

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : 洛神葉多酚對 H2O2 誘導胰島  $\beta$  細胞損傷的保護作用  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生：張維彧  
學生計畫編號：MOST 104-2815-C-040-031-B  
研究期間：104 年 07 月 01 日至 105 年 02 月 28 日止，計 8 個月  
指導教授：林慧萱

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 105 年 03 月 25 日

# 目錄

目錄	I
圖表目錄	III
摘要	1
第一章、研究動機研究問題	3
第二章、文獻回顧與探討	5
2.1. 第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus)	5
2.2. 氧化壓力(Oxidative stress)	5
2.2.1. 活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)	5
2.2.2. 細胞凋亡(Apoptosis)	6
2.2.3. 細胞自噬(Autophagy)	9
2.3. 洛神葉多酚( <i>Hibiscus</i> leaf polyphenols)	11
第三章、實驗架構與流程	13
第四章、研究方法與步驟	14
4.1. 洛神葉多酚萃取物 HLP 製備及成份分析	14
4.1.1. HLP 之製備	14
4.1.2. 總多酚量測定(Folin-Ciocalteu method)	14
4.1.3. 總黃酮量測定(Jia method)	15
4.1.4. 總花青素含量測定(Fuleki and Francis method)	15
4.2. 細胞培養(Cell culture)	16
4.2.1. RIN-m5F 細胞株來源	16
4.2.2. 培養方式	16
4.3. 細胞生長分析(Cell growth assay)	16
4.4. 葡萄糖刺激胰島素分泌試驗(Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)	17
4.5. 細胞內 ROS 含量測定(ROS assay)	18
4.6. 細胞週期分析(Cell cycle analysis)	18
4.7. 細胞凋亡分析試驗(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI stain)	19
4.8. 細胞自噬分析實驗(Autophagic analysis)	20
4.8.1. 酸性小囊定量分析試驗(Acidic vesicular organelles, AVO stain)	20
4.8.2. 細胞自噬蛋白分析試驗(Flow cytometry analysis of LC3)	21

4.9. 西方點墨法(Western blotting).....	21
4.9.1. 萃取蛋白及蛋白定量 .....	21
4.9.2. Western blotting .....	22
第五章、結果與討論.....	25
5.1. 洛神葉多酚(HLP)萃取物成份分析 .....	25
5.2. 探討 HLP 對於 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞之毒性及存活率之影響.....	25
5.3. 探討 HLP 對於 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞之胰島素分泌及氧化傷害之影響 .	26
5.4. 探討 HLP 對於 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞誘導細胞凋亡機制之影響 .....	27
5.5. 探討 HLP 對於 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞誘導細胞自噬機制之影響 .....	28
第六章、參考文獻.....	31
第七章、圖表 .....	33

## 圖表目錄

附圖 1：研究動機 .....	4
附圖 2：細胞凋亡之分子機制 .....	8
附圖 3：細胞自噬之分子機制 .....	11
附表 1：separating gel 配方 .....	23
附表 2：staging gel 配方 .....	24
Table 1：Composition of the HLP .....	33
Figure 1：Effect of HLP in combination with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> on β-cell viability.....	34
Figure 2：Effects of HLP on insulin secretion and oxidative injury of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated pancreatic β cells .....	36
Figure 3：Effect of HLP on apoptosis of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated pancreatic β cells .....	38
Figure 4：Effect of HLP on autophagy of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated pancreatic β cells.....	43
Figure 5：A proposed model for the protective effect of HLP on H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced oxidative injury in rat pancreatic β cells (RIN-m5F) via downregulation of apoptosis and upregulation of autophagy. ....	47

## 摘要

近年來，代謝症候群(metabolic syndrome)引發之相關疾病已超越癌症成為國人高致死率的死因，其中糖尿病佔很大的比例，且以非自體免疫疾病的第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)居多。目前糖尿病治療藥物主要皆以降低血糖為主，近年研究則著重胰島β細胞損傷方面的探討，進而證實減低β細胞的氧化壓力(oxidative stress)可以根本地改善 T2D 的病情。在過去的研究已提出多酚化合物(polyphenols)具有抗氧化(antioxidation)及降低胰島素抗性(insulin resistance)的潛力。本計劃擬探討富含多酚之天然物--洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* leaf)是否具有保護胰島β細胞免於損傷之作用，因此以萃取洛神葉多酚(*H. leaf polyphenols*, HLP)為實驗材料並研究其保護β細胞對抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所造成的氧化傷害的能力。首先以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>誘導大鼠胰島β細胞RIN-m5F氧化傷害作為實驗模式，觀察HLP不同劑量對於細胞生長之影響。由細胞生長曲線分析(cell growth assay)以及葡萄糖刺激胰島素分泌試驗(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)中可發現HLP能有效保護β細胞存活及胰島素分泌。接著以流式細胞儀分析(flow cytometric analysis)細胞週期與活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量發現HLP可以抗細胞凋亡(apoptosis)並減少其氧化傷害。進一步透過DAPI及AVO螢光染色分析處理HLP確實能抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所

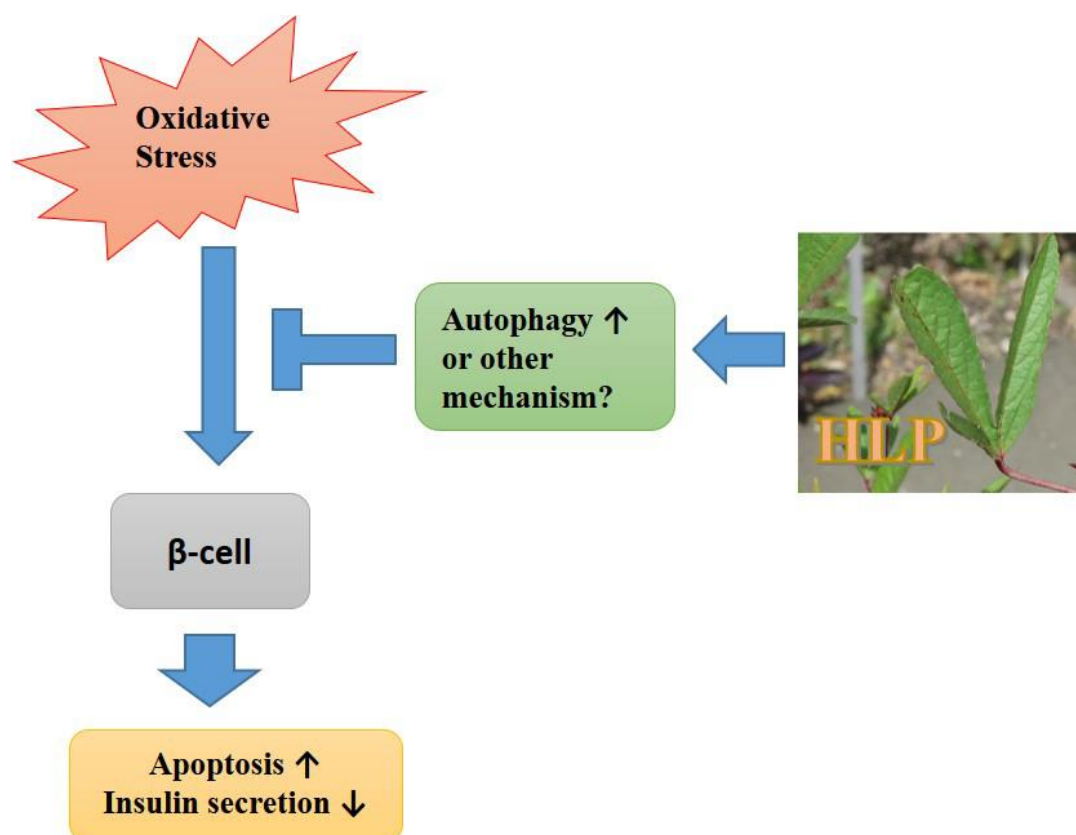
誘導之細胞凋亡，且能增加細胞自噬(autophagy)的作用。最後藉由西方點墨法分析發現，HLP 能夠抑制促凋亡蛋白 Caspase 3 和 Bax 的表現量，而細胞自噬蛋白 LC3-II 及 Beclin-1 的表現量也有上升之趨勢。綜合上述，HLP 能夠保護  $\beta$  細胞免於氧化壓力性傷害，進而達到阻斷胰島素抗性的作用，顯示洛神葉具有改善 T2D 之潛力。

關鍵字：第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)、氧化壓力(oxidative stress)、洛神葉多酚(*Hibiscus* leaf polyphenols, HLP)、細胞凋亡(apoptosis)、細胞自噬(autophagy)。

## 第一章、研究動機研究問題

代謝症候群(metabolic syndrome)容易引發心血管疾病、高血壓、糖尿病、腎病變等症狀。過去研究顯示其主要是由於飲食中的高脂肪和高糖等對於胰臟、血管或其他組織造成氧化傷害而誘發此多重病癥。因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* leaf)在東南亞一代為普遍食用的蔬菜類，然而在台灣洛神葉大多被丟棄不用。過去的研究顯示洛神葉具有降血糖之功效，以及其富含類黃酮(flavonoids)等多酚(polyphenols)成分，此類黃酮具有抗氧化、抗發炎、降血脂、防癌之作用及抑制心血管疾病。過去我們實驗室已證實洛神葉水萃取物(*H. leaf* extracts, HLE)具有促進癌細胞凋亡(apoptosis)作用，顯示洛神葉可以扮演一個化學預防的角色。本計劃進一步探討其多酚萃取物(*H. leaf* polyphenols, HLP)是否具有保護胰島  $\beta$  細胞免於損傷之作用，以透過減少細胞凋亡或增加細胞自噬(autophagy)的機制來保護  $\beta$  細胞免於氧化性傷害，進而恢復胰島素分泌功能為研究之重點(附圖 1)。

附圖 1：研究動機





## 第二章、文獻回顧與探討

### 2.1. 第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus)

2013 年國人十大死因中與代謝症候群有關的糖尿病、心臟病、腦血管疾病、高血壓疾病、腎臟病等死因，分佔所有死亡原因高達 31.1%，已超越癌症 29%，而其中糖尿病跟去年比更躍居第 4 位[1]。如未經治療，糖尿病可能引發許多嚴重的併發症。糖尿病不僅僅是國人必須面對的重大疾病，更是全球都在關注的重大議題。相較於第一型糖尿病是因為自體免疫引起的疾病，第二型糖尿病則是因為胰島素抗性(insulin resistance)以及胰島β細胞衰竭(failure)而引起的高血糖之現象[2]，此為一種慢性的代謝性疾病。過去研究顯示，在體內高血糖以及高血脂的環境會造成β細胞氧化壓力(oxidative stress)以及內質網壓力(endothelium reticulum stress, ER stress)的上升[3]，並且會造成慢性發炎(chronic inflammation)反應[4]，進而產生了許多併發症。因此，近年來的研究除了針對降血糖之外，也著重於恢復β細胞功能以減緩其衰竭所造成的氧化壓力與慢性發炎反應[5]。

### 2.2. 氧化壓力(Oxidative stress)

#### 2.2.1. 活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)

ROS 包括超氧陰離子(superoxide anion,  $O_2 \cdot^-$ )、過氧亞硝酸陰離

子(peroxynitrite anion, ONOO<sup>-</sup>)、羥基自由基(hydroxyl radical, OH·)及過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。ROS 源自於 O<sub>2</sub> 在體內正常代謝而產生，並且在胰島 β 細胞訊息傳遞中扮演重要的角色[6]。在第二型糖尿病中，當胰島素的需求量增加，ROS 的生成也會由粒線體的呼吸作用增強而上升，而促使細胞內氧化壓力的上升[7]。更嚴重的是在 β 細胞中分解 ROS 的酵素又比一般的細胞表現量還要少，使得其對 ROS 更為敏感[8]。進一步 ROS 會攻擊蛋白質、脂質、及核酸，被攻擊而氧化的這些物質則會使細胞喪失訊息傳遞、運送、分泌等多種主要功能，這些持續性的功能損傷會促使細胞走向壞死(necrosis)或細胞凋亡(apoptosis) [9]，最終則會造成 β 細胞失去胰島素分泌的能力[10]

### 2.2.2. 細胞凋亡(Apoptosis)

#### (1) 簡介

細胞凋亡屬於細胞程序式死亡(programmed cell death)之一，起因細胞本身受凋亡訊息所誘發一連串的相關蛋白質作用促使細胞死亡的過程。生物體在生長發育、細胞分化或免疫反應中，常藉由細胞凋亡來維持體內生理上的平衡。然而當胰島 β 細胞凋亡不正常被觸發時，則會使平衡被破壞，導致 β 細胞數量下降，進而導致胰島素分泌不足[11]。目前研究顯示至少有三個訊息路徑參與其壓力媒介細胞凋亡(stress-mediated apoptosis)，分別是轉錄因子 ATF3 (activating

transcription factor 3)、CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein)、蛋白酶 IRE1–JNK (inositol-requiring enzyme 1-c-jun kinase) 訊息路徑、以及關鍵酵素 caspases 的活化[12, 13]。

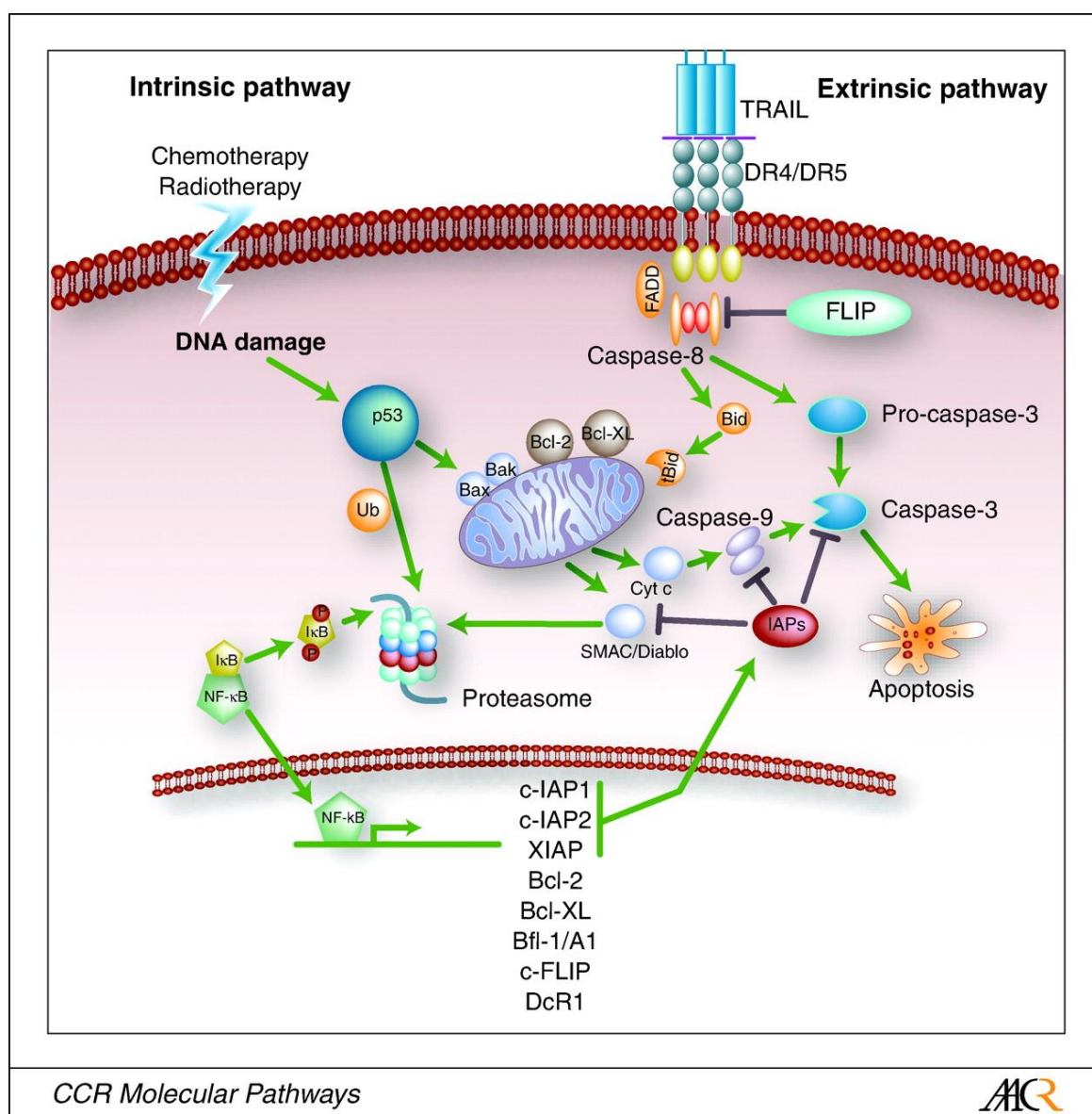
## (2) 分子機制

細胞凋亡主要涉及兩大主要的凋亡訊息傳遞途徑：其一是內源性凋亡途徑(intrinsic apoptosis pathway)，亦稱之為粒線體介導途徑(mitochondria-mediated pathway)；其二則是外源性凋亡途徑(extrinsic apoptosis pathway)，亦即死亡受體介導途徑(death receptor-mediated pathway)，透過死亡受體(death receptor)所形成的複合物與半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate specific proteinase, caspase)結合進行活化。

內源性途徑會透過細胞外的各種壓力來啟動，細胞缺乏生長因子、DNA 受損、過多的氧化壓力等。調控於細胞凋亡的內源性途徑的主要為 Bcl-2 家族蛋白。根據同源性與功能性的基礎還有另外三個亞類型：第一種為抑制凋亡蛋白(anti-apoptotic proteins)，例如：Bcl-2、Bcl-XL；第二種為促凋亡蛋白(pro-apoptotic proteins)，例如：Bax、Bak；而第三種類型為 BH3-only proteins 僅具有一個 BH3 domain 的促凋亡蛋白，如Bad、Bid。

外源性途徑是經由細胞膜上特定受體受到特定的刺激來引發，

因此稱為死亡受體，死亡受體與其特定細胞外的配體結合而進一步引發細胞凋亡，當兩者結合時會開始一系列的蛋白質水解反應，最後活化下游effector caspases (caspase-3、caspase-6、caspase-7)，使細胞DNA 斷裂降解而導致細胞的死亡(附圖 2) [14]。



附圖 2：細胞凋亡之分子機制[14]

### 2.2.3. 細胞自噬(Autophagy)

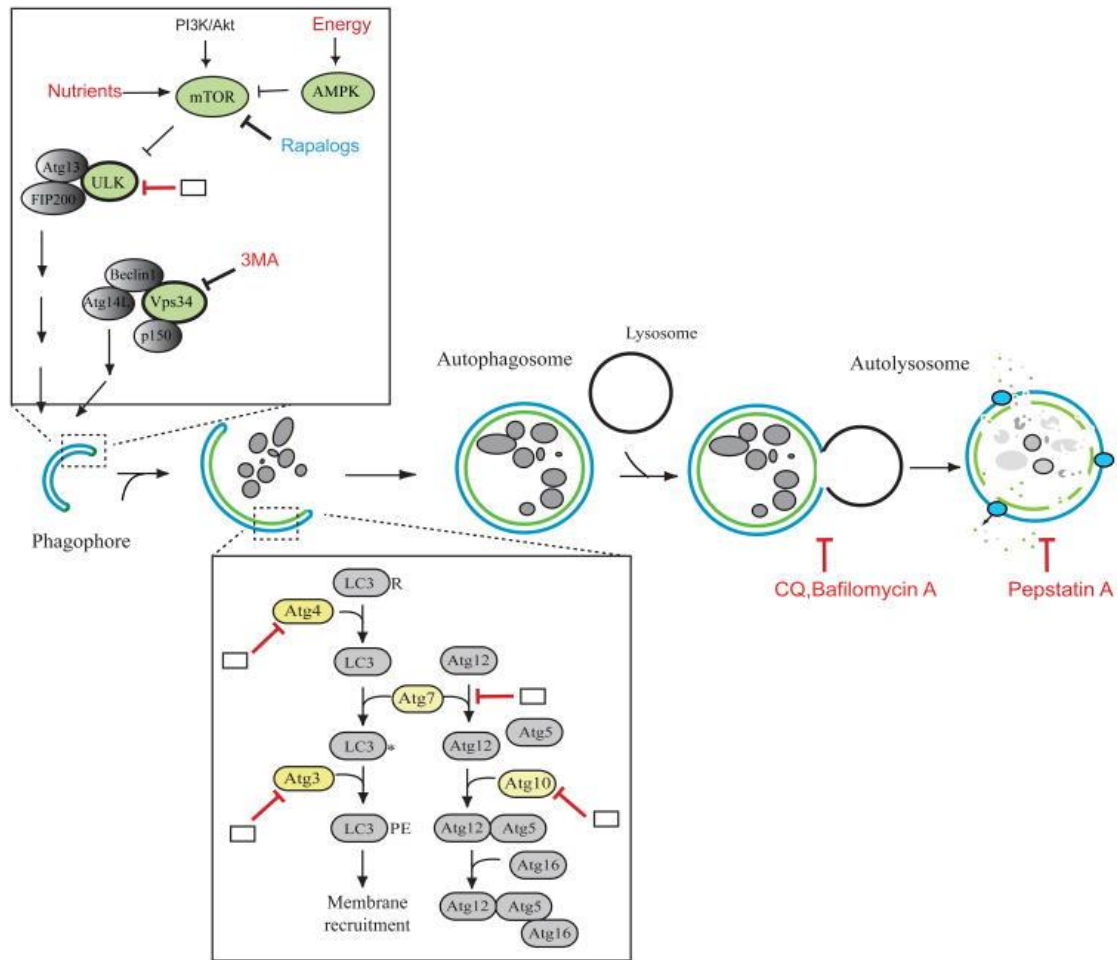
#### (1) 簡介

細胞自噬為真核生物利用溶小體(lysosome)對細胞內蛋白質及胞器進行分解的一種被高度調控的機制，此機制可以將老化的細胞或胞器降解及清除。近年來，細胞自噬被認為是一種與細胞凋亡相抗衡的保護作用，藉由清除老化或受損的胞器促使細胞維持正常的恆定[15]。研究證實細胞自噬的降低可能會造成  $\beta$  細胞的數量減少[16]；反之，如果刺激細胞自噬的活化則可以改善氧化壓力所造成的糖尿病[17]，造成  $\beta$  細胞數量與功能恢復正常。

#### (2) 分子機制

細胞自噬包含了幾個階段，分別為自噬雙層膜的形成、自噬小體的產生、自噬小體的降解等。當細胞接受到自噬訊號後或活化 ULK/Atg13/FIP200 導致自噬小體 (autophagosome) 中自噬膜 (phagophore) 的生成。同時 class III PI3 kinase (Vps34)-Atg14L-Beclin1 複合物也可促進自噬小體的產生並調節自噬小體核化(nucleation)的步驟。為了使自噬膜延伸(elongation)，將細胞質中需要降解的胞器或廢棄物質完全包覆，需要透過雙 ubiquitin-like 的結合系統將 LC3 黏附到 phosphatidyl ethanolamine (PE) 上並使其與 Atg5 及 Atg12 結合。接著進一步讓 Atg5/Atg12 複合物與 Atg6 作用形成

Atg5/Atg12/Atg6 複合物並結合到自噬小體的膜上。完成的自噬小體會與溶酶體(lysosome)結合形成自噬溶酶體(autolysosome)，因此在自噬小體內待分解的物質就會被溶酶體中的酰胺化水解酶(lysosomal hydrolases)分解，而分解完後的氨基酸、脂肪酸等細胞原料將被輸送到細胞質中，供細胞重新利用，而不能被回收利用的殘渣可能被排出細胞外或滯留在胞漿中。目前研究發現目前有數種抑制劑(紅字標示)能夠透過調控細胞自噬的不同階段來抑制自噬作用。部分自噬調控蛋白具有酵素活性(綠字及黃字標示)被認為是細胞自噬抑制劑的主要作用目標。目前常見的抑制劑如 3-methyladenine (3-MA)會以細胞自噬初期啟動機制之 class III PI3 kinase-Beclin 1 複合物為目標來降低細胞自噬作用(附圖 3) [18]。



附圖 3：細胞自噬之分子機制[18]

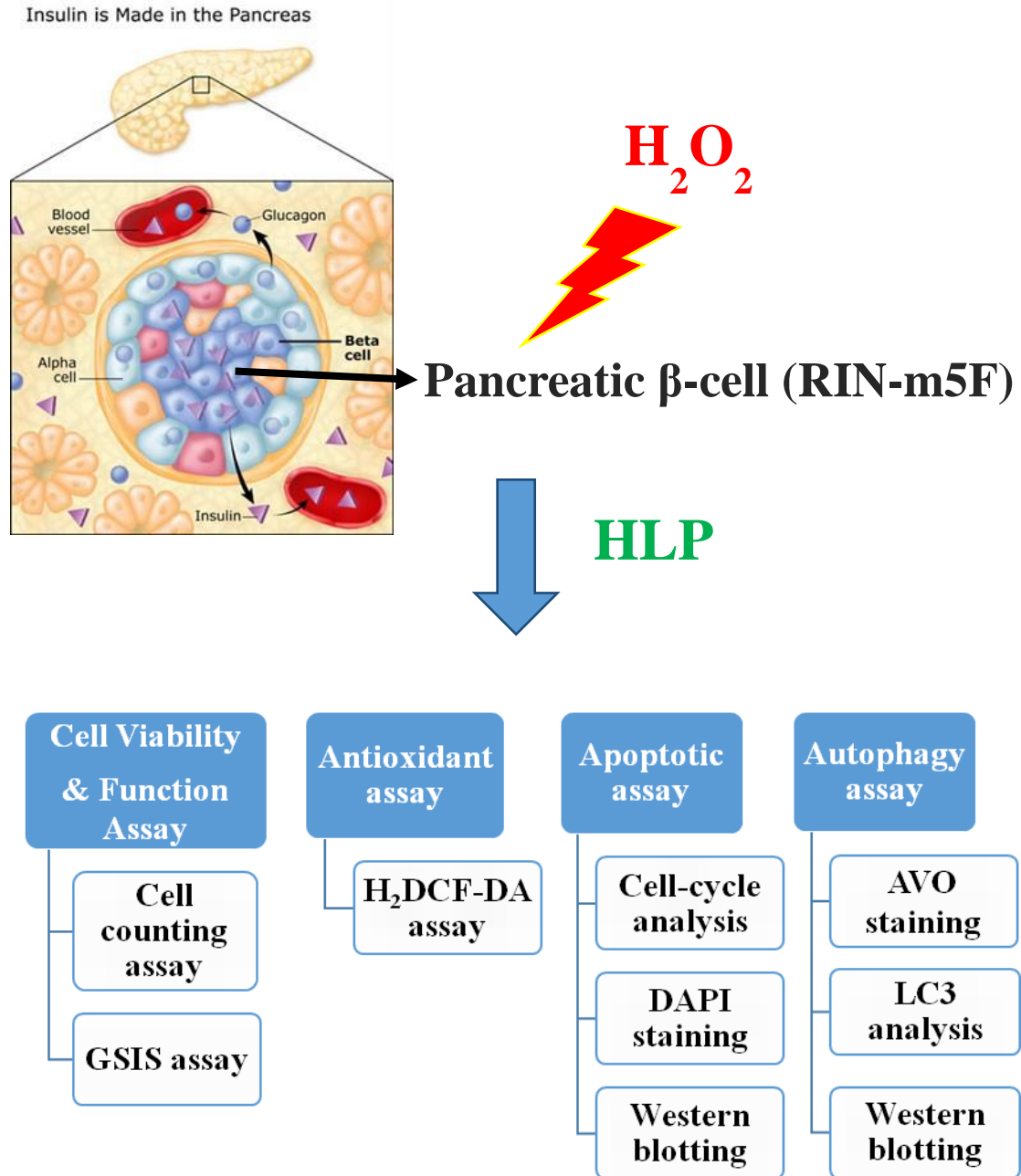
## 2.2. 洛神葉多酚(*Hibiscus* leaf polyphenols)

洛神名稱是由英文名 Roselle 音譯而來，學名為 *Hibiscus sabdariffa*，又稱「洛神葵」、「洛濟葵」、「山茄」、「紅葵」，屬於錦葵科木槿屬一年生草本植物或多年生灌木，主要分布在熱帶及亞熱帶。傳統中藥藥理上，洛神花具有清熱解渴、降血壓、補血、促進陳代謝、利尿等作用。在許多東南亞國家，洛神花被當成藥用植物使用。研究顯示洛神花萃取出物中含有類黃酮(flavonoids)、原兒茶酸(protocatechuic

acid)和花青素(proanthocyanidins)等成分，而這些有效成分則具有有抗菌(antibacterial)、抗氧化(antioxidant)、肝腎的保護以及抗糖尿病以及降血壓等功能[19]。並在動物模式中發現洛神花多酚萃取物可以抑制高血糖(hyperglycemia)、高血脂(hyperlipidemia)以及氧化壓力來降低胰島素抗性[20-21]。但目前的研究大多關注在花萼的部分，相較之下，關於洛神葉的研究便為少數。近年來，我們實驗室研究也發現洛神葉富含多酚化合物(polyphenols)，多酚是植物中化學物質的統稱，結構中含有多個酚基團。多酚化合物的共同特點是具有良好的抗氧化活性以及清除自由基(free radical)的能力。有研究證實洛神葉多酚萃取物 HLP 可以促進癌細胞走向凋亡[22]、以及具有抗氧化和抑制由氧化型低密度脂蛋白誘發泡沫細胞(foam cell)形成等多種的功能[23]。因此我們擬探討 HLP 對於胰島  $\beta$  細胞是否具有保護其免於氧化損傷之效果。



### 第三章、實驗架構與流程



## 第四章、研究方法與步驟

### 4.1. 洛神葉多酚萃取物 HLP 製備及成份分析

#### 4.1.1. HLP 之製備

秤取 100 克乾燥洛神葉，攪拌至粉末狀。接著以 300 ml 甲醇在 50°C 水浴中萃取 3 小時後過濾三次，收集完濾液以減壓濃縮法乾燥後溶解於 50°C 500 ml 二次水(deionic distilled water)。然後以 200 ml 己烷移除色素，分層之水層以 180 ml 乙酸乙酯萃取三次，再用減壓濃縮法乾燥後溶解於 300 ml 二次水，最後進行冷凍乾燥為粉末。HLP 產率約為 2.5%。

#### 4.1.2. 總多酚量測定(Folin-Ciocalteu method)

配製食子酸(gallic acid)標準品，先取 10 mg 溶於 25 ml 甲醇中，再分別取 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 ml 並以甲醇將體積補至 1 ml；另配製待測樣品，以 1000 倍稀釋，一樣加入甲醇將體積補至 1 ml。隨後各加入 0.5 ml 2 N Folin-Ciocalteu's reagent 混勻後，再加入 3 ml 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 靜置於室溫中 15 min。最後加入 5 ml ddH<sub>2</sub>O 搖勻，以 1000 rpm 進行離心 5 min。在波長 725 nm 下測 OD 值(以甲醇歸零)，畫出標準曲線，對照樣品吸光值，進一步推算出樣品總多酚含量。

#### 4.1.3. 總黃酮量測定(Jia method)

以 rutin 為標準品(8.8 mg/25 ml MeOH)，分別取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml 以 30% 乙醇進行稀釋並補足體積至 10 ml；另配置待測樣品，以 1000 倍稀釋，並一樣加入乙醇將體積補至 10 ml。隨後各加入 0.3 ml 之 1 M Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> 混勻，靜置室溫 6 min 後，再加入 0.3 ml 之 10% AlNO<sub>3</sub> 混勻並一樣靜置室溫 6 min。最後加入 4 ml 4% NaOH 溶液以及補 0.4 ml ddH<sub>2</sub>O 混合均勻，放置 15 min。以分光光度計在波長 510 nm 下測吸光值(乙醇歸零)，求得標準曲線。計算方程式，對照樣品吸光值，進一步推算出樣品總黃酮含量。

#### 4.1.4. 總花青素含量測定(Fuleki and Francis method)

將樣品進行稀釋 1000 倍後，分別取 2 ml 至兩管離心管中，以酸鹼 Buffer 調 pH 值，使一管 pH 為 1.0，另一管為 pH 4.5。兩份稀釋液分別以分光光度儀在 520 nm 進行吸光測試，得 A1 (pH 為 1.0)與 A2 (pH 為 4.5)，再以下列公式計算樣品中所含總花青素含量。

$$\frac{|A1 - A2| \times F \times MW}{\epsilon}$$

MW：花青素分子量以 delphinidin-3-diglycoside 之分子量 518.5 計算

F：稀釋倍數

$\epsilon$ ：花青素之莫耳吸光係數(Molecular extinction coefficient)，以

delphinidin-3-diglycoside 在含 0.1% 鹽酸的甲醇溶液之吸光係數  $\epsilon$  值

301.6 計算。

## **4.2. 細胞培養(Cell culture)**

### **4.2.1. RIN-m5F 細胞株來源**

RIN-m5F 為大鼠胰臟胰島  $\beta$  細胞，細胞來源為食品工業發展研究所菌種中心／國家衛生研究院細胞庫。此細胞會分泌胰島素以及 L-dopa-decarboxylase 兩種物質，型態上屬於上皮細胞。

### **4.2.2 培養方式**

RIN-m5F 細胞以 90% RPMI 1640 培養液為主，並外加 1.5 g/L sodium bicarbonate、2.5 g/L glucose、10 mM HEPES、1.0 mM sodium pyruvate、2 mM L-glutamine、1% penicillin/streptomycin，pH 7.2~7.3，再加上 10% fetal bovine serum (FBS) 作為增殖培養基。培養在 75 cm<sup>2</sup> Nunclon<sup>TM</sup> delta treated flask 中，並放置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境的恆溫箱裡。每 2 至 3 天更換一次培養液，5~7 日繼代細胞一次。

## **4.3. 細胞生長分析(Cell growth assay)**

將 RIN-m5F 細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 的培養皿中種植細胞，等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium (不含有 10% FBS 的培養液) 以進行飢餓處理，放回 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，換回正常的培養液，並將細胞處理 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以模擬氧化壓力之環境，再分別加入不同劑

量的萃取物 HLP (0、0.5、1、2、5、10、50、100  $\mu\text{g/ml}$ ) 反應於 5%  $\text{CO}_2$  之 37°C 無菌恆溫培養箱中。24 小時後，去除上清液，並加入適量的胰蛋白酶(trypsin)，於恆溫箱中反應 10 分鐘，使細胞脫落，後以 trypan blue 染色，再以計數盤計數，並以統計分析。

#### **4.4. 葡萄糖刺激胰島素分泌試驗(Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)**

將細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 中種入細胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium 以進行飢餓處理，並放置 5%  $\text{CO}_2$  之 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，將舊的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  合併不同劑量的萃取物 HLP (0、0.5、1  $\mu\text{g/ml}$ )處理，再放回 5%  $\text{CO}_2$  之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，將上清液去除，並以 PBS 清洗細胞 2 次後，以 KRBH solution 配置 2.8 mM 葡萄糖溶液，並各加入 1 ml 到 well 中(low glucose)，放到 37°C 反應 1 h 後，將上清液收集待測。接著再以 KRBH solution 配置 16.7 mM 葡萄糖溶液，並各加入 1 ml 到 well 中(high glucose)，同樣放到 37°C 反應 1 h 後，將上清液收集待測，最後利用 insulin kit 測其胰島素的含量，即可測得在高糖與低糖環境中  $\beta$  細胞中胰島素的分泌量。

#### 4.5. 細胞內 ROS 含量測定(ROS assay)

細胞飢餓處理 24 小時後，將舊的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，接著先將細胞以 50  $\mu\text{M}$  dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)處理，再放回 5%  $\text{CO}_2$  之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。1 小時後，將含有 DCFDA 的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  合併不同劑量的萃取物 HLP (0、0.5、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )處理，再放回 5%  $\text{CO}_2$  之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，加入適量的 trypsin，於恆溫箱中反應 10 分鐘，使細胞脫落，隨後加入 5~10 ml 的 medium 以終止 trypsin 的反應並沖刷細胞，再將其吸到 15 ml 離心管中，接著以 1000 rpm 離心 5 分鐘後將上清液去除，再以 PBS 清洗細胞後上機測定 DCF 螢光表現，即代表細胞內 ROS 的含量。

#### 4.6. 細胞週期分析(Cell cycle analysis)

將細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 中種入細胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium 以進行飢餓處理，並放置 5%  $\text{CO}_2$  之 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，將舊的 medium 移除，以 phosphate buffer saline (PBS)清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  合併不同劑量的

萃取物 HLP (0、0.5、1  $\mu\text{g/ml}$ )處理，再放回 5%  $\text{CO}_2$  之  $37^\circ\text{C}$  無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，加入適量的 trypsin，於恆溫箱中反應 10 分鐘，使細胞脫落，隨後加入 5~10 ml 的 medium 以終止 trypsin 的反應並沖刷細胞，再將其吸到 15 ml 離心管中，接著以 1000 rpm 離心 5 分鐘後將上清液去除，再以 PBS buffer 清洗細胞並將細胞沖散後以 1000 rpm 再離心 5 分鐘並去除上清液。隨後利用離心管內所殘餘的上清液將細胞打散，並加入 1 ml 70% 的酒精(可避免細胞發生凝集現象)並輕輕的將其混合均勻，使細胞固定，再將處理完的細胞液放置  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中反應 overnight (12 小時)。固定完成後，將細胞液以 100 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液，再以殘留在管內的液體將細胞打散。隨後加入 1 ml 的 PBS buffer 並均勻混合後離心，再去除上清液，重複數次，以清洗細胞。最後再加入 1 ml 的 PI/Triton X-100 溶液 (終濃度 PI= 20  $\mu\text{g/ml}$ ，Triton-X 100=0.1%，RNase A=0.2  $\text{mg/ml}$ )，並將細胞均勻打散，且應避光染色至少 30 分鐘後，再以流式細胞儀分析其細胞週期的變化。

#### **4.7. 細胞凋亡分析試驗(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI stain)**

將細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 中種入細胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium 以進行飢餓處理，並放置 5%  $\text{CO}_2$  之  $37^\circ\text{C}$  無菌恆溫培養箱中生長。24 小

時後，將舊的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  合併不同劑量的萃取出 HLP (0、0.5、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )處理，再放回 5%  $\text{CO}_2$  之 37 $^\circ\text{C}$  無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，以 PBS 清洗細胞 1~3 次，並加入 3ml 的 4% para-formaldehyde，於室溫下固定 30 分鐘。固定完成後，再以 PBS 清洗細胞 1~3 次，並加入 3 ml 的 DAPI (以 PBS 將濃度為 10 mg/ml 的原始試劑稀釋為濃度 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  後才可使用)染色 30 分鐘。最後，再以 PBS 清洗細胞 3 次，於 340/380 nm 下的螢光顯微鏡中觀察結果。

#### **4.8. 細胞自噬分析實驗(Autophagic analysis)**

##### **4.8.1. 酸性小囊定量分析試驗(Acidic vesicular organelles, AVO**

##### **stain)**

將細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 中種入細胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium 以進行飢餓處理，並放置 5%  $\text{CO}_2$  之 37 $^\circ\text{C}$  無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，將舊的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  合併不同劑量的萃取出 HLP (0、0.5、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )處理，再放回 5%  $\text{CO}_2$  之 37 $^\circ\text{C}$  無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，將上清液去除，並以 PBS 清洗細胞 2 次後，再加



入 1 ml 的 AVO 染劑(於 999  $\mu$ l 的 medium 中加入 1  $\mu$ l 的 AVO 原始試劑)作用 15 秒後，將 AVO 染劑去除，並以 PBS 清洗細胞，最後再加入 1 ml 的 PBS 於 well 後，於螢光顯微鏡下觀察結果。

#### **4.8.2. 細胞自噬蛋白分析試驗(Flow cytometry analysis of LC3)**

將細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 中種入細胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium 以進行飢餓處理，並放置 5%  $\text{CO}_2$  之  $37^\circ\text{C}$  無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，將舊的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  合併不同劑量的萃取物 HLP (0、0.5、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )處理，再放回 5%  $\text{CO}_2$  之  $37^\circ\text{C}$  無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，將上清液去除，並以 PBS 清洗細胞 2 次後，加入 LC3 一抗室溫反應半小時後把多餘抗體離下，並以含有 1% BSA 的 PBS 清洗後再加入接著 FITC 的二抗，避光反應半小時，之後把多餘抗體離下並以含有 1% BSA 的 PBS 1 ml 回溶，接著以流式細胞儀分析結果。

### **4.9. 西方點墨法(Western blotting)**

#### **4.9.1. 萃取蛋白及蛋白定量**

將細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 中種入細

胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium 以進行飢餓處理，並放置 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，將舊的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併不同劑量的萃取物 HLP (0、0.5、1 μg/ml) 處理，再放回 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，去除舊的 medium 並加入適量的 trypsin，於恆溫箱中反應 10 分鐘，使細胞脫落，隨後加入 5~10ml 的 medium 以終止 trypsin 的反應並沖刷細胞，後將細胞溶液收取 15ml 離心管中，再以 1000 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液後，加入 1 ml 的 PBS 將細胞打散，再以 1000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，重複兩次。加入 RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholic acid、0.1% SDS、50 mM Tris-base, pH 7.5)，再加入蛋白酶抑制劑(1 mM sodium orthovanadate、1 mM PMSF、170 μg/ml leupeptin)。以均質機破壞細胞後，於 4°C、12000 rpm 下離心 10 分鐘，離心後保留上清液的部分。藉由 BCA protein assay kit (內有試劑 A 與試劑 B，分別以 50:1 的比例配置) 與蛋白在 37°C 下反應 30 分鐘後，以 562 nm 測其 OD 值，並換算出蛋白濃度。

#### **4.9.2. Western blotting**

將所需的蛋白濃度調整一致，並以二次水補至相同體積後再加入

loading dye，將 sample 放到乾熱器上，以 100°C 加熱 10 分中使其變性。將經過處理的 sample loading 至已配置完成的聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 進行電泳 (附表 1、2)，以 70V 的電泳約三小時，使其依分子量不同而分開。接著以 100V、100 分鐘使蛋白從凝膠上轉印到硝化纖維膜。將已轉印完成的硝化纖維膜以麗春紅進行紅染，裁剪出所要觀察的蛋白分子量之部分，再以 TBS 將紅染清洗乾淨，接著浸泡在 5% 的脫脂牛奶中一個小時，去除非特异性鍵結，再以 TBS + tween 清洗三次，每次十分鐘。加入一抗於 4°C 下反應 overnight 後，以 TBS + tween 清洗三次，每次十分鐘，接著再加入所對應的二抗於 4°C 下反應一個小時，最後再以 TBS + tween 清洗三次，每次 10 分鐘。最後將 ECL 加至處理好的硝化纖維膜上並以冷光儀拍攝，並以分析軟體透過亮度的不同來定量蛋白質表現量。

#### 附表 1：separating gel 配方

---

10 % separating gel (15 mL，兩片量)	
ddH <sub>2</sub> O	5.9 mL
30% Acrylamide mix	5.0 mL
1.5 M Tris-base (pH8.8)	3.8 mL
10% SDS	0.15 mL
10% APS	0.15 mL
TEMED	0.006 mL

---

**附表 2：stacking gel 配方**

---

Stacking gel (4 mL，兩片量)

---

ddH <sub>2</sub> O	2.7 mL
30% Acrylamide mix	0.67 mL
1.0 M Tris-base (pH6.8)	0.5 mL
10% SDS	0.04 mL
10% APS	0.04 mL
TEMED	0.004 mL

---

## 第五章、結果與討論

### 5.1. 洛神葉多酚(HLP)萃取物成份分析

利用 Folin-Ciocalteu 方法測定 HLP 萃取物約莫得到 35.36% 總多酚含量(Table 1)，接著利用 Jia 方法分析 HLP 萃取物之總黃酮含量，結果顯示 HLP 中大約含 65.16% 的總黃酮。而總花青素含量測定則是利用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，利用分光光度計分析 HLP 再計算其吸光值差額，帶入公式中換算出萃取出 HLP 總花青素含量大約有 1.33%。上述分析顯示證實 HLP 的確為一富含類黃酮之萃取物質。

### 5.2 探討 HLP 對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞之毒性及存活率之影響

首先以不同濃度的 HLP 處理胰島 β 細胞來測試其對 β 細胞之毒性，並透過顯微鏡及細胞計數實驗來進行分析。透過細胞計數試驗分析細胞數量發現，相較於對照組，加入 HLP (50、100 μg/mL) 的組別其細胞之存活率明顯下降(Fig. 1A)。然後再以 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與各種劑量的 HLP 合併處理胰島 β 細胞反應 24 小時，結果透過觀察細胞型態發現，加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的組別細胞皆明顯皺縮及有破碎的現象。接著透過細胞計數試驗則發現，相較於對照組，經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理的誘導組其細胞數量減少約 50%，顯示處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 對細胞造成氧化傷害導致細胞存活

率明顯下降。然而以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併處理低或高劑量 HLP (0.5 和 1 µg/ml) 的組別細胞型態較為完整且數量明顯比誘導組多，約能提升 10~20% 的細胞存活率(Fig. 1B)。透過上述結果可發現 HLP 具有保護 β 細胞免於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所造成的氧化傷害，以維持細胞之存活率。

### 5.3 探討 HLP 對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞之胰島素分泌及氧化傷害之影響

實驗以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併 HLP (0.5 和 1 µg/ml) 反應 24 小時後，接著透過低和高劑量的葡萄糖(2.8 mM 和 16.7 mM)分別處理胰島 β 細胞，分析其在低糖與高糖環境中胰島素分泌量的變化。在單純處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的誘導組細胞無論在低糖或高糖環境下其胰島素分泌量皆下降超過 30%，顯示處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 會讓細胞承受巨大的氧化壓力而造成細胞分泌胰島素的活性降低。而在高糖環境中，細胞胰島素分泌量反而比低糖環境還要更低，可能是因為高糖對細胞造成更大的損傷所致。再合併處理高低劑量的 HLP 時，不論在高糖或低糖的環境中，胰島素分泌量皆有上升的趨勢，顯示其具有恢復細胞胰島素分泌活性的效果(Fig. 2A)。

接著近一步透過 H<sub>2</sub>DCF-DA 螢光染劑對細胞中活性氧物質 ROS 進行染色並以流式細胞儀來分析細胞中 ROS 之含量變化。實驗結果發現單純處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的誘導組細胞活性氧物質明顯增加，代表細胞中氧

化壓力的上升，而合併處理 HLP 之後則可以降低細胞中 ROS 的含量表現，進而緩解氧化壓力(Fig. 2B)。

#### 5.4 探討 HLP 對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞誘導細胞凋亡機制之影響

進一步，探討 HLP 對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞誘導細胞凋亡之影響，以螢光染劑 PI 針對細胞 DNA 進行染色後並以流式細胞儀分析其細胞週期的變化。在處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的誘導組細胞 subG1 期比例上升了 4 倍，顯示細胞凋亡的表現量明顯增加。但在合併處理低或高劑量的 HLP 發現其 subG1 比例明顯下降約 25%，顯示 HLP 可能藉由抑制細胞凋亡現象來達到保護細胞的目的(Fig. 3A)。

接著以 DAPI 螢光染劑來對細胞 DNA 進行染色，並可透過螢光顯微鏡進行確認分析。直接以相位差觀察細胞可發現，在處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的組別與對照組相比其細胞型態皺縮且數量明顯下降，與細胞計數試驗之結果相符，再來透過紫外光激發後觀察則可以發現 DAPI 螢光染劑濃染的細胞比例相較對照組明顯上升，而合併處理低或高劑量 HLP 與誘導組相比其濃染比例顯著下降，再度確認 HLP 具有抑制細胞凋亡的作用(Fig. 3B)。

最後透過西方點墨法分析細胞蛋白表現以探討細胞凋亡相關之分子機制。處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的組別與對照組相比其細胞中 pro-Caspase 3 表現量增加約 20%，而被切割過後的 active caspase 3 表現量也增加約

20%，PARP-1 則略為增加；而合併處理高或低劑量之 HLP 與誘導組相比其三者表現量皆有下降的趨勢，且具濃度依賴性(Fig. 3C)。接著分析抑制凋亡蛋白 Bcl-2 及促凋亡蛋白 Bax、p-Bad 和 Bad 的表現發現，Bcl-2 蛋白表現方面在誘導組有下降趨勢，但在合併處理 HLP 之高劑量上升約 20%。而在促凋亡蛋白 Bax 在誘導組表現增加；反之，在合併處理 HLP 的部分皆下降了 20%。最後 p-Bad 與 Bad 比值的部分在誘導組明顯下降很多，而在合併處理 HLP 的部分在低劑量大幅提升了兩倍(Fig. 3D)。此分析細胞凋亡相關調控蛋白表現之結果顯示，處理 HLP 能透過有效調控細胞凋亡蛋白表現，達到抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導 β 細胞凋亡之作用。

### 5.5 探討 HLP 對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞誘導細胞自噬機制之影響

後續分析 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 對於胰島 β 細胞自噬機制之調控，以及處理 HLP 所導致的影響，實驗以 acridine orange 處理各組別的細胞，使細胞中之酸性小囊具有螢光表現，並以螢光顯微鏡來觀察細胞自噬表現的變化。量化結果發現處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的誘導組與對照組相比酸性小囊數量顯著增加，顯示氧化壓力的上升會誘導細胞內生性細胞自噬的作用，用以保護細胞免於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 帶來的氧化傷害。而在合併處理低或高劑量 HLP 之後酸性小囊數量與誘導組相比則有上升的趨勢，顯示 HLP 可能透過加強細胞自噬作用來達到對細胞的保護效果(Fig. 4A)。



接著進一步透過 LC3 抗體偵測細胞中 LC3 蛋白表現並以流式細胞儀進行分析細胞中 LC3 之含量變化。實驗結果發現單純處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的誘導組之細胞 LC3 表現量明顯增加，代表細胞中細胞自噬表現上升；而合併處理 HLP 之後則可促使 LC3 表現量與誘導組相比有增加之趨勢(Fig. 4B)，此實驗再次驗證酸性小囊試驗的結果。

接著分析細胞中細胞自噬蛋白 LC3、ATG5/12、細胞自噬初期起始作用之調控蛋白 Beclin-1 以及細胞自噬上游調控蛋白 class I PI3K、p-Akt/Akt、mTOR。首先，分析 LC3-II 與 LC3-I 之比值顯示處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後與對照組相比其增加約 25%，顯示誘導組細胞自噬表現確有上升。合併處理 LSE 後之比值呈現濃度依賴性表現，在低劑量組別些微上升；而高劑量則顯著增加約 30%。接著分析 Beclin-1 可發現其誘導組表現量也有上升趨勢，而在合併處理之後也和 LC3 趨勢相吻合。ATG5/12 則是誘導組些微上升，處理 HLP 之後其表現相對增加。然而在上游調控的部分，class I PI3K 表現在誘導組與對照組相比幾乎相同，然而在處理 HLP 之後大幅下降了 50%。而 p-Akt/Akt 的比值則是在誘導組呈現下降約 30%，而 HLP 組別一樣維持在這個水平。接著分析 class I PI3K/Akt 下游調控蛋白 mTOR，其在誘導組表現量下降 10%，在 HLP 處理後更為下降 10% 以上，上述驗證 HLP 可藉由降低 class I PI3K /p-Akt/Akt/mTOR 訊息路徑的表現，進而抑制

此路徑阻斷細胞自噬的能力。總結，HLP 可能透過調控細胞凋亡以及自噬機制，有效的保護胰島細胞免於氧化壓力所造成的傷害，具有具有改善 T2D 之潛力，然而此保護性細胞自噬之分子機制仍有待進一步釐清。

## 第六章、參考文獻

1. Ministry of Health and Welfare, Taiwan, Republic of China. Statistics of Causes of Death 2013. ([www.mohw.gov.tw](http://www.mohw.gov.tw)) 2014.
2. Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2003; 14: 398-403.
3. Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress, and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014; 7: 25-34.
4. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115:1111–1119.
5. Jung KY, Kim KM, Lim S. Therapeutic Approaches for Preserving or Restoring Pancreatic  $\beta$ -Cell Function and Mass. *Diabetes Metab J.* 2014; 38: 426-36.
6. Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, Collins S, Andersen ME. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 244: 77-83.
7. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999; 48: 927-32.
8. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 300: 216-22.
9. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev.* 2004; 25: 612-628.
10. Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia.* 1999; 42: 849-55.
11. Roy S, Mondru AK, Dontamalla SK, Vaddepalli RP, Sannigrahi S, Veerareddy PR. Methoxy VO-salen stimulates pancreatic  $\beta$  cell survival by upregulation of eNOS and downregulation of apoptosis in STZ-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 144: 1095-111.
12. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 381–389.
13. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 2002; 277:

34287–34294.

14. de Vries EG, Gietema JA, de Jong S. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 2390-3.
15. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 741–752.
16. Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Tsuboi K, Osonoi S, Yoshida T, Yagihashi S. Involvement of oxidative stress-induced DNA damage, endoplasmic reticulum stress, and autophagy deficits in the decline of  $\beta$ -cell mass in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2014; 37: 1966-74.
17. Bachar-Wikstrom E, Wikstrom JD, Kaiser N, Cerasi E, Leibowitz G. Improvement of ER stress-induced diabetes by stimulating autophagy. *Autophagy.* 2013; 9: 626-8.
18. Cheong H, Lu C, Lindsten T, Thompson CB. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol.* 2012; 30: 671-8.
19. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. Hibiscus sabdariffa L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.* 2014; 165: 424-43.
20. Peng CH, Yang YS, Chan KC, Wang CJ, Chen ML, Huang CN. Hibiscus sabdariffa polyphenols alleviate insulin resistance and renal epithelial to mesenchymal transition: a novel action mechanism mediated by type 4 dipeptidyl peptidase. *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 9736-43.
21. Peng CH, Chyau CC, Chan KC, Chan TH, Wang CJ, Huang CN. Hibiscus sabdariffa polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 9901-9.
22. Chia-Liang Lin. The study of inhibitory effect of Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extracts on human prostate cancer cell growth. 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系碩士論文. 2013.
23. Chen JH, Wang CJ, Sheu JY, Lin HH. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of LXR $\alpha$ /ABCA1 pathway. *Food Chem.* 2013; 141: 397-406.

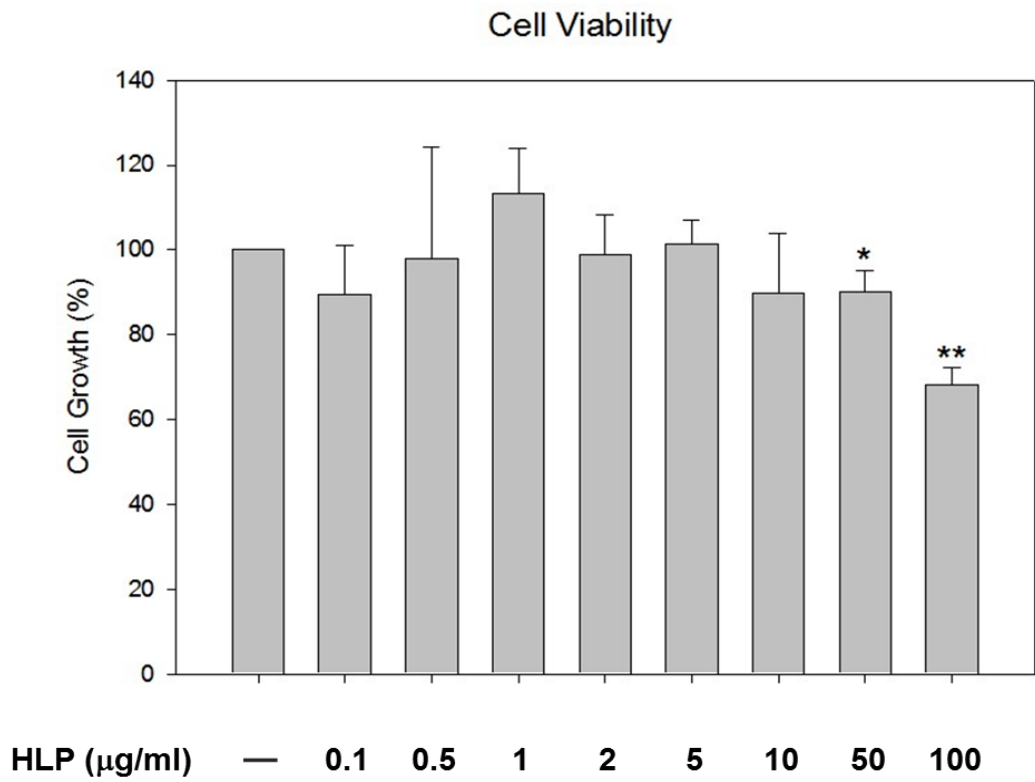
## 第七章、圖表

Table 1

**Table 1 – Composition of the HLP**

	<b>HLP (%)</b>
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)	<b>35.36 ± 1.09</b>
Total flavonoid (Jia method)	<b>65.16 ± 9.37</b>
Total anthocyanin (Fuleki and Francis method)	<b>1.33 ± 1.13</b>

**Figure 1**  
**(A)**



**(B)**

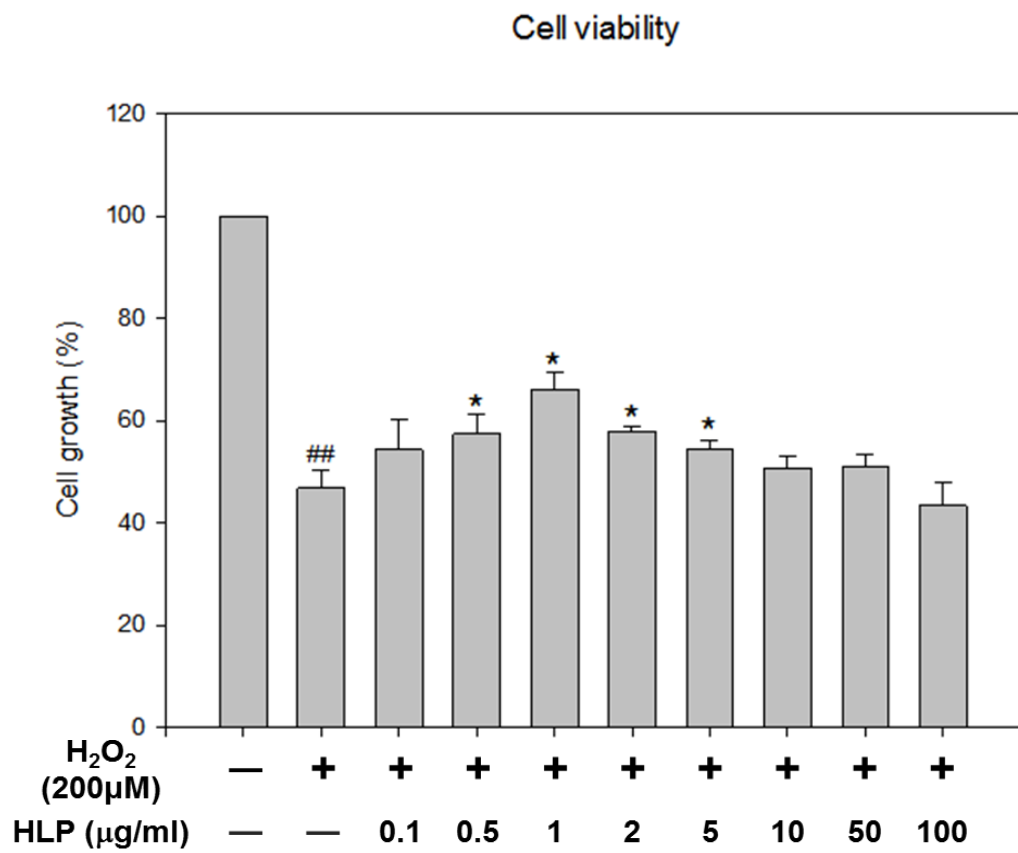
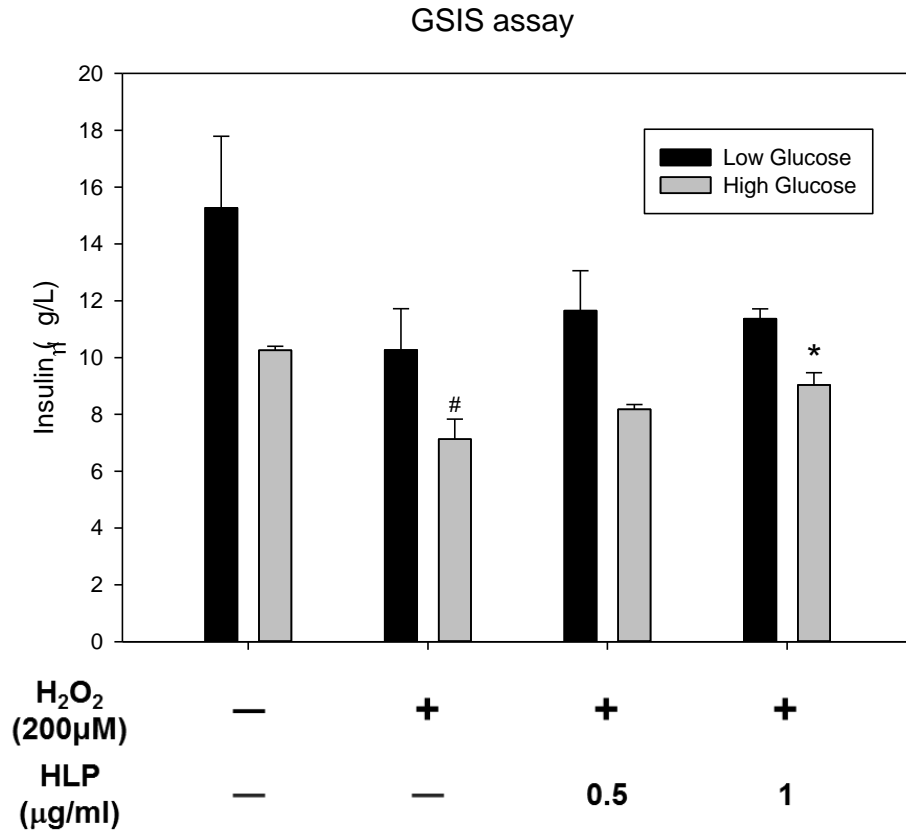


Fig. 1. Effect of HLP in combination with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on  $\beta$ -cell viability.  $\beta$ -cells were treated with or without various concentrations of HLP (0.1-100  $\mu$ g/mL) (A) in the presence or absence of 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) for 24 h. Cell viability was analyzed by cell counting assay. The results represent the mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

**Figure 2**  
**(A)**



**(B)**

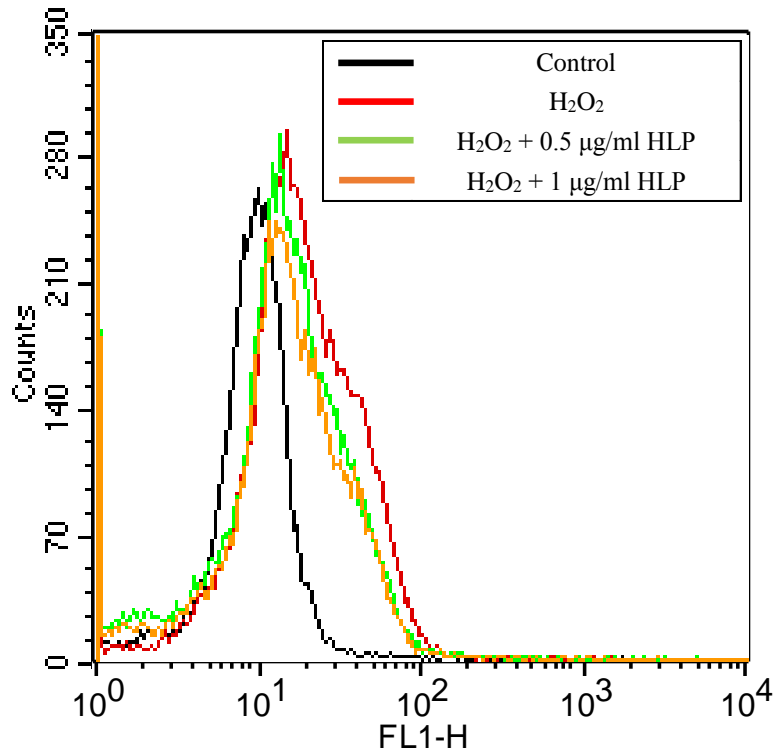
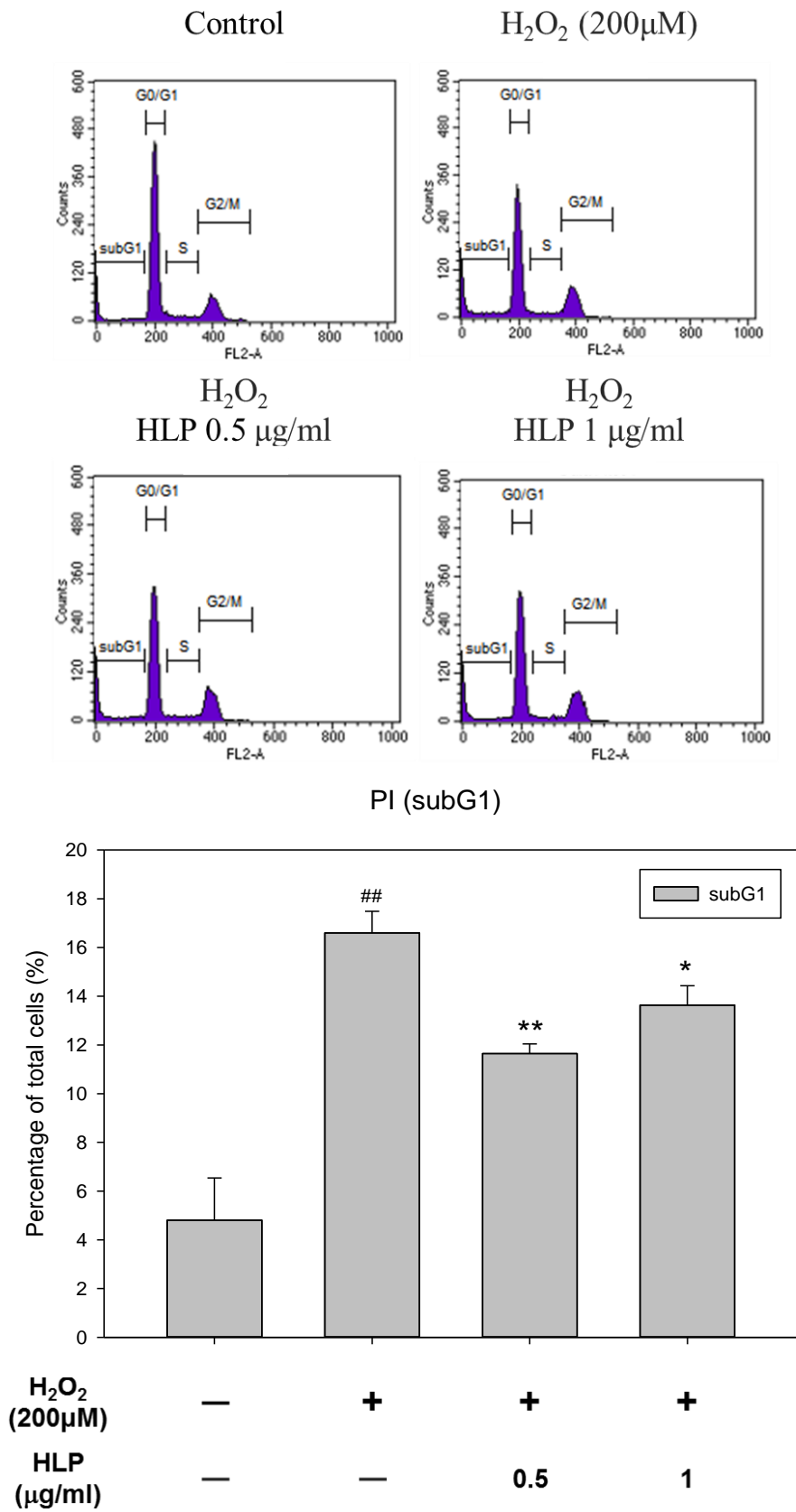


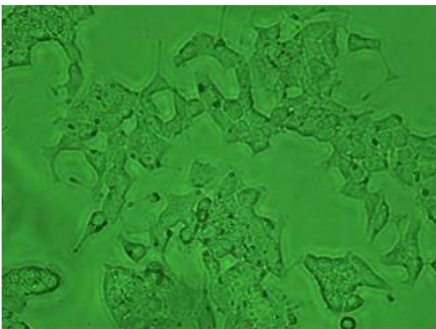
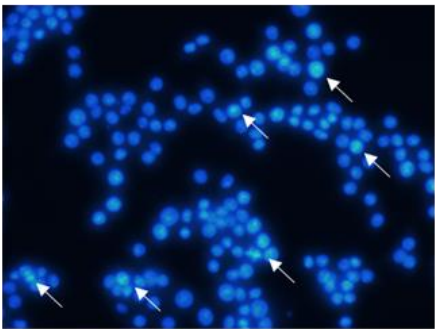
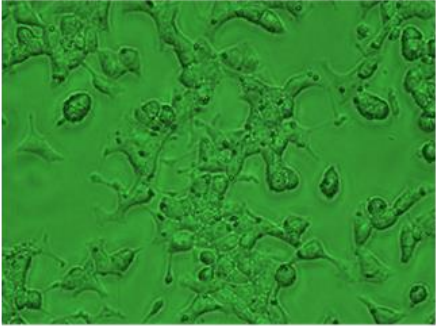
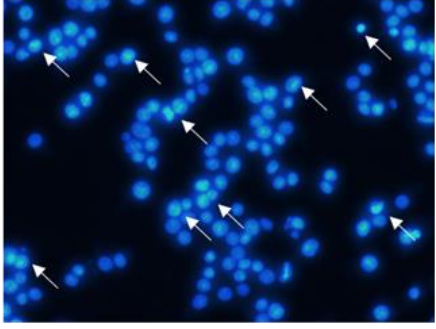
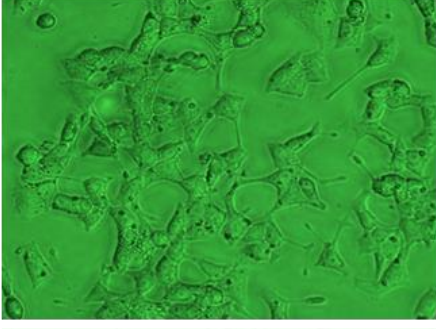
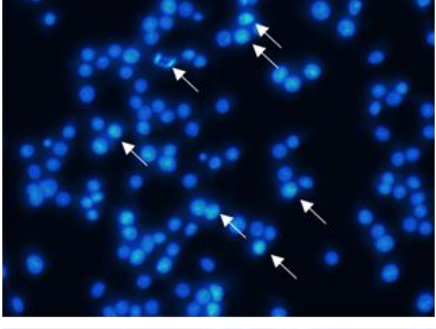
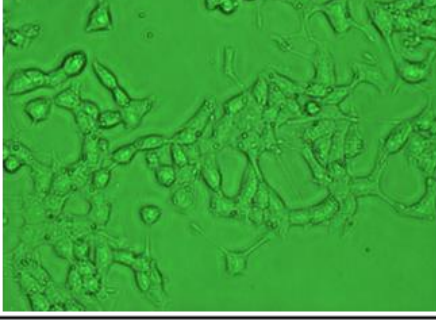
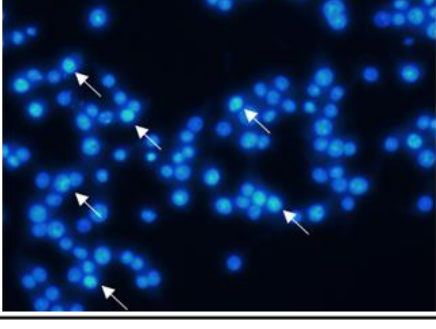


Fig. 2. Effect of HLP on insulin secretion and oxidative injury in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated pancreatic  $\beta$  cells.  $\beta$ -cells were treated with 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the presence or absence of indicated concentrations of HLP (0.5 and 1  $\mu$ g/ml). After the incubation, the insulin secretion (A) and the intracellular ROS level (B) were measured by the GSIS and the H<sub>2</sub>DCF-DA assay, respectively. The results represent the mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. #p < 0.05, compared with control. \*p < 0.05, compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group.

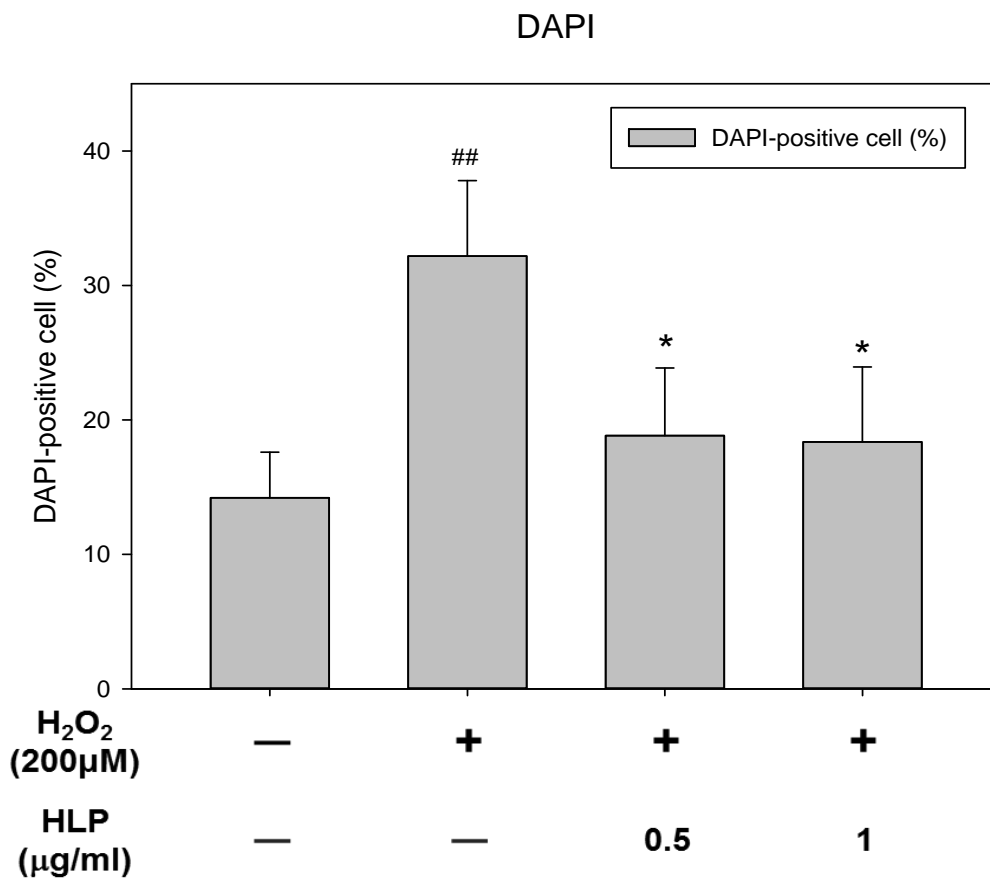
**Figure 3**  
**(A)**



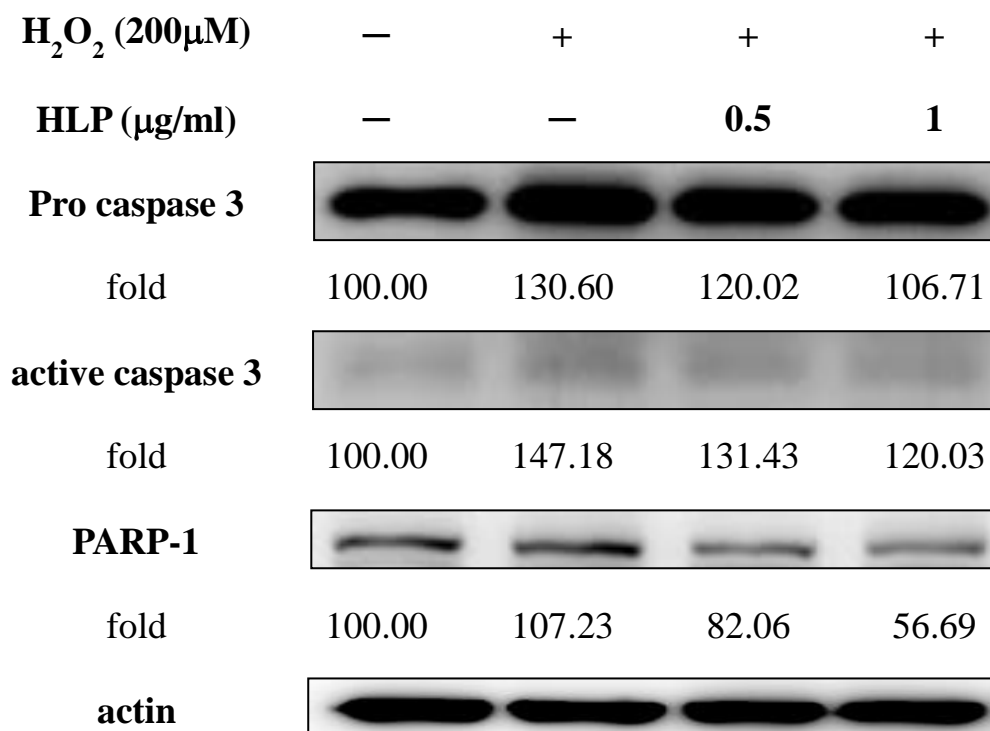
(B)

	Phase	DAPI
Control		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (200μM)		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HLP 0.5 μg/ml		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HLP 1 μg/ml		

(B)



(C)



(D)

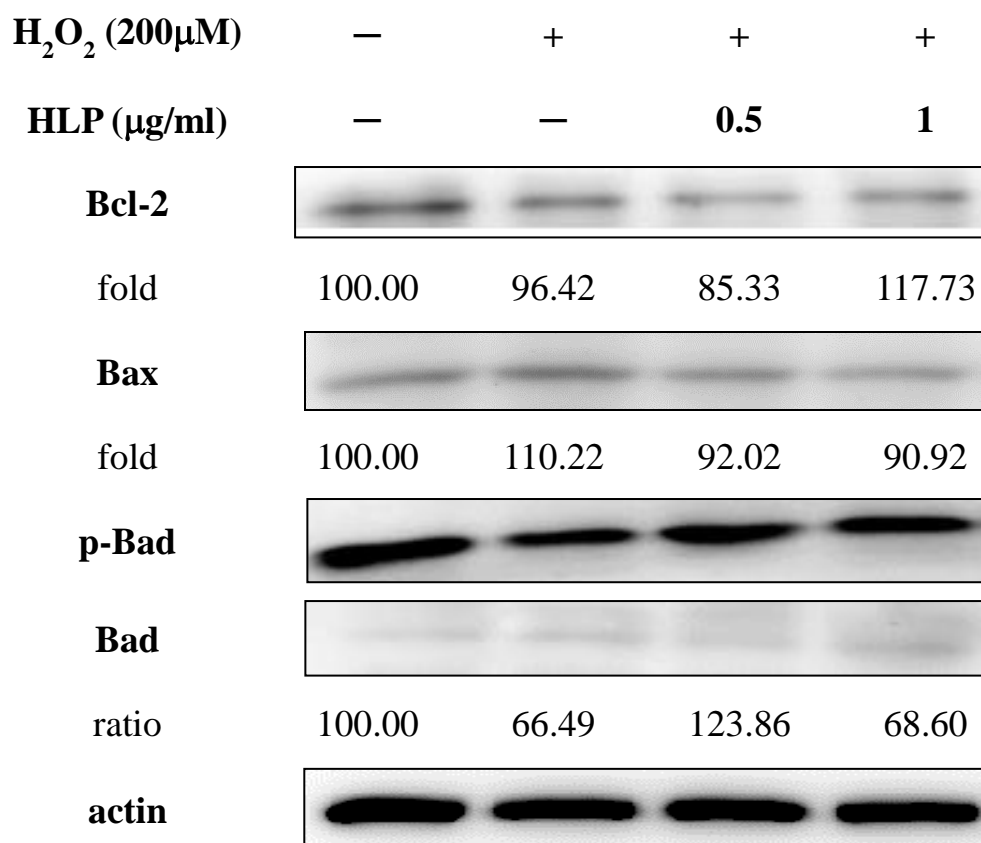
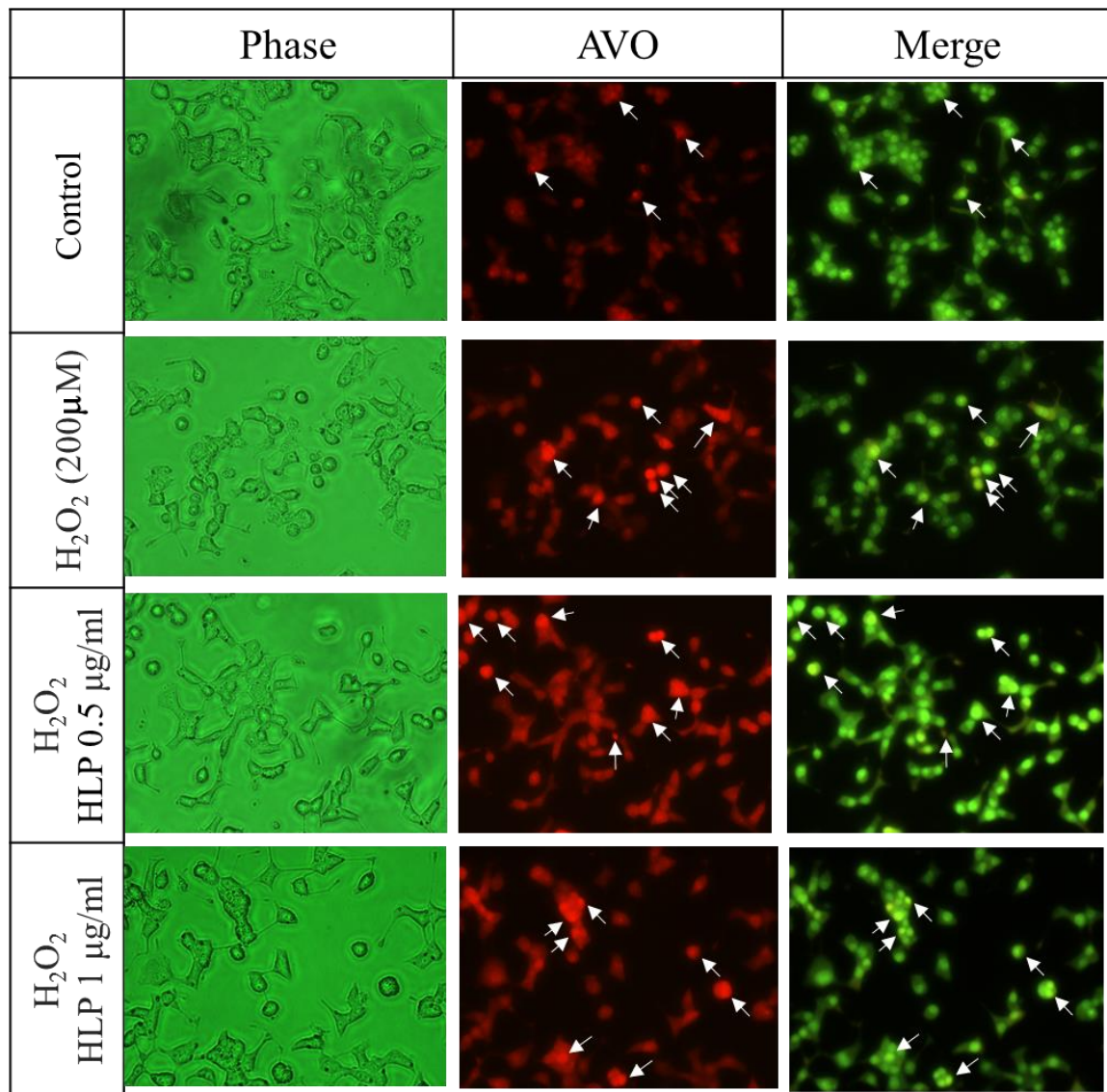


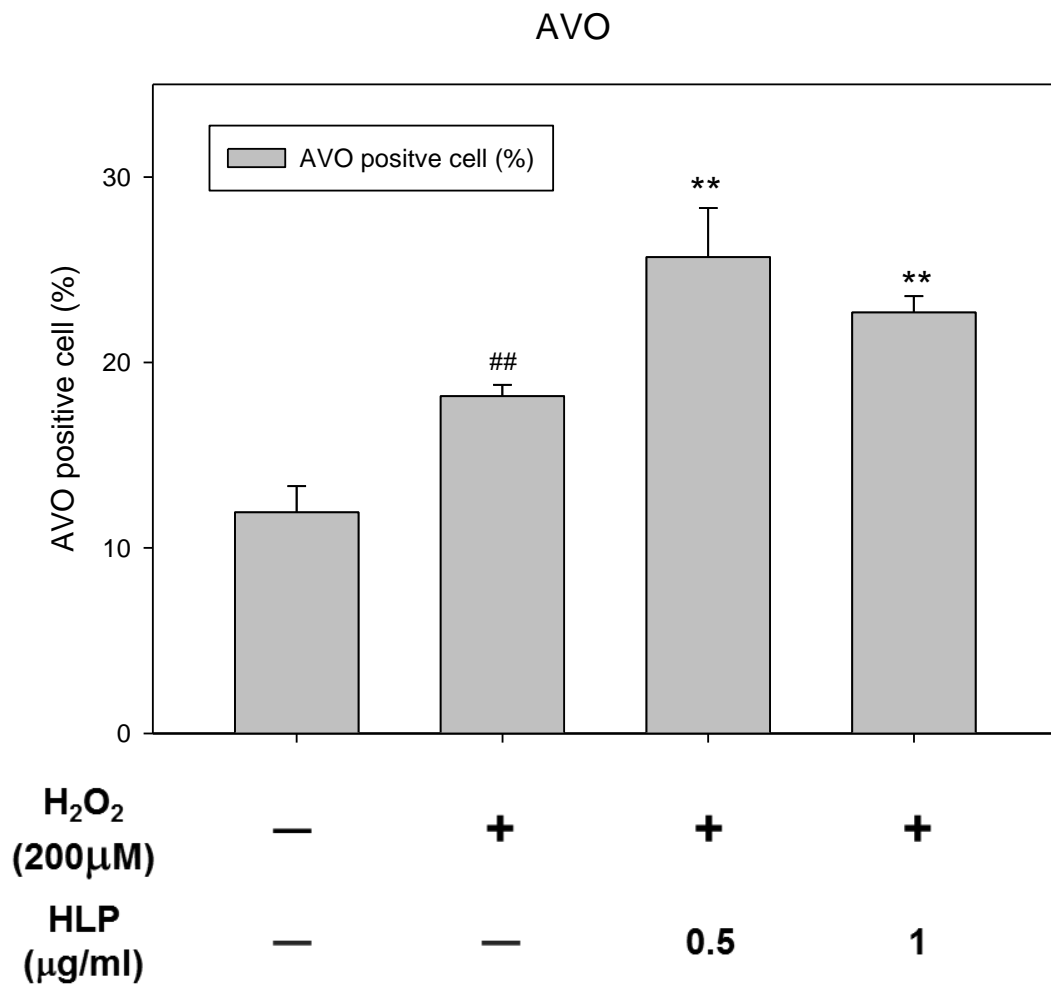
Fig. 3. Effect of HLP on apoptosis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated pancreatic β cells. β-cells were treated with 200 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the presence or absence of indicated concentrations of HLP (0.5 and 1 μg/ml). (A) cell cycle distribution of β-cells was measured by propidium iodide flow cytometry. The position of the subG1 peak (hypodiploidy), integrated by apoptotic cells, and the other peaks in the illustration correspond to the G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle. Histogram showing the percentages of cells in the subG1 phase of the cell cycle indicated the apoptotic cells. (B) The cells were assayed with the stained of DAPI. Arrows indicate apoptotic cells. The panel shows the stained nuclei with DAPI solution were then photographed with a phase contrast microscope and fluorescent microscope using a blue filter (from left to right). The proportion of the apoptotic cells were calculated as the percentage of apoptotic cells relative to the total number in each random field (>100 cells) and represent as mean ± SD (n=3) from three independent experiment. ## p < 0.01, compared with the control. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group. Western blot analysis of (C)

caspase 3 (pro-form and active-form), PARP-1, (D) Bcl-2, Bax, p-Bad, and Bad was carried out with the whole cell lysate. The protein levels (fold) below the blots represent the relative density of the bands normalized to  $\beta$ -actin. The protein levels (ratio) below the blots represent the relative density of the bands from the p-Bad/Bad. Results are presented three independent experiments.

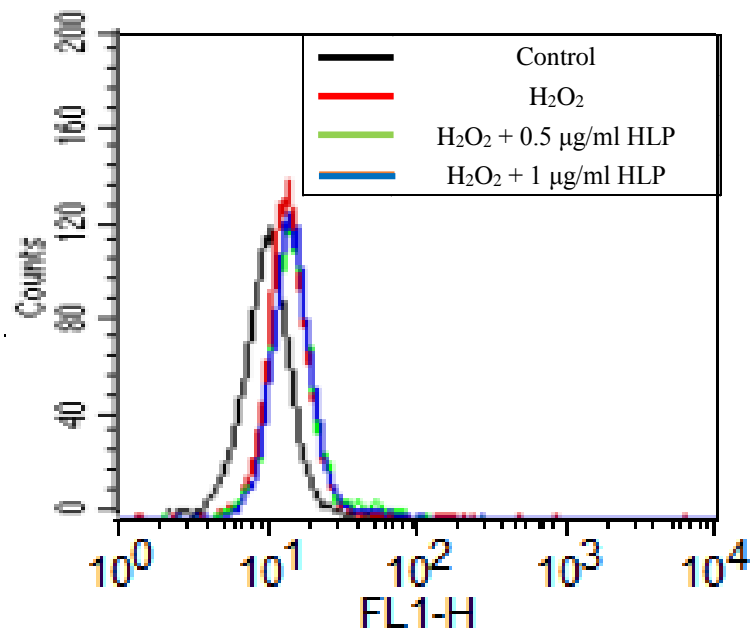
**Figure 4**  
**(A)**



(A)

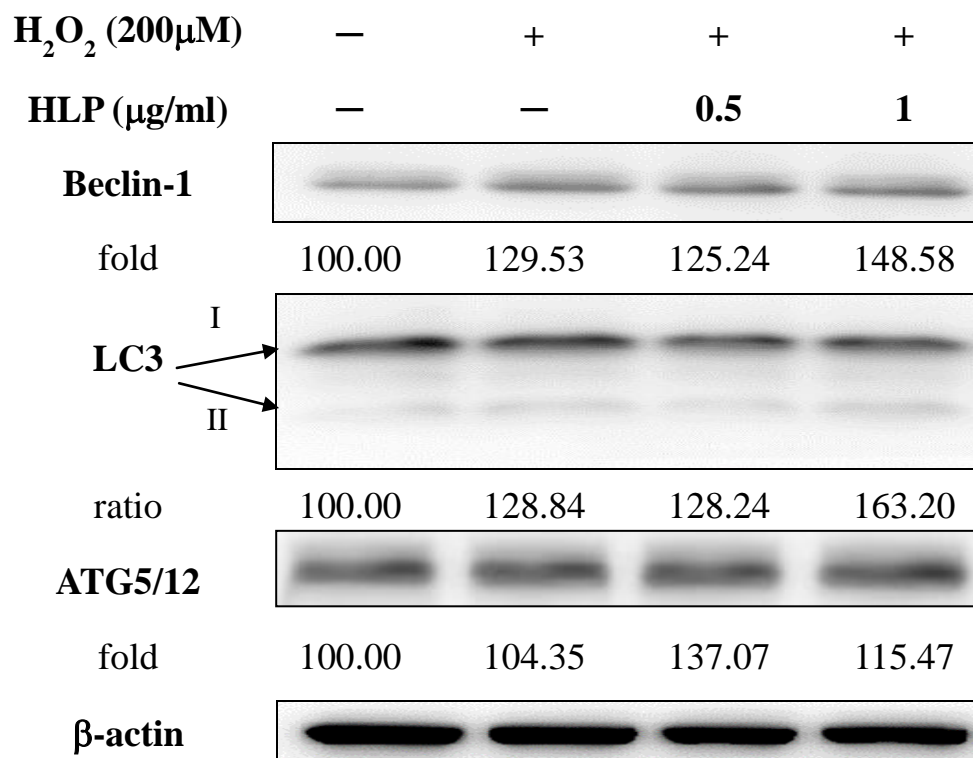


(B)





(C)



(D)

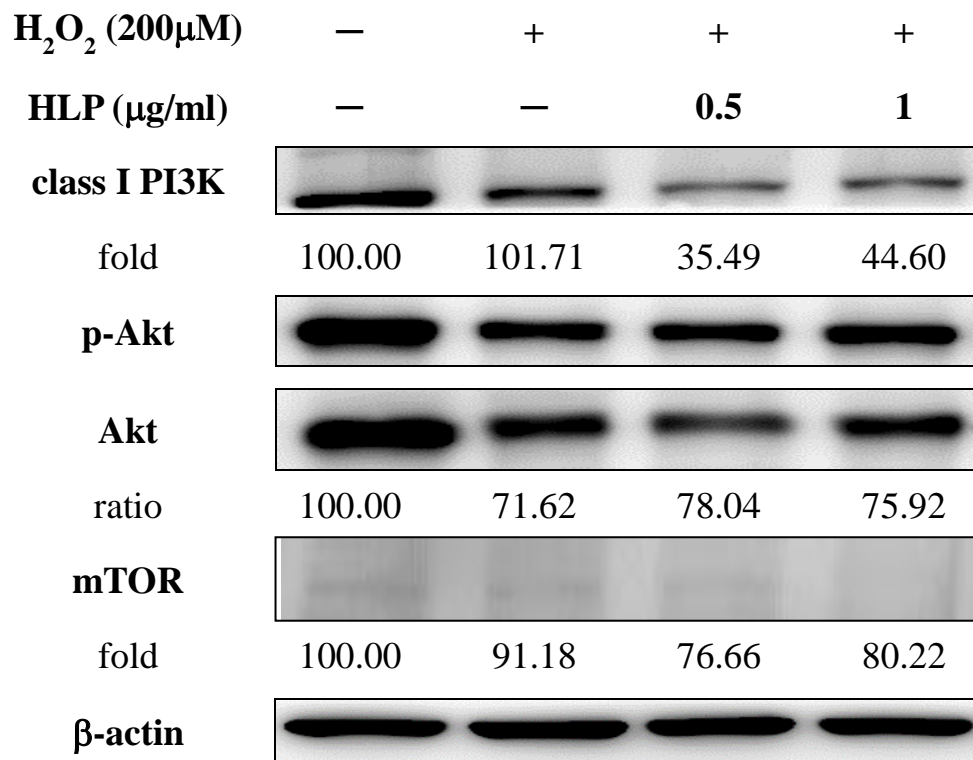


Fig. 4. Effect of HLP on autophagy of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated pancreatic  $\beta$  cells.  $\beta$ -cells were treated with 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the presence or absence of indicated concentrations of HLP (0.5 and 1  $\mu$ g/ml). (A) Autophagic cells were assayed by acridine orange staining. Arrows indicated the autophagic cells. The panel shows phase contrast microscopy (left), acridine orange staining (middle), and merge image (right). Autophagic values were calculated as the percentage of acridine orange against total cells. The quantitative data are represented as mean  $\pm$  SD (n=3) from three independent experiment. ##p < 0.01, compared with the control. \*\*p < 0.01 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group. (B)  $\beta$ -cells were loaded with LC3 primary antibodies then conjugated with secondary antibodies labeled with FITC. After that washed and analyzed by flow cytometry. Results are presented as histogram overlay. Western blot analysis of (C) LC3, Beclin-1, ATG5/12, (D) class I PI3K, p-Akt, Akt, and mTOR was carried out with the whole cell lysate. The protein levels (fold) below the blots represent the relative density of the bands normalized to  $\beta$ -actin. The protein levels (ratio) below the blots represent the relative density of the bands from the LC3-II/LC3-I. Results are presented three independent experiments.

**Figure 5**

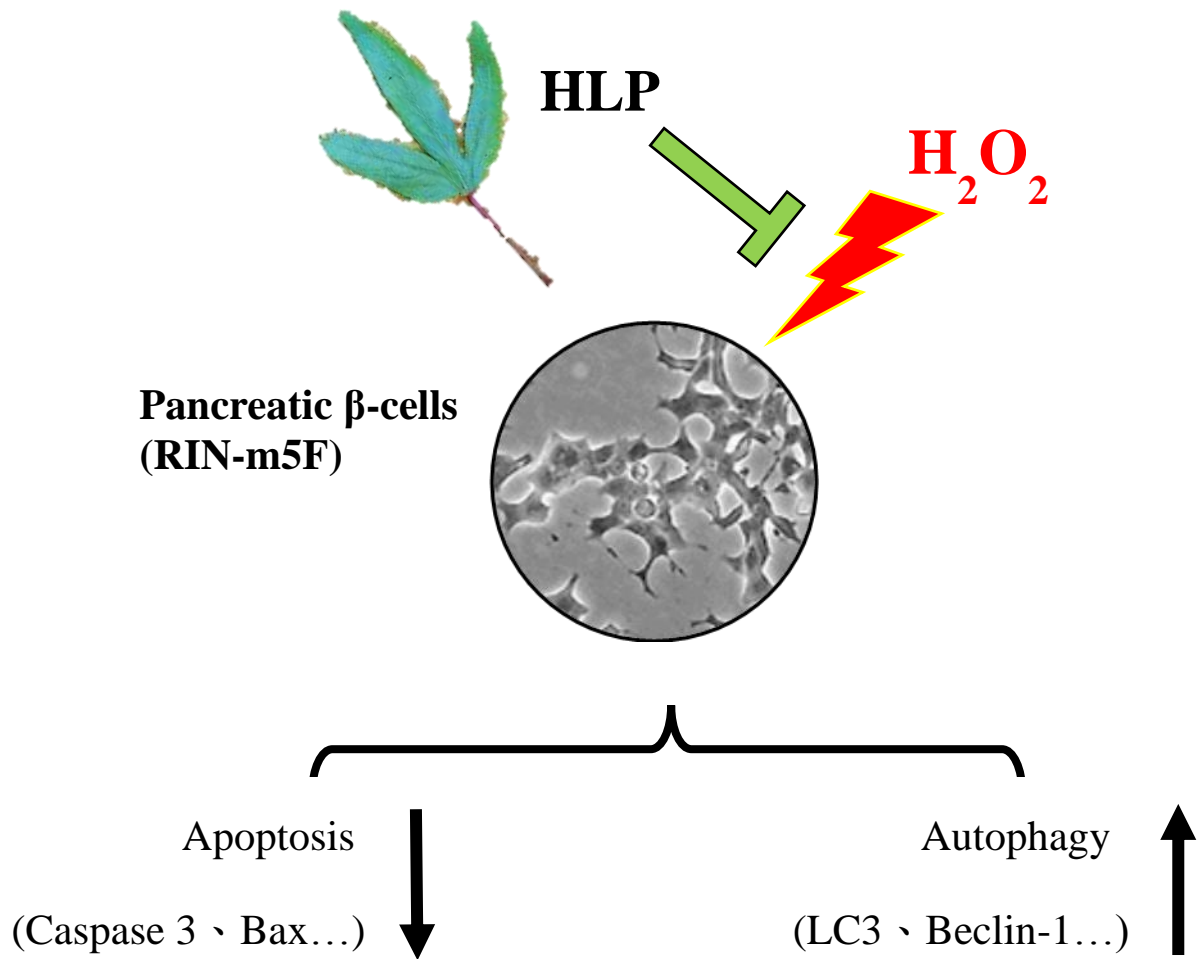


Fig. 5. A proposed model for the protective effect of HLP on  $H_2O_2$ -induced oxidative injury in rat pancreatic  $\beta$  cells (RIN-m5F) via downregulation of apoptosis and upregulation of autophagy.