

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※

※

※

※

新防曬係數的研發-生物技術的應用

※

※

※

※

※

※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

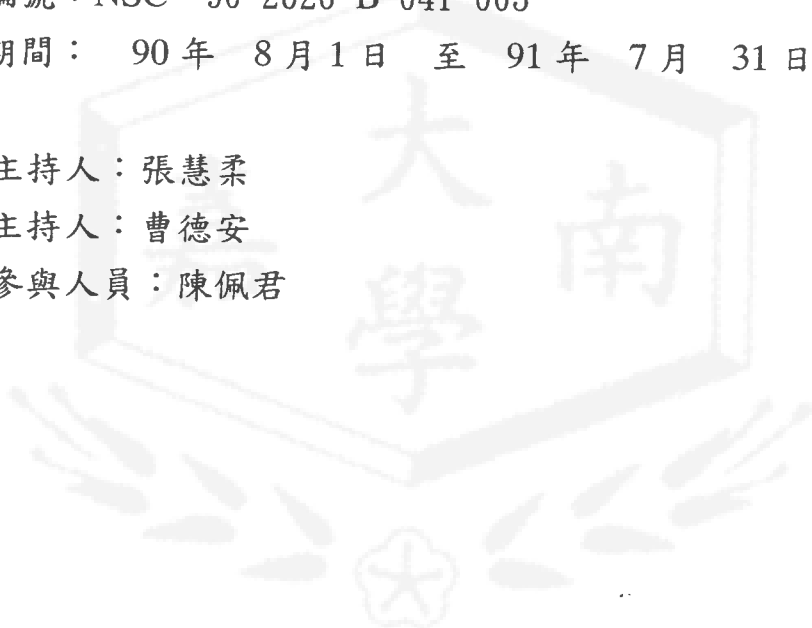
計畫編號：NSC 90-2626-B-041-003

執行期間：90年 8月1日 至 91年 7月 31日

計畫主持人：張慧柔

共同主持人：曹德安

計畫參與人員：陳佩君



本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理科技大學 化粧品應用與管理系

中華民國 91年 10月 18日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

新防曬係數的研發-生物技術的應用

計畫編號：NSC 90-2626-B-041-003

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：張慧柔 嘉南藥理科技大學化粧品應用與管理系

共同主持人：曹德安 輔英科技大學醫學技術系

一、中文摘要

紫外線長期之照射會對皮膚有相當嚴重的傷害，在紫外線的三個波段(UVA, UVB, UVC)中，又以UVB的影響最為嚴重。為了避免紫外線的傷害，一般人都是以撐傘或戴帽子來防止，除了這兩種方法外，使用防曬劑來避免紫外線的照射是最好的方法了。目前市面上所販賣的防曬化粧品相當多，有的有標示防曬係數(SPF)，有的則沒有標示，並且都標榜其有實際的防曬功能。防曬化粧品是一種保護性的化粧品，絕對不同於一般的化粧品，所以如何來判定防曬化粧品的防曬功能就顯的相當的重要。對於防曬化粧品隔絕紫外線效果的評估方法中，在國內、外都是以防曬係數(SPF)做為一個評估的準則，由於要排除以人做為測試對象的危險性，所以目前防曬係數的評估方法相當混亂，因此，為了瞭解防曬化粧品是否真的可以防止紫外線的傷害，本研究將制定一套真正可以探測出防曬化粧品的防曬效果的方法，有別於SPF只做皮膚表面紅斑點的觀察，另外也會使用一種傳統的測定防曬係數法(天竺鼠測定法)，與本研究所研發的方法做比較。角質細胞被証實含有NO-synthase，並且會產生NO。UVB照射人類皮膚，會刺激角質細胞的NO-synthase的作用，於是造成紅斑的產生和發炎反應。因此經由評估角質細胞的NO-synthase的作用及NO的產生，是更直接評估皮膚受傷害的情形的方式。所以本研究主要目的，是要使用生物技術方式的測定(NO的產生，

NO-synthase的作用，及NO-synthase基因表現)重新評估防曬化粧品的防曬功能，並訂定一套評估防曬化粧品的防曬功能的指標。

關鍵詞：紫外線，防曬化粧品，一氧化氮，一氧化氮合成酶

Abstract

Chronic UV irradiation profoundly damages the skin of human and animal. These alterations were thought to be irreversible. UVB radiation (280-315 nm) can cause erythema, skin cancer, and dermal connective tissue damage. For protecting the skin against sun exposure, it is necessary for everyone to use sunscreens. Hence, the ability of sunscreen to protect ultraviolet damage to the skin is very important for consumers. At present, the assessment of sun protection factor (SPF) is very confused. For assessing the ability of sunscreen to protect ultraviolet damage to the skin, we want to set up a new model of SPF. The keratinocytes contain NO-synthase and produce NO. UVB irradiated human skin to stimulate the response of NO-synthase and the production NO in keratinocytes. Consequently, the erythema and inflammation was occurred. For this reason, the production of NO and the action of NO-synthase in

keratinocytes was estimated, it is a more direct way to assess the condition of damaged skin. The purpose of study is to use the biotechnology to anew estimate the function of sunscreens and to formulate a new index to assess the function of sun protection of sunscreens

Keywords: UV, NO, NO-synthase, SPF

二、緣由與目的

陽光是一種含有多種波長電磁波的輻射線，包含有紫外線、可見光和紅外線，其中以紫外線對人體具有明顯的傷害。目前針對紫外線對人體作用的波段範圍分為 UVA (320~400 nm)，UVB (280~320 nm) 及 UVC (190~280 nm)，其中波長最短的 UVC，到達太空的大氣層就吸收掉，因此大部分都不能到達地面，中波長波段的 UVB 是最容易對生物造成傷害的紫外線，而波長最長的 UVA，雖到達地面的量最多，且會透過到達人體組織深部，但其毒性卻比 UVB 來得少。

過多的紫外線照射對皮膚有害，UVA 會造成真皮層的纖維變性，因而無法保持皮膚的張力和彈性，並且與深層皺紋和光過敏的產生有密切的關係。UVB 會造成表皮細胞新陳代謝的紛亂和變性，使其不能保持水分，皮膚會變的乾燥和粗糙，並且與淺層皺紋和皮膚癌的產生有非常密切的關係。此外 UVA，UVB 皆會使黑色素母細胞產生大量黑色素，使皮膚變黑。因此進入皮膚之紫外線波段不同，對皮膚組織所產生之影響也有不同。

皮膚為人類最外部之屏障，因此與陽光中的紫外線接觸的機會最多，尤其是高度工業及某些物質（如海龍等）過分利用的結果，造成大氣層中的臭氧層逐漸稀薄，無形中增加了人體的紫外線曝露量，因而易造成皮膚之傷害，所以防止

紫外線之直接照射的使用產品，便顯的格外的重要。

目前防止紫外線的常用產品是防曬化粧品。防曬化粧品可以隔絕紫外線並將它對皮膚的不良影響降至最低，目前含有以下三類：(1) 日曬化粧品 (Sun tan cosmetics) (2) 防曬化粧品 (Sun screen cosmetics) (3) 日曬後保養化粧品 (After screen cosmetics)。

由於近年來紫外線所導致的皮膚傷害日趨嚴重，尤其是皮膚癌的形成更是令人擔心，因此防曬產品對於紫外線隔絕之效果就顯的相當重要。所以防曬產品對紫外線隔絕效果之評估，實在是當務之急。

目前對於紫外線隔絕效果之評估法有六種：(1) 防曬係數 SPF (Sun Protection Factor) 之測定 (2) 稀釋穿透率法 (3) 石英板薄膜法 (4) 剝離表皮穿透法 (5) 天竺鼠法 (6) Solatex 法。其中防曬係數 SPF 之測定，是以人體為檢測對象，為現今各國根據 UVB 所引發的皮膚反應來評估防曬劑之阻隔效果之一項精密指標，但因為人體研究對象之取得不易，所以此法有其困難之處。另外天竺鼠法之應用是最接近防曬係數 SPF 之測定之法，但因天竺鼠必需經過剔毛，而且不易判斷紅斑點的出現，更不容易知道防曬化粧品防曬的效果。其他的方法，則是完全不是在活細胞上進行，其對防曬化粧品防曬的效果評估，更是令人置疑。目前雖然防曬之測定方法有好幾種，但是沒有一種能夠真正解釋及判定防曬化粧品對皮膚保護性的真正能力，因此，在本計劃的研究中希望利用生物技術方式，有效的評估防曬化粧品對皮膚受紫外線照射後的防護效果，以取代先前防曬化粧品之防曬的評估都只限於表面的觀察。本研究更是要研發出一套真正可評估防曬化粧品是否對皮膚具有真正保護效果的防曬指數。

NO (nitric oxide) 目前被研究指出是一

種自由基也是一種訊號分子，它有許多重要的生理功能，包括調節局部血流，當一個神經傳遞物質 (neurotransmitter)，抗微生物和抗腫瘤的活性 (Knowles and Moncada, 1994; Kroncke et al, 1995; Moncada et al., 1991)。NO 的產生是經由 NO-synthase 對 arginine 的作用，但要經過需氧的反應 (包括：NADPH, flavin mononucleotide, flavin adenine dinucleotide, calmodulin and tetrahydrobiopterin 的參與)。角質細胞被證實含有 NO-synthase 並且會產生 NO (Knowles and Moncada, 1994; Kroncke et al., 1995;); 有研究更加指出，UVB 照射人類皮膚，會刺激角質細胞的 NO-synthase 的作用，於是造成紅斑的產生和發炎反應 (Deliconstantinos et al., 1996)。因此經由評估角質細胞的 NO-synthase 的作用及 NO 的產生，是更直接評估皮膚受傷害情形的方式。所以本研究主要目的，是要使用生物技術方式 (測定 NO 的產生，NO-synthase 的作用，及 NO-synthase 的基因表現) 重新評估防曬化粧品的防曬功能，並制定一套新的防曬化粧品的防曬指數。

三、結果與討論

由 UVB 不同劑量照射後，測定角質細胞產生的 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現。由於 UVB 劑量在 50 mJ cm^{-2} 角質細胞產生 apoptosis，因此在研究中 UVB 照射劑量採用 50 mJ cm^{-2} 以下劑量。經過測試後取得五個不同 UVB 劑量來作為評估劑量 (0 mJ cm^{-2} , 10 mJ cm^{-2} , 20 mJ cm^{-2} , 30 mJ cm^{-2} , 40 mJ cm^{-2})。在 Table. 1 可看到隨著 UVB 曝露劑量的增加，NO 產生的濃度也隨著增加。針對 NO-synthase 的測定，經由 Western blotting 方法測得，圖形顯示在 figure. 1，可以看出隨著 UVB 曝露劑量的增加，NO-synthase 產生的量也隨著增加，將其以 density ratio 的情形將其量化，圖形顯示在 figure.2。

另外，為了確認 UVB 對 NO-synthase 基因表現的影響，以 RT-PCR 的方式，發現隨著 UVB 曝露劑量的增加，NO-synthase RNA 量有增加的情形 (figure.3)，將其以 density ratio 的情形將其量化，圖形顯示在 figure.4。

由 UVB 照射角質細胞所產生的 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現的變化，我們整理出一套評估防曬產品防曬能力的方法。因為隨著 UVB 曝露劑量的增加，角質細胞所產生的 NO 的濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，都會明顯隨著增加，因此，只要防曬產品具有阻隔此種現象產生的，我們就認定其具防曬效果。但因 UVB 曝露劑量的不同，以及不同防曬產品其防曬能力的不同，我們就將防曬產品的級數分為四級，如果可以阻隔 UVB 劑量 10 mJ cm^{-2} 照射，即 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，沒有明顯變化的，就屬於防曬指數是 I 級的。如果可以阻隔 UVB 劑量 20 mJ cm^{-2} 照射，即 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，沒有明顯變化的，就屬於防曬指數 II 級的。如果可以阻隔 UVB 劑量 30 mJ cm^{-2} 照射，即 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，沒有明顯變化的，就屬於防曬指數 III 級的。如果可以阻隔 UVB 劑量 40 mJ cm^{-2} 照射，即 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，沒有明顯變化的，就屬於防曬指數是 IV 級的。這是目前根據研究所得研發出的新防曬級數的判定。為了使用此套新防曬級數的應用性，未來我們要將市售的防曬產品作檢測，並將其分出新防曬級數 (SPG) 的級次，為了增加此法的可信度，我們會以最接近人體測試的天竺鼠法測 SPF 值，來與我們研發的新防曬級數法作比對。

四、計畫成果自評

本研究是一新的構思，對於此研究的期許甚高，目前研究所得成果值得慶幸。就多年來，防曬功能的評估都止於表面化，無法深入細胞層面的評估，本研究就企圖以生物技術方式將防曬功能的評估深入細胞層面作探討。我們所得初步成果非常有意義，應用性很高，但因為是初步成果，所以我們將再有後續的成果評估測試。雖然目前所得的成果與當初所預期的成果相距不遠，但是本研究成果仍需在未來的研究中得到更多的應證。

五、參考文獻

Deliconstantinos G, Villiotou V, and Stravides JC. (1996). *Biochem Pharmacol* 51:1727-1738.

Knowles RG, and Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298:249-258, 1994.

Kroncke KD, Fehsel K, and Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem* 376:327-343, 1995

Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA (1991). *Pharmacol Rev* 43:109-142.

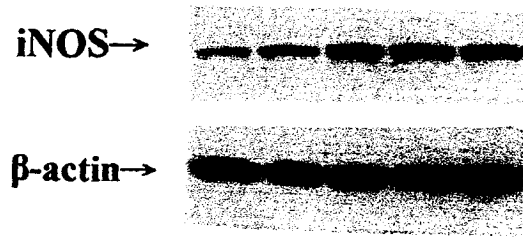


Fig. 1

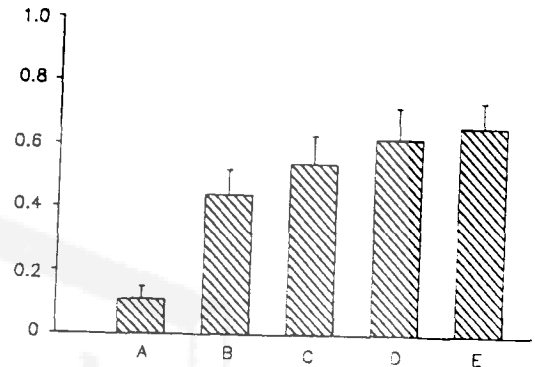


Fig. 2

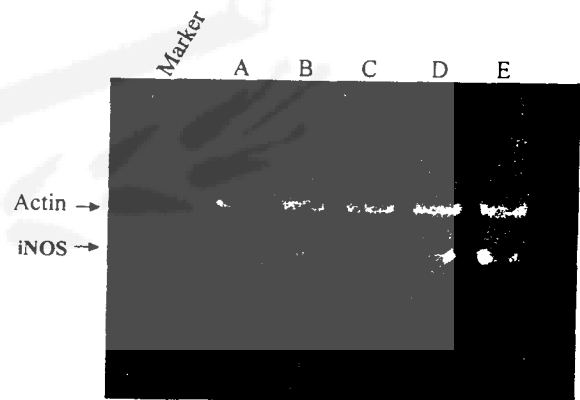
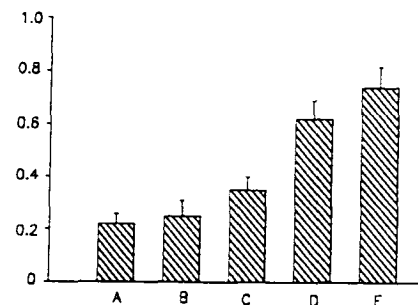


Fig. 3



A-E: 0 mJ/cm², 10 mJ/cm², 20 mJ/cm², 30 mJ/cm², 40 mJ/cm² UVB

Fig. 4

Table. 1

UVB 劑量 (mJ/ cm ²)	0	10	20	30	40
NO 濃度 (pmol/ 10 ⁶ cells)	352±50	556±66	665±22	742±31	861±40