

毛茄及台灣懸鉤子之美白活性探討

黃秀琴 林杪蓁 莫怡瑩 張雅婷 張晉璋 鄭志宇 楊晴文 陳秋蘭*

嘉南藥理大學藥學系

摘要

大多數的美白成分都是藉由抑制酪胺酸酶的活性，以抑制黑色素的生合成，且大多為抗氧化物質；並且，抗氧化物質可捕捉因紫外線照射所形成的自由基，直接或間接的抑制由自由基傳遞的二次訊息，因而抑制刺激黑色素生合成的訊息傳遞。台灣懸鉤子地上部及毛茄葉部的水層和酒精層萃取物皆富含多酚類化合物，並且具有良好的抗氧化能力。因此，本研究想探討台灣懸鉤子地上部及毛茄葉部的水層和酒精層萃取物對於黑色素生合成的影響。結果發現台灣懸鉤子及毛茄的萃取物均可抑制體外的酪胺酸酶活性，但台灣懸鉤子萃取物對 B16 小鼠黑色素瘤細胞具有較強的細胞毒性，而毛茄萃取物則可抑制細胞內的酪胺酸酶活性及黑色素含量。因此，毛茄葉部萃取物可能有潛力發展成為美白產品。

關鍵詞：黑色素生合成、酪胺酸酶、台灣懸鉤子、毛茄

*通訊作者:嘉南藥理大學藥學系

Tel: 06-2664911*2222

E-mail: betelan@mail.chna.edu.tw

壹、前言

皮膚為人體中表面積最大的器官，可阻隔外在與內在環境，並對外在環境築起一道屏障，作為生物體對外界的一道防禦。此外，皮膚還有調節體溫、感覺、分泌、吸收、免疫、製造維他命 D 及對抗紫外線的照射等許多的功能。皮膚的構造可分三層，由外而內可分為表皮層〈epidermis〉、真皮層〈dermis〉及皮下組織〈subcutaneous layer〉。最外層的表皮層具有保護人體抵抗外界物理性及化學性傷害的能力，也可保持水分及體液不會散失；真皮層富含膠原蛋白、彈力蛋白、與運送養分的微血管及淋巴管等，可支撐表皮層，使皮膚有彈性；皮下組織則由脂肪細胞、結締組織、汗腺、毛囊等所組成，具有緩衝外力衝擊的作用。

最外層的表皮層由外而內又可分為角質層

〈stratum corneum〉、顆粒層〈granular layer〉、有棘層〈spinous layer〉、以及基底層〈basal layer〉等四層〈Segre 2006〉。約有 95%基底層的基底細胞具有增生複製的能力，複製後的細胞一個留在原處，另一個則會往上層逐漸移動，形成角質細胞〈keratinocyte〉，最後會變成皮屑脫落。細胞由基底層新生，推至表皮約 14 天，而停留於表皮上保護皮膚約 14 天後，變成皮屑剝落。細胞由新生至剝落約 28 日，此稱為皮膚的新陳代謝週期。另外，約有 5%的黑色素細胞〈melanocyte〉，不具有複製的能力，但能製造黑色素〈melanin〉，除了可使皮膚呈現顏色外，也可對抗紫外線的照射，是皮膚對抗紫外線照射的主要因素〈Gilchrest et al. 1996〉。

基底層上一個黑色素細胞周圍會被 30~40 個角質細胞所包圍，形成所謂的表皮層黑色素單位〈epidermal melanin unit〉。黑色素細胞內黑色小體

〈melanosome〉的成熟可分為四個階段，在第二個階段開始製造黑色素，到第三、四個成熟階段的黑色小體內即含有許多的黑色素〈Orlow 1995〉。成熟的黑色素小體會經由黑色素細胞的樹突狀末端被分泌出去，周圍鄰近的角質細胞再將其胞吞〈endocytosis〉，除了可使皮膚呈現顏色外，也可對抗紫外線的照射。雖然黑色素細胞在此層組織只佔了 5%，但在皮膚上卻扮演著重要的防禦功能〈Bologna et al. 1988〉。

位於黑色素細胞內的黑色小體，是一種具有膜的球形或橢圓形的胞器〈Orlow 1995〉，可對抗黑色素生合成〈melanogenesis〉的過程中，所釋放出之自由基對細胞產生的氧化性傷害。黑色素生合成是在酪胺酸〈tyrosine〉的存在下，先經酪胺酸酶〈tyrosinase〉連續兩個步驟的催化氧化形成 dopa 及 dopachrome，再經一連串酵素的催化下所形成的聚合物〈Bologna et al. 1988〉。而酪胺酸酶是一種含銅的酵素，是黑色素形成的速率決定步驟〈Hearing et al. 1987〉。除了酪胺酸酶外，還有許多酵素的參與，包括兩個與酪胺酸相關的蛋白質〈tyrosine related-protein; TRP〉，即 TRP-1〈又稱為 DHICA oxidase〉及 TRP-2〈又稱為 dopachrome tautomerase〉〈Boissy 1998〉。

紫外線及黑色素刺激荷爾蒙〈MSH〉會促進黑色素生合成。當皮膚暴曬在紫外線中，產生少量的自由基，會活化訊息傳遞而刺激酪胺酸酶的轉錄作用，進而增加黑色素的合成。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〈Gilchrest et al. 1996〉。

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〈Mountjoy 1994〉。當表皮的黑色素細胞活性增加，黑色素生合成的作用增加以及黑色小體數目增加的情況下，會導致過度色素化的現象。此外，

像是黑色小體分泌、轉移至角質細胞的能力增加，或是角質細胞分解黑色素的能力下降，也都會導致過度色素化而使皮膚的膚色變黑。若過度色素化而引起色素沉著，就會形成了所謂的斑點〈Jimbow 2001〉。另外，若基底細胞的增生速率減慢，導致皮膚的新陳代謝率減慢，含有黑色素小體的角質細胞還沒有脫落，也會讓皮膚看起來比較黑。

隨時代遞嬗，美白世紀如火如荼持續擴張，愛美是人類的天性，推陳出新的美白商品更是眾人所追求與推崇。至於目前衛生署所核准上市的美白成分主要有 magnesium ascorbyl phosphate、kojic acid、ascorbyl glucoside、arbutin、chamomile ET、sodium ascorbyl phosphate 及 ellagic acid 等。其中維他命 C 的衍生物就有 3 種，主要是因維他命 C 易氧化且為水溶性，不易為表皮吸收所致。維他命 C 具有抗氧化的作用，可以將已形成的黑色素轉變成顏色較淡的黑色素，因此在皮膚的美白方面具有效果〈Hayakawa 1980〉。熊果素〈arbutin〉是從 bearberry 這種小灌木的紅色果實中萃取出的天然成份。它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〈Maeda 1996〉。而麴酸(kojic acid; KA)是由麴黴菌屬〈Aspergillus〉和青黴菌屬〈Penicillium〉中提煉而得。其作用機制是藉由與銅離子螯合，而抑制酪胺酸酶的生成及降低酪胺酸酶的活性，因此減少黑色素的生合成〈Briganti et al. 2003〉。Endothelin 1〈ET1〉是由內皮細胞所釋放，可作用在黑色素細胞上，使酪胺酸酶磷酸化，因此與 TRP-1 的偶合能力增強，進而促進黑色素生合成作用。Chamomile ET 為 ET1 的拮抗劑，因此具有抑制黑色素生合成的作用〈Imokawa 1997〉。

從以上可知大多數的美白成分都是藉由抑制酪胺酸酶的活性，以抑制黑色素的生合成，且大多為抗氧化物質；並且，抗氧化物質可捕捉因紫外線照射所形成的自由基，直接或間接的抑制由自由基傳遞的二次訊息，因而抑制刺激黑色素生合成的訊息傳遞。或許抗氧化物質能有效取代黑色素清除自由基的能力而進一步達到美白之功效。另外，人體處在有氧環境中，產生能量時會進行氧化機制，而

產生自由基(過氧化物)，雖然體內有抗氧化酵素即抗氧化劑的保護，但在病態情況下，這些自由基可能會造成細胞突變、喪失功能，甚至老化、衰亡〈Halliwell 1994〉。另外，也會刺激黑色素之合成與分泌，使得膚色黯淡或形成斑點〈Gilchrest et al. 1996〉，因此具備充足的抗氧化物質以減緩及防護人體氧化，是為美白重要關鍵之一。

台灣懸鉤子〈*Rubus formosensis*〉屬薔薇科〈*Rosaceae*〉植物，別名有刺波、虎婆刺、虎蕾刺、虎梅刺與刺莓等，民間常用於止癢、痔瘡、消毒與牙痛〈甘偉松 1985〉。過去對於台灣懸鉤子之活性及成分的研究，並無相關文獻報告。最近的研究則發現台灣懸鉤子之地上部的水層和酒精層萃取物含有多酚類化合物，同時具有抗氧化的能力〈磨耀霖 2011〉。

毛茄〈*Solanum lasiocarpum*; *Solanum ferox*〉別名羊不食、毛刺茄，為多年生草本植物，為民間常用之中草藥，可治疝氣、跌打損傷、蛀牙、咳嗽、咽喉痛、水腫且具麻醉之效用〈Saikia et al. 2010〉。目前關於毛茄的文獻並不多，只知毛茄的種子含有硬脂酸、棕櫚酸、油酸及亞油酸〈Garg et al. 1966〉，而毛茄的果實含有固醇類生物鹼茄鹼〈*Solanine*〉〈Gupta et al. 1966〉。最近的研究則發現茄鹼可抑制黑色素瘤細胞的爬行和侵襲，有抑制癌細胞擴散的作用〈張簡賜聰 2009〉。另一文獻則研究毛茄全草各部位的總酚類含量及抗氧化能力，結果發現葉部之水層和酒精層萃取物的總酚類含量及抗氧化能力最強〈林煜書 2012〉。因此我們選用台灣懸鉤子的地上部及毛茄的葉部為本次研究之中草藥，希望可得到抑制黑色素細胞之效能，晉升為美白相關產品的原物料之一。

貳、材料及方法

一、台灣懸鉤子及毛茄萃取物之製備

本研究所使用之台灣懸鉤子是至嘉義縣大埔鄉水庫路沿路上採集地上部而得；而毛茄則是至台南市關廟區文衡路上採集，經嘉南藥理科技大學藥學系林榮貴老師鑑定後提供，再由磨耀霖及林煜書

萃取後所提供。將摘取陰乾的台灣懸鉤子地上部〈以 RF 表示〉以及毛茄葉部〈以 SLL 表示〉切至細碎後，秤量 50g 均勻分配為 2 等份，個別放入 500mL 的圓底燒瓶內，再各別加入水以及 95% 的酒精 250mL，水層方面用加熱板將溫度控制在 100°C，另外酒精部分則在 80°C，以加熱迴流的方式進行萃取 1 小時。待 1 小時後，再分別用水流抽氣機以布氏漏斗和吸濾瓶趁熱過濾，而濾出之殘渣則再重複上述步驟 3 次進行萃取，而後各別將水層或酒精層的濾液合併，經過減壓濃縮機濃縮至乾，得到台灣懸鉤子或毛茄的水層萃取物〈以 RFW 或 SLLW 代表〉、以及台灣懸鉤子或毛茄的酒精層萃取物〈以 RFE 或 SLLE 代表〉，將得到的萃取物進行秤重算出其萃取物的百分比後，置入 4°C 下保存，待進行後續之實驗。

二、小鼠 B16 黑色素瘤細胞之培養

培養小鼠的 B16-F0 黑色素瘤細胞〈B16-F0 melanoma cells〉所使用的培養液為含 10% 小牛血清〈new born calf serum〉的 DMEM 〈Dulbecco's modified eagle medium〉。將細胞每三天作一次繼代培養，整個過程在無菌操作台中進行。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 PBS 沖洗，再加入 2~3 毫升之胰蛋白酶〈TEG〉靜置反應 1~2 分鐘，最後加入 10 毫升的 PBS 終止反應。取出約 5×10^6 的細胞放入 T75 或 10cm 的培養盤中，加入 10 毫升的培養液，放入 5% CO₂、37 °C 的培養箱中培養。

三、體外及細胞內之酪胺酸酶活性分析

體外的酪胺酸酶活性〈tyrosinase activity〉分析是在 96 孔洞培養皿中，於每個孔洞中加入 110μl 的 phosphate buffer saline 〈PBS〉、10μl 各種不同濃度的台灣懸鉤子或毛茄萃取液，及 400 U/ml 的酪胺酸酶〈溶於 PBS〉15μl，放入 37 °C 培養箱中反應 30 分鐘，之後先以 ELISA reader 測其在 490nm 的波長下之基礎吸光值。然後再加入 65μl 2.5 mM L-dopa 〈溶於 PBS〉，繼續放入培養箱中反應 30 分鐘後，同樣在 490 nm 的波長測其吸光值，減掉之

前的基礎吸光值，即可由吸光值的變化量得知酪胺酸酶的活性〈Ishikawa et al. 2007〉。

至於細胞內的酪胺酸酶活性分析，則是參考 Jian 等人的方法加以修飾〈Jian et al. 2011〉，將細胞培養在 10 公分培養皿隔夜後，加入不同的台灣懸鉤子或毛茄萃取物處理 3 至 4 天，以胰蛋白酶將細胞收集離心後，加入 1% Triton-X100〈溶於 PBS〉放入超音波震盪約 30 分鐘，離心後取 100 μ l 的細胞溶解上清液放入 96 孔洞培養皿中，再加入 2.5mM 的 dopa 100 μ l，放入 37⁰ C 培養箱中反應 1 小時後，同樣在 490 nm 的波長測其吸光值變化量。同時取細胞溶解液以及不同濃度的白蛋白〈albumin〉標準品各 3 μ l，加入 97 μ l 的 PBS，再加入 200 μ l 的 Bradford 試劑〈Sigma〉，在 550 nm 的波長測其吸光值，算出檢量線及其蛋白質含量。將酪胺酸酶活性除以蛋白質濃度，即可得每毫克蛋白質中的酪胺酸酶活性〈tyrosinase activity/mg protein〉。

四、細胞毒性之分析

此法是參考 Jiao 等學者之方法加以修飾而成。MTT 全名為 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromide，為一黃色染料，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 去氫氧化後形成藍紫色的 formazan 結晶，再用 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 μ l 含細胞的培養液植入 96 孔洞之培養盤，隔夜後加入 100 μ l 含各種不同濃度中草藥萃取液的培養液。經 24~72 小時培養後，加入 50 μ l 含 MTT 之 PBS 溶液〈1mg/ml〉置於培養箱中反應 3 小時後取出，並吸出培養液，用 100 μ l 的 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中草藥萃取液後生長曲線之變化〈Jiao et al. 1992〉。

存活的細胞皆具有排除錐蟲藍〈trypan blue〉

的能力。實驗中培養之細胞數目，可由 10 μ l 的細胞懸浮液混合等量之錐蟲藍染色溶劑，並置於血球計數器中，於顯微鏡觀察計算之。由此也可得到存活的細胞數目。

五、黑色素含量之測定

將細胞培養於 10 公分的培養盤中，加入不同濃度的中草藥萃取液培養 3~4 天後，將細胞收集，加入 0.5 毫升 1N 之 NaOH，加熱 80~100 ⁰C 溶解 30 分鐘，待冷卻後，取出 100 μ l 置於 96 孔洞培養皿中，以 405 nm 的波長來測黑色素吸光值的變化量。同時以不同濃度的黑色素求出一條檢量線，算出檢體中所含黑色素的濃度〈 μ g/ml〉。另外，取 3 μ l 的細胞溶解液以及 97 μ l 的 PBS，加入 200 μ l 的 Bradford 試劑，算出其蛋白質含量。將黑色素濃度除以蛋白質濃度即可得細胞中所含的黑色素含量〈 μ g melanin/mg protein〉〈Ishikawa et al. 2007〉。

六、統計方法

本研究所得之數據均以平均值加減標準差來表示。使用 Student's t-test 評估在兩組之間的變化，互相比較其差異性，當 P 值小於 0.05 時，則表示具有統計上顯著的差異。

參、結果及討論

一、台灣懸鉤子及毛茄萃取物之萃取率

台灣懸鉤子地上部經由水與 95%的酒精萃取後，分別得到 RFW 及 RFE 二種萃取物，其中 RFW 的萃取率比 RFE 高，RFW 及 RFE 的萃取率分別為 27.5 %及 8.4 % 〈磨耀霖 2011〉，表示台灣懸鉤子地上部含有較多水溶性成分。而毛茄的葉經由水與 95 %的酒精萃取，分別得到 SLLE 及 SLFE 二種萃取物，SLLE 及 SLFE 之萃取率分別為 23.12 %及 15.36% 〈林煜書 2012〉。

二、體外的酪胺酸酶之活性分析

酪胺酸酶之作用為黑色素生合成的關鍵步

驟，因此若能有效抑制酪胺酸酶之物質，即可能具有美白的潛力，因而以此做為簡單快速的篩選工具〈Choi et al. 2002〉。已知麴酸〈以 KA 代表〉具有抑制酪胺酸酶活性之作用〈Briganti et al. 2003〉，因此以 KA 作為正對照組，如圖 1 所示，KA 可明顯抑制酪胺酸酶活性之作用〈 $**p<0.001$ 〉，表示此實驗方法具有可行性。

如圖 1A 所示，台灣懸鉤子及毛茄的水層萃取物〈以 RFW 及 SLLW 代表〉也都具有明顯抑制酪胺酸酶活性之作用〈 $*p<0.05$ 〉，且成劑量相關性。SLLW 在 50 $\mu\text{g/ml}$ 即可抑制酪胺酸酶活性，但 RFW 在 80 $\mu\text{g/ml}$ 才有抑制，在 100 $\mu\text{g/ml}$ 可抑制達 81.65%。而圖 1B 則為台灣懸鉤子及毛茄的酒精層萃取物〈以 RFE 及 SLLE 代表〉對酪胺酸酶活性的抑制作用，可知 RFE 在 100 $\mu\text{g/ml}$ 可抑制酪胺酸酶活性〈83.31%〉，而 SLLE 在 200 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度下才有明顯的抑制作用〈 $**p<0.001$ 〉。

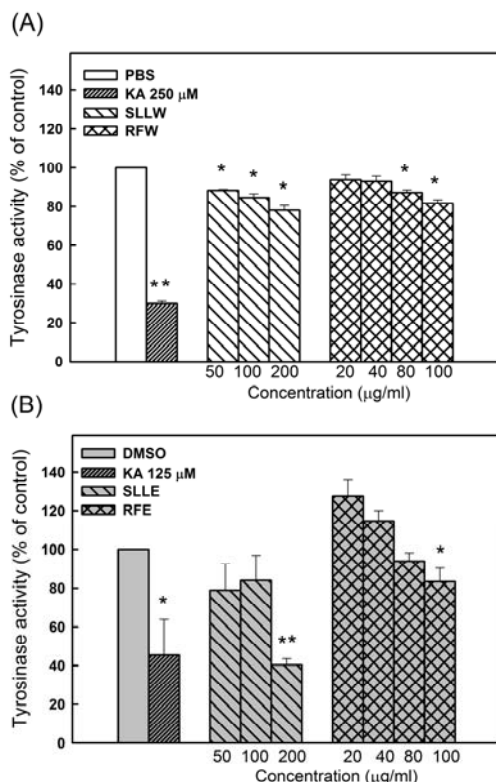


圖 1、毛茄及台灣懸鉤子對體外酪胺酸酶活性之影響。(A)、麴酸〈KA〉250 μM 與其溶劑 PBS 比較， $**P<0.001$ ；50~200 $\mu\text{g/ml}$ 的毛茄水層萃取物〈SLLW〉與其溶劑 PBS 比較， $*P<0.05$ ；

80~100 $\mu\text{g/ml}$ 的台灣懸鉤子水層萃取物〈RFW〉與其溶劑 PBS 比較， $*P<0.05$ ；(B)、麴酸〈KA〉125 μM 與其溶劑 DMSO 比較， $*P<0.05$ ；200 $\mu\text{g/ml}$ 的毛茄酒精層萃取物〈SLLE〉與其溶劑 DMSO 比較， $**P<0.001$ ；100 $\mu\text{g/ml}$ 的台灣懸鉤子酒精層萃取物〈RFE〉與其溶劑 DMSO 比較， $*P<0.05$ 。

從磨耀霖及林煜書的碩士論文中，整理比較台灣懸鉤子及毛茄萃取物的抗氧化能力及總酚類含量，如表一所示，可知 RFW 的 DPPH 自由基清除能力、Trolox 當量氧化能力、以及總酚類含量均大於 RFE。此結果與圖 1 酪胺酸酶的活性作比較，也有一致的現象，即 RFW 抑制酪胺酸酶的活性〈在 100 $\mu\text{g/ml}$ 時抑制 81.65%〉大於 RFE 〈83.31%〉。由此比較結果認為 RFW 因含有較多的總酚類化合物，因此具有較強的抗氧化能力與抑制酪胺酸酶活性的作用。

表一、台灣懸鉤子及毛茄萃取物的抗氧化能力及總酚類含量〈出自磨耀霖及林煜書之論文〉

	DPPH 自由基清除能力(IC_{50} : $\mu\text{g/ml}$)	Trolox 當量氧化能力 (μM)	總酚類含量 (mg of gallic acid/g)
RFW	53.9	21.187	334.342
RFE	249.7	8.681	173.622
SLLW	352.7	10.43	158.908
SLLE	255.9	13.79	185.419

從表一中也可知 SLLE 的 DPPH 自由基清除能力、Trolox 當量氧化能力、以及總酚類含量均大於 SLLW。與圖 1 作比較，雖然 SLLW 在 50 $\mu\text{g/ml}$ 即可抑制酪胺酸酶活性，SLLE 在 200 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度下才有明顯的抑制作用〈40.32%〉，但此抑制程度較 SLLW 的抑制作用〈78.03%〉來得強。SLLE 在 50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 沒有明顯的統計差異，可能是因誤差值較大所致，需再更進一步確認。

此外，從表一中可看出在四個萃取物中，以 RFW 的 DPPH 自由基清除能力、Trolox 當量氧化能力、以及總酚類含量最高。但從圖 1 中，RFW

抑制酪胺酸酶的活性並沒有 SLLE 來得強，這可能是因酚類化合物的種類不同所致。

三、細胞毒性之分析

若使用具有細胞毒性之藥物，導致黑色素細胞死亡，反而會造成白斑，故篩選美白候選藥時，應將具有細胞毒性之物質排除或降低濃度。故本研究需評估台灣懸鉤子及毛茛的萃取物之細胞毒性為何。以 MTT 染劑分析中草藥萃取物對 B16-F0 黑色素瘤細胞生長之影響，結果如圖 2A 所示，分別測試 SLLW 和 SLLE 在不同濃度下培養 1~3 天的細胞毒性，可發現 SLLW 的濃度在 10~100 μ g/ml 皆無明顯細胞毒性，反而在 100 μ g/ml 的濃度下，似乎有促進細胞數目增加的趨勢，但並不具統計上的差異。而處理濃度 50~100 μ g/ml 的 SLLE 三天時，即產生細胞毒性 (*:p<0.05)。

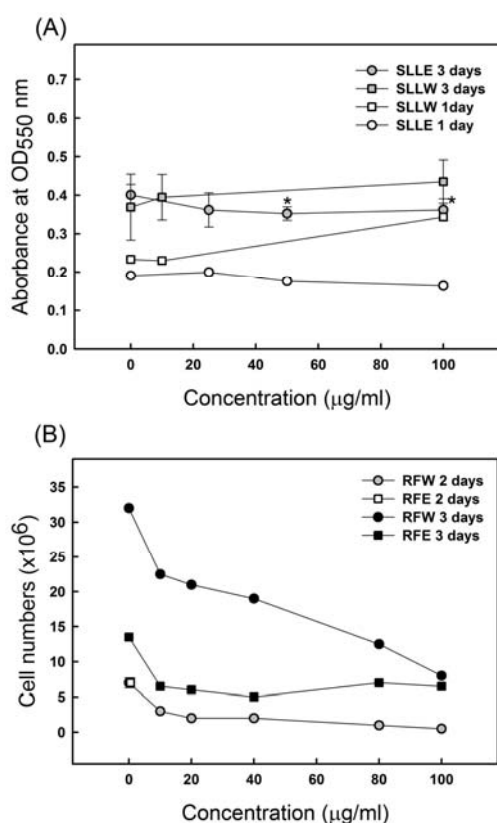


圖 2、毛茛及台灣懸鉤子對 B16-F0 黑色素瘤細胞生長之影響。(A)、處理 3 天 50~100 μ g/ml 的毛茛酒精層萃取物〈SLLW 3 days〉與其對照組〈0〉比較，*P<0.05；SLLE 1 days 為處理 1 天；SLLW 3days 及 SLLW 1 days 則是分別處理 25~100 μ g/ml 的毛茛

酒精層萃取物 3 天及 1 天；(B)、RFW 3days 及 RFW 1 days 是分別處理 10~100 μ g/ml 的台灣懸鉤子水層萃取物 3 天及 1 天；RFE 3days 及 RFE 1 days 則是分別處理 10~100 μ g/ml 的台灣懸鉤子酒精層萃取物 3 天及 1 天。

至於台灣懸鉤子萃取物對 B16-F0 黑色素瘤細胞生長之影響，是以錐蟲藍排除方法來計算細胞數目，結果如圖 2B 所示，在濃度 10~100 μ g/ml 的 RFW 或 RFE，不管是處理 2 天或 3 天，均具細胞毒性。因為從 MTT 染劑的實驗中發現，顯微鏡下觀察高濃度的台灣懸鉤子萃取物已經造成 B16-F0 黑色素瘤細胞死亡，但 MTT 染劑被氧化成藍紫色結晶的量反而增加〈結果未呈現〉，猜測可能是 RFW 或 RFE 中的多酚類化合物將 MTT 氧化，而非細胞內的粒腺體去氫酶氧化所致，故以此方法來評估台灣懸鉤子萃取物對 B16-F0 黑色素瘤細胞的細胞毒性並不準確，因此改用錐蟲藍排除方法。從實驗中發現 RFW 及 RFE 的細胞毒性均明顯大於 SLLW 及 SLLE，可能的原因還需後續的研究。

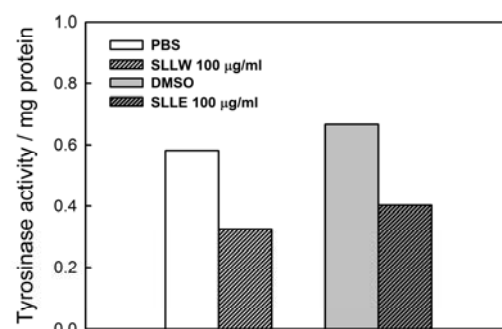


圖 3、毛茛對 B16-F0 黑色素瘤細胞酪胺酸酶活性之影響。處理 3 天的毛茛水層萃取物〈SLLW〉100 μ g/ml 與其溶劑組 PBS 比較；毛茛酒精層萃取物〈SLLE〉100 μ g/ml 與其溶劑組 DMSO 比較。

四、細胞內酪胺酸酶之活性分析

由於台灣懸鉤子對 B16-F0 黑色素瘤細胞具有較大的細胞毒性，因此選擇毛茛萃取物進行細胞內酪胺酸酶活性及黑色素含量的分析。處理毛茛萃取物三天後，將收集下來的細胞懸浮於 500 μ l 的

PBS 中後，取 250 μ l 的細胞懸浮液進行酪胺酸酶活性分析，另一半進行黑色素含量分析。因為會有些許的細胞毒性，處理 SLLW 或 SLLE 的細胞數目會較 PBS 或 DMSO 少，相對的蛋白質含量會較低，因此以蛋白質含量來標準化〈normalized〉。酪胺酸酶活性分析結果如圖 3 所示，100 μ g/ml 的 SLLE 及 SLLW 與其溶劑對照組 DMSO 及 PBS 作比較，均有抑制酪胺酸酶活性之作用，但因只有一次的結果，無法作統計分析，需再進行後續的實驗。此結果與體外酪胺酸酶活性的結果〈圖 1〉一致，因此毛茄萃取物有潛力發展為美白之產品，但仍需更多後續的研究。

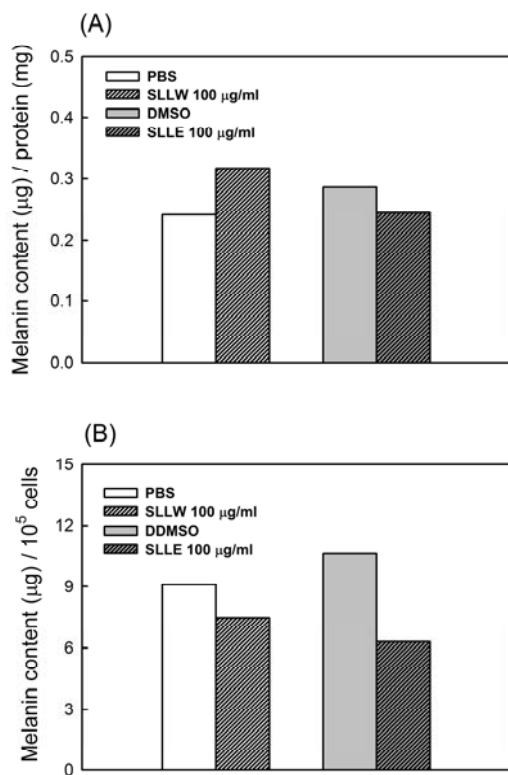


圖 4、毛茄對 B16 黑色素瘤細胞黑色素含量之影響。處理 3 天的毛茄水層萃取物〈SLLW〉100 μ g/ml 與其溶劑組 PBS 比較；毛茄酒精層萃取物〈SLLE〉100 μ g/ml 與其溶劑組 DMSO 比較。(A)為每 mg 的蛋白質有多少 μ g 的黑色素含量；(B)為每 10^5 個細胞有多少 μ g 的黑色素含量。

五、黑色素含量之測定

由於高濃度〈1000 μ g/ml〉之毛茄萃取物有明

顯的細胞毒性〈結果沒有呈現〉，所以暫時不將高濃度列入細胞內試驗，這部分主要是觀察 SLLE 100 μ g/ml 及 SLLW 100 μ g/ml 及其各溶劑對照組 DMSO 及 PBS 對黑色素的影響。給藥後之細胞經過 3 天的培養，再收集並測其黑色素含量。因為會有些許的細胞毒性，處理 SLLW 或 SLLE 的細胞數目會較 PBS 或 DMSO 少，相對的黑色素含量會較低，因此以蛋白質含量或細胞數目來標準化。培養 3 天結果如圖 4 所示，圖 A 之黑色素含量是除以蛋白質的量作比較，則 SLLW 及 SLLE 各 100 μ g/ml 所培養的細胞與溶劑對照組比較並沒有降低，而圖 B 則是除以細胞的數目作比較，平均每 10^5 個細胞產生的 melanin 較 PBS 培養下的細胞少，而 SLLE 100 μ g/ml 培養之細胞，平均每 10^5 個細胞產生之 melanin 亦少於 DMSO 培養之細胞。但此為初步結果，需再後續實驗作更進一步的確認。

從圖 3 中可初步看到處理 3 天 100 μ g/ml 的 SLLW 及 SLLE，可抑制細胞內酪胺酸酶的活性，但圖 4A 中黑色素含量並沒有降低(以蛋白質含量標準化)，這可能是因處理的時間不夠。因為原先的 B16-F0 黑色素細胞瘤細胞是黑色的，已經有許多黑色素在細胞中，細胞經由增生複製後，除非全部黑色素生合成的路徑都被抑制，其複製後的子細胞才有可能變白的，因此抑制細胞內酪胺酸酶的活性，細胞需要經過許多次的複製後，變為灰色的細胞才會越來越多，黑色素含量才会有明顯降低的現象，故後續的研究會延長萃取物處理的時間。

肆、謝辭

本研究得以完成，非常感謝嘉南藥理科技大學保健營養系的吳淑靜教授所提供的 B16-F0 黑色素細胞瘤細胞株。

伍、參考文獻

- 甘偉松〈1985〉・台灣藥用植物誌，國立中國醫藥研究所。
- 林煜書〈2012〉・毛茄葉部之抗氧化成分研究，嘉

- 南藥理大學藥物科技研究所碩士論文。
- 張簡賜聰〈2009〉・ α -Solanine 抑制人類黑色素瘤細胞侵襲及爬行之研究，嘉南藥理大學生物科技暨研究所碩士論文。
- 磨耀霖〈2011〉・台灣懸鉤子地上部的抗氧化成分之研究，嘉南藥理大學藥物科技研究所碩士論文。
- Boissy, R.E., Sakai, C., and Zhao, H., Kobayashi, T., Hearing, V.J. (1998). Human tyrosinase related protein-1(TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp. Dermatol.*, 7, 198-204.
- Bolognia, J.L. and Pawelek, J.M. (1988). Biology of hypopigmentation. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 19, 217-255.
- Briganti, S., Camera, E., Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* 16, 101-110.
- Choi, S.Y., Kim, S., Kim, H., Suk, K., Hwang, J.S., Lee, B.G., Kim, A.J., Kim, S.Y. (2002). (4-Methoxy-benzylidene)-(3-methoxy-phenyl)-amine, a nitrogen analog of stilbene as a potent inhibitor of melanin production. *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 450-452.
- Garg S, Gupta D. (1966). Chemical examination of the seed fat of *Solanum ferox*. *Fette, Seifen, Anstrichmittel.* 68, 449-450.
- Gilchrest, B.A., Park, H.Y., Eller, M.S., Yaar, M. (1996). Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem. Photobiol.*, 63, 1-10.
- Gupta D, Garg S. (1966). Isolation of solanine from the fruits of *Solanum ferox*. *Naturwissenschaften.* 53, 108-109.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 52, 253-265.
- Hayakawa, R. (1980). Effects of combination preparation of vitamin E and C in comparison with single preparation to the patients of facial hyperpigmentation: a double-blind controlled clinical trial. *Nishinihon. J. Dermatol.*, 42, 1024-1034.
- Hearing, V.J. and Jimenez, M. (1987). Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.*, 19, 1141-1147.
- Imokawa, G., Kobayashi, T., Miyagishi, M., Higashi, K., and Yada, Y. (1997). The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res.*, 10, 218-228.
- Ishikawa, M., Kawase, I., Ishi, F. (2007). Combination of amino acids reduces pigmentation in B16F0 melanoma. *Cells Biol. Pharm. Bull.*, 30, 677-681.
- Jiao, H., Soejima, Y., Ohe, Y., Saijo, N.A. (1992). A new MTT assay for examining the cytotoxicity of activated macrophages towards the nonadherent P388 leukemia cell line. *J. Immunol Methods.*, 153, 265-266.
- Jimbow, K. and Minamitsuji, Y. (2001). Topical therapies for melasma and disorders of hyperpigmentation. *Dermatol. Ther.*, 14, 35-45.
- Jian, D., Jiang, D., Su, J., Chen, W., Hu, X., Kuang, Y., Xie, H., Li, J., Chen, X. (2011). Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediating up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells. *Steroids*, 76, 1297-1304.
- Maeda, K. and Fukuda, M. (1996). Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Pharmacol. & Experimental Ther.* 276, 765-769.
- Mountjoy, K.G. (1994). The human melanocyte stimulating hormone receptor has evolved to become "super-sensitive" to melanocortin peptides. *Cell. Endocrinol.*, 102, R7-R11.
- Orlow, S.J. (1995). Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J.*

- Invest. Dermatol.*, 105, 3-7.
- Pathak, M.A., Fitzpatrick, T.B., and Kraus, E.W. (1986). Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 15, 894-899.
- Saikia, B., Borthakur, S., Saikia, N. (2010). Medico-ethnobotany of Bodo tribals in Gohpur of Sonitpur district, Assam. *Indian J. Traditi. Knowl.*, 9, 52-54.
- Segre, J.A. (2006) Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J. Clin. Invest.*, 116, 1150-1158.
- Willis, I., Kligman, A., Epstein, J. (1972). Effects of long ultraviolet rays on human skin: photoprotective or photoaugmentative. *J. Invest. Dermatol.*, 59, 416-420.

The study of *Rubus formosensis* and *Solanum lasiocarpum* on skin-whitening activity

Shiow Chyn Huang Miao Chen Lin Yi Ying Mo Ya Ding Chang Chin Wei Chang
Jr Yu Jeng Ching Wen Young Chiu Lan Chen*

Department of pharmacy,
Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Abstract

Most whitening ingredients are by inhibiting the activity of tyrosinase, then to inhibit the biosynthesis of melanin, and most of them are antioxidants. Furthermore, antioxidants can capture the free radicals from ultraviolet irradiation, therefore decreasing the radical-induced secondary message, thereby inhibiting the stimulation of melanogenesis, either directly or indirectly. The water and alcohol extracts of *Rubus formosensis* and *Solanum lasiocarpum* are rich of polyphenolic compounds, and have good antioxidant capacity. Therefore, the objective of our study is to investigate the water and alcohol extracts of *Rubus formosensis* and *Solanum lasiocarpum* on melanogenesis. The results showed that extracts of *Rubus formosensis* and *Solanum lasiocarpum* can inhibit tyrosinase activity *in vitro*. The extracts of *Rubus formosensis* have stronger cytotoxic for B16 mouse melanoma cells. However, extracts of *Solanum lasiocarpum* can inhibit the intracellular tyrosinase activity and decrease the melanin content. Therefore, *Solanum lasiocarpum* extract may have the potential to develop into a whitening product.

Key words: melanogenesis; tyrosinase; *Rubus formosensis*; *Solanum lasiocarpum*

*Correspondence: Department of pharmacy, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Tel: 06-2664911*2222

E-mail: betelan@mail.chna.edu.tw