

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

第三名

052013

傳明酸美白新機制的發現：透過誘導角質細胞自噬作用

學校名稱： 國立中科實驗高級中學

作者：	指導老師：
高二 陳喬茵	王郁茜
高二 林敬宸	何家齊
高一 翁識騏	

關鍵詞： 傳明酸、美白、細胞自噬

摘要

已知傳明酸可抑制黑色素生合成達美白效果。實驗以黑色素餵食角質細胞並置於培養箱，模擬曬黑狀況，加入最高 $500 \mu\text{M}$ 傳明酸處理。MTT 顯示傳明酸在此濃度下幾乎無毒性。處理後西方墨點法顯示自噬相關蛋白增加；AO 測定出現紅色螢光，顯示自噬酸性囊泡存在，且加入自噬抑制劑後囊泡減少。隨傳明酸濃度提升，黑色素小體蛋白與黑色素含量明顯下降。最後以斑馬魚模擬人體觀察黑色素變化與存活率，結果顯示其幾乎無毒性且黑色素含量下降。總結，傳明酸可透過自噬分解黑色素，達成美白。

壹、前言

一、研究動機

現在大家越來越注重美白。我們查詢到衛生福利部核准的美白成分，其中傳明酸引起了我們的興趣。傳明酸(Tranexamic Acid, TXA)因具有高穩定性/溫和等特性，廣泛應用於淡斑美白產品。過去文獻指出，口服低劑量的傳明酸可以有效治療肝斑，副作用低，是安全且效果很好的治療方法。傳明酸利用抑制黑色素生成進而達到美白效果。但是，我們認為如果是抑制黑色素生成(Melanogenesis)，那只能達到「不變黑」的效果，那傳明酸是否可以分解已經存在黑色素(Melanin degradation)而達到美白的效果呢？在高二的選秀生物（一）中提到有關細胞自噬(Autophagy)作用。細胞自噬為一個維持體內平衡的機制，透過降解掉老廢物質胞器，來維持細胞代謝的功能。我們查找資料的過程中發現，許多美白劑是透過活化黑色素及角質細胞中的自噬作用進而抑制黑色素生成及分解黑色素。黑色素細胞合成黑色素會被送至角質細胞，本研究利用黑色素餵食角質細胞來模擬真實曬黑皮膚的狀況。我們決定將角質 HaCaT 細胞（人類永生化角質細胞）加入黑色素美白模式，加入傳明酸進行反應，檢測傳明酸是否誘導黑色素餵食角質 (HaCaT) 細胞進行自噬作用分解黑色素。

二、研究目的

- (一) 檢測傳明酸是否會影響誘導黑色素餵食角質 (HaCaT) 細胞自噬相關蛋白 (LC3-I/II 及 p62) ?
- (二) 檢測傳明酸是否會誘導黑色素餵食角質 (HaCaT) 細胞自噬作用，形成酸性自噬囊泡 (AVOs, Acidic vesicular organelles) 形成？
- (三) 檢測傳明酸是否對黑色素餵食角質 (HaCaT) 細胞抑制黑色素小體 gp100 蛋白及誘導蛋白黑色素分解(Melanin degradation)?

三、文獻回顧

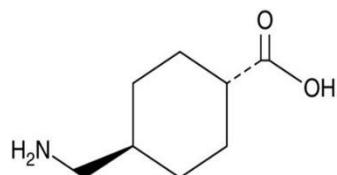
(一) 細胞自噬(Autophagy)

細胞自噬作用是一種細胞內的分解與回收機制，能夠清除受損或不再需要的細胞成分，並將其分解成小分子(如氨基酸與脂肪酸等)，以供細胞再利用。細胞自噬對於維持細胞內環境穩定至關重要，特別是在營養缺乏或面臨壓力時，細胞可

以透過自噬獲取能量以維持生存。主要原理為細胞藉由溶酶體將其自身胞器或物質進行溶解，而細胞藉由自體吞噬將老化異常、功能喪失胞器或物質包覆進自噬體 (Autophagosome)，接著再與溶酶體融合形成自噬溶酶體 (Autolysosome)，由於溶酶體中含有分解酵素，可快速將其分解回再利用，以支持正常的生理功能 [1,2]。LC3B 蛋白與磷脂質 PE 結合，使原本為親水性 LC3-I 轉變為疏水性 LC3-II，最終使 autophagosome 形成。具 Autophagy 機制的細胞中，p62 可結合老舊胞器或物質(含黑色素)與溶酶體融合，由溶酶體中分解酵素快速分解回再利用。自噬溶酶體會有自噬酸性囊泡 (AVO, Acidic vesicular organelles) 的形成，在酸性環境下可被吖啶橙 (Acridine orange , AO) 染劑染為帶有紅色螢光。

(二) 傳明酸 (Tranexamic acid, TXA)

傳明酸原來是一種人工合成的抗纖維蛋白溶解劑，用於醫療傷止血。傳明酸的分子結構與離氨酸 (Lysine) 相似，可與纖維蛋白溶解酶的位點競爭性結合，阻止纖維蛋白溶解酶活化。後來，發現傳明酸對抑制色素沉澱，因此被廣泛用於美白與淡斑。



圖一、傳明酸結構式

(三) 黑色素細胞內的黑色素生成 (Melanogenesis) 機制

皮膚中黑色素細胞 (Melanocyte) 內的酪胺酸酶 (Tyrosinase) 會催化黑色素生成。主要受到紫外線 (UVA/B) 、發炎反應、荷爾蒙反應等刺激因素影響。其中紫外線刺激時，角質細胞會釋放黑色素刺激荷爾蒙 (α -MSH, α -melanocyte-stimulating hormone) [1, 2]。 α -MSH 被活化後，會促使黑色素細胞活化酪胺酸酶，這是一種關鍵的催化酶，可促使黑色素的合成。黑色素細胞產生的黑色素會透過黑色素小體 (Melanosome) 傳遞到角質細胞，導致皮膚變黑。黑色素小體 gp100 是一種黑色素細胞膜的蛋白，gp100 會表現在黑色素小體。先前指導教授實驗室的研究發現，天然物 3-O-ethyl ascorbic acid, CoQ₀, ellagic acid, and pterostilbene 具有美

白皮膚的功效，它們可以在體外黑色素細胞/黑色素餵養角質細胞和體內斑馬魚模型中誘導自噬作用，從而抗色黑素生成和促進黑色素分解 [3-5]。

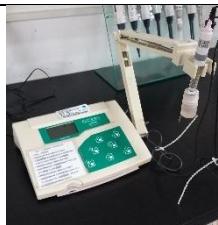
(三) 斑馬魚

斑馬魚 (*Danio rerio*) 因具體型小、繁殖週期短、胚胎透明、發育快速等特性，廣泛用作脊椎動物模式生物。研究指出，斑馬魚與人類具有約 70%的蛋白質編碼基因同源性，其中約 82%與人類疾病相關的基因亦可在其基因組中發現 [6]，顯示其在醫學研究中的高度應用潛力。其胚胎發育歷程具階段性與可視性，自受精後快速進入分裂期，並依序經歷囊胚期、原腸期、分節期、咽唇期至孵化期，至 48–72 小時即具明確體節與器官分化 [7]。斑馬魚的皮膚組織一語哺乳動物相似，由表皮、真皮與皮下組織構成，雖缺乏角質層與皮膚附屬構造 [8]，卻擁有功能完整的色素細胞系統，包括黑色素細胞 (Melanophores)、虹色素細胞 (Iridophores) 與黃色素細胞 (Xanthophores)，共同形成其特有的條紋 [9-11]。黑色素細胞來源於神經脊細胞，於受精後約 24 小時開始生成，並受 SOX10 誘導 MITF 表現，進一步啟動酪胺酸酶、TRP-1 及多巴色素互變異構酶 (Dopachrome tautomerase) 等黑色素合成路徑 [9][12]。斑馬魚兼具基因同源性與實驗觀察便利性，為探討皮膚發育與色素生成之理想模型。

貳、研究設備及器材

一、實驗器材及設備

表一、實驗器材及設備（由實驗者自行繪製）

培養皿 (6-cm/10-cm)	Auto pipette	96 孔盤	振盪器
			
微量吸管	磁石攪拌器	分光光度計	超音波震盪器
			
冷光拍片機	乾熱器	pH 計	水浴槽
			

二、細胞來源及細胞培養所需藥品試劑

本研究選用的實驗細胞為角質 (HaCaT) 細胞，由中國醫藥大學楊新玲教授提供。使用 DMEM/H 培養基，培養於 37°C/5% CO₂ 培養箱內。

(一) 細胞培養液 (DMEM/H)

本實驗所使用的人類永生化角質細胞 HaCaT 使用 Dulbecco's Modified Eagle Medium/High Glucose (DMEM/H) 培養液。將下表配方加入 d.d. water，待溶解後以 pH meter 將 pH 值調整至 7.2~7.4，再加入三合一抗生素，以 0.22 μm 孔徑血清瓶專用無菌過濾杯過濾至血清瓶，最後加入 10% FBS 混合均勻，提供細胞生長時所需要的養分，儲存於 4°C。

表二、細胞培養液配方（由實驗者自行繪製）

藥品名稱	含量
Dulbecco's Modified Eagle Medium/High Glucose (DMEM/H)	13.2 g
NaHCO ₃ (碳酸氫鈉)	3.7 g
HEPES	6 g
Sodium pyruvate (丙酮酸鈉)	0.11 g
2 in 1 (penicillin/streptomycin)	10 mL
d.d.H ₂ O	定量至 1 L

(二) 1 X 磷酸緩衝溶液 (PBS, pH7.2~7.4)

表三、磷酸緩衝溶液配方（由實驗者自行繪製）

藥品名稱	g/L
NaCl	8
KCl	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
NaHPO ₄	1.15
d.d.water	定量至 1L

本實驗以 PBS 配置傳明酸及清洗培養皿

(二) 胰蛋白酶 (0.5 % Trypsin Solution, BI)

Trypsin 可使細胞間及細胞與培養皿間的蛋白質水解，使細胞離散。不同細胞與溫度，Trypsin 所需的作用時間不同，在 37°C 時，Trypsin 作用強度最強，需控制 Trypsin 使用時間與濃度，避免細胞過度水解而受到破壞。10x Trypsin 分裝儲存

於 -20°C，HaCaT 細胞使用前需 10 倍稀釋，剩餘的儲存於-80°C。

三、MTT Assay 所需試劑

(一) 10 x MTT stock solution

在避光環境下將 1g MTT 粉末溶於 200 mL 1x PBS 中，使用 0.22 μm 過濾後分裝至 15mL 離心管，儲存於-20°C。使用前 10 倍稀釋。

(三) DMSO

在避光環境下，於室溫儲存

四、蛋白質定量所需試劑

(一) 0.1 mg/mL BSA:取 0.02 g 粉末溶於 20 mL 二次水中，分裝到 eppendorf 每管 100 μL，儲存於-20°C 備用，使用前加入 900 μL 次水稀釋。

(二) Protein Assay Dye: 儲存於 4°C 冰箱中備用。

(三) 6 x protein loading dye: 首先取 Tris-HCl 溶於 5 mL 二次水中，調整 pH 值至 6.8，再分別加入表所示之樣品，最後以二次水定量至 25 mL，分裝至 eppendorf 每管 1 mL，儲存於-20°C。

五、西方墨點法所需的試劑

(一) 1.5 M Tris (pH=8.8)

取 91 g Tris base 粉末溶於 400 mL 二次水中，調整 pH 至 8.8，用二次水定量至 500 mL 以 0.45 μm filter 過濾，儲存於 4°C 備用。

(二) 1.5M Tris (pH=6.8)

取 12.1 g Tris base 粉末溶於 80 mL 二次水中，調整 PH 至 6.8，用二次水定量到 100mL，以 0.45 μm filter 過濾，儲存於 4°C 備用。

(三) 30% Acrylamide / Bis solution (29:1)

購買後直接使用，儲存於 4°C。

(四) 10% SDS

儲存於室溫。

(五) APS (ammonium persulphate)

取 0.1 g (NH₄)S₂O₈ 粉末溶於 1 mL 二次水，儲存於 4°C。

(六) TEMED

儲存於 4°C。

(七) 1× Transfer buffer

儲存於室溫備用。

(八) PBST wash buffer

取 500 μL Tween-20，加入至 500 mL 1× PBS，混合均勻。

(九) 0.1% Ponceau S solution

快速染色 PVDF 膜上的蛋白條帶。以 950 mL 二次水稀釋 50 mL 100% 醋酸後，加入 1 g Ponceau S 粉末混合均勻，儲存於室溫備用。

(十) 5% Milk blocking buffer

取 2.5 g 脫脂奶粉溶於 50 mL 1× PBST(現配)。

(十一) Chemiluminescent Detection Reagent 顯影劑

將 WesternBrightTM ECL 和 Peroxide 等比例混合，依 PVDF 膜大小及數量調整添加量。

六、黑色素含量測定所需的試劑

(一) 1N NaOH: 取 4g NaOH 粉末溶於 100 mL 二次水中，儲存於室溫下備用。

(二) Melanin: 使用時取 Melanin 原液(10 mM)，用培養液 500 倍稀釋成濃度 20 μ M。

七、AO Assay 所需的試劑

(一) AO 染劑: 將 1 mg 的 AO 粉末溶於 1 mL 的 PBS，使用時用培養液千倍稀釋。

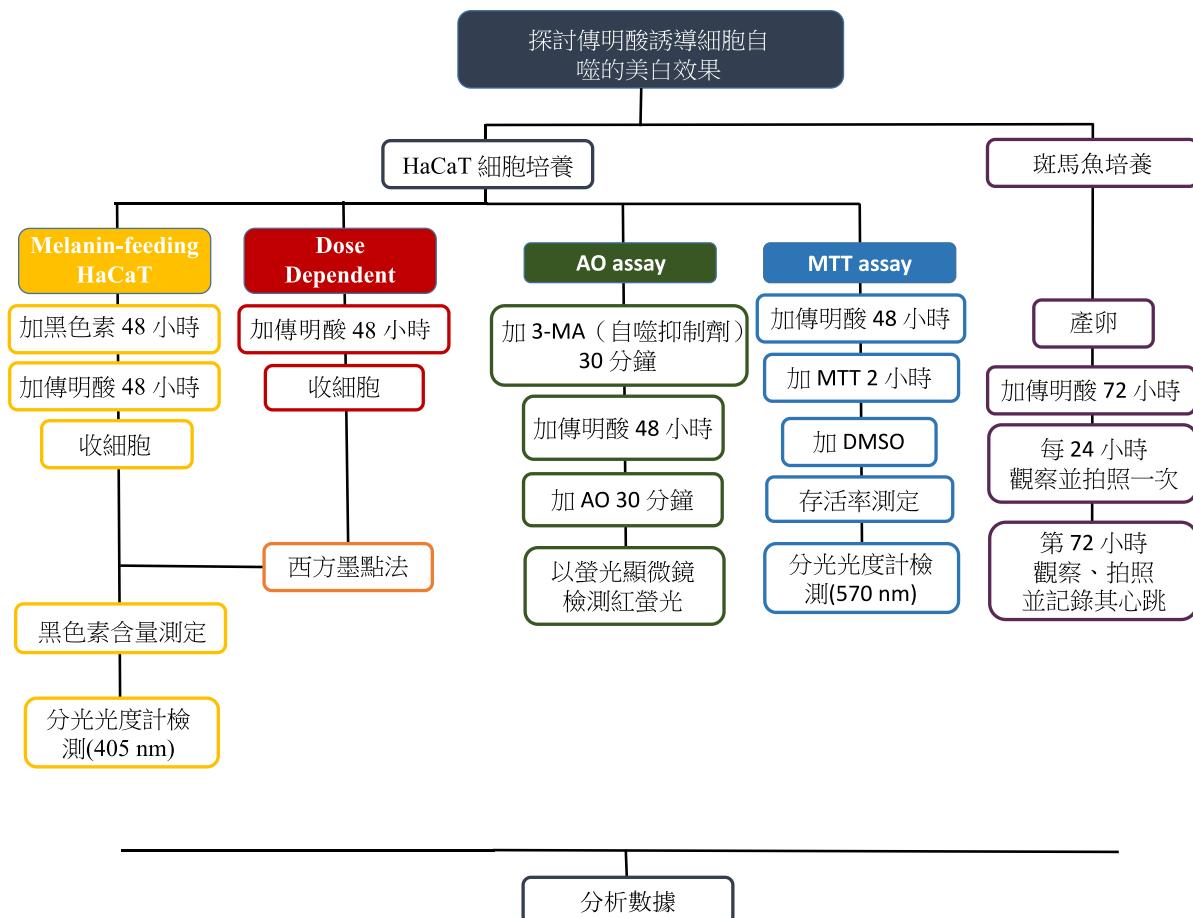
(二) 3-MA: 取 100 μ L 的 3-MA 原液(儲存濃度 100 mM)，用培養液千倍稀釋。

八、斑馬魚黑色素含量所需的試劑

(一) PTU: 儲存於 4°C。使用前將 8.8 mM 之 PTU 500 倍稀釋至 17.7 μ M。

參、研究過程及方法

一、實驗架構



圖二、實驗架構圖（由實驗者自行繪製）

二、實驗方法

(一) 細胞繼代培養 (Subculture of Cells)

將 HaCaT 細胞培養在 37°C/5% CO₂ 的培養箱，並將細胞株種在 10-cm dish。

1. 將新的細胞培養液放入 37°C 水浴鍋中回溫。
2. 以顯微鏡觀察細胞情況(確認是否污染和健康)。
3. 將細胞培養盤內原先的培養液吸除。
4. 加入 10 mL 磷酸鹽緩衝液(PBS)，將殘餘的培養液去除乾淨，重複兩次。
5. 加入 1 mL 1 x Trypsin 在細胞培養箱中，反應 3 分鐘，結束後取出，以顯微鏡觀察，並輕敲 dish 使細胞分離。
6. 細胞分離後，加入 9 mL 細胞培養液，均勻混合以終止 Trypsin 反應，將混合液收集至 15 mL 離心管，離心 1000 rpm x 5 分鐘。
7. 離心結束後，去除上清液，加入 10 mL 細胞培養液將細胞完全打散。
8. 取 100 μL 細胞懸浮液及等量 0.4% Trypan blue 混合，並取適量注入血球計數器，在顯微鏡中計算細胞數量。
9. 後依照實驗需求，將細胞種於各式培養皿中，並將其餘細胞種回原培養皿中進行繼代培養。

(二) dose dependent HaCaT cells

1. 將細胞分成 4×10^5 一盤共 4 盤(控制組 x 1 及實驗組 x 3)。
2. 待 24 小時候後，細胞貼壁，將實驗組(3 盤)加 TXA，控制組(1 盤)不加 TXA。
3. 反應 48 小時，讓細胞充分把 TXA 吸收。

(三) Melanin-feeding HaCaT cells

表四、此實驗之黑色素及傳明酸濃度 (由實驗者自行繪製)

Melanin (μg/mL)	0	20	20	20	20
TXA (μM)	0	0	300	400	500

1. 將細胞分成 2×10^5 一盤共 5 盤(控制組 x 1 及實驗組 x 4)。
2. 待 24 小時候後，細胞貼壁，將實驗組(4 盤)加 Melanin，控制組(1 盤)不加 Melanin。
3. 反應 48 小時，讓細胞充分把 Melanin 吸收。
4. 把舊的培養液抽掉，將 TXA 稀釋加進培養皿。
5. 反應 48 小時，讓細胞充分把 TXA 吸收。

(四) 細胞存活率測定 (MTT Assay)

原理：MTT 是一種水溶性的四唑鹽，溶於 PBS 時呈現淡黃色，MTT 會被活細胞中粒線體內膜中的琥珀酸脫氫酶(SDH)還原，而 MTT 中的環狀結構(Tetrazolium ring)則會被切斷形成脂溶性的紫色Formazan結晶，加入DMSO溶解此結晶，再利用分光光度計以波長 570 nm 檢測其吸光值，越高代表細胞存活率越高。

步驟：

1. 將 HaCaT 細胞以每格 5×10^4 種於 12 孔盤中。
2. 以濃度 0-500 μM TXA 之細胞培養液反應 24 小時。
3. 反應結束後，加入 1 x MTT 作用 1 小時。
4. 去除培養液，使用 DMSO 溶解紫色結晶。
5. 再利用分光光度計進行定量。

(五) 細胞總蛋白質萃取 (Total protein extraction)

原理：細胞總蛋白質萃取是以刮勺收取細胞，並利用高滲透力的細胞 Lysis 溶液使得細胞膜脹破，使細胞內的蛋白質溶解出來。細胞 Lysis 溶液加入 PMSF 與 DTT，可提供合適的 pH 值，並使蛋白質產生變性及避免蛋白酶失去活性，利用超音波震盪將細胞膜徹底破壞。最後再用超高速離心機離心，收取細胞上清液，即為細胞的總蛋白質溶液。

步驟：

1. 將 HaCaT 細胞種於 10-cm 培養皿，每盤含各實驗所需之細胞數。
2. 實驗結束後，將培養皿內的細胞培養液移除，以冰的 PBS 清洗培養皿兩次，並以 pipette 將培養皿內殘存的 PBS，完全去除乾淨，將培養皿至於冰上。
3. 先將刮勺清洗乾淨後，放置於 PBS 中，使用前取出，並以乾淨的擦手紙擦乾殘餘水分。
4. 加入 350 μL Lysis buffer，利用細胞刮勺將細胞收集至 1.5 mL 微量離心管中。
5. 將微量離心管至於-80°C 冰箱中，利用快速冷凍破壞細胞膜，使細胞蛋白溶出。
6. 以超音波震盪器打破細胞，5 分鐘/次，重複 3~5 次，再以 4°C、12000 rpm 離心 30 分鐘，離心後上清液即為細胞總蛋白質溶液。
7. 將上清液取至另外的微量離心管，利用西方墨點法檢測相關的蛋白質。
8. Pellet 留下做黑色素含量測定。

(六) 製作標準曲線

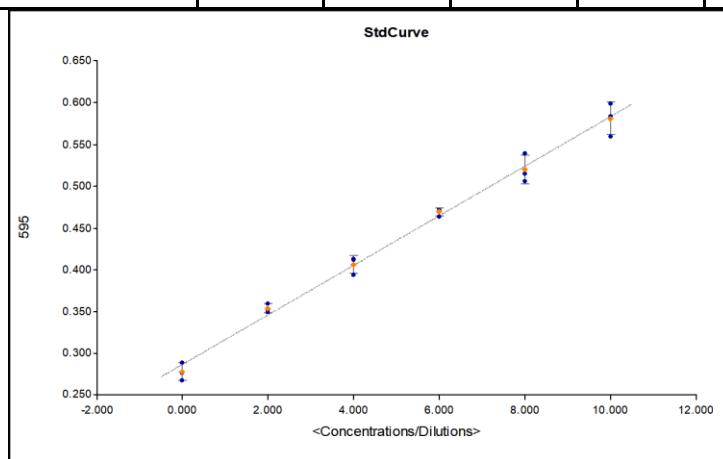
原理：利用 Bovine Serum Albumin (BSA) 為標準品，以作為標準曲線，即可推算出樣品蛋白質濃度。

步驟：

1. 取微量離心管依照表依順序加入二次水及 BSA，配置不同濃度之 BSA 標準品，並重複三次。
2. 將標準曲線蛋白分別加入 200 μL Protein Assay Dye，並混合均勻。
3. 取 200 μL 混合液至 96 孔盤，確認無氣泡以防止氣泡產生影響數據。
4. 1 小時內用分光光度計於波長 595 nm 下測吸光值。
5. 最後利用標準品所求出的標準曲線，計算出樣品蛋白質之濃度。此方程式的直線迴歸分析結果 $R^2 > 0.995$ 時可信。若吸光值大於標準曲線方程式，則需要稀釋蛋白。

表五、製作標準曲線之個試劑濃度（由實驗者自行繪製）

BSA 濃度 (g\mL)	0	2	4	6	8	10
0.1mg\mL	0	20	40	60	80	100
d.d. H ₂ O	800	780	760	740	720	700
Protein Assay Dye (μL)	200	200	200	200	200	200
Total volume (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000



圖三、標準曲線（由實驗者自行繪製）

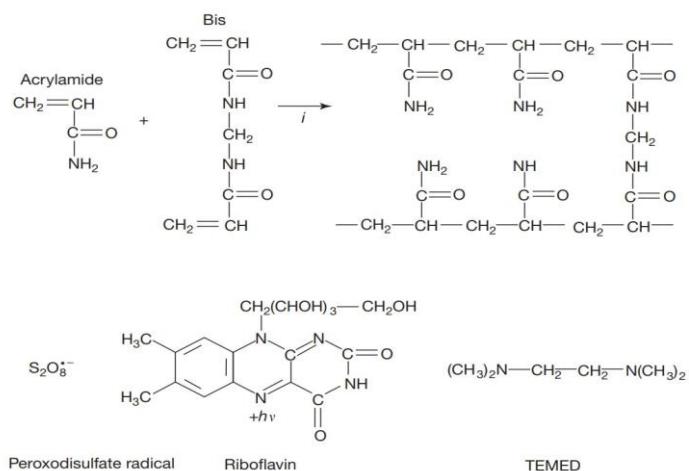
(七) 西方墨點法

原理：西方墨點法是利用外加的電場影響帶電分子，將不同分子量蛋白展開並轉

印至 PVDF 膜上，再利用抗原/抗體專一性結合，抓取 PVDF 膜上的特定蛋白質，進行蛋白質定性與定量。在 TEMED 與 APS 的催化下 Acrylamide 產生聚合反應，溶液凝集呈膠狀，而 SDS 會使蛋白質表面均勻分佈負電荷。接上電源後，帶負電之蛋白分子往正極移動，分子量大者泳動率小，反之，分子量小者泳動率大。將不同分子量蛋白分離後，轉漬於甲醇活化之 PVDF 膜上，並加入特定蛋白質結合的一級抗體 (Primary antibody)，再加入二級抗體 (Secondary antibody) 與一級抗體做專一性結合，最後經過顯影劑冷光顯色，來檢測電泳分離的蛋白表現。

1. 跑電泳

原理：膠片本身是經由 Bis/ Acrylamide 經由 APS 與 TEMED 催化反應而成，可利用不同成分與不同 Acrylamide 比例來製出不同特性的膠片，來分離不同特性的目標蛋白（反應示意圖如下）。若膠片的濃度越大，蛋白質遷移速率越慢，因此濃度越大膠體，可以更有效地分離分子量小的蛋白質，進而更清晰的呈現蛋白質帶條，所以我們選擇下膠濃度 8% or 13.5% 及上膠 5%。



圖四、電泳凝膠電泳 (聚丙烯醯胺凝膠) [13]

步驟：

- (1) 取厚/薄玻璃片以酒精和試鏡紙擦拭乾淨，並將玻璃片放置架膠台上，接著加入二次水查看是否有漏水現象。
- (2) 將配置好的下膠注入兩玻璃片之間至%處，再注入 95% 酒精將氣泡壓出並使膠面平整。
- (3) 待下膠凝固後，將酒精移除，並加入上膠並立刻放入尺梳，將氣泡擠出。
- (4) 待上膠凝固後，將配置好的膠體放置在電泳槽上，加入 1 × Running buffer 至膠與電泳槽之間的內槽及外槽。

- (5) 拔出齒梳後將配好的蛋白質樣品、protein marker、6 x Dye 注入膠體的溝槽內，並進行電泳分析
- (6) 電泳第一階段使用 60 伏特跑 30 分鐘，第二階段 90 伏特跑 30 分鐘，第三階段 110-120 伏特跑 70 分鐘，待 Protein marker 完全展開，觀察分子量後，即可進行下一步驟。

2. 蛋白質轉漬

步驟：

- (1) 在轉漬槽內倒入 Transfer buffer 以待過程中 PVDF 膜不會過度乾燥。
- (2) 準備 2 個水盤，一個倒入回收的 Transfer buffer，另一個倒入回收的 Running buffer (來源於跑完的電泳槽) 。
- (3) 將膠體從電泳槽取下，將上膠的部分切掉丟棄，將下膠與玻璃片分離後，將下膠放到 3M 濾紙上 (切的過程放在回收的 Running buffer) 。
- (4) 由於 PVDF 膜具高度疏水性，因此先將 PVDF 膜轉漬膜浸泡在甲醇內以活化 PVDF 膜，再以 Transfer Buffer 將甲醇洗掉備用。
- (5) 依序在塑膠夾放上海綿→圖畫紙→膠→PVDF 膜→圖畫紙→海綿，將塑膠夾夾緊，過程中不可有氣泡出現，放至轉漬槽內，並使用伏特、720 分鐘 (慢圈) 或者 400 毫安培、120 分鐘 (快圈) 擇一。

3. 加一級/二級抗體

原理：一級抗體抓住目標蛋白：二級抗體標定一級抗體。經顯影劑作用後冷光顯色。

步驟：

- (1) 將轉漬好的 PVDF 膜，切小塊放入盒子，倒入 PBST wash，放置迴轉式震盪器。
- (2) 5 分鐘重覆 3 次，第 3 次洗完加入 10% 脫脂牛奶，放置迴轉式震盪器 55 rpm x 30 分鐘，PBS wash×3，然後加入一級抗體，放入 4 °C 冰箱中震盪 55 rpm (overnight) 。
- (3) 將 PVDF 膜用 PBST 清洗，加入二抗(抗體：5% 脫脂牛奶=1：5000)，55 rpm 震盪 40 分鐘，最後再以 PBST wash×3。
- (4) 冷光拍片。

(八) AO assay

原理：AO 染劑會與細胞自 (Autolysosome) 所產生的自噬酸性囊泡 (AVOs, Acidic

vesicular organelles) 結合成，呈現紅色螢光，可利用螢光顯微鏡觀察或流式細胞儀定量。

步驟：

1. 將 HaCaT 細胞種在 12 孔盤 (5×10^4 /well)
2. 待 24 小時後細胞貼壁
3. 加入 1mM 的 3-MA 反應 1 小時 (1 格 1c.c.)
4. 反應完後用 PBS wash 兩次，再加 TXA 反應 24 小時 (1 格 1c.c.)
5. 反應完成後用 PBS wash 兩次
6. 加入 AO 染劑後放置於培養箱 (5% CO₂、37°C) 反應 30 分鐘
7. 反應完成後用 PBS wash 兩次，再加 500 μl 的 1 x PBS
8. 用螢光顯微鏡拍照後用 Image J 定量製成圖表

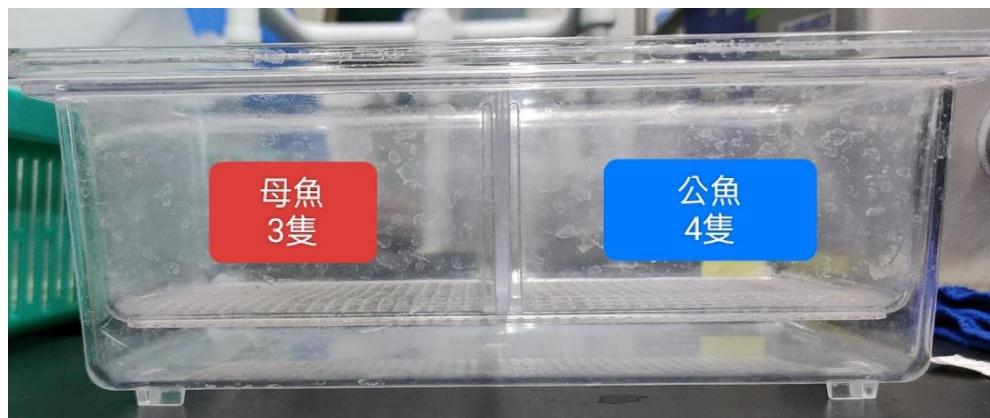
(九) 傳明酸對斑馬魚之美白效果：

1. 斑馬魚飼養

斑馬魚培養環境是 26~28.5 °C 、 pH 值 6.0~8.0 之一次水、光週期 (14 小時光照 / 10 小時黑暗交替循環)，將公魚母魚分開飼養，並一天餵食兩次，早上餵食乾燥的豐年蝦，下午則餵食以孵化的豐年蝦。

2. 斑馬魚之繼代培養

- (1) 在魚缸中加入一次水至八分滿，並在魚缸中設立一塊透明塑膠隔板。
- (2) 將公魚與母魚分別放入隔板之兩側，其中母魚 3 隻而公魚 4 隻。



圖五、斑馬魚產卵魚缸之示意圖（由實驗者自行拍攝）

- (3) 配合光週期將魚缸放置至暗室。
- (4) 10 小時後取出，並移至光照處，將隔板移除，此時公魚會衝撞母魚，並幫助母魚腹中之魚卵排出。若無法順利排出魚卵。則可將魚缸內隻水料減少，或是將魚缸傾斜放置。
- (5) 30~60 分鐘後，以細網將魚缸中隻用卵撈出，其中每隻母斑馬魚約可產下

100~200 顆魚卵，並以溫和水柱將糞便及狀況不佳隻魚卵（彈性不佳或呈現白色）移除。

- (6) 將魚卵轉至加入一次水之 10 cm dish 中，每盤約 60~80 顆魚卵，並去除狀態良好之魚卵外所有物質，以防止發霉。
- (7) 產卵後，將卵放置於 28.5 °C 培養箱中，並每天更換其培養液。低一週不需喂食，第二週後可少量餵食。

3. 傳明酸對斑馬魚隻實驗

- (1) 將斑馬魚培養於 12 孔盤中 (10 隻/well)，並以濃度 0、300、400、500 (μM) 之傳明酸溶液和濃度 17.6 (μM) 之 PTU 溶液作為其培養液 (1ml/well)，其中每個濃度重複實驗 3 次。
- (2) 24 小時後，更換斑馬魚的培養液為新的培養液。
- (3) 觀察每個濃度之斑馬魚狀況，並拍攝斑馬魚做為紀錄。
- (4) 每 24 小時重複 步驟 (2)-(3) 一次。
- (5) 第一次加藥後 72 小時（斑馬魚孵化），一樣重複步驟 2-3，並記錄其心跳。

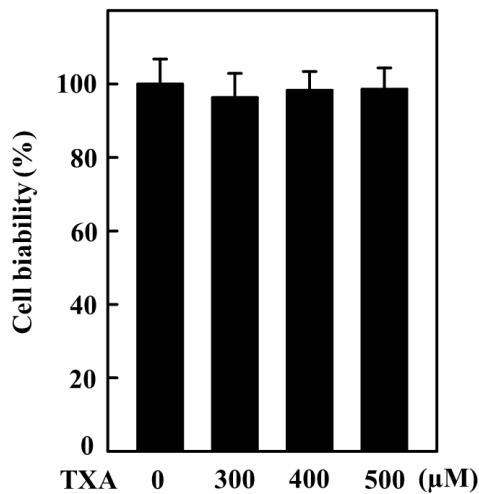
(十) 數據分析:

利用 Image Lab、Image J、Sigma Plot 進行數據定量。

肆、研究結果

一、傳明酸對角質 (HaCaT) 細胞存活率的影響

實驗以黑色素餵食角質 (HaCaT) 細胞 (5×10^4 /12 孔盤) 並放置於培養箱 48 小時。給予黑色素餵食角質細胞 (Melanin-feeding HaCaT cells) 不同濃度 (0 、 300 、 400 及 $500 \mu\text{M}$) 之傳明酸 (TXA) ，置於培養箱 24 小時後，測定其存活率。從 MTT 結果顯示，傳明酸至最高濃度幾乎不具細胞毒性，細胞存活率皆大於 95% (圖六) 。

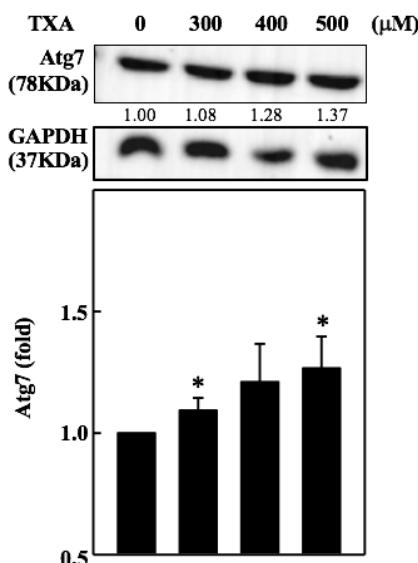


圖六、細胞存活率 (由實驗者自行繪製)

圖六、傳明酸對角質 (HaCaT) 細胞存活率的影響。[Results are the mean \pm SD ($n=3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with untreated cells. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with melanin-treated cells.]

二、傳明酸增加角質細胞自噬相關 ATG7 蛋白

實驗以 0、300、400 及 500 μM 的傳明酸 (TXA) 處理角質細胞 ($4 \times 10^5/10\text{-cm dish}$)，並放置於培養箱 48 小時後，進行總蛋白萃取。利用西方墨點法觀察，自噬蛋白 ATG7 的表現。一般蛋白質檢測 GAPDH 蛋白適宜作為內控蛋白，能體現蛋白數據可信度及準確性。結果顯示，自噬蛋白 ATG7 隨傳明酸劑量上升而表現增加。結論，傳明酸會誘導角質細胞產生自噬作用（圖七）。

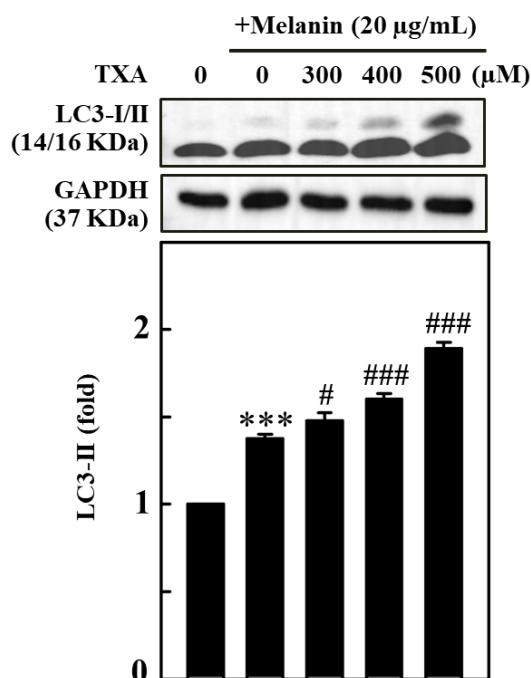


圖七、西方墨點法條帶及定量之結果（由實驗者自行繪製）

圖七、傳明酸增加角質 (HaCaT) 細胞的自噬相關蛋白 ATG7 表現。[Results are the mean \pm SD ($n=3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with untreated cells. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with melanin-treated cells.]

三、傳明酸增加黑色素餵食(Melanin-feeding)角質細胞自噬相關 LC3-II 蛋白

實驗以黑色素餵食角質(HaCaT)細胞(2×10^5 /10-cm dish)並放置於培養箱48小時。以0、300、400及500 μM 的傳明酸(TXA)處理黑色素餵食角質細胞，放置培養箱48小時後，進行總蛋白萃取。利用西方墨點法觀察，自噬蛋白LC3-I/II的表現。一般蛋白質檢測GAPDH蛋白適宜作為內控蛋白，能體現蛋白數據可信度及準確性。結果顯示，自噬蛋白LC3-II隨傳明酸劑量上升而表現增加。結論，傳明酸會誘導角質細胞產生自噬作用(圖八)。

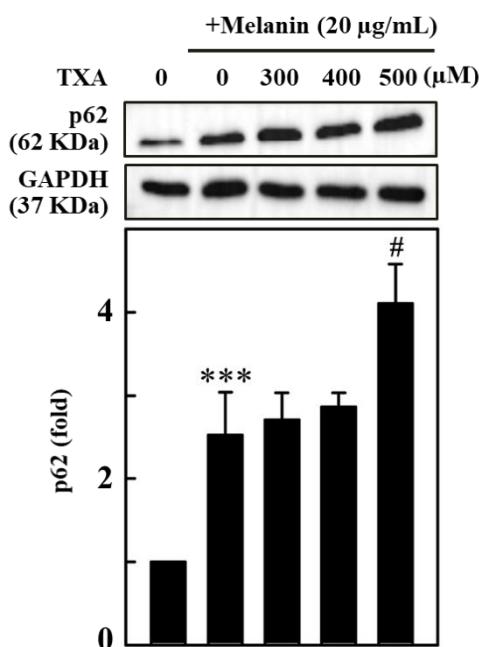


圖八、西方墨點法條帶及定量之結果（由實驗者自行繪製）

圖八、傳明酸增加黑色素餵食(HaCaT)細胞的自噬相關蛋白LC3-II表現。[Results are the mean \pm SD ($n=3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with untreated cells. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with melanin-treated cells.]

四、傳明酸增加黑色素餵食角質細胞自噬相關 p62 蛋白

實驗以黑色素餵食角質 (HaCaT) 細胞 (2×10^5 /10-cm dish) 並放置於培養箱 48 小時。以 0 、 300 、 400 及 500 μM 的傳明酸 (TXA) 處理黑色素餵食角質細胞，放置培養箱 48 小時後，利用西方墨點法觀察，自噬蛋白 p62 的表現。結果顯示，自噬蛋白 p62 隨傳明酸劑量上升而增加。結論，傳明酸會誘導角質細胞自噬蛋白 p62 增加（圖九）。

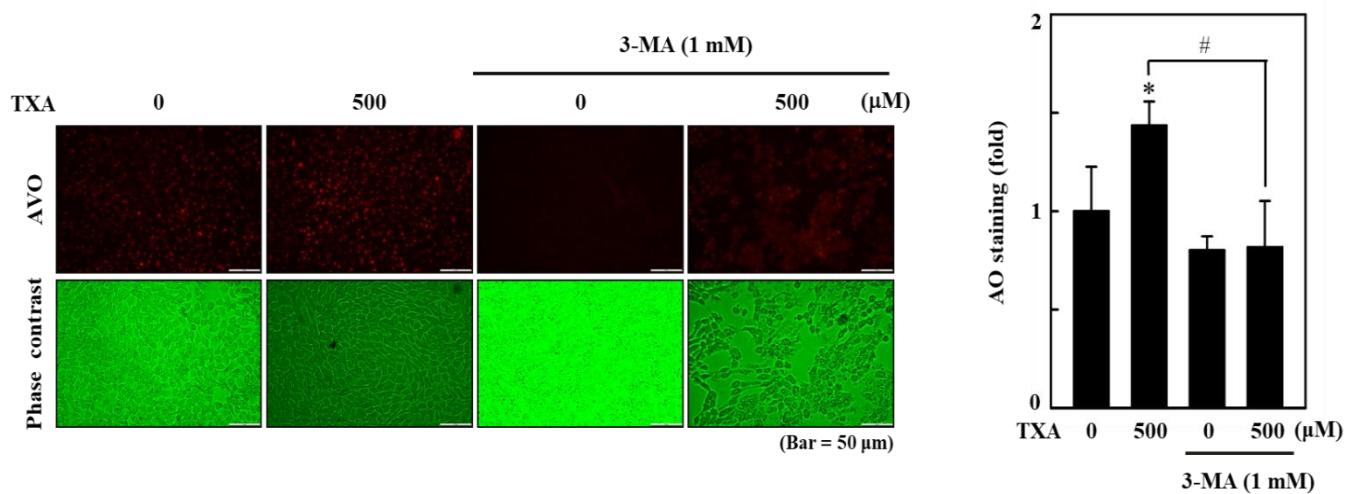


圖九、西方墨點法條帶及定量之結果（由實驗者自行繪製）

圖九、傳明酸增加黑色素餵食 (HaCaT) 細胞的自噬相關蛋白 p62 表現。[Results are the mean \pm SD (n=3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with untreated cells. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with melanin-treated cells.]

五、傳明酸誘導角質細胞酸性自噬囊泡 (AVOs, Acidic vesicular organelles) 形成

實驗以黑色素餵食角質 (HaCaT) 細胞 (5×10^4 /12 孔盤) 並放置於培養箱 48 小時。以 0、300、400 及 500 μM 的傳明酸 (TXA) 處理黑色素餵食角質細胞，放置培養箱 48 小時後，進行吖啶橙染色 (AO/Acridine orange staining)，以螢光顯微鏡觀察細胞酸性自噬囊泡 (紅色螢光) 的表現。結果顯示，細胞酸性自噬囊泡隨傳明酸劑量上升而增加 (圖十)。加入自噬抑制劑 3-MA (3-methyladenine)，傳明酸誘導增加酸性自噬囊泡會下降 (圖十)。

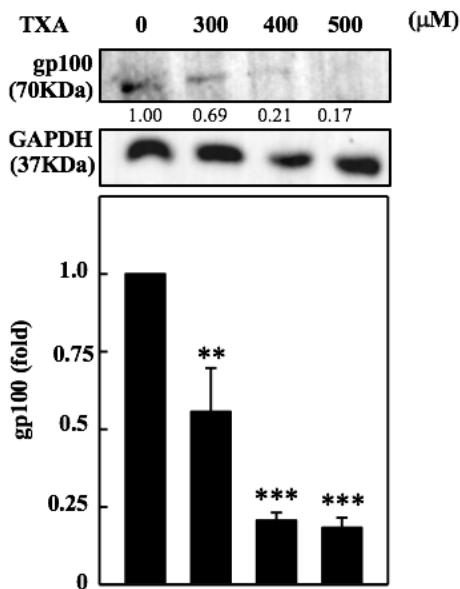


圖十、各濃度螢光表現量及定量之結果 (由實驗者自行繪製)

圖十、傳明酸增加黑色素餵食 (HaCaT) 細胞的酸性自噬囊泡形成。[Results are the mean \pm SD ($n=3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with untreated cells. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with melanin-treated cells.]

六、傳明酸抑制角質細胞之黑色素小體 gp100 蛋白

實驗以 0、300、400 及 500 μM 的傳明酸 (TXA) 處理角質細胞 ($4 \times 10^5/10\text{-cm dish}$)，並放置於培養箱 48 小時，最後進行總蛋白萃取。利用西方墨點法觀察黑色素小體 gp100 蛋白的表現。結果顯示，黑色素小體 gp100 蛋白隨傳明酸劑量上升而減少（圖十一）。結論，傳明酸會誘導角質細胞黑色素小體 gp100 蛋白減少。

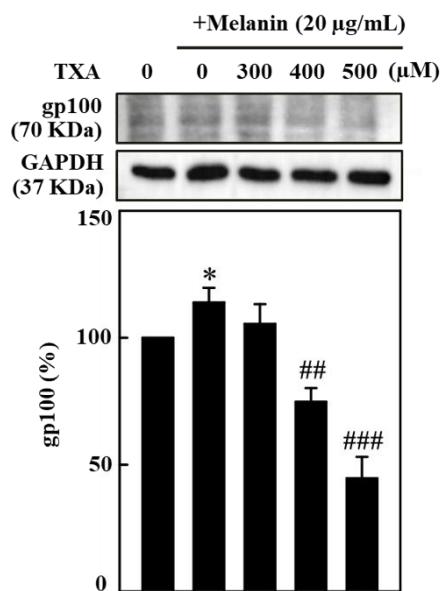


圖十一、西方墨點法條帶及定量之結果（由實驗者自行繪製）

圖十一、傳明酸抑制角質細胞之黑色素小體 gp100 蛋白。[Results are the mean \pm SD ($n=3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with untreated cells. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with melanin-treated cells.]

七、傳明酸抑制黑色素餵食角質細胞之黑色素小體 gp100 蛋白

實驗以黑色素餵食 (HaCaT) 細胞 (2×10^5 /10-cm dish) 並放置於培養箱 48 小時。以 0、300、400 及 500 μM 的傳明酸 (TXA) 處理黑色素餵食角質細胞，並放置於培養箱 48 小時，最後進行總蛋白萃取。利用西方墨點法觀察黑色素小體 gp100 蛋白的表現。結果顯示，黑色素小體 gp100 蛋白隨傳明酸劑量上升而減少（圖十二）。結論，傳明酸會誘導角質細胞黑色素小體 gp100 蛋白減少。

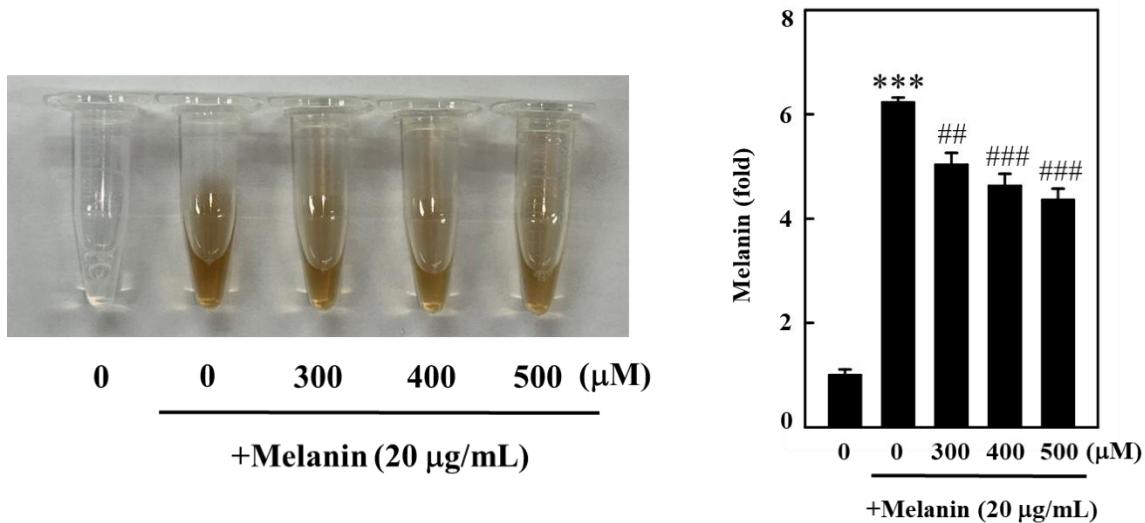


圖十二、西方墨點法條帶及定量之結果（由實驗者自行繪製）

圖十二、傳明酸抑制黑色素餵食角質細胞之黑色素小體 gp100 蛋白。[Results are the mean \pm SD ($n=3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with untreated cells. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with melanin-treated cells.]

八、傳明酸促進黑色素餵食角質細胞之黑色素分解 (Melanin degradation)

實驗以黑色素餵食角質 (HaCaT) 細胞 (2×10^5 /10-cm dish) 並放置於培養箱 48 小時。以 0、300、400 及 500 μM 的傳明酸 (TXA) 處理黑色素餵食角質細胞，並放置於培養箱 24 小時，最後進行黑色素測定。結果顯示，黑色素含量隨傳明酸劑量上升而減少（圖十三）。結論，傳明酸會誘導角質細胞黑色素含量減少 (Melanin degradation) 。

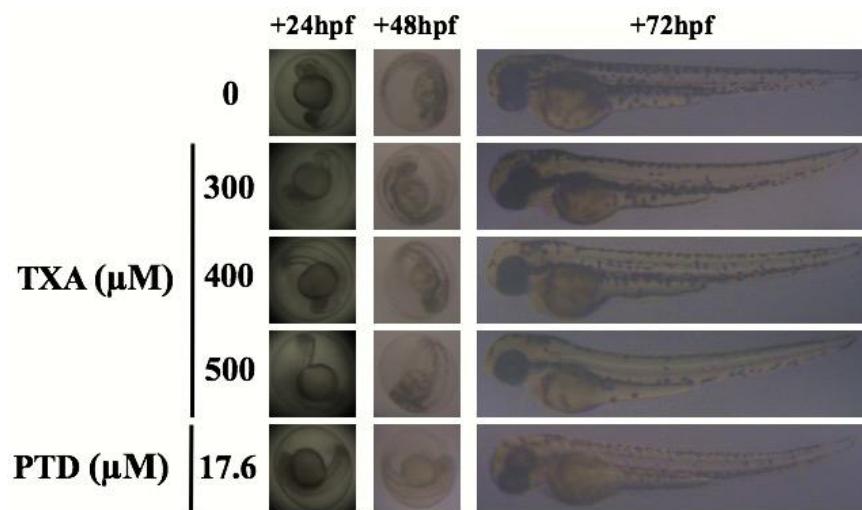


圖十三、細胞中黑色素含量及定量之結果（由實驗者自行繪製）

圖十三、傳明酸促進黑色素餵食角質細胞之黑色素分解。[Results are the mean \pm SD ($n=3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with untreated cells. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with melanin-treated cells.]

九、傳明酸使斑馬魚之黑色素分解 (Melanin degradation)

實驗以 0、300、400、500 μM 的傳明酸 (TXA) 以及 17.6 μM 的 PTU 處理斑馬魚，並於 24、48、72 小時後觀察斑馬魚之黑色素生成狀況和拍照紀錄（圖十四）。結果顯示，斑馬魚隨傳明酸劑量上升而變白（圖十三）。結論，傳明酸會誘導角質細胞黑色素含量減少 (Melanin degradation)。



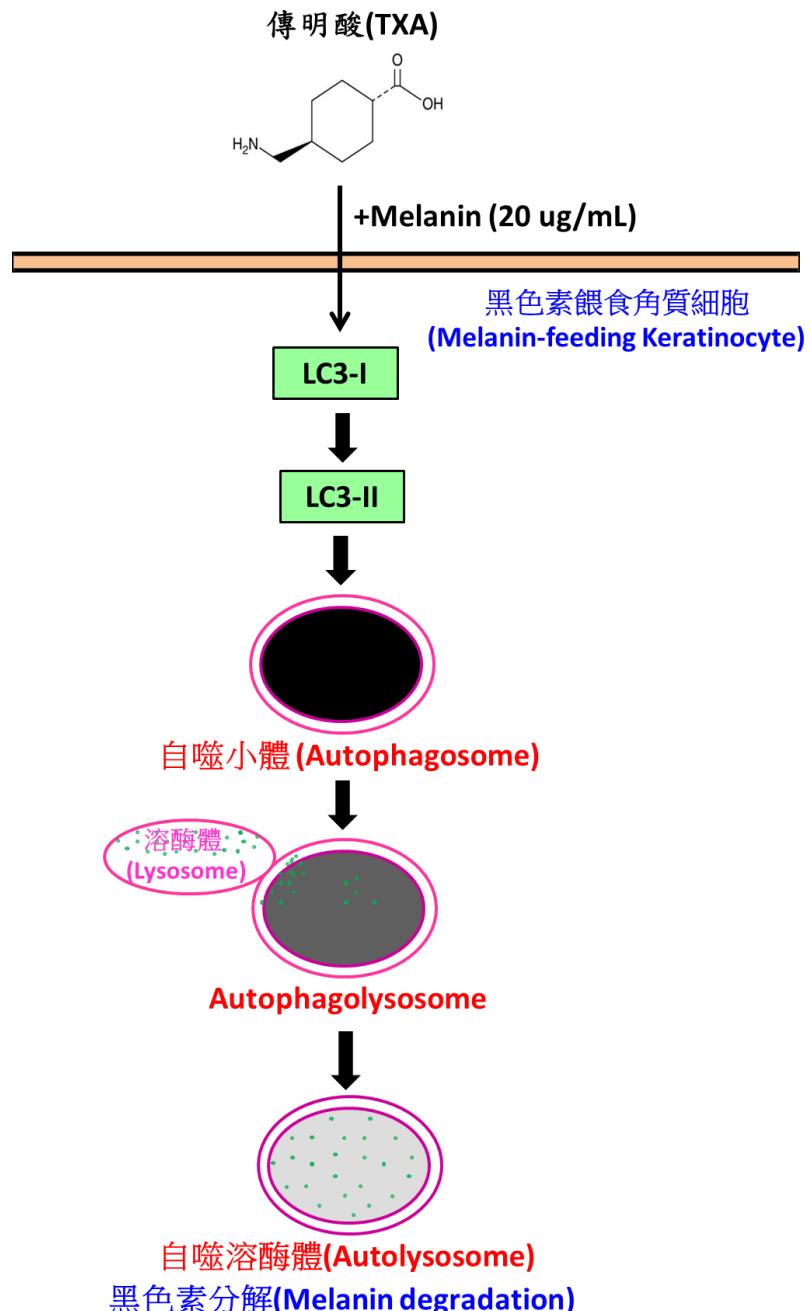
圖十四、斑馬魚中黑色素含量之拍攝照片（由實驗者自行拍攝）

伍、討論

- 一、實驗以黑色素 (20 µg/mL) 飼食角質 (HaCaT) 細胞置於培養箱 48 小時。以 0、300、400 及 500 µM 的傳明酸 (TXA) 處理黑色素餵食角質細胞，放置培養箱 48 小時。
- 二、MTT 結果顯示，傳明酸至最高濃度 (500 µM) 幾乎不具細胞毒性，細胞存活率皆大於 95%。
- 三、利用西方墨點法觀察，結果發現，經過傳明酸處理的黑色素餵食角質細胞，自噬相關蛋白 (LC3-II 及 p62) 有上調的表現。結果證實，傳明酸可以誘導角質細胞產生自噬作用。
- 四、傳明酸作用角質細胞後，以 AO 染色看到紅色螢光，表示自噬酸性囊泡 (AVOs, Acidic vesicular organelles) 的存在。加入自噬抑制劑 3-MA，傳明酸誘導增加酸性自噬囊泡會下降。結果發現，傳明酸可以誘導角質細胞產生自噬 (Autolysosome) 作用。
- 五、利用傳明酸處理的黑色素餵食角質細胞，結果隨著傳明酸增加，黑色素小體 gp100 蛋白及黑色素的含量 (黑色素分解) 明顯減少。
- 六、利用傳明酸處理的斑馬魚，結果隨著傳明酸增加，黑色素的含量 (黑色素分解) 明顯減少。且效果接近 PTU。
- 七、總結，黑色素餵食角質細胞實驗證實，傳明酸可透過細胞自噬進行皮膚黑色素分解及美白作用。

陸、結論

美白在化妝品市場一直受東方女性熱愛，美白產品的市場正快速成長。衛生福利部美白化妝品中共核准 13 種美白成分(含傳明酸)，其美白作用機轉各不相同。我們以黑色素餵食角質細胞實驗的研究證實，傳明酸可透過細胞自噬進行皮膚美白作用（見下機制圖）。



圖十五、作用機制圖（由實驗者自行繪製）

柒、參考文獻資料

1. Chen, S.-J., Hseu, Y.-C., Gowrisankar, Y., Zhang, Y.-Z., Chen, X.-Z., Huang, P.-J., & Yang, H.-L. (2021). The anti-melanogenic effects of 3-O-ethyl ascorbic acid via Nrf2-mediated α-MSH inhibition in UVA-irradiated keratinocytes and autophagy induction in melanocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 173, 151–169. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.030>
2. 自噬自噬-溶酶體系統靶向降解蛋白質技術研究進展. (2023). *Journal of Medical Chemistry and Engineering*, 3(4), 1–10. Retrieved from <https://www.jmche.org/>
3. Hseu, Y.-C., Gowrisankar, Y. V., Wang, L.-W., Zhang, Y.-Z., Chen, X.-Z., Huang, P.-J., Yen, H.-R., & Yang, H.-L. (2021). The in vitro and in vivo depigmenting activity of pterostilbene through induction of autophagy in melanocytes and inhibition of UVA-irradiated α-MSH in keratinocytes via Nrf2-mediated antioxidant pathways. *Redox Biology*, 44, 102007. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102007>
4. 黎亞璇. (2024). 四氫厚朴酚美白功效: 透過自噬作用抑制黑色素生成及誘導黑色素降解 (碩士論文).
5. 李佳穎. (2022). Zerumbone 誘導人黑色素瘤細胞中 ROS 介導的自噬細胞死亡 (碩士論文, 中國醫藥大學).
6. Hosen MJ, Vanakker OM, Willaert A, Huysseune A, Coucke P and De Paepe A, Zebrafish models for ectopic mineralization disorders: practical issues from morpholino design to post-injection observations. *Frontiers in genetics*, 2013. 4: p. 74.
7. Merecz-Sadowska A, Sitarek P, Stelmach J, Zajdel K, Kucharska E and Zajdel R, Plants as modulators of melanogenesis: role of extracts, pure compounds and patented compositions in therapy of pigmentation disorders. *International journal of molecular sciences*, 2022. 23(23).
8. Tan YR, Liaw M and Chen CH, The hidden depths of zebrafish skin. *Elife*, 2023. 12.
9. Liu L, Zhong M, Dong J, Chen M, Shang J and Yue Y, S-Hydroxytryptamine (S-HT) positively regulates pigmentation via inducing melanoblast specification and melanin synthesis in zebrafish embryos. *Biomolecules*, 2020. 10(9).
10. Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S et al., Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment cell research*, 2007. 20(2): p. 120-127.

11. Cooper CD, Insights from zebrafish on human pigment cell disease and treatment. Developmental dynamics: an official publication of the American association of anatomists, 2017. 246(11): p. 889-896.
12. Chen L, Ren X, Liang F, Li S, Zhong H and Lin S, Characterization of two novel small molecules targeting melanocyte development in zebrafish embryogenesis. Pigment cell & melanoma research, 2012. 25(4): p. 446-53.
13. Gupta, M. N. (2019). Electrophoresis | Gel electrophoresis: Polyacrylamide gels. In P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Eds.), Encyclopedia of Analytical Science (3rd ed., pp. 447–456). Academic Press.

【評語】052013

本作品探討傳明酸（Tranexamic Acid, TXA）作為美白劑，除了已知可以抑制黑色素生成外，是否也能透過促進角質細胞自噬來加速黑色素的分解。研究團隊使用黑色素餵食的人類角質細胞（HaCaT）模擬曬黑，再以不同濃度的傳明酸處理，評估細胞存活率、自噬相關蛋白表現（ATG7、LC3-II、p62）、自噬囊泡（AO染色）及黑色素蛋白與含量變化，並以斑馬魚作體內模式評估黑色素含量變化。結果證實 TXA 在有效濃度無明顯毒性，可促進自噬蛋白及酸性囊泡生成，增加黑色素分解，聚焦於美白機轉，具有應用價值。

有關本研究的建議如下：

1. 本研究同時以細胞株 HaCaT 與斑馬魚進行分析，兼顧了 *in vitro* 與 *in vivo* 的研究，研究完整。然而雖然斑馬魚作為活體模型提供了初步驗證，但其生理結構、皮膚屏障功能以及黑色素代謝途徑與複雜的人類皮膚仍存在差異。因此，研究結果不能完全等同於在人體上的實際效果，未來仍需進一步的人體臨床試驗來驗證。

2. 雖然發現了自噬這一新機制，但傳明酸如何精確地誘導角質細胞自噬，以及自噬途徑中涉及的具體信號傳導路徑等更深層次的分子機制，未有詳細討論。
3. 雖指出自噬相關蛋白上升，但未進一步分析 upstream pathway (如 AMPK/mTOR、Nrf2) 參與與否？實驗中宜加入 lysosomal inhibitor (如 BafA1) 來判斷 autophagic flux 完整與否。
4. 黑色素餵食角質細胞僅模擬曬黑狀態，和臨床自然曬黑或黑斑成因不完全等同，生理相關性有侷限。

作品海報

傳明酸美白新機制的發現：

透過誘導角質細胞自噬作用

壹

摘要

傳明酸(Tranexamic Acid, TXA)為衛生署公告之美白成分，具高穩定性與溫和性，廣泛應用於淡斑美白產品，已知其機制為抑制黑色素生合成 (Melanogenesis)。本研究以班馬魚模式及黑色素餵食角質細胞 (HaCaT) 模擬曬黑皮膚狀況，探討傳明酸是否能誘導自噬作用 (Autophagy) 分解黑色素 (Melanin degradation)。班馬魚體內模式證實，傳明酸可分解班馬魚黑色素；且發現傳明酸(至500 μM)對班馬魚存活率/心跳及角質細胞無毒性。西方墨點分析顯示，角質細胞自噬蛋白 (LC3-II/p62/ATG5與ATG7) 表現上升，且吖啶橙 (Acridine orange, AO) 染色呈紅色螢光，顯示酸性囊泡 (AVOs) 存在。進一步觀察發現，黑色素餵食角質細胞gp100蛋白及黑色素含量隨傳明酸濃度升高而下降。結果證實，傳明酸可誘導自噬作用進而分解黑色素，達成美白效果。

貳

研究動機

現代人越來越重視美白，我們查詢衛生福利部核准的美白成分後，對傳明酸 (Tranexamic Acid, TXA) 產生興趣。文獻指出，低劑量口服傳明酸能有效治療肝斑，副作用低且具安全性。傳明酸藉由抑制黑色素合成 (Melanogenesis) 達到美白效果，但我們好奇是否也能分解已存在黑色素(Melanin degradation)。高二選修生物課提到細胞自噬 (Autophagy) 是降解老廢胞器的平衡機制，而許多美白劑可活化自噬以抑制黑色素合成或分解黑色素。本研究以班馬魚及黑色素餵食角質細胞模擬曬黑狀態，並加入傳明酸觀察其是否誘導班馬魚及HaCaT 細胞產生自噬作用來分解黑色素。

參

實驗方法

探討傳明酸誘導細胞自噬的美白效果

斑馬魚培養

產卵

加傳明酸 72 小時

第 24/48 小時
觀察並拍照第 72 小時觀察
拍照並記錄心跳

黑色素餵食(Melanin-feeding) 角質(HaCaT) 細胞培養

加黑色素 48 小時

MTT assay

加傳明酸 48 小時

加 MTT 2 小時

加 DMSO

存活率測定

分光光度計檢測
(570 nm)

西方墨點法 (Western blotting)

加傳明酸 48 小時

收細胞

加傳明酸 48 小時

收細胞

分光光度計檢測
(405 nm)

黑色素(Melanin) 含量測定

加傳明酸 48 小時

收細胞

AO assay

加 3-MA 30 分鐘

加傳明酸 48 小時

加 AO 30 分鐘

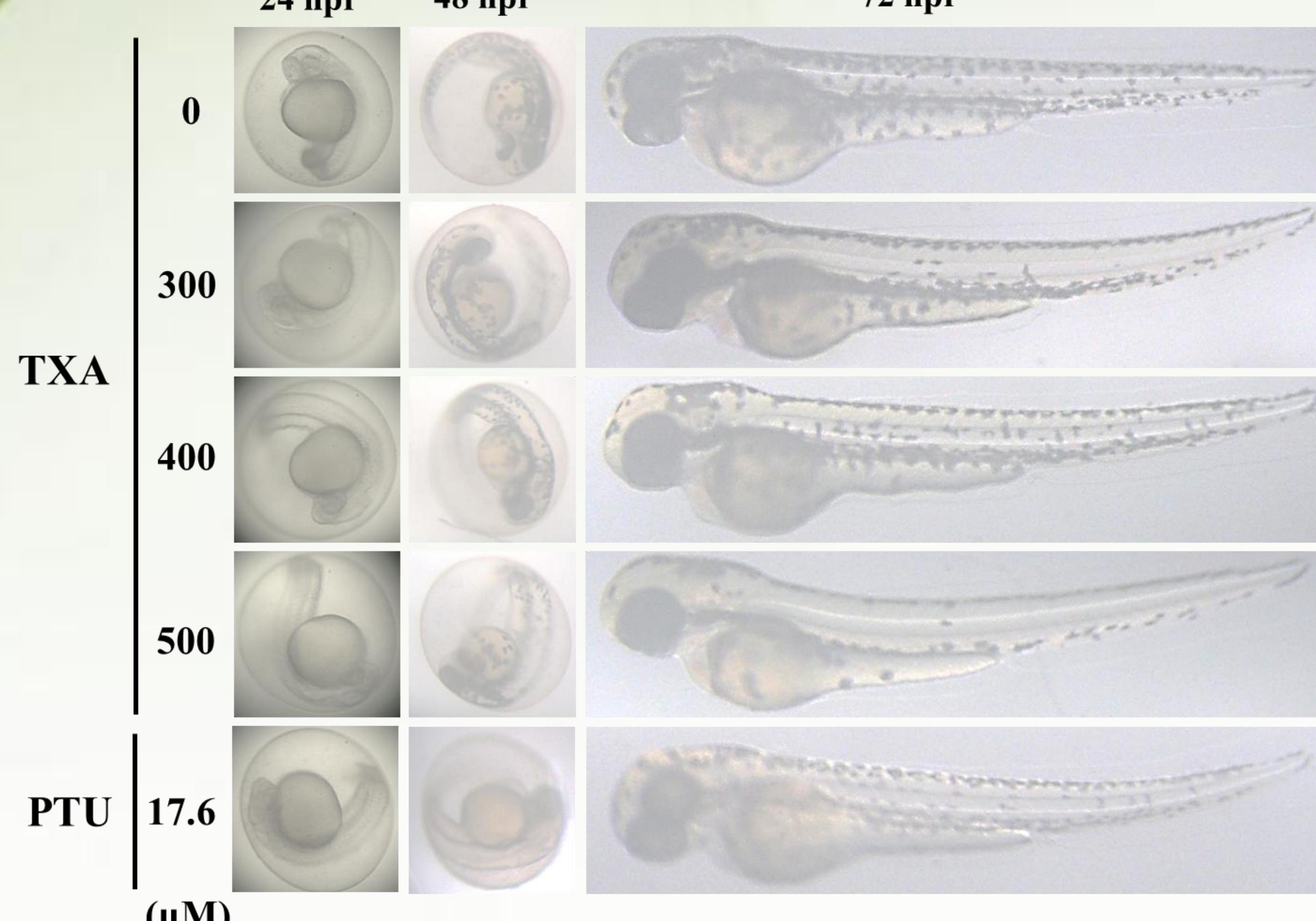
螢光顯微鏡
檢測紅色螢光Results are the mean \pm SD (n=3). $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ compared with untreated cells. $#p < 0.05$; $##p < 0.01$; $###p < 0.001$ compared with melanin- or 3-MA treated cells.

- (1)歐盟及台灣境內禁止銷售經過動物實驗或含經動物實驗成分的化妝品，故須發展動物實驗替代方案。
- (2)依照歐盟的規定斑馬魚在受精卵後五天，斑馬魚可以獨立進食後，才需要申請通過動物實驗同意書。
- (3)本實驗在斑馬魚受精卵後72小時之內完成，也不會犧牲斑馬魚(故原則上不需要申請動物實驗通過)。
- (4)斑馬魚和人類的基因與蛋白高度同源性，斑馬魚被廣泛用於研究人類美白及色素沈著症。
- (5)斑馬魚生命週期短、高繁殖力、外部授精、胚胎透明且易於觀察。

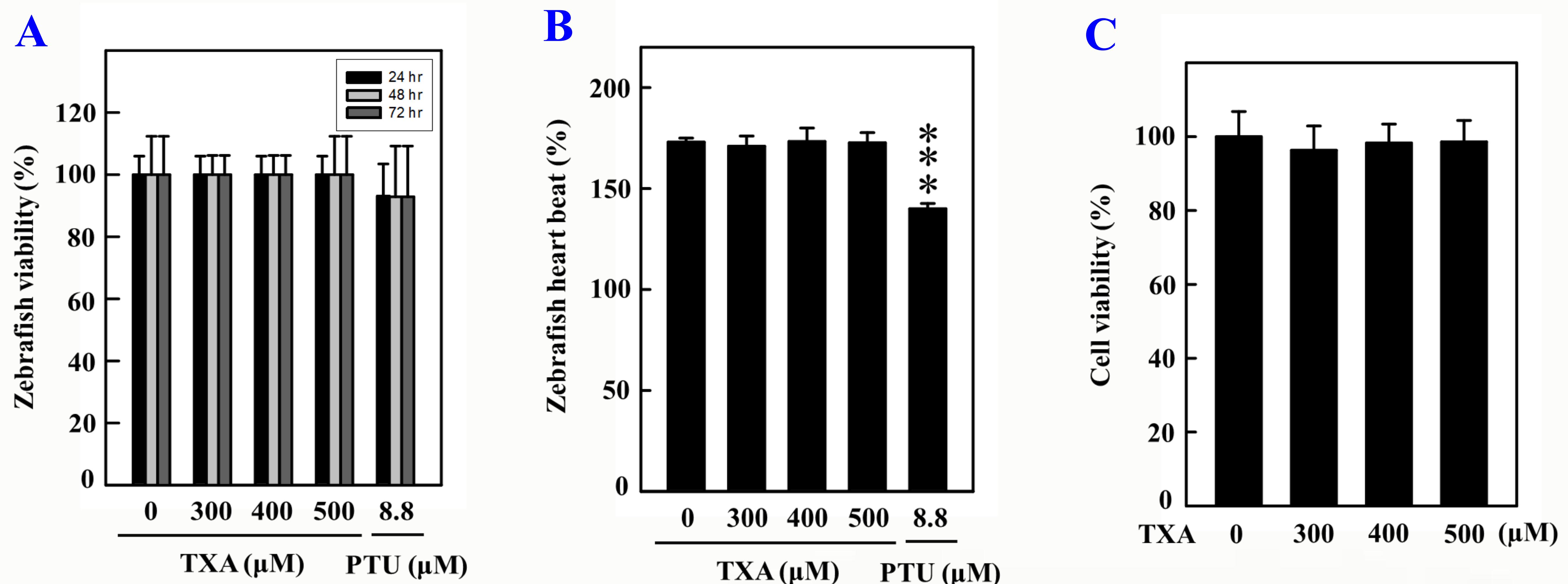
肆

實驗結果

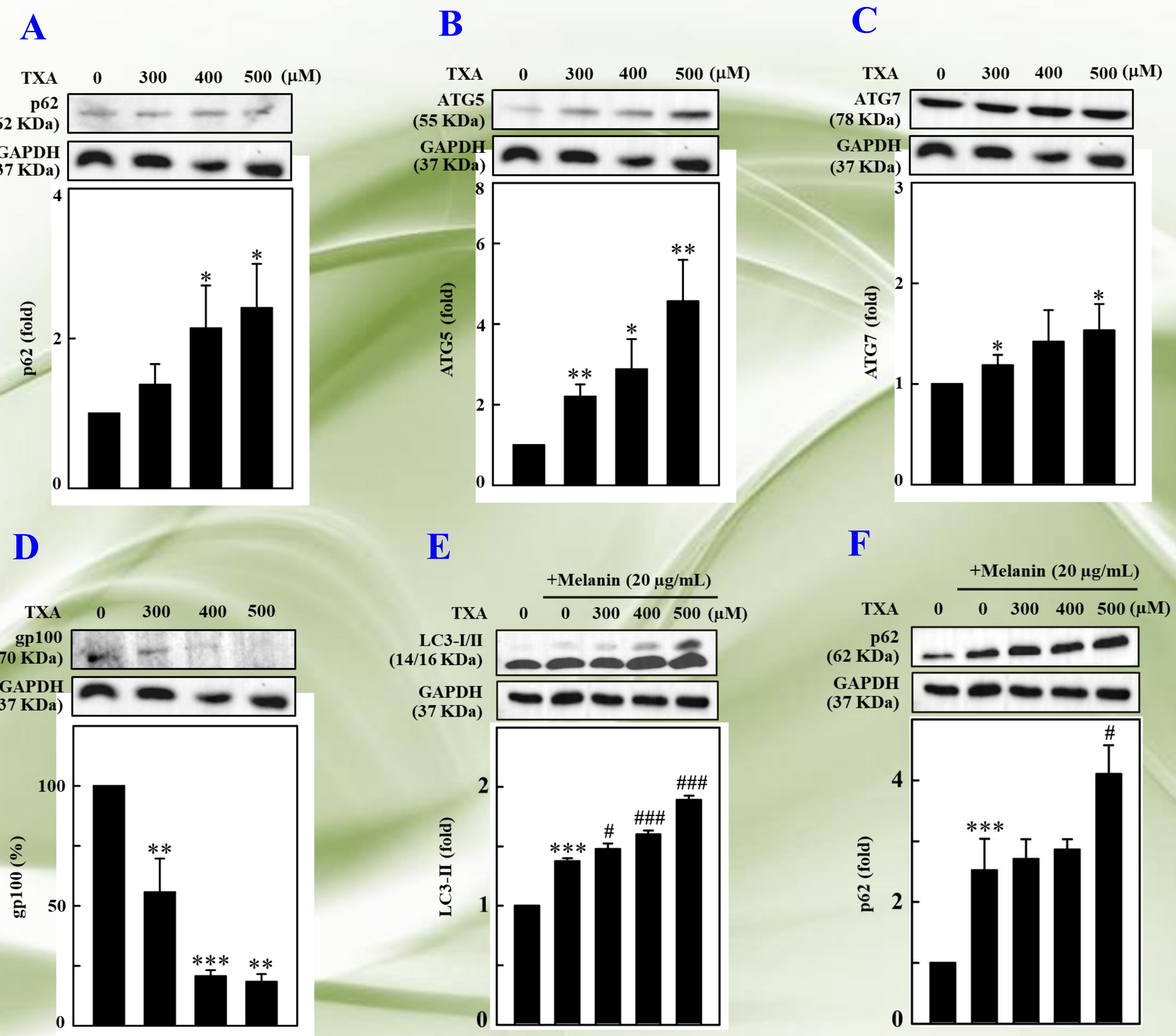
圖一 傳明酸誘導班馬魚黑色素分解及美白作用



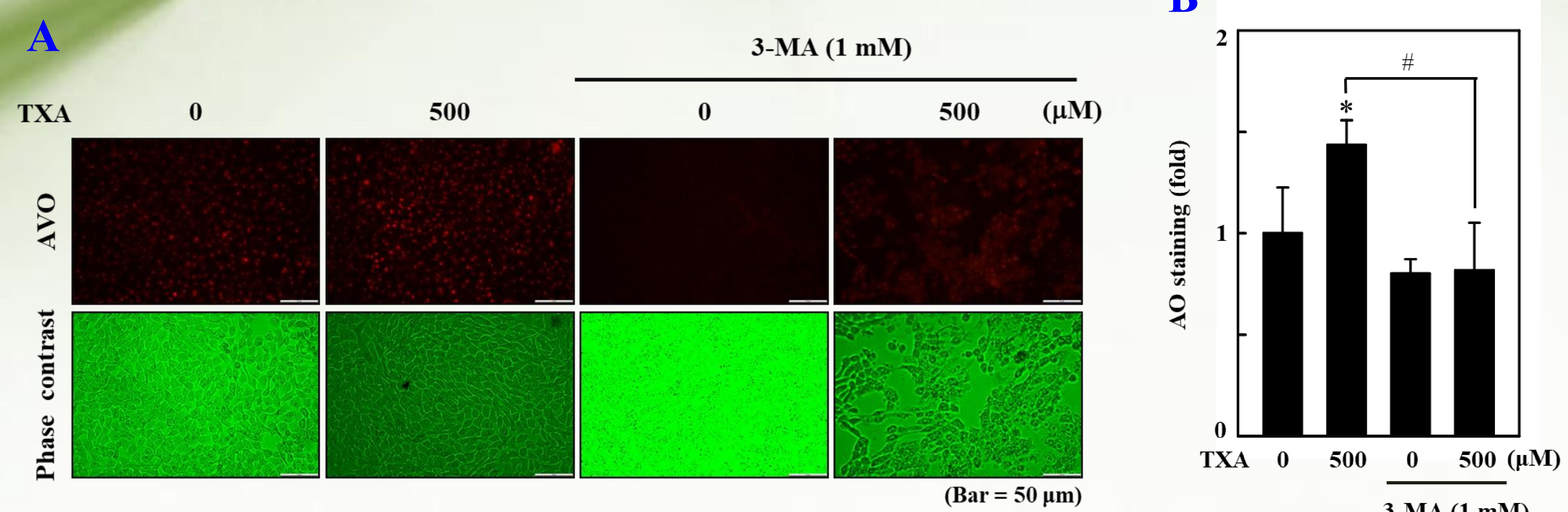
圖二傳明酸對斑馬魚存活率及心跳及角質細胞存活率無毒性



圖三傳明酸誘導黑色素餵食角質細胞自噬相關蛋白(p62/ATG5/ATG7/LC3-II/gp100)增加

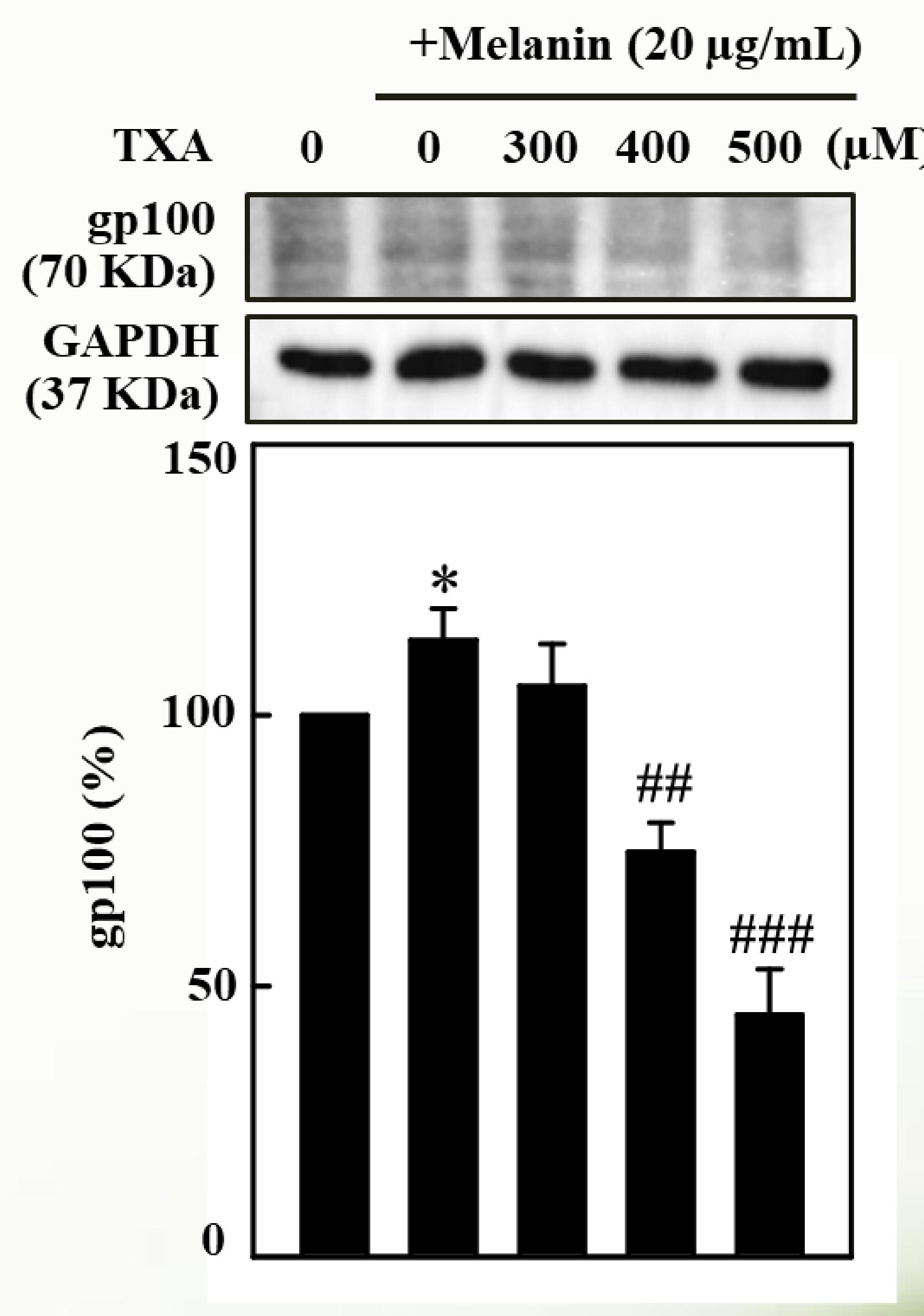


圖四傳明酸誘導黑色素餵食角質細胞自噬酸性囊泡AVO形成

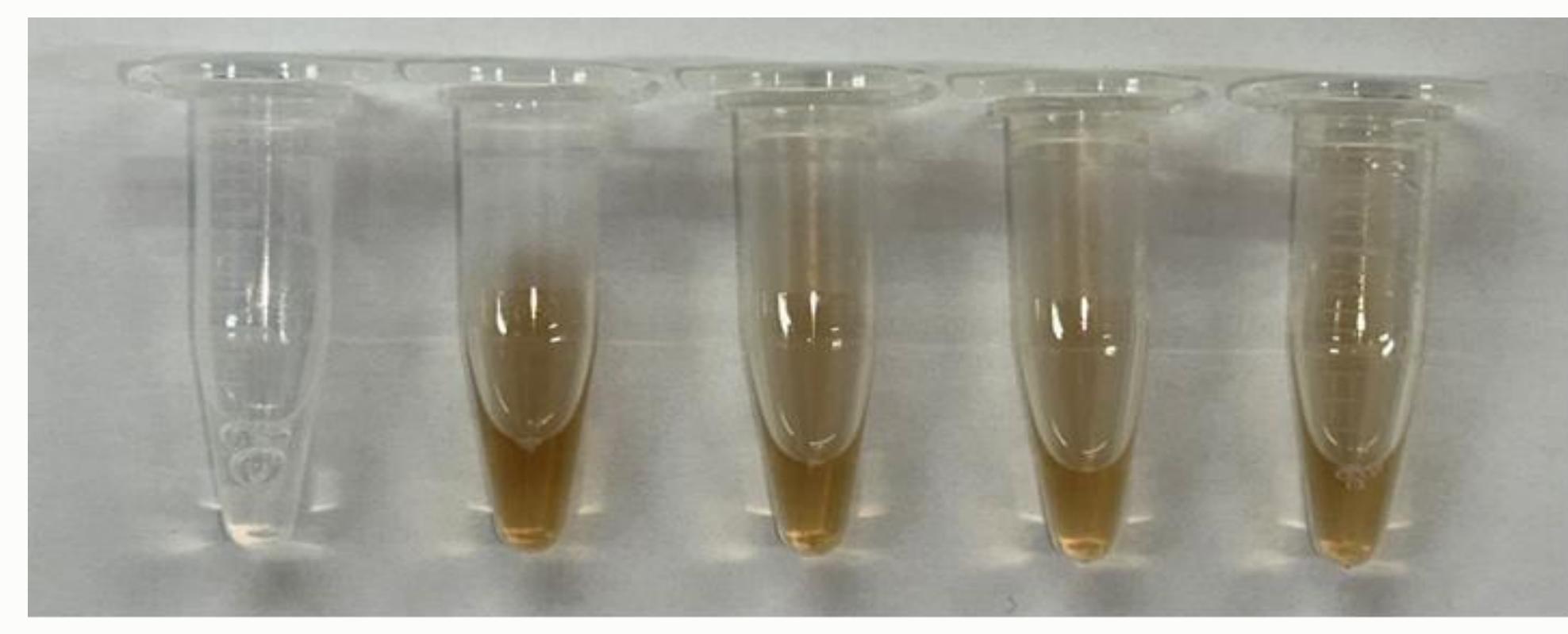


圖五 傳明酸誘導黑色素餵食角質細胞黑色素小體gp100蛋白形成及分解黑色素

A

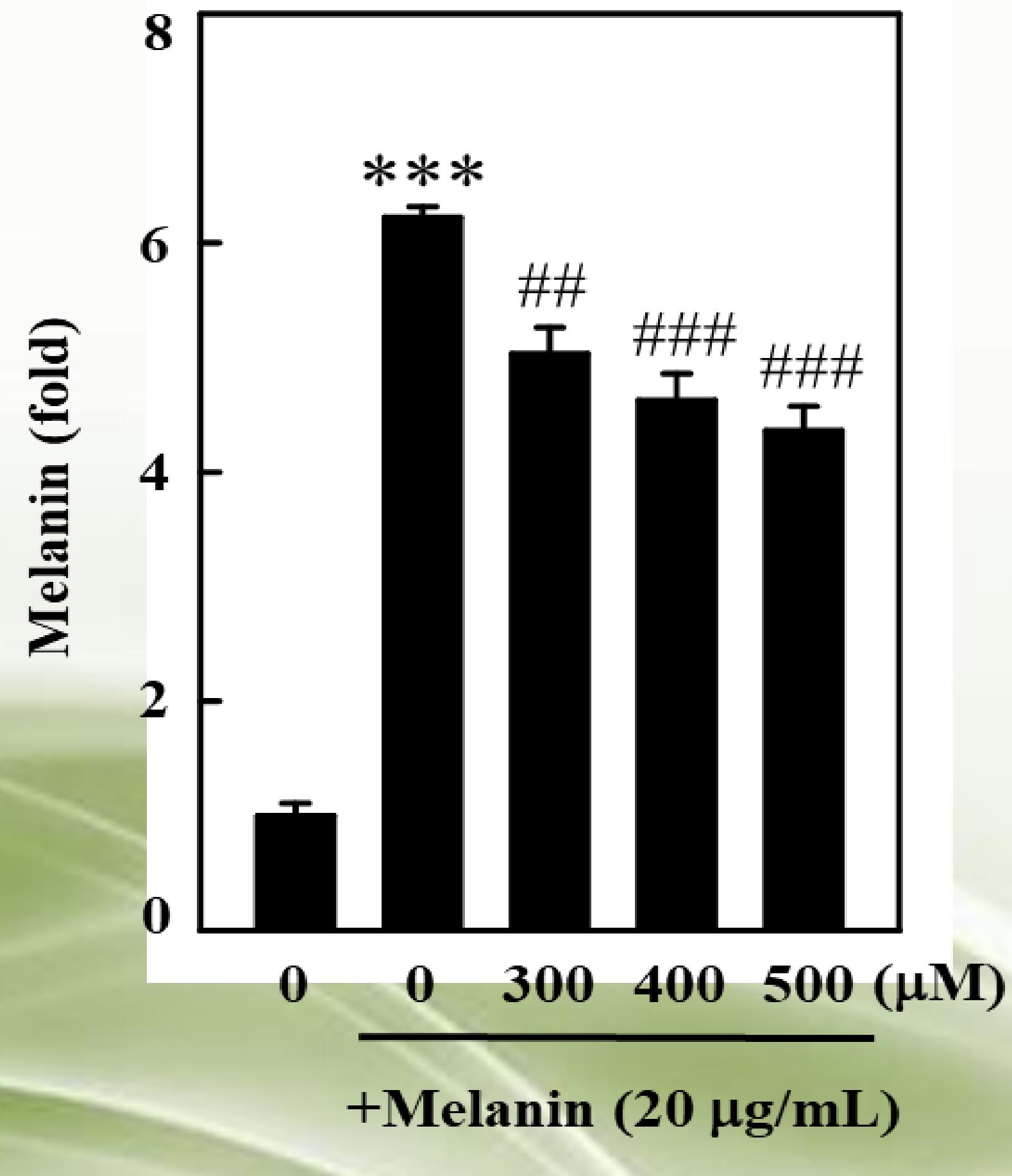


B



0 0 300 400 500 (µM)

C

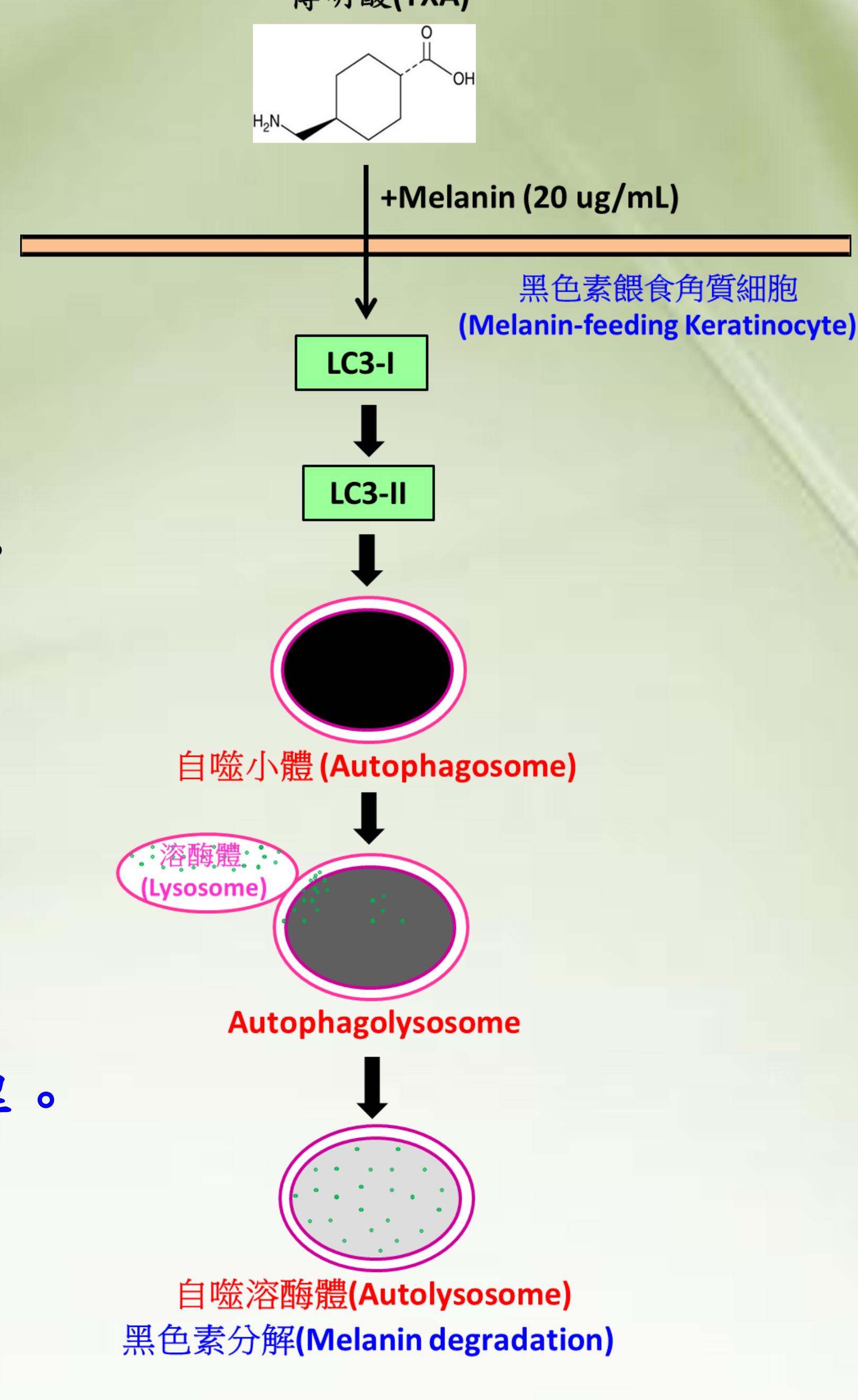


伍 討論

- (一) 國際期刊曾報導以黑色素餵食人類初代角質細胞，傳明酸(1 mg/mL)處理24小時並未發現黑色素分解，我們也有相同的實驗結果。所以，我們使用傳明酸(~500 µM)處理48小時後，發現傳明酸可透過細胞自噬進行皮膚黑色素分解。
- (二) 傳明酸在0, 300, 400及500 µM濃度處理下，斑馬魚存活率皆大於95%；顯微鏡觀察斑馬魚第72小時(72 hpf)，結果隨著傳明酸濃度增加，斑馬魚身體黑色素含量逐漸減少。PTU為正控制組。
- (三) 角質(HaCaT)細胞MTT結果，傳明酸至最高濃度500 µM 幾乎不具細胞毒性(存活率大於95%)。
- (四) 西方墨點法觀察，發現經過傳明酸處理的角質細胞，自噬相關蛋白(LC3-II、p62、ATG5及ATG7)有上調的表現。
- (五) 傳明酸作用角質細胞後，以AO染色呈現紅色螢光，表示自噬酸性囊泡(AVOs, Acidic vesicular organelles)的存在。加入自噬抑制劑3-MA，傳明酸誘導增加酸性自噬囊泡會下降。
- (六) 傳明酸處理黑色素餵食角質細胞，發現隨著傳明酸增加，黑色素小體gp100蛋白及黑色素含量明顯減少(黑色素分解)。

陸 結論

- 傳明酸至最高濃度(500 µM)幾乎不具毒性。
- 傳明酸能誘導角質自噬作用(Autophagy)。
- 傳明酸會誘導斑馬魚及黑色素餵食角質細胞黑色素分解。
- 傳明酸可透過細胞自噬進行皮膚美白作用(見機制圖)。



柒 參考文獻

- 一、Chen, S.-J., Hseu, Y.-C., Gowrisankar, Y., Zhang, Y.-Z., Chen, X.-Z., Huang, P.-J., & Yang, H.-L. (2021). The anti-melanogenic effects of 3-O-ethyl ascorbic acid via Nrf2-mediated α-MSH inhibition in UVA-irradiated keratinocytes and autophagy induction in melanocytes. Free Radical Biology and Medicine, 173, 151–169. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.030>
- 二、自噬自噬-溶酶體系統靶向降解蛋白質技術研究進展. (2023). Journal of Medical Chemistry and Engineering, 3(4), 1–10. Retrieved from <https://www.jmche.org/>
- 三、Hseu, Y.-C., Gowrisankar, Y. V., Wang, L.-W., Zhang, Y.-Z., Chen, X.-Z., Huang, P.-J., Yen, H.-R., & Yang, H.-L. (2021). The in vitro and in vivo depigmenting activity of pterostilbene through induction of autophagy in melanocytes and inhibition of UVA-irradiated α-MSH in keratinocytes via Nrf2-mediated antioxidant pathways. Redox Biology, 44, 102007. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102007>
- 四、黎亞璇. (2024). 四氫厚朴酚美白功效: 透過自噬作用抑制黑色素生成及誘導黑色素降解 (碩士論文).
- 五、李佳穎. (2022). Zerumbone 誘導人黑色素瘤細胞中 ROS 介導的自噬細胞死亡 (碩士論文, 中國醫藥大學).
- 六、Hosen MJ, Vanakker OM, Willaert A, Huysseune A, Coucke P and De Paepe A, Zebrafish models for ectopic mineralization disorders: practical issues from morpholino design to post-injection observations.
- 七、Hu et al., Tranexamic acid may promote melanocores clustering in keratinocytes through upregulation of Rab5b. Experimental Dermatology. 2023. 32:777–786.