

銀耳多醣應用為皮膚保養原料之活體外及活體內評估¹

楊淑惠^{2,5} 楊鎮榮³ 陳宜嫻⁴

摘 要

楊淑惠、楊鎮榮、陳宜嫻。2007。銀耳多醣應用為皮膚保養原料之活體外及活體內評估。台灣農業研究 56:143~151。

本研究探討銀耳多醣應用於皮膚保濕用途之可行性，並進行安全性評估。本實驗所使用之銀耳多醣重量平均分子量為 2,000-5,000 Kdalton。安全性試驗顯示，銀耳多醣在濃度 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下不會抑制 STO 小鼠胎體層纖維細胞正常生長，經連續 14 天長期培養對其膠原蛋白合成有部份促進效果。銀耳多醣不會導致 L929 細胞變形，無細胞毒性；對供試動物皮膚刺激指數為零，表示對皮膚無刺激性。對人體皮膚經 180 分鐘的保濕功效評估顯示，銀耳多醣溶液能提高正常皮膚角質層 35-56% 的含水率，可提高乾燥皮膚角質層 25-44% 含水率，故銀耳多醣為安全之天然保濕原料，且無刺激性。

關鍵詞：銀耳、多醣體萃取液、皮膚細胞毒性、保濕。

前 言

銀耳 (*Tremella fuciformis* Berk)，俗稱白木耳 (white jelly fungi)，屬真菌中擔子菌 (basidiomycetes)，銀耳科 (Tremellaceae)；可食用部份為子實體。古籍記載，銀耳性味甘、平具有滋陰潤肺、養胃生津之功效，自古以來被人們視為延年益壽的藥膳珍品。主要化學結構以 α -1,3-甘露聚醣 (mannan) 為主鏈，側鏈接有 β -D-木糖 (xylose) 與 β -D-葡萄糖醛酸 (glucuronic acid)，在 C2 的位置接有 β -(1,2) D-木二糖 (xylobiose)，屬於酸性異質多醣體 (acidic heteropolysaccharide) (Kakuta 1979, Yui 1995, Baets 2001)。科學研究也證實，銀耳多醣具有降低小鼠血糖 (Kiho *et al.* 1994) 與低密度膽固醇含量 (Cheung 1996)、抗發炎 (Ukai *et al.* 1983)、促進淋巴球增生與血小板細胞活性及增加脾臟巨噬細胞的活性 (Ma & Lin 1992)，及誘導人體產生致腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) (Gao 1997, 1996; Ukai *et al.* 1992)，能提升人體免疫力 (Xia & Lin 1989) 等。相對於其他產業，化妝品產業是一項低風險、高毛利的產業。在一片回歸自然風潮裡，天然、安全的美容保養產品，也是近年來國際化妝品的訴求主流，各著名化妝品公司大力投入天然素材的開發及應用。來自動物、植物、微生物發酵的原料，如玻尿酸、膠原蛋白、蠶絲蛋白、米蛋白、熊果素及麴酸等等，都被大量而穩定的使用著。銀耳的利用以食用為主，因此市場消費量無法有效提升，產業逐漸萎縮，若能將銀耳多醣萃出作為化妝品保濕原料，應可大大提升銀耳的使用量及產值。因此，本實驗擬針對其保濕功效及皮膚細胞毒性及皮膚刺激性進行安全性評估。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2289 號。接受日期：2007 年 5 月 30 日。
2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系助理研究員。台灣 高雄縣。
3. 行政院農業委員會畜產試驗所生理組助理研究員。台灣 台南縣。
4. 靜宜大學化粧品科學系助理教授。台灣 台中縣。
5. 通訊作者，電子郵件：debbie@fthes-tari.gov.tw；傳真：(07)7315590。

材料與方法

銀耳多醣萃取過程

銀耳子實體原料，以無化學藥劑添加的熱萃取技術（營業秘密），進行萃取，萃取液經加 3 倍體積酒精進行純化，收集沉澱物，冷凍乾燥後，備用（密封於室溫保存）。

細胞株之來源

細胞存活率及細胞膠原蛋白合成試驗係使用 STO 小鼠胎體層纖維細胞株進行 (STO mouse embryonic fibroblast, STO)。STO 細胞株購自食品工業研究所菌種中心編號 60003 之細胞株 (ATCC CRL-1503, USA)。L929 小鼠纖維母細胞 (mouse fibroblasts, NCTC Clone929, Strain L)，由中興大學育成中心生物醫學材料實驗室提供。

分子量分析

將銀耳多醣溶於 0.1M NaNO₃，以高效能分子篩層析儀 (High Performance size exclusion chromatography, HPSEC) 測定多醣分子量，Pump (P580, Gynkotek, USA) 含線上除氣裝置，管柱：Tosoh TSK PW_{XL} guard column 及 TSK GMPW_{XL} column (7.8×300 nm)，偵測器：RI (Model 250, Viscotek)，沖提液為 0.1 M NaNO₃，流速 0.6 mL/min，烘箱及偵測器溫度 70°C，以 pullulan (Fluka, No.82439, Switzerland) 為標準品。

附著性細胞之培養與繼代

STO 小鼠胎體層纖維細胞株之培養方式為以 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, high glucose and no pyruvate, Invitrogen 11965-092, Grand Island, NY, USA) 為培養液，添加 4.5 g/L 之葡萄糖 (Sigma-Aldrich G 7021, St. Louis, MO, USA) 與 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Invitrogen 16000-044)，培養條件為 37°C、5% CO₂ 以及相對濕度 95%，每週更換培養液 2 至 3 次。細胞株以相位差顯微鏡觀察 (Nikon, TE2000, Japan)，當細胞長滿為單層 (monolayer) 時，即可進行繼代培養 (subculture)。在無菌操作台內，以抽氣機吸去上層液，再以 5 mL phosphate-buffered saline (PBS) 沖洗細胞兩次，吸去 PBS 並加適量之 0.25% 胰蛋白酶-0.02 mM EDTA (trypsin-EDTA, Invitrogen 25200-072)，前後左右搖晃培養皿使胰蛋白酶均勻分散於細胞層，並浸潤所有細胞後，於 37°C 下作用 3 至 5 分鐘，輕拍培養皿使細胞自培養皿底部脫落，再以新鮮的培養液重新懸浮，並以 400xg 離心 5 分鐘去除懸浮液後，調整細胞濃度至 1×10⁵ 個/mL 進行繼代培養。

細胞存活率測定

準備 24-孔的培養盤 (Multidishes Nunclon™, NUNC 142475, Roskilde, Denmark)，分別於每一孔中接入 STO 小鼠胎體層纖維細胞 1×10⁵ cell/mL 及 400 μL 培養液，以 DMEM（未添銀耳多醣）為對照組，加入不同濃度 10、25、50、100 或 500 μg/mL 之銀耳多醣溶液 200 μL 及 200 μL DMEM 為實驗組（最終濃度為 5、12.5、25、50、250 μg/mL），於 37°C、5%CO₂ 環境下進行培養，培養時間分別為 1、2 及 3 天，或連續培養 7 天及 14 天（期間不更換培養基，只依蒸散情形，填加少量 DMEM）。培養過程中，細胞數量之計數係將培養盤中的每孔細胞以胰蛋白酶回收後，取 20 μL 細胞液，與等量之 0.4% trypan blue 溶液 (Sigma-Aldrich T 8154) 充分混合均勻後，吸入血球計數盤中，於相位差顯微鏡下觀察，死亡細胞呈藍色，活細胞則為光亮狀，計算存活及死亡細胞數量，依細胞存活數量及死亡細胞數量比值，計算存活率 (%) = [細胞存活數 / (細胞存活數及死亡細胞數)] × 100。

膠原蛋白生成測定

試驗方法參考 (Yamamoto & Nishioka 2001; Li *et al.* 2001; Blease *et al.* 2002) 文獻報告所使用之套組 (Kit) 來測量膠原蛋白生成量，收集不同培養時間的 STO 小鼠胎體層纖維細胞之細胞培養液，以 Collagen assay Kit (Circol Collagen assay kit, S1111, Biocolor, Ireland, UK) 依廠商所附操作手冊進行測定。取實驗組培養液、對照組培養液及 reagent blanks (0.5 M acetic acid) 各 50 μ L 於 1.5 mL microcentrifuge tubes，加入 medium buffer 定量至 100 μ L，分別加入 1 mL Sircol dye reagent 於 37°C 培養箱震盪反應 30 分鐘，以 10,000 rpm 離心 5 分鐘，倒乾液體並留下沉澱物，每管加入 1 mL Alkali reagent，震盪至沉澱完全溶解，以雙光束紫外光/可見光分光光譜儀 (Hitachi, U2000, Japan) 於 540 nm 光譜測吸光值。並以 1、2、5、6.25、12.5 μ g/mL 的 Collagen standard (S1010) 作為標準膠原蛋白求出標準檢量線，換算對照組及實驗培養液中膠原蛋白濃度 (μ g/mL)。

細胞毒性試驗

參考 ISO 10993-5 Biological Evaluation of Medical Devices Test for in vitro cytotoxicity 方法 (1999) 進行，準備 24-孔的培養盤，分別於每一孔中接入 L929 小鼠纖維母細胞 1×10^5 cell/mL，並加入 DMEM (含 10%FBS)，培養至單層細胞生長到接近融合時，將培養液移出，並更換為銀耳多醣萃取液 (萃取方式參考 ISO 10993-5 Biological Evaluation of Medical Devices Sample preparation and reference material (1999) 或對照組 (陰性對照組-DMEM，陽性對照組-DMEM 添加 5% DMSO)，於 37°C、5% CO₂ 環境下培養 24 小時後，以顯微鏡檢查細胞是否有變形或死亡，以胰蛋白酶將細胞層打下來計算細胞數。

皮膚刺激測驗

參考 ISO 10993-10:2002 (E) Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity (6.3 Animal skin irritation test 方法 (2002) 進行，本實驗於中興大學育成中心生物醫學材料實驗室進行 (2003 年)，試驗前剃除試驗動物 (白化，雄性，紐西蘭大白成兔) 背脊兩側足夠大小範圍的毛，放上可吸水的紗布 (25 mm \times 25 mm，中國衛生材料，彰化，台灣) 四片，並於對角位置紗布以 2.0 mL 銀耳多醣萃取液 (萃取方法參考 ISO 10993-10:2002 (E) Annex A (normative) preparation of materials for irritation/ sensitization testing) 潤濕 (實驗組) 或生理食鹽水 (對照組) 潤濕，貼敷於試驗動物背脊兩側，以半密封性繃帶包紮 (中國衛生材料，彰化，台灣)，於 24、48 及 72 小時觀察試驗區域有無紅斑及水腫情形。紅斑及水腫刺激值：以 0=無 (No erythema or oedema)，1=非常輕微 (Very slight erythema or oedema)，2=清晰 (Well-defined erythema or oedema)，3=中度 (Moderate erythema or oedema)，4=重度 (Severe erythema or oedema)。實驗組與對照組的皮膚刺激指數 (primary irritation index, PII) 為其各時間點總合，刺激指數反應分級：可忽略 (Negligible) =0-0.4，輕微 (Slight) =0.5-1.9，中度 (Moderate) =2.0-4.9，嚴重 (Severe) =5.0-8.0。

皮膚保濕試驗

本實驗於靜宜大學化粧品科學系進行，女性自願參予者，年齡 20 至 50 歲，無過敏病史者，實驗前 48 小時受測的皮膚部位無塗抹任何保養品或藥品。受測前以低刺激性肥皂清洗受測的手臂內側皮膚，洗淨後拭乾。試驗環境溫度控制在 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ；相對濕度控制於 45% 至 50% RH 下，休息 30 分鐘，並標記 5 個測試位置，每一測試位置為直徑 3 公分。分二組，一為正常皮膚組 (n=3)，另一為誘發的乾性皮膚組 (n=3，以 20% SLS (sodium lauryl sulfate, Fluka 71729, Germany) 塗抹於測試區 20 分鐘，以清水沖洗)。將 100 μ L 銀耳多醣溶液塗抹於受測者手臂上所標記的皮膚上，以去離子水作為空白對照組，塗抹均勻後每 30 分鐘，以皮膚分析儀 (Skin analyzer SHP 88, Courage &

Khazaka, Cologen, Germany), 連續 3 小時測定皮膚角質層水含量 (hydration) 的變化, 水含量導電度單位 (a.u.), 保濕增加率 = [(實驗組-對照組) / 對照組] × 100。

結 果

銀耳多醣分子量

銀耳多醣溶於 0.1M NaNO₃, 並經加熱及 0.45 μm 濾膜過濾, 直接以高效能分子篩層析儀分析其重量平均分子量 (molecular weight), 銀耳多醣重量平均分子量大部分分布在 2,000,000-5,000,000 dalton, 少量分布在 100,000-500,000 dalton。

銀耳多醣對 STO 小鼠胎體層纖維細胞存活率之影響

實驗中 STO 小鼠胎體層纖維細胞以 24-孔的培養盤加 400 μL DMEM 培養液為對照組, 添加不同濃度 10、25、50、100、500 μg/mL 的銀耳多醣萃取液各 200 μL, 再加入 200 μL DMEM 培養液為實驗組, 最終濃度應為 5、12.5、25、50、250 μg/mL 與纖維細胞於 37°C、5%CO₂ 細胞培養箱連續培養 3、7 及 14 天。結果如表 1 所示, 連續 3 天培養後對照組細胞數為 7.4×10⁵, 銀耳多醣萃取液各組細胞數為 7.5-8.0×10⁵, 與對照組比較並無顯著性差異 ($p>0.05$); 繼續培養 7 天, 銀耳多醣萃取液組細胞生長數目於 5、12.5 及 250 μg/mL 組與對照組比較有顯著性增加 ($p<0.05$); 培養第 14 天, 銀耳多醣萃取液組細胞生長數目於 5、25、50 及 250 μg/mL 組與對照組比較亦有顯著性增加 ($p<0.05$)。細胞生長數目結果顯示銀耳多醣萃取液雖無線性關係, 但仍具有促進小鼠胎體層纖維母細胞生長趨勢。由死亡細胞數與活細胞數換算細胞存活率, 連續培養 3、7 及 14 天的存活率為均可達 90%以上, 結果顯示銀耳多醣萃取液對 STO 小鼠胎體層纖維細胞並無細胞毒性 (表 2)。

銀耳多醣萃取液對小鼠胎體層纖維細胞膠原蛋白生成之影響

小鼠胎體層纖維細胞在 24-孔的培養盤以 DMEM 培養液 (對照組) 中培養, 可自行產生膠原蛋白。試驗中以 5、12.5、25、50、250 μg/mL 不同濃度的銀耳多醣萃取液添加於培養液, 取代部分 DMEM, 於 37°C、5%CO₂ 環境下連續培養 3、7 及 14 天, 分析膠原蛋白生成情形。試驗結果如表 3 所示, STO 小鼠胎體層纖維細胞連續培養 3 天, 對照組膠原蛋白產量為 8.03 μg/mL, 實驗組膠原蛋白產量為 7.5-9.0 μg/mL, 與對照組比較並無顯著性差異 ($p>0.05$)。膠原蛋白產量隨著培養時間延長而持續累積增加, 連續培養 7 天, 對照組膠原蛋白產量為 12.2 μg/mL, 各實驗組膠原蛋白產量為 13.9-18.0 μg/mL, 與對照組比較雖有增加但無顯著性差異 ($p>0.05$)。連續培養 14 天, 對照組膠原蛋白產量為 31.4 μg/mL, 各實驗組膠原蛋白產量為 35.6-46.4 μg/mL, 與對照組比較雖有增加但無顯著性差異 ($p>0.05$)。顯示銀耳多醣雖有促進膠原蛋白生成之功效, 但無濃度與效能之關係。

銀耳多醣之細胞毒性分析

L929 小鼠纖維母細胞於 24-孔的培養盤培養至接近長滿時, 將培養液移出, 並更換為銀耳多醣萃取液 (250 μg/mL), 陰性對照組-DMEM 培養液 (無細胞毒性), 或陽性對照組 (5%DMSO) 培養液 (有細胞毒性), 於 37°C、5% CO₂ 環境下培養 24 小時, 之後以顯微鏡檢查細胞是否有變形或死亡, 以胰蛋白酶將細胞層打下計算密度。三次 24-孔的培養盤之細胞層密度試驗, 添加銀耳多醣萃取液之細胞總數平均值為 3.86×10⁵, 與添加 DMEM (無細胞毒性對照組) 的細胞總數平均值為 4.41×10⁵ 細胞數相近, 與對照組比較並無顯著性差異 ($p>0.05$), 顯示銀耳多醣萃取液無細胞毒性, 而細胞添加含 5%DMSO 之 DMEM 培養液 (有細胞毒性對照組) 細胞總數為 1.31×10⁵ 與對照組比

表 1. 銀耳多醣萃取液對小鼠胎體層纖維細胞數量之影響

Table 1. Effect of *Tremella* polysaccharide extract on the cell density of STO mouse embryonic fibroblasts cultivated in DMEM plus FBS medium^z

Incubation (days)	Polysaccharide concentration (µg/mL)					
	0 ^z	5	12.5	25	50	250
3	7.4 ± 0.4 ^y	7.8 ± 0.0	8.0 ± 0.3	7.9 ± 0.6	8.0 ± 0.3	7.5 ± 0.1
7	8.0 ± 0.4	9.8 ± 0.3 ^{*x}	9.5 ± 0.7 [*]	8.3 ± 0.3	9.1 ± 0.5 [*]	10.0 ± 0.5 [*]
14	9.3 ± 0.4	11.4 ± 0.1 [*]	9.8 ± 0.2	12.4 ± 0.3 [*]	10.4 ± 0.1 [*]	10.5 ± 0.1 [*]

^z Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) plus 5% fetal bovine serum (FBS).^y Total cells number of STO 1 × 10⁵/mL; Mean ± SD, n= four wells per group in a 24-well plate.^{*x} Significant difference between the control and treated groups at *p*<0.05.

表 2. 銀耳多醣萃取液對 STO 小鼠胎體層纖維細胞存活率之影響

Table 2. Effect of *Tremella* polysaccharide extract on the viability of STO mouse embryonic fibroblasts cultivated in DMEM plus FBS medium^z

Incubation (days)	Polysaccharide concentration (µg/mL)					
	0 ^z	5	12.5	25	50	250
3	96.0 ± 1.5 ^y	98.7 ± 0.9 [*]	97.5 ± 1.0	96.0 ± 2.0	96.3 ± 2.4	96.4 ± 2.9
7	98.1 ± 1.1	98.0 ± 0.7	99.5 ± 0.5	98.2 ± 1.1	99.0 ± 0.9	100.0 ± 0.0 [*]
14	94.7 ± 1.0	97.4 ± 0.6 [*]	96.7 ± 0.9 [*]	96.4 ± 1.2	95.4 ± 0.8	94.0 ± 1.0

^z Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) plus 5% fetal bovine serum (FBS).^y Total cells number of STO 1 × 10⁵/mL; Mean ± SD, n= four wells per group in a 24-well plate.^{*x} Significant difference between the control and treated groups at *p*<0.05.

表 3. 銀耳多醣萃取液對 STO 小鼠胎體層纖維細胞膠原蛋白生成量之影響

Table 3. Effect of *Tremella* polysaccharide extract on production of collagen by the STO mouse embryonic fibroblasts cultivated in DMEM plus FBS medium^z

Incubation (days)	Polysaccharide concentration (µg/mL)					
	0 ^z	5	12.5	25	50	250
3	8.1 ± 0.7 ^y	8.1 ± 0.1	8.2 ± 0.6	8.4 ± 0.5	8.0 ± 0.6	8.1 ± 0.5
7	12.2 ± 3.3	18.0 ± 5.5	15.8 ± 1.9	16.3 ± 0.9	15.8 ± 2.9	13.9 ± 2.5
14	31.4 ± 3.6	35.6 ± 3.7	33.5 ± 4.5	46.4 ± 5.1 [*]	38.2 ± 7.8	38.8 ± 6.5

^z Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) plus 5% fetal bovine serum (FBS).^y Total cells number of STO 1 × 10⁵/mL; Mean ± SD, n= four wells per group in a 24-well plate.^{*x} Significant difference between the control and treated groups at *p*<0.05.

較顯著下降 (*p*<0.05), 如表 4 所示。細胞外形觀察, 細胞添加含 5%DMSO 之 DMEM 培養液之陽性對照組, 細胞變圓並與培養盤表面分離, 為有嚴重細胞毒性。細胞添加銀耳多醣萃取液或 DMEM 培養液, 所有培養沒有出現細胞變形的情形, 顯示並無細胞毒性。

表 4. 銀耳多醣萃取液與陰性或陽性培養液對 L929 細胞層密度之比較

Table 4. Comparison of *Tremella* polysaccharide extract and negative or positive control culture media on the cell density of mouse fibroblasts (L929) for 24 hours.

Treatment ^z	Cell density ($1 \times 10^5/\text{mL}$)			
	I	II	III	Average
Negative control	4.9 ± 0.2^y	4.0 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.5
Positive control	1.3 ± 0.1	$1.3 \pm 0.1^*$	$1.3 \pm 0.1^*$	$1.3 \pm 0.1^*$
<i>Tremella</i> extract	$3.4 \pm 0.3^* \text{ a}$	$4.2 \pm 0.3 \text{ a}$	$4.0 \pm 0.6 \text{ a}$	$3.9 \pm 0.5^* \text{ a}$

^z Negative control culture medium: DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) plus 10% fetal bovine serum (FBS); positive control culture medium: Dimethylsulfoxide (DMSO) at final concentration of 5% in DMEM plus 10% FBS; *Tremella* extract: *Tremella* polysaccharide powder 2 g was extracted in 20 mL DMEM at 37°C for 24 hr.

^y Mean \pm SD, n= four wells per group in a 24-well plate.

^x * Significant difference between the negative control and *Tremella*-treated group at $p < 0.05$; a significant difference between the positive control and *Tremella*-treated group at $p < 0.05$.

銀耳多醣之皮膚刺激分析

紗布以銀耳多醣萃取液（處理組）潤濕或生理食鹽水（對照組）潤濕，貼敷於紐西蘭大白兔背脊兩側，以半密封性繃帶包紮，觀察試驗區域有無紅斑及水腫情形。貼敷生理食鹽水紗布為無紅斑及水腫反應的無刺激性對照組，試驗顯示，將潤濕銀耳多醣萃取液的紗布，貼敷於試驗動物背脊兩側，皮膚無紅斑及水腫情形，基本刺激積分為 0，處理組與對照組之基本刺激積分平均值刺激指數 (PII)，刺激指數 (PII) 等於零，整體皮膚刺激反應分級為無刺激性（數據未附）。

皮膚保濕試驗

將濃度 0.5% 銀耳多醣萃取液 (0.1 mL)，塗於受試人皮膚上為實驗組，以塗抹蒸餾水為對照組，每 30 分鐘測定皮膚角質水含量，以表皮之高頻電傳導 a.u. 值計算，值愈高水分含量愈高，試驗時間供 180 分鐘。試驗結果，塗抹去離子水於正常皮膚，皮膚角質層的水含量為 8.0-9.0 a.u.，而皮膚塗抹多醣萃取液後，角質層水含量為 11.3-12.8 a.u.，顯示多醣萃取液，可增加正常皮膚的角質層水含量為 3-4 a.u.，與對照組比較顯著上升 ($p < 0.05$)。於乾性皮膚塗抹去離子水，角質層的水含量為 7.2-7.8 a.u.，將多醣萃取液塗抹於乾性皮膚，角質層水含量為 9.5-10.5 a.u.，顯示多醣萃取液，可增加乾性皮膚角質層水含量為 2-3 a.u.，與對照組比較顯著上升 ($p < 0.05$)，如表 5 所示；與對照組（去離子水）比較換算成角質層含水率，如表 5 所示，但正常與乾性皮膚之含水率並無顯著差異 ($p > 0.05$)。顯示塗抹銀耳多醣萃取液，能提高正常皮膚角質層 35-56% 的含水率，亦可提高乾燥皮膚角質層 25-44% 含水率，故銀耳多醣萃取具有提高正常皮膚含水率的作用，有降低皮膚水分散失量的傾向。

討 論

多醣應用於皮膚保濕研究顯示，在化妝品中添加蘆薈多醣，使用二週，可顯著增加角質層含水量 (Dal'Beló *et al.* 2006)，發酵納豆所含之納豆多醣具有良好的吸濕性，有減少乾性皮膚水分散失、增加皮膚角質層水含量與提高對皮膚吸濕性的現象 (Lu 2003)，由細菌萃取而來的多醣 γ -PGA，可

表 5. 銀耳多醣萃取液塗於人體正常或乾性皮對角質層含水量之影響

Table 5. Effect of *Tremella* polysaccharide extract on hydration and water content of horny layer of human skin

Skin Type	Treatment	Treated time (min.)/water content (%)					
		30	60	90	120	150	180
Normal	Distilled water	09.0±0.0 ^z	09.0 ± 0.3	08.7 ± 0.2	08.5± 0.2	08.0 ± 0.3	08.0 ± 0.3
	5% Tremella polysaccharide	12.2±0.9** ^x	12.5 ± 0.8*	12.0 ± 0.7*	12.8± 0.8*	11.3 ± 1.1*	12.5 ± 0.6*
		35.6±9.1 ^y	38.9 ± 6.6	37.9±11.0	50.6± 9.1	41.3 ± 9.6	56.3 ± 11.3
Dry	Distilled water	07.8±0.2	07.3 ± 0.2	07.3 ± 0.2	07.3± 0.3	07.2 ± 0.2	07.3 ± 0.2
	5% Tremella polysaccharide	09.8±0.7*	10.5 ± 0.8*	09.5 ± 0.6*	09.9± 0.5*	09.5 ± 1.1*	09.5 ± 0.8*
		25.6±9.8	43.8 ± 13.6	30.1 ± 10.2	35.6± 10.3	31.9 ± 17.6	30.1 ± 14.2

^z Hydration unit: a.u.; Mean ± S.E (n=6).

^y Water content (%) = [(test group a.u.-contrast group a.u.) / contrast group a.u.] × 100

^x * significant difference between the distilled water and *Tremella*-treated group at $p < 0.05$.

做為保濕劑、生物抗沾粘之用 (Shih 2001)。美國及日本等國有多項以銀耳多醣活性成分 glucuronoxylomannan 為訴求之專利，包括飲食補充劑 (Wasser *et al.* 2002)、血管內皮細胞促進劑 (Xiu 1997)、抗過敏藥劑 (Sato *et al.* 1989) 及皮膚創傷敷料 (Xiu 1996)，顯示銀耳多醣的高安全性。銀耳多醣應用於皮膚保濕的相關研究報告不多，1986 年的日本專利中提出，銀耳多醣可以將水分保留在皮膚上，增加皮膚光澤度及改善皮膚皺紋 (Konishi. *et al.* 1986)。

本研究顯示，銀耳熱萃取物對兔之皮膚無刺激性，長時間添加於培養基，不會影響小鼠胎體層纖維細胞正常生長，並能輕微促進 STO 小鼠胎體層纖維細胞膠原蛋白合成；且培養基中添加多醣細胞數量比未添加者高，顯示銀耳多醣可能具有促進細胞生長功能，雖然此效果與是添加濃度無線性關性，但也顯示高濃度使用對細胞無毒性反應。由各項試驗評估，銀耳熱萃取物-銀耳多醣為安全性產品，可添加於化妝品中，作為保濕材料劑之應用。

引用文獻 (Literature cited)

- Baets, S. De and E. J. Vandamme. 2001. Extracellular *Tremella* polysaccharides: structure, properties and applications. *Biotech. Letters* 23:1361-1366.
- Dal'Belo, S. E., L. R. Gaspar, and P. M. B. G. M. Campos. 2006. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering technique. *Skin Res Technol.* 12:241-246.
- Cheung, Peter. C. K. 1996. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricular* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr Res.* 16:1721-1725.
- Gao, Q., M. K. Killie, H. Chen, R. Jiang, and R. Seljelid. 1997. Characterization and cytokine stimulating activities of heteroglycans from *Tremella fuciformis*. *Planta Med.* 63:457-460.

- Gao, Q., R. Selielid, H. Chen, and R. Jiang. 1996. Characterisation of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk with cytokine stimulating activity. *Carbohydrate Res.* 288:135-142.
- Konishi, H., A. Niwa, T. Katada, K. Hasegawa, and K. Osumik. 1986. Cosmetic JP61260006, 6pp, Japan Patent Office, JP, Tokyo.
- Kiho, T., Y. Tsujimura, M. Sakushima, S. Usui, and S. Ukai. 1994. Polysaccharides in fungi. XXXIII. Hypoglycemic activity of an acidic polysaccharide (AC) from *Tremella fuciformis*. *Yakugaku Zasshi*, 114:308-315.
- Kakuta, M., Y. Sone, T. Umeda, and A. Misaki. 1979. Comparative structural on acidic heteropolysaccharides isolated from "Shirokikurage" fruit body of *Tremella fuciformis* Berk, and the growing culture of its yeast-like cells. *Agric. Biol. Chem.* 43:1659-1668.
- Lu, I. C. 2003 Studies of Liquid Natto on Cosmetics. Providence University, Department of Applied Chemistry, Master thesis 117 pp. (in Chinese with English abstract)
- Ma, L., and Z. B. Lin. 1992. Effect of Tremella polysaccharide on IL-2 production by mouse splenocytes. *Yao Hsueh Hsueh Pao (藥學彙報)* 27:1-4.
- Shih, I. L. and Y. T. Van. 2001. The production of poly- (γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology* 79:207-225.
- Sato Toshio *et al.* 1989. Production of extract of cultured mycelia of edible basidiomycete. JP1228480.
- Yui, T., K. Ogawa, M. Kakuta, and A. Misaki. 1995. Chain conformation of a glucurono-xylo-mannan isolated from fruit body of *Tremella fuciformis* Berk. *J. Carbohydr. Chem.* 14:255-263.
- Ukai, S., T. Kiho., C. Hara, I. Kuruma, and Y. Tanaka. 1983. Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J. Pharma.* 6 (12):983-990.
- Ukai, S., H. Kiriki, K. Nagai, and T. Kiho. 1992. Synthesis and antitumor activities of conjugates of mitomycin C-polysaccharide from *Tremella fuciformis*. *Yakugaku Zasshi.* 112:663-668.
- Xia, D., and Z. B. Lin. 1989. Effects of Tremella polysaccharides on immune function in mice. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao (中國藥理學報)* 10:453-457.
- Wasser, P. Solomon, Reshetnikov, V. Sergey. 2002. Process for Producing, Methods and Compositions of Glucuronoxylomannan as Nutraceutical Agent from Higher Basidiomycetes Mushroom. USP 6383799, 18pp, United Stated Patent and Trademark Office, USA, Virginia.
- Xiu, R. J. 1997. Stimulator of Vascular Endothelial Cells and Use thereof. USP 5616325, 13pp, United Stated Patent and Trademark Office, USA, Virginia.
- Xiu, R. J. 1996. Accelerated Wound Healing USP 5547672, 6pp, United Stated Patent and Trademark Office, USA, Virginia.

In Vitro and *in Vivo* Evaluations of *Tremella* Polysaccharides for Skin Care¹

Shu-Hui Yang^{2,5}, Jenn- Rong Yang³ and Yi-Shyan Chen⁴

Abstract

Yang, S. h., J. R. Yang, and Y. S. Chen. 2007. *In vitro* and *in vivo* evaluations of *Tremella* polysaccharides for skin care. J. Taiwan Agric. Res. 56:143-151.

The fruiting body of *Tremella fuciformis* Berk is a famous traditional food in Taiwan and China. The polysaccharides extracted from *T. fuciformis* have been reported to display several pharmacological activities. In this study, the moisturizing effect of *Tremella* polysaccharides were studied and its safety for use as a novel application of skin care was evaluated. Result showed that the molecular weight of *Tremella* polysaccharides is in between 2,000,000 and 5,000,000 dalton. The STO mouse embryonic fibroblast cells grew normally and its collagen synthesis increased when the culture medium was amended with 5-250 µg/mL *Tremella* polysaccharides. *Tremella* polysaccharides didn't cause malformation of tested L929 cells of mouse fibroblasts. The primary irritation index was zero and the overall response felled into the category 'negligible' for skin irritation test. When applying to skin for 180 minutes, the *Tremella* polysaccharides increased the ratio of the water content in the stratum corneum about 35-56% for normal skin and 25-44% for dry skin, respectively. This indicates that *Tremella* polysaccharides are safe for the development of a moisturizing product for skin care.

Key words: *Tremella fuciformis*, Polysaccharides, Cells toxicity, Moisturizing product.

1. Contribution No. 2289 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: May 30, 2007.

2. Assistant Researcher of Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Station, ARI, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

3. Assistant Researcher of Physiology Division, Livestock Research Institute, Tainan, Taiwan, ROC.

4. Assistant Professor of Department of Cosmetic Science, Providence University, Taichung, Taiwan, ROC.

5. Corresponding author, e-mail:debbbie@fthes-tari.gov.tw; Fax:(07)7315590.