

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-02

計畫名稱：化粧品成分之檢測與評估方法研究-子計畫四

篩檢具抗落髮效果之中草藥

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：楊朝成

計畫主持人：

子計畫主持人：林維炤

中華民國□□年□□月□□日

一、前言

落髮、禿頭一直以來困擾著特定的人群，且近年來這特定人群的數量有明顯上升的趨勢，嚴重的落髮會影響對禿頭者的年齡甚至是第一印象上的評斷，所以雖然禿頭不會明顯地造成生理上的病痛，但卻非常有可能會使禿頭者在心理上生病。

近年來，隨著禿頭問題日益嚴重的狀況，許多治療藥物及外科手術等可改善禿頭問題的方法也愈來愈被重視且不斷地再改良，於是本實驗室開始在禿頭患者比例低的民族—中國、日本—的飲食習慣中尋找些許的蛛絲馬跡。

在本研究室前一年的實驗成果，已証實在中國及日本的飲食習慣中佔有一席之地之食品—大豆—的萃取物能夠在 B6CB/F1 雜交鼠身上有效地抑制雄性禿的發生，但有鑒於所需的實驗時間較長，且無法確認確切的抑制機制為何，於是本實驗室再度嘗試建立抑制雄性禿的細胞測試模式，期望能提供更完整的實驗模式。

在本實驗中除了以張學長已確認有效抑制雄性禿的大豆萃取物為試驗方向之外，還另外萃取了山藥及柏葉的初萃物，一併作為實驗樣品。

二、文獻回顧

造成禿頭的病因甚多，因此禿頭在病理上被分為圓形禿(Alopecia Areata)、生長期脫髮症(Anagen Effluvium)、休止期落髮症(Telogen Effluvium)以及雄性禿(Androgenetic Alopecia)等四種型態，而其中除了雄性禿之外，皆可藉由藥物調整免疫力至正常時，便可再度自行生髮，而雄性禿則因病因上的關係，無法輕易地被治癒。

雄性禿(Androgenetic Alopecia)，如同原文字面上所述，此病因包含了雄性素及遺傳因子二部份，當毛囊下真皮層中之乳突中的雄性素接受器(Androgen Receptor)容易和睪素酮(Testosterone)或加氫睪素酮(Dihydrotestosterone)結合時，即

易造成雄性禿；據文獻指出雄性素接受器的基因位於 X 染色體上，也就是說，雄性子代的雄性素接受器敏感度是否過高，端賴於其母親所遺傳給他的基因而定。

睪素酮和加氫睪素酮會進入毛囊細胞核中，對於代謝系統產生抑制作用，使毛囊無法進行蛋白的合成，而減少毛髮生長；其中加氫睪素酮在表現雄性特徵上的強度更遠大於睪素酮所造成的結果，也就是說，當加氫睪素酮和雄性接受器反應後，所造成對代謝系統抑制的狀況，會較相同數量的睪素酮和雄性接受器反應後所造成的抑制狀況更加嚴重，而位在頭皮的毛囊細胞質中的第二型 5 α -還原酶 (5 α -reductase type 2) 則是將睪素酮轉換為加氫睪素酮的重要酵素，換言之，若能有效地抑制第二型 5 α -還原酶的活性，那麼就能在一定程度上有效地抑制雄性禿的發生或緩和其症狀，目前市面上已有顯著效果的藥物—柔沛—即是以此為治癒雄性禿之機制。

三、實驗材料及方法

(一) DNA 來源

由 Russell DW. 教授提供的質體—pCMV7-5 α R—上所擁有的完整的人類第二型 5 α -還原酶 cDNA 片段，以適當的限制酶將其切下，再接合到載體—pFlag-CMV2—之中，並使其能正常地被讀取序列。

(二) 測試樣品來源

大豆萃取物(活性，以酵素去除萃取物中配醣體之糖基)及大豆萃取物(非活性)是由 公司所提供。

山藥及柏葉皆自台南某中藥行購得之乾燥成品，各 300 公克，分別以 99.5% 乙醇在固定 65 $^{\circ}$ C 的環境下，浸泡 4 小時，而後以減壓濃縮法將萃取物中的所有溶劑去除。

以上四項測試樣品各取 0.01g 溶於 1ml DMSO 中，做為儲備溶液。

(三) 活性測試

選用細胞為 HEK293，於 6 well plate 中，種入 2.5×10^5 cells/well，在 37°C，5% CO₂ 環境下培養 24 小時，以 Lipofetamine 2000 做轉染(transfection)，將 pFlag-CMV2-5 α R2 送入細胞中，再培養 24 小時，將原培養液置換為無血清的培養液(1ml/well)，並依各組試驗加入適當藥劑(如下列表格所示)，靜置於 37°C 水浴中 2 小時，抽出培養液 950 μ l/well，各加入 1.6ml 乙酸乙酯，混合均勻後，靜置，取出有機層，待完全揮發，樣品全數乾燥後，再各加入 30 μ l 的乙酸乙酯，振盪後，各管取 5 μ l 滴於 TLC plate(Si60 F₂₅₄, Merk)上，置於展開液(乙酸乙酯：正己六烷 = 1 : 1)中，以 photoimage 掃描之。

項目	藥劑
B	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone
H	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone
H-F	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone
H-R	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone
G	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone + 50 μ M genistein
SI	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone + 50 μ M 大豆萃取物(非活性)
SA	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone + 50 μ M 大豆萃取物(活性)
山	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone + 50 μ M 山藥萃取物
柏	0.05 μ Ci ¹⁴ C-testosterone + 20 μ M 柏葉萃取物

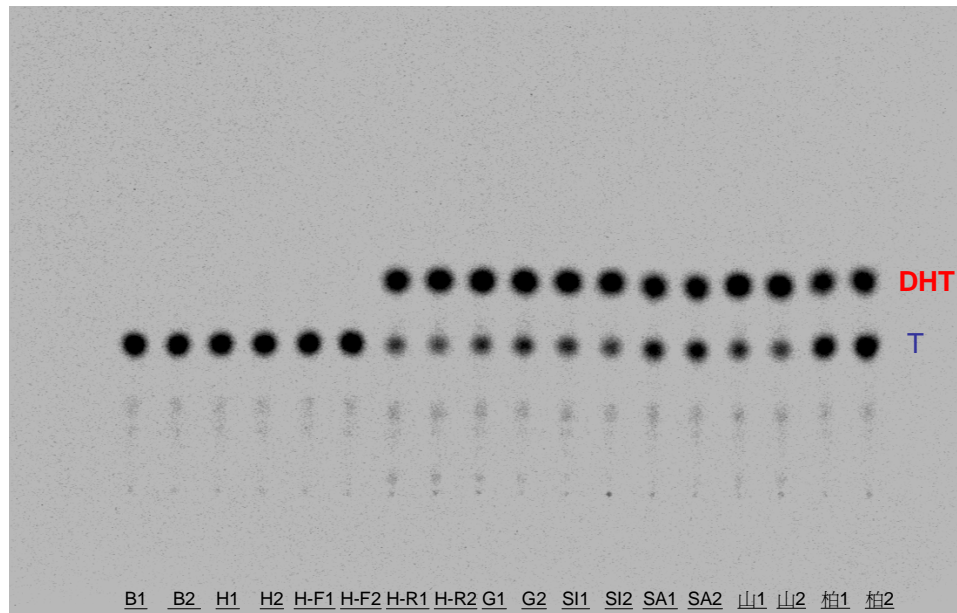
n=2

註：假設 SI、SA、山、柏 四組萃取物中的 compound 分子量皆為 1000

四、結果

在下頁圖中可看到睪素酮在此實驗環境中並不會自行轉化為加氫睪素酮(B)，HEK293 本身也沒有將睪素酮轉化為加氫睪素酮的能力(H)，且當 HEK293 在被送入了含有第二型 5 α -還原酶的質體後，HEK293 有能力正常表現出此蛋白

質，進而將睪素酮轉化為加氫睪素酮(H-R)。



B : without cell	G : genestein	柏 : 柏葉萃取物
H : only HEK293	SI : 大豆萃取物(非活性)	N=2
H-F : HEK293-Flag	SA : 大豆萃取物(活性)	
H-R : HEK293-Flag-5aR2	山 : 山藥萃取物	

在上圖中可看到添加了大豆萃取物(活性)及柏葉萃取物的實驗組中，所呈現的睪素酮量確實明顯地較對照組(H-R，無添加任何抑制成份)多出許多，這也就意謂著，睪素酮在被第二型 5 α -還原酶轉化為加氫睪素酮的過程被抑制了，所以還有較對照組更多的睪素酮存在著。

五、未來實驗方向

在初步的篩檢中已經發現扁柏乙醇萃取液具有抑制第二型 5 α -還原酶效果，而山藥則不具效果，未來將以不同極性溶劑萃取扁柏，探討不同極性所萃取出的萃取液之抑制效果。