

基因芯片技术在化妆品中的应用

方兆华

(伽蓝集团研发中心, 上海 200233)

摘要: 基因芯片技术具有对大量基因进行平行和快速分析检验的优势, 广泛应用于新基因的发现、基因诊断以及药物筛选等领域。基因芯片技术越来越受到化妆品研发人员的关注, 已成功应用于揭示功效成分作用靶点、人皮肤基因表达水平变化等研究。总结了近年来基因芯片技术在化妆品新产品开发、功效评价和分析检测 3 个方面的研究现状和应用实例。

关键词: 化妆品; 基因芯片; 微阵列; 基因表达谱; 单核苷酸多态性

中图分类号: TQ658.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7264(2012)01-0024-04

1 基因芯片技术

基因芯片(gene chip), 又称为微阵列(microarray), 是基于碱基互补原理, 在固体载体表面按一定的阵列集成大量的基因探针, 通过与待测基因进行杂交反应后检测杂交信号的强弱, 判断样品中靶基因的性质, 进而对大量基因进行平行瞬时分析检验的技术。

1991 年, 美国 Affymetrix 公司的 Fodor 博士提出并开始研究基因芯片技术。1992 年, Affymetrix 公司制成了首张商业化寡核苷酸芯片, 并使用 Genechip 作为其芯片的商业名称。1995 年, 斯坦福大学的 Schena M 等首次在《Science》杂志上发表基因表达谱芯片的论文^[1]。1996 年, Affymetrix 公司运用激光共聚焦及分子生物学技术研制出首块 cDNA 芯片, 从此拉开了基因芯片技术与开发的帷幕, 这一年也被称为基因芯片的元年。1998 年, 美国科学促进会将基因芯片技术列为年度自然科学领域十大进展之一, 同年美国政府正式启动生物芯片计划。

基因芯片技术与传统的生物技术相比较, 具有处理速度快、信息量大、样品量少、可靠性好、重复性强和污染少等优点。基因芯片技术以其可同时、快速和准确地分析数以千计基因组信息的本领而显示出了巨大的威力, 推动了新基因的发现、基因诊断、药物筛选和给药个性化等领域的一系列重大进展。

基因芯片技术通常的操作流程是: 抽提样本的总 RNA 并纯化 mRNA, 通过反转录过程获得标记的 cDNA (将荧光染料 Cy3 或 Cy5 接于 dNTP 上, 进行反转录时引入 Cy3. dNTP 和 Cy5. dNTP 分别标记测

试样品和参比样品), 与包含上千基因的基因芯片进行杂交反应, 然后将芯片上未互补结合反应的片断洗去, 杂交后的芯片置于激光共聚焦扫描仪进行图像数据的转换, 比较芯片上不同波长荧光的分布图, 计算出待测样本中各种基因表达水平变化。

2 在化妆品中的应用

新产品开发尤其是新功效成分的开发是化妆品开发的重要组成部分。化妆品中功效成分的多样性、多途径和多靶点的作用特点决定了其系统化研究的趋势, 基因芯片技术以其高通量、并行和高内涵的优势为化妆品研究开辟了崭新的领域。基因芯片在新产品开发中的应用方向包括: 功效成分作用靶点研究、功效成分筛选和作为高通量筛选平台以及开发“量身定做”化妆品。

2.1 功效成分作用靶点研究

基因芯片在医药研究领域已广泛用于药物作用靶点研究^[2]。Wang 等^[3]用基因芯片技术对鬼臼亚乙苷的作用机制进行研究, 提出了介导鬼臼亚乙苷诱导细胞凋亡的信号传导途径, 从而获得一种抗肿瘤药物的新靶点。

利用基因芯片进行化妆品功效成分作用靶点的研究有 2 种模式。一种是直接检测功效成分对生物大分子(如受体、酶、离子通道和抗体等)的结合及作用; 另一种是检测功效成分作用于皮肤细胞后基因表达的变化, 尤其是 mRNA 的变化。吕洛等^[4]通过基因芯片杂交技术, 研究积雪草苷(Ad)作用于体外培养成纤维细胞(HSFb)后, 对 HSFb 基因表达谱的影

响,进一步通过 Northern 杂交和放射免疫技术研究 Ad 对胶原代谢相关可疑靶基因。采用表达谱基因芯片研究基因表达与传统的 Northern Blot 相比有许多优点,如样品/试剂需要量非常小;同时获得大量基因的表达变化信息,效率明显提高;更多地揭示基因之间表达变化的关联关系,从而研究基因与基因之间内在的作用;检测基因表达变化的灵敏度高;节约费用和时间等。最重要的是,基因芯片有效扩大了功效成分筛选的作用靶标数目,促进了功效成分发现的机会。基因芯片易于实现自动化操作,是功效成分高通量筛选、揭示机理的重要手段。

2.2 功效成分筛选

基于作用靶标、靶分子的药物筛选模型也是适合化妆品功效成分筛选的技术路线。基因芯片技术的出现使得人们可以同时观察功效成分对多个靶蛋白、靶基因甚至整个组织、个体的基因和靶标的作用情况,这符合现代化妆品作用多靶点、多途径的作用方式,也符合中医药注重整体性协调的思维模式,所以利用以基因芯片为基础的筛选技术,进行化妆品功效成分筛选是开发新型中药化妆品的有效途径。

目前,将基因芯片应用于化妆品功效成分的筛选还较为少见^[9],但在合成药和中药的筛选中已经广泛使用,该技术用于化妆品功效成分时,只需将化学药改为化妆品功效成分即可,而筛选系统和检测方法并不需要做大的改变,可以有效地改变传统化妆品功效成分筛选时样品消耗量大、实验周期长和成本高的缺点。如果将该技术与现代化学分离分析技术相结合,不但可以在短时间内筛选得到功效成分,而且可以对功效成分进行快速的结构判定,避免了常规条件下需要分离纯化出较多量的化妆品混合物中的各种成分的麻烦,在微量条件下即可得到明确的结果。

2.3 作为高通量筛选平台

高速、低成本的高通量筛选已成为功效成分筛选的首选。基因芯片作为一种新型技术平台,完全可以满足高通量筛选的微型化和自动化需要。基因芯片技术应用于高通量筛选有 2 个发展方向:微流体芯片技术和液相芯片技术。

微流体芯片,又被称为“芯片实验室”。它是利用微机电技术将一般实验室所使用的装置微小化到芯片上,进行生化反应、过程控制或分析。因为其具有使用样品和试剂量少、反应速度快和大量平行处理等优点,因此在高通量筛选上的应用具有非常大的优势。Lin 等^[10]将微流体芯片技术与高通量筛选相结合,使用 Caliper250HTS 系统进行磷脂酶 A 药物筛选,384 孔板筛选自动运行时间仅仅 5.4 h。这个新筛选方

法将洗脱和检测自动化,大大提高了高通量筛选的效率。

液相芯片(liquid chip),也称为悬浮芯片(suspension array),是在不同荧光编码的微球上进行核酸杂交反应,通过红、绿 2 束激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的,一个反应孔内可以完成多达 100 种不同的生物学反应,是新一代高通量分子检测技术平台。2001 年 12 月美国食品及药品管理局(FDA)已批准将悬浮芯片技术用于临床,这是唯一被 FDA 批准用于临床诊断的生物芯片产品^[7]。

2.4 开发“量身定做”化妆品

“人类基因组计划”的研究表明,由于不同个体存在单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNP),化妆品的使用效果也会显示个体差异。通过基因组学手段研究基因多态性对化妆品的影响,以便对不同的基因型个体“量身定做”化妆品,从而充分发挥化妆品的功效,同时把不良反应减少到最小。其优点在于:①在进入成品开发前,可以通过功效成分对基因多态性的影响实现早期筛选,从而降低由于功效成分的安全性导致的开发失败几率;②个体基因型可以预见基因多态性造成的化妆品功效差异;③功效成分作用靶蛋白的差异反应在基因多态性上,可以根据研究个体基因型预见基因多态性造成的化妆品功效方面的差异;④如果发现 1 种可以导致功效活性差异的蛋白,其他与之相关的蛋白就可以作为潜在的化妆品作用靶点。

将基因芯片运用到化妆品的开发方面,根据基因型将人群分类,实现化妆品的个性化是未来化妆品的发展趋势之一,由于基因表达还受很多环境的因素影响,实际应用还需要很长时间的探索。

3 在化妆品功效评价中的应用

基因芯片技术不仅用于研究临床人体皮肤细胞的基因表达差异,发现和识别化妆品功效靶点和非安全作用靶点,阐明化妆品的作用机制^[8],基因芯片与细胞和组织培养技术相结合,还可用于检测功效成分对细胞基因表达的影响,或者建立基于基因表达模式的细胞模型,直接用于筛选和开发可调控细胞基因表达水平的新功效成分。

3.1 研究正常皮肤与异常皮肤基因表达差异

人体皮肤组织在衰老和色素沉着等生理过程中,往往伴随着基因表达的变化,基因表达水平的升高或降低,可能是异常的原因,也可能是皮肤异常的外在表现。若基因表达的变化是异常的原因,则以此基因作为靶点的化妆品就可能逆转皮肤异常;若基因表达的

变化是异常的外在表现,则以此基因为靶点的化妆品就可能改善皮肤异常情况。

张琳西^[9]应用基因芯片对皮肤恶性黑色素瘤差异表达基因进行了研究,从 21 073 个基因中筛选出 1 596 个差异基因。颜薇^[10]通过基因芯片技术,在全基因组水平上比较中国人光老化皮肤与正常皮肤的基因表达差异,在转录组水平上研究光老化分子生物学机制,为皮肤光老化的临床防治提供了理论依据。陈尚等^[11]用基因芯片法筛选了毫米波辐射所致基因表达的改变。周珉菲等^[12]总结了基因芯片技术在皮肤科学研究领域中的应用进展。

3.2 建立基因表达模型

使用细胞模型进行化妆品临床前的功效评价,可以减少个体化差异造成的假阳性干扰,有助于得出准确的功效评价结论。采用基因芯片技术,建立基因表达模型,从多层次获得综合功效评价数据。

马宏^[13]以国际公认的衰老模型——人二倍体成纤维细胞为研究对象,应用高通量的基因芯片技术,检测细胞复制性衰老的基因表达谱,筛选细胞衰老的生物学标志,同时观测细胞衰老过程中其他生物学指标的变化,以多项指标综合评估细胞的衰老程度。

3.3 研究功效成分对皮肤细胞基因表达影响

化妆品涂抹到皮肤上后,将引起皮肤细胞外部形态及内部正常代谢过程的一系列变化。其内部生理活动的变化可集中表现在其基因表达的变化上。通过测定分析化妆品对细胞的基因表达的影响,可评价化妆品活性及安全性,进而确证功效靶点或者发现新的作用靶点。通过基因芯片测定功效成分诱导的皮肤细胞基因表达变化来进行功效成分筛选与研究,对那些用常规方法很难追踪监测的功效成分或需要很长时间才能得到临床实验结果的情况,具有明显的优势。

谢韶琼^[14]通过检测灵芝多糖抗角质形成细胞衰老基因表达水平,阐明了古老的抗衰老中药“灵芝”的抗衰老机理,实验通过角质形成细胞系 Hacat 细胞的传代培养并且与药物作用,用 Trizol 法提取总 RNA,反转录成 cDNA,用 cy3 和 cy5 两种荧光分别标记药物组和对照组 cDNA,与基因表达谱 cDNA 芯片杂交,用激光共聚焦扫描获取图象,用分析软件进行图象分析获取数据。

3.4 化妆品安全性评价

基因芯片分析法是一种可以用来分析药物安全性和对环境毒物进行分类的灵敏度较高的方法。基因芯片技术可将化妆品毒性与基因表达特征联系起来,通过基因表达分析便可确定化妆品安全性,使得化妆品安全性或不期望出现的效应在临床实验前得以确认^[5]。

今后,基因芯片分析还可能在化妆品耐受性方面大展身手,即检测对化妆品功效成分耐受的基因,指导产品开发时对功效成分的添加使用,也有助于消费者选择化妆品时更加有针对性。①可以利用表达谱芯片检测化妆品诱导的基因表达变化来分析其耐受性;②可利用寡核苷酸芯片检测基因组序列的亚型或突变位点,从而分析其耐受性。由于基因芯片技术可以同时检测化妆品的多个耐受基因,还可以同时对多个功效成分的多个耐受基因进行检测。

4 在化妆品分析检测中的应用

基因芯片近年来已广泛应用于食品和化妆品等样品中致病菌的检测研究^[16]。Carl D R^[17]采用基因芯片同时检测大肠埃希菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌和空肠弯曲菌 4 种细菌,该方法检测不仅敏感度高于传统方法,而且提高了检测效率。

基因芯片还可用于化妆品中动物源成分、转基因成分的检测^[18,19]。石丰运等^[20]采用基因芯片技术建立了 4 种动物源成分的基因芯片检测方法,能够同时实现对牛、山羊、猪和鸡等动物源成分的快速检测,灵敏度均达到 1×10^{-12} g。

从国内外发表的文献来看,基因芯片在化妆品开发、评价和分析检测中的应用时日较短,大多数研究报道是基于药物开发、食品药品分析和临床医学等领域的研究进展,专门针对化妆品进行的相关研究和开发还比较少。基因芯片在化妆品领域的应用价值还远远未被人们所熟知。作为生物芯片大家族中的一员,基因芯片还可以和蛋白质芯片以及组织芯片等其他生物芯片整合起来形成芯片系统,在化妆品研究和应用方面具有巨大的潜力^[21]。

参考文献:

- [1] Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270 (5): 467-70.
- [2] Khan S, Chaturvedi S, Goel N, et al. Review: DNA microarray technology and drug development[J]. *Chron Young Sci* 2010(1): 1-5.
- [3] Wang Y X, Rea T, Bian Junhua, et al. Identification of the genes responsive to etoposide -induced apoptosis, application of DNA chip technology[J]. *FEBS Letters*, 1999, 445: 269.
- [4] 吕洛, 应康, 魏少敏, 等. 积雪草苷对成纤维细胞胶原相关基因的作用[J]. *日用化学工业*, 2004, 34 (6): 344-346.
- [5] Hae Jong Kim, Chi-Ho Choi, Sung Won Choi, et al. Discovery of compound 18 as a novel melanogenesis inhibitor using protein chip-based HTS assay[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136 (S): 453.
- [6] Lin S, Fischl AS, Bi X, et al. Separation of (下转第 29 页)

水硬度有关; 蒸馏水中, 碳链越长, 脂肪醇硫酸钠泡沫性能越好, 硬水中 C_{12-14} 醇硫酸钠泡沫性能最佳。

参考文献:

- [1] 伍堂敏, 邓龙辉, 刘保. 液体脂肪醇硫酸盐的生产及应用性能[J]. 日用化学品科学, 2009, 32(1): 27-31.
[2] 巢骏. 三氧化硫硫酸化十二醇的生产工艺[J]. 日用化学工业,

1993(1): 11-13.

- [3] 干祯祥. 脂肪醇及脂肪胺的国内外现状[J]. 杭州化工, 1992(3): 27-31, 34.
[4] 夏纪鼎, 倪永全, 梁梦兰, 等. 表面活性剂和洗涤剂化学与工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
[5] 王载紘, 张余善, 王多闻, 等. 阴离子表面活性剂[M]. 北京: 轻工业出版社, 1983.

Effect of carbon chain on the performance of sodium fatty alcohol sulfate

FANG Ling-dan¹, XIA Xiong-yan¹, KONG Ling-niao¹, LEI Xiao-ying¹, YU Xin-lin²

(1. Zhejiang Zanyu Technology Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310009;

2. Jiaxing Zanyu Technology Co., Ltd., Jiaxing, Zhejiang 314201 China)

Abstract: The chemical properties of sodium fatty alcohol sulfate with different carbon chains, such as surface tension, cmc, emulsification, contact angle, resistance to hard water, foaming power, etc. were determined. The results illustrated the longer carbon chain, the bigger contact angle and the poorer resistance to hard water. The sodium C_{12-14} alcohol sulfate showed the best property in reduction of surface tension. The sodium C_{8-10} alcohol sulfate showed the worst foaming property. The foam of sodium C_{16-18} alcohol sulfate decreased with the increasing hardness of water due to its bad resistance to hard water. The sodium C_{16-18} alcohol sulfate showed the best emulsifying performance.

Key words: sodium fatty alcohol sulfate; carbon chain; property

(上接第 26 页) phospholipids in microfluidic chip device: application to high-through put screening assays for lipid-modifying enzymes [J]. Analytical Biochemistry, 2003, 314 (1): 97.

[7] 苏璞, 刘楠, 高志贤. 悬浮芯片技术在生物医学领域中的应用[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43 (8): 733-735.

[8] Méhul B, Asselineau D, Bernard D, et al. Gene expression profiles of three different models of reconstructed human epidermis and classical cultures of keratinocytes using cDNA arrays [J]. Arch Dermatol Res, 2004, 296: 145-56.

[9] 张琳西. 应用基因芯片对皮肤恶性黑色素瘤差异表达基因的研究[D]. 第四军医大学, 2006.

[10] 颜薇. 应用基因芯片技术对国人皮肤光老化基因差异表达的研究[D]. 中国协和医科大学(北京协和医学院), 2008.

[11] 陈尚, 郑一凡, 曾群力. 毫微波辐照对角质形成细胞的影响[C]. 第 3 届电磁辐射与健康国际研讨会暨 2003 年全国电磁辐射生物学术会议论文集, 2003.

[12] 周珉菲, 徐丽敏. 基因芯片技术及其在皮肤科学领域研究中的应用[J]. 中国皮肤性病杂志, 2006, 20(2): 109-111.

[13] 马宏. 人二倍体成纤维细胞的衰老生物学标志[D]. 北京大学, 2002.

[14] 谢韶琼. 灵芝多糖抗角质形成细胞衰老相关基因表达的研究[G]. 中国中西医结合皮肤性病学术会议论文汇编, 2006.

[15] 刘晓智, 陈颢, 王睿. 生物芯片技术研究进展及其应用前景[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(22): 1684-1688.

[16] 翟俊辉, 宋亚军, 杜宗敏, 等. 通用基因芯片检测感染性细菌方法的研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 430-431.

[17] Call D R. Detecting and genotyping Escherichia coli O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarray [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 67(1): 71-78.

[18] Bottero MT, Civera T, Nucera T, et al. Design of universal primers for the detection of animal tissues in feed stuff [J]. ProQuest Agric J, 2003, 27: 667-669.

[19] Prins TW, Van Dijk JP, Beenen HG, et al. Optimised padlock probe ligation and microarray detection of multiple (non-authorized) GMOs in a single reaction [J]. BMC Genomics, 2008 (9): 584.

[20] 石丰运, 缪建锟, 张利平, 等. 基因芯片技术检测牛、山羊、猪和鸡源性成分[J]. 生物工程学报, 2010, 26(6): 823-829.

[21] Francoeur, Ann Michele. Dermatology biochips and test system, CA, 20072593101 [P]. 2008.

Applications of gene chip technology in cosmetics

FANG Zhao-hua

(JALA Corporation R&D Center, Shanghai 200233, China)

Abstract: Gene chip technology is widely used in many fields including discovery of new genes, diagnosis, drug screening and so on, for its advantages in rapid analysis and ability of testing a large number of gene in parallel. Besides, it is gaining increasing interest from cosmetic industry. Gene chip has been successfully used in revealing the target of functional ingredients and the level of gene expression changes in human skin. This paper summarized recent applications of gene chip in development, evaluation and analysis of cosmetic product.

Key words: cosmetics; gene chip; microarray; gene expression profile; single nucleotide polymorphisms