

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

甘草對細胞增殖與修復作用之探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNCS-91-05

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

計畫主持人：林清宮

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 92 年 2 月 27 日

甘草對細胞增殖與修復作用之探討

摘要

紫外線對皮膚會造成許多嚴重的傷害，包括皮膚紅腫、曬傷、色素沉積、老化、失去彈性及產生皺紋等，甚至會造成皮膚免疫系統受損及增加皮膚癌發生機率。本計畫目的探討甘草對紫外線引起細胞的傷害之修復作用探討。方法以紫外線照射B16 melanoma 細胞，計算細胞死亡數目評估其傷害程度，再以不同濃度之甘草萃取液添加後觀察細胞之變化。結果顯示UVB對 B16 會引起細胞死亡現象，如外加甘草萃取液可避免UVB引起之死亡達70%。

二、緣由與目的

紫外線依波長長短分為紫外線 A (UVA ,400~320 nm), 紫外線 B (UVB, 320~280 nm), 紫外線 C (UVC, 280 或 290~230 nm)，其中 UVB 會引起皮膚曬傷紅腫，所謂的防曬係數即是指防曬用品延長皮膚曬傷的能力，因此一般的防曬係數只考量對 UVB 的隔離效果；最近有關 UVA 的防護也愈來愈受到重視，理由是 UVA 可穿透皮膚真皮層而造成皮膚變黑、老化、失去彈性以及容易產生皺紋等問題。

紫外線會造成皮膚出現 Sun burn cells，最近 Baba 等人(1996)的研究發現這些可能屬於計畫性死亡細胞，因為這些經紫外線照射的細胞會出現 DNA ladders 現象。

三、材料與方法：

細胞培養：

B16 melanoma 細胞株購自新竹食品工業研究所，編號 CCRC60030,細胞解凍後以 DMEM(含 10 % FCS, penicillin and streptomycin, non essential amino acids)培養於 37 °C, 5 % CO₂ 之培養箱中。每隔 3-4 天繼代一次。

紫外線照射：

細胞於照射前一天繼代培養於 6 孔培養盤中(約八分滿)，隔天將待測防曬劑以 2 mg/cm₂ 均勻塗抹在 6 孔培養盤之蓋子上，於細胞上方約 5cm 處以 UV 光源 (Handisol, USA)包括 UVA 及 UVB 兩種波段照射，未照射部位以錫箔紙覆蓋，而紫外線照射強度以紫外線偵測儀(Solar co., USA)測定之。

細胞計畫性死亡：

細胞計畫性死亡以TUNEL (TdT- mediated dUTP-florescein nick end labeling)方法測定，此方法是一種in situ apoptosis檢測試劑組(BM公司)，其敏感度比傳統的apoptosis檢測法 (如DNA ladder)敏感，並且再現性高、操作簡單，此方法可參考本實驗室之論文(Lin et al., 1996)。簡述之，將細胞以paraformaldehyde固定30分鐘後，再以0.1 % Triton X-100將細胞膜打洞，然後以Terminal deoxynucleotidyl transferase將含有螢光物質之 dUTP 接在有DNA斷裂位置，使apoptotic細胞發出螢光，然後利用螢光顯微鏡觀察及計算之。此方法是利用酵素將細胞內的斷裂DNA加上florescein，再利用alkaline phosphatase conjugated anti-florescein抗體反應

後，以alkaline phosphatase受質進行呈色反應，最後以倒立顯微鏡觀察apoptotic cells。

四、結果與討論：

為了探討防曬劑對細胞照射紫外線的保護效果，本計畫在 B16 melanoma 細胞培養盤上添加甘草萃取液，利用 UVB 紫外燈分別照射 5, 10, 15, 20, 25 分鐘，經過 16 小時後以觀察細胞之死亡率，結果發現為塗抹防曬劑之細胞在紫外線照射 5 分鐘後細胞開始死亡，照射 15 分鐘後，死亡率接近 100 %，而培養盤添加甘草萃取液，照射 15 分鐘後，細胞只有部分死亡，顯示添加甘草萃取液對 UVB 引起的細胞死亡具有保護能力。

在觀察細胞死亡過程中，我們發現紫外線照射的細胞與正常細胞的形態有很明顯的差別，在高倍顯微鏡底下呈現細胞膜鼓起的構造，此現象類似 apoptosis，為了證實此點，我們以 TUNEL 方法，進行細胞核內斷裂 DNA 之染色，結果發現經過紫外線照射的細胞有較多的 apoptotic 細胞，如果塗抹具保護力的防曬劑則 apoptotic 細胞明顯減少。這些結果可得知添加甘草萃取液對細胞具有保護效果。

五、參考文獻：

- Baba, T., Hanada, K. and Hashimoto, I. 1996. The study of ultraviolet B-induced apoptosis in cultured mouse keratinocytes and in mouse skin. *J Dermatol Sci.* **12**, 18-23.
- Chatterjee, M. L. Agarwal R. Mukhtar H. 1996. Ultraviolet B radiation-induced DNA lesions in mouse epidermis: an assessment using a novel ³²P-postlabelling technique. *Biochemical & Biophysical Research Communications.*

229(2):590-595.

- Imokawa, G., Yada, Y. and Kimura, M. 1996. Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem J.* **314**, 305-312.
- Potten, C. S., Chadwick, C. A., Cohen, A. J., Nikaido, O., Matsunaga, T., Schipper, N. W., Young, A. R. 1993. DNA damage in UV-irradiated human skin in vivo: automated direct measurement by image analysis (thymine dimers) compared with indirect measurement (unscheduled DNA synthesis) and protection by 5-methoxypsoralen. *International Journal of Radiation Biology.* **63**, 313-324.
- Lin, C.-G., Kao, Y.-T., Liu, W.-T., Huang, H.-H., Chen, K.-C. and Lin, H.-C. 1996. Cytotoxic effects of *Bacillus anthracis* lethal toxin on macrophage-like cell line. *Current Microbiology* **33**, 224-227.
- Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabni, W., Ortonne, J. P., Ballotti, R. 1996. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem.* **271**, 28052-28056.
- Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Clement, M., Ortonne, J. P., Ballotti, R. 1997. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest.* **99**, 635-642.
- Sayre, R. M., Poh Agin, P., LeVee, G. J. and Marlowe, E. 1979. A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulae. *Photochem. Photobiol.* **29**, 559-566.
- Sayre, R. M. and Agin, P. P. 1984. Comparison of human protection factors to predicted factors using different lamp spectra. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **35**, 439-445.
- Stockdale, M. 1987. A novel proposal for the assessment of sunscreen product efficacy against UVA. *International Journal of Cosmetic Science.* **9**, 85-98.
- Taylor, J. T. 1990. DNA, sunlight and skin cancer. *J. Chem. Educ.* **67**, 835-841.
- Walker, S. L. and Young, A. R. 1997. Sunscreens offer the same UVB protection factors for inflammation and immunosuppression in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology.* **108**, 133-138.