

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

各種蜂膠萃取物生物活性與口腔癌化學預防特性之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-040-001-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：王進崑

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 8 日

中文摘要

蜂膠為具保健功能之天然物，但對於各種不同蜂膠萃取物其消化前後之組成與活性則缺乏相關之研究，本研究針對不同蜂膠萃取物(甘油、水以及 30%、60%、95%的酒精水溶液等蜂膠萃取物)消化前後組成及生物活性進行探討。首先瞭解不同萃取液之組成與生物活性之差異性，再探討經過人工胃液以及先經人工胃液再經人工腸液的消化後其組成和生物活性的變化。由於酚類化合物為蜂膠之主要活性貢獻物質，因此以酚類化合物之組成變化來比較蜂膠消化前後的差異，而有關生物活性的評估則包含了總抗氧化能力、還原力、自由基的清除以及對 COX-2 表現與 PGE₂ 之生成的抑制情形。

本研究之結果得知，95%與 60%的蜂膠乙醇水溶液萃取物的組成和生物活性相近，而水和 30%蜂膠乙醇水溶液萃取者則相類似，但其生物活性較 95%與 60%乙醇兩者水溶液萃取者差，而甘油萃取者則介於兩大組之間。經 HPLC 分析酚類化合物得知，蜂膠萃取物經消化處理後，酚類化合物之含量隨著萃取溶劑中乙醇含量比例降低而顯著減少。而活性表現方面(包括總抗氧化能力、清除過氧化氫、DPPH、還原能力以及抑制 COX-2 的表現與 PGE₂ 的生成)，經消化處理後各種萃取物之活性表現不若原始萃取物；而消化處理前後，皆以 95%與 60%蜂膠乙醇水溶液萃取者之功效較佳；在螯和亞鐵離子和清除超氧陰離子方面，在未經消化處理時，以水萃取者之效果較佳，但經消化處理後，水萃取者效果反而有最明顯的降低，比較 HPLC 之分析結果可知，滯留於 0-50 分鐘具有較高極性之單寧物質可能為其主要貢獻物質。

關鍵詞：蜂膠萃取物、COX-2、PGE₂、消化、抗氧化性、酚類化合物

Abstract

Propolis is a very popular nature health food currently. However, the composition and biological actives of various propolis extracts and their digested products are still deficient. Therefore, the composition and biological actives of propolis extracts and their digested products will be discussed in this study. 95%EtOH, 60%EtOH, 30%EtOH, aqueous and glycerol extracts of propolis were used in this study. Phenolics are found to be the major available physiological contributor of propolis, the phenolic composition and biological actives in various propolis extracts and their digested products will be determined. In addition, the change of phenolic composition and biological actives of the extracts after gastric digestion or gastrointestinal digestion were also determined. Biological evaluations include total antioxidant capacity, reducing power, free radical scavenging efficiency, suppression efficiency for COX-2 expression and PGE-2 formation.

Result revealed that 95%EtOH and 60%EtOH extracts of propolis showed similar phenolic components and biological actives. Both 30%EtOH and aqueous extract of propolis showed less levels of phenolics and lower biological actives than that of 95 %EtOH and 60%EtOH extracts. The phenolic contents and biological effects of glycerol extract are between the above two groups. By the analysis of HPLC, phenolics were greatly decreased and changed, especially in 30%EtOH and aqueous extracts. The digestion treatment greatly decreased the biological activities of various propolis extracts. Both 95%EtOH and 60%EtOH extracts showed better biological effects (total antioxidant capacity, H₂O₂ scavenging, reducing power, DPPH, free radical scavenging and suppression efficiency for COX-2 expression and PGE₂ formation) than the other extracts before and after digestion. The effects on chelating ferrous ion and superoxide anion scavenging were only shown by the original aqueous extract. However, digestion of aqueous extract greatly reduced both effects. By the results of HPLC on phenolics compounds, the tannin-like materials with high polarity in the range of 0-50 minutes were probably the main contributor for chelating ferrous ions and scavenging superoxide anion.

Keywords: propolis, COX-2, PGE₂, gastrointestinal digestion, antioxidation, phenolics

前言

蜂膠含有極豐富之多元酚（包括類黃酮）（Greenaway et al.,1991），被發現具有抗菌、抗腫瘤、抗氧化、抗發炎等特性（Guarini et al.1992；Dobrowolski et al. 1991；Grange and Davey, 1990；Serkedjieva et al.,1992；Dimov et al., 1992；Krol et al.,1990），為目前市面上極受消費者喜愛之保健食品。蜂膠產品大多由原塊萃取之，因此萃取物之多元酚組成與生物活性表現將直接影響商品之保健有效性，然而到目前為止，對蜂膠各種萃取物多元酚之組成與生物活性表現的相關研究仍相當缺乏，甚至對於蜂膠萃取物經消化後的變化也一為所悉。另外，蜂膠已經被發現可有效的預防皮膚癌的發生並抑制其增長，但對於同樣是直接可觸摸性之口腔癌的研究卻付之闕如。近年來我國口腔癌的發生率不斷上升，由於發炎組織與癌化組織皆有 COX-2 的表現，且 COX-2 表現之抑制性與抗癌性有關（Zimmermann et al.,1999；Masferrer et al., 2000；Shirahama et al.,2001）。因此，本研究擬以蜂膠萃取物及其消化產物，以 COX-2 之表現作為指標探討其對口腔癌之化學預防特性。

目的

蜂膠為具保健功能之天然物，但對其消化前後組成與活性的變化則缺乏相關之研究，故本研究之目的擬瞭解不同蜂膠萃取物經消化前後之差異性，及其組成和生

物活性的變化並且以 COX-2 之表現為指標探討蜂膠在口腔癌之化學預防所扮演的角色。

材料與方法

一、試驗材料

(一) 蜂膠

1. 蜂膠原塊來源：由巴西 Minas Gerais 州 Apis mellifera 公司所提供。

2. 各種蜂膠萃取物的製備：

參考 Miyataka 等(1997)之方法分別以水、甘油與不同比例的乙醇水溶液(30%、40%、50%、60%、70%、80%、95%)等溶劑分別進行萃取，以獲得的各種蜂膠萃取物 (prpolis extracts; PE)。PE 的製備是利用溶劑與蜂膠原塊重量以 4:1 之比例攪拌混合。甘油和各種不同比例的乙醇水溶液萃取者，置於燒杯中在 70 水浴震盪 30 分鐘;以水萃取者，則置於燒杯中在 95 水浴震盪 2 小時，所有萃取皆反覆進行兩次。將兩次萃取液混合並過濾 (Whatman .NO4)，所得之濾液定量至一定體積，濾液經減壓濃縮後即得蜂膠萃取物。

3. 各種蜂膠萃取物之 in vitro 消化處理：

(a) in vitro stomach system:

根據 The United States Pharmacopeia conditions (USP 23) 以及 Sarria 等 (2001) 之方法，將各種萃取物放入人工胃液中 (取 0.2g 食鹽及 0.32g 胃蛋白酶(pepsin),溶於 80 ml 的水,以 0.2M 鹽酸調製為 pH=1.2,再加水稀釋至 100 ml)，置於 37 的水浴震盪反應 2 小時。

(b) in vitro intestine system:

根據 The United States Pharmacopeia conditions (USP 23) 以及 Sarria 等 (2001) 之方法與 Kurl 等(2000)之方法取經上述人工胃液消化的產物放入人工腸液中 (取 0.68g 碳酸二氫鈉溶於 25 ml 水中,加入 19 ml 0.2M 氫氧化鈉及 40 ml 水,再加入 1.0g 胰蛋白酶,均勻混合,以 0.2M 氫氧化鈉調至 pH=7.5±0.1,再加水稀釋至 100 ml)，置於 37 的水浴震盪反應 2 小時。

(c) 經消化作用後蜂膠萃取物的取得

將各種溶劑的蜂膠萃取物經過人工胃液、人工胃液和腸液的反應後，反應液與等量的乙酸乙酯均勻混合 2 小時，然後靜置分層取上清液。此外另取一組不加入消化酶但經過乙酸乙酯的萃取過程作為對照組。

(二) 試驗細胞株：KB cell 購自新竹食品工業發展研究所

二、試驗方法

1. 蜂膠的多元酚分析

(1) 以高效能液相層析進行測定蜂膠萃取液中之分類化合物組成。移動相 A 溶液為 2.5% glacial acetic acid 之水溶液，B 溶液為 acetonitrile，起始為 100%A 溶

液，於 10 分鐘以線性梯度轉換成 87%A 溶液，13%之 B 溶液，於 60 分鐘線性梯度轉成 60%A 溶液，40%之 B 溶液，於 90 分鐘以線性梯度轉成 100%B 溶液，樣品注射量為 20 μ l，流速為 1.0 ml/min，檢測波長為 280 nm，分離管柱為 Lichrospher 100 RP-18 column，(250 x 4 mm I.D.，粒徑 5 μ m，德國 Merck 公司)

(2) 蜂膠中總酚類化合物與類黃酮之含量分析

分別參考 Julkunen-Tiitto(1985)之方法與李(1986)之方法進行之。

(3) 蜂膠中聚合單寧含量分析

參考 Julkunen-Tiitto(1985)之方法進行之。

3. 生物活性分析：包括還原力、總抗氧化的能力、螯合亞鐵離子之能力測定以及對各種自由基清除能力之測定

4. 人類口腔癌細胞 (KB cell) 中 COX-2 的表現

(1) 細胞培養與細胞存活試驗

參考 Kremer (1999) 及鄭 (2000) 的方法取人類口腔上皮癌細胞株 (KB cell)，培養於 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培養液中另外加入 10%FBS, 1% penicillin 後在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 環境下進行培養。利用 trypan blue 染色後進行計數。

(2) 細胞內蛋白質之萃取

參考 Michaluart 等 (1999) 的方法將細胞內蛋白質萃取出來。利用 Lowry method 測定蛋白質濃度。蛋白質定量至 100 μ g / lane。

(4) Western blotting assay

參考 Towbin 等(1979) 及 Tucker 等(1999)的方法進行之。

結果與討論

一、蜂膠萃取物消化前後之酚類化合物含量

(一) 蜂膠萃取物之酚類化合物含量

酚類化合物為蜂膠中極為重要之天然成分，蜂膠所含的酚類化合物種類相當廣泛，包括有類黃酮、聚合單寧、游離態的酚酸 (phenolic acid) 及其衍生之酯類化合物等，多元酚化合物一般相信與蜂膠的生物活性有相當重要的關係，如抗氧化、抗癌性、抗菌性及抗發炎等，故有必要針對蜂膠萃取物中酚類化合物的特性進行探討。在總酚類化合物含量方面，以 95%EtOH

和 80%EtOH 之萃取物之含量最高，分別為 129.1 mg/g 和 126.8 mg/g，在總類黃酮含量方面，也是以 95%EtOH 和 80%EtOH 之萃取物的含量最高分別為 182.1 mg/g 和 189.8 mg/g，總酚類或是總類黃酮的含量都與萃取溶劑中之乙醇百分比成正相關，其中甘油所萃取者，兩者之含量介於 50%EtOH 和 40%EtOH 所萃取者之間，至於縮合單寧含量方面，水萃取物中的含量最多，其他萃取物中縮合單寧之含量隨著乙醇萃取液中百分比含量的增加而遞減，而以甘油萃取物中所含之縮合單寧量最少，這可能與高極性單寧較易被含水百分比高的溶劑萃取所致。此結果與解（1999）之發現相似，顯示不同的萃取溶劑所萃得之總類黃酮、總酚類和單寧的含量是有差異的。各種豐教脆取物經過消化處理後，總酚類含量顯著地低於未經消化處理者，而隨著萃取溶劑中含水比例的增加，其萃取物經過消化處理後，多元酚含量更加明顯的減少，但經過單獨的胃消化處理以及經過胃再經腸之消化處理者並無顯著的差異。有關總類黃酮與縮合單寧之含量變化與總酚類含量的變化相似。

表一、各種蜂膠萃取物經消化處理後總酚類之含量

Table 1. Contents of total phenolics of various extracts of propolis after digestion

	Content (mg/g)*				
	95%-EtOH	60%-EtOH	30%-EtOH	Aqueous	Glycerol
No digest	3.38±0.15 ^a	3.22±0.09 ^a	0.95±0.05 ^a	0.73±0.01 ^a	1.46±0.01 ^a
G digest	1.95±0.08 ^b	2.44±0.06 ^b	0.47±0.04 ^b	0.25±0.01 ^c	1.17±0.04 ^b
GI digest	2.08±0.07 ^b	2.49±0.07 ^b	0.51±0.03 ^b	0.31±0.01 ^b	1.09±0.03 ^b

*mg gallic acid equivalent/ g dry wt

G digest : gastric digest

GI digest : gastrointestinal digest

Mean within the same column sharing different superscript letters were significantly different(p<0.05)

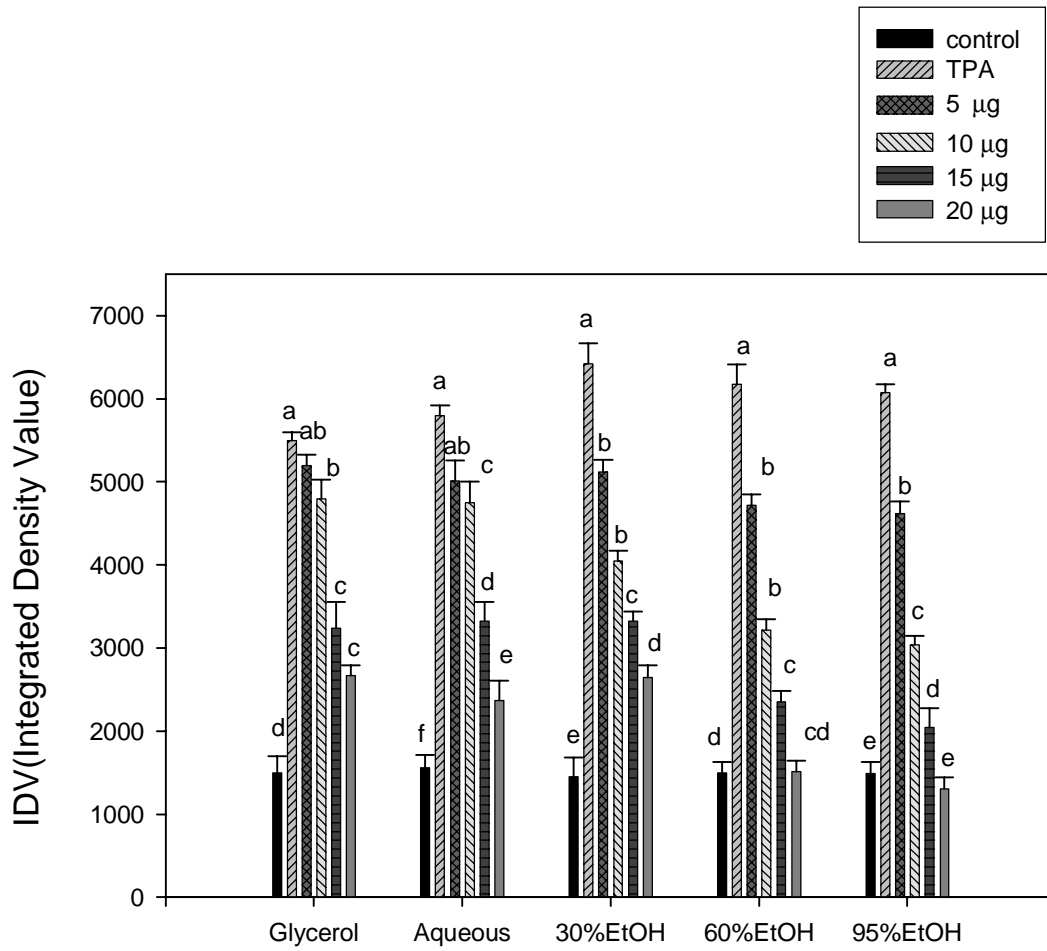
二、以 Western blot 觀察蜂膠對 COX-2 表現之影響

(一) 蜂膠萃取物對 COX-2 表現之影響

近年來，蜂膠為一深受矚目之保健食品。許多研究指出蜂膠具有抑制促癌劑之作用、壓抑腫瘤生長 (Frenkel et al.,1993; Sakamoto et al.,1994) 及抑制誘突變劑之作用 (Rao et al.,1992)。本研究發現不同溶劑萃取的蜂膠萃取物都具有抑制 COX-2 的表現，其中以 95%EtOH、60%EtOH 和 30%EtOH 的蜂膠萃取物效果最佳，在加入蜂膠萃取物 5mg 就有極顯著的抑制效果，其中又以 95%EtOH 和 60%EtOH 效果最佳，當劑量增加至 20 µg 時會將 TPA 所誘發之 COX-2 表現完全控制。而水和甘油蜂膠萃取物則需加入 10 µg 才能對 COX-2 的表現有抑制的效果。

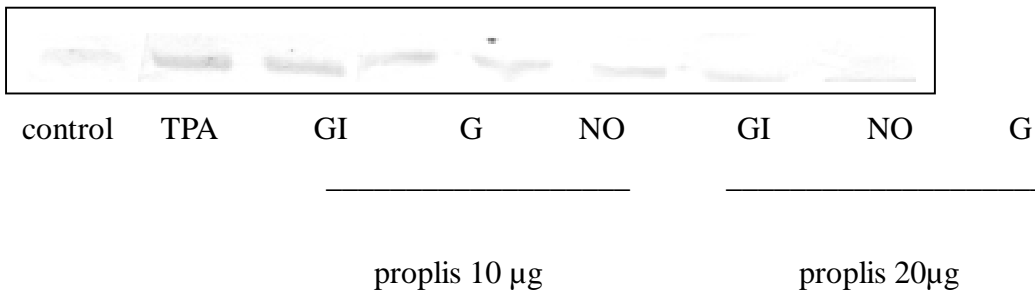
各種萃取物之消化處理產物仍具有抑制 COX-2 的表現，但其效果與各原始萃取物相比，卻大大的減少，但其抑制功能也同樣與劑量成正相關。95%EtOH 和 60%EtOH 萃取物之消化處理產物同樣較 30%EtOH、水和甘油萃取物之消化處理產物佳。此外，NO digest 的 95%EtOH 和 60%EtOH 萃取物，在高濃度 (20 µg) 時仍可完全將 TPA 所誘發之 COX-2 的表現完全控制。而 NO digest 的 30%EtOH、水和甘油萃取物在高濃度 (20 µg) 處理下，雖可以抑制有效的抑制 COX-2 的表現，但效果較弱。No digest 的抑制能力低於原始萃取物，也應可能是僅萃取部分中低極性之酚類化合物所致。90%EtOH 及 60%EtOH 萃取物的各

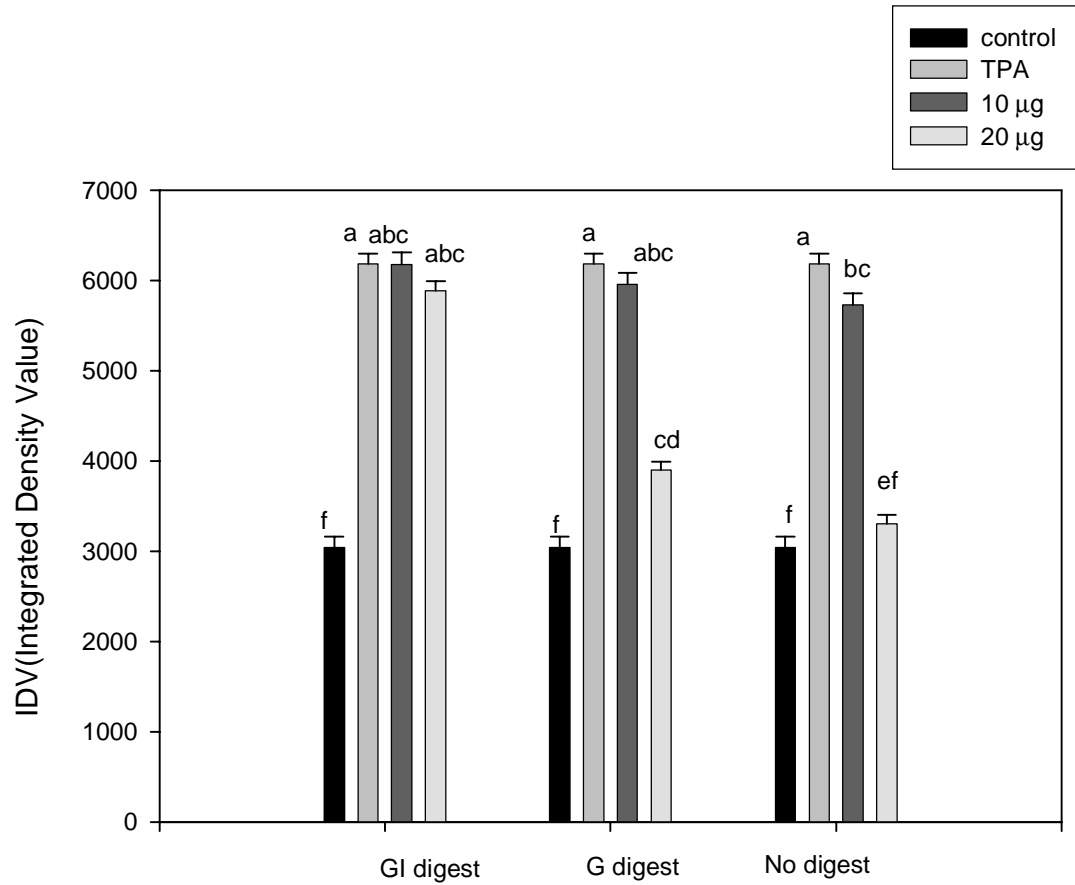
種消化產物之抑制功效也有隨劑量而增加，但與 No digest 相比，其效果有降低的趨勢，可能是因為所萃取之成分為不易被胃腸系統所改變之較低極性成分。而 30%EtOH 及水萃取物中含有高量之高極性且易受消化處理而改變。



圖一、各種蜂膠萃取物對 TPA 誘發 KB 細胞 COX-2 表現之影響

Fig.1 Effect of various propolis extracts on the COX-2 expression of KB cell induced by TPA





圖二、KB 細胞經 TPA 與 95%EtOH 蜂膠萃取物經消化作用後產物共同處理後 COX-2 的表現

Fig.2 COX-2 expression of KB cell that treated with vehicle、TPA 50ng/ml compared with digests obtained from 95%EtOH extract of propolis