

美和科技大學

104 年度教師專題研究計畫 結案報告

計畫名稱：台灣香丁皮抗氧化和抑制酪胺酸酶活性之分析及其美容生
技產品之應用

Studies on the Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activity of the
Peels from Taiwan Native Species *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and
Their Application in Beauty Biotech Products

計畫編號：MH- 104-DBT-001

計畫期間：104.01.01.~104.12.31.

計畫主持人：黃瑞齡

共同主持人：林昀生

經費總額：50000 元

經費來源：104 年度教育部獎補助款

計畫中文摘要。(500~1000 字以內)

台灣香丁(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)屬於芸香科，其果皮富含川陳皮素(Nobiletin)、橘紅素(Tangeretin)等多甲氧基黃酮(Polymethoxylated Flavones; PMF)，具有抗發炎、抗氧化及降膽固醇功能。近年來皮膚保健美白產品一直為保養品研發的主軸之一，而影響美白最主要的因素為黑色素(Melanin)的生成，酪胺酸酶是黑色素生成的關鍵酵素，許多影響黑色素生成的因素都是直接或間接作用在酪胺酸酶，因此藉由台灣香丁抗氧化和抑制酪胺酸酶活性之分析，來篩選具美白活性之有效成分。實驗結果顯示，香丁皮粗萃物必須在高濃度(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)具有輕度 DPPH 抗氧化活性，香丁皮粗萃物 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對於細胞外蕈菇酪胺酸酶活性，具有輕度抑制作用，對於 B16-F10 細胞中黑色素的含量並無抑制的作用；且對於 B16-F10 細胞中酪胺酸酶的活性，亦無抑制作用。基於本實驗結果，建議香丁皮粗萃物並不具有開發美白生技產品之潛能。

關鍵詞：台灣香丁、抗氧化、蕈菇酪胺酸酶、B16-F10 黑色素瘤細胞。

計畫英文摘要。(500~1000字以內)

Abstract:

Citrus sinensis (L.) Osbeck belongs to the family of Rutaceae. Its peels are known to contain abundant Polymethoxylated Flavones, PMF, such as nobiletin and tangeretin, and have anti-inflammatory, radical scavenging activity and hypo cholesterol functions. Recently the skin whitening products are in high demand for beauty and skincare developments. The major factor influencing the skin color is the amount of melanin, with tyrosinase catalyzing the first rate-determining step, and is considered as the key enzyme in melanin production. Many agents influencing the skin whitening act either directly or indirectly upon tyrosinase. Therefore, screening for potent antioxidant activity and tyrosinase inhibitors from the crude extract of the peels from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck is valuable in the development of skin whitening agents. Our results showed that the crude extract of peels from *Citrus sinensis* has light antioxidant activity through DPPH assay only at high concentration (1000 $\mu\text{g/mL}$). While crude extract of peels from *Citrus sinensis* at 100 $\mu\text{g/mL}$ showed light inhibition effect by using *in vitro* mushroom tyrosinase activity assay, and it showed no effect by using *in vivo* B16-F10 melanin level assay and tyrosinase activity assay. Based on these results, we suggest that the crude extract of the peels from *Citrus sinensis* has no potential in developing skin whitening agents for beauty biotech products.

Keywords: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, antioxidant, mushroom tyrosinase, B16-F10 melanoma cell.

前言

近年來皮膚保健美白產品一直為保養品研發的主軸之一，而影響美白最主要的因素為黑色素(Melanin)的生成。黑色素由位於皮膚表皮基底層(Basal layer)的黑色素細胞受紫外線照射時，會刺激表皮角質細胞(Keratinocytes) 釋放內皮細胞素-1(Endothelin-1; ET-1)，與黑色素細胞之細胞膜上的接受體(ET-1 receptors)結合，將訊息傳遞入黑色素細胞內，活化黑囊體(melanosomes)膜上的酪胺酸酶(tyrosinase)，催化黑色素的生成。接著黑色素會經由皮膚細胞代謝由基底層逐漸移至表皮層，正常生理情況製造的黑色素會隨著皮膚的代謝而分解，不會影響膚色 (Prakash, & Muhammed, 2009)。但如果在短時間內曝曬紫外光，過量的黑色素無法藉由皮膚代謝排出表層，就會沈澱於表皮層內；如果黑色素均勻沈澱，膚色就單純變深褐色或黑色，但如果為局部沈澱即會產生斑點，例如雀斑、黑斑 (Prakash, & Muhammed, 2009)，雀斑屬於單純性褐色或淡黑色的斑點，主要分佈於臉部為主，尤其是雙側臉頰與眼睛下方，且呈現對稱性，通常於雙側臉頰的中央部位較密集，女性發生率較高，因個人體質而異。黑斑可分為存在於表皮層（雀斑、曬斑）以及存在於真皮層（顴骨斑、痣），減少黑斑的形成可藉由抑制酪胺酸酶達到減少黑色素合成的作用，以及淡化黑色素或是直接破壞黑色素細胞。

黃酮類化合物(Flavonoids)，廣泛存在植物中，具有抗發炎 (Manthey & Bendele, 2008)、降血脂 (Nichols, Jackson, Manthey, Shukla & Holland, 2011; Assini, Mulvihill & Huff, 2013) 及抗癌 (Ren, Qiao, Wang, Zhu & Zhang, 2003; Park et al., 2012) 等生物活性。川陳皮素 (nobiletin) 與橘紅素 (tangeretin) 為多甲氧基黃酮類 (Polymethoxylated Flavones; PMF) 化合物，具有抗發炎 (Wu, Zhou, Tao & Li, 2006; Chen, Weng & Lin, 2007; Jang et al., 2013; Yoshigai et al., 2013)、改善高血糖及胰島素抗性 (Lee et al., 2010)、抗動脈粥樣硬化 (Whitman, Kurowska, Manthey & Daugherty, 2005)、抗關節炎 (Imada et al., 2008)、腦神經退化保護作用 (Ihara et al., 2012)、抗B型肝炎病毒 (Shie, Huang & Lay, 2013; Hsu, Chen & Huang, 2014) 及抗癌 (Yoshimizu et al., 2004; Miyata, Sato, Yano & Ito, 2004; Morley, Ferguson & Koropatnick, 2007;

Moon, Cho, Ahn & Cho, 2013 ; Ma et al., 2013 ; Shi, Liao, Shih & Tsai, 2013 ; Hsu, Chen & Huang, 2014) 等生物活性，台灣香丁(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)，果皮富含川陳皮素(Nobiletin)、橘紅素(Tangeretin)等多甲氧基黃酮(Polymethoxylated Flavones ; PMF)。

黑色素細胞位於表皮、真皮交界處，夾雜在基底細胞之間。每一個色素細胞成星狀構造，其放射狀之樹突可以傳送黑色素(melanin)到鄰近的角質細胞，黑色素細胞中生成黑色素的關鍵酵素稱為酪氨酸酶(tyrosinase)，其會將酪胺酸 (Tyrosine)氧化形成多巴 (Dopa)，再經酪胺酸酶的作用，進一步氧化成多巴醌 (Dopaquinone)，接著進一步氧化成真黑色素(Eumelanin)或褐黑色素 (Pheomelanin) (Prakash, & Muhammed, 2009)。酪胺酸酵素是黑色素生成的關鍵酵素，許多影響黑色素生成的因素都是直接或間接作用在酪氨酸酶，因此分析台灣香丁皮粗萃取物對酪胺酸酶活性抑制效果(Tyrosinase activity assay)，來篩選具美白活性之有效成分。

本研究先針對不同濃度的台灣香丁皮粗萃取物(crude extract)，測試其抗氧化活性，及對蕁菇酪胺酸酶之抑制作用，並且以過去已證實有美白作用的麴酸(Kojic acid)，作為正對照組，探討台灣香丁皮粗萃取物是否具有美白作用。而後選擇適當的台灣香丁皮粗萃取物濃度處理老鼠B16-F10黑色素瘤細胞，針對細胞中黑色素的含量以及酪胺酸酶的活性做深入探討，最後進行台灣香丁皮粗萃取物用於美白養顏面膜及精華液之生技美容產品開發。

研究方法、步驟

1、供試藥物之來源及製備

本計畫供試之台灣香丁(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)果皮，採自台東東河鄉，台灣香丁皮粗萃取物(crude extract)的製備，由計畫共同主持人林昀生博士負責。並以 40 µg/ml 濃度溶解於二甲基亞砒(Dimethyl sulfoxide ; DMSO)中，供測試備用。

2、細胞株及細胞培養

本計畫使用小鼠黑色素瘤細胞株 B16-F10 (感謝本校美容系吳裕仁博士贈予)，進行台灣香丁皮粗萃取物抑制酪胺酸酶活性測試，B16-F10 細胞培養於含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中。每毫升的培養基內添加 100 I.U.青黴素 (penicillin)、100 µg 鏈黴素(streptomycin)、2.5 µg 防治黴(fungizone)、2 mM 麩氨酸(L-glutamine)及 100 µM 之非必需性氨基酸(non-essential amino acid，包括 14.7 µg glutamic acid, 7.5 µg glycine, 8.9 µg alanine, 13.3 µg aspartic acid, 11.5 µg proline, 15 µg asparagine 及 10.5 µg serine)，以上稱完全培養基，置於含 5%二氧化碳的 37°C 培養箱中。

3、DPPH抗氧化活性測試

抗氧化活性，較常被使用的是 DPPH，事實上 DPPH 是一種穩定的自由基可以接受電子或者氫原子，因此可用來評估抗氧化物的提供氫原子或電子之能力之方法，台灣香丁皮粗萃取物之五種濃度，於 96 孔盤內，將甲醇萃取物之各劃分部(100µl)與 DPPH(100µl)進行混合，DPPH 在波長 517 nm 下有較強的吸光值 (Molyneux, 2014)，並以維他命 C 作為標準品，把樣品或標準品與 DPPH 混合後，因為樣品會清除自由基造成吸光值的降低可藉此算出清除率，吸光值越低表示抗氧化物質之還原力越強。

4、MTT assay細胞毒殺測試

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide)是一種黃色的染劑，

會被活細胞所吸收並經由粒線體中的 succinate dehydrogenase 還原成藍紫色的 formazan，可用來檢測細胞存活與生長變化。在 96 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 2×10^4 細胞，培養於 5 % CO₂，37°C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予台灣香丁皮粗萃取物五種劑量(100、50、25、12.5、6.25 μg/mL)，每種劑量三重複。給藥處理 48 小時後，盤中留下 100 μL 培養液，加入 25 μL 含有 1 mg/ml MTT 溶液，放回 5 % CO₂，37°C incubator 中 4 小時，再移除培養液加入 100 μL 的 DMSO 於室溫下震盪 5 分鐘，待紫色結晶完全溶解後，在 540 nm 測定吸光值，將不同處理後之吸光值扣除空白組吸光值後，帶入下列公式以求得細胞存活率 Cell viability (%) (Hsu, Chen & Huang, 2014)。

$$\text{Cell viability (\%)} = [\text{OD}_{540}(\text{sample}) / \text{OD}_{540}(\text{control})] \times 100 \%$$

5、ELISA assay 細胞外萼菇酪胺酸酶活性測試

首先配製 67 mM phosphate buffer (pH6.8)，並以此配製 5 mM L-Dopa，取 120 μl 加入 96 well 的平底盤中，加入 40 μl 不同濃度供測樣品，最後加入 40 μl 萼菇酪胺酸酶 tyrosinase (2 units)，放置於 37°C 反應 30 分鐘，使用 ELISA reader，測定 490 nm 波長吸光值(Kong et al., 2008)。

$$\text{酪胺酸酶活性抑制率(\%)} = (A-B)/A \times 100\%$$

A：控制組 B：供測組

6、B16-F10 黑色素表現量測定

將 B16-F10 細胞以 2×10^5 /well 種於 6 well 之培養皿中，每個 well 中加入 100 nM 之 α-黑色素刺激激素(α-melanocyte stimulating hormone；α-MSH)，放置於二氧化碳培養箱中 24 小時後，加入含不同濃度的供測藥物之 cDMEM，再放置於二氧化碳培養箱中 24 小時後，使用 1X PBS 沖洗細胞兩次，加入 Trypsin-EDTA 將細胞脫離培養皿底部，吸入 1 mL 無菌

離心管，以 12000 rpm 離心 10 分鐘，清除上清液，加入 100 μ L 1M NaOH，於 60^oC 中反應 1 小時，隨後放置於室溫冷卻，使用酵素連結免疫吸附偵測儀(ELISA reader)測波長 405 nm 吸光值(Yokozawa, & Kim, 2007 ; Sato, Takahashi, Iraha, & Toriyama, 2008)，並以 100 μ M 麴酸(Kojic acid)為正對照組(Saruno, Kato & Ikeno, 1979)。

5、B16-F10酪胺酸酶活性測試

將 B16-F10 細胞以 2×10^5 /well 種於 6 well 之培養皿中，每個 well 中加入 100 nM 之 α -黑色素刺激激素(α -melanocyte stimulating hormone ; α -MSH)，放置於二氧化碳培養箱中 24 小時後，加入含不同濃度的供測藥物之 cDMEM，再放置於二氧化碳培養箱中 24 小時後，使用 1X PBS 沖洗細胞兩次，加入 Trypsin-EDTA 將細胞脫離培養皿底部，吸入 1 mL 無菌離心管，以 12000 rpm 離心 10 分鐘，清除上清液，每管再分別與等體積的細胞裂解緩衝液(50 mM Tris, pH = 7.5, 150 mM NaCl, 2% Triton X-100, 100 μ g/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 μ g/mL aprotinin)混勻。在 4^oC 下靜置 5 分鐘後，以 4^oC、14000 rpm 條件進行離心 30 分鐘。酪胺酸酶活性測試：離心後的上清液，則用於進行酪胺酸酶活性測試。依據 Bio-Red 產品說明，定量各細胞樣本之上清液內蛋白質含量後，分別取內含 40 μ g 蛋白質的上清液 80 μ L，與 1X PBS 配置的 2.5 mM L-dopa (2 mg/mL) 20 μ L 混勻，使兩者體積共為 100 μ L，使其搖晃反應 1 小時後，再以酵素連結免疫吸附偵測儀(ELISA reader)測波長 492 nm 吸光值(Yokozawa, & Kim, 2007)，並以 100 μ M 麴酸(Kojic acid)為正對照組(Saruno, Kato & Ikeno, 1979)。

7、統計方法

實驗所得之數據以平均值+標準誤差 (mean \pm standard error of mean) 來表示。實驗組與對照組之間是否有差異以 Student' s t-test 測定，當 $p < 0.05$ 時視為有統計意義。

研究結果與討論

1、香丁皮粗萃物對 DPPH 抗氧化活性測試

香丁皮粗萃物對 DPPH 之抗氧化活性測試。香丁皮粗萃物與維生素 C 均各以 5 種濃度 (1000、500、250、125 及 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，3 重覆，分別處理 DPPH，30 分鐘後測定 517 nm 吸光值之測試結果詳圖 1。香丁皮粗萃物在 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度下對 500 μM DPPH 之抗氧化活性其百分比為 46.5 ± 2.4 ，500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度下對 500 μM DPPH 之抗氧化活性(%)為 23.9 ± 1.3 ，顯示具有輕度抗氧化活性；作為正對照組的維生素 C 其 5 種濃度均呈現非常強度之抗氧化活性其百分比為 87.9 ± 0.2 。

2. 香丁皮粗萃物對細胞外萘酚酪胺酸酶活性之影響

酪胺酸酶在生物體內負責催化酪胺酸轉變為 L-Dopa(左旋-多巴)，接著生成 Dopakinone (多巴醌)，形成生物體皮膚顏色、眼睛顏色、頭髮顏色等表現所需之黑色素。為了探討香丁皮粗萃物對細胞外萘酚酪胺酸酶活性之影響，實驗用 L-Dopa 作為萘酚酪胺酸酶之受質，每個反應 2 單位，結果如圖 2 所示，作為正對照組之 100 μM 麴酸其對於細胞外萘酚酪胺酸酶抑制作用，具有顯著抑制作用；香丁皮粗萃物 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對於細胞外萘酚酪胺酸酶抑制作用，具有輕度抑制作用。DMSO 最終濃度為 0.25 %，作為有機溶劑對照組 (solvent control)，對細胞外萘酚酪胺酸無抑制作用，詳圖 2。

3. 香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞之毒殺作用

為了探討香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞之用藥處理安全濃度，首先進行細胞毒性測試。藥物作用濃度為 100、50、25、12.5 及 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等 5 種濃度，3 重覆，分別測定 24 及 48 小時細胞毒性試驗(MTT assay)，DMSO 最終濃度為 0.25 %，作為有機溶劑對照組 (solvent control)。結果顯示，香丁皮粗萃物 5 種濃度對 B16-F10 小鼠黑色素細胞給藥處理 24 及 48 小時均無顯著細胞毒性，詳圖 3A 及 3B。

4、香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞內黑色素表現量之影響

為了探討多香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞之細胞內黑色素表現量之影響，B16-F10 細胞以 2×10^5 /well 種於 6 well 之培養皿中，每個 well 中加入 100 nM 之 α -黑色素刺激激素(α -melanocyte stimulating hormone； α -MSH)，放置於二氧化碳培養箱中 24 小時後，加入 5 種濃度的香丁皮粗萃物濃度為 100、50、25、12.5 及 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，再放置於二氧化碳培養箱中 24 小時後，以 1M NaOH 分解 B16-F10 細胞，細胞內黑色素量，使用酵素連結免疫吸附偵測儀(ELISA reader)測波長 405 nm 吸光值，結果如圖 4 所示，100 μM 麴酸(Kojic acid) 具有顯著抑制作用。但是香丁皮粗萃物對 B16-F10 之細胞內黑色素量無抑制作用。添加於 medium 之 DMSO 最終濃度為 0.25 %，作為有機溶劑對照組 (solvent control)，對 B16-F10 之細胞內黑色素量無抑制作用。

5、香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞內酪胺酸酶活性之影響

為了探討香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞內酪胺酸酶活性之影響，將 B16-F10 細胞以 2×10^5 /well 種於 6 well 之培養皿中，每個 well 中加入 100 nM 之 α -黑色素刺激激素(α -melanocyte stimulating hormone； α -MSH)，放置於二氧化碳培養箱中 24 小時後，加入含 5 種濃度的香丁皮粗萃物濃度為 100、50、25、12.5 及 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，再放置於二氧化碳培養箱中 24 小時後，進行酪胺酸酶活性測試，結果如圖 5 所示，DMSO 最終濃度為 0.25 %，作為有機溶劑對照組 (solvent control)，對 B16-F10 小鼠黑色素細胞內酪胺酸酶活性，無抑制作用。100 μM 麴酸(Kojic acid) 具有顯著抑制作用。但是香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞內酪胺酸酶活性無抑制作用。

結論

台灣香丁是台灣原生柑橘，在台東縣東河鄉北源村企作 70 多甲，其果皮富含川陳皮素 (nobiletin)、橘紅素(tangeretin)等多甲氧基黃酮(Polymethoxylated Flavones；PMF)，文獻記載多甲氧基黃酮具有抗發炎、抗氧化及降膽固醇功能，因此藉由台灣香丁皮粗萃物，進行 DPPH 抗氧化活性、細胞外萼菇酪胺酸酶活性、B16-F10 細胞中黑色素的含量測定和抑制酪胺酸酶活性之分析，探討台灣香丁粗萃物是否具有開發美白生技產品之潛能。本實驗結果顯示香丁皮粗萃物必須在高濃度(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)具有輕度 DPPH 抗氧化活性，香丁皮粗萃物 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對於細胞外萼菇酪胺酸酶活性，具有輕度抑制作用，對於 B16-F10 細胞中，無顯著細胞毒性的濃度，對黑色素的含量並無抑制的作用；且對於 B16-F10 細胞中酪胺酸酶的活性，亦無抑制作用。基於本實驗結果，建議香丁皮粗萃物並不具有開發美白生技產品之潛能。

參考文獻

- Assini, J. M., Mulvihill, E. E., & Huff, M. W. (2013). Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 24, 34-40.
- Chen, K. H., Weng, M. S., & Lin, J. K. (2007). Tangeretin suppresses IL-1beta-induced cyclooxygenase (COX)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK, and AKT activation in human lung carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 73, 215-227.
- Hsu, H. W., Chen, C. C. and Huang, R. L.. (2014). The Inhibition Effects of Nobiletin and Tangeretin on Seven Kinds of Tumor Cells and Hepatitis B Surface Antigen. *Journal of Meicho University*. 33(2):159 - 186.
- Ihara, H., Yamamoto, H., Ida, T., Tsutsuki, H., Sakamoto, T., Fujita, T., Okada, T., & Kozaki, S. (2012). Inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression by a polymethoxyflavone from young fruits of Citrus unshiu in rat primary astrocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76, 1843–1848.
- Imada, K., Lin, N., Liu, C., Lu, A., Chen, W., Yano, M., Sato, T., & Ito, A. (2008). Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and -2 in collagen-induced arthritic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 373, 181–185.
- Jang, S-E., Ryu, K-R., Park, S-H., Chung, S., Teruya, Y., Han, M. J., Woo, J-T., & Kim, D-H. (2013). Nobiletin and tangeretin ameliorate scratching behavior in mice by inhibiting the action of histamine and the activation of NF- κ B, AP-1 and p38. *International Immunopharmacology*, 17, 502-507.
- Kong, Y. H., Jo, Y. O., Cho, C-W., Son, D., Park, S., Rho, J., & Choi, S. Y. (2008). Inhibitory effects of cinnamic acid on melanin biosynthesis in skin. *Biol. Pharm. Bull*, 31(5), 946-948.

- Lee, Y. S., Cha, B. Y., Saito, K., Yamakawa, H., Choi, S. S., Yamaguchi, K., Yonezawa, T., Teruya, T., Nagai, K., & Woo, J-T. (2010). Nobiletin improves hyperglycemia and insulin resistance in obese diabetic ob/ob mice. *Biochem Pharmacol*, 79, 1674-1683.
- Ma, X., Jin, S., Zhang, Y., Wan, L., Zhao, Y., & Zhou, L. (2013). Inhibitory Effects of Nobiletin on Hepatocellular Carcinoma *In Vitro* and *In Vivo*. *Phytother. Res*, Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.5024.
- Manthey J. A., & Bendele, P. (2008). Anti-inflammatory activity of an orange peel polymethoxylated flavone, 3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone, in the rat carrageenan/paw edema and mouse lipopolysaccharide-challenge assays *J. Agric Food Chem*, 56, 9399–9403.
- Miyata, Y., Sato, T., Yano, M., & Ito, A. (2004). Activation of protein kinase C betaII/epsilon-c-Jun NH2-terminal kinase pathway and inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in antitumor invasive activity induced by the polymethoxy flavonoid, nobiletin. *Mol Cancer Ther*, 3, 839-847.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26: 211-9.
- Moon, J. Y., Cho, M., Ahn, K. S., & Cho, S. K. (2013). Nobiletin Induces Apoptosis and Potentiates the Effects of the Anticancer Drug 5-Fluorouracil in p53-Mutated SNU-16 Human Gastric Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 65, 286-295.
- Morley, K. L., Ferguson, P. J., & Koropatnick, J. (2007). Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Letters*, 251, 168-178.
- Nichols, L. A., Jackson, D. E., Manthey, J. A., Shukla, S. D., & Holland, L. J. (2011). Citrus flavonoids repress the mRNA for stearoyl-CoA desaturase, a key enzyme in lipid synthesis and

obesity control, in rat primary hepatocytes. *Lipids Health Dis*, 10, 36-40.

Park, K. Il., Park, H. S., Nagappan, A., Hong, G. E., Lee, D. H., Kang, S. R., Kim, J. A., Zhang, J., Kim, E. H., Lee, W. S., Shin, S. C., Hah, Y. S., & Kim, G. S. (2012). Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean *Citrus aurantium* L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chemistry*, 135, 2728-2735.

Prakash, L., & Muhammed, M. (2009). Multifunctional Skin Tone Lighteners from Nature: An Overview. *Euro cosmetics* 6 : 19-23.

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23, 519-534.

Saruno, R., Kato, F., & Ikeno, T. (1979). Kojic Acid, a Tyrosinase Inhibitor from *Aspergillus albus*. *Agric. Bioi. Chern.* 43 (6), 1337-1338.

Sato, K., Takahashi, H., Iraha, R., & Toriyama, M. (2008). Downregulation of tyrosinase expression by acetylsalicylic acid in murine B16 melanoma. *Biol. Pharm. Bull*, 31(1), 33-37.

Shi, M-D., Liao, Y-C., Shih, Y-W., & Tsai, L-Y. (2013). Nobiletin attenuates metastasis via both ERK and PI3K/Akt pathways in HGF-treated liver cancer HepG2 cells. *Phytomedicine*, 20, 743-752.

Shie, P. H., Huang, R. L., & Lay, H. L. (2013). The flavonoids in *Citrus madurensis* Lour and their anti-hepatitis B virus activity. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 4, 239-243.

Whitman, S. C., Kurowska, E. M., Manthey, J. A., & Daugherty, A. (2005). Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages. *Atherosclerosis*, 178, 25-32.

Wu, Y. Q., Zhou, C. H., Tao, J., & Li, S. N. (2006). Antagonistic effects of nobiletin, a

polymethoxyflavonoid, on eosinophilic airway inflammation of asthmatic rats and relevant mechanisms. *Life Sci*, 78, 2689-96.

Yokozawa, T., & Kim, Y. J. (2007). Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull*, 30 (11), 2007-2011.

Yoshigai, E., Machida, T., Okuyama, T., Mori, M., Murase, H., Yamanishi, R., Okumura, T., Ikeya, Y., Nishino, H., & Nishizawa, M. (2013). Citrus nobiletin suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1b-treated hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439, 54-59.

Yoshimizu, N., Otani, Y., Saikawa, Y., Kubota, T., Yoshida, M., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Fujii, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A., & Kitajima, M. (2004). Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol Ther*, 20 (Suppl. 1), 95-101.

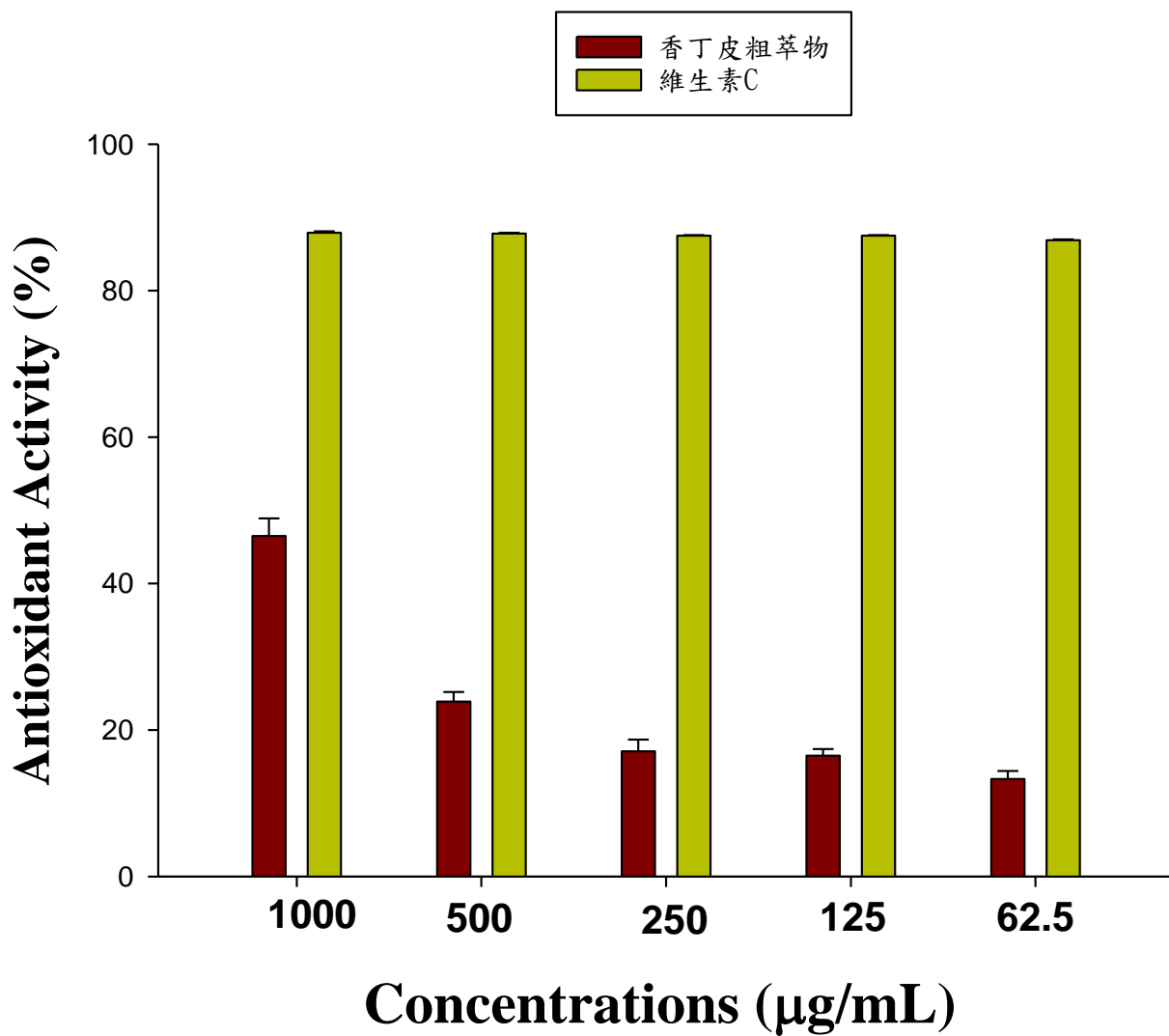


圖 1、香丁皮粗萃物對 DPPH 之抗氧化活性測試。香丁皮粗萃物與維生素 C 均各以 5 種濃度，3 重覆，分別處理 DPPH，30 分鐘後測定 517 nm 吸光值之測試結果。實驗數據皆以平均值±標準誤差來表示。* $p < 0.05$

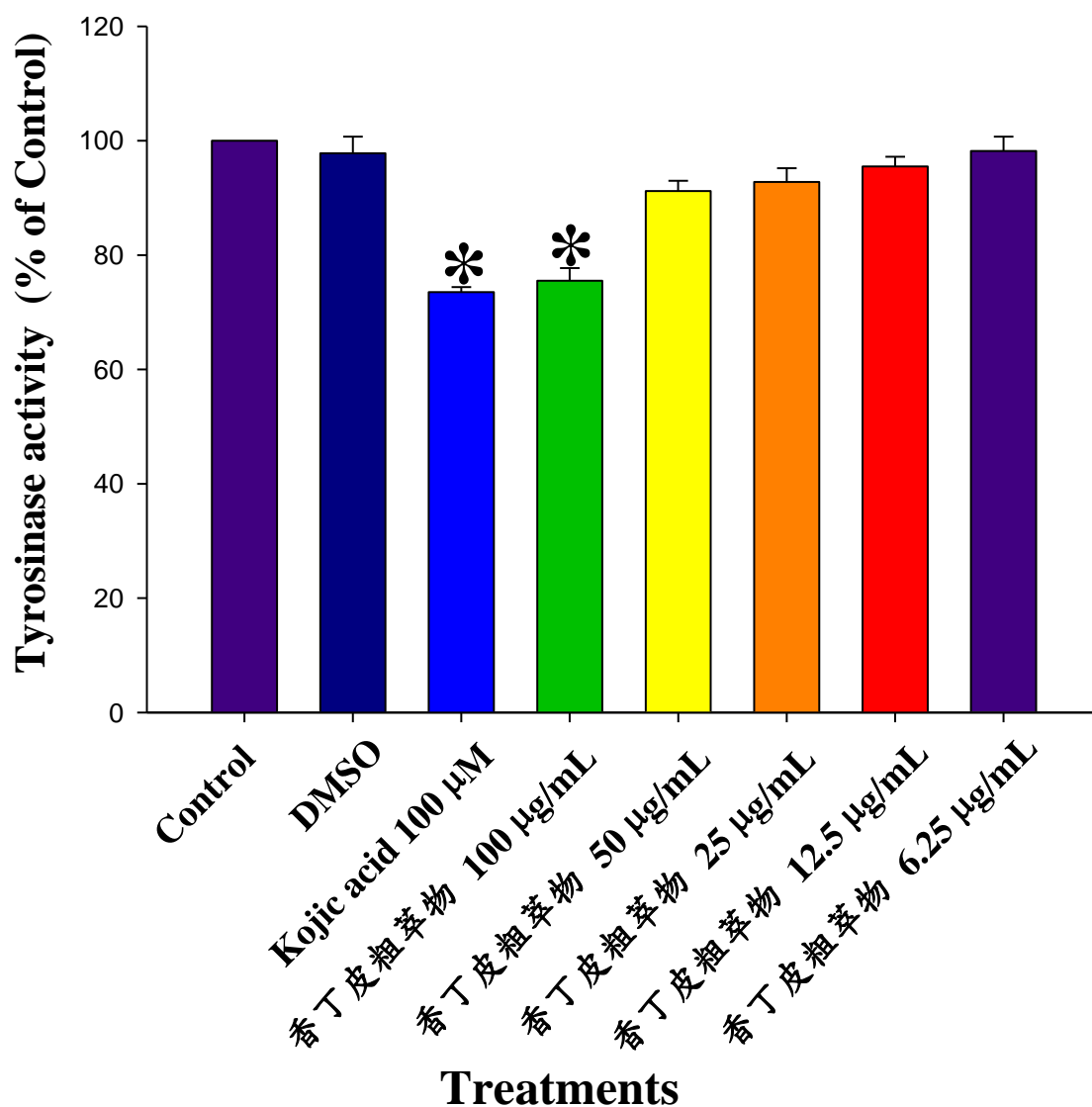
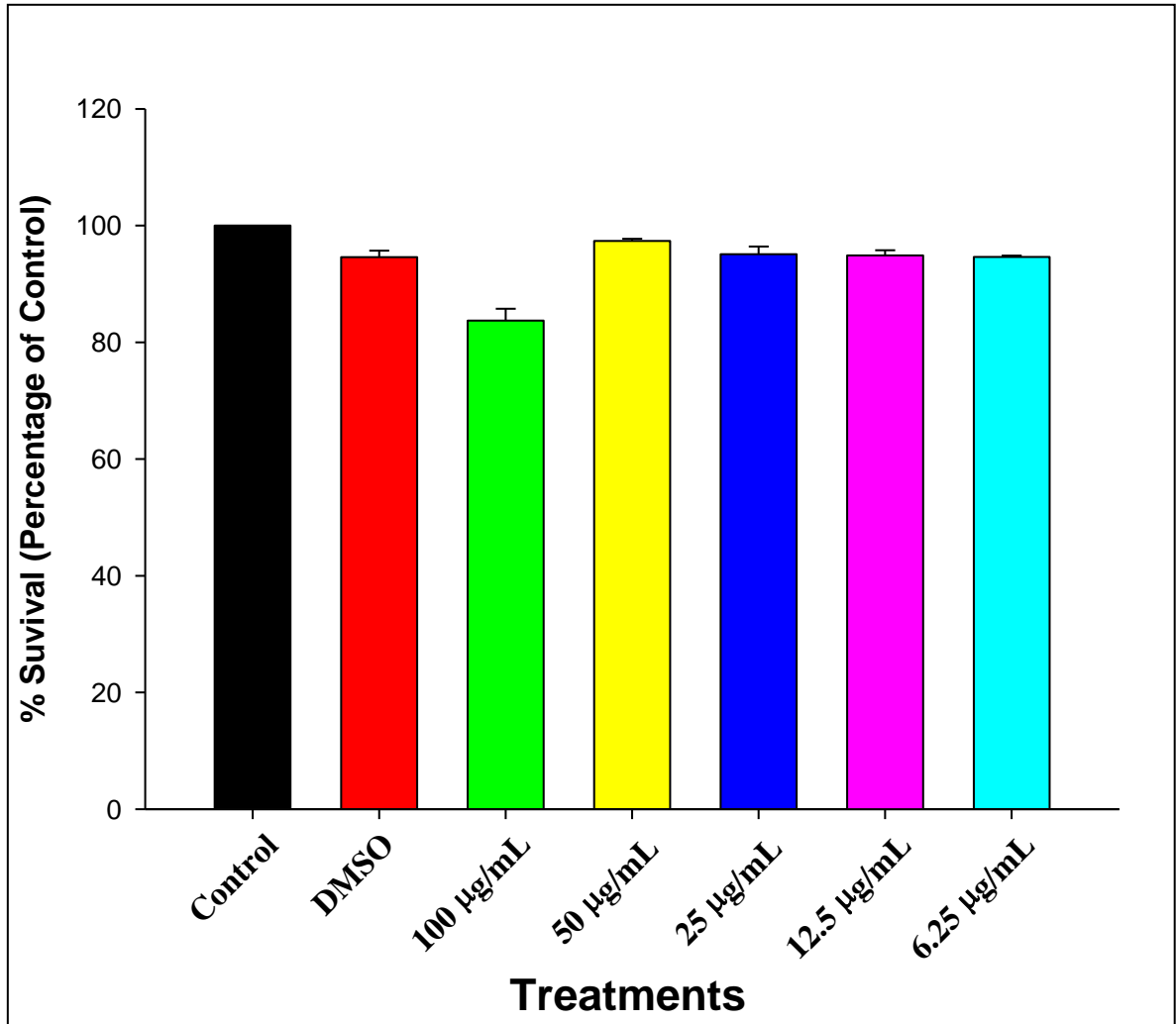


圖 2、香丁皮粗萃物對細胞外蕈菇酪胺酸酶活性之影響。香丁皮粗萃物以 5 種濃度，3 重覆。

100 µM 麴酸(Kojic acid) 為正對照組。DMSO 最終濃度為 0.25 %，作為有機溶劑對照組 (solvent control)。實驗數據皆以平均值±標準誤差來表示。* $p < 0.05$

(A)



(B)

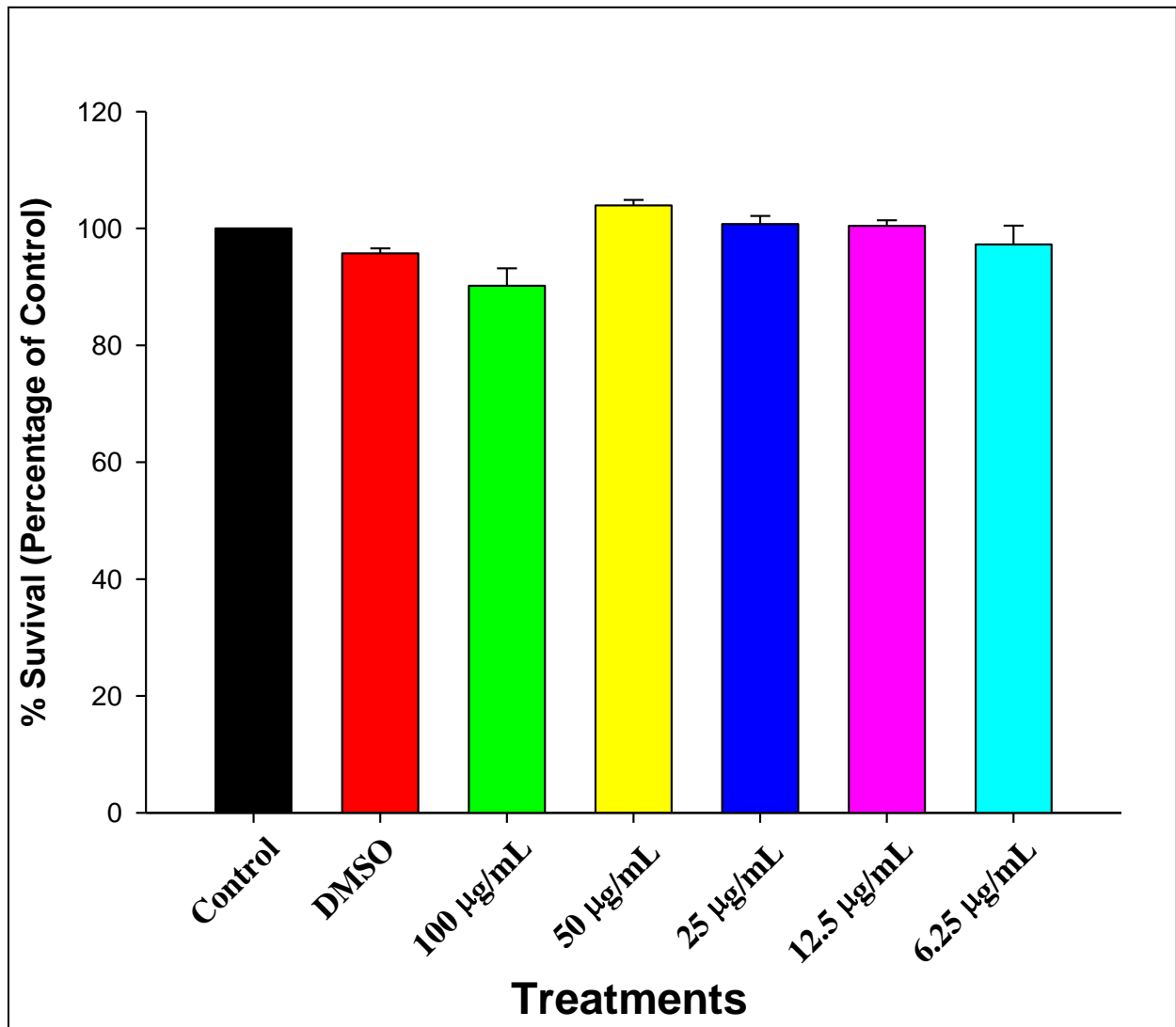


圖 3、香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞之毒性作用。香丁皮粗萃物以 5 種濃度，3 重覆，分別處理 24 及 48 小時，MTT 測試結果。3A 為藥物處理 24 小時；3B 為藥物處理 48 小時。實驗數據皆以平均值±標準誤差來表示。* $p < 0.05$

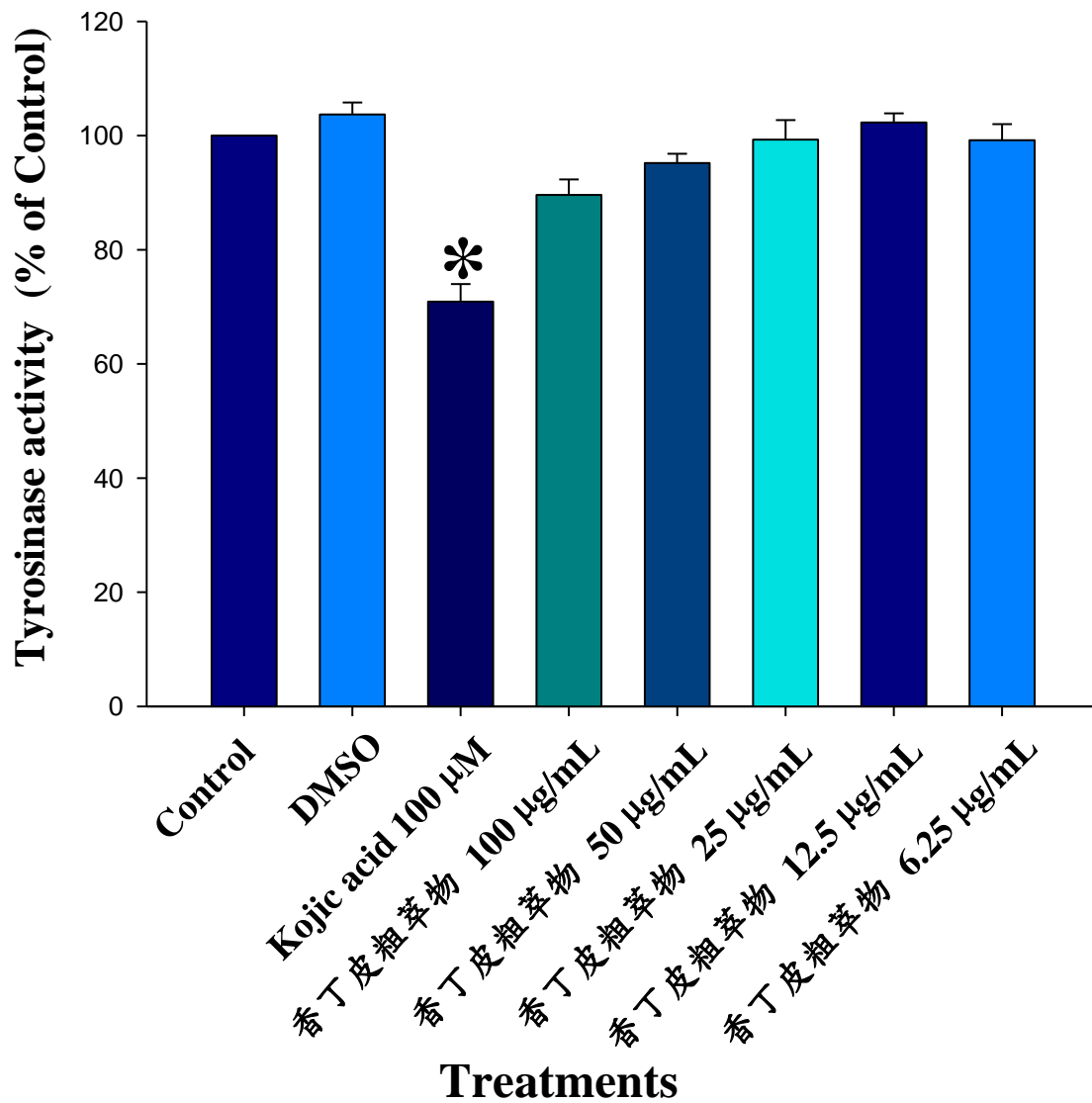


圖 4、香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞內黑色素表現量之影響。香丁皮粗萃物以 5 種濃度，3 重覆。100 µM 麴酸(Kojic acid) 為正對照組。DMSO 最終濃度為 0.25 %，作為有機溶劑對照組 (solvent control)。實驗數據皆以平均值±標準誤差來表示。* $p < 0.05$

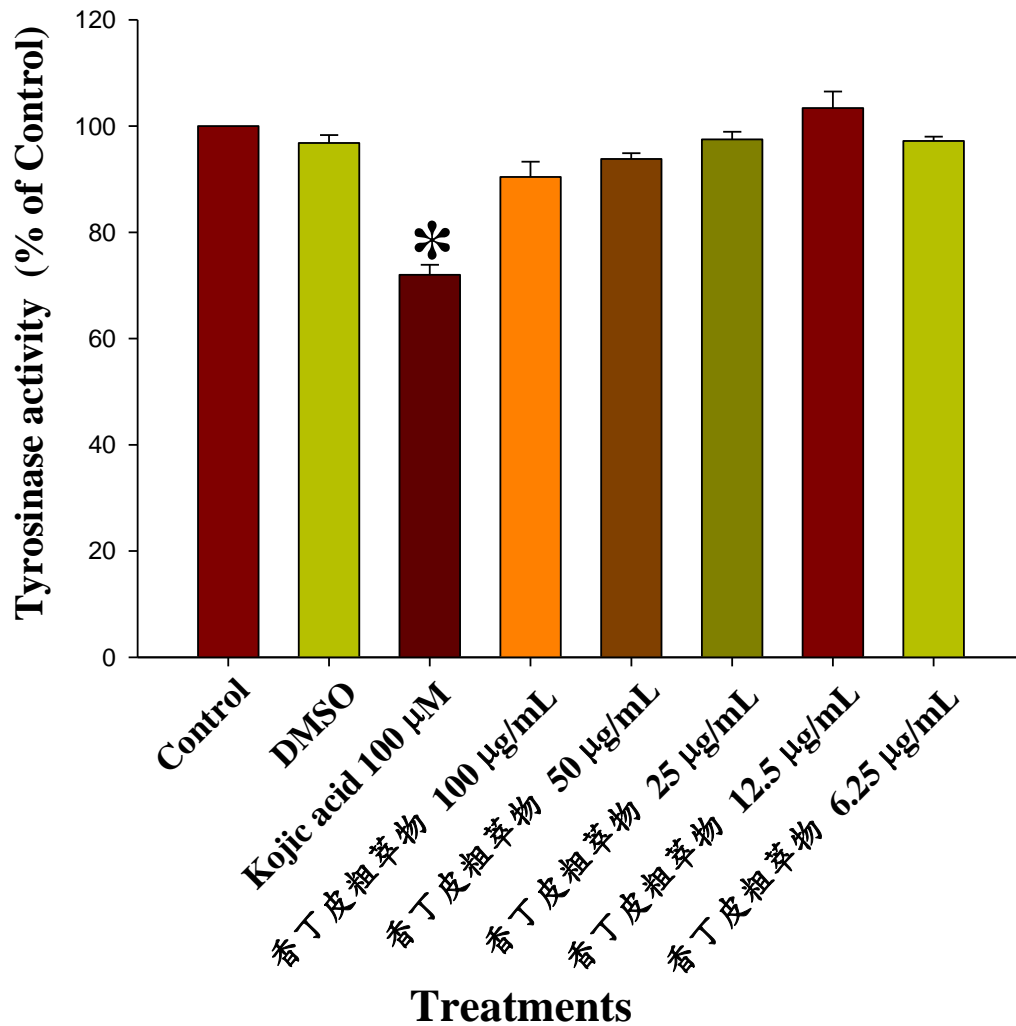


圖 5、香丁皮粗萃物對 B16-F10 小鼠黑色素細胞內酪胺酸酶活性之影響。香丁皮粗萃物以 5 種濃度，3 重覆。100 μM 麴酸(Kojic acid) 為正對照組。DMSO 最終濃度為 0.25 %，作為有機溶劑對照組 (solvent control)。實驗數據皆以平均值 \pm 標準誤差來表示。* $p < 0.05$