

牡蠣殼水溶性萃取物之抑制黑色素生成及抗光損傷之確效性評估

蔡儀冠·黃培安*·高淑雲·吳純衡

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘 要

本研究目的係評估牡蠣殼水溶性萃取物 (Oyster shell water soluble extract, OWE) 對抑制黑色素生成能力及受 UVA/UVB 光損傷之保護/修復作用。在抑制黑色素生成能力發現：2、4、8 及 16 mg/ml OWE 皆能抑制酪胺酸酶活性，且隨濃度愈高其抑制能力愈強，且 OWE 並不會影響 B16 黑色素細胞之存活率。此外，OWE 能促進 HaCaT 角質細胞之存活率，而於 8 and 16 mg/ml 濃度下能保護角質細胞對抗 UVA/UVB 光損傷，且其細胞存活率與胞內蛋白質含量皆顯著高於未添加 OWE 的負控制組。然而，OWE 對 UVA/UVB 光損傷的 HaCaT 角質細胞則不具修復作用。

關鍵詞：牡蠣殼水溶性萃取物、酪胺酸酶、B16 小鼠黑色素腫瘤細胞、HaCaT 人類皮膚角質細胞

前 言

黑色素 (Melanin) 的形成是酪胺酸(Tyrosine) 在黑色素細胞中，藉著酪胺酸酶 (Tyrosinase) 的催化而轉變成多巴 (Dopa)，進而形成黑色素，而酪胺酸酶即是此反應過程的關鍵酵素 (Prota, 1996)。當黃褐斑、雀斑、曬斑等不正常的黑色素過高症發生時，容易導致惡性黑色素瘤皮膚癌的發生 (Takakazu and Stan, 1993)。此外，陽光中的紫外線是造成皮膚老化的主要原因，由於紫外線被發現具有高度的基因毒性且長期照射會導致 DNA 損傷 (de Gruijl, 1999)，若皮膚過度曝露於紫外線下則會產生光老化及皮膚癌 (Kligman, 1986)。紫外線依波長範圍不同可區分為 UVA (320 ~ 400 nm)、UVB (280 ~ 320 nm) 及 UVC (200 ~ 280 nm)。UVA 能量最弱但穿透力最強，可直達真皮層破壞彈性及膠原纖維，進而導致皮膚失去彈性，且容易造成深層的皮膚癌病變，因此長期曝露在 UVA 下還是有相當的危險性 (Pathak, 1982;

Santos *et al.*, 1999)。UVB 能量較 UVA 強，對表皮層傷害較為明顯，容易造成皮膚曬傷及曬黑進而導致癌化發生 (Goldsmith, 1991)。而 UVC 具有極大的致突變性，但穿透力最差且絕大多數都會被臭氧層吸收，故幾乎不會對皮膚造成影響 (Morison, 1991; Fitzpatrick *et al.*, 1993)。因此就上述文獻可知，黑色素的形成與紫外線有關，而紫外線是造成皮膚的傷害的主要原因之一，故黑色素與紫外線及皮膚傷害息息相關。

台灣四面環海，貝類資源豐富，是為重要的養殖經濟漁業，然衍生而來的水產廢棄物即為貝殼，其中以牡蠣殼為大宗。牡蠣殼主要是由 95% 以上的碳酸鈣所組成 (李, 2006)，其中陽離子以鈣為主，佔總乾重的 35 ~ 40%；其次為鈉和鎂，約分別佔0.6和0.3%；其餘的陽離子包括鉀、鐵、鋁、錳、銅、鋅、鋇及矽，含量均在 0.1% 以下。除了碳酸鈣之外，貝殼其餘組成有有機基質 (蛋白質及醣類)、微量元素和水，雖然這些物質約僅佔 5%，卻被認為具有連結組織及強化殼硬度的功能 (Sudo *et al.*, 1997)。貝殼結構主要分為三層：外層為幾丁質構造的殼皮 (Periostracum) 可以抗酸性腐蝕。中層為碳酸鈣方解石柱狀結晶所形成的稜柱層 (Ostracum, Prismatic layer)，此層為貝殼的主

* 通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: pnhwang@mail.tfrin.gov.tw

要結構，貝殼的厚薄通常由此層決定。內層則為碳酸鈣片狀霰石結晶所形成的珍珠層 (Pearl layer)，亮麗的珍珠一直是珍珠養殖的重點 (Wu, 2000)，也是使用超過千年的中國傳統中藥之一 (陳, 2008)。珍珠在傳統中藥被宣稱具有「治目潤肌皮」、「塗面向顏色」等作用，就科學角度評斷應與抑制黑色素生成及活化皮膚角質細胞有關。

有鑑於台灣每年約有12 ~ 20萬噸的廢棄牡蠣殼產生，若不將這些牡蠣殼處理妥當，衍生而來的就是相當大的環保問題。雖然這些牡蠣殼在經過灰化後，可拿來做成飼料添加物、家庭用壁材、土壤改良劑或水泥膠結材料 (李, 2004)，但因附加價值低且使用量不高，導致廢棄牡蠣殼的囤積量仍大於使用量。因此，本研究以牡蠣殼當原料，萃取其水溶性物質，以進行抑制酪胺酸酶活性、黑色素生成及抗光損傷之確效性評估，以探討牡蠣殼水溶性萃取物做為皮膚外用劑之可行性，以期達到廢棄牡蠣殼資源化利用。

材料與方法

一、材料

(一) 牡蠣殼粉

本研究所使用之牡蠣殼係取自雲林縣台西鄉地區的廢棄牡蠣殼堆放區，將牡蠣殼經清水洗淨後，以烘箱 (RISEN Co., LTD, RHD-602D) 經80 °C 乾燥 12 h，後以粉碎機 (D3V-10, YOUQI, Taiwan) 進行粉碎，經過0.5 mm 孔徑篩網篩選後，再以80 °C 乾燥 4 h，取出後冷卻予以備用。

(二) 牡蠣殼水溶性萃取物

本研究所使用的牡蠣殼水溶性萃取物(Oyster shell water soluble extract, 以下簡稱OWE) 之萃取方法，仍在進行專利實審中 (申請案號：096126155)，故不揭示。取OWE以去離子水配製成2、4、8 及16 mg/mL 做為樣品，供一般成分測定、抑制酪胺酸酶活性分析及細胞實驗用。

(三) 細胞株

本研究使用之 B16 小鼠黑色素腫瘤細胞株 (Mouse melanoma cell, B16)，以下簡稱 B16 細胞，

購自新竹食品工業研究所生物資源中心。HaCaT 人類皮膚角質細胞株 (Human keratinocyte cell, HaCaT)，以下簡稱 HaCaT 細胞，由成功大學藥理學研究所張文昌教授提供。

(四) 試藥

化學分析藥品購自Sigma (St. Louis, USA)，細胞試驗藥品購自GIBCO BRL (Grand Island, N. Y., USA)。

二、方法

(一) 一般成分測定

參照 AOAC (1995) 方法測定。將 OWE 進行濃縮凍乾後，分別進行粗蛋白質、粗脂肪、灰分及碳水化合物之分析。

1. 粗蛋白質

使用微量凱氏氮法 (Micro-Kjeldahl) 進行測定，取 1 g 的 OWE 加入 1 g 的催化劑 ($\text{HgSO}_4 : \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} : \text{K}_2\text{SO}_4 = 0.75 : 1 : 10$) 及 20 mL 的 H_2SO_4 (sulfuric acid)，置於分解瓶中待分解至成透明白色，再於全氮蒸餾器中蒸餾出氮，並用 0.1 N 的 H_2SO_4 收集之，再以 0.1 N 的 NaOH (Sodium hydroxide) 滴定至淡粉紅色，氮係數為 6.25。

2. 粗脂肪

取 5 g 的 OWE 於 105 °C 下乾燥 2 h，再將水分去除後秤重，再置於索氏 (Soxhlet) 萃取器以乙醚迴流 4 h 以上進行萃取。

3. 灰分

OWE 經 105 °C 恆溫乾燥後，再置於 550 °C 灰化爐中進行灰化至恆重而測定之。

4. 碳水化合物

碳水化合物 (%) = $100\% - \{(\text{粗蛋白質} + \text{粗脂肪} + \text{灰分}) \times 100\%$ 。

(二) 抑制酪胺酸酶活性試驗

參照 Arung *et al.* (2005) 方法測定。取 600 μl 的 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (Phosphate buffer,

pH6.5)，加入333 μl 的2.5 mM 多巴溶液，再加入33 μl 不同濃度 (2、4、8及16 mg/mL) 的OWE及33 μl 的酪胺酸酶溶液 (1380 units/mL)，均勻混合後於470 nm 下記錄2 mins 內 (每隔30 s 記錄一次) 的吸光值變化。在此過程中，酪胺酸酶的催化作用主要是將在酪胺酸轉化為多巴，進而將多巴轉化為多巴醌 (Dopachrome)，其中多巴醌是一有色物質於470 nm 有最大吸收波長，故多巴醌生成量愈少則吸光值愈低，意即樣品抑制酪胺酸酶活性的能力愈強。本試驗以磷酸緩衝溶液取代樣品作為控制組。

(三) 細胞培養

B16及HaCaT皆為附著型細胞，培養方式參照Boukamp *et al.* (1988) 方法培養。將細胞以含10% FBS (Fetal calf serum) 的DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) 培養基於37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培養。B16 黑色素細胞培養與繼代容易，常被使用於黑色素生成試驗 (Masamoto *et al.*, 2004)。HaCaT 角質細胞為第一株由成人人上皮細胞分化出的細胞，具備完整角質細胞分化能力，已被廣泛使用於角質細胞模式評估 (Deyrieux and Wilson, 2007)。

(四) 細胞存活率試驗

參照 Ferrari *et al.* (1990) 方法測定。細胞離心收集後，調整為 2×10^5 cell/mL，以100 μl /well 加入96 well 培養盤中，並加入20 μl 不同濃度 (2、4、8 及 16 mg/mL) 的 OWE，於37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培養24 h 之後，以100 μl /well 加入 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 及 YLP (Yolk lipoprotein) 之等比例混合溶液，於37 $^{\circ}\text{C}$ 反應4 h 後，振盪2 mins，於570 nm 測定吸光值。細胞存活率 (%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 控制組吸光值] \times 100%。本試驗以培養液取代樣品作為控制組並視為100%，空白組為不含細胞及樣品之培養液。

(五) B16 細胞之黑色素生成試驗

參照 Masamoto *et al.* (2004) 方法測定。細胞離心收集後調整為 2×10^4 cell/mL，以100 μl /well 加入96 well 培養盤中，並加入10 μl 不同濃度

(2、4、8及16 mg/mL) 的 OWE，於37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培養24 h 後，離心移去上層液使細胞沉澱，再加入1 mL 的1 M NaOH，置於80 $^{\circ}\text{C}$ 下反應30 mins，於400 nm 測定吸光值。黑色素生成 (%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 控制組吸光值] \times 100%。本試驗以培養液取代樣品作為控制組並視為100%，空白組為不含細胞及樣品之培養液，對照組為10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的98% 熊果素 (Arbutin, Hydroquinone β -D-glucopyranoside)。

(六) UVA/UVB 對 HaCaT 細胞之光損傷試驗

1. 保護 / 修復試驗

參照 Torita *et al.* (2004) 方法測定。細胞離心收集後調整為 2×10^5 cell/mL，以100 μl /well 加入96 well 培養盤中，並加入10 μl 不同濃度 (2、4、8 及 16 mg/mL) 的 OWE 於96 well 培養盤中，爾後以UVA (0.8 J/cm²) 照射120 s，或以UVB (0.24 J/cm²) 照射40 s，再置於37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培養箱培養24 h，係為保護試驗。另外，細胞離心收集後調整為 2×10^5 cell/ml，以100 μl /well 加入96 well 培養盤中，先以UVA (0.8 J/cm²) 照射120 s，或以UVB (0.24 J/cm²) 照射40 s 後，再加入10 μl 不同濃度 (2、4、8 及 16 mg/mL) 的 OWE 進行24 h 培養，係為修復試驗。爾後再於各 well 以100 μl /well 加入 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 及 YLP (Yolk lipoprotein) 之等比例混合溶液，於37 $^{\circ}\text{C}$ 反應4 h 後，振盪2 mins，細胞存活率 (%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 控制組吸光值] \times 100%。本試驗以培養液取代樣品、不照射 UVA/UVB 作為控制組並視為100%，負控制組以培養液取代樣品並照射 UVA/UVB，空白組為不含細胞及樣品之培養液。

2. 細胞蛋白質測定

參照 Torita *et al.* (2004) 方法測定。取上述保護 / 修復試驗之細胞，經離心去除上層液後，加入200 μl 的20% SDS (Sodium dodecyl sulfate) 將細胞膜溶解，再參照 Lowry *et al.* (1951) 方法測定胞內蛋白質含量。胞內蛋白質含量 (%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 控制組吸光值] \times

100%。本試驗以培養液取代樣品、不照射 UVA/UVB 作為控制組並視為 100%，負控制組以培養液取代樣品並照射 UVA/UVB，空白組為不含細胞及樣品之培養液。本試驗以 BSA (Bovine serum albumin) 當作校正標準品。

(七) 統計分析

實驗數據以 SAS (Statistical analysis system) 統計套裝軟體進行單項變異數分析 (One-way analysis of variance)，並以鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異，顯著水準定為 0.05。

結果與討論

一、OWE 之一般成分

物質中的一般成分測定是評估其活性因子之依據，因此本研究希望藉由分析 OWE 的一般成份，來推測 OWE 是經由何種活性成份來達到抑制酪胺酸酶活性、抑制 B16 黑色素細胞之黑色素生成及保護光損傷 HaCaT 細胞之作用。

在一般成分中，OWE 之粗蛋白、粗脂肪、灰分及碳水化合物分別為 65.2 ± 4.6 、 5.6 ± 1.9 、 18.5 ± 2.8 及 10.7 ± 3.3 (Table 1)，可得知 OWE 主要是由蛋白質所組成。邱 (2003) 指出台灣長牡蠣的外殼珍珠質中，含有醣蛋白及多陰離子性蛋白質，此外扇貝殼 (*Patinopecten yessoensis*) 萃取物中的 90、20 及 17 kDa 蛋白質即為活化皮膚纖維母細胞及抑制彈性蛋白酶活性的機能性物質 (Liu *et al.*, 2002)，因此我們推測 OWE 中的蛋白質是主要的活性成份。

Table 1 Composition of Oyster shell water soluble extract

| Species | Protein (%) | Fat (%) | Ash (%) | Carbohydrate ² (%) |
|---------|------------------|---------------|----------------|-------------------------------|
| OWE | 65.2 ± 4.6^1 | 5.6 ± 1.9 | 18.5 ± 2.8 | 10.7 ± 3.3 |

¹ Mean \pm SD (n=3).

² Carbohydrate (%) = $100\% - \{(\text{Protein} + \text{Fat} + \text{Ash}) \times 100\}$

二、OWE 抑制酪胺酸酶活性試驗

酪胺酸酶是一個含銅的多酚氧化酵素，且是黑色素生成的關鍵酵素 (Kubo *et al.*, 2000)，若能有效抑制酪胺酸酶活性，便可減少黑色素的形成。酪胺酸酶不僅負責髮色及皮膚色素，也與白斑或雀斑等皮膚異常狀況有關，故酪胺酸酶於皮膚癌中可能扮演一重要角色 (Piamphongsant, 1998)，因此本研究先以多巴醌生成量多寡來探討 OWE 對酪胺酸酶活性之影響。

在抑制酪胺酸酶活性試驗中發現：於固定時間點下 (0.5、1、1.5、2 mins) 測量 470 nm 吸光值，結果顯示添加 OWE (2、4、8 及 16 mg/mL) 組的吸光值均較控制組低，也就是 OWE 能抑制多巴醌生成，且隨著 OWE 的濃度愈高則吸光值愈低，故得知 OWE 具有抑制酪胺酸酶活性的能力，且 OWE 濃度與抑制酪胺酸酶活性的能力呈現正相關 (Fig. 1)。蕭 (2007) 採用珍珠粉、珍珠粉蛋白質萃取物及去除蛋白質之珍珠粉進行抗氧化性、清除自由基之活性探討，結果顯示珍珠粉與珍珠粉蛋白質萃取物皆具有抗氧化性、清除自由基的活性，並隨著劑量呈正相關，因此學者推測珍珠粉中的蛋白質可能是珍珠粉抗氧化的主要成分。另有學者採用微米與奈米級的珍珠粉來萃取珍珠水溶性有機質，以進行抑制酪胺酸酶活性試驗，結果發現珍珠水溶性有機質中以蛋白質為主要成分，而微米與奈米級的珍珠水溶性有機質皆能抑制酪胺酸酶活性，其中又以奈米級的珍珠水溶性有機質的抑制能力較強 (丁, 2007)。因此推測 OWE 中的主要蛋白質成分應是抑制酪胺酸酶活性的主要活性成份。故本研究更進一步探討 OWE 對 B16 細胞是否具有抑制黑色素生成的作用。

三、OWE 抑制 B16 黑色素細胞之黑色素生成試驗

研究指出荖葉 (賴, 2003)、葡萄籽 (黃, 2004)、洛神花 (湯, 2004)、維生素 C 醣苷和熊果素 (蕭, 2006) 皆可顯著抑制 B16 黑色素細胞之黑色素生成，故目前篩選抑制黑色素生成之素材，目前多使用 B16 黑色素細胞做評估。因此，本研究亦使用 B16 黑色素細胞來探討 OWE 對黑色素生成之影響。此外，熊果素在臨床上用於治療皮膚色素

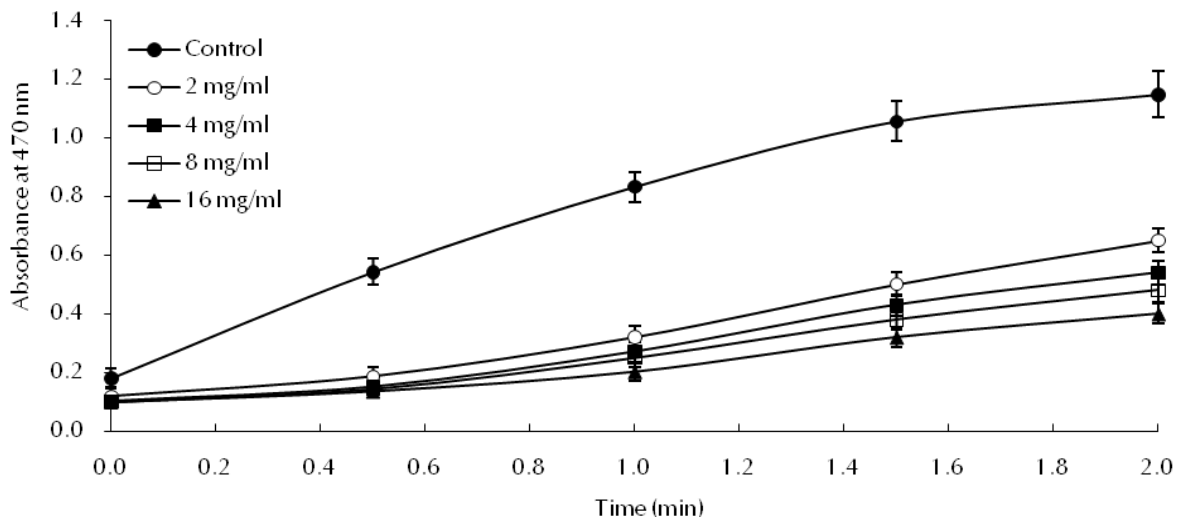


Fig. 1 Inhibition effects of different concentrations (mg/ml) of OWE on tyrosinase activity. Each value represents means \pm SD (n=3).

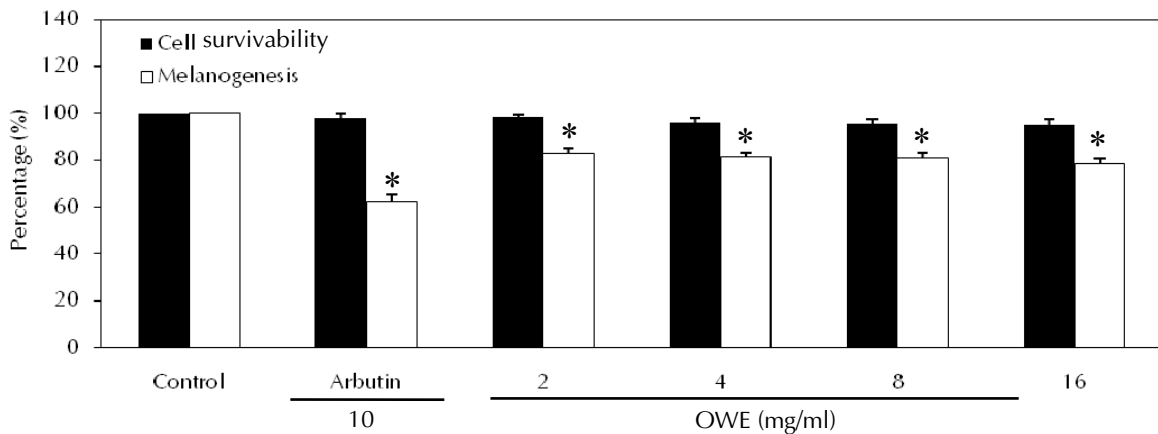


Fig. 2 Effects of OWE on cell survivability and melanogenesis by B16 cell. Each value represents means \pm SD (n = 3). The "*" means significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control group.

沉澱及抑制黑色素生成的效果顯著，也廣泛應用於皮膚保養品 (Chakraborty *et al.*, 1998)，故本研究以熊果素當作對照組。

經由 B16 黑色素細胞之存活率試驗得知熊果素及不同濃度 (2、4、8 及 16 mg/mL) 的 OWE 皆不影響 B16 黑色素細胞之存活率 (98.10 ± 1.83 、 98.25 ± 1.12 、 96.14 ± 1.77 、 95.24 ± 1.96 及 $95.18 \pm 2.08\%$) (Fig. 2)。而在 B16 黑色素細胞之黑色素生成試驗中得知：添加 2、4、8 及 16 mg/mL OWE 後，B16 黑色素細胞之黑色素生成率分別為 82.76 ± 2.18 、 81.35 ± 1.49 、 80.92 ± 2.35 及 $78.47 \pm 1.98\%$ 。依據統計分析，不同濃度 (2、4、8 及 16 mg/mL) 的 OWE 與控制組相比，其 P 值 (0.043、0.041、0.041 及 0.042) 皆顯著低於 0.05，表示

OWE 能較控制組顯著減少 B16 黑色素細胞之黑色素生成率，且隨 OWE 的濃度愈高則黑色素生成愈少，兩者之間呈現負相關。此外 10 μ g/mL 的熊果素亦可顯著抑制黑色素生成 ($62.31 \pm 2.78\%$) (Fig. 2)。於本研究發現：OWE 抑制黑色素生成之能力雖不及熊果素，然卻間接證明中醫認為珍珠具有美白作用之可能性。另外，呂 (2006) 指出檸檬皮萃取物兼具抗氧化及抑制黑色素之能力，未來期可解決色素過度化所引起之皮膚病變，因此推測 OWE 也可能藉由抑制黑色素生成，進而減緩色素過度化所引起之皮膚病變的發生。由於黑色素生成與紫外線息息相關，故本研究將進一步探討 OWE 對光損傷 HaCaT 角質細胞是否具有保護/修復作用。

四、OWE 對光損傷 HaCaT 角質細胞之保護 / 修復試驗

角質層是皮膚的最外層，也是接觸化學物質及紫外線最頻繁的一層，因此本研究利用 HaCaT 角質細胞來探討 OWE 對光損傷角質細胞之保護 / 修復作用。將不同濃度 (2、4、8 及 16 mg/mL) 的 OWE 添加於 HaCaT 角質細胞中共同培養，結果顯示隨著 OWE 濃度愈高則 HaCaT 角質細胞之存活率也愈高 (104.25 ± 1.74 、 107.36 ± 1.64 、 124.48 ± 3.26 及 $131.09 \pm 2.92\%$)，依據統計分析，在 8 及 16 mg/mL 濃度下與控制組相比，其 P 值 (0.034 及 0.032) 皆顯著低於 0.05，表示 8 及 16 mg/mL 的 OWE 能顯著提升 HaCaT 角質細胞之存活率，且呈現濃度依存現象 (Fig. 3)。此外，扇貝殼水萃物亦能提升角質細胞之存活率，亦呈現濃度依存現象 (Torita *et al.*, 2004)，此結果與本研究相似，因此推測 OWE 具有活化角質細胞增生的能力。

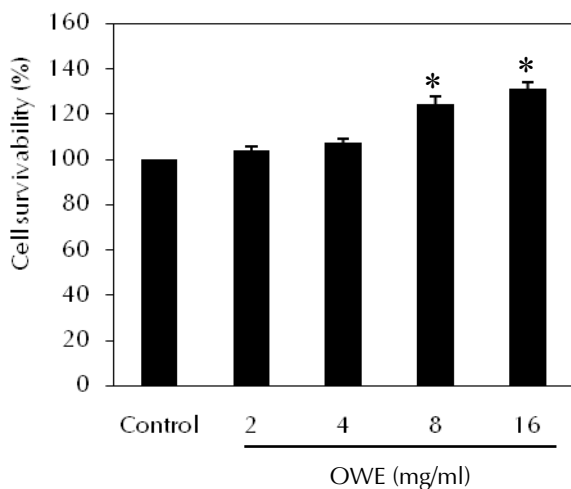


Fig. 3 Effects of OWE on cell survivability by HaCaT cell. Each value represents means \pm SD (n = 3). The "*" means significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control group.

於 UVA 光損傷下，先行添加 OWE 與 HaCaT 角質細胞共同培養再以 UVA 照射，係為保護試驗。結果顯示：當 HaCaT 角質細胞不添加 OWE 直接受 UVA 照射後 (負控制組) 其細胞存活率為 $75.36 \pm 2.16\%$ ，然添加 2、4、8 及 16 mg/mL 的 OWE 後，其細胞存活率分別為 80.12 ± 1.81 、 88.37 ± 1.68 、 91.81 ± 2.48 及 $92.35 \pm 2.83\%$ 。依據統計

分析，在 4、8 及 16 mg/mL 濃度下與負控制組相比，其 P 值 (0.042、0.040 及 0.039) 皆顯著低於 0.05，表示：先行添加 4、8 及 16 mg/mL 的 OWE，能保護 HaCaT 角質細胞、減緩 UVA 光損傷，同時顯著提升 HaCaT 角質細胞之存活率 (Fig. 4A)。此外，當 HaCaT 角質細胞受 UVA 照射後 (負控制組)，其胞內蛋白質含量會下降 ($72.86 \pm 3.01\%$)，在 8 及 16 mg/ml 濃度下與負控制組相比，其 P 值 (0.039 及 0.039) 皆顯著低於 0.05，表示：先行添加 8 及 16 mg/mL 的 OWE 能顯著提升其胞內蛋白質含量 (89.79 ± 2.88 及 $90.02 \pm 2.76\%$) (Fig. 4B)。

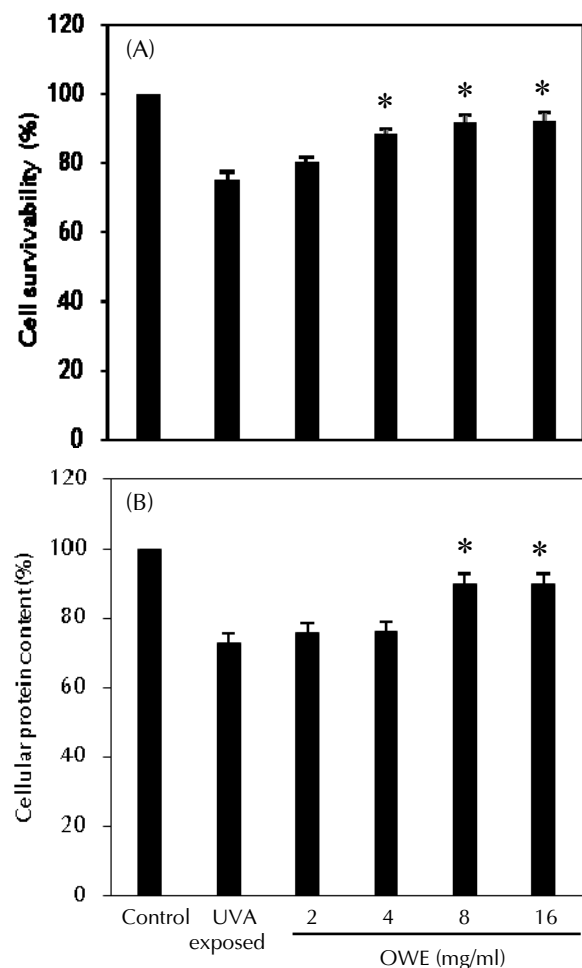


Fig. 4 Protective effects of OWE on cell survivability (A) and cellular protein content (B) against UVA-exposed damage by HaCaT cell. Each value represents means \pm SD (n = 3). The "*" means significant difference ($p < 0.05$) when compared to the negative control group.

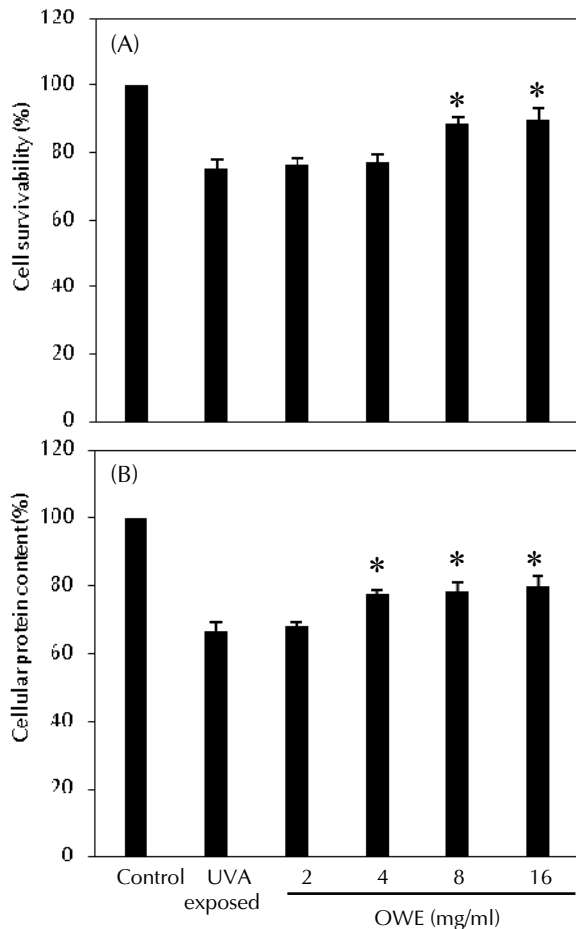


Fig. 5 Protective effects of OWE on cell survivability (A) and cellular protein content (B) against UVB-exposed damage by HaCaT cell. Each value represents means \pm SD ($n = 3$). The “*” means significant difference ($p < 0.05$) when compared to the negative control group.

於 UVB 光損傷下，先行添加 OWE 與 HaCaT 角質細胞共同培養再以 UVB 照射，亦同樣進行保護試驗。結果顯示：當 HaCaT 角質細胞不添加 OWE 直接受 UVB 照射後（負控制組），其細胞存活率為 $75.23 \pm 2.72\%$ ，然添加 2、4、8 及 16 mg/mL 的 OWE 後，其細胞存活率分別為 76.54 ± 1.67 、 77.26 ± 2.10 、 88.43 ± 2.13 及 $89.89 \pm 3.12\%$ 。依據統計分析，在 8 及 16 mg/mL 濃度下與負控制組相比，其 P 值 (0.045 及 0.044) 皆顯著低於 0.05，表示：先行添加 8 及 16 mg/mL 的 OWE，能保護 HaCaT 角質細胞、減緩 UVB 光損傷，同時顯著提升 HaCaT 角質細胞之存活率 (Fig. 5A)。相同的，當 HaCaT 角質細胞受 UVB 照射後（負控制組），其胞內蛋白質含量會下降 ($66.31 \pm 3.01\%$)，在 4、

8 及 16 mg/mL 濃度下與負控制組相比，其 P 值 (0.043、0.043 及 0.042) 皆顯著低於 0.05，表示：先行添加 4、8 及 16 mg/mL 的 OWE 能顯著提升胞內蛋白質含量 (77.24 ± 1.69 、 78.56 ± 2.36 及 $79.79 \pm 2.97\%$) (Fig. 5B)。

黃與吳 (2006) 指出隨著牡蠣殼萃取物中的可溶性蛋白濃度愈高則 DPPH 自由基清除能力愈強，當其可溶性蛋白量達 1.4 mg/mL 時，則 DPPH 自由基清除能力可達 40%。且 SOD-like 活性亦與牡蠣殼萃取物中的可溶性蛋白濃度呈現正相關，同樣在其可溶性蛋白量達 1.4 mg/mL 時，SOD-like 活性可達 15% 以上。此外，扇貝殼萃取物具有清除自由基、活化纖維母細胞及降低紫外線對細胞的損傷之作用 (Liu *et al.*, 2002)。因此推測在保護試驗下，OWE 可能藉由清除自由基以減少 UVA/UVB 對 HaCaT 角質細胞的傷害以達到保護作用。此外，扇貝殼萃取物亦能提升角質細胞的胞內蛋白質含量 (Liu *et al.*, 2002)，此結果與本研究相似，因此推測 OWE 可能藉由提供 HaCaT 角質細胞養分，以提升胞內蛋白質含量，進而提高 HaCaT 角質之細胞存活率，以達到保護角質細胞避免光損傷的效果。然而，OWE 對 UVA/UVB 光損傷的 HaCaT 角質細胞均不具有修復作用，其細胞存活率與負控制組相比均無顯著差異。

結 論

由體外試驗評估 OWE 之抑制黑色素生成及抗光損傷作用，結果發現隨著 OWE 濃度愈高則抑制酪胺酸酶活性愈強，並可減少 B16 黑色素細胞之黑色素生成，推測 OWE 藉由抑制黑色素生成，進而減緩皮膚病變的發生。此外，由細胞實驗中亦發現 OWE 對角質 HaCaT 細胞具有保護作用，減少 UVA/UVB 對 HaCaT 角質細胞之光損傷，故推估 OWE 具有開發做為皮膚外用劑之可行性。

謝 辭

本研究得以順利完成，承蒙成功大學藥理學研究所張文昌教授提供細胞試驗材料，特此致謝。

參考文獻

- 丁雲川 (2007) 珍珠粉萃取物成份之體外生物活性探討. 東海大學化學所 碩士論文, 87 pp.
- 呂學益 (2006) 柑橘類果皮萃取物抗氧化性及黑色素合成之評估. 嘉南藥理科技大學生物科技研究所 碩士論文, 82 pp.
- 李哲榮 (2004) 牡蠣殼粉資源化做為水泥膠結材料之研究. 國立臺灣海洋大學河海工程研究所 碩士論文, 100 pp.
- 李彥儒 (2006) 台灣主要經濟貝類廢棄殼研製珍珠粉之可行性研究. 國立成功大學資源工程研究所 碩士論文, 75 pp.
- 邱國成 (2003) 台灣產長牡蠣殼內珍珠質之生化特性分析. 中山醫學大學口腔醫學研究所 碩士論文, 49 pp.
- 陳相訓 (2008) 奈米化珍珠粉之理化特性與生體可用率. 國立臺灣大學食品科技研究所 博士論文, 126 pp.
- 湯成杰 (2004) 洛神花各成分萃取物對於黑色素瘤細胞黑色素生成之影響. 中山醫學大學生化暨生物科技研究所 碩士論文, 108 pp.
- 黃湘玲 (2004) 葡萄籽多元酚粗萃物對B16-F1黑色素瘤細胞黑色素生成之影響. 中山醫學大學營養科學研究所 碩士論文, 84 pp.
- 黃培安, 吳純衡 (2006) 牡蠣殼萃取物在抗氧化及抑制酪胺酸酶活性之研究. 水試專訊, 16: 1-3.
- 蕭伊妙 (2006) 維他命C醣苷和熊果素對於B16黑色素瘤細胞抑制黑色素生成之研究. 國立清華大學化學工程研究所 碩士論文, 52 pp.
- 蕭夙君 (2007) 珍珠粉抗氧化性與延緩衰老之研究. 中山醫學大學營養學研究所 碩士論文, 102 pp.
- 賴慧芬 (2003) 荖葉萃取液對黑色素生成作用之研究. 嘉南藥理科技大學生物科技研究所 碩士論文, 49 pp.
- AOAC (1995) Official methods of analysis. 16th edition, Association of official analytical chemist, Arlington, VA.
- Arung, E. T., I. W. Kusuma, Y. M. Iskandar, S. Yasutake, K. Shimizu and R. Kondo (2005) Screening of Indonesian plants for tyrosinase inhibitory activity. *J. Wood Sci.*, 51: 520-525.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N. E. Fusenig (1988) Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, 106: 761-771.
- Chakraborty, A. K., Y. Funasaka, M. Komoto and M. Ichihashi (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.*, 11: 206-212.
- de Gruijl, F. R. (1999) Skin cancer and solar UV radiation. *Eur. J. Cancer*, 35: 2003-2009.
- Deyrieux, A. F. and V. G. Wilson (2007) In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*, 54: 77-83.
- Ferrari, M., M. C. Fornasiero and A. M. Isetta (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods*, 131: 165-172.
- Fitzpatrick, T. B., A. Z. Eizen and K. Wolff (1993) *Dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill.
- Goldsmith, L. A. (1991) *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*. New York: Oxford University Press.
- Kligman, L. H. (1986) Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Dermatol Clin*, 4: 517-28.
- Kubo, I., I. Kinst-Hori, S. K. Chaudhuri, Y. Kubo, Y. Sánchez and T. Ogura (2000) Flavonols from *Heterotjeca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.*, 8: 1749-1755.
- Liu, Y. C., K. Uchiyama, N. Natsui and Y. Hasegawa (2002) In vitro activities of the components from scallop shells. *Fish. Sci.*, 68: 1330-1336.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Masamoto, Y., Y. Murta, K. Baba, Y. Shimoishi, M. Tada and K. Takahata (2004) Inhibitory effects of esuletin on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 422-425.
- Morison, W. L. (1991) *Phototherapy and photochemotherapy of skin disease*. New York: Raven Press.
- Pathak, M. A. (1982) Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 7: 285-312.
- Piamphongsant, T. (1998) Treatment of melasma: a review with personal experience. *Int. J. Dermatol.*, 37: 897-903.
- Prota, G. (1996) Melanins and melanogenesis. *Cosmetic & Toiletries Magazine* 111: 43-51.

- Santos, E. P., Z. M. Freitas, K. R. Souza and S. Garcia (1999) In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 21: 1-5.
- Sudo, S., T. Fujikawa., T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima and T. Takahashi (1997) Structure of mollusk shell framework proteins. *Nature*, 387: 563-564.
- Takakazu, S. and P. Stan (1993) Differences in subcellular distribution of catechol-O-methyltransferase and tyrosinase in malignant melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 100: 222-225.
- Torita, A., Y. Chun and Y. Hasegawa (2004) Photoprotective activity of scallop shell water-extract in keratinocyte cells. *Fish. Sci.*, 70: 910-915.
- Wu, W. L. (2000) EM studies on Taiwan mollusks. *Instruments Today* 21: 41-50.

Melanogenesis Inhibition and UV-protective Effects of Oyster Shell Water Soluble Extract

Yi-Kuan Tsai, Pai-An Hwang^{*}, Shu-Yun Gau and Chwen-Herng Wu

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

In order to enable effective utilization of oyster shell, the aim of this study was evaluating the melanogenesis inhibition and the protective effect against ultraviolet (UV) A/B-exposed of oyster shell water soluble extract (OWE). In the melanogenesis inhibition test, it was found that 2, 4, 8 and 16 mg/ml OWE inhibited the activity for tyrosinase in a concentration-dependent manner, and OWE also reduced the production of melanin on B16 melanoma cell. In addition, OWE promoted proliferation of HaCaT keratinocyte cell. At the concentration of 8 and 16 mg/ml, OWE protected keratinocyte cell against UVA/UVB-exposed damage, and the cell survivability and cellular protein content all were significantly higher than negative group. However, OWE showed no repair function on UVA/B-exposed damage.

Key words: oyster shell water soluble extract, tyrosinase, B16 mouse melanoma cell line, HaCaT human keratinocyte cell line

*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan, TEL: (02) 2462-2101; Fax: (02) 2462-3306; E-mail: pahwang@mail.tfrin.gov.tw