

美和學校財團法人美和科技大學

100 年度教師產學合作計畫 結案報告書

計畫名稱：地膚子萃取物之抗發炎活性評估

計畫編號：100-FI-DBS-IAC-R-001

計畫期間：100.02.01---100.12.31

計畫主持人：鄭智交

共同主持人：王正隆、陳威全

研究助理：

經費總額：50,000 元

經費來源：芳勳諾生技有限 公司

地膚子萃取物之抗發炎活性評估

中文摘要

本研究主要是在探討地膚子萃取物的抗發炎活性，及其應用於功能性化粧品之可能性評估。

地膚子 (*Fructus kochiae Scopariae.*)為藜科植物地膚的成熟果實，一年生草本，味苦，性寒。

成份：含三萜類及其苷有齊墩果酸 (oleanolic acid) 等，一些飽和脂肪酸混合物和甾體成份有 20-羥基甾皮素 (20-hydroxyecdysone)、20-羥基-24-甲基甾皮素 (20-hydroxy-24-methylecdysone) 等。藥理作用：具有抗病原微生物作用及抗發炎作用。

我們利用 lipopolysaccharide (LPS) 刺激巨噬細胞產生大量的一氧化氮的發炎試驗，來評估地膚子萃取物的抗發炎活性。結果顯示，地膚子粗萃液具有明顯的抑制效果，其抑制 50% 之 LPS 誘發的 NO 生成量產生時的濃度 (IC₅₀) 為 29.3±2.1 μg/mL。

本研究以免疫細胞為主，建立抗發炎活性之評估系統。以作為發展美容生技之基礎研究，以利有效開發中草藥美容生技化粧品有效成分。

- 1、本研究有效的運用抗發炎活性之檢測系統，評估地膚子之抗發炎活性。
- 2、本研究將為本系建立抗發炎活性成分之篩選系統，並逐步提升本系對美容生技產業研究之實力。

對參與本計畫的研究人員，研究期間可獲得細胞培養及細胞活性檢測平台相關知識，並熟悉相關研究的實驗技術。因此，對美容生技產業研發人才之培育助益良多。

關鍵詞：地膚子、抗發炎、LPS、巨噬細胞

一、前言

地膚子 *Fructus Kochiae Scopariae*。為藜科植物地膚的成熟果實，一年生草本，味苦，性寒。成份：含三萜類及其苷有齊墩果酸 (oleanolic acid) 等，一些飽和脂肪酸混合物和甾體成份有 20-羥基甾皮素 (20-hydroxyecdysone)、20-羥基-24-甲基甾皮素 (20-hydroxy-24-methylecdysone) 等。藥理作用：具有抗病原微生物及抗發炎作用。對 2,4,6-三硝基甲苯所引起的接觸性皮炎有抑制作用。

Nitric oxide (NO) 和超氧自由基一樣也是自由基，活性雖不是很強，但具有三種重要的生理活性。分述如下：(1) 在心血管系統中 NO 由內皮細胞產生，可活化平滑肌細胞的 guanylate cyclase，使細胞內 cGMP 升高而使血管放鬆 (Ma *et al.*, 1993)。(2) 在免疫系統中，巨噬細胞產生的 NO，可以毒殺癌細胞或細胞內的病原體 (Wei *et al.*, 1995)。(3) 在神經系統中，NO 可扮演細胞與細胞之間的傳遞分子 (Lander, 1997)。

NO 是由 NOS (NO synthase) 所合成，目前所知的 NOS 可分為三種 (Forstermann *et al.*, 1995)：(1) endothelial NOS (eNOS or NOS III) 分佈於內皮細胞、表皮細胞 (epithelial cells)，心肌細胞等。(2) neuronal NOS (nNOS or NOS I) 分佈於神經細胞、骨骼肌等。(3) inducible NOS (iNOS or NOS II) 分佈於巨噬細胞、肝臟細胞、平滑肌及骨骼肌等。

此三種 NOS 活化時皆需要一些輔助因子參與，包括 calmodulin (CaM)，flavin adenine dinucleotide (FAD)，flavin mononucleotide (FMN) 及 tetrahydrobiopterin (BH₄) (Knowles *et al.*, 1994)。nNOS, iNOS 為 cytosolic protein，eNOS 則為 membrane-bound protein。此外 nNOS, eNOS 皆是持續性地表現，會受到細胞內鈣離子 ([Ca²⁺]_i) 的調控，其 NO 產量皆很少。而 iNOS 則不受 [Ca²⁺]_i 調控，且細胞未活化時是不表現的，唯有當細胞受到 (lipopolysaccharide) LPS 或 pro-inflammatory cytokines 等的刺激才會表現 (Morris *et al.*, 1994)。一旦表現出來，便會大量的產生 NO，而且持續很長一段時間。因此，可作為抗發炎活性成分之篩選平台。

本研究主要目的是探討地膚子萃取物在此抗發炎活性篩選平台之表現，以作為其應用於功能性化粧品之可行性評估。

二、研究方法

地膚子粗萃液

本研究所使用的地膚子，先磨成粉後浸泡於 75% 酒精中五倍體積，即 10g 的地膚子取 50mL 的 75% 酒精，浸泡兩週後，離心取上清液備用。

亞硝酸試驗 (nitrite assay)

測量培養液中亞硝酸的濃度，做為 NO 產生的指標。方法是根據 Griess reaction (Green *et al.*, 1982) 而來。簡言之，將 5×10^4 cells/0.2ml 種在 96-well plates 上，在 phenol-red free DMEM 培養液中培養 24 小時。細胞先以 BCA 處理 20 分鐘後，再給予 LPS (1 μ g/ml) 刺激 24 小時後，測量培養液中 nitrite 的含量。nitrite 的測法是取 60 μ l 的 Griess reagents (其組成分為 20 μ l 6.5 M HCl、20 μ l 37.5 mM sulfanilamide 及 20 μ l 12.5 mM N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine dihydrochloride)，加入 200 μ l 的培養液中靜置 10 分鐘後，用 EL312e microplate reader (Bio-Tek) 測 550 吸光值。nitrite 的含量可利用 NaNO_2 標準曲線換算而來。

西方點墨法分析 (Western blot analysis)

將細胞培養在 6-well 的培養皿上，等細胞長滿後 (約 2×10^6 cells/well)，在藥物存在或不存在下，給予 LPS (1 μ g/ml) 刺激 24 小時。然後細胞以冰冷-PBS 清洗兩次，再以 lysis buffer (20 mM Tris/HCl (pH7.4), 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml leupeptin 和 20 μ g/ml aprotinin) (Chen *et al.*, 1999) 將其刮下；然後在 4°C 下超音波震盪 20 sec。將含 50 μ g protein 的萃取液以電泳分離 (7.5% PAGE for iNOS, 10% PAGE for I κ B and I κ B α -P)，然後再轉印 (transfer) 至 PVDF membrane (Millipore)，將 membrane 浸泡在 blocking solution (5% nonfat dried milk 和 0.1% Tween 20) 室溫下 1 小時。然後，將 membrane 浸泡在含 anti-iNOS, anti-I κ B 或 anti-I κ B α -P 抗體的浸泡液中，在 4°C 下隔夜。再將 membrane 浸泡在鑲有 alkaline-phosphatase 的二級抗體 (即抗 IgG 的抗體) 緩衝溶液中 2 小時，最後 membrane 再以 PBST (0.1% Tween-20 in PBS) 清洗三次及 PBS 清洗兩次，再進行呈色反應。加入呈色劑 BCIP/NBT (bromo-chloro-indolyl-phosphate /nitro blue tetrazolium) 至呈色到適合濃度，將呈色劑洗掉即可。

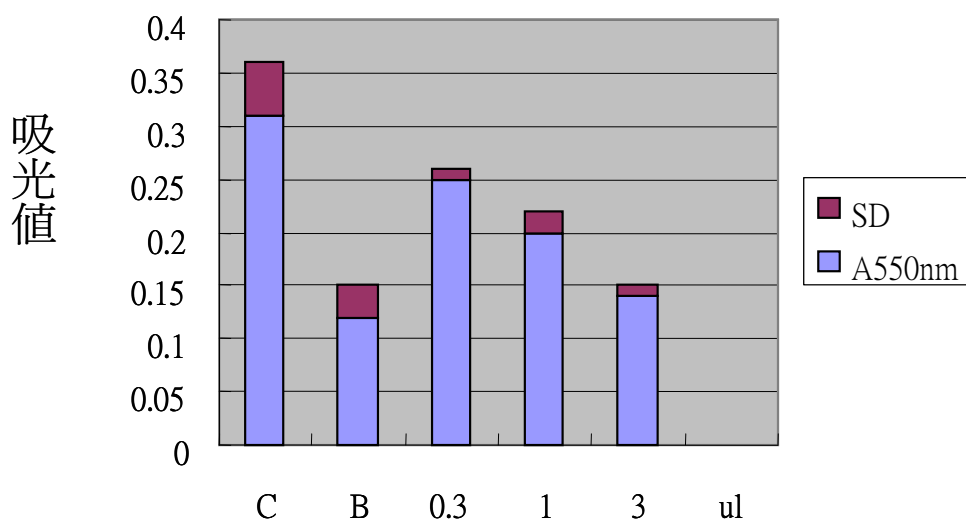
三、研究結果

地膚子粗萃液

10g 的地膚子取 50mL 的 75%酒精，浸泡兩週後，離心取上清液即得地膚子粗萃液。另外，將粗萃液置於乾燥皿中乾燥，計算出粗萃液的濃度為 37.6 mg/ml。

對 LPS 引發 NO 生成作用之抑制

為了探討地膚子是否影響 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬細胞產生 NO 的反應。因此，將 RAW264.7 細胞給予 LPS 刺激 24 小時，培養液中 nitrite 的含量明顯地增多(如圖一所示)，所以藉由測量培養液中 nitrite 的含量可作為 NO 生成量的指標。由圖一結果顯示，地膚子粗萃液具有明顯的抑制效果，其抑制 50%之 LPS 誘發的 NO 生成量產生時的濃度 (IC₅₀) 為 29.3±2.1μg/mL。



圖一 地膚子粗萃液對巨噬細胞產生NO之影響

結論：

- 1.本研究以免疫細胞為主，建立抗發炎活性之評估系統。以作為發展美容生技之基礎研究，以利有效開發中草藥美容生技化粧品有效成分。
- 2.本研究有效的運用抗發炎活性之檢測系統，評估地膚子之抗發炎活性。
- 3.本研究將為本系建立抗發炎活性成分之篩選系統，並逐步提升本系對美容生技產業研究之實力。對參與本計畫的研究人員，研究期間可獲得細胞培養及細胞活性檢測平台相關知識，並熟悉相關研究的實驗技術。因此，對美容生技產業研發人才之培育助益良多。

四、参考文献

Boppré M, Colegate SM, Edgar JA, Fischer OW (2008) **Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen.** *J Agric Food Chem.* 56(14):5662-72.

Chen, C.C. and Wang, J.K. (1999) p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol.* **55**: 481-488.

Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E.I. and Kleinert, H. (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* **50** : 1321-1332.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrite, nitrate, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.

Hall, E.D. and Braugher, J.M. (1989) Central nervous system trauma and stroke. *Free Radic. Biol. Med.* **6** : 303-313.

Harman, D. (2003) The free radical theory of aging. *Antioxidant Redox Signal* **5** : 557-561.

Helfrich, Y.R., et al (2008) Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology Nursing* **20(3)** : 177-183.

Ishikawa Y, Tokura T, Ushio H, Nivonsaba F, Yamamoto Y, Tadokoro T, Ogawa H, Okumura K (2009) **Lipid-soluble components of honeybee-collected pollen exert antiallergic effect by inhibiting IgE-mediated mast cell activation in vivo.** *Phytother Res.* 23(11):1581-6.

Kilbourn, R. (1997) Nitric oxide and shock. *Dis. Mon.* **43** :281-348.

Knowles, R.G. and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298** :249-258.

Lander, H.M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* **11** : 118-124.

Lee, C.M. (1997) Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic. Biol. Med.* **22**: 1259.

Ma, X.L., Weyrich, A.S., Lefer, D.J. and Lefer, A.M. (1993) Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ. Res.* **72** : 403-412.

- Maxwell, S.R.J. (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* **49**: 345-361.
- McCall, M.R. and Frei, B. (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans ? *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1034-1053.
- McCord, J.M. (1985) Oxygen-derived free radicals in post-ischaemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* **312** : 159-163.
- Mellors, A. and Tappel, A.L. (1966) The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **241** : 4353-4356.
- Modell, B., Letsky, E.A. and Flynn, D.M. (1982) Survival and desferrioxamine in thalassaemia major. *B.M.J.* **284** : 1081-1084.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43** : 109-142.
- Morris, S.M. and Billiar, T.R. (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.* **266** : E829-E839.
- Packer, J.E., Slater, T.F. and Wilson, R.L. (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **278** : 737.
- Qian B, Zang X, Liu X** (1990) Effects of bee pollen on lipid peroxides and immune response in aging and malnourished mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* May;**15(5)**:301-3, 319. Chinese.
- Sarić A, Balog T, Sobocanec S, Kusić B, Sverko V, Rusak G, Likić S, Bubalo D, Pinto B, Reali D, Marotti T** (2009) Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol.* **47(3)**:547-54.
- Sevenian, A. and Hochstein, P. (1985) Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **5** : 365-375.
- Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**: 291-295.
- Stadtman, E.R. and Berlett, B.S. (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabol. Rev.* **30**: 225-243.
- Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B. and Willett, W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.* **328** : 1444-1449.
- Stocker, R. and Frei, B. (1991) Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In Sies H, editor. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *London: Academic Press*, pp.213-243.

Szabo, A. (1995) Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.* **3**: 2-32.

Takahashi, K., Newberger, P.E. and Cohen, H.J. (1986) Glutathione peroxidase protein: absence in selenium-deficiency states and correlation with enzymatic activity. *J. Clin. Invest.* **77** :1402.

Turski MP, Turska M, Zgrajka W, Kuc D, Turski WA (2009) Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. *Amino Acids.* **36(1)**:75-80.

Wei, X.-Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.-J., Huang, F.-P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. and Liew, F.Y. (1995) Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375** : 408-411.

Wu YD, Lou YJ (2007) A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytother Res.* 21 (11) : 1087-91.

Xie Y, Wan B, Li W (1994) Effect of bee pollen on maternal nutrition and fetal growth. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* Dec;**25(4)**:434-7. Chinese.

Yamaguchi M (2006) Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. *Yakugaku Zasshi.* Nov;**126(11)**:1117-37. Review.