

多聚脱氧核糖核苷酸 (PDRN) 的护肤功效研究

孙 雯¹, 隋杏玲¹, 尹 娟², 徐文茂¹, 霍小敏¹, 袁晓华^{1*}

1. 山东省循证医学研究院有限公司, 山东 济南 250117;

2. 山东协和学院, 山东 济南 250109

【摘要】目的 探讨多聚脱氧核糖核苷酸的舒缓、抗皱、紧致功效。**方法** 利用脂多糖诱导 RAW264.7 炎症模型检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量, 评价 PDRN 的舒缓功效。利用斑马鱼模型检测 I 型胶原蛋白和弹性蛋白基因表达, 评价 PDRN 的抗皱、紧致功效。**结果** 浓度为 0.156%、0.625%、1.25% 时, PDRN 有效抑制炎症因子 TNF- α 的表达。浓度为 0.1%、0.25%、0.5% 时, PDRN 可显著促进 I 型胶原蛋白和弹性蛋白基因表达。**结论** PDRN 具有抗炎、促进胶原蛋白和弹性蛋白再生作用, 可用于舒缓、抗皱、紧致系列护肤品中。

【关键词】 多聚脱氧核糖核苷酸; PDRN; 舒缓; 抗皱; 紧致

【中图分类号】 R473 **【文献标识码】** A

多聚脱氧核糖核苷酸 (PDRN) 是从鲑鱼精子细胞中提取的特定规格 DNA 片段的混合物, 活性物质纯度 > 95%, 不含药理活性蛋白和多肽^[1]。PDRN 因其修复与再生特性而广泛应用于临床, 随着研究的深入, 研究者们发现其在医学美容领域也具有巨大潜力。PDRN 通过抗炎^[2]、抗氧化^[3]、增强细胞活力^[4]、抗黑色素生成^[3, 5] 及促进胶原再生^[4] 等多种途径修复受损皮肤, 改善皮肤质量, 减轻皮肤老化, 但目前国内关于 PDRN 在护肤领域的研究相对较少, 因此本次研究主要通过细胞和斑马鱼模型对 PDRN 的功效进行研究, 为其在抗炎、抗衰领域的应用提供研究依据。

1 实验部分

1.1 主要材料、试剂与仪器

PDRN, 山东省循证医学研究院有限公司; 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7; 野生型 AB 品系斑马鱼。CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 试剂; 小鼠肿瘤坏死因子酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒; 细胞培养基 (DMEM); 甘草酸二钾; 鱼胚胎培养液; 磷酸盐缓冲液 (PBS); RNA 样品储存液 (RNAlater); RNA 提取试剂 (TRIzol); 反转录试剂盒 (gDNA Eraser 的 PrimeScript RT); 实时 PCR

试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq) 等。

1.2 实验方法

1.2.1 脂多糖诱导 RAW264.7 炎症模型 TNF- α 含量检测

(1) 细胞活力: 细胞计数后稀释至所需浓度, 在 96 微孔板中添加细胞悬液, 铺板 24h, 细胞融合率达 40%~50% 时, 加入不同浓度 PDRN, 设置溶剂对照。加样 48h 后, 去除废液, 加入含 10% CCK-8 的 DMEM, 培养 1~1.5h 后, 在 450nm 处测定吸光度 (OD 值)。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{Cn}} - \text{OD}_{\text{VCh}}}{\text{OD}_{\text{C0}} - \text{OD}_{\text{VCh}}} \times 100\%$$

(2) TNF- α 含量测定: 按照 1.2.1.1 方法加样 (24 ± 2) h 后, 每孔收集 200 μ l 细胞培养上清液于 1.5ml 无菌离心管, 参照酶联免疫试剂盒的使用说明书进行检测。以 OD 值为纵坐标 (Y), 相应待测物质标准品浓度为横坐标 (X), 绘制曲线, 样品待测物质含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应浓度。最终取各组 3 复孔的平均值作为最终的待测物质含量结果。

$$\text{TNF-}\alpha \text{ 含量抵制率}(\%) = \left(1 - \frac{t}{C}\right) \times 100\%$$

T、C 分别为受试孔、空白 / 溶剂对照孔中

TNF- α 含量平均值。

1.2.2 斑马鱼模型 I 型胶原蛋白和弹性蛋白基因表达促进率检测

(1) 检测分组：挑选健康的受精后 6d 大的斑马鱼。设置空白对照组（鱼胚胎培养液）和 PDRN 组。用鱼胚胎培养液将 PDRN 溶解配制测试溶液（0.5%、0.25% 和 0.1%）。每组随机挑选 36 尾斑马鱼，平均分配到 24 孔板中，设 3 个孔，每孔含 12 尾斑马鱼。

(2) I 型胶原蛋白和弹性蛋白基因表达测定：应用 qRT-PCR 检测相关基因 mRNA 表达。TRIzol 提取总 RNA，应用紫外分光光度计检测浓度和纯度。用 PrimeScript RT 试剂盒将 RNA 合成 cDNA，并进行实时 RT-PCR 实验。引物序列：coll1a1 上游引物 5'-TAGCCCCTATGGACGTTGGT-3'，下游引物 5'-CGCAGGTCTAAGCAAGTGGA-3'；coll1a1b 上游引物 5'-TGGCATGACCGGCCCTATTG-3'，下游引物 5'-CTCTCCTTTAGCACCAGGCTGT-3'；coll1a2 上游引物 5'-GAGGCCAGCCTGGTAACATT-3'，下游引物 5'-GTTACCATCAGGACCAGGGC-3'；Elna 上游引物 5'-AAAACCAGGTTACGGCTCTGT-3'，下

游引物 5'-TCCTCCTGGATAAGCTCCGTATC-3'； β -actin 上游引物 5'-GCTGACAGGATGCAGAAGGA-3'，下游引物 5'-TAGAAGCATTTCGCGGTGGAC-3'。反应条件：95℃ 30s，95℃ 5s 和 60℃ 30s 进行 40 个循环，95℃ 15s，60℃ 1min 和 95℃ 15s。读取 Ct 值， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因相对表达量，并计算基因表达促进率。

基因表达促进率 =
$$\frac{2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ 受试物} - 2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ 空白对照组}}{2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ 空白对照组}}$$

1.3 统计学方法

应用 SPSS 23.0 统计学软件对本研究数据进行分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示，采用 χ^2 检验；计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验；以 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 PDRN 对细胞活力的影响

表 1 为不同浓度 PDRN 对 RAW264.7 细胞活力的影响，浓度为 0.02%~1.25% 时，PDRN 促进 RAW264.7 细胞增殖，在浓度为 0.02%~0.156% 时，PDRN 对 RAW264.7 细胞的促增殖作用存在剂量依赖效应，随着 PDRN 浓度增加，细胞活力增加。

表 1 PDRN 对 RAW264.7 细胞活力的影响

项目	数值							
浓度 (%)	0	0.02	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.250
细胞活力 (%)	100	159.69	157.97	168.67	174.99	172.05	143.98	111.18
SD mean (%)	2.77	10.35	9.73	10.79	12.21	11.13	4.82	6.42

2.2 PDRN 对 TNF- α 的抑制作用

脂多糖是革兰阴性菌细胞壁的一种成分，可诱导巨噬细胞免疫反应，增加 TNF- α 等细胞因子产生^[2]。作为一种炎症因子，TNF- α 在炎症反应、细胞免疫及肿瘤免疫中发挥重要作用。脂多糖诱导 RAW264.7 是研究炎症因子的经典细胞模型，检测 PDRN 对 RAW264.7 分泌 TNF- α 含量的影响，可以评价其抗炎作用。

不同组别 TNF- α 抑制率如图 1 所示，甘草酸二钾在浓度为 100 μ g/ml 时，对 TNF- α 的抑制率为 27.96% $\pm$ 0.57%，与空白组相比，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，证实该试验模型有效。PDRN 在浓

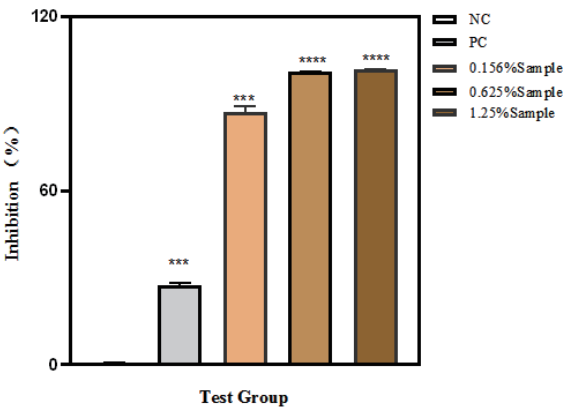


图 1 不同组别对 TNF- α 含量抑制率的影响

度为 0.156%、0.625%、1.25% 时，对 TNF- α 抑制率分别为 $87.03\% \pm 1.35\%$ 、 $100.98\% \pm 0.13\%$ 、 $101.63\% \pm 0.02\%$ ，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PDRN 对 TNF- α 表达的显著抑制效应，提示 PDRN 具有卓越的抗炎作用。

2.3 PDRN 对 I 型胶原蛋白及弹性蛋白基因表达的影响

胶原蛋白和弹性蛋白是皮肤真皮层中的重要结构成分。胶原蛋白负责组织结构完整性，维持皮肤弹性，其中 I 型胶原蛋白含量最多。弹性蛋白具有高度的延伸性和韧性，可赋予皮肤较强的弹性和反冲力，负责将变形后的皮肤恢复到正常形态。胶原蛋白和弹性蛋白降解是皮肤产生皱纹、松弛、缺乏弹性的主要原因。

斑马鱼 I 型胶原蛋白分布与人体相同，且显示出与人类的高度保守性。斑马鱼存在三种 I 型胶原蛋白基因 *coll1a1a*、*coll1a1b* 和 *coll1a2*，分别编码 $\alpha_1(I)$ 、 $\alpha_2(I)$ 和 $\alpha_3(I)$ 链^[6]。人类弹性蛋白由 *Eln*

基因合成，其在斑马鱼中对应基因为 *Elna*。因此通过检测 PDRN 对斑马鱼 I 型胶原蛋白及弹性蛋白基因表达变化，可以评价其抗皱紧致功效。

图 2、图 3 分别为不同浓度 PDRN 对斑马鱼 I 型胶原蛋白及弹性蛋白基因表达变化的影响。浓度为 0.5% 时，PDRN 对 *coll1a1a*、*coll1a1b* 和 *coll1a2* 基因表达促进率分别为 378%、312% 和 237%，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。0.25% 浓度时，基因表达促进率分别为 22%、49% 和 79%，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。0.1% 浓度时，基因表达促进率分别为 -13%、12% 和 91%，其中 *coll1a2* 表达促进率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。浓度为 0.5%、0.25% 和 0.1% 时，PDRN 对 *Elna* 基因表达促进率分别为 251%、25% 和 62%，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果显示，0.1% 浓度下，PDRN 即可有效促进 I 型胶原蛋白及弹性蛋白基因表达，0.5% 浓度下，其促进效果显著，提示 PDRN 具有促进胶原蛋白和弹性蛋白再生的作用。

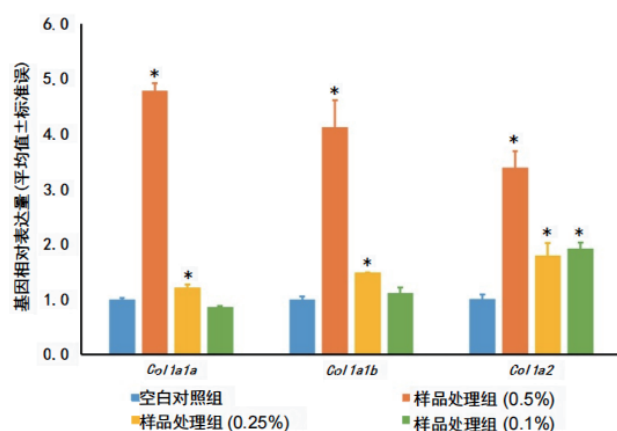


图 2 I 型胶原蛋白基因相对表达量

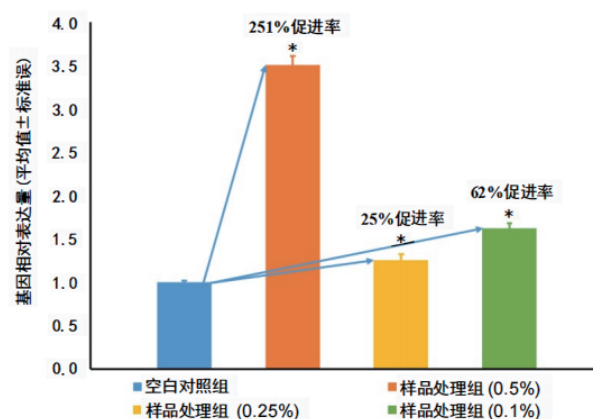


图 3 弹性蛋白基因相对表达量

3 结论

本研究通过细胞和斑马鱼模型验证了 PDRN 的舒缓、抗皱紧致功效，细胞活性显示，在一定浓度下 (0.02%~1.25%)，PDRN 对 RAW264.7 细胞有促增殖作用；在浓度为 0.02%~0.156% 时，PDRN 对 RAW264.7 细胞有显著的浓度依赖性促进增殖效应。细胞炎症模型研究显示，PDRN 可显著抑制炎症因子 TNF- α 的表达，在浓度为 0.156% 时，抑制效果即达 87%，效果具有显著性，并随浓度递增。在浓度为 0.625% 时，抑制效果达 98%。提示

PDRN 具有卓越的抗炎功效。斑马鱼模型研究显示 PDRN 显著促进 I 型胶原蛋白和弹性蛋白基因表达，0.1% 浓度下即具有有效的促进效果，提示 PDRN 具有促进胶原蛋白和弹性蛋白再生的作用。

综上所述，PDRN 具有舒缓、抗皱紧致功效，可用于相关系列护肤品的开发，具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Kim TH, Heo SY, Oh GW, et al. Applications of marine organism-derived polydeoxyribonucleotide: its potential

- in biomedical engineering[J]. Mar Drugs, 2021, 19(6): 296.
- [2] Han JH, Jung J, Hwang L, et al. Anti-inflammatory effect of polydeoxyribonucleotide on zoledronic acid-pretreated and lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(1): 400–405.
- [3] Kim YJ, Kim MJ, Kweon DK, et al. Polydeoxyribonucleotide activates mitochondrial biogenesis but reduces mmp-1 activity and melanin biosynthesis in cultured skin cells [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2020, 191(2): 540–554.
- [4] Shin SM, Baek EJ, Kim KH, et al. Polydeoxyribonucleotide exerts opposing effects on ERK activity in human skin keratinocytes and fibroblasts [J]. Mol Med Rep, 2023, 28(2): 148.
- [5] Noh TK, Chung BY, Kim SY, et al. Novel anti-melanogenesis properties of polydeoxyribonucleotide, a popular wound healing booster [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1448.
- [6] Gistelinck C, Gioia R, Gagliardi A, et al. Zebrafish collagen type I: Molecular and biochemical characterization of the major structural protein in bone and skin [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21540.

(接第 59 页)

隙加宽,且长时间水肿可能引起细胞破裂、大疱形成、内皮细胞退变或消失、厚度改变、增生改变等。本研究中 11.29% 上皮细胞变厚、45.16% 后弹力层增厚;内皮细胞较为稀疏,67.74% 患者基本消失,40.32% 病理切片中根本未见上皮细胞,14.52% 仅局部发现角膜上皮细胞。细胞破裂、坏死可在一定程度上引起炎症,致使基质层出现炎症细胞浸润问题,促进纤维增生,基质层损害可形成瘢痕。本研究中上皮细胞与基质细胞新生血管形成各见 5 例 (8.06%)、16 例 (12.90%),纤维增生各见 9 例 (14.52%)、8 例 (12.90%),上皮细胞上皮内生 6 例 (9.68%),32.26% 出现炎症细胞浸润与皱折现象,6.45% 出现基质层瘢痕化。

综上所述,角膜失代偿是白内障摘除术后严重并发症,角膜失代偿形成与角膜细胞损伤密切相关。建议临床医生在对患者进行白内障摘除术治疗时,根据患者具体情况科学制订治疗方案,合理选择手术疗法,并在手术过程中慎重操作,尽可能缩短手术时间,减少手术操作损伤等,以减少角膜失代偿发生率。

参考文献

- [1] 刘忆南,蔡宏媛,洪晶,等.重组牛碱性成纤维细胞生长因子对角膜内皮细胞密度低下患者白内障术后角膜内皮的保护作用[J].眼科新进展,2023,43(6): 467–471.
- [2] 翁碧艳,王琳,伍水玉.囊袋张力环辅助超声乳化白内障摘除术在超高度近视伴发白内障患者治疗中的应用效果分析[J].医药前沿,2023,13(9): 103–105.
- [3] 陈雪.分析角膜后弹力层前内皮移植术治疗角膜内皮功能失代偿的临床效果[J].中国现代药物应用,2020,14(21): 105–107.
- [4] 苗壮,鲁静.带虹膜隔人工晶体植入术后 10 年角膜内皮失代偿 1 例[J].中医眼耳鼻喉杂志,2019,9(2): 119–120.
- [5] 范祥雨,洪佳旭,徐建江.角膜内皮失代偿患者 302 例临床分析[J].中国眼耳鼻喉科杂志,2019,19(2): 105–109.
- [6] 陈雪.分析角膜后弹力层前内皮移植术治疗角膜内皮功能失代偿的临床效果[J].中国现代药物应用,2020,14(21): 105–107.