

# 美和學校財團法人美和科技大學

## 100 年度教師產學合作計畫

### 結案報告書

計畫名稱：檀香精油對角質蛋白羰基暴露的減緩效果

計畫編號：100-FI-DBS-IAC-R-003

計畫期間：100.01.01.~100.12.31.

計畫主持人：蔡豐仁

共同主持人：

研究助理：

經費總額： 50000 元

經費來源：芳勳諾生技有限公司

## 一、 中文摘要

檀香(Sandalwood)為檀香科植物檀香 *Santalum album* L. 樹幹的心材，氣清香，燃燒時香氣更濃；味淡，嚼之微有辛辣感。主要成分含揮發性油。檀香精油(essential oil)中主要成分為  $\alpha$ -檀萜香醇和  $\beta$ -檀香萜醇( $\alpha$ - $\beta$ -Santalol),其次為檀萜烯(Santene)、 $\alpha$ -檀香烯和  $\beta$ -檀香烯( $\alpha$ -, $\beta$ -Santalene)、檀萜烯酮(Santenone)、檀萜烯酮醇(Santenone alcohol)、及少量的檀香萜酸(Santallic acid)、檀油酸(Teresantallic acid)、紫檀萜醛(Santal aldehyde)等。其功能主治：行氣溫中，開胃止痛。用於寒凝氣滯，胸痛，腹痛，胃痛食少；冠心病，心絞痛。此外，有研究指出檀香具有抗氧化的活性(Scartezzini & Speroni, 2000)，另外也顯示有抗皮膚腫瘤的效果(Dwivedi & Zhang, 1999)，並顯示有很低的經口(oral)及經皮(dermal)急性毒性(Burdock & Carabin, 2008)，已普遍使用於食品及化妝品中。本計畫將利用此偵測皮膚角質蛋白質羰基暴露的方法，透過簡便的免疫分析操作流程，以評估檀香精油臨床的抗氧化效力，以做為研製抗氧化化妝品的重要參考。結果顯示含 0.5%檀香精油之試驗配方不但沒有臨床抗氧化效力，反而增加羰基暴露的數量，推測檀香精油組成份中抗氧化物質含量並不多，且應富含有不飽和之雙鍵物質，經紫外線的照射易產生過氧化自由基進一步攻擊並氧化角質蛋白。建議不宜直接接觸皮膚並暴曬陽光。

## 二、 前言

本計畫使用之材料為檀香精油(Sandalwood oil)。其為檀香科植物檀香 *Santalum album* L. 樹幹的心材，氣清香，燃燒時香氣更濃；味淡，嚼之微有辛辣感。主要成分含揮發性油。檀香精油(essential oil)中主要成分為  $\alpha$ -檀香醇和  $\beta$ -檀香醇 ( $\alpha$ - $\beta$ -Santalol)，其次為檀香烯 (Santene)、 $\alpha$ -檀香烯和  $\beta$ -檀香烯 ( $\alpha$ - $\beta$ -Santalene)、檀香烯酮 (Santenone)、檀香烯酮醇 (Santenone alcohol)、及少量的檀香酸 (Santallic acid)、檀油酸 (Teresantallic acid)、紫檀香醛 (Santal aldehyde) 等。其功能主治：行氣溫中，開胃止痛。用於寒凝氣滯，胸痛，腹痛，胃痛食少；冠心病，心絞痛。此外，有研究指出檀香具有抗氧化的活性(Scartezzini & Speroni, 2000)，另外也顯示有抗皮膚腫瘤的效果(Dwivedi & Zhang, 1999)，並顯示有很低的經口(oral)及經皮(dermal)急性毒性(Burdock & Carabin, 2008)，已普遍使用於食品及化妝品中。本計畫將利用此偵測皮膚角質蛋白質羰基暴露的方法，透過簡便的免疫分析操作流程，以評估檀香精油臨床的抗氧化效力，以做為研製抗氧化化妝品的重要參考。

我們所建立的臨床抗氧化有效性的檢測平台主要是使用偵測蛋白質羰基 (carbonyl groups) 暴露的免疫呈色方法，其主要是因為蛋白質的氧化皮膚光老化與氧化壓力重要的生化指標 (Sander et al, 2002)。該方法係根據有學者利用免疫轉印呈色方式偵測羰基數量來表示蛋白質被氧化的程度(Levine et al, 1994; Smith et al, 1996)，因為蛋白質羰基可藉由蛋白質的氧化斷裂(oxidative cleavage)或是直接氧化離胺酸、精胺酸、脯胺酸及蘇胺酸殘基而產生，也有學者利用此方法發現在皮膚較外層的角質層 (stratum corneum) 內的 keratin 10 被氧化的程度比較內層的角質細胞 (keratinocyte) 高，甚至使用化學性氧化劑及 UV 處理所得到的結果與上述相同 (Thiele et al, 1999a)。因此，我們將利用此偵測蛋白質氧化的方法，透過簡便的免疫分析操作流程，以評估檀香精油臨床的抗氧化效力。

近年來，氧化的壓力 (oxidative stress) 造成皮膚的急性及慢性的破壞反應已被廣泛地被討論 (Wenk J et al, 2001)，如：在紫外線照射下的急性反應中，皮膚會出現有紅斑 (erythema)、細胞增生 (hyperproliferation) 及脫屑等現象；而在慢性反應中真皮層會出現膠原蛋白被降解及不正常彈力蛋白累積的彈力纖維鬆弛症現象 (elastosis)。已有學者證實在皮膚的組織中經由 UVA 及 UVB 的照射會誘導生成 ROS (reactive oxygen species) (Scharffetter-Kochanek et al, 1997)，此外，其他環境的因子也可產生 ROS，如：臭氧、藉由空氣攜帶的污染源、UV 及正常的代謝過程...等等。目前，眾多的研究已經把焦點擺在建立真皮、表皮及角質層之內生性抗氧化酵素 (如：Superoxide dismutase、Catalase、Glutathione peroxidase、Glutathione reductase...等) 及非酵素性抗氧化劑 (如： $\alpha$ -tocopherol、Ascorbic acid、Uric acid、Reduced glutathione...等) 之正常的基本量 (baseline levels) (Shindo et al, 1993, 1994a; Thiele et al, 1998a)，因為一般相信這些内生性酵素性及非酵素性抗氧化劑是維持細胞內氧化還原平衡的主要角色。最近，在人類皮膚自然老化及光老化過程之研究中，證實酵素性抗氧化劑的活性及非酵素性抗氧化劑是一種複合式的調節模式 (Rhie et al, 2001)。最近，已有研究顯示皮膚光老化與氧化壓力所產生的現象有關，如：脂肪

的過氧化現象 (lipid peroxidation) (Tanaka et al, 2001)、醣化作用產物 (glycation products) (Jeanmaire et al, 2001) 及蛋白質的氧化現象 (protein oxidation) (Christina et al, 2002), 上述諸種現象亦可當作是氧化壓力的指標。

目前應用於皮膚抗老化或抗氧化的化妝品產值相當可觀, 根據工研院生醫中心整理 2003 年全球護膚用化妝品產值達 370 億美金, 而且每年平均約以 7% 的成長率增加, 其中以抗老化或抗氧化為訴求的化妝品佔有最大的比例, 而需求之年成長率亦最高。目前已知應用於抗老化或抗氧化的化妝品的有效成份相當多樣化, 有來自天然物純化萃取或人工合成成份, 大致而言可區分為酵素性及非酵素性抗氧化劑, 其中又以非酵素性抗氧化劑為最主要使用的種類, 例如: 1. 谷胱甘肽 (glutathione) 2. Vit E (tocopherol) 及其衍生物 3. Vit C (ascorbic acid) 其衍生物 4.  $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene) 5. Vit A 其衍生物 6. 黑色素 (melanins) 7. 泛醌類 (ubiquinol, ubiquinones): ex: CoA、Q10 8. 甘露糖醇 (mannitol) 9. 黃口票口令 (xanthine) 10. 類黃酮 (flavonoids) 11. 尿酸 (urate) 12. 山梨糖酸 (sorbate) 13. 多酚類 (polyphenols) 14. 硒 (Selenium) 15. 硫辛酸 (lipoic acid) 16. 茄紅素 (lycopene) 17. 前花青素 (proanthocyanidine) 18. 半胱胺酸 (cystein) 19. 甲硫胺酸 (methionine) 20. 兒茶素 (catechins)。化妝品產業是崇尚流行的產業, 有效成份的推陳出新及崇尚天然環保的新趨勢都是這產業所重視的內涵, 檀香精油在坊間有極高的評價, 若能證實其效用並開發出以此為訴求的抗氧化化妝品則應有相當大的商業價值。

### 三、 研究方法及步驟

#### 1 受測對象之選擇及前額皮膚的貼布剝屑處理

選擇無任何皮膚病史及無使用化妝保養品習慣之六位年齡介於 20~45 歲之男性, 在考量臺灣氣溫於春、夏、秋三季變化差距較小, 故預計施行季節為春、夏、秋三季, 而每組配方實驗期間為期 4 週。我們將以常暴露外在環境的前額皮膚角質層為測試標的, 先將前額皮膚以鼻樑為中線劃分為兩邊, 每日早、晚以實驗組及空白組之乳霜狀敷劑各塗抹於前額兩邊, 塗抹劑量約 0.5mL 且兩邊須一致。為了取樣本時避免被皮脂所污染, 每一邊的前額皮膚先以酒精擦拭清潔且第一層貼布樣本丟棄, 取第 2~3 層的貼布樣本並收集於離心管中。為了儘量避免取樣誤差, 前額皮膚靠近鼻樑中線區域寬約 2 公分不採集樣本。

#### 2 實驗組及空白組敷劑之製備

我們將以水包油之乳化劑型為實驗敷劑, 此乳化劑型係以 Glyceryl stearate、Stearic acid 及 stearyl alcohol 為油相的主基劑及乳化助劑; 低刺激性的 Tween-20 為乳化劑; Xanthan gum 為增稠劑; EDTA 為金屬螯合劑; Dimethicone 及 Cyclomethicone 為助滑劑; 而 Phenva 為抑菌劑; 另加入保濕劑成份; 實驗組將使用 0.5%(w/w) 檀香精油之配方。pH 值標定為 6.5 (以 triethanolamine, NaOH 標定)。詳細的配方如下表: ( ) 標示為空白組配方; 無( ) 標示為實驗組配方。實驗組所使用之非極性相檀香精油, 其相對之空白組將以 Capric triglycerides 來替代。配製過程如下: 分別將油相(檀香精油除外)及水相加熱至 80°C, 混合後快速攪拌 (6000rpm), 自然降溫至 45°C, 加

入檀香精油並標定 pH 值為 6.5；降溫至 42°C 調更慢速（4000rpm）並加入抑菌劑，混合均勻後靜置至室溫。最後以離心機調速 5000 rpm 離心 10 分鐘將氣泡去除即為成品。以下是實驗組及空白組配方範例：

#### 實驗組

油相：		水相：	
1. Glyceryl stearate	1.2 %	9. Deionized water	<b>87.05 %</b>
2. Stearyl alcohol	0.8 %	10. Propylene glycol	2.0 %
3. Stearic acid	0.4 %	11. Glycerol	2.0 %
4. PEG-40 Hydrogenate castor oil	0.5 %	12. Sodium PCA	1.0 %
5. Capric triglycerides	<b>1.6 %</b>	13. Xanthan gum	0.4 %
6. Tween 20	0.5 %	14. EDTA	0.1 %
7. Dimethicone	0.5 %	抑菌劑：	
8. Cyclomethicone	0.75 %	15. Phenova	0.2 %
		16 檀香精油	0.5 %

#### 空白組

油相：		水相：	
1. Glyceryl stearate	1.2 %	9. Deionized water	<b>87.05 %</b>
2. Stearyl alcohol	0.8 %	10. Propylene glycol	2.0 %
3. Stearic acid	0.4 %	11. Glycerol	2.0 %
4. PEG-40 Hydrogenate castor oil	0.5 %	12. Sodium PCA	1.0 %
5. Capric triglycerides	<b>2.1 %</b>	13. Xanthan gum	0.4 %
6. Tween 20	0.5 %	14. EDTA	0.1 %
7. Dimethicone	0.5 %	抑菌劑：	
8. Cyclomethicone	0.75 %	15. Phenova	0.2 %

### 3 皮膚角質層蛋白質的分離

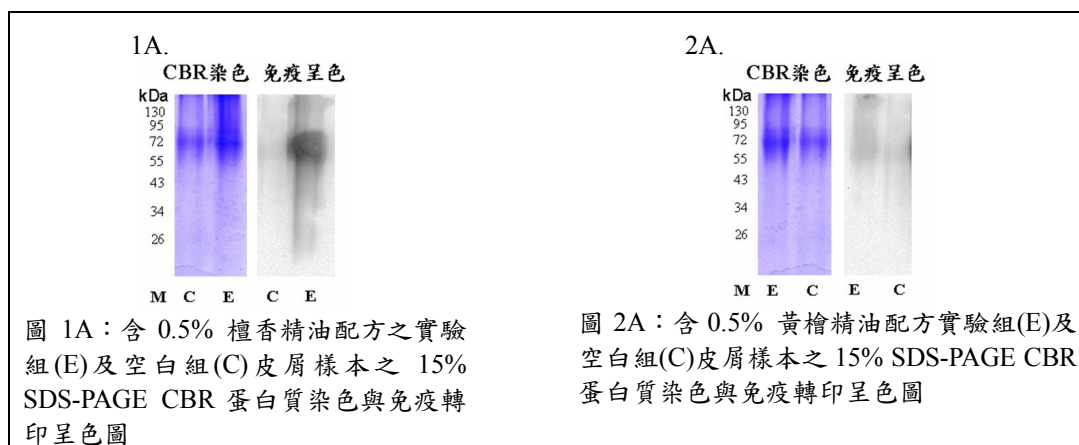
依據 Thiele 等人(1999a)所建構的方法，我們將其若干步驟及材料加以修飾及替換，我們使用一般透明膠帶，取適當寬度及長度平整緊貼於前額特定位置的皮膚上並進行連續剝屑二層，取下貼布時須施以適當的力道及相同的磨擦力，取下的貼布置於離心管中，收集足量後以溶離緩衝液(2 % SDS/0.5 mM Tris, pH7.0/ 10 % glycerol/ 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol)覆蓋在貼布上，隨後於 100°C 下隔水加熱 20 分鐘，經離心(3000 rpm)後收集其蛋白質溶離液，隨後以蛋白質溶離液 3 倍量之丙酮(acetone)並靜置 12 小時待蛋白質沉降，經離心(13000 rpm)取下沉澱的蛋白質後再取適量的 6M 尿素樣本溶液(6M urea/2M Thiourea/0.5% TritonX-100/1% DTT)震盪回溶，此方式可成功將蛋白質有效濃縮並去除透明膠帶之膠質。將蛋白質回溶液進行蛋白質定量，回溶液樣本冰凍於-80°C 以備用。

#### 4 蛋白質羰基的偵測

蛋白質羰基可視為蛋白質氧化的指標，亦可被偵測係依據 Levine 等人(1994)及 Shacter 等人(1994)所描述的方法，即前述經 6M 尿素樣本溶液回溶之蛋白質樣本取 10  $\mu$ L 體積先與 5  $\mu$ L 含有 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)的溶液(6 % SDS/ 40 mM DNPH/ 5 % trifluoroacetic acid)於室溫下混合反應 20 分鐘，預計可將蛋白質羰基生成 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone)。隨後將反應溶液加入 15  $\mu$ L 之中和液(2 M Tris base/ 30 % glycerol)，隨後將中和的反應溶液進行 12.5 % 的 SDS-PAGE 蛋白質迷你電泳，將相同條件的電泳膠片之其中一片進行 CBR(Coomassie Brilliant Blue R-250)蛋白質染色，另一片進行西方點墨法(western blotting)免疫分析(參考 Thiele 等人(1999a)作法)，其步驟如下：將 12.5 % 的 SDS-PAGE 電泳膠片之蛋白質轉印至 PVDF(polyvinylidene difluoride)上，經明膠溶液(0.25 % gelatin/0.15M NaCl/5mM EDTA/0.05 % Tween20/50mM Tris base, pH8.0)覆蓋，隨後使用 mouse 的 anti-DNP 的一次抗體(稀釋比例為 1 : 300)結合抗原，再利用 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)的二次抗體(稀釋比例為 1 : 5000)結合一次抗體，最後進行冷光呈色反應(使用 PIERCE SuperSignal<sup>R</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate)，並利用分子顯像儀 (機型: BIO-RAD ChemiDoc XRS )進行色帶的定量分析。

#### 四、 研究結果與討論：

1. 已完成測定檀香精油之臨床抗氧化效力。結果顯示含 0.5%檀香精油之試驗配方不但沒有臨床抗氧化效力，反而增加羰基暴露的數量，代表檀香精油會促進角質蛋白的氧化(圖 1A)。



2. 我們也比較台灣黃檜精油的臨床抗氧化效力。結果顯示含 0.5%黃檜精油之試驗沒有明顯的臨床抗氧化效力，也不會會促進角質蛋白的氧化(圖 2A)。

#### 五、 結論：

- A. 含 0.5%檀香精油之試驗配方不但沒有臨床抗氧化效力，反而增加羰基暴露的數量，推測檀香精油成份中抗氧化物質含量並不多，且應富含有不飽和之雙鍵物

質，經紫外線的照射易產生過氧化自由基進一步攻擊並氧化角質蛋白。建議不宜直接接觸皮膚並暴曬陽光。

- B. 含 0.5% 黃檜精油之試驗配方沒有明顯的臨床抗氧化效力，也不會會促進角質蛋白的氧化。推測黃檜精油組成份中抗氧化物質含量並不多，且不飽和之雙鍵物質的含量也不多。此精油應可直接接觸皮膚及暴曬陽光。

## 六、參考文獻：

1. Burdock GA, Carabin IG (2008) Safety assessment of sandalwood oil (*Santalum album* L.). *Food Chem Toxicol.* 46(2):421-32
2. Dwivedi C, Zhang Y (1999) Sandalwood oil prevent skin tumour development in CD1 mice. *Eur J Cancer Prev.* 8(5):449-55.
3. Jeanmaire C, Danoux L, Pauly G (2001) Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing: an in vivo and in vitro model study. *Br J Dermatol.* 145:10-18
4. Levine R L, Williams J A, Stadtman E A, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346-357
5. Rhee GE, Shin MH, Seo Y, et al (2001) Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117:1212-1217
6. Scartezzini P, Speroni E (2000) Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol.* 71(1-2):23-43.
7. Shindo Y, Witt E, Packer L (1993) Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 100:260-265
8. Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L (1994a) Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 102:122-124
9. Shacter E, Williams J A, Lim M, Levine R L (1994) Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 17: 429-437
10. Smith M A, Perry G, Richey P L, Sayre L M, Anderson V E, Beal M F, Kowall N (1996) Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382:120-121
11. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem* 378:1247-1257
12. Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CSL, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ (2002) Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 118:618-625
13. Thiele JJ, Traber MG, Packer L (1998a) Depletion of human stratum corneum vitamin

- E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J Invest Dermatol* 110:756-761
14. Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K, Sies H (1999a) Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient in vivo. *J Invest Dermatol* 113:335-339
  15. Tanaka N, Tajima S, Ishibashi A, Uchida K, Shigematsu T (2001) Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. *Arch Dermatol Res* 293:363-367
  16. Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, et al (2001) UV-induced oxidative stress and photoaging. In: Thiele J, Elsner P, eds. *Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology, Current Problems in Dermatology*, Vol. 29. Basel: Karger. pp 83-94