

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

裙帶海菜生物活性胜肽在細胞模式抑制黑色素生成機制

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-041-005-

執行期間：106年08月01日至107年07月31日

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學生活應用與保健系

計畫主持人：王柏森

計畫參與人員：碩士級-專任助理：簡瑞涓

中華民國 107 年 10 月 16 日

中文摘要：本研究為探討裙帶海菜生物活性胜肽UP1、UP4、UP9、UP10在照射UVA對人類色素細胞A375誘導的氧化壓力及黑色素合成反應中，所扮演的保護作用。結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽UP10可有效減少UVA誘發A375細胞黑色素合成反應。其作用機轉與裙帶海菜生物活性胜肽UP10降低UVA所誘發細胞內ROS生成具有密切關係。此外，裙帶海菜生物活性胜肽UP10對照射UVA所刺激細胞內tyrosinase蛋白產生具有抑制作用。且裙帶海菜生物活性胜肽UP10並具有抑制照射UVA細胞內NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO-1)與nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)蛋白表現的作用。這些數據顯示，應用裙帶海菜生物活性胜肽UP10可能有助於減少色素細胞進行黑色素合成。

中文關鍵詞：裙帶海菜，生物活性胜肽，黑色素

英文摘要：In this project, the major purpose is to investigate of inhibitory effects of bioactive peptides UP1, UP4, UP9 and UP10 from *Undaria pinnatifida* on UVA induced oxidative stress and melanin production in human melanoma A375 cells. Bioactive peptide UP10 from *Undaria pinnatifida* displayed inhibitory effects on UVA induced melanin production in A375 cells. The protective effects of bioactive peptide UP10 on UVA induced A375 cells may be in association with the decrease intracellular ROS production in A375 cells. In addition, bioactive peptide UP10 decreased tyrosinase production in UVA induced A375 cells. In addition, bioactive peptide UP10 decreased the levels of NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) and nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) production in UVA induced A375 cells. These data suggested that bioactive peptide UP10 from *Undaria pinnatifida* exhibiting biological activities could contribute to decrease melanin production in cells.

英文關鍵詞：Undaria pinnatifida; bioactive peptides; melanin

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

裙帶海菜生物活性胜肽在細胞模式抑制黑色素生成機制

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-041-005

執行期間：106年8月1日至107年7月31日

執行機構及系所：嘉南藥理大學 生活應用與保健系

計畫主持人：王柏森

計畫參與人員：簡瑞涓

中 華 民 國 107 年 10 月 16 日

摘要

本研究為探討裙帶海菜生物活性胜肽UP1、UP4、UP9、UP10在照射UVA對人類色素細胞A375誘導的氧化壓力及黑色素合成反應中，所扮演的保護作用。結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽UP10可有效減少UVA誘發A375細胞黑色素合成反應。其作用機轉與裙帶海菜生物活性胜肽UP10降低UVA所誘發細胞內ROS生成具有密切關係。此外，裙帶海菜生物活性胜肽UP10對照射UVA所刺激細胞內tyrosinase蛋白產生具有抑制作用。且裙帶海菜生物活性胜肽UP10並具有抑制照射UVA細胞內NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO-1)與nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)蛋白表現的作用。這些數據顯示，應用裙帶海菜生物活性胜肽UP10可能有助於減少色素細胞進行黑色素合成。

關鍵字：裙帶海菜，生物活性胜肽，黑色素

Abstract

In this project, the major purpose is to investigate of inhibitory effects of bioactive peptides UP1, UP4, UP9 and UP10 from *Undaria pinnatifida* on UVA induced oxidative stress and melanin production in human melanoma A375 cells. Bioactive peptide UP10 from *Undaria pinnatifida* displayed inhibitory effects on UVA induced melanin production in A375 cells. The protective effects of bioactive peptide UP10 on UVA induced A375 cells may be in association with the decrease intracellular ROS production in A375 cells. In addition, bioactive peptide UP10 decreased tyrosinase production in UVA induced A375 cells. In addition, bioactive peptide UP10 decreased the levels of NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) and nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) production in UVA induced A375 cells. These data suggested that bioactive peptide UP10 from *Undaria pinnatifida* exhibiting biological activities could contribute to decrease melanin production in cells.

Key words: *Undaria pinnatifida*; bioactive peptides; melanin

I、前言

隨著國人經濟能力提昇與近年美容醫學發展迅速，使得具有延緩皮膚老化及美白肌膚之保養品受到相當的重視。基本上，美白肌膚著重在消除或減少皮膚黑色素沈著，而黑色素由黑色素細胞(melanocyte)產生。已知許多因子可以刺激黑色素產生，例如紫外線，慢性發炎反應，異常的黑色素細胞刺激素(α -melanocyte stimulating hormone)分泌等，因此，許多黑色素生成抑制劑的原理為(I)吸收或隔離紫外線;(II)阻礙酪胺酸酶活性和改變黑色素的生成途徑，包括抑制酪胺酸酶活性，抑制MITF(Microphthalmia-associated transcription factor)活性，干擾黑色素合成;(III)抗氧化(Antioxidant)作用，促進黑色素之移除。

由於氧化壓力被認為是引發許多疾病發展的重要因子，因此近年許多研究注重天然抗氧化成分功能測試，進而利用於調整體內氧化壓力。目前已知的天然抗氧化劑來源廣泛，除了多酚，類黃酮和類胡蘿蔔素等之外，具有抗氧化性之生物活性胜肽也是研究重點。當皮膚暴曬在惡劣環境及紫外線(100-400nm)照射之下，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)，例如UVA(320-400nm)可導致黑色素細胞產生superoxide anion，而UVB(280-320 nm)可誘導黑色素細胞產生H₂O₂，這些ROS會引起黑色素細胞內氧化還原系統失去平衡，此時若產生少量的ROS，則會活化細胞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，由於消費者對於純淨無污染的產品需求日增，因此海洋藻類的產品受到廣泛的喜愛。換言之，若能對海洋藻類機能性有更深入的了解，將有助於消費者選購與相關產業的發展。裙帶海菜(Undaria pinnatifida)又名海帶芽，屬褐藻門(Phaeophyta)，褐藻綱(Phaeophyceae)，海帶目(Laminariales)，翅藻科(Alariaceae)，裙帶菜屬(Undaria)。裙帶海菜為食品的主要原料之一。裙帶海菜具有降低血中膽固醇，預防動脈硬化的作用。但是否具有其他生物活性仍不清楚。

因此，本研究以人類黑色素腫瘤細胞A375細胞株為平台，探討裙帶海菜活性胜肽UP1，UP4，UP9，UP10在人類色素細胞中抑制氧化作用與調節細胞黑色素產生之機轉，試驗結果可提供產業進行專利開發與相關農業生物技術產業之應用參考。

II、結果與討論

a. 裙帶海菜生物活性胜肽對UVA誘導A375細胞黑色素產生之影響

為探討細胞模式分子間作用，我們測試UP1，UP4，UP9，UP10共4段裙帶海菜生物活性胜肽是否抑制A375細胞之黑色素合成作用。從圖一可知，以200 $\mu\text{g/ml}$ 之樣品濃度而言，與UVA單獨處理組比較，裙帶海菜生物活性胜肽UP10可以抑制UVA刺激A375細胞之黑色素產生。此結果顯示裙帶海菜活性胜肽UP10具備抑制UVA誘發色素細胞產生黑色素活性。

b. 裙帶海菜生物活性胜肽對UVA誘導A375細胞活性氧產生之影響

已知UVA可以增加色素細胞內活性氧分子產生。圖二為裙帶海菜生物活性胜肽UP1，UP4，UP9，UP10抑制細胞內活性氧產生。以UVA處理A375細胞，結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽UP10在200 $\mu\text{g/ml}$ 存在下，與UVA單獨處理組比較，UP10可以抑制UVA刺激細胞內活性氧產生，此結果顯示活性胜肽UP10在色素細胞具備較佳的抑制UVA誘發活性氧產生的活性。

c. 裙帶海菜生物活性胜肽對UVA誘導A375細胞gluthione(GSH)產生之影響

另一方面，UVA照射會增加細胞內抗氧化分子GSH。圖三為裙帶海菜生物活性胜肽UP1，UP4，UP9，UP10抑制細胞內GSH產生。以UVA處理A375細胞，結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽UP10在200 $\mu\text{g/ml}$ 存在下，與UVA單獨處理組比較，可以抑制UVA刺激細胞內GSH產生，此結果顯示活性胜肽UP10在色素細胞具備較佳的抑制UVA誘發GSH產生的活性。

d. 裙帶海菜生物活性胜肽對UVA誘導A375細胞酪胺酸酶產生之影響

細胞黑色素主要由細胞內酪胺酸酶所生成。圖四為裙帶海菜生物活性胜肽UP1，UP4，UP9，UP10抑制細胞內酪胺酸酶產生。以UVA處理A375細胞，結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽UP10在200 $\mu\text{g/ml}$ 存在下，與UVA單獨處理組比較，可以抑制UVA刺激細胞內酪胺酸酶產生，此結果顯示活性胜肽UP10在色素細胞具備較佳的抑制UVA誘發酪胺酸酶產生的活性。

e. 裙帶海菜生物活性胜肽對UVA誘導A375細胞MITF產生之影響

由於細胞酪胺酸酶主要是由上游轉譯因子Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)所調控，我們進一步分析細胞內MITF表現。圖五為裙帶海菜生物活性胜肽UP1，UP4，UP9，UP10調節細胞MITF轉譯因子。以UVA處理A375細胞，結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽UP10在200 $\mu\text{g/ml}$ 存在下，與UVA單獨處理組比較，可以明顯抑制UVA刺激細胞內MITF轉譯因子之產生，此結果顯示生物活性胜肽UP10在色素細胞可以有效抑制UVA誘發MITF轉譯因子產生的活性。

f. 裙帶海菜生物活性胜肽對UVA誘導A375細胞NQO1產生之影響

另一方面，我們探討A375細胞對抗氧化壓力，是否藉由增加細胞內NADPH-quinone oxidoreductase (NQO1)之路徑。圖六為裙帶海菜生物活性胜肽UP1，UP4，UP9，UP10調節細胞內NQO1產生。以UVA處理A375細胞，結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽UP10在200 μ g/ml存在下，與UVA單獨處理組比較，可以減少UVA刺激細胞內NQO1產生，此結果顯示活性胜肽UP10在UVA刺激色素細胞下，具備較佳的保護作用。

f. 裙帶海菜生物活性胜肽對UVA誘導A375細胞Nrf2產生之影響

由於細胞NQO1主要是由上游轉譯因子Nrf2所調控，我們進一步分析細胞內Nrf2表現。圖七為裙帶海菜生物活性胜肽UP1，UP4，UP9，UP10調節細胞Nrf2轉譯因子。以UVA處理A375細胞，結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽UP10在200 μ g/ml存在下，與UVA單獨處理組比較，可以有效抑制UVA刺激細胞內Nrf2產生，此結果顯示生物活性胜肽UP10在UVA刺激色素細胞下，具備較佳的抑制Nrf2產生的活性。

III、結論

根據上述結果可知裙帶海菜生物活性胜肽UP10，對UVA誘發人類色素細胞產生黑色素具有抑制之機能作用，其抑制作用可能與其抑制UVA誘發產生過多細胞活性氧相關，此外，也對細胞酪胺酸酶蛋白表現具有抑制作用。另一方面，裙帶海菜生物活性胜肽UP10也能抑制UVA刺激細胞內NQO1蛋白產生。而裙帶海菜生物活性胜肽UP10也有效抑制UVA刺激色素細胞中轉譯因子Nrf2產生。此結果暗示裙帶海菜生物活性胜肽UP10主要作用於減少細胞內氧化壓力。此外，這些數據也顯示，應用裙帶海菜生物活性胜肽可能有助於體內降低色素細胞合成黑色素。

參考文獻

1. Suetsuna K. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from the red alga *Porphyra yezoensis*. J Mar Biotechnol. 1998, 6, 163-167.
2. Park SJ, Ryu J, Kim IH, Choi YH, Nam TJ. Induction of apoptosis by a peptide from *Porphyra yezoensis*: Regulation of the insulin-like growth factor I receptor signaling pathway in MCF-7 cells. International Journal of Oncology, 2014, 45, 1011-1016.
3. Shampa M, Suman KS, CHimnoy S, Bidisha S, Ranjan B. (2005) Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro. Pigment Cell Res, 18, 25-33.
4. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. Planta Med, 74, 1526–1539.

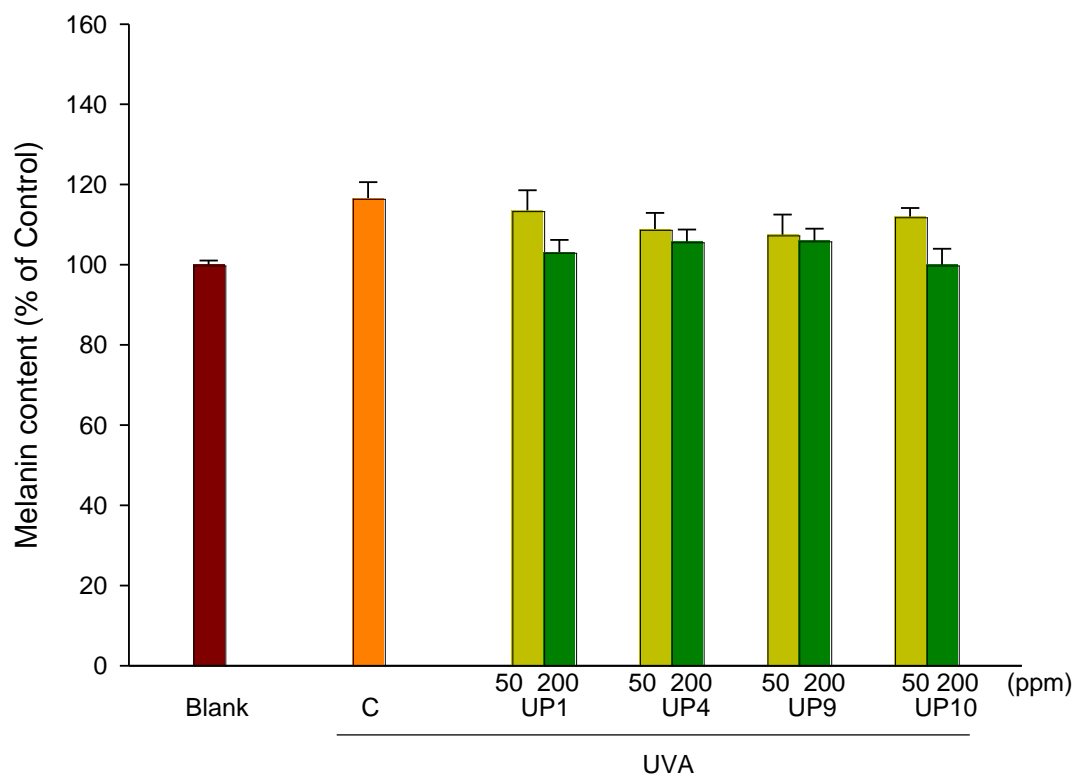


Figure 1. Effects of bioactive peptides from *Undaria pinnatifida* on UVA induced melanin production in A375 human melanoma cells. The cells were pretreated with UVA for 10 min then incubated with bioactive peptides from *Undaria pinnatifida*, respectively, for 48 h. Data are presented by mean \pm SD (n=3).

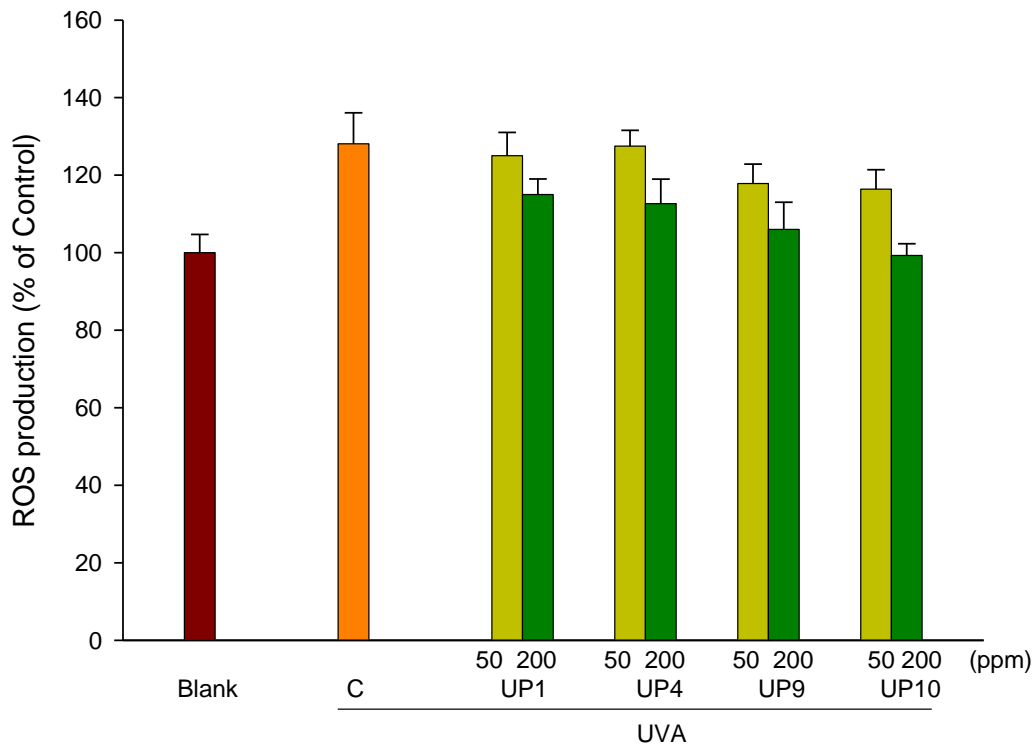


Figure 2. Effects of bioactive peptides from *Undaria pinnatifida* on UVA induced reactive oxygen species (ROS) production in A375 human melanoma cells. The cells were pretreated with UVA for 10 min then incubated with bioactive peptides from *Undaria pinnatifida*, respectively, for 6 h. Data are presented by mean \pm SD (n=3).

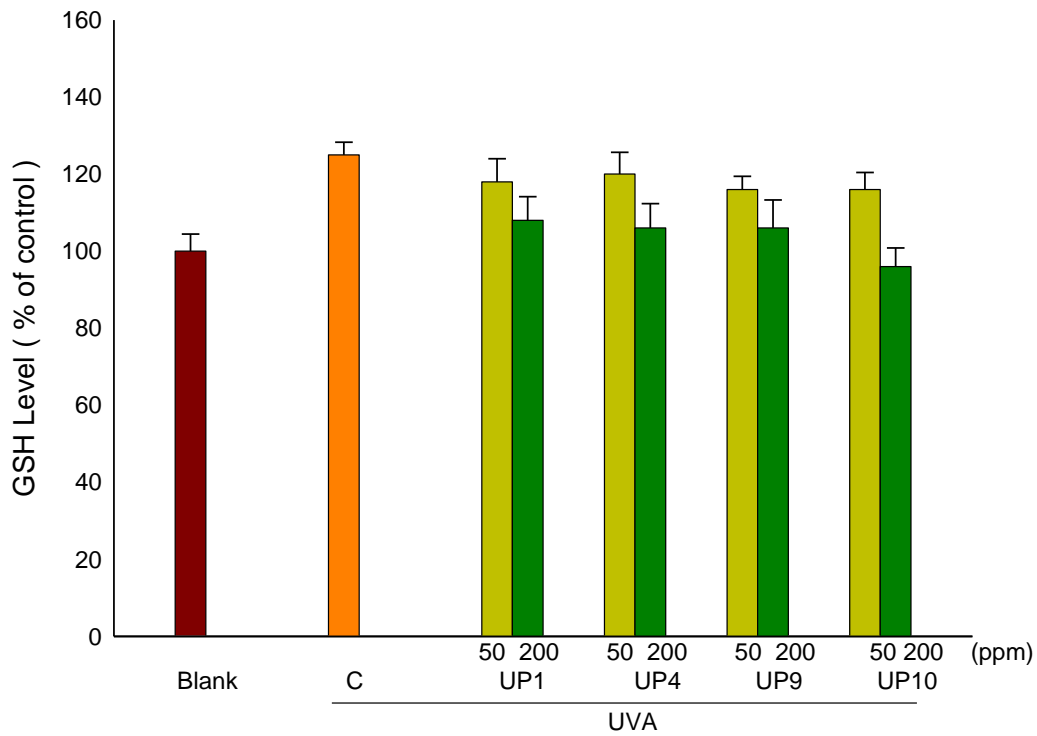


Figure 3. Effects of bioactive peptides from *Undaria pinnatifida* on UVA induced glutathione (GSH) production in A375 human melanoma cells. The cells were pretreated with UVA for 10 min then incubated with bioactive peptides from *Undaria pinnatifida*, respectively, for 6 h. Data are presented by mean \pm SD (n=3).

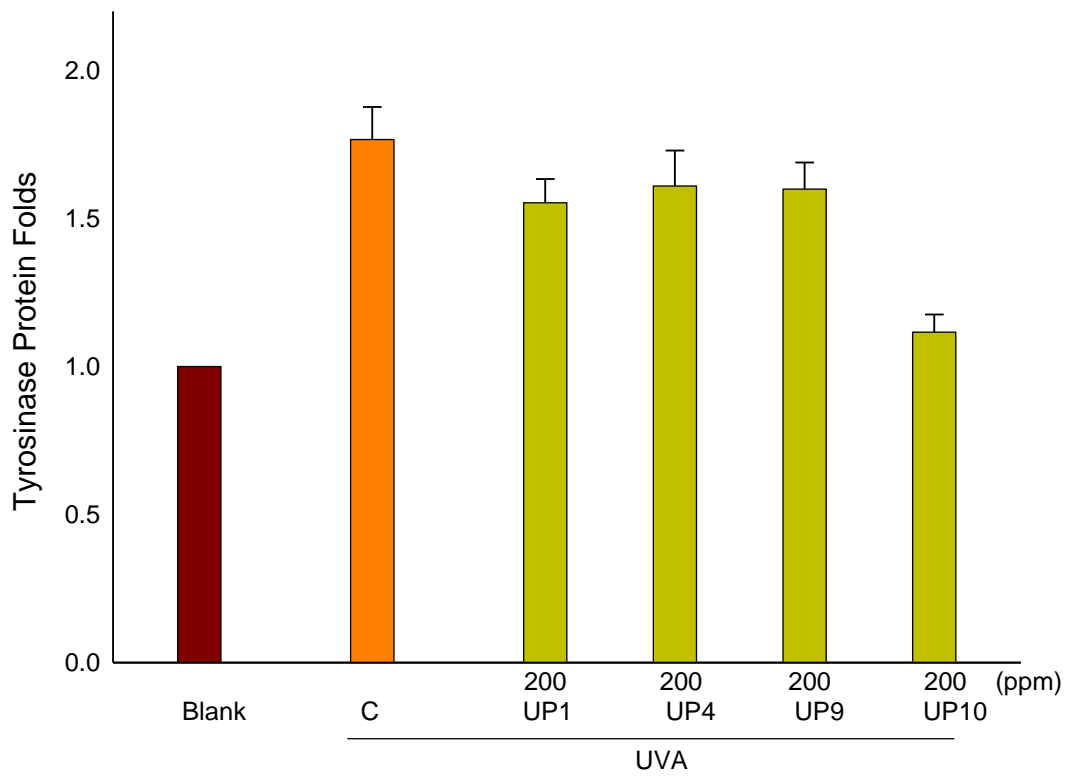


Figure 4. Effects of bioactive peptides from *Undaria pinnatifida* on UVA induced tyrosinase production in A375 human melanoma cells. The cells were pretreated with UVA for 10 min then incubated with bioactive peptides from *Undaria pinnatifida*, respectively, for 48 h. Data are presented by mean±SD (n=3).

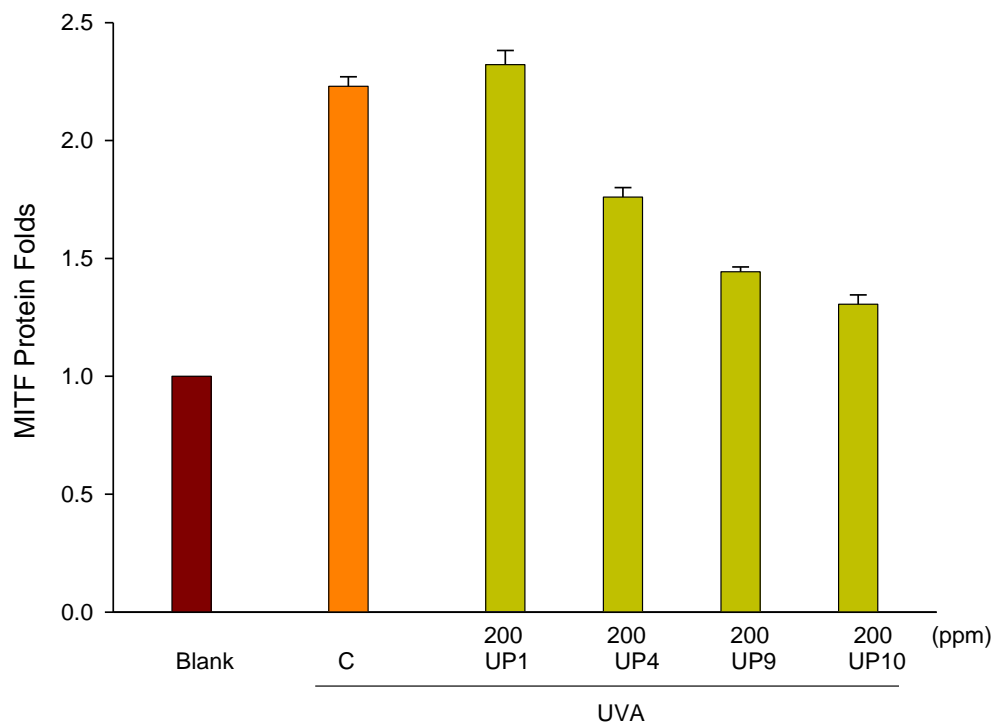


Figure 5. Effects of bioactive peptides from *Undaria pinnatifida* on UVA induced MITF production in A375 human melanoma cells. The cells were pretreated with UVA for 10 min then incubated with bioactive peptides from *Undaria pinnatifida*, respectively, for 24 h. Data are presented by mean±SD (n=3).

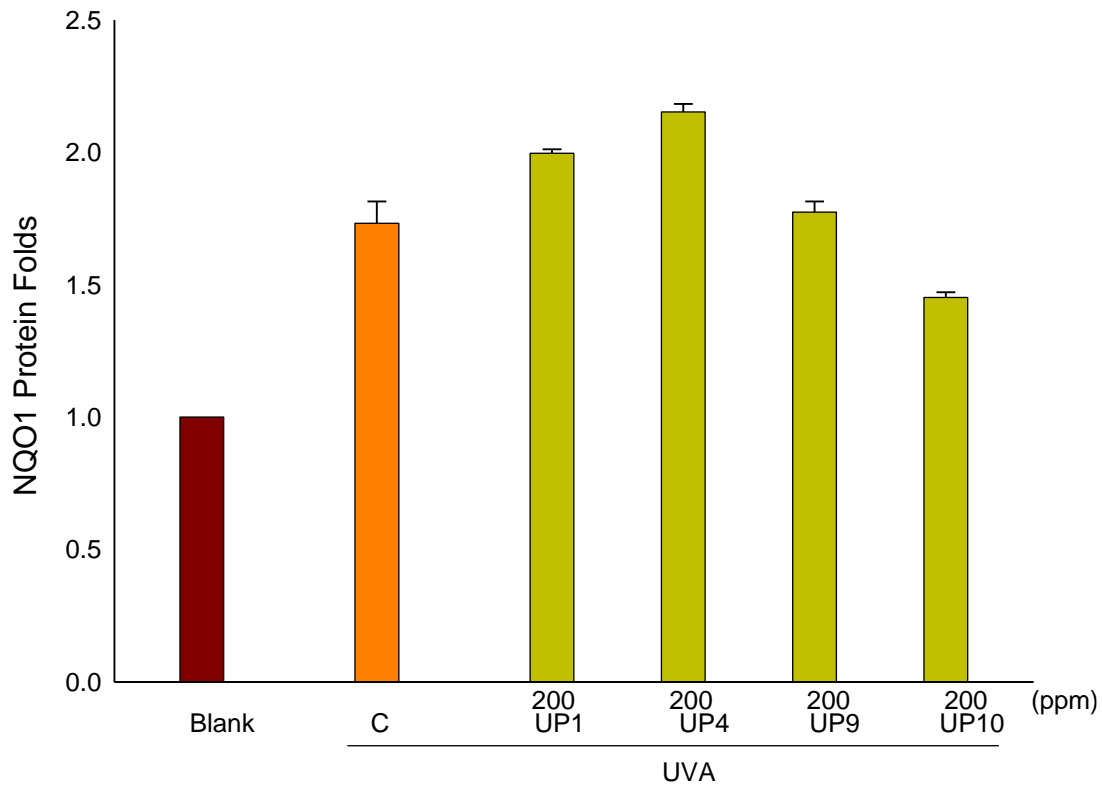


Figure 6. Effects of bioactive peptides from *Undaria pinnatifida* on UVA induced NQO1 production in A375 human melanoma cells. The cells were pretreated with UVA for 10 min then incubated with bioactive peptides from *Undaria pinnatifida*, respectively, for 48 h. Data are presented by mean \pm SD (n=3).

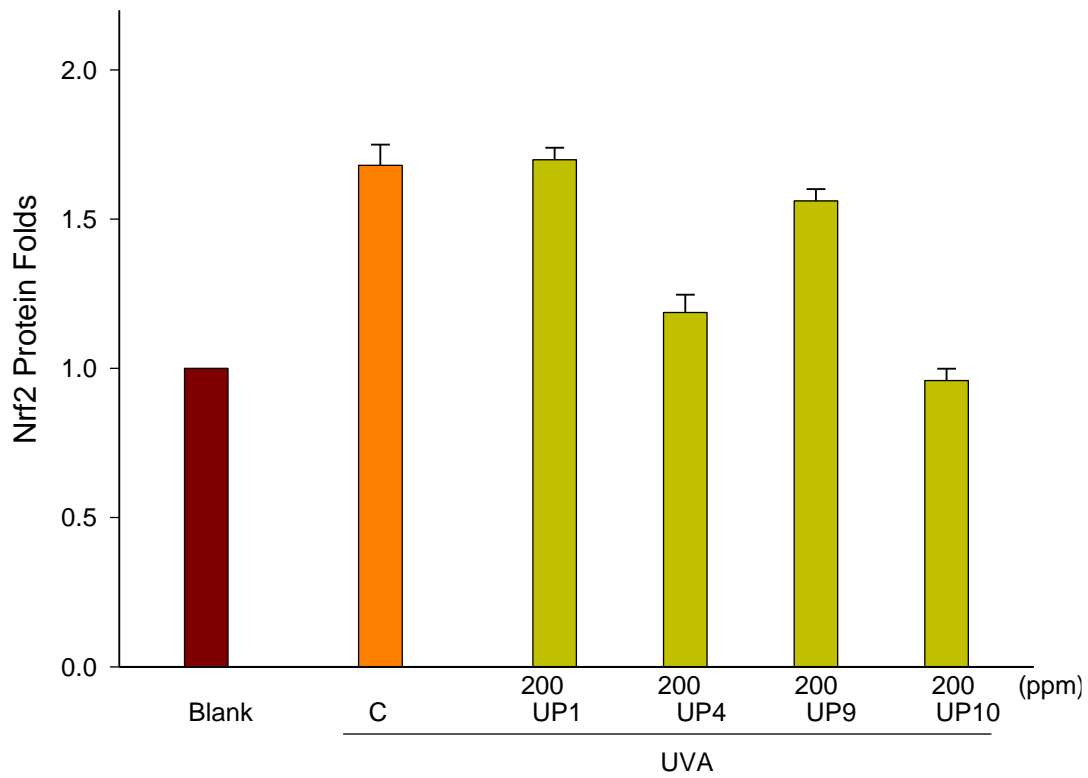


Figure 7. Effects of bioactive peptides from *Undaria pinnatifida* on UVA induced Nrf2 production in A375 human melanoma cells. The cells were pretreated with UVA for 10 min then incubated with bioactive peptides from *Undaria pinnatifida*, respectively, for 24 h. Data are presented by mean±SD (n=3).

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形(請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊)

論文：已發表未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得申請中 無

技轉：已技轉洽談中 無

其他：(以 200 字為限)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以 500 字為限）。

本研究為探討裙帶海菜生物活性胜肽對人類色素細胞產生黑色素之抑制作用。結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽可抑制UVA誘發色素細胞黑色素合成反應。其作用機轉與裙帶海菜生物活性胜肽可抑制UVA所誘發酪胺酸酶活性與細胞內ROS生成具有密切關係。此外，裙帶海菜生物活性胜肽對UVA所誘發細胞內GSH具有抑制作用。裙帶海菜生物活性胜肽可抑制UVA所誘發細胞內NQO1與Nrf2蛋白表現的作用。這些數據顯示，應用裙帶海菜生物活性胜肽可能有助於體內減少氧化壓力並進而減少黑色素合成。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關_____

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以 150 字為限)

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：王柏森			計畫編號：106-2320-B-041-005-			
計畫名稱：裙帶海菜生物活性胜肽在細胞模式抑制黑色素生成機制						
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	
		研討會論文		0		
		專書		0	本	
		專書論文		0	章	
		技術報告		0	篇	
		其他		0	篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇
			研討會論文		0	
			專書		0	本
			專書論文		0	章
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	1		本計畫提供專任助理良好實作場域。
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

本研究為探討裙帶海菜生物活性胜肽對人類色素細胞產生黑色素之抑制作用。結果顯示，裙帶海菜生物活性胜肽可抑制UVA誘發色素細胞黑色素合成反應。其作用機轉與裙帶海菜生物活性胜肽可抑制UVA所誘發酪胺酸酶活性與細胞內ROS生成具有密切關係。此外，裙帶海菜生物活性胜肽對UVA所誘發細胞內GSH具有抑制作用。裙帶海菜生物活性胜肽可抑制UVA所誘發細胞內NQO1與Nrf2蛋白表現的作用。這些數據顯示，應用裙帶海菜生物活性胜肽可能有助於體內減少氧化壓力並進而減少黑色素合成。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）