

海巴戟天(*Morinda citrifolia* L.) 抗氧化與抗病毒活性研究
子計畫四：海巴戟天果實粗抽物抗毒性分析
整合型計畫總主持人：生物科技系葉東柏
主持人：保健營養系林翠品

一 摘要

海巴戟天 (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) 其俗名為 Noni。海巴戟天果實可以抑制肺癌及肉瘤的生長，也發現果實中的多醣類物質具有免疫調節的功能。此外，海巴戟天內所含的某些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 可以藉由類似 AP-1 的轉錄因子 Zta 的活化，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。所以本實驗的目的是要分析海巴戟天的萃取物之抗 EBV 效應及其萃取條件的評估。

主要是以酒精萃取海巴戟天之果實，並且以 Hexane、1-butanol 及 ethyl acetate 分劃酒精粗抽物，將所得到的萃取物進行細胞毒性及以免疫轉印法分析、鑑定海巴戟天萃取物之抗 EBV 的效應。在海巴戟天毒性試驗結果顯示，ethyl acetate 萃取物對於細胞毒性相較於其他分劃物高。在免疫轉印分析結果顯示，果實酒精粗萃取物作用濃度在 124 g/ml 具有抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現作用，但是 Hexane、1-butanol 及 ethyl acetate 分劃物在濃度 124 g/ml 卻不具有抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現的能力。

二、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。所以本實驗將以酒精製備海巴戟天果實萃取物並且進行抗 EBV 效應分析，也進一步以 Hexane、butanol、ethyl acetate 分劃海巴戟天果實酒精萃取物分離之抗 EBV 的成分。

三、材料與方法

(一) 細胞培養與 EB 病毒溶裂生活史(lytic cycle)的誘導作用

P3HR1 是 Burkitt' s 淋巴瘤的細胞株，而且有 EBV 存在，培養時細胞必需維持在每毫升細胞數為 4×10^5 至 1×10^6 ，培養基為 RPMI 1640，同時在培養基中需要再添加 56 °C 加熱處理過的 10%胎牛血清(FCS)，60 g/ml penicillin 及 100 g/ml streptomycin。培養條件是在 37°C 及 5 % CO₂ 補充的培養箱。EBV 溶裂生活史的誘導作用是將每毫升細胞數 2×10^6 的 P3HR1 經由 300 nM 的 trichostatin A (TSA) 所誘發。

(二) 細胞的毒性分析

評估海巴戟天之葉 (Noni-L) 萃取物對 P3HR1 細胞株的生長抑制。將 2×10^4 的細胞數/ml 的 P3HR1 細胞株培養在 RPMI 1640 同時添加各種濃度的 Noni-L 萃取物，再培養四天。再將細胞以 trypan blue 染色，可以得到 CC50 的數值以作為海巴戟天對 P3HR1 細胞株的生長抑制的濃度。CC50 的定義是使細胞數目減少一半的抑制濃度。

(三) 免疫轉印分析(Immunoblot analysis)

將 PH3R1 細胞以各種濃度的 Noni-L 萃取物處理一小時再添加 300 nM TSA 以誘導 EBV 溶裂生活史，經過 24 小時培養後將細胞溶解，得到的蛋白質以 SDS PAGE 進行電泳分析，再將電泳完畢的 SDS PAGE 置於浸濕的硝化纖維膜，以電泳的方式在 100 伏特進行一小時，將蛋白質轉印至的硝化纖維膜上。轉印後取出硝化纖維膜分別以稀釋 2000 倍的抗 EA-D 多株抗體，稀釋 1000 倍的抗 EBNA-1 多株抗體，稀釋 200 倍的抗 Rta 單株抗體及抗 Zta 單株抗體進行反應。最後蛋白質以 ECL 偵測試組進行分析。

四、結果

(一) 海巴戟天果實粗萃物的製備

1. 果實酒精粗萃物

3.5 g 的果實粉末溶於 50 ml 的酒精在 50°C 下萃取 24 小時所得到的產率為 11.8%。

2. 分劃果實酒精粗萃物

將果實酒精粗萃物進一步以 Hexane、butanol、ethyl acetate 進行分劃，所得到的產率分別為 27.2%、48.1% 及 1.0%。

(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、1.24、4.96、19.84、79.36 及 124 (g/ml) 不同濃度的海巴戟天果實萃取物處理，每隔一天觀察細胞生長情形持續觀察三天。結果顯示果實酒精萃物對細胞毒性相較於其他分劃的萃物高，其中以 ethyl acetate 分劃物對細胞毒性較高 (圖一)。

(三) 評估海巴戟天酒精粗萃物及其分劃物是否誘發 EBV 病毒溶裂循環

將 6×10^5 cells/ml PH3R1 細胞以 30 ng/ml TPA 及 3 mM sodium butyrate(SB)處理，這兩個藥劑會誘導溶裂循環所需蛋白質的表現，如 Zta 蛋白，它可以結合在 AP-1 序列及 AP-1 序列類似的 Zta 反應元素(ZRE)上。在 orilyt、BRLF1、BZLF1 啟動子及早期基因啟動子上均有 ZRE 序列，因此可以被 Zta 所活化而表現 Rta 蛋白及早期蛋白。在海巴戟天的研究中發現含有某些糖類的物質有抑制轉錄因子 AP-1 的活化，所以推測海巴戟天應該具有抑制

Zta 的活化作用，因此先以 Rta 蛋白作為偵測 EBV 病毒溶裂循環的指標。在評估海巴戟天粗萃物對 EBV 病毒溶裂循環是否抑制作用前必需先了解海巴戟天粗萃物是否會誘發 EBV 病毒溶裂循環。所以將 6×10^5 cells/ml PH3R1 細胞以 0、0.78、1.56、3.12

95 FE Day 0 1 2 3 Cells / ml (10⁻⁵) 05

10

15

0 ug/ml

T+SB

1.24 ug/ml

4.96 ug/ml

19.84 ug/ml

79.36 ug/ml

124 ug/ml

1-Butanol

Day

0 1 2 3

Cells / ml (10⁻⁵)

0

5

10

15

0 ug/ml

T+SB

1.24 ug/ml

4.96 ug/ml

19.84 ug/ml

79.36 ug/ml

124 ug/ml

EtOAc

Day

0 1 2 3

Cells / ml (10⁻⁵)

0

5

10

15

20

25

0 ug/ml

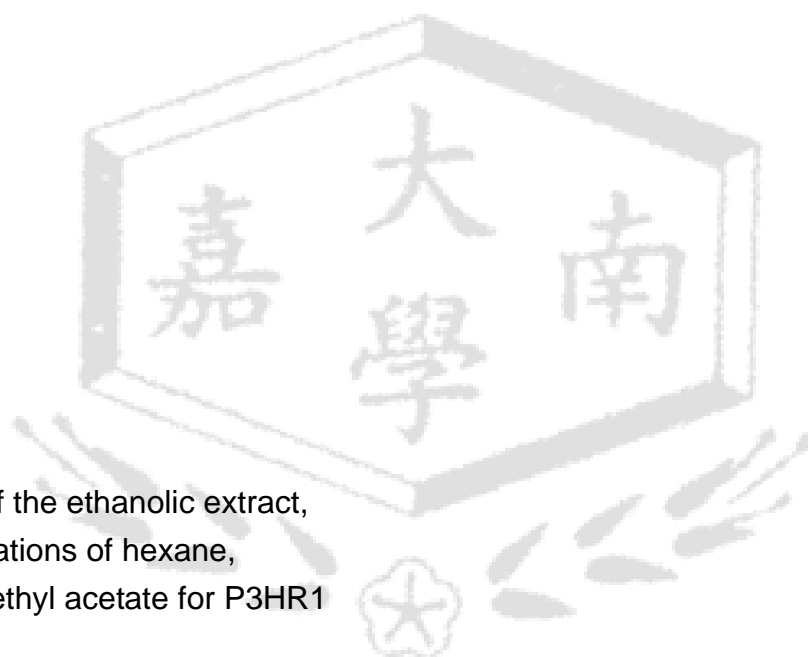


T+SB
1.24 ug/ml
4.96 ug/ml
19.84 ug/ml
79.36 ug/ml
124 ug/ml
EA aqueous
Day
0 1 2 3
Cells / ml (10⁻⁵)

0
5
10
15
20
0 ug/ml
T+SB
1.24 ug/ml
4.96 ug/ml
19.84 ug/ml
79.36 ug/ml
124 ug/ml

Fig. 1 Toxicity of the ethanolic extract, various fractionations of hexane, 1-butanol, and ethyl acetate for P3HR1 cell

Hexane
Day
0 1 2 3
Cells / ml (10⁻⁵)
0
5
10
15
0 ug/ml
T+SB
1.24 ug/ml
4.96 ug/ml
19.84 ug/ml



79.36 ug/ml

124 ug/ml

及 6.25 (mg/ml)不同濃度的海巴戟天萃取物處理，經過 24 小時培養後將細胞溶解，得到的蛋白質以 SDS PAGE 進行電泳分析，再進行免疫轉印分析，結果顯示海巴戟天粗萃物不會誘發 EBV 的 Rta 蛋白表現，也可以表示海巴戟天各部分粗萃物不會誘發 EBV 病毒溶裂循環。

(四) 評估海巴戟天果實酒精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 及 SB 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 EBNA1 蛋白，EBNA1 作為 internal control。結果顯示海巴戟天果實酒精粗萃物在濃度 124 g/ml 時可以有效抑制溶裂循環所需的蛋白質 Rta (69.28%)、EA-D (87.75%) 和 Zta (88.08%)，但是分劃物卻無法有效抑制溶裂蛋白的表現(圖二)。

Fig.2 Inhibitory effect of Ethanolic extracts and various fractionations for lytic proteins expression of EBV lytic cycle.

五、討論

海巴戟天果實酒精粗萃物，在濃度 124 g/ml 時具有完全抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現作用，但是分劃物並不能完全抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現。是否在酒精粗萃物中具有抗 EBV 效應的成分經由分劃後流失或者是分布在各個分劃物，而導致分劃物在濃度 124 g/ml 時無法有效抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現。

六、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. Biophysic.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 damnacanthol 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.