

# 相思樹心材之新用途—抗氧化與抗發炎功效

◎國立臺灣大學森林環境暨資源學系·張上鎮

## 前言

近年來，許多研究已證實黃酮類(Flavonoid)、單寧(Tannin)及木酚素(Lignan)等酚類化合物具有良好之抗氧化(Anti-oxidation)及抗發炎(Anti-inflammation)活性，而許多植物含有這些化合物，因此，有關植物成分在抗氧化、抗發炎及癌症化學預防(Chemoprevention)等方面之研究，已成為全球保健醫學所關注之焦點。然而，卻鮮少看到有關臺灣本土樹種之抗氧化及抗發炎活性等的相關研究。

誠如大家所知，豆科(Leguminosae)植物中含有大量單寧等酚類化合物。臺灣本土樹種相思樹(*Acacia confusa*)，原產於恆春半島，屬豆科陽性樹種，生長快速且繁殖容易，是早期最主要的造林樹種之一，因此，臺灣低海拔地區處處可見相思樹，但除了用來作為傳統農具、家具與薪炭材外，一直未能有效的加以利用，殊為可惜。筆者曾針對相思樹心材、樹皮、花、葉子及細枝等部位之抽出



臺灣低海拔地區處處可見相思樹(張上鎮 攝)

物進行抗氧化與抗發炎活性評估，期能開發成保健醫藥用品。本文將簡單介紹相思樹心材抗氧化與抗發炎之研究成果，並探討相思樹抽出成分供作保健醫藥原料之潛能，藉此拋磚引玉。

## 心材抽出物之抗氧化活性

ROS(Reactive oxygen species)及自由基(Free radicals)為許多疾病的元兇，它會毫無選擇的攻擊細胞膜、細胞及組織，引起連鎖性過氧化反應，同時產生更多的自由基及ROS，進而攻擊DNA，使其斷裂、變性或突變，造成人體內部的各種退化性症候群。此外，ROS可以活化許多種激酶(Kinase)，導致致癌基因(Oncogenes)的活化或抑制抗癌基因，最後引發癌症。因此，如能適當調控體內之自由基及ROS，就能延緩或避免各種退化性症候群及癌症之產生。

為了瞭解相思樹抽出成分是否具有抗氧化活性，筆者乃利用數種抗氧化評估模式，包括：DPPH自由基清除試驗(DPPH assay)、超氧自由基清除試驗(Superoxide scavenging assay，即NBT assay)、鼠腦脂質過氧化試驗(Assay of lipid peroxidation using mouse brain homogenates)、氫氧自由基引發DNA劣解試驗(Assay of hydroxyl radical-induced DNA strand scission)，以及細胞抗氧化活性評估(Cellular assay of antioxidant activity)等體外(*in vitro*)及半活體(*ex vivo*)試驗，進行相思樹心材、樹皮、細枝、花及葉子等五部位抽出物及其成分之抗氧化活性評估。同時並以福林—西歐

卡都法(Folin-Ciocalteu method)測定抽出物總酚類化合物含量(Total phenolic content)，以五倍子酸相對量(Gallic acid equivalent, GAE)來表示，即抽出物酚類化合物的總量以每克抽出物所含五倍子酸之毫克(mg)來表示。

由清除DPPH自由基能力之結果顯示，相思樹五部位抽出物之抑制率隨濃度的升高而增大。比較五部位抽出物之抑制率，以心材和樹皮表現最佳，其半數抑制濃度(IC<sub>50</sub>)分別為2.2及4.0μg/mL，至於葉子、細枝及花等部位的IC<sub>50</sub>值分別為7.9、21.4及62.9μg/mL，換言之，五部位清除DPPH自由基的能力依序為心材>樹皮>葉子>細枝>花。此結果顯示，心材及樹皮抽出物具有極佳的清除DPPH自由基能力，其中，心材之清除能力較已知抗氧化劑Quercetin(IC<sub>50</sub>值為3.3μg/mL)更佳。至於相思樹心材與樹皮抽出物清除超氧自由基之能力，亦隨著抽出物濃度的提高而增大，其IC<sub>50</sub>值分別為1.8及3.5μg/mL，清除能力較已知抗氧化劑兒茶素((+)-Catechin)為佳，其IC<sub>50</sub>值為5.0μg/mL。

由總酚類化合物含量之結果證實，相思樹的確含有豐富的酚類化合物，每克心材與樹皮分別含有相當於529.7與466.8mg五倍子酸之酚類化合物，含量極豐，與葡萄皮(33.3mg/g)、葡萄子(85.8mg/g)、白洋蔥(115mg/g)、紅洋蔥(133mg/g)及黃洋蔥(107mg/g)相比，心材與樹皮酚類化合物含量均較這些抗氧化食品多。而分析總酚類化合物含量與清除DPPH自由基能力(或清除超氧自由基之能力)的關係時，亦證實清除DPPH自由基之能力(或清除超氧自由基之能力)與總酚類化合物含量呈正比，即心材>樹皮。

由於相思樹心材抽出物的酚類化合物含量甚高，故有極強的抗氧化活性，5~10μg/mL低濃度的相思樹心材抽出物即可完全抑制DPPH與超氧自由基的生成，亦可避免脂質過氧化的產生，其抗氧化活性甚至較維他命C及兒茶素等抗氧化劑還佳。此外，也證實相思樹心材抽出物對DNA具有良好的保護作用，使用濃度為500μg/mL時，即可有效保護DNA免遭氫氧自由基的危害；而當使用濃度提高為1mg/mL時，則可完全抑制氫氧自由基對DNA的傷害。再利用流式細胞儀(Flow cytometry)配合DCFH-DA(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)細胞螢光染色方法，評估相思樹心材抽出物於細胞內清除過氧化氫之能力。試驗結果顯示，細胞內氧化壓力(Oxidative stress)隨著心材抽出物濃度的增大而減少。

進一步將相思樹中具較佳抗氧化活性之心材進行液相—液相分配(Liquid-liquid partition)萃取，初步分為乙酸乙酯可溶部、正丁醇可溶部以及水可溶部等3個分離部，然後再將各分離部抽出物進行DPPH自由基清除能力測定，結果顯示，乙酸乙酯可溶部活性最佳，其次為正丁醇可溶部與水可溶部，乙酸乙酯可溶部的IC<sub>50</sub>值為2.4μg/mL；其總酚含量為544.4mg/g；而乙酸乙酯可溶部亦被證實對DNA具有良好的保護作用，且效果較心材粗抽出物更佳。因此，將心材乙酸乙酯可溶部進一步利用薄層層析、管柱層析及高效能液相層析進行分離、純化，得到15種酚類化合物，包括：3,4-Dihydroxybenzoic acid、(-)-2,3-trans-3',4',7,8-Tetrahydroxydihydroflavonol、3-Hydroxy-

4-methoxybenzoic acid、7,8,3',4'-Tetrahydroxyflavanone、3,4-Dihydroxybenzoic acid methyl ester、3,7,8,3',4'-Pentahydroxyflavone (Melanoxetin)、7,8,3',4'-Tetrahydroxy-3-methoxyflavone (Transilitin)、3,4-Dihydroxybenzoic acid ethyl ester、3,4,2',3',4'-Pentahydroxy-trans-chalcone (Okanin)、3,7,8,3'-Tetrahydroxy-4'-methoxyflavone、7,8,3',4'-Tetrahydroxy-4-methoxyflavan-3-ol、7,8,3',4'-Tetrahydroxyflavone、7,8,3'-Trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone、7,3',4'-Trihydroxyflavone及7,3',4'-Trihydroxy-3-methoxyflavone。

由此得知，相思樹心材中含有多樣的苯甲酸類與黃酮類化合物，而由相思樹心材分離得到之黃酮類化合物與一般常見的黃酮類Phloroglucinol類型(5,7-Dihydroxy)或Resorcinol類型(7-Hydroxy)大不相同，一般常見黃酮類A環(A-ring)所接的羥基大都在C5及C7的位置，而相思樹黃酮類A環所接的羥基則大都在C7及C8的位置。在這些多樣的相思樹黃酮類化合物中，尤以3,7,8,3',4'-Pentahydroxyflavone (Melanoxetin)、7,8,3',4'-Tetrahydroxy-3-methoxyflavone (Transilitin)及3,4,2',3',4'-Pentahydroxy-trans-chalcone (Okanin)的含量較多。經HPLC的定量得知，相思樹心材乙酸乙脂可溶部，每克抽出物分別含有33.38、24.48以及5.81毫克之Melanoxetin、Transilitin及Okanin。

進一步將此三個黃酮類化合物與已知之黃酮類抗氧化劑—Quercetin(對照組)一起進行抗氧化活性評估，由清除DPPH自由基能力之結果顯示，Melanoxetin、Okanin、Transilitin及Quercetin的 $IC_{50}$ 值依序為2.9 $\mu$ M、3.0 $\mu$ M、



相思樹心材抽出物具有十分良好的抗氧化活性(張上鎮 攝)

3.2 $\mu$ M及3.6 $\mu$ M；此外，四者於5 $\mu$ M濃度下，DPPH自由基抑制率分別為73.9、64.8、72.0及57.1%。這些結果証實，相思樹心材之黃酮類化合物具有極佳之抗氧化能力，其清除DPPH自由基之活性，甚至較Quercetin為佳。

### 心材抽出物之抗發炎活性

IL-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ )、IL-6(Interleukin-6)及TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )等促發炎激素(Proinflammatory cytokines)在發炎反應中扮演極重要的角色，適當的分泌這些激素可以調節免疫反應，抵抗致病原的傳染，這是有利的；但是促發炎激素若大量分泌，會導致一氧化氮(NO, Nitric oxide)的過量釋出，可能造成嚴重的疾病，例如敗血性休克(Septic shock)。換言之，NO已被視為影響發炎反應及造成組織損傷之重要分子，因此抑制NO的生成亦為目前治療發炎症狀的重要策略之一，如能適當調控TNF- $\alpha$ 與IL-1 $\beta$ 促發炎激素的生成，就能避免產生敗血性休克。

由於相思樹心材抽出物具有十分良好的抗氧化活性，因此，進一步探討心材抽出物對NO生成的抑制效果。試驗結果顯示，使用濃度為250 $\mu$ g/mL時，相思樹心材抽出物可抑制50%以上的NO生成。此外，根據相思樹乙醇抽出物對RAW 264.7細胞株之細胞毒性試驗結果發現，在使用濃度250 $\mu$ g/mL的範圍內，



臺灣本土相思樹的栽植面積相當廣泛(張上鎮 攝)

心材抽出物對RAW 264.7細胞株均不具毒性。接著，進一步將心材抽出物中各可溶部進行評估，結果顯示，抑制NO生成的 $IC_{50}$ 值依序為：乙酸乙酯可溶部( $31.1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < 正丁醇可溶部( $42.3\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < 正己烷可溶部( $207.6\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < 水可溶部( $>250\mu\text{g}/\text{mL}$ )，由此得知，相思樹心材抽出物中之乙酸乙酯可溶部對NO生成的抑制效果最佳。

進一步評估相思樹心材乙酸乙酯可溶部分離出之主要黃酮類化合物—Melanoxetin與Transilitin—抑制NO生成之效果，並與已知的NO抑制劑Quercetin比較。試驗結果顯示，Melanoxetin及Quercetin對LPS誘導巨噬細胞生成NO均具有良好的抑制活性，二者之 $IC_{50}$ 值分別為 $6.9\mu\text{M}$ 及 $6.4\mu\text{M}$ ；而Transilitin之 $IC_{50}$  >  $100\mu\text{M}$ ，不具抑制效果。至於細胞毒性，在使用濃度小於 $50\mu\text{M}$ 的範圍內，這些黃酮類化合物均不具毒性，當濃度提升為 $100\mu\text{M}$ 時，亦可維持80%以上之存活率，顯示這些藥劑在此試驗中對巨噬細胞並無顯著毒性。綜合上述結果顯示，相思樹心材主成分Melanoxetin抑制NO生成之效果極佳。

此外，由Melanoxetin抑制 $PGE_2$ 生成之結果可以明顯發現，培養基中 $PGE_2$ 含量隨Melanoxetin或Quercetin(對照組)使用濃度的提高而減少。當使用濃度為 $100\mu\text{M}$ 時，Quercetin可降低細胞中98%

的 $PGE_2$ ，而Melanoxetin亦可降低60%的 $PGE_2$ ( $IC_{50}=67.7\mu\text{M}$ )，顯示該化合物對 $PGE_2$ 的生成具有相當程度之影響。為了更進一步了解Melanoxetin抑制NO及 $PGE_2$ 生成之作用機制，利用RT-PCR配合電泳分析方法檢測Melanoxetin對iNOS與COX-2 mRNA表現之影響。試驗結果顯示，使用濃度分別為 $50\mu\text{M}$ 及 $100\mu\text{M}$ 時，Melanoxetin能完全抑制iNOS及COX-2 mRNA的表現。

綜合上述結果證實，相思樹心材主成分Melanoxetin除具有良好的抗氧化活性外，對iNOS與COX-2 mRNA的表現亦具有良好的抑制作用，且能有效地降低下游NO及 $PGE_2$ 的生成，故具有極佳的抗發炎活性。

此外，相思樹心材抽出物經由哺乳動物毒理試驗(Mammalian toxicology)的單劑量毒性初步評估結果顯示，抽出物對各器官之重量及外觀皆無改變，即相思樹抽出物對動物並無任何毒性。

## 結語

臺灣本土相思樹的栽植面積相當廣泛，早期僅用來作為薪炭、枕木、礦坑支柱及家具之用，後來由於種種因素，一直未能有效的加以利用。最近經由筆者的研究，已證實相思樹心材等部位之抽出物具有極佳的抗氧化及抗發炎等活性，若能配合育林、藥理、生物技術等相關學者專家及產業界繼續對相思樹進行更深入的研究，相信必可在合乎森林永續經營以及全株利用的原則下，將各部位抽出物及其化合物開發成高價值的保健醫藥用品，為相思樹的用途帶來新契機。⊙

⊙ 參考文獻請逕洽作者