

## 子計畫三：海巴戟天葉粗抽物對 DNA 氧化傷害之影響

整合型計畫總主持人：生物科技系葉東柏

子計畫主持人：保健營養系陳師瑩

### 一、摘要

基於本團隊過去的研究得知，海巴戟天之葉含有較高的抗氧化活性與多樣化的抗氧化特性，故選定葉的不同溶劑萃取物進行 DNA 氧化傷害之研究，以進一步分析海巴戟天的葉中所含抗氧化物質的作用與氧化傷害的保護機轉，實驗結果顯示海巴戟天葉的各萃取物不論在有或無細胞膜的情形下皆能減少·OH 所誘導淋巴球細胞 DNA 的氧化傷害，提供相當程度的保護作用，其中以絕對酒精所萃取的抗氧化物質能在 10  $\mu\text{g/mL}$  時發揮保護 DNA 氧化傷害效果，效應最佳，但濃度提高時，也有促氧化的危險；50% 乙醇及純水萃取物皆以濃度為 1 mg/mL 以上時的保護效果最明顯，而其 DNA 降解的情形隨著濃度增加而效果越顯著，推測與 50% 乙醇及純水萃取物具有清除自由基之能力外，在螯合鐵上有非常突出的能力有關。

### 二、緣由與目的

自由基或其他活性物質一旦產生，則會從身體組成的各種細胞或分子上搶走電子，包括 DNA 中的核酸、細胞膜上多元不飽和脂肪酸 (PUFA) 的位置、蛋白質分子、醣類等；而胞內的胞器如：細胞核、粒線體及內質網等也有可能受到氧化攻擊，也可能使電子傳遞鏈受到損傷，甚至粒線體破裂(1-2)。氧自由基所引起 DNA 中 purine 及 pyrimidine 結構上的傷害可能會使雙股 DNA 產生斷裂、交叉連結(cross-linkage)，若此時 DNA 的修復系統未發揮功能或發生配對錯誤時，就可能引起種種突變的現象，一些如癌症、慢性病等疾病可能就會因此而產生。若活性氧對蛋白質作攻擊則可能讓骨架上的 peptide bond 斷裂而使蛋白質結構產生變化；蛋白質的氧化傷害也可能造成胺基酸之間產生雙硫鍵的 cross linkage，使蛋白質二級或三級結構受到改變。這些情況也許會導致膜上接受器的結合力改變、酵素不活化、細胞免疫性的變異、離子通道通透性的改變、蛋白質進行不當的降解(premature degradation) 等。而自由基攻擊膜上磷脂質部位的 PUFA 則會使得油脂過氧化讓油脂分解，若發生在紅血球上，則會造成膜的破裂引發溶血；氫氧自由基及 NOO—則會誘導 LDL 的氧化形成氧化態 LDL(ox-LDL) (1-2)。

若能增加生物體內抗氧化防禦系統之作用，以清除或防止活性氧物質的產生，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(3)，如番茄、西瓜中所含的番茄紅素 (Lycopene) (4)，茶品中所含的兒茶素類物質 (Catechins) (5)，皆能防止或減緩自由基或活性氧所造成的細胞組織傷害或生理功能破壞。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，也有造成抽煙者發生肺癌的病例報告(6)，使得抗氧化相關物質的作用機轉已然成為開發具有抗氧化性質之保健食品的重要研究議題。

Sang S., 2001(7) 由海巴戟天的葉純化出新物質 flavonol glycosides 和 iridoid glycoside，經光譜分析與結構鑑定，iridoids 是由一個以五環為骨架之單類醣體，將其成份稱之 citrifolinolide，而葉中含有五種熟知的多酚類物質 (flavonol glycosides)，其中部份成份具清除 DPPH 自由基的能力；Zin Z.M. 2002(8)使用 FTC 與 TBARS 法對海巴戟天的葉、果實與根進行抗氧化活性分析，發現根以醇抽的部分抗氧化活性較高，葉、果實、根以乙酸乙酯萃取的部分皆有抗氧化活性；此外，基於本研究室過去的研究得知(9-15)，海巴戟天之葉含有較高的抗氧化活性（如較佳的清除 DPPH 自由基能力與總抗氧化能力 (TEAC)) 與多樣化的抗氧化特性（如具有最佳的清除氫氧自由基、 $\text{H}_2\text{O}_2$  的能力，與螯合鐵能力）；因此，海巴戟天的葉值得作為進一步萃取開發抗氧化物質的材料來源，而本研究的主要目的是探討海巴戟天葉粗抽物對 DNA 氧化傷害可能的保護功能與機轉。

### 三、材料與方法

#### (一) 樣品來源與粗萃取

研究材料海巴戟天係購自南部農產地，其葉子經 37°C 烘乾後，以磨粉機輾磨成粉(mesh 30)裝瓶，並置入除濕器中冷藏備用，計劃擬利用熱水(80°C)萃取水溶性物質、酒精(50°C)萃取醇溶性物質及乙酸乙酯(50°C)萃取油溶性物質等方法，進行粗萃取海巴戟天之新鮮葉，集合萃液於室溫進行減壓濃縮至乾，所得粗抽物作為本研究材料主要來源。

#### (二) 人類淋巴球的分離

取 5 mL 含真空抽血管的 heparin 之全血(由捐血中心購入人血)，加入等量的 PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, NaHPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.4)，溫和的上下反轉幾次，再將稀釋的 10 mL 全血沿管壁緩緩加入 Ficoll-paque 中(稀釋的全血：Ficoll-paque = 2:1)，使用懸臂式離心機以 2,500 rpm 離心 30 分鐘，以吸管緩緩吸出位於界面的淋巴球，加入 PBS 清洗，再次進行離心(2000 rpm, 10min)，吸去上清液丟棄，加入 1 mL PBS 使細胞懸浮並進行細胞計數。

#### (三) DNA 氧化傷害之引發

淋巴球不具細胞膜：將淋巴球 107 cells/mL 以 DNA Extraction Kit 純化出 DNA 後，將總體積 10  $\mu$ L 含 0.5  $\mu$ g DNA 與 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>、200  $\mu$ M ascorbic acid 及不同濃度的海巴戟天萃取液混勻，於 37°C 下反應 30 分鐘，加入 1 mM EDTA 1  $\mu$ l 終止反應，隨後進行 DNA fragmentation 之測定。

淋巴球具有細胞膜：將淋巴球 107 cells/mL 與 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、2 mM FeCl<sub>3</sub>、4 mM ascorbic acid 及不同濃度的海巴戟天萃取液混勻後，於 37°C 下反應 30 分鐘後離心(2000 rpm, 10min)取出上清液丟棄，以 DNA Extraction Kit 將 DNA 純化出來後進行 DNA fragmentation 之測定。

#### (四) DNA fragmentation 之測定(16)

DNA 受到氧化傷害時，常會產生大小不一的片段(fragmented DNA)，經凝膠電泳後可將降解(degradation)之產物分離開。1. 淋巴球不具細胞膜：各實驗組取同樣量(10  $\mu$ L)之反應液以 0.6% 洋菜凝膠在 0.5X TBE buffer 中進行 50 伏特，90 分鐘電泳。經 ethidium bromide 染色後以 UV transilluminator 觀察，最後以拍立得相機將電泳圖照相。

2. 淋巴球具有細胞膜：各實驗組取同樣量 (0.5  $\mu$ g) 純化之 DNA，以 0.6% 洋菜凝膠在 0.5X TBE buffer 中進行 50 伏特，90 分鐘電泳。經 ethidium bromide 染色後以 UV transilluminator 觀察，最後以拍立得相機將電泳圖照相。

### 四、結果

#### (+) Catechin

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Fe<sup>2+</sup> / VitC - + + + + +

(+) Catechin ( $\mu$ g/mL) - - 100 10 1 0.1

#### 乙酸乙酯萃取物絕對酒精萃取物

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Fe<sup>2+</sup> / VitC - + + + + + - + + + + +

Extract ( $\mu$ g/mL) - - 100 10 1 0.1 - - 100 10 1 0.1

#### 50% 酒精萃取物熱水萃取物

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Fe<sup>2+</sup> / VitC - + + + + + - + + + + +

Extract ( $\mu$ g/mL) - - 100 10 1 0.1 - - 100 10 1 0.1

圖一、海巴戟天葉各萃取物對氫氧自由基誘導無細胞膜之人類淋巴球 DNA 氧化傷害之影響。

(+) Catechin

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Fe<sup>2+</sup> / VitC - + + + + +

(+) Catechin (mg/mL) - - 50 10 1 0.1

乙酸乙酯萃取物 絕對酒精萃取物

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Fe<sup>2+</sup> / VitC - + + + + + - + + + + +

Extract (mg/mL) - - 50 10 1 0.1 - - 50 10 1 0.1

50% 酒精萃取物 熱水萃取物

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Fe<sup>2+</sup> / VitC - + + + + + - + + + + +

Extract (mg/mL) - - 50 10 1 0.1 - - 50 10 1 0.1

圖二、海巴戟天葉各萃取物對氫氧自由基誘導人類淋巴球 DNA 氧化傷害之影響。

## 五、討論

由過去抗氧化能力分析的結果得知 (11-15)，就材料而言以海巴戟天的葉中萃取物能偵測出較多樣的抗氧化特性與較高的活性，故選定葉的不同溶劑萃取物進行 DNA 氧化傷害之研究。本實驗以 Fenton reaction 產生之氫氧自由基來誘導人類淋巴球 DNA 氧化，並分成無細胞膜保護和有細胞膜保護下來探討其可能的保護機轉。在無細胞膜保護的實驗則是將人類淋巴球 DNA 直接取出以 DNA 的形態進行反應，並評估 DNA 氧化傷害之情形；而有細胞膜保護的實驗中是將人類淋巴球以完整細胞的形態進行反應，之後再將其 DNA 萃取出來觀察 DNA 氧化傷害之情形。

圖一是(+)Catechin 及海巴戟天葉四種溶劑萃取物對無細胞膜保護的淋巴球 DNA 氧化傷害之影響，在本實驗中採用已被公認具有 DNA 保護作用的(+)Catechin 做為正控制組，由圖中可以很明顯的看出加入氧化劑（如：氫氧自由基）確實會造成 DNA 產生氧化傷害進而降解成大小不一的片段(fragmented DNA)，而加入(+)Catechin 或海巴戟天葉的溶劑萃取物對於 DNA 也確實有明顯的保護作用，其中(+)Catechin 以濃度為 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ，乙酸乙酯、50% 乙醇及純水萃取物皆以濃度為 100  $\mu\text{g/mL}$  時的保護效果最明顯，且 DNA 降解的情形隨著濃度增加而跟著降低；絕對酒精萃取物在濃度 10 -0.1  $\mu\text{g/mL}$  間 DNA 降解的情形隨著濃度增加而跟著降低，但在濃度為 100  $\mu\text{g/mL}$  時其 DNA 降解的情形卻較 10  $\mu\text{g/mL}$  還明顯，可能是由於絕對乙醇萃取物中所含多酚類化合物在高濃度下反而將金屬離子 (Fe<sup>3+</sup>) 還原，而增加  $\cdot\text{OH}$  或  $\text{OH}^-$  的產生，導致促氧化作用的發生。

為了更進一步了解在細胞膜的存在下是否海巴戟天葉的溶劑萃取物亦有保護 DNA 氧化傷害的能力，故建立以氫氧自基誘導人類淋巴球 DNA 氧化模式 (data not shown)，隨著 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ascorbic acid 濃度的增加其 DNA 降解的情形也跟著增加的趨勢，但在 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 mM FeCl<sub>3</sub>, 4 mM ascorbic acid 濃度下其 DNA 降解的情形才較明顯故本實驗採用此濃度做為誘導人類淋巴球 DNA 氧化之濃度。圖二是(+)Catechin 及海巴戟天葉四種溶劑萃取物對有細胞膜保護的淋巴球 DNA 氧化傷害之影響，由圖中可以很明顯的看出 50% 乙醇及純水萃取物皆以濃度為 1 mg/mL 以上時的保護效果最明顯，而其 DNA 降解的情形隨著濃度增加而效果越顯著；而(+)Catechin、乙酸乙酯萃取物與絕對酒精萃取物以濃度為 100  $\mu\text{g/mL}$  時有保護效果，但濃度增加時不但沒有保護作用反而隨著給予的劑量增加，DNA 降解的情形也跟著增加，造成其氧化傷害更為嚴重。推測可能是海巴戟天葉的 50% 乙醇及純水萃取物與(+)Catechin、乙酸乙酯萃取物和絕對酒精萃取物所萃取出來的多酚類抗氧化物質極性不同、成分不同所致；也有可能因為 50% 乙醇及純水萃取物中含有水溶性纖維，具有螯合鐵離子的效應，進而阻斷 Fenton reaction 的發生。

綜合以上兩組實驗可以確定海巴戟天葉的各萃取物不論在有或無細胞膜的情形下皆能減少  $\cdot\text{OH}$  所誘導淋巴球細胞 DNA 的氧化傷害，提供相當程度的保護作用，其中以絕對酒精所萃取的抗氧化物質能在 10  $\mu\text{g/mL}$  時發揮保護效果，效應最佳，但濃度提高時，也有促氧化的危險。

因本實驗是以 Fenton reaction 來產生氫氧自由基，根據過取本實驗室的抗氧化活性分析(11-15)發現 50% 乙醇及純水萃取物除了具有清除自由基及些微活性氧之能力外，皆在螯合鐵上有非常突出的能力，可能是造成兩者在高濃度下部會發生促氧化的原因。

## 六、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. (1994) Antioxidants in nutrition health and disease, 1th edition, Oxford: Oxford University Press.
4. Pan H., Shi G., Chen W. and Wang D. (2003) Effect of lycopene on the function of antioxidative enzyme system in rats. Wei Sheng Yen Chiu/Journal of Hygiene Research. 32(5):441-2.
5. Chen, S.Y., Chen C.H., Wan Y.C., Chiang C.H., Chung Y.L. and Yeh D. B. (2003) Evaluation of Antioxidative activity in Noni Leaf Extracts. Chia Nan Annual Bulletin 29:87-96.
6. Bast A. and Haenen G.R.M.M. (2002) The toxicity of antioxidants and their metabolites. Environ. Toxicol. Pharmacol.11: 251-258.
7. Sang S., Cheng X., Zhu N., Stark RE., Badmaev V., Ghai G., Rosen R.T. and Ho C.T. (2001) Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. J. Agric. Food Chem. 49: 4478-4481.
8. Zin Z.M., Abdul-Hamid A. and Osman A. (2002) Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. Food Chem. 78: 227 – 231.
9. Chen, S. Y., Chen C. H., Wan Y. C., Chiang C. H., Chung Y. L. and Yeh D. B ( . 2003) Evaluation of antioxidative activity in Noni leaf extracts. Chia Nan Annual Bulletin 29:87-96.
10. Chen, S. Y., T. P. Lin<sup>2</sup>, Chung Y. L. and Yeh D. B. (2004) Studies on the antioxidant activity of crude extracts from Noni leaves。中華民國生藥學會、生藥資訊第 12 期 p114.
11. 鍾玉玲、林翠品、葉東柏、陳師瑩\* (2004) 海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選。中華民國營養學會第三十屆年會。
12. 陳師瑩 (2004) Antioxidants purification and antioxidative physiological properties of *Morinda citrifolia*。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。
13. 陳師瑩 (2003) 海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。
14. 陳師瑩、葉東柏 (2003) *Morinda citrifolia* 抗氧化活性鑑定。嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告。
15. 鍾玉玲、王瑞顯、陳師瑩 (2004) Comparison of Antioxidative Activity of Crude Extracts from Leaves, Stems and Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). Department of Biotechnology Chia-Nan University of Pharmacy and Science. Thesis for the Degree of Master.
16. McConkey D. J., et al. (1989) Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. FASEB J. 3:1843-1849.