

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

子計畫四：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氨酸酶。第三階段的黑色小體其黑色素量較第二階段為多，酪氨酸酶的活性也很高。

而第四階段的黑色小體其黑色素的量較第三階段為多，但是酪氨酸酶的活性較低(Bolognia, 1988)。在黑色素形成的過程中，除了酪氨酸酶外，還有許多酵素的參與，包括兩個與酪氨酸酶相關蛋白質 (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氨酸酶的轉錄作用，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。(Gibbs, 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氨酸酶活性作用，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氨酸酶抑制劑，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 1000 μ g/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 30 μ l 酪胺酸酶,加入 20 μ l,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胺酸酶並不具抑制力。

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-dimethylthiazol-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 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或萃取液之培養液 100 μ l,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) 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,可由此比較細胞經 200,400,800,及 1000 μ g/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 1000 μ g/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*10⁶ 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 200 μ l 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 μ g/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 1000 μ g/ml 之狼尾草水萃取物,經 24 及 72 小時培養,以 cytometer 計量(約 150 \times 10⁴ 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°C 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°C 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胺酸酶並不具抑制力。

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.
- Gibbs, S., Murli, S., De Boer, G., Mulder, A., Mommaas, A.M., and Ponc, M. Melanosome capping of keratinocytes in pigmented reconstructed epidermis effect of ultraviolet 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. Immunol. 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($\mu\text{g/ml}$)	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 ($\mu\text{g/ml}$)	melanin($\mu\text{g/ml}$)	
	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 ($\mu\text{g/ml}$)	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