

臺灣產筋骨草生物活性及基因毒理分析

劉芳妙、孫芳君

E-mail: 321840@mail.dyu.edu.tw

摘要

筋骨草又稱為散血草，於民俗療法中具有消腫止血、止咳、清熱解毒、抗發炎、抑制腫瘤及減緩心血管疾病功效。由於筋骨草之生理活性並未被完整的探討，因此本研究利用不同細胞平台檢測不同條件萃取之台灣產筋骨草萃取液的功能性(包含抗氧化、抗發炎、腫瘤抑制)及基因毒理安全性評估。四株台灣產筋骨草以五種不同萃取條件萃取，經研究結果顯示，75%酒精萃取之矮筋骨草萃取液的抗氧化功能最明顯；而抗發炎和腫瘤抑制方面，以25%酒精萃取之矮筋骨草萃取液的抗發炎效果為最佳。另外為了探討筋骨草萃取液是否會造成肝癌細胞氧化壓力或內質網逆境的產生，並導致肝癌細胞(HepG2)死亡，故本研究利用不同試驗平台進行檢測。結果顯示筋骨草萃取液會促使肝癌細胞(HepG2)氧自由基(ROS)上升，並且誘發內質網逆境。此外本研究亦針對樣品進行基因安全性評估，試驗平台以微生物及細胞為主，經試驗發現筋骨草萃取液不具基因突變力。

關鍵詞：筋骨草 生物活性功能評估 安全性評估

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書	iii 中文摘要
iv 英文摘要	v 誌謝
vi 目錄	vii 圖目錄
vii 表目錄	xiv 第一章 研究
相關背景	1 第二章 研究動機
16 第三章 材料方法	17 第四章 實驗結果
31 第一節 細胞存活率測試	36 第三節 台
31 第二節 台灣產筋骨草萃取液之抗氧化能力分析	42 第四節 筋骨草萃取液誘導
灣產筋骨草萃取液之抗發炎能力分析	46 第五節 筋骨草萃取液誘導細胞內
氧化壓力造成HepG2細胞死亡	51 第六節 基因毒理安全性評估
質網逆境產生	60 第五章 結論
53 第七節 討論	64
63 參考文獻	
圖目錄 圖1. 四株台灣產筋骨草萃取液對CHO-K1及HepG2 細胞毒殺之影響	
33 圖2. 四株台灣產筋骨草五種萃取條件萃取液之氧清除自由 基能力分析	
37 圖3. 台灣產筋骨草之細胞內GSH含量分析	40
圖4. 台灣產筋骨草萃取液之移除一氧化氮能力分析	44 圖5. 台灣產筋
骨草萃取液對LPS誘導巨噬細胞 TNF-alpha 及 iNOS 之影響	45 圖6.
四種台灣產筋骨25%酒精萃取液對HepG2之氧化傷害 影響	48 圖7.
不同萃取條件之台灣產筋骨草萃取液對 HepG2 細胞 中ROS含量影響	
49 圖8. 25%酒精萃取之矮筋骨草萃取液作用於HepG2 細胞 NF- B表現量偵測	
50 圖9. 四株台灣產筋骨草作用於HepG2細胞內質網逆境基因 grp78表現之情形	
52 表目錄 表1. 25%酒精萃取之台灣筋骨草萃取液對TA98及TA100毒性測試(-S9)	
55 表2. 25%酒精萃取之台灣筋骨草萃取液對TA98及TA100毒性測試(+S9)	
56 表3. 25%酒精萃取之台灣筋骨草萃取液對於TA98及 TA100致突變測試結	
果	57 表4. 25%酒精萃取之台灣產筋骨草染色體變異測試結果
	59

參考文獻

參考文獻 1.王艷和張鐵軍。2005。微波萃取技術在中藥有效成分提取中的應用。中草?嶼 x3 (36): 470-473。 2.吳立軍。2006。中藥化學。第1-33頁。科技圖書館。台北。台灣。李岡榮。2005。實用台灣草藥百科。第108頁。漢宇國際文化有限公司。臺北。台灣。 3.吳旭

、王武軍、張軍花、熊俊和侯量。2006。植物藥有效成分 - 蛻皮激素抑制血管內皮細胞的凋亡。中國臨床康10 (19)72-73。4.吳德峰。1997。淺析筋骨草的藥用價值。福建畜牧獸醫(1)32-33。5.林進和唐仕榮。2005。論天然黃酮類化合物及其抗氧化作用。徐州工程學院學報20:187-190。6.邱年永和張光雄。2001。原色台灣藥用植物圖鑑(6)。第181及184頁。南天書局有限公司。台北。台灣。7.邱明華和邢其毅。1998。具有生理活性的天然有機化合物。化學進展10 (3):265-272。8.金繼曙和都述虎。1994。筋骨草中黃酮類成份的研究。安徽醫學15(2):51-52。9.武繼彪、隋在雲和張玲。2001。 - 蛻皮甙延緩衰老的初步實驗研究。天然產物研究與開發13(5):28-29。10.徐世清、戈志強、戴漩穎、喬洪根、司馬楊虎和鄭必平。2005。20-羥基蛻皮酮的藥理作用和醫學應用研究進展。科技通報21(1):56-62。11.陳美旋。2008。台灣產之不同筋骨草屬蛻皮甙酮、總黃酮及抗氧化能力的分析比較。大葉大學生物產業科技學系。12.馬志平和黃榕。2002。筋骨草有效部位黃酮類粗品的保肝試驗。海峽藥學14(5):40-41。13.張英、俞卓裕和吳曉琴。2004。中草藥和天然植物有效成分提取新技術-微波協助萃取。中國中藥雜誌29 (2):104-108。14.張曉東、潘國鳳和呂圭源。超聲提取在中藥化學成分提取中的應用研究進展。2004。時珍國醫國藥15(12):861-862。15.曾茂貴、賈鈞和吳符火。2003。筋骨草對小鼠S180肉瘤的抑瘤試驗。福建中醫學院學報13(2):30-31。16.單文軍、郭芳齡、王科軍和徐建平。2006。微波技術在天然產物生物活性成份提取中的應用研究。江西化工(4):46-49。17.楊遠波、劉和義、彭鏡毅、施炳霖和呂勝由編著。1999。臺灣維管束植物簡誌第四卷，行政院農業委員會，台北，臺灣。18.褚小蘭和王漢章。1997。筋骨草的本草考証。中藥材20(11): 586-587。19.鄧湘慶和龔盛昭。2006。微波輔助萃取中藥有效成分的研究進展。廣東化工 33(164):89-92。20.劉斌、石任兵、葛小俠、周瑩和周靜。2001。筋骨草屬植物化學成分與藥理活性。國外醫藥 (植物藥分冊) 16 (3):96-101。21.蔡旻都和陳皓君。2006。蔬果中類黃酮之抗氧化作用與生物活性。化學64(3):315-353。22.賴建福。2010。四種台灣產筋骨草活性成份含量及其抗氧化能力之分析比較。大葉大學生物產業科技學系。23.薛聰賢。2003。台灣原生景觀植物圖鑑。第149頁。台灣普綠有限公司出版部。彰化。台灣。謝宗欣。1998。台灣筋骨草屬植物介紹。自然保育季刊21:21-27。24.龍春、高志強、陳鳳鳴和王林。2006。黃酮類化合物的結構-抗氧化活性關係研究進展。重慶文理學院學報(自然科學版)5(2):13-17。25.鍾錠全。1997。青草世界-彩色圖鑑。第273頁。協聯印書館股份有限公司。台北。台灣。26.蕭久富。2007。不同萃取方法對台灣筋骨草及匍匐筋骨草活性成分之比較研究。大葉大學碩士論文。27.蕭培根。1990。中國本草圖錄。第123頁。台灣商務印書館股份有限公司。台北。台灣。28. Adhikari, S., Joshi, R., Patro, B.S., Ghanty, T.K., Chintalwar, G.J., Sharma, A., Chattopadhyay, S., and Mukherjee, T. (2003). Antioxidant activity of bakuchiol: experimental evidences and theoretical treatments on the possible involvement of the terpenoid chain. *Chem Res Toxicol* 16, 1062-1069. 29. Araghiniknam, M., Chung, S., Nelson-White, T., Eskelson, C., and Watson, R.R. (1996). Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sci* 59, PL147-157. 30. Aviram, M., and Fuhrman, B. (2002). Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 957, 146-161. 31. Barbieri, S.S., Eligini, S., Brambilla, M., Tremoli, E., and Colli, S. (2003). Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 60, 187-197. 32. Barnes, P.J., and Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336, 1066-1071. 33. Beutler, B. (1995). TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med* 43, 227-235. 34. Bhor, V.M., Raghuram, N., and Sivakami, S. (2004). Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 89-97. 35. Camuesco, D., Comalada, M., Rodriguez-Cabezas, M.E., Nieto, A., Lorente, M.D., Concha, A., Zarzuelo, A., and Galvez, J. (2004). The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 143, 908-918. 36. Chen, H.S., Tsai, Y.F., Lin, S., Lin, C.C., Khoo, K.H., Lin, C.H., and Wong, C.H. (2004). Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorg Med Chem* 12, 5595-5601. 37. Chenni, A., Yahia, D.A., Boukourt, F.O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., and Bouchenak, M. (2007). Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J Ethnopharmacol* 109, 207-213. 38. Da Ros, R., Assaloni, R., and Ceriello, A. (2004). The preventive anti-oxidant action of thiazolidinediones: a new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance. *Diabet Med* 21, 1249-1252. 39. de Mello, S.B., Novaes, G.S., Laurindo, I.M., Muscara, M.N., Maciel, F.M., and Cossermelli, W. (1997). Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm Res* 46, 72-77. 40. Dhandapani, S., Subramanian, V.R., Rajagopal, S., and Namasivayam, N. (2002). Hypolipidemic effect of *Cuminum cyminum* L. on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 46, 251-255. 41. Eddouks, M., Lemhadri, A., Zeggwagh, N.A., and Michel, J.B. (2005). Potent hypoglycaemic activity of the aqueous extract of *Chamaemelum nobile* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 67, 189-195. 42. El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., and Lyoussi, B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J Ethnopharmacol* 86, 149-158. 43. El Hilaly, J., Israili, Z.H., and Lyoussi, B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 91, 43-50. 44. El Hilaly, J., and Lyoussi, B. (2002). Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 80, 109-113. 45. Fujimoto, Y., Ohyama, K., Nomura, K., Hyodo, R., Takahashi, K., Yamada, J., and Morisaki, M. (2000). Biosynthesis of sterols and ecdysteroids in *Ajuga hairy* roots. *Lipids* 35, 279-288. 46. Glover, A., and Assinder, S.J. (2006). Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *J Endocrinol* 189, 565-573. 47. Ikan, R., and Ravid, U. (1971). The isolation and identification of ecdysterone from *Ajuga iva*. *Planta Med* 20, 33-35. 48. Kariba, R.M. (2001). Antifungal activity of *Ajuga remota*. *Fitoterapia* 72, 177-178. 49. Khafagy, S.M., Sabri, N.N., El-Sebakhy, N., Blessington, B., and Asaad, A. (1979). A C-20 ecdysone-like substance from *Ajuga iva*. *Planta Med* 35, 184-185. 50. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., and Nishino, H. (2000). Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*. *Cancer Lett* 157, 87-92. 51. Koop, C.E. (2002). The future of medicine. *Science* 295, 233. 52. Kuria, K.A., Chepkwony, H., Govaerts, C., Roets, E., Busson, R., De Witte, P., Zupko, I., Hoornaert, G.,

Quiryneen, L., Maes, L., et al. (2002). The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*. *J Nat Prod* 65, 789-793. 53. Kuria, K.A., De Coster, S., Muriuki, G., Masengo, W., Kibwage, I., Hoogmartens, J., and Laekeman, G.M. (2001). Antimalarial activity of *Ajuga remota* Benth (Labiatae) and *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpinaceae): in vitro confirmation of ethnopharmacological use. *J Ethnopharmacol* 74, 141-148. 54. Kuria, K.A., and Muriuki, G. (1984). A new cardiotonic agent from *Ajuga remota* Benth (Labiatae). *East Afr Med J* 61, 533-538. 55. Liao, S.C., Chiu, T.F., Chen, J.C., and Lin, C.C. (2005). *Ajuga nipponensis* Makino poisoning. *Clin Toxicol (Phila)* 43, 583-585. 56. Litchfield, J.T., Jr., and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96, 99-113. 57. Manthey, J.A., Grohmann, K., and Guthrie, N. (2001). Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem* 8, 135-153. 58. Mellstedt, H., Fagerberg, J., Frodin, J.E., Henriksson, L., Hjelm-Skoog, A.L., Liljefors, M., Ragnhammar, P., Shetye, J., and Osterborg, A. (1999). Augmentation of the immune response with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol* 6, 169-175. 59. Minhajuddin, M., Beg, Z.H., and Iqbal, J. (2005). Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol* 43, 747-753. 60. Mnich, S.J., Hiebsch, R.R., Huff, R.M., and Muthian, S. Anti-inflammatory properties of CB1-receptor antagonist involves beta2 adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 333, 445-453. 61. Murakami, A., Nakamura, Y., Torikai, K., Tanaka, T., Koshiba, T., Koshimizu, K., Kuwahara, S., Takahashi, Y., Ogawa, K., Yano, M., et al. (2000). Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res* 60, 5059-5066. 62. Nakano, A., Watanabe, N., Nishizaki, Y., Takashimizu, S., and Matsuzaki, S. (2003). Immunohistochemical studies on the expression of P-glycoprotein and p53 in relation to histological differentiation and cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 25, 158-165. 63. Odek-Ogunde, M., Rajab, M.S., Migwi, G.J., and Ndegwa, J.M. (1993). Blood pressure responses to an extract of *Ajuga remota* in experimentally hypertensive rats. *Planta Med* 59, 573-574. 64. Sprenger, N., and Keller, F. (2000). Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. *Plant J* 21, 249-258. 65. Yang, N.S., Wang, J.H., and Turner, J. (2004). Molecular strategies for improving cytokine transgene expression in normal and malignant tissues. *Gene Ther* 11, 100-108. 66. Yuan, R., and Lin, Y. (2000). Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacol Ther* 86, 191-198. 67. Zhu, Y.Z., Huang, S.H., Tan, B.K., Sun, J., Whiteman, M., and Zhu, Y.C. (2004). Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Nat Prod Rep* 21, 47