

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品之研發—植酸應用於化妝品之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：

執行期間：93年01月01日至93年12月31日

計畫主持人：楊朝成

共同主持人：呂敏勇

計畫參與人員：賴怡甄

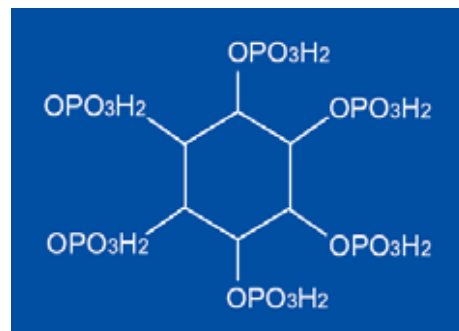
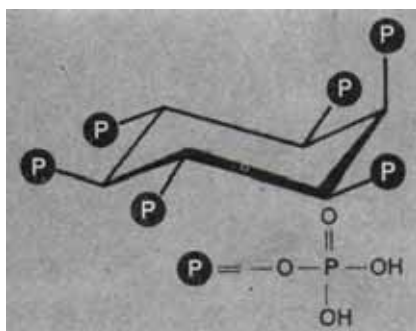
執行單位：化妝品應用與管理系

中華民國94年02月28日

一、前言

皮膚的老化過程主要由兩種原因所造成，一種為自然老化或稱內在老化 (intrinsic senescence)，此現象是與生俱來的，由基因所控管；另一種老化為外在老化 (extrinsic senescence)，由外在環境因子所造成，例如陽光中紫外線；內在老化無法或很難被人為改變，但外在老化卻可被人為所避免。皮膚老化的過程主要因為表皮層角質細胞 (epidermal keratinocytes) 及真皮層纖維母細胞 (dermal fibroblasts) 的增生減緩，造成皮膚內真皮層 (dermis) 細胞外基質的大分子成份 (macromolecular components of the extracellular matrix) [包括膠原蛋白 (collagens)、彈性素 (elastins)、勝糖 (proteoglycans)、葡萄糖胺糖 (glycosaminoglycans; hyaluronan 屬於此類) 及結構性糖蛋白 (structural glycoproteins)] 的改變，進而導致皮膚的皺縮、厚度變薄、暗沉、彈性降低及保濕性降低等種種的老化現象 (1, 2, 3, 4, 5, 6)。膠原蛋白是人類皮膚真皮層細胞外間質 (extracellular matrix) 的主要大分子成份 (約佔 70%)，其主要的功能是維持真皮層的穩固及對抗外來的壓力，其中 type I (85%)、type III (15%) 與 type V (5%) 膠原蛋白則是真皮層細胞外基質內主要的膠原蛋白 (6)；但隨著年齡的增加或外在環境因子 (例如：UV irradiation 與抽煙) 的影響，真皮層細胞外基質內的基質金屬整合蛋白酶 (matrix metalloproteinases；MMP) 的活性也隨著增加，這些種類眾多的基質金屬蛋白酶的活性增加將造成真皮層細胞外基質內大部份的大分子成份被分解，進而引起皺縮、厚度變薄等皮膚的老化現象 (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8)。其中基質金屬蛋白酶-1 [matrix metalloproteinase-1

(MMP-1)，是一種鋅離子依賴性的內切性肽酶(Zn^{2+} -dependent endopeptidase)；也是一種間質性的膠原蛋白酶(interstitial collagenase)，可以導致皮膚真皮層細胞外基質內的膠原蛋白被初步分解成高分子量的膠原蛋白片段(high molecular weight collagen fragments)，而後基質金屬蛋白酶-2 [matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)，是一種明膠酶 A (gelatinase A)]以及基質金屬蛋白酶-9 [matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)，是一種明膠酶 B (gelatinase B)]，這兩種基質金屬蛋白酶再將上述的高分子量的膠原蛋白片段進一步破壞而瓦解(9, 10, 11)；另一方面，這些由膠原蛋白被基質金屬蛋白酶-1 初步分解而形成的高分子量的膠原蛋白片段存在於真皮層細胞外基質會抑制新膠原蛋白的合成，也會引起真皮層細胞外間質內膠原蛋白的補充不足(12)。所以在真皮層細胞外基質內，基質金屬蛋白酶-1 的蛋白質及活性表現量是一種皮膚老化現象的指標；當然，type I、type II 與 type III 膠原蛋白在真皮層細胞外基質內的含量與合成也是另一個說明皮膚真皮是否老化的因子；因此，與原膠原蛋白(procollagen)新合成相關的 heat shock protein 47 (Hsp47) (13, 14, 15)，它所對應 mRNA 的表現量及蛋白質質量，亦是與皮膚老化有關且值得深入探討的重要因素。



在另一方面，六磷酸肌醇(myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate, inositol hexaphosphate, IP₆)，又稱為植酸(phytic acid)，其結構式如上圖所示，它是一種二價金屬離子(例如：Zn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺等)的螯合劑(chelator)，容易與金屬離子形成不溶性的化合物(16, 17)；目前已知六磷酸肌醇大量存在於各類穀類種子、豆莢、可榨油的果實(例如：花生)、堅果、孢子及花粉之內，約佔重量之 1~5%，並證實具有抗氧化(antioxidant)及抗腫瘤(antineoplastic)的能力(18)。它擁有獨特的抗氧化能力，可以阻斷自由基(free radical)的形成，並且抑制脂質的過氧化(lipid peroxidation)以及 DNA 的損傷，而可預防心血管疾病罹患危險(19, 20)。近來醫學研究發現植酸本身或在體內代謝而導致去磷酸化 (dephosphorylation)，展現其對癌症的抑制與治療效果，諸如大腸癌、結腸癌、直腸癌等(21, 22, 23, 24, 36)。它亦可以藉由降低惡性細胞的增生 (malignant cell proliferation) 並予消滅，以抑制乳腺癌細胞 (mammary carcinoma cells) (25, 26)。另外，如採用高植酸配方膳食時，應注意其可能罹患礦物質缺乏症的危險。因植酸通常與營養上重要的礦物質，諸如，鈣，鎂，銅，鐵，鋅，鈷，錳等，結合 (即螯合) 而成為植酸鹽 (phytate) 而妨礙人體吸收金屬離子，以致會降低膳食礦物質 (dietary minerals) 的生物可利用率 (bioavailability) (27, 28)，而且當攝取高植酸含量的食品，易引起鐵質缺乏貧血症 (iron deficiency anemia) (29)；目前已有研究人員藉由基因轉殖技術培養出含有植酸酶(phytase) 的基因轉殖穀類植物，利用植酸酶分解植酸以製造出低植酸含量的食品，來改善並提升膳食礦物質的生物可利用率(30,31)。

因此植酸是屬於一種抗營養的物質，卻具有如上述擁有強烈的抗氧化作用以及抑制癌症的能力，可以保護人體的健康。

植酸除了上述的抗氧化和抑制癌症的功用以外，植酸亦有其他的生理機能。如植酸可處置自發性的尿鈣過多症(hypercalciuria)，以避免產生腎臟結石(kidney stones) (32)；同時它擁有降低血膽固醇的效應(hypocholesterolemic effect)，可供血脂過多症(hyperlipidemia)的治療應用(33, 34)。植酸經在體內代謝而完全脫磷酸化後，則產生肌醇(inositol)，肌醇本身亦擁有抗癌的效應，對於植酸的抗癌效果具有合作增效的作用(synergistic effect) (35)。

有文獻發現經植酸處理過的 breast cancer cells，可能藉由植酸降低 43% 的基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9) 活性來達到抑制這種癌細胞的黏附(adhesion)與轉移(migration)作用(40)。關於上述的金屬性酵素的活性抑制研究，作者或已證實、或推測均與植酸對於金屬離子的螯合作用有關。而與皮膚老化相關的基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 (MMP-2 and MMP-9)，亦是一種鋅離子依賴性的內切性胜肽酶(Zn^{2+} -dependent endopeptidase)，它們參與皮膚真皮層細胞外基質內的膠原蛋白的破壞而導致皮膚老化，因此本研究計劃將利用植酸(六磷酸肌醇)來處理纖維母細胞，以探討植酸對於基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 的活性表現，並分析這些纖維母細胞的生長情況，我們預期六磷酸肌醇藉由其螯合的能力可以抑制基質金屬蛋白酶的活性，進而使膠原蛋白的分解與破壞降低，並可作為

抗老化化妝品的有效成份。

二、材料與方法

1. 纖維母細胞的培養與處理：

人類皮膚纖維母細胞(human skin fibroblast)培養於含 10%胎牛血清(fetal calf serum, Hyclone)及 2.5%小牛血清(bovine calf serum, Hyclone)之 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培養基並加入 3.7% (w/v)的碳酸氫鈉, 0.03% (w/v)的麩氨酸(L-glutamine), 每毫升含 100 單位的 penicillin 及 100 毫克 streptomycin 等抗生素, 在 37 °C, 10% CO₂ 培養箱培養, 一般接種 1 x 10⁶ cells 於 75 cm² 之培養皿, 每三至四天進行繼代培養並換以新鮮培養基。取約第十代細胞進行不同濃度的六磷酸肌醇(pH 7.4)之處理實驗。

2. 基質金屬蛋白酶-2 與 -9 (MMP-2 and -9)的 zymography 分析：

收集有處理或無處理(控制組)六磷酸肌醇(pH 7.4)之纖維母細胞的胞外培養基, 收集的胞外培養基經 Centricon 10 (Millipore)的濃縮(約 100 倍濃縮), 其蛋白質濃度以 Bio-Rad protein determination assay kit 測量, 取約相同量(10 µg)的蛋白質, 於 10%的 Tris-Glycine gels (with 0.1% 膠原蛋白)進行 non-denaturing 的蛋白質電泳分析, 電泳完成後, 於室溫、緩和搖擺振盪的情形下, 電泳膠片以 2.5%的 Triton X-100 處理 30 分鐘以恢復蛋白質的活性, 電泳膠片再與 developing buffer (Bio-Rad) 於室溫下先反應 30 分鐘, 然後於 37 °C 下再反應至少 24 小時, 反應完成後, 電泳膠片以 0.1%的 Coomassie blue (in 9.2% acetic acid and 45.4% methanol) 於室溫下染色 20 分鐘, 然後以 9.2% acetic acid 與 45.4% methanol 清洗 10 分鐘, 重複 2 次, 最後以 10% acetic acid 與 10% methanol 清洗至基質金屬蛋白酶-2 與 -9 的蛋白質 bands 出現, 即完成分析步驟。

3. 纖維母細胞生長的分析：

細胞培養於含 10%胎牛血清及 2.5%小牛血清 DMEM 培養基，取約 5000 cells/well 分別加入於 96-well microtiter plate，再以不同濃度的六磷酸肌醇(pH 7.4) 處理細胞，於 37 培養 4 天，再加入 0.2% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 50 l/well)，於 37 再培養 4 天，產生 formazan，formazan 的製造量可作為細胞生存能力的指標，再利用 dimethyl sulfoxide 將 formazan 溶出，以 microplate reader 於 570 nm 的波長下讀出吸光值，代表細胞增生的情形。

三、結果與討論

在不危害纖維母細胞的情況下，根據 MTT 的細胞毒性分析(作用 72 小時，如圖一所示)，植酸對於纖維母細胞的作用濃度為 1.75 mM。所以本研究植酸應用於纖維母細胞的處理濃度均設定為 1.75 mM。

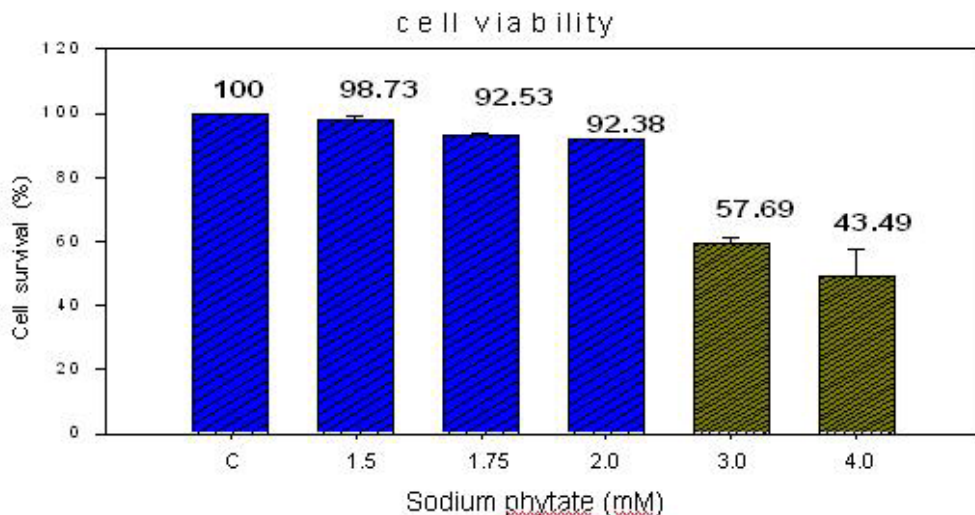


Fig.1 Effect of sodium phytate on 3T3 fibroblasts for 72 h by MTT assay

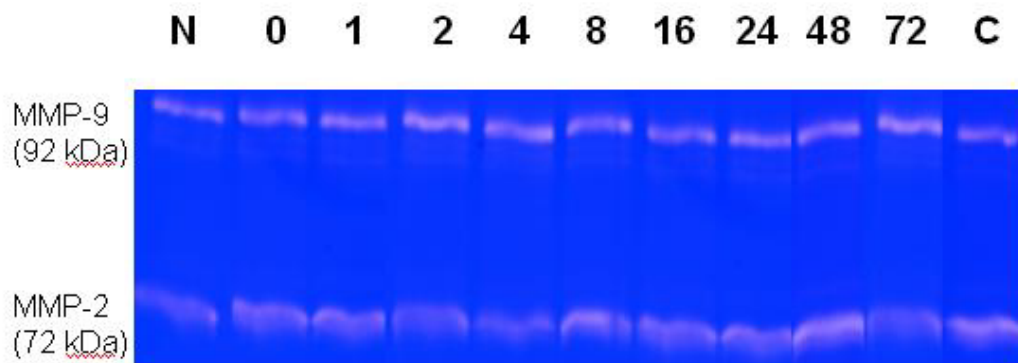


Fig. 2 Effects of sodium phytate (1.75 mM) on the activities of MMP-2 and MMP-9 in culture medium of 3T3 cells for 0~72 h by gelatin-based zymography. Lane (C) as control; N: without treatment.

另外，根據基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 (MMP-2 and MMP-9)的 zymography 分析之實驗資料(如圖二所示)，我們無法證明 sodium phytate(本實驗所利用的植酸試劑)可以對基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 有抑制的作用，也就是本研究實驗中 sodium phytate 無法利用其螯合的特性將基質金屬蛋白酶的 Zn^{2+} 螯合住，使得纖維母細胞所分泌的基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 失去活性，即使是在 sodium phytate 作用 72 小時之後。因此本研究進行至目前，無法獲得預期的結果—六磷酸肌醇藉由其螯合的能力可以抑制基質金屬蛋白酶的活性，進而使膠原蛋白的分解與破壞降低。可能必須修正本研究實驗所利用的植酸試劑，例如：calcium phytate, copper phytate, or barium phytate，因有研究文獻報導，植酸與 2 價銅離子的複合物可應用於抑制或降低金屬性酵素 (metalloenzymes)的活性，例如：phytate-Cu(II) complexes 與 carboxypeptidase A (一種 Zn^{2+} -containing metalloenzyme)於 pH 7.2 與 25 的條件下進行反應，可導

致 carboxypeptidase A 的活性減少 95%以上(37, 38, 39)。所以本研究將繼續應用其他的植酸相關試劑，例如：calcium phytate, copper phytate, or barium phytate，處理纖維母細胞，再利用基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 的 zymography 分析方法，研究探討是否 2 價離子與植酸的複合物可與基質金屬蛋白酶進行相互間的離子交換，藉由離子交換將基質金屬蛋白酶的 Zn^{2+} 置換成 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、或 Ba^{2+} ，以達到抑制基質金屬蛋白酶活性的目的。

四、參考文獻

1. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol. 138 (11): 1462-1470.
2. Jenkins G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. Mech Ageing Dev. 123 (7): 801-810.
3. Trautinger F. 2001. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. Clin Exp Dermatol. 26 (7): 573-577.
4. Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. J Photochem Photobiol B. 63 (1-3): 41-51.

5. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol.* 35 (3): 307-316.
6. Robert L. 2001. Extracellular matrix and aging: a review of mechanisms and interventions. *Cosmetics & Toiletries.* 116 (1): 61-70.
7. Kennedy C, Bastiaens MT, Bajdik CD, Willemze R, Westendorp RG, Bouwes Bavnick JN. 2003. Effect of smoking and sun on the aging skin. *J Invest Dermatol.* 120 (4): 548-554.
8. Yin L, Morita A, Tsuji T. 2001. Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 17 (4): 178-183.
9. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. 1997. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 6: 199-213.
10. Woessner JF Jr. 1998. The matrix metalloproteinase family, in *Matrix Metalloproteinases*, WC Parks and RP Mecham, eds, San Diego, California: Academic Press. pp 1-14.
11. Thibodeau A. 2000. Metalloproteinase inhibitors. *Cosmetics & Toiletries.* 115

(11): 75-82.

12. Varani J, Perone P, Fligiel SE, Fisher GJ, Voorhees JJ. 2002. Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J Invest Dermatol.* 119 (1): 122-129.
13. Kuroda K, Tsukifuji R, Shinkai H. 1998. Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 111 (6): 1023-1028.
14. Ohba S, Wang ZL, Baba TT, Nemoto TK, Inokuchi T. 2003. Antisense oligonucleotide against 47-kDa heat shock protein (Hsp47) inhibits wound-induced enhancement of collagen production. *Arch Oral Biol.* 48 (9): 627-633.
15. Wang JF, Olson ME, Winkfein RJ, Kulyk WM, Wright JB, Hart DA. 2002. Molecular and cell biology of porcine HSP47 during wound healing: complete cDNA sequence and regulation of gene expression. *Wound Repair Regen.* 10 (4): 230-240.
16. Lee DY, Schroeder J 3rd, Gordon DT. 1988. Enhancement of Cu bioavailability in the rat by phytic acid. *J Nutr.* 118 (6): 712-717.

17. Martin CJ, Evans WJ. 1986. Phytic acid-metal ion interactions. II. The effect of pH on Ca(II) binding. *J Inorg Biochem.* 27 (1): 17-30.
18. Raboy V. 2003. myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry.* 64 (6): 1033-1043.
19. Graf E, Eaton JW. 1990. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic Biol Med.* 8 (1): 61-69.
20. Graf E, Empson KL, Eaton JW. 1987. Phytic acid. A natural antioxidant. *J Biol Chem.* 262 (24): 11647-11650.
21. Fox CH, Eberl M. 2002. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. *Complement Ther Med.* 10 (4): 229-234.
22. Zhou JR, Erdman JW Jr. 1995. Phytic acid in health and disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 35 (6): 495-508.
23. Graf E, Eaton JW. 1993. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr Cancer.* 19 (1): 11-19.
24. Nielsen BK, Thompson LU, Bird RP. 1987. Effect of phytic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Cancer Lett.* 37 (3): 317-325.

25. Shamsuddin AM, Yang GY, Vucenik I. 1996. Novel anti-cancer functions of IP6: growth inhibition and differentiation of human mammary cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res.* 16 (6A): 3287-3292.
26. Shamsuddin AM, Vucenik I. 1999. Mammary tumor inhibition by IP6: a review. *Anticancer Res.* 19 (5A): 3671-3674.
27. Hurrell RF. 2002. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. *Complement Ther Med.* 10 (4): 229-234.
28. Sandberg AS. 2002. Bioavailability of minerals in legumes. *Br J Nutr.* 88 Suppl 3: S281-S285.
29. Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. 2002. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J Am Coll Nutr.* 21 (3 Suppl): 184S-190S.
30. Holm PB, Kristiansen KN, Pedersen HB. 2002. Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. *J Nutr.* 132 (3): 514S-516S.
31. Davidsson L. 2003. Approaches to improve iron bioavailability from complementary foods. *J Nutr.* 133 (5 Suppl 1): 1560S-1562S.

32. Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M, Morimoto S, Miyazaki Y, Yasukawa S. 1984. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental and clinical studies. *J Urol.* 132 (6): 1140-1145.
33. Jariwalla RJ. 1999. Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. *Anticancer Res.* 19 (5A): 3699-3702.
34. Potter SM. 1995. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr.* 125 (3 Suppl): 606S-611S.
35. Vucenik I, Shamsuddin AM. 2003. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J Nutr.* 133 (11 Suppl 1): 3778S-3784S.
36. Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE. 1997. IP6: a novel anti-cancer agent. *Life Sci.* 61 (4): 343-354.
37. Martin CJ, Evans WJ. 1989. Phytic acid-enhanced metal ion exchange reactions: the effect on carboxypeptidase A. *J Inorg Biochem.* 35 (4): 267-288.
38. Friedman M, Grosjean OK, Zahnley JC. 1986. Inactivation of metalloenzymes by food constituents. *Food Chem Toxicol.* 24 (9): 897-902.

39. Friedman M, Grosjean OK, Zahnley JC. 1986. Inactivation of metalloenzymes by lysinoalanine, phenylethylaminoalanine, alkali-treated food proteins, and sulfur amino acids. *Adv Exp Med Biol.* 199: 531-560.
40. Tantivejkul K, Vucenik I, Shamsuddin AM. 2003. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits key events of cancer metastasis: I. In vitro studies of adhesion, migration and invasion of MDA-MB 231 human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 23 (5A): 3671-3679.

