

計畫編號：DOH93-TD-F-113-019

行政院衛生署九十三年度科技研究計畫

台農二號山藥水萃物保肝活性及可能分子機制之探討

研究報告

執行機構：中山醫學大學、生命科學系

計畫主持人：王祖興

研究人員：

執行期間：93年01月01日至93年12月31日

＊＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見＊＊

目錄

摘要(中/英文)-----	02-03
前言-----	06-07
材料與方法-----	08-11
結果-----	12-15
討論-----	16
參考文獻-----	17-22
圖一、山藥水萃物對芬頓氏反應($\text{CuSO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$)造成牛胸腺 DNA 傷害 之保護作用。-----	23
圖二、山藥水萃物對二價銅及鐵離子造成人類淋巴母細胞 DNA 傷害之 保護作用。-----	24
圖三、超氧歧化酵素(SOD)、胱氨酸過氧化酵素(GPX)及過氧化氫酵 素(catalase)膠體活性染色之比較。-----	25
圖四、純酵素與大鼠肝初代肝細胞超氧歧化酵素(superoxide dismutase)活性染色。-----	26
圖五、純酵素與大鼠肝初代肝細胞過氧化氫酵素蛋白活性染色。	
圖六、山藥水萃物處理對大鼠初代肝細胞中 superoxide dismutase 活性的影響。-----	27
圖七 Acetamino 造成人類肝癌細胞 HepG2 之細胞毒性。-----	28
圖八、台農二號山藥乙酸乙酯萃物、沸水萃物及冷水萃物對 HepG2 肝細胞的細胞毒殺性。-----	29
圖九、山藥水萃物處理對 acetaminophen 造成人類肝癌細胞 HepG2 細 胞毒殺之影響。-----	30
圖十、山藥水萃物對人類肝癌細胞抗氧化酵素基因表達之影響。-31	
表一、人類抗氧化基因表現分析使用之引子序列。-----	32

中文摘要

由於病毒感染、飲酒與吸煙的不良習性、藥物濫用、美食主義及環境污染加劇等情形，已大幅增加國人罹患肝病的機會，長期的肝功能失調更是未來發展形成肝癌的禍首，目前國人罹患肝癌的比率已高居癌症的第一位，這個事實也凸顯了國人平日肝臟機能保護的重要性，以及研發具明顯保肝活性食品的迫切性，然而目前對具有保肝活性食品的研究並不多。食用山藥最近在本國農政單位大力的推廣栽種下，產量豐富，目前許多的科學性研究也指出：山藥確實有降低血糖及提昇免疫力、抗疲勞、抗骨質疏鬆、抗氧化等多方面的保健活性，最近的報告更指出台農二號山藥水萃物具有保護乙醯氨基苯酚 (acetaminophen) 在大鼠肝臟及腎臟所造成的細胞毒性，但對其保肝活性的分子作用機制則仍不清楚。本研究室最近的實驗結果發現：台農山藥二號山藥 (*Dioscorea alata* L.) 水萃物具強烈的銅離子鍵結活性，並可明顯抑制芬頓氏 (銅離子和過氧化氫) 在牛胸腺 DNA 及人類淋巴母細胞核 DNA 所造成的傷害，這項活性與山藥保肝活性可能有關，因為典型肝臟毒素所造成肝細胞毒性幾乎都與脂質過氧化 (lipidperoxidation) 有關，而脂質過氧化的過程中過渡金屬 (如銅或鐵離子) 扮演重要的前導 (processing) 角色，因此確認台農二號山藥水萃物的保肝活性及可能的分子作用機制是本計畫的主要目的。本計畫利用大鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞 (HepG2) 探討省產台農二號山藥水萃物保護肝細胞之活性及其可能的分子機制。本計畫利用：(1) ethidium bromide binding assay 及彗星分析 (comet assay) 測量山藥水萃物對氧化性核酸傷害可能之影響，(2) 膠體酵素活性染色法 (in gel enzyme activity assay) 測量山藥水萃物對大鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞中 catalase, superoxide dismutase 活性及同功酵

素圖譜的影響，(3) 以細胞生長抑制方法(growth inhibition assay) 測量山藥水萃物對 acetaminophen 處理造成人類肝癌細胞毒殺可能之影響，(4) 以 RT-PCR 方法測量淋巴母細胞中多種抗氧化酵素包括 catalase、glutathione reductase、glutathione peroxidase 1, phospholipids peroxidase, CuZn superoxide dismutase 及 Mn superoxide dismutase) 基因表達的影響等三種方式來評估山藥的抗氧化活性及可能的保肝活性機轉。結果發現：(1) 山藥水萃物具明顯抗氧化活性可有效抑制芬頓氏反應所造成之牛胸腺 DNA 傷害；對二價銅離子在人類淋巴母細胞造成的核 DNA 傷害也有很強的抑制作用，(2) 山藥水萃物處理人類肝癌細胞 HepG2 及大鼠初代肝細胞明顯增加 Cu-Zn superoxide dismutase 酵素活性，但卻略微降低 catalase 酵素的活性，(3) 山藥水萃物處理人類肝癌細胞 HepG2 明顯增加細胞內 Cu-Zn superoxide dismutase 的 mRNA 表達及 catalase mRNA 表現少量增加，然而對 glutathione peroxidase、phospholipid glutathione peroxidase 及 glutathione reductase mRNA 表現則無明顯影響，(4) 山藥水萃物與 acetaminophen 共同處理無法抑制其在 HepG2 細胞所造成之細胞毒殺性，在高濃度下 0.5%、1% 甚至會加劇 acetaminophen 所造成之細胞毒殺性。本研究首次確認山藥水萃物可調節大鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞 HepG2 中 Cu-Zn superoxide dismutase 及 catalase 的酵素活性及 mRNA 表達，然而此調節功能在保護肝臟功能之角色，仍須藉由其他不同肝毒素作進一步之探討。

關鍵詞：台農二號山藥，大鼠初代肝細胞，人類肝癌細胞，抗氧化酵素，乙醯氨基苯酚

英文摘要：

Dioscorea plants have been widely used as traditional medicine and food for health benefits. Several therapeutic properties such as anticough, antidiabetic, antidiarrhea, and anticancer have been attributed to these plants. Although the steroidal saponins (such as diosgenin) account for some of Dioscorea's activity, there is little information on the effective components. Previously, We demonstrated that aqueous extract of *Dioscorea alata* L. (YAE) inhibited the H₂O₂-CuSO₄ induced damage of calf thymus DNA, and protected cultured human lymphoblastoid cells from CuSO₄-induced DNA damage. A recent report also shows that aqueous extract of yam can protect acetaminophen induced liver injury in rat; however the molecular mechanism is still unknown. The present study, we examine the protective effect of aqueous extract of yam (*D. alata* L.) on acetaminophen induced hepatotoxicity and the possible mechanism(s) underlying this effect in rat primary liver cells and human HepG2 cells. Here, we determine the modulation effect of the aqueous extract on antioxidant enzymes genes (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase) genes expression by in gel activity assay and RT-PCR, respectively. The supplementation of aqueous extract of yam led to an significant increase the enzyme activity and mRNA expression in rat primary liver cells and human HepG2 cells, whereas it had no effect on the glutathione peroxidase, glutathione reductase expressions. When aqueous extract of yam was administered to HepG2 cells, followed by hepatotoxic dose of acetaminophen (10 mM) for 48 hours did not reduce acetaminophen-induced killing effect. These results suggest that aqueous extract of yam could modulate the antioxidant enzymes which are important for maintaining cell viability by lowering the level of oxygen radical generated from intracellular metabolism.

Keywords: yam (*D. alata* L.), rat primary liver cells, human HepG2, antioxidant enzymes, acetaminophen

本文

前言：

山藥為重要之國際性農園藝與根莖類作物，具高產及富含營養價值之特色，自古以來即被國人利用為保健食品及生藥材料，近來更是我國農政單位列為重點推廣栽培之作物。根據試驗資料及醫藥典籍可知，山藥富含蛋白質、氨基酸、礦物質、粘質多糖體及皂素(diosgenin)等成分^{1,2}，具有抗菌³⁻⁵、抗氧化⁶⁻¹¹、抑制癌細胞¹²⁻¹⁹、增強免疫力²⁰、降低膽固醇²¹⁻²²、減重²³、抗關節炎²⁴⁻²⁵及骨質疏鬆症²⁶⁻²⁸等作用。慢性肝病(慢性肝炎、肝硬化及肝癌)是國人健康之大敵。在台灣每年約有五千人死於肝癌，四千人死於肝硬化和慢性肝炎，所以肝病可以說是台灣地區最常見之本土病，也是我們的國病。雖然肝病或肝癌的形成因素複雜，包括病毒感染、攝取環境有毒物質(如黃麴毒素)、飲酒及藥物濫用等因子，但這些因素都直接或間接造成肝細胞內氧化傷害增加，因此若能有效提昇細胞抗氧化活性，對維護肝臟機能正常，防止肝癌的發生應甚具保健潛力，上述有關山藥的研究指出具有明顯的抗氧化活性，同時又具有抗癌的功效，加上全球山藥種類眾多，在保護肝臟功效上值得詳細進行比較研究。其實最近已有一篇文獻指出山藥水萃物具有抑制保護在 acetaminophen 處理下大鼠的肝腎活性²⁹。本計畫主要目的是利用大鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞(HepG2)探討省產台農二號山藥水萃物保護肝細胞之活性及其可能的分子機制。本計畫利用(1)ethidium bromide binding assay 及彗星分析(comet assay)測量山藥水萃物對氧化性核酸傷害可能之影響，(2)膠體酵素活性染色法(in gel enzyme activity assay)測量山藥水萃物對大鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞中 catalase, superoxide dismutase 活性及同功酵素圖譜的影響，(3)以細胞生長抑制方法(growth

inhibition assay)測量山藥水萃物對 acetaminophen 處理造成人類肝癌細胞毒殺可能之影響，(4)以 RT-PCR 方法測量淋巴母細胞中多種抗氧化酵素包括 catalase、glutathione reductase、glutathione peroxidase 1, phospholipids peroxidase, CuZn superoxide dismutase 及 Mn superoxide dismutase)基因表達的影響等三種方式來評估山藥的抗氧化活性及可能的保肝活性機轉。

材料與方法

細胞培養

大鼠初代肝細胞分離與培養³⁰

老鼠先以腹腔注射 sodium pentobarbital (80 mg/ kg body weight) 麻醉，剪開腹腔，將肝臟暴露出來，找出肝門靜脈插入頭皮針灌洗，第一階段所用灌流液為不含膠原蛋白酶之 calcium-free Earle' s balanced salt solution (EBSS) (pH 7.4)，內含 0.75 mM EGTA、100 units/ml penicillin 和 1 mg/ml streptomycin，以每分鐘 25 ml 流速將肝中血液灌洗出。持續 6 分鐘後，再以 250 ml EBSS (pH 7.4) 進行第二次灌洗(20 ml/min)，此時灌流液將含 100 unit/ml penicillin、1 mg/ml streptomycin、1.8 mM CaCl₂、0.8 mM MgCl₂ 及 50 mg 膠原蛋白酶 (collagenase IV)。約經 10 分鐘消化後，將肝臟剪下並移出體外，置放於過濾用的尼龍網上，輕柔攪拌於含 10 mM HEPES、2 mM L-glutamine、100 units/ml penicillin、1 mg/ml streptomycin、1 μ M dexamethasone 及 ITS+(含 6.25 μ g/ml insulin、6.25 μ g/ml transferrin、6.25 ng/ml selenious acid、1.25 mg/ml BSA 及 5.35 μ g/ml linoleic acid)之 RPMI 1640 medium 中(pH 7.4)。此步驟可使得肝臟中的細胞完全分離，所得細胞液於 50 xg 轉速下離心 2 分鐘，離心後之細胞將懸浮於不含 ITS+之上述 RPMI 1640 medium 中，再經二次低速離心(50 xg，每次 2 分鐘)即可初步完成肝細胞清洗工作。接著為了更有效分離出健康的肝實質細胞(hepatic parenchymal cells)，將利用 percoll 溶液(percoll: 10X Hank' s buffer = 9 : 1)進行一次等密度(isodensity)離心(350 xg，10 分鐘)。所得細胞再用上述之 RPMI 1640 medium 進行二次低速離心(50 xg，每次 3 分鐘)，將殘留 percoll 溶液除去。完成清洗後，最後再

將細胞懸於上述含 ITS+ 之 RPMI 1640 medium 為基礎的培養液中。細胞計數後，將細胞密度調整為每一毫升含 0.6 百萬個細胞，分別將 5ml 細胞懸浮液注入直徑 6 公分已預先經膠原蛋白(collagen, type III)處理的培養皿中，然後置於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中。3 小時後更換培養液，再 1 個小時後於每一個培養皿加入 Matrigel (最終濃度為 233 µg/ml)，之後培養液每天更換一次。

人類肝癌細胞(HepG2)

HepG2 細胞，以內含 10%胎牛血清、三合一抗生素、2 mM L-glutamine 之 RPMI1640 培養基進行培養，培養環境為內充 5% CO₂ 37 °C 恆溫及濕度 100%培養箱中，每兩天繼代培養一次。

台農二號山藥水萃物製備

台農二號山藥 (*Dioscorea alata* L.) 由台中農業試驗所園藝系劉新裕博士提供，種源確定，數量充足。山藥洗淨後去皮、切成薄片，置於 55 °C 烘箱中乾燥約 3 天，乾燥後的山藥片，以研磨機打成細粉，裝入樣品瓶中密封，置於冰箱中保存備用。水萃物配製：稱取一定量之山藥粉以煮沸之 PBS 沖泡，再經 30 分鐘攪拌，之後以 5000 rpm 離心去除不溶物，上清液定義為水萃物，小量分裝後置於 -20 °C 冰箱冷凍保存，山藥水萃物庫存溶液為 10 mg/ml。處理細胞時，山藥水萃物再以 0.2 mm 針筒過濾膜進行過濾滅菌。

細胞毒性分析

將細胞種入 6 孔盤(1×10^5 細胞/孔)，隔夜培養後，分別加入山藥水萃物、acetaminophen 或 acetaminophen 加山藥萃取物質，再經 48 小時培養後，以 trypsin-ETDA 從盤養盤剝離細胞以自動細胞計數儀計算細胞總數，(處理組細胞總數/無任何處理之控制組細胞數目) $\times 100\%$ ，作為處理之效應評估。

細胞總蛋白溶解液製備

細胞用 PBS 清洗二次後，用細胞刮刀將細胞刮下並轉移至 15-ml 離心管中，以 1000 rpm，離心 6 分鐘，倒掉上清液並用拭鏡紙將離心管擦乾，細胞塊置於 -80°C 保存備用。製備細胞蛋白溶解液時，將細胞塊溶於適量的 PBS，利用超音波震碎機震盪。震盪完畢後把離心管的溶液移至 1.5-ml 離心管中，在 13,000 rpm， 4°C 下離心 15 分鐘後，保留上清液。使用 Bio-Rad 試劑分析上清液中蛋白質濃度，以 bovine serum albumin (BSA) 當做蛋白質標準品。

細胞內總 RNA 製備

細胞($5 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$)加 2 ml PBS 以細胞刮刀刮下細胞離心，留下細胞塊加入 1ml 的 Trizol reagent (Invitrogen, USA)，放到小管中，置室溫下 5 分鐘，接著加入 0.2 ml chloroform，避光用力搖晃 15 秒後，置室溫下 15 分鐘，使用離心機在 4°C ，12,000 rpm 下離心 15 分鐘，離心後取上清液至新的管中(避免取到中間沉澱物)，加入同體積的異丙醇上下倒搖 20 次後置室溫下 10 分鐘，接著在 12,000 rpm， 4°C 下離心 8 分鐘，可見白色的沉澱在管底，去除上清液，以 75°C 的乙醇沖洗 2 次(把沉澱沖離管底)，離心 12,000 rpm， 25°C ，5 分鐘，吸去上清液，將沉澱物置通風櫥中吹乾，約 30 分鐘呈透明狀，重新溶於

ddH₂O 中，水浴 55~60°C，10~15 分鐘，以求完全溶解。所有 RNA 的濃度由分光光度計(Beckman DU 640)測量其波長 260 nm 的值加以換算定量，分裝放置-80°C 冰箱保存備用。

抗氧化酵素膠體活性分析³¹⁻³³

Native-PAGE 及 superoxide dismutase (SOD) 活性染色：以 10% Native-PAGE 將細胞中的蛋白質電泳分離。而 SOD 活性染色則利用 NBT、Vit B₂ 可與 SOD 的相互作用而呈色；NBT 是一種呈色劑，可被 superoxide anion 即 Vit B₂ 所誘導呈色，而 SOD 則是一種相對的拮抗劑會使 NBT 無法呈色，故以 SOD 活性染色法染色會使整片 PAGE 呈現藍紫色，而僅在 SOD 存在的區域會出現空白帶。

抗氧化酵素基因表達分析³⁴⁻³⁵

每個樣品取約 1~5 μg 的 RNA，依照 First-Strand System kit (Invitrogen, USA) 的步驟，先和 10 mM dNTP、Oligo dT 混合在 65°C 加熱 5 分鐘，放置冰上至少 1 分鐘，然後混合 reverse transcription (RT) buffer、25 mM MgCl₂、0.1 M DTT 在 42°C 下加熱 2 分鐘，再加入 reverse transcriptase 在 42°C 下反應 50 分鐘、70°C 下 15 分鐘，冷卻至 4°C 保存。取適量的 cDNA 分別加入不同抗氧化酵素的引子(表一)進行聚合鏈鎖反應(PCR)，PCR 產物以 agarose 膠體電泳進行電泳分離、ethidium bromide 染色後照相後分析定量。

結果

山藥保護氧化 DNA 傷造的活性

二價銅離子或鐵離子與過氧化氫所造成的芬頓氏反應(Fenton reaction)可有效造成牛胸腺 DNA 的傷害，降低螢光染劑 ethidium bromide 與 DNA 間之鍵結，然後造成螢光值下降(圖一)。在芬頓氏反應進行前加入山藥水萃物則可明顯抑制該反應在牛胸腺 DNA 所造成之傷害。另外山藥水萃物處理也可有效降低二價銅離子在人類淋巴母細胞所造成的核 DNA 傷害，但對二價鐵離子所造成的核 DNA 傷害則無明顯抑制作用(圖二)。

抗氧化酵素在 native-PAGE 膠體之活性染色

分別以純抗氧化酵素 catalase、superoxide dismutase 及 glutathione peroxidase 進行量測抗氧化酵素在 native-PAGE 膠體內之染色發現大鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞可明顯檢出具 superoxide dismutase 及 catalase 活性的條帶各一條，檢出敏感度 catalase 大於 superoxide dismutase，相差約 15 倍(圖四、圖五)。然而 glutathione peroxidase 的檢出條帶圖譜與 superoxide dismutase 幾乎完全相同，無專一之鑑別率(圖三)，故在本研究之後不進行 glutathione peroxidase 在膠體的活性染色。大鼠肝細胞處理 0.5%~2%山藥水萃物 48 小時後，發現 superoxide dismutase 在 native-PAGE 膠體活性染色之條帶寬度及亮度增加，酵素活性隨山藥處理濃度增加而明顯增加的趨勢，但條帶數目仍維持一條，並無明顯同功酵素表達上的改變(圖六)；然而山藥水萃物處理大鼠初代肝細胞則發現 catalase 在 native-PAGE 膠體的活性染色呈現略為下降的趨勢(數據未列入)。另以山藥水萃物處理人類肝癌細胞 HepG2 也發現 superoxide dismutase 活性增加而 catalase 略

為下降的趨勢，與大鼠初代肝細胞所得結果相似。

山藥對 acetaminophen 造成肝細胞死亡的影響

人類肝癌細胞 HepG2 處理 1.25 mM ~ 10 mM acetaminophen 48 小時，在 5 mM 及 10 mM 處理組造成明顯的細胞死亡，比率分別為 35% 及 50% (圖七)。採用 5 mM acetaminophen 同時處理山藥水萃物 48 小時，發現山藥濃度在 1% 及 2% 濃度有明顯增加 acetaminophen 造成的細胞毒殺性，其餘濃度則無明顯影響 acetaminophen 造成 HepG2 的細胞死亡的影響(圖九)。

山藥水萃物處理對抗氧化酵素基因表達之影響

HepG2 細胞處理 0.5% 或 1.0% 山藥水萃物 48 小時，收集細胞製備細胞總 RNA，然後進行細胞內之 catalase, CuZn-SOD, Mn-SOD, glutathione peroxidase, phospholipids glutathione peroxidase, glutathione reductase 等抗氧化酵素基因之 RT-PCR 分析，各基因表達成度以相對於 GAPDH 內標基因表達程度比評估。山藥水萃物處理下發現對 HepG2 細胞中 CuZnSOD 基因的表現有明顯增加表現的趨勢，在 1.0% 山藥水萃物處理下 CuZn-SOD 表現約增加 50%，此外 catalase 的表現也有少許增加，其餘抗氧化酵素基因(glutathione reductase、glutathione peroxidase 及 phospholipid peroxidase)表現則不受山藥水萃物處理而改變(圖十)。另本研究所使用的 Mn-SOD 引子無法放大複製出明顯的 PCR 產物。

討論

本研究利用大鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞 HepG2 探討山藥水萃物可能的保肝活性及可能的分子機轉。發現山藥水萃物可明顯調節大鼠初代肝細胞及 HepG2 細胞中抗氧化酵素的表現，可明顯增加細胞中 CuZn-SOD 酵素活性及增加 CuZn-SOD 及 catalase 基因 mRNA 的表現，但卻些微降低 catalase 活性。目前的研究發現許多藥用或保健植物的萃取物質可改變細胞內抗氧化酵素基因的表現，如牛樟芝³⁶、黃精³⁷、葛根³⁸、酸模³⁹、銀杏葉⁴⁰等，但對於這些萃取物對細胞內抗氧化酵素表現的提升或甚至降低所扮演的保健意義仍不清楚。本研究以 HepG2 細胞同時處理山藥和 acetaminophen，意外發現山藥水萃物不但無法降低 acetaminophen 所造成之細胞毒性，高濃度 >10% 時更有促進 acetaminophen 在 HepG2 細胞所造成的活性，而且此現象並非因高濃度山藥萃取物處理直接造成 HepG2 細胞死亡所導致，因為山藥水萃物在目前的使用劑量下的細胞毒性其實很低(圖八)。最近的文獻卻指出台農二號山藥水萃物可保護 acetaminophen 造成 Wistar 鼠肝臟組織的壞疽(necrosis)⁴¹，這項衝突可能來自動物模式與細胞模式的系統差異，也可能來自細胞型態(鼠肝細胞與人類肝細胞株)與不同細胞生理(正常與癌細胞)的差異，當然也可能來自山藥組成分之不同所導致，亟待進一步研究釐清，對了解山藥的保肝活性及其可能的作用機制幫助很大。Acetaminophen 造成細胞死亡的機制一般的證據認為，acetaminophen 經 cytochrome P450 酵素的代謝產物與細胞內巨分子形成內轉體或間接釋放 reactive oxygen species 攻擊粒線體造成細胞死亡為主要可能機制⁴²。最近的文獻指出高量表達細胞內 superoxide dismutase 或血漿型 glutathione peroxidase (extracellular GPx) 之轉殖鼠(transgenic mice)表現對 acetaminophen 高度的抗拒性，

但若高量表現細胞內 glutathione peroxidase 則提高對 acetaminophen 的敏感性，推測 acetaminophen 的細胞毒性，glutathione peroxidase 可能參與細胞內代謝 acetaminophen 形成致毒性的產物⁴³。本研究發現山藥水萃物可同時增加 superoxide dismutase 基因的 mRNA 表現及酵素活性，理應發揮抑制 acetaminophen 在 HepG2 細胞所造成之細胞毒性，但結果卻相反，是否山藥水萃物處理在升高 superoxide dismutase 表現降低 catalase 酵素活性的同時，伴隨有 intracellular glutathione peroxidase 酵素活性的上昇，然後造成 HepG2 細胞對 acetaminophen 敏感性的提升，改良本研究中 glutathione peroxidase 在膠體活性之染色法分析之辨識專一性，可進行詳細的探討。

結論與建議

1. 山藥水萃物具明顯抗氧化活性可有效抑制芬頓氏反應所造成之牛胸腺 DNA 傷害；對二價銅離子在人類淋巴母細胞造成的核 DNA 傷害也有很強的抑制作用。
2. 山藥水萃物處理人類肝癌細胞 HepG2 及大鼠初代肝細胞明顯增加 Cu-Zn superoxide dismutase 酵素活性，但卻略微降低 catalase 酵素的活性。
3. 山藥水萃物處理人類肝癌細胞 HepG2 明顯增加細胞內 Cu-Zn superoxide dismutase 的 mRNA 表達及 catalase mRNA 表現少量增加，然而對 glutathione peroxidase、phospholipid glutathione peroxidase 及 glutathione reductase mRNA 表現則無明顯影響。
4. 山藥水萃物與 acetaminophen 共同處理無法抑制其在 HepG2 細胞所造成之細胞毒殺性，在高濃度下 0.5%、1% 甚至會加劇 acetaminophen 所造成之細胞毒殺性。

本研究首次確認山藥水萃物可調結大鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞 HepG2 中 Cu-Zn superoxide dismutase 及 catalase 的酵素活性及 mRNA 表達，然而此調節功能在保護肝臟功能之角色，仍須藉藉由其他不同肝毒素作進一步之探討。

參考文獻

1. Wanasundera JP, Ravindran G. Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. *Plant Foods Hum Nutr.* 1994; 46(1): 33-9.
2. Tang SR. Analysis of nutrient constituents in *Dioscorea opposita*. *Zhong Yao Tong Bao.* 1987; 12(4): 36-8.
3. Sautour M, Mitaine-Offer AC, Miyamoto T, Dongmo A, Lacaille-Dubois MA. Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Med.* 2004; 70(1): 90-2.
4. Atindehou KK, Kone M, Terreaux C, Traore D, Hostettmann K, Dosso M. Evaluation of the antimicrobial potential of medicinal plants from the Ivory Coast. *Phytother Res.* 2002; 16(5): 497-502.
5. Aderiyi BI, Ogundana SK, Adesanya SA, Roberts MF. Antifungal properties of yam (*Dioscorea alata*) peel extract. *Folia Microbiol (Praha).* 1996; 41(5): 407-12.
6. Chen PY, Tu YX, Wu CT, Jong TT, Chang CM. Continuous hot pressurized solvent extraction of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging compounds from Taiwan yams (*Dioscorea alata*). *J Agric Food Chem.* 2004; 52(7): 1945-9.
7. Chang SJ, Lee YC, Liu SY, Chang TW. Chinese yam (*Dioscorea alata* cv. Tainung No. 2) feeding exhibited antioxidative effects in hyperhomocysteinemia rats. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(6): 1720-5.
8. Wang TS, Liang SJ, Lii CK, Liu SY. Protective effect of water yam (*Dioscorea alata* L.) extract on the copper-driven fenton reaction and X-ray induced DNA damage in vitro. *Phytother Res.* 2004; 18(4): 325-8.

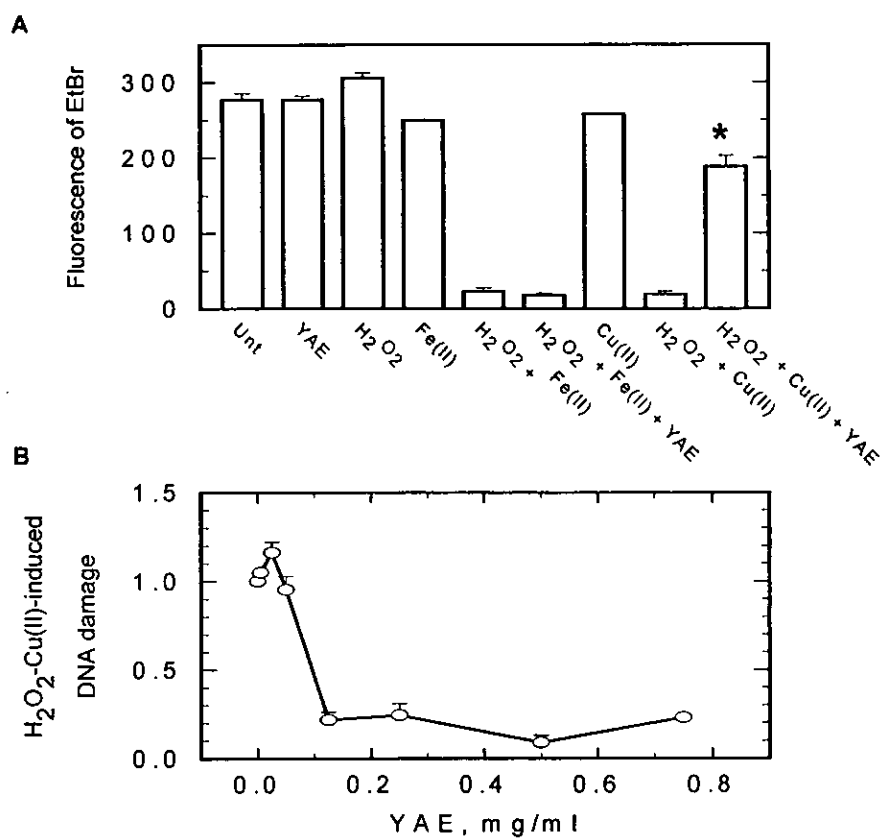
9. Hou WC, Hsu FL, Lee MH. Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. *Planta Med.* 2002; 68(12): 1072-6.
10. Hou WC, Lee MH, Chen HJ, Liang WL, Han CH, Liu YW, Lin YH. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(10): 4956-60.
11. Araghiniknam M, Chung S, Nelson-White T, Eskelson C, Watson RR. Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sci.* 1996; 59(11): PL147-57.
12. Wang SL, Cai B, Cui CB, Liu HW, Wu CF, Yao XS. Diosgenin-3-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1 --> 4)-beta-D-glucopyranoside obtained as a new anticancer agent from *Dioscorea futschauensis* induces apoptosis on human colon carcinoma HCT-15 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. *J Asian Nat Prod Res.* 2004; 6(2): 115-25.
13. Hu K, Yao X. The cytotoxicity of methyl protodioscin against human cancer cell lines in vitro. *Cancer Invest.* 2003; 21(3): 389-93.
14. Itharat A, Plubrukarn A, Kongsaree P, Bui T, Keawpradub N, Houghton PJ. Dioscorealides and dioscoreanone, novel cytotoxic naphthofuranoxepins, and 1,4-phenanthraquinone from *Dioscorea membranacea* Pierre. *Org Lett.* 2003; 5(16): 2879-82.
15. Hu K, Yao X. The cytotoxicity of methyl protoneogracillin (NSC-698793) and gracillin (NSC-698787), two steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells in vitro. *Phytother Res.* 2003; 17(6): 620-6.

16. Hu K, Yao X. The cytotoxicity of protoneodioscin (NSC-698789), a furostanol saponin from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells in vitro. *Phytomedicine*. 2002; 9(6): 560-5.
17. Hu K, Yao XS. The cytotoxicity of methyl protoneodioscin (NSC-698791) against human cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res*. 2002; 22(2A): 1001-5.
18. Hu K, Yao X. Protodioscin (NSC-698 796): its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in an anticancer drug screen panel. *Planta Med*. 2002; 68(4): 297-301.
19. Hu K, Yao X. Methyl protogracillin (NSC-698792): the spectrum of cytotoxicity against 60 human cancer cell lines in the National Cancer Institute's anticancer drug screen panel. *Anticancer Drugs*. 2001; 12(6): 541-7.
20. Choi EM, Koo SJ, Hwang JK. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *J Ethnopharmacol*. 2004; 91(1): 1-6.
21. Chen H, Wang C, Chang CT, Wang T. Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. *Nutrition*. 2003; 19(7-8): 646-51.
22. Ma HY, Zhao ZT, Wang LJ, Wang Y, Zhou QL, Wang BX. Comparative study on anti-hypercholesterolemia activity of diosgenin and total saponin of *Dioscorea panthaica*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2002; 27(7): 528-31.

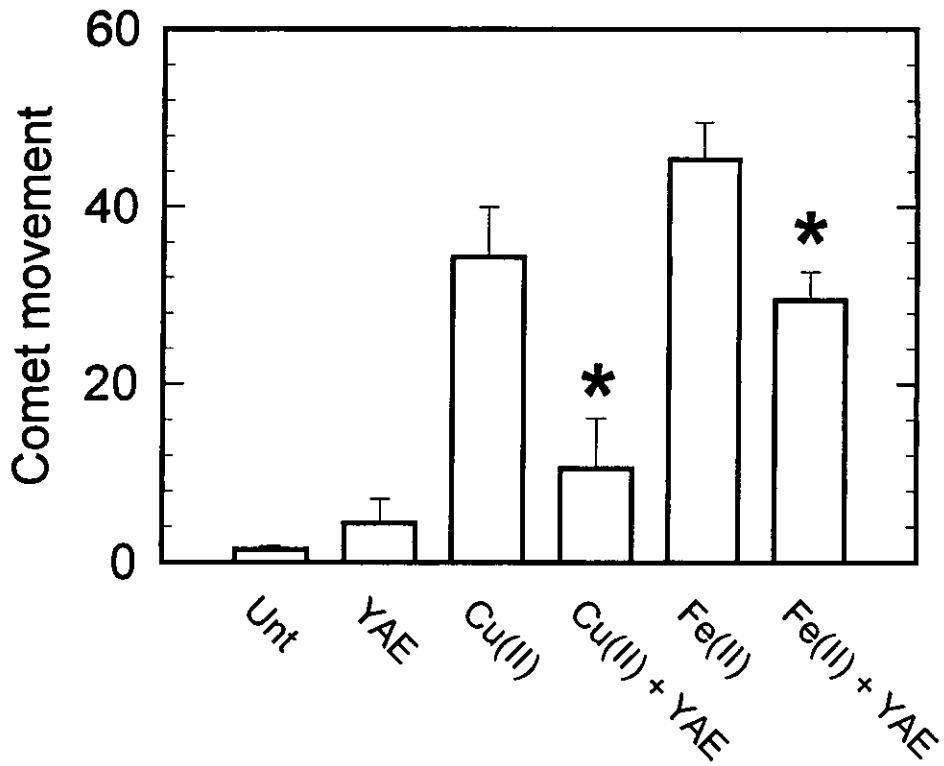
23. Kwon CS, Sohn HY, Kim SH, Kim JH, Son KH, Lee JS, Lim JK, Kim JS. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003; 67(7): 1451-6.
24. Kim MJ, Kim HN, Kang KS, Baek NI, Kim DK, Kim YS, Kim SH, Jean BH. Methanol extract of *Dioscoreae Rhizoma* inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4(12): 1489-97.
25. Li S, Lu AP, Wang YY, Li YD. Suppressive effects of a Chinese herbal medicine qing-luo-yin extract on the angiogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *Am J Chin Med*. 2003; 31(5): 713-20.
26. Yin J, Tezuka Y, Kouda K, Le Tran Q, Miyahara T, Chen Y, Kadota S. In vivo antiosteoporotic activity of a fraction of *Dioscorea spongiosa* and its constituent, 22-O-methylprotodioscin. *Planta Med*. 2004; 70(3): 220-6.
27. Yin J, Tezuka Y, Kouda K, Tran QL, Miyahara T, Chen Y, Kadota S. Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27(4): 583-6.
28. Yin J, Kouda K, Tezuka Y, Le Tran Q, Miyahara T, Chen Y, Kadota S. New diarylheptanoids from the rhizomes of *Dioscorea spongiosa* and their antiosteoporotic activity. *Planta Med*. 2004; 70(1): 54-8.
29. Lee SC, Tsai CC, Chen JC, Lin CC, Hu ML, Lu S. The evaluation of reno- and hepatoprotective effects of huai-shan-yao (Rhizome *Dioscoreae*). *Am J Chin Med*. 2002; 30(4): 609-16.

30. Tsai CF, Lii CK, Yang JJ, Liu K, Lin WL, Chen HW. Prostaglandin E2 is involved in the increase of cytochrome P-450 2B1 expression by alpha-tocopheryl succinate in primary rat hepatocytes in the presence of phenobarbital. *Nutr Cancer*. 2001; 41(1-2): 188-95.
31. Lin CL, Chen HJ, Hou WC. Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 2002; 23(4): 513-6.
32. Chen J, Liao C, Mao SJ, Chen T, Weng C. A simple technique for the simultaneous determination of molecular weight and activity of superoxide dismutase using SDS-PAGE. *J Biochem Biophys Methods*. 2001; 47(3): 233-7.
33. Woodbury W, Spencer AK, Stahman MA. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem*. 1971; 44(1): 301-5.
34. Hasegawa Y, Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, Yoshida H, Kuma K, Amino N. Decreased expression of catalase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2003; 33(1): 6-9.
35. Yoshiko S, Naomi A, Ryouko U, Emiko K, Maki H, Tadashi K. Induction of antioxidant enzymes by FAK in a human leukemia cell line, HL-60. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1683: 22-32.
36. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, Lin CH, Su CH, Sheu JR. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(11): 3302-8.
37. Jeon SM, Lee MK, Park YB, Park HM, Choi MS. *Polygonatum rhizoma* affects antioxidant defense systems without changing

- mRNA expression in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *J Med Food*. 2004; 7(3): 358-65.
38. Lee JS. Supplementation of *Pueraria radix* water extract on changes of antioxidant enzymes and lipid profile in ethanol-treated rats. *Clin Chim Acta*. 2004; 347(1-2): 121-8.
 39. Cetinkaya O, Silig Y, Cetinkaya S, Demirezer LO. The effects of *Rumex patientia* extract on rat liver and erythrocyte antioxidant enzyme system. *Pharmazie*. 2002; 57(7): 487-8.
 40. Lin SY, Chang HP. Induction of superoxide dismutase and catalase activity in different rat tissues and protection from UVB irradiation after topical application of *Ginkgo biloba* extracts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1997; 19(6): 367-71.
 41. Lee SC, Tsai CC, Chen JC, Lin JG, Lin CC, Hu ML, Lu S. Effects of "Chinese yam" on hepato-nephrotoxicity of acetaminophen in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23(6): 503-8.
 42. Bartlett D. Acetaminophen toxicity. *J Emerg Nurs*. 2004; 30(3): 281-3.
 43. Mirochnitchenko O, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Chen L, Yang C, Inouye M. Acetaminophen toxicity. Opposite effects of two forms of glutathione peroxidase. *J Biol Chem*. 1999; 274(15): 10349-55.



圖一、山藥水萃物對芬頓氏反應(CuSO₄+H₂O₂)造成牛胸腺 DNA 傷害之保護作用。

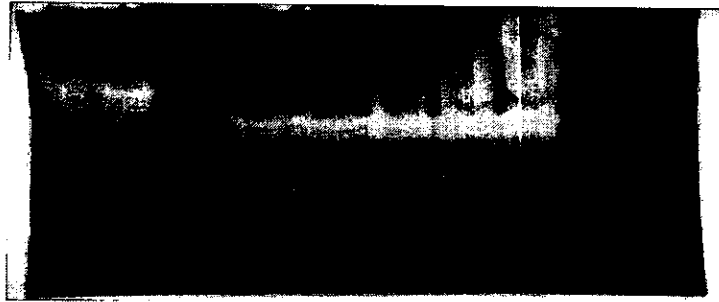


圖二、山藥水萃物對二價銅及鐵離子造成人類淋巴母細胞 DNA 傷害之保護做用。山藥分別與 25 μM CuSO_4 或 300 μM FeSO_4 在 HBSS 中處理人類淋巴母細胞 2 小時，DNA 傷害程度以慧星分析法進行分析。

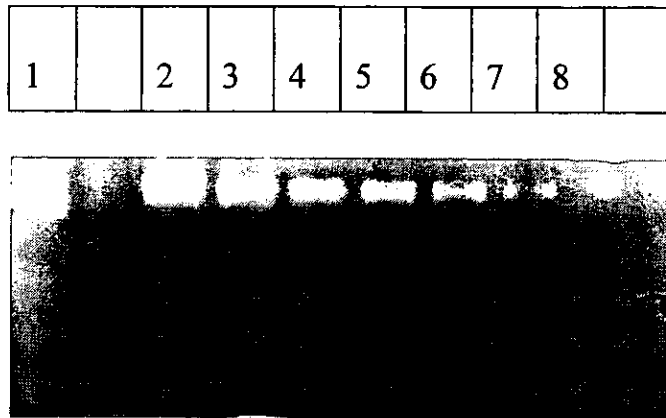


圖三、超氧歧化酵素、胱氨酸過氧化酵素及過氧化氫酵素膠體活性染色之比較。Lane 1: 純超氧歧化酵素(5 U)、lane 2: 純過氧化氫酵素(1 μg)、lane 3: 大鼠初代肝細胞總蛋白質 500 μg 、lane 4: 大鼠初代肝細胞總蛋白質 30 μg 。Superoxide dismutase 染色加入 KCN 抑制劑(I), superoxide dismutase 活性染色 (II), glutathione peroxidase 活性染色 (III), catalase 活性染色 (IV)。

1	2		3	4	5	6	7		
---	---	--	---	---	---	---	---	--	--

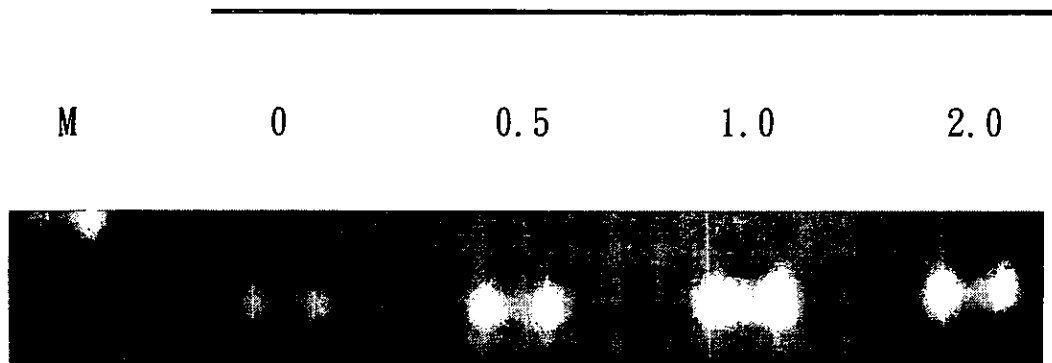


圖四、純酵素與大鼠肝初代肝細胞超氧歧化酵素(superoxide dismutase)活性染色。純酵素 6.25 U (lane 1)、3.125 U (lane 2), 初代大鼠肝細胞總蛋白質 50 μg (lane 3)、100 μg (lane 4)、200 μg (lane 5)、400 μg (lane 6)、800 μg (lane 7)。

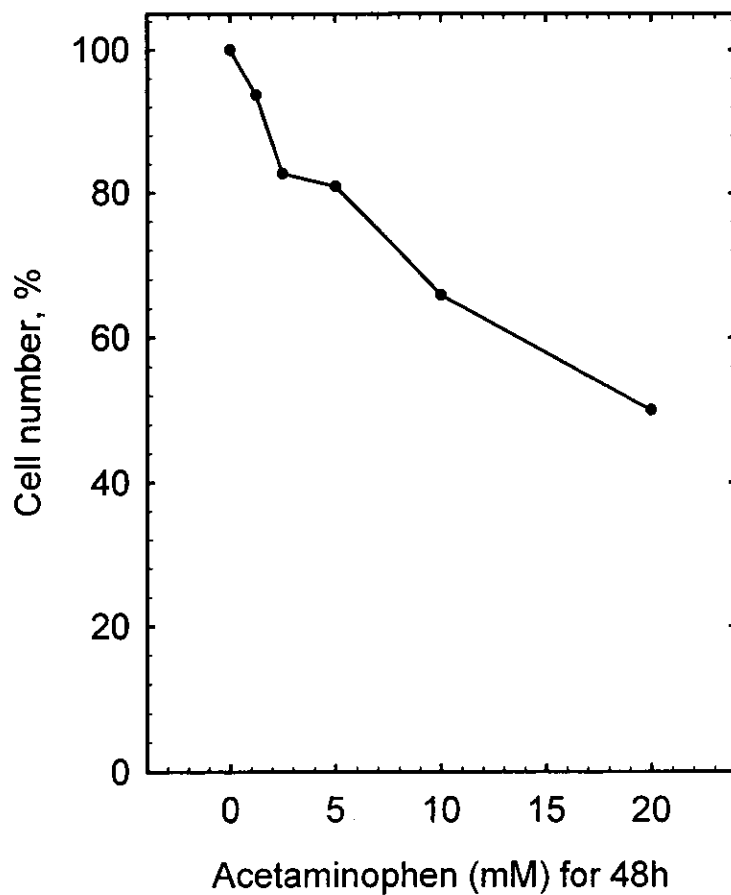


圖五、純酵素與大鼠肝初代肝細胞過氧化氫酵素蛋白活性染色。純酵素 1.5 μg (lane 1)、大鼠初代肝細胞總蛋白質 150 μg (lane 2)、100 μg (lane 3)、50 μg (lane 4)、25 μg (lane 5)、12.5 μg (lane 6)、6.25 μg (lane 7)、3.125 μg (lane 8)、1.5625 μg (lane 9)。

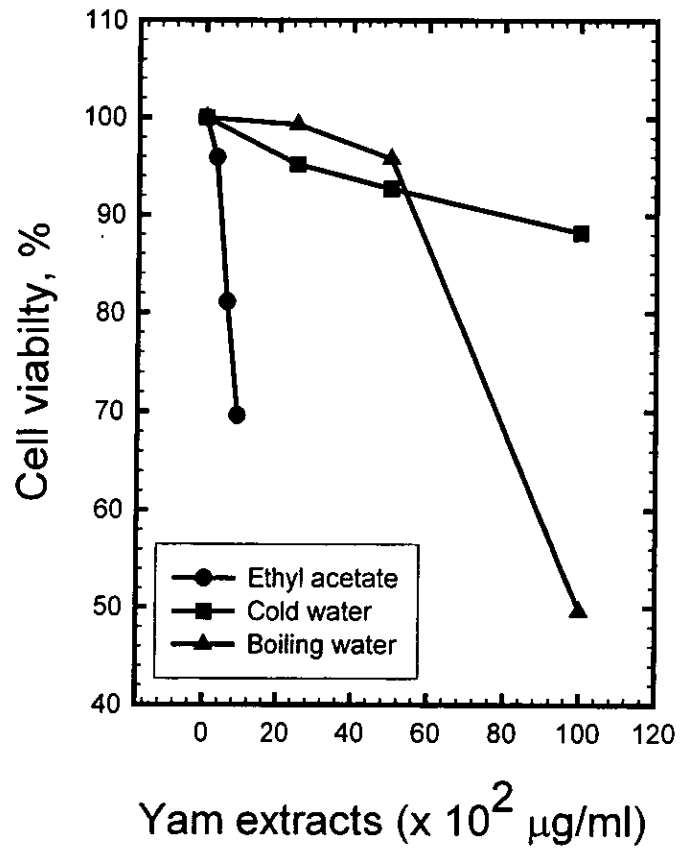
山藥水萃物 (%)



圖六、山藥水萃物處理對大鼠初代肝細胞中 superoxide dismutase 活性的影響。大鼠初代肝細胞經山藥水萃物(5%~20%)處理 48 小時後收集細胞製備細胞總蛋白溶解液，取 100 μg 蛋白經 native-PAGE 分離，染色法測量 SOD 在膠體中之活性。M: 純 SOD 酵素(6.25U)。

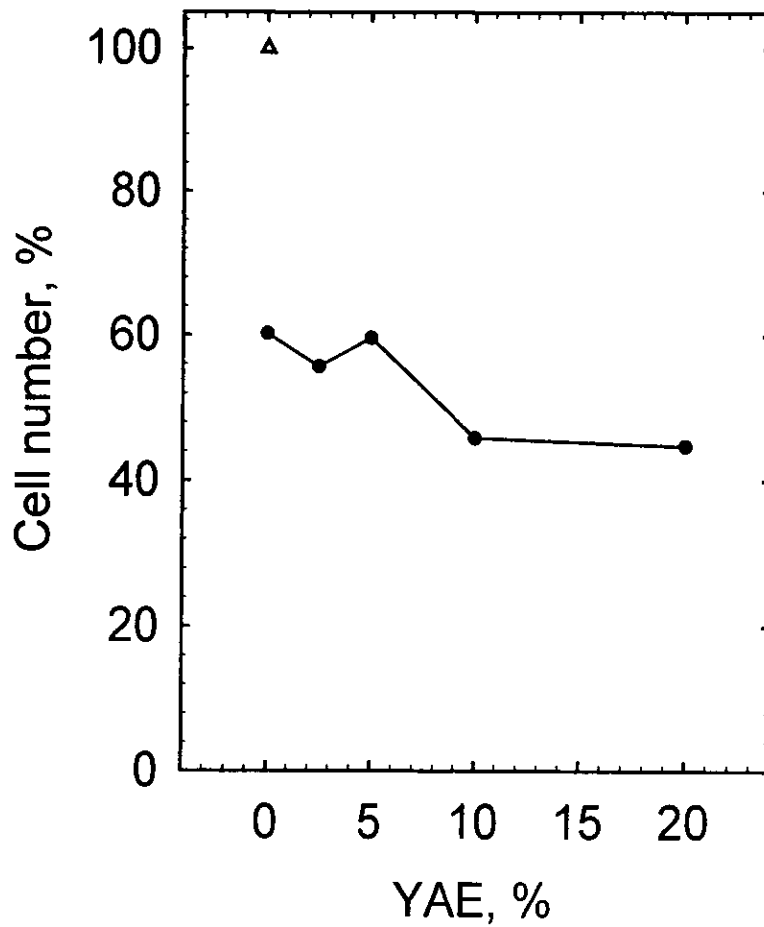


圖七、Acetaminophen 造成人類肝癌細胞 HepG2 之細胞毒性。HepG2 細胞處理 acetaminophen (1.25 mM ~ 20 mM) 48 小時後，計算總細胞數目，以相對於未處理組之總細胞數目之百分比表示。

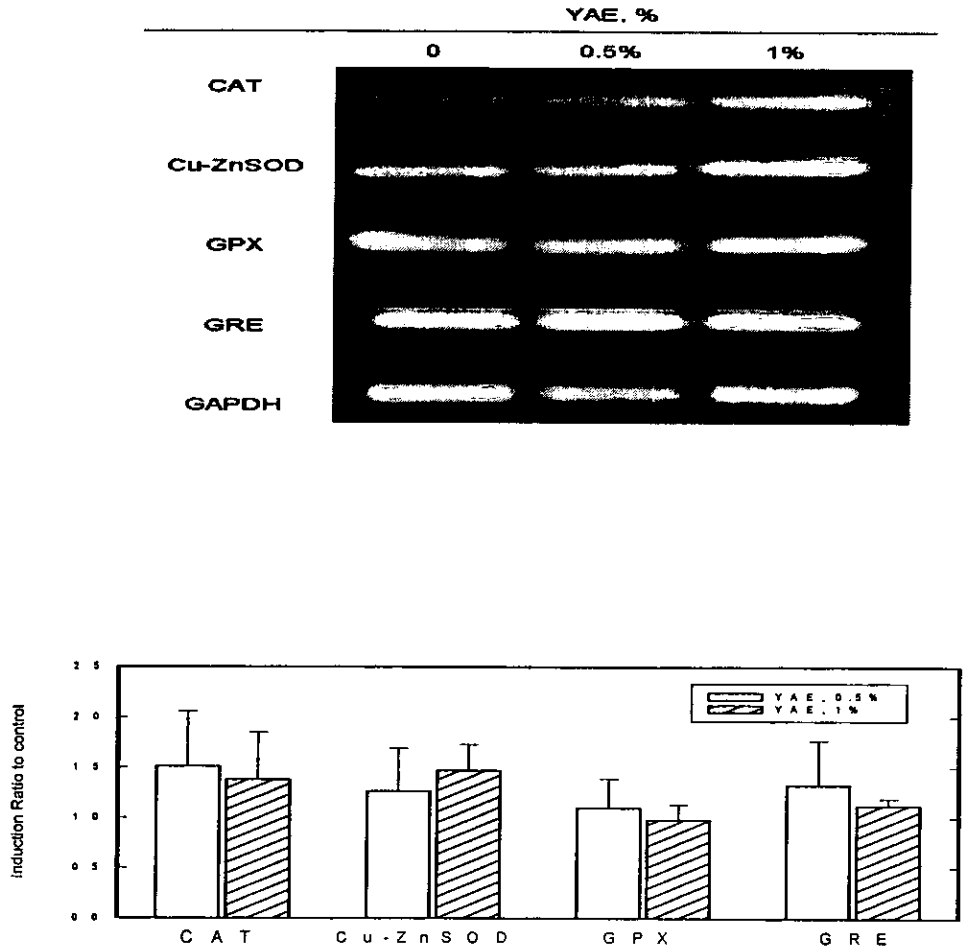


圖八、台農二號山藥乙酸乙酯萃物、沸水萃物及冷水萃物對 HepG2

肝細胞的細胞毒殺性。



圖九、山藥水萃物處理對 acetaminophen 造成人類肝癌細胞 HepG2 細胞毒殺之影響。山藥水萃物不同濃度(2.5% ~ 20%)與 10%共同處理 HepG2 細胞 48 小時，以計算總細胞數目相對於對照組總細胞數目比值評估處理間效應。



圖十、山藥水萃物對人類肝癌細胞抗氧化酵素基因表達之影響。人類肝癌細胞 HepG2 經 5%或 10%山藥水萃物處理 48 小時後，收集細胞製備 RNA 然後以特殊引子進行抗氧化基因之 RT-PCR 分析。各抗氧化基因之表現強度以相對內標基因 GAPDH 之表達比率表示。

表一、人類抗氧化基因表現分析所使用之引子序列。

Antioxidant enzyme	Primer sequence	Size (bp)
Glutathione reductase	5'-cagtgggactcacggaagat-3'	220
	5'-ttcactgcaacagcaaaacc-3'	
Glutathione peroxidase	5'-ctcttcgagaagtgcgaggt-3'	236
	5'-tcgatgtcaatggctctggaa-3'	
Phospholipid hydroperoxidase	5'-tcagcaagatctgcgtgaac-3'	195
	5'-ggggcaggctccttctctatc-3'	
Catalase	5'-ttaatccattcgatctcacc-3'	210
	5'-ggcggtagtgcaggatag-3'	
CuZn superoxide dismutase	5'-cagtgcaggctcctcactta-3'	240
	5'-cctgtctttgtactttcttc-3'	
Mn superoxide dismutase	5'-ggtggtcatatcaatcata-3'	260
	5'-agtgaataaggtttgtgt-3'	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5'-ccaccatggcaattccatggca-3'	598
	5'-tctagacggcaggctcaggccacc-3'	