

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

洛神花與洛神葉萃取物預防紫外線照射引起的黑色素沉澱、皮膚老化與皮膚癌作用之研究(第3年)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2320-B-040-015-MY3
執行期間：101年08月01日至102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：碩士級-專任助理人員：蔡淑美
碩士級-專任助理人員：李欣珮

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

中華民國 102年10月03日

中文摘要：紫外線(Ultraviolet radiation, UV)照射會導致許多皮膚疾病，且長期暴露於UV中亦會造成皮膚細胞之損傷。近年來，使用植物萃取物當作抗紫外線之成分儼然已蔚為風潮。洛神花(Hibiscus Sabdariffa Linnaeus)為台灣本土農作物，許多研究發現洛神花萃取物(H. sabdariffa extract, HSE)具有抗氧化、降血脂、以及保肝等功效，其中多酚成分(polyphenol)物質--原兒茶酸(protocatechuic acid, PCA)也被證實其具有抗氧化及抗癌活性，但在美容保健開發上都甚少有相關研究。洛神植株葉子在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物。過去研究亦顯示洛神葉(H. sabdariffa L. leaf)具有降血糖以及雌激素(oestrogen)之活性，其成分富含類黃酮等多酚成份，顯示洛神葉也可以扮演化學預防之角色。於本研究中，欲探討洛神花與洛神葉萃取物(H. sabdariffa L. leaf extract, HLE)成分抗UV引起皮膚皺紋及黑色素生成之研究。

第一年，在分析兩者水萃取物HSE、HLE及其多酚萃取物(HPE和HLP)抑制黑色素生成試驗後發現，以HPE有較明顯抑制效果。進而以洛神花多酚活性物質PCA測試，其抑制黑色素效果更為顯著，因此以PCA進行後續實驗。實驗結果顯示PCA無細胞毒性濃度下，具有抑制人類角質HaCaT細胞受UVB促進黑色素生成之功效。於即時定量PCR及西方墨點法實驗中證實，PCA抑制黑色素生成機制起始因子p53及POMC的表現量而抑制黑色素生成。本實驗也證明PCA得以抑制UVB照射人類黑色素A375細胞後誘發之MC1-R表現量，推論PCA可能抑制誘發黑色素生成因子與受器之結合，細胞質中的MITF亦會受到PCA影響，使其降低轉錄進入細胞核內，最終導致生成黑色素之關鍵蛋白TRP-1及TRP-2的含量受到抑制，達到減緩黑色素生成之功效。PCA亦可抑制UVB誘發人類真皮纖維母細胞WS1之基質金屬蛋白酶(MMP)表現量，並增加前膠原蛋白(pro-collage)的含量，進而達到抗皺之功效。綜合上述顯示，PCA得以阻斷UVB誘導之p53/POMC訊息路徑及MMP生成，此些路徑與黑色素生成及皺紋形成具相關性。

第二年利用無毛裸鼠與小黑鼠C57BL/6進行實驗，分別將洛神花與洛神葉萃取物(HSE、HPE、HLE和HLP)及其功性成份(PCA和鞣花酸EA)塗抹於裸鼠背部以及小黑鼠耳朵，再以UVB照射。8週後犧牲取裸鼠背部皮膚及小黑鼠耳朵進行後續分析。不論在裸鼠及小黑鼠抗UV誘導黑色素生成試驗中都證實，六種萃取物成份都具有良好抑制黑色素生成的效果，尤其以HLP及HPE兩種多酚萃取物效果最好；此外，在抗UVB誘導皺紋生成實驗中發現，所有萃取物也都具有良好抑制皺紋生成之作用，同樣以多酚萃取物抑制效果最佳，驗

證在細胞實驗得到的結果。

第三年利用洛神葉多酚萃取物 HLP 進行抗皮膚癌之研究。我們測試 HLP 對於人類皮膚癌 A375 細胞生長影響，利用細胞計數、流式細胞儀分析、DAPI 及 AVO 染色，觀察 HLP 在細胞週期、細胞凋亡及細胞自噬作用之影響，發現 HLP 能有效抑制 A375 細胞生長，並且會促使 A375 細胞凋亡及細胞自噬作用。分析細胞內蛋白質表現發現，HLP 會活化細胞凋亡相關蛋白 caspase-3/8/9 表現，並且活化細胞自噬作用相關蛋白 ATG5、Beclin-1、P62 和 LC3。總論，HLP 能經由誘導細胞凋亡及細胞自噬機制，達到抑制 A375 細胞之生長。因此，HLP 未來可以提供預防或治療皮膚癌上的參考。

綜合三年研究發現，洛神植株(花與葉)所富含多酚類成分物質具有抗 UVB 曝照後所引發黑色素生成及皮膚皺紋生成的光保護作用；洛神葉多酚物質也能抑制皮膚癌細胞生長及說明其抗癌機制。因此未來洛神花功能性成分物質 PCA、洛神花及洛神葉萃取物可發展成為具有化學預防活性之美容保健產品。

中文關鍵詞：紫外線、洛神花、多酚、原兒茶酸、洛神葉、防皺、黑色素生成、皮膚癌、細胞凋亡、細胞自噬。

英文摘要：Ultraviolet radiation (UV) is the cause of many skin diseases, and UV exposing on long-time could cause the injury of skin cells. The use of phytochemicals as anti-UV agents has gained considerable importance in recent years. *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) extract (HSE) are currently marketed as supplements due to their perceived potential health benefits. Protocatechuic acid (PCA), the major polyphenol compound in HSE, has been shown to prevent carcinogenesis in vivo and in vitro. *H. sabdariffa* L. leaf extract (HLE) had been demonstrated to possess hypoglycemic activity and oestrogenic effects previously. However, the studies involved in chemopreventive activity of beauty and health care of *H. sabdariffa* L. and PCA are poorly few. In first year investigations were conducted to examine the mechanisms of the anti-UVB activity of HSE, HLE and their polyphenol-rich extracts, HPE and HLP. Our data imply that PCA treatment led to the blockage of UVB-induced p53/POMC signaling and MMP production was related to melanogenesis and wrinkle formation, respectively. In second year investigations were

conducted to examine the anti-UVB activity of HSE, HLE, their polyphenolic extracts (HPE and HLP), and major compounds (PCA and EA). To test the in vivo inhibitory effect of these agents on UVB pigmentation, hairless mice (nude mice) and C57BL/6 mice were subjected to UVB. Among these agents, HPE and HLP possessed the strongest ability to inhibit UVB-triggered hyperpigmentation. Anti-wrinkle activity of these agents was further investigated in hairless mice exposed to UVB, in which HPE and HLP attenuated UVB-triggered skin wrinkle formation and MMPs expression most significantly. The results demonstrated that the flowers and leaves extracts of *H. sabdariffa* prevented hyperpigmentation and collagen destruction caused by UVB. In third year investigations were conducted to examine the anticancer activity of HLP in vitro. Our findings indicated HLP induced A375 cell death through autophagy and apoptotic signaling. These results suggested that HLP potentially could be developed as an anti-cancer agent. All these results suggested that PCA, the flowers and leaves extracts of *H. sabdariffa* may be useful to develop new chemopreventive agents in beauty and health care.

英文關鍵詞： Ultraviolet radiation, *Hibiscus sabdariffa*, *H. sabdariffa* L. leaf, polyphenol, protocatechuic acid, beauty and health care, whitening, anti-wrinkle, melanogenesis, hyperpigmentation, anticancer, apoptosis, autophagy.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

洛神花與洛神葉萃取物預防紫外線照射引起的黑色素
沉澱、皮膚老化與皮膚癌作用之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2320-B-040-015-MY3

執行期間： 99 年 08 月 01 日至 102 年 07 月 31 日

計畫主持人：陳璟賢

共同主持人：林慧萱

計畫參與人員：蔡淑美、李欣珮

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學 營養學系(所)

中 華 民 國 102 年 10 月 30 日

§ 中文摘要

紫外線(Ultraviolet radiation, UV)照射會導致許多皮膚疾病,且長期暴露於UV中亦會造成皮膚細胞之損傷。近年來,使用植物萃取物當作抗紫外線之成分儼然已蔚為風潮。洛神花(Hibiscus Sabdariffa Linnaeus)為台灣本土農作物,其中多酚成分(polyphenol)物質--原兒茶酸(protocatechuic acid, PCA)也被證實其具有抗氧化及抗癌活性,但在美容保健開發上都甚少有關研究。洛神植株葉子在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物。過去研究亦顯示洛神葉(H. sabdariffa L. leaf)具有降血糖以及雌激素(oestrogen)之活性,其成分富含類黃酮等多酚成份,顯示洛神葉也可以扮演化學預防之角色。於本研究中,欲探討洛神花與洛神葉萃取物(H. sabdariffa L. leaf extract, HLE)成分抗UV引起皮膚皺紋及黑色素生成之研究。

第一年,在分析兩者水萃取物HSE、HLE及其多酚萃取物(HPE和HLP)抑制黑色素生成試驗後發現,以HPE有較明顯抑制效果。進而以洛神花多酚活性物質PCA測試,其抑制黑色素效果更為顯著,因此以PCA進行後續實驗。實驗結果顯示PCA無細胞毒性濃度下,具有抑制人類角質HaCaT細胞受UVB促進黑色素生成之功效。於即時定量PCR及西方墨點法實驗中證實,PCA抑制黑色素生成機制起始因子p53及POMC的表現量而抑制黑色素生成。本實驗也證明PCA得以抑制UVB照射人類黑色素A375細胞後誘發之MC1-R表現量,推論PCA可能抑制誘發黑色素生成因子與受器之結合,細胞質中的MITF亦會受到PCA影響,使其降低轉錄進入細胞核內,最終導致生成黑色素之關鍵蛋白TRP-1及TRP-2的含量受到抑制,達到減緩黑色素生成之功效。PCA亦可抑制UVB誘發人類真皮纖維母細胞WS1之基質金屬蛋白酶(MMP)表現量,並增加前膠原蛋白(pro-collage)的含量,進而達到抗皺之功效。綜合上述顯示,PCA得以阻斷UVB誘導之p53/POMC訊息路徑及MMP生成,此些路徑與黑色素生成及皺紋形成具相關性。

第二年利用無毛裸鼠與小黑鼠C57BL/6進行實驗,分別將洛神花與洛神葉萃取物(HSE、HPE、HLE和HLP)及其功性成份(PCA和鞣花酸EA)塗抹於裸鼠背部以及小黑鼠耳朵,再以UVB照射。8週後犧牲取裸鼠背部皮膚及小黑鼠耳朵進行後續分析。不論在裸鼠及小黑鼠抗UV誘導黑色素生成試驗中都證實,六種萃取物成份都具有良好抑制黑色素生成的效果,尤其以HLP及HPE兩種多酚萃取物效果最好;此外,在抗UVB誘導皺紋生成實驗中發現,所有萃取物也都具有良好抑制皺紋生成之作用,同樣以多酚萃取物抑制效果最佳,驗證在細胞實驗得到的結果。

第三年利用洛神葉多酚萃取物HLP進行抗皮膚癌之研究。我們測試HLP對於人類皮膚癌A375細胞生長影響,利用細胞計數、流式細胞儀分析、DAPI及AVO染色,觀察HLP在細胞週期、細胞凋亡及細胞自噬作用之影響,發現HLP能有效抑制A375細胞生長,並且會促使A375細胞凋亡及細胞自噬作用。分析細胞內蛋白質表現發現,HLP會活化細胞凋亡相關蛋白caspase-3/8/9表現,並且活化細胞自噬作用相關蛋白ATG5、Beclin-1、P62和LC3。總論,HLP能經由誘導細胞凋亡及細胞自噬機制,達到抑制A375細胞之生長。因此,HLP未來可以提供預防或治療皮膚癌上的參考。

綜合三年研究發現,洛神植株(花與葉)所富含多酚類成分物質具有抗UVB曝照後所引發黑色素生成及皮膚皺紋生成的光保護作用;洛神葉多酚物質也能抑制皮膚癌細胞生長及說明其抗癌機制。因此未來洛神花功能性成分物質PCA、洛神花及洛神葉萃取物可發展成為具有化學預防活性之美容保健產品。

關鍵詞：紫外線、洛神花、多酚、原兒茶酸、洛神葉、防皺、黑色素生成、皮膚癌、細胞凋亡、細胞自噬。

§ 英文摘要

Ultraviolet radiation (UV) is the cause of many skin diseases, and UV exposing on long-time could cause the injury of skin cells. The use of phytochemicals as anti-UV agents has gained considerable importance in recent years. *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) extract (HSE) are currently marketed as supplements due to their perceived potential health benefits. Protocatechuic acid (PCA), the major polyphenol compound in HSE, has been shown to prevent carcinogenesis in vivo and in vitro. *H. sabdariffa* L. leaf extract (HLE) had been demonstrated to possess hypoglycemic activity and oestrogenic effects previously. However, the studies involved in chemopreventive activity of beauty and health care of *H. sabdariffa* L. and PCA are poorly few. In first year investigations were conducted to examine the mechanisms of the anti-UVB activity of HSE, HLE and their polyphenol-rich extracts, HPE and HLP. Our data imply that PCA treatment led to the blockage of UVB-induced p53/POMC signaling and MMP production was related to melanogenesis and wrinkle formation, respectively. In second year investigations were conducted to examine the anti-UVB activity of HSE, HLE, their polyphenolic extracts (HPE and HLP), and major compounds (PCA and EA). To test the in vivo inhibitory effect of these agents on UVB pigmentation, hairless mice (nude mice) and C57BL/6 mice were subjected to UVB. Among these agents, HPE and HLP possessed the strongest ability to inhibit UVB-triggered hyperpigmentation. Anti-wrinkle activity of these agents was further investigated in hairless mice exposed to UVB, in which HPE and HLP attenuated UVB-triggered skin wrinkle formation and MMPs expression most significantly. The results demonstrated that the flowers and leaves extracts of *H. sabdariffa* prevented hyperpigmentation and collagen destruction caused by UVB. In third year investigations were conducted to examine the anticancer activity of HLP in vitro. Our findings indicated HLP induced A375 cell death through autophagy and apoptotic signaling. These results suggested that HLP potentially could be developed as an anti-cancer agent. All these results suggested that PCA, the flowers and leaves extracts of *H. sabdariffa* may be useful to develop new chemopreventive agents in beauty and health care.

Keywords: Ultraviolet radiation, *Hibiscus sabdariffa*, *H. sabdariffa* L. leaf, polyphenol, protocatechuic acid, beauty and health care, whitening, anti-wrinkle, melanogenesis, hyperpigmentation, anticancer, apoptosis, autophagy.

(一) 前言

一、洛神花和洛神葉：

洛神花(*Hibiscus sabdariffa* Linnaeus)為錦葵科(Malvaceae)植物，原產熱帶地區，分部於印度、馬來西亞及東南亞、台灣東部及南部也盛產。其花成份包含有機酸(如檸檬酸、壞血酸、原兒茶酸等)(1);醣分主要為半乳糖、葡萄糖及果糖(2);Pectin及類黃酮(flavonoids)，黃酮素包括有 hibiscetin, gossypetin, quercetin。國外之研究，在體外試驗顯示其水萃取物有抗痙攣、降膽固醇、降血壓及抗菌作用(3)。其成份類黃酮具有抗氧化及抑制心血管疾病(4);原兒茶酸(protocatechuic acid, PCA)可抑制化學致癌物誘導之癌化(5)，本研究團隊發現洛神花中之 PCA 和花青素有強的抗氧化作用(6)，並引起血癌 HL-60 細胞凋亡以及生長週期停滯(7)，證實洛神花具有抗癌之活性。洛神葉則為洛神花植株之葉子，在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物。過去的研究顯示洛神葉萃取物(*H. sabdariffa* L. leaf extract, HLE)具有降血糖之功效(8)以及雌激素(oestrogen)之活性，其成分富含類黃酮等多酚成份(9)，顯示洛神葉可以扮演一個化學預防的角色。

二、紫外線照射引發黑色素生成：

UV 可直接誘導黑色素細胞生長及分化或間接透過環繞在 UV 照射過的角質細胞旁來增加黑色素細胞生長、增殖及樹突分支生長來達到黑色素生成作用(10)。黑色素是一種不可溶且結構緊密的高分子聚合物，以酪胺酸作為原料而開始進行合成的步驟，在過程中最重要的調控酵素為酪胺酸酶，可催化黑色素合成過程中的許多反應(11)。當 L-酪胺酸被水解形成 L-DOPA 後，會藉由酪胺酸酶氧化成 L-dopaquinone (具有反應性的中間產物)，可形成真黑色素或褐黑色素，當硫氫基(thiol)不存在時，L-dopaquinone 會自發性的進行環化作用而形成 dopachrome，再自發性脫羧作用形成 DHI，或經由 dopachrome 異構酶(又稱之為 tyrosinase-related protein, TRP-2)催化為更穩定的 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHICA)。DHI 會受到酪胺酸酶氧化為 indole-5,6-quinone，而 DHICA 則會由 DHICA 氧化酶(又稱之為 tyrosinase-related protein, TRP-1)氧化為 indole-5,6-quinonecarboxylic acid，最後聚合形成真黑色素(12)。

三、紫外線照射引發光老化(13)：

在日光下長期曝露，造成紫外光的傷害。紫外線會使膠原蛋白變性及製造量也減少、皮脂腺分泌失調、氧化自由基增多，傷害健康細胞。皺紋產生之光老化或光加齡(photoaging)現象產生，更嚴重者甚至會有皮膚癌現象產生(14)，而這些現象則與皮膚經過過量紫外線的照射後，皮膚會產生過量 ROS 有關。UV 有誘導 MMPs 活性增加的作用，文獻指出長期照射游離輻射(ionizing radiation, IR)會導致皺紋產生，因為 IR 會顯著增加 MMP-3 以及 MMP-13 的 mRNA 表現量，若是同時照射 IR 及 UV 則會增強 UV 誘導 MMP-3、MMP-13 的 mRNA 表現量及 MMP-2、MMP-9 的活性，因此 IR 有增強 UV 誘導皺紋形成的作用(15)。根據文獻報導照射 UVA 會促使細胞膜上的磷脂質雙層產生脂質過氧化作用(lipid peroxidation)而形成過氧化物，進而成為活化 MMP-1 途徑中重要的訊息傳遞物，導致老化及皮膚癌的發生(16)。

(二) 研究目的

洛神花為台灣本土農作物，近年來研究發現洛神花具有抗氧化、降血脂、以及保肝等功效，但在美容保健上的研究開發卻很少。洛神葉在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物，但在台灣卻鮮少被食用或利用。過去的研究顯示洛神葉萃取物(*H. sabdariffa* L. leaf extract, HLE)成分富含類黃酮等多酚成份。顯示洛神葉也可以扮演化學預防與美容保健的角色。近年來，因溫室效應使得陽光紫外線越來越強，人類皮膚受紫外線傷害風險也與日劇增，皮膚癌罹患率相對增加。因此由天然物中萃取功效成分來對抗紫外線傷害，必能帶來相當可觀的經濟效應。本研究室初步利用紫外線損傷乳豬皮膚之動物模式，實驗發現洛神花水萃取物(*H. sabdariffa* extract, HSE)塗抹豬皮膚之組別其乳豬皮膚保水性及細胞層結構完整性

較好、皮膚角質層無變厚，其皮膚的光澤與透明度較好，HSE 有促使延緩皮膚老化現象的發生，所以推論洛神花能保護皮膚免於紫外線照射之損害，HSE 具有成為天然化妝品之潛力。利用洛神花各種水萃取物來處理老鼠黑色素瘤B16-F1 細胞，發現各種萃取物都能抑制酪氨酸酶活性，而減少黑色素產生。在本實驗室初步分析發現，洛神葉水萃取物(HLE)與洛神葉多酚萃取物(H. sabdariffa leaf polyphenol-rich extract, HLP)中其總多酚與黃酮含量都高於洛神花萃取物，足以推論洛神葉也具有開發天然化妝品或預防皮膚癌的潛力。

(三) 文獻探討

本研究室發現洛神花中之 PCA 和花青素有強的抗氧化作用(6)，並引起血癌 HL-60 細胞凋亡以及生長週期停滯(7)。洛神葉則為洛神花植株之葉子。在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物。過去的研究顯示洛神葉萃取物(HLE)具有降血糖之功效(12)以及雌激素之活性，其成分富含類黃酮等多酚成份(9)。顯示洛神葉可以扮演一個化學預防的角色。紫外線照射可直接誘導黑色素細胞生長及分化或間接透過環繞在 UV 照射過的角質細胞旁來增加黑色素細胞生長、增殖及樹突分支生長來達到黑色素生成作用(10, 11)。當皮膚曝露在紫外線下，若產生大量自由基容易引起細胞內 DNA 單股斷裂，形成 DNA 片段化的現象。若產生少量的自由基，則會活化訊息傳遞系統而刺激酪氨酸酶(tyrosinase)轉錄作用，造成黑色素合成增加(17)。Yoshinor 等人(18)研究報告指出以較高的 UVB 照射劑量，造成膠原蛋白總含量明顯減少，伴隨著皺紋產生，皮膚皺紋加深的程度會隨照射時間增加而加深。過去研究發現 β -carotene、Vit. E 及 Vit. C 等抗氧化物質能保護人類胎兒肺部纖維母細胞免於受到 UVB 的照射傷害(19)。期盼本計畫所獲得之初步結果，對於日後保健食品及農業之開發與應用上能有所貢獻。

(四) 研究方法

第一年：洛神花水萃 (HSE)、洛神葉水萃 (HLE) 及其多酚萃取物 (HPE、HLP) 抗氧化、減少黑色素產生、加速角質代謝及減少皮膚皺紋產生等抗老化功效之研究 (in vitro)。

一、洛神花與洛神葉萃取物之製備及定量

(1) 洛神花水萃取物 (HSE) 與洛神葉水萃取物 (HLE) 之製備

秤取乾燥洛神花或葉 100 g，加入 6 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷後過濾，將濾液進行冷凍乾燥，得其粉末即為洛神花與葉粗萃取物，最後進行冷凍乾燥為粉末。

(2) 洛神花多酚萃取物(HPE)與洛神葉多酚萃取物(HLP)之製備

秤取 100 克乾燥洛神花或洛神葉，攪拌至粉末狀。以 300 ml 甲醇在 50°C (水浴) 中萃取 3 小時過濾，連續三次，收集濾液，於減壓濃縮乾燥後溶解於 50°C 500 ml 二次水(deionized distilled water)。然後以 200 ml 己烷移除色素，分層之水層以 180 ml 乙酸乙酯萃取三次，再於減壓濃縮乾燥後溶解於 300 ml 二次水，最後進行冷凍乾燥為粉末。

(3) 高效能液相層析儀 (HPLC) 分析

為使 HSE、HLE、HPE 及 HLP 製備固定標準化，實驗利用 HPLC (high performance liquid chromatography) 鑑定其多酚成份。使用 12 個多酚標準品：1. ellagic acid、2. PCA、3. catechin、4. epicatechin、5. caffeic acid、6. EGCG、7. ECG、8. p-coumaric acid、9. naringenin、10. ferulic acid、11. EGC、12. quercetin。分析條件為用 C-18 reverse-phase column (5 μ m, Hypersil ODS, 200 mm X 2.1 mm)，將 HSE、HLE、HPE 及 HLP 過濾 (0.45 μ m) 後，取 20 μ l 注入 HPLC，mobile phase 為 A: acetonitrile; B: 0.5% glacial acetic acid in water; C: isopropanol; 0-5 min 為 100% B; 5-15 min 為 5% A、95% B; 15-22 min 為 1% A、96% B、3% C; 22-24 min 為 5% A、90% B、5% C; 24-30 min 為 100% A³ monitored at 290 nm。

二、美白效能評估分析 (in tube)

(1) 酪胺酸酶活性抑制試驗

取 85 μ L 配製成不同濃度之待測物溶液置於 96 孔培養盤中在 25°C 下靜置 10 分鐘。加入 85 μ L mushroom tyrosinase (135 U/mL)、85 μ L 之 0.03 % L-Dopa solution，混合培養 5 分鐘。最後以 ELISA 於 475nm 下測其 OD 值，再以公式計算其抑制率。以左旋維生素 C (L-ascorbic acid) 為標準品，製作校正曲線，比較待測物質與維生素 C 間對酪胺酸酶活性抑制之關係。

(2) 細胞內黑色素含量測定

利用黑色素可溶於強鹼 NaOH 的特性，藉由加熱作用將黑色素由不溶性聚合物裂解為水可溶物質，並於特定波長 405 nm 測定人類黑色素瘤 A375 細胞內黑色素含量。以合成黑色素 (synthetic melanin) 為黑色素標準溶液，以換算各樣品中細胞內黑色素含量；另一方面，以 BSA 為蛋白質標準溶液，以換算各樣本細胞液蛋白質濃度，求得每毫克蛋白質中之細胞內黑色素含量。

三、UVB 照射實驗

(1) 細胞培養

將人類角質 HaCaT 細胞、人類黑色素瘤 A375 細胞、真皮纖維 WS1 細胞三株細胞培養於 10 公分培養皿中，放置於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中生長。

(2) UVB 劑量的測量及換算

使用紫外光/可見光光譜分析儀 USB4000 量測裝有 5 ml PBS 的 10 cm 培養皿，於 15 cm 高度測量會得到數據 (μ W)，劑量之換算公式為 (μ W/cm² × 暴露時間(s)) / 1000 = 劑量 mJ/cm²。若測量得到數值為 1000 μ W/cm² 乘上暴露時間為 25 秒，代入該公式算得之劑量約為 25 mJ/cm²。

(3) UVB 照射實驗

將人類皮膚層由外至內之 HaCaT、A375、及 WS1 三株細胞種於 10 公分培養皿培養到 8 分滿時，先加入不同劑量之 HSE、HLE、HPE 及 HLE，待 2 小時後移除萃取物，再以 UVB 燈照射細胞(照射劑量為 25 mJ/cm²)，24 小時後觀察萃取物對三株人類皮膚細胞之影響。

四、皮膚防皺試驗

(1) MMPs 活性分析試驗(Gelatin and casein zymography assay)

以 WS1 細胞進行試驗，利用 gelatin zymography 測試 MMP-2 及 MMP-9 活性，評估抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性進而減少分解細胞外基質明膠之效果。將 0.1% gelatin(或 casein)-8% SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，將組織均質液與 5x 染劑均勻混和後，注入膠片中，分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer 在室溫下搖晃 30 分鐘 2 次，後加入 reaction buffer 在 37°C 恆溫箱中反應 12~16 小時，最後反應完的膠片以 coomassie blue 染色液染色 30 分鐘，再以退色液退染，觀看結果。

(2) 西方點墨法 (Western blotting)

將處理好的細胞蛋白萃取液取 30-50 μ g 蛋白質與 5x dye 及二次水混勻，於 100°C 下加熱 10 分鐘後置於冰上，離心備用。蛋白質以 10 % SDS-polyacrylamide gel 進行分離。80 伏特(V)電壓跑約 2 小時，使蛋白質依分子量大小分開，再將膠上的蛋白質以 90 伏特(V)電壓 transfer 到 NC paper 上。將 transfer 完成的 NC paper 置於 0.5% 的脫脂牛奶，於室溫下進行 blocking 一小時，之後再以緩衝溶液清洗 2~3 次，每次 10 分鐘以洗去未專一性結合的抗體。之後加次一級抗體 (1:500)，於 4°C 下作用 overnight，隔天再以緩衝溶液清洗 2~3

次後再加入次級抗體 (1:10000)，於室溫下 1 小時，再以緩衝溶液清洗 2~3 次。最後加入 ECL solution 以 1:1 方式加在 NC paper 上使其顯色作用，最後再利用高解析度自動冷光螢光影像分析儀(UVP/ BioSpectrum Acw)來進行分析及定量，包含 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-13 與 pro-collagen 蛋白質表現。

(3) Real Time-Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR)

將純化出之 total RNA，利用 DEPC H₂O 進行不同程度之稀釋，稀釋後之 RNA 樣本以分光光譜儀讀取核酸定量，計算出各個樣本 1 μ g 之 total RNA 的體積，進行反轉錄(reverse transcriptase)。當反轉錄反應完成所得到之 cDNA 可以進行儲存或直接進行定量 PCR 反應之用。進行定量 PCR 實驗步驟：首先需將所要分析基因之 primer(包含:reverse 與 forward) 與 TaqMan 螢光 Probe 準備完畢。再配製 iQ Supermix (Cat#170-8860, BioRad)，用於進行 PCR 反應之用，Supermix 含有 PCR 反應所需的 dNTPs、buffer、鎂離子等，當 Supermix 與 cDNA template 混合後(請勿 vortex，內有 DNA polymerase)，即可放入 Real-time PCR 機器進行分析。將 Supermix 與 primers、probe 混合好後，小心地將 20 μ l 的 Supermix 混和液加入 96 well plate 或 8 連排的 PCR 專用試管當中，最後加入 5 μ l 的 cDNA template，上機分析結果(Bio-Rad iCycler Real-Time PCR)。

(4) 凝膠遷移或電泳遷移率分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

EMSA 是一種檢測蛋白質和 DNA 序列相互結合的技術。先將細胞全部的 nuclear extract protein 準備好，使用 10 μ g Nuclear protein extracts 和 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1mM DTT, 5 mM MgCl₂, 2 μ g poly(dI·dC)的溶液以及 biotin 標記的 AP-1 or NF- κ B oligonucleotide probe (購自 Promega)在室溫下一起作用 20 分鐘之後，再將 Sample 放到 6% acrylamide gel 使用 0.5X TBE buffer 用 25 mA 跑 90 分鐘，之後轉漬到帶正電 nylon membranes，進行 UV cross-linked，最後反應 streptavidin-horseradish peroxidase，以冷光儀呈色。

五、統計分析 (Statistical Analysis)

數據以 means \pm SD 表示。以 Student t-test - Unpaired 來評估統計差異。P < 0.05 表示具有顯著性。

第二年：：建立洛神花水萃 (HSE)、洛神葉水萃 (HLE) 及其多酚萃取物 (HPE、HLP)

促進美白、預防老化功效之動物模式 (in vivo)。

一、動物模式:建立洛神花水萃 (HSE)、洛神葉水萃 (HLE) 及其多酚萃取物 (HPE、HLP) 促進美白、預防老化功效之動物模式 (in vivo)。

(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 BALB/cAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrINarl 裸鼠與 C57/BL6 小黑鼠，動物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 \pm 2 $^{\circ}$ 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) 實驗設計：裸鼠與小黑鼠自國家實驗動物中心購進後隨機分組，經過一星期的適應期開始實驗。實驗先將配置好的試劑取 300ul 均勻塗抹於裸鼠背上，塗抹完等待約 1~2 小時使水分揮發乾後，將裸鼠放入 UVB 光照機器中，設定照射劑量為 150 mJ/cm²，照完即完成一次實驗，每星期照射三次，實驗為期 2 個月，並在實驗期間每週秤量體重，每月拍照記錄背部皮膚變化。實驗結束後，取其血液以及背部皮膚做分析。

二、皮膚樣品處理(切片)

犧牲當天取下裸鼠背部部分皮膚及小黑鼠耳朵後，直接泡入 Formol-Alcohol 固定液 (formalin : acetic acid : 70% alcohol = 1 : 1 : 20)，24 小時後換新的固定液，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，最後浸泡於全石蠟並每 24 小時換新石蠟 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 μ m 的厚度置於玻片上準備染色。

(1) 黑色素切片染色(NovaUltra™ Fontana Masson Stain Kit)(20)：此染色套組可將黑色素呈現棕黑色，細胞核呈現粉紅色，細胞質為淡粉紅色。

(2) 膠原蛋白染色(Sigma Trichrome Masson Stain)(21)：此染色套組在細胞核呈現黑色，細胞質及肌肉為紅色，膠原蛋白呈現藍色。

三、血液生化值分析

動物血液收集入 EDTA-coated tubes，然後離心，進行血液生化值分析，分析項目包括 BUN、Cre、Sugar、TP、GLO、GOT、GPT、Cholesterol、TG，做為肝功能、腎功能是否受 HSE、HLE、HPE 及 HLP 之影響。

四、細胞培養

實驗使用之 B16F0 細胞株為老鼠黑色素瘤細胞，將細胞培養於 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培養基；WS-1 細胞株為人類胎兒皮膚纖維母細胞，將細胞培養於 Minimum essential medium Eagle (MEM) 的培養基；培養環境條件：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。

五、西方點墨法 (Western blotting)

將處理好的細胞蛋白萃取液取 30-50 μ g 蛋白質與 5x dye 及二次水混勻，於 100°C 下加熱 10 分鐘後置於冰上，離心備用。蛋白質以 10% SDS-polyacrylamide gel 進行分離。80 伏特(V)電壓跑約 2 小時，使蛋白質依分子量大小分開，再將膠上的蛋白質以 90 伏特(V)電壓 transfer 到 NC paper 上。將 transfer 完成的 NC paper 置於 0.5% 的脫脂牛奶，於室溫下進行 blocking 一小時，之後再以緩衝溶液清洗 2~3 次，每次 10 分鐘以洗去未專一性結合的抗體。之後加次一級抗體 (1:500)，於 4°C 下作用 overnight，隔天再以緩衝溶液清洗 2~3 次後再加入次級抗體 (1:10000)，於室溫下 1 小時，再以緩衝溶液清洗 2~3 次。最後加入 ECL solution 以 1:1 方式加在 NC paper 上使其顯色作用，最後再利用高解析度自動冷光螢光影像分析儀(GE/ LAS4000 mini)來進行分析及定量，包含 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-13 蛋白質表現。

六、Real-time PCR 方法，同第一年，第四-(3)項目。

七、凝膠遷移或電泳遷移率分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) 方法，同第一年，第四-(4)項目。

八、統計分析 (Statistical Analysis) 同第一年第五項目。

第三年：洛神葉多酚萃取物 (HLP) 促進人類黑色素瘤 A375 細胞凋亡及生長週期停滯之作用。

一、細胞毒性測試 (Cytotoxicity assay, cell counting assay)

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 μ l) 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。

二、DAPI 螢光染色法

DAPI 染劑會辨認 DNA 裡 AT 序列的小凹槽並且與之結合，其吸收光波長為 345nm，螢光波長為 455 nm，因此可利用流式細胞儀分析或是直接使用螢光顯微鏡觀察，在本實驗裡是利用螢光顯微鏡直接觀察。將細胞以 1×10^5 /well 種於 6 well plate，待細胞長約 7~8 分滿後依序加入不同濃度 (0、0.1、0.5、1、5、10 mg) 黑蒜萃取液處理 24 小時後。培養 24 小時後，以 PBS 將細胞清洗三次，加入 3ml 4% paraformaldehyde 將細胞固定 30 分鐘後，再以 PBS 將細胞清洗三次，之後再加入 $15 \mu\text{l}$ 之 DAPI 染劑 ($1 \mu\text{g/ml}$)，於室溫下避光作用 15 分鐘，最後以螢光顯微鏡觀察細胞核外觀上的變化。凋亡細胞占有細胞百分比計算方式是在顯微鏡下每個樣本觀察 3 個視野(200 倍)，求取平均值計算細胞發生凋亡的百分比。

三、西方點墨法 (Western blotting)

首先製備細胞萃取蛋白 (cell lysate)。收集細胞，加入 RIPA buffer 與蛋白酵素抑制劑 (sodium orthovanadate、leupeptin 及 PMSF)，在 0°C 下震盪 30 分鐘，之後於 4°C 高速離心 ($10000 \times g$) 10 分鐘，所得上清液即為 cell lysate，可儲存於 -70°C 備用。接下來為所得蛋白定量，將 $30 \mu\text{l}$ cell lysate 加入 1 ml coomassie brilliant blue G-250，在室溫下反應 1 分鐘，利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 有一較大之吸光值，以 Spectrophotometer (HITACHI U-3210) 之可見光紫外光比色儀測定，並以 BSA 為蛋白質標準溶液，來換算細胞萃取液之蛋白質濃度。取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白與 5X loading dye 以 4:1 比例混合，以 95°C 加熱 10 分鐘，再置於冰上冷卻，即可作為電泳樣本。

至於 SDS-聚丙醯胺電泳 (SDS-PAGE) 膠片的配鑄，於鑄膠模型架設完成後，下層膠 (separating gel) 依照分子量所需而配製成 6-15%，上層膠 (stacking gel) 則為 4%。將配好之整組電泳玻璃膠體裝置移入電泳槽，把 running buffer 加入內槽需至玻璃上緣，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 color protein markers，然後把 running buffer 加入外槽也需蓋過電導線，連接電泳槽與電源供應器，先以 70 V 壓縮電泳樣本至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電流為 90 V，當 loading dye 跑至底線時才停止電泳。之後進行蛋白轉漬。將膠片截去上層膠之部份後置於兩張濾紙上，膠片上面放上與膠片大小相同之硝化纖維紙 (Nitrocellulose transfer membrane, NC paper)，再置兩張濾紙於其上，其中所有濾紙、NC paper 都必須以 transfer buffer 浸濕過。用玻璃棒趕走氣泡，再以夾板 (內含海綿襯墊) 夾緊，放入轉漬槽中，於冰上以固定電壓 100V 轉漬約 2 個小時。轉漬完成後，取出 NC paper，加入 5% milk blocking buffer，在室溫下搖晃 1 小時。以 washing buffer (TBS + 0.1% Tween 20) 清洗三次，每次 10 分鐘，之後加入一級抗體 (分析 bcl-2 family、caspase-3,-8,-9、cytochrome c 等蛋白)，在 4°C 下反應，隔天早上以 washing buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。接著再加入二級抗體，置於室溫作用 1 小時後，以 washing buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。最後將 NC paper 放入盤子 (Tray) 上，用面紙擦去多餘的 washing buffer，再以 Western Lightning (Enhanced chemiluminol Reagent: Oxidizing Reagent= 1:1；即 ECL substrate) 覆蓋整個 NC paper，在室溫下約反應一分鐘後，擦去多餘的 ECL substrate，將盤子放入 FUJIFILM LAS-3000 之冷光螢光影像分析系統中，以 ImageReader LAS-3000 Life 儀器控制軟體，在 Chemiluminescence 條件下拍得影像，並以 FUJIFILM-Multi Gauge V2.2 軟體定量蛋白密度。

四、細胞週期分析 (Cell cycle analysis)

(1) Cell cycle distribution (Flow cytometric analysis)

細胞處理 HLE 或 HLP 分別於 0-48 小時後收集，先以 PBS 沖洗，再用 trypsin-EDTA 將細胞打下 (不可用刮的)，離心去除上清液，重複沖洗、離心一次，最後取 pallet。隨即

將 pallet 打散後加入 1 ml 70 % ethanol 以固定細胞，保存於-20°C（勿超過三個月）。分析前先將檢體離心去除 ethanol，再以 PBS 沖洗，離心後取 pallet。將 pallet 輕彈打散，加入 1 ml PI（20 µg/ml propidium iodide、20 µg/ml RNase、0.1% Triton-X100）染色室溫下 15 min（要避光），以 Flow cytometer（FACS）分析。

(2) 細胞週期相關蛋白分析（Western blotting）

將經 HLE 或 HLP 處理之癌細胞分別於 0-48 小時後收取其 lysate，以 Western blotting 分析 p53 蛋白表現及磷酸化表現。

五、自體吞噬分析

(1) Acidic vesicular organelles stain（AVO stain）

自體吞噬是一種細胞內利用膜的構造將多餘或要代謝及有問題的蛋白質及胞器加以包裹，最後與溶酶體(lysosome)結合形成 autolysosome，予以分解並再加利用的機制，而形成這類的構造也被稱為 AVO。在活體狀態下，AVO 可以吞噬 acidine orange 進行活體染色，因此觀察 HLE 或 HLP 處理之後，細胞 AVOs 的形成。首先細胞經過不同濃度的 HLE 或 HL 處理之後，以 PBS 清洗三次，置換新的培養液，加入 acrdine orange 染劑(1 µg/ml)，於室溫下避光並染色 15 分鐘，移除培養液並以 PBS 清洗三次後加入新的培養液，於螢光顯微鏡下觀察細胞螢光之變化，並拍照記錄。

(2) 自體吞噬相關蛋白分析（Western blotting）

將經 HLP 處理之癌細胞分別於 48 小時後收取其 lysate，以 Western blotting 分析 ATG 蛋白表現。

六、Real-time PCR 等方法，同第一年，第四-(3)項目。

七、統計分析（Statistical Analysis）同第一年第五項目。

(五) 結果與討論（含結論與建議）

第一年：洛神花水萃（HSE）、洛神葉水萃（HLE）及其多酚萃取物（HPE、HLP）抗氧化、減少黑色素產生、加速角質代謝及減少皮膚皺紋產生等抗衰老功效之研究（in vitro）

5.1 洛神葉水萃萃取物（HLE）及多酚（HLP）之成份分析

一、定性分析

為使HLE及HLP製備固定標準化首先以HPLC分析10個多酚標準品：1. GA、2. protocatechuic acid (PCA)、3. catechin、4. (-)-epicatechin gallate (ECG)、5. ellagic acid、6. rutin、7. ρ -coumaric acid、8. ferulic acid、9. quercetin、10. naringenin，其滯留時間（retention time; RT）依序出現在4.55, 7.48, 9.40, 11.20, 13.27, 13.99, 14.41, 15.32, 21.64 和 24.47分鐘；另外，將洛神葉所萃取出之HLE或HLP與標準品（HLE + standard或HLP + standard）兩兩混合，其RT分別在幾個時間點相吻合，從Figure 1可得分析結果。總結Figure 1顯示：HLE包含兩個成份catechin和ellagic acid各別含量大約有4.25%和28.20%；而HLP包含六個成份catechin (7.4%)、ECG (16.53%)、ellagic acid (10.3%)、ferulic acid(0.7%)、以及quercetin (0.83%)。

二、定量分析

利用Folin-Ciocalteu方法測定HLE以及HLP各約莫得到5.22%和35.36%的總多酚含量（Fig. 1）。比較HLE經HPLC分析結果之多酚加總則為32.45 %，兩種試驗的多酚含量出現明顯的落差。以HPLC來論，它屬於定性分析，為使HLE製備固定標準化的一種評估方法；測定總多酚含量的Folin-Ciocalteu方法(33)卻會受制於標準品而有不同的分析結果。

另根據Table 1之結果顯示：類黃酮（catechin + ECG > 20%）這類多酚占HLP成分比例最高，續利用Jia方法分析萃取出之總黃酮含量。Table 1結果顯示：HLE以及HLP各約莫得到20.98%和74.96%的黃酮測定值。上述成份鑑定試驗證實HLP功能性成份之含量遠高於HLE，HLP

確為富含多酚之萃取物，其中以類黃酮的比例最高。然而在總花青素含量測定分析方面，兩種萃取物的含量都極低(<2%)。

5.2 洛神花(HSE、HPE)與洛神葉萃取物成份(HLE、HLP)對黑色素生成之測試

首先，將四種萃取物 HSE、HLE、HPE 及 HLP 進行 MTT 毒性測試 (Data not shown)，選取對人類黑色素 A375 細胞生長無影響之劑量進行測量黑色素生成之實驗。經由實驗結果發現，以 100-200 $\mu\text{g/ml}$ 洛神花多酚萃取物(HPE)抑制黑色素生成效果較為顯著。進一步，經 HPLC 分析 HPE 成分後發現，原兒茶酸(PCA)約佔 8.83% (Table 2)，100 $\mu\text{g/ml}$ HPE 萃取出物中含 8.83 $\mu\text{g/ml}$ (大約 50 μM) PCA。因此選擇洛神花活性物質 PCA 再進行黑色素生成分析。結果發現，隨 PCA 劑量增加至 50 μM ，黑色素生成有明顯抑制效果 (Fig. 2)。

5.3 原兒茶酸(PCA)抑制紫外線 B 誘發黑色素生成機制之分析

5.3.1 原兒茶酸(PCA)對於紫外線 B 曝照人類正常角質 HaCaT 細胞傷害之影響

利用人類正常角質細胞株 HaCaT，來進行不同濃度的 PCA (0~1000 μM)處理及培養 24 小時後，觀察其對於 HaCaT 存活率是否有產生影響，由 MTT assay 結果所示，0~1000 μM 的 PCA 濃度並沒有顯著影響 HaCaT 存活率(Fig.3A)。因此我們挑選低劑量 5、10 及 20 μM 等三個 PCA 濃度來做為本次實驗劑量濃度。以 10 mJ/cm^2 UVB 劑量曝照 HaCaT 後再加入 5、10 及 20 μM 濃度的 PCA 處理及培養 24 小時後，觀察其細胞存活率是否會受影響。由 Fig.3B 與 Fig.3C 結果所示，照射 UVB 後再加入 PCA 並無明顯影響細胞生長與細胞週期。

5.3.2 原兒茶酸(PCA)對於紫外線 B 曝照人類正常角質 HaCaT 細胞誘發 p53 及 POMC 表現之影響

利用 Real-time PCR，觀察經 10 mJ/cm^2 UVB 劑量曝照 HaCaT 後再加入 5、10 及 20 μM 濃度的 PCA 處理及培養 24 小時後，與 UVB 組相比，PCA 顯著的降低 p53 及 POMC 的 mRNA 表現量(Fig.4)。再分析蛋白表現，經 UVB 曝照後 nuclei-p53 蛋白表現量有顯著的增加，且經 UVB 曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理其表現有顯著地增加。cytosol-p53 再經其 UVB 曝照後蛋白質表現量有顯著的增加⁵，但曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理其表現有顯著地抑制 (Fig.5A)。此外，POMC 蛋白質表現量經 UVB 曝照後有顯著的增加，且曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理其表現有顯著地抑制 (Fig.5B)。最後再分析 p53 是否影響 POMC 的轉錄活性，利用 EMSA 的方法來分析 p53 與 DNA 結合能力。(Fig.6)。由實驗結果可得知，經 UVB 曝照後 p53 與 DNA 結合能力有顯著的上升，且再經 UVB 曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理其表現有顯著地抑制。

5.3.3 原兒茶酸(PCA)對於紫外線 B 曝照人類黑色素 A375 細胞傷害之影響

後續為確認 PCA 之細胞毒性，利用 A375 黑色素細胞，來進行不同濃度的 PCA (0~100 μM)處理及培養 24 小時後，觀察其對於 A375 存活率是否有產生影響，由 MTT assay 的結果所示，0~100 μM 的 PCA 濃度並沒有顯著影響 A375 之細胞存活率(Fig.7A)。因此我們挑選低劑量 20 及 50 μM 等濃度來做為本次實驗劑量濃度。以 5 mJ/cm^2 UVB 劑量曝照 A375 後再加入 20 及 50 μM 濃度的 PCA 處理及培養 24 小時後，觀察其細胞週期，由 Fig.7B 結果所示，照射 UVB 後再加入 PCA 並無明顯影響細胞生長與細胞週期。

5.3.4 原兒茶酸(PCA)對於紫外線 B 曝照人類黑色素 A375 細胞誘發 TRP-1、TRP-2、MITF 及 Tyrosine 表現之影響

利用 Real-time PCR，觀察經 5 mJ/cm^2 UVB 劑量曝照 A375 後再加入 20 及 50 μM 濃度的 PCA 處理及培養 24 小時後，其 TRP-1、TRP-2 基因之 mRNA 表現。由實驗結果可發現，再在經 UVB 曝照後其 TRP-1 及 TRP-2 的 mRNA 表現量有顯著的提高，且在 UVB 曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理，與 UVB 組相比其 TRP-1 及 TRP-2 mRNA 的表現量有顯著的降低 (Fig.8A, B)，同樣結果也在蛋白表現上得到證實(Fig.8C)；此外分析細胞膜上調控黑

色素生成的 MC1-R，同樣 PCA 也可抑制其表現(Fig.8D)。分析調控 TRP-1、TRP-2 及 Tyrosinase 的轉錄因子 MITF 表現，由實驗結果得知，經 UVB 曝照後 nucle-MITF 蛋白表現量有顯著的增加，且經 UVB 曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理其表現有顯著地抑制(Fig.9)。最後分析 Tyrosine 活性，利用細胞內 Tyrosinase 和等量的 L-Dopa 作用生成 Dopaquinone 促使黑色素產生，在波長 475nm 測量其吸光值，判斷 tyrosinase hydroxylase 活性效果。由實驗結果可得知，經 UVB 曝照後 A375 細胞內之黑色素含量有顯著的增加，且經 UVB 曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理其表現有顯著地抑制 (Fig.10A)，同樣結果也在 Tyrosinase zymography 酵素活性分析得到證實(Fig.10B)。

5.4 原兒茶酸(PCA)抑制紫外線 B 誘發膠原蛋白降解之研究

5.4.1 原兒茶酸(PCA)對於紫外線 B 曝照人類胎兒皮膚纖維母細胞 WS1 細胞傷害之影響

利用人類胎兒皮膚纖維母細胞 WS1 細胞，來進行不同濃度的 PCA (0~1000 μ M)處理及培養 24 小時後，觀察其對於 WS1 存活率是否有產生影響，由 MTT assay 的結果所示，0~1000 μ M 的 PCA 濃度並沒有顯著影響 WS1 之細胞存活率(Fig.11A)。因此我們挑選低劑量 10 及 50 μ M 等濃度來做為本次實驗劑量濃度。以 25 mJ/cm² UVB 劑量曝照 WS1 後再加入 10 及 50 μ M 濃度的 PCA 處理及培養 24 小時後，觀察其細胞週期，由 Fig.11B 結果所示，照射 UVB 後再加入 PCA 並無明顯影響細胞生長與細胞週期。

5.4.2 原兒茶酸(PCA)對於紫外線 B 曝照人類胎兒皮膚纖維母細胞 WS1 誘發 MMP 相關基因轉錄活性之影響

利用 Real-time PCR 方法，觀察經 25mJ/cm² UVB 劑量曝照 WS1 後再加入 10 及 50 μ M 濃度之 PCA 處理及培養 24 小時後，其 MMP 相關基因之 mRNA 表現。由實驗結果可發現，再在經 UVB 曝照後其 MMP-1、MMP-2 及 MMP-9 的 mRNA 表現量有顯著的提高。然而，曝照 UVB 後再加入不同劑量之 PCA 處理，與 UVB 組相比其 MMP-1、MMP-2 及 MMP-9 的 mRNA 表現量有顯著的降低(Fig.12)。利用 Gelatin zymography 試驗分析 MMP-2 及 MMP-9 之酵素活性(Fig.13A)，由結果所示，曝照 UVB 後再加入不同劑量之 PCA 處理，UVB 組其 MMP-2 及 MMP-9 之酵素活性在加入不同劑量之 PCA 處理後有顯著的降低。再利用 western blotting 分析其 MMP 相關蛋白之表現 (Fig.13B)。由實驗結果可得知，MMP-1 及 MMP-2 經 UVB 曝照後其蛋白表現量有顯著的增加。在經 UVB 曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理其 MMP-1 及 MMP-2 的蛋白質表現量有明顯的抑制。最後再分析 Pro-collagen 蛋白之表現 (Fig.13C)。由實驗結果可得知，經 UVB 曝照後 Pro-collagen 蛋白表現量有顯著的抑制，且經 UVB 曝照後再加入不同劑量之 PCA 處理其表現量有顯著地增加。

總結來看，本研究證實了洛神花當中多酚含量高的 PCA 具有抑制黑色素生成(分子機制詳見 Fig.14)及抗光老化(分子機制詳見 Fig.15)之功效，以利日後運用至保養產品上。而本年度順利建置美白抗皺細胞實驗模式，未來將可應用於大量篩選具潛力之天然物開發及應用。

第二年：洛神葉 (HLE、HLP) 與洛神花(HSE、HPE) 萃提取物成份抑制小鼠黑色素生成實驗

5.5 洛神葉 (HLE、HLP) 與洛神花(HSE、HPE) 萃提取物成份抑制小鼠黑色素生成實驗

5.5.1 HLE、HLP、HSE、HPE 萃提取物抑制裸鼠黑色素生成實驗

首先，將配置好的萃提取物取 300ul 均勻塗抹於裸鼠背上，塗抹完等待約 1~2 小時使水分揮發乾後，將裸鼠放入 UVB 光照機器中，設定照射劑量為 150mJ/cm²，照完即完成一次實驗，每星期照射三次，實驗為期 2 個月。因上年度分析洛神葉萃提取物成分發現主要含鞣花酸(EA)，故以 EA 為洛神葉實驗對照組；而洛神花萃提取物成分中主要含有原兒茶酸(PCA)，故以 PCA 為洛神花實驗之對照組。經由黑色素染色實驗結果發現(Fig. 16A)，UVB 照射組

背部皮膚黑色素比 control 組高出 3.46 倍，而以 5%洛神葉水萃(HLE)塗抹後，經 UVB 照射後，黑色素明顯降低許多(為 control 組的 1.34 倍)；在 5%洛神花水萃(HSE)組降低到接近 control 組(為 control 組的 1.08 倍)；而在 1%洛神葉多酚萃取物(HLP)組效果更優於鞣花酸(EA)組，且黑色素量只有 control 組的 0.79 倍；在 1%洛神花多酚萃取物(HPE)組效果更優於 1%原兒茶酸(PCA)組，且黑色素量只有 control 組的 0.84 倍。因此證實所有萃取物均能有效抑制 UVB 所誘導黑色素的生成，而且多酚萃取物效果為最佳(Fig. 16B)。

5.5.2 HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物抑制 C57BL/6 小黑鼠黑色素生成實驗

為更確認萃取物的美白功效，再以 C57BL/6 小黑鼠進行實驗。首先，將配置好的萃取物取 300ul 均勻塗抹於小黑鼠耳朵上，塗抹完等待約 1~2 小時使水分揮發乾後，將小黑鼠放入 UVB 光照機器中，設定照射劑量為 150mJ/cm²，照完即完成一次實驗，每星期照射三次，實驗為期 2 個月。同樣洛神葉萃取物以 EA 為洛神葉實驗對照組；而洛神花萃取物以 PCA 為洛神花實驗之對照組。由 Fig. 17A 結果可明顯觀察到 UVB 照射組耳朵皮膚黑色素比 control 組高，而以洛神葉水萃(5%、10%HLE)塗抹後，經 UVB 照射後，黑色素明顯降低許多；在洛神花水萃(5%、10%HSE)組也可以明顯觀察到；而在洛神葉多酚萃取物(0.5%、1%HLP)組或是洛神花多酚萃取物(0.5%、1%HPE)組也有顯著效果。再將小黑鼠耳朵進行黑色素切片染色，由染色結果也更加證實所有萃取物均能有效抑制 UVB 所誘導黑色素的生成，而且多酚萃取物效果為最佳 (Fig. 17B)。

5.5.3 HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物抑制裸鼠黑色素生成之分子機制分析

因動物實驗結果顯示，HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物均能有效抑制裸鼠黑色素生成，而其中以 HLP 實驗組的抑制效果最為顯著，故選取 HLP 組皮膚進行分析實驗。為了解 HLP 如何抑制黑色素生成之分子機制，將實驗後取得之裸鼠背部皮膚，萃取蛋白質後進行 Western blotting 分析，初步分析結果顯示，HLP 明顯抑制經由 UVB 照射所誘發的 TRP-1 與 TRP-2 蛋白質表現，未來可針對 TRP-1 與 TRP-2 的調控機制進行更深入的分析研究(Fig. 18)。

5.5.4 HLE 萃取物抑制 B16F0 黑色素細胞生成黑色素及其相關分子機制分析

5.5.4.1 不同濃度的 HLE 對於 α -MSH 所誘發的黑色素生成作用及酪胺酸酶活性之影響

因洛神葉萃取物於 C57BL/6 小黑鼠中具有良好抑制黑色素生成效果，因此我們利用 C57BL/6 小黑鼠所分離出之 B16F0 黑色素細胞進行詳細分子機制探討。過去研究指出，當細胞受到 UVB 照射會刺激分泌促黑激素(α -MSH)，因此我們利用 α -MSH 刺激 B16F0 細胞為模式，再加入不同濃度之 HLE，並以 HLE 中主要多酚物質 EA 為對照組進行實驗。首先我們分析 HLE 對於黑色素生成作用之影響，將 B16F0 細胞投予不同濃度的 HLE (25、50 和 100 μ g/ml)及 EA 5 μ M 後，再加入 1 μ M α -MSH 共同培養 48 小時，觀察細胞之黑色素產量是否受到影響。結果顯示，經 α -MSH 處理後 B16F0 細胞內之黑色素含量增加至控制組的 167.9 %；而給予 HLE 會抑制黑色素的產生，並且具有劑量依存效應(dose-dependent)，HLE (25、50 和 100 μ g/ml)之黑色素含量分別降低至控制組的 138.6 %、120.2 % 和 107.5 %；而 5 μ M EA 之黑色素含量降低至控制組的 105.3 % (Fig. 19A)。而 HLE 對於酪胺酸酶活性之影響，結果顯示，經 α -MSH 處理後 B16F0 細胞內之酪胺酸酶活性增加至控制組的 273.4 %；而給予 HLE 會抑制酪胺酸酶的活性，並且呈現 dose-dependent，HLE (25、50 和 100 μ g/ml)之酪胺酸酶活性分別降低至控制組的 211.3 %、133.5 %和 130.2 %；而 5 μ M EA 之酪胺酸酶活性降低至控制組的 116 % (Fig. 19B)。

5.5.4.2 不同濃度的 HLE 對於 α -MSH 所誘發酪胺酸酶、TRP-1 及 TRP-2 相關蛋白及 mRNA 表現之影響

接下來我們利用 Western blotting 分析酪胺酸酶、TRP-1、TRP-2 等蛋白表現。結果顯

示，經 α -MSH 處理後酪胺酸酶及 TRP-1 蛋白的表現分別增加至控制組的 5.7 倍及 1.67 倍；而給予 HLE 會抑制酪胺酸酶及 TRP-1 蛋白之表現，HLE (25、50 和 100 $\mu\text{g/ml}$) 之酪胺酸酶蛋白表現降低至控制組的 3.8 倍、3.3 倍及 2.4 倍；而 TRP-1 之表現降低至控制組的 1.13 倍、0.96 倍及 0.79 倍；而 5 μM EA 的酪胺酸酶及 TRP-1 蛋白表現分別降低至控制組的 2.4 倍及 0.59 倍。然而 α -MSH、HLE 與 EA 對於 TRP-2 蛋白之表現，沒有顯著的影響 (Fig. 20A)。利用 Real-time PCR 分析酪胺酸酶、TRP-1 及 TRP-2 基因之 mRNA 表現。結果顯示， α -MSH 顯著誘發酪胺酸酶及 TRP-1 基因之 mRNA 表現，分別增加至控制組的 1.71 倍及 1.32 倍；而給予 HLE 會抑制酪胺酸酶及 TRP-1 之 mRNA 表現，HLE(25、50 和 100 $\mu\text{g/ml}$) 之酪胺酸酶 mRNA 表現分別降低至控制組的 1.18 倍、0.98 倍及 1.13 倍；而 TRP-1 mRNA 之表現分別降低至控制組的 1.05 倍、0.77 倍及 0.61 倍；而 5 μM EA 組的酪胺酸酶及 TRP-1 之 mRNA 表現分別降低至控制組的 1.08 倍及 0.98 倍。然而 α -MSH、HLE 與 EA 對於 TRP-2 mRNA 之表現，沒有顯著的影響 (Fig. 20B)。

5.5.4.3 不同濃度的 HLE 對於 α -MSH 所誘發 MC1R/cAMP/PKA 訊息路徑之影響

過去文獻指出 α -MSH 與其接受器 MC1R 結合後，會活化 cAMP / PKA 路徑，促進黑色素的生成(26)，為了釐清 HLE 抑制黑色素生成作用之分子機轉，我們利用 Western blotting 分析 cAMP / PKA 路徑相關蛋白之表現。首先我們先觀察 HLE 對於 MC1R 表現之影響，結果顯示， α -MSH 會誘發 MC1R 蛋白表現，增加至控制組的 1.17 倍；而給予 HLE 會抑制 MC1R 蛋白表現，HLE (50、100 $\mu\text{g/ml}$) 分別降低至控制組的 0.84 倍、0.87 倍；而 5 μM EA 的 MC1R 蛋白表現降低至控制組的 0.73 倍 (Fig. 21A)。接下來分析 HLE 對於細胞內 cAMP 濃度之影響，我們利用 cAMP 商業套組分析細胞內 cAMP 濃度之變化。結果顯示， α -MSH 顯著提高細胞內 cAMP 濃度，與控制組相比增加至 169.8 %；而給予 HLE 會降低細胞內 cAMP 的濃度，HLE (25、50 和 100 $\mu\text{g/ml}$) 之 cAMP 濃度分別降低至控制組的 124.5 %、112.9 % 及 113 %；而 5 μM EA 組細胞內 cAMP 降低至控制組的 107.9 % (Fig. 21B)。

然後我們利用 Western blotting 分析 p-PKA、PKA、p-CREB 和 CREB 蛋白表現之變化。結果顯示， α -MSH 誘發 p-PKA 蛋白之表現，增加至控制組的 1.3 倍，而給予 HLE 會抑制 p-PKA 蛋白之表現，HLE(25、50 和 100 $\mu\text{g/ml}$) 之 p-PKA 蛋白表現分別降低至控制組的 1.09 倍、1.08 倍及 0.83 倍，而 5 μM EA 之 p-PKA 蛋白表現降低至控制組的 0.36 倍；而 HLE 100 $\mu\text{g/ml}$ 與 5 μM EA 細胞質中 p-CREB 的表現分別降低至 0.86 倍及 0.76 倍 (Fig. 21C)。

5.5.4.4 不同濃度的 HLE 對於 α -MSH 所誘發細胞核內 p-CREB 和 MITF 蛋白表現之影響

過去研究指出 α -MSH 可以藉由增加 CREB 及 MITF 等轉錄因子的活化，促進酪胺酸酶的表現，進而增加黑色素的生成(27)，因此我們利用 Western blotting 分析 HLE 對於細胞核內 p-CREB 和 MITF 蛋白表現之影響。結果顯示， α -MSH 顯著增加 p-CREB 及 MITF 蛋白之表現，與控制組相比分別增加至 1.21 倍及 1.5 倍；而給予 HLE 會抑制 p-CREB 及 MITF 之蛋白表現，兩者皆於 HLE 濃度在 50 $\mu\text{g/ml}$ 開始發揮抑制作用，HLE (50 和 100 $\mu\text{g/ml}$) 之 p-CREB 表現分別降低至控制組的 1.09 倍及 0.98 倍；5 μM EA 則降低至 1.04 倍；而 MITF 之表現則分別降低至控制組的 1.06 倍及 0.98 倍，而 5 μM EA 則降低至控制組的 0.88 倍 (Fig. 22A)。

5.5.4.5 不同濃度的 HLE 對於 α -MSH 所誘發核內轉錄因子 MITF 與 DNA 結合能力之影響

我們推測 HLE 抑制黑色素生成是透過干擾 MITF 的活性，因此我們利用 EMSA 的方法來分析轉錄因子 MITF 與 DNA 的結合能力。由實驗結果可以得知，經過 α -MSH 處理後 MITF 與 DNA 結合能力增加至控制組的 1.2 倍；而給予 HLE 會抑制 MITF 與 DNA 的結合能力，HLE 50 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 之 MITF 與 DNA 的結合能力降低至控制組的 1.1 倍和 0.6 倍，而 5 μM EA 之 MITF 與 DNA 的結合能力降低至控制組的 0.6 倍 (Fig. 22B)。

5.6 洛神花(HSE、HPE)與洛神葉萃取物成份(HLE、HLP)抑制小鼠皺紋生成實驗

5.6.1 HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物抑制裸鼠皺紋生成實驗

首先，將配置好的萃取物取 300ul 均勻塗抹於裸鼠背上，塗抹完等待約 1~2 小時使水分揮發乾後，將裸鼠放入 UVB 光照機器中，設定照射劑量為 150mJ/cm²，照完即完成一次實驗，每星期照射三次，實驗為期 2 個月。由 Fig. 23A 結果發現，UVB 照射組明顯增加許多皺紋，甚至有曬傷的情況，而在給予萃取物之組別則有所改善。為更進一步確認萃取物抗皺之功效，將裸鼠背部皮膚取下進行膠原蛋白染色，由 Fig. 23B 結果發現，HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物均能有效抑制 UVB 照射所導致膠原蛋白層的變薄，推論各萃取物能抑制皺紋生成。再由 Fig. 23C 量化結果發現，UVB 照射後，其藍色膠原蛋白層明顯減少(為 control 組的 0.7 倍)，而給予各萃取物後均有所改善，其中洛神葉水萃組(5%HLE 為 control 組的 0.95 倍)效果優於洛神花水萃組(5%HSE 為 control 組的 0.84 倍)；而在多酚萃取物組，不論是洛神葉多酚萃取物(0.5%、1%HLP)組或是洛神花多酚萃取物(0.5%、1%HPE)組，膠原蛋白層都接近 control 組的厚度。但實驗中卻發現，純物質組抗皺效果似乎都優於萃取物，由其在 0.5%PCA 組發現，其膠原蛋白層增厚為 control 組的 1.23 倍。

5.6.2 HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物抑制裸鼠皺紋生成之分子機制分析

由動物實驗結果發現，HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物均能有效抑制裸鼠皺紋生成(抑制膠原蛋白分解)，而其中 HLP 與 HPE 多酚萃取物組抗皺效果優於水萃物組，故選取 HLP 與 HPE 組進行初步分析實驗。為了 HLP 與 HPE 抑制皺紋生成之分子機制，將實驗後取得之裸鼠背部皮膚，萃取蛋白質後進行 Western blotting 分析，初步分析結果顯示，HLP 可以抑制 MMP-1、MMP-2、MMP-8 及 MMP-13 的表現(Fig. 24A)；而在 HPE 組發現，0.5%HPE 能抑制 MMP-2 的蛋白表現(Fig. 24B)，未來可針對 MMP 家族的調控機制進行更深入的分析研究。

5.7 洛神花(HSE、HPE)與洛神葉萃取物成份(HLE、HLP)對於裸鼠生理之影響

為了解裸鼠體重是否影響到實驗結果，因此在每週實驗進行前測量體重，經由 8 週統計結果發現，各組體重變化並無顯著差異(Fig. 25)。並於第 8 週實驗結束時，將裸鼠血液收集入 EDTA-coated tubes，然後離心，進行血液生化值分析，分析項目包括 BUN、Cre、Sugar、TP、GLO、GOT、GPT、Cholesterol、TG，做為肝功能、腎功能是否受 HSE、HLE、HPE 及 HLP 之影響。分析結果整理於 Table 3 與 Table 4。

5.8 洛神葉水萃取物(HLE)或洛神葉多酚萃取物(HLP)對於 UVB 曝照引發皺紋生成之細胞實驗及其相關機制之分析

5.8.1 不同濃度的 HLE 或 HLP 對於 UVB 曝照人類胎兒皮膚纖維母 WS1 細胞存活之影響

經由動物實驗證實 HLE 及 HLP 皆能抑制 UVB 誘發裸鼠皮膚誘發 MMPs 的表現，因此接下來透過細胞實驗來證實。利用人類胎兒皮膚纖維母細胞株 WS-1 進行不同濃度的 HLE (0-1 mg/ml)、EA (0-50 μ M)、HLP (0-0.2 mg/ml)或 ECG (0-80 μ M)處理，培養 24 小時後，觀察其對於 WS1 存活率是否有產生影響，藉此判斷 HLE、EA、HLP 或 ECG 對細胞是否有毒性。由 Fig. 26 細胞計數結果可知，HLE (0.05-1 mg/ml)、EA (1-50 μ M)、HLP (0.05-0.1 mg/ml)及 ECG (20-40 μ M)皆不會影響 WS-1 的存活率。因此我們挑選中間沒有毒性之 HLE (0.1 和 0.2 mg/ml)劑量及其主成份 EA (10 和 20 μ M)、HLP (0.05 和 0.1 mg/ml)及其成份 ECG (20 和 40 μ M)濃度作為後續實驗劑量濃度。

5.8.2 不同濃度的 HLE 或 HLP 對於 UVB 曝照人類胎兒皮膚纖維母 WS1 細胞內 pro-collagen 降解之影響

接下來利用 Western blotting 分析其 pro-collagen 之表現。由 Fig. 27A 結果可知，經 UVB 曝照後與控制組相比其 pro-collagen type I 顯著減少為 0.40 倍；而給予 UVB+HLE (0.1 和 0.2

mg/ml)組與控制組相比其 pro-collagen type I 分別顯著回復為 0.49 和 0.49 倍;給予 UVB+EA (10 和 20 μ M)組與控制組相比其 pro-collagen type I 分別顯著回復為 0.57 和 0.57 倍。另一方面,由 Fig. 27B 結果可知,經 UVB 曝照後與控制組相比其 pro-collagen type I 顯著減少為 0.38 倍;而給予 UVB+HLP (0.05 和 0.1 mg/ml)組或 ECG (20 和 40 μ M)組與控制組相比其 pro-collagen type I 則無回復作用。因此,後續細胞實驗以 HLE (0.1 和 0.2 mg/ml)及其成份 EA (10 和 20 μ M)為主軸,分析其調控 pro-collagen 之分子機制。

5.8.3 不同濃度的 HLE 或 HLP 對於 UVB 曝照人類胎兒皮膚纖維母 WS1 細胞誘發 collagenases (MMP-1/8/13)及 gelatinases (MMP-2/9)之表現

以知 Pro-collagen type I 由 MMPs 酵素所分解,所以接下來再利用 western blotting 分析其 MMPs 相關蛋白之表現,將結果分成兩大家族蛋白酶作探討,由 Fig. 28 A 結果可知,經 UVB 曝照後與控制組相比其 collagenases 家族系列之 MMP-1、MMP-8 和 MMP-13 的蛋白質表現量分別顯著提高為 1.56、1.67 和 1.19 倍;UVB+HLE 0.1 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 MMP-1 為 1.22 倍;UVB+HLE 0.2 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 MMP-1、MMP-8 及 MMP-13 為 1.17、1.22 和 0.83 倍;UVB+EA 10 μ M 組與控制組相比顯著減少 MMP-1、MMP-8 及 MMP-13 為 1.00、1.20 及 0.84 倍;UVB+EA 20 μ M 組與控制組相比顯著減少 MMP-1、MMP-8 及 MMP-13 為 0.83、0.94 及 0.91 倍。由 Fig. 28 B 結果可知,經 UVB 曝照後與控制組相比其 gelatinases 家族系列之 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白質表現量分別顯著提高為 1.89 和 1.57 倍;UVB+HLE 0.1 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 MMP-2 為 1.52 倍;UVB+HLE 0.2 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 MMP-2 及 MMP-9 為 1.27 及 1.21 倍;UVB+EA 10 μ M 組與控制組相比顯著減少 MMP-2 和 MMP-9 分別為 1.44、1.28 倍;UVB+EA 20 μ M 組與控制組相比顯著減少 MMP-9 為 0.70 倍。上述結果證明了 HLE 可以去抑制 UVB 誘發 collagenases 家族及 gelatinases 家族之 MMPs 的表現。

5.8.4 不同濃度的 HLE 或 HLP 對於 UVB 曝照人類胎兒皮膚纖維母 WS1 細胞誘發 MMP 相關基因轉錄活性之影響

由於 HLE 可以去抑制 UVB 誘發 collagenases 家族及 gelatinases 家族之 MMPs 的表現。因此,接下來利用 real time-PCR 方法探討 UVB 對於 WS-1 細胞之 MMPs mRNA 表現的影響。由 Figure 29 A 結果可知,經 UVB 曝照後與控制組相比其 collagenases 家族系列之 MMP-1 和 MMP-13 mRNA 表現量分別顯著提高為 1.65 和 9.60 倍;UVB+HLE 0.1 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 MMP-1 和 MMP-13 為 1.22 及 2.14 倍;UVB+HLE 0.2 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 MMP-1 和 MMP-13 為 0.75 和 2.42 倍;UVB+EA 10 μ M 組與控制組相比顯著減少 MMP-1 和 MMP-13 為 1.14 及 3.00 倍;UVB+EA 20 μ M 組與控制組相比顯著減少 MMP-1 和 MMP-13 為 1.08 及 2.38 倍。由 Fig. 29 B 結果可知,經 UVB 曝照後與控制組相比其 gelatinases 家族系列之 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白質表現量分別顯著提高為 1.26 和 1.91 倍;UVB+HLE 0.1 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 MMP-2 及 MMP-9 為 0.96 和 0.74 倍;UVB+HLE 0.2 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 MMP-2 及 MMP-9 為 0.77 及 0.32 倍;UVB+EA 10 μ M 組與控制組相比顯著減少 MMP-2 和 MMP-9 為 0.61 及 0.72 倍;UVB+20 μ M 組與控制組相比顯著減少 MMP-9 為 0.52 倍。上述結果證明了 HLE 可以去抑制 UVB 誘發 collagenases 家族及 gelatinases 家族之 MMPs mRNA 的表現。

5.8.5 不同濃度的 HLE 或 HLP 對於 UVB 曝照人類胎兒皮膚纖維母 WS1 細胞誘發細胞核相關蛋白之表現

上述的結果得知,HLE 可以調控 MMPs 的表現來增加 pro-collagen 的表現。過去研究指出 UVB 會經由調控 MMPs 轉錄因子來影響其表現量(28, 29),目前已知 MMPs 轉錄因子包含 AP-1 (Jun/Jun 或 Jun/Fos 二元體)以及 NF- κ B(30, 31)。因此接著利用 western blotting

分析其細胞核相關蛋白之表現。由 Fig. 30 結果可知，經 UVB 曝照後與控制組相比其 c-Fos 和 c-Jun 顯著提高 1.73 和 2.52 倍；UVB+HLE 0.1 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 c-Fos 為 1.24 倍；UVB+HLE 0.2 mg/ml 組與控制組相比顯著減少 NF- κ B、c-Fos 和 c-Jun 為 0.69、1.15 和 0.63 倍；UVB+EA 10 μ M 組與控制組相比顯著減少 c-Jun 為 1.23 倍；UVB+EA 20 μ M 組與控制組相比顯著減少 c-Fos 為 1.23 倍。

5.8.6 不同濃度的 HLE 或 HLP 對於 UVB 曝照人類胎兒皮膚纖維母 WS1 細胞誘發轉錄因子與 DNA 結合能力之影響

因 HLE 能明顯減少 UVB 所誘發細胞核內 c-Jun 和 c-Fos 之表現，所已後續實驗利用 EMSA 的方法來分析兩者轉錄因子與 DNA 結合能力之影響。由 Fig. 31 結果可知，經 UVB 曝照後與控制組相比其 AP-1 與 DNA 結合能力顯著提高為 1.25 倍；UVB+HLE (0.1 和 0.2 mg/ml) 組與控制組相比顯著減少為 0.90 和 1.02 倍；UVB+EA (10 和 20 μ M) 組與控制組相比顯著減少為 0.93 和 0.86 倍；而在 NF- κ B 轉錄活性方面，UVB+EA 10 μ M 組與控制組相比顯著減少為 0.76 倍；UVB+HLE (0.1 和 0.2 mg/ml) 組和 EA 20 μ M 組與控制組相比則無明顯變化。

總結來看，本研究證實了洛神花與洛神葉萃取物具有抑制黑色素生成及抗光老化之功效，以利日後運用至保養產品上。而本年度除順利完成洛神花與洛神葉各萃取物於動物體內實驗外，更進一步利用細胞模式證實洛神葉抑制黑色素生成及抑制皺紋生成之分子機制的完整研究。

第三年：洛神葉水萃酚萃取物 (HLP) 促進人類黑色素瘤 A375 細胞凋亡及細胞自噬之作用。

5.9 洛神葉多酚萃取物 (HLP) 對 A375 細胞毒殺作用

一、HLP 影響 A375 細胞存活率

利用細胞計數測試 HLP 影響 A375 細胞生長情形。結果發現，A375 細胞暴露在濃度 100 和 250 μ g/ml 之 HLP 在 48 小時觀察下，與 control 組對照可發現，A375 細胞在 100 μ g/ml 和 250 μ g/ml 之 HLP 處理下與控制組相比，其細胞存率降為 85% 及 60%，並呈現濃度依賴性 (Fig. 32)。

二、HLP 影響 A375 細胞凋亡

利用 DAPI 螢光染色實驗測試 HLP 造成 A375 細胞存活率下降是否經由細胞凋亡途徑。結果發現，A375 細胞暴露在濃度 100 和 250 μ g/ml 之 HLP 在 24 小時後，與 control 組對照可發現，細胞在 250 μ g/ml HLP 處理下可增加約 2.5 倍的細胞凋亡，並呈現濃度依賴性 (Fig. 33)。

5.10 洛神葉多酚萃取物 (HLP) 促進 A375 細胞凋亡之分子機制

HLP 促進 A375 細胞凋亡是透過何種機制？接下來利用西方點墨法分析與細胞凋亡相關蛋白的表現。結果發現，HLP 可促進細胞凋亡 caspase 家族 (caspase-3,8,9) 的蛋白活性表現 (Fig. 34A)；在 Bcl-2 家族的表現方面，Fig. 34B 顯示在 250 μ g/ml HLP 處理下，可抑制細胞凋亡的 Bcl-2, Mcl-1 蛋白及增加凋亡蛋白 Bid 及 Bax 表現；進一步分析細胞凋亡內在途徑指標蛋白 cytochrome c 的表現發現，隨著處理 HLP 劑量增加，使細胞質及粒線體內的 cytochrome c 明顯增加 (Fig. 34C)；最後再分析外在路徑 Fas 與 FasL 的表現同樣發現，HLP 可增加 FasL 的蛋白表現，並呈現濃度依賴性 (Fig. 34D)。初步證實：HLP 可以經由內在與外在途徑造成 A375 細胞凋亡增加。

5.11 洛神葉多酚萃取物 (HLP) 影響 A375 細胞自噬作用

細胞自噬作用 (Autophagy) 是屬於第二型細胞程序性死亡的途徑 (22)。在細胞受到環境因素刺激下 (包含受到感染、營養缺乏、環境壓力等) 會被啟動此程序 (23)。過去文獻也指出，

當細胞走向細胞凋亡時，同時也受到細胞自噬作用所控制(24)。而當細胞自噬被啟動下，相關調控蛋白會啟動細胞溶酶體系統，將細胞質胞器與溶酶體形成 autophagosomes 最後促使細胞經由溶酶體系統而自體吞噬分解(25)。因此，我們進一步利用 AVO 染色觀察 A375 細胞是否受到 HLP 刺激作用而走向細胞自噬作用。經由 AVO 螢光染色後觀察細胞發現，在 250 µg/ml HLP 處理下，與控制組相比可增加約 6 倍細胞的細胞自噬作用(Fig. 35A)；再利用流式細胞儀分析也發現，250 µg/ml HLP 處理下，與控制組相比可增加約 95.17%細胞的細胞自噬作用(Fig.35B)，為了更確認 HLP 是經由此途徑造成細胞死亡，我們加入細胞自噬作用抑制劑 3-MA，結果原本受 HLP 刺激而增加 95.17%的細胞自噬作用下降了 57.85%，因此更加證實 HLP 能造成 A375 細胞的細胞自噬作用。

5.12 洛神葉多酚萃取物 (HLP) 促進 A375 細胞自噬作用之分子機制

HLP促進A375細胞自噬是透過何種機制？接下來利用西方點墨法分析與細胞自噬相關蛋白的表現。結果發現，HLP可促進細胞自噬蛋白ATG9A, ATG16L1, Beclin-1, ATG5-ATG12, LC3及P63的蛋白活性表現 (Fig. 36A)；最後再分析調控細胞自噬作用PI3K class I路徑，結果發現，HLP可抑制PI3K class I, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR 的蛋白表現(Fig. 36B)；而在PI3K class III路徑，HLP並無影響(data not shown)。

綜合上述結果，HLP 抑制人類皮膚癌 A375 細胞生長作用是經由加速皮膚癌細胞的凋謝死亡及細胞自噬作用(Fig. 37)，而本研究成果將可應用於發展新的保健食品。希望藉由我們的發現可以在癌症治療或預防上能有所裨益。由於洛神葉在國內容易栽培，但過去一直被視為無經濟價值的植物部位，而 HLE 及 HLP 也容易分離，因此，本研究成果除了可應用於發展新的保健食品，也能推廣洛神植株之葉子為可食用之資源。

§ 參考文獻

1. Kerharo J. Senegal bisap (Hibiscus sabdariffa or Guinia sorrel or red sorrel) Plant Med Phytoher. 5,277-81, 1971.
2. El-Hamidi A, Saleh M, Ahmed SS. Hibiscus sabdariffa. J Chem U.S.A. 90, 127-30, 1966.
3. Ali MB, Satih WM, Mohamed AH, Homeida AM. Investigation of antispasmodic potential of Hibiscus sabdariffa calyces. J Ethnopharmacol. 31, 249-57, 1991.
4. Rankin SM, De Whalley CV, Hoult RS, Jessup W, Wilkins GM, Collard T, Leake DS. The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. Biochem Pharmacol. 45, 67-75, 1993.
5. Thanka T, Kojima T, Kawamori T, Yoshimi N, Mori H. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rat. Cancer Res. 53, 2775-9, 1993.
6. Tseng TH., Wang CJ, Kao ES, Chu CY. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. Chem Biol Interact. 101, 137-48, 1996.
7. Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. Biochem. Pharmacol. 60, 307-315, 2000.
8. Sachdewa A, Nigam R, Khemani LD. Hypoglycemic effect of Hibiscus rosa sinensis L. leaf extract in glucose and streptozotocin induced hyperglycemic rats. Indian J Exp Biol. 39, 284-6, 2001.
9. Ali BH, Al Wabel N, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. Phytother Res. 19, 369-75, 2005.
10. Sulaimon SS, Kitchell BE. The biology of melanocytes. Vet Dermatol. 14(2), 57-65, 2003.
11. Bologna, J. L. and S. J. Orlow. Melanocyte biology. In: Dermatology, (Eds J. L. Bologna, J. L. Jorizzo and R. P. Rapini). Mosby: London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto. 43-52, 2003.
12. Boissy, R. E., C. Skai and H. Zhao. Human tyrosinase related protein TRP-1 does not

- function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp. Dermatol.* 7: 198-204, 1998.
13. William.J.C. Photoaging. In: H. I. Maibach and P. Elsner (eds.), *Cosmeceuticals: Drugs vs. Cosmetics*, Marcel Dekker, 2000.
14. Goihman, Y. M. Skin aging and photoaging: an outlook. *Clin. Dermatol.* 14: 153-160, 1996.
15. Kim, H. H., Lee, M. J., Lee, S. R., Kim, K. H., Cho, K. H., Eun, H. C., Chung, J. H. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mechanisms of Ageing and Development.* 126: 1170-1177, 2005.
16. Polte, T. and Tyrrell, R. M. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Free Radical Biology & Medicine.* 36: 1566-1574, 2004.
17. Gibbs et al. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen.* 8(3), 192-203, 2000.
18. Yoshinori, T., Michihiro, H. and Katsunori, A. The relationship between quantitative change in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 12: 56-63, 1996.
19. Bohm, F., Edge, R., Lange, L. and Truscott, G. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *J. Photochem. Photobiol. B.* 44: 211-215, 1998.
20. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE. Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. *Cell.* 128, 853-864, 2007.
21. Bae JY, Choi JS, Kang SW, Lee YJ, Park J, Kang YH. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Experimental Dermatology.* 19, e182-e190, 2010.
22. Mayur V. Jain, et al., Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J. Cell. Mol. Med.*, 2013. 17(1): p. 12-29.
23. Park, J.H., et al., Autophagy regulates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. 268(1): p. 55-67.
24. Bursch, W., et al., Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *Journal of cell science*, 2000. 113: p. 1189-1198.
25. Kelekar, A., Autophagy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2005. 1066: p. 259-271.
26. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J: Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004, 84:1155-1228.
27. Busca R, Ballotti R: Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000, 13:60-69.
28. Ahn BN, Kim JA, Himaya SW, Bak SS, Kong CS, Kim SK: Chitooligosaccharides attenuate UVB-induced damages in human dermal fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012, 385:95-102.
29. Bond M, Baker AH, Newby AC: Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264:561-567.
30. Karin M, Liu Z, Zandi E: AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9:240-246.
31. May MJ, Ghosh S: Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998, 19:80-88.

§ 預期成果自評

1. 完成之工作項目

第一年：洛神花主要成分物質原兒茶酸(PCA)減少黑色素產生、加速角質代謝及減少皮膚皺紋產生等抗老化功效之研究 (in vitro)。

1. 完成洛神葉萃取物 (HLE 及 HLP) 之分離及成分鑑定。
2. 建立 UVB 照射皮膚細胞誘發黑色素生成模式。
3. 建立 UVB 照射皮膚細胞誘發膠原蛋白降解模式。
4. 確認洛神花主要成分物質原兒茶酸(PCA) 抑制 UVB 誘發黑色素生成機制分析。
5. 確認洛神花主要成分物質原兒茶酸(PCA)抑制 UVB 誘發膠原蛋白降解之研究。

第二年：洛神葉 (HLE、HLP) 與洛神花(HSE、HPE) 萃取物成份抑制小鼠黑色素生成實驗

1. 建立 UVB 照射 C57BL/6 小黑鼠耳朵誘發黑色素生成動物模式。
2. 建立 UVB 照射裸鼠背部皮膚誘發黑色素生成動物模式。
3. 建立 UVB 照射裸鼠背部誘發皮膚膠原蛋白降解動物模式。
4. 確認 HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物抑制 C57BL/6 小黑鼠黑色素生成實驗。
5. 確認 HLE 萃取物抑制 B16F0 黑色素細胞生成黑色素及其相關分子機制分析。
6. 確認 HLE、HLP、HSE、HPE 萃取物抑制裸鼠皺紋生成實驗。
7. 完成 HLE、HLP 萃取物抑制 UVB 曝照引發皺紋生成之細胞實驗及其相關機制之分析。

第三年：洛神葉水萃酚萃取物 (HLP) 促進人類黑色素瘤 A375 細胞凋亡及細胞自噬之作用。

1. 確認洛神葉多酚萃取物 (HLP) 對 A375 細胞之毒殺作用。
2. 確認洛神葉多酚萃取物 (HLP) 促進 A375 細胞凋亡之分子機制。
3. 確認洛神葉多酚萃取物 (HLP) 促進 A375 細胞自噬作用之分子機制。
4. 提出 HLP 開發為預防皮膚癌之潛力天然萃取物。

2. 對於學術研究、國家發展及其他應用方面預期之貢獻

- (1) 配合國家防癌目標，降低國人癌症發生率及死亡率，本研究物質洛神葉來自於台灣本土，且易栽培，產率高，可食用，為低毒或無毒之天然成份，將可大量生產，提供國人食用。
- (2) 研究之方法模式可為未來發展天然物美白、抗皺及抗癌作用研究之參考。
- (3) 研究之成果可提供產業界生產 HLE 及其多酚成份 HLP 為美容保健食品。
- (4) 研究之成果可提升洛神植株農業作物的經濟效益，並符合現今節能減碳之概念。

3. 對於參與之工作人員，預期可獲之訓練

- (1) 學習皮膚美白、抗皺之相關知識。
- (2) 學習更多皮膚美白、抗皺之機轉及體內外研究模式。
- (3) 學習細胞週期、細胞凋亡、細胞自噬等與癌症之相關性。
- (4) 學習如何從天然植物萃取出各純化成份與細胞培養、電泳點墨、切片染色、酵素活性、血清檢測、動物實驗等實驗方法。
- (5) 學習如何統整實驗數據。

4. 已完成之研究成果及績效

4.1. 期刊論文(SCI)

1. Hui-Hsuan Lin, Kuei-Chuan Chan, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang*, **Jing-Hsien Chen***. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Food Chemistry. 132, 880-891, 2012. [SCI] [Impact factor: 3.334 ; Ranking: 10/124] (洛神葉水萃取物分析)
2. **Jing-Hsien Chen**, Chau-Jong Wang, Hui-Hsuan Lin*. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of LXRA/ABCA1 pathway Journal of Agricultural and Food Chemistry. Food Chemistry. 141, 397-406, 2013. [SCI] [Impact factor: 3.334 ; Ranking: 10/124] (洛神葉多酚萃取物分析)
3. Hui-Hsuan Lin, Chun-Tang Chiu, Yi-Han Han, Tai-An Chiang, Fen-Pi Chou, **Jing-Hsien Chen***. Protocatechuic acid inhibits Ultraviolet B-induced melanogenesis in vitro and in vivo. Toxicology and Applied Pharmacology. Submitted.
4. Hui-Hsuan Lin, Jing-Wei Lin, **Jing-Hsien Chen***. The Inhibitory Effect of Hibiscus Sabdariffa

Leaf Extract on Melanogenesis in vitro and in vivo. Food Chemistry. Submitted.

5. Hui-Hsuan Lin, Shih-Shu Lu, **Jing-Hsien Chen***. The Inhibitory Effects of Hibiscus Sabdariffa Leaf Extract on UVB-induced Expression of Matrix Metalloproteinases in vitro and in vivo. Food Chemistry. Submitted.

6. Chia-Wen Tsai, Shu-Wen Hsuan, Kuei-Chuan Chan, **Jing-Hsien Chen***. Hibiscus Sabdariffa Leaf Polyphenolic Extract Induces Autophagy and Apoptosis in Human Melanoma Cells. Food and Chemical Toxicology. Under review.

4.2. 研討會論文

1. Hui-Hsuan Lin, Chin-Hsun Hsu, Yi-Han Han, Jing-Wei Lin, Tai-An Chiang, **Jing-Hsien Chen***, 2012, Protocatechuic acid inhibits ultraviolet B-induced melanogenesis via down-regulation of p53/proopiomelanocortin expression in human epidermal keratinocytes. The 27th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
2. **Jing-Hsien Chen**, Jenn-Yuan Sheu, Ting-Hsuan Wang, Liao-Shi Xian, Hui-Hsuan Lin, 2012, Chemopreventive Effects of Hibiscus sabdariffa Linne Leaf on Human Melanoma A375 Cells through Cell Cycle Inhibition. The 27th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
3. Shih-Shu Lu, Hui-Hsuan Lin, Cheng-Chin Hsu, **Jing-Hsien Chen***, 2013, The Inhibitory Effects of Hibiscus Sabdariffa Leaf Extract on UVB-induced Expression of Matrix Metalloproteinases in Human Dermal Fibroblast Cells. The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
4. Jing-Wei Lin, Hui-Hsuan Lin, Cheng-Chin Hsu, **Jing-Hsien Chen***, 2013, The Inhibitory Effects of Hibiscus Sabdariffa Leaf Extract on α -MSH Induced Melanogenesis in Mouse Melanoma B16 cells. The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
5. Hui-Hsuan Lin, Hsin-Pei Lee, Jenn-Yuan Sheu, **Jing-Hsien Chen***, 2013, Hibiscus Sabdariffa Leaf Polyphenolic Extract Induces Autophagy and Apoptosis in Human Melanoma Cells. The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.

4.3. 專書及專書論文

1. Han YH, 2011, 碩士論文：原兒茶酸抑制紫外線 B 誘發黑色素及膠原蛋白降解之研究 The inhibitory effects of protocatechuic acid on UVB-induced melanogenesis and collagen degradation.
2. Lin JW, 2013, 碩士論文：洛神葉萃取物抑制黑色素生成作用之研究 The study of inhibitory effect of Hibiscus sabdariffa leaf extracts on melanogenesis.
3. Lu SS, 2013, 碩士論文：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 The inhibitory effects of Hibiscus sabdariffa leaf extracts on UVB-induced expressions of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblast cells.

§ 附表及附圖

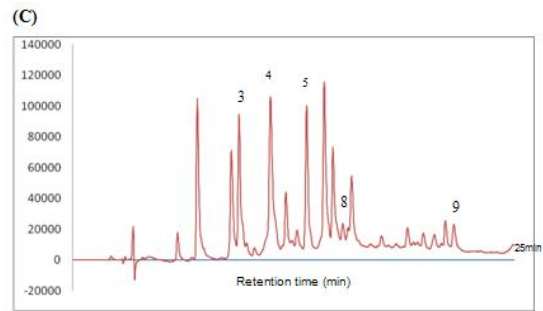
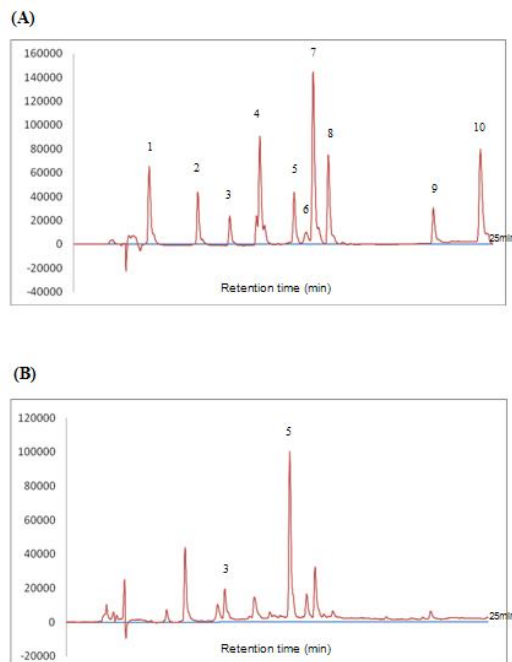


Table 1 – Composition of the HLE and HLP

Polyphenolic compound	Peak no.	HLE (%)	HLP (%)
Catechin	3	4.25 ± 1.43	7.40 ± 2.55
ECG	4	--	16.53 ± 5.58
Ellagic acid	5	28.20 ± 8.63	10.30 ± 3.40
Ferulic acid	8	--	0.70 ± 0.29
Quercetin	9	--	0.83 ± 0.38
Total (HPLC)		32.45	35.76
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)		5.22 ± 0.06	35.36 ± 1.09
Total flavonoid (Jia method)		20.98 ± 1.65	74.96 ± 9.37
Total anthocyanin (Fuleki and Francis method)		1.93 ± 1.24	1.33 ± 1.13

Table 2 – Composition of the HPE

Polyphenolic compound	Peak no.	HPE ^a (%)
PCA	2	8.83 ± 0.84
Catechin	3	9.97 ± 1.00
EGC	4	10.23 ± 1.41
EGCG	5	20.20 ± 1.73
Caffeic acid	6	18.10 ± 0.43
unknown		22.67

^a The HPE was prepared as described in Materials and Methods.

Fig. 1 (A) HPLC chromatogram of 10 kinds of standard polyphenols (10 mg/mL; 10 μ l). Peaks: 1, GA; 2, PCA; 3, catechin; 4, ECG; 5, ellagic acid; 6, rutin; 7, *p*-coumaric acid; 8, ferulic acid; 9, quercetin; and 10, naringenin. (B) HPLC chromatograms of free polyphenols from HLE (5 mg/mL; 10 μ l). Phenolic compounds correspond to peaks 3 and 5 as in (A). (C) HPLC chromatograms of free polyphenols from HLP (5 mg/mL; 10 μ l). Phenolic compounds correspond to peaks 3, 4, 5, 8 and 9 as in (A). Detector was set at 285 and 345 nm.

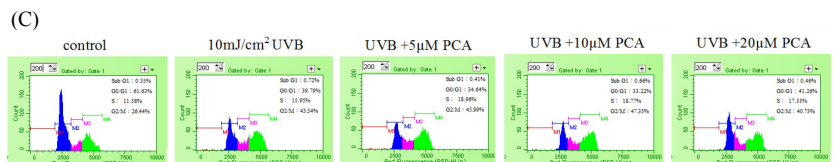
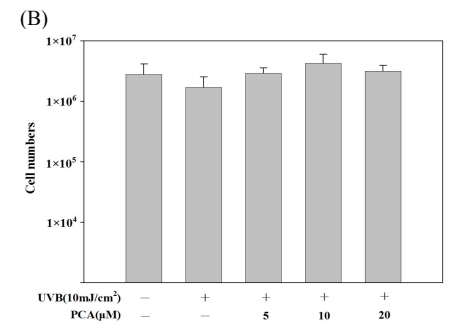
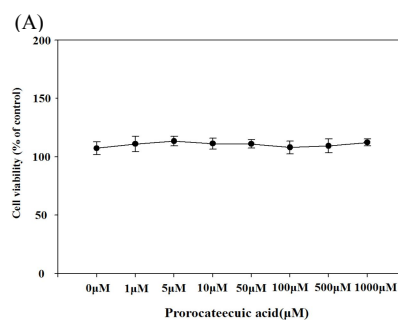
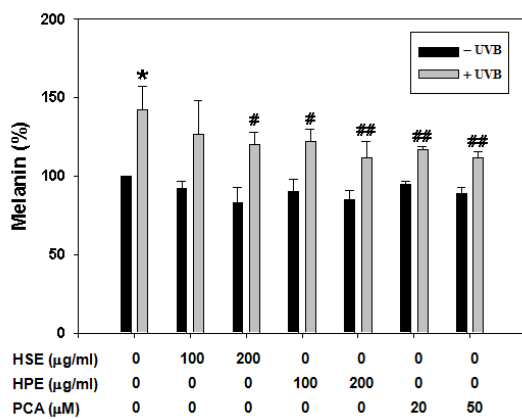


Fig. 2 Effect of HSE, HPE and prorocatechuic acid (PCA) on UVB-induced intracellular Melanin content in A375. A375 cells were stimulated with UVB (5 mJ/cm²) and the indicated various concentrations of HSE, HPE and PCA for 24 h. Cell lysates were collected to measure melanin content by ELISA analysis. Data shown are the average of three independent experiments \pm S.D. * P < 0.05, ** P < 0.005 compared with the control. # P < 0.05, ## P < 0.005 compared with the UVB. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

Fig. 3 Effect of prorocatechuic acid (PCA) on HaCaT cell viability and cell cycle progression. The viable cell was measured by MTT(A) assay and cell counting(B). Cell cycle progression was measured by flow cytometry(C). HaCaT cells were treated with various concentrations (0~1000 μ M) of PCA for 24 h. Data shown are the average of three independent experiments \pm S.D. * P < 0.05, ** P < 0.005 compared with the control. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

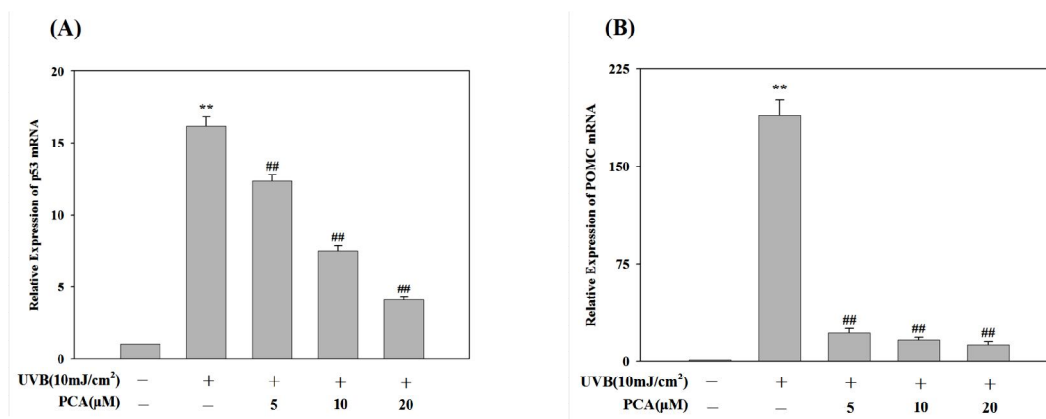


Fig. 4 Effect of prorocatechuic acid (PCA) on UVB-induced p53 and POMC expressions in HaCaT. HaCaT cells were stimulated with UVB (10mJ/cm²) and the indicated various concentrations (5,10,20μM) of PCA for 24 h. Total cellular RNA was analyzed by real-time PCR for p53 (A), POMC (B). Data shown are the average of three independent experiments ± S.D. **P* < 0.05, ***P* < 0.005 compared with the control. #*P* < 0.05, ###*P* < 0.005 compared with the UVB. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

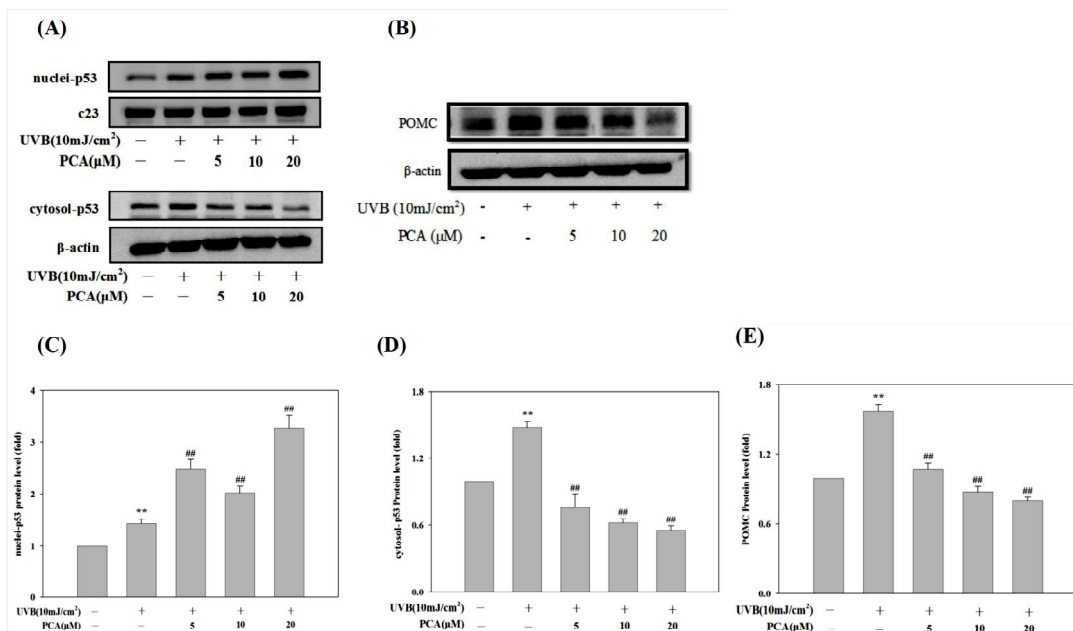


Fig. 5 Immunoblot analysis of prorocatechuic acid on UVB-induced nuclei and cytosol p53 and POMC protein expression in HaCaT. (A) HaCaT cells were stimulated with UVB (10mJ/cm²) and the indicated various concentrations (5,10,20μM) of PCA for 24 h after which cells were harvested and analyzed for the nuclei-p53 and cytosol-p53 protein. (B) POMC protein. Equal amounts of cell lysates (50μg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with specific nuclei-p53, (C) and cytosol-p53 (D), POMC (E) antibodies, and β-actin, served as internal control, antibodies. The results were represented by using an ECL system and represent the average of three independent experiments ± S.D. **P* < 0.05, ***P* < 0.005 compared with the control #*P* < 0.05, ###*P* < 0.005 compared with the UVB. DMSO (0.2%) served as the solvent control

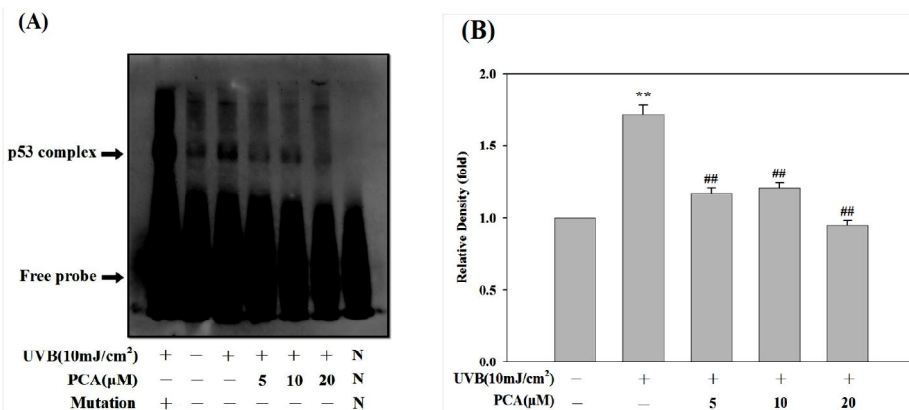


Fig. 6 Effect of prorocatechuic acid inhibits on UVB-induced p53 DNA binding activity in HaCaT. (A) HaCaT cells were stimulated with UVB (10mJ/cm²) and the indicated various concentrations (5,10,20μM) of PCA for 24 h and then nuclear extracts were analyzed for the DNA-binding activities of p53 biotin-labeled p53 specific oligonucleotide (POMC) by Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). (B) The quantitative data were represent the average of three independent experiments ± S.D. **P* < 0.05, ***P* < 0.005 compared with the control. #*P* < 0.05, ###*P* < 0.005 compared with the UVB. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

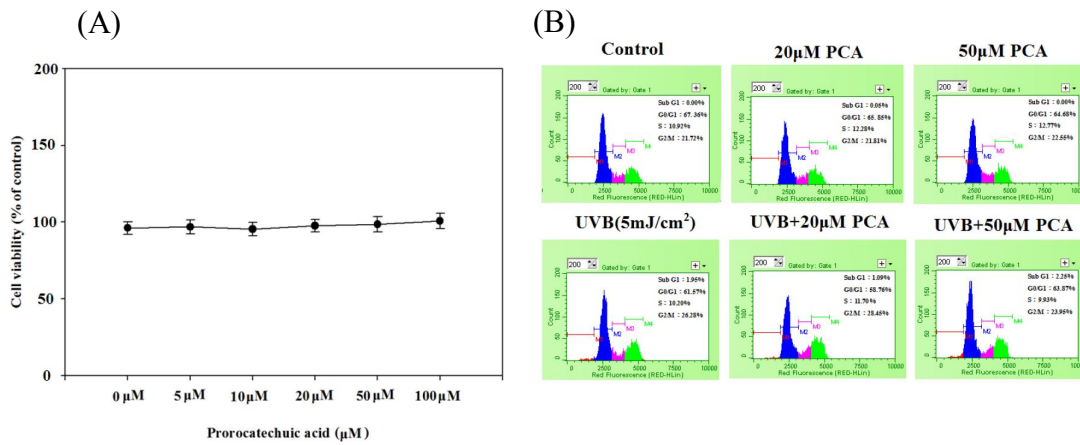


Fig. 7 Effect of procatechuic acid (PCA) on A375 cell viability and cell cycle progression. The viable cell was measured by MTT(A) assay. Cell cycle progression was measured by flow cytometry (B). A375 cells were treated with various concentrations (0~100μM) of PCA for 24 h.

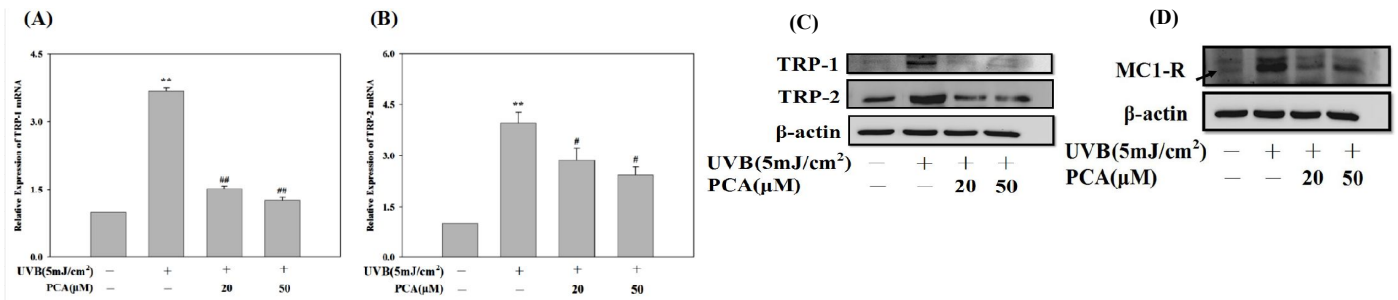


Fig. 8 Effect of procatechuic acid (PCA) on UVB-induced TRP-1, TRP-2, MC1-R expressions in A375. A375 cells were stimulated with UVB (5mJ/cm²) and the indicated various concentrations (20,50μM) of PCA for 24 h. Total cellular RNA was analyzed by real-time PCR for TRP-1 (A), TRP-2 (B). Protein expression was analyzed by Western blotting for TRP-1&2(C) and MC1-R(D). Data shown are the average of three independent experiments ± S.D. **P* < 0.05, ***P* < 0.005 compared with the control. #*P* < 0.05, ##*P* < 0.005 compared with the UVB. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

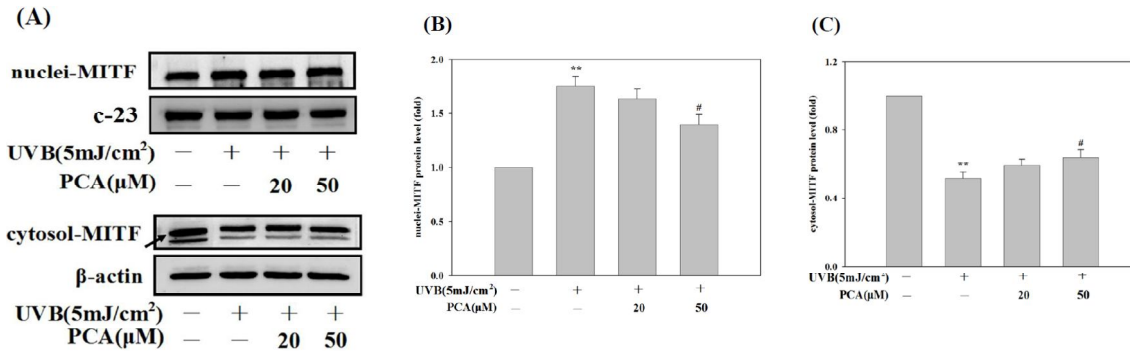


Fig. 9 Immunoblot analysis of procatechuic acid (PCA) on UVB-induced nuclei and cytosol MITF protein expression in A375 cell line. (A) A375 cells were stimulated with UVB (5mJ/cm²) and the indicated various concentrations (20,50μM) of PCA for 24 h after which cells were harvested and analyzed for the MITF protein. Equal amounts of cell lysates (50μg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with specific nuclei MITF (B), cytosol MITF (C) antibodies, and β-actin, served as internal control, antibodies. The average of three independent experiments ± S.D. **P* < 0.05, ***P* < 0.005 was compared with the control. #*P* < 0.05, ##*P* < 0.005 compared with the UVB. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

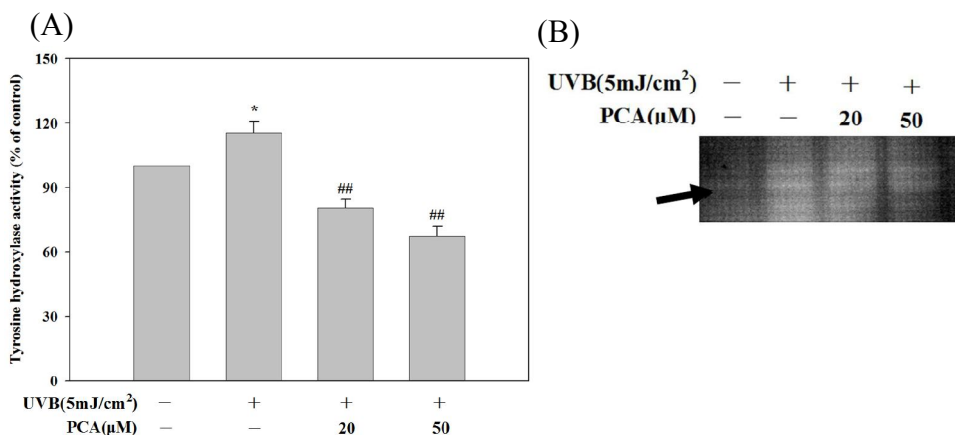


Fig. 10 Effect of procatechuic acid on UVB-induced tyrosine hydroxylase activity in A375. A375 cells were stimulated with UVB (5mJ/cm²) and the indicated various concentrations (20,50μM) of PCA for 24 h. Cell lysates were collected to measure melanin content by ELISA analysis(A) and Tyrosinase zymography(B). Data shown are the average of three independent experiments ± S.D. **P* < 0.05, ***P* < 0.005 compared with the control. #*P* < 0.05, ##*P* < 0.005 compared with the UVB. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

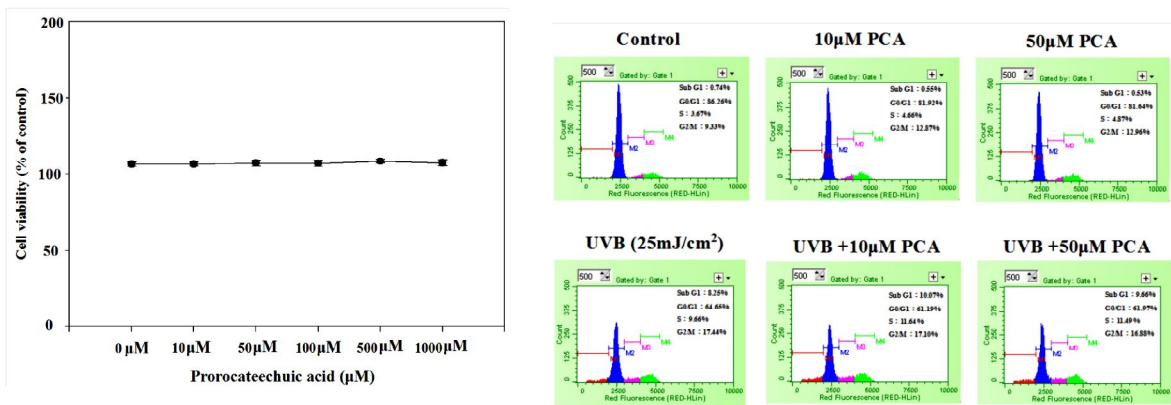


Fig. 11 Effect of prorocatechuic acid (PCA) on WS1 cell viability and cell cycle progression. The viable cell was measured by MTT(A) assay. Cell cycle progression was measured by flow cytometry(B). WS1 cells were treated with various concentrations (0~1000μM) of PCA for 24 h. Data shown are the average of three independent experiments ± S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared with the control. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

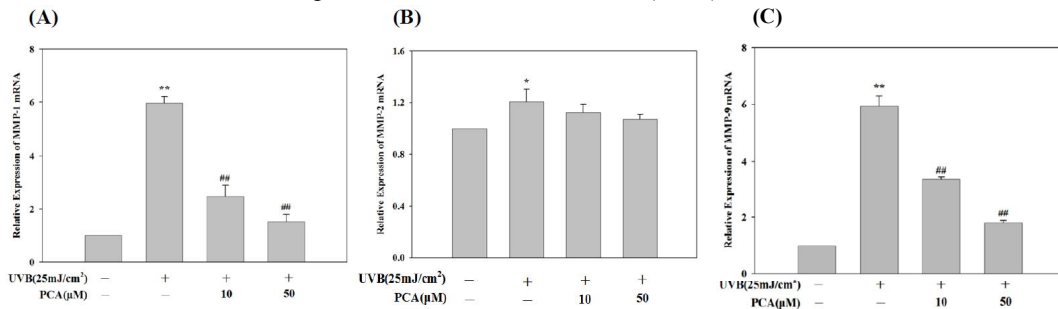


Fig. 12 Effect of prorocatechuic acid (PCA) on UVB-induced MMP-1, MMP-2 and MMP-9 mRNA expressions in WS1. WS1 cells were stimulated with UVB (25mJ/cm²) and the indicated various concentrations (10,50μM) of PCA for 24 h. Total cellular RNA was analyzed by real-time PCR for MMP-1 (A), MMP-2 (B), MMP-9 (C). Data shown are the average of three independent experiments ± S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared with the control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.005$ compared with the UVB. DMSO (0.2%) served as the solvent control.

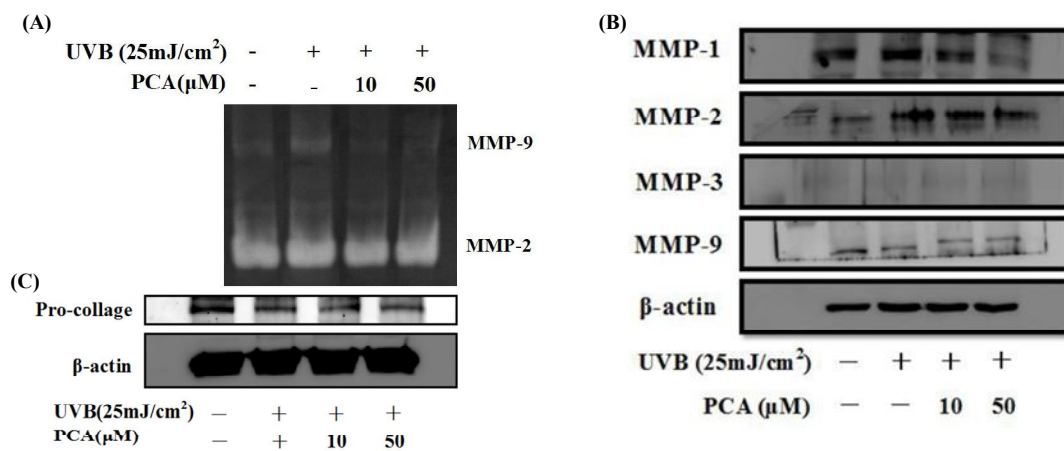


Fig. 13 Effect of prorocatechuic acid (PCA) on UVB-induced MMPs and Pro-collagen in WS1. All assays were measured 24 h after stimulated with UVB (25mJ/cm²) and the indicated various concentrations (10,50μM) of PCA in the culture supernatant. MMP-2 and MMP-9 enzymatic activity was measured by gelatin zymography(A). Immunoblot analysis of prorocatechuic acid (PCA) on UVB-induced MMP-1,2,3,9 protein(B) and pro-collagen(C) expression in WS1.

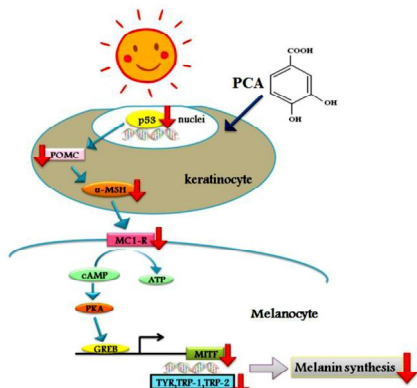


Fig. 14 Possible mechanism of prorocatechuic acid (PCA) regulates tanning pathway by p53/POMC and MITF pathway on HaCaT cell and A375 cell lines.

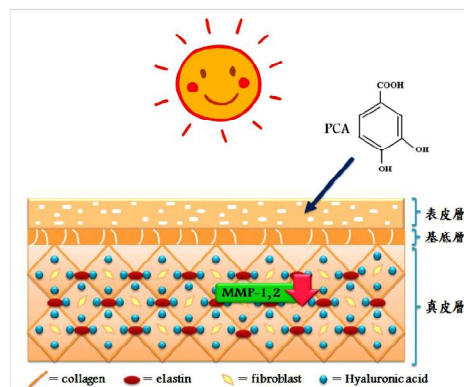


Fig. 15 Possible mechanism of prorocatechuic acid (PCA) regulates MMP expression on WS1 cell line.

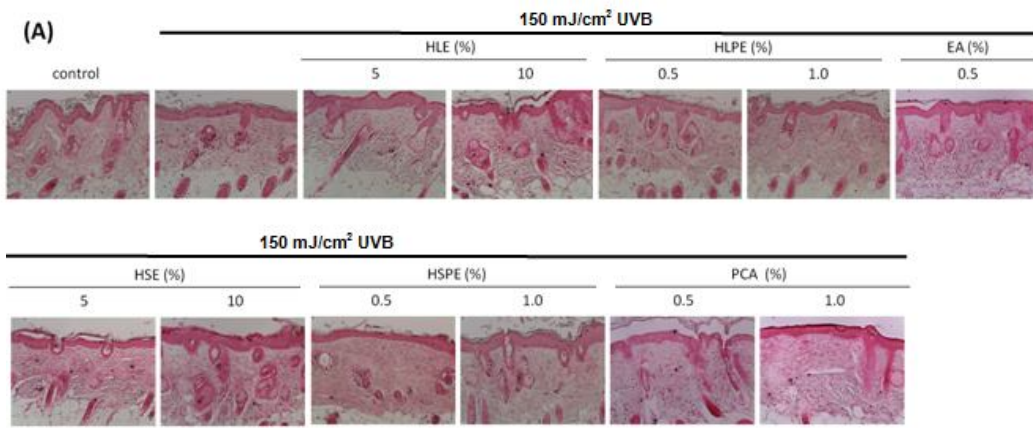


Fig. 16 Pigmentation formation after long term topical treatment with 6 kinds of agents, including HLE, HLP, EA, HSE, HSPE, and PCA, on the dorsal skin of hairless mice exposed to UVB radiation. The dorsal skin of hairless mice was topically treated with various doses of these agents. Skin specimens were obtained from dorsal skin of mice that were killed at the end of the 8-week experiments. Fontana-Masson staining of ear sections from the mice reveals differences in melanin content (A). Each photograph is representative of at least six animals. The quantitative data were presented as means \pm SD of from six animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control. ## $p < 0.01$ compared with the UVB-exposed group (B).

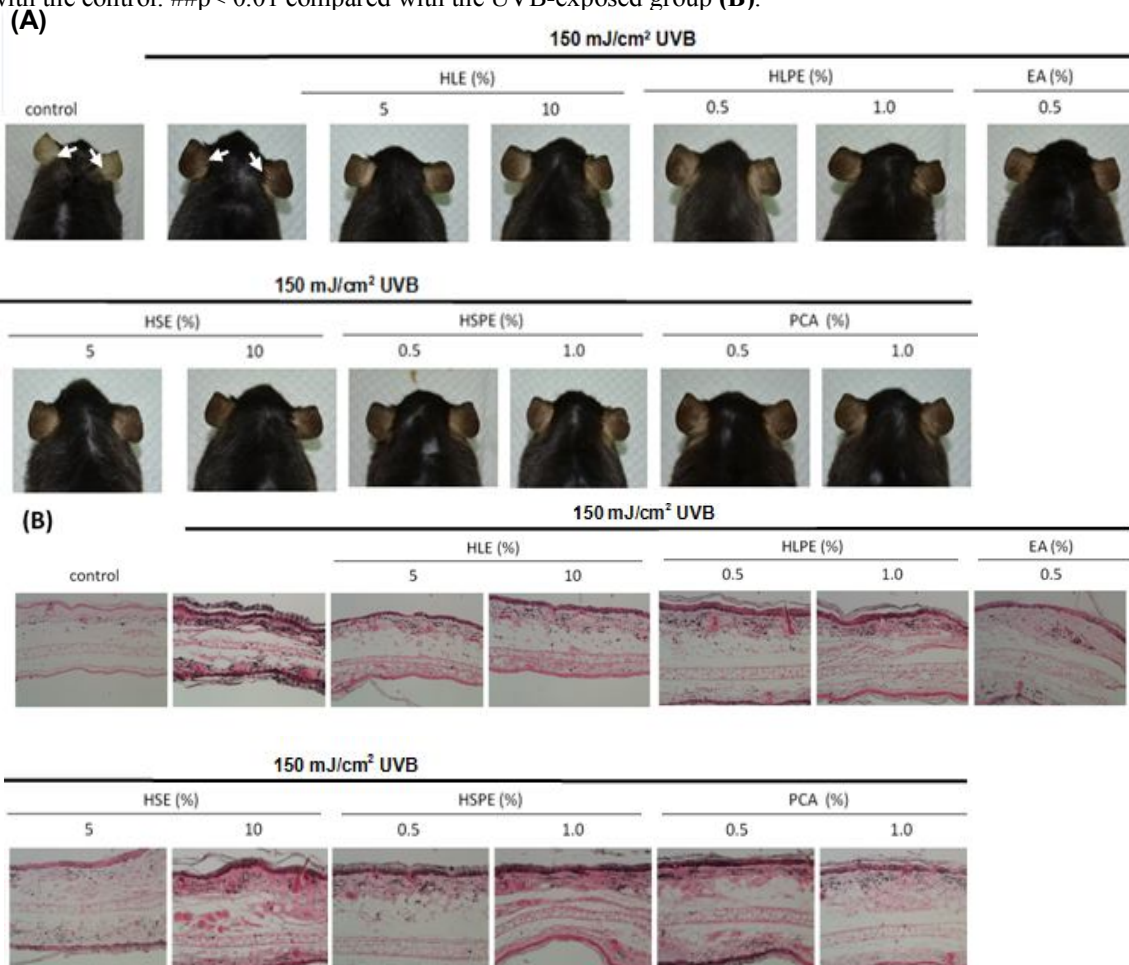


Fig. 17 Skin characteristics (A) and pigmentation formation (B) after long term topical treatment with 6 kinds of agents, including HLE, HLP, EA, HSE, HSPE, and PCA, on the ear skin of C57BL/6 mice exposed to UVB radiation. The ear skin of C57BL/6 mice was topically treated with various doses of these agents. Skin specimens were obtained from ear skin of mice that were killed at the end of the 8-week experiments. Skin pigmentation images were photographed by using a CCD optical camera and skin surface analysis was performed. Arrows indicate pigmentation differences between the ear skin of no-UVB control and UVB-exposed mice. Ear skin was employed because, unlike trunk/fur-bearing skin, epidermis of the ear contains melanocytes (akin to human skin). UVB-exposed mice tanned markedly in contrast to control or other treatment mice (A). Fontana-Masson staining of ear sections from the mice shown in (A) reveals differences in melanin content (B). Each photograph is representative of at least six animals.

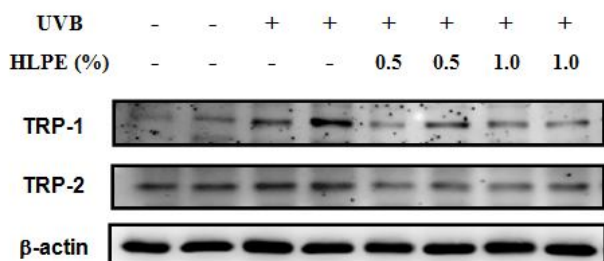


Fig. 18 Effect of HLP on the levels of TRPs proteins *in vivo*. The dorsal skin of hairless mice exposed to UVB was topically treated with 0.5% and 1.0 % of HLP. Skin specimens were obtained from dorsal skin of mice that were killed at the end of the 8-week experiments and Western blotting was carried out with skin tissue extracts from them. β -actin was served as an internal control. Results were representative of at least six animals.

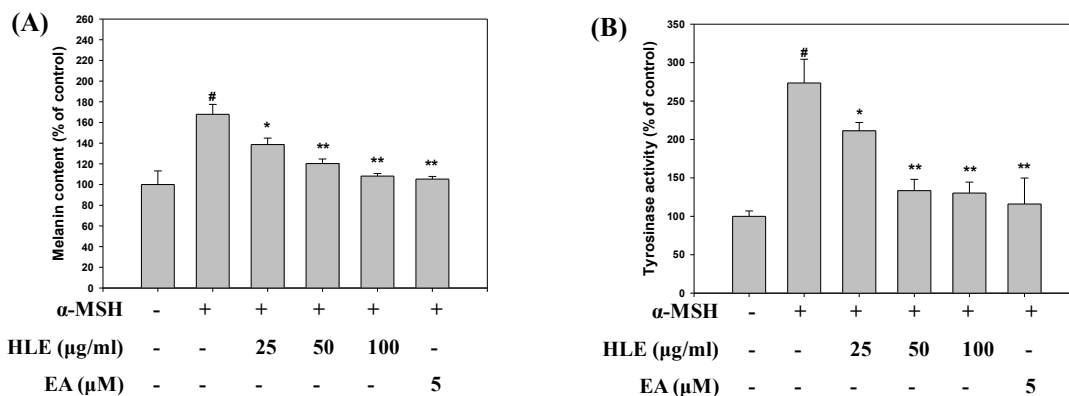


Fig. 19 Effects of HLE on α -MSH-induced cellular melanogenesis and tyrosinase activity in B16F0 cells. Cells were stimulated with α -MSH (1 μ M) and the indicated various concentrations of HLE (25, 50, 100 μ g/ml) and EA (5 μ M) for 48 h. (A) Cell pellets were harvested and photographed, and melanin content was measured. (B) Cell pellets were processed for the determination of tyrosinase activity. The results were represented the mean \pm S.D. of three independent experiments and the significant difference was established at $p < 0.05$. # $P < 0.01$ compared with the control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the α -MSH.

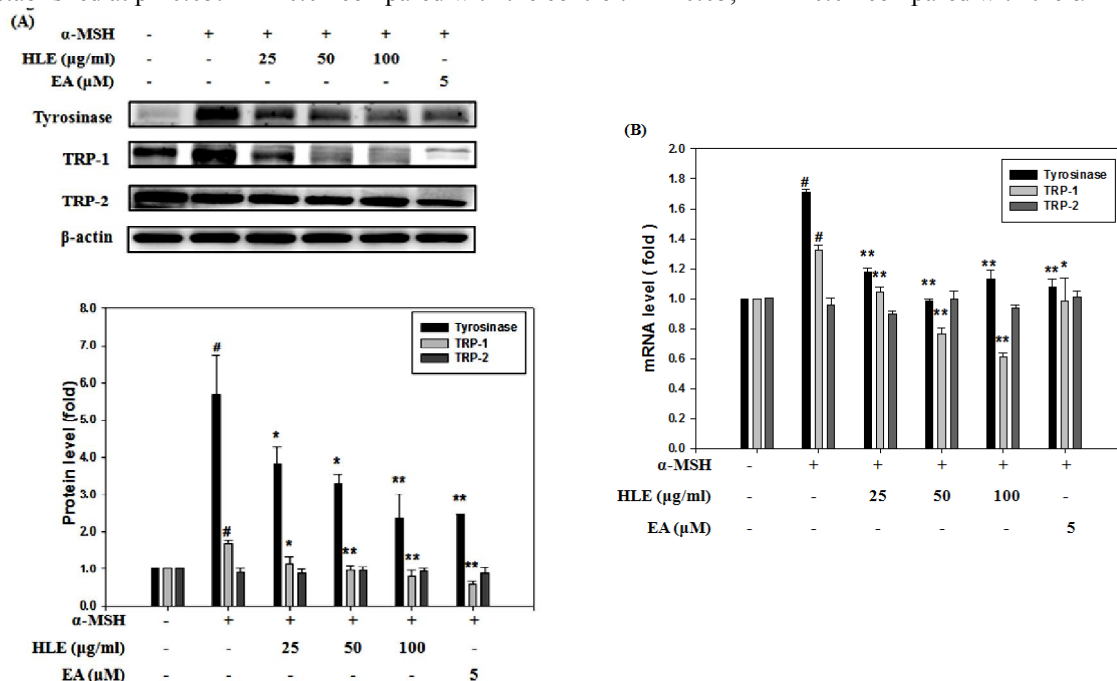


Fig. 20 Effects of HLE on α -MSH-induced tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 protein expression and mRNA level in B16F0 cells. Cells were stimulated with α -MSH (1 μ M) and the indicated various concentrations of HLE (25, 50, 100 μ g/ml) and EA (5 μ M) for 48 h. (A) Tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 proteins were analyzed by Western blotting. β -actin, served as internal control. (B) Total cellular mRNA was analyzed by real-time PCR for tyrosinase, TRP-1, and TRP-2. The results were represented the mean \pm S.D. of three independent experiments and the significant difference was established at $p < 0.05$. # $P < 0.01$ compared with the control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the α -MSH.

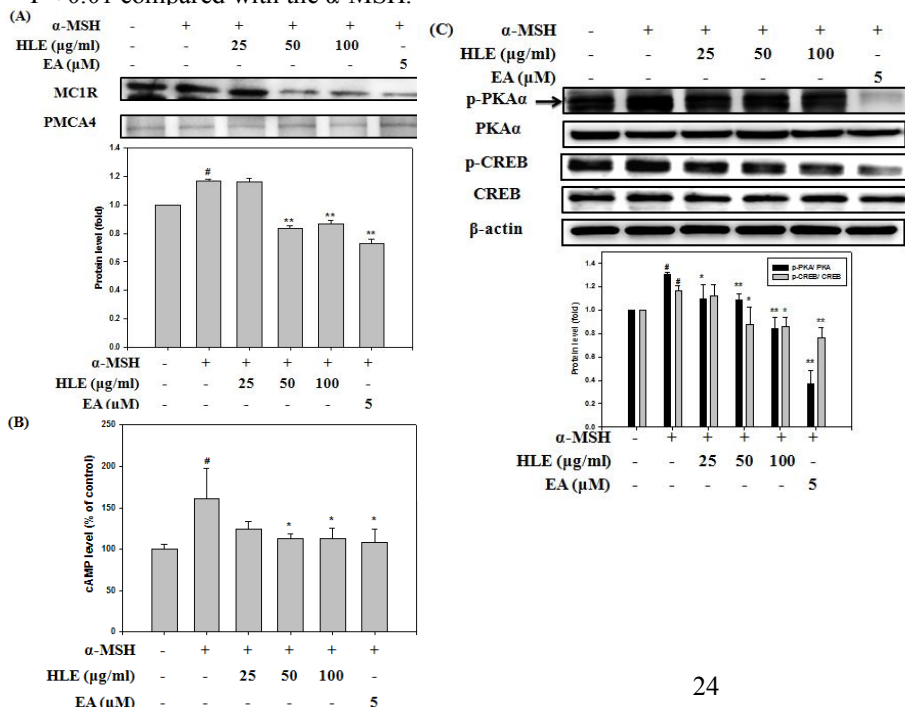


Fig. 21 Effects of HLE on α -MSH-induced MC1R/cAMP/PKA signaling pathway in B16F0 cells. Cells were stimulated with α -MSH (1 μ M) and the indicated various concentrations of HLE (25, 50, 100 μ g/ml) and EA (5 μ M) for 48 h. (A) MC1R protein was analyzed by Western blotting. PMCA4, served as an internal control of membrane. (B) The concentration of cellular cAMP was determined using a cAMP immunoassay kit. (C) p-PKA, PKA, p-CREB, CREB 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 and the significant difference was established at $p < 0.05$. # $P < 0.01$ compared with the control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the α -MSH.

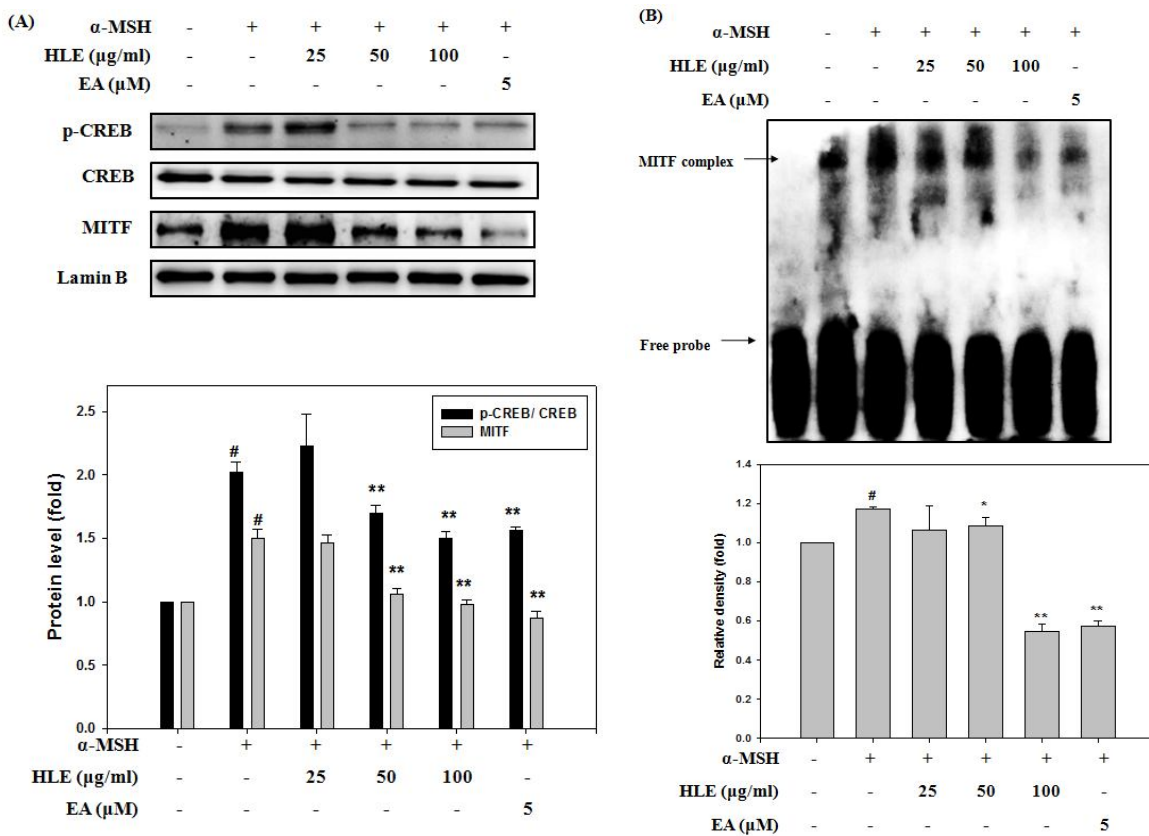
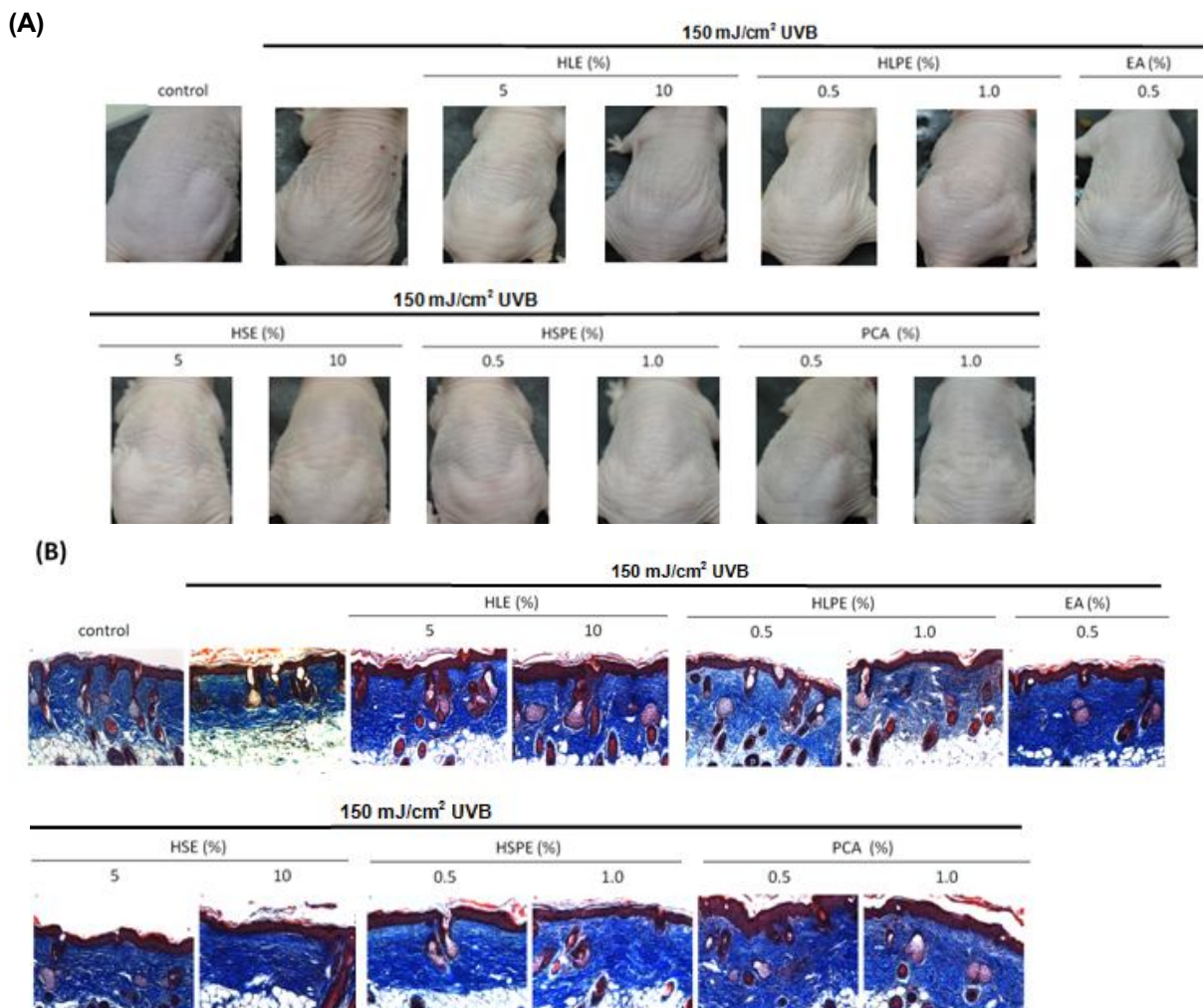


Fig. 22 Effects of HLE on α -MSH-induced nuclear translocation of p-CREB and MITF in B16F0 cells. B16F0 cells were stimulated with α -MSH (1 μ M) and treated with various concentrations (25,50,100 μ g/ml) of HLE and EA (5 μ M) for 48h.(A) The expression of p-CREB and MITF were determined by Western blotting. Lamin B served as internal control. (B) The nuclear extracts were analysed for MITF DNA-binding activity 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 \pm S.D. of three independent experiments and the significant difference was established at $p < 0.05$. # $P < 0.01$ compared with the control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the α -MSH.



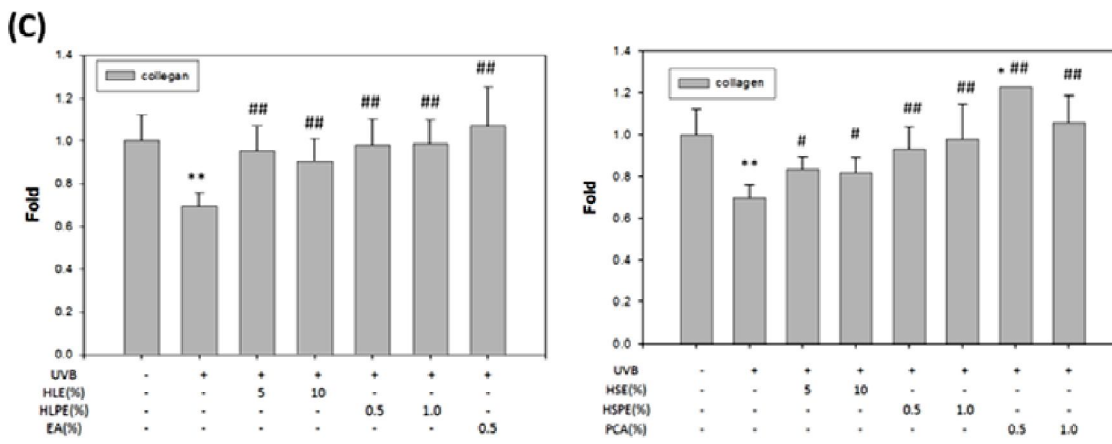


Fig. 23 Skin characteristics (A) and wrinkle formation (B) after long term topical treatment with 6 kinds of agents, including HLE, HLP, EA, HSE, HSPE, and PCA, on the dorsal skin of hairless mice exposed to UVB radiation. The dorsal skin of hairless mice was topically treated with various doses of these agents. Skin specimens were obtained from dorsal skin of mice that were killed at the end of the 8-week experiments. Skin wrinkle images were photographed by using a CCD optical camera and skin surface analysis was performed (A). After the UVB irradiation for 8 weeks, histological sections of mouse dorsal skins were stained with Masson-trichrome (B). Each photograph is representative of at least six animals. The quantitative data were presented as means \pm SD of from six animals. **p < 0.01 compared with the control. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the UVB-exposed group (C).

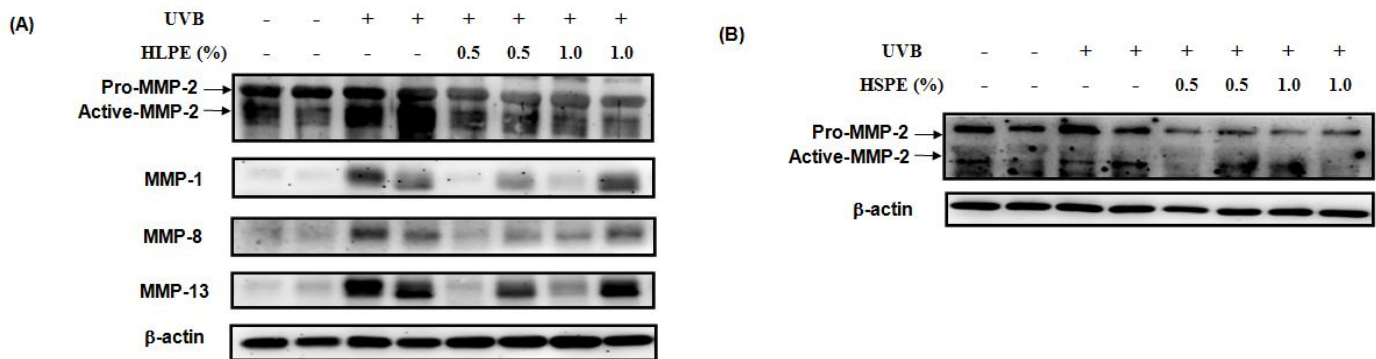


Fig. 24 Effects of HLP (A) and HSPE (B) on the levels of MMPs proteins *in vivo*. The dorsal skin of hairless mice exposed to UVB was topically treated with 0.5% and 1.0 % of HLP or HSPE. Skin specimens were obtained from dorsal skin of mice that were killed at the end of the 8-week experiments and Western blotting was carried out with skin tissue extracts from them. β -actin was served as an internal control. Results were representative of at least six animals.

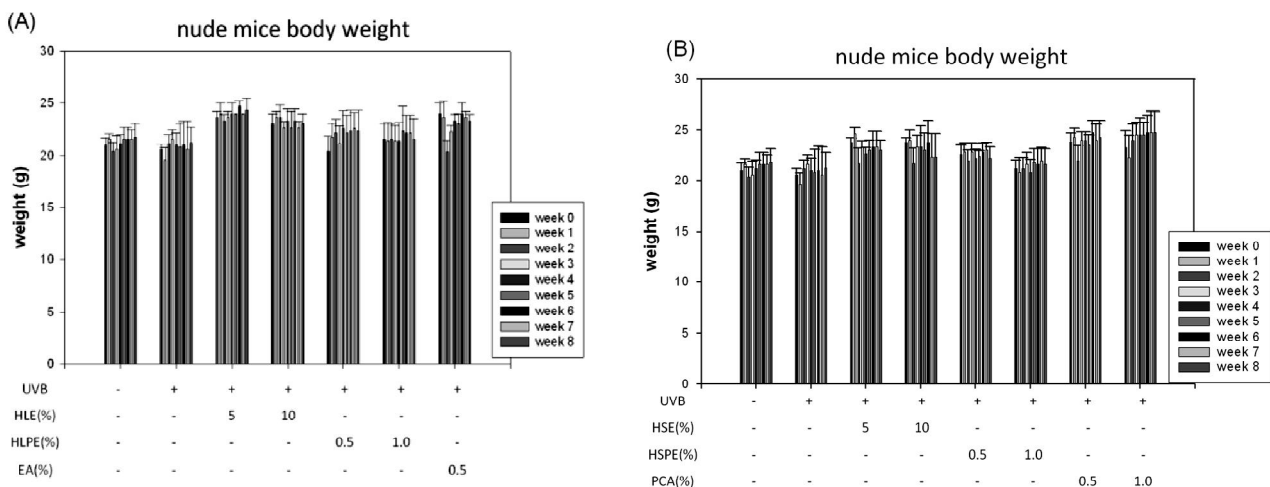


Fig. 25 Effects of the extracts of leaves (A) and flowers (B) of *H. sabdariffa* on body weight of the animals in experiment. The dorsal skin of hairless mice exposed to UVB was topically treated with 6 kinds of agents, including HLE, HLP, EA, HSE, HSPE, and PCA. Skin specimens were obtained from dorsal skin of mice that were killed at the end of the 8-week experiments and the body weight of mice was recorded every 1 week one times. The quantitative data were presented as means \pm SD of from six animals.

Table 3. Effects of the extracts of leaves of *H. sabdariffa* on the serum biochemical parameters of mice exposed to UVB.

		Control	UVB	UVB + 5% HLE	UVB + 10% HLE	UVB + 0.5% HLPE	UVB + 1.0% HLPE	1.0% HLEP	UVB + EA
BUN	mg/dl	24.6±4.33	29.83±5.95	32.27±2.24*	27.7±2.03	29.36±2.18	23.3±2.84	25.92±3.66	34.67±1.9*
Cre	mg/dl	0.42±0.04	0.4±0.08	0.53±0.06*	0.57±0.06*#	0.48±0.04	0.46±0.05	0.44±0.05	0.57±0.06*#
Sugar	mg/dl	129.2±5.89	120.75±10.37	137.33±10.26	148.33±14.5*#	127.8±11.88	141.6±11.5#	138.2±5.72*#	148±17.06#
TP	mg/dl	4.22±0.72	5.15±0.62	4.57±0.21	4.53±0.5	5.06±0.42	4.86±0.25	4.72±0.65	4.5±0.1
ALB	mg/dl	2.16±0.67	2.58±0.1	2.5±0.1	2.47±0.15	2.52±0.16	2.44±0.09	2.56±0.17	2.43±0.06
GLO	g/dl	2.06±0.26	2.58±0.56	2.07±0.12*	2.07±0.35*	2.54±0.38	2.44±0.21	2.58±0.48	2.1±0
GOT	U/L	273.8±28.07	266.75±51.18	437.33±98.8*#	284.33±65.16	269±70.51	246.4±55.96	306±83.78	275.33±71.59
GPT	U/L	67.4±8.50	68.5±7.51	88.67±3.06*#	67.67±10.12	84.2±41.78	63.6±8.2	66.8±10.38	68.33±1.53
Cholesterol	mg/dl	65.8±11.52	63.5±13.03	68.33±7.77	74±4.36	63.2±8.53	65.8±7.16	73.2±8.93	76.33±9.71
TG	mg/dl	85.6±18.47	76±12.68	75.67±6.11	75±16.09	73.2±10.99	80.4±13.9	79±6.04	84.67±3.21

Table 4. Effects of the extracts of flowers of *H. sabdariffa* on the serum biochemical parameters of mice exposed to UVB.

		Control	UVB	UVB + 5% HSE	UVB + 10% HSE	UVB + 0.5% HSPE	UVB + 1.0% HSPE	1.0% HSEP	UVB + 0.5% PCA	UVB + 1.0% PCA
BUN	mg/dl	24.6±4.33	29.83±5.95	23.57±1.27	33.8±8.5	24.3±2.42	27.28±2.53	37.88±9.11*	23.88±4.24	26.65±3.16
Cre	mg/dl	0.42±0.04	0.4±0.08	0.47±0.06	0.53±0.06*	0.5±0.07	0.4±0.07	0.5±0*#	0.5±0*#	0.53±0.05*#
Sugar	mg/dl	129.2±5.89	120.75±10.37	119.67±13.65	140.33±36.47	126.4±14.1	129.4±14.62	120.25±12.45	137.25±7.72#	129.25±9.95
TP	mg/dl	4.22±0.72	5.15±0.62	4.13±0.35	4.7±0.3	4.98±0.26	4.4±0.52	4.7±0.39	4.7±0.28	4.97±0.23
ALB	mg/dl	2.16±0.67	2.58±0.1	2.37±0.06#	2.5±0	2.46±0.15	2.42±0.31	2.25±0.19	2.57±0.12	2.68±0.13
GLO	g/dl	2.06±0.26	2.58±0.56	1.77±0.4	2.2±0.3	2.52±0.29*	1.98±0.4	2.45±0.24	2.28±0.46	2.3±0.12
GOT	U/L	273.8±28.07	266.75±51.18	212±14.8*	254.67±74.57	228.6±25.77*	284.8±78.64	270.5±40.68	279±93.31	311.5±114.17
GPT	U/L	67.4±8.50	68.5±7.51	60.67±5.13	65.33±7.77	71.4±6.66	55.8±15.4	66.5±4.36	67.5±9.15	102.5±74.37
Cholesterol	mg/dl	65.8±11.52	63.5±13.03	71±7.21	65.33±9.71	63.6±5.13	54.8±7.63	70.75±4.99	72.25±12.61	73.75±7.76
TG	mg/dl	85.6±18.47	76±12.68	75.33±8.02	85.67±19.35	90.6±13.30	77.6±13.16	83±25.65	68.5±14.39	73.5±5.8

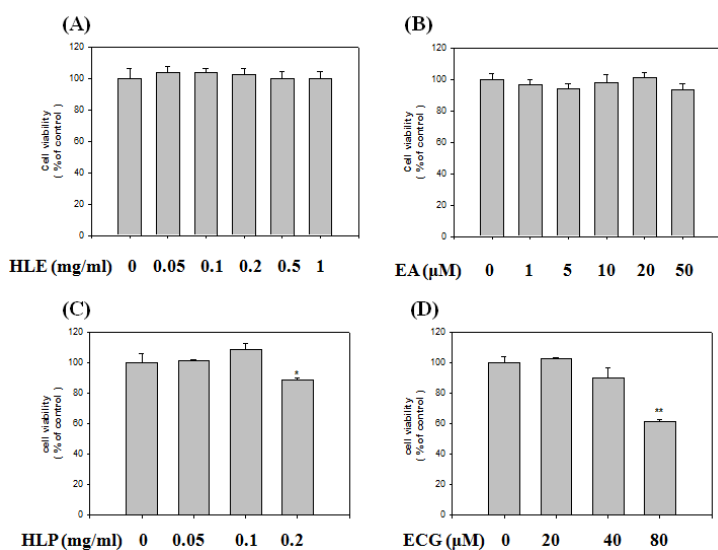


Fig. 26 Effects of HLE, EA, HLP or ECG on WS-1 cell growth. WS-1 cells were treated with various concentrations of (A) HLE (0-1 mg/ml), (B) EA (0-50 μ M), (C) HLP (0-0.2 mg/ml) or (D) ECG (0-80 μ M) for 24 h. The number of cells was counted by trypan blue dye exclusion assay. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments and the significant difference was established at $p < 0.05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.01$ compared with the control group.

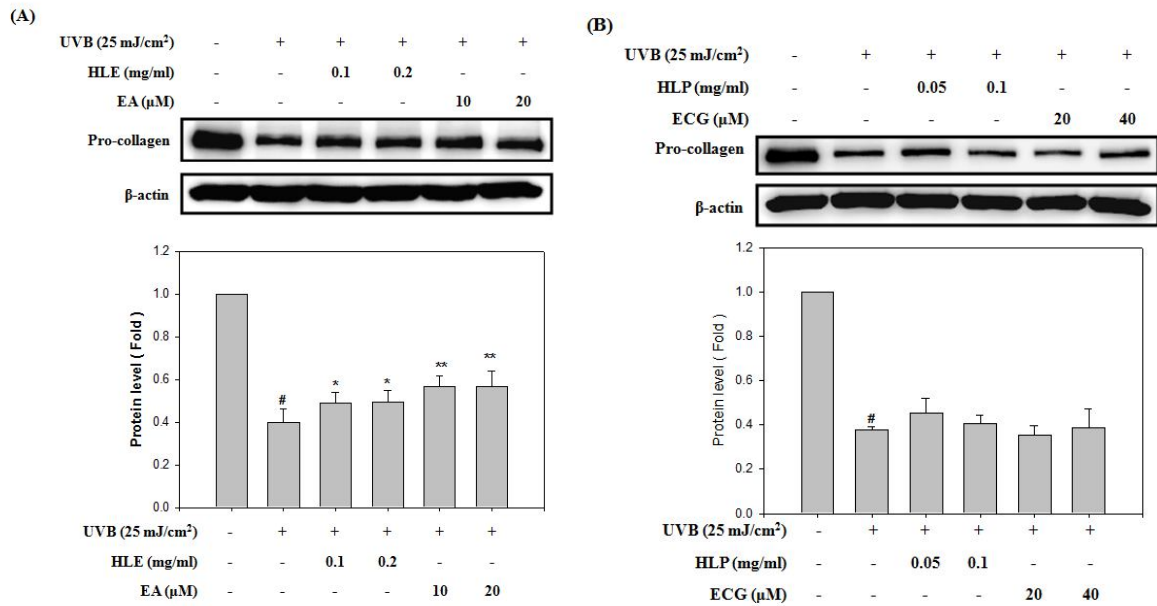


Fig. 27 Effects of HLE or HLP on UVB-induced Pro-collagen protein expression in WS-1 cells. WS-1 cells were stimulated with UVB (25 mJ/cm²) and treated with various concentrations of (A) HLE (0.1 and 0.2 mg/ml) or EA (10 and 20 μM), (B) HLP (0.05 and 0.1 mg/ml) or ECG (20 and 40 μM) for 24 h. The Pro-collagen proteins were analyzed by Western blotting. The quantitative data were presented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment. #p < 0.01, compared with control at the respective times. *P < 0.05, **P < 0.01 compared with the UVB.

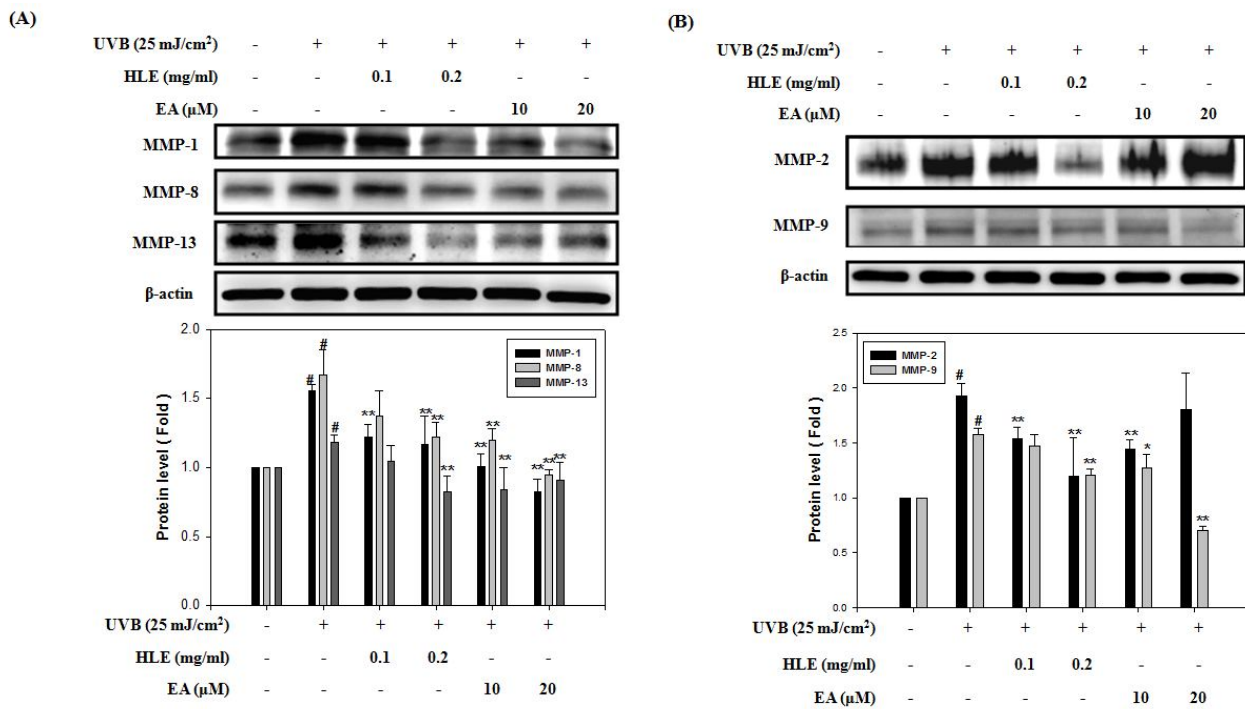
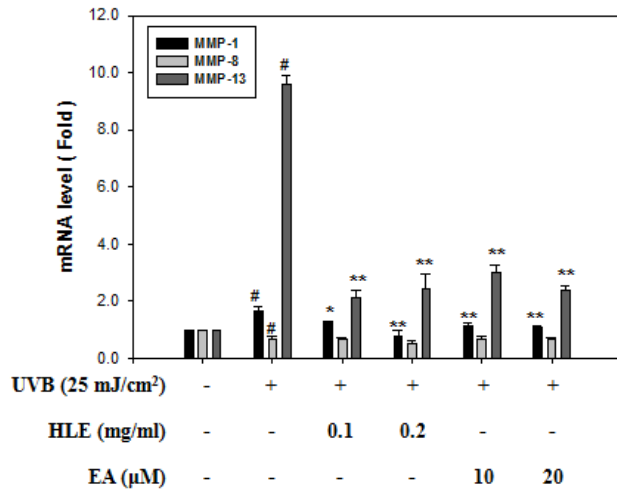


Fig. 28 Effects of HLE on UVB-induced MMP-1/8/13 (collagenases) and MMP-2/9 (gelatinases) protein expression in WS-1 cells. WS-1 cells were stimulated with UVB (25 mJ/cm²) and treated with various concentrations of HLE (0.1 and 0.2 mg/ml) or EA (10 and 20 μM) for 24 h. The (A) MMP-1/8/13 proteins and (B) MMP-2/9 proteins were analyzed by Western blotting. The quantitative data were presented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment. #P < 0.01, compared with control at the respective times. *p < 0.05; **p < 0.01 compared with the UVB.

(A)



(B)

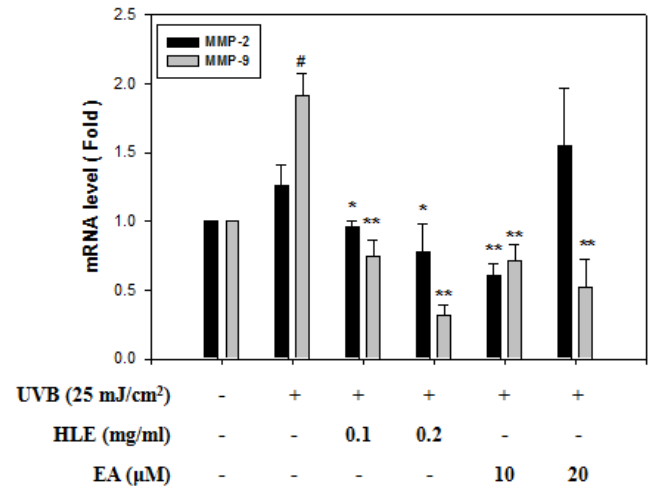


Fig. 29 Effects of HLE on UVB-induced MMP-1/8/13 (collagenases) and MMP-2/9 (gelatinases) mRNA levels in WS-1 cells. WS-1 cells were stimulated with UVB (25 mJ/cm²) and treated with various concentrations of HLE (0.1 and 0.2 mg/ml) or EA (10 and 20 µM) for 24 h. Total cellular mRNA was analyzed by real-time PCR for (A) collagenases (MMP-1/8/13) and (B) gelatinases (MMP-2/9). The quantitative data were presented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment. #p < 0.01, compared with control at the respective times. *P < 0.05, **P < 0.01 compared with the UVB.

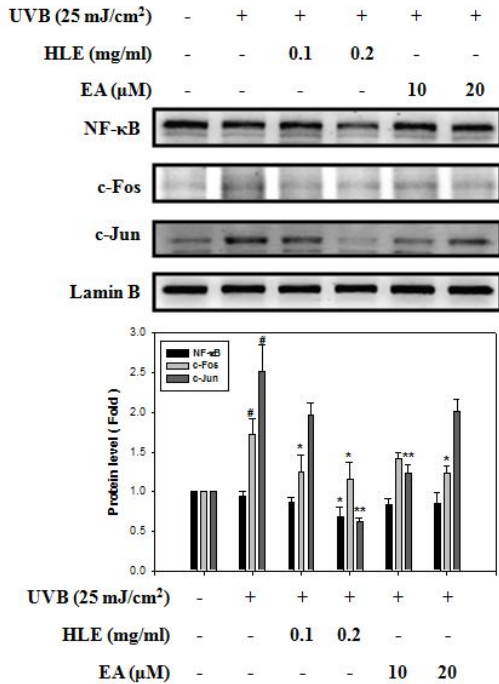


Fig. 30 Effects of HLE on UVB-induced nuclear translocation of NF-κB, c-Fos and c-Jun in WS-1 cells. WS-1 cells were treated with various concentrations of HLE (0.1 and 0.2 mg/ml) or EA (10 and 20 µM) for 24 h, after which cells were harvested and the nuclear fraction analysed for the expression of NF-κB, c-Jun and c-Fos. The nuclear protein levels were determined by Western blotting. Lamin B served as internal control. The quantitative data were presented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment. #P < 0.01 compared with the control. *P < 0.05, **P < 0.01 compared with the UVB.

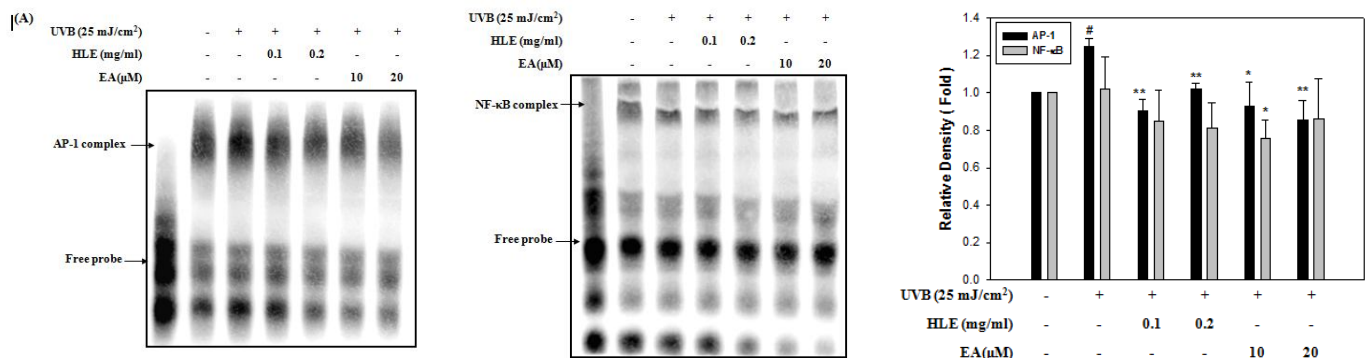


Fig. 31 Effects of HLE on UVB-induced AP-1 and NF-κB DNA binding activity in WS-1 cells. (A) WS-1 cells were treated with various concentrations of HLE (0.1 and 0.2 mg/ml) or EA (10 and 20 µM) for 24 h, after which cells were harvested and the nuclear extracts were analysed for AP-1 and NF-κB DNA-binding activity using biotin-labelled AP-1 and NF-κB 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. (B) The quantitative data were presented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment. #P < 0.01 compared with the control. *P < 0.05, **P < 0.01 compared with the UVB.

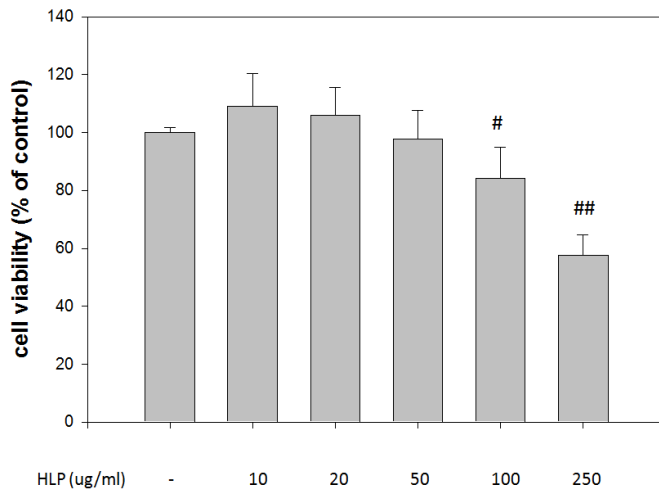


Fig. 32 Effect of *H. sabdariffa* leaf polyphenolic extract (HLP) on A375 cells viability. A375 cells treated with various concentrations (0, 100 and 250 ug/mL) of HLP for 24 h. The number of cells was counted by trypan blue dye exclusion assay. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments and the significant difference was established at $p < 0.05$. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with the control group.

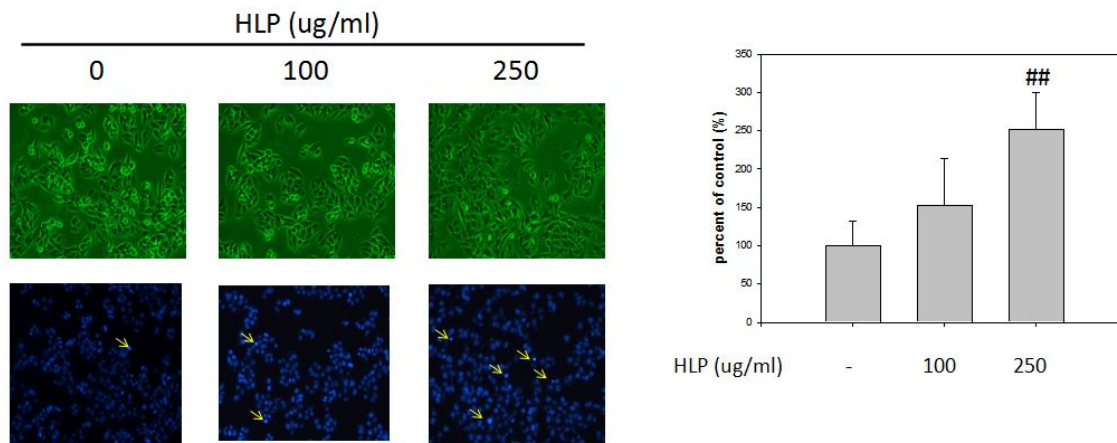


Fig. 33 *H. sabdariffa* leaf polyphenolic extract (HLP) induces apoptosis in A375 cells. A375 cells treated with various concentrations of HLP (0, 100 and 250 ug/mL) for 24 h and stained with DAPI. The quantitative data were presented as means ± SD of three repeats from one independent study. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

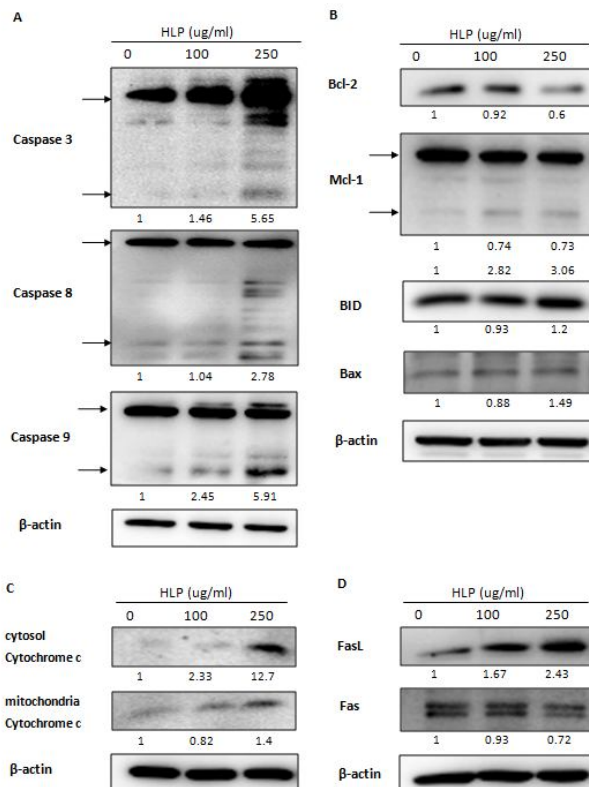
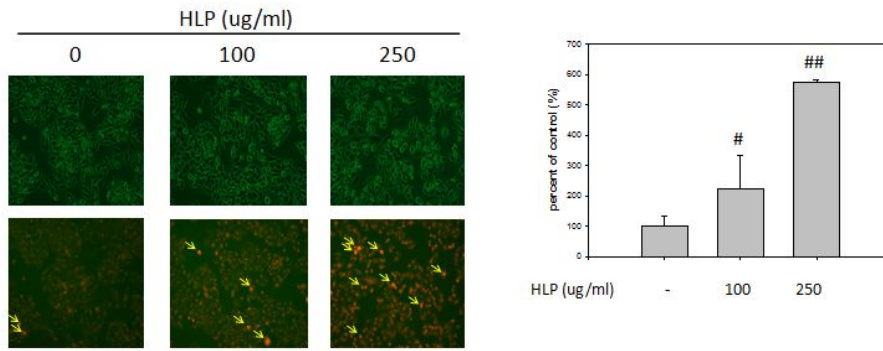


Fig. 34 Effect of *H. sabdariffa* leaf polyphenolic extract (HLP) on the intrinsic and extrinsic apoptotic pathway in A375 cells. (A) Effect of HLP on the caspase 3/8/9 protein expression in A375 cells. A375 cells treated with various concentrations of HLP (0, 100 and 250 ug/mL) for 24 h. (B) Effect of HLP on the Bcl-2 family proteins expression. A375 cells were analyzed by SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antibodies against Bcl-2, Mcl-1, Bax, Bid and β-actin that served as an internal control. (C) Effect of HLP on the release of cytochrome c. The expressions of cytochrome c (Cyt c) in cytosol and mitochondria were analyzed by Western blotting. (D) Effect of HLP on the FasL and Fas protein expression in A375 cells.

A



B

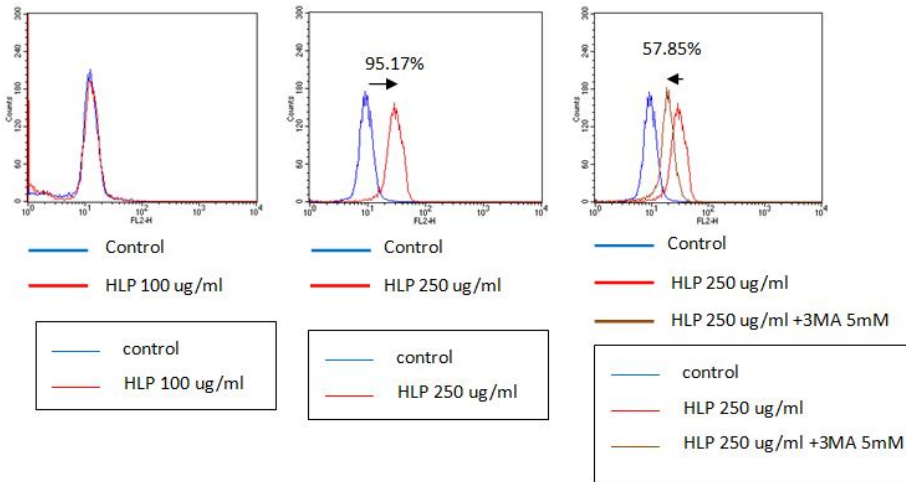


Fig. 35 *H. sabdariffa* leaf polyphenolic extract (HLP) induces autophagy in A375 cells. (A) A375 cells treated with various concentrations of HLP (0, 100 and 250 µg/mL) for 24 h and the cells were stained with acridine orange. (B) For blocking experiments, cells were preincubated with 3-MA (5mM) for 1 h before the addition of 250 µg/mL HLP for an additional 24 h. After 24h, the cells were stained with acridine orange and measured using flow cytometry. The quantitative data were presented as means ± SD of three repeats from one independent study. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

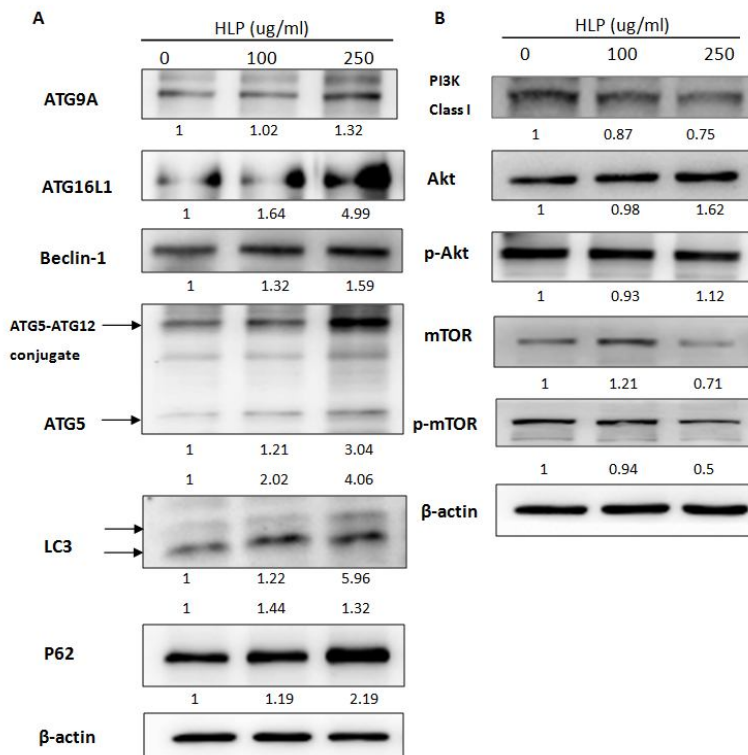


Fig. 36 Effect of *H. sabdariffa* leaf polyphenolic extract (HLP) on the autophagy pathway in A375 cells. (A) Total cell lysates of A375 cells treated with various concentrations of HLP (0, 100 and 250 µg/mL) for 24 h were analyzed by SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotted with antibodies against ATG9A, ATG16L1, Beclin-1, ATG5, LC3, P62 and β-actin that served as an internal control. (B) Effect of HLP on the Akt, p-Akt, mTOR and p-mTOR proteins expression in A375 cells.

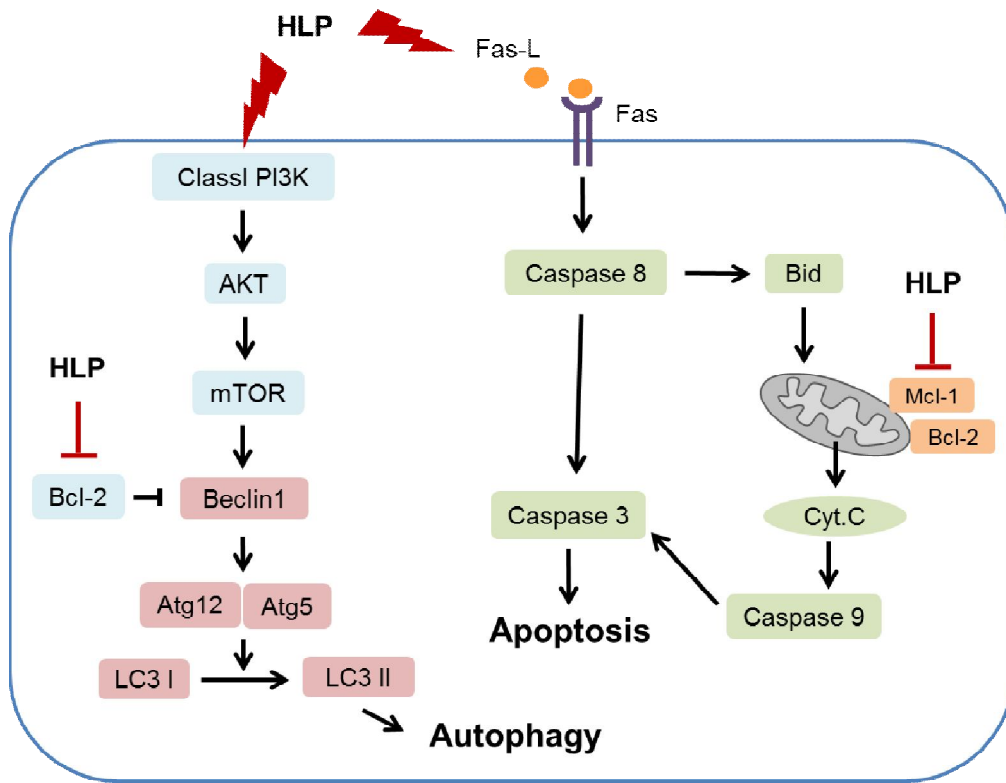


Fig. 37 A proposed model for the inhibitory effect of HLP in human melanoma A375 cells.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/09/24

國科會補助計畫	計畫名稱: 洛神花與洛神葉萃取物預防紫外線照射引起的黑色素沉澱、皮膚老化與皮膚癌作用之研究
	計畫主持人: 陳璟賢
	計畫編號: 99-2320-B-040-015-MY3 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

99 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：99-2320-B-040-015-MY3				計畫名稱：洛神花與洛神葉萃取物預防紫外線照射引起的黑色素沉澱、皮膚老化與皮膚癌作用之研究	
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	0	0	100%		
		研討會論文	4	3	100%		
		專書	3	3	100%		
	專利	申請中件數	2	2	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	2	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	3	3	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	2	2	100%		
國外	論文著作	期刊論文	2	6	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	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>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>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	

國科會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）

論文已發表刊登 2 篇，投稿中 4 篇

申請專利 2 件

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）

綜合三年研究發現，洛神植株(花與葉)所富含多酚類成分物質具有抗 UVB 曝照後所引發黑色素生成及皮膚皺紋生成的光保護作用；洛神葉多酚物質也能抑制皮膚癌細胞生長及說明其抗癌機制。因此未來洛神花功能性成分物質 PCA、洛神花及洛神葉萃取物可發展成為具有化學預防活性之美容保健產品。

(1) 配合國家防癌目標，降低國人癌症發生率及死亡率，本研究物質洛神葉來自於台灣本土，且易栽培，產率高，可食用，為低毒或無毒之天然成份，將可大量生產，提供國人食用。

(2) 研究之方法模式可為未來發展天然物美白、抗皺及抗癌作用研究之參考。

(3) 研究之成果可提供產業界生產 HLE 及其多酚成份 HLP 為美容保健食品。

(4) 研究之成果可提升洛神植株農業作物的經濟效益，並符合現今節能減碳之概念。