

計畫編號：DOH89-TD- 1047

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度
科技研究發展計畫

洛神花成分及保健機能之評估(三)

原兒茶酸對 t-butylhydroperoxide 誘發鼠肝氧化性損傷之影響

研 究 報 告

執行機構： 中山醫學院

計畫主持人： 曾翠華

研究人員： 王俊民 林偉隆 劉春蘭

執行期間： 88 年 7 月 1 日至 89 年 6 月 30 日

＊ ＊ 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 ＊ ＊

目 錄

中文摘要	2
英文摘要	3
前言	4
材料與方法	6
結果	14
討論	20
結論與建議	24
參考文獻	25
圖、表	31

中文摘要

原兒茶酸(protocatechuic acid: PCA) 是一結構簡單之多酚類化合物，廣佈於蔬菜、水果、花和胡桃中，而本研究室先前從臺灣受歡迎的洛神花茶中分離出此化合物，並於體外活性分析中發現：原兒茶酸具有清除自由基的能力，對於 tert-butylhydroperoxide (t-BHP)引起的鼠肝細胞毒性具有保護作用。本研究乃進行體內實驗，首先建立 t-BHP 誘發老鼠體內氧化性肝損傷之模式，再以胃管預先給予老鼠灌食原兒茶酸(50 mg/kg、100 mg/kg)連續五天，觀察原兒茶酸是否降低 t-BHP 所誘發之肝毒性，實驗中發現老鼠腹腔注射 0.2 mmol/kg 之 t-BHP 18h 後，可誘發血清中肝功能生化指標 alanine aminotransaminase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST)值之升高，肝組織之脂質過氧化增加、GSH 的減少及在病理組織切片中發現肝組織之病變如白血球侵潤及壞死等，而預先灌食連續5天之原兒茶酸 (50 mg/kg、100 mg/kg) 則能有效抑制 t-BHP 所誘發之肝毒性現象，且此作用與原兒茶酸之抗氧化活性有密切關係。

關鍵字：原兒茶酸，抗氧化，洛神花，氧化性肝毒性

英文摘要

Protocatechuic acid, a simple phenolic compound, is isolated from *Hibiscus sabdariffa* L which is a Chinese traditional herb and beverage material in Taiwan. In our previous study, protocatechuic acid (PCA) possesses antioxidant property and anticarcinogenic potentials. Since increasing evidence of free-radical generating agents and inflammatory process suggests accumulation of reactive oxygen species involving hepatotoxicity, in this experiment, we used tert-butylhydroperoxide (t-BHP) to induced hepatic oxidative stress. We found that t-BHP (0.2mmol/kg i.p. for 18h) significantly increased the serum hepatic enzyme markers alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase (ALT and AST), increased formation of hepatic lipid peroxidation, decreased hepatic reduced form of glutathione (GSH) level and inducing hepatic damage such as leukocytes infiltration and cellular necrosis. If we pretreated PCA (50 mg/kg 、 100 mg/kg) for 5 days before t-BHP administration, it showed that PCA inhibited t-BHP-induced hepatotoxicity significantly. The protective effect of PCA was associated with its antioxidant potential.

Key words: Protocatechuic acid, tert-butylhydroperoxide, hepatotoxicity, antioxidant, *Hibiscus sabdariffa* L.

前 言

近年來很多報告提出生物體過多的活性氧系(ROS: $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{RO}\cdot$ 、 H_2O_2 、 O_2^- , etc.)堆積將導致氧化性傷害，此過程與發炎、癌症或退行性疾病有密切關係(1-4)，而活性氧系的來源很多如:由飲食攝入、細菌或病毒感染、抽煙及生理代謝等(5-6)，雖然生物體有一套完整系統可以降低或消除氧化性傷害如 Glutathione、ceruloplasmin、抗氧化酵素(catalase、GSH-peroxidase)等，但是過量或急遽的活性氧系將產生不可逆的氧化性傷害，因此由飲食中攝取具有抗氧化活性或活化抗氧化酵素之物質，可能有保健之效。又流行病學調查中顯示多攝取蔬菜、水果可減少心血管疾病及癌症之發生(7-10)，近年來更有學者指出某些飲料如綠茶、葡萄酒亦有類似功能(11-12)，由探討中得知 polyphenolic compounds 扮演重要角色(13)。

洛神花為錦葵科 (Malvaceae) 洛神葵之花，於未成熟時去除子房之萼片，在許多藥書中指其有解熱、降血壓、抗痙攣、利尿等功效，而今多為夏季清涼飲料或茶品之主要原料之一。過去本研究室在乾燥洛神花成份分析中發現一簡單多酚化合物:原兒茶酸 (protocatechuic acid)，由體外試驗證明其具抗氧化活性(14)，近年來多位學者從動物實驗中指出原兒茶酸可抑制化學致癌物之致癌性(15-19)如 diethylnitrosamine 所引起之肝癌、azoxymethane 所引起的

大腸癌等，然其他保健作用之體內試驗則未見。

tert-Butyl Hydroperoxide (t-BHP)，在以前的實驗中已經証實會在短時間內造成肝細胞中還原態的 glutathione (GSH) 氧化、細胞脂肪的過氧化 (peroxidation)，甚至造成細胞死亡 (20)。其可能造成細胞毒性的機制。t-BHP 在細胞內會很快的被 glutathione peroxidase 代謝成 tert-butyl alcohol 和 glutathione disulfide (GSSG)；接著 GSSG 被 glutathione reductase 再氧化回 GSH 而造成 NADPH 的氧化 (21-22)，進一步影響到鈣離子的平衡 (23)，另外 t-BHP 於金屬離子的存在之下會還原成 t-BHP 自由基，而造成細胞膜脂質之過氧化，此自由基或相伴產生的自由基攻擊細胞內之分子而造成毒性，如 OH 等小分子產生而攻擊 DNA(24)。

材料與方法

一. 化學試劑

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), TBA(thiobarbituric acid), collagenase, t-BHP(tert-butyl hydroperoxide), [methyl-3H]-thymidine, SDS, EDTA, thymidine 、MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), alanine transaminase (ALT) kit, lactate dehydrogenase(LDH) kit, phosphotungstic acid 以上皆購自美國 sigma 公司, protein assay kit (Bio-Rad), isopropanol, HCl, n-butanol (MERCK) 。

二、儀器

- (1) Spectrophotometer (Hitachi; U2000)
- (2) Fluorescence spectrophotometer (Hitachi; F2000)
- (3) 超導核磁共振儀 (Varion; VXR-300MHz)
- (4) 紅外線光譜儀
- (5) 氣相層析質譜儀
- (6) Fraction collector

三、動物來源

Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠(230 ± 20 g)購自台中榮民總醫

院，實驗前至少飼養於動物房一週，使其適應環境；在動物房中，以 Purina Lab Chow 為飼料，蒸餾水不限制使用，並維持在日夜 12 小時循環中。

四、洛神花茶原兒茶酸成份之確認與洛神花茶原兒茶酸之定量分析：

將洛神花酒精粗萃物減壓濃縮後以乙酸乙酯萃取乾燥之，得 HS-E，以 Choloform: methol 當溶劑通 silica gel column 做梯度分析，然後以 silica gel TLC 與標準品比較 Rf 值後收集，將之乾燥後冷藏備用，並以 Mass, NMR 等儀器測定確定其結構。

接著利用高效能液相層析作洛神花茶原兒茶酸之定量分析，首先製備洛神花茶粗萃物(30g 加 500cc 水煮沸後熄火濾液乾燥) 配成 1mg/ml 之濃度打 HPLC，採用 5 μ Hypersil ODS 管柱，以 1.5% 磷酸，20% 醋酸及 25% acetonitrile 之水溶液當移動相，流速為每分鐘 0.5 ml，待系統穩定後施打 10 μ l 之標準品與洛神花茶。

五、黃票矽氧化酵素抑制作用之測定(xanthine oxidase inhibition assay)

黃票矽氧化酵素於發炎時會被活化，xanthine oxidase 活化時常相伴產生 superoxide，因此抑制此酵素可減少氧化性傷害。根據 Robak 等人之方法藉測 xanthine 和 xanthine oxidase 反應產物---

uric acid 來看酵素活性，即將 xanthine 和 xanthine oxidase 反應十分鐘後，以分光光度計於 295 nm 測 OD value，分析有無原兒茶酸對 xanthine oxidase 活性之影響。

六、脂質過氧化酵素抑制作用之測定(lipoxygenase inhibition assay)

發炎時會活化 arachidonic cascade 其中 Lipoxygenase 會被活化造成過氧化物產生進而傷害細胞膜，因此抑制 Lipoxygenase 可減少氧化性傷害。Lipoxygenase activity 分析是根據 Evan 等人之方法測定，即以 arachidonic acid 當受質，以分光光度計於 236 nm time scan 方式測 OD value 變化，分析有無原兒茶酸對 lipoxygenase 活性之影響。

七、口服原兒茶酸之毒性分析

將 Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠每六隻一組分為正常組及實驗組，實驗組分別以胃管餵食原兒茶酸 1 mg/kg, 10 mg/kg、100 mg/kg 連續 5 天，斷食一夜(18 h)後採血測 AST、ALT, BUN 等肝腎毒性指標。並將肝肺組織做病理切片觀察有無病變之變化。

八、抗氧化動物實驗方法

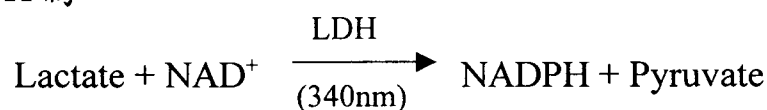
(一) 動物分組及藥物處理

將 Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠每六隻一組分為正常組及實驗組，實驗組分別以胃管餵食原兒茶酸 50 mg/kg、100 mg/kg、連續 5 天，第五天再加以皮下注射 t-BHP 0.2 mmol/kg，斷食一夜(18 h)後採血測 LDH、AST、ALT；將肝組織測定生化值如 catalase activity，GSH/GSSG，MDA，並將肝肺組織做病理切片觀察病變之變化。

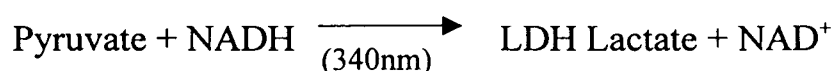
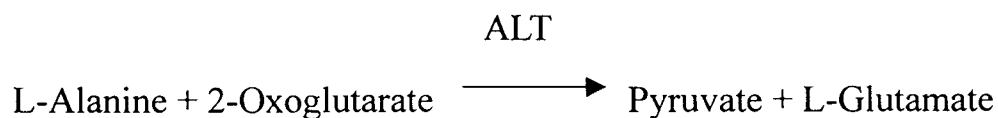
(二) 血清中肝酵素毒性分析

以肝功能診斷酵素包括 lactate dehydrogenase(LDH)、alanine transaminase(ALT)或 aspartate aminotransferase(AST)，作為肝毒性分析的指標(12)。以 Sigma Lactate dehydrogenase (LDH) kit、(ALT) kit 在波長 340nm 下測定 NADH 的生成或減少表示 LDH、ALT、AST 的活性，其測定原理分別為：

LDH 為



ALT 為



(三). MDA 生成濃度之分析

肝細胞脂質過氧化係根據 Yagi 氏等修飾之螢光測定法(25)，藉由 Thiobarbituric acid 來測定 malondialdehyde (MDA)的生成濃度。

實驗方法: 取 0.5g 肝臟，加入 3ml ice-cold 0.05M phosphate buffer (pH7.4)，然後以 polytron-like stirrer 研磨。取少部份研磨液作蛋白質定量(protein assay kit/BIO-RAD)，其餘加入 7% SDS、0.1N HCL、10% phosphotungstic acid 及 0.67% TBA 之後，避光 95°C 加熱 1 小時，冷卻後，加入 5ml n-butanol 萃取，再以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液測定螢光強度(Ex/Em_{515/535nm})。以 1,1,3,3-tetramethoxypropane 當作 standard。

(四). 肝中 GSH 和 GSSG 的定量及酵素活性之測定

(1).組織液之製備

取 0.25g 肝組織，加入 1ml 10% metaphosphoric acid 及 3.75 ml 0.1M Na₂HPO₄ 和 0.005M EDTA(pH 8.0)緩衝液，以 polytron-like stirrer 研磨後，經 100000 g 90 分鐘離心取上清液。

(2). GSH 之測定(26)

取 0.5ml 上清液，加入 4.5ml phosphate-EDTA 緩衝液(0.1M Na₂HPO₄ 和 0.005M EDTA，pH 8.0)稀釋後，取出 100ul，加入 0.9ml phosphate-EDTA 緩衝液與 100ul o-phthalaldehyde(1mg/ml)

充份混合後，在室溫避光反應 15 分鐘(26)，以 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer(F2000)於 Ex=350nm/Em=420nm 測定之。

(3). GSSG 之測定

取 0.5ml 上清液，加入 0.4ml NEM(避免 GSH 氧化成 GSSG)，在室溫反應 20-30 分鐘後，取出 100ul，加入 0.9ml NaOH(pH 12.0) 與 100ul o-phthalaldehyde(1mg/ml)充分混合後，在室溫避光反應 15 分鐘，以 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer (F2000) 於 Ex=350nm/Em=420nm 測定之。

(五) Glutathione-S-transferase activity assay (27)

取 0.25g 肝組織，加入 2ml Homogenizer Buffer (50 mM Tris-HCL、0.25M sucrose，pH 7.5)，經 polytron-like stirrer 研磨後，於 4°C 狀態下，以 39000 rpm 離心 30 分鐘，取 20 ul 上清液加入 1.5 ml 的 GSH substrate buffer 和 1.5 ml CDNB substrate buffer 放入 cuvette 中，並迅速混合均勻，在 340 nm 下，scan 三分鐘，並以下列公式換算活性的變化量：

$$1. C = A/\Delta A \times 1/9.6 \times 1/1$$

2. GST 的活性表示為 nmole/min/mg

(六) Catalase activity assay (28)

取 0.25g 肝組織，加入 2ml phosphate-EDTA 緩衝液(0.1M

potassium phosphate、0.1mM EDTA, pH 7.0), 經 polytron-like stirrer 研磨後, 於 4°C 狀態下, 以 39000 rpm 離心 30 分鐘, 取 50 ul 上清液加入 1 ml 0.1M Tris-HCL(pH 7.2), 另一管取 2ml 30mM H_2O_2 , 分別在 30°C 水浴中反應 1 分鐘後, 立刻混合, 於分光光度計 240nm 測定 3 分鐘。

(七) GSH Peroxidase activity assay (29)

取 0.25g 肝組織, 加入 2ml phosphate-EDTA 緩衝液(0.1M potassium phosphate、0.1mM EDTA, pH 7.0), 經 polytron-like stirrer 研磨後, 於 4°C 狀態下, 以 39000 rpm 離心 30 分鐘, 取 100ul 上清液加入 2.2ml 0.1M Tris-HCL(pH 7.2)、100ul 0.113M NaN_3 、100ul 30mM GSH 及 6mM NADPH, 充分混合後, 再加入 50ul 5IU GSH-reductase, 於 37°C 水浴中反應 5 分鐘, 接著立刻加入 100ul 30mM H_2O_2 , 於分光光度計 340nm 掃描 3 分鐘, 測定其析光值之變化。

(八) 肝臟組織切片之病理分析

將老鼠斷頸後, 取約 2cm×2cm 的肝臟, 置於 10% 福馬林中固定, 然後作蘇木紫&伊紅(Hematoxylin & Eosin)染色, 分析觀察肝組織有無 inflammation, necrosis 病變及程度, 在有無 PCA 成份下是否有差異。

其染色步驟如下:

1. 脫蠟後，以蘇木紫(hematoxylin)溶液染 2-15 分鐘。
2. 以水浸洗。
3. 以 0.5%鹽酸溶液分辨染色色度，約 1-5 秒。
4. 浸入氫水中(1000ml 的水滴入氫水 2 滴)，直至組織呈現藍色。
5. 於流水中清洗，至少須 15 分鐘。
6. 染以 0.5%伊紅 Y 溶液，數秒至 2 分鐘。
7. 依次以 80%、90%、95%酒精浸洗。
8. 依次移入 100%酒精、二甲苯(1:1)、二甲苯-木餾油(4:1)、二甲苯(I)、二甲苯(II)中各半分鐘。
9. 以二甲苯使之透明。
10. 封片。

(九) 免疫組織化學染色

1. 將包埋在蠟中的組織切片置入已預熱至 56°C 的烘箱中脫蠟。
2. 將已加熱的切片依照順序移至純的二甲苯、絕對酒精、95%酒精中各五分鐘。
3. 將切片以二次水沖洗十分鐘。
4. 將切片移至 0.05M Tris buffer[(PH7.8)內含 0.15M NaCl 及 0.1% Triton X-100]中五分鐘
5. 將已脫蠟完全的切片移至煮沸中的 citrate buffer，再繼續煮五分

鐘。

6. 待玻片自動降溫至室溫。
7. 將玻片取出，以二次水沖洗。
8. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
9. 用 3%的 H_2O_2 沖洗五至十分鐘。
10. 將玻片取出，以二次水沖洗。
11. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
12. 在玻片上加入一級抗體(PY20)反應 20 至 40 分鐘。
13. 將玻片取出，以二次水沖洗。
14. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
15. 在玻片上加入二級抗體反應 30 分鐘。
16. 將玻片取出，以二次水沖洗。
17. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
18. 在玻片上加入 biotin ligand 反應 30 分鐘。
19. 將玻片取出，以二次水沖洗。
20. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
21. 加入 DAB 呈色劑在室溫下反應五分鐘。
22. 以二次水沖洗五分鐘。
23. 加入 hematoxylin 染背景，但染色時間不超過 1 分鐘。

24. 以二次水沖洗五分鐘。
25. 將已染色之玻片置於 95%酒精中。
26. 將玻片置於絕對酒精五分鐘以脫水。
27. 將玻片滴上 xylene。
28. 以封片膠封片。
29. 顯微鏡觀察

(十) 分析統計

體外實驗過程每組皆 3 重覆以上，而動物實驗則每組至少 6 隻，採用 Student's t-test 統計分析，凡 $p < 0.05$ 以下時表示為有意義的差異。

結 果

一、洛神花茶中原兒茶酸之含量分析

由圖 1, 2 確認原兒茶酸(PCA)之結構(Fig.3), 由 HPLC 之分析得知水草物中含 2- 0.2 % PCA。另二峰 (peak) 依具之前研究所分離得到之標準品比較, 分別為花青素成份: delphinidine 3- diglycoside and cyanidine 3-diglycoside。

二、原兒茶酸對 xanthine oxidase 及 lipoxxygenase 之體外抑制作用

由 Table 1 得知 0.1 mM 原兒茶酸對 xanthine oxidase 可達 48 % 之抑制作用, 而對 lipoxxygenase 可達 63 %之抑制作用(Table 2)。

三、原兒茶酸對肝腎之毒性測試

由 Table 3 知原兒茶酸 100 mg/kg 仍未見肝腎之毒性。因此接下去之實驗採用 50 及 100 mg/kg 之劑量。

四、原兒茶酸對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠血清

肝功能指標上升之影響

鼠肝之損傷, 可由血清中一些酵素的升高作為指標, 如 ALT , AST , LDH ,當以單一劑量 0.2mmol/kg t-BHP 腹腔注射大白鼠

18h 後，血清中 ALT , AST ,LDH 等酵素急劇升高(Table 4)，亦即肝細胞受到傷害，肝機能受損，但預先餵食 50mg/kg 及 100mg/kg 之原兒茶酸則有意義($P<0.01$ and $P<0.05$)抑制肝臟釋放 ALT , AST ,LDH 至血清中。

五、原兒茶酸對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠脂質過氧化的影響

以 MDA 生成濃度當作脂質過氧化的指標，由 Table 5 得知單獨給 t-BHP 則發生嚴重脂質過氧化，預先餵食 50 mg/kg , 100mg/kg 之原兒茶酸則有意義抑制 MDA 的形成。

六、原兒茶酸對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠肝肺 GSH 含量減少之影響

由 Table 6 得知當以單一劑量 0.2mmol/kg t-BHP 腹腔注射大白鼠 18h 後，t-BHP 會抑制肝細胞中 GSH 的含量。預先餵食 50 mg/kg 原兒茶酸仍無法有意義改變之，預先餵食 100 mg/kg 可提高 GSH 的值。又 t-BHP 在此研究模式中只看到輕微的降低 GSH 含量，而預處理原兒茶酸並無法改善此現象 (Table 7)。

七、原兒茶酸對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠肝臟 GST , GSH-Px , Catalase 酵素變化之影響

由 Table 8 發現單一劑量 0.2mmol/kg t-BHP 腹腔注射大白鼠 18 h 後，有無餵食原兒茶酸對 GSH-Px 影響不大，但單獨給 t-BHP 則可降低 catalase activity，預先餵食 50 mg/kg, 100mg/kg 之原兒茶酸則有意義的恢復 catalase 活性，預先餵食 50 mg/kg, 100mg/kg 之原兒茶酸可明顯改變 GST 的活性。

八、原兒茶酸對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠肝、肺臟損傷之病理變化

如 Table 9 所示單獨腹腔注射 t-BHP 組鼠肝明顯有淋巴球浸潤及壞死等肝病變，而預處理原兒茶酸 50 mg/kg, 100mg/kg 則不見淋巴球浸潤及壞死等肝病變 (Fig.5)。而 t-BHP 亦造成鼠肺輕微的出血、發炎，但預處理原兒茶酸則並無明顯改善(Fig.6)。

九、利用免疫組織化學染色法觀察原兒茶酸對 t-BHP 所誘發之 tyrosine phosphorylation 的抑制作用：

之前有研究指出 oxidative stress 會促進 protein tyrosine 磷酸化，故以免疫組織化學染色觀察 tyrosine-phosphorylated protein (1° antibody:PY-20) 的表現。由圖 7 知，控制組有微量之表現，而 t-BHP 組可刺激 tyrosine phosphorylation protein 大量表現 (呈棕色部份)，且主分佈於組織外緣，又由高倍鏡觀察其 tyrosine

phosphorylation protein 位於細胞質，而以原兒茶酸前處理之兩組則似控制組只有微量之表現，則可抑制其表現。

討論

流行病學調查中顯示多攝取蔬菜、水果可減少心血管疾病及癌症之發生(30-32)，由探討中得知 polyphenolic compounds 扮演重要角色。近年來對食物中的酚類化合物其抗發炎、抗突變和抗癌的特性有較多的科學家投入研究(33)，各研究報告顯示植物的酚類化合物具有多功能的生物化學活性，包括：(a) 捕捉嗜電性自由基(electrophilic radical trapping)，(b) 抑制硝化反應(inhibition of nitrosation)，(c) 花生烯酸代謝調控(arachidonic metabolism modulation)，(d) 改變致癌物質的代謝(alteration of carcinogen metabolism)(34)。原兒茶酸廣布於核桃及蔬果中，過去本研究室自中國傳統草藥中的地區飲料材料洛神花的乾燥花朵中亦純化得之，在此次研究中以 HPLC 方法得知洛神花所含原兒茶酸的量會隨著溶劑的不同及浸煮時間之長短而有所改變約 2-0.2 %。

過去探討肝毒性或肝損傷的實驗模式多採用四氯化碳作為誘導劑，可是四氯化碳目前為管制溶劑不易購得，且以四氯化碳作為誘導肝損傷的實驗模式中所造成的組織脂質過氧化機制仍有爭議，因其可能是四氯化碳本身所造成的溶劑效應(35)。因此本計劃採用另一種引起肝毒性或肝損傷的實驗模式，即以有機過氧化物: t-butylhydroperoxide 作為誘導劑，t-butylhydroperoxide 可經由 cytochrome p450 代謝為自由基

質(RO[•])，進而傷害組織或細胞(36)，而肝臟和肺臟含有豐富的 cytochrome p450。另外 t-butylhydroperoxide 還可經由 GSH 系統代謝為醇類，而大量消耗 GSH 將影響細胞的訊息傳遞、基因表現及防止細胞受氧化性傷害的能力(37)。而本研究中由 GSH 指標發現 t-BHP 在本研究之實驗模式下誘發肝臟氧化性損傷程度較肺臟明顯 (Table 7)。

以往曾有研究指出，t-BHP 在細胞內會很快的被 glutathione peroxidase 代謝成 tert-butyl alcohol 和 glutathionedisulfide(GSSG)；接著 GSSG 被 glutathione reductase 再氧化回 GSH 而造成 NADPH 的氧化(38-39)，進一步影響到鈣離子之平衡(40-41)，另外 t-BHP 於金屬離子存在下會還原成 t-BHP 自由基，而自由基與一些活性氧對於細胞的傷害在以前的文獻中則已經被證實與細胞的突變、腫瘤形成有關(42-43)。本實驗以 t-BHP 來產生肝細胞的傷害，評估原兒茶酸是否具有抗肝毒性活性。在實驗中我們利用 ALT、AST、LDH 作為肝細胞毒性之基本指標，由 Table 4 所示：預處理原兒茶酸 (50 mg/kg、100 mg/kg)結果發現能有效抑制 t-BHP 對肝細胞毒性。接著再以 MDA 當作脂質過氧化的指標，t-BHP 可造成肝細胞的脂質過氧化，使脂質過氧化物 MDA 的濃度大量增加，由 Table 5 實驗結果發現原兒茶酸可以抑制 t-BHP 所誘發細胞脂質過氧化。因為 t-BHP 在細胞內代謝會消耗掉大量的 GSH，所以可以經由 GSH 的定量來探討原兒茶酸抑制過氧化物之路徑，由

Table 6 發現：t-BHP 能抑制 GSH 的生成，而以原兒茶酸(50 mg/kg、100 mg/kg)預處理之老鼠則可使 GSH 的含量增加($P<0.05$)，然原兒茶酸是否可促進 GSH 之生合成有待進一步分析。之前曾有研究指出原兒茶酸可以有效抑制致癌效應，是否與解毒酵素 GST 的活性有關？因為解毒酵素 GST 會催化 glutathione 和致癌物結合，使這些致癌物去活化，所以提高 GST 活性以增加細胞之抗癌效果進而達到 chemoprevention 之目的。由 Table 8 發現：預處理原兒茶酸(50 mg/kg、100 mg/kg) 可提高 GST 的活性($P<0.05$)，和 catalase 的活性($P<0.01$)，因此初步認為原兒茶酸抑制 t-BHP 所引起之肝毒性，是藉由直接捕捉自由基或過氧化物來降低細胞膜的脂質過氧化，且與能維持組織內 GSH system 之穩定有密切關係。

由病理切片觀察到以腹腔注射 t-BHP(0.2mmol/kg) 18 小時後，肝組織明顯有淋巴球侵潤及壞死等肝病變等現象，而預處理原兒茶酸(50 mg/kg、100 mg/kg) 則不見淋巴球侵潤及壞死等肝病變等現象。然肺臟之氧化性損傷在本研究模式中不夠明顯 (Fig.6)，可能與劑量或時間點有關。

活性氧系的刺激往往會影響細胞內之訊息傳遞如 Ca^{+2} -signaling and protein phosphorylation (44)，而這些 target protein 可能有 enzyme、receptor、transcription factor, 活性氧系往往會使一些

kinase 去活化或使 phosphatase 活化。雖然 oxidative stress 所引發之訊息傳遞相當複雜，之前有報告指出 oxidative radical 會刺激 liver plasma protein tyrosine phosphorylation (45)，而本研究發現 t-BHP 會使肝細胞發生大量 tyrosine phosphorylation。原兒茶酸對 t-BHP 詳細之訊息傳遞影響有待進一步之研究。

總之，原兒茶酸可以對抗 t-BHP 所造成鼠肝細胞氧化性損傷，亦可抑制 t-BHP 所造成之發炎，又發炎時活化的嗜中性白血球亦會大量釋放活性氧係系，因此原兒茶酸可透過捕捉自由基而降低 t-BHP 所造成傷害並可減緩發炎所造成的二度傷害。

結論與建議

本研究首先建立以高效能管柱分析法定量洛神花茶中多酚成份：原兒茶酸，在體外及體內研究中得知其具抗氧化及抗發炎等保健活性，然洛神花茶中含量並不豐富。又於本研究模式中，t-BHP 明顯誘發氧化性肝損傷，但無法看到明顯之氧化性肺損傷，因此 t-BHP 可能不是適當的明顯之氧化性肺損傷誘發物 (inducer)。

參考資料

1. Reilly, P.M., Schiller, H.J. and Bulkley, G.B. Pharmacological approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* 1991; 161: 488-503.
2. Cerutti PA Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375-380.
3. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K. and Banerjee A Simultaneous liver and lung injury following gut ischaemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma* 1992; 32: 723-728.
4. Shimoda R. Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yijita J, and Kasai H Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in Human liver with chronic Hepatitis. *Cancer Research* 1994; 54: 3171-3172.
5. Kukielka, K., Dicker, E., and Cederbaum, A.I. (1994) Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 309 (2), 377-386.
6. Daniel, F., Church, R. and William, A. (1985) Free-Radical Chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environmental Health Perspectives* 64, 111-126.
7. Block, G. (1992) A role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr. Rev.* 50, 207-213.
8. Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *Lancet* 342, 1007-1011.
9. Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, Z.Y., Ferraro, T., Finneganolive, T.,

- Lou, Y.R., Mitchell, J.M., Laskin, J.D., Newmark H., Yang, C.S., Conney, A.H. (1992) Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis* 13, 947-954.
10. Renaud S, De Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-1526.
 11. Salah, N. Miller N.J., Paganga, G., Tijburtm L., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Tice-Evans, C. (1995) Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 339-346.
 12. Namiki, M. (1990) Antioxidants/Antimutagens in Foods. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 29, 273.
 13. Huang MT, and Ferrano T. Phenolic compounds in food and cancer prevention. In : Huang MT, Ho CT, and Lee CY. (eds.), *Phenolics Compounds in Food and Health : Antioxidants and Cancer Prevention*, American Chemical Society Symposium Series 507: 8-34. Washington, D.C. : American Chemical Society, 1992.
 14. Tseng TH, Wang CJ, Kao ES, and Chu HY. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemico-Biological Interaction* 1996; 101 : 137-148,.
 15. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Yoshimi N, and Mori H. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rats. *Cancer Res.*, 1993; 53: 2775-2779.
 16. Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, Okamoto K, Mori H, and Hara A.

- Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phases. *Cancer Res.*, 1994; 54: 2359-2365.
17. Kawamori T, Tanaka T, Kojima T, Suzui M, Ohnishi M, and Mori H. Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1994; 54: 2359-2365.
18. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, and Mori H. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer supplement* 1995; 75: 1433-1439.
19. Hirose Y, Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, Makita H, Mori H, Satoh K, and Hara A. Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2337-2342.
20. Rush G, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski P, and Hewitt WR. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1985; 78: 473-483.
21. Davies MJ. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochem. J.*, 1989; 257: 603-606.
22. Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E, and Richter D. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1979; 76: 4340-4344.
23. Joyeux M, Rolland A, Fleurentin J, Mortier F, Dorfman P. tert-Butylhydroperoxide induced injury in isolated rat hepatocytes. *A*

- model for studying antihepatotoxic crude drugs. *Planta Medica* 1990; 56: 171- 174.
24. Breimer LH. Molecular mechanism of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. *Mol.Carcinogenesis* 1990; 3: 188-197.
 25. Yagi K. Lipid peroxidation and human disease. *Chem. Phys. Lipids* 1987; 45: 337-351.
 26. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione : applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27 : 502-522, 1969.
 27. Cheng TJ. Protective action of seed oil *Hippophae rhamnoides* L.against experimental liver injury in mice. *Chinese J. Pre. Med.* 1992; 26: 513-552.
 28. William HH, Michael JP, and William BJ. Glutathion S-transferas. *The journal of Biological Chemistry* 1974; 249(22): 7130-7139. 19. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 103: 121.
 29. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
 30. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983; 221: 1256-1264.
 31. Weisburger JH. Effective human cancer prevention as goal for the regulation of environmental chemicals. *J.Environ. Health* 1991;C8: 339- 351.

32. Shibata A, Paganini-Hill A, Ross RK, and Henderson BE. Intake of vegetable, fruits, β -carotene, vitamin C and vitamin supplements and cancer incidence among the elderly: a prospective study. *Br. J. Cancer* 1992; 66: 673-679.
33. Ho CT . Phenolic compounds in food : an overview, in: Huang MT, Ho CT, and Lee(Eds.)CY. Phenolic compounds in food and Health II : Antioxidants and Cancer prevention, American Chemical Society Symposium Series 507, American Chemical Society, Washington, D.C., 1992, pp.2-7.
34. Newmark HL. Plant phenolic compound as inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, in: Huang MT, Ho CT, and Lee(Eds.)CY. Phenolic compounds in food and Their Effects on Health II : Antioxidants and Cancer prevention, American Chemical Society Symposium Series 507, American Chemical Society, Washington, D.C.,1992.;48-52.
35. Berger, M.L., Sozeri, T. (1987) Rapid halogenated hydrocarbon toxicity in isolated hepatocytes is mediated by direct solvent effects. *Toxicology* 45, 319-330.
36. Rush, G., Gorski, J.R., Ripple, M.G., Sowinski, J., Bugelski, P., and Hewitt, W.R. (1985) Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 78, 473-483.
37. Meister, A. (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal application in research and therapy. *Pharmac. Ther.* 51, 155-194.
38. Sies H, and Gerstenecker C. Oxidation in the NADPH system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides. *FEBS Lett.* 1972; 27:171-175.

39. Lotscher HR., Winterhalter KH, Carafoli E, and Richter C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76:4340-4344.
40. Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Smith MT, and Orrenius S. Bled formation in isolated hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 1982; 217:1257-1259.
41. Bellomo G, Thor H, and Orrenius. Increase in cytosolic Ca^{2+} concentration during t-butyl peroxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca^{2+} stores. *FEBS Lett* 1984; 168:38-42.
42. Blakely WF, Fuciarelli AF, Wegher BJ, and Dizdaroglu M. Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid. *Red. Res* 1990; 121:338-343.
43. Frenkel F. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative damage. *Pharmacol. Ther* 1992; 53:127-166.
44. Suzuki YJ, Forman HJ, and Sevanian A. Oxidant as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine* 1997; 22: 269-285.
45. Chan TM, Chen E, and Tatoyan A Shargill NS, Pleta M, Hochstein P. Stimulation of tyrosine-specific protein phosphorylation in the rat liver plasma membrane by oxygen radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 139: 439-445.

圖、表

Table. 1 Effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on xanthine oxidase *in vitro*.

Concentration(mM)	absorbance (OD)	% of inhibition ^a
0	1.50 ± 0.02	0
0.01	1.37 ± 0.04	9
0.10	0.78 ± 0.02	48
1.00	0.54 ± 0.05	64

a. % of inhibition = (OD. of control - OD. of test) / OD. of control

Table. 2 Effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on lipoxygenase *in vitro*.

Concentration(mM)	absorbance (OD)	% of inhibition ^a
0	0.320 ± 0.012	0
0.01	0.296 ± 0.010	8
0.05	0.215 ± 0.008	33
0.10	0.101 ± 0.012	68

a. % of inhibition = (OD. of control - OD. of test) / OD. of control

Table. 3 Effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on alanine amino-transferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and blood urea nitrogen (BUN) in rats.

Concentration	ALT	AST	BUN
0	56 ± 8	99±16	10 ±2
1 mg/kg	60 ± 12	103±12	10 ±3
10 mg/kg	52 ± 14	101±18	11 ±3
100 mg/kg	64 ± 10	107±14	12 ±2

Table 4. Effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on the elevation of serum enzymes induced by t-BHP in rats

Treatment ^a	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	LDH(IU/L)
control	56±7	98±21	709 ±298
t-BHP(0.2 mmol/kg)	140±62 [#]	413±93 [#]	1805 ±281 [#]
t-BHP (0.2 mmol/kg) plus PCA 50 mg/kg	81±11*	314±61*	1213 ±271**
PCA 100 mg/kg	68±11*	251±83*	700±113**

a. In this experiment, the animal were pretreated with *Hibiscus* PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18 h after the administration of t-BHP.

[#]. P<0.01 , compared with control , *P<0.05 , **P<0.01, compared with t-BHP treated alone (n=6).

Table 5 Effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on t-BHP-induced lipid peroxidation in rats

treatment ^a	MDA (nmol/g liver)
Control	101 ± 14
t-BHP (0.2 mmol/kg)	198 ± 42 [#]
t-BHP (0.2 mmol/kg) plus:	
<i>Hibiscus</i> PCA 50 mg/kg	127 ± 16*
<i>Hibiscus</i> PCA 100 mg/kg	134 ± 28*

a. In this experiment, the animal were pretreated with *Hibiscus* PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18 h after the administration of t-BHP.

[#]. P<0.01 , compared with control , *.P<0.01, compared with t-BHP treated alone (n=6).

Table 6 Effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on t-BHP-induced hepatic GSH depletion

treatment ^a	GSH (μg/g liver)	GSSG (μg/g liver)
Control	1866±80	1241±64
t-BHP (0.2 mmol/kg)	1492±42 [#]	837±80 [#]
t-BHP (0.2 mmol/kg) plus:		
<i>Hibiscus</i> PCA 50 mg/kg	1956±61*	1071±52
<i>Hibiscus</i> PCA 100 mg/kg	2104±89*	1115±63*

a. In this experiment, the animal were pretreated with *Hibiscus* PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18 h after the administration of t-BHP.

[#]. P<0.05 , compared with control , *.P<0.05, compared with t-BHP treated alone (n=6).

Table 7 Effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on t-BHP-induced lung GSH depletion

treatment ^a	GSH (μg/mg protein)
Control	101 ± 21
t-BHP (0.2 mmol/kg)	87 ± 23
t-BHP (0.2 mmol/kg) plus:	
<i>Hibiscus</i> PCA 50 mg/kg	96 ± 25
<i>Hibiscus</i> PCA 100 mg/kg	93 ± 30

a. In this experiment, the animal (n=6) were pretreated with *Hibiscus* PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18 h after the administration of t-BHP.

Table 8 Effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on hepatic enzymes

treatment ^a	GST nmol/min/mg	GSH-Px (nmol/min/mg)	catalase (k/min/mg)
Control	103 ± 12	30 ± 5	0.17 ± 0.02
t-BHP (0.2 mmol/kg)	105 ± 6	36 ± 2	0.11 ± 0.01 [#]
t-BHP (0.2 mmol/kg) plus:			
<i>Hibiscus</i> PCA 50 mg/kg	132 ± 24 [*]	36 ± 2	0.16 ± 0.03 ^{**}
<i>Hibiscus</i> PCA 100 mg/kg	117 ± 7 [*]	39 ± 3	0.15 ± 0.02 ^{**}

a. In this experiment, the animal were pretreated with *Hibiscus* PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18 h after the administration of t-BHP. The liver tissue was homogenized, centrifigued and supernatant was used to determined the activity of antioxidant enzymes.

[#]. P<0.01 , compared with control , ^{*}.P<0.05, ^{**} P< 0.01, compared with t-BHP treated alone (n=6).

Table 9 Effect of PCA on t-BHP induced hepatic lesion

Treatment ^a	necrosis	neutrophile infiltration
Normal	0 / 6	0 / 6
t-BHP (0.2 mmole/kg)	5 / 6	6 / 6
PCA plus t-BHP:		
PCA 50 mg/kg	0 / 6	0 / 6
PCA 100 mg/kg	0 / 6	0 / 6

a. In this experiment, the animal were pretreated with *Hibiscus* PCA by gastric tube for 5 consecutive days, then rats were killed 18 h after the administration of t-BHP. The liver tissue was prepared for histopathology.

Fig.1 Mass spectrum of PCA

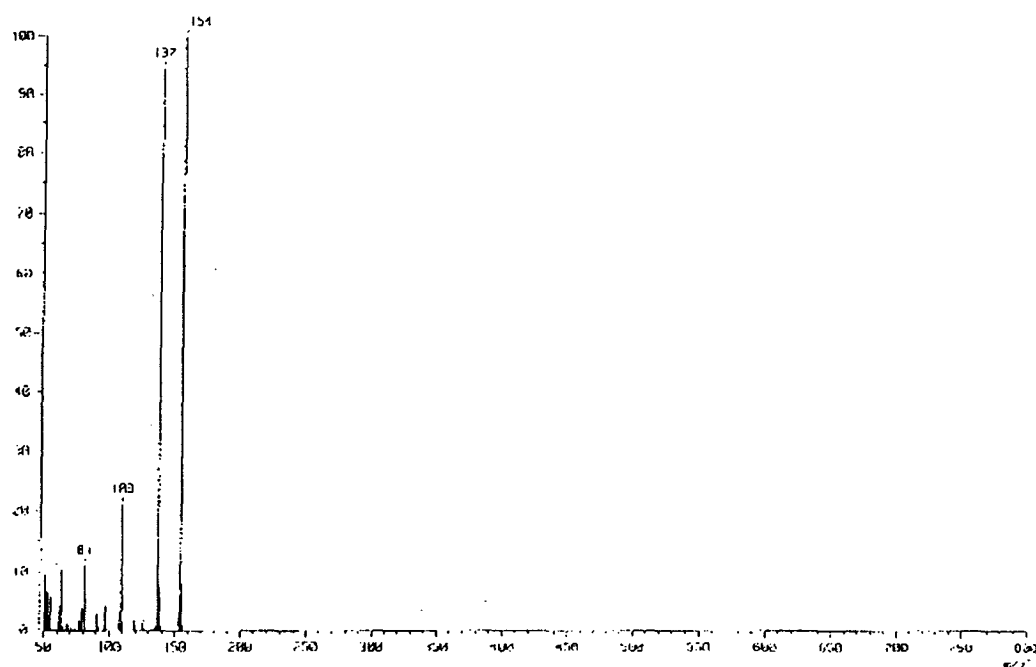


Fig.2 ^{13}C -NMR spectrum of PCA

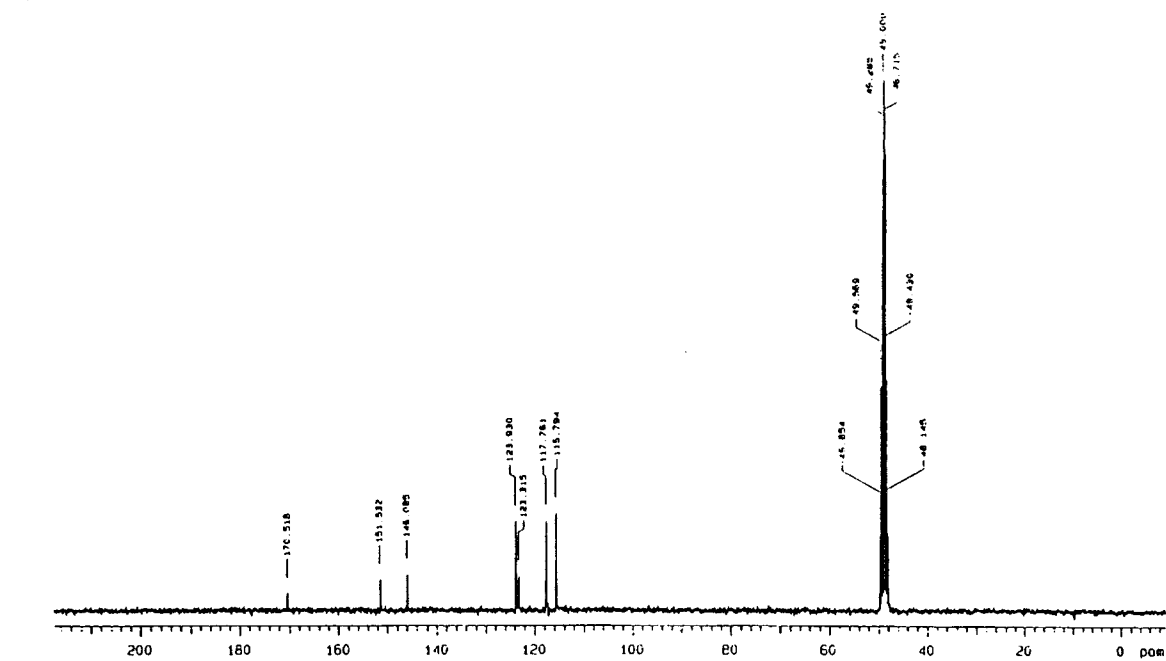


Fig.3 Structure of PCA

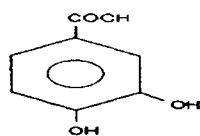


Fig.4 洛神花水萃取物 HPLC 之分析

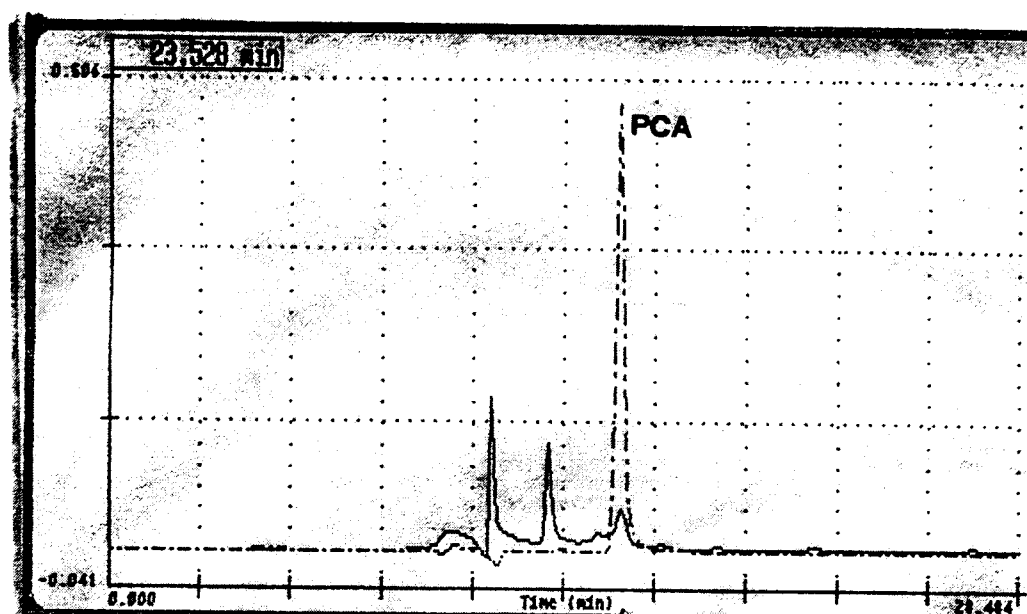
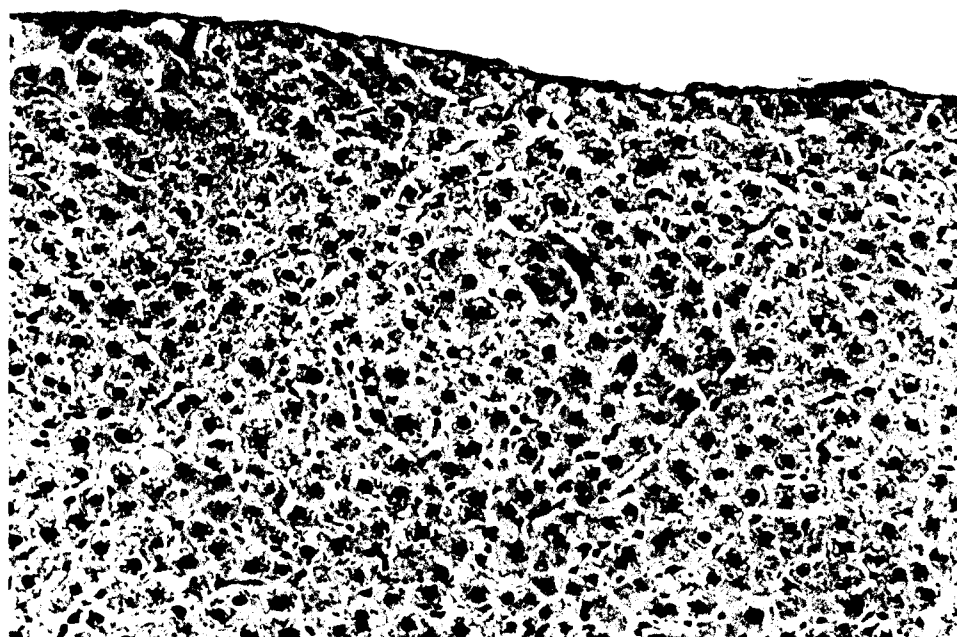


Fig.5 Effect of PCA on t-BHP-induced hepatic damage of rats

Effects of *Hibiscus* PCA on t-BHP-induced liver damage. (A) Solvent control group (n=6). (B) Animals treated with t-BHP (0.2 mmol/kg) showed neutrophil leukocyte infiltration (thin arrow), cell swollen (Arrow head) and necrosis (thick arrow). (C) Animals pretreated with 50 mg/kg 100 mg/kg *Hibiscus* PCA, and then t-BHP with showed no pathological change; hematoxylin/eosin staining; magnification 100 fold.

(A)



• (B)



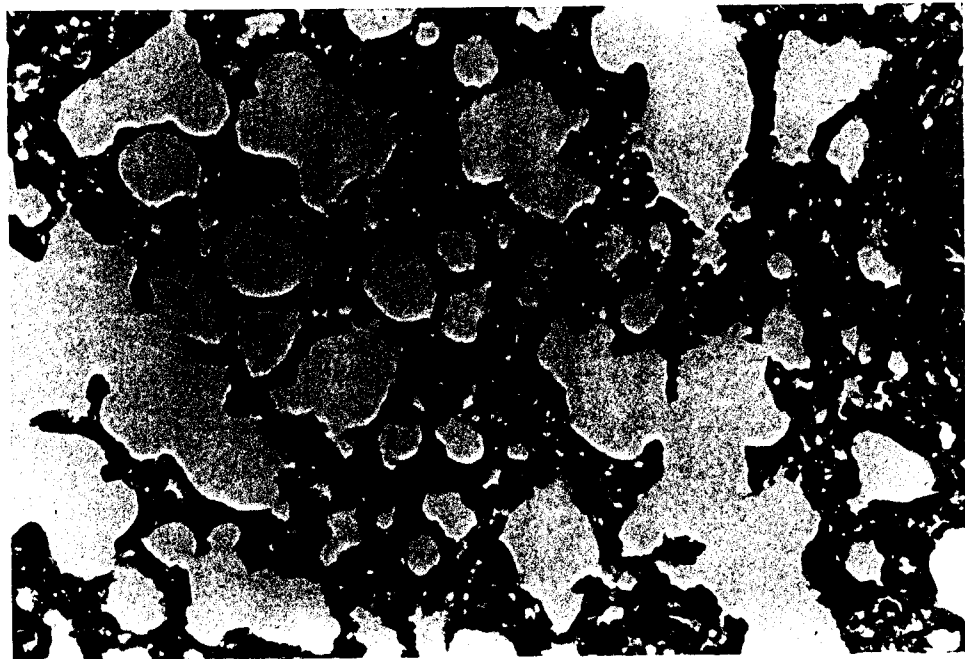
(C)



Fig.6 Effect of PCA on t-BHP-induced lung damage of rats

Effects of *Hibiscus* PCA on t-BHP-induced lung damage. (A) Solvent control group (n=6). (B) Animals treated with t-BHP (0.2 mmol/kg) showed bleeding slightly neutrophil leukocyte infiltration (thin arrow), (C) Animals pretreated with 50 mg/kg (D) 100 mg/kg *Hibiscus* PCA, and then t-BHP with showed bleeding and slightly neutrophil leukocyte infiltration; hematoxylin/eosin staining; magnification 100 fold.

(A)



(B)

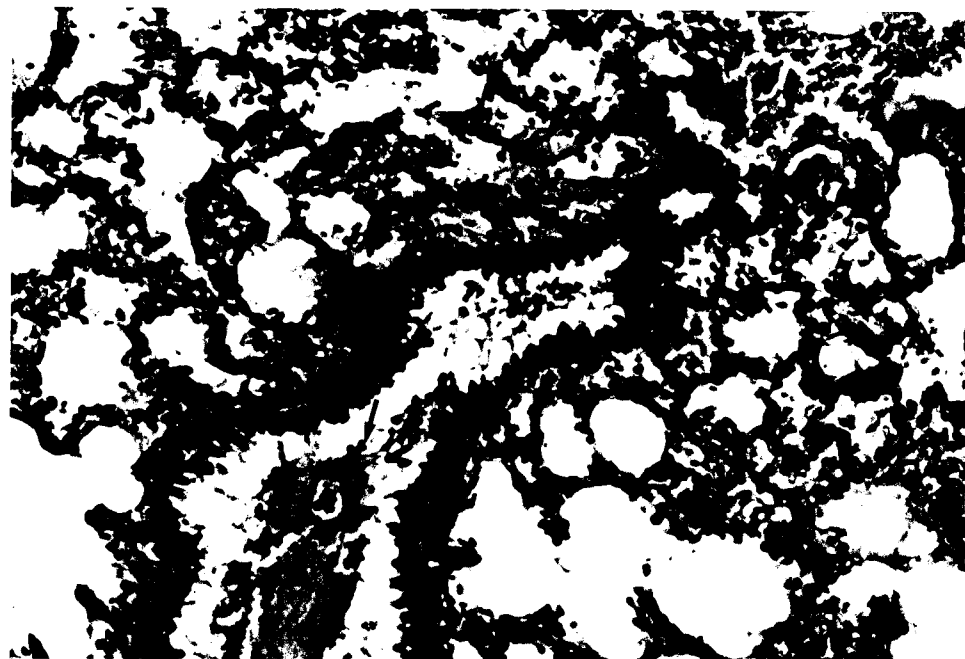
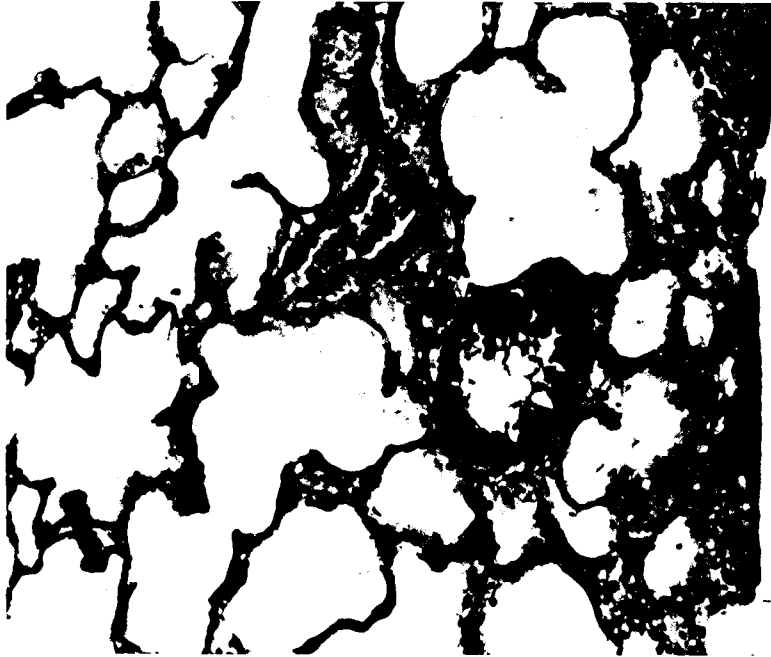


Fig.6

(C)



(D)

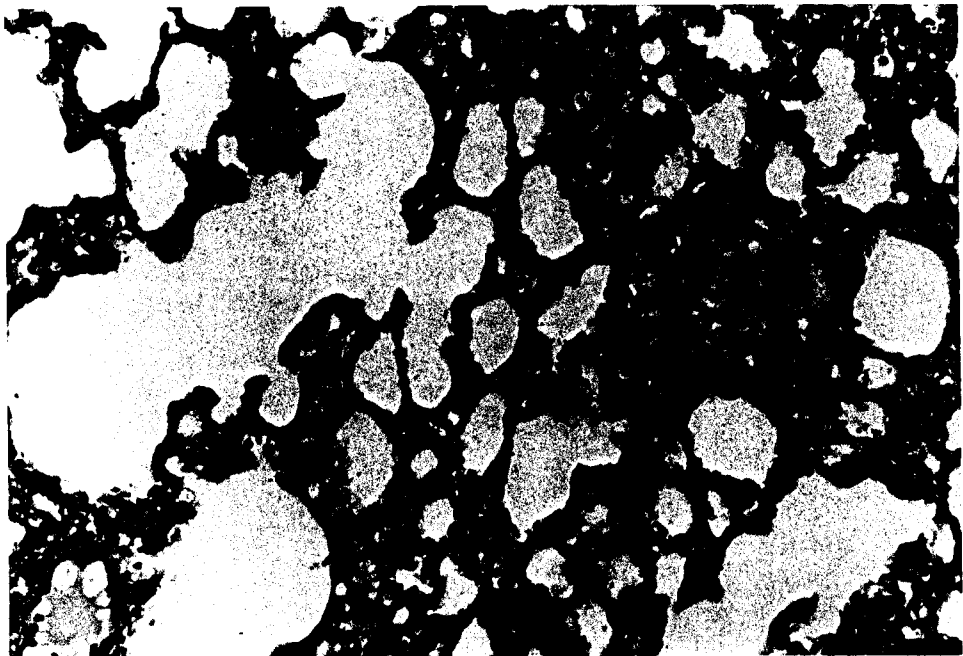
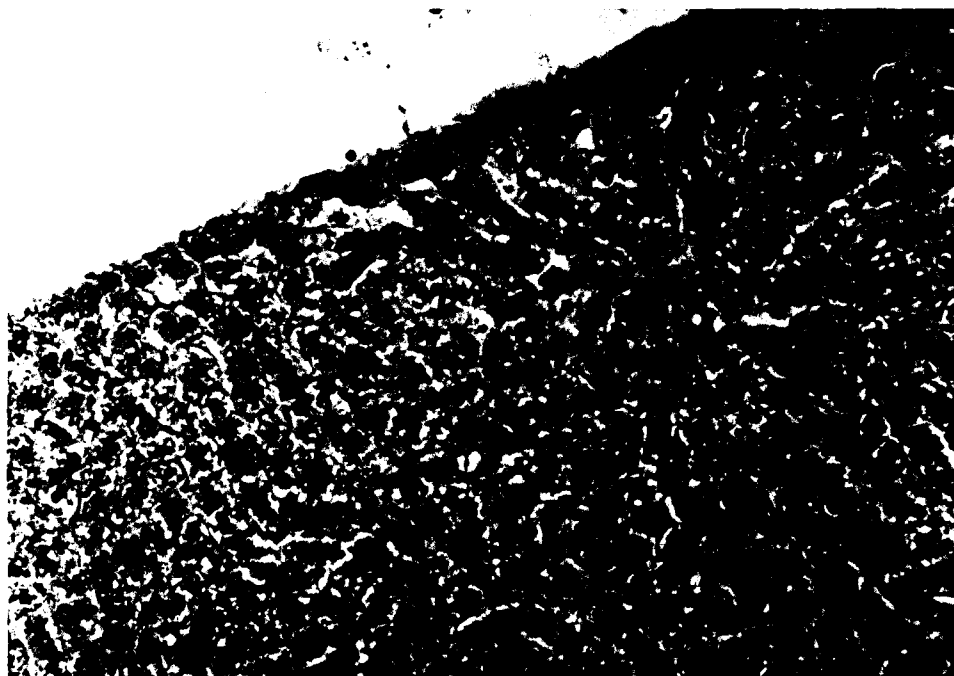


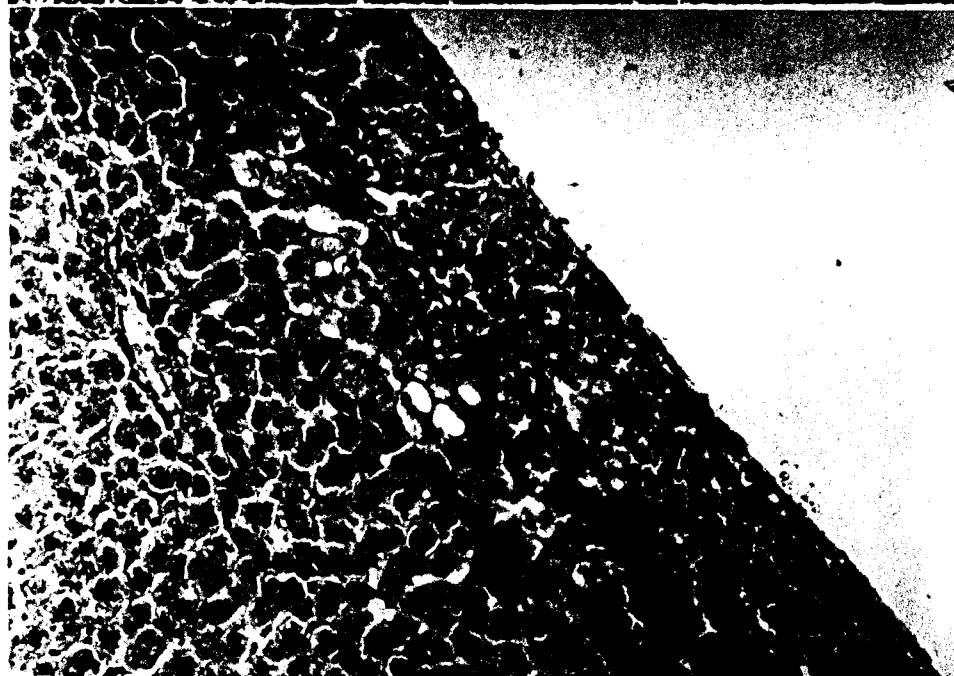
Fig.7. Effect of PCA on t-BHP-induced expression of tyrosine phosphorylated protein by immunocytochemistry.

(A) Solvent control group; (B) t-BHP treated alone group showed numerous immunoreactive area (brown). Animals pretreated with (C) 50 mg/kg and (D) 100 mg/kg of PCA, and then with t-BHP showed markedly reduction of immunostain.

(A)

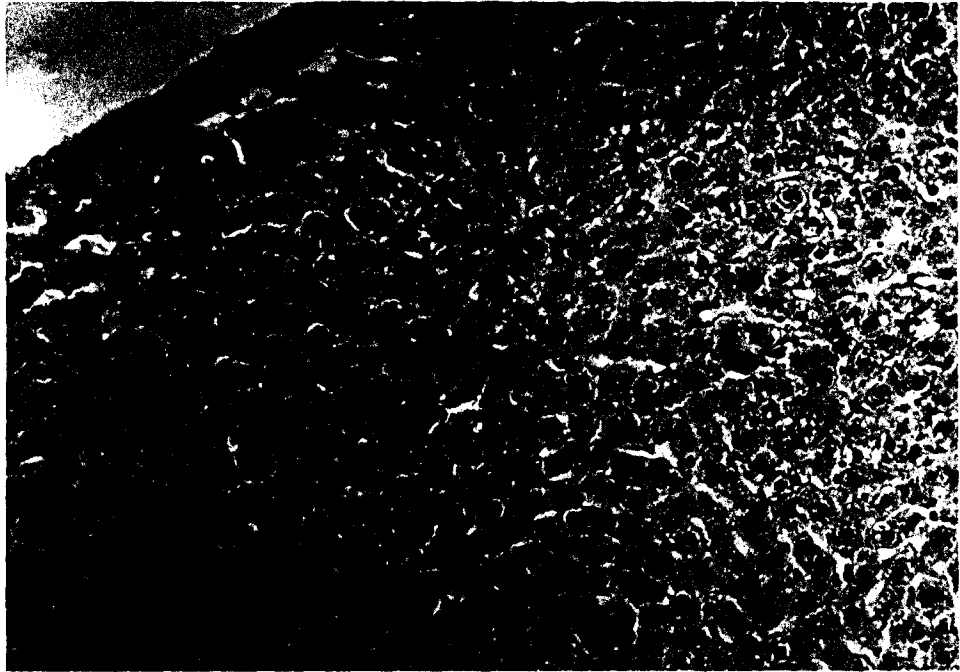


(B)



. Fig.7

(C)



(D)

