

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 嘉寶果萃取物預防黑色素生成之研究 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 陳佳瑜
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-038-B
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月
指導教授： 黃惠珮

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系生化學科

中華民國 106年03月31日

目錄

中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
報告內容.....	1
前言.....	1
研究目的.....	2
文獻探討.....	3
研究方法.....	9
結果與討論.....	11
參考文獻.....	13
實驗圖表與說明.....	17
成果自評.....	21

中文摘要

嘉寶果不耐存放，做為普通的食用水果較不常被人們注意，由於嘉寶果富含多酚，目前已有許多研究證實其對於疾病的幫助，市面上也有相關保健食品，而美白方面則無相關研究。因東方社會的審美觀偏好淺色皮膚，美白成了女性保養中重要的一項。有研究證實多酚可抑制黑色素生成，因此本計畫確認其與美白的相關性，以增加嘉寶果經濟價值及保養品選擇。本計畫的方法使用細胞實驗，選擇 B16F1 小鼠黑色素瘤細胞為研究的細胞，先進行黑色素含量的測定，確認細胞是否變白，再進行 MTT 試驗及細胞死亡分析。細胞實驗結果發現其顏色變淡，且在高劑量時有 Sub-G1 的產生。後續將會以西方墨點法進行相關機轉的分析，並進行動物實驗，利用塗抹黑色素形成促進劑於 C57BL/6J 小鼠尾巴及耳朵部位，同時塗抹或服用嘉寶果萃取物，確認在生物體上是否有同樣效果。期望將來能運用在保養品上，增加消費者選擇。

關鍵詞：嘉寶果、多酚、黑色素形成

英文摘要

Increased products containing polyphenol have been proved their anti-melanogenic effects. *Myrciaria cauliflora* has been reported as a functional food rich in polyphenol and anthocyanins possessing anti-oxidative and anti-inflammatory properties. However, there is no research to study the anti-melanogenic effect of *Myrciaria cauliflora* polyphenol extract. In this study, the project aimed to examine the inhibition of melanogenesis by *Myrciaria cauliflora* polyphenol extract. B16F1 cells were treated with 0~1mg/ml *Myrciaria cauliflora* polyphenol extract for 24, 48, and 72 hrs respectively, and the contents of melanin in collected cells and medium were measured. The results indicated that *Myrciaria cauliflora* polyphenol extract promoted melanin release from cell to medium. Following, MTT assay and flow cytometric analysis were further to determine the cytotoxicity of *Myrciaria cauliflora* polyphenol extract on B16F1 cells. The result showed that *Myrciaria cauliflora* polyphenol extract inhibited the cell survival and may induce the cell apoptosis. These data suggested that the anti-melanogenic effect of *Myrciaria cauliflora* polyphenol extract *in vitro*. In the future, our task is to determine the mechanism of *Myrciaria cauliflora* polyphenol extract inhibiting melanogenesis.

Key word : *Myrciaria cauliflora*, polyphenol, melanogenesis

前言

嘉寶果作為食用時，因其獨特的口感並不受大眾歡迎，隨著許多的研究證實他可預防疾病產生，才逐漸被人所知。而本實驗室也進行相關研究，期望發現更多益處，目前已發表一些文章，像是藉由不同路徑減少糖尿病腎病變的產生。關於嘉寶果的組成，有許多研究測量後，發現嘉寶果的多酚含量與一般水果相比偏高，同時本實驗室對嘉寶果的多酚含量進行測量，了解其多酚的種類及所佔的百分比。目前有許多酚相關研究，像是預防癌症[1]、降低心血管疾病有關聯[2, 3]。美白方面，則有研究發現綠茶[4]和荔枝[5]中的多酚可抑制黑色素生成，又嘉寶果富含多酚，因此決定探討嘉寶果多酚對於黑色素生成的影響。期望將來能將嘉寶果多酚應用於美白產品中，增加效果和消費者選擇，並且提高其經濟效益。

研究目的

對於女性而言，美白與生活有很緊密的關聯。像是在印度，膚色反映階級和階層；亞洲女性則因處在偏好淺色皮膚的社會中，淺色皮膚對其婚姻及事業有極大幫助，而致力於皮膚美白[6]。由於以上原因，美白需求增加，市面上也推出許多相關產品。

市售的各式各樣的美白產品，價格差距大。奈米美白產品利用奈米碳球或奈米粒子促進保養物質吸收，或改善美白物質的不穩定性，有研究利用奈米球包覆 salidroside 和 paeonol 測試後發現有較強的抗黑色素能力，且高劑量使用時，可能減少其潛在的毒性[7]。因其對技術要求相對較高，價格也較昂貴。而萃取物質像是甘草、艾草、桑椹、葡萄柚、西印度櫻桃等都有製成的美白產品，價格也差不多。對於美白有幫助的物質則有植物精油、類黃酮素、多酚類物質、維他命。

其中多酚類物質則多存於植物中，有研究證實茶葉中多酚 catechins epigallocatechin (EGC)、epicatechin (EC)、epigallocatechin gallate (EGCG)、epicatechin gallate (ECG)可抑制黑色素生成[4]。

嘉寶果的多酚與花青素含量高，其果皮富含 cyanidin 3-glucoside、delphinidin 3-glucoside[8]。在台灣嘉義縣、彰化縣、南投縣一帶都有人種植嘉寶果，其一年可以開四次花，且百年老樹仍可生產，是個容易種植的作物，可食率達 96% 以上。

原產於巴西之嘉寶果，於國內目前並無人研究，在國外僅有少數文獻發表。然而相較於其他莓果類與葡萄類，嘉寶果水分含量較低，因此其花青素與多酚之成分較高，嘉寶果含糖量較少，相對偏酸，但新鮮果實不易保存。由於嘉寶果的易種植性，產量也相對較多，所以本計畫採用新鮮嘉寶果水萃物，利用其高多酚含量特性，探討其對美白之效用，以發展嘉寶果多樣經濟價值，為此，將進行一連串的實驗深入討論：

1. 嘉寶果的多酚物質是否有抑制黑色素生成的效果？
2. 嘉寶果的多酚物質造成細胞死亡的原因
3. 嘉寶果的多酚物質抑制黑色素生成的相關蛋白為何？
4. 嘉寶果在動物實驗上美白效果如何？

文獻探討

1. 黑色素

1-1 黑色素產生

黑色素細胞(Melanocyte)為一群位於皮膚的特化細胞，胚胎時期存在神經嵴組織，隨著其生長，黑胚細胞(melanoblasts)遷移至上皮的基底層，分化成成熟的黑色素細胞，細胞產生多個分泌顆粒黑色素小體 (Melanosomes) 合成黑色素，後黑色素小體從核周區移至樹突末端轉移至角化細胞，確保黑色素均勻分佈於表皮[9, 10]。黑色素與人皮膚顏色有關，其生成多寡由基因表現決定，所以有人類族群皮膚顏色的差異。有研究調查黑色素的特性發現[11]：

- I. 黑色素並不穩定，以化學物質處理下有多或少的結構性退化，其在物理因子如光、熱作用下，也有改變。
- II. 黑色素隨著水合程度而有不同性質，像是乾黑色素會聚集，並可能表現出與剛收集的濕黑色素不同的物理性質。

1-2 刺激因子

主要為紫外線(ultraviolet)，太陽輻射中的紫外線藉由增加黑色素細胞數量、合成黑色素及傳遞誘導皮膚呈深色[10]。此外，黑色素細胞激素(alpha-melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)、促腎上腺皮質激素 (ACTH) 及藥理中的 cAMP 促進劑 forskolin (FK)、cholera toxin (CT) 、isobutylmethylxanthine (IBMX)也會刺激黑色素生成 [10, 12]。

1-3 黑色素生成路徑相關因子 (附圖一)

I、 **MITF (microphthalmia-associated transcription factor)**是黑色素有關特定轉錄因子。由兩種路徑產生：

- i. 黑色素細胞激素 (α -MSH) 和促腎上腺皮質激素 (ACTH) 與 melanocortin type 1 receptor (MC1-R)結合，活化腺苷酸環化酶 (adenylate cyclase enzyme)，增加細胞內 cyclic AMP (cAMP)和活化 protein kinase A (PKA)，PKA 磷酸化 cAMP 反應元件結合蛋白 (CREB)，CREB 作為 MITF 的啟動子之一，調節 MITF，MITF 促進 PKC- β 的表達後黑色素生成[13-16] (附圖一 a)。
- ii. keratinocyte-produced-SCF 和 c-kit 受體結合誘導 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 磷酸化 MITF，MAPK 包含 ERK1 和 ERK2，促使其活化[17] (附圖一 b)。
- iii. MITF 為酪氨酸酶、TRP-1 及 TRP-2 基因轉錄的主要調節因子。

II、酪氨酸酶 (Tyrosinase) 是位於黑色素體膜上的一種醣蛋白，由兩種路徑產生：

- i. 紫外線刺激角質形成細胞產生 NO，活化鳥苷酸環化酶 (GC)，其產生的 cGMP，活化 protein kinase G (PKG)，PKG 活化的 CREB 刺激 MITF 和 Tyrosinase[18] (附圖一 c)。
- ii. norepinephrine/ α 1 adrenergic 受體刺激 inositol trisphosphate/diacylglycerol (IP3/DAG)，活化 PKC- β ，磷酸化酪氨酸酶 [19] (附圖一 d)。

1-4 蛋白與黑色素種類生成 (附圖二)

I. phenylalanine hydroxylase (PAH)

為 L-tyrosine 形成重要因子，PAH 以 6-tetrahydrobiopterin (6BH4) 為輔因子催化 L-phenylalanine 轉化成 L-tyrosine[19, 20]。

II. 酪氨酸酶 (Tyrosinase)

催化 L-tyrosine 轉化為 L-DOPA 後轉成 DOPA-quinone，並依其後續機制不同生成 eumelanin、pheomelanin 黑色素。

III. Tyrosine hydroxylase isoform I (THI)

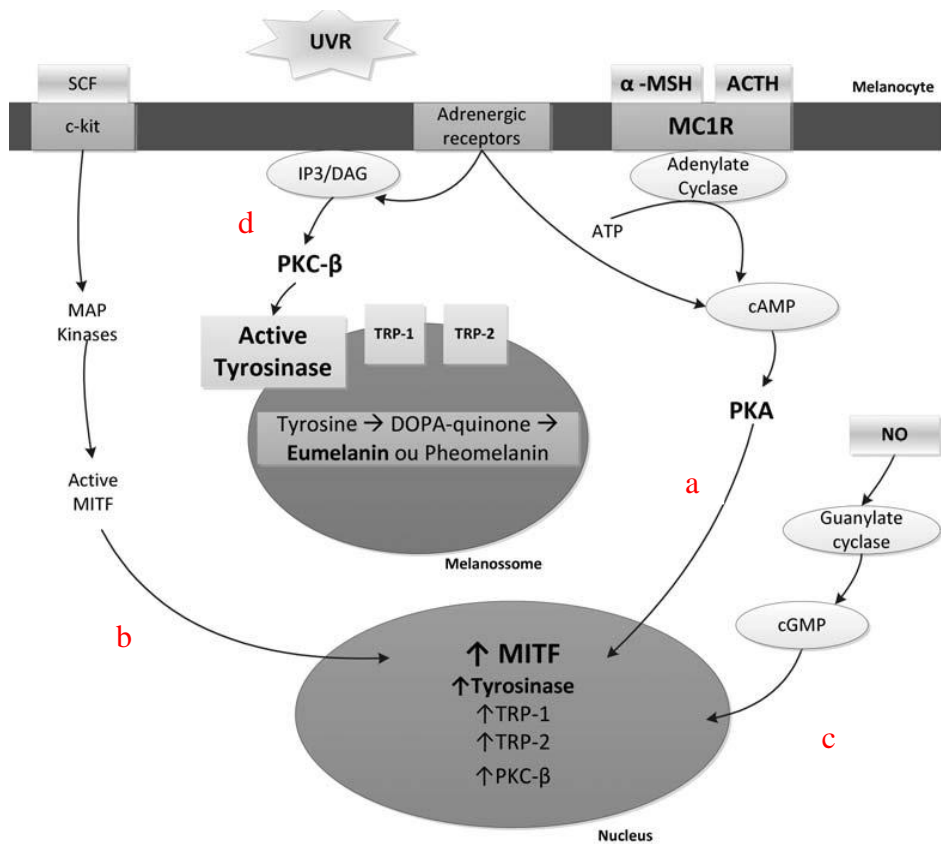
黑色素體上活化 Tyrosinase 因子，調節 L-tyrosine 轉化為 L-DOPA 步驟，附圖二[21]。

IV. tyrosinase-related protein-1 (TRP-1)

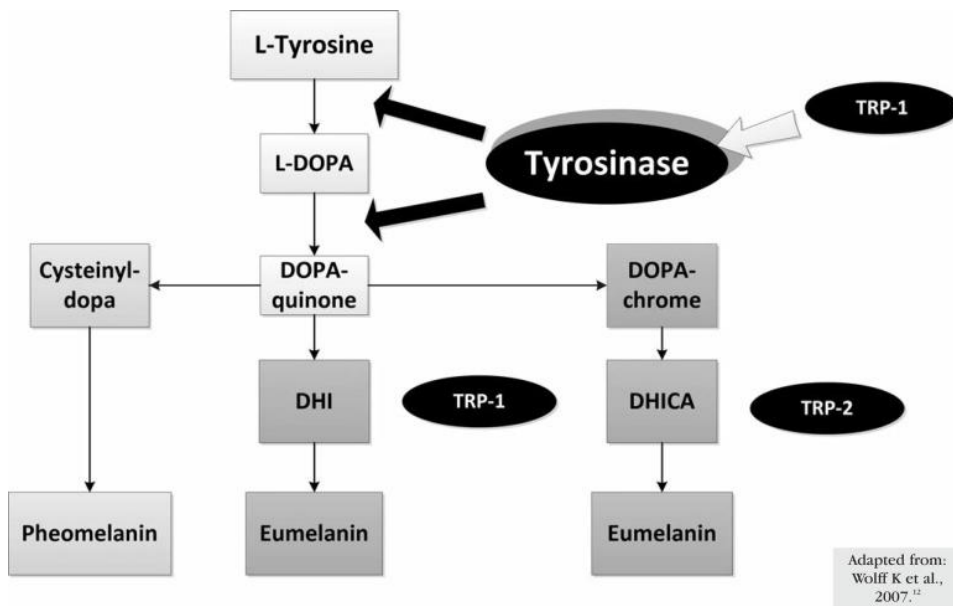
存在於黑色素體膜上，功能為氧化 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) 成 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid，但人體中的 TRP-1 缺乏此活性[10]。

V. tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)

又稱 dopachrome tau-tomerase (DCT)，將 DOPA-chrome 異構化為 DHICA。而 TRP-1、TRP-2 與兩種黑色素形成的比例相關[13, 20]。



附圖一參考自 [21]



附圖二參考自 [21]

2. 嘉寶果

2-1 背景介紹

又名樹葡萄，英文名稱：Jaboticaba，學名：*Myrciana cauliflora*。屬桃金娘科，與蕃石榴同種，多分佈於巴西和南美，果實呈球形，果皮呈暗紅色

接近黑色，內有白色果肉，通常只有單一種子，由於保存不易，除了少量做為食用水果，大部分皆以酒精類、果醬、果汁形式供應於社會。

嘉寶果於民國五十一年引進臺灣，由於其果實酷似葡萄，所以名之為樹葡萄。嘉寶果對病蟲害的抵抗力很強，種植上幾乎不需要農藥，一年可以開四次花，結四次果，但以每年 3-4 月及 8-10 月春秋二季所結的果實最甜美。結果前先開白色的小花，花謝後結成綠色的生果，之後再逐漸轉為黑色的熟果，果實轉黑之後即可以採摘且可生吃，平均甜度為十三至十八度，帶點酸味，目前在嘉義縣、彰化縣、南投縣一帶都有人種植。



圖：樹葡萄

嘉寶果富含多種營養物質及生命活性物質，其中果肉含水分、維他命 C、鈣、磷、鐵、纖維、碳水化合物、維他命 B1、菸鹼酸、脂肪、蛋白質等 15 種以上的營養成份。研究顯示，從去籽嘉寶果中分離出的二縮酚酸類，發現具有抗自由基活性和結腸癌細胞的細胞毒性，且對於白細胞介素 IL-8 產生的抑制表現，表示抗發炎性，因此被利用於治療咳血、咳嗽，支氣管炎，哮喘，腹瀉和痢疾，以及慢性咽喉發炎洗劑[22]。

嘉寶果富含酚類成分，包括間苯二酚 (resorcinol)，對羥基苯甲酸 (p-hydroxybenzoic acid)，花青素 (anthocyanins)，羥基酸 (hydroxycinnamic acids)，類黃酮 (flavonoids)，香豆素 (coumarins) 和鞣花單寧 (ellagitannins)。酚類化合物是公認的強抗氧化劑，其亦有抗炎性質和抗癌效力[23]。

目前關於嘉寶果的文獻有治療哮喘，咽喉發炎，胃腸道和心血管障礙、預防心血管疾病、促血管舒張，嘉寶果果皮可顯著降低血膽固醇 (血脂異常) 和肥胖相關的胰島素抵抗[24]、嘉寶果籽化學預防作用[23]、嘉寶果抗氧化能力對癌細胞的預防功效、降低胃潰瘍發生、嘉寶果成分無致突變性作用、延緩糖尿病病程[25]，美白方面則無相關研究。本實驗室過去利用水草物冷凍乾燥，應用於預防或延緩糖尿病腎病已被 *Journal of Food and Drug*

Analysis 所刊登[26]，同時有關抑制糖尿病腎病引起之發炎已投稿(Title: *Myrciaria cauliflora* extract improves diabetic nephropathy via suppression of oxidative stress and inflammation in STZ/NA mice)；嘉寶果應用於預防肥胖與降血脂研究結果，目前正申請專利中並撰寫論文投稿中。

2-2 植物多酚

酚類化合物為一群含有至少一個苯酚環，且環上的氫基通常被羥基、甲基或乙醯基取代的化合物。而植物中的酚類化合物大部分以多苯酚環的形式存在，因此稱之為多酚。目前已有 8000 種不同結構的植物多酚被發現，常見的分類為類黃酮及非類黃酮化合物兩大類，其中類黃酮包含六個主要的子類：黃酮醇(flavonols)、黃酮(flavones)、黃烷酮(flavanones)、flavan-3-ols、異黃酮(isoflavones)和花青素(anthocyanidins)；非類黃酮化合物則包含酚醛酸(phenolic acids)、木聚糖(lignans)、二苯乙烯(stilbenes)、單寧(tannins)、木質素(lignins)五個主要的子類[27, 28]。

多酚主要存在於植物的根、皮、葉、果實中，為其重要的次級代謝產物之一。多酚除了參與植物形態發育、繁殖及其他生理過程也防止細菌和真菌對其的攻擊[29]，多酚也對人體的健康也有許多益處，由常見的酚類成分討論。

2-2-1 類黃酮(flavonoids)

多存在於食物如水果、蔬菜、植物來源的果汁、茶、咖啡和酒[30]。目前許多研究顯示攝取富含類黃酮的飲食與神類疾病預防有關，像是癌症[1]、第二型糖尿病[31]、神經退行性疾病[32]和骨質疏鬆症[33, 34]。也有研究發現橘子和葡萄柚果汁中的柑橘類黃酮與降低女性患缺血性中風的風險有關，說明此分子可保護心臟[35]，且與降低心血管疾病有關聯[2, 3]。

2-2-2 花青素(anthocyanins)

花青素是一群水溶性色素，廣泛存在於許多食用的植物果實中，其功能為使果實具有各種不同的色澤。

花青素被認為對於許多的疾病有益處的，許多研究指出，飲食中含有豐富的花青素，似乎可以解決目前社會日益嚴重的疾病，如肥胖、動脈粥狀硬化以及癌症等[36]。此外也有許多報告指出花青素具有抗氧化活性[37-41]、抗致突變性[42-44]、抗癌作用[45-47]及降低脂質過氧化作用和DNA損傷[48]。臨床實驗則證實具有紅、藍或紫色色素之蔬菜水果，可以有效的降低人類乳癌發生率[49]，以及減少大腸直腸的息肉[50]。以上相關研

究都顯示食物中的花青素具有延緩慢性疾病功效，降低發炎現象，乃因為有強的抗氧化作用，而抑制慢性疾病病程的氧化物質(ROS)產生。

2-2-3 單寧 (tannins)

在食品和飲料中發現的抗氧化物質多酚的主要群體之一，因為其對人體健康有益，近幾年獲得大量的關注[51]。單寧豐富的植物提取物顯示抗菌效果，而分離的單寧則發現有抗感染性質，例如：綠茶萃取物 epigallocatechin gallate(EGCG)有抗釀膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)和葡萄球菌(staphylococci)活性，其也可抗 C 形肝炎病毒，人類免疫缺陷病毒或 A 型流感病毒[52]。

2-2-4 沒食子酸(gallic acid)

多存在於天然植物中，其製品像是茶、紅葡萄酒就被發現含有大量此物質，而本次計畫使用的嘉寶果也有此成分。沒食子酸已證實具有多種生物性質，包括抗氧化劑，抗發炎，和抗癌特性[23]

研究方法

1. 嘉寶果多酚與水草的萃取

1-1 嘉寶果多酚萃取物

取 100 克嘉寶果冷凍乾燥後的粉末，加入能覆蓋粉末的甲醇(methanol)，約 2500 ml~3000 ml，放置於 50°C 水浴槽加熱 3 小時，後以濾紙過濾收集濾液，此步驟重複 2 次。將收集的濾液以旋轉真空減壓濃縮機去除甲醇，成乾燥狀，再加入 50°C 之 500 ml 二次水溶出。二次水溶出後的溶液加入正己烷 (n-hexane)200 ml 攪拌均勻，進行移除色素作用後進行分餾，收集下層液。下層液加入乙酸乙酯(ethyl acetate)180 ml 混合均勻後進行分餾，收集上層液，重複此步驟 3-4 次，以旋轉真空減壓濃縮機去除乙酸乙酯，後加入 50°C 之 500 ml 二次水溶出，冷凍乾燥成粉。乾燥後的粉末，為嘉寶果多酚萃取物，置於 -20°C 冰箱保存。細胞實驗則以二次水溶解嘉寶果多酚萃取粉末，0.22 μm filter 過濾除菌，後利用 phosphate-buffered saline 配製成各濃度以進行細胞實驗。

1-2 嘉寶果水草萃取物

取 100g 嘉寶果冷凍乾燥粉末加二次水 1000ml 或 2000ml 以玻棒攪拌，放入磁石，在電磁加熱攪拌器上攪拌 1 小時後以真空過濾方法過濾，所得之嘉寶果萃取液經冷凍乾燥去除水分再加以細磨成嘉寶果粉末，此即為嘉寶果水草萃取物，儲存於 -20 °C 備用。

2. 細胞實驗

2-1 小鼠黑色素瘤細胞培養

使用 B16F1 小鼠黑色素瘤細胞以 Dulbecco's modified Eagle's medium - high glucose + 10% Fetal Bovine Serum + 1% penicillin streptomycin + 1% L-glutamine 在 37 °C 和 5% CO₂ 下培養。

2-2 黑色素含量的測定

將 B16F1 細胞密度調整為 10⁵ / mL，以 6cm dish 培養，分成以下各組：無加藥、Forskolin 20 μM (誘導黑色素形成)、Forskolin 20 μM + 0.125 mg/ml 嘉寶果多酚萃取物、Forskolin 20 μM + 0.25 mg/ml 嘉寶果多酚萃取物、Forskolin 20 μM + 0.5 mg/ml 嘉寶果多酚萃取物、Forskolin 20 μM + 1 mg/ml 嘉寶果多酚萃取物。第一盤培養 24 小時後用 LAS-2000 拍照，第二盤培養 48 小時 (24 小時換藥) 後拍照，第三盤收集培養液取 200 μl 使用 plate reader 測吸光值 (405nm)，細胞則拍照後以 ice-cold phosphate-buffered saline 清洗

2 次，加入 phosphate-buffered saline containing 1% Triton X-100 裂解細胞，10000xg 離心 10 分鐘。上清液測蛋白濃度，下層加入 200 μ l 1M NaOH，60 °C 加熱 2 小時後取 200 μ l 使用 plate reader 測吸光值（405nm）。標準曲線配置黑色素溶液(0 – 250 μ g/ml) 取 200 μ l 使用 plate reader 測吸光值（405nm）[53]。

2-3 細胞存活率分析 (MTT 試驗)

以 3×10^4 /mL 細胞在 3 盤 24-well plate 中分別培養 24 小時、48 小時、72 小時後，加入不同劑量的嘉寶果多酚萃取物並判斷對細胞增生影響，找出有效且存活率適當的劑量。

2-4 細胞死亡分析(Flow cytometric 分析)

以 10^6 /mL 細胞在 10 cm dish 中培養 24 小時後加入不含 FBS 的 DMEM 培養 12 至 16 小時，加入 0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 的嘉寶果多酚萃取物，再培養 24 小時。將細胞以 trypsin 打下，使用 PBS wash 一次，再以 1ml 的 70%酒精每次加入 200 λ 將細胞完全打散，放入 -20°C 冰箱，靜置 48 小時以上。細胞進行 4°C 1000xg 10 分鐘離心，使用 PBS wash 一次，加入 PI 染劑，避光靜置 15 分鐘，以流式細胞儀分析細胞週期。

結果與討論

1. 嘉寶果多酚萃取物對黑色素生成的影響

為了先確認嘉寶果多酚萃取物對黑色素形成抑制之效果，實驗設計先觀察經過嘉寶果多酚萃取物處理之 B16F1 黑色淡化情形。由結果圖 1A 發現 B16F1 細胞處理 Forskolin (促進黑色素形成) 黑色素的產生隨處理時間增長而增加，隨著嘉寶果多酚萃取物劑量增加顏色越淺，同時時間越久效果越明顯。

接著進一步分析細胞與培養基黑色素含量，加藥培養 24 小時(圖 B)、48 小時(圖 C)、72 小時(圖 D)後，分別測培養液(medium)黑色素濃度；細胞經離心裂解(pellet)的黑色素濃度；和總黑色素濃度(medium+pellet)。由 pellet 的結果發現 48 和 72 小時的黑色素濃度依嘉寶果多酚萃取物劑量增加而下降，而 24 小時的黑色素濃度卻隨嘉寶果多酚萃取物劑量增加而增加，推測可能是實驗失誤造成。medium 的結果說明黑色素濃度大多隨嘉寶果多酚萃取物劑量增加而增加。medium+pellet 的結果則部分下降，部分上升，並無趨勢。由目前的結果，可知道嘉寶果多酚萃取物可抑制細胞內黑色素含量，其方式可能是釋放的黑色素量增加，由於總黑色素量無下降趨勢，因此需先再一次的實驗確認結果。

2. 確認嘉寶果多酚萃取物有效及半致死劑量及細胞死亡原因

利用 MTT 分析方法發現嘉寶果多酚萃取物確實可抑制 B16F1 黑色素細胞生長，由結果發現不同劑量的存活率在培養 24 小時後皆高於 50%，並無明顯的下降趨勢，48 小時和 72 小時則明顯的下降，辦致死劑量約為 0.25mg/ml (圖二)。

為了釐清嘉寶果多酚萃取物抑制 B16F1 細胞生長機制，接下來利用 Flow cytometry 分析細胞週期。加入不同劑量萃取物於培養液中，經過分析結果，發現在 0.5mg/ml 及 1mg/ml 的濃度下均有 sub-G1 表現，說明 DNA 斷裂，可能是 Apoptosis 所產生(圖三)。

3. 後續會做的實驗

在本研究中，黑色素細胞本身黑色素量下降但釋放的量增加，因此，後續會進行 western blot 觀察其對黑色素相關蛋白的影響以了解釋放黑色素的增加原因。細胞死亡形式則可以半致死劑量加入，分不同時間點收集細胞觀察 cell cycle 後，進一步進行 Apoptosis 分析實驗確認 Sub-G1 的生成是否由 Apoptosis 產生。最後則以動物實驗，藉由塗抹或攝取萃取物方式了解嘉寶

果的美白效果及其安全性。

4. 討論

黑色素生成一般被認為是一種保護機制，有研究發現其可以防止紫外線（UV）引起的 DNA 損傷[54]，然而黑色素的累積不僅使皮膚變深，同時其也與許多疾病有關，像是黑色素細胞增生症及黑色素瘤。而關於抑制黑色素生成部分，則已有許多物質被發現具有此功能，且也藉由了解它們的抑制機制，衡量可做成產品的可行性[55]。嘉寶果的抑制黑色素功能若確認機制，則不僅可製作成產品，同時可能也對相關疾病的治療與預防有益處。

參考文獻

1. Weng, C.J. and G.C. Yen, *Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities*. *Cancer Metastasis Rev*, 2012. **31**(1-2): p. 323-51.
2. Mulvihill, E.E., A.C. Burke, and M.W. Huff, *Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis*. *Annu Rev Nutr*, 2016.
3. Assini, J.M., E.E. Mulvihill, and M.W. Huff, *Citrus flavonoids and lipid metabolism*. *Current Opinion in Lipidology*, 2013. **24**(1): p. 34-40.
4. Kim, Y.C., S.Y. Choi, and E.Y. Park, *Anti-melanogenic effects of black, green, and white tea extracts on immortalized melanocytes*. *J Vet Sci*, 2015. **16**(2): p. 135-43.
5. Hagiwara, K., et al., *Biochemical effects of the flavanol-rich lychee fruit extract on the melanin biosynthesis and reactive oxygen species*. *The Journal of Dermatology*, 2016. **43**(10): p. 1174-1183.
6. Malathi, M. and D.M. Thappa, *Systemic skin whitening/lightening agents: what is the evidence?* *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2013. **79**(6): p. 842-6.
7. Peng, L.H., et al., *Sequential release of salidroside and paeonol from a nanosphere-hydrogel system inhibits ultraviolet B-induced melanogenesis in guinea pig skin*. *Int J Nanomedicine*, 2014. **9**: p. 1897-908.
8. Lima, A.d.J.B., et al., *Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2011. **33**(3): p. 877-887.
9. Jimbow, K., *Current update and trends in melanin pigmentation and melanin biology*. *Keio J Med*, 1995. **44**(1): p. 9-18.
10. Busca, R. and R. Ballotti, *Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation*. *Pigment Cell Res*, 2000. **13**(2): p. 60-9.
11. d'Ischia, M., et al., *Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols*. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2013. **26**(5): p. 616-633.
12. Lehraiki, A., et al., *Inhibition of melanogenesis by the antidiabetic metformin*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(10): p. 2589-97.
13. Park, H.Y., et al., *Cellular mechanisms regulating human melanogenesis*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(9): p. 1493-506.
14. Yamaguchi, Y. and V.J. Hearing, *Physiological factors that regulate skin pigmentation*. *Biofactors*, 2009. **35**(2): p. 193-9.
15. Rouzaud, F., et al., *MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation*. *Mutat Res*, 2005. **571**(1-2): p. 133-52.

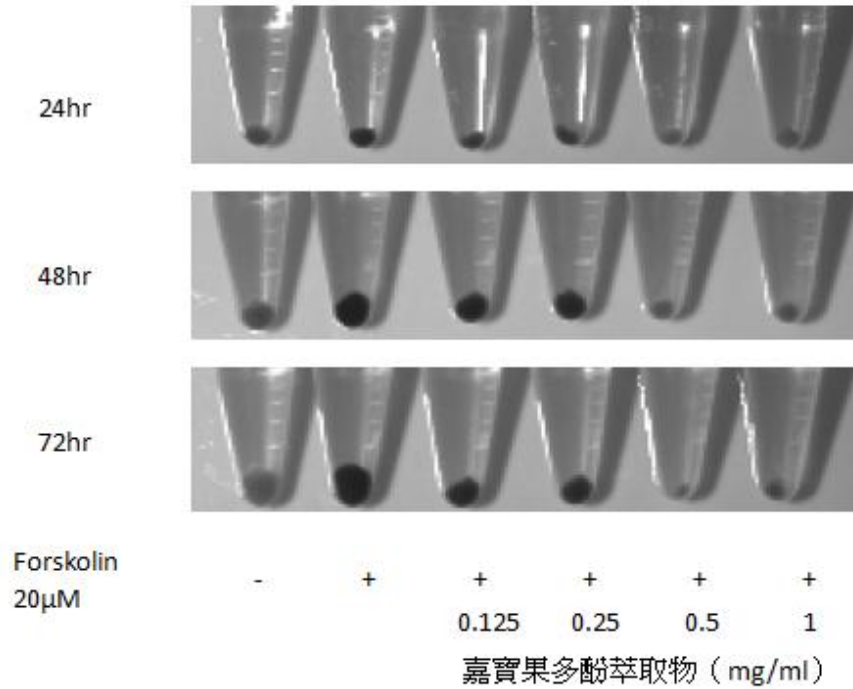
16. Park, H.Y., et al., *MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes*. *Biochem J*, 2006. **395**(3): p. 571-8.
17. Tsatmali, M., J. Ancans, and A.J. Thody, *Melanocyte function and its control by melanocortin peptides*. *J Histochem Cytochem*, 2002. **50**(2): p. 125-33.
18. Moon, K.M., et al., *Anti-melanogenic activity of MHY384 via inhibition of NO-induced cGMP signaling*. *Exp Dermatol*, 2016.
19. Schallreuter, K.U., et al., *Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts*. *Exp Dermatol*, 2008. **17**(5): p. 395-404.
20. Slominski, A., et al., *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1155-228.
21. Videira, I.F., D.F. Moura, and S. Magina, *Mechanisms regulating melanogenesis*. *An Bras Dermatol*, 2013. **88**(1): p. 76-83.
22. Santos, S.C., et al., *Assessment of a Maturity Index in Jaboticaba Fruit by the Evaluation of Phenolic Compounds, Essential Oil Components, Sugar Content and Total Acidity*. *American Journal of Food Technology*, 2011. **6**(11): p. 974-984.
23. Wang, W.H., et al., *Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 185946.
24. Lobo de Andrade, D.M., et al., *Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. **2015**: p. 696135.
25. Alezandro, M.R., D. Granato, and M.I. Genovese, *Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats*. *Food Research International*, 2013. **54**(1): p. 650-659.
26. Wu, C.-C., et al., *Myrciaria cauliflora extracts attenuate diabetic nephropathy involving the Ras signaling pathway in streptozotocin/nicotinamide mice on a high fat diet*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016. **24**(1): p. 136-146.
27. Działo, M., et al., *The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. **17**(2): p. 160.
28. Del Rio, D., et al., *Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(14): p. 1818-92.
29. *Review: plant polyphenols modulate lipid metabolism and related molecular mechanism*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015.
30. Tsao, R., *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols*. *Nutrients*, 2010.

- 2(12): p. 1231-1246.
31. Wedick, N.M., et al., *Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(4): p. 925-33.
 32. Hwang, S.L., P.H. Shih, and G.C. Yen, *Neuroprotective effects of citrus flavonoids*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(4): p. 877-85.
 33. Hardcastle, A.C., et al., *Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(5): p. 941-7.
 34. Hooper, L., et al., *Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(1): p. 38-50.
 35. Cassidy, A., et al., *Dietary flavonoids and risk of stroke in women*. Stroke, 2012. **43**(4): p. 946-51.
 36. Iredale, J.P., et al., *Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors*. J Clin Invest, 1998. **102**(3): p. 538-49.
 37. Mathurin, P., et al., *Survival and prognostic factors in patients with severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone*. Gastroenterology, 1996. **110**(6): p. 1847-53.
 38. Luo, B., et al., *ET-1 and TNF-alpha in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(2): p. G294-303.
 39. Louis, H., et al., *Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice*. Hepatology, 1998. **28**(6): p. 1607-15.
 40. Poynard, T., et al., *Effects of interferon therapy in "non responder" patients with chronic hepatitis C*. J Hepatol, 1999. **31 Suppl 1**: p. 178-83.
 41. Nelson, D.R., et al., *Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders*. Gastroenterology, 2000. **118**(4): p. 655-60.
 42. Liang, X.H., et al., *Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 672-6.
 43. Saeki, K., et al., *Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1263-9.
 44. Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth, and E. White, *Role of autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(12): p. 961-7.
 45. Lum, J.J., et al., *Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis*. Cell, 2005. **120**(2): p. 237-48.

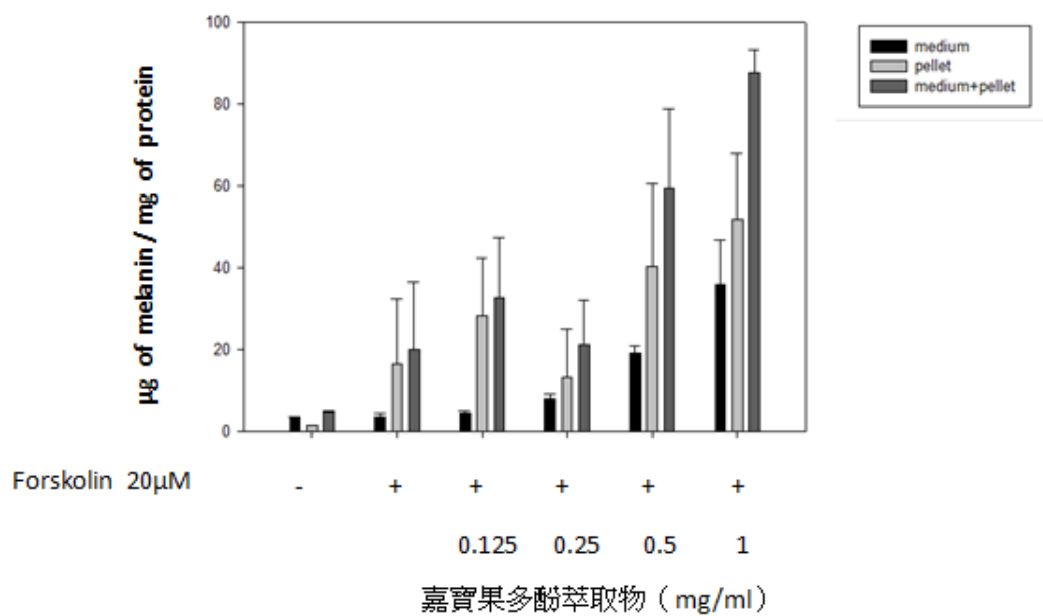
46. Shimizu, S., et al., *Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(12): p. 1221-8.
47. Scarlatti, F., et al., *Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18384-91.
48. Kanzawa, T., et al., *Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3*. Oncogene, 2005. **24**(6): p. 980-91.
49. Sionov, R.V. and Y. Haupt, *The cellular response to p53: the decision between life and death*. Oncogene, 1999. **18**(45): p. 6145-57.
50. Lohrum, M.A., et al., *C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(24): p. 8521-32.
51. Yoshida, T., Y. Amakura, and M. Yoshimura, *Structural Features and Biological Properties of Ellagitannins in Some Plant Families of the Order Myrtales*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. **11**(1): p. 79-106.
52. Pöhlmann, S., et al., *Tannins from Hamamelis virginiana Bark Extract: Characterization and Improvement of the Antiviral Efficacy against Influenza A Virus and Human Papillomavirus*. PLoS ONE, 2014. **9**(1): p. e88062.
53. Bellei, B., et al., *p38 regulates pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7288-99.
54. Kobayashi, N., et al., *Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(5): p. 806-10.
55. Ando, H., M.S. Matsui, and M. Ichihashi, *Quasi-Drugs Developed in Japan for the Prevention or Treatment of Hyperpigmentary Disorders*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. **11**(6): p. 2566-2575.

實驗圖表與說明

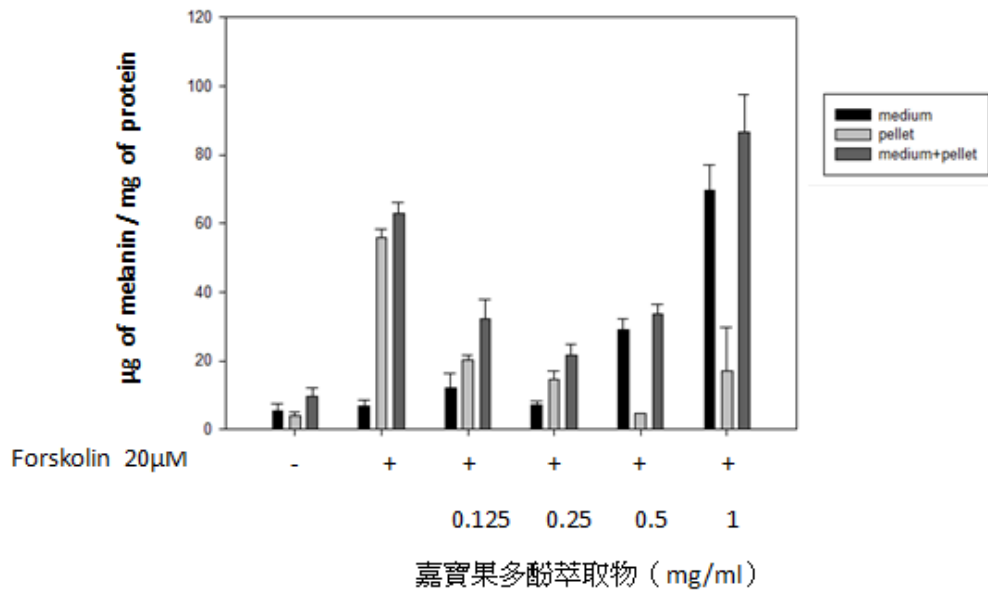
(A)



(B) 24 小時



(C) 48 小時



(D) 72 小時

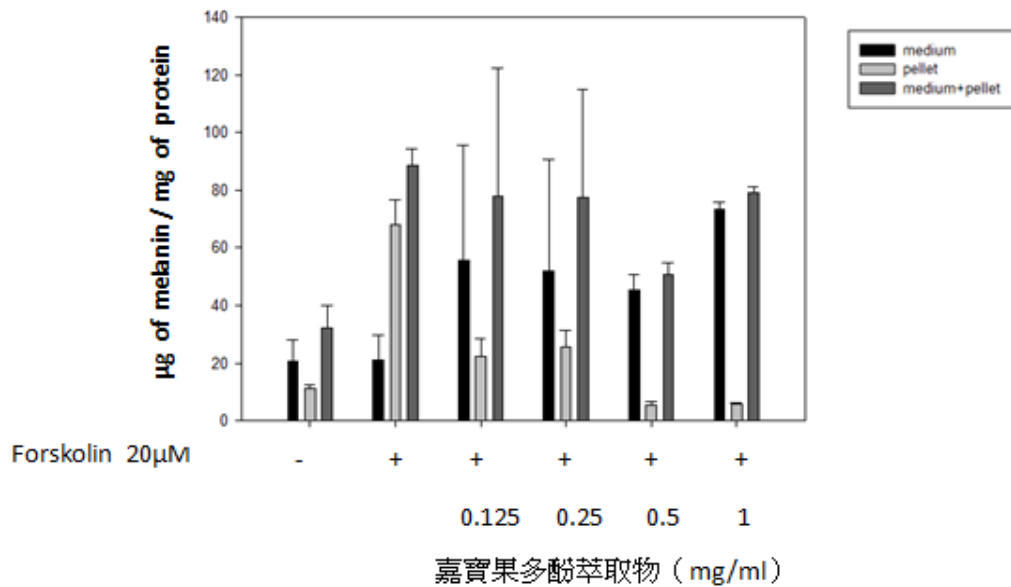


圖 1. 嘉寶果多酚萃取物抑制細胞黑色素形成效果。將 B16F1 細胞以 Forskolin 20µM 刺激黑色素形成後分別加入 0.125 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 嘉寶果多酚萃取物分別處理不同時間後，使用 LAS-4000 拍照(A)。上述處理 24 (B), 48 (C), 72 (D)小時後，收集細胞進行蛋白及黑色素測量，濃度以 µg of melanin/mg of protein 表示。

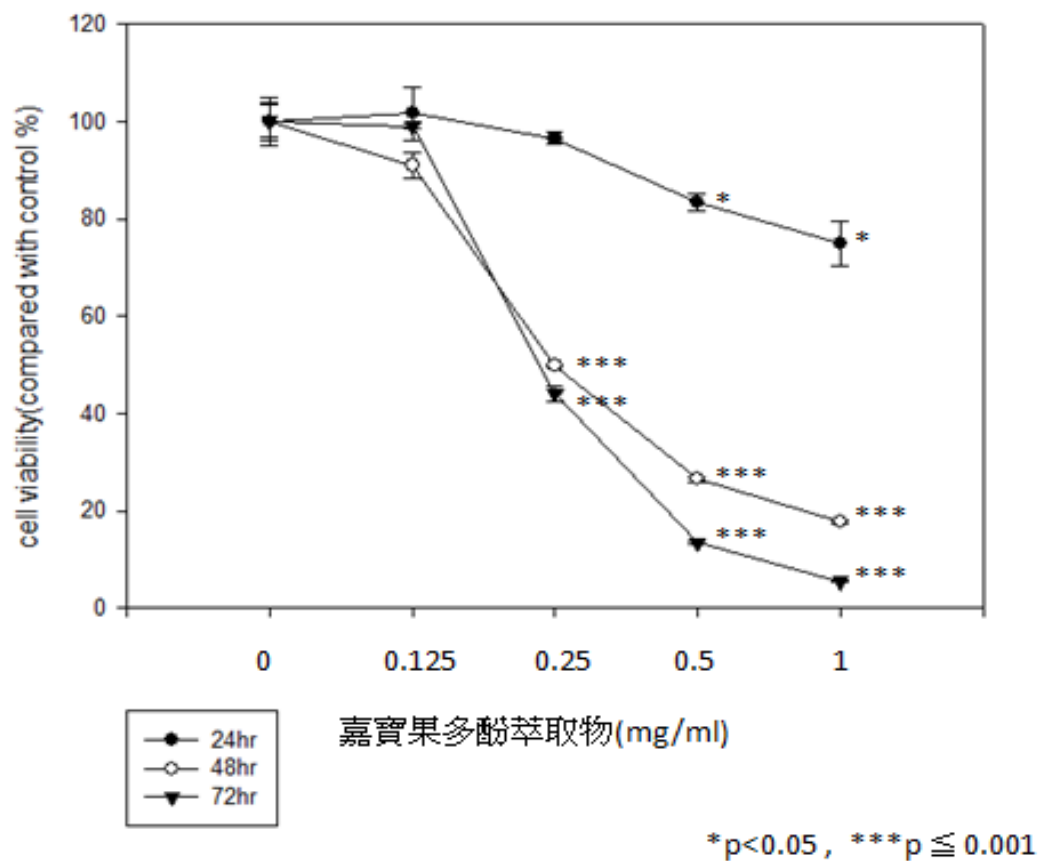
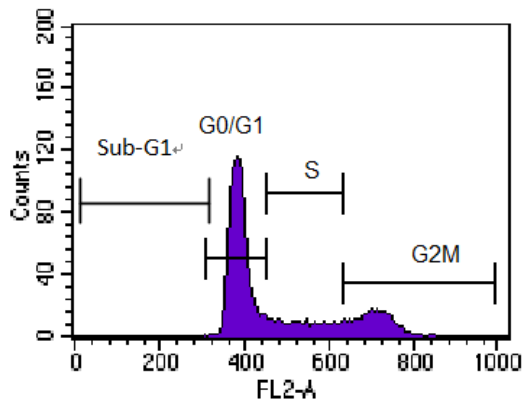
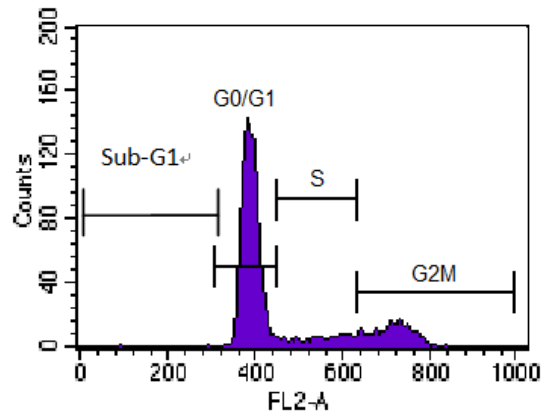


圖 2. 嘉寶果多酚萃取物抑制 B16F1 黑色素細胞生長之效果. 將 B16F1 細胞分別處理 0.125 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 嘉寶果多酚萃取物，利用 MTT 方法於 24 小時、48 小時、72 小時觀察細胞死亡率。細胞存活率以 % 表示，*p<0.05, ***p<0.001。

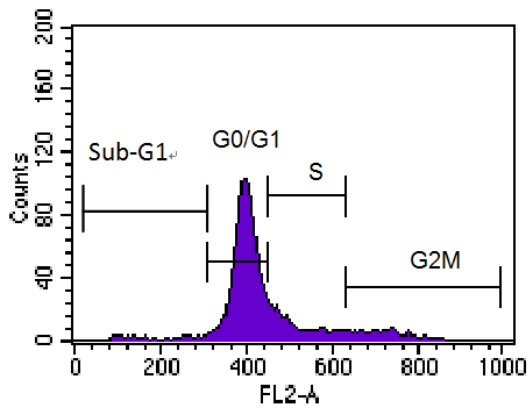
Control



0.25mg/ml



0.5mg/ml



1mg/ml

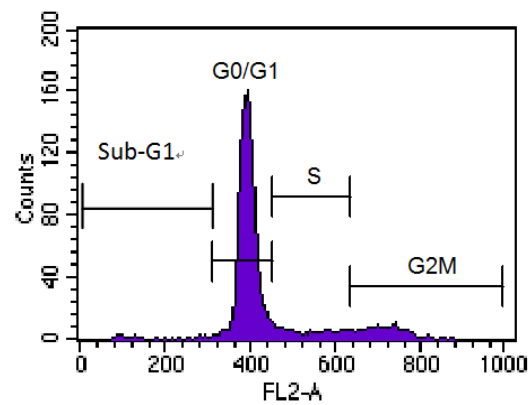


圖 3. 嘉寶果多酚萃取物促進 B16F1 黑色素細胞凋亡之作用。將 10^5 /ml B16F1 細胞至 10cm dish 中，以無 FBS 的 DMEM 培養 12~16 小時，分別依 Control、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 嘉寶果多酚萃取物組加入符合萃取物濃度，以流式細胞儀分析。縱軸為細胞數，橫軸 FL2-A 為 PI 螢光(紅)的量，Sub-G1 代表細胞凋亡。

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）。

嘉寶果不易保存但含高濃度多酚成分，本研究室已證實其許多功效，若能確認其抗黑色素形成之作用，除可增加市面美白用品選擇性，也可提高嘉寶果經濟價值。

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)