嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

整合型計畫：狼尾草生物活性之探討

計畫類別：□個別型計畫　　▉整合型計畫
計畫編號：CNFS9502、CNFS9507、CNFS9508、 CNAL9504
執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

整合型總主持: 杜平惠

子計畫一：狼尾草對內源性抗氧化酵素表現之調控(CNFS9507)
計畫主持人：杜平惠

子計畫二：狼尾草之對蛋白氧化反應之探討(CNAL9504)
計畫主持人：王柏森

子計畫三：狼尾草對胞內自由基之影響(CNFS9502)
計畫主持人：張璨文

子計畫四：狼尾草對黑色素細胞之黑色素生成調節(CNFS9508)
計畫主持人：朱惠鈴

中華民國　96 年　2 月　26 日

一、摘要

狼尾草為坊間生機飲食材質之一，民間盛傳其具有特殊功效，惟迄今仍缺乏科學根據。本研究乃探討狼尾草之生物活性包括對細胞內源性抗氧化酵素 mRNA 之調控性、對細胞蛋白氧化反應之影響、對黑色素腫瘤細胞黑色素生成之影響、對細胞內自由基之影響等。結果顯示，500 μg/ml 之狼尾草水萃取物 (water extract of Naipergrass, WEN) 對大鼠肝細胞 Clone9 之抗氧化酵素包括 ZnCu-superoxide dismutase (ZnCu-SOD), Mn-superoxidase dismutase (Mn-SOD), catalase (CAT) 與 glutathione peroxidase (GPx)等之 gene 轉錄作用，會隨著 WEN 與彼等反應作用時間不同而有不同之調控性； 在蛋白質氧化反應方面，WEN 則顯示對 clone9 之蛋白質氧化修飾具有保護性;在細胞氧化自由基表現上，WEN 能顯著地抑制不同模式所生成氧自由基,顯示 WEN 在細胞內能降低氧化壓力;另外,在黑色素腫瘤細胞(B16-F0)之黑色素生成調控上，WEN 無法抑制 melanin 之生成與酪氨酸酶活性，顯示 WEN 對黑色素生成調控不具影響性 。

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

整合型計畫：狼尾草生物活性之探討
子計畫：狼尾草對內源性抗氧化酵素表現之調控

計畫類別：□個別型計畫　　▉整合型計畫
計畫編號：CNFS9507
執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

整合型總主持: 杜平惠
計畫主持人：杜平惠

執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國　96 年　2 月　26 日

一、摘要

本研究探討狼尾草水萃取物(WEN)對大鼠肝細胞 Clone9 細胞內源性抗氧化酵素 mRNA (如 ZnCu-superoxide dismutase，Mn-superoxide dimutase，catalase，及 glutathione peroxidase)表現之影響。結果顯示，狼尾草水萃取物(WEN)在 0-500μg/ml 濃度下，對 Clone9 細胞不具細胞毒性。再者彼等對於 Clone9 細胞之內源性抗氧化酵素 ZnCu-superoxide ismutase (ZnCu-SOD)，Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)，catalase，及 glutathione peroxidase (GPx)等，隨著處理時間不同(2, 6, 24 h)，具有不同調控性。

關鍵詞：狼尾草水萃取物，抗氧化酵素 mRNA，肝細胞

二、前言

細胞於正常代謝過程中會生成自由基與活性氧，當其超過細胞內自體防禦能力時，即會造成氧化壓力，而使細胞發生氧化傷害，氧化傷害常會引發脂質氧化，DNA 斷裂，致突變及細胞老化等現象（Halliwell and Gutteridge, 1989; Lindahl, 1993），且與許多疾病相關，包括動脈硬化、退化性腦病變、阿滋海默症、以及各種癌症與發炎反應等（Parola and Robino, 2001; Kovacic and Jacintho, 2001）， 雖然生理代謝造成自由基為不可避免的現象，但是現代人因為高油脂與高鹽飲食，亦促使產生過多的自由基，造成身體的負擔增加。而已知體內的抗氧化酵素的防禦系統如 superoxide dismutase (SOD)、glutathione peroxidase(GPx)、glutathione S-transferase(GST)、glutathione reductase(GSR)及 catalase 等的表現，對降低體內氧化傷害相當重要。其中 SOD 可捕捉 superoxide，GPx 可以催化 GSH 與自由基反應，GST 活性提升時可以減少細胞內氧化傷害，catalase 活性提升則直接對 H_2O_2 進行降解，以減少氧化傷害的衝擊。（Hochstein and Atallah, 1988; Somani and Husain, 1997）。由上述可知，細胞內抗氧化酵素的表現高低，對細胞之抗氧化力有深遠之影響。而天然抗氧化活性成分，除了直接捕捉自由基之功能外，也被認為可調節細胞內源性抗氧化酵素系統。狼尾草，學名為 *Pennisetum purpureum* S.屬於禾科植物，別名養生草、狼茅、小甜茅草，全株含礦物質、微量元素等。本研究室先前試驗已證實狼尾草能增加內源性抗氧化酵素之活性，惟其調控性之機制仍尚未釐清。基於此，本研究乃進一步探討狼尾草對大鼠肝細胞內源性抗氧化酵素表現系統調控之影響。

三、結果與討論

狼尾草水萃取物(WEN)對大鼠肝細胞 Clone9 細胞毒性作用

圖一為狼尾草水萃取物(WEN)對大鼠肝細胞 Clone9 細胞毒性作用之影響。將狼尾草水萃取物(WEN)添加於培養基中，結果發現大鼠肝細胞 Clone9 細胞存活率皆高於 99%以上，顯示狼尾草水萃取物(WEN)對大鼠肝細胞 Clone9 不具有毒性。

狼尾草水萃取物(WEN)對大鼠肝細胞 Clone9 細胞抗氧化酵素 mRNA 作用

圖二為處理不同濃度狼尾草水萃取物(WEN)2 小時對大鼠肝細胞 Clone9 抗氧化酵素 mRNA 作用之調節作用。當添加 500μg/ml 狼尾草水萃取物(WEN)於細胞培養基中，造成抗氧化酵素 mRNA 下降，

ZnCu-SOD 下降至 25%， Mn-SOD 下降至 55%，另一方面，catalase mRNA 及 GPx mRNA 也減少，由結果可知狼尾草水萃取物(WEN)處理 2 小時對細胞抗氧化酵素 mRNA 具有減少作用。

由圖三結果可知，當添加 500ug/ml 狼尾草水萃取物(WEN)於細胞培養基中處理 6 小時後，其 ZnCu-SOD mRNA，Mn-SOD mRNA 與處理 2 小時相比較有增加的趨勢。而 catalase mRNA 及 GPx mRNA 則出現明顯下降。

由圖四結果可知，當添加 500μg/ml 狼尾草水萃取物(WEN)於細胞培養基中處理 24 小時後，其 ZnCu-SOD mRNA，Mn-SOD mRNA 與控制組相比較有增加的趨勢。而 catalase mRNA 及 GPx mRNA 與處理 6 小時相比較有明顯增加的趨勢。

綜合上述結果可知狼尾草水萃取物(WEN)對大鼠肝細胞 Clone9 不具細胞毒性，且對抗氧化酵素 mRNA 具有調節作用，其中，處理 2 小時後對 ZnCu-SOD mRNA，Mn-SOD mRNA，具有減少作用。處理 6 小時後，對 catalase mRNA 及 GPx mRNA 具有減少作用。惟此 mRNA 減少作用於處理 24 小時後不明顯。而在動物實驗中是否亦具有同樣的效果，仍待進一步研究證實。

四、參考文獻

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1989. “Free Radical in Biology and Medicine”, ed. By B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge. Clarendon Press, Oxford.

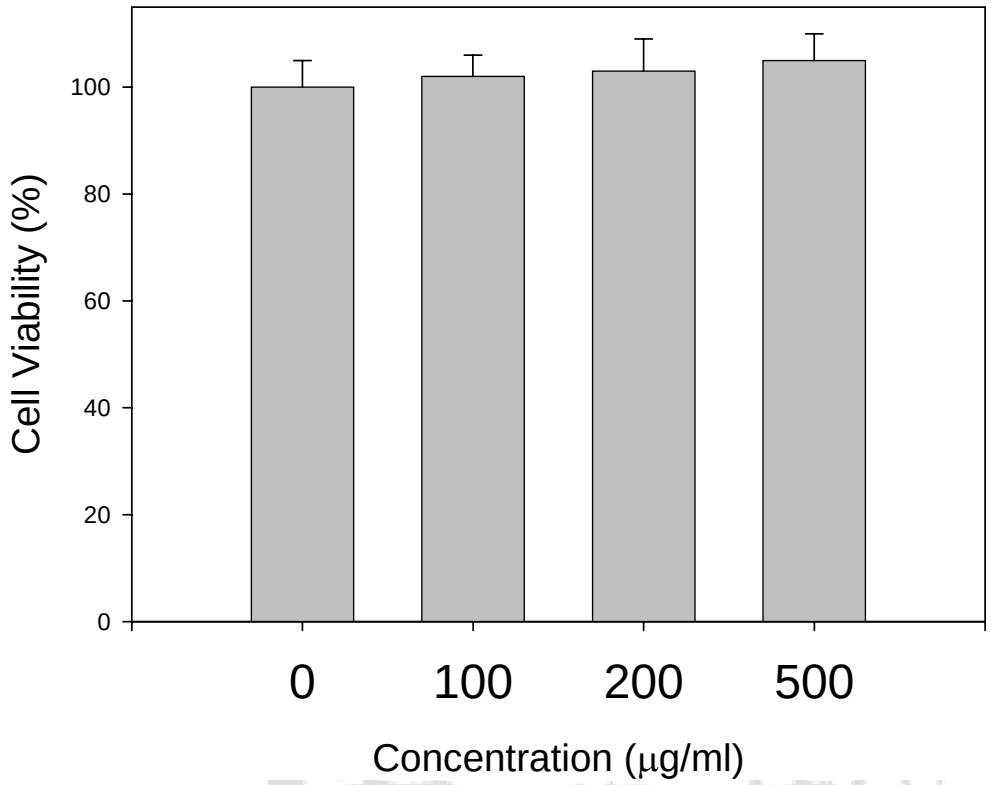
Hochstein, P and Atallah, A. S. 1988. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and canaer. Mutat. Res. 202:0363-375.

Kovacic, P, Jacintho, J. D. 2001. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidativestress and electron transfer. Curr Med Chem. 8:773-796.

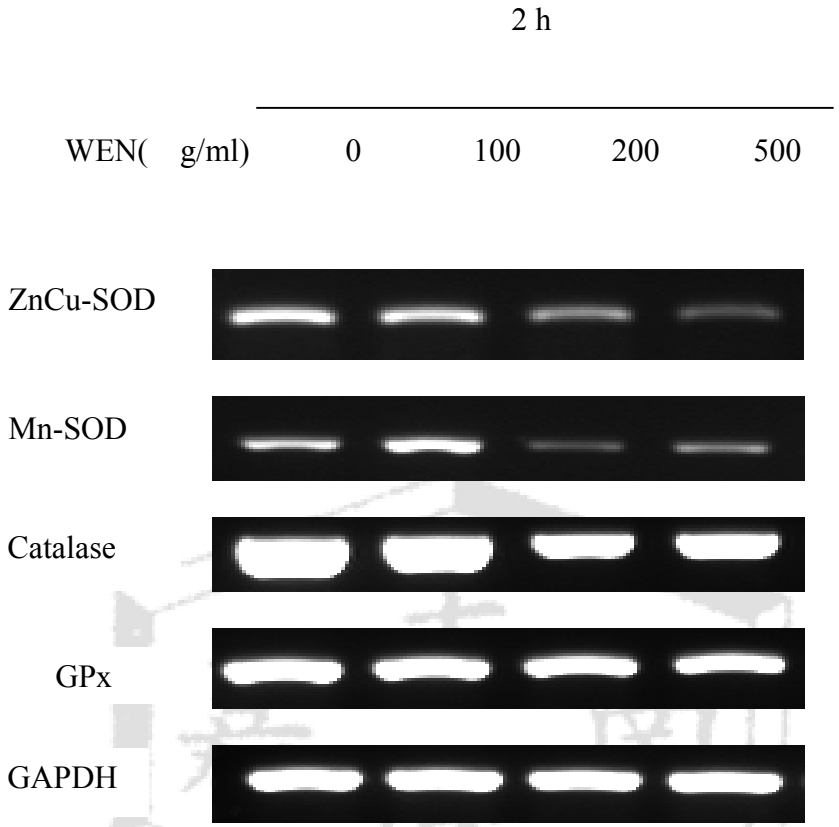
Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature. 362:709-715.

Parola, M, and Robino, G.. 2001. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. J. Hepatol; 35:297-306.

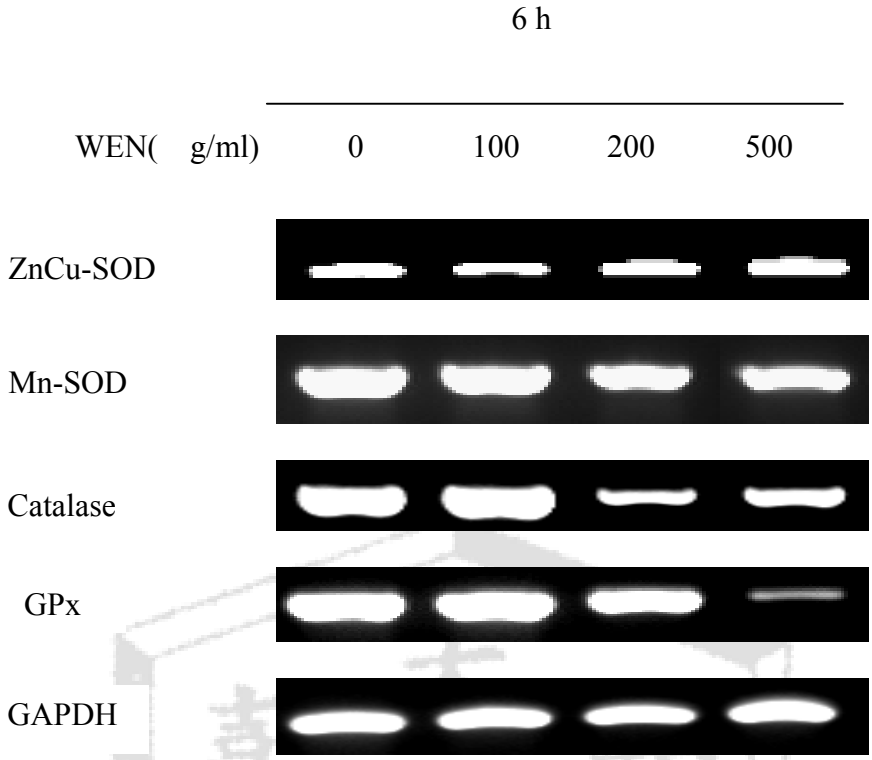
Somani, S. M and Husain, K. 1997. Schlorff C: Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In: Baskin SI, Harry S, eds. Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals , New York: Taylor & Francis, pp 125-141.



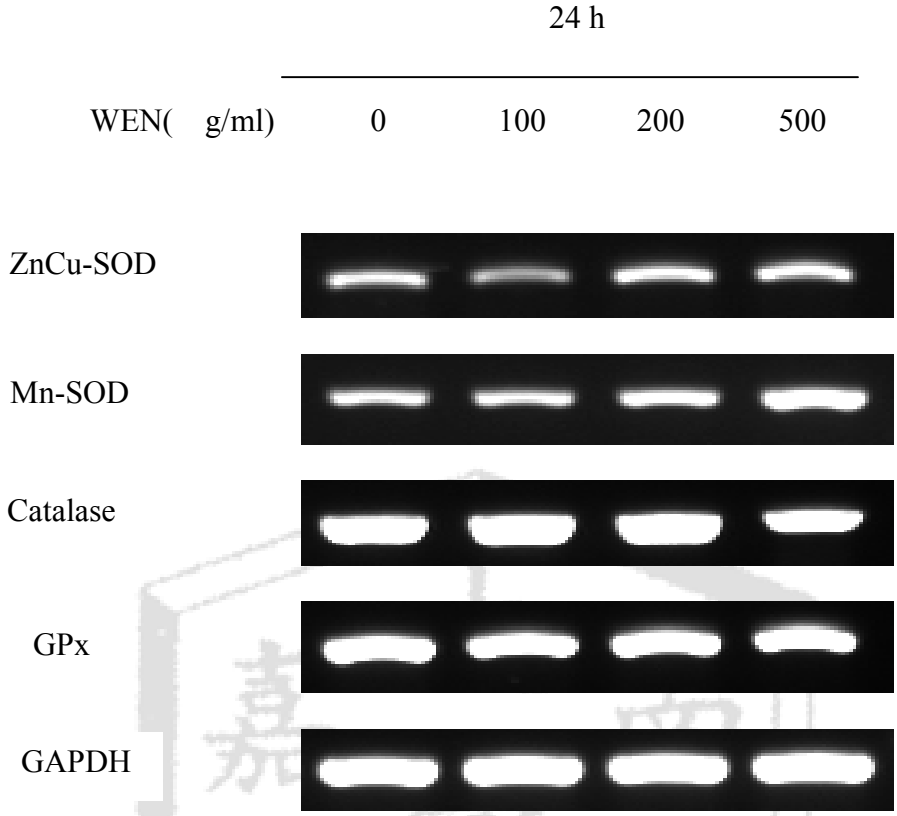
圖一不同濃度狼尾草水萃取物(WEN)處理 24 小時對大鼠肝細胞 Clone9 細胞毒性作用之影響



圖二不同濃度狼尾草水萃取物(WEN)處理 2 小時對 ZnCu-SOD，Mn-SOD，catalase，GPx 等抗氧化酵素 mRNA 之影響



圖三不同濃度狼尾草水萃取物(WEN)處理 6 小時對 ZnCu-SOD，Mn-SOD，catalase，GPx 等抗氧化酵素 mRNA 之影響



圖四不同濃度狼尾草水萃取物(WEN)處理 24 小時對 ZnCu-SOD，Mn-SOD，catalase，GPx 等抗氧化酵素 mRNA 之影響

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

整合型計畫：狼尾草生物活性之探討
子計畫：狼尾草之對蛋白氧化反應之探討

計畫類別：□個別型計畫　　▉整合型計畫
計畫編號：CNAL9504
執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

整合型總主持: 杜平惠
計畫主持人：王柏森

執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國　96　年　2　月 26　日

一、摘要

本研究探討狼尾草水萃取物(WEN)對大鼠肝細胞 Clone9 細胞之蛋白氧化之影響。結果顯示，狼尾草水萃取物(WEN)對大鼠肝細胞 Clone9 細胞之蛋白氧化具有良好的抗氧化力，惟其保護蛋白抗氧化未隨著添加濃度的增加而增加。此結果顯示狼尾草水萃取物(WEN)含有天然抗氧化活性成分具有 primary antioxidants 的角色，可以保護蛋白質免於氧化修飾。

關鍵詞：狼尾草、蛋白氧化

二、前言

在正常生理代謝過程中，會伴隨具有氧化傷害能力之自由基的產生。其中，含氧及含氮自由基（如 O_2^-, NO, $ONOO^-$）在體內具有生理調節與組織傷害的角色(Jessup et al, 1992)。許多研究證實體內若有過多含氧及含氮自由基之產生，會傷害及破壞修飾體內蛋白，造成蛋白氧化作用，並進而引發組織病變及加速疾病惡化(Radi, 1991; Leeuwenburgh, 1997)。在動脈硬化症發展的早期，位於動脈血管壁上的蛋白質會出現氧化的現象(Berliner et al, 1995)。另外根據先前研究指出，血漿裡的膽固醇的主要運送者，低密度脂蛋白，在受到外來氧化壓力及氧化修飾後，是脂肪沈滯性動脈硬化症發展的主要危險因子(Ross, 1999)。由此可推知，為避免心血管疾病及動脈硬化症的產生，如何有效的減少血漿中低密度脂蛋白及血管壁蛋白質受到氧化傷害，便成為相當重要的研究目標。目前已經知道經常食用保健飲食與降低慢性疾病的發生有密切因果關係。飲食中的蔬果類食物，可以有效的減少心血管疾病與癌症發生的風險(Hertog et al, 1993)。狼尾草[napier grasses (NG); Pennisetum purpureum]民間俗稱為牧草。是國內生機飲食之常用食材之一，但是國內有關狼尾草抑制蛋白質氧化的研究報告相當少見，因此，本研究擬探討狼尾草對細胞蛋白氧化作用之影響。

三、結果與討論

本實驗以免疫蛋白反應方式，進行大鼠肝細胞 Clone9 蛋白氧化之分析測試，藉以評估狼尾草水萃取物(WEN)是否具有保護蛋白氧化的抗氧化作用。將細胞以狼尾草水萃取物(WEN)與氧化劑共同培養四小時，再將細胞培養盤中之培養液吸乾，再以細胞專用刮勺將細胞刮下並收集到微量離心管，將細胞溶解，接著利用 10% SDS-polyacrylamide gel 進行電泳，將蛋白質依分子量大小不同分離。之後再利用半乾式轉移器將分離後之蛋白轉移至硝化纖維膜上。由於蛋白氧化後，會產生 carbonyl group，本試驗中再將纖維膜與 2,4-dinitrophenyl hydrazone (DNP- hydrazone)溶液進行反應，使 DNP 與氧化蛋白結合。反應結束後，洗去多餘的 DNP，再以抗體偵測纖維膜上結合的 DNP 濃度，即可判斷不同分子量蛋白氧化的程度。

由圖一結果顯示，狼尾草水萃取物(WEN)在不同濃度，對氫氧自由基所造成

之大鼠肝細胞蛋白質氧化具有保護之效果高，在狼尾草水萃取物 10ppm 時，具有高達 45% 之保護率，但是其保護效果並未隨狼尾草水萃取物濃度上升而增加，反而在狼尾草水萃取物 500ppm 時，其保護效力下降。綜合上述，可知狼尾草水萃取物具有抗氧化性，對蛋白質氧化具有保護效力，但是在高濃度下，可能會增加反應中氧化劑效果，造成其保護作用下降。

四、文獻參考

Berliner, J.A. *et al.*1995. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Circulation. 91:2488-2496.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kornhout D. 1993 Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet.;342:1007-1011

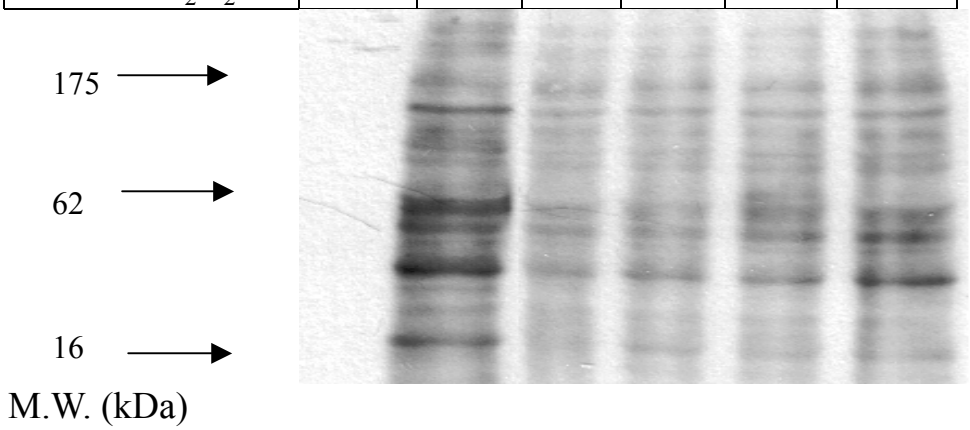
Jessup, W., Mohr, D., Gieseg, S.P.,Dean,R.T., and Stocker, R. 1992. The participation of nitric oxide in cell free- and its restriction of macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. Biochem. Biophys. Acta. 1180:73-82

Leeuwenburgh, C. *et al.*1997. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. J. Biol. Chem. 272:1433-1436.

Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch. Biochem. Biophys. 288:481-487

Ross, R.. 1999. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New Eng. J. Med. 340:115*.

WEN (ppm)	0	0	10	50	100	500
VitC+Fe+H_2O_2	0	+	+	+	+	+



圖一、狼尾草水萃取物(WEN)在不同濃度，對氫氧自由基所造成之大鼠肝細胞蛋白質氧化之影響

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

整合型計畫：狼尾草生物活性之探討
子計畫：狼尾草之細胞自由基之影響

計畫類別：□個別型計畫　　▉整合型計畫
計畫編號：CNFS9502
執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

整合型總主持: 杜平惠
計畫主持人：張璨文

執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國　96　年　2　月 26　日

一、摘要

本研究探討狼尾草水萃取物(WEN)對人類肝癌細胞 HepG2 細胞內自由基之影響。結果顯示，狼尾草水萃取物(WEN)對 xanthine/ xanthine oxidase 或 Fe(Ⅱ)-H_2O_2- luminol 誘發 superoxide 、hydroxyl radical 化學冷光激發強度具減緩之趨勢，顯示其對 superoxide 、hydroxyl radical 具有捕捉能力。再者狼尾草水萃取物(WEN) 對 t-BHP 誘發 HepG2 所產生之細胞壓力具有明顯之降低作用。

關鍵詞：狼尾草、細胞氧化壓力

二、前言

當生物體內經由外來物質或內生性的代謝過程產生的自由基，各式的活性氧(reactive oxygen species ,ROS) 如 singlet oxygen ($^1O_2$), superoxide radical ($O_2^{\bullet}$-), hydrogen peroxide (H_2O_2), 及 hydroxyl radical (• OH) 皆是細胞進行有氧代謝的副產品(Halliwell, 1994) ，這些副產物會氧化體內蛋白質和脂質等大分子，進而引起細胞死亡或組織受傷。氧化傷害對人類疾病有相當程度的影響，如：癌症、肺氣腫、腎絲球腎炎、肝硬化、心血管疾病，甚至腦退化疾病等，都曾被報導和氧化傷害有關（Parola and Robino, 2001; Kovacic and Jacintho, 2001; Gibson and Zhang, 2002; Wardle, 2000）。細胞內有各種防禦酵素及非酵素系統，用以抵抗可能的氧化傷害(Halliwell, 1994)。然而即使如此，仍有許多活性氧未能清除，因此造成細胞內累積受氧化傷害的生物分子。因而攝取富含抗氧化能力的食物或服用具抗氧化物質的補充劑，成為現代人膳食的新參考依據。

近年有學者提出天然植物中的成分，例如多酚類、類黃酮，可以防止動物體受到自由基和活性氧的氧化傷害。這些活性成分除了直接與活性氧反應，也可能藉由降低細胞產生活性氧之代謝，以減少細胞內氧化壓力。雖然本研究室已經證實狼尾草具有抗氧化性，但是關於狼尾草對於細胞內自由基產生之影響仍然未知。因此，本研究擬探討以 HepG2 為細胞模式，探討狼尾草對於細胞內自由基產生之影響。

三、結果與討論

狼尾草水萃取液(WEN)對人類肝癌細胞 HepG2 細胞毒性作用

圖一為不同濃度狼尾草水萃取液(WEN)對人類肝癌細胞 HepG2 細胞毒性之作用，將不同濃度(0-500 μg/ml)狼尾草水萃取液加入培養基液中培養肝細胞 24 小時。結果顯示，HepG2 細胞生長均高於 99%以上,因而狼尾草水萃取液對人類肝癌細胞 HepG2 細胞不具有毒性。

狼尾草水萃取液(WEN)對 superoxide radical 的捕捉能力

圖二為狼尾草水萃取液(WEN)對 Xanthine/xanthine oxidase 系統產生 superoxide radical 之作用，以化學冷光激發強度偵測自由基產生，在試管內加入 xanthine/ xanthine oxidase 以誘發 superoxide radical ，並加入不同量的狼尾草水萃取液，當添加量為 100 μg/ml 時，其 chemiluminescence intensity 下降至 76%，此結果顯示，狼尾草水萃取液具有 superoxide radical 之捕捉能力，可降低化學冷光激發。

狼尾草水萃取液(WEN)對 hydroxyl radical 的捕捉能力

圖三為狼尾草水萃取液(WEN)對以 Fe(Ⅱ)-H_2O_2-luminol 產生 hydroxyl radical 化學冷光激發強度之影響，當狼尾草水萃取液添加量為 200 μg/ml 時， 對於 Fenton-mediated Hydroxyl radical 產生之化學冷光激發強度降低至 69.79%，結果顯示，狼尾草水萃取液具有 Hydroxyl radical 之捕捉能力。

狼尾草水萃取液(WEN)對細胞內含氧自由基產生之影響

圖四為狼尾草水萃取液對細胞內含氧自由基 生成作用之影響。細胞內含氧自由基產生以 DCF-DA 螢光染劑偵測，螢光強度越高，表示細胞內含氧自由基產生量越高。試驗中以 t-BHP 為細胞內氧化劑。由結果可知，細胞單獨處理 t-BHP，細胞內含氧自由基產生量明顯增加。若同時給予 500 μg/ml 狼尾草水萃取液(WEN)，可以降低細胞內含氧自由基產生量。

綜合上述結果，可知狼尾草水萃取物(WEN)對人類肝癌細胞 HepG2 不具細胞毒性，惟對 superoxide 、hydroxyl radical 具有捕捉能力且對細胞內含氧自由基之生成，有顯著降低之能力。

四、參考文獻

Alia, M. Mateos, R. Ramos, S. 2006.

Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defence system of a human hepatoma cell line (HepG2). Eur Journal Nutriation 45:19-28

Gibson, G.. E. and Zhang, H. 2002.

Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration.Neurochem Int.40:493-504.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1989.

"Free Radical in Biology and

Medicine",ed. By B.

Halliwell and J. M. C. Gutteridge. Clarendon Press, Oxford.

Kovacic, P, Jacintho, J. D. 2001. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on

oxidativestress and electron transfer. Curr Med Chem. 8:773-796.

Parola, M, and Robino, G.. 2001. Oxidative

stress-related molecules and liver fibrosis. J.Hepatol; 35:297-306.

Shen, S. C., Chen, Y. C., Hsu, F. L. and Lee,

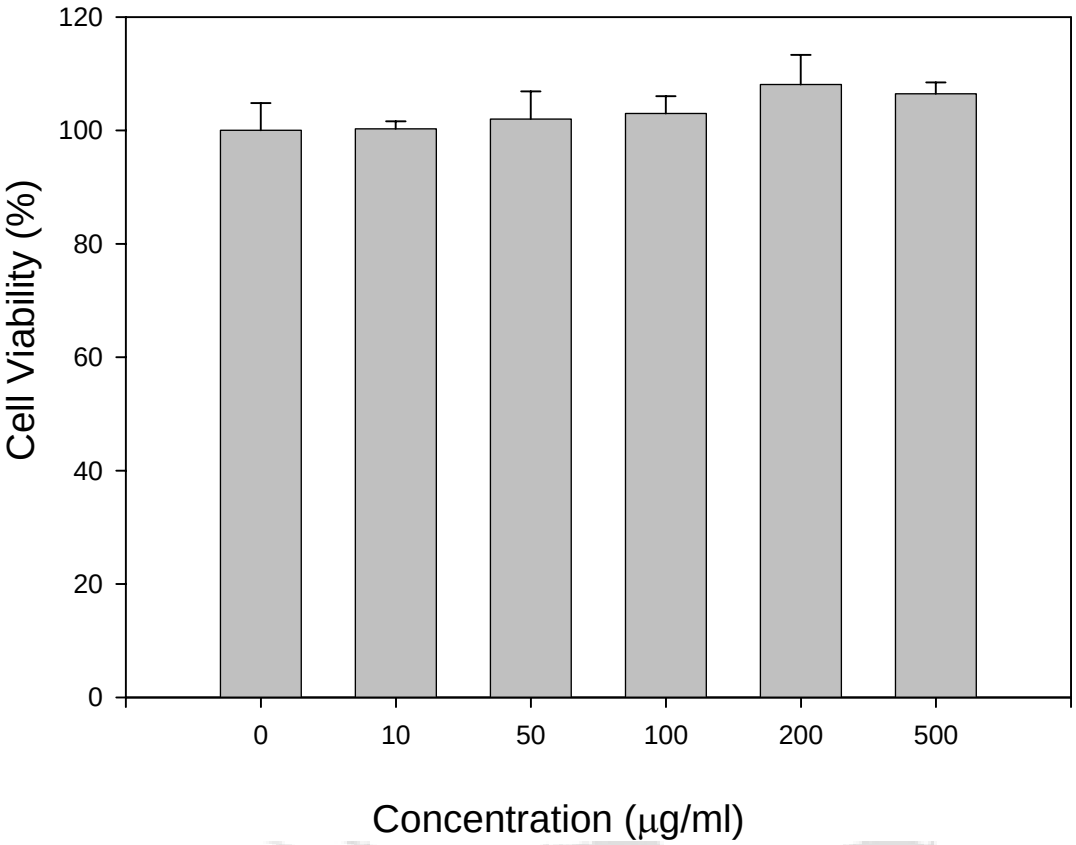
W. R. 2003 Differential apoptosis- inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cscade. J. Cell Biochem. 89:1044-1055.

Wardle, E. N. 2000. Oxidative processes in

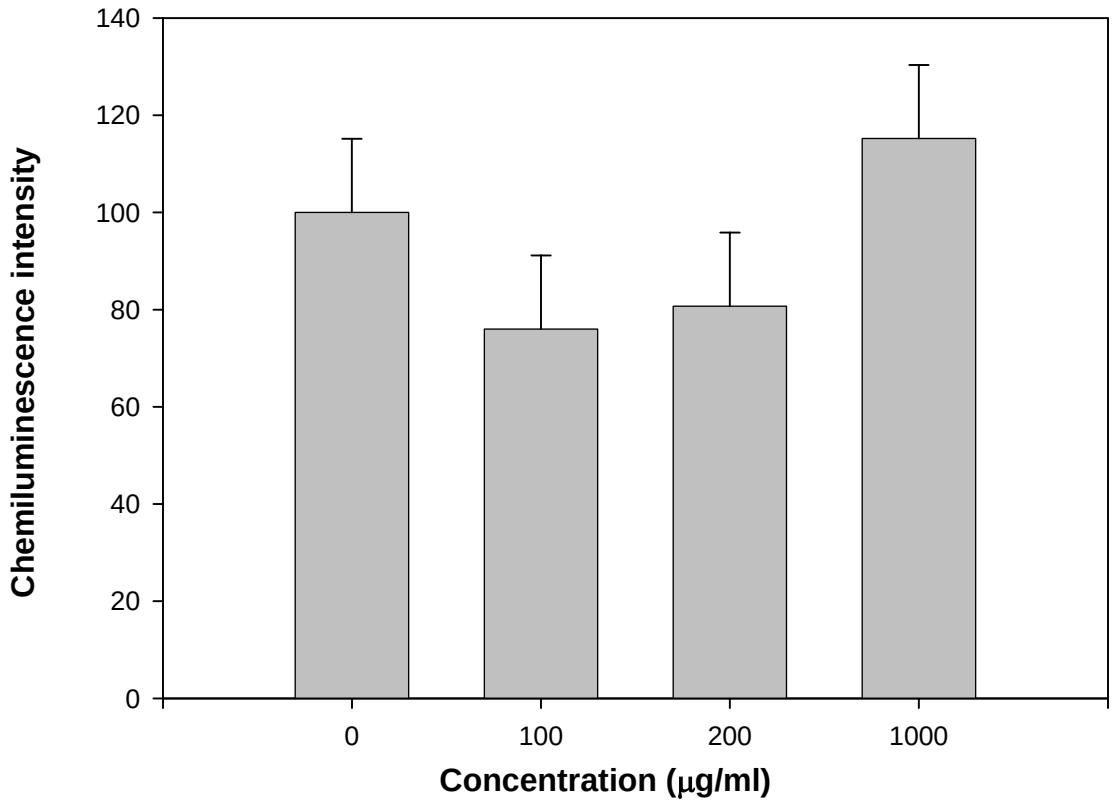
glomerulonephri-tides: Additional facts. Nephron. 85:103-106.

Wu M-J, Huang C-J, Lian T, Kou M-C, Wang L

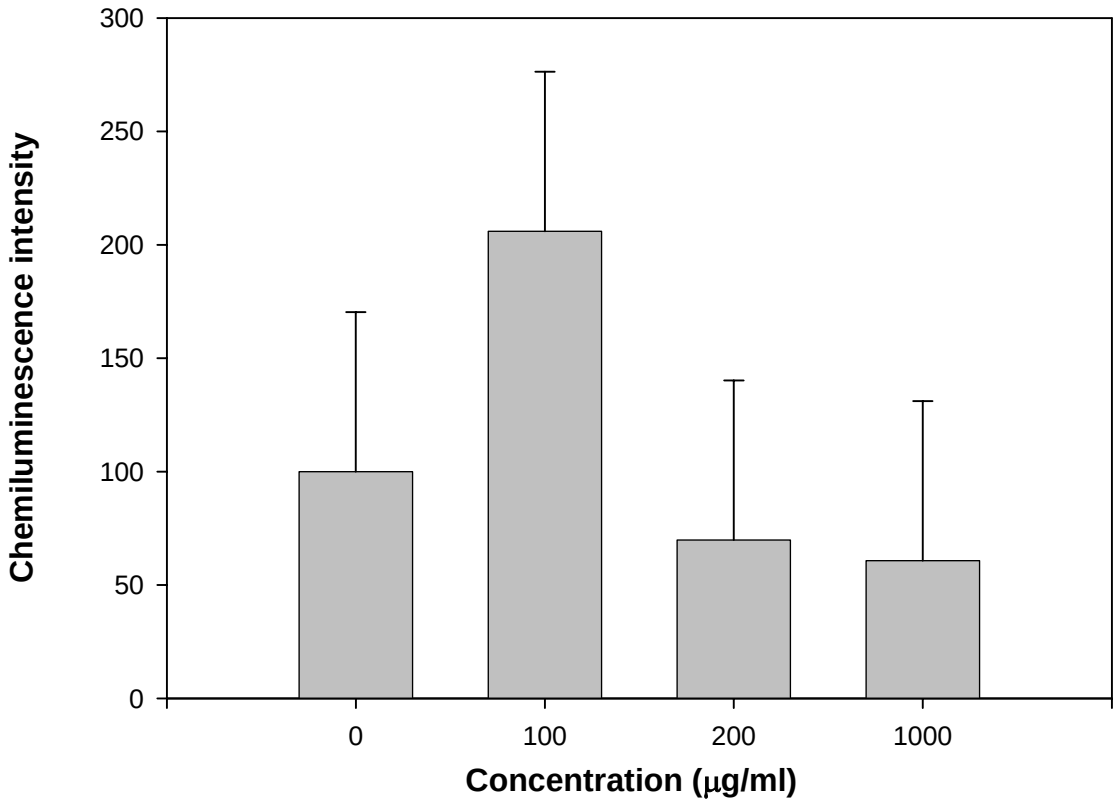
2005. Antioxidant Activity of Glossogyne tenuifolia. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (16): 6305-6312



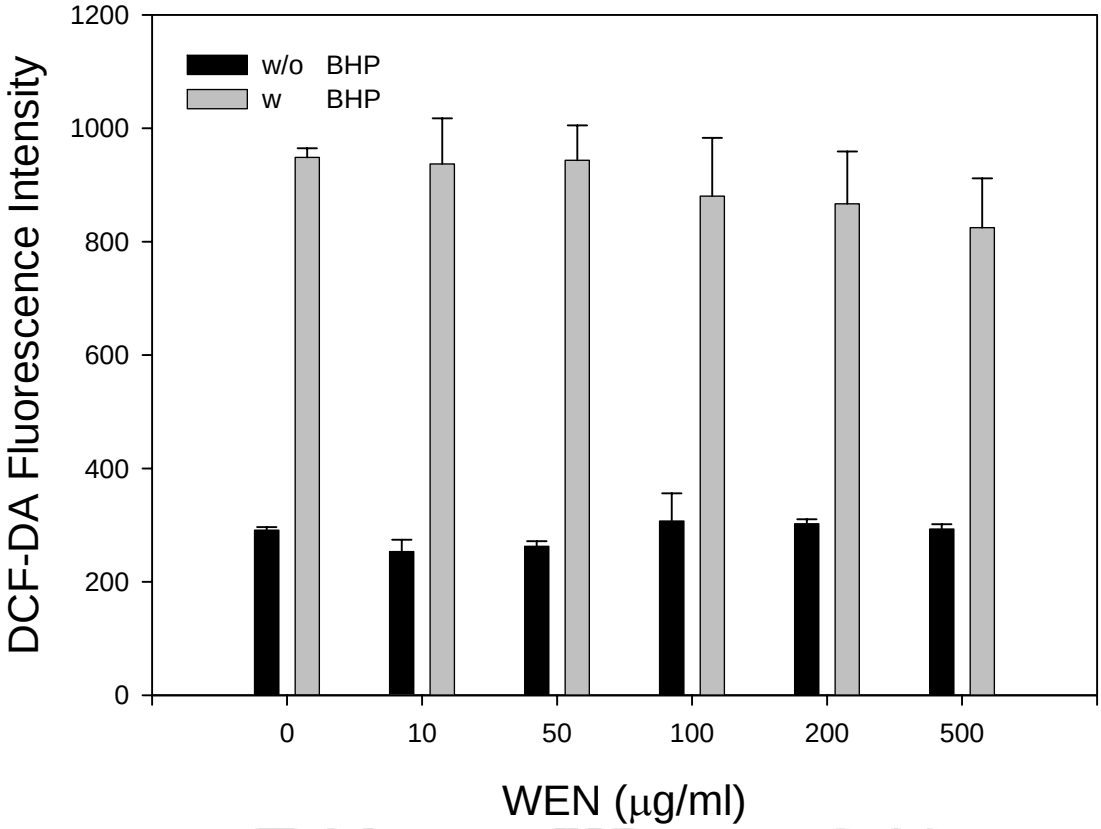
圖一、不同濃度狼尾草水萃取液(WEN)對人類肝癌細胞 HepG2 細胞毒性之作用影響



圖二、狼尾草水萃取液(WEN)對 Xanthine/xanthine oxidase 誘發 Superoxide radical 化學冷光激發強度之影響



圖三、狼尾草水萃取液(WEN)對以 Fe(Ⅱ)-H_2O_2-luminol 誘發 hydroxyl radical 化學冷光激發強度之影響



圖四、狼尾草水萃取液對細胞內含氧自由基 (ROS) 生成作用之影響

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

整合型計畫：狼尾草生物活性之探討
子計畫：狼尾草對黑色素細胞之黑色素生成調節

計畫類別：□個別型計畫　　▉整合型計畫
計畫編號：CNFS9508
執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

整合型總主持: 杜平惠
計畫主持人：朱惠鈴

執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國　96　年　2　月 26　日

一、摘要

近年來美容醫學發展迅速，具有防曬美白概念相關化妝保養品一直都是化妝界長青明星商品，在臨床上針對各種色素沈著問題如黑斑、曬斑及老人斑，最常使用對苯二酚、麴酸及維生素 A 衍生物，雖於臨床上可得淡化色素效果，但常因其對皮膚具有較強的刺激性及細胞毒殺作用而造成使用上困擾。故尋找有效天然不具毒性之黑色素生成抑制劑乃蔚為世界風潮，此不僅可運用於美白保養品上；在食品上亦有防止褐變功能；在醫療上或許可用來治療黑色素腫瘤。有鑑於此，本計劃擬以狼尾草之萃取物作用於小鼠的黑色素腫瘤細胞(B16-F0 細胞)，經試管及細胞實驗結果了解狼尾草之水萃取物對酪氨酸酶抑制劑活性及 B16 細胞黑色素生合成影響不明顯。

二、前言

美白最基本在於如何消除或減少皮膚黑色素沉澱,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被 30~40 個角質細胞所包圍，形成了所謂的“表皮層黑色素單位”(Jimbow, 1976)。黑色素細胞可持續製造黑色小體，被製造出的黑色小體會被分泌至鄰近的角質細胞。黑色小體位在黑色素細胞細胞質內，是一種含有膜的球形胞器，黑色小體的形成可分為四個階段其形狀皆為橢圓形，而熟成的黑色小體，會轉移至黑色素細胞的樹狀軸突末端處經吞噬作用，送到周圍的角質細胞內。第一階段形成的黑色小體，是空胞。第二階段稱為前黑色小體，內含有纖維絲、少量的黑色素及高活性的酪胺酸酶。第三階段的黑色小體其黑色素量較第二階段為多，酪胺酸酶的活性也很高。而第四階段的黑色小體其黑色素的量較第三階段為多，但是酪胺酸酶的活性較低(Bolognia, 1988)。在黑色素形成的過程中，除了酪胺酸酶外，還有許多酵素的參與，包括兩個與酪胺酸酶相關蛋白質（tyrosinase related- protein；TRP 即 TRP-1 及 TRP-2。當皮膚暴曬在紫外線之下，可經組織細胞內質網上之氧化酵素（如 cytochrome P450）代謝產生活性氧化物（ROS），ROS 會引起 DNA 單股斷裂，形成片斷化的現象，或是鹼基的改變、產生突變等(Janssen, 1993)。若產生少量的 ROS，則會活化訊息傳遞系統而刺激了酪胺酸酶的轉錄作用，使黑色素合成增加。此外，也由於黑色素細胞受到刺激，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。(Gibbbs, 2000)。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，而其和 melanocortin-1 receptor 有很高的親和力，當它們結合後，會刺激黑色素細胞內 cAMP 的形成增加，而使得黑色素的產生增加 (Bolognia, 1988)。

狼尾草為狼尾草屬植物，其學名為 *Pennisetum purpureum* S.為國內重要牧草品種之一， 生長迅速且抗病蟲害，為高經濟價值植物。狼尾草富含鉀鈣鐵等礦物質，近年來國人生機飲食風潮興起，狼尾草已成為健康食源。本實驗室與其他學者以証實狼尾草具抗氧化性(吳，2002) ，且所含酚類化合物如:*p*-coumaric acid ，rutin 及 epicatechin，於預備實驗中發現具有調控酪胺酸酶活性作用，故若能進一步探討狼尾草之萃取物，如何影響黑色素腫瘤細胞調控黑色素生成機制，不但可得到對人體較無害的天然酪胺酸酶抑制劑，也可作為防曬美白新成分開發與篩選之參考依據，藉此亦可作為研發抑制黑色素腫瘤細胞生理活性的物質之參考。

三 、結果與討論

狼尾草水萃取物於試管內對酪胺酸酶活性影響

取凍乾狼尾草粉末以二次水製備成200,400,800,及1000μg/ml之狼尾草水萃取物,進行酪胺酸酶抑制劑活性測定實驗組：取30μl酪胺酸酶，加入20 μl,不同濃度之狼尾草水萃取物,混合靜置10分鐘，於450 nm測吸光值後，再加以25mM磷酸緩衝溶液(pH6.8)配製的3.8mM L-DOPA，混合靜置10分鐘，再於450nm測吸光值。結果如表一所示,狼尾草之萃取物對酪氨酸酶並不具抑制力。

狼尾草水萃取物對B16細胞生長及存活率之影響

以MTT全名為3-（4,5-dimethyl-thiazol-2-yl）-2,5- diphenyl- tetrazolium-bromide，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去氫還原作用後形成藍紫色的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存活細胞的多寡，因此常用於檢測藥物對細胞生長及存活率之影響。將100μl細胞植入96孔洞之培養盤（$6*10^3$cells/well），24小時後加入含各種不同濃度試劑或萃取液之培養液100μl，經72小時培養後，以PBS沖洗一次，再加入含MTT之新鮮培養液（0.5mg/ml）100μl，置於培養箱中2.5小時後取出，並除去培養液，用DMSO將藍紫色結晶溶出，再以ELISA reader判讀波長550nm時之吸光值，可由此比較細胞經200,400,800,及1000μg/ml之狼尾草水萃取物作用, 不同濃度狼尾草水萃取物對B16細胞生長之變化,結果上述狼尾草水萃取物濃度對B16細胞生長率均高於95%,並無顯著之影響變化,可將上述濃度狼尾草水萃取物添加至B16測試其對黑色素生成是否具調控作用。

狼尾草水萃取物對B16細胞黑色素生成調控作用之影響

B16細胞分別加入200,400,800,及1000μg/ml之狼尾草水萃取物,經24及72小時培養,利用錐蟲藍染劑計算出細胞數目後，將各稀釋的細胞懸浮液，取固定的細胞數目（$1*10^6$細胞）來做黑色素含量的分析。取完所需的細胞數目後，經離心倒掉上清液，將細胞pellet拍散，加入1毫升之PBS沖洗，然後將細胞懸浮液轉移至小離心管內，再離心6,000g、10分鐘，倒掉上清液，將細胞pellet拍散後，加入0.5毫升1N之NaOH，加熱溶解30分鐘；待30分鐘後，從小離心管中取出200μl的細胞懸浮液置於96孔洞培養皿中，以405nm的波長來測黑色素的變化量(Kim, 2002)。以購自sigma之人工合成之黑色素以12.5,25,37.5, 50,75, 100,125,及250 μg/ml種濃度人工合成之黑色素製作標準曲線,以內插法測得B16細胞所產生之黑色素濃度。結果如表二所示,狼尾草之萃取物對B16細胞黑色素生成調控作用並不具影響力。

狼尾草水萃取物於B16細胞內對酪胺酸酶活性影響

B16細胞分別加入200,400,800,及1000μg/ml之狼尾草水萃取物,經24及72小時培養, 以 cytometer計量(約150×10^4個cell/ml)，取B16細胞以PBS清洗二次，加入萃取緩衝劑 (1% nonidet P-40,0.01%SDS, proteinase

inhibitor)於 4℃下以超音波震盪 5 分鐘，12000rpm,30 分鐘離心,取上清液，即為酪胺酸酶抽出液。在 96 孔洞培養皿中，於每個孔洞中加入酪胺酸酶抽出液 70μl 及 100μl 之 L-DOPA，放入 37℃培養箱中反應 30 分鐘，採用 ELISA reader 判讀 492nm 的波長來測其吸光值的變化量。結果如表三所示,狼尾草之萃取物對細胞內酪氨酸酶並不具抑制力。

綜合上述可知狼尾草之萃取物於試管內對洋菇酪胺酸酶活性並不具抑制力,於 B16 細胞內對黑色素生成調控及酪胺酸酶活性調控均不具影響力。

五、參考文獻

Bolognia, J.L., and Pawelek, J.M. Biology of hypopigmentation. J. Am. Acad. Dermatol., 19, 217-255, 1988.

Gibbbs, S., Murli, S., De Boer, G., Mμlder, A., Mommaas, A.M., and Ponec, M. Melanosome capping of keratinocytes in pigmented reconstructed epidermis effect of μltraviolet radiation and 3-isobutyl-1methyl -xanthine on melanogenesis. Pigment Cell Res., 13, 458-466,2000.

Janssen, Y.M.W., Houten, B., Borm, P.J.A., and Mossman, B.T. Cell and tissue responses to oxidative damages. Lab. Invest., 69, 261-274,1993.

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.

Jimbow, K., Quevedo, W.C., and Fitzpatrick, T.B., Szabo, G. Some aspects of melanin biology. J. Invest. Dermatol., 67, 72-89,1976.

吳曉琪,成游貴,區少梅,黃卓治,吳永惠及蔡碧任 狼尾草水萃取液抗氧化性之探討,台灣農業化學與食品科學 40(6):437-444,2002

表一. 狼尾草水萃取物(WEN)於試管內對酪胺酸酶活性影響

Compound(μg/ml)	relative inhibitory activity(%)
Blank (二次水)	0
WEN-200	0
WEN-400	0
WEN-800	0
WEN-1000	0

表二. 狼尾草水萃取物(WEN)對 B16 細胞黑色素生成調控作用之影響

Compound (μg/ml)	melanin(μg/ml)	
	1day	3day
Blank	46.87	56.64
DMSO	45.37	60.45
WEN-200	46.12	59.75
WEN-400	46.87	57.11
WEN-800	43.85	56.64
WEN-1000	45.82	56.64

表三. 狼尾草水萃取物於 B16 細胞內對酪胺酸酶活性影響

Compound (μg/ml)	specific activity (unit/mg)
Blank	12.5
DMSO	13.9
WEN-200	14.9
WEN-400	12.6
WEN-800	13.3
WEN-1000	14.2