

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

白茶對生物分子抗氧化及生理功能之影響及誘導肝癌細胞
凋亡之評估

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 95-2313-B-041-009-

執行期間：95年08月01日至96年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學食品科技系

計畫主持人：晏文潔

計畫參與人員：大學生-兼任助理：邱春萍、吳欣諭

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☒ 成果報告 ☐ 期中進度報告

白茶對生物分子抗氧化及生理功能之影響及誘導肝癌細胞凋亡之評估
The Effect of White Tea on the Antioxidative and Biofunctional Activity of
the Biomolecule and the Assessment of Apoptosis in HepG2 Cells

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC95-2313-B-041-009

執行期間： 95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：晏文潔

共同主持人：

計畫參與人員：邱春萍、吳欣諭

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐ 赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☐ 一年 ☐ 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學食品科技系

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

白茶對生物分子抗氧化及生理功能之影響及誘導肝癌細胞凋亡之評估

The Effect of White Tea on the Antioxidative and Biofunctional Activity of the Biomolecule and the Assessment of Apoptosis in HepG2 Cells

計畫編號：NSC95-2313-B-041-009

執行期間：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：晏文潔

一、摘要

本計畫探討白茶水萃取物 (water extracts of white tea, WEWT) 在生物分子與細胞之抗氧化作用，及對細胞抗氧化酵素之影響，並解析其生理功能特性及分析其主要成分，而其對肝癌細胞凋亡之誘導，亦做初步的評估。研究中以綠茶水萃取 (water extracts of green tea, WEGT) 物及普洱茶水萃取物 (water extracts of pu-erh tea, WEPT) 為對照組。結果顯示茶葉水萃取物均提供脂質體具有良好的抗氧化保護效果，其抑制效果可能來自於其對自由基的捕捉及還原力。而 WEWT 對低密度脂蛋白之氧化，及 LPS 誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生的 NO 亦具有抑制效果。此外 WEWT 之總多酚化合物含量較 WEGT 低，但類黃酮及 Gallic acid 含量較 WEGT 高，而此三種成分含量皆較 WEPT 高。WEWT 之兒茶素類化合物含量則以 EGCG 含量最高。在細胞模式方面，WEWT 添加濃度低於 200 $\mu\text{g/mL}$ 時，對大鼠正常肝細胞 clone 9 不具毒性，並藉由提高麩胱甘肽還原酶及麩胱甘肽過氧化酶活性，以降低過氧化氫所造成的細胞毒性與細胞氧化。當 WEWT 添加濃度高於 1000 $\mu\text{g/mL}$ 時，對人類肝癌細胞 HepG2 有毒性效應，且具有誘發其凋亡之效果。

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the antioxidant effect of water extracts from white tea, and their effects on biomolecules and antioxidant enzyme systems in cell, researching on extracts provide physiological effect, and their composition. Also, the extracts induction of apoptosis of HepG2 is evaluated. This study used water extracts of green tea (WEGT) and water extracts of pu-erh tea (WEPT) contrast to water extracts of white tea (WEWT) physiological effect. All the water extracts of tea inhibited liposome peroxidation as assessed by the amount of malondialdehyde produced, while their showed catching free radical and reduced activities. WEWT showed dose-dependent inhibit H_2O_2 mediated LDL oxidation, and reduced LPS activated RAW264.7 produce nitric oxide. WEGT had highest contents of phenolic compounds, but WEWT had highest contents of flavonoids and Gallic acid. There was no observable cytotoxicity in Clone 9 cells at the concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$. WEWT reduced the malondialdehyde formation and exhibited protective effects on cell viability of clone 9 cells induced by H_2O_2 . WEWT raised the

activity of GPx and GRd. Moreover, WEWT could inhibit cell viability and the mechanism was WEWT-induced cytotoxic and apoptosis at 1000 $\mu\text{g/mL}$ in HepG2 cells.

二、前言

隨著人們對健康日益注重，對機能性食品的需求也日益增加，傳統保健食品茶類飲料便成為許多學者研究的對象。許多研究顯示茶葉具有多種生理功能，而綠茶因製造過程不需經過發酵，所以檢測出其抗氧化物質保留較為完整，具有較好的抗氧化性，為目前熱門的研究話題。由於白茶的製作過程只是單純的曬乾，所保留下來的多酚化合物也應越為完整，而有關白茶之研究除了具有抗致突變的效果及抑制 β -catenin/Tcf 活性外，探討其機能特性之其他文獻則甚為少見。有鑑於此，實有必要針對白茶之機能特性做進一步探討。本計畫探討白茶在生物分子與細胞之抗氧化作用，及對細胞抗氧化酵素之影響，並解析其生理功能特性及分析其主要成分，而其對肝癌細胞凋亡之誘導，亦將做初步的評估。所得結果期將有助於人類之健康及醫、藥、食品業之應用參考。

三、結果與討論

1. WEWT 對生物分子傷害之影響

圖一為 WEWT 對脂質體過氧化的影響。WEWT 及 WEGT 於濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ 時，對脂質體的氧化即有 90 % 以上的抑制率，而 WEPT 亦有 80 % 以上的抑制率，顯示茶葉水萃取物均對脂質體具有良好的抗氧化效果。圖二為 WEWT 對白蛋白氧化傷害的影響。WEWT 對白蛋白的氧化抑制效果並不顯著，添加濃度為 200 $\mu\text{g/mL}$ 時，氧化抑制率低於 50 %。

圖三為 WEWT 對自由基清除的影響。WEWT 對 DPPH 自由基具有捕捉效果，當添加濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 時，捕捉率可達 70 % 以上，與 WEGT 的效果相近，並比 Toc 高，且具有濃度效應。表一為 WEWT 之總抗氧化力測定。結果顯示 WEWT 之總抗氧化力與 WEGT 相近，且比 WEPT 高。表二為 WEWT 之還原力測定結果。WEWT 每克相當於含有 Vit. C 0.65 克的還原力，WEGT 為 1.33 克，WEPT 為 0.45 克。

2. WEWT 對細胞內抗氧化酵素活性之影響

圖四為 WEWT 對大鼠正常肝細胞 clone 9 毒性效應之影響。WEWT 對大鼠正常肝細胞 clone 9 不具毒性，當添加濃度達 200 $\mu\text{g/mL}$ 時，細胞存活率仍接近 100 %。圖五為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 毒性的保護作用。添加 WEWT 200 $\mu\text{g/mL}$ 時，對於過氧化氫傷害的 clone 9 細胞株，明顯提高存活率可達 50 %，而 WEGT 的存活率可達 60 % 以上。圖六為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 氧化的保護作用。WEWT 與 WEGT 可以抑制過氧化氫誘導下 clone 9 細胞株 MDA 之生成量，當 WEWT 添加濃度為 10 $\mu\text{g/mL}$ 時，抑制率達 90 % 以上，抑制效果較 WEPT 及 Toc 高。圖七顯示 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 內麩胱甘肽還原酶活性之影響。WEWT 與 WEGT 添加濃度高於 100 $\mu\text{g/mL}$ 時，可提高經過氧化氫傷害大鼠正常肝細胞 clone 9 內麩胱甘肽還原酶活性。WEWT 與 WEGT 添加濃度高於 100 $\mu\text{g/mL}$ 時，亦可提高經過氧化氫傷害之大鼠正常肝細胞 clone 9 中麩胱甘肽過氧化酶之活性（圖八）。

3. WEWT 生理活性之測定

圖九顯示 WEWT 對低密度脂蛋白氧化傷害的抑制效果。WEWT 與 WEGT 於添加濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ 時，對低密度脂蛋

白氧化傷害的抑制率達 60 % 以上。圖十為 WEWT 對 LPS 誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生 NO 之影響。WEWT 具有抑制對 LPS 誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生 NO 的效果，且隨著添加濃度的增加而增加，當添濃度為 200 $\mu\text{g/mL}$ 時，其抑制率達 80 % 以上，較 Toc 效果明顯。

4. WEWT 主要成分分析

表三為 WEWT 之總多酚化合物及類黃酮含量。WEWT 之總多酚化合物含量較 WEGT 低，但類黃酮及 Gallic acid 含量較 WEGT 高，而此三者含量皆較 WEPT 高。表四為 WEWT 之兒茶素含量。WEWT 中之 EGCG 含量最高，每克萃取物含有 209.07 mg，其次是 EGC、ECG 及 EC。總兒茶素含量，以 WEGT 最高，WEWT 次之，WEPT 最低。

5. WEWT 誘導人類肝癌細胞 HepG2 細胞凋亡之作用

圖十一為 WEWT 對人類肝癌細胞 HepG2 毒性效應之影響。當 WEWT 添加濃度越高時，對人類肝癌細胞 HepG2 毒性具有劑量效應。添加濃度為 1500 $\mu\text{g/mL}$ 時，存活率降至 40 % 以下。圖十二為 WEWT 對誘導人類肝癌細胞 HepG2 細胞凋亡之結果。結果顯示凋亡現象同樣具有劑量關係。圖十三為 WEWT 對誘導人類肝癌細胞 HepG2 細胞凋亡之比率。當 WEWT 添加濃度為 1000 $\mu\text{g/mL}$ 時，其凋亡率達到 70 % 以上，且具有濃度效應。而 HepG2 細胞之 Caspase 3 活性雖隨著 WEWT 添加濃度的增加亦有增加的趨勢，但其蛋白質之表現不明顯，故推測其調控可能由其他之蛋白質所影響，可於後續進一步探討。

四、結論

本研究結果發現茶葉水萃取物均對脂質體具有良好的抗氧化效果，其抑制

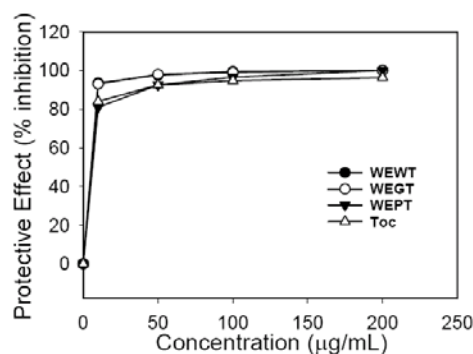
效果可能來自於其對自由基的捕捉及還原力。而 WEWT 對低密度脂蛋白之氧化，及 LPS 誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生的 NO 亦具有抑制效果。此外 WEWT 之總多酚化合物含量較 WEGT 低，但類黃酮及 Gallic acid 含量較 WEGT 高，而此三者含量皆較 WEPT 高。WEWT 之兒茶素相關化合物中以 EGCG 含量最高。在細胞模式方面，WEWT 對大鼠正常肝細胞 clone 9 不具毒性，並藉由提高麩胱甘肽還原酶及麩胱甘肽過氧化酶活性，以降低過氧化氫所造成的細胞毒性與細胞氧化。當 WEWT 添加濃度高於 1000 $\mu\text{g/mL}$ 時，對人類肝癌細胞 HepG2 有毒性效應，且具有誘發其凋亡之效果。

五、參考文獻

1. Dashwood, W. M., Orner, G. A. and Dashwood, R. H. 2002. Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H_2O_2 at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochem Biophys Res Commun.* 296:584-588.
2. Duh, P. D., Yen, G. C., Yen, W.J., Wang, B. S. and Chang, L. W. 2004. Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 52(26):8169-8176.
3. Gilberto, S. R., Orner, A. G., Amantana, A., Provost, C., Wu, S. Y. and Dashwood, R.H. 2001. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research.* 495:61-74.
4. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M.,

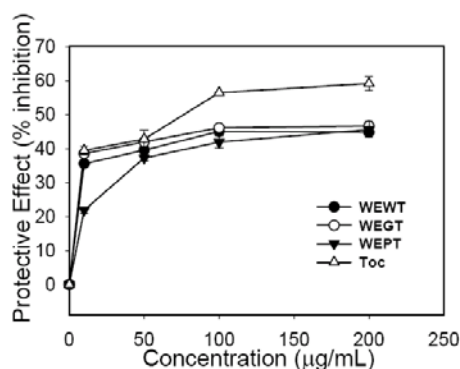
- and Freeman, B.A. 1991.
Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch. Biochem. Biophys. 288:481-487
5. Steinberg, D.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Khoo, J. C. and Witztum, J. L. 1989.
Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N. Engl. J. Med. 320, 915-924.





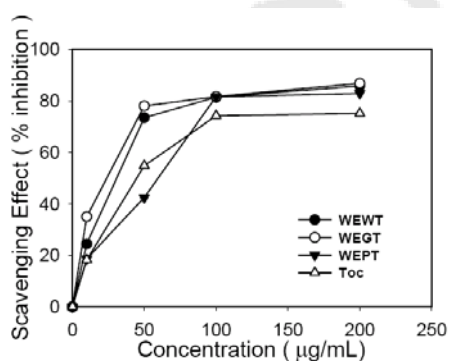
圖一、WEWT 對脂質體過氧化的影響

Fig 1. Effects of WEWT on liposome peroxidation. WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea; Toc, tocopherol.



圖二、WEWT 對白蛋白氧化傷害的影響

Fig 2. Effects of WEWT on albumin oxidative damage. WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea; Toc, tocopherol.



圖三、WEWT 對自由基清除的影響

Fig 3. Scavenging effect of WEWT on free radical. WEWT, water extract of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea; Toc, tocopherol.

表一、WEWT 之總抗氧化力測定

Table1. Total antioxidant activity of WEWT

Sample	Trolox equivalent antioxidant capacity*	
	(TEAC, mM)	
WEWT	3.20 ± 0.01	
WEGT	3.18 ± 0.02	
WEPT	2.17 ± 0.05	
Toc	2.87 ± 0.09	

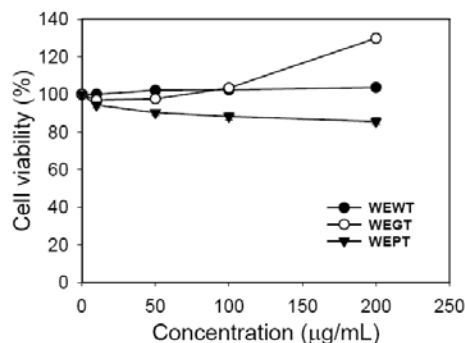
*TEAC is the millimolar concentration of a trolox solution having the antioxidant capacity equivalent to a 1000 ppm solution of the sample under investigation. WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extract of pu-erh tea; Toc, tocopherol.

表二、WEWT 之還原力測定

Table 2. Reducing ability of WEWT

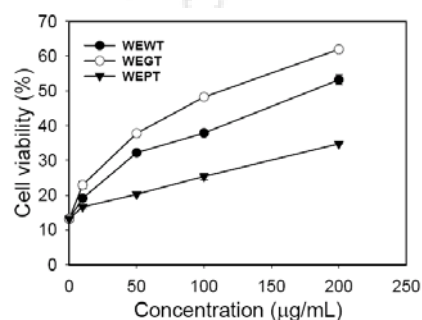
Sample	Ascorbic acid equivalent reducing ability	
	(Vit. C, g/g)	
WEWT	0.65 ± 0.03	
WEGT	1.33 ± 0.09	
WEPT	0.45 ± 0.02	

WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea.



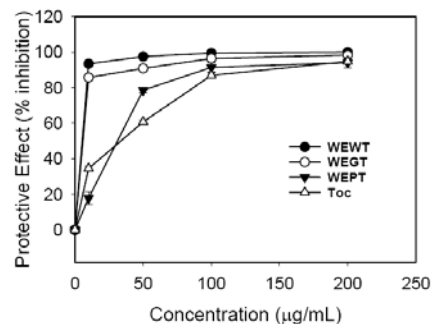
圖四、WEWT 對大鼠正常肝細胞 Clone 9 毒性效應之影響

Fig 4. Effects of WEWT on cell viability of Clone 9 cell. WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea.



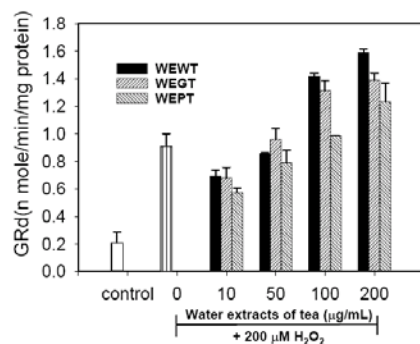
圖五、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 Clone 9 毒性的保護作用

Fig 5. Protective effects of WEWT on cell viability of Clone 9 cells induced by H₂O₂. WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea.



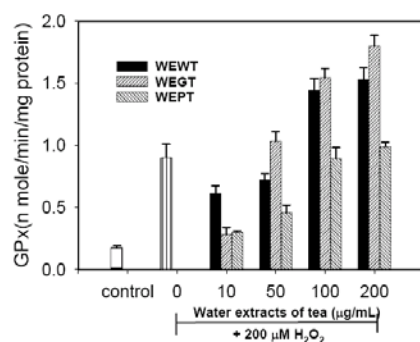
圖六、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 Clone 9 氧化的保護作用

Fig 6. Protective effects of WEWT on oxidation of Clone 9 cells induced by H₂O₂. WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea.



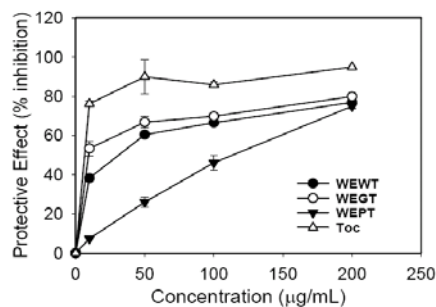
圖七、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 Clone 9 內巯基甘肅還原酶活性之影響

Fig 7. Effects of WEWT on glutathione reductase activities in Clone 9 cells induced by H_2O_2 . WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea.



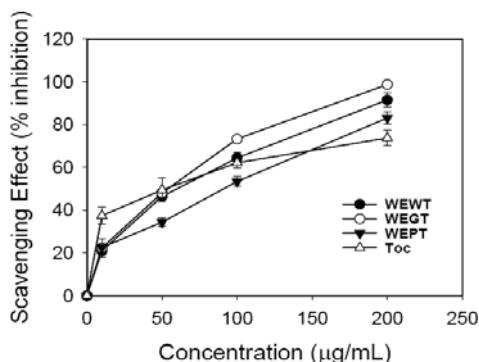
圖八、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 Clone 9 內巯基甘肅過氧化酶活性之影響

Fig 8. Effects of WEWT on glutathione peroxidase activities in Clone 9 cells induced by H_2O_2 . WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea.



圖九、WEWT 對低密度脂蛋白氧化傷害的影響

Fig 9. Effect of WEWT on LDL oxidative damage. WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea; Toc, tocopherol.



圖十、WEWT 對 LPS 誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生 NO 之影響

Fig 10. Effects of WEWT on production of nitric oxide in RAW264.7 macrophage induced by lipopolysaccharide. WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea; Toc, tocopherol.

表三、WEWT 之總多酚化合物及類黃酮含量

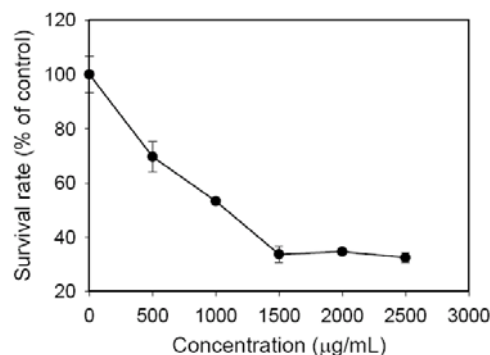
Table 3. Analysis of total phenolics, flavonoids contents of WEWT			
sample	Total phenolics (mg/g)	Flavonoid (mg/g)	Gallic acid (mg/g)
WEWT	236.6 ± 1.0	25.7 ± 0.1	58.60
WEGT	320.2 ± 2.9	20.9 ± 0.5	27.54
WEPT	189.3 ± 0.5	15.7 ± 0.4	36.92

WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea.

表四、WEWT 之兒茶素含量

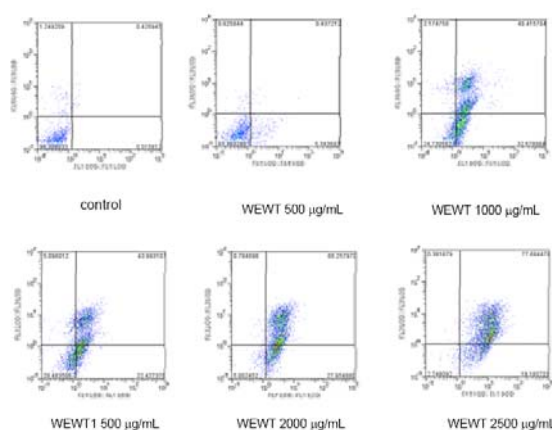
Table 4. Analysis of catechins content of WEWT					
sample	EC (mg/g)	ECG (mg/g)	EGC (mg/g)	EGCG (mg/g)	total catechins (mg/g)
WEWT	5.23	27.74	39.21	209.07	281.25
WEGT	6.86	16.01	100.34	236.39	359.6
WEPT	0	0	0	5.69	5.69

WEWT, water extracts of white tea; WEGT, water extracts of green tea; WEPT, water extracts of pu-erh tea.



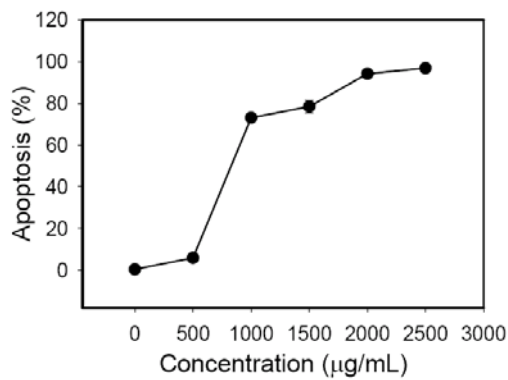
圖十一、WEWT 對人類肝癌細胞 HepG2 毒性效應之影響

Fig 11. Cytotoxicity of WEWT on cell viability of HepG2 cells. WEWT, water extracts of white tea.



圖十二、WEWT 對誘導人類肝癌細胞 HepG2 細胞凋亡之影響

Fig 12. Effects of WEWT on HepG2 cells apoptosis. WEWT, water extracts of white tea.



圖十三、WEWT 對誘導人類肝癌細胞 HepG2 細胞凋亡之比率
 Fig 13. Percentages of WEWT on HepG2 cells apoptosis.
 WEWT, water extracts of white tea.

六、計畫成果自評

茶為全球最受歡迎與消耗量最大的飲料，其中的抗氧化成分具有降低氧化壓力與相關疾病之功效。本研究探討之白茶為眾多茶類之一，具有茶葉的一般功效與較高含量的簡單酚類化合物，可以協助因氧化壓力損傷之細胞啟動防禦機制外，亦具有抑制癌細胞生長的能力，除證明白茶之生理功能外，也具有進一步驗證生理活性的必要性。

本研究內容與原計畫相符，已達成預期目標，白茶之相關研究不多，此研究之成果適合在學術期刊發表供其他學者參考引用，亦將有助於人類之健康及醫、藥、食品業之應用參考。

可供推廣之研發成果資料表

☐ 可申請專利

☐ 可技術移轉

日期：96 年 10 月 24 日

國科會補助計畫	<p>計畫名稱：</p> <p>白茶對生物分子抗氧化及生理功能之影響及誘導肝癌細胞凋亡之評估</p> <p>The Effect of White Tea on the Antioxidative and Biofunctional Activity of the Biomolecule and the Assessment of Apoptosis in HepG2 Cells</p> <p>計畫主持人:晏文潔</p> <p>計畫編號：NSC95-2313-B-041-009</p> <p>學門領域：食品</p>
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	<p>中文：</p> <p>本計畫探討白茶水萃取物（water extracts of white tea, WEWT）在生物分子與細胞之抗氧化作用，及對細胞抗氧化酵素之影響，並解析其生理功能特性及分析其主要成分，而其對肝癌細胞凋亡之誘導，亦做初步的評估。研究中以綠茶水萃取（water extracts of green tea, WEGT）物及普洱茶水萃取物（water extracts of pu-erh tea, WEPT）為對照組。結果顯示茶葉水萃取物均提供脂質體具有良好的抗氧化保護效果，其抑制效果可能來自於其對自由基的捕捉及還原力。而 WEWT 對低密度脂蛋白之氧化，及 LPS 誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生的 NO 亦具有抑制效果。此外 WEWT 之總多酚化合物含量較 WEGT 低，但類黃酮及 Gallic acid 含量較 WEGT 高，而此三種成分含量皆較 WEPT 高。WEWT 之兒茶素類化合物含量則以 EGCG 含量最高。在細胞模式方面，WEWT 添加濃度低於 200 µg/mL 時，對大鼠正常肝細胞 clone 9 不具毒性，並藉由提高麩胱甘肽還原酶及麩胱甘肽過氧化酶活性，以降低過氧化氫所造成的細胞毒性與細胞氧化。當 WEWT 添加濃度高於 1000 µg/mL 時，對人類肝癌細胞 HepG2 有毒性效應，且具有誘發其凋亡之效果。</p>

	<p>英文：</p> <p>The purpose of this study was to evaluate the antioxidant effect of water extracts from white tea, and their effects on biomolecules and antioxidant enzyme systems in cell, researching on extracts provide physiological effect, and their composition. Also, the extracts induction of apoptosis of HepG2 is evaluated. This study used water extracts of green tea (WEGT) and water extracts of pu-erh tea (WEPT) contrast to water extracts of white tea (WEWT) physiological effect. All the water extracts of tea inhibited liposome peroxidation as assessed by the amount of malondialdehyde produced, while they showed catching free radical and reduced activities. WEWT showed dose-dependent inhibit H₂O₂ mediated LDL oxidation, and reduced LPS activated RAW264.7 produce nitric oxide. WEGT had highest contents of phenolic compounds, but WEWT had highest contents of flavonoids and Gallic acid. There was no observable cytotoxicity in Clone 9 cells at the concentration of 200 µg/mL. WEWT reduced the malondialdehyde formation and exhibited protective effects on cell viability of clone 9 cells induced by H₂O₂. WEWT raised the activity of GPx and GRd. Moreover, WEWT could inhibit cell viability and the mechanism was WEWT-induced cytotoxic and apoptosis at 1000 µg/mL in HepG2 cells.</p>
可利用之產業 及 可開發之產品	食品工業應用及健康食品之開發
技術特點	細胞培養技術及抗氧化功能評估
推廣及運用的價值	<p>本研究探討之白茶為眾多茶類之一，具有茶葉的一般功效與較高含量的簡單酚類化合物，可以協助因氧化壓力損傷之細胞啟動防禦機制外，亦具有抑制癌細胞生長的能力，除證明白茶之生理功能外，也具有進一步驗證生理活性的必要性。此研究之成果適合在學術期刊發表供其他學者參考引用，亦將有助於人類之健康及醫、藥、食品業之應用參考。</p>

- ※ 1.每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
- ※ 2.本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
- ※ 3.本表若不敷使用，請自行影印使用。