



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105246498 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201480023810. 7

(22) 申请日 2014. 04. 24

(30) 优先权数据

1353718 2013. 04. 24 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2014/050994 2014. 04. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/174220 FR 2014. 10. 30

(71) 申请人 兰斯大学

地址 法国兰斯

申请人 法国国家糖产品中心 鲁昂大学

范德普特油脂化学公司

国家科学研究中心

(72) 发明人 佛朗索瓦·马库特 乔治斯·贝罗

克莱尔·马歇尔 伊莲·杜卡特

奥利弗·迪皮伊 鲁克·皮克顿

迪迪尔·勒塞尔夫 雷诺·福贝斯

(74) 专利代理机构 北京律和信知识产权代理事
务所(普通合伙) 11446

代理人 武玉琴 刘国伟

(51) Int. Cl.

A61K 36/55(2006. 01)

A61K 8/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

从亚麻籽中提取中性低聚糖混合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种从亚麻籽中提取中性低聚糖混合物的方法,所述低聚糖混合物由超滤分离方法获得,具有高分子量,包含两类截留分子量的低聚糖,其中一类的截留分子量位于 15,000 至 50,000Da 之间,另一类的截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 之间。本发明还涉及一种实施所述方法得到的低聚糖混合物,以及所述混合物的应用,尤其是在皮肤修复以及控制皮肤衰老中的应用。

1. 一种从亚麻籽中提取中性低聚糖混合物的方法,所述低聚糖具有高分子量,所述方法包括以下步骤:

- 亚麻粘胶溶液进行酸性 pH 条件下的水解反应,所述亚麻粘胶溶液由亚麻籽经溶剂萃取而得;
- 所述溶液通过加入足量的碱进行中和;
- 所述溶液通过孔径为 50,000Da 的滤膜进行第一次超滤,以获得首次回流液和首次透过液;
- 所述首次透过液通过孔径为 15,000Da 的滤膜进行第二次超滤,以获得二次回流液和二次透过液;
- 所述二次透过液通过孔径为 5,000Da 的滤膜进行第三次超滤,以获得三次回流液和三次透过液;
- 将所述二次和三次回流液混合,以获得上文所述的低聚糖混合物,所述二次回流液含有通过超滤分离方法得到的截留分子量位于 15,000 至 50,000Da 处的低聚糖,所述三次回流液含有通过超滤分离方法得到的截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 处的低聚糖。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中从亚麻籽中萃取的步骤在水溶剂中进行。

3. 根据以上任一权利要求所述的方法,其中粘胶溶液的水解反应条件为:pH2,反应温度 80℃,反应时间 24 小时。

4. 根据以上任一权利要求所述的方法,其中所述粘胶溶液通过加入足量的强碱进行中和,可选的强碱溶液至少包括氢氧化钡和氢氧化钠。

5. 实施以上任一权利要求所述的方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,其中所述混合物包含由超滤分离方法得到两类截留分子量的低聚糖,其中一类的截留分子量位于 15,000 至 50,000Da 之间,另一类的截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 之间。

6. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,其中所述混合物中含有的低聚糖,其糖链组成中至少包括岩藻糖和 / 或果胶糖和 / 或半乳糖和 / 或葡萄糖和 / 或木糖。

7. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,其中所述混合物包含一类低比例的低聚糖,该低聚糖的糖链组成中含有鼠李糖和低比例的糖醛酸。

8. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于在皮肤美容或化妆品中使用,以对抗皮肤衰老的影响或促进皮肤组织修复。

9. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于刺激成纤维细胞的增殖。

10. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于刺激成纤维细胞的趋化。

11. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于刺激成纤维细胞的细胞迁移。

12. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于刺激成纤维细胞合成 III 型胶原或 IV 型胶原。

13. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于刺激成纤维细胞合成基膜聚糖以及抑制成纤维细胞合成核心蛋白聚糖。

14. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于诱导角质形成细胞分化。

15. 根据上述任一权利要求所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于促进伤口愈合。

16. 含有上述任一权利要求所述的中性低聚糖混合物的化妆品或皮肤用药成分,含有至少用于化妆品或皮肤科用药的赋形剂。

17. 根据上述权利要求 16 所述的化妆品成分,其中中性低聚糖的浓度在 0.1 至 5mg/mL 之间。

18. 根据上述权利要求 1-7 之一所述的亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于药物中。

19. 根据上述权利要求之一所述的从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物,用于促进组织愈合,即应用于慢性溃疡或手术后用药。

从亚麻籽中提取中性低聚糖混合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及从植物中提取的低聚糖,尤其是该类低聚糖在化妆品或皮肤病学领域的应用。

[0002] 本发明具体涉及从亚麻籽中提取的中性低聚糖在化妆品或皮肤病领域的应用,以及该类低聚糖的生产方法,例如亚麻籽粘胶的水解分离法。

[0003] 具体来说,亚麻籽中提取的中性低聚糖可以用于促进皮肤组织修复和防止皮肤衰老。

[0004] 皮肤修复包含一系列具体实施步骤,以期达到修复遭受损伤的皮肤以及重塑接近于原先未被损伤组织的目的。

[0005] 相反,皮肤衰老则是导致解剖学和组织学结构改变以及细胞功能改变的原因。

[0006] 皮肤衰老存在几个诱因,例如氧化应激导致的细胞的变化,此外还包括外部因素,如污染,吸烟,饮酒,阳光暴晒等。

[0007] 皮肤衰老导致皱纹和色斑(常为棕色)的出现,以及皮肤张力下降。

背景技术

[0008] 现有技术中有一些措施可以去除可见的皮肤衰老痕迹。在这方面,涉及以下技术:

[0009] - 激光治疗,用于改善(棕色)色斑和细纹等问题;

[0010] - 注射肉毒杆菌毒素,透明质酸或胶原;

[0011] - 剥离,主要包括明显去除一层表皮;

[0012] - 面部整形手术(拉皮手术);等。

[0013] 然而,现有技术存在一些有害的副作用,常常不能获得令人满意的结果。

[0014] 因此,近年来实验室研究已经开始采用一些其他措施以期达到更有效、更自然地对抗皮肤衰老,以及延缓这一进程的目的。找到促进创伤后的皮肤组织修复的方法也十分必要。

[0015] 具体来说,近年来已有化妆品成分中使用低聚糖以减少皮肤衰老痕迹的研究开展起来。事实上,由于其具有保湿性能,糖基分子也引起了特别的关注。

[0016] 因此,一些涉及低聚糖化妆品成分的专利申请,特别是,专利申请国际公布 WO 99/24009 号公开了使用含木糖的低聚糖来提高一些化合物(如蛋白聚糖和氨基葡聚糖)的合成量的用途。然而,在本方案中,木糖是一种商品,而不是植物中的天然产物。

[0017] 专利文献 US 2007/0293433 号公开了一种抗衰老成分,其中含有由果胶通过酶水解得到的多种低聚糖,该成分也制成商品。

[0018] 从美国专利申请 US2004/0097464 号亦可获知一种含有低聚糖混合物的成分,即岩藻糖,后者通过微生物进行水解得到。本方案所述低聚糖混合物,需要采用多步骤的复杂实施方法得到,其中一些步骤需要利用病原微生物参与作用,而在化妆品的实际应用中这些病原微生物则必须从该混合物中除去。

[0019] 此外,上述文献中所述的成分并没有起到足够有效的作用,即在刺激皮肤修复的现有技术中并没有有效的解决方案。

[0020] 亦已公知,可以使用从亚麻科植物,即亚麻 (*Linum usitatissimum*) 中提取的活性物质对抗衰老痕迹。

[0021] 国际专利申请 W02008/043944 号已公开:亚麻中提取的活性物质可以用于制备抗皮肤衰老的化妆品的用途,以及其生产方法。

[0022] 然而,通过该专利申请所述方法获得的活性物质包括多种成分:单糖,糖醛酸,碳水化合物、高浓度的蛋白质等,且其中大多数蛋白质的分子量小于 5000Da(道尔顿)。

[0023] 因此,组分的多样性不允许靶向性和特异性的反应发生,即所述的有差异的成分无法有效地促进损伤的皮肤进行修复。

发明内容

[0024] 在本发明的框架中,申请人发现亚麻籽提取物中一些特定的低聚糖可以确保对所需实施的现象(即皮肤组织修复过程)进行有效地刺激,并且已经开发出一种用于提取这些低聚糖的方法。

[0025] 具体来说,这些都是通过超滤分离法得到的具有高分子量的中性低聚糖,其截留分子量分别位于 5,000 至 15,000Da 之间,以及 15,000 至 50,000Da 之间。

[0026] 因此,本发明提供了一种从亚麻籽中提取中性低聚糖混合物的方法,所述低聚糖具有高分子量,所述方法包括以下步骤:

[0027] - 亚麻粘胶溶液进行酸性 pH 条件下的水解反应,所述亚麻粘胶溶液由亚麻籽经溶剂萃取而得;

[0028] - 所述溶液通过加入足量的碱进行中和;

[0029] - 所述溶液通过孔径为 50,000Da 的滤膜进行第一次超滤,以获得首次回流液和首次透过液;

[0030] - 所述首次透过液通过孔径为 15,000Da 的滤膜进行第二次超滤,以获得二次回流液和二次透过液;

[0031] - 所述二次透过液通过孔径为 5,000Da 的滤膜进行第三次超滤,以获得三次回流液和三次透过液;

[0032] - 将所述二次和三次回流液混合,以获得上文所述的低聚糖混合物,所述二次回流液含有通过超滤分离方法得到的截留分子量位于 15,000 至 50,000Da 处的低聚糖,所述三次回流液含有通过超滤分离方法得到的截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 处的低聚糖。

[0033] 根据上述方法的进一步的特征:

[0034] - 从亚麻籽中提取的过程最好在水溶剂中进行;

[0035] - 所述粘胶溶液的水解过程优选于 pH 2,反应温度为 80℃,反应时间为 24 小时的条件下进行;

[0036] - 优选的实施方式是:所述粘胶溶液通过加入足量的强碱进行中和,可选的强碱溶液至少包括氢氧化钡和氢氧化钠。

[0037] 本发明还涉及实施上述方法从亚麻籽中提取出的中性低聚糖混合物,所述由超滤分离方法得到的混合物包含两类截留分子量的低聚糖,其中一类的截留分子量位于 15,000

至 50,000Da 之间,另一类的截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 之间。

[0038] 在一个具体的实施例中,所述混合物中含有的低聚糖,其糖链组成中至少包括岩藻糖和 / 或果胶糖和 / 或半乳糖和 / 或葡萄糖和 / 或木糖。

[0039] 优选的方案是,所述混合物包含一类低比例的低聚糖,该低聚糖的糖链组成中含有鼠李糖和低比例的糖醛酸。

[0040] 在皮肤美容或化妆品应用过程中,亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物可以有效地用于对抗皮肤衰老问题或促进皮肤组织修复。

[0041] 所述混合物也可进一步用于刺激:

[0042] - 成纤维细胞的增殖;

[0043] - 成纤维细胞的趋化;

[0044] - 成纤维细胞的细胞迁移;

[0045] - 成纤维细胞合成III型和 / 或IV型胶原。

[0046] 亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物也有利于促进成纤维细胞合成基膜聚糖以及抑制成纤维细胞合成核心蛋白聚糖。

[0047] 所述混合物还可用于诱导角质形成细胞的分化。

[0048] 亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物也可用于促进伤口愈合。

[0049] 本发明还涉及根据本方法得到的中性低聚糖混合物而制成的皮肤科用药或化妆品成分,其包含至少一种可用于化妆品或皮肤科用药的赋形剂。

[0050] 该组成成分中中性低聚糖的优选浓度在 0.1 至 5mg/mL 之间。

[0051] 根据一个具体实施例,利用本发明方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物也可以具体用作促进组织愈合的药物,即慢性溃疡或手术后的用药。

[0052] 本发明的其他特点和优势,将从以下参照附图对本发明的非限制性实施例的详细说明中呈现得更加清晰。

附图说明

[0053] 图 1 所示表格中总结了从亚麻籽粘胶中获得的样本 E1 至 E7 的表征结果,其中 E4 和 E6 为所需成分,在表中圈出。

[0054] 图 2A, B 和 C 的柱状图是利用比色法对活细胞数量进行检测的结果,如图所示:从亚麻籽中提取的中性低聚糖对成纤维细胞没有细胞毒性,不同浓度低聚糖处理均未见细胞毒性。

[0055] 图 3 显示了从亚麻籽中提取的中性低聚糖经不同时间(24, 48 和 72 小时)孵育后对成纤维细胞增殖的影响。

[0056] 图 4 的柱状图显示,细胞迁移的数量取决于其是否经亚麻籽中提取的中性低聚糖暴露。

[0057] 图 5 显示出成纤维细胞的迁移取决于亚麻籽中提取的中性低聚糖的处理浓度。

[0058] 图 6 为经低聚糖组分处理或未处理时的成纤维细胞的不同路径示意图。

[0059] 图 7A 和 7B 的柱状图显示了低聚糖处理 24 小时(图 7A)或 48 小时(图 7B)后 III 型胶原的合成情况。

[0060] 图 8 的免疫印迹膜照片显示了经亚麻籽中低聚糖处理或未处理的成纤维细胞中

IV 型胶原的表达情况。

[0061] 图 9 的琼脂糖凝胶电泳照片显示了经亚麻籽中低聚糖处理或未处理的成纤维细胞中核心蛋白聚糖和基膜聚糖的基因表达情况 ; 以 GAPDH 基因作为内参对照。

具体实施方式

[0062] 本发明涉及一种从亚麻籽 (即亚麻 *Linum usitatissimum*) 中获得中性低聚糖混合物的方法。所述混合物通过可控的水解反应获得, 然后从亚麻籽粘胶溶液中分离, 而亚麻籽粘胶则可从所述种子中经溶剂萃取而得。

[0063] 在下文说明中, “低聚糖” 是指由粘胶经热酸水解产生的糖的低聚物或聚合物, 包括所有分子量可以通过 50, 000Da 的超滤膜的糖的低聚物或聚合物。

[0064] 本文所述“中性低聚糖” 是指不含电荷或 N- 乙酰基的低聚糖。

[0065] 本文所述“粘胶” 是指含有糖苷类聚合物的植物物质, 具体说来即是亚麻籽外周的多糖。

[0066] 本文所述“粘胶溶液” 是指亚麻籽经水等水性溶剂浸泡处理后得到的溶液, 其组成主要是糖苷类聚合物。

[0067] 根据本发明的方法可以有效地从亚麻籽中提取中性低聚糖混合物, 所述低聚糖混合物由超滤分离方法获得, 包含两类截留分子量的低聚糖, 其中一类的截留分子量位于 15, 000 至 50, 000Da 之间, 另一类的截留分子量位于 5, 000 至 15, 000Da 之间。

[0068] 本发明也涉及通过实施本方法从亚麻籽中提取得到的中性低聚糖混合物。

[0069] 本发明还涉及一种化妆品或皮肤使用的成分, 其中包含通过本方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物。除了所述的低聚糖, 所述成分还包含至少一种化妆品或皮肤病学上可用的赋形剂。

[0070] 根据本发明得到的成分可以用作乳膏、凝胶、乳液、血清、泡沫或软膏等形式。

[0071] 所述成分特别适用于皮肤或身体表层水平的生长。

[0072] 皮肤是一个复杂的器官, 覆盖整个身体。它确保了身体存在所必需的几个功能, 即保护身体免受无论物理性、化学性还是生物性的外部侵袭。

[0073] 皮肤主要由三层组成 : 表面部分是表皮, 其次是一层稍厚的真皮, 最里层是皮下组织, 皮下组织中的细胞相互作用以确保皮肤的功能。

[0074] 表皮是直接接触外部环境的一层。它保护机体, 防止病原体进入, 并保持体内的水份和营养物质。表皮平均厚度 100 μ m, 但根据身体区域或角化程度的不同, 其厚度也可能有很大差异。

[0075] 表皮的主要细胞是角质形成细胞。它在炎症和皮肤免疫反应中起到多种作用, 从而形成保护屏障。

[0076] 表皮与真皮由一层膜结构分离, 即所谓的基底膜, 其主要成分为 IV 型胶原。

[0077] 真皮是为皮肤提供弹性和抗性的一层。根据身体部位的不同, 其厚度变化很大。

[0078] 真皮主要由结缔组织构成, 使其具有可压缩性和弹性。它为各种皮肤的附属器官, 如血管、头发、神经末梢和皮脂腺和汗腺等提供了支撑。

[0079] 上述附属器官由 I 型和 III 型胶原构成的纤维所包围, 使真皮具有柔软性和弹性。

[0080] 胶原是细胞外基质的主要成分之一。它是一种在组织修复过程中合成的蛋白质。

然而,随着年龄的增长,胶原的合成越来越少。

[0081] 成纤维细胞是真皮的主要细胞,负责合成所有类型的纤维(即胶原纤维),以及基底膜的其他组成部分。

[0082] 真皮成纤维细胞是皮肤的重要组成部分:它们产生和构建真皮的细胞外基质并与其他类型的细胞进行通讯,在调节皮肤生理功能方面起到重要的作用。

[0083] 随着时间的积累皮肤可能会受到许多内部和外部的侵袭。当皮肤受到损害或损伤时,为了修复损伤、复原接近原始皮肤的组织,会进行一系列的过程。

[0084] 具体来说,衰老是皮肤改变的主要因素。它改变了皮肤的解剖结构和组织结构,影响了细胞的功能。因而皮肤也发生了重大的改变。

[0085] 皮肤衰老是由不同的、复杂的、相互影响的因素综合作用造导致的。

[0086] 具体来说,皮肤衰老是由多种细胞改变导致的,如端粒的减少,氧化应激,DNA 修复系统的退化,加之诸如日晒,污染,气候侵袭等外部因素,以及饮酒、吸烟或饮食等。

[0087] 表皮衰老主要表现在其厚度减少。这种退化情况一方面是衰老的角质形成细胞积累的结果,另一方面是表皮特征性的内陷功能逐渐丧失的结果。

[0088] 基底角质形成细胞的大小和形状出现差异,表明它们发生了形态学改变,并且增殖能力下降。此外,由于创伤的发生,表皮再生能力随着年龄的增长而降低。

[0089] 另外, $\beta 1$ 整合素参与基底角质形成细胞黏附到基底膜的过程,而 $\beta 1$ 整合素表达量的减少则导致表皮粘附性能的下降。基底层的 IV 型胶原的作用是保证真皮-表皮连接的粘聚力以及角质形成细胞的粘附,也会随着衰老过程而减少。

[0090] 最后,衰老造成黑色素细胞和朗格汉斯细胞减少,影响表皮抵御攻击的能力。

[0091] 在皮肤衰老过程中,真皮层也表现出高度无序状态,其胞外基质密集,且轻微血管化。其退化主要是由于成纤维细胞的数量减少、尺寸减小,特别是由于其合成能力下降导致的。

[0092] 具体来说,胶原纤维颗粒化并且变得更加致密。它们变得离散并趋于与真皮层表面平行。真皮层的衰老主要表现在胶原纤维以及弹性材料的改变,蛋白多糖含量的改变以及成纤维细胞呈现休眠状态而不与胶原纤维束交联。

[0093] 上述组织学改变和生化改变对皮肤正常功能具有重要影响,会使得皮肤不能适应各种外部侵袭。

[0094] 组织修复是当组织遭受外部侵袭而损伤时发生的自然反应。该过程系统性地进行,并分为三个阶段:炎症,增殖和成熟。

[0095] 组织修复过程的早期事件包括炎症阶段,血管反应和细胞反应。细胞反应阶段可以观察到许多内皮细胞和血管炎症细胞的出现。是通过产生化学趋化性因子起作用的。

[0096] 在增殖阶段,粒状组织的形成是关键。炎性细胞,成纤维细胞,细胞外基质的分子(纤连蛋白,胶原,糖胺聚糖和蛋白聚糖)形成肉芽组织。肉芽组织在炎症刺激后 3-5 天的炎症期之后发生。

[0097] 当上皮细胞受损时,伤口周围的表皮细胞开始增殖、迁移并覆盖到健康的组织上。当这一过程完成,表皮细胞恢复到原来的形状并发挥正常作用。而在这一阶段中发生纤维组织增生:成纤维细胞在这一步中起到非常重要的作用。它们负责产生胶原(尤其是 III 型胶原),弹性蛋白,纤连蛋白和糖胺聚糖。此外,成纤维细胞迁移并增殖。

[0098] 第三个阶段是成熟和重塑阶段,真皮和表皮修复结束。

[0099] 在这一阶段中发生纤维成熟和细胞凋亡,从而形成一层接近原先组织的新生组织。重塑过程即在胶原水平发生。蛋白,即基质金属蛋白酶 (MMPs),控制此进程的早期阶段中以自由不受限方式沉积的胶原量,继而胶原继续合成重组为规则有序的纤维。基质金属蛋白酶 (MMPs) 的抑制剂可以调节这些酶的活性。建立新胶原形成和旧胶原破坏的平衡。先前沉积的III型胶原显著下降,代之以 I 型胶原。

[0100] 随着年龄增长皮肤衰老,组织修复开始失效:特别是,成纤维细胞增殖和迁移减少,胶原的合成也减少。

[0101] 申请人发明了从亚麻籽(即亚麻 *Linum usitatissimum*) 中提取中性低聚糖混合物的方法,通过本发明的方法得到的混合物,由特定的低聚糖组成,可以大幅改善组织修复的效率,同时促进减缓皮肤衰老迹象的进程。

[0102] 本文进行的实验和研究表明,根据本方法由超滤分离获得的低聚糖混合物具有显著促进皮肤修复的功能,该混合物包含两类截留分子量的低聚糖,其中一类的截留分子量位于 15,000 至 50,000Da 之间,另一类的截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 之间。

[0103] 根据本发明的实施方式,优选的混合物中包含多种低聚糖,该实施方式始于亚麻籽中提取粘胶溶液,该溶液具有显著特性,对参与组织修复机制的细胞,如成纤维细胞和角质形成细胞等具有积极的作用。

[0104] 根据一个优选的实施方式,据本发明方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物可用于促进人体和动物体的伤口愈合。

[0105] 因此,该混合物可以应用于如贴片或绷带在内的医疗设备中,用于各种程度的伤口中,以便快速愈合。

[0106] 在具体的应用方式中,由本方法所获得的低聚糖混合物也可以用在人类药物或兽药中。

[0107] 特别是,由于其对结缔组织的成纤维细胞具有有益作用,所述低聚糖混合物可以有利地促进组织愈合,即应用于慢性溃疡或术后。

[0108] 根据本发明的方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖混合物的性质将在下列实施例中结合附图中予以进一步说明。

[0109] 例 1:多组分低聚糖的制备方法。

[0110] 本发明的方法中,粘胶溶液是由黄色亚麻籽经溶剂萃取而得,适宜在加温条件下进行,例如温度 80℃ 左右。所述亚麻籽从植物亚麻(即 *Linum usitatissimum*) 中提取,种子与溶剂(优选水溶剂)的优选比例为 1/10。

[0111] 优选萃取步骤之后进行离心分离,随后液相提取物复溶于乙醇介质中,所述液相提取物与乙醇的比例以 1/4 进行。

[0112] 优选方式是,该提取物随后放入 2% 溶液进行水解步骤。所述溶液水解 pH 值为 2,优选加入硫酸 H_2SO_4 调节 pH。水解反应优选控制在 80℃ 的范围内,反应时间 24 小时。

[0113] 而 pH 值和温度参数,以及水解反应持续时间,可根据需要进行调节。

[0114] 水解步骤后,加入足量的强碱将溶液进行中和,可选的碱溶例如氢氧化钡 $Ba(OH)_2$ 和氢氧化钠 $NaOH$ 。

[0115] 也可以使用任何其他可行的碱溶液将胶质溶液中和。

[0116] 随后该溶液通过一系列超滤操作进行纯化。

[0117] 该溶液第一次超滤优选通过孔径为 50,000Da 的无机膜进行 (Carbosep, 直径 6mm, 三叶, 6,8m²表面)。优选体积浓缩因子在 5 和 7 之间可变的条件下进行, 第一次超滤后得到首次回流液及首次透过液, 首次回流液中包含截留分子量不超过 50,000Da 的化合物和分子, 而首次透过液中则为分子量超过这一孔径的化合物。

[0118] 所述首次透过液随后进行第二超滤步骤, (优选孔径为 15,000Da 的无机膜, 品牌 InsideCéram, 直径 20mm/13 通道, 0,8m²表面) 优选体积浓缩因子在 4 和 8 之间, 获得二次回流液和二次透过液。

[0119] 通过上述孔径为 15,000Da 膜的第二次超滤步骤后得到的二次透过液, 再进行第三次超滤步骤 (优选孔径为 5,000Da 的无机膜, 品牌 InsideCéram, 直径 20mm/13 通道, 0,8m²表面), 例如可以选用体积浓缩因子在 4 和 8 之间。得到三次回流液和三次透过液。

[0120] 超滤操作结束后, 可以得到 7 种样品或组分: 初始水解液 (E1), 分子量 50,000Da 的首次回流液 (E2), 分子量 50,000Da 的首次透过液 (E3), 分子量 15,000Da 的二次回流液 (E4), 分子量 15,000Da 的二次透过液 (E5), 分子量 5,000Da 的三次回流液 (E6) 以及分子量 5,000Da 的三次透过液 (E7)。

[0121] 具体说来, 所需样品为超滤分离后具有高分子量的低聚糖样品 E4 (二次回流液) 和 E6 (三次回流液), 样品 E4 的截留分子量为 15,000 至 50,000Da 之间, 而样品 E6 的截留分子量为 5,000 至 15,000Da 之间。

[0122] 样品存于液体中或冻干保存。

[0123] 将二次回流液与三次回流液混合, 以得到所需的低聚糖混合物。

[0124] 例 2: 低聚糖成分的鉴定。

[0125] 样品通过光散射仪 (MALS: 多角度光散射) 和差示折射检测器 (DRI: 差示折射率) 耦合的尺寸排阻色谱 (SEC) 进行分析。分析线组成为: 脱气装置 (岛津 DGU-20A3, 日本), 流速为 0.5mL/min (分) 的高效液相色谱泵 (岛津 LC10Ai, 日本), 自动进样器 (岛津 SIL-20A, 日本), 串联安装的两个 Shodex 色谱柱 (ohpack SB802.5 和 SB804), 多角度激光散射仪: MALS (Dawn EOS, 怀雅特技术公司, 美国) 组成, 其中多角度光散射仪 MALS 配有池容量为 50 μ L 的 K5 检测池和 18 检测二极管以及示差检测器 (RID 10A 岛津, 日本)。样品中混合组分使用 Astra 6 软件 (怀雅特技术) 进行鉴定, 采用 1 阶 Zimm 法作图。所用折射率增量 (dn/dc) 为 0.15ml/g, 低聚糖或多糖采用传统平均值。

[0126] 不同组分的低聚糖溶液浓度分别为 2, 5, 10 或 20g/L。根据最初溶质的干重, 可以通过以下方法调节溶液浓度: 低聚糖混合物冻干粉在 0.15mol/L NaCl 溶液中可进行浓缩, 也可在液体中进行稀释。取 30ml 溶液, 使用 Millipore 牌孔径为 0.45 μ m 的再生纤维素膜进行真空过滤 10 分钟, 以去除过度散射的不溶性化合物, 并获得良好的数据基线。

[0127] 整合折射和散射峰强度后, 经超滤分离于截留分子量 5,000 至 50,000Da 处得到的二次回流液 (E4), 其数均分子量为 17,000g/mol, 重均分子量为 31,000g/mol (测量误差 $\pm$ 2,000g/mol)。

[0128] 经超滤分离于截留分子量 5,000 至 15,000Da 处得到的三次回流液 (E6), 其数均分子量和重均分子量分别为 4000 和 5000g/mol, 测量误差 $\pm$ 1,000g/mol。

[0129] 测量误差是由低分子量物质的散射信号过低引起的。

- [0130] 其他结果于图 1 中列出。
- [0131] 表中 MS 表示回收的干重。此处术语“ash/MS”表示样品的灰分含量比干物质含量。
- [0132] 样品于 103℃烘箱中干燥至少 16 小时以测定干物质含量。
- [0133] 样品于马弗炉中按下列温度梯度处理 20 小时：(103℃, 550℃, 700℃) 以测定灰分含量。
- [0134] 此处术语“Prot”表示由凯氏定氮法测定的蛋白质含量百分比。
- [0135] 此处“uronic”一栏显示了糖醛酸的回收量, 由比色法测定。
- [0136] 每个样品中低聚糖的百分比由总糖的百分比减去游离糖的百分比来确定。
- [0137] 值得指出的是, 受试样品中尿酸比例较低的组分即为混合组分中所需的 E4 和 E6, 优选方案低于 12%, 甚至低于 5% 更优。
- [0138] 此外, 通过分析不同样品中的低聚糖成分 (结果未显示), 表明含有所需低聚糖混合物的二次回流液和三次回流液中, 其低聚糖糖链仅包含少量的鼠李糖。
- [0139] 事实上, 含有鼠李糖和糖醛酸的游离糖链不易被水解, 故在低聚糖混合物中几乎不含有这些分子。
- [0140] 也就是说, 低聚糖中的中性组分反应活性最强, 最容易由本发明的水解步骤对其产生作用。
- [0141] 样品中的低聚糖成分也已分析得出。即每个样品中低聚糖的质量相较于所述样品总质量的百分比介于 40% 和 80% 之间。
- [0142] 已进一步证明, 本样品中低聚糖的糖链包括以下几种特定糖: 岩藻糖, 阿拉伯糖, 半乳糖, 葡萄糖和木糖。
- [0143] 低聚糖组分对皮肤细胞的影响。
- [0144] E1 到 E7 几个不同样品对于皮肤修复过程相关细胞的影响已检测。
- [0145] 例 3: 所获混合物组分对于成纤维细胞和角质形成细胞没有细胞毒性。
- [0146] 体外培养成人真皮成纤维细胞和表皮角质形成细胞 (由手术中的皮肤碎屑获得或商业购买获得细胞株 (Lonza®, 瑞士))。利用原代培养的细胞进行实验, 以达到尽可能接近体内真实条件的目的。
- [0147] 通过上述培养细胞的研究表明, 亚麻籽中提取的低聚糖样品在给药浓度高达约 5mg/ml 时, 对于所述真皮成纤维细胞和表皮角质形成细胞均没有细胞毒性。
- [0148] 结果见附图 2 中的柱状图。图中显示了加入不同组分低聚糖处理后的活细胞数量, 以 450nm 处的吸光度为纵坐标。
- [0149] 具体说来, 测试的组分包括水解产物 E1 (图 2A), 二次回流液 E4 (图 2B—截留分子量位于 15,000 至 50,000Da 之间的低聚糖组分) 以及回流液 E6 (图 2C—截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 之间的低聚糖组分)。
- [0150] 利用体外培养的已经长至汇合阶段的成人皮肤成纤维细胞对上述组分进行测试, 测试浓度不同 (0.5, 1.0, 2.0 和 5.0mg/mL)。以空白培养基培养的细胞毒性结果作为阴性对照, 以加入苯酚 (0.1%) 处理的细胞毒性结果作为阳性对照 (毒性对照)。
- [0151] 利用 WST-1 检测法评价各样品的细胞毒性。
- [0152] 结果表明, 在低聚糖浓度高达 5mg/mL 的情况下, 受试样品对于成纤维细胞和角质形成细胞均没有细胞毒性 (数据未显示), 不能引起损伤。

[0153] 此外,另有实验显示,低聚糖浓度 1mg/mL 暴露 48 小时后,对成纤维细胞和角质形成细胞也没有负面作用(结果未显示)。

[0154] 例 4:低聚糖组分对成纤维细胞增殖的影响。

[0155] 已经证明,除了对细胞没有毒性以外,通过本发明的方法从亚麻籽中提取的低聚糖可以有效刺激皮肤成纤维细胞增殖。

[0156] 亚麻籽中提取的中性低聚糖对成纤维细胞的积极作用如图 3 所示。成纤维细胞经 1mg/mL 浓度的低聚糖组分暴露不同时间(24 小时,48 小时和 72 小时),通过 WST-1 方法检测其增殖情况。

[0157] 结果表明,受试的低聚糖组分能导致真皮成纤维细胞增殖量的增加。亚麻籽中提取的低聚糖在孵育 48 小时或 72 小时后对细胞增殖的刺激作用更强。

[0158] 已进行低聚糖组分浓度对于成纤维细胞增殖影响的研究。结果(未显示)表明,暴露浓度为 0.5mg/mL 时,样品 E4 和 E6 中可以观察到对细胞增殖作用的刺激作用。

[0159] 例 5:亚麻籽中提取的中性低聚糖对细胞趋化作用的影响。

[0160] 根据本发明的方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖对成纤维细胞具有明显的趋化活性。该效果特别有利于组织修复。

[0161] 因此,在带膜的 Transwell® 装置的插入式小室中体外培养成人皮肤成纤维细胞,所述成纤维细胞与亚麻籽中提取的不同低聚糖样品及对照组(不处理)共同孵育 24 小时,孵育浓度为 1mg/mL。

[0162] 通过计数从插入式小室跨膜迁移的细胞数量来检测皮肤成纤维细胞的趋化性。

[0163] 结果如图 4 所示,根据本发明的方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖可以明显增加真皮成纤维细胞的趋化性。另有实验表明,在低聚糖暴露浓度很低(0.5mg/mL)的条件下已经可见趋化效果,且此效果随着暴露浓度的增加而加大。结果如图 5 所示。

[0164] 例 6:亚麻籽中提取的低聚糖对细胞迁移的影响。

[0165] 使用据本发明的方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖处理真皮成纤维细胞,检测了细胞迁移量随处理时间的变化。经这些化合物处理后,检测了成纤维细胞迁移随时间的变化。

[0166] 结果如图 6 所示。成人皮肤成纤维细胞体外培养于 Ibidi® 小室中,用来人为模拟伤口的情况。

[0167] 成纤维细胞与浓度为 1mg/mL 的低聚糖共同孵育,通过视频-显微镜监测细胞迁移情况,监测 48 小时。进而重组细胞迁移的轨迹。

[0168] 可以清晰地知道:通过实施本发明的方法得到的低聚糖组分为中性低聚糖,其截留分子量分别位于 5,000 至 15,000Da 之间,以及 15,000 至 50,000Da 之间的两个区间,可以有效地促进细胞迁移,包括体外人为创伤的快速愈合。

[0169] 例 7:亚麻籽中提取的低聚糖对 III 型和 IV 型胶原合成的影响。

[0170] 此处已经证明:从亚麻籽中提取的含有中性低聚糖的成分显著提高了胶原的合成量,特别是提高了成纤维细胞进行组织修复过程中 III 型胶原的合成。

[0171] 体外培养成人皮肤成纤维细胞,并用亚麻籽中提取的低聚糖成分刺激 24 小时(图 7A)和 48 小时(图 7B),浓度为 1mg/mL。回收培养液上清液,III 型胶原的量由商用的 ELISA 试剂盒测定。

[0172] III型胶原合成的结果见图 7。

[0173] 该图明确地显示出样品包含了由超滤分离获得的两类截留分子量的中性低聚糖，其中一类的截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 之间，另一类的截留分子量位于 15,000 至 50,000Da 之间。所述根据本发明方法获得的样品可以显著促进成纤维细胞合成III型胶原。

[0174] 另有实验表明亚麻籽中提取的中性低聚糖可以促进成纤维细胞合成 IV 型胶原。

[0175] 具体说来，人真皮成纤维细胞在体外培养至汇合阶段，随后与不同样品孵育 24 小时，所述样品即为通过实施本发明的方法得到的二次和三次透过液中的低聚糖组分。组分的浓度为 1mg/mL。

[0176] 培养上清液进行回收，分别分析培养上清液和细胞层中的 IV 型胶原。

[0177] 结果如图 8 所示，通过超滤分离得到的两类截留分子量的低聚糖组分能够激活 IV 型胶原的合成，该组分其中一类的截留分子量位于 15,000 至 50,000Da 之间，另一类的截留分子量位于 5,000 至 15,000Da 之间。该效果十分有益，因为IV型胶原是基底膜的基本组分之一，且在衰老过程中，该组分的合成趋于减少。

[0178] 例 8：亚麻籽中提取的中性低聚糖对小蛋白多糖合成的影响。

[0179] 名为蛋白多糖的化合物，即 SLRPs（小的富含亮氨酸的蛋白多糖），对细胞活性的调节以及皮肤功能性质的组织起到重要作用。

[0180] 具体来说，核心蛋白聚糖和基膜聚糖是重要的蛋白多糖。核心蛋白聚糖在成人皮肤中含量丰富且在稳态的调节中起着关键的作用。随着年龄的增长，皮肤中核心蛋白聚糖的量也增加。相反，基膜聚糖的量往往随着年龄的增长而减少。基膜聚糖具有保持皮肤功能特性的作用。

[0181] 为了确定据本方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖对这些小蛋白多糖合成的影响，进行了以下实验。

[0182] 成纤维细胞加入亚麻中提取的中性低聚糖孵育 24 小时，孵育浓度为 1mg/mL。

[0183] 提取成纤维细胞中的 RNA，并进行一系列的 RT-PCR，以评价编码核心蛋白聚糖和基膜聚糖的合成的基因表达水平。以 GAPDH 基因的表达作为阳性对照。

[0184] 结果如图 9 所示。结果显示，从亚麻中提取的中性低聚糖可以导致真皮成纤维细胞中核心蛋白多糖的合成下降，基膜聚糖基因表达反而升高。

[0185] 因此，在衰老的皮肤中引入据本发明方法得到的中性低聚糖可以使皮肤有更年轻的表型，所述低聚糖即为通过超滤分离得到的截留分子量分别位于 5,000 至 15,000Da 之间，以及 15,000 至 50,000Da 之间的中性低聚糖。

[0186] 例 9：亚麻籽中提取的中性低聚糖对角质形成细胞的作用。

[0187] 光学显微镜下观察发现，亚麻籽中提取的中性低聚糖的组分对表皮角质形成细胞具有积极作用。

[0188] 具体说来，中性低聚糖诱导角质形成细胞的分化，而角质形成细胞发生变化的特征即为其形态学的变化。

[0189] 使用多种不同的分化标志物进行免疫细胞化学实验，如外皮蛋白（颗粒层的标志物），或丝聚蛋白和兜甲蛋白（表皮角质层的标记物），显微镜下观察到的结果也证实了这一结论（结果未显示）。使用据本发明的方法从亚麻籽中提取的中性低聚糖处理后，有效地刺激了角质形成细胞中这些标志物的表达。

[0190] 刺激角质形成细胞的分化有利于提高保护皮肤抵御外界侵袭的能力。

[0191] 当然,本发明并不局限于上述的实施例说明和描述,在不偏离本发明目标的范围内,可以进行变动和修饰而不受限制。

样本	编号	MS(%)	Ash / MS	Prot / MS	硫酸盐 / MS	总糖 / MS	游离糖 / MS	Uronic / MS	根 MS
经过了水解、中和、离心	E1	0.91	0.00%	11.42%	0.21%	73.60%	14.96%	11.21%	0.22%
浓缩回流液 50 KD (上清液)	E3	2.73%	5.30%	3.60%	0.01%	42.70%	0.70%	28.24%	0.72%
浓缩透过液 50 KD	E2	1.48%	0.90%	12.55%	0.36%	85.36%	19.80%	4.17%	0.02%
浓缩透过液 15 KD	E4	0.79%	6.00%	26.31%	0.12%	52.60%	5.70%	11.01%	0.11%
浓缩透过液 15 KD	E5	0.89%	0.00%	8.82%	0.38%	82.10%	27.80%	1.62	
浓缩透过液 5 KD	E6	1.10%	0.50%	9.78	0.20%	86.30%	19.70	1.34	
浓缩透过液 5 KD	E7	1.23%	3.10	4.66%	0.38%	97.20%	36.30%	0.71%	

图 1

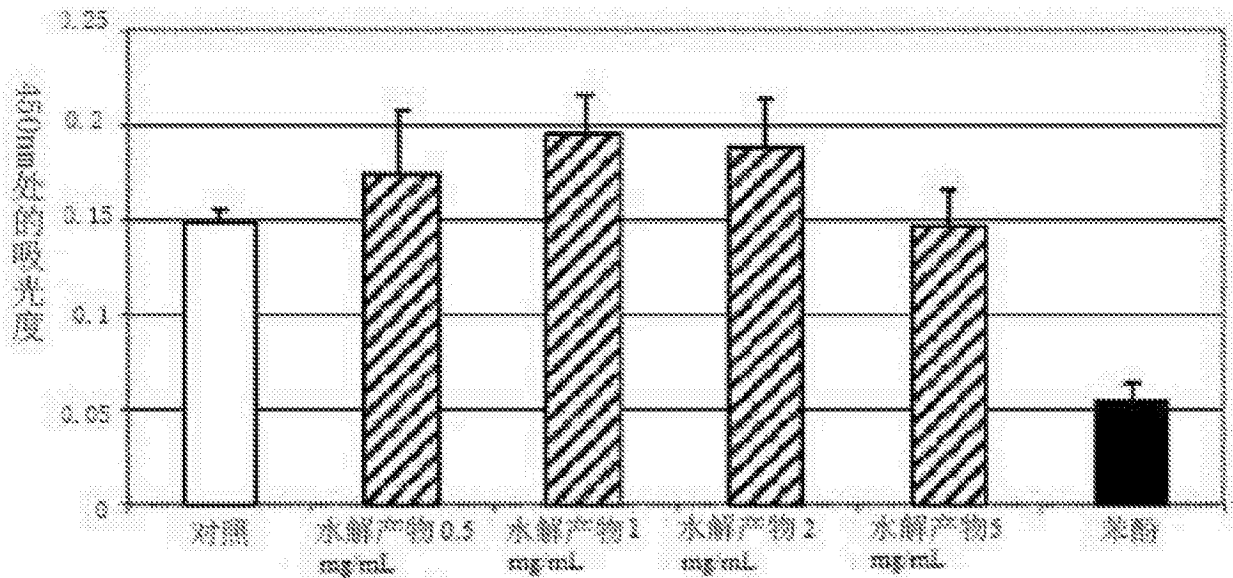


图 2A

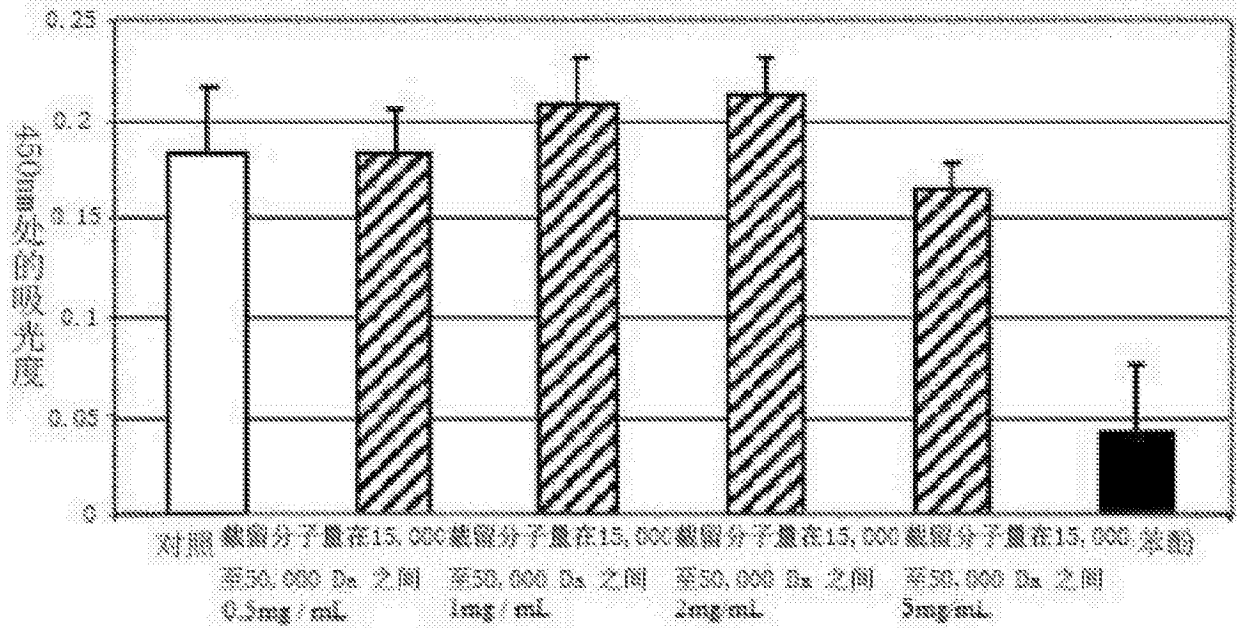


图 2B

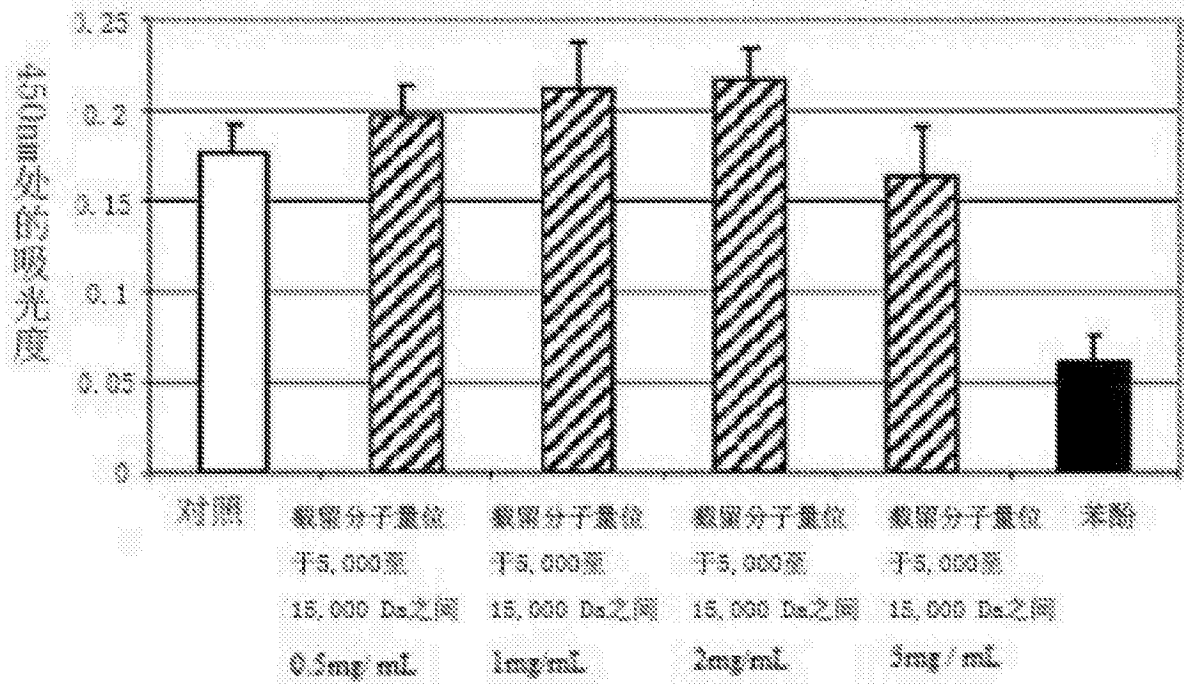


图 2C

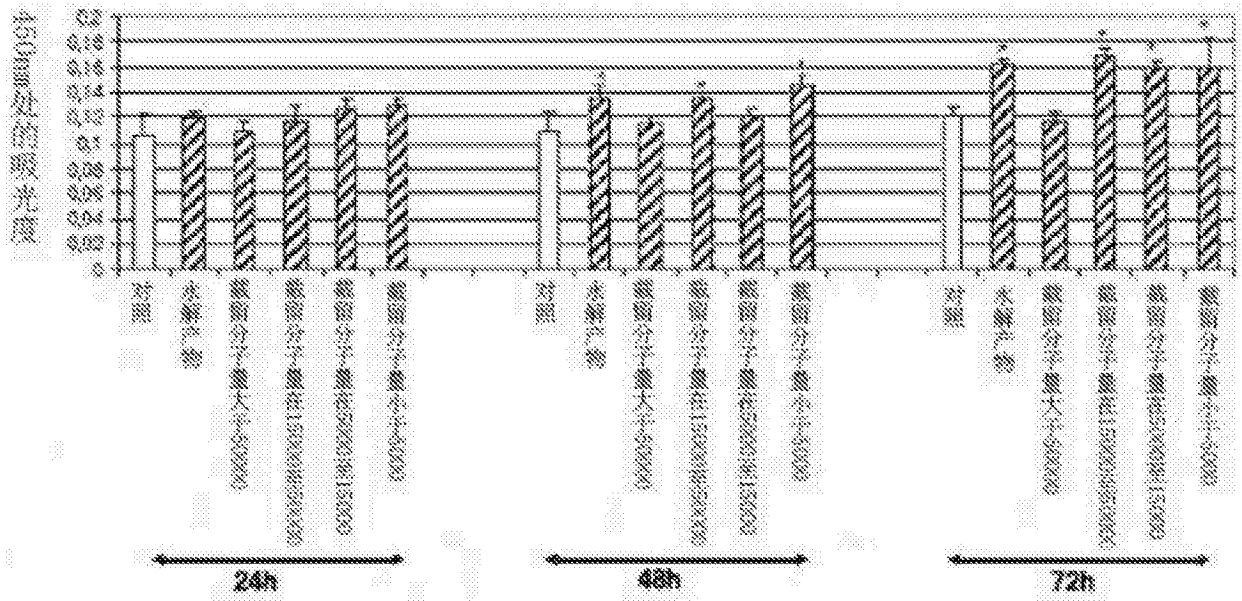


图 3

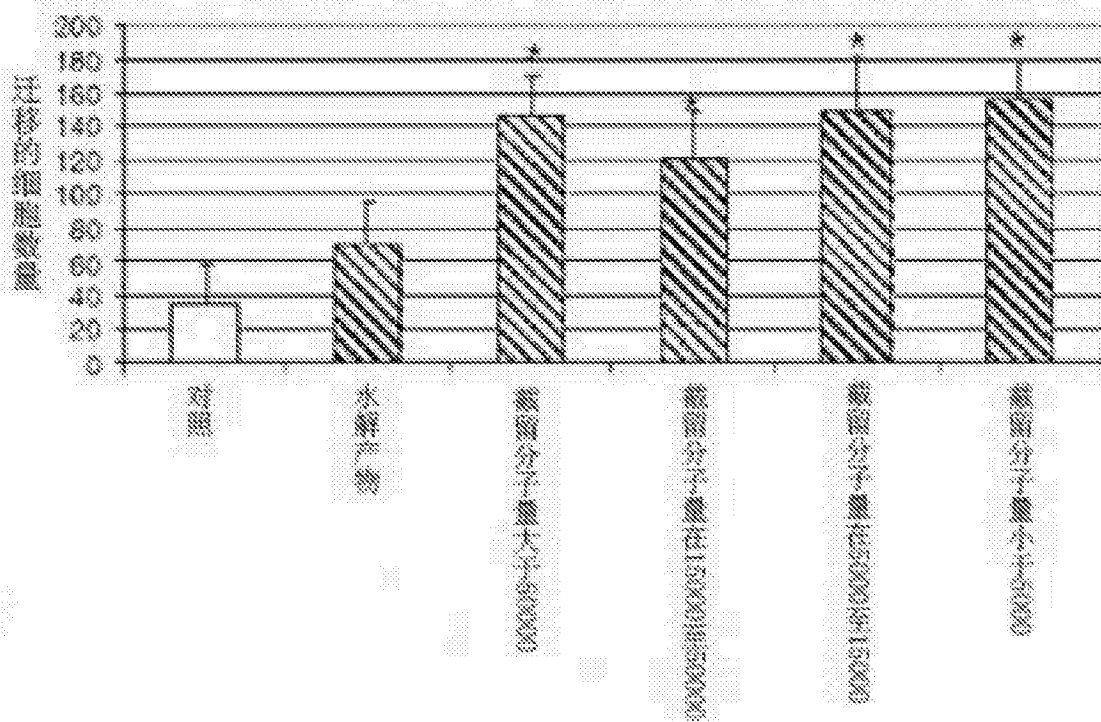


图 4

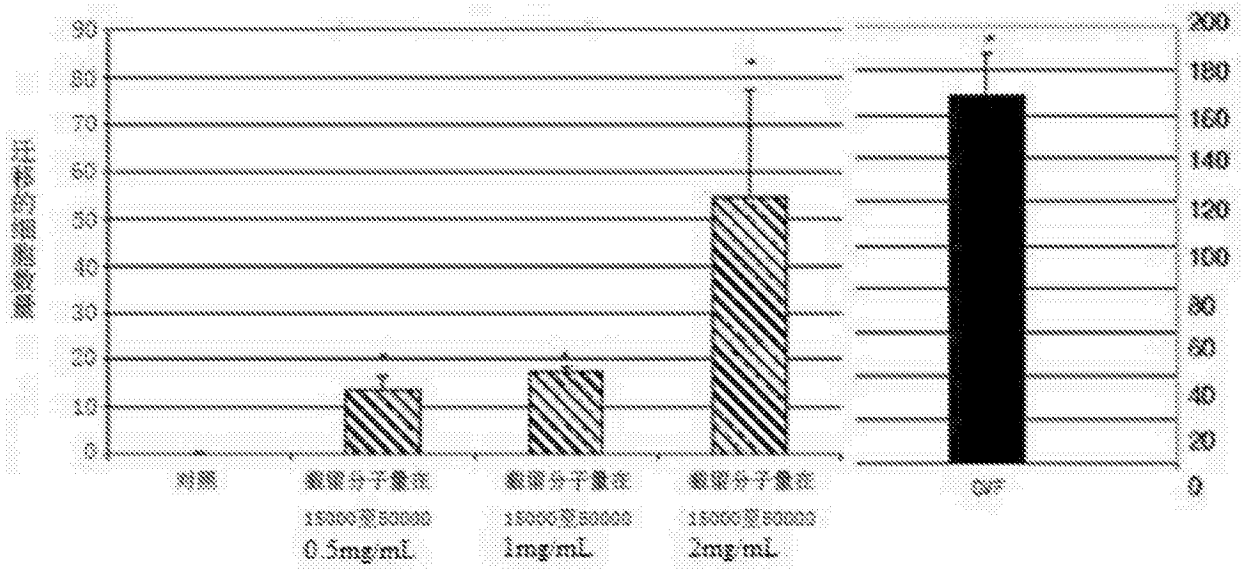


图 5

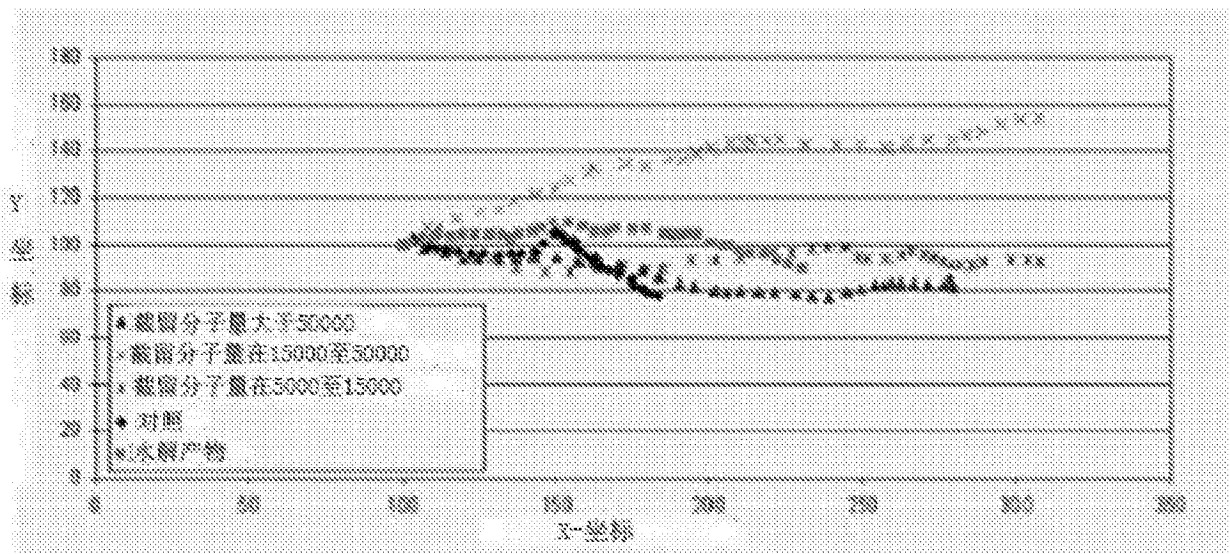


图 6

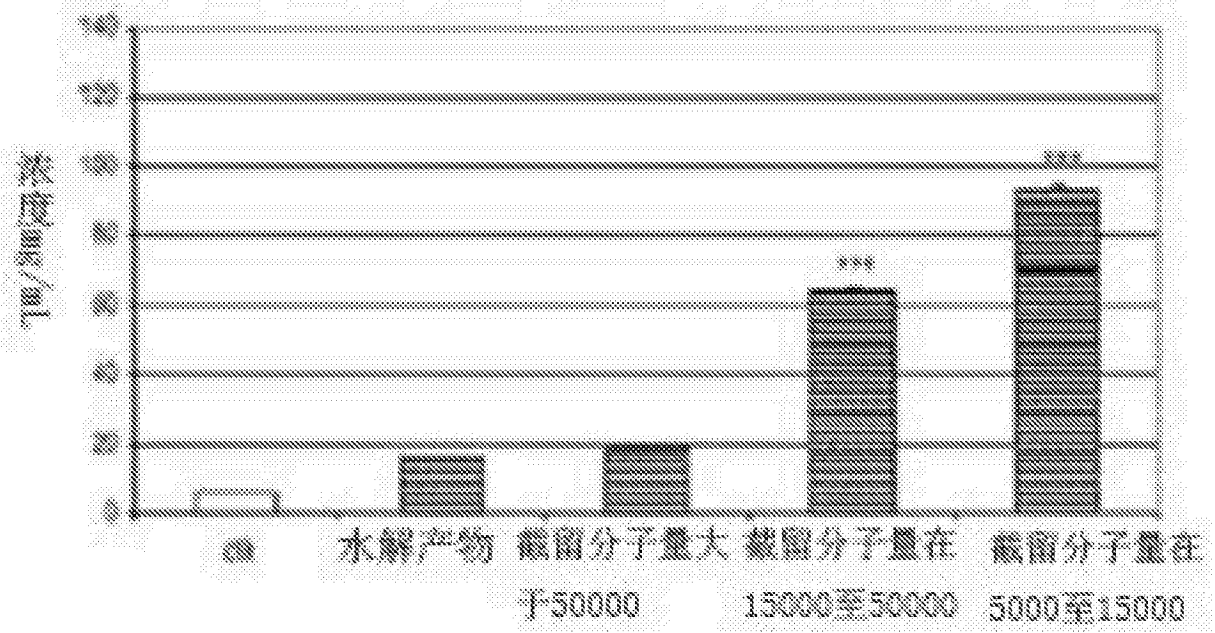


图 7A

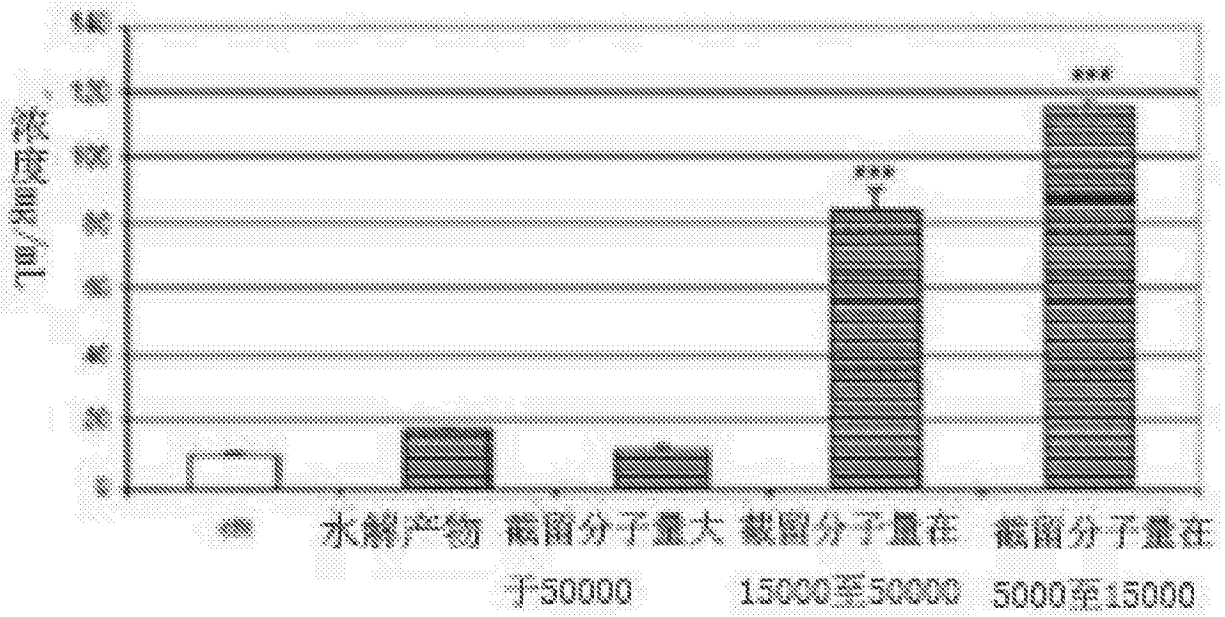


图 7B

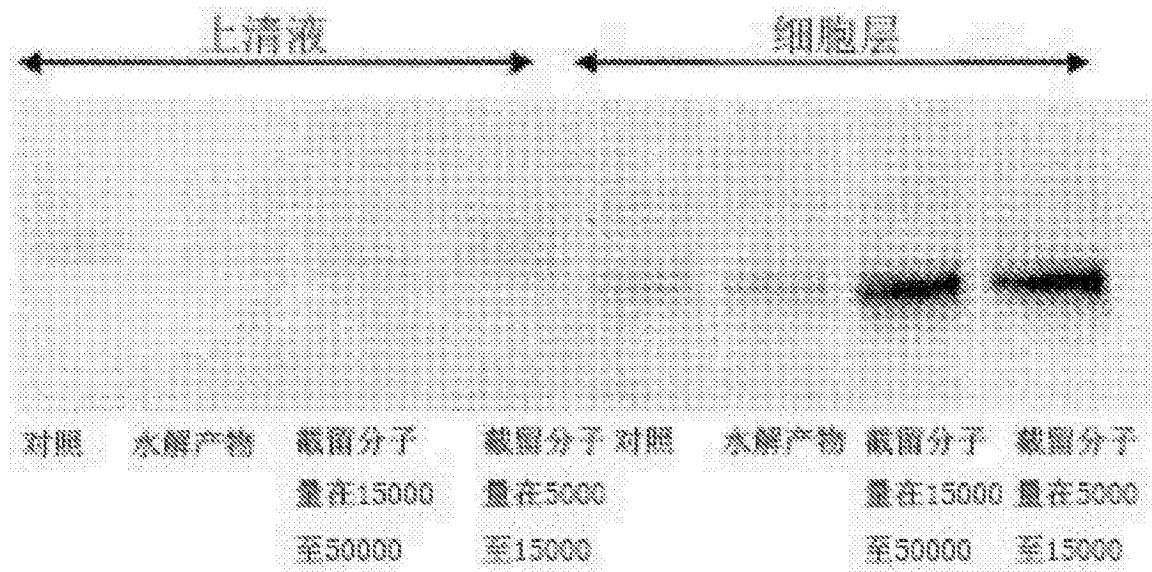


图 8

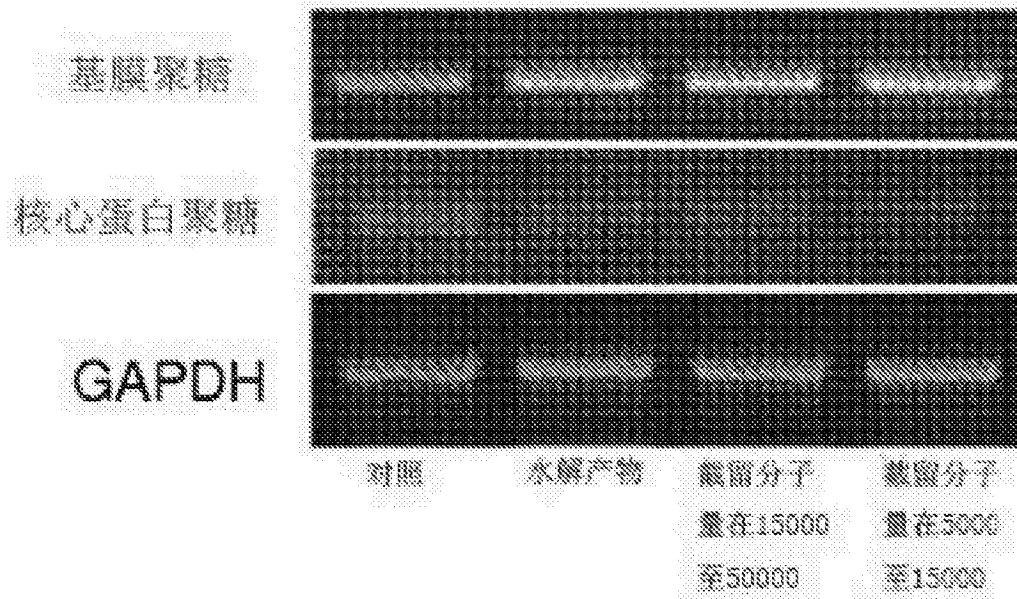


图 9