

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC-98-01
計畫名稱：類薑黃素對草菇酪胺酸酶活性及 B16 細胞之黑色素形成之影響

執行期間：98 年 1 月 1 日至 98 年 12 月 31 日

<input checked="" type="checkbox"/> 整合型計畫	<input type="checkbox"/> 個別型計畫
計畫總主持人：楊朝成	計畫主持人：
子計畫主持人：楊朝成、郭玫君	
子計畫共同主持人：郭玫君	
計畫參與人員：楊朝成、郭玫君、 吳明娟、張綺芳、蔡幸芳、黃郁 媛和吳婉君	

中華民國 99 年 02 月 28 日

## 摘要

薑黃(*Curcuma longa* Linn)是一種薑科植物，其根狀地下莖萃取出主要成份為薑黃素 (Curcumin)、去甲氧基薑黃素(Demethoxycurcumin)、去二甲氧基薑黃素 (Bidemethoxycurcumin)，合稱為類薑黃素(Curcuminoids)；另外四氫薑黃素 (Tetra-hydro curcumin)則是薑黃素之代謝產物。本研究之目的為探討類薑黃素是否可藉由抑制酪胺酸酶的活性而降低黑色素的生合成，以及其抑制機轉。

本研究將類薑黃素加入酪胺酸酶與不同的酵素基質(tyrosine或L-DOPA)共同作用，其後偵測490nm吸光值以及檢測其有效抑制酪胺酸酶活性百分之五十的濃度(IC<sub>50</sub>)；結果顯示Curcumin、Demethoxycurcumin、Bidemethoxycurcumin和Tetra-hydro curcumin，其IC<sub>50</sub> (tyrosine)分別為：71.83、14.14、8.65和54.33μM，其中以Bidemethoxycurcumin抑制效果最佳。再者研究其抑制酵素活性之機制，利用基質和反應速率進行Lineweaver-Burk plots雙倒數作圖以判定抑制酵素的形態，結果發現其均為競爭型的抑制。進一步將化合物進行B16的細胞測試，結果發現20μm Demethoxycurcumin、Bidemethoxycurcumin和curcumin作用72小時後，黑色素含量減少，且細胞存活率達80%以上。

未來希望可將化合物進行相關動物試驗，以期拓展類薑黃素在黑色素抑制劑之應用價值。

關鍵字：類薑黃素、酪胺酸酶、IC<sub>50</sub>、B16 細胞

## 前言

黑色素廣泛分布在動物、植物和微生物內，其能阻擋紫外線的穿透使真皮及皮下組織免受紫外線的傷害。不過黑色素的過度產生，會在皮膚上產生黃褐斑、黑斑及皮膚癌。美白治劑添加於多種保養品和化粧品中，為了使消費者使用後不致產生副作用，其除了具美白功效外，還必須兼具穩定性及安全性，於是安全無毒性的美白治劑並成了目前的新趨勢。天然萃取物相對於化學合成物，其穩定性高且較易被生物體吸收和代謝，因此是一絕佳的選擇。另外蔬果及菇蕈類的褐變也和黑色素有關；農產品的褐變直接影響外觀，進而降低售價。黑色素的生合成又與酪胺酸酶和其相關蛋白質的活性相關。因此抑制酪胺酸酶及其相關蛋白質的活性，便可阻斷黑色素的生合成。

本研究主要利用類薑黃素來探討其抑制酪胺酸酶的活性，以及抑制的機轉。並利用B16小鼠黑色素瘤細胞株，來探討樹蕃茄萃取物對於抑制胞內酪胺酸酶及其相關蛋白質的活性。期望此種天然物可用於人類美白治劑或防止蔬果核變，進而經過相關動物試驗甚至於臨床試驗，爾後能夠應用於醫療美白或降低農產品褐變之用。

## 結果和討論

黑色素之生合成是由酪胺酸酶催化酪胺酸形成 L-DOPA，L-DOPA 再經由酪胺酸酶催化形成黑色素。將不同濃度的 curcumin、Demethoxycurcumin、Bisdemethoxy-curcumin、Tetra-hydro curcumin 四種化合物，以及 Kojic acid(正對照組以草菇酪胺酸酶和不同的酵素基質(L-Tyrosine 或 L-DOPA)共同作用，再偵測其作用溶液的吸光值來推斷類薑黃素抑制酪胺酸酶活性達百分之五十之濃度。其結果如表 1 所示，Bisde-methoxycurcumin 抑制效果最佳，在低濃度  $8.65 \pm 0.43 \mu\text{M}$  即可降低百分之五十的草菇酪胺酸酶活性；Demethoxycurcumin 次之 IC<sub>50</sub> 為  $14.14 \pm 1.27 \mu\text{M}$ ；Bisdemethoxycurcumin 和 Demethoxycurcumin 兩者 IC<sub>50</sub> 皆優於正對照組的 Kojic acid ( $20.86 \pm 2.62 \mu\text{M}$ )。另外 Curcumin 和 Tetra-hydro curcumin 也具有抑制草菇酪胺酸酶的能力，其 IC<sub>50</sub> 分別為  $71.83 \pm 3.68 \mu\text{M}$  和  $54.33 \pm 0.17 \mu\text{M}$ 。而抑制草菇酪胺酸酶活性形成多巴的 IC<sub>50</sub> 結果如表 2 所示：其中以 Bisdemethoxycurcumin 效果為最佳，IC<sub>50</sub> 達  $9.89 \pm 3.01 \mu\text{M}$ ，效果遠比 Kojic acid 之  $42.59 \pm 5.37 \mu\text{M}$  為佳；Demethoxycurcumin 之 IC<sub>50</sub> 為  $56.72 \pm 1.11 \mu\text{M}$ ，其餘二個化合物之 IC<sub>50</sub> 皆大於  $100 \mu\text{M}$ 。

表 1 類薑黃素純化合物以酪胺酸(Tyrosine)為反應基質下抑制酪胺酸酶活性的能力

Compound	IC50 <sup>a</sup> ( $\mu$ M) of L-Tyrosine $\pm$ SD
Curcumin	71.83 $\pm$ 3.68
Demethoxycurcumin	14.14 $\pm$ 1.27
Bisdemethoxycurcumin	8.65 $\pm$ 0.43
Tetra-hydro curcumin	54.33 $\pm$ 0.17
Kojic acid	20.86 $\pm$ 2.62

<sup>a</sup>IC50:是可以抑制酪胺酸酶活性達百分之五十的樣品濃度

表 2 類薑黃素純化合物分別在以 L-DOPA 為反應基質下抑制酪胺酸酶活性的能力

Compound	IC50 <sup>a</sup> ( $\mu$ M) of L-DOPA $\pm$ SD
Curcumin	>100
Demethoxycurcumin	56.72 $\pm$ 1.11
Bisdemethoxycurcumin	9.89 $\pm$ 3.01
Tetra-hydro curcumin	>100
Kojic acid	42.59 $\pm$ 5.37

<sup>a</sup>IC50:是可以抑制酪胺酸酶活性達百分之五十的樣品濃度

再者研究其抑制酵素活性之機制，以 0  $\mu$  M、8  $\mu$  M 和 12  $\mu$  M 的酪胺酸和酪胺酸酶共同作用，並偵測其反應速率，利用基質濃度和反應速率，以 Lineweaver-Burk plots 作圖並計算 Vmax 和 Km。四種試驗化合物結果由圖 1 顯示，不同濃度抑制物之作用線皆相交於 Y 軸，顯示其 Vmax 相同，其皆為競爭型抑制。另外由表 3 可看出 Bisdemethoxycurcumin 之 Km (0.727mM)最高，其次為 Demethoxycurcumin (0.712mM)、Curcumin (0.654mM)，最後為 Tetra-hydro curcumin (0.479mM)，其皆高於對照組的 0.338mM。此結果顯示類薑黃素與酪胺酸競爭酪胺酸酶的結合位置，因此抑制酪胺酸酶的活性。

表 3 類薑黃素(a)Curcumin,(b)DMC,(c)BDMC,(d)THC 酪胺酸酶抑制型態及活性動力參數( $V_{max}$ , $K_m$ )之影響

Compound	抑制形式 <sup>a</sup>	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\Delta OD_{490}/min$ )
Normal	/	0.338	0.067
Curcumin	Competitive	0.654	0.068
Demethoxycurcumin	Competitive	0.712	0.071
Bisdemethoxycurcumin	Competitive	0.727	0.068
Tetra-hydro curcumin	Competitive	0.479	0.067

<sup>a</sup> 酪胺酸酶與基質酪胺酸反應的結果

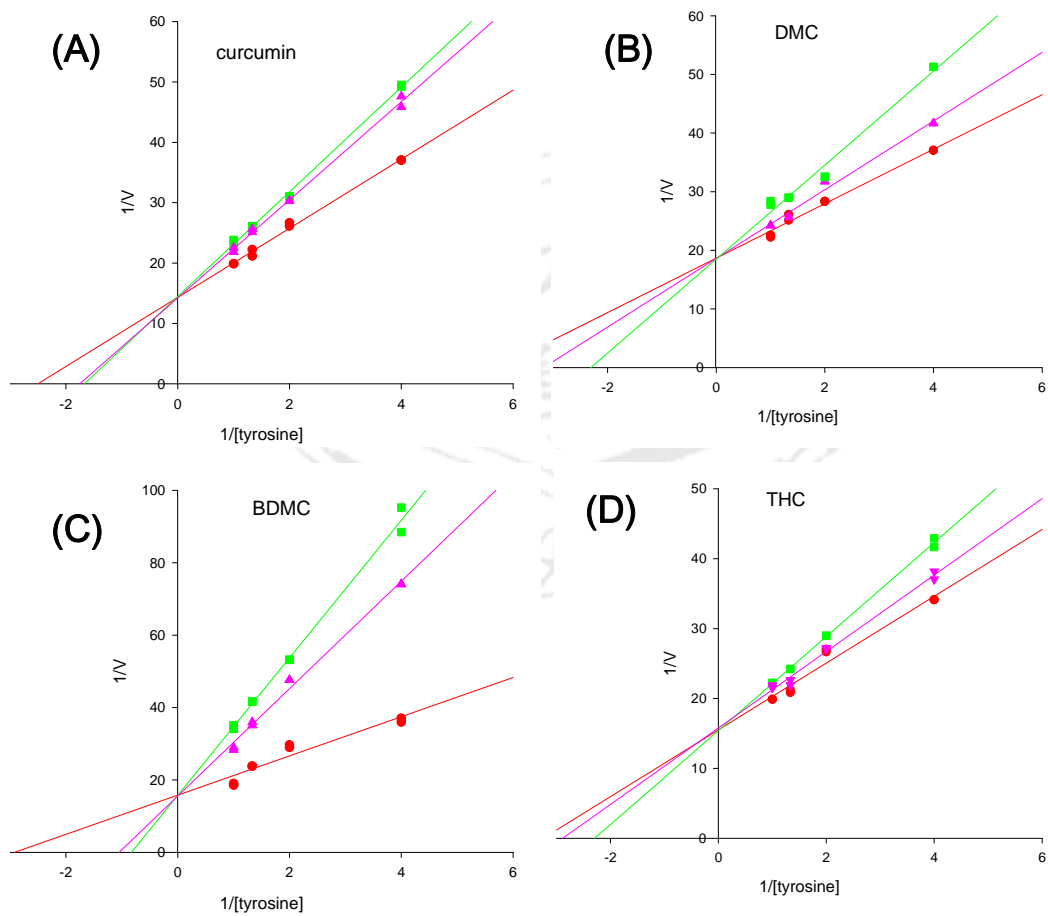


圖 1 (a)Curcumin , (b)DMC , (c)BDMC , (d)THC 以酪胺酸為基質抑制酪胺酸酶之雙倒數圖

最後我們將化合物進行小鼠黑色素瘤細胞 B16 F10的細胞測試，經MTT測試

在20mM的類薑黃素處理下，B16細胞的存活率多為80%以上，統計上與空白組並無顯著差異(如圖2所示)。另外在抑制B16細胞產生黑色素實驗中，結果顯示(圖 3) 20μM Demethoxycurcumin、Bidemethoxycurcumin和curcumin作用72小時後，B16細胞之黑色素驟減至20%以下( $p < 0.01$ )。

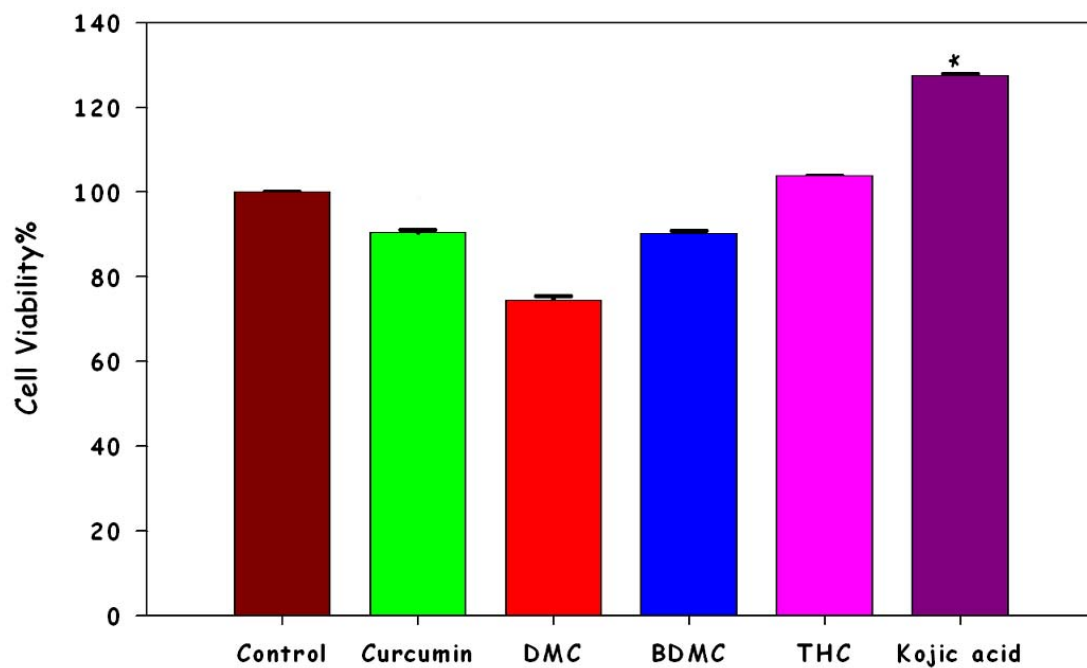


圖 2. 類薑黃素在黑色素腫瘤細胞上的細胞毒性測試。

(\* $P$ -value $<0.05$  , \*\*  $P$ -value $<0.01$ )

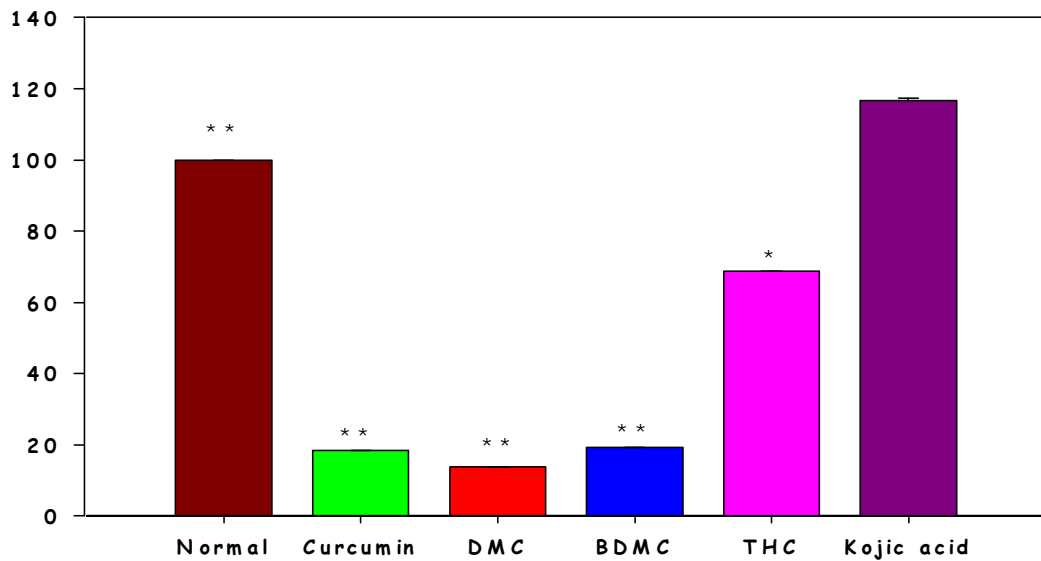


圖 3. 類薑黃素對 B16 細胞胞內黑色素含量之影響。

(\*  $P$ -value < 0.05 , \*\*  $P$ -value < 0.01)

酚類物質相關產品目前已廣泛使用於日常生活；有許多文獻指出，植物中所含的酚類化合物能有效抗氧化、清除自由基。除此之外，亦有文獻說明酚類化合物因結構上的特性，能與基質競爭酪胺酸酶而達到抑制酪胺酸酶活性的效果。本研究以結構上屬多酚類化合物的類薑黃素研究其抑制草菇酪胺酸活性，結果發現類薑黃素多能有效抑制草菇酪胺酸酶的活性。由於此些化合物部分結構與酪胺酸相似，因此其皆與基質競爭酵素活性之鍵結區而達到降低酵素活性之目的。在 B16 的細胞測試中，也有極佳地抑制黑色素的功效，未來希望可深入探討抑制胞內黑色素生合成的機轉及進行相關動物試驗，以期拓展類薑黃素在黑色素抑制劑之應用價值。



## 謝誌

感謝嘉南藥理科技大學的經費支持，另外感謝美國Rutgers(the state university of New Jersey) 食品科學系何其樞教授提供類薑黃素純化合物。

## 參考文獻

- [1] Arslan O., E. M., Sinan S.& Ozensoy O. (2004). "Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties." *Food Chemistry* **88**(3): 479-484.
- [2] Chang L.H., J. T. T., Huang H.S., Nien Y.F., Chang C.M. J. (2006). "Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn and purification of turmerones." *Separation and Purification Technology* **47**(3): 119-125.
- [3] Eigner D., S. D. (1999). "Ferula asa-foetida and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal." *Journal of Ethnopharmacology* **67**(1): 1-6.
- [4] Fidler Isaiah J. (1975). "Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo." *Cancer Res* **35**(1): 218-224.
- [5] Gabriela N., Raymond A. D.& Stefana M. P. (2005) "Tyrosinase-related protein-2 and -1 are trafficked on distinct routes in B16 melanoma cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**(4): 914-921.
- [6] Hye J. K., H. S. Y., Jin C. K., Chan S. P., Mi S. C., Mijee K., Hyangsoon C., Jung S. M., Yong S. K., Seong W. Y.& Jeong K. A. (2009). "Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication." *Journal of Ethnopharmacology* **124**(2,15): 189-196.
- [7] Hsu, C.-K., Chang, C.-T., Lu, H.-Y. & Chung Y.-C. (2007) " Inhibitory effects of the water extracts of *Lavendula* sp. on mushroom tyrosinase activity ". *Food Chemistry* **105**(3), 1099-1105.
- [8] Matsuda H., Nakashima S., Oda Y., Nakamura S.& Yoshikawa M.

- (2009) "Melanogenesis Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma Cells." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**(16): 6048-6053.
- [9] Madani W., Kermasha S.& Bisakowski B. (1999). "Inhibition of tyrosinase activity by a polyphenol esterase using selected phenolic substrates." *Phytochemistry* **52**(6): 1001-1008.
- [10] Ng L.T., K. H.-H.& Lu T.M. (2009). "Potential antioxidants and tyrosinase inhibitors from synthetic polyphenolic deoxybenzoins." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**(13): 4360-4366.
- [11] Ohguchi K., Banno Y., Akao Y. & Nozawa Y. (2004) "Involvement of Phospholipase D1 in Melanogenesis of Mouse B16 Melanoma Cells." *Biolobucal Chemistry* **279**(30): 3408–3412.
- [12] Lee M. H., Lin Y. P., Hsu F. L., Zhan G. R.& Yen K. Y. (2006) "Bioactive constituents of *Spatholobus suberectus* in regulating tyrosinase-related proteins and mRNA in HEMn cells." *Phytochemistry* **67**(12): 1262–1270.
- [13] Jiang Z., Xu J., Long M., Tu Z., Yang G.& He G. (2009) "2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-d-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation." *Life Sciences* **85**(9-10): 345-350.