

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(13)—膠原蛋白增生效果平台建立與評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

計畫主持人：林清宮

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 21 日

一、摘要：

化妝品經常標榜具有膠原蛋白刺激能力，然而卻缺乏評估篩選平台，本計畫針對中草藥以新建立之評估系統篩選有效部分，建立方法是以細胞模式建立膠原蛋白增生效果平台。利用本計畫之研究不但建立膠原蛋白增生效果平台，同時期待能將中草藥應用在化妝品之膠原蛋白增生效果。

二、前言：

皮膚皺紋減少是女性普遍的需求，市面上所謂的抗老化化粧品是否有效仍然存疑，有些產品可能潛藏有害化學物質，消費者在不知情情況下，若是長期使用，將會對健康造成很大傷害，藉由本計畫期能開發安全又有效之抗老化化粧品，不但能提升化粧品技術，亦能帶動我國相關產業之發展。

本計畫目標包括：

- 1.Establishment of the *in vitro* collagen stimulation assay system
- 2.Find out some herbs with potent collagen stimulation activity

三、材料與方法：

分光光度計 Spectrophotometer U-3200(Hitachi), Eliza reader,

Laminar flow, CO₂ incubator, inverted microscope

進行步驟：

- 1.Establishment of the in vitro culture system
- 2.Measurement of collagen synthesis
- 3.Maximum induction of collagen
- 4.Screening of herbal extracts

四、結果與討論：

A. 細胞模式的建立：Human foreskin fibroblast cell culture system

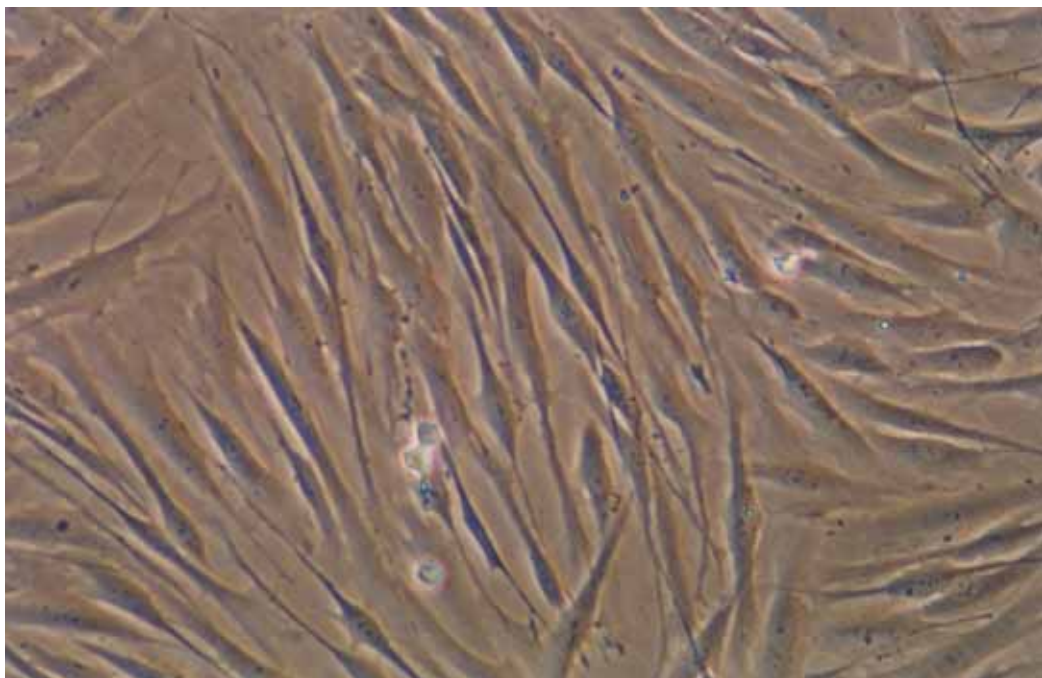
細胞模式採用人類正常細胞株(HS68, *Homo sapiens*; skin; foreskin; fibroblast; newborn male ;adherent)進行，細胞自冷凍狀

態下，先經過解凍程序，培養於 37°C, 5 % CO₂ 環境下，培養基

條件為：

90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose + 10% fetal bovine serum

細胞培養照片



B. 膠原蛋白偵測系統的建立：

免疫染色：

1. Antibodies:

mouse anti-human collagen type I monoclonal antibody
goat anti-mouse secondary antibody(conjugated with AP)

2. Substrates for alkaline phosphatase

C. 中草藥的篩選

中草藥篩選以粗萃取液為主，萃取方式為微波水萃法，經過冷凍乾燥後備用。測試濃度以 1 mg/ml 為基準，測試前先評估其細胞毒性，評估方法如下：

MTT 方法：利用活細胞 dehydrogenase 可將黃色的 MTT[3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 還原成藍紫色的 formazan，測量細胞存活率。細胞經樣品處理後吸去上清液，每個 well 加入 90 μ l 培養液及 10 μ l MTT(5mg/ml in PBS)，反應 1 小時後，吸去上清液，加 150 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO) 到每個 well，劇烈振盪使 formazan 溶解，15 分鐘後，以 ELISA reader 在波長 570 nm 測量吸光值，計算 LC₅₀。

Trypan blue 方法：利用活細胞可將藍色 Trypan blue 排出的原理，直接以一般光學顯微鏡觀察，測量細胞存活率。

Neutral red 方法：細胞經處理後種入 96 孔盤中(2500 cells/well)，培養三天後，更換 250 μ l 培養液(含待測樣品)。經 48 小時後吸去上清液，加入 250 μ l 含 neutral red (50 u/ml)培養液，3 小時後加入 250 μ l 固定液(1%甲醛，1%氯化鈣)，固定 2 分鐘後加入 100 μ l 溶液(1 % glacial acetic acid, 50% ethanol)，20 分鐘後，以

ELISA reader 在波長 540 nm 測量吸光值，計算 NRU_{50} 。

TUNEL 方法：TUNEL(TdT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling)，細胞經樣品處理後，以 paraformaldehyde 固定 30 分鐘，再以 0.1 % Triton X-100 將細胞膜打洞，然後以 Terminal deoxynucleotidyl transferase 將含有螢光物質之 dUTP 接在有 DNA 斷裂位置，使死亡細胞發出螢光，另外也再利用 alkaline phosphatase conjugated anti-fluorescein 抗體反應後，以 alkaline phosphatase 受質進行呈色反應，直接以顯微鏡觀察，計算 LC_{50}

在確認細胞毒性後，再以免疫染色法評估其產生膠原蛋白能力，最後以人體試驗驗證其實際效果，有關人體(*in vivo*)皮膚抗老化有效性試驗方法如下：

1. 選定 35 歲以上受試者。
2. 塗抹樣品前先以 Cutometer 測定彈性，然後每天塗抹兩次樣品。
3. 每週以 Cutometer 測定塗抹抗老化乳液及塗抹對照乳液部位之皮膚的彈性值。
4. 連續測定 8 週，然後比較彈性值的差異。

五、參考文獻：

- Bernard, P. and Berthon, J. Y. 2000. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. *International journal of Cosmetic Science*. **22**, 219-226.
- Boots the chemist Ltd. The guide to practical measurement of UVA/UVB ratios. The Boots Chemist, PLC, Nottingham, England.
- Cabanes, J. et al. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J.*

- Pharm. Pharmacol.* **46**, 982-985.
- Cosmetics & toiletries 1996. Natural and Botanical products formulary. Vol **111**, 81-94.
- Easton, A. Women have deadly desire for paler skin in the Philippines. *The Lancet* **352**, 555.
- Fitzpatrick, T. B. 1995. Pathophysiology of hypermelanoses. *Clin. Drug. Invest.* **10** (suppl. 2)
- Goihman-Yahr, M. 1996. Skin aging and photoaging: an outlook. *Clinics in Dermatology.* **14**,153-160.
- Lee, K. T. et al., 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International Journal of Cosmetic Science.* **19**, 291-298.
- Lin, C.-G., Kao, Y.-T., Liu, W.-T., Huang, H.-H., Chen, K.-C. and Lin, H.-C. 1996. Cytotoxic effects of *Bacillus anthracis* lethal toxin on macrophage-like cell line. *Current Microbiology* **33**, 224-227.
- Melo, P. S., Duran, N., and Haun, M. Cytotoxicity of prodigisin and benznidazole on V79 cells. 2000. *Toxicology letters* 116, 237-242.
- Merot, F., Seniuta, R., Benita, G. and Masson, Ph. 1992. Method for quantifying cutaneous pigmentation in animals and preliminary study in humans. *International Journal of Cosmetic Science.* **14**, 173-182.
- Motoyoshi, K., Ota, Y., Takuma, Y. and Takenouchi, M. 1998. Wrinkles from UVA exposure. **113**, 51-56.
- Phillips, B. J. 1996. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicology in vitro* 10, 69-76.
- Schallreuter, K. U. et al. 1994. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **263**. 1444-1446.
- Shin, N. H. et al. 1998. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochememical And Biophysical Research Communications.* **243**, 801-803.
- Shirota, S. et al. 1994. Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 266-269.
- Smith, J. 1996. State of the industry: the Asia-Pacific cosmetics and toiletries sector, 1995. *DCI.* 24-34.
- Stern, M. Klausner, M., Alvarado, R., Renskers, K., and Dickens, M.

1998. Evaluation of the EpiOcular tissue model as an alternative to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 12, 455-461.

