

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780009483.X

[43] 公开日 2009年4月8日

[11] 公开号 CN 101405601A

[22] 申请日 2007.3.15

[21] 申请号 200780009483.X

[30] 优先权

[32] 2006.3.17 [33] JP [31] 075024/2006

[86] 国际申请 PCT/JP2007/055926 2007.3.15

[87] 国际公布 WO2007/108523 日 2007.9.27

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.17

[71] 申请人 株式会社资生堂

地址 日本东京都

[72] 发明人 片桐千华 仲西城太郎 日比野利彦

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 段承恩 田欣

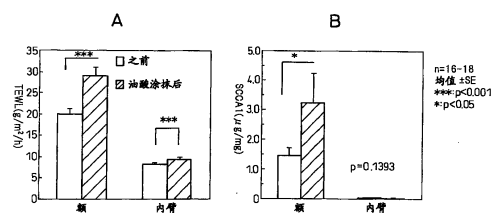
权利要求书1页 说明书9页 附图4页

[54] 发明名称

以鳞状上皮细胞癌抗原为指标的肌肤敏感性程度的评价方法

[57] 摘要

本发明提供了以皮肤角质层细胞的鳞状上皮细胞癌抗原(SCCA)的表达为指标的肌肤敏感性程度的评价方法。



1. 肌肤的敏感性程度的评价方法，其以皮肤角质层细胞的鳞状上皮细胞癌抗原(SCCA)的表达作为指标。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肌肤的敏感性是相对于药剂刺激的肌肤的敏感性。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，所述方法是通过使用 SCCA 特异性抗体的酶联免疫吸附分析(ELISA)来实施所述 SCCA 的表达。
4. 如权利要求 1~3 的任一项所述的方法，其中所述皮肤角质层样本是通过胶带剥离采集的。
5. 如权利要求 1~4 的任一项所述的方法，其中 SCCA 是 SCCA-1。

以鳞状上皮细胞癌抗原为指标的肌肤敏感性程度的评价方法

技术领域

本发明提供以细胞的鳞状上皮细胞癌抗原(Squamous Cell Carcinoma Antigen 1, 以下称为“SCCA”)为指标的肌肤敏感性程度的评价方法。

背景技术

近年来,认为自己的肌肤是敏感肌肤,即是对于外部刺激、压力显示强反应性的敏感性高的肌肤的人倾向于增加。尤其是在20~30岁的年轻女性中,70%以上的人在民意调查中回答自己的肌肤是敏感肌肤。作为肌肤状态变得敏感的主要原因,可以列举皮肤的屏障功能的下降、皮肤刺激阈值的下降、皮肤的干燥、接触性皮炎的发炎物质、物理化学的刺激、压力、身体状况、季节变化、紫外线、生理等。另外,还有即使对于对肌肤的压力等有抵抗力却也呈报为敏感肌肤的情况,要求恰当且客观的生物化学指标。

这样的敏感肌肤,如下定义。

1. 一般来说对于药物外用剂、化妆品、植物、紫外线、金属等物质特异性地反应,容易引起皮肤问题的肌肤,以及屏障功能下降而对于过敏物质(花粉、香料等)、刺激性物质(酒精等)体质性地敏感的肌肤,具体地说,可以认为是过敏体质、知觉过敏体质,可以发现皮肤容易干燥(生疮)、容易皮肤粗糙、皮肤屏障功能下降而容易引起斑疹等症状。

2. 在像由于睡眠不足、过度疲劳、生理、季节交替的时候、精神压力等,肌肤本来的抵抗力或皮肤的生理功能减弱那样的时候,变得暂时性地容易引起皮肤问题的皮肤。

肌肤对于各种外部刺激、压力的敏感性有个体差异,例如对于某种药

剂，有的人敏感反应而产生皮肤粗糙，也有的人完全不显示反应。另外，有的情况下对于药剂和外界的刺激即刻应答而产生皮肤粗糙，也有的人经持续的刺激才产生皮肤粗糙。一直以来，肌肤的敏感性的程度要通过产生皮肤粗糙之后才能明确。但是，在产生这样的皮肤粗糙之后，对于身心的负担巨大，也有达到恢复需要很长的时间或者变成很难完全治愈的疤痕的情况。所以，如果能够预先测定并认知个体的肌肤对于外部刺激、压力的敏感性、反应性的程度，就能够将皮肤粗糙防患于未然，进而能够选择适合敏感肌肤、敏感性高的肌肤的护理，是极为有意义的。

鳞状上皮细胞癌抗原(SCCA)是从鳞状上皮癌细胞提取的抗原，在宫颈、肺、食道、皮肤的鳞状上皮细胞癌中显示高血液浓度，经常在鳞状上皮细胞癌的诊断中被应用(H. Kato 等, *Cancer* 40: 1621-1628(1977); N. Mino 等, *Cancer* 62: 730-734(1988))。特别是，由于 SCCA 的血液浓度与鳞状上皮细胞癌的发展阶段、恶性程度、肿瘤大小等良好地相关，所以不仅在癌症的早期发现，而且在癌症治疗效果的评价、复发危险性的诊断等中，也是特别有效的癌标记。

人们还知道，SCCA 还在牛皮癣表皮的上层中被确认表达增强(Takeda 等, *J. Invest. Dermatol.* (2002) 118(1), 147-154)。牛皮癣是皮肤病的一种，具有作为慢性、复发性的炎症性角化不全症的牛皮癣，其特征在于表皮细胞的增殖、分化异常和炎症细胞浸润。一般认为牛皮癣由于遗传因素再加上种种环境因子而发病(Hopso-Havu 等, *British Journal of Dermatology* (1983) 109, 77-85)。

SCCA 是由在染色体 18q21.3 上串联排列的两个基因 SCCA-1 基因和 SCCA-2 基因所编码。由它们所编码的蛋白质 SCCA-1 和 SCCA-2 均是分子量约 45000 的蛋白质，显示高同源性，其同源性在核酸水平上为 95%。这些 SCCA 属于卵清蛋白丝氨酸蛋白酶抑制物(ov-serpin)家族。ov-serpin 在丝氨酸蛋白酶抑制物超家族中也具有独特的特征。一般来说丝氨酸蛋白酶抑制物被分泌而在细胞外发挥作用，但 ov-serpin 是主要在细胞内也发挥作用的蛋白酶抑制物。

SCCA1 是木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶抑制剂, SCCA2 是糜蛋白酶样丝氨酸蛋白酶抑制剂, 尽管同源性高, 但由于反应部位的氨基酸序列不同, 所以有时也具有不同的特性(Schick 等, J. Biol. Chem. (1997) 27213, 1849-55)。人们已经知道由于牛皮癣等疾病、UV 引起 SCCA-1 和 SCCA-2 高表达, 但它们在皮肤性状中怎样参与尚不清楚。

发明内容

本发明人以阐明 SCCA 参与的表皮生理学机制为目的进行了研究, 结果发现, 肌肤的敏感性、反应性的程度与表皮中的 SCCA 量相关, 表皮的 SCCA 量越高的被试验者对于刺激显示越高的反应性。所以, 认为 SCCA 的表达可成为肌肤的敏感性和反应性的指标, 从而完成了本发明。

本发明提供了肌肤的感受性的程度的评价方法, 该方法以皮肤角质层细胞的鳞状上皮细胞癌抗原(SCCA)为指标, 详细地说, 以 SCCA-1 和/或 SCCA-2, 特别是 SCCA-1 的表达为指标。优选的是, 通过使用 SCCA 特异性抗体的酶联免疫吸附分析(ELISA)实施上述 SCCA 的表达。在更优选的方案中, 上述皮肤角质层样本是通过胶带剥离采集的。

通过本发明的方法, 使得在生物化学的水平上判定肌肤的敏感性、反应性、敏感的程度成为可能。

附图简述

图 1 表示正常皮肤中 SCCA 表达量与 TEWL 的相关图。

图 2 表示油酸涂抹造成的 TEWL 值与 SCCA-1 表达量。

图 3 表示油酸涂抹造成的 TEWL 值的变化与 SCCA-1 表达量的变化。

图 4 表示 TEWL 的变化与 SCCA-1 表达量的相关图。

具体实施方式

SCCA 如上所述, 是存在于鳞状上皮癌细胞和牛皮癣表皮的分子量约 45,000 的蛋白质。SCCA-1 和 SCCA-2 的氨基酸序列和编码它们的核酸序

列在 Takeda A 等, *J. Invest. Dermatol.* 118. 147-154(2002) (见上文) 中记载。

本发明所涉及的 SCCA 的表达的测定, 可以按照能够测定 SCCA 的任意方法, 定量或定性地实施。具体地说, 可以列举使用 SCCA 特异性抗体的免疫测定方法, 例如使用酶标记的 ELISA 法、使用放射性标记的 RIA 法、免疫比浊法、蛋白质印迹法、乳胶凝集法、红细胞凝集法等各种各样的方法。免疫测定法的方式中可以列举竞争法和夹心法。此外, SCCA 的表达量也可以通过测定在编码它的基因的细胞内表达的量来进行。这种情况下, 优选的是, SCCA 的表达通过测定细胞内编码 SCCA 的 mRNA 的量来确定。mRNA 的提取、其量的定量或定性测定在本领域内是周知的, 例如可以通过 PCR 法、3SR 法、NASBA 法、TMA 法等各种各样周知的方法来实施。此外, SCCA 的表达可以通过原位杂交法、测定其生物活性来定性地确定。

作为被检验体的皮肤角质层样本的采集可以用任意的的方法实施, 从简便性的观点出发, 优选胶带剥离法。所谓胶带剥离法, 是通过在皮肤表层贴附粘胶带片, 剥离, 使皮肤角质层附着在其该剥离的粘胶带上, 来采集角质层样本的方法。如果利用胶带剥离法, 那么只采取一片胶带的角质层就可进行 SCCA 表达的测定, 可以实现以 SCCA 为指标的非侵入性的敏感肌肤评价方法。胶带剥离的优选方法通过如下进行: 首先用例如乙醇等净化皮肤的表层, 除去皮脂、污垢等, 将切成适当大小(例如 $2 \times 5\text{cm}$) 的粘胶带片轻轻放在皮肤表面上, 对整个胶带施以均匀的力压合平整, 然后以均匀的力剥离粘胶带。粘胶带可以使用市售的玻璃纸胶带等, 例如 Scotch Superstrength Mailing Tape (3M 社生产)、玻璃纸胶带(セロテープ(注册商标); ニチバン株式会社)等。附着于粘胶带的皮肤角质层样本中的 SCCA, 可以通过将胶带片浸渍于适当的提取液, 例如 Tris 缓冲液(pH 8.0) (0.1M Tris-HCl, 0.14M NaCl, 0.1%吐温 20) 中, 提取角质层, 来从胶带上分离、提取。

在本发明的优选方案中, SCCA 通过免疫测定方法, 例如 ELISA 来测定。在 ELISA 中使用的 SCCA 特异性抗体可以是单克隆抗体也可以是多

克隆抗体。单克隆抗体、多克隆抗体的制备方法是本领域技术人员周知的，例如在 Lunstrum 等人, *J Biol. Chem.* 1986, 261: 9042-9048; Hurle 等人, *J Cell Science* 1994, 107: 2623-2634 中所记载。

在本发明所涉及的方法中，特别优选夹心免疫测定法。夹心免疫测定方法可以例如如下来实施。

将 2 种 SCCA 特异性抗体的其中之一作为一次抗体在载体上固定化。作为载体优选固体载体，例如作为固体载体可以使用在免疫测定法中常用的任意载体，例如除了成型成任意大小、形状的苯乙烯、聚苯乙烯等高分子载体之外，还可以列举由这些适宜材料成型的反应容器，例如 ELISA 板的孔的内壁等。

上述一次抗体向载体的固定化可以按照常规方法进行，例如可以通过将上述一次抗体溶解到缓冲液，例如磷酸缓冲盐水(PBS)、硼酸缓冲液等中，使其吸附于载体上，来进行固定化。另外，例如也可以将结合上述一次抗体的抗体、其它蛋白质例如蛋白质 C 预先在载体上固定化，使它们与上述一次抗体接触等。进而，为了抑制非特异性结合，优选通过向这样固定化有一次抗体的载体加入适当的封闭剂，在约 4~40℃，优选为 20~37℃，孵育 5 分钟~数天，优选为 10 分钟~24 小时、更优选为 10 分钟~3 小时，来进行封闭，所述封闭剂例如 PBS-BSA、市售的封闭剂，例如ブロックエース(大日本制药)。

将上述 2 种 SCCA 特异性抗体中的另一种抗体作为二次抗体使用，进行标记。作为标记，可以例举酶标记、放射线标记、荧光标记等。进行酶标记的情况，可以使酶直接与二次抗体结合进行标记，或者通过例如亲和素-生物素那样的相互反应性蛋白质间接地用酶进行标记。酶与抗体等的结合，可以通过利用例如市售的巯基导入基试剂向酶和应该标记的抗体等各自分别导入巯基，然后使二者形成二硫键来进行。作为酶，可以列举辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶等。酶的检测可以使用该酶的特异性底物来进行。例如使用辣根过氧化物酶时，可使用 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)、ABTS(2,2'-连氨基-双[3-乙基苯并噻唑啉磺酸])等。

该免疫测定，通过将固定了上述一次抗体的载体、上述经标记的二次抗体、被检样品进行混合、孵育，使被检样品中的 SCCA 与在载体上固定化了的一次抗体结合，使标记二次抗体与该 SCCA 分子结合。

这样，标记化抗体，在反映样本中的 SCCA 量的量上，通过在载体上固定化了的一次抗体和来自样本的 SCCA，而被固定在载体上。该孵育在适当的缓冲液，例如 PBS 中，在约 4~40℃、优选为 20~37℃，进行 5 分钟~数天、优选为 10 分钟~24 小时，更优选为 10 分钟~3 小时。

接着，进行从上述载体分离未结合的标记化抗体的操作。载体为固体载体的情况下，该分离操作可以通过固液分离简单地进行。在使用了一定已知量的标记二次抗体的情况下，可以测定与载体结合的标记或未结合的标记或者两者均测定。另一方面，使用任意的标记抗体的情况下，检测、测定与载体结合的标记。为了检测与载体结合的标记，优选通过清洗液清洗载体，除去未结合的标记化抗体，然后进行检测，所述清洗液例如加入了适当的表面活性剂的缓冲液，例如 PBS-吐温 20。根据标记的种类，可以按照常规方法进行检测。

下面，列举具体例子，更具体地说明本发明。此外，本发明并不受这些实施例的限制。

实施例

材料和方法

(1) 抗体

识别 SCCA-1 和 2 两者的多克隆抗体为使用从牛皮癣表皮的鳞屑中纯化的 SCCA(SCCA-1 和 SCCA-2)，制作多克隆抗体。将牛皮癣表皮的鳞屑提取物(提取液: 0.1M Tris-HCl(pH8.0), 0.14M NaCl)离心，然后将上清用 Sephacryl S-200, DEAE Sepharose, Mono Q, Mono S, Mono P, Superrose 6 纯化，以此作为抗原，将兔作为致敏动物来使用。

抗 SCCA-1 单克隆抗体和抗 SCCA-2 单克隆抗体通过 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA 获得。

(2) ELISA

皮肤角质层样本通过将透明粘胶带(セロテープ(注册商标)(NICHIBAN))贴附在皮肤表面,然后剥离的胶带剥离法来采集。将附着有皮肤角质层的该胶带剪断、浸渍到提取缓冲液(0.1M Tris-HCl(pH8.0), 0.14M NaCl, 0.1% 吐温 20, 1ml)中,施以超声波处理(20秒×4),制作样本提取液。

将 PBS 中稀释的多克隆抗 SCCA 抗体(1:1000 稀释)各 100 μ l, 分别注入到 96 孔 ELISA 板的各孔中, 室温放置一夜, 使之与板的固相结合。然后, 为了抑制与板的非特异性结合, 在封闭溶液(将ブロッカーエース在 PBS-吐温 20 中稀释得到的溶液, 300 μ l/孔)中孵育 1 小时。

将上述样本提取液 50 μ l 添加到 ELISA 板的各孔中, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。添加单克隆抗 SCCA-1 抗体(1:1000 稀释), 在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。接着, 添加二次抗体, 即辣根过氧化物酶标记的抗小鼠抗体, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 用 0.1% 吐温 20 PBS 清洗后, 添加底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB), 用 TMB Peroxidase EIA substrate kit (BIO-RAD 公司)使之显色, 在 630nm 进行测定。

(3)皮肤的经皮水分丧失量(TEWL)的测定

检验体(正常人的脸和内臂)的 TEWL, 用 TEWA meter(TM120)进行测定。

(4)SCCA 表达量与经皮水分丧失量(TEWL)的相关

对于皮肤角质层, 在通过 ELISA 测定 SCCA 表达量的同时, 也研究作为皮肤生理参数的 TEWL, 从而研究了 SCCA 表达量与 TEWL 的相互关系。其结果示于图 1。在 SCCA-1 与 TEWL 之间, 皮尔逊相关系数为 0.876, 在 SCCA-2 与 TEWL 之间, 皮尔逊相关系数为 0.600, 都可以断定是显著性的相关, 所以得知, 在 TEWL 高、肌肤的性状比较恶劣的时候, SCCA-1 和 SCCA-2 均表达量增高, 特别是 SCCA-1 的表达量增高。

(5)在药剂刺激中的 SCCA 表达量

对于额(暴露部位)和内臂(非暴露部位)的皮肤, 作为药剂刺激, 在第 1

和第2天适量涂抹10%的油酸。从油酸涂抹前和涂抹开始第4天，对皮肤的TEWL进行测定，同时通过对这些皮肤实施胶带剥离来采集各自的角质层，通过ELISA测定了SCCA-1的表达量。也研究了油酸涂抹前和涂抹后的皮肤与TEWL的关系。

图2表示油酸涂抹前，与TEWL的关系(a)和与SCCA1表达量的关系(b)。正如图2(a)所表明的那样，在额通过油酸的涂抹可以断定TEWL值的显著上升，相反在内臂不能断定药剂刺激造成的TEWL的显著上升。所以得知，通过油酸的涂抹，在额皮肤屏障功能显著下降，相反在内臂几乎没有下降，额相比于内臂对于药剂刺激是敏感性的。

图2(b)表示油酸涂抹前和涂抹后的SCCA-1的量。由该结果得知，在额的SCCA-1的量较多，且通过药剂刺激其量显著增加。另一方面，在内臂SCCA-1的量与在额的量相比显著较少。所以，明确了对于药剂刺激为敏感性的额，比内臂SCCA-1表达量要多。

图3表示在油酸的涂抹前后，额和内臂各自的TEWL的变化(a)和SCCA-1表达量的变化(b)。图3(a)与图2(a)同样，显示了额相比于内臂对于药剂刺激为敏感性，由图3(b)可见，在敏感性高的额，通过药剂刺激，SCCA-1的表达量显著上升，相反在敏感性低的内臂，SCCA-1的表达量没有显著变化。所以，可以认为，在敏感性高的额，通过油酸的涂抹SCCA-1的表达增强，与皮肤屏障功能的下降相关。

图4表示在每一块涂抹了油酸的皮肤上的TEWL的变化与SCCA-1表达量的变化的相关关系。归纳了对于额和内臂的皮肤得到的值。从该图得知，油酸涂抹前个体的表皮所具有的SCCA-1量越高，油酸涂抹后的TEWL的变动越大。即，暗示了油酸涂抹前个体的表皮所具有的SCCA-1量越高，外部刺激所造成的皮肤屏障功能下降的比例越高(在SCCA-1与TEWL之间，皮尔逊相关系数为0.7668，是显著性的)。所以，暗示了各个体的表皮所具有的SCCA-1的表达水平可以作为肌肤对于药剂刺激等外部刺激的敏感性和反应性的指标。

(6)呈现角化不全的暴露部位皮肤、过敏性皮肤、特应性干燥皮肤、牛

牛皮癣皮肤中的 SCCA-1 的表达水平

通过对于显示正常皮肤性状的非暴露部位(内臂)皮肤、呈现角化不全的暴露部位(脸)皮肤、由于花粉症造成的过敏性皮肤而患有皮肤粗糙的患者的皮肤、患有特应性皮炎的患者的皮肤、患有牛皮癣的患者的皮肤分别实施胶带剥离,采集各自的角质层,如上所述通过 ELISA 测定 SCCA-1 的表达量。

其结果示于表 1。除了显示正常皮肤性状的非暴露部位皮肤(对照)之外,在所研究的全部皮肤中都确认了 SCCA1 的显著增强。与对照相比较,表达增强在特应性干燥皮肤中为 16 倍,在暴露部位皮肤中为 90 倍,在花粉症过敏性皮肤中为 232 倍,在牛皮癣皮肤中高达 466 倍。根据这些结果,明确了 SCCA1 在刺激敏感性高,即以较少的刺激还是容易皮肤粗糙的敏感且反应性高的皮肤中,呈现显著的表达增强。

表 1. 角化不全皮肤中的 SCCA1 的增加

皮肤	SCCA1	统计分析
正常皮肤(非暴露部位)	1.0±0.1	-
特应性干燥皮肤	15.5±4.1	**
暴露部位皮肤	90.0±16.6	***
过敏性皮肤	232.2±32.6	***
牛皮癣	465.8±146.0	***

均值±SD. **: p<0.01. ***: p<0.001(t 检验)

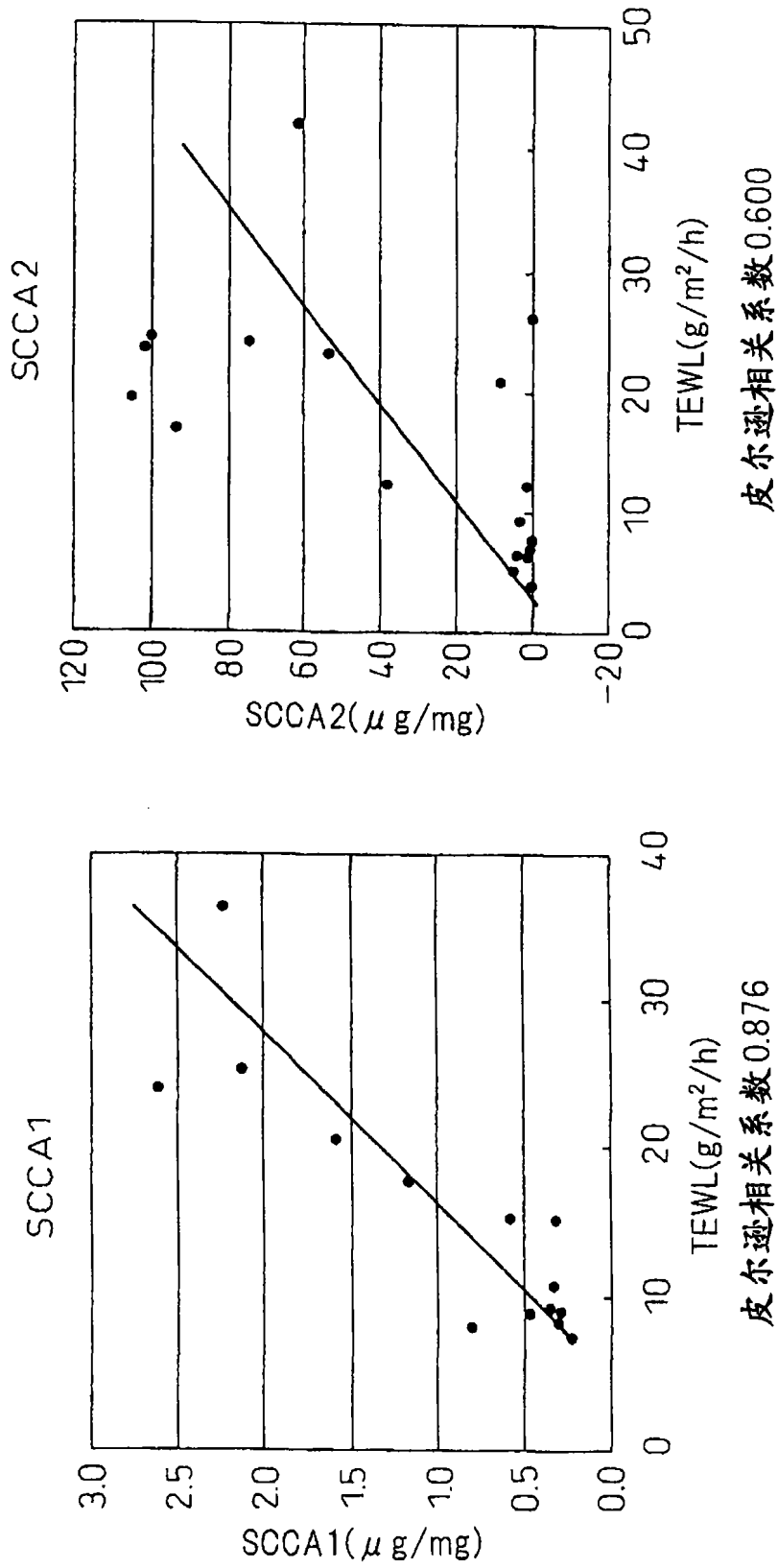


图 1

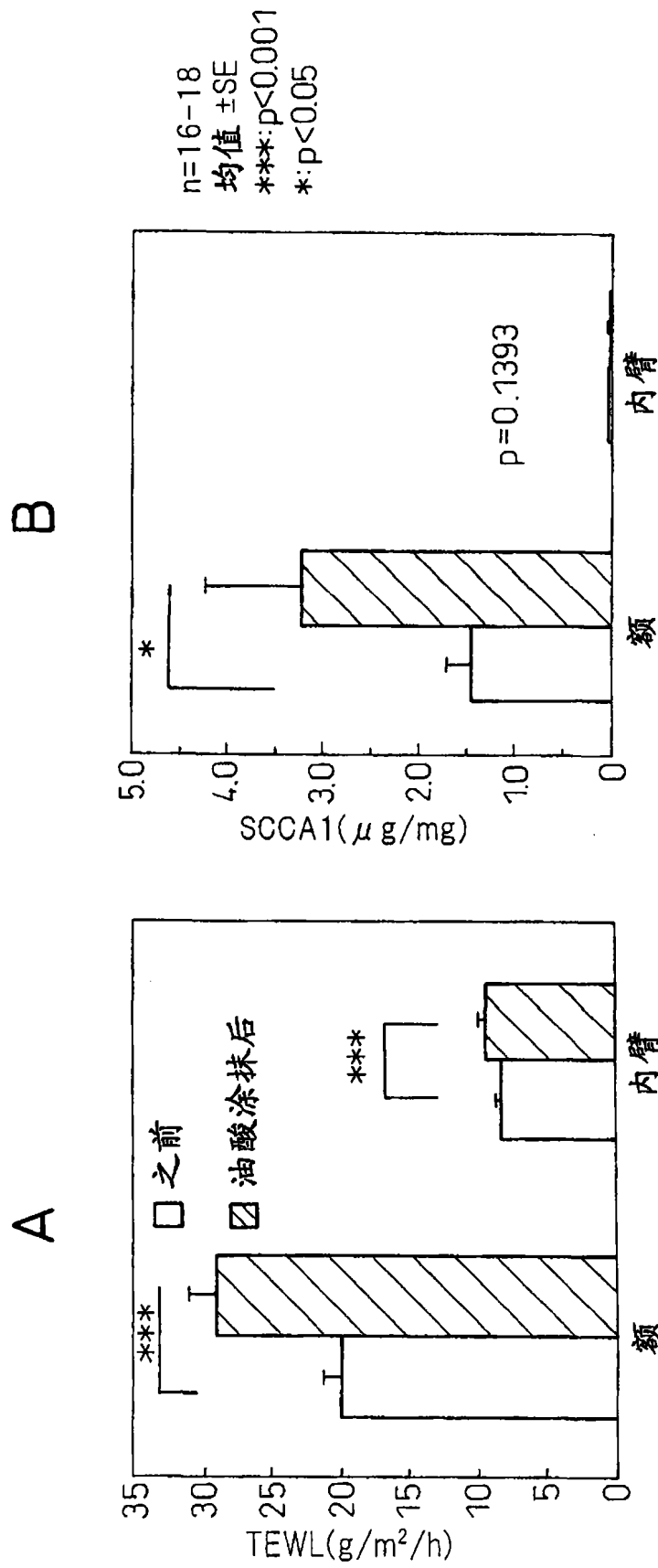


图 2

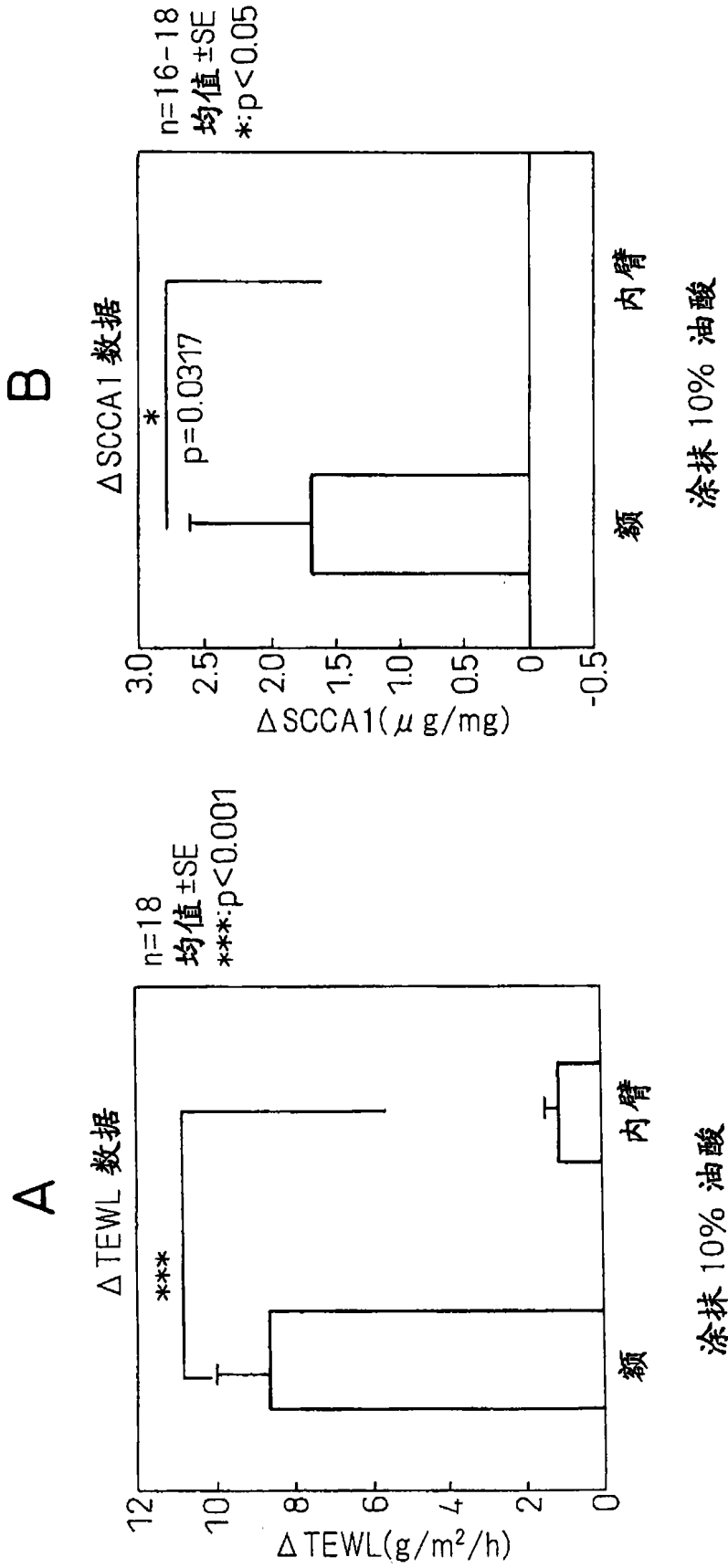


图 3

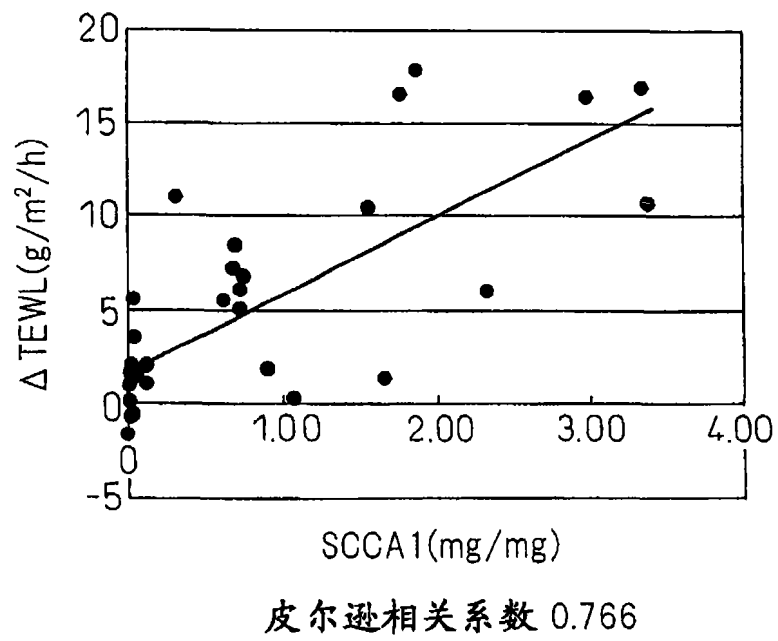


图 4

专利名称(译)	以鳞状上皮细胞癌抗原为指标的肌肤敏感性程度的评价方法		
公开(公告)号	CN101405601A	公开(公告)日	2009-04-08
申请号	CN200780009483.X	申请日	2007-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
[标]发明人	片桐千华 仲西城太郎 日比野利彦		
发明人	片桐千华 仲西城太郎 日比野利彦		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6881 G01N2333/705 G01N33/5091		
代理人(译)	段承恩 田欣		
优先权	2006075024 2006-03-17 JP		
其他公开文献	CN101405601B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了以皮肤角质层细胞的鳞状上皮细胞癌抗原(SCCA)的表达为指标的肌肤敏感性程度的评价方法。

