教師研究計畫成果報告

年度:九十五年度

編號: CNCS9504

題目:生物氧療法於皮膚上之開發與應用

執行機構: 嘉南藥理科技大學

職稱姓名: 粧品系助理教授 劉家全

研究成果內容

(一)摘要

氧化壓力(oxidative stress)一直以來都被認為對人體各方面均 有極大的傷害,其中在皮膚方面包括有老化、斑點和皺紋的形成等均 與其有密切的關係。然而,有文獻研究發現,若給予適當低濃度臭氧 (ozone)或二氧化氫(hydrogen peroxide)卻可明顯降低許多疾病的 症狀,並可誘發活化體內許多對抗氧化壓力的防禦機制;很多動物及 臨床實驗也都證實有其正向的醫療價值,統稱為生物氧療法 (bio-oxidative therapy);此兩者觀點明顯不同,也都有研究文獻 佐証,實有必要實驗研究闡述釐清臭氧是否有其確實有效作用。且此 一概念也使用於市面上化妝品科技應用,例如:超氧純精油皮膚霜和 臭氧防皺霜等。因此,本實驗主要的目的是利用不同濃度臭氧水來評 估對皮膚細胞毒性及安全評估之影響,進一步實驗設計觀察是否對美 白及抑癌功效有作用。首先以臭氧製造機製成高或低不同濃度臭氧 水,給予處理在皮膚纖維母細胞和黑色素瘤細胞上,以 MTT 觀察細胞 存活率。另一方面,以黑色素瘤細胞的生長抑制來評估對美白功效與 抑癌之影響。結果發現經細胞培養兩天後,稀釋後臭氧水對正常皮膚 細胞並無明顯毒性,且對黑色素癌細胞於處理兩天後,明顯有抑制生 長的情形。本研究有助釐清生物氧療法是否在皮膚上確有其功效,可 作為市售化妝品產品篩選或原料開發使用之參考。

(二)研究目的

本本實驗主要的目的是利用不同濃度臭氧水來評估對皮膚細胞 毒性及安全評估之影響,進一步實驗設計觀察是否對美白及抑癌功效 有作用。

(三)研究方法與步驟

臭氧水製造

以臭氧水生成裝置(電解法臭氧發生器)產生臭氧水,實驗當天新 鮮配置,在稀釋成低或高各種不同濃度存放。

細胞存活率分析(MTT viability assay)

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenol tetrazolium bomide] 為tetrazolium salt,經細胞內粒腺體去氫酶(dehydrogenase)的分解,由透明無色產生藍色formazan晶體。將細胞置於 24 孔的微量平盤,每孔有 1 ml之新鮮的培養液及約 10^4 cells,培養隔夜後,經過不同的處理再進行細胞存活力之測定。在測定前,先將MTT以未含有FBS的DMEM培養液稀釋成 0.2 mg/ml,將 1 ml之MTT稀釋液加入每孔細胞中,於 37° C下培養 1 小時,於倒立顯微鏡下可觀察到細胞內藍色結

晶的生成。將24孔的微量平盤倒蓋,移去培養液,再以1ml之DMSO加以溶解,搖晃5分鐘直到看不到晶體後,在492nm讀取其吸光值。 酪胺酸酶分析(tyrosinase assay)

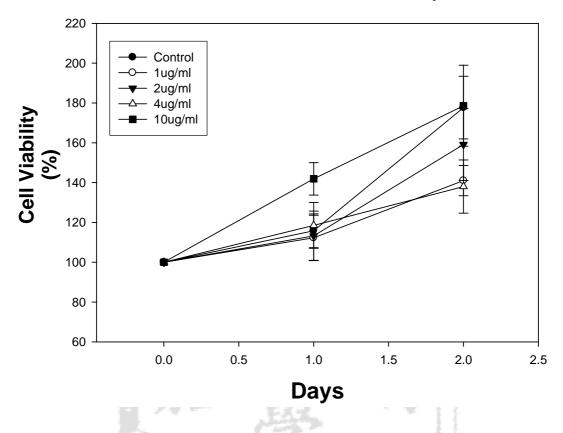
將細胞以 3×10^4 /well之密度培養於 96-well培養盤中,並在 37° C、5% CO_2 培養箱中至少生長 16 小時以上,接著分別加入不同濃度的萃取物於指定的時間作用後,每個well中以 200 µl的PBS清洗,再分別加入 20 µl 0.5% (V/V),Triton-X-100/50 mM sodium phosphate buffer solution (pH6.9),置入- 80° C,30 分鐘後,取出於室溫中放置 25 分鐘,最後再於 37° C放置 5 分鐘。每個well中加入 190 ml受質溶液(6.3 mM MBTH,3-methyl-benzothizaolinone hydrazone),1.1 mM L-dopa於 48 mM sodium phosphate buffer solution,pH7.1)含有 4% (V/V) N,N-dimethyl foramamide,於 37° C反應 60 分鐘後,以免疫酵素分析儀測定波長 508 nm吸光值。

(四)研究結果及討論

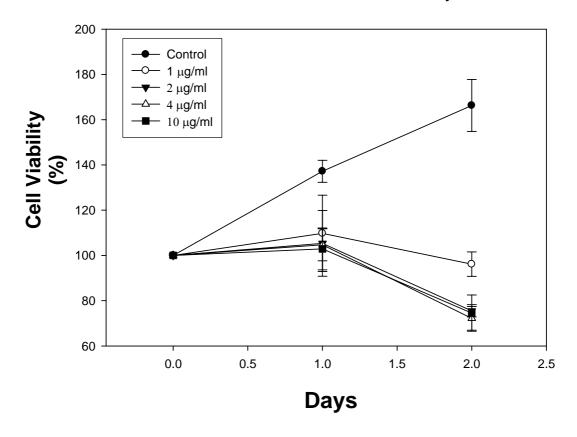
根據文獻報導指出,適量的給予氧化壓力源,不僅不會增加生物 體本身的傷害,反而會直接或間接誘發出體內抗氧化防禦系統,產生 更強的抗氧化作用;例如臭氧和二氧化氫的稀釋後低量使用,可見於 臨床醫學治療上。於皮膚上的應用有,將臭氧混入橄欖油、葵花油等, 作成外敷油膏治療:黴菌感染(包括香港腳)、腿部潰瘍、褥瘡、齒齦 炎、單純泡疹、痔瘡、外陰道炎、蜂螫、蟲咬、粉刺及其他皮膚問題。 最近,學者也指出臭氧療法具有正向和反向不同的兩面作用,而仿間 市售產品中亦出現超氧純精油皮膚霜和臭氧防皺霜等產品,然而,卻 鮮少有實驗明確指出其功效作用,或是否經安全性評估。而本實驗結 果發現經細胞培養兩天後,稀釋後臭氧水對正常皮膚細胞並無明顯毒 性,且對黑色素癌細胞於處理兩天後,明顯有抑制生長的情形(如結 果圖表)。然而,濃度提升後,臭氧水有出現些微細胞毒性情形(12 μg/ml),針對抑制黑色素癌細胞生長方面,低濃度適當處理後兩天 確實出現抑制效果,且呈現濃度依賴效果,但是超過12 μg/ml 濃度 後,抑制情形則逐漸遲緩(data not shown)。因此市售臭氧水產品需 注意高濃度的使用是否對細胞本身有傷害性,且過度強調高濃度是否 確有其功效值得深入考量。

(五)結果圖表

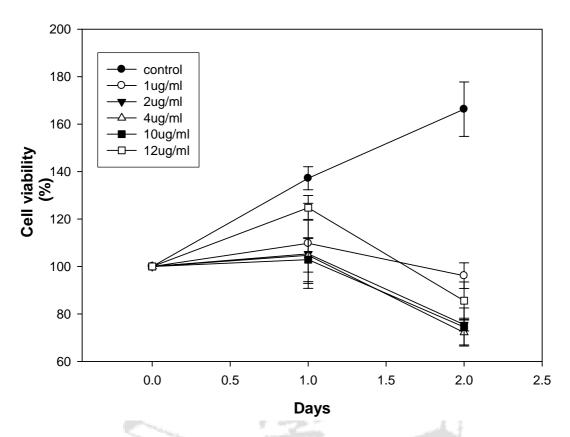
The effects of ozone water on cell viability in HS68 cell



The effects of ozone water on cell viability in B16 cell



The effects of ozone water on cell viability in B16 cell



(六)參考文獻

F. Sweet et al., Ozone Selectively Inhibits Growth of Cancer Cells. Science 209 (August 22, 1980): 931-32.

R. T. Canoso et al., Hydrogen Peroxide and Platelet Function. Blood 43, no. 5 (May 1974).

De Fabo EC. Arctic stratospheric ozone depletion and increased UVB radiation: potential impacts to human health. Int J Circumpolar Health. 2005 Dec;64(5):509-22.

Saladi RN et al., The causes of skin cancer: a comprehensive review. Drugs Today (Barc). 2005 Jan;41(1):37-53. Review.

Lipatov KV et al., Ozone-ultrasonic therapy in the treatment of purulent wounds. Khirurgiia (Mosk). 2002;(1):36-9.

Valacchi G et al., The dual action of ozone on the skin. Br J Dermatol. 2005 Dec;153(6):1096-100. Review.