

## 论著

## 组合体外与临床测试评价植物抗氧化剂抗老化功效

程树军<sup>1</sup>,秦瑶<sup>2</sup>,潘芳<sup>1</sup>

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

**摘要:**目的 基于非动物测试理念,研究植物抗氧化剂复配后的皮肤抗老化功效。方法 体外培养 HaCaT 角质细胞,紫外线照射诱发氧化损伤模型,分别加入白藜芦醇、原花青素和二者复配物,用 MTT 比色法、荧光素标记法和 ELISA 法检测细胞活性、活性氧簇自由基(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、细胞周期及细胞凋亡的变化。对含两种植物原料的眼霜配方进行鸡胚尿囊膜血管试验(CAMVA)和牛角膜混浊渗透试验(BCOP)的组合测试评价其眼刺激性。选择平均年龄 40 岁的女性志愿者 25 名,眼部连续使用该眼霜 60 d,于使用产品的第 0、30 和 60 d 分别检测皮肤的水份、水份流失、弹性和肤色等皮肤老化相关指标。结果 白藜芦醇-原花青素复配的植物抗氧化剂可明显缓解紫外线造成的 HaCaT 细胞氧化损伤,SOD 水平明显升高( $P < 0.001$ ),ROS 荧光强度、细胞凋亡率及 S 期细胞比例均明显降低( $P < 0.001$ ),细胞修复作用强于单独作用。经过替代方法组合评价其安全性后进行临床志愿者测试,证明皮肤保湿、弹性和皮肤颜色等指标得到改善。结论 白藜芦醇和原花青素两种植物抗氧化剂复配使用可有效减少皮肤氧化应激和明显改善皮肤性能。

**关键词:**皮肤抗氧化;角质细胞;白藜芦醇;原花青素;替代方法;细胞凋亡;细胞周期;体外实验

中图分类号:R155;R136.4 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)03-0213-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.03.003

### Skin antiaging efficacy evaluation for plant antioxidants integrating in vitro and clinical test

CHENG Shu-jun, QIN Yao, PAN Fang

(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Guangzhou 510623, China)

**Abstract: Objective** To investigate the skin antiaging efficacy of plant antioxidant blend based on the concept of non-animal testing. **Methods** HaCaT keratinocyte cell line were induced oxidation damage by ultraviolet irradiation and treated with resveratrol, procyanidins and two substances blend respectively. The quantitative measurement including cell viability, ROS, SOD, cell cycle and cell apoptosis were detected by MTT assay, fluorescein labeling and ELISA method. The ocular irritation of eye cream formula containing plant material were assessed by combination of CAMVA and BCOP testing. Clinical efficacy was evaluated in terms of chronoaging and photoaging features including skin hydration, elasticity and color by non-invasive methods on 25 female volunteers after 60 days of treatment. **Results** Resveratrol-procyanidins blend antioxidant could significantly relieve HaCaT cell oxidative lesion induced by UV. The SOD level in test group were significantly higher than radiation group ( $P < 0.001$ ). All ROS fluorescence intensity, apoptosis cell and the percentage of S-phase cell in cell cycle were obviously decreased in test group ( $P < 0.001$ ). The antioxidant ability of blend are better than resveratrol and procyanidins. The clinical test of volunteers after alternative combination evaluation of its safety, which showed that skin moisturization, TEWL, elasticity and color had significantly improved. **Conclusion** Specific plant antioxidant blend by resveratrol and procyanidins could effectively reduce skin oxidative stress and improve function.

**Key words:** Skin antioxidant; keratinocyte; resveratrol; procyanidin; alternative method; apoptosis; cell cycle; experiment in vitro

欧盟化妆品新法规已于 2013 年 7 月 11 日实施,禁止化妆品及其原料的动物实验是其重要原则<sup>[1]</sup>。如何建立体外替代方法的整合应用策略,是

替代方法使用者(化妆品企业、检测机构、监管机构等)急需解决的问题。特别是当前产品创新和市场竞争激烈的情况下,避免和减少不必要的动物试验,可有效缩短从体外原料筛查测试到与临床应用的时间。已知皮肤老化与紫外线照射引起的活性氧簇自由基(ROS)的介导有关<sup>[2]</sup>。近年来,从植物中寻找天然抗氧化剂成为热潮<sup>[3]</sup>。而且多种活性成份配合使用可明显促进各自功效,降低成本。本

收稿日期:2013-11-18

基金项目:国家科技支撑计划(2011BAI15B03)

作者简介:程树军 男 研究员 研究方向为动物替代实验方法开发与标准化 E-mail:chengciq@sohu.com

研究尝试建立一种基于体外替代方法结合临床评价的整合测试策略,为产品开发和测试提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 志愿者

25例女性,年龄36~50岁,平均年龄(40±3)岁,III或IV型皮肤。以室内活动为主,无严重系统性疾病、急性炎症、免疫缺陷或其他皮肤病;无过敏性疾病;既往无护肤类化妆品过敏史;近2个月内未参加药物临床实验或其他化妆品功效评价;志愿参加并能按照试验要求完成试验内容,并在知情同意书上签字。每天早晚各使用1次美白眼部滋润霜,连续使用60d。

#### 1.1.2 生物材料及培养

HaCaT细胞系(武汉细胞所),MEM培养基、含双抗HBSS缓冲溶液、新生牛血清和胰蛋白酶均购自Gibco公司,75cm<sup>2</sup>细胞培养瓶、培养皿和96孔板均购自美国Corning,SPF级白莱杭鸡受精鸡胚[广东新兴大华农禽蛋有限公司,许可证号:SCXK(粤)2008-0019],新鲜牛眼球采自广州地区机械化牛屠宰场。

#### 1.1.3 主要仪器与试剂

皮肤水份测定仪、皮肤水份流失测定仪、皮肤弹性测定仪均购自德国Courage & Khazaka;紫外线模拟仪及滤光片(德国Honle)、照度计、孵化箱、浊度仪、流式细胞仪、全波长酶标仪(美国Thermo Scientific)、倒置显微镜、分光测色计。

白藜芦醇(RV)为在弱碱性条件下直接从虎杖中药饮片采用超声波法提取粗提物,层析分离提纯,经HPLC检测其纯度为84.7%。原花青素(OPC)购自广州启源生物科技公司,经薄层色谱法检测其纯度为85.2%。荧光素钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)均购自美国Sigma公司,抗坏血酸(分析纯,广州试剂厂),细胞凋亡及细胞周期试剂盒(美国BD公司)、活性氧检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司),3种美白滋润眼霜配方,均含0.5%白藜芦醇和2%原花青素两种活性成份。

抗坏血酸(VC)和OPC均以培养基为溶剂制备储备液,再稀释成终浓度为0.1和0.05mmol/L的使用液,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0.05mmol/L的溶液,白藜芦醇-原花青素混合液(RV-OPC),将上述两种溶液等比例混合。

## 1.2 方法

### 1.2.1 紫外线损伤角质细胞及抗氧化作用

取对数生长期HaCaT细胞,0.25%胰酶/EDTA消化,以密度为 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板,培养24h后,吸出培养基,每孔加200μl PBS接受紫外线照射。紫外线光谱模拟夏日室外紫外线类型,含UVA和UVB。96孔板距光源垂直距离30cm,经照度计测量UVA和UVB强度分别为(3930±40)和(521±2)μw/cm<sup>2</sup>,照射剂量分别为1、3、5、8、10J,照射后更换新的培养基,再次孵育24h后MTT比色法测定细胞存活率。对照组用铝箔覆盖,每处理组设6个复孔。取细胞活性抑制率<30%(IC<sub>30</sub>)的UV照射剂量作为参考紫外线照射剂量。

制备细胞悬液,以密度为 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板,培养24h后,加入不同浓度梯度的试剂,VC、RV和OPC分别设置400、200、100、50、25、12.5μmol/L共6个浓度梯度,作用(20±1)h,MTT法检测细胞活性,以无细胞毒性的最高浓度作为活性筛查有效浓度。

待HaCaT细胞生长至80%时,以每皿 $0.5 \times 10^4$ 个细胞的密度将细胞接种于75mm的细胞培养皿,放入培养箱中孵育24h。试验设空白对照组、照射组、VC组、RV组、OPC组和RV-OPC组。空白对照组用PBS替代培养基,避光水平放置。其余各组先用日光模拟仪照射造成细胞氧化应激,UVA和UVB照射强度分别为5和0.6J。抗氧化组于照射后更换分别含有无细胞毒性最高浓度的白藜芦醇、原花青素或RV-OPC的培养基。培养箱中继续孵育24h。孵育后的细胞用0.25%胰酶/0.02%EDTA消化悬浮,1200r/min离心3min,用4℃PBS清洗2次,用PBS重悬至4ml,分装至4个离心管中。细胞内ROS水平测定采用二氯荧光素(DCFH-DA)标记法,流式细胞仪测定荧光强度;细胞内SOD水平测定采用酶标仪在波长450nm处读取数值;细胞周期用PI(碘化丙啶)标记细胞核,用流式细胞仪检测PI荧光强度区分不同周期的细胞;细胞凋亡采用AnnexinV-FITC/PI双染法检测。测试重复6次,计算平均值。

### 1.2.2 配方安全性评估

采用绒毛膜尿囊膜血管试验(CMAVA)和牛角膜混浊渗透性试验(BCOP)组合方法评价3种眼霜配方的刺激性。CAMVA试验参考文献[4]方法进行,记录阳性或阴性反应的鸡胚数,计算导致50%的鸡胚显示阳性反应的被测物浓度(RC<sub>50</sub>),以0.01mol/L SDS作为阳性对照。BCOP试验参考OECD指南437的方法和判定标准<sup>[5]</sup>,计算体外评分(IVS)。如果RC<sub>50</sub>>50%,且IVS≤25,判定配方无

眼刺激性,直接进入临床测试;如果  $RC_{50} \leq 50\%$ , 或  $IVS > 25$ , 则预测配方具有刺激性。

### 1.2.3 临床功效评价

以志愿者眼周为试验区域,选取双侧眼角和眼眶下缘共4个位点为测试部位,分别于试验前和试用产品后30和60d进行无创性皮肤生理功能检测仪采集数据。分别用皮肤水份测定仪和皮肤水份流失测定仪检测皮肤水份含量和皮肤水份流失量(TEWL);用皮肤弹性测定仪检测皮肤弹性,比率  $R_2(Ua/Uf)$  代表无负压时皮肤回弹量  $Ua$  与有负压时最大拉伸量  $Uf$  之比;CM-2600D分光测色计检测皮肤的  $L^*$  和  $b^*$  值,并转换成色度角 ITA 值,对皮肤颜色定量。测试当天,志愿者不使用产品,清洁测试部位后需在室内 [温度 ( $23 \pm 2$ )  $^{\circ}C$ , 湿度 ( $55 \pm 5$ ) %] 平衡至少30min以适应检测室环境,1h后检测。每位志愿者每次测试区域位置尽量一致。

### 1.3 统计学分析

所测数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和两两比较方差分析(SNK法)检验,统计过程使用 SAS 8.0 统计软件完成,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。细胞周期使用 modfit 统计软件分析。临床数据取4个测试位点的均值进行使用产品前后对比。

## 2 结果

### 2.1 紫外线照射剂量和细胞毒性测定

不同剂量紫外线照射可诱导 HaCaT 细胞的活性降低,并呈剂量依赖性关系。MTT 法检测显示  $IC_{70}$ 、 $IC_{50}$  和  $IC_{30}$  分别约为 20、10 和 5  $J/cm^2$ , 试验中取  $IC_{30}$  的 UV 照射剂量为紫外线氧化损伤模型的参考剂量。经细胞毒性测试表明,VC、RV 和 OPC 的浓度分别为 100、200 和 100  $\mu mol/L$  时,对细胞无毒性作用。

### 2.2 抗氧化剂对 ROS 及 SOD 水平的影响

HaCaT 细胞经紫外线照射后,细胞内 ROS 含量明显增加,SOD 活性明显降低,较未照射组差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。添加阳性对照 VC 和抗氧化剂后各组与照射组相比,细胞内 ROS 含量明显下降,且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),下降程度从高到低依次为 RV-OPC、RV、OPC 和 VC;细胞内 SOD 活性与照射组相比明显升高且差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),其含量接近空白组水平(见表1)。

### 2.3 抗氧化剂对细胞凋亡率的影响

紫外线照射 HaCaT 细胞后,晚期凋亡细胞(Q2)和早期凋亡细胞(Q4)较空白对照组均明显增多,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),存活细胞(Q3)明显下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。在添加抗氧化剂后,与照射组相比,晚期凋亡细胞

表1 角质细胞内 ROS 和 SOD 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分组	ROS/荧光密度	SOD(U/mgprot)
空白对照组	75.4 $\pm$ 8.6 *	49.1 $\pm$ 4.7 *
照射组	780.5 $\pm$ 62.7 $\Delta$	23.4 $\pm$ 2.9 $\Delta$
VC组	132.8 $\pm$ 11.5 * $\Delta$	40.2 $\pm$ 4.3 *
RV组	106.4 $\pm$ 9.8 * $\Delta$	46.7 $\pm$ 4.9 *
OPC组	118.7 $\pm$ 10.8 * $\Delta$	43.8 $\pm$ 3.6 *
RV-OPC组	63.9 $\pm$ 6.7 *	55.2 $\pm$ 4.6 *

注: \* 为各组与照射组相比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$  为各组与空白对照组相比,  $P < 0.01$

明显下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )、存活细胞(Q3)明显增多,但早期凋亡细胞仍有明显增长(见表2)。几种抗氧化剂两两相比,细胞存活率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),对早期凋亡和晚期凋亡细胞的影响,RV-OPC 组与 VC 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),其余各组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表2 抗氧化剂对 HaCaT 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6, \%$ )

分组	Q2	Q3	Q4
空白对照组	1.2 $\pm$ 0.3 *	76.7 $\pm$ 3.5 *	5.4 $\pm$ 1.8 *
照射组	47.8 $\pm$ 2.7 $\Delta$	35.1 $\pm$ 1.9 $\Delta$	12.6 $\pm$ 2.9 $\Delta$
VC组	16.6 $\pm$ 1.8 * $\Delta$	65.8 $\pm$ 2.2 * $\Delta$	21.8 $\pm$ 4.6 * $\Delta$
RV组	6.6 $\pm$ 0.9 * $\Delta$	75.1 $\pm$ 3.5 * $\Delta$	16.7 $\pm$ 4.1 * $\Delta$
OPC组	5.1 $\pm$ 1.4 * $\Delta$	70.7 $\pm$ 2.7 *	18.0 $\pm$ 2.3 * $\Delta$
RV-OPC组	3.4 $\pm$ 0.7 *	79.1 $\pm$ 5.4 *	8.5 $\pm$ 3.1

注: Q3 为存活细胞占所收集细胞的百分率; Q2 为中、晚期凋亡细胞及死亡细胞占所收集细胞的百分率; Q4 为早期凋亡细胞占所收集细胞的百分率。\* 为各组与照射组相比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$  为各组与空白对照组相比,  $P < 0.01$

### 2.4 抗氧化剂对细胞周期的影响

细胞经紫外线照射后,S 期细胞明显减少 ( $P < 0.001$ ),  $G_0/G_1$  期细胞增多 ( $P < 0.001$ )。添加抗氧化剂后,各组 S 期细胞明显增多,虽然与空白对照组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),但已比较接近正常水平(见表2)。 $G_0/G_1$  期和  $G_2$  期变化与 S 期类似,见表3。

表3 抗氧化剂对 HaCaT 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6, \%$ )

分组	$G_0/G_1$	S	$G_2$
空白对照组	65.7 $\pm$ 2.2 *	26.1 $\pm$ 1.9 *	2.6 $\pm$ 0.3 *
照射组	82.2 $\pm$ 4.5 $\Delta$	12.1 $\pm$ 1.0 $\Delta$	0.9 $\pm$ 0.2 $\Delta$
VC组	70.1 $\pm$ 2.4 * $\Delta$	19.6 $\pm$ 1.0 * $\Delta$	2.6 $\pm$ 0.4 *
RV组	66.7 $\pm$ 3.2	23.9 $\pm$ 2.0	2.4 $\pm$ 0.1 $\Delta$
OPC组	70.7 $\pm$ 2.5 * $\Delta$	20.5 $\pm$ 1.7 * $\Delta$	5.4 $\pm$ 3.2 * $\Delta$
RV-OPC组	59.5 $\pm$ 3.8 * $\Delta$	30.0 $\pm$ 1.9 * $\Delta$	3.7 $\pm$ 1.1 *

注: \* 为各组与照射组相比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$  为各组与空白对照组相比,  $P < 0.01$

### 2.5 配方安全性测试

3种配方经 CAMVA + BCOP 组合测试结果见表4。配方1经 CAMVA 测试  $RC_{50}$  为 13.61%, 小于 50% 的预设值,以 BCOP 证实  $IVS > 25$ 。经配方优化后

重新检测,配方2和配方3均无刺激性,配方3更温和,选择其进入下一阶段临床评价。

表4 CAMVA和BCOP替代方法组合试验结果

Table 4 CAMVA and BCOP combination test results

配方	CAMVA ( $RC_{50}/\%$ )	BCOP (IVS)
1	13.61	28.8
2	62.45	15.4
3	71.75	7.6

## 2.6 产品临床评价

使用含抗氧化剂产品不同时间眼部皮肤老化相关指标检测值见表5。结果显示使用产品60 d,眼部皮肤水份含量明显提高( $P < 0.01$ ),经皮肤水份流失下降明显( $P < 0.01$ ),肤色变白趋势明显,弹性功能有所改善,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表5 皮肤临床功效检测结果( $n = 100$ )

Table 5 Clinical skin efficacy test results

时间/d	皮肤水份含量/ $\mu\text{m}$	皮肤弹性/ $(U_a/U_f)$	ITA值/ $^\circ$	皮肤水份流失/ $(\text{g}/\text{hm}^2)$
0	38.5 ± 2.4	0.675 ± 0.032	25.3 ± 2.1	15.49 ± 3.56
30	43.7 ± 3.5*	0.717 ± 0.039*	28.1 ± 2.3*	13.98 ± 4.45*
60	49.7 ± 3.5**	0.775 ± 0.035**	29.4 ± 2.3*	12.33 ± 2.30**

注:与0 d相比,\*为 $P < 0.05$ ,\*\*为 $P < 0.01$

## 3 讨论

皮肤老化与自由基损伤的关系已得到充分证据证明,寻找天然抗氧化活性原料对于皮肤护理和临床治疗均有积极意义<sup>[3]</sup>。白藜芦醇存在于虎杖、首乌、决明、藜芦等多种植物中<sup>[6]</sup>。原花青素是由黄烷-3-醇聚合而成的一类多酚物质,葡萄籽、松树皮等植物以及中药山楂、莲房、银杏、大黄、地榆等含量较多。对于两种活性成份的抗皮肤老化应用鲜有体外机制结合临床应用研究的报道<sup>[7]</sup>。

两种波长的紫外线均能诱发皮肤细胞产生多种氧自由基,引起表皮层和真皮层的损伤<sup>[8]</sup>,长期效应则与皮肤弹性丧失和光老化相关。HaCaT是体外研究紫外线损伤机制的理想皮肤细胞系,如研究植物提取物中槲皮素、飞燕草素的抗紫外线氧化作用等<sup>[3,9]</sup>。本研究使用剂量分别为5和0.6 J/cm<sup>2</sup>的UVA和UVB两种紫外线,模拟夏日室外日光辐射类型,一次性暴露造成角质细胞氧化损伤模型,再添加抗氧化剂研究其修复机制。结果表明白藜芦醇和原花青素均可对紫外线损伤后的角质细胞起到修复作用,明显降低细胞内ROS的含量和提高SOD水平,晚期凋亡细胞明显减少,早期凋亡及活细胞比例增高。提示抗氧化剂通过清除自由基及细胞自身修复,促使早期凋亡细胞逆转,正常细胞周期逐渐恢复。而且复配后的混合物在低浓度下抗氧化作用优于单独使用和阳性对照。

植物中的RV、OPC,以及花青素和鞣花酸等多酚类化合物均对皮肤有益,但其抗老化的确切机制尚未完全明确<sup>[7]</sup>。RV的主要生物学作用是下调血管活性肽(如内皮缩血管肽)<sup>[10]</sup>,调节细胞凋亡信号通路。其对表皮细胞的保护机制是通过与表皮细胞膜特异性的多酚受体结合<sup>[11]</sup>,同时诱发其他抗氧化酶的表达,并与去乙酰化酶1和腺苷单磷酸活化蛋白酶等激酶相互作用<sup>[12]</sup>。RV还可保护正常成纤维细胞免受过氧化氢的损伤<sup>[13]</sup>。OPC的作用表现为有益于胶原蛋白纤维形成交联结构,修复因自由基所致的过度交联,对抗因UVB引起的氧化应激和细胞凋亡<sup>[9]</sup>,从而延缓纤维过度硬化和皱纹发生。本研究结合了两种活性成份分别改善表皮和真皮功能的特点,经60 d临床试用含RV和OPC的化妆品试验,结果表明两种活性成分可改善皮肤保湿功能,弹性和肤色明显改善。推测使用产品后可有效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改善皮肤的胶原结构,改善皮肤性能<sup>[14]</sup>。Fabbrocini等<sup>[15]</sup>临床研究发现RV的凝胶对痤疮有效,而OPC促进治愈牛皮癣和老年斑,也证明了两种活性成份的皮肤药妆价值。

CAMVA和BCOP两种不同适用范围和预测能力的替代方法组合在一起可完全代替动物试验<sup>[4,16]</sup>,本研究采用这一组合筛查和优化配方的安全性,使之成为连接原料开发到临床评价策略的中间环节<sup>[17]</sup>。

本研究以皮肤老化的生物学机制为依据,尝试建立从人体皮肤细胞功能测试到组合替代方法配方优化,再到临床评价的策略,兼顾了产品的有效性与安全性,避免了传统动物试验评价周期过长、与人体皮肤相关性差的不足,可作为个人护理用品开发的有效途径。

## 参考文献

- [1] Regulation (EC). No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products [Z]. 2009.
- [2] Scharffetter K K, Wlaschek M, Brenneisen P, et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging [J]. Biol Chem, 1997, 378(11): 1247-1257.
- [3] Olson E R, Melton T, Dong Z, et al. Stabilization of quercetin paradoxically reduces its proapoptotic effect on UVB-irradiated human keratinocytes [J]. Cancer Prev Res, 2008, 1(5): 362-368.
- [4] Donahue D A, Kaufman L E, Avalos J, et al. Survey of ocular irritation predictive capacity using chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(2): 563-572.
- [5] OECD Guideline. No. 437, Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying ocular corrosives and

- severe irritants[S]. OECD Paris, 2009.
- [6] Baxter R A. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2008, 7(1):2-7.
- [7] Smoliga J M, Baur J A, Hausenblas H A. Resveratrol and health: a comprehensive review of human clinical trials [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(8):1-13.
- [8] Greinert I R B, Henning V S. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(20):10263-10273.
- [9] Afaq F, Syed D N, Malik A. Delphinidin, an antocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(1):222-232.
- [10] Corder R, Douthwaite JA, Lees D M, et al. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine [J]. *Nature*, 2001, 414(6866):863-864.
- [11] 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.
- [12] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha [J]. *Cell*, 2006, 127(6):1109-1122.
- [13] Jagdeo J, Adams L, Lev T H, et al. Dose-dependent antioxidant function of resveratrol demonstrated via modulation of reactive oxygen species in normal human skin fibroblast in vitro [J]. *J Drugs Dermatol*, 2010, 9(12):1523-1526.
- [14] Bae J Y, Choi J S, Kang S W, et al. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(8):e182-e190.
- [15] Fabbrocini G, Staibano S, De Rosa G, et al. Resveratrol-containing gel for the treatment of acne vulgaris: a single-blind vehicle-controlled, pilot study [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2011, 12(2):133-141.
- [16] 程树军, 焦红. 实验动物替代方法原理与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [17] 步犁, 程树军, 秦瑶, 等. 皮肤抗氧化功效评价动物模型及替代方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(5):62-66.

## 论著

# 广州市非伤寒沙门菌感染流行病学负担分析

黄熙<sup>1,2</sup>, 黄琼<sup>1,2</sup>, 石玮<sup>3</sup>, 黄蔚<sup>2</sup>, 梁骏华<sup>2</sup>, 卢玲玲<sup>2</sup>, 邓小玲<sup>1,2</sup>, 张永慧<sup>1,2</sup>

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510010; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510430; 3. 皖南医学院, 安徽 芜湖 241002)

**摘要:**目的 评估广州市非伤寒沙门菌感染流行病学负担, 提出食源性疾病监测策略。方法 在广州市6区设9家食源性疾病主动监测医院, 调查12个月腹泻病例采样率、沙门菌检测率、实验室检测敏感度, 进而推算全市医疗机构相应数据; 在广州市3区开展人群腹泻随机抽样入户调查, 调查腹泻病例就诊率; 通过传染病报告信息管理系统获得监测医院和全市医疗机构沙门菌感染性腹泻报告率; 利用食源性疾病流行病学负担金字塔模型, 通过倍数校正和不确定性分析估计沙门菌感染实际发病数, 比较食源性疾病主、被动监测数据用于疾病负担分析的优劣。结果 监测医院12个月腹泻病例平均采样率38.34%, 沙门菌检测率28.24%, 实验室检测敏感度87.5%, 人群腹泻病例就诊率23.91%, 沙门菌感染性腹泻报告率42.98%; 全市医疗机构推算采样率38.34%, 检测率28.24%, 实验室检测敏感度47.5%, 报告率20.94%, 估计广州市沙门菌感染病例64 586例(95% CI: 44 136~101 921), 年发病率508.5/10万(95% CI: 347.5~802.5/10万), 全年全市被动报告病例仅171例, 报告年发病率1.3/10万; 经估算5岁以下年龄组(3 583.2/10万)年发病率最高, 15~24岁年龄组(23.5/10万)最低。结论 首次验证疾病负担金字塔模型在我国食源性疾病负担研究领域的适用性; 表明主动监测一定程度上提升了食源性疾病尤其是特定病原体感染采样率、检测率、实验室检测敏感度和报告率, 有助于对负担作出更准确和积极有效的估计; 结果提示广州市非伤寒沙门菌感染负担较重, 5岁以下年龄组人群负担水平尤其显著。

**关键词:** 非伤寒沙门菌感染; 流行病学负担; 金字塔模型; 食源性疾病; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号: R155; R378; TS207.4 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)03-0217-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.03.004

收稿日期: 2014-02-08

基金项目: 中美新发再发传染病合作项目子项目6(1U2GHH00018-01); 广东省医学科研基金立项课题(A2013069)

作者简介: 黄熙 女 主管医师 研究方向为食源性疾病监测 E-mail: huangxi\_3148@163.com

通讯作者: 张永慧 男 主任医师 研究方向为食品安全及公共卫生管理 E-mail: zyh@cdep.org.cn

黄琼 女 副主任医师 研究方向为食源性疾病监测与应急 E-mail: huangqiong@cdep.org.cn