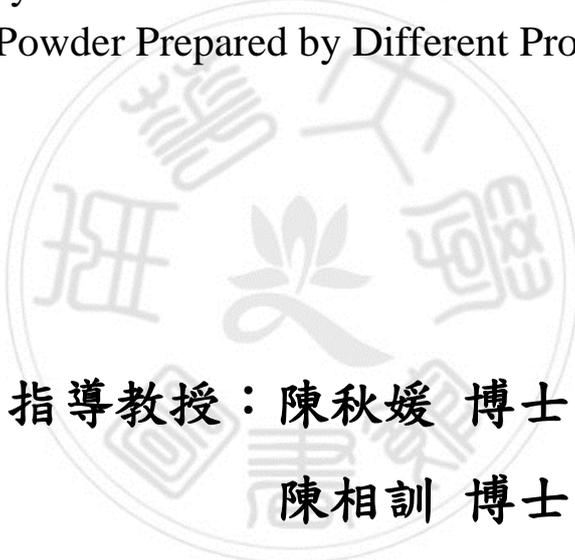


南華大學
自然醫學研究所
碩士論文

不同炮製法製備珍珠粉水萃物之生物活性評估

Bioactivity Assessments of Water-Soluble Extracts of
Pearl Powder Prepared by Different Processing



指導教授：陳秋媛 博士
陳相訓 博士

研究生：李雨霖

中華民國一百零三年七月

南 華 大 學

自然醫學研究所

碩 士 學 位 論 文

不同炮製法製備珍珠粉水萃物之生物活性評估

Bioactivity Assessments of Water-Soluble Extracts of

Pearl Powder Prepared by Different Processing

研究生：李 雨 霏

經考試合格特此證明

口試委員：陳秋媛
曾慶瀾
陳相訓
彭信展

指導教授：陳秋媛

系主任(所長)：陳秋媛

口試日期：中華民國 103 年 6 月 24 日

誌 謝

在碩士生涯，我特別感謝恩師陳秋媛所長及陳相訓教授的悉心教誨與指導，使得學生得以受益豐碩，師恩浩蕩，永銘於心。在論文口試過程中，要特別感謝中州科大曾慶瀛校長、許偉庭兩位教授口試委員以嚴謹之治學態度，句斟字酌，剴切指正，提供諸多之精闢意見，使本論文得以更臻周詳，特此一併致最高謝意。同時，還要感謝這兩年研究所教導過我的所有教授，因為有您們精闢的學術傳授，才能平順的完成學業。

此外更要感謝研究所同學明和、美智及麗敏在論文撰寫期間所給予經驗分享、相互討論、鼓勵打氣，讓我倍感溫馨，因為有您們，撰寫論文變得生動有趣。感謝宜蓉在口試上的安排、聯繫與張羅，謝謝您們的熱心。

最後感謝我的太太美娟及我的家人，在漫長的求學生涯中對我的付出及關懷與支持。謝謝你們！

李雨霖 謹誌於

南華大學自然醫學研究所

中華民國一百零三年七月

摘要

珍珠粉是傳統中藥材，在本草綱目中有安神，治目潤皮膚，解痘瘡毒等功用，而傳統炮製方法過於繁瑣，對於炮製過程所造成成分及生物活性影響的相關研究尚不多。本研究目的是利用傳統牛奶豆腐同煮法與現代低溫研磨法二種珍珠粉加工方式，探討不同炮製法之成分差異，並以細胞試驗探討其水萃物對人類皮膚纖維母細胞(HS68)之毒性、光老化之影響，同時探討萃取物對前驅脂肪細胞(3T3-L1)之脂肪分化，與珍珠粉抑制脂肪形成的影響。

結果顯示，以低溫製程製備之珍珠粉，其重金屬含量低於傳統炮製珍珠粉約 42~54%。傳統炮製法確實會導致珍珠蛋白之破壞或流失，流失量約 24.95%。微量礦物質與巨量礦物質並無明顯的差異。在 SDS-PAGE 中，分離後發現主要之蛋白質為 50 kDa。後續之生物活性得知，在對皮膚抗老化實驗中，不同製程之珍珠水萃物在濃度 0.1~1.0 mg/mL 下，對人類皮膚纖維母細胞 (HS68) 並不會抑制其生長，而前處理珍珠水萃物可以減少由 UV 照射所造成的細胞老化。珍珠水萃物對於 3T3-L1 前驅脂肪細胞及分化後脂肪細胞之生長並無影響；在脂肪分化實驗中，低溫製程之水萃物並不會對 3T3-L1 前驅脂肪細胞的

分化造成影響，對未分化及已分化之脂肪細胞之生長亦無抑制效果。同時在動物實驗中發現珍珠粉對細胞與動物之安全劑量很高，每日餵食高熱量食物同時攝取高劑量(3g/kg)珍珠粉雖可以明顯降低餵食高脂飼料的老鼠體重，但因劑量太高，並不建議具有降低試驗動物脂肪形成之效果。此外，實驗中發現以低溫製程所得到珍珠成分比傳統炮製效果好，但在保護 UV 所造成的細胞老化傷害及抑制前趨脂肪生長及分化與則無顯著差異。

關鍵字：珍珠粉、傳統炮製、低溫製程、衰老、人類皮膚纖維母細胞、前驅脂肪細胞



Abstract

Pearl powder, a traditional medicine in general used in skin or eye care in 《*Compendium of Materia Medica*》 in Chinese. However, the bioactive and components change in different process were not described in modern study. The purpose of this thesis was to compare the components change by chemical and electrophoresis analysis, the toxicity and photoaging of pearl powder water extract on human foreskin fibroblast HS68 cell, the cell differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte with traditional tofu-milk-preparation and modern cryo-dry-milling. We also the body weight reduction of pearl powder by animal model.

Results demonstrated that the reductions of heavy metal was 42-54%, pearl protein increased 24.95% by modern cryo-dry-milling. The trace and macro mineral content were the same. The pearl protein prepared by water extract displayed a mixed protein by SDS-PAGE analysis, and the main protein shows 50 kDa.

Results also showed non-toxic inhibition of pearl protein water extract from pearl powder was in vitro performed at 0.1-1.0 mg/mL for skin fibroblast HS68 cell. The photoaging will reduced by pearl water

extract. The water extract demonstrated not effects on pre-adipose and differential 3T3-L1 adipocyte by cryo-milling. Otherwise, the great amount of feeding pearl powder over 3g/kg per day and high calorie feed results as body weight reduction on ICR mice in vivo. We suggested the pearl powder is very safe and the pearl powder water extract by modern dry-cryo milling. However, pearl powder was not suggested be claimed as fat weight loss demand. We also suggested the component from cryo-milling was better than traditional process. However, the water extract of pearl powder showed no obvious photoaging protective effect on human HS68 cell undergo UV treatment. It also showed no obvious inhibition on 3T3-L1 pre-adipocyte growth and differentiation.

Keywords: pearl powder, traditional process, cryo-milling, aging, HS68, 3T3-L1

目次

摘要.....	i
Abstract.....	iii
目次.....	v
表目次.....	x
圖目次.....	xi
第一章 緒論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究動機.....	3
1.3 研究目的.....	4
第二章 文獻回顧.....	5
2.1 珍珠之本草學考察.....	5
2.1.1 珍珠藥名之考據.....	5
2.1.2 中醫古籍中珍珠之來源、形態、特性.....	6
2.1.3 中醫古籍中珍珠之性味、藥能描述.....	7
2.2 珍珠粉現代藥理研究.....	12

2.2.1 對中樞神經系統的作用	12
2.2.2 提高免疫力作用	12
2.2.3 抗炎作用	13
2.2.4 延緩衰老作用	13
2.2.5 對心臟血管的作用	14
2.2.6 對眼的的作用	15
2.2.7 皮膚的作用	16
2.2.8 抑菌的作用	17
2.2.9 其他臨床的應用	17
2.3 珍珠之炮製	18
2.3.1 中醫古籍中珍珠粉炮製之記載	19
2.3.2 近代珍珠粉之加工製程	24
2.4 紫外線對皮膚老化之影響	25
2.4.1 皮膚生理結構	27
2.4.2 紫外線對膠原纖維之影響	28
2.4.3 紫外線對彈性纖維之影響	28
2.5 珍珠粉對改善皮膚疾患之相關文獻	29
2.6 珍珠粉對肥胖之影響	32

2.6.1 肥胖之機轉	32
2.6.2 前驅脂肪細胞 (3T3-L1) 與肥胖的相關研究	34
2.6.3 珍珠粉相關萃取物對肥胖之影響	35
第三章 材料與方法	36
3.1 實驗藥品	36
3.2 儀器設備	37
3.3 實驗用珍珠粉規格	38
3.4 實驗方法	39
3.4.1 低溫超音波洗淨	39
3.4.2 傳統炮製製備珍珠粉	39
3.4.3 低溫製程製備珍珠粉	40
3.4.4 珍珠粉之重金屬、微量礦物質、巨量礦物質分析	40
3.4.5 珍珠粉粒徑分析	40
3.4.6 珍珠蛋白之胺基酸成分分析	40
3.4.7 珍珠水溶性蛋白分析	41
3.4.8 珍珠蛋白之濃度分析	44
3.4.9 皮膚纖維細胞(HS68) 及前驅脂肪細胞(3T3-L1)之培養	44
3.4.10 UV 照射誘導細胞老化	46

3.4.11 細胞存活率測定: MTT Assay	46
3.4.12 細胞衰老試驗 (SA-β-gal).....	46
3.4.13 Nile Red 油滴染色測定細胞內中性脂肪含量.....	47
3.4.14 珍珠粉對高脂飼料誘導小鼠肥胖之影響.....	48
第四章 結 果.....	49
4.1 珍珠粉粒徑分析	49
4.2 珍珠粉重金屬、微量礦物質、巨量礦物質分析.....	49
4.3 珍珠粉水萃物胺基酸成分分析.....	49
4.4 珍珠粉水萃物之蛋白質分離.....	50
4.5 珍珠粉水萃物之安全性與 UV 造成皮膚纖維母細胞老化之保護 作用	52
4.6 珍珠粉水萃物對前驅脂肪細胞生長趨勢之影響及安全劑量..	53
4.7 攝取珍珠粉對小鼠體重降低之影響.....	54
第五章 討 論.....	55
5.1 珍珠粉粒徑分析	55
5.2 珍珠粉重金屬、微量礦物質、巨量礦物質分析.....	56
5.3 珍珠粉胺基酸分析.....	57
5.4 珍珠水萃物之蛋白質分離.....	59

5.5 珍珠粉水萃物對皮膚纖維母細胞之安全性與 UV 造成細胞老化 保護作用	61
5.6 珍珠粉萃取物對前趨脂肪細胞生長趨勢之影響及安全劑量	64
5.7 攝取珍珠粉對高脂飼料誘導小鼠肥胖之影響	65
第六章 結 論.....	66
參考文獻.....	86



表目次

表 1、歷代中醫典籍中有關珍珠粉之功效及炮製方法	20
表 2、珍珠粉重金屬、微量元素、巨量礦物質含量測定	68
表 3、珍珠粉胺基酸含量測定	69
表 4、傳統炮製與低溫製程之水萃珍珠蛋白質含量	70



圖目次

圖 1、連續式低溫超音波珍珠振盪洗淨機(新型專利第 M429530 號)..	71
圖 2、乾式低溫珍珠研粉機(新型專利第 M387702 號).....	72
圖 3、研究流程	73
圖 4、建立藥物誘導 3T3-L1 脂肪細胞分化模式.....	74
圖 5、珍珠粉之粒徑分析	75
圖 6、水萃取珍珠蛋白之電泳分析圖	76
圖 7、傳統炮製法與低溫製程法之蛋白質電泳圖	77
圖 8、珍珠粉水萃物對皮膚纖維細胞(HS68) 安全性測試	78
圖 9、UV 造成皮膚纖維母細胞 (HS68) 之老化傷害.....	79
圖 10、珍珠粉水萃物對 UV 造成皮膚纖維母細胞老化之保護作用	80
圖 11、3T3-L1 細胞分化過程	81
圖 12、珍珠粉水萃物對前驅脂肪細胞(3T3-L1)生長趨勢之影響	82
圖 13、珍珠粉水萃取物對已分化之前驅脂肪細胞(3T3-L1)生長趨勢之影 響.....	83
圖 14、珍珠粉水萃取物對前驅脂肪細胞(3T3-L1)分化之影響	84
圖 15、不同劑量珍珠粉對小鼠體重變化之影響	85

第一章 緒論

1.1 研究背景

珍珠外表光澤鮮艷，玲瓏剔透，價格昂貴，顯現出珍珠不凡的價值。外觀優良者經過加工鑲嵌後可成為華麗裝飾品，外觀不良者可以研磨成粉，即為珍珠粉，可供醫藥或膳食補充品之用。中國傳統醫學中，珍珠粉同時也是名貴中藥材，具有清熱解毒、消炎生肌、治療潰瘍等功效，目前國內以食品及中藥管理。

珍珠的來源與品種，就生長環境而言，可分為淡水珍珠(fresh water pearl)與海水珍珠(sea water pearl)，其中海水養殖珍珠是由海水生長的貝類培育，多應用插核培育技術來生產，可以進行大規模的養殖生產，目前市場上 95% 以上的海水養殖珍珠是人工插核養殖而成。而淡水養殖珍珠是產於湖、河等蚌類的體內，其形成過程與海水養殖珍珠相似。就獲得來源而言，可分為天然野生(wild)或人工養殖(cultivated)珍珠。就品種而言，淡水養殖珍珠以三角帆蚌(*Hypriosis cumingii*)為主，海水養殖珍珠以馬氏珠母貝(*pteria martensii Dunker*)為主。(鄭全英、毛葉盟，2004)

在中國，珍珠粉是一個流傳千年的藥品，依據中華人民共和國藥典指

出，可以入藥的珍珠品種為馬氏珠母貝(*Pteria martensii* Dunker)、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)、褶紋冠蚌(*Cristaria plicata* Leach)。(趙雲志，張秋燕，2000)。世界上的養殖珍珠主要產於中國及日本。中國的海水養殖珍珠主要分佈於南海海域，以廣東、廣西及海南發展最為迅速。中國的淡水無核珍珠主要分佈於浙江、江蘇、上海、安徽、江西、湖南、湖北及四川等地。日本海水養殖珍珠主要分佈於三重、高知、長崎、廣島、熊本及神戶等縣。

在 1930 年由日本的藤田昌世發表以池蝶貝成功地培育出能量化且具經濟價值的淡水珍珠，並於 1936 年後移殖至距離東京東北方六十公里處的霞浦；當時珍珠水產事業的開發大都在琵琶湖，因此 1959 年由縣府單位統一名稱，琵琶湖所產的珍珠統稱為『琵琶湖珍珠、Biwako Real Pearl』。

淡水珍珠的養殖，位於水淺處，並有穩定的生長環境，方便採收，淡水珍珠養殖雖在日本各地都有進行，但以琵琶湖佔最重要地位，可惜好景不常，湖岸四周過度的開發及濫用資源，水質環境日漸惡化，西邊的湖於 1983 年水草發生紅潮後，池蝶貝的生長大受影響一度瀕臨絕種，根據統計，琵琶湖到了 1992 年時的珍珠產量呈現幾乎零的狀態（陸啟萍，杜雨潔，2011）。

日本養殖珍珠雖然品質優異，但因日本人力成本高漲，採珠工作亦十分辛苦，都是以高單價飾品珠為主。目前中國生產的淡水養殖珍珠為市場主要原料供應來源。所以本研究以中國杭州西湖所生產的三角帆蚌為主要的研究標的。

1.2 研究動機

珍珠粉屬於傳統中藥，需經過炮製方能食用。一般而言，中藥炮製程式複雜，依加工方式、加工條件或所使用的輔料不同，皆會產生不同成分、藥理及毒理變化。傳統珍珠粉炮製多使用水飛法，其過程必須經過水煮加熱、加水研磨、反覆乾燥等程式，可能使得珍珠蛋白成分流失或變性，降低其功效。因此本實驗使用不同炮製方法，即傳統炮製法及現代乾式低溫研磨法，比較其珍珠蛋白特性及生物活性。預期採用低溫乾式研磨方式可以減少珍珠蛋白流失(陳相訓，2008)。

《本草綱目》記載珍珠之效用為「治目潤肌皮」、「塗面像顏色」、「精遺清白濁」、「安魂魄定驚悸」、「解痘瘡毒」、「治煩熱」，說明珍珠可以內服、外用，廣泛應用於眼睛、皮膚及神經系統等疾患。因此本研究以不同炮製方法所得珍珠水萃物分別以人類皮膚纖維母細胞(HS68)以及前趨脂肪細胞(3T3-L1)進行測試，來探討不同炮製的珍珠水萃物的生物活性是否有差異。

1.3 研究目的

基於上述動機，本研究目的如下：

1. 比較不同炮製過程對珍珠水溶性蛋白質含量之影響。
2. 探討珍珠水萃物對 UV 導致皮膚纖維母細胞老化之影響。
3. 探討珍珠水萃物對抑制 3T3-L1 細胞脂肪堆積影響。
4. 探討攝取不同含量珍珠粉對小鼠體重之影響。



第二章 文獻回顧

2.1 珍珠之本草學考察

2.1.1 珍珠藥名之考據

珍珠自古就是極為珍貴的藥材，在清朝更是皇族御用的珠寶，顯示珍珠兼具藥材與寶石之特性。而對於真珠此一藥名的來源，早在《漢書·武帝紀》即有紀載，《漢書·武帝紀》云：(珠、儋耳) 二郡在大海中崖岸之邊，出真珠，故曰珠，說明當時珍珠來源是海邊，可見當時之珍珠來源以天然海中蚌類體內生成的真珠為主。而目前通稱的藥名珍珠，從唐朝的《開元本草》一書已開始稱為珍珠，之後就陸續以珍珠稱之。

一般認為藥材的藥效與成熟度有關，如人參等需成長至少六年，達到適當大小，功效較好，愈成熟其有效成分則可能越高。相反的，靈芝太成熟會木質化，其中的多醣類反而降低。而珍珠是由蚌類分泌一層一層的珍珠質累積而成，因此不同的大小、成熟度應與珍珠的功效並無直接相關，因此《抱樸子·內篇·仙藥》中即有記載，曰：真珠徑一寸以上可服，服之可以長久。

從性味與功效來看，唐代《開元本草》紀載：真珠，寒，無毒。

主手足皮膚逆臚，鎮心。綿裏塞耳，主聾。敷面令人潤澤好顏色。點目中，主膚翳障膜。顯示當時已經發現珍珠對皮膚、神經系統、眼睛等有功效，惟其中是否對於聽覺系統有幫助，在後續之現代研究報告尚無法證明。

然而需特別說明者，真珠與真朱二詞常會相混而誤用，在《開寶本草》中已有說明：【異名】真朱《本草經集注》，真珠《雷公炮炙論》，蚌珠《南方志》，珠子《儒門事親》，濂珠《增訂偽藥條辨》，說明真朱與真珠之差異。現代的考據研究又更清楚說明，沈(2000)之報告認為，真朱是丹砂之末(即硃砂粉末)，真珠是蚌珠，兩者從基源到命名原因、入藥年代都不相同，但兩者自古以來多有相混，分析相混原因主要有：因名稱的讀音與用字相同及文字演變造成的錯亂，部分功能相似而造成混亂。因此，為避免混用，本研究統一以目前之習稱，即以珍珠稱之，而所炮製研磨之細粉稱為珍珠粉。

2.1.2 中醫古籍中珍珠之來源、形態、特性

關於珍珠來源與型態之描述，《說文》云：珠，蚌之陰精也，說明其來源為蚌類，漢朝以前文獻中將蚌類所生成之蚌珠直接稱為“珠”，但同時也有以美石等類似之物混稱‘珠’的。例如《神農本草經》說：青琅……一名石珠，一名青珠。《別錄·就篇》卷三就提及珠為“石珠”，

顏師古則解釋：「琅，火齊珠也；一曰石之似珠者也」，其實當時的”珠”也是指美麗的寶石。例如，在《史記·司馬相如傳》中說道：玫瑰，石珠也。顯示當時”珠”泛指一般的美麗石頭，猜測是玫瑰色的寶石。而在《博物志》一書中又有更多描述珠是琥珀色的寶石，例如：琥珀，一名江珠。在《山海經·海內西經》一書中又寫道：開明北有……珠樹，則其時稱為珠的尚有樹生者。因此，古代的”珠”，猜測應指許多美麗的寶石或具寶石光澤之果樹或分泌液等，但以目前科學知識，無法認同樹上能結真珠。

段玉裁在《說文解字》注記載到真珠之涵義：王充《論衡》曰：「魚蚌之珠，與《禹貢》琅皆真珠也」。段玉裁解釋如下：出於蚌者為珠，則出於地中者為似珠。似珠，亦非人為之，故王謂之真珠也，顯示真珠是指由蚌類生產者才叫真珠，具有光澤之寶石類可以稱為似珠。

關於真珠的特性，唐代成書的《海藥本草》述之：「蜀中西路女瓜亦出真珠，是蚌蛤產，光白甚好，不及舶上彩耀，欲穿須得金剛鑽也」，說明珍珠具有良好之光澤，其硬度高，需要金剛鑽才能穿孔。

2.1.3 中醫古籍中珍珠之性味、藥能描述

《本草蒙筌》：寒。無毒。老蚌生者圓大寸圍為上，光瑩不暗極

優，求入醫方，惟新完者可用。說明珍珠性寒無毒，以老蚌生所生者為上品，品質較佳。《本草征藥》認為珍珠：入肝經。若依肝主目來說，可解釋具有眼睛治療功效。

中國最偉大的醫書之一《本草綱目》說明珍珠之效用為「治目潤肌皮」、「塗面像顏色」、「精遺清白濁」、「安魂魄定驚悸」、「解痘瘡毒」、「治煩熱」。說明珍珠可以內服、外用，廣泛應用於眼睛、皮膚及神經系統等疾患。

而在《外台秘要》認為珍珠在婦科之效用，可以：療子死腹中方，珍珠二兩，為末，酒調服盡，立出。《千金方》也說：治兒胞衣不出，苦酒服珍珠末一兩。又方：難產。取珍珠末一兩，和酒服之，立出。以現代醫學來看，子死腹中、胞衣不出與難產，均與子宮收縮有關，暗示大量珍珠可以促進子宮收縮，以此論點，懷孕期間大量攝取珍珠是否會造成流產，仍未有定論。然坊間認為懷孕期間攝取珍珠粉，同時具有補鈣與美白效果，因此廣泛用於孕婦或胎兒補充鈣質、安定神經，目前在適量使用上仍未有副作用之文獻報導。此外，許多古籍中整理珍珠之來源、性味、炮製方法、功效，如《本草蒙筌》：瓷鉢極研，薄絹重篩。為丸鎮心神，敷面潤顏色。作散點目去膜，綿裹宜耳除聾。說明在神經系統之作用，可直接塗抹於眼睛與治療耳聾之功能，

可惜現代醫學尚未證實在聽覺上的功效。

《綱目》：凡用，以新完未經綴者研如粉石，方堪服食，不細，則傷人臟腑。凡入藥，不用首飾及見屍氣者，以人乳浸三日，煮過。李時珍認為作為入藥之用途，須以人乳浸三日，但在古代沒有冷藏設備之情形下，人乳浸三日將導致發酸，本研究仿古籍作法，改以牛乳在冷藏下浸三日。《本草征藥》說明真珠之炮製方式及性味歸經功效，即用絹包，入豆腐中，煮一炷香，研極細。外用收口生肌，內服止渴除蒸，安魂定悸。稟太陰之精氣而結，宜其主用多入陰經。而《本草求真》進一步說明真珠，蚌所生之珠也，珠稟太陰精氣而成。故中秋無月，則蚌即無珠，蚌蛤無陰陽牝牡。故珠一於陰精也。入手少陰心經、足厥陰肝經。蓋心虛有熱，則神氣浮游。肝虛有熱，則目生障。除二經之熱。故能鎮心明目。但中秋無月，則蚌即無珠，在中秋是否無月則無珠，學理上應有探討空間，因稱生真珠，與品種、水質、時間等應有關，且是慢慢分泌真珠質經年累積而成，而中秋有月或無月，相信不會與有無生珠有關。

《經驗奇方》：治下疳陽物腫痛破爛等症，珍珠（煨）、枯礬、雄精、黃柏、宮粉（煨）上藥各研細末。研極細。儲瓷瓶。用米泔水洗淨患處。日搽數次。數日即愈。顯示真珠對皮膚之功能相當好。此

外，《眼科闡微》曾經記載真珠：用鹽水濕疏紙乾，包珠，將瓦燒紅取出，將紙試之，無黑色，方將珠安瓦上，半刻時，取起搗細，每一錢入好朱砂三分，聽用。又法：以紙包夾脅下一時，即可研末。《馮氏錦囊秘錄》：主治痘疹合參，珍珠，細研成粉，主小兒驚熱，鎮心明目，痘中疔毒癰毒，俱入摻藥，用之神效。

相同醫書中，對於真珠之來源、分類、用法與功效亦有不同之解釋，例如《本草方藥大全》至少有四部分提及真珠，如《本草方藥大全·證類本草·卷第二十·上品·珍珠》：主手足皮膚逆臚，鎮心。綿裹塞耳，主聾。敷面令人潤澤好顏色。粉點目中，主膚翳障膜。而《本草方藥大全·本草蒙筌·卷之十一·蟲魚部·珍珠》：小兒驚熱風癩，和藥作錠摩服。尤堪止渴，亦能墜痰。《本草方藥大全·本草征藥·第四卷·外治、食療於附錄·外治·動物藥·珍珠》：綿裹塞耳治聾，塗面駐顏潤澤。內服止渴除蒸，安魂定悸。稟太陰之精氣而結，宜其主用多入陰經。珠體最堅，研如飛面，方用，不細損人臟腑。病不由火熱者忌之。《本草方藥大全·本草求真上編·卷四·瀉熱珍珠》：除心肝熱邪及脾腎濕熱。《本草便讀·鱗介部·鱗介類·珍珠》：得太陰精氣以生，清熱益陰專解毒，具甘淡鹹寒之性，鎮心定悸可療狂，治驚癩之痰迷，入肝明目，生肌肉而翳退。澤面塗容，甘鹹寒無

毒，益陰解毒，是其本功。雖陰精之氣結成，而質稟堅剛，性含靈寶，故能鎮心墜痰，安魂定魄。至於退翳膜，治痘瘡，生肌澤面。《雷公炮製藥性解·卷六·蟲魚部·珍珠》：味無考，性寒無毒，入心經。主手足皮膚逆臚，鎮心潤顏，止渴墜痰，點目去膜，塞耳除聾，催生下死胎，又主小兒驚熱風。由以上說明，真珠的功能相當廣泛，惟炮致過程繁瑣，因此價格相對高昂。

除上述說明，《外科全生集·卷三·諸藥法治及藥性·珍珠》亦介紹：入豆腐煮一炷香，取出，與燈心同研極細，去心，除翳障，安魂魄，療驚逐痰，止遺精白濁，解痘疔毒，下死胎胞衣，生肌肉。因此珍珠粉可以促進肌肉再生，其與皮膚的相容相當高。《馮氏錦囊秘錄：雜症痘疹藥性主治合參卷四十七：蟲魚部：珍珠》：珠太陰之精氣而結，故中秋無月則蚌無胎，是以功用多入陰經，其色光明，其體堅硬，大小無定，要以新完未經鑽綴者為上。味其微鹹，氣寒，無毒。入手少陰、足厥陰經。心虛有熱，則神氣浮越，肝虛有熱，則目生翳障，除二經之熱，故能鎮心明目也。綜合上述，因此珍珠具有鎮新、安神、養陰，息風、清熱、墜痰、明目，解毒生肌等功效（張文東等人，2003）。

2.2 珍珠粉現代藥理研究

綜合了珍珠的在營養和保健上的臨床應用，本研究整理相關臨床研究，說明珍珠粉有下列作用（菅原穎、趙文靜與常惟智，2010）。

2.2.1 對中樞神經系統的作用

珍珠粉對動物中樞神經系統功能的影響，珍珠粉可使小鼠痛閾明顯升高，可對抗咖啡因引起的驚厥，使小鼠腦內單胺類遞質 5-HT、5-HIAA 的含量升高，顯示珍珠粉對中樞神經系統有一定程度的抑制作用（潘建新、顧振綸與錢曾年，1999）。

藥理研究證明酵素水解珍珠液灌服可使小鼠表現出安靜、自發活動減少等現象，每日灌服 8 mL/kg 劑量酵素水解珍珠口服液能明顯延長閾劑量戊巴比妥鈉誘導的小鼠睡眠時間，同時對閾下劑量戊巴比妥鈉誘導小鼠睡眠發生率有明顯升高，而且還能明顯縮短巴比妥鈉誘導的睡眠潛伏期，顯示酵素水解珍珠口服液具有中樞鎮靜作用（樊柏林，2000）。

2.2.2 提高免疫力作用

由珍珠、牛黃等為主要成分組成的複方珍珠散對小鼠的多項免疫指標的影響。結果顯示複方珍珠散可增強免疫功能正常小鼠和地塞米

松所致免疫功能低下小鼠巨噬細胞的吞噬功能，促進血清溶血素的生成，顯著提高 Con A 誘導小鼠脾臟 T 淋巴細胞的增殖功能，證實該方可顯著提高小鼠的免疫功能，增強機體抵抗力（張文東等人，2003）。

2.2.3 抗炎作用

珍珠及其複方具有良好抗炎效果。由珍珠、牛黃、麝香酮等配製而成的珍珠六神花露水的抗炎作用與氫化可體松一樣，對由巴豆油混合液引起的耳腫脹、鹿角菜膠引起的足蹠腫脹都有明顯抑制作用，主藥珍珠、牛黃等具有抗炎作用（史清水、孟群與陳民輝，1995）。珍珠水提取液高、低劑量組均具有顯著的抑制二甲苯引起的小鼠耳廓腫、蛋清引起的大鼠足蹠腫和醋酸刺激所引起的腹腔毛細血管通透性的增高（周大興、吳森林，2001）。珍珠、陳皮等組成的珍珠胃安丸可明顯減輕二甲苯引致的小鼠耳廓腫脹度，其作用強度弱於阿司匹林（張小娜等人，2008）。

2.2.4 延緩衰老作用

珍珠粉中含 22 種微量元素，其中微量元素鋅能活化人體過氧化物歧化酶(SOD)，清除易引起人體衰老的過氧化脂質。珍珠粉中所含

的甘氨酸、甲硫氨酸可促進皮膚膠原蛋白的再生，達到美容的效果(馬麗莎、肖樹雄，2007)。此外，珍珠粉能降低血中過氧化脂質降解產物丙二醛(MDA)的含量，提高血中超氧化物歧化酶(SOD)活力，並能延長果蠅的平均壽命，因此說明珍珠粉具有延緩衰老的作用(錢榮華、竹劍平，2003)。

2.2.5 對心臟血管的作用

章等人(1994)證明，水溶性珍珠粉能提高心肌收縮力、對心肌的基礎張力呈現雙相型影響，但不影響心率。普通珍珠粉則對以上三種指標幾乎都呈負性作用。但大鼠單次攝取水溶性珍珠粉 1g/kg 劑量，會使竇性節律的恢復明顯加快，若多次使用，可得較高血藥濃度，抗心律失常作用可能更顯著。因此佐證中醫認為珍珠可以鎮心安神功效的理論。在心臟血管方面，珍珠粉對高血壓的有幫助，一般認為鹽份攝入量高的人血壓較高，但鈣攝取量少的人，血壓也較高。因血管壁有平滑肌，具有使血管收縮或擴張的功能，當平滑肌有太多的鈣流入時，就會引起血管強烈收縮，而鈣缺乏時，身體骨骼就會發出大量的鈣來補充，導致血鈣濃度升高，引起平滑肌異常收縮，造成血壓上升。珍珠粉含有豐富的鈣，能防止鈣缺乏，從而有效地預防高血壓的發生。此外，神經興奮時，也會使血壓升高，而珍珠粉能鎮靜神經系統，穩

定情緒，自然也能預防血壓升高。珍珠粉對心肌梗塞亦有幫助，心肌梗塞是因為管狀動脈血管阻塞，血液無法送到心肌，因而引起心肌敗壞的症狀。心肌梗塞通常與膽固醇太高有關，與鈣的缺乏也有很大關係。當體內缺乏鈣時，必須由骨骼負責補給，於是鈣就會大量進入血管內，同時也會使膽固醇進入血管內，積存使動脈硬化。追本溯源的關鍵還是在於鈣的缺乏。因此，平時多服珍珠粉，加強鈣缺乏的預防，就能有效地防止心肌梗塞和腦梗塞的發生。中風（腦梗塞）的發生原因基本上與心肌梗塞一樣，不僅與膽固醇有關，與鈣的缺乏也有很大關係。據日本調查表明，中風是腦血管因血壓過高而破裂所引起，與鈣缺乏有密切的關係。要預防也必須服珍珠粉，使其中吸收的鈣能直接提高血管壁肌肉的作用，防止血壓上升，具有預防中風的功能（章蘊毅、顧文、吳中與李端，1994）。

2.2.6 對眼的作用

珍珠水解液針對實驗模型眼球的各種測量結果均證實，其具有明顯的抑制眼球外徑、內徑及赤道半徑擴張的作用，顯著抑制了眼球形態學的擴張，抑制負性屈光度的增長（陳祖基、韓秀嫻，2001）。珍珠水解液能疏通微循環，增加兔眼球結膜的毛細血管交點數，增加血流速度，改善實驗所致的兔眼球結膜微循環障礙和阻止微循環障礙的

形成，因此，珍珠水解液應有疏通微循環功能（高秋華、韓秀嫻、黃開勳與徐輝碧，2000）。

另據孟等人(2007)對兔視網膜缺血再灌注損傷 Bcl-2 基因表達的影響的實驗證實，珍珠丸能減少神經元細胞凋亡的數目，並能促成 Bcl-2 基因的表達，有保護神經元細胞的作用。以上藥理作用可能是珍珠明目功效的藥理學基礎（孟根花、李浩軍與烏仁圖雅，2007）。

針對珍珠活性蛋白進行安全性藥理學研究，觀察珍珠活性蛋白對小鼠中樞神經系統與家貓心血管和呼吸系統的影響，結果發現小鼠腹腔注射劑量為 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的珍珠活性蛋白，對小鼠自主活動次數無明顯影響，貓腹腔一次注射劑量為 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的珍珠活性蛋白時，對心血管系統的心律和血壓無明顯影響，對呼吸系統的呼吸頻率和幅度也無明顯影響。亦即珍珠活性蛋白對小鼠中樞神經系統、對家貓心血管系統和呼吸系統均無不良影響（黃福星、陳連劍、李婷、劉新宇與李成，2007）。

2.2.7 皮膚的作用

許多藥理研究證實珍珠粉能營造上皮細胞再生的良好環境。在組織學兔耳背創傷實驗裡，使用珍珠粉後有大量纖維素滲出且白細胞被活化（丁雲川，2008）；珍珠粉直接敷在傷口上可治療久治不癒傷口

(鄧穎珠，2000)；珍珠粉治療小面積淺度燙傷，將發炎、水泡，已傷及表皮及真皮層之皮膚，使用珍珠粉塗抹，無包紮，保持通風，認為效果明顯，由於珍珠粉易被人體表皮細胞吸收，可增強細胞活力，促進細胞新陳代謝，促進人體的膠原細胞生長，促進肌膚再生，同時還具有較顯著消炎作用，能使局部組織蛋白凝固，水腫消退，炎性漿液滲出減少，使肉芽組織的營養狀況得到改善，皮膚爬行速度加快，促進創面癒合，減輕了創面的色素沉澱，和多種治療方法相比，珍珠粉治療燙傷有安全、方便、快捷、止痛快、病程短、療效好與經濟的優點(劉菲，2010)。

2.2.8 抑菌的作用

珍珠粉可治癒口腔潰瘍，包含減少疼痛、促進癒合等(劉加明，2004)。珍珠粉對葡萄球菌所致的豚鼠口腔黏膜潰瘍有治療作用，體外抑菌試驗證明珍珠粉對金黃色葡萄球菌、奈氏球菌、溶血鏈球菌均有較強抑制作用(吳家瑜、竹劍平，1996)。

2.2.9 其他臨床的應用

臨床實驗證明珍珠粉具有改善孕婦營養性貧血作用(劉曉榮、竹劍平，2005)。超細珍珠粉可以改善睡眠作用(王麗雲、凌寶銀與趙

榮，2007)。學者利用小鼠研究證明珍珠有增強小鼠抗疲勞的作用(張錦衛、竹劍平，2005)。依據老中醫師臨床經驗，認為珍珠有安神定驚、寧心平悸、養顏美容、和胃制酸、解毒生肌等作用，常用治療失眠、心律失常、食道炎、胃炎、消化性潰瘍、面部黃褐斑等病(張榮春，2009)。

2.3 珍珠之炮製

中藥炮製的目的包括: 1.消除或減少藥物的毒性、烈性和副作用: 如生半夏、生南星有毒，用生薑(薑)、明礬脆制，可解除毒性；又如巴豆有劇毒，去油用霜，可減少毒性。2.改變藥物的效能: 如地黃生用性寒涼血，蒸製成熟地則微溫而補血；何首烏生用潤腸通便、解瘡毒，制熟能補肝腎、益精血。3.便於制劑和貯藏: 如將植物類藥物切碎，便於煎煮；礦物類藥物煨，便於研粉。又如某些生藥在擷取後必須烘焙，使藥物充分乾燥，以便貯藏。4.使藥物潔淨、便於服用: 如藥物在擷取後必須清除泥沙雜質和非藥用的部分；有些海產品與動物類的藥物需要漂去鹹味及腥味等(張哲賢、蔡貴花，1995)。而珍珠的傳統炮製是採取水飛法，利用水的浮力讓較細的粉末懸浮於水中，目的是使珍珠粉碎得更加細膩，便於內服和外用。近年來，因為機械設備的不斷改良，在乾式研磨上，不僅在加工細度及分級上，或是炮

製速度上都有長足的進步，所以本實驗採取新式乾式研磨機作為實驗標的。因此，本研究匯整歷代中醫古籍珍珠粉炮製之記載與近代珍珠粉之加工製程研究進展。

2.3.1 中醫古籍中珍珠粉炮製之記載

許多典籍有說明珍珠之研粉，《雷公炮炙論》即說明：須取新淨者以絹袋盛之，然後用地榆、五加皮、牡蠣以漿水煮三日夜，勿令火歇，日滿出之，用甘草湯淘之令淨後，於白中搗令細，以娟羅重重篩過，卻硬研二萬下了用。說明瞭古時候珍珠製作的繁複過程，稱為炮製，而且《雷公炮炙論》使用其他三中藥材一併煮三日夜，其目的並未說明。而在過篩過程中必在水中分級，故稱為水飛法，水飛法通常適用於不溶於水之礦物類藥材。

傳統珍珠粉炮製是採取水飛法，水飛是研粉方法之一，利用水的浮力讓較細的粉末懸浮於水中，做粉末的分級，適用於礦石和貝殼類不易溶解於水的藥物如硃砂等，目的是使藥物粉碎得更加細膩，便於內服和外用。在水飛前先將藥物打成粗末，然後放在研鉢內和水同研，傾取上部的混懸液，然後再將沉於下部的粗末繼續研磨，這樣反複作業，研至將細粉放在舌上嘗之無渣為度。水飛並可防止粉末在研磨時飛揚，以減少損耗。

本研究整理歷代中醫典籍中有關珍珠粉之功效及炮製方法

如表 1。

表 1、歷代中醫典籍中有關珍珠粉之功效及炮製方法

醫 著	功 效	炮製方法
《證類本草·卷二十》、《雷公炮製藥性解·卷六》、《馮氏錦囊秘錄·雜症痘疹藥性主治合參卷四十七》	主手足皮膚逆臚，鎮心。綿裹塞耳，主聾。敷面令人潤澤好顏色。粉點目中，主膚翳障膜	取新淨者，以絹袋盛之。然後用地榆、五花皮、五方：草三味各四兩，細銼了，又以牡蠣約重四、五斤以來，先置於平底鐺中，以物四向令穩，然後著珍珠于上方：下銼了三件藥，籠之，以漿水煮三日夜。勿令火歇，日滿出之，用甘草湯淘之，令淨後，於白中搗令細，以絹羅重重篩過，卻更研二萬下用，凡使，要不傷破及鑽透者，方可用也。
《本草求真·上篇卷四》、《馮氏錦囊秘錄·雜症痘疹藥性主治合參卷四十七》	珍珠，專入心肝，兼入脾胃。入手少陰心經足厥陰肝經。蓋心虛有熱。則神氣浮游。肝虛有熱。則目生翳障。(目為肝竅。)除	體最堅硬。研如飛面。方堪服食。否則傷人臟腑。外搽肌肉作疼。

二經之熱。故能鎮心明目也。耳聾本屬腎虛有熱。（耳為腎竅。）甘寒所以主之。逆臚者臚脹也。胸腹氣逆脹滿。以及手足皮膚皆腫也。經曰。諸濕腫滿。皆屬脾土。諸滿脹大。皆屬於熱。此脾虛有熱。兼有積滯所致。珍珠，味甘。既能益脾。寒能除熱。體堅復能磨積消滯。故亦主之。珠藏於澤。則川自媚。況塗於面。寧不令人潤澤顏色乎？至於疔毒癰腫。長肉生肌。尤臻奇效。

《本草蒙筌·卷十一》

為丸鎮心神，敷面潤顏色。作散點目去膜，綿裹宜耳除聾。小兒驚熱風癰，和藥作錠摩服。尤堪止渴，亦能墜痰

求入醫方，惟新完者可用。瓷鉢極研，薄絹重篩。

《本草征藥·卷四》

外用收口生肌，點睛退翳。綿裹塞耳治聾，塗面駐顏潤澤。內服止渴除蒸，安魂定悸。稟太陰之精氣而結，宜其主用多入陰經。

絹包，入豆腐中，煮一炷香，研極細。珠體最堅，研如飛面，方用，不細損人臟腑。病不由火熱者忌之。

《本草求真·鱗介部·鱗介類》

清熱益陰專解毒。具甘淡鹹寒之性。鎮心定悸可療狂。治驚癰之痰迷。入肝明目。生肌肉而翳退。澤

	面塗容。而質稟堅剛。性含靈寶。故能鎮心墜痰。安魂定魄。至於退翳膜。治痘瘡。生肌澤面。皆取其靈寶鹹寒潤澤之力耳。	
《雷公炮製藥性解·卷六》	主手足皮膚逆臚，鎮心潤顏，止渴墜痰，點目去膜，塞耳除聾，催生下死胎，又主小兒驚熱風癲。	須未經鑽眼者，研細篩過，再研二萬下方用。
《驗方新編·卷二十四·疔瘡部奇效八寶丹》	治瘡毒膿腐已盡，用此摻上，即能生肌長肉，平口收功。	
《驗方新編·卷二十四·外科膚貼匯方》	治楊梅內疔，諸處梅毒。	
《太醫院秘藏膏丹丸散方劑·卷二》	專治癰疽潰後瘡口不收，敷之即能消腫定痛，收口生肌。	
《方症會要·卷四》	治精滑白濁濕熱在內下二焦	
《惠直堂經驗方·卷三》	治下疳破爛，痛不可忍，及諸瘡新肉已生，不能生皮，並湯火瘡，破爛痛甚者俱效。	
《方症會要·卷四》	治精滑白濁濕熱在內下二焦	
《經驗奇方·卷上》	治下疳陽物腫痛破爛等症，用米泔水洗淨患處，日摻數次，數日即愈。	

《外科全生集·卷三》 除翳障，安魂魄，療驚逐痰，止遺精白濁，解痘疔毒，下死胎胞衣，生肌肉。

入豆腐煮一炷香，取出，與燈心同研極細，去心。

《臨床醫術大全·醫編·卷之七》 研勻，以細筆管吹入喉內爛肉處。

兒茶、川連末、川貝母（去心，研）、青黛（各一錢五分）、紅褐（燒灰存性）、官粉、黃柏末、魚腦石（微煨）、琥珀末（各一錢）、人中白（二錢，煨）、硼砂（八分）、冰片（六分）、京牛黃、珍珠（各五分，豆腐內煮半炷香時，取出研末）、麝香（三分）、各研極細末，共兌一處。

《眼科闡微·卷四》

用鹽水濕疏紙幹，包珠，將瓦燒紅取出，將紙試之，無黑色，方將珠安瓦上，半刻時，取起搗細，每一錢入好朱砂三分，聽用。又法：以紙包夾脅下一時，即可研末。

2.3.2 近代珍珠粉之加工製程

拜科技之賜，現代珍珠粉之加工方法已經越來越進步，珍珠粉是由珍珠研磨加工而成，而珍珠的研磨方法，『中國藥典』及『中藥炮製規範』均採用「一般炮製法」製造珍珠粉，其方法如下，1.珍珠：洗淨，曬乾。2.珍珠粉：取珍珠用紗布包好，放入珍珠，上面再覆蓋豆腐，然後，置籠內蒸1小時，清水洗淨，再置於乳鉢內研碎，加入適量水研製無聲時，用紙將乳鉢口封嚴，曬乾或風乾(張和蔡，1995)，其炮製目的：1 以新淨未經鑽綴者，研如粉，方勸服食，不然則傷人臟腑。2.人乳浸三日，絹包入豆腐中，煮一炷香，搗碎，研二萬餘如飛麵，方堪用，不細傷人臟腑(本草匯)，本方法即為傳統之水飛法，但各種方法均大同小異，其目的均為將珍珠研磨成為細緻之珍珠粉。

傳統的水飛法屬於濕式研磨法，需加水研磨，將礦物質或貝殼類藥物反覆研磨成極細粉末，利用研磨過程中粗細粉末在水中懸浮性不同來分離不同粒徑的珍珠粉，在取懸浮液乾燥製成粉末，以此法製得之粉末質地細膩，水飛法亦可防止研磨過程中之粉塵飛揚，同時也可以去除可溶性雜質，重金屬、胺基酸等(張文東，2003)。

由於目前珍珠粉的市場需求量越來越大，而傳統工藝生產效率低，生產時間長，損耗率大，並且不易控制微生物的污染。因此，各地出

現許多珍珠粉的加工新工藝，如傳統粉碎法、機械粉碎法、球磨粉碎法、氣流粉碎法、振動混練粉碎法。從粉碎條件來分析，傳統法和球磨法必須在恆溫左右的環境中操作，否則由於時間較長，極易引起珍珠粉產生異味。從設備要求來看，除氣流粉碎法需要配備價格昂貴的分級分離器外，其它加工設備均較為簡單、價廉和易操作。

2.4 紫外線對皮膚老化之影響

當人體老化時，在外觀上即會有所變化，如臉部皺紋加深，眼袋下垂、喉部贅肉形成；皮膚變乾燥、鬆垮，失去彈性；牙齒、牙齦萎縮；頭髮皮膚色素脫失；頭髮稀薄，臉手足前脛皮下脂肪變薄與男人腰腹部、女人大腿脂肪增厚等現象。就西醫的論點而言，皮膚的堅實和彈性主要由真皮層所決定，因而真皮層與形成皺紋有直接關係，皮膚老化又可分為自然性老化（intrinsic aging）與光老化（photoaging）兩種，在皮膚自然性老化過程中，會產生一些皮膚生理變化，如皮膚中的葡萄糖胺聚醣（glycosaminoglycans；GAGs）與醣醛酸（Uronic acid）含量減少，導致水合能力降低（Jung, Cha, Lee, Chun, & Kim, 1997）、皮膚表面水脂乳化物含量減少及腺體分泌功能減弱；真皮層中膠原纖維合成減少，蛋白酵素釋放增加，使膠原降解增加，彈力纖維變性，使彈力衰退；纖維母細胞分化能力降低；皮下脂肪減少，汗腺、皮脂腺、

毛囊退化，進而造成皮膚鬆弛、皺紋和變薄。另外 Tahara 等人報告中，指出小鼠隨著年齡增加，其皮膚內的超氧歧化酶活性相對減少，進而造成體內自由基增加，促使皮膚老化(Tahara, Matsuo, & Kaneko, 2001)。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 (dermatoheliosis、photoaging) 現象產生，更嚴重者甚至會有皮膚癌現象產生(Goihman-Yahr, 1996)，而這些現象則與皮膚經過過量紫外線的照射後，皮膚會產生過量活性含氧族群有關聯。在中醫論點方面，人體衰老時，顏面肌膚呈現枯癟無澤、榮華頹落，或蒼白，或黯黑，彈性減弱，乾燥粗糙、萎縮，皺紋增加等現象產生。並認為衰老的原因為腎之精氣虛衰、脾胃虛損、心肺氣虛、肝血虧虛，而五臟虧虛的主要誘因為飲食失節、飲酒過度、勞逸失常、情志失常所造成。

紫外線照射屬於皮膚老化之外在環境因素，其會造成表皮層或是真皮層結構發生變異，進而加速皮膚皺紋的產生。真皮層中除了皮膚細胞外，還包括彈性纖維、膠原纖維與葡萄胺聚醣等細胞外間質，而

這些細胞外間質具有支撐真皮層結構及做為纖維蛋白的基質的功能，因此與皮膚結構有密切關係 (Miyachi, 1995)。

2.4.1 皮膚生理結構

真皮層組織細胞可以分成兩種：(1)實質細胞(parenchymal cells)負責提供組織的主要功能；(2)支援細胞(support cells)則提供組織的構造骨架。支持細胞族群是由一群具有複雜代謝功能之高度發展細胞所組成，纖維母細胞可合成葡萄糖胺聚醣(glycosamino-glycans；GAGs)與微纖維蛋白(fibrillar proteins)，而此兩種物質即為結締組織(connective tissue)的主要組成。葡萄糖胺聚醣佔總含量90%，平時這些葡萄糖胺聚醣會與蛋白質結合以醣蛋白(proteoglycan)形式存在，可吸附大量的水分而呈現膠狀(Bernstein & Uitto, 1996)；至於微纖維蛋白質和支援組織的張力性質有關，其中膠原纖維(collagen fiber)與維持組織架構有關，為白色纖維、可彎曲但無法伸長，且為網狀層的主要組成；彈性纖維(elastic fibers)則與皮膚組織彈性有關，為黃色纖維、單一存在而不成束、具有彈力素(elastin)可提供彈性(李建雄，1992)；微纖維素(fivrillin)，形成微纖維的醣蛋白，且為彈性纖維的成分之一；纖維網蛋白(fibronectin)負責將不同胞外基質組成間的黏合作用。細胞外間質雖為無生命，卻會影響細胞流動性

及生長、非纖維組織基層形成。

2.4.2 紫外線對膠原纖維之影響

皮膚大約占體重的 16%，由內而外可分為皮下組織、真皮層和表皮層等三層（趙偉康、劉平、洪嘉禾、沈松法與孔穎，1989）。皺紋的形成與真皮層中的酸溶性膠原蛋白含量下降有關，而皮膚經 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以致真皮層中膠原蛋白含量減少。Kambayashi 等人研究指出，利用 UVA 14 J/cm² 與 UVB 20 mJ/cm² 每週照射裸鼠三次，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 (Kambayashi et al., 2001)。另外 Takema 等人研究指出以較高的 UVB : 305 nm，61 mJ/cm² 照射劑量，每星期三次照射裸鼠，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皺紋產生，而到第六個星期時則有粗糙皺紋形成，此外，皮膚皺紋加深的程度會隨照射時間增加而加深 (Takema, Hattori, & Aizawa, 1996)。

2.4.3 紫外線對彈性纖維之影響

Imokawa 研究指出，三週大的 Sprague-Dawley rat，分別經由 UVA

27 J/cm², 3 times/week 及 UVB 130 mJ/cm², 5 times/week 照射之後，引起彈性纖維蛋白立體結構扭曲，又以 UVB 較易引起彈性蛋白扭曲；也指出紫外線照射對於年齡小的老鼠其彈性纖維變異程度影響較大，並推測皺紋產生的原因可能是彈性纖維形成不可逆的變形；也有可能因為紫外線造成彈性纖維降解與干擾纖維母細胞利用細胞外間質合成直線性彈性纖維過程而無法維持皮膚平滑。此結果與 Lavker 與 Kaidbey 以年齡 18~28 歲皮膚性質相似的人，利用不同 UVA 波長，每次照射劑量為 35 J/cm²，於一天之內照射劑量達 315 J/cm²，其結果會使彈性纖維扭曲變形之結果相同(Lavker & Kaidbey, 1997)。另外 Schwartz 等人研究指出，以 UVA 25~35 J/cm² 與 UVB 0.3~0.7 J/cm²，每星期照射人體皮膚兩次，造成真皮層內彈性纖維的含量減少。故推測，長期的紫外線照射，會造成皮膚中彈性纖維扭曲變形與合成量降低。

2.5 珍珠粉對改善皮膚疾患之相關文獻

《證類本草·卷二十》、《雷公炮製藥性解·卷六》、《馮氏錦囊秘錄·雜症痘疹藥性主治合參卷四十七》等醫著認為，珍珠粉敷面令人潤澤好顏色。粉點目中，主膚翳障膜，《本草蒙筌·卷十一》認為珍珠粉，敷面潤顏色，《本草征藥·卷四》認為珍珠粉外用收口生肌，

塗面駐顏潤澤，《經驗奇方·卷上》認為珍珠粉可治下疳陽物腫痛破爛等症，用米泔水洗淨患處，日搽數次，數日即愈。《惠直堂經驗方·卷三》認為珍珠粉可治下疳破爛，痛不可忍，及諸瘡新肉已生，不能生皮，並湯火瘡，破爛痛甚者俱效。以上顯示古老醫著已經探討珍珠粉對於皮膚之功效。現代人追求美麗，希望能延緩皮膚老化之速度，蕭(2007)認為珍珠粉具有抗氧化性質，並以線蟲模式探討，發現珍珠粉可以延長線蟲壽命。因此坊間許多珍珠霜、珍珠面膜等產品亦訴求可以美白、促進皮膚修復等（蕭夙君，2007）。

近年來，珍珠粉被用在抗氧化 (Xu, Huang, Gao, Gao, & Han, 2001)、抗衰老、抗輻射及抽筋 (Cao, Xu, Wei, Yao, & Liu, 1996)。在臨床的應用上珍珠粉被證實對復發性口腔潰瘍、胃潰瘍、十二指腸潰瘍的治療有顯著功效 (Ruan, Wu, & Wu, 2004)。

創傷修復(wound repair)是一個很複雜的生理過程。過程中纖維母細胞扮演重要角色，纖維母細胞可分泌膠原蛋白(collagen)、纖維結合素 (fibronectin) 來生成新的葡萄糖胺聚糖及肉芽組織、分泌生長因素以刺激細胞增生、分化及其他與細胞遷移有關的創傷修復、促進肌纖維母細胞的遷移和分化以加速創傷表面的癒合。經由體外實驗顯示增加纖維母細胞的數目可以促進創傷修復 (Lamme, Van Leeuwen,

Brandsma, Van Marle, & Middelkoop, 2000)。纖維母細胞及其功能在組織修復的初始階段，通常被認為是很重要的 (Dong & Shi, 2006)。

Jian-Ping 等人研究珍珠粉水萃取物及其區分物對纖維母細胞在創傷修復上的機轉，其利用三角帆蚌珍珠粉之水萃取物 (WSM) 及其水不溶部分的分子量區分物(demineralized water insoluble residue, MR)中 MR14 (>14 kDa)，MR3-14 (3-14 kDa)，MR3 (<3 kDa) 等四種物質對纖維母細胞 (fibroblast) 生長之影響。以 MTT (3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)分析法、氯胺 T 法 (chloramine T method)、蛋白酶電泳法(gelatin zymography) 和酵素聯結免疫吸咐分析法(ELISA)等來探討 WSM, MR14, MR3-14, 和 MR3 對小鼠初代口腔纖維母細胞的增生、膠原蛋白累積、基質金屬蛋白酶-2,-9 活性 (MMP-2,-9) 及金屬蛋白酶組織抑制因數 1 (TIMP-1) 的影響。結果顯示，WSM 及 MR14 可明顯促進纖維母細胞的增生 ($p<0.05$)，所有組別皆可促進膠原蛋白累積，MR14 可抑制 MMP-2 的活性($p<0.05$)，所有組別皆可促進 TIMP-1 的生成，結果證明珍珠粉促進創傷復原的機制，部分原因是刺激纖維母細胞的有絲分裂，膠原蛋白累積，TIMP-1 的生成，而其中最主要的活性部分應為 MR14 的區分物。因此可以推測珍珠粉萃取物可溫和的促進傷口癒合，

其作用機轉似乎可以啟動纖維母細胞的有絲分裂，促進細胞外基質的沈澱，並使 TIMP-1 的生成量增加。根據上述結果得知，MR14 可以顯著促使纖維母細胞的增生，促進膠原累積，抑制 MMP-2 的活性，還可以增加 TIMP-1 的生成。所以本研究認為 MR14 是珍珠粉中最主要的活性區分物，MR14 或許可用來研發成治療創傷的藥品 (Jian-Ping et al., 2010)。

2.6 珍珠粉對肥胖之影響

人類在青春期以後體重的增加絕大部分是由脂肪組織的增加，因此肥胖症之形成基本上是因體內脂肪堆積所致。脂肪組織是由脂肪組成，脂肪組織 (adipose tissue) 的形成和體內能量恆定調節有關，當能量過多時會導致脂肪細胞內三酸甘油酯貯存增加，因此引起肥胖的原因與脂肪細胞數目增加(hyperplasia)和脂肪細胞肥大(hypertrophy)均有關 (Rosell, Hakansson, & Wolk, 2006)。

2.6.1 肥胖之機轉

肥胖症是指身體由於生理或生化機能之改變而引起體內脂肪過度沉積，造成體重增加之病症。WHO 與 FDA 已經於 1996 年將肥胖列為慢性疾病之一，強調「維持理想體重」之重要性。而肥胖症可分

為以下兩種：一、單純性肥胖 (simple obesity)：又可分為體質性肥胖和獲得性肥胖兩種。體質性肥胖是指脂肪細胞數目較多所引起之肥胖症，常見於兒童時期之肥胖。另外，獲得性肥胖則是指脂肪細胞增大所引起之肥胖，常見於成年時期之肥胖症。而 95% 以上之肥胖症是屬於單純性肥胖症。二、續發性肥胖 (secondary obesity)：由於內分泌或代謝性疾病等所引起之肥胖症，亦稱為症狀性肥胖 (symptomatic obesity)。一般而言，保健食品可做為不易形成體脂肪所應用之原理如下：

一、調節體內脂質分解作用－活化激素敏感性脂解酶 (hormone-sensitive lipase)：不易形成體脂肪之過程就是體內脂肪動員作用之過程。許多不易形成體脂肪食品乃是利用其中可以促進脂肪組織分解之物質，減少體脂肪，以達到體重降低之目的。而身體中存於脂肪組織之激素敏感性脂解酶 (hormone-sensitive lipase)，可以促進脂肪組織中三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 之分解，乃是脂肪分解作用之關鍵酵素。

二、調節消化道消化及吸收之功能：不易形成體脂肪食品中亦有許多可以影響消化道消化及吸收之物質，藉此作用減少營養素之吸收，例如：抑制胰脂解酶之分解作用，減少腸道中脂質之分解；或抑制胰澱

粉酶和雙醣酶之活性，減少澱粉和雙醣類之消化分解；或促進消化道蠕動，使食物快速通過，減少營養素之消化與吸收等(行政院衛生署，2007)。

2.6.2 前驅脂肪細胞 (3T3-L1) 與肥胖的相關研究

目前可供研究脂肪細胞形成的 adipocyte precursor 細胞株可分為二類：一為 pluripotent fibroblasts，包含 10T1/2、BALB/c 3T3、1246、RCJ3.1 和 CHEF/18 等；另一為 unipotent preadipocytes，如 3T3-L1、3T3-F422A、Ob1771、TA1 和 30A5。3T3-L1 細胞株，是研究脂肪細胞生成作用(adipogenesis)常用的研究模式。其中 3T3-L1 和 3T3-F422A 為由 Swiss 3T3 品系小鼠的胚胎中分離出來的，可以由前驅脂肪細胞(preadipocytes)轉換成脂肪細胞(adipocyte)，是最常被使用於研究 adipogenesis 和脂肪細胞特性之材料(Green & Kehinde, 1975)。將 3T3-L1 preadipocytes 植入小鼠身上，此 preadipocytes 會自發形成脂肪細胞，且與小鼠原有的脂肪細胞不易分別(Green & Kehinde, 1979)。由於動物身上的脂肪細胞，可分白色脂肪細胞和棕色脂肪細胞兩種，經觀察研究，3T3-L1 adipocyte 的形態、胞內結構和油滴大小、分佈樣式均與動物身上白色脂肪細胞相似，白色脂肪細胞主要負責脂肪之儲存，而棕色脂肪細胞主要功能為體熱之生成以便調節體溫。

2.6.3 珍珠粉相關萃取物對肥胖之影響

Liu 及 Hasegawa(2006)曾使用體內及體外試驗證實，Wistar 大鼠餵食研粉後之扇貝殼粉，28 天後大鼠體重降低，白色脂肪也降低，血液中三酸甘油脂之濃度亦顯下降，且肝、腎、睪丸、脾臟、胰臟之脂肪組織並無明顯之影響，認為扇貝殼粉中之有機成分可以促進體脂肪之分解，進而導致降低大鼠體脂肪中之體脂肪組織(adipose tissue)此外，研究並發現老鼠攝取扇貝殼粉可使體重降低，且並無其他副作用，其粗抽物能有效減少脂肪細胞之油滴累積，有效抑制磷酸氫酶反應，能促進 3T3-L1 細胞在分化過程中之脂肪分解。而在其研究中使用之扇貝殼粉為將外殼去除後所保留之珍珠層來試驗，其成分即為珍珠蚌所分泌之珍珠層，亦即類似珍珠粉之成分，因此預期攝取珍珠粉可能具有減重作用。進一步發現是由於大鼠 UCP1 基因的表現，使體重降低 (Liu & Hasegawa, 2006)。

綜合以上所述，珍珠粉之成分主要類似於貝殼之珍珠層，應該可以降低脂肪細胞，因此本研究擬以小鼠作試驗，以進一步瞭解其有效劑量，同時確認其安全性。

第三章 材料與方法

3.1 實驗藥品

acrylamide: Sigma (Cat. No. A-8887)

bromophenol blue: Sigma (Cat. No. B-8026)

L-Buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO): Sigma (Cat. No. B-2515)

dimethyl sulfoxide, DMSO: Sigma (Cat. No. D-2650)

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT:

Sigma (Cat. No. M-5655)

dithiothreitol, DTT: Sigma (Cat. No. D-9779)

ethidium bromide, EtBr: Sigma (Cat. No. E-8751)

agarose: Amresco (Cat. No. 0170-500G)

Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate: Bio-Rad (Cat. No. 500-0006)

bis-acrylamide: Promega (Cat. No. 110-26-9)

boric acid: Merck (Cat. No. 100165)

bovine serum albumin, BSA: Merck (Cat. No. 112018)

coomassie brilliant blue: Merck (Cat. No. 12553)

DMEM: GibcoBRL (Cat. No. 12100-038)

fetal bovine serum, FBS: Gibco BRL (Cat. No. 26140-079)

ammonium persulfate: Gibco BRL (Cat. No. 5523UA)

ECL Western blotting detection reagents: Amersham (Cat. No. RPN 2106)

ethanol, EtOH: Merck (Cat. No. 100983)

ethylenediaminetetraacetate, EDTA: Merck (Cat. No. 108418)

Hoechst 33342: Sigma (Cat. No. B2261, USA).

Nile red: Sigma (Cat. No. 72485, for microscopy, USA)

3.2 儀器設備

bright-line hemacytometer: Hausser Scientific

CO₂ incubator: Espec (Model BNA-211)

centrifuge: Kubota (Model 5700 and KR-1500)

densitometer: Molecular Dynamics (Model 375A)

dry bath: cool blockbath: Sun Kuan (Model SKC-40)

dry bath: Thermolyne (Model 17600)

gel electrophoresis system: protein mini-gel electrophoresis system:

Bio-Rad (Mini-PROTEAN II)

DNA gel electrophoresis system: Cosmo Bio (Model Mupid-2)

hot plate stirrer: Corning (Model PC-320)

incubator: 光勝科儀 (Model KS-31D)

laminar flow: 海天科儀 (Model 6BH-24)

microscope: light-field microscope for immunohistochemistry: Olympus
(Model BH-2)

連續式低溫超音波震盪洗淨機: 漢田生物科技股份有限公司 (見圖 1),

新型專利第 M429530 號。

乾式低溫珍珠研粉機: 漢田生物科技股份有限公司 (見圖 2), 新型專

利第 M387702 號。

雷射粒徑分佈儀：Horiba, Model LA-950

感應耦合電漿質譜儀(ICP/OES)：ICP/MS (Agilent, Model 7500CE)

感應耦合電漿質譜儀(ICP/OES)：ICP/OES (Perkin Elmer, Model 4300DV)

螢光偵測器：(Agilent, Model HPLC 1100)

3.3 實驗用珍珠粉規格

本研究使用之珍珠粒取自人工淡水養殖之三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)，來源為中國大陸浙江省諸暨市。

本研粉機所研磨出之珍珠粉，其微米級之粒徑，平均大約在 1.2 到 7.9 微米，奈米級之粒徑，其平均約在 550 到 700 奈米之間，兩者平均後可稱為超微珍珠粉，因此本研究之後動物試驗所使用之珍珠粉，並不強調奈米或微米級。

圖 5 為珍珠粉之粒徑分析，由圖可知，經由乾式研粉機研磨至細粉，其平均粒徑為 562 nm，屬於次微米級之顆粒，過程中完全無水份，並使用液態氮降溫，其研粉溫度不高於 40°C。

3.4 實驗方法

3.4.1 低溫超音波洗淨

取適量珍珠，經 40 °C 以下低溫(室溫下)超音波振盪檢洗珍珠，以頻率 10000 次/秒的高速震盪在液體中傳導，推動介質的作用，使液體分子間產生壓力變化，形成空穴效應(cavitation phenomenon)。利用無數微小的真空汽泡在震盪受壓破裂時，發生強大衝擊力，將珍珠表面及細縫死角汙物剝離，並連續性自動進水與排水裝置，以維持低溫，經不斷地沖洗珍珠，以有效徹底洗淨且能去除珍珠特有的腥味，接著再以傳統炮製法或低溫乾式研磨法製備珍珠粉。

3.4.2 傳統炮製製備珍珠粉

參考張和蔡(1995)作法稍作修改(張哲賢、蔡貴花，1995)，先將珍珠做前處理，取 375 g 珍珠，使用前述之超音波震盪洗淨後，在冷藏庫下以牛乳浸煮三日，清洗晾乾，裹紗布備用。另取 600 g 板豆腐，挖成槽狀。將珍珠放入槽中，上面同時覆蓋豆腐，於蒸籠內蒸 1 小時。取出珍珠，以清水洗淨，接著再以低溫乾式研磨法粉碎至細粉，稱為傳統炮製法(牛奶豆腐同煮法)製備珍珠粉。

3.4.3 低溫製程製備珍珠粉

取 25kg 珍珠置入粗碎機中，初級粉碎至粗顆粒，粗顆粒繼續置入乾式低溫研粉機中繼續研粉，過程中沖入液態氮氣將研磨中之珍珠降溫，由於液態氮之溫度為零下 196⁰C，控制研磨過程中，珍珠粉之溫度不超過 40⁰C，以避免珍珠蛋白之變性破壞，稱為低溫製程製備珍珠粉。

3.4.4 珍珠粉之重金屬、微量礦物質、巨量礦物質分析

珍珠粉之重金屬、微量礦物質、巨量礦物質分析，參考 USEPA 3051 方法，以感應耦合電漿光譜儀(IEP/OES, Model 4300DV)檢測。

3.4.5 珍珠粉粒徑分析

使用雷射粒徑分析儀(Horiba, Model Partica LA-950)，其檢測極限 0.03 μm。

3.4.6 珍珠蛋白之胺基酸成分分析

珍珠蛋白樣品先以 6N 水解 24 小時，中和，溶液萃取及稀釋，用自動注射裝置使樣品溶液分別與過量 OPA 及 FMOC-CI 進行衍生化後，利用 HPLC 逆向層析管柱作梯度溶離分析，再以螢光偵測器檢測。

本實驗部分委託台灣檢驗科技股份有限公司(SGS)分析。

3.4.7 珍珠水溶性蛋白分析

3.4.7.1 珍珠粉水溶性蛋白質之萃取

取經不同炮製法之兩種珍珠粉各 50 g，分別溶於 500 ml 10% 醋酸溶液中，再將上清液經三道過濾(無菌濾紙、0.45 μm 及 0.22 μm)。濾液用蛋白濃縮離心管(10,000 MMW-cutoff)進行濃縮。濃縮至體積約為 10 ml 時，加入 0.1 M Tris(pH 8.0)透析去鹽，即為水溶性珍珠蛋白萃取物，作為分析之用。

3.4.7.2 珍珠粉水萃物之蛋白質電泳分析

1. 溶液配製：

(1) 30% 聚丙烯醯胺/bis-聚丙烯醯胺 stock 溶液

取 150g 之聚丙烯醯胺/bis-聚丙烯醯胺(聚丙烯醯胺: bis-聚丙烯醯胺=29:1)，內含 145 g 聚丙烯醯胺及 5 g bis-聚丙烯醯胺，溶解於去離子水中，體積調至 500 mL 後，以濾紙重力過濾至棕色血清瓶，即為 30% 聚丙烯醯胺/bis-聚丙烯醯胺 stock 溶液，保存於 4°C 備用。

(2) 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

取 18.15 g 的 Tris- base 溶於水中，以 1N HCl 調整其 pH 值至

8.8，再加水至終體積為 100 mL。

(3) 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

取 6 g 的 Tris-base 溶於水中，以 1N HCl 調整其 pH 值至 6.8，再加水至終體積為 100 mL。

(4) 10X 電泳緩衝液

秤 30 g Tris-base、144 g 甘氨酸 (glycine) 及 10 g 十二烷基硫酸鈉 (SDS) 溶於去離子水中，體積調至 1 L 後，保存於室溫備用。使用時以去離子水稀釋成 1X 使用。

(5) 2X 樣品緩衝液

取 2 mL 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)，4 mL 10% 十二烷基硫酸鈉，2 mL 2% 溴酚藍 (bromophenol blue)，2 mL 甘油 (glycerol) 及 0.3 g DTT，體積調至 10 mL 後，保存於 4°C 備用。使用時與蛋白質溶液等體積混合。

2. 凝膠之製備：

(1) 裝置

將玻璃片、梳子、間隔板(spacer)以 70% 乙醇擦拭乾淨，將玻璃片及間隔板組合好固定於製膠架(casting stand) 上，確定玻璃片與間隔板底邊呈一直線，以防止製膠時滲漏。

(2) 10%分離凝膠 (separating gel)之配方與製備

取水 4 mL，30% 聚丙烯醯胺 3.3 mL，1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 mL，10% 十二烷基硫酸鈉 0.1 mL，10% 過硫酸銨(ammonium persulfate) 0.1 mL，TEMED 0.006 mL，配好之凝膠溶液，注入兩片玻璃中間至距離小片玻璃頂端 1.5 公分處，於溶液上方小心地加上一層去離子水，約一小時後凝膠即形成。將水倒掉後備用。

(3) 5%焦集凝膠之配製

取水 3.4 mL，30% 聚丙烯醯胺 0.83 mL，0.5 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 0.63 mL，10% 十二烷基硫酸鈉 0.05 mL，10% 過硫酸銨 0.05 mL，TEMED 0.005 mL，配好之凝膠溶液，加在分離凝膠上方並放入梳子，約 30 分鐘後凝膠即形成。梳子拿掉後即形成容納樣品之槽。

3. 蛋白質樣品之處理：

取適量 (10-40 mg) 之蛋白質溶液與等體積之 2X 樣品緩衝液混合後，在 100°C 下煮 7.5 分鐘，迅速於冰上冷卻後於 4°C 下，11000 × g 離心 5 分鐘後，分別取 5μL, 10μL 上清液進行電泳分析。

4. 電泳之操作方法：

將做好之凝膠固定在電極架上，置於電泳槽中，電泳槽內裝有 1X 電泳緩衝液。將蛋白質樣品注入樣品槽中，以 15 毫安培培培培

的固定電流進行電泳。待追蹤染料 (tracking dye) 進入分離凝膠時，則改為 30 毫安培的固定電流進行電泳。

3.4.8 珍珠蛋白之濃度分析

使用 Bradford protein-binding assay 方法定量分離純化後之珍珠蛋白，以 bovine serum albumin (BSA) 之標準濃度來分析珍珠蛋白含量，利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 染劑與蛋白質結合形成藍色複合物，使用以 ELISA reader 在 595 nm 偵測。將已知濃度 BSA 標準品稀釋，於每個 well 中加入 200 μ L 已稀釋的 BCA protein reagent (以原液 1:4 稀釋於二次水)，再分別加入標準品稀釋液 10 μ L 與珍珠蛋白濾液 (10 μ L/well)，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 10 分鐘，利用 ELISA reader 偵測吸光值。利用已知之 BSA 標準品製作檢量線，換算出珍珠蛋白濃度。

3.4.9 皮膚纖維細胞(HS68) 及前驅脂肪細胞(3T3-L1)之培養

本實驗參考 Ho 等人(2005)之方法，使用皮膚纖維細胞(HS68)來探討，採用 100 mm 之培養盤，懸浮培養在 DMEM 含 10% FBS 及 1% 之抗生素及抗真菌素之培養基中，培養在 37 $^{\circ}$ C 之培養箱，通以 5% 二氧化碳及 95% 空氣培養，當細胞超過 80% 時，再稀釋 5 倍使用。

使用 3T3-L1 前驅脂肪細胞第 11 代，以 24 孔盤培養，細胞數為

每孔 1×10^4 個。細胞培養液為 DMEM-10 (10% fetal bovine serum) , 經 48 h 培養後進行更換, 培養箱溫度為 37°C , 5% 二氧化碳。前趨脂肪細胞誘導分化試劑為 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ insulin 、 0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX) 、 1 mM dexamethasone 之混合液, 其方法如(圖 4)。



3.4.10 UV 照射誘導細胞老化

本研究使用手提式紫外線燈管(Vilber Lourmat)以波長 280 nm 照射誘導細胞老化。照射 5 分鐘之劑量為 100 mJ/cm^2 ，照射 10 分鐘之劑量為 200 mJ/cm^2 (Ho et al., 2005)。

3.4.11 細胞存活率測定: MTT Assay

本研究使用 MTT 法，利用活性細胞中粒腺體酵素(mitochondria succinate dehydrogenase) 會將 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 還原成紫色 formazan 結晶，將結晶溶解後分析光學密度(optical density) 值以代表活性細胞之數量。以酵素免疫連結測定儀 ELISA Reader 偵測 550 nm 之吸光值(OD_{550})。細胞相對存活率($\%$)= $(\text{藥物處理組 } \text{OD}_{550} / \text{對照組 } \text{OD}_{550}) \times 100\%$ 。

3.4.12 細胞衰老試驗 (SA- β -gal)

本研究藉由分析已知的細胞老化標誌 (Enescence-associated -galactosidase) 進行細胞老化試驗。將 HS68 以 1×10^5 之密度種於 12 well 圓孔盤(內放玻片)，分別以 UVB 照射 5、10 分鐘，經 16 小時，移除培養液，用 1 ml 的 PBS 洗一次，加入 0.5 ml 的 Fixative Solution 於室溫下反應 10–15 分鐘，接著配製染色試劑混合液，每一 well 需

470 μL 的 Staining Solution、5 μL 的 Staining Supplement、25 μL 的 20 mg/ml X-gal 在 DMF 中，再將與 Fixative Solution 反應後的細胞以 PBS 洗兩次，加入 0.5 ml 的染色試劑混合液到每個 well 中，於 37°C 培養箱中培養至隔夜後，用 PBS 洗一次，將玻片取出，覆蓋於在玻片上，以顯微鏡檢視細胞被試劑染色之情形並計算正常細胞與老化細胞的數目。前處理稀釋 100 倍的低溫製程及傳統炮製珍珠蛋白 1 小時，以 UVB 照射 5 分鐘，經 16 小時後進行 SA- β -gal 染色，計算正常細胞與老化細胞數目以評估不同製程之珍珠粉水草物對 UVB 導致細胞老化的保護作用。

3.4.13 Nile Red 油滴染色測定細胞內中性脂肪含量

Nile Red, DMSO 購自 Sigma (USA)。Nile Red 粉末以每 0.5 g/100 mL 異丙醇的濃度作為儲備溶液，使用前以 0.22 μm 濾過去除雜質。每次染色前取 6 mL 儲備溶液與 4 mL 去離子水混合成為作用溶液。細胞在 24 孔盤中於特定天數下以 PBS 清洗，再用 10% 福馬林固定保存於 4°C 冰箱 1 h，之後以去離子水清洗每孔再加入 Nile Red 作用溶液 1 mL 避光染色 15 分鐘，再以去離子水清洗數次，加入 0.5 mL 異丙醇退染 15 min 後於 540 nm 下測定吸光值，吸光值越高代表油脂含量越高。

3.4.14 珍珠粉對高脂飼料誘導小鼠肥胖之影響

參考健康食品之不易形成體脂肪功能評估方法(衛署食字第 0960403113 號公告)(行政院衛生署, 2007), 以高熱量飼料誘發實驗動物之肥胖症後, 投與受試物, 並利用各種評估指標判定。

取 ICR 公鼠 40 隻, 隨機分組, 分為對照組(control group, normal diet), 攝取基礎飼料, 高熱量組(high energy group, HE), 攝取高脂飼料。對照組以正常飼料飼養, 而 HE 組以高熱量飼料飼養。飼養至少 4 週後, 確定 HE 組之體重顯著高於對照組 20% 後($p < 0.05$), 依照有無投與受試物以及投與劑量之高低分成四組(HE, HE/1x, HE/2x, HE/3x)。

取 10 g 珍珠粉及 10 mL 蒸餾水混勻, 製備珍珠粉溶液濃度為 1 g/mL, 其中一組為不投與珍珠粉溶液組(HE), 根據珍珠粉攝取之最高限量, 每日投與 2 次珍珠粉溶液, 每次管灌投與量為 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL 之劑量, 即為 HE/1x, HE/2x, HE/3x 組, 每組至少 8 隻實驗動物, 共 40 隻。再飼養至少 4 週後, 共飼養 72 天, 犧牲實驗動物, 每 3 天量測體重變化。

第四章 結果

4.1 珍珠粉粒徑分析

如圖 5 所示，取低溫研磨之珍珠粉，以雷射粒徑分佈儀(Horibal Model LA-950)檢測之，在寬的動態範圍內(0.01 - 3000 μm)測量顆粒尺寸分佈。檢測出之粒徑(D50)分別為 0.542, 0.659, 0.550, 0.562, 0.603, 0.595，取 6 次平均粒徑應為 $585 \pm 44 \text{ nm}$ 。

4.2 珍珠粉重金屬、微量礦物質、巨量礦物質分析

表 2 顯示重金屬、微量礦物質、巨量礦物質之分析結果，發現重金屬中，傳統炮製之砷、鉛、汞、鎘分別是 0.056, 0.041, 0.118, 0.207, 0.459 ppm，低溫製程均比傳統製程減少，降低約 42%~54%。

比較微量礦物質之結果，傳統炮製與低溫製程，所檢出之結果其差異量有增加亦有減少。比較巨量礦物質中鈣、鎂的含量，結果顯示傳統炮製與低溫製程，所檢出之結果極為相近，並無明顯差異。

4.3 珍珠粉水萃取物胺基酸成分分析

表 3 為珍珠粉水萃取物之胺基酸成分分析，發現共有 17 種胺基酸，因一般組成蛋白質的主要胺基酸共有 20 種，顯示並非每種胺基

酸均存在於珍珠粉中。其中，傳統炮製之胺基酸總含量為 19.25 mg/g，低溫製程之胺基酸總量為 25.65 mg/g，相差 6.4 mg/g，顯示在炮製過程中，低溫製程可以減少胺基酸流失。

傳統牛奶與豆腐法所製備之炮製法，因為長時間高溫加工過程，不僅工序繁瑣、曠日費時，更可能會破壞珍珠中的蛋白質。而利用現代超音波震盪洗淨珍珠後，直接以乾式低溫研磨，所分析出之胺基酸含量較高，顯示高溫蒸煮過程或加牛奶過程會減少對珍珠中胺基酸的含量。

Marie 等人(2012)發現珍珠母貝殼(*Pinctada pearl oyster*)中含有大量的甲硫胺酸(Methionine)，進一步發現蛋白質之主要分子量為 34 kDa，將之命名為 MRNP34 蛋白質(methionine rich protein)，該研究提出 MRNP34 為生物礦物化(biomineralization)之主要疏水性蛋白(hydrophobic protein)，與現有發現脂蛋白並不相同。再由本研究分析之胺基酸比例，甲硫胺酸之含量並不多，故應非 MRNP34 (Marie et al., 2012)。

4.4 珍珠粉水萃物之蛋白質分離

在珍珠粉水溶性萃物之蛋白 SDS-PAGE 分析時，發現珍珠粉水不溶性萃物中含有大量之混合蛋白，但在分離過程中，發現無法

清楚分離出，參考 Marie 等人(2011)之研究，其認為貝殼所含之少量蛋白中含有醣蛋白，推測可能是蛋白質分離過程中，有部分之蛋白質與糖類形成醣蛋白(glycoprotein)導致蛋白質不易分離。另外，猜測可能在蛋白質的萃取液中，可能尚含有相關鹽離子導致蛋白質之帶電性，使珍珠蛋白不易分離。故將原蛋白再經過 3 天之脫鹽處理，分析其蛋白質混合物，發現蛋白質可以清出分離出(圖 6)，顯示珍珠蛋白須經過長時間之脫鹽處理才能夠清楚分離出。

以醋酸水解方式再經過脫鹽以製備純化後之珍珠蛋白，並再以 SDS-PAGE 分析其蛋白質，發現珍珠粉水不溶性萃取物中，在 26 與 50 kDa 部分有大量蛋白質，顯示可能為主要之珍珠蛋白，尤其以 50 kDa 含量最高(圖 7)，Marie 等人(2012)指出在 34 kDa 部分有蛋白質，稱為 MRNP34，但進一步比對胺基酸分析之結果，發現此 26 與 50 kDa 之蛋白質應該不是 MRNP34，而是另有他物。進一步比較分析，其所使用之珍珠層萃取物，實為分別來自於法國之 *Pinctada margaritifera* 及來自於澳大利亞之 *P. maxima*(大珠母貝)，比照上述胺基酸含量之分析結果，顯示不同品種之間其珍珠蛋白應有差異，且珍珠層萃取物與珍珠粉之有機萃取物，其成分也是不同的 (Marie et al., 2012)。

進一步以 BSA 方法測定蛋白質含量，表 4 顯示其蛋白質含量在低溫研磨法為 4.23 mg/mL；而傳統高溫炮製法為 3.48 mg/mL，顯示低溫乾式研磨法可以減少蛋白質之流失 17.7%。第二次再比較傳統炮製法與乾式研磨法製備之珍珠蛋白之蛋白質含量分析，發現傳統炮製法，減少珍珠蛋白之含量為 14.5%，故本研究認為乾式研粉法可以減少珍珠蛋白之流失量應為 14.5~17.7%，量雖然不多，但對功能性是否有差異需要進一步之探討，因為傳統高溫炮製法經過長時間之加熱，而許多蛋白質在溫度超過 55°C 下即變性，因此可以預期會造成蛋白質之變性。

4.5 珍珠粉水草物之安全性與 UV 造成皮膚纖維母細胞老化之保護作用

將 HS68 分別處理各種濃度(0.1、0.5、1 mg/mL)的低溫製程及傳統炮製珍珠粉水草物 1 小時，經 24 小時和 48 小時培養後，結果顯示，二種炮製方法之最高濃度的珍珠粉水草物對細胞並沒有顯著毒殺作用(圖 8)。

HS68 細胞分別以 UVB 照射 5、10 分鐘，接著培養 16 小時後進行 SA-β-gal 染色。結果顯示 UV 照射 5 分鐘劑量造成 50%細胞老化，UV 照射 10 分鐘時細胞數量明顯減少(圖 9)，顯示 UVB 照射 10 分鐘

會造成細胞大量死亡。前處理 1 mg/mL 的珍珠粉水萃物 1 小時，接著以 UVB 照射 5 分鐘，培養 16 小時後進行 SA- β -gal 染色。結果發現經前處理珍珠粉水萃物的細胞，皆比單獨照射 UV 對照組的正常細胞數量還要多，老化的細胞也較少(圖 10)，另外，低溫製程的效果也比傳統炮製略佳，但在統計上仍無顯著差異。

4.6 珍珠粉水萃物對前驅脂肪細胞生長趨勢之影響及安全劑量

3T3-L1 細胞培養至第二天分別以不同濃度 (0.1、0.5、1 mg/mL) 的低溫製程珍珠粉水萃物處理，經 48 小時處理後，以 MTT 法偵測珍珠粉水萃物對細胞存活率，結果發現不同藥物濃度處理後之細胞數與控制組比較並無顯著差異，顯示珍珠水萃物對前驅脂肪細胞 (preadipocyte) 生長無抑制作用，亦不會造成細胞毒性(圖 12)。3T3-L1 細胞培養到第 6-8 天誘導分化成功之脂肪細胞 (圖 11)，分別以不同濃度 (0.1、0.5、1 mg/mL) 的珍珠粉水萃物處理，經 48 小時處理後，以 MTT 法偵測珍珠粉水萃物對細胞存活率，結果發現不同藥物濃度處理後之細胞數與控制組比較並無顯著差異，顯示珍珠水萃物對分化後脂肪細胞(adipocyte) 生長無抑制作用，亦不會造成細胞毒性 (圖 13)。另外細胞以 Nile red 染色後也發現，以最高濃度(1 mg/mL) 處

理對脂肪細胞的分化及脂肪堆積並無影響(圖 14)。

4.7 攝取珍珠粉對小鼠體重降低之影響

8 週齡 ICR 公鼠，飼養約 2 週後，分別以基礎飼料與高脂飼料飼養 72 天，每 3 天秤重一次，發現平均體重有明顯增加趨勢(圖 15)，顯示飼養模式是可以增胖的，如圖所示。本次使用之高脂肪飼料與基礎飼料，在體重增加方面，攝取高熱量食物及 3 倍量珍珠粉(即 HE/3x 組)之珍珠粉在飼養第 36 天後，體重已開始降低，而攝取高熱量食物及 1 倍與 2 倍之珍珠粉(即 HE/1x 組, HE/2x 組)，與控制組及空白組 HE 比較，均無明顯之差異。顯示需要大量攝取珍珠粉，才會有降低體重之功能，參考 Liu 等人 (2006) 之研究，發現老鼠攝取扇貝殼粉可使體重降低，且並無其他副作用，其粗抽物能有效減少脂肪細胞之油滴累積，有效抑制磷酸氫酶反應，能促進 3T3-L1 細胞在分化過程中之脂肪分解 (Liu & Hasegawa, 2006)。而在其研究中使用之扇貝殼粉為將外殼去除後所保留之珍珠層來試驗，其成分類似珍珠蚌所分泌之珍珠層，亦即為珍珠粉之成分，因此預期攝取珍珠粉可能具有減重作用。因此本實驗證明大量攝取珍珠粉與扇貝殼粉對動物均有降低脂肪形成之功效，但其機制與對人體安全性仍應建議有後續之研究。

第五章 討論

5.1 珍珠粉粒徑分析

圖 5 為低溫研磨珍珠粉之粒徑分析，由圖可知，經由乾式研粉機研磨至細粉，其 6 次檢測的平均粒徑為 $585 \pm 44 \text{ nm}$ ，屬於次微米級之顆粒，過程中完全無水份，並使用液態氮降溫，其研粉溫度不高於 40°C 。

這兩種做法的最大差異是在證明傳統炮製使用功法一為高溫炮製，一為低溫製程。第二點是若按傳統炮製水飛法為濕式研磨，但此次研究僅在前段炮製的比較，以後研究可再針對濕式研磨及乾式研磨做交叉比對及研究。

《雷公炮炙藥性解》說明，珍珠研之不細，傷人臟腑，但以現代藥理學來說，珍珠粉主要成分為碳酸鈣，陳(2008)分析其含量為 90.0% (陳相訓，2008)，然碳酸鈣已知為傳統與合法之鈣質補充劑(calcium supplement)，如果攝取大劑量之大粒徑珍珠粉，應僅為消化吸收問題，本研究在探討降低體重之動物試驗時，若大量攝取珍珠粉，發現未消化吸收之珍珠粉會隨糞便排出，而呈現較白色之糞便，尚未發現有腸阻塞或其他症狀出現，因此本研究認為研之不細應為吸收率之差異，

應不致於傷人臟腑。

傳統炮製珍珠目的多為方便加工研磨，利於人體吸收碳酸鈣，惟其中許多炮製方法，可能使有效成分含量減少，亦即含量在 1~5% 的珍珠蛋白及有機物質，因此本研究藉由珍珠有關中藥典籍的探討，對不同珍珠炮製過程進行成分分析及研究，並能建立珍珠炮製的標準，達到最大的功效。由於傳統珍珠的炮製方法有其時代背景及限制，經由相關文獻考據發現，傳統炮製珍珠目地多為方便加工研磨，便於人體吸收碳酸鈣，惟炮製方法中，若會使功能性成分降低或破壞，已失去其意義，現代炮製中藥的技術多沿用明、清的理論和方法，希望藉由現代研究方法改善珍珠炮製工序，以提高其使用價值。

5.2 珍珠粉重金屬、微量礦物質、巨量礦物質分析

表 2 顯示重金屬、微量礦物質、巨量礦物質之分析結果，珍珠粉是一種常見的中藥，其含有多種胺基酸、礦物質。由各種微量元素之分析結果顯示，以傳統炮製與低溫製程之平均計算，珍珠粉主要含錳(545 ppm)、鎂(45.0 ppm)、鐵(6.74 ppm)、鋅(1.63 ppm)、銅(0.353 ppm)、鉻(0.28 ppm)、硒(0.09 ppm)等元素，其中除硒之外，其餘均為金屬元素。若不計算鈣含量，含量最多者，依序為錳、鎂、鐵、鋅、銅、鉻、硒。

重金屬是影響健康的物質，但其平均含量均在標準範圍內，然而，低溫製程均比傳統製程大大減少，平均降低 41.6%~53.6%。傳統上認為牛奶與豆腐同煮法目的是去除毒性物質，本研究卻發現與預期相反，由於原料來源相同，推測可能的原因是，在豆腐蒸煮或與牛奶同煮過程中，牛奶或豆腐中之重金屬反而會污染珍珠粉，增加重金屬含量。

微量礦物質中，鉻、硒分別降低 25.0%、20.0%，而鋅、鐵、錳分別增加 21.8%、8.5%、9.2%，有增有減，推測應是珍珠粉個別差異所致。巨量礦物質包含鎂及鈣，則幾乎無差異。據陳(2008)研究，以三角帆蚌珍珠粉中之主要成分為碳酸鈣(CaCO_3)，其中鈣含量占整個珍珠粉之 35.9~36.2%，其研磨方法亦使用乾式研粉，本研究與該研究之結果相似(陳相訓, 2008)，但本研究檢測出之鈣含量為 38.6~38.9%，稍高於陳(2008)的研究結果，未來可考慮繼續探討。

5.3 珍珠粉胺基酸分析

表 3 為珍珠粉之胺基酸成分分析，發現共有 17 種胺基酸，一般組成蛋白質的主要胺基酸共有 20 種，顯示並非每種胺基酸均存在於珍珠粉中。其中，半胱胺酸及甲硫胺酸的降低量最大，分別達 91.98% 及 92.12%，且均為含硫胺基酸，推測可能在牛奶與豆腐同煮的過程中，因加熱導致蛋白質之雙硫鍵解開，導致珍珠蛋白變性、流失，此

與後續的電泳分析結果相似，顯示蒸煮後的珍珠蛋白已經破壞。以胺基酸總量來看，傳統炮製之胺基酸總含量為 19.25mg/g，低溫製程之胺基酸總量為 25.65 mg/g，減少 6.4 mg/g，大約降低 24.95%，顯示在炮製過程中，胺基酸含量明顯減少 1/3，顯示低溫製程可減少 33.2% 的胺基酸流失。以胺基酸種類來說，含量最多為丙胺酸(Alanine)及甘胺酸(Glycine)，分別為 3.74 和 3.72 mg/g。半胱胺酸及甲硫胺酸的降低量最大，分別達 91.98% 及 92.12%，且均為含硫胺基酸，推測可能在牛奶與豆腐同煮的過程中，因加熱導致雙硫鍵解開，導致珍珠蛋白變性、流失。

許多學者探討珍珠層蛋白的胺基酸序列，例如 Nacrein 具有 Gly-Xaa-Asn (Xaa 為 Asp, Asn, or Glu) 的重複序列，可能是結合鈣離子的成分 (Miyamoto et al., 1996)。MSI60 及 MSI31 蛋白質則分別是含有許多 Gly-Ala 或 Gly-Glu 重複序列的蛋白質。

近年來有些珍珠層中的微量蛋白質被鑑定出來，例如 lustrin A 是一個黏合的蛋白質 (Shen, et al., 1997)，MSI60 是一個含有豐富 glycine、alanine 胺基酸的結構成分 (Sudo et al., 1997)。N16 (pearlin) 或稱為 N14 系列的蛋白質可以協助碳酸鈣的結晶化 (crystallization)，此外，尚有 perlustrin 蛋白質，具有類似胰島素生長因數的結合蛋白結構 (insulin-like growth factor binding protein) (Weiss, Gohring, Fritz, &

Mann, 2001)。由本研究中胺基酸的分析結果，大量的 glycine、alanine 被鑑定出來，顯示 MSI60 應為珍珠蛋白的主要成分之一。

5.4 珍珠水萃取物之蛋白質分離

表 4 為 BSA 方法測定不同方法之珍珠粉之蛋白質含量，許多動物實驗結果指出，珍珠粉具有抗衰老、抗氧化及清除自由基等功效。以珍珠粉蛋白質萃取物、珍珠粉及去除蛋白質之珍珠粉進行抗氧化性、清除自由基之活性探討，認為珍珠中的蛋白質可能是珍珠粉抗氧化之主要貢獻成分，並以線蟲模式探討抗衰老作用，發現珍珠粉之蛋白質萃取物具有抗衰老作用（蕭夙君，2007）。

針對珍珠活性蛋白進行安全性藥理實驗，認為珍珠蛋白應無藥理毒性，反而許多研究亦認為珍珠蛋白應為珍珠粉之功能性成分，而可能在製備過程中，有功能性之珍珠蛋白已經被破壞或流失，致使功能下降，故本研究探討如何保留研磨或加工過程中珍珠蛋白，並同時定性與定量（黃福星等人，2007）。

使用 BSA 法分析酸萃物之蛋白質，低溫研粉法之蛋白質含量為 4.23 mg/mL，而傳統高溫炮製法之蛋白質含量為 3.48 mg/mL，其降低量為 0.75 mg/mL，降低百分比為 17.7%，略低於胺基酸之分析結果，顯示低溫製程確實可以降低蛋白質之流失。劉(2000)亦認為，珍珠中

胺基酸是有效成分之一，經過高溫炮製後，大部分胺基酸被破壞而影響療效。

圖 7 為比較傳統炮製法與乾式研粉所製備出之珍珠蛋白之電泳圖，由圖發現乾式研粉所能夠保留的蛋白質較多，尤其在分子量 50 kDa 左右之蛋白質最明顯，傳統炮製法所製備出的珍珠粉，許多蛋白質已經破壞，在電泳圖上已經非常稀少。因此建議若欲保留較高之珍珠蛋白，應使用乾式研粉。

至於珍珠蛋白之功能性，極少研究是針對珍珠粉的，但有研究探討珍珠層粉中之蛋白質，大部分脂蛋白成分功能與控制珍珠層之形成有關，如其中 perlucin 及 perlustrin 是從 *Haliotis laevigata* nacre 分離出的蛋白質，而 perlucin 是屬於異質(heterogeneous group)的蛋白(Mann, Weiss, Andre, Gabius, & Fritz, 2000)。Perlustrin 含量較少，是一種類似從 *Haliotis rufescens* nacre 而來的類膠原蛋白(collagen-like collagen)，稱之為 lustrin A (Shen et al., 1997)。Lao 等人(2007)將 *Pinctada fucata* 之珍珠層中之水溶性蛋白成分 P60 分離純化，認為 P60 蛋白質複合物能刺激礦物化結節(mineralized nodule)之形成 (Lao et al., 2007)。某些文獻證實已被分離之 perlucin 可以幫助鈣結晶形成 (Blank et al., 2003)。Shematin 可提供鈣化的蛋白質(Yano, Nagai,

Morimoto, & Miyamoto, 2006), 以動物實驗證實具有誘導鈣化作用 (Gong et al., 2008)。而作用在珍珠層的 lustrin A, perlucin, perlustrin, 這些蛋結構蛋白為與鈣調控機制有關 (Mann et al., 2000; Shen et al., 1997)。但珍珠蛋白中也有分離出水溶性蛋白為如 soluble protein complex P60、P14, 其主要為促進鈣形成 (Lao 等人, 2007), 與色素形成有關的 tyrosinase (Lao et al., 2007; Zhang, Xie, Huang, Chen, & Zhang, 2006), 與鈣抑制的形成的 19 kDa 蛋白質的 N19(Yano, et al., 2007)。

本研究認為, 珍珠粉之珍珠蛋白主要分佈在分子量 50 kDa 之蛋白質, 少量為 26 kDa, 與其他許多人之研究並不完全相同, 因此不同之萃取方法、分析方法, 或原料不同, 將影響珍珠蛋白質之分析結果, 顯見珍珠粉中含量僅 2.0~2.1%的珍珠蛋白, 其蛋白質之差異性與珍珠層粉 (nacre powder) 是有差異的。這些蛋白質是否為功能性蛋白, 仍須繼續探討。

5.5 珍珠粉水萃物對皮膚纖維母細胞之安全性與 UV 造成細胞老化保護作用

在 UV 誘導 HS68 細胞老化實驗當中可以發現以 UV 照射 5 分鐘之後可以明顯增加老化細胞, 但經珍珠水萃物前處理之後可以顯著降

低 UV 所造成老化細胞數目，推測可能與珍珠水萃物會增加細胞內抗氧化酵素活性，學者認為珍珠粉、珍珠粉蛋白質萃取物及去除蛋白質之珍珠粉皆具有抗氧化力及清除自由基的能力且亦證實珍珠中的蛋白質於抗氧化功效上扮演非常重要之角色。同時也利用線蟲模式探討得知可延長其壽命顯是珍珠粉蛋白質具有抗衰老作用，並認為珍珠粉萃取物可以延長線蟲之壽命，其主要功能性物質亦為珍珠蛋白（蕭夙君，2007）。同時我們也觀察到低溫研磨的效果比傳統炮製效果好，推測可能是低溫研磨可以降低珍珠蛋白的損失。

當皮膚暴露於紫外線下，會大量產生自由基而使皮膚產生光老化現象。由於珍珠粉主要的成分為大量的碳酸鈣，占約 90% 以上（陳相訓，2008），碳酸鈣並無抗氧化作用，因此推測，少量的珍珠蛋白可抑制 UVB 所引起纖維母細胞之 ROS。

參考 Jian-Ping 等人(2010)探討珍珠粉水萃取物及其區分物對纖維母細胞在創傷修復上的機轉，以三角帆蚌珍珠粉之水萃取物 (WSM) 及其水不溶部分的分子量區分物 MR14 (>14 kDa)，MR3-14 (3-14 kDa)，MR3 (<3 kDa) 對纖維母細胞生長之影響。以 MTT 分析法、氯胺 T 法 (chloramine T method)、蛋白酶電泳法 (gelatin zymography) 和酵素聯結免疫吸咐分析法 (ELISA) 等來探討 WSM, MR14, MR3-14,

和 MR3 對小鼠初代口腔纖維母細胞的增生、膠原蛋白累積、基質金屬蛋白酵素-2, -9 活性 (MMP-2, -9) 及金屬蛋白酵素組織抑制因數 1 (TIMP- 1) 的影響。結果顯示, WSM 及 MR14 可明顯促進纖維母細胞的增生 ($p < 0.05$), 所有組別皆可促進膠原蛋白累積, MR14 可抑制 MMP-2 的活性 ($p < 0.05$), 所有組別皆可促進 TIMP-1 的生成, 結果證明珍珠粉促進創傷復原的機制, 部分原因是刺激纖維母細胞的有絲分裂, 膠原蛋白累積, TIMP-1 的生成, 而其中最主要的活性部分為 MR14 的區分物 (Jian-Ping et al., 2010)。

珍珠蛋白可能在纖維母細胞的形成中扮演重要角色 (Torita 等人, 2007), 纖維母細胞可分泌膠原蛋白(collagen)、纖維結合素(fibronectin) 來生成新的聚葡萄糖胺及肉芽組織、分泌生長因數以刺激細胞增生、分化及其他與細胞遷移有關的創傷修復、促進肌纖維母細胞的遷移和分化以加速創傷表面的癒合。經由體外實驗顯示增加纖維母細胞的數目可以促進創傷修復(Lamme et al., 2000)。纖維母細胞及其功能在組織修復的初始階段, 通常被認為是很重要的 (Dong & Shi, 2006)。

近年來, 珍珠粉被用在抗氧化、抗衰老、抗輻射及抽筋(Cao et al., 1996; Xu et al., 2001)。由上述實驗結果顯示, 珍珠粉水萃提取物具抗氧化、抗老化及抗光老化的能力, 因此可說明為何自古以來珍珠粉即為

優良的皮膚保養聖品。

5.6 珍珠粉萃取物對前驅脂肪細胞生長趨勢之影響及安全劑量

本研究結果發現高濃度珍珠水萃物並不會對 3T3-L1 脂肪細胞造成傷害，但對於脂肪細胞的分化也沒有影響。Takahashi 針對貝類珍珠層萃取物抑制 3T3-L1 脂肪細胞分化的前趨試驗，用的是貝類萃取物，研究並指出大鼠吃貝類外殼粉末可以降低白色脂肪組織的重量 (Takahashi, et al., 2012)。且該研究認為貝殼粉萃取物抑制 3T3-L1 脂肪細胞的分化具有劑量反應 (dose-dependent manner) 的趨勢，G-3-PDHase 之活性也降低，顯示貝殼粉確實可以抑制脂肪組織的分化，此乃本研究之動機及目的之一，但本研究結果與其結果並不完全相同，因為本研究發現珍珠粉並無法降低前驅脂肪細胞之分化，原因仍需探討。動物實驗部分，本研究使用之珍珠粉量極大，每天餵食建議量(1 g/mL)之 3 倍劑量才有功效，而 Takahashi 等人使用的是貝類之外殼研磨成粉，兩者之成分並不完全相同。

5.7 攝取珍珠粉對高脂飼料誘導小鼠肥胖之影響

珍珠粉經傳統炮製與低溫製程所得水萃物來進行實驗，分別測試對脂肪堆積與皮膚老化作用。首先發現在珍珠水萃物處理 3T3-L1 細胞時並不會造成細胞毒性，但是在動物實驗中卻會減少餵食高脂飼料老鼠體重，但餵食劑量卻高達建議量(1 g/mL)的 3 倍(HE/3x)才有明顯差異，若換算成每天攝食劑量須高達數十公克。因此推測可能是餵食大量珍珠粉導致老鼠胃空間已經填滿，而導致無法再進一步的進食才造成體重降低，其結果無法判定是否達到預期的減肥效果。本研究前 30 天餵食高脂飼料，所有公鼠之體重均明顯增加，顯示高脂飼料是可以使公鼠的體重增加。在增重完成後，隨即將小鼠餵食不同劑量之珍珠粉，每天餵食兩次，每次 1, 2, 3 mL，可同時瞭解其毒性及功能性，結果發現，在整個過程中，餵食高脂飼料體重可以持續增重，體重最高可達 48 公克，所有動物尚無發現死亡。

本研究以 ICR 小鼠為試驗對象，發現大量攝取珍珠粉，的確會使體重下降，雖未見明顯副作用，但是已經大大超出正常攝取量，因此珍珠粉是否有減重功效仍待探討。

第六章 結論

1. 研究結果顯示，低溫炮製製程中珍珠粉萃取物在蛋白質及胺基酸含量高於傳統牛奶與豆腐同煮法炮製製程，在生物活性評估中有抗皮膚光老化之成效，與典籍之記載具美容功效相符，確實機制仍須進一步探討。
2. 傳統炮製牛奶與豆腐同煮法確實會導致珍珠蛋白之破壞或流失，本研究提供一改良式的炮製工序，可避免蛋白質破壞，其成效優於傳統之炮製加工法。
3. 珍珠粉之珍珠蛋白主要分布在分子量 50 kDa，少量為 26 kDa，與其他許多人之研究並不完全相同，因此不同之萃取方法、分析方法，或原料不同，將影響珍珠蛋白質之分析結果，顯見珍珠粉中含量僅 2.0~2.1% 的珍珠蛋白，其蛋白質之差異性與珍珠層粉(nacre powder)是有差異的。這些蛋白質是否為功能性蛋白，仍須繼續探討。
4. 珍珠粉萃取物對細胞之安全劑量很高，未來作為保健營養食品應用之安全性值得進一步探討。
5. 珍珠粉萃取物對分化後油脂堆積能力與成熟脂肪細胞油脂含量沒有影響；ICR 小鼠攝取大量珍珠粉，的確會使體重下降，雖未見明顯副作用，但是已經大大超出正常攝取量，因此珍珠粉是否有減重功效

仍待探討。



表 2、珍珠粉重金屬、微量元素、巨量礦物質含量測定

種類		單位	傳統炮製	低溫製程	平均	差值
重金屬	砷	ppm	0.056	0.026	0.041	-0.03
	鉛	ppm	0.041	0.021	0.031	-0.02
	汞	ppm	0.118	ND	0.118	--
	鎘	ppm	0.207	0.121	0.164	-0.086
	銅	ppm	0.459	0.247	0.353	-0.212
微量礦 物質	鋅	ppm	1.47	1.79	1.63	0.32
	鐵	ppm	6.46	7.01	6.74	0.55
	鉻	ppm	0.32	0.24	0.28	-0.08
	硒	ppm	0.10	0.08	0.09	-0.02
	錳	ppm	521	569	545	48
巨量礦 物質	鎂	ppm	44.3	45.64	45.0	1.34
	鈣	%	38.6	38.87	38.7	0.27

表 3、珍珠粉胺基酸含量測定

種類	單位	傳統炮製	低溫製程	差值
天門冬胺酸	mg/g	2.21	2.49	0.28
麩胺酸	mg/g	1.14	1.30	0.16
絲胺酸	mg/g	1.63	2.01	0.38
組胺酸	mg/g	0.21	0.18	-0.03
甘胺酸	mg/g	3.72	4.05	0.33
羥丁胺酸	mg/g	0.42	0.49	0.07
丙胺酸	mg/g	3.74	4.70	0.96
精胺酸	mg/g	1.36	1.51	0.15
酪胺酸	mg/g	0.38	0.55	0.17
半胱胺酸	mg/g	0.17	2.12	1.95
頤胺酸	mg/g	0.63	0.71	0.08
甲硫胺酸	mg/g	0.10	1.27	1.17
苯丙胺酸	mg/g	1.00	1.15	0.15
異白胺酸	mg/g	0.34	0.46	0.12
白胺酸	mg/g	1.26	1.46	0.20
離胺酸	mg/g	0.44	0.80	0.36
脯胺酸	mg/g	0.50	0.40	-0.10
總胺基酸		19.25	25.65	6.40

表 4、傳統炮製與低溫製程之水萃珍珠蛋白質含量

分析次序	製程	濃度(mg/mL)
1	低溫製程	4.23
	傳統炮製	3.48
2	低溫製程	2.42
	傳統炮製	2.07

*BSA as the protein standard of 0.5, 1, 2.5 mg/ml,
wavelength= 595 nm. ($y=0.3216x+0.1759$, $R^2=0.9917$).





圖 1、連續式低溫超音波珍珠振盪洗淨機(新型專利第 M429530 號)

在 40 °C 以下低溫(室溫下)超音波振盪檢洗珍珠，以頻率 10000 次/秒的高速震盪在液體中傳導，推動介質的作用，使液體分子間產生壓力變化，形成空穴效應(cavitation phenomenon)，以達到清洗效果。



圖 2、乾式低溫珍珠研粉機(新型專利第 M387702 號)

將粗顆粒置入乾式低溫研粉機中，過程中沖入液態氮氣將研磨中之珍珠降溫，控制研磨過程中，珍珠粉之溫度不超過 40°C 。

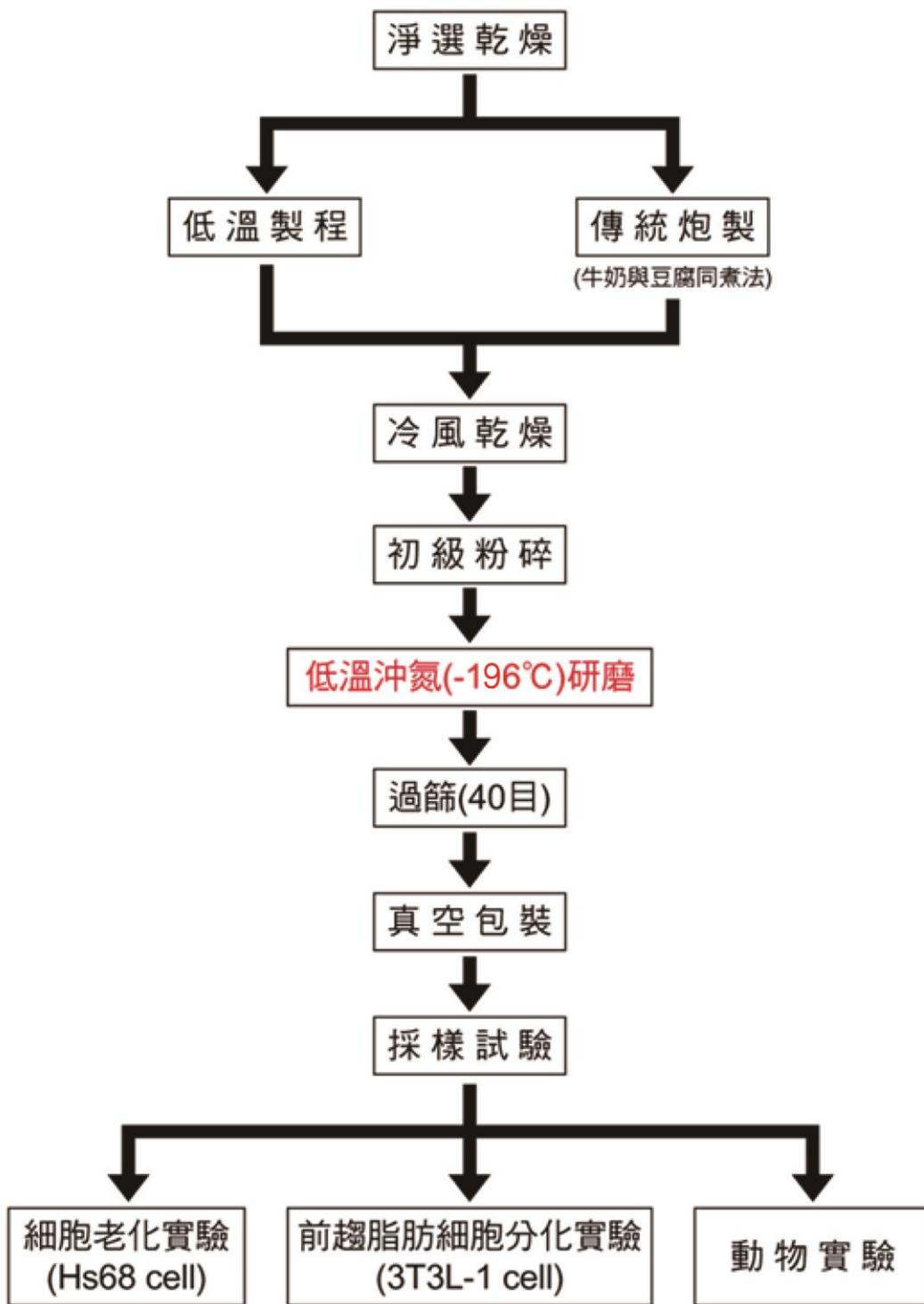


圖 3、研究流程

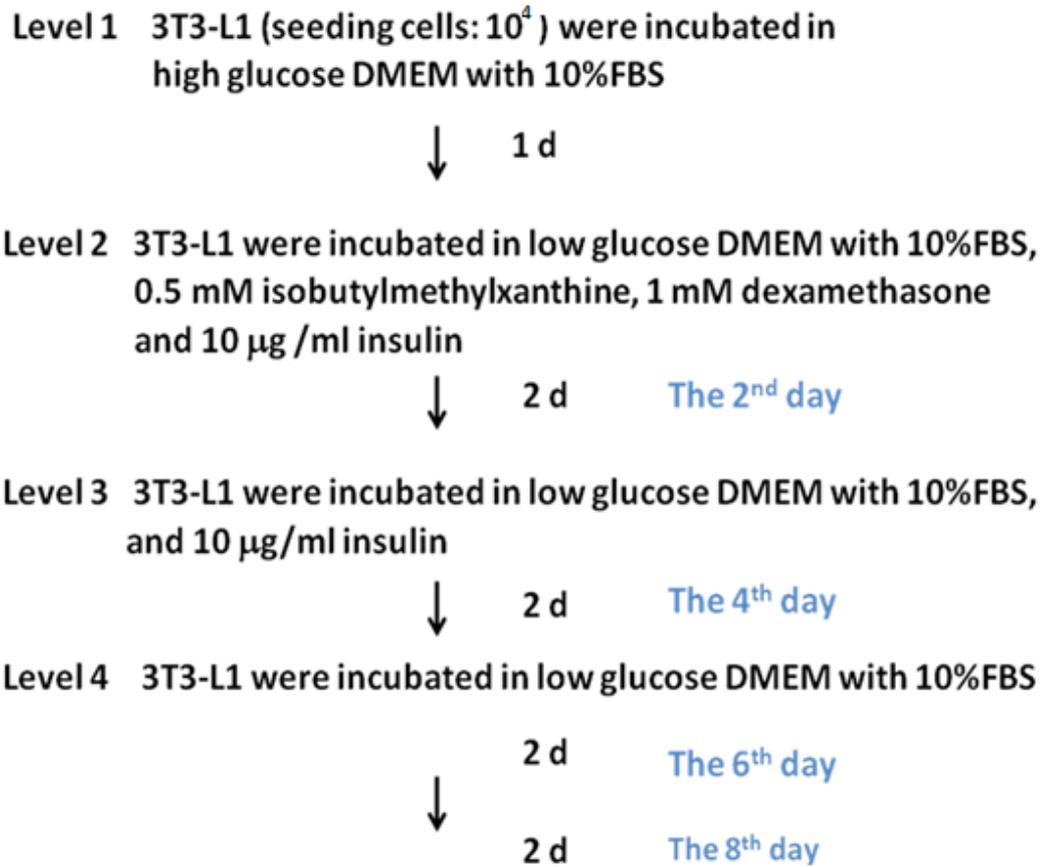


圖 4、建立藥物誘導 3T3-L1 脂肪細胞分化模式

Sample Name	: B0351-1	Median Size	: 0.49379(μm)
ID#	: 201011291053542	Mean Size	: 0.56251(μm)
Data Name	: 201011291053542	Std.Dev.	: 0.2769(μm)
Transmittance(R)	: 86.7(%)	Geo.Mean Size	: 0.5082(μm)
Transmittance(B)	: 74.9(%)	Geo.Std.Dev.	: 1.5544(μm)
Circulation Speed	: 2	Mode Size	: 0.4750(μm)
Agitation Speed	: 4	Span	: OFF
Ultra Sonic	: 04:09 (2)	Diameter on Cumulative %	: (1)5.000 (%) - 0.2585(μm)
Form of Distribution	: Manual		: (2)10.00 (%) - 0.2959(μm)
Distribution Base	: Volume		: (3)20.00 (%) - 0.3489(μm)
Refractive Index (R)	: CaCO3[Calcium carbonate (1.580 - 0.000)],(NaPO3)6(1.482)]		: (4)30.00 (%) - 0.3962(μm)
Refractive Index (B)	: CaCO3[Calcium carbonate (1.580 - 0.000)],(NaPO3)6(1.482)]		: (5)40.00 (%) - 0.4430(μm)
Material	:		: (6)60.00 (%) - 0.5535(μm)
Source	:		: (7)70.00 (%) - 0.6285(μm)
Lot Number	:		: (8)80.00 (%) - 0.7339(μm)
Test or Assay. Number	:		: (9)90.00 (%) - 0.9200(μm)
			: (10)95.00 (%) - 1.1130(μm)

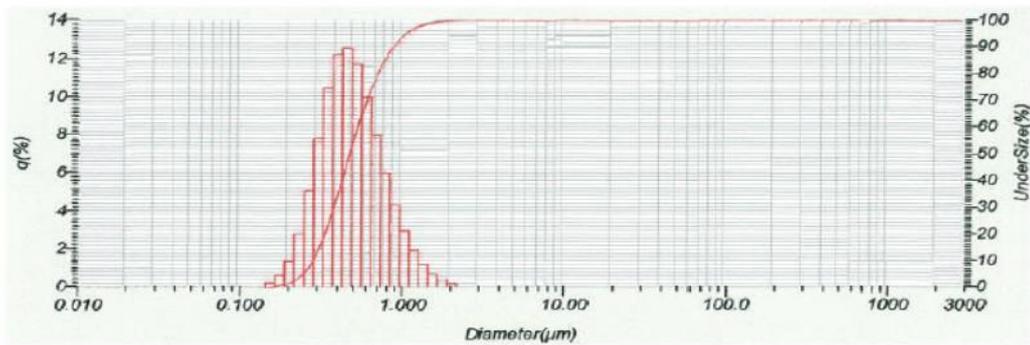


圖 5、珍珠粉之粒徑分析

取低溫研磨之珍珠粉，以雷射粒徑分佈儀(Horibal Model LA-950)檢測之，在寬的動態範圍內(0.01-3000 μm)測量顆粒尺寸分佈。平均粒徑為 585 ± 44 nm。

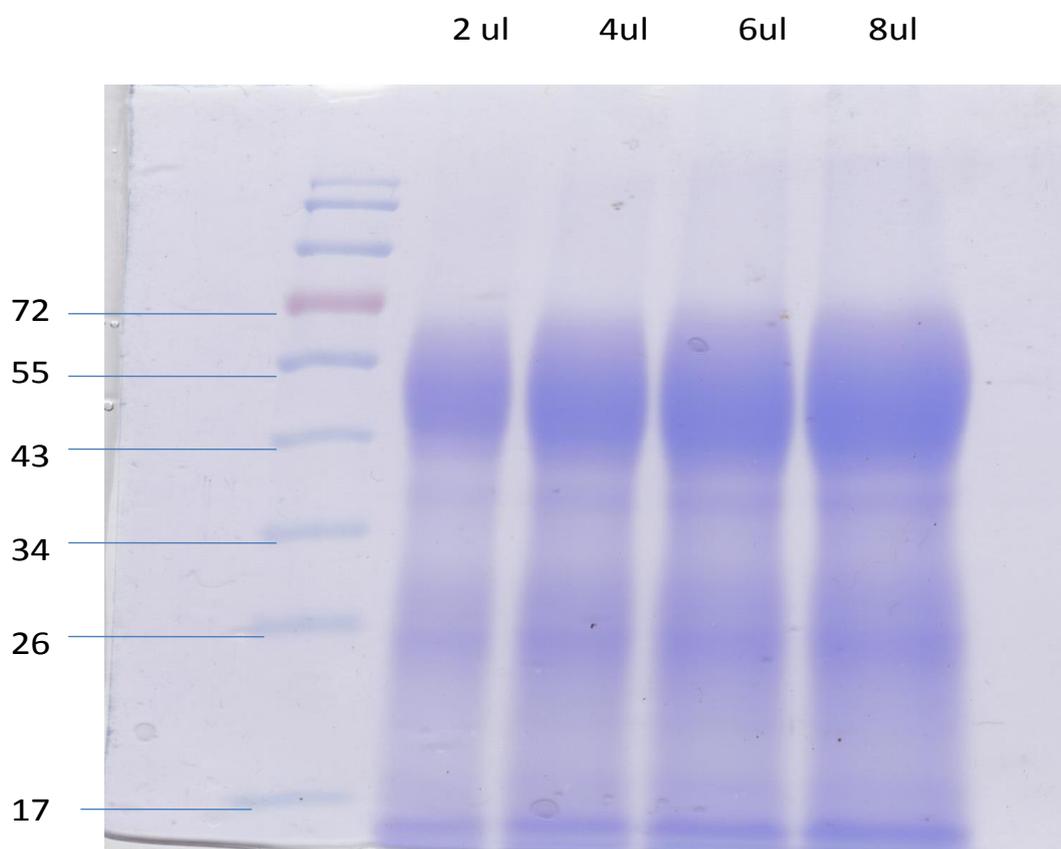


圖 6、水萃取珍珠蛋白之電泳分析圖

珍珠粉水不溶性萃取物中含有大量之混合蛋白，無法清楚分離出，推測可能是蛋白質分離過程中，有部分之蛋白質與糖類形成醣蛋白 (glycoprotein) 導致蛋白質不易分離。

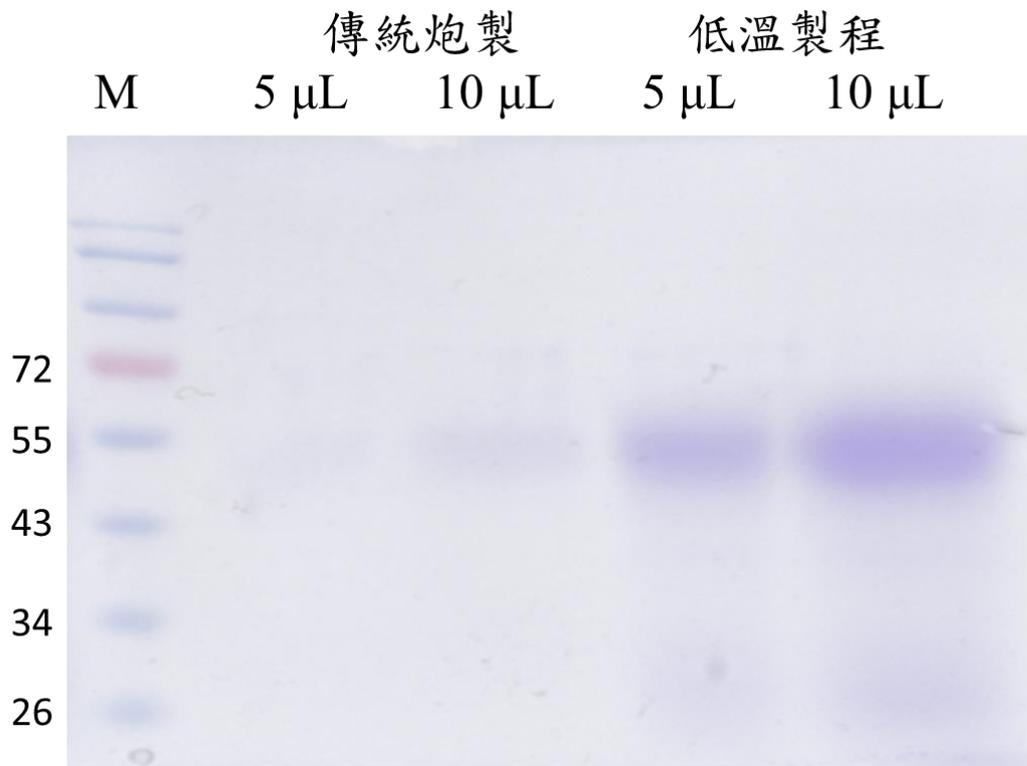


圖 7、傳統炮製法與低溫製程法之蛋白質電泳圖

乾式研粉所能夠保留的蛋白質較多，尤其在分子量 50 kDa 左右之蛋白質最明顯，傳統炮製法所製備出的珍珠粉，許多蛋白質已經破壞。珍珠粉之珍珠蛋白主要分佈在分子量 50 kDa 之蛋白質，少量為 26 kDa

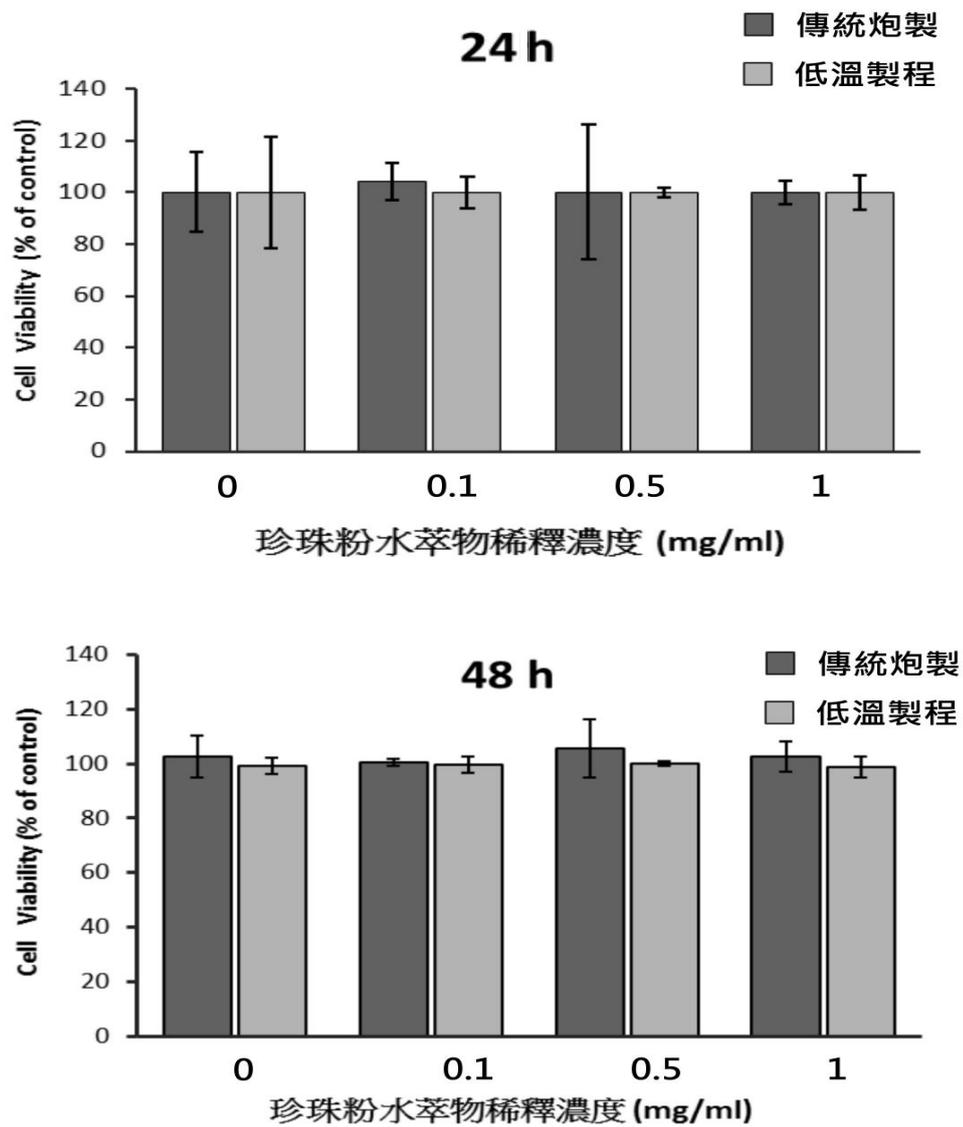
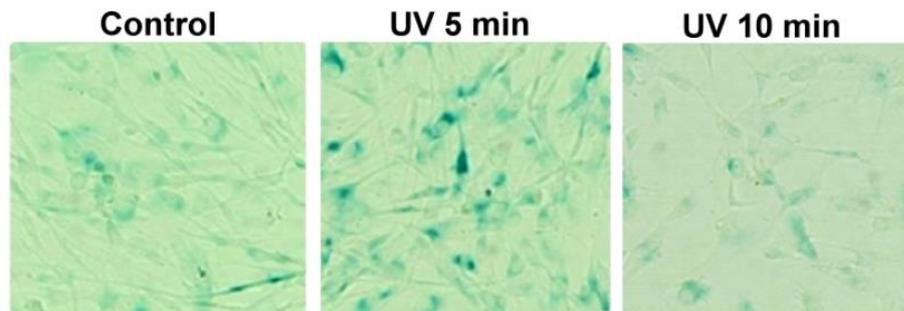


圖 8、珍珠粉水萃物對皮膚纖維細胞(HS68) 安全性測試

HS68 細胞株分別處理不同濃度的傳統炮製及低溫製程珍珠粉水萃物，經由(A) 24 及(B) 48 小時培養後以 MTT 測試細胞存活率。

(A)



(B)

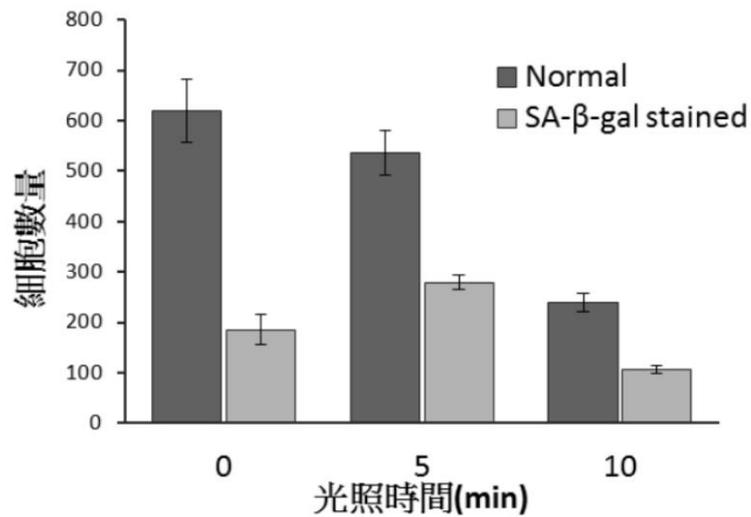
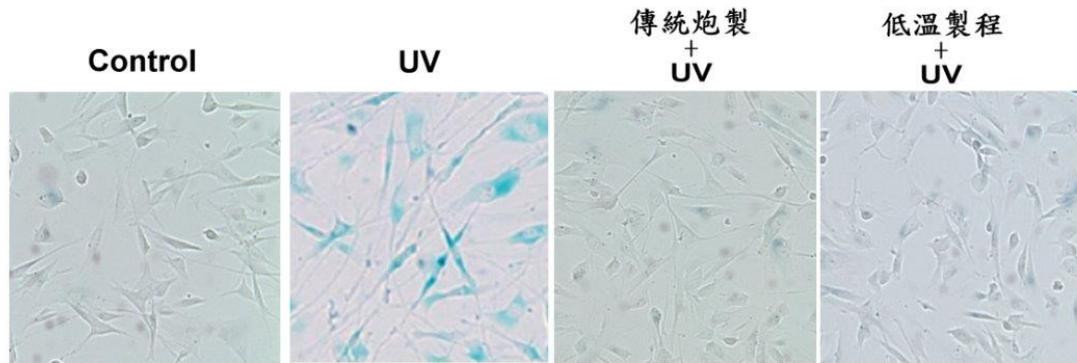


圖 9、UV 造成皮膚纖維母細胞 (HS68) 之老化傷害

HS68 細胞株分別以 UVB 照射 5、10 分鐘，接著培養 16 小時後進行後進行 SA-β-gal 染色 (A)，計算正常細胞與老化細胞數目

(B)。

(A)



(B)

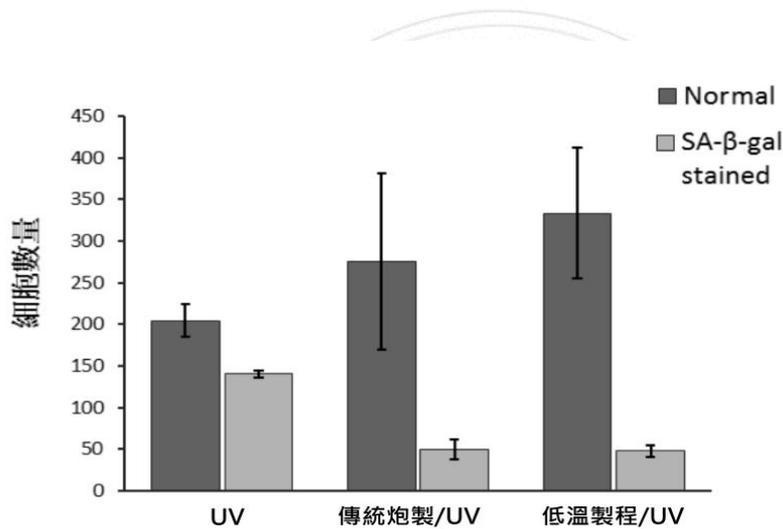


圖 10、珍珠粉水萃物對 UV 造成皮膚纖維母細胞老化之保護作用

HS68 細胞前處理濃度為 100 mg/L 的傳統炮製及低溫製程珍珠粉水萃物 1 小時後，以 UVB 照射 5 分鐘，接著培養 16 小時後進行 SA-β-gal 染色 (A)，計算正常細胞與老化細胞數目(B)。

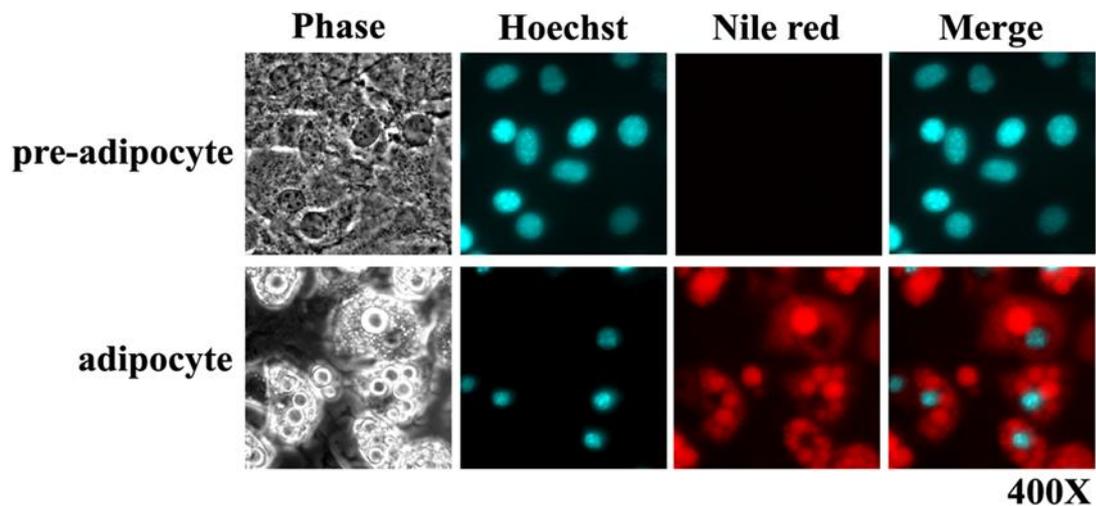


圖 11、3T3-L1 細胞分化過程

本實驗使用 3T3-L1 前驅脂肪細胞(pre-adipocyte) 第 11 代，以 24 孔盤培養，細胞數為每孔 5×10^4 個。細胞培養液為 DMEM-10 (10% 胎牛血清)，經 48 h 培養後進行更換，培養箱溫度為 37°C ，5% 二氧化碳。前驅脂肪細胞誘導分化試劑為 insulin、IBMX、dexamethasone。Nile Red 油滴染色顯示第 8 天已成功分化成為脂肪細胞(adipocyte)。

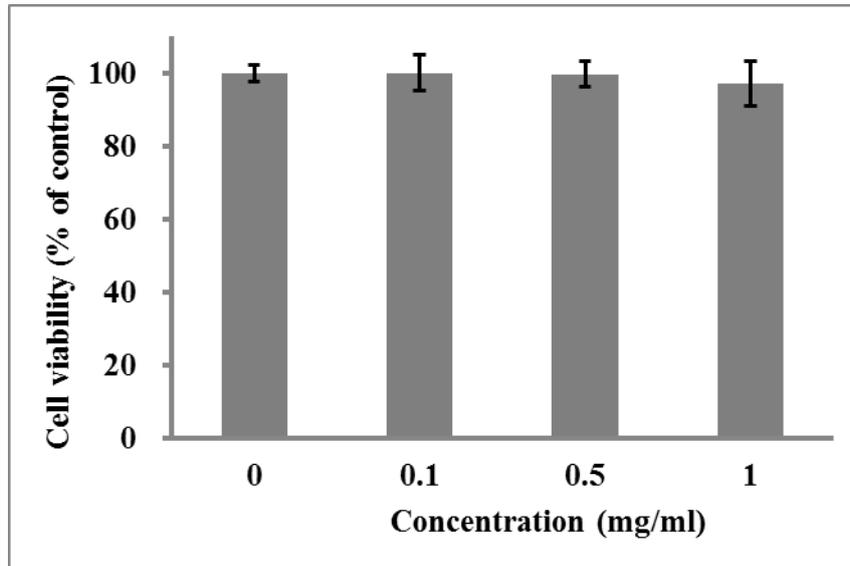


圖 12、珍珠粉水萃物對前趨脂肪細胞(3T3-L1)生長趨勢之影響

將 3T3-L1 細胞以每孔 5×10^4 個細胞分種於 24 孔細胞培養盤中，均勻搖散細胞後，將細胞培養於 37°C 、5% CO_2 的培養箱中，培養 over night 後給予不同濃度(0.1、0.5、1 mg/mL) 珍珠粉水萃物處理，經 48 小時後，以 MTT 法偵測珍珠粉水萃物對細胞生長趨勢的影響，結果發現 1 mg/mL 以下的藥物濃度均不會對細胞生長造成抑制，亦沒有細胞毒性。

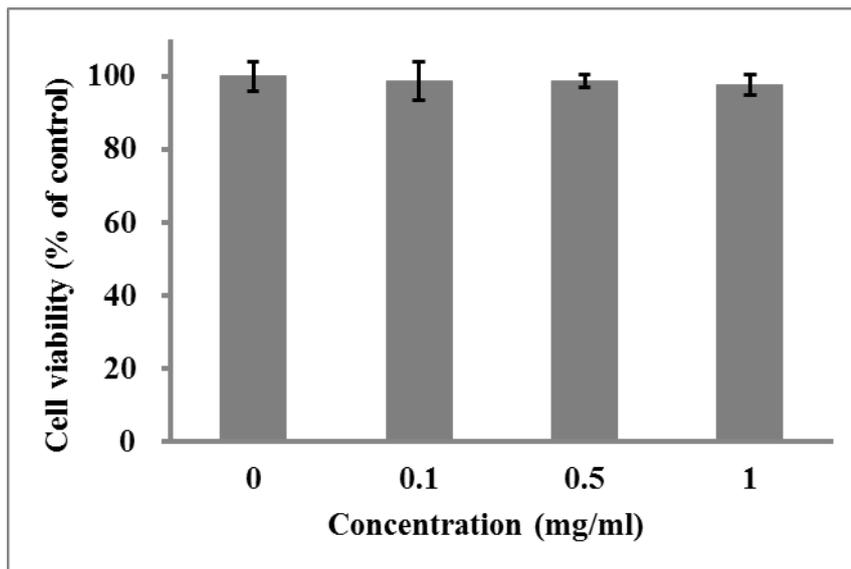


圖 13、珍珠粉水萃取物對已分化之前趨脂肪細胞(3T3-L1)生長趨勢之影響

培養到第 6 天誘導分化成功之脂肪細胞細胞分別以不同濃度 (0.1、0.5、1 mg/mL) 的珍珠粉水萃物處理，經 48 小時後，以 MTT 法偵測珍珠粉水萃物對細胞生長趨勢的影響，結果發現 1 mg/mL 以下的藥物濃度均不會對細胞生長造成抑制，亦沒有細胞毒性。

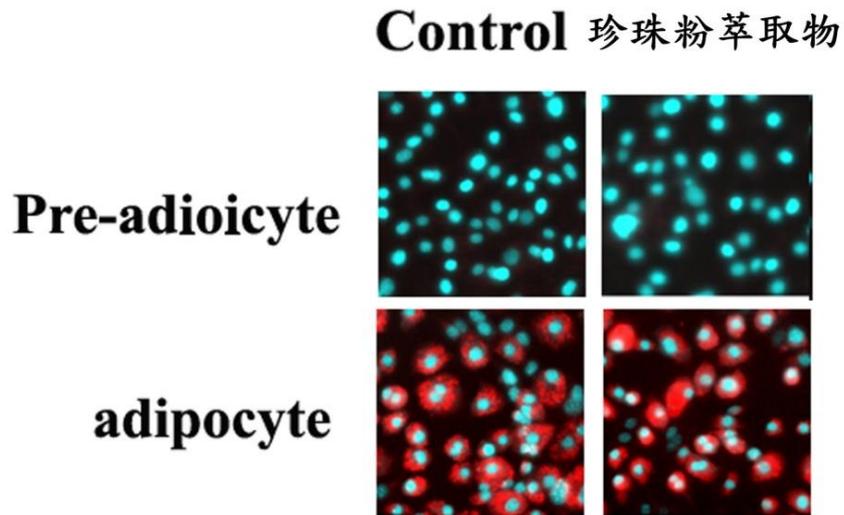


圖 14、珍珠粉水萃取物對前趨脂肪細胞(3T3-L1)分化之影響

3T3-L1 細胞培養至第 2 天(preadipocyte) 及培養到第 6 天誘導分化成功之脂肪細胞細胞(adipocyte) 處理珍珠粉水萃物(1 mg/ml)，經 48 小時後，以 Nile Red 油滴染色測定細胞內中性脂肪含量，結果發現珍珠粉水萃物對前趨脂肪細胞的分化並無影響，亦未能抑制分化後脂肪細胞的油脂堆積。

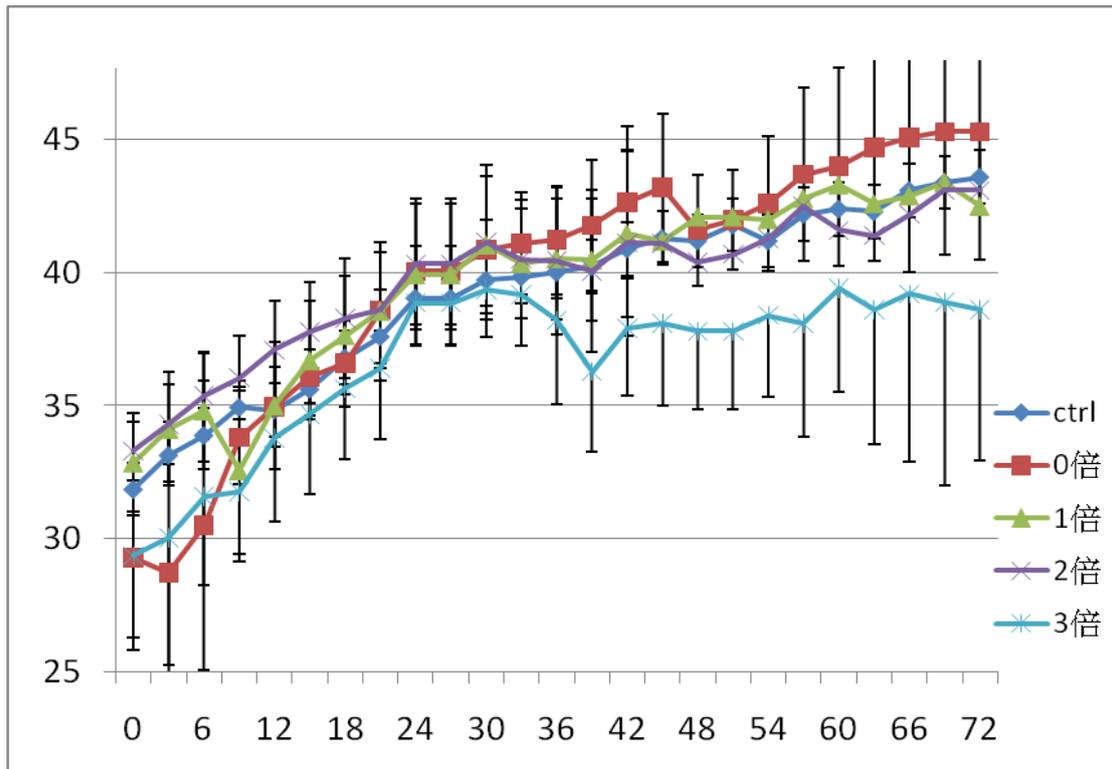


圖 15、不同劑量珍珠粉對小鼠體重變化之影響

ICR 公鼠攝取建議量 3 倍(HE/3x)之珍珠粉在飼養第 36 天後，體重已開始降低，而攝取 1 倍(HE/1x)與 2 倍(HE/2x)之珍珠粉，與控制組(一般飼料)及空白組(HE)比較，均無明顯之差異。顯示大量攝取珍珠粉，確實有降低體重之功能，雖未見明顯副作用，但是已經大大超出正常攝取量，人體臨床上並不建議具有減重之訴求。

參考文獻

中文部分

丁雲川 (2008)。珍珠粉萃取物成份之體外生物活性探討。未發表的碩士論文，東海大學化學系碩士班，台中市。

王麗雲、凌寶銀、趙榮 (2007)。超細珍珠粉對小鼠改善睡眠的影響 [Effect of super thin pearl powder on sleep improvement in mice]。現代預防醫學，頁 273-274

史清水、孟群、陳民輝 (1995)。珍珠六神花露水的抗炎作用初探。基層中藥雜誌，9 (1)，頁 34-35。

行政院衛生署 (2007)。健康食品之不易形成體脂肪功能評估方法 (衛署食字第 0960403113 冊)。

吳家瑜、竹劍平 (2009)。水溶性珍珠粉的毒理實驗研究 [Observe the Safety of Water Soluble Pearl Powder: An Experimental Research]。中華中醫藥學刊，27 (2)，頁 397-399。

李建雄 (1992)。生物化學。藝軒圖書出版社。頁 670-675。

周大興、吳森林 (2001)。珍珠水提取液的抗炎、抗氧化作用 [Anti-inflammation and Antioxidation of Pearl Water Extract]。浙江中醫藥大學學報，頁 41-42。

- 孟根花、李浩軍、烏仁圖雅 (2007)。珍珠丸對兔視網膜缺血再灌注的神經保護作用及 Bcl-2 基因的表達 [Study of Protecting rabbits retinal ischemic- reirrigation and expression of Bcl- 2 gene]。中國民族醫藥雜誌，頁 42-46。
- 翁林福 (1989)。淡水珍珠和海水珍珠化學成分的分析比較。中國藥學雜誌，5。
- 馬麗莎、肖樹雄 (2007)。藥用珍珠的藥理和臨床應用。中國藥師，頁 380-381。
- 高秋華、韓秀嫻、黃開勳、徐輝碧 (2000)。珍珠層粉和鋅對兔眼球結膜微循環的影響 [Effects of Margaric Hydrolysate and Zinc on Microcirculation in Bulbar Conjunctiva of Rabbit Eyes]。廣東藥學院學報，頁 273-276。
- 張小娜、張琳、郭春梅、彭小茹、吳靄、吉彬 (2008)。珍珠胃安丸藥效學研究 [Study on Pharmacodynamics of Zhenzhuwei'an Pill]。中國藥師，頁 1037-1040。
- 張文東、劉玉娥、魏欣冰、劉慧青、李愛國、陳曉陽等人 (2003)。複方珍珠散調節免疫功能作用的實驗研究。山東中醫藥大學學報，頁 459-461。

- 張哲賢、蔡貴花 (1995)。中藥炮製學。台中：中國醫藥學院。
- 張榮春 (2009)。張德超應用珍珠經驗。中醫雜誌，頁 765。
- 張錦衛、竹劍平 (2005)。珍珠粉抗疲勞作用的實驗研究。中國醫院藥學雜誌，頁 358-359。
- 章蘊毅、顧文、吳中、李端 (1994)。水溶性珍珠粉對心臟的藥理作用。中成藥，16 (9)，頁 37。
- 陳相訓 (2008)。奈米化珍珠粉之理化特性與生體可用率。臺灣大學食品科技研究所博士論文，臺北市。
- 陳祖基、韓秀嫻 (2001)。雞眼形覺剝奪性近視模型的實驗研究。眼科研究，6，頁 507-510。
- 陸啟萍，杜雨潔 (2011)。寶石 101 問，我的第一本珠寶書。台灣：書泉。
- 管原穎、趙文靜、常惟智 (2010)。珍珠的藥理作用及臨床應用概述。中醫藥資訊，頁 114-116。
- 黃福星、陳連劍、李婷、劉新宇、李成 (2007)。珍珠活性蛋白的安全性藥理學研究 [Safety pharmacology study of pearl active protein]。中國臨床實用醫學，頁 4-5。
- 趙偉康、劉平、洪嘉禾、沈松法、孔穎 (1989)。固真飲延緩皮膚膠

- 原衰老的實驗研究。中華中醫藥雜誌 (06)，頁 23-24。
- 趙雲志、張秋燕 (2000)。藥用珍珠粉真偽鑒別方法研究概況。中成藥，頁797-798。
- 劉加明 (2004)。珍珠粉治療口腔潰瘍類疾病療效觀察。遼寧中醫雜誌，頁 769。
- 劉菲 (2010)。珍珠粉在治療小面積淺度燙傷中的應用。中國傷殘醫學，頁 187-188。
- 劉曉榮、竹劍平 (2005)。珍珠粉治療孕婦缺鐵性貧血 51 例臨床觀察。中國中醫藥科技，頁 396-397。
- 樊柏林 (2000)。酶解珍珠液改善睡眠作用試驗。預防醫學情報雜誌，16 (4)，頁 46-47。
- 潘建新、顧振綸、錢曾年 (1999)。珍珠粉對中樞神經系統影響的研究。中成藥，21 (11)，頁 596 - 597。
- 鄧穎珠 (2000)。珍珠末治療久治不愈傷口 3 例。廣東醫學，頁 193。
- 鄭全英、毛葉盟 (2004)。海水珍珠與淡水珍珠的成分、藥理作用及功效 [Comparison of Component, Action and Effects Between Freshwater and Seawater Pearl]。上海中醫藥雜誌，頁 54-55。
- 蕭夙君 (2008)。珍珠粉抗氧化性與延緩衰老之研究。中山醫學大學

營養學研究所碩士論文，台中市。

錢榮華、竹劍平（2003）。珍珠粉延緩衰老作用的實驗研究。浙江
臨床醫學，頁 718。

英文部分

- Bernstein, E. F., & Uitto, J. (1996). The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin Dermatol*, 14(2), 143-151.
- Blank, S., Arnoldi, M., Khoshnavaz, S., Treccani, L., Kuntz, M., Mann, K., . . . Fritz, M. (2003). The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *J Microsc*, 212(Pt 3), 280-291.
- Cao, G., Xu, Z., Wei, H., Yao, S., & Liu, Y. (1996). [Pearl and mother-of-pearl powder in health-care]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 21(10), 635-638 inside back cover.
- Dong, Y., & Shi, J. R. (2006). [Application of primary culture technique to traditional Chinese medicine research]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 4(1), 90-93.
- Goihman-Yahr, M. (1996). Skin aging and photoaging: an outlook. *Clin Dermatol*, 14(2), 153-160.
- Gong, N., Ma, Z., Li, Q., Li, Q., Yan, Z., Xie, L., & Zhang, R. (2008). Characterization of calcium deposition and shell matrix protein secretion in primary mantle tissue culture from the marine pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar Biotechnol (NY)*, 10(4), 457-465. doi: 10.1007/s10126-008-9081-1
- Green, H., & Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5(1), 19-27.
- Green, H., & Kehinde, O. (1979). Formation of normally differentiated

- subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol*, 101(1), 169-171. doi: 10.1002/jcp.1041010119
- Ho, J. N., Lee, Y. H., Park, J. S., Jun, W. J., Kim, H. K., Hong, B. S., . . . Cho, H. Y. (2005). Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. *Biol Pharm Bull*, 28(7), 1244-1248.
- Imokawa, G., Takema, Y., Yorimoto Y, Tsukahara, K., Kawai, M., Imayama, S.(1995). Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent. *J Invest Dermatol*. 105(2):254-8.
- Jian-Ping, D., Jun, C., Yu-Fei, B., Bang-Xing, H., Shang-Bin, G., & Li-Li, J. (2010). Effects of pearl powder extract and its fractions on fibroblast function relevant to wound repair. *Pharm Biol*, 48(2), 122-127. doi: 10.3109/13880200903046211
- Jung, J. W., Cha, S. H., Lee, S. C., Chun, I. K., & Kim, Y. P. (1997). Age-related changes of water content in the rat skin. *J Dermatol Sci*, 14(1), 12-19.
- Kambayashi, H., Yamashita, M., Odake, Y., Takada, K., Funasaka, Y., & Ichihashi, M. (2001). Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci*, 27 Suppl 1, S19-25.
- Lamme, E. N., Van Leeuwen, R. T., Brandsma, K., Van Marle, J., & Middelkoop, E. (2000). Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol*, 190(5), 595-603. doi: 10.1002/(sici)1096-9896(200004)190:5<595::aid-path572>3.0.co;2-v
- Lao, Y., Zhang, X., Zhou, J., Su, W., Chen, R., Wang, Y., . . . Xu, Z. F. (2007). Characterization and in vitro mineralization function of a soluble protein complex P60 from the nacre of *Pinctada fucata*. *Comp*

- Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 148(2), 201-208. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.05.010
- Lavker, R., & Kaidbey, K. (1997). The spectral dependence for UVA-induced cumulative damage in human skin. *J Invest Dermatol*, 108(1), 17-21.
- Liu, Y. C., & Hasegawa, Y. (2006). Reducing effect of feeding powdered scallop shell on the body fat mass of rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70(1), 86-92.
- Mann, K., Weiss, I. M., Andre, S., Gabius, H. J., & Fritz, M. (2000). The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevis*) nacre protein perlucin. Detection of a functional C-type lectin domain with galactose/mannose specificity. *Eur J Biochem*, 267(16), 5257-5264.
- Marie, B., Joubert, C., Belliard, C., Tayale, A., Zanella-Cleon, I., Marin, F., . . . Montagnani, C. (2012). Characterization of MRNP34, a novel methionine-rich nacre protein from the pearl oysters. *Amino Acids*, 42(5), 2009-2017. doi: 10.1007/s00726-011-0932-0
- Marie, B., Zanella-Cléon, I., Corneillat, M., Becchi, M., Alcaraz, G., Plasseraud, L., Luquet, G., Marin, F. (2011). Nautilin-63, a novel acidic glycoprotein from the shell nacre of *Nautilus macromphalus*. *FEBS J*. 278(12),2117-30.
- Miyachi, Y. (1995). Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol Sci*, 9(2), 79-86.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., & Matsushiro, A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), 9657-9660.
- Rosell, M., Hakansson, N. N., & Wolk, A. (2006). Association between dairy food consumption and weight change over 9 y in 19,352 perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 84(6), 1481-1488.

- Ruan, S. B., Wu, F. H., & Wu, S. S. (2004). [Clinical observation on treatment of 320 patients with relapsed aphthous ulcer by pearl aphthous granule]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 24(3), 254-255.
- Schwartz E1, Feinberg E, Lebwohl M, Mariani TJ, Boyd CD. (1995). Ultraviolet radiation increases tropoelastin accumulation by a post-transcriptional mechanism in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 105(1):65-9.
- Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D., & Morse, D. E. (1997). Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J Biol Chem*, 272(51), 32472-32481.
- Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., . . . Takahashi, T. (1997). Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature*, 387(6633), 563-564. doi: 10.1038/42391
- Tahara, S., Matsuo, M., & Kaneko, T. (2001). Age-related changes in oxidative damage to lipids and DNA in rat skin. *Mech Ageing Dev*, 122(4), 415-426.
- Takahashi, K., Satoh, K., Katagawa, M., Torita, A., & Hasegawa, Y. (2012). Scallop shell extract inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Fisheries Science*, 78(4), 897-903. doi: 10.1007/s12562-012-0515-3
- Takema, Y., Hattori, M., & Aizawa, K. (1996). The relationship between quantitative changes in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation. *J Dermatol Sci*, 12(1), 56-63.
- Torita, A., Miyamoto, A., Hasegawa, Y. (2007). The effects of scallop shell extract on collagen synthesis. *Fisheries Science*. 73(6), 1388-1394.
- Weiss, I. M., Gohring, W., Fritz, M., & Mann, K. (2001). Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of

- vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(2), 244-249. doi: 10.1006/bbrc.2001.5170
- Xu, H., Huang, K., Gao, Q., Gao, Z., & Han, X. (2001). A study on the prevention and treatment of myopia with nacre on chicks. *Pharmacol Res*, 44(1), 1-6. doi: 10.1006/phrs.2000.0780
- Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., & Miyamoto, H. (2006). Shematrixin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 144(2), 254-262. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.03.004
- Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., & Miyamoto, H. (2007). A novel nacre protein N19 in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(1), 158-163. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.172
- Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Chen, L., & Zhang, R. (2006). A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem Biophys Res Commun*, 342(2), 632-639. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.182