

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

甘醇酸對人類皮膚角質細胞與皮膚癌細胞之細胞凋亡作用 研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 94-2314-B-040-032-
執行期間：94年08月01日至95年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：楊仁宏
共同主持人：鍾景光
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：黃芯蘭、呂啟誠、楊依倩
主持人：楊仁宏
共同主持人：鍾景光
協同研究人員：魏耀揮、鄭雅文、周濟眾
臨時工：張慧敏、蕭玉屏

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 95 年 11 月 22 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

計畫名稱：甘醇酸對人類皮膚角質細胞與皮膚癌細胞之細胞凋亡作用
研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2314-B-040-032

執行期間：2005年08月01日 至 2006年07月31日

計畫主持人：楊仁宏

共同主持人：鍾景光

計畫參與人員：魏耀揮、鄭雅文、周濟眾、黃芯蘭、呂啓誠、楊依倩、
蕭玉屏、張慧敏

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫
及下列情形者外，得立即公開查詢
 涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

中文摘要

近年來果酸 α -hydroxyacids (AHAs) 很廣泛的被使用於皮膚保養產品以及醫學美容治療上，然而長期使用果酸仍有安全性疑慮，尤其是果酸對皮膚光敏感及刺激性的副作用。本研究目的在探討甘醇酸 (glycolic acid) 與乳酸 (lactic acid) 是否會對人類皮膚角質細胞 (HaCaT) 產生細胞毒性作用，一方面探討其對細胞週期的影響、另一方面也探討甘醇酸與乳酸對 HaCaT 細胞凋亡作用之路徑與分子機轉。我們選擇人類皮膚角質細胞 (HaCaT cell) 進行研究，觀察果酸處理過的 HaCaT 細胞型態的改變，利用 DAPI 染色與彗星試驗偵測細胞受損情形，以凝膠電泳偵測 DNA ladder，並運用流式細胞儀技術探討甘醇酸與乳酸對細胞週期和細胞凋亡的作用及其分子機轉。實驗結果指出，甘醇酸與乳酸均對人類皮膚角質細胞 HaCaT 產生細胞毒性作用。從細胞型態上的改變、DAPI 染色、彗星試驗均能偵測 HaCaT 細胞受損，凝膠電泳也偵測到 DNA ladder 顯示細胞凋亡之產生；甘醇酸與乳酸抑制 HaCaT 細胞增生並呈現劑量—依賴性 (dose-dependent) 的模式，但乳酸同時也引起細胞週期停滯在 G1/S 期以及誘導細胞產生凋亡；而甘醇酸僅有誘導細胞凋亡但並不引起細胞週期停滯之現象。西方墨點法進一步分析，發現乳酸經由增加 Bax 的表現及抑制 Bcl-2 及 Bcl-xL 的表現，並活化 caspase-9 及

caspase-3，Flow cytometry 結果並發現乳酸是經由細胞質鈣離子增加、粒線體膜電位下降，進而使粒線體釋放出 AIF、Endo G 及 cytochrome c 到細胞質中，啟動細胞凋亡路徑，顯示乳酸主要是經由粒線體路徑來誘發 HaCaT 細胞的凋亡。此外乳酸會增加 Chk2、P21、P27 蛋白的表現，以及降低 cyclin E-CDK2、cyclin A-CDK2 複合體的表現而造成細胞週期停滯在 G1/S 期。我們的研究顯示，甘醇酸與乳酸雖然同屬果酸，但甘醇酸僅有誘導細胞凋亡但並不引起細胞週期停滯，但乳酸則同時抑制細胞週期停滯與誘導細胞凋亡，本研究雖是 in vitro 進行，但發現甘醇酸、乳酸抑制角質細胞之作用，因此臨床上使用果酸產品時必須審慎以對。

關鍵詞：果酸、甘醇酸、乳酸、HaCaT 細胞株、細胞週期、細胞凋亡、Caspase、粒線體膜電位

Abstract

α -hydroxyacids (AHAs) have been widely used in skin care products and cosmetic dermatology in recent years. However, there is still concern about its safety for long-term use. It has been found that AHA-containing products may induce photosensitivity and skin irritation. In this study, we investigated the cytotoxic effect of glycolic acid (GA) and lactic acid (LA) on human keratinocyte cell line (HaCaT). Our data suggested that both GA and LA are cytotoxic to HaCaT cells. The results indicated that both GA and LA inhibited proliferation of HaCaT cells in a dose-dependent manner. We observed cell morphological changes, and also used DAPI stain, comet assay, and agarose gel electrophoresis to investigate DNA damage. The results of flow cytometry showed decrease of mitochondrial membrane potential (MMP), and release of AIF, Endo G and cytochrome *c* from mitochondria to the cytosol in LA-treated cells. In addition, increased the level of Bax and inhibited the level of Bcl-2, Bcl-xL and activate caspase-9 and caspase-3, which subsequently induced apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathway in LA-treated cells. This indicated that LA induced apoptosis through the mitochondrial pathway in HaCaT cells. We also found that the decrease of MMP and the increase of reactive oxygen species (ROS) may be related to the increase of cytoplasmic calcium level. Western blotting results presented lactic acid increase the levels of Chk2, P21, P27 and decreased the levels of cyclin E-CDK2, cyclin A-CDK2 complexes that cause cell cycle arrest at G₁/S phase. In conclusion, our study demonstrate that both GA and LA inhibited HaCaT cell proliferation; however, LA inhibited cell proliferation via induction of cell cycle arrest at G₁/S phase and induction of apoptosis, and GA inhibited cell proliferation only via induction of apoptosis and not through cell cycle arrest.

Key words: α -hydroxyacids, Glycolic acid, Lactic acid, HaCaT cell line, Cell cycle, Apoptosis, Caspase, Mitochondrial membrane potential

前言

近年來果酸 α -hydroxyacids (AHAs) 很廣泛的被使用於皮膚保養產品以及醫學美容治療上，然而長期使用該成份的安全性疑慮並未完全獲得解答 (Berardesca *et al.* 1997; Ditre *et al.* 1996)。衛生署對化粧品中含有「果酸及其相關成分」之製品發出正告，呼籲業界和消費大眾注意果酸使用的安全性，特別注意果酸對皮膚光敏感及刺激性的副作用 (Bergfeld, 1997)。

研究目的

本研究目的在探討甘醇酸 (glycolic acid) 與乳酸 (lactic acid) 是否會對人類皮膚角質細胞 (HaCaT) 產生細胞毒性作用，一方面探討其對細胞週期的影響、另一方面也探討甘醇酸與乳酸對 HaCaT 細胞凋亡作用之路徑與分子機轉。

文獻探討

韓國學者 Ahn 等人研究指出甘醇酸可以抑制中波紫外線在角質細胞上所引起 c-Fos、AP-1 及 p53-p21 的表現 (Ahn *et al.*, 2002)，也發現在 hairless mouse 上甘醇酸可以抑制紫外線誘發皮膚癌的產生 (Hong *et al.*, 2001)。我們先前的研究也指出甘醇酸對血癌細胞 HL-60 有抑制生長作用並使細胞週期停滯在 G₂/M phase (Yang *et al.*, 2004)。

但是，並沒有文獻研究甘醇酸或乳酸 (lactic acid) 對人類角質細胞相

關的細胞毒性報告，於是本論文旨在探討在臨床上常使用的甘醇酸與乳酸對人類皮膚角質細胞(HaCaT cell)是否有產生細胞毒殺等影響生長的作用，進而去一連串探討此抑制作用是否經由誘導細胞凋亡的路徑以及探討對細胞週期調控的影響。

研究方法

我們選擇人類皮膚角質細胞 (HaCaT cell) 當本研究的 model，以其具有無限生長 (immortalization) 的功能。我們觀察果酸處理過的 HaCaT 的細胞型態改變、利用 DAPI 染色與彗星試驗偵測細胞受損情形，以凝膠電泳偵測是否出現 DNA ladder，並運用流式細胞儀技術 (flow cytometry) 探討甘醇酸與乳酸對細胞週期和細胞凋亡的作用，並進一步以西方墨點法 (Western blot) 分析影響細胞週期和細胞凋亡相關蛋白質的表現，以深入探討其分子機轉。

結果與討論

結果指出實驗結果指出，甘醇酸與乳酸對人類皮膚角質細胞 HaCaT 產生細胞毒性作用其機轉相近似，均可引起細胞週期的停滯及誘導細胞凋亡的產生。從細胞型態上的改變、DAPI 染色、彗星試驗 (comet assay) 均能偵測 HaCaT 細胞 DNA 受損情形，凝膠電泳也偵測到 DNA ladder 顯示細胞凋亡之產生；甘醇酸與乳酸抑制 HaCaT 細胞增生並呈現劑量－依賴性 (dose-dependent) 的模式，但乳酸同時也引起細

胞週期停滯在G₁/S期以及誘導細胞產生凋亡，而甘醇酸僅有誘導細胞凋亡但並不引起細胞週期停滯之現象。流式細胞儀技術結果指出，乳酸是經由粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)下降，進而使粒線體釋放出AIF、Endo G (Fig. 1)及 cytochrome *c*到細胞質中。西方墨點法進一步分析，發現乳酸也可經由增加Bax的表現及抑制Bcl-2 及Bcl-xL的表現(Fig. 2)，並活化了caspase-9 及 caspase-3 隨後啟動了caspase-dependent及caspase-independent的凋亡路徑，乳酸也能經由活化其他死亡接受器活化caspase 8 並使Bid 活化。我們並進一步發現，乳酸促使粒線體膜電位下降及活性氧的增加可能和細胞質鈣離子增加有關，實驗證據顯示乳酸主要是經由粒線體路徑來誘發HaCaT細胞的凋亡(Hengartner, 2000; Jiang and Wang, 2004)。此外乳酸會增加Chk2、P21、P27 蛋白的表現，以及降低cyclin E-CDK2、cyclin A-CDK2 複合體的表現而造成細胞週期停滯在G₁/S期。我們的研究顯示，雖然甘醇酸與乳酸均屬果酸，但其對人類皮膚角質細胞HaCaT的細胞抑制作用，並不完全相同，甘醇酸僅有誘導細胞凋亡但並不引起細胞週期停滯，但乳酸則同時抑制細胞週期停滯在G₁/S期並經由粒線體路徑誘導細胞凋亡(Fig. 3)。

計畫成果自評

我們的研究顯示，甘醇酸與乳酸雖然同屬果酸，但其對人類皮膚

角質細胞HaCaT的抑制作用，並不完全相同，甘醇酸僅有誘導細胞凋亡但並不引起細胞週期停滯，但乳酸則同時抑制細胞週期停滯在G₁/S期、並經由粒線體路徑誘導細胞凋亡，本研究雖是*in vitro*進行，但仍值得提醒臨床醫師與一般大眾在使用含有甘醇酸、乳酸等果酸產品時，必須審慎以對。

預估本研究內容與原計畫相符程度與預期目標情況約為70%，目前達成的研究成果為指導醫學研究所研究生取得碩士學位(黃芯蘭, 2006)，現並將研究成果整理中，擬投稿論文至國際學術期刊(Yang et al., in preparation)。

我們在下一年國科會的研究中將進一步的探討紫外線與甘醇酸、乳酸對HaCaT細胞之交互影響作用，以釐清甘醇酸、乳酸是否會加重HaCaT細胞對於紫外線之敏感性。

參考文獻

Berardesca E, Distanto F, Vignoli GP et al. Alpha hydroxyacids modulate stratum corneum barrier function. *Brit J Dermatol* 1997; 137: 934-938.

Ditre CM, Griffin TD, Murphy GF et al. Effects of a-hydroxy acids on photoaged skin: A pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. *J Am Acad Dermatol* 1996;34: 187-195.

Ahn KS, Park KS, Jung KM, et al. Inhibitory effect of glycolic acid on ultraviolet B-induced c-Fos expression, AP-1 activation and p53-p21

response in a human keratinocyte cell line. *Cancer Lett.* 186:125-135, 2002.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776, 2000.

Hong JT, Kim EJ, Ahn KS, et al. Inhibitory effect of glycolic acid on ultraviolet-induced skin tumorigenesis in SKH-1 hairless mice and its mechanism of action. *Mol Carcinog* 31:152-160, 2001.

Jiang X, Wang X. Cytochrome c-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**: 87-106, 2004.

Yang JH, Chou CC, Cheng YW, et al. Effects of glycolic acid on the induction of apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia cell line (HL-60). *Food Chem Toxicol.* 42 : 1777-1784, 2004.

Yang JH, et al. Sodium ascorbate inhibits the growth via the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human malignant melanoma A375.S2 cells. *Melanoma Research*, in press (2006).

Yang JH, Huang HL, Chung JG. Effects of Lactic Acid on the Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Immortalized Keratinocyte Cell Line (HaCaT), in preparation (*Brit J Dermatol*), 2006.

黃芯蘭 (指導教授:楊仁宏)。探討乳酸對人類皮膚角質細胞株(HaCaT)

誘發細胞凋亡及細胞週期停滯的影響。中山醫學大學醫學研究所

碩士論文，2006。

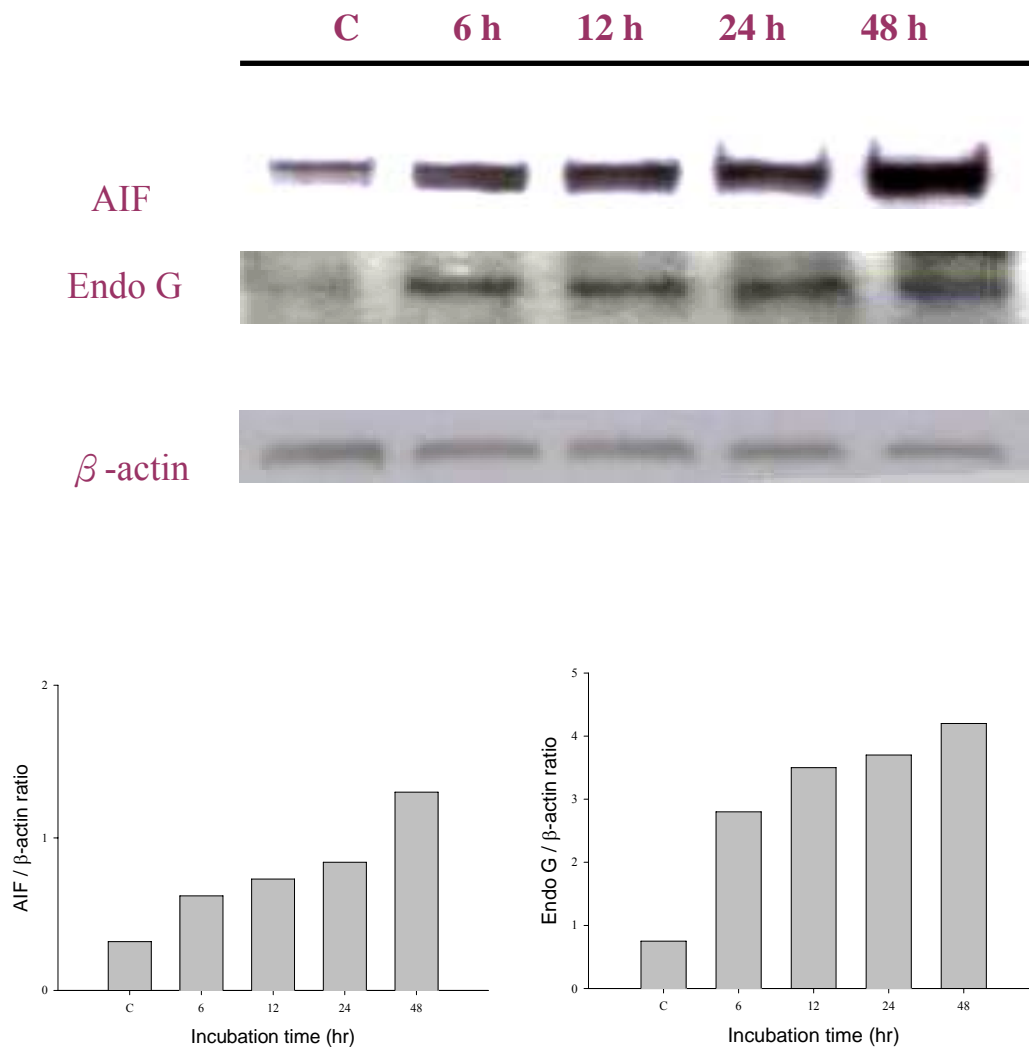


Fig. 1 以西方點墨法分析 HaCaT 細胞經17.5 mM乳酸處理後細胞中AIF、Endo G蛋白之表現量

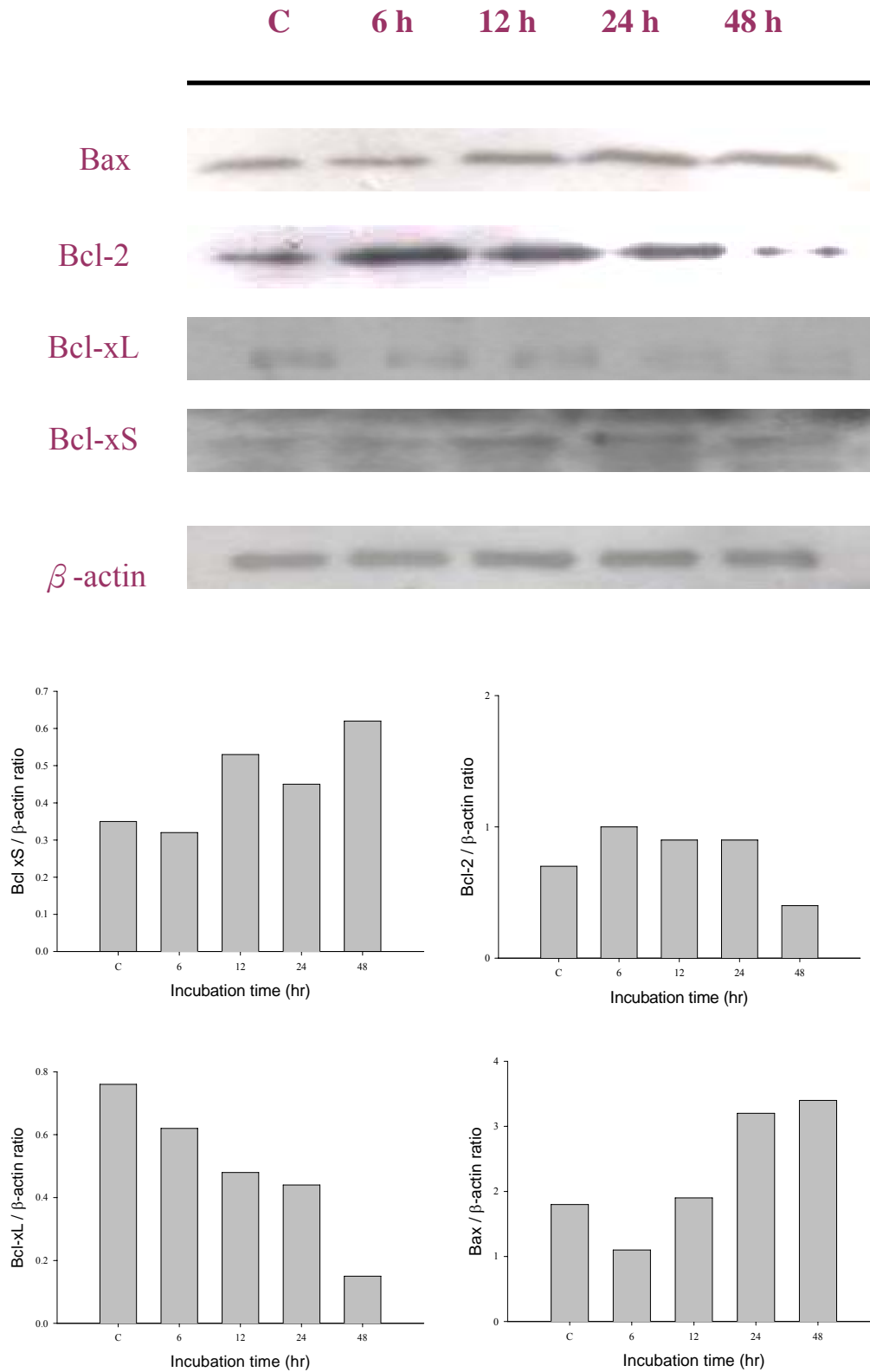


Fig. 2 以西方點墨法分析 HaCaT 細胞經17.5 mM乳酸處理後細胞中Bax、Bcl xL /xS、Bcl-2蛋白之表現量

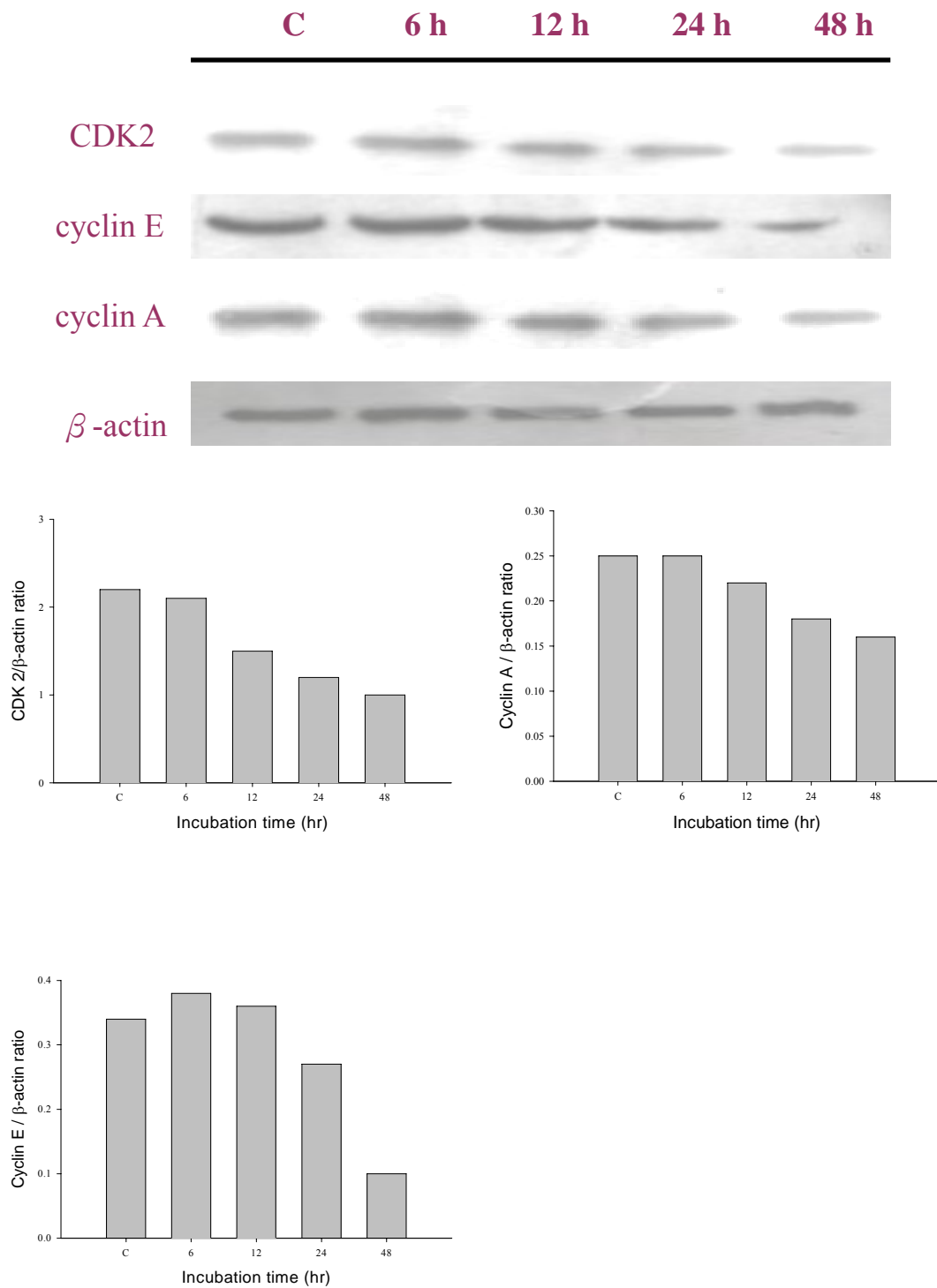


Fig. 3 西方點墨法分析 HaCaT 細胞經17.5 mM乳酸處理後細胞中

CDK 2、cyclin A、cyclin E蛋白之表現量