

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(9)——

大豆異黃酮在抗禿頭保養品之開發與評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：林維炤

共同主持人：

計畫參與人員：余兆松，張力元，王涵穎

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國94年02月24日

一、摘要：

本研究評估大豆異黃酮萃取物對於 5 α -還原酶的抑制作用。實驗中以 PCR 方法對兩種 pCMV7-5aR 質體進行複製並轉移到 HEK 293 細胞。分別添加經水解與未經水解的大豆異黃酮萃取液。結果顯示兩者對於 5 α -還原酶均有抑制作用。所得數據，可以提供以後做為抗落髮保養品基礎。

二、前言：

雄性禿是最常見男性掉髮,40%年屆 40 歲以上男性受影響,有些甚至在 20 多歲便出現。雄性禿受兩個因素影響,一是多基因遺傳,二是雄性荷爾蒙。雄性荷爾蒙(睪固酮)隨血液循環到頭髮的毛囊細胞,毛囊細胞質中有 5a-reductase,把睪固酮轉化成二氫睪固酮(DHT),DHT 會進入毛囊細胞核中,對於代謝系統產生抑制作用,使毛囊無法進行蛋白的合成,成為休止期毛髮,約三個月就會脫髮萎縮。5a-reductase 有二種 isoenzyme,type1 主要分佈在皮脂腺,type2 分佈在毛囊與攝護腺。

柔沛(finasteride)主要作用是抑制 type 2 5a-reductase,使 DHT 的濃度降低,阻止毛囊細小化作用,使禿頭部位毛囊回復原來生長週期。柔沛是經肝臟代謝,且須長期服用,如有肝功能異常須小心使用,1%會出現可逆性性功能障礙。

有一部分異黃酮素(isoflavones) or 類黃酮素(flavonoids)對 type 2 5a-reductase 具有抑制能力,理論上可以運用在改善雄性禿,因此我們篩選自然界中具有抑制 type2 5a-reductase 的異黃酮素或類黃酮素,製成各種劑型讓產品有效地經皮吸收,並應用在人體上改善雄性禿頭皮的狀態(包括皮脂腺分泌)

三、材料與方法：

(A) 複製穩定表現 5 α -還原酶的 HEK293

(I) 材料:

(1) 兩種 pCMV7-5aR 質體,含有全段人類 cDNAs 包含兩種 5 α -還原酶編碼。

(2) PCR 引子能接上EcoRI 端(5') 與 XbaI 端 (3'). 引子的序列為

LCHP-4 (5'-CTA CCA GTA TCG AAT TCG ATG CAG GTT CAG TGC CAG CAG AGC-3') LCHP-6 (5'-CTA CCA GTA GCT CTA GAT TAA AAG ATG AAT GGA ATA AGG GC-3').

- (3) CMV 促進劑
- (4) p3_ FLAG-CMV-10 (Sigma Chemical, USA).
- (4) HEK293 細胞
- (5) lipofectamine plus (Life Technologies, USA)
- (6) G418 sulfate (400 mg/ml)
- (7) anti-FLAG Tag (Sigma Chemical, USA)
- (8) anti-5 α reductase type 2 (Biogenesis Ltd, UK) antibodies.

(II) 實驗流程

- (1) 以 pCMV7-5 α R2 質體與引子進行聚合酶鏈鎖(PCR)反應。PCR 產物為單股0.82 kb .
- (2) 將 PCR 產物接到表現p3_ FLAG-CMV-10 的CMV 促進劑。得到 p3_ FLAGCMV-5 α R2; 7.2 kb 。
- (3) 將p3_ FLAGCMV-5 α R2; 7.2 kb 到 HEK293 細胞。
- (4) 以西方點墨法確認。

(B) 5 α -還原酶的抑制效果評估

(I)材料

- (1) [¹⁴C]testosterone

(II) 流程

- (1) 將細胞在 37°C, 5% CO₂ 下, 加入 0.05 μ Ci 進行一天培養。
- (2) 比較有加入萃取液與沒有加入大豆異黃酮萃取液的testosterone 轉換至 dihydrotestosterone 的轉換率。將添加後的樣品培養 6 小時後進行評估。將樣品以乙醚萃取後, 以 TLC 將 testosterone 與 dihydrotestosterone 分離後, 以同位素法測定C¹⁴- testosterone 與 C¹⁴- dihydrotestosterone 的比例。

四、結果與討論：

(1) HEK 細胞的 5 α -還原酶表現

在實驗中所選擇的 HEK293 細胞以西方點墨法確認。在西方點墨法中, 可以看到單股 30 kDa 的 DNA。以免疫細胞法則可以確定在細胞核中有 5 α -還原酶。

(2) 5 α -還原酶抑制效果:

大豆中所含有的異黃酮如圖一所示, 主要有 daidzein(黃豆素), genistein(金雀異黃酮素), 而在天然的大豆中, 常常會接上醣基而成為 daidzin, genistin。實驗中所使用的大豆異黃酮萃取物由德榮公司提供, 分

別為經水解與未經水解的大豆異黃酮萃取物，有效成分如表一所示。前者含有較多的 daidzin, genistin, 而後者則是 daidzein(黃豆素), genistein(金雀異黃酮素)。實驗中分別以這兩種大豆異黃酮萃取物進行評估，並且以柔沛(finasteride) 進行對照組。

所得的結果如表二所示。柔沛的 IC50 最小(0.37 μ m)，而兩種大豆異黃酮萃取物的 IC50 均十分的小，顯示對 5 α -還原酶均有抑制作用。其中水解後的大豆異黃酮效果比未水解的效果好，顯示 daidzein(黃豆素), genistein(金雀異黃酮素)比 daidzin, genistin 有較好的作用。



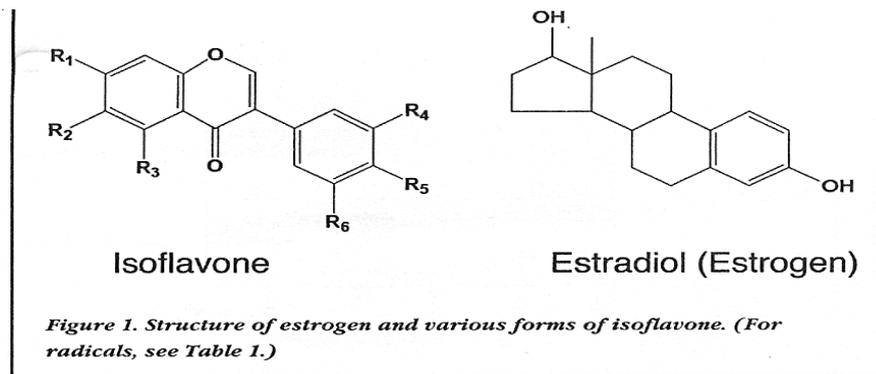


Table 1. Isoflavones of soybean extract, with radicals for Figure 1

Isoflavone	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Daidzein	H	H	H	H	OH	H
Daidzin	O-Glu	H	H	H	OH	H
Genistin	O-Glu	H	OH	H	OH	H
Glycitein	H	CH ₃ O	H	H	OH	H
Glycitin	O-Glu	CH ₃ O	H	H	OH	H

圖一 大豆異黃酮萃取物的有效成分

表一，實驗中所使用兩種大豆異黃酮萃取物的主要成分

	Genistin	Genistein	Daidzin	Daidzein
Type I	35.78%	0.46 %	13.76%	0.34%
Type II	-	15.38%	-	5.02%

表二 IC₅₀ 值

樣品	IC ₅₀ 值
Type I	12.4 um
Type II	3.52 um
Finasteride	0.37 um

參考資料

- (1) Park W.S., Lee C.H., Lee B.G. and Chang I.S.; J. of Dermatol. Sci. (2003)31, 91-98
- (2) Richard A. H., Zhang H.Z., Dai W., Dai Q. and Liao ST; Biochem. Pharma. (2002)63, 1165-1176.
- (3) Matias J.R., Malloy V. and Orentreich N.; Arch Dermatol. Res.:(1989)281, 247-253.

