

嘉南藥理學院教師專題研究計畫成果報告

計畫名稱：芫荽(*Coriandrum sativum*)抽出液對 DNA 氧化傷害之保護

計畫編號：CNFH-89-04

計畫執行期間：88 年 9 月 1 日至 89 年 6 月 30 日

計畫主持人：吳明娟

摘要

累積過多的活性氧 (reactive oxygen) 已知會造成許多人類疾病：包括心血管疾病、老化、癌症等。膳食中的抗氧化物對保護細胞內的遺傳物質、脂質、蛋白質等，使之免於受自由基產生之氧化傷害非常重要。芫荽是國人菜餚中重要的調味蔬菜，據本草綱目記載可為驅風、祛痰藥。近年民間流行之生機飲食中芫荽大蒜汁、芫荽蘋果汁皆聲稱具降血壓、清潔血液之功能。本研究之主題即為探討不同處理之芫荽抽出液在試管內對 Fenton reaction 所誘發的 DNA 氧化傷害的抑制作用。我們初步的結果顯示：所有的萃取液對 DNA 的抗氧化性隨濃度下降而遞減。在濃度降至 0.001 mg/ml 時，新鮮芫荽的甲醇萃取液、熱乾芫荽的 50%乙醇/50%水萃取液、及冷凍乾燥芫荽的 50%乙醇/50%水萃取液對 H_2O_2 -ascorbate- Fe^{3+} 誘導的 DNA 氧化傷害仍具明顯之保護作用。

關鍵字：芫荽、活性氧、Fenton reaction、DNA 氧化傷害

Abstract

Increased production of reactive oxygen species have been involved in several human diseases, including cardiovascular diseases and cancers. Dietary antioxidants may be especially important in protecting against diseases associated with free radical damage to cellular DNA, lipids and proteins. Coriander (*Coriandrum sativum*) is an important seasoning in Taiwan. Recently, coriander and garlic juice blend as well as coriander and apple juice blend have been very popular as natural organic drinks and were claimed to have the functions of lowering blood pressure and cleaning blood vessels. In this study, the antioxidant effects from different preparations of coriander extracts against Fenton reaction induced DNA damage will be investigated. Wu found that the antioxidative effect decreased as the extracts concentrations lowered. At concentration as low as 0.001 mg/ml, methanol extract of fresh coriander, 50% ethanol/ 50% water extract of heat-dried coriander, and 50% ethanol/ 50% water extract of lyophilized coriander could significantly inhibit DNA oxidation induced by H_2O_2 -ascorbate- Fe^{3+} .



前言

近年來氧化傷害對細胞組成的破壞及其在誘發許多老化相關疾病上的角色逐漸受世人重視。電子傳遞鏈是好氧生物能量主要的產生來源。在此過程中偶爾會出錯而產生超氧陰離子(superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$)及其他活性氧群(reactive oxygen species, ROS), 因此造成細胞及染色體受傷。許多老化相關疾病即是由於累積過多受自由基氧化傷害的蛋白質, DNA, 或脂質所致。其中, 活性氧群對 DNA 氧化傷害主要是經 Fenton 作用導致的。

Fenton 反應產生的氧化物主要破壞 DNA 的鹼基和糖基。糖基的傷害源於去氧核糖上氫的去除(abstraction)引起 DNA 的斷裂及鹼基的游離[Henle et al, 1995]。主要的產物為游離鹼基、malondialdehyde [Bertoncini and Meneghini, 1995]; 另一類的傷害的主產物為 5'- 及 3'-phosphomonoesters 間有一個 nucleoside 的間隙; 有些糖基則變成 γ -lactone; 有些則將糖基 1'-carbon 的鍵結由 β 變成 α , 而導致 B-DNA 結構破壞[Ide et al, 1994]。若同時作用在 nucleoside 的鹼基和糖基則會產生 5'-8-cyclodeoxyribopurines [Dirksen et al, 1988]。

自由基攻擊鹼基的主要作用方式為將 OH 基加到 purine 的 N-7-C-8 的雙鍵及 pyrimidine 的 5,6 的雙鍵上。在 purine 的氧化物中以 formamidopyrimidines 和 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxo-Gua)的相關研究最多, 尤其是後者因為會與 adenine 形成配對為一個高突變性分子。至於 pyrimidine 的氧化物中以 thymine glycol 及其自動水解的產物的相關研究最多。其他體內鐵離子參與的 DNA 氧化傷害尚有 DNA-protein cross-links [Altman et. al., 1995]。

生物體減少 Fenton 反應對 DNA 傷害的主要機制有: 氧化還原代謝反應的準確忠誠度、利用鐵蛋白(ferritin)及運鐵蛋白(transferrin)來清除體內的鐵、胞器將鐵和超氧自由基(superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$)區隔、及 histones 保護 DNA 避免與鐵接觸等。此外, 超氧歧化酵素(superoxide dismutases, SODs), catalase 和 peroxidases 等酵素皆可清除由 Fe/H_2O_2 所產生的活性氧群(reactive oxygen species, ROS)。

膳食中的抗氧化物對保護細胞內的遺傳物質、脂質、蛋白質等, 使之免於受自由基產生之氧化傷害非常重要。芫荽是國人菜餚中重要的調味蔬菜, 據本草綱目記載可為驅風、祛痰藥。近年民間流行之生機飲食中芫荽大蒜汁、芫荽蘋果汁皆聲稱具降血壓、清潔血液之功能。本研究之主題即為探討不同處理之芫荽抽出液在試管內對 Fenton reaction 所誘發的 DNA 氧化傷害的抑制作用。

材料與方法

材料

芫荽購自嘉南地區農場。化學試藥購自 Sigma Co. (USA); 溶劑購自 Merck Co. 。所有檢驗試藥皆新鮮製備於去離子水中, 以確保無其他金屬離子干擾。檢驗用塑膠製品皆需全新且事先殺菌斧處理去除 DNase。

方法

芫荽前處理—

新鮮購入之芫荽洗淨切碎後均分三份：一份備用、一份在 45°C 熱風乾燥至全乾後、另一份冷凍乾燥。

芫荽萃取—

新鮮芫荽分別以每 140 克加入 300ml 的不同溶劑，在室溫萃取 20 小時。熱風乾燥芫荽分別以每 20 克加入不同溶劑 300 ml，在室溫萃取 20 小時。冷凍乾燥芫荽分別以每 5 克加入不同溶劑 200 ml，在室溫萃取 20 小時。溶劑種類有：甲醇、乙醇、50%乙醇/50%水。萃取液經過濾後置於減壓濃縮機或冷凍乾燥機，濃縮乾燥。濃縮乾燥物經稱重後，回溶於原始溶劑。

超螺旋型質體 DNA 抽取—

含 pUC18 質體之 DH5 α 大腸菌，培養於含 ampicillin 培養基一夜。利用 Wizard PureFection Plasmid DNA Purification System (Promega Co., USA) 質體抽取套組，製備超螺旋型質體 DNA。製備之 DNA 以 A260 及洋菜電泳定量。

在 H₂O₂-Fe⁺⁺⁺-ascorbate 系統中對雙股 DNA 的抗氧化性探討--

本實驗利用質體鬆散反應 (plasmid relaxation reaction)，探討在 H₂O₂-Fe⁺⁺⁺-ascorbate 系統中各種不同芫荽萃取液對雙股 DNA 的抗氧化性 (Kobayashi *et al.*, 1990)。反應液 10 μ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.8)，200ng pUC18 超螺旋型質體 DNA, 1mM hydrogen peroxide, 50 μ M ferric chloride, 100 μ M ascorbic acid 及不同濃度的芫荽萃取液。反應液置於 37°C 水浴 30 分鐘後，以 0.7% 洋菜電泳分離。洋菜電泳膠而後以 ethidium bromide 染色並在 UV 燈下照相。

結果與討論

經不同處理之芫荽利用不同溶劑萃取後，回收率如表一所示。

表一、經不同處理之芫荽利用不同溶劑萃取之回收量

Sample	Solvent	Initial Weight (g)	Yield (g)
新鮮芫荽	Methanol	140	2.51
	Alcohol	140	3.41
	50%Alcohol/50% H ₂ O	140	3.53
熱風乾燥芫荽	Methanol	20	2.87
	Alcohol	20	0.9
	50%Alcohol/50% H ₂ O	20	2.53
冷凍乾燥芫荽	Methanol	5	1.04
	Alcohol	5	0.57
	50%Alcohol/50% H ₂ O	5	1.83

由此表可知新鮮芫荽的甲醇萃取回收率最低；但是以熱風乾燥芫荽及冷凍乾

燥芫荽而言，乙醇萃取的回收率最低。這可能意味在乾燥過程中芫荽化學組成的改變，因此溶於乙醇的物質明顯減少。由熱風乾燥芫荽及冷凍乾燥芫荽的甲醇萃取回收率約為乙醇萃取回收率的兩倍，可推測得知非極性的物質在乾燥樣品中比在新鮮樣品中減少許多。

接著我們繼續探討不同處理之芫荽抽出液在試管內對 Fenton reaction 所誘發的 DNA 氧化傷害的抑制作用。我們初步的結果顯示：所有的萃取液對 DNA 的抗氧化性隨濃度下降而遞減。在濃度降至 0.001 mg/ml 時，新鮮芫荽的甲醇萃取液、熱乾芫荽的 50%乙醇/50%水萃取液、及冷凍乾燥芫荽的 50%乙醇/50%水萃取液對 H_2O_2 -ascorbate- Fe^{3+} 誘導的 DNA 氧化傷害仍具明顯之保護作用。由此可知芫荽的抗氧化成份可能是界於極性與非極性之間的多酚類。

