嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

美容保健中草藥之開發與研究

計畫類別：■個別型計畫　　□整合型計畫
計畫編號：CNPH92-04
執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人： 王四切
共同主持人：楊政哲、陳秋蘭
計畫參與人員：卓建宇、施惠瑩

執行單位：藥學系

中華民國 93 年 2 月 27 日

一、緒論

I. 黑色素的形成和位置

黑色素（melanin）在人體內是由黑色素細胞（melanocyte）內的黑色素小體（melanosome）不斷製造產生的，而黑色素細胞分布在眼睛、頭髮、大腦和皮膚等組織。

在皮膚的黑色素細胞是位在表皮組織的基底層。一個黑色素細胞周圍會被30~40 個角質細胞（keratinocyte）所包圍，形成所謂的”表皮層黑色素單位”（epidermal melanin unit）[1]。雖然黑色素細胞在此層組織只佔了少部分的空間，但其在皮膚上扮演著重要的功能。

黑色素細胞會持續製造黑色小體，被製造的黑色素小體會經由黑色素細胞的樹狀軸突末端被分泌至周圍鄰近的角質細胞。黑色小體是位在黑色素細胞的細胞質內，是一種具有膜的球形或橢圓形的胞器[2]，可保護細胞對抗黑色素生成過程中釋放出的自由基（free radical）對細胞產生氧化性傷害[3]。

黑色小體中黑色素的形成是在酪胺酸（tyrosine）的存在下，先經酪胺酸酶（tyrosinase）的催化，在經一連串酵素的催化下形成的。形成的黑色素有兩種，一種是棕黑色的 eumelanin，一種是黃棕色的 phaeomelanin [4]。而酪胺酸酶是一種含銅的酵素[5]，是黑色素形成的速率決定步驟。

II. 紫外線及黑色素刺激荷爾蒙（MSH）對黑色素形成的影響

紫外線及黑色素刺激荷爾蒙會去促進黑色素生合成。當皮膚暴曬在紫外線中，產生少量的自由基，會去活化訊息傳遞而刺激酪胺酸酶的轉錄作用，則黑色素的合成增加。另外，也由於黑色素細胞受到刺激，活性增加，黑色小體增生且轉移至角質細胞的能力增加，因此皮膚呈現褐色。而這些增加的黑色素具有吸收紫外線、中和自由基的功能，這是身體對抗紫外線曝曬的一種保護作用。

而黑色素刺激荷爾蒙是體內調控黑色素生合成的一種內生性荷爾蒙，其和 melanocortin-1 receptor 有很高的親和力，當他們結合後，會刺激黑色素細胞而使得黑色素的產生增加。[6,7]

III. 有去色素化(depigmentation)作用的物質

1. 維生素 C

Vit.C 為一種水溶性維生素，人類身體無法合成，必須額外藉助食物中取得。Vit.C 又叫抗壞血酸，故名思意，可用來對抗壞血病；另外，還可以促進膠原蛋白的合成以幫助傷口癒合[8]。而在皮膚的美白上也有效果，這是因為他的抗氧化作用，即具有還原的能力[9,10]，能將已形成的黑色素轉變成顏色較淡的黑色素。

2. 維他命 E

Vit.E 是一種脂溶性維生素，又稱為生育醇（α-Tocopherol），有抗不孕之功效，能抑制雌鼠胎兒流產，也能抑制雄鼠睪丸素退化。Vit.E 也具有抗氧化的作用，能吸收自由基，防止脂肪過氧化作用，因而達到改善皮膚過度色素化的效果。同時對酪胺酸酶具有抑制作用，則可使黑色素生合成的量減少[11]。

3. 對苯二酚 (HQ)

對苯二酚（HQ）是一種脂溶性的酚類化合物，在皮膚的美白方面，HQ 會抑制黑色素生合成的作用，是因為抑制了酪胺酸酶的活性及抑制黑色小體的形成

或增加黑色小體的分解作用，而產生了美白的效果。但是因為具刺激性，高濃度（5% ）長期使用會引起皮膚炎以及色素沉澱，1987 年時已經被列入藥用品，一般化妝品不能使用。

4. 麴酸 (Kojic acid)

麴酸是從麴菌萃取出的成分，它的作用是能抑制黑色素的產生。由於麴酸可以抓住銅離子，則能有效地抑制酪胺酸酶的生合成及降低酪胺酸酶的活性，因此減少黑色素的生合成[12]。所以麴酸為最受歡迎的美白成份。但長期使用麴酸會造成細胞病變毒化，衛生署公告：美白麴酸含量-限量 2%。

5. 熊果素(Arbutin)

熊果素的學名為 hydroquinone-ß-glucopyranosid，對苯二酚的衍生物。熊果素具有皮膚美白的效果，主要是因為抑制酪胺酸酶的活性，而減低了黑色素的生合成[12]。

IV. 酪梨及其他中草藥的介紹

酪梨是常綠喬木，枝條脆弱，易被風折斷，且淺根性，易被強風吹倒，栽植時最好在避風地區或設有防風林地。嘉南地區開花期 12-4 月，其花器雖為兩性花，但因雌雄蕊不同時間成熟，難以自行授粉，一花序著果 1-2 個，從開花至果實成熟所需日數依品種而異，早熟品種約 4 個月，晚熟品種約 7 個月以上。因此酪梨的產期可從 6 個月至翌年二月份。台灣栽培酪梨集中在嘉南地區，其中以台南縣大內鄉產量最多，而以麻豆鎮栽植歷史最久，嘉義縣竹崎鄉也栽培約 80-100 公頃；近年來，屏東內埔及高雄六龜等地亦開始零星栽培[13]。

根據有權威性的『世界之最』記載，酪梨是營養價值最高的水果。酪梨果實糖分含量低，植物性脂肪高，多為不飽和脂肪酸，具有降低膽固醇、疏通阻塞的血管及預防心臟疾病與高血壓之功效。除含有植物性脂肪外，並含有豐富的蛋白質、礦物質、維他命 A、C、E 及維生素 B 群等，可以去除黑斑、青春痘、皺紋，有養顏美容及防老化的效果，可作為自然的化妝品及天然防曬藥物。[14,15]

酪梨含有豐富的蛋白質、礦物質、維他命 A、C、E 及維生素 B 群，是一種高營養價值的水果，民間流傳有美白的效果，而酪梨含大量植物性脂肪，可快速滲透皮膚，所以有些美白及防曬化妝品會加入酪梨油。

至於其他中草藥如藁本、白芍、天門冬及絲瓜露等，則是名間傳說或中醫醫學記載具有美白療效，所以本次實驗則是要利用這些中草藥之萃取物來了解其美白的機轉，看各層萃取物是透過抑制黑色素生合成抑或是毒殺黑色素細胞而產生美白作用。

二、實驗方法

I. 細胞培養

1. 細胞培養的培養液：

小鼠的黑色素瘤細胞（B16-F0 cells）所使用培養液為含 10% 胎牛血清（FBS）、2mM L-glutamine、100ug/ml penicillin/streptomycin、1% non-essential amino acid 及 3.7g/L $NaHCO_3$，pH7.2~7.4 的 DMEM（Dulbeccos modified eagle medium），所有使用的培養皿皆購自 Costar、Corning 或 Greiner 等公司。

2. 細胞株繼代培養：

將細胞每三天作一次繼代培養，整個過程在無菌操作（Laminar flow）中進

行。當細胞生長到約八至九分滿時，先吸出原有之培養液，以 10 毫升之 HBSS 沖洗，再加入 1 毫升之胰蛋白酶(TEG)靜置反應 2 分鐘,最後加入 8 毫升培養液終止反應。取出約 10^6 的細胞放入 T75 的培養皿中，加入 10 毫升的培養液，放入 5% CO_2、37 ℃的培養箱中培養。

II. 中草藥萃取液的製備

將買來的中草藥切塊或磨粹，浸泡在正己烷（n-hexane）中。2 小時後，過濾，取其浸液，利用減壓濃縮機將其濃縮，即得到正己烷層萃取物（n-NF）。一部分的中草藥則浸泡在二氯甲烷（dichloromethane），一樣經過 2 小時後，過濾，取其浸液，利用減壓濃縮機將其濃縮，即得到二氯甲烷層萃取物（diCF）。再以相同的步驟加入甲醇（Methanol），濃縮後，即得到甲醇層萃取物（MeF）。

再將剩下的中草藥，用果汁機加二次水打碎，將其過濾，再將濾液拿去冷凍乾燥，及得到水層萃取物（WF）。

III. 試劑的配製

除 Vit.C 及 WF 以二次水溶解，配置成 0.1M 及 100mg/ml 的 stock solution 以外，其餘的試劑，如酪梨有機溶劑層萃取液皆以 DMSO 溶解，配製成 0.1M 及 100mg/ml 的 stock solution。而 MTT 染劑則溶在 HBSS 中配製成 5mg/ml 的 stock solution。

IV. 細胞生長及毒性測試

1. MTT 分析法

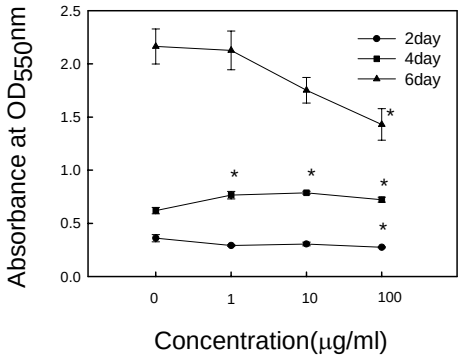
此法是參考 Jiao 等學者於 1922 年所發表之方法加以修飾而成[16]。MTT 全名為 3-（4,5-dimethylthiazol-2-yl）-2,5-diphenyltetrazoleliumbromide，為一黃色染劑，加入細胞培養液中，會經擴散進入細胞中，在存活細胞中，經粒線體之 succinate dehydrogenase 去氫還原後形成藍紫色的 formazan 結晶，用 DMSO 將 formazan 結晶溶出，可得到藍紫色溶液，於 550nm 測吸光值，由吸光值高低便可知細胞存活的多寡，因此常用於檢測藥物對於細胞生長及存活率的影響。

將 100 μl 細胞植入 96 孔洞之培養盤（5×10^3cells/well），在 24 小時後加入含各種不同濃度試劑或酪梨萃取液的培養液 100 μl。經 72 小時培養後，將培養液吸出，並以 HBSS 沖洗一次，再加入含 MTT 之新鮮培養液（1mg/ml）100 μl 置於培養箱中 2.5 小時後取出，並吸出培養液，用 100 μl DMSO 將藍紫色結晶溶出，再以 ELISA reader 判讀波長 550nm 時之吸光值，可由此比較細胞處理不同濃度試劑或酪梨萃取液後生長曲線之變化。

2. 錐蟲藍排除法

存活的細胞皆具有排除錐蟲藍的能力。實驗中培養細胞數目，可由 10ul 的細胞懸浮液混合等量的錐蟲藍染色劑，並置於血球計數器（hema- cytometer）中，於顯微鏡觀察計算之。由此可得存活和死亡細胞數目及細胞存活率。

將細胞培養在 T25 中，經過 72 小時後，將培養液吸出及用 HESS 沖洗，加入 TEG 反應 2 分鐘，再加入 6.5 毫升的 HESS 將細胞吸出放在離新管中，以 1000g 離心 5 分鐘，倒掉上清液，用手拍散沉澱細胞之後，加入培養液混合成懸浮液，取 10ul 的細胞懸浮液混合錐蟲藍溶劑，至於血球計數器中，於顯微鏡下觀察之。



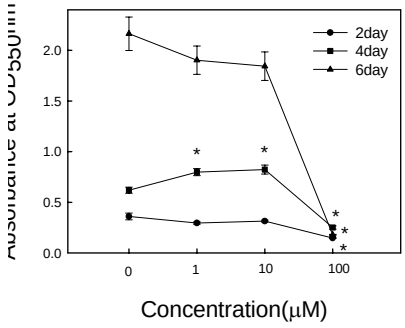
V. 酪胺酸酶的活性測試

酪胺酸酶的活性分析是採用 *in vitro* 的方式，在 96 孔洞培養皿中，於每個孔洞中加入 70 μl 的 HBSS、10 μl 各種不同濃度的試劑或酪梨萃取液，及 10 μl 之 12U 酪胺酸酶，放入 37 ℃培養箱中反應 30 分鐘，然後再加入 10 μl 的 10mM L-dopa，繼續放入培養箱中反應 30 分鐘，採用 492 nm 的波長來測吸光值的變化量[17]。

三、結果與討論

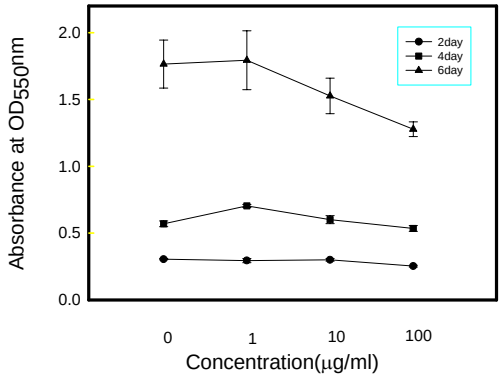
由實驗結果得知，在細胞生長及毒性測試方面，酪梨的 diCF 及 Me F 和正對照組 Vit C 有相似的走向，甚至在第六天的低濃度（10μg/ml）就有明顯的細胞毒性，但酪梨的 n-HF 和 WF 在第六天的高濃度（100μg/ml）時，才有明顯的細胞毒性。測試酪胺酸酶活性是以 L-Dopa 為受質，偵測其被酪胺酸酶催化成 dopaquinone 的能力，故測定 dopaquinone 的吸光值便可得知酪胺酸酶的活性是否被抑制，在正對照組 Vit C 中，隨濃度增加，吸光值降低，表示活性有被抑制，而負對照組（NC）為酪胺酸酶加 Vit C 的結果，吸光值沒有增加，表 Vit C 在 OD_{492}nm 沒有影響到 dopaquinone 的吸光，故從圖 F 可看出此方法可有效地來測試酪梨萃取物對酪胺酸酶活性的影響。而和正對照組 Vit C 比較，酪梨 WF 在高濃度（100μg/ml）有明顯的抑制作用，而酪梨 diCF 和 MeF 只有在低濃度（1μg/m）才有明顯的抑制作用，但作用也比 WF 低。

附圖 1　vit C 之生長抑制圖

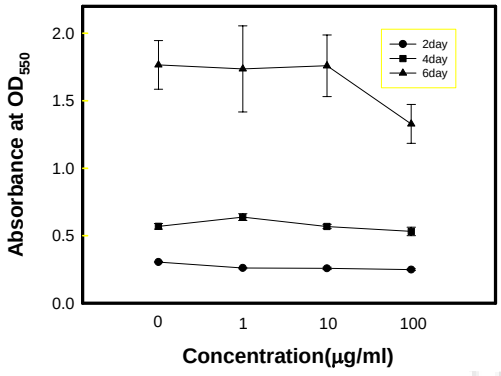


附圖 2　酪梨 之生長抑制圖

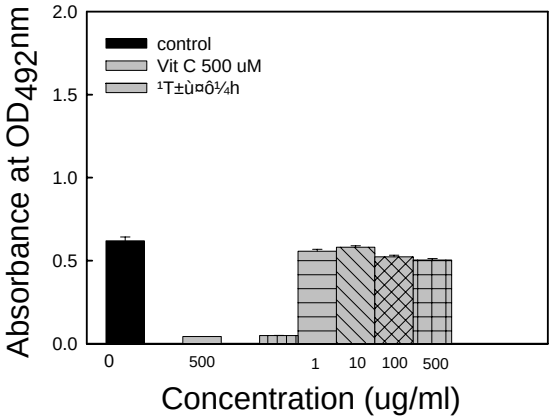
附圖 3　天門冬之生長抑制圖



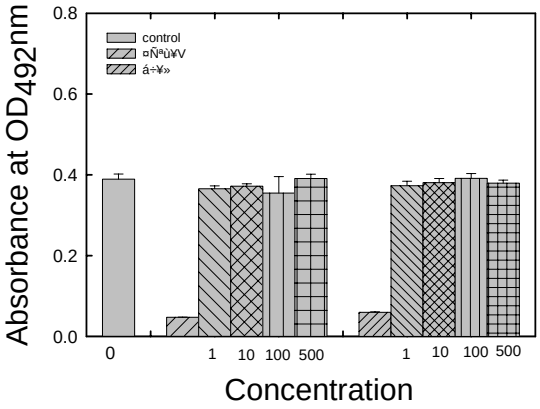
附圖 4　絲瓜露之生長抑制圖



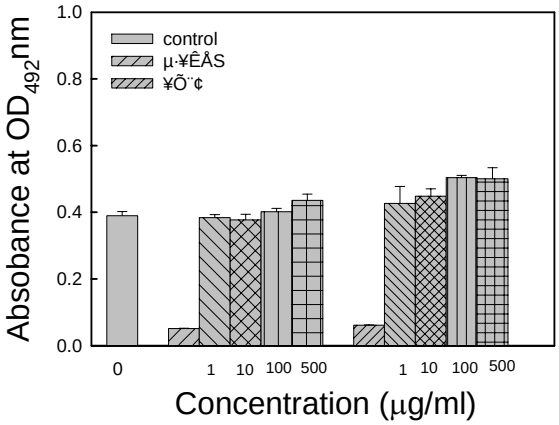
附圖 5　酪梨之 tyrosinase 活性抑制圖



附圖 6　天門冬及藁本之 tyrosinase 活性抑制圖



附圖 7　絲瓜露及白芍之 tyrosinase 活性抑制圖



四、參考文獻

1. Bolognia, J.L., and Pawelek, J.M. Biology of hypopigmentation. *J. Am. Acad. Dermatol*., 19, 217-255, 1988.
2. Riley, P.A., Cookey, C.J., Johnson, C.I., Land, E.J.Latter, A.M., and Ransden, C.A. Melanogenesis-targeted anti-melanoma pro-drug development ： effect of side-chain variations on the cytotoxicity of tyrosinase-generated ortho-quinones in a model screening system. *Eur. J. Cancer*., 33, 135-143, 1997.
3. Orlow, S.J. Melanosome are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J. Invest. Dermatol*., 105, 3-7, 1995.
4. Ito, S., Wakamatsu, K, and Ozeki, H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res.*, 13(suppl 8), 103-109, 2000.
5. Hearing, V.J., and Jimenez, M. Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int . J. Biochem*, 19, 1141-1147,1987.
6. Mountjoy, K.G. The human melanocyte stimulating hormone receptor has evolved to become “ super-sensitive " to melanocortin peptides. *Cell. Endorcrinol.*, 102, R7-R11, 1994.
7. Mountjoy, K.G., Robbins, J.S., Nortrud, M.T., and Cone, R.d. The cloing of a family of genes that encode the melanocortin recepters. *Science*, 257, 1248-1251, 1992
8. Mumma, R.O., Mckee, E.E., and Verlangieri, A.J. Anti-ascorbutic effect of ascorbic acid 2-sulfate in the guinea pig. *Nutr, Rep. Int*.., 6, 133-137, 1972.
9. Manning, J.M. and Meister, A. Conversion of praline to collagen hydroxyproline. *Biochemistry*, 5, 1154-1165, 1966
10. Lerner, A.B. and Fitzpatrick, T.B., Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.*, 30, 91-126, 1950
11. Takeuchi, M. and Tomioka, Y.Mutual reaction between vitamine Cand E.Vitamine, 40, 116, 1969.
12. Maeda, K. and Fukuda, M. Arbutin：mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Pharmacol. & Experimental Ther*. 276, 765-769, 1996
13. http://www.lilyfruit.com.tw/data_22/book_01.htm
14. http://nknucc.nknu.edu.tw/~s1378/wjs-5-1.htm
15. http://www.aeh.ntu.edu.tw/oldweb/910817/char1.htm
16. Jiao, H., Soejima, Y, Ohe, Y., and Saijo, N.A. A new MTT assay for examining the cytotoxicity of activated macrophages towards the nonadherent P388 leukemia cell line. *J. Immnol Methods*., 153, 265-266, 1992
17. Choi, S. Y., Kim,S., Kim, H.,Suk, K., Hwang, J.S., Lee, B.G., Kim, A.J., and Kim, S.Y. (4-Methoxy-benzylidene)-(3-methoxy- phenyl)-amine, a nitrogen analog of stibene as a potent inhibitor of melanin production. *Chem. Pharm. Bull*., 50, 450-452, 220.
18. http://home.kimo.com.tw/nutriology.tw/html/vit_e.html