

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

以 HepG2 來探討破布子葉萃取液對細胞抗氧化能力  
與細胞毒性的影響

計畫類別：個別型計畫

整合型計畫

計畫編號：CNHN 92-04

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人：蕭慧美

執行單位：保健營養系

中華民國 93 年 1 月 12 日

以 HepG2 來探討破布子葉萃取液對細胞抗氧化能力與細胞毒性的影響

**Antioxidant and cytotoxic activities of extracts of *Cordia dichotoma* Forst. f in HepG2 cells**

計畫編號：CNHN 92-04

執行期限：92 年 01 月 01 日至 92 年 12 月 31 日

主持人：蕭慧美 助理教授 保健營養系

一、中文摘要

破布子為民間之藥用植物，但是未見其葉子的相關研究，本實驗採取嫩葉取得水和甲醇兩種萃取液，分別和人類肝癌細胞株(HepG2) 進行培養。兩種成分在高濃度下(0.1mg/mL 甲醇萃取液和 0.5mg/mL 水萃液)皆明顯降低細胞存活率，且兩者亦造成不同的細胞型態。高濃度的水萃物會促進細胞群聚並出現爪狀攀爬的延伸觸角型態，使細胞看起來呈現三角形；反觀高濃度的甲醇萃取物則是使生長變緩慢，細胞量少且萎縮成圓形，呈現出小且鈍狀的細胞聚落。由於 HepG2 的過氧化指標極低以及抗氧化酵素活性未受萃取液所改變，所以初步推斷其死亡原因可能與細胞氧化狀況無直接相關。

關鍵詞：HepG2 細胞、破布子葉、抗氧化、細胞毒性

**Abstract**

The *Cordia dichotoma* Forst f. is used as traditional medicine in Taiwan. The effects of leaf haven't been studied. We prepare the water and methanol extraction from the leaves of *Cordia dichotoma* Forst f.. The HepG2 was coincubated with different concentration of plant extract. As the concentration of plant extract increased, the

cell viability decreased. The cells incubated with the two plant extract showed different morphology. The cells showed triangle clone in water extract while the cells incubated with methanol extract showed small clone. The catalase activity showed no changes during incubation with plant extracts. The oxidation is not directly related to the death of cell and which couldn't be the major cause of cell death.

**Keywords:** HepG2 cell, leaf of *Cordia dichotoma* Forst f., antioxidant, cytotoxicity

二、緣由與目的

破布子為紫草科植物，破布子屬，學名為 *Cordia dichotoma* Forst. f，俗名樹子、布渣葉等；夏秋採葉曬乾，夏天採果實作醬料。破布子為民間之藥用植物：用樹皮於子宮炎、肺出血與癌症治療，果實富含膠質[1]除了入菜亦具開胃、解毒功效，根部經由煎煮可用於治療糖尿病，破布子葉可治療腹瀉、消化不良，外用還有去淤消炎等功能，可說所有的部位皆有其特定藥效。目前已經分離出根部化學成分包括 camptosterol,  $\beta$ -sitosterol、生物鹼等[2]，且可明顯降低大白鼠的血糖與血脂肪[2]；此外在細胞培養研究中亦證明破布子樹皮確實可抑制癌細胞之生長[3,4]。

本實驗意欲探討破布子葉是否有具有特殊功效，因此以 HepG2 作為細胞模式，藉由與不同濃度的破布子葉萃取液共同培養，觀察細胞之生長型態與抗氧化系統是否受到影響。

### 三、結果與討論

本實驗將夏天採得之破布子嫩葉經清洗晾乾後秤重，加入十倍重量的滅菌水一起加熱半小時，以果汁機進行均質，將均質液經低溫離心取得上清液和葉渣。上清液以冷凍乾燥去除水分，稱之為水草物 (water extract)；葉渣部分經冷凍乾燥後，加入一百倍重量的甲醇進行萃取三次後，以減壓濃縮去除甲醇，所得之乾燥物稱為甲醇萃取物 (methanol extract)。

以細胞培養基配製水草物；以甲醇溶解甲醇萃取物，再以培養基配製各種濃度，但是培養基中的甲醇濃度不超過 0.5%。HepG2 細胞與不同濃度的兩種植物萃取物培養不同時間點，其細胞存活率如表一所示；隨著萃取物的濃度增加，細胞存活率隨之下降，尤其在高濃度的萃取物 (如 0.1mg/mL 甲醇萃取液和 0.5mg/mL 水草液) 培養下，HepG2 的細胞存活率明顯下降為控制組的五成和八成左右。可見兩種萃取物都具有某種程度的細胞毒性。

從圖三可觀察到兩種萃取物對細胞型態的影響是有所不同的。高濃度的水草物會促進細胞群聚並出現爪狀攀爬的延伸觸角型態，使細胞看起來呈現三角形但是細胞卻呈現乾涸沒有光澤，大概都是死細胞為多，且不易被 Trypsin 分解下來；反觀高濃度的甲醇萃取物則是使細胞量少，感覺有萎縮成圓形，生長變緩慢，呈現出小且鈍狀的細胞聚落，聚落擴張性降低，也有很多死細胞。由此可見兩種不同萃取成分對 HepG2 之毒性影響機制各有

不同，此點值得進一步探討。

在抗氧化能力方面，本人發現 HepG2 的 TBARS 濃度 (亦即脂質過氧化指標) 極低 (數據未列出)，不易偵測，故其準確性降低而無法進行組間的比較。

細胞經過 0h、24h、48h 和 72h 的培養後，觀察 Catalase 酵素活性之改變，結果如圖一 A 所示，各時間點的酵素活性沒有很大的改變，但經 72 小時之培養後，細胞的酵素活性明顯下降。

以各種不同濃度甲醇萃取液和細胞培養後，其 catalase 活性看來並不會因為甲醇萃取液之添加而有所改變，唯一明顯改變的仍是 72h 的酵素活性之下降。至於 Glutathione peroxidase 酵素活性，在偵測系統中的變化極微 (吸光值極低)，不易觀察，此點可能是該細胞本身的特性，因此亦未將數據列出。

由於 HepG2 的抗氧化酵素系統不易偵測，所以對於破布子葉萃取液對細胞的氧化情形無法觀察，但是從 Catalase 活性來判斷，其活性並未受到明顯的改變。若是單從細胞存活率可以看到破布子葉萃取液對細胞的毒性，但是其造成死亡的原因可能與氧化傷害不是非常直接的關係；另一方面若從細胞型態來看，兩種萃取液對細胞造成的毒性機制有所不同，可能透過細胞間聯繫系統之破壞或是細胞分裂等因素，對細胞造成壞死或是凋亡現象與否需要進一步探討才知道，其機制或許有助於日後應用在探討破布子液對肝癌細胞毒害測試。

### 四、計畫成果自評

1. 破布子葉的兩種萃取液對肝癌細胞的毒性機制是有所不同的。
2. 萃取液有大量膠質，會干擾實驗進行仍待克服。

3. 細胞死亡原因必須找到具有代表性的酵素指標，才能知道死亡原因。
4. 抗氧化酵素系統不易偵測，可能要改成偵測 mRNA 的表現，但是由於酵素活性與 mRNA 表現不一定相關，所以無法具代表性。

## 五、參考文獻

- [1] 汪群超、吳昌明，破布子加工特性之探討，民國 92 年，國立屏東科大食品科學系碩士論文
- [2] 張肇宇、李佩端，破布子降血糖作用及化學成分之研究，民國 77 年，中國醫藥學院藥化所碩士論文
- [3] 破布子樹皮之成份分析及其對子宮頸癌細胞毒性作用之研究，民國 68 年，碩士論文
- [4] 以組織培養細胞觀察破布子樹皮萃取物對人類癌細胞之作用，民國 79 年，台大生化所，國科會計畫成果

## 六、附表：請參見下頁

Table 1 The cell viability (%) by treatments of two kinds of plant extract

	Methanol Extract				Water Extract			
	Control	0.01mg/mL	0.02 mg/mL	0.1 mg/mL	Control	2.5ug/mL	25ug/mL	0.5mg/mL
24h	95	92	90	59.4	98	92	88	78
48h	93	93	78	26	95	93	90	68

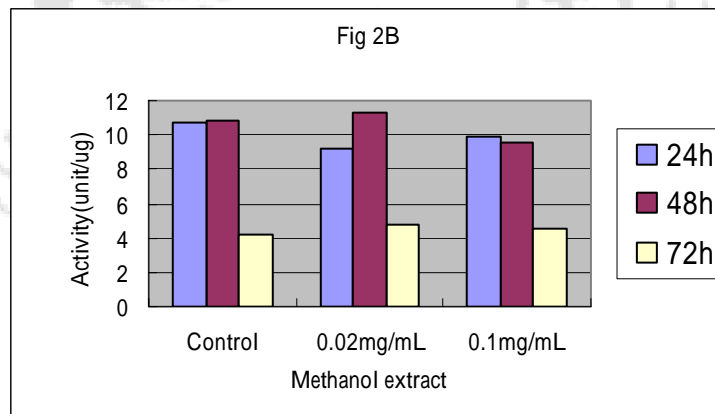
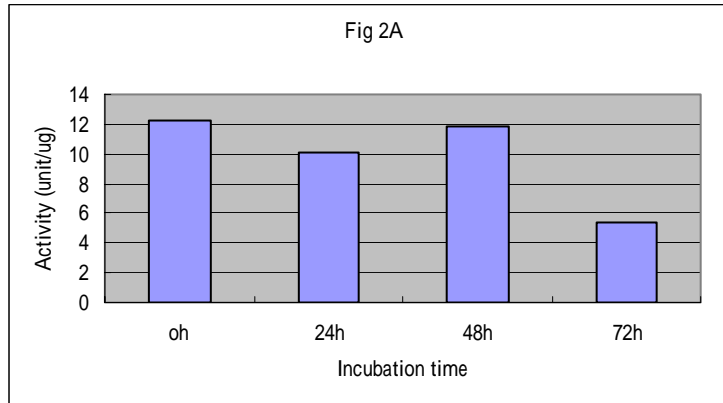


Fig 2. The catalase activity in cells during different incubation time(A) and in cells with treatment of various concentration of plant extract(B)