

萃取純化稜軸土人參多醣及促進一氧化氮產生之抑癌效果

蔣博豪、蔡明勳

E-mail: 364813@mail.dyu.edu.tw

摘要

衛生署的統計資料顯示，國人因癌症的死亡率已連續三十年為所有致死因素的首位。目前癌症的治療藥物仍以較無專一性的化學藥物為主，常會引起許多副作用，所以較低毒性、甚至無毒的中草藥或天然植物成為抗癌的熱門研究方向。稜軸土人參傳說有許多保健功效，但僅有其多醣的抗氧化能力與保肝功能的文獻發表，因此本研究探討稜軸土人參多醣是否具有調節發炎或抗腫瘤的作用。首先利用L9直交表找出稜軸土人參多醣以純水萃取的最佳條件：以熱回流方式為溫度95、固液比1/20、時間150分鐘；以超音波輔助方式為溫度85、固液比1/20、時間75分鐘，兩種方式的多醣最大產率同為3.1%。將以乙醇沉澱後的多醣回溶與定量後，利用透析膜將回溶的多醣分離成大、小分子量兩種，這兩種多醣都可活化RAW264.7小鼠巨噬細胞產生發炎作用，使其分泌一氧化氮(NO)，但在相同濃度下，大分子量多醣誘導巨噬細胞產生NO的量較多，具有較好的促發炎效果。接著收集經多醣處理後的巨噬細胞培養液，作為腫瘤細胞的條件培養基，結果顯示多醣處理後的條件培養基對子宮頸癌HeLa與大腸癌SW620細胞都具有顯著的抑制生長效果，且大分子量多醣之抑制率較佳，但是直接以多醣處理腫瘤細胞則沒有抑制生長效果。再將大分子量多醣利用陰離子交換樹脂分離出7種分餾液，發現分餾後的多醣誘導NO的產量與對腫瘤細胞的抑制效果均較原大分子量多醣差，可能因調節巨噬細胞免疫反應非單一分餾多醣可完全誘導。由上述結果推測稜軸土人參多醣可以調節巨噬細胞的發炎功能，進而增加抗腫瘤的活性。

關鍵詞：稜軸土人參、多醣的最佳萃取條件、一氧化氮、促發炎反應、抑癌作用

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 中文摘要iii 英文摘要v 誌謝vii 目錄viii 圖目錄xii 表目錄xiv 1.緒論1 2.文獻回顧2 2.1稜軸土人參2 2.2常見中草藥萃取方法簡介4 2.2.1冷浸攪拌萃取法4 2.2.2熱迴流萃取法5 2.2.3超音波輔助萃取5 2.3多醣化合物6 2.4巨噬細胞之功能7 2.5免疫活性評估7 2.6癌症8 2.6.1大腸癌8 2.6.2子宮頸癌9 3.材料與方法10 3.1試驗材料10 3.1.1植物來源10 3.1.2細胞株來源10 3.1.3藥品清單10 3.1.4儀器清單11 3.2稜軸土人參多醣最佳萃取條件12 3.2.1熱迴流萃取稜軸土人參多醣最佳條件12 3.2.2超音波最佳稜軸土人參多醣萃取條件15 3.2.3成分分析-多醣分析16 3.3乙醇沉澱條件評估17 3.4透析膜透析分離大、小分子量多醣17 3.5陰離子交換樹脂分離純化稜軸土人參多醣18 3.5.1 DEAE Sepharose Fast Flow樹脂前處理18 3.5.2以樹脂層析法分離稜軸土人參多醣18 3.6細胞培養20 3.7一氧化氮(NO)產量分析21 3.8稜軸土人參多醣處理所得RAW264.7細胞條件培養液的製備22 3.9免疫調節試驗(抗癌細胞試驗)22 3.9.1利用倒立式顯微鏡檢測多醣溶液處理的癌細胞數目與形態22 3.9.2細胞存活率試驗(Tetrazolium dye colorimetric assay, MTT assay)23 3.10統計分析24 4.結果與討論25 4.1熱迴流萃取單因子探討25 4.1.1熱迴流萃取稜軸土人參多醣-不同的萃取溫度對多醣產率之探討25 4.1.2熱迴流萃取稜軸土人參多醣-不同的萃取時間對多醣產率之探討27 4.1.3熱迴流萃取稜軸土人參多醣-不同的固液比對多醣產率之探討29 4.2熱迴流萃取稜軸土人參多醣直交表試驗31 4.3超音波萃取稜軸土人參多醣單因子探討35 4.3.1超音波萃取稜軸土人參多醣-不同的萃取溫度對多醣產率之探討35 4.3.2超音波萃取稜軸土人參多醣-不同的萃取固液比對多醣產率之探討37 4.3.3超音波萃取稜軸土人參多醣-不同的萃取時間對多醣產率之探討39 4.4超音波萃取稜軸土人參多醣直交表試驗41 4.5熱迴流萃取與超音波萃取稜軸土人參多醣產率之比較45 4.6乙醇沉澱條件評估47 4.7免疫活性評估-測量一氧化氮(NO)產生量49 4.8利用倒立式顯微鏡檢測經多醣溶液處理的癌細胞數目與形態51 4.8.1稜軸土人參多醣對子宮頸癌細胞株(HeLa)癌細胞數目與形態之影響51 4.8.2稜軸土人參多醣對大腸癌細胞株(SW620)的細胞數目與形態之影響55 4.9以樹脂層析法分離不同稜軸土人參多醣59 4.10各多醣分餾液對巨噬細胞產生NO產量及活化細胞免疫活性評估61 4.11稜軸土人參多醣處理的條件培養液培養癌細胞之生長抑制率評估63 5.結論67 參考文獻69 圖目錄 圖2-1稜軸土人參植株3 圖4-1熱迴流萃取稜軸土人參多醣-不同萃取溫度對多醣產率影響26 圖4-2熱迴流萃取稜軸土人參多醣-不同萃取時間對多醣產率影響28 圖4-3熱迴流萃取稜軸土人參多醣-不同萃取固液比對多醣產率影響30 圖4-4熱迴流萃取稜軸土人參多醣-L9直交表試驗中各項萃取因子之訊號與雜訊(S/N)比值34 圖4-5超音波萃取稜軸土人參多醣-不同萃取溫度對多醣產率影響36 圖4-6超音波萃取稜軸土人參多醣-不同萃取固液比對多醣產率的影響38 圖4-7超音波萃取稜軸土人參多醣-不同萃取時間對多醣產率影響40 圖4-8超音波萃取稜軸土人參多醣-L9各項萃取因子之訊號與雜訊(S/N)比值 圖4-9熱迴流與超音波萃取稜軸土人參多醣最佳條件之產率比較 圖4-10乙醇沉澱稜軸土人參多醣條件評估-各多醣濃度下乙醇沉澱後多醣回收率之結果48 圖4-11各樣品誘導RAW264.7巨噬細胞產生NO量之比較50 圖4-12利用顯微鏡觀察直接添加大、小分子量稜軸土人參多醣對子宮頸癌細胞數目與形態的影響53 圖4-13利用顯微鏡觀察經由稜軸土人參多醣處理的RAW264.7巨噬細胞條件培養液培養子宮頸癌細胞之數目與形態54 圖4-14利用顯微鏡觀察直接添加大、小分子量稜軸土人參多醣對大腸癌細胞數目與形態的影響56 圖4-15利用顯微鏡觀察經由稜軸土人參多醣處理的RAW264.7巨噬細胞條

件培養液培養大腸癌細胞之形態57 圖4-16a利用顯微鏡觀察經由PBS處理的巨噬細胞條件培養液培養大腸癌細胞形態之局部放大圖58 圖4-16b利用顯微鏡觀察經由大分子量多醣處理的巨噬細胞條件培養液培養大腸癌細胞形態之局部放大圖58 圖4-17經由DEAE Sepharose Fast Flow樹脂分離稜軸土人參大分子量多醣60 圖4-18各樣品誘導RAW264.7巨噬細胞產生NO量之比較62 圖4-19條件培養液處理子宮頸癌細胞活性檢測-MTT assay65 圖4-20條件培養液處理大腸癌抗細胞活性檢測-MTT assay66 表目錄 表4-1熱回流萃取稜軸土人參多醣L9直交表各因子與參數範圍32 表4-2熱回流萃取稜軸土人參多醣L9直交試驗表所得結果33 表4-3超音波萃取稜軸土人參多醣L9直交表各因子與參數範圍42 表4-4超音波萃取稜軸土人參多醣L9直交試驗表43

參考文獻

- 1.王承中。2011。微波輔助及超音波輔助萃取千層塔中石杉鹼甲之最佳條件探討及萃取液活性成分分析。大葉大學碩士論文。
- 2.台超科技股份有限公司(2012)。超音波技術。檢索自: <http://www.tst.tw/technology-more.php?Key=2>
- 3.行政院衛生署(2012)。100年國人主要死因統計。檢索自: http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_p01.aspx?class_no=25&level_no=1&doc_no=84788
- 4.何競旻、王瑞俠、黃勁松 編著。2009。超聲波在藥用植物提取中的應用研究。(23冊)池州師範專科學校學報編輯部出版社。
- 5.余漢謀、姜興濤、肖海鴻、李慶廷、燕飛宇 編著。2011。超聲波輔助萃取天然植物香料研究進展。(Research Progress in Ultrasound Assisted Extraction of Natural Plant Flavor)(2011冊)香料香精化妝品編輯部出版社。
- 6.吳亭瑤。2008。1999-2008健康食品管理法邁向十年-六項靈芝產品取得八張健康食品認證。健康靈芝 40:22-29。
- 7.邱士峰。2003。甲魚萃取物之生體外免疫調節功能評估。國立台灣海洋大學碩士論文。
- 8.姚遠賢、謝東呈、蘇淑芬、王守玉。2011。現今大腸癌之治療趨勢。弘光學報 :72-92。
- 9.財團法人台灣癌症基金會(2012)。癌症的起因與生成。檢索自: http://www.canceraway.org.tw/CancerNews_Show22.asp?AppCode=SITEPAGES&ID=27
- 10.財團法人台灣癌症臨床研究發展基金會。2012。認識大腸直腸癌。
- 11.許耿福。2010。人類乳突病毒與子宮頸癌。科學發展月刊:50-55。
- 12.陳志璋。2011。牛初乳蛋白水解物在體外之免疫調節及細胞活性之研究。大葉大學博士論文。
- 13.癌症研究組 編著。1998。大腸直腸癌診斷與治療之共識。第2頁。國家衛生研究院出版社。台北。
- 14.Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74,324 – 329.
- 15.Bruck, R., Aeed, H., Avni, Y., Shirin, H., Matas, Z., Shahmurov, M., Avinoach, I., Zozulya, G., Weizman, N., Hochman, A., 2004. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *Journal of Hepatology* 40,86 – 93.
- 16.Cheng, A., F. Wan, J. Wang, Z. Jin, and X. Xu. 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fish. *International immunopharmacology*. 8:43-50.
- 17.Ge, Y., Y. Duan, G. Fang, Y. Zhang, and S. Wang. 2009. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: Isolation, purification, structural features and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*. 77:188-193.
- 18.Karnjanapratum, S., and S. You. 2011. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48:311-318.
- 19.Liang, D., Q. Zhou, W. Gong, Y. Wang, Z. Nie, H. He, J. Li, J. Wu, C. Wu, and J. Zhang. 2011. Studies on the antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Talinum triangulare*. *Journal of ethnopharmacology*. 136:316-321.
- 20.Singodia, D., A. Verma, R.K. Verma, and P.R. Mishra. 2012. Investigations into an alternate approach to target mannose receptors on macrophages using 4-sulfated N-acetyl galactosamine more efficiently in comparison with mannose-decorated liposomes: an application in drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 8:468-477.
- 21.Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, Joshua, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39,44 – 84.
- 22.Zhao, L., Y. Dong, G. Chen, and Q. Hu. 2010. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*. 80:783-789.