

NSC 90-2311-B-041-002-

Kinetin 抗老化機制對於皮膚細胞粒線體 DNA 在日照
下之保護作用及其對抑制皮膚黑色素形成機制之研究

初期成果報告



主持人： 侯征宏

研究單位： 嘉南藥理科技大學

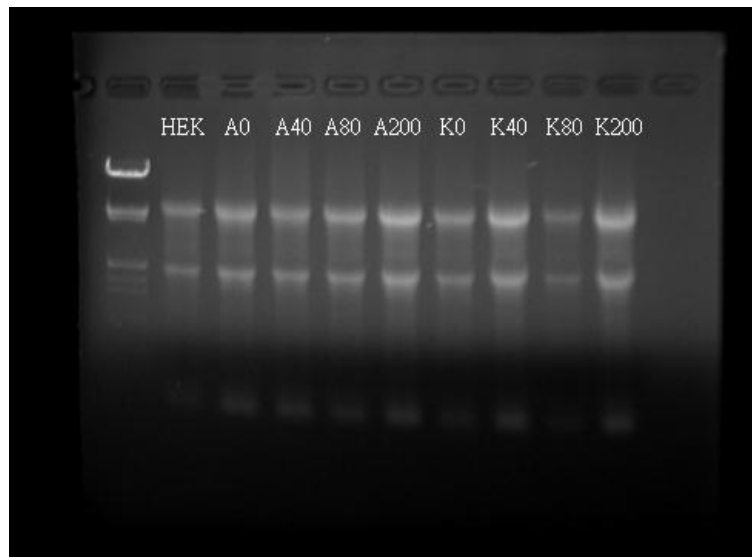
化粧品應用與管理系

Kinetin 是一種植物的生長荷爾蒙 (growth hormone)，而且已知在植物中有抑制衰老 (senescence-retarding effects) 的功效。而 kinetin 對動物細胞已知其有生長抑制 (growth inhibitory effects) 和抗腫瘤生成 (anti-tumorigenic effects) 的現象。而在細胞培養的經驗顯示，kinetin 的確對於衰老 (senescent) 的皮膚纖維母細胞 (skin fibroblast) 在型態學上有延緩衰老的現象，並且對於帶有粒線體基因缺陷的皮膚纖維母細胞而言，亦觀察到對其在組織培養上有明顯的幫助。

Kinetin 的存在不僅僅在植物細胞中，在動物細胞中亦可發現其蹤跡。由於 kinetin 有提昇細胞內修補及防禦機制的功能，故很容易的聯想到其在美容醫學方面的功效。直接聯想到可運用在化妝品中，並予以強調的就是其抗老的功效。目前 kinetin 已被部分的化妝品公司和其他抗氧化劑 (如 vit. C, vit. E 等) 搭配販售於世面。在臨床醫學上亦發現 kinetin 具有除皺和抗老的功效並且發現 kinetin 的使用並不會像維生素 A 酸等藥用成分具有無法預料的危險性，是故 kinetin 在當作化妝品成分的使用上相當安全。

基本上，kinetin 的用量在作為化妝品成分時，會和在細胞實驗不一樣。故原本本實驗欲設計一套動物實驗以決定 kinetin 在化妝品調製成不同型態的成品時的有效劑量，但有鑑於國際上禁止化妝品成分相關的試驗運用動物實驗，所以本實驗在執行時改變方向，決定以探討 kinetin 在不同劑量下對皮膚纖維母細胞的基因表現，預計以此觀察 kinetin 之作用機制及其他可能的功效 (例如：美白、保溼等)。

本實驗之實驗方法簡述如後。已有文獻提出：在纖維母細胞以 kinetin 做處理時，kinetin 對於纖維母細胞的生理功能在 40~200 μM 之間方有功效。故本實驗以結構類似的 adenine 作為控制組分別以 0、40、80 及 200 μM 濃度的 adenine 及 kinetin 分別處理皮膚纖維母細胞，待長到約 50~60% confluency 時收取細胞並抽取其 RNA。此 RNA 用來準備進行 microarray 的實驗。而本次實驗之 RNA 的品質及量經由多次試驗中可達到進行 microarray 的要求。如下圖：



Microarray 的進行及資料讀取由微晶生物科技公司負責執行，而此次所用的 DNA chips 含有 1803 種不同的基因，實驗結果以各濃度之 kinetin 表現情形處以 adenine 的表現情形而得到各基因的表現比例 (expression ratio)。

由於 kinetin 的具有延緩衰老、促進細胞修復及保護細胞的生理功能，故我們合理的推測 kinetin 可能具有提昇體內自由基防護機制的功能；此外，因其在臨床觀察上具有除皺的功效，故我們合理的推測其可能影響到膠原蛋白的表現。故在分析時我們在 1803 種基因中主要針對自由基清除酵素系統的數個與抗氧化相關的酵素 (catalase、superoxide dismutase、glutathione reductase 等)、一些細胞外的結締組織基因的表現 (keratins、collagens 等) 以及和核苷酸代謝相關的基因等來進行分析。

實驗結果相當有趣，我們原先認為 kinetin 之細胞生理功能因是提昇細胞內大部分的自由基清除系統中的酵素，但是結果大異其趣，catalase 及一些和 glutathione 相關的酵素其基因的表現，竟然隨著 kinetin 的濃度增加而降低 (如下表)。但有趣的是：Cu/Zn superoxide dismutase 和 ATP citrate lyase 有隨著 kinetin 的濃度增加而微幅上升。我們懷疑是否提昇細胞質內的 SOD 表現和充足的 NADPH 提供就可有效的抑制或控制細胞內的有害性的氧化反應，並減少其對細

胞的傷害。

Gene	40 ~M	80 ~M	200 ~M
Adenine nucleotide translocator 2 (fibroblast)	3.7935	0.7379	0.5005
Catalase	2.0573	1.3836	1.0260
Collagen, type VI, alpha 1	1.0204	1.2933	0.8074
Collagen, type XV, alpha 1	1.8913	0.4618	0.7880
Cytochrome P450, subfamily IIE	1.1038	0.7423	1.1010
Double-stranded RNA adenosine deaminase	0.6224	0.5471	0.2259
FAT--procollagen type I, III	0.7026	1.2179	0.8328
Fibroblast growth factor 2 (basic)	17.9846	0.8623	0.7707
Glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase)	3.0251	1.0859	2.7948
Glutathione peroxidase 3 (plasma)	11.4448	1.8962	1.6365
Glutathione S-transferase A3	7.5814	0.9549	0.2837
Glutathione S-transferase M1	1.2583	0.5552	0.7003
Homo sapiens glutathione transferase (GSTA4) mRNA	14.0520	1.1097	2.3353
Homo sapiens microsomal glutathione S-transferase 2 (MGST2)	24.7537	1.4871	1.8395
Human antioxidant enzyme AOE37-2 mRNA	2.5495	1.1750	0.0678
Human dsRNA adenosine deaminase DRADA2b (DRADA2b) mRNA	1.5894	0.7639	1.1983
Keratin 13	638.5696	0.8791	0.2053
KERATIN, TYPE II CYTOSKELETAL 6D	1.6688	1.0760	0.9256
Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	0.7259	0.8523	0.0020
Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	32.1419	2.4509	0.5557
Quinone oxidoreductase (NQO2)	1.3831	1.4122	0.6199
Superoxide dismutase 1 (Cu/Zn)	0.6111	1.3541	1.8067
Superoxide dismutase 2, mitochondrial	1.4992	0.2398	1.3312
Human melanocyte-specific gene 1 (msg1) mRNA, complete cds			0.2053
Homo sapiens lysyl hydroxylase isoform 2 (PLOD2) mRNA	2.6493	0.8523	
Homo sapiens BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 2	0.8865	1.3217	
ATP citrate lyase	0.3792	0.9464	

此外，對於一些胞外的結締組織如 keratins 和 collagens 亦隨著 kinetin 的濃度增加而下降。雖然在皮膚防皺上有邏輯上的相關，但是結締組織的表現降低對於皮膚的保護是有負面影響的。但是，因此次的胞外結締組織基因不包括皮下含量最高的 collagen type I 和 III，是故這點推論仍需進一步的實驗方能證實。另一點有趣的發現：與膠原蛋白纖維間之結合和膠原蛋白堅韌度有關的酵素 lysyl hydroxylase 在表現上會被 kinetin 所抑制（此基因在 200 μM 時沒有結果出現，表示表現量太低），這和 kinetin 之除皺功效有直接的關係，膠原蛋白的 cross-link 少了，皮膚自然較細緻、較柔嫩。

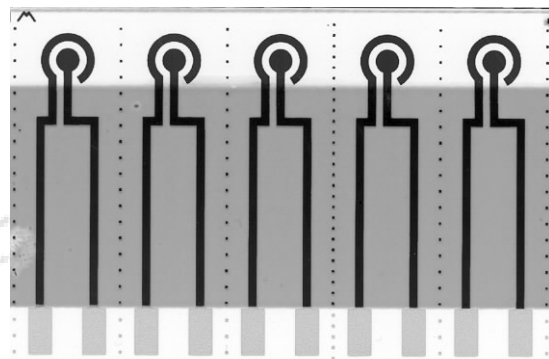
對於美白的功效，在此次實驗的設計上較看不出來，因為此次所用的細胞為纖維母細胞。但是有趣的是，在高 kinetin 的濃度下（200 μM ），本來沒有表現的 Human melanocyte-specific gene 1 竟然表現出來，這是否為 kinetin 保護皮膚細胞避免紫外線照射後而得到傷害的另一種機制，實在是值得進一步的實驗來探討。

Kinetin 雖然已經廣泛應用在許多美容保養品上，並有許多臨床上的實證功效，但是探討 kinetin 這些細胞生理功能機制的相關文獻並不多，此次的研究在針對 kinetin 的細胞生理功能的機轉上雖然無法提供一些直接的證據，但是的確提供了一些可能的方向讓我們思考，並可能進一步發現其他植物性的生長荷爾蒙可以提供在美容醫學相關的應用。

至於 kinetin 對於皮膚美白的功效，即抑制皮膚黑色素之形成，目前已積極在建立細胞實驗模式，目前已與動物科技研究所在進行 melanocyte 和 fibroblast 共同培養 (co-culture) 之模式，希望夠建立一個快速且可信度高的方法，以用在檢定草本素材及中草藥萃取物等常用之美白素材，對於皮膚黑色素形成之影響。由目前之初步實驗結果亦可得知，一味的抑制黑色素的形成，有可能降低皮膚抵抗紫外線的能力，故欲防止因日曬所造成之皮下黑色素沉積，亦需注意到提昇細胞自我保護機制，以防止因抑制黑色素形成所造成不可預知的後果。故未來計劃能以此實驗模式，找出能抑制黑色素且亦提昇皮膚細胞抗自由基機制之化合物或

配方，用於日後生技化妝品的開發與應用。

除此之外，美容保養品之主要成分滲入皮膚表皮的程度，是決定保養品功效的重要因子。目前實驗上並無方便並有效的模式來評估保養品有效成分之穿透程度。故本實驗室計劃結合電化學分析方法以及動物或人造皮膚，設計一個體外檢測化合物對於皮膚滲透度的實驗方法，電極之設計如下圖：



目前正與動物科技研究所積極進行人造皮膚在電極上之培養，以及電極材質之試驗。目前已有之材質為石英玻璃及 Polypropene 二種。在電極完成之後，擬先以維生素 C 為研究對象，藉此找出此電極之特性及待改進之缺點，以建立更方便快速之鑑定皮膚滲透程度之研究模式。