IL-6 含量结果分析

样品名称	IL-6 含量 (pg/mL)	SD
阴性对照 (NC)	32.37	15.14
LPS 模型	3221.65	130.43
阳性对照 (PC)	669.06	87.94
GG-0.05%	3102.30	160.17
GG-0.19%	3628.83	48.43
GG-0.75%	4095.52	93.24



注：## 与阴性对比， $p < 0.01$ ；** 与 LPS 模型对比， $p < 0.01$

图 2 GG 对 IL-6 含量的影响

2.4 炎症因子 (IL-1 α 和 PGE2) 模型测试结果

由于蓝光照射可以引起皮肤炎症的发生^[18-20]，所以基于炎症因子 (IL-1 α 和 PGE2) 模型，通过检测样品作用后的组织形态，评价待测样品抵抗蓝光损伤的作用。抗蓝光测试组织形态检测结果见图 3，与 BC 组相比，NC 组模型细胞数量减少，排列紊乱，角质层疏松，说明本次测试刺激条件有效。

与 NC 组相比，PC (地塞米松) 组模型活细胞数量减少和角质层疏松情况明显改善，说明本次阳性对照检测有

效。与NC组相比，样品甘油葡萄糖苷在0.5%时，模型活细胞数量减少和角质层疏松情况明显改善，在浓度为1%时，角质层疏松情况明显改善。

基于3D表皮皮肤模型，我们进一步测试了IL-1 α 和PGE2含量（表7，图4、5）。与对照组相比，在GG浓度0.5%时，模型活细胞数量减少和角质层疏松情况明显改善，IL-1 α 含量和PGE2含量分别显著下降了63.72%和18.91%，证明GG在0.5%的浓度下，具有抵抗蓝光损伤的作用。同样，在GG浓度1%时，角质层疏松情况明显改善，IL-1 α 含量和PGE2含量分别显著下降了11.94%和14.50%，但是改变幅度小于0.5%浓度的GG。分析认为在0.5-1%浓度下，GG具有抵抗蓝光损伤的作用。

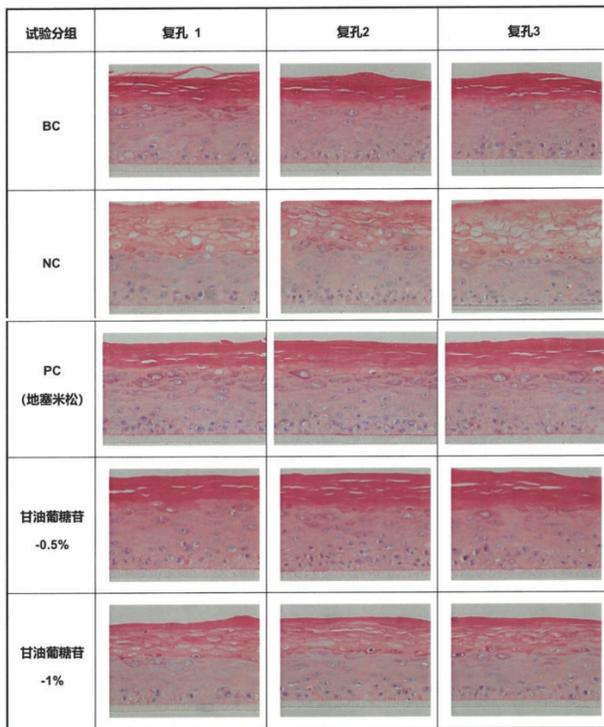


图3 组织形态图

表7 抗蓝光测试结果

样品名称	IL-1 α 含量		PGE2 含量	
	Mean (SD)	P-value	Mean (SD)	P-value
BC	2.30 (0.16)	/	1017.92 (53.22)	/
NC	12.90 (0.52)	0.000 ^{##}	1442.82 (118.06)	0.005 ^{##}
PC	3.23 (0.21)	0.000 ^{**}	1120.14 (23.34)	0.010 ^{**}
GG-0.5%	4.68 (0.16)	0.000 ^{**}	1170.02 (18.96)	0.017 ^{**}
GG-1%	11.36 (0.10)	0.007 ^{**}	1233.66 (16.07)	0.038 ^{**}

注：用t-test方法进行统计分析时，NC组与BC组相比，显著性以#表示，P-value<0.05表示为#，P-value<0.01表示为##；PC组、样品组与NC组相比，显著性以*表示，P-value<0.05表示为*，P-value<0.01表示为**。

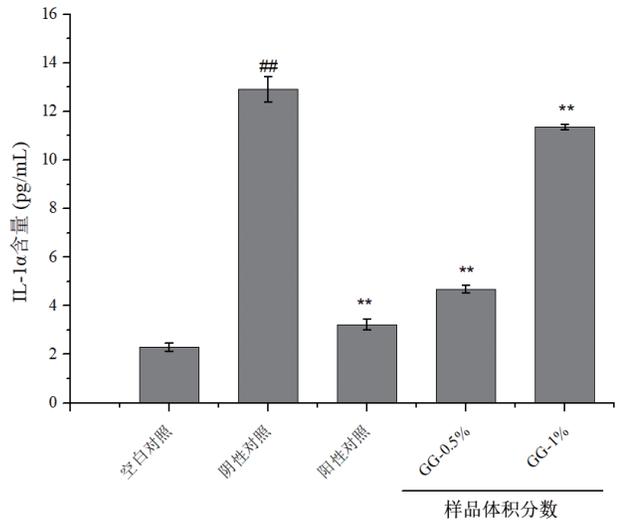


图4 IL-1 α 含量检测结果柱状图

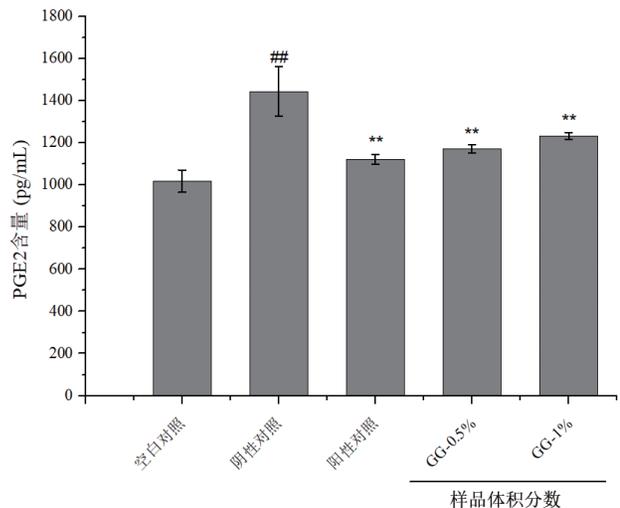


图5 PGE2 含量检测结果柱状图

2.5 舒缓功效测试结果

基于“C48/80刺激肥大细胞”的脱颗粒模型测试GG的作用效果，细胞形态饱满透亮的是正常细胞（红色圆圈示例），细胞形态干瘪灰暗的是脱颗粒细胞（绿色圆圈示例），计算脱颗粒率，形态学结果见图6，脱颗粒率统计结果见表8和图7。

与BC组相比，NC组肥大细胞脱颗粒率显著升高（ $p<0.01$ ），表明本次实验脱颗粒模型造模成功。与NC组相比，PC组肥大细胞脱颗粒率显著降低（ $p<0.01$ ），表明本次阳性对照检测有效。

与NC组相比，GG在0.1%~3%（V/V）浓度时使肥大细胞脱颗粒率显著（ $p<0.05$ ）降低，说明GG具有舒缓功效，且随着GG浓度升高作用愈加明显。尤其是在GG为3%时，肥大细胞脱颗粒率降低了87.88%，说明GG浓度越高，舒缓功效越好。

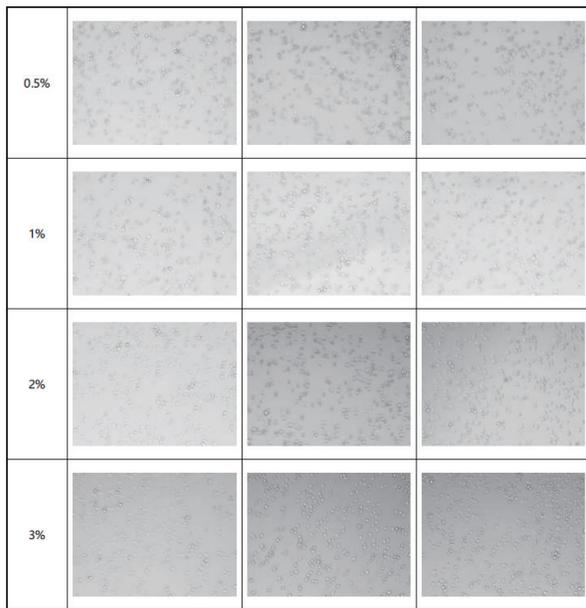
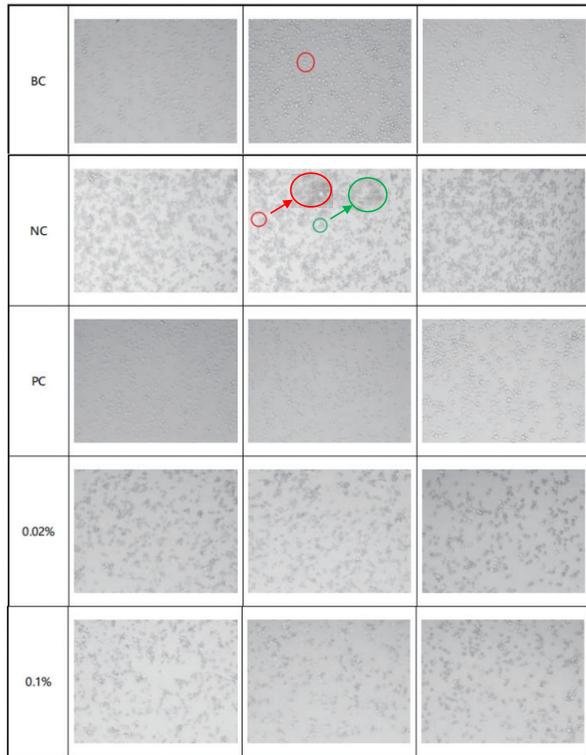


图6 肥大细胞脱颗粒形态学结果

表8 肥大细胞脱颗粒率

样品名称	Mean (%)	SD	P-value
BC	1.23	0.18	/
NC	90.92	4.74	0.001##
PC	2.20	0.18	0.001**
GG-0.02%	92.38	3.21	0.384
GG-0.1%	79.99	5.21	0.003*
GG-0.5%	78.68	3.23	0.012*
GG-1%	66.62	3.12	0.004**
GG-2%	17.79	0.49	0.001*
GG-3%	11.02	1.68	0.001*

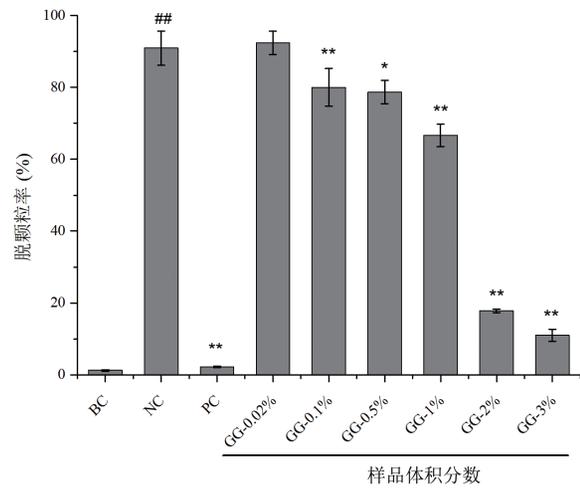


图7 肥大细胞脱颗粒率柱状图

2.6 细胞修复功效检测结果

细胞迁移划痕实验测试结果如图8所示，结果分析见表9和图9。细胞迁移试验中，阳性对照组的细胞愈合水平

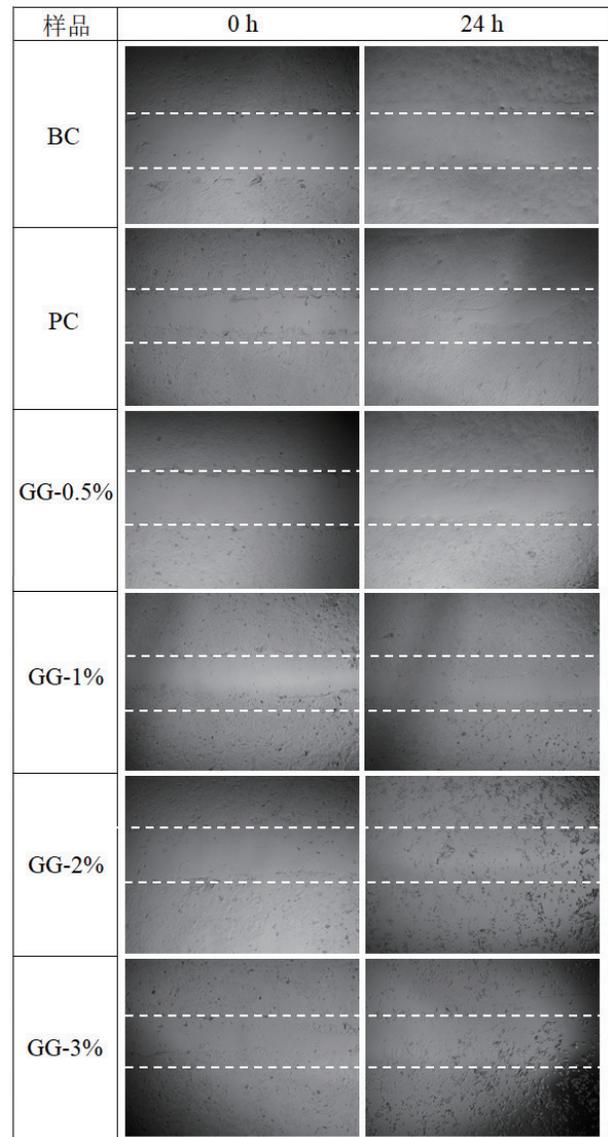


图8 细胞迁移实验结果

较阴性对照组显著升高 ($p < 0.05$)；与阴性对照组比较，经0.5%和1% (V/V) GG样品处理后细胞愈合率从22.63%显著升高到了44.02%和45.99%，表明GG具有良好的细胞修复功效。但是，伴随着GG浓度上升到2%和3% (V/V)时，细胞愈合率未能估算出来，可能的原因是GG刺激细胞生长速度过快，在模型研究周期内，划痕愈合时间早于检测时间，因此我们推断GG对细胞迁移的影响也会随浓度升高而增强。

表9 细胞迁移实验结果数据

样品名称	愈合率	SD	P-value
BC	22.63	15.63	/
PC	79.59	11.80	0.002
GG-0.5%	44.02	8.97	0.031
GG-1%	45.99	7.50	0.038
GG-2%	/	/	/
GG-3%	/	/	/

注：用 *t*-test 方法进行统计分析时，与阴性对照相比，显著性以 * 表示， P -value < 0.05 表示为 *， P -value < 0.01 表示为 **。

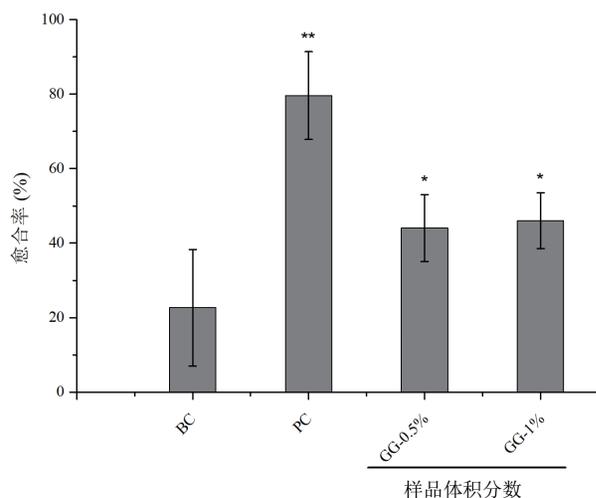


图9 细胞划痕损伤愈合率

2.7 屏障功能基因表达结果

GG 作用于角质细胞后，我们对基因 TGM1&LOR 表达量进行了测试，结果如表 10 和图 10 所示。与空白对照相比，在 GG 浓度为 1% 和 2% 时，细胞的 TGM1 表达量显著提高了 28% 和 46%；当 GG 浓度为 3% 时，TGM1 表达量并无显著变化。同时，在 GG 浓度为 1% 时，细胞的 LOR 基因表达量显著提高了 175%，当 GG 浓度为 2% 和 3% 时，基因 LOR 表达没有显著提升。结果说明 GG 作用于角质细胞，能够促进屏障功能基因表达，且低浓度比高浓度有效。原因可能是甘油葡糖苷是一种由甘油与葡萄糖分子通过糖苷键连接而形成的糖苷类化合物，其分子量相对较

小，能够直接渗透至皮肤真皮层。这种特性使得甘油葡糖苷在低浓度下就能有效地与角质细胞接触并发挥作用，达到理想的渗透效果。其次，甘油葡糖苷具有显著的生物活性，能够促进水通道蛋白的合成，维持渗透平衡，为皮肤细胞带来所需水分。同时，它还能促进丝聚蛋白的再生，帮助皮肤保持水分，增强皮肤屏障功能，而高浓度时其渗透性受到影响，同时高浓度的活性成分可能会对皮肤造成一定的刺激或负担，进而影响其屏障修复效果，因此在低浓度下使用可以提高角质细胞屏障功能，发挥有效的护肤功效。

表 10 屏障基因表达量结果汇总表

样品名称	TGM1			LOR		
	Mean	SD	P-value	Mean	SD	P-value
空白对照	1.00	0.03	/	1.00	0.08	/
GG-1%	1.28	0.06	0.012*	2.75	0.01	0.001*
GG-2%	1.46	0.17	0.040*	1.00	0.25	0.997
GG-3%	0.70	0.2	0.096	0.59	0.16	0.095

注：用 *t*-test 方法进行统计分析时，样品组与 BC 组相比，显著性以 * 表示， P -value < 0.05 表示为 *， P -value < 0.01 表示为 **。

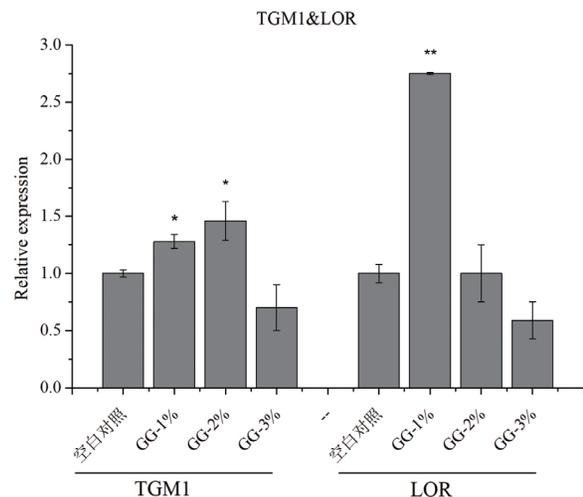


图 10 基因 TGM1&LOR 表达量汇总表

3. 结论

本研究分别采用细胞实验和 3D 皮肤模型等方式，对甘油葡糖苷的抵抗皮肤炎症、舒缓及增强皮肤屏障作用进行了较为系统的评价。在抗炎舒缓方面，GG 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌的 IL-1 β 和 IL-6 释放量有显著降低效果。肥大细胞脱颗粒试验证明了 GG 具有舒缓功效。3D 表皮模型测试还证明了 GG 具有抑制炎症因子的功效。细胞修复功效测试结果显示，经 1% 浓度 GG 处理后细胞愈合率

从22.63%显著升高到了45.99%，证明了GG具有良好的细胞修复功效。TGM1&LOR基因表达结果显示，GG在1%浓度下就可以增强角质细胞的屏障功能。

本研究较为系统地分析了甘油葡糖苷在降低皮肤炎症因子表达、修复表皮细胞及增强表皮屏障方面的作用，证明了甘油葡糖苷具备抗炎舒缓及屏障修护的良好效果，可为甘油葡糖苷在皮肤抗炎舒缓、表皮细胞修护等领域的应用提供有价值的科学依据。

参考文献

- [1] 王丹丹. 基于数据挖掘的中医药治疗过敏性皮肤病的组方规律分析与实验研究[D]. 广西中医药大学, 2023.
- [2] Egawa G, Kabashima K. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergology International*, 2018, 67(1): 3–11.
- [3] 王颖, 董银卯, 张守文. 舒缓中药提取物制备及其功效评价研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(03): 448–456.
- [4] Quirk S, Rainwater E, Shure A, et al. Vitamin D in atopic dermatitis, chronic urticaria and allergic contact dermatitis. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2016, 12 (8): 839–847.
- [5] Nesovic L, Shaky A, Gill H. Treating allergies via skin – Recent advances in cutaneous allergen immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022,190: 114458.
- [6] Finkel Z, Follows M, Irwin A. Size–scaling of macromolecules and chemical energy content in the eukaryotic microalgae. *Journal of Plankton Research* 2016, 38(5): 1151–1162.
- [7] Brito–Bello A, Lopez–Arredondo D. Bioactive compounds with pesticide activities derived from aged cultures of green microalgae. *Biology*, 2023, 12(8): 1149.
- [8] 曾雪霞, 但玉, 毛绍名, 等. 蓝藻光驱固碳合成糖类物质的技术研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(07): 90–100.
- [9] Kalasariya H, Yadav V, Yadav K, et al. Seaweed–Based Molecules and Their Potential Biological Activities: An Eco–Sustainable Cosmetics. *Molecules* 2021, 26(17): 5313.
- [10] Su S, Hong J, Kim E, et al. Anti–inflammation and Anti–Cancer Activity of Ethanol Extract of Antarctic Freshwater Microalga, *Micractinium sp.* *International Journal of Medical Sciences*, 2018, 15(9): 929–936.
- [11] Ragusa I, Nardone G, Zanatta S, et al. Spirulina for Skin Care: A Bright Blue Future. *Cosmetics* 2021, 8(1): 1–7.
- [12] Garcia M, Regueiras A, Lopes G, et al. Nonthermal high–pressure microalgae extracts: A new source of natural ingredients for cosmetics. *Algal Research*, 2024, 81: 103591.
- [13] 周示玉, 范嘉莹, 沈佳琪, 等. 甘油葡糖苷的护肤功效评价[J]. *广东化工*, 2021, 48(23): 103–105.
- [14] Sawangwan T, Goedl C, Nidetzky B. Glucosylglycerol and glucosylglycerate as enzyme stabilizers. *Biotechnology Journal* 2010, 5 (2), 187–191.
- [15] Luo Q, Duan Y, Lu X. Biological sources metabolism and production of glucosylglycerols a group of natural glucosides of biotechnological interest. *Biotechnology Advances* 2022, 59: 107964.
- [16] 郑博文, 王斌雅, 肖婉玲, 等. 基于蛋白质组学的透明质酸寡聚糖抗炎活性研究及验证[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(14): 33–38.
- [17] Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, et al. Differential expression and release of cytokines by an in vitro reconstructed human epidermis following exposure to skin irritant and sensitizing chemical. *Toxicology in Vitro* 1999, 13(6): 867–877. (18) Hiramoto K, Kubo S, Tsuji K, et al. Induction of Skin Cancer by Long–Term Blue Light Irradiation. *Biomedicines*, 2023, 11(8): 2321.
- [19] 何忠东. 蓝光对皮肤的损伤及抗蓝光技术在化妆品中的应用[J]. *当代化工研究*, 2021, (03): 61–62.
- [20] 夏艾婷, 田燕. 蓝光对皮肤的损伤及其防护剂的研究进展[J]. *照明工程学报*, 2017, 28(06): 20–23.

Evaluation of the anti-inflammatory, soothing, and barrier repair efficacy of microalgae source glycerolglucoside

Li Yan, Li Xin, Li Ri-sheng, Liu Hai-yan, Zhou Xiao-feng, Duan Yang-kai*

(Qingdao Zhongke Smart Cyano Biotech Development Co., Ltd., Qingdao, Shandong, 266000)

Abstract : Microalgae source glycerolglucoside (GG) is a cosmetic ingredient with multiple effects. The anti-inflammatory properties of GG have been investigated through cellular experiments and 3D skin models. The results showed that GG can significantly reduce the release of IL-1 β and IL-6 secreted by LPS-induced RAW264.7 cells, revealing that GG has an anti-inflammatory effect. Based on the 3D epidermal skin model, it was verified that GG can largely improve the porosity of the stratum corneum and reduce the expression of inflammatory factors IL-1 α and PGE2. TGM1&LOR gene expression results showed GG can remarkably enhance the barrier function of cytoplasmic cells. The cell migration scratch experiment also proved that GG has good epidermal cell repair effect.

Keywords : microalgae source; glycerolglucoside; anti-inflammatory and soothing; inflammatory factors; epidermal cell repair