

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：010201a120

## 行政院農業委員會九十六年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**利用離體動物實驗與高血壓鼠模式，開發小葉葡萄應用於預防高血壓之研究 (第1年/全程1年)**  
(英文名稱) **The use of ex vivo animal experiments and SHR models to develop *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* against hypertension**

計畫編號：96農科-1.2.1-科-a1(20)

全程計畫期間：96年1月1日至96年12月31日  
本年計畫期間：96年1月1日至96年12月31日

計畫主持人：侯文琪  
執行機關：私立台北醫學大學



## 一、中文摘要：

於預備試驗初步結果發現，組織培養苗與田間種植之小葉葡萄酒酒精提取物，能有效且具有濃度相關的抑制血管收縮素轉化酶 (angiotensin converting enzyme)。本計畫利用離體動物實驗與高血壓鼠動物模式，以組織培養苗（或穴盤苗）及田間種植之小葉葡萄為材料，分別進行不同溶劑抽取（由子計畫一提供），以粗抽物進行血管收縮素轉化酶抑制活性與高血壓鼠的降血壓實驗；有效的粗提取物進一步進行離體動物實驗，評估可能降壓機制。

## 二、英文摘要：

The sub-project 2 is the use of ex vivo animal and SHR model to develop *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* against hypertension. In the preliminary results, the ethanolic extracts of *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* from tissue culture and mature plant were found to exhibit dose-dependently inhibitory activities against angiotensin converting enzyme (ACE). The crude extracts of different solvent extraction from seedling of tissue culture or plantlet and mature plant will be tested for ACE inhibitory activities and orally administrated to SHR. The effective fraction will further perform the ex vivo animal models to predict the possible hypotensive mechanisms of crude extracts.

### 三、計畫目的：

評估小葉葡萄抽出物與純化物降低高血壓之效果與機制，作為未來應用於做預防或調節血壓之保健品。

#### 四、重要工作項目及實施方法：

1. 植物材料：組織培養苗或穴盤苗及田間種植之小葉葡萄。
2. 粗萃取物之製備(由子計畫一提供)：由於不同溶劑萃取物製備，並經冷凍乾燥後供作實驗用材料。
3. 血管收縮素轉化酵素(ACE)抑制活性的測定。
4. 自發性高血壓鼠(Spontaneous Hypertensive Rats, SHR)及Wister Kyoto (WKY)之餵食(Maruyana et al., 1982)。
5. 離體大白鼠胸主動脈血管環張力實驗。
6. 抑制細胞內鈣離子釋放實驗。
7. 抑制細胞外鈣離子流入實驗。

## 五、結果與討論：

1. 田間種植小葉葡萄四種抽取物（莖, stem, S; 葉, leaf, L; 枝, branch, B; 根, root, R）與四種不同植物生長素之小葉葡萄組織培養抽取物（根部, R; 莖葉部, L）進行血管收縮素轉化酶抑制活性比較。在相同200 $\mu$ g重量下，結果顯示，田間種植之根(R)與莖(S)有最佳抑制活性，葉與分枝抽取物的抑制活性低；就組織培養抽取物而言，四種組織培養抽取物之根部（TC-1R~TC-4R）有較佳的抑制活性，且明顯優於莖葉部分（TC-1L~TC-4L）；且都優於田間種植的根部抽取物，而其中以 S>TC1R>TC3R>TC4R>TC2R>R。
2. 對於20 mU ACE的50%抑制濃度 (IC<sub>50</sub>)，分別為：  
R, 136.61  $\mu$ g/mL; S, 69.49  $\mu$ g/mL; TC1, 98.87  $\mu$ g/mL; TC2, 132.05  $\mu$ g/mL; TC3, 99.04  $\mu$ g/mL; TC4, 102.46  $\mu$ g/mL
3. 以田間種植Stem粗抽物及TC1R (20 mg/kg SHR)餵食一次自發性高血壓鼠，觀察24小時血壓變化。高血壓鼠餵食試驗顯示，Stem粗抽物於第四小時達到最低的血壓，其收縮壓與舒張壓分別降低19.7與16.9 mmHg，24小時收縮壓還有15mmHg的降幅。組織培養苗根部抽取物TC1R於第四小時達到最低的血壓，其收縮壓與舒張壓分別降低16.9與17.7 mmHg，24小時收縮壓還有15mmHg的降幅。
4. 以田間種植小葉葡萄之莖部與組織培養小葉葡萄TC-1之根部，進行離體動物血管舒張試驗。初步顯示，二個樣品血管舒張作用很好，均在0.04-0.08 mg/ml達100%血管舒張 (n=4)。
5. 經LC-MS分析有效調降高血壓鼠血壓之田間種植小葉葡萄之莖部與組織培養小葉葡萄TC-1之根部，發現兩粗抽物含有非常類似指標成分，包括 resveratrol (30.0 min), ampelopsin C (35.8 min), (+)-??-viniferin (38.6 min), (+)-vitisin A (41 min)。而初步實驗結果顯示，resveratrol並不能有效抑制ACE。
6. 田間種植Stem粗抽物及TC1R (30 mg/kg SHR)每天餵食一次，觀察一個月自發性高血壓鼠血壓變化。結果顯示，結果顯示餵食後第二週開始之血壓，田間種植莖部抽取物與組培根部抽取物皆能有效降低高血壓鼠的血壓（收縮壓與舒張壓），Stem粗抽物於第二、三、四週收縮壓分別下降16.34, 26.63, 12.86 mmHg；組織培養苗根部抽取物TC1R於第二、三、四週收縮壓分別下12.45, 17.13, 10.50mmHg。
7. 生化指標為第四週犧牲高血壓鼠之血液生化指標測定。結果顯示，組培根部抽取物與對照組進行比較，在Creatine (P<0.01)與CPK(P<0.05)有統計性差異（與腎功能有關係）

## 六、結論

於第一年實驗結果發現，田間種植小葉葡萄之莖部與組織培養小葉葡萄之根部粗抽物，具有抑制ACE (50% 抑制濃度，莖部，69.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；組織培養小葉葡萄之根部，98.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )與降低高血壓鼠血壓活性，其他部位的效果不佳；以田間種植之莖部(Stem)抽取物及TC1R (20 mg/kg SHR)餵食一次自發性高血壓鼠，觀察24小時血壓變化。高血壓鼠餵食試驗顯示，Stem粗抽物於第四小時達到最低的血壓，其收縮壓與舒張壓分別降低19.7與16.9 mmHg，24小時收縮壓還有15mmHg 的降幅。組織培養苗根部抽取物TC1R於第四小時達到最低的血壓，其收縮壓與舒張壓分別降低16.9與17.7 mmHg，24小時收縮壓還有15mmHg 的降幅。於離體動物實驗也發現此兩種粗抽物具有良好血管舒張效果，均在0.04-0.08 mg/mL達100%血管舒張 (n=4)。經LC-MS分析有效調降高血壓鼠血壓之田間種植小葉葡萄之莖部與組織培養小葉葡萄TC-1之根部，發現兩粗抽物含有非常類似指標成分，包括 resveratrol (30.0 min), ampelopsin C (35.8 min), (+)- $\epsilon$ -viniferin (38.6 min), (+)-vitisin A (41 min)。而初步實驗結果顯示，resveratrol並不能有效抑制ACE。因此，下年度將以分離純化ampelopsin C, (+)- $\epsilon$ -viniferin, 及 (+)-vitisin A 進行降壓機制探討

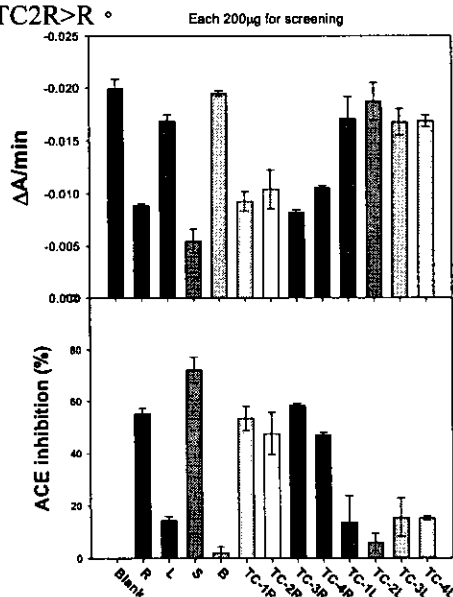
## 七、參考文獻：

- 行政院衛生署中醫藥委員會編 台灣常見藥用植物圖鑑第二冊 行政院衛生署中醫藥委員會第一版 2002.
- 台灣植物編輯協會。2003。葡萄科， p.696-710。刊於：台灣植物誌。台灣植物編輯協會。台北。
- 林煥哲。1997。小本山葡萄及羅氏鹽膚木蟲癭成份之研究。台北醫學院藥學研究所碩士論文。
- 林義恭、劉新裕、賴瑞聲、胡敏夫、高瑞隆、徐原田。2002。台灣原生細本山葡萄的選種與栽培(I)細本山葡萄的外表型變異。中華農業研究 51(2):24-31.
- 蔡佳宏、王子慶、吳明昌。2001。細葉山葡萄及香茹草抗至突變性之研究。科學農業 49(7,8):186-191。
- 謝文聰、譚思濂、陳介甫、蔡輝彥。1998。山葡萄粗萃取物及其活性成分之鎮痛抗炎作用研究。
- 郭賢伸。2005。利用細本山葡萄(*Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc.)細胞培養生產白藜蘆醇(resveratrol)之研究。大同大學生物工程研究所碩士論文。
- Chiu, N. Y.; Chang, K. H. 1995. The illustrated medicinal plants of Taiwan Vol.4. SMC PUBLISHING INC. Taiwan, R.O.C., p.147.
- Chiu, N. Y.; Chang, K. H. 1998. The illustrated medicinal plants of Taiwan Vol.5. SMC PUBLISHING INC. Taiwan, R.O.C., p.140.
- Decendit, A., Waffo-Teguo, P., Richard, T., Krisa, S., Vercauteren, J., Monti, J. P., Deffieux, G., Me rillona, J. M. 2002. Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 60, 795-798.
- Dou, D. Q.; Ren, J.; Cooper, M.; He, Y. H.; Pei, Y. P.; Takaya, Y.; Niwa, M.; Chen, Y. J.; Yao, X. S.; Zhou, R. P. 2003. Polyphenols from *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 12, 57-59.
- He, Y. H.; Dou, D. Q.; Terashima, K.; Takaya, Y.; Niwa, M. 2004. Two lignan glycosides from *Vitis thunbergii*. *Heerocycles*, 63, 871-877.
- He, Y. H.; Terashima, K.; Takaya, Y.; Niwa, M. 2005. Structural confirmation of (+)-cis-??-viniferin. *Chin. J. Nat. Med.*, 3, 90-92.
- Huang, K. S., Lin, M., Cheng, G. F. 2001. Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. *Phytochemistry*, 58, 357-362.
- Huang, Y. L.; Tsai, W. J.; Shen, C. C.; Chen, C. C. 2005. Resveratrol derivatives from the roots of *Vitis thunbergii*. *Journal of Natural Products*, 68, 217-20.
- Li, W. W., Ding, L. S., Li, B. G., Chen, Y. Z. 1996. Oligostilbenes from *Vitis heyneana*. *Phytochemistry*, 42, 1163-1165.
- Lu, M. C. 2005. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shot tip culture. *Scientia Horticulturae*, 107, 64-69.
- Teguo, P. W., Fauconneau, B., Deffieux, C., Huguet, F., Vercauteren, J., Merillon, J. M. 1998. Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Journal of Natural Products*, 61, 655-657.



## 成果報告

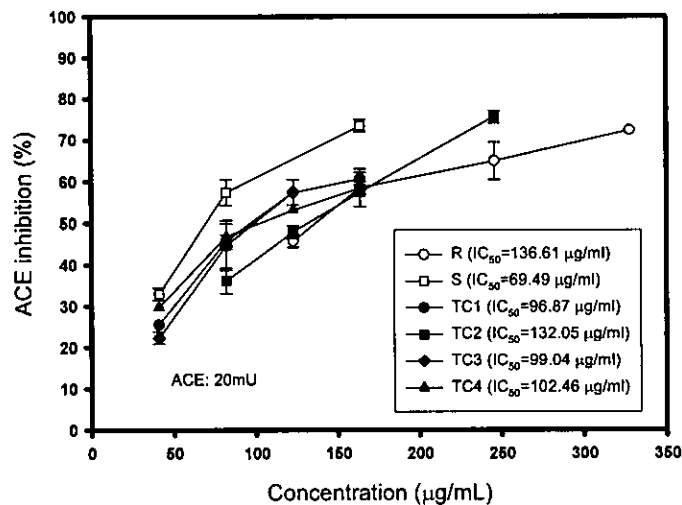
1. 田間種植小葉葡萄四種提取物（莖, stem, S; 葉 leaf, L; 枝, branch, B; 根, root, R）與四種不同植物生長素之小葉葡萄組織培養提取物（根部, R; 莖葉部, L）進行血管收縮素轉化酶抑制活性比較。在相同 200 $\mu\text{g}$  重量下，結果顯示，田間種植之根(R)與莖(S)有最佳抑制活性，葉與分枝提取物的抑制活性低；就組織培養提取物而言，四種組織培養提取物之根部（TC-1R~TC-4R）有較佳的抑制活性，且明顯優於莖葉部分（TC-1L~TC-4L）；且都優於田間種植的根部提取物，而其中以  $S > TC1R > TC3R > TC4R > TC2R > R$ 。



2. 對於 20 mU ACE 的 50% 抑制濃度 ( $IC_{50}$ )，分別為：

R, 136.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; S, 69.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$

TC1, 98.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; TC2, 132.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; TC3, 99.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; TC4, 102.46  $\mu\text{g}/\text{mL}$



3.以田間種植 Stem 粗抽物及 TC1R (20 mg/kg SHR) 餵食一次自發性高血壓鼠，觀察 24 小時血壓變化。高血壓鼠餵食試驗顯示，Stem 粗抽物於第四小時達到最低的血壓，其收縮壓與舒張壓分別降低 19.7 與 16.9 mmHg，24 小時收縮壓還有 15mmHg 的降幅。組織培養苗根部抽物 TC1R 於第四小時達到最低的血壓，其收縮壓與舒張壓分別降低 16.9 與 17.7 mmHg，24 小時收縮壓還有 15mmHg 的降幅。現正在進行長時間餵食高血壓鼠試驗。

Time after treatment (H)	$\Delta$ SBP (mmHg) (20 mg/kg)		$\Delta$ DBP (mmHg) (20 mg/kg)	
	Stem extracts	TC1R extracts	Stem extracts	TC1R extracts
2	-15.1 $\pm$ 6.6	-14.1 $\pm$ 2.9	-16.2 $\pm$ 7.3	-11.1 $\pm$ 4.6
4	-19.7 $\pm$ 5.6	-16.3 $\pm$ 6.8	-16.9 $\pm$ 5.5	-17.7 $\pm$ 5.7
6	-16.2 $\pm$ 2.1	-9.1 $\pm$ 5.3	-11.2 $\pm$ 3.5	-11.9 $\pm$ 4.4
24	-15.0 $\pm$ 3.5	-10.9 $\pm$ 7.0	-15.0 $\pm$ 2.5	-6.7 $\pm$ 6.0

4. 以田間種植小葉葡萄之莖部與組織培養小葉葡萄 TC-1 之根部，進行離體動物血管舒張試驗。初步顯示，二個樣品血管舒張作用很好，均在 0.04-0.08 mg/ml 達 100% 血管舒張 (n=4)。

5. 經 LC-MS 分析有效調降高血壓鼠血壓之田間種植小葉葡萄之莖部與組織培養小葉葡萄 TC-1 之根部，發現兩粗抽物含有非常類似指標成分，包括 resveratrol (30.0 min), ampelopsin C (35.8 min), (+)- $\epsilon$ -viniferin (38.6 min), (+)-vitisin A (41.1 min)。而初步實驗結果顯示，resveratrol 並不能有效抑制 ACE。因此，下年度將以分離純化 ampelopsin C, (+)- $\epsilon$ -viniferin, 及 (+)-vitisin A 進行降壓機制探討。

