

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

探討蓮蓬萃取物在光保護作用及抑制皮膚癌作用機轉之研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 102-2320-B-040-004-
執行期間：102年08月01日至103年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養學系（所）

計畫主持人：陳璟賢
共同主持人：林慧萱
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：陳姿潔
碩士班研究生-兼任助理人員：蔡珮旻
碩士班研究生-兼任助理人員：黃登琪
碩士班研究生-兼任助理人員：李庭暄
博士班研究生-兼任助理人員：軒叔汶

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 103 年 10 月 15 日

中文摘要：黑色素生成作用 (melanogenesis) 是一種皮膚對抗紫外線照射的重要防禦機制，可使皮膚免於紫外線照射傷害，然而皮膚異常的色素沉澱不僅會造成美觀問題，也會增加罹患皮膚癌的風險。蓮蓬 (lotus seedpod) 富含多酚 (polyphenol) 成分，已有研究指出蓮蓬具有抗氧化、抗老化及抗癌之活性，但對於美白之應用仍是未知。表沒食子兒茶素 (epigallocatechin, EGC) 為蓮蓬萃取物中主要之多酚成分，過去研究證實 EGC 可做為美白試劑。因此本篇研究以蓮蓬主要成分 EGC 作為對照物質，利用黑色素瘤細胞 (B16F0) 及 C57BL/6 小鼠模式，探討蓮蓬萃物 (Lotus seedpod extract, LSE) 對於黑色素生成作用之影響，並分析其分子機轉。在細胞實驗中，以 α -黑色素細胞刺激素 (α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH) 誘導促進黑色素 (melanin) 之生成，並給予不同劑量的 LSE (10、15、20 μ g/ml) 或 EGC (15 μ M)，其結果顯示 LSE 與 EGC 皆能降低酪胺酸酶 (tyrosinase) 活性和黑色素生成作用；以西方墨點法分析，結果顯示 LSE 能顯著抑制 tyrosinase 及其相關蛋白 TRP-1 (tyrosinase-related protein 1) 蛋白表現。本研究分析參與 LSE 抑制黑色素生成當中的分子機轉，發現 LSE 能透過抑制 PKA (protein kinase A) 和 p38 之磷酸化，進而干擾 CREB (cAMP responsive element-binding protein) 活化，影響下游轉錄因子 MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 表現，導致 tyrosinase 的表現和黑色素合成下降。在動物實驗中發現，當 C57BL/6 小鼠耳朵皮膚暴露於 UVB 之下，處理 LSE 可以減少其黑色素之生成。綜合以上研究結果顯示，未來 LSE 可能有潛力應用於美容醫學、化妝品等行業。

中文關鍵詞：黑色素生成作用、蓮蓬、表沒食子兒茶素、黑色素瘤細胞、 α -黑色素細胞刺激素、黑色素、酪胺酸酶

英文摘要：Melanogenesis has many important physiological functions, including photo-protection of human skin from UV irradiation. Melanin synthesis is stimulated by α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH). However, abnormal melanogenesis causes hyperpigmentation in the skin, which results in serious aesthetic issues and increases the risk of skin cancer. Previous studies have indicated lotus seedpod extract (LSE) has antioxidant, anti-aging and anticancer activities. Therefore, in this study we examined the effect of LSE on melanogenesis and

signaling pathways in vitro and in vivo. Results showed that non-cytotoxic doses of LSE and its main composition Epigallocatechin (EGC) reduced α -MSH-induced both tyrosinase activity and melanin production in mouse melanoma B16F0 cells. Western blotting data showed LSE and EGC inhibited the expression of tyrosinase and TRP-1 (tyrosinase-related protein 1), Phosphorylation of p38 MAPK and PKA by α -MSH stimulation was efficiently blocked by LSE treatment. Further, LSE also suppressed the nuclear levels of CREB causing the consequent disturbed activation of MITF in α -MSH-stimulated B16F0 cells. The LSE-inhibited α -MSH-induced tyrosinase expression appeared be a consequence of MITF inactivation, because its DNA binding activity was suppressed by LSE. Besides, LSE inhibited melanin production in the ear skin of C57BL/6 mice exposed to UVB and the molecules involved in the melanogenesis. These findings suggested that LSE might be used as a potential natural whitening agent.

英文關鍵詞： melanogenesis, melanin, α -MSH, lotus seedpod extract, Epigallocatechin, tyrosinase

目錄

(三)報告內容：

前言·····	2
研究目的·····	2
文獻探討·····	2
研究方法·····	6
結果·····	11
討論·····	15
參考文獻·····	17
附圖·····	22

(三)報告內容：

前言、

朔古至今，亞洲女性美白觀念根深柢固，而造就了美白護膚產品日亦月滋的發展。從過去傳統醫學美容護膚品如白芷、珍珠粉、薏仁等至現代社會醫美診所裡的美白針、果酸煥膚、雷射等，再再說明了女性追求美白的渴望，其當中潛藏著不可限量的商機。除之此外，台灣美妝市場逐年增加，社會對於「純天然」的意識抬頭，尋找低敏感性與低副作用的天然物做為化妝品添加物成為了一項趨勢；而這使得一般化妝品已無法滿足大眾消費市場，促使許多的醫師、生技公司及學術單位投入大量的人力及物力於原物料的萃取與美白產品的開發。

美白成分的開發以中草藥萃取做為這幾年美白研究的主力。市面上多有據衛生署規範合格且具美白功效的產品如熊果酸、麴酸、苯二酚等。然而，另有研究指出其過量使用恐造成人體的傷害。因此，當前應尋找出對人體無害且具有抑制黑色素生成之美白成分。

研究目的、

蓮蓬(lotus seedpod extract, LSE) 富含多酚成分，過去有研究指出，蓮蓬具有抗氧化、抗癌、清除體內自由基等功能。我們藉由蓮蓬及其主要功能性成分(Epigallocatechin, EGC)進行研究，觀察其對黑色素合成之影響。而過去的研究顯示，EGC 具有抑制黑色素生成之關鍵酵素-酪胺酸酶的合成。因此本研究利用蓮蓬萃取物為實驗材料，期許其能夠達到抑制黑色素生成之功效並運用於美白化妝品市場中。

文獻探討、

1.1 皮膚色素沉澱 (skin pigmentation)

地球上的生物，從無脊椎動物自人類其皮膚膚色皆受到色素沉澱作用所影響。黑色素細胞(Melanocyte)為影響皮膚色素沉澱的主要因子，黑色素細胞會受到(一)基因遺傳如:人種。(二)內分泌如:懷孕、老化。(三)環境因子如:紫外線照射所調控進而改變了皮膚的顏色。

1.1.1 皮膚構造

皮膚為人體最大的器官，具有調節體溫、感覺、分泌、吸收、免疫、製造維生素 D 等功能[1]。皮膚可分為表皮層、真皮層與皮下組織三個部分 [2]。

1.1.1.1 表皮層 (Epidermis)

表皮層的厚度約為 0.03~1.0 mm，位於皮膚的最外層，此層無血管，表皮層為皮膚最外層以抵禦自環境的壓力如傳染性病原體，化學劑和 UV。表皮層的分層由內而外區分成五層，依序為基底層(stratum basale)、刺狀層(stratum spinulosum)、顆粒層(stratum granulosum)、透明層(stratum lucidum)及角質層(stratum corneum)。表皮層除了主要的角質細胞 (keratinocyte)外，尚包括黑色素細胞(melanocyte)、蘭格罕氏細胞 (Langerhans cell)及莫克耳氏細胞(Merkel's cell) [3]。

1.1.1.2 真皮層 (Dermis)

真皮層的厚度約為 0.3~3 mm，位於表皮層以下，皮下組織以上，由真皮結締組織組成，包含膠原蛋白纖維、彈性蛋白纖維及網狀蛋白纖維與大量主要成分為黏多醣體蛋白的基質及纖維母細胞(fibroblast)、肥大細胞(mast cell)及巨噬細胞(macrophage)所構成[2]。真皮與表皮是由成份複雜又起伏的真皮-表皮連接(dermal-epidermal junction, DEJ)所連結，上方的基底表皮角質形成細胞(epidermal keratinocytes)藉由半橋粒(hemidesmosomes)被固定到第 IV 型膠原豐富的基底膜，而其下方的真皮層藉由膠原纖維 VII 和 fibrillin-rich microfibril bundles 固定與之接合彈性纖維系統的延伸稱為(oxytalan fibres)。真皮層纖維細胞被認為是真皮層細胞外基質(dermal extracellular matrix, ECM)的三個主要群體組成，且細胞外基質蛋白分子不僅主導真皮的結構和功能，且透過異常重塑，調解皮膚老化導致的功能轉變。

1.1.1.3 皮下組織 (Hypodermal; Subcutaneous layer)

位於真皮層和肌肉之間，主要是由脂肪細胞所構成，皮下脂肪組織層是一層比較鬆散的組織，主要功能為可緩衝外來的壓力，防止身體因外力碰撞而受傷害，其他功能亦包括保存體溫、儲存能量等[2]。

黑色素細胞主要散布於表皮層與真皮層間，與表皮層中的基底層和纖維母細胞相連結，上頭覆蓋角質細胞，三者透過分泌因子與細胞接受器間的交互作用影響了膚色；而一個黑色素細胞約對應四十個角質細胞，形成表皮黑色素單位(Epidermal melanin unit)[6]。因此，每個人皆具有相當數量的黑色素細胞，而影響各體間膚色的差異性，原因出在於黑色素細胞的活性與密度。

1.1.2 紫外線照射引起色素沉澱

紫外線(Ultraviolet; UV)照射是最普遍存在的環境危害之一，陽光下的生物皆會受其影響。紫外線波長範圍為200~400 nm，依波長可分為長波紫外線(UVA)，是波長320~400 nm的紫外線；中波紫外線(UVB)，是波長280~320 nm的紫外線；短波紫外線(UVC)，是波長200~280 nm的紫外線。一般而言，紫外線照射到地表有5~10%是屬於UVB，90~95%是屬於UVA，波長愈短，能量愈強，對人體造成的傷害愈大。皮膚是直接暴露在紫外線照射的器官。長期暴露在紫外線的照射下會導致皮膚過早老化(photoaging)、局部或全身免疫抑制，最後導致癌症發生[1,7,8]。

色素沉澱為人體的保護作用機制之一，而造成黑色素沉澱最重要的外在因素為「紫外線」。當皮膚暴露於紫外線(ultraviolet radiation, UVR)的照射下會增加(一)黑色素細胞量(二)黑色素合成速率(三)黑色素體轉移至皮膚周圍的角質細胞；在皮膚上引起表皮層黑色素細胞分泌黑色素，造成色素沉澱，形成物理性屏障，以保護細胞免於受到UVB傷害，降低致癌性[1,9]。此外，UVR會刺激角質細胞分泌原嗎啡黑色素皮質(proopiomelanocortin, POMC)，經轉譯後修飾作用產生黑色素細胞刺激素(α -Melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)與促上腺皮質激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)，兩者被釋出後與黑色素細胞上的黑素皮質素接受器(melanocortin-1-receptor, MC1R)結合，藉由訊息傳遞路徑促進酪胺酸酶的轉錄作用，進而增加了黑色素之生成。

1.2 黑色素生成途徑 (Melanogenesis)

1.2.1 黑色素細胞(Melanocytes)

在人體內，黑色素母細胞(melanoblast)在胚胎時期由外胚層神經脊細胞衍生出，而後在皮膚、毛囊、眼、腦、內耳耳蝸等處分化成黑色素細胞(melanocytes) [6,10]。黑色素細胞成熟後，細胞內會生成特異性胞器-黑色素體(Melanosome)，黑色體的大小、數量及其分佈會影響到黑色素的活性[11]。黑色素體自黑色素細胞轉移至鄰近的角質細胞，而黑色素堆積在角質層造成色素沉澱。

1.2.2 黑色素體 (Melanosome)的形成與轉移

黑色素是由黑色素細胞內具特異性的胞器-黑色素體所產生，黑色素體的形成主要分為四個階段 [12]。Stage I 黑色素體位於細胞核和高基氏周圍，接收自高基氏體所產生的酵素與結構蛋白，以助於黑色體之形成。此時，黑色素體成空泡狀且酪胺酸酶未具有活性。

Stage II 受到黑色體的主要結構蛋白Pmel17調控，黑色體的外型由空泡狀轉為細長，內部出現纖維狀物質，此外，酪胺酸酶自高基氏體轉運至黑色素體內，使得黑色體內部出現微量的黑色素沉澱物，黑色素開始生成。

Stage III 大量的酪胺酸酶在黑色體內活化，其所產生的黑色素均勻地堆積在黑色素體內部纖維上。

Stage IV 成熟的黑色素體呈橢圓狀，黑色素會經由黑色素細胞樹突狀分泌進入周圍的角質細胞內。因此，在產生黑色素的細胞內可大量偵測到黑色素體。

1.2.3 黑色素 (Melanin)

黑色素不僅僅存在於動物的毛髮與皮膚上，在自然界中也存在於細菌、黴菌與真菌中。黑色素為生物體內高分子聚合物[13]當紫外線照射到皮膚上，黑色素細胞內的酪胺酸酶會被活化，並藉由酪胺酸酶(tyrosinase)將酪胺酸(tyrosine)轉換成多巴(dopa)，再經由酪胺酸酶的作用催化多巴氧化成多巴奎林(dopaquinone)，而這個過程為黑色素形成的速率限制步驟。多巴奎林在缺乏半胱胺酸(cysteine)或穀胱甘肽(glutathione)的情況下，會自發性氧化環化成多巴醌(dopachrome)並會進一步氧化成真黑色素

(eumelanin)，倘若為半胱胺酸與或胱甘肽存在的情況下，則會氧化成紅色或黃色之褐黑素(pheomelanin)。黑色素主要可分為兩大類，如下介紹：

(I)真黑色素(eumelanin)，真黑色素外觀為棕色或黑色，在哺乳動物中藉由兩條途徑生成；當多巴醌脫羧作用形成 DHI，其會被酪胺酸酶氧化成 indole-5,6-quinone。或是藉由多巴色素異構酶(tyrosinase-related protein 2,TRP-2)將多巴醌催化成較為穩定的 DHICA，DHICA 氧化酶 (tyrosinase-related protein 1,TRP-1) 則會將 DHICA 氧化成 indole-5,6-quinonecarboxylic acid，最後兩者聚合成真黑色素

(II)褐黑素(pheomelanin)，主要存在於淺色的皮膚和頭髮中，尤其是紅髮。多巴醌會與半胱胺酸或穀胱甘肽結合形成 cysteinyl-dopa，衍生出偏紅棕色的褐黑素(附圖四)[2]。因此，人種膚色上的差異性是藉由上述兩種不同的黑色素，依不同的比例所構成。而真黑色素為色素沉澱之主要色素，真色黑色素所佔比例較高之人其膚色較深。

1.2.4 黑色素受體 (melanocortin receptor,MCR)

黑色素受體共有五種不同的型態，MC1R、MC2R、MC3R、MC4R 與 MC5R，分別調控人體包括食欲、能量平衡、發炎反應等。而 MC1R 為 G 蛋白偶聯型受體(G protein-coupled receptor crucial)，負責調控黑色素細胞增殖及功能，除此之外，MC1R 另還涉及了在人體表皮黑色素細胞 DNA 損傷之修復途徑[14]。MC1R 與黑皮質素 (α -MSH)會活化與黑色素生成相關的訊息傳遞路徑，如 cAMP 數量增加後，活化下游蛋白進而合成真黑素以保護皮膚抵禦紫外線[15]。基因遺傳會控制真黑素與褐黑素的含量比，因此，MC1R 在此調控機制中扮演至關重要之角色[16]。

1.2.5 黑皮質素 (α -melanocyte stimulating hormone , α -MSH)

色素沉澱受到 α -MSH 所調節。其可誘導變溫動物、魚類、兩棲類和爬行動物表皮之顏色變化。此外，在哺乳動物中則會刺激皮膚黑色素生成[17,18]。 α -MSH 是個十三胜肽色素賀爾蒙，可在腦下垂體 (pituitary gland)和皮膚被分泌。當 UV 暴露照射在皮膚上，會誘導角質細胞、巨噬細胞、黑色素細胞產生 α -MSH 以保護表皮細胞免於 DNA 損傷。 α -MSH 通過自分泌與旁分泌自角質細胞上轉移到相鄰的黑色素細胞。

人類黑色素細胞裡 α -MSH 扮演至關重要之角色。其可促進黑色素之生成、增加黑色素細胞樹突化 (dendricity)與增生(proliferative)，以及防禦黑色素細胞免於遭受到氧化傷害等。酪胺酸酶為合成黑色素之必要酵素， α -MSH 藉由調控酪胺酸酶的活化與表現，從中調控了黑色素之合成。除此之外，超氧陰離子(superoxide anion)為酪胺酸酶合成黑色素受質之一，當細胞受到超氧陰離子所破壞時， α -MSH 會激活酪胺酸酶，以降低細胞內的氧化傷害[19]。

1.2.6 cAMP/ PKA pathway :

1.2.6.1 環磷酸腺苷(Cyclic adenosine monophosphate, cAMP)

cAMP 參與細胞內多條生理代謝途徑，為細胞內重要的二級訊息傳遞分子。在黑色素細胞生成黑色素的路徑中，cAMP 也是關鍵的調控因子。當 α -MSH 與 MC1R 結合後，會促使 cAMP 的合成量增加[2,20,21]。而黑色素細胞內 cAMP 數量提升後進而激活蛋白質激酶 A (Protein kinase A, PKA)，磷酸化 PKA 會活化 cAMP responsive element binding protein (CREB)，促其進入細胞核內。CREB 為 Microphthalmia associates transcription factor (MITF)的轉錄因子，而 MITF 為酪胺酸酶之轉錄因子。此時，CREB 與 MITF 的基因促進子(promoter)結合，使得 MITF 得以促使酪胺酸酶之基因表現[22,23]，誘導黑色素生成增加[2]。

1.2.6.2 PKA 抑制劑

PKA 由四個亞基組成四聚體，當中包含了兩個蛋白質激酶 A 調節亞基(protein kinase A regulatory subunit, R subunit)與蛋白質激酶 A 催化亞基(protein kinase A catalytic subunit, C subunit)，R subunit 的分子量約 49~55kDa，C subunit 的分子量約 40 kDa。當細胞內的 cAMP 與 R subunit 結合，使 C subunit 與 R subunit

解離，C subunit 被釋出和 ATP (Adenosine triphosphate) 結合，CREB 上的絲胺酸 (serine) 和蘇胺酸 (threonine) 被磷酸化，促使 CREB 被活化 (附圖六) [24]。

H89 為 PKA 競爭性抑制劑。H89 會與 C subunit 競爭 ATP。倘若 C subunit 未與 ATP 接合，將無法磷酸化 CREB，進而阻斷了下游蛋白的表現 [24]。

1.2.7 MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway:

1.2.7.1 ERK

黑色素細胞內的 mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 訊號被活化後，會磷酸化 MITF 之 Ser73 位置，造成磷酸化的 MITF 被帶到 proteasome 內水解，抑制 MITF 的活化進而抑制黑色素之合成下降 [25]。

1.2.7.2 p38 MAPK

p38 訊號路徑會受到紫外線照射、發炎因子、生長因子等刺激所活化，而參與了調控細胞分化、細胞週期、發炎反應等多種生理過程。p38 MAPK 包含了四個同型異構體，分別是 p38 α 、 β 、 γ 與 δ ；p38 α 與 β 存在於所有組織器官中，p38 γ 主要表現於肌肉組織中，p38 δ 則是在睪丸、胰腺與小腸。

p38 MAPK pathway 與黑色素生成息息相關。在破骨細胞當中，p38 MAPK 會磷酸化 MITF 之 Ser307 位置，使 MITF 表現增加 [26]。而在黑色素細胞當中，p38 會在 UVB 照射後會誘導 CREB Ser133 位置磷酸化而活化 [27]；除此之外，UVB 也會促使 p38 激活 Usf-1 的轉錄，進而促進酪胺酸的表現。[28,29]。 α -MSH [30]、紫外線、蛇麻醇酶 (Lupeol) [31] 皆可透過 p38 MAPK Pathway 促使酪胺酸酶基因活性提高黑色素生成量。

SB203580 是一種吡啶基咪唑化合物 (pyridinyl imidazole compound)，對 p38 MAPK 訊號傳導路徑有專一性的抑制作用，已被廣泛運用在闡述人體內 p38 蛋白角色的研究裡。其抑制作用與 H89 p-PKA 抑制劑相似，皆是競爭 ATP 結合位置。

1.2.8 酪胺酸酶 (Tyrosinase)

酪胺酸酶是黑色素生成之關鍵酵素，廣泛存在於微生物、植物、動物及人體中。酪胺酸酶含有多酚氧化酵素 (polyphenol oxidase)，哺乳類動物中其分子量約 60-70 kDa，為黑色素的顆粒的前驅物。在細胞粗內質網上的核糖體合成，生成後藉由細胞質或平滑內質網被轉移之高基氏體之特定位置，再分裂釋放到黑色素細胞的細胞質中。

1.3 抑制黑色素生成之研究方向

美白作用機制大致可分為：

- (1) 降低酪胺酸酶或酪胺酸酶相關蛋白 (TRP-1、TRP-2) 活性及酪胺酸合成；如市售的美白產品麴酸，其藉由銅螯合劑 (Copper-chelating agents) 螯合酪胺酸酶的活性中心-銅離子，進而降低酪胺酸酶的活性 [32]。
- (2) 競爭性抑制酪胺酸之受質如熊果酸，其與酪胺酸結構相似能與酪胺酸酶或多巴等受質競爭受質接受器，減少了酪胺酸酶與受質作用，藉此降低黑色素生成 [33]。
- (3) 氧化還原劑抑制黑色素如維生素 C，黑色素為一連串的氧化反應，維生素 C 可藉還原反應阻止多巴醌轉變成黑色素。此外，維生素 C 的可捕捉 UV 照射下所產生的自由基，保護皮膚免於細胞 DNA 損傷、皮膚老化 [34,35]。
- (4) 使用對細胞具有毒殺性 (cyto-toxic) 的抑制物，如苯二酚，其可降低黑色素細胞功能及細胞增殖使其無法產生黑色素 [36]。
- (5) 抑制紫外線刺激後皮膚的發炎反應，如花生四烯酸的化學介質，會刺激黑色素細胞誘發發炎性的黑色素沉著。
- (6) 調節黑色素細胞內黑色體的分布。

1.4 蓮蓬 (Lotus seedpod)

1.4.1 植物來源

蓮蓬為蓮花孕育蓮子之部分。蓮花為多年生草本植物，學名 *Nelumbo Nucifera Gaertn*, 英文名 *Lotus Flower* 或 *East Indian Lotus*, 中文學名荷花，亦可稱之為蓮花、芙蓉、君子花等。原產於亞洲熱帶及溫帶地區；而在台灣蓮花的栽種以台南縣白河鎮最具規模，佔全國總產量四分之三。

蓮花為食用、藥用、觀賞兼具之植物。蓮花構造包括蓮花、蓮蓬、蓮子、蓮葉、蓮藕、蓮藕節等。蓮花根莖有節如三節棍稱此部位為蓮藕，生長在汙泥裡。葉片部分為蓮葉，蓮花為蓮之開花部分，位在花中央者為蓮蓬，蓮蓬種子即為蓮子，皆生長在水面之上[37,38]。蓮花全株皆可入藥，具有許多藥理活性物質；本草綱目記載蓮花能解熱解毒，荷葉能減脂排淤，蓮心能養心補腎，蓮藕與蓮蓬能止血散瘀。現就蓮蓬加以詳細介紹。

1.4.2 成分及功效

根據液相層析分析研究中指出蓮蓬多酚類化合物含量以表沒食子兒茶素(Epigallocatechin, EGC)居冠，具有 11.27%，其次為 Catechin [34]。過去文獻指出蓮蓬的聚合前花青素(Oligomeric procyanidins of lotus seedpod, LSOPC)能透過其抗氧化之效能與提升胰島素活性來達到減緩阿茲海默症(Alzheimer's disease)與糖尿病(Diabetes)之效果[39,40]。另有研究表示 LSOPC 在動物實驗中可藉由降低大腦裡丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)及一氧化氮合成酶(NOS)的表現量，增加穀胱甘肽(GSH)的含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性來提昇學習記憶障礙；此外，LSOPC 還具有金屬螯合作用、清除體內自由基、降低糖化終產物、抵抗輻射線、改善心肌缺血損傷等[41,42,43]

1.4.3 表沒食子兒茶素(Epigallocatechin, EGC)

兒茶素(catechin)又稱之為茶丹寧或兒茶酚，屬於一種多酚物質，主要以四種型式:表兒茶素(epicatechin, EC)、表沒食子兒茶素(epigallocatechin, EGC)、表沒兒茶素沒食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)和表沒食子兒茶素沒食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)廣泛存在於許多天然的植物中，包括茶、蘋果、葡萄等[44]。其中茶又以綠茶含量最高，其次是烏龍茶、包種茶。因具有苦澀味，因此兒茶素是影響茶口感的主要因素。過去文獻指出，在動物實驗當中，EGC 能顯著降低血小板之活性與抗凝血的之功能。David Vergote 等人指出 EGC 可透過增加 Bax 蛋白的表現，減少 Bcl-2 的生成，誘導乳腺癌細胞(MCF-7 與 MDA-MB-231)發生細胞凋亡，進而抑制乳腺癌細胞株的生長[45]。另外，David M. Smith 也指出 EGC 能藉由抑制血癌細胞(Jurkat T、HL-60 與 K562)DNA 複製影響腫瘤細胞的增殖[46]。過去文獻指出，EGC 可以透過影響酪胺酸的表現，進而影響色素沉澱[47]。

研究方法、

2.2 蓮蓬水萃取物 (lotus seedpod extract, LSE)製備

秤取 100 g 乾燥蓮蓬，加入 4 L 的二次水覆蓋蓮蓬，用 95°C 熱水加熱至沸騰後燜煮 2 小時，待冷卻後取出汁液過濾並去除雜質，置於-80°C 冰箱冷凍，隔日取出以冷凍乾燥機乾燥製得粉末狀，所得 18.4 g 即為蓮蓬水萃取物(LSE)，產率約為 18.4%，然後將其避光存放於-20°C 冰箱保存。後續之實驗進行，均以 50%滅菌水和 50%的乙醇溶解 LSE 乾燥粉末作為實驗材料。

2.3 實驗細胞株培養

2.3.1 細胞株來源

本實驗使用之 B16F0 細胞株為老鼠黑色素瘤細胞，源自於台灣食品工業發展研究所(Food industry research and development institute, R.O.C)。

2.3.2 培養環境

將細胞培養於 5% CO₂、37°C 恆溫之培養箱中，再依據其生長速度定期更換培養液。

2.3.3 細胞培養基配製

秤取適量 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培養基粉末與 NaHCO₃ 溶解於 2650 ml 無菌純水中，待粉末完全溶解後以 HCl 調整溶液 pH 值至 7.2~7.4 之間，再以無菌純水將體積補至 3 L。最後以 0.22 μm 無菌過濾器過濾後，保存於 4°C 冰箱中備用。

2.3.4 解凍細胞

將新鮮培養基放置於 37°C 水浴槽回溫後移置無菌操作台內備用，將含有 B16F0 細胞的冷凍小管由液態氮桶中取出，迅速置於 37°C 水浴槽中解凍，以避免冰晶對細胞造成傷害。輕搖冷凍小管使其在 1 分鐘內完全溶化後，以 70% 酒精擦拭冷凍小管外部並快速移入無菌操作台內，將已溶化完全的細胞懸浮液移至 15 ml 離心管中，以 1200 rpm 離心 5 分鐘後移除上清液，並加入適量的新鮮培養基至 15 ml 離心管中混合均勻，再將混勻的細胞培養液置於細胞培養皿中，並置放於維持 5% CO₂，37°C 細胞培養箱中即可。

2.3.5 細胞培養

將 B16F0 細胞培養於含有 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、1% Penicillin Streptomycin solution 以及 1% glutamine 之 DMEM 培養基中，根據其生長速度定期更換培養液；此外，將細胞放置於維持 5% CO₂、37°C 恆溫之細胞培養箱中進行培養。

2.3.6 繼代培養

當細胞生長至八~九分滿時，以 phosphate Buffered Saline (PBS) 將細胞潤洗過兩次，再加入 trypsin-EDTA 溶液 (0.5 ml/25T flask, 1 ml/75T flask)，於 37°C 細胞培養箱中作用 3 分鐘後，以新鮮含血清之培養基中和 trypsin-EDTA 的作用，並將細胞沖洗下來，隨後離心 (1200 rpm, 5 分鐘)，去除上清液後，再以新鮮含血清的培養基將細胞均勻打散，分種至新的培養皿中，並於培養時間 2~3 天更換一次新鮮的培養基即可。

2.3.7 冷凍細胞

事先配置冷凍細胞的保存液，將 DMSO 加入新鮮的培養基中，以適當比例混和均勻 (90% culture medium + 10% DMSO) 後備用。再依細胞繼代培養的操作方法，將細胞收集於 15 ml 離心管中，取出少量的細胞懸浮液 (100 μl) 進行細胞計數，求得細胞存活率及欲冷凍的細胞數後，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，將上清液去除，再加入事先配置好的細胞保存液，混合均勻後平均分裝於冷凍小管中 (1.5~1.8 ml/個，細胞濃度約 1~3 × 10⁶ cell/ml)。之後再將冷凍小管放入裝有異丙醇 (isopropanol) 的冷凍保存盒裡，放置於 -80°C 冰箱中冷凍隔夜，最後再將冷凍管放入液態氮桶內長期保存。

2.4 實驗方法

2.4.1 細胞計數

計算細胞個數採用 trypan blue 染色法進行，trypan blue 能使死亡的細胞染成藍紫色；但無法使具有完整細胞膜的活細胞著色，因此顯微鏡下可以看見明亮完整的細胞，藉此可用來計算活細胞數。其方法為將培養皿的細胞經 trypsin-EDTA 溶液作用，經過離心並收集細胞後，加入 10 ml 的培養液混合均勻，吸取適量培養液 (約 100 μl) 與 trypan blue 混合，利用細胞計數盤計算培養皿中活細胞數，求得細胞存活率。

2.4.2 細胞毒性試驗

將細胞接種於 6 well 培養皿中，每個培養皿種入 2 × 10⁵ 個細胞，輕搖培養皿使細胞分散均勻後，培養於 37°C、5% CO₂ 之恆溫培養箱中，24 小時後以倒立式顯微鏡觀察並記錄細胞型態與變化，待細胞生長至 6 分滿時，依序投予不同濃度之 LSE (5-25 μg/ml)，48 小時後將細胞收集於 15 ml 離心管中，並以 trypan blue 染色法進行活細胞計數，以求得細胞存活率。

計算公式如下：

細胞存活率 (%) = (實驗組細胞數 / 對照組細胞數) × 100 %

2.4.3 黑色素 (melanin) 含量試驗

參考 2011 年 Park 等人之實驗方法[49]，並做些許修改，將 4×10^5 個細胞於 6 cm dish 中培養 24 小時後，投以不同劑量的 LSE (5-20 $\mu\text{g/ml}$) 或 EGC (5-20 μM)，同時加入 1 μM α -MSH，繼續培養 48 小時後，以 trypsin-EDTA 作用將細胞收集於 15 cm 離心管中，離心去除上清液後，以 PBS 洗滌細胞 pellet 兩次，觀察細胞 pellet 顏色並拍照，之後再以 500 μl 之 1M NaOH 溶解細胞 pellet，並於 80°C 水浴中加熱 1 小時後，以 12,000 rpm 高速離心 20 分鐘，取出上清液以 ELISA reader 偵測波長在 405 nm 之吸光值。以合成之 melanin 作為黑色素標準溶液，濃度分別為 0、50、100、150、200、400 $\mu\text{g/ml}$ ，作出檢量線再利用線性回歸方式換算黑色素含量；此外再取出 10 μl 上清液，以 BSA 為蛋白質標準溶液，進行蛋白質含量分析，以求得每毫克蛋白質中之細胞內黑色素含量。

計算公式如下：

$$\text{細胞內黑色素含量 (\%)} = (\text{實驗組 OD405} / \text{對照組 OD405}) \times 100 \%$$

2.4.4 酪胺酸酶活性 (tyrosinase activity) 試驗

參考 2012 年 Shen 等人之實驗方法[50]，其原理是利用細胞內酪胺酸酶和等量的 L-Dopa 作用生成 dopaquinone 促使黑色素生成，在波長 490nm 測量其吸光值，判斷酪胺酸酶之活性。其做法為將 2×10^5 個細胞於 6 well 中培養 24 小時後，投以不同劑量的 LSE (10-20 $\mu\text{g/ml}$) 或 15 μM EGC，同時加入 1 μM α -MSH，繼續培養 48 小時後，以 trypsin-EDTA 作用將細胞收集於 15 cm 離心管中，離心去除上清液後，以 PBS 洗滌細胞 pellet 兩次，將細胞 pellet 溶解於 0.2 ml 含有 1% Triton X-100 之 PBS 溶液中，取出 100 μl 置於 96 孔盤中，再加入 100 μl 之 2 mM L-DOPA，於 37°C 反應 60 分鐘後，以 ELISA reader 偵測波長在 490 nm 之吸光值。

計算公式如下：

$$\text{細胞內酪胺酸酶活性 (\%)} = (\text{實驗組 OD490} / \text{對照組 OD490}) \times 100 \%$$

2.4.5 細胞內 Cyclic AMP 濃度分析

本實驗是用 Cyclic AMP EIA kit 商業套組作分析，利用 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 的原理，先將具有偵測 cAMP 的抗體 coating 在 96 孔盤上，加入的樣品中若含有 cAMP 就會與之結合，再加入的 cAMP-acetylcholinesterase (AChE) conjugate anti-cAMP 抗體也會與 cAMP 專一性的結合並固定在微孔上，利用緩衝溶液洗掉多於的樣品後，再加入含有 AChE 受質的 Ellman's Reagent 作為呈色劑，並於波長 412 nm 下測定吸光值，將吸光值帶入標準曲線即可換算出 c-AMP 濃度。

2.4.6 西方墨點法(Western blot)

2.4.6.1 B16F0 細胞蛋白質萃取

利用商業套組 Mitochondria isolation kit for mammalian cells 將 B16F0 細胞中的細胞核、細胞質及粒線體之蛋白質分離。

2.4.6.2 蛋白質之定量

利用商業套組 Pierce RBCA Protein Assay kit 進行檢測，其原理為在鹼性條件下，蛋白質將二價的銅離子 (Cu^{2+}) 還原為一價的氧化亞銅 (Cu^+)， Cu^+ 與 BCA (bicinchoninic acid) 試劑形成藍紫色的複合物，再於波長 562 nm 下測定吸光值。

2.4.6.3 樣品(sample)配製

取 20-50 μg 已定量完成之蛋白質，以二次去離子水補至固定體積，然後加入 5X loading dye 混合均勻，於 100°C 下加熱 10 分鐘後置於冰上冷卻，然後離心備用。

2.4.6.4 鑄膠 (SDS-PAGE)

將玻璃片洗淨擦拭後，利用玻璃厚度 1.00 mm 之 spacer 為間隔組裝好電泳片，置於架膠器上固定。選擇要配置之下層 separating gel 的比例，欲分析大分子蛋白質，配置 8~10% 的下層 separating gel；若欲分析小分子蛋白質，則配置 12~15% 的下層 separating gel。將下層 separating gel 混合液 (Table 1) 緩慢加入玻璃片，並加入二次去離子水把下層膠壓平，待 30~40 分鐘下膠凝固後，將上層的二次水吸乾。

隨後將配置好的上層 stacking gel 混合液注入電泳片中，小心地插入齒梳，待 10~15 分鐘上膠凝固後，拔除齒梳，用二次去離子水沖洗 well 數次，去除殘膠。再將整組電泳膠體置入電泳槽中備用。

2.4.6.5 電泳法 (electrophoresis)

首先將新的 running buffer 倒入電泳槽內槽中，外槽以回收的 running buffer 補至蓋過電導線。再將處理好的蛋白質樣品與追蹤染劑 (5X loading dye) 混合均勻，小心地注入 well 中，勿使樣品溢出 well，其中一個 well 注入 protein standard marker。待蛋白質樣品注入完成，連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 90 V 的電壓使蛋白質跑過 stacking gel 聚成一直線後，再將電壓調整為 110 V 加速蛋白質樣品於 separating gel 中的移動，當色帶跑至玻璃底部邊緣時即可停止電泳。

2.4.6.6 轉漬 (transfer)

先將海綿、濾紙以及 nitrocellulose (NC) paper 浸泡在 transfer buffer 中備用。當 SDS-PAGE 完畢後取出膠體，切除上膠，在三明治夾上依序放入海綿及濾紙，將膠片小心的置於濾紙上，再放上 NC paper 覆蓋膠體，用玻璃棒小心地趕走夾雜在各層之間的氣泡，最後再依序放上濾紙及海棉後夾上三明治夾放入轉漬槽中，最後放入冰盒，倒入 transfer buffer，以 100V 轉漬 100 分鐘 (視玻璃厚度決定，玻璃越厚轉漬時間越長)。

2.4.6.7 免疫墨點法 (immunoblot)

將轉漬完成的 NC paper 取出，利用紅色染劑 (ponceau's solution) 觀察轉漬效果並將所需蛋白的位置剪下，用 TBS buffer 漂洗去除紅色染劑後，加入 5% 脫脂奶粉於 4°C 下進行 blocking 1~2 小時，再以 TBS-Tween buffer 漂洗三次每次 10 分鐘，以洗去未專一性結合的抗體。之後加入一級抗體 (1:500)，於 4°C 下作用 overnight，隔天再以 TBS-Tween buffer 清洗三次每次 10 分鐘。接著加入二級抗體 (1:10000)，於 4°C 下作用 1 小時，再以 TBS-Tween buffer 以每次 10 分鐘，漂洗三次。最後以 1:1 等比例方式將 HRP Substrate Peroxide Solution 及 HRP Substrate Luminol Solution 混合均勻加在 NC paper 上使其顯影，再利用冷光影像分析系統 (Image Quant LAS 4000 mini) 來進行分析及定量。

2.4.7 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR)

2.4.7.1 B16F0 細胞 RNA 萃取

首先以 PBS 潤洗細胞 3 次，加入 1~2 ml TRIzol Reagent，置於培養箱反應 5~10 分鐘後，將細胞分裝於微量離心管中，貯存於 -80°C 備用。隔日將離心管取出於冰上回溫，加入 200 μ l 氯仿 (chloroform)，劇烈震盪 15 秒，於室溫靜置 10 分鐘後離心 (4°C, 12,000 g, 15 分鐘)。離心完成後可觀察到明顯的分層，最上層透明層為 RNA；中間白色層為 DNA、蛋白質及細胞碎片；最下層粉紅色為有基層。取出透明層的液體置於新的微量離心管中，接著加入 500 μ l 的異丙醇 (isopropanol) 上下搖晃 15 秒，靜置 10 分鐘後離心 (4°C, 12,000 g, 15 分鐘)，離心完成後去除上清液，加入 1 ml 75% 無水酒精，上下搖晃 15 秒後再離心 (4°C, 7500 g, 10 分鐘)，離心後去除上清液，置於無菌操作台內風乾至白色 pellet 變透明，再加入 20~25 μ l DEPC 水，置於乾式加熱槽 60°C，加熱 5 分鐘。最後再取出 3 μ l mRNA 於 OD260 下測定濃度。mRNA 濃度計算方式如下：

mRNA 濃度 = OD260 \times 40 \times 稀釋倍數

2.4.7.2 轉 cDNA

利用商業套組 GoScriptTM Reverse Transcription System 進行轉 cDNA，分成兩個步驟，首先將 sample RNA 與 radom primer 及 nuclease-free water 於微量離心管中混合均勻，置於 PCR 機器中反應 (70°C, 5 分鐘；4°C, 5 分鐘)，完成後放置於冰上；接著將相關的反應試劑包括：5X reaction buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix, rRNasin RRNase inhibitor, reverse transcriptase, nuclease-free water 混合均勻，再加入前步驟之微量離心管中，於 PCR 機器中進行反應，反應完成後存放於 -20°C 中備用。

2.4.7.3 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-Time PCR)

原理是利用螢光染劑或是帶有螢光標記的 DNA 探針，在進行 PCR 反應的同時進行螢光強度的測量，藉此來進行基因定量。此方法之優點為偵測範圍廣、靈敏度、準確性、專一性皆高且又快速方便。操作方法為取一個微量離心管，分別加入 cDNA、DEPC water、Forward / Reverse primer、Power SYBR Rgreen 等試劑。混合均勻後放入 Step One TM Real time PCR system 中依序進行以下反應。(95°C denaturation; 60°C annealing; 72°C extension)。反應完成後將 Ct 值與 housekeeping gene (GAPDH) 進行換算，最後以 $2^{-\Delta Ct}$ 值公式來換算定量結果。

2.4.8 膠體電泳位移分析法 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

2.4.8.1 DNA probe 製備

將合成好的 probe 以 DEPC H₂O 稀釋成 20 μ M/100 μ l，依序以 95°C、80°C、60°C、40°C、20°C 及 4°C 進行 annealing，最後將 annealing 好的 probe 以 TEN buffer 稀釋成 1~2 pmole/ μ l，保存於 4°C 備用。

2.4.8.2 鑄膠 (negative-TBE PAGE)

將電泳玻璃片洗淨擦拭後，利用玻璃厚度 1.00 mm 之 spacer 為間隔裝好電泳片，置於架膠器上。將下層 separating gel 混合液緩慢加入玻璃片，插入電泳齒梳，待 30 分鐘凝膠後，拔除齒梳，以二次水沖洗 well 數次，然後置入電泳槽中，加入 0.5X TBE buffer 保存即可。

2.4.8.3 核蛋白製備

利用商業套組 Mitochondria isolation kit for mammalian cells 將 B16F0 細胞中的細胞核、細胞質及粒線體進行分離。取其細胞核加入 RIPA buffer 以及蛋白酶抑制劑 (PMSF, Na₃VO₄, cocktail)，於冰上均質 1 分鐘後，再次加入蛋白酶抑制劑並離心 (4°C, 12,000 g, 10 分鐘)，取其上清液至新的微量離心管中，儲存於 -20°C。

2.4.8.4 樣品處理

先將 ddH₂O、10X binding buffer、poly [dI-dC] 及 probe 混合再加入已定量完成之核蛋白，於室溫下反應 15 分鐘後，再加入 5X loading dye 混合備用。

2.4.8.5 電泳

將新的 0.5X TBE buffer 倒入電泳槽內槽中，外槽以回收的 0.5X TBE buffer 補至蓋過電導線，先用 100 V running 60 分鐘，再將配置好的 sample 注入到電泳片中，以 100 V running 240 分鐘，直到第一條色帶跑至玻璃底部時即可停止電泳。

2.4.8.6 轉漬

將 positive charged nylon membrane 浸泡在 0.5X TBE buffer 5 分鐘後，再浸泡於 transfer buffer 5 分鐘。當電泳跑完畢後，切除上膠，在三明治夾上依序放入海綿及濾紙，將膠片小心的置於濾紙上，再放上 positive charged nylon membrane 覆蓋膠體，用玻璃棒趕走夾雜在各層間的氣泡，最後再依序放上濾紙及海棉後夾上三明治夾放入轉漬槽中，以 100 V 轉漬 75 分鐘。待轉漬完成後取出 positive charged nylon membrane，正面朝上晾乾。再以 1200 mJ/cm² 進行 3 次 UV-crosslink。

2.4.8.7 免疫墨點法

將完成 UV-crosslink 的膜取出，以 1X wash buffer 清洗 10 分鐘後，加入 blocking buffer 反應 15 分鐘，然後再加入 conjugate buffer (streptavidin-HRP) 於室溫作用 15 分鐘後，再以 1X wash buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘，接著再加入 equilibration buffer 反應 3 分鐘，最後利用冷光影像分析系統 (ImageQuant LAS 4000 mini) 進行分析及定量。

2.5 實驗動物來源與實驗試劑配製

2.5.1 實驗動物

由國家實驗研究院實驗動物中心購進 5 週齡雄性 C57BL/6 mice，飼養於中山醫學大學實驗動物中心。飼養條件為自動空氣調節(換氣率每小時 12 次)、自動光照控制(12 小時白晝、12 小時黑夜)、平均室溫 22±2 °C、相對濕度 50~55 %、給予裸鼠自由進食無菌之一般飼料及飲水。

2.5.2 實驗試劑配製

藉由相同體積的二次水和酒精配製不同濃度之萃取物，包含 LSE 1.25 mg/cm² (0.13%) 及 2.5 mg/cm² (0.25%)。純物質 EGC 溶於 DMSO 中，在動物實驗中配置成 2 mM/cm² (0.16%)。

2.5.3 實驗設計

將購進之 C57BL/6 mice 隨機分為 5 組，分別為控制組、UVB 組、UVB+LSE1.25 mg/cm² (0.13%) 組、UVB+LSE2.5 mg/cm² (0.25%) 組以及 UVB+EGC 2mM/cm² (0.16%) 組，每組 5 隻，經過一星期的適應期後開始實驗。實驗先將配製好的試劑取出 300 μl 均勻塗抹於 C57BL/6 mice 的耳朵上，塗抹完等待約 30-60 分鐘使水分揮發後，將 C57BL/6 mice 放入 UVB 光照機器中，設定照射劑量為 100 mJ/cm²，照射完即完成一次實驗，每星期照射三次，實驗為期 8 週，在實驗期間每週秤量 C57BL/6 mice 體重，並於每月拍照記錄 C57BL/6 mice 耳朵皮膚之變化。實驗結束後，取其血液以及耳朵皮膚做分析。

2.5.4 皮膚樣品處理 (切片)

犧牲當天取下 C57BL/6 mice 耳朵的皮膚後，直接泡入 formol-alcohol 固定液中 (formalin : acetic acid : 70% alcohol = 1 : 1 : 20)，並於 24 小時後更換固定液，浸泡 48 小時。接著分別以 70% 酒精 2 小時、90% 酒精 2 小時、100% 酒精 24 小時進行脫水。再以二甲苯 (xylene) 置換酒精，每 24 小時換乾淨 xylene 浸泡兩天，之後將組織置於 58°C 環境，並依石蠟 (paraffin) : xylene = 1 : 1 比例浸泡 24 小時，石蠟 (paraffin) : xylene = 2 : 1 浸泡 24 小時，最後浸泡於全石蠟中，每 24 小時更換新石蠟，2~3 天後進行包埋。包埋時，將石蠟完全浸潤的組織置於模子中，加入溶化的石蠟蓋上包埋盒，放入 -20°C 冰箱中冷卻後除去模子即可。經由切片機切 5 μm 的厚度置於玻片上準備染色。

2.5.5 黑色素切片染色 (Fontana-Masson Stain)

本實驗利用商業套組 NovaUltra™ Fontana Masson Stain Kit 來分析皮膚組織中黑色素的生成量，其原理是利用硝酸銀可經黑色素作用還原為黑色的金屬銀之特性，藉以計算黑色素的生成量，此套組可以使黑色素呈現棕黑色，細胞核呈現粉紅色，細胞質為淡粉紅色。

實驗步驟如下：

- (1) 將切片好的玻片浸泡 xylene 10 分鐘兩次，再換成 100% 酒精 5 分鐘兩次，95% 及 70% 酒精各 1 分鐘一次。
- (2) 以二次水浸泡 3 分鐘三次後，將玻片放入已加溫至 56°C 的 FM Silver Nitrate Solution 1~2 小時。
- (3) 以二次水浸泡 3 分鐘三次，然後將玻片放入 Gold Chloride Solution 1 分鐘。
- (4) 以二次水浸泡 3 分鐘三次後，將玻片放入 5% Sodium Thiosulfate Solution 1 分鐘。
- (5) 以二次水浸泡 3 分鐘三次後，將玻片放入 Nuclear Fast Red solution 5 分鐘。
- (6) 以二次水浸泡 3 分鐘三次後，進行脫水。
- (7) 脫水：浸泡 95% 酒精 1 分鐘，再換成 100% 酒精 5 分鐘兩次，接著換 xylene 5 分鐘兩次
- (8) 封片

2.5.6 組織均質與蛋白純化

將老鼠犧牲後取組織 1.5 g 置於 50 ml 離心管中並加入 RIPA buffer 及蛋白酶抑制劑混合液 (100:1)，將離心管置於冰上用均質機研磨，避免研磨溫度過高而使蛋白活性遭受破壞。研磨完畢後將組織液分裝於 1.5 ml 離心管中，再以高速離心機離心 (4°C, 12000g, 10 分鐘)，取出上清液，存放於 -80 °C 冰箱。組織蛋白濃度定量方式利用商業套組 Pierce RBCA Protein Assay kit 進行檢測。

2.6 統計

實驗數據透過 Sigma Plot 10.0 軟體分析，以 means±S.D. 來表示，並利用 Student's t-test 統計方法來評估不同組別之間的差異。P < 0.01 表示具有顯著性差異。

結果、

3.1 LSE 對於 B16F0 細胞毒性之影響

以 B16F0 黑色素瘤細胞做為實驗細胞株，給予不同濃度的

LSE(0-25 $\mu\text{g/ml}$)分析 LSE 對 B16F0 細胞之毒性傷害。在處理不同劑量的 LSE 後，培養 48 小時，觀察其對於 B16F0 細胞存活率之影響。由細胞計數的結果顯示，當 LSE 劑量大於 25 $\mu\text{g/ml}$ 時，其細胞存活率約 73%，會對細胞造成顯著性的死亡(Fig. 1A)。因此，我們挑選 5、10、15 及 20 $\mu\text{g/ml}$ 等對於細胞較無毒殺性的濃度作為後續實驗之劑量。

此外，根據液相層析的實驗結果發現 EGC 為 LSE 主要的多酚成分。因此，本研究以 EGC 作為對照實驗組別，向 B16F0 細胞給予不同濃度的 EGC(0-25 μM)進行處理，培養 48 小時，發現 EGC 濃度為 20 μM 時細胞存活率為 81%(Fig. 1B)。所以，我們挑選較為安全之劑量進行後續的試驗。

3.2 LSE 對於 α -MSH 所誘發的黑色素生成量與酪胺酸酶活性之影響

我們分析 LSE 在不同劑量下對於黑色素生成作用之影響。對

B16F0 細胞株分別投以 LSE 濃度 5、10、15 或 20 $\mu\text{g/ml}$ ，與 1 μM 的 α -MSH 共同培養 48 小時，觀察其對於細胞黑色素生成量之影響。結果顯示，經 α -MSH 處理後，B16F0 細胞內黑色素含量與控制組相較，提升了約 159%；而給予了 LSE 後可抑制黑色素生成量，並且隨著劑量(5、10、15 和 20 $\mu\text{g/ml}$)越高，分別降低至 157.2%、138.8%、110.6%與 100%。由此可知，LSE 可以抑制黑色素生成 LSE 且存在著劑量依賴效應(dose-dependent) (Fig. 2A)。

EGC 作為 LSE 主要的多酚成分。過去的文獻指出，EGC 具有抑制黑色素生成之功能。Kazuomi Sato 等人以不同劑量(0-20 μM)的 EGC 對於黑色素瘤細胞進行細胞活性測試，其結果顯示在加入 EGC 五天後，最高劑量 20 μM 明顯的對細胞有毒殺作用[45]。因此，本實驗各別挑選了 5、10、15 以及 20 μM 進行試驗，檢驗在 48 小時處理之 EGC 降低 B16F0 細胞株黑色素合成之效果。由實驗結果可得知，EGC 在 20 μM 時雖可抑制細胞生長，但對細胞內黑色素生成量之影響並不明顯；而在 15 μM 時與誘導組相較降低至 129.7%，具有顯著的差異(Fig. 2B)。

酪胺酸酶作為黑色素合成量之限制速率的關鍵酵素，其含量與活性可作為黑色素生成指標。由上述的實驗結果，我們選擇了 LSE 10、15 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 與 EGC 15 μM 等濃度進行酪胺酸酶活性之測定。B16F0 細胞株經 α -MSH 處理後，細胞內酪胺酸酶活性與控制組相較增加至 200%，而給予了 LSE 或 EGC 後，酪胺酸酶活性倍抑制並呈現 dose-dependent 的關係性。在 LSE 加藥組 (10、15 和 20 $\mu\text{g/ml}$) 分別降低至 142.7%、125.3%與 87.6%。而 EGC (15 μM)之酪胺酸酶活性則降低至 158.8% (Fig. 2C)。

3.3 LSE 對於 α -MSH 所誘發酪胺酸酶其相關蛋白 (TRP-1、TRP-2) 等表現之影響

過去的研究顯示，酪胺酸酶、TRP-1 與 TRP-2 等酵素參與了黑色

素生成作用的路徑中，並扮演著重要的角色[2]。因此，我們利用 Western blotting 分析酪胺酸酶、TRP-1 與 TRP-2 等蛋白表現與 LSE 之間的關聯性。經 α -MSH 刺激誘導 48 小時後，B16F0 細胞內酪胺酸酶及 TRP-1 蛋白表現分別提升至控制組的 2 倍與 1.4 倍；而投予 LSE (10、15 和 20 $\mu\text{g/ml}$)後，酪胺酸酶表現下降至 1.5 倍、1.18 倍與 0.89 倍。TRP-1 表現降低至控制組的 1.26 倍、1.15 倍 1.13 倍。另 15 μM 的 EGC 其酪胺酸酶與 TRP-1 蛋白表現下降之控制組的 1.48 倍與 1.21 倍。反觀 α -MSH 單獨或合併處理 LSE 或 EGC 對於 TRP-2 蛋白表現並無任何顯著之影響(Fig. 3A)。

3.4 LSE 對於 α -MSH 所誘發酪胺酸酶及其相關蛋白 (TRP-1、TRP-2) 等與 mRNA 表現之影響

接著我們進一步藉由 Real-Time PCR 來分析酪胺酸酶、TRP-1

及 TRP-2 基因之 mRNA 表現情況。其結果顯示與 Western blotting 相仿，以 α -MSH 誘導 B16F0 細胞株產生黑色素後，酪胺酸酶及 TRP-1 之 mRNA 表現情況較控制組分別提升了 1.75 倍與 1.2 倍。而給予 LSE (10、15 和 20 $\mu\text{g/ml}$)後其酪胺酸酶 mRNA 表現情況降低了 1.49 倍、1.47 倍與 1.09 倍；TRP-1 mRNA 表現情況分別降至 0.69 倍、0.65 倍和 0.50 倍。15 μM 的 EGC 其酪胺酸酶與 TRP-1 mRNA 表現也各別下降到 1.57 倍與 0.83 倍 (Fig. 3B)。

綜觀上述實驗結果，我們證實 B16F0 細胞在經由 α -MSH 刺激可促進細胞內黑色素之生成量以及酪胺酸酶活性及表現。然而，藉由 Western blotting 與 mRNA 的實驗可得知 LSE 可以透過抑制黑色素合成之限制蛋白-酪胺酸酶與 TRP-1 的蛋白及基因層次的表現，進而顯著性的降低黑色素的產生。

3.5 LSE 對於 α -MSH 所誘發 MC1R/cAMP/PKA 訊息路徑之影響

我們進一步想探討在 B16F0 細胞株內，LSE 是藉由調控下列何種細胞傳遞途徑來達到降低黑色素生成之效果。過去文獻指出 α -MSH 與 MC1R 結合後，細胞質內的 cAMP 與 PKA 會被激活，造成黑色素之生成量增加。我們首先以 Western blotting 分析 LSE 對於 MC1R 蛋白質表現之影響。由 Fig. 4A 結果顯示，經 α -MSH 刺激後可誘導 MC1R 表現增加至控制組的 1.36 倍；而隨著 LSE 濃度越高(10、15 和 20 μ g/ml) 對於 MC1R 的抑制效果越明顯，MC1R 蛋白表現分別降至 1.08 倍、0.96 倍和 0.87 倍。而 15 μ M 的 EGC 其 MC1R 蛋白表現則減少至 1.03 倍。

我們以 Real-Time PCR 來分析 MC1R 基因之 mRNA 表現情況。探討 LSE 抑制 MC1R 蛋白表現是透過抑制 MC1R 合成途徑抑或是降低 MC1R 蛋白的表現。結果顯示誘導組基因表現情況顯著提昇為控制組的 1.15 倍，而給予 LSE 後其下降趨勢與 Western blotting 相仿(Fig. 4B)。

接著我們測定 LSE 對於 MC1R 下游細胞訊息傳遞分子 cAMP 之影響。我們利用 cAMP 商業套組分析細胞內 cAMP 濃度之變化。根據 Fig.4B 實驗結果顯示， α -MSH 能顯著性的提高了 B16F0 細胞株內 cAMP 的濃度；與控制組相較其 cAMP 的濃度上升到了 172.9%。而在投予 LSE(10、15 和 20 μ g/ml)後降低至 133.4%、106.8%和 101.5%

。15 μ M 的 EGC 其 cAMP 的濃度則減少至 138.1% (Fig. 4C)。

cAMP 磷酸化 PKA 後，會促使細胞質內 CREB 被激活而進入 MITF，造成酪胺酸酶活性及表現增加，黑色素合成量上升。因此，我們以 Western blotting 檢測細胞質內 p-PKA 之變化。由 Fig. 4D 實驗結果顯示 α -MSH 會誘發 PKA 的磷酸化蛋白表現，增加至控制組的 1.44 倍。在 LSE 劑量為 20 μ g/ml 時 p-PKA 的蛋白質表現具有顯著意義性的下降，減少至控制組之 1.21 倍。15 μ M 的 EGC 其 p-PKA 表現則下降至 1.2 倍。

我們推論在細胞內 LSE 可能是藉由抑制 MC1R 蛋白表現，減少 cAMP 濃度，進而降低了細胞質內 PKA 活化來達到減低黑色素生成之效果。

3.6 LSE 對於 α -MSH 所誘發黑色素生成路徑 MAPK pathway 之影響

另有研究指出，cAMP 除了藉由活化 PKA 以促進黑色素合成外，

還可能透過磷酸化而激活 MAPK 蛋白表現，使 MITF 走向降解之

途徑，達到黑色素生成之平衡目的[51]。因此，我們想深入探討 LSE 是否藉由影響 MAPK 蛋白之表現，進而抑制黑色素的產生。本實驗以 Western blotting 分析 LSE 對於 ERK、JNK 和 p38 MAPK 路徑相關蛋白表現之影響。Fig. 5 其結果顯示，LSE 以影響 p-p38 MAPK 表現最為顯著。p-p38 MAPK 經由 α -MSH 處理後會增加其表現量，與控制組相較提升了 1.25 倍。而給予 LSE(10、15 和 20 μ g/ml)會抑制 p-p38 MAPK 之表現，尤其是 LSE 濃度在 15 μ g/ml 時抑制效果最為明顯，減少至 1.05 倍。

因此，LSE 抑制黑色素之生成不僅僅是透過 p-PKA 訊息傳遞路徑，也會藉由影響 p-p38 MAPK 蛋白的表現，來達到降低黑色素合產生之目的。

3.7 LSE 對於 α -MSH 所誘發細胞核內 p-CREB 和 MITF 蛋白表現之影響

過去研究表示 α -MSH 可以藉由促進 p-PKA 磷酸化細胞質內的 CREB，磷酸化 CREB 為 MITF 之轉錄因子，其進入細胞核中，會激活 MITF 的表現，MITF 為酪胺酸酶之轉錄因子，進而增加酪胺酸酶的活性，提升了黑色素生成量。此外，Akihiro Tada 等人指出在 UVB 照射後，p-p38 會誘導 CREB 磷酸化[52]。而由上述實驗結果，我們已證實 LSE 可以降低細胞內 p-PKA 與 p-p38 的表現。我們進一步想探討 LSE 是否會抑制細胞核內 CREB 與 MITF 等轉錄因子之活化。

以 Western blotting 分析 LSE 對於細胞核內 CREB 和 MITF 表現的影響。Fig. 6A 結果顯示， α -MSH 顯著增加 p-CREB 和 MITF 的蛋白的表現，與控制組相比分別提高至 1.95 倍及 1.26 倍。而隨著 LSE 投予的劑量增加(10、15 和 20 $\mu\text{g/ml}$)，LSE 處理之 p-CREB 蛋白表現減少至控制組的 1.24 倍、1.21 倍及 1.01 倍。而 15 μM 的 EGC 其 p-CREB 在細胞核內的表現則降低之控制組的 1.15 倍。

LSE 之 MITF 蛋白核內表現情況也與 p-CREB 相仿，在最高劑量 20 $\mu\text{g/ml}$ 具有顯著抑制的 MITF 表現，減少至控制組 0.91 倍。而 15 μM 的 EGC 其 p-CREB 蛋白表現則降低之控制組的 1.09 倍。

3.8 LSE 對於 α -MSH 所誘發核內轉錄因子 MITF 和 CREB 與 DNA 結合能力之影響

由上述的實驗結果，我們推測 LSE 抑制黑色素合成是藉由干擾

MITF 與 CREB 的活性。因此，我們進一步分析轉錄因子 MITF 和 CREB 與 DNA 結合的能力，藉由 EMSA 試驗來印證 Western blotting 之結果。Fig. 6B 結果顯示，經由 α -MSH 誘導後 CREB 與 DNA 結合表現顯著增加至控制組之 1.18 倍。再投以 LSE(10、15 和 20 $\mu\text{g/ml}$)會抑制 CREB 與 DNA 的結合能力，LSE 濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ 會顯著減少至控制組的 0.93 倍。15 μM 的 EGC 其 CREB 與 DNA 的結合能力則降低至控制組的 1.02 倍。

另外，MITF 經由 α -MSH 誘導後顯著增加至控制組之 2.18 倍。而給予 LSE (10、15 和 20 $\mu\text{g/ml}$)會抑制 MITF 與 DNA 的結合能力，分別顯著減少至控制組的 1.57 倍、0.88 倍及 0.79 倍。在 15 μM 的 EGC 的組別中，其 MITF 與 DNA 的結合能力則降低至控制組的 1.27 倍(Fig.6 C)。

因此，LSE 藉由干擾細胞質內 MC1R/cAMP/PKA 路徑與 p38 MAPK 的活化，造成核內轉錄因子 CREB 與 MITF 的表現量與 DNA 結合能力下降，進而減少了黑色素的產生。

3.9 LSE、H89 和 SB203580 對於 α -MSH 所誘發酪胺酸酶 TRP-1 蛋白表現之影響

為了更加確認 LSE 抑制黑色素生成是透過減少 PKA 和 p38 的活

化，我們使用 PKA 的抑制劑 H89 和 p38 抑制劑 SB203580，觀察在抑制 PKA 和 p38 蛋白表現後，黑色素生成量和酪胺酸酶相關蛋白表現情況。

我們首先檢驗 LSE、H89 及 SB203580 是否可以抑制 PKA 與 p38 的磷酸化。由 Fig. 7A 的結果顯示 15 $\mu\text{g/ml}$ LSE 可以抑制經 α -MSH 誘導後 PKA 及 p38 的活化，而處理 H89 和 SB203580 後，兩者各別降低 PKA 和 p38 蛋白的表現。合併處理三者 LSE、H89 和 SB203580 則可發現，抑制 PKA 及 p38 表現至 0.41 倍和 0.79 倍，甚至低於控制組。

Fig. 7B 的結果顯示經 α -MSH 誘導後黑色素生成量與酪胺酸酶活性明顯高於控制組，而分別給予 15 $\mu\text{g/ml}$ LSE、10 μM H89/ml 及 5 $\mu\text{M/ml}$ SB203580 後，黑色素量與酪胺酸酶活性皆降低，而將 LSE 合併 H89 或 SB203580 發現以 LSE+H89 組顯著抑制了黑色素量與酪胺酸酶活性，降低至控制組的 101.1% 和 116.6%。以 Western blotting 分析酪胺酸酶和 TRP-1 蛋白表現，發現同時給予了 LSE、H89 和 SB203580 後，酪胺酸酶與 TRP-1 蛋白近乎完全失去表現，分別降低至控制組的 0.62 倍與 0.26 倍 (Fig. 7C)。

我們透過細胞核內 MITF 與 p-CREB 蛋白表現，探討 PKA 和 p38 是否會藉由影響核內蛋白的活化，進而降低黑色素的生成。Fig. 7D 的結果顯示無論是個別處理 LSE、H89 和 SB203580，或是合併處理，p-CREB 與 MITF 的表現皆會受到抑制。因此，我們進一步確認 LSE 是透過 PKA 和 p38 兩條路徑來降低黑色素的產生，並且主要是藉由 MC1R /cAMP /PKA 這條路徑。

3.10 LSE 對於 UVB 照射之 C57BL/6 小鼠黑色素生成作用的影響

在細胞實驗中發現 LSE 的處理可以抑制經 α -MSH 誘導後所產生

的黑色素，且可以抑制酪胺酸酶與 TRP-1 的蛋白表現量，因此，我們進一步探討 LSE 的處理是否也會對 UVB 照射後的動物皮膚具有抑制黑色素生成。本實驗對象為 C57BL/6 小鼠，將實驗分為五組，分別是 control 組、UVB 組、UVB+ LSE 低劑量(1.25 mg /cm²)組、 UVB+ LSE 高劑量(2.5 mg /cm²)組和 EGC(2 mM /cm²)組，實驗開始先將萃取物均勻塗抹於 C57BL/6 mice 耳朵的皮膚上，塗抹完等待約 30-60

分鐘使水分揮發乾後，再以 100 mJ/cm² UVB 曝照，八週後犧牲取得耳朵皮膚，再利用 Fontana-Masson staining 染色分析黑色素的生成量，黑色部分代表黑色素之分佈(Fig. 8A)。

由 Fig. 8B 檢測黑色素生成量的結果顯示，UVB 照射會誘發 C57BL/6 小鼠耳朵的皮膚黑色素的產生，與控制組相比顯著增加至 194%，而萃取物 LSE 會降低黑色素的產量，LSE 在 1.25 mg/cm² 和 2.5 mg/cm² 之劑量，其黑色素分別顯著降低至控制組的 132.9%及 113.3%，而 EGC(2 mM/cm²)組黑色素的生成量會降低至 129.4%。

3.11 LSE 對於 UVB 照射之 C57BL/6 小鼠酪胺酶、TRP-1 與 TRP-2 蛋白表現之影響

接著透過 Western blotting 分析酪胺酸酶、TRP-1 與 TRP-2 蛋白表現，探討給予 LSE 是否也可抑制 UVB 照射所誘發黑色素的生成。由 Fig. 8C 實驗結果可知，經 UVB 曝照後與控制組相比酪胺酸酶和 TRP-1 顯著增加至控制組的 2.55 倍和 1.66 倍，UVB+LSE 低劑量(1.25 mg/cm²)組及 UVB+LSE 高劑量(2.5 mg/cm²)組與控制組相比，兩組的酪胺酸酶表現量分別顯著降低至 1.54 倍和 1.52 倍；UVB+ EGC 組(2 mM/cm²)組則降低至控制組的 1.63 倍。另外，UVB+ LSE 低劑量(1.25 mg/cm²)組及 UVB +LSE 高劑量(2.5 mg/cm²)組與控制組相比，兩組的 TRP-1 表現量分別顯著降低至 1.21 倍和 0.97 倍；UVB+ EGC(2 mM/cm²)組則降低至控制組的 0.81 倍。在動物實驗中 TRP-2 蛋白的表現情況與細胞實驗結果相同，並無顯著差異性。

3.12 LSE 對於 UVB 照射之 C57BL/6 小鼠 p-PKA 與 p-p38 蛋白表現之影響

我們進一步想確認 LSE 在 C57BL/6 小鼠體內是否也與體外試驗

B16F0 細胞相同，藉由影響磷酸化 PKA 與 p38 的表現，來達到抑制黑色素生成之效果。Fig. 8D 結果顯示 UVB 曝照過後，p-PKA 和 p-p38 的表現上升至控制組的 1.4 倍與 1.1 倍。在預先塗抹 LSE 後經 UVB 照射，高劑量組磷酸化 PKA 的表現會降低至 1.04 倍。p-p38 則是在低劑量 UVB+ LSE 低劑量(1.25 mg/cm²)組具有明顯的抑制效果。不論是 PKA 或是 p38 之磷酸化分細結果，UVB+ EGC(2 mM/cm²)組表現量皆顯著性的減少。

綜觀上述結果可知，預先給予 LSE 有助於減少照射 UVB 所導致的黑色素之生成，且其是透過降低 PKA 和 p38 的活化進而抑制酪胺酸酶與 TRP-1 蛋白的表現。

討論、

目前市面上充斥著琳瑯滿目的美白護膚產品中，可以一窺「美白」的課題深受市場所重視。膚色主要會受到賀爾蒙、發炎因子、基因、紫外線所影響造成膚色暗沉、黑斑與雀斑等問題，而當中引發黑色素色素沉澱又以紫外線照射影響最甚。黑色素為皮膚天然之防護機制，在正常的情況之下，黑色素會隨著皮膚新陳代謝而淡化，但倘若紫外線照射到皮膚上，則又會立即產生大量的黑色素以保護皮膚細胞與 DNA 等免於受損傷。

「反璞歸真，回歸自然」是近年化妝品市場發展方向，宣稱產品擁有溫和、低過敏性與天然與的成分成為市場主流。而衛生署許可之合法美白添加物，都有其缺點，如：麴酸具有刺激性會導致皮膚過敏，維生素 C 對於人體較無害，但其穩定性較差，容易受到破壞。因此，有許多的研究人員投入於尋找可以減少黑色素合成功能之中藥美白成分。蓮蓬作為蓮花孕育蓮子之子房，為蓮花不可食之部分。有實驗證實蓮蓬具有抗凝血、抗氧化、抗老化等功用。蓮蓬水萃物(Lotus seedpod extract, LSE)富含多酚等功能性成分，而多酚的成分又以表沒食子兒(epigallocatechin, EGC)含量最多，達 11.27%，其次為兒茶素(catechin)、原花青素(procyanidin-B2)與香豆酸(p-coumaric acid)。Kazuomi Sato 等人以黑色素瘤細胞株作為實驗細胞株，同時給予 EGC 和 α -MSH，五天後檢測其黑色素生成量，發現 EGC 具有抑制色素合成的效果[47]。本研究以 EGC 作為對照物質，證實 EGC 可能透過調控酪胺酸酶的基因轉錄作用，進而調節酪胺酸酶的表現 (Fig.2)。

本篇研究所使用 LSE 之細胞劑量為 10、15 和 20 μ g/ml 藉由 HPLC 實驗結果分析 LSE 內 EGC 之含量，推算出細胞劑量內所含 EGC 分別為 5.38 μ M、7.1 μ M 和 8.9 μ M。而我們參考過去文獻 EGC 抑制

黑色素之劑量，選擇以濃度 15 μM 進行細胞處理，相當於 LSE 濃度為 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時所含 EGC 的量，遠遠高於本實驗所採用 LSE 之細胞劑量。另外，先前的研究指出兒茶素、原花青素與香豆酸等成分也可以減少黑色素的合成[47,53,54,55]。因此，我們推測蓮蓬抑制黑色素生成作用，可能透過多種化合物間的相互作用，共同降低黑色素的產生。

酪胺酸酶是一種氧化酵素，銅離子為其催化酵素反應之活性中心，在黑色素生成過程中扮演著速率限制步驟的關鍵角色。過去許多的研究已證實抑制酪胺酸酶、TRP-1 與 TRP-2 等蛋白的表現，或是與銅離子進行螯合作用即可減少黑色素的生成；如同市面上的麴酸(Kojic acid)[56]和鞣花酸(Ellagic Acid)[57]等即具備這些功能性。然而，也有文獻指出 TRP-1、TRP-2 與酪胺酸酶三者不一定會共同調控黑色素的生成，黑色素的產生主要還是透過酪胺酸酶的活性的所調節。本研究發現在細胞實驗中，LSE 可以抑制由 $\alpha\text{-MSH}$ 所誘發之 Tyrosinase 和 TRP-1 蛋白及 mRNA 的表現。但 LSE 對於 TRP-2 則沒有什麼影響。

此外，在動物實驗中我們參考過去文獻 UVB 照射劑量 100 mJ/cm^2 [58,59]，以細胞實驗 LSE 所採用的 10 與 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之濃度，除以細胞培養皿之表面積，推算出每個 B16F0 細胞株可能接收到之 LSE 的劑量，再放大至一千倍，分別為 LSE 1.25 mg/cm^2 和 2.5 mg/cm^2 及 EGC 2 mM/cm^2 。在本研究動物實驗中 LSE 和 EGC 以此濃度塗抹在 C57BL/6 小鼠的耳朵上，藉由 UVB 照射使其產生黑色素後，透過組織切片、Western blotting 與黑色素量進行測定，檢視 LSE 抑制黑色素生成之效果。發現 LSE 可以透過降低酪胺酸酶和 TRP-1 蛋白表現，而降低了黑色素的產生。此外，透過細胞實驗我們證實 LSE 抑制黑色素產生是由抑制 PKA 和 p38 的表現，而在動物實驗也可以發現相同的結果。因此，我們由 in vivo 和 in vitro 實驗確認 LSE 抑制黑色素產量主要是透過減少 PKA 和 p38 的活性而影響酪胺酸酶與 TRP-1 的表現。

過去許多的研究證實，UVB 照射會誘導角質細胞產生 $\alpha\text{-MSH}$ ，進而增加 MC1R 的活性，促進 cAMP 濃度上升，激活 PKA，使細胞質的 CREB 被磷酸化後進入細胞核內活化 MITF。而此路徑在黑色素生成路徑中是最被確認的一條[20,21,60,61,62]。由 MC1R/cAMP/PKA pathway 的實驗結果可發現，給予 $\alpha\text{-MSH}$ 後，MC1R 與 cAMP 的表現有顯著上升的情況，而隨著 LSE 投以 B16F0 細胞株的劑量越大，兩者表現也隨之受到抑制越明顯。但依照 Western blotting 中 LSE 對與 p-PKA 表現的影響結果來看，在 LSE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 最高劑量組其抑制效果相較其上游 MC1R 與 cAMP 的表現情況不明顯。其原因可能為 cAMP 不僅僅可以活化 PKA 也影響了 MAPK 蛋白的活性[25]。

在 UV 照射刺激下， $\alpha\text{-MSH}$ 會受刺激產生真黑色素，因此，可稱其為黑色素的促進劑。而刺鼠信號肽 (Agouti Signalling Peptide, ASP) 可稱之為反向促進劑，在受到刺激後會產生褐黑素。過去文獻指出 ASP 與癌症的發生以及肥胖相關；然而，在黑色素細胞當中 ASP 具有抑制 MC1R 蛋白表現的功能[71,72,73]。在本篇研究中，發現 LSE 會影響 MC1R 的蛋白表現，其作用機制是否與 ASP 相同為 $\alpha\text{-MSH}$ 的競爭性抑制劑，但卻不會增加癌症的敏感性，還有待進一步的釐清。

MAPK 路徑在先前的研究中被發現到與黑色素生成也有所關聯。當陽光照射下，經 UVB 誘導所產生的 $\alpha\text{-MSH}$ 活化 cAMP 同時，也可能激活 MAPK 以啟動 MITF 走向降解的途徑，使黑色素生成能達到平衡之目的[51]。MAPK 成員包括 ERK、JNK 及 p38；過去有許多的文獻說明倘若 ERK 路徑活化，則會降低轉錄因子 MITF 的表現，減少酪胺酸酶、TRP-1 和 TRP-2 等與黑色素合成相關酵素之轉錄，降低黑色素的生成量[25]。而活化 p38 MAPK 則會促進 CREB 與 MITF 磷酸化，增加了黑色素的產生[26]。因此，本研究探討 LSE 對於 MAPK 路徑活化之影響。根據實驗結果顯示，LSE 主要是降低 p38 MAPK 的表現，對於 ERK 或 JNK 則不影響。

在上述研究中我們已經確認 LSE 是藉由降低 PKA 和 p38 蛋白表現來抑制黑色素的產生；為了探討 LSE 主要是藉由經由何種路徑來抑制黑色素生成，我們參考過去文獻 PKA 抑制劑(H89)和 p38 抑制 (SB203580)所使用的劑量[63,64]。皆以 $\alpha\text{-MSH}$ 誘導產生黑色素，不論是個別處理 H89 與 SB203580，

或是合併處理三者，細胞核內 MITF 和 p-CREB 蛋白表現、黑色素生成量與酪胺酸酶活性皆會受到抑制。

研究指出 CREB 為 MITF 之轉錄因子，而 MITF 為酪胺酸酶之轉錄因子，兩者在細胞核內被磷酸化後增加酪胺酸酶的活性，進而促進了黑色素生成。由 Fig.6 之結果，LSE 可能可以抑制 p-CREB 和 MITF 的表現，我們進一步透過 DNA 轉錄活性之結果來印證此項發現，以確認 LSE 在透過抑制 CREB 的磷酸化以及 MITF 的磷酸化或降解使得酪胺酸酶的表現降低，黑素合成量減少。

有趣的是，在先前細胞實驗中 EGC 對於酪胺酸酶和 TRP-1 活性之檢驗結果，可觀察到 15 μ M EGC 降低酪胺酸酶和 TRP-1 活性表現之效果介於 LSE 濃度 10-15 μ g/ml 之間。然而，由 Western blotting 中 EGC 對於 p-PKA 表現的影響結果可發現到 p-PKA 具有顯著被抑制的效果，而這樣的結果同樣可被發現在體內試驗中。此外，在 p-CREB 和 MITF 蛋白的表現情況與黑色素生成量的調控情形有些許差異性。我們推論 MITF 不僅僅是黑色素細胞生長、分化及色素生成的主要調節蛋白，也在黑色素細胞惡化成黑色素瘤、黑色素瘤細胞發展及轉移扮演重要的角色。過去研究指出 MAPK 活化 MITF 可能會使黑色素瘤細胞走向細胞凋亡、轉移、黑色素生成等路徑[65,66,67]。Sihnh 等人亦指出兒茶素可以降低黑色素瘤的侵襲轉移作用[68]。因此，EGC 對於黑色素瘤細胞的影響仍須進一步做釐清。

總而言之，本篇研究證實，在細胞實驗當中，LSE 可以抑制 MC1R 的表現，影響 α -MSH 所刺激之黑色素生成訊息傳遞路徑，造成酪胺酸酶表現量降低，黑色生成減少。此外，動物實驗中也證實 LSE 可以降低長期暴露於 UVB 下 C57BL/6 小鼠之皮膚色素沉澱。因此，LSE 具有發展為美白化妝品之潛力。

參考文獻、

1. SLOMINSKI A., WORTSMAN J. Neuroendocrinology of the skin, *Endocrine reviews* 2000,21, 457-487.
2. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M: Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol.* 2000,35,307-16.
3. D'Orazio, J.Jarrett, S. Amaro-Ortiz, A. Scott, T., UV Radiation and the Skin. *International journal of molecular sciences* 2013, 14, 12222-12248.
4. Naylor EC, Watson RE, Sherratt MJ: Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas.* 2011,69,249-56.
5. Gosline J, Lillie M, Carrington E, Guerette P, Ortlepp C, Savage K. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002, 357,121-32.
6. CICHOREK M., WACHULSKA M., STASIEWICZ A., TYMINSKA A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy dermatologii i alergologii* 2013,30, 30-41.
7. Gilchrist BA: Photoaging. *J Invest Dermatol.* 2013, 133,E2-6.
8. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci.* 2002,973,31-43.
9. CHAKRABORTY A. K., FUNASAKA Y., SLOMINSKI A., BOLOGNIA J., SODI S., ICHIHASHI M. et al. UV light and MSH receptors, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999,885,100-116.
10. Videira, I. F. d. S.; Moura, D. F. L.; Magina, S. B. L. M. V., Mechanisms regulating melanogenesis*. *Anais brasileiros de dermatologia* 2013, 88, 76-83.
11. SEIJI, M.; FITZPATRICK, T. B., The reciprocal relationship between melanization and tyrosinase activity in melanosomes (melanin granules). *Journal of biochemistry* 1961, 49, 700-706.
12. COSTIN G. E., HEARING V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2007: 21: 976-994.

13. Slominski, A.; Tobin, D. J.; Shibahara, S.; Wortsman, J., Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews* 2004, 84, 1155-1228.
14. Bohm, M.; Luger, T. A.; Tobin, D. J.; Garcia-Borrón, J. C., Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *The Journal of investigative dermatology* 2006, 126, 1966-75.
15. Garcia-Borrón, J. C.; Abdel-Malek, Z.; Jimenez-Cervantes, C., MC1R, the cAMP pathway and the response to solar UV: Extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment cell & melanoma research* 2014.
16. Naysmith, L.; Waterston, K.; Ha, T.; Flanagan, N.; Bisset, Y.; Ray, A.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Rees, J. L., Quantitative measures of the effect of the melanocortin 1 receptor on human pigmentation status. *The Journal of investigative dermatology* 2004, 122, 423-8.
17. Geschwind, H., Change in hair color in mice induced by injection of alpha-MSH. *Endocrinology* 1966, 79, 1165-7
18. Sawyer, T. K.; Hruby, V. J.; Wilkes, B. C.; Draelos, M. T.; Hadley, M. E.; Bergsneider, M., Comparative biological activities of highly potent active-site analogues of alpha-melanotropin. *Journal of medicinal chemistry* 1982, 25, 1022-7.
19. Tobin D, Thody AJ: The superoxide anion may mediate short- but not long-term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. *Exp Dermatol* 1994,99-105.
20. Suzuki, I.; Cone, R. D.; Im, S.; Nordlund, J.; Abdel-Malek, Z. A., Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 1996, 137 , 1627-33.
21. Pawelek, J.; Wong, G.; Sansone, M.; Morowitz, J., Molecular biology of pigment cells. *Molecular controls in mammalian pigmentation. The Yale journal of biology and medicine* 1973, 46 , 430.
22. Bertolotto, C.; Abbe, P.; Hemesath, T. J.; Bille, K.; Fisher, D. E.; Ortonne, J.-P.; Ballotti, R., Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *The Journal of cell biology* 1998, 142 , 827-835.
23. Levy, C.; Khaled, M.; Fisher, D. E., MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine* 2006, 12 , 406-14.
24. Murray, A. J., Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science signaling* 2008, 1 , re4.
25. 盧妍馨. 皮膚黑色素生成調控之研究. 國立臺南大學, 台南市, 2012
26. Mansky, K.C.; Sankar, U.; Han, J.; Ostrowski, M.C., Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *The Journal of biological chemistry* 2002, 277 , 11077-83.
27. Bertolotto, C.; Abbe, P.; Hemesath, T. J.; Bille, K.; Fisher, D. E.; Ortonne, J.-P.; Ballotti, R., Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *The Journal of cell biology* 1998, 142 , 827-835.
28. Corre, S.; Galibert, M. D., Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 2005, 18, 337-48.
29. Galibert, M. D.; Carreira, S.; Goding, C. R., The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced tyrosinase expression. *The EMBO journal* 2001, 20 , 5022-5031.

30. Smalley, K.; Eisen, T., The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS letters* 2000, 476 (3), 198-202.
31. Hata, K.; Hori, K.; Takahashi, S., Role of p38 MAPK in lupeol-induced B16 2F2 mouse melanoma cell differentiation. *Journal of biochemistry* 2003, 134 , 441-445.
32. Cabanes, J.; Chazarra, S.; Garcia-Carmona, F., Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1994, 46 , 982-985.
33. Maeda, K.; Fukuda, M., Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1996, 276 , 765-9.
34. Denton, C. R.; Lerner, A. B.; Fitzpatrick, T. B., Inhibition of melanin formation by chemical agents. *Journal of Investigative Dermatology* 1952, 18 , 119-135.
35. Choi, Y. K.; Rho, Y. K.; Yoo, K. H.; Lim, Y. Y.; Li, K.; Kim, B. J.; Seo, S. J.; Kim, M. N.; Hong, C. K.; Kim, D. S., Effects of vitamin C vs. multivitamin on melanogenesis: comparative study in vitro and in vivo. *International journal of dermatology* 2010, 49 , 218-226.
36. Draelos, Z. D., Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatologic Therapy* 2007, 20 , 308-313.
37. 李季螢. 荷葉乙醇萃取物對動脈粥狀硬化早期發展之影響. 國立臺灣大學, 台北市, 2004.
38. 黃婷婉. 中草藥應用於美白化粧品之探討. 嘉南藥理科技大學, 台南市, 2010.
39. 林韋帆. 使用高效能液相層析法分析洛神葉、蓮蓬和石蓮花中多酚類化合物. 中華醫事科技大學, 台南市, 2012.
40. Wu, Q.; Chen, H.; Lv, Z.; Li, S.; Hu, B.; Guan, Y.; Xie, B.; Sun, Z., Oligomeric procyanidins of lotus seedpod inhibits the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food chemistry* 2013, 138 , 1493-502.
41. Xu, J.; Rong, S.; Xie, B.; Sun, Z.; Zhang, L.; Wu, H.; Yao, P.; Hao, L.; Liu, L., Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate age-related antioxidant deficit in aged rats. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 2010, 65 , 236-41.
42. Gong, Y.; Liu, L.; Xie, B.; Liao, Y.; Yang, E.; Sun, Z., Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Behavioural brain research* 2008, 194 (1), 100-7
43. Xu, J.; Rong, S.; Xie, B.; Sun, Z.; Zhang, L.; Wu, H.; Yao, P.; Zhang, Y.; Liu, L., Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate scopolamine-induced memory impairment in mice. *Phytotherapy research : PTR* 2009, 23 (12), 1742-7.
44. Duan, Y.; Zhang, H.; Xie, B.; Yan, Y.; Li, J.; Xu, F.; Qin, Y., Whole body radioprotective activity of an acetone-water extract from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. seedpod. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2010, 48 (12), 3374-84.
45. 呂世樹. 洛神葉萃取物抑制紫外線 B 誘發人類真皮層纖維母細胞基質金屬蛋白酶表現之影響. 中山醫學大學, 台中市, 2013.
46. Vergote, D.; Cren-Olivé, C.; Chopin, V.; Toillon, R.-A.; Rolando, C.; Hondermarck, H.; Le Bourhis, X., (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts. *Breast cancer research and treatment* 2002, 76, 195-201.

47. Sato, K.; Toriyama, M., Depigmenting effect of catechins. *Molecules* 2009, 14, 4425-4432.
48. Smith, and Q. Dou. Green tea polyphenol epigallocatechin inhibits DNA replication and consequently induces leukemia cell apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine International Journal of Molecular Medicine* ,2001,645-652.
49. Park SY, Jin ML, Kim YH, Kim Y, Lee SJ: Aromatic-turmerone inhibits alpha-MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. *Arch Dermatol Res* 2011, 303,737-744.
50. Shen T, Heo SI, Wang MH: Involvement of the p38 MAPK and ERK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of methyl 3,5-dicaffeoyl quinate in B16F10 mouse melanoma cells. *Chem Biol Interact* 2012, 199,106-111.
51. Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clement M, Lallemand D, Ortonne JP, Ballotti R: Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem* 1995, 270,24315-24320.
52. Tada, A.; Pereira, E.; Beitner-Johnson, D.; Kavanagh, R.; Abdel-Malek, Z. A., Mitogen-and ultraviolet-B-induced signaling pathways in normal human melanocytes. *Journal of investigative dermatology* 2002, 118 , 316-322.
53. An, S.; Lee, S.; Choi, S.; Moon, S. W.; Boo, Y., p-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quepaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by α -melanocyte stimulating hormone. *British Journal of Dermatology* 2008, 159 , 292-299.
54. An, S. M.; Koh, J. S.; Boo, Y. C., p-coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity in vitro but also melanogenesis in cells exposed to UVB. *Phytotherapy research* 2010, 24 , 1175-1180.
55. Shoji, T.; Masumoto, S.; Moriichi, N.; Kobori, M.; Kanda, T.; Shinmoto, H.; Tsushida, T., Procyanidin trimers to pentamers fractionated from apple inhibit melanogenesis in B16 mouse melanoma cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 2005, 53, 6105-11.
56. Saghaie, L.; Pourfarzam, M.; Fassihi, A.; Sartippour, B., Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. *Research in pharmaceutical sciences* 2013, 8 , 233-42.
57. Shimogaki H, Tanaka Y, Tamai H, Masuda M: In vitro and in vivo evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition. *Int J Cosmet Sci* 2000, 22,291-303
58. Kwon, O. S.; Jung, S. H.; Yang, B. S., Topical administration of manuka oil prevents UV-B irradiation-induced cutaneous photoaging in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 2013.
59. Choi, Y. J.; Uehara, Y.; Park, J. Y.; Chung, K. W.; Ha, Y. M.; Kim, J. M.; Song, Y. M.; Chun, P.; Park, J. W.; Moon, H. R., Suppression of melanogenesis by a newly synthesized compound, MHY966 via the nitric oxide/protein kinase G signaling pathway in murine skin. *Journal of dermatological science* 2012, 68, 164-17
60. Lee, C. S.; Jang, W. H.; Park, M.; Jung, K.; Baek, H. S.; Joo, Y. H.; Park, Y. H.; Lim, K. M., A novel adamantyl benzylbenzamide derivative, AP736, suppresses melanogenesis through the inhibition of cAMP-PKA-CREB-activated microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase expression. *Experimental dermatology* 2013, 22, 762-764.
61. Tsang, T.-F.; Ye, Y.; Tai, W. C.-S.; Chou, G.-X.; Leung, A. K.-M.; Yu, Z.-L.; Hsiao, W.-L. W., Inhibition of the p38 and PKA signaling pathways is associated with the anti-melanogenic activity of Qian-wang-hong-bai-san, a Chinese herbal formula, in B16 cells. *Journal of ethnopharmacology* 2012, 141 , 622-628.
62. 林菁薇. 洛神葉萃取物抑制黑色素生成作用之研究. 中山醫學大學, 台中市, 2013.

63. Bizzozero, L.; Cazzato, D.; Cervia, D.; Assi, E.; Simbari, F.; Pagni, F.; De Palma, C.; Monno, A.; Verdelli, C.; Querini, P. R.; Russo, V.; Clementi, E.; Perrotta, C., Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphtalmia-associated transcription factor signalling pathway. *Cell death and differentiation* 2014, 21 , 507-20.
64. Smalley, K.; Eisen, T., Differentiation of human melanoma cells through p38 MAP kinase is associated with decreased retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle arrest. *Melanoma research* 2002, 12 , 187-192.
65. Estrada, Y.; Dong, J.; Ossowski, L., Positive crosstalk between ERK and p38 in melanoma stimulates migration and in vivo proliferation. *Pigment cell & melanoma research* 2009, 22 , 66-76.
66. Singh, T.; Katiyar, S. K., Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. *PloS one* 2011, 6 , e25224.
67. Zhou, J.; Song, J.; Ping, F.; Shang, J., Enhancement of the p38 MAPK and PKA signaling pathways is associated with the pro-melanogenic activity of Interleukin 33 in primary melanocytes. *Journal of dermatological science* 2014, 73 , 110-116.
68. Zhou, J.; Shang, J.; Ping, F.; Zhao, G., Alcohol extract from *Vernoniaanthelmintica* willd seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes. *Journal of ethnopharmacology* 2012, 143 , 639-647.
69. Wellbrock, C.; Rana, S.; Paterson, H.; Pickersgill, H.; Brummelkamp, T.; Marais, R., Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PloS one* 2008, 3, e2734.
70. Zhao, X.; Fiske, B.; Kawakami, A.; Li, J.; Fisher, D. E., Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase. *Nat Commun* 2011, 2, 414.
71. Swope, V. B.; Jameson, J. A.; McFarland, K. L.; Supp, D. M.; Miller, W. E.; McGraw, D. W.; Patel, M. A.; Nix, M. A.; Millhauser, G. L.; Babcock, G. F.; Abdel-Malek, Z. A., Defining MC1R regulation in human melanocytes by its agonist alpha-melanocortin and antagonists agouti signaling protein and beta-defensin 3. *The Journal of investigative dermatology* 2012, 132, 2255-62.
72. Kwon, H. Y.; Bultman, S. J.; Löffler, C.; Chen, W.-J.; Furdon, P. J.; Powell, J. G.; Usala, A.-L.; Wilkison, W.; Hansmann, I.; Woychik, R. P., Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994, 91, 9760-9764.
73. McNulty, J. C.; Jackson, P. J.; Thompson, D. A.; Chai, B.; Gantz, I.; Barsh, G. S.; Dawson, P. E.; Millhauser, G. L., Structures of the agouti signaling protein. *Journal of molecular biology* 2005, 346, 1059-1070.

附表及附圖、

Figure 1

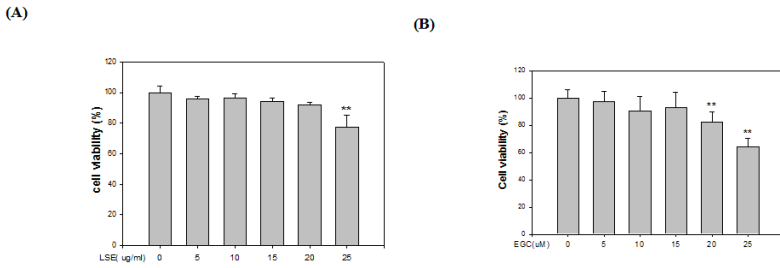


Figure 1. Effect of LSE or EGC on B16F0 cell viability. B16F0 cells were treated with various concentrations of (A) LSE (0~25 µg/ml) and (B) EGC(0~25 µM) for 48h. The number of cells was counted by trypan blue dye exclusion assay. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments. *p < 0.01, **p < 0.005 compared with the control group.

Figure 2

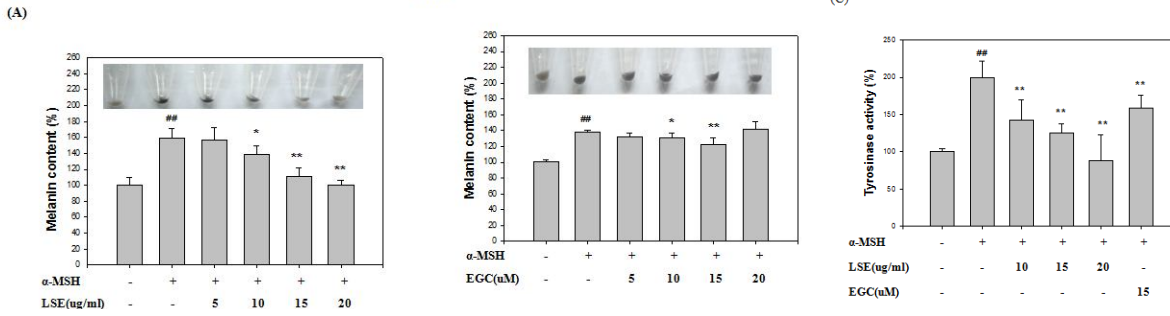


Figure 2. Effect of LSE or EGC on α-MSH-induced melanogenesis and tyrosinase activity in B16F0 melanoma cells. B16F0 cells were stimulated with α-MSH (1 µM) and treated with various concentrations (5, 10, 15, 20 µg/ml) of LSE (A) concentrations (5, 10, 15, 20 µM/ml) of EGC (B) for 48h. The Cell pellets were harvested and photographed, and then treated with 1 M NaOH at 80°C for 1hr to measure the melanin contents. (C) Cell pellets were processed for the determination of tyrosinase activity. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments. #p < 0.01, ## P < 0.005, significant increase compared with the control. *P < 0.01 ; ** P < 0.005, significant decrease compared with the α -MSH group.

Figure 3

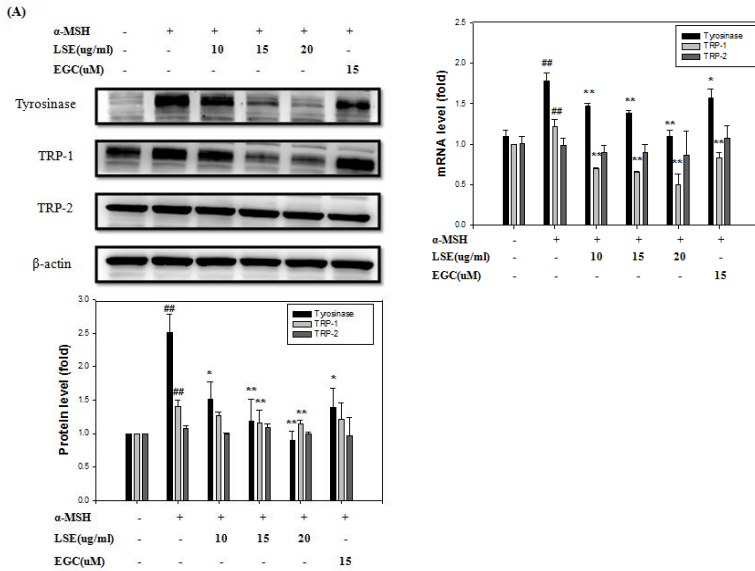


Figure 3. Effect of LSE and EGC on α-MSH-induced tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 protein expression in B16F0 cells. B16F0 cells were stimulated with α-MSH (1 µM) and treated with various concentrations (10, 15, 20 µg/ml) of LSE or EGC (15 µM/ml) for 48 h. (A) Tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 proteins were analyzed by Western blotting. β-actin, served as internal control. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments. (B) Total cellular mRNA was analyzed by real-time PCR for tyrosinase, TRP-1, and TRP-2. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments and the significant difference was established at # p < 0.01, ## P < 0.005, significant increase compared with the control. * P < 0.01 ; ** P < 0.005, significant decrease compared with the α-MSH group.

Figure 4

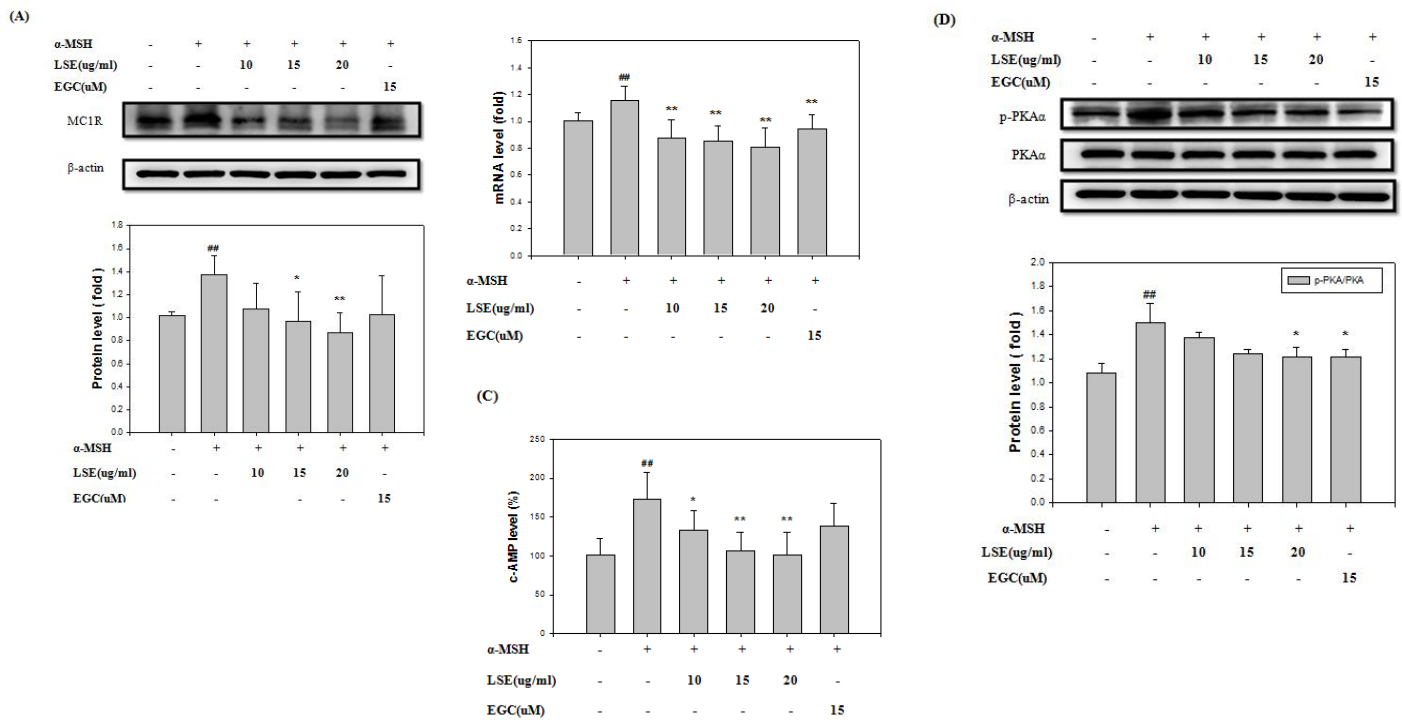


Figure 4. Effect of LSE and EGC on α -MSH-stimulated MC1R/c-AMP/PKA signaling pathway in B16F0 cells. Cells were stimulated with α -MSH (1 μ M) and the indicated various concentrations of LSE (10, 15, 20 μ g/ml) and EGC (15 μ M) for 48 hr. (A) MC1R protein was analyzed by Western blotting. β -actin, served as an internal control of membrane. (B) Total cellular mRNA was analyzed by real-time PCR for MC1R. (C) The concentration of cellular c-AMP was determined using a cAMP immunoassay kit. (D) p-PKA α and PKA α proteins were analyzed by Western blotting. β -actin, served as internal control. The results were represented the mean \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.01$, ## $P < 0.005$, significant increase compared with the control. * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$, significant decrease compared with the α -MSH group.

Figure 5

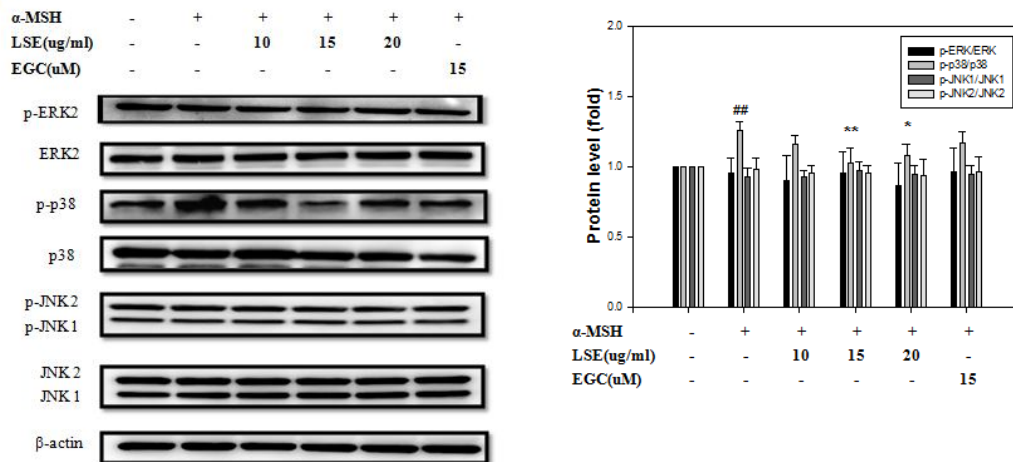


Figure 5. Effect of LSE and EGC on α -MSH-induced MAPK pathway in B16F0 cells. B16F0 cells were stimulated with α -MSH (1 μ M) and treated with various concentrations (10, 15, 20 μ g/ml) of LSE for 48h. The MAPK Pathway proteins were analyzed by Western blotting. β -actin, served as internal control. The results were represented the mean \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.01$, ## $P < 0.005$, significant increase compared with the control. * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$, significant decrease compared with the α -MSH group.

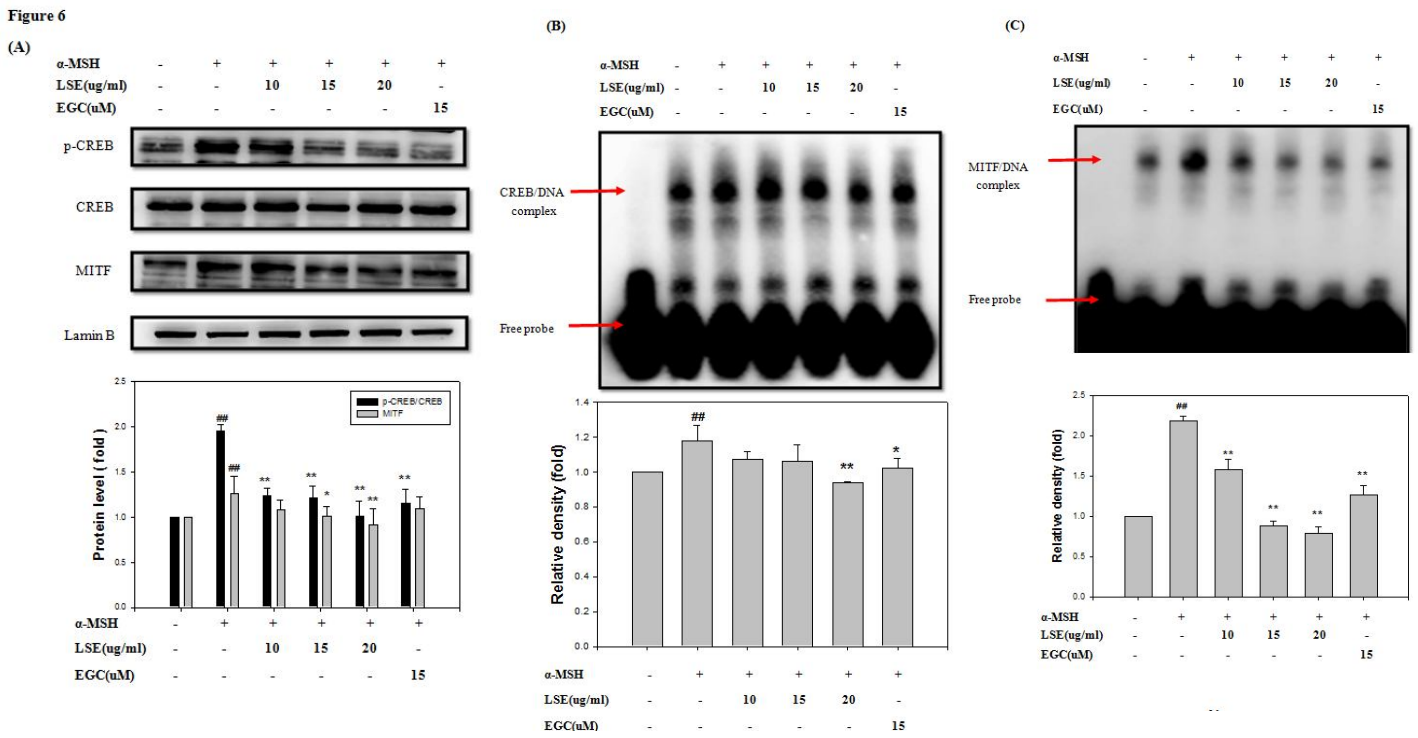
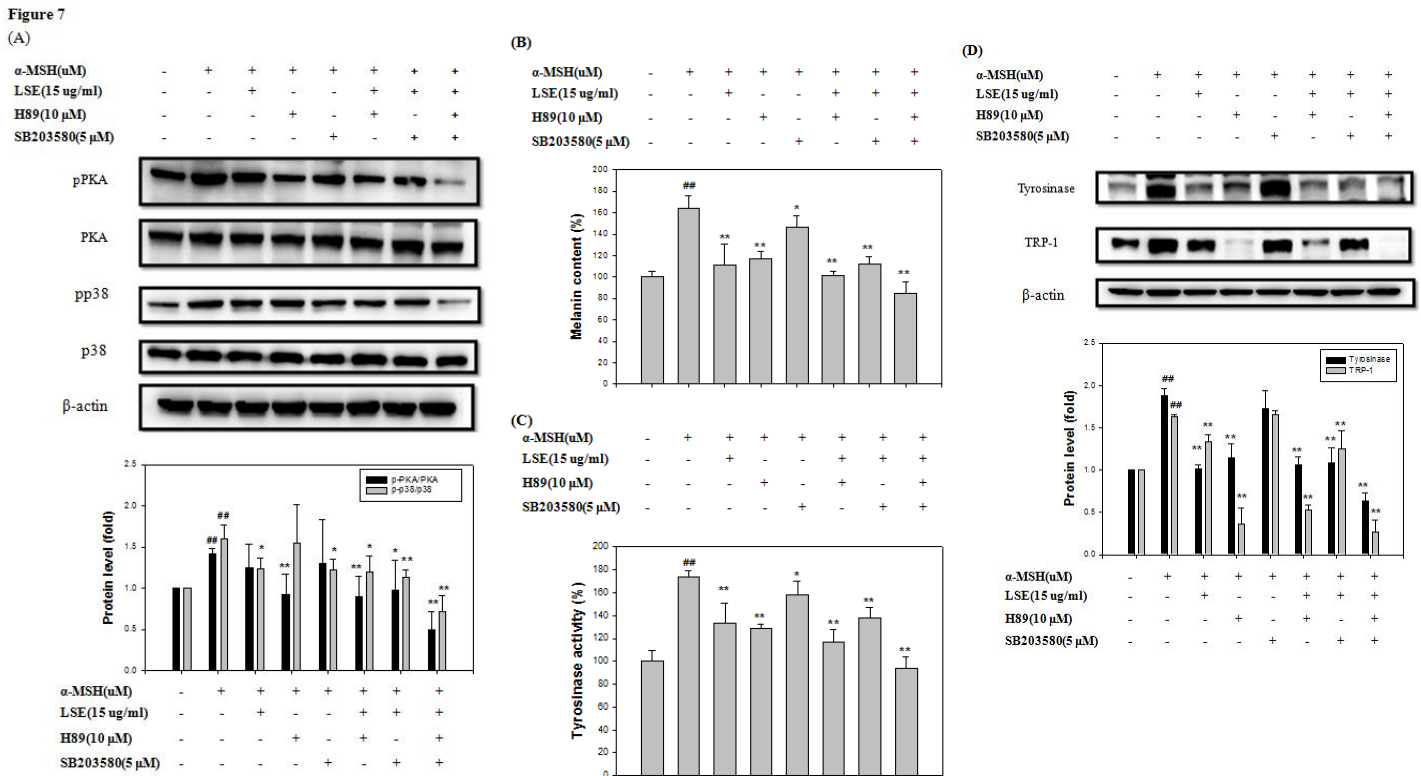


Figure 6. Effects of LSE on α-MSH-induced nuclear levels of p-CREB and MITF in B16F0 cells. B16F0 cells were stimulated with α-MSH (1 μM) and treated with various concentrations (10,15,20 μg/ml) of LSE and EGC (15 μM) for 48h.(A) The expression of p-CREB and MITF were determined by Western blotting. Lamin B served as an internal control of nuclear fraction. (B) The nuclear extracts were analysed for DNA-binding CREB activity of using biotin-labelled CREB specific oligonucleotides by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Lane 1 represents nuclear extracts incubated with unlabeled oligonucleotide (free probe) to confirm the specificity of binding. (C) The nuclear extracts were analysed for DNA-binding MITF activity of using biotin-labelled MITF specific oligonucleotides by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Lane 1 represents nuclear extracts incubated with unlabeled oligonucleotide (free probe) to confirm the specificity of binding. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments and the significant difference was established at $p < 0.01$. $\#\#P < 0.005$ compared with the control. $*P < 0.01$, $**P < 0.005$ compared with the α-MSH.



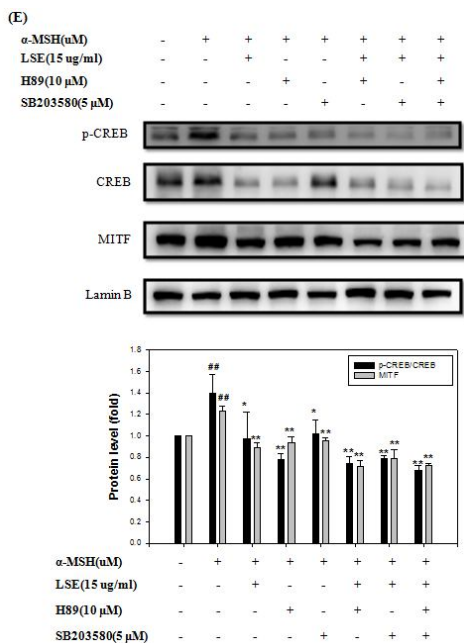


Figure 7. Effects of LSE, H89 and SB203580 on α -MSH-induced melanin and tyrosinase in B16F0 cells. B16F0 cells were stimulated with α -MSH (1 μ M) and treated with various concentrations 15 μ g/ml of LSE, 10 μ M/ml of H89 (PKA inhibitor) and 5 μ M/ml of SB203580 (p38 inhibitor) for 48 h. (A) p-PKA α , PKA α , p-p38 and p38 proteins were analyzed by Western blotting. β -actin, served as internal control.(B) Cell pellets were harvested and photographed, and then treated with 1 M NaOH at 80 $^{\circ}$ C for 1hr to measure the melanin contents. (C) Cell pellets were processed for the determination of tyrosinase activity. (D) Tyrosinase and TRP-1 proteins were analyzed by Western blotting. β -actin, served as internal control. (E) The expression of p-CREB and MITF were determined by Western blotting. Lamin B served as an internal control of nuclear fraction. The results were represented the mean \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.01$, ## $P < 0.005$, significant increase compared with the control. * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$, significant decrease compared with the α -MSH group.

Figure 8

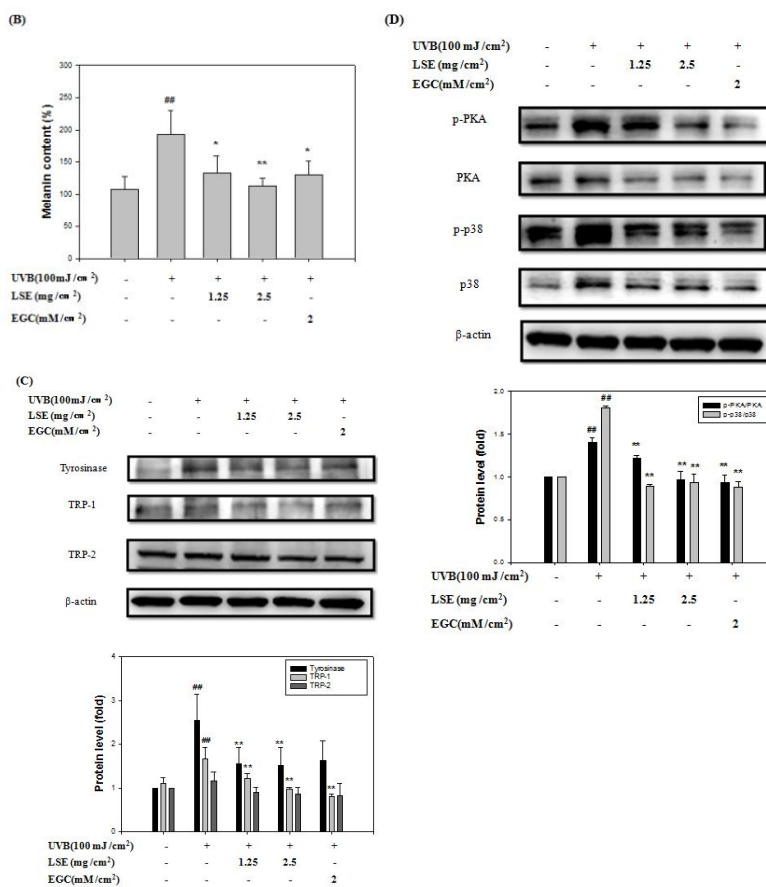
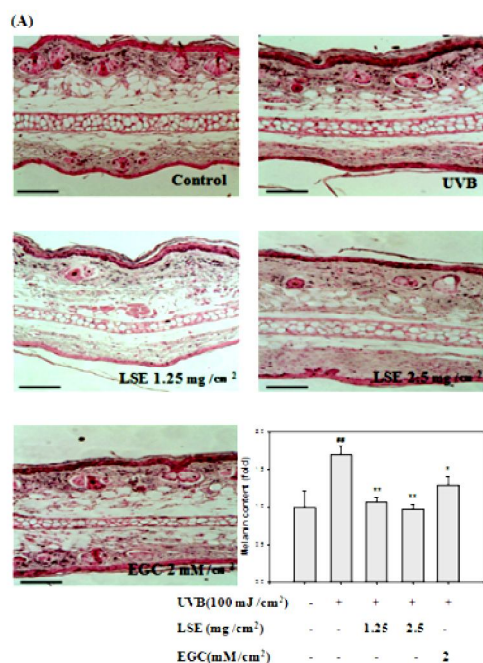


Figure 8. Effect of LSE and EGC on UVB-induced melanogenesis in ears back of C57BL/6 mice. (A) The morphological distribution of melanin in ears back of C57BL/6 mice as visualized using Fontana-Masson staining 100X. Pigmented skin was stimulated with UVB 100mJ /cm 2 and treated with various concentrations of LSE (1.25 mg /cm 2 and 2.5 mg /cm 2), EGC (2 mM /cm 2) for 8 weeks. Scale bars = 100 μ m. (B) Ears back of C57BL/6 mice were harvested and photographed, and then treated with 1 M NaOH at 80 $^{\circ}$ C for 1h to measure the melanin contents. (C) Tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 proteins were analyzed by Western blotting. β -actin, served as internal control. (D) p-PKA, PKA, p-p38 and p38 proteins were analyzed by Western blotting. β -actin, served as internal control. The results were represented the mean \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.01$, ## $P < 0.005$, significant increase compared with the control. * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$, significant decrease compared with the UVB group.

Figure 9

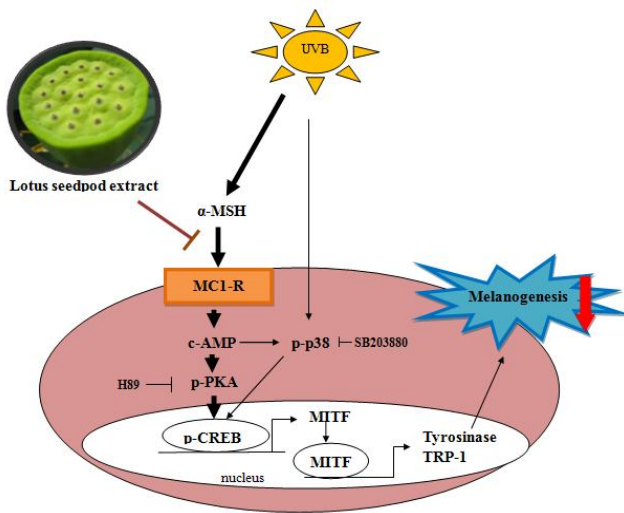


Figure 9. Summary

The possible mechanism for LSE to inhibit the melanogenesis in vitro and in vivo.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/10/15

科技部補助計畫	計畫名稱: 探討蓮蓬萃取物在光保護作用及抑制皮膚癌作用機轉之研究		
	計畫主持人: 陳璟賢		
	計畫編號: 102-2320-B-040-004-		學門領域: 保健營養
研發成果名稱	(中文) 蓮蓬萃取物及其用於美白之用途		
	(英文) The inhibitory effect of lotus seedpod extract on melanogenesis		
成果歸屬機構	中山醫學大學	發明人 (創作人)	陳璟賢
	技術說明	<p>(中文) 本研究以EGC作為對照物質, 利用黑色素瘤細胞 (B16F0)及C57BL/6小黑鼠模式, 探討蓮蓬萃物 (Lotus seedpod extract, LSE)對於黑色素生成作用之影響, 並分析其分子機轉。在細胞實驗中, 以α-黑色素細胞刺激素 (α-melanocyte stimulating hormone, α-MSH)誘導促進黑色素(melanin)之生成, 並給予不同劑量的LSE或EGC其結果顯示LSE與EGC皆能降低酪胺酸酶 (tyrosinase)活性和黑色素生成作用; 以西方墨點法分析, 結果顯示LSE能顯著抑制Tyrosinase及其相關蛋白TRP-1 (tyrosinase-related protein 1)蛋白表現。本研究分析參與LSE抑制黑色素生成當中的分子機轉, 發現LSE能透過兩條路徑減少黑色素的生成; 抑制PKA (protein kinase A)和p38之磷酸化進而干擾CREB (c-AMP responsive element-binding protein)活化, 影響MITF (microphthalmia-associated transcription factor)表現, 導致Tyrosinase的表現和黑色素合成下降。在C57BL/6小黑鼠動物實驗中, 藉由Melanin stain發現當小黑鼠耳朵皮膚暴露於UVB之下, LSE可以減少其黑色素之生成。綜合以上研究結果顯示, HLE可能有潛力應用於美容醫學、化妝品等行業。</p> <p>(英文) We examined the effect of LSE on melanogenesis in vitro and in vivo. In vitro studies showed non-cytotoxic doses of LSE and its main composition epigallocatechin (EGC) reduced α-MSH-induced tyrosinase activity and melanin production in mouse melanoma B16F0 cells. Results showed LSE and EGC inhibited the expression of tyrosinase and TRP-1 (tyrosinase-related protein-1). LSE and EGC also suppressed the nuclear levels of CREB and MITF (the regulator and transcription factor of tyrosinase), and the DNA binding activity of MITF in α-MSH-stimulated cells. Finally, LSE and EGC inhibited melanin production in the ears back of C57BL/6 mice exposed to UVB. These findings suggested LSE might be used as a potential natural whitening agent.</p>	
產業別	研究發展服務業, 其他專業、科學及技術服務		
技術/產品應用範圍	醫學美容、化粧品產業		
技術移轉可行性及預期效益	萃取技術及美白功效專利與Know-how可實質技術轉移並獲得相關技術轉移及專利授權等權利金		

註: 本項研發成果若尚未申請專利, 請勿揭露可申請專利之主要內容。

102 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：陳璟賢		計畫編號：102-2320-B-040-004-					
計畫名稱：探討蓮蓬萃取物在光保護作用及抑制皮膚癌作用機轉之研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	1	1	100%		
	專利	申請中件數	1	1	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	1	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （本國籍）	碩士生	4	3	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(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。)</p>	<p style="text-align: center;">無</p>
---	--------------------------------------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 字為限）

本計畫雖只通過一年經費，但針對蓮蓬萃取物在光保護作用研究上完成蓮蓬萃取物抑制黑色素生成的細胞實驗與動物實驗，且詳細分析釐清蓮蓬萃取物能有效抑制黑色素的相關分子機制，研究成果：1.已申請專利一案(專利案號 103120693)；2.學術研討會論文一篇(第 40 屆營養年會)；3.專書論文一本。

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）

未來此研究成果除可發表於國際期刊論文外,亦可應用於美容醫學、化妝品等行業。