

計畫編號：CNIC94-02 (子計畫 1)

計畫名稱：樟芝菌絲體胞外多醣應用於化妝品上之研究

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：楊朝成



中華民國 95 年 02 月 28 日

一、 研究計畫之背景及目的

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-1 [matrix metalloproteinase-1, MMP-1, 是一種膠原蛋白酶(interstitial collagenase)]、MMP-2 (gelatinase A) 及 MMP-9 (gelatinase B) 的活性也隨著增加，導致皮膚真皮層細胞外間質內的膠原蛋白被分解，而引起皺縮、厚度變薄等皮膚的老化現象。因此本研究計劃將利用樟芝菌絲體深層培養中所含有不同分子量的胞外多醣體分別處理培養的纖維母細胞，以分析細胞的生長及增生情況、type I 膠原蛋白 mRNA 及蛋白質的量、以及 MMP-1、MMP-2 及 MMP-9 的酵素活性與蛋白質分泌量。由初步的實驗結果我們預期樟芝菌絲體深層培養中所含有不同分子量的胞外多醣體可藉由抑制 MMPs 的酵素活性而對於皮膚具有抗老化的能力，可作為抗老化化妝品的有效成份，並達到利用中草藥有效成份開發化妝品的目的。

二、研究方法及進行步驟

1. 纖維母細胞的培養與處理
2. 樟芝菌絲體的固態培養及深層培養
3. 樟芝菌絲體胞外多醣以酒精進行沉澱
4. 纖維母細胞的存活率試驗 (MTT assay)
5. 膠體過濾層析分析分子量的分佈測定
6. 電泳酵素分析法 (gelatin-based zymography)
7. 皮膚的功能性測試

三、結果與討論

樟芝發酵液以 95 % 的酒精濃度沉澱總多醣體，再利用苯酚-硫酸法 (Phenol-sulfuric acid assay) 進行多醣體的濃度分析。以 95%酒精沉澱的多醣體總量除以樟芝發酵液體積，得知本研究所培養樟芝菌絲體發酵液的總多醣體濃度為 4.5 mg/ml。以不同的酒精濃度範圍沉澱樟芝發酵液的胞外多醣體，可分離出 10 個 fractions 的樟芝胞外多醣體，其分子量的分佈以膠體穿透層析法進行偵測，乃利用分子篩管柱 (TSKgelGMPWxl column)，並配合光散射偵測器(ELSD)來進行分析。經 MTT 毒性測試分析，實驗結果顯示樟芝胞外多醣體於 0.75 mg/ml 的劑量以上，處理細胞 48 小時，會造成 3T3 細胞的存活率降至 60% 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 的樟芝胞外多醣體。

在樟芝胞外總多醣體對於 MMPs 的活性分析探討中，我們先收集正常培養 48 小時的 3T3 細胞培養液，以 0.5 mg/ml 的樟芝胞外多醣體處理細胞培養液，反應 0~120 小時，再進行以明膠為基礎之受質凝膠電泳的酵素活性分析(gelatin-based zymography)，以偵測樟芝胞外多醣體是否會抑制 MMPs 的酵素活性，由實驗結果顯示，以 0.5 mg/ml 的樟芝胞外多醣體處理細胞培養液 24~120 小時，對於細胞培養液內所含 MMP-2 及 MMP-9 的活性具有抑制的作用。

由於樟芝胞外多醣體在 0.5 mg/ml 的劑量之下，可以抑制細胞培養液內所含 MMP-2 及 MMP-9 的酵素活性。我們對於樟芝胞外多醣體處理劑量的範圍將作更進一步的探討，我們選取 0.1~0.5 mg/ml 的濃度範圍，分別處理細胞培養液 48 小時，再進行 gelatin-based zymography 的酵素活性分析，由實驗結果得知隨著樟芝胞外多醣體處理劑量的增加，細胞培養液內所含 MMP-2 及 MMP-9 的酵素活性的抑制作用越加明顯。綜合以上的實驗結果顯示，樟芝胞外多醣體於 0.5 mg/ml 的處理劑量下，處理細胞培養液 48 小時後，可以明顯降低細胞培養液內所含 MMP-2 及 MMP-9 的酵素活性。

綜合上述的實驗結果，得知樟芝胞外多醣體藉由對

MMP-2 及 MMP-9 的抑制作用而減緩膠原蛋白的破壞，因此，我們認為樟芝胞外多醣體確實具有抗老化的功效。更進一步地，我們將樟芝胞外總多醣體調製成水凝膠精華露化妝品，以 10 位受試者的皮膚做測試，由於受試個人之間的皮膚膚質有差異性，故以塗抹後對於皮膚的影響做為指標，我們以多功能膚質檢測儀分析，分析的項目包括美白功能、除皺功能、皮膚保濕性、皮膚彈性、對皮膚的刺激性，由表一的檢測結果顯示樟芝胞外多醣體水凝膠精華露，在皮膚塗抹過後，對於皮膚具有正面的功效，可以減少皮膚的皺紋、增加皮膚的彈性以及對於皮膚具有保濕的功能。

表一、樟芝胞外多醣體所調製凝膠化妝品對人體皮膚的功能性評估

測試項目	功能性
美白	-
除皺	+
保濕性	+
彈性	+
刺激性	-

＋：代表對於人體皮膚有此項功能

－：代表對於人體皮膚無此項功能