

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 白茶對抗氧化酵素調控及黑色素生成及誘導 B16 細胞凋亡 機制之評估 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2313-B-041-003-  
執行期間：96年08月01日至97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  
共同主持人：朱惠鈴  
計畫參與人員：大專生-兼任助理人員：王怡惠  
大專生-兼任助理人員：吳欣諭

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 97年10月31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

白茶對抗氧化酵素調控及黑色素生成及誘導 B16 細胞凋亡機制之評估  
The assessments of the regulations for the mechanism of antioxidative enzyme  
in clone9 cell, and melanogenesis and apoptosis in B16 cell by white tea

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC96-2313-B-041-003

執行期間：96年08月01日至97年07月31日

計畫主持人：晏文潔

共同主持人：朱惠鈴

計畫參與人員：王怡惠、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：

中華民國 97 年 10 月 25 日

## 一、摘要

本計畫將延續 95 年度國科會研究計劃的成果，探討白茶水萃取物 (water extracts of white tea, WEWT) 對細胞內源性抗氧化相關的酵素調控及其機制探討，並評估其於細胞內之可能調控路徑。結果顯示細胞以過氧化氫傷害時，添加 WEWT 可於 2-3 小時提高 GRd、SOD、CAT 和 GPx 等酵素之活性，且其 GPx、GST 及 GRd 皆比單獨添加傷害劑時，表現出較高之活性。而對於抗氧化酵素 mRNA 之表現，WEWT 亦可提高 GPx、CuZnSOD、CAT 及 HO-1mRNA 的表現量，且於 0.5-1 小時達到最高量。此外傷害組之 pJNK、p38、pERK 等 MAPKs 蛋白質及 Nrf2 之表現量會下降，當介入 WEWT 於傷害組時可提高 p38、pERK 及 Nrf2 之表現量，且以 pERK 之表現量最為明顯。

關鍵詞：白茶，抗氧化酵素，抗氧化酵素 mRNA，MAPKs 蛋白質、Nrf2。

## Abstract

The functional properties of white tea in liver cell model system in my NSC grant (NSC 95-2313-B-041-009) has been elucidated. we try to investigate the regulative action and mechanism of white tea on antioxidant enzyme systems. WEWT raised the activity of GRd, SOD, CAT and GPx on cell viability of clone 9 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 2-3 hours. The expressions of antioxidant enzymes mRNA of GPx, CuZnSOD, CAT and HO-1 could induce by WEWT, and mRNA were shown highest levels at 0.5-1 h. In the other way, all MAPKs expression decreased by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury, including pJNK、p38、pERK. Expression of MAPKs protein could increase when WEWT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added at the same time, including p38, pERK, and Nrf2.

Key words: white tea, antioxidant enzyme, antioxidant enzymes mRNA, MAPKs, Nrf2

## 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  $\beta$ -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。由於執行 95 年度國科會研究計劃已經獲得初步的成果，白茶在以 TEAC 方法評估其抗氧化性之結果中，顯示白茶極具抗氧化性，且其效率不亞於 tocopherol，而其水萃取物對於大鼠肝臟上皮細胞 clone 9 於過氧化氫傷害下其抗氧化酵素活性亦有提升的功效。因有研究指出綠茶萃取物中的 EGCG 等多酚化合物除具抗氧化性，並有調節相關蛋白質表現的功效，所以推估同樣含有 EGCG 的白茶也具相近的功能性。由於抗氧化酵素的表現與上游數條路徑有關，在確認白茶可有效的提升下游抗氧化酵素活性後，本研究擬繼續探討抗氧化相關的酵素 mRNA 在細胞中表現量，並且探討上游蛋白質的表現，以評估其於細胞內之可能調控路徑。

## 三、結果與討論

### 1. WEWT 對細胞內抗氧化酵素活性之影響

圖一至圖五為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 內抗氧化酵素活性之影響。結果顯示 clone 9 細胞其 GST、GRd、SOD 和 CAT 之酵素活性皆於傷害後第二小時達到最高，而 GPx 則於傷害後第三小時達到最高點。當介入 WEWT 於過氧化氫傷害之細胞時，其 GRd、SOD、CAT 和 GPx 亦於第二及第三小時達到最大活性，而 GST 則延後至第四小時達到最大活性，且其 GPx、GST 及 GRd 皆比單獨添加傷害劑時，表現出較高之活性。

### 2. WEWT 對細胞內抗氧化酵素 mRNA 表現之影響

圖六為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 抗氧化酵素 mRNA 表現之影響，探討過氧化氫傷害及介入 WEWT 對細胞抗氧化酵素 mRNA 於不同時間點的表現。圖七為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 GPx mRNA 表現之影響，顯示細胞於傷害後第 0.5 小時其 GPx mRNA 表現量即增加，於第一小時表現量達到最高，當介入 WEWT 200  $\mu$ g/mL 時，細胞之 GPx mRNA 亦於第 0.5 小時表現量增加，且高於傷害組，並於第一小時表現量達到最高，而其他添加濃度則於第 0.5 小時表現量達到最高。圖八為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 CuZnSOD mRNA 表現之影響，顯示細胞於傷害後第 0.5 小時其 CuZnSOD mRNA 表現量即增加，於第一小時表現量達到最高，而添加 WEWT 200  $\mu$ g/mL 亦有相同的趨勢，而其他添加濃度則於第 0.5 小時表現量達到最高，且較低添加濃度其 mRNA 表現量較傷害組高。圖九為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 CAT mRNA 表現之影響，顯示細胞於傷害後第 0.5 小時其 CAT mRNA 表現量即增加，於第一小時表現量達到最高，而添加 WEWT 200  $\mu$ g/mL 亦有相同的趨勢，而其他添加濃度則於第 0.5 小時表現量達到最高，且其 mRNA 表現量較傷害組高。圖十為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 HO-1 mRNA 表現之影響，顯示細胞於傷害後

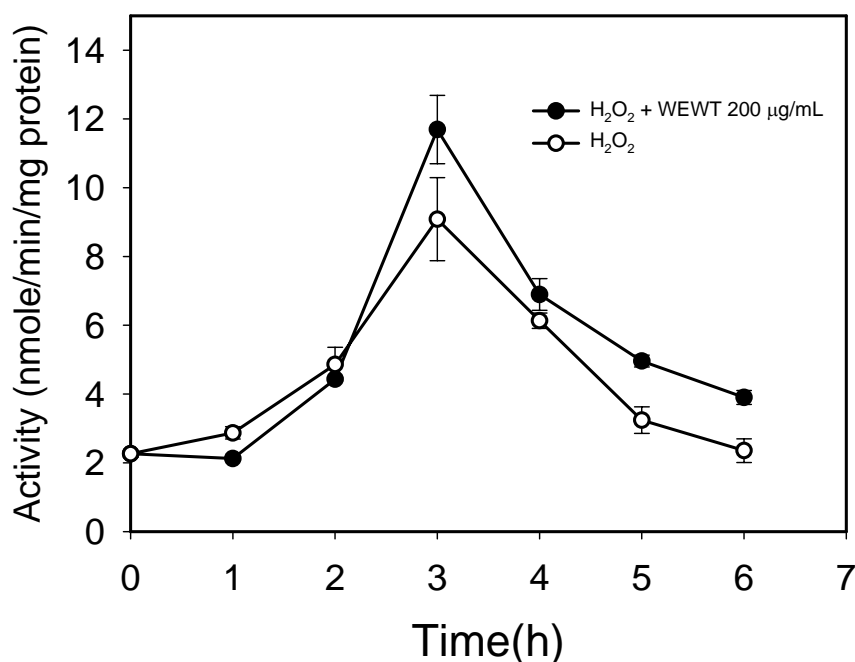
第 0.5 小時其 HO-1 mRNA 表現量即增加，於第一小時表現量達到最高，而添加 WEWT 亦有相同的趨勢，且其 mRNA 表現量較傷害組高。

### 3. WEWT 對細胞 MAPKs 及 Nrf 蛋白質表現之影響

圖十一為 WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 MAPKs 及 Nrf2 蛋白質表現之影響，顯示傷害組之 pJNK、p38、pERK 等 MAPKs 蛋白質及 Nrf2 之表現量會下降，當介入 WEWT 於傷害組時可提高 p38、pERK 及 Nrf2 之表現量，且以 pERK 之表現量最為明顯。

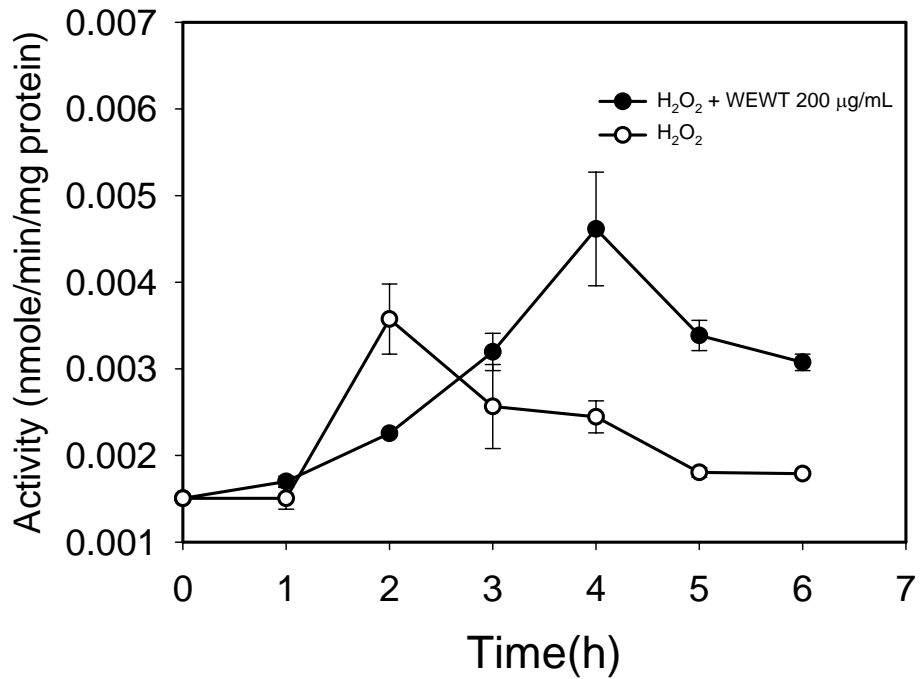
### 四、結論

本研究結果發現細胞以過氧化氫傷害時，添加 WEWT 可於 2-3 小時提高 GRd、SOD、CAT 和 GPx 等酵素之活性，且其 GPx、GST 及 GRd 皆比單獨添加傷害劑時，表現出較高之活性。而對於抗氧化酵素 mRNA 之表現，WEWT 亦可提高 GPx、CuZnSOD、CAT 及 HO-1mRNA 的表現量，且於 0.5-1 小時達到最高量。此外傷害組之 pJNK、p38、pERK 等 MAPKs 蛋白質及 Nrf2 之表現量會下降，當介入 WEWT 於傷害組時可提高 p38、pERK 及 Nrf2 之表現量，且以 pERK 之表現量最為明顯。



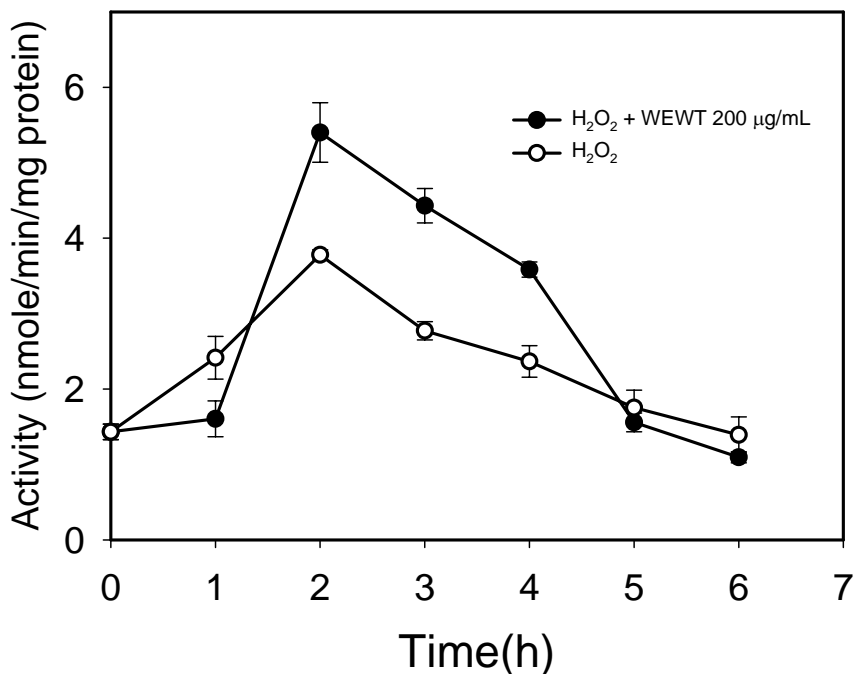
圖一、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 內 GPx 活性之影響

Fig 1. Effects of WEWT on GPx activities in clone 9 cells induced by 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-6 h. WEWT, water extracts of white tea; GPx : glutathione peroxidase.



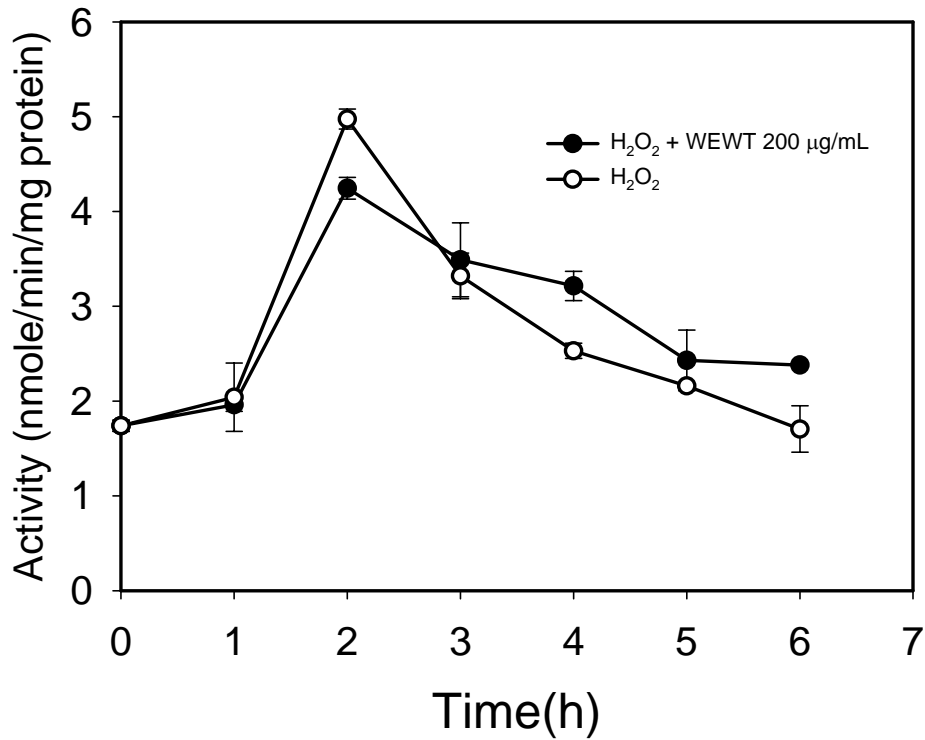
圖二、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 內 GST 活性之影響

Fig 2. Effects of WEWT on GST activities in clone 9 cells induced by 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-6 h. WEWT, water extracts of white tea; GST : glutathione S transferase..



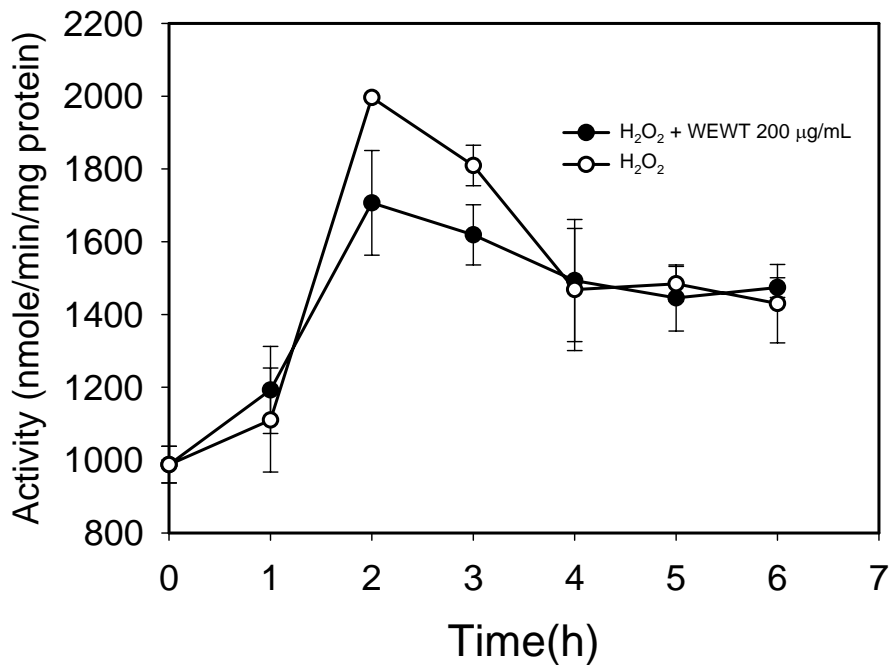
圖三、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 內 GRd 活性之影響

Fig 3. Effects of WEWT on GRd activities in clone 9 cells induced by 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-6 h. WEWT, water extracts of white tea; GRd : glutathione reductase.



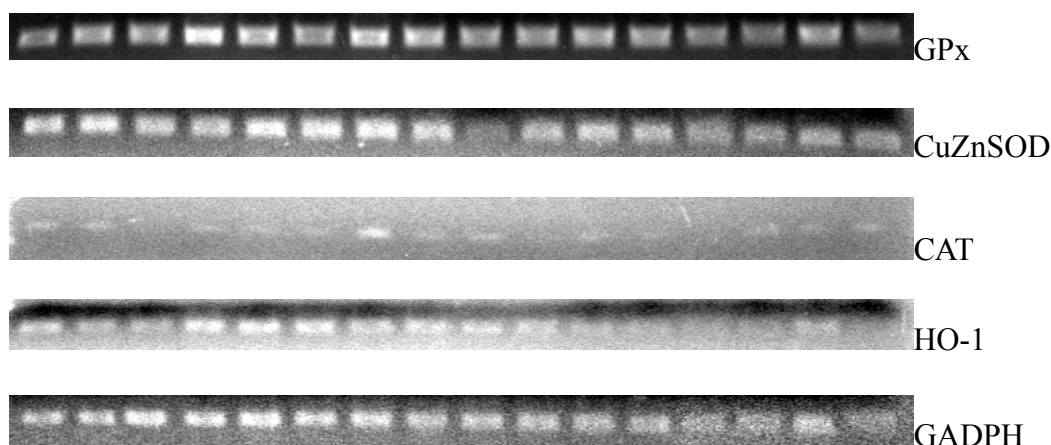
圖四、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 內 SOD 活性之影響

Fig 4. Effects of WEWT on SOD activities in clone 9 cells induced by 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-6 h. WEWT, water extracts of white tea; SOD : superoxide dismutase..



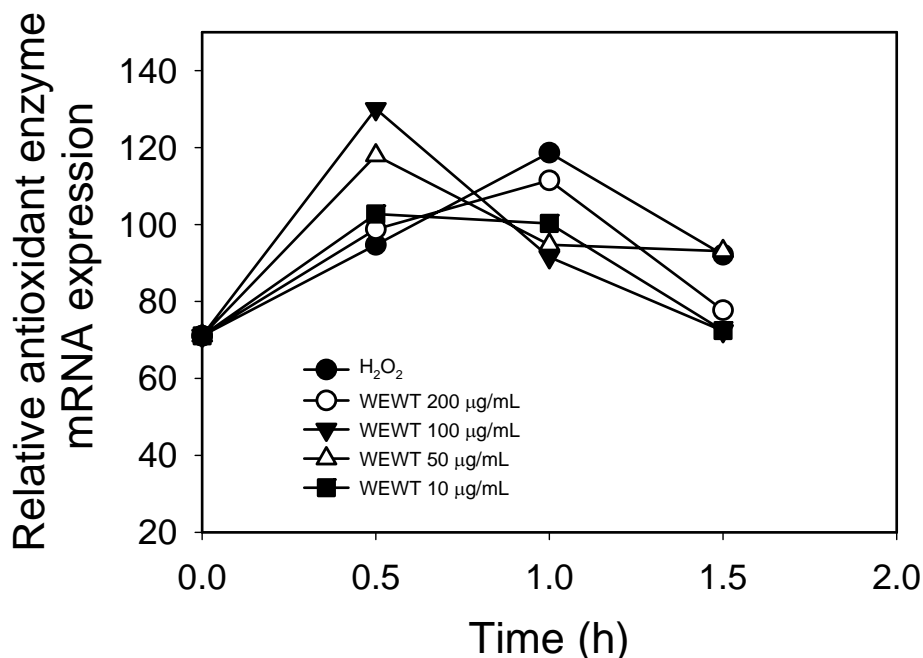
圖五、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 內 CAT 活性之影響

Fig 5. Effects of WEWT on CAT activities in clone 9 cells induced by 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-6 h. WEWT, water extracts of white tea; CAT : catalase.



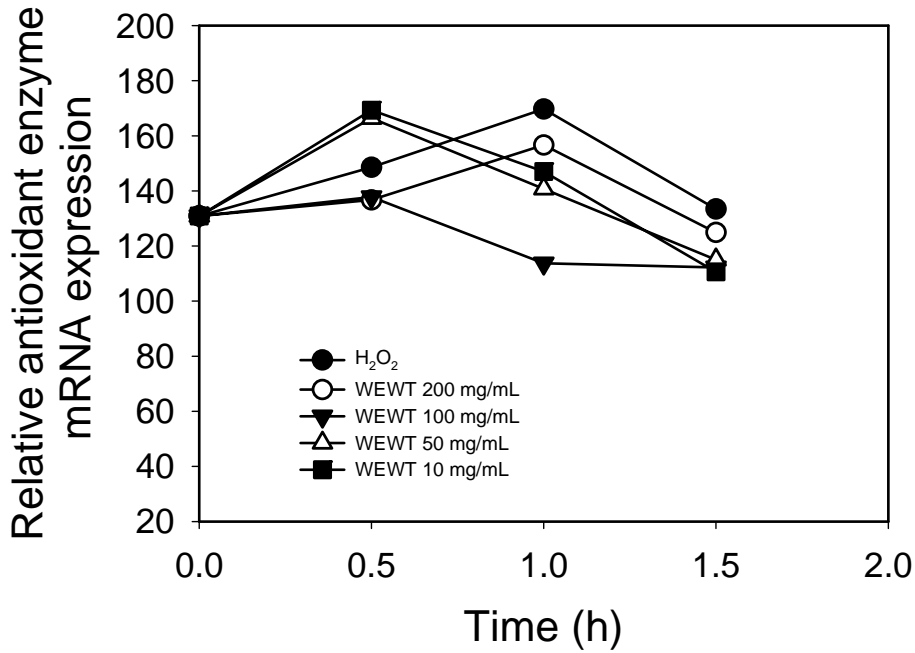
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WEWT	-	-	200	100	50	10	-200	100	50	10	-	200	100	50	10
Time(h)	0.5					1					1.5				

圖六、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 抗氧化酵素 mRNA 表現之影響  
 Fig 6. Effects of WEWT on antioxidant enzymes mRNA expression in clone 9 cells induced by 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-1.5 h. Expression of GPx, CuZnSOD, CAT, and HO-1 mRNA was analysis by RT-PCR. GADPH, the housekeeping gene, was used as an internal control.

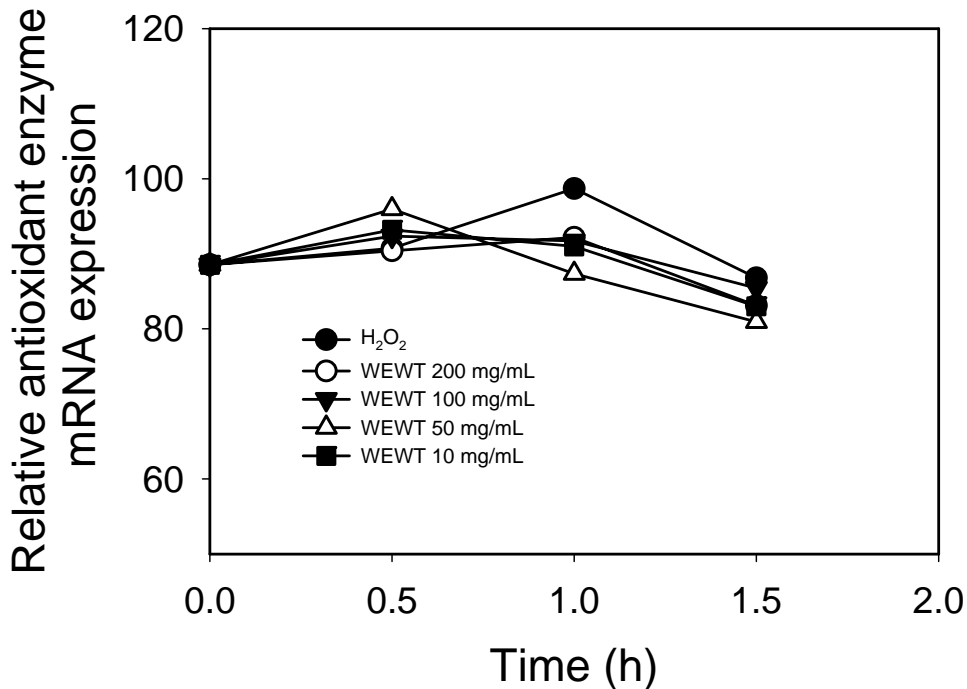


圖七、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 GPx mRNA 表現之影響  
 Fig 7. Effects of WEWT on GPx mRNA expression in clone 9 cells induced by 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-1.5 h. Expression of GPx mRNA was analysis by RT-PCR. GADPH, the housekeeping gene, was used as an internal control.

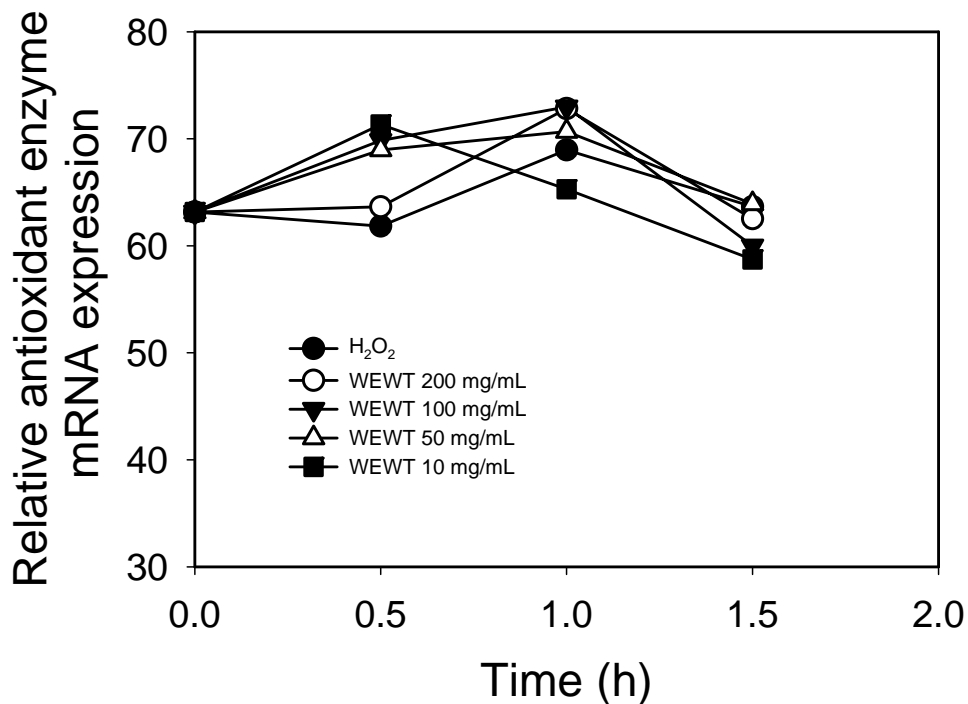




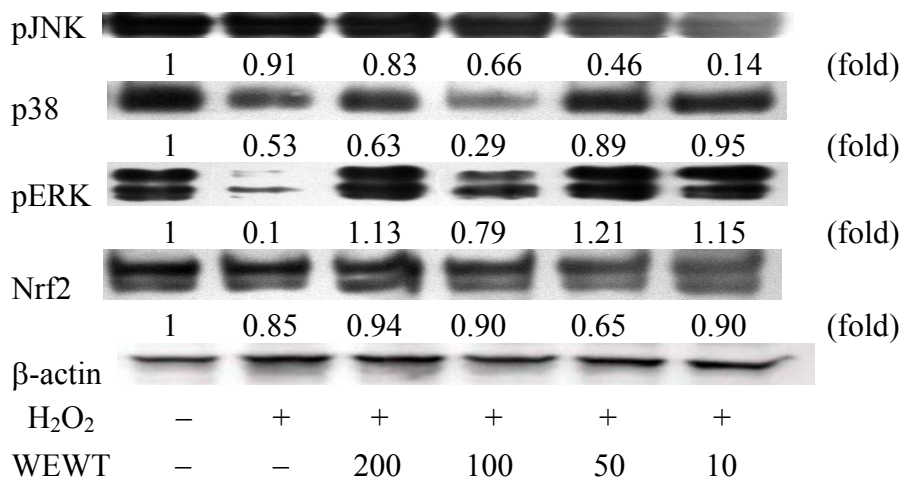
圖八、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 CuZnSOD mRNA 表現之影響  
 Fig 8. Effects of WEWT on CuZnSOD mRNA expression in clone 9 cells induced by 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-1.5 h. Expression of CuZnSOD mRNA was analysis by RT-PCR. GADPH, the housekeeping gene, was used as an internal control.



圖九、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 CAT mRNA 表現之影響  
 Fig 9. Effects of WEWT on CAT mRNA expression in clone 9 cells induced by 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-1.5 h. Expression of CAT mRNA was analysis by RT-PCR. GADPH, the housekeeping gene, was used as an internal control.



圖十、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 HO-1 mRNA 表現之影響  
 Fig 10. Effects of WEWT on HO-1 mRNA expression in clone 9 cells induced by 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-1.5 h. Expression of HO-1 mRNA was analysis by RT-PCR. GADPH, the housekeeping gene, was used as an internal control.



圖十一、WEWT 對過氧化氫誘發大鼠正常肝細胞 clone 9 之 MAPKs 及 Nrf2 蛋白質表現之影響

Fig 11. Effects of WEWT on proteins of MAPKs and Nrf2 expression in clone 9 cells induced by 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0-1.5 h.

## 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

## 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。本研究延續探討白茶之抗氧化功能外，也進一步驗證其於細胞內之可能調控路徑。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：97 年 10 月 25 日

<p><b>國科會補助計畫</b></p>	<p>計畫名稱：            白茶對抗氧化酵素調控及黑色素生成及誘導 B16 細胞凋亡機制之評估            The assessments of the regulations for the mechanism of antioxidative enzyme in clone9 cell, and melanogenesis and apoptosis in B16 cell by white tea            計畫主持人:晏文潔            計畫編號：NSC96-2313-B-041-003            學門領域：食品</p>
<p><b>技術/創作名稱</b></p>	
<p><b>發明人/創作人</b></p>	
<p><b>技術說明</b></p>	<p>中文：            本計畫將延續 95 年度國科會研究計劃的成果，探討白茶水萃取物 (water extracts of white tea, WEWT) 對細胞內源性抗氧化相關的酵素調控及其機制探討，並評估其於細胞內之可能調控路徑。結果顯示細胞以過氧化氫傷害時，添加 WEWT 可於 2-3 小時提高 GRd、SOD、CAT 和 GPx 等酵素之活性，且其 GPx、GST 及 GRd 皆比單獨添加傷害劑時，表現出較高之活性。而對於抗氧化酵素 mRNA 之表現，WEWT 亦可提高 GPx、CuZnSOD、CAT 及 HO-1mRNA 的表現量，且於 0.5-1 小時達到最高量。此外傷害組之 pJNK、p38、pERK 等 MAPKs 蛋白質及 Nrf2 之表現量會下降，當介入 WEWT 於傷害組時可提高 p38、pERK 及 Nrf2 之表現量，且以 pERK 之表現量最為明顯。</p>

	<p>英文：</p> <p>The functional properties of white tea in liver cell model system in my NSC grant (NSC 95-2313-B-041-009) has been elucidated. we try to investigate the regulative action and mechanism of white tea on antioxidant enzyme systems. WEWT raised the activity of GRd, SOD, CAT and GPx on cell viability of clone 9 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 2-3 hours. The expressions of antioxidant enzymes mRNA of GPx, CuZnSOD, CAT and HO-1 could induce by WEWT, and mRNA were shown highest levels at 0.5-1 h. In the other way, all MAPKs expression decreased by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury, including pJNK、p38、pERK. Expression of MAPKs protein could increase when WEWT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added at the same time, including p38, pERK, and Nrf2.</p>
<p>可利用之產業 及 可開發之產品</p>	<p>食品工業應用及健康食品之開發</p>
<p>技術特點</p>	<p>細胞培養技術及抗氧化功能評估</p>
<p>推廣及運用的價值</p>	<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，除證明白茶之抗氧化功能外，也進一步驗證其於細胞內之可能調控路徑。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。