

## 海巴戟天褐莖乙醇萃取物保護人類淋巴球細胞 遭受氧化性傷害的效應

顏名聰<sup>1</sup> 林翠品<sup>2</sup> 林美芳<sup>1</sup> 陳靜慧<sup>3</sup> 陳偉璋<sup>2</sup> 陳師瑩<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 嘉南藥理科技大學生活應用與保健系

<sup>2</sup> 嘉南藥理科技大學保健營養系

<sup>3</sup> 元培科技大學醫學檢驗暨生物技術學系

### 摘要

研究顯示人類癌症的發生與 DNA 受傷害有關。海巴戟天俗稱諾麗，生長在熱帶亞洲，其被應用在很多的傳統醫療，包括癌症。本研究利用彗星試驗探討海巴戟天褐莖乙醇萃取液 (BSE) 與其各正己烷、正丁醇、乙酸乙酯及水層分配相，保護人類淋巴球細胞免於遭受過氧化氫誘發 DNA 氧化傷害的效果。結果顯示 BSE 中同時含有抗氧化及促氧化的物質存在，其中正-己烷分配相 (BSE-H)，濃度在 25~50  $\mu\text{g/mL}$  時，不具基因毒性，且具有顯著保護淋巴球細胞免於遭受到過氧化氫傷害的效應，綜合本研究顯示 BSE-H 中的成分清除 DPPH 自由基的能力不高，多屬非多酚類物質，並具有油溶性特性。

**關鍵詞：**海巴戟天，氧化傷害，人類淋巴球細胞，彗星試驗

\*通訊作者：嘉南藥理科技大學保健營養系

Tel: +886-6-2664911-3403

Fax: +886-6-2667327

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

### 壹、前言

與癌症相關的疾病超過一百種以上，但都有一個共通點，就是基因突變，研究顯示人類癌症的發生與 DNA 受傷害有關 (Ames, 1989; Cerutti, 1991; Block, 1992; Cerutti, 1994; Beckman, 1997; Halliwell, 1998); 因此，檢測 DNA 受傷害程度可以間接預測癌症發生的危險機率 (Fenech, 2002)。很多方法可作為評估 DNA 受傷害程度，如：Micronucleus assay (DNA damage biomarkers) (Fenech, 2000)，然而此方法只能評估增生期的細胞 (proliferating cells) (Betti, Davini, Giannessi, Loprieno, & Barale, 1994); Ames test 經常被用來評估 DNA 受傷害程度 (Ames, 1989)，然而此方法只用在評估原核細胞 (prokaryotic cells; bacterial

cells); Comet assay 則可以在 *in vitro* 及 *in vivo* 的條件下分析不同的真核細胞 (eukaryotic cells) 之 DNA 受傷害程度 (Rojas, 1999; Chen, 2003)，因為具有簡單、快速、靈敏的特點，而被廣泛應用於毒理學、生物學、醫學及環境生物監測等領域。由於可以使用人體血球細胞當模式，來檢測測試物質的抗氧化或 DNA 傷害能力，故具有接近人體試驗結果的分析方法。突變的原因很多，大多數源自於生活型態或環境與飲食因素；如何防止基因突變，進而減少癌症之衍生，為預防醫學重要研究重點。因此，利用彗星試驗檢測系統，篩選具有防止 DNA 氧化、斷裂與抑癌作用的生物資源，可做為將來臨床醫學或保健食品之應用。

海巴戟天 (*Morinda citrifolia* L.) 屬茜草科 (Rubiaceae) 植物，其俗名為 Noni (Hirazumi, 1994; Wang, 2002)，台灣文獻則稱檄樹、水冬瓜、紅珠樹，其他別名還包括蘿梨、四季果、精力果、長壽果等，印度稱為桑椹故又名印度桑椹 (Indian mulberry)。由於本植物為台灣民間盛行之保健食品，由於種植及採收容易，故南部農民對於種植該類植物的興趣相當濃厚，目前已有供應國內外廠商及餐飲業使用。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，各部位並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 (Hirazumi, 1994; Wang, 2002)。關於海巴戟天所含的化學成分，從花 (Tiwari & Singh, 1997)、果實 (Levand, 1979; Mingfu, 1999)、葉 (Ahmad, 1980; Sang, 2001)、種子 (Daulatabad & Mulla, 1989)、根 (Rusia & Srivastava, 1989) 及心材 (Srivastava & Singh, 1993) 等部分，共鑑定出屬於 Anthraquinone glycosides (Tiwari, 1997; Rusia, 1989; Srivastav, 1993)、Flavone glycosides (Sang, 2001; Rusia, 1989)、Fatty acid (Levand, 1979; Mingfu, 1999; Daulatabad, 1989)、Iridoid glycosides (Sang et al., 2001)、Steroids (Ahmad & Bano, 1980)、Triterpenoids (Sang, 2001) 及 Polysaccharide-rich substance (Hirazumi & Fursawa, 1999) 等類型的成分；然而，對於提供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相當不足，其中針對果實與葉子進行的生物活性分析的研究報告最多 (Wang, 2002; Hirazumi, 1999; Zin, 2006)，而莖相關的研究則付之闕如。

許多研究顯示海巴戟天成分中富含抗氧化物質 (Wang, 2002; Levand, 1979; Sang, 2001; Rusia, 1989; Srivastav, 1993; Zin, 2006)，以及在本研究室研究成果 (Chen, 2003; Chen, 2009) 中發現：除了乙醇粗萃取的海巴戟天之葉比其他粗萃取方式 (乙酸乙酯及熱水萃取) 與部位 (果實、青莖與褐莖)，具有較佳的總抗氧化能力 (TEAC)、清除 DPPH 自由基能力，並具有顯著的清除氫氧自由基、過氧化氫的能力及螯合鐵的能力外；另以海巴戟天褐莖在低溫高壓的條件下進行超臨界二氧化碳萃取 (SFE-CO<sub>2</sub>)，亦具有良好的總抗氧化能力 (TEAC)、清除 DPPH 自由基、超氧自由

基、氫氧自由基的能力及螯合鐵的能力，顯示葉與褐莖的抗氧化特性皆具多樣化，但活性成分的化學特性應截然不同，葉中活性成分具醇溶性特徵，並與多酚類物質有關；然而褐莖活性成分應與二二氧化碳適合萃取出油溶性化學特性相似，基於油溶性抗氧化活性物質的研究鮮少研究，再加上一般農民對海巴戟天褐莖皆以廢棄物處理，實在棄之可惜，本研究對褐莖進行初步研究，期待研究結果能帶動廢棄物再利用，以增加其經濟效益，並喚起更多研究人員對開發海巴戟天褐莖的重視。

## 貳、材料及方法

### 一、試驗材料

海巴戟天褐莖係取自於臺南縣學甲鎮仁安農園，經 37°C 烘乾 5 天後，由磨粉機輾磨過篩 (20 mesh) 後裝瓶，並置入除濕器中於 -80°C 下保存 (Chen et al., 2009)。

### 二、萃取與分離

#### (一) 95%乙醇萃取

將乾燥粉碎之海巴戟天褐莖與 95% 乙醇以 1:10 的比例混合，於 80°C 水浴加熱，待其沸騰後計時 2 小時迴流萃取，再以同比例換新的乙醇進行萃取，重覆上述步驟共三次。所得的樣品先以紗布進行粗過濾，再進行抽氣過濾。所得樣品放入 -80°C 冰箱中保存，部分樣品則經恆重後作為定量標準。

#### (二) 有機溶劑的液-液相分層

將海巴戟天褐莖 95% 乙醇萃取物 (BSE) 逐步利用分液漏斗以有機溶劑 *n*-Hexane、*n*-Butanol 及 Ethyl acetate 逐步進行液液相分離，請參見圖一分離流程，可分別得到三個有機層及一個水溶性層的萃取物，分別以 BSE-H, BSE-B, BSE-EA 及 BSE-A 作為各層的簡稱。

### 三、總酚類含量測定及抗氧化活性分析

#### (一) 總酚類化合物含量測定

參考 Germano et al. (2002) 之方法，測定總酚類化合物含量 (total phenolic content, TPC)，並以 gallic acid 當做標準品。以不同濃度 100 μL 的 gallic acid 甲醇溶液，各加 0.2 mL Folin-Ciocalteu phenol



reagent，搖勻後再加入 1 mL 15%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液及 1 mL 去離子水後混勻，於室溫下反應 2 小時後，以  $8,000 \times g$  離心 10 分鐘，取上清液測其 765 nm 吸光值，做出標準曲線。再以同樣條件測定試驗樣品後與標準曲線比較，算出試驗樣品總酚類化合物的含量。

#### (二) 清除 DPPH 自由基能力之測定

清除 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate, (DPPH $\cdot$ ) 自由基能力測定依 Shimada, Fujikawa, Yahara, and Nakamura (1992) 之方法，至少取 5 個不同濃度有機分層樣品 500  $\mu\text{L}$ ，分別加入 0.2 mM DPPH 之甲醇溶液 500  $\mu\text{L}$ ，於 37°C 避光反應 30 分鐘後，以  $8,000 \times g$  離心 10 分鐘，測其 517 nm 之吸光值。空白試驗 (Blank) 以樣品溶劑取代樣品，將吸光值與樣品濃度作圖，計算出樣品清除 50% DPPH 自由基時所需濃度 ( $\text{EC}_{50}$ )。

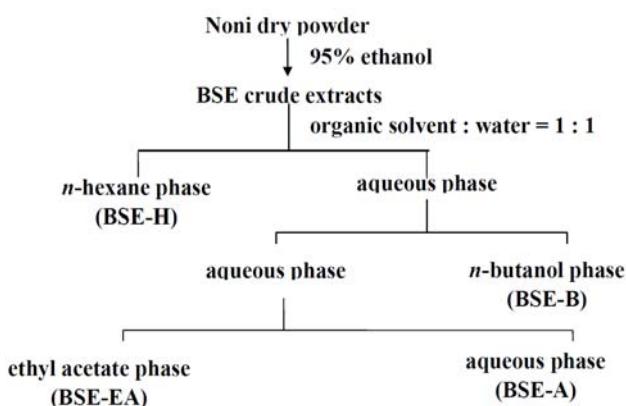


圖 1、有機溶劑的液-液相分層流程圖

## 四、彗星試驗

#### (一) 人類淋巴球之製備

健康人類血液之取得，係經嘉南藥理科技大學人體試驗委員會審查通過，並由捐贈者填寫同意書後，進行採血。取 5 mL 含 heparin 之全血，加入等量的 PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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, 10 min)，吸去上清液丟棄，加入 1mL PBS 使細胞懸浮並進行細胞計數，並調整細胞數至  $1 \times 10^6$  cell/mL 後

進行試驗。

#### (二) 對人類淋巴球 DNA 氧化傷害之保護作用與基因毒性分析

液-液相分層後樣品，以 dimethyl sulphoxide (DMSO) 回溶，實驗組之研究材料皆依「系列稀釋濃度」的原則，以 PBS 稀釋，並控制 DMSO 最終濃度為 0.1% 下測定。每次試驗材料對保護人類淋巴球細胞免於遭受到過氧化氫氧化傷害的研究，會包含下列各組：控制組係不含研究材料與不接受過氧化氫處理；正對照組以 quercetin 替代研究材料，並接受過氧化氫處理；負對照組不含研究材料，但接受過氧化氫處理。基因毒性的研究設計同前，唯各組皆不添加過氧化氫。每組實驗處理至少三重複。

試驗開始時取 50  $\mu\text{L}$  細胞懸浮液與 50  $\mu\text{L}$  試驗樣品，於 1 mL 離心管中震盪混合均勻，於 37°C, 150 rpm 反應 30 min 後，離心 ( $800 \times g$ , 20°C, 3 min)，倒掉上清液，加入 PBS 清洗，重複離心、去上清液等步驟 3 次。再加入 PBS 至 50  $\mu\text{L}$ ，用微量吸管沖洗附著在管底的淋巴球細胞，添加 50  $\mu\text{L}$  過氧化氫 (50  $\mu\text{M}$ )，於 37°C, 150 rpm 下反應 10 min，倒掉上清液，加入 PBS 清洗，重複離心、去上清液等步驟 3 次。

於 37°C 下取上述反應後的細胞懸浮液 10  $\mu\text{L}$  嵌入 75  $\mu\text{L}$  的 low-melting agarose (LMA；濃度為 0.5 %) 中混合，再將其平鋪在已覆蓋一層 0.5% normal-melting agarose (NMA；熔點約 45-50°C) 之載玻片上 (此時共有 2 層 agarose)。待 LMA 固化後，將其浸泡在 lysis buffer (pH 10.0) 中 10 分鐘，隨後移至 alkaline buffer (pH 13.0) 中 10 分鐘，在鹼性條件下 (pH 13.0) 進行電泳 15 分鐘 (30V, 300 mA)，電泳完成後再浸泡於 Tris buffer (pH 7.4；Neutralization buffer) 10 分鐘，最後浸泡於甲醇溶液 10 分鐘，待乾燥後加入 10  $\mu\text{L}$  propidium iodide 染色 (避光)，並於螢光顯微鏡下觀察 (Szeto, 2002)。

#### (三) DNA 傷害及傷害分數之分析：

以 400 × Nikon 螢光顯微鏡隨機觀察及計算 50 個各別淋巴球，以 comet image software 計算 Tail Moment 作為評估指標。Tail Moment = percent of DNA in the tail × tail length ( $\mu\text{m}$ )。本實驗將所觀察的淋巴球 Tail Moment 值 (單位為  $\mu\text{m} \times \text{percentage tail fraction}$ )，依據 Quartile 百分位的分佈狀況，分為 4



個等級 (單位為 arbitrary unit)，再執行統計分析。

酚類物質的含量不多。

## 伍、統計分析

數據以 Statistical Analysis System (SAS) 進行 ANOVA 變異數分析，並以 Tukey's Multiple Range Tests 比較各組間顯著差異程度 ( $P < 0.05$ )，所得數據以平均值±標準誤 (Mean ± SE) 表示。

## 參、結果及討論

### 一、褐莖萃取液在各有機分配相中的產率

表一結果顯示海巴戟天褐莖的乙醇萃取率為 4.46%；依序再經正-己烷、正-丁醇、乙酸乙酯及水層液-液相分配後，產率分別為褐莖的 0.41%、0.64%、0.06 及 2.76%。海巴戟天褐莖的乙醇萃取率顯著低於果實乙醇萃取率 (15.17%) 與葉的乙醇萃取率 (37.29%) (陳，2006)；但優於超臨界二氧化碳萃取海巴戟天各部位的效率(0.22-1.97%) (Chen, 2009)。

表 1、褐莖萃取液在各有機分配相中的產率

partitioned phases	(g)	(%)*	(%)**
BSE	53.76	100.00	4.46
BSE-H	4.98	9.26	0.41
BSE-B	7.73	14.37	0.64
BSE-EA	0.72	1.34	0.06
BSE-A	33.32	61.98	2.76

\*: 各有機分配相相對於 BSE 的產率。

\*\*: 各有機分配相相對於 1,206 克褐莖粉末的產率。

### 二、褐莖萃取液的總酚類含量與抗氧化能力分析

表二中顯示 BSE-EA 中的總多酚類物質含量最多 (69.35 mg/g)，BSE-H 中的總多酚類物質含量最低 (8.71 mg/g)。BSE-B 及 BSE-EA 具有較好的清除 DPPH 自由基的能力，BSE-A 清除 DPPH 自由基的能力最低，其次為 BSE-H。褐莖各有機分配相所含總多酚類含量與其清除 DPPH 自由基的能力顯然有關，與一般研究皆顯示清除 DPPH 自由基的能力與總多酚類含量呈正相關，不謀而合(Zin, 2006; Chen, 2009)。然而，適合萃取多酚類物質的萃取溶劑，如乙酸乙酯分配相，其萃取率並不高，顯示褐莖乙醇萃取液中所含多

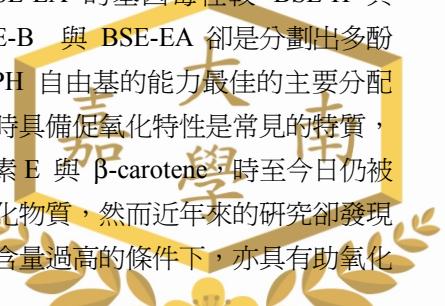
### 三、褐莖各分配相的基因毒性

圖二顯示 BSE 濃度在 25-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，對人類淋巴球細胞沒有顯著基因毒性；但在 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  高濃度時，淋巴球細胞中 DNA 傷害的程度有顯著增加的趨勢 (與控制組相較， $P < 0.05$ )，但 DNA 傷害程度仍顯著低於 50  $\mu\text{M}$  過氧化氫所造成的基因傷害 (與負對照組相較， $P < 0.05$ )。BSE-H 濃度在 0.1~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，對於人類淋巴細胞皆沒有顯著基因毒性，由於此分配相的油溶性特徵，嚴重影響在極性溶劑中的溶解度，因此未能評估大於 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的劑量，是否造成基因的氧化傷害。BSE-B 濃度在 25-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，對人類淋巴球細胞有顯著基因毒性 (與控制組相較， $P < 0.05$ )；但在 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  高濃度時，淋巴球細胞中 DNA 傷害的程度顯著增加 (與控制組相較， $P < 0.05$ )，並與 50  $\mu\text{M}$  過氧化氫所造成的基因傷害程度相似 (與負對照組相較， $P > 0.05$ )。BSE-EA 則隨著濃度的增加 (25-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，淋巴球細胞中 DNA 傷害的程度有增加的趨勢，其中在高濃度 200-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，DNA 傷害的程度顯著高於控制組 ( $P < 0.05$ )，但低於負對照組相較 ( $P < 0.05$ )。BSE-A 不論濃度高低 (25~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，對於人類淋巴球細胞的基因毒性皆不顯著。

表 2、褐莖萃取液在各有機分配相的總酚類含量與清除 DPPH 自由基的能力分析

partitioned phases	TPC (mg/g)	DPPH EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
BSE	18.25±0.21	232.27±7.82
BSE-H	8.71±0.33	681.17±5.46
BSE-B	55.52±3.63	167.33±1.89
BSE-EA	69.35±0.68	98.10±1.11
BSE-A	17.72±0.43	845.20±4.53

綜合基因毒性分析的結果，顯示 BSE 分配相中的 BSE-B 與 BSE-EA 的基因毒性較 BSE-H 與 BSE-A 高，而 BSE-B 與 BSE-EA 却是分割出多酚類物質與清除 DPPH 自由基的能力最佳的主要分配相。抗氧化物質同時具備促氧化特性是常見的特質，如抗壞血酸、維生素 E 與  $\beta$ -carotene，時至今日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血鐵質含量過高的條件下，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，也有加速抽煙者發生肺癌的病例報告 (Bast, 2002)。Alia, Mateos, and Ramos (2006) 以 HepG2 為受試細胞，觀察到以 rutin 及 quercetin 作為抗氧化的試驗樣品時，會降低細胞內活性氧分子的含量及脂質過氧化物質 (MDA) 的生成量，顯示具有抗氧化效應，但在高濃度 50-100  $\mu\text{M}$  的 quercetin 却降低 catalase 活性，100  $\mu\text{M}$  的 rutin 降低 glutathione reductase 酶素活性 (Alia, 2006)，這個結果與生物體抗氧化能力與抗氧化酶素活性成正相關的觀念亦不相符合。本實驗室研究亦顯示 rutin 及 quercetin 的劑量越高，對人類淋巴球細胞的基因毒性也越高 (data not shown)。

#### 四、褐莖各分配相保護人類淋巴球細胞免於遭受到氧化傷害的效果

圖三顯示 BSE 濃度在 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，其保護人類淋巴球細胞免於遭受到過氧化氫傷害的效果與 Quercetin (5  $\mu\text{M}$ ) 相似 (與正對照組相較， $P>0.05$ )；但是 BSE 在高濃度 (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 時，卻明顯的提高了淋巴球細胞中 DNA 氧化傷害的程度 (與負對照組相較， $P<0.05$ )，結果中顯示 BSE 具最佳抗氧化的濃度在 25~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之間，濃度太高反而有加重氧化壓力的危險。BSE-H 濃度在 25-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，可以達到與 Quercetin (5  $\mu\text{M}$ ) 相似的保護效果；但濃度太低 (0.1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 時，無法看出 BSE-H 的保護效果。BSE-B 濃度在 100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，具有些微保護人類淋巴球細胞免於遭受到過氧化氫傷害的效果。BSE-EA 在低濃度 (25-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 時，與 Quercetin (5  $\mu\text{M}$ ) 具備相似的保護效應；但在 100~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的濃度時，無法有效保護人類淋巴球細胞受到過氧化氫的氧化性傷害。BSE-A 不論濃度高低 (25~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，皆不具保護人類淋巴球細胞中 DNA 遭受過氧化氫的氧化傷害。

綜合上述分析的結果，顯示 BSE 分配相中的 BSE-H 與 BSE-EA 在 25~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的濃度時，保護人類淋巴球細胞免於過氧化氫的氧化性傷害，效果最佳。BSE-EA 的效果可能源自於良好的清除 DPPH 自由基的能力與多酚類物質成分較高有關 (Gutteridge, 1994; Halliwell, 1996; Rice-Evans, 2003)；但 BSE-H 中的成分具有油溶性特性，多屬非多酚類物質，且清除 DPPH 自由基的能力不高，值得進一步純化鑑定；然而，BSE-H 受限於溶解度的影響，不能推知大於 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，是否亦具相同效應，故仍需進一步分析研究。

#### 五、褐莖各分配相保護人類淋巴球細胞免於遭受到氧化傷害的最適條件

依據表三，同時考慮海巴戟天褐莖各分配相保護人類淋巴球細胞免於遭受氧化傷害的效應，及其基因毒性等兩項因素，可以推算出海巴戟天褐莖各分配相最適作用濃度或分劃條件，本文簡稱之為選擇性指標 (selective index)。選擇性指標係將兩項因素之 Tail moment 的級數相乘而得，分數越低越符合最適作用濃度或分劃條件，亦即反映該測試樣品之基因毒性較低，且/或保護人類淋巴球細胞免於遭受氧化傷害的效應越佳。

表 3、最適作用濃度和/或分劃條件之評估

	$\mu\text{g}/\text{mL}$	selective index*
<b>Blank</b>	—	0.94±0.12
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>	50 $\mu\text{M}$	4.67±0.21
<b>Quercetin</b>	5 $\mu\text{M}$	1.13±0.08
<b>BSE</b>	25	1.46±0.06 <sup>c</sup>
	50	1.69±0.04 <sup>c</sup>
	100	2.03±0.19 <sup>bc</sup>
	200	2.81±0.30 <sup>b</sup>
	400	4.12±0.54 <sup>a</sup>
<b>BSE-H</b>	0.1	1.91±0.20 <sup>ab</sup>
	1	2.65±0.15 <sup>a</sup>
	10	2.50±0.17 <sup>a</sup>
	25	1.43±0.03 <sup>b</sup>
	50	1.41±0.08 <sup>b</sup>
<b>BSE-B</b>	25	2.6±0.050 <sup>ab</sup>
	50	2.95±0.26 <sup>a</sup>
	100	2.03±0.07 <sup>b</sup>
	200	2.02±0.12 <sup>b</sup>
	400	3.11±0.54 <sup>a</sup>
<b>BSE-EA</b>	25	1.66±0.02 <sup>c</sup>
	50	1.75±0.10 <sup>bc</sup>
	100	2.53±0.28 <sup>abc</sup>
	200	2.73±0.19 <sup>ab</sup>
	400	3.03±0.36 <sup>a</sup>
<b>BSE-A</b>	25	2.50±0.14 <sup>ab</sup>
	50	2.24±0.20 <sup>ab</sup>
	100	2.88±0.06 <sup>ab</sup>
	200	3.20±0.17 <sup>a</sup>
	400	2.00±0.22 <sup>b</sup>

\*選擇性指標 (selective index) 係將測試樣品對淋巴球細胞之基因毒性與保護 DNA 免於氧化傷害效應之 Tail moment 的級數相乘而得。

<sup>a,b,c</sup> 以 Tukey's Multiple Range Tests 進行各組統計檢定，並以不同上標符號表示達顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



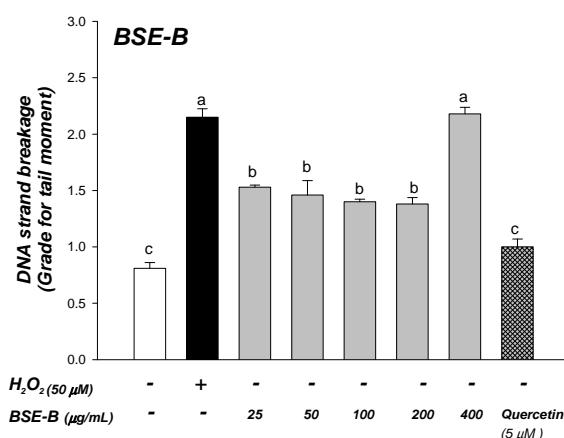
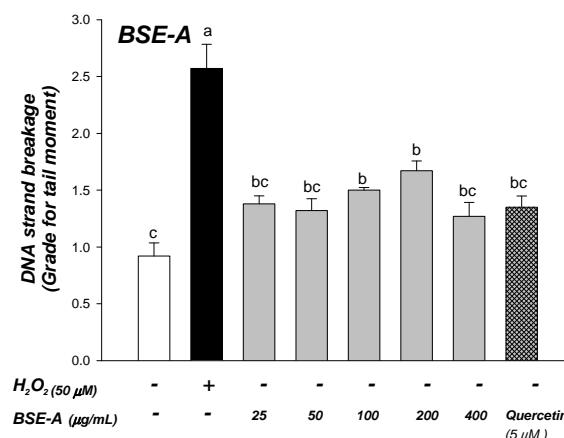
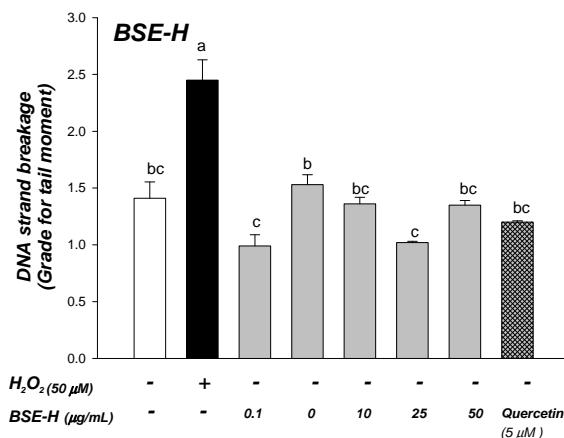
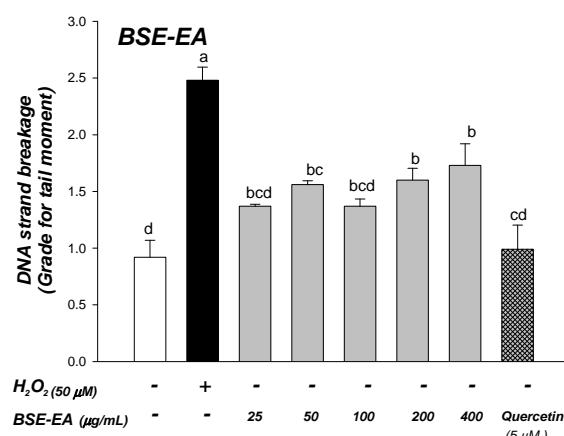
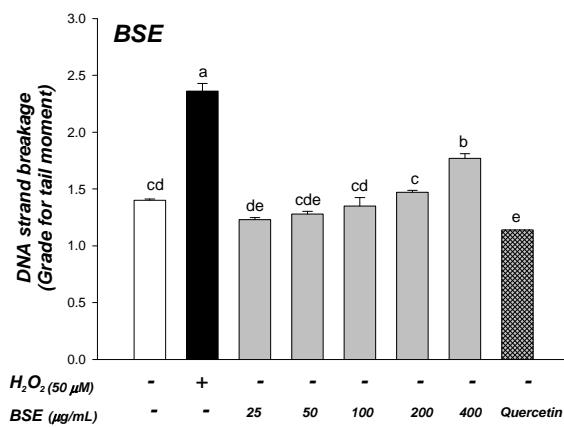


圖 2、褐莖乙醇萃取物與各分配相對淋巴球細胞的基本毒性。灰底柱狀圖係添加褐莖乙醇萃取物或液-液相分層後，以 DMSO 回溶的測試樣品；白底柱狀圖係不含測試樣品；黑底柱狀圖不含測試樣品，但接受過氧化氫處理；網底柱狀圖以 quercetin 替代測試樣品。各組溶劑皆為 PBS，內含 DMSO 最終濃度為 0.1%。所得數據以平均值±標準誤 (Mean ± SE) 表示，以 Tukey's Multiple Range Tests 進行各組統計檢定，並以不同上標符號表示達顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



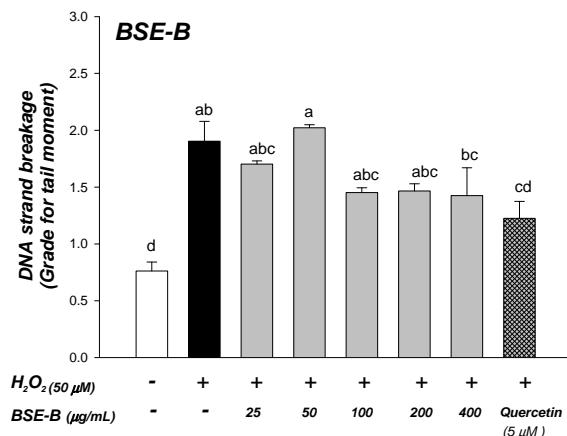
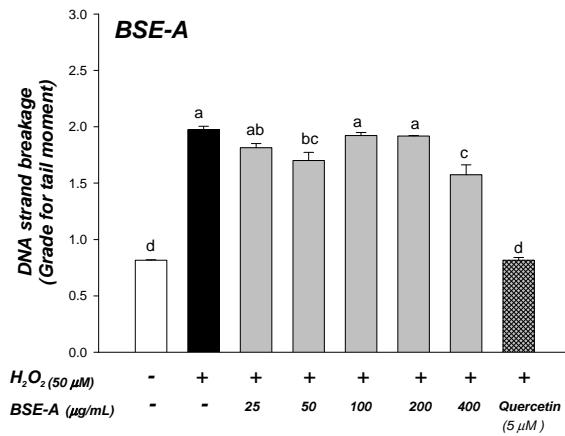
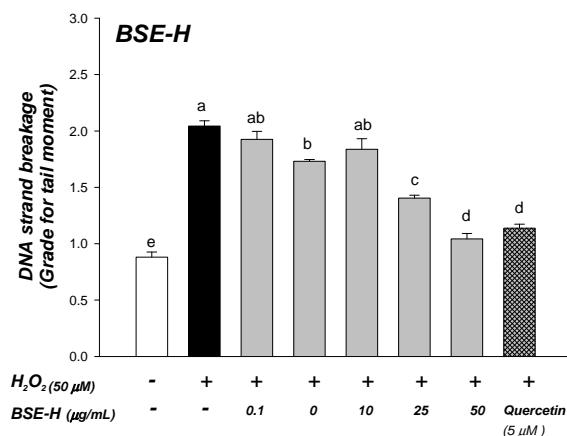
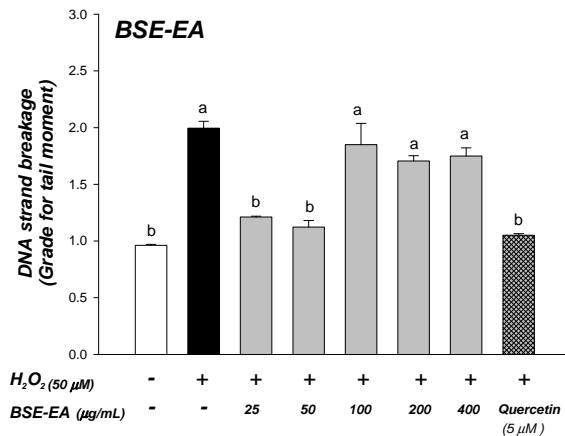
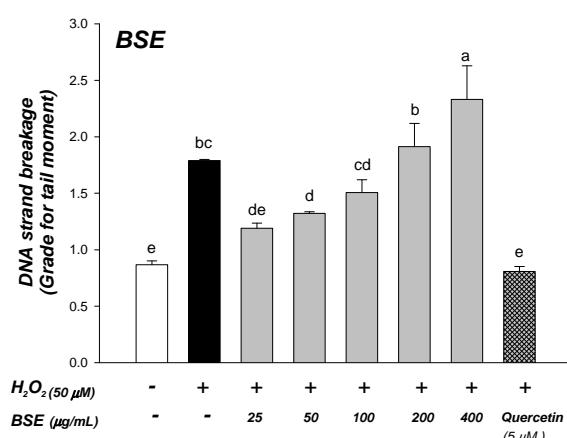


圖 3、褐莖乙醇萃取物與各分配相保護淋巴球細胞免於遭受到氧化傷害的效果。灰底柱狀圖係添加褐莖乙醇萃取物或液-液相分層後，以 DMSO 回溶的測試樣品，隨後接受過氧化氫處理；白底柱狀圖係不含測試樣品，亦不接受過氧化氫處理；黑底柱狀圖不含測試樣品，但接受過氧化氫處理；網底柱狀圖以 quercetin 替代測試樣品，隨後接受過氧化氫處理。各組溶劑皆為 PBS，內含 DMSO 最終濃度為 0.1%。所得數據以平均值±標準誤 (Mean ± SE) 表示，以 Tukey's Multiple Range Tests 進行各組統計檢定，並以不同上標符號表示達顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



依據選擇性指標顯示 BSE、BSE-H、BSE-EA 的最適作用濃度皆在 25~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而 BSE-B 與 BSE-A 分配相之所有作用濃度的選擇性指標皆相對高於 2，為最不適宜的分劃條件。此外，高濃度 (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 BSE，明顯同時提高了淋巴球細胞中 DNA 氧化傷害的程度（促氧化）與其基因毒性，其選擇性指標大於 4 相對過高，顯示 BSE 中含有的促氧化或基因毒性物質相對較高，有進一步分劃的必要。BSE-EA 在濃度 100~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下的選擇性指標皆高於 2，亦顯示 BSE-EA 保護人類淋巴球細胞受到過氧化氫的氧化性傷害的效果不佳，且同時具有基因毒性；顯示 BSE-EA 僅在低濃度下才為安全劑量。

綜合以上討論，BSE 中同時含有生物活性與基因毒性的物質，如果要開發應用，有進一步分劃的必要；經液-液相分配後，BSE-H 濃度在 25~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，將不具基因毒性，安全性較高，且具有顯著保護人類淋巴球細胞免於遭受到過氧化氫傷害的效果，同時 BSE-H 的成分具有油溶性特性，又多屬於非多酚類物質，推測成分中含有新穎性生物活性物質，並可能藉由引發細胞內訊息傳遞 (cell signaling) 達到保護 DNA 免於氧化傷害的效果。

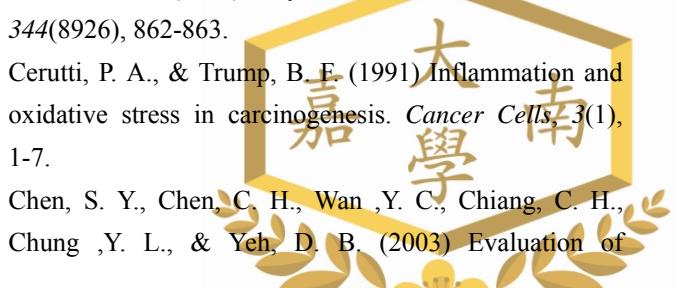
除了維生素 A 與 E 為常見的油溶性天然抗氧化物質外，生育三烯酚 (Tocotrienol) 也是油溶性、非多酚類的抗氧化物，研究顯示其能減少氧化物對細胞 DNA 造成的傷害；本研究 BSE-H 中的成分，是否具有類似物質或是新穎性成分需進一步成分分析。Rice-Evans (2003) 的研究指出部分多酚類物質，如 quercetin，雖具備清除自由基的能力，亦可以藉由影響細胞內訊息傳遞的方式，間接達到保護 DNA 免於氧化傷害的效果；類似研究結果，發現抗氧化力不高的 hesperetin (Htn) 在生理濃度下呈現高度 DNA 保護作用，係歸因於觸發 ER 及 TrkA 訊息傳遞之特性，此外 Htn 可經由 ER 及 TrkA 媒介其 ROS 清除，同時經由 ER 及 TrkA 活化 Akt/PKB, extracellular signal-regulated kinase (ERK) 及 cAMP response element-binding protein (CREB) 等方式保護 DNA 免於氧化傷害 (黃，2010)。因此，抗氧化能力不應作為解釋保護 DNA 免於氧化傷害的唯一機轉；此外，抗氧化能力的強弱比較，會受到分析檢測或比較的方法不同，而出現不一致的結果。

## 肆、謝辭

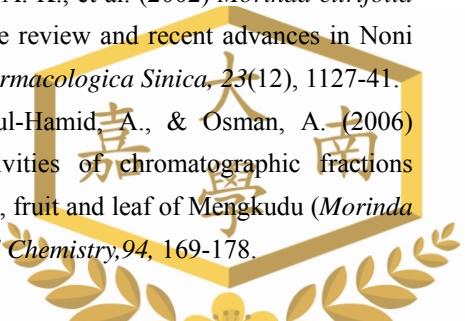
感謝嘉南藥理科技大學 (CNHN-93-01) 與國科會部分經費 (NSC92-2626-B041-002) 的補助。

## 伍、參考文獻

- 陳建丞 (2006)。海巴戟天萃取物對人類血球細胞遭受氧化性傷害的保護效應。未發表的碩士論文，嘉南藥理科技大學，台南，中華民國。
- 黃三龍 (2010)。橙皮素對氧化傷害下 PC12 細胞之保護作用及其機制探討。未發表的博士論文，中興大學，台中，中華民國。
- Ahmad, V. U., & Bano, M. (1980) Isolation of  $\beta$ -sitosterol and ursolic acid from *Morinda citrifolia* Linn. *Journal of the Chemical Society of of Pakistan*, 2, 71.
- Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., & Goya, L. (2006) Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition*, 45, 19–28.
- Ames, B. N. (1989) Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutation Research*, 214(1), 41-46.
- Bast, A., & Haenen, G. R. M. M. (2002) The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 251-258.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1997) Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 19633-19636.
- Betti, C., Davini, T., Giannessi, L., Loprieno, N., & Barale, R. (1994) Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*, 307(1), 323-333.
- Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992) Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition Cancer*, 18(1), 1-29.
- Cerutti, P. A. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, 344(8926), 862-863.
- Cerutti, P. A., & Trump, B. F. (1991) Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells*, 3(1), 1-7.
- Chen, S. Y., Chen, C. H., Wan ,Y. C., Chiang, C. H., Chung ,Y. L., & Yeh, D. B. (2003) Evaluation of



- Antioxidative activity in Noni Leaf Extracts. *Chia Nan Annual Bulletin*, 29, 87-96.
- Chen, C. H., Lin, T. P., Chung, Y. L., Lee, C. K., Yeh, D. B., & Chen, S. Y. (2009) Determination of antioxidative properties of *Morinda citrifolia* using near supercritical fluid extraction. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17 (5), 333-341.
- Chen, C. Y., Wang, Y. F., Huang, W. R., & Huang, Y. T. (2003) Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 18 (3), 153-159.
- Daulatabad, C. D., & Mulla, G. M. (1989) Ricinoleic acid in *Morinda citrifolia* seed oil. *Journal of the Oil Technologists' Association of India*, 21, 26-27.
- Fenech, M. (2002) Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181-182, 411-416.
- Fenech, M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455(1-2), 81-95.
- Germano, M. P., De Pasquale, R., D'Angelo, V., Catania, S., Silvari, V., & Costa, C. (2002) Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 50, 1168-1171.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell B. (1994) *Antioxidants in nutrition health and disease*, (1 st ed.). Oxford: Oxford University Press..
- Halliwell, B. (1996) Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, 25, 55-74.
- Halliwell, B. (1998) Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radical Research*, 29(6), 469-486.
- Hirazumi, A., & Furusawa, E. (1999) An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. *Phytotherapy Research*, 13, 380-387.
- Hirazumi, A., Furusawa, E., & Chou, S. C. (1994) Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted lewis lung carcinoma in syngeneic mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 37, 145-146.
- Levand, O., & Larson, H. (1979) Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*, 36, 186-187.
- Mingfu, W., Hiroe, K., Katalin, C., Charles, D. B., Alika, M., Sheri, F. T. F., et al. (1999) Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 47, 4880-4882.
- Rice-Evans, C., & Packer, L. (2003) *Flavonoids in health and diseases*. Marcel Decker Inc., New York.
- Rojas, E., Lopez, M. C., & Valverde, M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications*, 722 (1-2), 225-254.
- Rusia, K., & Srivastava, S. K. (1989) A new anthraquinone from the root of *Morinda citrifolia* Linn. *Current Science*, 58, 249.
- Sang, S., Cheng, X., Zhu, N., Stark, R. E., Badmaev, V., Ghai, G., et al. (2001) Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 49, 4478-4481.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 40, 945-948.
- Srivastava, M., & Singh, J. (1993) A new anthraquinone glycoside from *Morinda citrifolia*. *Journal of Pharmacognosy*, 182-184.
- Szeto, Y. T., Collins, A. R., & Benzie, I. F. (2002) Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutation Research*, 500(1-2), 31-38.
- Tiwari, R. D., & Singh, J. (1997) Structural study of the anthraquinone glycosides from the flowers of *Morinda citrifolia*. *Journal of the Indian Chemical Society*, 54, 429-430.
- Wang, M. Y., West, B. J., Jensen, C. J., Nowicki, D., Chen, S. U., Palu, A. K., et al. (2002) *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(12), 1127-41.
- Zin, Z. M., Abdul-Hamid, A., & Osman, A. (2006) Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chemistry*, 94, 169-178.



## The effects of *Morinda citrifolia* brown stem ethanol extracts on protecting human lymphocytes from oxidative damage

Ming Tsung Yen<sup>1</sup> Tsuey Pin Lin<sup>2</sup> May Fang Lin<sup>1</sup> Chin Hui Chen<sup>3</sup>  
Wei Wei Chen<sup>2</sup> Shih Ying Chen<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Life Science and Health,

<sup>2</sup>Department of Health and Nutrition,

Chia-Nan University of Pharmacy and Science,

Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

<sup>3</sup>Department of Medical Technology,

Yuanpei University of Science and Technology, Taiwan, ROC.

### Abstract

Studies have shown that the incidences of human cancer are associated with DNA damage. *Morinda citrifolia* commonly known as Noni, is a plant typically found in the tropical Asia. The plant has been used traditionally as a folk remedy for many diseases including cancers. In this study, we examined the effects of the ethanolic extracts from the Noni's brown stem (BSE), and *n*-hexane-, *n*-butanol-, ethyl acetate-, and H<sub>2</sub>O-soluble partitioned phases obtained from BSE on protective from hydrogen peroxide induced DNA damage within purified healthy human blood lymphocyte using comet assay. Results showed that BSE contains antioxidants and pro-oxidants dual components. Furthermore, *n*-hexane partitioned phase from BSE (BSE-H) at concentration of 25-50 µg/mL had significant protection against oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. From these findings, we suggest that ingredients from BSE-H belong to hydrophobic properties, mostly non-polyphenolics and lower in the scavenging ability of DPPH radical.

**Key words:** *Morinda citrifolia*, oxidative damage, human blood lymphocytes, comet assay.

\*Correspondence: Shih-Ying Chen, Department of Health and Nutrition, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Tel: +886-6-2664911-3403

Fax: +886-6-2667327

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

