

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

計畫編號：NSC 89-2312-B-040-001

執行期限：88年08月01日至89年07月31日

主持人：林嬪嬪

執行機構及單位名稱：中山醫學院毒理學研究所

一、中文摘要

杜仲是一種傳統中藥材，其樹皮經炮製與其他中藥材同時使用，具有補肝腎強筋骨安胎等作用。由於採取杜仲樹皮會造成杜仲樹的乾枯，而杜仲葉也具有類似樹皮的成份，因此近年來杜仲的樹葉經曬乾加工後，做成杜仲茶包，在日本與台灣當作保健食品銷售。本計畫第一階段定量杜仲茶萃取液之 quercetin 含量，並以體外實驗及細胞實驗評估杜仲茶之抗氧化作用及安全性。我們以 Ames test strain TA100 測試其致突變性時發現，杜仲葉各種萃取液均不具有致突變性。我們以高效液相層析法及質譜儀確定杜仲葉的水萃取液中含有 quercetin，並估計每克杜仲葉(乾重)之水萃取液含有 106.4 微克 quercetin。接著我們評估杜仲葉萃取液之抗氧化性。在鐵離子存在下，杜仲葉各種萃取液對完整紅血球及紅血球細胞膜具有抗氧化作用。接著最後我們利用流質細胞計數法再次證實杜仲葉的水萃取液在人類肝癌細胞 HepG2 中具有抗氧化作用。杜仲葉各種萃取液在 Ames test strain TA100，SOS/Umu 無致突變性，對肺細胞 DNA 及外周血網織紅細胞無基因毒性，但我們以杜仲葉水萃取液處理小鼠周邊淋巴細胞之後，以彗星試驗偵測到細胞發生 DNA 斷裂的現象。因此杜仲葉萃取液的安全性需要進一步評估。

關鍵詞：杜仲茶、抗氧化作用、遺傳毒性

Abstract

Tochu, which is the dry stem bark of *Eucommia ulmoides* Oliv, is one of the oldest herbs in traditional Chinese medicine. Since Cortex *Eucommiae* is difficult to obtain, its leaves which contain same components as the cortex, have been used for medical research. Recently Tochu tea, an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* Oliv leaves, has become a popular beverage in Japan and Taiwan. The objective of this project is to evaluate the

antioxidant activity of aqueous extract of Tochu leaf and its genotoxicity. We found that tochu-leaf extract was not mutagenic in Ames' test (TA100 strain). Later, we identified quercetin in tochu-leaf with HPLC-MASS and estimate 106.4mg quercetin /g of dried tochu-leaf. Antioxidant effect of tochu-leaf extract was evaluated in intact RBC, RBC-gost, and human hepatoma HepG2 cells. We found that tochu-leaf extract reduced t-butyl hydroperoxide-induced lipid peroxidation in intact RBC and RBC-gost system, and oxidative stress in HepG2 cells. We further evaluate the genotoxicity of tochu-leaf extract *in vitro* and *in vivo*. We found that tochu-leaf extract was negative in Umu test, DNA cross-linking assay, micronuclei assay. However, it caused DNA stand breaks as measured with the Comet assay.

Keywords: Tochu leaf, genotoxicity, antioxidation

二、緣由與目的

杜仲是一種傳統中藥材，其樹皮經炮製與其他中藥材同時使用，具有補肝腎強筋骨安胎等作用。杜仲原生長於中國大陸山區，現在台灣花蓮與台東山區林場已成功種植杜仲樹。由於採取杜仲樹皮會造成杜仲樹的乾枯，而杜仲葉也具有類似樹皮的成份，因此近年來杜仲的樹葉經曬乾加工後，做成杜仲茶包，在日本與台灣當作保健食品銷售。中國大陸學者研究指出，服用含杜仲樹皮的中藥處方，能降低人體及動物體內自由基的產生或促進自由基的代謝(1, 2)，但是杜仲葉是否有相同作用，目前仍不清楚。杜仲葉茶包在日本風行已久，宣傳長期飲用能促進新陳代謝，增強抵抗力(3)。日本學者於動物實驗發現，飲用杜仲茶可降低血脂、血壓並促進皮膚膠原蛋白合成(4-6)。另外日本學者研究指

出，杜仲葉萃取液能降低 mitomycin C 對 CHO 細胞與小鼠的基因毒性(7)。CHO 細胞先以 mitomycin C 處理後再加入杜仲葉萃取液可降低 mitomycin C 誘發 chromosome aberration 的程度。相同地，將小鼠事先灌食杜仲葉萃取液，再腹腔注射 mitomycin C，可降低血球中微核的形成(7)。已知 mitomycin C 經代謝後，會產生自由基，進而對細胞產生毒性。因此杜仲葉萃取液可能會抑制細胞內自由基的產生或清除自由基。杜仲葉萃取液中的成份複雜，包括 iridoides monoglycoside (例如 geniposidic acid 與 aucubin)，phenols 及 falvonoids，例如 quercetin (7)。在人類肝癌細胞 HepG2 中 quercetin 能降低 H2O2 所誘發之 DNA 氧化產物 8-oxo-2-deoxyguanosine (8)。因此 quercetin 可能是杜仲葉萃取液抗氧化作用的主要成份。雖然杜仲葉萃取液可能具有抗氧化能力，但是也有研究報告，指出杜仲樹皮萃取液在 Ame's test(TA100) 中呈陽性反應(9)，將小鼠以腹腔注射杜仲樹皮萃取液會導致染色體異常及血球微核的形成，因此杜仲樹皮萃取液可能具有致突變性。本計畫將以細胞實驗及體外實驗探討杜仲茶抗氧化作用的成分及機轉，並以動物實驗評估其抗氧化作用及安全性。

三、結果與討論

1. 杜仲葉萃取物之致突變性。

杜仲葉分別以熱水煮沸 10 分鐘、熱水浸泡 10 分鐘、methanol、ethanol、isopropanol、acetone、dichloromethane 或 n-hexane 萃取之萃取物於 *Salmonella typhimurium* TA100 系統中測試結果顯示並不具有致突變性(Table 1)。

2. 定量及定性杜仲葉萃取物中 quercetin 含量。

將杜仲葉經各種溶劑萃取之萃取液以 HPLC 分析並定量 quercetin，與 quercetin 標準品對照後，收集 fraction，以質譜儀確認其結構。我們發現杜仲葉經各種溶劑萃取後之萃取液均含有 quercetin，其中經水煮沸 10 分鐘之杜仲葉萃取液含有 103.6 克

quercetin(每克杜仲葉乾重)；以 dichloromethane 或 n-hexane 萃取液中之 quercetin 含量最高(分別為 441.6 或 420.7 克)(Table 2)。

3. 以紅血球細胞膜，完整紅血球 and HepG2 cells 三種系統，評估杜仲葉萃取物之抗氧化性。

紅血球細胞膜是以低張緩衝液將人紅血球漲破所得到之細胞生物膜為模式，在鐵離子存在下會發生 Fenton reaction，產生脂質過氧化現象(以 TBAR 測定)。我們發現，0.05 克(乾重)杜仲葉之各種萃取液能降低

Table 1. The mutagenicity of the extracts from tochu-leaf by various solvents on *Salmonella typhimurium* TA100

Extracted solvents (Dose, dry weight)	Mutagenicity (revertant \pm S.D./ plate)	
	0.5 g	0.05g
Hot water (soak 10 min)	79 \pm 6	63 \pm 2
Boiling water (10 min)	76 \pm 2	61 \pm 5
Methanol	70 \pm 4	65 \pm 7
Ethanol	81 \pm 6	60 \pm 6
Isopropanol	65 \pm 9	72 \pm 3
Acetone	72 \pm 3	72 \pm 4
Dichloromethan	67 \pm 6	68 \pm 6
n-Hexane	86 \pm 7	68 \pm 4

Negative control: 76

Positive control: 298 \pm 19 (5ug 4NQO/plate)

Table 2. Amounts of quercetin isolated from tochu-leaf extracted with various solvents

Extracted solvent	Amounts of quercetin
	(μ g/g, dry weight)
Hot water (soak 10min)	38.7
Boiling water (10min)	103.6
Cold water	27.3
Methanol	41.2
Ethanol	43.7
Isopropanol	44.6
Acetone	47.6
Dichloromethane	441.6
n-Hexane	420.7

Amounts of quercetin was calculated from the standard curve ($Y=11.374X-26.033, R^2=0.9785$) determined by HPLC assay.

17.9%~72.8%的脂質過氧化程度(Table 3)。

接著我們以完整的人類紅血球為材料，相同地，在鐵離子存在下會進行 Fenton reaction，產生脂質過氧化現象(以 TBAR 測定)。如 Table 4 所示，0.5 克(乾重)杜仲葉之各種萃取液能降低 28.6%~74.6%的脂質過氧化程度。

最後我們以人類肝癌細胞株 HepG2 為材料，以過氧化物螢光染料 dichlorodihydrofluorescein(DCFH) 配合

Table 3. The protective effect of tochu-leaf extracts on the lipid peroxidation in RBC membrane induced by Fenton reaction

Extracted Solvents (Dose, dry weight)	TBARs level (mmol/protein) / % of inhibition	
	0.5g	0.05g
Hot water	0.052 / 71.1	0.133 / 23.1
Boiling water	0.051 / 70.5	0.107 / 38.2
Cold water	0.087 / 49.7	0.142 / 17.9
Methanol	0.039 / 77.5	0.094 / 45.7
Ethanol	0.028 / 83.8	0.078 / 54.9
Isopropanol	0.036 / 79.2	0.061 / 64.7
Acetone	0.033 / 80.9	0.073 / 57.8
Dichloromethane	0.036 / 79.2	0.050 / 71.1
n-Hexane	0.033 / 80.9	0.047 / 72.8

Positive control: 0.173

流質細胞計數儀，偵測細胞內過氧化物之變化。我們以 t-butylhydroperoxide 為陽性對照，檢測杜仲葉經水煮沸 10 分鐘之萃取液在人類肝癌細胞株 HepG2 中之抗氧化

Table 4. The protective effect of tochu-leaf extracts on the lipid peroxidation in intact RBC induced by Fenton reaction

Extracted solvents (Dose, dry weight)	TBARs level (mmol/protein) / % of inhibition	
	0.5g	0.05g
Hot water	0.165 / 50.7	0.275 / 17.9
Boiling water	0.132 / 66.6	0.190 / 43.3
Cold water	0.239 / 28.6	0.309 / 7.8
Methanol	0.200 / 40.3	0.258 / 23.3
Ethanol	0.208 / 37.9	0.302 / 9.9
Isopropanol	0.141 / 57.9	0.313 / 6.6
Acetone	0.140 / 50.9	0.272 / 18.8
Dichloromethane	0.143 / 57.3	0.295 / 11.9
n-Hexane	0.085 / 74.6	0.282 / 15.8

Positive control: 0.335

作用。我們發現杜仲葉之水萃取液(1-2mg

乾重/ml)可降低 49%-51% 由 t-butylhydroperoxide 所誘發之過氧化物。而 10 μ M quercetin 可降低 46%過氧化物 (Table 5)。因此，經由 RBC-ghost system, intact RBC, and HepG2 cells 三種系統均證實，杜仲葉經水煮沸 10 分鐘之萃取液具有抗氧化作用。

Table 5. The protective effect of tochu-leaf extracts on oxidative stress in human hepatoma HepG2 cells.

Treatment	Relative fluorescence	% of inhibition
Blank	1.00	-
2 mg/ml Tochu-leaf extract	0.59	-
1 mg/ml Tochu-leaf extract	0.72	-
10 μ M Quercetin	0.76	-
2 mM TBH	2.55	100
2 mM TBH + 2 mg/ml tochu-leaf extract	1.26	51
2 mM TBH + 1 mg/ml tochu-leaf extract	1.30	49
2 mM TBH + 10 μ M Quercetin	1.37	46

TBH represents t-Butyl hydroperoxide.

Tochu-leaf extract was prepared by boiling in hot water for 10 min.

4. 體外毒性試驗

以 SOS/Umu、DNA 交聯試驗及彗星試驗檢測杜仲葉水萃取液之遺傳毒性。我們以 10 至 100mg/ml 杜仲葉水萃取液處理 Umu 菌株 2 小時後對 Umu 菌株呈陰性反應。接著我們以 0.1, 0.5, 1, 10 mg/ml 杜仲葉水萃取液處理大鼠肺細胞 DNA30 分鐘後測定 DNA 交聯程度時呈陰性反應。最後我們將小鼠周邊淋巴細胞與 0.01-0.5 mg/ml 杜仲葉水萃取液反應 24 小時後以彗星試驗檢測 DNA 損傷情形，發現 DNA 斷裂情形隨劑量增加而增強 (Table 6)。

Table 6. The Comet assay for Tochu leaf extract-treated mouse lymphocytes

Doses (mg/ml)	DNA tail length
0.01	11.9 \pm 1.4
0.05	14.9 \pm 1.7
0.25	17.1 \pm 2.1
0.5	21.0 \pm 2.6
Positive control	43.9 \pm 3.2

5. 體內毒性試驗

脈取血分離外周血網織紅細胞，以螢光染色，於顯微鏡下計算細胞內微核數目，發現處理組與陰性對照組(注射生理時鹽水)之微核數目無顯著差異。

綜合上述結果可知，杜仲葉各種萃取液在 Ames test strain TA100, SOS/Umu 無致突變性，對肺細胞 DNA 及外周血網織紅細胞無基因毒性，但我們以杜仲葉水萃取液處理小鼠周邊淋巴細胞之後，以彗星試驗偵測到細胞發生 DNA 斷裂的現象。因此杜仲葉萃取液的安全性需要進一步評估。截至目前為止，我們在紅血球細胞膜，完整人類紅血球 及人類肝癌細胞株 HepG2 cells 三種系統均證實，同時處理鐵離子或過氧化物以及杜仲葉水萃取液時，能降低脂質過氧化或細胞內过氧化物的產生。

四、計畫成果自評

本計畫完成 100%既定目標，尤其完成杜仲水萃取液之體內與體外遺傳毒性試驗，證實其不具遺傳毒性，但在大鼠淋巴細胞引起 DNA 斷裂，必須進一步探討其生理意義。

五、參考文獻

1. 廖承濟、許秀敏、陳文發, (1993) 年爾康抗衰老與超氧化物歧化酶活性的研究, 福建中醫學院學報, 2(3), 91-96.
2. 沈霖、楊家玉、高蘭, (1996) 補腎健骨湯對膝關節病患氧自由基代謝的影響, 中國骨傷, 4(9), 8-10.
3. 杜仲茶在日本熱銷, 中國中醫藥信息雜誌, 1995, 2(2).
4. Metori, K., Furutsu, M., Takahashi, S. (1994) Effects of du-zhong leaf extract on

serum and hepatic lipids in rats fed a high-fat diet. Biol. Pharm. Bull. 17, 917-920.

5. Metori, K., Furutsu, M., Takahashi, S. (1997) The preventive effect of ginseng with du-zhong leaf on protein metabolism in aging. Biol. Pharm. Bull. 20, 237-242.

6. Li, Y., Sato, T., Metori, K., Koike, K., Che, Q.M. and Takahashi, S. (1998) The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* OLIVER leaves on collagen synthesis. Biol Pharm. Bull. 21, 1306-1310.

7. 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): I. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. Mutat. Res. 338: 7-20.

8. Musonda, C.A. and Chipman, J.K. (1998) Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. Carcinogenesis. 19:1583-1589.

9. Yin, X., Liu, D., W., H. and Yu, Z. (1991) A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine. Mutat. Res. 260:73-82.