

國立交通大學

生化工程所

碩士論文

評估豬隻胎盤萃取液在抗皮膚老化及美白之功效

Evaluation of porcine placenta extracts on the efficacy
of anti-skin aging and whitening



研究生：黃淑旻

指導教授：張正博士

中華民國九十三年七月

評估豬隻胎盤萃取液在抗皮膚老化及美白之功效

Evaluation of porcine placenta extracts on the efficacy
of anti-skin aging and whitening

研究生：黃淑旻

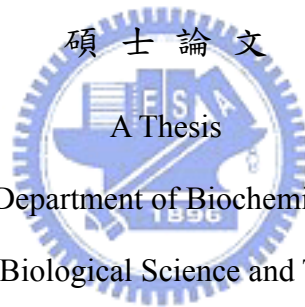
Student : Shung Ming Huang

指導教授：張正

Advisor : Allen Chang

國立交通大學

生化工程研究所



Submitted to Department of Biochemical Engineering

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master in

Biochemical Engineering

July 2004

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十三年七月

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、前言.....	4
貳、文獻整理.....	6
一、胎盤素之簡介.....	6
二、皮膚老化之簡介.....	7
2.1.人體皮膚的構造.....	7
2.1.1 表皮層.....	7
2.1.2 真皮層.....	8
2.1.3 皮下組織.....	9
2.2 皮膚老化.....	9
2.2.1 皮膚老化的特徵.....	9
2.2.2 皮膚老化的外觀變化.....	9
2.2.3 皮膚老化的生理機能變化.....	10
2.2.4 影響皮膚老化的相關機制.....	12

2.3. 皮膚老化的自由基學說.....	12
2.3.1 自由基學說.....	13
2.3.2 自由基學說對皮膚老化的意義.....	13
2.4. 人體中的抗氧化系統.....	14
2.4.1 酵素性抗氧化酵素系統.....	15
2.4.2 非酵素性抗氧化酵素系統.....	16
三、皮膚黑色素生成之簡介.....	17
3.1 黑色素細胞.....	17
3.2 黑色素形成和酪胺酸酶活性作用的關係.....	17
3.3 酪胺酸酶.....	18
參、材料與方法.....	19
一、實驗架構.....	19
二、實驗材料與方法.....	20
2.1 萃取之材料與藥品.....	20
2.2 分析萃取液之成分試劑.....	20
2.3 抗氧化及抗老化功能測定試劑.....	21

2.4 細胞培養與分析之藥品.....	23
2.5 美白有效性測試之試劑.....	23
2.6 皮膚纖維母細胞經 UV 照射之模式測試.....	23
2.7 實驗儀器與材料.....	24
三、實驗方法.....	26
3.1 豬隻胎盤萃取.....	26
3.2 胎盤萃取物之成分分析.....	26
3.3 細胞培養.....	31
3.4 胎盤萃取物抗老化及抗氧化能力評估.....	32
3.5 胎盤萃取物美白有效性試驗.....	35
3.6 皮膚纖維母細胞經 UV 照射之模式測試.....	36
肆、結果與討論.....	38
4.1 萃取液之分析.....	38
4.2. 評估萃取液對抗老化、抗氧化之功效.....	38
4.3. 評估萃取液對美白之功效.....	41
4.4. 紫外線對於細胞存活率之影響.....	42

伍、結論.....	44
陸、未來展望.....	45
柒、參考文獻.....	46



圖目錄

圖一、	紫外線 A 照射皮膚所引起之氧化性傷害機制.....	53
圖二、	皮膚之構造.....	53
圖三、	黑色素生成(Melanogenesis)之反應機構.....	54
圖四、	胎盤萃取液中含有 bFGF	55
圖五、	胎盤萃取液中含有 EGF	55
圖六、	胎盤萃取液中含有 VEGF	55
圖七、	不同濃度之胎盤萃取液或 α -tocopherol 對 DPPH 自由基清除 之能力.....	56
圖八、	不同濃度之胎盤萃取液清除超氧陰離子的能力.....	57
圖九、	不同濃度之萃取物對清除過氧化氫的能力.....	58
圖十、	不同濃度之胎盤萃取液對 NIH 3T3 增生之影響。細胞增生是 以 tyrpan blue 方法在 12、24、48、60、84、108 小時後所測 得.....	59
圖十一、	不同濃度之胎盤萃取液對 NIH 3T3 增生之影響。細胞增生是 以 tyrpan blue 方法在 48 小時後所測得.....	60
圖十二、	不同濃度的水之胎盤萃取液對 NIH 3T3 增生之影響。細胞存 活率是以 tyrpan blue 方法在 48 小時後所得.....	61
圖十三、	膠原蛋白分析測定檢量線.....	62
圖十四、	不同濃度之胎盤萃取液對促進 NIH 3T3 合成膠原蛋白的影響。 萃取物與細胞培養 24 小時後測膠原蛋白的含量.....	63
圖十五、	不同濃度之胎盤萃取液對促進 NIH 3T3 合成膠原蛋白的影響。 萃取物與細胞培養 48 小時後測膠原蛋白的含量.....	64

圖十六、 不同濃度之胎盤萃取液或 Vit C 對酪胺酸酶活性抑制率之比較.....	65
圖十七、 不同濃度之胎盤萃取液對 B16 黑色素形成的抑制率的影響。 黑色素抑制率是以第三天的產量來計算，而黑色素細胞在第二天以 UVA (1.1 mw/cm ²)照射 30 分鐘.....	66
圖十八、 不同濃度之胎盤萃取液對 B16 黑色素形成的抑制率的影響。 黑色素抑制率是以第三天的產量來計算，而黑色素細胞在第二天以 UVB (1.5 mw/cm ²)照射 15 分鐘.....	67
圖十九、 不同紫外線 A 與 B 照射時間，對人類皮膚纖維母胞存活率之影響.....	68
圖二十、 添加維他命 E、維他命 C、過氧化氫酶、不同濃度之胎盤萃取液對於皮膚纖維母細胞經 UVB 照射後存活率之影響.....	69
圖二十一、 添加維他命 E、維他命 C、過氧化氫酶、不同濃度之胎盤萃取液對於皮膚纖維母細胞經 UVA 照射後存活率之影響.....	70

表目錄

表一、	胎盤之生長因子.....	71
表二、	皮膚的老化特徵.....	72
表三、	皮膚老化之表皮的變化.....	73
表四、	皮膚老化之真皮變化.....	74
表五、	維生素與其衍生物於保護皮膚上之功效.....	75



中文摘要

中國古來即運用乾燥胎盤-紫河車，用於「至男女一切虛損勞極、安心養血、益氣補精。」，乃為早經證實之古有漢方胎盤療法。近年來各先進國家更用於各種化妝品、皮膚保養品等外敷製劑，其防止皮膚老化、美容、潤白肌膚之效果也有著一定的評價。老化的皮膚生長緩慢，每天受到外界環境污染或紫外線照射而受損的表皮細胞及黑色素，來不及由基底層所增生的新細胞所取代，積存在皮膚表面，外觀就顯得又粗又黑，甚至產生許多皮膚的病變。

此實驗目的是在胎盤萃取物之抗老化與美白能力評估包括活性氧(ROS)的捕捉、抑制酪胺酸酶的測定，以及細胞培養方法觀察此萃取物對於皮膚細胞的存活率影響及抑制黑色素形成的能力。而抗老化與美白能力評估主要方向為：(1)ROS之捕捉效應和促進纖維母細胞增生及膠原蛋白之生成量及光損害之保護能力；(2)抑制酪胺酸酶及黑色素形成的能力；(3)確定豬隻胎盤中之成分。實驗結果發現：(1)活性氧捕捉之功效均隨萃取液濃度提高而增加，且抗氧化能力以水之萃取液比其它萃取液佳。(2)促進皮膚纖維母細胞 NIH 3T3 之增生及膠原蛋白合成在萃取液濃度為 0.75 mg/ml 時效果較佳。(3)水萃取液於濃度於 1 mg/ml 下，具有 60% 的酪胺酸酶活性抑制率；而對 B16 黑色素的抑制率方面，當水之萃取物在濃度小於 0.5 mg/ml 對 B16 黑色素形成的抑制率達 75% 以上。(4)皮膚纖維母細胞經 UV 照射後，萃取液濃度介於 0.25~0.75 mg/ml 是保護皮膚纖維母細胞抵抗紫外線之最適濃度。(5)在胎盤萃取液中確實有 bFGF、EGF、VEGF 的存在。

Abstract

Placenta is a rich reservoir of bioactive molecules. Placenta extracts contain basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), keratinocyte growth factor (KGF) and stimulators of endothelial cell growth.

The objectives of the study is to evaluate the efficacy of an anti-skin aging and whitening cosmetics that containing porcine placental extracts. The study includes : (1) To evaluate the efficacy of anti-skin aging of the porcine placenta extracts remedies by observation the scavenging activity of reactive oxygen species(ROS) ; collagen formation of the cultured fibroblast ; protection of fibroblast by photodamageing and stimulation of the growth of skin and corium. (2) Tyrosinase inhibition via determining cells viability, and melanin inhibition of the cultured melanocytes. (3) Identification of growth factors of porcine placental extracts that involved in the above-mentioned activities. The results obtained are as following : (1) Reactive oxygen species scavenging activities with increasing the concentration of the porcine placental extracts. The antioxidant capacity of extracts in water was better than other extracts. It showed that water extracts had the highest scavenging effect. (2) Cell proliferation showed the extracts concentration between 0.05 ~1 mg/ml and the result showed that best cell proliferation was with a concentration of 0.75 mg/ml . On enhancing collagen content of NIH 3T3 , it showed that best collagen content was with a concentration of 0.75 mg/ml. (3) Placental extracts in water had the highest tyrosinase inhibitory activity than other extracts. It showed 60% tyrosinase inhibitory activity at 1 mg/ml. The water extracts revealed 75% inhibition

on melanin content of B16 at concentration ≤ 0.5 mg/ml.(4) The optimum concentration of the extracts that shower protect on photodamageing by UV was 0.25~0.75 mg/ml. (5) bFGF 、EGF 、VEGF was present in the placental extracts.



壹、前言

老化及美白是現今困擾人的問題之一，皮膚老化是人體自然的規律，而對於皮膚衰老及美白機制的探討，人們不斷的研究預防和延緩皮膚衰老和抵禦紫外線侵害的有效途徑和方法。紫外線、空氣污染、吸煙及其它化學、物理性傷害等都是可能造成老化的因子，而影響皮膚老化的基理上，近年來發現日光是導致外在皮膚老化的主要因素(Chung et al., 2001)，日光中的紫外線不只會使黑色素細胞活化，也會導致皮膚斑點的出現，且使真皮組織產生退化現象，並且會加速皮膚的氧化，產生游離自由基(Darr et al., 1994)；這些自由基會破壞纖維母細胞，且真皮之膠原蛋白變性和含量減少以及彈性纖維組織的功能退化，以致降低其對組織的修復能力(Chung et al., 2001)而造成皮膚真皮層的鬆垮產生皺紋；更會加速細胞內 DNA 的氧化傷害(Wickens, 2001)，使得皮膚細胞衰老、更新的能力變差，新細胞取代舊細胞的速度變慢(Jenkins, 2002)，因此未經妥善保養的肌膚顯得黯淡而無光彩。

一般而言造成人體皮膚衰老的因素有兩種因素：外在環境因素與內在生理，而陽光的曝曬即屬於外在因素的一種。紫外線的波長從 200~400nm，依波長的範圍，分別為短波長 UVC (200 ~ 290 nm)、中波長 UVB(290 ~ 320 nm)、長波長 UVA(320 ~ 400 nm)三種波長，雖然臭氧層能阻絕 UVC 光線對皮膚的傷害，但無法阻隔 UVB 及 UVA 光波穿透角質層進入表皮層與真皮層內，進而造成皮膚光損傷(Photodamaging)。而皮膚經 UV 照射後，皮膚產生過量活性含氧族群(圖一)(Reactive oxygen species, ROS)有關連，而過多的活性含氧族群會影響纖維母細胞合成細胞外間質(Kohen et al., 2000)，間接造成真皮層中膠原纖維、彈性纖維、葡萄胺聚糖含量改變與膠原纖維、彈性纖

維變性，使得皮膚增厚與彈力衰退，進而生成皺紋(Karin et al.,2000)，除此之外還會引起皮膚細胞之細胞膜脂質過氧化(Moysan et al., 1993；Morliere et al., 1995)、蛋白質氧化變質、DNA 股斷裂與妨礙含氮鹽基的修飾作用(Steenvoorden and Henegouwen, 1997；Shoichi et al., 2001)，甚或損害一些參與皮膚修復機轉中酵素性抗氧化系統和非酵素性抗氧化系統，因此皮膚抗氧化系統與光老化有非常密切的關係(Genji et al., 1995；Kohen, 1999；Shapiro and Pharmed, 2001)。


化妝品是一種預防老化和保養的方法。對於化妝品的功能性訴求，希望在使用同一產品即可得到多重功效如保濕、美白、抗老、防曬等，所以當今化妝品的成分逐漸趨向複雜多元化，而採用天然的原料更成為化妝品發展的一個趨勢。



貳、文獻整理

一、胎盤素之簡介

中國古來即運用乾燥胎盤-紫河車，用於「至男女一切虛損勞極、安心養血、益氣補精。」，乃為早經證實之古有漢方胎盤療法。近年來各先進國家更用於各種化妝品、皮膚保養品等外敷製劑，其防止皮膚老化、美容、潤白肌膚之效果也有著一定的評價。而在中國的古方名著《本草綱目》中，將胎盤以(紫河車)之名加以介紹，其藥效內容敘述大致如下：“其藥效非其他的金石、草木之類所可以比擬，非常的優良，婦人使用非常有效。不論男女，平常服用，則能夠身心和順，耳聰目明，白髮、白鬚變黑，并且固本培原，延年益壽(龍又麟，1994)。



雖然胎盤素成份已被明確分析，然其中所含有的荷爾蒙、凝血因子、免疫球蛋白、礦物質、脂質、微量元素等等卻不足以解釋其臨床效果。換句話說，胎盤素療法的作用機轉在現代醫學的觀點來說並未真正被解明。現代醫學強調原因療法、藥效的作用機轉必須明確。而胎盤素療法如同漢方療法一般，知道成分、藥效，卻無法以現代醫學的標準來說明作用機轉，也無法作精密的基礎研究。總之胎盤素不是單一化學成分，而是胎盤天然萃取液中所有活性物質的總稱。近年來，逐漸認為胎盤素中各種生長因子，扮演著重要的功效角色。

胎盤素的效果被認為是其生長因子，可促進皮膚細胞生長代謝。老化的皮膚生長緩慢，每天受到外界環境污染或紫外線照射而受損的表皮細胞及黑色素，來不及由基底層所增生的新細胞所取代，積存在皮膚表面，外觀就顯得又粗又黑，甚至產生許多皮膚的病變。

而在胎盤中的生長因子可幫助皮膚:(1)促使細胞分裂活化的作用(2)促進細胞新陳代謝，且其生長因子有：epidermal growth factor(EGF)；fibroblast growth factor (bFGF)；transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)；keratinocyte growth factor (KGF) 和 stimulators of endothelial cell growth (表二)。

生長因子能夠促進皮膚上皮細胞角質細胞的分裂，促進表皮的循環，產生紋裡細緻，潤澤的美肌。且對於真皮的纖維芽細胞發揮作用，使纖維芽細胞進行旺盛的細胞分裂，而製造出膠原蛋白、彈力蛋白以及透明質酸。膠原蛋白或彈力蛋白是幾乎佔據所有真皮的纖維狀蛋白，故可以藉此保持肌膚的彈性。胎盤素能夠使纖維芽細胞活化，促進膠原蛋白、彈力蛋白、透明質酸的產生，利用新的細胞組織更新老舊細胞組織，才能發揮效果。

二、皮膚老化之簡介

2.1. 人體皮膚構造

皮膚為人體的最大器官，具有保護身體不受外部各種刺激、損害、調節體溫、感覺。人的皮膚結構大致分為三層：表皮(epidermis)、真皮(dermis)和皮下組織(subcutis)三大層(Scharffetter. K., 2000)(圖二)。(光井武夫，1992)

2.1.1. 表皮層

表皮位於皮膚最外層，為外界環境接觸的保護性皮膚，保護皮膚不受有害物質的侵害。表皮乃由密集扁平版狀的角質(keratin)所組成，藉由基底膜(basement membrane)與真皮層接合。表皮內除了角質細胞(Keratinocytes)外，還有合成黑色素的黑色素細胞(melanocytes)，



而黑色素細胞散在於基底細胞層的基底細胞間。此外，在表皮還有存在針對異物侵襲與免疫反應表現的蘭格罕氏細胞(langerhans)和感覺受器的默克細胞(Merkel)細胞。

表皮由內至外，可區分為五層：(1) 基底層(basal cell layer)為表皮最深層，位於基底膜上，負責生產角質細胞與黑色素細胞；(2)棘細胞層(stratum spinosum)由基底細胞層上方的角質細胞形成，細胞藉由胞橋小體(desmosomal junction)所構成的細胞間橋(intercellular bridges)相連，使細胞間的營養物質與淋巴液互通；(3) 顆粒細胞層(stratum granulosum)內的角質細胞，含有角質層透明質顆粒(keratohyaline granules)，其內富含硫氨基酸與可製造疏水性糖磷脂(glycophospholipid)的角質體(keratinosomes)與葡萄胺聚糖，為細胞間結合的物質。當細胞死亡後，所留下角質層透明質和微張絲(tonofibrils)則形成了角質素，而角質體則會黏接角質素，使皮膚不易潮濕；(4) 透明層只存在手掌、腳底的表內，由2~3層透明而扁平的細胞所組成，緻密細胞質會形成電荷障壁層，可抑制電解質的穿透；(5) 角質層(stratum corneum)，其為皮膚的防水層，當角質細胞死亡後，即會留下角質層透明質和微張絲而形成表層無細胞之角質層中的角質素(keratin)，而所形成角質層的角質素，則會因皮膚表面摩擦、梳洗與脫落而流失。

2.1.2. 真皮層

真皮為表皮下的支持結締組織所構成，平均厚度1~4mm，佔約皮膚的90%，其細胞外空間多，這一部份被稱為細胞外基質(matrix)之巨大分子的網狀結構，如大多是為纖維母細胞所分泌的葡萄胺聚糖(glycosaminoglycan)與纖維蛋白質所充滿。其主要組成為：(1) 膠原

纖維(collagen fibers)、彈性纖維(elastic fibers)、網狀纖維(reticulum fibers)；(2) 葡萄糖胺聚合醣；(3) 纖維母細胞(fibroblast)與纖維細胞(fibrocyte)、巨噬細胞(macrophage)、肥大細胞(mast cell)、淋巴球等所組成，又可區分為二層：(1) 薄而靠近真皮表皮交界處的乳頭狀真皮層(papillary dermis)，其膠原蛋白與彈性蛋白含量較少，但基質較多，並含有小血管、細小神經分支及神經末梢；(2) 位於乳頭狀真皮和皮下脂肪組織間較厚的網狀真皮層(reticular dermis)，為形成真皮的大部分，內有明顯寬帶狀的緻密膠原纖維，彈性蛋白粗纖維，皮膚血管、淋巴及神經。

2.1.3. 皮下組織

為一層鬆散的結締組織，將皮膚鬆散而不牢地連接與鄰近的器官，含有大量的脂肪組織(adipose tissue)，並藉由纖維膠原組織與真皮層分隔，內含有供應真皮的血管和神經，其主要功能在阻隔熱、能量的儲藏和吸收震動。

2.2. 皮膚老化

當人體老化時，在外觀上即會有所變化，如臉部皺紋加深，眼袋下垂、喉部贅肉形成；皮膚變乾燥、鬆弛，失去彈性，色素沈著；牙齒、牙齦萎縮；頭髮皮膚色素脫失；頭髮稀薄，臉手足前脛皮下脂肪變薄與男人腰腹部、女人大腿脂肪增厚等現象。

2.2.1. 皮膚老化的特徵

人類的老化特徵的器官。老化的程度會隨個體的不同及不同的部位而有所差別。在這些老化所產生的變化當中，表二列出各種皮膚變化，這些變化特稱為老化的特徵。

2.2.2. 皮膚老化的外觀變化

(一) 皺紋

大多數人的皺紋在 30 歲左右變得較為明顯，之後隨著年齡的增長，而逐漸增加其數目、範圍、深度。皺紋的分類方式不下數種，其中之一是根據其型態上的特徵而區分為：線狀皺紋、圖形皺紋及皺網皺紋。前兩者屬於光老化，後者則為自然老化的表現。皺紋的發生與各式各樣的因素有關，除了陽光中紫外線的影響外，尚包括其他的皮膚壓力因素，如乾燥、物理性或化學性刺激等。這些因素致使真皮膠原纖維與彈力纖維的質、量及構造上發生變化，最後導致皮膚彈力與伸縮性的降低而至皺紋產生(Bologna, 1995；Nelson and Cox, 2000)。

(二) 鬆弛

皮膚的鬆弛現象從 40 歲左右開始出現，其發生的原因與皺紋相同，都是由於真皮彈性度與皮下脂肪組織支持力降低而形成。

(三) 色素沉著、色調變化

隨著年齡的增長而引起的膚色變化，且由於透明度降低，膚色由紅向黃變化。而其變化分別用色相（皮膚的色調）、明度（皮膚的光亮）、彩度（皮膚的鮮豔程度）來表示：隨著年齡的增長，皮膚的色相由發紅變為發黃，明度降低及皮膚的彩度慢慢趨於暗淡；皮膚的色素沉著會逐漸增加。(Stefania, B., et al.2003)

(四) 皮膚表面形態

隨著年齡的增長，皮膚上凹凸不平的皮溝、皮丘等會逐漸變淺而較不明顯，除了皮溝的均質性喪失、密度減少之外，毛孔也有變大的傾向。

2.2.3. 皮膚老化的生理機能變化

(一) 角質層

角質層的水分含量有隨年齡增長而有增加的傾向，表示防護機能提高。另外，經皮水分蒸散量隨著年齡增長而逐漸減少，好像防護機能有所提高，其實是因為隨著年齡增長角質層也在增加之故。老人的皮膚在外觀上給人乾燥的印象，此乃由於其皮脂腺和排汗功能較差所造成的。

(二) 表皮

表皮最明顯的老化現象是表皮細胞增殖活性的降低，故表皮細胞之更新及新陳代謝降低。而皮膚表面的角質細胞大小和增殖能力及細胞更新有關，藉由角質細胞大小的測定，可以在不影響皮膚組織的情況下獲得一些表皮生理機能的相關資訊。表皮細胞面積會隨年齡的增長而逐漸變大，也就是說，表皮的增殖能力會漸漸降低。

(三) 真皮

真皮生理機能的老化表現在纖維母細胞增殖活力的降低。纖維母細胞具有合成及分解膠原纖維、彈性纖維或葡萄胺聚糖的功能 (Huang-Lee and Nimni, 1993)，隨著年歲的增大，這些代謝機能都會逐漸降低，將導致真皮彈性變差與產生皺紋等有關的變化。

(四) 皮下脂肪組織

隨著年歲增長，皮下脂肪會逐漸減少，致使皮膚對物理性刺激的抵抗力降低。

(五) 皮脂量

一般來說，皮脂量會隨著年齡的增長而逐漸減少分泌。

(六) 皮膚組織血流量

皮膚的組織血流量大致是隨著年歲增長而逐漸減少，主要是因為微血管數量減少之故。

2.2.4. 影響皮膚老化的相關機制

老化原因可以分兩個方向解釋(Eric, F. et al.1996 ; Jenkins, 2002) :

(一) 內在因素

指年齡的老化、自然的生理老化，一般是指機能的降低與萎縮性的變化。就皮膚而言，所謂自然老化是指皮膚的細胞數目減少厚度變薄皮膚中的膠原蛋白、彈力蛋白、細胞間質等，因年齡的增加而減少，新陳代謝的能力減弱。人種、皮膚特性及體內荷爾蒙的變化都有關係。

(二) 外在因素

主要指光老化，以紫外線為主因所產生的變化稱為光老化。紫外線使膠原蛋白變性及製造量也減少、皮脂腺分泌失調、氧化自由基增多，傷害健康細胞 (Mauricio, G. Y.1996) 。表三、四就自然老化與光老化的本質做一區分。

2.3. 皮膚老化的自由基學說

此學說主要認為隨著年齡增大的老化現象是由於自由基的副作用所引起的。在正常情況下，生物體內自由基的產生與消失是處於動態平衡。一方面，自由基(包括氧自由基在內)在正常細胞新陳代謝中不斷地產生，並且參與了正常生物體內各種有益的作用，如防禦作用，某些生理活性物質的合成等。在生物體生長發育階段或正常運轉階段，即使某種自由基的產生多了一些，也會被生物體內的各種自由基清除機制所清除而不至於加害於人體。這類自由基清除機制包括一系列的酵素如 SOD、過氧化氫酶等，和一些抗氧化劑如維生素 A、維生素 E、維生素 C 等。當生物體衰老時，體內清除自由基的能力出現急性或慢性減弱，從而清除不了多餘的自由基。這樣就使自由基的產生與清除失去了平衡。過剩的自由基對構成組織細胞的大分子化學結構發生破壞性反應，隨著破壞層次的逐步擴展，會損傷正常組織形

態和功能的完整性，當損傷程度超過修復或喪失其代謝能力時，組織器官的機能就逐步發生紊亂及障礙，表現出老化現象。老化是一個極為複雜的過程，自由基學說只能解釋其部份現象，但自由基在促使衰老過程加快的作用是確切的(Davies et al., 1982；Yoshiki, M.1995)。

2.3.1. 自由基學說

(一) 自由基

所謂自由基是指游離存在的帶有不成對電子的分子、原子或離子。常在帶有不成對電子的原子符號注上一個圓點“·”，如 $O_2 \cdot^-$ 等。由於自由基具有不成對的電子，一般均顯示極為活潑的化學活性亦即自由基具有非常高的反應性。

在生物體內存在的自由基，是自 1986 年由 Mccord 與 Fridovich 發現清除超氧化物自由基($O_2 \cdot^-$ 或 $HO_2 \cdot$)的超氧化物歧化酶(SOD)以後，證實了生物體內源性自由基的存在，與生物體老化有關的自由基主要是一些含氧的自由基，如活性氧自由基($O_2 \cdot^-$)、過氧化氫自由基($HO_2 \cdot$)、羥基自由基($\cdot OH$)。(Kenneth B.1998)

(二) 活性氧

自發現 SOD 具有清除超氧化物自由基的作用以後，發現氧的某些代謝產物 $O_2 \cdot^-$ 或 $HO_2 \cdot$ 、 H_2O_2 與 $\cdot OH$ 以及其衍生物的活性物質如脂質過氧化物與單線態氧($\cdot O_2$)可以損傷生物體。這些自由基都是氧的某些代謝產物，及含氧的衍生物，直接或間接由氧轉化而成的，由於它們都含有氧，而且具有較氧活潑的化學反應性，統稱為活性氧。

2.3.2. 自由基學說對皮膚老化的意義

活性氧自由基對皮膚老化有著重要的作用。隨著年齡的增加及各種疾病的影響，使得人體內活性氧自由基增加，再加外部原因如紫外

線的照射、溫度、濕度的變化都可使人體內產生活性氧自由基。活性氧可以引發人體內脂質中的不飽和脂肪酸氧化，而產生脂質過氧化自由基 $R\cdot$ 、 $RO\cdot$ 、 $ROO\cdot$ 與 $ROOH$ 。

膠原蛋白是一種纖維狀的結構蛋白，它是人體結締組織最主要的蛋白質，皮膚組織大都由膠原蛋白所組成(Li, 1993)。隨著年齡的增加，人體內各種氧自由基亦增加，可以改變機體內許多酶的平衡和性質，如氧自由基的增加，就會引起結締組織中膠原蛋白的變性、交鏈以及彈力蛋白的分解，由於交聯度的增加就可使膠原蛋白的溶解度降低，在老年時，膠原蛋白的這種交聯變得更穩定且不能被還原。這種膠原蛋白結構的改變，表現在機體上就是一些衰老的象徵，如皮膚無彈性、無光澤、骨骼變脆、眼晶狀體的物理性質改變等等。最近新的發展就是利用低能量強力脈衝光療法治療日光導致的外因性老化，如膠原含量減少、細皺紋增加、皮膚微血管擴張等現象。(Darr and Fridovich, 1994； Wickens and Andrew, 2001)

2.4.人體中的抗氧化系統

由於自由基對人體細胞、組織的傷害是累積與漸進的破壞，所以生物體內中的抗氧化物質即顯得重要，而所謂的抗氧化劑(antioxidant)是具有延緩脂質或其它物質氧化之物質，又可區分為兩個抗氧化消除自由基系統，一個是抗氧化酵素，另一個則為小分子的非酵素抗氧化物。

酵素性抗氧化物質包括超氧化歧化酶(SOD)、穀胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、和過氧化氫酶(catalase)等，不過想以口服的方式補充這些酵素性抗氧化物質是不可行的，因為當它們進入胃時，會被胃酸破壞而失去效用。至於不同膚色人種，白種人

(Caucasian)與黑種人(Blacks)其皮膚中抗氧化酵素活性(GPx、SOD、peroxidase、catalase)差異不大 (Kohen,1999)。

除了酵素性抗氧化物質外，還有許多非酵素性抗氧化物質，如 α -tocopherol (Vit. E)除了可以避免脂質過氧化連鎖反應，也可以清除自由基，且如與維生素 C 並用，可降低陽光對皮膚所造的氧化性傷害；Urate、ascorbic acid 可清除羥基自由基，並可還原維生素 E 或 β -carotene； β -carotene 可以捕捉高反應性的 $1O_2$ ，中斷脂質過氧化連鎖反應、吸收激發氧的過多能量(Steenvoorden and Henegouwen, 1997；Shapiro, 2001；Kohen, 2000)。因此可知體內抗氧化系統可以在過氧化物產生，即可發揮作用，利用氧化還原作用將過氧化物轉換為氧化力較低或無害的物質，為人體防禦氧化性傷害的第一道防線。

2.4.1. 酵素性抗氧化酵素系統

(一)過氧化氫酶(Catalase)

過氧化氫酶為體內的三大抗氧化酵素之一，為複合蛋白之一種，反應中心為 Fe^{3+} ，並以 heme 為輔基，分佈於紅血球外，多分佈於細胞中之過氧化體(peroxisom)中，藉以清除過氧化氫體內 amino acid oxidase 與 α -hydroxy -acid oxidases 所產生的大量過氧化氫。

(二)巯胺基硫過氧化酶(GSH-PX)

存於血液、粒腺體及細胞質中、而依其含硒與否，區分為 Se-GSH-PX 與 Non-Se GSH-PX 兩種抗氧化酵素，藉由歧化機轉(dismutation)中斷過氧化氫與脂質過氧化酵素(Lipid peroxides)作用，並可還原過氧化脂質成為水及氧等其他無害物質的功能，而 Se-GSH-PX 可還原過氧化氫，Non-Se GSH-PX 只能還原有機氫雙氧化物。

(三) 麩胺基硫(GSH)

由甘胺酸(glycine)、麩胺酸(glutamic acid)、半胱胺酸(cysteine)所構成的 tripeptide，可藉由 GSH-PX 催化為 GSSG，另外麩胺基硫還原酶再將 GSSG 還原成 GSH。正常細胞中 GSH/GSSG 之比值較高，又因大量存於細胞質中、可直接清除過氧化氫，且對過氧化氫的親和力大於 catalase。

(四) 超氧化歧化酶(SOD)

SOD 是催化超氧自由基發生歧化反應的唯一金屬酶，廣泛存於自然界一切需氧和耐氧生物體各組織細胞內，由活細胞產生。又因結合的金屬種類不同，區分為存於哺乳動物真核細胞內的 Zn/Cu、Mn-SOD 與存於原核細胞內的 Fe-SOD。Zn、Cu-SOD 主要存在於胞漿中，Mn-SOD 位於粒腺體內，但細胞外液(血漿)也含有少部分 SOD。其 SOD 最大的功效在於能將毒性最強的超氧陰離子歧化成為氧與過氧化氫，過氧化氫再藉由過氧化氫酶的還原與再氧化後形成氧及過氧化氫，達到消除超氧陰離子的作用(Lods et al., 2000)。

2.4.2. 非酵素性抗氧化酵素系統

皮膚中除了酵素性抗氧化物質外，還有許多非酵素性抗氧化物質，如維生素 C (ascorbic acid)、維生素 E (tocopherol)、胡蘿蔔素 (β -carotene)、glutathione、ubiquinol、Urate 等，可作為防禦紫外光對皮膚所造成的光損傷(photodamage)，因此這些抗氧化物質具有保護與修護問題皮膚之功效(表五)，目前已廣泛應用於化妝品上(Shapiro, 2001)。

(一) 維生素 C (ascorbic acid)

維生素 C 為一種水溶性維生素，每分子可提供一對未配對電子，當與自由基作用時會產生 semi-dehydroascorbate，再經由 GSH 與 NADPH 的還原而再生，可作為清除含氧自由基清除劑。

(二) 維生素 E (α -tocopherol)

維生素 E 為一種脂溶性維生素，可分為 α 、 β 、 γ 、 δ 四種，又以 α -tocopherol 抗氧化效果最好，藉由其-OH 作為阻斷脂質氧化連鎖反應中的阻斷劑。

(三) 胡蘿蔔素 (β -carotene)

胡蘿蔔素為維生素 A 的前驅物，可清除過氧化自由基與吸收單態氧以達到阻止氧化作用的反應，並可保護富含脂質的組織受到氧化傷害。

三、皮膚黑色素生成之簡介

3.1. 黑色素細胞

黑色素細胞(melanocytes)為單細胞的分泌器官，為於表皮層中的基底層與棘層之間，皮膚的黑色素均由黑色素細胞所形成的，其細胞體呈圓狀，且呈長條狀不規則的突起，分支則進入表皮中，盤繞在基底層與棘層之間。黑色素於表皮的深層內形成，並且向皮膚的表面移動，但黑色素細胞本體不會跟著移動，而是角質細胞負責轉移的工作，角質細胞將黑色素轉運至皮膚的表面，以形成保護的屏障。

3.2. 黑色素形成和酪胺酸酶活性作用的關係

黑色素細胞生成於皮膚的表皮層(Byorksten, 1958)，可阻止紫外線的穿透使真皮及底下的組織免受紫外線的傷害，但也是皮膚顏色改變的主要因素(Byorksten, 1958)。不正常的黑色素過高症，如黃褐斑、雀斑、曬斑、及炎症導致之黑變病，對非深色皮膚的人而言，不僅有

礙外觀儀容，且日後容易導致致命的惡性皮膚癌--黑色素瘤(melanoma)(Takakazu and Stan, 1993)。黑色素的形成是酪胺酸(tyrosine)在黑色素細胞(melanocytes)中，藉著酪胺酸酶(tyrosinase)的催化而轉變成多巴(dopa)，多巴再轉變成多巴醌(dopaquinone)等一連串的氧化作用而形成(圖三)，酪胺酸酶是此反應過程的唯一決定酵素(Prota, 1996)。因此，所採用的原料是否具有降低黑色素形成和有美白效果，通常是以酪胺酸酶活性的阻滯作用大小(阻滯率%)(Bernard and Berthon, 2000)來評定的。

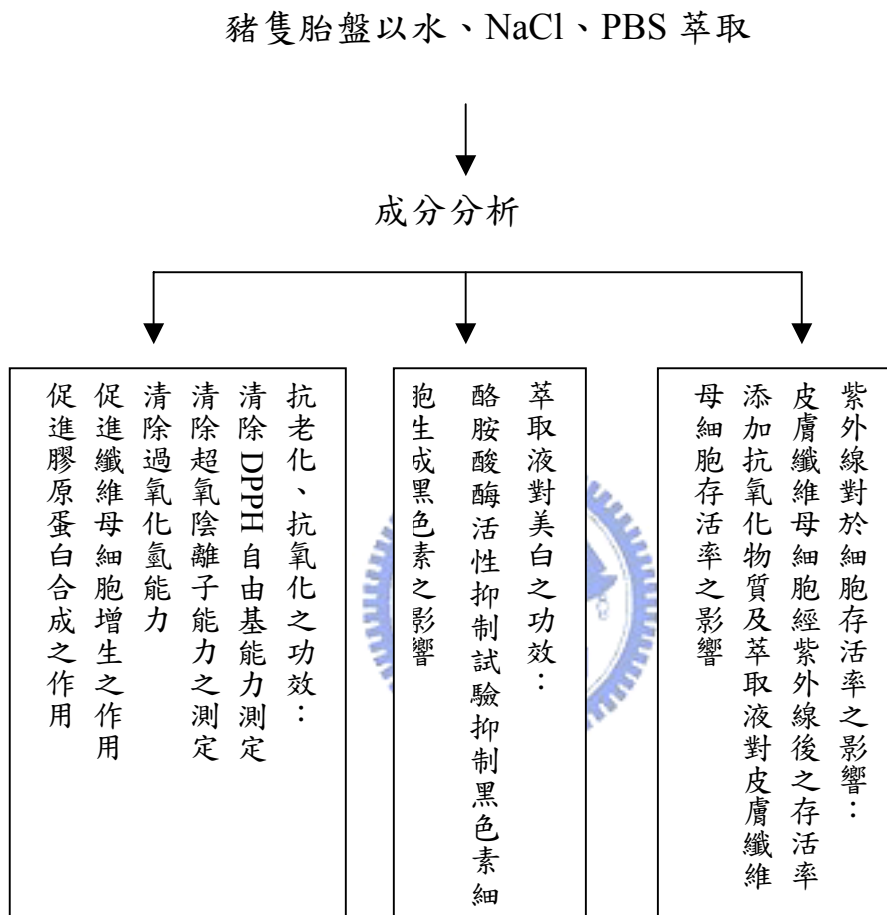
3.3. 酪胺酸酶

酪胺酸酶為一種銅離子的多酚氧化酶由黑色素細胞的核糖所合成的於粗內質網中所發現，其活性與取之來源不同而有所不同。酪胺酸酶是引起黑變的酵素，其分布很廣，幾乎無所不在，由微生物(例如：枯草桿菌和真菌的洋菇及南瓜黴)、植物(可能分佈於葉綠體、粒腺體之中、而大部分的蔬果表皮具較強的活性、但蘋果則以果核的活性最強)、動物(例如：昆蟲的外殼、蝦類的頭胸部分)到人體都有存在。為一種含銅的氧化酵素，是由黑色素細胞內的核糖體所合成，再通過顆粒內質網的內腔，儲積於高基氏體形成的小泡中。此後在此顆粒內由於酪胺酸與酪胺酸酶的反應，開始生成黑色素，然後從高爾基氏體上分裂開並釋放至黑色素細胞的細胞質中，成為黑色素顆粒的前驅物，當生成的黑色素完全沈著於此顆粒上，酪胺酸酶逐漸失去活性，此時即為完全成熟的黑色素體 (melanosome)。黑色素體形成後，將移至黑色素細胞的細胞質突起，以細胞分泌(cytocytine secretion)的方式，再運送到鄰近的角質細胞(Prota, 1996)。

參、實驗材料與方法

一、實驗架構

1. 豬隻胎盤萃取流程



二、實驗材料與藥品

2.1. 萃取之材料與藥品

- 本次實驗所使用的動科所的豬隻胎盤
- (2)二次水
- (3) Phosphate buffer
- (4)NaCl

2.2. 分析胎盤之成分試劑

2.2.1. SDS-PAGE

- 0.1 M Potassium phosphate buffer (pH 7.6):1 M K_2HPO_4 86.6 ml 和 1 M KH_2PO_4 13.4 ml 以水調整至最後體積為 1 升。
- 4×SDS gel-loading buffer:200 mM Tris • Cl (pH 6.8) 、400 mM dithiothreitol、8% SDS、0.4% bromophenol blue、40% glycerol Dithiothreitol 未添加前可長期儲存於室溫。使用前再添加 Dithiothreitol。
- 5×Tris-glycine electrophoresis buffer:將 15.1 g Tris base 和 94 g glycine 溶於 900 ml 二次水(ddH₂O)，加入 50 ml 10% SDS，然後以水調整最後體積為 1 升。
- Coomassie Blue staining solution:將 0.25 g Coomassie Brilliant Blue R250 溶於 90 ml 的 methanol: H₂O (1:1)混合液，再加入

10 ml glacial acetic acid。以 Whatman No.1 Filter 過濾後儲存於室溫。

- Destain solution: ddH₂O 450 ml、methanol 450 ml、glacial acetic acid 50 ml。

2.2.2. Western Blotting

- Phosphate-buffered saline (PBS): 將 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄ 溶於 800 ml 的二次水，利用 HCl 調整 pH 至 7.4，以水調整最後體積至 1000ml。高壓滅菌 30 分鐘。

- Transfer buffer: 39 mM glycine、48 mM Tris base、0.037% SDS (electrophoresis grade)、20% methanol。

- Blocking Solution: 5% (w/v) skim milk、0.2% Tween 20 in PBS。

- “Developer and replenisher” solution: (KODAK)
將 100 ml “developer and replenisher” 與 400 ml 的二次水混合。

- “Fixer and replenisher” solution: (KODAK)
將 100 ml “fixer and replenisher” 與 400 ml 的二次水混合。

2.3 抗老化功能測定試劑

2.3.1. 清除 DPPH 自由基能力測定試劑

- 1,1-diphenyl-2-picryl – hydrazyl (DPPH) (Sigma D-9132)
- 95% Ethanol (景明化工)
- L-ascorbic acid (Sigma A-0278)
- α - tocopherol (95%, Sigma T-3251)

2.3.2. 清除超氧陰離子試劑

- Pheazine methosulphate (PMS; Sigma P9625)
- (Dihyronicotinamidadenin dinucleotide (β -NADH; Sigma N-4505)
- Nitro-blue tetrazolium (NBT; Sigma N-6639)
- L-ascorbic acid (Sigma A-0278)
- Sodium phosphate buffer

2.3.3. 過氧化氫清除能力測定試劑

- H_2O_2 -Horseradish peroxidase-phenol red (Sigma P-6782; 1000 units/mg solid)
- Phenol red (Sigma P-4633)
- Catalase (13600 units/mg solid, Sigma C-40)

2.3.4. 萃取物對促進膠原蛋白合成之作用

- Collagen assay kit (伯新)

2.4. 細胞培養與分析之藥品

2.4.1. 細胞株

本實驗所使用的細胞株為附著性老鼠皮膚纖維母細胞 NIH 3T3，購自食品工業研究所菌種中心；附著性老鼠黑色素瘤細胞 B16-F0，購自食品工業研究所菌種中心。

2.4.2. 細胞培養藥品

- Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco , 1159375)
- Foetal Calf Serum(FBS, Gibco ,715480)
- Bovine Serum(CS , Gibco , 427252)
- PSN Antibiotic Mixture (Gibco , 1189496)

2.5. 美白的有效性測試

2.5.1. 萃取液對於酪胺酸酶活性的影響

- Tyrosinase (Sigma, T7755)
- Tyrosine (Sigma, T3745)
- KH_2PO_4 (Sigma, P0622)
- Na_2HPO_4 (Merck, F862086)
- α -Tocopherol (Sigma, T3251)

2.5.2. 萃取物對抑制黑色素細胞生成黑色素的影響

- NaOH(Merck, B578898)
- DMSO(景明化工)

2.6. 皮膚纖維母細胞經 UV 照射模式測試

2.6.1. 細胞照射 UVA 和 UVB 後之存活率

- UVA 燈管(365nm , 1350 μ w/cm²) (伯新)
- UVB 燈管(365nm , 1500 μ w/cm²)(伯新)
- Tyrpan blue

2.6.2. 添加抗氧化物質對細胞存活率之影響

- α -tocopherol(Sigma, T3251)
- Vit C
- Catalase
- Tyrpan blue

2.7. 實驗儀器與材料

- 恆溫水浴槽
- 冷凍乾燥機
- 高速離心機 (Hitachi CR-21)
- 小型離心機
- 試管震盪機
- 微量定量吸管
- 無菌無塵操作台
- 直立式殺菌釜
- 恆溫箱
- 50 ml 無菌離心管(TPP 與 orange)
- 血球計數器



- 倒立式顯微鏡
- 二氧化碳培養箱
- 離心機 (Cimac CR-21, Hitachi)
- 分光光度計 (U-2000, Hitachi)
- 酸鹼度計
- -80°C 冷凍櫃 (Nuair)
- 液態氮桶
- 細胞用 6-well 培養皿 (orange)
- 10 公分培養皿
- 6 公分培養皿
- 凍結細胞用小管 (Nalgene 5000-0020)
- 紫外燈 (UVA 365 nm ; UVB 302 nm)
- ELISA 判讀器
- 無菌過濾器
- 0.22 μ m 無菌過濾膜



三、實驗方法

3.1. 豬隻胎盤萃取

將取得之豬隻胎盤，先用 PBS(pH 7.4)清洗，再用均質機攪碎，且轉速不能快，攪完之後馬上，拿去冷凍乾燥或直接萃取。而萃取時，使用不同的溶劑(如不同濃度之 NaCl、PBS)，在冷房(cool room 4°C)中進行(overnight)；然後利用高速離心機將胎盤碎片移除，取上層液來進行各種分析。


3.2. 豬隻胎盤成分分析

3.2.1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins

【Preparation of SDS-polyacrylamide gel】

- Resolving-gel solution:

15% : for 4 ml



Components	Volume (ml)
ddH ₂ O	0.88
30% Acrylamide mixture	2
1.5M Tris (pH 8.8)	1.04
10% SDS	0.04
TEMED	0.0016
10% APS	0.04

- Stacking-gel solution:

5% : for 3 ml

Components	Volume (ml)
ddH ₂ O	2.1
30% Acrylamide mix	0.5
1M Tris (pH 6.8)	0.38
10% SDS	0.03
TEMED	0.003
10% APS	0.03

1. 將玻璃及鋁板依造操作手冊組裝起來。
2. 注入 3.5 ml 的 resolving-gel solution 於玻璃與鋁板間的溝槽，再以 300 μ l 的 isopropanol 覆蓋其表面，靜置 30 分鐘以待其凝結完全。
3. 倒掉覆蓋的 isopropanol 並側立等待其完全蒸發。
4. 注入適當體積的 stacking-gel solution 於凝結完全的 resolving gel 上，立即在 stacking-gel solution 中斜插入 Teflon comb，小心避免產生氣泡。
5. 再注入 stacking-gel solution 以完全充滿 comb 的間隙。
6. 靜置 30 分鐘，待其凝結後小心移開 comb，然後立即以二次水清洗以去除殘留未凝結的 acrylamide。

【Electrophoresis of samples】

1. 將凝結完成的 gel 連同玻璃、鋁板架設於電泳槽上，小心倒入 Tris-glycine electrophoresis buffer，並小心去除藏匿於 gel 下方的氣泡。
2. 將 sample 與 4× SDS gel-loading buffer 混合後，在 100°C 的沸水中靜置 6 分鐘以確保蛋白質完全 denature。
3. 然後立即離心 2 秒後，將殘留於管壁上的 sample，spin down 下來。
4. 將 sample 注入 well 中。
5. 先以 100 volt 進行蛋白質電泳，當 dye 通過 stacking gel 要進入 resolving gel 時，將電壓增加至 150 volt。
6. 當 bromophenol blue 到達 resolving gel 的底部時，將電源供應器關上。
7. 小心將 gel 自電泳槽取下。

【Staining with Coomassie brilliant Blue】

1. 小心切下 stacking gel，並將 resolving gel 浸泡於 Coomassie Blue staining solution。
2. 回收 staining solution。
3. 將 gel 浸泡於 destain solution I，並置放於緩慢擺動的 orbital shaker 1 小時。
4. 將 destain solution 倒掉，再將 gel 浸泡於二次水，並置放於緩慢擺動的 orbital shaker 數十分鐘，直至背景完全去除。

5. 將 gel 以玻璃紙密封起來，以長期儲存。

3.2.2. Western Blotting

【Transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gel to PVDF membrane】

1. 剪下一塊與 gel 相同大小的 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane。
2. 將剪下的 membrane 以 methanol 潤溼 15 分，然後浸泡於二次水 1 分鐘，最後置放於 transfer buffer 中。
3. 將 2 片 Whatman 3MM paper 及多孔性襯墊(porous pad)浸泡於 transfer buffer 中。
4. 當 SDS-polyacrylamide gel 電泳完成後，將 resolving gel 以二次水 rinse，然後浸泡於 transfer buffer。
5. 依以下步驟將 transfer apparatus 裝置起來: (不時以 transfer buffer 潤溼並避免氣泡產生)。
 - a. 將裝置板平攤於桌面。
 - b. 將一片浸泡於 transfer buffer 中的多孔性襯墊平放於 black electrode(陰極端)上。
 - c. 再將一張浸泡於 transfer buffer 中的 3MM paper 平放於多孔性襯墊上。
 - d. 再將 gel 平鋪於 3MM paper 上。(正面朝下)
 - e. 將 PVDF membrane 確實的覆蓋於 gel 上。

- f. 再將另一片 3MM paper 覆蓋於 PVDF membrane 上。
 - g. 最後將另一片多孔性襯墊覆蓋於 3MM paper 上。
 - h. 將 colorless electrode (陽極) 覆蓋於多孔性襯墊上。
 - i. 將 transfer cassette 夾好並放入 transfer apparatus 中。
6. 打開電源供應器，以 400 mA 電流進行 transfer。
 7. 將電源供應器關掉，並取出 transfer cassette。
 8. 將 PVDF membrane 浸泡於 blocking solution。

【Blotting】

1. 將 membrane 浸泡於 25 ml 的 blocking solution 中，並置放於緩慢運轉的 orbital shaker 上 1 小時。
2. 以 PBS buffer 清洗掉未吸附殘留的 blocking buffer，並置放於緩慢運轉的 orbital shaker 上 5 分鐘。重複 3 次。
3. 將 membrane 浸泡於含有 4 μ l primary antibody 的 10 ml blocking buffer，然後置放於緩慢運轉的 orbital shaker 上 1 小時，以讓 primary antibody 得以吸附於 target protein 上。
4. 以 PBS buffer 清洗掉未吸附殘留的 blocking buffer 以及 primary antibody，並置放於緩慢運轉的 orbital shaker 上 5 分鐘。重複 2 次。
5. 將 membrane 浸泡於含有 2 μ l HRP-labeled secondary antibody 的 10 ml blocking buffer，然後置放於緩慢運轉的 orbital shaker 上 1 小時。

6. 以 PBS buffer 清洗掉未吸附殘留的 blocking buffer 以及 secondary antibody，並置放於緩慢運轉的 orbital shaker 上 5 分鐘。重複 2 次。

【ECL Immunodetection】

1. 將 membrane 平鋪於投影片上，含有蛋白質的那一面朝上，吸乾多餘的 buffer。
2. 將 0.75 ml 的 ECL detection solution I 和 ECL detection solution II (Pharmacia) 加於 1.5-ml tube 中，vortex 混合均勻。
3. 將 detection mixture 滴於 membrane 上。
4. 不時擺動投影片，使 detection mixture 充分佈滿 membrane。
5. 吸掉多餘的 detection reagent，並包覆一層投影片於 membrane 上，將電燈關掉，再覆蓋一層底片後於暗房 1~3 分。
6. 快速地移開底片，並浸泡於“developer and replenisher” solution 中，使之顯影，再以清水清洗。
7. 再將底片浸泡於“fixer and replenisher” solution 中 90 秒，使之定影，再以清水清洗。
8. 直立底片並靜置使之乾燥。

3.3. 細胞培養

3.3.1. 附著性細胞之培養

將附著性細胞以 DMEM 培養基 (含 5% FBS) 培養於 37°C、5% CO₂ 濃度下之細胞株以倒立式顯微鏡觀察，當細胞長滿為單層 (monolayer)

時，即可進行繼代培養 (subculture)。在無菌操作台 (laminar flow) 內，以抽氣機吸去上層液，再以 5 ml phosphate-buffered saline (PBS) 洗細胞兩次，然後吸去 PBS 並加 1 ml 胰蛋白酶(trypsin)，前後左右搖晃培養皿使胰蛋白酶均勻分散於細胞層，同時吸走部份胰蛋白酶，並置於培養箱中約 1 鐘後，輕拍培養皿同時以倒立式顯微鏡觀察，待細胞層脫落並浮起時，加入 2ml FBS 並吸放多次以沖散細胞，將細胞與培養基培養，約 2-3 天細胞長滿，即可再行繼代培養。

3.3.2. 細胞的繼代培養

將培養皿內培養液吸取棄去，加入 PBS 液沖洗，重覆二次，吸去 PBS 液後，加入胰蛋白酶，置於 CO₂ 培養箱，1 分鐘後輕拍皿底至細胞全漂浮起為止。立即加入培養基並混合均勻後，分裝於培養皿內，加入適量的培養液再行培養。

3.3.3. 細胞解凍與保存

將冷凍管置於 37°C 水浴槽中迅速解凍後，以 75% 酒精擦拭管壁及管口，在無菌操作台內將解凍的細胞吸到含有 9 ml 之 DMEM 培養液直徑 10 cm 培養皿中，放入 37 °C、5 %CO₂ 之培養箱中培養並在解凍培養 24 小時內更換培養基。

欲保存之細胞以 trypsin 來懸浮細胞，將此細胞懸浮後以細胞計數器(hemocytometer)計算細胞數目，並取約 1×10^6 個到無菌的離心管中以 1000g 離心 10 分鐘，移去上清液後以 1 ml 之 DMEM 之冷凍培養液 (含 DMEM, 10% FBS 與 7% DMSO) 均勻懸溶後，移到冷凍管中，置於 -80°C 冰櫃 24 小時內再移至液態氮桶內保存。

3.4. 抗氧化及抗老化能力評估

3.4.1. 清除 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基之效果

(Shimada et al., 1992 ; Bonina et al., 1998 ; Aquino et al., 2002)

取不同濃度(0.05 ~ 1 mg/mL)的 500 μ L 豬隻胎盤萃取液加入 500 μ L 新鮮配置的 0.2 mM DPPH 之乙醇或水溶液，均勻混合靜置 30 分鐘後，使用分光光度計(Spectrophotometer U-2000, Hitachi)檢測 517 nm 之吸光值。控制組以 1 mL 的乙醇或一次水取代。吸光值越低表示樣品清除 DPPH 自由基的能力越強。

清除率(scavenging effects) = ((控制組 $A_{517\text{nm}}$ -樣品 $A_{517\text{nm}}$ 吸光值) / 控制組 $A_{517\text{nm}}$ 吸光值) \times 100

3.4.2. 清除超氧陰離子能力之測定

以 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 配製 120 μ M 之 phenazinemethosulphate (PMS)、936 μ M 之 NADH 及 300 μ M 之 nitro-blue tetrazolium (NBT)。將萃取物以 phosphate buffer 溶在不同濃度之溶液。取 500 μ L 的豬隻胎盤萃取物 (0.05 ~ 1mg/mL)，依序加入 500 μ L 的 PMS、NADH 及 NBT 溶液，混和均勻，控制組以 500 μ L phosphate buffer 取代。在室溫下靜置 3 分鐘後，使用分光光度計 (Spectrophotometer) 檢測 560 nm 的吸光值。吸光值越低表示樣品清除超氧陰離子的能力越強。(Liu and Ng, 1999 ; Sanchez, C.2002)

清除率(scavenging effects) = ((控制組於 A_{560} 吸光值-樣品於 $A_{560\text{nm}}$ 吸光值) / 控制組於 $A_{560\text{nm}}$ 吸光值) \times 100

3.4.3. 清除過氧化氫能力

取豬隻胎盤萃取物 1 mL 加入 H_2O_2 溶液 0.4 mL，均勻混合，於室溫下靜置 20 分鐘，添加 0.6 mL 的 Horseradish peroxidase-phenol red(0.5

mg/ml HRPase 1 mL ; 7.5 mM phenol red 2 mL) 混合液，均勻靜置 10 分鐘，再冰浴 10 分鐘後，以分光光度計測其在 610 nm 的吸光值。控制組以 1 mL 乙醇取代。吸光值越低代表清除過氧化氫的能力越強。(Pick and Keisari, 1980 ; Souheil, et. al.2002)

清除率(scavenging effects)=((控制組於 A₆₁₀ nm 吸光值-樣品於 A₆₁₀ nm 吸光值)/控制組於 A₆₁₀ nm 吸光值)× 100

3.4.4. 萃取液對促進纖維母細胞增生之作用

準備 6-孔的培養盤，分別於每一孔中接種 6×10^4 個纖維母細胞，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱內培養。觀察添加不同溶劑萃取的萃取液，在不同的時間 12、24、48、60、84、108 小時下，對纖維母細胞增生的情形，以 tyrpan blue 測驗法檢測。經過 48、96 小時，需更換新鮮的培養基。

3.4.5. 萃取液對促進膠原蛋白合成之作用

參考(Li et al., 2001 ; Yamamoto and Nishioka, 2001 ; Blease et al., 2002)於其研究中均曾使用此套件(Kit)來測量膠原蛋白生成量的作法。準備 6-孔的培養盤，分別於每一孔中接種 6×10^4 個纖維母細胞，加入不同溶劑萃取的萃取液，於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養分別培養 24 小時和 48 小時。另外，以只用基本培養基者作為對照組。以上述方法，測量培養之纖維母細胞中膠原蛋白之含量，來瞭解其促進膠原蛋白合成之作用。其中膠原蛋白以 Collagen assay kit 測量之。

採用 Sircol Collagen assay kit (S1000) 之方法，取 50 μ l sample 與 reagent blanks (0.5 M acetic acid) 至 microcentrifuge tubes (1.5 ml)，另一組以基本培養基取代同樣定量至 100 μ l，再加入 1 ml 反應試劑 A

(Sircol dye reagent)混合作用 30 分鐘，離心 $5000 \times g$ ，5 分鐘後留下沈澱物再添加入每管 1 ml 反應試劑 B (Alkali reagent)，震盪混勻以 540 nm 測吸光值。並以 1、2.5、5、10、20、30、40 μg 的 Collagen standard 作為標準膠原蛋白求出標準檢量線，回歸後求出直線方程式，換算樣品中膠原蛋白濃度 ($\mu g/ml$)。

3.5. 萃取液對美白有效性的測試

3.5.1. 萃取液對酪胺酸酶活性抑制之影響

(1) 實驗組(萃取液):

探討不同萃取物對抑制酪胺酸酶形成 Dopachrom 的能力，並以 Vit C 做對照組。取 0.5ml 萃取液，加入 0.45ml pH 6.8 的緩衝溶液及 0.5ml 0.03 % 的酪胺酸溶液於試管中混和，並置於 $37^{\circ}C$ 的恆溫槽中 10 分鐘，再加入 0.05 ml 的酪胺酸酶(350 units/ ml)水溶液，將溶液混和均勻，置於恆溫槽中反應 25 分鐘後，以紫外光光譜儀測定 475 nm 時的吸光度(B)。

(2) 空白組: (Bo)

步驟與處理組相同，但以等體積的磷酸緩衝溶液取代酪胺酸酶溶液。

(3) 對照組: (A)

步驟與處理組相同，但以等體積萃取液所使用的溶劑取代萃取液。

(4) 總空白組:

步驟與處理組相同，但以等體積萃取液所使用的溶劑取代萃取液，以等體積的磷酸緩衝溶液取代酪胺酸酶溶液(Ao)。(Bernard, P. 2000 ; Shimogaki, H.2000)

$$(A - A_0) - (B - B_0)$$

$$\text{抑制率}\% = \frac{\quad}{\quad} \times 100$$

$$(A - A_0)$$

3.5.2. 萃取物對抑制黑色素細胞生成黑色素的影響

準備 6-孔的培養盤，分別於每一孔中接種 4×10^4 個黑色素細胞，並分別加入萃取液 0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0mg/well 加入培養盤中，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養三天。於第二天照射紫外線-A(365 nm)、紫外線-B(302 nm) 30 分鐘，再繼續培養 24 小時後，加入 1ml 1 N NaOH/10% DMSO 溶液，充分震盪後，於 475 nm 波長測其吸光度，並計算黑色素生成的抑制率。(Sandra, M., et al.2001；Shampa, M., et al.2002)

3.6. 皮膚纖維母細胞經 UV 照射模式測試

3.6.1. 細胞照射 UVA 和 UVB 後之存活率

以 6 孔的培養盤，分別於每一孔中接種 6×10^4 個皮膚纖維母細胞，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱內培養二天。照射紫外線時，將培養皿內之培養置換為 PBS 後，再將細胞分別照射 UVA (365nm, $1350 \mu \text{w}/\text{cm}^2$)、UVB (302nm, $1500 \mu \text{w}/\text{cm}^2$), 10、30、60、90、120、150、180 分鐘後，以為照射之細胞為對照組。照射後，將 PBS 置換為培養液，在置於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養一天後，以 trypan blue 計算其細胞數。(Phillips, 1995；Shindo and hashimoto, 1998；Liu and Ng, 1999；Benaiges, 2001；Christian, 2001)。

3.6.2. 添加抗氧化物質和萃取液對細胞存活率之影響

以 6 孔的培養盤，分別於每一孔中接種 6×10^4 個皮膚纖維母細胞，置於 37°C 、5% CO_2 培養箱內培養二天。照射時將培養液置換成 PBS 溶液，再將細胞分別照射紫外線後，將 PBS 置換回 DMEM(含 1%CS)、抗氧化物質與萃取液之培養液，靜置培養 24 小時後，以 trypan blue 計算其細胞數。



肆、結果與討論

4.1. 萃取液之分析

胎盤萃取液中，經由 Western Blot 方法證實，萃取液中含有 epidermal growth factor(EGF)；fibroblast growth factor (bFGF)；vascular endothelial growth factor(VEGF)。

4.2. 評估萃取液對抗老化、抗氧化之功效

4.2.1. 清除 DPPH 自由基能力測定

所謂的抗氧化劑(antioxidants)，乃是藉由提供質子與過氧化自由基(peroxy radical)結合，來達到抑制自由基的形成。脂質在自氧化的過程中會產生自由基造成各種傷害，所以可以利用抗氧化劑來抑制脂質自氧化的連鎖反應，而在抗氧化的研究上通常使用 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH · $C_{18}H_{12}N_6O_5$) 來檢測抗氧化劑提供質子的能力。DPPH · 是一種很穩定的自由基，且 DPPH · 溶於甲醇溶液中，會有強之吸收值為 517 nm，但是被抗氧化劑(AH)或自由基(R ·)還原時，則吸收值消失或降低(Brand-Williams et al., 1995)。故藉由測定 517 nm 的吸收值來判斷樣品是否具有清除自由基的能力。此外 DPPH · 的甲醇溶液會隨時間的增長而逐漸的劣化，所以在實驗時需要新鮮的試劑(Blois, 1958)。圖七是不同之萃取液、 α -tocopherol 對於清除自由基之評估。結果發現，四種不同萃取液中，於濃度 1mg/ml 時，清除自由基之能力可達 30%以上，其中以水之萃取液效果較佳。而對照組 α -tocopherol，其能力可達 60%以上。

此結果與 Kurechi et al. (1980)的研究指出 α -tocopherol (Vit E) 能夠在短時間內清除 DPPH ·，達到穩定狀態。Shimada et al. (1992)指

出 α -tocopherol 亦是將質子轉移給過氧化的自由基以達成抑制脂質過氧化的作用。Brand-Williams et al. (1995)也認為抗自由基力強的物質，其在抗氧化能力上也較強。

4.2.2. 萃取液對清除超氧陰離子能力之測定

超氧陰離子為自由基反應的起使者，具有強氧化性，可產生一連串的自由基連續反應，生成更多的活性含氧族群 (ROS)，如單線態氧、羥基自由基、超氧陰離子自由基、過氧化氫、脂質過氧化物等，因此清除超氧陰離子，即可有效地抑制自由基的生成。

由圖八可發現以水之萃取液的效果最佳，且清除超氧陰離子之能力是隨著萃取液的濃度(0.05~1.0 mg/ml)提升而增加。而在濃度為 0.25 mg/ml 時，其清除能力均達 70%以上。

在測試清除超氧陰離子之 NBT - PMS - NADH 實驗系統中，胎盤萃取液可能藉由清除超氧陰離子來降低吸光值，但也有可能是因為萃取物使 NBTH·、PMSH· 減少，以間接方式去除超氧陰離子，因此萃取物是否為直接抑制超氧陰離子之生成，尚需進一步實驗探討。

4.2.3. 萃取液對清除過氧化氫能力

水萃取物，於濃度 0.05 ~ 1.0 mg/mL 時，其萃取物清除過氧化氫之實驗結果，不同濃度不同溶劑之萃取物之清除效力皆隨著萃取物濃度提升而增加。從圖九結果可知，於濃度 0.625 ~ 5 mg/mL 時，水萃取物與 catalase 相比，其效果差不多。

4.2.4. 萃取液對促進纖維母細胞增生之作用

圖十、十一、十二分別是以不同濃度之水、0.1MNaCl、0.5MNaCl 及 PBS 萃取之豬隻胎盤萃取液來培養 NIH 3T3 於 12、24、48、60、

84、108 小時後對細胞增生的結果。所以這幾種方法萃取之豬隻胎盤的萃取液對細胞均有增生之效果，而於培養之 60 小時，以水之萃取液的效果較佳。而以不同萃取液之濃度(0.01~1.0 mg/ml)來培養細胞，其顯示濃度於 0.01~0.5 mg/ml 均有增生之效果，而水之萃取液在於濃度為 0.75 mg/ml 時，其增生能力較佳。添加不同之萃取一對照組做比較發現，添加萃取液之增生效果均比對照組佳；濃度增加為 0.75mg/ml 時其效果均約兩倍以上；以水之萃取液較佳。細胞經過長時間之培養後其存活率降低且在高濃度萃取液之培養也會導致細胞死亡，推測萃取液之濃度和鹽濃度提高會造成滲透壓不平衡而使得細胞死亡。

而由 4.2 結果顯示以萃取液清除 ROS 以水之萃取液較具有效果，所以推論減少 ROS 對細胞的傷害，對於纖維母細胞增生有一定的功效，這與 Ma et al.(2001)提出減低 ROS 對纖維母系包傷害能減緩老化的現象。

4.2.5 萃取液對促進膠原蛋白合成之作用

以 The sircol collagen assay (Biocolor Ltd., Belfast, Ireland)測量纖維母細胞生成膠原蛋白的含量。所以先以 1、2.5、5、10、20、30、40 μ l 的第一型膠原蛋白標準溶液(Type I collagen standard)作為標準檢量線，圖十三是膠原蛋白分析測定之檢量線經回歸後可以 $Y = 0.0118X + 0.0229$ ， $R^2 = 0.9962$ ，並求出直線方程式再換算樣品中膠原蛋白濃度(μ g/ml)。圖十四、十五是不同溶劑抽取之萃取物對促進 NIH 3T3 合成膠原蛋白的影響。不同濃度的萃取物與細胞培養 24 和 48 小時之候，分析其膠原蛋白含量的變化情形。細胞在 24 小時後，添加萃取液的膠原蛋白量(圖十四)均比控制組要高，不同之萃取物和抗氧化物質(a-tocopherol、VitC)在濃度越高時，對促進膠原合成作用

較佳。圖十五顯示當培養時間增長至 48 小時之後，則膠原蛋白的含量也有升高的趨勢，而以水之萃取液效果較好。添加不同之萃取物培養後，均比不添加任何萃取物的對照組高出 5~6 倍的膠原蛋白形成量。所以由以上結果顯示此萃取液和抗氧化物質對促進膠原蛋白合成確實有效。

4.3. 評估萃取液對美白之功效

4.3.1. 萃取物之酪胺酸酶活性抑制試驗

萃取液抑制酪胺酸酶活性是在 37°C、pH 6.8 的條件下反應 30 分鐘的結果，且主要目的是抑制 tyrosine 形成 dopachrom。圖十六的結果顯示不同濃度不同溶劑抽取之萃取物或 Vit C 對酪胺酸酶活性抑制率之比較，萃取液於濃度 0.1 mg/ml 下，具有 23.94% 的酪胺酸酶活性抑制率，在濃度 1 mg/ml 下，具有 42.6% 的酪胺酸酶活性抑制率。而在相同濃度下，以水萃取物對酪胺酸酶活性之抑制效果最佳。以 Vit C 作為對照組，Vit C 於濃度 0.1、0.5、1 mg/ml 下之酪胺酸酶活性抑制率分別為 40.5、51.4 及 72.6%。由圖之結果可知當濃度越高則酪胺酸酶活性抑制率增加。在 Yoshitaka Higa (1987) 中指出胎盤萃取液能抑制酪胺酸形成黑色素；取萃取液之美白效果比麴酸(kojic acid)佳。

4.3.2. 萃取液對抑制黑色素細胞生成黑色素的影響

不同溶劑之萃取液對 B16 黑色素形成的抑制率(圖十七、十八)。不同濃度的萃取液培養三天，在第二天時分別以 UVA 和 UVB 照射 30 分鐘，測量其黑色素抑制率的情形；而照射紫外線的目的是為了活化酪胺酸酶，刺激黑色素細胞加速其黑色素的形成。結果發現在濃度 ≤ 0.5 mg/ml 時，此萃取液對 B16 生成的黑色素量之抑制率均達 60% 以上，其中都以水的萃取液對抑制黑色素形成的效果最好，但也發現

於較高濃度下(≥ 0.5 mg/ml)對抑制黑色素的結果反而有下降的趨勢，推測可能原因是此萃取液對 B16 細胞有一定的濃度限制，而萃取液對細胞增生之效果中也發現在濃度 ≥ 0.75 mg/ml 會對細胞生長形成抑制。在人體皮膚受紫外線照射後，皮膚中的酪胺酸酶會被活化，促使酪胺酸酶進行一連串的氧化反應，最後形成黑色素(Melanin)，通常黑色素會隨著角質細胞角化的過程，逐漸上推至皮膚表面，隨著角質層而代謝。若因生理失調或過多紫外線反應作用，造成黑色素生產過多，就會在角質層積存，使皮膚暗沈或形成雀斑、黑斑(Jablonski and Chaplin, 2000)。因此當酪胺酸酶降低活性時，則黑色素的形成便減少。所以由圖十七、圖十八可見相同的表現，推論此水萃取時較能抑制酪胺酸酶活性，所以減少黑色素形成的功效最好。

由以上各圖推論照射紫外光 UVA 及 UVB 形成黑色素量的多寡，由吸光值判斷其刺激黑色素細胞形成黑色素的量應該相差不大，但考慮到照射劑量的差異，UVA 為 1.1 mw/cm^2 ，UVB 為 1.5 mw/cm^2 ，因為 UVB 的劑量較高但產生黑色素量和 UVA 形成的相差不多，所以推測 UVA 較易刺激黑色素細胞形成黑色素。

4.4. 紫外線對於細胞存活率之影響

4.4.1. 皮膚纖維母細胞經紫外線後之存活率

圖十九為人類皮膚纖維母細胞經由不同時間之 UVA (365 nm, $1350 \mu\text{w/cm}^2$)與 UVB (302 nm, $1500 \mu\text{w/cm}^2$)照射後，細胞與細胞培養液，培養二天後，測其細胞存活率之實驗結果。將實驗結果與控制組相比，可得知隨著照射時間(照射劑量)增加，細胞數隨之降低。如以 UVB 照射後之細胞存活率與 UVA 照射者相比，其細胞數雖有較低之情形，但並沒有多大明顯差異，推測乃是因為兩者之照射強度差異不

大，但隨著照射時間增加，其細胞之存活率也隨之下降。從圖十五之結果可知，經 UVA 照射 30 分鐘後，細胞之存活率為 82.1%，而 UVB 則為 73.4%；經 UVA 照射 180 分鐘後，細胞之存活率為 52.4%，而 UVB 則為 42.6%。學者推論當細胞受到 UV 照射後，可能造成降低細胞間連結、細胞膜雙層突起(surface blebbing)進而造成細胞骨架崩潰(disruption of cytoskeleton)、使細胞結構改變(Elisabetta et al., 2001)，也可能使細胞膜與 DNA strand 斷裂破壞，而進一步造成細胞死亡(De Leo et al., 1984；Moysan et al., 1993；Morliere et al., 1995)。

4.4.2. 添加抗氧化物質及萃取液對皮膚纖維母細胞存活率之影響

圖二十、二十一為人類皮膚纖維母細胞經 UVB、UVA 照射 30 分鐘後，添加不同濃度(0.01~0.75 mg/mL)之不同濃劑之萃取液後，經培養二天後，其細胞存活率之結果。結果中可得知，不同之萃取液與控制組相比，於濃度 0.01~1 mg/mL，對於纖維母細胞之存活率皆比控制組高，尤其以濃度為 0.01~0.5 mg/mL 保護皮膚纖維母細胞抵抗紫外線之最適濃度。且萃取液濃度一旦過高，可能會造成細胞內之滲透壓的改變，進而造成死亡，也有可能因萃取液之 pH 值不在中性範圍(Wood et al., 2002)，而造成細胞培養液之 pH 改變，進而使細胞存活率降低。

添加不同萃取液之皮膚纖維母細胞，對於細胞具有一定程度之增生效果，且經 UV 照射後，細胞存活率與控制組相比，也有較高之存活率，猜測萃取液可能具有防禦 UV 損傷之成分，而達到保護細胞之功效。

伍、結論

由實驗發現胎盤萃取含有豐富的蛋白質、賀爾蒙、氨基酸和一些維生素...等。所以萃取液比單一的生長因子有較佳之功效。

體外試驗發現，清除 DPPH 自由基、清除超氧陰離子、清除過氧化氫抑制酪胺酸酶的能力之實驗結果，發現抗氧化能力、抑制酪胺酸酶的能力皆隨萃取液濃度增加，其抗氧化力及抑制酪胺酸酶的能力也隨之提升，又以水萃取液比其它萃取液有較顯著。

細胞試驗發現，水萃取液於濃度 0.75 mg/mL 時能促進纖維母細胞增生能力為對照組之四倍。但水萃取物於 1.0 mg/mL 時，反而會降低細胞存活率。促進膠原蛋白之生成，萃取液的濃度為 0.25~0.75 mg/ml，其增生效果較為明顯。在美白方面，萃取液確實有降低老鼠黑色素腫瘤細胞 B16 的存活率，其濃度在 ≥ 0.5 mg/ml 時，抑制之效果均達 60%；且增強細胞防護紫外線損害之功效，也有明顯之效果。

整體而言，萃取物具有抗氧化、促進細胞增生與增強細胞防護紫外線損害之功效，尤以水萃取具有較佳之功效。

陸、未來展望

化妝品的誕生成為一種預防老化和保養的方法。基於消費者對於化妝品的功能性訴求，希望在使用同一產品即可得到多重功效如保濕、美白、抗老、防曬等，所以當今化妝品的成分逐漸趨向複雜多元化，而採用天然的原料更成為化妝品發展的一個趨勢。而保養品需具有防治皮膚病、防曬、增強皮膚營養的功能，對於乾燥、色斑、粉刺、皺紋等皮膚缺陷有彌補功能。同時，還能增強皮膚彈性、減少皮膚角化、色素沈著，防止皮脂功能減退等多種作用。胎盤素應用於化妝品，符合現代化妝品以天然素材為原料。依照不同配方調製成保養品，需具有溫和療效的機能性且評估其安全性及有效性。



柒、參考文獻

1. 光井武夫(卓倩台譯), 1992, 新化妝品學, 南山堂株式會社出版, 合記圖書出版社發行, pp.1-28。
2. 李仰川, 2001, 化妝品學原理, 文京圖書有限公司, pp.9-17, 127-140, 143-161。
3. 龍又麟, 1994, 神奇的胎盤素, 青春出版社, pp.31-35。
4. Aquino, R., Morelli, S., Tomaino, A., Pellegrino, M., Saija, A., Grumetto, L., Puglia, C. and Ventura, D. 2002. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *J. Ethnopharmacology*. 79: 183-191.
5. Benaiges, A., Armengol, R., Mateu, B., Sagrista, M. L. and Mora, M. 2001. Effect of germinated seeds extract on the respiratory activity of human skin fibroblasts and sheep liver mitochondria. Influence on cell viability and proliferation and their usefulness as active cosmetic ingredient. *Int. J. Cosmetic Sci.* 23: 245-255.
6. Bernard, P. and Berthon, J. Y. 2000. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. *International Journal of Cosmetic Science*. 22: 219-226.
7. Blease, K., Schuh, J. M., Jakubzick, C., Lukaces, N. W., Kunkel, S. T., Joshi, B. H., Puri, R. K., Kaplan, M. H. and Hogaboam, C.M.

2002. Stat6-deficient mice develop airway hyperresponsiveness and peribronchial fibrosis during chronic fungal asthma. *American Journal of Pathology*. 160(2): 481-490.
8. Bologna, J. L. 1995. Aging skin. *The American Journal of Medicine*. 98(16): 99-103.
9. Bonina, F., Saija, A., Tomaino, A., Cascio, R. L., Rapisarda, P. and Dederen, J. C. 1998. In vitro antioxidant activity and in vivo photoprotective effect of a red orange extract. *Int. J. Cosmetic Sci.* 20: 331-342.
10. Byorksten, J. A. 1958. A common molecular basis for the aging syndrome. *Journal of the American Geriatrics Society*. 6: 740.
11. Christian, M., Peter, B., Jutta, W., Lale, K., Wenjian, M., Jonna, A., Arndt, P., Thomas, K. and Karin, S. K. 2001. Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 30(3): 238-247.
12. Chung, J. H., Seo, J. Y., Choi, H. R., Lee, M. K., Youn, C. S., Rhie, G., Cho, K. H., Kim, K. H., Park, K. C. and Eun, H. C. 2001. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*. 117(5): 1218-1224.
13. Darr, D and Fridovich, I. 1994. Free radicals in cutaneous biology. *The Journal of Investigative Dermatology*. 102(5): 671-675.
14. Davies, K. J. A., Qaintanilha, A. T., Brooks, G. A. and Packer, L. 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 107(4): 1198-1205.

15. Eric, F. B., Jouni, U. 1996. *Clinics in Dermatology*. 14: 143-151.
16. Genji, I., Yoshinori, T., Yukiko, Y., Kazue, T., Michio, K. and Shuhei, I. 1995. Degree of elastic fibers in rat skin is age dependent. *J. Invest. Dermatol.* 2: 254-258.
17. Huang-Lee, L. L. H. and Nimni M. E. 1993. Preparation of type I collagen fibrillar matrices and the effects of collagen concentration on fibroblast contraction. *Biomedical Engineering Application, Basis and Communication Engineering.* 5: 664-675.
18. Jenkins, G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development.* 123: 802-810.
19. Karin, S. K., Peter, B., Jutta, W., Gernot, H., Weijan, Ma., Lale K., Christian, M. and Meinhard, W. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experi. Geronto.* 35: 307-316.
20. Kenneth B.B. and Bruce N. A. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews.* 78: 547-581.
21. Kohen, K. 1999. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress- new approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.* 53: 181-192.
22. Kurechi, T., Kikugawa, K. and Kato, T. 1980. Studies on the antioxidants XIII. Hydrogen-donation capacity of antioxidants to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.* 2089-2093.
23. Li, Y. Y., Feng, Y., McTiernan, C. F., Pei, W., Moravec, C. S., Wang, P., Rosenblum, W., Kormos, R. L. and Feldman, A. M. 2001. Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices. *Circulation.* 104: 1147-1152.

24. Liu, F. and Ng, T. B. 1999. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci.* 66(8): 725-735.
25. Lods, L.M., Dres, C., Johnson, C., Scholz, D.B. and Brooks, G.J. 2000. The future of enzymes in cosmetics. *Internal Journal of Cosmetic Science.* 22:85-94.
26. Ma, W., Wlaschek, M., Tancheva-poór, I., Schneider, L. A., Naderi, L., Razi-Wolf, Z., Schuller, J. and Scharffetter-Kochanek, K. 2001. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clinical and Experimental Dermatology.* 26: 592-599.
27. Mauricio, G. Y. 1996. *Clinics in Dermatology.* 14:153-160.
28. Marieb, E.N. 1989. The Benjamin/gummings Publishing Company, California. *Human anatomy and physiology.*
29. Morliere, P., Moysan, A. and Tirache, I. 1995. Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 19(3): 365-371.
30. Moysan, A., Marquis, I. Gaboriau, F., Santus, R. Dubertret, L. and Morliere, P. 1993. UltravioletA-Induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 100(5): 692-698.
31. Nelson, D. L. and Cox, M. M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, p. 313.
32. Phillips, B. J. 1996. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicology in vitro.* 10: 69-76.

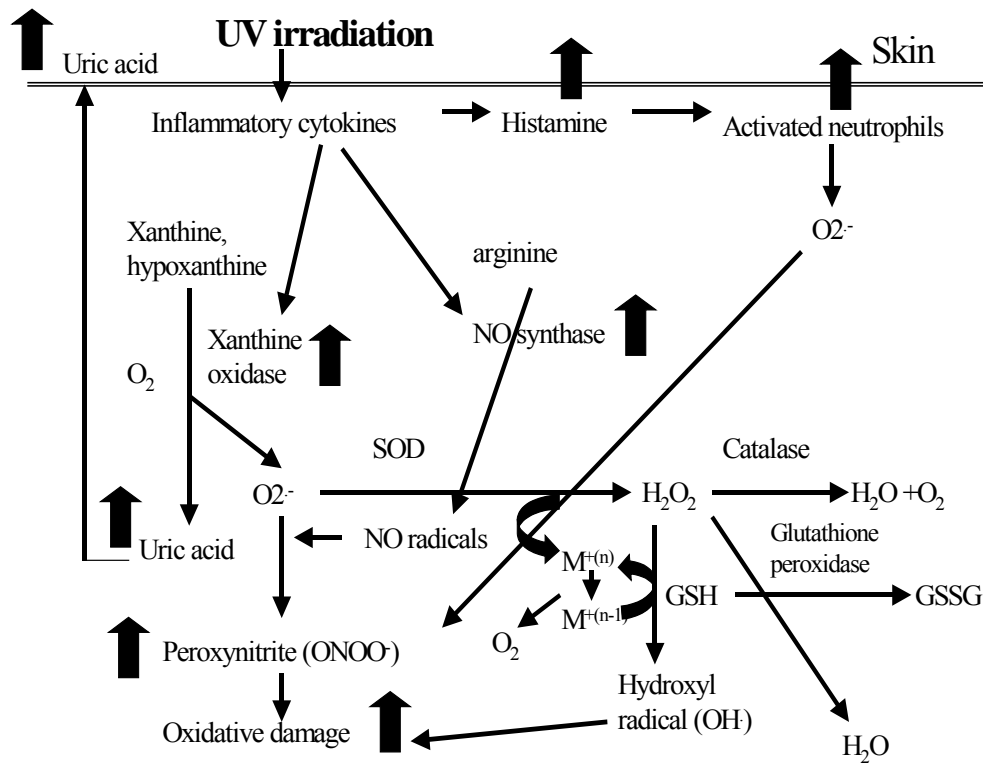
33. Pick, E. and Keisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immun. Meth.* 38: 161-170.
34. Prota, G. 1996. Melanins and Melanogenesis. *Cosmetic and Toilettries Magazine.* 111: 43-51.
34. Sanchez, C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.* 8:121-137.
36. Snadra, M. D. L. ; Nico, P.M. ; Monique V. V. 2001. *Journal of Photobiology B: Biology.* 61: 106-113.
37. Shampa, M. ; Samir, K. M. and Ranjan, B. 2002. Human placental lipid induces mitogenesis and melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *J. Biosci.* 27:243-249.
38. Shapiro, S. S. and Pharmd, C. S. 2001. Role of Vitamins in skin care. *Nutrition.* 17: 839-844.
39. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the anti-oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40: 945-948.
40. Shimogaki, H. Tanaka, Y. Tamai, H. and Masuda, M. 2000. *International Journal of cosmetic Science.* 22:291-303.
41. Shindo, Y., Witt, E. and Packer, L. 1993. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J. Invest. Dermatol.* 100(3): 260-265.
42. Shoichi, T., Mitsuyoshi, M. and Takao, K. 2001. Age-related changes

in oxidative damage to lipid and DNA in rat skin. *Mech. Ageing. Dev.* 122: 415-426.

43. Souheil, E., Matthias, S. and Sylvia B. 2002. Hydrogen peroxide-scavenging properties of normal human airway secretions. *167*:425-430.
44. Steenvoorden, D. P. T. and Henegouwen, M. J. B. V. 1997. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J. Photochem. Photobio. B.* 41: 1-10.
45. Stefania, B.; Emanuela, C. and Mauro, P. 2003. Pigment Cell Res. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *16*:101-110.
46. Takakazu, S. and Stan, P. 1993. Differences in subcellular distribution of catechol-O-methyltransferase and tyrosinase in malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology.* 100: 222S-225S.
47. Wickens, A. and Andrew, P. 2001. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology.* 128(3): 379-391.
48. Wood, J. E., Senthilmohan, S. T. and Peskin, A. V. 2002. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food chemistry.* 77 : 155-161 Yamamoto, Y. 2001. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J. Dermatol. Sci.* 27(1): S1-S4.
49. Yamamoto, T. and Nishioka, K. 2001. Animal model of sclerotic skin. IV : induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent. *Journal of Investigative Dermatology.* 117(4): 999-1001.

50. Yoshiki, M.1995.Journal of Dermatological Science.9:79-86.
51. Yoshitaka, H. 1987. Melanin inhibiting cosmetic composition.
751,755.

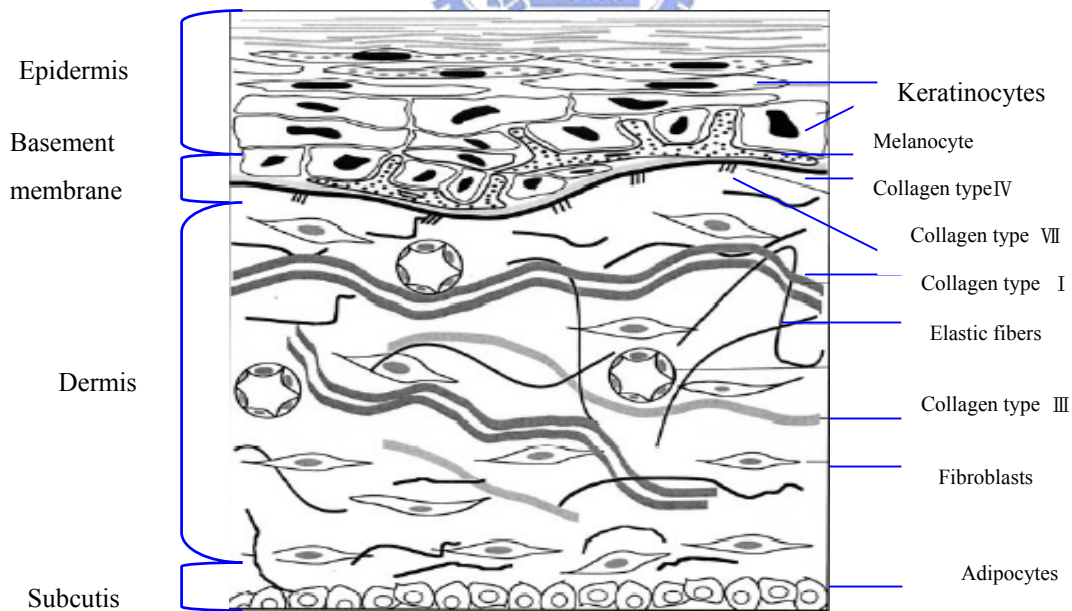




圖一、紫外線A照射皮膚所引起之氧化性傷害機制。

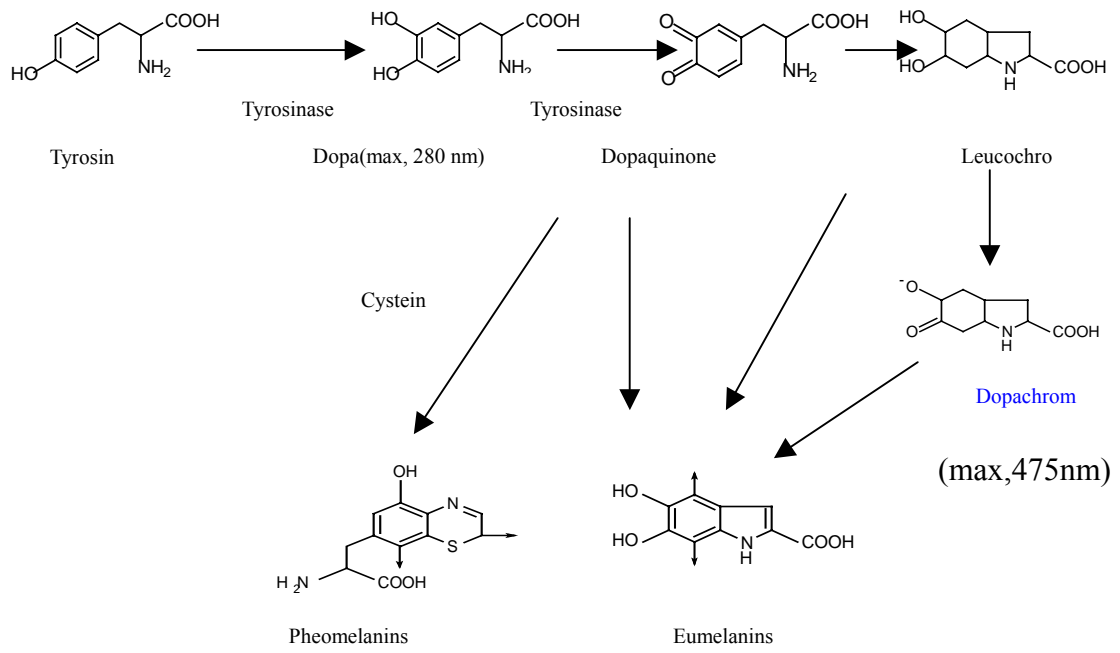
Fig. 1. A scheme of the proposed mechanism of the oxidative damage in the skin.

(Kohen et al., 2000)



圖二、皮膚之構造

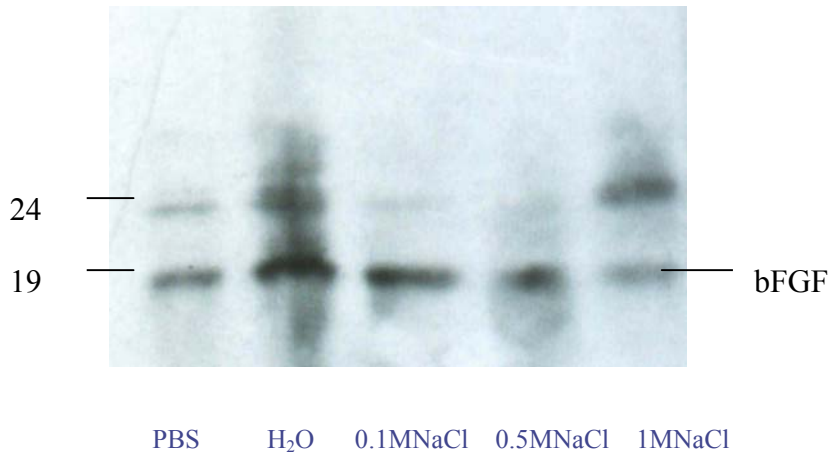
Figure 2. Scheme of different layers of the skin.



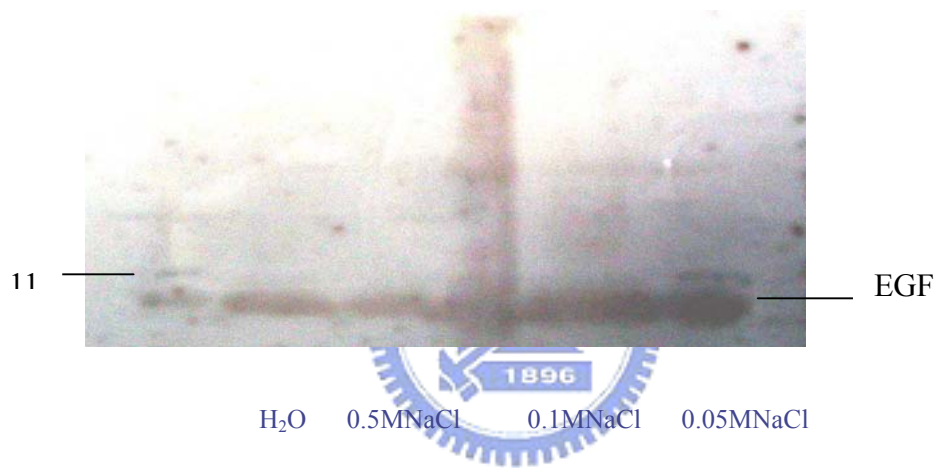
圖三、黑色素生成(Melanogenesis)之反應機構

(Prota, 1996)

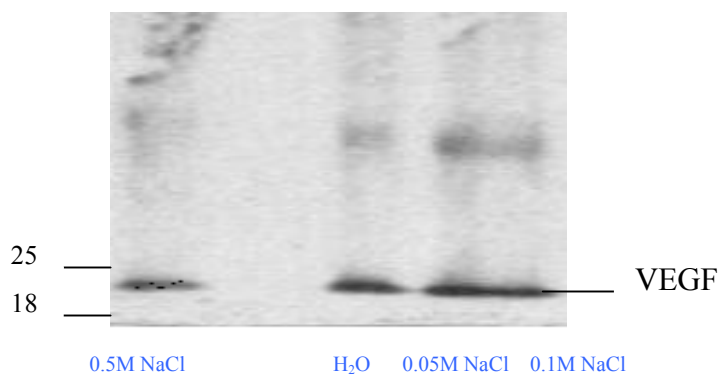




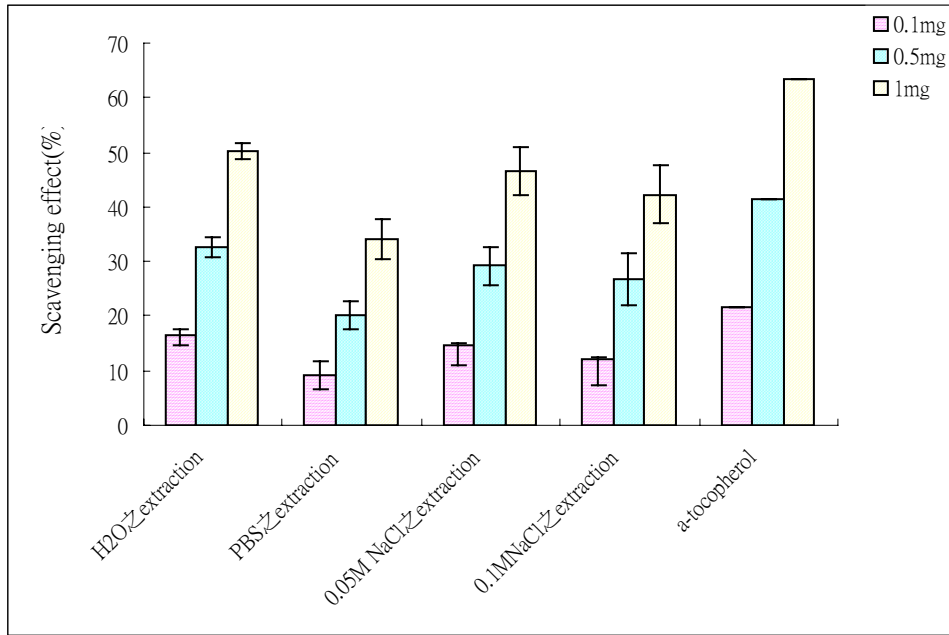
圖四、胎盤萃取液中含有 bFGF



圖五、胎盤萃取液中含有 EGF



圖六、胎盤萃取液中含有 VEGF

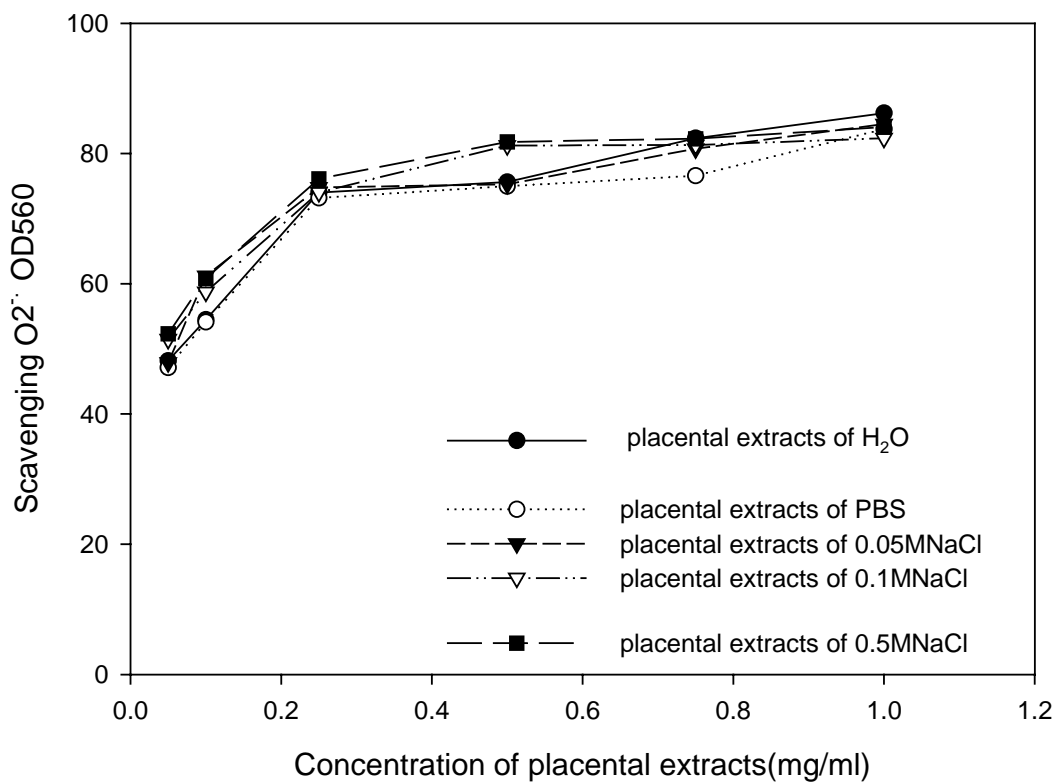


圖七、不同濃度之胎盤萃取液或 α -tocopherol 對 DPPH 自由基清除之能力。

Figure 7. Scavenging effects of different concentrations of porcine placental extracts on DPPH radicals.

* Scavenging effects (%) (capacity to scavenge the DPPH) = $1 - \left[\frac{\text{Absorbance of sample at 517 nm}}{\text{Absorbance of control at 517 nm}} \right] \times 100$.

Each value is the means \pm standard deviation (n=5)

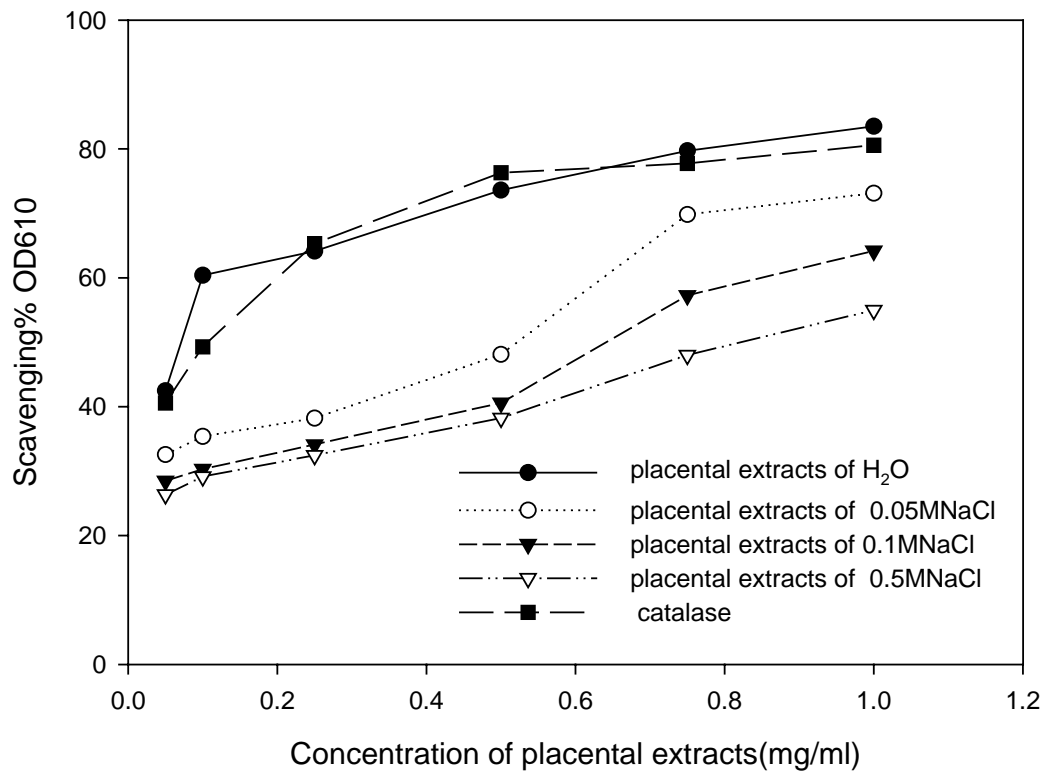


圖八、不同濃度之胎盤萃取液對清除超氧陰離子的能力。

Figure 8. Scavenging effects of different concentrations of porcine placental extracts on superoxide anion.

* Scavenging effects (%) (capacity to scavenge the $O_2^{\cdot-}$) = $1 - \left[\frac{\text{Absorbance of sample at 560 nm}}{\text{Absorbance of control at 560 nm}} \right] \times 100$.

Each value is the means \pm standard deviation (n=5)

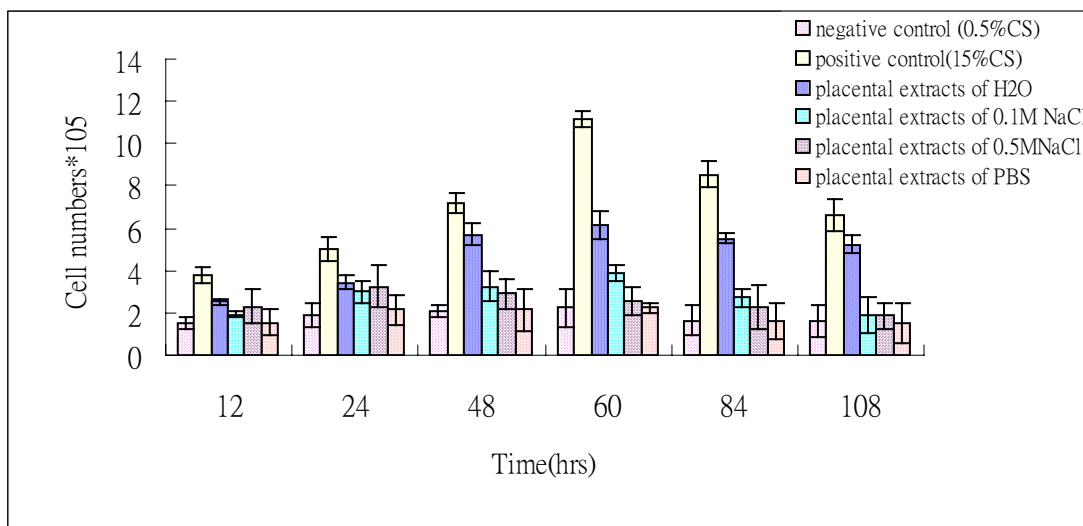


圖九、不同濃度之萃提取物清除過氧化氫的能力

Figure9.Scavenging effects of different concentrations of porcine placental extraction on hydrogen peroxide.

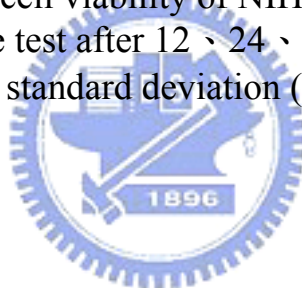
* Scavenging effects (%) (capacity to scavenge the H₂O₂) = 1 - [(Absorbance of sample at 610 nm)/(Absorbance of control at 610 nm)] × 100.

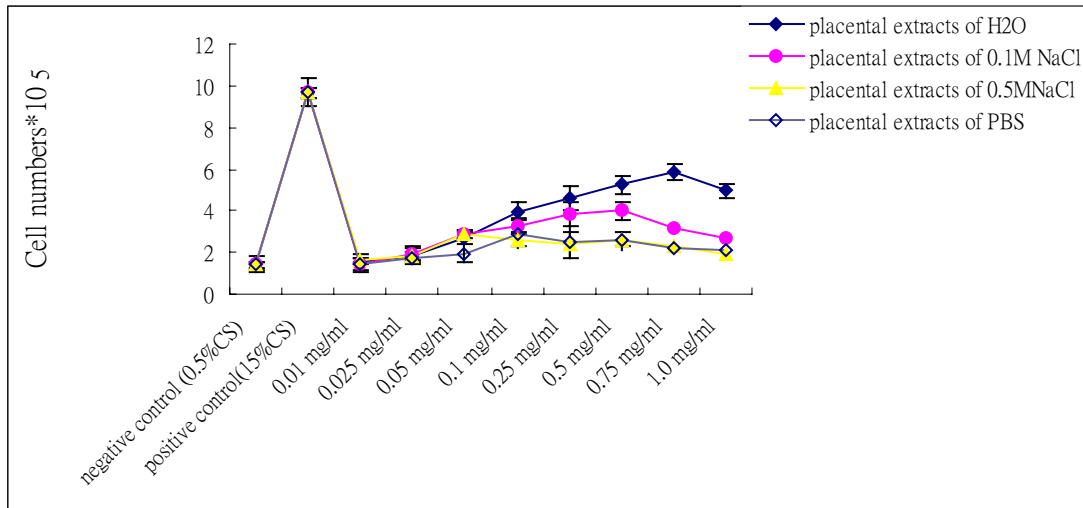
Each value is the means ± standard deviation (n=5)



圖十、不同濃度之胎盤萃取液對 NIH 3T3 增生之影響。細胞增生是以 tyrpan blue 方法在 12、24、48、60、84、108 小時後所測得。

Figure 10. Effect of different concentrations of porcine placental extracts with different solvents on cell viability of NIH 3T3. Cell viability was measured with tyrpan blue test after 12、24、48、60、84、108 hr. Each value is the means \pm standard deviation (n=5)



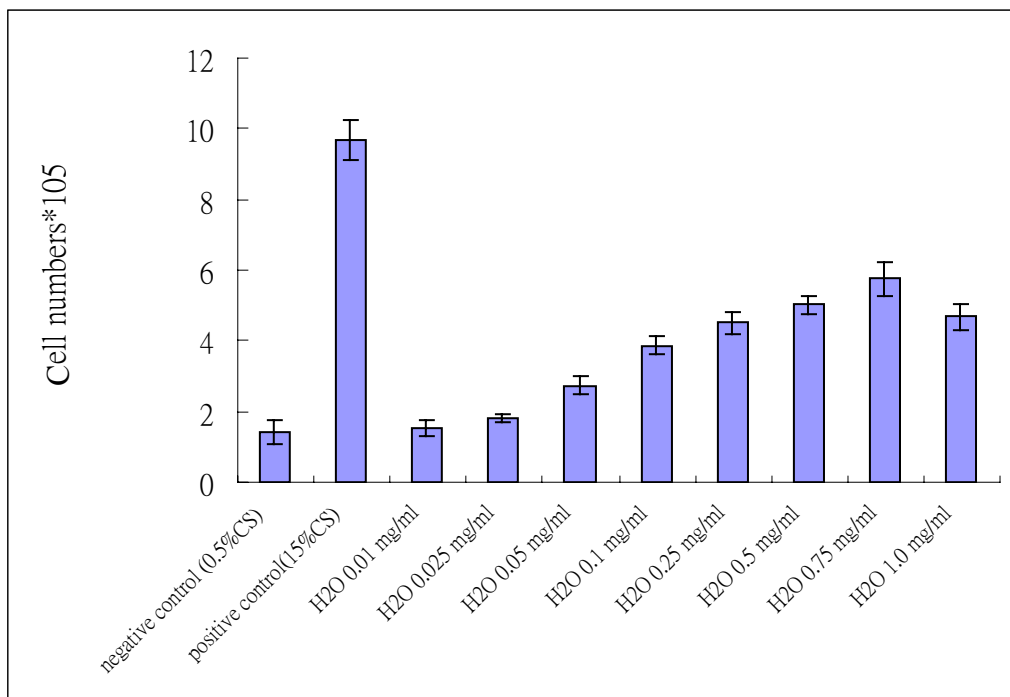


圖十一、不同濃度之胎盤萃取液對 NIH 3T3 增生之影響。細胞增生是以 tyrpan blue 方法在 48 小時後所測得。

Figure 11. Effect of different concentrations of porcine placental extracts with different solvents on cell viability of NIH 3T3. Cell viability was measured with tyrpan blue test after 48 hr.

Each value is the means \pm standard deviation (n=5)

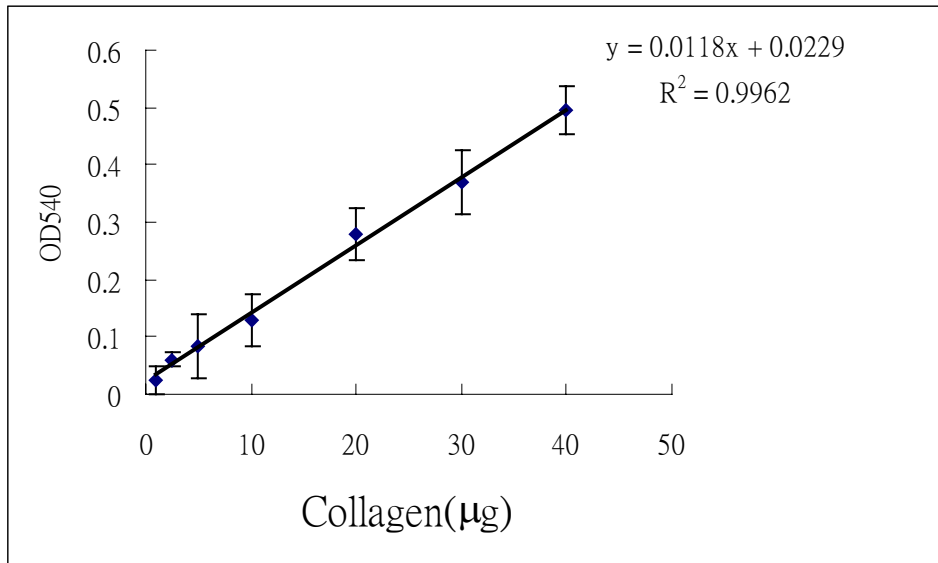




圖十二、不同濃度的水之胎盤萃取液對 NIH 3T3 增生之影響。細胞存活率是以 tyrpan blue 方法在 48 小時後所測得。

Figure 12. Effect of different concentrations of porcine placental extracts with water on cell proliferation of NIH 3T3. Cell viability was measured with tyrpan blue test after 48 hr.

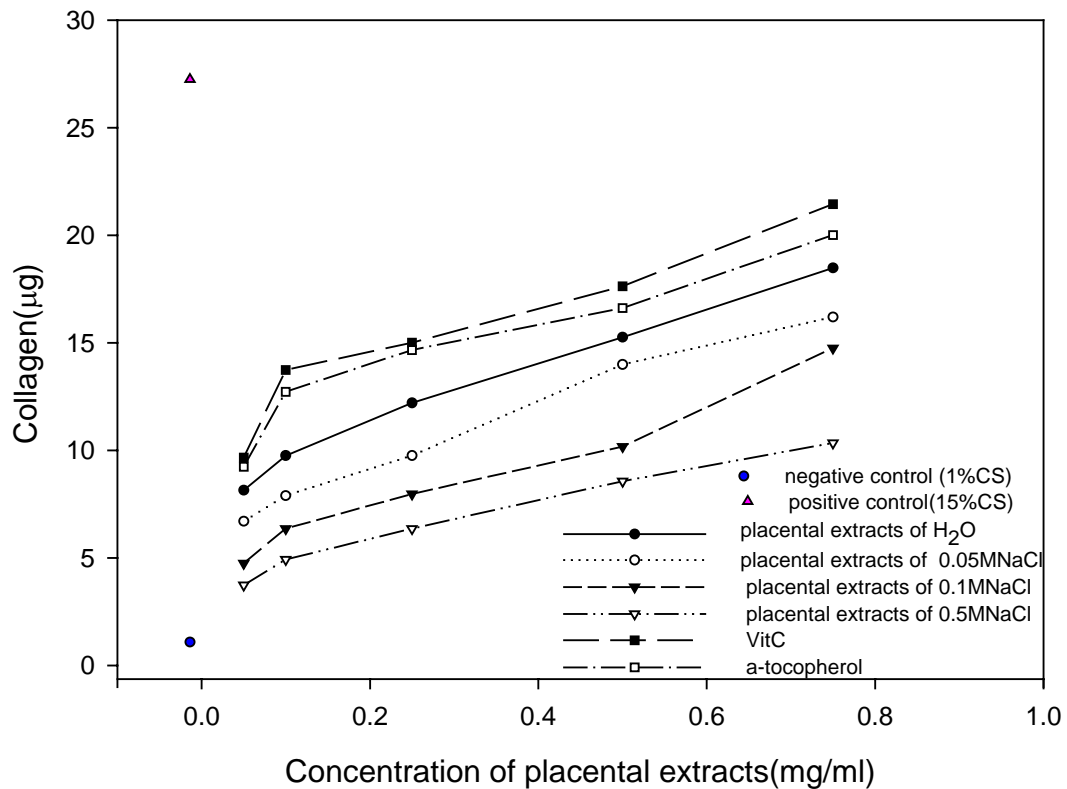
Each value is the means \pm standard deviation (n=5)



圖十三、膠原蛋白分析測定檢量線。以 Type I collagen 作為標準品，使用 SIRCOL collagen assay kit 測定。

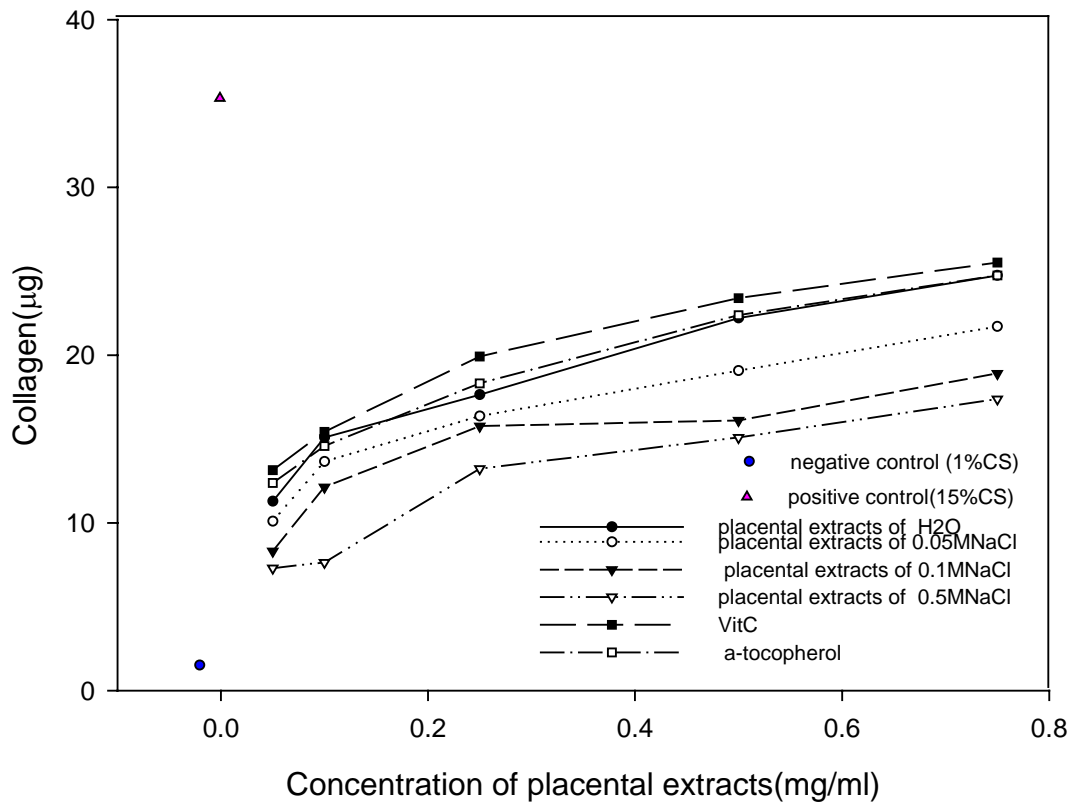
Figure 13. Calibration curve for the determination of Type I collagen. Collagen content was determined by SIRCOL collagen assay kit. Each value is the means \pm standard deviation (n=3)



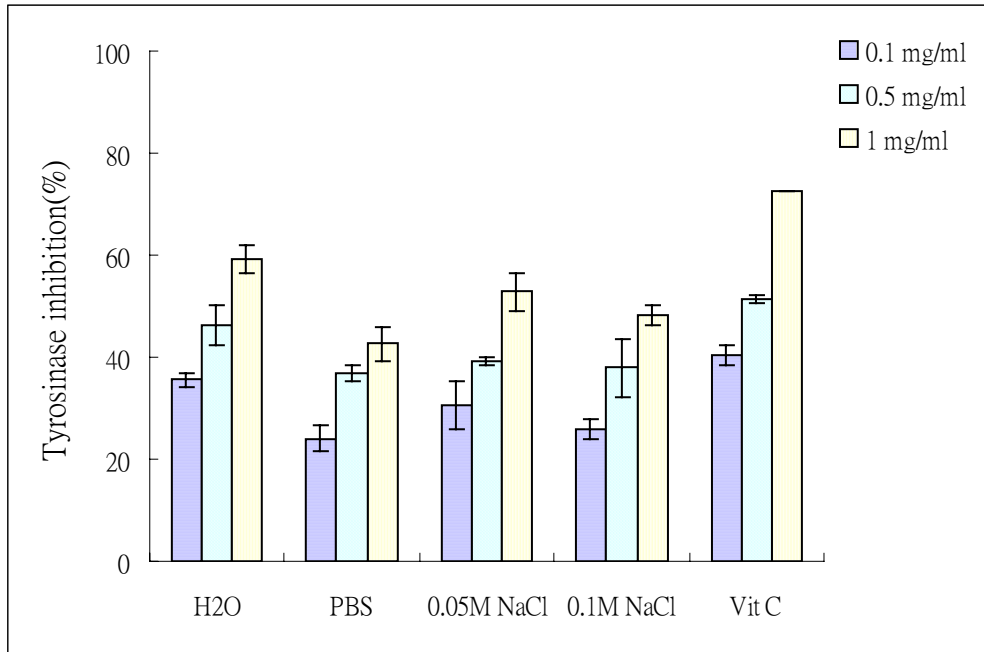


圖十四、不同濃度之胎盤萃取液對促進 NIH 3T3 合成膠原蛋白的影響。萃取物與細胞培養 24 小時後測膠原蛋白的含量。

Figure 14. Effect of different concentrations of porcine placental extracts on enhancing collagen content of NIH 3T3 after growth for 24 hr with the extracts.



圖十五、不同濃度之胎盤萃取液對促進 NIH 3T3 合成膠原蛋白的影響。萃取物與細胞培養 48 小時後測膠原蛋白的含量。
 Figure 15. Effect of different concentrations of porcine placental extracts on enhancing collagen content of NIH 3T3 after growth for 48 hr with the extracts.

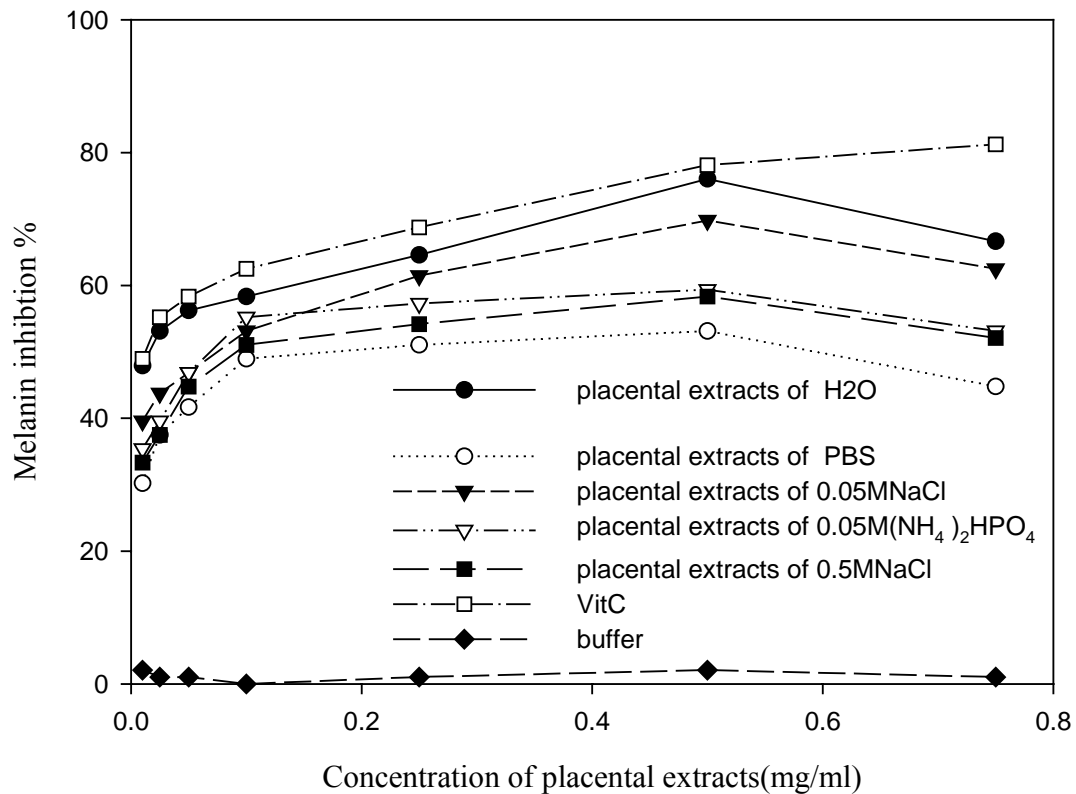


圖十六、不同濃度胎盤萃取液或 Vit C 對酪胺酸酶活性抑制率之比較。

Figure 16. Inhibition effects of different concentrations (mg/ml) of porcine placental extracts or Vit C on tyrosinase.

* Tyrosinase inhibition (%) = $1 - \left[\frac{\text{Absorbance of sample at 475 nm}}{\text{Absorbance of control at 475 nm}} \right] \times 100$.

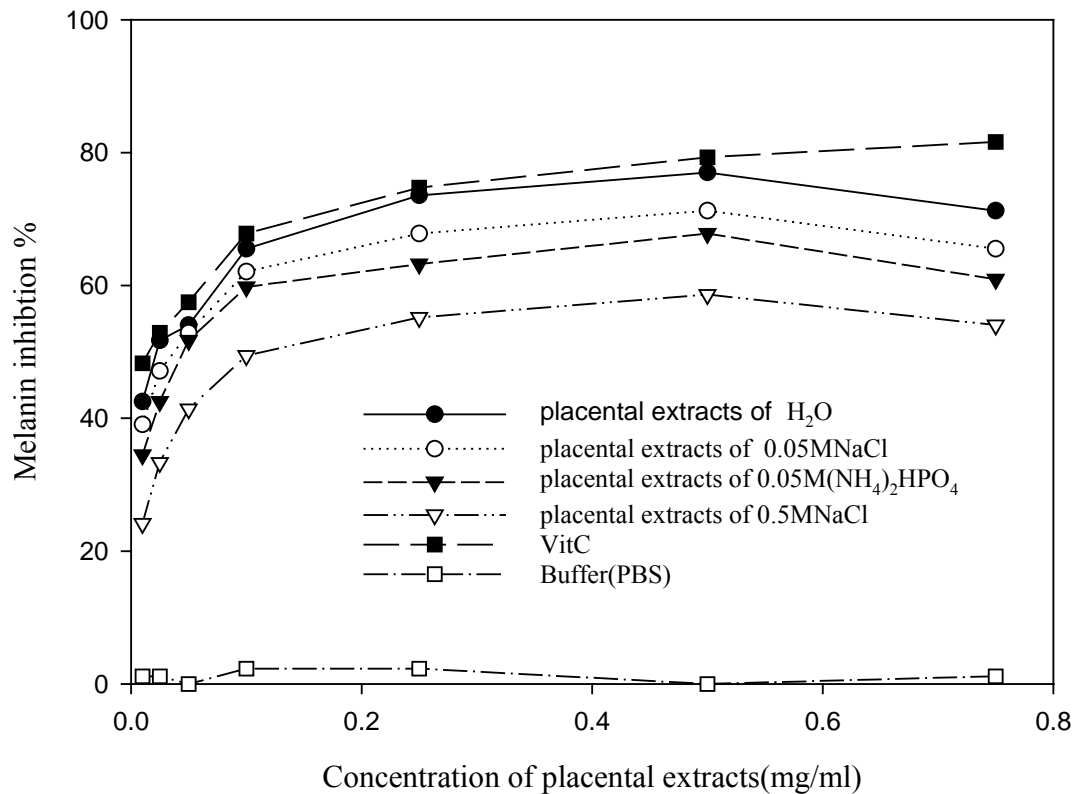
Each value is the means \pm standard deviation (n=5)



圖十七、不同濃度之胎盤萃取液對 B16 黑色素形成的抑制率的影響。黑色素抑制率是以第三天的產量來計算，而黑色素細胞在第二天以 UVA (1.1 mw/cm²) 照射 30 分鐘。

Figure 17. Inhibition effect of different concentrations of porcine placental extracts on cell melanin content of B16. Melanin was yielded at Day 3. The cell was irradiated with UVA (1.1 mw/cm²) for 30 min on Day 2.

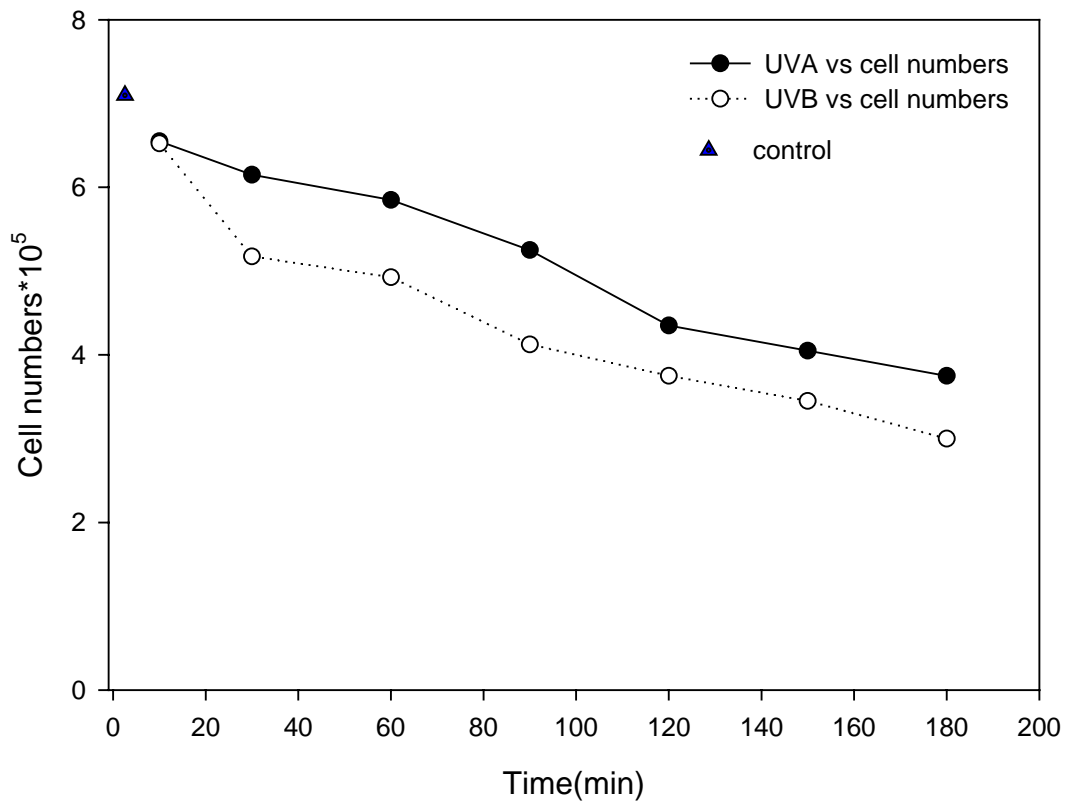
* Melanin inhibition (%) = $1 - \left[\frac{\text{Absorbance of sample at 475 nm}}{\text{Absorbance of control at 475 nm}} \right] \times 100$.



圖十八、不同濃度不同溶劑之胎盤萃取液對B16黑色素形成的抑制率的影響。黑色素抑制率是以第三天的產量來計算，而黑色素細胞在第二天以UVB (1.5 mw/cm²)照射15分鐘。

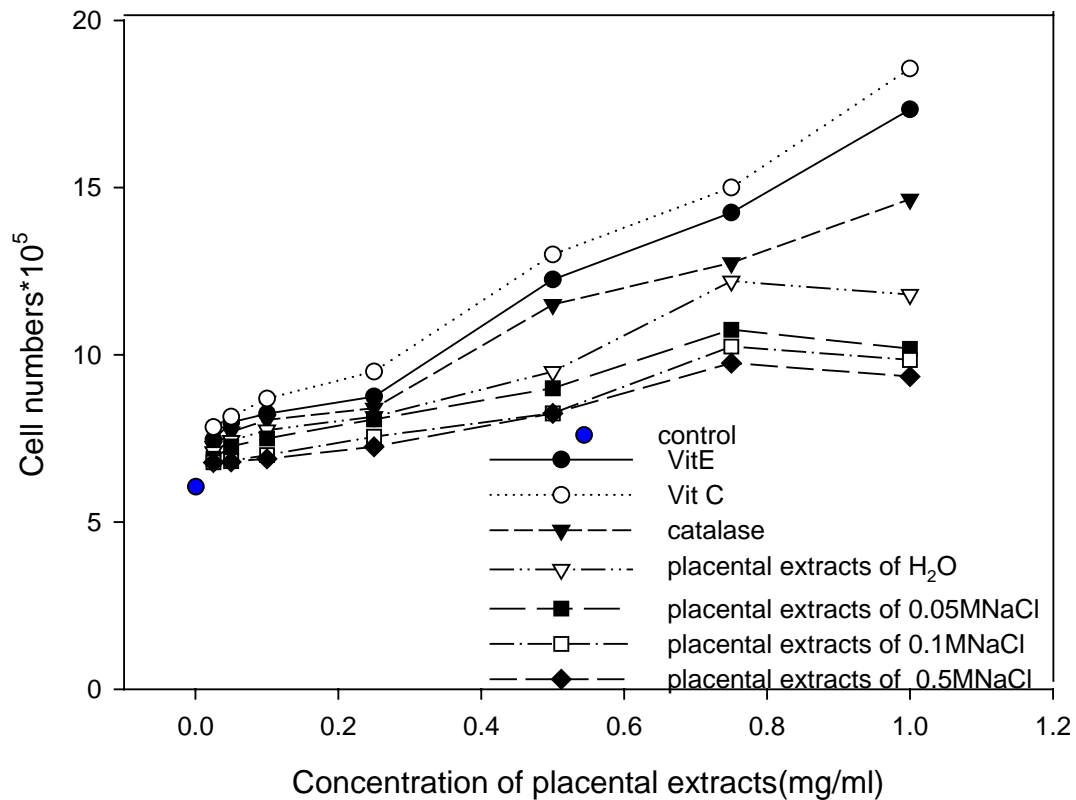
Figure 18. Inhibition effect of different concentrations of porcine placental extracts with different solvents on cell melanin content of B16. Melanin was yielded at Day 3. The cell was irradiated with UVB (1.5 mw/cm²) for 30 min on Day 2.

* Melanin inhibition (%) = $1 - \left[\frac{\text{Absorbance of sample at 475 nm}}{\text{Absorbance of control at 475 nm}} \right] \times 100$.



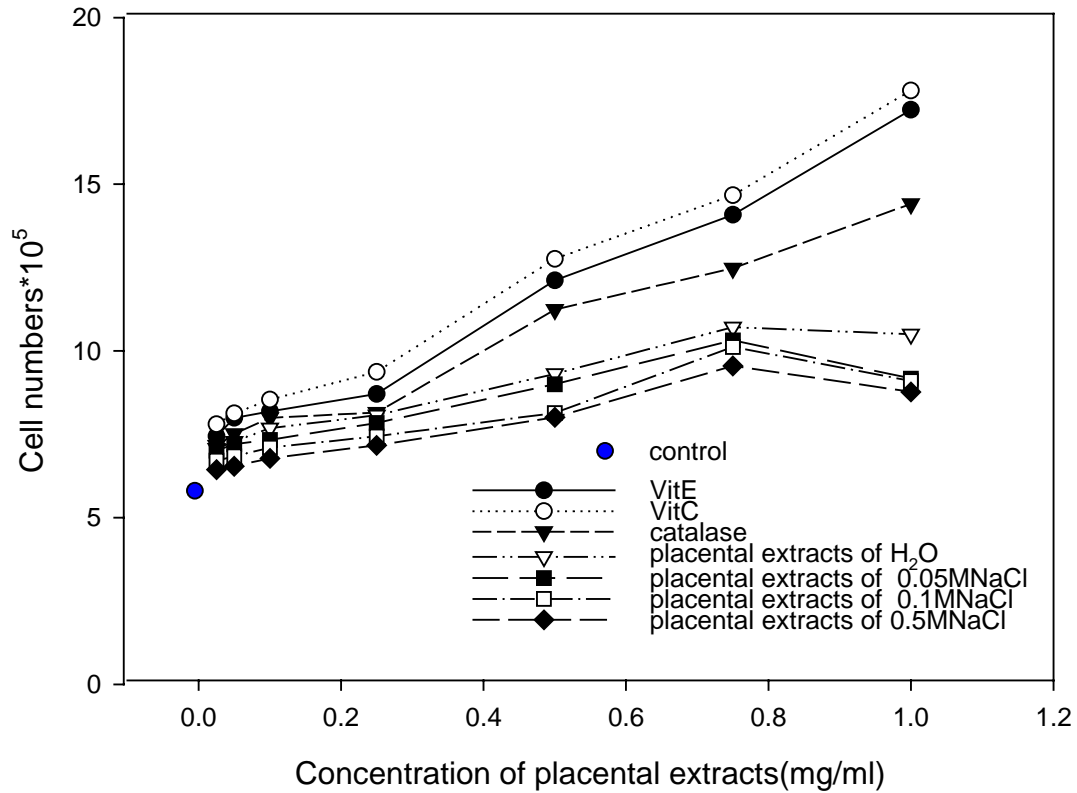
圖十九、不同紫外線 A 與 B 照射時間，對皮膚纖維母胞存活率之影響(未處理細胞之存活率當作 100%)

Figure19. Viability of the skin fibroblasts following different UVA and UVB treatment times (Cell viability of the untreated cells are 100%)



圖二十、添加維他命 C、維他命 E、過氧化氫酶、不同濃度之胎盤萃取液對於皮膚纖維母細胞經 UVB 照射後存活率之影響(未處理細胞之存活率為 100%)

Figure 20. The effect of Vitamin E、Vitamin C、Catalase and different concentrations of porcine placental extracts with different solvents on the viability of skin fibroblast .The cell irradiated with UVB. (Cell viability of the untreated cells are 100%)



圖二十一、添加維他命 C、維他命 E、過氧化氫酶、不同濃度之胎盤萃取液對於皮膚纖維母細胞經UVA照射後存活率之影響(未處理細胞之存活率為 100%)

Figure 21. The effect of Vitamin E、Vitamin C、Catalase and different concentrations of porcine placental extracts on the viability of skin fibroblast .The cell irradiated with UVA. (Cell viability of the untreated cells are 100%)

表一、胎盤之生長因子

Factor	Principal Source	Primary Activity	Comments
PDGF	platelets, endothelial cells, placenta	promotes proliferation of connective tissue, glial and smooth muscle cells	two different protein chains form 3 distinct dimer forms; AA, AB and BB
EGF	submaxillary gland, Brunners gland	promotes proliferation of mesenchymal, glial and epithelial cells	
TGF- α	common in transformed cells	may be important for normal wound healing	related to EGF
FGF	activated TH ₁ cells (T-helper) and natural killer (NK) cells	promotes proliferation of many cells; inhibits some stem cells; induces mesoderm to form in early embryos	at least 19 family members, 4 distinct receptors
NGF		promotes neurite outgrowth and neural cell survival	several related proteins first identified as proto-oncogenes; trkA (<i>trackA</i>), trkB,
Erythropoietin	kidney	promotes proliferation and differentiation of erythrocytes	
TGF- β	activated TH ₁ cells (T-helper) and natural killer (NK) cells	anti-inflammatory (suppresses cytokine production and class II MHC expression), promotes wound healing, inhibits macrophage and lymphocyte proliferation	at least 100 different family members
IGF-I	primarily liver	promotes proliferation of many cell types	related to IGF-II and proinsulin, also called Somatomedin C
IGF-II	variety of cells	promotes proliferation of many cell types primarily of fetal origin	related to IGF-I and proinsulin

表二、皮膚的老化特徵

- 皮膚皺紋變多
- 皮膚鬆弛
- 皮膚之光澤、潤滑度降低
- 皮膚張力降低
- 皮膚紋理變粗、皮溝紊亂
- 色素沉著斑增加，有些人會出現局部脫色斑
(前者稱為老年性色素斑；後者稱為老年性白斑)
- 皮膚變黃
- 頭髮變少、光澤消失
- 禿頭
- 白頭髮增加
- 眉毛與耳毛變長
- 指甲粗糙、白濁化且彎曲度變大



表三、老化皮膚之表皮的變化

項目	光老化的皮膚	自然老化的皮膚
表皮的厚度	<ul style="list-style-type: none"> ● 表皮增厚 	<ul style="list-style-type: none"> ● 表皮薄
表皮細胞	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞成多樣性 ● 細胞排列無次序 ● 極性消失 ● 通常可見肥大 ● 有多樣的黑素體 	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞均一 ● 細胞成規則性排列 ● 保留極性 ● 通常為萎縮 ● 黑素體成均一
角質層	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞層較多 ● 角質細胞的型態、染色性及大小呈多樣性 	<ul style="list-style-type: none"> ● 通常的細胞層 ● 角質細胞大小均一
黑色素細胞	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞數增加 ● 細胞呈多樣性 ● 黑素體形成增加 	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞數減少 ● 細胞均一 ● 黑素體產生不足
郎罕氏細胞	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞數明顯減少 ● 細胞呈多樣性 	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞數輕度減少 ● 為正常的細胞

表四、老化皮膚之真皮變化

項目	光老化的皮膚	自然老化的皮膚
葡萄糖胺聚糖	● 明顯增加	● 輕度減少
彈力纖維組織	● 極為增多 ● 變性	● 雖有增多，但幾乎正常 ● 細胞排列正常
膠原	● 纖維束和纖維的明顯減少	● 纖維束粗而無排列方向
網狀真皮 纖維母細胞 肥大細胞	● 出現肥厚性彈力纖維化 ● 增加、活性增大 ● 增加	● 彈性纖維薄化 ● 減少，無活性 ● 減少
微血管	● 明顯減少 ● 出現異常的血管 ● 有微血管擴張	● 中度減少 ● 血管正常 ● 無微血管擴張
淋巴管	● 幾乎消失	● 中度消失

資料來源 (光井武夫，1992)



表五、維生素與其衍生物對於保護皮膚上之功效

Name	Skin benefits
Vitamin A (retinoids)	Normalize Keratinization; downregulate sebum production in acne, and cellulite
Vitamin D (and analogs)	Downregulate the cutaneous immune system; downregulate epithelial proliferation and promote differentiation
Vitamin C	Antioxidant; regulates collagen synthesis (transcription and posttranslation); formation of stratum-corneum barrier lipids; regenerates Vitamin E; provides photoprotection (in combination with vitamin E)
Vitamin E	Membrane antioxidant; protects against oxidative damage; provides photoprotection (in combination with vitamin C)
Coenzyme Q	Membrane antioxidant; regenerates vitamin E; protects against photoaging