

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

佳作

052003

鼠鞠草萃取物調節 NRF-2 轉錄因子救援 UVB 造成的皮膚細胞老化

學校名稱：臺中市私立嶺東高級中學

作者： 高二 陳凱欣 高二 李晨宇	指導老師： 陳錦苙
---------------------------------	------------------

關鍵詞：鼠鞠草、皮膚老化、NRF-2

鼠鞠草萃取物調節 NRF-2 轉錄因子救援 UVB 造成的皮膚細胞老化

摘要

人類皮膚接觸到陽光中的紫外線(UVB)會造成皮膚細胞內產生大量的自由基進而導致皮膚老化，本研究的目的是為了探討鼠鞠草萃取物是否可用於減緩 UVB 造成的皮膚老化。本實驗以 UVB 紫外燈來照射人類皮膚纖維母細胞，藉此模擬人類皮膚曬太陽所引起的老化狀況。由實驗結果得知，UVB 照射會造成皮膚細胞的傷害，包括皮膚細胞死亡、細胞移動能力的減緩、氧化壓力上升、老化蛋白質 p21 表現量上升、抗老化相關蛋白質 collagen1a1 的表現量下降；而加入鼠鞠草萃取物之後，上述造成皮膚細胞老化的病理現象都得到了明顯改善。進一步的研究，我們發現鼠鞠草萃取物是經由抗氧化蛋白質 NRF-2 表現量提升來抑制皮膚細胞的老化。

關鍵字：鼠鞠草、皮膚老化、NRF-2

壹、前言

一、研究動機

甚麼是老化?簡單言之，老化是隨著時間推移、年紀增長，身體組織及器官功能下降。若老化過程發生在皮膚組織，則會造成皮膚彈性變差、皺紋變多及傷口癒合速度變慢[1]。造成皮膚老化的原因有許多，除了年紀之外，促使皮膚加速老化的最大因素就是曬太陽。陽光中的紫外線照射會促使皮膚細胞產生自由基，而自由基的增加會使皮膚加速老化。故而延緩紫外線所造成的皮膚老化是目前在抗老化醫學中最重要的課題之一[2]。

二、研究背景與文獻回顧

(一) 曬太陽造成皮膚細胞加速老化的過程

隨著年齡增長，皮膚細胞生長速度減緩、製造膠原蛋白能力下降，使得肌膚乾燥沒有彈性，並容易長出細紋。造成皮膚細胞老化的原因可分成內在因素及外在因素。長期日曬、空氣污染、不良飲食習慣、過度使用 3C、生活作息不正常這些外在因素都會導致皮膚細胞加速老化[3]。而遺傳、新陳代謝減緩、疾病等這些內在因素亦會造成皮膚加速老化。皮膚組織的老化可以透過調整飲食習慣、將生活作息正常化、運動、減少接觸刺激皮膚的物質、使用保健食品及抗老化保養品的使用來維持組織正常運作，延緩皮膚老化。前述提及，曬太陽其中的紫外線會造成皮膚組織的加速老化，紫外線可分為紫外線 A(亦稱 UVA，其波長為 320-400 nm)、紫外線 B(亦稱 UVB，其波長為 290-320 nm)、紫外線 C(亦稱 UVC，其波長為 200-290 nm)。依據文獻指出太陽光所含三種波長的紫外線之中，UVB 可抵達地面對皮膚進行傷害。當皮膚細胞接觸到 UVB 之後，UVB 產生的能量會使細胞

內部誘發「連鎖反應(chain reaction)」因而產生大量的自由基，一旦產生自由基濃度超出一定範圍則會使得細胞內部造成氧化傷害，而細胞內部氧化傷害程度愈嚴重，細胞愈無法正常的運作，促使細胞造成損傷，並加速細胞老化[4]。若要減緩皮膚細胞老化的速度，最有效方式就是清除細胞內部多餘的自由基，例如吃抗氧化食物或是將含有抗氧化成份的保養品塗抹於皮膚之上[5]。皮膚的老化亦跟皮膚組織中原蛋白含量的多寡成正相關，皮膚組織中的膠原蛋白其主要功能是維持皮膚的彈性，還能支撐組織結構，保持皮膚緊緻不產生皺紋，另外膠原蛋白的增生亦會促進皮膚傷口癒合。然而 UVB 的照射會使皮膚細胞受損，受傷的皮膚細胞無法分泌足夠的膠原蛋白維持皮膚正常的生理功能，因而使皮膚塌陷及保水能力下降，令皮膚變乾且產生皺紋[5]。

(二) 鼠鞠草的特性

鼠鞠草(學名：*Pseudognaphalium affine*)，是鞠科鼠鞠草屬的一种植物，又名鼠麴草、清明草、佛耳草、母子草……等，其外觀為 10~20 公分高的小莖植物，花呈黃色，葉呈湯匙狀互生結構。鼠鞠草具備抗旱特性，非常好栽種，鼠鞠草在台灣主要分佈於低海拔的山區、路旁及田邊。鼠鞠草在曬乾後能當成藥材使用，具有止咳、降血壓、保護眼睛、消炎、殺菌等功效[6]。在民間，鼠鞠草榨成汁後，可單獨或與艾草製成「草仔粿」，常在清明節食用。國內有關鼠鞠草相關的醫學研究甚少，在碩博士論文網中只搜尋到一篇有關鼠鞠草相關的研究。葉于菁[7]提出相關的研究數據說明，鼠鞠草萃取物具有很強的清除自由基的能力，亦即鼠鞠草萃取物具備很強的抗氧化能力。

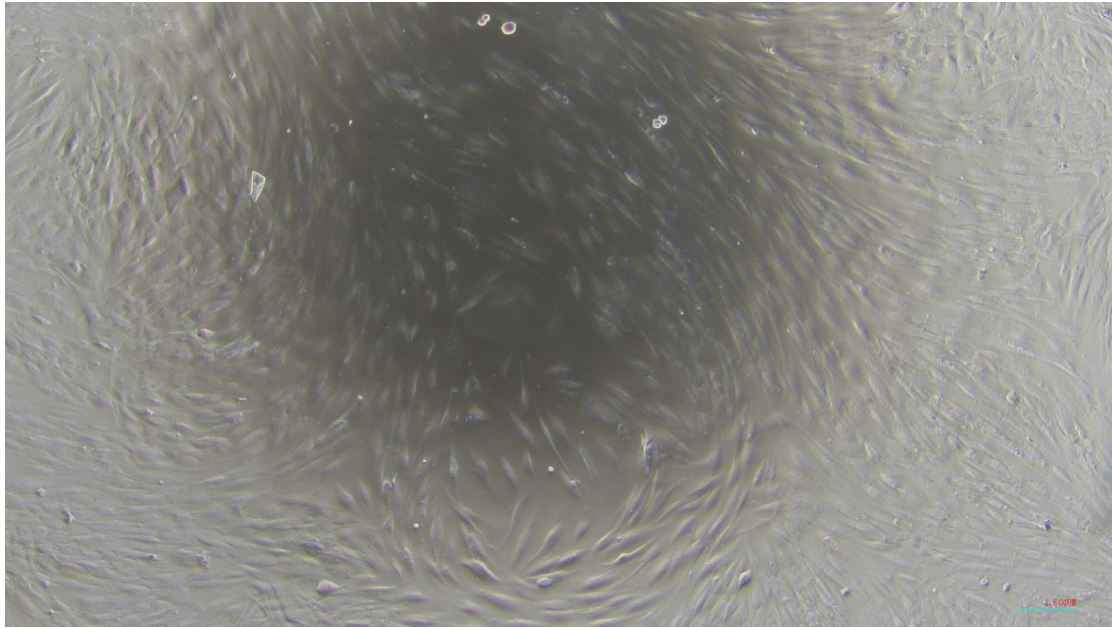
三、研究目的

由前述可知，UVB 會透過產生自由基而造成而加速皮膚細胞老化，而鼠鞠草又具備很強的清除自由基能力。有鑑於此，本次研究假設鼠鞠草的抗氧化能力，能清除 UVB 照射皮膚細胞後產生的自由基，因而延緩皮膚的老化現象。由上述的研究假設而衍生出下列待解決的問題：

- (一) 鼠鞠草萃取物是否具有清除自由基的抗氧化能力?
- (二) UVB 是否能傷害皮膚細胞?
- (三) 鼠鞠草萃取物是否能藉由清除自由基而延緩 UVB 造成的皮膚老化?
- (四) 如是，鼠鞠草萃取物其抗老化功能的詳細分子機轉又為何?

貳、研究設備與器材

一、細胞株



(細胞圖片為本研究作者拍攝自製)

本研究所使用之細胞株為「人類皮膚纖維母細胞」(Human dermal fibroblasts, HDF)，採購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(細胞株編號 BCRC number 08C0011)。HDF 培養方式依食工所 BCRC 所建議，以 10%胎牛血清加入 DMEM 培養基為培養液，在 37°C 及 5%二氧化碳濃度下培養。

二、研究相關設備與藥品

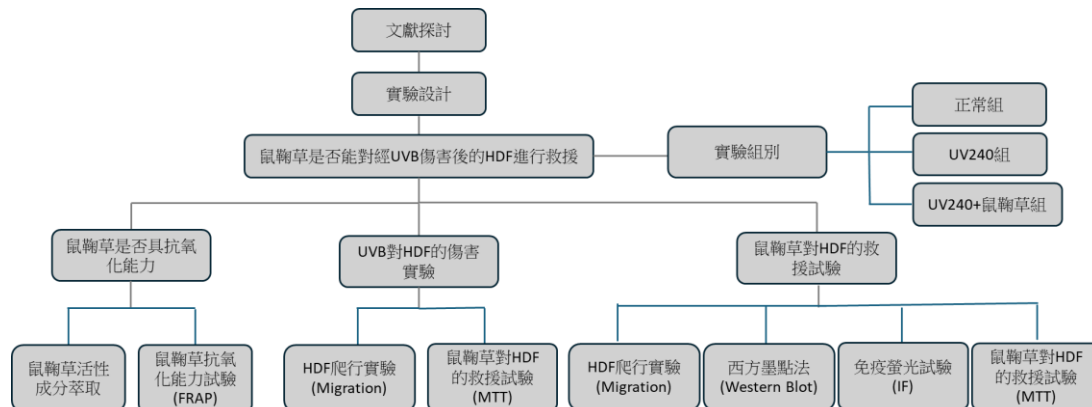
此次研究相關的儀器與藥品試劑如下表所示：

相關設備	相關藥品
無菌操作台	Medium(DMEM+10%胎牛血清)
倒立式顯微鏡	磷酸鹽緩衝液(PBS)
桌上型離心機	胰蛋白酶(Trypsin)
共軛焦顯微鏡	甲基藍(Tryan blue)
細胞培養箱	MTT 試劑
24孔細胞培養盤	乙酸溶液
96孔細胞培養盤	硫酸亞鐵溶液FeSO ₃
振盪器	氯化鐵溶液FeCl ₂
細胞移動測試實驗套組(insert)	TPTZ
電泳設備	福馬林
製膠設備	一抗mouse
UVB燈	二抗rabbit
吸光值檢測儀(ELISA reader)	Triton

(本表為本研究作者自製)

參、研究過程與方法

一、研究流程圖



(本圖為本研究作者自製)

二、實驗方法

(一) 西方墨點法(Western blot analysis)

此研究方法可用於分離皮膚細胞中的目標蛋白質並利用抗體來觀察目標蛋白質的表現量。其做法是以一維膠電泳來分離蛋白質，並利膜轉漬、一級二級抗體結合來觀察及分析目標蛋白質，之後以 ImageJ 軟體(美國國家衛生研究院免費提供)來分析蛋白質墨點的強弱，並做成統計量化圖。

(二) 傷口癒合實驗(Wound healing assay)

此研究技術可用以分析皮膚細胞的移動能力。在細胞培養皿中放入小型膠條，由於細胞無法在在膠條內生長，於是細胞經培養後並將膠條移除，膠條移除後的區域會在培養皿中造成類似傷口的括痕，在此「傷口」中無任何的細胞存在，待培養若干時間之後，皮膚胞會從傷口外側移動到傷口內

側，使得傷口面積變小，傷口面積愈小，代表細胞移動能力愈佳。

(三) 細胞免疫螢光蛋白質染色(Immuno-fluorescent staining)

顧名思義，此研究技術是將螢光抗體加入皮膚細胞之中，此抗體會與目標蛋白質結合，再利用螢光顯微鏡來觀察目標蛋白質的螢光表現，螢光愈強，表示目標蛋白質表現量愈高。

(四) 細胞存活率分析(Cell viability assay)

亦稱 MTT 分析，在細胞培養時加入 MTT 試劑，此時活細胞會吸收 MTT 試劑而使細胞內產生紫色結晶，接下來利用有機溶劑將細胞內的紫色結晶溶出，使得溶液呈紫色，再利用吸光儀檢測溶液中紫色的深淺，紫色愈深代表培養皿中活細胞數量愈多。

(五) 鼠鞠草萃取液抗氧化能力分析(Ferric reducing antioxidant power, FRAP)

此技術的原理，是將鼠鞠草萃取物放入含有 3 價鐵離子的溶液中，鼠鞠草會將 3 價鐵還原 2 價鐵，若溶液中 2 價鐵的濃度愈高，代表萃取物的還原能力愈強，亦代表萃取物的抗氧化能力愈高。

(六) 數據統計分析

研究數據之統整及作圖均以微軟 excel 來進行，而研究所得數據之表示方式以平均值及標準偏差來表示(Mean \pm STD)，並以微軟 excel 軟體內含之 t-test 來執行二組之間比較的顯著性，以 p 值小於 0.05 ($p < 0.05$)可視為二組間的比較具備統計上有顯著差異。

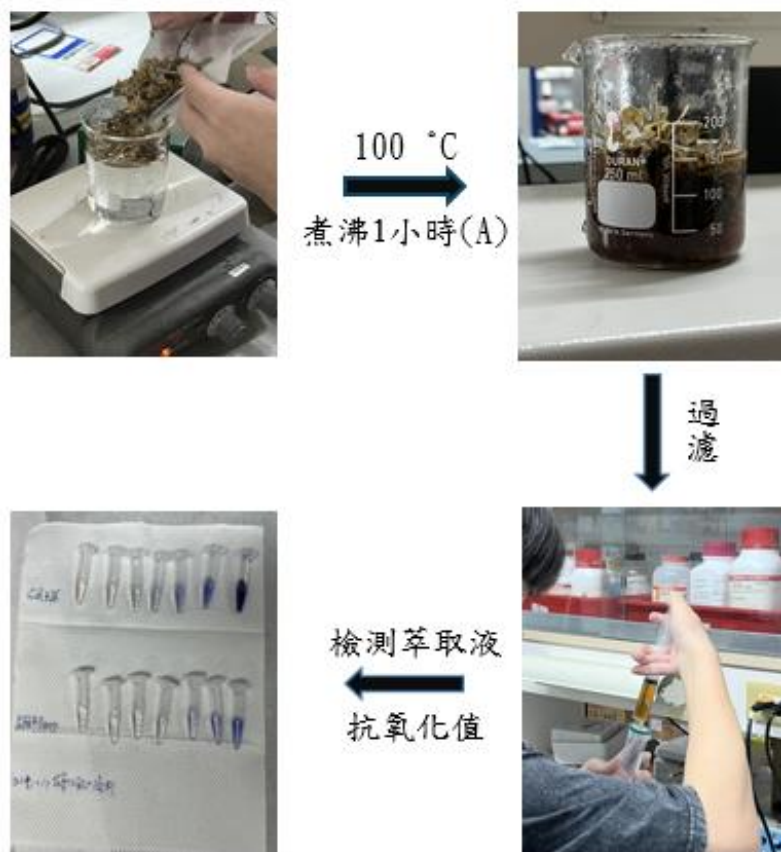
肆、研究結果

(研究結果所有圖片皆由作者親自拍攝及製作)

一、鼠鞠草特性研究

如圖 1(A)所示，取花 2 克及根莖 2 克共 4 克的鼠鞠草，加入 200cc 純水煮沸一小時，萃取液過濾後放入離心管冷藏。如圖 1(B)所示，將鼠鞠草萃取液適度稀釋後以 FRAP 方式測其萃取物抗氧化能力，並經還原後得到原液的抗氧化值為 $3200\mu\text{M}$ 。

(A)



(B)

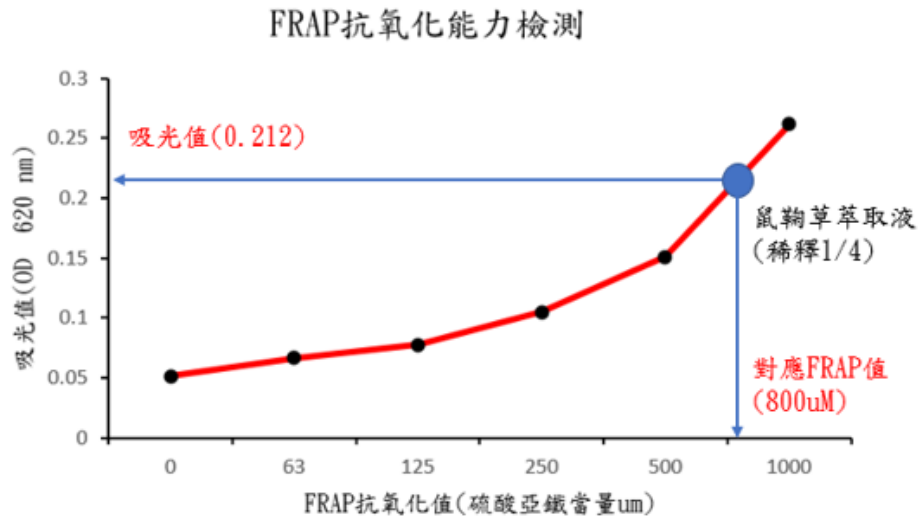
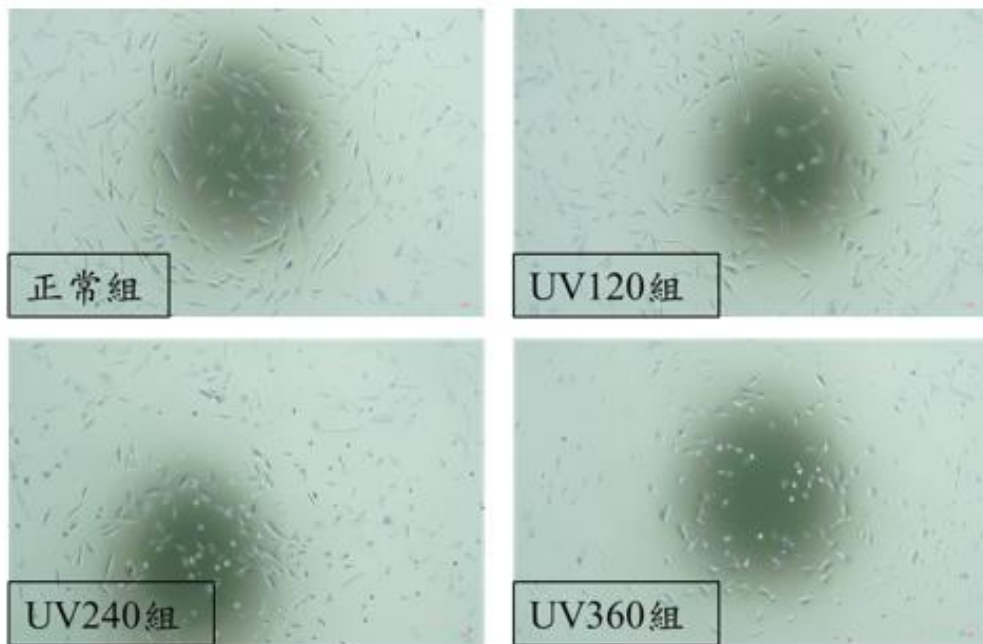


圖 1:鼠鞠草特性研究(A)鼠鞠草萃取流程；(B)鼠鞠草抗氧化能力檢測。

二、觀察不同劑量紫外線(UVB)對皮膚細胞的傷害情形

如圖 2(A)所示，將皮膚細胞分為四個組別，分別為正常組、UVB 照射 120 秒(稱 UV120 組)、240 秒(稱 UV240 組)、360 秒(稱 UV360 組)，並以顯微鏡觀察細胞存活狀況。如圖 2(B)所示，3 個劑量的 UVB 照射皆造成皮膚細胞明顯的傷害，而其中以 UVB 照射 240 秒的傷害最為顯著(細胞存活率正常組 > UV240 組， $p < 0.001$)，因此接下來實驗會以 UVB 照射皮膚細胞 240 秒的傷害作為研究主軸。

(A)



(B)

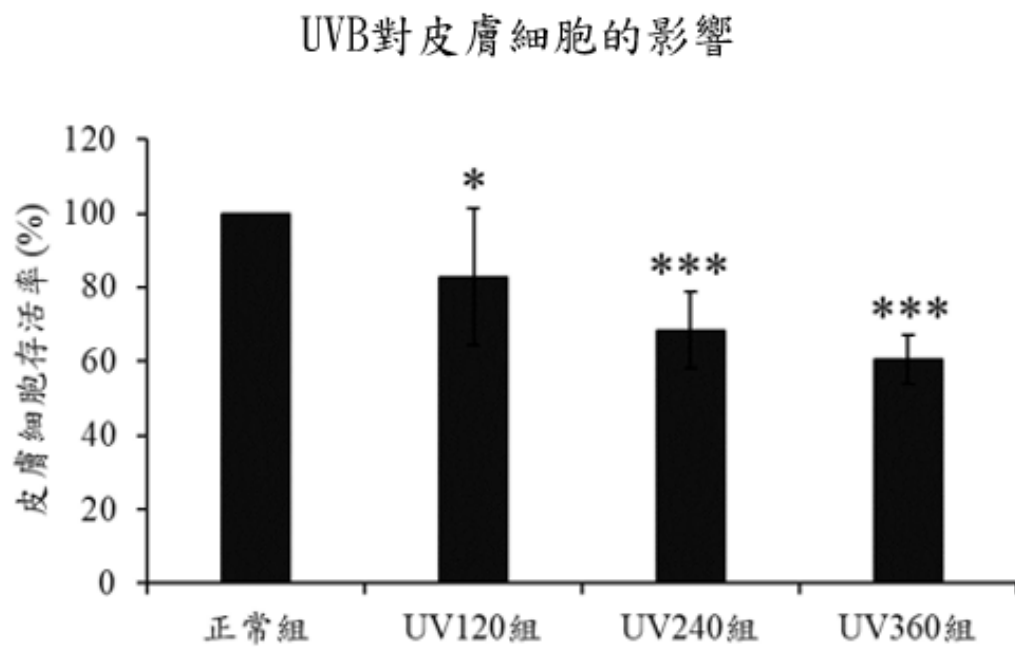


圖 2：觀察不同劑量紫外線(UVB)對皮膚細胞的傷害情形。(A)以顯微鏡觀察

不同 UV 劑量傷害下皮膚細胞存活率之差異；(B)以 MTT 方式檢測不同 UVB 劑量下皮膚細胞存活率之差異(重覆次數 n=9)。*與正常組相比， $p<0.05$ ；***與正常組相比， $p<0.001$ 。

三、UVB 照射前後皮膚細胞的移動能力差異

如圖 3 所示，將皮膚細胞分為四組，分別為正常組、UV120 組、UV240 組、UV360 組，每組具有對照組(無 UVB 照射)和實驗組(有 UVB 照射)，並觀察被 UV 傷害不同時間的細胞 24hr 後的移動情況來模擬皮膚傷口癒合的速度。研究結果顯示，與正常組相比，UVB 照射的時間愈長則皮膚細胞由線外側移動到線內側的數目愈少，顯示照射時間愈長，造成細胞移動爬行的狀況愈糟，依爬行狀況顯示，接下來實驗以 UVB 照射 240 秒當作 UV 傷害的劑量。

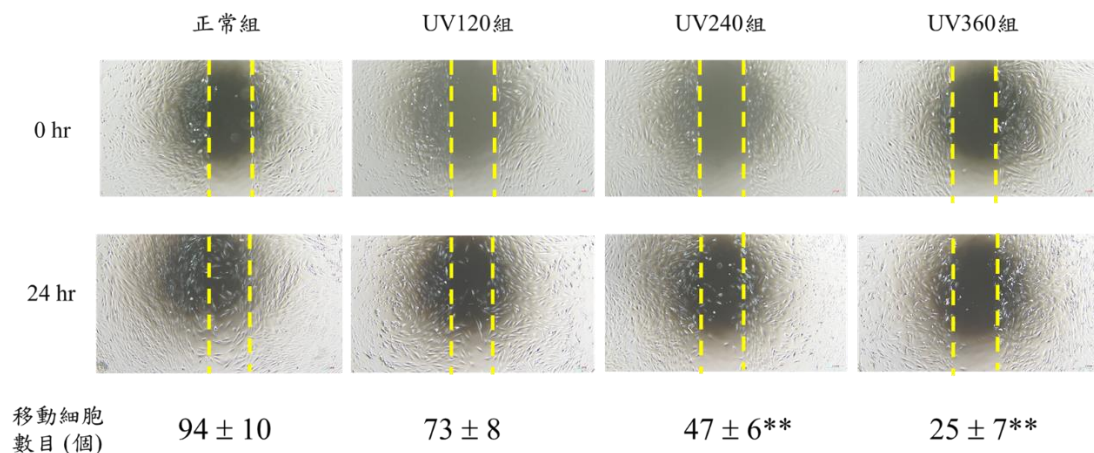


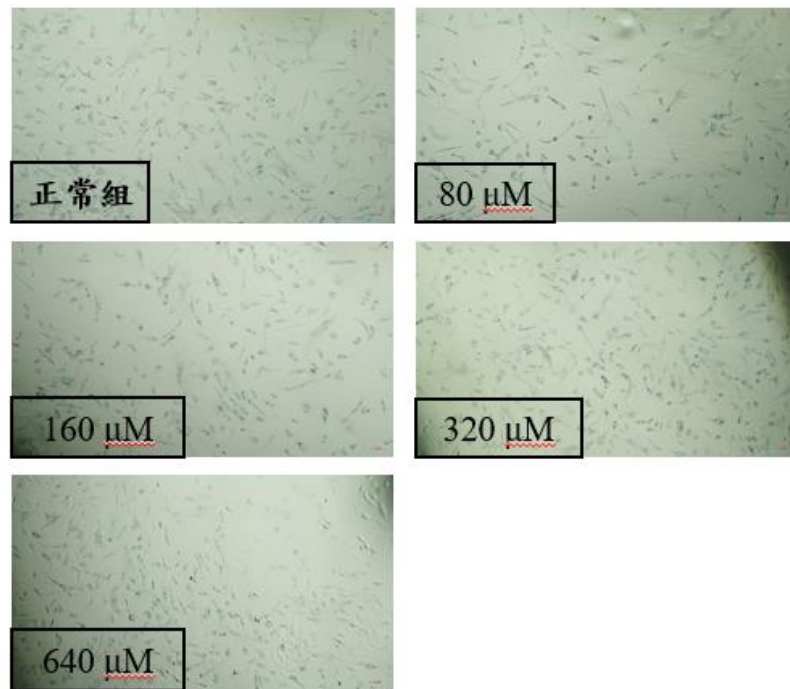
圖 3：皮膚細胞在照射 UV 當下(0 hr)及照射後並培養一天(24 hr)其移動情況的差異。細胞從白線外側移動到白線內側的細胞數目(重覆次數 n=3)。*與正常組相比， $p<0.05$ ；**與正常組相比， $p<0.01$ 。

四、觀察不同濃度之鼠鞠草萃取物對皮膚細胞的影響

如圖 4(A)所示，將皮膚細胞分為五個組別，分別為正常組、加入 80 μ M、

160 μ M、320 μ M、640 μ M 的鼠鞠草萃取液並觀察細胞存活情況。如圖 4(B)所示，在所有劑量中 320 μ M 的鼠鞠草萃取液濃度對增加皮膚細胞數量的效果最明顯(正常組<320 μ M， $p<0.01$)，因此接下來的實驗以 320 μ M 的濃度作為鼠鞠草救援皮膚細胞老化的劑量。

(A)



(B)

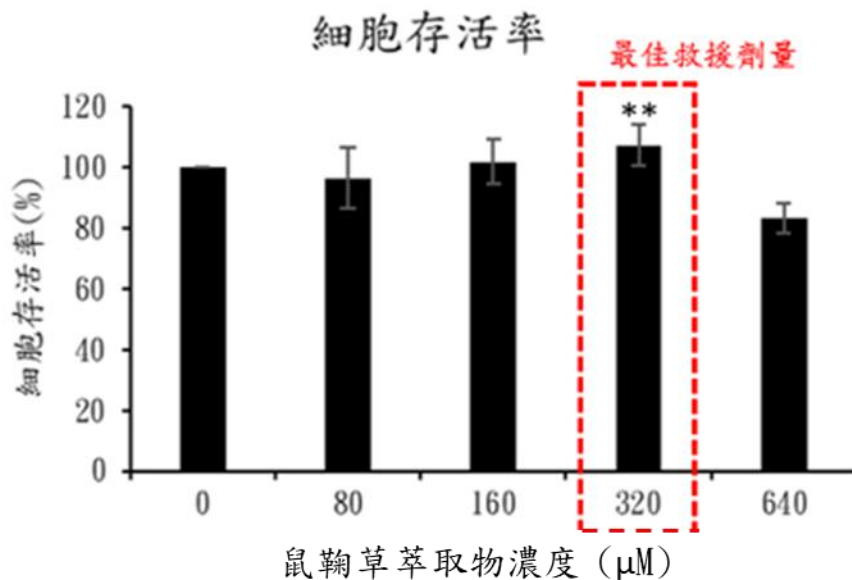


圖 4：觀察不同濃度之鼠鞠草萃取物對皮膚細胞的影響。(A)以顯微鏡觀察不同濃度之鼠鞠草萃取物影響下皮膚細胞的生長狀況；(B)以 MTT 方式檢測不同濃度之鼠鞠草萃取物影響皮膚細胞存活率之差異(重覆次數 $n=4$)。**與正常組相比， $p<0.01$ 。

五、觀察不同濃度之鼠鞠草萃取物對皮膚細胞移動特性的影響

如圖 5 所示，將皮膚細胞分為五組，分別為正常組、80μM、160μM、320μM、640μM、每組具有對照組和實驗組，並觀察以 240 秒 UVB 傷害後的皮膚細胞在各濃度鼠鞠草萃取物救援下的移動情形。研究結果顯示，與正常組相比，鼠鞠草濃度愈高由線外側移動到線內側的數目愈多，研究結果顯示以鼠鞠草萃取物濃度 320μM 及 640μM 救援皮膚細胞移動狀況最理想。

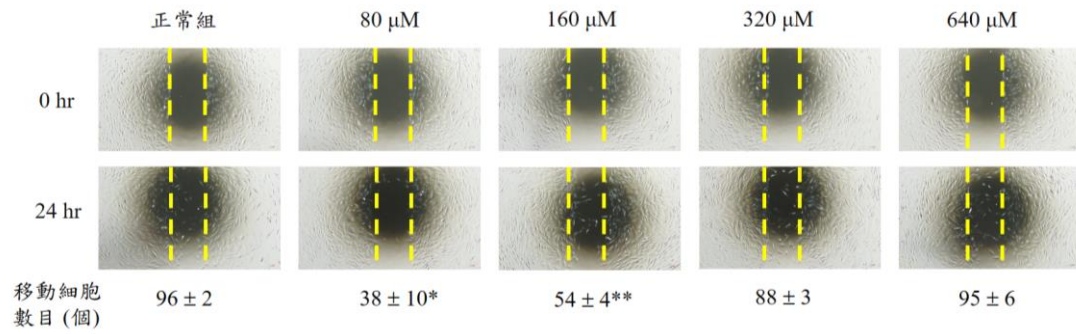


圖 5：觀察不同濃度之鼠鞠草萃取物對皮膚細胞移動特性的影響。細胞從黃線外側移動到黃線內側的細胞數目(重覆次數 n=3)。 $*$ 與正常組相比， $p < 0.05$ ； $**$ 與正常組相比， $p < 0.01$ 。

六、觀察鼠鞠草萃取物救援皮膚細胞受 UV 傷害的影響

由圖 6(A)可知，將皮膚細胞分為三個組別，分別為正常組、UV240 組及 UV240+鼠鞠草組(320 μ M)，並以顯微鏡觀察細胞的生長情況。依圖 6(B)的研究結果顯示，與正常組相比，UV240 組的皮膚細胞生長數目最少(正常組 $>$ UV240 組, $p < 0.05$)，但在加入鼠鞠草萃取物後，細胞生長數目有明顯上升 (UV240+鼠鞠草組 $>$ UV240 組, $p < 0.001$)。

(A)

正常組細胞總數目最多



← 正常組

UV240組的P值與正常組相比 <0.001



← UV240組

UV240+鼠鞠草組組的P值與正常組相比 <0.05



← UV240+鼠鞠草組

(B)

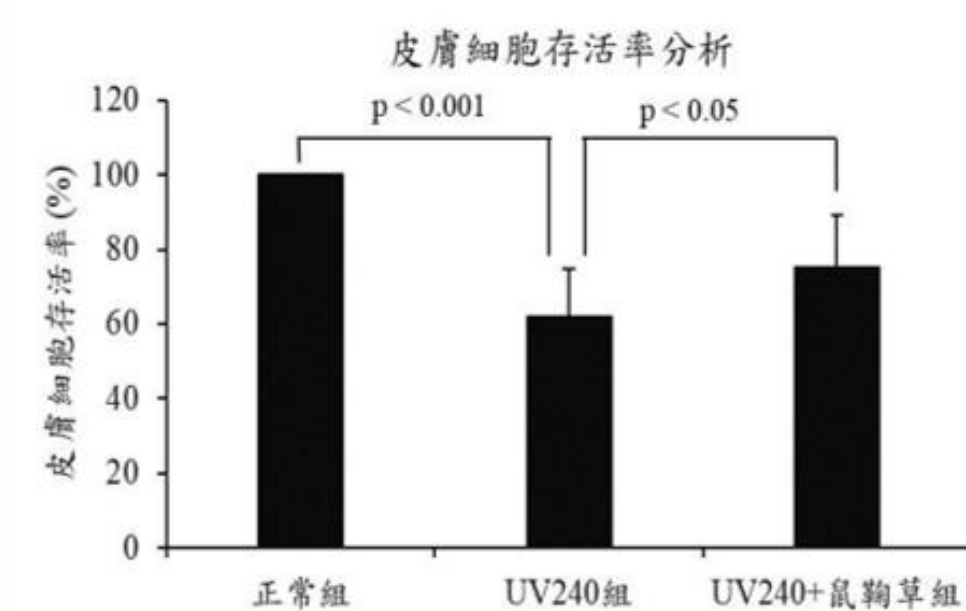


圖 6：觀察鼠鞠草萃取物(320 μ M)救援皮膚細胞受 UV 傷害的影響。(A)以顯微鏡觀察不同組別皮膚細胞的生長狀況；(B)以 MTT 方式檢測不同組別皮膚細胞存活率的差異(重覆次數 n=7)。

七、觀察鼠鞠草萃取物救援皮膚細胞受 UVB 傷害後其移動能力的影響

將皮膚細胞分成 3 組，分別為正常組、UV240 組及 UV240+鼠鞠草組，放置一天後以顯微鏡觀察。由圖 7 可知，與正常組相比，UV240 組的皮膚細胞由白線外爬行到線內的數目最少(正常組>UV240 組， $p<0.05$)，但在加入鼠鞠草萃取物後，細胞由線外爬行到線內的數目有明顯上升(UV240+鼠鞠草組>UV240 組， $p<0.05$)。

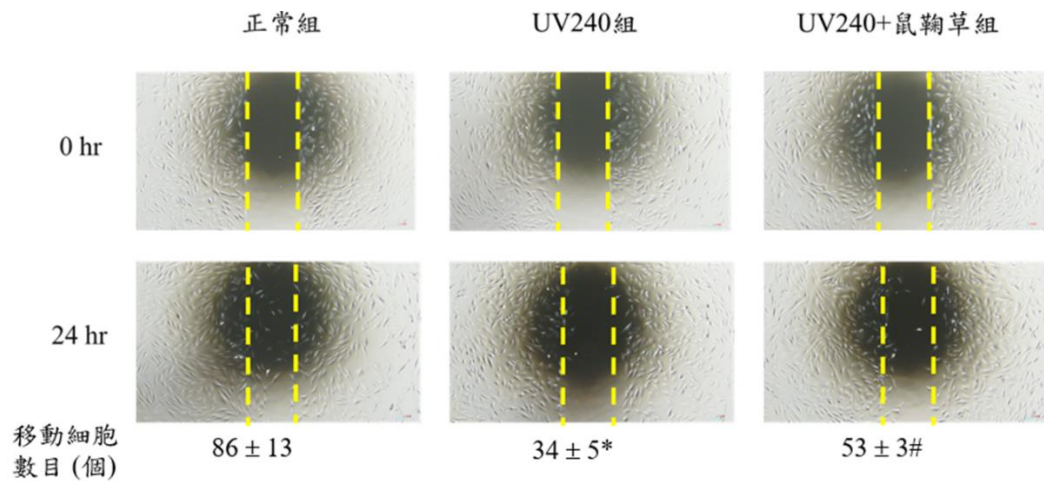


圖 7：觀察鼠鞠草萃取物(320 μ M)救援皮膚細胞受 UVB 傷害後其移動能力的影響。細胞從黃線外側移動到白線內側的細胞數目(重覆次數 n=3) 。*與正常組相比， $p<0.05$ ；#與 UV240 組相比， $p<0.05$ 。

八、以西方墨點法觀察不同組別的皮膚細胞其蛋白質表現量之差異

圖 8(A)以西方墨點法來檢視不同組別之皮膚細胞其蛋白質表現量之差異，實驗成 3 組，分別為正常組、UV240 組及 UV240+鼠鞠草組，並觀察鼠鞠草萃取物(320 μ M)救援皮膚細胞受 UV 傷害後其抗氧化相關蛋白質 SOD2 及老化相關蛋白質 p21 的表現量。依圖 8(B)的研究結果顯示，與正常組相比，UV240 組的抗氧化相關蛋白質 SOD2 表現量最低(正常組>UV240 組， $p<0.05$)，但在加入鼠鞠草萃取物後，SOD2 的表現量有明顯上升(UV240+鼠鞠草組>UV240 組， $p<0.05$)。依圖 8(C)的研究結果顯示，與正常組相比，UV240 組的老化相關蛋白質 p21 的表現量最高(正常組<UV240 組， $p<0.01$)，但在加入鼠鞠草萃取物後，UV240 組的老化相關蛋白質 p21 的表現量有明顯降低(UV240+鼠鞠草組<UV240 組， $p<0.05$)。

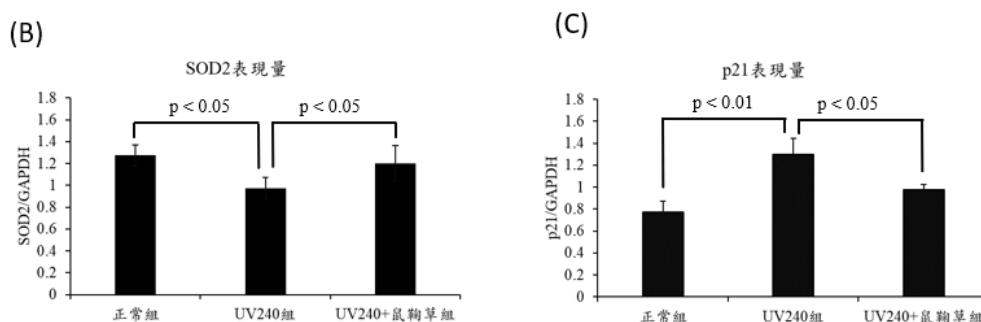
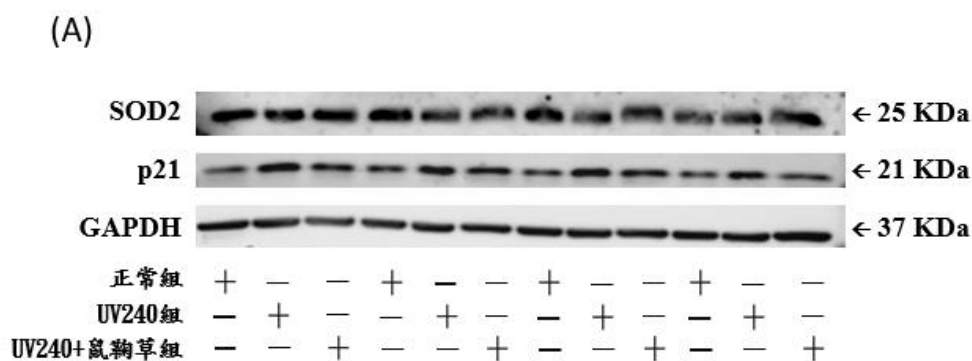


圖 8：觀察鼠鞠草萃取物(320 μ M)救援皮膚細胞受 UV 傷害後其抗氧化相關蛋白質 SOD2 及老化相關蛋白質 p21 的表現量。(A)西方墨點法；(B)SOD2 定量圖；(C)p21 定量圖。(重覆次數 n=3)。

九、以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其目標蛋白質 NRF-2 表現量

圖 9 為免疫螢光試驗，實驗分成 4 組，分別為正常組、UV240 組、UV240+鼠鞠草組及 UV240+鼠鞠草組+Tri (Trigonelline，NRF-2 抑制劑)。與正常組相比，UV240 組的抗氧化相關蛋白質 NRF-2 表現量降低許多，但加入鼠鞠草救援後，其 NRF-2 蛋白質表現量有明顯上升。而 UV240+鼠鞠草組+Tri 其 NRF-2 的表現量有明顯被抑制，此數據則證明 Trigonelline (NRF-2 抑制劑，Tri)具備抑制 NRF-2 表現的能力。

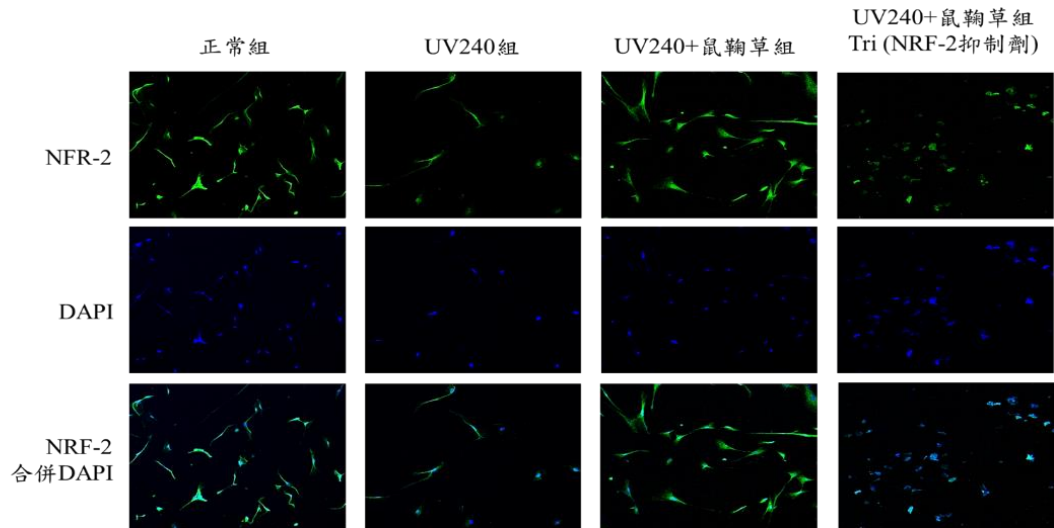


圖 9：以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其 NRF-2 表現量(重覆次數 n=3)。NRF-2 以綠色螢光染色表示；皮膚細胞其細胞核以 DAPI 藍螢光染色表示；Tri = trigonelline (NRF-2 抑制劑)。

十、免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其老化相關蛋白 p21 表現量

圖 10 為免疫螢光試驗，實驗分成 4 組，分別為正常組、UV240 組、UV240+鼠鞠草組及 UV240+鼠鞠草組+Tri (NRF-2 抑制劑)。與正常組相比，UV240 組的老化相關蛋白質 p21 表現量增高許多，但加入鼠鞠草救援後，p21 表現量有明顯下降。為了證明鼠鞠草是經 NRF-2 來進行救援，加入 Trigonelline (NRF-2 抑制劑)來抑制 NRF-2 的表現，發現鼠鞠草的救援效果不見了，亦即 UV240+鼠鞠草組與 UV240+鼠鞠草組+Tri 相比較，p21 老化蛋白質的表現量隨之上升(p21 表現量，UV240+鼠鞠草組 < UV240+鼠鞠草組+Tri)，所以證明了鼠鞠草是經 NRF-2 來抑制 p21 老化蛋白質的表現量。

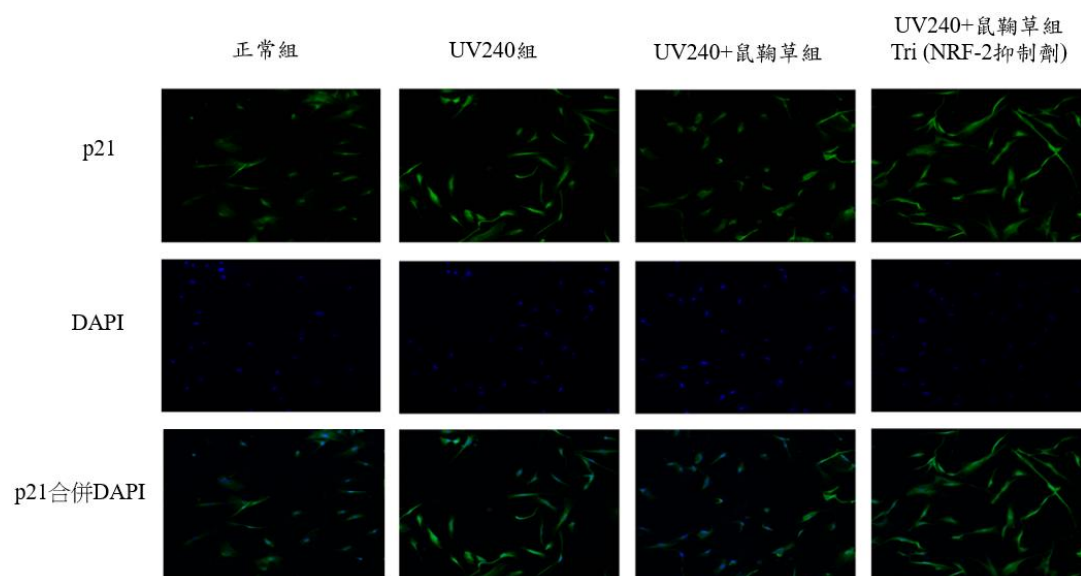


圖 10：以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其 p21 表現量(重覆次數 n=3)。*p21 以綠色螢光染色表示；皮膚細胞其細胞核以 DAPI 藍螢光染色表示；Tri = trigonelline (NRF-2 抑制劑)。

十一、以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其 Collagen 1a1 表現量

圖 11 為免疫螢光試驗，實驗分成 4 組，分別為正常組、UV240 組、UV240+鼠鞠草組及 UV240+鼠鞠草組+Tri (NRF-2 抑制劑)。與正常組相比，UV240 組的抗老化相關蛋白質 Collagen 1a1 表現量降低許多，但加入鼠鞠草救援後，其表現量有明顯上升。為了證明鼠鞠草是經 NRF-2 來進行救援，加入 Trigonelline (NRF-2 抑制劑)來抑制 NRF-2 的表現，發現鼠鞠草的救援效果不見了，亦即 UV240+鼠鞠草組與 UV240+鼠鞠草組+Tri 相比較，Collagen1a1 抗老化蛋白質的表現量隨之下降(Collagen1a1 的表現量，UV240+鼠鞠草組 > UV240+鼠鞠草組+Tri)，所以證明了鼠鞠草是經 NRF-2 來調控 Collagen1a1 抗老化蛋白質的表現量。

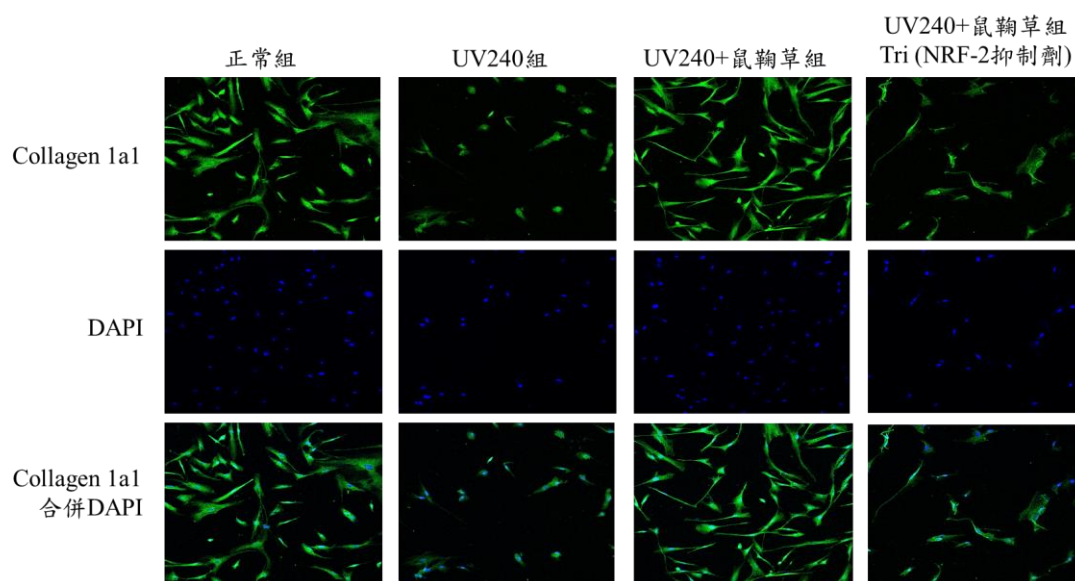


圖 11：以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其 Collagen 1a1 表現量 (重覆次數 n=3) 。*Collagen 1a1 以綠色螢光染色表示；皮膚細胞其細胞核以 DAPI 藍螢光染色表示；Tri = trigonelline (NRF-2 抑制劑) 。

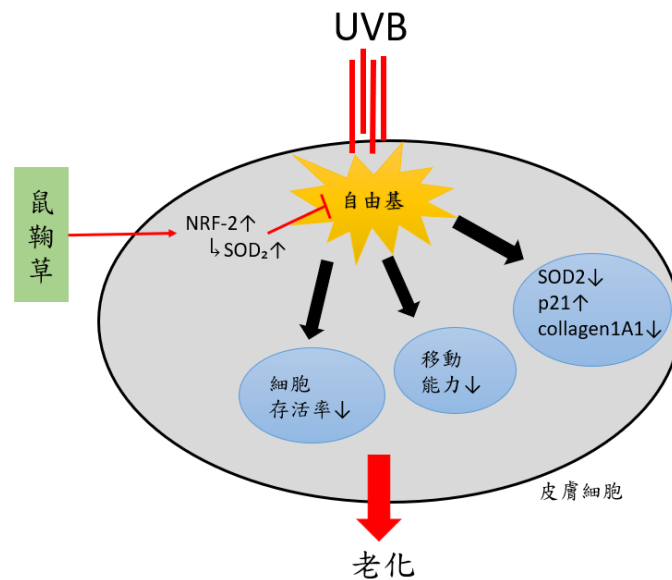
伍、討論

前述的實驗結果可知，我們以細胞實驗證實了 UVB 的照射會造成皮膚細胞的傷害，包括細胞存活率下降(如圖 2 所示)、細胞移動能力下降(如圖 5 所示)、抗氧化蛋白 SOD2 表現量下降(如圖 8 所示)、抗老化相關蛋白 Collagen1a1 表現量下降(如圖 11 所示)、老化相關蛋白 p21 表現量上升(如圖 8 所示)，上述病理現象的活化到最後造成皮膚細胞的老化。相對的，加入鼠鞠草的萃取物能有效且顯著的改善 UVB 所造成的上述病理特徵，進而延緩皮膚細胞的老化。

接下來，我們便思考為何鼠鞠草萃取物具備抗老化的功能?由文獻回顧得知，照射 UVB 會使皮膚細胞內部產生大量的自由基，而自由基的產生則和皮膚細胞老化現象呈正相關[8]。在我們的研究數據之中，UVB 的照射會使抗氧化蛋白質 SOD2 的表現量下降(如圖 8 所示)，由於 SOD2 的功能是清除細胞內的自由基，SOD2 表現的下降則表示細胞內部產生大量的自由基，而大量的自由基消耗大量的 SOD2，因而使得 SOD2 的量下降；相反的，加入鼠鞠草萃取物之後，SOD2 的表現量上升，使得皮膚細胞內部的自由基減少(被 SOD2 清除)，因而減緩細胞老化。

前人的研究結果顯示，NRF-2 (nuclear factor erythroid derived 2)蛋白質為轉錄因子，而 NRF-2 的活化會使得 SOD2 的表現量上升[9]，本研究為了證實鼠鞠草萃取物具備調節 NRF-2 轉錄因子的能力，故而在實驗之中加入 Trigonelline (簡稱 Tri，此藥物為 NRF-2 的抑制劑)[10]，並於圖 9 的結果可證實 Tri 可抑制 NRF-2 的表現。接下來，我們在鼠鞠草的救緩組別之中加入 Tri，把 NRF-2 給抑制住，令其表現量下降，進一步的數據顯示鼠鞠草的效果會因 NRF-2 被 Tri 抑制住而使其救援能力下降(如圖 10 及圖 11 所示)，由此可證明，鼠鞠草萃取物的抗老化

效果來自於活化 NRF-2 轉錄因子，而 NRF-2 轉錄因子的活化會提升 SOD2 的表現量，進而清除皮膚細胞內部的自由基，而自由基的清除，會使得 UVB 所造成的病理現象(如 p21 上升、collagen1a1 下降)得到顯著改善，減緩 UVB 對皮膚細胞造成的老化影響。本研究的結論以下圖呈現。



本研究結論圖(本圖為本研究作者自製)

陸、結論

經由一系列的細胞實驗，能讓我們了解到鼠鞠草能提供細胞各式各樣的保護功能，像是能加速皮膚細胞的移動(可當成是加速皮膚傷口的復原速度)，又或是減緩老化蛋白質的表現量、幫助清除自由基，進而加強皮膚細胞生成膠原蛋白，使皮膚具有彈性及保水等多重功效，這些數據讓我們了解到鼠鞠草萃取物在未來可以運用在抗老化保健食品或是延緩皮膚老化面膜來商品化，為人們在抗老醫學上提供新選擇。

柒、參考文獻資料

1. 呂佳陵（2022）。台灣紅藜 (*Chenopodium formosanum*) 萃取物於皮膚老化之作用及其機制探討。〔博士論文。中國醫藥大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
2. 黃怡靜（2024）。普通念珠藻多醣增強幹細胞對於皮膚老化之治療機轉。〔碩士論文。國立臺灣師範大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
3. 洪于婷（2017）。照射強度對於紫外線 A 所誘導之皮膚老化的影響。〔碩士論文。高雄醫學大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
4. 郭嘉雯（2025）。探討高分子奈米材料減緩 UVB 導致的皮膚光老化效應與相關機制。〔碩士論文。中國醫藥大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
5. 姜櫟宣（2007）。奈米/次微米化山藥之抗氧化與抗皮膚老化能力。〔碩士論文。國立臺灣大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
6. 農業部農業主題館 (<https://kmweb.moa.gov.tw/subject/index.php?id=132>)
7. 葉于菁（2018）。艾草和鼠麴草萃取物抗氧化特性之研究。〔碩士論文。中臺科技大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
8. 林知穎（2025）。白藜蘆醇食品於皮膚功效研究。〔碩士論文。弘光科技大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
9. 蔡豔柔（2019）。Pomalidomide 減緩在缺血性腦部損傷所產生的發炎反應、氧化壓力及凋亡作用。〔博士論文。臺北醫學大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。

10. Fouzder C, Mukhuty A, Mukherjee S, Malick C, Kundu R. Trigonelline inhibits Nrf2 via EGFR signalling pathway and augments efficacy of Cisplatin and Etoposide in NSCLC cells. *Toxicol In Vitro*. 2021.

【評語】 052003

本研究針對紫外線 B (UVB) 引起的皮膚老化，探討鼠鞠草 (*Pseudognaphalium affine*) 萃取物的抗老化潛力，結果顯示其可透過活化 NRF-2 轉錄因子，提升抗氧化酶 (如 SOD2) 表現，減少氧化壓力並改善皮膚損傷，顯示出應用於抗老化醫學的潛在價值。

首先，研究主題具應用潛力。UVB 引發的皮膚老化不僅影響健康，也與美容產業密切相關。若鼠鞠草能被證實為有效的天然抗老化成分，將提供市場一種低副作用的新選擇。其次，本研究採用 FRAP 抗氧化力分析、MTT 細胞存活率、傷口癒合實驗、免疫螢光與 Western blot 等多種技術，顯示研究者具備良好的細胞實驗操作能力。此外，研究亦提出完整的分子機制，指出鼠鞠草可藉由 NRF-2 路徑調控抗氧化反應，為未來商品開發與臨床應用提供科學依據。

然而，研究仍有多項待改進之處。第一，萃取物中有效成分未被分離與鑑定，使機轉解析與未來商品開發受限。第二，細胞觀察時間過短 (僅 24 - 48 小時)，不足以評估長期抗老化效果。第三，細胞模型侷限於 HDF (人類皮膚纖維母細胞)，未涵蓋其

他皮膚細胞如角質細胞或黑色素細胞，影響結果的完整性。第四，未與常見抗氧化劑如維他命 C、E 進行比較，難以評估其相對效能。第五，缺乏高濃度或長期使用下的細胞毒性測試，無法充分保證其使用安全性。第六，目前僅止於細胞實驗，未進行動物模型驗證，限制了結果的轉譯性與實際應用性。最後，參考文獻以碩博士論文為主，應加強引用國際學術期刊以提升可信度與學術影響力。

總結而言，本研究提出鼠鞠草為潛在抗 UVB 老化植物資源，並揭示其透過 NRF-2 調控抗氧化機制的初步證據。然而，為強化其學術與臨床應用價值，未來建議針對活性成分分析、細胞模型拓展、長期效果評估、對照組比較、安全性測試及動物實驗進行補充研究，以增強資料可信度並促進臨床轉譯。

作品海報

鼠鞠草萃取物調節NRF-2轉錄因子救援 UVB造成的皮膚細胞老化

摘要

人類皮膚接觸到陽光中的紫外線(UVB)會造成皮膚細胞內產生大量的自由基進而導致皮膚老化，本研究的目的是為了探討鼠鞠草萃取物是否可用於減緩UVB造成的皮膚老化。本實驗以UVB紫外燈來照射人類皮膚纖維母細胞，藉此模擬人類皮膚曬太陽所引起的老化狀況。由實驗結果得知，UVB照射會造成皮膚細胞的傷害，包括皮膚細胞死亡、細胞移動能力的減緩、氧化壓力上升、老化蛋白質p21表現量上升、抗老化相關蛋白質collagen1a1的表現量下降；而加入鼠鞠草萃取物之後，上述造成皮膚細胞老化的病理現象都得到了明顯改善。進一步的研究，我們發現鼠鞠草萃取物是經由抗氧化蛋白質NRF-2表現量提升來抑制皮膚細胞的老化。

(關鍵字：鼠鞠草、皮膚老化、NRF-2抗氧化蛋白質)

壹、前言

研究背景

- 皮膚組織老化，會造成皮膚彈性變差、皺紋變多及傷口癒合速度變慢。
- 除了年紀之外，促使皮膚加速老化的最大因素就是曬太陽。陽光中的紫外線照射會促使皮膚細胞產生自由基，而自由基的增加會使皮膚加速老化。
- 延緩紫外線所造成的皮膚老化是目前在皮膚抗老化醫學中最重要的課題之一。

文獻回顧

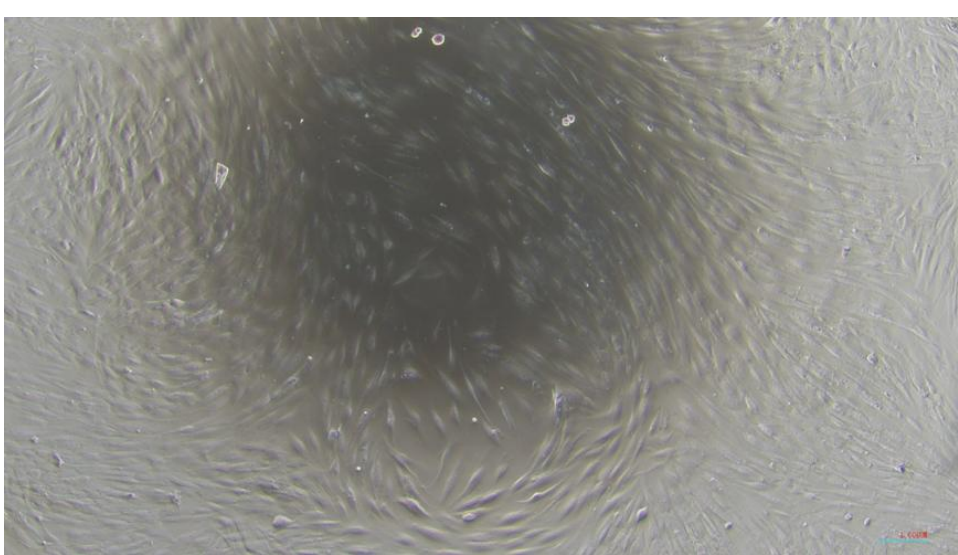
- 皮膚細胞接觸到太陽光之中的紫外線B (UVB，其波長為290-320 nm)，則細胞內部會產生大量的自由基，因而加速皮膚細胞的老化。
- 若要減緩UVB造成的皮膚細胞老化，提高皮膚細胞的抗氧化能力、清除細胞內部的自由基則是最有效的方式之一。
- 鼠鞠草(學名：Pseudognaphalium affine)，是鞠科鼠鞠草屬的一种植物，又名清明草，榨成汁後與艾草製成「草仔粿」，常在清明節食用。
- 國內有關鼠鞠草相關的醫學研究甚少，國內有一篇論文提出相關的研究數據說明，鼠鞠草萃取物具有很強的清除自由基的能力，亦即鼠鞠草萃取物具備很強的抗氧化能力。

研究目的

- 由前述可知，UVB會透過產生自由基而加速皮膚細胞老化，而鼠鞠草又具備很強的清除自由基能力，然而鼠鞠草是否可應用在對抗皮膚老化部份則尚未被研究。有鑑於此，本研究提出下列假設：
- 1. 鼠鞠草萃取物是否具有清除自由基的抗氧化能力？
- 2. UVB是否能加速皮膚細胞老化？
- 3. 鼠鞠草萃取物是否能藉由清除自由基而延緩UVB造成的皮膚老化？
- 4. 如是，鼠鞠草萃取物其抗皮膚細胞老化的詳細分子機轉又為何？

貳、研究設備與方法

➤本研究所使用之細胞株為「人類皮膚纖維母細胞」(Human dermal fibroblasts, HDF)，採購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(細胞株編號BCRC number 08C0011)。



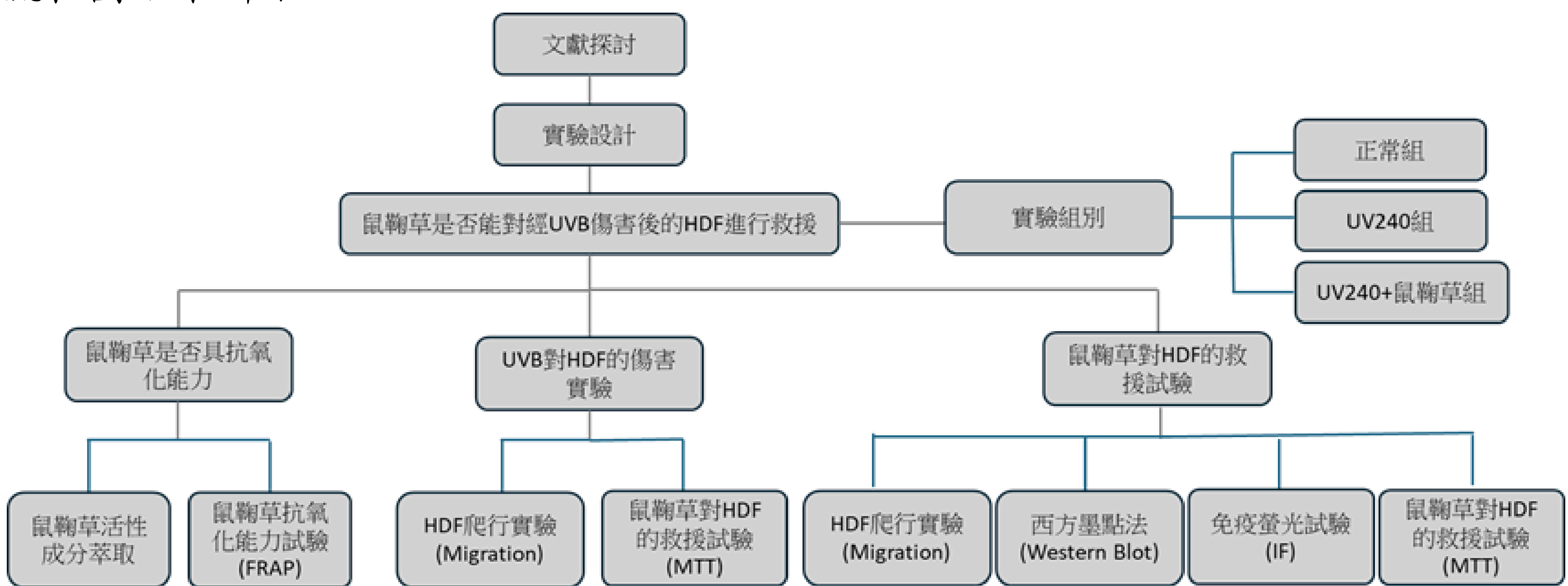
(細胞圖片為本研究作者拍攝自製)

➤本研究所使用器材如下：

1. UVB燈：體外模擬太陽光照射皮膚細胞。
2. FRAP抗氧化能力測試：檢測鼠鞠草清除自由基的能力。
3. MTT細胞存活率測試：偵測不同組別之細胞存活率。
4. 西方墨點法：偵測細胞內目標蛋白質的表現量。
- 5.傷口癒合實驗(Wound healing assay)：偵測不同組別之皮膚細胞其傷口癒合(爬行)能力。
- 6.細胞免疫螢光蛋白質染色(Immuno-fluorescent staining)：利用螢光蛋白標定目標蛋白質，藉以觀察其表現量之增減。
7. 以Excel軟體內含之T檢定(t-test)功能來計算各組細胞數據比較值之顯著程度，當p值小於0.05 (p<0.05)則具有統計學上的顯著意義。

參、研究過程

➤本研究的流程圖如下所示：



(本圖為本研究作者自製)

肆、研究結果

(研究結果所呈現之圖表皆為本研究作者拍攝及自製)

鼠鞠草抗氧化能力測定

如圖1(A)所示，取花2克及根莖2克共4克的鼠鞠草，加入200cc純水煮沸一小時，萃取液過濾後放入離心管冷藏。如圖1(B)所示，將鼠鞠草萃取液適度稀釋後以FRAP方式測其萃取物抗氧化能力，並經還原後得到原液的抗氧化值為3200 μ M。

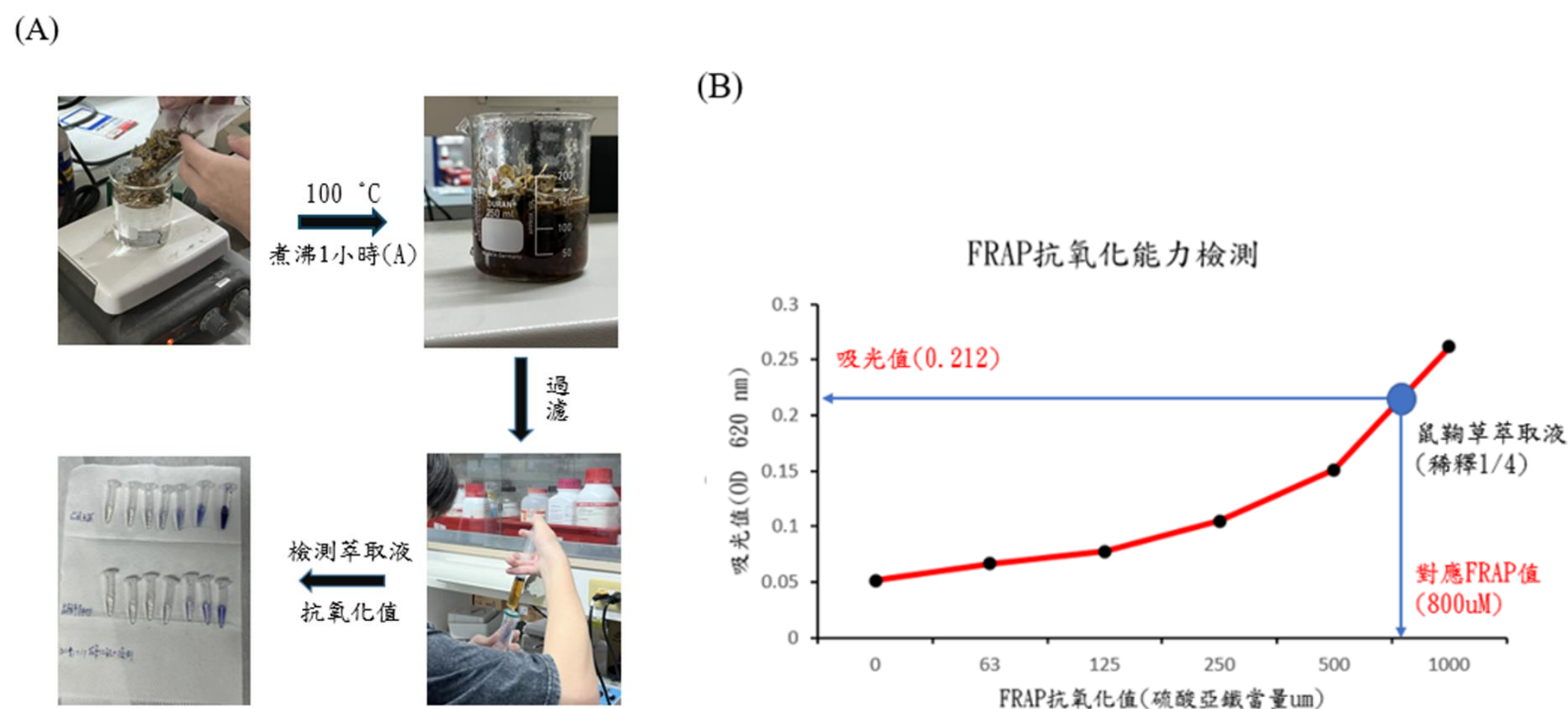


圖1:鼠鞠草特性研究(A)鼠鞠草萃取；(B)鼠鞠草抗氧化能力檢測。

紫外線(UVB)對皮膚細胞的傷害

如圖2(A)所示，分別為正常組、UVB照射120秒(稱UV120組)、240秒(稱UV240組)、360秒(稱UV360組)，並以顯微鏡觀察細胞存活狀況。如圖2(B)所示，而其中以UVB照射240秒的傷害最為顯著(細胞存活率正常組>UV240組， $p<0.001$)。

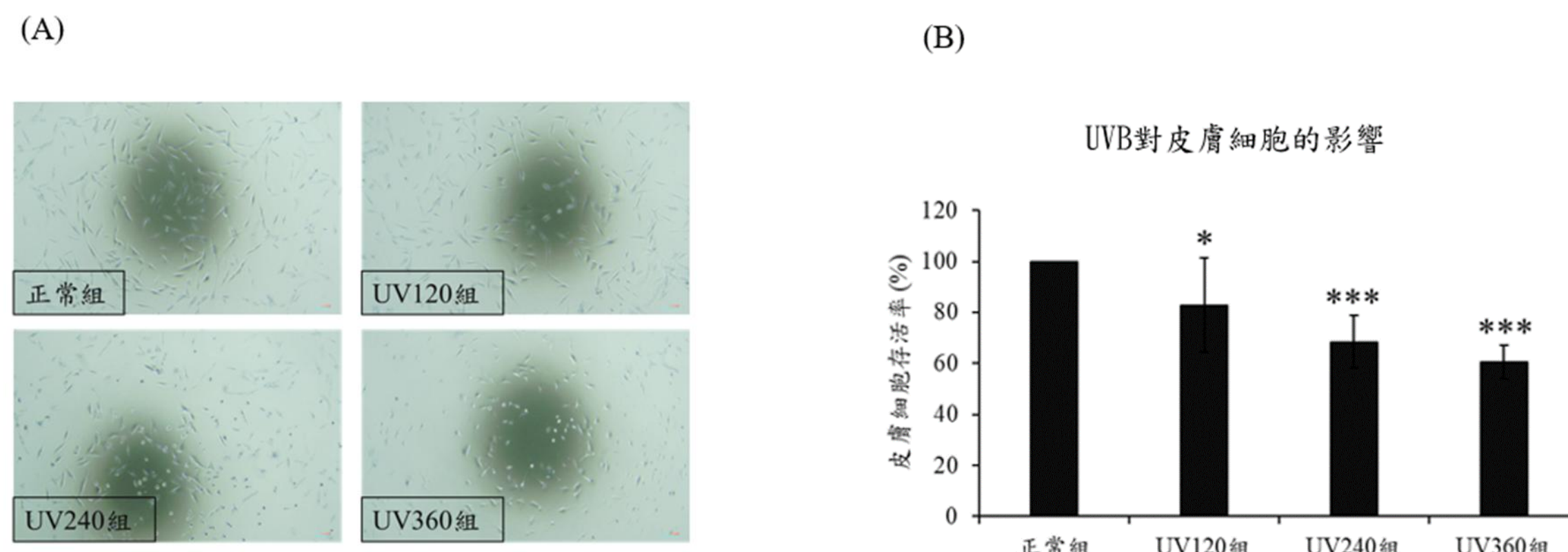


圖2：觀察不同劑量紫外線(UVB)對皮膚細胞的傷害情形。(A)顯微鏡觀察不同UV劑量傷害下皮膚細胞存活率之差異；(B)不同UVB劑量下皮膚細胞存活率之差異(重覆次數n=9)。*與正常組相比， $p<0.05$ ；***與正常組相比， $p<0.001$ 。

UVB照射前後皮膚細胞移動能力

如圖3所示，觀察被UV傷害不同時間的細胞24hr後的移動情況來模擬皮膚細胞傷口癒合(爬行)的速度。研究結果顯示，與正常組相比，UVB照射的時間愈長則皮膚細胞由線外側移動到線內側的數目愈少，顯示照射時間愈長，造成細胞移動爬行的狀況愈糟，依爬行狀況顯示，接下來實驗以UVB照射240秒當作UV傷害的劑量。

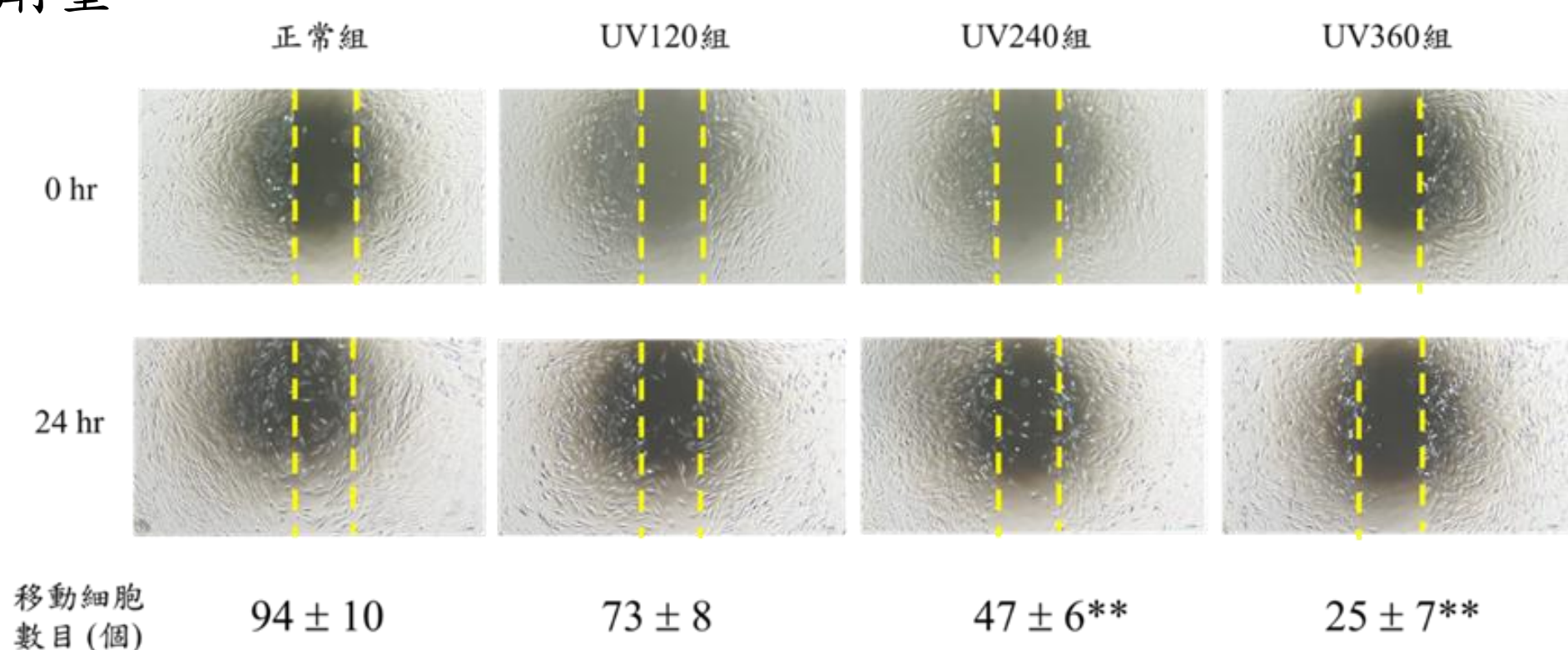


圖3：皮膚細胞在照射UV當下(0 hr)及照射後並培養一天(24 hr)其移動情況的差異。細胞從白線外側移動到白線內側的細胞數目(重覆次數n=3)。*與正常組相比， $p<0.05$ ；**與正常組相比， $p<0.01$ 。

鼠鞠草萃取物對皮膚細胞的影響

如圖4(A)所示，將皮膚細胞分為五個組別，分別為正常組、加入80 μ M、160 μ M、320 μ M、640 μ M的鼠鞠草萃取液並觀察細胞存活情況。如圖4(B)所示，在所有劑量中320 μ M的鼠鞠草萃取液濃度對增加皮膚細胞數量的效果最明顯(正常組<320 μ M， $p<0.01$)，因此接下來的實驗以320 μ M的濃度作為鼠鞠草救援皮膚細胞老化的劑量。

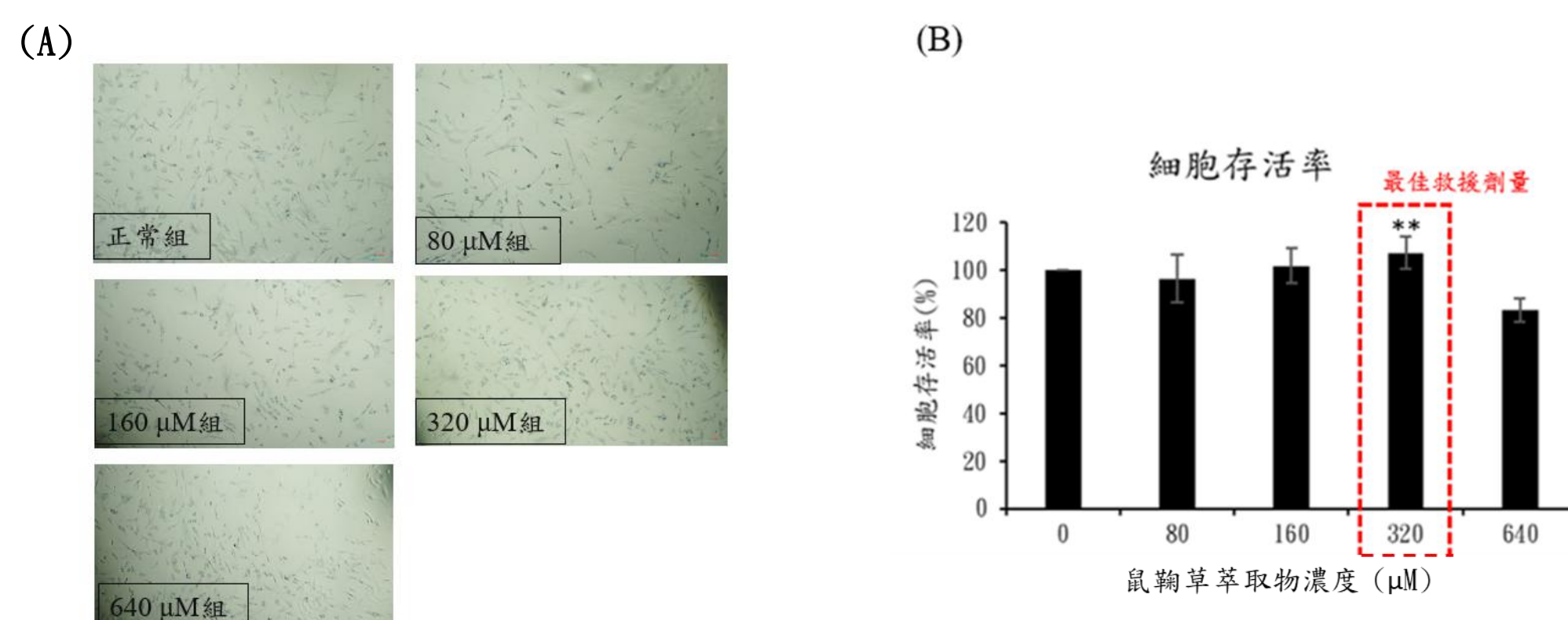


圖4：觀察不同濃度之鼠鞠草萃取物對皮膚細胞的影響。(A)以顯微鏡觀察不同濃度之鼠鞠草萃取物影響下皮膚細胞的生長狀況；(B)以MTT方式檢測不同濃度之鼠鞠草萃取物影響皮膚細胞存活率之差異(重覆次數n=4)。**與正常組相比， $p<0.01$ 。

鼠鞠草對皮膚細胞移動特性的影響

如圖5所示，將皮膚細胞分為五組，分別為正常組、80 μ M、160 μ M、320 μ M、640 μ M、每組具有對照組和實驗組，並觀察以240秒UVB傷害後的皮膚細胞在各濃度鼠鞠草萃取物救援下的移動情形。研究結果顯示，與正常組相比，鼠鞠草濃度愈高由線外側移動到線內側的數目愈多，研究結果顯示以鼠鞠草萃取物濃度320 μ M及640 μ M救援皮膚細胞移動狀況最理想。

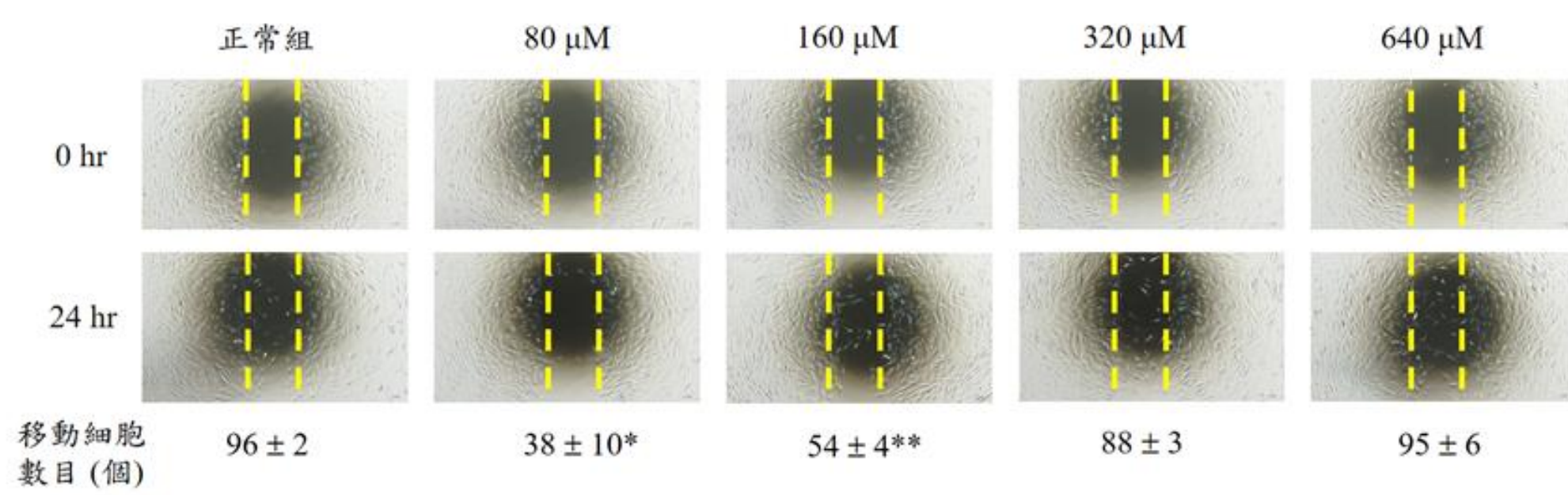


圖5：觀察不同濃度之鼠鞠草萃取物對皮膚細胞移動特性的影響。細胞從黃線外側移動到黃線內側的細胞數目(重覆次數n=3)。*與正常組相比， $p<0.05$ ；**與正常組相比， $p<0.01$ 。

鼠鞠草救援皮膚細胞受UVB傷害

由圖6(A)可知，將皮膚細胞分為三個組別，分別為正常組、UV240組及UV240+鼠鞠草組(320 μ M)，並以顯微鏡觀察細胞的生長情況。依圖6(B)的研究結果顯示，與正常組相比，UV240組的皮膚細胞生長數目最少(正常組>UV240組, $p<0.05$)，但在加入鼠鞠草萃取物後，細胞生長數目有明顯上升(UV240+鼠鞠草組>UV240組, $p<0.001$)。

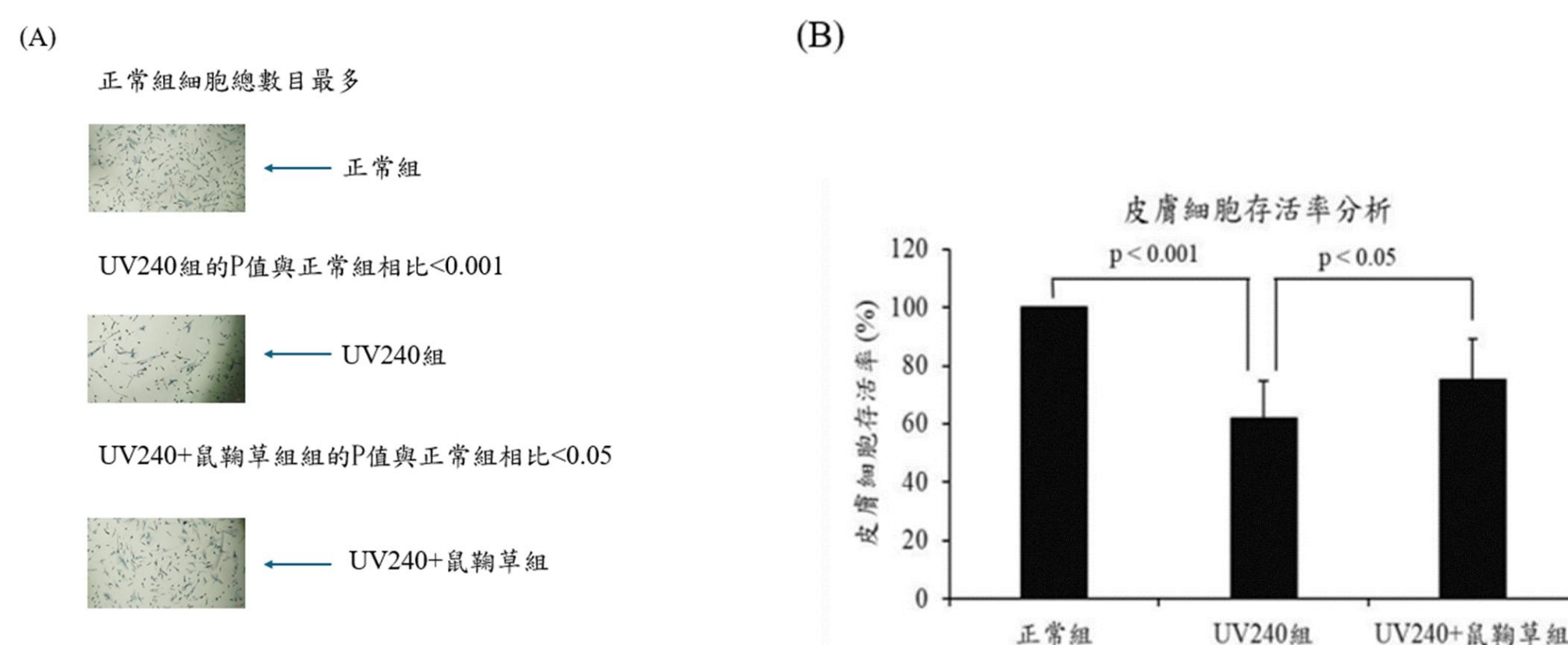


圖6：觀察鼠鞠草萃取物(320 μ M)救援皮膚細胞受UV傷害的影響。(A)以顯微鏡觀察不同組別皮膚細胞的生長狀況；(B)以MTT方式檢測不同組別皮膚細胞存活率的差異(重覆次數n=7)。

鼠鞠草救援皮膚細胞受UVB傷害後其移動能力的影響

將皮膚細胞分成3組，分別為正常組、UV240組及UV240+鼠鞠草組，放置一天後以顯微鏡觀察。由圖7可知，與正常組相比，UV240組的皮膚細胞由白線外爬行到線內的數目最少(正常組>UV240組， $p<0.05$)，但在加入鼠鞠草萃取物後，細胞由線外爬行到線內的數目有明顯上升(UV240+鼠鞠草組>UV240組， $p<0.05$)。

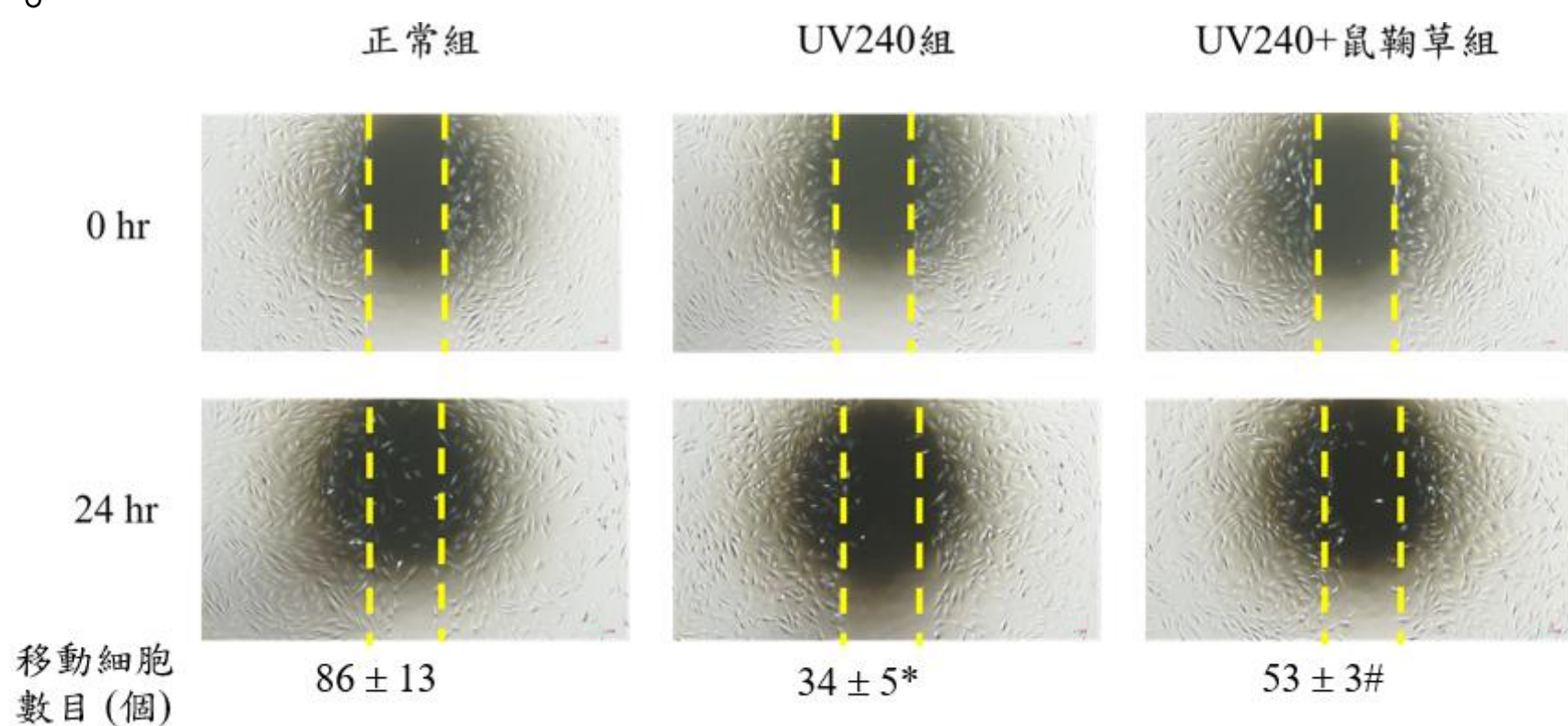


圖7：觀察鼠鞠草萃取物(320 μ M)救援皮膚細胞受UVB傷害後其移動能力的影響。細胞從白線外側移動到白線內側的細胞數目(重覆次數n=3)。*與正常組相比， $p<0.05$ ；#與UV240組相比， $p<0.05$ 。

不同組別的皮膚細胞其蛋白質表現量之差異

圖8(A)以西方墨點法來檢視不同組別之皮膚細胞其蛋白質表現量之差異，依圖8(B)的研究結果顯示，與正常組相比，UV240組的抗氧化相關蛋白質SOD2表現量最低，但在加入鼠鞠草萃取物後，SOD2的表現量有明顯上升。依圖8(C)的研究結果顯示，與正常組相比，UV240組的老化相關蛋白質p21的表現量最高，但在加入鼠鞠草萃取物後，UV240組的老化相關蛋白質p21的表現量有明顯降低。

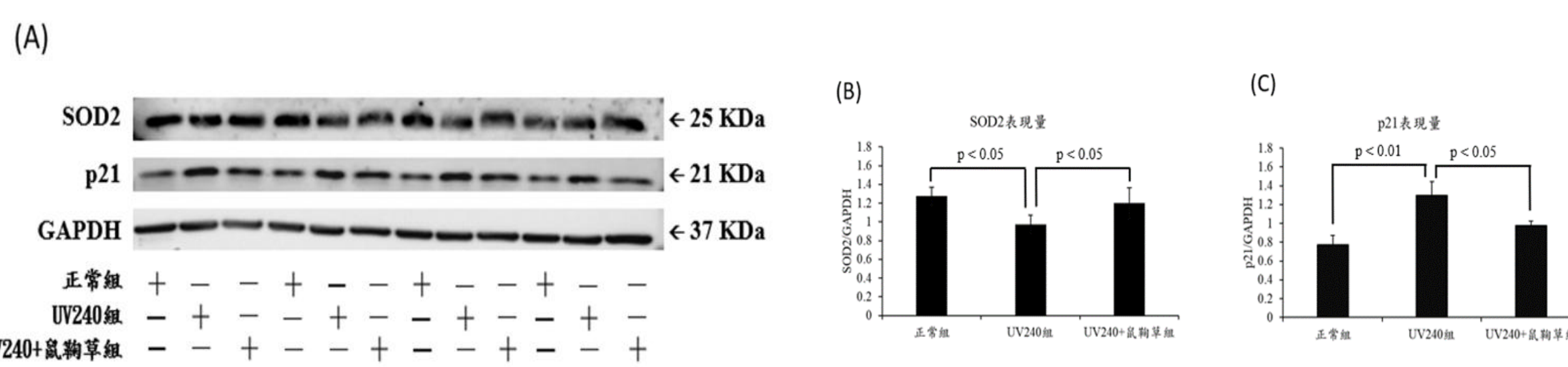


圖8：觀察鼠鞠草萃取物(320 μ M)救援皮膚細胞受UV傷害後其抗氧化相關蛋白質SOD2及老化相關蛋白質p21的表現量。(A)西方墨點法；(B)SOD2定量圖；(C)p21定量圖。(重覆次數n=3)。

以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其目標蛋白質表現量

圖9為免疫螢光試驗，與正常組相比，UV240組的抗氧化相關蛋白質NRF-2表現量降低許多，但加入鼠鞠草救援後，其NRF-2蛋白質表現量有明顯上升。而UV240+鼠鞠草組+Tri其NRF-2的表現量有明顯被抑制。

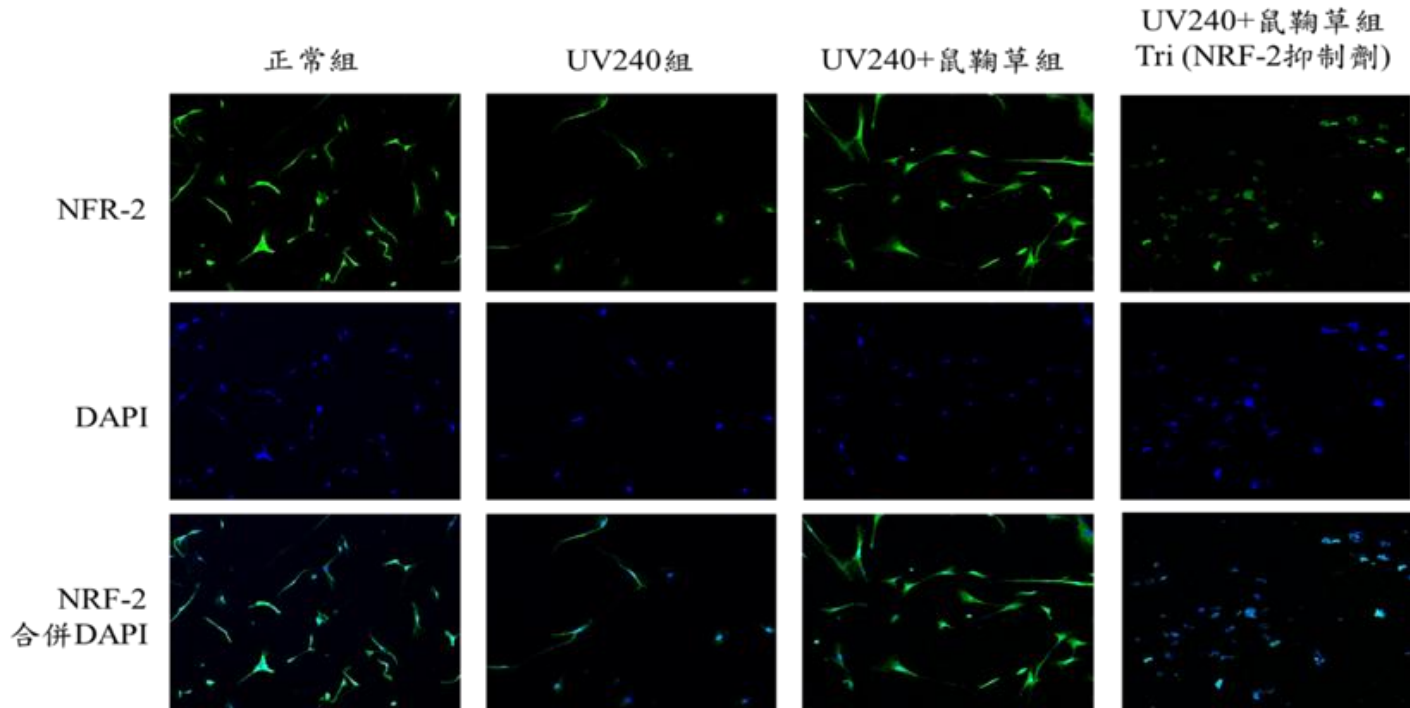


圖9：以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其NRF-2表現量(重覆次數n=3)。NRF-2以綠色螢光染色表示；皮膚細胞其細胞核以DAPI藍螢光染色表示；Tri = trigonelline (NRF-2抑制劑)。

圖10為免疫螢光試驗，與正常組相比，UV240組的衰老相關蛋白質p21表現量增高許多，但加入鼠鞠草救援後，p21表現量有明顯下降。加入Trigonelline (NRF-2抑制劑)來抑制NRF-2的表現，發現鼠鞠草的救援效果不見了，所以證明了鼠鞠草是經NRF-2來抑制p21老化蛋白質的表現量。

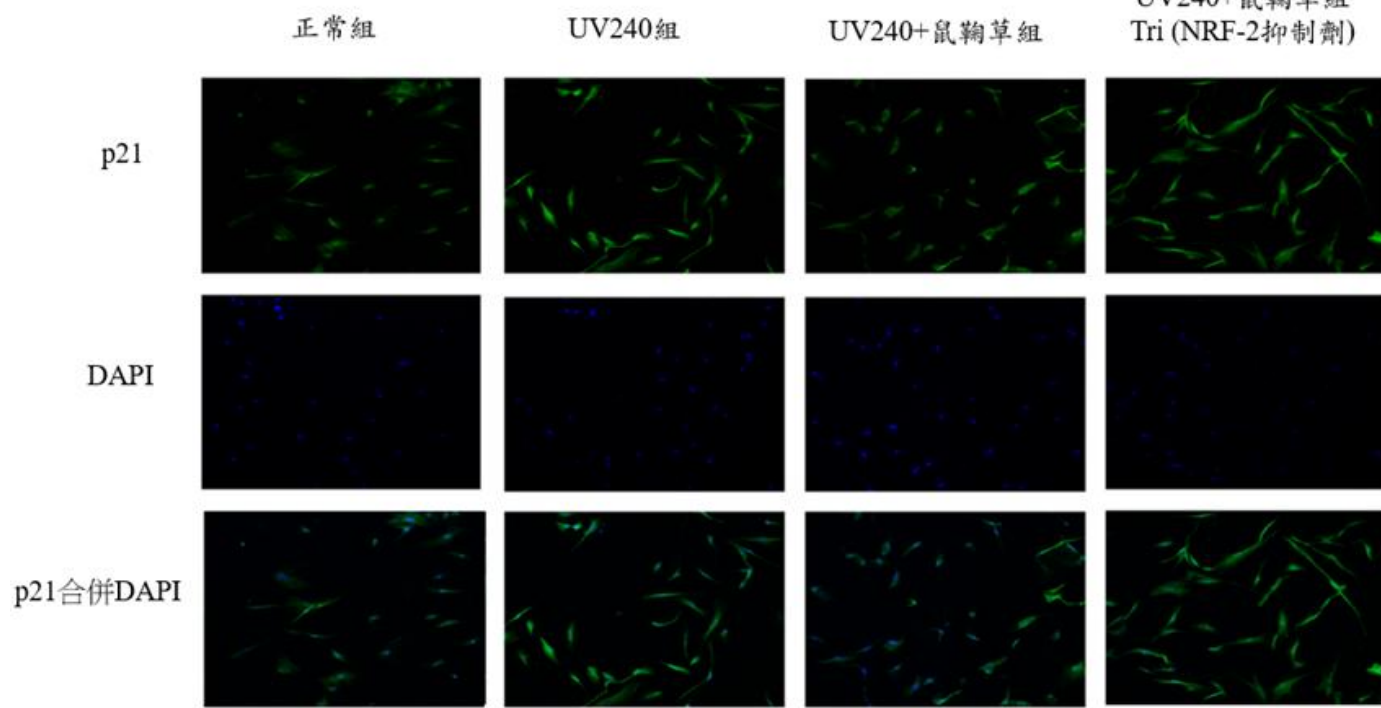


圖10：以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其p21表現量(重覆次數n=3)。*p21以綠色螢光染色表示；皮膚細胞其細胞核以DAPI藍螢光染色表示；Tri = trigonelline (NRF-2抑制劑)。

圖11為免疫螢光試驗，與正常組相比，UV240組的抗老化相關蛋白質Collagen 1a1表現量降低許多，但加入鼠鞠草救援後，其表現量有明顯上升。加入Trigonelline (NRF-2抑制劑)來抑制NRF-2的表現，發現鼠鞠草的救援效果不見了，所以證明了鼠鞠草是經NRF-2來調控Collagen1a1抗老化蛋白質的表現量。

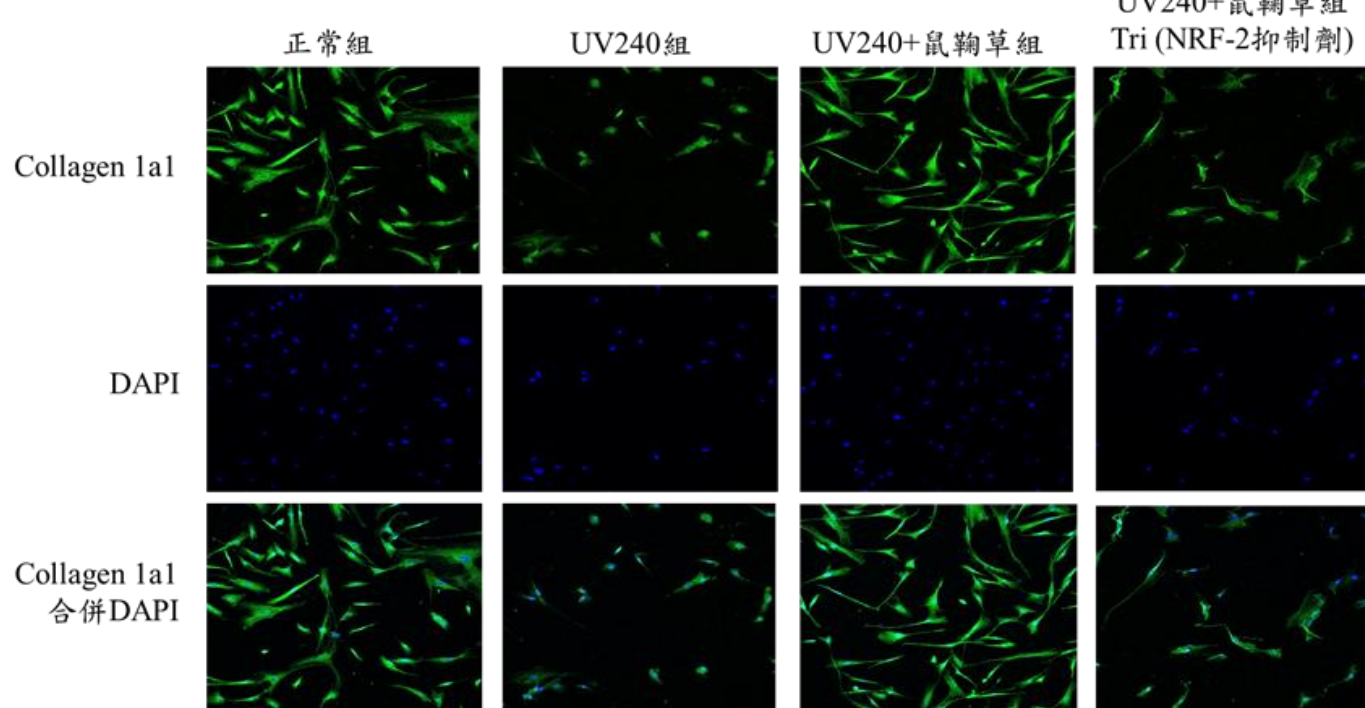


圖11：以免疫螢光染色法觀察皮膚細胞在不同組別其Collagen 1a1表現量(重覆次數n=3)。*Collagen 1a1以綠色螢光染色表示；皮膚細胞其細胞核以DAPI藍螢光染色表示；Tri = trigonelline (NRF-2抑制劑)。

伍、討論

UVB是否能加速皮膚細胞老化?

➤由實驗結果得知，UVB會造成皮膚細胞增生率下降、移動能力(傷口癒合能力)下降、膠原蛋白表現量下降、抗氧化蛋白質表現量下降，而老化相關蛋白質p21表現量上升，從而得知，UVB會造成皮膚細胞老化。

鼠鞠草萃取物是否具有清除自由基的抗氧化能力?

➤由FRAP抗氧化實驗得知，鼠鞠草萃取物本身具備強抗氧化能力，亦即鼠鞠草本身的抗氧化能力可直接清除自由基。

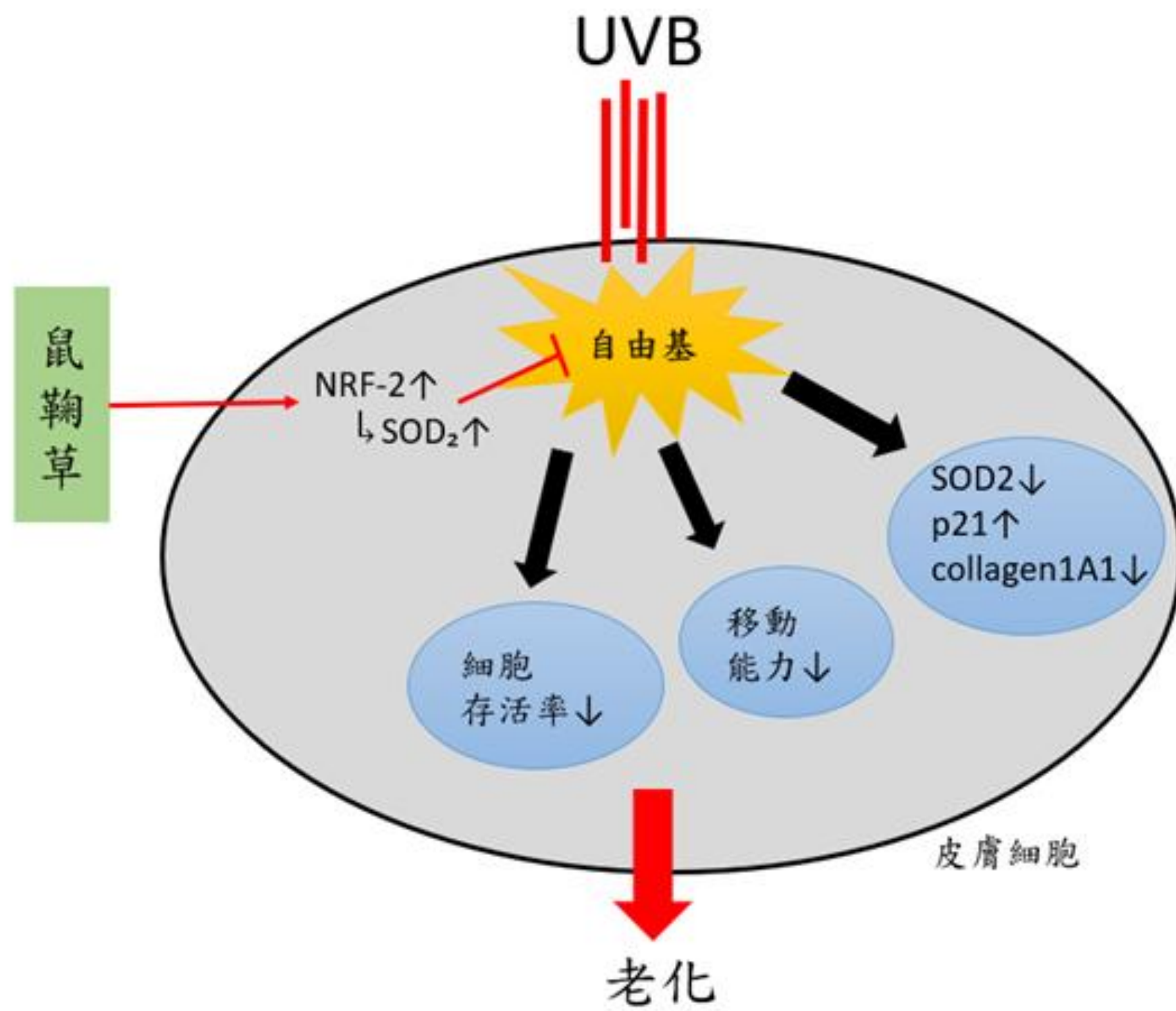
➤另外，鼠鞠草萃取物能提高皮膚細胞抗氧化蛋白質(NRF-2、SOD2)的表現量，藉由提高這些抗氧化蛋白質的表現量來提升皮膚細胞自身清除自由基的能力。

鼠鞠草萃取物是否能藉由清除自由基而延緩UVB造成的皮膚老化?

➤鼠鞠草萃取物可提升抗氧化蛋白質SOD2的表現量來清除皮膚細胞內部的自由基，進而改善UVB對皮膚細胞所造成的老化病理特徵。

鼠鞠草萃取物其抗皮膚細胞老化的詳細分子機轉又為何?

➤由前述實驗數據可知，當NRF-2被抑制之後，鼠鞠草的救援效果隨即降低。由此可知，鼠鞠草是透過提升NRF-2的表現量來救援UVB所造成的皮膚細胞老化的現象。



研究結論圖(本圖為本研究作者自製)

陸、結論與未來展望

結論

經由一系列的細胞實驗，能讓我們了解到鼠鞠草能提供細胞各式各樣的保護功能，像是能加速皮膚細胞的移動(可當成是加速皮膚傷口的復原速度)，又或是減緩老化蛋白質的表現量、幫助清除自由基，進而加強皮膚細胞生成膠原蛋白，使皮膚具有彈性及保水等多重功效，這些數據讓我們了解到鼠鞠草萃取物在未來可以運用在抗老化保健食品或是延緩皮膚老化面膜來商品化，為人們在抗老醫學上提供新選擇。

未來展望

- 本研究鼠鞠草是以水做為溶劑萃取，若換成有機溶劑萃取(如酒精)，是否會有不一樣的效果。
- 對鼠鞠草萃取物做進一步的純化，其抗老化效果是否會進一步提升。
- 設計動物實驗，進一步證實鼠鞠草萃取物的有效性及安全性。

重要參考文獻

1. 呂佳陵 (2022)。台灣紅藜 (Chenopodium formosanum) 萃取物於皮膚老化之作用及其機制探討。〔博士論文。中國醫藥大學〕。
2. 黃怡靜 (2024)。普通念珠藻多醣增強幹細胞對於皮膚老化之治療機轉。〔碩士論文。國立臺灣師範大學〕。
3. 洪于婷 (2017)。照射強度對於紫外線A所誘導之皮膚老化的影響。〔碩士論文。高雄醫學大學〕。
4. 郭嘉雯 (2025)。探討高分子奈米材料減緩UVB導致的皮膚光老化效應與相關機制。〔碩士論文。中國醫藥大學〕。
5. 姜櫟宣 (2007)。奈米/次微米化山藥之抗氧化與抗皮膚老化能力。〔碩士論文。國立臺灣大學〕。
6. 農業部農業主題館 (<https://kmweb.moa.gov.tw/subject/index.php?id=132>)。
7. 葉于菁 (2018)。艾草和鼠麴草萃取物抗氧化特性之研究。〔碩士論文。中臺科技大學〕。
8. 林知穎 (2025)。白藜蘆醇食品於皮膚功效研究。〔碩士論文。弘光科技大學〕。
9. 蔡豔柔 (2019)。Pomalidomide減緩在缺血性腦部損傷所產生的發炎反應、氧化壓力及凋亡作用。〔博士論文。臺北醫學大學〕。
10. Fouzder C, Mukhuty A, Mukherjee S, Malick C, Kundu R. Trigonelline inhibits Nrf2 via EGFR signalling pathway and augments efficacy of Cisplatin and Etoposide in NSCLC cells. Toxicol In Vitro. 2021.