

參、材料與方法

一、諾麗果汁與諾麗鮮果

Fresh noni fruit: were purchased in winter, 2006 from Tung Fon Fruit Farm (Yun Lin, Taiwan)

Fermented 100 % pure noni juice: were purchased from Palawan noni juice (Bangkudo Enterprise, Philippines)

二、試劑與試藥：

Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g glucose/L (DMEM), fetal bovine serum (FBS), N-(2-HydroxyEthyl)Piperazine-N'-2-Ethane-Sulfonic Acid (HEPES buffer, 1 M), L-glutamine (200 mM), non essential amino acids (NEAA, 100×)、penicillin-streptomycin-amphotericin (PSA, penicillin (10,000 U/mL); streptomycin (10 mg/mL) and amphotericin B (0.025 mg/mL)), phosphate buffer saline without calcium, magnesium (PBS, 1×), Trypsin-EDTA (1×) and XTT kit were purchased from Biological Industries (Israel).

Sodium bicarbonate (7.5 %) and Sodium pyruvate (100 mM) were purchased from Biosource (USA).

Dimethyl sulphoxide (DMSO), Ethidium bromide, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA), N-lauroylsarcosine sodium, Low melting agarose (LMA), sodium chloride (NaCl), sodium hydroxide (NaOH), Tris base and Triton X-100, were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from J. T. Baker (USA).

Annexin-V apoptosis kit was purchased from Gene Research Lab. Co. Ltd. (Taiwan).

Pectinase G and cellulase AP3 were purchased from Ho Jun

Biotechnology Co. (Taiwan).

三、儀器設備：

Centrifuge 5810R (Eppendorf, Germany)
Flow cytometry FACSCalibur (Becton Dickinson, USA)
Inverted microscope IX71 (Olympus, Japan)
Slide warmer (LAB-Line instruments, Inc., USA)
Micro plate reader MRX II (Dynex Technologies, USA)
High speed centrifuge SCR20B (Hitachi, Japan)

HPLC 分析儀器：

HPLC pump LC-10AT_{VP} (Shimadzu, Japan)
UV-Vis Detector S-3702 (Soma, Japan)
Integrator D-2500 (Hitachi, Japan)
Synergi 4 μ Fusion-RP column (250 \times 4.6 mm, 4 μ m,
Phenomenex, USA)

pH meter (PHM82 Standard pH Meter, Radiometer Copenhagen,
Denmark)

UV-visible spectrophotometer UV-2100 (Shimadzu, Japan)

四、其他

Full-frosted cytology microscope slide was purchased from Chin-Fa
(Taiwan)

Cover slip (24 \times 50 mm) was purchased from Marienfeld
(Germany)

Carcinoma of Human esophagus (CE 81T/VGH) was purchased
from Biosource Collection and Research Center (BCRC, Taiwan)

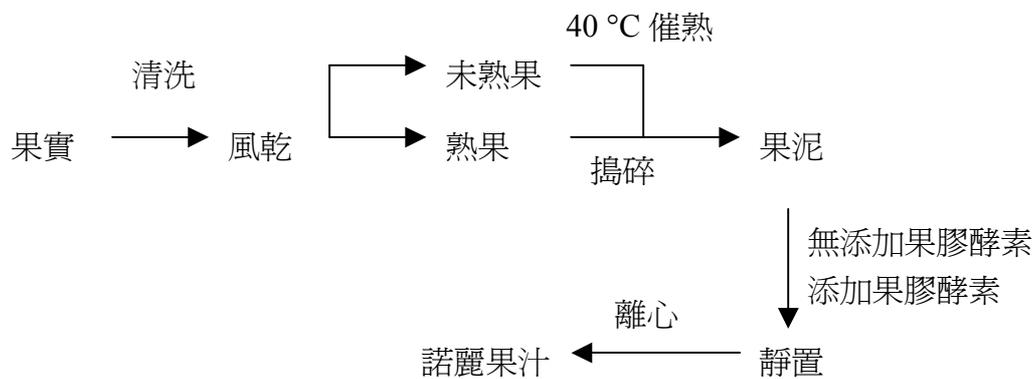
Human colon cancer (HTB-37) was purchased from American Type
culture collection (ATCC, USA)

CometScoreTM image-analysis system (TriTek Corp., Sumerduck,
VA)

五、添加酵素生產諾麗果汁

(一) 果實前處理與添加酵素生產果汁方式

將採收後之果實以自來水洗去表面髒污，使用軟毛刷將果實凹陷處再次洗淨。用紙巾稍微拭乾果實表面水份，再放置通風處待沖洗之水份完全蒸發。挑選熟果將其冰藏避免過熟，未熟果置入 40 °C 烘箱催熟。將熟軟之果實壓碎並混合均勻，每組取 250 公克進行試驗。添加不同量 pectinase G (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 %)或 cellulase AP3 (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 %)進行實驗，控制組則無添加酵素。酵素特性寫於附錄十中。待作用數天後以 5,000xg、4 °C 離心十分鐘，可得諾麗果汁。製造流程如圖五示。



圖五、生產果汁流程圖

Fig. 5. Flow chart of juice production

(二) 分析果汁固形物與東莨菪素(scopoletin)含量

A. 取 10 mL 諾麗果汁冷凍乾燥後計算其固形物重。

B. 測定 scopoletin 含量

使用高效液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)搭配 Synergi 4 μ Fusion-RP 管柱；分析條件如下：

流速：0.8 mL/min、移動相：20 % acetonitrile (in H₂O)以 scopoletin 標準品製作標準曲線。

(三) 果汁顏色變化、TEAC 抗氧化能力、總酚含量、縮合單寧含量與 scopoletin 含量之儲藏試驗

選擇最佳酵素添加量與酵素作用時間，再進行新鮮諾麗果汁儲藏試驗。實驗流程如圖六示。

A. 顏色變化

以 UV-2100 測定果汁顏色，以 Lightness (L*，明亮度)、a* (綠紅軸參數)、b* (藍黃軸參數)表示。L*值 100 為全白，0 為全黑；a*正值為紅色、負值為綠色；b*正值為黃色、負值為藍色。

B. 總抗氧化能力(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

參考 Miller 等人(1993)及 Arno 等人(1996)之方法，使下列各項試 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS)、peroxidase 與 H_2O_2 之最終濃度分別為 $100 \mu M$ 、 $5 U/mL$ 及 $70 \mu M$ 。混合液靜置室溫反應三十分鐘，形成穩定的自由基反應試劑。以 $10 \mu L$ 待測物與 $1 mL$ 自由基反應試劑混合，反應十分鐘後測定波長 $734 nm$ 的吸光值，吸光值越低表示樣品抗氧化能力越強。以

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

(Trolox) $1000-100 \mu g/mL$ 作為標準曲線，樣品換算其相當濃度。

Horseshoe peroxidase 會催化 H_2O_2 及 ABTS 形成 $ABTS^+$ ，此為穩定的藍綠色物質在波長 $734 nm$ 下有吸收峰。加入抗氧化劑會減少 $ABTS^+$ 的量，因此吸光值減少。Trolox 為合成抗氧化劑，添加不同劑量作成檢量曲線。

C. 總酚含量

參考 Julkunen-Tiitto (1985)之方法，取 $50 \mu L$ 待測物加入 $1 mL$ H_2O 及 $500 \mu L$ Folin-Ciocalteu's phenol reagent 混合均勻，再加入 $2.5 mL$ $20\% Na_2CO_3$ 混合。室溫下靜置二十分鐘，以波長 $735 nm$ 測定吸光值。以 gallic acid 製作標準曲線。

Folin-Ciocalteu's phenol reagent 與酚類化合物之 OH 基反應呈色，顏色由黃變藍且於波長 $735 nm$ 有吸光。

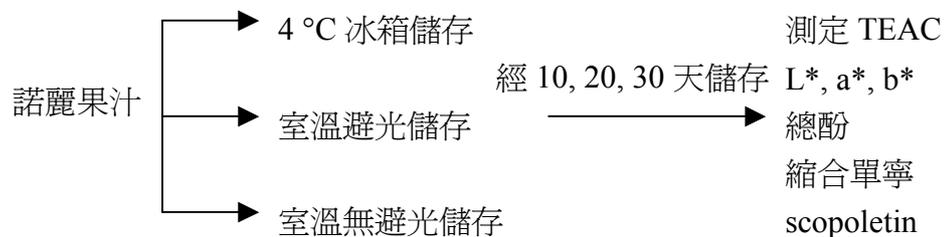
D. 縮合單寧含量

參考 Julkunen-Tiitto (1985) 之方法，取 80 μL 待測物加入 800 μL 4 % vanillin (methanol)，混合均勻再加入 500 μL 12 N HCl 反應 20 分鐘測定 A_{500} 吸光值。以(+)-catechin 製作標準曲線。

縮合單寧、vanillin 與 HCl 會反應呈紫紅色，於 500 nm 下有吸光值。

E. 測定 scopoletin 含量

方法如前述

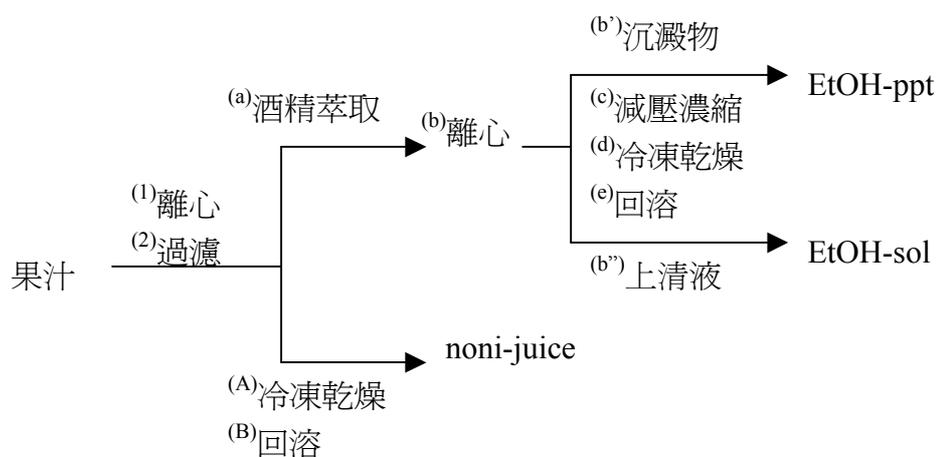


圖六、諾麗果汁儲藏試驗流程圖

Fig. 6. Flow chart of noni juice storage assay

六、以乙醇分離熟成果汁進行細胞實驗

將 Palawan noni 果汁以 $5,000\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 離心十分鐘，再經 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 濾膜過濾除去不溶物即為 noni-juice。取 600 mL noni-juice 加入 1800 mL 95 % 乙醇混合，以 $5,000\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 離心十分鐘分離出沉澱物即 EtOH-ppt、與上清液即 EtOH-sol。將 noni-juice、EtOH-ppt 和 EtOH-sol 冷凍乾燥除去水與乙醇後再復水進行實驗，流程如圖七所示。三者之固形物含量分別為 noni-juice 63 mg/mL、EtOH-ppt 9.72 mg/mL、EtOH-sol 53.1 mg/mL。



圖七、諾麗果汁及酒精萃取流程圖

Fig. 7. Flow chart of preparation of noni-juice and its alcohol extracts.

七、培養細胞之條件

(一) 細胞培養基配製

DMEM-10：DMEM 含 10 % FBS、1 % HEPES buffer、1 % Sodium bicarbonate、1 % Sodium pyruvate、1 % PSA 及 1 % NEAA。

(二) 解凍細胞

從液態氮筒中將細胞株取出置於 37 °C 溫水，解凍一分鐘移至加有 10 mL DMEM-10 新鮮培養液之無菌離心管，以 300×g 離心 5 分鐘後除去上清液加入 2 mL DMEM-10 混合均勻，再移入已添加 8 mL DMEM-10 的 10 公分培養皿。人類食道癌細胞(CE 81T)、人類結腸癌細胞(HTB-37)培養於 DMEM-10 培養基。培養箱環境為 37 °C、含 5 % CO₂ 的潮溼空氣。

(三) 繼代細胞

將培養皿中培養基吸出，以 5 mL PBS 清洗細胞一次，並除去 PBS 再加入 1× Trypsin-EDTA (CE 81T 需 4 mL、HTB-37 需 3 mL)，置入 37 °C 培養箱(CE 81T 需 8 分鐘、HTB-37 需 3 分鐘)，再加入 Trypsin-EDTA 二倍體積的 DMEM-10，取出細胞液放入離心管以 300×g 離心 10 分鐘。除去上清液加入培養液混勻，並取 50 μL 的細胞懸浮液和 0.4 % Trypan blue 於血球計數器中，用顯微鏡計算活細胞數目，再依實驗所需分配細胞至培養皿中繼續培養。

(四) 凍存細胞

步驟同繼代，離心完成除去上清液並敲散細胞團塊後加入冷凍培養基(10 % DMSO、90 % FBS)，將混合液移入冷凍小管後置於液態氮筒保存。

八、細胞相關試驗

(一) 測定細胞存活率(XTT assay)

方法參考廠商建議與文獻(Biological Industries；洪，2004)，將細胞種於 96-well 培養皿(3,000 cell/well)，16 小時後換新培養基，再添加 noni-juice (63, 12.6, 6.3 mg/mL well)、EtOH-ppt (9.72, 1.944, 0.972 mg/mL well)、EtOH-sol (53.1, 10.62, 5.31 mg/mL well)至小孔。作用 72 小時後移去培養基，每小孔以 100 μ L PBS 清洗兩次後添加 100 μ L 培養基。將 0.1 mL activation reagent 與 5 mL XTT 混合均勻，每小孔添加 50 μ L 後置入培養箱中呈色三小時。使用 ELISA reader (Dynex Technologies, USA)以 450 nm 測定每一小孔的吸光值。

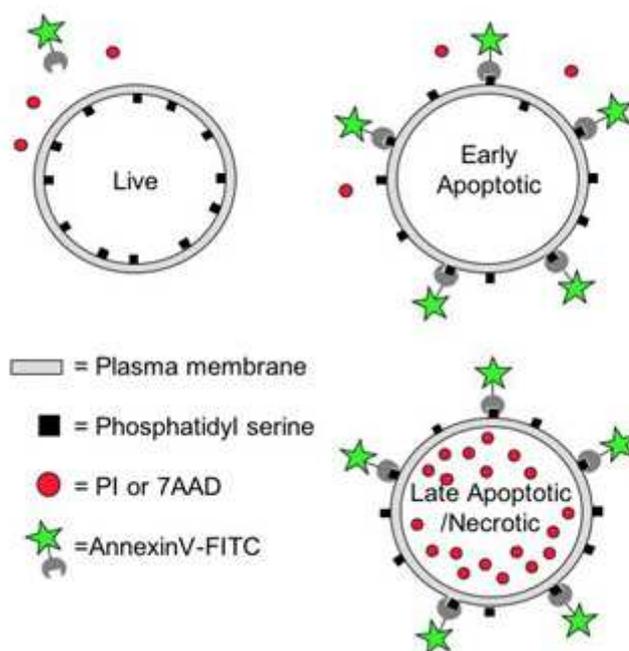
XTT 會被活細胞中粒線體的 succinate dehydrogenase 還原呈色，藉由呈色程度間接判斷活細胞的數量。

(二) 使用流式細胞儀測定細胞凋亡

細胞(1.5×10^6)貼壁十六小時後，換新培養基再添加 noni-juice (63 mg/mL)、EtOH-ppt (9.72 mg/mL)、EtOH-sol (53.1 mg/mL)，作用二十四小時後，使用 trypsin 收取細胞。使用流式細胞儀，測定

細胞(Vermes et al., 1995)，以下步驟來自 Annexin-V kit protocol (Gene Research Lab. Co. Ltd.)。以 PBS 清洗細胞兩次，移除 PBS 後添加 100 μL 1 \times binding buffer、2 μL FITC-labeled Annexin-V 與 5 μL propidium iodide (PI)。置於暗室 4 $^{\circ}\text{C}$ 、三十分鐘，添加 400 μL 1 \times binding buffer，再以流式細胞儀進行分析。

細胞早期凋亡(apoptosis)時細胞膜內膜的 phosphatidylserine 會移至外膜，此時細胞膜仍維持一定穩定度。FITC-labeled Annexin-V 與 phosphatidylserine 專一性結合，由螢光可偵測 FITC 螢光量。當細胞壞死(necrosis)時細胞膜強度減低，溶液中的 PI 會進入細胞；藉兩種不同螢光染劑區分凋亡或壞死的細胞。



圖八、Annexin-V 與 PI 雙染示意圖

Fig. 8. The diagram of Annexin-V and PI double staining.

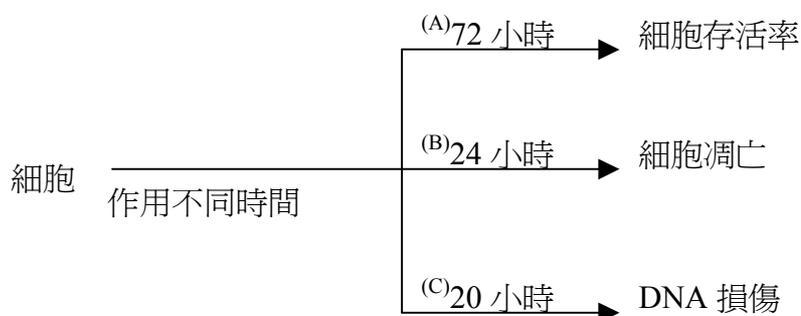
(From: www.dundee.ac.uk)

(三) 彗星試驗(comet assay)

細胞(1.5×10^6)貼壁十六小時後換新培養基再添加 noni-juice (63 mg/mL)、EtOH-ppt (9.72 mg/mL)、EtOH-sol (53.1 mg/mL)，作用二十小時後使用 trypsin 收取細胞。方法來自(Comet Assay Interest Group Website)並稍微修改，步驟如下。以 PBS 配製 0.8 % normal melting agarose (NMA)與 1.5 % low melting agarose (LMA)，於噴砂玻片上覆蓋 125 μ L NMA 凝固後置於 slide warmer 乾燥。取 25 μ L 濃度為 1×10^5 /mL PBS 細胞旋浮液與 50 μ L LMA 混合後覆於凝固之 NMA 玻片上，待凝固後置於 slide warmer 乾燥。取 25 μ L PBS 與 50 μ L LMA 混合後覆於凝固之 NMA 玻片上製作第三層凝膠，待凝固後置於冰冷的 lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 10 % DMSO, 1 % Triton X-100, pH = 10)中隔夜。將玻片置於水平電泳槽中，放入 electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13)後靜置二十分鐘，以 25 V、300 mA 電泳二十分鐘。電泳完成後以 neutralized buffer (0.4 M Tris base, pH = 7.5)沖洗三次，稍微乾燥後以 2 μ g/mL ethidium bromide 染色靜置暗盒二十分鐘。使用螢光顯微鏡(Olympus)觀察，再以 CometScore 影像分析軟體分析。以尾部 DNA 百分比(percentage of DNA in the tail, % Tail DNA)為 DNA 受損單位。

當 DNA 受損造成單股斷裂(single-strand breakage)或是雙股斷裂(double-strand breakage)在鹼性環境下電泳後，受損的 DNA 片段會游離，DNA 片段越短游離越遠。經染色後可以光學顯微鏡觀察，再以人眼評核或是使用影像分析軟體自動分析，可得 DNA 受損情形。使用影像分析軟體較能減少人為誤差，並以 % Tail DNA 為評

等單位最具公信力(Kumaravel et al., 2006)。



圖九、細胞試驗流程圖

Fig. 9. Flow chart of in vitro assay

九、測定抗氧化能力

(一) 總抗氧化能力(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

方法如前述

(二) 清除 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力

參考 Shimada 等人(1992)之方法,取 250 μL 待測物加入 500 μL H_2O 與 250 μL 新鮮配製 0.008 % DPPH 甲醇溶液均勻混合。室溫下避光反應三十分鐘,以分光光度計測定波長 517 nm 的吸光值。吸光值越低表示樣品清除自由基能力越強。

DPPH 甲醇溶液在 517 nm 下有強烈吸光值,被具抗氧化能力的物質還原並脫色成淡黃色。測定 517 nm 之吸光值反映待測物的 DPPH 清除能力。

(三) 過氧化氫清除能力

參考 Randall 等人(1989)之方法，取 400 μL 待測物與 600 μL 4 mM H_2O_2 (溶於 2 mM phosphate buffer, pH = 7.4) 均勻混合後反應十分鐘，以分光光度計測定波長 230 nm 的吸光值。吸光值越低表示樣品清除自由基能力越強。

H_2O_2 在 230 nm 有最大吸光值，若待測物具 H_2O_2 清除能力則吸光值會降低。

(四) 還原力

參考 Oyaizu (1986) 之方法，取 250 μL 待測物，加入 250 μL 0.2M pH = 6.6 phosphate buffer 和 1 mL 1 % 赤血鹽(potassium ferricyanide, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)，於 50 $^\circ\text{C}$ 水浴反應二十分鐘。加入 250 μL 冰冷的 10 % TCA (trichloroacetic acid) 溶液，加入 1 mL 蒸餾水與 50 μL 0.1 % 氯化鐵(ferric chloride, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 溶液，混合後靜置十分鐘以分光光度計測定波長 700 nm 的吸光值。吸光值越高表示樣品還原力越強。以 ascorbic acid 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 做為對照組，樣品換算其相當濃度。

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 會被具還原力的物質還原成 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ，而 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 再與 Fe^{3+} 形成 $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ 。 $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ 在 700 nm 下有吸收峰，藉此判斷還原力的強弱。化學反應式如下：



(五) 螯合亞鐵離子能力

參考 Dinis 等人(1994)之方法，取 250 μL 待測物加入 1.75 mL 甲醇與 250 μL 400 μM FeSO_4 ，混合後再添加 250 μL 2mM ferrozine 並反應十分鐘。使用分光光度計測定波長 562 nm 的吸光值，吸光值越低表示樣品螯合亞鐵離子能力越強。以 EDTA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 做為對照組。

Fe^{2+} 與 ferrozine 會結合並在波長 562 nm 下有吸收峰，存在具螯合能力的樣品會與 ferrozine 競爭 Fe^{2+} ，進而降低吸光值。 Fe^{2+} 是一促氧化劑，能使脂質更容易被氧化。

十、功能性成分測定

(一) 總酚含量

(二) 縮合單寧含量

(三) 測定 scopoletin 含量

以上方法如前述