

# 科技部補助產學合作研究計畫成果精簡報告

## 探討維生素 C 對於鈣羥磷灰石促進膠原蛋白合成之活體研究

計畫類別：技術及知識應用型  
計畫編號：MOST 103-2622-B-040-002-CC3  
執行期間：103年06月01日至104年05月31日  
執行單位：中山醫學大學營養學系（所）

計畫主持人：陳璟賢  
共同主持人：徐成金  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：余亭萱  
                  博士班研究生-兼任助理人員：軒叔汶

處理方式：

1. 公開資訊：立即公開
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中 華 民 國 104 年 08 月 14 日

中文摘要：鈣羧磷灰石(calcium hydroxylapatite, CaHA)又稱為微晶瓷(radiesse)，是一種人工合成之皮下填充物，在醫學美容上常用於鼻樑、山根、下巴、下巴線條、法令紋、蘋果肌等處之塑型與填補。相較於玻尿酸，CaHA 效期長、不會吸水膨脹、不易位移、用量更省、視覺效果佳等優點，而皮下注射 CaHA 能吸引膠原母細胞(fibroblasts)進駐，進而產生新生的膠原蛋白(collagen)鑲嵌形成穩定的網狀結構體。維生素 C (vitamin C, Vit. C)又稱抗壞血酸(ascorbic acid)，除治療壞血病外，也與膠原蛋白生成有關。最近研究發現，每日給予正常大鼠補充 Vit. C 可刺激第一型膠原蛋白的合成；也有研究發現 Vit. C 抗氧化劑混合物可減少紫外線 B (ultraviolet radiation B, UVB)照射後裸鼠皺紋生成，其中分子機制是經由抑制基質金屬蛋白酶(metalloproteinases, MMPs)活性或經由增加前膠原蛋白(procollagen)的合成，抑制光老化(photoaging)作用。本實驗利用裸鼠，將 CaHA 注射於裸鼠背部皮下並照射 UVB 下，同時餵食 Vit. C 12 週後，取裸鼠皮膚進行膠原蛋白染色(trichrome masson stain)與西方點墨法(Western blotting)分析下發現，注射 CaHA 合併餵食 Vit. C 可預防 UVB 照射導膠原蛋白的裂解；而其分子機制是經由抑制 MMP-1、MMP-2、MMP-9 及 MMP-13 的活性，同時活化基質金屬蛋白酶組織抑制劑-1(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1)來達到抑制膠原蛋白分解。因此本研究結果建議施打微晶瓷者，平時在戶外照射 UVB 下，攝取 Vit. C 確實可以抑制 MMPs 活性來維持膠原蛋白的含量，進而減少皺紋的生成。本研究結合營養與醫美領域，希望藉此計畫的完成，提供未來國內外醫學美容領域更多參考之學理依據，也藉此計畫完成醫學美容於動物活體試驗研究平台建置，有助於未來國內外醫學美容發展的同時能思考結合飲食中保健營養概念，以達到相輔相成的目標。

中文關鍵詞：鈣羧磷灰石、膠原蛋白、維生素 C、紫外線 B、皺紋、光老化

英文摘要：Calcium hydroxylapatite (CaHA, also known as radiesse) is an injectable filler material. CaHA has utility in many facial contouring and rejuvenation applications. When CaHA was placed into soft tissue, it provides immediate correction by recruiting fibroblasts. Over time, the carrier gel is gradually absorbed and CaHA particles remain. Local histiocytic and fibroblastic response at the site appears to result in the production of new collagen around the

microspheres. Vitamin C (Vit. C, also known as ascorbic acid) is not only used for scurvy treatment, but also correlation to collagen formation. Vit. C is a potent stimulator for type I collagen expression in rats. Vit. C was also reported to have protective effects against ultraviolet radiation B (UVB)-induced wrinkle formation through prevention of matrix metalloproteinases (MMPs) and/or induction of collagen synthesis.

In this study, CaHA was injected into the back of hairless mice skin, and then these mice were exposed to UVB irradiation (1.2 kJ/m<sup>2</sup>) and treated with Vit. C (2 g/kg and 4 g/kg BW) for 12 weeks. Trichrome masson stain and Western blotting demonstrated that the combination of CaHA and Vit. C could inhibit the activities of pro-MMP-1/2/9/13, induce the production of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1), and increase the synthesis of procollagen in the dorsal skin of hairless mice exposed to UVB. In summary, we provided evidence suggesting that CaHA and Vit. C might be used as potential combined agents for treatment of UV-induced skin photoaging.

英文關鍵詞： calcium hydroxylapatite, collagen, vitamin C, ultraviolet radiation B, wrinkle, photoaging

## 科技部補助產學合作研究計畫成果精簡(進度)報告

計畫名稱：探討維生素 C 對於鈣羥磷灰石促進膠原蛋白合成之活體研究

計畫類別： 先導型       開發型       技術及知識應用型

計畫編號：MOST 103-2622-B-040 -002 -CC3

執行期間： 103 年 6 月 1 日 至 104 年 5 月 31 日

執行單位：中山醫學大學 營養學系(所)

計畫主持人：陳璟賢

共同主持人：徐成金

計畫參與人員：軒叔汶、余亭萱

**研究摘要** (500 字以內)：鈣羥磷灰石(calcium hydroxylapatite, CaHA)又稱為微晶瓷(radiesse)，是一種人工合成之皮下填充物，在醫學美容上常用於鼻樑、山根、下巴、下巴線條、法令紋、蘋果肌等處之塑型與填補。皮下注射 CaHA 能吸引膠原母細胞(fibroblasts)進駐，進而產生新生的膠原蛋白(collagen)鑲嵌形成穩定的網狀結構體。最近研究發現，每日給予正常大鼠補充 Vit. C 可刺激第一型膠原蛋白的合成；有研究發現 Vit. C 抗氧化劑混合物可減少紫外線 B (ultraviolet radiation B, UVB)照射後裸鼠皺紋生成，其中分子機制是經由抑制基質金屬蛋白酶(metalloproteinases, MMPs)活性或經由增加前膠原蛋白(procollagen)的合成，抑制光老化(photoaging)作用。本實驗利用裸鼠，將 CaHA 注射於裸鼠背部皮下並照射 UVB 下，同時餵食 Vit. C 12 週後，取裸鼠皮膚進行膠原蛋白染色(trichrome masson stain)與西方點墨法(Western blotting)分析下發現，注射 CaHA 合併餵食 Vit. C 可預防 UVB 照射導膠原蛋白的裂解；而其分子機制是經由抑制 MMP-1、MMP-2、MMP-9 及 MMP-13 的活性，同時活化基質金屬蛋白酶組織抑制劑-1(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1)來達到抑制膠原蛋白分解。本研究結果建議施打微晶瓷者，在照射 UVB 下，攝取 Vit. C 確實可以抑制 MMPs 活性，進而減少皺紋的生成。本研究結合營養與醫美領域，除提供未來國內外醫學美容領域更多參考之學理依據，也有助於未來國內外醫學美容發展的同時能思考結合飲食中保健營養概念，以達到相輔相成的目標。

**人才培育成果說明**：本計畫執行期間，共 1 位博士級學生、1 位碩士級學生參與協助研究進行，並於執行期限內完成體內動物實驗之研究分析，對於微晶瓷、維他命 C 與 UVB 照射的研究背景與研究方法均得到良好教育與訓練。

**技術研發成果說明**：本研究結果建議施打微晶瓷者，平時在戶外照射 UVB 下，攝取 Vit. C

確實可以抑制 MMPs 活性來維持膠原蛋白的含量，進而減少皺紋的生成。而本研究建立之皮下填充物與營養補充品協同作用之實驗動物模式平台，可應用為將來發展預防及改善光老化皺紋生成醫美醫材與相關保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。

**技術特點說明：**1. 維生素 C 抑制 UVB 照射導致皺紋生成；2. 皮下注射 CaHA 可改善 UVB 照射導致皺紋生成；3. 維生素 C 增長皮下注射 CaHA 效期之研究；4. 補充維生素 C 可提升皮下注射 CaHA 改善 UVB 照射導致皺紋生成。

**可利用之產業及可開發之產品：**完成本研究計畫可將研究成果與技術進行技術轉移，將有助於 CaHA 在醫學美容推廣與相關維生素保健產品的銷售。經由本研究成果繼續規劃進入人體試驗，強化臨床效果。

**推廣及運用的價值：**在本實驗室先前已建立光老化之動物實驗，UVB 照射裸鼠確實能減少裸鼠背部皮下膠原蛋白層的厚度。而本實驗進一步先以皮下注射 CaHA 增強皮下膠原蛋白厚度，再照射 UVB，加上每日餵食維生素 C，將可多元觀察營養素與皮下填充物協同抑制裸鼠皮下膠原蛋白層的減少，達到抗皺紋功效。本研究結合營養與醫美領域，希望藉此計畫的完成，提供未來國內外醫學美容領域更多參考之學理依據，也藉此計畫完成醫學美容於動物活體試驗研究平台建置，希望未來國內外醫學美容發展的同時能思考結合飲食中保健營養概念，達到相輔相成的目標。

#### **處理方式：**

##### 1. 立即公開

(依規定，精簡報告係可供科技部立即公開之資料，並以 4

至 10 頁為原則，如有圖片或照片請以附加檔案上傳，如因涉及專利、技術移轉案或其他智慧財產權、影響公序良俗或政治社會安定等，而不宜對外公開者，請勿將其列入精簡報告)

##### 2. 本研究是否有嚴重損及公共利益之發現：否 是

##### 3. 本報告是否建議提供政府單位參考 否 是，衛福部（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送。）

中 華 民 國 104 年 8 月 13 日

## 前言、

### 一、鈣羧磷灰石 (calcium hydroxylapatite)：

鈣羧磷灰石 (calcium hydroxylapatite, 簡稱 CaHA) 又稱為微晶瓷(Radiesse), 是一種人工合成之皮下填充物, 屬於非永久性, 中長效期 (12~18 個月) 的皮下填充物; 而另一常使用的皮下填充物玻尿酸, 效期約為 6 個月, 因此漸為醫美市場主流。CaHA 在醫學美容上常用於鼻樑、山根、下巴、下巴線條、法令紋、蘋果肌等處之塑型與填補(1,2)。目前 CaHA 已通過歐盟 CE 及美國 FDA 認證 (2006), 而台灣衛生署也於 2008 年認證通過, 可合法使用於醫美用途。目前 CaHA 只有一種分子大小, 25-45 um, 懸浮在水狀凝膠 (glycerin and sodium carboxy-methyl-cellulose) 白色牙膏狀, 只有 30% 一種濃度。比起大分子玻尿酸, CaHA 軟中帶硬略具「骨感」, 黏滯性、保水性雖不如玻尿酸但不會吸水膨脹、不易位移是相對玻尿酸的最大好處。而且 CaHA 用量更省, 以鼻樑注射而言, CaHA 常常有玻尿酸 1.2~1.5 倍的視覺效果, 換句話說, 0.6ml CaHA 打出的隆鼻效果和玻尿酸 1ml 類似。這完全是因為 CaHA 更凝聚、更不會散失。鈣羧磷灰石(CaHA) 20 年前醫界就在使用, 只是以前的 CaHA 濃度高、質地硬, 長期被整形外科用來填充細微的骨頭缺陷、神經外科用來填充頭蓋骨、牙科用來補牙洞, 因人體骨質、牙齒琺瑯質 (enamel) 及齒質(dentin) 主要成份為 CaHA, 補牙用銀粉(amalgam)就是 CaHA 加上水銀、銀及其他重金屬組成, 因此 CaHA 安全性與生物相容性高。目前醫美使用注射劑型 CaHA 是美國著名的必治妥施貴寶公司(Bristol-Myers Squibb Inc.)與 Bioform 公司共同研發, 於 2006 年 10 月取得美國 FDA 許可上市。屬於一種生物軟陶瓷, 有近乎 100% 生物相容性與生物可分解性, CaHA 晶球狀的微晶瓷顆粒懸浮在水凝膠中, 形成濃度 30% 的膠狀漿糊 (paste) 顆粒大小介於 25-45 毫米之間, 容易進行注射。當注射入組織間, CaHA 晶球會形成一個骨架, 骨架空隙具有生物電位, 吸引膠原母細胞 (fibroblast) 進駐進而產生新生的膠原蛋白鑲嵌形成穩定的網狀結構體(3)。此結構攀附於周圍組織, 取得抵抗應力、張力以及重力的穩固而柔軟的架構而不會位移。一般六個月左右大部分的微晶瓷分子會被分解, 但由於有新生膠原蛋白緣故, 體積不至於減少太多。也就是因為刺激新生膠原蛋白長入的這個緣故, 被有些人稱為『semi-permanent』半永久性。

### 二、維生素 C 與膠原蛋白：

維生素 C, 又稱抗壞血酸, 首次發現在 1700 年代中葉, 由一位蘇格蘭海軍外科醫生發現, 含有維生素 C 的柑橘類水果飲食可治療壞血病。壞血病的特徵在於造成人類牙齦出血, 牙齒脫落, 削弱骨骼, 關節腫脹和貧血。維生素 C 是脯氨酰羧化酶(prolyl hydroxylase)的輔因子, 可催化脯氨酸胜肽鏈羧基化的轉譯後修飾(4)。在該反應中, 維生素 C 輔助氧化的鐵結合到脯氨酰羧化酶上, 降低了鐵和促進酶的釋放(5)。羧基化脯氨酸是膠原蛋白組成中的一種重要的氨基酸, 而膠原蛋白又是結締組織(如骨, 腱, 韌帶, 牙齒, 皮膚, 軟骨和血管)組成之結構蛋白。因此維生素 C 缺乏將造成壞血病、結締組織不全等問題, 嚴重更會導致死亡。膠原蛋白是由三個膠原蛋白單體結合形成之三股螺旋結構(6)。在膠原蛋白單體的脯氨酸中, 至少 35 % 必須被羧基化來保證膠原蛋白的熱穩定性(7), 未經羧基化的分子通常在細胞內被降解而不會被排出於細胞外基質中(8)。研究維生素 C 在活體內的作用是具有挑戰性的, 因實驗動物通常能合成維生素 C, 而不能引發壞血病。但有研究利用基因突變, 使得小鼠無法合成維生素 C, 來研究小鼠缺乏維生素 C 下與動脈粥樣硬化的關係, 結果發現正常與基因突變小鼠動脈粥樣硬化病灶大小沒有變化, 但缺乏維生素 C 小鼠的膠原蛋白含量明顯減少, 這種變化導致動脈粥樣硬化血管壁更容易破裂(9)。除了其抗壞血病作用, 維生素 C 具有強大的抗氧化特性。維生素 C 在體外試驗發現可以抑制低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化(10), 這與預防動脈粥樣硬化及其併發症有關。維生素 C 也具有抗發炎作用, 包括降低 leukocyte 粘附到內皮細胞和增加一氧化氮 (NO) 的生物利用度以減少動脈粥樣硬化發生(11-12)。維生素 C 還能抑制與發炎有關的轉錄因子 NF-κB 活性, 來抑制發炎基因的表現(13)。最近針對維生素 C 與膠原蛋白相關之研究也發現, 給予正常大鼠每 2 天給予大劑量維生素 C 補充, 刺激血管生成和第一型膠原蛋白的合成, 因而增加了跟腱的癒合(14)。此外也有研究利用維生素 C、維生素 E、碧蘿芷和月見草油等抗氧化劑混合物, 以口服給藥方式, 觀察裸鼠對抗 UVB 誘導皺紋形成的效果。結果發現維生素 C 抗氧化劑混合物可減少皺紋生成, 其中分子機制是維生素 C 抗氧化劑混合物可抑制 MMP 活性或經由增加前膠原蛋白(procollagen)的合成, 達到小鼠背部皮膚之光保護作用(15)。

### 三、紫外線 (ultraviolet, UV) 照射之皮膚損傷

#### 3.2. 紫外線照射對皮膚之影響：

3.2.1. 毒性效應：太陽光(sunlight)為一連續性光譜依據波長範圍主要可分成三大區：紫外線、可見光(visible)和紅外線(infrared)。紫外線以波長又可分為 UVA(320~400nm)、UVB(280~320nm)、UVC(200~280nm), 波長愈短能量愈強; 不同波長穿透皮膚的深度亦不同; UVC 在穿透大氣層時即會被吸收或散射, 到達地面之輻射劑量非常少, 幾乎不會對生物體造成影響。UVA 和 UVB 會穿透表皮影響到真皮層, 破壞膠原纖維、彈力纖維, 使皮膚老化產生皺紋(16)。UVB 主要作用在表皮層會造成皮膚紅腫、曬傷, 甚至是皮膚癌。

3.2.2. 光老化 (膠原蛋白裂解導致皺紋生成)：在日光下長期曝露, 造成紫外光的傷害。紫外線會使

膠原蛋白變性及製造量也減少、皮脂腺分泌失調、氧化自由基增多，傷害健康細胞。光老化所呈現的症狀為看起來比實際年齡還老、皺紋普遍較細、膚色變黃、皮膚粗糙不平、皮膚乾燥以及出現各種良性或惡性腫瘤。光老化也會使生理功能異常，如：不均勻的曬黑、皮膚容易腫脹、皮膚感覺降低、免疫功能降低而且皮膚受壓後回復正常較慢。雖然皮膚可藉由緊密的角質層、黑色素、抗氧化系統或塗抹紫外線吸收劑，以抵抗陽光對皮膚的傷害，但是如在太陽光下過度曝曬，會使皮膚會產生曬斑 (sunburn)、皮膚炎、起水泡、紅腫等急性反應現象；而慢性反應則會造成皮膚色澤變黑、觸感變硬、深刻皺紋產生之光老化或光加齡 (photoaging) 現象產生，更嚴重者甚至會有皮膚癌現象產生(17)，而這些現象則與皮膚經過過量紫外線的照射後，皮膚會產生過量 ROS 有關。紫外線照射會造成表皮層或真皮層結構產生變異，進而加速皺紋生成 (wrinkle formation)。

3.2.2.1. 細胞外基質(extracellular matrix, ECM)與皮膚老化之關係：真皮層中除了皮膚細胞外，還包括彈性纖維、膠原纖維與葡萄糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 等細胞外間質(Extracellular matrix, ECM)，這些細胞外間質則具有支撐真皮層結構及做為纖維蛋白基質等功能(18)。Hiroaki 等人(19)報告指出利用 UVB 20 mJ/cm<sup>2</sup> 每週照射裸鼠三次，照射四星期後，觀察發現有皺紋產生，其原因為表皮層中顆粒層與角質層的厚度增加所造成。另外 Yoshinori 等人(20)報告指出以較高的 UVB 照射劑量 (61 mJ/cm<sup>2</sup>)，每星期三週照射無毛老鼠，經 24 星期長期照射後，膠原蛋白總含量明顯減少，並發現在第四個星期時伴隨著細緻型縐紋產生，而到第六個星期時則有粗糙皺紋形成，除此之外皮膚皺紋加深的程度會隨照射時間增加而加深。Hiroakie 等人(21)認為皺紋的形成與真皮層中的酸溶性膠原蛋白含量下降有關，推測皮膚經 UVB 照射後，膠原蛋白的降解增加及減少纖維母細胞生成膠原蛋白，導致真皮層中膠原蛋白含量減少。

3.2.2.2. 基質金屬蛋白水解蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)對皮膚老化之調控：MMPs 為一群聚有水解蛋白質能力的酵素，它們以非活化態的 pro-enzyme 型態分泌到細胞外，然而非活化態的 MMPs 並不具有水解蛋白質的能力，必須仰賴一些蛋白質水解酵素以及一些非酵素型的化學物質等，間接或直接的水解其一小 signal domain，再經由 auto-cleaved 後，使原來的 pro-MMPs 轉變成具有水解蛋白質能力的酵素。相對的，MMPs 的活性則會受到內生性抑制蛋白 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 所抑制。UV 具有誘導 MMPs 活性增加的作用，文獻指出長期照射游離輻射 (ionizing radiation, IR) 會導致皺紋產生，因為 IR 會顯著增加 MMP-3 以及 MMP-13 的 mRNA 表現量，若是同時照射 IR 及 UV 則會增強 UV 誘導 MMP-3、MMP-13 的 mRNA 表現量及 MMP-2、MMP-9 的活性，因此 IR 有增強 UV 誘導皺紋形成的作用(22)。根據文獻報導照射 UVA 會促使細胞膜上的磷脂質雙層產生脂質過氧化作用 (lipid peroxidation) 而形成過氧化物，進而成為活化 MMP-1 途徑中重要的訊息傳遞物，導致老化及皮膚癌的發生(23)。此外，UV 中的 UVB 可以誘導角質細胞分泌 MMP-9 並具有 dose-dependent 趨勢，而 MMP-9 會導致細胞產生發炎現象，使細胞趨向凋亡(apoptosis)(24)。

## 研究目的、

現今由於社會環境與結構的變遷、醫藥生物科技的日新月異，使得保健、養生的觀念日益受到重視。如何吃得健康？如何抗癌防老化等議題，皆成了社會大眾關注的焦點。許多研究學者亦致力於相關的研究，例如：癌症、心血管疾病、細胞老化與死亡、美容保健等等。近年來，因溫室效應使得陽光紫外線越來越強，人類皮膚受紫外線傷害風險也與日劇增，皮膚老化問題更是受到重視。因此許多人藉由醫學美容方式尋求保持外貌年輕，過去常以施打肉毒桿菌、電波拉皮方式，但仍常因引發皮膚不良反應而產生許多醫療糾紛，因此皮下填充物的研發可快速修補老化皺紋、補強凹陷，而且立即有效果，同時較無不良反應而漸漸受到醫美市場重視。鈣羥磷灰石 (簡稱 CaHA) 又稱為微晶瓷(Radiesse)，是一種人工合成之皮下填充物，因效期比另一常使用的皮下填充物玻尿酸長，因此漸為醫美市場主流。而 CaHA 皮下注射後，可刺激吸引膠原母細胞 (fibroblast) 產生新生的膠原蛋白，達到填補皺紋凹陷。但目前 CaHA 因為仍有效期限限制 (12~18 個月)，因此尋求增長 CaHA 效期是醫美領域的努力方向。

維生素 C 是人類所必須之營養素，也是目前便宜且容易取得的營養素補充劑。且維生素 C 具有抗氧化與促進膠原蛋白合成的學理基礎，因此本研究若能成功證實維生素 C 具有延長 CaHA 效期之能力，將有助於 CaHA 使用者免於多次注射的花費與痛苦。我們研究室近年來致力於由台灣常見植物中找尋具光保護作用潛能的天然植物萃取物與天然物。其主要的目的是希望發展出一套系統性之體外 (細胞培養系統) 及體內 (動物模式) 之研究平台與提供重要之科學性數據，來評估、驗證並有效應用於將來做為人類抗 (防) 光老化之健康食品或另類保健產品之可能性。

## 研究方法、

### 一、動物模式

利用 Balb/c 裸鼠進行實驗，以 UVB 誘導皮膚病變較為顯著。實驗分別分為 8 組 (分組如下說明)，每組 10 隻。預先於裸背部皮下注射鈣羥磷灰石後再施以 UVB 照射，每週照射三次，照射期間每日飲水給予不同劑量維生素 C，持續 12 週後取老鼠背部皮膚約 1-2cm (取兩部分)。一份直接固定在 4% neutral buffered formaldehyde 後以石蠟包埋。另一部分直接冷凍在 -80°C 備用進行 Western blot 及其他相關實驗分

析。分組處理方式如下：(1) 正常組(2) UVB 照射組(誘導組)(3) CaHA+ UVB (4) CaHA+ UVB+Vit.C 2g/kg BW (5) CaHA+ UVB+Vit.C 4g/ kg BW (6) UVB+Vit.C 4g/ kg BW (7) CaHA 組 (8)Vit.C 組 4g/ kg BW。

二、組織病理切片及組織染色 (Hematoxylin & Eosin, H&E stain)

三、脂質過氧化測定(Lipid peroxidation assay)

四、GSH peroxidase 酵素活性的測定

五、SOD 酵素活性的測定(RANSOD Kit)

六、血液生化值分析

七、膠原蛋白染色法 (Sigma Trichrome Masson Stain)

八、西方點墨法 (Western blotting)

九、統計分析 (Statistical Analysis)

**結果與討論、(含結論與建議)**

一、動物實驗

1. 在有無照射 UVB 後，施打微晶瓷與餵食維他命 C 12 週後，對於裸鼠血液抗氧化酵素及血液生化值之影響：經由 12 週實驗後，犧牲裸鼠取其血液進行後續分析，其中血液抗氧化酵素分析結果發現，偵測麩胱甘太過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)數值發現，照射 UVB 的組別 GPx 數值高於其他組別，而無照射 UVB 但有餵食維他命 C 組別其 GPx 則較低，在有無施打微晶瓷的組別其差異性並不大(Fig.1A)。此外，血液脂質過氧化測定(TBA reactive subatances, TBARS)發現，各組間並無明顯差異(Fig.1B)。再分析血中超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD)表現發現，各組間也無顯著差異(Fig.1C)。同時，將裸鼠犧牲後血清進行血液生化值分析，包括 GOT、GPT、BUN、creatinine、CHO、TG、Glucose 等項目分析，由 Table 1 結果發現，肝功能指標 GOT 與 GPT 數值各組間並無顯著差異；血液尿素氮 BUN 分析結果發現，照射 UVB+微晶瓷(CaHA)組比 CaHA 組高，達顯著差異( $p < 0.05$ )，而 UVB+ CaHA+Vit.C 4g/kgBW 組比 UVB+ CaHA 組則顯著降低( $p < 0.05$ )；creatinine 分析數值各組間並無顯著差異；總膽固醇 CHO 分析結果發現，照射 UVB+ CaHA 組達到 105.33mg/dl 而 UVB+ CaHA+Vit.C 2g/kgBW 組比 UVB+ CaHA 組則降低為 74.86 mg/dl，達顯著差異降低( $p < 0.01$ )，UVB+ CaHA+Vit.C 4g/kgBW 組比 UVB+ CaHA 組則降低為 87.00 mg/dl，達顯著差異降低( $p < 0.05$ )，而單獨餵食 Vit.C 4g/kgBW 組與正常組相比下，經 12 週餵食 Vit.C 4g/kgBW 可顯著降低血中總固醇，達顯著差異降低( $p < 0.01$ )；而三酸甘油酯 TG 分析結果發現，UVB+ CaHA+Vit.C 2g/kgBW 組比 UVB+ CaHA 組則達顯著差異降低( $p < 0.05$ )，而單獨餵食 Vit.C 4g/kgBW 組與正常組相比下，經 12 週餵食 Vit.C 4g/kgBW 可顯著降低血中 TG，達顯著差異降低( $p < 0.05$ )；而血糖方面則發現有餵食 Vit.C 4g/kgBW 組別血糖值都較高。

2. 在有無照射 UVB 後，施打微晶瓷與餵食維他命 C 12 週後，對於裸鼠皮膚膠原蛋白之影響：12 週犧牲後取背部施打微晶瓷區域皮膚取下，進行組織病理切片及組織染色(Hematoxylin & Eosin, H&E stain)，同時將皮膚切片進行膠原蛋白染色 (Sigma Trichrome Masson Stain)，此染色法染色時，在細胞核呈現黑色，細胞質及肌肉為紅色，膠原蛋白呈現藍色。因此將染色出藍色膠原蛋白的皮膚進行測量，量化後數據顯示，照射 UVB 確實使皮膚膠原蛋白層減少且達顯著差異( $p < 0.01$ )，而照射 UVB 且施打微晶瓷後有意義回復膠原蛋白層厚度且達顯著差異( $p < 0.05$ )；照射 UVB 且餵食 Vit.C 後更是明顯回復膠原蛋白層厚度且達顯著差異( $p < 0.001$ )，甚至比無照射 UVB 控制組高；照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是最明顯增加膠原蛋白層厚度且達顯著差異( $p < 0.001$ ) (Fig.2)。為了更精確量化膠原蛋白增加現象，我們以西方點墨法 (Western blotting) 分析各組原膠原蛋白含量，由 Fig. 3 結果發現，照射 UVB 有讓原膠原蛋白減少的現象，而照射 UVB 且施打微晶瓷後無明顯回復膠原蛋白層厚度；照射 UVB 且餵食 Vit.C 後則明顯增加原膠原蛋白厚度且達顯著差異( $p < 0.05$ )，甚至比無照射 UVB 控制組高；照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是最明顯增加原膠原蛋白表現且達顯著差異( $p < 0.01$ )，而單獨餵食 Vit.C 組則有些微增加原膠原蛋白表現。

3. 在有無照射 UVB 後，施打微晶瓷與餵食維他命 C 12 週後，對於調控裸鼠皮膚膠原蛋白相關酵素蛋白分析：UV 具有誘導 MMPs 活性增加的作用，文獻指出照射 IR 及 UV 則會增強 UV 誘導 MMP-3、MMP-13 的 mRNA 表現量及 MMP-2、MMP-9 的活性，因此 IR 有增強 UV 誘導皺紋形成的作用(22)。因此我們為了瞭解膠原蛋白的表現是否與 MMPs 酵素活性有關，我們以西方點墨法 (Western blotting) 分析各組 MMPs 蛋白表現為何。Pro-MMP2 與 Pro-MMP9 是屬於 pro-form type 蛋白，也就是未被活化的原始態 MMPs，因此原態 MMPs 表現多則表示 MMPs 未被活化，未活化的 MMPs 則無法分解膠原蛋白；因此由 Fig. 4 結果發現，只要有餵食 Vit.C 4g/kgBW 組，其 Pro-MMP2 表現量都是最高的且達顯著差異( $p < 0.005$ )，而 Pro-MMP9 則是以照射 UVB 且餵食 Vit.C 組及照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是最明顯增加 Pro-MMP9 蛋白表現且達顯著差異( $p < 0.001$ )；再分析 Pro-MMP-1 及 Pro-MMP-13 蛋白表現發現(Fig. 5)，UVB 明顯減少 Pro-MMP-1 表現且達顯著差異( $p < 0.001$ )，單獨餵食 Vit.C 組、照射 UVB 且餵食 Vit.C 組、照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是明顯增加 Pro-MMP-1 蛋白表現且達顯著差異( $p < 0.05$ )；而 Pro-MMP-13 蛋白表現則以照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是明顯增加。



此外，MMPs 的活性也會受到內生性抑制蛋白 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 所抑制，因此我們也分析了 TIMP-1 的蛋白表現，由 Fig. 6 發現，照射 UVB 且餵食 Vit.C 組、照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是明顯增加 TIMP-1 蛋白表現且達顯著差異( $p < 0.001$ )。

## 二、綜合討論：

經由本研究結果發現，本實驗採用餵食高劑量 2g/kgBW 及 4g/kgBW Vit.C，經由血液生化分析結果發現並無實質肝腎毒性發生，而過去也有研究發現，飲用高劑量 Vit.C (3.3 g/l) 可以降低老鼠愛滋海默症的發生(38)，而過去動物實驗中也發現，餵食 5g/kg BW 高劑量 Vit.C 也無明顯誘發小鼠毒性發生(39)。除此之外，我們也發現餵食 Vit.C 4g/kgBW 組與正常組相比下，經 12 週餵食 Vit.C 4g/kgBW 可顯著降低血中總固醇與三酸甘油酯(Table 1)。而針對微晶瓷 CaHA 的實驗結果發現，UVB 照射 12 週下，微晶瓷也只有略微散開，並無顯著消失，但由皮膚切片進行膠原蛋白染色 (Sigma Trichrome Masson Stain)，將染色出藍色膠原蛋白的皮膚進行測量，量化後數據顯示，照射 UVB 確實使皮膚膠原蛋白層減少且達顯著差異，而照射 UVB 且施打微晶瓷後有意義回復膠原蛋白層厚度且達顯著差異，可見微晶瓷確實有刺激部分膠原蛋白生成的效果 (Fig. 2)；但是綜觀 8 組結果卻發現，餵食 Vit.C 4g/kgBW 組卻明顯有刺激部分膠原蛋白生成的效果而且更優於施打微晶瓷組，若在 UVB 照射下，施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是最明顯增加膠原蛋白層厚度且達顯著差異( $p < 0.001$ ) (Fig. 2、3)。因此本研究結果可以得知，若平時攝取 Vit.C 確實可以促進活體膠原蛋白的生成；但若有施打微晶瓷者，平時在戶外照射 UVB 下，攝取 Vit.C 確實可以維持最佳膠原蛋白的含量，可以減少皺紋的生成。最近研究發現，給予正常大鼠每 2 天給予大劑量維生素 C 補充，刺激血管生成和第一型膠原蛋白的合成，因而增加了跟腱的癒合(14)。此外也有研究利用維生素 C 抗氧化劑混合物，以口服給藥方式，觀察裸鼠對抗 UVB 誘導皺紋形成的效果。結果發現維生素 C 抗氧化劑混合物可減少皺紋生成，其中分子機制是維生素 C 抗氧化劑混合物可抑制 MMP 活性或經由增加前膠原蛋白(procollagen)的合成，達到裸鼠背部皮膚之光保護作用(15)。因此本研究進行一連串 MMPs 分析，由 Fig. 4 結果發現，只要有餵食 Vit.C 4g/kgBW 組，其 Pro-MMP2 表現量都是最高的且達顯著差異，而 Pro-MMP9 則是以照射 UVB 且餵食 Vit.C 組及照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是最明顯增加 Pro-MMP9 蛋白表現且達顯著差異；再分析 Pro-MMP-1 及 Pro-MMP-13 蛋白表現發現(Fig. 5)，UVB 明顯減少 Pro-MMP-1 表現且達顯著差異，單獨餵食 Vit.C 組、照射 UVB 且餵食 Vit.C 組、照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是明顯增加 Pro-MMP-1 蛋白表現且達顯著差異；而 Pro-MMP-13 蛋白表現則以照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是明顯增加。此外，MMPs 的活性也會受到內生性抑制蛋白 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 所抑制，因此我們也分析了 TIMP-1 的蛋白表現，由 Fig. 7 發現，照射 UVB 且餵食 Vit.C 組、照射 UVB 且施打微晶瓷且有餵食 Vit.C 組則是明顯增加 TIMP-1 蛋白表現且達顯著差異。綜合 Fig.4~6 的研究結果得知，平時若有 UVB 照射刺激下，服用維生素 C 就有良好抑制 MMPs 分解及刺激 TIMP-1 表現，達到抑制膠原蛋白分解的效果；而上述這些效果，若在施打微晶瓷下更有加乘效用，因此證實施打微晶瓷者，平時在戶外照射 UVB 下，攝取 Vit.C 確實可以抑制 MMPs 活性來維持最佳膠原蛋白的含量，可以減少皺紋的生成。

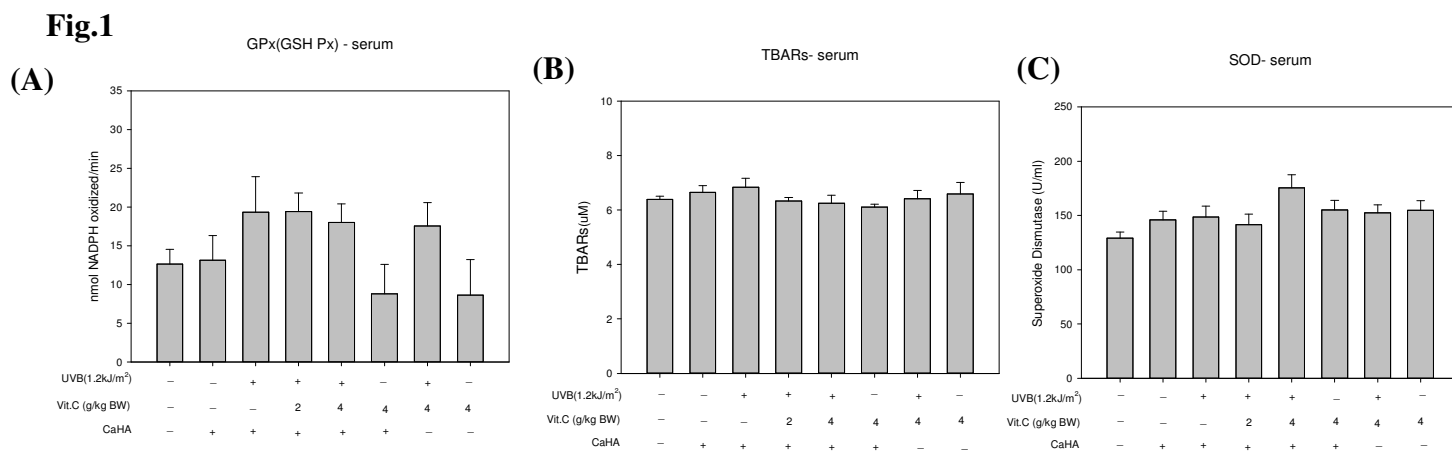
## 參考文獻、

1. Jansen DA, Graivier MH. Evaluation of a calcium hydroxylapatite-based implant (Radiesse) for facial soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg.* 118(3 Suppl):22S-30S, 2006.
2. Bass LS, Smith S, Busso M, McClaren M. Calcium hydroxylapatite (Radiesse) for treatment of nasolabial folds: long-term safety and efficacy results. *Aesthet Surg J.* 30(2):235-8, 2010.
3. Graivier MH, Bass LS, Busso M, Jasin ME, Narins RS, Tzikas TL. Calcium hydroxylapatite (Radiesse) for correction of the mid- and lower face: consensus recommendations. *Plast Reconstr Surg.* 120(6 Suppl):55S-66S, 2007.
4. Stetten MR. Some aspects of the metabolism of hydroxyproline, studied with the aid of isotopic nitrogen. *J Biol Chem* 181: 31-37, 1949.
5. Myllyla R, Kuutti-Savolainen ER, and Kivirikko KI. The role of ascorbate in the prolyl hydroxylase reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 441-448, 1978.
6. Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, and Raspanti M. Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* 33: 587-596, 2002.
7. Berisio R, Granata V, Vitagliano L, and Zagari A. Characterization of collagen-like heterotrimers: implications for triple-helix stability. *Biopolymers* 73: 682-688, 2004.
8. Berg RA, Steinmann B, Rennard SI, and Crystal RG. Ascorbate deficiency results in decreased collagen production: under-hydroxylation of proline leads to increased intracellular degradation. *Arch Biochem Biophys* 226: 681-686, 1983.
9. Nakata Y, Maeda N. Vulnerable atherosclerotic plaque morphology in apolipoprotein E-deficient mice unable to make ascorbic acid. *Circulation.* 2002;105:1485-1490.
10. Martin A, Frei B. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1583-1590.
11. Weber C, Erl W, Weber K, et al. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation.* 1996;93:1488-1492.
12. Lehr HA, Frei B, Olofsson AM, et al. Protection from oxidized LDL-induced leukocyte adhesion to microvascular and

macrovascular endothelium in vivo by vitamin C but not by vitamin E. *Circulation*. 1995; 91:1525–1532.

13. Bowie AG, O'Neill LA. Vitamin C inhibits NF- $\kappa$ B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*.;2000; 165:7180–7188.
14. Omeroğlu S, Peker T, Türközkan N, Omeroğlu H. High-dose vitamin C supplementation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. *Arch Orthop Trauma Surg*. 129(2):281-6, 2009.
15. Cho HS, Lee MH, Lee JW, No KO, Park SK, Lee HS, Kang S, Cho WG, Park HJ, Oh KW, Hong JT. Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 23(5):155-62, 2007.
16. Matsumura and Ananthaswamy. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*.195, 298-308, 2004.
17. Goihman YM. Skin aging and photoaging: an outlook. *Clin Dermatol*. 14, 153-160, 1996.
18. Yoshiki M. Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol Sci*. 9, 79-86, 1995.
19. Hiroaki K, Masahiro Y, Yuki O, Koji T, Yoko F, Masamitsu I. Epidermal change caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci*.1, 19-25, 2001.
20. Yoshinori T, Michihiro H, Katsunori A. The relationship between quantitative change in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation. *J Dermatol Sci*. 12, 56-63, 1996.
21. Hiroaki K, Masahiro Y, Yuki O, Koji T, Yoko F, Masamitsu I. Epidermal change caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci*. 1, 19-25, 2001.
22. Kim HH, Lee MJ, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech Ageing Dev*. 126, 1170-1177, 2005.
23. Polte T, Tyrrell RM. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Free Radic Biol Med*. 36, 1566-1574, 2004.
24. Onoue S, Kobayashi T, Takemoto Y, Sasaki I, Shinkai H. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci*. 33, 105-111, 2003.
25. Kook SY, Lee KM, Kim Y, Cha MY, Kang S, Baik SH, Lee H, Park R, Mook-Jung I. High-dose of vitamin C supplementation reduces amyloid plaque burden and ameliorates pathological changes in the brain of 5XFAD mice. *Cell Death Dis*. 2014 Feb 27;5:e1083. doi: 10.1038/cddis.2014.26.
26. Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, et al. Pharma-cologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:11105–9. doi:10.1073/pnas.0804226105

## 附圖

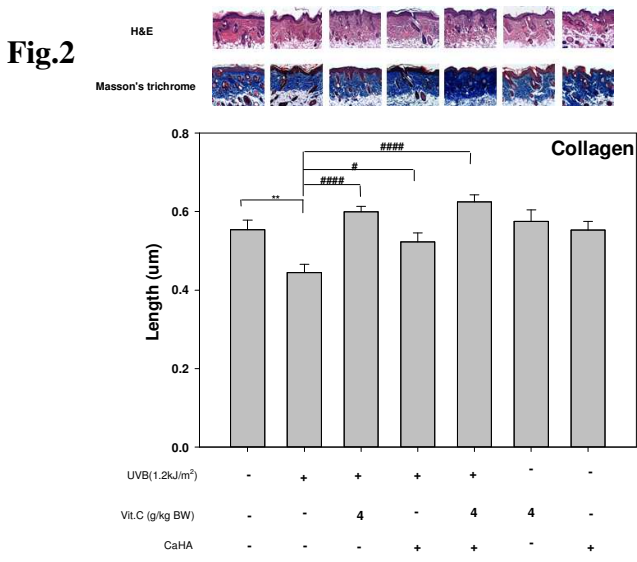


**Figure 1. Effects of Vit.C and CaHA on serum antioxidant enzymes under UVB-irradiation in the back of hairless mice skin.** Hairless mice were treated with or without Vit.C (2g/kg BW and 4g/kg BW) and CaHA on UVB-irradiation(1.2kJ/m<sup>2</sup>) for 12 weeks. Serum were collected and GPx (A), TBARs (B), SOD (C) activities were detected by ELISA assays. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 10). There were no significant differences in eight groups on GPx, TBARs, SOD activities.

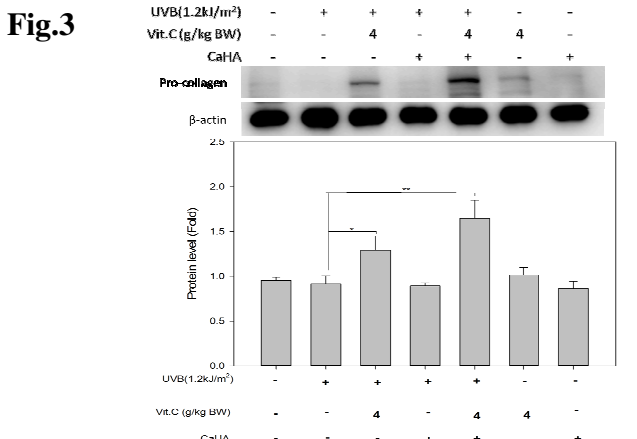
**Table 1. The effect of 12 weeks of CaHA with/without Vit.C treatment on serum biochemical parameters of nude mice induced by UVB irradiation<sup>a</sup>.**

Value <sup>b</sup>	control	CaHA	CaHA+UVB	CaHA+UVB+Vit.C 2g/kgBW	CaHA+UVB+Vit.C 4g/kgBW	CaHA +Vit.C 4g/kgBW	UVB+Vit.C 4g/kgBW	Vit.C 4g/kgBW
GOT(U/L)	251.7 $\pm$ 40.16	283.3 $\pm$ 45.02	276.5 $\pm$ 43.98	253.14 $\pm$ 21.67	262.83 $\pm$ 62.60	249.40 $\pm$ 54.01	297.86 $\pm$ 53.45	243.71 $\pm$ 56.71
GPT(U/L)	71.3 $\pm$ 5.90	67.5 $\pm$ 5.97	76.5 $\pm$ 12.44	81.3 $\pm$ 10.78	81.5 $\pm$ 16.77	74.2 $\pm$ 6.91	88.6 $\pm$ 21.43	74.7 $\pm$ 12.54
BUN(mg/dl)	30.1 $\pm$ 2.44	27.4 $\pm$ 3.46	32.0 $\pm$ 2.56 <sup>c</sup>	32.1 $\pm$ 2.34	29.1 $\pm$ 1.4 <sup>d</sup>	28.7 $\pm$ 7.72	29.3 $\pm$ 4.15	30.9 $\pm$ 5.78
CREA(mg/dl)	0.37 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.00	0.42 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.04
CHO(mg/dl)	88.9 $\pm$ 5.15	93.25 $\pm$ 9.32	105.33 $\pm$ 16.88	74.86 $\pm$ 11.52 <sup>h</sup>	87.0 $\pm$ 5.73 <sup>e</sup>	86.4 $\pm$ 19.37	75.6 $\pm$ 10.47	73.14 $\pm$ 10.85 <sup>d</sup>
TG(mg/dl)	83.0 $\pm$ 20.98	74.8 $\pm$ 17.86	64.2 $\pm$ 5.74	53.3 $\pm$ 9.50 <sup>e</sup>	59.7 $\pm$ 6.86	55.4 $\pm$ 7.44	48.4 $\pm$ 8.24	55.4 $\pm$ 7.91 <sup>c</sup>
Glucose(mg/dl)	89.3 $\pm$ 7.72	89.4 $\pm$ 12.05	83.0 $\pm$ 6.76	77.3 $\pm$ 7.74	100.13 $\pm$ 11.86 <sup>h</sup>	94.71 $\pm$ 16.99	84.3 $\pm$ 9.48	93.3 $\pm$ 19.59

<sup>a</sup>Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD (n=10/group). Duration of the experiment =12 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test.<sup>b</sup> GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; CHO, Total cholesterol; TG, Triglyceride; Glucose, blood glucose.<sup>c</sup> p < 0.05 compared with the control group.<sup>d</sup> p < 0.01 compared with the control group.<sup>e</sup> p < 0.05 compared with the CaHA group.<sup>f</sup> p < 0.01 compared with the CaHA group.<sup>g</sup> p < 0.05 compared with the CaHA+UVB group.<sup>h</sup> p < 0.01 compared with the CaHA+UVB group.

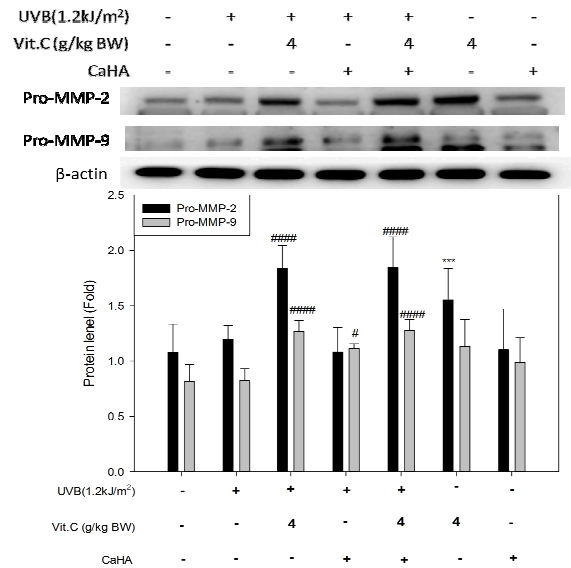


**Figure 2.** Effects of Vit.C and CaHA on UVB-induced collagen breakdown in the back of hairless mice skin. Hairless mice were treated with or without Vit.C 4g/kg BW and CaHA on UVB-irradiation(1.2kJ/m<sup>2</sup>) for 12 weeks. The morphological distribution of collagen fibers in mouse dorsal skin were stained with H&E and Masson-trichrome stain. Collagen fibers were stained in blue, and pictures were take at 100x magnification. The quantitative data were represented as means±S.D. (n=10).\*\* p< 0.01 compared with the control group. # p < 0.05 compared with the UVB group. #### p < 0.001 compared with the UVB group.

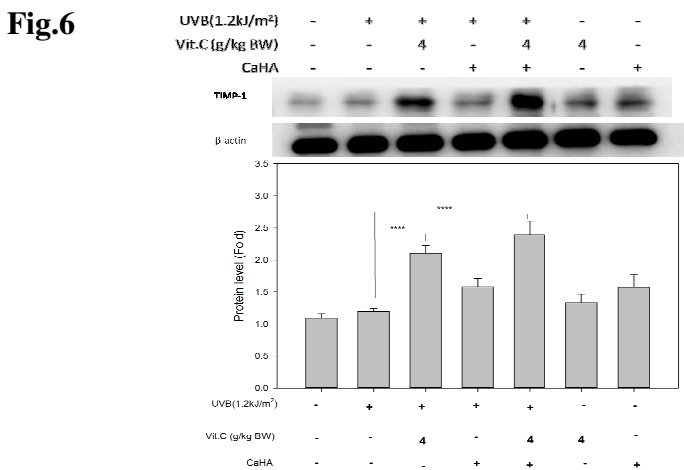


**Figure 3.** Effects of Vit.C and CaHA on the protein levels of Pro-collagen under UVB-irradiation in the back of hairless mice skin. Hairless mice were treated with or without Vit.C 4g/kg BW and CaHA on UVB-irradiation(1.2kJ/m<sup>2</sup>) for 12 weeks. The Pro-collagen proteins were analyzed by Western blotting. The quantitative data were represented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment (n=3). # p < 0.05 compared with the UVB group. ## p < 0.01 compared with the UVB group.

**Fig.4**

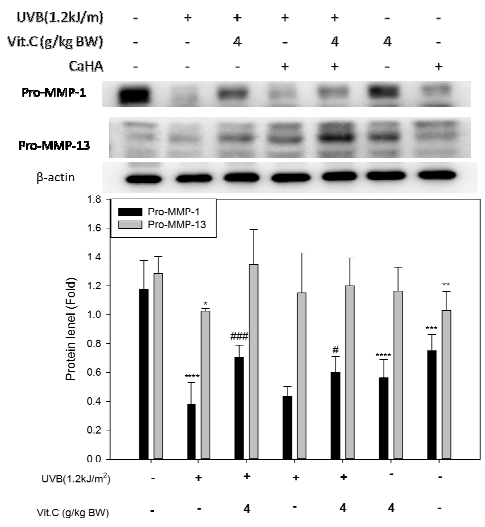


**Figure 4.** Effects of Vit.C and CaHA on the protein levels of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 under UVB-irradiation in the back of hairless mice skin. Hairless mice were treated with or without Vit.C 4g/kg BW and CaHA on UVB-irradiation(1.2kJ/m<sup>2</sup>) for 12 weeks. The pro-MMP-2 and pro-MMP-9 proteins were analyzed by Western blotting. The quantitative data were represented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment (n=3). # p < 0.05 compared with the UVB group. ## p < 0.01 compared with the UVB group.



**Figure 6.** Effects of Vit.C and CaHA on the protein levels of TIMP-1 under UVB-irradiation in the back of hairless mice skin. Hairless mice were treated with or without Vit.C 4g/kg BW and CaHA on UVB-irradiation(1.2kJ/m<sup>2</sup>) for 12 weeks. The TIMP-1 proteins were analyzed by Western blotting. The quantitative data were represented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment (n=3). #### p < 0.001 compared with the UVB group.

**Fig.5**



**Figure 5.** Effects of Vit.C and CaHA on the protein levels of pro-MMP-1 and pro-MMP-13 under UVB-irradiation in the back of hairless mice skin. Hairless mice were treated with or without Vit.C 4g/kg BW and CaHA on UVB-irradiation(1.2kJ/m<sup>2</sup>) for 12 weeks. The pro-MMP-1 and pro-MMP-13 proteins were analyzed by Western blotting. The quantitative data were represented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment (n=3). \* p < 0.05 compared with the control group. \*\* p < 0.01 compared with the control group. \*\*\* p < 0.005 compared with the control group. # p < 0.05 compared with the UVB group. #### p < 0.001 compared with the UVB group.

計畫查核點自評表 (請逐年填列)

一、 本表為本計畫重要審查資訊，本表之期程可視產學合作計畫執行情況予以設定。(例如按月別、季別、半年別等均可)。

重要工作項目	查核內容概述 (力求量化表示)			廠商參與情形概述		
	期程一 (第1~4月)	期程二 (第5~8月)	期程三 (第9~12月)	期程一 (第1~4月)	期程二 (第5~8月)	期程三 (第9~12月)
A實驗準備	細胞及動物實驗前各項準備工作			測試樣本提供與實驗前討論		
A1動物實驗	1.動物訂購及入室觀察；2.CaHA皮下注射觀察；3.UVB照射觀察；4.維生素C飲水餵食及比例調整			測試樣本提供		
A2藥品樣本	藥品採買、試藥配置及飲水調配			測試樣本提供		
B活性分析	動物實驗各項活性分析			各項活性分析討論		
B1動物實驗	飲食紀錄、體重紀錄、皮膚拍照觀察紀錄	1.組織病理切片及染色(H&E、IHC、膠原蛋白染色)；2.血液生化、酵素活性分析	1.Western blot、real-time PCR基因表現、Zymograph分析；2.發炎指標、轉錄因子活化分析	討論樣品注射與餵食情況	討論樣品動物實驗活性測試情況	詳細分子機制分析討論
C報告撰寫	計畫成果撰寫			計畫成果討論		
C1動物實驗		數據整理	1.結果討論；2.成果發表(國內外研討會及期刊論文發表)。		數據整理	1.結果討論；2.市場分析；3.成果發表(國內外研討會及期刊論文發表)。

二、本產學合作計畫預估後續發展情形概述：

(計畫執行及結束後之計畫如何配合追蹤管考，產品產出與開發規劃，預期可推廣至產業或市場之成果，預估可授權商品，預估應用價值及產值，建立平台等)

1.追蹤管考

期刊論文與研討會論文發表(研究結果將可發表 1.維生素C抑制UVB照射導致皺紋生成之研究；2.皮下注射CaHA可改善UVB照射導致皺紋生成之研究；3.維生素C增長皮下注射CaHA效期之研究；4.補充維生素C可提升皮下注射CaHA改善UVB照射導致皺紋生成之研究。

2.產品產出與開發規劃(技術移轉)

完成本研究計畫可將研究成果與技術進行技術轉移，將有助於CaHA在醫學美容推廣與相關維生素保健產品的銷售。經由本研究成果繼續規劃進入人體試驗，強化臨床效果。

3. 預期可推廣至產業或市場之成果

推廣成果重點 1. 維生素C抑制UVB照射導致皺紋生成；2. 皮下注射CaHA可改善UVB照射導致皺紋生成；3. 維生素C增長皮下注射CaHA效期之研究；4. 補充維生素C可提升皮下注射CaHA改善UVB照射導致皺紋生成。

#### 4. 預估應用價值及產值

在本實驗室先前已建立光老化之動物實驗，UVB 照射裸鼠確實能減少裸鼠背部皮下膠原蛋白層的厚度。而本實驗進一步先以皮下注射 CaHA 增強皮下膠原蛋白厚度，再照射 UVB，加上每日餵食維生素 C，將可多元觀察營養素與皮下填充物協同抑制裸鼠皮下膠原蛋白層的減少，達到抗皺紋功效。本研究結合營養與醫美領域，希望藉此計畫的完成，提供未來國內外醫學美容領域更多參考之學理依據，也藉此計畫完成醫學美容於動物活體試驗研究平台建置，希望未來國內外醫學美容發展的同時能思考結合飲食中保健營養概念，達到相輔相成的目標。

#### 5. 建立平台

本研究建立之皮下填充物與營養補充品協同作用之實驗動物模式平台，可應用為將來發展預防及改善光老化皺紋生成醫美醫材與相關保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/06/25

科技部補助計畫	計畫名稱: 探討維生素C對於鈣羧磷灰石促進膠原蛋白合成之活體研究		
	計畫主持人: 陳璟賢		
	計畫編號: 103-2622-B-040-002-CC3		學門領域: 食品及農化
研發成果名稱	(中文) 探討維生素C 對於鈣羧磷灰石促進膠原蛋白合成之活體研究		
	(英文) The study of effect of vitamin C on calcium hydroxylapatite-induced collagen synthesis in vivo		
成果歸屬機構	中山醫學大學	發明人 (創作人)	陳璟賢
	<p>(中文) 開發醫學美容研究平台, 提供未來跨領域合作。保健營養與醫學美容皆為本合作企業之營業範圍, 本計畫對合作企業將有實質貢獻。藉由本研究計畫所提供科學研究數據, 將有助於合作企業保健食品與醫美醫材販售與推廣。技術說明如下:</p> <p>(1) 皮下注射鈣羧磷灰石(CaHA)動物模式。</p> <p>(2) 維生素C預防UVB損傷動物皮膚(皺紋生成)模式。</p> <p>(3) 維生素C可增長鈣羧磷灰石(CaHA)效期之研究。</p> <p>(4) 維生素C與鈣羧磷灰石(CaHA)抗UVB導致動物皮膚皺紋產生及其分子機制研究。</p> <p>(5) 鈣羧磷灰石(CaHA)及維生素C於動物之毒理評估。</p> <p>(英文) (1) To establish a animal model of subcutaneous injection of calcium hydroxyapatite (CaHA).</p> <p>(2) vitamin C prevent UVB-induced skin wrinkle formation in hairless mice.</p> <p>(3) Vitamin C could increase calcium hydroxylapatite (CaHA) validity.</p> <p>(4) Anti-wrinkling effects of Vitamin C and calcium hydroxyapatite (CaHA), and molecular mechanisms on hairless mice skin caused by ultraviolet B irradiation.</p> <p>(5) The toxicity test of calcium hydroxyapatite (CaHA) and vitamin C in hairless mice.</p>		
產業別	其他專業、科學及技術服務		
技術/產品應用範圍	保健營養與醫學美容		
技術移轉可行性及預期效益	將有助於合作企業保健食品與醫美醫材販售與推廣。		

註: 本項研發成果若尚未申請專利, 請勿揭露可申請專利之主要內容。

103 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：陳璟賢		計畫編號：103-2622-B-040-002-CC3				計畫名稱：探討維生素 C 對於鈣磷灰石促進膠原蛋白合成之活體研究	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	1	100%		預計於 2016 年生物醫學年會發表
		專書	0	1	100%	預計於 2016 年完成碩士論文專書	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	1	1	100%	件	
		權利金	83	83	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	2	100%	人次	
		博士生	1	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	目前正在撰寫中
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
----------------------------------------------------------------------------------------	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	



本產學合作計畫研發成果及績效達成情形自評表

成果項目		本產學合作計畫 <b>預估</b> 研究成果及績效指標 (作為本計畫後續管考之參據)	計畫達成情形
技術移轉		預計技轉授權 1 項	完成技轉授權 1 項
專利	國內	預估 0 件	提出申請 0 件，獲得 0 件
	國外	預估 0 件	提出申請 0 件，獲得 0 件
人才培育		博士 0人，畢業任職於業界0人	博士 1人，畢業任職於業界0人
		碩士 2人，畢業任職於業界0人	碩士 1人，畢業任職於業界0人
		其他 0人，畢業任職於業界0人	其他 0人，畢業任職於業界0人
論文著作	國內	期刊論文 0 件	發表期刊論文 0 件
		研討會論文 1 件	發表研討會論文 0 件
		SCI論文 0 件	發表SCI論文 0 件
		專書 1 件	完成專書 0 件
		技術報告 0 件	完成技術報告 0 件
	國外	期刊論文 0 件	發表期刊論文 0 件
		學術論文 0 件	發表學術論文 0 件
		研討會論文 1 件	發表研討會論文 0 件
		SCI/SSCI論文 1 件	發表SCI/SSCI論文 0 件
		專書 0 件	完成專書 0 件
		技術報告 0 件	完成技術報告 0 件
其他協助產業發展之具體績效		新公司或衍生公司 0 家	設立新公司或衍生公司(名稱)：

計畫產出成果簡述：請以文字敘述計畫非量化產出之技術應用具體效益。(限 600 字以內)

本研究結果建議施打微晶瓷者，平時在戶外照射 UVB 下，攝取 Vit. C 確實可以抑制 MMPs 活性來維持膠原蛋白的含量，進而減少皺紋的生成。包含證實：1. 維生素 C 抑制 UVB 照射導致皺紋生成；2. 皮下注射 CaHA 可改善 UVB 照射導致皺紋生成；3. 維生素 C 增長皮下注射 CaHA 效期之研究；4. 補充維生素 C 可提升皮下注射 CaHA 改善 UVB 照射導致皺紋生成。完成本研究計畫可將研究成果與技術進行技術轉移，將有助於 CaHA 在醫學美容推廣與相關維生素保健產品的銷售。經由本研究結果繼續規劃進入人體試驗，強化臨床效果。而本研究建立之皮下填充物與營養補充品協同作用之實驗動物模式平台，可應用為將來發展預防及改善光老化皺紋生成醫美醫材與相關保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。本研究結合營養與醫美領域，希望藉此計畫的完成，提供未來國內外醫學美容領域更多參考之學理依據，也藉此計畫完成醫學美容於動物活體試驗研究平台建置，希望未來國內外醫學美容發展的同時能思考結合飲食中保健營養概念，達到相輔相成的目標。