

中文摘要

美容醫學的市場近年來可說是發展迅速，潛力無限，尤其針對肝斑等色素沉著問題的解決，以往都得使用較具副作用的對苯二酚來治療，因此，針對中藥及各種天然物的萃取物之抑制黑色素形成及去斑美白的研究，更是目前發展的趨勢。本研究的目的是希望了解槐花萃取物的美白功效，研究中分別以 95%乙醇、50%乙醇及純水來進行熱迴流萃取，並以不同溶劑萃取出之樣品的一半再加酸水解，再針對這六種不同的槐花萃取物樣品及市售常用之美白保養品成分(維他命 C、BHA 及熊果素)檢測其體外抑制酪氨酸酵素活性的能力，並以其中抑制率最高之實驗組(以純水萃取並加酸水解)樣品進行對人體纖維母細胞(WS1)及黑色素癌細胞(RPMI7951)培養之生長抑制影響的測定及對黑色素癌細胞培養時，針對細胞內液之酪氨酸酵素活性抑制的檢測。結果顯示以純水萃取並加酸水解之槐花萃取物具有最高的體外抑制酪氨酸酵素活性的能力，而對於 WS1 細胞培養之生長並無影響，但對黑色素癌細胞培養具有明顯之劑量相關性的生長抑制能力，但並無明顯對此細胞之細胞內液的酪氨酸酵素活性抑制能力。本實驗結論可推知槐花萃取物應為一有效且安全的美白成分，但其詳細的機轉則值得進一步的研究。



Abstract

The marketing of medical cosmetics, especially for treating pigmented problems and mainly melasma is rapidly developing and has an unlimited potential in the current trend. Hydroquinone used to be used for bleaching with number of side effects been reported. Therefore, the studies on the Chinese herbs or other nature products for inhibiting melanogenesis are the tendency of researching this time. The purpose of this study is to assay the bleaching efficiencies of the extract of *Sophora japonica*. In our studies, distilled water, 50% alcohol and 95% alcohol were used as solvents to extract the dried *Sophora* flower buds. One half of each extract samples were hydrolyzed with sulfuric acid. The tyrosinase inhibiting efficiencies were evaluated by comparison the efficacies between extracted samples and commercial available bleaching agents (i.e. ascorbic acid, BHA and arbutin). The *sophora* extract by distilled water with further hydrolysis was found to be the most effective one based on its influences on the WS1 and RPMI 7951 cell culture studies. The results revealed that *sophora* extract didn't disturb the cell growth in WS1 cell culture lines, but could inhibit cell growth with a dose-related effect in RPMI7951 cell culture lines. Herein, it was concluded that the *Sophora japonica* extracted with distilled water with further hydrolysis is a safe and an effective bleaching agent. However, the detailed mechanism should be merit to investigate.

第一章 前言

美容醫學的市場近年來可說是發展迅速，潛力無限。以往針對一些問題皮膚的處理，包括青春痘、痘疤、色素沉著及老化肌膚的預防與治療，更是超越了以往對化妝品所能提供的有限療效之印象，轉而期望能由各種化妝品原料的開發與改進，尋求對於各種治療的療效突破與副作用的降低，尤其是針對中藥及各種天然物的萃取，更是目前化妝品原料開發的主流。根據統計，在 1997 年內，全球的中草藥市場就有 150 億美元之多，而預估至公元 2006 年則將會突破 350 億美元。因此，世界各國無不投注相當多的人力及物力來進行這方面的研究，就以我國而言，經濟部亦計劃於未來幾年內投入新台幣 35 億元，用於這方面的研究。

以 89 年 3 月至 8 月於台中榮總針對醫學美容就診患者的一個臨床回溯性研究中可見到，共有 400 位患者因為皮膚色素問題而前來求診，經檢視後發現有 350 位患者的臉部有肝斑問題，而這些肝斑患者其中又多有臉部同時合併有其他色素沉著的問題，包括曬斑(57%)、顴骨母斑(12%)及雀斑(4%)等。由此可知肝斑這種「易診難治」的臉部皮膚色素沉著問題，應是中草藥萃取物介入醫學美容及保養品市場時所需格外關切的問題所在。

肝斑在中醫典籍中又稱「黃褐斑」或「蝴蝶斑」，皮損為對稱分佈於面部的黃褐色斑片，常在顴骨部呈蝴蝶形。《中國醫學大辭典》：此症由憂思抑鬱，血弱不華，火燥精滯而成，多生於面上。而憂思抑鬱，血弱不華，火燥精滯而致肝火旺盛，上衝於面，三者均與肝有關，故本病多從肝論治。依照中醫辯證論治可區分為以下幾型(1)：

(1) 肝鬱氣滯型：色斑深褐或略帶青藍、瀰漫分佈於面頰部為主，兼有情志抑鬱、胸膈脹滿或少寐多夢，面部烘熱、月經不調、舌潤或夾有瘀點或瘀斑、苔薄或黃、脈多弦細，治宜理氣活血。主治以逍遙散，柴胡疏肝散。

(2) 脾溼型：色斑黃褐，狀如污泥，顴、唇部為主，兼有肢體困倦、納穀不馨，白帶多、經期愆後、舌多淡潤或有齒印、脈多濡或軟，治宜理

氣健脾活血。主治以人參健脾丸。

(3) 肝腎不足型：色斑褐黑、邊界截然、狀如蝶型、面色晦暗不澤，兼有目眩頭暈、腰酸膝軟、舌紅少苔、脈細或兼數，治宜滋養肝腎為主。主治以六味地黃湯。

？合以上可知：中醫治療黃褐斑所用的藥材多以疏肝理氣活血為主。

另一方面，在西醫領域中，針對肝斑的治療實為各種色素沉著問題治療中最具有挑戰性的。影響肝斑形成及惡化的因素很多，包括遺傳、紫外線、荷爾蒙、口服避孕藥、甲狀腺功能失調、光毒性、抗癩癩藥物及壓力等(2)。

臨床上可見肝斑主要為對稱性分佈之黃褐色斑，按其分布位置可區分為臉部中間型(centrofacial type)、顴骨型(malar type)及下顎型(mandibular type)；而其病理切片的表現主要是可發現在表皮之基底層處有較多的黑色素及黑色素細胞，而在真皮層中則可發現有較多的黑色素吞噬細胞。依其黑色素分佈的情形又可將其區分為表皮型(epidermal type)、真皮型(dermal type)及混合型(mixed type)(3)。傳統上，肝斑的治療以外用對苯二酚(hydroquinone)合併維他命A酸及外用類固醇治療為主，如此雖然臨床上可獲得淡化色素的效果，但通常因其具有較強的刺激性及黑色素細胞毒性而造成使用上的困擾(4)。尤其針對苯二酚在臨床的使用上，常見有下列幾種副作用：

- (1) 突然停止使用所導致的皮膚色素反彈現象(rebounding)。
- (2) 連續使用所導致的皮膚刺激性(irritation)。(5)
- (3) 長期使用所導致的黑色素細胞毒殺作用(melanocytotoxicity)。(6)
- (4) 長期干擾皮膚代謝所導致的赭黃症(Ochronosis) (7)。

尤其針對使用對苯二酚所導致的細胞毒殺作用，亦有學者先行以大鼠之皮膚纖維母細胞培養測定在加入對苯二酚 24 小時後，導致 50%細胞死亡之濃度為 16.5 μ M，但再以大鼠腹部全層皮膚做藥物穿透性實驗時，發現在塗抹對苯二酚 2 小時後，角質層中測得藥物濃度為 358 mM，而表皮及真皮層中的藥物濃度為 51.7 mM，皆遠遠高於 50%細胞致死濃度。由此可見外用對苯二酚的副作用，主要皆是肇因於細胞毒殺的作用

(8)。因此，許多保養品的美白成分亦是陸續被開發出來，企圖用來取代對苯二酚所扮演的角色。

傳統上，面對色素沉著問題治療的市售美白保養品及藥品成分，其作用機轉不外乎以下幾類：

- (1) 酪氨酸酵素的直接或間接的抑制(Tyrosinase inhibitor)
- (2) 抗氧化及抗自由基作用(Anti-oxidation and anti-free radical)
- (3) 加速皮膚黑色素的移除(Enhance melanin elimination)
- (4) 黑色素細胞的毒殺作用(Melanocytotoxic effect)
- (5) 防曬(Sunscreen)

雖然整個黑色素形成的生理機轉並不全然由上述幾種作用來得以減少黑色素的形成或加速其代謝移除，像是有些植物的萃取物，如洋甘菊的萃取物，亦於文獻中被提及能針對表皮細胞所分泌之細胞激素(endothelin-1)對黑色素細胞產生抑制的作用，以達到減少黑色素形成的目的(9)；或像是具有抗自由基作用的綠茶萃取物，亦被提及具有藉由抑制黑色素顆粒自黑色素細胞的傳遞與分佈，以造成皮膚外觀色澤的淡化，其並可與 L-tyrosine 競爭性地與酪氨酸酵素的活性位置結合，進而抑制黑色素的形成(10)，這些亦皆是天然萃取物應用於美白的例子。但這其中，仍是以藉由抑制酪氨酸酵素(tyrosinase)來達到減少皮膚色素的形成與淡化斑點之類的美白材料為主流。因此，各國的應用化學或是從事醫學美容研究的學者，不斷地想從各種中草藥、植物及天然物中萃取有效成分，並以體外方式來測定其抗自由基及酪氨酸酵素之抑制作用。唯此些體外方式測定，僅能做為初步參考之用，與要成為一個有價值且具療效的美白材料，並能實際應用於化妝品市場上尚有一段距離，畢竟這些材料最終是希望用於人的皮膚上的。像是楮樹萃取物(paper mulberry)，在體外的美白測定效果不錯，甚至於對 mushroom tyrosinase 的抑制效果比 Ascorbic acid, Kojic acid 及對苯二酚還強(11)，可是實際塗抹時的臨床應用經驗顯示，其效果卻不如體外試驗所預期的好，由此便之體外試驗的結果是無法完全與臨床使用的效果相吻合的。且這些去斑材料，有時單獨使用於皮膚上並無法起作用，當與其他材料配伍時，方能發揮作用，像是以去斑效果最強的對苯二酚為例，

單獨使用時的效果有限，但當合併維他命 A 酸及外用類固醇時，去斑的療效就會大幅地提昇了(2)，只是這類屬於純藥品的去斑材料，一定得由醫師指導追蹤下使用，才不會有副作用產生。

在以往的文獻中，已有許多中草藥的萃取物曾經被廣泛地以體外抗氧化及抗酪氨酸酵素試驗來篩檢其美白的功效，研究報告中顯示出天麻、桑白、槐花、甘草根及北大麻等 都有不錯的抗酪氨酸酵素活性(12)。另外，這些中草藥的萃取物之美白效果，有時也將因萃取的方式不同及萃取物的化學結構修改而有不一樣的實驗結果。本實驗即以以不同方式萃取乾燥槐花花苞為材料，並再以是否加酸水解分為六組，評估不同種類的樣品之間的體外抑制酪氨酸酵素活性之不同、對纖維母細胞與黑色素癌細胞的生長抑制情形及細胞內液之酪氨酸酵素活性抑制的能力。

因此，在目前中草藥中，有許多被提及具有抗自由基與抑制酪氨酸酵素效力的材料，針對這些在文獻中被提及的中草藥，若能以一有系統的體外試驗篩檢，再針對這些作用效力較強的材料，進一步以細胞培養的方式研究其對正常細胞的毒性、黑色素腫瘤細胞的生長抑制及黑色素合成的抑制效果進行評估，定能針對各種中草藥萃取成分做快速的分析且提供動物及人體實驗的重要參考依據。

目前在記載有關於利用天然植物來做美白之用的文獻中，針對槐花萃取物在體外抑制 mushroom tyrosinase 效力的評估，Kim 及 Son 等學者曾自槐樹根部以二氯甲烷萃取並偵測此萃取物抑制 mushroom tyrosinase 的效力，結果顯示其抑制率($IC_{50}=9.6 \mu g/ml$)優於以 75% ethanol 萃取之萃取物($IC_{50}=75.1 \mu g/ml$)，而以二氯甲烷萃取之萃取物中所含之 prenylated flavonoids 包括 sophoraflavanone G, kuraridin 及 kurarinone，而其中又以 kuraridin 對 mushroom tyrosinase 之抑制效果最好($IC_{50}=1.0 \mu g/ml$)(13)。但針對槐花花苞 (*Sophora japonica*)的萃取物而言，並無明確的臨床或實驗數據來證實槐花萃取物在美白上的實際效果。本研究乃利用體外抑制酪氨酸酵素活性實驗及細胞培養試驗，將不同方式萃取及有無水解之槐花花苞萃取物進行細胞生長抑制及酪氨酸酵素活性抑制的評估。

第二章 文獻探討

一、皮膚的結構：

皮膚是身體最大的器官，也是最活躍的器官之一，大約佔總體重的百分之十六。此外，皮膚更是具備多種重要功能，除了可以保護身體免受寄生蟲、冷、熱、脫水等外來的傷害外，還兼具排汗、調節體溫及感覺等功能，而彈性及抵抗力也是皮膚重要的功能之一，在正常情況下，皮膚還具有自我更新的能力。

雖然健康的皮膚在觸摸下感覺平滑柔軟，但詳細視察則為高低不平，高的部分稱之為「皮丘」；低的部位稱之為「皮溝」，且交錯成三角形、菱形、多角形等(14)。皮膚是薄而扁平的器官，組織學上將皮膚分為表皮、真皮及皮下組織，分別概述如下。

A：表皮 (Epidermis)：

表皮是皮膚的最外層，為直接與外界接觸之部分，是皮膚的保護層，此層無血管與神經，對各種外來的刺激與傷害有強的抵抗力。表皮層由不斷角化的細胞所組成，而身體各處的表皮厚薄不一；手掌與腳底，是全身最厚的部分；眼瞼處的皮膚則最薄，其平均厚度約為 0.2mm。表皮無血管構造，主要由表皮細胞(epidermal cells)與黑色素細胞(melanocyte)所構成。表皮由於細胞型態之不同而可再區分為五層，由內而外分別為基底層(stratum basale)、有棘層(stratum spinulosum)、顆粒層(stratum granulosum)、透明層(stratum lucidum)及角質層(stratum corneum)(15)(圖 2-1)。

表皮位於皮膚的最外層，由五個明顯的層面組成，由表層至深層其依序如下：

a、角質層 (Stratum corneum)：

由數層相疊的扁平角質所構成，為無色或淡黃色的透明物質，此細胞並無細胞核而成枯死狀，其細胞質中充滿了一種雙折光性的絲狀硬蛋白稱為角質素(keratin)。此外，角質層與一種皮膚所分泌的脂肪物質相接合，它使細胞能有防水的功能，並可預防皮膚破裂及細菌感染，保

護皮膚免受外來的刺激，並能很快的經由體內的新陳代謝而更新。

b、透明層(Stratum lucidum)：

此層僅在手掌及腳掌處可見，在光學顯微鏡底下呈現透明的薄層，位於角質層與顆粒層之間。

c、顆粒層 (Stratum granulosum)：

含三到五層的扁平多角形細胞，細胞核位於中央細胞質中，充滿了粗的嗜鹼性顆粒，稱為角質層透明質顆粒 (keratohyaline granules)，愈外層愈呈扁平狀，在這些細胞間有狹小的空隙，細胞間隙有著上皮淋巴液，此淋巴液連接著真皮的淋巴管，專司表皮的營養。

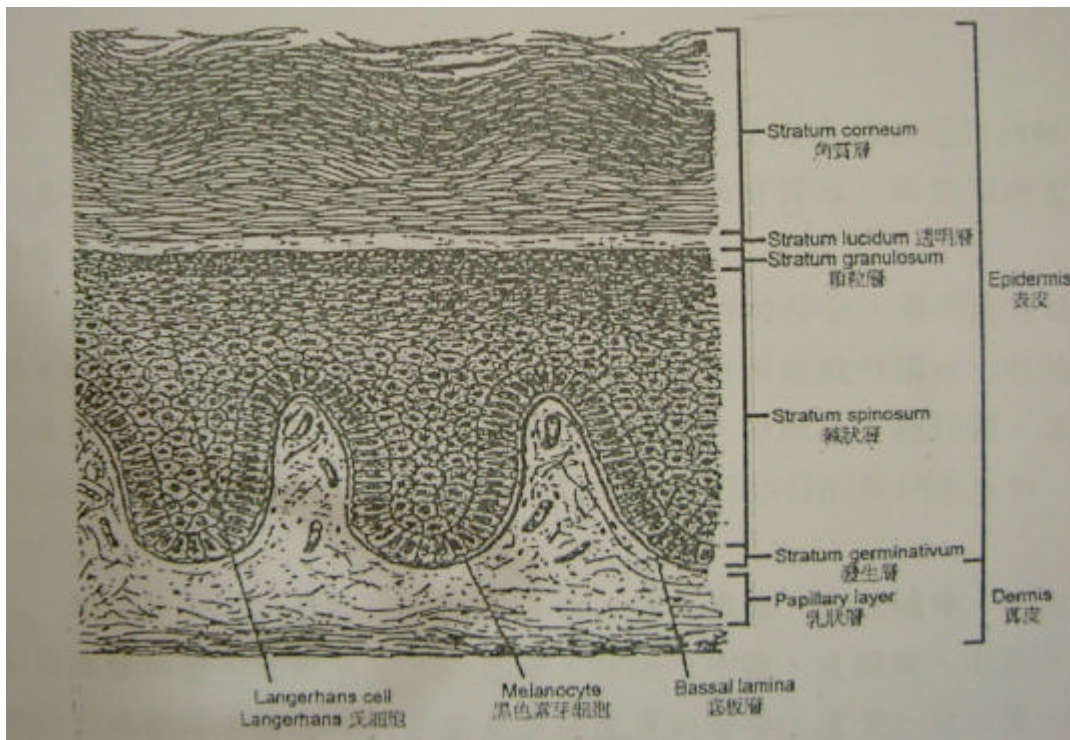


圖 2-1 皮膚的縱切圖

d、有棘層 (Stratum spinosum)：

細胞呈方形、多角形或略為扁平，其細胞核位於中央，並充滿纖維絲束的細胞質突起。這些含纖維絲束的細胞質及細胞表面的胞橋小體，將此層的細胞彼此緊密地連結在一起，在光學顯微鏡下可見這些張絲 (tonofilament) 束，稱為緊張絲 (tonofibrils)。此絲在維持細胞間結合及對抗摩擦力方面，扮演極重要的角色。

e、基底層 (Stratum germinativum) :

這是表皮最深的層面，是由一排圓柱型細胞所組成，與真皮層相接，此層從真皮的上部毛細血管中得到營養以行細胞分裂，所產生的新細胞向表層發展，並逐漸取代舊細胞。所產生的新細胞向表層發展、經有棘細胞、顆粒細胞而成熟為堅硬無生命之角質，整個過程稱“角化過程”，正常的表皮更新週期為 28 天。因為是表皮細胞的來源，故此層亦稱之為種子層 (germinal layer)。黑色素細胞大多位於基底層，以顯微鏡觀察時可發現黑色素細胞與基底細胞數目約為一比十，黑色素細胞能產生黑色素。

B、真皮 (Dermis) :

厚約 1-4mm，此層既結實又富彈性，是皮膚主要功能運作的部分，主要的結構為結締組織，可支持表皮，堅韌而有彈性，因其同時富含彈力蛋白及水分，亦能使皮膚兼具柔軟的特質。

真皮位於表皮下方，是皮膚主要功能運作的部分，專司皮膚的營養、感覺、分泌等。真皮主要由彈性纖維的結締組織所構成，在結締組織及網狀組織中穿插以豐富的血管、淋巴管、神經及多種腺體，並含有 75%的膠原蛋白(collagen)、2%的彈力蛋白(elastin)與網狀蛋白(reticulin)等。

因此層含有結締組織、膠原蛋白、彈力纖維、網狀纖維、細胞間基質及纖維細胞，可使血管、淋巴管、神經、汗腺、皮脂腺、毛根等不至於凸出或散落，其主要的機能是主持皮膚的營養、感覺、分泌等。真皮並可依其構造及功能再細分成兩個層面：

a、乳頭層 (Papillary layer) :

是由薄而疏鬆的結締組織所構成。此層富有細微血管及結締組織纖維，與表皮的營養供給及體溫調節有很大的關係。

b、網狀層 (Reticular layer) :

此層由比乳頭層較大且緻密的結締組織纖維所組成，並含彈力纖維，這兩種纖維可以增強皮膚的強韌性及運動方面的功能。

C、皮下組織 (Hypodermis)：

為皮膚最深的層面，由鬆散的結締組織及脂肪細胞所組成，會依不同的性別、體型而產生不同的厚度，皮下組織可保護表皮及真皮，使之可以抵抗外來的壓力，防止身體因碰撞而受到傷害，並給予身體平滑且順暢的外觀，此外亦為儲藏脂肪的場所，是全身熱量的來源。皮下組織 (subcutis) 位於真皮層內，具有豐富的脂肪組織，其厚度依性別、體型而異，具緩衝、保持體溫、儲存脂肪等功用(16)。

二、黑色素細胞 (Melanocytes)：

黑色素細胞為樹突狀的單細胞分泌器官，佔表皮細胞的 5-10%，位於表皮中的基底層與有棘層之間，黑色素細胞亦存在於毛囊之中，它們是黑色素的製造者。這種細胞的細胞體呈圓形，並且有長而不規則的突起，分枝進入表皮，走在基底層與有棘層之間。這些突起的尖端終止於基底層與有棘層細胞的凹陷中之(17)(18)。(圖 2-2)(17)

Fitzpatrick 和 Breathnach 於 1963 年發表，在黑色素細胞與角質細胞間有很特別的功能與構造，此特別的功能與構造為每個表皮黑色素細胞會分泌黑色素顆粒注射進入限量的鄰近角質細胞，此過程稱之為細胞分泌 (cytokrine secretion) (17)(18)。色素細胞與鄰近一群角質細胞 (約 36 個) (19) 的配對關係稱為『表皮黑色素單位』(epidermal melaninunit)(圖 1-2-4)，後來 Breathnach 於 1980 年將此親近的關係稱為『表皮共生』(17)(18)(20)(21)。當所形成的黑色素經隨同角質層的代謝作用而到達角質細胞時，這些顆粒會被一層薄膜包圍而聚集在一起。此構造稱之為『黑色素顆粒化合物』。

黑色素在表皮的深層內形成，並向皮膚表面移動，以扮演其保護的角色。其實在往上移動的過程中，黑色素細胞是不動的，而是由角質細胞負責轉移的工作，角質細胞將這些黑色素運至皮膚表面，以形成保護的屏障，雖然黑色素是由黑色素細胞所生成的，上皮細胞確是黑色素的倉庫，較黑色素細胞含有更多的黑色素。(圖 2-3)(19)

無論肌膚較白或較黑，都擁有幾乎等量的黑色素細胞，而其中的差異在於：膚色黑者之(17)黑色素細胞較為活躍，可生產較多的黑色素

顆粒(18)。黑色素無法被肌膚內的酵素分解(19)。黑色素細胞在人體上分佈的密度因部位的不同而有差異，尤其是在紫外線照射得到的部位，黑色素細胞的密度會增加。一個人約有20億個黑色素細胞，平均每平方公厘有1500個，通常於皮膚基底層、頭髮毛囊、軟腦膜和眼睛脈絡膜中部有黑色素細胞的存在(22)。

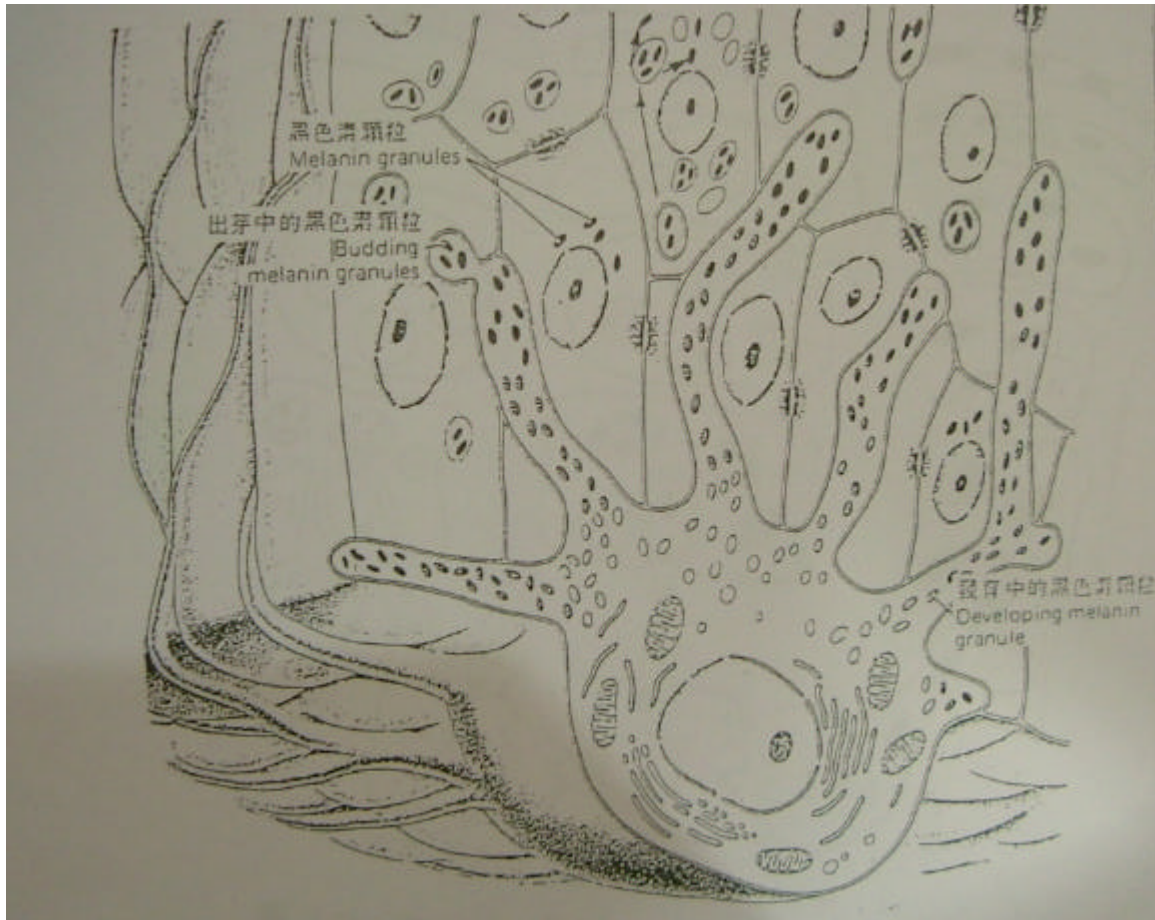


圖 2-2、黑色素細胞的圖解

三、酪氨酸酵素：

酪氨酸酵素是引起黑變的酵素，其分布很廣，幾乎無所不在，由微生物（例如：枯草桿菌和真菌的洋菇及南瓜黴）、植物（可能分布於葉綠體、色素體膜、粒腺體之中，而大部分的蔬果表皮具較強的活性，但蘋果則以果核的活性最強）、動物（例如：昆蟲的外殼、蝦類的頭胸部

分), 到人體都有存在(23)。為一種含銅的氧化酵素, 是由黑色素細胞內的核糖體所合成, 再運送到粗內質網的內腔, 儲積於高基氏體所形成的小泡中。它是利用細胞質或平滑內質網轉移至高基氏體內的特定位置上, 然後從高基氏體上分裂開並釋放至黑色素細胞的細胞質中, 成為黑色素顆粒的前驅物 (24)(25)(26)(27)。

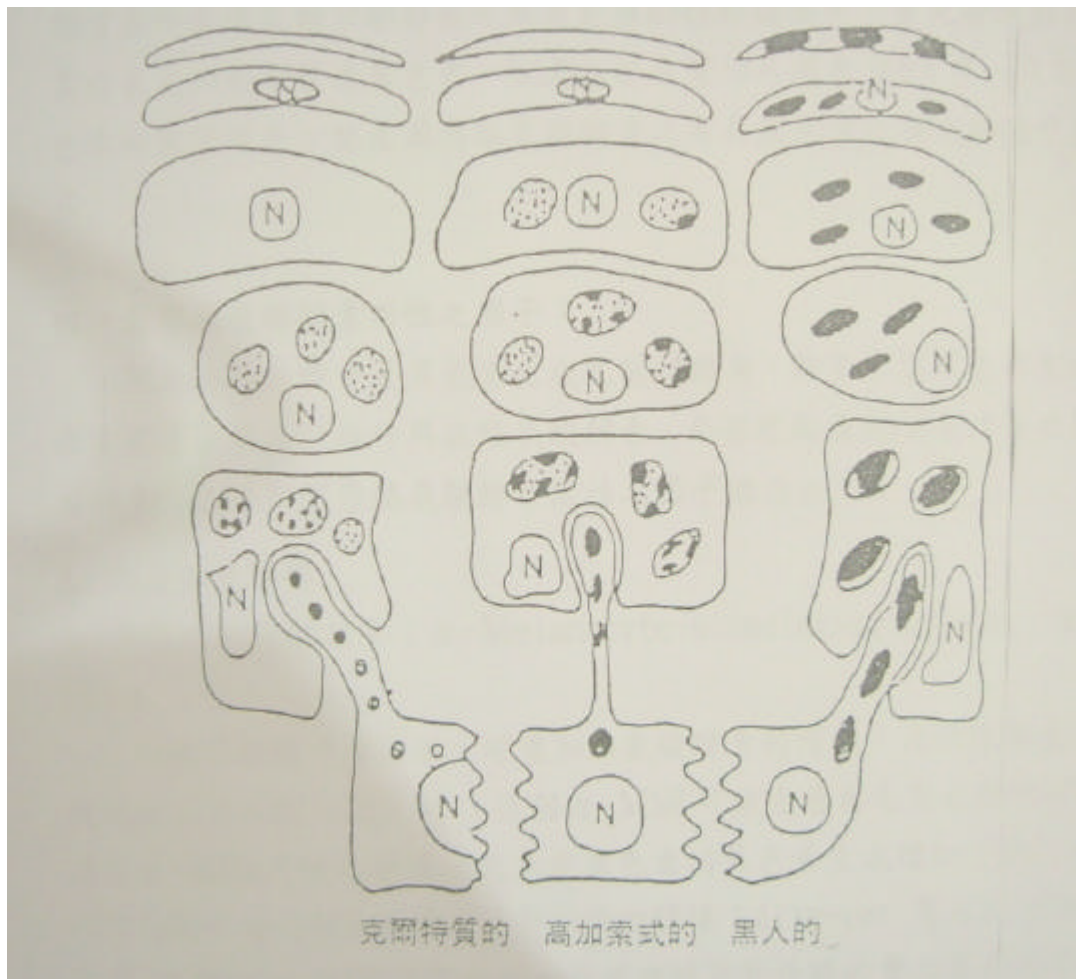


圖 2-3、黑色素細胞與角質細胞的轉換

由人體中分離得到的酪氨酸酵素與其它天然動植物體中所分離到的酪氨酸酵素在性質上是不相同的(27)(28)。例如, 蕈類中的天然酪氨酸酵素, 其活性會被過量的酪氨酸所抑制, 而人體的則不會。酪氨酸酵素是表皮黑色素細胞在合成黑色素的過程中的速率限制酵素, 此酵素的活性是黑色素生成的重要調節因素(28)。Korner 與 Pawelek 利用 Cloudman S91 老鼠的黑色素細胞瘤研究發現酪氨酸酵素能將反應過程

中的中間產物轉換，單獨成為黑色素生成路徑(27)。

酪氨酸酵素為一種含銅的氧化酵素，由黑色素細胞的核糖體所合成，在粗內質網中發現(29)(30)。而黑色素是一種聚合蛋白(polymerized protein)，在其生成機轉中，一定要有酪氨酸酵素參與反應才行，因此，酪氨酸酵素是黑色素生化形成過程中之關鍵酵素，已證實在所有哺乳類中都存在。而在皮膚的顯微觀察中，首先發現到只有某些表皮細胞會製造黑色素，就是由於皮膚切片浸在 DOPA 中，只有黑色素細胞變深色。就是因為酪氨酸酵素只有在黑色素生合成細胞中存在。

四、影響酪氨酸酵素活性之因子：

因為酪氨酸酵素是黑色素生成之關鍵酵素，許多影響黑色素生成的因素都是直接或間接作用在酪氨酸酵素，而影響酪氨酸酵素活性之因子有許多，在此將影響酪氨酸酵素活性之因子概述如下：

A. 內分泌之影響

a. 黑色素細胞刺激素 (α -Melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)：

由腦下垂體中葉分泌，可增加酪氨酸酵素的活性，進而使黑色素生成增加(31)(32)(33)(34)。注射 α -MSH 可使皮膚與毛髮之顏色增加，乃因 α -MSH 可使毛髮濾泡及表皮黑色素的黑色素生成增加(35)(36)(37)(38)。 α -MSH 的濃度有季節性的韻律；Altmeyer 等人於 1986 年指出：人類的 α -MSH 濃度會在一整年終隨著紫外線的量而呈現季節性的韻律，人類夏天皮膚中的 α -MSH 濃度將顯著地比冬天高(39)。

b. 褪黑激素 (melatonin)：

松果腺可以刺激神經末梢分泌一種色素凝集素，即褪黑激素。褪黑激素可以促使黑色素細胞中的黑色素體聚集，因此可以使皮膚變白。褪黑激素長久以來，即被視為一種可以使皮膚變白之荷爾蒙，在兩棲類和一些可以隨季節變換毛髮顏色之動物中，褪黑激素即為控制動物體表顏色可隨外界環境和季節變化而改變之主因。(29)

B. 化學方面之影響

a. 苯丙胺酸(Phenylalanine):

苯丙胺酸會使黑色素合成量減低，並非藉由抑制酪氨酸酵素之活性，而是因為丙苯胺酸在黑色素合成過程中，會與酪氨酸酵素競爭，而影響內源性酪胺酸之吸收，而使黑色素合成受影響。(34)

b. 硫氫化物類 (-SH-group) :

酪氨酸酵素為含銅蛋白，氫硫化物有強力結合銅離子的特性，能妨礙酪氨酸酵素在黑色素形成過程中之功用，因此黑色素合成量降低。(40)

c. 金屬:

黑色素顆粒具有銅及高濃度的鋅(Zn^{2+})，鋅會抑制酪氨酸酵素的羥化作用(hydroxylation)；而鎳(Ni^{2+})與鈷(Co^{2+})卻會促進酪氨酸酵素的羥化作用。鉛(Pb^{2+})與汞(Hg^{2+})會與銅離子競爭而抑制酪氨酸酵素的活性。(41)

d. 還原劑:

如維生素 C 與維生素 E 等，具有抗氧化的特性，能將 dopaquinone 還原成 DOPA，抑制黑色素的生成，或將深色的氧化型黑色素還原成淡化的還原型黑色素。

C. 物理因素之影響 (42)

a. 溫度:

在試管內，酪胺酸? 的活性會隨著溫度升高而增加，太低的溫度會影響酪氨酸酵素的活性；而人體皮膚暴露於熱源的部位黑色素亦較深。(40)

b. pH 值:

在黑色素合成過程中，適當的 pH 值約在 7.0 左右(43)，pH 值不適宜，會影響酪氨酸酵素的活性。(40)

c. 陽光、紫外線:

Quevado et al (1965)證實將人類皮膚暴露於紫外線照射下，酪氨

酸酵素的活性會增加，使得黑色素之合成增加(44)，膚色變黑；人類的 α -MSH 濃度會在一整年中隨著紫外線的量而呈現季節性的節律變化，人類皮膚中的 α -MSH 的濃度及顯著的比冬天為高。(45)

d. 放射線：

以 X 光而言，小劑量及中等劑量可產生直接色素加深或炎症後間接性色素加深之現象，大劑量則可使黑色素細胞遭受永久性的破壞。(40)

D、酪氨酸酵素活性與人類皮膚之關係

人類皮膚之呈現，與酪氨酸酵素活性之間有絕對之相關，酪氨酸酵素之活性與黑色素之合成量成正比關係；在人類皮膚中，黑人的酪氨酸酵素活性為白人的 3 倍之高(46)；而 Iozumi et al.(1993)培養黑人之皮膚，其黑色素細胞中酪氨酸酵素之活性，可能比白人皮膚者高十倍之多(47)。而黑人新生兒皮膚中之酪氨酸酵素活性，經由證實確實比白人新生兒高 2.25 倍(48)。一般來說，酪氨酸酵素活性越高，所能合成之黑色素量越高，則所呈現出來之膚色越黑。(47)

E. 酪氨酸酵素影響皮膚顏色深淺之決定因子

一般來說皮膚色素的差異性，是因為黑色素細胞所產生黑色素的量不同，並經由表皮的蓄積而表現。(49)皮膚黑色素含量的不同，可以歸納為下列幾點原因(45)：

a. 皮膚中酪氨酸酵素之活性：

酪氨酸酵素活性越高，所能合成黑色素量越高。

b. 黑色素體之大小：

黑色素體之大小與其所能合成之黑色素之量有關。

c. 酪氨酸酵素合成與衰退的速率：

以游離態存於黑色素細胞中的酪氨酸酵素，可以合成具有活性的酪氨酸酵素，以生成黑色素；而酪氨酸酵素失去活性後，變無法再生成黑色素。

d. 黑色素體中合成黑色素之速率：

黑色素體為黑色素細胞中專司生成黑色素之胞器，若黑色素體中合

成黑色素之速率越高，則皮膚中的黑色素含量越高。

e. 黑色物體將黑色素運送至周圍角質細胞之效率：

黑色素在黑色素體中合成後，會經由周圍角質細胞之吞噬作用，而在皮膚呈現出黑色；若黑色素體將黑色素運送之周圍角質細胞之效率越高，則所能表現出來的黑色素量越高。

f. 角質細胞中黑色素體之降解速率：

黑色素體進入角質細胞後，隨著角質細胞的成熟而迷散到角皮各層，並隨著角質細胞脫落而與表皮分離，此過程需 4 週。黑色素體降解所需時間越長，則膚色能維持較長之黑色。

五、黑色素(Melanin)之形成過程

A. 黑色素之定義

生物界中主要之色素物質可分為：(1)血紅素(hemoglobins)，(2)葉綠素(chlorophylls)、(3)花青素(flavonoids)、(4)類胡蘿蔔素(carotenoids)、(5)黑色素(melanins) 五大類；其中前四類，學術界已有詳盡之了解；但對黑色素之了解，仍停留在眾說紛紜之階段(51)。

哺乳動物的毛髮與皮膚顏色，主要有五種基本色素；分別為黑色、棕色、紅色、黃色及白色(缺乏色素者)；這些色素經由不同的組合與明暗度呈現，就會有多種色彩的變異。在自然界中，色素是最明顯的體表型之一，而在眾多色素物質當中，黑色素則是最廣泛的存在於自然界中，包括細菌、黴菌及體內毛髮皮膚等皆有黑色素存在，植物的蕈類亦有黑色素之合成。暴露在空氣中之蘋果、香蕉、蕃茄等水果之切面亦會進行黑色素之生成。(52)

而影響皮膚外觀美白與否的因素，自然也不外乎上述的幾個皮膚的基本色素。除此之外，皮膚黑色素分布的均勻程度，同樣影響著皮膚外觀的色澤，當表皮細胞內的黑色素顆粒分布得越分散，皮膚外觀顏色則越暗沉；一旦整體的黑色素或是黑色素細胞在表皮層中分布不均，則皮膚外觀就將產生斑點；而真皮層內的微血管循環的豐富程度，同樣影響皮膚外觀的色澤；而血液中的血紅素，如果氧合程度不夠，亦將導致皮膚外觀的暗沉；另外，皮膚最外層的角質層如果過厚，外觀顏色同樣會

顯得暗沉與偏黃。雖然影響皮膚外觀色澤及質感的因素相當複雜，但仍以皮膚內含的黑色素之多少為最主要的關鍵。

B. 黑色素之種類

黑色素依其構造可區分為 eumelanin、phaeomelanin、及 allomelanin，其中 allomelanin 則存在於細菌與黴菌中。(22)

一般來說，黑色素在哺乳動物中有兩種基本形式：

a. 真黑色素(Eumelanin):

Eumelanin 為含氮元素，外觀為黑色或棕色，廣泛的存在於動物體中。通常泛指真黑色素為黑色素，呈現褐色或黑色，存在於動物的上皮細胞、體毛、羽毛、脈絡膜、視網膜、神經等處，是決定皮膚顏色的色素。(53)

b. 褐黑色素(Pheomelanin):

Phaeomelanin 則含有硫元素，為黃色或紅棕色，大多存在於人類的紅髮、鳥類的紅、黃色羽毛等處。(52)

黑色素的顏色多變異，是因為在體內(in vivo)，多種酪胺酸(L-tyrosine)的衍生物(如 N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester)及含硫氨基酸(如 cysteine)等，均可能參予黑色素之自然氧化、聚合的過程，而產生黃、紅(pheomelanin)至棕、黑(eumelanin)等程度不同的黑色素；而經由 pheomelanin 與 eumelanin 依不同比例混合出現，則會承受不同深淺之黑色。(53)

C. 黑色素細胞(Melanocyte)

黑色素細胞源自神經脊索(neural crest)，為樹突狀的單細胞，在胚胎期第七週進入表皮，約佔細胞的 5-10%，專司產生黑色素，一般存在於脊椎動物的表皮基底層、頭髮毛囊、軟腦膜、眼睛脈絡膜、視網膜色素上皮、消化器官黏膜、卵巢與腎上腺等處。

黑色素細胞在人體上分佈的密度依身體部位而有差別，尤其在紫外線照射下之部位會增加；以人類來說，每人平均約有 20 億個黑色素細胞，平均約為 1500 個/mm²。對於黑色素細胞的數目而言，黑人與白人在

單位面積所含之數量差異不大，但是黑人的黑色素細胞比白人的大，且活性較高，所以能產生的量很多，這是黑人比白人黑的原因(35)。而一般肉眼所見皮膚上之雀斑，其上之黑色素細胞數目與一般皮膚無異，只是雀斑部分之黑色素細胞充滿較多之黑色素體。

黑色素細胞數目或其產生黑色素的能力，將隨著年老而逐漸衰退，即生理的 aging。一個人一生當中大約會減少 10% 的黑色素細胞(54)，所以老年人皮膚較白也較容易受陽光傷害。

D. 黑色素生成 (Melanogenesis) 之機轉

黑色素細胞內的黑色素，是透過酪氨酸酵素形成的，通常這種色素並不活躍，而且受抑制。紫外線一旦去除了其抑制性，酵素就會變的活躍。之後，便促使黑色素生成，這是酵素及非酵素化學反應的複雜結果，最後終於引起黑色素的產生。

a. 黑色素之生化合成路徑：

許多研究報告皆有提及(52)(55)：黑色素之生化合成過程首先被 Raper(1982) 提出，再經由 Mason (1965) 的證實與補充而確定，因此可將黑色素之生化形成之過程稱為 Raper-Mason pathway(56)。經由此路徑，產生一連串的自我發性化學反應與酵素催化作用，便可產生黑色素。最基本的黑色素生成 (melanogenesis) 路徑是由 Mason 及 Raper 兩人所證實的(25)(26)。黑色素生成的第一階段即是酪氨酸酵素在紫外光的催化下將酪氨酸轉變為 Dopa，再將 Dopa 氧化成 Dopachrome，而 Dopachrome 十分容易反應，用不著酵素的作用，便自行氧化聚合成黑色素 (eumelanin)。若含硫化物 (半胱氨酸) 存在時，則會氧化成紅色的黑色素 (phaeomelanin) (26)(57)。

黑色素之生化反應，以酪氨酸(一種 monophenol)為起點，經由酪氨酸轉化酶的催化作用而形成 dopa(dihydroxyphenylalanine)，dopa 再經由酪氨酸酵素之催化，而形成 dopachrome，接著經由連續的自我發性化學反應，非常快速的，轉化成 leucodopachrome 在形成紅色的 dopachrome 緩慢的轉化成 5,6-dihydroxyindole，再經由酪氨酸酵素催化 5,6-dihydroxyindole 成為 indole-5,6-quinone 後，迅速的轉

換成紫色的 melanochrome，在聚合成黑色素。而在反應過程中，一些含硫氨基酸(如 cysteine)及金屬離子(如銅離子)等，均可參與反應。(圖 2-4)

b. 黑色素細胞中之黑色素生成

在哺乳動物中，黑色素的生成大同小異，以人類為例，酪氨酸以游離狀態存於黑色素細胞之細胞質中，在平滑內質網中的核糖體內含有酪氨酸酵素的蛋白質，在通過顆粒內質網，GERL (Golgi-endoplasmic reticulum lysosome)內縮合成具有活性的酪胺酸酵素，進入高基氏體中，並形成膜性囊泡。之後在此囊泡內，由於酪氨酸與酪氨酸酵素的反應，開始生成黑色素。生成的黑色素又沉著於此膜性囊泡上之後酪胺酸酵素逐漸失去活性，此時即為完全熟之黑色素體。

成熟之黑色素體，位於黑色素細胞之樹突之上，藉由波浪狀運動，接觸周圍的角質細胞；再經由周圍的周圍角質細胞之吞噬作用，就會在表皮表現出黑色。人體的膚色不一定隨著黑色素細胞內黑色素體的增加而變黑，必須黑色素體從黑色素細胞向鄰近的角質細胞移行並散開，皮膚才會變黑。(54)(圖 2-5)

E. 黑色素之功用

a. 吸收紫外線：

黑色素對於生物體有保護之功能；Niggli(1990)發現細胞內的黑色素，可吸收波長範圍廣泛的紫外線 UV-A 與 UV-B，具有保護 DNA 免受紫外線直接傷害之功用。(54)

b. 穩定自由基：

malanin 本身是安定的自由基，可與各種自由基中和而形成穩定的化學鍵，以減少自由基對正常細胞的傷害。

c. 作為生物聚合物：

目前已知有許多化合物或藥物會停留在含黑色素體的 carboxylic group 帶有強陰電性，故可結合許多帶電的分子或官能基，此種靜電吸引特性，可以用來作為吸附藥物的生成聚合物(biopolymer)。(51)

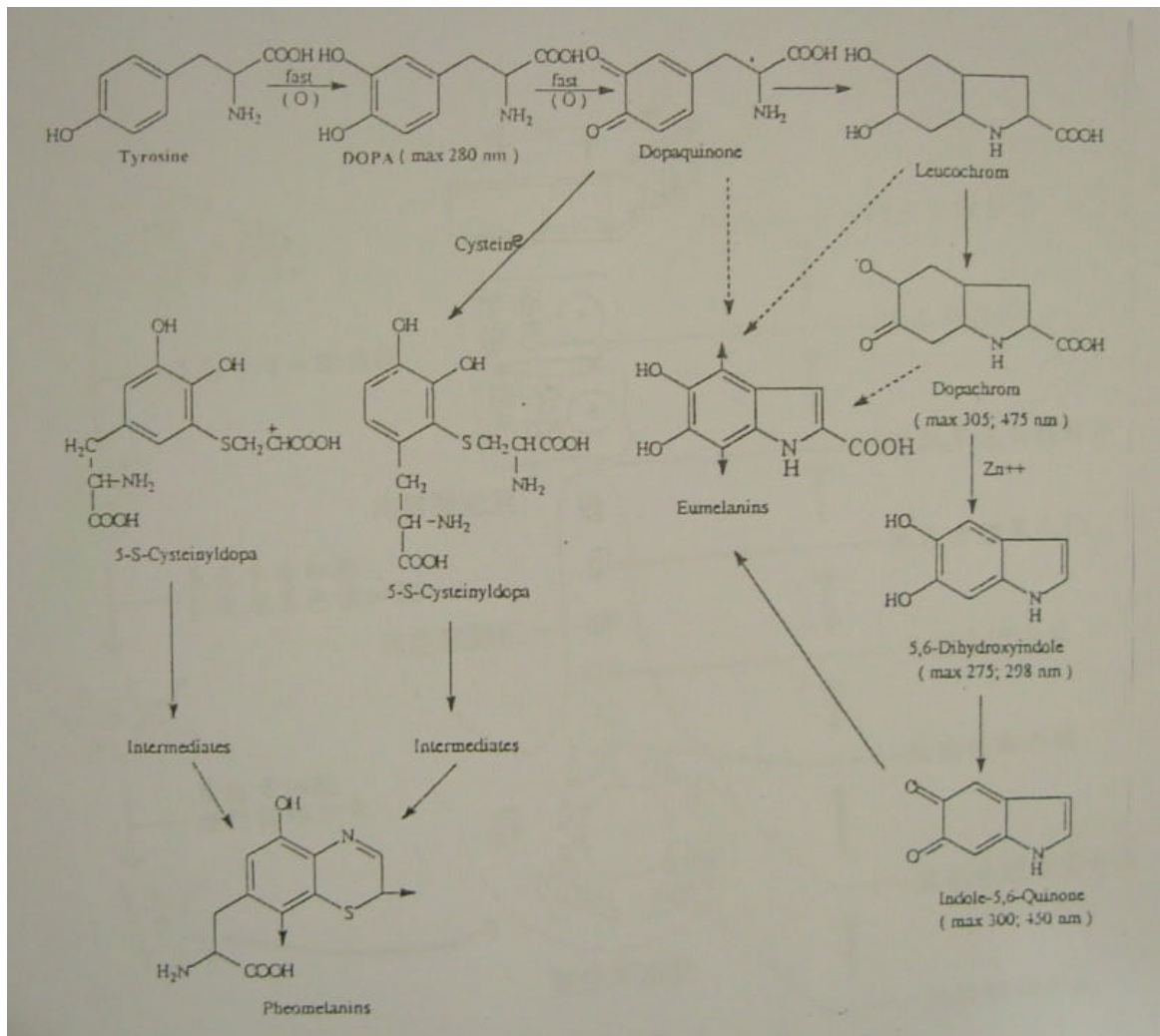


圖 2-4、黑色素生成的反應機構

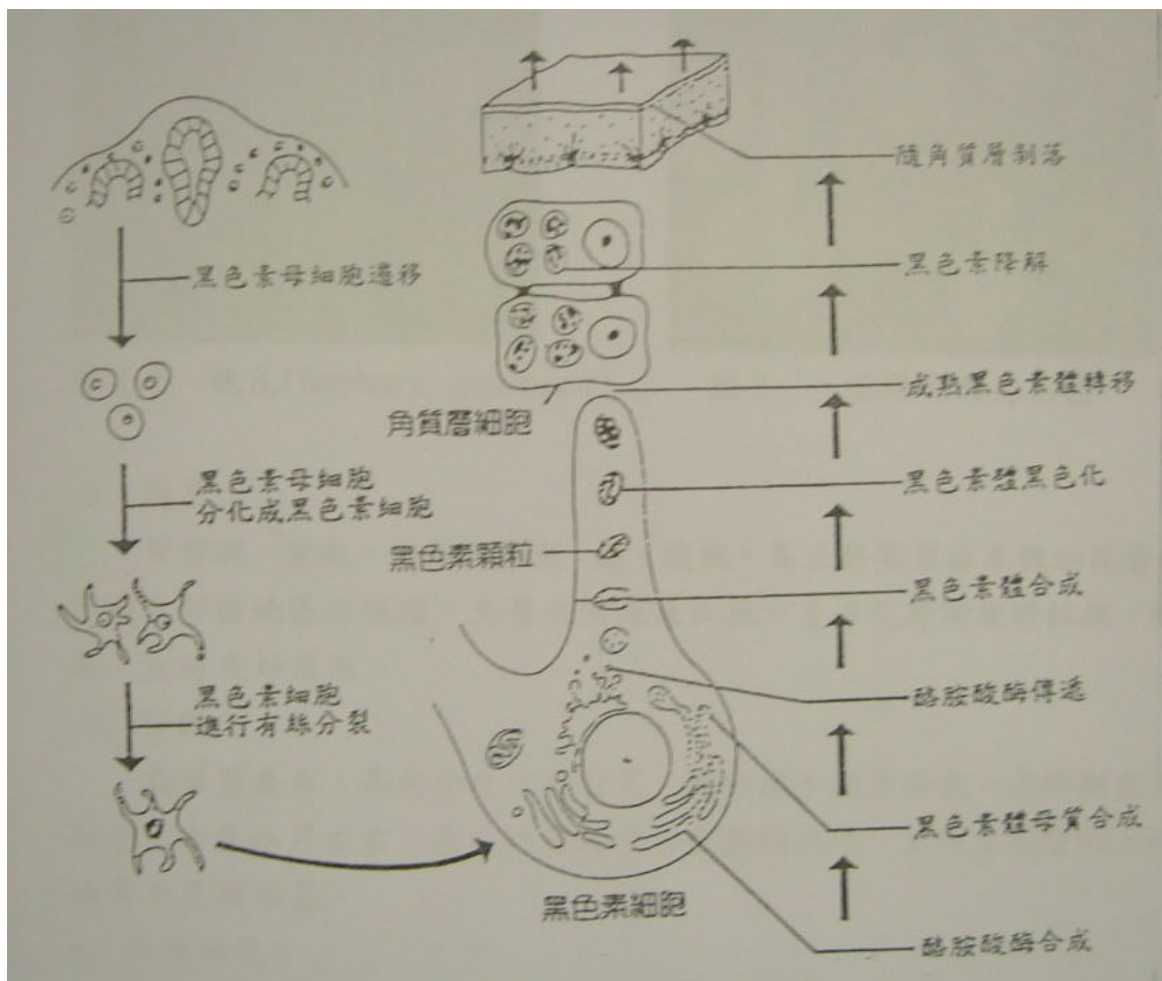


圖 2-5、黑色素細胞中黑色素生成過程

六、實驗植物介紹

A. 植物介紹

槐花(Flos Sophorae)(圖 2-6 , 2-7)



圖 2-6、槐花(Sophora japonica)



圖 2-7、乾燥的槐花花苞

a. 別名：

守宮槐、紫槐、白槐、豆槐、櫟、櫟槐。為豆科落葉喬木槐的花蕾。中國大部份地區有栽培。主要在河北及江蘇。夏季花將開放時採摘，曬乾。生用或炒炭用。

b. 特徵：

為落葉喬木，高約十至二十公尺，嫩幹或小枝呈綠色，老幹樹皮呈灰色，六至八月左右，在小枝前端會抽出圓錐花序，並開出花型向上的淡黃白色蝶形花。

c. 性味功能：

味苦，性微寒，歸肝、大腸經。有清熱、涼血、止血的功能。用於出血病症、便血、血痢、痔血、崩漏、咯血、衄血等。現代用於高血壓病、及預防中風。

d. 藥理：(1)降血壓，能降低血管通透性；(2)抗炎；(3)解痙；(4)能縮短凝血時間。

e. 主要化學成分：

花含蘆丁 10%~28%，槐花甲素、乙素、丙素，樺皮醇、槐二醇、葉綠素、及油脂等。且在其他文獻中指出槐花萃取物中含有 triterpenes, phospholipids, alkaloids, amino acids, polysaccharides, fatty acids 及 flavones(62)，除此之外，槐花萃取物的成分亦被提出包括一些新的 coumaronochromone 衍生物，像是 sophorophenolone 及其它十三種成分：1-maackiain、medicagol、7-o-methylpseudobaptigenin、pseudobaptigenin、7,3'-di-o-methylorobol、genistein、prunetin、daidzein、formononetin、Di-o-methyl daidzein、quercetin、kaempferol 及 isorhamnetin (63)。

B. 槐花的中醫臨床應用

a. 用於血熱出血症。如吐血、衄血、便血、痔血等，尤以下消化道出血之痔血、便血為擅長。槐花性寒涼而苦降，善清泄大腸之火熱而涼血止血。

b. 用於肝火上炎之頭痛目赤等。現代臨床亦常用於高血壓屬肝火偏旺者，有清肝明目降壓之功。

《日華子本草》：“治五痔，心痛，眼赤，殺腹臟蟲及熱，治皮膚風並腸風瀉血、赤白痢。”

c. 《本草備要》：“入肝，大腸血份而涼血，治風熱目赤、赤白泄痢、五痔腸風、吐崩諸血。”

C. 槐花的現代臨床局部應用 (58)：

槐花通常被用來作為外用洗劑或藥膏的中草藥配方之一，以往文獻中提及其主要臨床用途為用以治療感染性及過敏症狀，有時也用於針對腫瘤的治療與預防，槐花經常被以外用中藥洗劑的配方應用於治療感染及過敏症，有時也被做成乳膏製劑，在婦科方面的應用，可作為子宮頸癌或異生(dysplasia)的預防與治療。(59)

第三章、材料與方法

本研究主要分為槐花萃取、水解與體外抑制酪氨酸酵素活性試驗及細胞培養試驗等部份各實驗所用之儀器設備、材料、試劑與實驗方法分述如下：

一、槐花萃取、水解與體外抑制酪氨酸酵素活性試驗

A. 儀器設備：

- (1) 減壓濃縮機(Rotary Vacuum Evaporator ; EYELA)
- (2) 冷凍乾燥機(Freeze Dryer FDU-128 ; EYELA)
- (3) 超音波震盪器(BRANSON 5210)
- (4) 電子天秤(Electrical Balance , Precisa 125A)
- (5) 純水製造機(Ultrapur Water System , NANO pure #D4741)
- (6) 酸鹼度計(pH meter)
- (7) 恆溫震盪水槽(Low Temp Shatter Bath , BT-350R)
- (8) 紫外線光譜儀(UV-visible Spectrophotometer , Varian CARY 300B)
- (9) 試管震盪器(Vortex Mixer Model VM-1000)
- (10) Pipet、lite (Magnetic Assist Pipette , RAININ)
- (11) 薄層層析片(Thin-Layer Chromatography , TLC)
- (12) 旋光度儀(Polarimeter)/Perkin-Elmer 241 MC Polarimeter

B. 試藥與溶劑

- (1) 顯色劑：10% H_2SO_4 solution
- (2) Diaion HP-20
- (3) Na_2HPO_4 (Disodium Hydrogenphosphate anhydrate , Showa Chemicals Inc.)
- (4) KH_2PO_4 (Potassium Dihydrogenphosphate , Fisher Scientific)
- (5) 酒精(Ethanol ; 95%)購自台灣菸酒公賣局
- (6) Tween 20 (Merck)
- (7) $FeCl_2$ (Ferrous chloride ; Merck)
- (8) NH_4SCN (Ammonium thiocyanate ; Merck)

- (9) 亞麻油酸(Linoleic acid , 99% purity ; Merck)
- (10) Hemoglobin from bovin (Merck)
- (11) 酪氨酸酵素(Tyrosinase from mushroom ; sigma)
- (12) 酪氨酸(L-tyrosine ; Sigma Chemical Co.)
- (13) Vitamin C(L-ascorbic acid ; Sigma Chemical Co.)
- (14) BHA(Butylated hydroxyanisole ; Sigma Chemical Co.)
- (15) 熊果素(Arbutin ; Sigma Chemical Co.)

C. 槐花之萃取與成份分離

(1) 樣品前處理與萃取流程：

各以槐花 600 公克分別以 95% alcohol、50% alcohol 及純水進行熱迴流萃取，依序加熱萃取 3 小時後趁熱以濾紙過濾，過濾後之萃取液以減壓真空濃縮機去溶劑及真空冷凍乾燥並紀錄重量。

用 50% alcohol 萃取槐花萃取可得萃取物 133 克，其萃取率為 22.1%

用 95% alcohol 萃取可得萃取物 78 克，其萃取率為 13%

用純水萃取得萃取物 195 克，其萃取率為 32.5%

(2) 樣品之加酸水解：

以不同溶劑萃取出之樣品，各取一半重量之樣品，以 1%的 H_2SO_4 (1000ml) 煮沸 30 分鐘，待其溶解後過濾，再加入稀乙醇(10%)再結晶析出備用。

D. 體外抑制酪氨酸酵素活性試驗試藥配製

(1) Sorensen 氏磷酸緩衝溶液 (pH6.8)：

取 KH_2PO_4 3.4g 和 Na_2PO_4 3.55g 以水定容至 1000ml，以 pH meter 測定其 pH 值

(2) L-tyrosine solution (0.025mg/ml)：

精秤 L-tyrosine(25mg)以純水定容至 100ml，以超音波震盪機震盪 5min，於 4 °C 冷藏。

(3) Tyrosinase：

配製 200 unit/ml 的水溶液，於 4 °C 冷藏。

(4) 槐花萃取物溶液

取槐花萃取物(0.01g) 加 10ml 磷酸緩衝溶液以超音波震盪機震盪至完全溶解，備用，依需求將溶液稀釋成不同濃度之溶液。

E. 體外抑制酪氨酸酵素活性試驗測定方法

參考日本丸善製藥株式會社技術報告的方法，將抑制酪氨酸酵素活性以體外試驗的方式來表現。取含不同濃度之萃取物溶液 2ml，依序加入 2ml 磷酸緩衝溶液及 0.5ml Tyrosine 混合，置於 37 °C 之恆溫震盪槽中震盪 10 min 後，再加 0.5ml 酪氨酸酵素後使其反應 25 分鐘，以 UV-Visible spectrophotometer 檢測其 475nm 下的吸光值(A_t)，當成這個實驗的給藥組。

另外設置一個酪氨酸酵素的空白組 A_0 ，實驗步驟和給藥組完全一樣，但是以等體積的純水取代酪氨酸酵素，並且以等體積的磷酸緩衝溶液取代萃取物溶液，為這個實驗的控制組 A_b 。

另外分別以熊果素(arbutin)、Vit-C 及 BHA 代替萃取物溶液，當成正對照組(positive control groups)。

Tyrosinase activity 之測定流程

	A_t	A_0	A_b
萃取物溶液	2 ml	2 ml	2 ml Buffer
Buffer	2 ml	2 ml	2 ml
Tyrosine	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Tyrosinase	0.5 ml	0.5 ml 純水	0.5 ml

抑制率百分率計算公式：

$$\text{抑制}\% = (A_b - (A_t - A_0)) / A_b \times 100$$

二、細胞培養試驗

A. 細胞株簡介

來源：財團法人食品工業發展研究所

種類：

(1) RPMI7951(CRCC60274) : Human malignant melanoma

Cell No.: 60274

Cell type: Human malignant melanoma

Species: Homo sapiens (human)

Strain/ Ethnicity: Caucasian

Age/Stage: 18 years

Gender: Female

Tissue: Melanoma; malignant; skin; metastatic site: lymph node

Growth property: Adherent

Morphology: Epithelial

Incubation condition: 37 ; 5% CO₂

Culture medium: 90% Minimum essential medium (Eagle) in Earle ' s BSS with nonessential amino acids and 1 mM sodium pyruvate + 10% fetal bovine serum

Subculture procedure: Trypsin-EDTA

Split ratio: 1:2 to 1:4

Medium renewal: Every 2 to 3 days

Freeze medium: 93% culture medium + 7% DMSO

Mycoplasma test: Negative; NOTE: A contaminant identified as Mycoplasma fermentans was eliminated in 1975.

Tumorigenic: Yes, in nude mice; forms pigmented melanoma

Depositor: Obtained from ATCC; ATCC number: HTB-66

Reference: J. Natl. Cancer Inst. 59: 301-307, 1977

Biosafety level: 1

(2) WS1(CRCC60300) : Human skin normal fibroblast

Cell No.: 60300

Cell type: Human normal skin fibroblast

Species: Homo sapiens (human)

Strain/ Ethnicity: Black

Age/Stage: 12 week gestation

Gender: Female

Tissue: Skin; normal; fibroblast

Growth property: Adherent

Morphology: Fibroblast

Incubation condition: 37 ; 5% CO₂

Culture medium: 90% Minimum essential medium (Eagle) with 2mM L-glutamine and Earle ' s BSS adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino acids, and 1.0 mM sodium pyruvate + 10% fetal bovine serum

Subculture procedure: Trypsin-EDTA

Split ratio: 1:2 to 1:4

Medium renewal: Every 2 to 3 days

Freeze medium: 93% culture medium + 7% DMSO

Mycoplasma test: Negative

Cytogenetics: Diploid; modal number=46

Depositor: Obtained from ATCC; ATCC number: CRL-1502

Description: Isolated from the midscapular skin of a 12-week-old black female embryo; the line has a doubling potential of 67

Reference: In Vitro (Rockville) 14: 787-794, 1978

Biosafety level: 1

B. 材料與設備

- (1) minimum essential medium (HyClone ; 岑祥)
- (2) NaHCO₃ ; HCl ; Trypsin ; DMSO ; trypan blue ; PBS ; Triton-X100 ; MBTH ; L-Dopa ; N,N-dimethylformamide(Sigma ; 友和)
- (3) CO₂ incubator (Model 3110 ; 尚偉)
- (4) Milli-Q (Milli-RX™ water purification system ; MILLIPORE)
- (5) 濾膜 (Millex-GP ; 伯森)
- (6) Larminar flow (JW-4N ; Lian Shen)
- (7) Culture dish (10 cm & 12-well, 96-well ; Bio-Rad)
- (8) Hemacytometer (Bright-Line ; 友和)
- (9) ELISA (enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) reader (TD-30 ; 尚偉)

C. 細胞培養基之配製

將 Minimum essential medium(MEM)(10g)先溶於 Milli-Q 去離子水中(900ml)，加入的碳酸氫鈉(3.7g)，再以 HCl 調整 pH=7-8，最後以去離子水定容至 1000ml。配製後以 0.45 μm 孔徑之濾膜進行粗過濾，再以 0.22 μm 孔徑之濾膜於無菌操作台(Larminar flow)中進行過濾，儲存於 4 °C 備用。

D. 細胞生長的測定(Cell proliferation assay)

細胞先以 Trypsin 處理適當時間後，以培養基稀釋細胞的濃度為 2×10^4 細胞/孔，植入 12 孔的培養盤中，於 37 °C、5% CO₂ 條件下讓細胞貼附 24 小時，分別以含有 DMSO (dimethyl sulfoxide) 及不同濃度槐花草取物的培養基(濃度為 0.1mg/ml ; 0.01mg/ml ; 0.001mg/ml)處理細胞 12hr , 24hr 及 48hr。

E. 細胞存活率分析

以 Trypsin 處理細胞後，稀釋細胞濃度，加入 0.04% trypan blue，混合均勻，取 10 μl 體積，置入血球記數器(hemocytometer)之凹槽中，

蓋上蓋玻片，於顯微鏡下計數觀察，死細胞被染為藍色，活細胞則不被染色。

F. 酪氨酸酵素分析(Tyrosinase assay)

於 96 孔培養盤植入細胞(密度為 3×10^4 細胞/孔)，於 37 °C，5% CO₂ 培養 24 hr，加入槐花試劑處理 24 hr 後，每孔洞先以 200 μl PBS (phosphate buffer saline)清洗，再分別每孔加入 20 μl 0.5% (V/V) Triton-X-100/50mM sodium phosphate buffer solution(pH6.9)，置入 -80 °C，30 分鐘後，取出於室溫(25 °C)放置 25 分鐘，最後再於 37 °C 放置 5 分鐘。每孔加入 190 μl 受質溶液(含 6.3mM MBTH，3-methyl-benzothiazolinone hydrazone)，1.1mM L-dopa in 48mM sodium phosphate buffer solution，pH7.1)含有 4%(V/V) N,N-dimethyl formamide，於 37 °C 反應 60 分鐘後，以免疫酵素分析儀 (ELISA ; enzyme-linked-immuno-sorbent-assay)測定 OD_{508nm} 吸光值。

第四章、結果

一、 槐花的萃取與體外抑制酪氨酸酵素活性試驗結果

近年來，在針對美白保養品成分的開發潮流中，各國的學者均不斷地想從各種中草藥、植物或天然物中萃取其有效成分，而這些萃取物的美白功效多可以體外試驗方式來測定其抗自由基、抗氧化及對酪氨酸酵素之抑制作用，來初步檢定其所具有的美白功效。

本實驗中針對槐花萃取物，先以純水、50%酒精及 95%酒精作為萃取的溶劑來進行萃取，萃取後分別濃縮至乾，並針對這些萃取產物再分為未加酸水解及加酸水解等不同的 6 組試驗樣品，而加酸水解的作用是将萃取成分中的 rutin 水解為 quercetin。

而此六組試驗樣品再分別與市面上常用的抗自由基、抗氧化與美白的產品(Vit-C、BHA、熊果素)來進行酪氨酸酵素抑制活性測驗，期能比較槐花萃取物與 Vit-C、BHA 及熊果素之美白效果的差異，並了解不同萃取方式及有無水解的不同槐花萃取物間的差異。

萃取的結果顯示：以純水萃取可得到最高的萃取率(以 50% alcohol 萃取萃取率為 22.1%；以 95% alcohol 萃取萃取率為 13%；以純水萃取萃取率為 32.5%)。

各實驗組與 Vit-C、BHA 及熊果素之體外抑制 mushroom tyrosinase 試驗如表 4-1 所示；其結果顯示(圖 4-1, 4-2):各組試劑的測試濃度越高，其對酪氨酸酵素的抑制率也跟著越高($p < 0.001$)(表 4-2)。另外，在這九個實驗的結果顯示出：以純水萃取並加酸水解的槐花萃取產物，不但具有最佳的抑制酪氨酸酵素活性，且其抑制率與其它各組比較，皆有明顯的統計學上的差異($p < 0.0001$) (表 4-3)。加上以此種方式萃取亦有最高的萃取率，由此可知此種萃取方式不僅有很好的經濟性，而且其對酪氨酸酵素活性的抑制率甚至比市面上常用的美白成分還高，由此推得槐花以 100%純水萃取的水解產物有很好的經濟性跟美白效果。

表 4-1、各實驗組與 Vit-C、BHA 及熊果素之體外抑制 mushroom tyrosinase 試驗結果

藥劑種類	濃度(mg/mL)	平均數	標準誤	95% 信賴區間	
				下限	上限
VIT-C	1	9.80	0.11	9.57	10.03
	2	18.70	0.16	18.37	19.03
	3	30.10	0.14	29.80	30.40
	4	42.00	0.15	41.69	42.31
	5	54.10	0.12	53.85	54.35
	6	62.30	0.09	62.11	62.49
	8	85.30	0.12	85.05	85.55
	BHA	1	12.10	0.11	11.87
2		22.20	0.16	21.87	22.53
3		31.90	0.14	31.60	32.20
4		43.20	0.15	42.89	43.51
5		56.80	0.12	56.55	57.05
6		70.00	0.09	69.81	70.19
8		98.10	0.12	97.85	98.35
熊果素		1	5.10	0.11	4.87
	2	14.40	0.16	14.07	14.73
	3	23.00	0.14	22.70	23.30
	4	34.30	0.15	33.99	34.61
	5	48.10	0.12	47.85	48.35
	6	55.10	0.09	54.91	55.29
	8	73.40	0.12	73.15	73.65
	槐花(水, 未水解)	1	6.80	0.11	6.57
2		12.20	0.16	11.87	12.53
3		19.50	0.14	19.20	19.80
4		23.60	0.15	23.29	23.91
5		29.60	0.12	29.35	29.85
6		35.00	0.09	34.81	35.19
8		48.00	0.12	47.75	48.25

表 4-1(續)

槐花(50%乙醇, 未水解)	1	7.20	0.11	6.97	7.43
	2	15.00	0.16	14.67	15.33
	3	28.40	0.14	28.10	28.70
	4	38.50	0.15	38.19	38.81
	5	49.00	0.12	48.75	49.25
	6	58.70	0.09	58.51	58.89
	8	79.40	0.12	79.15	79.65
槐花(95%乙醇, 未水解)	1	5.13	0.11	4.90	5.37
	2	14.00	0.16	13.67	14.33
	3	21.90	0.14	21.60	22.20
	4	33.30	0.15	32.99	33.61
	5	43.50	0.12	43.25	43.75
	6	53.40	0.09	53.21	53.59
	8	72.60	0.12	72.35	72.85
槐花(水, 水解)	1	22.23	0.11	22.00	22.47
	2	30.10	0.16	29.77	30.43
	3	48.43	0.14	48.14	48.73
	4	64.97	0.15	64.66	65.27
	5	82.20	0.12	81.95	82.45
	6	91.50	0.09	91.31	91.69
	8	125.20	0.12	124.95	125.45
槐花(50%乙醇, 水解)	1	15.23	0.11	15.00	15.47
	2	21.80	0.16	21.47	22.13
	3	36.40	0.14	36.10	36.70
	4	54.40	0.15	54.09	54.71
	5	60.23	0.12	59.98	60.49
	6	76.30	0.09	76.11	76.49
	8	100.37	0.12	100.11	100.62
槐花(95%乙醇, 水解)	1	14.10	0.11	13.87	14.33
	2	20.90	0.16	20.57	21.23
	3	31.10	0.14	30.80	31.40
	4	50.00	0.15	49.69	50.31
	5	58.37	0.12	58.11	58.62
	6	68.43	0.09	68.25	68.62
	8	90.27	0.12	90.01	90.52

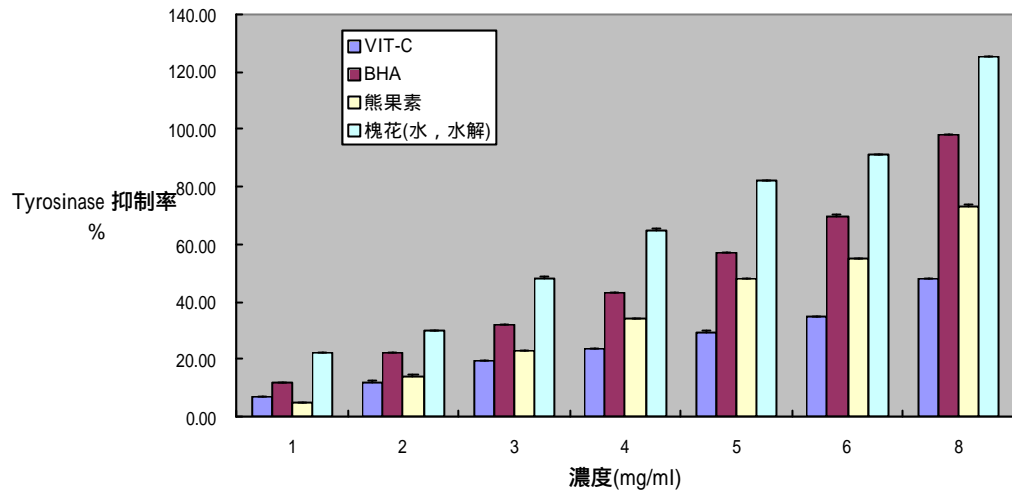


圖 4-1、各種槐花萃取樣品之體外抑制酪氨酸酵素活性試驗結果

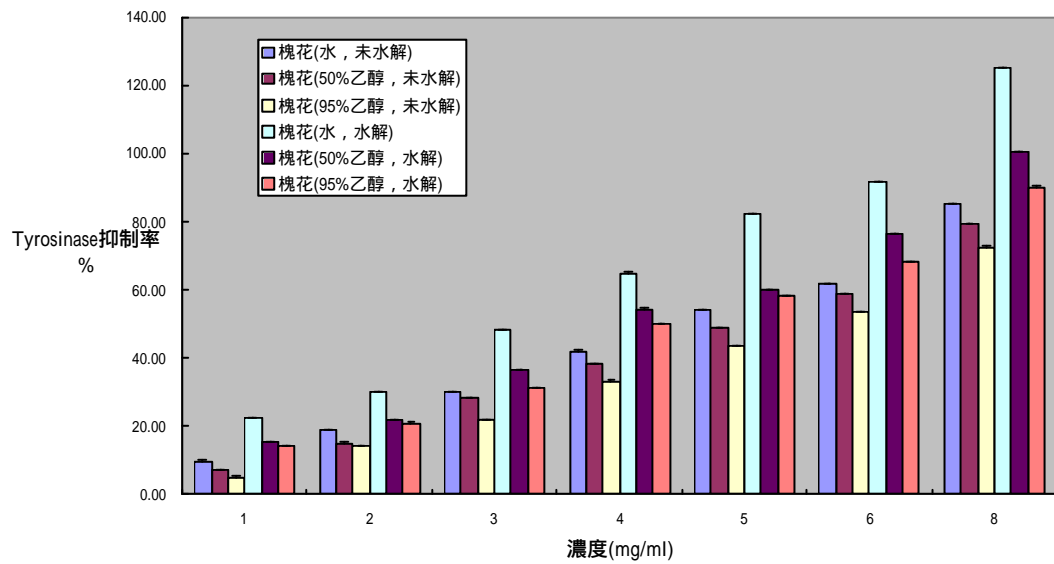


圖 4-2、槐花萃取物與市售常用美白成分體外抑制酪氨酸酵素活性試驗結果

表 4-2、各組試劑的測試濃度越高，其對 tyrosinase 的抑制率也跟著越高 ($p < 0.001$)

濃度 : one way ANOVA

受試者內效應項的檢定										
測量 MEASURE_1	型 III 平方和	自由度	平均平方和	F 檢定	顯著性	淨相關 Eta 平方	Noncent. 參數	觀察的檢定能力		
來源	111960.34	6.00	18660.06	429306.23	0.0000	1.00	2575837.35	1.00		
假設為球形										
Greenhouse-Geisser	111960.34	4.84	23114.78	429306.23	<0.001	1.00	2079417.58	1.00		
Huynh-Feldt 值	111960.34	6.00	18660.06	429306.23	0.0000	1.00	2575837.35	1.00		
下限	111960.34	1.00	111960.34	429306.23	0.0000	1.00	429306.23	1.00		
總度 * 變異種類										
假設為球形	5663.38	48.00	117.99	2714.49	0.0000	1.00	130295.64	1.00		
Greenhouse-Geisser	5663.38	38.75	146.15	2714.49	<0.001	1.00	105184.84	1.00		
Huynh-Feldt 值	5663.38	48.00	117.99	2714.49	0.0000	1.00	130295.64	1.00		
下限	5663.38	8.00	707.92	2714.49	0.0000	1.00	21715.94	1.00		
總度 (濃度)										
假設為球形	4.69	108.00	0.04							
Greenhouse-Geisser	4.69	87.19	0.05							
Huynh-Feldt 值	4.69	108.00	0.04							
下限	4.69	18.00	0.26							

a. 使用 alpha = .05 計算

受試者間效應項的檢定

測量 MEASURE_1

轉換的變數: 均數

來源	型 III 平方和	自由度	平均平方和	F 檢定	顯著性	淨相關 Eta 平方	Noncent. 參數	觀察的檢定能力	
變異	51343.36148	1.00	51343.36	4114310.55	0.00000	1.00000	4114310.55	1.00	
變異	3362.503689	8.00	420.31	33681.04	<.001	0.99999	369448.36	1.00	
總變異	0.22462385	18.00	0.01						

a. 使用 alpha = .05 計算

但因美白保養品是要使用在人體的皮膚上的，單獨根據體外的抑制酪氨酸酵素活性試驗結果，僅能作為初步的美白功效的篩檢。因此，我們以抑制率最高的一組試驗樣品(以 100%純水萃取的槐花水解產物)進行下一步的細胞培養實驗，期能瞭解其對正常人體纖維母細胞(WS1)的細胞培養之影響，以推測其在臨床使用上的安全性；並偵測對黑色素癌細胞(RPMI7951)的生長抑制情形與黑色素形成的抑制作用，以推測其在臨床真正使用時的功效，並預測其美白的可能機轉。

表 4-3、以純水萃取並加酸水解的槐花萃取產物，不但具有最佳的抑制酪氨酸酵素活性，且其抑制率與其它各組比較，皆有明顯的統計學上的差異(p<0.0001)

LSD 多重比較

Variable	compared	compared
槐花(水，水解)	VIT-C	<0.0001 **
	BHA	<0.0001 **
	熊果素	<0.0001 **
	槐花(水，未水解)	<0.0001 **
	槐花(50%酒精，未水解)	<0.0001 **
	槐花(95%酒精，未水解)	<0.0001 **
	槐花(50%酒精，水解)	<0.0001 **
	槐花(95%酒精，水解)	<0.0001 **

* P< 0.05 ** P<0.01

註：取有差異之兩兩比較

二、細胞培養實驗結果

本實驗針對與市售常用之抗氧化及美白成分比較下，具有明顯較強的抗酪氨酸酵素能力之槐花純水萃取並經加酸水解後的樣品，進一步偵測其在正常人體纖維母細胞(WS1)及黑色素癌細胞(RPMI7951)之細胞培

養中的影響。

結果如圖 4-3 所示，針對 WS1(正常人體纖維母細胞)的培養實驗中，未加任何槐花萃取物之控制組，其細胞在培養後之細胞數目，將因培養時間的延長而明顯增加細胞數目($p < 0.0001$)；且其細胞經 48 小時得培養後，外形便有明顯成熟分化而形成正常人體纖維母細胞之梭形外觀。

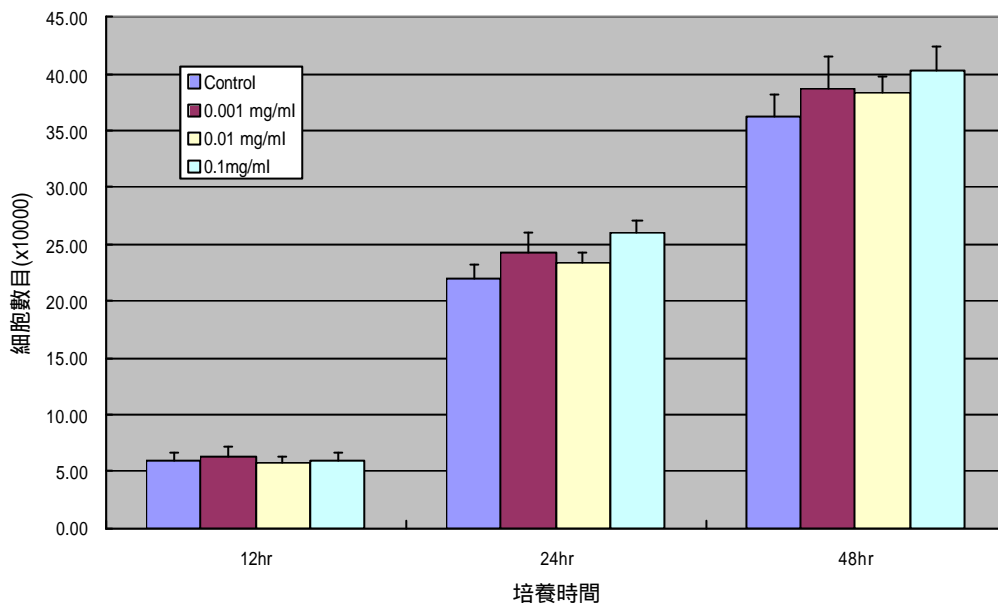


圖 4-3、WS1(正常人體纖維母細胞)的培養實驗結果

另一方面，分別以不同濃度之槐花萃取樣品(0.001mg/mL, 0.01mg/mL, 0.1mg/mL)添加於細胞培養盤之特定孔內時，亦可見到細胞數目同樣可因培養時間延長而增加；而以添加 0.1mg/mL 槐花萃取物之實驗組而言，經 48 小時的培養後，其細胞外形同樣有明顯成熟之梭形外觀。統計中可見各實驗組及控制組的細胞數目在不同的培養時間觀察計數下，皆有明顯的差異($p < 0.0001$)。但在考慮每個實驗組與控制組之間，對於細胞培養時的生長情形的影響，則並無明顯的統計學上的差異。因此可見，在針對人體正常纖維母細胞的培養中添加槐花萃取物，並不會干擾細胞的正常生長！對此，各組間並無明顯的統計學上的差異($p = 0.8361$)。

因此，根據本實驗的結果可推論：槐花萃取物對人體的正常細胞，尤其是位於真皮層內的纖維母細胞的生長與分裂，並無抑制或毒性作用。加上體外的抗酪氨酸酵素的實驗中亦顯示其具有高於其他各組的抑制能力，因此推論此種以純水萃取並加酸水解之槐花萃取物，應為一有效且安全的美白成分。

而針對能產生黑色素之黑色素細胞癌細胞的培養試驗，可見到無添加槐花萃取物之控制組細胞，將因培養時間的延長而呈現生長與細胞數目增加的現象；相對的，在添加槐花萃取物之各個實驗組，則可見到明顯細胞生長抑制的效果($p < 0.001$) (圖 4-10)。而在實驗組之間，若再以添加 0.1mg/mL 槐花萃取物與添加 0.001mg/mL 槐花萃取物兩組間作一比較，則可見到前者具有更明顯的抑制效果($p < 0.001$) (表 4-4)。

由此可推測：槐花萃取物應具有抑制黑色素癌細胞生長的作用，且其抑制效果應與細胞培養時所添加的槐花萃取物濃度有關。而在細胞外形上，無添加槐花萃取物之控制組細胞，將因培養時間的延長而見到呈現圓形，細胞核明顯，細胞質豐富且具有多有絲分裂情形之黑色素癌細胞；以添加 0.1mg/mL 槐花萃取物之實驗組而言，隨著培養時間的延長，細胞逐漸呈現萎縮、細胞核溶解及凋亡的現象。

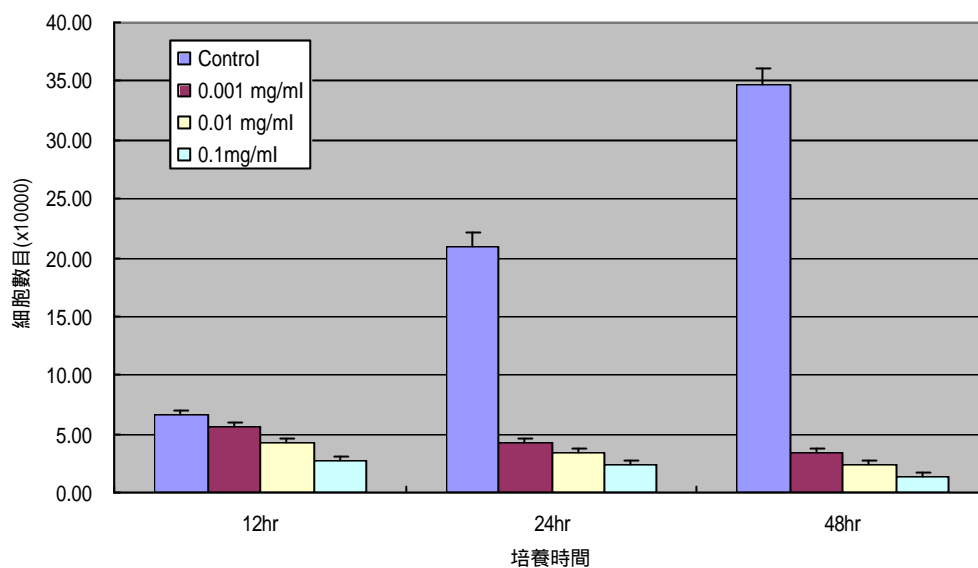


圖 4-10、RPMI7951(人體黑色素癌細胞)的培養實驗結果

表 4-4、槐花萃取物對 RPMI7951 細胞生長有劑量相關性抑制作用

LSD 多重比較

測量: MEASURE_1

Variable	compared	compared
CONTROL	0.001	<0.0001 **
	0.01	<0.0001 **
	0.1	<0.0001 **
0.1	0.001	0.005 **

* P< 0.05 ** P<0.01

註:取有差異之兩兩比較

三、黑色素癌細胞培養之 Tyrosinase assay 實驗結果

雖然此萃取樣品的體外抑制酪氨酸酵素活性的抑制率相當優異，且在黑色素癌細胞的培養試驗中亦顯示其具有劑量相關性(dose-related)之抑制效果，但實際應用於皮膚上時，此萃取物是否能有效穿過細胞膜並實際作用於位在高基氏體內的酪氨酸酵素以發揮其抑制黑色素形成的作用，亦是需要藉由進一步的研究來加以驗證。因此，本實驗的最後一部份乃是利用偵測黑色素癌細胞在培養時添加槐花萃取物後，其細胞內液的酪氨酸酵素抑制情形，以期推測了解槐花萃取物是否能順利穿透黑色素細胞的細胞膜並如體外抑制酪氨酸酵素的實驗結果般，藉由抑制細胞內之酪氨酸酵素以達到美白及抑制黑色素形成的作用。

實驗的原理是利用酪氨酸酵素可將 L-dopa 氧化為 dopaquinone, 而 dopaquinone 可再與 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) 作用，產生粉紅色產物，且此產物可在 508nm 波長光線有吸光反應(61)。本部分的實驗方法設計是參考 Dutkiewicz R 等人針對 latanoprost 對 tyrosinase activity 及黑色素癌細胞培養的 mitotic index 影響的實驗方法(61)。實驗時先於 96 孔培養盤植入細胞(密度為 3×10^4 細胞/孔)，於 37 °C, 5% CO₂ 培養 24 小時，再加入槐花試劑處理 24 小時後，再行測定細胞內液的酪氨酸酵素抑制能力。假定實驗中所希望檢定的槐花萃取物能有效地穿過細胞膜並發揮作用，則細胞內液之酪氨酸酵素將被抑制，此時實驗中所加入的受質 L-dopa 將較難被氧化成 dopaquinone，這時再加入 MBTH，自然將產生較少的粉紅色產物，最後偵測 508nm 波長光線吸光值亦將較低。實驗中亦使用不同濃度之酪氨酸酵素取代槐花萃取物來作為控制組，結果可見：當添加酪氨酸酵素的濃度越高時，其吸光值越高！而另外亦以單純純水及以 DMSO 取代槐花萃取物添加於細胞培養孔之細胞內液作為另一控制組。雖然槐花萃取物的體外抑制酪氨酸酵素活性顯示其具有優異的抑制效果，但在本部分實驗的結果中，各控制組(除了使用不同濃度之酪氨酸酵素取代槐花萃取物之各控制組外)與各實驗組之間，並沒有統計學上明顯的差異。(如表 4-5)

表 4-5、黑色素瘤細胞培養之 Tyrosinase assay 實驗結果與統計分析，顯示實驗組與控制組之間並無明顯的統計學上的差異。

Dependent Variable: x1

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.0009367	0.00023418	1.52	0.2117
Error	49	0.00756183	0.00015432		
Corrected Total	53	0.00849854			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
濃度	4	0.0009367	0.00023418	1.52	0.2117

MANOVA Test Criteria and Exact F Statistics for the Hypothesis of No Overall ml Effect

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilk's Lambda	0.88978059	1.52	4	49	0.2117

濃度 平均數 標準誤 95% 信賴區間

試劑濃度	OD _{508nm} 吸光值	下限	上限
control(DMSO)	0.079 0.002	0.075	0.083
0.1 mg/ml	0.085 0.002	0.079	0.090
0.01 mg/ml	0.090 0.006	0.076	0.103
0.001 mg/ml	0.089 0.002	0.083	0.094
control(water)	0.081 0.004	0.069	0.092

第五章、討論

萃取的結果顯示：以純水萃取可得到最高的萃取率(以 50% alcohol 萃取萃取率為 22.1%；以 95% alcohol 萃取萃取率為 13%；以純水萃取萃取率為 32.5%)。各實驗組與 Vit-Q BHA 及熊果素之體外抑制 mushroom tyrosinase 試驗結果顯示出：以純水萃取並加酸水解的槐花萃取產物，不但具有最佳的抑制酪氨酸酵素活性，且其抑制率與其它各組比較，皆有明顯的統計學上的差異($p < 0.0001$)。加上以此種方式萃取亦有最高的萃取率，由此可知此種萃取方式不僅有很好的經濟性，而且其對酪氨酸酵素活性的抑制率甚至比市面上常用的美白成分還高，由此推得槐花以 100%純水萃取的水解產物有很好的經濟性跟美白效果。

而以槐花純水萃取並經加酸水解後的樣品，進一步偵測其在正常人體纖維母細胞(WS1)及黑色素癌細胞(RPMI 7951)之細胞培養中的影響的實驗結果顯示：未加任何槐花萃取物之控制組，其細胞在培養後之細胞數目，將因培養時間的延長而明顯增加細胞數目($p < 0.0001$)；且其細胞經 48 小時得培養後，外形便有明顯成熟分化而形成正常人體纖維母細胞之梭形外觀。另一方面，分別以不同濃度之槐花萃取樣品(0.001mg/mL, 0.01mg/mL, 0.1mg/mL)添加於細胞培養盤之特定孔內時，亦可見到細胞數目同樣可因培養時間延長而增加；而以添加 0.1mg/mL 槐花萃取物之實驗組而言，經 48 小時得培養後，其細胞外形同樣有明顯成熟之梭形外觀。統計中可見各實驗組及控制組的細胞數目在不同的培養時間觀察計數下，皆有明顯的差異($p < 0.0001$)。但在考慮每個實驗組與控制組之間，對於細胞培養時的生長情形的影響，則並無明顯的統計學上的差異。因此可見，在針對人體正常纖維母細胞的培養中添加槐花萃取物，並不會干擾細胞的正常生長！對此，各組間並無明顯的統計學上的差異($p = 0.8361$)。根據本實驗的結果可推論：槐花萃取物對人體的正常細胞，尤其是位於真皮層內的纖維母細胞的生長與分裂，並無抑制或毒性作用。加上體外的抗酪氨酸酵素的實驗中亦顯示其具有高於其他各組的抑制能力，因此推論此種以純水萃取並加酸水解之槐花萃取物，當為一有效且安全的美白成分。

酪氨酸酵素是皮膚黑色素細胞在製造黑色素的過程中最具有關鍵

性的酵素，而其主要參與了黑色素在形成的前幾個步驟，這包括 p-monophenolic amino acid l-tyrosine(monophenolase activity of tyrosinase) 的 hydroxylation 和此反應產物(o-diphenolic amino acid L-DOPA(di-phenolase activity))的氧化，藉以形成 o-dopaquinone，接著 o-dopaquinone 則是經由一連串非酵素性的反應，最後轉變成黑色素。而許多具有抑制黑色素形成的植物萃取物，不管是在臨床或是組織病理學上的表現，都可見到其在正常皮膚黑色素細胞與黑色素癌細胞間，將有造成相同或類似的影響(60)。針對能產生黑色素之黑色素細胞癌細胞的培養試驗，可見到無添加槐花萃取物之控制組細胞，將因培養時間的延長而呈現生長與細胞數目增加的現象；相對的，在添加槐花萃取物之各個實驗組，則可見到明顯細胞生長抑制的效果 ($p < 0.001$)。而在實驗組之間，若再以添加 0.1mg/mL 槐花萃取物與添加 0.001mg/mL 槐花萃取物兩組間作一比較，則可見到前者具有更明顯的抑制效果 ($p < 0.001$)。由此可推測：槐花萃取物應具有抑制黑色素癌細胞生長的作用，且其抑制效果應與細胞培養時所添加的槐花萃取物濃度有關。而在細胞外形上，無添加槐花萃取物之控制組細胞，將因培養時間的延長而見到呈現圓形，細胞核明顯，細胞質豐富且具有多有絲分裂情形之黑色素癌細胞；以添加 0.1mg/mL 槐花萃取物之實驗組而言，隨著培養時間的延長，細胞逐漸呈現萎縮、細胞核溶解及離亡的現象。因此，由槐花萃取物在黑色素癌細胞培養試驗中的抑制作用，可推測其應亦有抑制正常人體黑色素細胞生長的效果。此結果對於應用到美白保養品的使用中，應是具有正面的意義。但對於正常皮膚會因紫外線照射導致黑色素細胞的增生現象，則應透過實驗方法的修改，於黑色素癌細胞培養時，先以紫外線照射處理後再添加槐花萃取物進行培養，藉由觀察細胞的生長情況以評估槐花對於黑色素細胞因紫外線照射所引起的細胞增生現象之抑制效力。

雖然此萃取產品的體外抑制酪氨酸酵素活性的抑制率相當優異，且在黑色素癌細胞的培養試驗中亦顯示其具有劑量相關性(dose-related)之抑制效果，但實際應用於皮膚上時，此萃取物是否能有效穿過細胞膜並實際作用於位在高基氏體內的酪氨酸酵素以發揮其抑制黑色素形成

的作用，亦是需要藉由進一步的研究來加以驗證。因此，本實驗的最後一部份乃是利用偵測黑色素癌細胞在培養時添加槐花萃取物後，其細胞內液的酪氨酸酵素抑制情形，以期推測了解槐花萃取物是否能順利穿透黑色素細胞的細胞膜並如體外抑制酪氨酸酵素的實驗結果般，藉由抑制細胞內之酪氨酸酵素以達到美白及抑制黑色素形成的作用。

實驗的原理是利用酪氨酸酵素可將 L-dopa 氧化為 dopaquinone，而 dopaquinone 可再與 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) 作用，產生粉紅色產物，且此產物可在 508nm 波長光線有弱吸光反應 (61)。

本部分的實驗方法設計是參考 Dutkiewicz R 等人針對 latanoprost 對 tyrosinase activity 及黑色素癌細胞培養的 mitotic index 影響的實驗方法 (61)。實驗時先於 96 孔培養盤植入細胞(密度為 3×10^4 細胞/孔)，於 37 °C，5% CO₂ 培養 24 小時，再加入槐花試劑處理 24 小時後，再行測定細胞內液的酪氨酸酵素抑制能力。假定實驗中所希望檢定的槐花萃取物能有效地穿過細胞膜並發揮作用，則細胞內液之酪氨酸酵素將被抑制，此時實驗中所加入的受質 L-dopa 將較難被氧化成 dopaquinone，這時再加入 MBTH，自然將產生較少的粉紅色產物，最後偵測 508nm 波長光線吸光值亦將較低。實驗中亦使用不同濃度之酪氨酸酵素取代槐花萃取物來作為控制組，結果可見：當添加酪氨酸酵素的濃度越高時，其吸光值越高！而另外亦以單純純水及以 DMSO 取代槐花萃取物添加於細胞培養孔之細胞內液作為另一控制組。雖然槐花萃取物的體外抑制酪氨酸酵素活性顯示其具有優異的抑制效果，但在本部分實驗的結果中，各控制組(除了使用不同濃度之酪氨酸酵素取代槐花萃取物之各控制組外)與各實驗組之間，並沒有統計學上明顯的差異。

針對導致這個實驗結果的可能因素再討論如下：

本實驗方法所參考的文獻中所使用的實驗材料為降眼內壓的藥物 latanoprost，其與本部分實驗中所希望檢定之槐花萃取物應屬不同，在我們的實驗中所使用的是以純水萃取並加酸水解過之槐花萃取物，基本上此樣本為一黃色粉末的混合物，在細胞培養孔中只加入樣品並只延長培養時間一天便採取細胞內液檢定對細胞內液之酪氨酸酵素的抑制

效果，在培養時間上也許過短，導致槐花萃取物尚未順利穿過細胞膜並發揮作用。

且在其他文獻中指出槐花萃取物中含有 triterpenes, phospholipids, alkaloids, amino acids, polysaccharides, fatty acids 及 flavones(62)，除此之外，槐花萃取物的成分亦被提出包括一些新的 coumaronochromone 衍生物，像是 sophorophenolone 及其它十三種成分：1-maackiain、medicagol、7-o-methylpseudobaptigenin、pseudobaptigenin、7,3'-di-o-methylorobol、genistein、prunetin、daidzein、formononetin、Di-o-methyl daidzein、quercetin、kaempferol 及 isorhamnetin (63)。

槐花萃取物的成分很多，各種成分能否有效穿透細胞膜當需進一步以定性的方法檢視在細胞經加入槐花萃取物且培養一段時間後的細胞內液的成分改變，而這將是日後進一步的研究中所需注意的。

且在考慮因影響細胞培養後之酪氨酸酵素抑制效果的機轉，有時並非單獨經由對酪氨酸酵素的直接抑制而來。這些成分可能將藉由其他機轉才能間接抑制酪氨酸酵素的作用，而這些機轉的啟動有時並非單獨在加入槐花萃取物並延長培養時間 24 小時就足夠發揮作用。因此，在加入樣品後的細胞培養時間的延長，亦當是日後進一步實驗中所需改進的實驗方法之一。

回顧相關文獻，其中除了主要影響黑色素形成的酪氨酸酵素之外，黑色素細胞中仍存有其他影響黑色素形成的酵素系統，像是 TRP-2(DT, DOPAchrome tautomerase)、TRP-1(DHICA oxidase) 及 DHICA polymerase。像是 -TFL(-tocopheryl ferulate)，就被學者提出其在針對人類黑色素癌細胞培養中顯示其具有明顯的黑色素形成抑制效果！但在其研究中亦指出：-TFL 並非藉由直接抑制酪氨酸酵素；而是經由抑制上述其他的酵素系統來發揮作用的。針對 TRP-1 這個分子，更是被提及是扮演著影響黑色素形成的主要角色！在體外的實驗中亦顯示其具有穩定酪氨酸酵素的功能，且此分子亦被提及具有 DHICA oxidase, tyrosine hydroxylase, DOPA oxidase, dihydroxyindole oxidase, DT and catalase 的功能。另外亦可藉由針對位於細胞膜上脂

質的抗氧化作用，亦能經由還原能促進酪氨酸被酪氨酸酵素氧化之超氧化陰離子(O_2^-)，或是藉此活化一些 intrinsic tyrosinase inhibitor(如 thioredoxin reductase) 以達到酪氨酸酵素抑制的效果(64)。

可被表皮層中之角質細胞分泌的 ET-1(endothelin-1)，亦曾被提及其具有促進黑色素細胞活性的功能。這包含了促進黑色素細胞的分裂、移行與黑色素的製造。像是保養品中常被添加使用的人類胎盤萃取物，就曾被提及因其含有 ET-1 及 ACTH 而被推論其是藉由此等成份的作用以達到促進黑色素形成與黑色素細胞增生的效果，並因此而建議大家注意到人類胎盤萃取物可被應用到白斑治療的可行性(65)。

人類的表皮細胞在經過紫外線照射後，有文獻指出其將導致在基因及蛋白質層次的 Endothelin-1(ET-1)的表現提升，而 ET-1 所扮演的角色，主要是在 UVB 照射後所引起的色素沉著。研究中亦顯示：其主要是透過刺激黑色素細胞的增生與分泌黑色素作用，而在表皮層中的 endothelin-converting enzyme-1 alpha (ECE)，又是扮演著能刺激角質細胞分泌 ET 的角色，因此亦有文獻指出 *Sanguisorba officinalis* L. 的萃取物，可藉由抑制 ECE 來減少皮膚因紫外線 B 照射所導致的黑色素沉著的作用(66)。

另外，就以存於槐花萃取物成分中的 Quercetin 為例，有文獻針對許多不同種類的 flavonoids 對於 mushroom tyrosinase 的抑制效果作體外實驗的比較，結果顯示：Quercetin 具有相當不錯的抑制效果 (quercetin > galangin > morin > fisetin > 3,7,4 - trihydroxy-flavone > luteolin > apigenin > chrysin)(67)。但驚訝的是：Nagata 等學者於 2004 年所發表的研究中指出，對於人體黑色素癌細胞及正常人體黑色素細胞在無紫外線照射下進行細胞培養，且在培養基中加入 quercetin 七天的研究結果發現，其不僅在酪氨酸酵素的 transcription 及 translation 的層次皆有刺激黑色素形成的作用，另一方面，quercetin 亦能對細胞中一些黑色素形成的抑制成份，表現出卓越的抑制效果，而這也是 quercetin 能刺激黑色素形成的另一個機轉(68)。根據這兩篇針對槐花萃取物成分之一的 quercetin 所做的研究結論，雖然對於黑色素形成的影響是不同的，但

也令我們注意到黑色素細胞在產生黑色素時，參與在其中的機轉是相當複雜的，進一步地對槐花萃取物中各成份對黑色素細胞的影響與作用機轉的確定，亦是日後研究的方向與重點。

最後，參考文獻的實驗設計中，並未單針對 latanoprost 置於細胞培養盤的孔中偵測其在 508nm 波長光線的吸光值，也因此，本部分實驗中亦未偵測所使用的槐花萃取物的 508nm 波長光線的吸光值，如果黃色粉末之槐花萃取物本身會有對 508nm 波長光線有吸光反應的話亦將導致實驗結果的誤差。為此，本實驗再以紫外線光譜儀針對以純水萃取並加酸水解之槐花萃取物進行測試，結果顯示其在 254 及 370nm 有較強的吸光反應(圖 5-1)，雖可排除此部分導致實驗誤差的疑慮，另一方面亦顯示出其具有不錯的紫外線 A 及 B 的吸收作用，以此可推測其在臨床使用中亦具有防曬與美白的功效。

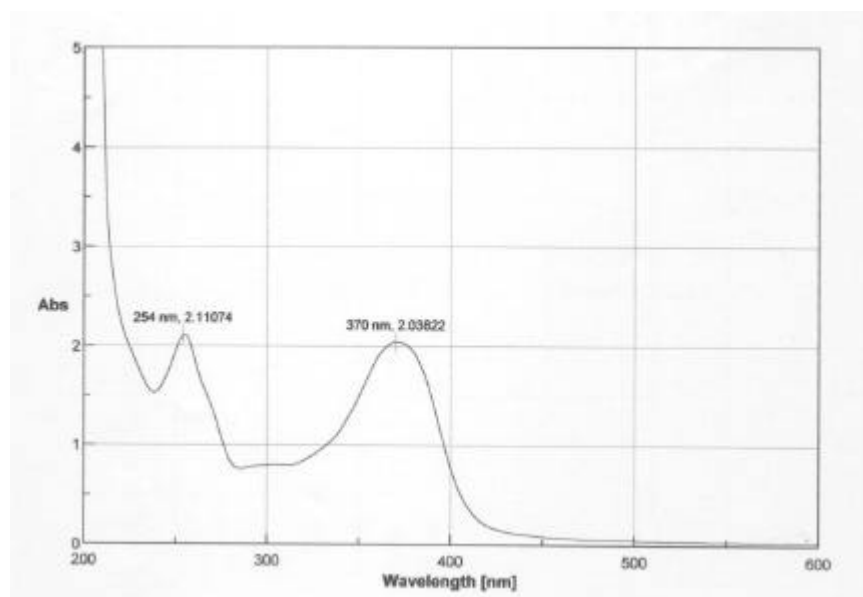


圖 5-1、以純水萃取並加酸水解之槐花萃取物在 254 及 370nm 有較強的吸光反應

美白成分的開發其目的主要是要應用到皮膚的塗抹，而影響皮膚黑色素的形成的因素又很多，尤其存在表皮層中負責產生黑色素的黑色素細胞，其又可藉由 endothelin-1 的作用與位於其周圍的角質細胞互相關聯著，因此，針對體外抑制酪氨酸酵素有效果之槐花萃取物，若能再應用到動物試驗上，針對先以紫外線照射產生動物皮膚的色素沉著後，

再以塗抹這些材料來檢視其與體外試驗的抑制效果是否一致。動物實驗的淡化色素效果，可藉由活體切片的方式，並以 Fontana-Masson 染色的方式來評估皮膚黑色素及黑色素細胞的多少，而此部分的動物實驗及更進一步的人體實驗，應是日後針對中草藥萃取物的美白研究的目標與期望。

第六章、結論

由於近年來生活水準的提升，醫學美容的需求市場日益擴大，尤其是受到色素沉著困擾的患者更是在醫學美容門診中佔了最大的族群，在考量外用去斑藥物對苯二酚於長期塗抹時所造成的許多副作用時，從中草藥及天然物萃取美白的有效成分，藉以取代對苯二酚，亦當是本研究所期盼的目標。

本研究中以具有清肝明目降壓功效的槐花為研究材料，藉由不同萃取方式加以萃取並研究各組樣品在有無加酸水解的情況下，其體外抑制酪氨酸酵素活性的比較。並進一步再與市售常用之美白成分比較體外抑制酪氨酸酵素活性的高低。最後再檢視槐花萃取物在細胞培養實驗中的各種影響。

根據本研究所得到的研究結果，可得到以下幾點結論：

- A. 以純水萃取槐花可得到最佳的萃取率(32.5%)，有此可推知此種方式的萃取式最具有經濟性的。
- B. 以純水萃取的槐花萃取物，經加酸水解後的產物，具有優於其他各實驗組織體外抑制酪氨酸酵素活性的能力，其抑制率亦是高於市售常用的美白成分(熊果素、BHA 及 Vit-C)，由此可推知經由純水萃取並加酸水解之槐花萃取物，具有很高的抑制酪氨酸酵素的能力，應可成為日後美白保養品有效成分之一。
- C. 槐花萃取物並不會影響正常人體纖維母細胞在培養時的細胞生長，而其對正常人體的皮膚是否會產生毒害作用，則需藉由進一步的組織培養或動物試驗來加以評估。
- D. 槐花萃取物在人體黑色素癌細胞培養時的細胞生長影響，具有劑量相關性的抑制效果，由此可推知槐花萃取物應具有抑制正常黑色素細胞增生的現象。
- E. 槐花萃取物在紫外線 A 及 B 的波長範圍內都有吸光反應，由此可推知槐花萃取物同時具有防曬作用。

？合以上結論可知，以純水萃取並加酸水解之槐花萃取物應含有安全且有效的美白中草藥萃取物成分。

參考文獻

- (1) 李林:實用中醫皮膚病學。海峰出版社, 香港, 1994。p.124-126.
- (2) Piamphongsant T.: Treatment of melasma: a review with personal experience. *Int. J. Dermatol.* 1998, 37(12): 897-903
- (3) Kang W.H.; Yoon K.H.; Lee E.S.; Kim J.; Lee K.B.; Yim H.; Sohn S.; Im S.: Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br. J. Dermatol.* 2002, 146(2): 228-37
- (4) Leenutaphong V.; Nettakul A.; Rattanasuwon P.: Topical isotretinoin for melasma in Thai patients: a vehicle-controlled clinical trial. *J. Med. Assoc. Thai.* 1999, 82(9): 868-75
- (5) Lim J.T.: Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. *Dermatol. Surg.* 1999, 25(4): 282-4
- (6) Matsubayashi T.; Sakaeda T.; Kita T.; Kurimoto Y.; Nakamura T.; Nishiguchi K.; Fujita T.; Kamiyama F.; Yamamoto A.; Okumura K.; Lim J.T.: Intradermal concentration of hydroquinone after application of hydroquinone ointments is higher than its cytotoxic concentration. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, 26(9): 1365-7
- (7) Kramer K.E.; Lopez A.; Stefanato C.M.; Phillips T.J.: Exogenous ochronosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000, 42(5 Pt 2): 869-71
- (8) Matsubayashi T.; Sakaeda T.; Kita T.; Kurimoto Y.; Nakamura T.; Nishiguchi K.; Fujita T.; Kamiyama F.; Yamamoto A.; Okumura K.: Intradermal concentration of hydroquinone after application of hydroquinone ointments is higher than its cytotoxic concentration. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, 26(9): 1365-7
- (9) Hachiya A.; Kobayashi A.; Ohuchi A.; Kitahara T.; Takema Y.: The inhibitory effect of an extract of *Sanguisorba officinalis* L. on ultraviolet B-induced pigmentation via the suppression of endothelin-converting enzyme-1 α . *Biol. Pharm. Bull.* 2001,

24(6): 688-92

(10) No J.K.; Soung D.Y.; Kim Y.J.; Shim K.H.; Jun Y.S.; Rhee S.H.; Yokozawa T.; Chung H.Y.: Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* 1999, 65(21): PL241-6

(11) Dong-II Hang: Melanogenesis inhibitor from paper mulberry, *Cosm. Toil.* 1997, 112(3) 59-62,

(12) Baurin N.; Arnoult E.; Scior T.; Do Q.T.; Bernard P. : Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacol.* 2002, 82(2-3): 155-8

(13) Kim S.J.; Son K.H.; Chang H.W.; Kang S.S.; Kim H.P.: Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, 26(9): 1348-50

(14) 方明發：化妝品製造學，人光出版社，台南，1985)

(15) Tortora G.J.; Anagnostakos N.P.: Principles of Anatomy and Physiology, Happer&Row Publisers, New York, 1990

(16) 周燕輝：皮膚病，正中書局，台北，1987,p.1-10

(17) 許元昱、李旺祚、郭文勵：組織學，合記圖書出版社，台北，1992

(18) 徐莉萍、柯哲明：ROSS 組織學，合記出版社，台北，1991

(19) Laurent D.: 黑白之間何者為膚色之決定因素? 現代美容, 1994, 70, 56-58

(20) Golgsmith L.A.: Biochemistry and Physiology of the skin, Oxford University Press, Inc., New York, 1983

(21) Marieb E.N.: Human Anatomy and Physiology, The Benjamin/Cummings Publishing Company, California, 1989

(22) 黃泰卿：中藥對酪氨酸酵素活性的影響，靜宜大學應用化學研究所碩士論文，台中，1995

(23) 葉美嬌：蝦酪氨酸抑制劑之研究，國立台海洋大學水產食品科學研究所碩士論文，台北，1994

(24) Cantarow A.; Schepartz B.: Biochemistry, W. B. Saunders, London, 1963

- (25) Orten J.M.; Neuhau O.W.: Human Biochemistry, London, 1975
- (26) Guyton A.C.: Human Physiology and Mechanisems of Disease, W. B. Saunders, London, 1987
- (27) Duggan M.; Wilmott J.; Znalden A.: Tyrosinase—The Enzyme Behind the Tan, *Cosm. Toil.* 1987, 102, 97-101
- (28) Tur W.: Increasing the effectiveness, *Cosm. Toil.* 1990, 105, 79-85
- (29) Pawelek J.M.; Korner A.M.: The Biosynthesis of Mammalian Melanin. *American Scientist.* 1982, 70, 136-145
- (30) Lerner A.B.; Fitzpatrick T.B.: Biochemistry of Melanin Formation. *Physiol. Rev.* 1950, 30: 91-126
- (31) Fuller B.B.; Lunsford J.B.; Iman D.S.:
-Melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in cloudman S-91 melanoma cell culture. *J. Biol. Chem.* 1987, 262: 4024-4033
- (32) Jimenez M.; Kameyama K.; Maloy W.L.; Tomita Y.; Hearing V.J.: Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1988, 85(11): 3830-4
- (33) Fuller B.B.; Viskochil D.H.: The role of RNA and protein synthesis in mediating the action of MSH on mouse melanoma cells. *Life Sci.* 1979,24(26): 2405-15
- (34) Wong G.; Pawelek J.: Melanocyte-stimulating hormone promotes activation of pre-existing tyrosinase molecules in Cloudman S91 melanoma cells. *Nature* 1975, 19; 255(5510): 644-6
- (35) 劉承煌：皮膚病理學，中國醫藥科技出版社，北京，1991;74-98
- (36) Burchill S.A.; Virden R.; Fuller B.B.; Thody A.J; Ito S.: Regulation of tyrosinase synthesis by alpha-melanocyte-stimulating hormone in hair follicular melanocytes of the mouse. *J. Endocrinol.* 1988, 116(1):17-23

- (37) Burchill S.A.; Thody A.J.; Ito S.: Melanocyte-stimulating hormone and the regulation of tyrosinase activity in hair follicular melanocytes of the mouse. *J. Endocrinol.* 1986, 111(2):225-32
- (38) Weatherhead B.; Logan A.: Interaction of alpha-melanocyte-stimulating hormone, melatonin, cyclic AMP and cyclic GMP in the control of melanogenesis in hair follicle melanocytes in vitro. *J. Endocrinol.* 1981, 90(1):89-96
- (39) Altmeyer P.; Stohr L.; Holzmann H.: Seasonal rhythm of the plasma level of alpha-melanocyte stimulating hormone. *J. Invest. Dermatol.* 1986, 86(4):454-6
- (40) Sanchez-Ferrer A.; Rodriguez-Lopez J.N.; Garcia-Canovas F.; Garcia-Carmona F.: Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995, 1247(1):1-11
- (41) Jara J.R.; Solano F.; Garcia-Borrón J.C.; Aroca P.; Lozano J.A.: Regulation of mammalian melanogenesis. II: The role of metal cations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, 1035(3): 276-85
- (42) Liebler D.C.: The Role of Metabolism in the Antioxidant Function of Vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 1993, 23(2):147-69
- (43) Tripathi R.K.; Chaya Devi C.; Ramaiah A.: pH-dependent interconversion of two forms of tyrosinase in human skin. *Biochem. J.* 1988, 252(2): 481-7
- (44) Romero C.; Aberdam E.; Larnier C.; Ortonne J.P.: Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation. Involvement of the melanogenic enzymes expression. *J. Cell Sci.* 1994, 107 (Pt 4): 1095-103
- (45) Quevedo W.C.; Szabo G.; Virks J.; Sinesi S.J.: Melanocyte populations in UV-irradiated human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1965, 45(4): 295-8
- (46) Iwata M.; Corn T.; Iwata S.; Everett M.A.; Fuller B.B.: The

- relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.* 1990, 95(1): 9-15
- (47) Iozumi K.; Hoganson G.E.; Pennella R.; Everett M.A.; Fuller B.B.: Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1993, 100(6): 806-11
- (48) Pomerantz S.H.; Ances I.G.: Tyrosinase activity in human skin. Influence of race and age in newborns. *J. Clin. Invest.* 1975, 55(5): 1127-31
- (49) Jimbow K.; Quevedo W.C.; Fitzpatrick T.B.; Szabo G.: Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J. Invest. Dermatol.* 1976, 67(1): 72-89
- (50) Quevedo W.C.: The control of color in mammals. *Am. Zool.* 1969, 9(2): 531-40
- (51) 黃效民：黑色素之功能。食品工業月刊，四月號 8-12，1996
- (52) Pawelek J.M.; Korner A.M.: The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* 1982, 70(2): 136-45
- (53) Prota G.:Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* 1980, 75(1): 122-7
- (54) Lowell A.; Golgsmith: *Biochemistry and Physiology of the skin.* Oxford University Press, Inc, 1983
- (55) Sanchez-Ferrer A.; Rodriguez-Lopez J.N.; Garcia-Canovas F.; Garcia-Carmona F.: Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995, 1247(1): 1-11
- (56) Keith C.B.; Lawrence M.: Melanins: Hair dyes for the future. *Cosm. Toil.* 1994, 109: 59-64
- (57) Shirota S.; Miyazaki K.; Aiyama R.; Ichioka M.; Kura T.Y.: Tyrosinase Inhibitors from Cude Drugs, *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17(2): 266-269
- (58) Seattle W.A.: *Manual of Dermatology in Chinese Medicine,*

Eastland Press, 1995

(59) Tan M.Q.; Luo Z.Y.; Wang Q.R.; Jiang D.Z.: [The anti-leukemia effect of *Sophora flavescens* and its mechanism], *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2000, 25(5): 443-5

(60) Baurin N.; Arnoult E.; Scior T.; Do Q.T.; Bernard P. : Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacol.* 2002, 82(2-3): 155-8

(61) Dutkiewicz R.; Albert D.M.; Levin L.A.: Effects of latanoprost on tyrosinase activity and mitotic index of cultured melanoma lines. *Exp. Eye Res.* 2000, 70(5): 563-9

(62) Wang J.H.; Lou F.C.; Wang Y.L.; Tang Y.P.: A flavonol tetraglycoside from *Sophora japonica* seeds. *Phytochemistry* 2003, 63(4): 463-5

(63) Tang Y.P.; Hu J.; Wang J.H.; Lou F.C.: A New Coumaronochromone from *Sophora japonica*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2002, 4(1): 1-5

(64) Funasaka Y.; Komoto M.; Ichihashi M.: Depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on normal human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2000, Suppl 8:170-4

(65) Pal P.; Mallick S.; Mandal S.K.; Das M.; Dutta A.K.; Datta P.K.; Bera R.; Bhadra R.: A human placental extract: in vivo and in vitro assessments of its melanocyte growth and pigment-inducing activities. *Int. J. Dermatol.* 2002, 41(11):760-7

(66) Hachiya A.; Kobayashi A.; Ohuchi A.; Kitahara T.; Takema Y.: The inhibitory effect of an extract of *Sanguisorba officinalis* L. on ultraviolet B-induced pigmentation via the suppression of endothelin-converting enzyme-1 α . *Biol. Pharm. Bull.* 2001, 24(6): 688-92

(67) Xie L.P.; Chen Q.X.; Huang H.; Wang H.Z.; Zhang R.Q.: Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom

tyrosinase. *Biochemistry (Moscow)* 2003, 68(4): 487-91
(68) Nagata H.; Takekoshi S.; Takeyama R.; Homma T.; Yoshiyuki
Osamura R.: Quercetin enhances melanogenesis by increasing the
activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and
in normal human melanocytes [In Process Citation] *Pigment Cell
Res.* 2004, 17(1): 66-73