

唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物的抗炎作用：治疗皮肤湿疹的可能应用

郭鸿胜¹, 郑钟毓¹, 伍嘉慧¹, 吴启韵¹, 高 雄¹, 夏翊腾¹, 董婷霞¹, 刘华清², 詹华强^{1*}

1. 香港科技大学 生命科学部暨中药研发中心, 香港特别行政区 999007

2. 金活医药集团 质量管理部, 广东 深圳 518116

摘要: **目的** 制备唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物, 研究其对慢性皮肤湿疹的抗炎作用。 **方法** 以加入蛹虫草或铁皮石斛的 MRS 培养基培养唾液乳杆菌, 培养后菌体通过发酵、高压破碎、离心制备药液。取小鼠随机分为对照组、模型组、阳性药组、唾液乳杆菌与蛹虫草共培提取物组、唾液乳杆菌与铁皮石斛共培提取物组, 建立小鼠湿疹模型, 并测量耳部肿胀程度、计算双耳质量差及背部皮肤厚度的变化。以 RAW264.7 细胞和 HaCaT 细胞作为炎症细胞模型, 采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导炎症反应, 评估唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物调节细胞中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 及皮肤炎症生物标志物水平的作用。测定 RAW264.7 细胞在各种提取物处理下的吞噬能力。选择 MatTek 人体皮肤敏感性测试来研究唾液乳杆菌与蛹虫草/铁皮石斛共培养提取物的过敏反应。 **结果** 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培组小鼠的双耳质量差和背部皮肤厚度均显著低于模型组 ($P < 0.01$ 、 0.001)。同时, 在唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物的处理下, LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中的炎症介质如 IL-1 β 、NO 和抗炎因子 IL-10 的产生受到显著调节 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 细胞的吞噬率显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。HaCaT 细胞在唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物处理下, 皮肤炎症生物标志物 I 型胶原 $\alpha 1$ 蛋白 (α -1 type I collagen, COL1A1)、I 型胶原 $\alpha 2$ 蛋白 (α -2 type I collagen, COL1A2)、III 型胶原 $\alpha 1$ 蛋白 (α -1 type III collagen, COL3A1) 的 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培养的提取物对人体皮肤无过敏反应。 **结论** 唾液乳杆菌和蛹虫草或铁皮石斛共培提取物对慢性皮肤湿疹和皮炎具有抗炎和治疗作用, 可作为抗炎、抗过敏护肤品的原料, 具有较大的应用前景。

关键词: 唾液乳杆菌; 蛹虫草; 铁皮石斛; 湿疹; 抗炎

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4417-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.021

Anti-inflammatory effects of co-culture extract of *Lactobacillus salivarius* and traditional Chinese medicine: Possible application in treatment of skin eczema

GUO Hong-sheng¹, ZHENG Zhong-yu¹, WU Jia-hui¹, WU Qi-yun¹, GAO Xiong¹, XIA Yi-teng¹, DONG Ting-xia¹, LIU Hua-qing², TSIM Wah Keung Karl¹

1. School of Life Science and Centre for Chinese Medicine R&D, Hong Kong University of Science & Technology, Hong Kong 999007, China

2. Department of Quality Management, Kingworld Medicines Group, Shenzhen 518116, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory effect of the co-cultured extracts of *Lactobacillus salivarius* and Yongchongcao [*Cordyceps militaris* (L.) Link] or Tiepishihu (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) on chronic skin eczema dermatitis. **Methods** *L. salivarius* was cultured in MRS medium with *C. militaris* or *D. officinale*. Then, the bacterial cells were fermented, crushed under high pressure, and centrifuged to prepare liquid medicine. Mice were randomly divided into control group, model group, positive drug group, co-cultured extract group of *L. salivarius* and *C. militaris*, and co-cultured extract group of *L. salivarius* and *D. officinale*. The eczema model of mice was established, and the degree of ear swelling, both ear quality difference and back skin thickness were measured.

收稿日期: 2022-03-03

基金项目: 港特区创新科技署项目 (UIM/385)

作者简介: 郭鸿胜 (1998—), 男, 硕士, 研究方向为中药抗炎活性及免疫活性研究。Tel: (852)94196513 E-mail: hguoal@connect.ust.hk

*通信作者: 詹华强, 男, 教授, 研究方向为中药抗炎活性及抗肿瘤活性研究。Tel: (852)23587332 E-mail: botsim@ust.hk

RAW264.7 cells and HaCaT cells were used as inflammatory cell models, and lipopolysaccharide (LPS) was used to induced the inflammatory responses. Effects of the co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), nitric oxide (NO), interleukin-10 (IL-10) and skin inflammation biomarkers in cells was evaluated. In addition, the phagocytic capacity of RAW264.7 cells treated with various extracts was determined. The MatTek human skin sensitivity test was selected to reveal the allergenic effect of the co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale*. **Results** The difference in weight between left and right ears and dorsal skin thickness of mice in co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* were significantly lower than that in the model group ($P < 0.01, 0.001$). In parallel the production of inflammatory mediators (IL-1 β and NO) and anti-inflammatory factor IL-10 were markedly regulated in cultured in RAW264.7 cells under the treatment of the co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The rate of phagocytosis of LPS-induced RAW264.7 cells under the treatment was significantly reduced ($P < 0.01, 0.001$). HaCaT cells were treated with the co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale*, the mRNA expression levels of the biomarkers of skin inflammation alpha-1 type I collagen (COL1A1), alpha-2 type I collagen (COL1A2), alpha-1 type III collagen (COL3A1) were significantly up-regulated ($P < 0.05, 0.01$). The co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* did not show allergy to human skin. **Conclusion** The co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* has anti-inflammatory and therapeutic effects on chronic skin eczema and dermatitis. They can be used as a raw material for anti-inflammatory and anti-allergic skin care products and has a strong application prospect.

Key words: *Lactobacillus salivarius*; *Cordyceps militaris* (L.) Link; *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; eczema; anti-inflammatory effect

湿疹 (eczema) 是由于先天性的皮肤结构问题, 致使皮肤表层细胞容易脱落, 皮肤失去应有的天然保护功能, 降低皮肤的抵抗能力, 化学物质、致敏原会渗入患者皮肤并长时间刺激皮肤的免疫细胞, 从而形成皮肤过敏现象。湿疹患者发炎部位会有红肿现象, 影响外观。若红肿现象一直持续, 会影响患者的正常生活及睡眠质量。全球有 10% 成人及 15% 儿童患有湿疹^[1-2]。治疗过敏性皮炎的方法有保护皮肤、防止接触致敏原或刺激皮肤的物质及使用消炎药物等。外用药物在皮肤科的使用非常广泛, 最常用的就是类固醇 (激素类) 湿疹皮炎药。类固醇湿疹皮炎药是过敏性及免疫紊乱性皮肤病的一线治疗药物, 但是使用过量类固醇有可能会引起毛囊炎及其他不良反应^[3]。除类固醇湿疹皮炎药膏外, 市场上的抗湿疹药还有补湿产品。近年来, 科学界对益生菌的研究以及消费者对益生菌的兴趣都在增长, 越来越多的临床证据证明益生菌对健康有益^[4]。由于益生菌的天然特性及长期使用不会引起像类固醇般的严重不良反应, 研究人员逐步开展了益生菌缓解湿疹的作用研究, 有研究指出唾液乳杆菌 *Lactobacillus salivarius* 具有较强的抗炎活性^[5]。

为了进一步探究唾液乳杆菌及相关药剂衍生品对湿疹的治疗作用及其机制, 本研究将唾液乳杆菌分别与中药蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link 和铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 共培养发酵后的提取物, 作用于湿疹动物模型和细胞模型进行研究, 包括对炎症小鼠的耳部肿胀程度和背部

皮肤厚度、巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬作用、促炎因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和抑炎因子白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 水平、NO 释放量的影响, 探讨唾液乳杆菌与中药共培养提取物的抗炎作用。本研究为将唾液乳杆菌与中药共培养提取物用于湿疹类皮肤炎症的治疗提供一定的科学依据。

1 材料

1.1 细胞

RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (目录号 TIB-71) 购自 ATCC 公司; HaCaT 人永生表皮细胞 (目录号 T0020001) 购自 AddexBio 公司。

1.2 药物与试剂

唾液乳杆菌购自信阳莱耀生物科技有限公司 (批号 JI23174)。蛹虫草和铁皮石斛由香港科技大学生命科学部董婷霞博士鉴定, 分别为麦角菌科虫草属真菌 *C. militaris* (L.) Link 的子实体和兰科植物石斛属植物 *D. officinale* Kimura et Migo 的茎。实验标本存放于香港科技大学生命科学部。MRS 培养基 (批号 HB384-1) 购自青岛海博生物科技有限公司; Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM, 批号 2472941)、胰蛋白酶和磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffer saline, PBS, 批号 5325271) 购自 Gibco 公司; 用于细胞培养的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 2391593)、青霉素-链霉素 (penicillin-streptomycin, PS, 批号 149237) 购自 Invitrogen 公司; 脂多糖 (lipopolysaccharides,

LPS, 批号 048M439V)、2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB, 批号 BCBX3575)、地塞米松(dexamethasone, DEX, 批号 BCCC1340)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, 批号 BCBT2005)、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO, 批号 BHCC2234)、多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA, 批号 BCBT2005)、Triton X-100(批号 79H0010)、4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 批号 MKCH1700)、罗丹明标记鬼笔环肽(rhodamine phalloidin, 批号 MKCD6607)、抗荧光淬灭封片剂(批号 SLCG0261)、牛血清白蛋白(BSA, 批号 BCBX3675)购自 Sigma 公司; RNAzol®RT 试剂(批号 632)购自美国辛那提州分子研究中心公司; 第一链 cDNA 合成试剂盒(批号 AL13650A)购自 Thermo Fisher Scientific 公司; SYBR Green 荧光染料(批号 20000838)购自瑞士 Roche 公司; 苏木素染液试剂盒(批号 GR3314951-1)、鼠源 IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 GR331023-1)、鼠源 IL-10 ELISA 试剂盒(批号 GR3288642-1)、NO 检测试剂盒(批号 GR3311102-1)购自 Abcam 公司。一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天公司(批号 C1088)。MatTek 表皮细胞培养模型购自 MatTek 公司(批号 MK-24-007-0023)。

1.3 仪器

Multiskan FC 型多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5810R 台式离心机(德国 Eppendorf 公司); NanoDrop 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Lightcycler 480 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司); SP8 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); Axiovert135 型光学显微镜(德国 Zeiss 公司); Cell discoverer 7 全自动活细胞成像平台(德国 Zeiss 公司); TiVi700 光谱成像血流分析仪(瑞典 WheelsBridge 公司); CryoStar™ NX70 型冰冻切片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物的制备

2.1.1 蛹虫草或铁皮石斛 MRS 培养基的制备 用研磨机分别粉碎 200 g 蛹虫草和铁皮石斛药材。分别称取 200 g 蛹虫草粉末和 40 g 铁皮石斛粉末, 各加入 1 L 去离子水搅混匀, 补足水至 2 L, 静置浸泡

30 min 后, 常压热回流水提 2 h, 待冷却后离心并取上层清液, 制得生药质量浓度为 0.10 g/mL 的蛹虫草和生药质量浓度为 0.02 g/mL 铁皮石斛的水提物。蛹虫草水提物 1.4 L 和铁皮石斛水提物 7 L 加入至 70 L MRS 培养基中, 用去离子水补足至 70 L, 得到 2 g/L 蛹虫草-MRS 培养基和铁皮石斛-MRS 培养基。

2.1.2 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛的共培养 取少量 MRS 液体培养基溶解唾液乳杆菌冻干粉, 取少量菌液涂抹 MRS 琼脂培养基, 37 °C 厌氧培养过夜。挑取单菌落至 20 mL MRS 液体培养基试管, 厌氧环境 37 °C, 120~150 r/min, 摇管培养 6~12 h, 得种子预备液; 取 20 mL 种子预备液接种于 400 mL MRS 液体培养基, 厌氧环境 37 °C, 120~150 r/min, 摇瓶培养 6~12 h 得 1 级种子液; 将 250 mL 1 级种子液接种至种子罐(含蛹虫草或铁皮石斛的 MRS 培养基以及不含中药的 MRS 培养基), 厌氧环境 37 °C, 培养至指数生长期, 得 2 级种子液; 将 5 L 2 级种子液全部接种于发酵罐(含蛹虫草或铁皮石斛的 MRS 培养基以及不含中药的 MRS 培养基), 37 °C, 厌氧培养至稳定生长期, 收样。将发酵液离心(8000~10 000 r/min), 分别收集上清与菌体, 用无菌生理盐水清洗菌体 2 次, 将菌体置于 -20 °C 待用。取少量菌体, 以质量比 1:15 的比例重溶于水, 并以 100 MPa 的条件高压匀浆破碎处理, 收集破碎液, 在 4 °C、4000 r/min 的条件下离心 10 min 除去沉淀, 留上清液得到唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物以及唾液乳杆菌提取物。

2.1.3 给药软膏的制备 取凡士林软膏, 分别加入 DNCB、地塞米松及蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培提取物以及唾液乳杆菌提取物, 均质成软膏。

2.2 动物实验

2.2.1 动物、分组及给药 健康无特定病原体 C57BL/6 小鼠 54 只, 鼠龄 6 周, 体质量 20~25 g, 购自香港科技大学动植物护理中心, 饲养于 12 h 光照/12 h 无光照环境, 实验室环境温度控制在 (25 $\pm$ 1) °C, 相对湿度 50%~70%, 食物和水自由摄取, 动物适应环境 1 周后开始实验。实验动物的使用与操作均符合香港科技大学关于实验动物操作与动物伦理的要求, 批准号为 DHVHT&A/8/2/2 Pt. 2(20-104)。

小鼠分为 9 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 分别为对照(凡士林)组, 模型(7% DNCB)组, 阳性药(0.12% DEX)组, 唾液乳杆菌与蛹虫草共培提取物高、中、低剂量(10%、5%、1%唾液乳杆菌与蛹虫

草共培提取物)组,唾液乳杆菌与铁皮石斛共培提取物高、中、低剂量(10%、5%、1%唾液乳杆菌与铁皮石斛共培提取物)组。

实验前 1 d 小鼠背部剃毛,露出约 2 cm×3 cm 的背部皮肤。实验第 1 天,除对照组外,其余组小鼠背部涂抹 7% DNCB 致敏,待 DNCB 被吸收 1 h 后,各给药组涂抹相应软膏,模型组和对照组只涂抹凡士林基质软膏。每天给药治疗 1 次,连续 7 d。第 4 天以 1% DNCB 涂抹小鼠右耳内侧激发炎症,同时给药治疗,给药同上,1 次/d,连续 3 d。

2.2.2 双耳质量差及背部皮肤厚度 第 7 天断颈处死小鼠,取直径 8 mm 的左右耳片,称量左右耳的质量(M),计算左右耳质量差($M_{\text{右耳}} - M_{\text{左耳}}$)。同时取小鼠背部病变皮肤,用 4%多聚甲醛组织固定液固定,包埋切片为 5 μm 厚度,用苏木素染液试剂盒染色。在 10 倍光镜下观察背部皮肤组织病理学变化,并随机选择 5 处视野测量皮肤厚度,计算皮肤厚度平均值。

2.3 细胞实验

2.3.1 细胞培养、分组及给药

(1) RAW264.7 细胞: RAW264.7 细胞置于 DMEM 培养基中(含 10%热灭活 FBS),并添加 100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养,隔天传代。将 RAW264.7 细胞培养在 96 孔板中至密度约 80% 后,以培养基为对照,DEX (10 $\mu\text{mol/L}$) 为阳性对照,1%唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物^[6]以及 1%唾液乳杆菌提取物^[6]处理 3 h,再向细胞中加入 LPS (100 ng/mL) 诱导炎症反应,继续培养 16 h 后收集细胞,每组 6 个复孔。

(2) HaCaT 细胞: HaCaT 细胞培养于 DMEM 培养基中(含 10% FBS),并添加 100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养,隔天传代。将 HaCaT 细胞培养在 12 孔板中至密度约 80% 后,以培养基为对照,分别以 TGF- β 1 (5 ng/mL) 和 CaCl_2 (1.5 mmol/L) 为阳性对照,1%、5%、10%唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物处理 3 h,再向细胞中加入 LPS (100 ng/mL) 诱导炎症反应,孵育 24 h 后收集细胞,每组 6 个复孔。

(3) RAW264.7-HaCaT 细胞共培养体系: HaCaT 细胞置于 DMEM 培养基中(含 10% FBS),并添加 100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养,隔天

传代。将 HaCaT 细胞培养在 96 孔板中至密度约 80% 后,向细胞加入 LPS (100 ng/mL),孵育 1 h,加入 1%唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物以及唾液乳杆菌提取物,以培养基为对照,DEX (10 $\mu\text{mol/L}$) 为阳性对照,孵育 3 h,更换培养基上清液,继续培养 24 h 后收集培养基上清液,将上清液加入预先培养于 96 孔板中的 RAW264.7 细胞中进行共培养,24 h 后收集 RAW264.7 细胞及其上清液^[7]。每组 6 个复孔。

2.3.2 MTT 法检测细胞生存率 收集接种于 96 孔板中生长良好的 RAW264.7-HaCaT 共培体系的 RAW264.7 细胞,分别加入 1%唾液乳杆菌与蛹虫草和铁皮石斛共培提取物、等体积 PBS (对照)、20 $\mu\text{mol/L}$ DEX (阳性对照),空白对照不做处理,每组 6 个复孔,继续培养 24 h 后,直接加入 MTT 溶液,继续孵育 1.5 h。孵育结束后加入 DMSO,溶解结晶,使用 Multiskan FC 型多功能酶标仪测量 570 nm 吸光度 (A),计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}})$$

2.3.3 NO 含量测定 收集 RAW264.7-HaCaT 共培体系的 RAW264.7 细胞的上清液,按照 NO 检测试剂盒说明书操作检测 NO 含量。

2.3.4 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 HaCaT 细胞丝聚蛋白 2 (filaggrin 2, *FLG2*)、I 型胶原 α 1 蛋白 (alpha-1 type I collagen, *COL1A1*)、I 型胶原 α 2 蛋白 (alpha-2 type I collagen, *COL1A2*)、III 型胶原 α 1 蛋白 (alpha-1 type III collagen, *COL3A1*) 的 mRNA 表达量 收集各组 HaCaT 细胞,并在 RNAzol@RT 试剂中室温孵育。然后,在 75%乙醇中沉淀总 RNA,12 000 r/min 离心 10 min。用 75%的乙醇洗涤 RNA 沉淀,溶解于不含 RNA 的水中。使用 NanoDrop 分光光度计,根据 260 nm 和 280 nm 处吸光度的比值判定 RNA 质量。利用第一链 cDNA 合成试剂盒,将 3 μg RNA 样品进行逆转录。

取等量的上述反转产物,使用 SYBR Green 荧光染料进行 RT-PCR。引物序列分别为 *COL1A1*: 上游引物 5'-TCTGCGACAACGGCAAGGTG-3',下游引物 5'-GACGCCGGTGGTTTCTTGTT-3'; *COL1A2*: 上游引物 5'-AGCAGGTCCTTGGAACCTT-3',下游引物 5'-GAAAAGGAGTTGGACTTGGC-3'; *COL3A1*: 上游引物 5'-GCTGGC-TACTTCTCGCTCTG-3',下游引物 5'-TCCGCATAGGACTGACCAAG-3'; *FLG2*: 上游引物 5'-CTGTG-

GTCATTCATGGAGTGG-3', 下游引物 5'-CCCTAG-AAGGGCTAATGTGTGA-3'; 磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*): 上游引物 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGG-AAGG-3', 下游引物 5'-GCCATCACGCCACAGT-TTC-3'。扩增条件: 95 °C, 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 45 个循环, 在罗氏 Lightcycler 480 RT-PCR 仪上进行, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因的相对表达量。

2.3.5 共聚焦显微镜分析 RAW264.7 细胞吞噬作用 RAW264.7 细胞接种在 35 mm 培养皿中培养 12 h 后, 加入直径 1 μ m 的荧光珠, 并在 37 °C 下孵育 2 h。各组分别给药, 孵育 3 h, 再向细胞中加入 LPS (100 ng/mL), 引发吞噬作用, 孵育 12 h。每组重复 6 盘。用含有 3.7% PFA 的 PBS 固定, 用 0.1% Triton X-100 渗透, 用含有 1% BSA 的 PBS 预孵育 1 h。然后, 细胞与罗丹明标记鬼笔环肽 (1:40) 以及含 3 μ mol/L DAPI 的 PBS 孵育 20 min 染色, 用莱卡 SP8 激光共聚焦显微镜观察。Rhodamine phalloidin 荧光在 540 nm 激发, 在 565 nm 测量。DAPI 荧光在 405 nm 激发, 在 420~480 nm 测量。Beads 荧光在 660 nm 处激发, 在 680 nm 处测量。图像使用 Zen/Leica SP8 Offline/Imaris 软件进行处理。

2.3.6 TUNEL 法检测细胞凋亡率 将各组 RAW264.7-HaCaT 共培的 RAW264.7 细胞用 PBS 洗涤。在室温下用 4% PFA 固定 30 min。PBS 洗涤, 每孔加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 5 min。各孔加入 50 μ g 现配的 TUNEL 反应液, 于 37 °C 避光反应 1 h。PBS 洗涤后, 使用抗荧光淬灭封片后在蔡司全自动活细胞成像平台 Zeiss Cell discoverer 7 (Zeiss, German) 下观察。用 ZEN Imaging Software 软件进行图像处理。

2.3.7 IL-1 β 、IL-10 水平检测 收集各组 RAW264.7 细胞上清液, 用 ELISA 测定试剂盒测定上清液中 IL-1 β 、IL-10 的水平, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.4 模拟皮肤测试

选用 MatTek 表皮细胞培养模型试剂盒进行体外人体皮肤刺激试验, 评估人体对唾液乳杆菌与蛹虫草和铁皮石斛共培提取物的反应。分别将 1%、5%、10% 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物, 1%、5%、10% 唾液乳杆菌提取物加入皮肤模型试剂盒, 1 h 后去除受试物, 加入分析用培养基继续培养

18 h 后, 按照 MatTek 表皮细胞培养模型试剂盒指示的 MTT 法检测其对细胞活力的影响。

2.5 皮肤刺激测试

本研究招募 6 名志愿者, 年龄 15~60 岁, 男、女数量相同, 无严重疾病, 受试部位皮肤健康, 并未接受过皮肤美容治疗, 均签署志愿者知情同意书。在恒温 (24 $\pm$ 1) °C, 恒湿 (50 $\pm$ 5) % 的房间适应 30 min 后, 用 TiVi700 光谱成像血流分析仪测试受试区域皮肤即左小臂和右小臂的微血管反应, 进行 2 次重复实验。阳性对照选用 70% 酒精, 阴性对照选用 0.9% 生理盐水。首先, 对给药前的小臂拍照片和血流分析。将涂有不同质量分数 (0%、1%、5%、10%) 唾液乳杆菌分别与蛹虫草和铁皮石斛共培提取物软膏的圆形滤纸贴片 (直径 8 mm), 分别贴在志愿者的受试区域皮肤, 每个实验点相隔 1 cm, 然后拍摄照片, 同时观察受试区域皮肤有无明显变化 (红肿、痒等过敏反应等), 之后每隔 1 h 再进行观察及拍摄照片, 共观察 2 h。

2.6 统计方法

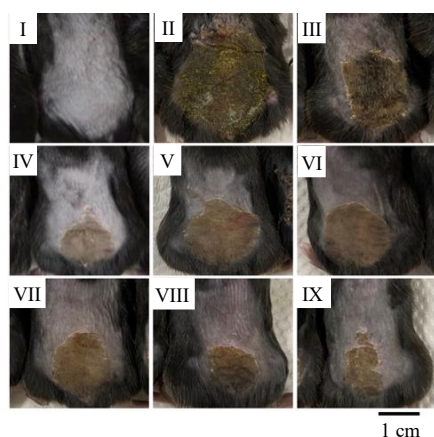
采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验, 3 组及以上采用单因素方差分析。检验水准 $P<0.05$ 、 0.01 、 0.001 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 动物实验

3.1.1 蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培物对湿疹小鼠背部皮肤的影响 外观评价如图 1 所示。与对照组相比, 模型组小鼠背部皮肤组织有明显结痂, 变黑, 增厚, 有大量皮屑掉落, 视为造模成功。唾液乳杆菌与蛹虫草/铁皮石斛共培物软膏干预后, 小鼠的上述病症均有明显改善; 与模型相比结痂面积明显缩小, 病变组织颜色淡化, 皮屑掉落减少。阳性组小鼠的结痂面积较模型组缩小。从外形看, 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培物的药效优于阳性药地塞米松。

小鼠背部皮肤组织病理学变化如图 2 所示。湿疹其中一个特点是病变部位皮肤明显增厚, 采用 HE 染色观察唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培物软膏对湿疹小鼠背部表皮层和真皮层病理学变化的影响。与对照组相比, 模型组小鼠皮肤组织表皮明显增厚, 角化过度, 细胞间水肿, 真皮淋巴细胞为主的炎性细胞浸润。与模型组相比, 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培物 6 组小鼠皮肤厚度均明显变薄, 且均低剂量组优于高剂量组。阳性药组的小鼠皮肤厚度较模型组明显变薄。

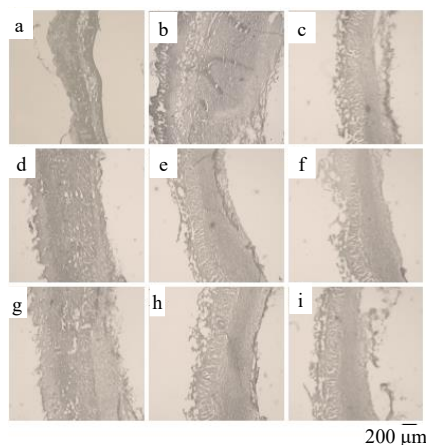


I-对照组 II-模型组 III-阳性药组 IV、V、VI-唾液乳杆菌与蛹虫草共培养提取物高、中、低剂量(10%、5%、1%)组 VII、VIII、IX-唾液乳杆菌与铁皮石斛共培养提取物高、中、低剂量(10%、5%、1%)组

I-blank group II-model group III-positive control group IV, V and VI-*L. salivarius* and *C. militaris* co-cultured high-dose, medium-dose, low-dose (10%, 5%, 1%) group VII, VIII and IX-*L. salivarius* and *D. officinale* co-cultured high-dose, medium-dose, low-dose (10%, 5%, 1%) group

图1 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培养提取物对小鼠背部皮肤外观的影响 ($n=6$)

Fig. 1 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on dorsal skin appearance of mice ($n=6$)



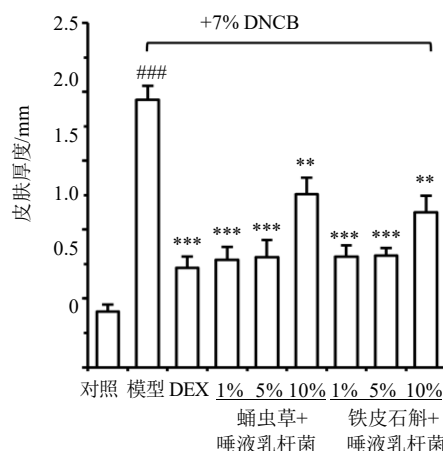
a-对照组 b-模型组 c-阳性药组 d、e、f-唾液乳杆菌与蛹虫草共培养提取物高、中、低剂量(10%、5%、1%)组 g、h、i-唾液乳杆菌与铁皮石斛共培养提取物高、中、低剂量(10%、5%、1%)组
a-blank group b-model group c-positive control group d, e and f-*L. salivarius* and *C. militaris* co-cultured high-dose, medium-dose, low-dose (10%, 5%, 1%) group g, h and i-*L. salivarius* and *D. officinale* co-cultured high-dose, medium-dose, low-dose (10%, 5%, 1%) group

图2 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培养提取物对小鼠背部皮肤组织病理学变化影响 (HE, $\times 100$, $n=6$)

Fig. 2 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on dorsal skin histopathological changes of mice (HE, $\times 100$, $n=6$)

皮肤组织切片相对厚度如图3所示。与模型组相比,唾液乳杆菌与蛹虫草/铁皮石斛共培养物组小鼠皮肤组织切片相对厚度均降低,差异具有统计学意义($P<0.01$ 、 0.001),其中低剂量组小鼠皮肤的厚度均比高剂量组薄,与剂量呈负相关。

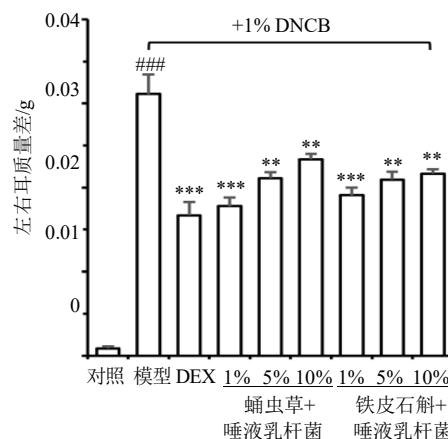
3.1.2 蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培养物的抗炎作用 结果如图4所示,与模型组相比,阳性药



与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$
$P<0.001$ vs control group; ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

图3 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培养提取物对小鼠背部皮肤组织切片厚度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on dorsal skin thickness of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$
$P<0.001$ vs control group; ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

图4 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培养提取物对小鼠左右耳质量差的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on weight difference of left and right ears of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组、蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培物的高、中、低剂量组两耳质量差显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)，与剂量呈负相关性。

3.2 蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培物对巨噬细胞噬菌作用的调控

在荧光显微镜下观察 RAW264.7 细胞对荧光微

球的吞噬作用，如图 5 所示。与对照组相比，模型组吞入胞内的荧光微球增加，阳性药 (20 $\mu\text{mol/L}$ DEX) 组吞入胞内的荧光微球减少。与模型组相比，蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培物组细胞吞噬的荧光微球数量有所降低，并显著抑制巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬作用 ($P<0.01$ 、 0.001)。

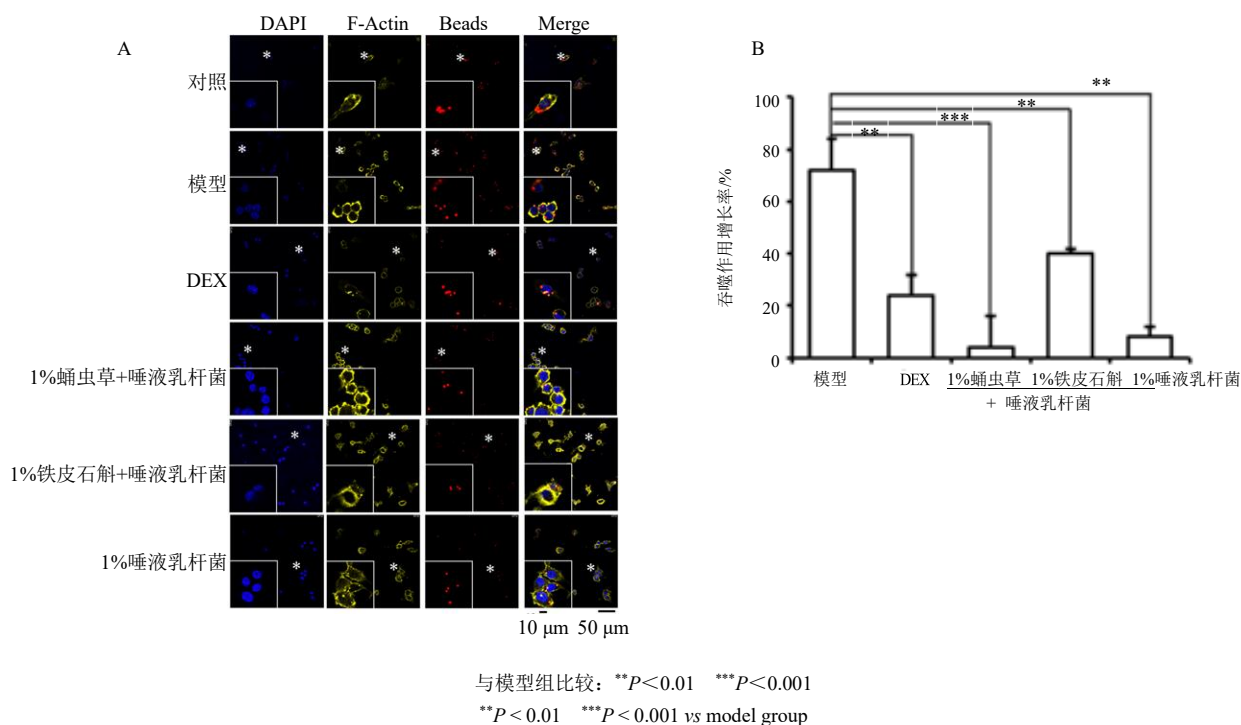


图 5 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 吞噬作用 (A) 和吞噬作用增长率 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on phagocytosis of RAW264.7 cells (A) and phagocytosis growth rate in RAW264.7 cells (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.3 蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培物对巨噬细胞 IL-1 β 和 IL-10 表达水平的调控

利用 ELISA 试剂盒，检测唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培物对 RAW264.7 细胞 IL-1 β 、IL-10 的表达水平，结果如图 6 所示。与模型组相比，阳性药组和唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培物组 IL-1 β 的表达水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001)，IL-10 的表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.4 蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培物对 HaCaT 角质细胞的 FLG2、COL1A1、COL1A2、COL3A1 的 mRNA 表达水平的影响

与对照组相比，唾液乳杆菌中药共培提取物组均可促进 FLG2 mRNA 的表达，但无显著性差异。铁皮石斛或蛹虫草与唾液乳杆菌共培物均可促进胶原蛋白 COL1A1、COL1A2 和 COL3A1 mRNA 的表

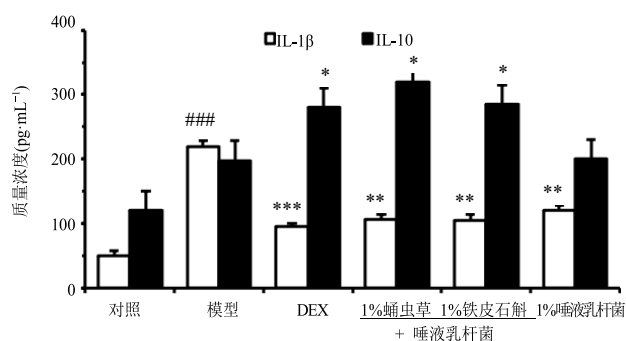
达，与对照组比较，铁皮石斛与唾液乳杆菌共培物的作用优于蛹虫草与唾液乳杆菌共培物 ($P<0.05$ 、 0.01) (图 7)。

3.5 蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培提取物对 RAW264.7-HaCaT 细胞共培体系 RAW264.7 细胞存活率和 NO 释放量的影响

MTT 结果显示，蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培提取物在 1% 的浓度下对 RAW264.7-HaCaT 细胞共培体系的细胞活力无明显影响 (图 8-A)，提示没有细胞毒性。1% 的蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培提取物明显抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 NO 释放量 ($P<0.01$) (图 8-B)。

3.6 蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培提取物对 RAW264.7-HaCaT 细胞共培体系细胞凋亡率的影响

采用一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒和免

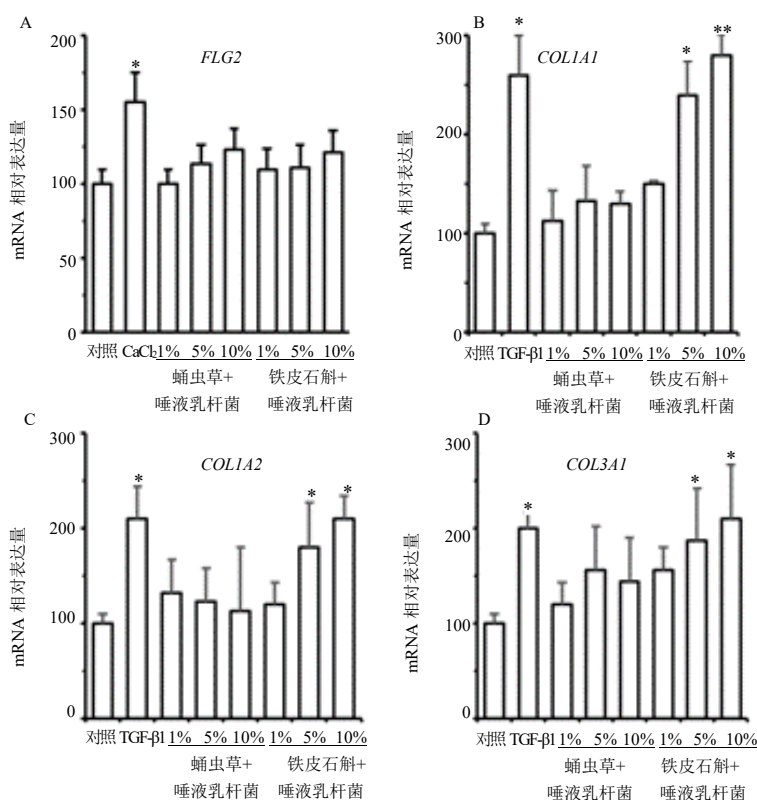


与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 6 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物对 RAW264.7 细胞的促炎因子 IL-1 β 及抗炎因子 IL-10 释放量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on release of pro-inflammatory factor IL-1 β and anti-inflammatory factor IL-10 in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 7 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物对 HaCaT 细胞的 *FLG2*、*COL1A1*、*COL1A2*、*COL3A1* mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on mRNA relative expression of *FLG2*, *COL1A1*, *COL1A2* and *COL3A1* in HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

疫荧光显微镜检测 RAW264.7-HaCaT 细胞共培体系细胞凋亡率。LPS 诱导后,模型组 TUNEL 阳性细胞数量高于对照组,如图 9-A 中绿色信号清晰可见。与模型组相比,阳性药组和唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物组均可明显下调细胞的 TUNEL 阳性率 ($P < 0.01$ 、 0.001),如图 9-B 所示。

3.7 蛹虫草或铁皮石斛与唾液乳杆菌共培提取物对体外人体皮肤模型及人体皮肤的刺激测试结果

3.7.1 体外人体皮肤模型刺激测试 如图 10 所示,唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物的低、中、高剂量组的细胞存活率均大于 50%,与对照组无明显差异,没有显示细胞毒性。因此,唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物被归类为无刺激物。

3.7.2 皮肤敏感测试 6 名志愿者(男性 3 名,女性 3 名),涂抹了不同浓度的唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物软膏。采用 TiVi700 光谱成像血流分析仪,监测皮肤血管血流灌注量,从而量化皮肤受刺激程度。皮肤均未出现诸如红肿、痒等

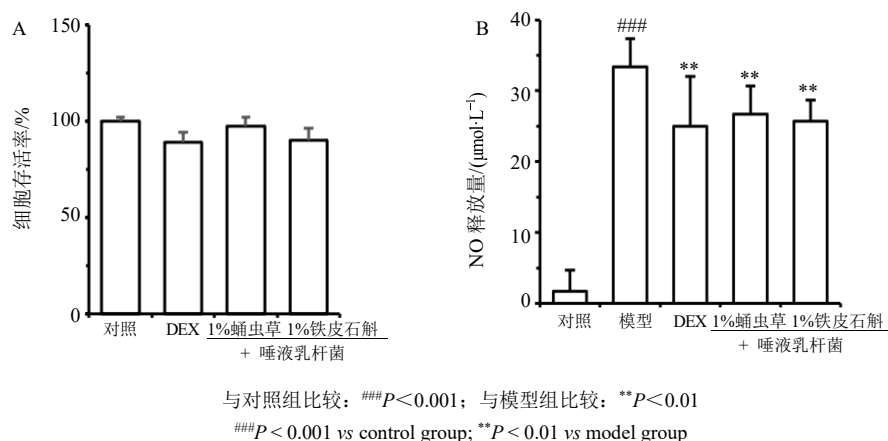
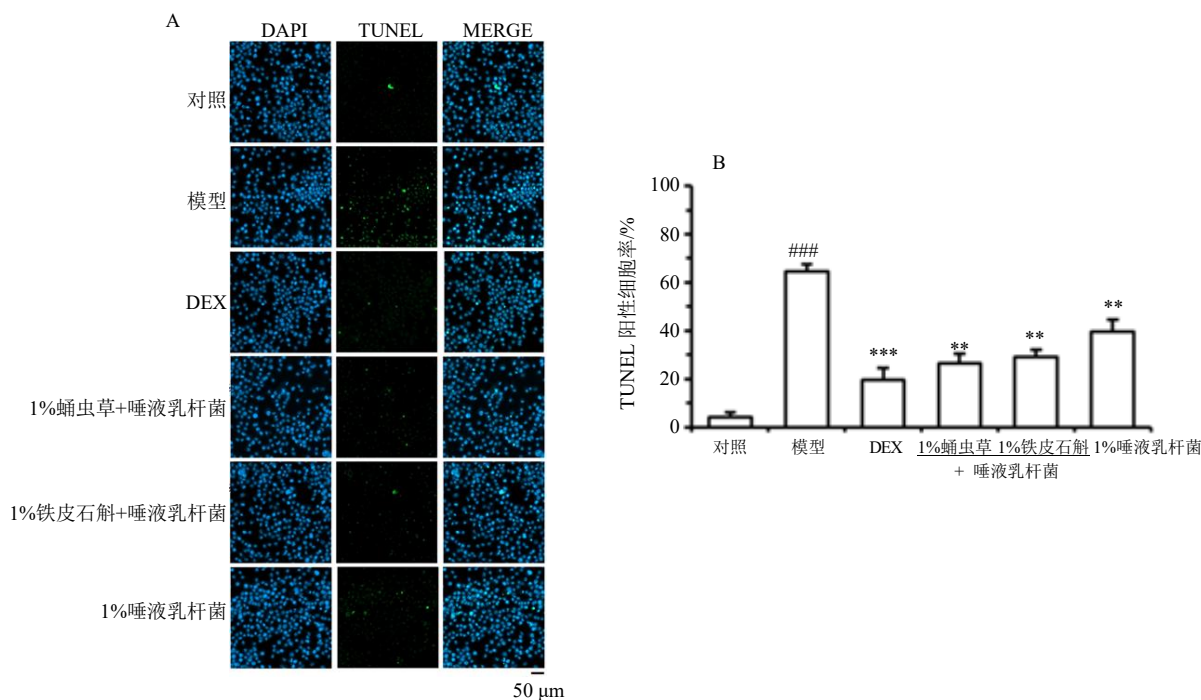


图 8 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物对 HaCaT-RAW264.7 共培养体系中 RAW264.7 细胞存活率 (A) 及 NO 释放量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on cell viability (A) and NO release of RAW264.7 cells (B) in HaCaT-RAW264.7 co-culture system ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: ###*P* < 0.001; 与模型组比较: ***P* < 0.01 ****P* < 0.001
###*P* < 0.001 vs control group; ***P* < 0.01 ****P* < 0.001 vs model group

图 9 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物对 HaCaT-RAW264.7 共培养体系中 RAW264.7 细胞的凋亡情况 (A) 及 TUNEL 阳性细胞率 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on apoptosis of RAW264.7 cells in HaCaT-RAW264.7 system (A) and TUNEL positive cells ratio (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

刺激性症状和变化。说明唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物对人体皮肤无刺激性。

4 讨论

对于湿疹的治疗, 目前主要的方法是通过外用

类固醇抑菌药物同时加以口服抗组胺药物达到抗过敏和止痒效果, 虽然短期疗效明显, 但很容易出现病症复发的情况, 且长期使用的不良反应明显^[8]。相比之下使用天然药物药效温和, 本研究使用唾液

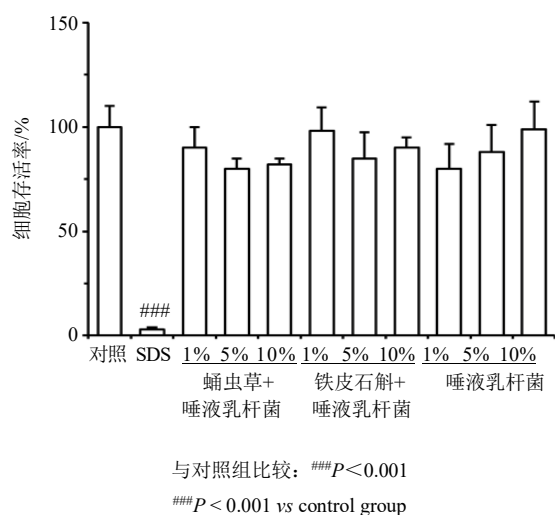


图 10 唾液乳杆菌与蛹虫草或铁皮石斛共培提取物对表皮细胞培养模型中细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 10 Effects of co-cultured extracts of *L. salivarius* and *C. militaris* or *D. officinale* on cell viability in epidermal cell culture model ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

乳杆菌与传统中药进行共同发酵后的提取物,可以避免化学药物带来的不良反应等弊端。

研究显示,微生物发酵可能会改变中药的有效成分含量,产生新的活性次生代谢产物^[8]。在研制药物产品时,通过尝试益生菌与中药共同发酵的方式,将中药作为益生元,来促进益生菌生长,并增加益生菌的生物活性,从而得到质量稳定、抗炎效果显著的提取物。首先,对于菌种的选择,前期研究将菌种的抗炎作用强弱作为筛选依据。通过加入 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 来诱导已被转染 NF- κ B 质粒的 RAW264.7 细胞产生炎症反应,来比较 22 种不同种类的益生菌,结果发现抗炎作用较强的菌种是唾液乳杆菌。另外,对于中药的选择,前期研究筛选了 50 种以上中药的水提物作为益生元,最终发现铁皮石斛、蛹虫草及六神曲可明显促进唾液酸乳杆菌生长,并增加唾液乳杆菌的抗菌活性。而由于六神曲本身为发酵产品,不同厂家的产品发酵方法不尽相同,未在本研究加以利用。

被作为益生元的铁皮石斛和蛹虫草是公认的均具有抗衰老、抗氧化、增强免疫力功效的传统中药^[10-11]。在药理学研究中,铁皮石斛具有益胃生津、滋阴清热的功效,其主要成分为多糖(质量分数可超过 50%)。高浓度的多糖物质被认为具有抑制黄嘌呤氧化酶、清除活性氧、强抗氧化活性,同时为益生菌的培养过程提供大量的碳源^[12-13]。蛹虫草也

称北虫草、虫草花或蛹草,是一种富含高蛋白、氨基酸的食用菌类,具有很强的抗炎和抗氧化功效^[14]。目前,蛹虫草已经人工培植成功,价格相对低廉^[10]。因此,本研究选定铁皮石斛和蛹虫草作为与唾液酸乳杆菌共同发酵的益生元。

本研究通过动物模型、细胞模型、人体模型来逐步多方面地验证唾液乳杆菌与蛹虫草或石斛共培提取物对慢性皮肤湿疹皮炎病的抗炎作用。在细胞实验中,使用 2 种细胞(RAW264.7 细胞和 HaCaT 细胞)模拟皮肤炎症模型,结果显示铁皮石斛或蛹虫草与唾液乳杆菌共培物均有抗炎作用;但对皮肤角质 HaCaT 细胞,铁皮石斛与唾液乳杆菌共培物促进胶原蛋白 COL1A1、COL1A2 和 COL3A1 mRNA 的表达量明显优于蛹虫草与唾液乳杆菌共培物。益生菌与中药共同发酵培养在抑制皮肤炎症方面是新的尝试,至于作用的主要成分的研究有待进一步深入探索。

对于人体模型中的皮肤敏感测试,可以对涂抹产品后人体皮肤的炎症反应直接进行分析。有一些研究使用以下方法来分析健康和过敏皮肤上的细胞因子水平^[15-16]。在每个实验点涂抹油脂贴片,一段时间后将贴片转移至 1.5 mL 离心管中并在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 储存,并从贴片上提取蛋白质。采用特异性酶联免疫吸附试验试剂盒进行生物标志物测量。本研究采用 TiVi700 组织活性成像仪,监测皮肤血管血流灌注量,从而量化皮肤受刺激程度,比较简单直接。

另外,本研究在动物实验和部分细胞实验中未设置唾液乳杆菌治疗组及单独未被发酵的中药治疗组,因此无法将单独药剂的药效和共培物药效进行对比,这是本研究的局限性。对于药效强弱的实验有待进一步深入研究。

综上所述,唾液乳杆菌发酵液及与中药共培液在抑制 DNCB 诱导的小鼠皮肤组织的炎症反应方面有效果,且呈现出剂量相关性;对 LPS 诱导的 HaCaT-RAW264.7 共培体系细胞中 NO 释放、吞噬作用、IL-1 β 水平及细胞凋亡率显示出抑制作用。唾液乳杆菌与铁皮石斛或蛹虫草共培提取物对皮肤无明显刺激性,可以作为抗炎、抗皮肤过敏的护肤品的原料,具有较强应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Silverwood R J, Forbes H J, Abuabara K, et al. Severe and predominantly active atopic eczema in adulthood and long term risk of cardiovascular disease: Population based

- cohort study [J]. *BMJ*, 2018, 361: k1786.
- [2] Bath-Hextall F J, Birnie A J, Ravenscroft J C, *et al.* Interventions to reduce *Staphylococcus aureus* in the management of atopic eczema: An updated Cochrane review [J]. *Br J Dermatol*, 2011, 164(1): 228.
- [3] Furue M, Terao H, Rikihisa W, *et al.* Clinical dose and adverse effects of topical steroids in daily management of atopic dermatitis [J]. *Br J Dermatol*, 2003, 148(1): 128-133.
- [4] Williams N T. Probiotics [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2010, 67(6): 449-458.
- [5] Peran L, Camuesco D, Comalada M, *et al.* Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(33): 5185-5192.
- [6] 詹华强, 赵利生, 赵键玮, 等. 益生菌中药共培提取液、制备方法以及应用: 中国, CN111569007A [P]. 2020-08-25.
- [7] Fernando I P S, Kim H S, Sanjeeva K K A, *et al.* Inhibition of inflammatory responses elicited by urban fine dust particles in keratinocytes and macrophages by diplolethohydroxycarmalol isolated from a brown alga *Ishige okamurae* [J]. *ALGAE*, 2017, 32(3): 261-273.
- [8] 康雨菲, 徐爱琴, 王首帆. 急性湿疹的中医药治疗进展 [J]. *中国中医急症*, 2021, 30(9): 1685-1688.
- [9] 章沙沙, 张海玲, 叶静, 等. 稀有人参皂苷微生物转化研究进展 [J]. *特产研究*, 2021, 43(2): 91-96.
- [10] 盛瑜, 谭超杰, 白丽丹, 等. 北虫草化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国食用菌*, 2021, 40(2): 1-5.
- [11] 孙晶, 魏静, 米艳, 等. 石斛活性成分及生物模型在胃肠道疾病保护作用中的应用进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(22): 7025-7031.
- [12] Pan L H, Li X F, Wang M N, *et al.* Comparison of hypoglycemic and antioxidative effects of polysaccharides from four different *Dendrobium* species [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64: 420-427.
- [13] Wang M, Meng X Y, Yang R L, *et al.* *Cordyceps militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89(2): 461-466.
- [14] Albuquerque P B S, de Oliveira W F, dos Santos Silva P M, *et al.* Skincare application of medicinal plant polysaccharides-A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 277: 118824.
- [15] Perkins M A, Cardin C W, Osterhues M A, *et al.* A non-invasive tape absorption method for recovery of inflammatory mediators to differentiate normal from compromised scalp conditions [J]. *Skin Res Technol*, 2002, 8(3): 187-193.
- [16] De Jongh C M, Verberk M M, Spiekstra S W, *et al.* Cytokines at different stratum corneum levels in normal and sodium lauryl sulphate-irritated skin [J]. *Skin Res Technol*, 2007, 13(4): 390-398.

[责任编辑 潘明佳]