

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

具有抑制黑色素形成作用之中草藥的開發與研究

子計畫(3)：中草藥抑制黑色素形成作用之機轉研究

計畫類別：☐個別型計畫 ☒整合型計畫

計畫編號：CNPH93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切

計畫主持人：陳秋蘭

共同主持人：陳莉螢；楊政哲

計畫參與人員：劉承忠；李育純；徐鳳文；林曉嵐

執行單位：藥學系

中華民國☐94 年☐2 月☐27 日

前言

黑色素是動物界中天然色素之一，它的合成途徑相當冗長、分岔，再加上它是一種聚合物，化學結構很複雜，以及它的不溶性，所以阻礙了對其結構的測定。黑色素的形成是在酪胺酸 (tyrosine) 的存在下，先經酪胺酸酶的催化，再經由一序列酵素的催化下而形成。所形成的黑色素主要有兩種，一種是棕黑色的，稱為 eumelanin，另外一種是黃棕色的，稱為 phaeomelanin (1)。

酪胺酸酶是一種含銅的酵素，是黑色素形成的主要速率決定因素 (2)，除了酪胺酸酶外，還有許多酵素的參與，包括像兩個與酪胺酸相關蛋白質 (tyrosine related-protein; TRP)，即 TRP-1 (DHICA oxidase) 及 TRP-2 (dopachrome tautomerase) (3)。

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，會導致黑色素過度化 (hyperpigmentation) 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，也都會導致色素過度化的現象，此時皮膚的膚色會較黑。若黑色素過度化而引起色素沉著，就會形成了所謂的斑點 (4)。

另外，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，此皮膚生理稱為皮膚的新陳代謝。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。

俗話說“一白遮三醜”，尤其在現今社會的審美觀，流行著擁有一身白皙的皮膚，而要讓皮膚看起來比較白皙的產品，即所謂的美白化妝品，在整個化妝品的市場佔有非常重要的比例。有幾個方針可以讓膚色看起來白皙：① 增加皮膚的新陳代謝率，即促進基底層細胞的增生；② 減少黑色素細胞的數目，但若處理不當，可能導致白斑症；③ 減少黑色素小體的數目或成熟度；④ 抑制黑色素的生合成，可透過抑制酪胺酸酶的活性或減少其表現量來達成。

目前市面上具有促進皮膚新陳代謝的產品中，其有效成分有維他命 A (retinol)、果酸、水楊酸 (salicylic acid) 等。維他命 A 是一種脂溶性的維生素，主要是因其具有促進表皮細胞分裂正常化，以及促進表皮細胞的新陳代謝，因此讓皮膚看起來顯得比較白皙光滑 (5)。至於果酸及水楊酸也都具有促進角質細胞新陳代謝的作用。

至於目前衛生署所核准上市的美白成分主要有七類，分別是 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 具有許多功效，像是治療壞血病 (6)；促進膠原蛋白的合成以幫助傷口的癒合 (7)；以及具有抗氧化的作用，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也具有效果 (8)。

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 (9)。而麴酸 (kojic acid) 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 (10)。

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 與偶合能力增強，進而促進黑色素生合成作用 (11)。chamomile ET 為 ET1 的拮抗劑，因此具有抑制黑色素生合成的作用。

綜觀上述具美白效果的成分，可以發現大多數的成分都在抑制黑色素的生合成路徑上，因此要開發一些具美白作用的成分，可以往這個方向著手。而酪胺酸酶是整個黑色素生合成路徑的速率決定步驟，且檢測酪胺酸酶活性的分析法是一種簡單、快速的方法 (12)，因此可以用來篩選一些具有抑制酪胺酸酶活性的成分。

中草藥是天然且在中國具有悠久的使用歷史，雖然有它原有的使用方法及治療適應症，但由於中草藥是複方使用，即多種成分相輔相成作用的結果，對於其單種成分的作用不是很清楚，因此具有極廣的開發及研究空間。

利用酪胺酸酶活性分析法可以篩選中草藥中是否具有抑制黑色素生合成作用的成分，雖然不具抑制作用的中草藥不見得在進入細胞後沒有作用，但此方法仍是最簡單、快速、方便的方法。

因此我們篩選了一些民間傳說具有烏髮效果的中草藥，包括何首烏、仙鶴草及旱蓮草等，另外還有槐米炒製品及民間傳說具有美白效果的水果如木瓜及奇異果等。

實驗方法

一、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 μ l 的 HBSS 緩衝液、10 μ l 各種不同濃度的試劑、中草藥或旱蓮草萃取液，及 10 μ l 之 2U 酪胺酸酶，放入 37°C 培養箱中反應 30 分鐘，然後再加入 10 μ l 的 10 mM L-dopa，繼續反應 5 分鐘後，採用 492nm 的波長來測其吸光值的變化量 (12)。

二、細胞生長及毒性測試

此法是參考 Jiao 等學者於 1992 年所發表之方法 (13)，加以修飾而成。MTT 為一黃色染劑，加入細胞培養液中，曾經擴散進入細胞中，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。

將小鼠的黑色素瘤細胞 (B16-F0 cells) 培養在含 10%胎牛血清(FBS)、2mM L-glutamine、100 μ g/ml penicillin/streptomycin、1% non-essential amino acid 及 3.7g/l NaHCO₃，pH 7.2~7.4 的 DMEM 培養液中，每三天做一次繼代培養，整個過程在無菌操作臺中進行。

將 100 μ l 細胞植入 96 孔洞之培養盤(6*10³cells/well)，24 小時後加入含各種不同濃度試劑、中草藥或旱蓮草萃取液之培養液 100 μ l，經 72 小時培養後，以 HBSS 沖洗一次，再加入含 MTT 之新鮮培養液(0.5mg/ml) 100 μ l，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，可由此比較細胞處理不同濃度試劑或旱蓮草萃取液後生長曲線之變化。

三、黑色素含量分析 (melanin content assay)

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*10⁶細胞)來做黑色素含量的分析。

取完所需的細胞數目後，以同樣的轉速及時間再離心一次，倒掉上清液，將細胞 pellet 拍散，加入 1 毫升之 HBSS 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 200 μ l 的細胞懸浮液置於 96 孔洞培養皿中，以 415nm 的波長來測黑色素吸光值的變化量 (14)。

實驗結果及討論

從實驗結果中發現以早蓮草抑制酪胺酸酶活性的作用最強，早蓮草屬於菊科植物鱧腸 *Eclipta prostrata* L. 之全草，為常用中藥之一，主用於各種出血性疾病 (如吐血、咯血、衄血或外傷出血)、牙齒鬆動、鬚髮早白、眩暈耳鳴、腰膝酸軟、慢性肝炎、腸炎、痢疾、神經衰弱等之治療 (15)。

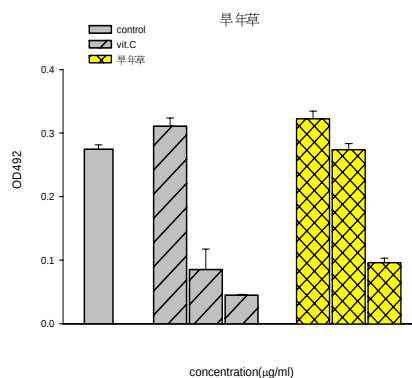
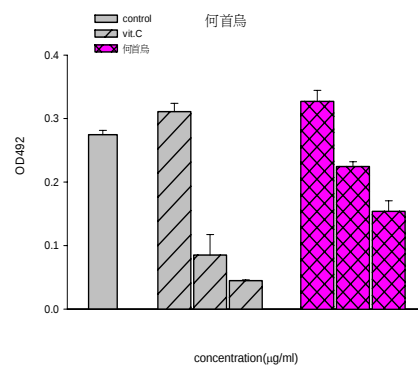
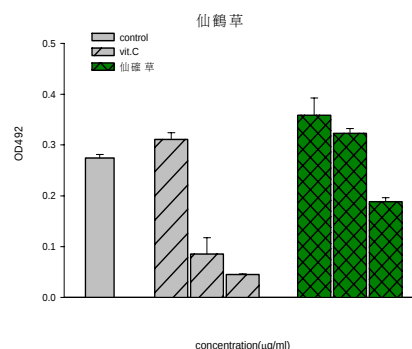
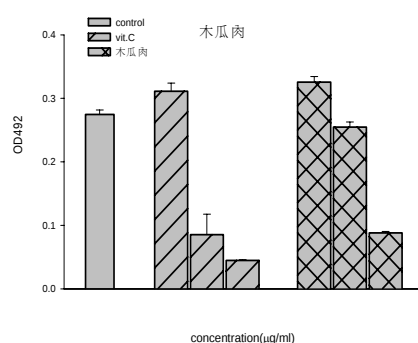
早期的研究發現：早蓮草的萃取液對四氯化碳在小白鼠或大白鼠誘發的肝毒性均具有保護的作用，其中以含有 coumestans 類成分如 wedelolactone 及 dimethylwedelolactone 的萃取層最具活性(16)。此外，也有研究顯示：早蓮草的乙醇萃取液對 cyclophosphamide 或 hydrocortisone 誘發小老鼠免疫力下降的實驗模式中具有促進免疫力的作用(17)；早蓮草也被證實具有中和蛇毒的作用，可能是因為 wedelolactone 具有抑制 trypsin 及 phospholipase A2 的活性所致 (18)。

在我們初步的實驗結果中發現早蓮草的萃取液具有抑制酪氨酸酶活性的作用，此作用是否具有淺力可以發展成美白產品，還需要非常漫長的研究。但是，早蓮草取得容易又不昂貴，實在有其開發的價值。因此，值得更進一步來測試早蓮草在黑色素細胞瘤細胞是否也具有抑制黑色素生合成的作用，同時分離其可能有效的成分及其可能之作用機轉。

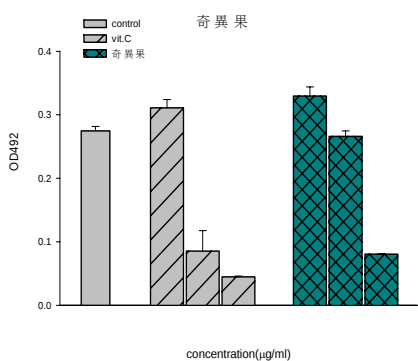
參考文獻

1. 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.
2. Hearing, V.J. and Jimenez, M. Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.*, **19**, 1141-1147, 1987.
3. Boissy, R.E., Sakai, C., and Zhao, H., Kobayashi, T., Hearing, V.J. 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, 1998.
4. Jimbow, K. and Minamitsuji, Y. Topical therapies for melasma and disorders of hyperpigmentation. *Dermatol. Ther.*, **14**, 35-45, 2001.
5. Pathak, M.A., Fitzpatrick, T.B., and Kraus, E.W. Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **15**, 894-899, 1986.
6. Mumma, R.O., Mckee, E.E., and Verlangieri, A.J. Anti-ascorbic effect of ascorbic acid 2-sulfate in the guinea pig. *Nutr. Rep. Int.*, **6**, 133-137, 1972.
7. Manning, J.M. and Meister, A. Conversion of praline to collagen hydroxyproline. *Biochemistry*, **5**, 1154-1165, 1966.
8. Hayakawa, R. 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. *Nishinippon. J. Dermatol.*, **42**, 1024-1034, 1980.
9. Maeda, K. and Fukuda, M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Pharmacol. & Experimental Ther.* **276**, 765-769, 1996.
10. Briganti, S., Camera, E., and Picardo, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**, 101-110, 2003.
11. Imokawa, G., Kobayashi, T., Miyagishi, M., Higashi, K., and Yada, Y. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res.*, **10**, 218-28, 1997.
12. 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 stilbene as a potent inhibitor of melanin production. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 450-452, 2002.

13. 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. Immunol. Methods.*, **153**, 265-266, 1992.
14. Kim, D.S., Kim, S.Y., Chung, J.H., Kim, K.H., Eun, H.C., and Park, K.C. Delayed ERK activation by creamide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cellular Sig.*, **14**, 779-785, 2002.
15. 邱年永, 張光雄, 原色臺灣藥用植物圖鑑(5), 臺北, p.231-232, 1983.
16. Saxena, A. X., Singh, B., and Anand, K. K. Hepatoprotective effects of *Eclipta alba* on subcellular levels in rats. *J. Ethanopharmacol.*, **40**, 155-161, 1993.
17. Jayathirtha, M. G. and Mishra, S. H. Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, **11**, 361-365, 2004.
18. Melo, P. A. and Ownby, C. L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. *Toxicon.*, **37**, 199-215, 1999.



tynosinase:0.2U/µl



dopa:0.01M

