

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9624

計畫名稱：胜肽應用於化妝保養品之研究

執行期間：96年1月1日至96年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：呂敏勇

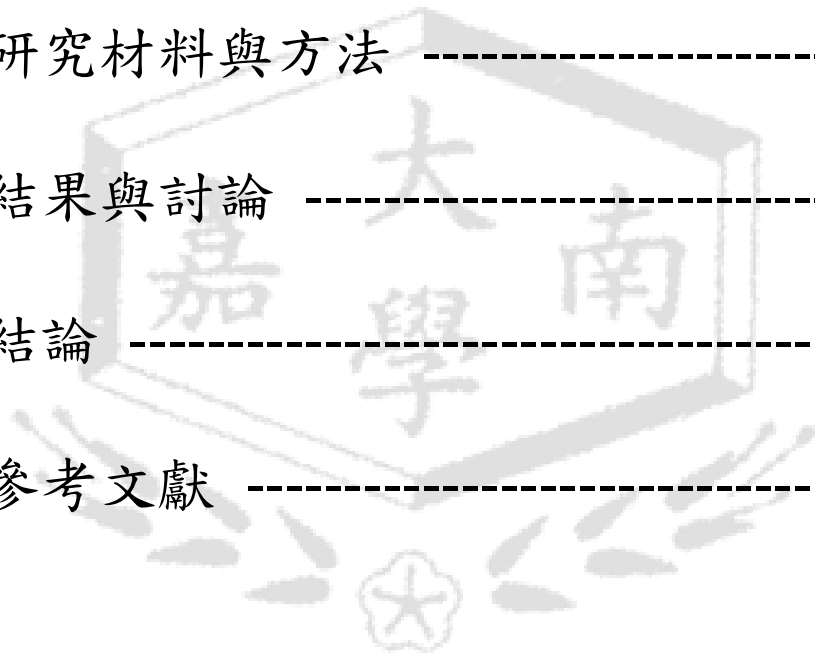
子計畫主持人：



中華民國 97 年 03 月 28 日

目 錄

一、研究摘要	-----	2
二、簡介	-----	3
三、研究材料與方法	-----	6
四、結果與討論	-----	11
五、結論	-----	19
六、參考文獻	-----	20



一、研究摘要

本研究探討魚鱗膠原蛋白胜肽對老鼠3T3纖維母細胞的影響。分析方法包括膠原蛋白生成量的改變、基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)酵素活性及酵素分泌量、體外動物細胞存活率及抗氧化作用。實驗結果顯示魚鱗膠原蛋白胜肽以 30 mg/ml 的劑量，處理纖維母細胞 24 小時，與控制組相較之下，膠原蛋白的累積量可增加 162%；魚鱗膠原蛋白胜肽並不會抑制 MMPs 的活性及酵素分泌；另外，發現在 20 mg/ml 的濃度下，具有 46.29% 的 DPPH 清除率，相當於 0.06 mg/ml Vit.C 的抗氧化作用。因此推論，魚鱗膠原蛋白胜肽具有顯著促進膠原蛋白增生的作用及明顯的抗氧化能力，可開發為抗老化化妝品的有效成份。

二、簡介

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螯合蛋白酶 (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胜肽酶(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 III 與 type V 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。

根據文獻報導的研究結果顯示，小分子胜肽具有許多生理活性，例如：抗菌(anti-microbial)、抗褐化(anti-browning)、抗氧化(anti-oxidation)、抗老化(anti-aging)及抗皺(anti-wrinkling)等功能。目前市場上許多小分子胜肽(包括三胜肽、六胜肽、九胜肽、十五胜肽)已應用於化粧品，但缺乏研究數據佐證其功效。而且至今並無文獻研究證明來自膠原蛋白的小分子胜肽具有增強真皮層纖維母細胞合成 type I 膠原蛋白 mRNA 及蛋白質量以及抑制 MMPs 活性的生理功能。另外，將類膠原蛋白的六胜肽(collagen-like hexapeptide)調製成化粧品使用於 40~62 歲的皮膚，具有明顯抗皺的作用；而且利用類膠原蛋白的六胜肽處理人類皮膚，可以增加皮膚真皮層內第一型膠原蛋白、第三型膠原蛋白、第四型膠原蛋白、第五型 laminin、 $\beta 1$ integrin 等的細胞外基質(extracellular matrix)的含量。因此，類膠原蛋白的六胜肽可應用於抗老化及對抗光老化的化妝保養品(13, 14)。本計劃將研究來自膠原蛋白的小分子胜肽對於纖維母細胞的影響。

三、研究材料與方法

1. 纖維母細胞的培養與處理：

老鼠 3T3 纖維母細胞(mouse 3T3 fibroblasts)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小分子膠原蛋白胜肽之處理實驗。

2. 纖維母細胞生長的分析(MTT assay)：

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，再以不同濃度的小分子膠原蛋白胜肽處理細胞，於 37°C 培養 4 天，再加入 0.2% 的 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 50 µl/well)，於 37°C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，代表細胞生長的情形。

3. 訊息 RNA (messenger RNA) 之萃取：

將培養的纖維母細胞加入含有 4 M Guanidine isothiocyanate，10 mM Na₂EDTA，50 mM Tris-HCl (pH 7.5)，和 8% β-mercaptoethanol 的裂解緩衝液 (lysis buffer) 中均質化，以 11,000x g 離心 (Sorvall RC 5C, SS-34 roter) 15 分鐘，去除不溶的物質，總 RNA (total RNA) 以 4 M LiCl 在 4 °C 下過夜沈澱下來，經過 3 M LiCl 清洗後，最後的 RNA 沈澱再以 RNA 可溶緩衝液 (0.1% SDS，10 mM Tris-HCl，pH 7.5，1 mM Na₂EDTA) 回溶，回溶的 RNA 以 phenol 和 chloroform 各萃取一次，最後用 isopropanol 沈澱 RNA。接著將 poly(A)⁺ RNA 以 oligo(dT)-cellulose 管柱 (Gibco BRL) 層析分離下來。

4. 逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)：

將上述步驟所獲得的訊息 RNA，於混合試劑中含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、20 mM DTT、500 μM dNTPs、0.1 μg/μl BSA、10 ng/μl primer、1 U/μl

RNase inhibitor、2.5 U/ μ l MMLV 逆轉錄酶，經由 MMLV 逆轉錄酶合成第一股 cDNA，將合成之第一股 cDNA 直接當作模版(templates)，進行聚合酶連鎖反應(PCR)快速複製目標基因之 DNA 片段，此聚合酶連鎖反應的混合試劑中含有 1X reaction buffer、合成之第一股 cDNA、5 μ M 5'- & 3'-primers、200 μ M dNTPs、2.5 U Taq DNA polymerase (Promega)；其反應的條件為 94°C 5 min, 1 cycle、94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2 min, 25 cycles、94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 20min, 1 cycle，經聚合酶連鎖反應放大之 DNA 片段以 1.5% agarose gel 進行電泳分析，於紫外燈下觀察並拍照電泳的實驗結果。

5. 基質金屬蛋白酶(MMPs)的 zymography 分析：

收集有處理或無處理(控制組)小分子膠原蛋白胜肽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 μ g)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的蛋白質 bands 出現，即完成活性分析步驟。

6. 膠原蛋白增生測定：

將魚鱗膠原蛋白胜肽處理 3T3 老鼠胚胎纖維母細胞的細胞培養液，分別於反應 0、2、4、8、12、24 小時後吸取，並利用膠原蛋白濃度分析套組 (The Sircol collagen assay kit) 分析，分析細胞培養液內膠原蛋白含量的情形。

7. 抗氧化能力測定：

自由基是一種不成對電子，會搶奪其他分子的電子使其氧化，大多數自由基都是不穩定的活潑中間體，很容易發生化學反應。只有極少數自由基是穩定的，如：二苯基苦基肼 (DPPH)，因此常被使用來評估抗氧化物的供氫能力。抗氧化力評估，實驗上所採用的 DPPH 甲醇溶液為紫色，在 517 nm 下有強的吸光值，若與被氧化物結合，將會降低吸光值，由此藉以判斷清除 DPPH 自由基的能力，其吸光值愈低，表

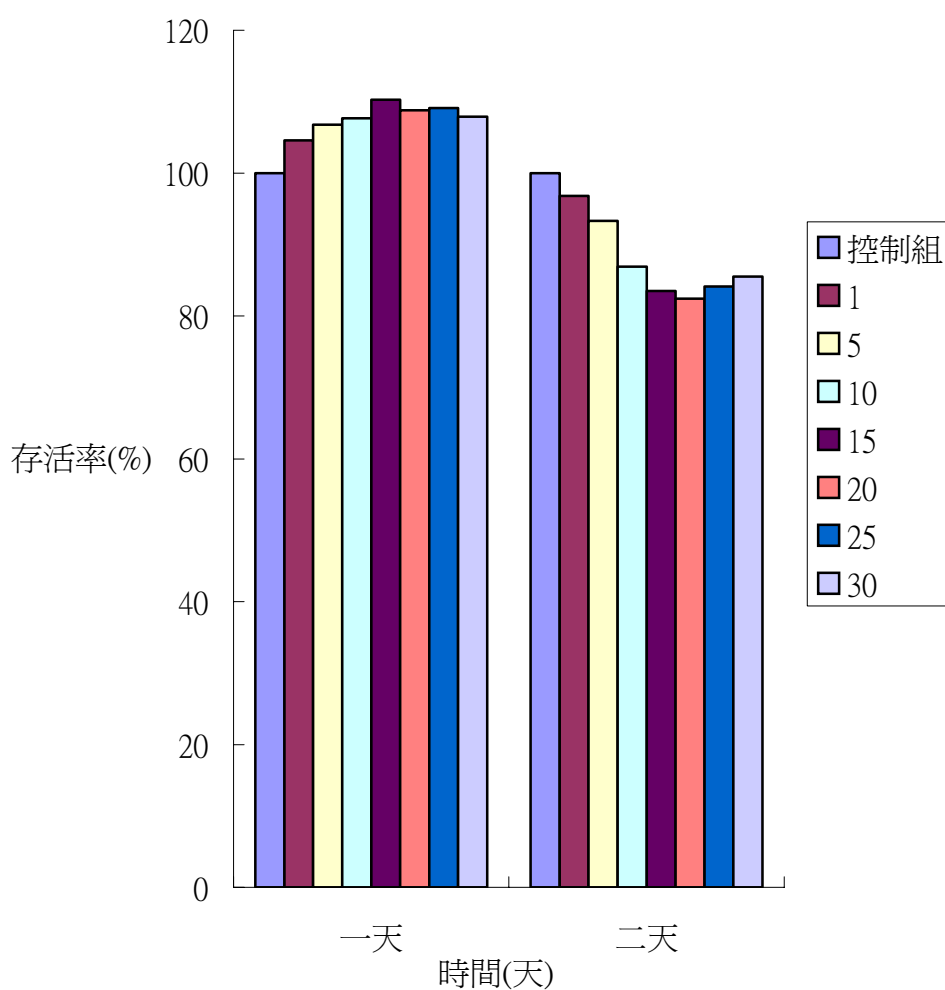
示抗氧化的能力愈強。參考 2006 年 Rout 等人(15)之實驗方法
進行試驗，並作微修改。



四、結果與討論

1. 細胞存活率試驗

對於虱目魚魚鱗膠原蛋白胜肽，我們選取的樣品濃度範圍介於 1~30 mg/ml，處理細胞 48 小時後，進行 MTT 細胞毒性測試分析，由圖一之實驗結果顯示虱目魚魚鱗膠原蛋白胜肽於 30 mg/ml 的劑量以內，處理細胞 48 小時，不會造成 3T3 細胞產生細胞毒性。



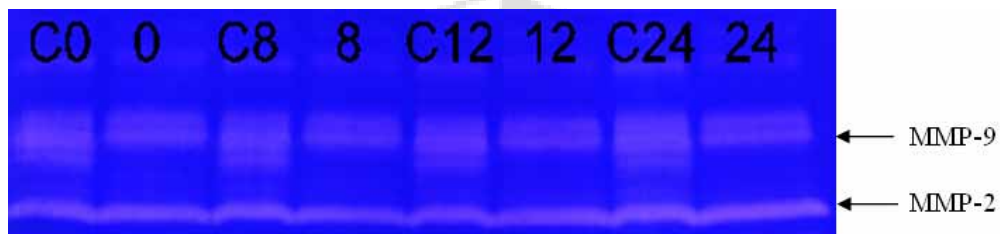
圖一、以 1~30 mg/ml 魚鱗膠原蛋白胜肽處理 3T3 纖維母細胞的 MTT assay

2. 皮膚抗老化效果評估

(一) 基質金屬蛋白酶(MMPs)活性抑制分析

以 30 mg/ml 的魚鱗膠原蛋白，反應 0~24 小時，再進行基質金屬蛋白酶的酵素活性分析，以偵測是否會抑制基質金屬蛋白酶的酵素活性，由圖二的實驗結果顯示，以 30 mg/ml 的魚鱗膠原蛋白處理細胞培養液 24 小時，我們發現對於細胞培養液內所含 MMP-2 及 MMP-9 的活性無明顯抑制的作用。另外，我們同樣以 30 mg/ml 的魚鱗膠原蛋白胜肽處理 3T3 纖維母細胞，反應 0~24 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的分泌分析，由圖三的實驗結果顯示，以 30 mg/ml 的魚鱗膠原蛋白處理 3T3 纖維母細胞 48 小時，與控制組(C₂₄)作比較，發現細胞培養液內所含 MMP-2 及 MMP-9 的活性並沒有減少，也就是沒有明顯抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9。因此，由以上的實驗資料(圖二、圖三)，認為 30 mg/ml 的魚鱗膠原蛋白不能直接抑制細胞培養液所含 MMP-2 及 MMP-9 的活性。而在 30 mg/ml 的魚鱗膠原蛋白在處理 3T3 纖維母細胞 24 小時後，與控制組(C₂₄)作比較，發現

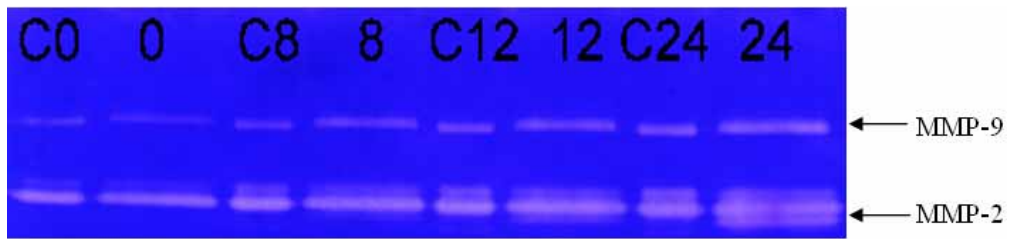
細胞培養液內所含MMP-2及MMP-9的活性並沒有減少。因此，我們可以推測30 mg/ml的魚鱗膠原蛋白並不會抑制3T3纖維母細胞分泌MMPs。



圖二、30 mg/ml 魚鱗膠原蛋白胜肽處理細胞培養液 24 小時之 MMPs 活性分析。

C0 代表未加入魚鱗膠原蛋白胜肽於 3T3 細胞培養液，放置 0 小時

C24 代表未加入魚鱗膠原蛋白胜肽於 3T3 細胞培養液，放置 24 小時



圖三、30 mg/ml 魚鱗膠原蛋白胜肽處理 3T3 纖維母細胞，反應 0~24

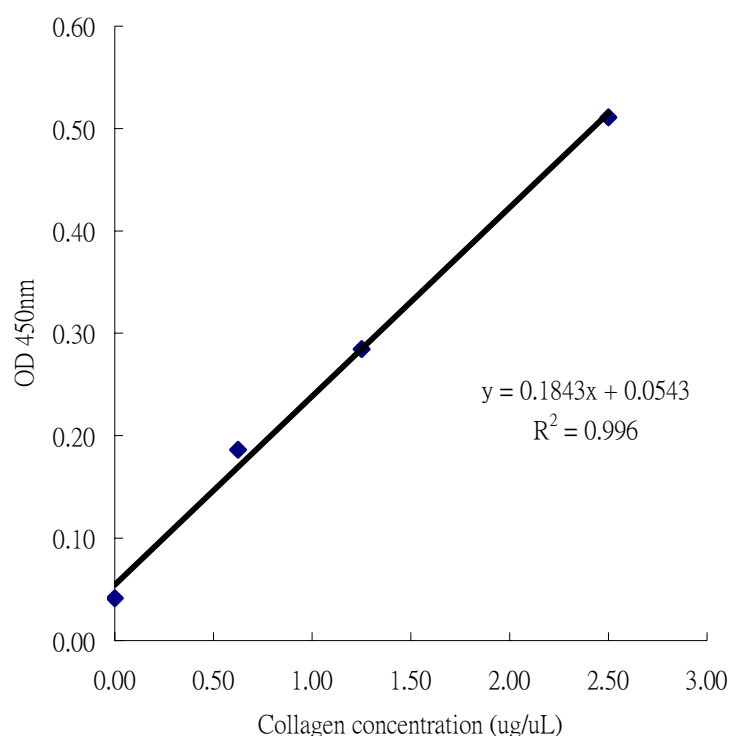
小時，對於 MMPs 的分泌分析。

C0 代表未加入魚鱗膠原蛋白胜肽於 3T3 細胞培養液，放置 0 小時。

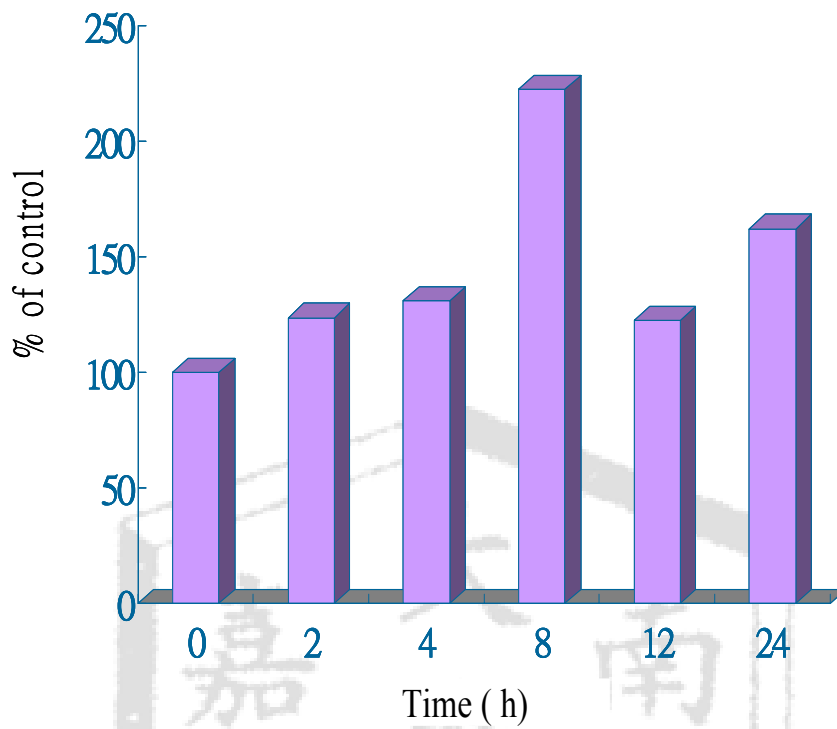
C24 代表未加入魚鱗膠原蛋白胜肽於 3T3 細胞培養液，放置 24 小時。

(二) 膠原蛋白增生的測定

以 The Sircol™ collagen assay kit 分析細胞培養液內第一型(type I)膠原蛋白的含量，會受到血清或其他物質影響，因此需製作標準品的檢量線（圖四），將未知樣品吸光值帶入公式計算，求得膠原蛋白含量。於是將魚鱗膠原蛋白胜肽處理 3T3 纖維母細胞，分別反應 0~24 小時後，檢測細胞培養液內膠原蛋白含量的情形。實驗結果（圖五）發現膠原蛋白含量明顯較控制組高，具有促進膠原蛋白增生效果。



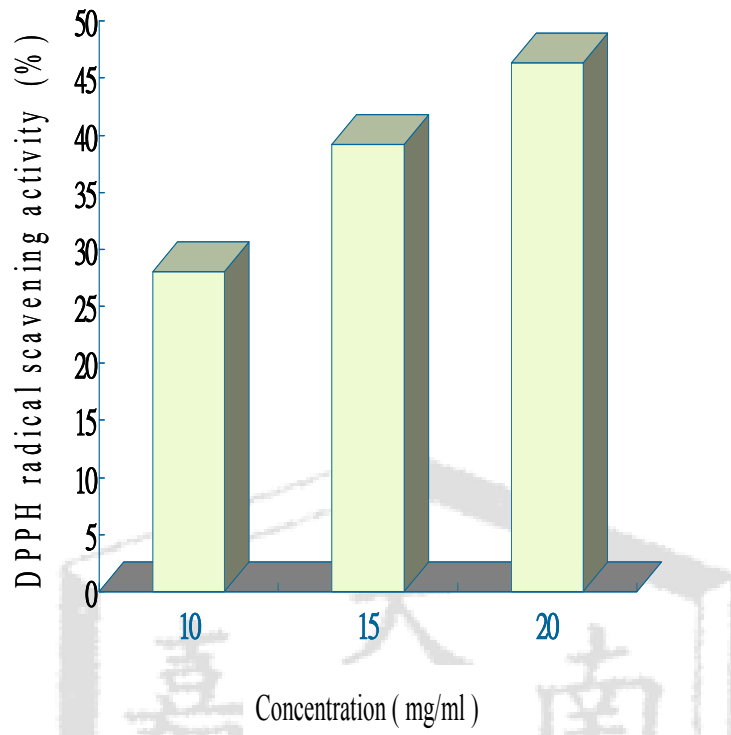
圖四、膠原蛋白標準品之檢量線。



圖五、30 mg/ml 的魚鱗膠原蛋白胜肽處理 3T3 纖維母細胞，
反應 0~24 小時，培養基內膠原蛋白之含量變化。

(三) 抗氧化能力測定

脂質氧化過程中會有自由基的形成，因而引發連鎖反應，加速脂質本身的氧化。由抗氧化劑與 DPPH 自由基的反應式($\text{DPPH}\cdot + \text{AH} (\text{抗氧化劑}) \rightarrow \text{DPPH} + \text{HA}\cdot$)，可知抗氧化劑在清除 DPPH 時會提供氫給 DPPH 自由基。文獻中指出維生素 C 會提供氫原子給過氧化自由基以中斷脂質自氧化連鎖反應，因此除去自由基便能達到抗氧化的效果。而魚鱗膠原蛋白胜肽方面，由圖六的實驗結果顯示，在 20 mg/ml，具有 46.29% 的清除率，清除率相當於 0.06 mg/ml 的 Vit.C。由上述的結果發現魚鱗膠原蛋白胜肽均具有明顯的抗氧化能力。



圖六、魚鱗膠原蛋白胜肽之抗氧化效果。

五、結論

1. 細胞存活率分析：魚鱗膠原蛋白胜肽處理 3T3 纖維母細胞的安全劑量為 30 mg/ml 以內。
2. MMPs 活性及分泌抑制分析：魚鱗膠原蛋白胜肽不能直接抑制細胞培養液所含 MMP-2 及 MMP-9 的活性；在處理 3T3 纖維母細胞 72 小時內，並不會抑制 3T3 纖維母細胞的 MMPs 酵素分泌。
3. 魚鱗膠原蛋白胜肽以 30 mg/ml 的劑量，處理纖維母細胞 24 小時，與控制組相較之下，膠原蛋白的累積量可增加 162%
4. 在抗氧化效果方面，魚鱗膠原蛋白胜肽濃度為 20 mg/ml 時，具有 46.29% 的清除率。

六、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 Bavinck 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. Perrin A, Bauza E, Dal Farra C, Domloge N. 2004. Stimulating effect of collagen-like peptide on the extracellular matrix of human skin: histological studies. *Int J Tissue React.* 2004;26(3-4):97-104.
 14. Bauza E, Oberto G, Berghi A, Dal CF, Domloge N. 2004. Collagen-like peptide exhibits a remarkable antiwrinkle effect on

the skin when topically applied: in vivo study. *Int J Tissue React.* 2004;26(3-4):105-11.

15. Rout, S., Banerjee, R. (2006). Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind of *punica grannatum*. *Bioresource Technology.*

