

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

建立評估中草藥萃取物對於抑制 UV 引發之人類皮膚黑色素生成之細胞模式

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 92-2626-B-041-005

執行期間：92 年 09 月 01 日 至 93 年 07 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：蔡玫琳

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 10 月 28 日

國科會補助技職院校發展應用性先期計畫研究報告  
建立評估植物萃取液對於人類皮膚黑色素細胞之抑制  
黑色素形成效力之細胞模式

Establishment of a cell model for evaluating inhibitory efficacy of botanical  
extracts on UV-induced melanogenesis of human skin melanocytes

### 摘要

本計畫擬利用人類黑色素細胞建立一個標準化、接近人類皮膚生理的細胞模式，以期在未來能利用此一細胞模式評估植物萃取液抑制黑色素細胞合成黑色素的效力。在這個測試黑色素調節的細胞模式中，經過 UVB 照射後包含了黑色素細胞與角質細胞共同調節黑色素生成的作用，比單獨使用黑色素細胞的評估模式，更加的符合實際皮膚生理上的 Pigmentation，同時也提供了一個可以用來大量篩選對黑色素生成具有調節作用的植物萃取液之細胞實驗平台。我們在這個細胞模式中分別加入抑制黑色素生成的 hydroquinone、arbutin、kojic acid、vitamin C 等，用來評估此模式的可行性。利用此一細胞模式篩選出具有液抑制黑色素細胞合成黑色素的效力的植物萃取液將可應用在化粧品原料中，並可藉此提升我國化粧品產業在國際上的競爭力。

關鍵詞：黑色素、黑色素細胞、角質細胞、化粧品

keywords : melanin, melanocyte, kerationocyte, cosmetics

### 一、緣由及目的

在化粧品研發上利用動物實驗來進行有效性評估已逐漸被一些先進國家禁止，發展替代性的細胞實驗平台已是一種全球化的趨勢，而建立一個容易且經濟實用、再現性高、符合人類皮膚生理的細胞模式，確有其必要之處。

Pigmentation 在化粧品的領域中扮演著相當重要的角色，舉凡東方人的美白、防曬化粧品，西方人嚮往的古銅色肌膚...等都與其息息相關。

人類的膚色取決於黑色素的數量、大小及型態，而 melanin 是由位於表皮基底層內的黑色素細胞所形成的，黑色素產生的必要條件是需要有紫外線的「刺激」，紫外線的照射不僅可以使得黑色素前質迅速氧化形成黑色素，亦能刺激黑色素細胞的分裂；而陽光中的紫外線依波長區分為 UVA、UVB、UVC，其中 UVA (320nm~400nm) 可以直接穿越表皮層到達真皮層的位置，造成真皮層中膠原蛋白與彈性蛋白的變性，並且會導致黑色素細胞增生使得皮膚變黑；UVB (280nm~320nm) 主要作用在表皮層，引起皮膚發紅及曬傷的現象。而 UVC (200nm~280nm) 當其穿透大氣層之際即被吸收或散射，所以到達地面的輻射劑量非常的少，對生物體的影響也是為乎其微。而根據研究其中 UVB 所造成的問題多半存在於表皮層之間，主要是因為 UVB 輻射到達的部位位於表皮層，而波長與能量成反比，所以實際上 UVB 輻射的能量比較大，也是造成一些皮膚問題產生的主要原因。

在黑色素細胞合成黑色素的過程中除了紫外線的外部刺激會促進黑色素的合成之外，由其他細胞產生的激素之內部訊號亦可能對其深具影響，是故此細胞模式也同時考慮到了角質細胞對黑色素細胞合成黑色素的影響因子。

## 二、材料及方法

### (一) 化學試劑與儀器設備

使用 hydroquinone、arbutin、kojic acid、vitamin C 等化粧品美白劑；利用合成的 Melanin 為標準品，定量黑色素細胞的 total melanin。MCDB153 細胞培養液購自 Cascade biologics，HMGS 生長因子購自 Cascade biologics，Antibody 購自 Biogenesis，Autoprobe II staining kit 購自 Biomedica。

### (二) 細胞株的選擇與細胞培養

選擇分離自人類組織的黑色素細胞為實驗對象，利用細胞型態以及表面抗原鑑定黑色素細胞後，將細胞以 MCDB153 培養在 6-well 中。

### (三) 細胞處理程序

先將黑色素細胞 ( $1\sim 2\times 10^5$  cells) 培養在 6-well 中，細胞貼皿後移去 medium 加入 condition medium 至每個 well，三天後照射 UVB ( $1.2\text{ mJ/cm}^2$ )，爾後加入含藥的 medium，連續培養三天後進行拍照及細胞存活率、melanin 定量等相關程序分析；另外以相同的細胞密度進行個別培養，作為控制組。

### (四) 細胞計數與細胞增殖速率

利用人工計數法確認細胞存活率與增殖速率，將細胞以 Trypan blue 染色後置於血球計數盤中，利用倒立顯微鏡觀察並計算細胞數。

### (五) Melanin 定量分析

將細胞置於 1 N NaOH 中，細胞充分混合溶解後轉置於 96-well，藉由 SpectraMax 250 ELISA reader 測試  $OD_{405\text{nm}}$  的吸光值。

## 三、結果與討論

在目前的研究中，大多是利用不同的細胞株（如 melanoma、melan-a melanocytes）來探討調節 melanin 產生的機制，然而 melanoma 異常的表現 melanin 將會使細胞內接收到的其他訊號降級而妨害正常 melanin 的產生，所以並不適合以此作為實驗對象；而分離自老鼠或其他動物組織之黑色素細胞，因其皮膚構造與生理調控機轉和人類皮膚亦有顯著差異，並不具代表性，是故理想中的細胞實驗平台為人類初代培養的黑色素細胞。我們利用纖維母細胞為陰性對照組進行細胞免疫染色，結果顯示分離自人類組織之細胞為黑色素細胞（圖一）。

本實驗為模擬太陽光照射人類皮膚的情況，利用 UVB 刺激黑色素細胞合成黑色素，並且照射劑量的照射強度必須維持細胞存活率在 90% 以上（圖二），避免黑色素細胞因 UVB 的過度照射而凋亡進而影響植物萃取液對黑色素細胞產生細胞毒性的濃度判斷。在選擇測定 melanin 的吸收波長方面，實驗結果顯示在 405nm 的波長可測得最大吸光值（圖三）。

此細胞模式考慮了角質細胞對黑色素細胞合成黑色素的影響因子，在培養黑色素細胞的培養基中加入不同比例的 condition medium，而實驗結果顯示角質細胞中的內部訊號的確影響黑色素細胞中 melanin 的合成（圖四）。為服膺人類皮膚生理的正常反應，故此一細胞模式在黑色素細胞的培養過程中同時加入了 condition medium 進行細胞培養。

我們在這個細胞模式中加入 vitamin C，實驗結果顯示 vitamin C 降低了黑色素細胞的樹突狀組織（圖五）。另分別加入 arbutin、kojic acid、vitamin C，均可抑制黑色素生成（圖六）。根據其他研究顯示 Hydroquinone 和 arbutin 對於抑制黑色素形成的作用機轉相當類似，都是作用在酪胺酸酶的活性抑制上，而 Hydroquinone 具有較強的細胞毒性，arbutin 則是因為結構上多了一個葡萄糖的分子，所以細胞毒性較前者低，對皮膚也較不會產生刺激性。kojic acid 和 vitamin C 對於 melanocytes 的黑化作用都產生間接性的抑制，kojic acid 藉由箝制銅離子而產生競爭性抑制。

在黑色素細胞裡，酪胺酸酶(tyrosinase)首先被合成，並隨後加入到黑色素形成的行列中，並扮演著最重要的調控角色，也因此坊間大部分標榜能抑制黑色素形成的「美白產品」，多半是針對酪胺酸酶來抑制。近兩年來，對於評估物質對黑色素細胞的黑色素生成之影響的方式，已經逐漸由單一測試酪胺酸酶活性轉向與測試 melanin 含量並行的趨勢，主要是除了確認物質的美白功效是否作用在抑制酪胺酸酶的活性外，還可篩選出非抑制酪胺酸酶活性但具美白功效的物質，因其可能作用在其他黑色素生成的途徑，若篩選出非抑制酪胺酸酶活性但具美白功效的物質則可依此細胞模式得到的結果，進行抑制途徑的確認和作更進一步的研究。

#### 四、參考文獻

Dong-Seok Kim, Sook-Young Kim, Jin-Ho Chung, Kyu-Han Kim, Hee-Chul Eun, Kyoung-Chan Park\*. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cellular Signaling* 14, 779–785 (2002)

Tie Chi Lei, Victoria M. Virador, Wilfred D. Vieira, and Vincent J. Hearing. A Melanocyte – Keratinocyte Coculture Model to Assess Regulators of Pigmentation *in Vitro*. *Analytical Biochemistry* 305, 260–268 (2002)

Meinhard Wlaschek, Iliana Tantcheva-Poor, Lale Naderi, Wenjian Ma, Lars Alexander Schneider, Ziba Razi-Wolf, Jutta Schuller, Karin Scharffetter-Kochanek. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *Journal of Photochemistry and*

Photobiology B: Biology 63, 41–51 (2001)

Victoria M. Virador, Nobuhiko Kobayashi, Jun Matsunaga, and Vincent J. Hearing  
*Laboratory of Cell Biology, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892.*

A Standardized Protocol for Assessing Regulators of Pigmentation . *Analytical Biochemistry* **270**, 207–219 (1999)

N. Baurin, E. Arnoult, T. Scior, Q.T. Do, P. Bernard. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology* 82 (2002) 155- 158

Jimbow K, Salopek TG, Dixon WT, Searles GE, Yamada K. The epidermal melanin unit in the pathophysiology of malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1991; 13:179–188

Thody AJ, Higgins EM, Wakamatsu K, Ito S, Burchill SA, Marks JM. Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1991;97:340–344

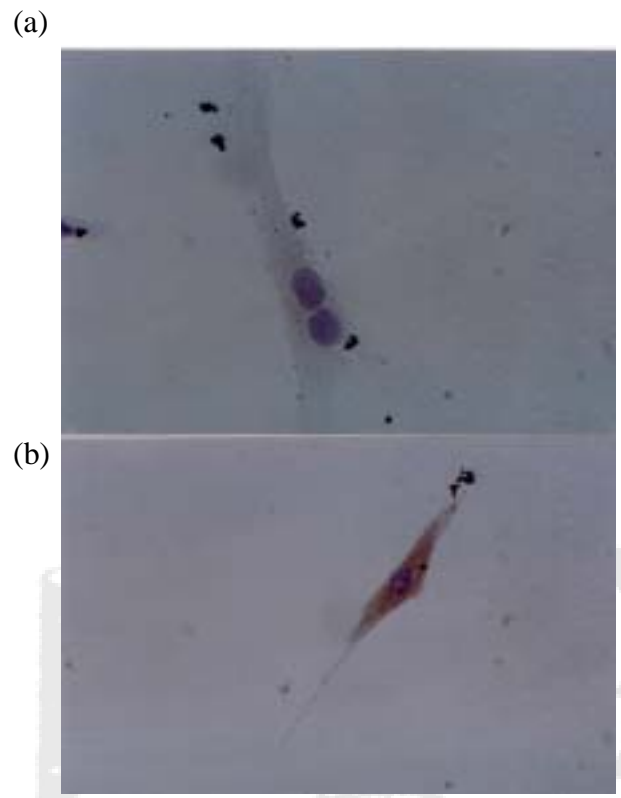
Marrot L, Belaidi JP, Meunier JR, Perez P, Agapakis-Causse C. The human melanocyte as a particular target for UVA radiation and an endpoint for photoprotection assessment. *Photochem Photobiol* 1999;69:686–693

Beer JZ, Olvey KM, Miller SA, Thomas DP, Godar DE. Non-nuclear damage and cell lysis are induced by UVA, but not UVB or UVC, radiation in three strains of L5178Y cells. *Photochem Photobiol* 1993;58:676–681

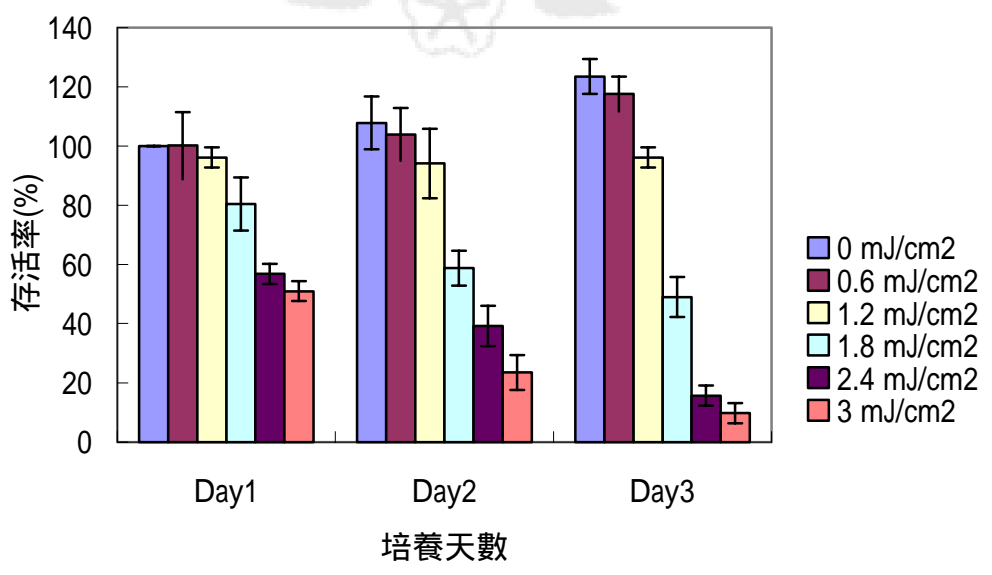
Hill HZ, Hill GJ, Cieszka K, Azure M, Chowdhary I, Sayre RM. A multitherapy resistance factor from melanoma reveals that killing by near UV is different from genotoxic agents. *Photochem Photobiol* 1995;61:479–483

Chan PP, Lin M, Faruqi AF, Powell J, Seidman MM, Glazer PM. Targeted correction of an episomal gene in mammalian cells by a short DNA fragment tethered to a triplex –forming oligonucleotide. *J Biol Chem* 1999;274:11541–11548

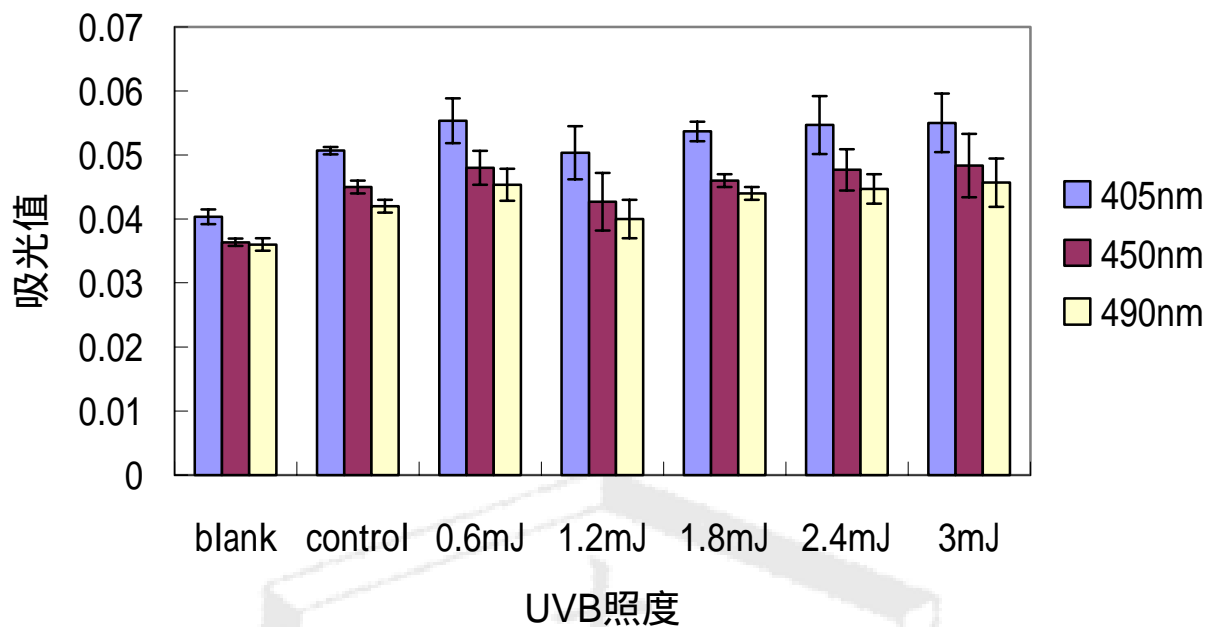
## 五、圖表



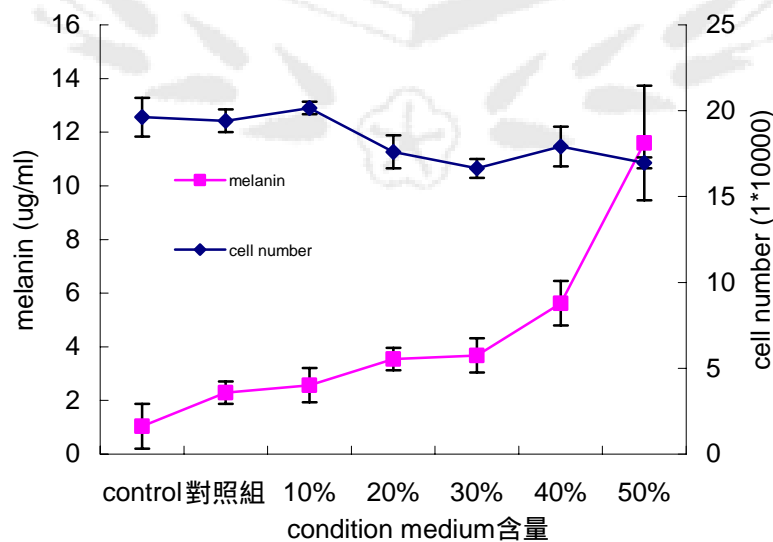
圖一 細胞免疫染色 (a) 纖維母細胞 (b) 人類初代培養的黑色素細胞。



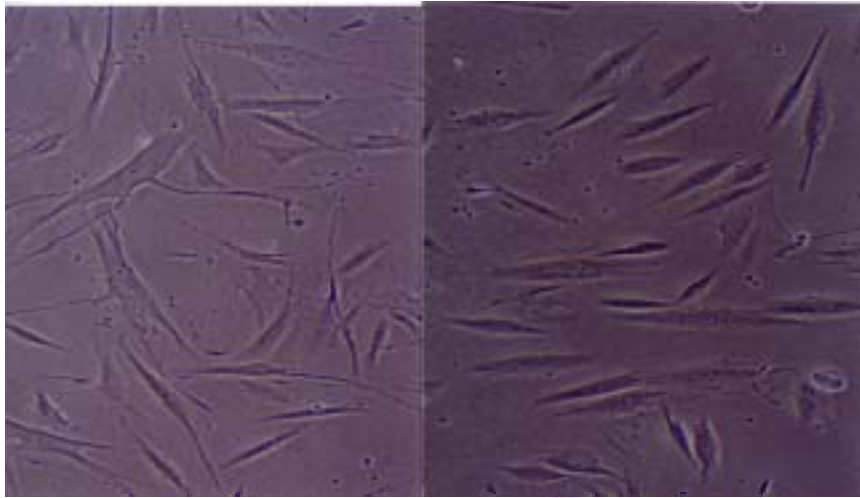
圖二 黑色素細胞在不同UVB照射劑量下經不同天數培養後之細胞存活率。



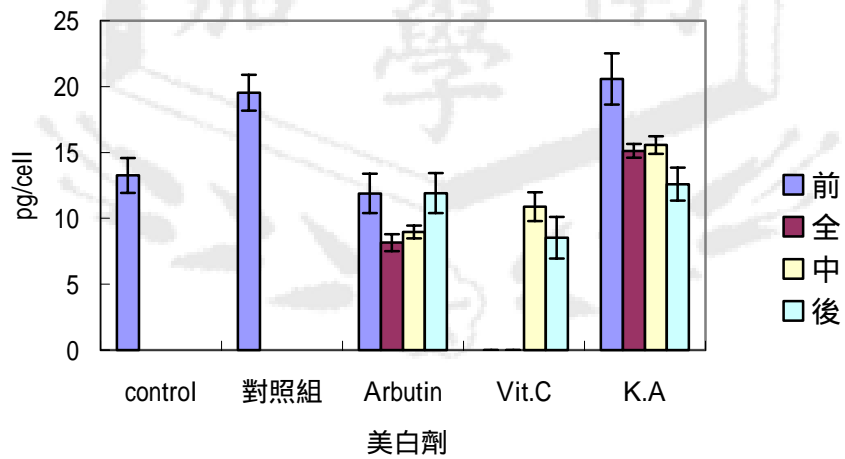
圖三 黑色素的吸收波長



圖四 添加培養角質細胞後的condition medium對黑色素細胞合成黑色素的影響



(a)未添加 (b)添加後  
圖五 加入vitamin C對黑色素細胞形態的影響



圖六 加入arbutin、vitamin C(VitC)、kojic acid (KA)對黑色素生成量的影響