

中國醫藥大學 藥學院
藥學系碩士班 碩士論文

玉蘭花、檫樹及咖啡等植物對基質金屬
蛋白酶及彈性蛋白酶作用之探討

The effect of *Michelia alba*, *Morinda citrifolia* and
Coffea arabica on MMPs and elastase

指導教授：溫國慶 教授

共同指導教授：江秀梅 助理教授

研究生：林岑蓉

Lin, Tsen-Jung

中 華 民 國 九 十 七 年 七 月

中國醫藥大學藥學院藥學系碩士班

碩士學位論文考試

玉蘭花、檫樹及咖啡等植物對基質金屬蛋白酶及彈性蛋白酶作用之探討

The effect of *Michelia alba*, *Morinda citrifolia* and *Coffea arabica* on MMPs and elastase

本論文係 林岑蓉 同學於中國醫藥大學藥學院藥學系碩士班完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

論文口試委員審定書

學位考試委員：

柯宏慧

吳台信

溫國瓊

(指導教授)

主

任：

吳台信

中華民國 97 年 7 月 25 日

目 錄

目錄	I
附圖目錄	IV
附表目錄	VI
中文摘要	VII
英文摘要	IX
第一章 緒言	1
第二章 總論	3
第一節 皮膚生理結構	3
第二節 膠原蛋白	6
第三節 基質金屬蛋白酶(MMPs)	10
第四節 光老化	13
第五節 玉蘭花、檫樹與咖啡之文獻考察	24
第三章 材料與方法	30
一、 實驗材料	30
二、 實驗方法	35
(一)咖啡、玉蘭花及檫樹之葉甲醇萃取物之製備	35
(二)明膠分解試驗	36
(三)膠原蛋白酶抑制試驗	38

(四)彈力蛋白酶抑制試驗	39
(五)細胞培養	40
(六)纖維母細胞之 UVB 照射試驗	41
(七)分離細胞內細胞質之蛋白質	42
(八)西方墨點法	43
(九)細胞毒性試驗	45
(十)皮膚一次刺激性試驗	46
(十一) 眼球刺激性試驗	47
(十二) 統計方法	47
第四章 結果	48
一、 植物萃取及水解物製備	48
二、 膠原蛋白酶活性抑制之試驗	48
三、 彈力蛋白酶抑制試驗	50
四、 抑制基質金屬蛋白酶(MMP-1, -3, -9)表現	50
五、 咖啡及玉蘭花萃取物之安全性評估	54
第五章 討論	57
第六章 結論與建議	66
第七章 參考文獻	67
圖	77

表.....94

附錄.....98



附 圖 目 錄

Fig.1 The inhibition of <i>Coffea arabica</i> , <i>Michelia alba</i> and <i>Morinda citrifolia</i> extract and their hydrolysates on collagenase activity.....	79
Fig. 2 The inhibition (%) of <i>Coffea arabica</i> extract and its hydrolysates on the activity of bacterial collagenase.....	80
Fig. 3 The inhibition (%) of <i>Michelia alba</i> extract and its hydrolysates on the activity of bacterial collagenase.....	80
Fig. 4 The inhibition (%) of <i>Michelia alba</i> extract and its hydrolysates on the activity of porcine elastase.....	81
Fig. 5 Cell viability (%) of <i>Coffea arabica</i> extract and its hydrolysates on human foreskin fibroblast.	81
Fig. 6 Cell viability (%) of <i>Michelia alba</i> extract and its hydrolysates on human foreskin fibroblast.....	82
Fig. 7 Cell viability (%) of chlorogenic acid and caffeic acid on human foreskin fibroblast.....	82
Fig. 8 Cell viability (%) of various dose UVB irradiation on human foreskin fibroblast.....	83
Fig. 9 UVB-induced expression of MMP-1, 3, 9, type I procollagen and MAP kinase.	85
Fig. 10 Effect of <i>Coffea arabica</i> extract on the UVB-induced expression of MMP-1, 3 and 9 and type I procollagen in human fibroblast.	86
Fig. 11 Effect of <i>Coffea arabica</i> extract on the UVB-induced expression of MAP kinases in human fibroblast.	87
Fig. 12 Effect of caffeic acid and chlorogenic acid on the UVB-induced expression of MMP-1, 3, 9 and type I procollagen in human fibroblast.	88
Fig. 13 Effect of <i>Michelia alba</i> extract on the UVB-induced expression of MMP-1, 3, 9 and type I procollagen in human fibroblast.	89
Fig. 14 Effect of <i>Michelia alba</i> extract on the UVB-induced expression of MAP kinases in human fibroblast.	90
Fig. 15 The primary skin irritation test of <i>Coffea arabica</i> extract in the rabbit.	91

Fig. 16 The primary skin irritation test of *Michelia alba* extract in the rabbit.92

Fig. 17 The Draize eye test of *Coffea arabica* extract in the rabbit. ...93

Fig. 18 The Draize eye test of *Michelia alba* extract in the rabbit.93



附表目錄

Table 1	The inhibition rate of <i>Coffea arabica</i> and <i>Michelia alba</i> extract on bacterial collagenase by gelatin digestion assay....	94
Table 2	The inhibition rate of <i>Coffea arabica</i> , <i>Michelia alba</i> and <i>Morinda citrifolia</i> extract and their hydrolysates on bacterial collagenase by gelatin digestion assay	94
Table 3	The inhibition rate of <i>Coffea arabica</i> extract and its hydrolysates on bacterial collagenase using fluorometric assay.....	94
Table 4	The inhibition rate of <i>Michelia alba</i> extract on bacterial collagenase using fluorometric assay.....	95
Table 5	The inhibition rate of <i>Michelia alba</i> extract and its hydrolysates on porcine elastase.....	95
Table 6	The scores of primary skin irritation test of <i>Coffea arabica</i> extract at low dose (0.1 g) in the rabbit.....	95
Table 7	The scores of primary skin irritation test of <i>Coffea arabica</i> extract at high dose (0.5 g) in the rabbit.....	96
Table 8	The scores of primary skin irritation test of <i>Michelia alba</i> extract at low dose (0.1 g) in the rabbit.....	96
Table 9	The scores of primary skin irritation test of <i>Michelia alba</i> extract at high dose (0.5 g) in the rabbit.....	96
Table 10	The scores of Draize eye test of <i>Coffea arabica</i>	97
Table 11	The scores of Draize eye test of <i>Michelia alba</i>	97

中文摘要

多酚類具有許多生物活性如抗氧化，抑制 MMPs 與彈力蛋白酶活性，若能抑制彈力蛋白酶或基質金屬蛋白酶之分泌或活性，則可延緩皺紋生成。本研究針對茜草科植物咖啡(*Coffea arabica*, CA)、檄樹(*Morinda citrifolia*, MC)和木蘭科植物玉蘭花(*Michelia alba*, MA)的葉萃取物及其水解物、咖啡成分綠原酸和咖啡酸等探討其抑制 MMP 活性。上述三種植物以甲醇製備其萃取物，再以鹽酸水解製備水解物。三種植物之萃取物及其水解物先以膠原蛋白酶與彈力蛋白酶抑制實驗進行初篩。具活性者再以紫外線 B 照射纖維母細胞誘導 MMPs 產生之模式，探討對第 I 型膠原蛋白原的生成及 MMPs 之作用，進而再探討對 MAP Kinases 磷酸化的影響。並針對具活性者進行安全性評估。

CA、MA 及 MC 之甲醇萃取率分別為 10.4%、16.9%、15.0%。於明膠分解初篩試驗結果顯示：咖啡萃取物(CAE，相當於原植物 9.6 mg/mL)與玉蘭花萃取物(MAE，相當於原植物 5.9 mg/mL)及兩者的水解物(CAH, MAH 1000 μ g/mL)抑制率皆大於 90%。檄樹萃取物(MCE 相當於原植物 6.7 mg/mL)抑制率 74.3%，水解物抑制率皆低於萃取物。而咖啡酸與綠原酸均無此抑制效果。

膠原蛋白酶活性抑制試驗結果顯示：CAE 具抑制效果，且具有濃

度依存性，序列稀釋萃取物，相當於原植物濃度 0.096~4.8 mg/mL 之抑制率 84.6~100.3%。CAH 之抑制效果未優於 CAE。MAE 具抑制效果，且具有濃度依存性，序列稀釋萃取物，相當於原植物濃度 0.059~2.96 mg/mL 之抑制率 92.7~100.1%。MAH 之抑制效果未優於 MAE。彈力蛋白酶活性抑制試驗結果顯示：CAE 及 CAH 皆無抑制效果。而 MAE 與 MAH，抑制效果亦不佳。

對於 UVB 所誘導 MMP-1, -3, -9 之抑制表現試驗結果顯示，CAE 能抑制 MMP-1, -3, -9 之濃度分別為相當於原植物 0.048, 0.96, 0.48 mg/mL。MAE 能抑制 MMP-1, -3 之濃度分別為相當於原植物 0.029 及 0.059 mg/mL。咖啡酸能抑制 MMP-1, -3 的表現之濃度分別為 5 及 50 μ M。綠原酸能抑制 MMP-1, -3 表現之濃度分別為 10 及 50 μ M。CAE 能提高第 I 型膠原蛋白原生成的濃度為相當於原植物 0.096 mg/mL。MAE 無提高生成的效果。

CAE 可抑制 JNK、ERK 及 p38 磷酸化之濃度分別為相當於原植物 0.048, 0.24 及 0.048 mg/mL。MAE 可抑制 JNK 及 ERK 磷酸化之濃度分別為相當於原植物 0.029 及 0.148 mg/mL。CAE 與 MAE 於高濃度(相當於原植物 4.8 及 2.9 g/mL)無皮膚刺激性。兩者皆無眼球刺激性。此結果顯示咖啡及玉蘭花具有開發成為抗光老化化妝品之潛力。

The effect of *Coffea arabica*, *Morinda citrifolia* and
Michelia alba on MMPs and elastase

Abstract

Polyphenols are a group of compounds possessing a variety of biological activities including anti-oxidant, inhibition of MMP-1 and elastase. The inhibition of elastase and MMPs in the skin would slow down the process of aging. In this study, *Coffea arabica* (CA), *Morinda citrifolia* (MC) and *Michelia alba* (MA) extracts and their hydrolysates, and active constituents of CA, chlorogenic acid and caffeic acid, had been selected to screen for MMPs inhibition. The plants were extracted with methanol and the extracts were hydrolyzed with different concentration of hydrochloric acid. The chlorogenic acid, caffeic acid, the various concentration of extracts and its hydrolysates were subject the inhibition tests to MMP-1 and elastase. The fibroblasts were used for the collagen synthesis promotion, MMPs inhibition and MAP Kinases phosphorylation inhibition tests on plants extracts. The active ones were process to safety assessment.

The methanolic extraction yield of CA, MA and MC were 10.4%, 16.9% and 15%, respectively. In gelatin digestion test, the inhibition effects of CAE (equal to 9.6 mg dried leaves/mL), MAE (equal to 9 mg dried leaves/mL) and their hydrolysates (1000 µg/mL CAH and MAH) were more than 90%, in MCE (equal to 6.7 mg dried leaves/mL) was 74.3%. However, chlorogenic acid and caffeic acid show no effect on gelatin digestion.

The results indicated that CAE would inhibit collagenase activity

and present dose dependent effects. The inhibition results were in range of 84.6%~100.3% at the concentrations of 0.096~4.8 mg/mL (dried leaves), respectively. The collagenase inhibition of CAE was superior to CAH. MAE would inhibit collagenase activity and present dose dependent effects. The inhibition results were in range of 92.7%~100.1% at the concentrations of 0.059~2.96 mg/mL (dried leaves), respectively. The effects of MAE on collagenase inhibition were better than MAH, moreover, CAE, CAH, MAE and MAH had no significantly inhibition results on elastase activity.

CAE would inhibit MMP-1, -3 and -9 at concentration of 0.048, 0.096 and 0.48 mg/mL (dried leaves) and MAE would inhibit MMP-1 and -3 at 0.029 and 0.059 mg/mL (dried leaves). Caffeic acid would suppress MMP-1 and -3 expressions at 5 and 50 μ M, moreover, that of chlorogenic acid were 10 and 50 μ M. In addition, CAE would elevate type I collagen synthesis at 0.096 mg/mL (dried leaves), but not MAE.

In MAP Kinases inhibition, the results indicated that CAE would inhibit the phosphorylation of JNK, ERK and p38 at the concentrations of 0.048, 0.24 and 0.048 mg/mL (dried leaves) and MAE would inhibit JNK and ERK phosphorylation at 0.029 and 0.148 mg/mL. In safety assessment, CAE and MAE did not present toxicity at higher concentrations (equal to 4.8 and 2.9 mg dried leaves/mL) on the skin and eye irritation test.

The results show that *Coffea arabica* and *Michelia alba* could become the promising anti-photoaging material of cosmetics through this investigation.

第一章 緒言

皮膚是保護身體的第一道防線，外在環境因素如紫外線，對於皮膚老化有促進的作用。隨著年紀的增長，皮膚皺紋、鬆弛及膚色黯沉等老化的徵象一一出現，越來越多人嘗試逆轉歲月留在皮膚上的痕跡。

老化原因分為內因性與外因性，內因性是指身體自然的老化過程，而外因性老化則是因為外在環境因素所造成的老化。對於皮膚而言，造成損害最嚴重、加速皮膚老化的最主要因素就是紫外線暴露。紫外線所造成的老化現象稱之為光老化，光老化會造成真皮層之基質金屬蛋白酶量及其活性增加。基質金屬蛋白酶會分解細胞外基質，例如膠原蛋白，皮膚少了膠原蛋白的支撐，外觀會變得鬆弛、彈性降低，而且角質層過度增生，皮膚變得黯沉(Oba and Edwards, 2006; Pillai et al., 2005; Uitto, 2008)。

因為美容醫學與化妝品工業的發展，人們對於皮膚的生理構造、恆定性與老化的過程機轉有了更深入的了解。現有市售的抗皺產品有效成分多為維他命 A 酸及其衍生物(Stefanaki et al., 2005)、果酸、維他命 C、維他命 E 及其衍生物或具抗氧化作用的化合物(Burke, 2007; Colven and Pinnell, 1996; Glaser, 2004; Luo et al., 2007; Torras, 1996)。A 酸與果酸有刺激性，維他命 C 則不穩定，因此希望能在天然物中尋求

經濟，有效、安定性更佳、安全的成分。有許多研究顯示，多酚類成分如綠茶及其主成分 EGCG (Bae et al., 2008; Katiyar, 2003; Yusuf et al., 2007)、石榴萃取物(Syed et al., 2006; Zaid et al., 2007)、白藜蘆醇(Baxter, 2008)等皆具有抗老化的效果。

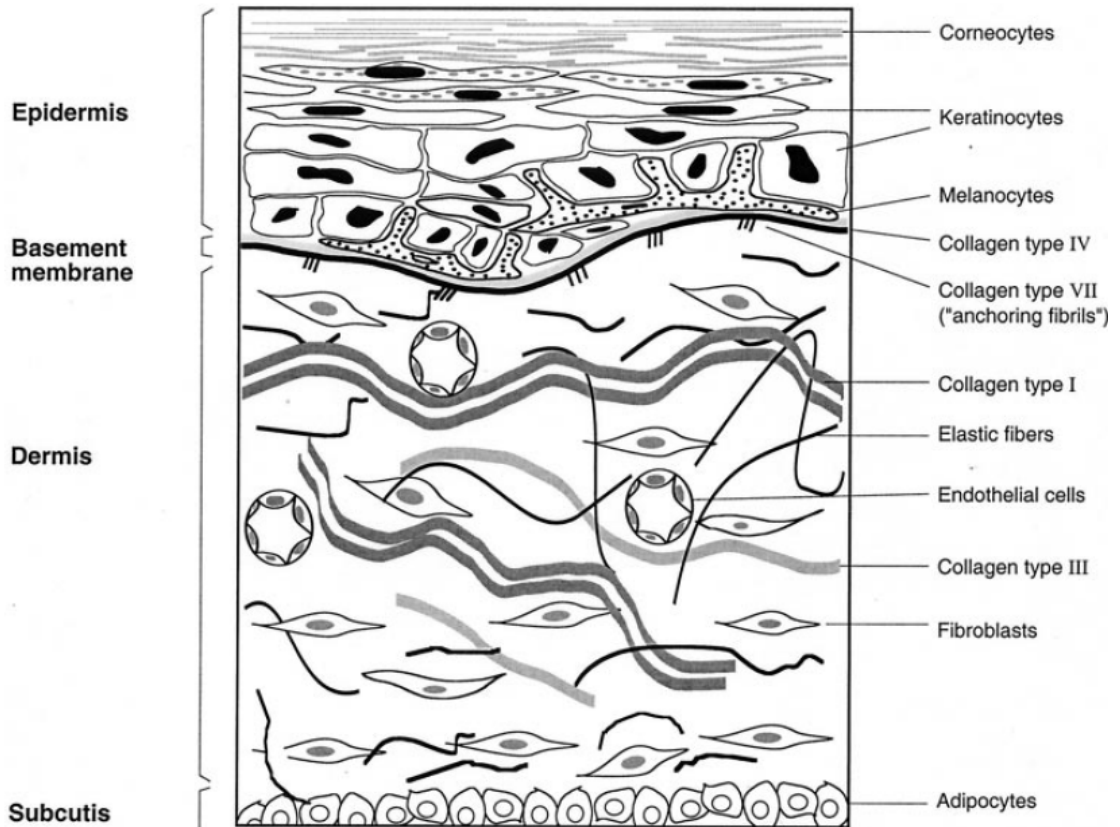
茜草科植物如檉樹(*Morinda citrifolia*)葉含 flavonol glycosides(Sang et al., 2001a)，阿拉比卡咖啡(*Coffea arabica*)含 chlorogenic acid、caffeic acid 及 catechin 等多酚類成分(Ramirez-Coronel et al., 2004; Zhao et al., 2008)，因而具抗老化的潛力。另外木蘭科植物和厚朴亦有研究指出具有抗光老化活性(Tanaka et al., 2007)，屬於此科植物之玉蘭花亦值得研究探討。

曾有文獻報導苷元之生理活性較配醣體佳(Kim et al., 2004a)而苷元較配醣體更具脂溶性易吸收，因此本研究針對咖啡、檉樹、玉蘭花等植物的葉子萃取物及其水解物對基質金屬蛋白酶之影響進行探討。先以細菌膠原蛋白酶進行明膠分解試驗篩選，確定具抑制作用後，再進一步探討對於纖維母細胞之基質金屬蛋白酶及膠原蛋白生成影響及調控機制，開發具對抗光老化作用之成分。

第二章 總論

第一節 皮膚生理結構

皮膚包覆身體與外在環境相界，可以抵禦外來各種刺激、傷害，達到保護人體的效果。其面積約 1.6 平方公尺，是身體很重要的器官。皮膚的厚度隨著年齡、性別及部位而有所變化，由外而內可以分成表皮(epidermis)、真皮(dermis)和皮下組織(subcutis)三層(如下圖)。茲將皮膚各層之構造及生理功能列述於下。



圖一 Scheme of different layers of the skin.

(Scharffetter-Kochanek et al., 2000)

(一) 表皮層

表皮位於身體最表淺處，由細胞相互緊密堆積而成。於身體各部位的厚薄度不一，以手掌及腳掌最厚，眼皮最薄，且個體間不盡相同。表皮層可由內而外再細分為四層：基底層(basal layer)、有棘層(spinous layer)、顆粒層(granular layer)、角質層(stratum corneum)；手掌及腳掌在顆粒層與角質層間還有一層透明層(lucid layer)，表皮細胞大多是角質細胞(keratinocytes)，角質細胞堆積最後會形成角質層。基底層細胞與表皮新陳代謝有關，基底層的細胞會持續地分裂，並且慢慢地向表皮上層移動，而漸漸形成棘狀細胞，形成有棘層。有棘層之細胞間有狹小間隙隔開，淋巴液可於其間隙間流動，促使營養物質擴散。有棘層是表皮中最厚的，其成熟後，形成顆粒層，顆粒層細胞呈扁平狀，平鋪排列二至三層，其細胞內有 keratohyalin 顆粒存在。表皮最外層為角質層，角質層細胞有別於其他細胞，細胞核及分散於細胞質中之胞器皆消失，多數只有角質素(keratin) (光井武夫, 2004; 張新湘, 1977)。

(二) 真皮層

表皮層與真皮層間靠著基底膜(basement membrane)緊緊地連接，基底膜的厚度只有 0.1 μm 。基底膜可使表皮細胞正常增生，新陳代謝。並調控真皮及表皮細胞所產生之生理活性物質與機能。真皮平

均厚度為 1~4 mm，約佔皮膚的 90%。此層細胞較表皮少，大多是細胞外基質，並以纖維為主，包括膠原蛋白(collagen)及彈力纖維(elastic fibers)。膠原蛋白以 I 與 III 為主，主要功能為維持組織形狀，而彈力纖維則分佈於膠原蛋白中，使皮膚具有彈性。真皮層大致可分為兩層：乳頭狀真皮層(papillary dermis)，位於真皮層與表皮交界面，較薄不如表皮平坦，具有凹凸狀似乳頭狀的結構，嵌入表皮中，與表面緊密銜接。此層的纖維較細，且稀疏、多成垂直走向；網狀真皮層(reticular dermis)，位於乳頭層下方，其纖維較密且粗，呈水平走向。有許多毛細血管及神經的末梢存在乳頭層中。真皮中尚有多醣類存在，以葡萄糖胺聚醣(glucosaminoglycans)為主，主成分為醣醛酸(hyaluronic acid)與硫酸皮膚素(dermatan sulfate)。這些成分會與蛋白質結合形成蛋白聚醣(proteoglycan)，可保持大量的水分，呈膠體狀，存在於纖維間。而膠體內之水分可使血管中的養分、代謝產物及荷爾蒙擴散到組織之細胞內，並使組織柔軟富有彈性，因此細胞外基質可提高皮膚之柔軟性與張力(光井武夫, 2004; 張新湘, 1977)。

(三) 皮下組織

皮膚最內層稱之為皮下組織，主要由脂肪組織組成，並藉纖維膠原與真皮層區隔，含有神經、血管、淋巴、毛囊及汗腺等。提供保暖、儲存能量和吸收震動之功能(光井武夫, 2004; 張新湘, 1977)。

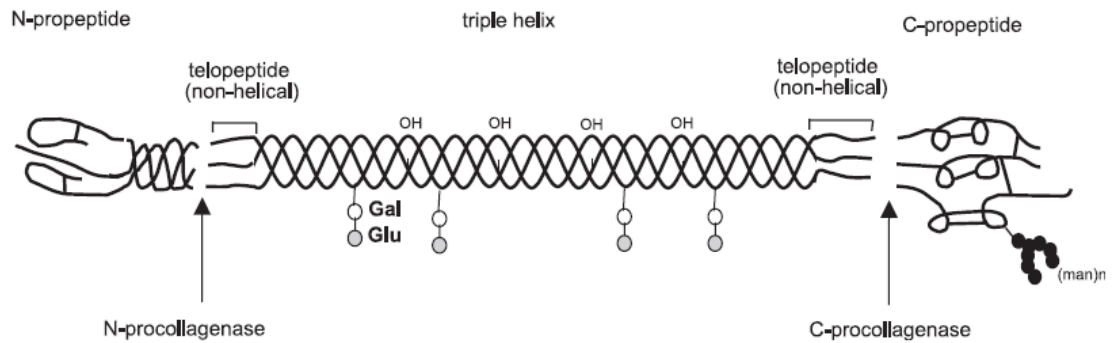
第二節 膠原蛋白

(一) 膠原蛋白生理功能

膠原蛋白(collagen)是細胞外基質含量最豐富的蛋白質，它是一群具有相似特性及結構蛋白質的總稱，目前共發現 21 種膠原蛋白。膠原蛋白是構成結締組織的主要成分，也可以在組織間隙發現其蹤跡，其能穩定組織、器官架構，並維持結構之完整性。

(二) 膠原蛋白結構

膠原蛋白是富含脯胺酸(proline)的三胜肽，由 Gly-X-Y 的重複片斷所構成的三條螺旋狀聚胜肽鏈纏繞形成的螺旋狀纖維蛋白，三條 α -chains 以左旋方向纏繞，每 18 個胺基酸形成一個圈，以一個基團與其他分子連結形成圍繞中心的右旋三股螺旋。形成此結構乃因膠原蛋白主要的胺基酸為甘胺酸，是最小的胺基酸，形成之立體障礙最小，可使中心緊密有序排列。而 Gly-X-Y 的其他基團則位於螺旋外部，X、Y 大多為脯胺酸或羥脯胺酸。依膠原蛋白的類型不同，胺基酸會由酶做轉譯後修飾，特別是脯胺酸與離胺酸(lysine)的基團，接上羥基，4-羥基脯胺酸而能形成分子內氫鍵，穩定三股螺旋結構，三股螺旋之長度視膠原蛋白類型不同長短及功能而不相同。

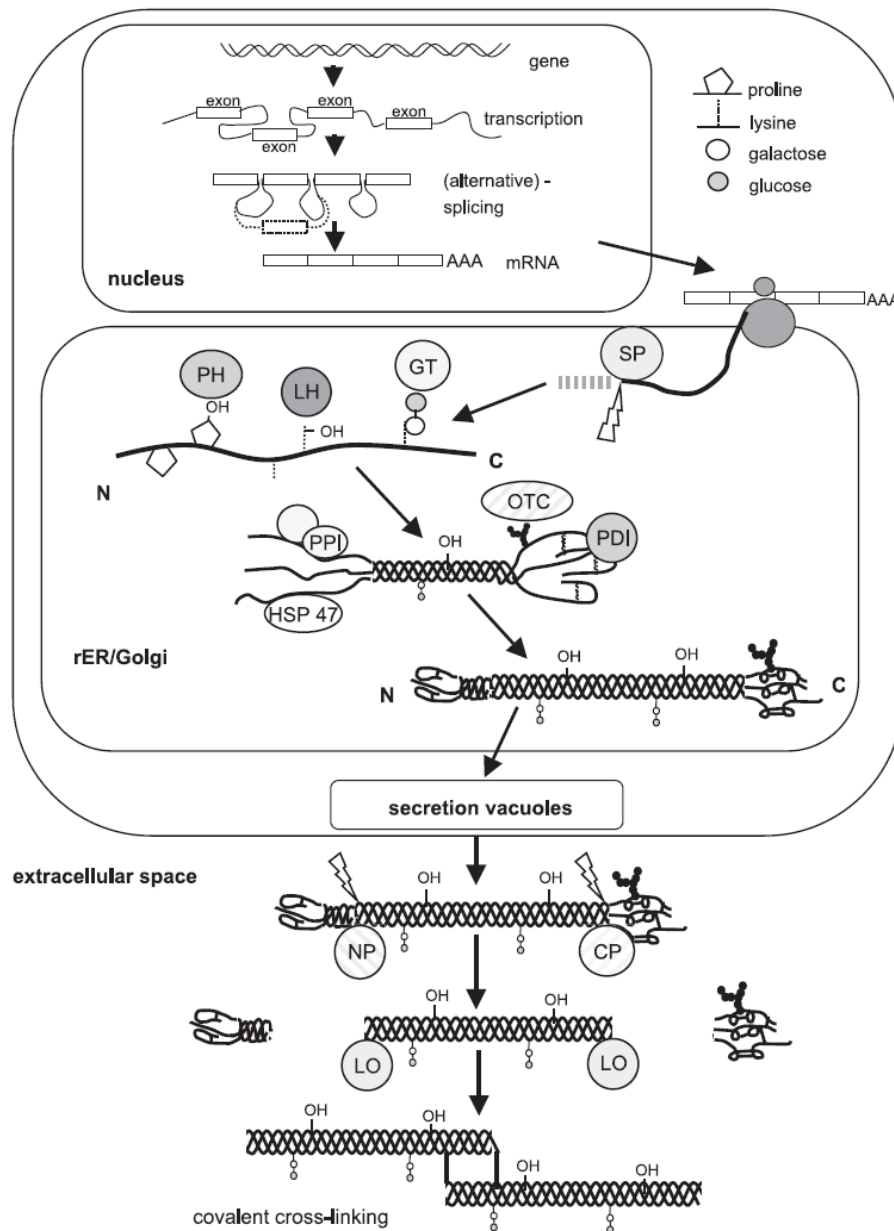


圖二 Molecular structure of type I collagen with the various subdomains as well as the cleavage sites for N- and C-procollagenases. (Gelse et al., 2003)

(三) 第 I 型膠原蛋白

(Gly-X-Y)_n 控制第 I 型膠原蛋白 domain 的長度(300 nm)由 1000 個胺基酸所組成，如圖二。第 I 型膠原蛋白佔骨骼之 90 %，也是肌腱、皮膚、韌帶、角膜和組織間隙主要的膠原蛋白類型。第 I 型膠原蛋白是由三條 α -chains 所組成，兩條 $\alpha 1(I)$ chain，一條 $\alpha 2(I)$ chain，其基因分別為 COL1A1 與 COL1A2，位於第 17 號染色體(17q21.31)及第 7 號染色體(7q22.1)。主要分佈於皮膚真皮層，支撐皮膚的結構，因而膠原蛋白於維持皮膚外觀扮演重要角色，少了膠原蛋白的支撐，真皮間隙產生空洞，皮膚會變得鬆垮、無彈性，皺紋隨之出現，老化的徵象一一出現。膠原蛋白從轉錄、轉譯、轉譯後修飾及分泌至細胞外的過程：膠原蛋白的基因序列經剪接體(spliceosome)將序列中內含子(intron)剪切後，外顯子(exon)黏合形成 mRNA，並將 mRNA 輸出至細胞質的粗糙內質網與高基氏體進行轉譯及轉譯後修飾。經核糖體

轉譯形成胜肽後，並接上訊號胜肽酶(signal peptidase)，進行一連串的后修飾作用。藉 hydroxylysyl galactosyltransferase 及 galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase 將半乳糖與葡萄糖接於胜肽上，lysyl hydroxylase 於離胺酸(lysine)接上 - OH 基，prolyl hydroxylase 於脯胺酸(proline)接上 - OH 基。纏繞形成膠原纖維後，oligosaccharyl transferase complex 於 C 端接上寡糖，protein disulfide isomerase 形成雙硫鍵，peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase 改變蛋白質結構，以 heat shock protein 47 幫助褶疊，傳送分泌至細胞外。再分別以膠原蛋白原 N-proteinase、膠原蛋白原 C-proteinase 切除 N、C 端之胜肽。經 lysyl oxidase 於纖維接上 - OH 基，使膠原纖維共價連結形成膠原蛋白(Gelse et al., 2003)。



圖三 Schematic representation of collagen synthesis starting from the nuclear transcription of the collagen genes, mRNA processing, ribosomal protein synthesis (translation) and post-translational modifications, secretion and the final steps of fibril formation.

(SP: signal peptidase; GT: hydroxylysyl galactosyltransferase and galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase; LH: lysyl hydroxylase; PH: prolyl hydroxylase; OTC: oligosaccharyl transferase complex; PDI: protein disulphide isomerase; PPI: peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase; NP: procollagen N-proteinase; CP: procollagen C-proteinase; LO: lysyl oxidase; HSP47: heat shock protein 47, colligin1). (Gelse et al., 2003)

第三節 基質金屬蛋白酶 (MMPs) (Wong et al., 2002)

(一) 基質金屬蛋白酶生理功能

基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases ; MMPs)可分解細胞外基質及基底膜蛋白質，這些酶與胚胎發育、生長、傷口癒合的過程皆息息相關。若MMPs活性長期失調會造成疾病的產生，不正常的細胞外蛋白質水解，例如：關節炎(arthritis)、腫瘤形成(tumorigenesis)、組織潰瘍(tissue ulceration)及動脈粥狀硬化(atherosclerosis)。

基質金屬蛋白酶於正常組織分泌量很低，發炎反應將促使其蛋白表現量增加及活性提高，此亦因細胞激素、賀爾蒙、生長因子與致癌基因的刺激而發生。MMPs活性在身體裡高度抑制避免失去控制，而過度破壞細胞外基質。而調控的機制可於轉譯的層次或者是轉譯後的修飾，抑制酶的活化與以TIMPs抑制活化的MMPs。

(二) 基質金屬蛋白酶分類

基質金屬蛋白酶至目前了解約近三十個成員，如表一，可以依據結構的特色分為五大類：膠原蛋白酶(collagenases)、明膠酶(gelatinases)、基質溶素(stromelysins)、膜型基質金屬蛋白酶(membrane-type MMPs ; MT-MMPs)、matrilysins以及其他。主要可以歸納出幾項特徵：

1. MMPs以zymogen(latent form)分泌。

2. MMPs皆能分解細胞外基質。
3. 酶的催化機轉為活化位的 Zn^{2+}/Cu^{2+}
4. MMPs的活性可以被tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs)所抑制。
5. cDNA的序列皆與膠原蛋白酶相似。

膠原蛋白酶專司分解結締組織中的膠原蛋白，主要是已被鬆開的螺旋膠原纖維及第I、II和III型的膠原蛋白。形成變性的明膠，使其易受其他金屬蛋白酶和蛋白水解酶的分解。明膠酶亦稱為第IV型的膠原蛋白酶，可分解基底膜及變性的膠原蛋白。而Stromelysins的受質較多樣，能夠分解細胞外基質，例如fibronectin，proteoglycans，laminin和基底膜的IV型膠原蛋白。

MT-MMPs的結構不同於其他的基質金屬蛋白酶，其具有穿膜的domain，靠細胞質一端有25個胺基酸所形成的錨，使酶能固定於細胞外膜上。膜型MMPs有一個獨特的辨識區域，即是位於propeptide區之furin(與高基氏體有關的蛋白水解酶)，此與其細胞內活性有關。

表一 The matrix metalloproteinase (MMP) family
(Raffetto and Khalil, 2008)

MMPs	Other names	Molecular weight (kDa)		Tissue distribution/ disease condition	Collagen substrate	Other substrates
		Proform	Active			
Vascular						
Collagenases						
MMP-1	Collagenase-1	55	45	Fibroblast, interstitial, tissue collagenase	I, II, III, VII, VII, X	Aggrecan, gelatin, MMP-2, -9
MMP-8	Collagenase-2	75	58	Neutrophil, or PMNL collagenase	I, II, III, V, VII, VIII, X	Aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin
MMP-13	Collagenase-3	60	48	SMC, varicose veins, preeclampsia, breast cancer	I, II, III, IV	Aggrecan, gelatin
Gelatinases						
MMP-2	Gelatinase-A	72	66	Aortic aneurysm, varicose veins	I, II, III, IV, V, VII, X, XI	Aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, proteoglycan, MMP-9, -13
MMP-9	Gelatinase-B	92	86	Aortic aneurysm, varicose veins	IV, V, VII, X, XIV	Aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin
Stromelysins						
MMP-3	Stromelysin-1	57	45	SMC, synovial fibroblasts, CAD, HTN, tumor invasion	II, III, IV, IX, X, XI	Aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, proteoglycan, MMP-7, -8, -13
MMP-10	Stromelysin-2	57	44	Uterine, preeclampsia, arthritis, atherosclerosis, carcinoma cells	III, IV, V	Aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, MMP-1, -8
Matrilysins						
MMP-7	Matrilysin-1	28	19	Uterine	IV, X	Aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, proteoglycan, MMP-1, -2, -9
Membrane-type MMPs						
MMP-14	MT1-MMP	66	56	Human fibroblasts, SMC, VSMC, uterine, angiogenesis	I, II, III	Aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, MMP-2, -13
MMP-15	MT2-MMP	72	50	Fibroblasts, leukocytes, preeclampsia, cancer (breast, prostate, colon)	I	Fibronectin, gelatin, laminin, MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	64	52	Leukocytes, angiogenesis human cancer	I	MMP-2
MMP-24	MT5-MMP	57	53	Leukocytes, brain tumor, astrocytoma/glioblastoma,	None identified	Fibrin, gelatin
Other MMPs						
MMP-11	Stromelysin-3	51	44	Uterine, angiogenesis, hepatocellular carcinoma	Does not cleave	Aggrecan, fibronectin, laminin
MMP-12	Metalloelastase	54	45 and 22	Macrophage	IV	Elastin, fibronectin, gelatin, laminin
MMP-21	XMMP	62	49	Human placenta		α 1-Anti-trypsin
Non-vascular						
MMP-18	Xenopus collagenase-4	70	53	Xenopus (amphibian)	I	Gelatin
MMP-26	Matrilysin-2, endometase	28	19	Human endometrial tumor	IV	Gelatin, fibronectin, gelatin
MMP-17	MT4-MMP	57	53	Brain specific cerebellum, breast cancer,	None identified	Fibrin, gelatin
MMP-25	MT6-MMP, leukolysin	34	28	Leukocytes, anaplastic astrocytomas, glioblastomas	IV	Gelatin, fibronectin, laminin, fibrin
MMP-19	RASI-1	54	45	Liver	IV	Fibronectin, aggrecan, COMP, laminin, gelatin
MMP-20	Enamelysin	54	22	Tooth enamel	V	Aggrecan, amelogenin, COMP
MMP-22	CMMP	51		Chicken fibroblasts	Unknown	Gelatin
MMP-23	Cysteine array MMP	28	19	Reproductive tissues	Unknown	Unknown
MMP-28	Epilysin	56	45	Skin keratinocytes	Unknown	Unknown

CAD, coronary artery disease; HTN, hypertension; PMNL, polymorphonuclear leukocytes; SMC, smooth muscle cells; VSMC, vascular smooth muscle cells.

第四節 光老化

皮膚的老化主要可分為兩個原因：內因性老化(intrinsic aging)與外因性老化(extrinsic aging)，而外因性老化受外在環境，如紫外線、汙染物、自由基等影響，最主要為紫外線所引起的光老化(photoaging)。光老化是指慢性光損害的皮膚，長期暴露於陽光下而造成皮膚光化。內因性老化皮膚的特色為平滑、乾燥、暗沉並伴隨著細紋的產生。而光老化的皮膚則是有嚴重的皺紋和色素沉澱，例如：曬斑和臉部、頸部與手臂斑點狀的色素沉著(Svobodova et al., 2006)。

轉譯因子NF- κ B會因為UV照射而活化，NF- κ B會刺激發炎反應的細胞激素產生，放大皮膚對於UV的反應，吸引已形成嗜中性白血球膠原蛋白酶(MMP-8)的嗜中性白血球。NF- κ B也能促進MMP-9的表現。只要很小的UV劑量，低於造成紅斑的劑量，就可使MMP的表現增加。隨著UV照射劑量的增加，MMPs的表現量也會隨之增加。

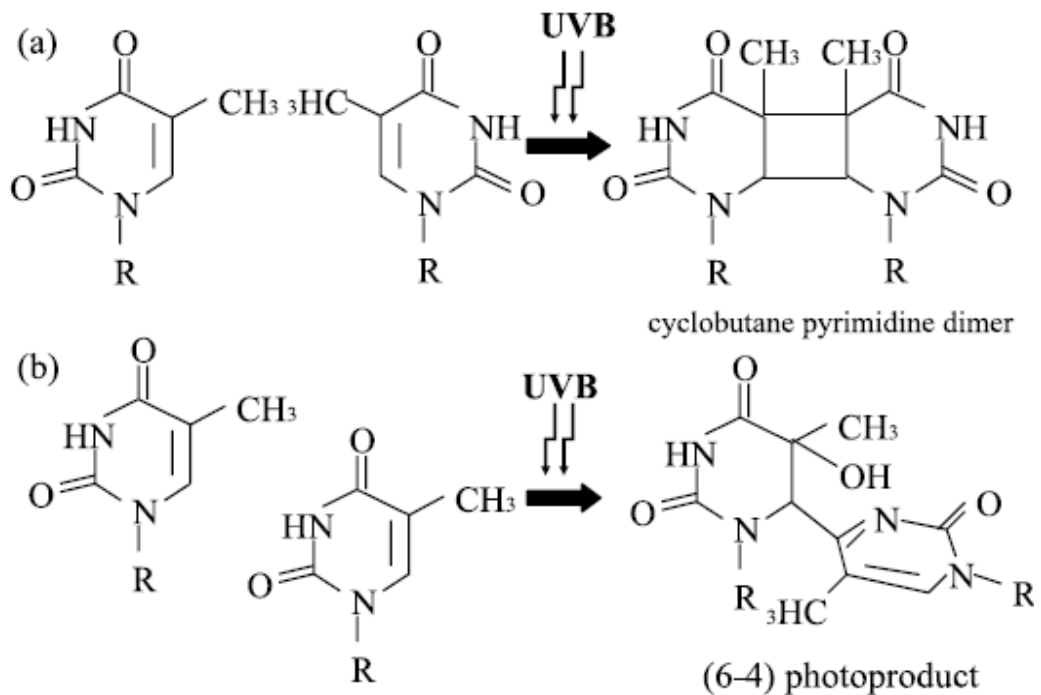
經人體試驗證實，光老化的皮膚膠原蛋白產生量會減少，照射UV後膠原蛋白原產生量降低，於二十四小時後最為明顯(Chung, 2003; Fisher et al., 2000; Rabe et al., 2006; Rittie and Fisher, 2002)。

(一) UV對於DNA所造成的傷害

皮膚經UV照射會產生直接或是間接的影響，大約有50%UV所造成的傷害乃因形成自由基，自由基會直接造成細胞的傷害。而光致癌

性(photocarcinogenesis)及UV照射所引起的DNA分子改變，已被廣泛研究。皮膚組織中黑色素吸收能量達到激發態(excited states)，產生化學變化，將能量轉移至其他分子，或以光或熱的方式散發多餘的能量。DNA吸收UV的波長範圍為245 nm至290 nm，因此UVB為誘導DNA突變的最主要原因。UVB對DNA所造成的突變除了化學變化之外，尚有形成環丁烷嘧啶二聚體(cyclobutane pyrimidine dimers)與Pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts(如圖四)，會使DNA的螺旋結構產生扭曲變形 (Ichihashi et al., 2003; Moriwaki and Takahashi, 2008)。

皮膚經UVA照射間接產生活性氧，包括超氧陰離子(superoxide anion)、過氧化物(peroxide)和單態氧(singlet oxygen)。活性氧不僅會損害DNA也會傷害組織裡之脂質與蛋白質，UVA能使*trans*-urocanic acid產生變化，使單態氧產生與DNA nicks。8-Hydroxy guanine 也是UVA藉由活性氧誘導產生。



圖四 Adjacent pyrimidine bases on the same strand pyrimidine dimer (a) or (6-4) pyrimidine-pyrimidone photoproduct (b) alter absorbing UVB light energy.(Ichihashi et al., 2003)

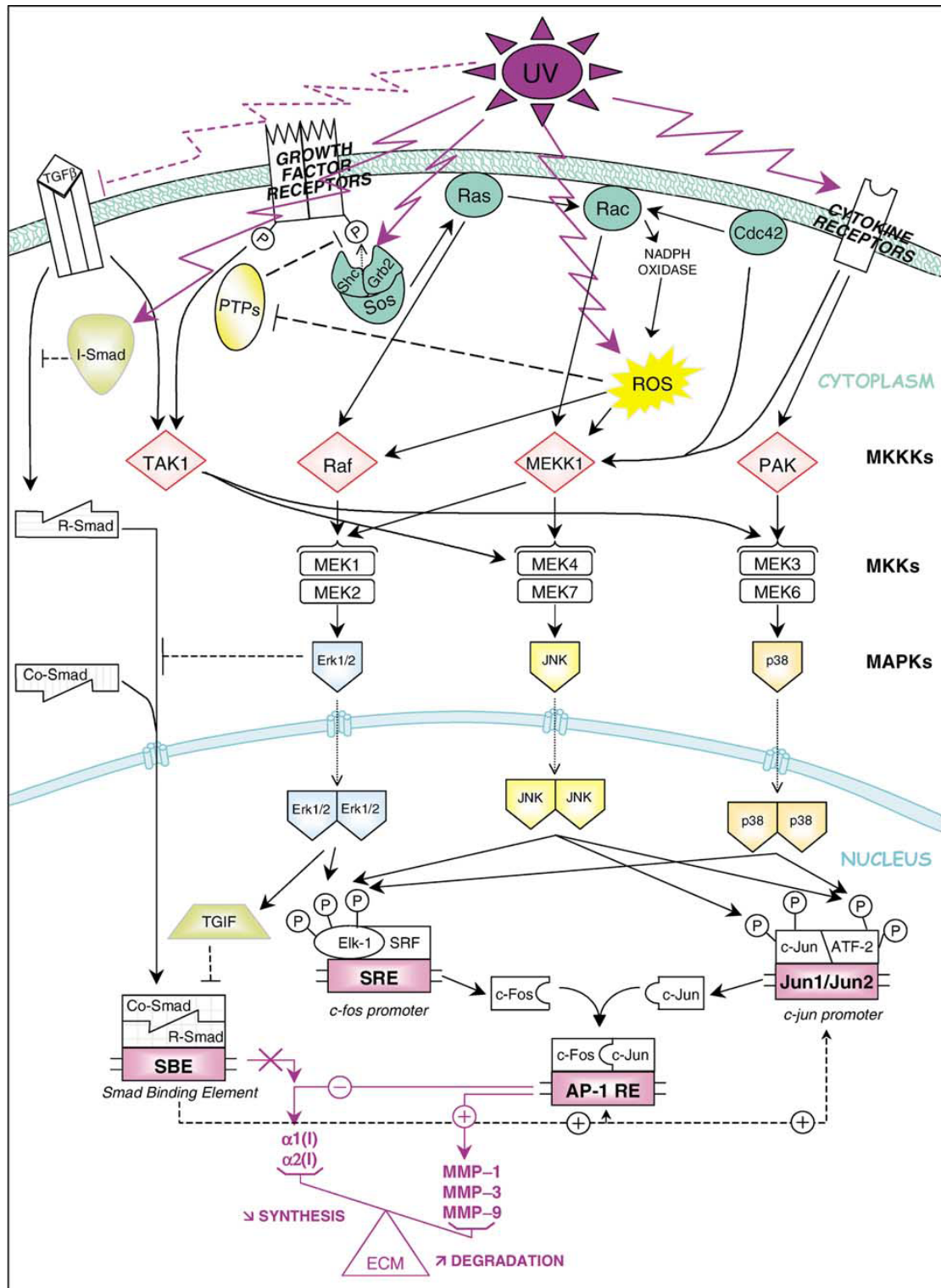
(二) UV誘導的訊號傳遞

UV照射後產生活性氧(Reactive oxygen species, ROS)，會引發下游一連串的訊號傳遞途徑產生。暴露UV後15分鐘，角質細胞、纖維母細胞的表皮生長因子、IL-1、TNF- α 的受器會活化，而影響下游的訊號傳遞。促使核轉譯因子AP-1(activator protein 1)被活化，進而調控MMPs的表現。

活化細胞表面細胞激素與生長因子受器將產生調節下游訊號傳

遞的蛋白質，匯集這些訊號傳遞將會活化small GTP-binding protein例如: Ras、Rac與Cdc42，這三個small GTP-binding protein是ERK、JNK與p38等mitogen activated protein kinase (MAP Kinase)的上游調控因子。在人體皮膚中經UV照射後的30分鐘內，Ras就會被活化。與GTP結合後的Ras會吸引Raf-1 kinase到細胞膜，Raf-1因而被活化，而Raf-1是ERK MAP Kinase的上游活化因子。另一個small GTP-binding protein，Rac-1，是由生長因子、細胞激素所活化，同樣地，在人體皮膚裡照射UV後能夠快速的被活化。皮膚經UV照射15分鐘後會誘導NADPH oxidase活性，因而提高超氧陰離子的活性。活性氧產生增加時可能擴大訊號傳遞而活化MAP Kinases。Rac-1和Cdc42已被證實能與調節MEKK(JNK、ERK和p38上游活化因子)的序列結合如圖四(Jinlian et al., 2007; Rittie and Fisher, 2002)。

UV照射後細胞內神經醯胺(ceramide)含量增加，能活化MAPK pathway。神經醯胺是由神經鞘磷脂酵素(sphingomyelinases, SMases)分解鞘磷脂(sphingomelin)所產生，能快速活化Raf-1、MEKK1和Erk。由於神經醯胺與活性氧的量同時提高，推測UV誘導神經醯胺的產生與活性氧產生的提高有相關性。而且UV所誘導神經醯胺的產生會被自由基清除劑如維生素E所抑制。



圖五 UV-induced signaling cascades: UV activation of growth factor or cytokine receptors leads to the activation of MAP Kinase.(Rittie and Fisher, 2002)

1. UV誘導AP-1活化

MAP kinase pathways最主要的效應產生於轉錄因子AP-1。AP-1是由Jun和Fos家族蛋白(c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra1和Fra2)所組成(Karin et al., 1997),以異雙元體(heterodimer)最為典型,由c-Jun與c-Fos所組成,縱使組合的變化依據啟動子前後的序列而定,但c-Jun/c-Fos具有最高的轉錄活性。與培養的細胞相比,人類皮膚會持續高度表現c-Fos,且不受UV的影響。當皮膚未照射UV時,AP-1轉錄因子通常由c-Fos和JunD所組成。在許多生長因子、細胞激素以及外在環境刺激下(例如:UV)能誘導c-Fos和c-Jun基因的轉錄。MAPK pathways可以直接或間接地促進c-Fos和c-Jun基因的轉錄,除此之外,JNK及p38可透過磷酸化的方式活化與穩定c-Jun。人體皮膚中,UV所誘導c-Jun的mRNA及蛋白質量的增加可在30分鐘及1小時分別被偵測出,c-Jun蛋白質的量可以持續維持24小時,其能有效與JunD競爭形成具有活性的AP-1(c-Jun:c-Fos)並遍及表皮與真皮細胞。

2. AP-1調控MMPs與膠原蛋白生成

AP-1可以調控許多基因的表現,而這些基因可進一步調節細胞生長與分化。有些MMPs家族成員也受到AP-1的調控,MMPs是依賴鋅(zinc-dependent)的蛋白內切酶,可以有效降解所有的細胞外基質蛋白,以不活化態(zymogens)分泌。經過酵素切斷前結構域(prodomain)

方能成為活化態，而MMPs的活化可藉由三方面來調控：MMPs的合成、zymogens的活化和抑制水解活性。MMPs活性可藉由內生性的蛋白抑制劑TIMPs所抑制。而這些MMPs中可被AP-1所活化的包含：MMP-1、MMP-9和MMP-3。在人體試驗中，皮膚經UV照射會誘發MMP-1、MMP-3和MMP-9基因的表現(Fisher et al., 1996; Fisher et al., 1997)。UV照射後的8小時可以觀察到MMP-1、MMP-3和MMP-9基因的轉錄增加，這三個MMPs的基因表達增加進一步合成許多具有酵素活性的MMPs(Fisher et al., 1998)。UV造成皮膚的傷害會誘發部分MMPs的表現，而MMP-1、MMP-3和MMP-9具降解膠原蛋白纖維的能力。人體試驗中觀察得知，UV照射後24小時內，可以發現膠原蛋白的降解量增加(Fisher et al., 1997)。因此，皮膚暴露於UV下，將導致AP-1轉錄因子增加，而提高MMPs的濃度，造成細胞外基質的降解。

UV不僅增加膠原蛋白降解速度，也會減少第I型膠原蛋白的生成，形成膠原纖維的量也會降低(Fisher et al., 2000)。活性氧能直接攻擊組織使其氧化，使膠原蛋白降解(Dong et al., 2008)，干擾膠原蛋白基因表現的訊號傳遞。在體外實驗(Bizot-Foulon et al., 1995; Fisher et al., 1997)與人體試驗(Bizot-Foulon et al., 1995; Fisher et al., 1996)中發現，纖維母細胞照射UV後，細胞外基質的降解會增加。第I型的膠原蛋白的減少部分是由於UV所誘發之AP-1造成的，AP-1可降低

COL1A1 and COL1A2的基因表現(Bornstein, 1996; Chung et al., 1996)。UV照射後的8個小時內，第I型膠原蛋白的表現會降低。在接下來的24小時內，可以觀察到上層的真皮中第I型膠原蛋白原減少(Chung, 2003; Fisher et al., 2000; Rabe et al., 2006)。

3. UV削弱TGF- β 訊號傳遞

TGF- β 能調節多種細胞功能，包括分化、增生與誘發細胞外基質蛋白的生成，在皮膚TGF- β 會抑制表皮角質細胞生長和促進真皮纖維母細胞生長，並誘發產生細胞外基質膠原蛋白和彈力蛋白，抑制MMP-1和MMP-3。TGF- β 的受器遍及表皮與真皮。TGF- β 是膠原蛋白合成過程中很重要的啟動子(promoter)，其中最占優勢為TGF- β 2群組。TGF- β 的作用是經由與細胞表面受器複合體結合，複合體含3種蛋白：Type I、II、III (T β RI、T β RII、T β RIII)，TGF- β 的接合是與兩個T β RI及兩個T β RII的複合體結合，T β RII磷酸化T β RI，T β RI又磷酸化receptor-activated Smad protein (R-Smad) -Smad2和Smad3形成雜聚體並與Smad4 (co-Smad) 結合形成聚合體，此聚合體進入細胞核後調節標的基因的轉錄。Inhibitory Smads (I-Smad)，Smad6和Smad7能夠阻斷R-Smad磷酸化，因此影響TGF- β 的訊號傳遞(Gambichler et al., 2007)。經UV照射後TGF- β 2的蛋白表現量降低和增加Smad7的表現，造成第I型膠原蛋白減少，能夠藉由調控AP-1與TGF- β 來調節UV

造成的膠原蛋白合成降低。

CCN family是 cystein-rich proteins，其中的兩類connective tissue growth factor (CTGF) 和Cyr61，可以調控TGF- β 所誘發的膠原蛋白原產生。TGF- β 藉由Smad這條路徑來刺激CTGF基因表達。以CTGF注射老鼠皮膚或加至培養的纖維母細胞中，可以刺激第I型膠原蛋白原的產生。也有文獻指出，利用anti-CTGF的抗體及RNAi的方式可以抑制由TGF- β 所誘導的第I型膠原蛋白原的產生(Duncan et al., 1999; Kothapalli et al., 1997)。相反地，在培養的纖維母細胞中加入Cyr61則可抑制膠原蛋白的產生，當外加TGF- β 時可以克服此現象。CTGF和Cyr61於人體皮膚的表皮及真皮中或是培養的角質細胞、纖維母細胞中皆能持續表現。

UV射線會藉由減少T β RII的表現及增加Smad7的表現來削弱TGF- β 的訊號傳遞，其中T β RII的減少所產生的影響較大，如此TGF- β /Smad的訊號傳遞在一開始的步驟就被阻斷。在動物實驗與細胞實驗中，經UV照射會減低CTGF(Quan et al., 2002)，此作用也可能是UV所造成第I型膠原蛋白原生成減少的原因，但UV抑制CTGF基因表現的機制目前尚未明瞭。

(三) 內因性老化

1. 內因性老化皮膚膠原蛋白生成降低

內因性最主要的特徵就是第I型、第III型膠原蛋白原生成量降低，使得皮膚變薄而脆弱，其不論是蛋白質或是mRNA的量皆降低。在體外實驗中，老化的纖維母細胞TGF- β 1、T β RI、T β RII基因表現降低，而在老化的皮膚中TGF- β 1和T β RII的量減少。T β RII的減少或許也是重要的一環，因為如此會減低TGF- β 所誘發的訊號傳遞，但T β RII的減少不會影響一般蛋白質的合成，因為在老化皮膚中T β RI並未減少。除此之外，CTGF也是減少的，這樣的現象與TGF- β 誘導的反應一致，皆會降低第I型膠原蛋白原的生成。

Decorin是富含白胺酸(leucine)的蛋白聚醣(proteoglycan)。在老化的皮膚中TGF- β 會與decorin結合且被隔離。Decorin與膠原蛋白間的作用會影響到皮膚的張力強度，並調控膠原蛋白纖維形成的速率。decorin基因缺陷的老鼠，皮膚因無張力而易損傷，大量膠原蛋白纖維呈現不規則狀。與年輕老鼠相較，年長老鼠皮膚真皮中decorin的量會上升，在體外實驗中，老化的人類纖維母細胞也有相同的情形。推測老化的人類皮膚中可觀察到過量decorin，造成膠原蛋白纖維結構破壞。然而decorin的量在老化與UV照射的皮膚中是否升高，仍是未知的。

2. 內因性老化皮膚基質金屬蛋白酶表現增加

內因性的皮膚除了膠原蛋白生成減少外，MMP-1、MMP-2

(gelatinase A)、MMP-3和MMP-9的產生增加。除了MMP-2以外其餘MMPs皆由AP-1所調節，也能由UV所誘發，不論在人體試驗或是體外實驗中AP-1於老化的皮膚中的表現量皆是上升。c-Jun mRNA的表現量與年輕的皮膚比較，老化的皮膚中增加了兩倍，c-Fos的量則是不變。因此可知MMP-1、MMP-3和MMP-9的表現增加是由於AP-1的緣故，MMP-2增加的機轉則不明。

3. AP-1表現增加

AP-1是MAP kinase訊息傳遞路徑中重要的效應因子。在老化皮膚中，AP-1表現增加是由於JNK MAP kinase活性增加，JNK活性提高約3.4倍，是因酵素活性增加而非蛋白量增加(Chung et al., 2000)。JNK將c-Jun磷酸化，刺激下游基因作用及增加其半衰期。因此AP-1所調節的MMPs表現增加及c-Jun蛋白量增加可能都歸因於JNK活性增加(Chung et al., 2000)。與光老化皮膚不同的是Erk於自然老化皮膚的活性是減少的，而蛋白質量未改變，推測其原因是上游訊號傳遞減弱。Erk是由生長因子受器所活化，訊號降低可能是反應細胞增生的減少。儘管EGF-G的表現不因老化而減少，但EGF-R-dependent的訊息傳遞將會減少(Reenstra et al., 1996)。

4. 氧化壓力提高

氧化壓力被認為是老化過程中最主要的因素，老化的自由基理論

在幾十年前被提出，老化起源於終生的累積有氧化代謝產生的自由基，細胞暴露於過量的活性氧時，造成氧化損傷(Hensley and Floyd, 2002)。皮膚雖擁有高效率的抗氧化系統，隨著年紀的增長，活性氧量提高而皮膚抗氧化能力下降(Hu et al., 2000; Kohen and Gati, 2000)。活性氧是MAP kinase傳遞路徑中必要的參與者，當MAPK kinase活化將誘導MMP表現的上游調控者AP-1表現，在老化皮膚中膠原蛋白降解增加可能是很重要的機轉(Rittie and Fisher, 2002)。

第五節 玉蘭花、檫樹與咖啡之文獻考察

(一) 玉蘭花

1. 概述

學名：*Michelia alba* DC. 白玉蘭為木蘭科之常綠喬木。樹皮灰色，嫩枝被白色毛。葉互生，柄長 1.5~2 cm，葉片大型，革質，卵狀橢圓形或長橢圓形，長 10~25 cm，寬 4~8 cm，先端長漸尖或尾狀漸尖，基部稍鈍狀尖形，全緣或微波緣，兩面光滑無毛或背被疏毛。花單生葉腋，白色，極芳香，長 3~4 cm。萼片長圓形，花瓣披針形，長 3~3.5 cm；雄蕊多數，多輪，花絲扁平。雌蕊心皮多數，每心皮具胚珠多於 2 枚，螺旋狀排列於花托柄上，子房被細毛，柱頭頭狀。果實近球形或木魚狀，由多數開裂之心皮組成，為大多數不結果。花期夏、秋間，果期秋季。分布於中國大陸浙江、福建、湖南、湖北、

廣東、廣西、四川、雲南等地。台灣於 1661 年引進，現今全境普遍栽種。白木蘭《福建藥物誌》，白蘭花(四川)，白蘭(廣州)，白緬花、緬桂花(雲南)，黃桷蘭(四川)。(李幸祥, 2007)

2. 化學成分

根及樹皮含黃心樹寧(ushiruninine)，氧化黃心樹寧(oxoushinsunine)，白蘭花鹼(michelalbine)，柳葉木蘭鹼(salicfoline)，掌葉防己鹼(palmatine)，藥根鹼(jatrooohizine)，尖刺鹼(oxyacanthine)。葉含芳樟醇(linalool)，甲基丁香油酚(methyleugenol)，苯乙醇(phenyl ethyl alcohol)。花含揮發油，有順式-氧化芳樟醇(*cis*-linalooloxide)，反式-葛縷醇(*trans*-carveol)，甲基異丁香酚(methyl-isoeugenol)，芳樟醇， β -蒎烯(β -pinene)，月桂烯(myrcene)，沉香醇(agarol)，羅勒烯(ocimene)，檸檬烯(limonene)。

(二) 咖啡

1. 概述

學名：*Coffea arabica*，茜草科多年生常綠小喬木或灌木。高約4~9 m，枝條平展。葉對生，披針形，中肋與第一側脈交叉處具凸腺，葉面具蠟質。花腋出，白色叢生。漿果簇生於側枝對生葉片間，長橢圓形，紅色或深紫色；種子卵形。臺灣零星栽培於雲林、嘉義及南投等地。(郭昭麟, 2006)

2. 化學成分(Ranheim and Halvorsen, 2005)

咖啡果實含diterpenoid alcohols類，如cafestol, kahweol。生物鹼如caffeine，及有機酸caffeic acid, chlorogenic acid。

3. 活性研究

A. 抗病毒

研磨咖啡熱水萃取物與即溶咖啡溶液皆能藉由殺病毒活性與抑制傳染性病毒子代於受感染細胞內形成達到抑制第I型單純皰疹病毒(HSV-1)增殖(Namba and Matsuse, 2002)。咖啡中主要的成分caffeine、quinic acid與chlorogenic acid，其中僅caffeine具抑制病毒增殖的作用，但不具病毒毒殺作用，推測咖啡中尚有其他化合物具有殺病毒活性。咖啡水萃取物也能夠抑制小兒麻痺病毒增殖，但不具毒殺該病毒的活性。咖啡水萃取物能夠抑制B型肝炎病毒表面抗原表現(Utsunomiya et al., 2008)。

B. 抗氧化

咖啡水萃取物能抑制超氧自由基、脂質過氧化(Namba and Matsuse, 2002)，咖啡酸塗抹裸鼠腹部皮膚能降低UVA所誘導產生之活性氧，於口服給藥後亦可發現咖啡酸分布於皮膚中(Yamada et al., 2006)。咖啡之綠原酸於可清除NO₂預防N₂O₃形成(Takahama et al., 2007)。

C. 其他

咖啡萃取物能抗腸桿菌(enterobacteria)(Almeida et al., 2006)。caffeic acid與chlorogenic acid藉由提高S-adenosyl-L-homocysteine之生成，進而抑制乳癌細胞DNA甲基化(Lee and Zhu, 2006)。於動物皮膚實驗證實caffeic acid能抑制因照射UVB所誘導的IL-10表現與MAPK的活化，進而達到防禦UVB所造成的免疫反應與光致癌性(Staniforth et al., 2006)。含綠原酸較多的即溶咖啡可降低體重(Thom, 2007)。於動物實驗發現綠原酸具有抗發炎、止痛作用(dos Santos et al., 2006)，具抗輻射作用，能降低小鼠照射 γ 射線後的致死率(Hosseinimehr et al., 2008)。

(三) 檄樹

1. 概述

學名：*Morinda citrifolia* Linn. 茜草科常綠小喬木，高可達 9 m 以上，小枝條具有4稜角，全株光滑無毛。單葉對生，具短柄，厚紙質，深綠色，葉面光亮，葉片橢圓形或長橢圓形，長10~15 cm，寬5~8 cm，大者長可達30 cm，寬15 cm，兩端均銳，全緣。托葉膜質，闊橢圓形或半月形。花白色，簇生而成頭狀，總梗單一，長約3~4 cm，常與葉對生。萼杯狀，邊緣截狀。花冠圓筒形，長約1.2 cm，先端5裂，冠喉有毛。雄蕊5枚，著生於喉部。柱頭2裂。果實為聚合果，由肉質、

擴大而合生的花萼組成，球形，徑約4~7 cm，漿質，果實剛開始時為綠色，後轉變為黃色，成熟時幾乎變為白色，內有很多種子。全年可以開花與結果。花期6~8月較盛。

2. 化學成分

檫葉含 roseoside II，deacetyl asperuloside，kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-1(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside，ursolic acid，quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-1(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside，13-hydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid，pteryxin，peucedanocoumarin III，5,15-dimethylmorindol (11),8) barbinervic acid，clethric acid，rotungenic acid，hederagenin，oleanolic acid，pheophorbide a，methyl pheophorbide β ，methyl pheophorbide α ，151(*S*)-hydroxypurpurin-7 lactone dimethyl ester，132(*R*)-hydroxypheophorbide a methyl ester，151(*R*)-hydroxypurpurin-7 lactone dimethyl ester，132(*S*)-hydroxypheophorbide a methyl ester，3-*O*-acetyl pomolic Acid，13-epi-phaeophorbide a methyl ester和 phytol 等成分(Takashima et al., 2007)。

3. 活性研究

A. 降血糖

檫樹甲醇萃取物分離出之 damnacanthol-3-*O*- β -D-primeveroside,

lucidin 3-*O*-beta-D-primeveroside具有降低streptozotocin所誘導的糖尿病小鼠血糖之效果(Kamiya et al., 2008)。並能提高肉芽組織重量，增加組織內羥脯胺酸含量，促進糖尿病老鼠傷口癒合(Nayak et al., 2007)。

B. 保肝

檫樹果汁對於S.D.大鼠由四氯化碳所誘發造成的急性肝臟損傷具保護的效果(Wang et al., 2008)。

C. 預防動脈硬化

檫樹果汁可預防動脈硬化，其所含成分3,3'-bisdemethylpinoresinol，americanol A，morindolin和isoprincepin有明顯抑制由銅所誘導的LDL氧化(Kamiya et al., 2004)。

D. 其他

檫樹葉含iridoids成分可抑制UVB所誘導的AP-1的活性(Sang et al., 2001b; Sang et al., 2003)，其乙醇萃取物的正己烷層，具抗結核菌的活性(Saludes et al., 2002)。檫樹果汁可藉活化CB2 receptors與抑制IL-4達到調控免疫系統的作用並提高IFN- γ 產生(Palu et al., 2008)。檫樹果甲醇萃取物可與GABA競爭GABA_A接受器，具有抗焦慮與鎮靜效果(Deng et al., 2007)。

第三章 材料與方法

一、實驗材料

(一)試藥與溶媒

- | | |
|---|---|
| 1. 1, 2-Propandiol | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 2. 2-Mercaptoethanol | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 3. Acetic acid | 聯工化學廠股份有限公司 (Taiwan) |
| 4. Acryamide/Bis, 37.5:1, 40 % solution | J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.) |
| 5. Agarose | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 6. Albumin from bovine serum , BSA | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 7. Amido black | USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.) |
| 8. Ammonium persulfate | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 9. Bradford Reagent | Bio-Rad Laboratories (California, U.S.A) |
| 10. Bromophenol blue | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 11. Caffeic acid | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 12. Calcium Chloride (CaCl ₂) | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 13. Chlorogenic acid | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 14. Collagenase, Type I | Calbiochem (San Diego, U.S.A) |
| 15. Coomassie blue R-250 | USB corporation (Cleveland, OH U.S.A.) |
| 16. Dibasic sodium phosphate | USB corporation |

- (Cleveland, OH U.S.A.)
17. Dimethyl sulfoxide Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
18. DL-Dithiothreitol Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
19. Disodium dehydrate (EDTA) USB corporation (Cleveland, OH U.S.A.)
20. Doxycycline hyclate Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
21. Dulbecco's Modified Eagle Media(DMEM) GIBCO™
22. Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020 Invitrogen Co. (NY, U.S.A)
23. ECL western blotting kit Amersham Biosciences (England)
24. Elastase substrate IV Calbiochem (San Diego, U.S.A)
25. Elastase, Porcine Calbiochem (San Diego, U.S.A)
26. Ethyl alcohol 台灣糖業股份有限公司 (Taiwan)
27. Ethyl acetate 聯工化學廠股份有限公司 (Taiwan)
28. ERK 1 (C-16): sc-93 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California)
29. Fetal Bovine Serum (FBS) GIBCO™
30. Full-Range rainbow molecular weight makers Invitrogen Co.(NY, U.S.A)
31. Gelatin Amersham Biosciences (England)
32. Glycerol Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
33. Glycine Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
34. Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005 USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)
- Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California)

35. Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California)
36. Hydrochloric acid J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
37. Igepal™ CA-630 USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)
38. JNK1 (G-13): sc-46006 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, U.S.A.)
39. Leupeptin Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
40. Methyl alcohol J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
41. MMP substrate I R&D systems (U.S.A)
42. MMP-1(L-20): sc-12348 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California)
43. MMP-3 (1B4): sc-21732 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, U.S.A)
44. MMP-9 (6-6B): sc-12759 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, U.S.A)
45. Monobasic potassium phosphate USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)
46. Monobasic sodium phosphate USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)
47. N, N, N', N'-tetra-methylethylene-diamine (TEMDE) Invitrogen Co.(NY, U.S.A)
48. Non-fat milk New Zealand Milk. Ltd. (New Zealand)
49. Penicillin-Streptomycin-Glutamine GIBCO™ Invitrogen Co.(NY, U.S.A)
50. p38 (A-12): sc-7972 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, U.S.A)
51. p-p38 (Thr 180/Tyr 182)-R: sc-17852-R Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, U.S.A)
52. p-JNK (Thr 183/Tyr 185): sc-12882 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, U.S.A)
53. p-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204): sc-16982 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, U.S.A)
54. Phenylmethanesulfonyl fluoride Sigma Chemical Co. (St.

(PMSF)	Louis, MO, U.S.A.)
55. Potassium chloride (KCl)	USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)
56. Procollagen Type I (N-17): sc-8782	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, U.S.A)
57. Sodium Chloride (NaCl)	J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
58. Sodium deoxycholate	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
59. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)
60. Sodium orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
61. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromides (MTT)	USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)
62. Tris	USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)
63. Trypan blue solution (0.4 %)	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
64. Trypsin-EDTA (0.5 % Trypsin, EDTA · 4Na)	GIBCO™ Invitrogen Co.(NY, U.S.A)
65. Tween 20	USB corporation (Cleveland, OH, U.S.A.)

(二)儀器設備、耗材

1. Electrophoretic transfer cell	Major Science (Taiwan)
2. Mini Vertical Gel Electrophoresis Apparatus	Major Science (Taiwan)
3. Luminescent image analyzer (LAS-4000)	Fujifilm Corporation (Japan)
4. Power supply MP500V	Major Science (Taiwan)
5. Forma Direct Heat CO ₂ Incubator HEPA class 100	Thermo Electron Corporation (Vantaa, Finland)

- | | |
|--|---|
| 6. Ultraviolet crosslinkers CL-1000M | UVP, Inc. (Upland, California, U.S.A) |
| 7. Luminescence spectrometer LS 50B | PerkinElmer Inc. (Massachusetts, U.S.A) |
| 8. Microplate reader (Multiskan Ascent) | Thermo Electron Corporation (Vantaa, Finland) |
| 9. 高速離心機
Hsiangtai CFT-6000 | Hermle Labotechnik GmbH (Wehingen, Germany) |
| 10. 渦旋振盪器
Vortex Genie G-560 | Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY, U.S.A.) |
| 11. 超音波振盪器
Soniclean 2000HT | Soniclean.Pty.Ltd (Australia) |
| 12. 氮氣濃縮裝置
N-EVAP 112 R-MT | Organomation Associates Inc. (Berlin, MA, U.S.A.) |
| 13. 分析天平
AB 104 | Mettler Toledo (Switzerland) |
| 14. 水壓抽氣機
Eyela Aspirator A-2S | Tokyo Rikakikai Co. Ltd. (Tokyo, Japan) |
| 15. 高壓滅菌鍋 TM-329 | Tomin Medical Equipment CO., Ltd |
| 16. 電器水浴鍋 WB-24 | Shin Kwang (Taiwan) |
| 17. 微量移液管
pipette 2-20 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L,
100-1000 μ L | Gilson S.A.S. (Entrepreneurs, Villiers Le Bel, France) |
| 18. 0.2 μ m Filter sterile-EO | Sartorius-Stedim Biotech (Goettingen, Germany) |
| 19. 拋棄式注射針及針筒
1.0 mL syringe (0.45 \times 13 mm) | Terumo Medical Corporation (Elkton, MD, U.S.A.) |
| 20. 微量吸管尖
tips (200 μ L, 1000 μ L) | Axygen Scientific, Inc. (Union City, CA, U.S.A.) |
| 21. 微量離心管
Microtubes (1.5 mL) | Axygen Scientific, Inc. (Union City, CA, U.S.A.) |
| 22. 96-Well plate | Corning Incorporated
Costar® (U.S.A) |

23. 96-Well plate (non-sterile)	Corning Incorporated Costar® (U.S.A)
24. 75 cm ² Cell Culture Flask	Corning Incorporated Costar® (U.S.A)
25. 10 cm ² Cell Culture dish	Corning Incorporated Costar® (U.S.A)
26. PVDF transfer membrane	Amersham Biosciences (England)

(三)藥材

1. 咖啡葉 採自雲林縣林內鄉
2. 玉蘭花葉 採自彰化縣田尾鄉
3. 檫樹葉 採自彰化縣花壇鄉

二、實驗方法

(一)咖啡、玉蘭花及檫樹之葉甲醇萃取物之製備

1. 甲醇萃取物之製備

秤取咖啡、玉蘭花及檫樹的乾燥葉各 10 g，分別加入甲醇 300 mL，浸潤 60 分鐘後，以超音波震盪器震盪 1 小時，經布氏漏斗抽氣過濾。同上步驟再萃取一次，合併濾液，減壓濃縮至浸膏狀，置於抽氣櫃揮去溶媒後，乾固物儲存於乾燥箱備用。

2. 酸水解物之製備

取上述咖啡、玉蘭花及檫樹甲醇萃取物 10 mg，分別各加入 1.2 N、2.4 N HCl 2 mL 混勻後，置於 80°C 水浴鍋中反應 30 分鐘後，以

等容之乙酸乙酯分配萃取兩次，以 6000 rpm 離心 5 分鐘後，分取上層，合併上層液體，以減壓濃縮設備濃縮至乾，置於-20°C 下備用。

(二)明膠分解試驗 (gelatin digestion assay)(Kim et al., 2006b)

本研究以細菌膠原蛋白酶進行初篩，即以明膠分解試驗(gelatin digestion assay)評估其活性，進而測定對於細菌膠原蛋白酶的抑制率。

1. 試劑之配製

(1) 2倍緩衝溶液之配製(50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0.15 M NaCl, pH 7.8)

取1 M Tris-HCl (pH 7.8) 5 mL, 1 M CaCl₂ 1 mL, 4 M NaCl 3.75 mL, 加二次水至100 mL。

(2) 1% 明膠培養基之製備

秤取 agarose 1 g, 加入2倍緩衝溶液45 mL, 二次水45 mL以及以2倍緩衝溶液配製的1.5% 明膠溶液10 mL, 置於微波爐中加熱至起泡溶解。趁熱倒入13 mL於製膠容器(8 cm × 6 cm)中, 靜置凝固, 冷藏備用。

(3) 細菌膠原蛋白酶之配製

取膠原蛋白酶 100 mg 以緩衝溶液(50 mM Tris-HCl pH7.8, 3.6 mM CaCl₂)少量溶解的, 待完全溶解後定容至 10 mL。並分裝至微量離心管中, 儲存於-20°C 備用。

(4) Doxycycline溶液之配製

秤取doxycycline 0.05 g，加1 mL 水溶解；置於-20°C 備用。

(5) 檢品溶液之配製

咖啡、玉蘭花及檫樹萃取物及其水解物以50%丙二醇溶解，使成檢品濃度為10 mg/mL。

(6) 染色液之配製

取 Coomassie blue R-250 1.25 g，amido black 0.5 g，加入甲醇 227 mL及冰醋酸 46 mL，溶解後加水至500 mL。

(7) 退染液之配製

取甲醇 50 mL、冰醋酸 75 mL混合後，加水至1000 mL。

2. 實驗操作步驟

於微量離心管中加入2倍緩衝溶液50 μ L、水 30 μ L、膠原蛋白酶(0.1 mg/mL) 10 μ L、檢品溶液或 doxycycline 溶液(做為正對照) 10 μ L 混合均勻，於室溫下反應60分鐘。將反應產物以微量移液管吸取40 μ L 滴於明膠培養基上的濾紙片，置於37°C，溫孵18小時後，移除濾紙片，以染色液染色。再以退染液退染至適當顏色對比。拍照後，影像以 TINA軟體分析，計算其抑制率。

3. 抑制率之計算

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{(C-B)}{(A-B)} \times 100\%$$

A: 無酶，無檢品

B: 無檢品

C: 有檢品

進行三次獨立試驗後，計算平均值及標準偏差 (standard deviation, S.D.)。

(三) 膠原蛋白酶抑制試驗(Kim et al., 2006b)

細菌膠原蛋白酶，以不同濃度檢品處理後，再以螢光受質偵測其抑制酵素活性及其是否具濃度依存性。

1. 試劑之製備

(1) 10倍緩衝溶液

1 M Tris (pH 7.8)	5 mL
1 M CaCl ₂	1 mL
4 M NaCl	3.75 mL
H ₂ O	0.25 mL

(2) Fluorogenic Peptide Substrate I 溶液之製備

螢光受質粉末 1 mg加入水1 mL溶解，置於-20 °C備用。使用前再以水稀釋至適當濃度。

2. 實驗操作步驟

取水 480 μL注入微量離心管中，再加入10倍緩衝溶液 80 μL、檢品 80 μL、膠原蛋白酶 80 μL (0.01 mg/mL)、螢光受質 80 μL (10

uM)，混合均勻後，放入37°C培養箱中溫孵20小時。分別於328 nm測激發光，393 nm測放射光。

3. 抑制率之計算

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \times 100\%$$

A: 有酶，無檢品

B: 無酶，無檢品

C: 有酶，有檢品

D: 無酶，有檢品

進行三次獨立試驗後，計算平均值及標準偏差 (standard deviation, S.D.)。

(四)彈力蛋白酶抑制試驗(Kim et al., 2007; Tsukahara et al., 2006)

本試驗以豬胰臟的彈力蛋白酶進行初篩。

1. 試劑之製備

(1) 彈力蛋白酶之製備

取500 U彈力蛋白酶以10 mM Tris pH 6.0緩衝溶液 5 mL溶解，分裝至微量離心管中，置於-20 °C備用。

(2) 彈力蛋白酶受質 IV 溶液之製備

取彈力蛋白酶受質IV粉末5 mg，以100 mM Tris pH 8.0緩衝溶液 5 mL溶解，分裝至微量離心管中，置於-20 °C備用。

2. 實驗操作步驟

取100 mM Tris pH 8.0緩衝溶液100 μ L加入96孔盤中，再依序加入彈力受質IV溶液(2.5 mg/mL) 25 μ L、檢品50 μ L、彈力蛋白酶(1 U/mL) 25 μ L。混合均勻，靜置於室溫20分鐘，以ELISA reader於波長405 nm讀取OD值。

3. 抑制率之計算

$$\text{抑制率(\%)} = 1 - \frac{(C-D)}{(A-B)} \times 100\%$$

A: 有酶，無檢品

B: 無酶，無檢品

C: 有酶，有檢品

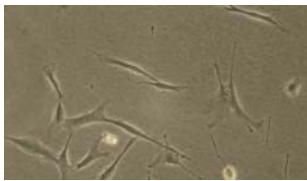
D: 無酶，有檢品

進行三次獨立試驗後，計算平均值及標準偏差 (standard deviation, S.D.)。

(五)細胞培養

(1) Hs 68細胞培養條件

BCRC編號	60038
組織來源	Human foreskin fibroblast
細胞來源	食品工業發展研究所

培養基	90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose + 10% fetal bovine serum
培養條件	37°C, 5% CO ₂
冷凍培養基	93% culture medium + 7% DMSO
細胞型態	

(六) 纖維母細胞之UVB照射實驗

先確立UVB照射纖維母細胞誘發基質金屬蛋白酶試驗模式之UVB照射劑量，再據以UVB光源照射經不同濃度檢品處理之纖維母細胞，供後續活性抑制試驗探討。

1. 檢品製備

取檢品100 mg，以1 mL DMSO復溶。於無菌操作台內以0.2 μm無菌濾膜過濾。再以培養液稀釋至所需濃度。

2. 實驗操作步驟

(1) 纖維母細胞之檢品處理與UVB照射

待纖維母細胞長至緻密度80%後，將培養液換成不同濃度檢品培養液。15分鐘後，將培養液吸除後，加入PBS溶液潤洗2次，再加入PBS溶液。將細胞置於UV燈源下，以UV照射後，吸除PBS溶液再加入無血清培養液繼續培養24小時。

(七) 分離細胞內細胞質之蛋白質

本試驗以破碎緩衝溶液破碎細胞再以離心的方式，取得位於細胞質之蛋白質，以備蛋白質分析用。

1. 緩衝液之製備

(1) RIPA 緩衝液

取1 M Tris-HCl (pH 7.4) 25 mL，NaCl 4.38 g，DL-dithiothreitol 0.0771 g，Sodium deoxycholate 2.5 g，0.5 M EDTA 1 mL，Igepal™ CA-630 5 mL及10 % SDS 5 mL，置於血清瓶中，加二次水至500 mL，混溶滅菌備用。

(2) 破碎緩衝溶液

將 1 mL RIPA緩衝液新鮮加入10 mM Na_3VO_4 10 μL ，Leupeptin 2 μL (10 mg/mL)及10 μL PMSF(10 mg/mL)即得。

2. 實驗操作步驟

(1) 萃取蛋白質

將培養液吸除，以預冰之PBS溶液清洗。後續的步驟皆於冰上操作。加入破碎緩衝溶液適量，以刮棒將細胞全數刮下，移至微量離心管。以12100×g 於4°C 離心10分鐘後，吸取上清液，上清液進行蛋白質定量。

(2) 蛋白質定量

以不同濃度之Albumin from bovine serum (2、4、6、8、10 mg/mL) 與檢品加入Bradford's reagent (使用前以預冰之二次水稀釋5倍) 200 μ L，反應10分鐘後 (不可超過1小時)，於波長595 nm測定吸光值。

(八) 西方墨點法

以從細胞質分離出之蛋白質，以電泳法分離後，再測定特定蛋白質質量。

1. 緩衝液與試劑之製備

(1) Upper gel buffer-stacking buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

稱取Tris 30.3 g 置於燒杯中，加入水約300 mL，以磁石攪拌機混勻後，以12 N HCl 調整 pH值 至 6.8，再倒入量筒中，加水至500 mL，倒入血清瓶中，高壓滅菌後備用。

(2) Lower gel buffer-running buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

稱取Tris 90.6 g置於燒杯中，加入水約300 mL，以磁石攪拌機混勻後，以12 N HCl 調整 pH 至 8.8，再倒入量筒中，加水至500 mL，倒入血清瓶中，高壓滅菌後備用。

(3) 10倍 Laemmli tank buffer

稱取 Tris 15.1 g及 glycine 93.8 g置於燒杯中，倒入量筒中，加水至500 mL，倒入血清瓶中，高壓滅菌後備用。此貯備溶液使用前需稀釋成1倍，稀釋方式如下：取Laemmli tank buffer (10倍)50 mL及10% SDS 5 mL，加水至 500 mL即得。

(4) 8倍 Transfer buffer

稱取 Tris 24.2 g及 glycine 115.4 g置於燒杯中，倒入量筒中，加水至1 L (pH 8.3)，倒入血清瓶中，高壓滅菌後備用。使用前需稀釋成1倍，稀釋方式如下：取貯備溶液 250 mL，甲醇 400 mL，加水至2 L，貯於4°C 中備用。

(5) 5倍 TBST

a. 1 M Tris-HCl (pH 7.5)：稱取Tris 60.6 g，加入約300 mL水，以磁石攪拌機混勻，以 12 N HCl 調整 pH 至 7.5，加水至500 mL，經高壓滅菌後備用。

b. 4 M NaCl：稱取NaCl 233.8 g，加水至500 mL，經高壓滅菌後備用。

c. 取 4 M NaCl 溶液312.5 mL、1 M Tris-HCl 50 mL、Tween 20 2.5 mL及135 mL H₂O混合均勻，即成5倍TBST，冰存於4°C 冰箱，使用前以水稀釋成1倍即得。

(6) 4倍檢品緩衝液

取 glycerol 4 mL、bromophenol blue 40 mg、upper stacking buffer 5 mL、SDS 400 mg 混合均勻後，分裝至微量離心管中，每管0.9 mL，貯存於 -20°C，使用前加 2-mercaptoethanol 100 μL，須保存於4°C 冰箱。

(7) 10% SDS溶液

取SDS1 g溶於10 mL 水中。

(8) 10% APS溶液

取APS 0.1 g 溶於1 mL水中。

(9) MTBST (Tris-Buffered Saline Tween-20 contain 5% non-fat milk)

取TBST 50 mL 加入2.5 g脫脂奶粉。

2. 實驗操作步驟

取各細胞檢品相當於30 μ g之蛋白質與4倍檢品緩衝液以3：1比例混合後，以二次水調整體積，置沸水中水浴鍋5分鐘。以10% 之 SDS-PAGE，電壓70伏特，進行電泳30分鐘，再以電壓140伏特，進行電泳2小時。以400毫安培通電100分鐘將其轉印至 PVDF 轉印膜上。將MTBST加於轉印膜，搖盪2小時後，以1倍TBST清洗數次，再加入一級抗體（以含5% Albumin from bovine serum之TBST稀釋， β -actin 稀釋 1000 倍；MMP-1、MMP-3、MMP-9、type I procollagen、ERK、JNK、p38、p-ERK、p-JNK、p-p38 稀釋 500 倍），置於 4°C 冰箱中搖盪至隔夜（至少16小時），回收一級抗體，再以TBST清洗數次後，加入二級抗體（以含5%BSA之TBST稀釋 5000 倍），置於室溫搖盪 2 小時，回收二級抗體，再以1倍TBST清洗數次。最後移去1倍TBST 加入ECL試劑，以LAS-4000顯影，multi Gauge V2.2定量分析。

(九)細胞毒性試驗（MTT assay）

本實驗以不同濃度之檢品處理纖維母細胞，以了解其細胞毒性。

1. 試劑之製備

(1) MTT 溶液 (5 mg/mL) 之配製

稱取MTT 100 mg溶解於PBS溶液 20 mL中，使成5 mg/mL，以褐色微量離心管分裝，置於-20°C備用。

(2) SDS 溶液 (10 % SDS in HCl)之配製

稱取SDS 100 g 溶於0.01 N HCl 1 L中即得，避光存放。

2. 實驗操作步驟

將細胞接種於96孔盤中，每孔接種 10^4 cells/well 待24小時後，加入待測檢品50 μ L，經24小時培養後，加入 MTT 溶液15 μ L，置37°C培養箱中3小時，加入 SDS溶液75 μ L，隔夜於波長570 nm下測定吸光值。

3. 抑制率之計算

$$\text{細胞存活率(\%)} = \frac{\text{實驗組吸光值}}{\text{控制組吸光值}} \times 100\%$$

(十)皮膚一次刺激性試驗(日本化粧品工業連合会, 2001)

1. 檢品之製備

秤取咖啡、玉蘭花萃取物0.1 g(低劑量)，0.5 g(高劑量)檢品，以1 mL生理食鹽水復溶備用。

2. 實驗操作步驟

將紐西蘭大白兔固定於兔架上，剃除背毛，以色筆畫出塗抹範圍每格2.5 cm × 2.5 cm，共6格。於格內以無菌針頭於皮膚上輕劃4條平行線，破壞角質層，不可見血。將檢品均勻塗佈於格內。24小時後，以生理食鹽水輕拭，除去檢品，於24與72 小時兩個時間點觀察、評分(如Table 13)，若有刺激性產生則需延長觀察時間。

(十一) 眼球刺激性試驗(Wilhelmus, 2001; 日本化粧品工業連合会, 2001)

1. 檢品之製備

取咖啡、玉蘭花萃取物300 µg溶於1 mL生理食鹽水，以6000 rpm離心5分鐘，取其上清液供作檢品。

2. 實驗操作步驟

取檢品100 µL，滴入白兔結膜囊，將白兔眼睛輕輕闔上。於1、5、15、30分鐘，1、2、24、48、72小時等時間點觀察記錄、評分(如附錄Table 14)，若具刺激性須延長觀察時間。

(十二) 統計方法

以ANOVA及Student's *t* test進行數據分析， $p < 0.05$ 表示於統計上有顯著差異，且每個實驗進行三次以上獨立實驗，實驗結果以 mean ± S.D. 表示。

第四章 結果

一、 植物萃取及水解物製備

(一)植物甲醇萃取物之製備

本試驗利用甲醇製備咖啡(CA)、玉蘭花(MA)及檫樹(MC)之葉萃取物，所得萃取物萃取率分別為：CAE, 10.4%；MAE, 16.9%；MCE, 15.0%。

(二)水解物之製備

水解物之水解條件，分別均於80°C水浴鍋，以1.2 N, 0.5 h；1.2 N, 1 h；2.4 N, 0.5 h及2.4 N, 1 h等四種條件處理，其代號分別為H1, H2, H3及H4。文內各植物水解物，再冠以各植物之代號，如咖啡之不同水解物之代號為CAH1, CAH2, CAH3及CAH4。其餘類推。

二、 膠原蛋白酶活性抑制之試驗

(一)明膠分解試驗

本試驗利用含明膠之洋菜培養基，評估植物萃取物及其水解物、咖啡酸與綠原酸等對膠原蛋白酶的抑制效果，其結果如Fig. 1 (a)、Table 2所示，正對照doxycycline (100 µg/mL) 之抑制率為97.3±0.02%，空白對照 (50% 1, 2-propanediol) 抑制率0.4±0.92%。咖啡萃取物及其水解物(1000 µg/mL)之抑制率分別為CAE 100.0±0.05%，CAH1 99.5±0.06%，CAH2 96.7±0.08%，CAH3 97.0±0.07%及CAH4 95.1±

0.23%。玉蘭花萃取物及其水解物之抑制率結果，如Fig. 1 (c)、Table 2 所示，分別為MAE $100.0\pm 0.03\%$ ，MAH1 $99.3\pm 0.13\%$ ，MAH2 $99.1\pm 0.14\%$ ，MAH3 $92.2\pm 0.12\%$ 及MAH4 $93.7\pm 0.40\%$ 。兩者水解物之抑制率皆未優於其萃取物。如Fig. 1(e)、Table 2所示，檫樹萃取物及其水解物之抑制率分別為MCE $74.3\pm 1.04\%$ ，MCH1 $-2.7\pm 2.11\%$ ，MCH2 $69.9\pm 1.26\%$ ，MCH3 $60.5\pm 17.8\%$ 及MCH4 $-3.3\pm 0.97\%$ 。水解物之抑制率與萃取物相比，抑制率皆無提高之情形，甚至喪失活性。以咖啡中主要成分咖啡酸與綠原酸進行膠原蛋白酶活性抑制篩選如Fig. 1(f)所示，抑制率分別只有 $26.1\pm 0.53\%$ 與 $35.9\pm 0.92\%$ 。

(二) 膠原蛋白酶抑制試驗

為更進一步確認抑制膠原蛋白酶活性效力，各植物萃取物及水解物進行序列稀釋濃度(10 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)進行本試驗，惟檫樹、咖啡酸及綠原酸於明膠分解試驗初篩效果不佳，未再進行本試驗。咖啡萃取物及水解物對膠原蛋白酶之抑制率如Fig. 2、Table 3所示，咖啡萃取物水解前後抑制效果皆具濃度依存性，於高濃度時(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)CAE及任何條件水解物皆具有極佳的抑制效果 (>95%)，但隨著稀釋倍數增加時，CAE(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)仍有 $84.6\pm 1.46\%$ 的抑制率，而水解物抑制率皆未大於60%，水解物伴隨酸的濃度增加及水解時間的延長，抑制率隨之降低。玉蘭花萃取物及其水解產物抑制效果如Fig. 3、Table 4所示，

均顯現濃度依存性，水解前後產物於高濃度(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抑制率均大於95%，隨稀釋倍數提高後抑制率 $< 50\%$ 。不論是咖啡或玉蘭花水解後的抑制效果，皆無水解前佳。

依據前述檢品對膠原蛋白酶活性之效果，再針對咖啡及玉蘭花草取物與咖啡主要成分咖啡酸與綠原酸，利用纖維母細胞(Hs68)進一步對於抗光化之效果與機轉進行探討。

三、 彈力蛋白酶抑制試驗

本試驗利用彈力蛋白酶與合成胜肽，評估檢品對於彈力蛋白酶抑制效果。玉蘭花草取物及其各水解物抑制結果如Fig. 4、Table 5所示，抑制率皆不大於30%。咖啡與其各水解物皆無抑制效果。檫樹草取物與其水解物亦無抑制效果。

四、 抑制基質金屬蛋白酶(MMP-1, -3, -9)表現

(一)纖維母細胞對UVB耐受劑量

欲探討UVB射線對於細胞生理之影響，先以不同UVB劑量照射纖維母細胞，再以MTT assay確認UVB劑量對纖維母細胞之影響。如Fig. 8所示，UVB 20~80 mJ/cm^2 時細胞存活率皆大於95%。於高劑量100 mJ/cm^2 時，細胞存活率僅有85%，顯示此劑量以對細胞造成較大的損傷。故進行照射UVB實驗時，選擇80 mJ/cm^2 之劑量。

(二)誘導纖維母細胞基質金屬蛋白酶-1, -3, -9表現及第I型膠原蛋白

原之UVB劑量

欲知擬探討的蛋白質MMP-1，MMP-3和MMP-9是否將會隨著UVB照射劑量之上升而產生變化。將細胞進行不同劑量之UVB (40~80 mJ/cm²)照射後，破碎細胞，萃取細胞質內之蛋白質，經西方墨點法分析及觀察，其結果如Fig. 9(a)所示，MMP-1蛋白表現量隨著UVB劑量之上升而表現增加，於80 mJ/cm²時達到最大，與控制組相較，表現量約提高2.6倍。MMP-3蛋白表現量也隨著UVB劑量增加而增加，於40 mJ/cm²表現量達到最高，約為控制組之1.4倍。MMP-9蛋白表現量與UVB照射劑量亦呈正比，於40 mJ/cm²表現量達到最高，約為控制組之2.7倍。

纖維母細胞之MMP-1，MMP-3和MMP-9蛋白表現量皆因UVB而有所增加，但不同蛋白質間受UVB劑量之影響也略有不同。當細胞照射UVB後，如Fig. 9(a)所示，當UVB劑量逐漸提高時，第I型膠原蛋白原的表現量會降低，於40 mJ/cm²時表現量接近零。於後續實驗皆選擇80 mJ/cm²為誘導劑量。

(三)抑制基質金屬蛋白酶-1, -3, -9(MMP-1, -3, -9)之表現

以不同濃度咖啡、玉蘭花萃取物(5~25 µg/mL)及咖啡酸與玉蘭花預先處理纖維母細胞15分鐘，再照射UVB，並繼續以萃取物處理24小時後，觀察MMPs的表現。如Fig. 10所示，MMP-1因照射UVB而表

現量增加，經CAE處理後蛋白質表現量從2倍降至1倍(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，恢復至未照射UVB之量。於較高濃度(10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)也同樣有抑制蛋白質表現的效果。CAE 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即可降低MMP-3由UVB所誘導的表現，從1.6倍降至1.3倍，而隨著濃度的增加(10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抑制效果也具濃度依存性。CAE對於MMP-9蛋白的表現現象與MMP-1與MMP-3相同，5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時降至1.1倍。

以咖啡酸與綠原酸預先處理纖維母細胞，再照射UVB細胞，並繼續以咖啡酸及綠原酸處理24小時，觀察MMP的表現。如Fig. 12所示，咖啡酸於5 μM 時，即可降低MMP-1的表現量至1倍，與未處理UVB的表現量相同。於較高濃度(10, 50 μM)也具有抑制的效果。MMP-3表現量照射UVB後增加至2倍，但咖啡酸處理細胞後無論濃度高低(5~50 μM)皆無抑制其表現的效果。MMP-9因UVB的誘導提高至1.2倍，經咖啡酸處理後(5~50 μM)其表現量皆恢復至1倍。以綠原酸處理細胞(5~50 μM)，MMP-1會因此而表現降低至1倍左右。MMP-3於高濃度(50 μM)才有抑制效果，將蛋白表現量從2倍抑制至1.7倍。對MMP-9無抑制表現的效果。

以MAE(5~50 μM)預先處理纖維母細胞15分鐘，再照射UVB細胞，並繼續以MAE處理24小時，觀察MMPs的表現。如Fig. 13所示，於10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可使MMP-1之表現量由UVB誘導的2倍降至未照射的表

現量。MMP-3表現量於10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時具有顯著效果，當濃度增加至25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時表現量為1.4倍。當濃度為5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，MMP-9可從UVB誘導的4.5倍降至2.7倍。

(四)對於第I型膠原蛋白原之影響

以CAE(5~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 預先處理纖維母細胞15分鐘，再照射UVB細胞，並繼續以CAE處理24小時，觀察第I型膠原蛋白原的表現。如Fig. 10所示，於濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 第I型膠原蛋白原之表現量恢復約0.6倍。而咖啡酸、綠原酸及MAE對於第I型膠原蛋白原表現量皆無改善的效果。

(五)對於MAP kinase之影響

UVB誘導MAP kinase的活化，如Fig. 9(b)所示，JNK隨著UVB的劑量增加而磷酸化量增加。分別為3.4倍(20 mJ/cm^2)、6.5倍(40 mJ/cm^2)、7.1倍(60 mJ/cm^2)和5.5倍(80 mJ/cm^2)。而ERK則是至UVB劑量達到80 mJ/cm^2 時，才誘導出磷酸化增加至1.3倍。p38的活化量則是於60 mJ/cm^2 始誘導出其增加(1.4倍)，當UVB劑量增加至80 mJ/cm^2 時，p38的磷酸化量增加至1.9倍。

如Fig. 11所示，細胞以CAE (5~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理後，JNK活化量於10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即有抑制效果，而且具有濃度依存性。ERK活化量於5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

與10 µg/mL則沒有抑制效果，至25 µg/mL才有抑制效果並且恢復至未照射UVB的狀態。p38經UVB (80 mJ/cm²)誘導後磷酸化量為1.2倍，以CAE處理濃度至25 µg/mL仍無明顯效果。

MAE對於UVB誘導之MAP kinase活化影響，如Fig. 14，JNK的部分，隨著濃度的增加，抑制磷酸化效果趨於明顯，於MAE 25 µg/mL時可將磷酸化量降至與未照射UVB者相當。ERK的表現，則是於高劑量25 µg/mL時，才顯現抑制效果，將磷酸化量抑制至1.3倍。處理MAE對於p38的影響，效果不顯著，MAE 25 µg/mL時才降至3.2倍(UV誘導為3.4倍)。

五、 咖啡及玉蘭花萃取物之安全性評估

(一)細胞毒性試驗

以不同檢品處理纖維母細胞，再以MTT assay測定檢品之細胞毒性。如Fig. 5所示，以1~1000 µg/mL濃度之CAE處理細胞，於高劑量1000 µg/mL時仍不具有細胞毒性，甚至於濃度高於100 µg/mL以上時出現促進纖維母細胞增生效果。而咖啡水解物CAH1，CAH2，CAH3，CAH4於1~1000 µg/mL等濃度，均無細胞毒性，且CAH1於濃度100 µg/mL出現促進纖維母細胞生長之效果，CAH2則無促進細胞增生之效果，CAH3於1000 µg/mL才略顯促進纖維母細胞增生之效果，CAH4於1 µg/mL出現促進纖維母細胞增生效果。如Fig. 6所示，以1~1000

$\mu\text{g/mL}$ 濃度之MAE處理細胞，於高劑量 $1000 \mu\text{g/mL}$ 時仍不具有細胞毒性。其水解物MAH1，MAH2，MAH3和MAH4於高劑量 $1000 \mu\text{g/mL}$ 時亦無細胞毒性。如Fig. 7所示，咖啡酸與綠原酸於低劑量至高劑量($20\sim 80 \mu\text{M}$)皆無細胞毒性。

(二)皮膚一次性刺激性試驗

將咖啡與玉蘭花草提取物復溶後分為低劑量(0.1 g)與高劑量(0.5 g)塗抹於白兔之背部。於24與72小時，分別觀察記錄之，並求出皮膚刺激指數(Primary irritation index, PII, 如附錄三)，判別刺激程度。CAE之結果，如Fig. 15、Table 6, 7所示：於低劑量24小時時間點，損傷皮膚具有輕微的刺激現象，評分為 1.25 ± 1.30 。經48小時，刺激之評分為 0.25 ± 0.43 。高劑量的部分，於24小時，產生中度的刺激評分為 2.00 ± 2.12 ，第48小時，刺激之評分降至 0.50 ± 0.50 ，所有動物之總評分(1.25 ± 1.38)屬於slight irritation之刺激。MAE之結果，如Fig. 16、Table 8, 9所示：於低劑量，24、48小時無產生任何刺激。於高劑量，24、48小時，評分為： 0.50 ± 0.50 ，所有動物之總評分(0.50 ± 0.53)屬於irritation barely perceptible之刺激。

(三)眼球刺激性試驗

將咖啡與玉蘭花草提取物復溶後，取 $100 \mu\text{L}$ ($300 \mu\text{g/mL}$)滴入受試白兔眼睛內，另一側不給藥，作為對照組，於各時間點觀察萃提取物對於

眼睛的影響，並以附錄四判別其刺激程度。CAE之結果，如Fig. 17、Table 10所示：對於眼睛的刺激性於前15分鐘較顯著，積分為4分左右。當CAE隨著動物眼淚帶出後，無觀察到刺激的現象。前15分鐘產生的刺激，於30分鐘後皆無觀察到，所有動物之總評分為 0.00 ± 0.00 屬nonirritation等級之刺激。MAE之結果，如Fig. 18、Table 11所示：對於眼睛的刺激性於前30分鐘較顯著，積分為3分以下。當MAE隨著動物眼淚帶出後，無觀察到刺激的現象。前30分鐘產生的刺激，於60分鐘後皆無觀察到，所有動物之總評分為 0.00 ± 0.00 屬nonirritation等級之刺激。



第五章 討論

一、 咖啡，玉蘭花及檫樹萃取物及其水解物對於膠原蛋白酶活性之影響

諸多文獻指出(Brenneisen et al., 2002; Dong et al., 2008; Uitto, 2008)，照射 UV 會提高膠原蛋白酶的活性，進而降解充填於皮膚真皮細胞外基質之膠原蛋白，而形成皺紋。因此篩選抑制膠原蛋白酶活性成分或萃取物，可開發成為抗光老化的化妝品原料。目前這類研究多以膠原蛋白酶為標的，探討抑制活性的效果。例如：迷迭香水萃物能透過調節 IL-1 α 與 IL-6 抑制 MMP-1 基因的轉譯，屬專一性抑制 MMP-1 的活性(Martin et al., 2008)。黃酮類化合物(quercetin, kaempferol, apigenin and wogonin)具有抑制 MMP-1 活性、抑制 MAP Kinase 及 AP-1 活化的效果(Lim and Kim, 2007)。維他命 C 衍生物 disodium isostearyl 2-*O*-*L*-ascorbyl phosphate 可降低 MMP-1 活性，並提高纖維母細胞膠原蛋白生成的量(Shibayama et al., 2008)。卷柏萃取物分離後乙酸乙酯層所得之 sumaflavone 與 amentoflavone 能抑制 UV 所誘導的 MMP-1 活性(Lee et al., 2008)。

而細菌膠原蛋白酶，由轉殖細菌產生，容易大量生產，為一廣效型的膠原蛋白酶。為能大量及便利地進行初篩，常以細菌膠原蛋白酶模式進行(Kim et al., 2006b)。大多數植物中所含多酚類成分多以配醣

體的形式存在，但據文獻指出(Kim et al., 2004a)，苷元的活性較配醣體佳。抗光老化化妝品經由局部塗抹經皮吸收，皮膚為親脂性結構(Barnhill and L., 2004)，苷元極性較低，較易經皮吸收。雖然有許多文獻報導指出植物萃取物能夠有效的抑制膠原蛋白酶(Leu et al., 2006; Lim and Kim, 2007)，對於苷元抑制膠原蛋白酶活性抑制之研究仍少，故本試驗進行萃取物水解前後，探討抑制膠原蛋白酶的活性。

結果顯示(Fig. 5)，咖啡與玉蘭花萃取物水解前後進行明膠分解實驗初篩時，抑制率均大於 90%。而檫樹無論水解前後抑制率均不佳，故未再進行其他活性試驗。為更進一步瞭解咖啡與玉蘭花萃取物及其水解物對膠原蛋白酶之抑制效果，將其稀釋後進行膠原蛋白酶抑制試驗。如 Fig. 2, 3, CAE 經過稀釋後(10 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，於低濃度(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)仍具 84%的抑制效果，水解後的抑制率則因水解條件的不同而有所變化。水解後經序列稀釋效果皆不如水解前佳，比較各種水解條件後發現，2.4 N HCl 水解時間不宜過久，30 min (CAH3)的效果優於 1 h (CAH4)。在 1.2 N 鹽酸中，增加水解時間抑制效果會提高(CAH2)。比較 CAH2 與 CAH3 的抑制效果，於高濃度(100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)時，兩者抑制效果相當，當濃度再稀釋後(10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，CAH2 (59 %)的抑制率大於 CAH3 (49%)。推測其原因為苷元雖可因水解而濃度提高，但鹽酸濃度過高時可能會對苷元產生破壞，故 CAH3 與 CAH4

的抑制效果較差。於 1.2 N HCl 中，需要較長時間方能將苷元水解完全，因此 CAH2 具較佳之抑制膠原蛋白酶活性。

玉蘭花萃取物水解前後抑制率之比較，MAE 於低濃度(10 µg/mL)抑制率為 92 %，水解物經稀釋後，效果亦無水解前佳。試比較各個水解條件，於低濃度(10 µg/mL)時，HCl 濃度較高條件者：MAH3 與 MAH4，具有較佳的抑制效果。MAH3 優於 MAH4 推測可能為 MAH4 水解時間過久，致成分破壞。

上述文獻所指抑制膠原蛋白酶活性試驗大部分皆於細胞實驗進行，前述初篩具抑制細菌膠原蛋白酶活性之咖啡、玉蘭花萃取物及各該水解物，未來可針對纖維母細胞所分泌之 MMPs，探討具酶抑制專一性之活性。

二、 咖啡、玉蘭花萃取物及其水解物對於彈力蛋白酶活性之影響

真皮層中細胞外基質為支撐整個皮膚架構的主要結構，除了膠原蛋白外，尚有彈力蛋白賦予皮膚彈性(Labat-Robert and Robert, 1988)。照射紫外線亦會促進彈力蛋白酶分泌，而降解彈力蛋白(Getie et al., 2005; Seite et al., 2006)，使皮膚彈性喪失，外觀上會變得鬆弛。因此抑制彈力蛋白酶也是發展延緩皺紋產生的另一標的。文獻指出，檳榔、肉桂、肉豆蔻、薑黃、台灣蘋果、杜松精油、檸檬精油與葡萄柚精油等天然萃取物皆有抑制彈力蛋白酶之活性(Getie et al., 2005; Kim

et al., 2007; Lee and Choi, 1999; Lee et al., 1999; Leu et al., 2006; Tsukahara et al., 2006)。因此亦進行前述三種植物萃取物及水解物之這項試驗。結果如 Fig. 4 所示，玉蘭花萃取物與其水解物具抑制彈力蛋白酶的效果，但效果略低 (<30%)，而咖啡與檫樹則無顯現抑制效果。推測咖啡與檫樹萃取物及其水解物中無抑制彈力蛋白酶之活性成分，而玉蘭花萃取物及其水解物中之活性成分含量極低，至於為何種成分具抑制彈力蛋白酶之作用，有待日後進一步分離及純化。

三、咖啡與玉蘭花對纖維母細胞經 UVB 照射後基質金屬蛋白酶 (MMP) 表現之影響

文獻指出，照射 UV 後會誘導基質金屬蛋白酶：MMP-1，MMP-3 與 MMP-9 的表現增加(Dong et al., 2008; Pillai et al., 2005)。抑制 MMPs 的表現也是延緩皺紋產生的另一標的。諸多文獻便是針對抑制 MMPs 的表現量尋找對抗光老化的活性成分。杜仲甲醇萃取物分離出的化合物 Aucubin 能抑制 MMP-1 蛋白質的表現，亦能減少 MMP-1 mRNA 的表現(Ho et al., 2005)。Berberine 可預防 UVB 造成的 MMP-1 的表現及膠原蛋白降解(Kim and Chung, 2007)。褐藻萃取物 eckol 和 dieckol 能抑制真皮纖維母細胞 MMP-1 表現(Joe et al., 2006)。由蒲瓜乙醇萃取物分離出之化合物，具抗氧化活性，並能抑制 UVA 所誘導產生的 MMP-1 蛋白質表現與 MMP-1 活性(Cho et al., 2006)。

2',4',7-trihydroxyisoflavone 能顯著減少原代培養之老化皮膚纖維母細

胞經 UVB 所誘導產生的 MMP-1 mRNA 與蛋白質的表現(Moon et al., 2005) 。從白蠟樹萃取物中分離出的 esculetin，具有優越的抗氧化能力，並能抑制 UV 所誘導的 MMP-1 mRNA 及蛋白質表現(Lee et al., 2007)。

纖維母細胞於照射 UVB 前預先處理萃取物，照射完 UVB 後 24 小時再觀察其 MMPs 的表現。如 Fig. 10 所示，處理咖啡萃取物 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纖維母細胞 MMP-1 與 MMP-9 的表現量即顯著降低，而 MMP-3 的表現量於 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 有明顯下降。一般文獻報導之有效劑量皆大於 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kim et al., 2006b; Kim et al., 2007; Lee and Choi, 1999; Tanaka et al., 2007)，而咖啡萃取物於 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即有不錯的效果，顯示咖啡萃取物中具有抑制 MMP 活性極佳的化合物。

選取咖啡的兩種主要成分咖啡酸與綠原酸進行試驗，試圖找出咖啡抑制 MMPs 表現的活性成分。結果如 Fig. 12 所示，咖啡酸對於 MMP-1 具抑制作用，但未顯現劑量依存性，而其並無法抑制 MMP-3 與 MMP-9 的表現。綠原酸於 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，始對 MMP-3 的表現產生抑制效果。但對抑制 MMP-1 與 MMP-9 表現之活性未顯出抑制作用。曾有研究指出，綠原酸能夠抑制 MMP-9 的活性(Jin et al., 2005)，因此未來可對纖維母細胞處理綠原酸後所產生之 MMP-9 活性做探討。

玉蘭花萃取物對於纖維母細胞 MMPs 表現之影響如 Fig. 13 所示，萃取物於 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 表現出良好抑制 MMP-1 的效果，對於 MMP-3 於高濃度(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)才顯現出較佳的抑制效果，MMP-9 於 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即顯現出抑制效果。實驗結果顯示玉蘭花萃取物亦具抗 UVB 誘導產生之 MMPs 效果佳的萃取物，而其中的主要活性成分更值得深入探討，具發展成對抗光老化產品之潛力。

上述文獻中，抑制 MMPs 的蛋白表現量，皆同時影響到 mRNA 的產生，因此未來能針對咖啡及玉蘭花萃取物影響纖維母細胞 mRNA 的部分進行探討，使其作用機轉更加明確。

四、咖啡與玉蘭花萃取物對纖維母細胞照射 UVB 後第 I 型膠原蛋白表現之影響

膠原蛋白為支撐皮膚的主要成分，於真皮層中細胞外基質膠原蛋白第 I 型膠原蛋白占了 70%。皮膚照射 UV 會使膠原蛋白的生成減少 (Bae et al., 2008; Chung, 2003; Ichihashi et al., 2003; Rabe et al., 2006; Scharffetter-Kochanek et al., 2000)；MMPs 生成與活性也會增加，致使其生成與降解失去平衡，老化現象因此產生。於老鼠皮膚局部塗抹大豆中異黃酮成分 equol，能顯著降低光老化造成的表皮細胞增生與真皮層的肥大細胞數量。改善皮膚局部彈性鬆弛的現象，減少真皮層膠原蛋白的降解，並具有良好的抗氧化效果，能夠預防老鼠皮膚因急性 UVA 照射所誘導的脂質過氧化(Reeve et al., 2005)。維他命 A 及其衍

生物與維他命 C 也有報導指出其能促進膠原蛋白生成(Burke, 2007; Chaqour et al., 1997; Dumas et al., 1996)。和厚朴中 magnolol 與 obvatol，黃連之 berberine，綠茶中的 EGCG，大豆異黃酮與異黃酮 equol 等成分皆能使 UVB 誘導的膠原蛋白生成減少的現象改善。(Bae et al., 2008; Choi et al., 2007; Kim and Chung, 2007; Kim et al., 2004b; Reeve et al., 2005; Tanaka et al., 2007)。實驗結果顯示(Fig. 10)，咖啡萃取物(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能提高纖維維母細胞照射 UVB 後第 I 型膠原蛋白原的生成。玉蘭花、咖啡酸與綠原酸處理細胞，對 UVB 造成的第 I 型膠原蛋白原生成下降無改善效果。推測此結果可能因為咖啡萃取物能夠促進細胞生長因素，其活性成分可能促進 TGF- β 產生，活化膠原蛋白生成訊號傳遞路徑，與 UVB 所誘導的 AP-1 活化產生抗衡。故可對咖啡萃取物影響 TGF- β 路徑做更深入的探討。另亦可進行動物實驗，針對膠原蛋白生成後的形態、質與量做評估。

五、 咖啡與玉蘭花萃取物對纖維母細胞照射 UVB 後 MAP kinase 活化之影響

而文獻中指出，咖啡酸具抑制 UVB 所誘導之 IL-10 mRNA 表現及 MAP kinase 活化(Staniforth et al., 2006)。而 MAP kinase 活化是光老化產生的路徑之一，更是 MMPs 產生增加主要因素，若咖啡酸能抑制 MAP Kinase 活化應能抑制 MMPs 的表現。

咖啡對於 JNK、ERK 與 p38 皆有抑制其活化的作用。玉蘭花萃植物抑制 MAP kinase 活化的效果尚不及咖啡，且對於 p38 的磷酸化不具抑制效果。推測抑制 MAP kinase 磷酸化原因為抗氧化的緣故，因 UVB 對纖維母細胞產生最直接的傷害為活性氧，而抗氧化的步驟從訊號傳遞的最上游先行阻斷，可使下游訊號傳遞減弱。許多具抗氧化活性的化合物，對於抗老化及抑制 MAP kinase 皆有效果。黃酮類化合物抗氧化與抑制膠原蛋白酶的能力與其化合物上 OH 基數目相關，數目越多抵禦 UV、預防皮膚光老化效果越好(Sim et al., 2007) 。 Sesamol 於動物實驗中證實能預防長期 UV 暴露所造成的皮膚光損害(Sharma and Kaur, 2006) 。塗抹杏仁油於動物實驗證實能預防皮膚因照射 UV 所產生結構上的損傷(Sultana et al., 2007) 。Lutein 具光保護效果，當細胞照射 UV 後，能提高細胞存活率、細胞膜完整性。未照射 UV 時，能提高彈力蛋白的表現(Philips et al., 2007) 。Eicosapentaenoic acid 於人體實驗證實對於皮膚具光保護與抗老化的效果(Kim et al., 2006a) 。以 silymarin 進行細胞實驗，可發現其可改善角質細胞照射 UVA 後所造成的氧化損傷與發炎反應(Svobodova et al., 2007) 。因此推測其抑制 MAP Kinases 及 MMP 等路徑應與抗氧化活性有關。咖啡萃植物可抑制 MAP Kinases 之 ERK、JNK 及 p38 可調節下游之 c-Fos 表現，JNK 及 p38 則可調控 c-Jun 之表現，c-Fos 及 c-Jun 則會合成轉

錄因子 AP-1，而咖啡萃取物可抑制此三種 MAP Kinases 磷酸化，推測其可影響 c-Fos 及 c-Jun 表現，抑制了下游的 AP-1、MMPs 及第 I 型膠原蛋白原表現。玉蘭花萃取物亦可抑制 JNK 及 ERK，對 c-Fos、c-Jun、AP-1 及 MMPs 具有類似之抑制作用，但其強度較咖啡萃取物略低，未來將進一步評估萃取物及其成分之抗氧化能力，是否與保護細胞、抑制 MAP Kinases 磷酸化的效果成正比，而對於此些天然物之抗老化作用及機轉有更詳細之研究。

綜合上述，不論是咖啡或玉蘭花萃取物抑制膠原蛋白酶活性水解前效果皆優於水解後，若欲開發成皮膚製劑，須先評估萃取物之經皮吸收效果，倘若效果不佳甚至因分子量過大或極性過高而無法進到真皮層作用，水解後含苷元之萃取物可以做為替代方案。其中咖啡最佳的水解條件為 CAH2, 1.2 N, 60 min；玉蘭花最佳水解條件為 MAH3, 2.4 N, 30 min。咖啡對於膠原蛋白有促進生長之效果，除了運用於修補光老化皮膚外，亦可運用於促進傷口癒合。

第六章 結論與建議

- 一、咖啡與玉蘭花萃取物具抑制膠原蛋白酶活性，而萃取物之效果優於水解物。檫樹萃取物及其水解物抑制膠原蛋白酶活性不顯著。
- 二、咖啡中成分咖啡酸與綠原酸不具有抑制膠原蛋白酶活性。但可抑制 UVB 所誘導的 MMP-1, -3 的表現。
- 三、咖啡萃取物能透過抑制 MAP kinase 之 JNK, ERK 及 p38 磷酸化降低由 UVB 所誘導的 MMP-1, -3, -9 的表現，以及提高第 I 型膠原蛋白原的產生。
- 四、玉蘭花萃取物能透過抑制 MAP kinase 之 JNK 及 ERK 磷酸化降低由 UVB 所誘導的 MMP-1, -3 的表現。
- 五、經動物試驗評估，咖啡及玉蘭花萃取物不具有皮膚刺激性與眼球激性。
- 六、咖啡及玉蘭花萃取物具有開發成抗老化及延緩皺紋產生之化妝品。

第七章 參考文獻

Almeida, A.A., Farah, A., Silva, D.A., Nunan, E.A., and Gloria, M.B. (2006). Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J Agric Food Chem* 54, 8738-8743.

Bae, J.Y., Choi, J.S., Choi, Y.J., Shin, S.Y., Kang, S.W., Han, S.J., and Kang, Y.H. (2008). (-)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. *Food Chem Toxicol* 46, 1298-1307.

Barnhill, and L., R. (2004). *Textbook of dermatopathology* (McGraw-Hill, Health Professions Division).

Baxter, R.A. (2008). Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *J Cosmet Dermatol* 7, 2-7.

Bizot-Foulon, V., Bouchard, B., Hornebeck, W., Dubertret, L., and Bertaux, B. (1995). Uncoordinate expressions of type I and III collagens, collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 along in vitro proliferative life span of human skin fibroblasts. Regulation by all-trans retinoic acid. *Cell Biol Int* 19, 129-135.

Bornstein, P. (1996). Regulation of expression of the alpha 1 (I) collagen gene: a critical appraisal of the role of the first intron. *Matrix Biol* 15, 3-10.

Brenneisen, P., Sies, H., and Scharffetter-Kochanek, K. (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 973, 31-43.

Burke, K.E. (2007). Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. *Dermatol Ther* 20, 314-321.

Chaqour, B., Bellon, G., Seite, S., Borel, J.P., and Fourtanier, A. (1997). All-trans-retinoic acid enhances collagen gene expression in irradiated and non-irradiated hairless mouse skin. *J Photochem Photobiol B* 37, 52-59.

Cho, Y.H., Kim, J.H., Sim, G.S., Lee, B.C., Pyo, H.B., and Park, H.D. (2006). Inhibitory effects of antioxidant constituents from *Melothria heterophylla* on matrix metalloproteinase-1 expression in UVA-irradiated human dermal fibroblasts. *J Cosmet Sci* 57, 279-289.

Choi, M.S., Yoo, M.S., Son, D.J., Jung, H.Y., Lee, S.H., Jung, J.K., Lee, B.C., Yun, Y.P., Pyo, H.B., and Hong, J.T. (2007). Increase of collagen synthesis by obovatol through stimulation

of the TGF-beta signaling and inhibition of matrix metalloproteinase in UVB-irradiated human fibroblast. *J Dermatol Sci* 46, 127-137.

Chung, J.H. (2003). Photoaging in Asians. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19, 109-121.

Chung, J.H., Kang, S., Varani, J., Lin, J., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2000). Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 115, 177-182.

Chung, K.Y., Agarwal, A., Uitto, J., and Mauviel, A. (1996). An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 271, 3272-3278.

Colven, R.M., and Pinnell, S.R. (1996). Topical vitamin C in aging. *Clin Dermatol* 14, 227-234.

Deng, S., West, B.J., Palu, A.K., Zhou, B.N., and Jensen, C.J. (2007). Noni as an anxiolytic and sedative: a mechanism involving its gamma-aminobutyric acid effects. *Phytomedicine* 14, 517-522.

Dong, K.K., Damaghi, N., Picart, S.D., Markova, N.G., Obayashi, K., Okano, Y., Masaki, H., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Smiles, K.A., *et al.* (2008). UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. *Exp Dermatol*.

dos Santos, M.D., Almeida, M.C., Lopes, N.P., and de Souza, G.E. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull* 29, 2236-2240.

Dumas, M., Chaudagne, C., Bonte, F., and Meybeck, A. (1996). Age-related response of human dermal fibroblasts to L-ascorbic acid: study of type I and III collagen synthesis. *C R Acad Sci III* 319, 1127-1132.

Duncan, M.R., Frazier, K.S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X., and Grotendorst, G.R. (1999). Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 13, 1774-1786.

Fisher, G.J., Datta, S., Wang, Z., Li, X.Y., Quan, T., Chung, J.H., Kang, S., and Voorhees, J.J. (2000). c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-*trans* retinoic acid. *J Clin Invest* 106, 663-670.

Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J.

(1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379, 335-339.

Fisher, G.J., Talwar, H.S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, F., Wang, Z., Li, X., Wan, Y., Kang, S., and Voorhees, J.J. (1998). Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest* 101, 1432-1440.

Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J. (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337, 1419-1428.

Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N.S., Breuksch, S., Altmeyer, P., and Kreuter, A. (2007). Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. *Br J Dermatol* 156, 951-956.

Gelse, K., Poschl, E., and Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1531-1546.

Getie, M., Schmelzer, C.E., and Neubert, R.H. (2005). Characterization of peptides resulting from digestion of human skin elastin with elastase. *Proteins* 61, 649-657.

Glaser, D.A. (2004). Anti-aging products and cosmeceuticals. *Facial Plast Surg Clin North Am* 12, 363-372, vii.

Hensley, K., and Floyd, R.A. (2002). Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch Biochem Biophys* 397, 377-383.

Ho, J.N., Lee, Y.H., Lee, Y.D., Jun, W.J., Kim, H.K., Hong, B.S., Shin, D.H., and Cho, H.Y. (2005). Inhibitory effect of Aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced matrix metalloproteinase-1 production in human skin fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 2227-2231.

Hosseinimehr, S.J., Zakaryae, V., Ahmadi, A., and Akhlaghpour, S. (2008). Radioprotective effects of chlorogenic acid against mortality induced by gamma-irradiation in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30, 13-16.

Hu, H.L., Forsey, R.J., Blades, T.J., Barratt, M.E., Parmar, P., and Powell, J.R. (2000). Antioxidants may contribute in the fight against ageing: an in vitro model. *Mech Ageing Dev* 121, 217-230.

Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., and

- Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology* 189, 21-39.
- Jin, U.H., Lee, J.Y., Kang, S.K., Kim, J.K., Park, W.H., Kim, J.G., Moon, S.K., and Kim, C.H. (2005). A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci* 77, 2760-2769.
- Jinlian, L., Yingbin, Z., and Chunbo, W. (2007). p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation. *J Biomed Sci* 14, 303-312.
- Joe, M.J., Kim, S.N., Choi, H.Y., Shin, W.S., Park, G.M., Kang, D.W., and Kim, Y.K. (2006). The inhibitory effects of eckol and dieckol from *Ecklonia stolonifera* on the expression of matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts. *Biol Pharm Bull* 29, 1735-1739.
- Kamiya, K., Hamabe, W., Harada, S., Murakami, R., Tokuyama, S., and Satake, T. (2008). Chemical constituents of *Morinda citrifolia* roots exhibit hypoglycemic effects in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 31, 935-938.
- Kamiya, K., Tanaka, Y., Endang, H., Umar, M., and Satake, T. (2004). Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem* 52, 5843-5848.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-246.
- Katiyar, S.K. (2003). Skin photoprotection by green tea: antioxidant and immunomodulatory effects. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3, 234-242.
- Kim, D.H., Kim, J.H., Baek, S.H., Seo, J.H., Kho, Y.H., Oh, T.K., and Lee, C.H. (2004a). Enhancement of tyrosinase inhibition of the extract of *Veratrum patulum* using cellulase. *Biotechnol Bioeng* 87, 849-854.
- Kim, H.H., Cho, S., Lee, S., Kim, K.H., Cho, K.H., Eun, H.C., and Chung, J.H. (2006a). Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo. *J Lipid Res* 47, 921-930.
- Kim, M.M., Ta, Q.V., Mendis, E., Rajapakse, N., Jung, W.K., Byun, H.G., Jeon, Y.J., and Kim, S.K. (2006b). Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life Sci* 79, 1436-1443.
- Kim, S., and Chung, J.H. (2007). Berberine prevents UV-induced MMP-1 and reduction of type I procollagen expression in human dermal fibroblasts. *Phytomedicine*.

Kim, S.Y., Kim, S.J., Lee, J.Y., Kim, W.G., Park, W.S., Sim, Y.C., and Lee, S.J. (2004b). Protective effects of dietary soy isoflavones against UV-induced skin-aging in hairless mouse model. *J Am Coll Nutr* 23, 157-162.

Kim, Y.H., Kim, K.S., Han, C.S., Yang, H.C., Park, S.H., Ko, K.I., Lee, S.H., Kim, K.H., Lee, N.H., Kim, J.M., *et al.* (2007). Inhibitory effects of natural plants of Jeju Island on elastase and MMP-1 expression. *Int J Cosmet Sci* 29, 487-488.

Kohen, R., and Gati, I. (2000). Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology* 148, 149-157.

Kothapalli, D., Frazier, K.S., Welply, A., Segarini, P.R., and Grotendorst, G.R. (1997). Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway. *Cell Growth Differ* 8, 61-68.

Labat-Robert, J., and Robert, L. (1988). Aging of the extracellular matrix and its pathology. *Exp Gerontol* 23, 5-18.

Lee, B.C., Lee, S.Y., Lee, H.J., Sim, G.S., Kim, J.H., Cho, Y.H., Lee, D.H., Pyo, H.B., Choe, T.B., Moon, D.C., *et al.* (2007). Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. *Arch Pharm Res* 30, 1293-1301.

Lee, C.W., Choi, H.J., Kim, H.S., Kim, D.H., Chang, I.S., Moon, H.T., Lee, S.Y., Oh, W.K., and Woo, E.R. (2008). Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* regulate the expression of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts. *Bioorg Med Chem* 16, 732-738.

Lee, K.K., and Choi, J.D. (1999). The effects of areca catechu L extract on anti-aging. *Int J Cosmet Sci* 21, 285-295.

Lee, K.K., Kim, J.H., Cho, J.J., and Choi, J.D. (1999). Inhibitory Effects of 150 Plant Extracts on Elastase Activity, and Their Anti-inflammatory Effects. *Int J Cosmet Sci* 21, 71-82.

Lee, W.J., and Zhu, B.T. (2006). Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* 27, 269-277.

Leu, S.J., Lin, Y.P., Lin, R.D., Wen, C.L., Cheng, K.T., Hsu, F.L., and Lee, M.H. (2006). Phenolic constituents of *Malus doumeri* var. *formosana* in the field of skin care. *Biol Pharm Bull* 29, 740-745.

Lim, H., and Kim, H.P. (2007). Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids. *Planta Med* 73, 1267-1274.

Luo, D., Lin, X.F., Min, W., Ma, Q.H., Gu, N., Jin, S.L., and Wang, D.G. (2007). Photoprotection by tocopherol submicron emulsion against UV-mediated damage in HaCaT cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29, 185-189.

Martin, R., Pierrard, C., Lejeune, F., Hilaire, P., Breton, L., and Bernerd, F. (2008). Photoprotective effect of a water-soluble extract of *Rosmarinus officinalis* L. against UV-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and reconstructed skin. *Eur J Dermatol* 18, 128-135.

Moon, H.I., Kwak, J.H., Zee, O.P., and Chung, J.H. (2005). Regulation effect of 2',4',7-trihydroxyisoflavone on the expression of matrix metalloproteinase-1, 2 in ultraviolet-B irradiated primary cultured old aged human skin fibroblasts. *Biol Pharm Bull* 28, 2173-2175.

Moriwaki, S., and Takahashi, Y. (2008). Photoaging and DNA repair. *J Dermatol Sci* 50, 169-176.

Namba, T., and Matsuse, T. (2002). [A historical study of coffee in Japanese and Asian countries: focusing the medicinal uses in Asian traditional medicines]. *Yakushigaku Zasshi* 37, 65-75.

Nayak, B.S., Isitor, G.N., Maxwell, A., Bhogadi, V., and Ramdath, D.D. (2007). Wound-healing activity of *Morinda citrifolia* fruit juice on diabetes-induced rats. *J Wound Care* 16, 83-86.

Oba, A., and Edwards, C. (2006). Relationships between changes in mechanical properties of the skin, wrinkling, and destruction of dermal collagen fiber bundles caused by photoaging. *Skin Res Technol* 12, 283-288.

Palu, A.K., Kim, A.H., West, B.J., Deng, S., Jensen, J., and White, L. (2008). The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action. *J Ethnopharmacol* 115, 502-506.

Philips, N., Keller, T., Hendrix, C., Hamilton, S., Arena, R., Tuason, M., and Gonzalez, S. (2007). Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 299, 373-379.

Pillai, S., Oresajo, C., and Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of

reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci* 27, 17-34.

Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2002). Connective tissue growth factor: expression in human skin in vivo and inhibition by ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 118, 402-408.

Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J., Morison, W.L., and Sauder, D.N. (2006). Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 55, 1-19.

Raffetto, J.D., and Khalil, R.A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 75, 346-359.

Ramirez-Coronel, M.A., Marnet, N., Kolli, V.S., Roussos, S., Guyot, S., and Augur, C. (2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 52, 1344-1349.

Ranheim, T., and Halvorsen, B. (2005). Coffee consumption and human health--beneficial or detrimental?--Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol Nutr Food Res* 49, 274-284.

Reenstra, W.R., Yaar, M., and Gilchrist, B.A. (1996). Aging affects epidermal growth factor receptor phosphorylation and traffic kinetics. *Exp Cell Res* 227, 252-255.

Reeve, V.E., Widyarini, S., Domanski, D., Chew, E., and Barnes, K. (2005). Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol. *Photochem Photobiol* 81, 1548-1553.

Rittie, L., and Fisher, G.J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 1, 705-720.

Saludes, J.P., Garson, M.J., Franzblau, S.G., and Aguinaldo, A.M. (2002). Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytother Res* 16, 683-685.

Sang, S., Cheng, X., Zhu, N., Stark, R.E., Badmaev, V., Ghai, G., Rosen, R.T., and Ho, C.T. (2001a). Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. *J Agric Food Chem* 49, 4478-4481.

Sang, S., He, K., Liu, G., Zhu, N., Cheng, X., Wang, M., Zheng, Q., Dong, Z., Ghai, G., Rosen, R.T., *et al.* (2001b). A new unusual iridoid with inhibition of activator protein-1 (AP-1)

from the leaves of *Morinda citrifolia* L. *Org Lett* 3, 1307-1309.

Sang, S., Liu, G., He, K., Zhu, N., Dong, Z., Zheng, Q., Rosen, R.T., and Ho, C.T. (2003). New unusual iridoids from the leaves of noni (*Morinda citrifolia* L.) show inhibitory effect on ultraviolet B-induced transcriptional activator protein-1 (AP-1) activity. *Bioorg Med Chem* 11, 2499-2502.

Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C., and Wlaschek, M. (2000). Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 35, 307-316.

Seite, S., Zucchi, H., Septier, D., Igondjo-Tchen, S., Senni, K., and Godeau, G. (2006). Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20, 980-987.

Sharma, S., and Kaur, I.P. (2006). Development and evaluation of sesamol as an antiaging agent. *Int J Dermatol* 45, 200-208.

Shibayama, H., Hisama, M., Matsuda, S., Ohtsuki, M., and Iwaki, M. (2008). Effect of a novel ascorbic derivative, disodium isostearyl 2-O-L-ascorbyl phosphate on human dermal fibroblasts: increased collagen synthesis and inhibition of MMP-1. *Biol Pharm Bull* 31, 563-568.

Sim, G.S., Lee, B.C., Cho, H.S., Lee, J.W., Kim, J.H., Lee, D.H., Pyo, H.B., Moon, D.C., Oh, K.W., Yun, Y.P. (2007). Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. *Arch Pharm Res* 30, 290-298.

Staniforth, V., Chiu, L.T., and Yang, N.S. (2006). Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. *Carcinogenesis* 27, 1803-1811.

Stefanaki, C., Stratigos, A., and Katsambas, A. (2005). Topical retinoids in the treatment of photoaging. *J Cosmet Dermatol* 4, 130-134.

Sultana, Y., Kohli, K., Athar, M., Khar, R.K., and Aqil, M. (2007). Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B-induced cutaneous photoaging in mice. *J Cosmet Dermatol* 6, 14-19.

Svobodova, A., Walterova, D., and Vostalova, J. (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150, 25-38.

Svobodova, A., Zdarilova, A., Maliskova, J., Mikulkova, H., Walterova, D., and Vostalova, J. (2007). Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin. *J Dermatol Sci* 46, 21-30.

Syed, D.N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Afaq, F., and Mukhtar, H. (2006). Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol* 82, 398-405.

Takahama, U., Ryu, K., and Hirota, S. (2007). Chlorogenic acid in coffee can prevent the formation of dinitrogen trioxide by scavenging nitrogen dioxide generated in the human oral cavity. *J Agric Food Chem* 55, 9251-9258.

Takashima, J., Ikeda, Y., Komiyama, K., Hayashi, M., Kishida, A., and Ohsaki, A. (2007). New constituents from the leaves of *Morinda citrifolia*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 55, 343-345.

Tanaka, K., Hasegawa, J., Asamitsu, K., and Okamoto, T. (2007). *Magnolia ovovata* extract and its active component magnolol prevent skin photoaging via inhibition of nuclear factor kappaB. *Eur J Pharmacol* 565, 212-219.

Thom, E. (2007). The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *J Int Med Res* 35, 900-908.

Torras, H. (1996). Retinoids in aging. *Clin Dermatol* 14, 207-215.

Tsukahara, K., Nakagawa, H., Moriwaki, S., Takema, Y., Fujimura, T., and Imokawa, G. (2006). Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles. *Int J Dermatol* 45, 460-468.

Uitto, J. (2008). The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Drugs Dermatol* 7, s12-16.

Utsunomiya, H., Ichinose, M., Uozaki, M., Tsujimoto, K., Yamasaki, H., and Koyama, A.H. (2008). Antiviral activities of coffee extracts in vitro. *Food Chem Toxicol* 46, 1919-1924.

Wang, M.Y., Nowicki, D., Anderson, G., Jensen, J., and West, B. (2008). Liver Protective Effects of *Morinda citrifolia* (Noni). *Plant Foods Hum Nutr* 63, 59-63.

Wilhelmus, K.R. (2001). The Draize eye test. *Surv Ophthalmol* 45, 493-515.

Wong, T.T., Sethi, C., Daniels, J.T., Limb, G.A., Murphy, G., and Khaw, P.T. (2002). Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Surv Ophthalmol* 47, 239-256.

Yamada, Y., Yasui, H., and Sakurai, H. (2006). Suppressive effect of caffeic acid and its derivatives on the generation of UVA-induced reactive oxygen species in the skin of hairless mice and pharmacokinetic analysis on organ distribution of caffeic acid in ddY mice. *Photochem Photobiol* 82, 1668-1676.

Yusuf, N., Irby, C., Katiyar, S.K., and Elmetts, C.A. (2007). Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 23, 48-56.

Zaid, M.A., Afaq, F., Syed, D.N., Dreher, M., and Mukhtar, H. (2007). Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. *Photochem Photobiol* 83, 882-888.

Zhao, Z., Shin, H.S., Satsu, H., Totsuka, M., and Shimizu, M. (2008). 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF-alpha-induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 56, 3863-3868.

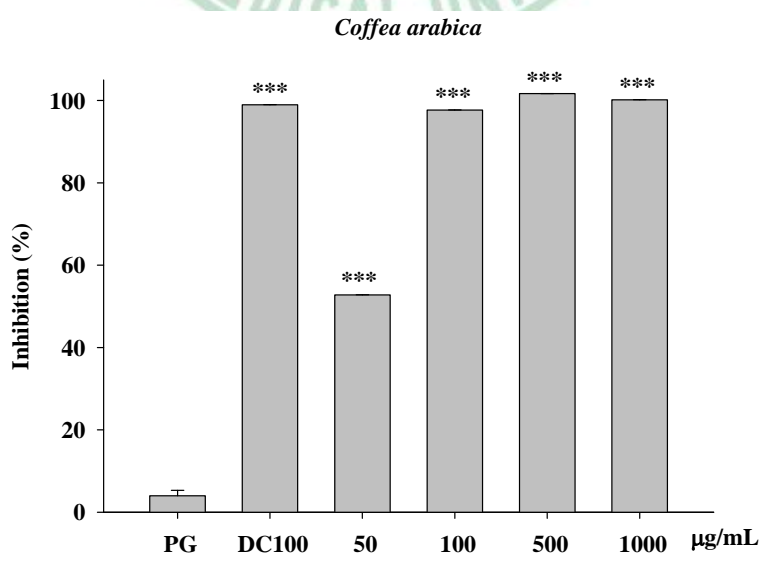
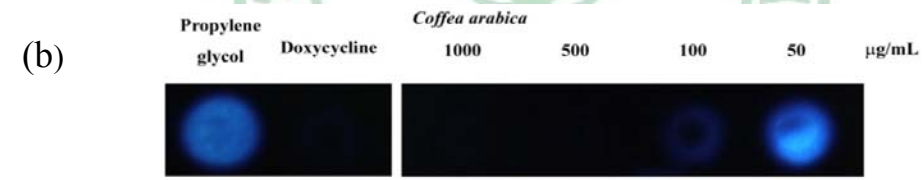
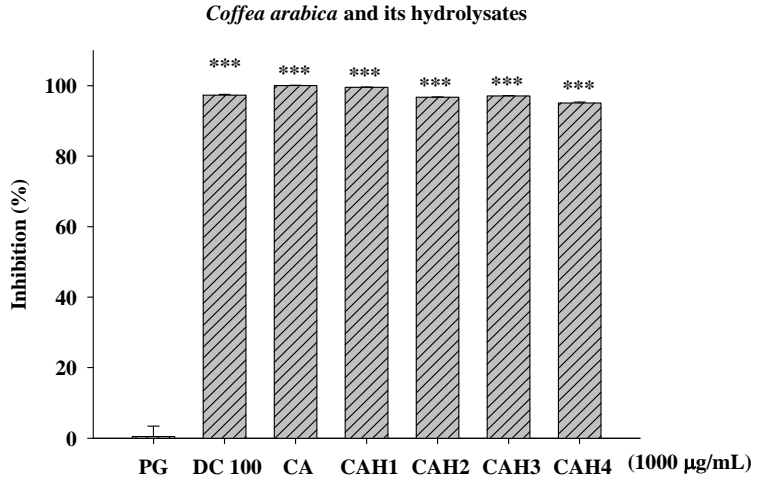
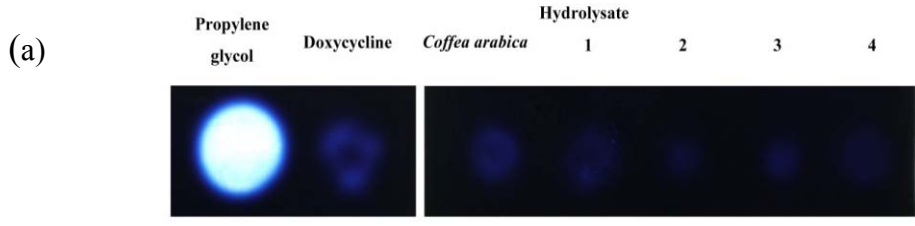
日本化粧品工業連合会 (2001). 化粧品の安全性評価に関する指針 2001 (薬事日報社).

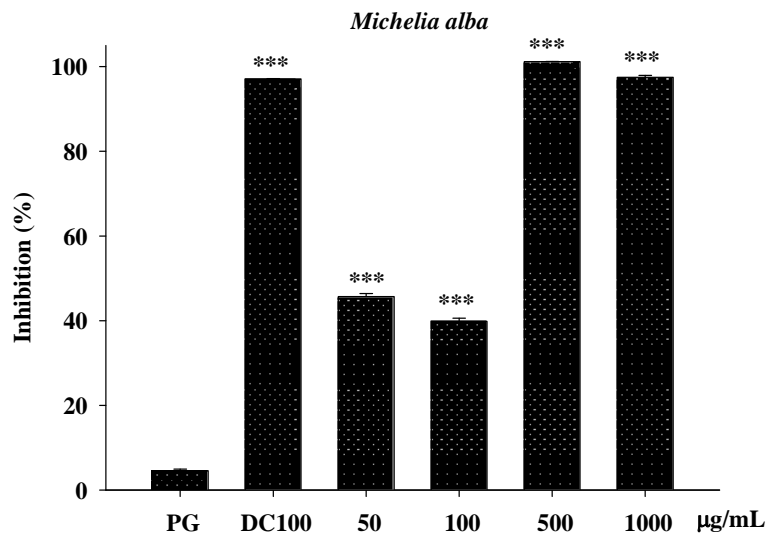
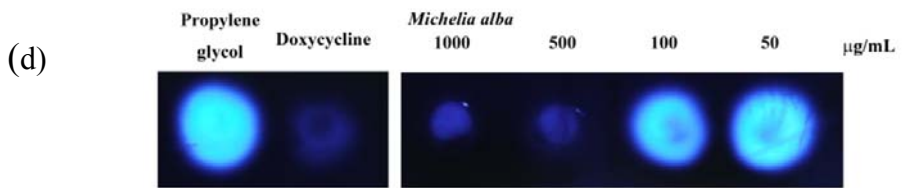
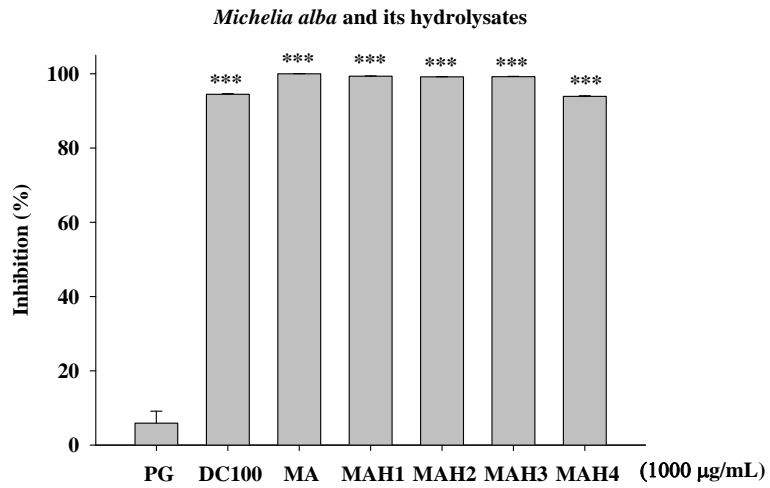
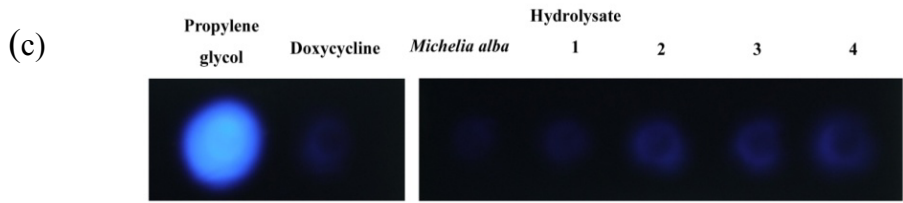
光井武夫 (2004). 新化粧品學, 2 edn.

李幸祥 (2007). 藥草圖鑑事典 (旺文社股份有限公司).

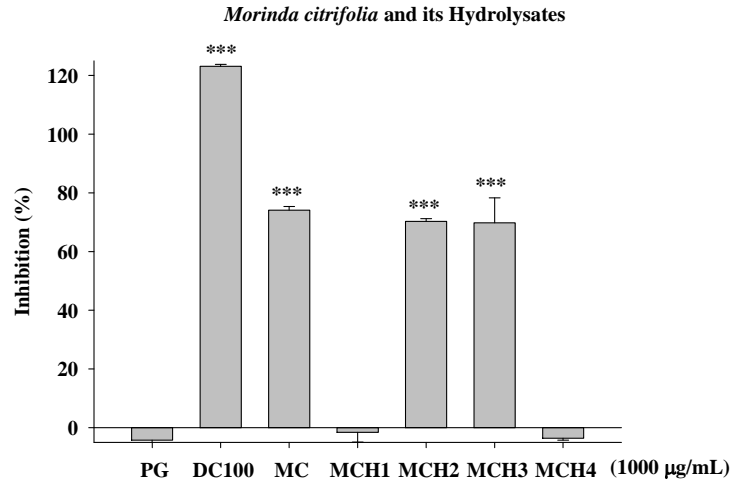
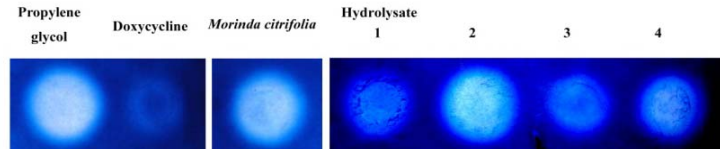
張新湘 (1977). 實用皮膚科學.

郭昭麟 (2006). 常見藥用植物圖鑑 (行政院衛生署中醫藥委員會).





(e)



(f)

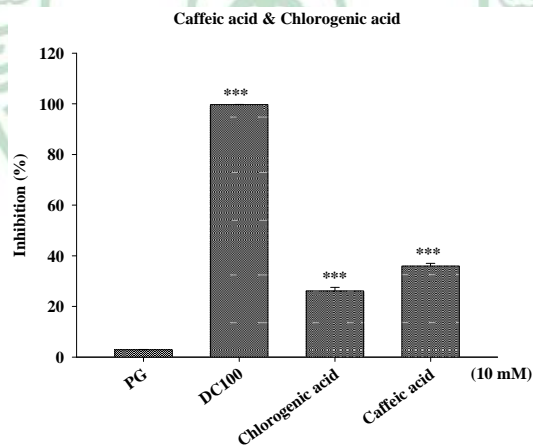
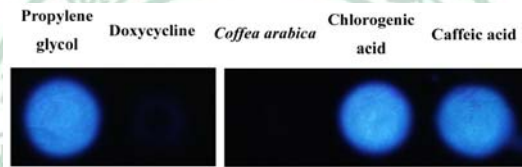


Fig.1 The inhibition of *Coffea arabica*, *Michelia alba* and *Morinda citrifolia* extract and their hydrolysates on collagenase activity.

(a) *Coffea arabica* and its hydrolysates 1000 µg/mL (b) *Coffea arabica* 50-1000 µg/mL (c) *Michelia alba* and its hydrolysates 1000 µg/mL (d) *Michelia alba* 50-1000 µg/mL (e) *Morinda citrifolia* and its hydrolystaes 1000 µg/mL (f) *Coffea arabica* (1000 µg/mL), chlorogenic acid and caffeic acid (100 µM)

(Hydrolysate 1: hydrolyzed by 1.2 N HCl for 30 min; hydrolysate 2: 1.2 N HCl for 60 min; hydrolysate 3: 2.4 N HCl for 30min; hydrolysate 4: 2.4 N HCl for 60min)

(* , P< 0.05; ** , P< 0.01; *** , P< 0.001)

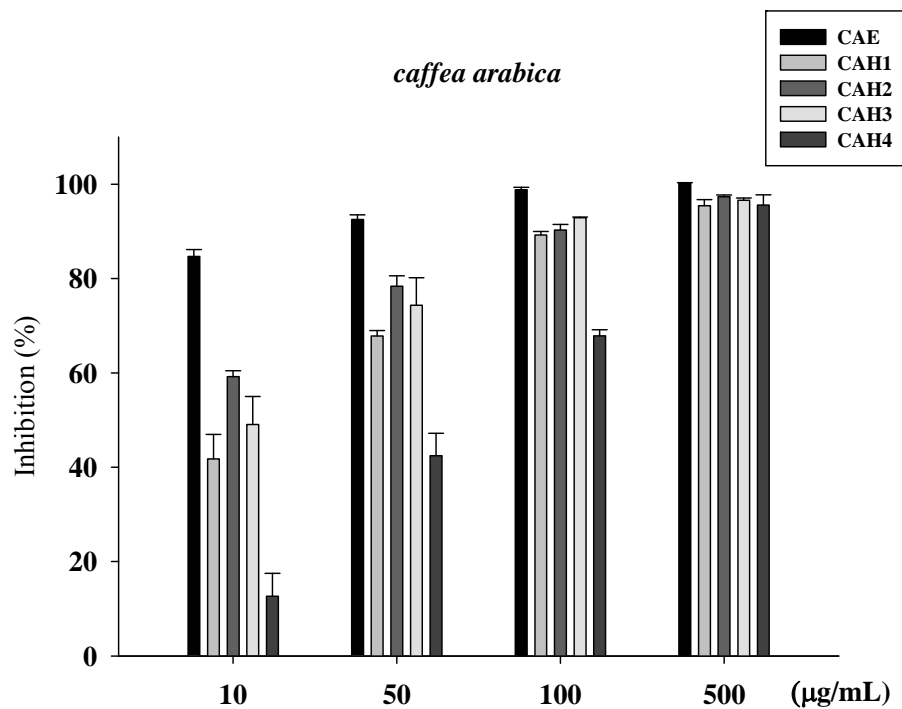


Fig. 2 The inhibition (%) of *Coffea arabica* extract and its hydrolysates on the activity of bacterial collagenase.

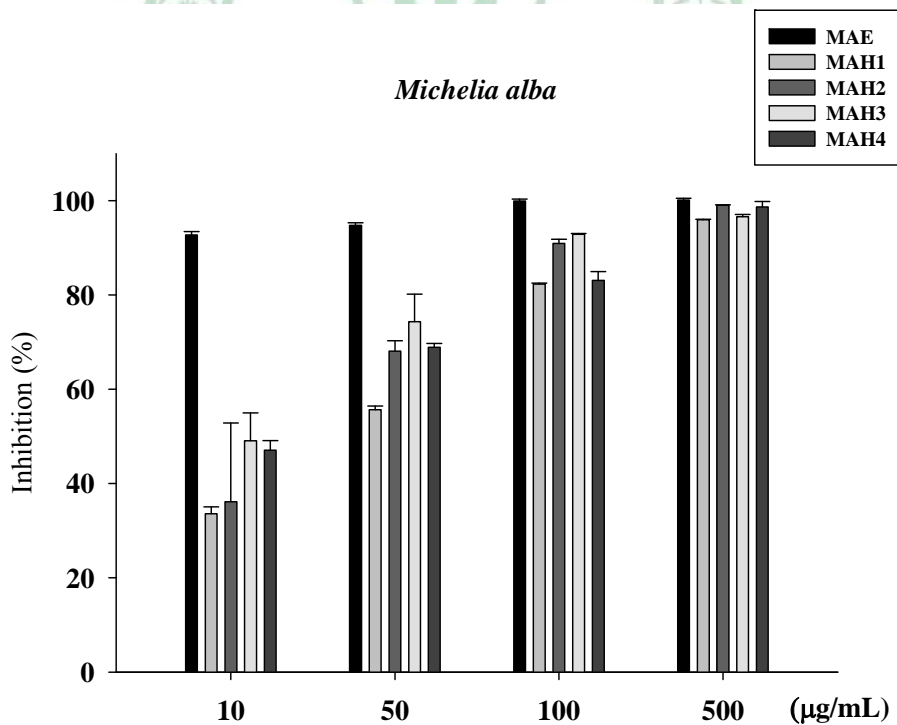


Fig. 3 The inhibition (%) of *Michelia alba* extract and its hydrolysates on the activity of bacterial collagenase.

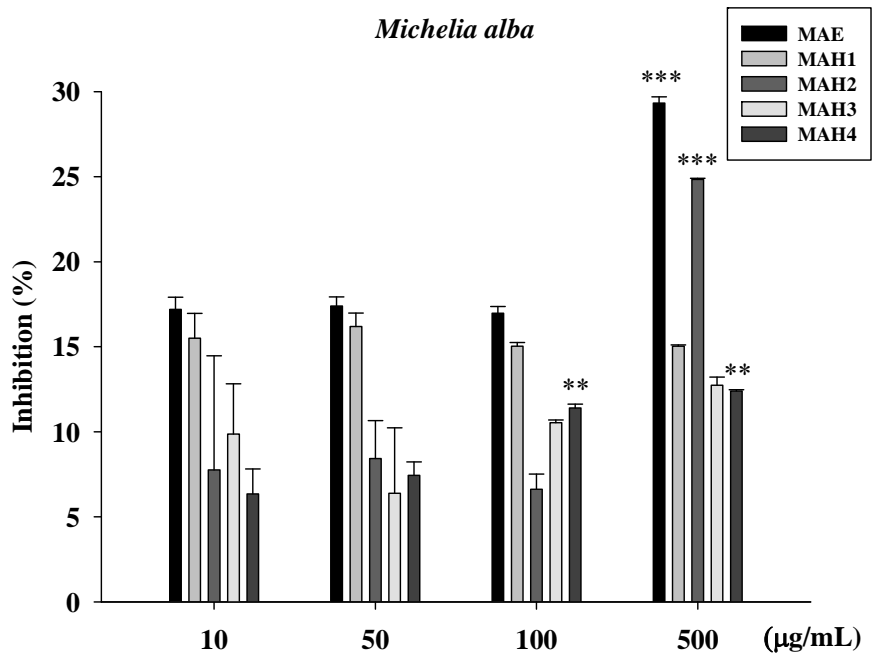


Fig. 4 The inhibition (%) of *Michelia alba* extract and its hydrolysates on the activity of porcine elastase. (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

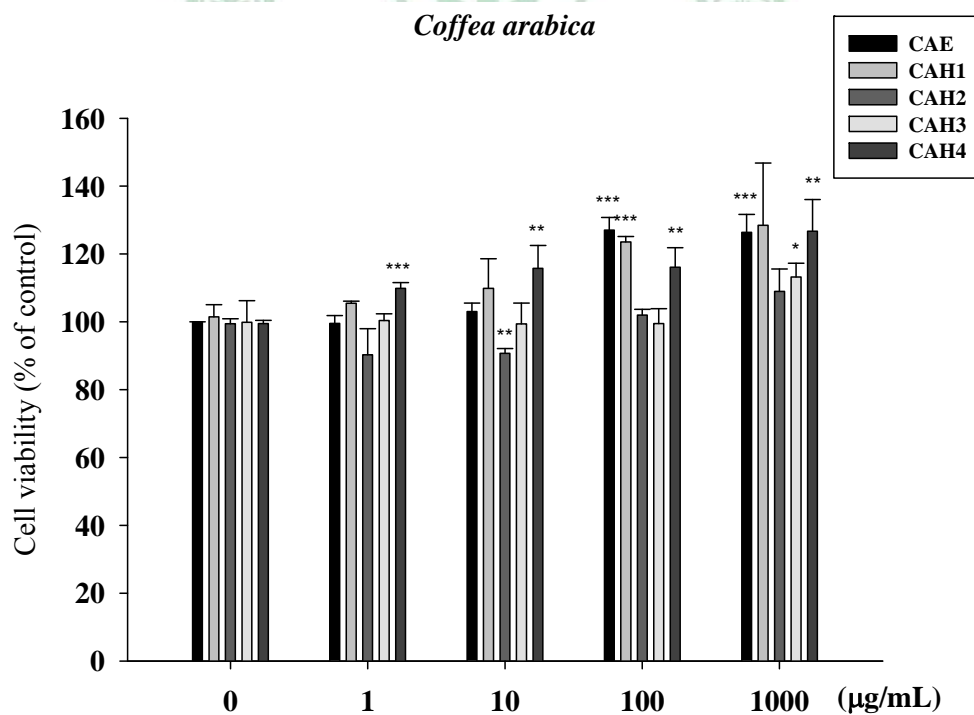


Fig. 5 Cell viability (%) of *Coffea arabica* extract and its hydrolysates on human foreskin fibroblast. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

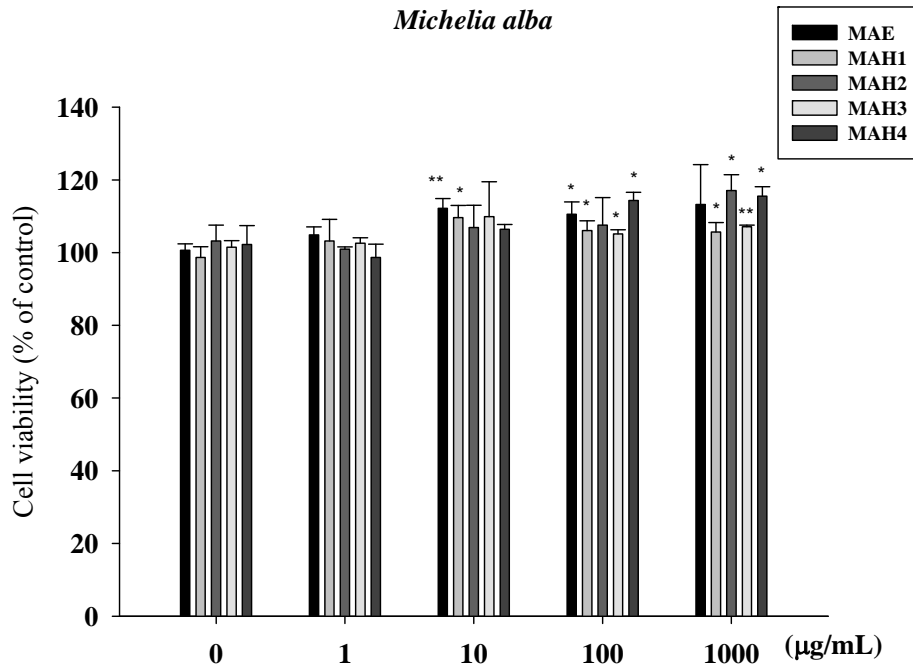


Fig. 6 Cell viability (%) of *Michelia alba* extract and its hydrolysates on human foreskin fibroblast. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

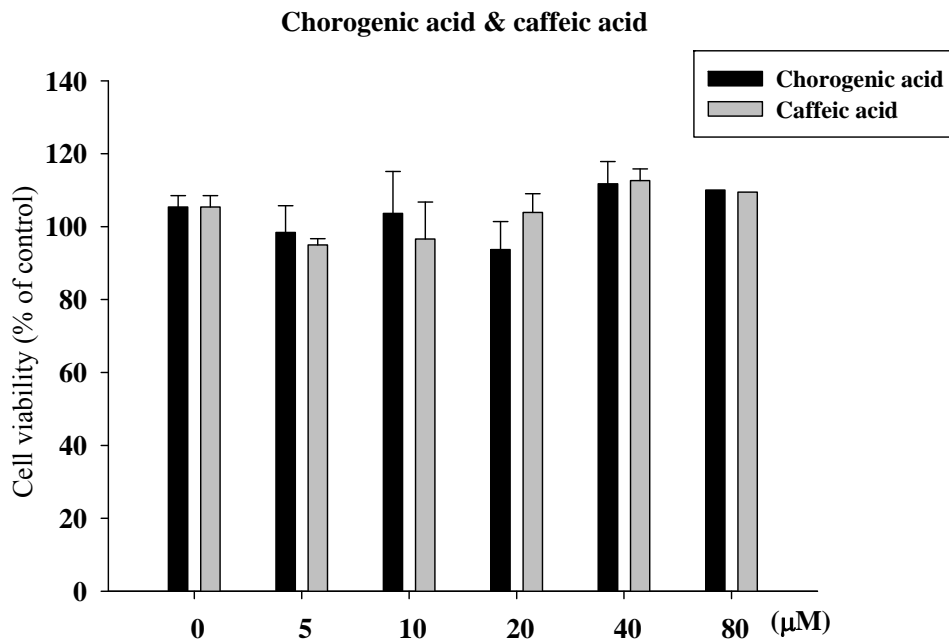


Fig. 7 Cell viability (%) of chlorogenic acid and caffeic acid on human foreskin fibroblast.

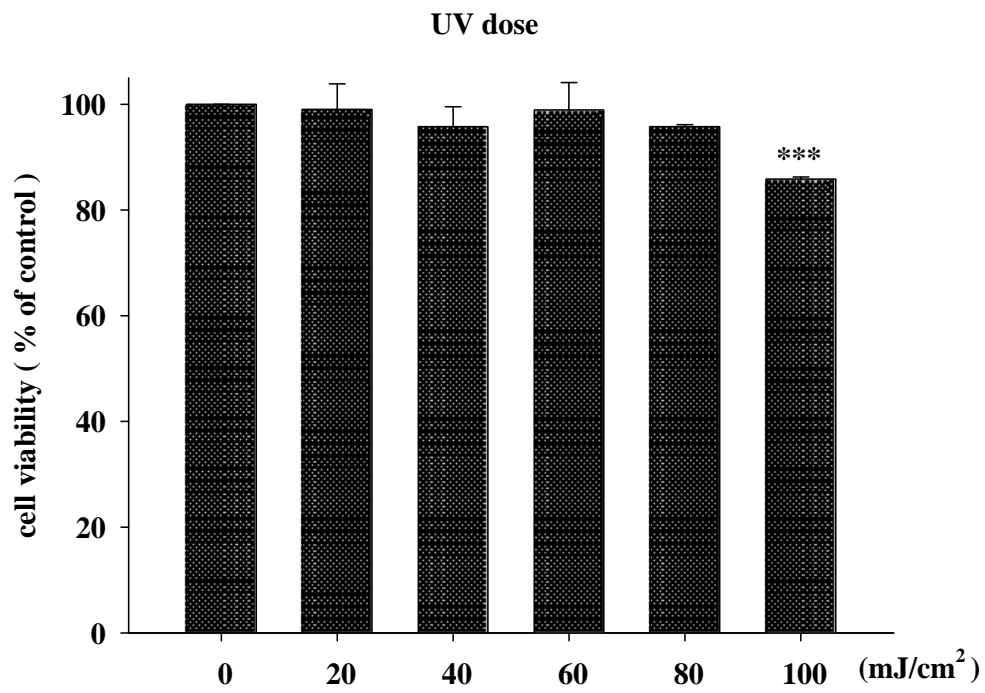
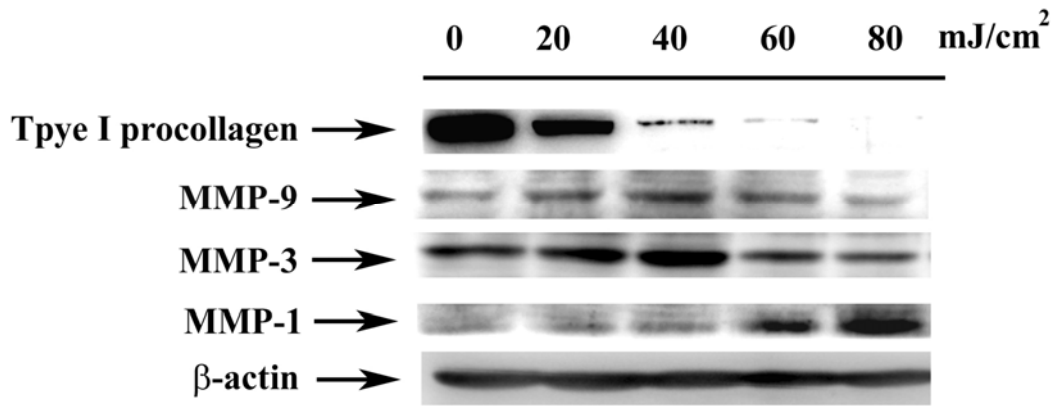
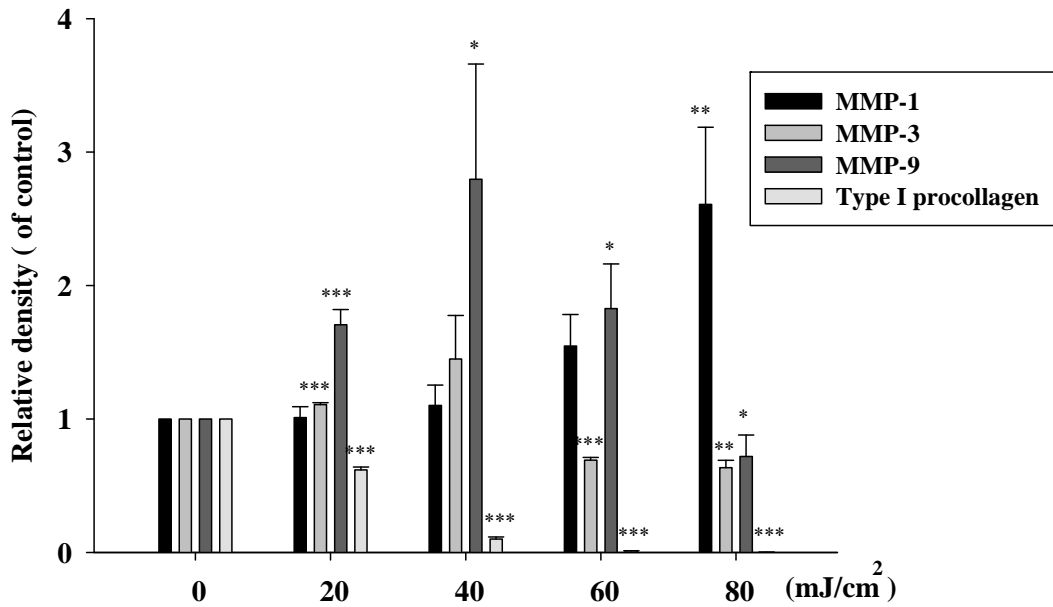


Fig. 8 Cell viability (%) of various dose UVB irradiation on human foreskin fibroblast. (***, $P < 0.001$)

(a)



UV-induced Expression of MMPs and Procollagen



(b)

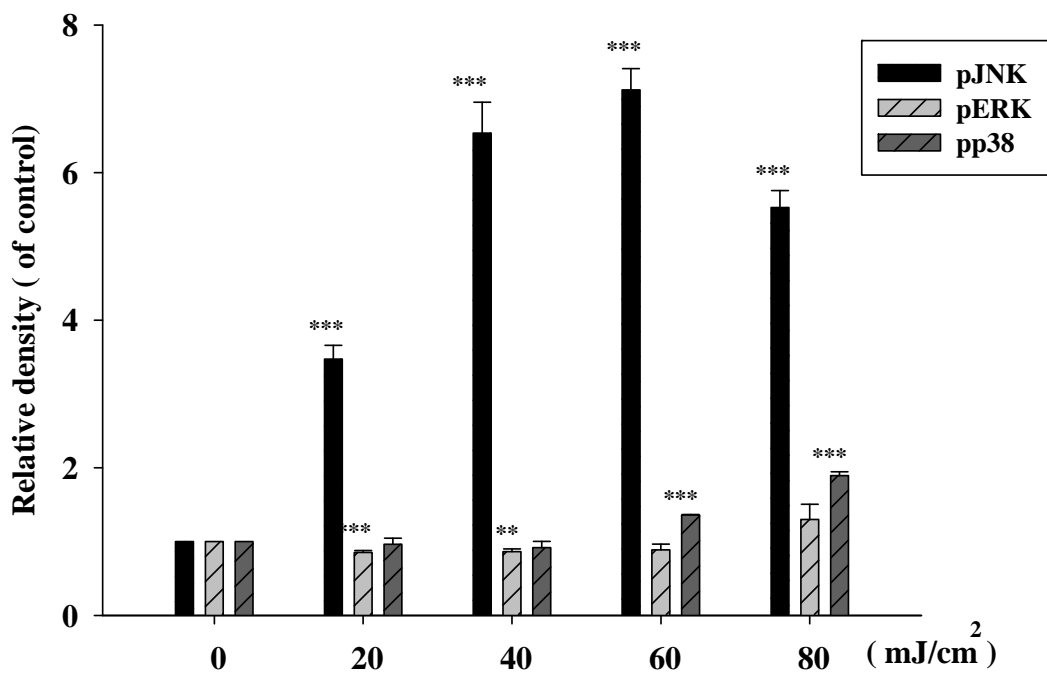
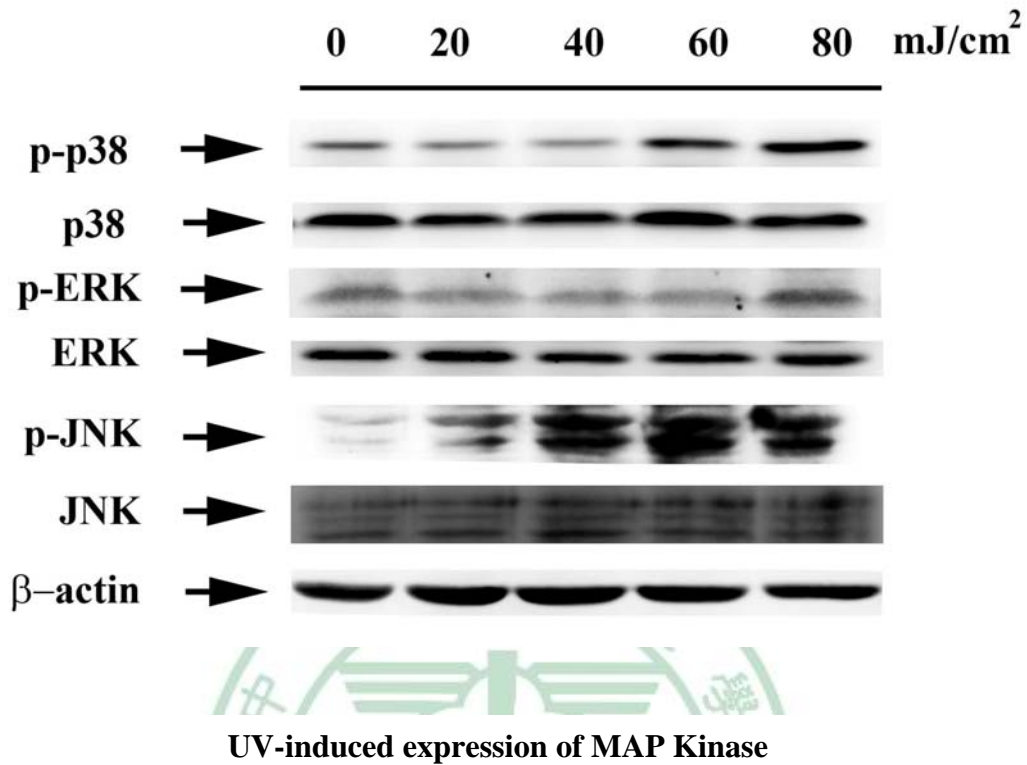


Fig. 9 UVB-induced expression of MMP-1, 3, 9, type I procollagen and MAP kinase. (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

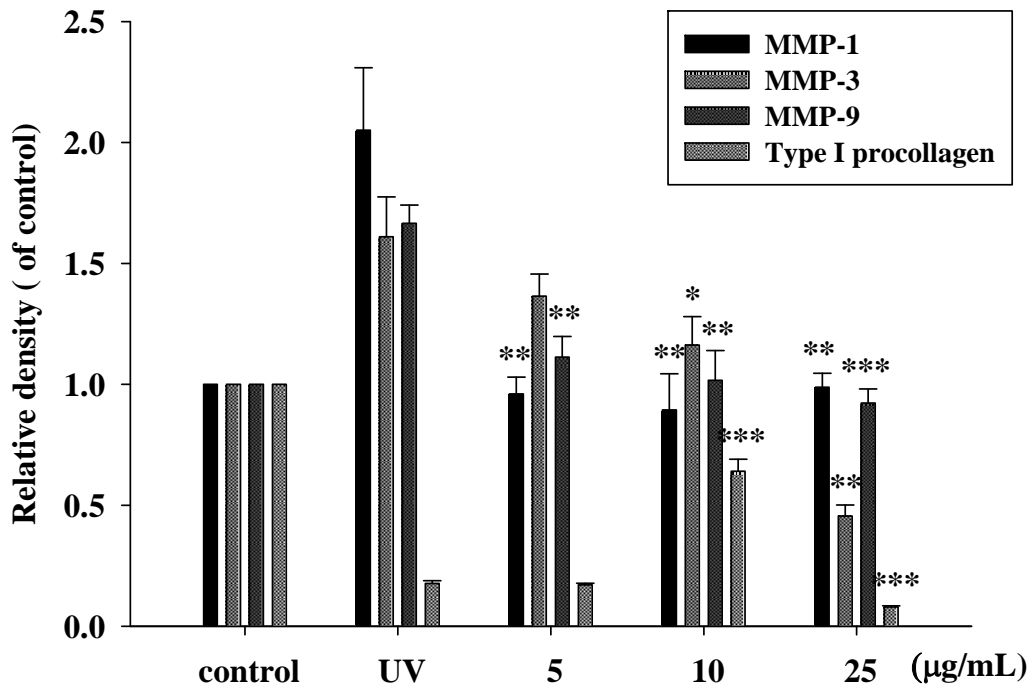
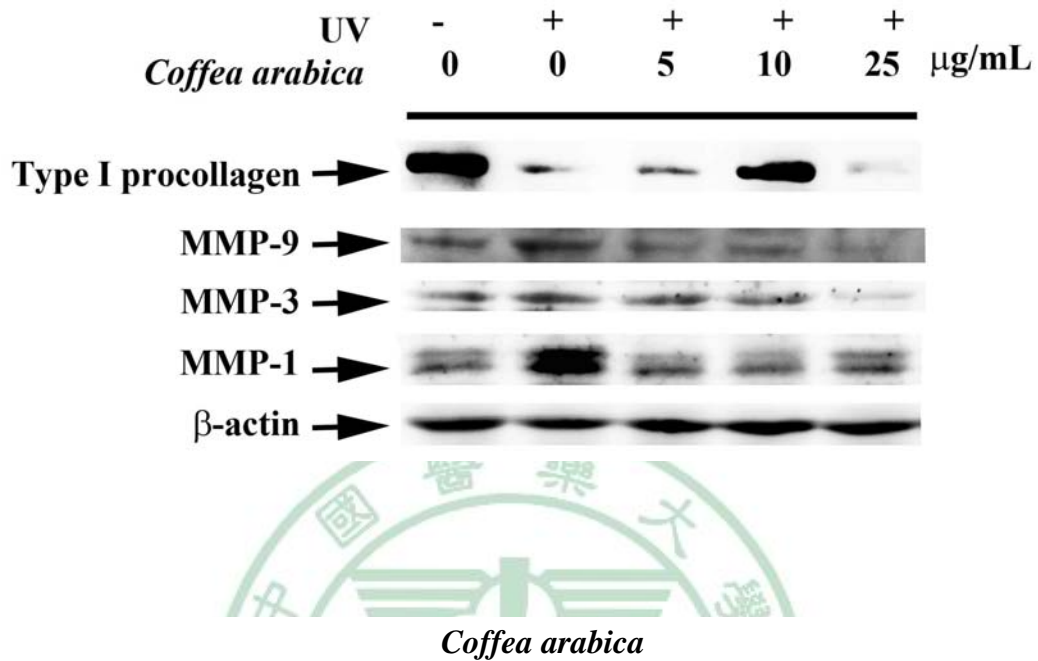


Fig. 10 Effect of *Coffea arabica* extract on the UVB-induced expression of MMP-1, 3 and 9 and type I procollagen in human fibroblast. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

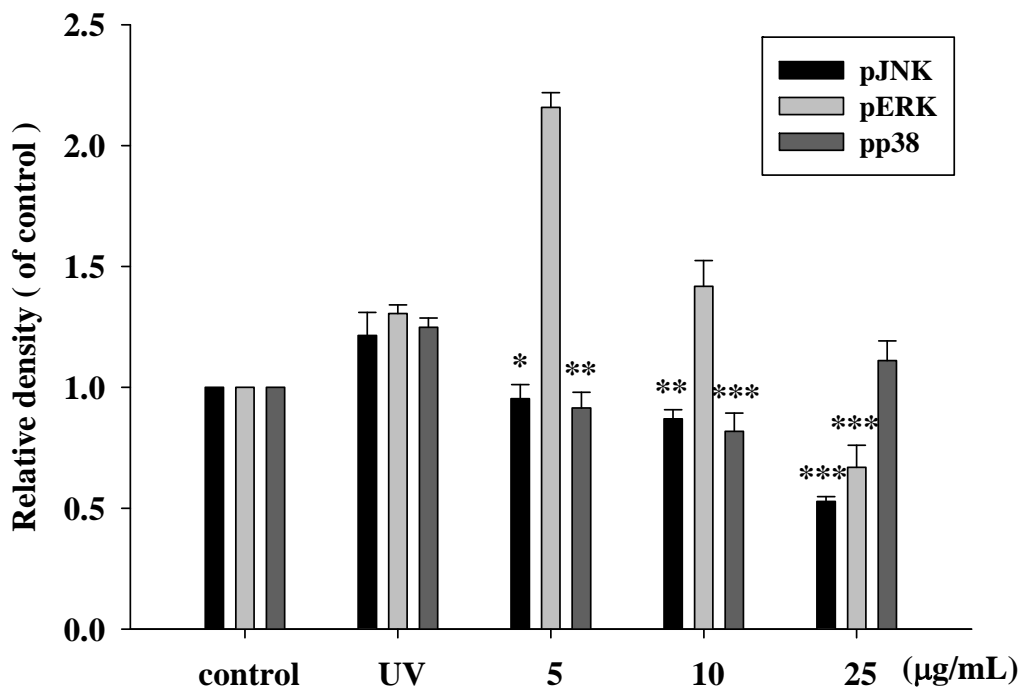
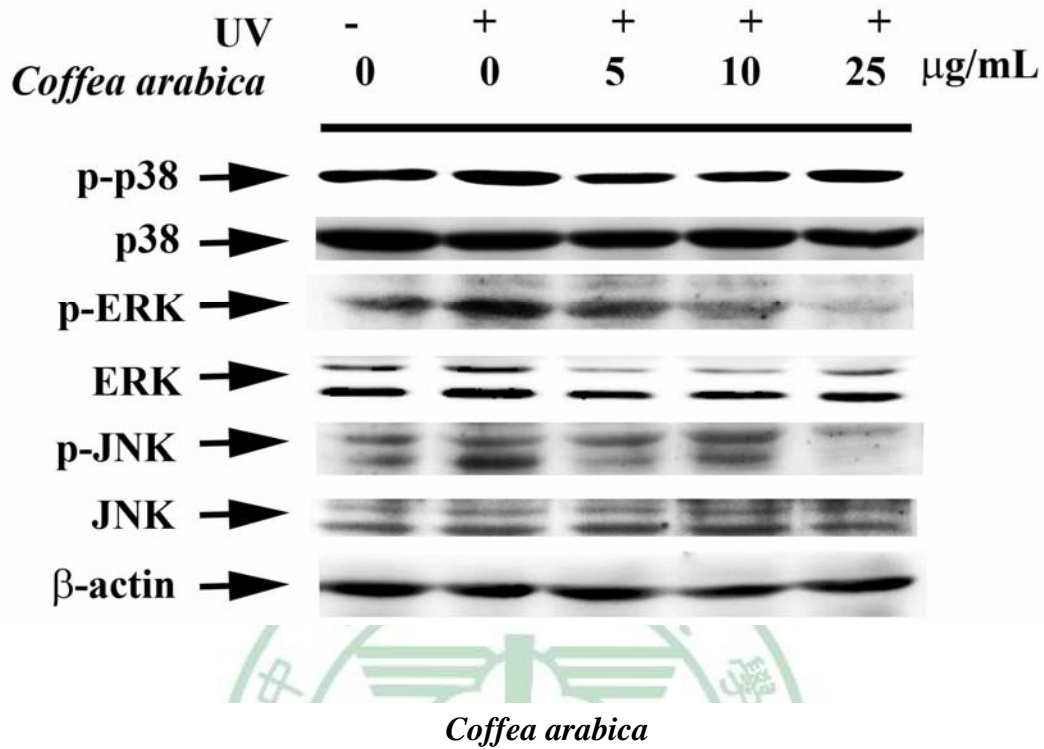


Fig. 11 Effect of *Coffea arabica* extract on the UVB-induced expression of MAP kinases in human fibroblast. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

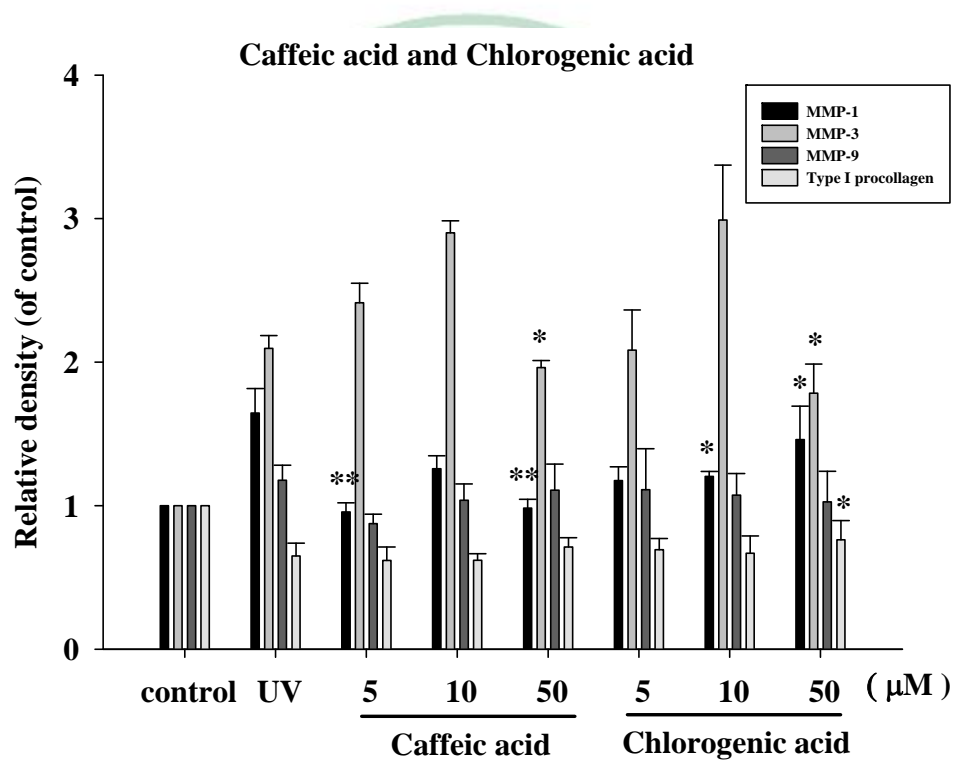
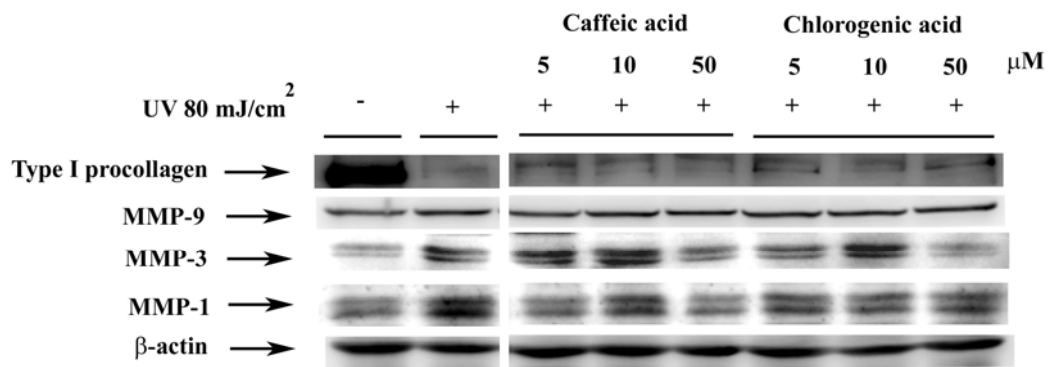


Fig. 12 Effect of caffeic acid and chlorogenic acid on the UVB-induced expression of MMP-1, 3, 9 and type I procollagen in human fibroblast. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

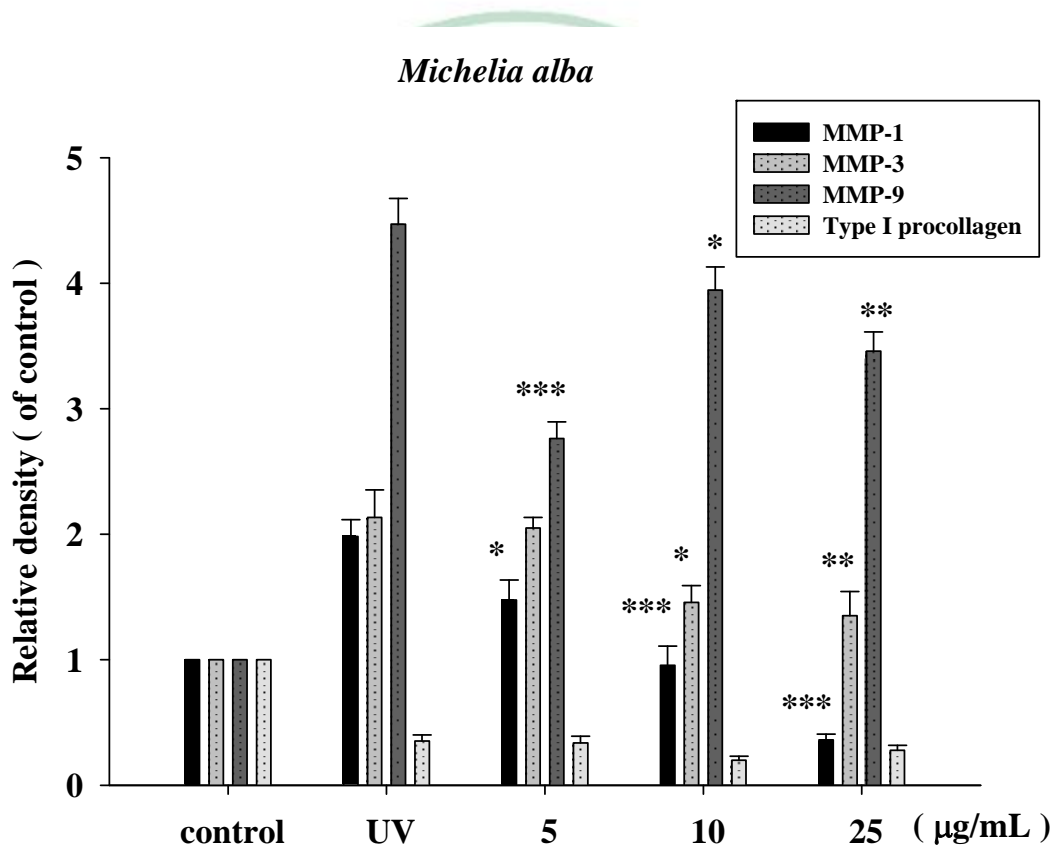
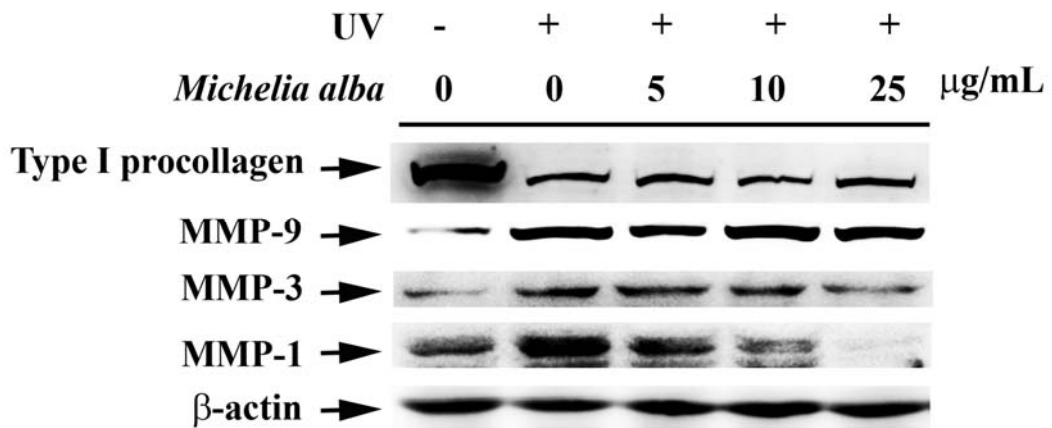


Fig. 13 Effect of *Michelia alba* extract on the UVB-induced expression of MMP-1, 3, 9 and type I procollagen in human fibroblast. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

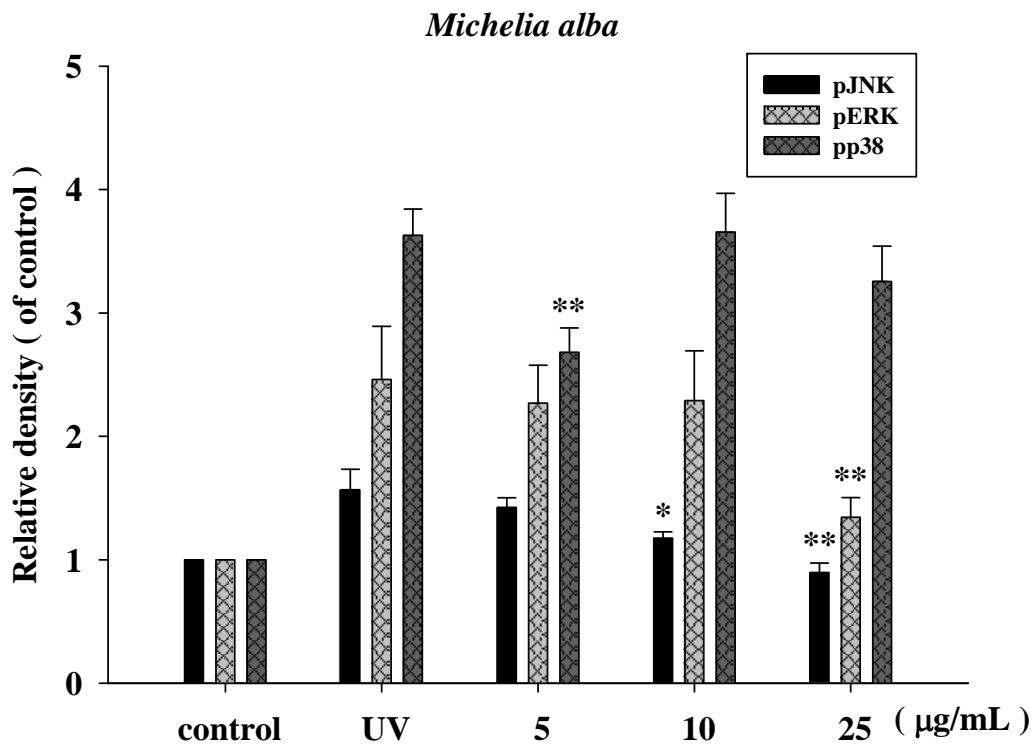
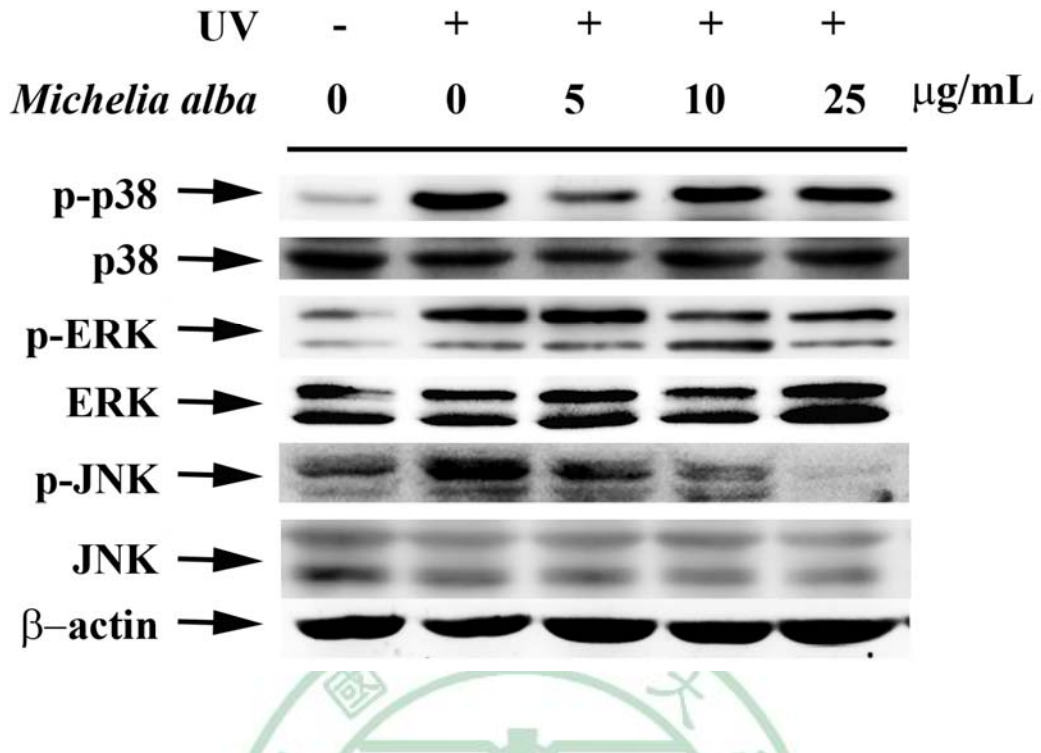


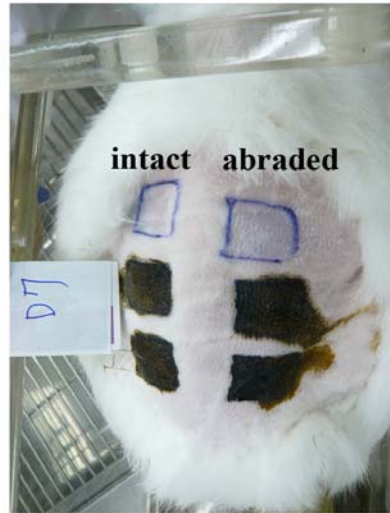
Fig. 14 Effect of *Michelia alba* extract on the UVB-induced expression of MAP kinases in human fibroblast. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

D 7

(a) Before



(b) 0 h



(c) 24 h



(d) 72h



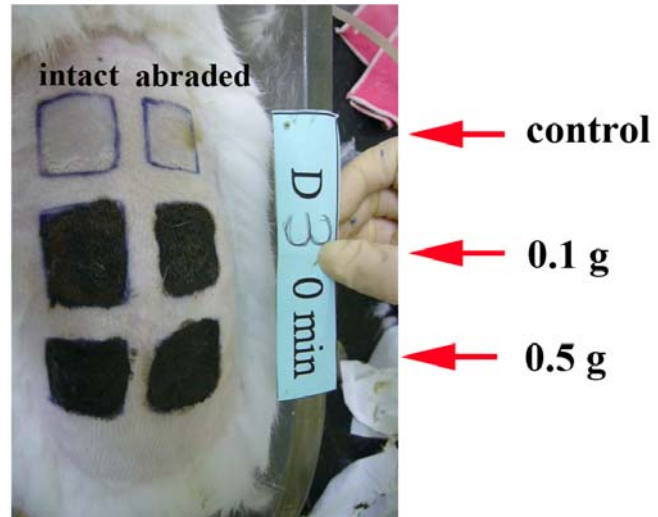
Fig. 15 The primary skin irritation test of *Coffea arabica* extract in the rabbit. (a) Before treating with *Coffea arabica* extract (b) After applying to skin with 0.1 g and 0.5 g of *Coffea arabica* extract (c) After a 24 hour exposure (d) After a 72 hour exposure.

D 3

(a) Before



(b) 0 h



(c) 24 h



(d) 48 h



Fig. 16 The primary skin irritation test of *Michelia alba* extract in the rabbit. (a) Before treating with *Michelia alba* (b) After applying to skin with 0.1 g and 0.5 g of *Michelia alba* extract (c) After a 24 hour exposure (d) After a 72 hour exposure.

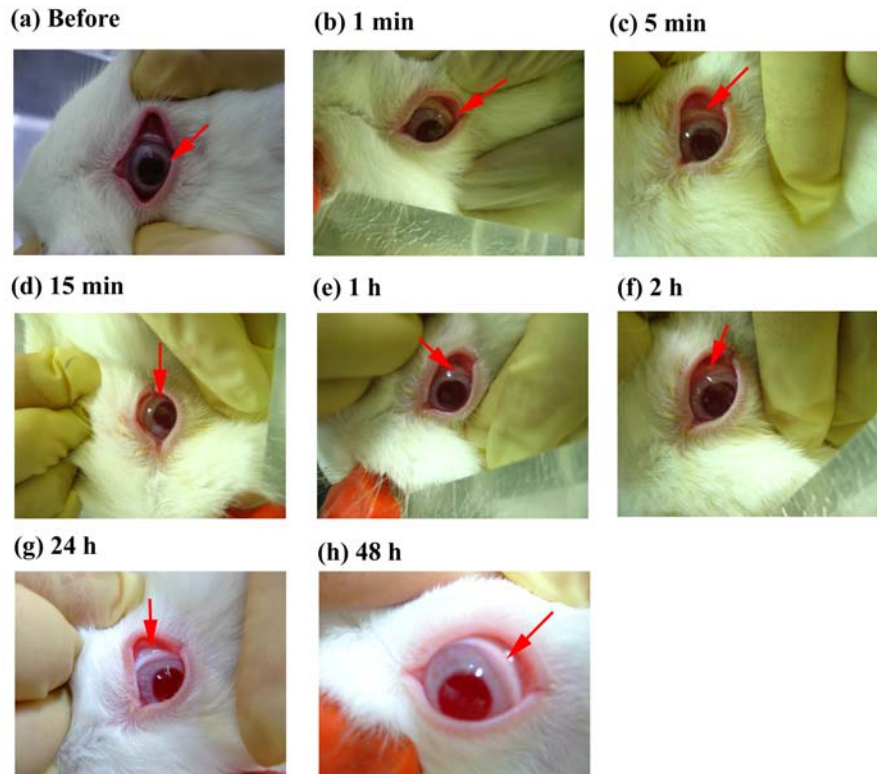


Fig. 17 The Draize eye test of *Coffea arabica* extract in the rabbit.

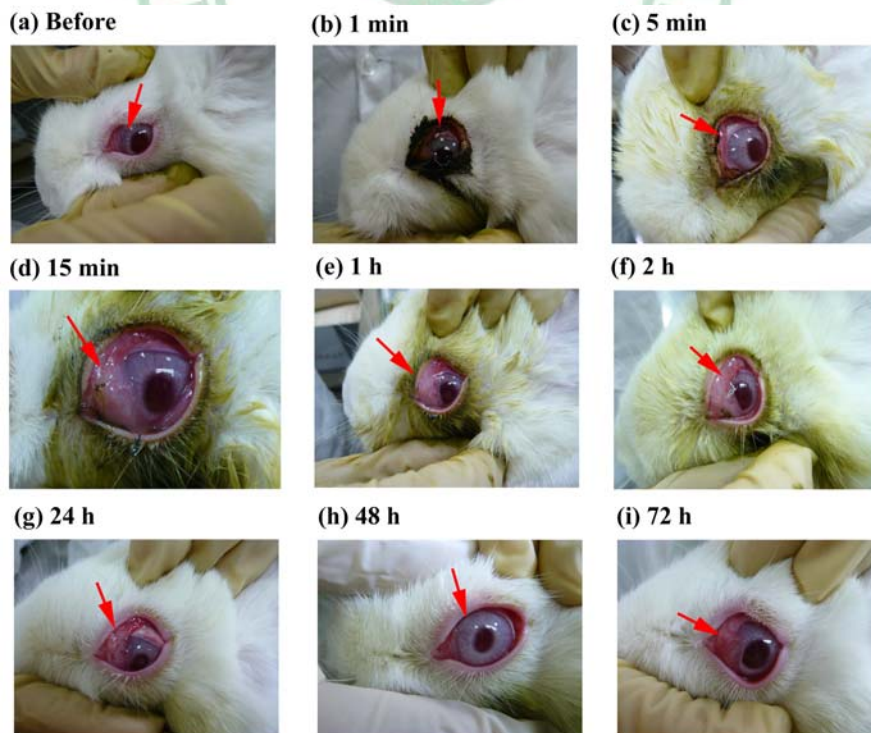


Fig. 18 The Draize eye test of *Michelia alba* extract in the rabbit.

表

Table 1 The inhibition rate of *Coffea arabica* and *Michelia alba* extract on bacterial collagenase by gelatin digestion assay

concentration ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Coffea arabica</i>	<i>Michelia alba</i>
50	52.7 ± 0.12	45.9 ± 0.52
100	97.7 ± 0.11	40.0 ± 0.54
500	101.7 ± 0.01	101.2 ± 0.03
1000	100.1 ± 0.03	97.6 ± 0.35

Table 2 The inhibition rate of *Coffea arabica*, *Michelia alba* and *Morinda citrifolia* extract and their hydrolysates on bacterial collagenase by gelatin digestion assay

sample	Plant %	<i>Coffea arabica</i>	<i>Michelia alba</i>	<i>Morinda citrifolia</i>
		extract	100.0 ± 0.05	100.1 ± 0.03
	H1	99.5 ± 0.06	99.3 ± 0.13	-2.7 ± 2.11
	H2	96.7 ± 0.08	99.1 ± 0.14	69.9 ± 1.26
	H3	97.1 ± 0.07	99.2 ± 0.12	60.5 ± 17.80
	H4	95.1 ± 0.23	93.7 ± 0.40	-3.3 ± 0.97

Hydrolysate 1: 1.2 N, 30 min; hydrolysate 2: 1.2 N, 60 min; hydrolysate 3: 2.4 N, 30min; hydrolysate 4: 2.4 N, 60min

Table 3 The inhibition rate of *Coffea arabica* extract and its hydrolysates on bacterial collagenase using fluorometric assay

concentration ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Coffea arabica</i>				
	extract	H1	H2	H3	H4
10	84.6 ± 1.46	41.8 ± 5.19	59.2 ± 1.26	49.1 ± 6.00	12.7 ± 4.81
50	92.5 ± 0.11	67.8 ± 1.13	78.4 ± 2.20	74.3 ± 5.83	42.4 ± 4.78
100	98.9 ± 0.51	89.2 ± 0.74	90.3 ± 3.50	92.9 ± 0.15	67.9 ± 1.28
500	100.3 ± 0.05	95.4 ± 1.28	97.3 ± 0.36	96.6 ± 0.50	95.6 ± 2.18

Hydrolysate 1: 1.2 N, 30 min; hydrolysate 2: 1.2 N, 60 min; hydrolysate 3: 2.4 N, 30min; hydrolysate 4: 2.4 N, 60min

Table 4 The inhibition rate of *Michelia alba* extract on bacterial collagenase using fluorometric assay

concentration ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Michelia alba</i>				
	extract	H1	H2	H3	H4
10	92.7 ± 0.72	33.6 ± 1.46	36.2 ± 16.7	49.1 ± 5.95	47.1 ± 2.00
50	94.8 ± 0.53	55.6 ± 0.79	68.1 ± 2.23	74.3 ± 5.83	68.9 ± 0.81
100	99.9 ± 0.40	82.3 ± 0.23	91.0 ± 0.90	92.9 ± 0.15	83.1 ± 1.86
500	100.1 ± 0.37	96.0 ± 0.08	99.0 ± 0.07	96.6 ± 0.47	98.7 ± 1.14

Table 5 The inhibition rate of *Michelia alba* extract and its hydrolysates on porcine elastase

concentration ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Michelia alba</i>				
	extract	H1	H2	H3	H4
50	17.2 ± 0.7	15.5 ± 1.4	7.8 ± 6.7	9.9 ± 3.0	6.4 ± 1.5
100	17.4 ± 0.5	16.2 ± 0.0	8.4 ± 2.2	6.4 ± 3.8	7.4 ± 0.8
500	17.0 ± 0.4	15.0 ± 0.2	6.6 ± 0.9	10.5 ± 0.2	11.4 ± 0.2
1000	29.3 ± 0.3	15.0 ± 0.1	24.8 ± 0.2	12.7 ± 0.5	12.4 ± 0.1

Table 6 The scores of primary skin irritation test of *Coffea arabica* extract at low dose (0.1 g) in the rabbit

Rat	1		2		3		4		Mean \pm SD	
	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded
Time (h)										
24	0	2	0	0	0	3	0	0	0.00 ± 0.00	1.25 ± 1.30
48	0	0	0	0	0	1	0	0	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.43

Table 7 The scores of primary skin irritation test of *Coffea arabica* extract at high dose (0.5 g) in the rabbit

Rat	1		2		3		4		Mean± SD	
	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded
24	0	3	0	0	0	5	0	0	0.00 ± 0.00	2.00 ± 2.12
48	0	1	0	0	0	1	0	0	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.50

Table 8 The scores of primary skin irritation test of *Michelia alba* extract at low dose (0.1 g) in the rabbit

Rat	1		2		3		4		Mean± SD	
	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Table 9 The scores of primary skin irritation test of *Michelia alba* extract at high dose (0.5 g) in the rabbit

Rat	1		2		3		4		Mean± SD	
	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded	intact	abraded
24	0	0	0	1	0	1	0	0	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.50
48	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.50

Table 10 The scores of Draize eye test of *Coffea arabica*

Time (h)	Rat			Mean± SD
	1	2	3	
1	0	0	0	0.00 ± 0.00
24	0	0	0	0.00 ± 0.00
48	0	0	0	0.00 ± 0.00
72	0	0	0	0.00 ± 0.00

Table 11 The scores of Draize eye test of *Michelia alba*

Time (h)	Rat				Mean± SD
	1	2	3	4	
1	0	0	0	0	0.00 ± 0.00
24	0	0	0	0	0.00 ± 0.00
48	0	0	0	0	0.00 ± 0.00
72	0	0	0	0	0.00 ± 0.00

附錄一 Draize evaluation of dermal reactions

SKIN REACTIONS	SCORE
Erythema and Eschar Formation (Most severely affected area graded):	
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
NOTE: Test sites assigned a “4” score for erythema require further description as to the extent of tissue injury.	
Edema Formation (Most severely affected area graded):	
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raising approximately 1 millimeter)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond the area of exposure)	4

附錄二 Draize's scale of weighted scores for grading the severity of ocular lesions

Assessment	Score
Cornea	
A. Opacity—Degree of density (most dense area taken for reading)	
Scattered or diffuse area; details of iris clearly visible	1
Easily discernible translucent areas; details of iris slightly obscured	2
Opalescent areas; no details of iris visible, size of pupil barely discernible	3
Opaque; iris invisible	4
B. Area of cornea involved	
One quarter (or less) but not zero	1
Greater than one quarter, less than one half	2
Greater than one half, less than three quarters	3
Greater than three quarters, up to whole area	4
Score= A × B × 5 (range, 0 to 80)	
Iris	
A. Values	
Folds above normal, congestion, swelling, and/or circumcorneal injection; iris still reacting to light (sluggish reaction is positive)	1
No reaction to light, hemorrhage, and/or gross destruction	2
Score= A × 5 (range, 0 to 10)	
Conjunctivae	
A. Redness of palpebral conjunctivae	

Vessels definitely injected above normal	1
More diffuse, deeper crimson red; individual vessels not easily discernible	2
Diffuse beefy red	3
B. Chemosis	
Any swelling above normal (includes nictitating membrane)	1
Obvious swelling with partial eversion of the lids	2
Swelling with lids about half closed	3
Swelling with lids about half closed to completely closed	4
C. Discharge	
Any amount different from normal	1
Discharge with moistening of the lids and hairs just adjacent to the lids	2
Discharge with moistening of the lids and considerable area around the eye	3
Score	(A + B + C) × 2 (range, 0 to 20)
Total score = Sum of all scores obtained for the cornea, iris, and conjunctivae.	

附錄三 The Score system of skin irritation

Evaluation of Primary irritation index (PII)

Score	Evaluation
0	Nonirritation
0.04~0.99	Irritation barely perceptible
1.00~1.99	Slight irritation
2.00~2.99	Mild irritation
3.00~5.99	Moderate irritation
6~8	Severe irritation

附錄四 Draize-Test: The Score system of Eye irritation

Score	Assessment
0	Nonirritation
0.1~15.0	Minimal irritation
15.0~25.0	Mild irritation
25.0~50.0	Moderate irritation
50.0~80.0	Severe irritation
80.0~110	Extreme irritation