

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

PART I

洛神花色素成分及其抗氧化活性之分析

PART II

洛神花原兒茶酸對 tert-Butyl hydroperoxide 誘發大白鼠肝毒性之抑制作用

指導教授：曾翠華 教授 (Tsui-Hwa Tseng)

朱嘉一 教授 (Chia-Yih Chu)

研究生：王俊民 (Jiunn-Min Wang)

中華民國八十九年六月

誌謝

從專科畢業到就業一直未敢夢想有天會拿到碩士學位，但這一切確是真實的，首先感謝生化所 王朝鐘所長開辦教育學分班，讓我們有機會重拾課本並接受醫學新知薰陶受益良多。另外曾翠華教授對本論文之指導，使本論文能順利完成在此致上深深謝意，論文完成之初，承蒙口試委員王朝鐘教授、林仁混教授、陳甫州教授、朱嘉一教授等細心指正及提供寶貴建議，在此一併致上謝意。

本論文整個實驗過程中由衷感謝林偉隆醫師在病理切片上的幫忙，黃俊銘老師、育英學姐、祖方學弟、醫院同仁林昭儀小姐在實驗上指導與協助，這裡也祝福春蘭、琬琪、明安、連福、函儀能順利完成學業。

最後要感謝內人金定這三年來無怨無悔付出，使我能順利取得學位，謝謝妳。

目錄

PART I 洛神花色素成分及其抗氧化活性之分析

	頁數
中文摘要-----	3
英文摘要-----	4
前言-----	5
材料與方法-----	12
結果-----	24
討論-----	30
參考資料-----	33
附圖	
Figure 1 -----	8
Figure 2 -----	9
Figure 3 -----	36
Figure 4 -----	37
Figure 5 -----	38
Figure 6 -----	39
Figure 7 -----	40
Figure 8 -----	41
Figure 9 -----	42
Table 1 -----	43
Table 2 -----	44
Figure10 -----	45
Figure 11 -----	46
Figure 12 -----	47
Table 3 -----	48
Table 4 -----	49
Table 5 -----	50
Table 6 -----	51
Table 7 -----	52
Table 8 -----	53
Figure 13-1 -----	54
Figure 13-2 -----	55
Table 9 -----	56
Figure 14 -----	57
Figure 15 -----	58
Figure 16 -----	59
Table 10 -----	60

PART II 洛神花原兒茶酸對 tert-Butyl hydroperoxide 誘發大白鼠肝毒

性之抑制作用

	頁數
中文摘要-----	61
英文摘要-----	62
前言-----	63
材料與方法-----	65
結果-----	73
討論-----	75
參考資料-----	78
附圖	
Figure 1-----	81
Figure 2-----	82
Figure 3-----	83
Figure 4-----	84
Table 1-----	85
Table 2-----	86
Table 3-----	87
Table 4-----	88
Table 5-----	89
Figure 5-1-----	90
Figure 5-2-----	91

中文摘要

近年來科學家發現在一些高等植物中所含之多酚化合物，亦具有抗氧化作用，例如常用之飲料綠茶、烏龍茶、紅酒等都因含多酚化合物而有不錯的抗氧化活性，洛神花茶是區域性常用飲料，過去民間用於解熱、抗高血壓及治療肝病，萃取物中含有明顯色素為花青素類是多酚化合物可能具有抗氧化之機能。發炎或活性氧系堆積與肝毒性有密切關係，因此我們利用 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)誘發體外及體內肝毒性的模式來探討洛神花色素之抗氧化機能。首先製備洛神花色素粗萃取物，以灌流方式取得的大白鼠肝細胞來進行體外抗氧化測試及將大白鼠以胃管餵食洛神花色素粗萃取物進行體內抗氧化測試。結果發現洛神花色素粗萃取物在 0.05 mg/ml 濃度以上有意義的抑制 t-BHP 所誘發大白鼠肝細胞損傷(以 lactate dehydrogenase(LDH) , alanine transaminase(ALT) , aspartate aminotransferase(AST) , malondialdehyde(MDA)等為指標)，另外動物實驗亦發現連續餵食 5 天 100 mg/kg及 200 mg/kg 之洛神花色素粗萃取物可完全預防 t-BHP 所誘發大白鼠之急性肝損傷，因此洛神花色素粗萃取物可透過抗氧化活性而達保健之效。

中文關鍵詞: 洛神花茶，多酚化合物，抗氧化作用。

Abstract

Increasing evidence of free-radical generating agents and inflammatory process suggests accumulation of reactive oxygen species involving hepatotoxicity. In this study , we use tert-butylhydroperoxide(t-BHP) to induce hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo* to assess the antioxidative bioactivity of color extracts of dried Hibiscus sabdariffa flowers(HS-colors). The investigations showed that pretreated-HS-colors(0.05-0.10 mg/ml) significantly decreased the leakage of lactate dehydrogenase(LDH)、 alanine aminotransaminase(ALT)、 aspartate aminotransferase(AST) and the formation of malondialdehyde(MDA) induced by 30 min treatment with t-BHP in primary cultured rat hepatocytes. *In vivo* study(rats) , histopathological evaluation of rat liver showed that groups treated with HS-colors at concentration of 50 – 200 mg/kg for 5 day orally then with single dose of t-BHP(ip; 0.2 mmol/kg) reduced the incidence of liver lesion including inflammatory leukocytes infiltration and necrosis. Furthermore , groups pretreated HS-colors at concentration of 50 – 200 mg/kg for 5 day orally decreased the serum index (LDH、 ALT、 AST) of hepatic function and liver lipid peroxidation induced by t-BHP. In addition to scavenging free radical property , HS-colors might exert its protective effect through modulating intracellular detoxication enzyme such as catalase.

Key words: Hibiscus sabdariffa L. , Polyphenols , Antioxidant

前言

一、洛神葵之形態與產地：

1. 名稱：

洛神葵，學名：*Hibiscus sabdariffa* Linnaeus，為錦葵科 (Malvaceae)植物。洛神花為洛神葵之花於未成熟時除去子房之萼片(Fig.1)。

[別名]：Rozelle(英)、Jamaica Sorrel(英)、Red Sorrel(英)、Asam susur(馬來)、Kachieb priew(泰)(1)。

2. 形態：

原產於印度及馬來西亞，臺灣引種栽培之一年生灌木。莖多分歧，表面紅紫色並被稀疏灰色粗毛。葉互生，具長柄(長 4 ~ 6 cm)，呈掌狀 3 ~ 5 深裂之單葉，長 8 ~ 12cm，裂片線形或長披針形，細鋸齒緣，表裏均散生粗毛。花腋生，單立，花梗長可達 7 mm，小苞 8 ~ 12 枚，基部合生，長 10 mm，有毛，萼粗厚多肉質，五裂，外呈紅紫色，花淡黃，花心紫黑色，5 片，雄蕊多數，花絲合生，雌蕊自雄蕊筒抽出，均較花瓣遙短。蒴果為宿存之萼所包被，橢

圓形，長約 17 mm，徑約 15 mm，外被白色毛，具 5 室，各生種子 5 ~ 7 粒。

3. 產地：

今以臺東、花蓮等東海岸地區為主要產地，中南部亦有栽培出產。並以大量向日本輸出。

二、洛神花性狀：

本品通常表面呈紫紅色，並略散生粗毛。因子房及花梗均已除去，故形狀頗規則。全體紙質易撕裂，微具特有之臭氣及愉快之酸味。新鮮品富黏液質，味酸。加熱可搗成果漿狀。

三、洛神花已知成分：

含 Carboxylic acid : D(+)-Apfelic acid(Malic acid)

$C_4H_6O_5$ 、Citronenic acid $C_6H_8O_7$ 12.5 ~ 16.8 %、Protocatechuic acid $C_7H_6O_4$ 、Citric acid、Malonic acid、Hibiscusic acid。

Hibiscin (Anthocyan)及 Flavonoids: Gossypetin $C_{15}H_{10}O_8$ 、

Hibiscetin $C_{15}H_{10}O_9$ 、Hibiscitrin $C_{21}H_{20}O_{14}$ 。

四、 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)

t-BHP 可以藉由細胞色素 P-450(在肝細胞中)或是血色素(在紅血球中)代謝形成自由基，自由基會引發脂肪的過氧化反應，進而影響細胞的完整性並會與細胞中的分子形成共價鍵結造成細胞損傷(2)。其可能造成細胞毒性機制如 Fig 2。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(3-4)，進一步影響到鈣離子的平衡(5-6)，另外 t-BHP 於金屬離子存在下會還原成 t-BHP 自由基，而造成細胞膜脂質之過氧化(7-8)，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。

五、洛神花色素粗萃取物之抗氧化活性分析

流行病學調查中顯示多攝取蔬菜水果可以降低心血管疾病與癌症的發生(9-10)，一般認為主要是因這些食物中含有豐富的抗氧化營養素如維生素C、維生素E (alpha-tocopherol)、類胡蘿蔔素等。近年來科學家發現在一些高等植物中所含的多酚化合物如類黃酮衍生物(Flavonoids)(11-12)，亦具有抗氧化之作用，並透過其他機制可以具有抗癌或保護心臟的功能(13-14)。又常用之飲料如綠茶、烏龍茶、紅酒等都因其含多酚化合物在體內或體外測試系統都有不錯的抗氧化活性(15-20)，洛神花茶(*Hibiscus sabdariffa L.*)是區域性常用飲料，過去民間用於解熱、抗高血壓及治療肝病。近來，雖然洛神花茶的藥物療效仍無確切證據，但是也贏得地方性飲料市場的重要地位。洛神花中含有的色素多是花青素 (anthocyanins)，如 cyanidin-3-glucoside 和 delphinidin-3-glucoside(21-22)，且常用在食物製造。花青素廣泛存在於人類攝食的穀物、果實與蔬菜中。花青素也曾被報導在脂微粒系統(liposomal system)中有抗氧化能力(23)。然花青素之種類及其含量會隨區域及採收季節有所改變，本論文首先對台東產洛神花進行主成分及含量研究。

保健性飲料長久以來深受人們喜愛，近年來更有各種不同類型的飲用物出現，但其實際的作用機制與保健效果都缺乏動物模式的研究結果，為了解洛神花花青素在生物系統中的抗氧化作用，我們使用 t-BHP 誘發培養的鼠肝細胞與老鼠肝臟產生氧化傷害，以研究花青素的保護能力及預防肝毒

性之效果。

首先製備洛神花色素粗萃取物，再以灌流方式取得的鼠肝細胞進行體外抗氧化測試及將大白鼠餵食洛神花色素粗萃取物進行體內抗氧化測試。

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-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)、alanine transaminase(ALT) kit、lactate dehydrogenase(LDH) kit、phosphotungstic acid、rhodamine 123 以上皆購自美國 sigma 公司, Williams' medium E、PBS、fetal bovine serum、PSN antibiotic mixture、glutamine、HBSS(Hanks balanced salt solution)以上皆購自美國 GIBCO BRL 公司、Aquasol-2 閃爍液(New England Nuclear)、protein assay kit(Bio-Rad)、percoll、isopropanol(皓峰)、HCL、n-butanol(Merck)、培養皿為丹麥 Nunc 公司產品。

二、儀器

- UV and Visible Spectrophotometer(HITACHI ; U2000)
- Fluorescence Spectrophotometer(HITACHI ; F2000)
- Homogenizer(EYRLAMAZELA Z)
- Microcentrifuge(Sheton , VS 15)
- Beckman HPLC Gradient Pump System 126
- Beckman UV Detector 166
- Beckman Gold Data Analysis System
- 超導核磁共振儀(VARION, VXR-300Mhz 簡稱 NMR)
- 氣液層析儀附質譜儀(Gas Liquid Chromatography/Mass Spectrometer)
- 紅外線光譜儀(JASCO, J-0087 簡稱 IR)

三、洛神花色素粗萃取(HS-color)之製備

將乾燥洛神花 3 公斤(購自台東) 根據 Hideo 等之方法(24), 以酒精浸泡一週將色素溶出後乾燥, 以 15 倍量之酸化甲醇置於室溫一日後, 去上清液加 5 倍量之乙醚溶解放置 4⁰C 12 小時沉澱之, 收集之沉澱物即洛神花色素粗萃取物(HS-color)約 100g 做為以下活性分析之材料。

目前國人飲食習慣以水煮方式飲用, 但因實驗室需大量萃取所以利用 HPLC 方法評估兩者成分是否有差異。

高效能液相層析儀操作方法(25) :

- (1). 高效能液相層分離管柱(250 x 4.6 mm , 5 μ m Hypersil ODS)。
- (2). Mobile phase : 1.5% H₃PO₄、 20% HOAc、 25% MeCN in H₂O。
- (3). 操作方法 : 確認管路中並無氣泡產生, UV 燈光源設定為 530 nm , 幫浦流速設為每分鐘 500 μ l, 待整個系統平衡後, 打入濃度為 1mg/ml 的水煮洛神花茶樣品, 確定管柱的分離效果並無問題後, 隨後施打以酒精所萃取之洛神花茶樣品打入濃度為 1mg/ml, 並比較兩者之間之差異。

結果如 Fig 3 所示兩者成份並無差異。

四、主要色素之純化分離鑑定及抗氧化分析

(一). 主要色素之純化定量及鑑定

1. 材料：

(1) 薄層層析部分：

薄層層析片(TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ precasted 25 sheets 20 x 20 cm layer thickness 0.2mm, Art No: 554)(E Merck , German)

展開液：n-butanol：acetic acid：dist water = 4：1：5

(2) 管柱層析部分：

吸著劑：cellulose

沖提劑： n-butanol：acetic acid：dist water = 4：0.3：5

2. 實驗步驟：

(1) 將洛神花色素粗萃取物以水溶解，以 cellulose TLC 薄層層析法，n-butanol：acetic acid：dist water = 4：1：5 為展開液，看出現幾條 band，並記錄其 R_f 值。

(2) 將洛神花色素粗萃取物以水溶解，以 cellulose 管柱層析法，n-butanol: acetic acid: dist water = 4:0.3:5 為沖提劑, 收集最主要色素(26)。將分離所得主成分乾燥後以 NMR、Mass、IR 等儀器測定及抗氧化活性分析，並利用 HPLC(方法同上)做主要色素之定量。

(二). 抗氧化活性分析

自由基捕捉測定、肝細胞之初代培養、肝細胞毒性分析、脂質過氧化分析等，其操作步驟如以下所述。

五、初代肝細胞之培養

初代培養之肝細胞係根據 Bonney 氏等之方法(27)，以肝臟灌流方法取得 (two-stage liver perfusion method)。由購自台中榮民總醫院 Sprague-Dawley 品系大白鼠腹腔注射戊基巴比妥 (pentobarbital) (50 mg/ml)劑量每 100 公克體重為 0.2 ml，麻醉後，打開腹腔，以 20G 血管導管穿刺肝門靜脈，固定之後以加有 EDTA 不含鈣、鎂離子之 HBSS(Hanks' Balabced Salt solution) 緩衝液 100 ml 灌流，同時剪斷下腔靜脈放血，再以含膠原酵素 (collagenase) 之 HBSS 緩衝液灌流 100 ml 後，取下肝臟，分離肝細胞，以 1×10^6 cell/ml 之細胞密度培養於含 10 % 胎牛血清 (Calf bovine serum)、1 % PSN antibiotic mixture、1 % Glutamine 之 William's E 培養基中 (Gibco)，於 37 °C，5 % CO₂ 中培養。於最初四小時更換培養基，除去未貼壁之細胞，當作以下各種實驗之細胞材料。

六、MTT 法之細胞活性分析

細胞活性分析係根據 Alley 等之方法(28)，其原理為存活的肝細胞能

將 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide)(tetrazolium salt)經由粒線體中 dehydrogenase 作用代謝還原成 formazan crystal , 來測其細胞存活。實驗方法是在 12well 的培養皿中置入一定量肝細胞(5×10^4 cell / 2 ml medium) , 於 37 , 5 % CO₂ 中培養四小時 , 然後加入各種不同濃度之洛神花色素粗萃取物(HS-color : 0.02 mg/ml – 0.50 mg/ml) , 培養 24 小時後 , 除去 medium , 加入新 medium 與 200 ul MTT (5 mg/ml) , 培養貼壁四小時後 , 移去 medium 加入 isopropanol 2 ml , 將 formazan 溶解 , 於光波長 563nm 下測定 OD 值 , 由 control 與實驗組比較 , 觀察洛神花色素粗萃取物(HS-color)加入後的細胞存活率 , 以作為毒性劑量之選擇。

七、自由基捕捉劑之測定

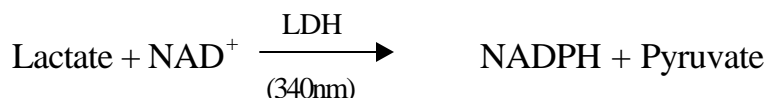
本實驗使用 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)自由基 , 因其在結構上可以產生穩定的共振 , 可在適當的狀態下長時間保存(29) , 且其在 571nm 的波長下有獨特的吸光值 , 當 DPPH 的濃度降低 , 其吸光值亦隨之降低。測定係將各種不同濃度之洛神花色素粗萃取物(HS-color 最終濃度為: 0.05 mg/ml – 0.50 mg/ml) 溶於 DMSO 中及以 DMSO 為控制組均取 100 ul 加入含 2.87 ml methanol 和 30 ul 10mM DPPH 的 reaction mixture , 於室溫中反應 30 min , 再加入 1 ml redistilled water 與 3 ml 的 toluene 充分混合 , 之

後以 3000rpm 離心 10 mins , 取上清液置 spectrophotometer 於 571nm 波長下測其吸光值。

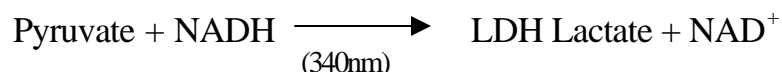
八、肝細胞毒性分析

以肝功能診斷酵素包括 LDH、ALT、AST 作為急性肝細胞毒性分析的指標(30) 。測定係將不同濃度 HS-color (最終濃度為: 0.05 mg/ml , 0.01 mg/ml , 0.20 mg/ml)先加入培養之肝細胞培養基中培養一小時 , 再加入 tert-butyl hydroperoxide (1.5 mM) 培養三十分鐘 , 以及單獨處理 t-BHP 做為控制組 , 之後收集培養基 , 分別取 1 ml 的培養基 , 以 Sigma Lactate dehydrogenase (LDH) kit、Aspartate aminotransferase (AST) kit 在波長 340nm 下測定 NADH 的生成或減少表示 LDH 及 ALT 的活性 , 其測定原理分別為:

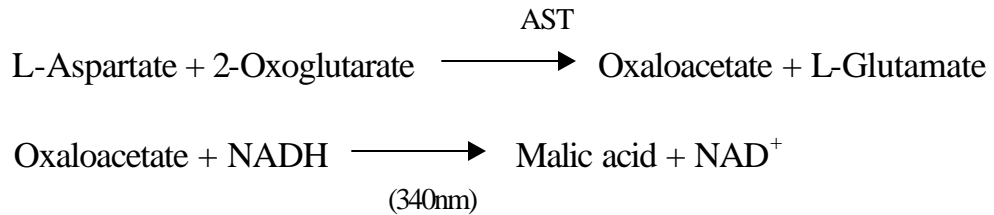
LDH 為



ALT 為



AST 為



九、MDA 生成濃度之分析

肝細胞中脂質過氧化係根據 Yagi 氏等修飾之螢光測定法(31)藉著 thiobarbituric acid(TBA), 來測定 malondialdehyde(MDA)的生成濃度。其測定原理為:

實驗方法是在肝細胞 1×10^6 cell 中, 加入不同濃度之 HS-color(最終濃度為: 0.05 mg/ml – 0.20 mg/ml)後在加入 tert-butyl hydroperoxide (1.5 mM), 繼續培養三十分鐘, 另以單獨處理 tert-butyl hydroperoxide 者作為控制組。除去 medium, 以 PBS wash 及 1ml 50mM phosphate buffer 收集細胞, 取 0.5ml 細胞懸浮液加入 3% SDS、0.1N HCL、10% phosphotungstic acid、0.7% 2-thiobarbituric acid 之後, 避光下加熱 100 30 min, 再加入 5 ml n-butanol 萃取, 最後以 3000rpm 離心 10 min 取上清液測定。採用 1,1,3,3-

$\lambda_{Em}=553nm$ 下測定螢光強度。取 0.1ml 細胞懸浮液用 protein assay kit(Bio-Rad) , 以 BSA 當 standard , 定量蛋白質含量。

十、動物實驗處理

(一).動物來源

Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠($230\pm 20g$)購自台中榮民總醫院 , 實驗前至少飼養於動物房三天 , 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。

(二).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洛神花色素粗萃取物 50 mg/kg 100 mg/kg, 200 mg/kg 連續 5 天 , 第五天再加以皮下注射 t-BHP 0.2mmol/kg , 斷食一夜(18 h)後採血測 LDH、AST、ALT; 將組織測定生化值如 catalase activity , GSH/GSSG , MDA(方法如上) , 並將組織做病理切片觀察病變之變化。

十一、肝中 GSH 和 GSSG 的定量及酵素活性之測定

(1). 組織液之製備

19

取 0.25g 肝組織 , 加入 1ml 10% metaphosphoric acid 及 3.75 ml 0.1M Na_2HPO_4 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

取 0.5ml 上清液，加入 4.5ml phosphate-EDTA 緩衝液(0.1M Na_2HPO_4 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(32)，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。

十二、 Glutathione-S-transferase activity assay(33)

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

狀態下，以 39000 rpm 離心 30 分鐘，取 20 ul 上清液加入 1.5 l 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：

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

2. GST 的活性表示為 nmole/min/mg

十三、Catalase activity assay (34)

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 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 H₂O₂，分別在 30 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，並以下列公式計算其活性的變化。

$$K = 0.153(\log A_1/A_2) / \text{min}$$

十四、GSH Peroxidase activity assay (35)

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 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 NaN₃、100ul 30mM GSH 及 6mM

NADPH，充分混合後，再加入 50ul 5IU GSH-reductase，於 37 水浴中反應 5 分鐘，接著立刻加入 100ul 30mM H₂O₂，於分光光度計 340nm

掃描 3 分鐘，測定其析光值之變化。

十五、 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，在有無洛神花色素成份下是否有差異。

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. 浸入氨水中(1000ml 的水滴入氨水 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。

11. 以顯微鏡觀察。

十六、 主要色素之抗氧化活性分析

以 DPPH、AST、ALT、LDH、MDA 等為指標。

十七、 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、主要色素之純化定量及鑑定

- (1) 在 TLC 看到兩個 band Rf 值分別為 0.29(紅紫色)、0.35(淡紅色)，收集 band 以酸化甲醇溶出，以分光光度計全波長掃描，得最大波長為 541.271 以及 528.281(Fig 4)，再根據文獻(21)判斷其分別為 delphinidin glycoside(紫紅色)及 cyanidin glycoside(淡紅色)。
- (2) 利用 cellulose column 進行色素之分離，主要有三個 peak(Fig 5)；peak 1 為黃色、peak 2 為淡紅色、peak 3 為紫紅色。peak 3 顏色較深且量較多，分離後進行 Mass、NMR、IR 來確認其結構及作抗氧化分析。以下為 peak 3 結構之光譜資料：

a. 紅外光譜 $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: (Fig 6)

3398.6	OH (broad)
1785.3	} C=O
1739.1	
1628.6	C=C
1402.6	Phenyl ring
1220.2	In plane CH bending of phenyl
865.7	β - sugar
716.7	Out of plane bending of aromatic C-H

b. 質譜 (m/z) : (Fig 7)

627 (M-H⁻) (C₂₇O₁₇H₃₂ = 627)

c. 核磁共振譜 (CDCl₃) : (Fig 8)

¹H-NMR : (ppm)

6 – 8 ppm (Aromatic proton)

5.142 (Anomeric-H)

4.911 (Anomeric-H)

¹³C-NMR : (ppm) (Fig 9)

174.1
173.9
172.0
171.9 — (Aromatic-O-C)
171.3
169.8
167.5

102
104 — (Aromatic-C)
92.231

98.065 — (Anomeric-C)
96.908

83 – 65 (Glc-C)

由上述之圖譜資料 (IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR)與參考資料 TLC 之 R_f 值及其顏色顯示及參考文獻(17), 結果發現其可能為 delphinidin-3-diglycoside, 再以此當 standard 利用 HPLC 技術分析水煮洛神花中之含量, 發現此色素在水煮洛神花中色素約占 61.82 %。

二、HS-color 對自由基捕捉能力之測定

利用 DPPH test 測定結果，顯示 HS-color 對自由基之捕捉作用，具有劑量依存性關係，如 Table 1 所示在實驗濃度 HS-colors 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.20 mg/ml, 0.50 mg/ml 下之捕捉能力分別為 26.3%、53.5%、92.4%、92.6%。

三、MTT 法之細胞活性分析

如 Table 2 所示，利用 MTT 法測定細胞活性時，在實驗濃度為 0.02 mg/ml – 0.20 mg/ml 時顯示對細胞沒有影響，因此本研究採用 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.20 mg/ml 三個濃度作為實驗之非毒性劑量。

四、HS-color 對於 tert-Butyl Hydro peroxide 誘發之肝細胞毒性的影響

如 Fig.10、11、12 所示，HS-colors 能顯著地抑制由 tert-butyl hydroperoxide 所誘導的肝細胞培養基中所滲漏的 LDH 值,ALT 和 AST 值升高的現象，當先經以 HS-colors 0.05mg/ml-0.20 mg/ml 前處理時分別有意義降低 LDH, ALT, AST($P < 0.05$)，並且呈現劑量依存性關係。

五、HS-color 對於 tert-Butyl Hydroperoxide 誘發之脂質過氧化的影響

以 MDA 生成濃度當作脂質過氧化的指標，如 Table 3 所示

，單獨以 1.5mM tert-butyl hydroperoxide 處理之控制組，其肝細胞中 MDA 濃度急速升高，但先經以 0.10 mg/ml, 0.20 mg/ml 之 HS-colors 前處理，結果與單獨處理 tert-butyl hydroperoxide 之控制組比較，MDA 分別降低了 33%($P<0.05$)和 38%($P<0.01$)。

六、HS-color 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 100mg/kg 及 200mg/kg 之 HS-colors 則有意義($P<0.01$ and $P<0.05$)抑制肝臟釋放 ALT, AST, LDH 至血清中。

七、HS-color 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 及 200mg/kg 之 HS-colors 則有意義抑制 MDA 的形成。

八、HS-color 對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠 GSH 含量之影響

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，肝臟組織中 GSH 的含量受到抑制，預先餵食 50 mg/kg，100 mg/kg 之 HS-colors 仍無法有意義改變之，但餵食 200mg/kg 之 HS-colors GSH 與 GSSG 的含量皆上升有統計學上意義。

九、HS-color 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 7 發現單一劑量 0.2mmol/kg t-BHP 腹腔注射大白鼠 18h 後，有無餵食 HS-colors 對 GST 及 GSH-Px 影響不大，但單獨給 t-BHP 則可降低 catalase activity，預先餵食 100mg/kg 及 200mg/kg 之 HS-colors 則有意義的恢復 catalase 活性。

十、HS-color 對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠肝臟損傷之病理變化

如 Table 10 所示單獨腹腔注射 t-BHP 組鼠肝明顯有多型核白血球浸潤、壞死、肝腫大等肝病變(Fig 13-1)，而預處理 HS-colors 50 mg/kg 組則有輕微多型核白血球浸潤及壞死等肝病變，預處理 HS-colors 100mg/kg(Fig 13-2)以上各組則不見多型核白血球浸潤及壞死等肝病變。

十一、delphinidin-3-diglycoside 對自由基捕捉能力之測定

利用 DPPH test 測定結果，顯示 delphinidin-3-diglycoside 對自由基之捕捉作用，具有劑量依存性關係，如 Table 11 所示在實驗濃度 delphinidin-3-diglycoside 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.20 mg/ml, 0.50 mg/ml 下之捕捉能力分別為 31.5%、66.5%、92.6%、96.6%。

十二、delphinidin-3-diglycoside 對於 tert-Butylhydroperoxide 誘發之肝細胞毒性的影響

如 Fig.14、15、16 所示，delphinidin-3-diglycoside 能顯著地抑制由 tert-butylhydroperoxide 所誘導的肝細胞培養基中所滲漏的 ALT 值、AST 和 LDH 值升高的現象，當先經以 delphinidin-3-diglycoside 0.05mg/ml-0.20 mg/ml 前處理時分別有意義降低 ALT, AST, LDH, 並且呈現劑量依存性關係。

十三、delphinidin-3-diglycoside 對於 tert-butylhydroperoxide 誘發之脂質過氧化的影響

以 MDA 生成濃度當作脂質過氧化的指標，如 Table 12 所示，單獨以 1.5mM tert-butylhydroperoxide 處理之控制組，其肝細胞中 MDA 濃度急速升高，但先經以 0.05mg/ml-0.20 mg/ml 之 delphinidin-3-diglycoside 前處理，結果與單獨處理 tert-butyl hydroperoxide 之控制組比較，MDA 有意義被抑制。

討 論

近年來有許多注意力都集中在生物系統中天然具有保護生化功能的抗氧化物質，與其作用機制。其中廣泛存在植物中的多酚化合物，扮演著食物中抗氧化劑的角色並可避免肝臟的氧化損傷(9-10)。

本研究以酒精萃取洛神花色素並乾燥之，目前國人飲食習慣以水煮方式飲用，但因實驗室需大量萃取所以利用 HPLC(25)評估兩者主要成分是否有差異，結果顯示酒精萃取和水煮洛神花色素成分無明顯差異。

由成分分析及其文獻判斷其主成分為 delphinidin-diglycoside (delphinidin-3-glucose-xylose)，在 TLC 中雖然只發現二個 band (一為紫紅色一為淡紅色)，但在 HPLC 中卻發現三個相靠近的 band 其中主要是 delphinidin-3-diglycoside，雖然依據文獻推測另二 band 分別為 delphinidin-3-glucoside 及 cyanidin-3-glucose-xylose 但有待進一步分離出標準品確認。本研究發現洛神花色素成分為花青素衍生物含多酚類結構，由 Table 1 所示：在體外的實驗 DPPH test 中發現乾燥洛神花色素具有消除自由基之作用，具有劑量依存性關係。

完整的細胞膜是維持細胞功能的重要因素，過氧化分解反應，細胞膜上的細胞會造成化學性誘發的毒性。在最近的研究顯示，t-BHP 證明可以加強培養細胞與動物系統的 lipid peroxidation(36)。所以在這實驗中我們利用 t-BHP 來產生肝細胞的傷害。鼠肝細胞實驗及動物實驗中由 ALT、AST、

LDH 等酵素作肝細胞毒性的基本指標，由 Table 4 所示:預處理乾燥洛神花色素(100、200 mg/kg)結果發現可以保護肝臟抑制 t-BHP 對肝細胞的毒性。接著再以 MDA 當作脂質過氧化的指標，由 Table 5 發現:以 t-BHP(0.2 mmol/kg)處理老鼠 18 小時後取肝細胞測 MDA 濃度和正常組比較，因肝臟發生脂質過氧化所以使 MDA 濃度增加，與實驗組比較在預處理乾燥洛神花色素(50、100、200 mg/kg) 發現可顯著抑制脂質過氧化($P<0.05$)，顯示乾燥洛神花色素可降低 t-BHP 所誘發肝脂質過氧化作用，可以保護肝細胞與鼠肝臟不被 t-BHP 氧化傷害。

Glutathione(GSH) 是重要分子可以保護細胞對抗化學性的細胞毒性物質，GSH 減少是因為與過氧化氫或是與自由基作用而減少。GSH 與肝臟損傷的關係已被證明，GSH 在肝細胞中的濃度會受到毒物處理的影響。t-BHP 有二種不同的代謝路徑，一是經由細胞色素 P450；另一是經由 GSH-peroxidase 轉換 t-BHP 成為 t-butanol 與氧化 GSH(2,30)。因為 t-BHP 在細胞內代謝會消耗大量的 GSH，故可以經由 GSH 的定量來探討乾燥洛神花色素抑制過氧化物(peroxide)之路徑，由 Table 6 所示: t-BHP 會抑制還原態 GSH 量，但若以高濃度乾燥洛神花色素(200 mg/kg)前處理，則有效抑制此現象。另外，t-BHP 導致 GSH 減少並無伴隨 GSSG 增加，顯示 t-BHP 是直接和 GSH 作用；而由 Table 7、8 結果得知 t-BHP 可代償性輕微提高 GST 和 GSH peroxidase 的活性，而預處理乾燥洛神花色素並無明顯改變

GST 和 GSH peroxidase 的活性，由以上實驗結果顯示乾燥洛神花色素對 GSH 的含量及肝臟解毒酵素 GST 及 GSH-Px 的活性影響並不明顯，然由 Table 9 結果所示：預處理乾燥洛神花色素(100、200 mg/kg) 可輕微提高 catalase 的活性，顯示與 catalase 的活化有關。因此初步認為乾燥洛神花色素可能不是經由一些酵素解毒系統來達到減少肝細胞受到氧化傷害，而是藉由直接在細胞外/內捕捉自由基或過氧化物來降低細胞膜的脂質過氧化，至於是否影響其他解毒酵素有待進一步研究。

由病理切片觀察到以腹腔注射 t-BHP (0.2mmol/kg) 18 小時後，肝組織明顯有白血球侵潤及壞死等肝病變等現象，而以乾燥洛神花色素 100 mg/kg 以上預處理後則不見白血球侵潤及壞死等肝病變等現象。

此研究結果證明乾燥洛神花色素具有抗 t-BHP 誘發的肝毒性效果，其中 delphinidin-3-diglycoside 可能佔有重要角色，因由 Table 11,12 結果顯示；delphinidin-3-diglycoside 具有保護肝細胞避免氧化性傷害，而其抗肝毒性效果主要是經由降低自由基與減少 MDA 形成，但詳細機制仍需研究。因為很難計算每天飲用含有洛神花色素的飲料血漿中可能的花青素濃度。因洛神花色素洛神花茶中含量高達 61.82 % 所以預估一般飲用可達到此實驗中具有抗氧化功能的最低濃度(50 mg/kg)。因此，建議每天飲用洛神花可能可以有效降低生物系統中的氧化性傷害。

參考資料

1. 賴榮祥(1976)原色生藥學 327-329。
2. Rush GF, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski P, and Hewitt W R. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1985; 78: 473- 483.
3. Sies H, and Gerstenecker C. Oxidation in the NADPH system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidative oxidation of glutathione by hydroperoxides. *FEBS Lett.* 1972; 27:171-175.
4. 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. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375-381.
5. 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.
6. Bellomo G, Thor H, and Orrenius. Increase in cytosolic Ca^{2+} concentration during t-butylhydroperoxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca^{2+} stores. *FEBS Lett* 1984; 168:38-42.
7. Thornalley P, Trotta RJ, and Stern A. Free radical involvement in the oxidative phenomena induced by tert-butylhydroperoxide in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 1983; 759: 16-22.
8. Hogberg J, Orrenius S, and O'Brine P. Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem* 1975; 59: 449-455.
9. Block G. A role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr Rev* 1992; 50: 207-213.
10. Hertog MGL, Feskens EJM. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011.
11. Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Finnegan T, Louyr, Mitchell JM, Laskin JD, Newmark H, Yang CS, Conney AH. Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis* 1992; 13: 947-954.
12. Renaud S, Delorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339: 1523-1536.

13. Huang MT, HO CT, and Lee CY. Phenolic compounds in food: an overview. In Phenolic compounds in Food and Health II: Antioxidants and Cancer prevention. American Chemical Society Symposium Series 1992;507: 2-7.
14. Huang MT, HO CT, and Lee CY. Phenolic compounds in food: an overview. In Phenolic compounds in Food and Health II: Antioxidants and Cancer prevention. American Chemical Society Symposium Series 1992; 507: 8-34.
15. Salah N, Millerm NJ, Paganga G, Tijurtm L, Tijurg L, Bolwell GP, Tice-Evans, C. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Arch Biochem Biophys 1995; 322: 339-346.
16. Namiki, M. Antioxidants/Antimutagens in Foods. Crit Rev Food Sci Nutr 1990; 29:273.
17. Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella J. Natural antioxidants in grapes and wines. J Agric Food Chem 1994; 42: 64-69.
18. Wang ZY, Hyang MT, Ho CL. Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. Cancer Res 1992; 52: 6657- 6665.
19. Yamane T, Hagiwara N, Tateishi M, Akachi S, Kim M, Okuzumi J, Kitao Y, Inagake M, Kuwata K, Takahashi T. Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenol fraction. Jpn. J. Cancer Res 1991; 82: 1336-1339.
20. Vinson J, Hontz B. Comparison of the antioxidant effectiveness of red and white wines. J Agric Food Chem 1995; 43: 401-403.
21. DU CT, and Francis FJ. Anthocynins of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.).Journal of Food Science 1973; 38: 310-312.
22. Nakamura Y, Hidaka M, Masaki H, and Uozumi T. Major anthocyanin of the flowers of Hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). Agriculture Biological Chemistry 1990; 54: 3345-3346.
23. Tsuda T, Ohshima K, Kawakish S, and Osawa T. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. J Agric Food Chem 1994; 42: 248-251.
24. Hideo Y, Hirotaka U, Yasuko S. Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical .Arch Biochem Biophys 1996; 332:183-186.
25. Terahara N, Callebaut A, Ohba R, Nagata T, Ohnishi K, Suzuki M. Triacylated anthocyanins from *Ajuga reptans* and cell cultures. Phytochemistry 1996; 42(1): 199-203.

26. Tsai TC, Chen SH. The Structure Identification of Two Major Anthocyanins in WU-No-Tao. *Food Science* 1996; 23(3): 444- 452.
27. Butterworht BE. A protocol and guide for the in vitro rat hepatocyte DNA repair assay. *Mutation Res* 1987; 122: 113-121.
28. Alley MC. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988; 48: 589-592.
29. Ursim F, Maiorino M, Morazzonip, Rover A, Oufferu G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology & Medicine* 1994; 10: 547-553.
30. 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.
31. Yagi K. Lipid peroxidation and human disease. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 337-351.
32. Cheng TJ. Protective action of seed oil *Hippophae rhamnoides* L. against experimental liver injury in mice. *Chinese J. Pre. Med.* 1992; 26: 513-552.
33. William HH , Michael J P, and William B J. Glutathion Stransferas. *The Journal of Biological Chemistry* 1974; 249(22): 7130-7139.
34. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 103: 121.
35. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
36. Tseng TH, Wang CJ, Kao ES, Chu CY. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidation damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemico-Biological Int* 1996; 101: 137-148.

Table 1. Effect of the color extracts of *Hibiscus Sabdariffa* dried flowers on DPPH bleaching

Concentration (mg/ml)	% of DPPH bleaching ^a
0.05	26±0.1 ⁺
0.10	53±0.2
0.20	92±0.1
0.50	92±0.1

a. % of DPPH bleaching = (absorbance of control group – absorbance of the color extract added group)/absorbance of control group x 100%.

+. Each data is calculated from three independent experiments.

Table 2. Cytotoxicity of color extract of *Hibiscus Sabdariffa* dried flowers analyzed by MTT assay

Treatment ^a	OD ^b	% of control absorbance
Control	0.801±0.081	100
0.02 mg/ml	0.871±0.080	109
0.05 mg/ml	0.957±0.151	119
0.10 mg/ml	1.002±0.060	125
0.20 mg/ml	0.834±0.070	104
0.50 mg/ml	0.783±0.121	92

a. Hepatocyte culture was treated with various concentration of the color extracts of dried flower of *Hibiscus sabdariffa* L. for 24h.

b. Mean ± SD, n=3.

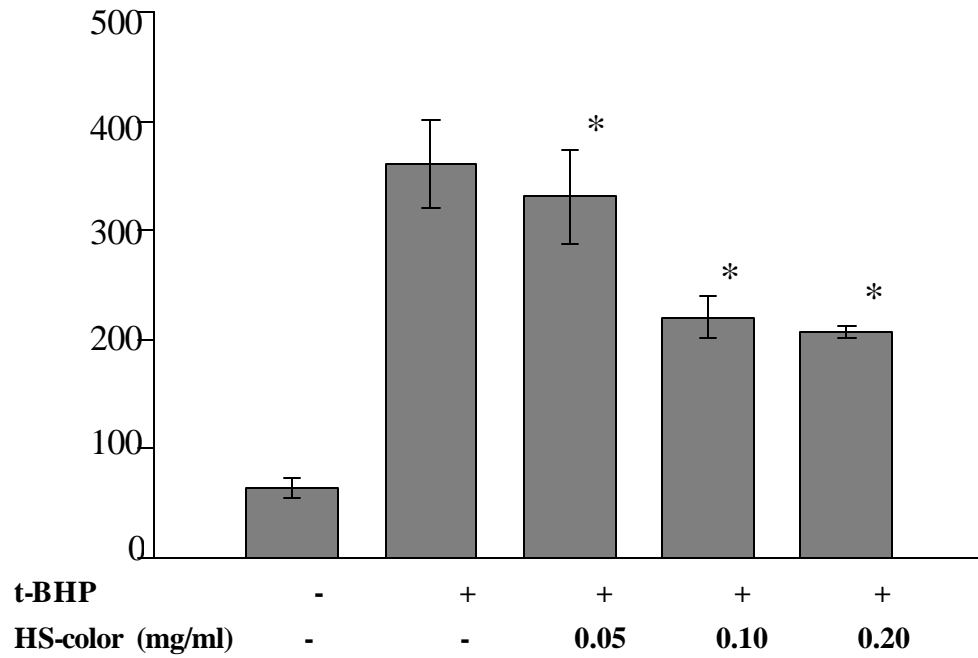


Fig 10. Effect of HS-colors on the leakage of LDH treated with tert-butyl hydroperoxide(t-BHP) in the primary rat hepatocytes.*P < 0.05,compared with t-BHP alone group. Mean±SD(n=3) ,t-test.

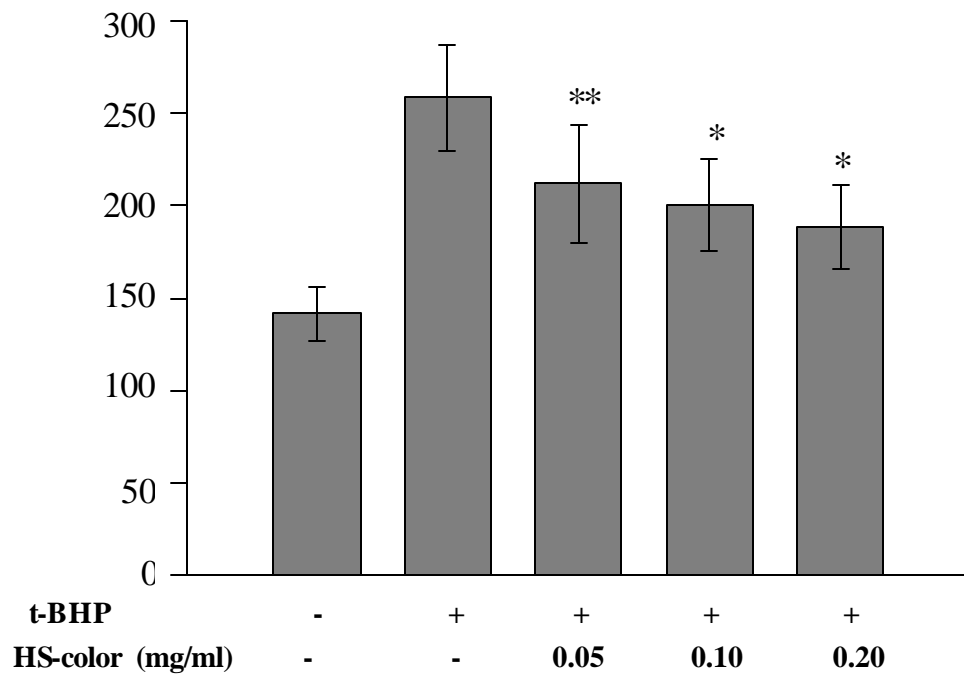


Fig 11. Effect of HS-colors on the leakage of ALT treated with tert-butyl hydroperoxide(t-BHP) in the primary rat hepatocytes. *P < 0.05, **P <0.01 compared with t-BHP alone group. Mean \pm SD(n=3) ,t-test.

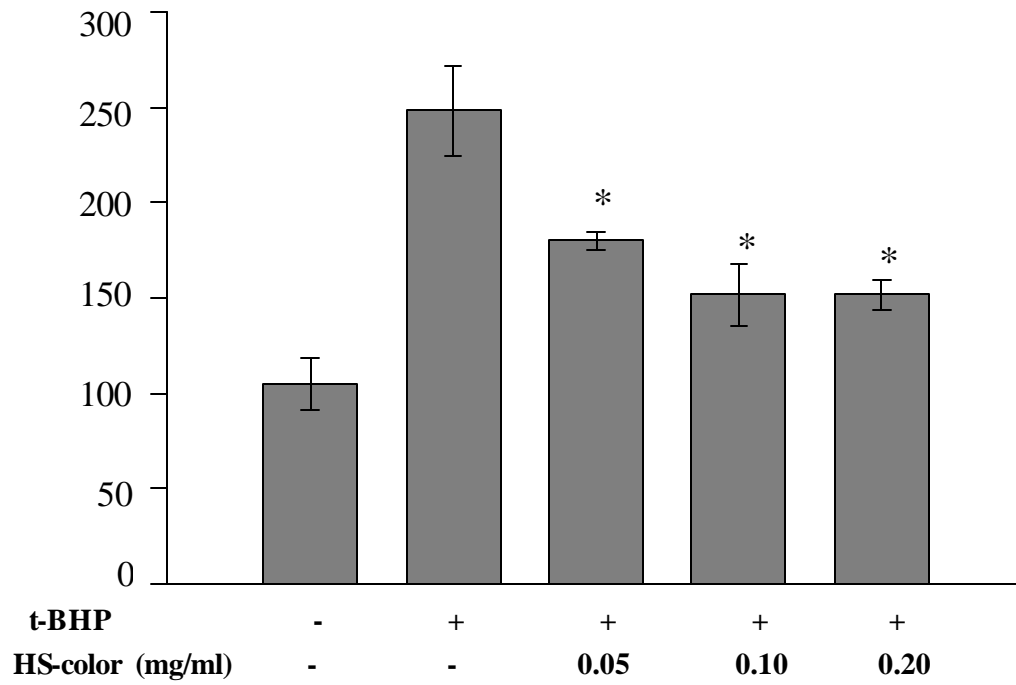


Fig 12. Effect of HS-colors on the leakage of AST treated with tert-butyl hydroperoxide(t-BHP) in the primary rat hepatocytes. *P < 0.05, compared with t-BHP alone group. Mean±SD(n=3) ,t-test.

Table 3. Effect of color extract of *Hibiscus sabdariffa* dried flowers on t-BHP induced lipid peroxidation in rat primary hepatocytes

Treatment ^a	nmol/mg protein
Normal	0.187±0.01
t-BHP(1.5 mM)	1.256±0.09
HS + t-BHP :	
0.05 mg/ml	1.040±0.29
0.10 mg/ml	0.830±0.07*
0.20 mg/ml	0.782±0.05**

a. Primary hepatocytes were pretreated respectively with various concentrations of HS-colors , then t-BHP was added for 30 min.

*P<0.05 , **P<0.01, compared with t-BHP treated alone (n=3).

Table 4. Effect of color extract of *Hibiscus sabdariffa* dried flowers on the elevation of serum enzymes induced by t-BHP in rats

Treatment	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
Normal	56±7	98±21
t-BHP(0.2 mmol/kg)	140±62 ⁺	413±93 ⁺
<i>HS</i> + t-BHP [®] :		
50 mg/kg	112±18	322±105
100 mg/kg	94±12*	271±77*
200 mg/kg	79±19**	245±32**

[®]. In these experiments, the animal were pretreated with *Hibiscus sabdariffa* by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h after the administration of t-BHP.

⁺. P<0.01 , compared with control , *.P<0.05 , **P<0.01 , compared with t-BHP treat alone (n=6).

Table 5. Effect of color extract of *Hibiscus sabdariffa* dried flowers on t-BHP induced lipid peroxidation in rats

Treatment	MDA (nmol/g liver)
Normal	101±14
t-BHP(0.2 mmol/kg)	198±42 ⁺
<i>HS</i> + t-BHP [@] :	
50 mg/kg	127±16*
100 mg/kg	134±28*
200 mg/kg	118±13*

[@]. In these experiments, the animals were pretreated with *Hibiscus sabdariffa* by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h after the administration of t-BHP.

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

Table 6. Effect of color extract of *Hibiscus sabdariffa* dried flowers on t-BHP induced GSH and GSSG in rats

Treatment	GSH (ug/g liver)	GSSG (ug/g liver)
Normal	1866±80	1241.7±114.0
t-BHP(0.2 mmol/kg)	1492±42 [#]	837.2±160.7 [#]
<i>HS</i> + t-BHP [@] :		
50 mg/kg	1521±154	879.2±134.0
100 mg/kg	1769±253	948.6±78.3
200 mg/kg	1862±240*	1167.7±144.1*

[@]. In these experiments, the animal were pretreated with *Hibiscus sabdariffa* by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h after the administration of t-BHP.

*. P < 0.05 , compared with t-BHP treat alone (n=6).

#. P<0.05 , compared with control.

Table 7. Effect of color extract of *Hibiscus sabdariffa* dried flowers on hepatic activity of GST , GSH-Px and Catalase induced by t-BHP in rats

Treatment ^a	GST (nmol/min/mg protein)	GSH-Px (nmol/min/mg protein)	Catalase (k/min/mg protein)
Normal	103±12	30±5	0.17±0.02
t-BHP(0.2 mmol/kg)	105±6	36±2	0.11±0.01 [#]
<i>HS + t-BHP[@] :</i>			
50 mg/kg	108±18	32±5	0.10±0.01
100 mg/kg	112±17	34±4	0.14±0.03*
200 mg/kg	116±16	39±5	0.14±0.02*

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

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

Table 8. Effect of color extract of *Hibiscus sabdariffa* dried flowers on the elevation of hepatic lesion induced by t-BHP in rats

Treatment	necrosis	neutrophile infiltration
Normal	0/6	0/6
t-BHP(0.2 mmol/kg)	6/6	6/6
<i>HS</i> + t-BHP [@] :		
50 mg/kg	1/6	1/6
100 mg/kg	0/6	0/6
200 mg/kg	0/6	0/6

[@]. In these experiments, the animal were pretreated with *Hibiscus sabdariffa* by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h after the administration of t-BHP.

A

B

Fig 13-1. Histopathological evaluation of rats livers after treatment with dist H₂O and t-BHP alone. (A) are sections of livers of normal group. (B) is a section of liver from t-BHP treated rat; note the cellular infiltration of inflammatory leukocytes(thick arrow) and cellular necrosis(thin arrow) and diffuse cellular degenerative changes with cloudy swelling(arrow) (H & E x 200).

C

D

Fig 13-2. Histopathological evaluation of rats livers after treatment with Hibiscus sabdariffa 50 mg/kg 100 mg/kg. (C) is section of a liver from an t-BHP + H.S 50 mg/kg treated rat. showed that moderately neutrophil infiltration(thick arrow) . (D) is section of a liver from an t-BHP + H.S 100 mg/kg treated rat same as Fig 13-1(A).

Table 11. Effect of the color extracts of delphinidin-3-diglycoside on DPPH bleaching

Concentration (mg/ml)	% of DPPH bleaching ^a
0.05	31±0.2 ⁺
0.10	66±0.1
0.20	92±0.2
0.50	96±0.2

a. % of DPPH bleaching = (absorbance of control group – absorbance of the color extract added group)/absorbance of control group x 100%.

+ . Each data is calculated from three independent experiments.

Table 12. Effect of color extract of delphinidin-3-diglycoside on t-BHP induced lipid peroxidation in rat primary hepatocytes

Treatment ^a	nmol/mg protein
Normal	0.225±0.01
t-BHP(1.5 mM)	2.467±0.2 [#]
dp-3- diglu + t-BHP :	
0.05 mg/ml	2.060±0.07*
0.10 mg/ml	1.803±0.03*
0.20 mg/ml	1.510±0.01**

a. Primary hepatocytes were pretreated respectively with various concentrations of delphinidin-3-diglycoside , then t-BHP was added for 30 min.

#. P<0.01 , compared with control , *P<0.05 , **P<0.01, compared with t-BHP treated alone (n=3).

each data is calculated from three independent experiments.

中文摘要

原兒茶酸(protocatechuic acid : PCA) 廣佈於蔬菜、水果、花和胡桃中，是一結構簡單之多酚類化合物，而本研究室從臺灣普受歡迎的洛神花茶中亦分離出此化合物，並於体外活性分析中發現：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。本實驗乃進行體內試驗，先以 t-BHP 誘發體內氧化性肝損傷，發現老鼠腹腔注射 0.2mmol/kg 之 t-BHP 18h 後，可誘發血清中 lactate dehydrogenase(LDH) ,alanine transaminase(ALT) , aspartate aminotransferase(AST) 生化值升高，肝組織發生脂質過氧化和半胱氨酸量的減少及肝組織之病變，如：發炎、壞死等病理變化。而預先灌食 5 天原兒茶酸(50 mg/kg 100 mg/kg)則能有效抑制 t-BHP 所誘發之肝毒性，不見白血球侵潤及壞死等肝病變現象。

Protocatechuic acid , a simple phenolic compound , is isolated from Hibiscus sabdariffa L. which is a traditional herb and beverage material in local region(Taiwan). In our previous study , protocatechuic acid(PCA) possesses antioxidant property and anticarcinogenic potentials.

In this experiment , we found that t-BHP(0.2mmol/kg i.p. for 18h) significantly increase the serum hepatic enzyme markers(ALT and AST) , increase lipid peroxidation decrease GSH and damage hepatocyte ex; cellular infiltration of inflammatory leukocytes , and cellular necrosis. If we pretreated PCA(50 mg/kg、 100 mg/kg) for 5 days before t-BHP treatment , it inhibits t-BHP-induced hepatotoxicity significantly .

原兒茶酸(protocatechuic acid : PCA) 廣佈於蔬菜、水果和胡桃中，為一結構簡單的多酚類化合物，是從 *Hibiscus sabdariffa L.* 中所分離出來的，在中醫上用來解熱及治療高血壓、肝疾病。雖然對其藥理及生化效應並不清楚，但已有報告指出原兒茶酸具有很強的抗氧化能力(1)，而且本研究室過去在洛神花成分及活性分析中亦發現之，並證實其具有清除自由基的能力，對於 t-BHP 引起之鼠肝細胞毒性具有保護作用(2)。

先前已有人證明存在於水果蔬菜與核果中的 PCA 可有效降低 diethylnitrosamine 對肝臟(3)、4-nitroquinoline 1-oxide 對口腔(4)、azoxymethane 對直腸(5)、N-methyl-N-nitrosourea 對胃部腺體組織(6)與 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 對膀胱(7)造成的致癌效應。但是 PCA 抑制化學致癌物質的機制仍是未知。

Oxidative stress 被認為與許多疾病有關連性，如心血管疾病、老化與癌症(8-10)。探求這些疾病的最主要機制，可能與氧化物存在造成 lipid hydroperoxides。這些過氧化物會分解成為 alkoxy-(RO.) 與 peroxy-(ROO.) 自由基，會氧化其他的細胞物質，並造成酵素活性或是產生媒介物(如 MDA 與反應性氧化物)造成細胞破壞(11)。t-BHP 的產物與短鏈脂肪過氧化物類似，都是經由細胞色素 P-450 代謝，與造成氧化壓力的產物類似(12)。

肝細胞代謝 t-BHP 經由兩種不同的路徑。一種是包括細胞色素 P-450，

會引導形成具毒性的 peroxy($\text{ROO}\cdot$)與 alkoxy($\text{RO}\cdot$)自由基。第二種路徑包括 glutathione peroxidase, 會升高 t-butanol 與 oxidized glutathione(13)。在細胞色素 P-450 代謝時產生的自由基會攻擊蛋白質、磷脂質與核酸。Glutathione peroxidase 活性會引導 glutathione 的氧化與減少 NADP。

為了解原兒茶酸之體內抗氧化作用, 我們使用 t-butylhydroperoxide (t-BHP) 誘發老鼠肝臟產生氧化傷害, 以研究其保護能力。

首先製備原兒茶酸, 並分析洛神花茶中原兒茶酸含量, 然後連續餵食 5 天劑量分別為 50 mg/kg 及 100 mg/kg 觀察其對 tert-butylhydroperoxide (t-BHP) 所誘發大白鼠急性肝損傷之影響。

一、 化學試劑

TBA(thiobarbituric acid) 、 t-BHP(tert-butyl hydroperoxide) 、 EDTA、 alanine transaminase(ALT) kit 、 lactate dehydrogenase(LDH) kit 、 phosphotungstic acid、 以上皆購自美國 sigma 公司 , PBS、 PSN antibiotic mixture、 glutamine 以上皆購自美國 GIBCO BRL 公司、 Aquasol-2 閃爍液 (New England Nuclear) 、 protein assay kit(Bio-Rad) 、 isopropanol(皓峰) 、 HCL、 n-butanol(MERCK)。

二、 儀器

- UV and Visible Spectrophotometer(HITACHI ; U2000)
- Fluorescence Spectrophotometer(HITACHI ; F2000)
- Homogenizer(EYRLAMAZELA Z)
- Microcentrifuge(Sheton , VS 15)
- Beckman HPLC Gradient Pump System 126
- Beckman UV Detector 166
- Beckman Gold Data Analysis System

三、洛神花茶中 PCA 定量分析

(1) 洛神花茶原兒茶酸標準品之製備(2)

本實驗室前期學長利用此方法將原兒茶酸分離出來，謹將此法及結果敘述於後；將洛神花茶減壓濃縮後以乙酸乙酯萃取乾燥之，得 HS-E，以 Choloform:methanol 當溶劑通 silica gel column 做梯度分析，然後以 silica gel TLC 與原兒茶酸標準品比較 Rf 值後收集，將之乾燥後冷藏備用，並以 Mass, NMR 等儀器測定確認其結構。(Fig.1)(Fig.2)(Fig.3)

(2) 高效能液相層析儀操作方法(14)：

- (a) 高效能液相層分離管柱(250 X 4.6 mm 5 μ m Hypersil ODS)。
- (b) Mobile phase：1.5% H₃PO₄、20% HOAc、25% MeCN in H₂O。
- (c) 操作方法：確認管路中並無氣泡產生，UV 燈光源設定為 254 nm，幫浦流速設為每分鐘 500 μ l，待整個系統穩定後，打入濃度為 1mg/ml 的 PCA 標準品，確定管柱的分離效果及標準品濃度並無問題後，隨後打入濃度為 1mg/ml 的洛神花茶水煮之乾燥物(以 100g 洛神花茶 + 水 1000cc 製備)，並予以積分計算檢體中 PCA 的含量。

四、實驗方法

(一). 動物來源

Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠(230±20g)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。

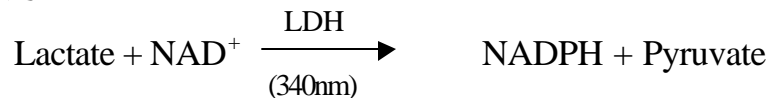
(二). 動物分組及藥物處理

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 PCA 50 mg/kg 100 mg/kg 連續 5 天，第五天再加以皮下注射 t-BHP 0.2mmol/kg，斷食一夜(18 h)後採血測 LDH、AST、ALT；將組織測定生化值如 catalase activity，GSH/GSSG，MDA(方法如上)，並將組織做病理切片觀察病變之變化。

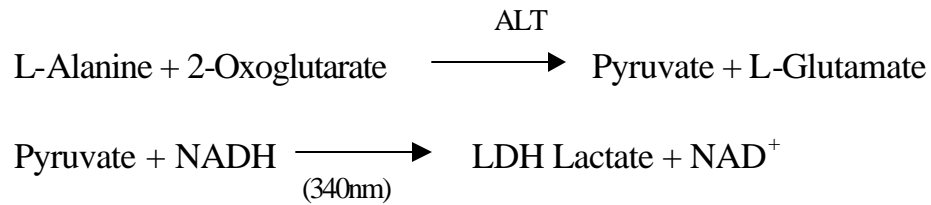
五、血清中肝酵素毒性分析

以肝功能診斷酵素包括 LDH、ALT 或 AST，作為肝毒性分析的指標(15)。以 Sigma Lactate dehydrogenase (LDH) kit、Alanine transaminase (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：

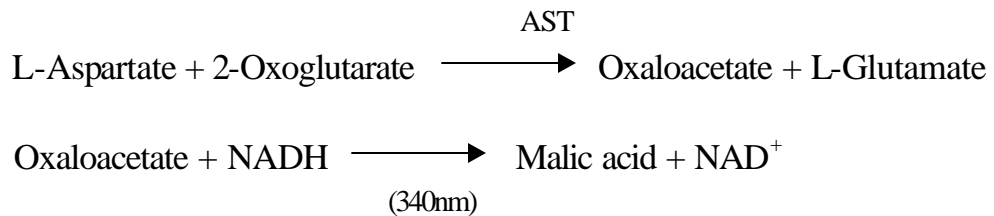
LDH 為



ALT 為



AST 為



六、MDA 生成濃度之分析

肝細胞中脂質過氧化係根據 Yagi 氏等修飾之螢光測定法(16)藉著 thiobarbituric acid(TBA) , 來測定 malondialdehyde(MDA)的生成濃度。其測定原理為:

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 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。

七、 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

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 (17) ，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。

八、 **Glutathione-S-transferase activity assay(18)**

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 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：

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

2. GST 的活性表示為 nmole/min/mg

九、 **Catalase activity assay (19)**

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 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 H₂O₂，分別在 30 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，並以下列公式計算其活性的變化。

$$K = 0.153(\log A_1/A_2) / \text{min}$$

十、 GSH Peroxidase activity assay (20)

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 stirer 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。

十一、 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. 浸入氨水中(1000ml 的水滴入氨水 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。

十二、 分析統計

動物實驗每組至少 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、水煮洛神花茶中 PCA 的含量

隨製備方法之不同例如水煮時間都有可能影響 PCA 含量，經積分計算結果水煮洛神花茶中 PCA 的含量為 0.2 – 2%。

二、PCA 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 1)，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 PCA 則有意義($P < 0.01$ and $P < 0.05$)抑制肝臟釋放 ALT，AST，LDH 至血清中。

三、PCA 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 2 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 PCA 則有意義抑制 MDA 的形成。

四、PCA 對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠 GSH 氧化酶

素含量之影響

由 Table 3 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, 100 mg/kg 之 PCA 可提高 GSH 與 GSSG 的含量具統計學意義。

五、PCA 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 4 發現單一劑量 0.2mmol/kg t-BHP 腹腔注射大白 18h 後, 有無餵食 PCA 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 PCA 則有意義的恢復 catalase 活性, 預先餵食 50 mg/kg, 100mg/kg 之 PCA 可明顯改變解毒酵素 GST 的活性且有統計學意義。

六、PCA 對於 tert-Butyl Hydroperoxide(t-BHP)誘發大白鼠肝臟

損傷之病理變化

如 Table 5 所示單獨腹腔注射 t-BHP 組鼠肝明顯有多型核白血球浸潤、壞死、肝腫大等肝病變(Fig 5-1), 而預處理 PCA 50 mg/kg, 100mg/kg 則不見多型核白血球浸潤及壞死等肝病(Fig 5-2)。

食療法與一些疾病，特別是與癌症有關，對人體健康扮演一重要的角色(21,22)。又流行病學調查報告顯示經常攝取新鮮蔬菜水果可以降低癌症的發生率(23)，因此食物成分之保健機制研究是有趣的課題。

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(24)。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)(25)。Hibiscus PCA 純化自中國傳統草藥中的地區飲料洛神花的乾燥花朵，在此次研究中以 HPLC 方法得知洛神花含 PCA 的量約 0.2 – 2%。之前本研究室第一份報告證明 PCA 在完整的細胞系統中的抗氧化特性。

本實驗採用 tert-butylhydroperoxide (t-BHP)來誘發肝細胞傷害，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(26,27)，進一步影響到鈣離子之平衡(28,29)，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(30,31)。本實驗擬以 t-BHP 來產生肝細胞的傷害，評估 Hibiscus PCA 是否具有抗肝毒性活性。在實驗中我們利用 ALT、AST 作為肝細胞毒性之基本指標，由 Table 1 所示：預處理 Hibiscus PCA(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 2 實驗結果發現 Hibiscus PCA 可以抑制 t-BHP 對細胞脂質過氧化。

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 Hibiscus PCA 抑制過氧化物之路徑，由 Table 3 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($P < 0.05$)，由結果顯示 Hibiscus PCA 可能有促進 GSH 之生成。之前曾有研究指出 Hibiscus PCA 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 4 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 Hibiscus PCA 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，但對於其詳細機制尚待進

一步探討。

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 Hibiscus PCA(50 mg/kg、100 mg/kg) 則不見淋巴球侵潤及壞死等肝病變等現象。

總之，Hibiscus PCA 可以對抗 t-BHP 造成鼠肝細胞氧化損傷。其中一個可能的抗氧化效應包括減少自由基的發生達成作用。

1. 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.
2. 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*, 101 : 137-148, 1996.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Morse MA, and Stoner GD. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1743-1746.
9. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375-380.
10. Breimer LH. Molecular mechanism of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. *Mol.Carcinogenesis* 1990; 3: 188-197.

11. 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.
12. Davies MJ. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochem. J.* 1989; 257: 603-606.
 13. 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.
 14. Terahara N, Callebaut A, Ohba R, Nagata T, Ohnishi K, Suzuki M. Triacylated anthocyanins from *Ajuga reptans* and cell cultures. *Phytochemistry* 1996; 42(1): 199-203.
 15. 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.
 16. Yagi K. Lipid peroxidation and human disease. *Chem. Phys. Lipids* 1987;45: 337-351.
 17. Cheng TJ. Protective action of seed oil *Hippophae rhamnoides* L. against experimental liver injury in mice. *Chinese J. Pre. Med.* 1992; 26: 513-552.
 18. William HH, Michael JP, and William BJ. Glutathion S-transferase. *The journal of Biological Chemistry* 1974; 249(22): 7130-7139.
 19. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 103: 121.
 20. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
 21. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983; 221: 1256-1264.
 22. Weisburger JH. Effective human cancer prevention as goal for the regulation of environmental chemicals. *J. Environ. Health* 1991;C8: 339-351.
 23. 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.

24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Smith MT,and Orrenius S.Bled formation in isolated hepatocytes during drug metabolism is cause by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. Science 1982; 217:1257-1259.
29. Bellomo G, Thor H,and Orrenius. Increase in cytosolic Ca²⁺ concentration during t-butyl peroxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca²⁺ stores. FEBS Lett 1984; 168:38-42.
30. Blakely WF, Fuciarelli AF, Wegher BJ,and Dizdaroglu M. Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid, Red. Res 1990; 121:338-343.
31. Frenkei F. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative damage. Pharmacol. Ther 1992; 53:127-166.

Table 1. Effect of 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)
Normal	56±7	98±21	809.1±298
t-BHP(0.2 mmol/kg)	140±62 [#]	413±93 [#]	1805±281 [#]
PCA + t-BHP :			
50 mg/kg	81.3±11.0*	314.4±61.7*	700±114**
100 mg/kg	68±11*	251.3±83.8*	1213±271**

a. In these experiments, the animals were pretreated with PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h after the administration of t-BHP.

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

Table 2. Effect of protocatechuic acid on t-BHP induced lipid peroxidation in rats

Treatment ^a	MDA (nmol/g liver)
Normal	101±14
t-BHP(0.2 mmol/kg)	198±42 [#]
PCA + t-BHP :	
50 mg/kg	127±16**
100 mg/kg	134±28**

a. In these experiments, the animals were pretreated with PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h after the administration of t-BHP.

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

Table 3. Effect of protocatechuic acid on t-BHP induced GSH and GSSG in rats

Treatment ^a	GSH (ug/g liver)	GSSG (ug/g liver)
Normal	1866±80	1241.7±114.0
t-BHP(0.2 mmol/kg)	1492±42 [#]	837.2±160.7 [#]
PCA + t-BHP :		
50 mg/kg	1956±121*	1071±52
100 mg/kg	2104±178*	1151.0±125.4*

a. In these experiments, the animals were pretreated with PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h after the administration of t-BHP.

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

#. P<0.05 , compared with control.

Table 4. Effect of protocatechuic acid on hepatic activity of GST , GSH-Px and Catalase induced by t-BHP in rats

Treatment ^a	GST (nmol/min/mg protein)	GSH-Px (nmol/min/mg protein)	Catalase (k/min/mg protein)
Normal	103±12	30±5	0.17±0.02
t-BHP(0.2 mmol/kg)	105±6	36±2	0.11±0.01 [#]
PCA + t-BHP :			
50 mg/kg	131.4±24*	36±2	0.16±0.03**
100 mg/kg	117.1±7*	39±3	0.15±0.02**

a. In these experiments, the animals were pretreated with PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h 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).

Table5. Effect of protocatechuic acid on the elevation of hepatic lesion induced by t-BHP in rats

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

a. In these experiments, the animals were pretreated with PCA by gastric tube for 5 consecutive days then rats were killed 18h after the administration of t-BHP.

A

B

Fig 5-1. Histopathological evaluation of rats livers after treatment with dist H₂O and t-BHP alone. (A) is section of livers of normal group. (B) is a section of liver from t-BHP treated rat; note the cellular infiltration of inflammatory leukocytes(thick arrow) and cellular necrosis(thin arrow) and diffuse cellular degenerative changes with cloudy swelling(arrow) (H & E x 200).

C

D

Fig 5-2. Histopathological evaluation of rats livers after treatment with PCA 50 mg/kg、 100 mg/kg.(C) and (D) is section of a liver from an t-BHP + PCA 50 mg/kg 、 100 mg/kg treated rat. same as Fig 5-1(A).