

計畫編號：DOH88-TD-1101

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

保健食品材料-杜仲抗氧化機能性之研究
Studies on Antioxidant Functionality of Du-zhong
- Health Food Material

研究報告

執行機構：國立中興大學食品科學系

計畫主持人：顏國欽

研究人員：謝秋蘭

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

目錄

中文摘要.....	4
英文摘要.....	6
前言.....	8
材料與方法.....	9
結果與討論.....	14
一、杜仲水萃取物對活性氧誘導紅血球細胞膜、肝臟粒腺體和微粒體脂質等不同脂質系統過氧化之影響.....	14
1、杜仲水萃取物對紅血球細胞膜脂質過氧化之影響.....	14
2、杜仲水萃取物對微脂粒脂質過氧化之影響.....	14
3、杜仲水萃取物對肝臟微粒體脂質過氧化之影響.....	15
4、杜仲水萃取物對肝臟粒線體脂質過氧化之影響.....	16
二、杜仲水萃取物對活性氧誘導 TA102 氧化突變之影響.....	17
1、杜仲水萃取物對 <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 之毒性及致突變性試驗.....	17
2、不同濃度的 H ₂ O ₂ 及 t-butylhydroperoxide 對 <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 之致突變性之影響.....	17
3、杜仲水萃取物對 H ₂ O ₂ 和 t-butylhydroperoxide 在 <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 致突變性之影響.....	18
三、炒杜仲、杜仲葉水萃取物及 H ₂ O ₂ 對淋巴球細胞毒性及基因傷害之影響.....	20
1、炒杜仲、杜仲葉水萃取物及 H ₂ O ₂ 對淋巴球細胞毒性之影響.....	20
2、炒杜仲、杜仲葉水萃取物及 H ₂ O ₂ 對淋巴球基因傷害之影響.....	20
3、炒杜仲及杜仲葉水萃取物對 H ₂ O ₂ 誘導淋巴球基因傷害之影響.....	21
4、杜仲葉水萃取物清除 H ₂ O ₂ 之能力.....	22
結論與建議.....	23
參考文獻.....	24
圖、表.....	30

圖次

圖 一、杜仲水萃取物對 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 誘導紅血球細胞膜脂質過氧化之影響.....	30
圖 二、杜仲水萃取物對(A)酵素性(B)非酵素性誘導微粒體過氧化之影響.....	32
圖 三、杜仲水萃取物對 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 所誘導粒線體脂質過氧化之影響....	34
圖 四、淋巴球細胞 DNA 彗星影像圖.....	41
圖 五、不同濃度之 H_2O_2 在彗星試驗下對人類淋巴球細胞 DNA 傷害之影響.....	42
圖 六、杜仲葉水萃取物對 H_2O_2 所誘導人類淋巴球DNA 傷害之影響...	46

表次

表 一、Gallic acid、mannitol 及杜仲水萃取物其抑制 20%微脂粒過氧化之濃度.....	31
表 二、Gallic acid、mannitol 及杜仲水萃取物對於微粒體脂質過氧化形成 TBARS 之影響.....	33
表 三、杜仲水萃取物對 <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 之毒性試驗...	35
表 四、杜仲水萃取物對 <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 之致突變性...	36
表 五、不同濃度的 H ₂ O ₂ 及 t-butylhydroperoxide 對 <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 之致突變性之影響.....	37
表 六、杜仲水萃取物對 t-butylhydroperoxide 誘導 <i>salmonella typhimurium</i> TA102 致突變性之影響.....	38
表 七、杜仲水萃取物對 H ₂ O ₂ 誘導 <i>salmonella typhimurium</i> TA102 致突變性之影響.....	39
表 八、H ₂ O ₂ 、炒杜仲及杜仲葉水萃取物對人類淋巴球細胞之細胞數及存活率之影響.....	40
表 九、炒杜仲及杜仲葉水萃取物對淋巴球基因傷害之影響.....	43
表 十、H ₂ O ₂ 、炒杜仲及杜仲葉水萃取物對人類淋巴球細胞基因傷害之影響.....	44
表十一、杜仲葉水萃取物抑制 H ₂ O ₂ 誘導人類淋巴球細胞基因傷害之實驗程序.....	45
表十二、杜仲葉水萃取物清除 H ₂ O ₂ 之能力.....	47

摘要

本研究主要是探討杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)水萃取物在不同脂質系統之抗氧化特性，包括杜仲葉、生杜仲皮及炒杜仲皮。結果顯示杜仲水萃取物對紅血球細胞膜脂質過氧化的現象均有抑制作用。在濃度 0.2 mg/mL 時，其抑制率依序為杜仲葉(70%)>炒杜仲(56%)>生杜仲(39%)。Ascorbic acid 及 gallic acid 則呈現促氧化效應，ascorbic acid 的促氧化效應較 gallic acid 明顯，其中可能是 ascorbic acid 的還原力強於 gallic acid，將 Fe^{3+} 還原為 Fe^{2+} ，再與 H_2O_2 反應，進行 Fenton reaction 產生 $\cdot OH$ 以催化紅血球細胞膜脂質的氧化。微脂粒(liposomes)脂質過氧化系統杜仲水萃取物中仍以杜仲葉水萃取物抑制微脂粒脂質過氧化之效果最佳，僅需 <0.06 mg/mL 之濃度即可抑制 20%之效果；炒杜仲及生杜仲水萃取物則需 0.24 及 0.81 mg/mL 之濃度方可抑制 20%之效果；gallic acid 仍呈現促氧化效果，mannitol 之抑制效果較杜仲葉水萃取物差，需 0.47 mg/mL 之濃度方可抑制 20%之效果。杜仲水萃取物對於 NADPH/ADP/ $FeCl_3$ (酵素性)及 $FeCl_2/H_2O_2$ (非酵素性)誘導微粒體脂質過氧化，結果可知杜仲水萃取物無論在酵素或非酵素所誘導的微粒體過氧化系統皆有抑制效果，且隨著濃度的增加而增加其抑制效果。在加入杜仲葉水萃取物 0.2 mg/mL 時，在非酵素系統其 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 的形成量為 0.08，炒杜仲及生杜仲水萃取物其 TBARS 的形成量分別為 0.69 及 0.88 μmol malondialdehyde/mg protein。杜仲葉、炒杜仲及生杜仲水萃取物在酵素系統其 TBARS 的形成量分別為 0.12，1.54 及 1.81 μmol malondialdehyde/mg protein，由此可知杜仲水萃取物在非酵素系統的抑制效果較高，所以有較低的 TBARS 值。杜仲水萃取物皆能抑制 Fenton reaction 所誘導粒線體的脂質過氧化現象。杜仲葉水萃取物在添加 0.2 mg/mL 的濃度下其抑制效果達 40%，其抑制效果分別為炒杜仲及生杜仲水萃取物之 1.42 及 2.75 倍。所有的杜仲水萃取物皆能抑制脂質氧化，且隨著濃度的增加而增加其抑制效應。

杜仲葉水萃取物對 t-BOOH 所誘導的 TA102 的突變作用有明顯的抑制作用。杜仲水萃取物在 4 mg/plate 時，可抑制 65% 的氧化突變；

然而對 H_2O_2 所誘導的 TA102 的突變作用的抑制作用不明顯，在 4 mg/plate 時，只可抑制 16% 的氧化突變。生杜仲及炒杜仲水萃取物對 H_2O_2 和 t-BOOH 為致突變劑誘發 TA102 突變之抑制效果並不明顯，此可能與杜仲葉水萃取物有良好的清除過氧化(peroxyl)及烷氧化(alkoxyl)自由基有關，因此能有效抑制 t-BOOH 所誘導的 TA102 氧化突變，此亦可由杜仲葉水萃取物有良好的抑制脂質過氧化效果可得到印證。

繼續以抗氧化效果較佳的炒杜仲及杜仲葉水萃取物，探討以 H_2O_2 誘導淋巴球基因傷害之影響。炒杜仲抑制 H_2O_2 誘導淋巴球基因傷害的效果並不明顯，然而杜仲葉水萃取物隨著其濃度的提高，其抑制 H_2O_2 誘導淋巴球氧化傷害之效果亦隨之增加，在濃度 2 mg/mL 時，Arbitrary Unit (AU) 值為 123，可抑制 37.9% 的 DNA 氧化傷害。以不同的反應程序將實驗分成六組，探討杜仲葉水萃取物對抑制 H_2O_2 誘導淋巴球基因傷害之機制。A、B 及 C 組主要目的分別探討杜仲葉水萃取物對有否幫助細胞修復之功能、清除 H_2O_2 的能力及細胞內抗氧化防禦系統的提振能力。D、E 組則為細胞與 H_2O_2 先後反應的負控制組，F 組為只有細胞的控制組，結果顯示 B 組(杜仲葉水萃取物先與 H_2O_2 反應後，再加入細胞)抑制效果最佳，其 AU 值降為 85。其餘各組效果不明顯 AU 值皆在 160-170 間，由此可知杜仲葉水萃取物其可抑制淋巴球氧化傷害其主要是藉清除 H_2O_2 之能力所致。以山葵過氧化酵素的方法測定杜仲葉水萃取物清除 H_2O_2 之能力，結果杜仲葉水萃取物在濃度 2 mg/ml 可清除約 70% 的 H_2O_2 。由此可知杜仲葉水萃取物可經由良好的清除 H_2O_2 之效果而抑制淋巴球細胞的氧化傷害。

中文關鍵詞：杜仲、抗氧化性、脂質過氧化、TA102、淋巴球

Abstract

The antioxidant properties of water extracts from leaves, raw cortex, and roasted cortex of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward various lipid models were investigated. The results revealed that all of the extracts of leaves, raw cortex, and roasted cortex of Du-zhong possessed antioxidant effect in peroxidation of ghost, their inhibitory activity followed the order of leaves (70%) > roasted cortex (56%) > raw cortex (39%) at a concentration of 0.2 mg/mL. Ascorbic acid and gallic acid had prooxidant effect. The prooxidant effect of ascorbic acid was more significant than that of gallic acid, which might be due to the reason that ascorbic acid had stronger reducing power than gallic acid and could reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} . Fe^{2+} reacted with H_2O_2 (i. e. Fenton reaction) and produced $\cdot\text{OH}$, then lead to prooxidant effect on ghost. Du-zhong leaf extract possessed the predominant antioxidant effect in liposome peroxidation. The IC_{20} for leaf, roasted cortex, and raw cortex of Du-zhong on the peroxidation of liposome induced by $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ascorbic acid}$ was less than 0.06, 0.24, and 0.81 mg/mL, respectively. Gallic acid had prooxidant effect the inhibition effect of mannitol was weaker than that of leaf extract and IC_{20} of mannitol was 0.47 mg/mL. The thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) values ($\mu\text{mol malondialdehyde}/\text{mg protein}$) for leaf, roasted cortex and raw cortex of Du-zhong were 0.12, 1.54 and 1.81 in the enzymatic mediated microsomal peroxidation, and 0.08, 0.70 and 0.88 in the nonenzymatic-mediated microsomal peroxidation, respectively. All the extracts of Du-zhong, including leaves, raw cortex, and roasted cortex of Du-zhong, inhibited lipid peroxidation in a concentration dependent manner.

The effect of Du-zhong extracts on the oxidative mutagenicity of *Salmonella typhimurium* TA102 induced by t-butylhydroperoxide (t-BOOH) and H_2O_2 was investigated. The results revealed that Du-zhong leaf extract had a marked inhibitory effect on the oxidative mutagenicity of TA102 induced by t-BOOH. Du-zhong leaf extract could inhibit 65% oxidative mutagenicity induced by t-BOOH, while only 16% in that induced by H_2O_2 at a concentration

4 mg/plate. The inhibitory effect of raw and roasted cortex was not significant on oxidative mutagenicity of TA102 by t-BOOH and H₂O₂. This result correlated with the scavenging effect of leaf extract on peroxy radicals and alkoxy radicals. This can be confirmed from that Du-zhong leaf extract had good inhibitory effect on lipid peroxidation.

Due to higher antioxidant activity of water extract from leaves and roasted cortex of Du-zhong, the effect extract from leaves and roasted cortex of Du-zhong on H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocyte was studied with COMET assay. The inhibitory effect of roasted cortex of Du-zhong on H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocyte was less significant while leaf extract had inhibitory effect and was in a concentration dependent manner. The arbitrary unit (AU) was 123. It inhibited 37% DNA oxidative damage in human lymphocytes at a concentration of 2 mg/mL. Six groups of experimental procedures were conducted to investigate the inhibitory mechanism of Du-zhong leaf extract on H₂O₂ -induced DNA oxidative damage in human lymphocytes. Groups A, B, and C were designed to investigate the repair function in lymphocytes, the ability of Du-zhong leaf extract to scavenge H₂O₂, and the increase of defense system in lymphocytes. Groups D, E, and F were negative control and blank, respectively. The results revealed that group B had marked inhibitory effect on DNA oxidative damage in human lymphocytes. The arbitrary unit (AU) of group B was 85 while the other groups ranged from 160-170. The others were ranging from 160-170. This result might be attributed to the ability of Du-zhong leaf extract to scavenge H₂O₂. From the results of horseradish assay, leaf extract of Du-zhong could scavenge 70% H₂O₂. Thus, the inhibitory effect of leaf extract of Du-zhong on DNA oxidative damage in human lymphocytes might be due to its scavenging activity on H₂O₂.

Key words: Du-zhong, antioxidant activity, lipid peroxidation, TA102, lymphocyte

前言

自由基(free radicals, FR)及活性氧(reactive oxygen species, ROS)在生物及醫藥領域已興起一陣研究熱潮。它們會在正常代謝下產生或暴露於氧化物質如外源物、污染物及離子照射下產生。Halliwell 和 Gutteridge (1989) 及 Ames et al. (1993)指出 FR 及 ROS 在一些臨床疾病上、老化及氧所參與的食品敗壞皆扮演重要角色(King et al., 1993)。

FR 及 ROS 的產生會形成所謂的氧化壓力，而且會造成脂質和蛋白質的損傷，因此而影響食品品質及生物組織(Halliwell, 1996)。另外，它亦被認為是致突變及致癌之重要機制。Sahu (1991)指出氧化傷害會導致 DNA 的未配對或錯誤修補，進而促使癌症的產生。藉著抗氧化劑的添加是減少氧化壓力最有效的方法。合成的抗氧化劑長期被質問它們的安全問題(Imaida et al., 1983)。天然抗氧化劑由於他們能保護生物體，免於受到自由基的侵犯，因此近來廣泛的受到重視(Cutlar, 1992)。天然抗氧化劑存在植物的許多部位如種子、葉子、果實及苗類(Namiki, 1990)。

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)茶(葉的水萃取物)，在日本使用於高血壓患者，且被當成機能性健康食品(Nakazawa et al., 1997)。文獻指出杜仲葉萃取物對高膽固醇脂及脂肪肝有治療效果(Nakasa et al., 1995)。Sasaki 等(1996) 和 Nakamura 等(1997)發現杜仲葉水萃取物對突發劑誘導染色體變異及突變有抑制效果，然而杜仲在抗氧化性方面，迄今尚未有相關的研究報告。根據本研究室先前的研究發現抗氧化和抗致突變性有良好的相關性(Yen and Chen, 1995)，因此本研究主要是探討杜仲的抗氧化機能性。第一年的研究發現杜仲水萃取物具有良好的抗氧化活性、清除 ROS 及對生物分子的保護效果，其活性依序為杜仲葉>炒杜仲>生杜仲。因此本年度（第二年）繼續探討杜仲水萃取物對活性氧誘導不同的膜脂質氧化之影響；另外亦探討其對活性氧誘導 *S. typhimurium* TA102 氧化突變及淋巴細胞 DNA 氧化傷害之影響。

材料與方法

(一)實驗材料

1. 樣品：杜仲葉及炒杜仲均購自台中市明興參藥行，品種 *Eucommia ulmoides* Oliv.
2. 實驗用老鼠：Sprague-Dawley大白鼠（購自中國醫藥學院動物中心）。
3. 試藥：Butylated hydroxytoluene (BHT)、dihyronicotinamid-adenin-dinucleotide-phosphate (NADPH)、ferrozine、adenosine diphosphate (ADP)、gallic acid、t-butylhydroperoxide、histidine、biotine、sodium chloride、ethilium bromide、N-lauroyl sarcosinate、Triton X-100 及trypan blue等購自美國Sigma公司。Iron (II) chloride tetrahydrate、ascorbaic acid、dihyronicotin-amid-adenin-dinucleotide (NADH)、thiobarbituric acid (TBA)及tricholoracetic acid (TCA)購自德國Merck公司。Sodium dihydrogen-phosphate、disodium hydrogenphosphate等購自日本和光純藥公司。Ammonium thiocyanate、sodium dihydrogen phosphate、disodium hydrogen phosphate為日本Hayashi公司產品。Hydrogen peroxide (H_2O_2)為日本Shimakyu公司產品。
4. 試驗菌株: *Salmonella typhimurium* TA102由美國加州大學Berkeley生化系 Ames博士提供。
5. 血液來源：由志願者提供。

(二)實驗方法

1. 樣品製備

(1). 水萃取物之製備

將10 g樣品剪碎或磨碎後，加入100 ml去離子水，然後於100℃迴流2小時，冷卻後過濾，再以冷凍乾燥去除水份，分別計算萃取率後於-20℃凍藏備用。

2. 杜仲萃取物對活性氧誘導紅血球細胞膜、肝臟粒腺體和微粒體脂質等不同脂質系統過氧化之影響

(1)、杜仲萃取物對紅血球細胞膜脂質過氧化之影響

A. 紅血球細胞之分離 (Tsuda et al., 1994)

取血液(100 ml)以緩衝溶液(10 mM phosphate/152 mM KCl, pH 7.4)等量稀釋，以 $1500\times g$ 離心20分鐘，以此種離心方式清洗血液三次。血球置於10 mM phosphate緩衝溶液(pH 7.4)中溶解破壞，紅血球細胞膜碎片以 $20000g$ 離心40分鐘，收集沈澱物備用。

B. 杜仲萃取物對於 $FeCl_2/H_2O_2$ 誘導紅血球細胞膜碎片脂質氧化之影響

在1 ml磷酸緩衝液(0.01 M, pH 7.4)中，含有紅血球細胞膜碎片，添加適當劑量之杜仲萃取物，及促氧化劑 $FeCl_2/H_2O_2$ 或 $FeCl_2$ 。將此反應液於 $37^\circ C$ 培育1小時，加入2 ml 1% thiobarbituric acid (TBA)和1 ml 2.8% trichloroacetic acid (TCA) 於 $100^\circ C$ 水浴加熱20分鐘冷卻後測532 nm 吸光值。

(2)、杜仲萃取物對粒腺體和微粒體脂質過氧化之影響

A. 大白鼠肝臟粒腺體和微粒體之分離 (Ham and Liebler 1995)

大白鼠以乙醚麻醉後解剖，取出肝臟，用生理食鹽水漂洗後稱重。將大白鼠肝臟剪碎，加入 phosphate buffer 後均質，均質液以 $4^\circ C$ 、 $600\times g$ 離心 10 min (沈澱物為粗細胞核)。取上層液，再以 $4^\circ C$ 、 $5000\times g$ 離心 10 min (沈澱物為粗粒腺體)。上層液再以 $4^\circ C$ 、 $9000\times g$ 離心 10 min，取上層液，以 $4^\circ C$ 、 $100000\times g$ 離心 45 min，沈澱物即為微粒體。粒腺體或微粒體沈澱物與肝臟等重之 buffer 均勻混合，測試蛋白質含量，充氮氣於 $-70^\circ C$ 保存備用。

B. 杜仲萃取物對於NADPH/ADP/ $FeCl_3$ 及 $FeCl_2/H_2O_2$ 誘導大白鼠肝臟微粒體脂質過氧化之影響

在1 ml磷酸鹽緩衝液(0.01 M, pH 7.4)中，含有肝臟微粒體 (0.6 mg)，添加適當劑量之杜仲萃取物，及促氧化劑NADPH/ADP/ $FeCl_3$ 、 $FeCl_2/H_2O_2$ 或 $FeCl_2$ 。反應試液於 $37^\circ C$ 培育1小時後，加入1 ml BHT (20 mg/ml)終止反應。再加入1 ml TBA (1%)及1 ml HCl (10%)溶液，混

合均勻後於100°C水浴30分鐘。冰浴冷卻後加入5 ml氯仿，於4000 rpm離心20分鐘，取上層液測532 nm之吸光值。吸光值越低表示測試樣品之抗氧化性越強。

C. 杜仲萃取物對於FeCl₂/H₂O₂誘導大白鼠肝臟粒腺體脂質氧化之影響

在1 ml磷酸鹽緩衝液(0.01 M, pH 7.4)中，含有肝臟粒腺體，添加適當劑量之杜仲萃取物，及促氧化劑FeCl₂/H₂O₂。反應試液如上述。

3. 杜仲萃取物對活性氧誘導 TA102 氧化突變之影響(Shiraki et al., 1994)

(1). 毒性試驗

在致突變或抗致突變性試驗中，若樣品對菌株具有毒性，則會使菌數降低，而誤判結果。因此需要進行樣品萃取液對菌株之生長能力是否有影響。取0.1 ml樣品萃取物及0.1 ml磷酸鹽緩衝液和0.1 ml經隔夜培養於oxid nutrient broth no.2 之*S. typhimurium*菌種TA102 於試管中，加入0.5 ml之S-9混合物或代替的磷酸鹽緩衝液0.5 ml，於37°C下預培養20分鐘後，取0.1 ml 混合液稀釋至2-3x10³個菌/ml，再取1 ml 稀釋溶液於plate中，加入nutrient agar 搖勻，凝固後將此plate 於37°C培養箱培養48小時後計算其菌落數。

(2). 致突變性試驗

致突變性試驗採用Maron 和Ames (1983)所提出的方法進行。取適當稀釋至一定濃度的樣品萃取物0.1 ml及0.1 ml磷酸鹽緩衝液和0.1 ml經隔夜培養於oxid nutrient broth no.2 之菌種*S. typhimurium*TA102於試管，加入0.5 ml之S-9混合物或代替的磷酸鹽緩衝液0.5 ml，於37°C下預培養20分鐘後，再加入2 ml、45°C的molten top agar (含0.05mM L-histidine及0.09M NaCl)，混勻後倒入glucose minimal agar plate，將此plate於37°C培養箱培養48小時後計算其菌落數。試驗中分別在有無S-9混合物情況下，測試樣品萃取液的致突變性。另外再以不加樣品萃取物而改以DMSO代替做一對照組。如果試驗組His⁺ revertants/plate數目高於對照組兩倍以上，則代表樣品萃取物有致突變性。

(3). 抗致突變性試驗

抗致突變性之方法主要依照 Ames test 之方法進行(Yen and Chen, 1995)。取適當稀釋至一定濃度的樣品萃取物 0.1 ml 及 0.1 ml 標準致突變劑和 0.1 ml 經隔夜培養於 oxoid nutrient broth no.2 之 *S. typhimurium* 菌種 TA102 於試管中，加入 0.5 ml 之 S-9 混合物或代替的磷酸鹽緩衝液 0.5 ml，於 37°C 下預培養 20 分鐘後，再加入 2 ml、45°C 的 molten top agar (含 0.05mM L-histidine 及 0.09M NaCl)，混勻後倒入 glucose minimal agar plate，將此 plate 於 37°C 培養箱培養 48 小時後計算其菌落數。在每一試驗中並用標準致突變劑作 positive control，每一樣品於試驗時做三重覆，樣品之 His⁺ revertants/plate 和對照組之百分比愈小則表示樣品之抗致突變性愈強。

4. 以 COMET 彗星試驗檢測杜仲水萃取物對活性氧誘導淋巴細胞氧化損傷之影響 (Anderson et al., 1994)

(1). 淋巴球的分離

取含 4 ml heparin 之全血加入 3 ml RPMI 1640 medium 後，將其注入 7 ml separation medium 中，此混合液以 1600 rpm 離心 15 分鐘。小心地吸出淋巴球(buffy coat) 注入內含 RPMI 1640 之離心管中，再以 1600 rpm，8 min 離心一次，取出上層液後，將仍懸浮於 RPMI 1640 之殘餘物再次進行離心(1200 rpm, 5 min)。準備 2 管細胞數已調整為 10⁶ cells/ml 的試管，取 0.9 ml cells 懸浮液及 35 μg/μl H₂O₂ 及杜仲水萃取物，置於 eppendorf 中，在 37°C 下反應 30 min。再將 cell 以 900 rpm 5 min 離心下來，移去上清液，加入適當量的 low melting point agarose，使 cell 懸浮於 low melting point agarose gel，並混合均勻。

(2). 杜仲萃取物對 H₂O₂ 誘導淋巴細胞 DNA 氧化損傷之影響

取 0.05 ml low melting point agarose，加在先前製備好，附在

載玻片上的normal melting point agarose上，蓋上蓋玻片，置於4°C 冰箱中5分鐘。待agarose凝固後取下蓋玻片，如前法再添加一層low melting point agarose。將製備好附於載玻片上三層的agarose置於4°C 的水解液(lysis solution；2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris pH10, 1% sodium sarcosinate, 1% Triton X-100及10%DMSO) 中反應一小時，其中後兩項溶液必需於使用前添加。水解後滴乾，置於鹼性電泳液(1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH)中20分鐘，使DNA雙股鬆開(unwinding)。接著接上電源，調整電流為300mA，電壓為25V，電泳20分鐘。最後添加中和液(Tris buffer 0.4M, pH7.5) 反應五分鐘。以ethidium bromide染色，染色後使用Nikon螢光顯微鏡，400倍的放大倍率，excitation filter510-560 nm 和barrier filter 590 nm觀察DNA的傷害情形。並連接Hitachi高解析度數位相機和彗星分析系統(Komet 3.1, Kinetic Image Ltd., Liverpool, UK)，判斷淋巴球中DNA的傷害情形。

5. 數據統計分析

實驗數據使用教育部工作站之統計分析系統(Statistical Analysis System, SAS)進行分析。變異數分析則以 PROC ANOVA 及 Duncan's multiple range test 進行分析。

結果與討論

一、杜仲水萃取物對活性氧誘導紅血球細胞膜、肝臟粒腺體和微粒體脂質等不同脂質系統過氧化之影響

1、杜仲水萃取物對紅血球細胞膜脂質過氧化之影響

細胞膜因富含多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid)，因此極易受到自由基的攻擊，而發生氧化傷害。動物體內的紅血球細胞膜因富含多元不飽和脂肪酸，因而也經常被用於模擬體內膜脂質過氧化的試驗。本實驗藉由 Fenton reaction 催化人體血液中紅血球細胞膜之過氧化作用，並探討杜仲水萃取物對紅血球細胞膜過氧化作用之影響。如圖一所示，杜仲水萃取物皆有抑制效應，在濃度 0.2 mg/mL 時，其抑制率依序為杜仲葉(70%)>炒杜仲(56%)>生杜仲(39%)。杜仲水萃取物能抑制 Fenton reaction 所誘導紅血球細胞膜氧化，其中所牽涉的機制可能包括清除 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、脂質過氧化自由基($\text{ROO}\cdot$ 和 $\text{RO}\cdot$)及螯合 Fe^{2+} 而抑制紅血球細胞膜氧化。Shiraki 等(1994)指出紅茶中的多酚化合物— theaflavins 可抑制紅血球細胞膜之脂質過氧化。杜仲水萃取物中由於含有多量的多酚化合物故亦能對紅血球細胞膜的脂質過氧化有抑制作用。Ascorbic acid 及 gallic acid 則呈現促氧化效應，ascorbic acid 的促氧化效應較 gallic acid 明顯，其中可能是 ascorbic acid 及 gallic acid 的還原力將 Fe^{3+} 還原為 Fe^{2+} ，再與 H_2O_2 反應，進行 Fenton reaction 產生 $\cdot\text{OH}$ 以催化紅血球細胞膜脂質的氧化，此結果與 gallic acid 及 ascorbic acid 在 Fenton reaction 誘導的 DNA 氧化傷害相似。

2、杜仲水萃取物對於 $\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Ascorbic acid}$ 誘導微脂粒脂質過氧化之影響

微脂粒(liposomes)脂質過氧化系統是一個理想的磷脂質模擬系統，目前已廣泛的被用來模擬體內膳食成分及藥物代謝對脂質過氧化之試驗(Chatterjee, 1988)。本實驗即利用添加 ascorbic acid 將 Fe^{3+} 還原為 Fe^{2+} ，再與 H_2O_2 反應，進行 Fenton reaction 產生 $\cdot\text{OH}$ 以催化脂質

的氧化。由表一可看出杜仲水萃取物中仍以杜仲葉水萃取物抑制微脂粒脂質過氧化之效果最佳，僅需 <0.06 mg/mL之濃度即可抑制20%之效果；炒杜仲水萃取物則需 0.24 mg/mL之濃度方可抑制20%之效果，約為杜仲葉之4倍劑量。生杜仲最差亦約需炒杜仲的4倍劑量方可達到一樣的抑制效果。Mannitol 的抑制效果則介於炒杜仲及生杜仲之間，gallic acid 仍呈現促氧化效果。Aruoma (1991)與Aruoma等(1993)指出gallic acid 在金屬離子所誘導的脂質過氧化系統中有抗氧化及促氧化雙重效果。Halliwell 和 Gutteridge (1989)指出mannitol 為良好的 $\cdot\text{OH}$ 清除劑，由於杜仲水萃取物之清除 $\cdot\text{OH}$ 效果較mannitol 佳，因此杜仲葉水萃取物亦可認為是良好的 $\cdot\text{OH}$ 清除劑。

3、杜仲水萃取物對於NADPH/ADP/FeCl₃及FeCl₂/H₂O₂誘導大白鼠肝臟微粒體脂質過氧化之影響

膜脂質之所以特別容易氧化，不僅因為其中高不飽和脂肪酸的含量，亦因為其中含有酵素性及非酵素性系統可催化自由基的產生而導致膜脂質的氧化。肝臟微粒體(microsome)為異質之混和物，其中含有endoplasmic reticulum及plasma membrane，因此常被用來評估多種外來藥物抑制脂質氧化之系統，NADPH-cytochrome P-450 reductase 是其中酵素系統誘導微粒體脂質氧化的主要酵素，而非酵素系統主要是以FeCl₂/H₂O₂誘導微粒體脂質過氧化(Buege and Aust, 1978；Halliwell and Gutteridge, 1989)。

杜仲水萃取物對於NADPH/ADP/FeCl₃(酵素性)及FeCl₂/H₂O₂(非酵素性)誘導微粒體脂質過氧化，結果如圖二及表二所示。由圖二可知杜仲水萃取物無論在酵素或非酵素所誘導的微粒體過氧化系統皆有抑制效果，且隨著濃度的增加而增加其抑制效果。如圖二所示杜仲葉水萃取物在 0.2 mg/mL時，其抑制脂質過氧化在酵素及非酵素系統分別為93.9及95.8%，其抑制效果遠較生杜仲及炒杜仲佳。由表二亦可看出杜仲水萃取物在非酵素系統所誘導的微粒體脂質氧化的抑制效果較優於酵素系統，在加入杜仲葉水萃取物 0.2 mg/mL時，在非酵素其TBARS的形成量為 0.08 μmol malondialdehyde/mg protein，炒杜仲及生杜仲水萃取物其TBARS的形成量分別杜仲葉水

萃取物的7倍及9倍。Hanna 等(1994)指出MA-631(藥草混和物之萃取物)之水萃取物及酒精萃取物其能抑制酵素及非酵素誘導的老鼠肝臟微粒體脂質過氧化，且呈現濃度反應關係。在酵素系統之TBARS的形成量皆較非酵素系統高，由此可知杜仲水萃取物清除Fenton reaction所產生的 $\cdot\text{OH}$ ，優於清除酵素所產生之 $\cdot\text{OH}$ ，因此在非酵素系統形成的TBARS較酵素系統為低。在酵素系統所誘導的脂質過氧化效果較差，其因可能是杜仲水萃取物抑制酵素活性較差，以致酵素與基質反應後能產生較高的 $\cdot\text{OH}$ ，使得此系統之脂質過氧化現象較嚴重。另外mannitol為良好的自由基清除劑，但在這些膜脂質的過氧化系統中，杜仲葉水萃取物的抑制效果皆優於mannitol，可知杜仲葉水萃取物對於抑制膜脂質氧化有良好的效果，且其抑制膜脂質氧化所牽涉的機制，除了清除 $\cdot\text{OH}$ 外，其他如清除 H_2O_2 ，或螯合金屬離子亦為重要之機制。

4、杜仲萃取物對於 $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ 誘導大白鼠肝臟粒線體脂質過氧化之影響

粒線體在正常的代謝下即會產生高量的氧自由基，而導致粒線體 DNA 的突變及粒線體功能的喪失，因此導致老化及一些退化性疾病的產生。粒線體能將 2% 氧轉換成氧自由基，而導致老化(Cotton et al., 1993)。而且粒線體 DNA 的突變與粒線體功能的損傷與退化性疾病有明顯的相關性。細胞及其胞器之細胞膜為自由基之主要攻擊對象，因為氧化還原反應常發生在粒線體，因此粒線體對於氧化壓力極為敏感。杜仲自古即被視為延年益壽的食療藥膳，因此探討杜仲水萃取物是否能有效抑制粒線體過氧化，將可間接了解杜仲水萃取物在抑制老化上之角色。如圖三所示，杜仲水萃取物皆能抑制 Fenton reaction 所誘導粒線體的脂質過氧化現象。杜仲葉水萃取物在添加 0.2 mg/mL 的濃度下其抑制效果達 40 %，其抑制效果分別為炒杜仲及生杜仲水萃取物之 1.42 及 2.75 倍。Sastre 等(1995)指出可改善粒線體功能的藥劑可推薦使用在退化性疾病使用，因此杜仲葉水萃取物在抑制人體的老化上或許亦扮演重要角色。

二、杜仲水萃取物對活性氧誘導 TA102 氧化突變之影響

1、杜仲水萃取物對 *Salmonella typhimurium* TA102 之毒性及致突變性試驗

為了了解杜仲水萃取物是否具有抗氧化突變性，因此需先了解其是否具有細胞毒性及致突變性，因此分別將不同的杜仲水萃取物配置不同濃度(0-4 mg/plate)測試其對 TA102 細胞毒性及致突變性之影響。依 Maron 和 Ames (1983)所示 TA102 之自發性突變應為 240-320，而生菌數一般應為 $1-2 \times 10^3$ 。結果如表三及表四所示，在不同濃度下(0-4 mg/plate)杜仲水萃取物看不出有明顯的細胞毒性($1-2 \times 10^3$)或致突變性(240-320)。

2、不同濃度的 H_2O_2 及 t-butylhydroperoxide 對 *Salmonella typhimurium* TA102 之致突變性之影響

活性氧可攻擊 DNA，造成 DNA 傷害，而改變其基因表現或影響細胞生長及細胞的分化(Cerutti, 1989)；氧自由基被認為是導致老化及癌症的主要致突變物(Ames, 1982)。以微生物方法來評估氧自由基之突變性是快速、簡單且經濟的方法(Hassan and Moody, 1984)。*Salmonella typhimurium* TA 102 為對氧自由基及氧化劑敏感之菌株，依 Levin 等(1982)所示，一些會產生自由基之抗生素如 mitomycin C 及 bleomycin 等及一些氫過氧化物如 t-butylhydroperoxide (t-BOOH)及 cumene hydroperoxide 及氧化劑 H_2O_2 等均會明顯的誘發 TA102 的突變。t-BOOH 在細胞培養的環境中極易裂解成烷氧自由基(alkoxyl radical ; RO^{\bullet})及過氧化自由基(peroxyl radical ; ROO^{\bullet})(Taffe et al., 1987)而造成 TA102 的氧化突變。t-BOOH 在生理狀態下會產生氧自由基及其相關的衍生物，而被當成腫瘤的促進劑(Epe at al., 1990)。細胞在正常代謝過程會將氧還原而成 H_2O_2 ，亦可由多種藥物及非離子照射而產生，屬於活性氧，在細胞中會與 Fe^{2+} 反應產生 $^{\bullet}OH$ (即所謂的 Fenton reaction)而造成細胞的氧

化傷害(Moraes at al., 1990)。因此本研究以 t-BOOH 及 H₂O₂ 當為誘發 TA102 突變之致突變劑。如表五所示，隨著致突變劑濃度的增加其致突變性亦隨之增加，而 t-BOOH 的致突變性較 H₂O₂ 明顯。在其 500 µg/plate 時其 TA102 的突變數已高達 1742，同劑量下 H₂O₂ 的突變數僅為 t-BOOH 的 1/2，再提高 H₂O₂ 之劑量為 1000 µg/plate 時，TA102 已全部被 H₂O₂ 所毒殺，即 H₂O₂ 對 TA102 之細胞毒性較 t-BOOH 強。因此本研究均以 500 µg/plate 的致突變劑量來誘發 TA102 的突變。

3、杜仲水萃取物對 H₂O₂ 和 t-butylhydroperoxide 在 *Salmonella typhimurium* TA102 致突變性之影響

表六為不同濃度之杜仲水萃取物對 H₂O₂ 和 t-BOOH 為致突變劑誘發 TA102 突變之影響，結果發現杜仲葉水萃取物對 t-BOOH 所誘導的 TA102 的突變作用有明顯的抑制作用。杜仲水萃取物在 4 mg/plate 時，可抑制 65% 的氧化突變，然而生杜仲及炒杜仲水萃取物其抑制效果並不明顯，此可能與杜仲葉水萃取物有良好的清除過氧化及烷氧化自由基有關，而其中可能是杜仲葉水萃取物中含有高量的多酚化合物所致，此可由杜仲葉水萃取物有良好的抑制脂質過氧化效果可得到印證(Yen and Hsieh, 1998)。Stadler 等(1994)指出咖啡可有效的抑制 t-BOOH 所誘導 TA102 的氧化突變，其中主要原因可能是咖啡中的多酚化合物可當為自由基清除劑而抑制 t-BOOH 對 TA102 的基因毒性。Constable 等(1996)亦指出茶葉能有效的抑制 t-BOOH 及異環胺等致突變物對 TA102 及 TA1535 的突變主要是來自其中的兒茶素及其他多酚化合物。

Ames (1982)指出 H₂O₂ 會造成 TA102 的氧化突變，因此繼續探討杜仲水萃取物對 H₂O₂ 誘導 TA102 氧化突變之影響，結果如表七所示，所有杜仲水萃取物對 H₂O₂ 誘導 TA102 氧化突變之抑制效果並不明顯，其原因可能是 TA102 為一株對氧化劑極為敏感的菌株，且 H₂O₂ 之擴散數率極快，杜仲水萃取物未來得及與 H₂O₂ 反應清除，

其已進入 TA102 細胞中造成 TA102 之氧化突變。雖然杜仲水萃取物可清除自由基而抑制脂質的氧化，但在 H₂O₂ 誘導 TA102 氧化突變的系統中，卻沒有明顯抑制 TA102 氧化突變之效果。其中可能因為 TA102 為對氧化劑極為敏感之菌株，當環境中有氧化劑如 H₂O₂ 存在時，H₂O₂ 會快速進入菌體中，導致 DNA 結構的改變，進而造成突變。亦即杜仲水萃取物清除自由基的速率遠不及其進入菌體的速率，因此加入杜仲水萃取物後之抑制效應不明顯。Minnunni 等 (1992) 以 ascorbic acid 探討以 t-BOOH 及 H₂O₂ 誘導 TA102 氧化突變之影響，結果 ascorbic acid 可明顯的抑制 t-BOOH 所誘導 TA102 氧化突變，然而對 H₂O₂ 所誘導 TA102 氧化突變，效果則並不明顯，此與我們的結果相似。

Nakazawa (1997) 指出杜仲茶(葉水萃取物)中含許多多酚如 chlorogenic acid、pyrogallol、protocatechuic acid、coumaric acid 及 chlorogenic acid 及類黃酮化合物 (flavonoids) 如 quercetin 及 kaempferol 等，這些化合物皆被證實具有抗致突變性，而此些化合物的去致突變作用也被廣泛的探討。Pyrogallol 會抑制 benzo[a]pyrene (B[a]P) 的致突變作用，其主要是藉由抑制老鼠肝細胞中微粒體的 mixed function oxidase 所催化 B[a]P 羥化作用 (Rahimtula et al., 1977)。Kato 等(1998)指出漢堡肉中加入洋蔥可降低肉中異環胺類的致突變性，其原因物質可能是洋蔥中的類黃酮化合物。茶葉中的多酚化合物亦被認為是主要的抗致突變物 (Weisburger et al., 1996)。蔬果中所含的多酚化合物如 chlorogenic acid、ferulic acid、caffeic acid、ellagic acid 及 protocatechuic acid 會抑制 aflatoxin B₁(AFB₁)及 B[a]P 的致突變作用(San and Chan, 1987; Wood, et al., 1982)。Quercetin 及 kaempferol 的去致突變作用也被廣泛探討著，研究發現這些類黃酮化合物有抑制 B[a]P、AFB₁ 及異環胺化合物之代謝活化作用(Huanget al., 1983; Heo et al., 1992; Edenharderet al., 1993)。Sasaki 等(1996)以一些人在其攝食生魚及煮牛肉後，其排出的尿一會使 *Salmonella typhimurium* YG1024 增加突

變性，但飲用杜仲茶卻可抑制此菌株的突變率，所以其認為杜仲茶有抗致突變性。另外 Nakamura (1997)等發現杜仲茶及其中所含的化合物如酚酸 chlorogenic acid、pyrogallol、protocatechuic acid、coumaric acid 及 chlorogenic acid 及類黃酮化合物(flavonoids)如 quercetin 及 kaempferol 等有抑制 mitomycin C 所誘導的 CHO 細胞及老鼠的染色體變異的現象。Mitomycin C 在生物體的代謝會產生活性氧及自由基，因此杜仲茶抑制染色體變異可能與清除活性氧有關。杜仲葉萃取物中多酚含量最高 212 mg/g，再其次為炒杜仲 108 mg/g，最少者為生杜仲 91mg/g。由於杜仲水萃取物中具有良多的多酚化合物，其中尤以杜仲葉水萃取物最多，因此其抑制 TA102 的氧化突變效果最佳，而其中的主要機制可能是來自清除自由基的能力。

三、炒杜仲、杜仲葉水萃取物及 H₂O₂ 對淋巴球細胞毒性及基因傷害之影響

1、炒杜仲、杜仲葉水萃取物及 H₂O₂ 對淋巴球細胞毒性之影響

將抗氧化效果較佳的樣品—炒杜仲及杜仲葉水萃取物，繼續探討其對淋巴球細胞毒性及基因傷害之影響。表八顯示炒杜仲及杜仲葉水萃取物，在系統濃度 2 mg/mL 下，對淋巴球細胞並不會造成細胞毒性。再以活性氧 H₂O₂ 探討其對細胞毒性之影響，結果 H₂O₂ 在系統濃度 200 μM 下，其對細胞亦無明顯的細胞毒性。因此以炒杜仲及杜仲葉水萃取物 2 mg/mL 及 H₂O₂ 50 μM 之濃度探討其對淋巴球細胞基因傷害的影響。

2、炒杜仲、杜仲葉水萃取物及 H₂O₂ 對淋巴球基因傷害之影響

基因傷害之測定是以單細胞膠體電泳測得。單細胞膠體電泳(single cell gel electrophoresis; SCGE)或稱為彗星試驗(Comet test)，此法乃源自 Östling 和 Johansson (1984)是一個快速、簡單、經濟又靈敏之檢測及分析哺乳動物細胞內 DNA 斷裂的一種技術(Hellman et al.,1995)。此方法主要是分析單細胞中 DNA 受傷害的情形，將細

胞懸浮液與 agarose 混合置於載玻片上然後以界面活性劑破壞其細胞膜，之後置於電場中電泳，隨即 DNA 的碎片及能形成所謂的彗星圖樣。彗星試驗目前被廣泛應用於 DNA 修復機制、輻射機理、基因毒性及細胞死亡程式(apoptosis)等方面的探討。如圖五所示，隨著 H_2O_2 濃度的增加，淋巴球細胞的基因氧化傷害也愈嚴重。在未加入 H_2O_2 時細胞之 Arbitrary Unit (AU) 為 38，當加入 H_2O_2 (50 μM) 時其 AU 為 195，當增加為 100 及 200 μM 其 AU 值增加為 249 及 364， H_2O_2 濃度為 200 μM 時其 AU 值為原來的 9.6 倍，且細胞中的 DNA 幾乎已完全被傷害。

表九為炒杜仲及杜仲葉水萃取物對淋巴球基因傷害之影響。在 1 mg/mL 時炒杜仲及杜仲葉水萃取物，其 AU 值分別為 42 及 50，濃度再增加為 2 mg/mL 時炒杜仲及杜仲葉水萃取物，其 AU 值增加為 50 及 69。由結果可發現炒杜仲及杜仲葉水萃取物對淋巴球細胞有一些基因毒性，其中以炒杜仲較明顯，此可能的原因為杜仲皮部本來就有些物質較會造成基因傷害，或是因為經焙炒過程生成一些梅納褐變產物而對基因造成傷害，此些原因值得進一步探討。

3、炒杜仲及杜仲葉水萃取物對 H_2O_2 誘導淋巴球基因傷害之影響

以 H_2O_2 50 μM 的濃度，探討炒杜仲及杜仲葉水萃取對其基因氧化傷害之影響如表十。炒杜仲抑制 H_2O_2 誘導淋巴球基因傷害的效果並不明顯；然而杜仲葉水萃取物隨著其濃度的提高，其抑制 H_2O_2 誘導淋巴球氧化傷害之效果亦隨之增加。當在濃度 1 mg/mL 時其 Arbitrary Unit (AU) 為 134，約可抑制 32.% 的 DNA 氧化傷害，在濃度 2 mg/mL 時，AU 值為 123 可抑制 38% 的 DNA 氧化傷害。

為了解杜仲水萃取物之抑制 DNA 氧化傷害之可能機制，將實驗分成六組如表十一。A 組先將 H_2O_2 (50 μM) 與細胞反應 30 分鐘後以 900 rpm 離心 5 分鐘，細胞再以 RPMI 洗 2 次，再加入杜仲葉水萃取物(2 mg/mL)反應 30 分鐘，此組主要目的是探討杜仲葉水萃取物，是否有幫助細胞修復之功能。B 組先將杜仲葉水萃取物與 H_2O_2 反應 30 分鐘後，再加細胞。此組主要目的在探討杜仲葉水萃取物

清除 H_2O_2 的能力。C 組為杜仲葉水萃取物先與細胞反應 30 分鐘後，再加入 H_2O_2 ，此組主要目的是在探討杜仲葉水萃取物對細胞內抗氧化防禦系統的提振能力。D、E 組則分別為細胞與 H_2O_2 先後反應的負控制組。F 組為只有細胞的控制組。這幾組以彗星試驗探討的結果如圖六，其中 F 組為僅有細胞的控制組，其 AU 為 67，而 B 組為 H_2O_2 與杜仲葉水萃取物先反應 30 分鐘，再加入細胞，此組目的在測杜仲葉水萃取物清除 H_2O_2 之能力，結果可明顯發現此組有良好抑制淋巴球氧化傷害之效果，其 AU 值為 85，其餘各組效果不明顯 AU 值皆在 160-170 間，由此可知杜仲葉水萃取物其可抑制淋巴球氧化傷害其主要是藉清除 H_2O_2 之能力所致。

4、杜仲葉水萃取物清除 H_2O_2 之能力

以山葵過氧化酵素的方法測定杜仲葉水萃取物清除 H_2O_2 之能力結果如表十二，杜仲葉水萃取物在濃度 2 mg/ml 可清除約 70% 的 H_2O_2 。由此可知杜仲葉水萃取物可經由良好的清除 H_2O_2 之效果而抑制淋巴球細胞的氧化傷害。Ruch 等 (1989) 指出由綠茶所分離出的 catechin 具有清除 H_2O_2 及氧自由基之功能，減少兩者對細胞所產生的毒害。

結論與建議

由本研究可知杜仲水萃取物在 Fenton reaction 所誘導的不同膜脂質的系統下具有良好的抗氧化能力，尤其是杜仲葉水萃取物。其中抑制作用所牽涉之機制，除了清除脂質過氧化自由基外，亦包括清除清除 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 及螯合 Fe^{2+} 而抑制細胞膜脂質過氧化。

杜仲葉水萃取物對於 t-BOOH 所誘導的 TA102 氧化突變有明顯抑制作用，而生杜仲及炒杜仲則無明顯的抑制作用，其中可能是因杜仲葉水萃取物中含高量的多酚化合物，可清除 t-BOOH 產生烷氧自由基及過氧自由基所致。然而杜仲葉水萃取物對於 H_2O_2 所誘導的 TA102 氧化突變的抑制效應較抑制 t-BOOH 誘導的 TA102 氧化突變不明顯。其可能是因杜仲葉水萃取物清除 H_2O_2 之速率慢於 H_2O_2 進入 TA102 的細胞中，引發 TA102 的氧化突變所致，另外生杜仲及炒杜仲水萃取物對於 H_2O_2 所誘導的 TA102 氧化突變的抑制效果仍然不明顯。

杜仲葉水萃取物對於 H_2O_2 誘導人類淋巴球細胞基因氧化傷害亦具抑制效應，炒杜仲水萃取物之抑制效果不明顯。針對杜仲葉水萃取物之抑制機制作探討，結果發現杜仲葉水萃取物抑制 H_2O_2 誘導人類淋巴球細胞基因氧化傷害之主要原因是由於清除 H_2O_2 所致。

參考文獻

- Aeschbacher, H. U. 1991. Mutagenic and antimutagenic compounds in beverages, in: "Mutagens in Food" : Detection and Prevention, pp.181-191.CRC Press, Boca Raton, FL.
- Aeschbacher, H. U., Wolleb, U., Loliger, J., Spadone, J. C. and Liardon, R. 1989. Contribution of coffee aroma constituents to the mutagenicity of coffee, *Food Chem. Toxicol.* 27: 227-232.
- Ames, B. N. 1982. In *Mutagens in Our Environment*. Sorsa, M. and Vainio, H. eds. P3. New York, 1982.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922.
- Anderson, D., Y. T., Phillips, B. J. and Schmezer, P. 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on the oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res.* 307: 261-271.
- Aruoma, O. I. and Halliwell, B. *Free radicals and food additives*. Taylor & Francis, London, 1991.
- Aruoma, O. I., Murcia, A., Butler, J. and Halliwell, B. 1993. Evaluation of the antioxidant and prooxidant action of gallic acid and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1880-1885.
- Cerutti, P. A. 1989. Mechanisms of action of oxidant carcinogens. *Cancer Detect. Prev.* 14: 281-284.
- Chatterjee, S.N. and Agarwal, S. 1988. Liposomes as a membrane model for study of lipid peroxidation. *Free Radical Biol. Med.* 4: 51-72.
- Constable, A., Varga, N., Richoz, J. and Stadler, R. H. 1996. Antimutagenicity and catechin content of soluble instant teas. *Mutagenesis* 11:189-194.

- Edenharder, R., Petersdorff, I. and Rauscher, R. 1993. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutat. Res.* 287: 261-274.
- Epe, B., Hegler, J. and Wild, D. 1990. Identification of ultimate DNA damaging oxygen species. *Enviro. Health Perspect.* 88: 111-115.
- Halliwell, B. 1996. Oxidative stress, nutrition and health. *Free radic Res.* 25: 57-74.
- Halliwell, B. and Gutteridge J. M . C. 1989. *Free Radicals in biology and medicine.* 2 nd Ed. Clarendon Press, Oxford: Clarendon Press.
- Ham, A. L. and Liebler, D. L. 1995. Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria. *Biochemistry* 34: 5754-5761.
- Hanna, A. N., Sharma, H. M., Kauffman, E. M. and Newwan, H. A. I. 1994. In vitro and in vivo inhibition of microsomal lipid peroxidation by MA-631. *Pharmacol. Biochem. Behav.*39: 505-510.
- Hassan, H. M. and Moody, C. S. 1984. Determination of the mutagenicity of oxygen free radicals using microbial systems. *Method Enzymol.* 254-263.
- Haug, M. T., Wood, A. W., Newmark, H. L., Sayer, J. M., Yagi, H., Jerina, D. M. and Conney, A. L. 1983. Inhibition of the mutagenicity bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic flavonoids. *Carcinogenesis* 4: 1631-1637.
- Hellman, B., Vaghef, H. and Bostrom, B. 1995. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 366: 123-131.
- Heo, M. Y., Yu, K. S., Kim, K. H., Kim, H. P. and Au, W. W. 1992. Anticlastogenic effect of flavonoids against mutagen-induced micronuclei in mice. *Mutat. Res.* 284: 243-249.
- Imaida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Ohtani, M., Nakanish, K., Ito, N. 1983. Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated

hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci development in the liver of rats. *Carcinogenesis* 4: 895-899.

Kato, T., Michikoshi, K., Minowa, Y., Maeda, Y. and Kikugawa, K. 1998. Mutagenicity of cooked hamburger is reduced by addition of onion to ground beef. *Mutat. Res.* 420: 109-114.

King, D. L., Hahm, T. S. and Min, D. B. 1993. Chemistry of antioxidants in relation to shelf life of foods. *Dev. Food. Sci.* 33: 629-705.

Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y. and Shibata, H. 1997. Chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochem. Biophys. Acta.*1335: 335-342.

Laranjinha, J., Alemeida, L. and Madeira, V. 1994. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*48: 487-494.

Laranjinha, J., Vieira, O., Madeira, V. and Alemeida, L. 1995. Two related phenolic : antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration. *Arch. Biochem. Biophys.*323: 373-381.

Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A. and Ames, B. N. 1982 A new Salmonella tester strain (TA102) with A.T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 7445-7449.

Maron, D. M. and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.

Minnunni, M., Wolleb, U., Mueller, O., Pferifer, A. and Aeschbacher, H. U. 1992. Natural antioxidants as inhibitors of oxygen species induced mutagenicity. *Mutat. Res.* 269: 193-200.

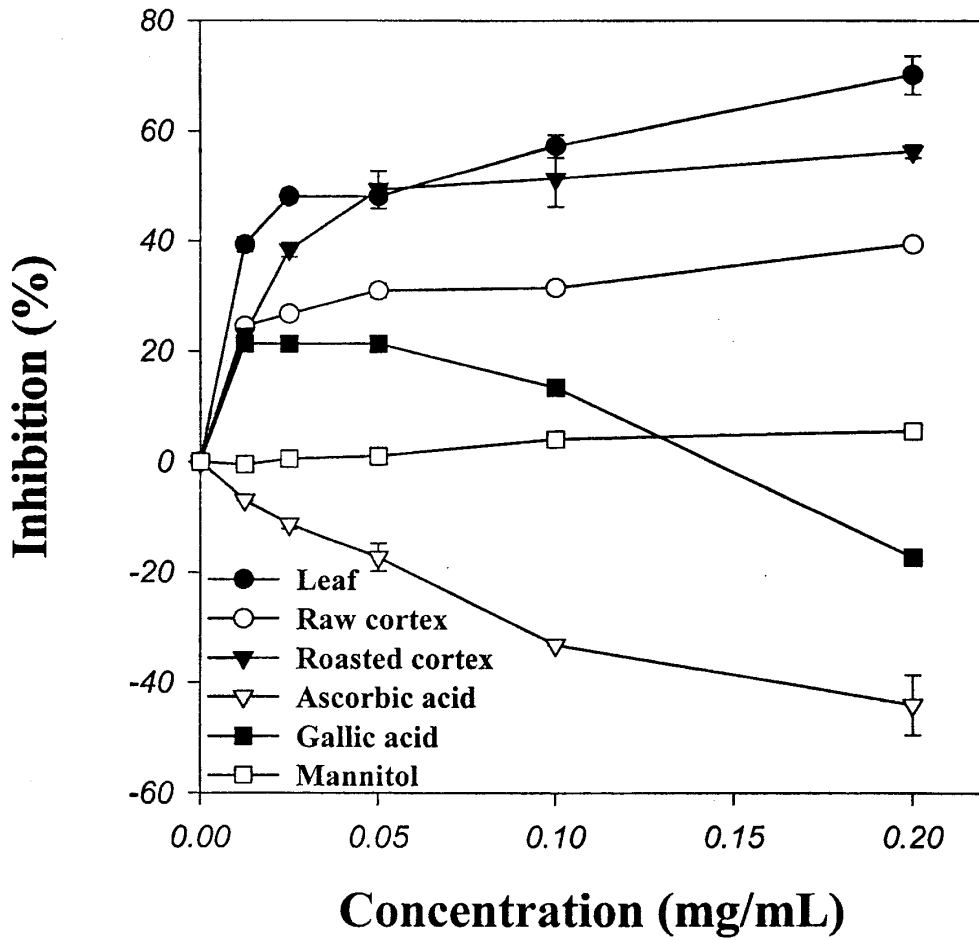
Moraes, E. S. Keyse, S. M. and Tyrrell, R. M. 1990. Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis* 11: 283-293.

- Nakamura, T. Nakazawa, Y., Onizuka, S. Satoh, S., Chiba A., Sekihashi, K., Miura, A., Yasugahira, N. and Sasaki, Y. F. 1997. Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutation Res.* 388, 7-20.
- Nakasa, T., Yamaguchi, M., Okinaka, O., Metori, K. and Takashi, S. 1995. Effects of Du-zhong leaf extract on plasma and hepatic lipids in rats fed on a high fat plus high cholesterol diet. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* (in Japanese). 69: 1491-1498.
- Nakazawa, Y. 1997. Application of Du-Zhong tea in functionality and healthy properties. *Food industry* (in Japanese) 40: 6-15.
- östling, O. and Johansson.K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-293.
- Ruch, K. J., Cheng, S. J. and Klaunig, J. E. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechin isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10:1003-1008.
- Rahimtula, A. D., Zachariah, P. K. and O'Brien, P. J. 1977. The effects of antioxidants on the metabolism and mutagenicity of benzo[a]pyrene in vitro. *Biochem. J.* 164: 473-475.
- Sahu, S. C. 1991. Role of oxygen free radicals in the molecular mechanisms of carcinogenesis: a review. *J. Environ. Sci. Health Chap. 9*: 83-112.
- San, R. H. C. and Chan, R. I. M. 1987. Inhibitory effect of phenolic compounds on aflatoxin B1 metabolism and induced mutagenesis. *Mutat. Res.* 177: 229-239.
- Sasaki, Y. F., Chi, A., Murakami, M., Sekihashi, K., Tanaka, M., Takahoko, M., Moribayashi, S., Kudou, C., Hara, Y., Nakazawa, Y., Nakamura, T. and Onizuka, S. 1996. Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves) :2. Suppressing effect of Tochu

- tea on the urine mutagenicity after ingestion of raw fish and cooked beef. *Mutat. Res.* 371: 203-214.
- Sasaki, Y.F., Chi, A., Murakami, M., Sekihashi, K., Tanaka, M., Takahoko, M., Moribayashi, S., Kudou, C., Hara, Y., Nakazawa, Y., Nakamura, T. and Onizuka, S. 1996. Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 2. Suppressing effect of Tochu tea on the urine mutagenicity after ingestion of raw fish and cooked beef. *Mutat. Res.* 371: 203-214.
- Shiraki, M., Hara, Y., Osawa, T., Kumon, H., Nakayama, T. and Kawakishi, S. 1994. Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea. *Mutat. Res.* 323: 29-34.
- Shiraki, M., Hara, Y., Osawa, T., Kumon, H., Nakayama, T. and Kawakishi, S. 1994. Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea. *Mutat. Res.* 323: 29-34.
- Stadler, R. H., Turesky, R. J. Muller, O., Markovic, J. and Leong-Morgenthaler, P. 1994. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat. Res.* 308: 177-190.
- Taffe, B. G., Takahashi, N., Kensler, T. W. and Mason, R. P. 1987. Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 262: 12143-12149.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S. W., Kaeakishi, S. and Osawa, T. 1994. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2407-2410.
- Ueda, J., Saito, N., Shimazu, Y. and Ozawa, T. 1996. A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 333: 377-384.
- Weisburger, J. H., Hara, Y., Dolan, L., Luo, F., Pittman, B. and Zang, E. 1996. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of

carcinogens. *Mutat. Res.* 371: 57-63.

- Wood, A. W., Haung, M. T., Chang, R. L., Newmark, H. L., Lehr, R. E., Yagi, H., Sayer, J. M., Jerina, D. M. and Conney, A. L. 1982. Inhibition of mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols; Exceptional activity of ellagic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5513-5517.
- Yen, G. C. and Chen, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 27-32.
- Yen, G. C. and Hsieh, C. L. 1998. Antioxidant activity of extracts from *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3952-3957.



圖一、杜仲水萃取物對 Fe^{2+}/H_2O_2 誘導紅血球細胞膜脂質過氧化之影響

Figure 1. Effect of water extracts from Du-zhong on Fe^{2+}/H_2O_2 -induced lipid peroxidation of ghost membrane.

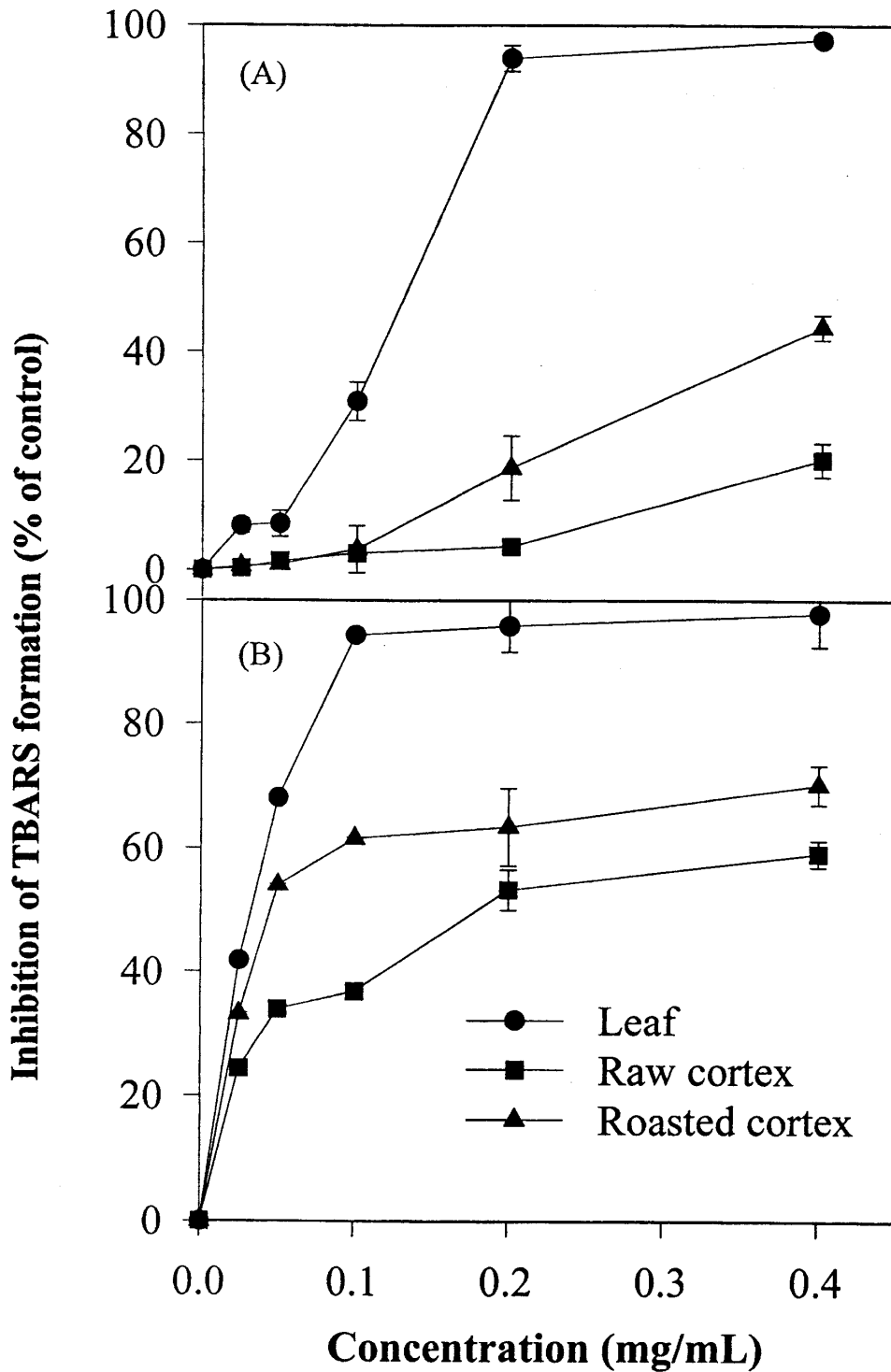
表一、Gallic acid、mannitol 及杜仲水萃取物其抑制 20%微脂粒過氧化之濃度

Table 1. Comparison of gallic acid, mannitol and water extracts from Du-zhong for 20% inhibition (IC₂₀) of liposome peroxidation

Samples	IC ₂₀ (mg/mL) ^a
Du-Zhong	
Leaf	<0.063
Raw cortex	0.814± 0.159
Roasted cortex	0.236± 0.018
Gallic acid	— ^b
Mannitol	0.467± 0.018

^a The concentration of samples that inhibited Fenton-induced liposome peroxidation by 20% (IC₂₀) was determined by linear regression of inhibitory percentages. Results are presented as mean ± standard deviations (n=3).

^b Gallic acid presented the prooxidant action.



圖二、杜仲水萃取物對(A)酵素性(B)非酵素性誘導微粒體過氧化之影響

Figure 2. Effect of water extracts from Du-zhong on the lipid peroxidation of microsomes. (A) Enzymatic system induced by NADPH/ADP/ Fe^{3+} ; (B) Nonenzymatic system induced by Fe^{2+}/H_2O_2 .

表二、Gallic acid、mannitol 及杜仲水萃取物對於微粒體脂質過氧化形成 TBARS 之影響

Table 2. Comparison of gallic acid, mannitol and water extracts from Du-zhong on TBARS production in microsomal lipid peroxidation^a

Samples (0.2 mg/mL)	TBARS (μmol malondialdehyde/mg protein)	
	Nonenzymatic induced lipid peroxidation	Enzymatic induced lipid peroxidation
Du-zhong		
Leaf	0.079 \pm 0.007	0.115 \pm 0.007
Raw cortex	0.882 \pm 0.007	1.807 \pm 0.009
Roasted cortex	0.692 \pm 0.008	1.535 \pm 0.030
Gallic acid	0.115 \pm 0.004	0.082 \pm 0.003
Mannitol	1.135 \pm 0.004	1.823 \pm 0.005

^a The experiments were conducted essentially as described in Materials and Methods. Each value represented the mean \pm the standard deviation of three experiments.

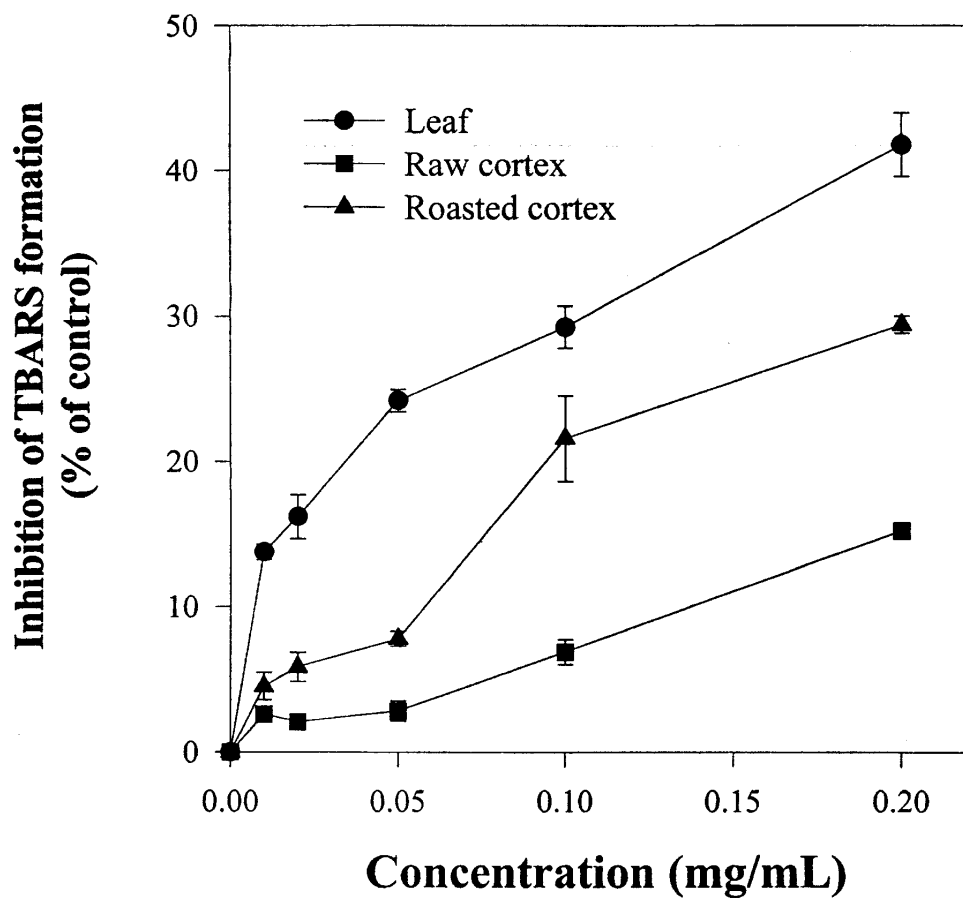


圖 三、杜仲水萃取物對 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 所誘導粒線體脂質過氧化之影響

Figure 3. Effect of water extracts from Du-zhong on the lipid peroxidation of mitochondria induced by $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$.

表 三、杜仲水萃取物對 *Salmonella typhimurium* TA102 之毒性試驗

Table 3. Toxicity of various Du-zhong extracts toward *Salmonella typhimurium* TA102

Du-zhong extracts (mg/plate)	No. of bacteria/plate*		
	Leaf	Raw cortex	Roasted cortex
Control**	1613±42	1613±42	1613±42
0.25	1533±202	1727±230	1747±148
0.5	1671±91	1670±152	1736±26
1	1649±61	1490±9	1558±37
2	1575±16	1765±24	1412±33
4	1638±44	1493±79	1889±47

* Data are means±standard deviation of three plates.

** The no. of control was determined without Du-zhong extracts.

表 四、杜仲水萃取物對 *Salmonella typhimurium* TA102 之致突變性
 Table 4. Mutagenicity of various Du-zhong extracts toward *Salmonella typhimurium* TA102

Du-zhong extracts (mg/plate)	His ⁺ revertants/plate*		
	Leaf	Raw cortex	Roasted cortex
Control**	259±49	259±49	259±49
0.25	299±35	291±21	260±44
0.5	284±64	272±14	253±25
1	312±11	263±33	293±12
2	315±39	268±24	246±31
4	300±45	240±35	251±13

* Data are means±standard deviation of three plates.

** The no. of control was determined without Du-zhong extracts.

表 五、不同濃度的 H₂O₂ 及 t-butylhydroperoxide 對 *Salmonella typhimurium* TA102 之致突變性之影響

Table 5. Effect of H₂O₂ and t-butylhydroperoxide with various concentrations the mutagenicity of *Salmonella typhimurium* TA102

Mutagens	Dose (µg/plate)	His ⁺ revertants/plate*
Control	0	284±27
H ₂ O ₂	25	491±49
	50	573±3
	100	794±3
	250	769±17
	500	788±10
	1000	0
t-Butylhydroperoxide	5	407±30
	10	437±17
	25	507±13
	50	678±12
	100	854±16
	500	1742±14

* Data are means± standard deviation of three plates.

** The no. of control was determined without mutagens.

表 六、杜仲水萃取物對 t-butylhydroperoxide 誘導 *salmonella typhimurium* TA102 致突變性之影響

Table 6. Effect of Du-zhong extracts on the mutagenicity of *Salmonella typhimurium* TA102 induced by t-butylhydroperoxide

Du-zhong extracts (mg/plate)	His ⁺ revertants/plate* (% of inhibition)**		
	Leaf	Raw cortex	Roasted cortex
Control***		1955±113	
0.25	1803±30 (9)	1957±13 (0)	1995±113 (0)
0.5	1642±131(17)	1960±18 (0)	2034±120 (0)
1	1569±111(21)	1962±4 (0)	1965±39 (0.7)
2	905±28 (54)	1954±14 (0)	1926±35 (3)
4	702±4 (65)	1950±4 (0)	1901±68 (4)
Spontaneous revertant		309±8	

*Data are means±standard deviation of three plates.

**Inhibition (%)=[1-(Number of His⁺ revertants in the presence of Du-zhong extracts / Number of His⁺ revertants in the absence of Du-zhong extracts)] × 100

***The no. of control was determined without Du-zhong extracts.

表 七、杜仲水萃取物對 hydrogen peroxide 誘導 *salmonella typhimurium* TA102 致突變性之影響

Table 7. Effect of Du-zhong extracts on the mutagenicity of *Salmonella typhimurium* TA102 induced by hydrogen peroxide

Du-zhong extracts (mg/plate)	His ⁺ Revertants/plate* (% of inhibition) **		
	Leaf	Raw cortex	Roasted cortex
Control***		816±44	
0.25	797±30 (2)	816±44 (0)	826±3 (0)
0.5	750±40 (8)	821±18 (0)	854±42 (-0.5)
1	727±20 (11)	842±4 (-0.5)	793±31(3)
2	728±47 (10)	818±14 (0)	777±19 (5)
4	683±22 (16)	794±4 (3)	753±29 (7)
Spontaneous revertant		309±8	

*Data are means±standard deviation of three plates.

**Inhibition (%)=[1-(Number of His⁺ revertants in the presence of Du-zhong extracts / Number of His⁺ revertants in the absence of Du-zhong extracts)] × 100

***The no. of control was determined without Du-zhong extracts.

表 八、H₂O₂、炒杜仲及杜仲葉水萃取物對人類淋巴球細胞之細胞數及存活率之影響

Table 8. Effects of H₂O₂ , roasted cortex and leaf extracts of Du-zhong on cell numbers and viability of human lymphocytes*

Sample	Concentration	Cell no.(10 ⁶ /ml)	Viability
Control	0	2.49± 0.07	95.7± 0.3
H ₂ O ₂	50 μM	2.44± 0.05	95.6± 0.4
	100 μM	2.48± 0.01	95.0± 1.1
	200 μM	2.24± 0.12	95.0± 1.7
Roasted cortex	0.5 mg	2.03± 0.15	95.9± 1.3
	1.0 mg	2.16± 0.02	95.1± 0.6
	2.0 mg	2.17± 0.03	95.8± 0.7
Leaf	0.5 mg	1.97± 1.21	95.6± 0.5
	1.0 mg	2.14± 0.15	96.8± 1.8
	2.0 mg	2.23± 0.09	96.3± 0.5

*Human lymphocytes were incubated at a density of 2×10^6 /ml. Viability (measured by Trypan blue exclusion) was determined before and after incubation with Du-zhong extract or H₂O₂. Results are mean ± SD for n≥3.

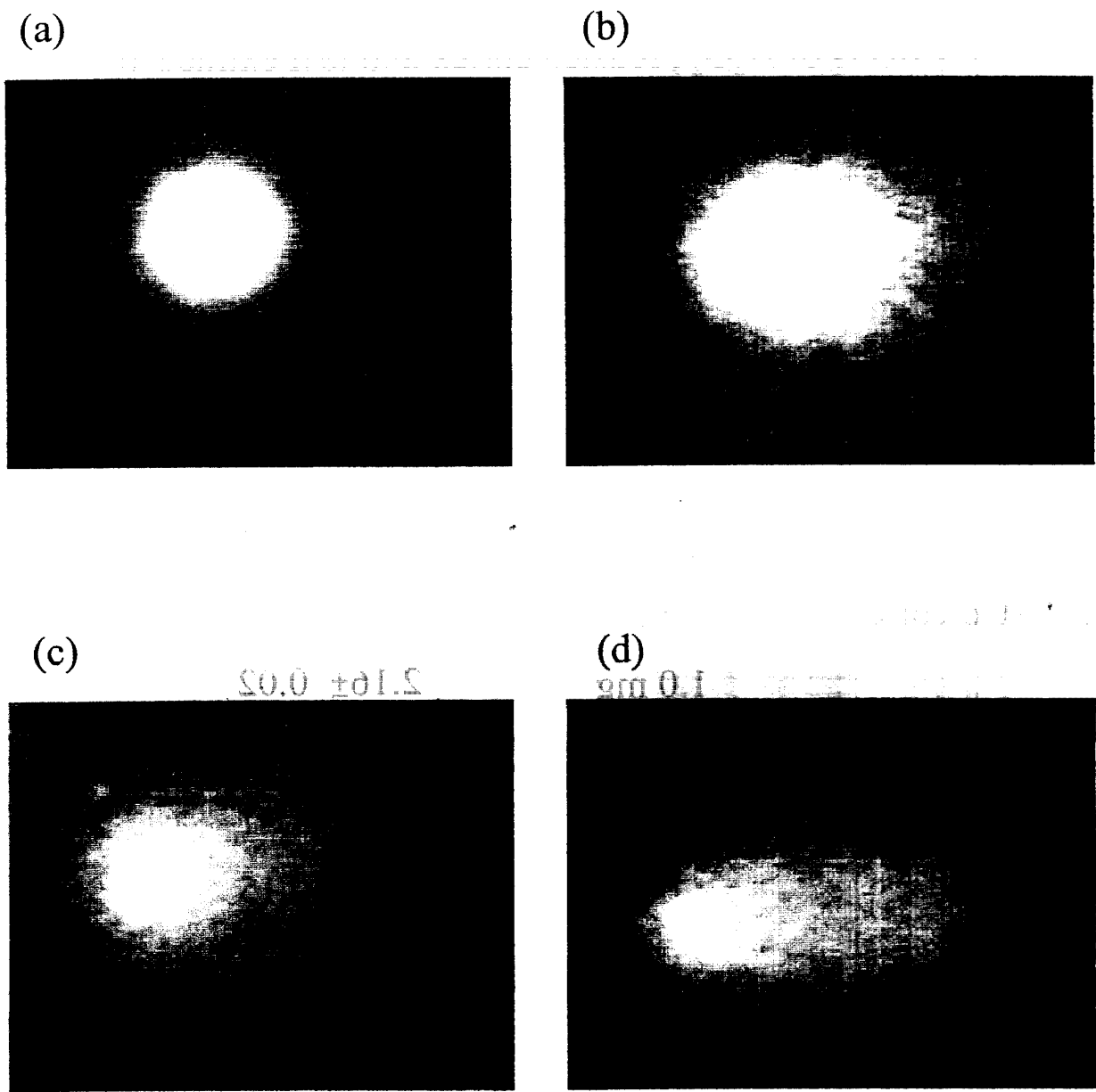


圖 四、淋巴球細胞 DNA 彗星影像圖。以 EtBr 當螢光染劑。(a)無 DNA 傷害 (b)輕度傷害 (c)中度傷害 (d)重度傷害

Figure 4. DNA comet images of lymphocyte. Fluorescent of staining with EtBr. (a) undamage cell , tail DNA <5%; (b) slightly damaged cell, tail DNA 5-20%; (c) damaged cell, tail DNA 20-40%; (d) highly damaged cell, tail DNA >75%.

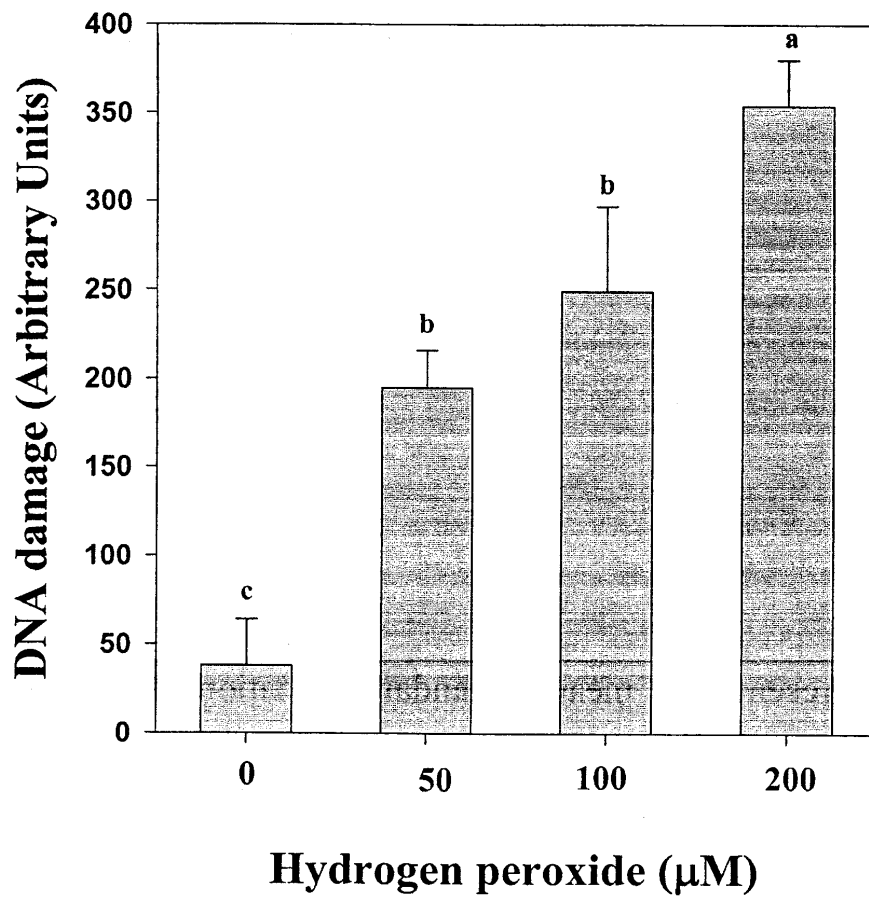


圖 五、不同濃度之 H_2O_2 在彗星試驗下對人類淋巴球細胞 DNA 傷害之影響

Figure 5. Effect of H_2O_2 on DNA damage in human lymphocytes with COMET assay. Results are mean \pm SD for $n=3$. Different letters denote significantly different ($p<0.05$) between each bar.

表 九、炒杜仲及杜仲葉水萃取物對淋巴球基因傷害之影響

Table 9. Effects of water extract from roasted cortex and leaves of Du-zhong on DNA damage in human lymphocytes with COMET assay

Sample	Concentration (mg/mL)	Arbitrary Units*
Control	0	40 ± 3 ^b
Roasted cortex	0.5	41 ± 10 ^b
	1.0	50 ± 13 ^b
	2.0	69 ± 15 ^a
Leaf	0.5	40 ± 5 ^b
	1.0	42 ± 9 ^b
	2.0	50 ± 6 ^b

*Results are presented as mean ± standard deviation of three experiments. Values in a column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

表 十、H₂O₂、炒杜仲及杜仲葉水萃取物對人類淋巴球細胞基因傷害之影響

Table 10. Effects of water extracts from leaf and roasted cortex of Du-zhong on H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes with COMET assay

Sample	Concentration	Arbitrary Units
Control		51 ±13 ^{c*}
H ₂ O ₂	50 μM	198 ±16 ^a
H ₂ O ₂ + roasted cortex	50 μM+0.5 mg/mL	190 ±20 ^{ab}
H ₂ O ₂ + roasted cortex	50 μM+1.0 mg/mL	185 ±18 ^{ab}
H ₂ O ₂ + roasted cortex	50 μM+2.0 mg/mL	168 ±14 ^{ab}
H ₂ O ₂ + leaf	50 μM+0.5 mg/mL	160 ±21 ^{bc}
H ₂ O ₂ + leaf	50 μM+1.0 mg/mL	134 ±15 ^{cd}
H ₂ O ₂ + leaf	50 μM+2.0 mg/mL	123 ±11 ^d

*Results are presented as mean ± standard deviation of three experiments. Values in a column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

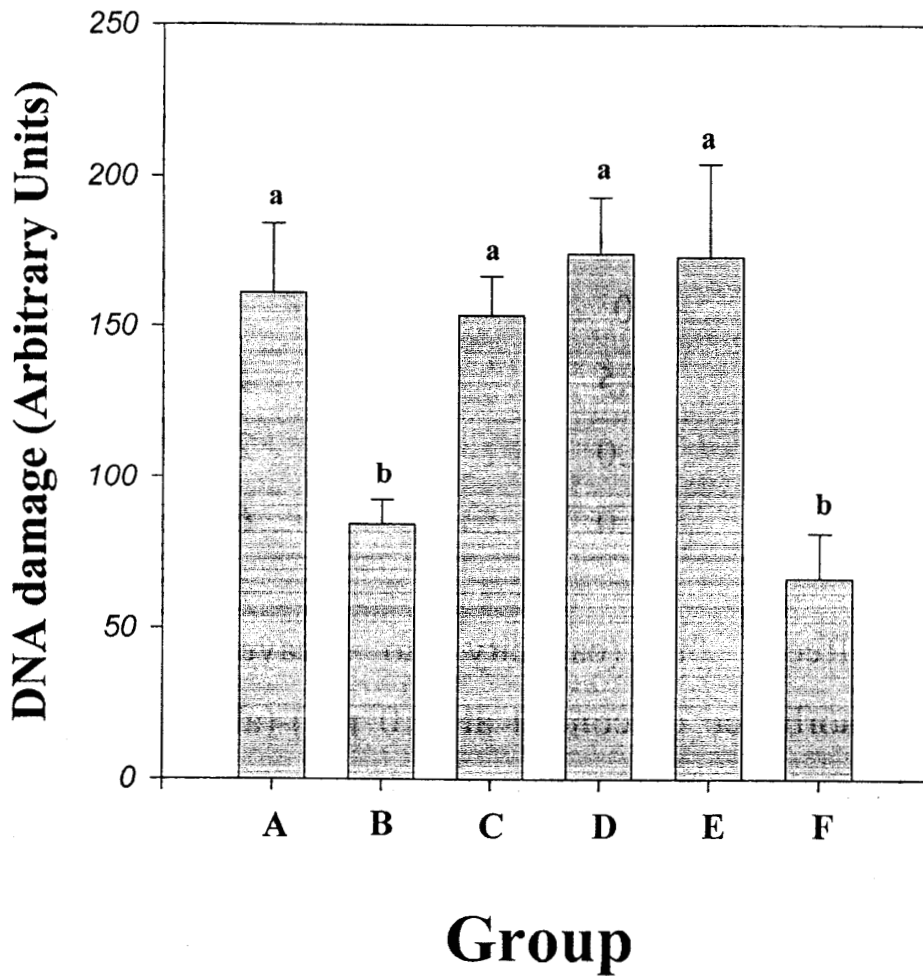
表十一、杜仲葉水萃取物抑制 H₂O₂ 誘導人類淋巴球細胞基因傷害之實驗程序

Table 11. Experimental procedures of water extract from Du-zhong leaves (WEDZL) inhibiting DNA damage induced by the H₂O₂ in human lymphocytes

Group	Reaction I*	Reaction II**	Aim
A	H ₂ O ₂ + cell	+WEDZL	Repair
B	WEDZL + H ₂ O ₂	+cell	Scavenging ability
C	WEDZL + cell	+H ₂ O ₂	Defense
D	H ₂ O ₂ + cell	+RPMI	Negative control
E	RPMI + cell	+H ₂ O ₂	Negative control
F	RPMI + cell	+RPMI	control

*Cells were spun down and then washed down two times with RPMI 1640 medium after reaction I for 30 min. After centrifuging (900 rpm, 5 min), reaction II was proceeded.

**For reaction II, the reaction time was 30 min.



圖六、杜仲葉水萃取物對 H_2O_2 所誘導人類淋巴球 DNA 傷害之影響

Figure 6. Effects of water extract of Du-zhong leaves (WEDZL) on H_2O_2 -induced DNA damage in human lymphocyte with COMET assay. Group (A) H_2O_2 reacted with cells first, then the WEDZL added. (B) H_2O_2 reacted with WEDZL first, then the cells added. (C) WEDZL reacted with cells first, then the H_2O_2 added. (D) H_2O_2 reacted with cells first, then the RPMI medium added. (E) RPMI medium reacted with cells first, then the H_2O_2 added. (G) RPMI medium reacted with cells first, then the RPMI medium added. Results are mean \pm SD for $n=3$. Different letters denote significantly different ($p<0.05$) between each bar.

表十二、杜仲葉水萃取物清除 H₂O₂ 之能力

Table 12. Scavenging effect of water extract of Du-zhong leaves (WEDZL) on hydrogen peroxide

Sample	Concentration (mg/mL)	Scavenging effects (%) [*]
Control	0	0 ^{d**}
WEDZL	0.5	15.08 ± 0.02 ^c
	1.0	26.72 ± 0.04 ^b
	2.0	69.75 ± 0.01 ^a

*Scavenging effects % (capacity to scavenging the hydrogen peroxide)=[(absorbance of control at 610 nm)-(absorbance of sample at 610 nm) / (absorbance of control at 610 nm)] × 100.

**Each value is the mean ± standard deviation of three replicate analyses. Values in a column with different superscripts are significantly different (p<0.05).