

Effect of Ethanol Extracts of Guava Seeds on Cytokine Secretions using Mouse Peritoneal Macrophages *in vitro*

芭樂籽乙醇萃取物對小鼠腹腔巨噬細胞細胞激素分泌之影響

Ting-Hsuan Yang¹⁾ Hsiao-Chien Lin²⁾ Jin-Yuarn Lin³⁾

楊庭瑄

林筱茜

林金源

Abstract

In our preliminary study we found that there are immunomodulatory components in guava seeds, however effective components in guava seeds are difficult to be ingested directly. To obtain effective components and evaluate their possible immunomodulatory functions, guava seeds were extracted with 80% alcohol in this study. The isolated ethanol extracts of guava seeds (EEGS) were subjected to cytotoxic effect assay using mouse peritoneal macrophages to achieve optimal non-cytotoxic concentrations. The adopted optimal concentrations were cultured with mouse peritoneal macrophages in the absence or presence of lipopolysaccharide (LPS) for evaluating the effect of EEGS on cytokine

secretions. The results showed that EEGS administered from 4 to 250µg/ml had not apparent cytotoxic effects on peritoneal macrophages, indicating optimal concentrations to the cells. The optimal concentrations were further administered to mouse peritoneal macrophages to assay cytokine secretion profiles. In the absence of LPS, both pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-6 and an anti-inflammatory cytokine (IL-10) secretion levels significantly ($P < 0.05$) increased by EEGS dose-dependently. Pro-/anti-inflammatory cytokine secretion ratios by the cells also increased dose-dependently, suggesting that EEGS might activate macrophages and slightly induce spontaneous inflammation. In the presence of LPS, the addition of EEGS

1) Bachelor Program of Biotechnology, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C.

國立中興大學生物科技學士學位學程。

2) Joint first authors, Dept of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C. 共同第一作者，國立中興大學食品暨應用生物科技學系。

3) Dept of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C., Corresponding Author. E-mail: jinlin@nchu.edu.tw

國立中興大學食品暨應用生物科技學系，通訊作者。

significantly decreased pro-/anti-inflammatory cytokine secretion ratio by peritoneal macrophages dose-dependently, suggesting that EEGS might inhibit LPS-induced inflammation in macrophages. In conclusion, we found EEGS possessed immunomodulatory activities. EEGS alone might activate macrophages, but it might inhibit LPS-induced inflammation in macrophages.

Key words: Anti-inflammation, Cytokine, Ethanol extract, Guava seed

摘要

先前研究已發現芭樂籽中含有免疫調節成分，但其有效成分難以被直接利用，因此本研究以 80% 的乙醇萃取其可能的有效成份，所獲得之芭樂籽乙醇萃取物在體外試驗以小鼠腹腔巨噬細胞進行免疫調節功能評估，樣品先進行細胞毒性試驗，取得非細胞毒性之最適作用濃度後，再以其最適作用濃度與小鼠腹腔巨噬細胞共同培養，探討單獨添加樣品或在脂多醣 (lipopolysaccharide · LPS) 存在下對小鼠腹腔巨噬細胞分泌細胞激素的影響。結果發現，乙醇萃取物在濃度 4 – 250µg/ml 時對細胞不具毒性，取此無細胞毒性濃度進行細胞激素分泌實驗，發現單獨添加樣品時，巨噬細胞分泌之促發炎 (TNF- α · IL-6) 或抗發炎細胞激素 (IL-10)，皆隨添加劑量的增加而顯著 ($P < 0.05$) 增加其分泌量，且呈現劑量反應關係，進一步分析其促發炎/抗發炎細胞激素分泌比值，亦有顯著增加的趨勢，推測芭樂籽乙醇萃取物可活

化巨噬細胞而誘發其輕微的自發性發炎反應。在脂多醣存在下，腹腔巨噬細胞隨著樣品濃度的增加，其促發炎/抗發炎細胞激素分泌比值有顯著下降的趨勢，顯示芭樂籽乙醇萃取物可抑制脂多醣誘導的發炎作用。綜合本實驗研究結果，顯示芭樂籽乙醇萃取物具有免疫調節生物活性，可活化巨噬細胞及抑制脂多醣所誘發的發炎作用。

關鍵詞： 抗發炎、細胞激素、乙醇萃取物、芭樂籽。

前言

免疫細胞可藉由分泌細胞激素與其他特定細胞細胞膜上特殊蛋白結合，以活化細胞，誘發發炎反應以清除外來抗原物質。當發炎反應發生時，依時間的先後，發炎細胞可能會分泌不同的細胞激素，於發炎前期，免疫細胞會分泌促發炎媒介物，如介白質 (interleukin (IL)) -1 β 、IL-6 與腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor alpha (TNF- α)) 等，以促進發炎反應，至反應中後期時，則適度分泌抗發炎細胞激素，如：IL-10⁽¹²⁾，以達到調控或中止發炎反應的目的，現今許多藥物也是藉由調節細胞激素分泌比例或抑制細胞激素的分泌作用，使細菌或內毒素等外來物入侵後會引起體內的免疫反應得以達到有效的控制，但過度使用類固醇等藥物抑制發炎反應，可能產生一些不良副作用，因此必須謹慎評估如何在使用效果與傷害之間達到平衡。近年來，研究發現中草藥或蔬果等食物成分中亦可能具有抗發炎及一些特殊生理功能，或可做為類固醇藥物等的替代物，以避免

不良副作用。已有許多研究報告證實，蔬菜水果中含有大量的植化素 (phytochemical) 與抗氧化劑，能夠降低胰臟癌⁽⁸⁾及膀胱癌⁽¹⁵⁾的患病風險，平常多攝食蔬果亦有預防癌症的功效⁽¹⁹⁾，癌症被認為是體內反覆發炎所導致的結果，推測蔬果可藉由其特殊的植化素與抗氧化劑等成分，進行溫和的免疫調控，使免疫系統保持穩定作用，避免出現過度的發炎反應，達到抗發炎或抗癌作用，因此本研究致力於開發天然抗發炎的蔬果成分及其作用評估。

蔬果中，番石榴 (*Psidium guajava* L.) 已被證實有抑菌⁽¹⁶⁾、清除自由基⁽¹⁷⁾及抗腫瘤⁽⁶⁾等功效，有研究分別對其葉、分枝、籽、果肉，進行不同溶劑的萃取，測試萃取物的抗氧化與抗酪氨酸酶的能力，證實芭樂葉的乙醇萃取物有最高的抗酪氨酸酶能力，且推測芭樂全株應皆具有生物活性⁽²⁴⁾，特別是從葉子中分離出的三萜類化合物：樺木酸 (betulinic acid) 和羽扇豆醇 (lupeol) 等，發現具有抗菌與植物毒性 (phytotoxic) 的潛力⁽⁷⁾。葉子的水萃取物中則含有可抑制白蛋白所誘導急性發炎的物質，具有鎮痛與抗發炎的特性⁽¹⁴⁾。但反觀芭樂籽的相關研究就比較少，本研究室先前研究已發現芭樂籽中含有免疫調節成分⁽¹⁾，因此本研究擬更深入探討芭樂籽乙醇萃取物對免疫細胞的活性與抗發炎作用。

許多植物的乙醇萃取物中，內含豐富的植物化學成分 (phytochemical constituents)，具有鎮痛和抗發炎等生理活性，例如 *Ficus iteophylla*⁽²⁾與番荔枝 (Annonaceae) 乙醇萃取物，可能透過調節周邊和中樞神經系統的機制，達到鎮痛效果⁽³⁾。先前研究顯示芭樂籽的乙醇萃取物對

小鼠脾臟細胞具有免疫調節活性⁽¹⁾。但對巨噬細胞之活化與抗發炎作用仍未有深入研究，因此，本研究擬探討芭樂籽乙醇萃取物對小鼠初代腹腔巨噬細胞分泌細胞激素之影響，釐清芭樂籽乙醇萃取物之免疫活性與抗發炎潛力。

材料與方法

一、芭樂籽乙醇萃取物製備

番石榴 (*Psidium guajava* L. · 甕仔拔) 購自彰化縣員林鎮固定農戶，新鮮番石榴稍放軟後，取出番石榴籽去除果肉後瀝乾，於 40°C 烘箱中乾燥隔夜後磨粉，即為番石榴籽粉末樣品。取芭樂籽粉末加入四倍體積的正己烷室溫浸漬 4 小時，萃取出其中的油脂以避免後續樣品製備時產生干擾，室溫下 5000×g 離心 30 分鐘，去除上清液，殘渣風乾備用，即為脫脂芭樂籽粉末。將脫脂芭樂籽粉末與四倍體積的 80% 乙醇，於抽氣櫃中室溫下萃取四小時，5000×g 離心 30 分鐘，抽氣過濾取得上清濾液，上清濾液減壓濃縮，除去乙醇後進行冷凍乾燥，即為芭樂籽 80% 乙醇萃取物 (80% ethanol extracts of guava seeds · EEGS) 粉末，於 -20°C 保存備用，以萃取率 (%) = [萃取物 (g) / 芭樂籽粉 (g)] × 100 的公式計算萃取率，得萃取率為 1.05 ± 0.12%。使用時，將乙醇萃取物粉末，以去離子水回溶樣品，配製成高濃度貯存溶液 (stock solution)，再以 TCM medium 適當稀釋，以進行細胞培養試驗。水果會受季節、土壤及氣候等問題影響而造成實驗差異，因此本研究在購買使用材料時，皆在同一季節分數批向員林同一農家購買同一品系芭樂果實，以減少樣品差異性，並增加每一批次實驗結果之可信度。目

前本實驗先以 80% 乙醇粗萃物進行試驗，確定其是否具有免疫調節活性後，爾後將以高效液相層析儀 (HPLC) 來分析其可能的有效成分。

二、BALB/c 小鼠初代腹腔巨噬細胞之取得與培養

(一) 藥品與設備：

Phosphate buffered saline (PBS · 137mM NaCl · 2.7mM KCl · 8.1mM Na₂HPO₄ · 1.5mM KH₂PO₄ · pH 7.4 · 0.2µm filtered) ° TCM medium：將 500 ml RPMI 1640 (Hyclone · UT · USA) · 2.5 ml 三合一抗生素 (Penicillin-streptomycin-amphotercin solution 100× · Biological industries · Israel) 和 10 ml TCM 代用血清 (Protide Pharmaceuticals · IL · USA) 均勻混和，置於 4 °C 備用。Hank's balanced salt solution (HBSS · Hyclone) ° 脂多醣 (lipopolysaccharide · LPS · Sigma · L2654 · MO · USA) ° Trypan blue (Sigma)：使用時與細胞液等體積混合。Dimethyl sulfoxide (DMSO · Wako · Osaka · Japan) ° 3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl)-tetrazolium bromide (MTT · Sigma) ° Mouse cytokine kits：IL-1β · IL-6 · IL-10 · TNF-α (R&D systems · Minneapolis · MN · USA) ° 細胞培養箱 (Shel Lab · TC2323 · Cornelius · OR · USA) ° ELISA reader (ASYS Hitech · GmbH · Austria) °

(二) 初代腹腔巨噬細胞來源

由國家動物中心購入 6-8 週齡 BALB/c 品系雌鼠，以 standard lab diet (chow diet) 飼養於不鏽鋼籠中，飼料及飲水均充足供應。動物房環境光照及黑暗交替各 12 小時，溫度維持於 25 ± 2°C，小鼠於 8-12 週齡時犧牲，取其腹腔巨噬細胞進行細胞培養試驗。

(三) 初代腹腔巨噬細胞之取得與培養

將 BALB/c 小鼠以乙醚麻醉後眼窩採血，而後將其以 CO₂ 窒息犧牲，在無菌操作條件下，以無菌針具向小鼠腹腔注以總量 10 ml HBSS buffer，分 2-3 次沖洗腹腔，沖洗液集中收集於 15 ml 離心管內，得約 10ml 之腹腔細胞沖洗液，以 400×g 下離心 10 分鐘後，去除上清液，拍散貼附於底部的細胞並加入 1 ml TCM medium 均勻混和，取得的腹腔細胞中巨噬細胞含量大於 90% 以上，取 20µl 細胞液，以台盼藍排除法 (Trypan blue exclusion method) 染色，於顯微鏡下進行活細胞數目計算，之後調整細胞濃度至 2 × 10⁶ cells/ml TCM medium，以利後續之細胞培養實驗。

(四) 芭樂籽乙醇萃取物對 BALB/c 小鼠初代腹腔巨噬細胞存活率之影響

將芭樂籽乙醇萃取物之貯存溶液 (stock solution) 加入 TCM medium 稀釋到最高作用濃度為 2 mg/ml，並以四倍序列稀釋，做為樣品實驗濃度。取 50µl 的腹腔巨噬細胞液 (2 × 10⁶ cells/ml TCM medium) 與相同體積、不同濃度的樣品溶液分別注入 96 well 無菌培養盤中，使巨噬細胞最終密度為 1 × 10⁶ cells/ml TCM medium，乙醇萃取物的最終作用濃度分別為 1.0、3.9、15.6、62.5、250、1000µg/ml，於 37 °C、5% CO₂ 之培養箱內共同培養 48 小時後，加入 10µl/well MTT (5 mg/ml PBS)，使 MTT 與細胞混合，再置於培養箱內反應 4 小時後，以 400×g 離心 10 分鐘並去除上清液，再加入 100µl/well PBS 振盪清洗，重複清洗兩次後，加入 100µl/well DMSO，經過 30 分鐘的溫和震盪，以溶解細胞膜，使釋出 MTT-formazan，使用

ELISA reader 測定波長為 550 nm 的吸光值，之後以 cell viability (% of control) = $[(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$ ，計算細胞數目的變化程度，其中 A_{sample} 為細胞在不同濃度樣品刺激下所測得的吸光值； A_{blank} 為僅有 TCM medium 的空白組吸光值； A_{control} 則為未添加任何樣品刺激的細胞液所測得之吸光值。

(五) 不同濃度芭樂籽乙醇萃取物對 BALB/c 小鼠初代腹腔巨噬細胞分泌細胞激素之影響
為探討不同濃度芭樂籽乙醇萃取物對腹腔巨噬細胞自發性分泌細胞激素，及以 LPS 誘導發炎下，其細胞激素分泌之影響，分別依下述兩種模式操作試驗，以評估不同濃度乙醇萃取物對 BALB/c 小鼠初代腹腔巨噬細胞分泌細胞激素之影響。

1. 單獨添加樣品對初代腹腔巨噬細胞細胞激素分泌之影響

取 500 μ l 腹腔細胞懸浮液與相同體積的樣品溶液共同加入 24 well 無菌培養盤中培養，使細胞最終濃度為 1×10^6 cells/ml，乙醇萃取物最終作用濃度分別為 3.9、15.6、62.5、250 μ g/ml (非細胞毒性濃度)，並以僅添加 TCM medium 於細胞液為負控制組，以添加 LPS (2.5 μ g/ml) 且未加入樣品的細胞培養液為正控制組，之後於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 之培養箱內共同培養 48 小時後，以 400 \times g 離心十分鐘，取上清液並置於 -80 $^{\circ}$ C 貯存備用，留待細胞激素分泌量之測定。

2. 模擬 LPS 誘導發炎模式下，樣品同時共同添加對初代腹腔巨噬細胞細胞激素分泌之影響

為模擬發炎狀況，同樣取 500 μ l 腹腔巨噬細胞懸浮液與相同體積的樣品溶液及 LPS 同時共同加入 24 well 無菌培養盤中培養，使細胞最

終密度為 1×10^6 cells/ml，乙醇萃取物樣品最終作用濃度分別為 3.9、15.6、62.5、250 μ g/ml (非細胞毒性濃度)，LPS 之最終作用濃度控制在 2.5 μ g/ml，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 之培養箱內共同培養 48 小時後，以 400 \times g 離心十分鐘，收集上清液並置於 -80 $^{\circ}$ C 貯存，留待細胞激素分泌量之測定。體外試驗研究結果顯示，以 LPS 刺激小鼠腹腔巨噬細胞，在 6-48 小時內細胞激素會隨發炎時間不同而有所變化，但培養 48 小時有最高分泌量，因此本試驗之觀測時間皆於刺激後 48 小時⁽¹¹⁾。

收集的細胞上清液，分析其促發炎 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) 與抗發炎 (IL-10) 細胞激素的分泌量變化，以 Mouse cytokine kits : IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α (R&D systems) 測定，測定步驟依據 R&D systems 公司 Duo set kit 內所提供之操作流程進行，以 ELISA reader 測定波長 450nm 之吸光值，再依標準品吸光值所製作之標準曲線，換算細胞液中特定細胞激素的含量。本實驗所使用之細胞激素實驗套組，其靈敏度低於 15.6 pg/ml。

三、統計分析

試驗結果以平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) 表示，組間數據之統計分析先以單向變方分析 (one-way ANOVA) 分析組間差異之顯著性，再以鄧肯氏多變域試驗法 (Duncan's Multiple Range Test) 檢定各組間的差異性，以 $P < 0.05$ 表示組間具有顯著差異，使用 SPSS version 19.0 軟體進行統計分析。

結果

一、芭樂籽乙醇萃取物對 BALB/c 小鼠初代腹

腔巨噬細胞存活率之影響

為取得芭樂籽乙醇萃取物 (EEGS) 對巨噬細胞非細胞毒性的適合實驗濃度範圍，因此利用 MTT assay 法來評估活細胞數目變化，以探討不同濃度樣品對小鼠腹腔巨噬細胞存活率的影響，並以 B 細胞裂質素 (B cell mitogen) LPS (2.5µg/ml) 做為正對照組，結果如圖 1，顯示樣品作用濃度在 0.97 - 62.5µg/ml 時，與控制組相比，細胞存活率無顯著差異，而在濃度為 250µg/ml 時，與控制組相比，其對存活率明顯增加。在體外試驗中，初代巨噬細胞可被活化但不會增生，只有初代淋巴球會增生，因本實

驗使用之細胞為初代巨噬細胞，所以不會有免疫細胞大量增生的現象，但本試驗觀察到細胞存活率明顯增加的現象，推測此濃度乙醇萃取物對巨噬細胞存活具有保護作用，可避免或減少初代巨噬細胞凋亡，因此與對照組相比存活率增加。但樣品濃度達 1000µg/ml 時，細胞存活率反而顯著地降低，推測此高濃度已具有細胞毒性。綜合 MTT 法結果，發現樣品作用濃度在 0.97 - 250µg/ml 時，對細胞不會產生毒性，故選擇 3.91、15.6、62.5、250µg/ml 等四種濃度為細胞非毒性適合作用濃度，以進行後續細胞激素分泌試驗。

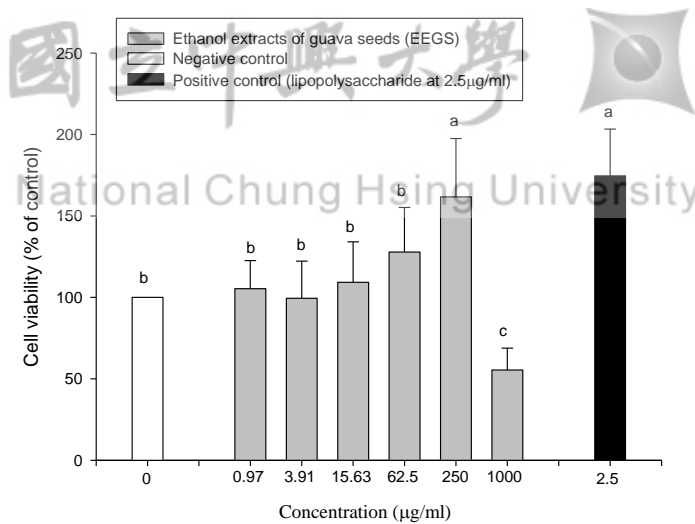


圖 1. 芭樂籽乙醇萃取物對 BALB/c 雌鼠腹腔巨噬細胞存活率之影響

Fig. 1. Effects of ethanol extracts of guava seeds on the cell viability of peritoneal macrophages from female BALB/c mice.

Values are means ± SD (n = 6 biological determinations). Bars not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Each cell population (1×10^6 cells/ml) was respectively treated with the ethanol extracts of guava seeds for 48 hrs. Lipopolysaccharide (LPS, 2.5µg/ml) treatment was selected as a positive control. The cell viability was determined using MTT assay. Cell viability (% of control) = $[(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$.

二、芭樂籽乙醇萃取物對 BALB/c 小鼠初代腹腔巨噬細胞分泌細胞激素之影響

本研究選取 3.91、15.6、62.5、250 $\mu\text{g/ml}$ 等四種非細胞毒性濃度，探討不同樣品濃度對小鼠腹腔巨噬細胞分泌細胞激素之影響，希望進一步了解 EEGS 對於腹腔巨噬細胞是否具有免疫活性及抗發炎潛力，以促發炎細胞激素 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) 及抗發炎細胞激素 (IL-10) 分泌之變化為指標，並分成兩種實驗模式進行，以觀察與比較兩者之間的關係。

在單獨添加樣品對初代腹腔巨噬細胞細胞激素分泌之影響方面，結果如表 1，在 IL-1 β 分泌量方面，分泌量大多低於實驗套組之靈敏度 (15.6 pg/ml)；觀察 IL-6 和 TNF- α 的分泌量變化，顯示兩者皆隨樣品濃度的增加而有增加分

泌量的趨勢，IL-6 則在樣品濃度 62.5 與 250 $\mu\text{g/ml}$ 時，與控制組相比，達顯著增加 ($P < 0.05$)；在抗發炎細胞激素 (IL-10) 分泌量方面，亦呈現劑量反應關係 (dose-dependent relationship)，並於樣品濃度達 250 $\mu\text{g/ml}$ 時，其分泌量與控制組相比，分泌量顯著增加 ($P < 0.05$)；綜和促發炎及抗發炎細胞激素分泌變化，推測 EEGS 對小鼠腹腔細胞具有免疫調節活性。進一步探討促發炎 / 抗發炎細胞激素分泌比值變化，以綜合評估 EEGS 抗發炎潛力，由於 IL-1 β 的分泌量遠低於 IL-6 和 TNF- α 的分泌量，故計算比值時將 IL-1 β 之濃度省略，結果如圖 2，發現促發炎/抗發炎細胞激素分泌比值，有隨樣品濃度增加而上升的趨勢 ($P < 0.05$)，顯示 EEGS 有輕微促發炎作用，但添加

表 1. 添加不同劑量芭樂籽乙醇萃取物對 BALB/c 雌鼠腹腔巨噬細胞促發炎與抗發炎細胞激素分泌之影響

Table 1. Effect of ethanol extracts of guava seeds treated with different concentrations on pro- and anti-inflammatory cytokine secretions by peritoneal macrophages from female BALB/c mice

Sample ($\mu\text{g/ml}$)	Pro-inflammatory cytokine			Anti-inflammatory cytokine
	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
0	ND	218 \pm 26 ^d	ND	397 \pm 148 ^c
3.9	ND	251 \pm 89 ^d	ND	374 \pm 100 ^c
15.6	ND	434 \pm 70 ^{cd}	33.2 \pm 62.5 ^b	320 \pm 58 ^c
62.5	ND	591 \pm 170 ^c	46.9 \pm 67.9 ^b	442 \pm 100 ^c
250	ND	894 \pm 251 ^b	84.1 \pm 78.1 ^b	582 \pm 116 ^b
LPS (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	97.6 \pm 29.7	2594 \pm 453 ^a	618.3 \pm 53.4 ^a	811 \pm 128 ^a

Values are means \pm SD (n = 8 biological determinations). Values within same column not sharing a common superscript letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other assayed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. ND, not detectable. Each cell population (1×10^6 cells/ml medium) was respectively treated with ethanol extracts of guava seeds for 48 hrs. Lipopolysaccharide (LPS, 2.5 $\mu\text{g/ml}$) treatment alone was selected as a positive control. The limit of detection of ELISA kits used in this study was <15.6 pg/ml.

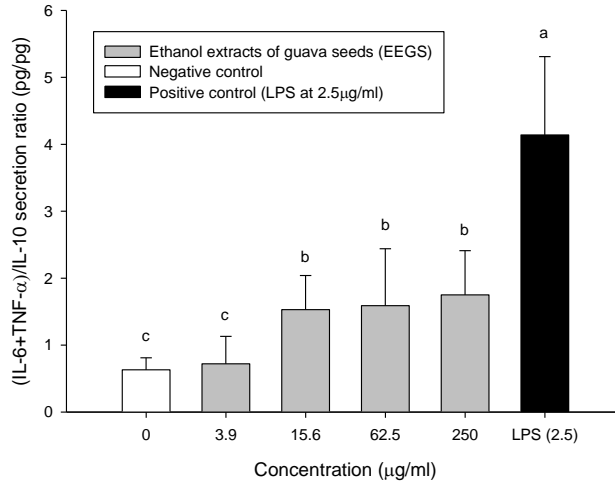


圖 2. 單獨添加不同劑量芭樂籽乙醇萃取物對 BALB/c 雌鼠腹腔巨噬細胞促發炎與抗發炎細胞激素分泌比值之影響

Fig. 2. Effects of ethanol extracts of guava seeds treated alone at different concentrations on the pro-/anti-inflammatory cytokine secretion ratios by peritoneal cells from female BALB/c mice.

Values are means \pm SD (n=8 biological determinations). Bars without sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Each cell population (1×10^6 cells/ml) was respectively treated with the ethanol extracts of guava seeds for 48 hrs. Lipopolysaccharide (LPS, $2.5 \mu\text{g/ml}$) treatment alone was selected as a positive control. The limit of detection of ELISA kits used in this study was $< 15.6 \text{ pg/ml}$.

樣品的比值，仍遠低於添加內毒素 (LPS, $2.5 \mu\text{g/ml}$) 誘導發炎之數值 (正控制組)，顯示 EEGS 雖然活化巨噬細胞導致輕微發炎，但並不會造成巨噬細胞大量發炎狀況。

為進一步釐清 EEGS 是否有抗發炎作用，模擬在內毒素 LPS ($2.5 \mu\text{g/ml}$) 存在下，評估添加 EEGS 對 LPS 刺激腹腔巨噬細胞促發炎與抗發炎細胞激素分泌之影響，結果如表 2 所示，在 IL-1 β 與 IL-6 促發炎細胞激素之分泌量方面，發現隨樣品濃度增加而細胞激素分泌量有

減少的趨勢，但與控制組相比，仍未達顯著差異 ($P > 0.05$)；TNF- α 分泌量方面，添加樣品對 TNF- α 分泌量變化無顯著影響；在 IL-10 分泌量方面，樣品添加與細胞激素分泌量呈現劑量反應關係，在樣品濃度為 $15.6 \mu\text{g/ml}$ 以上時，與控制組相比，顯著增加 IL-10 分泌量 ($P < 0.05$)；進一步分析促發炎/抗發炎細胞激素分泌比值，結果如圖 3，發現該比值隨著樣品添加濃度的升高而有顯著降低的趨勢 ($P < 0.05$)，顯示 EEGS 有明顯抗發炎潛力。

表 2. 添加不同劑量芭樂籽乙醇萃取物對以脂多醣刺激 BALB/c 雌鼠腹腔巨噬細胞促發炎與抗發炎細胞激素分泌之影響

Table 2. Effect of ethanol extracts of guava seeds treated with different concentrations on pro- and anti-inflammatory cytokine secretions by LPS-stimulated peritoneal macrophages from female BALB/c mice

Sample ($\mu\text{g/ml}$)	Pro-inflammatory cytokine			Anti-inflammatory cytokine
	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Vehicle control	17.9 \pm 12.6 ^c	591 \pm 390 ^c	115 \pm 93 ^b	112 \pm 39 ^d
0	100.1 \pm 20.4 ^{ab}	4045 \pm 1755 ^{ab}	890 \pm 257 ^a	535 \pm 112 ^c
3.9	127.4 \pm 54.3 ^a	5283 \pm 2038 ^a	1129 \pm 410 ^a	860 \pm 212 ^{bc}
15.6	127.5 \pm 27.3 ^a	4917 \pm 2005 ^{ab}	1020 \pm 432 ^a	943 \pm 222 ^b
62.5	96.5 \pm 37.0 ^{ab}	4598 \pm 2052 ^a	893 \pm 230 ^a	1192 \pm 237 ^b
250	67.9 \pm 37.1 ^b	3601 \pm 2186 ^b	1037 \pm 438 ^a	1701 \pm 730 ^a

Values are means \pm SD (n = 8 biological determinations). Values within same column not sharing a common superscript letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other assayed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Each cell population (1×10^6 cells/ml medium) was respectively treated with ethanol extracts of guava seeds in the presence of lipopolysaccharide (LPS, 2.5 $\mu\text{g/ml}$) for 48 hrs. The limit of detection of ELISA kits used in this study was < 15.6 pg/ml. Vehicle control: cells cultured alone.

討論

近年來已發現許多植物的乙醇萃取物，具有鎮痛和抗發炎活性，如 *Ficus iteophylla* (2) 與番荔枝 (*Annonaceae*) 乙醇萃取物 (4) 等。本實驗室先前比較不同溶劑萃取芭樂籽，亦發現芭樂籽的乙醇萃取物對小鼠脾臟細胞具有免疫調節活性 (1)。本試驗更進一步證實芭樂籽 80% 乙醇萃取物 (EEGS)，對巨噬細胞確實具有免疫調節功能 (表 1 及圖 2) 與抗發炎潛力 (表 2 及圖 3)。巨噬細胞分布全身，為先天性免疫細胞，推測 EEGS 中的成分應可被巨噬細胞吸收或辨識，使巨噬細胞被適度活化，雖然產生輕微發

炎反應 (表 1 及圖 2)，但卻可增強先天性免疫作用。一些內在或外來物質會激起身體對抗感染的反應，這些物質統稱為生物反應修飾劑 (biological response modifiers, BRMs)。某些生物反應修飾劑已被使用於治療關節炎、癌症及一些其他疾病。有研究指出，在傳統中草藥中，有許多活性酚類化合物及多醣，可能具有免疫活性，因此已有部分化合物被認為是生物反應修飾劑 (21, 21)。根據本論文結果，推測 EEGS 將來或可發展為生物反應修飾劑。本實驗更深入探討芭樂籽 80% 乙醇萃取物對以 LPS 誘導發炎細胞的影響 (表 2)，證實抗發炎細胞激素 IL-10，隨著添加樣品濃度的增加而有大幅增加分

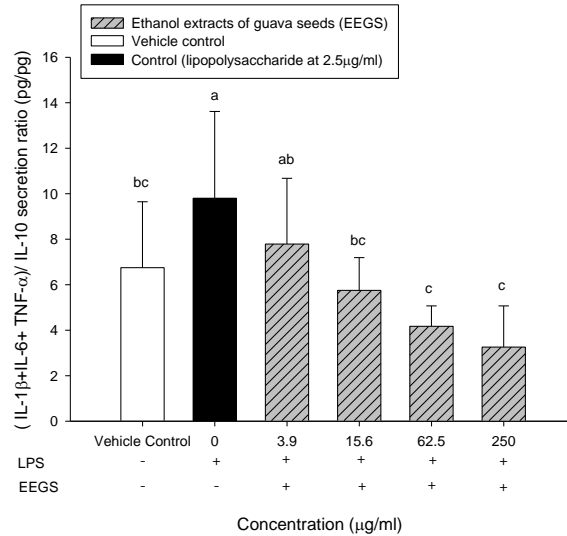


圖 3. 添加不同劑量芭樂籽乙醇萃取物對以脂多醣刺激 BALB/c 雌鼠腹腔巨噬細胞促發炎與抗發炎細胞激素分泌比值之影響

Fig. 3. Effects of ethanol extracts of guava seeds treated at different concentrations on the pro-/anti-inflammatory cytokine secretion ratios by LPS-stimulated peritoneal macrophages from female BALB/c mice.

Values are means ± SD (n = 8 biological determinations). Bars without sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other assayed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Each cell population (1×10^6 cells/ml medium) was respectively treated with ethanol extracts of guava seeds in the presence of lipopolysaccharide (LPS, 2.5μg/ml) for 48 hrs. The limit of detection of ELISA kits used in this study was < 15.6 pg/ml. Vehicle control: cells cultured alone.

泌量的傾向(表 2), 且促發炎/抗發炎細胞激素分泌比值有顯著下降的趨勢($P < 0.05$) (圖 3), 深具抗發炎藥理活性意義, 爾後將更深入探究該萃取物內的有效成分, 將來或可發展成為免疫調節保健食品或藥物。本論文所使用脂多醣 (LPS) 為革蘭氏陰性菌細胞壁的主要成分之一, LPS 可與 LPS binding protein (LBP) 及 bactericidal/ permeability increasing protein (BPI) 結合形成複合物, LBP 與 LPS 形成複

合物後, 再與細胞膜上的 LPS receptor (CD14) 結合, 可誘發細胞激素表現, 活化免疫細胞, 使細胞處於發炎狀態⁽⁹⁾, 但是本實驗模擬 LPS 誘導發炎模式下, 樣品與 LPS 同時存在, 同時對初代腹腔巨噬細胞作用, 因為芭樂籽乙醇萃取物與 LPS 同時存在, 也有可能因為芭樂籽乙醇萃取物直接阻礙 LPS 對細胞之誘導發炎反應, 而非透過免疫調節機制來抑制發炎反應, 為釐清此種可能性, 爾後尚需進行預防及治療

2 種模式實驗；預防模式為細胞先與具有抗發炎潛力之樣品共同培養後，洗去樣品，再加入 LPS 誘導發炎，以探討添加樣品是否具有預防 LPS 所誘導的細胞發炎作用；治療模式為利用 LPS 先與細胞共同培養，使細胞呈現發炎狀態後，洗去 LPS，再加入具有抗發炎潛力之樣品與此發炎細胞共同培養，以探討添加樣品是否具有治療 LPS 所誘導細胞發炎的能力。另外，在 LPS 誘導發炎實驗中，應以類固醇藥物或抗發炎藥物作為治療正對照組，雖然本研究中並未有此操作，但本實驗室在先前實驗中，已發現以類固醇 dexamethasone (100 nM) 處理 LPS 誘發之巨噬細胞發炎，可有效抑制促發炎及抗發炎細胞激素之分泌⁽¹⁰⁾。

本研究已證實芭樂籽乙醇萃取物可增加抗發炎細胞激素 IL-10 之分泌 (表 1 及表 2)，隨著添加樣品濃度的增加而有大幅增加其分泌量的傾向，有文獻指出，肝癌與肝硬化患者，其體內 TNF- α /IL-10 比值增加⁽⁵⁾。推測若能提高患者體內 IL-10 分泌量，可增加其體內抗發炎能力，或可改善其嚴重的肝病變，芭樂籽乙醇萃取物能促使 IL-10 分泌量增加的特性，或可用於肝硬化與肝癌的治療上。另外，Taraz 等人提出，持續進行血液透析之患者其睡眠品質大多不佳，統計結果顯示其血清中含有的 IL-10 濃度明顯較低，並且此類病人更容易引起其他併發症⁽²²⁾。且接受維持性血液透析治療的患者有較一般人群高的 B 型肝炎 (HBV) 和 C 型肝炎 (HCV) 患病率⁽³⁾，甚至大幅縮短生存時間⁽¹⁸⁾。同理，如能提高患者體內 IL-10 分泌量，與調控其免疫反應的特性，當可協助此類病患改善睡眠品質，以及調節多次血液透析刺激所

產生的過度免疫反應，降低肝炎的患病率，進一步可望延長其壽命，但本研究僅為體外試驗的結果，後續仍需更深入研究。

文獻顯示芭樂籽丙酮萃取物內含酚苷類 (phenolic glycosides) 和類黃酮苷 (flavonoid glycosides) 等植化素⁽²⁰⁾。而芭樂籽乙醇萃取物中，可分離出黃酮醇 (flavonol)、酚類化合物以及黃酮苷 (flavonol glycoside) 等物質⁽¹³⁾。因此推測芭樂籽 80% 乙醇萃取物之有效成分可能以多酚類或類黃酮等物質為主，但仍有待更深入證實。

本實驗以 80% 乙醇萃取芭樂籽中可能的免疫調節有效成分，結果萃取率僅為 1.05%，萃取率與本實驗室先前之數據 1.5% 相比⁽¹⁾，產率較低，推測可能原因為：本實驗為避免種子中的油脂對細胞培養產生干擾，因此芭樂籽粉末先以正己烷去除油脂後，再以 80% 乙醇萃取，因此導致萃取率較低，另外，本實驗考慮到實驗方便性，僅萃取樣品四小時，而先前實驗之萃取時間則長達二十四小時，若萃取時間延長或可稍稍增加其萃取產率。

謝誌

本研究承蒙行政院農業委員會農糧署 91-93 農業生產自動化計畫之經費補助，特申謝意。

參考文獻

1. 連思惠、顧琪玫、林金源。2012。芭樂籽溶劑萃取物對小鼠初代脾臟細胞細胞激素分泌之影響。台灣農業化學與食品科學 50: 271-280。

2. Abdulmalik, I. A., M. I. Sule, A. M. Musa, A. H. Yaro, M. I. Abdullahi, M. F. Abdulkadir and H. Yusuf. 2011. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Ficus iteophylla* leaves in rodents. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* 8: 462-466.
3. Alashek, W. A., C. W. McIntyre and M. W. Taal. 2012. Hepatitis B and C infection in haemodialysis patients in Libya: prevalence, incidence and risk factors. *BMC Infect. Dis.* 12: 265.
4. Almeida, J. R., E. C. Araujo, L. A. Ribeiro, J. T. de Lima, X. P. Nunes, A. S. Lucio, F. Agra Mde and J. M. Barbosa Filho. 2012. Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). *Sci. World J.* 2012:859210.
5. Aroucha, D. C., M. P. do Carmo, J. L. Silva, L. R. Vasconcelos, M. S. Cavalcanti, M. T. Muniz, M. L. Aroucha, E. R. Siqueira, G. G. Cahu, L. M. Pereira and M. R. Coelho. 2013. High tumor necrosis factor- α /interleukin-10 ratio is associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Cytokine* 62: 421-425.
6. Chen, K. C., C. L. Hsieh, C. C. Peng, H. M. Hsieh-Li, H. S. Chiang, K. D. Huang and R. Y. Peng. 2007. Brain derived metastatic prostate cancer DU-145 cells are effectively inhibited *in vitro* by guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts. *Nutr Cancer* 58: 93-106.
7. Ghosh, P., A. Mandal, P. Chakraborty, M. G. Rasul, M. Chakraborty and A. Saha. 2010. Triterpenoids from *Psidium guajava* with biocidal activity. *Indian J. Pharm. Sci.* 72: 504-507.
8. Jansen, R. J., D. P. Robinson, R. Z. Stolzenberg-Solomon, W. R. Bamlet, M. de Andrade, A. L. Oberg, K. G. Rabe, K. E. Anderson, J. E. Olson, R. Sinha and G. M. Petersen. 2013. Nutrients from fruit and vegetable consumption reduce the risk of pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Cancer* 44: 152-161.
9. Lahti, A., M. Lahde, H. Kankaanranta, E. Moilanen. 2000. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase suppresses endotoxin-induced nitric oxide synthesis in mouse macrophages and in human colon epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 1188-1194.
10. Liao, C. H., J. Y. Lin. 2012. Purification, partial characterization and anti-inflammatory characteristics of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) plumule polysaccharides. *Food Chem.* 135: 1818-1827.
11. Lin, J. Y., C. Y. Tang. 2007. Interleukin-10 administration inhibits TNF- α and IL-1 β , but not IL-6 secretion of LPS-stimulated peritoneal macrophages. *J. Food Drug Anal.* 15: 48-54.
12. Martire-Greco, D., N. Rodriguez-Rodriguez, V. I. Landoni, B. Rearte, M. A. Isturiz, G. C. Fernandez. 2013. Interleukin-10 controls human peripheral PMN activation triggered by

- lipopolysaccharide. *Cytokine* 62: 426-432.
13. Michael, H. N., J. Y. Salib, M. S. Ishak. 2002. Acylated flavonol glycoside from *Psidium guajava* L. seeds. *Pharmazie* 57: 859-860.
 14. Ojewole, J. A. 2006. Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. *Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.* 28: 441-446.
 15. Park, S. Y., N. J. Ollberding, C. G. Woolcott, L. R. Wilkens, B. E. Henderson and L. N. Kolonel 2013. Fruit and vegetable intakes are associated with lower risk of bladder cancer among women in the multiethnic cohort study. *J. Nutr.* 143: 1283-1292.
 16. Prabu, G. R., A. Gnanamani and S. Sadulla. 2006. Guaijaverin -- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J. Appl. Microbiol.* 101: 487-495.
 17. Qian, H. and V. Nihorimbere. 2004. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 5: 676-683.
 18. Robinson, B. M., J. Zhang, H. Morgenstern, B. D. Bradbury, L. J. Ng, K. P. McCullough, B. W. Gillespie, R. Hakim, H. Rayner, J. Fort, T. Akizawa R. L. Pisoni and F. Tentori. 2014. Worldwide, mortality risk is high soon after initiation of hemodialysis. *Kidney Int.* 85: 158-165.
 19. Salas, D. and R. Peiro. 2013. Evidence on the prevention of cancer. *Rev. Esp. Sanid. Penit.* 15: 66-75.
 20. Salib, J. Y. and H. N. Michael. 2004. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guajava* seeds. *Phytochemistry* 65: 2091-2093.
 21. Schepetkin, I. A., M. T. Quinn. 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6: 317-333.
 22. Taraz, M., M. R. Khatami, M. Hajiseyedjavadi, A. Farrokhian, M. Amini, H. Khalili, A. Abdollahi and S. Dashti-Khavidaki. 2013. Association between antiinflammatory cytokine, IL-10, and sleep quality in patients on maintenance hemodialysis. *Hemodial. Int.* 17: 382-390.
 23. Wani, M., F. A. Sarvar, J. Agrawal, J. Deshpande, S. Mathew, M. Khetmalas, D. Y. Patil. 2012. Qualitative phytochemical analysis and antimicrobial activity studies of *Gymnema sylvestre* R. Br. *Acta Biol. Indica* 1: 121-124.
 24. You, D. H., J. W. Park, H. G. Yuk and S. C. Lee. 2011. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of different parts of guava (*Psidium guajava* L.). *Food Sci. Biotechnol.* 20: 1095-1100.

Received: March 3, 2013.

Accepted: June 18, 2013.