

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

海巴戟天葉乙醇萃取物抑制 EB 病毒溶裂蛋白表現的影響

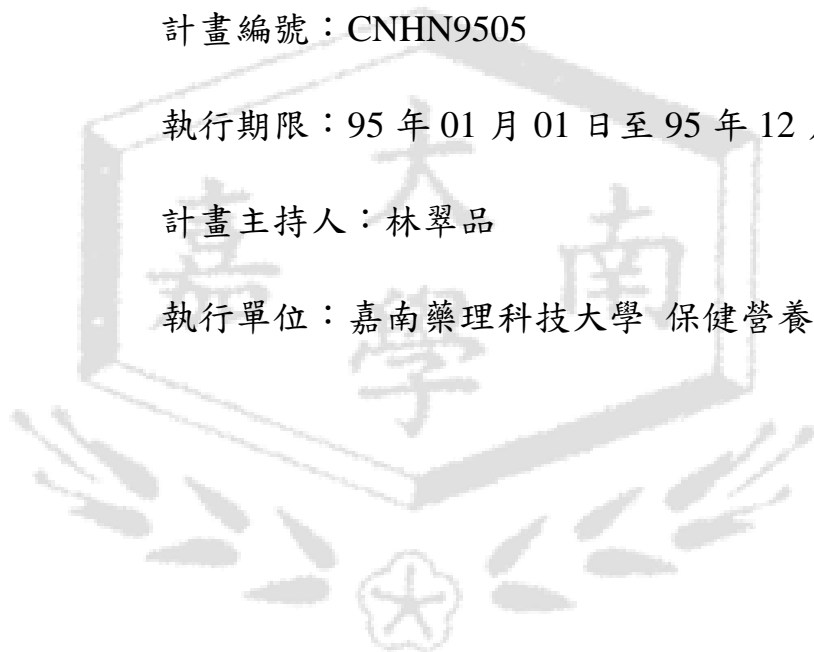
計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNHN9505

執行期限：95 年 01 月 01 日至 95 年 12 月 30 日

計畫主持人：林翠品

執行單位：嘉南藥理科技大學 保健營養系



中華民國 九十六年二月二十八日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNHN9505

執行期限：95 年 01 月 01 日至 95 年 12 月 30 日

主持人：林翠品 嘉南藥理科技大學 保健營養系

一、中文摘要

海巴戟天 (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) 其俗名為 Noni，適合生長在夏威夷群島、法屬玻里尼西亞大溪地及位於熱帶的亞洲地區。海巴戟天的活性成分具有抗腫瘤、抗病毒及免疫調節的活性。此外，海巴戟天內所含的某些糖苷類的物質具有顯著抑制轉錄因子 AP-1。Epstein-Barr 病毒 (EBV) 屬於人類疱疹病毒，感染後會引起鼻咽癌及淋巴瘤。證據顯示 EBV 可以藉由活化 AP-1，使病毒進入溶裂期而擴散至全身。因此，海巴戟天內應含有抗病毒的活性成分。本實驗的目的即是要分析海巴戟天的葉乙醇萃取物之抗 EBV 效應。主要是以乙醇萃取海巴戟天之葉，並且以 Hexane、1-butanol 及 ethyl acetate 分劃乙醇粗抽物，將所得到的萃取物及分劃物進行細胞毒性及以免疫轉印法分析抑制 EB 病毒溶裂蛋白質表現的效應。在海巴戟天毒性試驗結果顯示，由 butanol 及 hexane 分劃的萃取物對於細胞毒性相較於其他分劃萃取物高。在免疫轉印分析結果顯示，葉乙醇粗萃取物作用濃度在 400 $\mu\text{g/ml}$ 時具有約 90% 抑制 EBV 溶裂蛋白質 Zta、Rta 及 EAD 的表現作用，經由 hexane 及 butanol 所分劃的萃取物在 200 $\mu\text{g/ml}$ 就具有明顯抑制 EBV 溶裂蛋白質 Zta、Rta 及 EAD 表現的能力。

Abstract

Keywords：海巴戟天、抗 Epstein-Barr 病毒

二、英文摘要

Morinda citrifolia (Rubiaceae), commonly known as noni, is reported to have a broad range of therapeutic effects, including antibacterial, antiviral, antifungal, antitumor, anti-inflammatory, and immune enhancing effects. Besides, some glycosides from noni have shown significant inhibition for transcriptional activator protein (AP-1) activity. Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpesvirus. Nasopharyngeal carcinoma and lymphoma is due to EBV infection. Evidence showed that EBV lytic activation is associated with AP-1 gene expression, causing the virus to spread through the body. Hence, noni should have potential anti-EBV compounds. The purpose of this study is to analyze the anti-EBV activity of leaves ethanolic extracts and various fractionations using hexane, 1-butanol and ethyl acetate. Taiwan number 2 noni leaves were extracted by ethanol and to analyze the cytotoxicity and inhibitory

effect on EBV using immunoblot assay。The ethanolic extract revealed 90% inhibitory effect of Zta, Rta and EA-D expression at 400 $\mu\text{g/ml}$. The result also showed that the butanol and hexane fractionation from ethanolic extract of leaves has significant higher cytotoxicity, which exhibit significant inhibition effect for expression of Zta, Rta and EA-D at 200 $\mu\text{g/ml}$.

Keywords: *Morinda citrifolia*、noni、anti-Epstein-Barr virus

三、緣由與目的

在 2001 年 Sang 等人研究證實海巴戟天內所含的某些糖苷類的物質具有顯著抑制轉錄因子 AP-1。根據 Fixman 等人(1995)證據顯示 EBV 溶裂循環可以藉由類似 AP-1 的轉錄因子 Zta 的活化，使病毒擴散至全身。因此，海巴戟天內應含有抗病毒的活性成分。所以本實驗將以乙醇製備海巴戟天葉萃取物並且進行抗 EBV 效應分析，也進一步以 hexane、butanol、ethyl acetate 分劃海巴戟天葉乙醇萃取物以分離抗 EBV 的成分。

四、結果

(一) 海巴戟天葉乙醇粗萃物的製備

1. 葉乙醇粗萃物

3.5 g 的果實粉末溶於 50 ml 的酒精在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下萃取 24 小時所得到的產率為 24.99%。

2. 分劃葉乙醇粗萃物

將葉乙醇粗萃物進一步以 Hexane、butanol、ethyl acetate 進行分劃，所得到的產率分別為 2.88%、2.98% 及 0.59%。

(二) 細胞毒性的分析

將 5×10^4 的細胞數/ml 的 P3HR1 細胞株培養在 RPMI 1640 同時以 0、100、200、300、400、500 及 600 ($\mu\text{g/ml}$) 不同濃度的海巴戟天葉乙醇萃取物處理，一天後觀察細胞生長情形。結果顯示葉乙醇萃取物對細胞毒性相較於由 butanol 及 hexane 分劃的萃取物低(CC50=368.14 \pm 1.99 $\mu\text{g/ml}$)，其中以 butanol 分劃物對細胞毒性較高(120.73 \pm 1.88) (圖一)。

(三) 評估海巴戟天葉乙醇粗萃物及其分劃物對 EBV 病毒溶裂蛋白質抑制作用

將 6×10^5 cells/ml PH3R1 細胞以各種濃度的海巴戟天粗萃物處理一小時，然後再添加 TPA(30 ng/ml)及 SB(3 mM) 以誘導 EBV 溶裂循環，經過 24 小時培養後將細胞溶解，得到的蛋白質以 SDS PAGE 進行電泳，再進行免疫轉印，分析 Zta、Rta、EAD 及 β -actin 蛋白質， β -actin 作為 internal control。結果顯示海巴戟天葉乙醇粗萃物在濃度 400 $\mu\text{g/ml}$ 時可以有效抑制溶裂循環所需的蛋白質 Rta (89.52%)、EA-D (96.62%) 和 Zta (86.60%) (圖二)，經由不同溶劑分劃後正己烷分劃物 (LE₉₅-H) 濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ 有抑制極早期蛋白 92.64% Rta、89.35% Zta 及 24.68% EA-D 的表現，在 200 $\mu\text{g/ml}$ 就能完全抑制溶裂蛋白質 Rta、Zta 和 EA-D 的表現 (圖三)，並且在正丁醇分劃物 (LE₉₅-B) 200 $\mu\text{g/ml}$ 也能明顯抑制溶裂蛋白質 88.99% Rta、82.27% Zta 和 83.86% EA-D 的表現，在 400 $\mu\text{g/ml}$ 就能完全抑制溶裂蛋白質 Rta、Zta 和 EA-D 的表現 (圖四)，水層分劃物(LE₉₅-A)在濃度 600 $\mu\text{g/ml}$ 抑制早期溶裂蛋白質 95.30% Rta、76.75% Zta 及的表現

96.89% EA-D (圖六), ethyl acetate 分劃物則無明顯抑制作用(圖五)。

五、討論

海巴戟天葉乙醇粗萃取物, 在濃度 400 $\mu\text{g/ml}$ 時具有約 90% 抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現作用, 經由分劃物, hexane 分劃物在 200 $\mu\text{g/ml}$ 就具有完全抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 表現的能力。所以在葉乙醇粗萃物中具有抗 EBV 效應的成分, 經由分劃後提高有效抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 表現的能力。

六、計畫成果自評

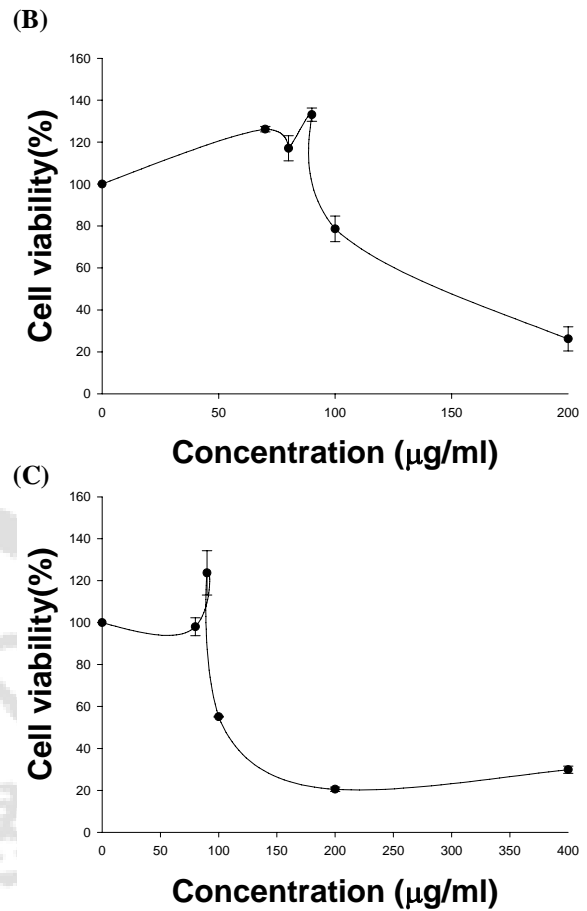
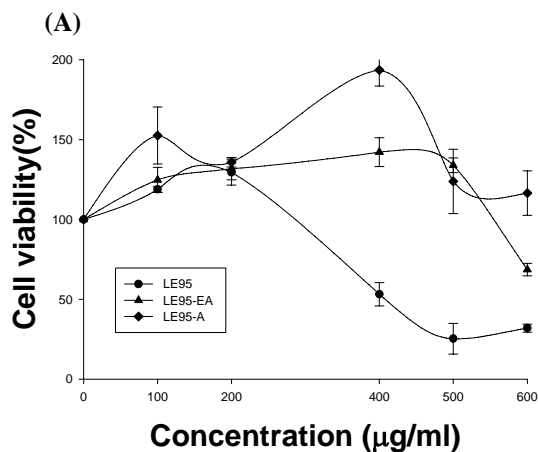
海巴戟天葉乙醇萃取物內抗病毒活性分析與原計畫相符, 達預期目標的百分之八十。這個研究將有助於了解海巴戟天萃取物對抗病毒活性物質之最適的萃取與製備條件的參考; 實驗成果不僅能提供具有抗病毒功效的保健食品, 提高海巴戟天的經濟效益與利用率, 有利於海巴戟天原料供應或製造商開發運用外; 亦可成為開發對抗其他病毒的參考模式。這個研究計畫也訓練一位生物科技系碩士生。

七、參考文獻

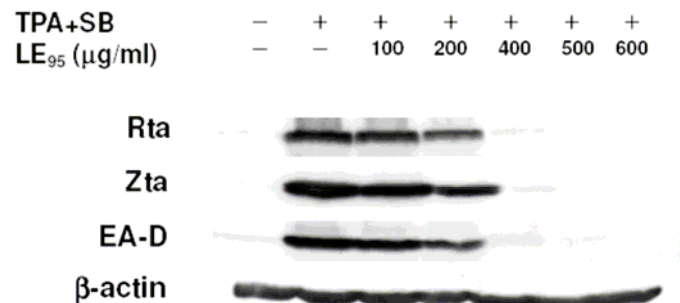
1. Hirazumi A. Furusawa E. Chou SC. and Hokama Y. (1994) Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 37:145-6.
2. Hirazumi A. Furusawa E. Chou SC. And Hokama Y. (1996) Immunomodulation contributes to the anticancer activity of morinda citrifolia (noni) fruit juice. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 39:7-9.
3. 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.
4. 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(15):5749-56.
5. 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(9):1307-9.
6. 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(9):4478-81.
7. 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.
8. Chang LK. and Liu ST. (2000) Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein-Barr virus by histone acetylation. Nucleic acids Res. 28: 3918-925.
9. Laux G., Freese K., Fischer R., Polack A., Hofler E. and Bornkamm G. (1988) TPA-inducible Epstein-Barr virus genes in raji cells and their regulation. Virology 162:503-7.
10. Chang LK., Wei TT., Chiu YF., Tung CP., Chuang JY., Hung SK, Li C. and

- Liu ST. (2003) inhibition of Epstein-Barr virus cycle by (-)-epigallocatechin gallate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:1062-68.
11. Lin JC. (2003) Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. *Antiviral Res.* 59:41-7.
 12. Zin ZM., 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.
 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 damnacanthal 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.

八、圖表



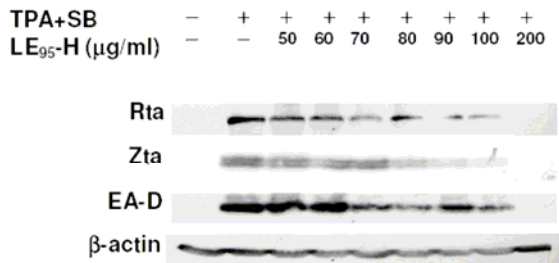
圖一、海巴戟天葉子乙醇萃取物及分割物對細胞存活率試驗。以樣品在不同濃度下對細胞生長抑制百分比與濃度作線性迴歸，推算細胞毒性 (CC₅₀)。 (A) LE₉₅ = 368.14±1.99 µg/ml、LE₉₅-EA、LE₉₅-A； (B) LE₉₅-H = 149.14±1.57 µg/ml；(C) LE₉₅-B = 120.73±1.88 µg/ml。



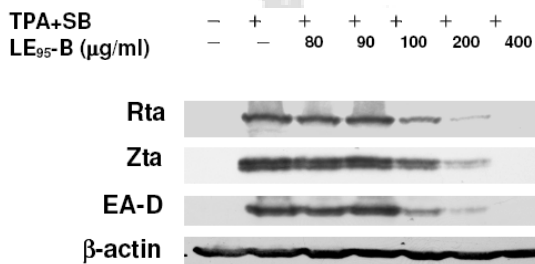
圖二、海巴戟天葉子乙醇萃取物對EB病毒溶裂蛋白質的影響。P3HR1細胞在加入海巴戟天葉子乙

醇己烷分劃萃取物作用 1 小時後，才加入 TPA (30 ng) 和 SB(3 mM)誘導細胞進入溶裂循環。細胞再經過 24 小時培養後溶解取蛋白質，接著以西方墨點法分析 Rta、Zta、EA-D 及 β -actin 的表現。

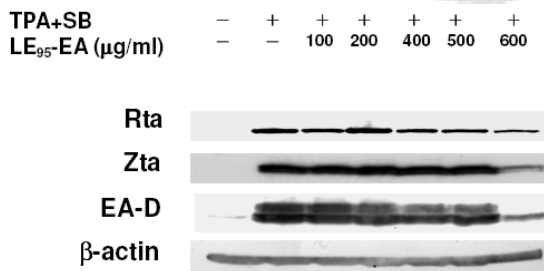
圖六、海巴戟天葉子水層分劃物對 EB 病毒溶裂蛋白質的影響。



圖三、海巴戟天葉子正己烷分劃物對 EB 病毒溶裂蛋白質的影響。



圖四、海巴戟天葉子正丁醇分劃物對 EB 病毒溶裂蛋白質的影響。



圖五、海巴戟天葉子乙酸乙酯分劃物對 EB 病毒溶裂蛋白質的影響。

