

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
* 計 畫 *
* : 探討辣木餵食對於小鼠腎臟的保護效應 *
* 名 稱 *
* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *

執行計畫學生： 陳意婷
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-041-002-B
研究期間： 99 年 07 月 01 日至 100 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 蕭慧美

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 嘉南藥理科技大學保健營養系

中華民國 100 年 04 月 21 日

研究主題：探討辣木餵食對於小鼠腎臟的保護效應

【摘要】

本實驗目的為探討小鼠餵食辣木 (*Moringa oleifera*, MO)後是否具有保護腎臟的氧化傷害。MO 含有高量多酚類，體外抗氧化活性亦很高。所以我們採用藥物注射造成腎臟的氧化傷害。將小鼠分成對照組和實驗組，飼養三週後再進行 6mg/kg BW 之 Cisplatin 單次注射，之後繼續餵飼一週後，進行動物犧牲，測定血漿的肌酸酐與尿素氮來評估腎功能的影響狀況。

【前言】

辣木，屬於熱帶植物起源於印度及非洲，生長快速具經濟價值。根據 Yang et al. (2008)的報告，辣木葉含有豐富的 quercetin、kaempferol 等黃酮類，總黃酮類的值是研究 115 種植物中的第二高。因此應有很強的抗氧化能力。Singh et al (2009) 以辣木葉、果實、種子為材料，結果指出葉子含最高量的總酚類、維生素 C，也具有較強的抗氧化活性與還原力並具有抑制 DNA 氧化傷害的效果。辣木葉還具有保護新機梗塞所造成的氧化傷害 Nandave et al.(2009)、保護肝臟損傷 (Fakurazi et al. 2008, Pari & Kumar 2002)、降血脂與抗動脈硬化 (Chumark et al. 2008, Ghazi et al. 2000)、促進傷口癒合 (Rathi et al. 2006)、抗游離輻射 (Rao et al. 2001)、調節甲狀腺荷爾蒙 (Tahiliani & Kar A. 2000)。以辣木種子管餵小鼠十天後，可以改善因為砷中毒所導致的過氧化傷害，例如血液 GSH 之減少、TBARS 之提高 (Gupta et al. 2007, Mishra et al. 2009)。Ndong et al.(2007) 發現餵與大鼠辣木具有改善葡萄糖不耐的問題。但是對於腎臟的保護卻未見有報告提出。

由於腎衰竭之高發生率與高死亡率，因此在治療與延緩該病程之惡化為目前頗受矚目的研究主題。雖然 FDA 已核可 Amifostine (一種含硫-磷的有機化合物)此藥物以降低 Cisplatin (CIP) 使用病患的腎毒性的藥物，但是因為昂貴、具副作用，且還可能干擾 CIP 之抗癌效果，所以在使用上頗受限制(Capizzi 1999)。因此有許多文獻皆在著手尋找可減緩 CIP-腎毒性的物質。

由於 CIP 之腎毒性與氧化傷害有關，所以探討抗氧化物質減緩 CIP-腎毒性的研究很多，例如具抗氧化能力的維生素 C 和維生素 E 之投予，可提升注射 CIP 的小鼠腎臟抗氧化酵素活性與 GSH 含量並降低血清尿素氮(Ajith et al. 2009)，透過電子顯微鏡的觀察研究，維生素 C 具有保護大鼠腎臟免於 CIP 之傷害(Tarladacalisir et al. 2008)。

在植物萃取成分方面，種類十分繁多：如藍綠藻抽出物(Kuriakose and Kurup 2008)、槲皮素 quercetin(Behling et al. 2006)、黑葡萄乾燥粉末和番茄汁(Cetin et al. 2006)等皆因其抗氧化作用而具有延緩 CIP 誘導之腎臟的氧化性傷害。關於辣木葉粉末是否具有保護腎臟的作用則少有報告探討，本實驗目的為探討小鼠餵食辣木 (*Moringa oleifera*, MO)後是否具有保護腎臟減少 CIP 引起的氧化傷害。

【材料與方法】

1. 前置試驗：小鼠注射單劑量 CIP 前與注射後 1 天、2 天、3 天和第 5

天之後犧牲，採血與腎臟測定體內氧化發展情形以尋找較佳的監測時間點與指標。

2. 動物飼養：小鼠，經適應三至七天後依體重分組。共分為六組：C、CIP、HM、LM、HW、LW 等(詳見下表)。先行單次管餵後，第二天進行單次 CIP 注射，注射後連續管餵各種試驗溶液兩天後進行犧牲；當天以 CO₂ 窒息，下腔靜脈採血並分離血清、取下腎臟。所有小鼠皆餵養於溫度及日照時間控制的環境中，任其自由攝食及飲水，每週記錄體重及飼料攝取。

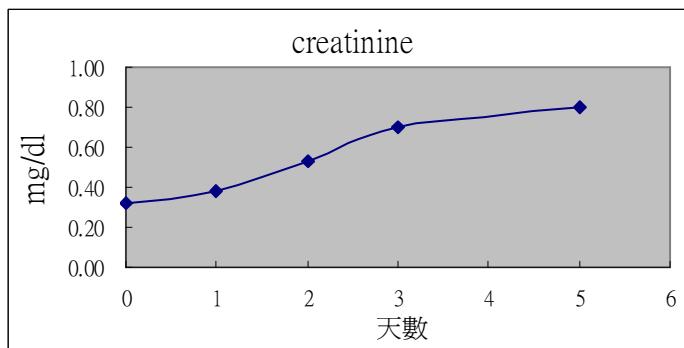
組名	C	CIP	HM	LM	HW	LW
管餵	Saline	Saline	M	M	W	W
注射 CIP	—	+	+	+	+	+

(註：M 和 W 分別表示甲醇和水萃取物：H 和 L 分別表示高劑量和低劑量)

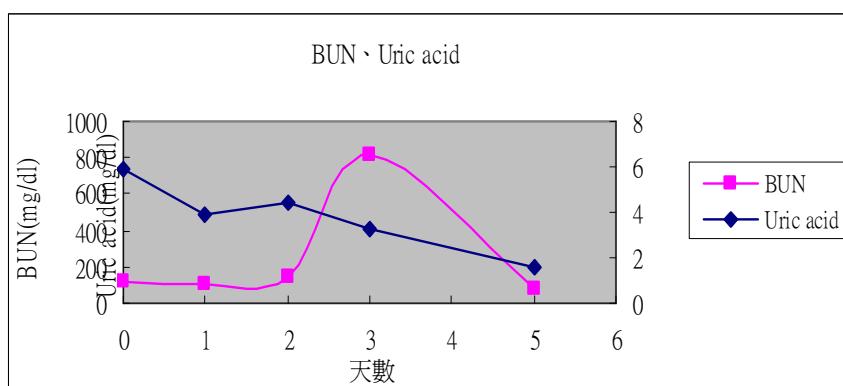
3. 分析項目與方法：

- (1) 血漿尿素氮、肌酸酐、尿酸、肌酸酐：血液以低速離心將血漿分離，分裝後貯存於 -20°C。分析當天解凍後以商用試劑套組測定之。
- (2) 腎臟(Thiobarbituric acid-reactive substance)TBARS：腎臟經秤重後，於冰上剪下定量的組織並記錄重量後，以均質緩衝液(potassium-phosphate buffer 0.01 M, pH 7.4) 進行均質，並定量體積使成為 25% (W/V) 細胞均質液。參考 Oteiza 等人⁽¹⁶⁾ 的方法，取適量的均質液加入 3g/L SDS 0.5mL、0.1mol/L HCl 2mL、10g/L phosphotungstic acid 0.3mL 以及 0.7g/L thiobarbituric acid，激烈震盪後於沸水中水浴 45 分鐘，冷卻後以 3mL 1-butanol 震盪萃取，離心後取得上層測定 532nm 之吸光質。另以 1,1,3,3-tetraethoxypropane 作為標準品，經過系列稀釋作出標準曲線以供濃度換算。
- (3) 腎臟 GSH 含量測定：取 1mL 腎臟均質液加入 5%TCA 溶液，製得 TCA 上清液後與 DTNB 反應測定 412nm 之吸光值，與標準曲線對照換算。
- (4) 統計方法
實驗結果皆以平均值 ± 標準偏差來表示。所有結果以 One-way ANOVA 進行統計以檢定組間差異， $p < 0.05$ 為顯著差異。

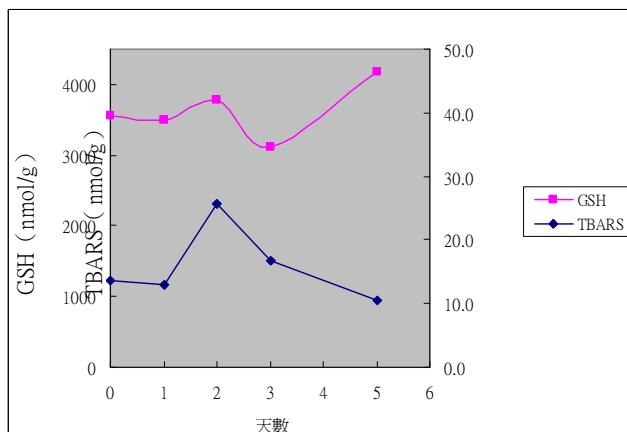
【結果與討論】



圖一 前置試驗中，注射 CIP 後血漿肌酸酐的含量。



圖二 前置試驗中，注射 CIP 後血漿尿素氮(BUN)及尿酸的含量。



圖三 前置試驗中，注射 CIP 後腎臟 GSH 及 TBARS 的含量。

從前置試驗的結果得知，CIP 注射後第二天便造成血液肌酸酐與腎臟 TBARS 濃度上升之情形；若以血液尿素氮為監測指標，則以第三天達最高點；此外腎臟 GSH 的消耗也於第三天顯著降低，血液尿酸也下降了。因此正式實驗則以 CIP 注射後三天進行動物犧牲與收集樣品。

表一 辣木餵食對於 CIP 誘導之腎臟氧化傷害之影響

GSH (umol/g)	TBARS (nmol/g)

Control	3.06±0.41	21.57±4.8
CIP	3.17±0.45	23.97±3.46
HM	3.30±0.26	23.17±3.70
LM	3.31±0.53	20.61±1.80
HW	3.29±0.35	21.73±3.45
LW	3.30±0.19	23.33±3.44

從實驗結果發現，CIP 注射對於 GSH 之消耗並無顯著差異，對於腎臟脂質過氧化情形有較 Control 組上升的趨勢，但是與各組間也沒有統計上的差異。結果指出，辣木葉的萃出物不管是甲醇抽出物還是熱水萃出物，對於小鼠腎臟病沒有增加 GSH 此還原物質或是降低脂質過氧化的效應。推測可能原因包括辣木葉的萃出物其吸收效率是否良好、或是具有組織特異性的保護效應；其他如劑量與餵食時間長短、動物受氧化之模式與機制不同等因素，都可能是與預期結果不符的重要因素。

【參考文獻】

- 膳食療養學，黃玲珠編，華杏出版股份有限公司
- Ajith TA, Abhishek G, Roshnv D, Sudheesh NP (2009) Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. *Exp Toxicol Pathol*, on line.
- Behling EB, Sendao MC, Francescato HDC (2006) Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacol Report* 58:526-532.
- Capizzi RL (1999) Amifostine reduces the incidence of cumulative nephrotoxicity from cisplatin:laboratory and clinical aspects. *Semin Oncol* 26(2 S 7):72-81.
- Cetin R, Devrim E, Kilicoglu B, Avci A, Candir O, Durak I (2006) Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues:possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol* 26:42-46.
- Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, et al. (2008) The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of Moringa oleifera lam leaves. *J Ethnopharmacol*. 116:439-446.
- Fakurazi S, Hairuszah I, Nanthini U (2008) Moringa oleifera lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. *Food Chem Toxicol* 46:2611-2615
- Ghasi S, Nwobodo E, Ofili JO (2000) Hypocholesterolemic effeccts of crude extract of leaf of Moringa oleifera lam in high-fat diet fed wistar rats. *J Ethnopharmacol* 69:21-25.
- Gupta R, Dubey DK, Kannan GM, Flora SJ (2007) Concomitant administration of Moringa oleifera seed powder in the remediation of arsenic-induced oxidative stress in mouse. *Cell Biol Int* 31:44-56.
- Mishra D, Gupta R, Pant SC, Kushwah P, Satish HT, Flora SJ (2009) Co-administration of monoisoamyl dimercaptosuccinic acid and Moringa oleifera seed powder protects arsenic-induced oxidative stress and metal distribution in mice. *Toxicol Mech Methods*. 19:169-182.
- Nakagawa T, Yokozawa T, Sano M (2004) Activity of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate against oxidative stress in rats with adenine-induced renal failure. *J Agric Food Chem* 52:2103-2107.

- Nandave M, Ojha SK, Joshi S, Kumari S, Arya DS (2009) Moringa oleifera leaf extract prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats:evidence for an antioxidant, antiperoxidative, and cardioprotective intervention. *J Med Food* 12:47-55.
- Ndong M, Uehara M, Katsumata Si, and Suzuki K (2007) Effects of oral administration of Moringa oleifera Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. *J Clin Biochem Nutr* 40:229-233.
- Pari L, Kumar NA (2002) Hepatoprotective activity of Moringa oleifera on antituberular drug-induced liver gamage in rats. *J Med Food* 5:171-177.
- Rao AV, Devi PU, Kamath R (2001) In vivo radioprotective effect of Moringa oleifera leaves. *Indian J Exp Biol* 39:858-863.
- Rathi BS, Bodhankar SL, Baheti AM (2006) Evaluation of aqueous leaves extract of Moringa oleifera Linn for wound healing in albino rats. *Indian J Exp Biol* 44:898-901
- Singh BN, Singh BR, Singh RL, Prakash D, Dhakarey R, Upadhyay G, Singh HB (2009) Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of Morinaga oleifera. *Food Chem Toxicol*, PubMed on line.
- Tahiliani P, Kar A (2000) Role of Moringa oleifera leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. *Pharmacol Res* 41:319-323
- Tarladacalisir YT, Kanter M, Uygun M (2008) Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage:a light and electron microscopic study. *Renal Failure* 30:1-8.