

# 嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

海巴戟天葉乙醇萃取物保護大白鼠血球抗氧化酵素的影響

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：CNHN95-06

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

主持人：陳師瑩 副教授

嘉南藥理科技大學營養與保健科技研究所

E-mail: shihying@mail.chna.edu.tw



執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國 96 年 2 月 28 日

# 嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

## 海巴戟天葉乙醇萃取物保護大白鼠血球抗氧化酵素的影響

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：CNHN95-06

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

主持人：陳師瑩 副教授

嘉南藥理科技大學營養與保健科技研究所

E-mail: shihying@mail.chna.edu.tw

### 一、中文摘要

本研究以大白鼠為模式，針對血球抗氧化酵素為分析標的，探討大白鼠血球在遭受氧化傷害的情形下，攝取海巴戟天葉乙醇萃取物 (LE95) 對血球抗氧化酵素的影響，並推論可能的抗氧化機制。結果顯示注射環磷醯胺 15 天後，顯示大白鼠攝食 LE95 能夠提升血球 GRd 活性，但與 CAT、GPx 和 SOD 的活性反應相反。亦即攝取 LE95 對於大白鼠遭受環磷醯胺之氧化壓力下，對血球抗氧化酵素的影響出現不一致的反應，亦難分辨是否具有保護大白鼠免於環磷醯胺誘發的氧化性傷害，需要進一步的生物體抗氧化能力分析以釐清抗氧化狀態。

**關鍵詞：**海巴戟天、環磷醯胺、血球抗氧化酵素。

### 二、緣由、實驗設計與目的

由自由基 (Free radical) 或活性氧 (Reactive oxygen species) 所造成的氧化性傷害已成為近年來食品學和生理學研究的重點。醫學上甚至認為許多疾病的發生

(如糖尿病、高血壓與癌症等) 與老化現象是因自由基或活性氧的產生所造成<sup>(1,2)</sup>。因為當自由基形成後就會造成連鎖反應，促使蛋白質、碳水化合物、脂肪、核酸等構成細胞物質的氧化，造成過氧化脂質的堆積，進而破壞體內的細胞膜、蛋白質及核酸等，使生理功能逐漸消失，產生疾病。若能增加生物體內抗氧化防禦系統之作用，以分解活性氧物質，則能有效減少細胞傷害，延緩生物體的衰老與死亡。事實上，在我們的飲食當中存在多種具有抗氧化特性的特殊成分，能防止或減緩自由基或活性氧所造成的破壞。二十一世紀預防醫學的觀念普及，健康食品 (Health food) 的研究風行，已有許多研究從各類的食品中找出可能具有抗氧化能力的物質。時至今日，維生素E、抗壞血酸和  $\beta$ -carotene 仍被公認為良好的抗氧化物質，然而近年來的研究卻發現抗壞血酸在特定的條件下亦具有助氧化的特性；而過量使用維生素A除了有肝毒性外，也有造成肺癌的病例報告<sup>(3)</sup>，使得抗氧化劑

的相關學理研究及其他抗氧化物的開發備受重視。

依據民間傳統療法的資料顯示，海巴戟天的花、果、葉、莖、樹皮、根皆可調製，可分開或合併飲用，相傳各部位具有百種以上醫療保健功效，當中包括糖尿病、高血壓與癌症的預防及治療效果，事實上，食用或飲用海巴戟天的相關產品已在台灣掀起一股風潮，然而對於支持海巴戟天之民間傳統療法的科學證據或有關生物活性的研究文獻，卻顯得薄弱與不足，這種現象對於消費者來說相當沒有保障，值得有關單位重視。

有關海巴戟天生物活性的研究傾向於抗腫瘤、免疫調節以及近年來的抗氧化活性為主題；對於海巴戟天的取材部位以根、葉與果實為主，有以粗萃取物或海巴戟天中某一化合物進行生物活性分析；而試驗方法多以細胞培養或試管試驗 (*in vitro*) 為主，少有相關的活體內試驗 (*in vivo*)<sup>(4-15)</sup>，顯示海巴戟天是一個尚待開發與需要充分研究的領域。基於文獻顯示海巴戟天成分中具有抗氧化物質，以及「海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選 (NSC 91-2626-B-041-003)」<sup>(16)</sup> 的研究成果顯示：海巴戟天葉的粗萃取物比果實與莖粗萃取物，較能偵測出多樣化的抗氧化特性與較高的活性，值得作為進一步純化抗氧化物質的材料來源；就萃取條件而言，乙醇萃取的方法比其他萃取條件能得到較高的總抗氧化活性，其中又以清除氫氧自由基能力為主。因此本計畫為了能接續過去的研究成果，並探討海巴戟天葉乙醇萃取物在生物體內可能的抗氧化生物活性，擬以大白鼠為模式，針對血球抗氧化酵素為分析標的，探討大白鼠血球在遭受氧化傷害的情形下，攝取海巴戟天葉乙醇萃取物對血球抗氧化酵素的影響，並推論可能的抗氧化機制。

### 三、材料與方法

1. 研究材料：海巴戟天葉係購自仁安農園，其新鮮採收的葉經烘乾後，以酒精萃取，經減壓濃縮以水回溶後，冷凍乾燥儲存於 -80°C。

#### 2. 動物飼養與飼料組成

大白鼠依體重隨機分入不同組別，飼養條件為溫度 20~24°C，相對濕度 50~70%，12 小時晝夜循環（光照時間為 8:00~20:00），在實驗期間，大白鼠自由攝取水和飼料配方，每兩天添加飼料並記錄體重一次。動物飼料以 AIN-76 為基礎，並利用研鉢研磨將飼料粉末與測試樣品混合均勻，配置好的飼料儲存於 4°C 中冷藏。

#### 3. 實驗設計及劑量分組

雄性大白鼠 32 隻，隨機分成控制組 (C)、每天接受每公斤體重 0.2 克海巴戟天葉乙醇萃取物組 (S)、腹腔注射環磷醯胺之氧化性傷害組 (CP)、以及每天接受每公斤體重 0.2 克海巴戟天葉乙醇萃取物，並經腹腔注射環磷醯胺誘發氧化性傷害的實驗組 (CPS)，共四組。實驗為期 30 天，在第 15 天進行腹腔注射模擬氧化性傷害；第 22 天進行大白鼠尾巴採血並立即分析抗氧化酵素活性；實驗結束後，犧牲動物，馬上收集大白鼠血液測定抗氧化酵素活性。

#### 4. 實驗分析項目

##### 1) 血液的處理

實驗進行到採集樣品的前一天，將大白鼠禁食 24 小時之後，用乙醚麻醉，並秤大白鼠最後體重，經由腹腔大動脈採集全血到含有 EDTA 的採血管中。

##### 2) 血液中抗氧化酵素活性的測定<sup>(17-19)</sup>

使用全自動血液分析儀，採用 RANDOX Laboratories (Antrum, UK) 公司之分析套組 (kit) 進行分析，檢測項目包含超氧化物歧化酵素 (Superoxide dismutase, SOD)、葡萄糖六磷酸去氫酵素 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)、觸酵素 (Catalase)、麩胱甘肽過氧化酵素 (Glutathione peroxidase, GSH Px)、麩胱甘肽還原酵素 (Glutathione reductase, GSH Rd) 活性，檢測程序皆採用國際聯邦臨床化學 (International

Federation of Clinical Chemistry, 1986) 的標準方法。

5. 將所得的數據以 Statistical Analysis System (SAS) 進行統計分析，以 Two-way ANOVA 程序做變異分析，並以 Duncan's Multiple Range Tests 做顯著性差異比較，以評估樣品是否真正具有抗氧化功能。

#### 四、結果與討論

1. 由表一結果顯示大白鼠在注射環磷醯胺 7 天後，血球抗氧化酵素 (CAT、GRd 和 SOD) 活性各組無顯著差異，亦即大白鼠腹腔注射環磷醯胺及攝食 LE95，皆不影響血球抗氧化酵素 (CAT、GRd 和 SOD) 活性。然而在血球 GPx 活性方面，在注射環磷醯胺 7 天後，雖不受到 CP 和 S 的影響，但是於氧化傷害下攝食 LE95，可以提升大白鼠血球 GPx 活性。在血球 G6PD 活性方面，在注射環磷醯胺 7 天後，S 組與控制組無顯著差異，但 CP 與 CPS 組顯著下降 ( $p < 0.05$ )，反映大白鼠腹腔注射環磷醯胺誘發氧化傷害下，會造成大白鼠血球 G6PD 活性下降，而這種活性下降不因攝食 LE95 而改善。在臨床研究中 (33) 發現缺乏 NADPH 生成的催化酵素 G6PD 造成會紅血球細胞膜遭氧化破裂，導致出現溶血性貧血。本實驗中大白鼠出現溶血性貧血，可能因為血球 G6PD 活性降低，降低 NADPH 生成量所導致。

2. 由表二結果顯示大白鼠在注射環磷醯胺 15 天後，在血球 CAT 活性方面，注射環磷醯胺 7 天後，S 組與控制組無顯著差異，但 CP 與 CPS 組顯著下降 ( $p < 0.05$ )，反映大白鼠腹腔注射環磷醯胺誘發氧化傷害下，會造成大白鼠血球 CAT 活性下降，而這種活性下降也不因攝食 LE95 而改善。此外，大白鼠腹腔注射環磷醯胺並不影響大白鼠血球抗氧化酵素 (GRd、GPx 和 SOD) 的活性；在 GPx 和 SOD 活性方面，攝食 LE95 雖不能有效提升血球抗氧化酵素 (GPx 和 SOD) 活性，但在血球 GRd 活性方面，在注射環磷醯胺 15 天後，顯示大白鼠攝食 LE95 能夠提升血球 GRd 活性，與 GPx 和 SOD 的反應相

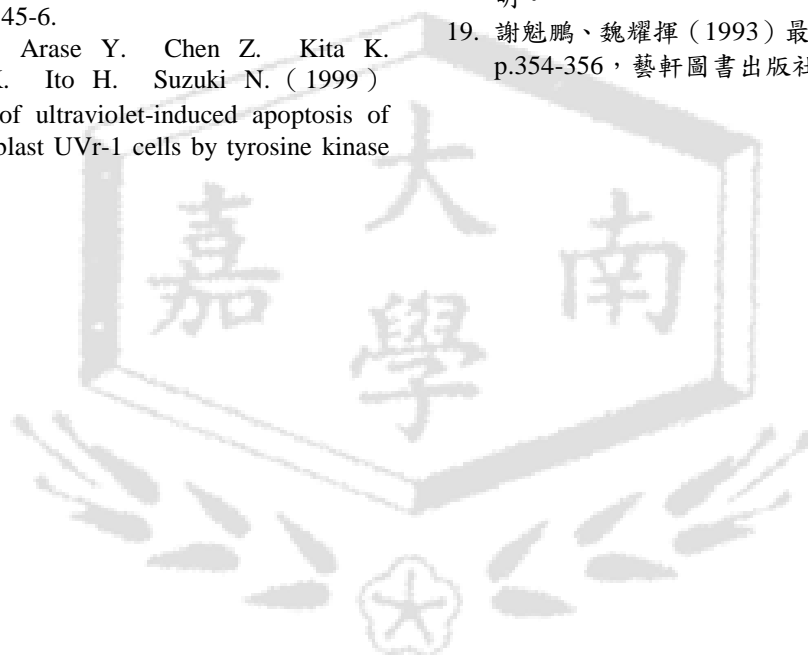
反。在血球 G6PD 活性方面，在注射環磷醯胺 15 天後，大白鼠腹腔注射環磷醯胺誘發氧化傷害下，攝食 LE95 可以緩解大白鼠血球 G6PD 活性的下降。

3. 綜合以上結果，顯示攝食 LE95 對於大白鼠遭受環磷醯胺之氧化壓力下，對血球抗氧化酵素的影響出現不一致的反應，亦難分辨是否具有保護大白鼠免於環磷醯胺誘發的氧化性傷害，需要進一步的生物體抗氧化能力分析以釐清抗氧化狀態。

#### 五、參考文獻

1. Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1989). Free radical in biology and medicine, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford.
2. Halliwell B. (1996) Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans, Free Radical Research. 25:55-74.
3. Gutteridge J. M. C., and Halliwell B., Antioxidants in nutrition health and disease, 1th edition, Oxford: Oxford University Press, 1994.
4. Zin Z.M., Abdul-Hamid A. and Osman A. (2006) Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Food Chem. 94: 169 - 178.
5. Sang S., Liu G., He K., Zhu N., Dong Z., Zheng Q., Rosen RT. and Ho CT. (2003) New unusual iridoid from the leaves of noni (*Morinda citrifolia*) show inhibitory effect on ultraviolet B-induced transcriptional activator protein-1 (AP-1) activity. Bioorganic and medicinal chemistry. 11:2499-502.
6. Zin ZM., Abdul-Hamid A. and Osman A. (2002) Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. Food Chemistry 78: 227 - 231.
7. Sang S., Cheng X., Zhu N., Stark RE., Badmaev V., Ghai G., Rosen RT. and Ho CT. (2001) Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. J. Agric. Food Chem. 49: 4478-81.
8. Liu G., Bode A., Ma WY., Sang S., Ho CT. and Dong Z. (2001) Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line. Cancer Research. 61: 5749-56.
9. Sang S., He K., Liu G., Zhu N., Cheng X., Wang M., Zheng Q., Dong Z., Ghai G., Rosen RT. and Ho CT. (2001) A new unusual iridoid with

- inhibition of activator protein-1 (AP-1) from the leaves of *Morinda citrifolia* L. *Organic Letters*. 3:1307-9.
10. Hirazumi A. and Furusawa E. (1999) An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. *Phytotherapy Research*. 13(5):380-7.
  11. Hirazumi A. Furusawa E. Chou SC. And Hokama Y. (1996) Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) fruit juice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 39:7-9.
  12. Hirazumi A. Furusawa E. Chou SC. and Hokama Y. (1994) Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 37:145-6.
  13. Hiwasa T. Arase Y. Chen Z. Kita K. Umezawa K. Ito H. Suzuki N. (1999) Stimulation of ultraviolet-induced apoptosis of human fibroblast UVR-1 cells by tyrosine kinase inhibitors. *FEBS Letters* 444:173-6.
  14. Hiramatsu T. Imoto M. Koyano T. Umezawa K. (1993) Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. *Cancer Letters*. 73:161-6.
  15. Younos C. Rolland A. Fleurentin J. Lanhers MC. Misslin R. Mortier F. (1990) Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*. 56: 430-4.
  16. 陳師瑩 (2002) 海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選。國科會計劃成果報告 (NSC 91-2626-B-041-003)。
  17. 行政院衛生署公告的健康食品之延緩衰老功能評估草案。
  18. 全自動生化分析儀 (Humalyzer 2000) 操作手冊與, Kit Chemistry of Humalyzer 試劑使用說明。
  19. 謝魁鵬、魏耀揮 (1993) 最新生物化學實驗, p.354-356, 藝軒圖書出版社, 台北市。



表一、攝食不同劑量之海巴戟天葉 95% 乙醇萃取物在大白鼠經腹腔注射處理後 7 天，對血液抗氧化酵素活性的影響

**Table 1. Effects of the activities of antioxidant enzymes during 7 days after intraperitoneal injection in blood cell on rats fed with various doses of LE<sub>95</sub><sup>1</sup>**

	CAT(K/mg Hb )	GRD( U/g Hb )	GPx( U/mgHb )	G6PD( U/g Hb )	SOD( U/mgHb )
C	8.86±4.86	12.67±3.47	0.93±0.54 <sup>b</sup>	32.02±1.00 <sup>a</sup>	3.13±0.91
S	10.75±2.13	9.70±2.82	0.98±0.41 <sup>b</sup>	32.72±0.61 <sup>a</sup>	2.28±0.64
CP	9.74±4.52	12.69±1.34	0.94±0.53 <sup>b</sup>	29.64±0.95 <sup>b</sup>	2.85±0.96
CPS	7.71±4.03	13.56±5.91	1.45±0.41 <sup>a</sup>	29.00±0.74 <sup>bc</sup>	2.08±0.97

1. Values are means ± SD for ten rats per group
2. Values in the same column with different superscript letter are significantly different at  $P < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test
3. A multiway ANOVA with nested design are analyzed. Effects of factors, interaction and doses of LE<sub>95</sub> shown in  $p$ -value are significantly different, or shown as NS are not different

CAT = catalase; GRD = glutathione reductase; GPx = glutathione peroxidase;

G6PD = glucose-6-phosphate dehydrogenase; SOD = superoxide dismutase.

表二、攝食不同劑量之海巴戟天葉 95% 乙醇萃取物在大白鼠經腹腔注射處理後 15 天後，對血液抗氧化酵素活性的影響

**Table 2. Effects of the activities of antioxidant enzymes during 15 days after intraperitoneal injection in blood cell on rats fed with various doses of LE<sub>95</sub><sup>1</sup>**

	CAT(K/mg Hb )	GRD( U/g Hb )	GPx( U/mgHb )	G6PD( U/g Hb )	SOD( U/mgHb )
C	3.05±0.66 <sup>a</sup>	8.75±1.42 <sup>b</sup>	1.01±0.15 <sup>ab</sup>	33.86±1.03 <sup>b</sup>	1.80±0.21 <sup>bc</sup>
S	3.03±0.25 <sup>a</sup>	10.01±0.99 <sup>b</sup>	0.92±0.04 <sup>b</sup>	30.96±1.60 <sup>c</sup>	1.63±0.06 <sup>c</sup>
CP	2.37±0.64 <sup>b</sup>	8.59±1.56 <sup>b</sup>	1.08±0.14 <sup>a</sup>	35.54±1.61 <sup>ab</sup>	1.92±0.14 <sup>ab</sup>
CPS	2.21±0.43 <sup>b</sup>	12.47±1.62 <sup>a</sup>	0.97±0.07 <sup>ab</sup>	36.73±5.67 <sup>a</sup>	1.75±0.38 <sup>bc</sup>

1. Values are means ± SD for ten rats per group
2. Values in the same column with different superscript letter are significantly different at  $P < 0.05$  analyzed by Duncan's multiple range test
3. A multiway ANOVA with nested design are analyzed. Effects of factors, interaction and doses of LE<sub>95</sub> shown in  $p$ -value are significantly different, or shown as NS are not different

CAT = catalase; GRD = glutathione reductase; GPx = glutathione peroxidase;

G6PD = glucose-6-phosphate dehydrogenase; SOD = superoxide dismutase.