

白尾蜈蚣草粗萃取物應用於化粧品之保濕與抗老化能力分析

李冠漢¹ 呂尚謙² 林怡亭³ 劉坤湘^{2*}

¹ 嘉南藥理大學藥學系

² 嘉南藥理大學化粧品應用與管理系

³ 嘉南藥理大學生物科技系

摘要

由於女性的愛美天性與近年市場需求，以及崇尚自然的風潮，以草本萃取應用於化粧保養品成為目前研發趨勢。人類最大的器官皮膚分為表皮層、真皮層與皮下組織，表皮中含量甚多的水通道蛋白為一蛋白質家族，功能為細胞膜上的穿膜水通道，能促進水分運輸使其通過細胞膜。在哺乳動物中，目前已發現有十三種水通道蛋白，*aquaporin 3* 參與水分及甘油的運輸，被證實與保濕最為相關。另外，真皮層中比例頗高的膠原蛋白為皮膚重要的結構蛋白，主要以第一型及第三型為主。本研究選用常見於中國與日本的白尾蜈蚣草 (*Ajuga decumbens*) 經水萃取之粗萃取物，分別以不同濃度各處理人類 HaCaT 角質層細胞及小鼠 3T3 纖維母細胞 24 及 48 小時，結果顯示：(1) 實驗中所使用的白尾蜈蚣草粗萃取物濃度與處理時間，並不會造成細胞毒性；(2) 5 µg/ml 濃度處理小鼠 3T3 纖維母細胞 24 小時，以及 10 µg/ml 濃度處理 48 小時，水通道蛋白 *mAQP3 mRNA* 之表現增加；(3) 經 10 及 25 µg/ml 的濃度處理小鼠 3T3 纖維母細胞 24 小時後，膠原蛋白第一型 *Col1A1* 基因表現有顯著增加；以 5、10 及 25 µg/ml 的濃度處理 48 小時後，膠原蛋白第三型 *Col3A1* 基因表現最為顯著。我們推論，白尾蜈蚣草粗萃取之有效成份若運用於訴求保濕與抗老化功能之化粧品，應具有一定之潛力。

關鍵詞：白尾蜈蚣草，水通道蛋白，膠原蛋白，人類 HaCaT 角質層細胞，小鼠 3T3 纖維母細胞

*通訊作者：嘉南藥理大學化粧品應用與管理系
Tel: +886-6-2664911Ext2514
Fax: +886-6-2662135
E-mail: sandraliu@mail.chna.edu.tw

的角質層，表皮的角質層可以說是在美容皮膚科學

壹、前言

皮膚是人體面積最大的器官，約為 1.8 m² (體表面積)，重量如與皮下脂肪合算，約佔體重的 18%。由外而內可分為表皮層、真皮層、皮下組織，具有保護、調節體溫、接受感覺、排泄及合成維生素 D 等功能。表皮層位於皮膚之上層，厚度從眼皮的 0.04 mm 至足底的 1.4 mm 不等，其中最外層的角質層由數層扁平角化細胞構成，主要提供皮膚防水及保護的作用，此層也是與美容化粧品接觸最頻繁的一層，大多數的傳統美容化粧品都只停留在表皮

的研究上，最為重要且研究最多的部位。角質層先前被認為只是一些已死亡的角質細胞，但近期有研究指出角質層在皮膚功能上其實扮演著重要的角色。角質細胞間圍繞著脂肪層，形成天然屏障具有抵抗外界病原的入侵及防止水分過度蒸散的功能。然而皮膚的角質含水量要受兩個因素影響，一為水合能力：肌膚本身就有多種保濕成分，可為肌膚做水分調節，即肌膚水合能力。二為障蔽功能：外在則有由皮脂膜分泌之皮脂及汗液混合而成之皮脂膜，做為肌膚最外層防止水分散失的防護膜，

也就是所謂的障蔽功能。但是這些負責保濕功能的成員，會因許多的內外在因素，逐漸喪失應有的功能。因此，許多肌膚開始轉變成乾燥肌膚。所以有必要藉由外在的保濕產品來幫助改善肌膚乾燥的情形，恢復水嫩肌膚。此外，位於細胞膜上的水通道蛋白 (aquaporin; AQP) 對於調節細胞水分子的通透扮演著重要的角色。

水通道蛋白為水分子通道，目前證實在動植物細胞中有多種不同的水通道蛋白。由於水通道蛋白的存在，細胞才可以快速調節自身體積和內部滲透壓，因此水通道蛋白在維持細胞恆定上扮演著相當重要的角色 (Borgnia, Engel, & Agre, 1999; Verkman, & Mitra, 2000)。AQPs 為一個膜蛋白家族，於哺乳動物中目前已發現有十三種水通道蛋白，分別命名為 AQP0 到 AQP12，AQP3、AQP7、AQP9 及 AQP10 被認為是與保濕較為相關的，除參與水分之運輸外也參與甘油的運輸，其中又以 AQP3 在皮膚中的含量較多，已有文獻指出 AQP3 與皮膚保溼有著密切的關係 (Hara-Chikuma, 2005)。近期有研究指出當小鼠皮膚缺乏 AQP3 時會使得甘油無法傳輸到表皮及角質細胞中，使得角質層之含油量降低，導致皮膚變得較為乾燥、皮膚彈性降低以及延緩皮膚傷口的癒合等 (Choi *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2011; Hara-Chikuma, 2003, 2008; Hara-Chikuma, & Verkman, 2008; Ma, Hara, Sougrat, Verbavatz, & Verkman, 2002)，但關於皮膚表皮之 AQPs 基因表達、位置、相關功能及作用方面仍不是十分清楚。

至於皮膚之真皮層厚度約為 2 mm 左右，是表皮的 15~40 倍，一般佔皮膚厚度的 95%，主要是由膠原蛋白 (collagens) (約佔 75%) 及彈性纖維 (elastic fibers) (約佔 20%) 所組成，其他則是神經、毛細血管、汗腺以及皮脂腺、淋巴管及毛根等。膠原蛋白由纖維母細胞產生，於真皮層中以第一型與第三型為主，正常的比例約為 5:1；這些纖維蛋白為構成細胞外基質的主要蛋白，與維護皮膚的形態、功能有關，負責皮膚的承受力 (張力)。膠原蛋白含量多寡會影響肌膚的彈性與光澤，當皮膚缺乏時會導致皮膚組織萎縮，進而出現皺紋、色斑、毛孔粗大等皮膚問題。而隨著年齡的增長，膠原蛋白在

人體內的含量會逐漸減少；尤其是真皮層的膠原蛋白會隨著老化而性質改變、含量減少，導致肌膚出現皺紋。

為了解決常出現於皮膚問題如乾燥、斑塊、皺紋等，對於此一領域的研究非常盛行，市面也不斷出現許多標榜保濕或除皺、抗老化等配方的保養化粧品，近年來化粧品市場逐漸以天然、草本的概念成為主流，人們有意願捨棄以化學合成物調製的化粧品。許多含化學合成物之化粧品輕者可能會刺激皮膚產生不適感，嚴重者可能導致基因損傷及突變。自然物質中以植物來源取得較容易，而以動物來源的有效成分，如膠原蛋白、胎盤素，則有動物性傳染病的考量。白尾蜈蚣草 (*Ajuga decumbens*) 廣泛應用於中醫學已行之有年，其相近物種的新疆筋骨草 (*Ajuga turkestanica*) 萃取物日前被證實具有提高皮膚組織上水通道蛋白的表現，因而可達到促進保濕的效果 (Apone *et al.*, 2010)，目前已被業者研發為皮膚保養品，為市面上極為少見但前瞻的針對調控水通道蛋白以達到保濕效果的保養品。另有文獻指出，其可促進關節及骨頭中膠原蛋白的增生，對於筋骨病痛等有緩解之功效，另外對於關節炎及骨質疏鬆的病患有改善的效果 (Dumas *et al.*, 2007; Ono, Fukaya, Imai, & Yamakuni, 2008; Takasaki, Haruna, & Konoshima, 1998; Takasaki, Nishino, & Konoshima, 1999)，然而白尾蜈蚣草在台灣較為普遍、易取得，但多注重於醫學之治療研究方面。現今有許多藥物都有舊藥新用的發現，而至今尚無研究指出白尾蜈蚣草具有美白、保濕或抗老化功效之相關作用機轉的報導，因此選用白尾蜈蚣草全草之萃取物，以永生性人類角質層細胞株 (HaCaT cells) 及小鼠 3T3 纖維母細胞模擬皮膚表皮之角質層與真皮層，針對保濕與抗老化之指標性基因表現做分析，進而推論保濕與抗老化效果，以期能夠對於天然保養品的開發及研究有更多的應用。

貳、材料及方法

一、白尾蜈蚣草粗萃取物製備

白尾蜈蚣草全株經洗淨及烘乾後研磨為粉末，

以 10 倍體積之 70% 酒精萃取，接著加熱至煮沸，並以 Whatman 1 號濾紙過濾，過濾液經減壓濃縮及冷凍乾燥，取 0.2 g 冷凍乾燥後的白尾蜈蚣草粉末，加入 2 ml 的無菌水，隨後以 0.22 μm 濾膜過濾，將過濾後的白尾蜈蚣草萃取液收集至微量離心管中。將此 100.0 mg/ml 的白尾蜈蚣草萃取液，利用無菌水連續稀釋為 25.0 mg/ml、10.0 mg/ml、5.0 mg/ml、2.5 mg/ml、1.0 mg/ml 等濃度，以進行之後處理細胞的各項實驗。

二、永生性人類角質層細胞株及小鼠 3T3 纖維母細胞培養

人類 HaCaT 角質層細胞培養於含有 10% 胎牛血清及 1% PEN-STREP-AMPHO 抗生素之 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; high glucose) 培養基中；小鼠 3T3 纖維母細胞則培養於含有 10% 新生牛血清 (newborn calf serum) 及 1% 抗生素之 DMEM 培養基中。細胞繼代培養時，首先各以 2 ml 的 1x phosphate-buffered saline (PBS) 清洗二次，加入 0.5 ml 的 1x trypsin，置於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中，直到底部的細胞掉落約 90% 時，加入 1 ml 培養基終止 trypsin 的反應。將細胞打散置於 15 ml 離心管中，於 25°C 下以 2,000g 離心 3 分鐘，去除上清液後加入 1 ml 的培養基回溶細胞，另外，於 T25 flask 中加入 3 ml 的培養基，取約 4x10⁵ 個細胞液回種至 T25 flask 中，置於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中繼續培養。

三、細胞存活率分析

於 96 孔盤的孔洞接種 1x10⁴ 個細胞，置於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養 24 小時，以 100 μl 的 1x PBS 清洗一次，接著加入 90 μl 的 DMEM 培養基及 10 μl 不同濃度 (原始濃度為 10 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml、100 μg/ml 及 250 μg/ml) 的白尾蜈蚣草粗萃取物，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中分別培養 24 及 48 小時，移除培養基後加入 100 μl 的 0.5 mM MTT

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleium bromide) 試劑反應 4 小時，移除 MTT 試劑後加入 100 μl 的 DMSO，利用分光光度計於 540 nm 波長下進行分析。

四、白尾蜈蚣草粗萃取物處理細胞

於 10 cm 培養皿中接種 1x10⁶ 個 HaCaT 細胞，3T3 細胞則是接種 4x10⁵ 個細胞至 6 孔盤的孔洞中，置於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養 24 小時，以 1x PBS 清洗一次，接著加入 5 ml 含 10% 血清的 DMEM 培養基及 5 μl 不同濃度 (原始濃度為 1.0 mg/ml、2.5 mg/ml、5.0 mg/ml、10.0 mg/ml 及 25.0 mg/ml) 的白尾蜈蚣草萃取物，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中分別培養 24 及 48 小時。

五、水通道蛋白 3 (AQP3)、膠原蛋白第一型 (Col1A1)、膠原蛋白第三型 (Col3A1) 基因序列以及基因表現之分析

收集細胞後，利用 TRIzol® Reagent (Invitrogen) 進行總 RNA 之萃取；cDNA 合成是利用 SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen) 進行反轉錄作用。針對人類與小鼠 AQP3、Col1A1、Col3A1 及 GAPDH 基因序列之引子設計，乃參考數篇已發表之文獻 (Agre, Saboori, Asimos, & Smith, 1987; Lee, Kim, & Choi, 2011; Sidel, 1957) 以及 NCBI 資料庫中該基因之核酸序列以擴增出該基因部分 cDNA 片段，引子序列如表 1。將擴增出之 cDNA 片段經與 pGEM®-T easy vector (Promega) 進行接合反應成為重組 DNA，轉形進入 *E. coli* XL1-blue 勝任細胞，挑選轉形成功的轉形株以 Gene-Spin™ MiniPrep Purification Kit-V2 實驗套組 (Protech) 純化重組 DNA 後，送往國立成功大學定序中心進行 DNA 定序，並以生物資訊軟體分析比對序列。

表 1、引子名稱與序列

Primers	Sequences	Primers	Sequences
Forward		Reverse	
AQP3-F	5'-ACCCCTCATCCGGTGATGTTG-3'	AQP3-R	5'-TCCTGCTCCCTGTGCTTCACAT-3'
Col1-F	5'-GCTAAAGGTGCCATGGTGCTC-3'	mAQP3-R	5'-TCCTGCTCCCTGTGTTCACTG-3'
ColIII-F	5'-ATGCTGGAGCAGAACCATG-3'	Col1-R	5'-TTTGCATCAGGACCAGGGCT-3'
GAPDH-F	5'-ACCAAGTCCATGCCATCAC-3'	ColIII-R	5'-TTGATACTGGAGGTCAGGCA-3'
		GAPDH-R	5'-TCCACCAACCTGTTGCTGTA-3'

各基因表現之分析使用半定量 PCR (semi-quantitative polymerase chain reaction) 方法，藉由偵測 PCR 產物於指數增加期內量的變化，反映樣本 mRNA 相對的變化量。將 PCR 反應終止於

指數增加期，隨後將 PCR 產物取出進行膠體電泳分析，並以持續表現之管家基因 (housekeeping gene) *GAPDH* 當做內控制組 (internal control) 做為基因表現量化之標準。以專一性引子 AQP3-F 和 AQP3-R 進行 PCR 擴增 *hAQP3* (human *AQP3*) 之部分 cDNA 片段；另外，以專一性引子 AQP3-F 和 mAQP3-R 擴增 *mAQP3* (mouse *AQP3*) 之部分 cDNA 片段；以 *ColI*-F 及 *ColI*-R 擴增小鼠 *ColIA1* 之部分 cDNA 片段；以 *ColIII*-F 及 *ColIII*-R 擴增小鼠 *Col3A1* 之部分 cDNA 片段。PCR 反應條件於 94°C 反應 1 分鐘，接著於適合之黏合溫度 (*hAQP3*: 52°C; *mAQP3*: 56.6°C; *ColIA1*: 63.4°C; *Col3A1*: 58.6°C) 反應 30 秒、72°C 反應 1 分鐘進行循環反應 (*hAQP3*: 23 cycles; *mAQP3*: 35 cycles; *ColIA1*: 28 cycles; *Col3A1*: 26 cycles)，最後以 72°C 反應 5 分鐘。使用內染 ethidium bromide 之 1.2% 的瓊脂膠體進行電泳，分析 PCR 反應結果。由 AlphaImager 2200 系統量化洋菜瓊脂膠體電泳上顯色強度，經由 *GAPDH* 基因標準化之後，即可以此反映指標基因 mRNA 的相對表現量。

六、統計方法

本實驗所得之數據以平均值加減標準差表示。以 GraphPad Prism 5 軟體進行單維變異數分析 (one-way ANOVA) 評估在各組別之間的變化，當 P 值小於 0.05 表示具有統計上顯著的差異。

參、結果及討論

一、人類 HaCaT 角質層細胞及小鼠 3T3 纖維母細胞經白尾蜈蚣草粗萃取物處理後之形態與細胞存活率

兩種細胞經過不同濃度之白尾蜈蚣草粗萃取物處理，不論是在未處理、處理 24 或 48 小時細胞外觀皆無明顯之變化，且處理前和處理後的細胞，可發現隨著培養時間的增加，細胞數皆有增加的趨勢，自形態上的觀察可看出白尾蜈蚣草粗萃取物並不對細胞型態與生長造成影響，如圖 1A (人類角質層細胞) 及圖 1B (小鼠 3T3 纖維母細胞) 所示。此外，以不同濃度粗萃取物處理兩種細胞 24 小時或 48 小時後細胞存活率均為 90%以上，如圖 2A (人

類角質層細胞) 及圖 2B (小鼠 3T3 纖維母細胞) 所示。由此可推測白尾蜈蚣草粗萃取物在 0~25 μg/ml 的濃度範圍內處理直至 48 小時均不對這兩種細胞產生毒性，顯示在此濃度與處理時間之範圍內應屬安全，可做為日後保養品添加劑量與使用時間的參考。

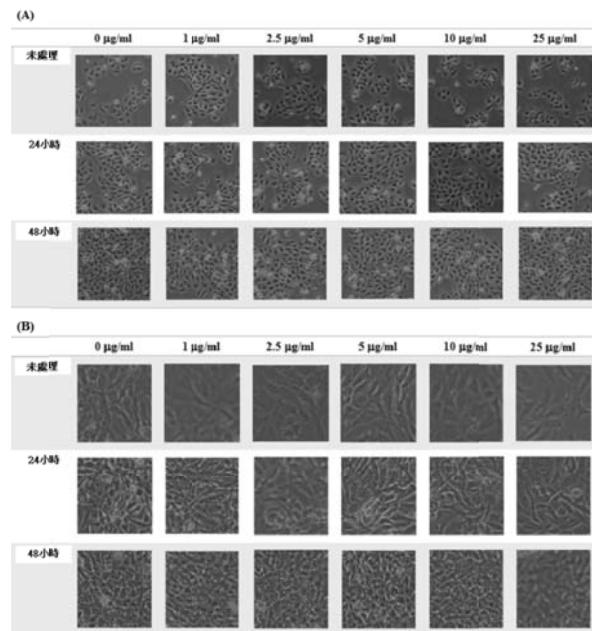


圖 1. 白尾蜈蚣草粗萃取物處理 (A) 人類角質層細胞；(B) 小鼠 3T3 纖維母細胞之細胞型態 (放大倍數 40 倍)

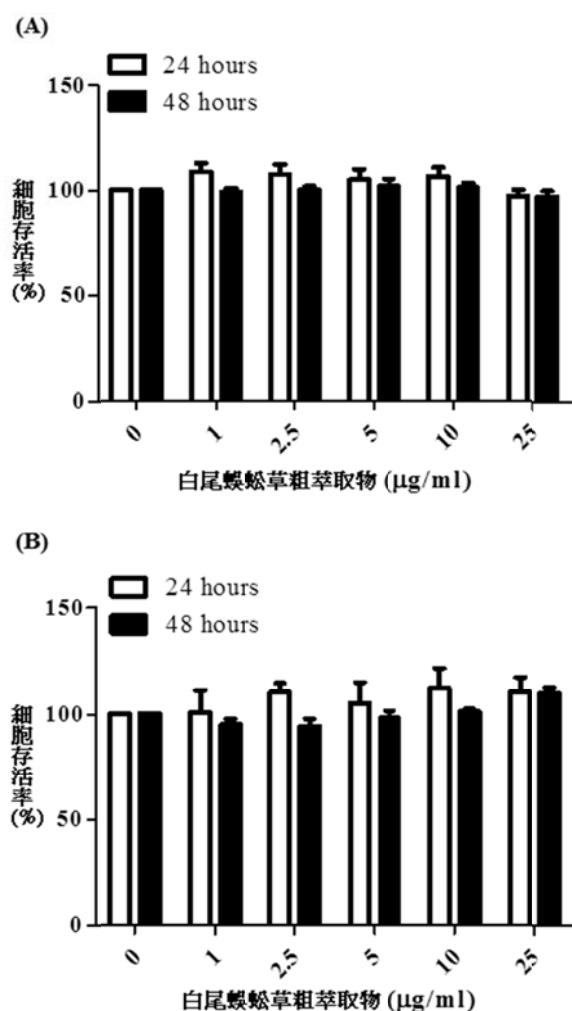


圖 2. 白尾螺旋草粗萃取物處理 (A) 人類角質層細胞；(B) 小鼠 3T3 纖維母細胞之細胞存活率

二、水通道蛋白 3 (*AQP3*)、膠原蛋白第一型 (*ColIA1*)、膠原蛋白第三型 (*Col3A1*) 基因序列

本實驗中所選殖與分離之 *hAQP3* 部分 cDNA 片段長度 781 碱基對，經 BLAST 搜尋引擎將此序列進行比對，發現與 *Homo sapiens aquaporin 3* 基因 (accession no. NM_004925) 第 156 碱基對至第 936 碱基對之相同性達 99.5%，如圖 3A。*mAQP3* 之部分 cDNA 片段長度 781 碱基對，經比對發現與 *Mus musculus aquaporin 3* 基因 (accession no. NM_016689) 第 168 碱基對至第 948 碱基對之相同性達 99.9%，如圖 3B。*ColIA1* 之部分 cDNA 片段長度為 472 碱基對，經比對發現與 *Mus musculus collagen, type I, alpha 1* 基因 (accession no. NM_007742.3) 第 1522 碱基對至第 1723 碱基對之

相同性達 100%。如圖 3C。*Col3A1* 之部分 cDNA 片段長度為 620 碱基對，經比對發現與 *Mus musculus collagen, type III, alpha 1* 基因 (accession no. NM_009930.2) 第 341 碱基對至第 960 碱基對之相同性達 99.5%，如圖 3D。

(A)

<i>hAQP3</i>	TCTGCTCCCTGTGCTTCACATGGGCCAGCTTCACATTCTCTCTCGTTG 58
NM_004925.3	TCTGCTCCCTGTGCTTCACATGGGCCAGCTTCACATTCTCTCTCGTTG 58
*****	*****
<i>hAQP3</i>	GAGGGTGGGGCTGCTCCAGGGCAGCCSACCATGAGCTGGTACACGAA 100
NM_004925.3	GAGGGTGGGGCTGCTCCAGGGCAGCCGATCATGAGCTGGTACACGAA 100
*****	*****
<i>hAQP3</i>	GACACCCGAATGGAGGCCAGGGTGGAACGATGGGACCCCCACACC 150
NM_004925.3	GACACCCGAATGGAGGCCAGGGTGGAACGATGGGACCCCCACACC 150
*****	*****
<i>hAQP3</i>	AATGCTGGCGGTGCTGAAGACTGCAGAGCCCCAGCCGCAAGGGCTGTA 200
NM_004925.3	AATGCTGGCGGTGCTGAAGACTGCAGAGCCCCAGCCGCAAGGGCTGTA 200
*****	*****
<i>hAQP3</i>	AAAAGCGGGGCCAAAGTCCCGGGCAGGGTTGACGGCATAGCGAGTT 250
NM_004925.3	AAAAGCGGGGCCAAAGTCCCGGGCAGGGTTGACGGCATAGCGGAGTT 250
*****	*****
<i>hAQP3</i>	GAAGCCCATGGAGGTGCCAATGACCAAGGACCCACCAAGGCCAACGGTGAAGG 300
NM_004925.3	GAAGCCCATGGAGGTGCCAATGACCAAGGACCCACCAAGGCCAACGGTGAAGG 300
*****	*****
<i>hAQP3</i>	CCTCCAGGGCTCGGGGACGGGGTTGTTGATGGGTCAAACAATGGCCAGC 350
NM_004925.3	CCTCCAGGGCTCGGGGACGGGGTTGTTGATGGGTCAAACAATGGCCAGC 350
*****	*****
<i>hAQP3</i>	ACACACACGATAAGGGAGGCTGCTGCTTATGAACTGGTCAAAGGAAGCCATT 400
NM_004925.3	ACACACACGATAAGGGAGGCTGCTGCTTATGAACTGGTCAAAGGAAGCCATT 400
*****	*****
<i>hAQP3</i>	GATCATATCCAAGTGTCCAGAGGGTAGTGAACAGATGCCGCGCTGTGC 450
NM_004925.3	GATCATATCCAAGTGTCCAGAGGGTAGTGAACAGATGCCGCGCTGTGC 450
*****	*****
<i>hAQP3</i>	CATTGGGGCCCGAAACAAAAAGCTGGTTGTCGGCGAAGTGCAGATTGCA 500
NM_004925.3	CATTGGGGCCCGAAACAAAAAGCTGGTTGTCGGCGAAGTGCAGATTGCA 500
*****	*****
<i>hAQP3</i>	TCATAATACAGCCAAAAACTATTCCAGCCACCCAAAGAAGGCTCCAGCGT 550
NM_004925.3	TCATAATACAGCCAAAAACTATTCCAGCCACCCAAAGAAGGCTCCAGCGT 550
*****	*****
<i>hAQP3</i>	CTGTGCCAGGGTGTAGATGGCGAGCTTGATCCAGGGCTCACAGCCAGGA 600
NM_004925.3	CTGTGCCAGGGTGTAGATGGCGAGCTTGATCCAGGGCTCACAGCCAGGA 600
*****	*****
<i>hAQP3</i>	AGCACATGCCAAAGGTACGGCAGGGTTCAAGGGGCCCCAGAGACCTGG 650
NM_004925.3	AGCACATGCCAAAGGTACGGCAGGGTTCAAGGGGCCCCAGAGACCTGG 650
*****	*****
<i>hAQP3</i>	CCAGCGATGAGGATGCCAGAGTGAACGCAAAGGCCAGGGTTGAT 700
NM_004925.3	CCAGCGATGAGGATGCCAGAGTGAACGCAAAGGCCAGGGTTGAT 700
*****	*****
<i>hAQP3</i>	GTTGAGGAAACCCACCGTGGGTGCCCCGGCTGAGCAGAAACCTGGGCCACGG 750
NM_004925.3	GTTGAGGAAACCCACCGTGGGTGCCCCGGCTGAGCAGAAACCTGGGCCACGG 750
*****	*****
<i>hAQP3</i>	AGCCACAGCCAAACATCACCAAGGATGAGGGT 781
NM_004925.3	AGCCACAGCCAAACATCACCAAGGATGAGGGT 781
*****	*****

(B)

mAQP3 ACCCTCATCTGGTGTGTTGGCTGTCAGGGCTCAAGGGCTGCT 50
 NM_016689.2 ACCCTCATCTGGTGTGTTGGCTGTCAGGGCTCAAGGGCTGCT 50

 mAQP3 CAGCCGTGGCACCCATGGGCTCCCTACACATCAACATTGGCTTTGGCT 100
 NM_016689.2 CAGCCGTGGCACCCATGGGCTCCCTACACATCAACATTGGCTTTGGCT 100

 mAQP3 TCGCTGTACCCCTGGCATCTTGGCTGGCTGGCCAGGGTGTCTGGTCCCCAC 150
 NM_016689.2 TCGCTGTACCCCTGGCATCTTGGCTGGCTGGCCAGGGTGTCTGGTCCCCAC 150

 mAQP3 TTGAACCCCGCTGTGACCTTCGCAATGTGCTTCTGGCACGAGAGGGCTG 200
 NM_016689.2 TTGAACCCCGCTGTGACCTTCGCAATGTGCTTCTGGCACGAGAGGGCTG 200

 mAQP3 GATCAAGCTGCCCATCTATGCACTGGCACAGCACTGGGGCCCTTCTGG 250
 NM_016689.2 GATCAAGCTGCCCATCTATGCACTGGCACAGCACTGGGGCCCTTCTGG 250

 mAQP3 CGCCTGGGATTGTTTGGGCTGTACTACGATGCAATCTGGGCTTGGCC 300
 NM_016689.2 CGCCTGGGATTGTTTGGGCTGTACTACGATGCAATCTGGGCTTGGCC 300

 mAQP3 AACAAATGAGCTTTCTGCTCTGGGCCCCAACGCAACAGCTGAACTCTTG 350
 NM_016689.2 AACAAATGAGCTTTCTGCTCTGGGCCCCAACGCAACAGCTGAACTCTTG 350

 mAQP3 CACCTATCCCTCTGGACACTGGGACATGGCAATCTGGGCTTGGT 400
 NM_016689.2 CACCTATCCCTCTGGACACTGGGACATGGCAATCTGGGCTTGGT 400

 mAQP3 TCATAGGSCACAGCCGGGCTTATTGTGTGTGTACTGGGACATGGT 450
 NM_016689.2 TCATAGGSCACAGCCGGGCTTATTGTGTGTGTACTGGGACATGGT 450

 mAQP3 TATAACACCCCTGTGCCCCGTGGCTTGAAGCTTCACTGTGGGCTGGT 500
 NM_016689.2 TATAACACCCCTGTGCCCCGTGGCTTGAAGCTTCACTGTGGGCTGGT 500

 mAQP3 GGTCTGGTCAATTGGACCTCATGGGCTTCAATTCTGGTATGGCGTCA 550
 NM_016689.2 GGTCTGGTCAATTGGACCTCATGGGCTTCAATTCTGGTATGGCGTCA 550

 mAQP3 ACCCTGCCGTTGACTTTGGACCTGGCTTCACTGGGCCCTGGCTGG 600
 NM_016689.2 ACCCTGCCGTTGACTTTGGACCTGGCTTCACTGGGCCCTGGCTGG 600

 mAQP3 GGCCTGAAAGTCTTCACGACTGGCCGGCACTGGTGGGGTACCCATTGT 650
 NM_016689.2 GGCCTGAAAGTCTTCACGACTGGCCGGCACTGGTGGGGTACCCATTGT 650

 mAQP3 CTCCCCACTCTGGGTTCCATGCTGGTGTCTCTGGTGTACCGCTCATGA 700
 NM_016689.2 CTCCCCACTCTGGGTTCCATGCTGGTGTCTCTGGTGTACCGCTCATGA 700

 mAQP3 TTGGTTGCCACCTGGACGGCCCCACCCCTACCGAGGGAGGAATGTG 750
 NM_016689.2 TTGGTTGCCACCTGGACGGCCCCACCCCTACCGAGGGAGGAATGTG 750

 mAQP3 AAGCTGGCCACATGAAACACAAAGGAGCAGA 781
 NM_016689.2 AAGCTGGCCACATGAAACACAAAGGAGCAGA 781

(C)

Col141 GCTAAAGGTGCAATGGTGTCTCTGGTATTGGCTGGTGTCTCTGGCTTCCC 50
 NM_007742.3 GCTAAAGGTGCAATGGTGTCTCTGGTATTGGCTGGTGTCTCTGGCTTCCC 50

 Col141 TGTTGCCAGGGCCCCCTGGACACCCAGGGCCCCAGGGCCCCCTGGAGGTC 100
 NM_007742.3 TGTTGCCAGGGCCCCCTGGACACCCAGGGCCCCAGGGCCCCCTGGAGGTC 100

 Col141 CCAAGGGTAACAGTGGTGAACCTGGTGTCTCTGGCAACAAAGGGAGACACT 150
 NM_007742.3 CCAAGGGTAACAGTGGTGAACCTGGTGTCTCTGGCAACAAAGGGAGACACT 150

 Col141 GGTGCCAAAGGGAGAACCCGGTGTACTGGAGTTCAAGGGTCCCCAGGGCCC 200
 NM_007742.3 GGTGCCAAAGGGAGAACCCGGTGTACTGGAGTTCAAGGGTCCCCAGGGCCC 200

 Col141 TGCGGGAGAGAAAAGGAAAAAGGGAGGGAGGGCGTGGTGAAGCTGGACCTTCG 250
 NM_007742.3 TGCGGGAGAGAAAAGGAAAAAGGGAGGGAGGGCGTGGTGAAGCTGGACCTTCG 250

 Col141 GACTGCCCTGGACCTCTGGCGAGCGTGGTGGACCTGGTGAAGCTGGTTTC 300
 NM_007742.3 GACTGCCCTGGACCTCTGGCGAGCGTGGTGGACCTGGTGAAGCTGGTTTC 300

 Col141 CCTGGTGTGATGGTGTGGCTGGGCCCCAAGGGTCTGGTGAACGGTGG 350
 NM_007742.3 CCTGGTGTGATGGTGTGGCTGGGCCCCAAGGGTCTGGTGAACGGTGG 350

 Col141 TGCTCCCGGACCTCTGGTCACTGGCAAGGGTCTGGTGAAGCTGGTCCC 400
 NM_007742.3 TGCTCCCGGACCTCTGGTCACTGGCAAGGGTCTGGTGAAGCTGGTCCC 400

 Col141 CGGGTGAAGCTGGTCTCCCTGGTGCACAGGGTCTGGTGAAGCTGGTCCC 450
 NM_007742.3 CGGGTGAAGCTGGTCTCCCTGGTGCACAGGGTCTGGTGAAGCTGGTCCC 450

 Col141 AGCCCTGGTCTGATGGCAAAA 472
 NM_007742.3 AGCCCTGGTCTGATGGCAAAA 472

(D)

Col3A1 ATGCTGSAAGG-AAGAACCATGTCAAATATGTGTGTGACTCAGGATCT 49
 NM_009930.2 ATGCTGSAAGG-AAGAACCATGTCAAATATGTGTGTGACTCAGGATCT 50

 Col3A1 GTCTTTCGATGACATAATCTGTGTGAGGGAGCCACTAGACTGCCCCAA 99
 NM_009930.2 GTCTTTCGATGACATAATCTGTGTGAGGGAGCCACTAGACTGCCCCAA 100

 Col3A1 CCCAGAGATCCCATTTGGAGAATGTGTGCAATATGCCACAGGCTTCA 149
 NM_009930.2 CCCAGAGATCCCATTTGGAGAATGTGTGCAATATGCCACAGGCTTCA 150

 Col3A1 CACCTGCTCTGTGCTTCTGTGATGGCCATGGACCTCAAGGGCCCAAGGG 199
 NM_009930.2 CACCTGCTCTGTGCTTCTGTGATGGCCATGGACCTCAAGGGCCCAAGGG 200

 Col3A1 GGTCCGGTCTCTGGGATTCCTGGGATGGGAAATGGTGAACCTGGCTTCCC 249
 NM_009930.2 GATCCGGTCTCTGGGATGGGATGGGAAATGGTGAACCTGGCTTCCC 250
 *
 Col3A1 AGGACACCAAGGCTCCCTGGGCTCTGGCTCCCTGGGAATCTGTGAAT 299
 NM_009930.2 AGGACACCAAGGCTCCCTGGGCTCTGGCTCCCTGGGAATCTGTGAAT 300

 Col3A1 CATGTCACACTGGTGGCCAAAATTATTCTCCCAATTGCAACCATATGAT 349
 NM_009930.2 CATGTCACACTGGTGGCCAAAATTATTCTCCCAATTGCAACCATATGAT 350

 Col3A1 GTCAAGTCTGGAGTGGAGGAAATGGTGTCTGGGACCTGGTGTCTGGTCC 399
 NM_009930.2 GTCAAGTCTGGAGTGGAGGAAATGGTGTCTGGGACCTGGTGTCTGGTCC 400

 Col3A1 ACCAGGGCCCTCCAGGACCCCCCTGGTTCTCTGGACATCTCTGG 449
 NM_009930.2 ACCAGGGCCCTCCAGGACCCCCCTGGTTCTCTGGACATCTCTGG 450

 Col3A1 GTTCTCTGGATACCAAGGCTCCCTGGGTGAACCTGGTCAAGCTGGTCCG 499
 NM_009930.2 GTTCTCTGGATACCAAGGCTCCCTGGGTGAACCTGGTCAAGCTGGTCCG 500

 Col3A1 GCAGGGCCCTCCAGGACCTCTGGTGTCTGGTCAAGCTGGTCTGGTCCG 549
 NM_009930.2 GCAGGGCCCTCCAGGACCTCTGGTGTCTGGTCAAGCTGGTCTGGTCCG 550

 Col3A1 AAAGGATGGAGAGTCAGGAAGACCTGACGACCTGGAGAGGGTGGACTGC 599
 NM_009930.2 AAAGGATGGAGAGTCAGGAAGACCTGACGACCTGGAGAGGGTGGACTGC 600

 Col3A1 CTGGACCTCCAGGATATCAA 619
 NM_009930.2 CTGGACCTCCAGGATATCAA 620

圖 3. 指標基因部分 cDNA 序列與最相近基因之比

對分析。(A) *hAQP3*; (B) *mAQP3*; (C) *ColIA1*; (D) *Col3A1*

三、水通道蛋白 3 (*AQP3*)、膠原蛋白第一型 (*ColIA1*)、膠原蛋白第三型 (*Col3A1*) 基因表現

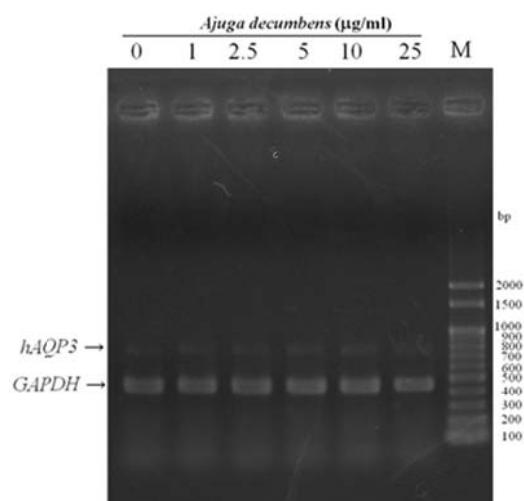
由圖 4 之結果顯示，以 1~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的白尾蜈蚣草粗萃取物處理人類角質層細胞 24 小時，*hAQP3* mRNA 表現量有些微增加之現象，但與未加粗萃取物的控制組間並無統計上之顯著差異。處理 48 小時後 *hAQP3* mRNA 表現量與 24 處理小時相較之下似有些微降低，但亦無統計上的意義。而小鼠 3T3 纖維母細胞之 *mAQP3* mRNA 表現結果顯示，經白尾蜈蚣草粗萃取物處理 24 小時，於 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度處理可提高 *mAQP3* mRNA 表現量 (144.5 %)，但 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度處理，*mAQP3* mRNA 表現有降低的現象 (圖 5A 及圖 5C)；處理 48 小時後，則是以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度處理會有較高的 mRNA 表現 (202.1 %)，具有統計上的顯著差異 ($p<0.05$) (圖 5B 及圖 5C)。我們發現以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的劑量處理 48 小時有較高之 mRNA 表現量，且低劑量、短時間及有效為市售保養品之需求，且以 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理 24 小時之 mRNA 表現量僅次高濃度處理 48 小時，因此 5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之白尾蜈蚣草粗萃取物應可做為日後保養品具備保濕功能添加劑量之參考。

白尾蜈蚣草粗萃取物處理小鼠 3T3 纖維母細胞 24 小時後，膠原蛋白第一型基因 *ColIA1* mRNA 表現於 10 及 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之濃度處理下與未加粗萃取物處理之控制組相較有顯著差異 (分別為 $p<0.05$ 及 $p<0.01$) (圖 6A 及圖 6C)。處理 48 小時後，mRNA 表現則無顯著變化 (圖 6B 及圖 6C)。而膠原蛋白第三型基因 *Col3A1* mRNA 表現，由圖 7A 及圖 7C 的結果顯示處理 24 小時後，雖 *Col3A1* mRNA 表現略具增加趨勢，但與未加粗萃取物藥處理之控制組間並無顯著差異；5、10 及 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之濃度處理 48 小時之組別，*Col3A1* mRNA 表現皆有明顯之提升，具有統計上之顯著差異 (分別為 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$)。同時由實驗結果觀察到，本實驗於模擬真皮層之小鼠 3T3 纖維母細胞中，膠原蛋白基因表現量是第三型大於第一型，於實際皮膚真皮層中

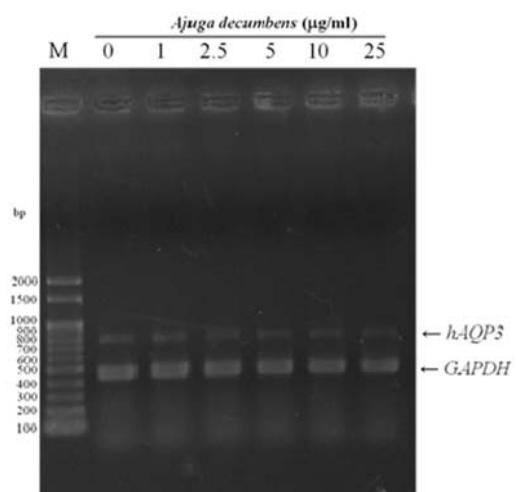
報導膠原蛋白第一及第三型之表現量似乎不甚符合，初步推論可能與小鼠真皮層中膠原蛋白含量與人類真皮層中含量有些微差異。由實驗結果顯示，白尾蜈蚣草粗萃取物確實能有效增加 *ColIA1* 及 *Col3A1* mRNA 表現的表現，應可藉由增加膠原蛋白 mRNA 的表現，而導致膠原蛋白含量的增加，達到保濕與抗老化的效果。

因此我們初步推論白尾蜈蚣草粗萃取物可能對皮膚具有保濕與抗老化之功效，同時因為在 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度之內均不具細胞毒性，在安全劑量的範圍內，應可利用其中之有效成份開發為保濕及抗老化化粧品的潛力。

(A)



(B)



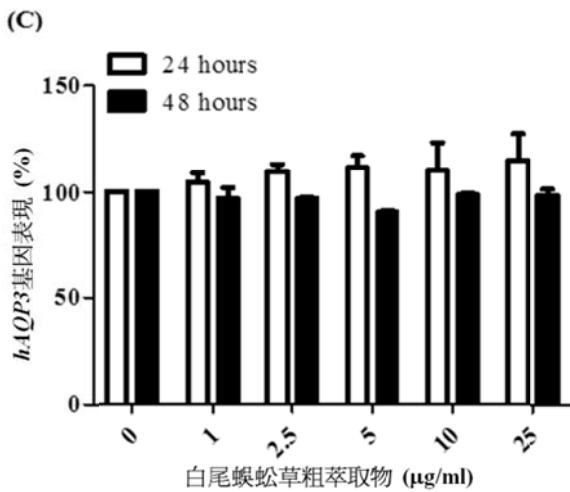


圖 4. 白尾蜈蚣草粗萃取物處理人類角質層細胞之 *hAQP3* mRNA 表現：(A) 處理 24 小時之瓊脂膠體電泳圖；(B) 處理 48 小時之瓊脂膠體電泳圖；(C) 將膠體電泳訊號以 AlphaImager 2200 軟體量化後並以管家基因 *GAPDH* 為相對標準之量化結果

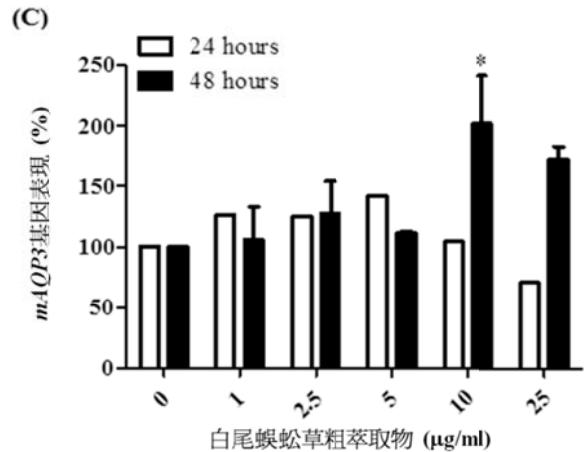
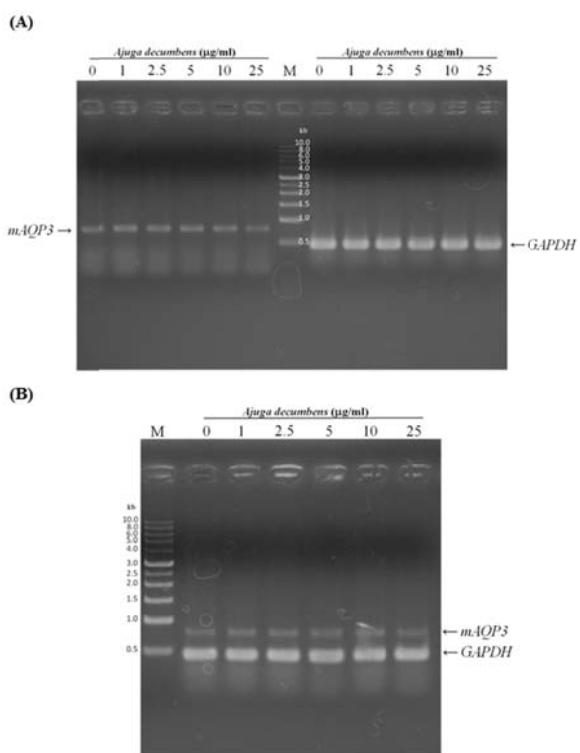
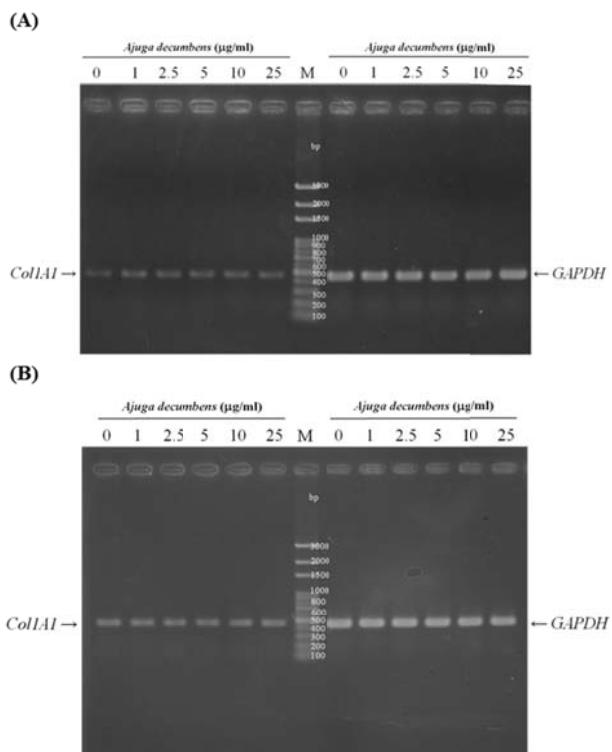


圖 5. 白尾蜈蚣草粗萃取物處理小鼠 3T3 纖維母細胞之 *mAQP3* mRNA 表現：(A) 處理 24 小時之瓊脂膠體電泳圖；(B) 處理 48 小時之瓊脂膠體電泳圖；(C) 將膠體電泳訊號以 AlphaImager 2200 軟體量化後並以管家基因 *GAPDH* 為相對標準之量化結果



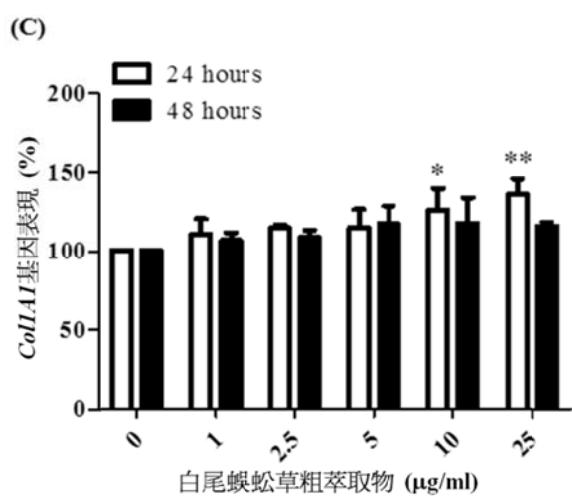


圖 6. 白尾蜈蚣草粗萃取物處理小鼠 3T3 纖維母細胞之 *Col1A1* mRNA 表現:(A) 處理 24 小時之瓊脂膠體電泳圖;(B) 處理 48 小時之瓊脂膠體電泳圖;(C) 將膠體電泳訊號以 AlphaImager 2200 軟體量化後並以管家基因 *GAPDH* 為相對標準之量化結果

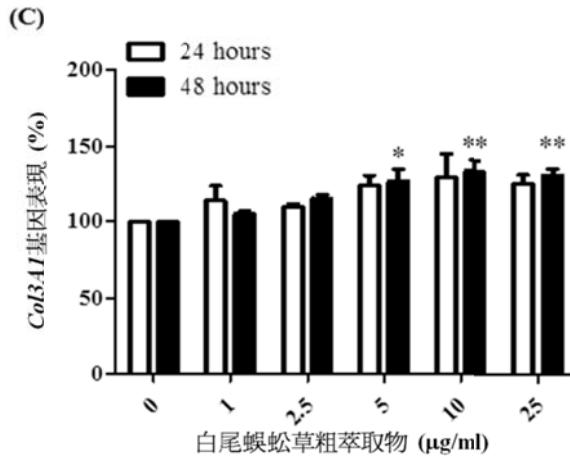
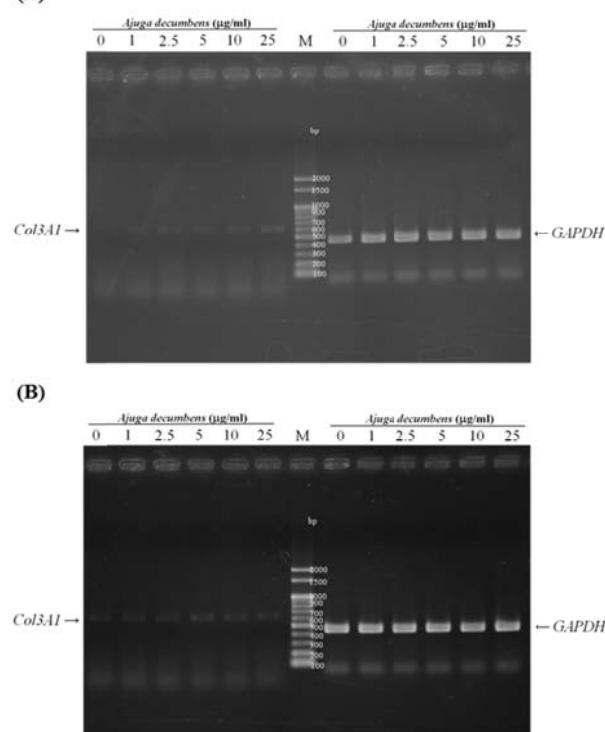


圖 7. 白尾蜈蚣草粗萃取物處理小鼠 3T3 纖維母細胞之 *Col3A1* mRNA 表現:(A) 處理 24 小時之瓊脂膠體電泳圖;(B) 處理 48 小時之瓊脂膠體電泳圖;(C) 將膠體電泳訊號以 AlphaImager 2200 軟體量化後並以管家基因 *GAPDH* 為相對標準之量化結果

肆、謝辭

感謝本校生物科技系陳品晟副教授提供人類 HaCaT 角質層細胞株，同時感謝本校提供本實驗經費補助，校內計畫編號 CN10023。

伍、參考文獻

- Agre, P., Saboori, A.M., Asimos, A., & Smith, B.L. (1987). Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J Biol Chem*, 26236, 17497-17503.
- Apone, F., Tito, A., Carola, A., Arciello, S., Tortora, A., Filippini, L., Monoli, I., Cucchiara, M., Gibertoni, S., Chrispeels, M.J., & Colucci, G. (2010). A mixture of peptides and sugars derived from plant cell walls increases plant defense responses to stress and attenuates ageing-associated molecular changes in cultured skin cells. *J Biotechnol*, 145, 367-376.
- Borgnia, M., Engel, A., & Agre, P. (1999). Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem*, 68, 425-458.
- Choi, E.H., Wang, F., Zhang, X., Brown, B.E.,

- Feingold, K.R., & Elias, P.M. (2005). Is endogenous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans? *J Invest Dermatol*, 125, 288-293.
- Dumas, M., Sadick, N.S., Noblesse, E., Juan, M., Lachmann-Weber, N., Boury-Jamot, M., Sougrat, R., Verbavatz, J.M., Schnebert, S., & Bonté, F. (2007). Hydrating skin by stimulating biosynthesis of aquaporins. *J Drugs Dermatol*, 6, s20-24.
- Hara-Chikuma, M. (2003). Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7360-7365.
- Hara-Chikuma, M. (2005). Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. *Biol Cell*, 97, 479-486.
- Hara-Chikuma, M. (2008). Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J Invest Dermatol*, 128, 2145-2151.
- Hara-Chikuma, M., & Verkman, A.S. (2008). Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med (Berl)*, 862, 221-231.
- Lee, S.Y., Kim, S.H., & Choi, E.C. (2011). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in squamous cell carcinoma of the tonsil and their clinical significance. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 4, 88-94.
- Ma, T., Hara, M., Sougrat, R., Verbavatz, J.M., & Verkman, A.S. (2002). Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J Biol Chem*, 27719, 17147-17153.
- Ono, Y., Fukaya, Y., Imai, S., & Yamakuni, T. (2008). Beneficial effects of *Ajuga decumbens* on osteoporosis and arthritis. *Biol Pharm Bull*, 316, 1199-1204.
- Qin, H., Zheng, X., Zhong, X., Shetty, A.K., Elias, P.M., & Bollag, W.B. (2011). Aquaporin-3 in keratinocytes and skin: its role and interaction with phospholipase D2. *Arch Biochem Biophys*, 5082, 138-143.
- Sidel, V.W. (1957). Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J Gen Physiol*, 41, 243-257.
- Takasaki, M., Haruna, M., & Konoshima, T. (1998). New glycosides from *Ajuga decumbens*. *J Nat Prod*, 61, 1105-1109.
- Takasaki, M., Nishino, H., & Konoshima, T. (1999). Cancer chemopreventive agents (antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*. *J Nat Prod*, 62, 972-975.
- Verkman, A.S., & Mitra, A.K. (2000). Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2781, F13-28.

The extract of *Ajuga decumbens* employed in the application of hydrating and anti-aging cosmetics

Kuan Han Lee¹ Shang Chian Lue² I Ting Lin³ Kun Hsiang Liu^{2*}

¹Department of Pharmacy,

²Department of Cosmetic Science,

³Department of Biotechnology,

Chia Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Abstract

In recent years, herbal extracts used in cosmetic products become the current R & D trends because of the requirement of women, market demand, as well as respect for the natural ingredients. In human skin, aquaporins (AQPs) are a family of proteins that facilitate water transport across cell membranes by forming channels. AQP3 is a membrane transporter of water and glycerol expressed in plasma membranes in the basal layer keratinocytes of epidermis in normal skin. AQP3 is a major protein implicated in skin hydration. In addition, collagens are structural proteins and the major component of extracellular matrix of dermis in skin. There are ten types of collagens in dermis, mainly type I and type III collagens. In this study, an ethanolic/water extract of *Ajuga decumbens*, a naturally occurring herb in China and Japan, was selected as the hydrating and anti-aging agent. We treated human HaCaT keratinocytes and mouse 3T3 fibroblasts with various concentrations of *Ajuga decumbens* extract. The results indicate that: (1) *Ajuga decumbens* extract has no cell toxicity in various concentrations and times of treatments; (2) the level of *mAPQ3* mRNA expression was slightly increased by 5 µg/ml extract after 24-hour treatment, and significantly increased by 10 µg/ml extract after 48 hours; (3) after 24 hours of treatment with this extract (10 and 25 µg/ml), *ColIA1* mRNA was significantly increased, and *Col3A1* mRNA was significantly increased by 5, 10 and 25 µg/ml after 48-hour treatment in 3T3 cells. Therefore, *Ajuga decumbens* extract should be used as hydrating active ingredients in the application of natural hydrating and anti-aging cosmetics.

Key words: *Ajuga decumbens*, aquaporins, collagens, human HaCaT keratinocytes, mouse 3T3 fibroblasts

*Correspondence: Development of Cosmetic Science, Chia Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Tel: +886-6-2664911Ext2514

Fax: +886-6-2662135

E-mail: sandraliu@mail.chna.edu.tw