

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNCS9502

計畫名稱：褐藻多醣應用於化妝品之研究

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

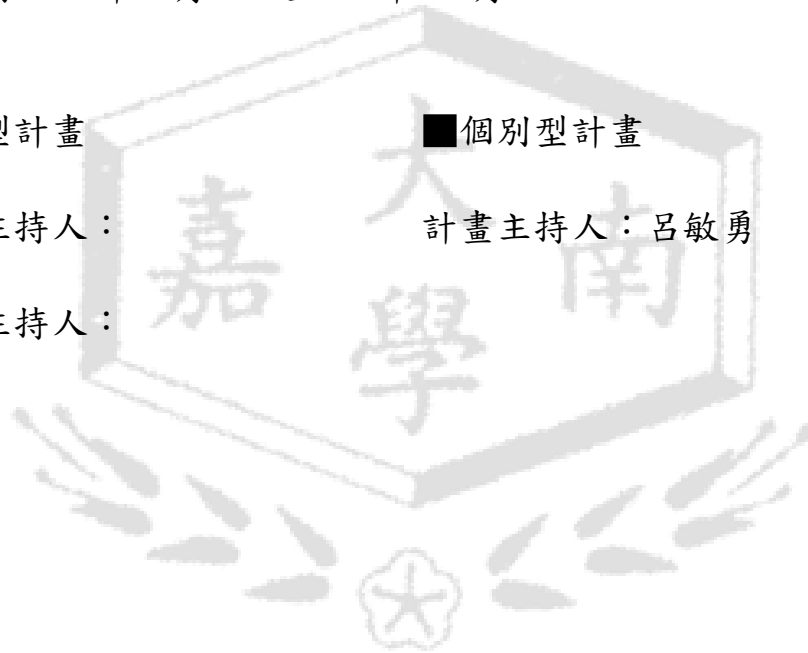
整合型計畫

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 96 年 02 月 27 日

目 錄

一、研究摘要	-----	2
二、簡介	-----	4
三、研究材料與方法	-----	6
四、結果與討論	-----	9
五、結論	-----	25
六、參考文獻	-----	26



一、研究摘要

本研究計劃已利用臺灣沿海的重緣葉馬尾藻(褐藻)所含的多醣體處理 3T3 老鼠纖維母細胞或細胞培養液，並進行基質金屬蛋白酶的酵素活性分析。我們發現 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體可直接抑制細胞培養液所含 MMP-2 的活性，但對於 MMP-9 的活性卻沒有影響。進一步地，我們發現在處理 3T3 細胞 7.5 小時後，0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體會藉由抑制 pro-MMP-2 的分泌量而達到抑制 3T3 細胞分泌 MMP-2 的功效；而且，這些小分子量的重緣葉馬尾藻多醣體會因為抑制 MMP-2 的活性及酵素分泌，使得細胞培養液內膠原蛋白的破壞減緩而導致膠原蛋白量的累積。因此，我們認為小分子量的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣可以抑制 MMP-2 的活性及酵素分泌，可以減緩膠原蛋白的破壞，對於皮膚具有抗老化能力，可作為抗老化化妝品的有效成份，以達到利用天然成份開發抗老化化妝品的目的。

重緣葉馬尾藻 (*Sargassum duplicatum*, Sd)



二、簡介

膠原蛋白(collagens)是人類皮膚真皮層(dermis)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、type III 與 type V 膠原蛋白則是真皮層細胞外間質內主要的膠原蛋白；但隨著年齡的增加，真皮層細胞外間質內的間質金屬螯合蛋白酶(matrix metalloproteinases)和彈力蛋白酶(elastases)的活性也隨著增加，將分別導致皮膚真皮層細胞外間質內的膠原蛋白與彈力蛋白(elastins)被分解，而引起皺縮、厚度變薄等皮膚的老化現象(1, 2, 3, 4, 5, 6)。

本實驗室已證實樟芝菌絲體經深層培養所得的胞外多醣體可用於抑制 3T3 纖維母細胞所分泌 matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)及 MMP-9 的活性，於 0.5 mg/ml 培養三天並不會對細胞產生毒性。；利用 gelatin-based zymography 來分析 MMP-2 及 MMP-9 的活性，發現於處理細胞 48 小時後，抑制 MMP-2 及 MMP-9 的活性最顯著。另一方面，我們以分離所得到的樟芝胞外多醣體與纖維母細胞共同培養至 4~8 小時，膠原蛋白的累積量與控制組相較之下增加 38%。因此，樟芝胞外多醣體是相當值得開發成抗老化的化妝品。由此可推測許許多多尚未被開

發利用的不同物種之多醣體，非常值得投入研發。另外，因為褐藻多醣富含岩藻醣(fucose)，而根據文獻報導，以人工合成之富含岩藻醣的寡醣或多醣可以刺激纖維母細胞增生並促進真皮層大分子蛋白增生以防止皮膚老化(7, 8, 9, 10, 11, 12)，因此我們推測褐藻多醣亦具有相同的功效，可以抑制間質金屬螯合蛋白酶的活性，對於皮膚具有抗老化能力，可作為抗老化化妝品的有效成份。

因此本研究計劃將利用臺灣沿海產的褐藻所含有的褐藻多醣處理培養的 3T3 老鼠纖維母細胞，以進行褐藻多醣對於細胞生長的毒性分析，並偵測 type I 膠原蛋白之蛋白質質量以及間質金屬螯合蛋白酶的酵素活性分析。我們預期褐藻多醣可以抑制間質金屬螯合蛋白酶的活性，使得 type I 膠原蛋白之破壞減少，導致 type I 膠原蛋白之蛋白質質量累積，對於皮膚具有抗老化能力，可作為抗老化化妝品的有效成份，以達到利用天然成份開發抗老化化妝品的目的。

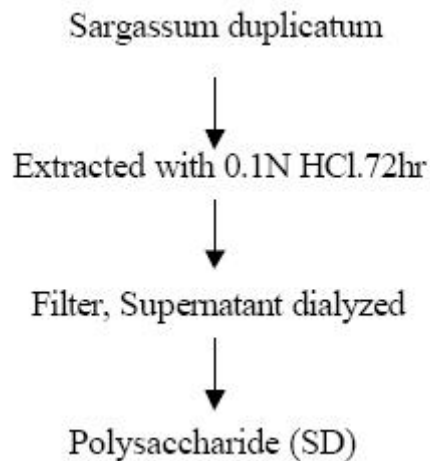
三、研究材料與方法

1. 纖維母細胞的培養與處理：

老鼠 3T3 纖維母細胞(mouse 3T3 fibroblast)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不同分子量褐藻多醣體的處理實驗。

2. 褐藻多醣的萃取及分子量分析：

褐藻多醣體的萃取如圖所示：



並以 gel permeation chromatography 判定褐藻多醣體的分子量

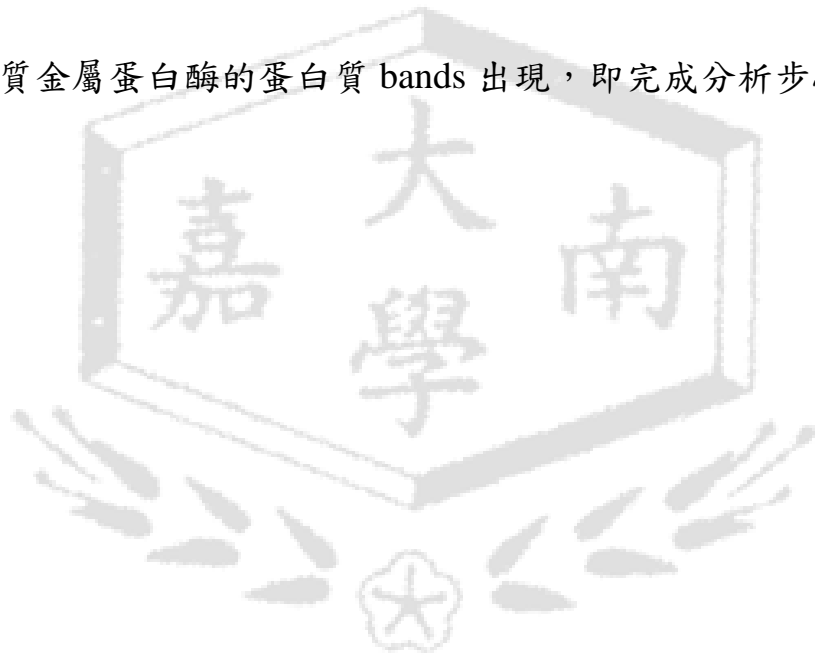
3. 褐藻多醣體對於纖維母細胞的毒性分析：

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，再以不同濃度的褐藻多醣處理細胞，於 37 °C 培養 4 天，再 加入 0.2% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 50 μg/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，代表細胞增生的情形。

4. 褐藻多醣體對於基質金屬蛋白酶的 zymography 活性分析：

收集有處理或無處理(控制組)褐藻多醣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 μg)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，即完成分析步驟。



四、結果與討論

在進行 3T3 細胞處理試驗之前，必須先確認何種劑量(濃度)的褐藻多醣體不會對細胞造成毒性傷害，本研究所利用的褐藻多醣體為來自重緣葉馬尾藻 (*Sargassum duplicatum*, Sd)的多醣體。褐藻多醣體的細胞毒性分析乃偵測褐藻多醣體於處理後對於細胞的存活率，也就是將處理不同劑量與不同時間點的褐藻多醣體之 3T3 細胞進行所謂的 MTT (3-[4,5-dimethylthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay，MTT assay 主要是分析細胞粒腺體中琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase)的活性，琥珀酸去氫酶可使 MTT 在結構上發生還原反應，而產生不溶性的藍紫色結晶。於 75 % 酒精濃度所沉澱的褐藻多醣體，我們選取的濃度範圍介於 0.1 ~1 mg/ml，處理細胞 72 小時後，進行 MTT 細胞毒性測試分析，實驗結果顯示重緣葉馬尾藻多醣體(Sd polysaccharides)於 0.5 mg/ml 的劑量以上，處理細胞 72 小時，會造成 3T3 細胞的存活率降至 80%以下，對於 3T3 細胞產生細胞毒性。因此，我們選取處理細胞的安全劑量為 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體。

在重緣葉馬尾藻總多醣體對於 MMPs 的活性分析探討中，我們也是收集正常培養 48 小時的 3T3 細胞培養液，以 0.5 mg/ml

的重緣葉馬尾藻多醣體處理細胞培養液，反應 0~72 小時，再進行基質金屬蛋白酶的酵素活性分析，以偵測重緣葉馬尾藻多醣體是否會抑制基質金屬蛋白酶的酵素活性，由圖一的實驗結果顯示，以 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體處理細胞培養液 72 小時，我們發現對於細胞培養液內所含 MMP-2 的活性有抑制的作用，而 MMP-9 的活性卻沒有抑制的作用。另外，我們同樣以 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 纖維母細胞，反應 0~72 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的酵素活性分析，由圖五的實驗結果顯示，以 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 纖維母細胞 72 小時，與控制組(C₇₂)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，由以上的實驗資料(圖一和圖二)，我們認為 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體可直接抑制細胞培養液所含 MMP-2 的活性，對於細胞培養液所含 MMP-9 的活性卻沒有影響；而且 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體在 72 小時之內，並不會抑制 3T3 纖維母細胞的 MMPs 酵素分泌。

小分子量的多醣體才能真正適合當作化妝品的原料，而最近我們發現小分子量(小於 30,000 Da)的樟芝(*Taiwanofungus camphoratus*)菌絲體深層培養的胞外多醣體具有抑制 MMPs 活

性的功效，而這些小分子量的樟芝胞外多醣體是以 50~75% 酒精濃度範圍所沉澱分離而獲得的。因此，我們亦利用 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離小分子量的重緣葉馬尾藻多醣體(分子量未分析)，再以這些小分子量的重緣葉馬尾藻多醣體對於 MMPs 的活性進行分析，我們收集正常培養 48 小時的 3T3 細胞培養液，以 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體處理細胞培養液，反應 0~48 小時，再進行基質金屬蛋白酶的酵素活性分析，以偵測 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體是否會抑制基質金屬蛋白酶的酵素活性，由圖三的實驗結果顯示，以 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體處理細胞培養液 48 小時，我們發現對於細胞培養液內所含 MMP-2 的活性確實有抑制的作用，而對於 MMP-9 的活性卻沒有抑制的作用。另外，我們同樣以 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 纖維母細胞，反應 0~72 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的酵素活性分析，由圖四的實驗結果顯示，以 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 纖維母細胞 72 小時，與控制組(C₇₂)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，由以上的實驗資料(圖三和圖四)，我們認為 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體可直接抑制細胞培養液所含 MMP-2 的活性，對於細胞培養液所含 MMP-9 的活性卻沒有影響。而且 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體在處理 3T3 纖維母細胞 72 小時後，與控制組(C₇₂)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 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體並不會抑制 3T3 纖維母細胞的 MMPs 酵素分泌。

但是，我們由圖四的實驗資料發現在處理 3T3 纖維母細胞 10 小時之內，細胞培養液內所含 MMP-2 及 MMP-9 的活性並沒有緩慢增加的現象產生，所以我們可以合理推測在處理 3T3 纖維母細胞 10 小時之內，0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體可能會抑制 3T3 纖維母細胞的 MMPs 酵素分泌。因此，我們嘗試以不同劑量(0~0.5 mg/ml)的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 纖維母細胞，反應 7.5 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的活性分析，我們發現細胞培養液內所含 MMP-2 的活性會隨著重緣葉馬尾藻多醣體的處理劑量增加而稍為減少，而細

胞培養液內所含 MMP-9 的活性並不受影響，另外，我們驚訝發現 pro-MMP-2 的分泌量會隨著重緣葉馬尾藻多醣體的處理劑量增加而快速減少，如圖五所示。因此，我們認為在處理 3T3 纖維母細胞 7.5 小時之內，0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體會藉由抑制 pro-MMP-2 的分泌量而達到抑制 3T3 纖維母細胞分泌 MMP-2 的功效。

由以上的實驗資料(圖二及圖四)得知小分子量的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體對於 3T3 纖維母細胞之細胞培養液內所含 MMP-2 的活性抑制比重緣葉馬尾藻總多醣體的抑制效果好。因此，我們分析小分子量的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體與大分子量的 0~50% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體的單醣組成成份，發現小分子量的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體的岩藻糖(fucose)與半乳糖(galactose)組成百分比分別為 39.50%、36.21%，而大分子量的 0~50% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體的岩藻糖與半乳糖組成百分比分別為 17.89%、19.77%，由表一的研究資料，我們推測小分子量的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體因含有較多成份的岩藻糖與半乳糖，使得這些重緣葉馬尾藻多醣體對

於3T3纖維母細胞之細胞培養液內所含MMP-2的活性及酵素分泌具有較好的抑制效果。與文獻已發表的富含岩藻糖的多醣或寡糖(fucose-rich polysaccharides or oligosaccharides)具有抑制MMP-2及MMP-9活性的能力之實驗研究結果相似(12)。

進一步，我們探討岩藻糖與半乳糖對於MMPs的活性分析，我們收集正常培養48小時的3T3細胞培養液，以197.5 µg/ml的岩藻糖或181.5 µg/ml的半乳糖(以岩藻糖與半乳糖在50~75%酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體的組成百分比計算出的濃度)處理細胞培養液，反應0~72小時，再進行基質金屬蛋白酶的酵素活性分析，以偵測岩藻糖或半乳糖是否會抑制基質金屬蛋白酶的酵素活性，由圖六的上圖及圖七的上圖之實驗結果顯示，以197.5 µg/ml的岩藻糖或181.5 µg/ml的半乳糖處理細胞培養液72小時，對於細胞培養液內所含MMP-2及MMP-9的活性沒有任何抑制的作用。另外，我們同樣以197.5 µg/ml的岩藻糖或181.5 µg/ml的半乳糖處理3T3纖維母細胞，反應0~72小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行MMPs的酵素活性分析，由圖六的下圖及圖七的下圖之實驗結果顯示，以197.5 µg/ml的岩藻糖或181.5 µg/ml的半乳糖處理3T3纖維母細胞72小時，與控制組(C₇₂)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，由以上的實驗資料(圖六和圖七)，我們認為 197.5 $\mu\text{g/ml}$ 的岩藻糖或 181.5 $\mu\text{g/ml}$ 的半乳糖無法抑制細胞培養液所含 MMP-9 及 MMP-2 的活性；而且 197.5 $\mu\text{g/ml}$ 的岩藻糖或 181.5 $\mu\text{g/ml}$ 的半乳糖在 72 小時之內，並不會影響 3T3 纖維母細胞的 MMPs 酵素分泌。

由以上的實驗資料，我們已知 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體可直接抑制細胞培養液所含 MMP-2 的活性；而且在處理 3T3 纖維母細胞 7.5 小時之內，可以藉由抑制 pro-MMP-2 的分泌量而達到抑制 3T3 纖維母細胞分泌 MMP-2 的功效。因此，我們預測 3T3 細胞培養液內所含的膠原蛋白含量會因為重緣葉馬尾藻多醣體對於 MMP-2 的活性及酵素分泌的抑制作用，使得膠原蛋白的降解(degradation)速率減緩而造成膠原蛋白含量累積的效果。所以，我們以 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體劑量處理 3T3 細胞培養液，分別於反應 0、24、48、72 小時後，檢測細胞培養液內 type I 膠原蛋白含量的變化情形。由圖八之實驗結果顯示，處理重緣葉馬尾藻多醣體的細胞培養液內 type I 膠原蛋白含量有維持一定量的趨勢，而沒有處理重緣葉馬尾藻多醣體的細胞培養液內 type I 膠原蛋白含量在 24 小時後已破壞超過

50% (由 68.70 $\mu\text{g/ml}$ 變成 33.48 $\mu\text{g/ml}$)。由以上的實驗結果，我們認為 50~75%酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體對於 3T3 細胞培養液內所含的膠原蛋白含量會因為抑制 MMP-2 的活性及酵素分泌，使得細胞培養液內膠原蛋白的破壞減緩而導致膠原蛋白量的累積。



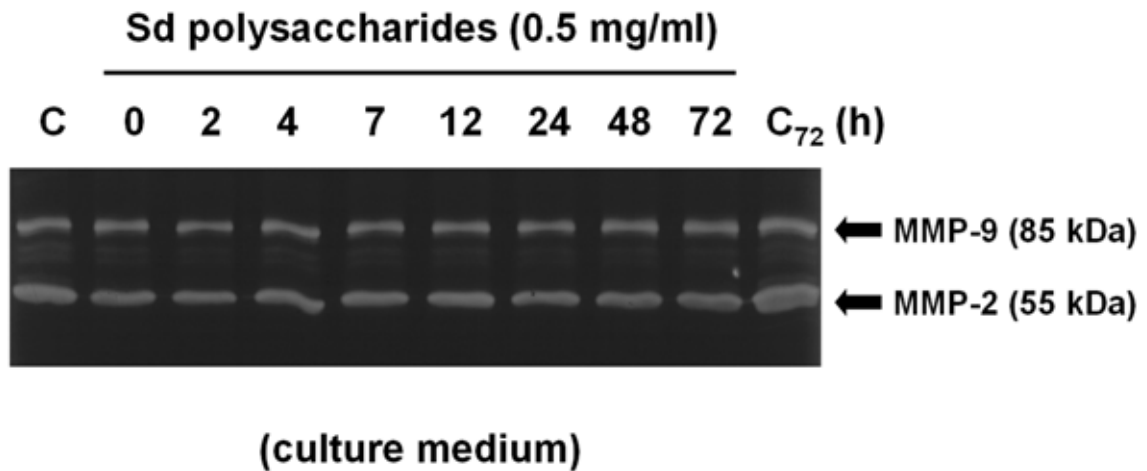


Figure 1. 以 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 細胞培養液，反應 0~72 小時，再進行 MMPs 的活性分析。C 代表未加入重緣葉馬尾藻多醣體於 3T3 細胞培養液，並放置 0 小時。C₇₂ 代表未加入重緣葉馬尾藻多醣體於 3T3 細胞培養液，並放置 72 小時。

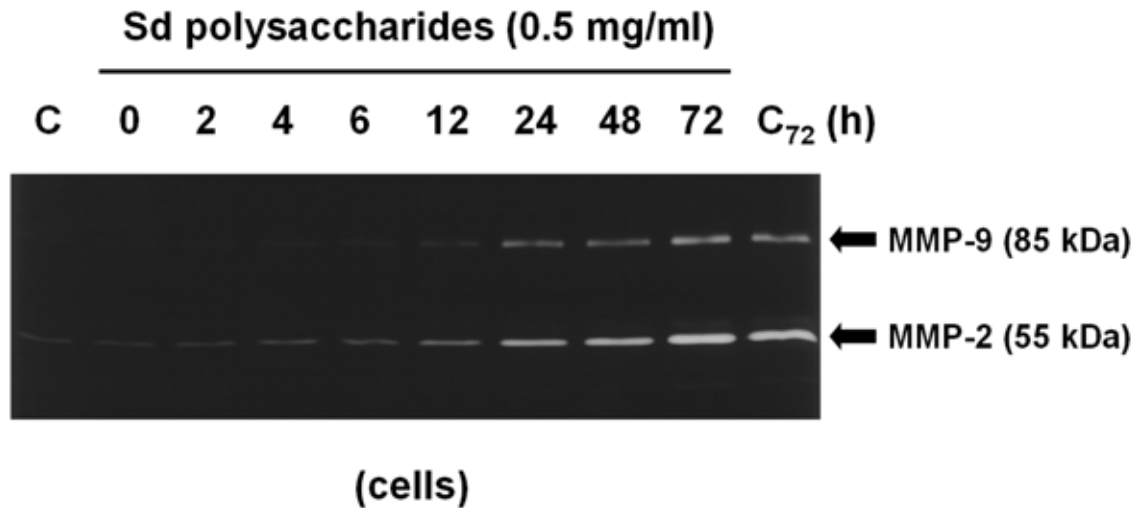


Figure 2. 以 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 纖維母細胞，反應 0~72 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的活性分析。C 代表未加入重緣葉馬尾藻多醣體於 3T3 纖維母細胞，並放置 0 小時。C₇₂ 代表未加入重緣葉馬尾藻多醣體於 3T3 纖維母細胞，並放置 72 小時。

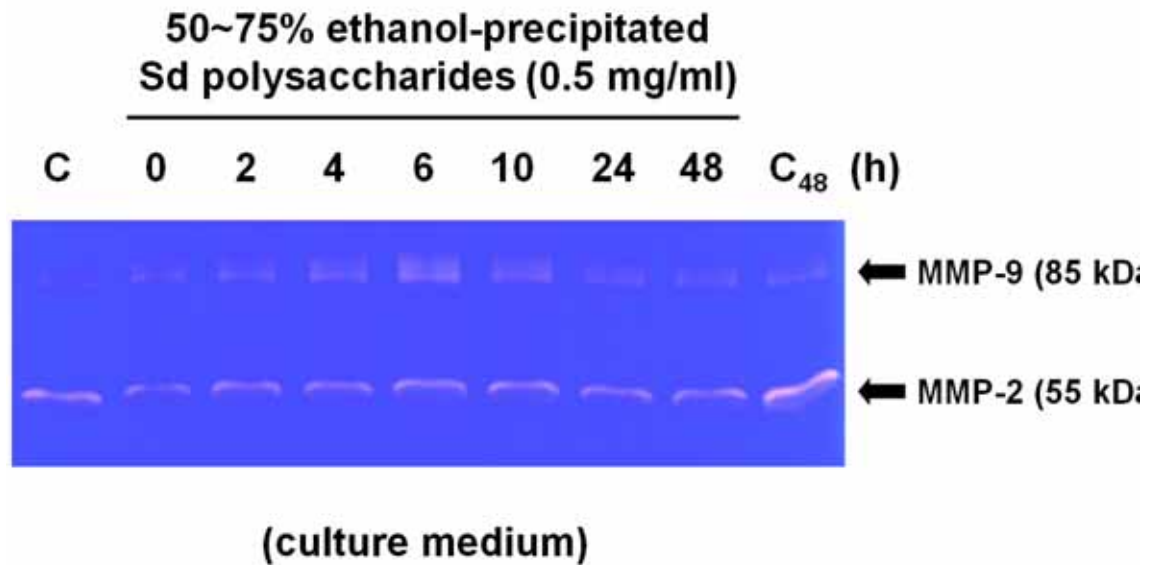


Figure 3. 以 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 細胞培養液，反應 0~48 小時，再進行 MMPs 的活性分析。C 代表未加入重緣葉馬尾藻多醣體於 3T3 細胞培養液，並放置 0 小時。C₄₈ 代表未加入重緣葉馬尾藻多醣體於 3T3 細胞培養液，並放置 48 小時。

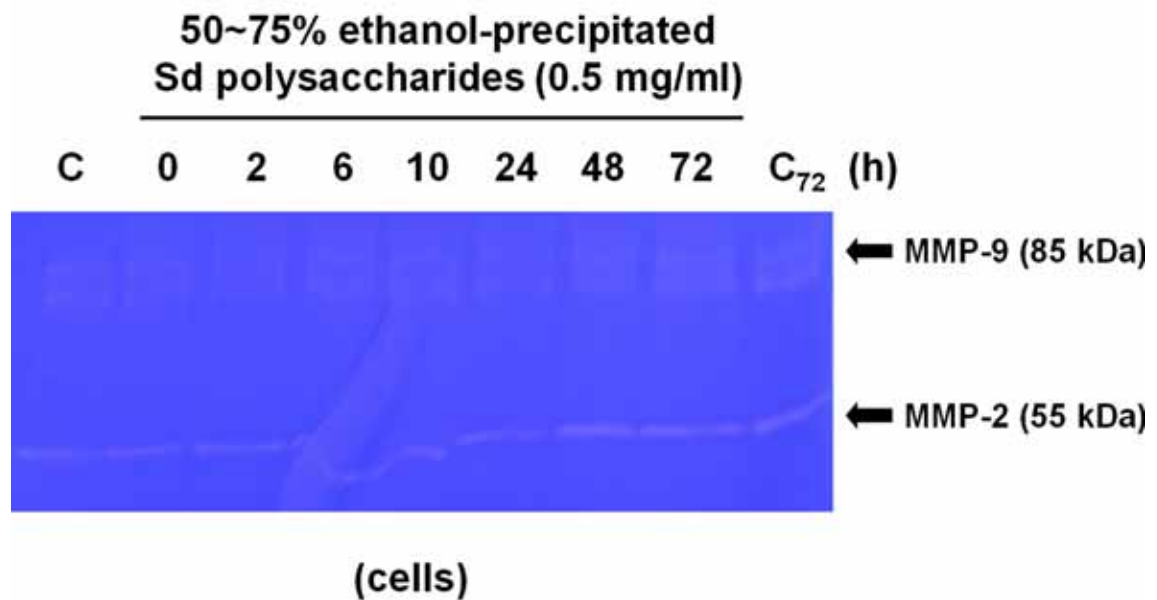


Figure 4. 以 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 纖維母細胞，反應 0~72 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的活性分析。C 代表未加入重緣葉馬尾藻多醣體於 3T3 纖維母細胞，並放置 0 小時。C₇₂ 代表未加入重緣葉馬尾藻多醣體於 3T3 纖維母細胞，並放置 72 小時。

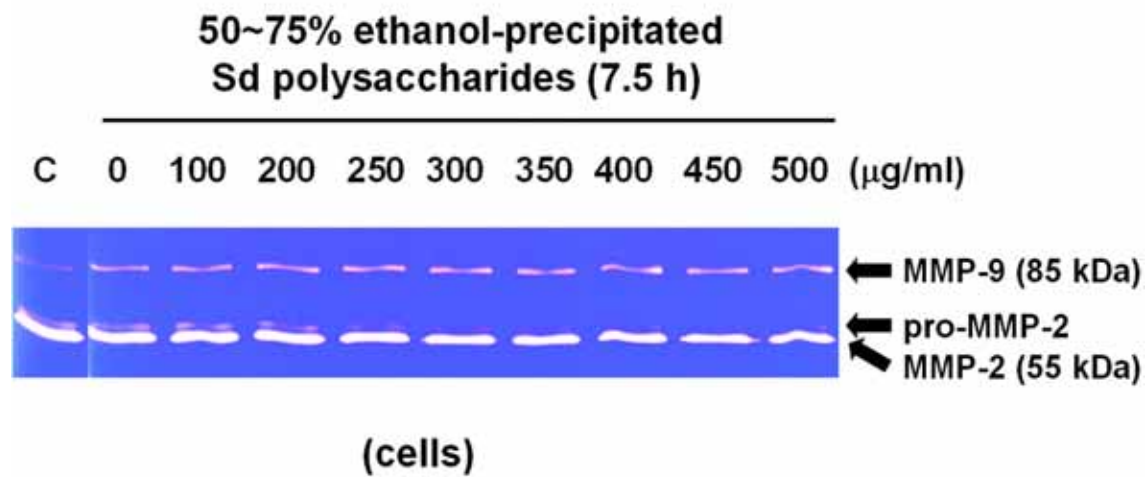


Figure 5. 以 0~0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體處理 3T3 纖維母細胞，反應 7.5 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的活性分析。

Table 1

**Characteristics of polysaccharides isolated from
*S. duplicatum***

Saccharides	50~75% ethanol-precipitated Sd polysaccharides	50% ethanol-precipitated Sd polysaccharides
Fucose	39.50%	17.89%
Galactose	36.21%	19.77%



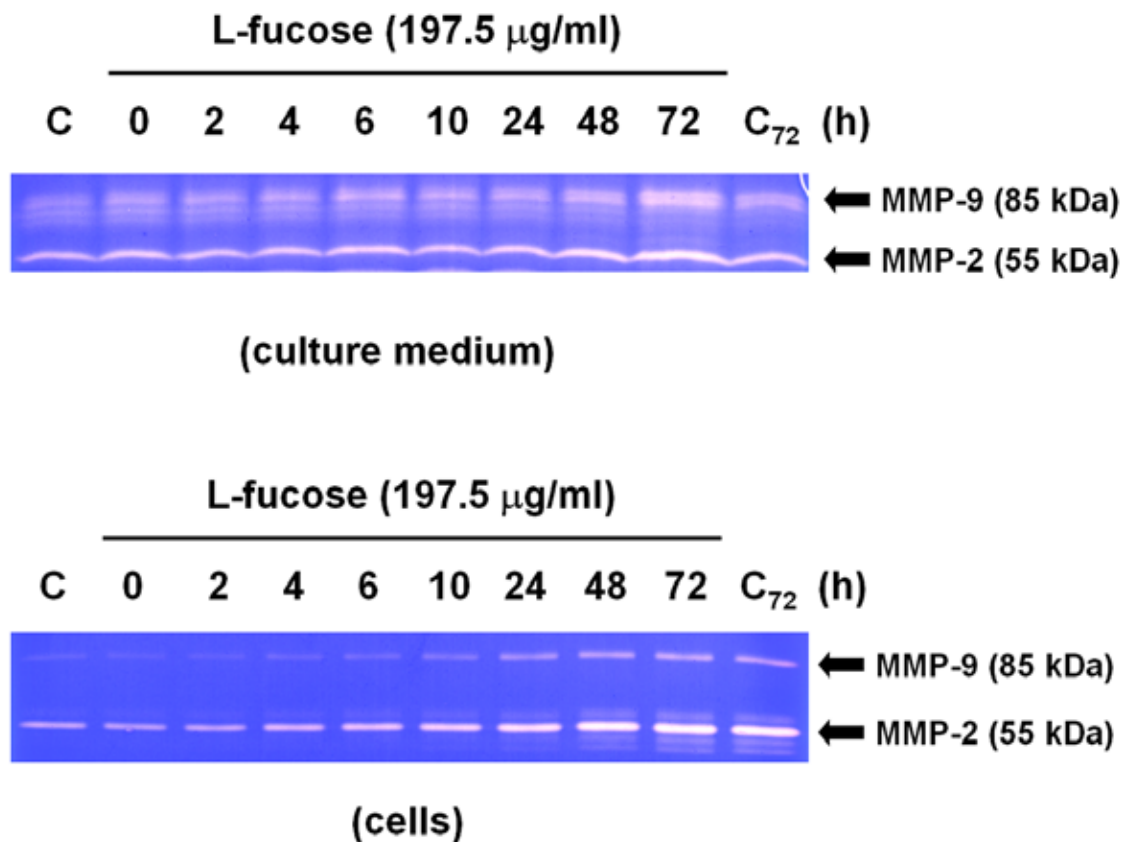


Figure 6. (上圖) 以 197.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 L-fucose 處理 3T3 細胞培養液，反應 0~72 小時，再進行 MMPs 的活性分析。C 代表未加入 L-fucose 於 3T3 細胞培養液，並放置 0 小時。C₇₂ 代表未加入 L-fucose 於 3T3 細胞培養液，並放置 72 小時。

(下圖) 以 197.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 L-fucose 處理 3T3 纖維母細胞，反應 0~72 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的活性分析。C 代表未加入 L-fucose 於 3T3 纖維母細胞，並放置 0 小時。C₇₂ 代表未加入 L-fucose 於 3T3 纖維母細胞，並放置 72 小時。

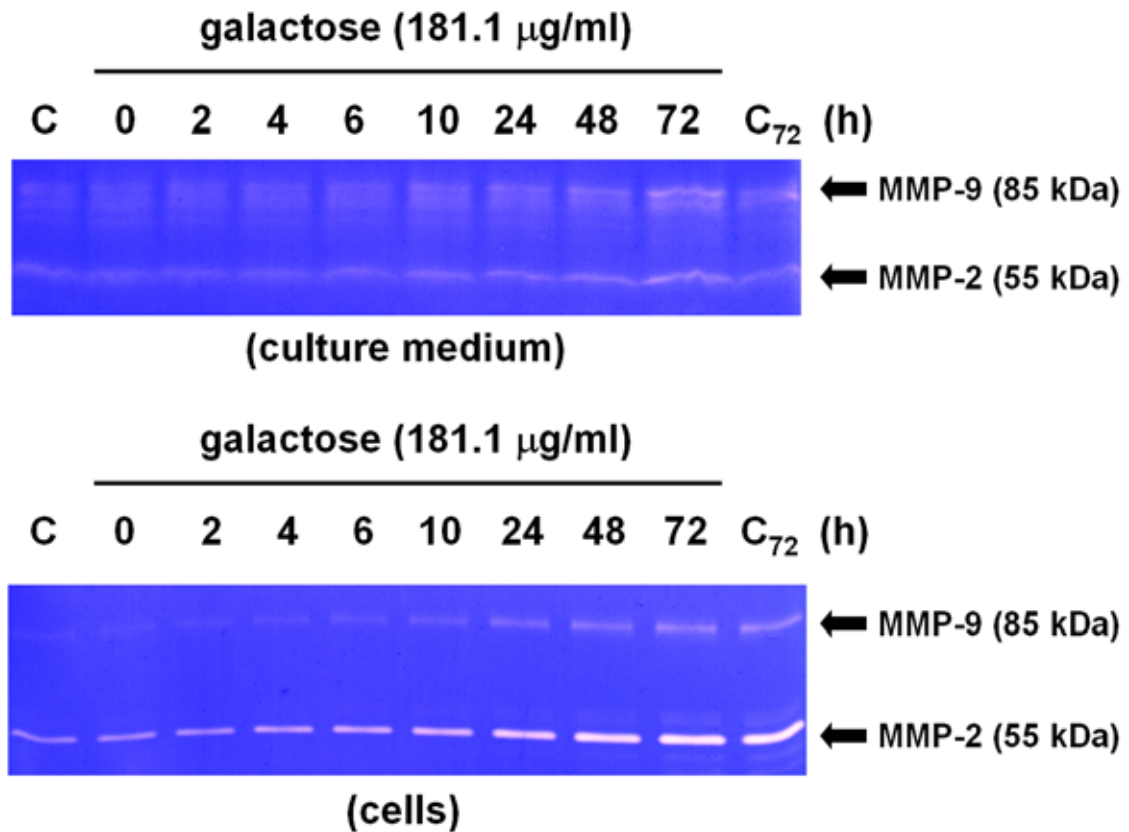


Figure 7. (上圖) 以 181.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 galactose 處理 3T3 細胞培養液，反應 0~72 小時，再進行 MMPs 的活性分析。C 代表未加入 galactose 於 3T3 細胞培養液，並放置 0 小時。C₇₂ 代表未加入 galactose 於 3T3 細胞培養液，並放置 72 小時。

(下圖) 以 181.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 galactose 處理 3T3 纖維母細胞，反應 0~72 小時，再以處理細胞後的細胞培養液進行 MMPs 的活性分析。C 代表未加入 galactose 於 3T3 纖維母細胞，並放置 0 小時。C₇₂ 代表未加入 galactose 於 3T3 纖維母細胞，並放置 72 小時。

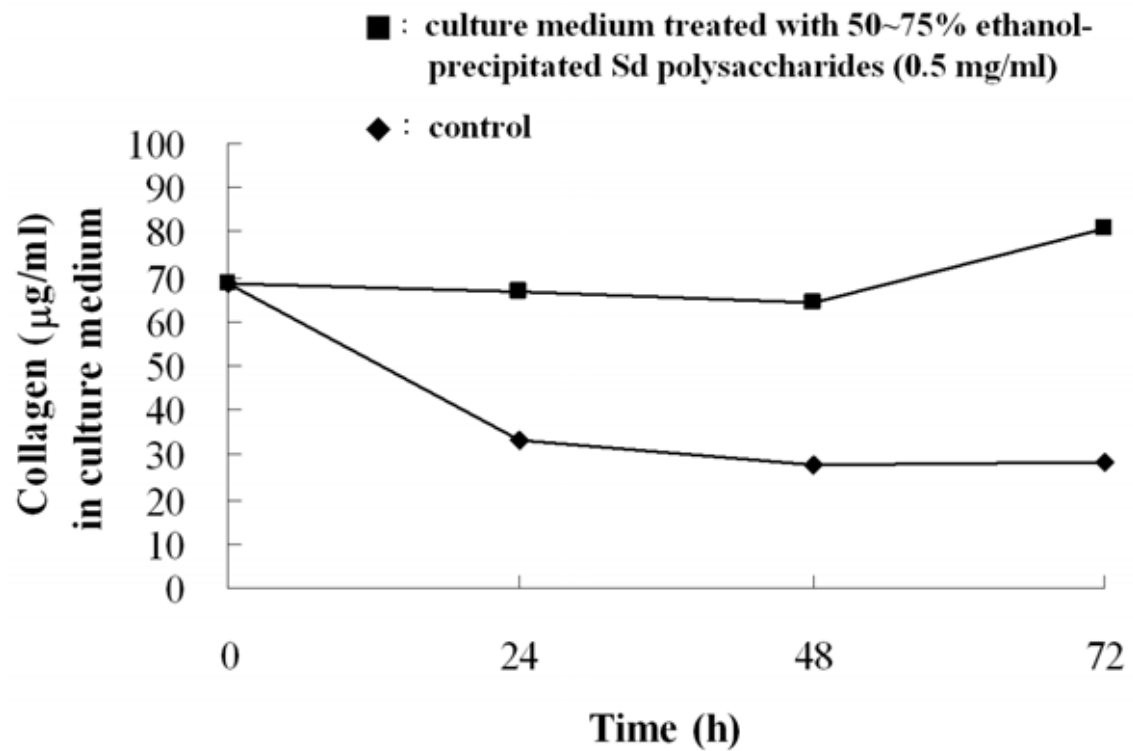


Figure 8. 以 0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體劑量處理 3T3 細胞培養液，分別於反應 0、24、48、72 小時後，檢測培養液內 type I 膠原蛋白含量的變化情形。

五、結論

1. 0.5 mg/ml 的重緣葉馬尾藻多醣體可直接抑制細胞培養液所含 MMP-2 的活性，但對於 MMP-9 的活性卻沒有影響。
2. 在處理 3T3 細胞 7.5 小時後，0.5 mg/ml 的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體會藉由抑制 pro-MMP-2 的分泌量而達到抑制 3T3 細胞分泌 MMP-2 的功效。
3. 小分子量的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣體會因為抑制 MMP-2 的活性及酵素分泌，使得細胞培養液內膠原蛋白的破壞減緩而導致膠原蛋白量的累積。
4. 小分子量的 50~75% 酒精濃度範圍沉澱分離的重緣葉馬尾藻多醣可以抑制 MMP-2 的活性及酵素分泌，可以減緩膠原蛋白的破壞，對於皮膚具有抗老化能力，可作為抗老化化妝品的有效成份。

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. Robert C, Robert AM, Robert L. 2005. Effect of a preparation containing a fucose-rich polysaccharide on periorbital wrinkles of human voluntaries. *Skin Res Technol.* 11(1): 47-52.

8. Isnard N, Fodil-Bourahla I, Robert AM, Robert L. 2004. Pharmacology of skin aging. Stimulation of glycosaminoglycan biosynthesis by L-fucose and fucose-rich polysaccharides, effect of in vitro aging of fibroblasts. *Biomed Pharmacother.* 58(3): 202-204.
9. Robert L, Fodil-Bourahla I, Bizbiz L, Robert AM. 2004. Effect of L-fucose and fucose-rich polysaccharides on elastin biosynthesis, in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother.* 58(2): 123-128.
10. Fodil-Bourahla I, Bizbiz L, Schoevaert D, Robert AM, Robert L. 2003. Effect of L-fucose and fucose-rich oligo- and polysaccharides (FROP-s) on skin aging: penetration, skin tissue production and fibrillogenesis. *Biomed Pharmacother.* 57(5-6): 209-215.
11. Peterszegi G, Isnard N, Robert AM, Robert L. 2003. Studies on skin aging. Preparation and properties of fucose-rich oligo- and polysaccharides. Effect on fibroblast proliferation and survival. *Biomed Pharmacother.* 57(5-6): 187-194.
12. Isnard N, Peterszegi G, Robert AM, Robert L. 2002. Regulation of elastase-type endopeptidase activity, MMP-2 and MMP-9 expression and activation in human dermal fibroblasts by fucose and a fucose-rich polysaccharide. *Biomed Pharmacother.* 56(5): 258-264.