

# 訶子之抗氧化活性成分保護 PC12 細胞 對抗巴拉刈之毒性

陳華鑫<sup>1</sup>、張嘉麟<sup>2,\*</sup>、黃一凡<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 澄清綜合醫院中港分院藥劑部，台中，臺灣

<sup>2</sup> 弘光科技大學生物科技系（所），台中，臺灣

**背景：**PC12 cell line 乃源自大鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤之細胞株，可作為多巴胺源神經元 (dopaminergic neurons) 的研究模型，用於探索巴拉刈毒性及神經保護劑的體外研究模型之開發。**材料與方法：**本研究主要是探討訶子 95% 乙醇萃取物的分層萃取物（正己烷萃取物、二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物及水萃取物）抑制巴拉刈毒性而保護 PC12 細胞之作用，以及分析訶子 95% 乙醇萃取物的分層萃取物之總酚、總類黃酮、總單寧與粗三萜成分含量及清除 2- 對 -1,1- 二苯基苦基苯肼 (DPPH) 自由基、過氧化氫、氫氧根離子自由基與超氧陰離子的抗氧化作用。**結果：**水萃取物的總酚成分含量最高，二氯甲烷萃取物中總類黃酮、總單寧及粗三萜成分含量最高。抗氧化作用是乙酸乙酯萃取物對 DPPH 自由基、過氧化氫、氫氧根離子自由基與超氧陰離子的清除效果最佳，而且乙酸乙酯萃取物抑制巴拉刈毒性而保護 PC12 細胞的能力最佳。**結論：**訶子 95% 乙醇萃取物的乙酸乙酯萃取物抗氧化效力最佳能抑制巴拉刈毒性而保護 PC12 細胞，希望訶子成分將來能成為神經保護劑。

**關鍵字：**巴拉刈、PC12 細胞、訶子

---

\* 通訊作者：張嘉麟，弘光科技大學生物科技系（所），地址：台中市沙鹿區晉江里台灣大道六段 1018 號，電話：04-26318652 分機 5624，Email：clchang@sunrise.hk.edu.tw  
109 年 3 月 3 日受理，109 年 10 月 29 日接受刊載

## 前言

訶子 (*Terminalia chebula*) 是屬於使君子科 (Combretaceae) 落葉喬木之果實。它富含單寧，可為藥用。在古代文獻中已記載其味酸澀，以光澤黃棕色，堅硬者為佳 [1-3]。訶子是著名的治喉痛中藥，常被用作收斂劑，主要藥效成分為多種可水解性單寧 (hydrolysable tannin: gallic acid、chebulic acid、punicalagin、chebulanin、corilagin、neochebulinic acid、ellagic acid、chebulagic acid、chebulinic acid、1,6,-di-O-galloyl-D-glucose、casuarinin、1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose、3,4,6-tri-O-galloyl-D-glucose、terchebulin) [1-5]、4-O-(4''-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)ellagic acid、chebulic ellagitannins、4-O-(3'',4''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)ellagic acid [6]、oleanane-type triterpenoids [7] 及 isoterchebulin 與 1, 3, 6-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose [8] 等。現代藥理研究指出訶子的功用包括抗菌、抗黴菌、抗病毒、抗突變、抗癌、抗氧化、抗過敏、降低脂質、降低膽固醇、改善胃腸蠕動、抗潰瘍、保肝、保護心臟、保護細胞、抗輻射、抗糖尿病、保護眼睛、抗痙攣、傷口癒合、瀉下、調節免疫、抗變形蟲和化學預防等二十餘種作用 [9]。最近本研究室的研究亦報導訶子的甲醇與水萃取物及 ellagic acid 可以抑制類澱粉樣蛋白 25-35 (amyloid  $\beta$ -peptide 25-35) 與過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 對大鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤細胞 (rat adrenal medullary pheochromocytoma cell, PC12 cell) 的傷害，達到保護 PC12 細胞的作用 [10, 11]。

巴拉刈 (paraquat) 透過氧化還原反應與

NADPH oxidases 的活化作用形成活性氧化物 (reactive oxygen species)，如：超氧陰離子 (superoxide anion,  $O_2^{\cdot-}$ ) 與過氧化氫，而引起肝臟過氧化，巴拉刈高劑量時會抑制粒線體 complex I 與 III 的活性使粒線體發生功能障礙 [12]。巴拉刈能誘導前凋亡蛋白 Bax 與 Bak 的表現，其次是細胞色素 C 的釋放及 caspase-9 與 caspase-12 的活化 [13, 14]，巴拉刈也會引發蛋白酶體功能障礙，誘導穀胱甘肽 (glutathione) 排空，增加  $\alpha$ -synuclein 的聚集與路易體的形成 [15]。此外研究發現巴拉刈會造成小型哺乳動物與鳥類的傷害，也會在土壤內殘留累積，同時研究發現高劑量的巴拉刈注射到大鼠腦部的不同區域會引起細胞壞死 (necrosis) [16]，相反地，低劑量的巴拉刈會引起自噬作用 (autophagy)，然而抑制自噬作用會強化巴拉刈誘導細胞凋亡，因此自噬作用的產生可能是作為對抗細胞死亡的一種保護機制 [17]。在荷蘭的研究中指出巴拉刈及農藥和帕金森氏症 (Parkinson's disease) 具有關聯性 [18]，因此關於農藥巴拉刈引起帕金森氏症的研究越來越受到人們重視。人類最常見的神經退化性疾病之一是帕金森氏症，其發病率僅次於阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease)。然而，目前尚無根治帕金森氏症的有效療法，只能緩解初期症狀，藥物使用一段時間，療效會逐漸下降，而且會出現嚴重的副作用，但是透過抗氧化劑或神經保護劑維持細胞內的氧化還原狀態，抑制細胞凋亡，進而減緩或阻止神經元死亡是一個重要途徑，因此研究開發療效高、副作用少及能阻止農藥巴拉刈引起帕金森氏症病程發展的神經保護劑是迫切需要解決的問題。

PC12 細胞是一種多巴胺源神經細胞

(dopaminergic neuron)，其能表現出類似多巴胺神經元之合成、儲存、分泌多巴胺的功能 [19-21]，因此 PC12 細胞具有神經內分泌細胞的一般特徵，而且其具有可以傳代的特點，早已被廣泛應用於神經生物學與神經化學研究中，它已成為一種公認的神經細胞體外研究模式 [22]，應用於神經毒性物質的研究模式 [23, 24]。PC12 細胞所含的膜受體及分泌的神經傳遞物質與黑質多巴胺神經元類似，能夠比照初代培養的神經細胞探討一致的問題，PC12 細胞是可以作為多巴胺神經元模型的研究 [25]，探討農藥巴拉刈毒性及開發神經保護劑減緩巴拉刈誘導帕金森氏症產生的一種體外研究模式。所以，本研究主要是探討訶子分層萃取物抗氧化能力及抑制巴拉刈毒性保護 PC12 細胞之相關性。

## 材料與方法

### 1. 實驗材料

訶子購自 Xin Long Pharmaceutical Limited Company (Taichung, Taiwan, R.O.C.)，95 % 乙醇、正己烷 (n-hexane)、二氯甲烷 (dichloromethane) 與乙酸乙酯 (ethyl acetate) 購自 Uni-Onward Corporation (Taipei, Taiwan, R.O.C.)，純水取自 Ultrapure Water System (Putity-UV, Suntex Instruments Corporation, LTD., Taipei, Taiwan, R.O.C.)，dimethyl sulphoxide (DMSO) 購自 Merck (Darmstadt, Germany)，Folin-Ciocalteu 試劑與熊果酸 (ursolic acid) 購自 Fluka Biochemica (ECHO Chemical Corporation, LTD., Taichung, Taiwan, R.O.C.)。巴拉刈、食子酸 (gallic acid)、亞硝酸鈉 (sodium nitrite)、氯化鋁六水合物 (aluminum chloride

hexahydrate)、槲皮素 (quercetin)、醋酸鋅 (zinc acetate)、氨水 (ammonia)、氯化銨 (ammonium chloride)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、香草精 (vanillin)、冰醋酸 (glacial acetic acid)、過氯酸 (perchloric acid)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide)、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)、luminol、碳酸鈉 (sodium carbonate)、碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate)、35 % 過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、硫酸銅 (cupric sulfate)、硼酸 (boric acid)、1,10-phenanthroline、L-ascorbate、pyrogallol、vitamin C、6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox)、3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 和 poly-L-lysine hydrobromide 購自 Sigma-Aldrich Corporation (Shanghai, China)。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、heat-inactivated horse serum (HS)、heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)、penicillin/streptomycin 和 L-glutamine 購自 HyClone (Tseng Hsiang Life Science LTD., Taipei, Taiwan, R.O.C.)，10 公分培養皿購自 Greiner Bio-One (Bio-Check Laboratories LTD., Taichung, Taiwan, R.O.C.)。PC12 細胞株來源為 American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)。

### 2. 訶子 95% 乙醇萃取物的分層萃取物製備

依照過去本研究室所發表的方法，取 330 g 訶子粉末加入 3.3 L 的 95 % 乙醇，超音波震盪 15 min，用濾紙過濾並收集萃取液，重複以上步驟三次，利用減壓濃縮機將萃取液濃縮與冷凍乾燥機乾燥，經由 95 % 乙醇萃取

的產率是 28.5 %，乾燥後放至  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存 [10]。接著取 18 g 訶子 95 % 乙醇萃取物加入 900 mL 去離子水，使用分液漏斗進行三種有機溶劑各 900 mL 的分層萃取，每種有機溶劑各重複三次，有機溶劑先後順序分別為正己烷、二氯甲烷與乙酸乙酯，將三種有機溶劑及水的萃取液再以減壓濃縮機濃縮與冷凍乾燥機乾燥，四種分層萃取物分別為正己烷萃取物（代號 Tech-Et-H）、二氯甲烷萃取物（代號 Tech-Et-DC）、乙酸乙酯萃取物（代號 Tech-Et-EA）及水萃取物（代號 Tech-Et-W），最後放至  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存，供作後續相關分析與對 PC12 細胞實驗之用。

### 3. 細胞培養與細胞存活率分析

取 4 mL 的 poly-L-lysine hydrobromide ( $0.01\text{ mg/mL}$ ) 至 10 cm 培養皿，放到  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱中隔夜後再用 10 mL 的去離子水清洗兩次，取  $1 \times 10^6\text{ cell/mL}$  的 PC12 細胞到 10 cm 培養皿，加入 10 mL 的 DMEM 培養液（含有 10 % HS、1 % L-glutamine、1 % FBS、1 % penicillin/streptomycin 溶液），放置  $37^{\circ}\text{C}$  細胞培養箱（含有 5 % 二氧化碳）內，每隔 2-3 天繼代細胞 1 次共 10 次。細胞存活率分析法是將細胞實驗結束的 24 小格培養盤加入 50  $\mu\text{L}$  的 MTT ( $1.0\text{ mg/mL}$ )，放置於  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱內 2 hr，移除培養基後加入 300-500  $\mu\text{L}$  的 DMSO，放室溫避光 30 min，每孔各取出 250  $\mu\text{L}$  到 96 小格培養盤，使用酵素免疫分析儀設定 570 nm 試驗波長及 655 nm 參考波長測量吸光值。細胞存活率 = [ (樣品組波長 570 nm 吸光值 - 波長 650 nm 吸光值) / (對照組波長 570 nm 吸光值 - 波長 650 nm 吸光值) ]  $\times 100\%$  [26,27]。

### 4. 巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之毒性試驗

取 400  $\mu\text{L}$  的 poly-L-lysine hydrobromide ( $0.01\text{ mg/mL}$ ) 到 24 小格培養盤，接著放到  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱中隔夜，再用 800  $\mu\text{L}$  的去離子水清洗每孔次，取  $1.25 \times 10^5$  (細胞 / 格) 至 24 小格培養盤中 24 hr 細胞貼壁，將培養基抽掉加入新的培養基 24 hr 後，再抽掉培養基加入巴拉刈濃度為 100-1300  $\mu\text{M}$  培養 24 hr，時間到後加入 MTT ( $1.0\text{ mg/mL}$ ) 等待 2 hr，接著抽掉上清液，將底部的紫色結晶用 DMSO 溶解後，以酵素免疫分析儀測波長 570 nm 和波長 650 nm 的吸光值來計算細胞存活率。

### 5. 訶子分層萃取物抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之保護作用

實驗設計分為控制組 (Control: 未加萃取物與巴拉刈)、傷害組 (只加入巴拉刈 600  $\mu\text{M}$ ) 與實驗組 (分別加入濃度 0.4、0.5、0.6  $\mu\text{g/mL}$  的 Tech-Et-H、Tech-Et-DC、Tech-Et-EA 與 Tech-Et-W 後再加入巴拉刈 600  $\mu\text{M}$ ) 做比較。取 400  $\mu\text{L}$  的 poly-L-lysine hydrobromide ( $0.01\text{ mg/mL}$ ) 到 24 小格培養盤，接著放到  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱中隔夜，再用 800  $\mu\text{L}$  的去離子水清洗每孔兩次，取  $1.25 \times 10^5$  (細胞 / 格) 至 24 小格培養盤中 24 hr 後，將各種不同濃度的訶子分層萃取物加入培養盤中 24 hr，接著再加入 600  $\mu\text{M}$  巴拉刈培養 24 hr，時間到後加入 MTT ( $1.0\text{ mg/mL}$ ) 等待 2 hr，接著抽掉溶液，將形成的紫色結晶用 DMSO 溶解，使用酵素免疫分析儀測定波長 570 nm 和波長 650 nm 的吸光值來計算細胞存活率。

### 6. 訶子分層萃取物誘導 PC12 細胞死亡之毒性試驗

PC12 細胞培養於 24 小格培養盤 ( $1.25 \times 10^5$  細胞 / 格) 中經過 24 hr 細胞貼壁，將培養基抽掉分別加入濃度 0.4、0.5、0.6  $\mu\text{g/}$

mL 的 Tech-Et-H、Tech-Et-DC、Tech-Et-EA 與 Tech-Et-W 訶子分層萃取物 24 hr 後，再抽掉培養基加入新的培養基 24 hr，時間到後加入 MTT (1.0 mg/mL) 等待 2 hr，接著抽掉上清液，將底部的紫色結晶用 DMSO 溶解後，以酵素免疫分析儀測波長 570 nm 和波長 650 nm 的吸光值來計算細胞存活率。

## 7. 訶子分層萃取物之成分分析

### 7.1. 測定總酚含量

使用 Folin-Ciocalteu 方法測定訶子分層萃取物的總酚含量，每種萃取物 0.6 mg 分別使用 1 mL 的 95 % 乙醇溶解，每種溶解液各取 11.4  $\mu$ L 與 227.3  $\mu$ L 的 2 % 碳酸鈉混合，混合物在室溫下放置 2 min 後，將 11.4  $\mu$ L 的 50 % Folin-Ciocalteu 試劑添加到每個樣品混合物中，在室溫下靜置 30 min，再使用酵素免疫分析儀測定波長 750 nm 混合物的吸光值。將沒食子酸溶於甲醇 (0.2-1.0 mg/mL) 作為標準品製作標準曲線，計算每 g 萃取物中總酚含量以沒食子酸當量 mg (mg/g) 表示 [28]。

### 7.2. 測定總類黃酮含量

取 2 mg 訶子分層萃取物溶於 1 mL 的 95 % 乙醇，每種溶解液各取 25  $\mu$ L 加入 152.5  $\mu$ L 的去離子水與 7.5  $\mu$ L 的 5 % 亞硝酸鈉混合均勻，靜置 6 min 後加入 15  $\mu$ L 的 10 % 氯化鋁六水合物混合均勻，靜置 5 min 後加入 50  $\mu$ L 的 1 M 氫氧化鈉混合均勻，放置室溫 15 min 再使用酵素免疫分析儀測定波長 510 nm 吸光值，空白組則是不添加 10 % 氯化鋁六水合物進行測定，將槲皮素溶於 95 % 乙醇 (0.2-1.0 mg/mL) 作為標準品製作標準曲線，計算每 g 萃取物中總類黃酮含量以槲皮素當量 mg (mg/g) 表示 [29]。

### 7.3. 測定總單寧含量

總單寧含量是採用一種滴定分析法進行

分析 (titrimetric method) [30]，訶子分層萃取物 1 mg 分別使用 1 mL 的去離子水溶解，放在  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  水浴中加熱 5 min，取 0.4 mL 的 1 M 醋酸鋅與 0.28 mL 的氨水混合均勻，加入 1 mL 溫熱的萃取物溶液，溶液放在  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  水浴中 30 min，加入 8.92 mL 去離子水，使最終體積達到 10.6 mL，然後取 0.8 mL 溶液用 5.2 mL 去離子水進行稀釋，並加入 0.5 mL 氨-氯化銨緩衝液 (pH = 10)，使用 0.05 M EDTA 對混合物進行滴定，達至滴定終點即可換算出總單寧含量。空白組則是不添加樣品進行滴定，每種萃取物總單寧含量 (每 mg 萃取物中總單寧之含量以百分比表示) 的計算如下： $\{[0.1556 \times (V_{\text{blank}} - V_{\text{extract}})] / W_{\text{extract}}\} \times 100\%$ 。V<sub>blank</sub> 和 V<sub>extract</sub> 表示為對應空白和萃取物溶液使用的 EDTA 滴定體積 (mL)，W<sub>extract</sub> 代表每個萃取物的重量 (mg) [31]。

### 7.4. 測定粗三萜含量

訶子分層萃取物 10 mg 分別使用 1 mL 的 95 % 乙醇溶解，每種溶解液各取 100  $\mu$ L 與 150  $\mu$ L 的 5 % 香草精 / 冰醋酸和 500  $\mu$ L 過氯酸溶液混合。樣品溶液在  $60^\circ\text{C}$  下加熱 45 min，然後在冰水浴中冷卻至環境溫度，再加入 2.25 mL 冰醋酸後，使用酵素免疫分析儀測定波長 548 nm 樣品溶液的吸光值。將熊果酸溶於甲醇 (0.025-0.5 mg/mL) 作為標準品製作標準曲線，計算每 g 萃取物中粗三萜含量以熊果酸當量 mg (mg/g) 表示 [32]。

## 8. 訶子分層萃取物之抗氧化活性

### 8.1. 測定 DPPH 自由基清除率

取 125  $\mu$ L 不同濃度訶子分層萃取物 (3.9–1000.0  $\mu$ g/mL) 與 125  $\mu$ L 的 DPPH 自由基甲醇溶液混合，DPPH 最終濃度為 0.5 mM。在避光靜置 30 min 後，使用酵素免疫分析儀測

定波長 517 nm 樣品溶液的吸光值。控制組為空白不包含萃取物，使用相同的過程進行分析。DPPH 自由基清除率百分比 =  $[1 - (\text{樣品組吸光值} / \text{控制組吸光值})] \times 100\%$  [33]，最後清除率以  $IC_{50}$  值表示。

### 8.2. 測定過氧化氫清除率

將 0.1 mM luminol 與 0.05 M 碳酸鈉 – 碳酸氫鈉 (pH = 9.4) 緩衝溶液以比例 1 : 17 混合均勻，分別取 12.5  $\mu\text{L}$  不同濃度訶子分層萃取物 (3.9-1000.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加入 225  $\mu\text{L}$  上述混合液中，再加入 12.5  $\mu\text{L}$  的 0.15 M 過氧化氫，接著放入化學冷光儀測定 40 min。在未添加過氧化氫溶液情況下是檢測背景，過氧化氫清除率百分比 =  $[1 - (\text{樣品組總面積值} - \text{背景總面積值}) / (\text{對照組總面積值} - \text{背景總面積值})] \times 100\%$  [34]，最後清除率以  $IC_{50}$  值表示。

### 8.3. 測定氫氧根離子 ( $\text{OH}^{\cdot-}$ ) 自由基清除率

分別取 12.5  $\mu\text{L}$  不同濃度訶子分層萃取物 (3.9-1000.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加入 12.5  $\mu\text{L}$  的 0.1 mM 硫酸銅溶液、175  $\mu\text{L}$  的 0.05 M 硼酸鹽緩衝溶液 (pH = 9.0)、12.5  $\mu\text{L}$  的 0.1 mM 1, 10-phenanthroline 溶液及 25  $\mu\text{L}$  的 0.1 mM L-ascorbate 溶液混合均勻，然後加入 12.5  $\mu\text{L}$  的 0.15 % 過氧化氫溶液，接著放入化學冷光儀測定 10 min。在未添加過氧化氫溶液情況下是檢測背景，氫氧根離子自由基清除率百分比 =  $[1 - (\text{樣品組總面積值} - \text{背景總面積值}) / (\text{對照組總面積值} - \text{背景總面積值})] \times 100\%$  [34]，最後清除率以  $IC_{50}$  值表示。

### 8.4. 測定超氧陰離子清除率

分別取 2.5  $\mu\text{L}$  不同濃度訶子分層萃取物 (3.9-1000.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加入 12.5  $\mu\text{L}$  的  $6.25 \times 10^{-4}$

M pyrogallol，再加入 235  $\mu\text{L}$  的 0.05 M 碳酸鈉 – 碳酸氫鈉 (含 0.1 mM EDTA/1 mM luminol = 2/1, pH = 10.2) 的混合溶液，接著放入化學冷光儀測定 10 min。在未添加 pyrogallol 溶液情況下是檢測背景，超氧陰離子清除率百分比 =  $[1 - (\text{樣品組總面積值} - \text{背景總面積值}) / (\text{對照組總面積值} - \text{背景總面積值})] \times 100\%$  [34]，最後清除率以  $IC_{50}$  值表示。

## 9. 統計分析

實驗結果以平均值  $\pm$  標準差 (mean  $\pm$  standard deviation) 表示，使用統計軟體 Statistic Product and Service Solution (SPSS) 的 Two-way ANOVA 分析，並以 Tukey 檢定差異顯著性，以 P 值表示具有統計差異的顯著性。

## 結果

### 1. 訶子 95 % 乙醇萃取物的分層萃取物產率

訶子 95 % 乙醇萃取物的分層萃取流程如圖 1 所示，實驗所得到的萃取物產率分別為 Tech-Et-H = 2.9 %、Tech-Et-DC = 0.5 %、Tech-Et-EA = 38.7 % 及 Tech-Et-W = 30.2 %，由高至低為 Tech-Et-EA > Tech-Et-W > Tech-Et-H > Tech-Et-DC。

### 2. 巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之毒性試驗

巴拉刈濃度為 100-1300  $\mu\text{M}$  評估細胞存活率時，如圖 2 所示，半數有效劑量 (50 % effective dose, ED50) 為  $676.2 \pm 40.6 \mu\text{M}$ ，低濃度 100  $\mu\text{M}$  巴拉刈的細胞存活率為  $90.3 \pm 6.8\%$ ，使用 600  $\mu\text{M}$  巴拉刈的細胞存活率為  $53.2 \pm 1.4\%$ ，高濃度 1300  $\mu\text{M}$  巴拉刈的細胞存活率為  $28.2 \pm 4.7\%$ ，因此本研究以

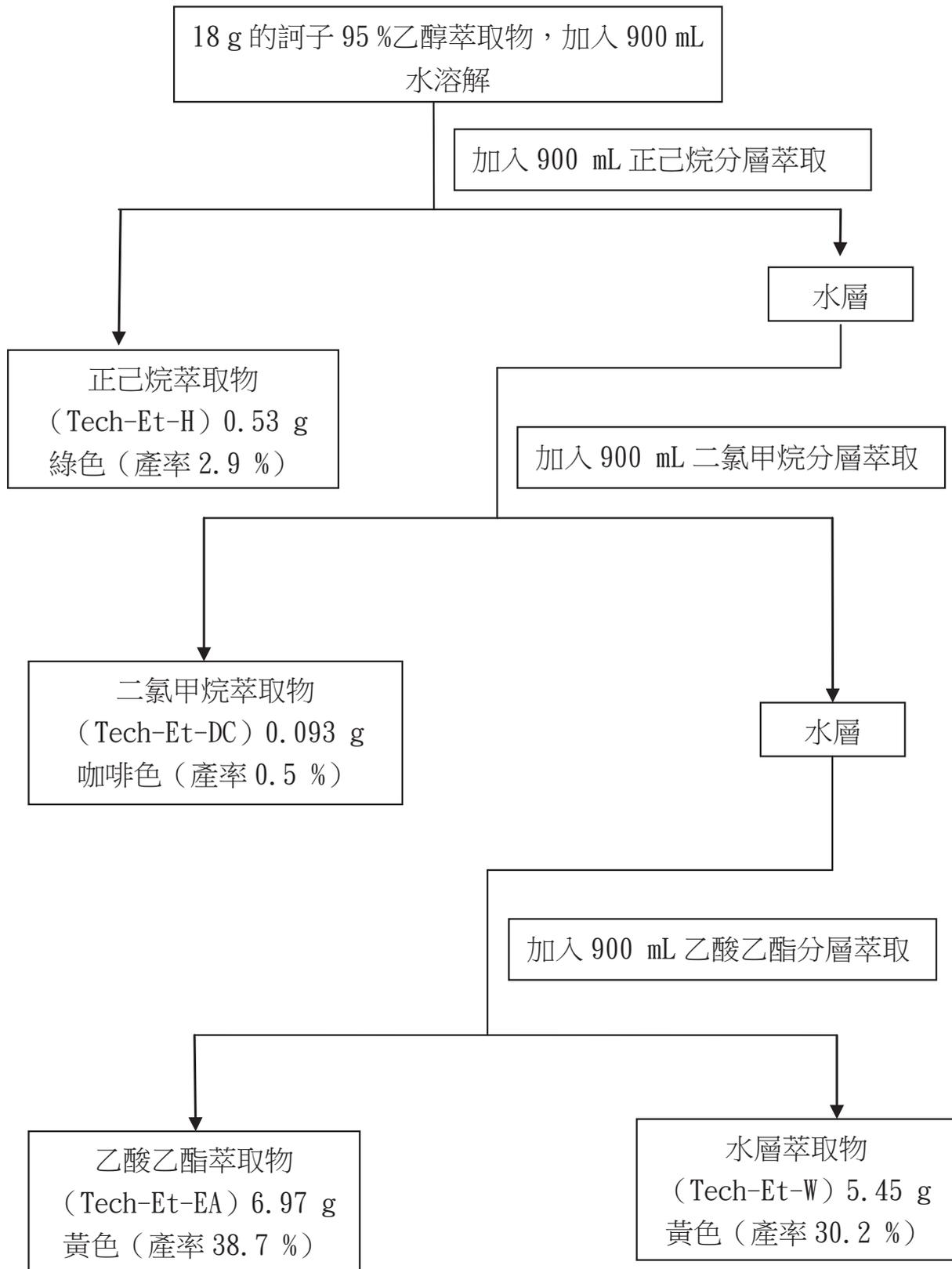


圖 1 訶子 95 % 乙醇萃取物的分層萃取流程

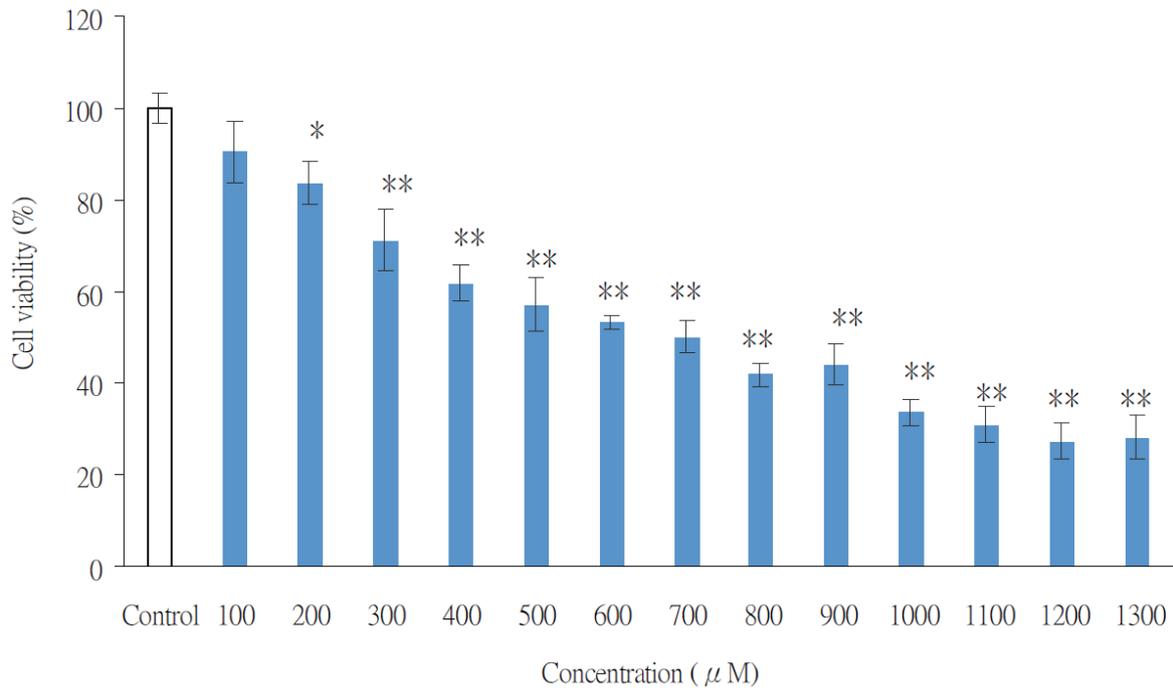


圖 2 巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之毒性試驗

以控制組（未加入巴拉刈，Control）與實驗組（加入濃度 100-1300  $\mu\text{M}$  巴拉刈）做比較。數據以 Mean  $\pm$  S.D. 表示，N = 3，數據顯著差異以 \*P < 0.01 與 \*\*P < 0.001 表示實驗組與 Control 具有統計差異的顯著性，自由度（degree of freedom）組間 = 13，組內 = 28，總和 = 41。

600  $\mu\text{M}$  巴拉刈做為誘導 PC12 細胞死亡之毒性使用的依據。

### 3. 訶子分層萃取物抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之保護作用

如圖 3 所示，實驗組訶子分層萃取物 Tech-Et-W 在濃度 0.4 – 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的細胞存活率皆低於傷害組巴拉刈的細胞存活率（60.3  $\pm$  6.7 %），沒有抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之保護作用，其他實驗組訶子分層萃取物在不同濃度時則具有不同程度抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之作用，結果為 Tech-Et-DC 在濃度 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時的細胞存活率（73.4  $\pm$  5.5 %），對抗巴拉刈的細胞存活率雖未達統計意義，但是其所造成的細胞存活率仍高於巴拉刈處理組，在濃度 0.4 與 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的細胞存活率皆低於巴拉刈的細胞存活

率。Tech-Et-H 對抗巴拉刈的細胞存活率雖未達統計意義，但是在濃度 0.4、0.5 與 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的細胞存活率（62.8  $\pm$  7.0 %、68.0  $\pm$  4.8 % 與 63.9  $\pm$  7.4 %）皆高於巴拉刈的細胞存活率（60.3  $\pm$  6.7 %）。值得注意的是 Tech-Et-EA 在濃度 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時的細胞存活率大於 80 %（86.0  $\pm$  3.5 %），具有統計差異的顯著性（P < 0.01），因此其具有保護 PC12 細胞的作用。訶子分層萃取物抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之作用由大至小為 Tech-Et-EA > Tech-Et-DC > Tech-Et-H > Tech-Et-W。

### 4. 訶子分層萃取物誘導 PC12 細胞死亡之毒性試驗

濃度 0.4、0.5、0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Tech-Et-H、Tech-Et-DC、Tech-Et-EA 與 Tech-Et-W 訶子分層萃取物對 PC12 細胞存活率的影響，如圖

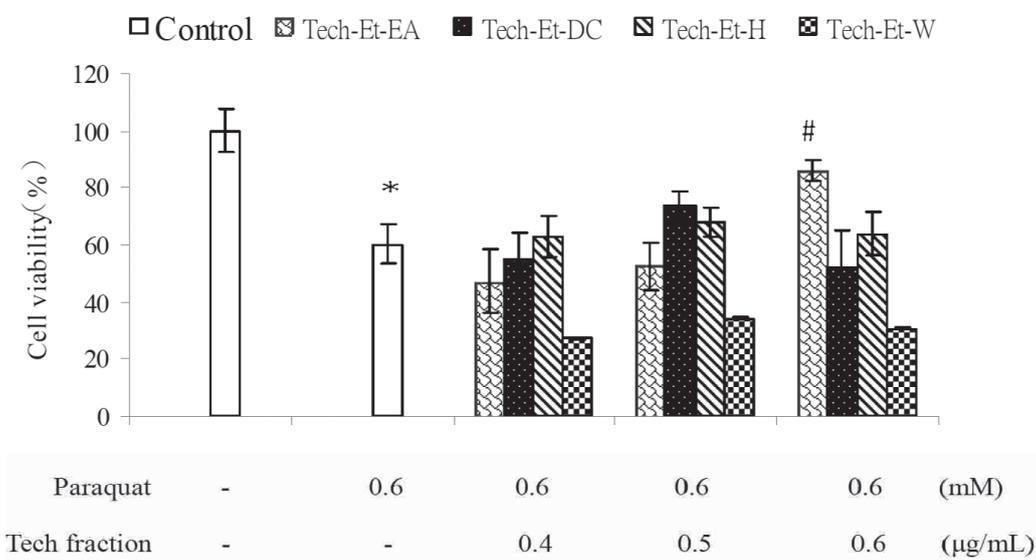


圖 3 訶子四種分層萃取物抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之保護作用

以控制組（未加入訶子分層萃取物與巴拉刈）、傷害組（加入 0.6 mM 的巴拉刈）與實驗組（加入濃度 0.4、0.5、0.6 µg/mL 的 Tech-Et-H、Tech-Et-DC、Tech-Et-EA、Tech-Et-W 與 0.6 mM 的巴拉刈）做比較。數據以 Mean ± S.D. 表示，N = 3，數據顯著差異以 \* $P < 0.001$  表示傷害組與控制組具有統計差異的顯著性，以 # $P < 0.01$  表示實驗組與傷害組具有統計差異的顯著性，自由度（degree of freedom）組間 = 13，組內 = 28，總和 = 41。

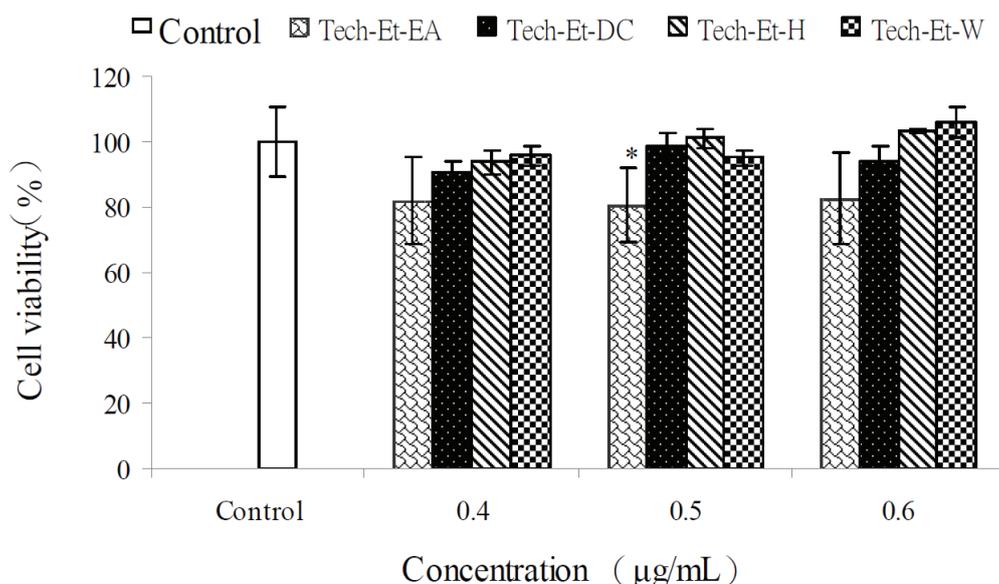


圖 4 訶子分層萃取物誘導 PC12 細胞死亡之毒性試驗

以控制組（未加入訶子分層萃取物，Control）與實驗組（加入濃度 0.4、0.5、0.6 µg/mL 的訶子分層萃取物）做比較。數據以 Mean ± S.D. 表示，N = 3，數據顯著差異以 \* $P < 0.05$  表示實驗組與 Control 具有統計差異的顯著性，自由度（degree of freedom）組間 = 12，組內 = 35，總和 = 47。

4 所示，並未顯示具有毒性，Tech-Et-EA 細胞存活率大於 80 %，Tech-Et-H、Tech-Et-DC 與 Tech-Et-W 細胞存活率皆大於 90 %。但是當 Tech-Et-W 與巴拉刈加成時其毒性更強，細胞存活率皆低於傷害組巴拉刈的細胞存活率，如圖 3 所示。

## 5. 訶子分層萃取物之成分分析

### 5.1. 總酚含量

由表 1 發現訶子分層萃取物的總酚含量 (mg gallic acid/g extract) 由多至少為 Tech-Et-W > Tech-Et-EA > Tech-Et-DC > Tech-Et-H。

### 5.2. 總類黃酮含量

由表 1 發現訶子分層萃取物之總類黃酮含量 (mg quercetin/g extract) 由多至少為 Tech-Et-DC > Tech-Et-H > Tech-Et-EA > Tech-Et-W。

### 5.3. 總單寧含量

由表 1 發現訶子分層萃取物之總單寧含量 (%/mg extract) 由多至少為 Tech-Et-DC > Tech-Et-H > Tech-Et-W > Tech-Et-EA。

## 5.4. 粗三萜含量

由表 1 發現訶子分層萃取物之粗三萜含量 (mg ursolic acid/g extract) 由多至少為 Tech-Et-DC > Tech-Et-H > Tech-Et-W > Tech-Et-EA。

## 6. 訶子分層萃取物之抗氧化活性

### 6.1. DPPH 自由基清除率

由表 2 發現訶子分層萃取物清除 DPPH 自由基能力由大至小為 Tech-Et-EA > Tech-Et-W > Tech-Et-H > Tech-Et-DC，然而全部分層萃取物都比標準品 Vitamine C 與 Trolox 清除 DPPH 自由基能力小。

### 6.2. 過氧化氫清除率

由表 2 發現訶子分層萃取物清除過氧化氫能力由大至小為 Tech-Et-EA > Tech-Et-W > Tech-Et-DC > Tech-Et-H，而且所有分層萃取物都比標準品 Vitamine C 與 Trolox 清除過氧化氫能力大。

### 6.3. 氫氧根離子自由基清除率

由表 2 發現訶子分層萃取物清除氫氧根離子自由基能力由大至小為 Tech-Et-EA >

表 1 訶子四種分層萃取物的總酚、總類黃酮、總單寧與粗三萜含量

萃取物	總酚 <sup>a</sup>	總類黃酮 <sup>b</sup>	總單寧 <sup>c</sup>	粗三萜 <sup>d</sup>
Tech-Et-H	49.8 ± 0.9	663.8 ± 16.1	42.7 ± 0.2	110.7 ± 1.1
Tech-Et-DC	117.5 ± 8.3	794.0 ± 18.9	43.7 ± 0.1	306.9 ± 7.1
Tech-Et-EA	142.8 ± 9.9	628.7 ± 3.5	19.8 ± 2.4	2.9 ± 0.9
Tech-Et-W	298.3 ± 12.7	217.5 ± 6.5	31.6 ± 1.0	7.5 ± 0.5

數據以 Mean ± S.D. 表示，N = 3.

<sup>a</sup> mg gallic acid/g extract

<sup>b</sup> mg quercetin/g extract

<sup>c</sup> %/mg extract

<sup>d</sup> mg ursolic acid/g extract

表 2 訶子四種分層萃取物的抗氧化能力

萃取物	DPPH 自由基清除率 <sup>a</sup>	過氧化氫清除率 <sup>a</sup>	氫氧根離子自由基清除率 <sup>a</sup>	超氧陰離子清除率 <sup>a</sup>
Tech-Et-H	475.3 ± 28.2	35.5 ± 5.1	N.D.	N.D.
Tech-Et-DC	646.4 ± 30.7	31.2 ± 3.5	562.6 ± 30.3	N.D.
Tech-Et-EA	47.5 ± 3.1	20.5 ± 5.5	71.2 ± 7.3	250.7 ± 19.1
Tech-Et-W	50.1 ± 3.4	26.4 ± 3.8	103.3 ± 15.5	679.3 ± 23.2
Positive control				
Vitamine C	17.0 ± 0.1	N.D.	688.3 ± 29.7	32.8 ± 4.9
Trolox	23.0 ± 0.9	209.6 ± 17.0	5.8 ± 1.0	0.8 ± 0.1

數據以 Mean ± S.D. 表示，N = 3。

N.D. : Not detected.

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> value : μg/mL.

Vitamine C 與 Trolox 作為抗氧化活性的對照標準品。

Tech-Et-W > Tech-Et-DC > Tech-Et-H，分層萃取物中 Tech-Et-EA、Tech-Et-W 與 Tech-Et-DC 都比標準品 Vitamine C 清除氫氧根離子自由基能力大，但是全部分層萃取物都比標準品 Trolox 清除氫氧根離子自由基能力小。

#### 6.4. 超氧陰離子清除率

由表 2 發現訶子分層萃取物清除超氧陰離子能力由大至小為 Tech-Et-EA > Tech-Et-W > Tech-Et-DC 與 Tech-Et-H，全部分層萃取物都比標準品 Vitamine C 與 Trolox 清除超氧陰離子能力小。

## 討論

訶子分層萃取物的產率在 0.5 – 38.7 % 之間，由於溶劑極性大小為水 > 乙酸乙酯 > 二

氯甲烷 > 正己烷，因此水與乙酸乙酯的萃取產率較高，二氯甲烷與正己烷的萃取產率較低。訶子分層萃取物的總酚含量在 49.8-298.3 mg gallic acid/g extract 之間，其中 Tech-Et-W 含量最多；總類黃酮含量在 217.5-794.0 mg quercetin/g extract 之間，其中 Tech-Et-DC 含量最多；總單寧含量在 19.8-43.7 %/mg extract 之間，其中 Tech-Et-DC 含量最多；粗三萜含量在 2.9-306.9 mg ursolic acid/g extract 之間，其中 Tech-Et-DC 含量最多。依據上述推論水的極性高，容易萃取出總酚成分，二氯甲烷的極性低，容易萃取出總類黃酮、總單寧及粗三萜成分。

訶子分層萃取物的 DPPH 自由基清除率 IC<sub>50</sub> 值在 47.5-646.4 μg/mL 之間，以 Tech-Et-EA 抗氧化能力最好，過氧化氫清除率 IC<sub>50</sub>

值在 20.5-35.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之間，以 Tech-Et-EA 抗氧化能力最好，氫氧根離子自由基清除率  $\text{IC}_{50}$  值在 71.2 至大於 1000.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上，以 Tech-Et-EA 抗氧化能力最好，超氧陰離子清除率  $\text{IC}_{50}$  值在 250.7 至大於 1000.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上，以 Tech-Et-EA 抗氧化能力最好。依據上述訶子分層萃取物抗氧化能力都是 Tech-Et-EA 效果最好，但是與總酚、總類黃酮、總單寧及粗三萜成分分析結果比較，發現並非是成分含量越多者，抗氧化能力會越好，所以 Tech-Et-EA 存在著特定活性成分才能有較好的抗氧化作用。Trolox 與 Vitamine C 都是已知的抗氧化成分，Trolox 清除 DPPH 自由基、氫氧根離子自由基與超氧陰離子都比訶子分層萃取物好，Vitamine C 清除 DPPH 自由基與超氧陰離子都比訶子分層萃取物好，但是訶子分層萃取物清除過氧化氫的效果卻都比 Trolox 與 Vitamine C 好。

雖然訶子分層萃取物 Tech-Et-W 的總酚含量最多，而且其抗氧化能力在所有分層萃取物中排名第二，卻沒有抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡之作用。Tech-Et-DC 的總類黃酮、總單寧及粗三萜含量最多，但是只有在濃度 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時有較佳抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡的作用，它在各項抗氧化指標均非居次，有的甚至墊底。至於 Tech-Et-H 也是在濃度 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時有抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡的作用，其抗氧化能力在所有分層萃取物中排名第三或第四。至於 Tech-Et-EA 在濃度 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時有抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡的作用是所有分層萃取物中最好，其抗氧化能力在所有分層萃取物中排名第一，但是其總酚、總類黃酮、總單寧及粗三萜的含量多寡與保護性無顯著關聯。此外由於各分層之保護性順位與抗氧化順位無法

吻合，所以抗氧化效力與對抗巴拉刈的效用並無關聯性。最後經由本研究發現 Tech-Et-EA 在濃度 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時抑制巴拉刈誘導 PC12 細胞死亡的作用最好，期盼未來進一步研究 Tech-Et-EA 的神經保護作用機轉。

## 誌謝

本研究計畫經費由澄清綜合醫院中港分院資助（計畫編號 CH10800237B），謹此致謝。

## 參考文獻

1. 張賢哲、蔡貴花，中藥炮製學，中國醫藥學院出版組，台中，pp. 393-394，1992。
2. 謝明村主編，中國藥材學，正中書局，台北，pp. 669-671，1993。
3. WHO Regional Publications: Western Pacific Series No. 2, Medicinal Plants in China, Philippines, pp. 281, 1997.
4. Juang LJ, Sheu SJ. Chemical identification of the sources of commercial Fructus Chebulae. *Phytochem. Anal.*, 2005; 16(4): 246-251.
5. Juang LJ, Sheu SJ, Lin TC. Determination of hydrolyzable tannins in the fruit of Terminalia chebula Retz. by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.*, 2004; 27(9): 718-724.
6. Pfundstein B, El Desouky SK, Hull WE, Haubner R, Erben G, Owen RW. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (Terminalia bellerica, Terminalia chebula and Terminalia horrida): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities.

- Phytochemistry.*, 2010; 71(10): 1132-1148.
7. Wang W, Ali Z, Li XC, Shen Y, Khan IA. Triterpenoids from two Terminalia species. *Planta Med.*, 2010; 76(15): 1751-1754.
  8. Manosroi A, Jantrawut P, Akazawa H, Akihisa T, Manosroi J. Biological activities of phenolic compounds isolated from galls of Terminalia chebula Retz. (Combretaceae). *Nat. Prod. Res.*, 2010; 24(20): 1915-1926.
  9. Chattopadhyay RR, Bhattacharyya SK. Plant review Terminalia chebula: an update. *Pharmacogn. Rev.*, 2007; 1(1): 151-156.
  10. Chang CL, Lin CS. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of Terminalia chebula Retzius extracts. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2012; 2012: 125247.
  11. Lin CS, Chen CC, Chang CL. Neuroprotective effect of Terminalia chebula extracts and ellagic acid in PC12 cells. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.*, 2017; 14(4): 22-30.
  12. Peng J, Mao XO, Stevenson FF, Hsu M, Andersen JK. The herbicide paraquat induced dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(31): 32626-32632.
  13. Huang CL, Lee YC, Yang YC, Kuo TY, Huang NK. Minocycline prevents paraquat-induced cell death through attenuating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Lett.*, 2012; 209(3): 203-210.
  14. Fei Q, McCormack AL, Di Monte DA, Ethell DW. Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283(6): 3357-3364.
  15. Fernagut PO, Hutson CB, Fleming SM, Tetreault NA, Salcedo J, Masliah E, Chesselet MF. Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: Effects of alpha-synuclein over-expression. *Synapse.*, 2007; 61(12): 991-1001.
  16. Calò M, Iannone M, Passafaro M, Nisticò G. Selective vulnerability of hippocampal CA3 neurones after microinfusion of paraquat into the rat substantia nigra or into the ventral tegmental area. *J. Comp. Pathol.*, 1990; 103(1): 73-78.
  17. González-Polo RA, Niso-Santano M, Ortíz-Ortíz MA, Gómez-Martín A, Morán JM, García-Rubio L, Francisco-Morcillo J, Zaragoza C, Soler G, Fuentes JM. Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol. Sci.*, 2007; 97(2): 448-458.
  18. Brouwer M, Huss A, van der Mark M, Nijssen PCG, Mulleners WM, Sas AMG, van Laar T, de Snoo GR, Kromhout H, Vermeulen RCH. Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environ. Int.*, 2017; 107: 100-110.
  19. Greene L, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1976; 73(7): 2424-2428.
  20. Greene LA, Rein G. Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells. *Brain Res.*, 1977; 129(2): 247-263.
  21. Drukarch B, Jongenelen CA, Schepens E, Langeveld CH, Stoof JC. Glutathione is involved in the granular storage of dopamine in rat PC12

- pheochromocytoma cells: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 1996; 16(19): 6038-6045.
22. Eik LF, Naidu M, David P, Wong KH, Tan YS, Sabaratnam V. *Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden: A medicinal mushroom that stimulates neurite outgrowth in PC-12 cells. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2012; 2012: 320308.
23. Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of organophosphates: a case study of chlorpyrifos. In: *Toxicity of Organophosphate and Carbamate Pesticides* (Gupta RC, ed), San Diego: Elsevier Academic Press, pp. 293-314, 2005.
24. Powers CM, Wrench N, Ryde IT, Smith AM, Seidler FJ, Slotkin TA. Silver impairs neurodevelopment: studies in PC12 cells. *Environ. Health Perspect.*, 2010; 118(1): 73-79.
25. Timothy JS, William DA. Transmitter ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC) cells: a model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology.*, 1991; 12(3): 473-492.
26. Lin YH, Liu AH, Wu HL, Westenbroek C, Song QL, Yu HM, Ter Horst GJ, Li XJ. Salvianolic acid B, an antioxidant from *Salvia miltiorrhiza*, prevents  $A\beta_{25-35}$ -induced reduction in BPRP in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 348(2): 593-599.
27. Troy CM, Rabacchi SA, Xu Z, Maroney AC, Connors TJ, Shelanski ML, Greene LA. Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation. *J. Neurochem.*, 2001; 77(1): 157-164.
28. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and praline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.*, 2005; 91(3): 571-577.
29. Joubert E, Manley M, Botha M. Evaluation of spectrophotometric methods for screening of green rooibos (*Aspalathus linearis*) and green honeybush (*Cyclopia genistoides*) extracts for high levels of bio-active compounds. *Phytochem. Anal.*, 2008; 19(2): 169-178.
30. 張青、鄭毅，有機溶劑萃取野生楓香的鞣質及含量測定。江西化工。2005；3：71-74。
31. 王家棟、於興博，正交實驗法優選榛子葉中鞣質的超聲提取工藝。黑龍江醫藥。2009；22(3)：313-314。
32. Fan JP, He CH. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006; 41(3): 950-956.
33. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 1992; 40(6): 945-948.
34. Guo S, Deng Q, Xiao J, Xie B, Sun Z. Evaluation of antioxidant activity and preventing DNA damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence method. *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55(8): 3134-3140.

# The Anti-oxidative Components of *Terminalia Chebula* Protect PC12 Cells against Paraquat-induced Toxicity

Hua-Sin Chen<sup>1</sup>, Chia-Lin Chang<sup>2,\*</sup>, Yi-Fan Huang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Cheng Ching Hospital, Taichung, Taiwan

<sup>2</sup>Research Institute of Biotechnology, HungKuang University, Taichung, Taiwan

**Background:** PC12 cell line is a rat adrenal medullary pheochromocytoma cell line, which has been used as a model to conduct studies on dopaminergic neurons to explore paraquat toxicity. Additionally, it has been used to develop an *in vitro* research model for the development of neuroprotective agents. **Materials and methods:** In this study, we mainly investigated the layered extracts (n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and water extracts) of the 95 % ethanol extract of *Terminalia chebula* for inhibiting the toxicity effect of paraquat to protect the PC12 cells. Further, we analyzed the total phenol, flavonoid, tannin, and triterpene contents of the aforementioned layered extracts. The antioxidant effects that were assessed included the scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and superoxide anions. **Results:** The water extract was found to possess the highest content of total phenolic compounds, while the dichloromethane extract possessed the highest contents of total flavonoid, tannin, and triterpene. The highest antioxidant effect of scavenging the DPPH radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and superoxide anions was exhibited by the ethyl acetate extract, and it was most efficient in inhibiting paraquat toxicity and protecting the PC12 cells. **Conclusion:** The ethyl acetate extract of the 95 % ethanol extract of *T. chebula* exhibited the most effective antioxidant effect among all the tested extracts in inhibiting paraquat toxicity and protecting PC12 cells. It is thus believed that the *T. chebula* composition can be utilized as a potential neuroprotective agent in the future.

**Key words:** Paraquat, PC12 cell, *Terminalia chebula*

---

\*Correspondence author: Chia-Lin Chang Research Institute of Biotechnology, HungKuang University, No. 1018, Sec. 6, Taiwan Boulevard, Shalu District, Taichung City 43302, Taiwan (R.O.C.), Tel: +886-4-26318652 ext.5624, Email: clchang@sunrise.hk.edu.tw