

編號：CCMP88-RD-018

# 中草藥-九層塔精油-對大白鼠初代肝細胞之生存力、解毒代謝能力、抗氧化系統與黃麴毒素 B<sub>1</sub> 誘發 DNA 損傷之影響

Effect of Chinese herb — basil oil — on the cell viability, detoxification capability, antioxidation system and AFB<sub>1</sub>-induced DNA damage of primary rat hepatocytes

沈立言<sup>1</sup> 張永賢<sup>2</sup>

1. 中國醫藥學院營養系

2. 中國醫藥學院附設醫院

## 摘要

本研究以九層塔(basil oil)精油為試驗樣品，採用肝灌注分離大白鼠初代肝細胞配合細胞培養技術為實驗模式，探討不同濃度的九層塔精油在不同培養時間下對肝細胞之生存力、脂質過氧化、麩胱甘肽(glutathione, GSH)相關之抗氧化系統及解毒代謝能力之影響。此外，並以西方免疫墨點法探討麩胱甘肽硫轉移酶(glutathione S-transferase, GST)異構酶之變化，同時更進一步探討九層塔精油對黃麴毒素 B<sub>1</sub>(aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>)所誘發之肝細胞 DNA 之傷害是否具有保護作用。

九層塔精油產率分別為 0.35%，而且其主要成分分別為香艾菊腦(methyl chavicol) 54.9%、沉香醇(linalool) 32.1%。

在肝細胞生存力方面，九層塔精油 0.5 μg/ml 處理組之乳酸去氫酶滲漏率(lactate dehydrogenase—LDH leakage)與控制組無明顯差異，顯示該濃度之處理對肝細胞並無不良影響；5 μg/ml 處理組之乳酸去氫酶滲漏率(23.6%)較控制組略高(P<0.05)，但由肝細胞之形態可看出該濃度並不會造成明顯之傷害；50 μg/ml



處理組之乳酸去氫酶滲漏率(54.4%)顯著高於控制組( $P < 0.05$ )，且在肝細胞形態出現細胞核模糊、細胞萎縮及聚集等現象，顯示在該濃度下有肝細胞受損之現象。

在肝細胞脂質過氧化方面，九層塔精油 0.5  $\mu\text{g/ml}$  處理組之硫巴比妥酸反應物(thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS)值與控制組無顯著性差異，但 5 及 50  $\mu\text{g/ml}$  處理組則九層塔精油高於控制組( $P < 0.05$ )。

在肝細胞麩胱甘肽濃度與其相關代謝酵素活性方面，九層塔精油 0.5  $\mu\text{g/ml}$  處理組之麩胱甘肽濃度顯著高於控制組( $P < 0.05$ )；5  $\mu\text{g/ml}$  處理組則低於控制組；九層塔精油 50  $\mu\text{g/ml}$  處理組則顯著低於控制組( $P < 0.05$ )。麩胱甘肽過氧化酶(Glutathione peroxidase, GSH Px)活性在九層塔精油 0.5、5 及 50  $\mu\text{g/ml}$  處理組皆顯著低於控制組( $P < 0.05$ )。麩胱甘肽還原酶(Glutathione reductase, GSH Rd)活性在九層塔精油 0.5 及 5  $\mu\text{g/ml}$  處理組二者均高於控制組，而 50  $\mu\text{g/ml}$  處理組則二者均顯著低於控制組( $P < 0.05$ )。麩胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)活性在九層塔精油 0.5 及 5  $\mu\text{g/ml}$  處理組則顯著高於控制組( $P < 0.05$ )；50  $\mu\text{g/ml}$  處理組則二者均顯著低於控制組( $P < 0.05$ )。由此可知，0.5 或 5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理下可以增加肝細胞中麩胱甘肽相關之抗氧化與解毒代謝能力。

九層塔精油 0.5 及 5  $\mu\text{g/ml}$  處理組分別可降低由黃麴毒素  $B_1$  所誘發肝細胞非程序性 DNA 合成達 49.5、51.5% (與控制組比較)，並且亦可增加麩胱甘肽硫轉移酶之活性( $P < 0.05$ )。顯示此等濃度處理組可減少因黃麴毒素  $B_1$  所造成肝細胞 DNA 之損傷。

關鍵詞：九層塔、生存力、抗氧化、解毒代謝、大白鼠初代肝細胞。

## ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the effect of various concentrations and incubation time intervals of basil oil on cell viability, lipid peroxidation, glutathione-related antioxidation and detoxification capabilities in primary rat hepatocytes. The protective effect for  $\text{AFB}_1$ -induced DNA damage was further examined.

The yield of basil oil was 0.35% (w/w), and the major components of it were methyl chavicol (54.9%) and linalool (32.1%), respectively.

In terms of cell viability, no significant difference in lactate dehydrogenase (LDH) leakage compared to that of the control was found at 0.5  $\mu\text{g/ml}$  treatment of basil oil, showing that no negative influence occurred



at this concentration. Although a little increase in LDH leakage (23.6 %) compared to that of the control ( $P < 0.05$ ) was found at 5  $\mu\text{g/ml}$  treatment, no obvious damage on cell morphology was found. High LDH leakage (54.4 %), nuclear indistinctness, cell shrinkage and aggregation compared to that of the control ( $P < 0.05$ ) were found at 50  $\mu\text{g/ml}$  treatment, showing that cell damage occurred at this concentration.

As for the lipid peroxidation in hepatocytes, no significant difference in thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) values compared to that of the control at 0.5  $\mu\text{g/ml}$  treatment of basil oil, while TBARS tended to increase as compared to that of the control at 5 and 50  $\mu\text{g/ml}$  basil oil treatments.

In terms of the amounts of glutathione (GSH) and its related enzyme activities, the amount of GSH was higher than that of the control at 0.5  $\mu\text{g/ml}$  treatment of basil oil ( $P < 0.05$ ); 5  $\mu\text{g/ml}$  treatment of basil oil lower than that of the control; 50  $\mu\text{g/ml}$  treatment was significantly lower than that of the control ( $P < 0.05$ ). Glutathione peroxidase (GSH Px) activities were significantly lower than that of the control at 0.5, 5 and 50  $\mu\text{g/ml}$  basil oil treatments ( $P < 0.05$ ) after 24 hr incubation. Glutathione reductase (GSH Rd) activities were both higher than that of the control at 0.5 and 5  $\mu\text{g/ml}$  treatment, but lower than that of the control ( $P < 0.05$ ) at 50  $\mu\text{g/ml}$  treatment. Glutathione S-transferase (GST) activities were significantly higher than that of the control at 0.5 and 5  $\mu\text{g/ml}$  treatments ( $P < 0.05$ ); of 50  $\mu\text{g/ml}$  treatment was lower than that of the control ( $P < 0.05$ ). Therefore, under 0.5 and 5  $\mu\text{g/ml}$  basil oil treatment could increase GSH-related antioxidation and detoxification capabilities.

0.5 and 5  $\mu\text{g/ml}$  treatments of basil oil reduced AFB<sub>1</sub>-induced unscheduled DNA synthesis up to 49.5 and 51.5 % as compared to the control, and enhanced GST activities, showing that under these concentration of basil oil certainly reduced the AFB<sub>1</sub>-induced DNA damage in primary rat hepatocytes.

KEY WORD: basil oil, cell viability, antioxidation, detoxification, primary rat hepatocytes



## 壹、前言

中國藥膳源遠流長，至今已有一千多年之悠久歷史(施奠邦，1992)。古代關於“神農嚐百草”之傳說，即顯示早在遠古時代，中華民族便開始探索食物與藥物之功能，故有“醫食同源”之說(張恩勤，1990)。而“藥膳”主要是由中國宮廷料理發展出來的(瀨井康雄，1988)，“藥膳”即是一種“飲食療法”，遠在周秦時代，滋補藥膳就是為宮廷御用(彭銘泉，1988)。由此可知“中國藥膳”，早已融入我國民間飲食醫療的一部分。由於現今人們飲食習慣的轉變及奢侈、精緻飲食文化的形成，造成身體上出現種種病態，因此由天然食品中找出能抑制這些病態的機能性食品已成當前的主要研究目標之一。

但是許多藥膳之配製，缺乏鞏固的科學研究基礎，多以“經驗”來做為判斷之依據，例如：藥膳之配伍禁忌，即是一例(彭銘泉，1988)。因此，本研究室先選擇具有發展潛力且為日常生活常用到之藥膳食品材料入手，採用肝灌注(liver perfusion)配合細胞培養(monolayer cell culture)之肝細胞實驗模式研究其在動物體內生理及代謝之影響，使得中國藥膳更具有學理依據，實乃提升藥膳之學術地位與實用價值的重要課題。

目前已知肝臟是體內具有代謝控制、酵素誘導、對激素反應及解毒抗氧化等特殊生理功能的主要器官，這些功能的執行大部份都發生在肝的實質細胞(parenchymal cell)內進行。目前應用於活體外研究肝細胞代謝之模式，有(1)肝灌注法(liver perfusion)；(2)肝灌注分離肝細胞配合細胞培養法(monolayer cell culture)；(3)肝灌注分離肝細胞配合細胞懸浮液(cell suspension)；(4)利用肝組織均質液(homogenates)；(5)利用肝組織切片(tissue slice)等。在上述模式中，第二種模式具有：(a)專一性(specific)(b)成本低(c)實驗條件容易控制(d)免於其他內生性因子(如：hormonal and neurogenic factor)之影響(e)大量樣品易取得等優點。因此，目前此技術已廣泛被應用於多種研究中(McQueen and Williams, 1987; Pascoe and Reed, 1989; Kremers et al., 1993; Gebhart, 1997)，包括肝細胞之毒性試驗，藥物代謝，肝細胞的功能與控制因子間的交互作用，以及抗癌及抗突變等研究。而且，肝細胞分離技術自 Howard 等人於 1967 年，Berry 和 Friend 於 1969 年發展出利用膠原蛋白酶分離肝細胞後，經 Seglen 於 1972 年與 Kremer 等人於 1986 年數度修正後，肝細胞培養技術已趨向成熟，成功率與產量均獲長足進步。本實驗室目前已建立此技術，並已能控制在相當良好之實驗狀態。

羅勒 ( Basil, *Ocimum basilicum* Linn. ) 為唇形科(Labiatae)，零陵香屬(ocimum)，為多年生半灌木狀草本藥用植物，俗稱九層塔(張憲昌，1987)。全草具芳香，且全草於民間傳說具有廣泛藥效，因而甚受重視。其原產於熱帶地區，以印度、熱帶亞洲為中心，現今已遍及溫帶各地都有栽培。羅勒之營養成分除水分含量



91.4% 外，其主要為蛋白質 1.4% ，脂質 0.2% 及醣類 1.4% ，其他的則為少量之維生素 A、C、磷、鐵、芳香精油等(薛聰賢, 1988)。民間常說「九層塔，十里香」，不論是在東西方日常生活中一直都扮演著重要的角色；在食品上可做為香味蔬菜，生菜、肉料理之添加料，或加入湯、燉物中食用外，羅勒在醫療保健上更是愈來愈受到重視。

早在明朝時李時珍所著“本草綱目”一書中就曾提及羅勒具有治胃痙攣、腎臟病、跌打、疏風行氣、活血解毒、治外感頭痛、食脹氣滯、月經不調、蛇蟲咬傷等之功能。近代許多研究也指出羅勒有其醫療之效果(Jain, M. and Jain, S., 1972; Githinji and Kokwaro, 1993)，對於抑制急性肝炎、胃潰瘍、解毒、抗氧化、抗癌、抗菌、治療口腔疾病、驅滅蚊蟲、促使蕈類孢子發芽及將酵素固定化等方面有其相當之效果(林等, 1993; Akhtar and Munir, 1989; Aruna and Sivaramakrishnan, 1990; Economou et al., 1991; Tawfiq et al., 1994; Patel, 1988; Suciu et al., 1988; White, 1973; Chavan and Nikam, 1982; Afifi, 1978; Afifi and Dowidar, 1978; Melo and D'Souza, 1992)。且亦有報告指出瓜地馬拉之加勒比人之所以長壽，與其生活中使用羅勒等植物有關(Giron et al., 1991)。因此羅勒是我們欲先研究的對象，而羅勒精油則以水蒸氣蒸餾法自羅勒所萃取出來的重要油狀萃取物，其主要含有 methylchavicol 與 1,8-cineole (沈, 1990; Pino et al., 1994; Venskutonis et al., 1996)等多種活性成分(active principles)，具有各種生理機能，例如：可驅蟲、誘導大鼠肝中之 P450s 等解毒代謝酵素、抗菌及抑制大鼠乳癌產生等(Werner, 1995; Hiroi et al., 1995; Hammersmidt et al., 1993; Russin et al., 1989)。

然而，羅勒對於動物細胞之生理及代謝狀況之影響卻不甚了解。因此本研究群將針對羅勒精油，利用肝灌注分離大鼠初代肝細胞配合細胞培養為實驗模式，探討活體外，羅勒精油對肝細胞之生存力、解毒代謝、抗氧化系統與基因毒性之影響，以便有系統的了解其生理活性。

## 貳、材料與方法

### 一、九層塔精油之製備

首先將九層塔取其葉後，然後將九層塔葉與水破碎，並以水蒸氣蒸餾法抽取，即得油狀之九層塔精油。將各批次萃取所得之精油混合，並以氣相層析-質譜儀(GC-MS)分析鑑定其成分，以確定其品質。

### 二、肝細胞之分離及培養

取雄性 Sprague-Dawley 之大白鼠，體重約 250 至 300 公克，作為肝細胞分離用。肝細胞分離乃依據 Berry and Friend (1973)與 Bonney 等 (1974)所報告



利用 Collagenase perfusion 之方法，並加以適度修正(Lii and Hendrich, 1993)。老鼠首先以腹腔注射 sodium pentobarbital(100 mg/kg BW)麻醉，打開腹腔，經由肝門靜脈注入第一階段 perfusion buffer (pH 7.6)，含 25 mM sodium phosphate、3.1 mM KCl、119 mM NaCl、3.5 mM glucose、0.1% BSA 和 0.005% phenol red 以洗出肝中血液，進行第二階段 perfusion 時，則於前述 buffer 中另加入 70 mg collagenase、40 mM CaCl<sub>2</sub> 和 5 mg trypsin inhibitor，經適度 collagenase 消化後，肝臟移出體外並輕柔攪拌於 L-15 medium (washing medium, pH 7.6)中，內含 18 mM HEPES、0.2% BSA、0.05% glucose 和 5 mg/ml insulin 以洗出肝細胞。分離後肝細胞懸浮液經五次離心(800 rpm, 3 min)及 resuspended 後，即完成細胞清洗工作。其中，在第二次與第三次離心間，並利用 iso-density 的 percoll 來分離 (1000 rpm, 10 min)肝細胞及其它受傷或死細胞、或非肝細胞(non-parenchymal cells) (Kreamer et al., 1986)。最後一次離心後，肝細胞將 resuspended 於 L-15 培養液(plating medium, pH 7.6)中，其中含 18 mM HEPES、5 µg/ml of insulin and transferrin、1 mg/ml galactose、1 mM dexamethasone、100 unit/ml penicillin、100 mg/ml streptomycin、5 ng/ml Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 和 2.5% 胎牛血清，細胞懸浮液的密度約 0.5 x 10<sup>6</sup> cells/ml，並分注到已預先經 collagen 處理的 60 mm 培養皿中，如此每一培養皿約有 2.5 x 10<sup>6</sup> 個肝細胞，然後，置於 37 之培養箱中。第一次培養液更換為含 0.2% BSA 之 L-15 培養液，將於分注後四小時進行，第二次則於分注後 24 小時；此後則每 24 小時更換一次。

### 三、不同九層塔精油量以及處理時間對於肝細胞生存力之影響

肝細胞經 24 小時培養後，將九層塔精油以不同濃度加入培養皿中，於不同培養時間(如:0, 4, 8, 24, 48, 72 hrs)後，以倒立式位相差顯微鏡觀察細胞之生長狀態，及測定細胞內外之 LDH (lactate dehydrogenase)酵素活性，以瞭解九層塔精油量以及處理時間對於肝細胞生存力之影響。

LDH 之測定是採用 Moldeus 等人(1978)所發表之方法。

### 四、脂質過氧化(lipid peroxidation)分析

採用 Fraga 等人(1988)所發表之方法，利用脂質過氧化的產物 malondialdehyde (MDA)，在酸性環境下可與二分子 thiobarbituric acid (TBA) 縮合成一紅色質(TBA chromagen)，在 excitation 515 nm 及 emission 555 nm 下即可利用螢光光度計測定 MDA 的濃度。標準溶液使用 1,1,3,3-tetramethoxy propane (TMP)先配成 100 µM 再稀釋成 20、10、5.0、1.0、0.5 及 0.1 µM 等濃度。各取 100 µl 細胞液及標準溶液分別加入 0.4 ml 20 mM 磷酸鉀緩衝液使成 0.5 ml。於沐浴中分別加入 0.5 ml 3% sodium dodecyl buffer (SDS)，2.0 ml 0.1 N HCl, 0.3 ml 10% phosphotungstic acid 及 1 ml 0.7% thiobarbituric



acid 混合均勻，再置放於沸水中 30 分鐘後立即以冷水冷卻。加入 5 ml n-butanol 振盪，萃取 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)。經 3000 rpm 離心 15 分鐘，取上層液，於 excitation 515 nm 及 emission 555 nm 下測其濃度，濃度以每 mg 蛋白質產生多少 nmole MDA 來表示。

#### 五、探討九層塔精油對於肝細胞中 GSH 相關抗氧化與解毒代謝系統之影響

GPx (glutathione peroxidase)、GRd (glutathione reductase)、GST 等酵素，均是參與肝細胞抗氧化系統之重要代謝酵素，且 GSH(reduced glutathione) 含量之測定，亦是瞭解肝細胞抗氧化系統作用之重要指標。因此將九層塔精油以不同濃度加入含正常肝細胞之培養皿中，於不同培養時間(如 4, 8, 24, 48, 72 hrs) 後，測定細胞之 GPx、GRd、GST 等酵素活性，以及 GSH 含量，以瞭解九層塔精油對於肝細胞中 GSH 相關抗氧化系統之影響。GPx 活性之測定是採用 Paglia 等人(1967)所發表之方法。GRd 活性之測定是採用 Bellomo 等人(1987)所發表之方法。GST 活性之測定是採用 Habig 等人(1974)所發表之方法。GSH 含量之測定是採用 Reed 等人(1980)所發表之方法。細胞蛋白質含量之測定是採用 Lowry 等人(1951)所發表之方法。

#### 六、探討九層塔精油對肝細胞 DNA 之保護作用

參考 Wang 等人(1992)之報告，取培養於 L-15 medium 之正常肝細胞，另外再以 15 mM hydroxyurea 培養一小時。添加 0.01 mM aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)含/不含九層塔精油於培養液中，並立即添加 1 μCi 的 [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (20Ci/mol) 於培養液中，經過二十小時後，取出細胞，然後以液體閃爍計數器(liquid scintillation counter)進行測定。DNA damage 以 dpm/ug DNA 來表示。並測定細胞之 GST、GPx、GRd、LDH 等酵素活性，及測定細胞蛋白質含量。GST 活性之測定是採用 Habig 等人(1974)所發表之方法。GPx 活性之測定是採用 Paglia 等人(1967)所發表之方法。GRd 活性之測定是採用 Bellomo 等人(1987)所發表之方法。LDH 之測定是採用 Moldeus 等人(1978)所發表之方法。細胞蛋白質含量之測定是採用 Lowry 等人(1951)所發表之方法。

#### 七、數據整理及統計分析

上述實驗所得之實驗數據，將採用 SAS 統計套裝軟體中之變異分析 (Analysis of variance, 簡稱 ANOVA) 配合 Duncan's test 進行統計分析，以客觀評斷實驗數據間是否達到顯著性差異之分析。本步驟所需儀器：電腦、SAS 統計套裝軟體。

## 參、結果與討論

### 一、九層塔精油之抽取、分析和鑑定



### (一)精油之抽取

精油之抽取乃是參考 Tsai 和 Sheen (1989)之方法，以水蒸氣蒸餾法 (steam distillation) 抽出其精油，將其稱重並加以避光冷藏。計算九層塔精油之產率分別為 0.35 %。

### (二)精油揮發性成分之分析與鑑定

圖一為九層塔精油的總離子層析圖(TIC 圖)，有十個主要成分被分析鑑定出，如表一。而鑑定之依據是將氣相層析-質譜儀(GC-MS)之質譜，以及 GC-MS 的 library search (GC-MS data base)，並參考有關之文獻如：Karawya 等(1974)、Brophy 和 Jogia (1986)、Nykanen (1986)、Tasi 和 Sheen (1989)、Katarzyna 等(1996; 1997)、Zola 與 Garnerio (1973)、Lawrence (1980)、Czygan (1997)、Pino 等(1994; 1996)、Mauro 等(1996)、Venskutonis 等(1996)等。由圖一與表一中之九層塔精油成分濃度可知其主成分為 methyl chavicol (54.9 %)與 linalool (32.1 %) (結構式見圖二)。

## 二、九層塔精油在大白鼠初代肝細胞之生理活性

### (一)九層塔精油對肝細胞生存力之影響

大白鼠初代肝細胞之生存力是利用乳酸去氫酶滲漏率 (lactate dehydrogenase leakage, LDH leakage) 及細胞形態的顯微鏡觀察來加以評估。在肝細胞懸浮液 (suspension) 或單層培養 (monolayer cultures)，乳酸去氫酶滲漏率常作為肝細胞受損的指標。正常情況下乳酸去氫酶存在於細胞之細胞質液 (cytosol) 中，而當細胞受損時，乳酸去氫酶會釋出於胞外。因此，乳酸去氫酶滲漏率可作為評估肝細胞生存力的指標 (Jauregui et al., 1981)。當細胞外液之乳酸去氫酶增加時，表示細胞膜受損使得胞內的乳酸去氫酶釋放至胞外，而當乳酸去氫酶滲漏率值愈大，則表示肝細胞受損的情形愈嚴重。經由倒立式位相差顯微鏡則可以觀察肝細胞形態之變化情形，並與控制組加以比較，可得知樣品對於肝細胞形態上的影響。

圖三表示不同濃度之九層塔精油，在不同培養時間下，對大白鼠初代肝細胞乳酸去氫酶滲漏率的影響。圖三結果顯示，0.5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油在各種培養時間下，其乳酸去氫酶滲漏率與控制組無明顯的差異，且從圖四可看出此濃度處理之肝細胞生長形態與控制組比較並沒有顯著變化，仍保持完整形態，表示在此等濃度的九層塔精油處理下，對肝細胞並不會造成不良的影響；而 5  $\mu\text{g/ml}$  的九層塔精油在培養 24 小時前，其乳酸去氫酶滲漏率與控制組無顯著性差異，然而至 48 小時後，才與控制組有顯著性地差異 ( $P < 0.05$ ) (23.6 %)，但由細胞形態上之觀察，發現此濃度並不足以造成細胞嚴重之傷害；至於 50  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組 (見圖三)，其乳酸去氫酶滲漏率在培養 24 小時後，即顯著高於控制組 ( $P < 0.05$ ) (26.5 %)，



在 48 小時其值則達到 54.4%，再經由比較 48 小時與 24 小時之 LDH leakage，其值分別為 26.5% 與 54.4%，其中已有了顯著性之差異 ( $P < 0.05$ )，由此可知雖然已於 24 小時後更換了新鮮之培養液，但仍不見細胞之回復正常現象，可見此等濃度已對細胞造成持續性之傷害，並配合圖四的細胞形態，發現此時的肝細胞已出現細胞膜破裂、細胞萎縮、細胞間隔模糊與細胞核消失的現象。因此，可以發現在此高濃度的九層塔精油處理下，不但無益於細胞之生存，反而會傷害細胞。

### (二) 九層塔精油對肝細胞脂質過氧化作用之影響

在測定肝細胞脂質過氧化的程度是利用脂質過氧化物丙二醛 (malondialdehyde, MDA)，在酸性環境下，可與二分子硫巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 縮合成有吸光性之紅色物質，藉螢光光譜儀來檢測其吸光值之高低進而判斷脂質過氧化的情形，若檢測出的紅色物質吸光值越高，表示脂質過氧化物愈多，即肝細胞中脂質過氧化的情形愈嚴重。

圖五分別表示不同濃度之九層塔精油對於肝細胞中脂質過氧化之影響。由圖五的結果顯示，0.5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組在各種培養時間下，其硫巴比妥酸反應物 (thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS) 值與控制組相近，均無顯著性差異；以 5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理肝細胞後，其 TBARS 值則於 24 小時後才顯著性地高於控制組 ( $P < 0.05$ )，顯示此時細胞於此濃度下發生了脂質過氧化作用；而 50  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組，在 8 小時後其 TBARS 值便有明顯增加趨勢 ( $P < 0.05$ )，顯示肝細胞在此濃度處理下會發生脂質過氧化作用，進而造成細胞之傷害。而 Marinova 等人 (1997) 亦發現九層塔之有機溶劑抽出物也無法抑制葵花油於 100  $^{\circ}\text{C}$  下之氧化作用。

### (三) 九層塔精油對肝細胞麩胱甘肽濃度與抗氧化系統及解毒代謝能力之影響

麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 普遍存在於一般的動物細胞中，尤其在肝細胞中，麩胱甘肽扮演對藥物代謝、解毒，抗氧化以及維持細胞膜完整等重要角色 (Meister, 1988)。麩胱甘肽藉由麩胱甘肽過氧化酶 (GSH peroxidase, GSH Px) 的催化來去除有機氫過氧化物或過氧化氫等的活性氧而轉變為氧化態麩胱甘肽，然後再經由麩胱甘肽還原酶 (GSH reductase, GSH Rd) 的作用將這些氧化態麩胱甘肽還原回還原態麩胱甘肽 (GSH)，以進行肝細胞中自我調節之抗氧化保護作用。此外，麩胱甘肽亦利用解毒酵素麩胱甘肽硫轉移酶 (GSH S-transferase, GST) 來參與解毒作用，即經由麩胱甘肽硫轉移酶的催化與各種外生性異物 (xenobiotics) 或內生性反應物結合後，再經過一連串其他的解毒酵素 [如  $\gamma$ -麩醯胺基轉移酶 ( $\gamma$ -glutamyl



transpeptidase)、雙肽酶(dipeptidase)及 N-乙醯基轉移酶等酵素(N-acetyltransferase)]作用代謝成較不具毒性的物質[如硫醚尿酸(mercapturates)]排出體外，以達到解毒的目的。因此，探討九層塔精油對肝細胞內麩胱甘肽濃度的變化，麩胱甘肽過氧化酶、麩胱甘肽還原酶及麩胱甘肽硫轉移酶活性之影響，有助於瞭解九層塔精油對肝細胞抗氧化系統與解毒代謝能力之影響。

圖六為九層塔精油對肝細胞內麩胱甘肽濃度之影響。肝細胞在 50  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理下，於 8 小時以後，肝細胞內麩胱甘肽的量即顯著的低於控制組( $P < 0.05$ )；5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組雖於 8、24 小時後其麩胱甘肽濃度顯著地低於控制組( $P < 0.05$ )，但隨著更換新鮮之培養液至 48 小時後，其麩胱甘肽濃度便與控制組無顯著性差異；而 0.5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組在 24 小時後，其肝細胞中麩胱甘肽的量顯著高於控制組( $P < 0.05$ )，在 48 小時後亦比控制組高，顯示 0.5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組具有誘導肝細胞產生更多麩胱甘肽的能力。

#### (四)九層塔精油對肝細胞中麩胱甘肽相關代謝酵素(麩

胱甘肽過氧化酶、麩胱甘肽還原酶及麩胱甘肽硫轉移酶)活性之影響

圖七、八、九分別探討不同濃度的九層塔精油在各種不同的處理時間下，對於肝細胞中麩胱甘肽過氧化酶(GSH Px)、麩胱甘肽還原酶(GSH Rd)及麩胱甘肽硫轉移酶(GST)活性之影響。由圖七的結果顯示出，5 與 50  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組，在 72 小時內，其麩胱甘肽過氧化酶的活性皆顯著性低於控制組( $P < 0.05$ )。至於低濃度的 0.5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組，則在 48 小時後，其麩胱甘肽過氧化酶的活性顯著性低於控制組( $P < 0.05$ )。顯示九層塔精油無法誘導麩胱甘肽過氧化酶活性的增加，且隨著九層塔精油處理濃度的增加反而有明顯的抑制效果。麩胱甘肽可藉由麩胱甘肽過氧化酶(GSH peroxidase, GSH Px)的催化來去除有機氫過氧化物或過氧化氫等等活性氧而達到抗氧化的目的。而由前述之實驗結果得知，九層塔精油無法有效抑制脂質過氧化作用的發生，推測可能與九層塔精油抑制麩胱甘肽過氧化酶的活性有關。圖八的結果則顯示，0.5 及 5  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組，經 24、48、72 小時處理後其麩胱甘肽還原酶的活性均顯著的高於控制組( $P < 0.05$ )，表示九層塔精油在此等濃度下是可以誘導出肝細胞中麩胱甘肽還原酶的活性，其中 0.5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組在 72 小時後，麩胱甘肽還原酶的活性更比控制組高出 34 %；而 50  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組，在 48 小時以後的培養時間下，其麩胱甘肽還原酶活性皆顯著低於控制組( $P < 0.05$ )，至 72 小時較控制組低 47 %。比較 48、72 小時與 24 小時 50  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組，發現其抑制麩胱甘肽還原酶活性的作用是持續的進行



( $P < 0.05$ )。圖九 則為肝細胞經九層塔精油處理後，對於麩胱甘肽硫轉移酶(GST)活性之影響，得知  $50 \mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組在 48、72 小時以後，麩胱甘肽硫轉移酶活性便顯著的低於控制組( $P < 0.05$ )。 $0.5 \mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組在 48 小時以後，麩胱甘肽硫轉移酶的活性便與控制組無顯著性差異，但其在各處理時段內麩胱甘肽硫轉移酶之活性皆略高於控制組；而  $5 \mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組則於培養 24 小時以後，其麩胱甘肽硫轉移酶活性即顯著高於控制組( $P < 0.05$ )，且在 24 小時換上新鮮的培養基後亦持續顯著性的增加麩胱甘肽硫轉移酶活性至 72 小時( $P < 0.05$ )。1990 年 Aruna 與 Sivaramakrishnan 也發現九層塔確實可以誘發老鼠肝、胃、以及食道中之麩胱甘肽硫轉移酶之活性。而高濃度之  $50 \mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組則可能在肝細胞之生存力已嚴重下降的情形下(圖三)，抑制麩胱甘肽硫轉移酶的生合成作用，因此無法誘導出麩胱甘肽硫轉移酶的活性。

### 三、九層塔精油對黃麴毒素 $B_1$ 所誘發肝細胞 DNA 損傷的影響

非程序性 DNA 合成是一種對真核細胞的基因毒性分析法，可用來測定黃麴毒素  $B_1$  (Aflatoxin  $B_1$ ,  $AFB_1$ ) 等的基因毒性。其原理是利用非分裂期細胞為修補基因毒物所造成之 DNA 傷害時，會利用已存在並含放射性之核甘酸(nucleotide)鑲嵌入受損之 DNA 雙股中進行 DNA 複製修復。因此依測定到的放射性量之多寡，即可知 DNA 所受到的傷害程度如何，放射線量愈多表示 DNA 在修補之前所受到的傷害愈大。而在本實驗設計中，則是除加入黃麴毒素  $B_1$  與放射性核甘酸([methyl- $^3\text{H}$ ]-thymidine)外，並同時添加九層塔精油，探討九層塔對於由黃麴毒素  $B_1$  所造成之 DNA 損傷之影響。

#### (一)九層塔精油對黃麴毒素 $B_1$ 誘發肝細胞非程序性 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, UDS)之影響

表二顯示九層塔精油對於黃麴毒素  $B_1$  所誘發非程序 DNA 合成之影響。由其結果可得知，若單獨以黃麴毒素  $B_1$  ( $1 \text{ mM}$ )處理肝細胞，則其鑲嵌入 DNA 雙股中之(methyl- $^3\text{H}$ )-thymidine 的量( $90.18 \pm 8.68 \text{ dpm}/\mu\text{g DNA}$ )會比負控制組(添加  $0.5\%$  DMSO, with hydroxyurea)的量( $21.30 \pm 2.55 \text{ dpm}/\mu\text{g DNA}$ )高出甚多，表示此黃麴毒素  $B_1$  會造成肝細胞之 DNA 毒性；若除了黃麴毒素  $B_1$  外，同時又添加不同濃度之九層塔精油( $0.5, 5 \mu\text{g/ml}$ )後，其鑲嵌入 DNA 雙股中之(methyl- $^3\text{H}$ )-thymidine 則分別顯著降低( $P < 0.05$ )為  $45.51 \pm 5.14$  與  $43.78 \pm 2.77 \text{ dpm}/\mu\text{g DNA}$ ，若與單獨以黃麴毒素  $B_1$  ( $1 \text{ mM}$ )之處理組比較，其抑制百分比分別為  $49.5$  及  $51.5\%$ 。顯示此二種濃度之九層塔精油皆可降低由黃麴毒素  $B_1$  所誘發之非程序性 DNA 合成之程度，表示此二種濃度之九層塔精油對於 DNA 具有保護作用。Russin 等(1989)曾指出，九層塔精油之主成分 1,8-cineole 可顯著降低由 7,12-



dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)所誘發大白鼠乳癌之 DMBA-DNA 鍵結的機會，以降低乳癌的發生機率。

(二) 經黃麴毒素 B<sub>1</sub> 與九層塔精油同時處理後，肝細胞中乳酸去氫酶滲漏率及麩胱甘肽過氧化酶、麩胱甘肽還原酶及麩胱甘肽硫轉移酶等酵素活性之變化

由表三的結果可知，若單獨以黃麴毒素 B<sub>1</sub> (1 mM)處理肝細胞 4、8、24 小時後，其乳酸去氫酶滲漏率與負控制組(添加 0.5% DMSO)已有顯著性差異(P<0.05)，顯示此時肝細胞已受損了。肝細胞同時經 1 mM 黃麴毒素 B<sub>1</sub> 與 0.5, 5 µg/ml 九層塔精油處理 4 小時後，其乳酸去氫酶滲漏率與正控制組(添加 1 mM 黃麴毒素 B<sub>1</sub>)、負控制組無顯著性差異，而在 8 及 24 小時之處理時間下，其乳酸去氫酶滲漏率則顯著低於正控制組(P<0.05)。此結果顯示在 24 小時內，九層塔精油(0.5, 5 µg/ml)可以降低經由黃麴毒素 B<sub>1</sub> (1 mM)所誘發肝細胞之損傷。

此外由表四 結果顯示出，經黃麴毒素 B<sub>1</sub> (1 mM)與九層塔精油(0.5, 5 µg/ml)同時處理之肝細胞，其麩胱甘肽硫轉移酶的活性在 24 小時之處理時間下，顯著地高於黃麴毒素 B<sub>1</sub> 處理組(P<0.05)，而肝細胞中麩胱甘肽過氧化酶與麩胱甘肽還原酶的活性，則在 24 小時後與黃麴毒素 B<sub>1</sub> 處理組並無顯著性差異。

前述曾提及，黃麴毒素 B<sub>1</sub> 在動物細胞內可被細胞色素 P-450 活化代謝成環氧化合物(epoxide)，黃麴毒素 B<sub>1</sub>-2,3-epoxide，而此環氧化合物在細胞內可行兩種途徑，一、可與細胞內巨大分子(macromoleculars)結合，如與 DNA 形成 DNA 鍵結物(DNA adducts)而造成 DNA 損傷；二、經水解後，其水解產物黃麴毒素 B<sub>1</sub>-dihydrodiol 可與細胞內之麩胱甘肽發生共軛結合作用(conjugation)形成較不具毒性的化合物而排出體外，故此途徑可視為動物細胞對黃麴毒素 B<sub>1</sub> 之解毒作用。此外，Wang 等人(1991, 1992)曾指出，在大白鼠肝細胞中可藉由增加黃麴毒素 B<sub>1</sub> 解毒酵素麩胱甘肽硫轉移酶與麩胱甘肽過氧化酶的活性，以及促進麩胱甘肽之生合成，進而可以抑制黃麴毒素 B<sub>1</sub> 所誘發之 DNA 修補合成現象。

因此，為了進一步探討九層塔精油抑制黃麴毒素 B<sub>1</sub> 所導致 DNA 損傷的機制，於是本實驗又分別測定肝細胞中之解毒酵素麩胱甘肽硫轉移酶及麩胱甘肽過氧化酶與麩胱甘肽還原酶等酵素活性。而當九層塔精油(0.5, 5 µg/ml)與黃麴毒素 B<sub>1</sub> 同時添加於培養肝細胞之培養液中 24 小時後，其麩胱甘肽硫轉移酶之活性均可被顯著提昇(P<0.05)，並配合表二 所顯示其可降低由黃麴毒素 B<sub>1</sub> 所引發非程序 DNA 合成的結果，推測其抑制 DNA 損傷的原因之一，可能是在此時間內因麩胱甘肽硫轉移酶活性的增加而抑制黃麴毒素 B<sub>1</sub> 之毒性，進而保護肝細胞 DNA 免於遭受黃麴毒素 B<sub>1</sub> 之基因毒性所



造成的傷害。

## 肆、結論與建議

### 一、精油成分之分析鑑定

以氣相層析-質譜儀(GC-MS)分析九層塔精油之成分濃度可知其主成分為香艾菊腦(methyl chavicol) (54.9 %)與沉香醇 linalool (32.1 %)。

### 二、對肝細胞生存力方面之影響

大白鼠初代肝細胞以 0.5  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理後，其乳酸去氫酶滲漏率與控制組並無顯著性差異，表示此等濃度之九層塔精油並不會對肝細胞造成不良影響。而 5  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔或精油處理組之乳酸去氫酶滲漏率雖與控制組有顯著性之差異( $P < 0.05$ ) (23.6 %; 18.9 %)，但其值與控制組(14.9 %; 14.1 %)相近，且由細胞形態之觀察，亦可發現此濃度之九層塔精油處理組並不會造成細胞明顯之傷害。50  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組，則在肝細胞培養 48 小時後，其乳酸去氫酶滲漏率顯著地高於控制組( $P < 0.05$ )，且以 50  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組更為顯著，顯示此等濃度以對細胞之生存力造成了傷害。

### 三、在脂質過氧化影響方面

0.5  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組於培養 4、8、24 小時後，均與控制組無顯著性差異，顯示此等濃度之九層塔精油並不會促進細胞脂質過氧化；而 5 與 50  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組於培養 24 小時後硫巴比妥酸反應物(thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS)值顯著高於控制組( $P < 0.05$ )，表示此等濃度之九層塔精油會增加細胞中脂質過氧化作用的發生。

### 四、在肝細胞中 GSH 濃度方面

0.5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理肝細胞 24 小時以後，造成細胞內麩胱甘肽濃度有顯著性增加的現象( $P < 0.05$ )，而 5 及 50  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組則皆無法使細胞中麩胱甘肽之濃度提高。

### 五、在麩胱甘肽相關代謝酵素活性方面

0.5 與 5  $\mu\text{g/ml}$  之九層塔精油處理組在培養 24、48 與 72 小時後，其麩胱甘肽硫轉移酶與麩胱甘肽還原酶之酵素活性均較控制組有顯著性的提升( $P < 0.05$ )。

### 六、對黃麴毒素 B<sub>1</sub> 所誘發非程序性 DNA 合成之影響方面

0.5 與 5  $\mu\text{g/ml}$  九層塔精油處理組分別降低對黃麴毒素 B<sub>1</sub> 所誘發非程序性 DNA 合成達 49.5 % 與 51.5 %。

### 七、經黃麴毒素 B<sub>1</sub> 與九層塔精油同時處理後，肝細胞中乳酸去氫酶滲漏率及麩胱甘肽相關代謝酵素活性方面



經黃麴毒素 B<sub>1</sub> 與九層塔精油(0.5, 5  $\mu\text{g/ml}$ )處理後，肝細胞中之乳酸去氫酶滲漏率皆低黃麴毒素 B<sub>1</sub> 控制組，顯示其對細胞並不會造成傷害，且九層塔精油均能顯著地誘導出解毒酵素麩胱甘肽硫轉移酶之活性( $P < 0.05$ )。

## 伍、參考文獻

- 施奠邦：中醫食療營養學。中國中醫研究所，人民出版社授權，台灣知音出版社：台北，1992：1-6。
- 張恩勤：中國藥膳。上海中醫學院出版社：中國，1990：140-169。
- 彭銘泉：中國藥膳大全。四川科技出版社：中國，1988：3-19。
- 瀨井康雄：中國“藥膳”原理效果的利用。食品開發，1988：23：28-35。
- 薛聰賢：蔬香果樂—台灣的食用農作物 130 種。淑馨出版社：台北，1988：154-155。
- 張憲昌：台灣自然觀察圖鑑 7—藥草(一)。渡假出版社：台北，1987：75。
- Afifi AF：Effect of volatile substances released from *Origanum majorana* and *Ocimum basilicum* on the rhizosphere and phyllosphere fungi of *Phaseolus vulgaris*. Folia. Microbiol. 1995; 23: 399-405.
- Afifi AF, Dowidar AE：Effect of volatile substances from *Origanum majorana* and *Ocimum basilicum* on spore respiration and germination of some soil fungi. Folia. Microbiol. 1978; 23: 489-492.
- Akhtar MS, Munir M：Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats. J. Ethnopharmacol. 1989; 27: 163-176.
- Aruna K, Sivaramakishnan VM：Plant products as protective agents against cancer. Indian J. Exp. Biol. 1990; 28: 1008-1011.
- Bellomo G, Mirabelli F, Dimonte D, Richelmi P, Thor H, Orrenius C, Orrenius S：Formation and reduction of glutathione-mixed disulides during oxidative stress. Biochem. Pharmacol. 1987; 36: 1313-1320.
- Berry MN, Friend DS：High yield production of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J. Biol. Chem. 1973; 59: 722-734.
- Berry MN, Friend DS：High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. a biochemical and fine structure study. J. Cell Biol. 1969; 43: 506-520.
- Bonny VR, Becker JE, Walker PR, Potfer VR：Primary monolayer cultures of rat liver parenchymal cells suitable for study of regulation of enzyme



- synthesis. *In vitro*. 1974; 9: 399-413.
- Brophy JJ, Jogia MK : Essential oils from f i j i a n *Ocimum basilicum* L. . Flavour and Fragrance J. 1986; 1: 53-55.
- Chavan SR, Nikam ST : Mosquito larvicidal activity of *Ocimum basilicum* Linn. Indian J. Med. Res. 1982; 75: 220-222.
- Czygan FC : Sweet Basil-*Ocimum basilicum* L. . Zeitschrift fur Phytotherapie. 1997; 18: 58-66.
- Davila JC, Rodriguez M, Acosta D : Toxicological studied of gossypol in primary culture of postnatal rat hepatocytes. *In Vitro Toxicol*. 1991; 4: 161-172.
- Economou KD, Oreopoulou V, Thomopoulos CD : Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiatae. J. Am. Oil Chem. Soc. 1991; 68: 109-113.
- Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL: Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substance in tissue slices: characterization and comparison between homogenates and microsomes. Free Rad. Biol. Med. 1988; 4: 155-161.
- Giron LM, Freire V, Alonzo A, Caceres A : Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacol. 1991; 34: 173-187.
- Githinji CW, Kokwaro JO : Ethnomedicinal study of major species in the family *Labiatae* from Kenya. J. Ethnopharmacol. 1993; 39: 197-203.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB: Glutathione S-transferase : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 1974; 249: 7130-7139.
- Hammerschmidt FJ, Clark AM, Soliman FM, el-Kashoury ES, Abd el-Kawy MN, el-Fishawy AM, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Jasonia candicans* and *J. montana*. Planta. Med. 1993; 59: 68-70.
- Hiroi T, Miyazaki Y, Kobayashi Y, Imaoka, S, Funae Y : Induction of hepatic P450s in rat by essential wood and leaf oils. Xenobiotica. 1995; 25: 457-467.
- Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA : The enzymatic preparation of isolated, intact parenchymal cells from rat liver. J. Cell Biol. 1967; 35: 675-684.



- Jain ML, Jain SR : Therapeutic utility of *Ocimum basilicum* var. *album*. *Planta. Med.* 1972; 22: 66-70.
- Jauregui HO, Hayner NT, Driscoll JL, Williams-Holland R, Lipsky MH, Galletti PM : Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes—freshly isolated cells, cell suspensions and primary monolayer cultures. *In vitro.* 1981; 17: 1100-1110.
- Karawya MS, Hashim FM, Hifnawy MS : Oils of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum rubrum* L. Grown in Egypt. *J. Agr. Food Chem.* 1974; 22: 520-522.
- Katarzyna JL, Gwyn PJ, David RB, Fred EB, Martin VP, Simon STT □ Murray H : Characteristics of essential oil from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 877-881.
- Kreamer BL, Staecker JL, Sawada N, Sattler GL, Hsia MTS, Pitot HC : Use of a low-speed, isodensity percoll centrifugation method to increase the viability of isolated hepatocyte preparations. *In Vitro Cell Develop. Biol.*, 1986; 22: 201-211.
- Lawrence BM : Progress in essential oils. *Perfumer and Flavorist.* 1980; 4: 31-32, 35-36.
- Lii CK, Hendrich S : Selenium deficiency suppressed the S-glutathionation of carbonic anhydrase in rat hepatocytes under oxidative stress. *J. Nutr.* 1993; 123: 1480-1486.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Kandall RJ : Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- Marinova, EM, Yanishlieva NV : Antioxidative activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. *Food Chem.* 1997; 58: 245-248.
- Mauro M, Roberta P, Enrico G : Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 3926-3929.
- Meister A : Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 17205-17208.
- Melo JS, D'Souza SF : Immobilization of invertase through its carbohydrate moiety on *Ocimum basilicum* seed. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1992; 32: 159-170.
- Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S : Isolation and use of liver cells. In



- “Methods in Enzymology” , S. Fleischer, and L. Packer, Eds. Academic Press, New York. 1978; 52: 60-71.
- Nykanen I : High resolution gas chromatographic-mass-spectrometric determination of the flavour composition of basil (*Ocimum basilicum* L. ) cultivated in Finland. Z. Lebensm. -Unters. -Forsch. 1986; 182: 205-211.
- Pascone GA, Reed DJ : Cell calcium, vitamin E, and the thio redox system in cytotoxicity. Free Rad. Biol. Med. 1989; 6: 209-224.
- Patel VK, Venkatakrishna-Bhatt H : Folklore therapeutic indigenous plants in periodontal disorders in India (review, experimental and clinical approach). Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1988; 26: 176-184.
- Pino JA, Rosado A, Fuentes V : Composition of the essential oil from the leaves and flowers of *Ocimum gratissimum* L. grown in Cuba. J. Essential Oil Res. 1996; 8: 139-141.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW: High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. Anal. Biochem. 1980; 106: 55-62.
- Russin WA, Hoesly JD, Elson CE, Tanner MA, Gould MN : Inhibition of rat mammary carcinogenesis by monoterpenoids. Carcinogenesis. 1989; 10: 2161-2164.
- Seglen PO : Preparation of rat liver cells. II Effects of ions and chelators on tissue dispersion. Exp. Cell Res. 1972; 76: 25-30.
- Suciu G, Hodisan V, Ban I, Chiorean V, Pop D : Pharmaceutical preparations from plant products employed in stomatologic diseases. Rev. Chir. Oncol. Radiol. O.R.L. Oftalmol. Stomatol. Ser. Stomatol. 1988; 35: 191-194.
- Tawfiq N, Wanigatunga S, Heaney RK, Musk SR, Williamson G, Fenwick GR : Induction of the anti-carcinogenic enzyme quinone reductase by food extracts using murine hepatoma cells. Europe. J. Cancer Pre. 1994; 3: 285-292.
- Tsai SJ, Sheen LY : Essential Oil of *Ocimum basilicum* L. cultivated in Taiwan. In “Trends in Food Science” , Ghee, A. H. ; Sze, L.W. ; Woo, F. C. Ed., Singapore Institute of Food Science and Technology. 1989;

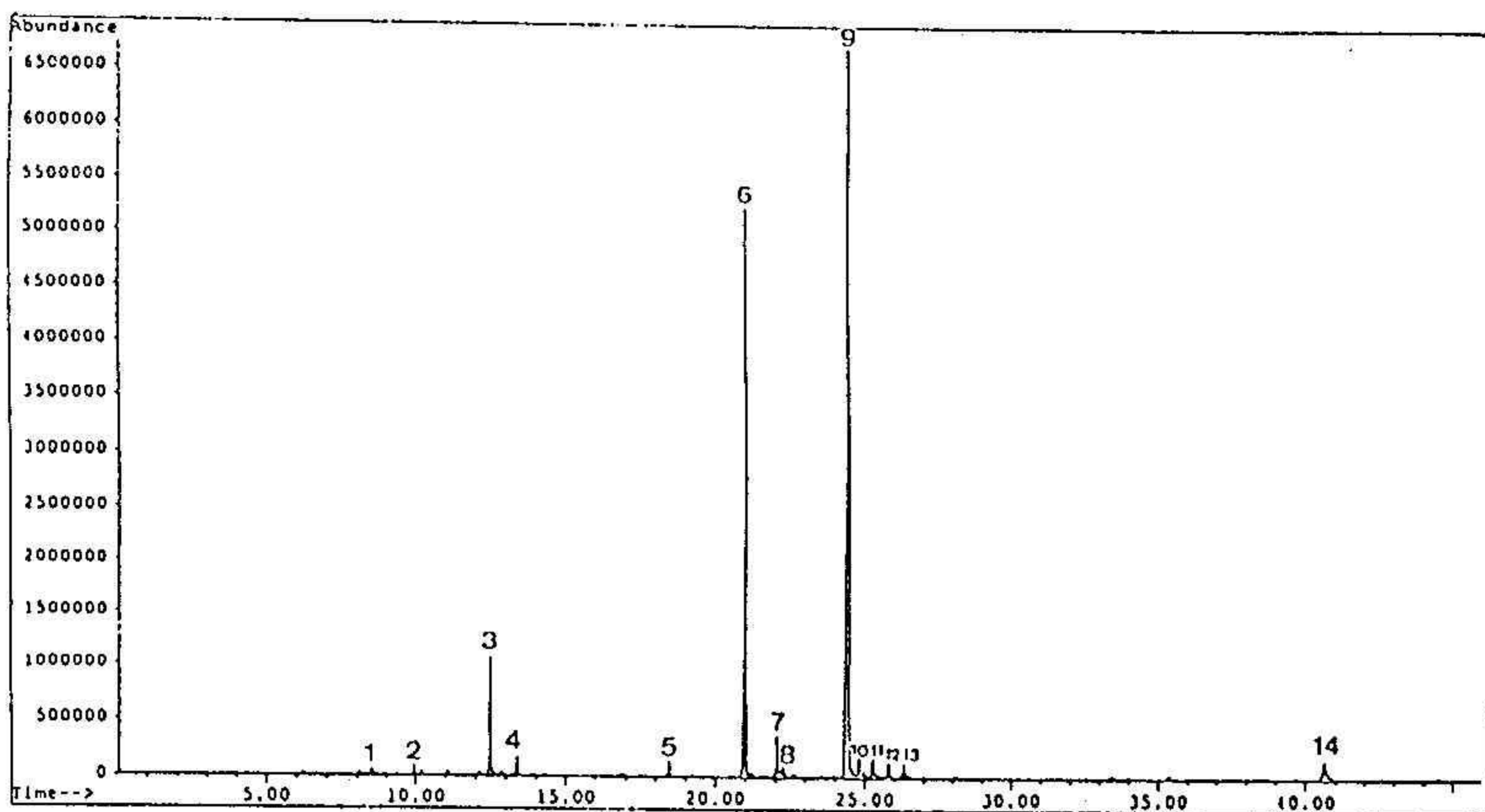


66-70.

- Venskutonis R, Poll L, Larsen M : Effect of irradiation and storage on the composition of volatile compounds in basil (*Ocimum basilicum* L. ). Flavour and Fragrance J. 1996; 11: 117-121.
- Wang CJ, Wang SW, Lin JK : Supressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B<sub>1</sub> in rats. Cancer Lett. 1991; 60: 95-102.
- Wang SW, Lai CY, Wang CJ : Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B<sub>1</sub>-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. Cancer Lett. 1992; 65: 133-137.
- Werner RA : Toxicity and repellency of 4-allylanisole and monoterpenes from white spruce and tamarack to spruce beetle and eastern larch beetle (Coleoptera: Scolytidae). Environ. Entomol. 1995; 24: 372-379.
- White GB : The insect-repellant value of *Ocimum* SPP. (*Labiatae*): traditional anti-mosquito plants. East. Afr. Med. J. 1973; 50: 248-252.

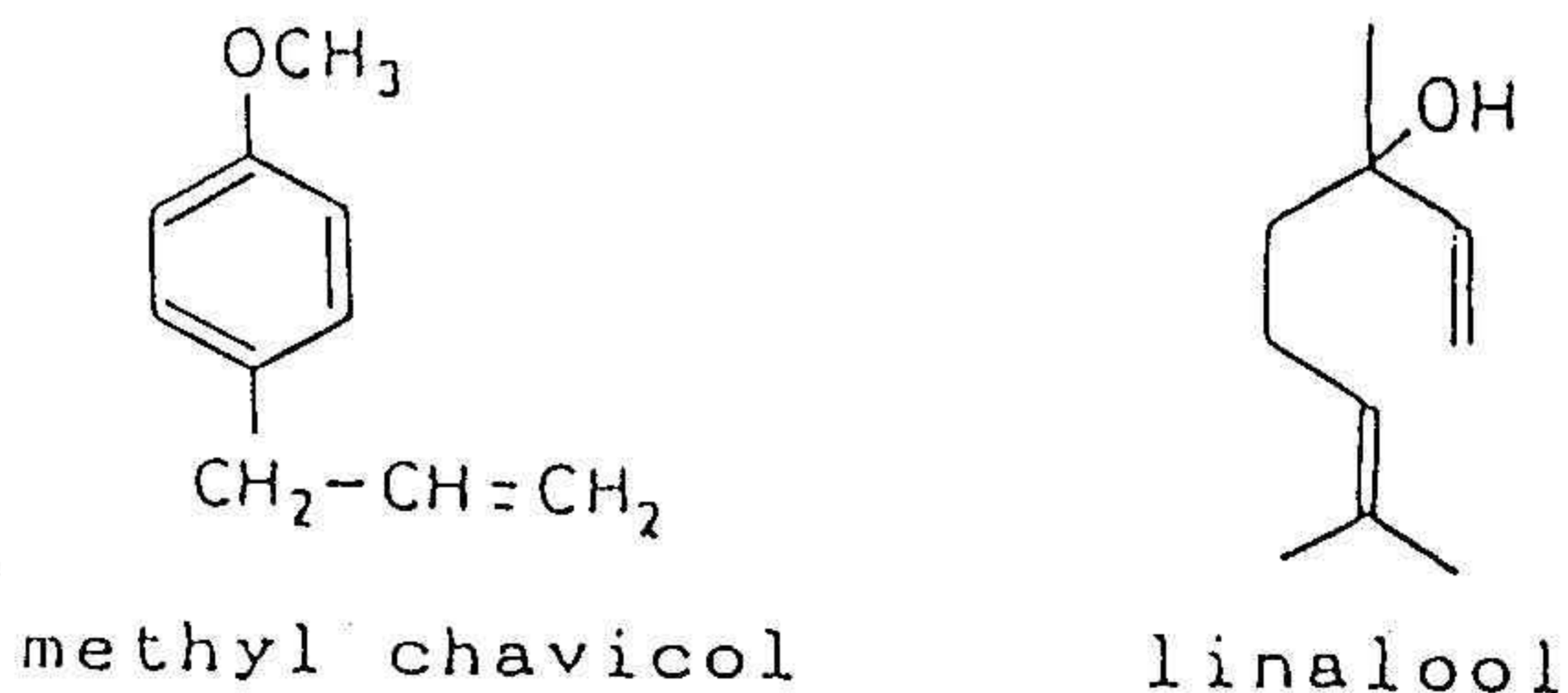


陸、圖、表



圖一 九層塔精油揮發性成分之總離子層析圖

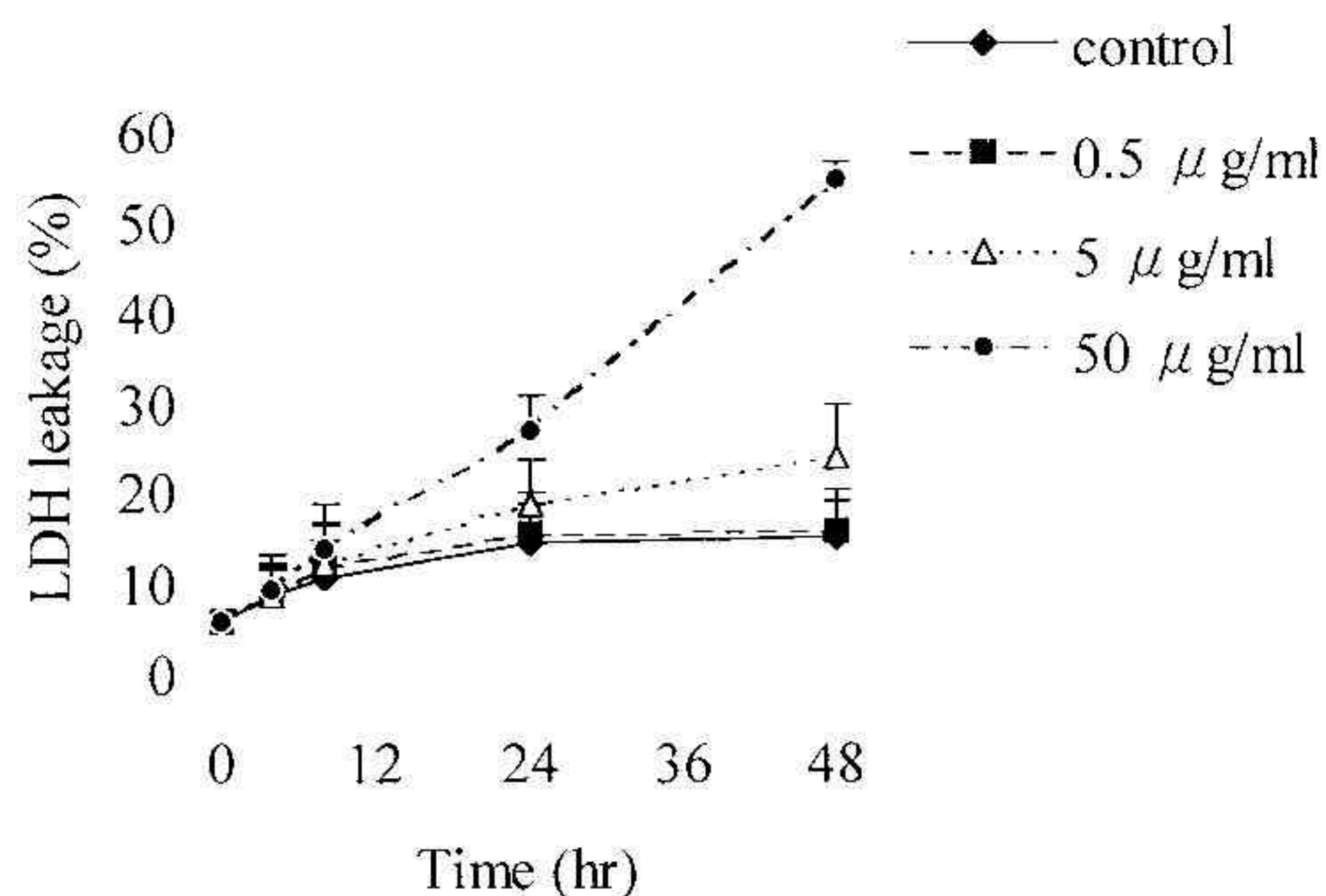
Fig.1 Total ion chromatogram of the volatiles in basil oil. 1, unknow; 2  $\beta$ -pinene; 3, 1, 8-cineol; 4, 3-carene; 5, 1-octen-3-ol; 6, linalool; 7, 6-methyl-2-bicycles[3.1.1]heptane; 8, clcmene; 9, methyl chavicol; 10,  $\alpha$ -terpineol; 11, unknow; 12, 2, 5, 5-trimethyl-1,3,6-hepatriene; 13, unknow; 14, unknow.



圖二 九層塔精油主要成分 methyl chavicol 及 linalool 之化學結構

Fig.2 The chemical structures of the main components identified in basil oil: chavicol and linalool.

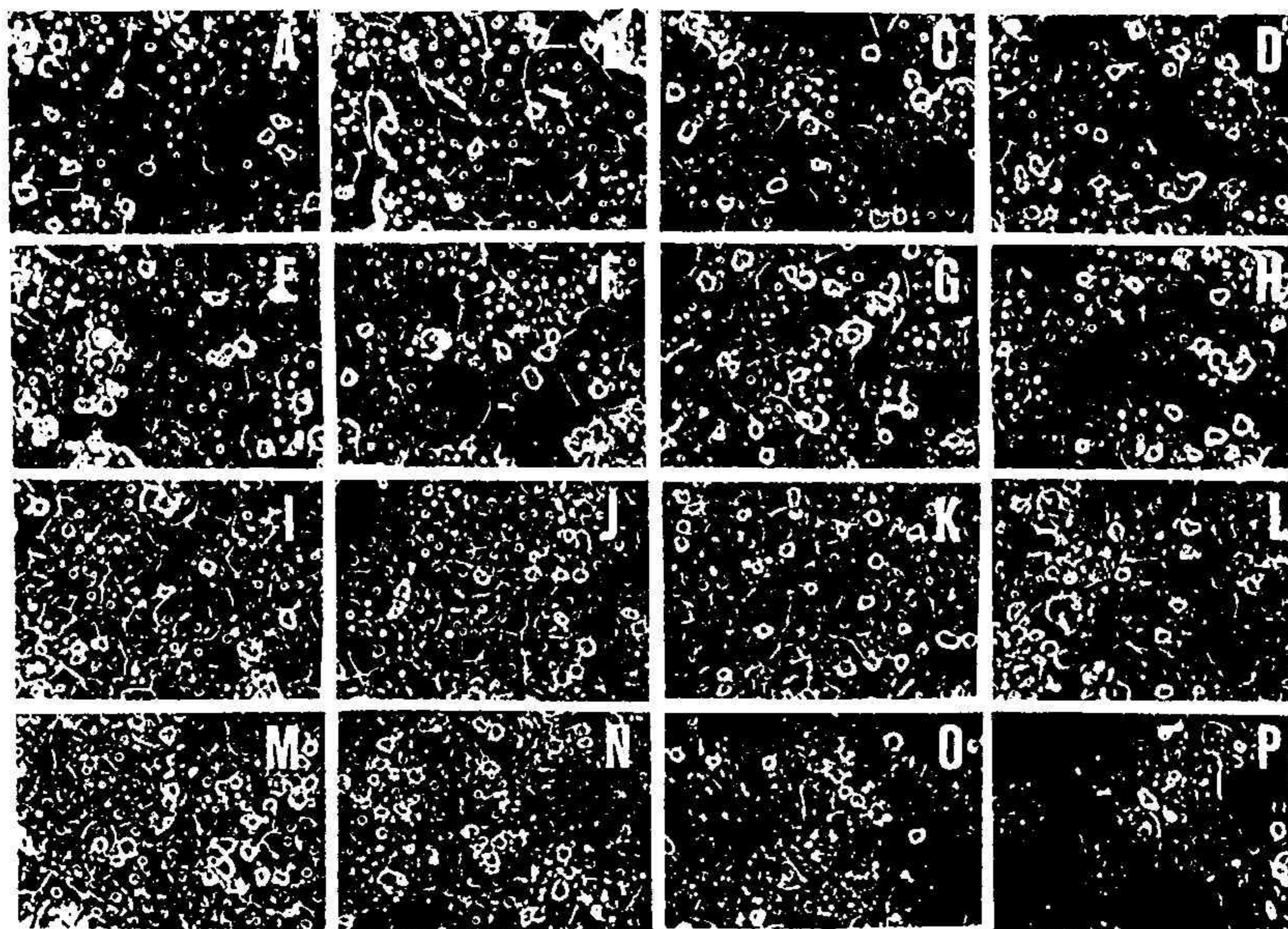




圖三 不同濃度之九層塔精油對大白鼠初代肝細胞乳酸去氫酶滲漏率之影響

Fig. 3 Effect of various concentrations of basil oil on LDH leakage of primary rat hepatocytes. Hepatocytes were isolated from 8 weeks old male rats. Cells isolated from each animal were divided equally and cultured in medium that containing 0, 0.5, 5 or 50  $\mu\text{g/ml}$  basil oil. Values are expressed as means  $\pm$  SD from 3 to 4 rats. \*Significantly different ( $P < 0.05$ ) between treatment and control at same time interval.



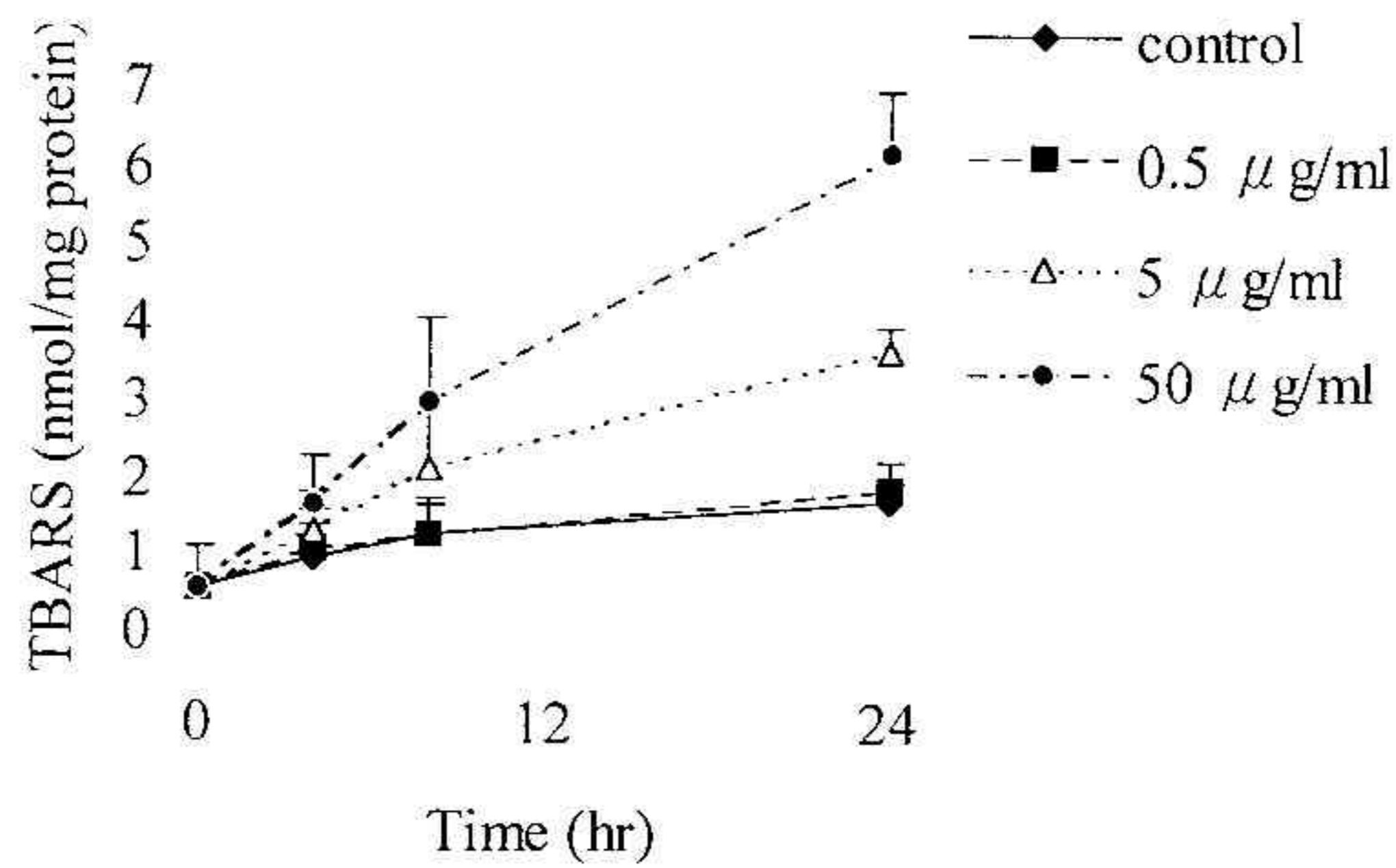


圖四 不同濃度與培養時間下九層塔精油對大白鼠初代肝細胞形態之影響

Fig.4 Effect of various concentrations and different incubation time intervals of basil oil on the morphology of primary rat hepatocytes (400 $\times$ under inverted stage microscope equipped with phase contrast). A-D, Hepatocytes were cultured for 4 hr after treatment with control, 0.5, 5 or 50  $\mu$ g/ml basil oil, respectively. E-H, Hepatocytes were cultured for 8 hr after treatment with control, 0.5, 5 or 50  $\mu$ g/ml basil oil, respectively. I-L, Hepatocytes were cultured for 24 hr after treatment with control, 0.5, 5 or 50  $\mu$ g/ml basil oil, respectively. M-P, Hepatocytes were cultured for 48 hr after treatment with control, 0.5, 5 or 50  $\mu$ g/ml basil oil, respectively.

— = 50  $\mu$ m

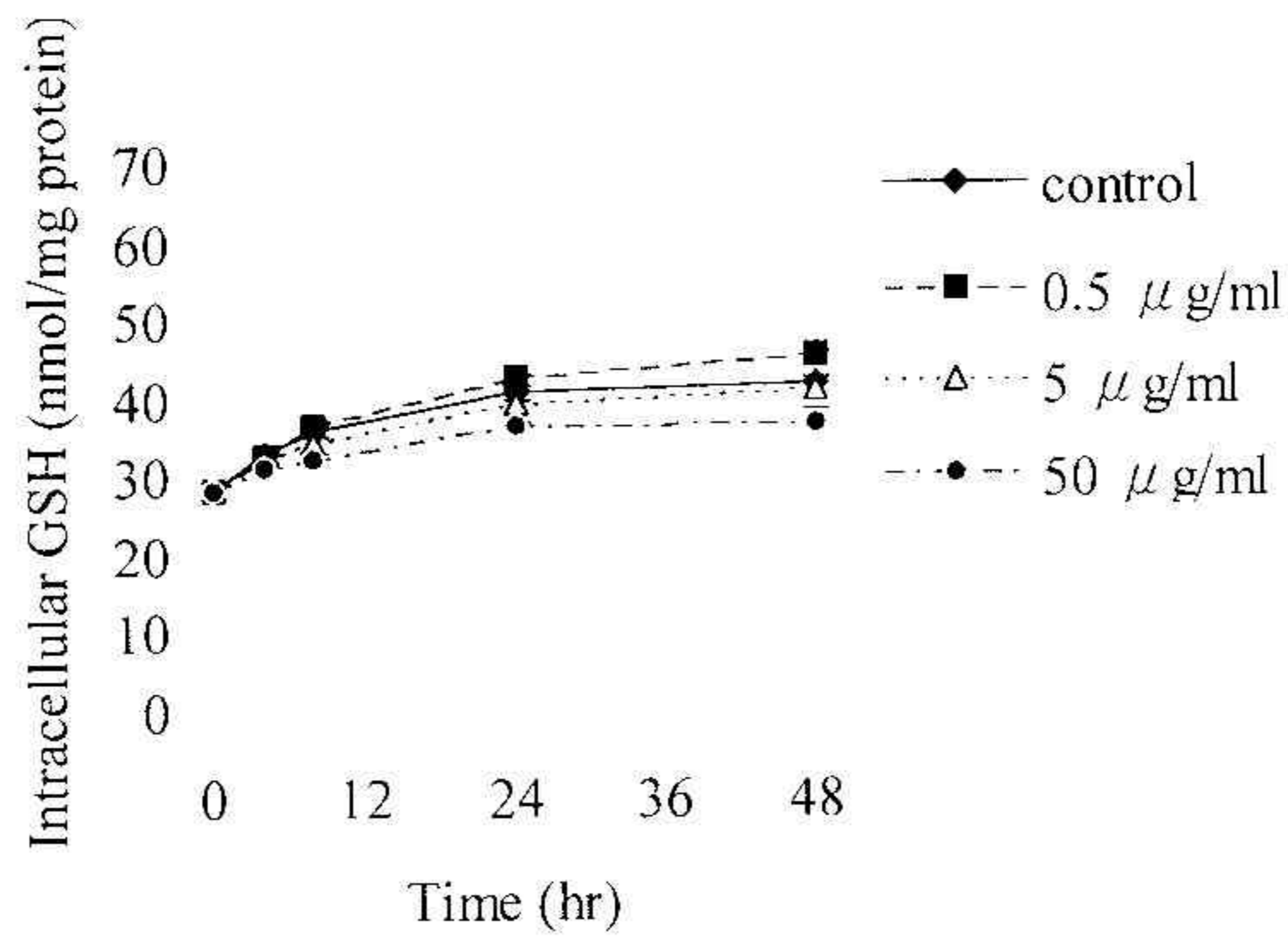




圖五 不同濃度之九層塔精油對大白鼠初代肝細胞中脂質過氧化之影響

Fig.5 Effect of various concentrations of basil oil on thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) production of primary rat hepatocytes. Hepatocytes were isolated from 8 weeks old male rats. Cells isolated from each animal were divided equally and cultured in medium that containing 0, 0.5, 5 or 50  $\mu\text{g/ml}$  basil oil. Values are expressed as means  $\pm$  SD from 3 to 4 rats. \*Significantly different ( $P < 0.05$ ) between treatment and control at same time interval.

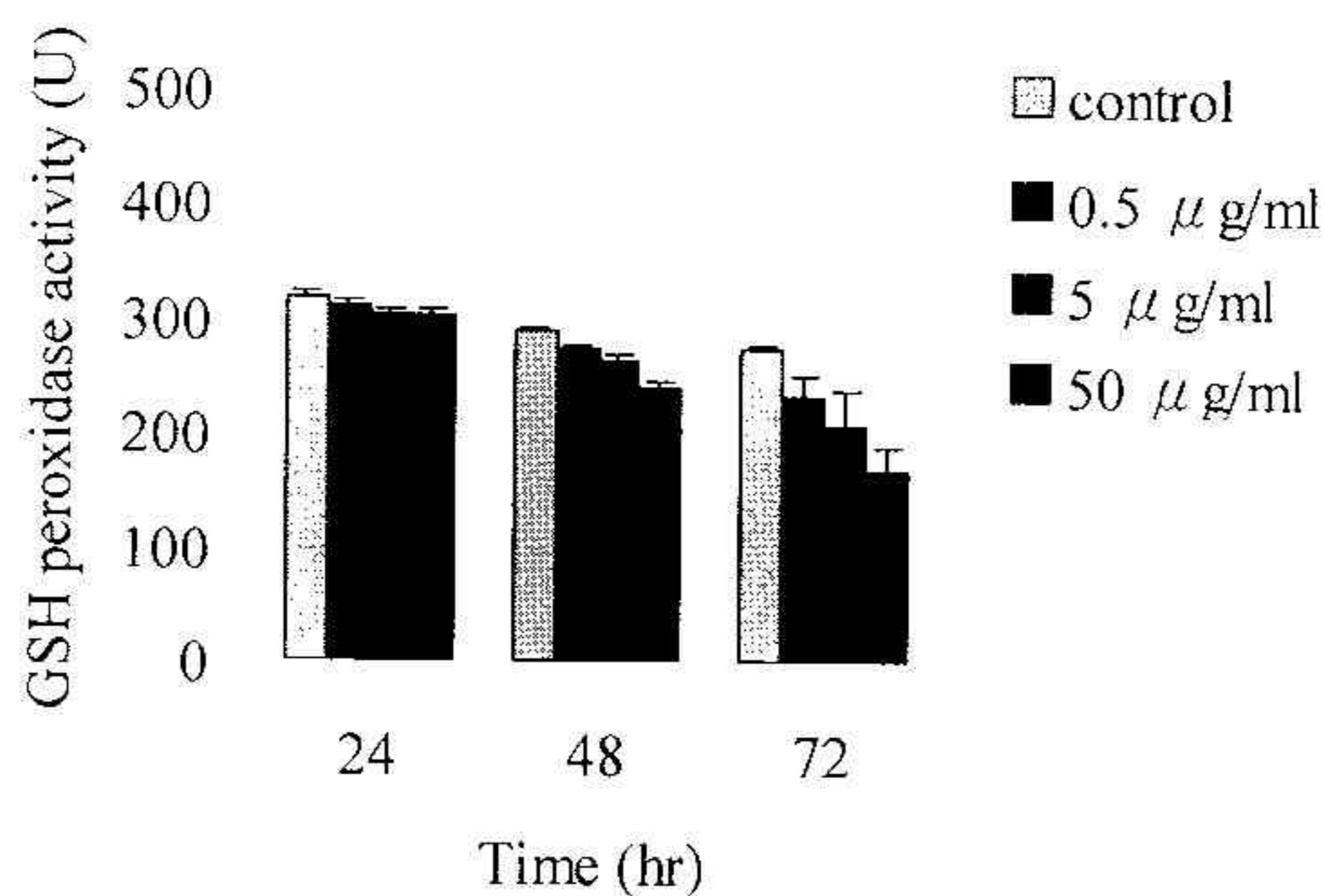




圖六 不同濃度之九層塔精油對大白鼠初代肝細胞內麩胱甘肽濃度之影響

Fig. 6 Effect of various concentrations of basil oil on intracellular reduced GSH levels of primary rat hepatocytes. Hepatocytes were isolated from 8 weeks old male rats. Cells isolated from each animal were divided equally and cultured in medium that containing 0, 0.5, 5 or 50  $\mu$ g/ml basil oil. Values are expressed as means SD from 3 to 4 rats. \*Significantly different ( $P < 0.05$ ) between treatment and control at same time interval.

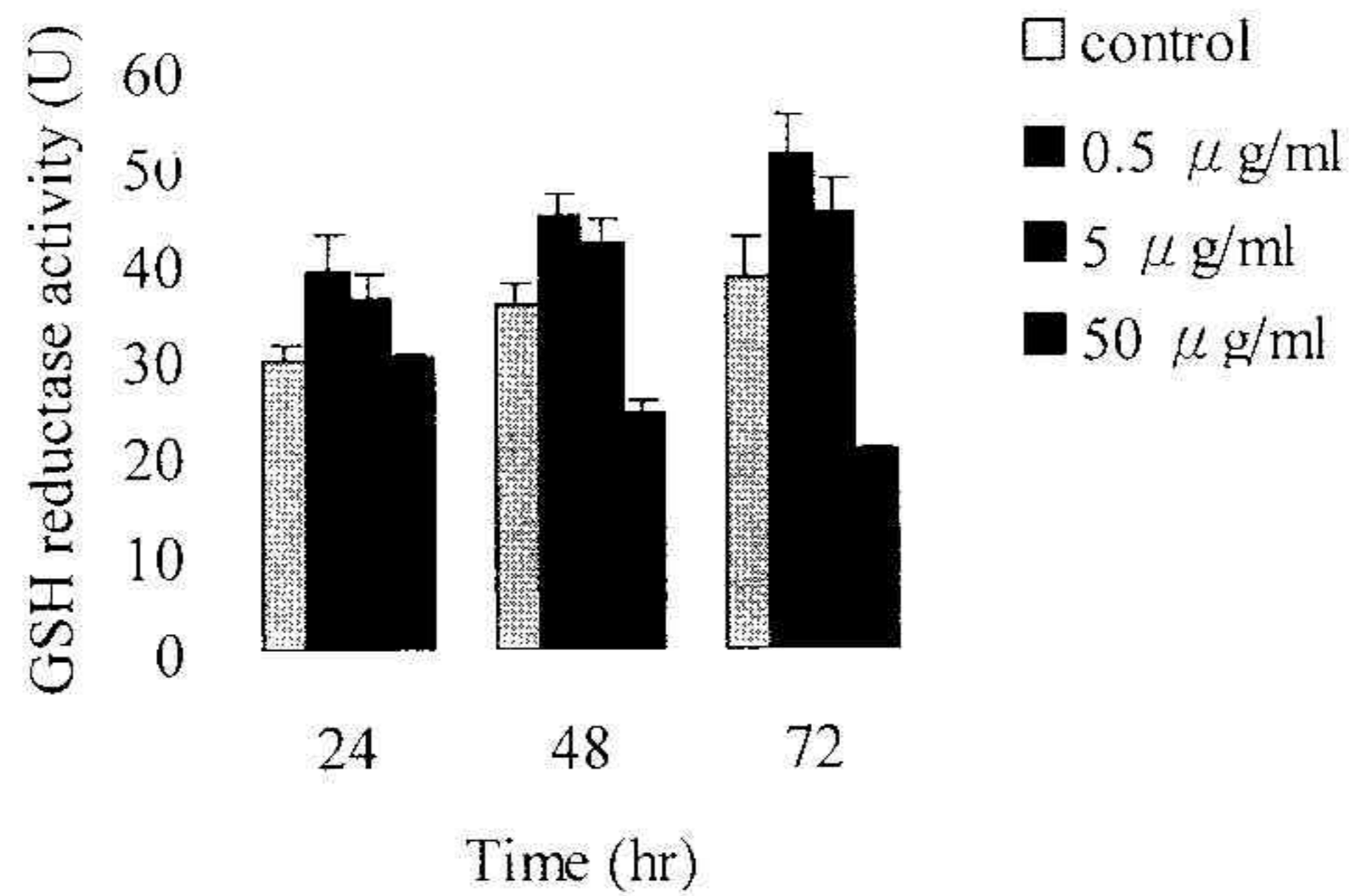




圖七 不同濃度之九層塔精油對大白鼠初代肝細胞內麩胱甘肽氧化酶活性之影響

Fig.7 Effect of various concentrations of basil oil on GSH peroxidase activity of primary rat hepatocytes at different incubation time intervals. Hepatocytes were isolated from 8 weeks old male rats. Cells isolated from each animal were divided equally and cultured in medium that containing 0, 0.5, 5 or 50  $\mu\text{g/ml}$  basil oil. Values are expressed as means  $\pm$  SD from 3 to 4 rats. \*Significantly different ( $P < 0.05$ ) between treatment and control at same time interval.

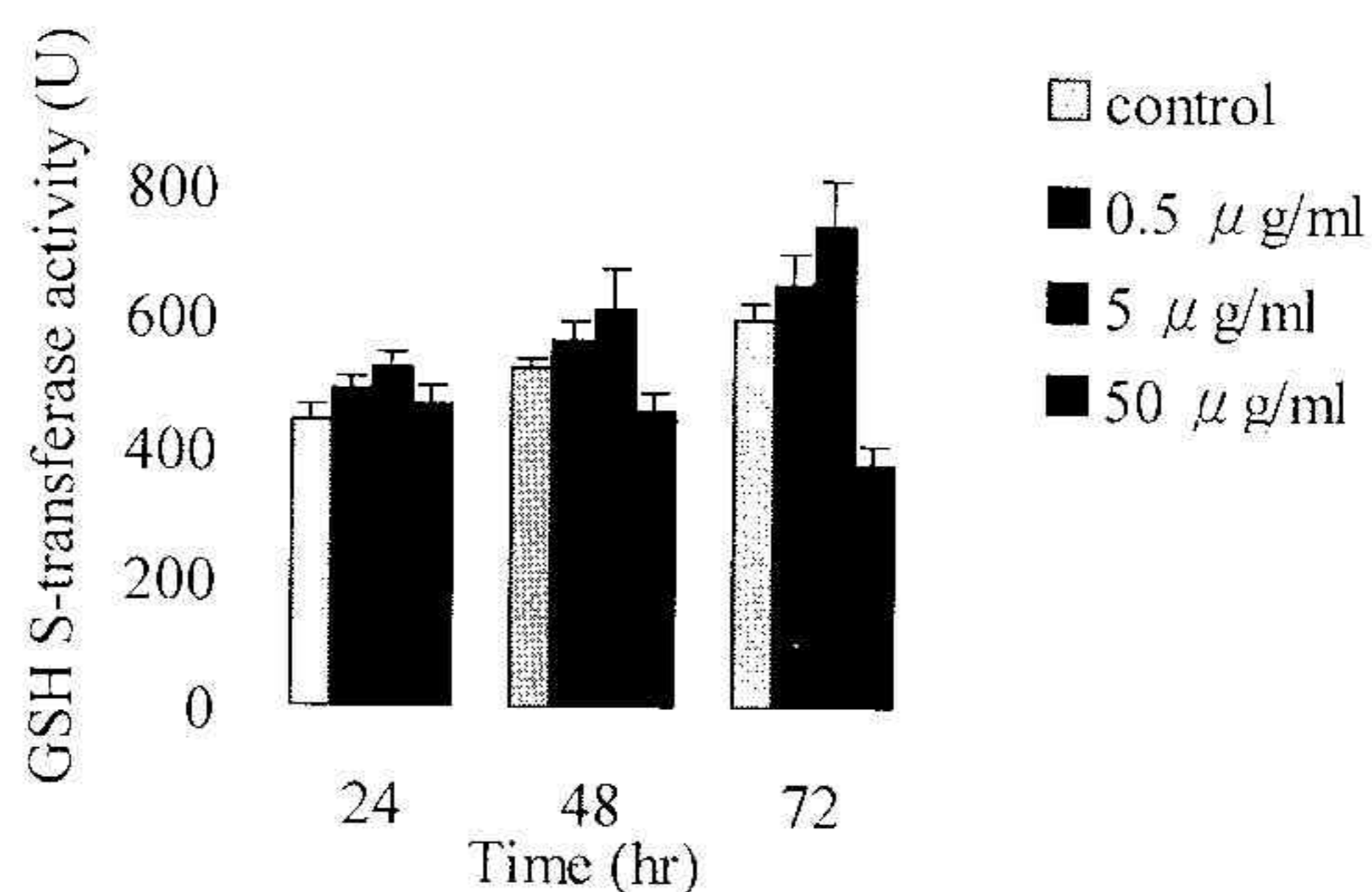




圖八 不同濃度之九層塔精油對大白鼠初代肝細胞內麩胱甘肽還原酶活性之影響

Fig. 8 Effect of various concentrations of basil oil on GSH reductase activity of primary rat hepatocytes at different incubation time intervals. Hepatocytes were isolated from 8 weeks old male rats. Cells isolated from each animal were divided equally and cultured in medium that containing 0, 0.5, 5 or 50 µg/ml basil oil. Values are expressed as means  $\pm$  SD from 3 to 4 rats. \*Significantly different ( $P < 0.05$ ) between treatment and control at same time interval.





圖九 不同濃度之九層塔精油對大白鼠初代肝細胞內麩胱甘肽轉移酶活性之影響

Fig. 9 Effect of various concentrations of basil oil on GSH S-transferase activity of primary rat hepatocytes at different incubation time intervals. Hepatocytes were isolated from 8 weeks old male rats. Cells isolated from each animal were divided equally and cultured in medium that containing 0, 0.5, 5 or 50 µg/ml basil oil. Values are expressed as means ± SD from 3 to 4 rats. \*Significantly different (P<0.05) between treatment and control at same time interval.



表一 九層塔揮發性成分之鑑定

Table 1 Identification of volatile compounds of basil oil

Peak No. <sup>a</sup>	Compound	M. W.	Conc. (%)
9	methyl chavicol	148	54.85
6	linalool	154	32.08
3	1, 8-cineole	154	4.58
7	6-methyl-2-bicyclo[3.1.1]heptane	204	1.71
14	unknow	-	1.56
11	unknow	-	0.91
10	$\alpha$ -terpincol	154	0.73
13	unknow	-	0.68
4	3-carene	136	0.66
12	2,5,5-trimethyl-1,3,6-heptatriene	136	0.63
5	1-octen-3-ol	128	0.50
8	elemene	204	0.49
2	$\beta$ -pinene	136	0.34
1	unknow	-	0.29

a. Numbers refer to fig. 1.



表二 九層塔精油對黃麴毒素B<sub>1</sub>在大白鼠初代肝細胞所誘發DNA  
損傷之影響

Table 2 Effect of basil oil on AFB<sub>1</sub>-induced DNA damage in primary  
rat hepatocytes.

Treatment	dpm/μg DNA	% of control
DMSO (0.5%) (negative control)	21.30 ± 2.55	
AFB <sub>1</sub> (1 mM) (positive control)	90.18 ± 8.68 <sup>#</sup>	100
AFB <sub>1</sub> (1 mM) plus:		
Basil oil 0.5 μg/ml	45.51 ± 5.14*	50.5
5	43.78 ± 2.77*	48.5

Hepatocytes ( $2.5 \times 10^6$  cells) were cultured for 20 hr and incubated with hydroxyurea for another 1hr. AFB<sub>1</sub> with or without basil oil were then added into the culture medium. A 4 pCi/ml quantity of [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (20 Ci/mmol) was added to the culture medium immediately after the test chemical for an additional 20 hr. At the end of culturing, the cells were harvested and lysed for radioactivity counting and DNA determination. DNA damage was determined by UDS and expressed as dpm/μg DNA. Values are expressed as means ± SD from 3 rats.

\* Significantly different ( $P < 0.05$ ) between treatment and AFB<sub>1</sub>-treated control at the same time interval. <sup>#</sup> Significantly different ( $P < 0.05$ ) between AFB<sub>1</sub> and DMSO treatment at the same time interval.



表三 九層塔精油對經黃麴毒素B<sub>1</sub>處理之大白鼠初代肝細胞的乳酸去氫酶滲漏率之影響

Table 3 Effect of basil oil on the LDH leakage of hepatocytes treated with AFB<sub>1</sub>.

Treatment / Time	LDH leakage (%)		
	4 hr	8 hr	24 hr
DMSO(0.5%) (negative control)	6.53±1.10	8.44±1.15	14.55±1.15
AFB <sub>1</sub> (1mM) (positive control)	9.55±0.86 <sup>#</sup>	14.12±1.29 <sup>#</sup>	20.20±1.04 <sup>#</sup>
AFB <sub>1</sub> (1mM) plus:			
Basil oil 0.5µg/ml	7.91±1.20	10.69±1.16*	16.72±1.33*
5	8.09±1.17	10.39±1.06*	16.12±1.19*

Hepatocyte cultures were treated with 1 mM AFB<sub>1</sub> and various concentrations of basil oil for 4, 8 or 24 hr incubation. Medium and cells were harvested for LDH leakage assay at the end of culturing. Values are expressed as means±SD from 3 rats. \*Significantly different (P<0.05) between treatment and AFB<sub>1</sub>-treated control at the same time interval. <sup>#</sup> Significantly different (P<0.05) between AFB<sub>1</sub> and DMSO treatment at the same time interval.



表四 九層塔精油對經黃麴毒素B<sub>1</sub>處理之大白鼠初代肝細胞中的  
 麩胱甘過氧化酶、麩胱甘肽還原酶及麩胱甘肽硫轉移酶活性之影  
 響

Table 4 Effect of basil oil on the activities of GST, GSH Px, GSH Rd  
 of hepatocytes treated with AFB<sub>1</sub>.

Treatment	GST	GSH Px (nmol/min/mg protein)	GSH Rd
DMSO(0.5%) (negative control)	551.54±5.48	197.62±9.72	29.74±4.49
AFB <sub>1</sub> (1mM) (positive control)	530.66±8.42 <sup>#</sup>	190.84±12.31	26.47±5.77
AFB <sub>1</sub> (1mM) plus:			
Basil oil 0.5 µg/ml	614.39±12.75*	187.62±11.35	25.88±4.79
5	644.55±11.17*	170.83±10.92	23.96±4.02

Hepatocyte cultures were treated with 1 mM AFB<sub>1</sub> and various concentrations of basil oil for 24 hr incubation. Cells were harvested, homogenized and centrifuged for enzyme activity assays at the end of culturing. Values are expressed as means±SD from 3 rats. \*Significantly different (P<0.05) between treatment and AFB<sub>1</sub>-treated control at the same time interval. <sup>#</sup> Significantly different (P<0.05) between AFB<sub>1</sub> and DMSO treatment at the same time interval.