

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC9504

計畫名稱：篩檢具預防禿頭效果之中草藥原料

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

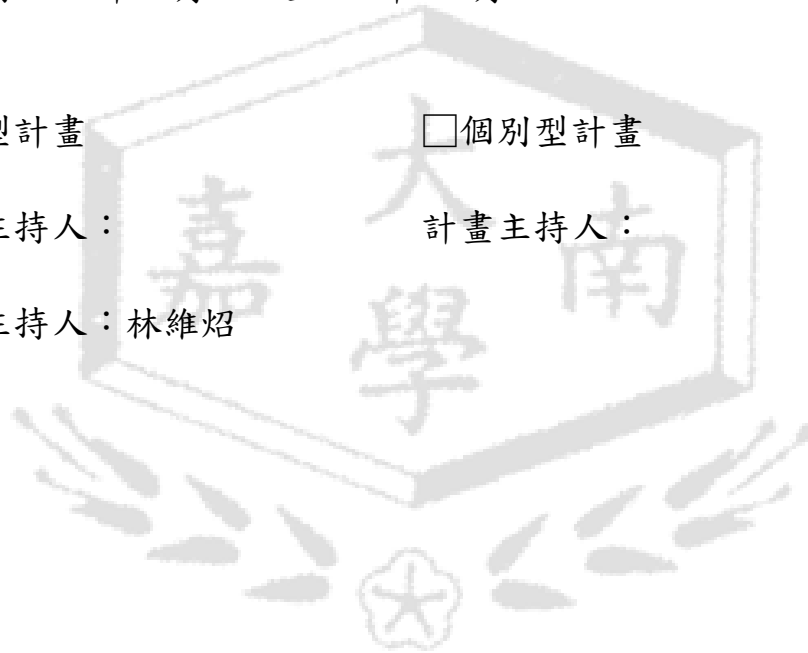
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：

子計畫主持人：林維炤



中華民國 96 年 02 月 27 日

一.研究背景與動機

雄性禿 (Androgenetic Alopecia; Male pattern bald) 是常見的落髮症狀，此病症影響了數百萬的男性和女性病患¹，以白種人為例，大約有 30% 的男性在 30 歲時，開始有雄性禿的症狀，至少有 50% 的男性在 50 歲時受到影響，到 70 歲的年齡族群中更有高達 80% 的男性受到影響，而雄性禿的發生率也因種族的不同而異，亞洲人的雄性禿發生率僅次於上述的白種人之後¹。

造成雄性禿的病因非常複雜，大致上可分為多基因遺傳因素 (polygenic inheritance) 及荷爾蒙的新陳代謝 (hormone metabolism)，根據目前針對治療雄性禿或其相關病症——前列腺腫大 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 及前列腺癌 (prostate cancer) ——的文獻²中指出，人體中 5 α -還原酶 (5 α -reductase) 在繁多的因素中有其重要之影響，因為 5 α -還原酶能與雄性素——睪素酮 (Testosterone, T) ——進行催化反應，使得睪素酮量減少，而轉換成更具效果的雄性素——二氫睪素酮 (Dihydrotestosterone, DHT)，因而扮演著非常重要的角色。

近年來，不難發現在國內因雄性禿而感到困擾的人數有逐年升高的現象，伴隨著這樣的現象，許多治療禿頭的藥物及外科手術等可改善狀況的方法也愈來愈被重視，目前經由美國食品及藥物管理局 (FDA) 認可，可使用於治療雄性禿的藥物，僅落健 (Minoxidil) 和柔

沛 (Finasteride) 兩種，落健使用於治療雄性禿的機制目前還不明，而柔沛為第二型 5 α -還原酶 (5 α -reductase type 2, 5 α R2) 的抑制劑，目的即在於減少二氫睪素酮的產生^{3,4}，但柔沛為口服藥，需經由肝臟代謝，所以對有肝臟方面疾病的病人在使用柔沛時需特別的注意，且使用柔沛的病患中有 1% 的使用者會出現可逆性的性功能障礙現象；於是本實驗室期望能在中草藥或日常生活常見之保健食品中，找到可長時間施用於人體，且能有效抑制 5 α R2 的成份，使此類成份能以預防雄性禿之角色存在於保養品中。

由文獻中發現，目前用以測試抑制 5 α R2 成份的實驗平台，大致上可分為動物實驗及細胞實驗兩種⁵，動物實驗雖較接近人體測試的狀況，但由於實驗結束後，必須犧牲動物，基於人道立場，所以這次研究中除了建立出可測試抑制 5 α R2 的細胞試驗平台外，更希望可藉由此細胞平台初步篩選出有效成份，再進行動物實驗，而大量減少實驗動物的數量。

若上述的實驗平台能被確實建立，相信可以在較短的時間中，快速且大量的篩選出具有抑制 5 α R2 效果的成份。

二. 材料與方法

於實驗一開始前，需先取得內含有人類完整 5 α R2 之 cDNA，因所取得的 cDNA 沒有任何的標記，為使後續的實驗程序能清楚地判斷轉譯成功的蛋白質是否為本實驗所需的 5 α R2，於是以核酸限制內切酶在適當的位置將屬於 5 α R2 的 DNA 序列剪下，並以連接酶(ligase)將此 DNA 片段與 pFlag-CMV2 相接，使 5 α R2 被轉譯成功時能帶有標記—Flag。

在質體處理並確定 DNA 序列無誤後，以 liposome 包覆質體，送入細胞 HEK293 中，使帶有 Flag 標記的 5 α R2 能被進行轉譯，為確定由細胞所做出的多種蛋白質中，是否有所需的 5 α R2，於是在送入質體並將細胞培養至足夠數量時，收下細胞萃取物，以 anti-Flag 為一級抗體進行西方轉漬法(western blotting)，以確定有 5 α R2 的存在。

在確定 5 α R2 能被進行轉譯後，加入其帶有同位素標記的受質—¹⁴C-Testosterone—進行活性測試，觀察睪素酮是否能被轉化成二氫睪素酮，以確定此細胞所轉譯出 5 α R2 是具有功能性的酵素。

選定細胞後，將帶有 5 α R2 cDNA 的質體 pFlag-CMV2-5 α R2 及帶有抗藥基因的 pSV2-neo 以 10：1 的比例，轉染送入人類胚胎腎臟上皮細胞 (HEK 293) 中，並加入適量的 G418 培養 5~7 天，以培養出能穩定產出 5 α R2 酵素的穩定細胞株，以此為實驗中所使用的細胞

試驗平台。

以此細胞試驗平台先進行各天然萃取物抑制細胞存活率的測試，確定實驗中欲測試之天然萃取物不致對此細胞株造成抑制增生的濃度後，在此濃度下，加入本實驗中的各天然萃取物，以進行活性測試，觀察各萃取物是否具有抑制 $5\alpha R2$ 的效果。另外，台灣扁柏的萃取物以動物實驗(C57BL/6 mouse model) 評估是否具有促進毛髮生長的功效。最後再針對上述的結果做一統整性的評估。

三. 結果與討論

3-1 pFlag-CMV2- $5\alpha R2$ 之設計

經 Quick Screening 之程序後，其結果如圖 3-1 所示，可見到菌落編號 4，5，6，7 皆有明顯大於原 vector，pFlag-CMV2 的質體，選擇 5 號 6 號菌落，抽出 DNA 後對限制內切酶 Kpn I 進行 Klenow，得結果 pFlag-CMV2- $5\alpha R2$ -7M，委託明欣生技公司進行 DNA 定序，其序列如附錄六所示，於附錄中可見 pFlag-CMV2- $5\alpha R2$ -7M 的序列能依正確啓始位置被讀取，其資料如圖 3-2 所示。

3-2 穩定細胞株之挑選

3-2-1 細胞株之挑選及其活性確認

在圖 3-3 中可見到不論是細胞 HEK293 或是 COS7，皆能在轉染了質體 pFlag-CMV2-5 α R2-7M 之後，在 30 kDa 上方得到疑似 5 α R2 的訊號；再將轉染 pFlag-CMV2 及 pFlag-CMV2-5 α R2-7M 等不同條件的細胞進行活性測試，其結果如圖 3-4 及圖 3-5 所示。

在圖 3-4 及圖 3-5 中，組別 $^{14}\text{C-T}$ 顯示，4- ^{14}C - testosterone 在抑制 5 α R2 活性測試的環境中並不會自行轉換為 ^{14}C -dihydrotestosterone，在單獨只有細胞 HEK293 以及轉染有 pFlag-CMV2 質體的細胞株 (293-pFlag-CMV2) 的環境中，亦無法將 4- ^{14}C -testosterone 轉換為 ^{14}C -dihydrotestosterone；4- ^{14}C -testosterone 在能轉譯出 5 α R2 的細胞株 (COS7-Flag- 5 α R2 或 293-Flag-5 α R2) 環

境中，能被大量轉換為 ^{14}C -dihydrotestosterone。

圖 3-4 中顯示若是由 COS7 做為被轉染細胞株，雖能將質體 pFlag-CMV2-5 α R2 成功地轉譯為具有活性的 5 α R2，使睪素酮轉換為二氫睪素酮，但在組別 C 中可見到，COS7 本身即具有將睪素酮轉換為少許的二氫睪素酮及其他化合物的能力，且轉染有 pFlag-CMV2-5 α R2 的組別，甚至能將睪素酮轉換出三種以上的化合物，此細胞株在轉換睪素酮的過程中並非單純地轉換出二氫睪素酮，其路徑可能與實驗中原設計的狀況不同，為避免在後續的抑制實驗中造成誤判的現象，於是選擇以 HEK293 為被轉染用細胞株。

圖 3-5 中，組別 5 α R2 (serum-free) 及 5 α R2 (serum) 兩組結果顯示出細胞株 293-Flag- 5 α R2 在 serum-free DMEM 的環境中，和 ^{14}C -testosterone 反應後，所得的睪素酮量和二氫睪素酮量之間的關係，較在正常生長環境 (10 % HS in DMEM) 下所測得的結果，明顯地具有更加強烈的差異性，為在後續的抑制實驗中，可較容易地觀察其轉換的變化，所以選擇以 serum- free DMEM 做為抑制活性測試的環境。

3-2-2 穩定細胞株

多組的細胞 HEK293 在轉染了 pFlag-CMV2-5 α R2-7M 及含抗藥

基因的質體 pSV2-neo 之後，加入 G418 進行挑選，並將細胞數量放大後，以西方轉漬法進行 5 α R2 蛋白質被轉譯量的確定，結果由圖 3-6 可見，當組別由實驗組 HEK293-Flag-5 α R2-2 及 HEK293-Flag-5 α R2 -3 在疑似 5 α R2 的位置 (30kDa) 有明顯地表現出較多的蛋白質量。

在控制組 30kDa 的位置並沒有和實驗組相同的訊號出現，於是判斷 30kDa 位置的蛋白質，為在實驗過程中以轉染進入細胞的質體 pFlag- CMV2-5 α R2 經由 HEK293 表現所產生的 5 α R2。

由結果得知編號 5 α R2-2 及 5 α R2-3 皆可做為抑制 5 α R2 之實驗平台，細胞株編號分別為 293-flag-5 α R2 (1-2) 及 293-flag- 5 α R2 (2-1)，儲放於液態氮桶中保存，於進行抑制實驗前 10 日解凍細胞即可。

3-3 天然萃取物對 5 α R2 抑制效果之測定

3-3-1 天然萃取物抑制細胞 293-Flag-5 α R2(2-1)增生之結果

結果如圖 3-7-A 至圖 3-7-D 所示，293-Flag-5 α R2 (2-1) 在各萃取物存在的環境下，經過 18 小時培養後，未對細胞造成抑制增生的上限濃度分別為：山藥乙醇萃取物 (Sample M)，2.500 mg/ml；大豆萃取物未去除配醣體 (Sample SI)，> 2.500 mg/ml；大豆萃取物去除配醣體 (Sample SA)，0.625 mg/ml；台灣扁柏乙醇萃取物 (Sample E)，0.090 mg/ml；台灣扁柏乙醇/正己烷萃取物 (Sample E/H)，0.100

mg/ml；台灣扁柏正己烷萃取物 (Sample H)，0.200 mg/ml；台灣扁柏精油 (Sample O)，1.250 mg/ml。

各萃取物對細胞 293-Flag-5 α R2 (2-1) 增生的影響由大到小依序為，Sample E > Sample E/H > Sample H > Sample SA > Sample O > Sample M > Sample SI。

由此結果發現，大豆萃取物去除配醣體後，造成抑制 293-Flag-5 α R2 (2-1) 細胞增生的濃度是未去除配醣體的四倍以上，根據得榮生物科技有限公司所提供的檢驗報告表(附錄七、附錄八)得知，未去除配醣體的大豆萃取物中含有 0.46%的 Genistein 及 Daidzein 0.34%，而去除配醣體的樣品中，則含有 15.38%的 Genistein 及 5.02 % 的 Daidzein，針對 Genistein 及 Daidzein 對正常細胞會造成抑制的文獻並不多，但在 Virgilio 等人³⁰的研究中指出，Genistein 對於 V79 cell (lung of normal Chinese hamster, male) 造成的半致死劑量為 75 μ M，因為細胞株並不相同，且大豆萃取物中尚其他的成份存在，所以不適合直接進行比較，但從此訊息中可得知，Genistein 對於正常細胞株的增生還是有一定程度的影響；在此次實驗中得到印證，Sample SA 中 Genistein 的含量比例為 Sample SI 33 倍之多，而 Sample SA 對 293-Flag-5 α R2 (2-1) 所造成的抑制細胞增生現象也較 Sample SI 明顯。

在台灣扁柏萃取物的部份，四種不同極性的萃取物對 293-

Flag-5 α R2 (2-1) 不致造成抑制細胞增生現象的濃度介於 0.090 mg/ml 至 1.25 mg/ml 之間，其中相差約十四倍，且愈偏向非極性萃取物其抑制現象有愈趨下降的情況 (如表 3-1 所示)。

3-3-2 天然萃取物對 5 α R2 抑制效果測定

各萃取物對於抑制 5 α R2 將睪素酮轉換為二氫睪素酮的結果如圖 3-8-A 至圖 3-8-G 所示，由抑制曲線中所推斷得知的抑制 50%活性的濃度 (IC₅₀) 分別為：Sample M (4.4 mg/ml)，Sample SI (1.251 mg/ml)，Sample SA (0.19 mg/ml)，Sample E (0.055 mg/ml)，Sample E/H (0.14 mg/ml)，Sample H (0.122 mg/ml)；Sample O 的 IC₅₀ 大於 0.625 mg/ml。

各萃取物對 293-Flag-5 α R2 (2-1) 所轉譯出的 5 α R2 的抑制效果由大到小的排列為，Sample E > Sample H > Sample E/H > Sample SA > Sample SI > Sample M > Sample O。

Marker pFlag-CMV2

1 2 3 4 5 6 7 8 9

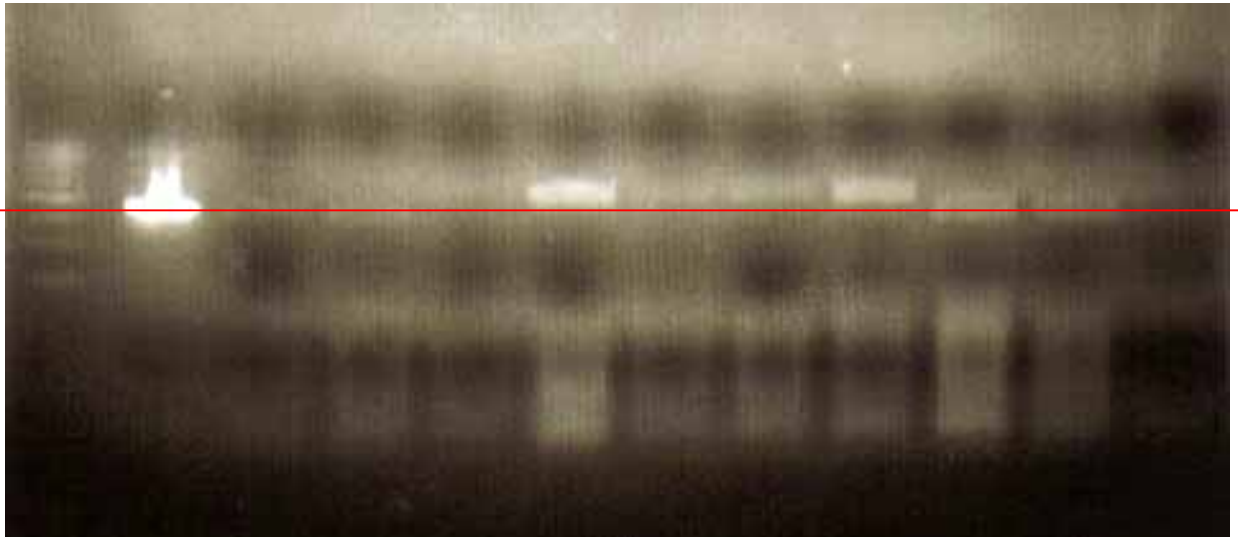
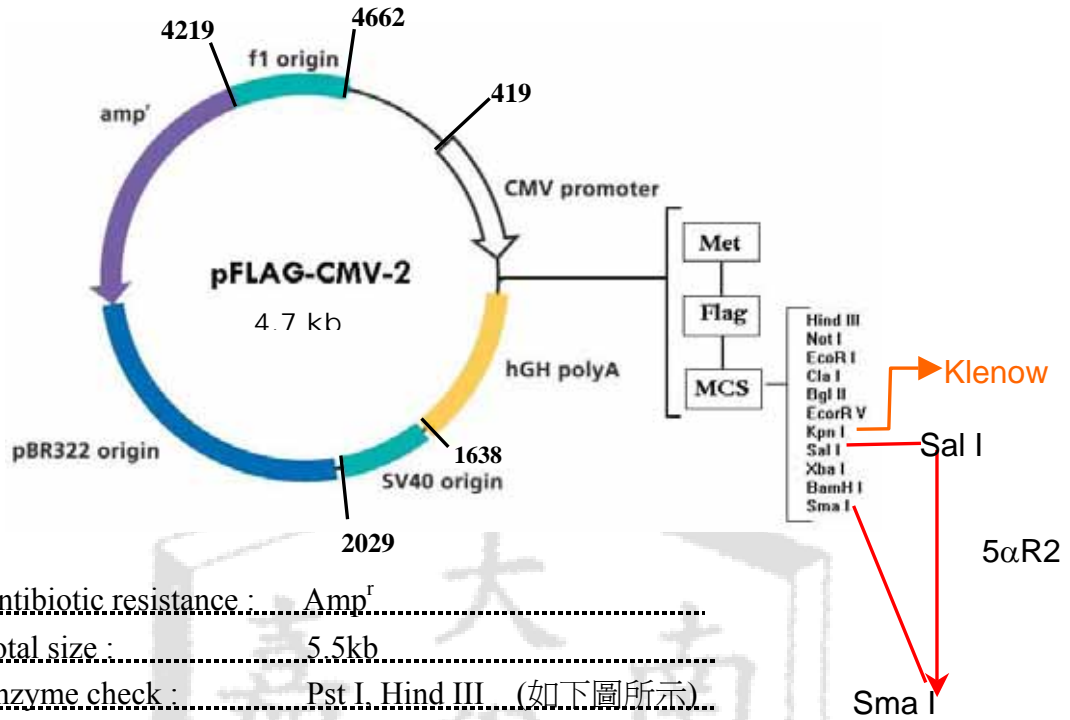


圖 3-1 Quick Screening 結果

經 transform 後有生成的菌落以竹籤取下，於固態培養基(含 Ampicillin) 上放大其量，再以竹籤分別將各個菌落群以 100 μ l lysis buffer 溶解，再加入 100 μ l 的 phenol-choloform (CH_3Cl) 混合均勻，以 11000 rpm 的速度離心 5 分鐘後取上清液，以 0.8% agarose 電泳分離法處理。



pFlag-CMV2-5αR2 :

Marker :

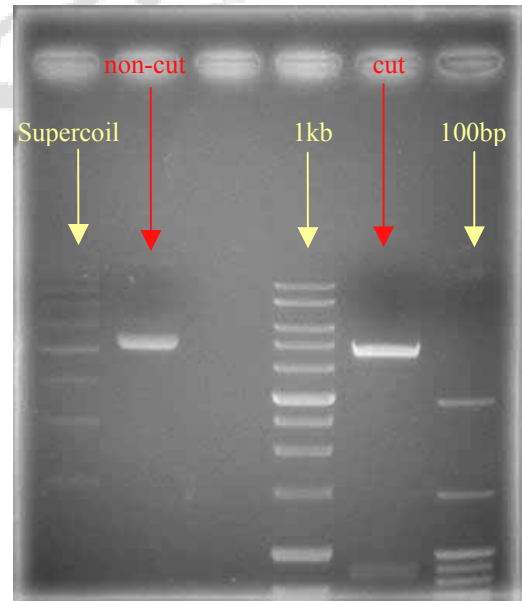


圖 3-2 pFlag-CMV2-5αR2-7M 之 clone 資料

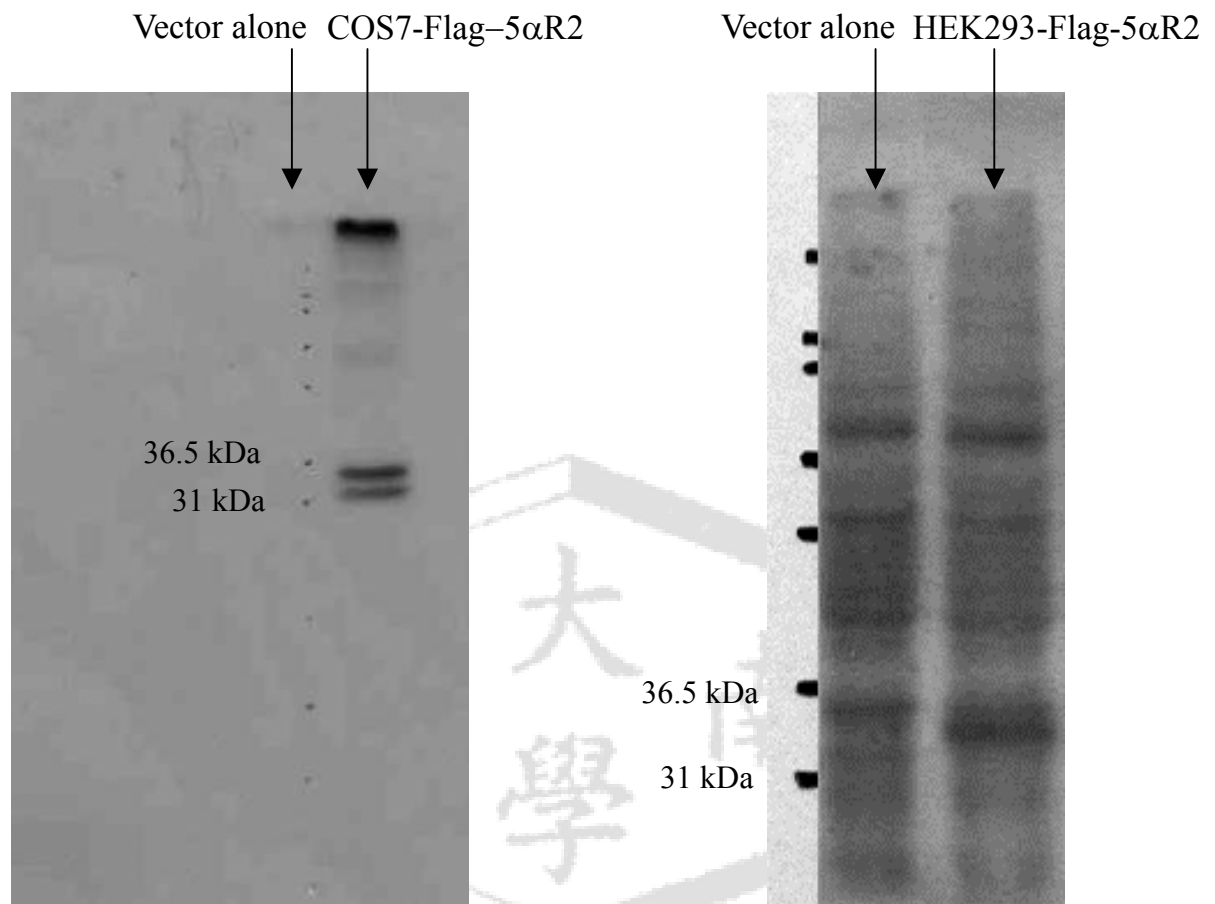


圖 3-3 細胞株挑選之結果

細胞 COS7 及 HEK293 分別轉染質體 pFlag-CMV2 及 pFlag-CMV2-5αR2，培養數日後，將細胞量放大，收集細胞萃取液，以 10% SDS page 進行蛋白質分離，以 anti-Flag 為一級抗體進行西方轉漬法。

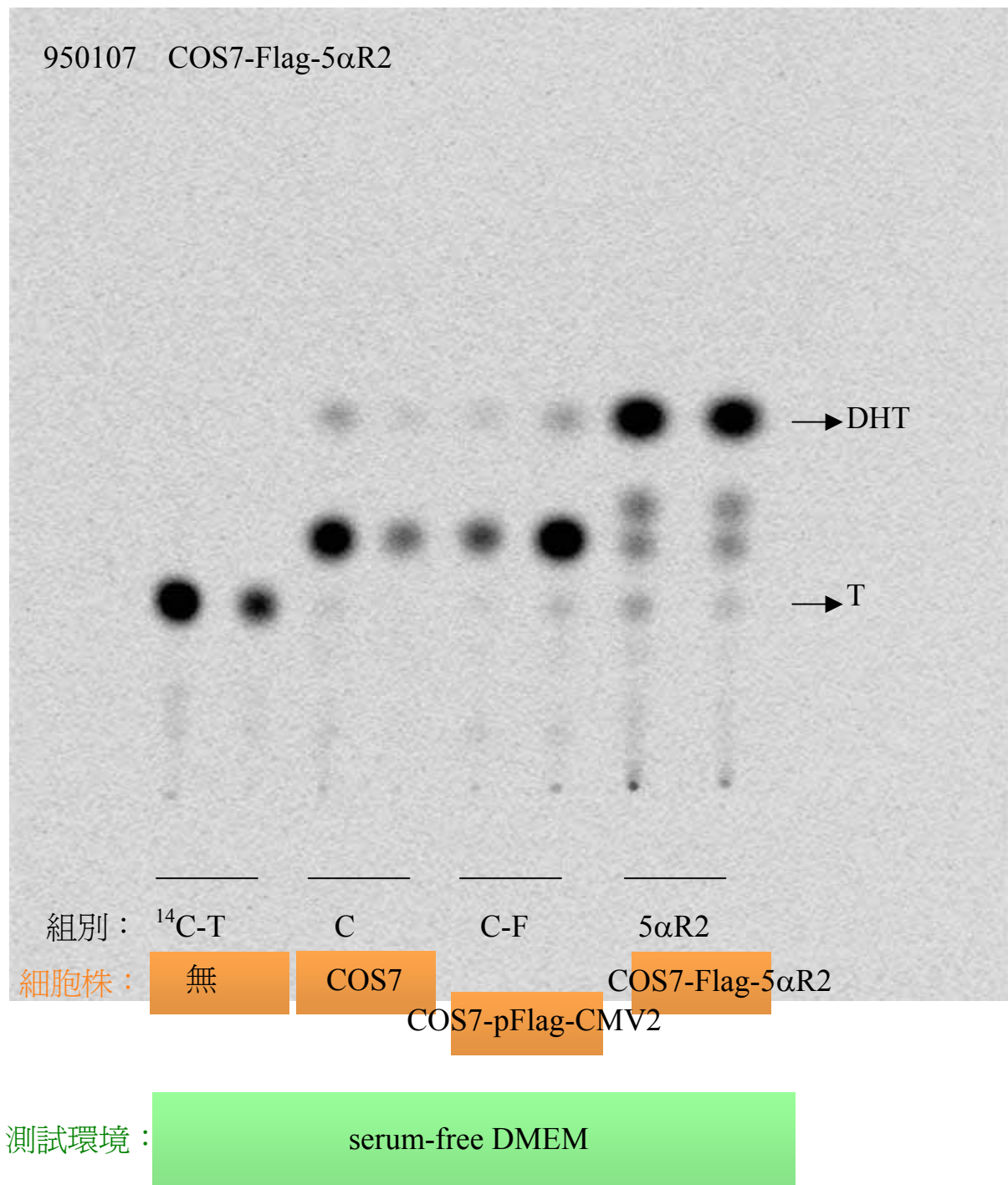


圖 3-4 COS7-Flag-5αR2 活性測試

取 COS7 cell line seeding 於 6 well plate 中，以 lipofectamine 2000 分別將 pFlag-CMV2 及 pFlag-CMV2- 5αR2 轉染進入細胞中，培養一段時間，至細胞穩定時，加入含有 ¹⁴C-T 的 serum-free DMEM，置於 37°C 水浴鍋中，反應 2Hrs，取出各 well 中之 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μl 的乙酸乙酯，混合均勻後，取出有機層，待全乾，重新加入 20 μl 乙酸乙酯，取 4 μl 進行 TLC 分析。

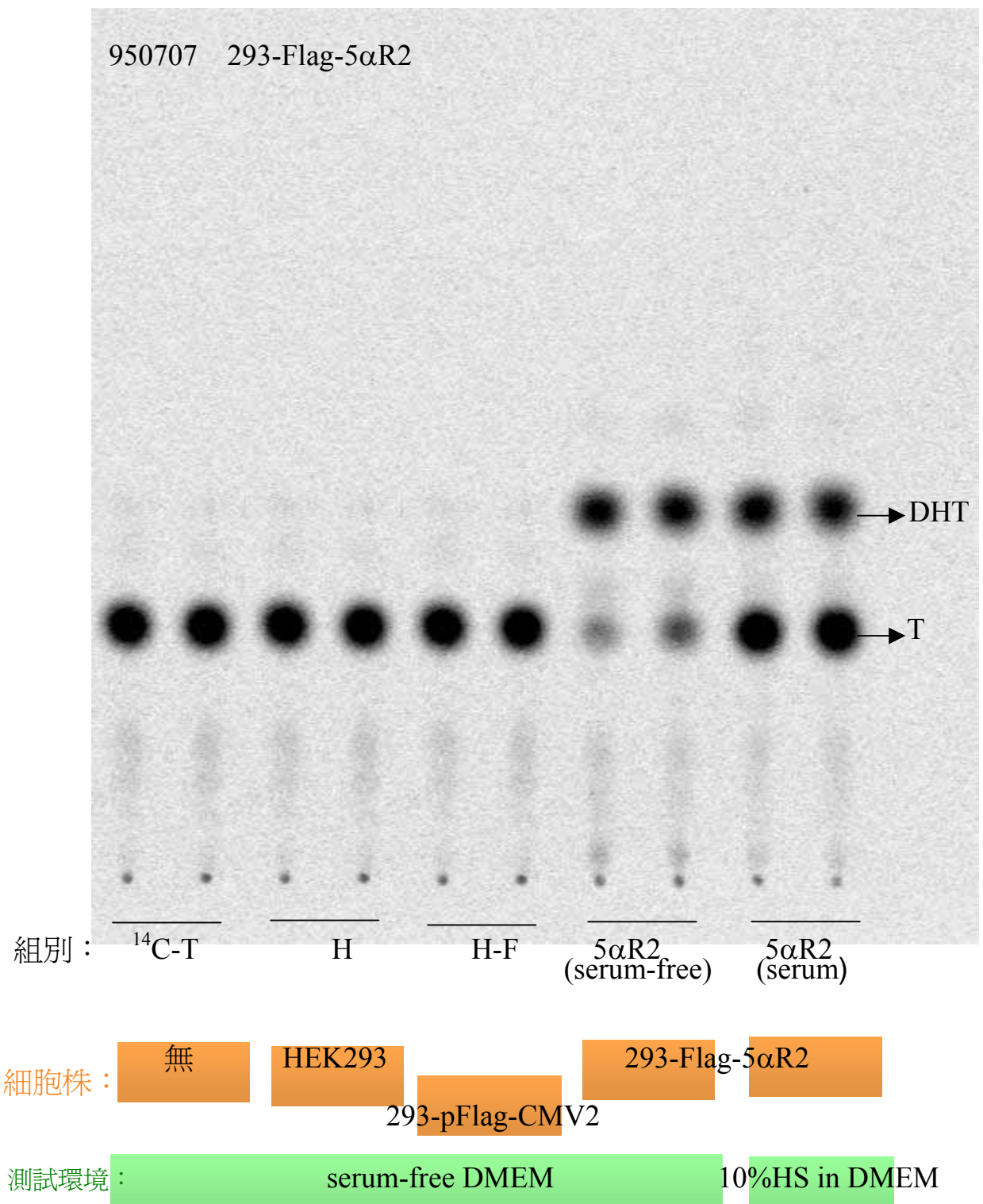


圖 3-5 293-Flag-5 α R2 活性測試

取 HEK293 cell line seeding 於 6 well plate 中，以 lipofectamine 2000 分別將 pFlag-CMV2 及 pFlag-CMV2- 5 α R2 轉染進入細胞中，至細胞穩定時，分別加入含有 14 C-T 的 serum-free DMEM 及 10% HS in DMEM，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴鍋中，反應 2Hrs，取出各 well 中之 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μ l 的乙酸乙酯，混合均勻後，取出有

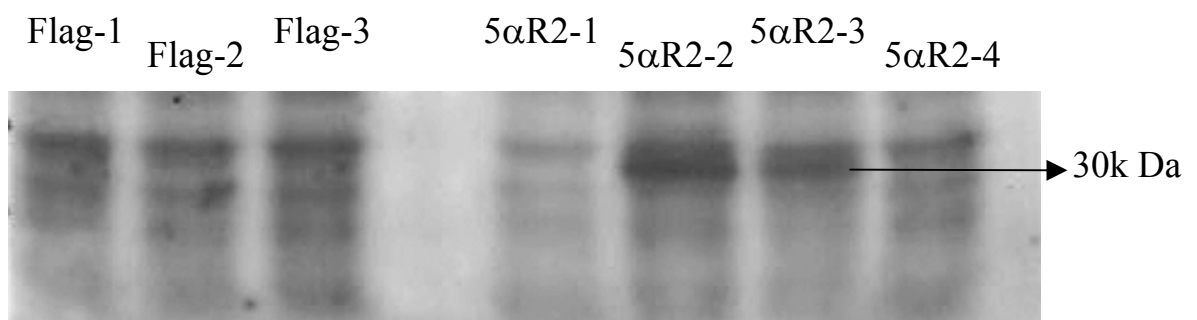


圖3-6 以西方轉漬法確認穩定細胞株轉譯5αR2之能力

細胞 HEK293 以不同比例的 Lipofectamine 2000™ 進行質體 pFlag-CMV2 : pSV2-neo = 1 : 10 及 pFlag-CMV2-5αR2-7M : pSV2-neo = 1 : 10 的轉染，並加入 G418 挑選出含有抗藥基因之細胞株，待細胞量放大後，收細胞萃取液，以 10% SDS page 分離蛋白質，以 anti-Flag 為一級抗體，進行西方轉漬法

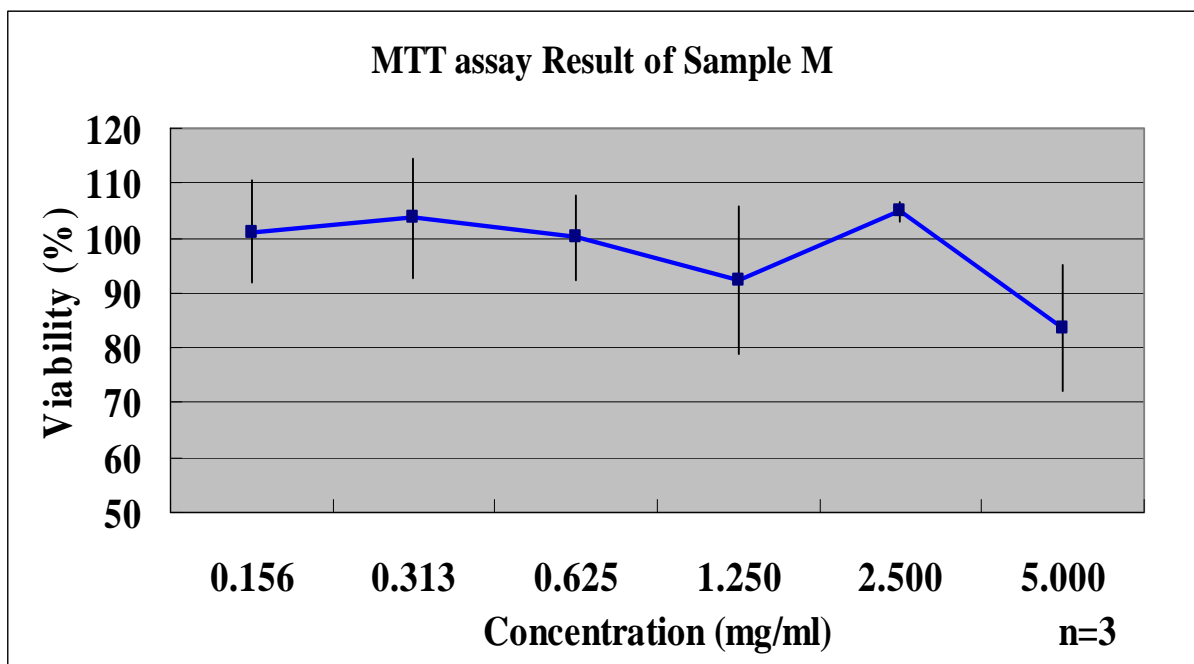


圖 3-7-A 山藥乙醇萃取物 (Sample M)

對 293-Flag-5 α R2 (2-1) 之抑制細胞增生試驗

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 96 well plate 中， 2.5×10^4 cells/well，培養 18Hrs，為實驗組，未 seeding 細胞的 96 well plate 為背景值，兩組各加入如附錄一中 Sample M 之 6 組配製濃度及 1 組 0.5% DMSO in DMEM 各 100 μ l，各 well 皆以三重覆操作，培養 18Hrs，加入 MTT assay Kit 中的 MTT labeling Reagent 10 μ l/well，反應 4Hrs，加入 100 μ l/well 的 solubilization solution，培養 O/N，以可見光 595 nm 偵測其吸光值，再以公式換算其細胞存活率。

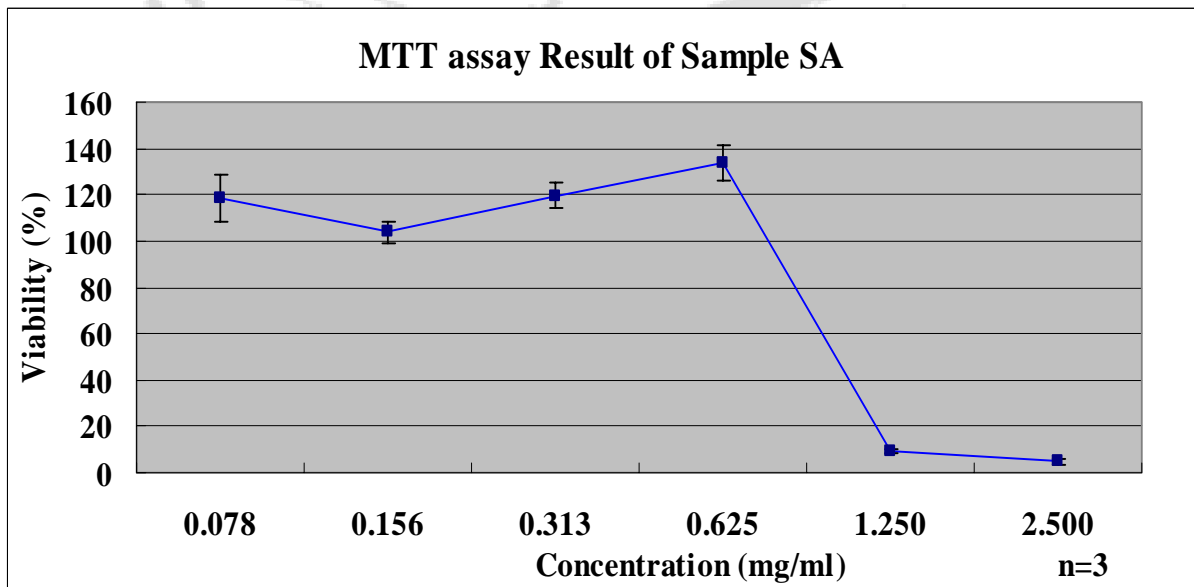
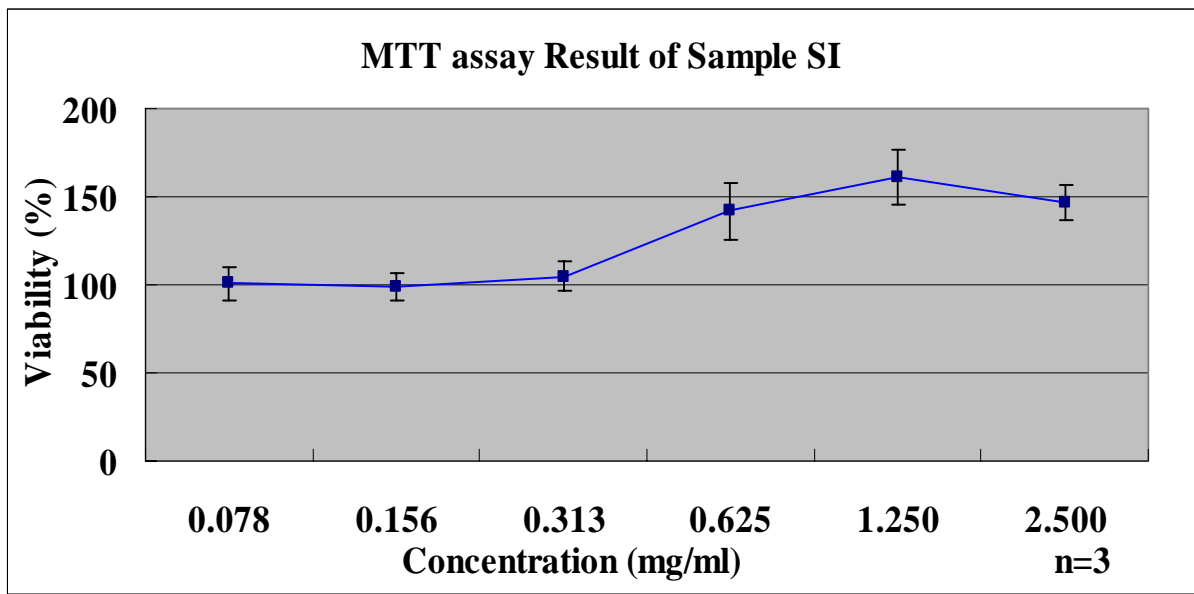


圖 3-7-B 大豆萃取物 (Sample SI、Sample SA)

對 293-Flag-5 α R2 (2-1) 之抑制細胞增生試驗

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 96 well plate 中， 2.5×10^4 cells/well，培養 18Hrs，為實驗組，未 seeding 細胞的 96 well plate 為背景值，兩組各加入如附錄一中 Sample SI 及 Sample SA 之各組配製濃度及 1 組 0.5% DMSO in DMEM 各 100 μ l，各 well 皆以三重覆操作，培養 18Hrs，加入 MTT assay Kit 中的 MTT labeling Reagent 10 μ l/well，反應 4Hrs，加入 100 μ l/well 的 solubilization solution，培養 O/N，以可見光 595 nm

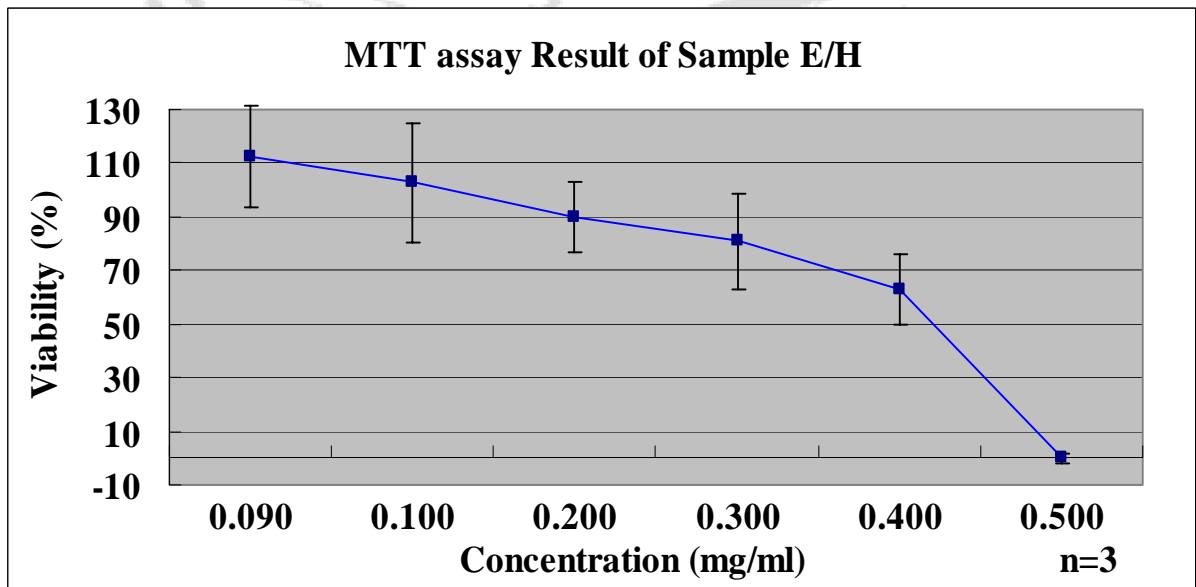
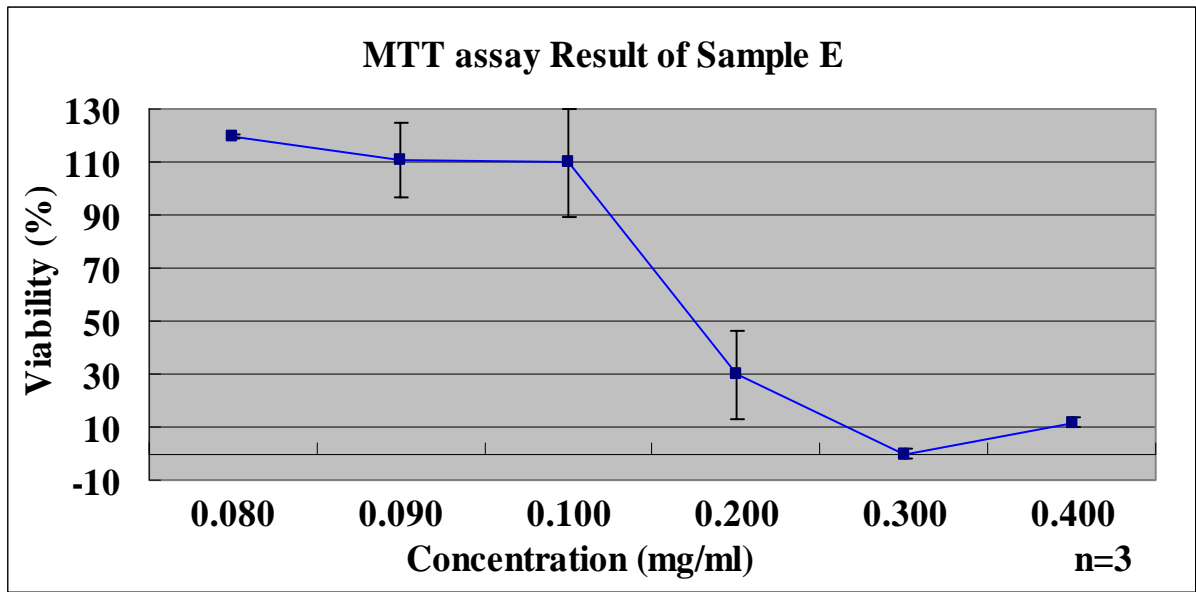


圖 3-7-C 台灣扁柏萃取物 (Sample E、Sample E/H)

對 293-Flag-5 α R2 (2-1) 之抑制細胞增生試驗

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 96 well plate 中， 2.5×10^4 cells/well，培養 18Hrs，為實驗組，未 seeding 細胞的 96 well plate 為背景值，兩組各加入如附錄一中 Sample E 及 Sample E/H 之各組配製濃度及 1 組 0.5% DMSO in DMEM 各 100 μ l，各 well 皆以三重覆操作，培養 18Hrs，加入 MTT assay Kit 中的 MTT labeling Reagent 10 μ l/well，反應 4Hrs，加入 100 μ l/well 的 solubilization solution，培養 O/N，以可見光 595 nm 檢測其吸光度，以計算其抑制率。

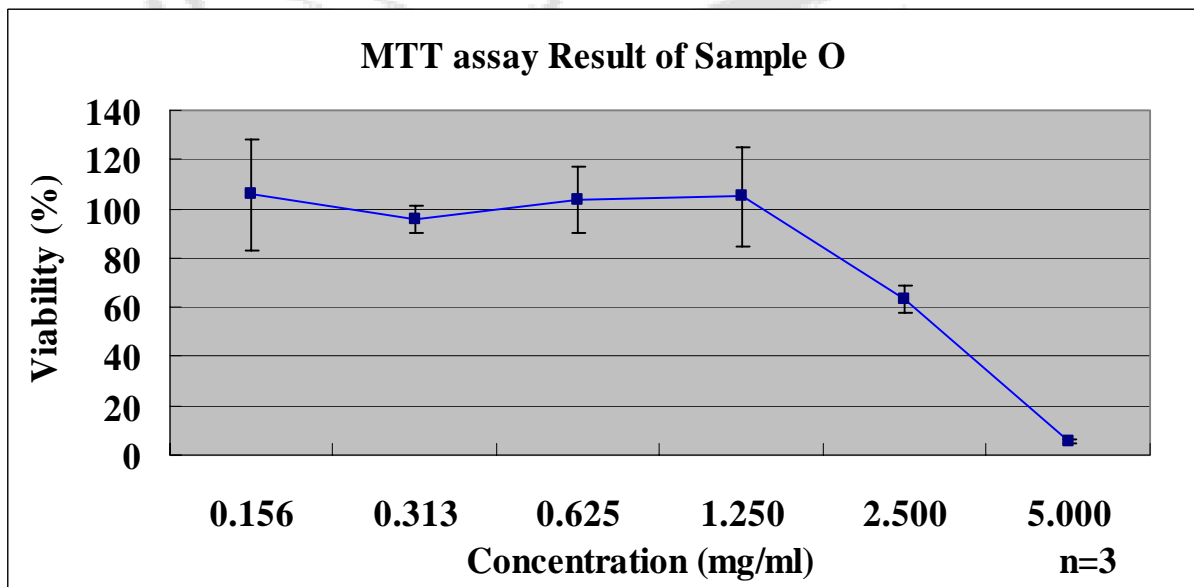
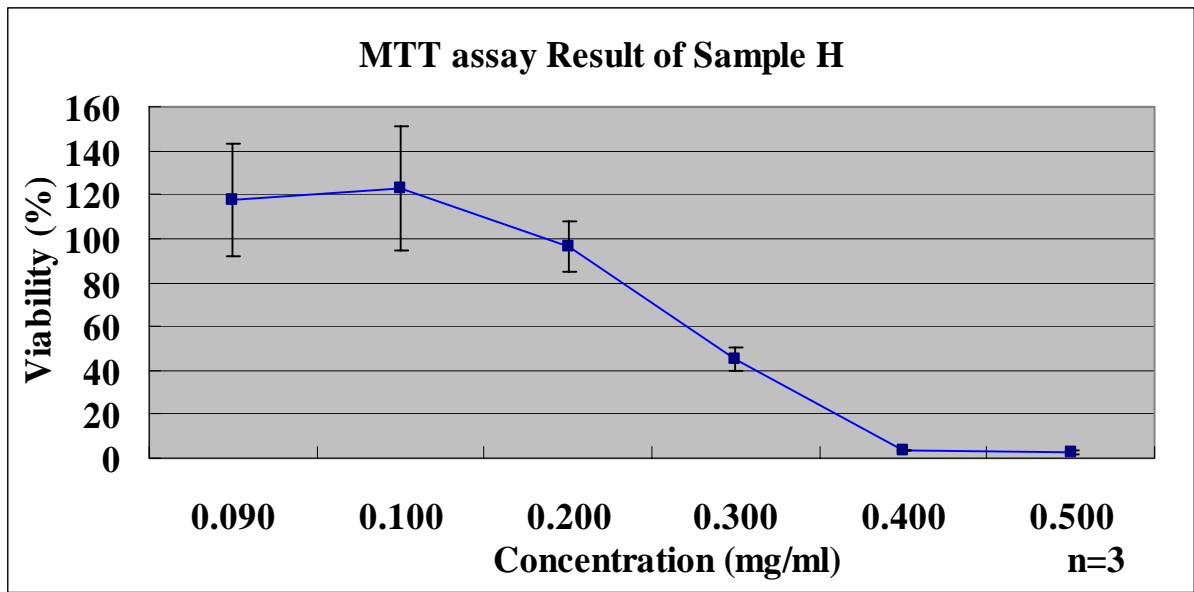


圖 3-7-D 台灣扁柏萃取物 (Sample H、Sample O)

對 293-Flag-5 α R2 (2-1) 之抑制細胞增生試驗

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 96 well plate 中， 2.5×10^4 cells/well，培養 18Hrs，為實驗組，未 seeding 細胞的 96 well plate 為背景值，兩組各加入如附錄一中 Sample H 及 Sample O 之各組配製濃度及 1 組 0.5% DMSO in DMEM 各 100 μ l，各 well 皆以三重覆操作，培養 18Hrs，加入 MTT assay Kit 中的 MTT labeling Reagent 10 μ l/well，反應 4Hrs，加入 100 μ l/well 的 solubilization solution，培養 O/N，以可見光 595 nm 的波長量測 OD 值，以計算細胞存活率。

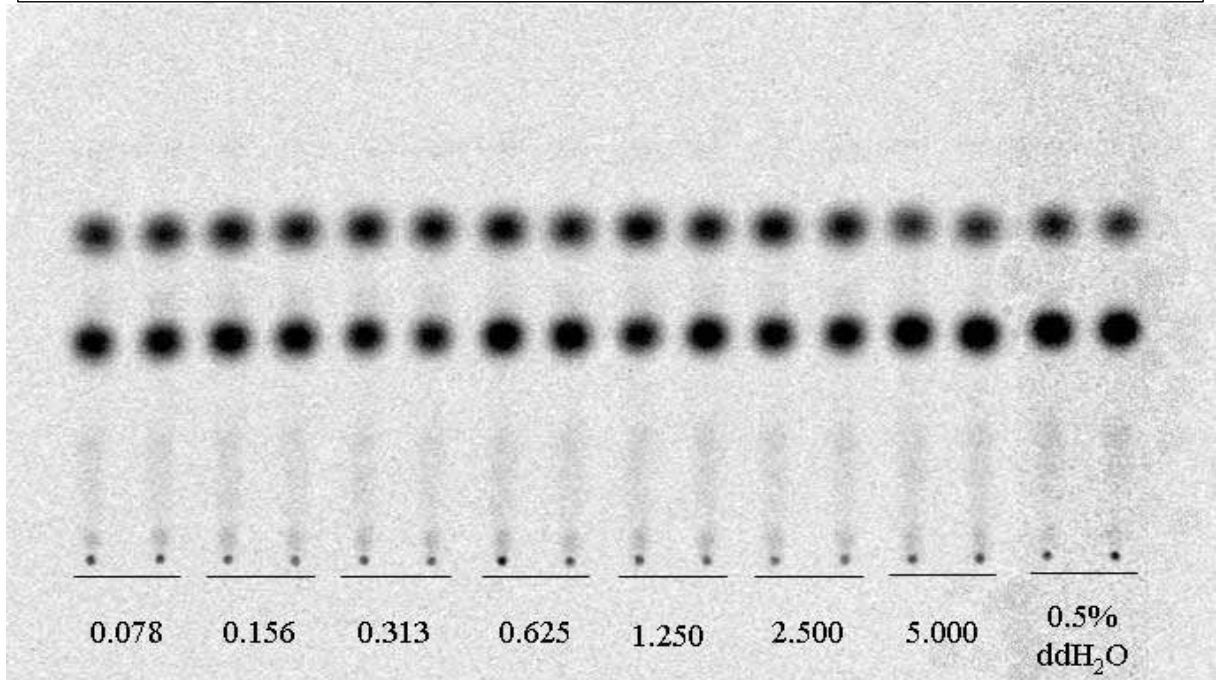
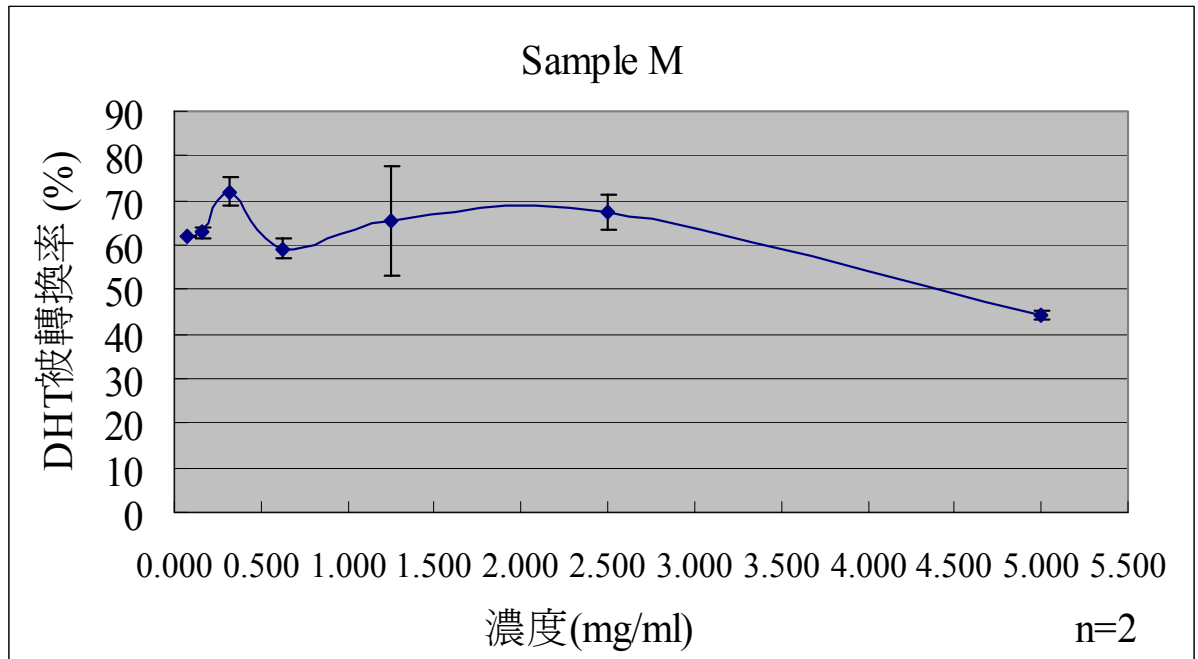


圖 3-8-A 山藥乙醇萃取物 (Sample M) 抑制 5 α R2 之效果

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 24 well plate 中， 2.5×10^5 cells/well，培養 18Hrs，於各組加入相當濃度的 Sample M 或二次水，再加入含有 14 C-T 的 serum-free DMEM，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴鍋中，2Hrs，取出其中 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μ l 的乙酸

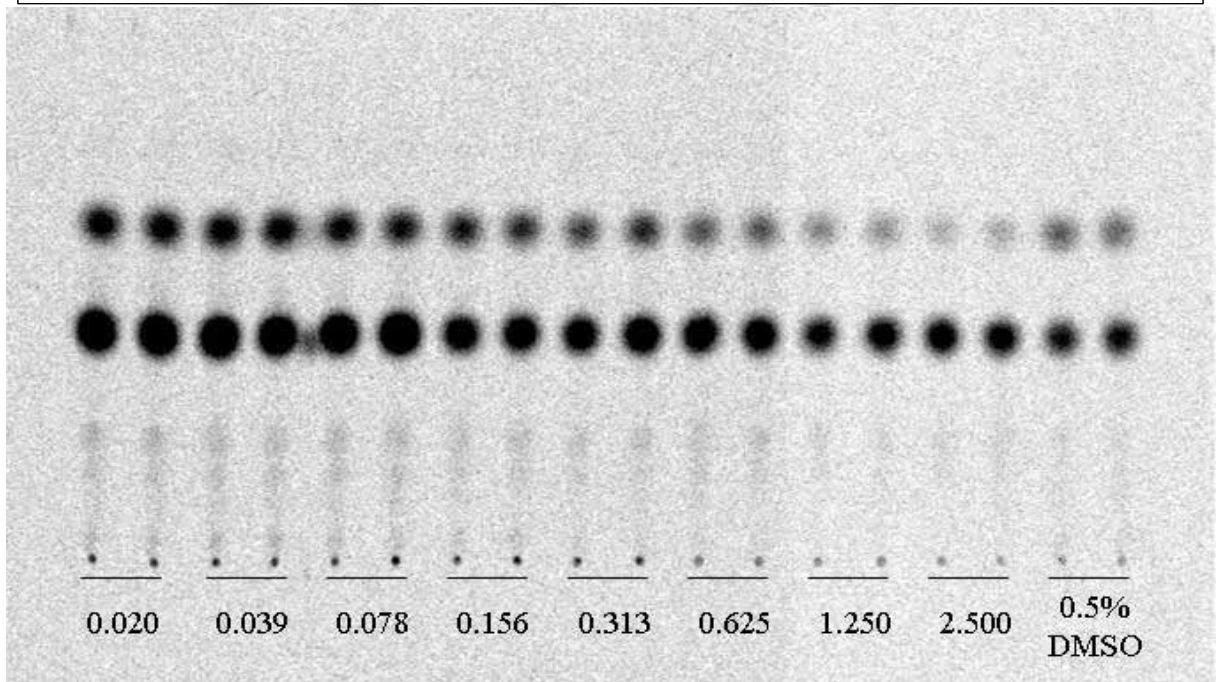
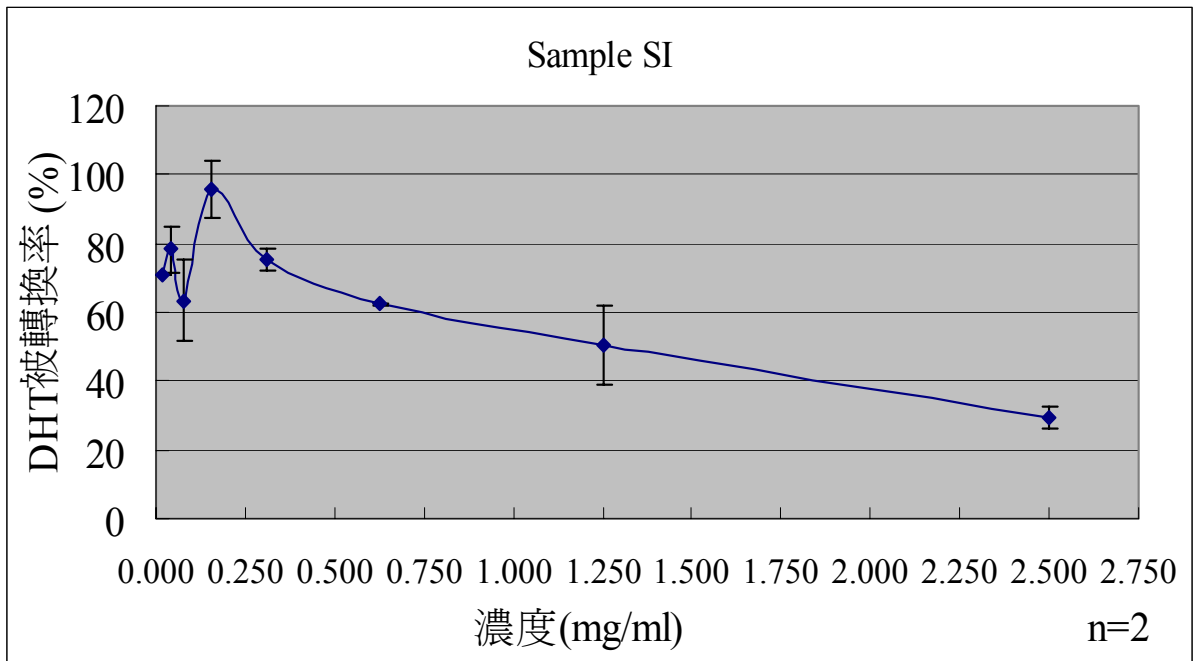


圖 3-8-B 大豆萃取物(未去除醣體) (Sample SI) 抑制 5 α R2 之效果

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 24 well plate 中， 2.5×10^5 cells/well，培養 18Hrs，於各組加入相當濃度的 Sample SI 或 DMSO，再加入含有 14 C-T 的 serum-free DMEM，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴鍋中，2Hrs，取出其中 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μ l 的乙酸乙酯，混合均勻後，取出有機層，待全乾，重新加入 20 μ l 乙酸乙酯，取 4 μ l 進行 TLC 分析。各組濃度以二重覆操作之。

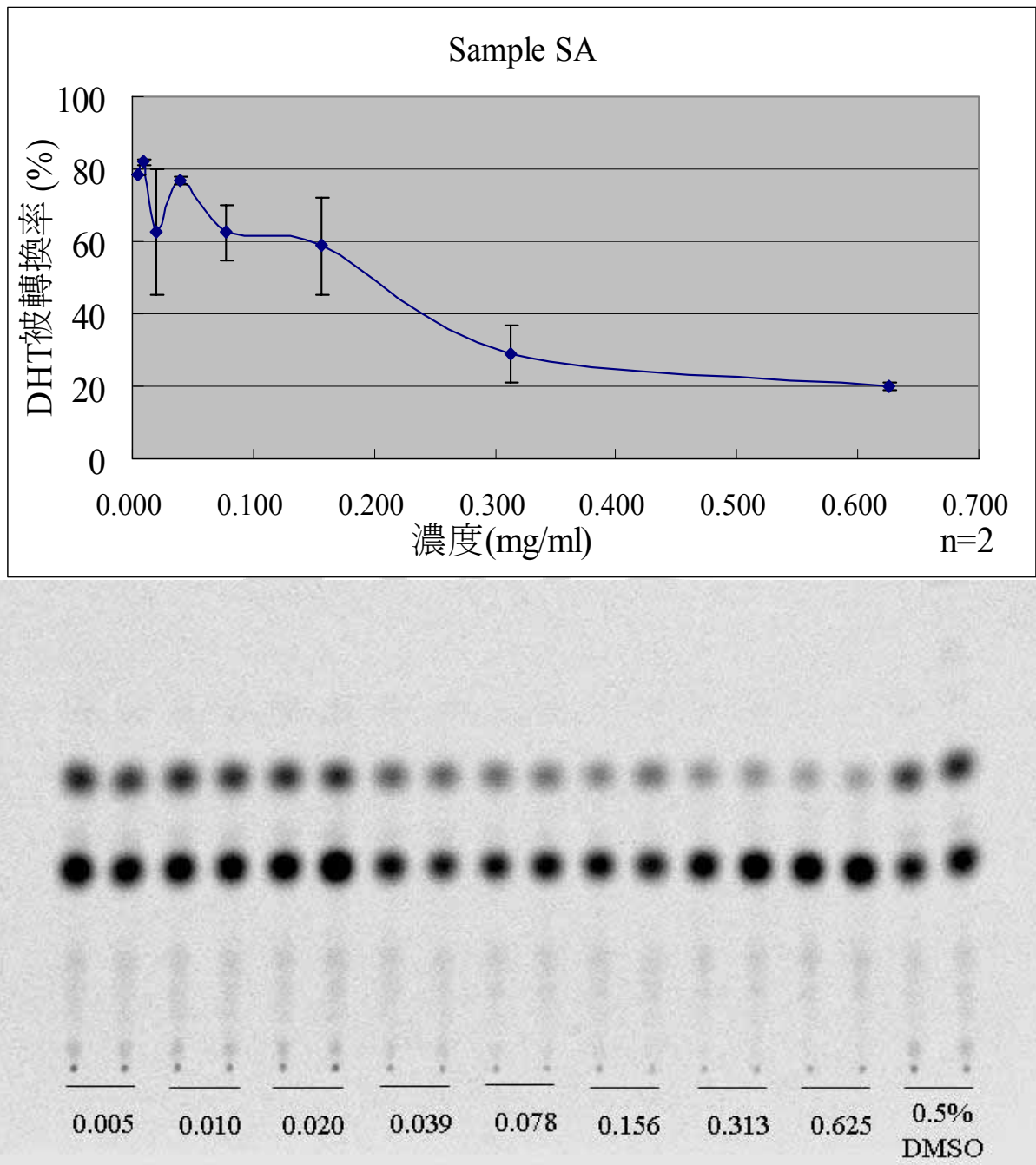


圖 3-8-C 大豆萃取物(去除醣體) (Sample SA) 抑制 5 α R2 之效果

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 24 well plate 中， 2.5×10^5 cells/well，培養 18Hrs，於各組加入相當濃度的 Sample SA 或 DMSO，再加入含有 14 C-T 的 serum-free DMEM，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴鍋中，2Hrs，取出其中 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μ l 的乙酸乙酯，混合均勻後，取出有機層，待全乾，重新加入 20 μ l 乙酸乙酯，取 4 μ l 進行 TLC 分析。各組濃度以二重覆操作之。

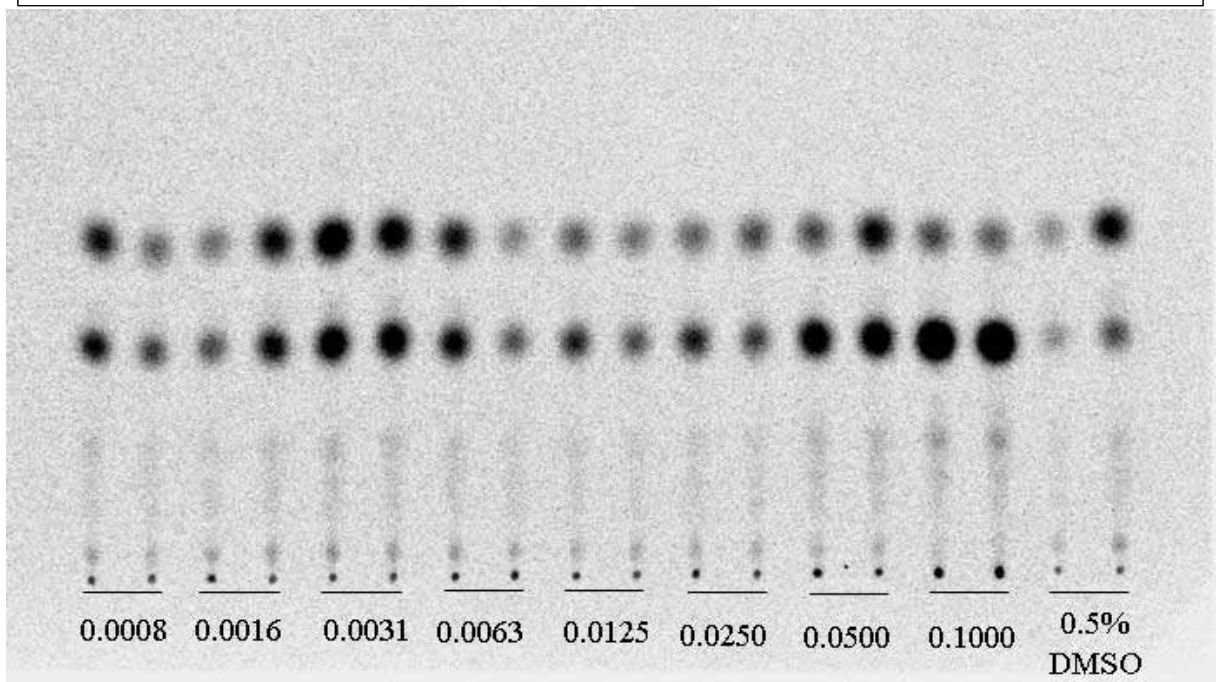
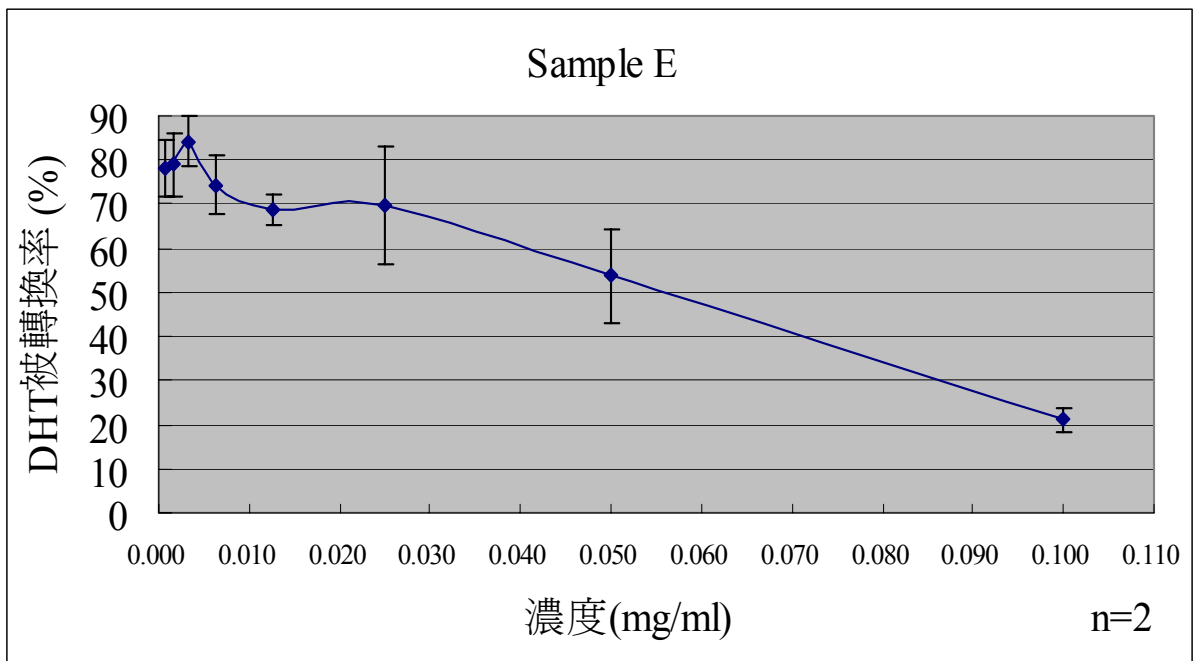


圖 3-8-D 台灣扁柏乙醇萃取物 (Sample E) 抑制 5 α R2 之效果

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 24 well plate 中， 2.5×10^5 cells/well，培養 18Hrs，於各組加入相當濃度的 Sample E 或 DMSO，再加入含有 14 C-T 的 serum-free DMEM，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴鍋中，2Hrs，取出其中 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μ l 的乙酸乙酯，混合均勻後，取出有機層，待全乾，重新加入 20 μ l 乙酸乙酯，取 4 μ l 進行 TLC 分析。各組濃度以二重覆操作之。

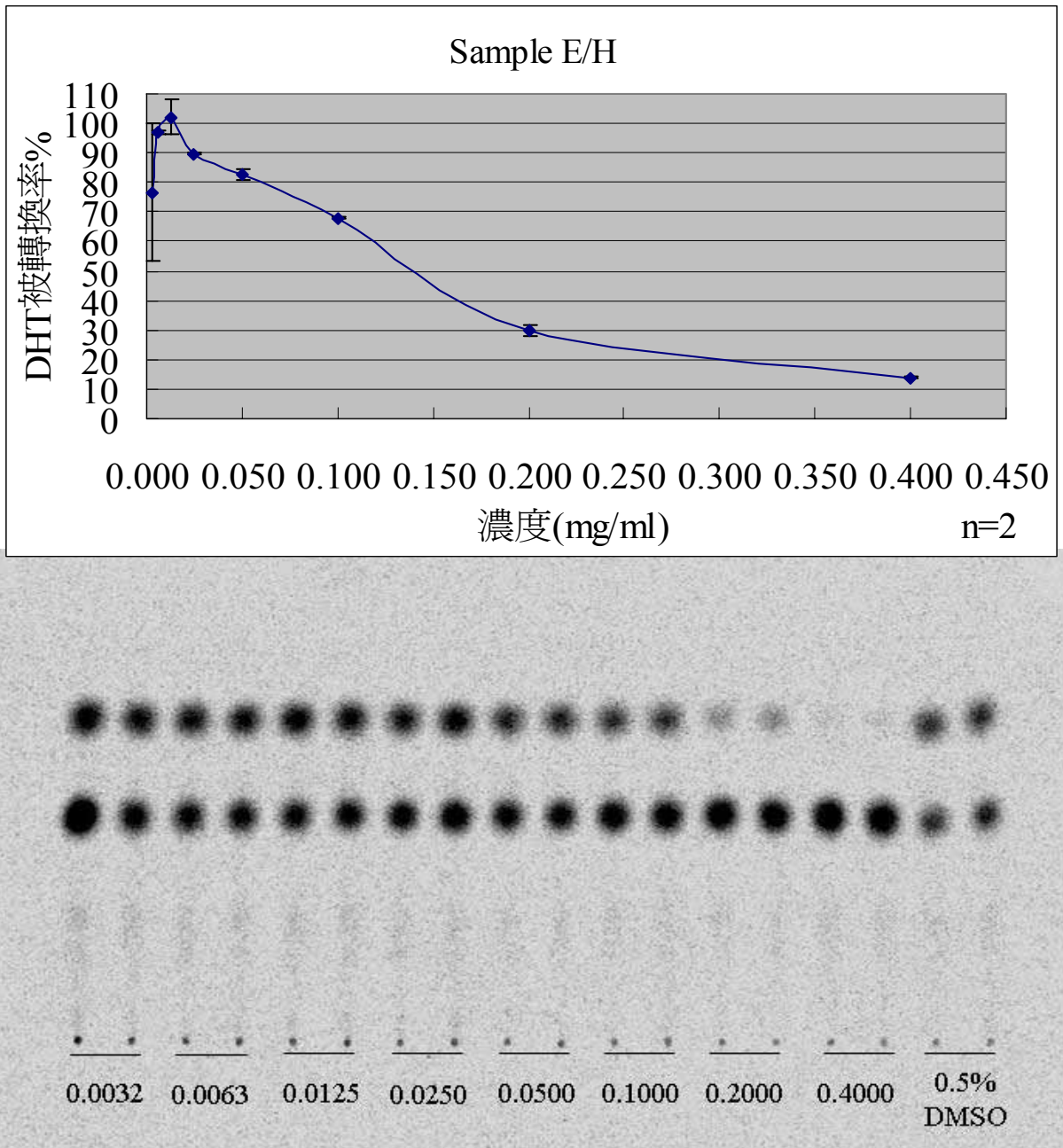
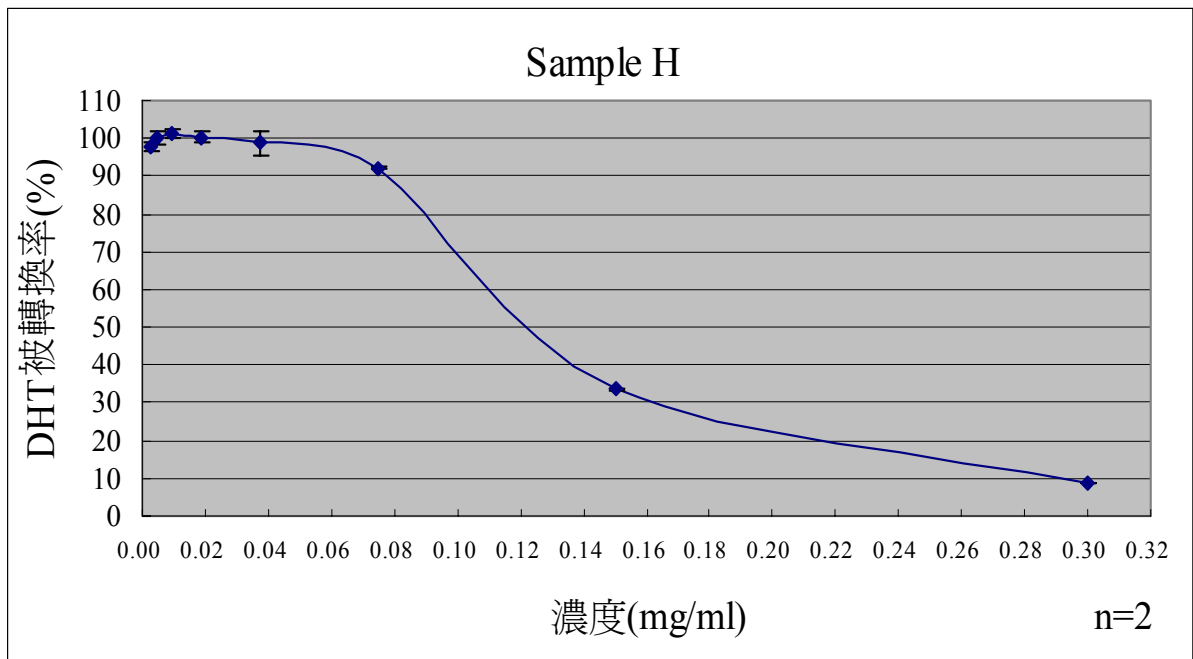


圖 3-8-E 台灣扁柏乙醇/正己烷 (50/50) 萃取物 (Sample E/H)

抑制 5 α R2 之效果

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 24 well plate 中， 2.5×10^5 cells/well，培養 18Hrs，於各組加入相當濃度的 Sample E/H 或 DMSO，再加入含有 14 C-T 的 serum-free DMEM，置於 37°C 水浴鍋中，2Hrs，取出其中 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μ l 的乙酸乙酯，混合均勻後，取出有機層，待全乾，重新加入 20 μ l 乙酸乙酯，取 4 μ l 進行 TLC 分析。各組濃度以二重覆操作之。



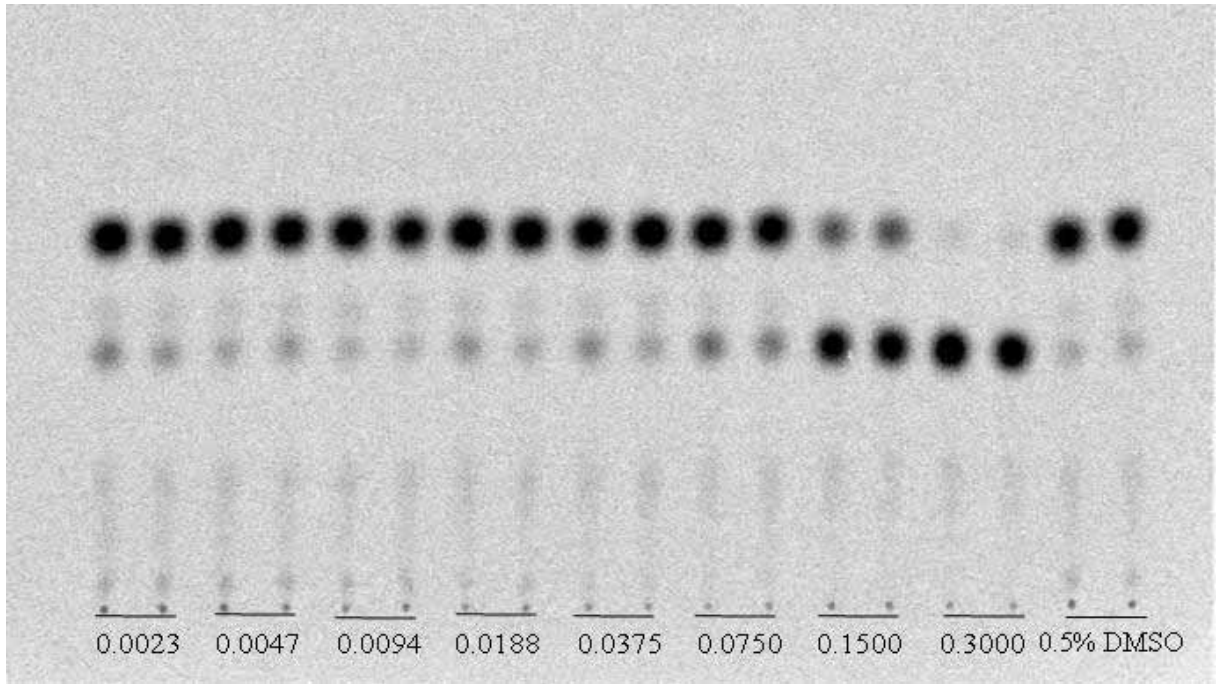
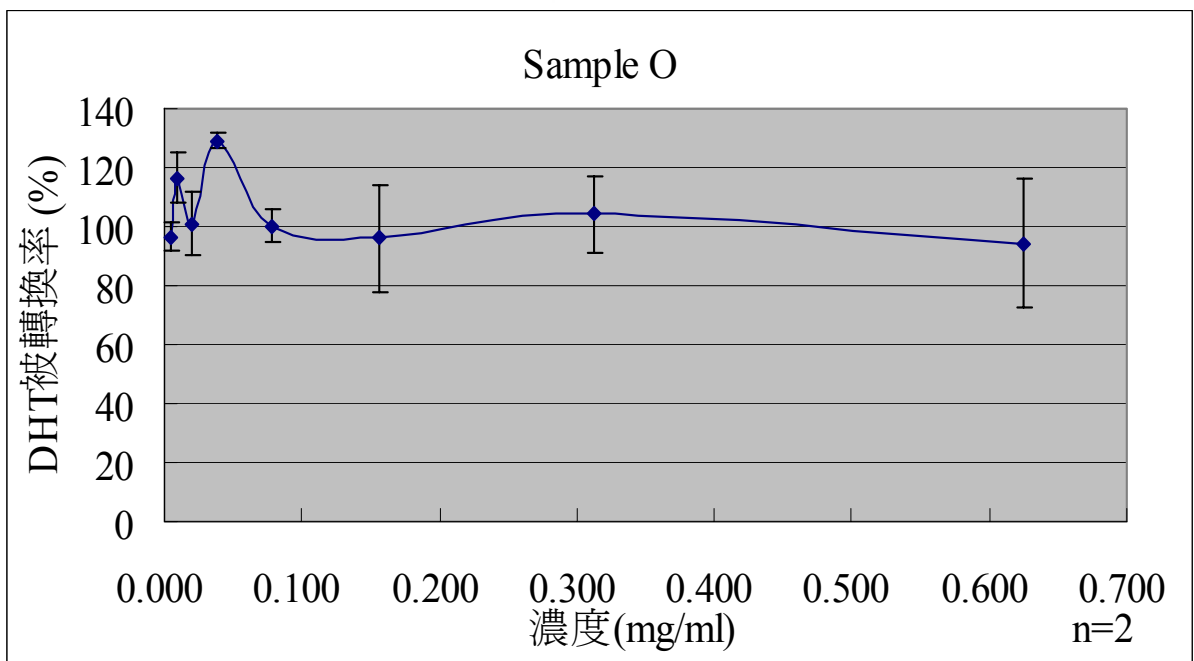


圖 3-8-F 台灣扁柏正己烷萃取物 (Sample H) 抑制 5 α R2 之效果

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 24 well plate 中， 2.5×10^5 cells/well，培養 18Hrs，於各組加入相當濃度的 Sample H 或 DMSO，再加入含有 14 C-T 的 serum-free DMEM，置於 37°C 水浴鍋中，2Hrs，取出其中 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μ l 的乙酸乙酯，混合均勻後，取出有機層，待全乾，重新加入 20 μ l 乙酸乙酯，取 4 μ l 進行 TLC 分析。各組濃度以二重覆操作之。



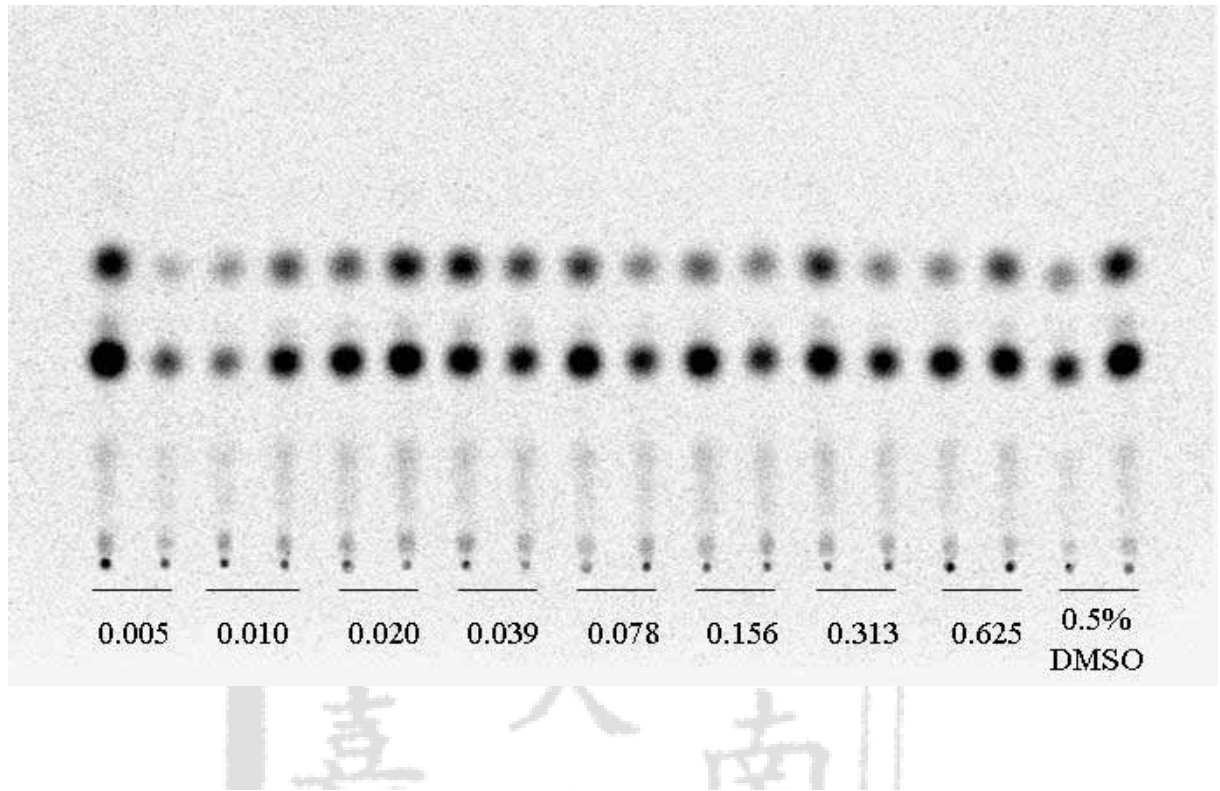


圖 3-8-G 台灣扁柏精油 (Sample O) 抑制 5 α R2 之效果

293-Flag-5 α R2 (2-1) seeding 於 24 well plate 中， 2.5×10^5 cells/well，培養 18Hrs，於各組加入相當濃度的 Sample O 或 DMSO，再加入含有 14 C-T 的 serum-free DMEM，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴鍋中，2Hrs，取出其中 medium 置於 eppendorf 中，加入 800 μ l 的乙酸乙酯，混合均勻後，取出有機層，待全乾，重新加入 20 μ l 乙酸乙酯，取 4 μ l 進行 TLC 分析。各組濃度以二重覆操作之。