

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : 紅甘蔗汁抗發炎及保肝活性之研究  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 洪瑜涵  
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-005-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： 曾翠華

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學應用化學系(含碩士班)

中華民國 105年03月30日

# 目次

目次.....	I
圖表次.....	II
縮寫表.....	III
中文摘要.....	IV
壹、緒論.....	1
第一節、實驗背景介紹.....	1
第二節、細胞訊息傳遞途徑.....	7
第三節、藥物介紹.....	10
貳、實驗動機與架構.....	13
參、實驗材料.....	15
第一節、實驗藥品.....	15
第二節、抗體.....	17
第三節、常用儀器.....	17
肆、實驗方法.....	20
第一節、甘蔗汁萃取.....	20
第二節、天然物化學成分分析.....	20
第三節、HPLC 成分分析.....	22
第四節、細胞培養.....	23
第五節、細胞毒性測試.....	23
第六節、一氧化氮之測定.....	24
第七節、IL-6 含量之測定.....	24
第八節、TNF- $\alpha$ 含量之測定.....	25
第九節、動物實驗.....	26
第十節、西方墨點法.....	32
第十一節、統計分析.....	35
伍、實驗結果.....	36
陸、討論.....	42
柒、結論.....	44
捌、參考文獻.....	45
玖、圖表說明.....	51
壹拾、附圖.....	73

# 圖表次

Table 1. 原始紅甘蔗汁與紅甘蔗汁萃取物成份比較 .....	51
Figure 1. 紅甘蔗汁萃取物 HPLC 圖譜(i).....	52
Figure 2. 紅甘蔗汁萃取物 HPLC 圖譜(ii).....	53
Figure 3. 紅甘蔗汁萃取物清除自由基能力測定.....	54
Figure 4. 紅甘蔗汁萃取物螯合亞鐵離子能力測定.....	55
Figure 5. 紅甘蔗汁萃取物細胞毒性分析.....	56
Figure 6. 紅甘蔗汁萃取物抑制細胞釋放 NO 能力的測定.....	57
Figure 7. 紅甘蔗汁萃取物抑制細胞釋放 IL-6 能力的測定.....	58
Figure 8. 紅甘蔗汁萃取物抑制細胞釋放 TNF- $\alpha$ 能力的測定.....	59
Figure 9. 紅甘蔗汁萃取物抑制 iNOS 蛋白表現能力.....	60
Figure 10. 紅甘蔗汁萃取物抑制 COX-2, IL-6 及 TNF- $\alpha$ 能力的測定....	62
Figure 11. 紅甘蔗汁萃取物抑制 STAT 路徑相關蛋白能力的測定.....	64
Figure 12. 紅甘蔗汁萃取物抑制 MAPK 路徑相關蛋白能力的測定.....	66
Figure 13. 紅甘蔗汁萃取物抑制 NF- $\kappa$ B 路徑相關蛋白能力的測定.....	68
Figure 14. 動物實驗架構.....	70
Figure 15. 紅甘蔗汁萃取物抑制小鼠血清中 AST 及 ALT 的能力.....	71
Figure 16. 小鼠肝臟組織切片.....	72

## 縮寫表

DPPH : di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium

ROS : Reactive Oxygen Species

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

FBS : Fetal Bovine Serum

LPS : Lipopolysaccharide

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

PBS : Phosphate Buffered Saline

NO : Nitric oxide

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

IL : Interleukin

iNOS : Inducible nitric oxide synthases

COX-2 : Cyclooxygenase-2

NF- $\kappa$ B : Nuclear factor kappa B

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha

SJM : *Saccharum* juice methanol extracts

# 中文摘要

根據行政院衛生福利部統計，慢性肝臟疾病為國人十大死因之一。而慢性肝病是造成肝腫瘤及肝硬化的主要原因。慢性肝病起因於肝細胞連續發炎反應，並進一步導致脂質過氧化(lipid peroxidation)作用。過去研究指出，多酚化合物(polyphenols)具有有效的抗氧化能力。而紅甘蔗汁為國人常食用之天然果汁，且紅甘蔗中含有多種多酚類，但並未有專門研究其抗發炎之活性。故本研究為專門探討其抗發炎及保肝活性。

本實驗先對紅甘蔗汁萃取物進行萃取並與原始紅甘蔗汁進行比較，發現其多酚類及類黃酮含量相當於每 100 mL 中有 5.98 g Gallic acid 和 11.62 g Quercetin，並推測其有保健的功效；首先，本研究利用 HPLC 確立其中的成份，結果證實含有相當多的 glucoside 相關物質，並經由試管試驗證實其具有清除 DPPH 自由基及螯合亞鐵離子的特性。接著利用脂多醣(lipopolysaccharides, LPS)誘導小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 的發炎反應的影響，並分析相關發炎因子，如：

NO、IL-6、TNF- $\alpha$  之誘導；經本實驗的結果表明，紅甘蔗汁萃取物 (SJM) 針對小鼠巨噬細胞 RAW264.7 有明確的抑制發炎作用；此外，在蛋白質分析也看到了相同的結果，紅甘蔗汁萃取物(SJM)經由 MAPK 及 STATs 路徑為主，NF- $\kappa$ B 路徑為輔，抑制相關抗發炎的蛋

白，如：iNOS、COX-2、IL-6 及 TNF- $\alpha$ 。在動物實驗方面，以先施打 SJM 保護一周後再灌食四氯化碳誘導之小鼠的肝損傷發炎，經 7 週後由血清檢測方面發現紅甘蔗汁萃取物可確實的降低 AST 和 ALT 的數值；此外，由組織 H&E 染色切片上也可觀察到明顯的降低發炎的現象，在實驗組(CCl<sub>4</sub>+SJM 40 mg/kg)觀察到其雖然有發炎的現象，但同時也有細胞分裂的現象以減少四氯化碳所造成的組織壞死，這顯示紅甘蔗汁萃取物有促使肝臟組織進行修補機制，至於在活體動物上抑制相關蛋白之機制，本實驗期望後續會繼續進行探討。

關鍵字：小鼠巨噬細胞、脂多醣、發炎反應、保肝能力、NO、四氯化碳

# 壹、緒論

## 第一節、實驗背景介紹

### 1、發炎反應(Inflammatory response)

人體的免疫系統，依照功能可分為兩大部份：先天性免疫和後天性免疫。先天性免疫為對抗病原的第一道防線。它是經由非特異性作用，來達到防禦多種不同感染性病原的功能。這點和後天免疫的專一性免疫反應不同。當病原菌入侵人體，會引起非特異性的抵抗。這種防禦系統包含了兩道防線。第一道防線是人體的物理和化學屏障（例如皮膚、黏膜、胃酸、溶菌酵素）以及生物因子（如抗菌物質）等。第二道防線則包含了發炎細胞的吞噬作用(phagocytosis)以及發炎反應。產生發炎反應時身體會產生紅、腫、熱、痛的症狀。人體遭受細菌感染的時候會引起發炎反應，嚴重時更會導致敗血性休克而對生命造成威脅。因為感染所引起的嚴重全身性發炎反應，病人除了有發燒、寒顫、呼吸急速和全身血壓劇降..等症狀外，更可能造成多種器官衰竭，而導致休克死亡。在感染過程的末期，血清中的一氧化氮以及前列腺素E<sub>2</sub>的含量均會大幅度增加，而造成嚴重的發炎反應。一般相信，一氧化氮在敗血性休克所造成的心血管功能失調以及組織傷害扮演著重要的調控角色。傷害扮演著重要的調控角色。有許多疾病是因為發炎關係而導致的，如我們最常見的肝炎。

肝炎(Hepatitis)是肝臟因病毒、藥物、酒精或是代謝異常引起的發炎症狀。最常見的原因是病毒感染。由病毒造成的肝炎能引起肝臟細胞腫脹，是世界上流傳廣泛，危害很大的傳染病之一。有五種主要病毒型肝炎，A~G型。尤其是B型肝炎(Hepatitis B Virus, HBV)和C型肝炎(Hepatitis C Virus, HCV)可使數億人罹患慢性病(Yu *et al.*, 2006)，並且二者合在一起是發生肝硬化和肝癌的最常見原因。B型肝炎病毒對於肝臟有組織趨性 (tissue tropism)，主要感染的標的細胞就是肝細胞 (hepatocyte)，可以造成急性或是慢性肝炎。病毒感染宿主後會在病患的肝臟細胞增殖，身體免疫系統對這些感染細胞的反應會造成肝臟的發炎和破壞。過去研究發現造成肝細胞癌和感染肝炎病毒有很大的相關性(Kiss *et al.*, 2002) 尤其是B型肝炎病毒。C型肝炎為一種RNA病毒，它是一種45奈米大的、有外殼的、單鏈核糖核酸的病毒，它屬於黃病毒科中的肝炎病毒屬。根據1994年新建立的分類系統，HCV可分成六種不同的屬型(Genotype)和30種亞型(subtype)。感染了HCV之後除了會影響肝臟之外，還會引起許多組織跟器官的病變。最常見的病變是混合性冷凝球蛋白血症(essential mixed cryoglobulinemia)，它會同時出現紫斑症、虛弱、關節疼痛這三種典型症狀。其他常出現的病變還有非霍奇金氏淋巴瘤以及膜增生性腎小球腎炎。

## 2、巨噬細胞(Macrophage)的活性



巨噬細胞是整個免疫系統中分化最為成熟的細胞，分布於全身各處組織中，且在發炎反應中扮演一個主要的角色(Eliopoulos *et al.*, 2002)。

目前已知巨噬細胞表面有許多不同的受體，透過各類受體感受環境變化。巨噬細胞的活化是指細胞受到刺激物誘發或增強許多免疫反應與功能，進而增強腫瘤及微生物的毒殺作用(cytotoxicity)。具有活化巨噬細胞的物質大致分為兩類：(1)細胞激素，如IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  或TNF- $\alpha$ ；(2)內毒素(endotoxin)，如脂多醣類(lipopolysaccharides, LPS) (Schwacha *et al.*, 2003)。

LPS 刺激活化巨噬細胞時，所生成的介質物質可分為三類：(1) protein，通常是Interleukin (如：IL-1、IL-6、IL-8)、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 protease(如：elastase and cathepsin)；(2) reactive oxygen species (ROS)，如 Nitric oxide (NO) 此與巨噬細胞的抑菌效應相關；(3) lipid 衍生物，包括血小板活化因子和 cyclooxygenase 和 lipoxigenase代謝 arachidonic acid 所生成的產物 (如：PGE2) (Nathan 1987)。

不少研究已證實，在慢性發炎及感染之細胞組織，會有一系列cytokines (IL-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ ) (Hanada and Yoshimura, 2002)、酵素及訊息蛋白 (signal protein) 生成。iNOS及COX-2分別可催化NO及PGs 大量產生，不但造成組織發炎及併發敗血性休克，也使得慢性傳染病 (例如：肺結核) 及自體免疫性疾病 (例如：風濕性關節炎) 等疾病症狀更加惡化 (Nussler and Billiar, 1993; Sautebin, 2000)。

### 3、脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)

脂多醣為格蘭氏陰性菌外膜的主要成份，其使得細菌結構更加完整，並保護細胞免受某些化學物質的攻擊(Marrack, 1990)。脂多醣屬於內毒素的一種，可引起激烈的免疫反應。相關文獻指出LPS可刺激巨噬細胞釋放TNF- $\alpha$ 、IL-6、NO等發炎因子(Liu, 2013)，導致人體發生敗血症(sepsis)、敗血性休克(sepsis shock)及全身性發炎等症狀 (Guha and Mackman, 2001)。

### 4、一氧化氮(NO)

一氧化氮(Nitric oxide, NO)為一個重要的訊息及細胞毒性分子，NO在生物體內生合成必須透過一氧化氮合成酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)所催化，一氧化氮合成酶家族NOS family目前共發現了三種形式的特異性蛋白質，分別為從神經組織純化分離而來的neuronal (nNOS)也分布於體內其他組織，endothelial NOS (eNOS) 與內皮細胞有關，inducible NOS (iNOS)則是發現於巨噬細胞Macrophages。由iNOS的幫忙把L-arginine及氧氣代謝後所產生(Musial and Eissa, 2001)，許多疾病的發生與NO在體內大量產生是有關連性的，例如：肺癌(lung cancer)、肺結核(pulmonary tuberculosis)、阿茲海默症(Alzheimer's disease)、動脈粥狀硬化(atherosclerosis)、氣喘(asthma)、關節炎(arthritis)、敗血症(septic shock)....等等(Vodovotz *et al.*, 1996 ; Eissa *et al.*, 1998)。在之前的文獻中

曾提及慢性發炎及感染(chronic infection and inflammatory)的過程是造成癌症發生的危險因子之一( Ohshima and Bartsch, 1994)。當組織受傷發炎時，會產生NO及其他的自由基，進而使細胞及DNA受損，並促使腫瘤形成(tumor development) ( Ohshima and Bartsch, 1994)。

#### 5、環氧化酵素(cyclooxygenase ; COX)

環氧化酵素(cyclooxygenase ; COX)有分兩種isoform，分別為持續活化的COX-1以及誘發型的COX-2，皆會利用花生四烯酸(arachidonic acid)做為受質代謝產生PGs，但在藉由LPS刺激macrophages時只有COX-2會表現(Hwang *et al.*, 1997)，而COX-2的代謝產物主要有四種，分別為 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、prostaglandin F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>)、thromboxane A 以及 prostacyclin，其中以PGE<sub>2</sub>與發炎反應最為相關(Ben-Av *et al.*, 1995)，可做为pro-inflammatory mediators。在許多不同的腫瘤細胞中皆發現COX-2做为pro-inflammatory mediators。在許多不同的腫瘤細胞中皆發現COX-2有大量的表現，進而造成PGs過度的產生，在癌症的發病過程中PGs扮演著一個重要的角色，它影響了mitogenesis、cellular adhesion、immune surveillance以及apoptosis (Subbaramaiah *et al.* , 1997)除此之外更有文獻提到PGs已被證實在癌細胞中具有抑制細胞凋亡及免疫的功能、加強了細胞的proliferation和增加了細胞的invasion (Ben-Av *et al.*, 1995; Sheng *et al.*, 1998)，因此若能以COX-2為目標抑制其活性將可有效的達到癌症的預

防。

## 6、促發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokines)

### i. 白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)

白介素是一種低分子量的醣蛋白，通常只有單鍵結構。其對生物性的調節作用包含細胞生長、細胞活化、發炎、免疫、組織修復等。

Interleukin family 包含IL-1~IL-33。白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)，分子量為22-27 kDa，它的分子量大小，取決於所分泌之細胞來源，以及其轉譯後變異量的多寡而定，它可被合成為212種胺基酸之前驅蛋白質，其中包含28 種胺基酸訊號序列及184 種胺基酸成熟片段(mature segment) (Haegeman *et al.*, 1986; Hirano *et al.*, 1986; May *et al.*, 1986; Zilberstein *et al.*, 1986)。主要由T細胞、巨噬細胞、B細胞、肥大細胞等產生。(Akira *et al.*, 1993)其功能包括增加體溫、刺激T細胞活化及刺激B細胞產生抗體等。當巨噬細胞在接受刺激而活化後，會分泌TNF- $\alpha$ 、IL-6，他們會再促發炎反應的進行(Groeneveld *et al.*, 1997)。

### ii. 腫瘤壞死因子- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor Alpha, TNF- $\alpha$ )

腫瘤壞死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor Alpha, TNF- $\alpha$ )是由單核球及巨噬細胞中產生，可誘導單核球和巨噬細胞分化並刺激補體及凝血系統。在脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)誘導的發炎反應中，TNF- $\alpha$ 是早期被誘發的調節因子，其次誘發IL-1、IL-6 及IL-8 的產生，再進而誘導感染區域血管表達黏附因子，促使內皮細胞產生血小板活化因子，以催

化血液凝結及局部血管阻塞，防止病原菌的擴散。

## 7、多酚類成分的功能

多酚(polyphenol)具有抗氧化、強化血管壁、促進腸胃消化、降血脂與增強身體抵抗力，並防止動脈硬化及血栓形成。多酚類已被證實具有抗氧化的效果(Djeridane *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014)。

## 8、四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)

四氯化碳，常溫下為一種無色液體。四氯化碳是最廣泛應用於誘導實驗動物肝臟損傷發炎、肝纖維化及肝硬化之肝毒性物質。過去研究上有指出四氯化碳會造成神經系統、肝、腎損害及造成肝纖維化過去研究上有指出四氯化碳會造成神經系統、肝、腎損害以及造成肝纖維化(Liu *et al.*, 2014; Ponmari *et al.*, 2014)。CCl<sub>4</sub>毒性對肝臟細胞再生能力的影響程度與給予劑量 (dosage)、暴露時間 (duration)及肝臟本身狀況有關，這也影響到CCl<sub>4</sub> 造成之肝損傷是否可以復原。在肝臟中主要經由 cytochrome P450 酵素系統代謝，產生三氯甲烷自由基，在氧氣的存在下會和其結合形成超陰離子，此分子參與了脂質過氧化反應，攻擊多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)，並干擾許多生化機制 (Weber *et al.*, 2003)。

## 第二節、細胞訊息傳遞途徑

### 1、Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) pathway

MAPKs 訊息傳遞路徑會調控細胞的增生、分化、入侵、轉移、凋亡以及細胞凋亡(Robinson *et al.*, 1998; Shore *et al.*, 1996)。MAPKs 是由一大群絲胺酸/酰胺酸激酶所組成的家族，當細胞膜上的受器藉由GTP-binding protein接受來自細胞外的訊息刺激並在絲胺酸與酰胺酸產生磷酸化，便引起一連串的訊息傳遞過程，並依序活化MAP kinase kinase (MAPKKK)、MAP kinase kinase (MAPKK)、MAP kinase (MAPK)。當MAPK活化後會進入細胞核中進行轉錄作用並促進相關基因調控 (Leevers *et al.*,1994；Marshall., 1994；Stokoe *et al.*, 1994)。另外，MAPKs cascades可以分為三大條路徑：(1) Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)、(2) Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNKs/SAPKs)與(3) p38 kinase，這些MAPKs cascades會依序活化細胞核內的p53、c-jun、Stats。

有文獻指出，酒精造成的肝臟慢性發炎，其發炎路徑與MAPK的p-38與ERK有關係 (Mandrekar and Szabo, 2009)，也有文獻指出ROS活化p-38這訊息路徑會造成肝臟發炎反應 (Wang *et al.*, 2014)，抗發炎藥其作用也會影響著MAPK的訊息傳遞。近幾年漸漸的確定了MAPK這條訊息路徑與發炎反應之間的關係(Kaminska, 2005)。

## 2、 Signal transducers and activators of transcription (STATs) pathway

在惡性腫瘤中會過度或持續表現的一種訊息傳遞途徑為Signal

Transducers and Activators of Transcription (STATs)，STATs 蛋白的家族中包含了Stat1、Stat2、Stat3、Stat4a、Stat4b、Stat5a、Stat5b、Stat6 (Levy and Lee, 2002)會調控多種細胞類型的分化及增生表現，其中Stat3是STATs家族中最重要成員，因為多種人類惡性癌症中會持續活化Stat3 (Bowman *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Coffey *et al.*, 2000)，這種現象除了造成腫瘤不斷增生且會進而活化VEGF來使血管新生形成。Stat3訊息傳遞路徑的活化是先經由具有酪胺酸激酶活性的Janus kinase(JAK)結合到細胞上的受器磷酸化而活化，磷酸化後的STAT會形成雙聚體，並進入細胞核啟動下游基因的表現。

STAT1涉及I型、II型或III型干擾素激活基因的正調控。在IFN- $\gamma$ 刺激下，STAT1會組成同源二聚體或與STAT3組成異二聚體結合到IFN- $\gamma$ 活化序列 (Interferon-Gamma-Activated Sequence，GAS)的啟動子上；在IFN- $\alpha$ 或IFN- $\beta$ 刺激下，STAT1會與STAT2組成異二聚體結合到IFN刺激反應元件(Interferon-Stimulated Response Element，ISRE)的啟動子上。在這兩種情況下，STAT二聚體與啟動子的結合都會導致干擾素激活基因(Interferon-18 Stimulated Genes，ISG)的表達。有文獻指出在間質幹細胞中iNOS的表達是因為STAT1的磷酸化(Chen *et al.*, 2014)；另外也有文獻指出LPS能誘使發炎反應，是經由STAT1、STAT3和ERK等的訊息路徑方式(Liu *et al.*, 2013)，以及STAT1過度表達會造成iNOS表現、發炎

(Zimmerman *et al.*, 2012)。

### 3、 Nuclear Factor-kappa B pathway

NF- $\kappa$ B為轉錄因子，其會結合壓力訊號和調控免疫反應，也與致癌作用有關聯。NF- $\kappa$ B是由不同的刺單元體組成的同二聚體或異二聚體，可以被分為五種不同的相關結構蛋白質：RelA (p65)、RelB、c-Rel、NF- $\kappa$ B1 (p50/p105)和NF- $\kappa$ B2 (p52/p100)。其中p50/p65異二聚體在癌症中會大量形成並且時常作為轉錄活化因子。在正常的細胞中，細胞質內的kappa B inhibitor(I $\kappa$ B)會離開NF- $\kappa$ B /Rel 二聚體，進而與p65次單元進行鍵結來抑制NF- $\kappa$ B。在細菌或病毒感染或誘發發炎因子(proinflammatory cytokines)的存在下就會誘導I $\kappa$ B kinase (IKK)的活化，而IKK是由兩種次單元體IKK $\alpha$ 及IKK $\beta$ 所組成的複合物，並由次單元IKK $\gamma$ 來調控。如果IKK被活化則會造成I $\kappa$ B的32及36位置的絲胺酸被磷酸化，在磷酸化的作用下就會誘導出泛素化(ubiquitination)以及I $\kappa$ B $\alpha$ 的蛋白水解作用(proteolysis)，NF- $\kappa$ B就會離開I $\kappa$ B並進入細胞核內開始調控轉錄活化作用(Sen *et al.*, 1986；Pikarasky *et al.*, 2004)。NF- $\kappa$ B所調控的轉錄基因涉及到附著分子、血管新生因子以及細胞外基質的相關酵素如MMP-9等，然而這些因子都與腫瘤細胞的形成以及入侵轉移均有密切相關。

## 第三節、 藥物介紹

### 1、 概述



甘蔗(*Saccharum officinarum*) 是禾本科甘蔗數的單子葉植物。甘蔗是溫帶和熱帶農作物，是製造蔗糖的原料，且可提煉乙醇作為生質能源。全世界有一百多個國家出產甘蔗，最大的甘蔗生產國是巴西、印度和中國。甘蔗為一年生或多年生草本植物。圓柱形莖直立、分蘗、叢生、有節，節上有芽；節間實心，外被有蠟粉，有紫、紅或黃綠色等；葉子叢生，葉片有肥厚白色的中脈；大型圓錐花序頂生，小穗基部有銀色長毛，長圓形或卵圓形穎果細小。甘蔗適合栽種於土壤肥沃、陽光充足、冬夏溫差大的地方。經過灌溉、施肥、除草約十八個月可收成。

本實驗之甘蔗汁選用台灣南投縣埔里鎮之甘蔗，其學名為*Saccharum officinarum* Linn. cv. badila。

## 2、 過去傳統療效

甘蔗味甘、性寒，歸肺、胃經；具有清熱解毒、生津止渴、和胃止嘔、滋陰潤燥等功效；在傳統中醫書籍《本草綱目》、《本草經疏》中主治口乾舌燥，津液不足，小便不利，大便燥結，消化不良，反胃嘔吐，高熱煩渴等。

## 3、 現今研究

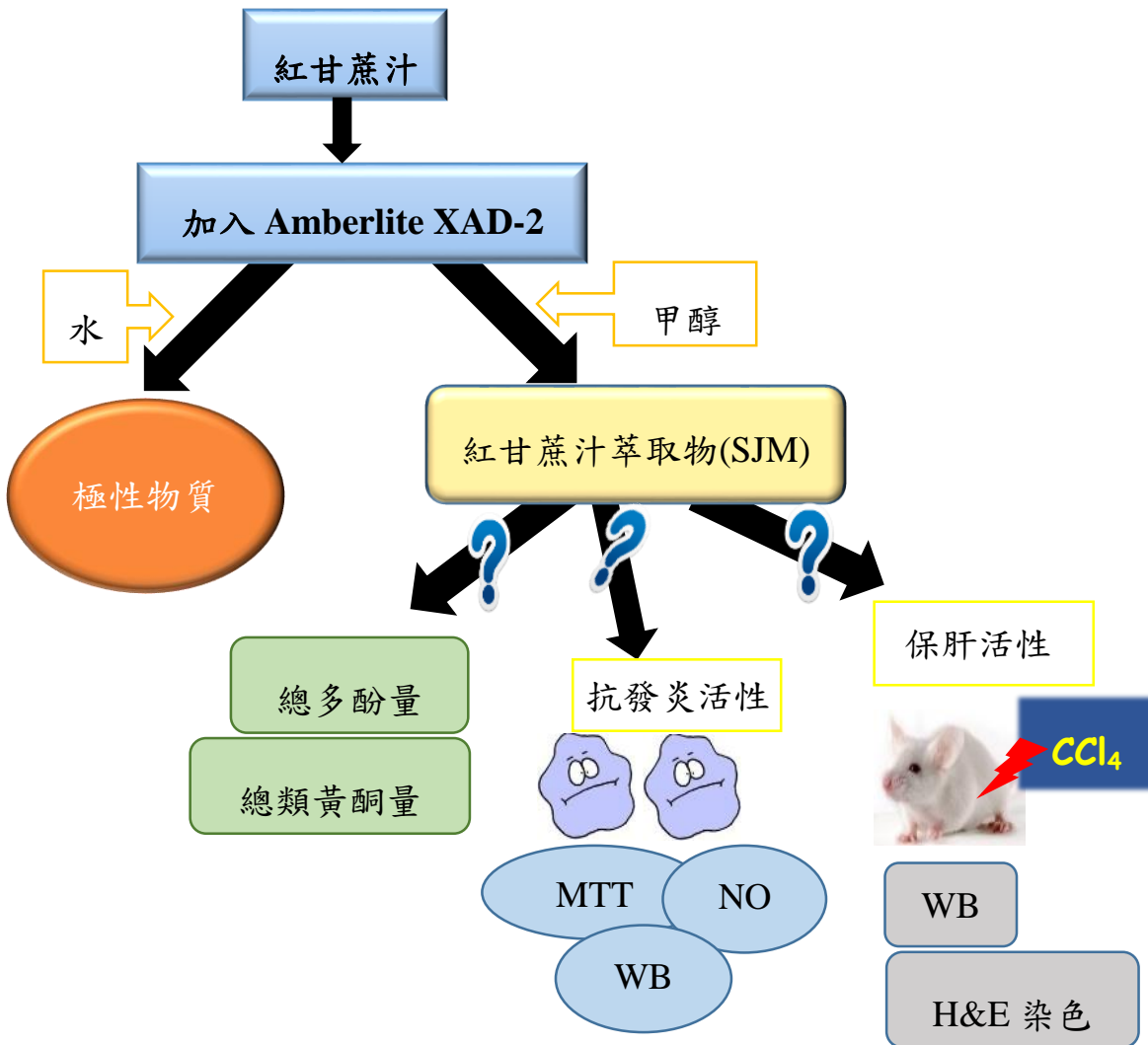
現代醫學研究表明，甘蔗中含有豐富的糖分、水分，此外，還含有對人體新陳代謝非常有益的各種維生素、脂肪、蛋白質、有機酸、鈣、

鐵等物質。甘蔗不但能給食物增添甜味，而且還可以提供人體所需的營養和熱量。

## 貳、 實驗動機與架構

由於甘蔗為台灣人在日常生活中喜歡食用的水果，而且過去有許多文獻指出多酚類及類黃酮相關物質具有抗氧化及抗發炎的效果，我們在成份測定的實驗中也發現本試藥 SJM 含有豐富類黃酮成份，因此想藉由 LPS 誘導巨噬細胞發炎及 CCl<sub>4</sub> 誘導小屬肝臟損傷的模式，探討紅甘蔗汁抗發炎及保護肝臟損傷的能力，並研究其分子機制。

研究架構：



# 參、實驗材料

## 第一節、實驗藥品

### 1、甘蔗汁

本實驗之新鮮甘蔗汁購買於台中市福順市場(美村路二段與福東街之交叉口)。

### 2、購自 Bio RAD 公司

Acrylamide

Glycine

N, N, N, N-tetramethylethylenediamine (TEMED)

Bovine serum albumin

### 3、購自 MERCK 公司

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Triton X-100

### 4、購自 Gibco BRL 公司

Fetal Bovine Serum (FBS)

L-glutamine

Penicillin-Streptomycin (PS)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)

RPMI medium 1640 (RPMI-1640)

Trypsin-EDTA

### 5、購自 Sigma 公司

RPMI-1640 medium modified (RPMI without phenol red)

Phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF)

Griess' reagent for nitrite (Griess' reagent)

Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Lipopolysaccharide (LPS)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris-base)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride (Tris-HCl)

Sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

Gallic acid

Quercetin dehydrate

Potassium acetate ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )

Sodium Carbonate anhydrate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Ammonium peroxodisulfate (APS)

#### **6、購自 Panreac Quimica sa 公司**

Di-sodium hydrogen phosphate 12-hydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

Potassium chloride (KCl)

Hydrogen chloride (HCl)

Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Sodium chloride (NaCl)

Sodium hydroxide (NaOH)

Ethanol

Methanol

#### **7、購自 Avantor 公司**

Acetonitrile

#### **8、購自 MD Bio 公司**

40% Acrylamide / Bis solution (29 : 1)

Ammonium peroxodisulfate (APS)

#### **9、購自 Falcon 公司**

6-cm dish

24-well plate

#### **10、購自 Thermo 公司**

6-cm dish

24-well plate

#### **11、購自 CORNING 公司**

10-cm dish

#### **12、購自 ExtraGene 公司**

96-well plate

### **13、購自 Millipore 公司**

Nitrocellulose membrane

Filtertips

Syringe filter

### **14、購自 Invitrogen 公司**

TNF- $\alpha$  ELISA kit

Interleukin-6 ELISA kit

## 第二節、 抗體

### **1、 購自 Santa Cruz Biotechnology 公司**

Anti-COX-2 rabbit polyclonal antibody

Anti-iNOS mouse monoclonal antibody

Anti-TNF- $\alpha$  goat polyclonal antibody

Anti-NF- $\kappa$ B mouse monoclonal antibody

Anti-ERK rabbit or goat polyclonal antibody

Anti-JNK mouse monoclonal antibody

Goat anti-rabbit antibody

Goat anti-mouse antibody

Goat anti-goat antibody

### **2、 購自 Cell Signaling 公司**

Anti-p-NF- $\kappa$ B antibody

Anti-p-ERK antibody

Anti-p-JNK antibody

Anti-p38 antibody

Anti-p-p38 antibody

### **3、 購自 Sigma 公司**

Mouse anti- $\beta$ -actin antibody

## 第三節、 常用儀器

無菌操作台 (NUATR Biological safety cabinets)

二氧化碳培養箱 (NUATR CO<sub>2</sub> water-jacketed incubator)

烘箱 (Mettler)

微量型離心機 (Shelton VS15)

桌上型離心機 (KUBOTA 2010)

冷凍離心機 (Universal 32/32R)

高速離心機 (High-speed centrifuge, Hermle Labortechnik, Germany)

蛋白質電泳槽 (Bio-Rad mini protein III cell)

蛋白質轉漬槽 (Hoefer pharnacia Biotech)

電泳電源供應器 (Bio-Rad Power Pac 1000)

振盪器 (Scientific industries vortex genie 2)

乾浴槽 (Thermolyne)

電子天秤 (Statorius analytic)

冷藏冰箱 (Whirlpool)

超純水系統 (Milli-Q Academic)

水浴槽 (Techne TE 8J)

酸鹼值測定計 (pH meter JENCO electronics)

倒立式顯微鏡 (Diaphot 3000, Nikon, Japan)

冷光螢光分析系統 (FUJIFILN/LAS-1000)

減壓濃縮機 (NVC-2100, EYELA, Japan)



光學影像顯微鏡 (Light microscope, CK-30, Olympus, Japan)

高壓滅菌釜 (TOMY)

冷凍乾燥機 (FD4, Heto, USA)

細胞計數盤 (Cell count)

高效能液相層析儀 (HPLC, L-7100, HITACHI, Japan)

酵素免疫分析儀 (EL-800, BioTek Instruments, USA)

# 肆、實驗方法

## 第一節、萃取甘蔗汁

本實驗採用台中市福順市場販售之紅甘蔗汁(約200 mL)，加入16 g Amberlite XAD-2 之非極性離子樹脂攪拌約3小時，先用二次水沖提出極性物質，再使用150 mL 甲醇沖提出多酚類物質，最後以減壓濃縮機濃縮出萃取物(SJM)。

## 第二節、天然物化學成分分析(Phytochemical screening)

### 1、多酚類(Phenolic)

將1000 ppm萃取物 and 不同濃度的沒食子酸(Gallic Acid)做為標準品，加入1 mL Folin-Ciocalteus phenol reagent 反應6分鐘後，再加入1 mL 的 75 g/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  終止反應40分鐘，測得吸光值760 nm 並換算每100 g 萃取物乾重所含之多酚當量。

### 2、類黃酮(Flavonoids)

將適當濃度萃取物，並以不同濃度的斛皮素(Quercetin)做為標準品，加入3.8 mL 甲醇、0.1 mL 的10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  和0.1 mL 1M  $\text{CH}_3\text{COOK}$  反應40分鐘後，於415 nm測吸光值並換算每100 g萃取物乾重所含之類黃酮當量。

### 3、碳水化合物(Polysacchrides)

配製10 mg/mL的蔗汁萃取物，加入5% phenol 0.5mL，再加入2.5

mL濃硫酸混合均勻（待測液：5% phenol：濃硫酸=1：1：5）於100℃水浴20分鐘，待溫度冷卻後，以490 nm波長測吸光值（利用0，10，20，30，40，50 µg/mL葡萄糖為標準品）。

#### 4、 自由基捕捉測定(Determination of free radical quenching assay)

本實驗使用之自由基為 1,1-diphenyl-1-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical，因為DPPH在結構上具有穩定的共振，所以可以在適當的儲存下長時間保留下來。且DPPH在517 nm的波長下有特定的吸光值，隨著DPPH濃度減少，其吸光值也會隨之降低，利用此原理可以測定特定物質清除自由基的效力。先配置不同濃度的紅甘蔗汁萃取物(SJM)、甲醇100 µL，再加入 20 µL的1 mM DPPH，室溫靜置30分鐘後，偵測517 nm下的吸光值。

$$\text{DPPH bleaching (\%)} = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100\%$$

#### 5、 螯合亞鐵離子之能力測定 (Ferrous chelating activity assay)

在多種金屬離子中，Fe<sup>2+</sup>是最具影響力的促氧化劑，會促進脂質氧化作用的進行。利用Fe<sup>2+</sup>與 Ferrozine 的複合物在562nm之呈色反應，可以測得樣品對Fe<sup>2+</sup>的螯合能力。當樣品螯合Fe<sup>2+</sup>時，會造成562nm 吸光值的降低。吸光值愈低表示樣品螯合亞鐵離子的能力愈強。先配置不同濃度的紅甘蔗汁萃取物(SJM)、甲醇160 µL，再加入 5 µL的2 mM FeCl<sub>2</sub>，室溫靜置30秒後，再加入10 µL的 5 mM Ferrozine水溶液，室溫

靜置10分鐘後，偵測562 nm下的吸光值。

$$\text{Ferrous chelating ability(\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \right) \right] \times 100\%$$

### 第三節、 HPLC 成份分析

#### 1、 管柱資訊與動相：

本實驗使用 RP-18 chromolith® SemiPrep HPLC column (100 × 10 mm, 2 μm; Merck, Germany)管柱進行偵測。取適量甘蔗汁萃取物(SJM)溶於甲醇後經由針頭過濾器(syringe filter, 0.22μm, Millipore, Germany)過濾後備用。動相溶液使用 A solution (acetonitrile), B solution(water)。

#### 2、 偵測條件：

注射體積：10μL, Detection：UV 370nm, gradient

流動相：A solution (acetonitrile), B solution(water)

0 minutes A-5% B-95% Flow rate：0.8 mL/min

5 minutes A-17% B-83% Flow rate：0.8 mL/min

17.5 minutes A-25% B-75% Flow rate：0.8 mL/min

37.5 minutes A-35% B-65% Flow rate：0.4 mL/min

58 minutes A-50% B-50% Flow rate：0.8 mL/min

63 minutes A-90% B-10% Flow rate：0.8 mL/min

### 第四節、 細胞培養(Cell culture)

## 1、細胞培養

選用小鼠巨噬細胞RAW 264.7，培養液為RPMI-1640，另添加10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1% penicillin /streptomycin 至RPMI-1640 培養液中。細胞培養在含5% CO<sub>2</sub>的37°C無菌恆溫培養箱，每2~3天繼代分盤培養，密度約維持在 $2 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  cells/mL。

## 2、細胞繼代培養

移除舊的 RPMI-1640 培養液，以 2~3 mL 的 phosphate buffer saline (PBS, 0.02% KCl、0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.8% NaCl 以及 0.216% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)清洗培養皿，並將 PBS 移除，再加入 5~10 mL RPMI-1640 培養液並沖刷細胞至 15 mL 離心管中，以 1200 rpm 離心五分鐘，下層即為細胞沉澱。移除上清液後，加入新鮮的 RPMI-1640 培養液 5~10 mL，並打散細胞使不成團塊狀，並將含有細胞的培養液均勻散布於培養皿中，繼代培養。

## 第五節、細胞毒性測試(MTT assay)

利用細胞能經由粒線體去氫酶(dehydrogenase)作用，將(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)代謝還原成紫色的 formazan crystal，並以波長 540 nm 偵測。細胞培養後，用 PBS 沖洗後，用培養基將細胞打下後，將濃度調整成  $5 \times 10^4$  cells/mL，培養於 24-well plate，經 24 小時細胞貼壁後，更換培養基，同時加入不同濃度的 SJM 作用 24 小時後，分別更換新的培養基，同時加入 100

$\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL)反應 4 小時後，以 dimethyl sulfoxide(DMSO)將紫色 formazan 結晶溶解，並以波長 540 nm 偵測吸光值。

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{\text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100\%$$

## 第六節、一氧化氮(NO)之測定

細胞培養後，用 PBS 沖洗，再利用培養基將細胞打下後，將濃度調整成  $5 \times 10^5$  cells/mL，培養於 24-well plate，經 24 小時細胞貼壁後，更換不含 phenol red 的培養基，同時加入不同濃度的 SJM 作用 30 分鐘後，再加入 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )反應 24 小時後，將 24-well plate 從培養箱拿出後立刻置於冰上，收取培養基加入 100  $\mu\text{L}$  Griess 試劑 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid:0.1% naphyylethylenediamine dihydrochloride in water=1:1(v/v)) 於 550 nm 下測得吸光值，並以  $\text{NaNO}_2$  做為標準品，計算培養基中 nitrite 的含量。

$$\text{NO production}(\%) = \frac{\text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100\%$$

## 第七節、IL-6 含量之測定

細胞培養後，用 PBS 沖洗，再利用培養基將細胞打下後，將濃度調整成  $5 \times 10^5$  cells/mL，培養於 24-well plate，經 24 小時細胞貼壁後，更換不含 phenol red 的培養基，同時加入不同濃度的 SJM 作用 30 分鐘後，再加入 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )反應 24 小時後，將 24-well plate 從培養箱拿出後立

刻置於冰上，收取培養基，先以 3500 rpm (800 g)，4°C 離心 30 秒後利用 Interleukin 6 kit 測定。

將事先 coating 過 capture antibody 的 96-well plate 以 washing buffer 清洗 5 次，加入 200  $\mu$ L 的 assay diluent 於室溫下反應 1 小時後，將 well 內的試液倒出，於各個 well 加入 100  $\mu$ L 的樣品(sample)並置於 4°C 反應隔夜。以 washing buffer 清洗 5 次後，加入 detection antibody 於室溫下反應 1 小時。倒出 well 內的試液，以 washing buffer 清洗 5 次後，再加入 100  $\mu$ L 的 avidin-HRP 試劑於室溫中反應 30 分鐘，再利用 washing buffer 清洗 7 次後，加入 100  $\mu$ L TMB 溶液於室溫下反應 15 分鐘，最後加入 50  $\mu$ L 停止溶液(stop solution)終止反應。使用 ELISA reader 於 450 nm 下檢測吸光值，並利用檢量線計算 IL-6 的濃度。

## 第八節、TNF- $\alpha$ 含量之測定

細胞培養後，用 PBS 沖洗，再利用培養基將細胞打下後，將濃度調整成  $5 \times 10^5$  cells/mL，培養於 24-well plate，經 24 小時細胞貼壁後，更換不含 phenol red 的培養基，同時加入不同濃度的 SJM 作用 30 分鐘後，再加入 LPS(1  $\mu$ g/mL)反應 24 小時後，將 24-well plate 從培養箱拿出後立刻置於冰上，收取培養基，先以 3500 rpm (800 g)，4°C 離心 30 秒利用 Tumor Necrosis Factor Alpha kit 測定。

將事先 coating 過 capture antibody 的 96-well plate 以 washing buffer 清洗 5 次，加入 200  $\mu\text{L}$  的 assay diluent 於室溫下反應 1 小時後，將 well 內的試液倒出，於各個 well 加入 100  $\mu\text{L}$  的樣品(sample)並置於 4 $^{\circ}\text{C}$  反應隔夜。以 washing buffer 清洗 5 次後，加入 detection antibody 於室溫下反應 1 小時。倒出 well 內的試液，以 washing buffer 清洗 5 次後，再加入 100  $\mu\text{L}$  的 avidin-HRP 試劑於室溫中反應 30 分鐘，再利用 washing buffer 清洗 7 次後，加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 溶液於室溫下反應 15 分鐘，最後加入 50  $\mu\text{L}$  停止溶液(stop solution)終止反應。使用 ELISA reader 於 450 nm 下檢測吸光值，並利用檢量線計算 TNF- $\alpha$  的濃度。

## 第九節、動物實驗

### 1、實驗動物

本實驗之動物乃經由中山醫學大學動物實驗委員會審核通過(編號 1427)並准予實行。使用 4 週齡的 CD-1 $^{\circledR}$  (ICR) Mice，體重約 19-21 g，購自樂斯科生物科技股份有限公司並飼養於中山醫學大學動物飼育中心，使用 Lab Diet 進口飼料。動物室設定溫度為 22 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ ，光照/黑暗週期為 12 小時循環。採自由飲水進食。

### 2、藥物劑量

本實驗之試驗藥劑為紅甘蔗萃取物(SJM)。本實驗使用的劑量為每次



以腹腔注射 40 mg/kg(每次注射 300  $\mu$ L)，CCl<sub>4</sub> 20%(4 mL 橄欖油加入 1 mL CCl<sub>4</sub>，每次管餵 100  $\mu$ L)。

### 3、 研究組別

實驗前將小鼠隨機分為 4 組，每組 6 隻，分別為 normal、CCl<sub>4</sub>、CCl<sub>4</sub>+ SJM 40 mg/kg、SJM 40 mg/kg。

### 4、 四氯化碳誘導小鼠肝臟損傷

本實驗誘導小鼠慢性肝臟肝炎之方法乃經由衛生署公布之「健康食品之護肝功能評估方法(針對四氯化碳誘導化學性肝損傷)」。待小鼠保定一週適應環境後，開始為期 7 週之實驗(SJM 處理 7 週，CCl<sub>4</sub> 處理 6 週)。並於每週一、三、五腹腔注射 SJM，每週二、四管餵 CCl<sub>4</sub>，並固定於每週二下午秤量小鼠重量，紀錄體重變化。

### 5、 小鼠犧牲

小鼠於第 7 週全數犧牲，麻醉後採取心臟血液，並秤取其肝臟、脾臟及腎臟之重量，並摘取肝臟最大右葉，固定於 10% 的福馬林(formalin)溶液中進行病理切片觀察。

### 6、 血液生化分析檢驗(Serum biochemical analysis)

犧牲時得到之血液先置於冰上，4 小時後在 4°C，1400 rpm (179 g) 離心 20 分鐘得上清液，並利用一般檢驗模組(commercial kit)檢驗血液中 AST 及 ALT 之絕對含量(U/L)。

## 7、 Hematoxylin & Eosin 染色(H&E stain)

本實驗之組織切片與染色委託中山醫學大學醫學系病理科林偉隆醫師進行，其步驟如下：

### i. 固定(fixation)

將組織保存於中性福馬林(10% neutral buffered formalin)中固定 24 小時以上，將組織切成 0.5 cm<sup>2</sup>，置於包埋盒中，於流動的水中沖洗 2 小時以去除福馬林，以免影響切片的製作。

### ii. 脫水(dehydration)

將以去除福馬林的組織取出，以吸水紙吸除多餘水份，接著進行脫水的步驟：

70% 酒精      20 分鐘

↓

80% 酒精      20 分鐘

↓

90% 酒精      20 分鐘

↓

95% 酒精(1)    20 分鐘

↓

95% 酒精(2) 20 分鐘

↓

100% 酒精(1) 20 分鐘

↓

100% 酒精(2) 20 分鐘

iii. 澄清(clearing)

將已完成脫水的組織浸於二甲苯(xylene)中，直到組織浸至透明。因酒精與石蠟(paraffin)不互溶，故必須完全以二甲苯取代組織內酒精成份，才不影響下個過程，其步驟以二甲苯進行浸泡 2 次，每次 6 分鐘。

iv. 浸潤(infiltration)

由於二甲苯與石蠟可以互溶，故先以二甲苯澄清才可使浸潤過程得以完全，浸潤的目的是為了使石蠟能完全進入組織內。其步驟為：

二甲苯：石蠟=1：1 40°C 60 分鐘

↓

石蠟(1) 55°C 30 分鐘

↓

石蠟(2) 55°C 30 分鐘

↓

石蠟(3)                      55°C    30 分鐘

v. 包埋(embedding)

將已完成浸潤的組織至於模子中，接著加入融化的石蠟覆蓋組織，然後將包埋臺置於模子上，再加入少許石蠟使組織固定於包埋臺。置入-20°C 冰箱，使石蠟結晶變細，待石蠟凝固後去除模子，即完成包埋。

vi. 切片(section)

將包埋臺固定於連續切片機上，調整刀片角度與距離，先以 20 nm 粗切至要觀察的組織面，然後調整為 5 nm 切出連續切片後，取下所切出的連續切片，置於 38°C 的水中，使其完全伸展，再將切片置於沾附蛋白與甘油比例為 1：1 的玻片中央，然後置於 38°C 乾燥臺上烘乾。

vii. 染色(stain)

以蘇木精-伊紅染色法(hematoxylin-eosin, H&E stain)染色，步驟如下：

二甲苯(1)                      6 分鐘

↓

二甲苯(2)                      6 分鐘

↓

100% 酒精(1)                      6 分鐘

↓

100% 酒精(2)	6 分鐘
------------	------

↓

95% 酒精	6 分鐘
--------	------

↓

80% 酒精	6 分鐘
--------	------

↓

沖水	30 分鐘
----	-------

↓

以蘇木精溶液染色	10 分鐘
----------	-------

↓

以酸性溶液辯色至核清楚為止

↓

沖水	30 分鐘
----	-------

↓

伊紅溶液染色	30 分鐘
--------	-------

↓

70% 酒精	30 秒
--------	------

↓		
80% 酒精		30 秒
↓		
90% 酒精		30 秒
↓		
100% 酒精(1)		6 分鐘
↓		
100% 酒精(2)		6 分鐘
↓		
二甲苯(1)		6 分鐘
↓		
二甲苯(2)		6 分鐘

#### viii. 封蓋(mount)

將封片膠滴於已染色的組織切片上，以 45 度角慢慢蓋上玻片以免氣泡產生，待封片膠凝固後即完成封片。

### 第十節、 西方墨點法(Western blotting，WB)

#### 1、 藥品配製

RIPA buffer：

150 mM NaCl – 8.76 mg	10% NP-40 – 1 mL
0.1% SDS – 0.1 g	50 mM Tris – 6.057 mg
0.5% deoxycholic acid – 0.5 g	ddH <sub>2</sub> O – 100 mL

Running buffer :

Tris base - 3.03 g	Glycine - 14.4 g
SDS - 1 g	ddH <sub>2</sub> O - 1 L

Transfer buffer :

Tris base – 1.86 g	Glycine – 8.64 g
Methanol - 120 mL	ddH <sub>2</sub> O - 480 mL

## 2、 蛋白萃取與定量

將 RAW264.7 細胞以每盤  $10 \times 10^6$  顆種入 10-cm dish，等待細胞貼壁後，以不同濃度的 SJM 分別處理，反應 24 小時。移除舊的培養液，並以 PBS buffer 清洗，加入適量 trypsin 反應 5 分鐘，使細胞脫落，收取細胞液，以 1400 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後，再以 1 mL PBS buffer 清洗並且打散細胞，1400 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，重複 2 次。加入 RIPA buffer ( 內 含 10 mM sodium orthovanadate 、 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMSF 、 170  $\mu\text{L}$  leupeptin)後，再加入蛋白酶抑制劑，於 4°C 震盪 30 分鐘以破壞細胞。在 4°C 14000 rpm 進行超高速離心 20 分鐘，-20°C 保存上清液。並測定上清液吸光值，與 BSA 標準曲線推算後可得蛋白濃度，並將蛋白濃度調整一致。

## 3、 鑄膠

Running gel :

ddH <sub>2</sub> O	30% Acrylamide mix
--------------------	--------------------

1.5 M Tris-base (pH=8.8)	10% SDS
10% APS	TEMED

Stacking gel :

ddH <sub>2</sub> O	30% Acrylamide mix
1.5 M Tris-base (pH=6.8)	10% SDS
10% APS	TEMED

(依分子量不同，所配置膠的%數也不同)

先將下層膠倒入，以酒精壓膠，待凝固後，再加入上層膠及齒梳。

#### 4、蛋白質電泳分析

將定量出的蛋白濃度，以二次水補至相同體積，使蛋白濃度調整一致，再加入 loading dye，製成西方墨點法所需的 samples。以 100°C 加熱器加熱 samples 10 分鐘，使其變性以利分析。待冷卻後，離心以離下壁上水蒸氣。利用 10% 聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 進行蛋白質電泳，加入 loading marker 作為標記，以 70 伏特的電壓電泳約 1 小時後再以 110 伏特的電壓電泳至結束，使 samples 依分子量而分離。以三明治法依序將菜瓜布，兩片濾紙，10% 聚丙烯醯胺凝膠，硝化纖維膜，兩片濾紙，菜瓜布，置於夾子內夾好，再將夾子放置於轉置槽中，膠片以電壓 100 伏特 2 小時轉印到硝化纖維膜上。再將硝化纖維膜以麗春紅染色，剪裁出所需的適當大小，再以 Washing buffer 清洗染色。接著浸泡在 5% 的脫脂牛奶中，去除非特異的鍵結。2 小時後，以 Washing buffer 清洗 10 分鐘，重複 3 次。加入一級抗體在 4°C 反應 overnight (12 小時)。再以 Washing buffer 清洗 10 分鐘，重複 3 次。再加入對應一級抗體的二級



抗體反應 1 小時，以 Washing buffer 清洗 10 分鐘，重 3 次。將經上述處理好的硝化纖維膜用顯影劑 ECL 覆蓋整張膜，使用冷光儀拍攝。以分析軟體透過亮度深淺來定量測定的蛋白變化。

## 第十一節、 統計分析

數據以 Sigma Plot 軟體分析，mean  $\pm$  SD 表示。利用 t-test 來評估統計差異。 $p < 0.05$  表示具有顯著意義，以\*表示  $p < 0.05$ 。

## 伍、 實驗結果

### 第一節、 紅甘蔗汁萃取物與原始紅甘蔗汁之成分比較(phenolic acid、flavonoids及sugar的含量)

在試管試驗中測得本試藥紅甘蔗萃取物含有多酚成分相當於 5.98 g Gallic Acid / 100 mL 甘蔗汁；類黃酮成分相當於 11.62 g Quercetin / 100 mL 甘蔗汁，且因為使用 Amberlite XAD-2 去除糖分，所以糖量相對於原始甘蔗汁以減少許多[Table.1]，至於詳細的萃取物的成分及含量，本實驗將採用 HPLC 儀器進行測定。

### 第二節、 紅甘蔗汁萃取物於HPLC成份分析所含之化合物

從HPLC的結果得知紅甘蔗汁萃取物可知大部分成份約在retention time 30分鐘前被識別完畢，其中含有tricin-7-O-glucoside及luteolin-7-O-glucoside的成份[Figure.1]，但本萃取物中的主要成份仍然尚未被確立。此外，將本萃取物與原始luteolin和tricin相比較可以判別出本萃取物之主成份為glucoside [Figure.2]。

### 第三節、 紅甘蔗汁萃取物清除 DPPH 自由基能力

探討自由基清除能力分別以不同濃度的紅甘蔗汁萃取物測試其對 DPPH 的抑制能力，結果發現紅甘蔗汁萃取物 2.5、5、7.5、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，都有明顯的抑制效果[Figure.3]。EC<sub>50</sub>=4.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 第四節、紅甘蔗汁萃取物螯合亞鐵離子的能力

探討螯合亞鐵離子的能力分別以不同濃度的紅甘蔗汁萃取物測試其對螯合亞鐵離子的能力，結果發現紅甘蔗汁萃取物 2.5、5、7.5、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，都有明顯的抑制效果[Figure.4]。EC<sub>50</sub>=17.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 第五節、紅甘蔗汁萃取物對巨噬細胞 RAW 264.7 毒殺作用之影響

在紅甘蔗汁萃取物對巨噬細胞 RAW 264.7 毒殺作用之影響的實驗中可以發現 RAW264.7 為小鼠巨噬細胞，且為 transformation-sensitive 的細胞，可被 LPS 刺激而轉為活化型。本研究利用紅甘蔗汁萃取物培養 24 小時後利用 MTT assay 觀察細胞毒性，發現紅甘蔗汁萃取物濃度高於 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  就已經開始有毒殺細胞的能力[Figure.5]，因此在後續實驗中，以 50、100、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作為用來保護 RAW264.7 的藥物劑量。

#### 第六節、紅甘蔗汁萃取物對 LPS 所誘導 RAW 264.7 巨噬細胞 NO 產生之抑制作用

為了瞭解紅甘蔗汁萃取物對 LPS 所誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生之 NO 是否有抑制作用，首先將 RAW264.7 經紅甘蔗汁萃取物處理 30 分鐘，再使用 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 誘導巨噬細胞產生 NO，結果顯示，經過 24 小時後，因 LPS 引起之 NO 釋放皆可被處理之紅甘蔗汁萃取物有效抑制下來[Figure.6]，

表示紅甘蔗汁萃取物對於 LPS 所引起的巨噬細胞發炎現象有一定的保護作用。

### 第七節、紅甘蔗汁萃取物對 LPS 所誘導 RAW 264.7 巨噬細胞 IL-6 及 TNF- $\alpha$ 產生之抑制作用

接下來為了瞭解紅甘蔗汁萃取物對 LPS 所誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生之 IL-6 及 TNF- $\alpha$  是否有抑制作用，首先將 RAW264.7 經紅甘蔗汁萃取物處理 30 分鐘，再使用 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 誘導巨噬細胞產生 IL-6 及 TNF- $\alpha$ ，結果顯示，經過 24 小時後，因 LPS 引起之 IL-6 [Figure. 7] 及 TNF- $\alpha$  [Figure. 8] 釋放皆可被處理之紅甘蔗汁萃取物有效抑制下來，表示紅甘蔗汁萃取物對於 LPS 所引起的巨噬細胞發炎現象有一定的保護作用。

### 第八節、紅甘蔗汁萃取物經 LPS 誘導之 RAW 264.7 巨噬細胞其發炎相關蛋白之影響

後續本實驗則想透過西方墨點法知道紅甘蔗汁萃取物處理 LPS 誘導的 RAW264.7 細胞時，其相關的發炎因子，如：iNOS、COX-2、IL-6、TNF- $\alpha$  其作用如何以及其作用路徑。數據結果可以看出在單獨處理 LPS 組，明顯的有誘發 iNOS、COX-2、IL-6 與 TNF- $\alpha$ ，而在紅甘蔗汁萃取物(SJM)濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時已經有抑制 iNOS、COX-2、IL-6 與 TNF- $\alpha$  的呈現，而在濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時已是有意義的降低了。明顯看出紅甘蔗汁萃取物能有效的

抑制 iNOS、COX-2、IL-6 與 TNF- $\alpha$  的生成[Figure.9] [Figure.10]。

### 第九節、紅甘蔗汁萃取物處理經 LPS 所誘導之 RAW 264.7 細胞對調控 STAT1、STAT3 訊息傳遞路徑之影響

另外在作用路徑的觀察上，本實驗為了瞭解紅甘蔗汁萃取物訊息調控路徑，蒐集經紅甘蔗汁萃取物(SJM)處理 30 分鐘再加 LPS (1  $\mu$ g/mL)誘導 6 小時的 RAW264.7 細胞蛋白進行西方墨點法。發現紅甘蔗汁萃取物能抑制 STAT1 與 STAT3 的磷酸化，以上結果表示紅甘蔗汁萃取物能有效抑制發炎相關蛋白，或許與 STAT1 與 STAT3 pathway 有相關[Figure.11]。

### 第十節、紅甘蔗汁萃取物處理經 LPS 所誘導之 RAW 264.7 細胞對調控訊息傳遞路徑 MAPKs 之影響

而另一方面分析 MAPK 路徑相關蛋白，收集處理過紅甘蔗汁萃取物以及 LPS 的巨噬細胞蛋白，用西方墨點法觀察，看到了 p-p38、p-JNK 與 p-ERK 都很明顯的被 LPS 誘發，而經由紅甘蔗汁萃取物處理的組別，有明顯被抑制其表現，抑制效果來看的話，p-ERK 與 p-JNK 的效果尤佳，推測可能跟這兩個相關性較大[Figure.12]。

### 第十一節、紅甘蔗汁萃取物處理經 LPS 所誘導之 RAW 264.7 細胞對調控訊息傳遞路徑 NF- $\kappa$ B 之影響

接著檢測 NF- $\kappa$ B 路徑蛋白。收集處理過的巨噬細胞蛋白，利用西方墨

點法觀察，在 NF- $\kappa$ B 方面，可以看出紅甘蔗汁萃取物具有顯著的抑制效果，但相較於 MAPK 及 STATs 相關蛋白的抑制作用，NF- $\kappa$ B 路徑則較低 [Figure.13]。

## 第十二節、紅甘蔗汁萃取物對四氯化碳誘發肝組織慢性發炎之影響

本實驗後續進行了小鼠誘導四氯化碳並經由本試藥治療後的觀察，實驗的流程編排為每周一、三、五經由腹腔注射紅甘蔗汁萃取物；每周二、四則經由胃管餵食 20% 四氯化碳，並排定於第七週之星期五進行犧牲 [Figure.14]。在第 8 週時，犧牲動物取下心臟之血液及肝臟。心臟之血液經由離心後採取血清並委託高品檢驗所進行 AST 及 ALT 的數據分析，本研究發現以四氯化碳誘導之小鼠的 AST 及 ALT 均有顯著上升，又經由紅甘蔗汁萃取物治療之組別的 ALT 數值則有顯著下降，此外在單純使用紅甘蔗汁萃取物之組別的發炎數值也相較於正常組別低，證明紅甘蔗汁萃取物在保肝作用也有實質效果 [Figure.15]；肝臟則委託中山醫學大學醫學系病理科林偉隆醫師進行病理切片與 H&E 染色。可看到肝臟組織 H&E 染色切片圖中正常組與單純藥物保健組的 H&E 染色其肝小葉結構完整清晰，肝索以中央靜脈為中心呈條索狀像四周放射狀排列，索間有不同大小肝竇。四氯化碳組 H&E 染色其肝小葉結構被嚴重破壞，肝細胞索排列雜亂，到處都可看到聚集的發炎細胞以及壞死的肝細胞。使用四氯化碳誘導後再使用紅甘蔗汁萃取

物治療的 H&E 染色組別，則可以看到，依舊有許多壞死與發炎處，但也發現有些地方正在細胞分裂[Figure.16]。至於抑制實驗動物發炎之機制等相關研究目前未有完整的探討。

## 陸、 討論

在本研究發現，紅甘蔗汁萃取物具有抗氧化、抗發炎和保肝的功效，且經由實驗證實：一、紅甘蔗汁萃取物能抑制由 LPS 誘導所產生的 NO、IL-6 及 TNF- $\alpha$ [Figure 6~8]；二、紅甘蔗汁萃取物能抑制 LPS 誘導生成的 iNOS、COX-2、IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表現[Figure 9~10]；三、紅甘蔗汁萃取物能抑制活化的 MAPK、STATs 及 NF- $\kappa$ B 的效果，進而抑制發炎的訊息傳遞途徑[Figure 11~13]；四、紅甘蔗汁萃取物能抑制小鼠體內由 CCl<sub>4</sub> 誘導所造成的肝臟損傷，並降低其血清中的 AST 及 ALT 還有組織內的發炎[Figure 15~16]。

在成份比較的表中明顯指出雖然本試藥—紅甘蔗汁萃取物(SJM)含有多酚類及類黃酮相關物質，但其含量還是相對於原汁低了許多，此外，在總糖量的測定也顯示，雖然本實驗有利用 Amberlite XAD-2 使原始紅甘蔗汁去糖，但在萃取物 SJM 還是含有糖量，推測可能是經由 Amberlite XAD-2 的作用使得小分子的 phenol-glucoside 和 flavonoid-glucoside 被保留，而大分子的 phenol 和 flavonoids 則被移除所造成的結果[Table.1]

HPLC 成份分析方面，本研究目前只有確立紅甘蔗汁主要成份為 phenol-glucoside 和 flavonoid-glucoside，但仍然未知其最主要的成份為何[Figure 1~2]，後續可進行確立紅甘蔗汁萃取物(SJM)中的最主要成份，也可探討其主要成份是否具有小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 抑制由 LPS 誘導的發炎因子的效果。

GSH(glutathione)是人體抗氧化免疫系統的重要來源，一旦肝細胞內的 GSH



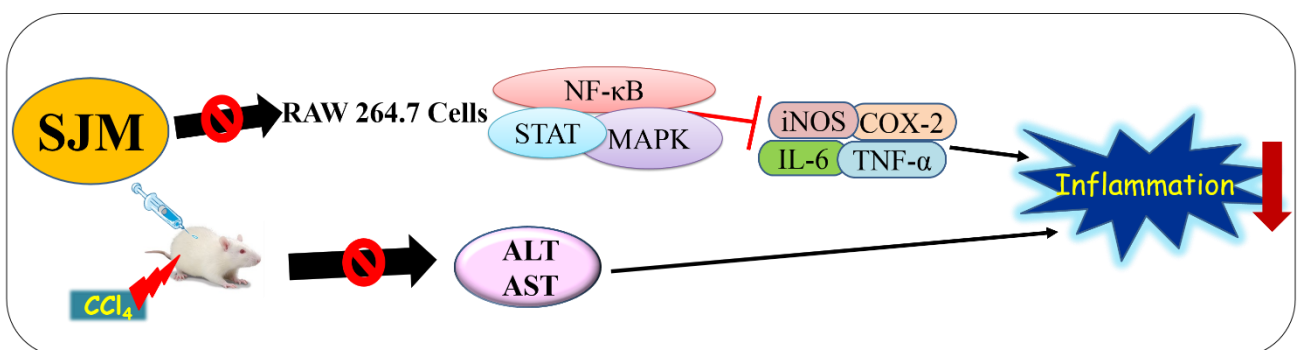
無法將多餘的過氧化物或自由基排出體外，將會造成人體細胞脂質過氧化作用；而 Lipopolysaccharide (LPS) 屬於內毒素(endotoxin)的一種，可引起強烈的發炎反應，本研究證實紅甘蔗汁萃取物能抑制小鼠巨噬細胞中由 LPS 所產生的 NO，未來會更進一步了解其抑制效果是否與 GSH 有關。

動物實驗方面，可以觀察到紅甘蔗汁萃取物能抑制小鼠體內由 CCl<sub>4</sub> 誘導所造成的肝臟損傷，並降低其血清中的 AST 及 ALT 還有組織內的發炎[Figure 15~16]，後續除了探討其抑制之訊息傳遞路徑外，也想進一步探討其上游 GSH、GSSG 等抗發炎因子是否有促進的效果。

後續期望能推廣延伸至保肝功能的效力，將本試驗藥物：紅甘蔗汁萃取物 (SJM) 應用於誘導 7-ketocholesterol 的小鼠之胚胎肝細胞 BNL CL.2 上觀察並試驗其是否有保護現象，希望對於未來之發展將能有所裨益。

## 柒、 結論

本實驗先對紅甘蔗汁萃取出物進行萃取並與原始紅甘蔗汁進行比較，發現其多酚類及類黃酮含量相當於每 100 mL 中有 5.98 g Gallic acid 和 11.62 g Quercetin。本研究利用 HPLC 確立其中的成份，結果證實含有相當多的 glucoside 相關物質，並經由試管試驗證實其具有清除 DPPH 自由基及螯合亞鐵離子的特性。接著利用脂多醣(lipopolysaccharides, LPS)誘導小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 的發炎反應的影響，推斷紅甘蔗汁萃取出物(SJM)針對小鼠巨噬細胞 RAW264.7 有明確的抗發炎作用，並且經由 MAPK 及 STAT 路徑為主，NF- $\kappa$ B 路徑為輔，調控相關抗發炎的蛋白，如：iNOS、COX-2、IL-6 及 TNF- $\alpha$ 。並且在動物實驗上也有確實的降低 AST 和 ALT 的數值，在組織 H&E 染色切片上也可觀察到明顯的降低發炎的現象，此外在實驗組(CCl<sub>4</sub>+SJM 40 mg/kg)也觀察到有細胞分裂的現象，這顯示紅甘蔗汁有促使肝臟組織進行修補機制，至於在活體動物上抑制相關蛋白之機制，本實驗期望後續會繼續進行探討。



## 捌、 參考文獻

1. Akira S., Taga T., Kishimoto T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immuno*, 54, 1-78.
2. Ben-Av. P., Crofford L. J., Wilder R. L., Hla T. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, 372, 83-87.
3. Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19, 2474-2488.
4. Cheng A., Yan H., Han C., Wang W., Tian Y., Chen X. (2014). Polyphenols from blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Int J Biol Macromol*, 69, 382-387.
5. Chen X., Gan Y., Li W., Su J., Zhang Y., Huang Y., Roberts A.I., Han Y., Li J., Wang Y., Shi Y. (2014). The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation. *Cell Death Dis*, 5, e1009.
6. Coffey P. J., Koenderman L., de Groot R. P. (2000). The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*, 19, 2511-2522.
7. Djeridane A., Hamdi A., Bensania W., Cheifa K., Lakhdari I., Yousifa M. (2013). The in vitro evaluation of antioxidant activity,  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Diabetes Metab Syndr*, 16, s1871-4201.
8. Elipoulos A. G., Dumitru C. D., Wang C. C., Cho J., Tsihchlis P. N. (2002). Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J*, 21, 4831-4840.
9. Eissa N. T., Yuan J. W., Haggerty C. M., Choo E. K., Palmer C. D., Moss J. (1998). Cloning and characterization of human inducible nitric oxide synthase splice variants: A domain, encoded by exons 8 and 9, is critical for dimerization. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 7625-7630.

10. Groeneveld P. H., Kwappenberg K. M., Langermans J. A., Nibbering P. H., Curtis L. (1997). Relation between pro- and anti-inflammatory cytokines and the production on nitric oxide (NO) in severe sepsis. *Cytokine*, 9, 138-142.
11. Guha M., Mackman N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell signal*, 13, 85-94.
12. Haegeman G., Content J., Volckaert G., Derynck R., Tavernier J., Fiers W. (1986). Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *European J Biochem*, 159, 625-632.
13. Hanada T., Yoshimura A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 413-421.
14. Hirano T., Yasukawa K., Harada H., Taga T., Watanabe Y., Matsuda T., Kashiwamura S., Nakajima K. Koyama K. Iwamatsu A., et al. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 73-76.
15. Hwang D., Jang B. C., Yu G., Boudreau M. (1997). Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol*, 54, 87-96.
16. Kaminska B. (2005). MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*, 1754, 253-262.
17. Kiss A., Lotz G., Kaposi N. P., Schaff Z. (2002). Hepatitis viruses and hepatocarcinogenesis. *Orv Hetil*, 143, 83-86.
18. Leever, S. J., Paterson H. F., and Marshall, C. J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, 369, 411-414.

19. Levy D. E., Lee C. K. (2002). What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109, 1143-1148.
20. Lin T. S., Mahajan S., Franck D. A. (2000). STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene*, 19, 2496-2504.
21. Liu X., Wang Z., Ye N., Chen Z., Zhou X., Teng X., Huang N., Liu N., Zhang N., Guan T., Mao Y., Kan B., Wei Y., Li J. (2013). A protective role of IL-30 via STAT and ERK signaling pathways in macrophage-mediated inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*, 435, 306-312.
22. Liu J., Wang X., Liu R., Liu Y., Zhang T., Fu H., Hai C. (2014). Oleanolic acid co-administration alleviates ethanol-induced hepatic injury via Nrf-2 and ethanol-metabolizing modulating in rats. *Chem Biol Interact*, 221C, 88-98.
23. Liu Y., Liu Q., Ye G., Khan A., Liu J., Gan F., Zhang X., Kumbhar S., Huang K. (2015). The protective effects of Selenium-enriched probiotics on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Agric Food Chem*, 63, 242-249.
24. Marshall C. J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase, MAP kinase. *Current opinion in genetics and development.*, 4, 82-89.
25. Mandrekar P., Szabo G. (2009). Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol*, 50, 1258-1266
26. Marrack P., Kappler J. (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, 248, 705-711.
27. May L. T., Helfgott D. C., Sehgal P. B. (1986). Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved. *Proc Natl Acad Sci*, 83, 8957-8961.
28. Musial A., Eissa N. T. (2001). Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem*, 276, 24268-24273.
29. Nathan C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*,

79, 319-323.

30. Nussler A. K., Billiar T. R. (1993). Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leuk Biol*, 54, 171-178.
31. Ohshima H., Bartsch H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res*, 305, 253-264.
32. Pikarasky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, K., Kasem S., Elena, G. P., Simcha, U. S., Galun, E., and Yinon, B. N. (2004). NF- $\kappa$ B functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431, 461-466.
33. Ponmari G., Annamalai A., Gopalakrisnam V. K., Lakshmi P. T., Guruvatoorappan C. (2014). NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory cytokines mediated protective effect of *Indigofera caerulea* Roxb. on CCl<sub>4</sub>-induced liver damages in rats. *Int Immunopharmacol*, 23, 672-680.
34. Rietschel E. T., Kikirae T., Schade F.U., Mamat U., Schmide G., Loppnow H., Ulmer A. J., Zahringer U., Seydel U., Padova F. D. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, 8, 217-225.
35. Robinson M. J., Stippec S. A., Goldsmith E., White M. A., Cobb, M. H. (1998). A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol*, 8, 1141-1150.
36. Sautebin L. (2000). Prostaglandins and nitric oxide as molecular target for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia*, 71, S48-57.
37. Schwacha M. G. (2003). Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns*, 29, 1-14.
38. Sen, R and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding. *Cell*, 47, 921-928.
39. Sheng H., Shao J., Morrow J.D., Beauchamp R. D., DuBois R. N. (1998).

Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E<sub>2</sub> in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 58, 362-366.

40. Shore P., Whitmarsh A. J., Bhaskaran R., Davis R. J., Waltho J. P., Sharrocks, A. D. (1996). Determinants of DNA-binding specificity of ETS-domain transcription factors. *Mol Cell Biol*, 16, 3338-3349.
41. Stokoe, D., Macdonald S. G., Cadwallader, K., Symons, M and Hancock, J. F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264, 1463-1467.
42. Subbaramaiah K., Zakim D., Weksler B. B., Dannenberg A. J. (1997). Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med*, 216, 201-210.
43. Tang C. C., Lin W. L., Lee Y. J., Tang Y. C., Wang C. J. (2014). Polyphenol-rich extract of *Nelumbo nucifera* leaves inhibits alcohol-induced steatohepatitis via reducing hepatic lipid accumulation and anti-inflammation in C57BL/6J mice. *Food Funct*, 5, 678-687.
44. Vodovotz Y., Lucia M. S., Flanders K. C., Chesler L., Xie Q., Smith T. W., Weidner J., Mumford R., Webber R., Nathan C., Roberts A. B., Lippa C. F., Sporn M. B. (1996). Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med*, 184, 1425-1433.
45. Wang H., Wang L., Li N. L., Li J. T., Yu F., Zhao Y. L., Wang L., Yi J., Wang L., Bian J. F., Chen J. H., Yuan S. F., Wang T., Lv Y. G., Liu N. N., Zhu X. S., Ling R., Yun J. (2014). Subanesthetic isoflurane reduces zymosan-induced inflammation in murine Kupffer cells by inhibiting ROS-activated p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 851692
46. Weber L., Boll M. and Stampfl A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33, 105-136.
47. Yu D., Sakurai Y., Chen C. H., Chang F. R., Huang L., Kashiwada Y., Lee K. H.

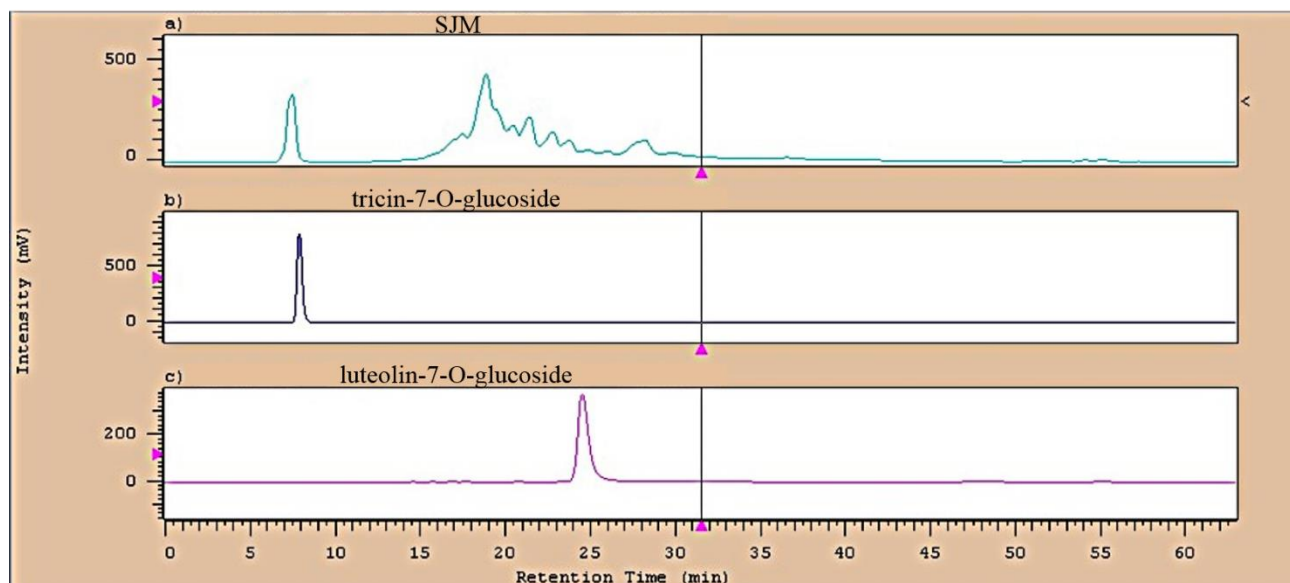
- (2006). Anti-AIDS agent 69. Moronic acid and other triterpene derivatives as novel potent anti-HIV agents. *J Med Chem*,49, 5462-5469.
48. Zhang X., Tao N., Wang X., Chen F., Wang M. (2015). The colorants, antioxidants and toxicants from nonenzymatic browning reactions and the impacts of dietary polyphenols on their thermal formation. *Food Funct*, 3, in press.
49. Zilberstein A., Ruggieri R., Korn J. H., Revel M. (1986). Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J*, 5, 2529–2537.
50. Zimmerman M. A., Singh N., Martin P. M., Thangaraju M., Ganapathy V., Waller J. L., Shi H., Robertson K. D., Munn D. H., Liu K.(2012). Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent Fas upregulation and Fas-mediated apoptosis of T cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302, G1405-1415.
51. 王錫崗等編譯, (2006), 人體生理學(第四版)



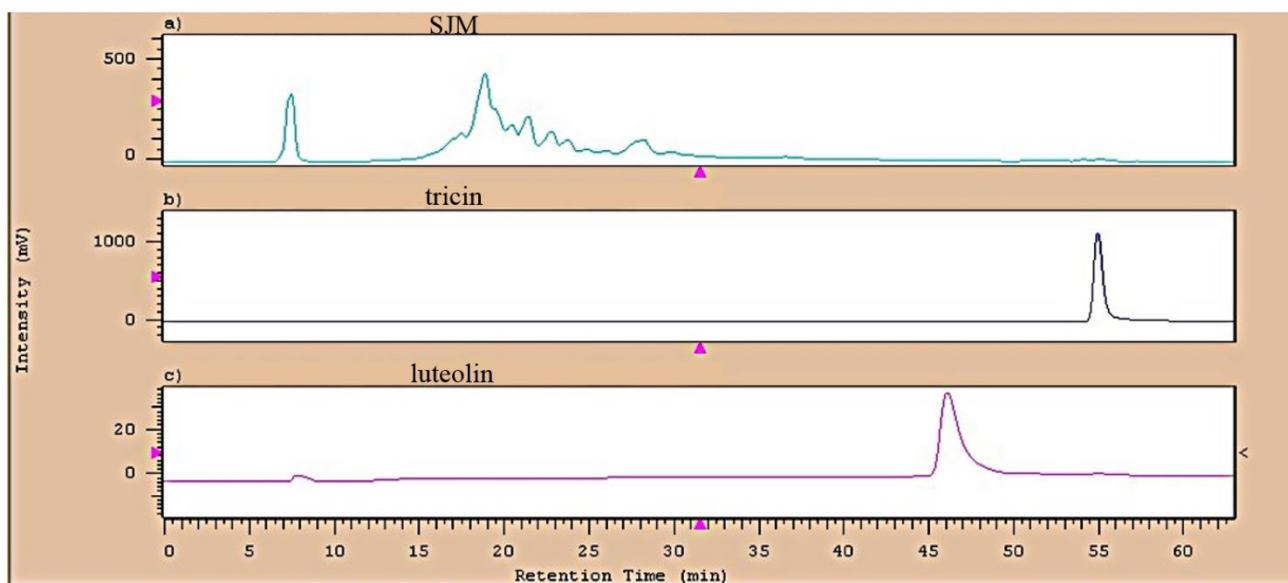
## 玖、圖表說明

	SJM	original saccharum juice
Total phenols	5.98 g Gallic Acid / 100 mL	19.54 g Gallic Acid / 100 mL
Total flavonoids	11.62 g Quercetin / 100 mL	18.62 g Quercetin / 100 mL
Total polysaccharides	31.36 g Glucose / 100 mL	921 g Glucose / 100 mL

**Table 1. Comparison between SJM and original saccharum juice.** We found that SJM contains 5.98 g Gallic acid and 11.62 g Quercetin in 100 mL saccharum juice. Though SJM still has lots of polysaccharides, it has been mostly desaccharified by Amberlite XAD-2, the ion-exchange resin, comparing to original saccharum juice.

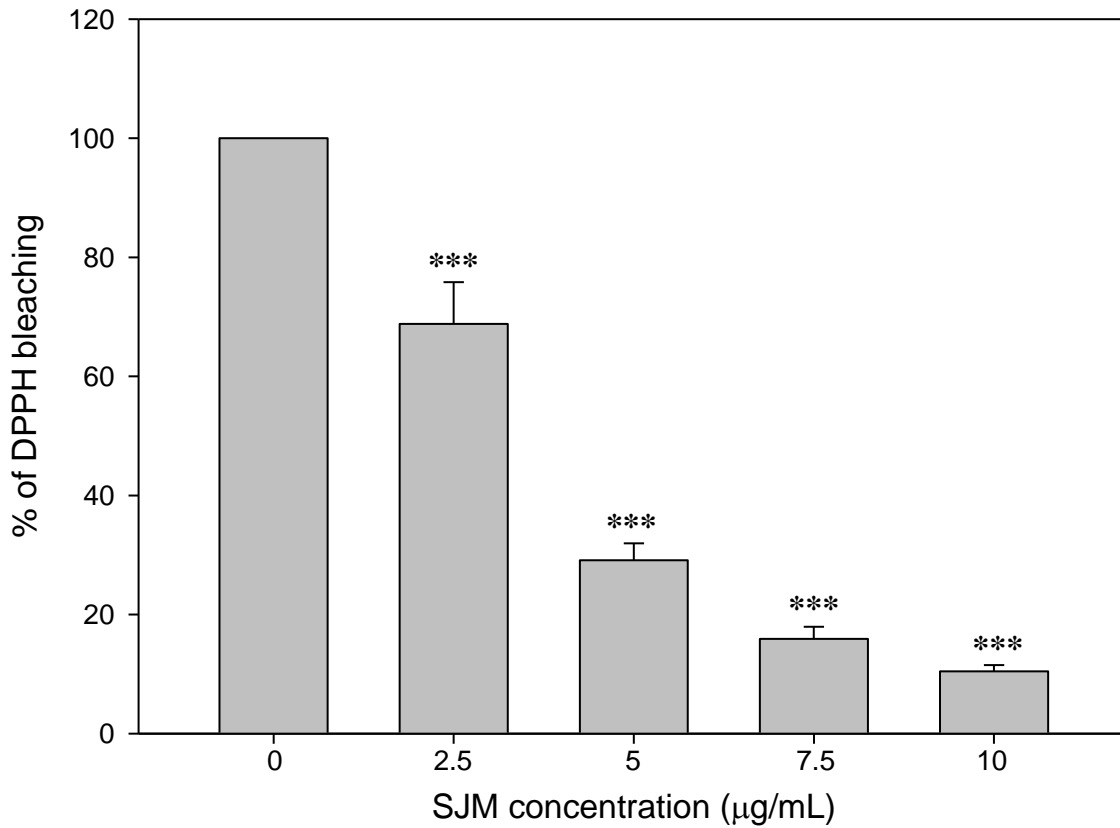


**Figure 1. HPLC analysis of SJM.** (A) Fingerprint of SJM, (B) triclin-7-O-glucoside, (C) luteolin-7-O-glucoside. Retention time :  $t_R=7.91$  minutes for triclin-7-O-glucoside and  $t_R=24.55$  minutes for luteolin-7-O-glucoside. The detection was at 370 nm and the gradient solvent in RP-18 column as described in the text.

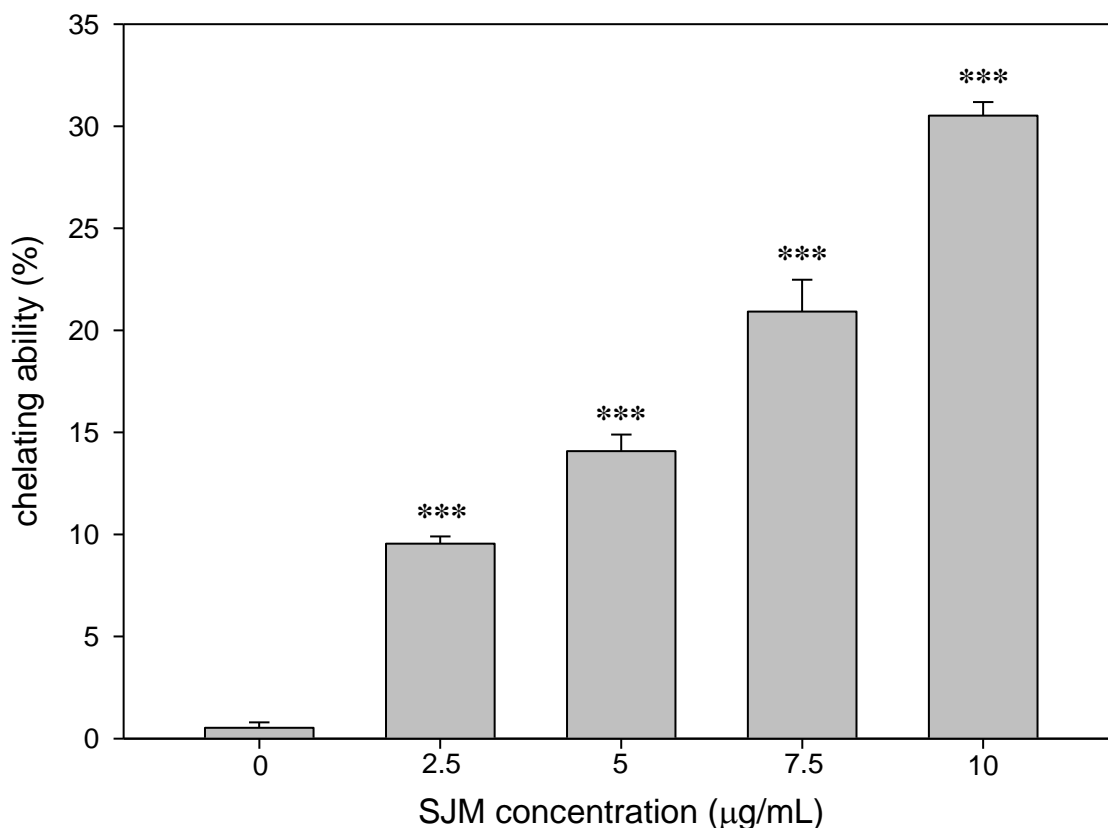


**Figure 2. HPLC analysis of SJM. (A) Fingerprint of SJM, (B) triclin, (C)luteolin.**

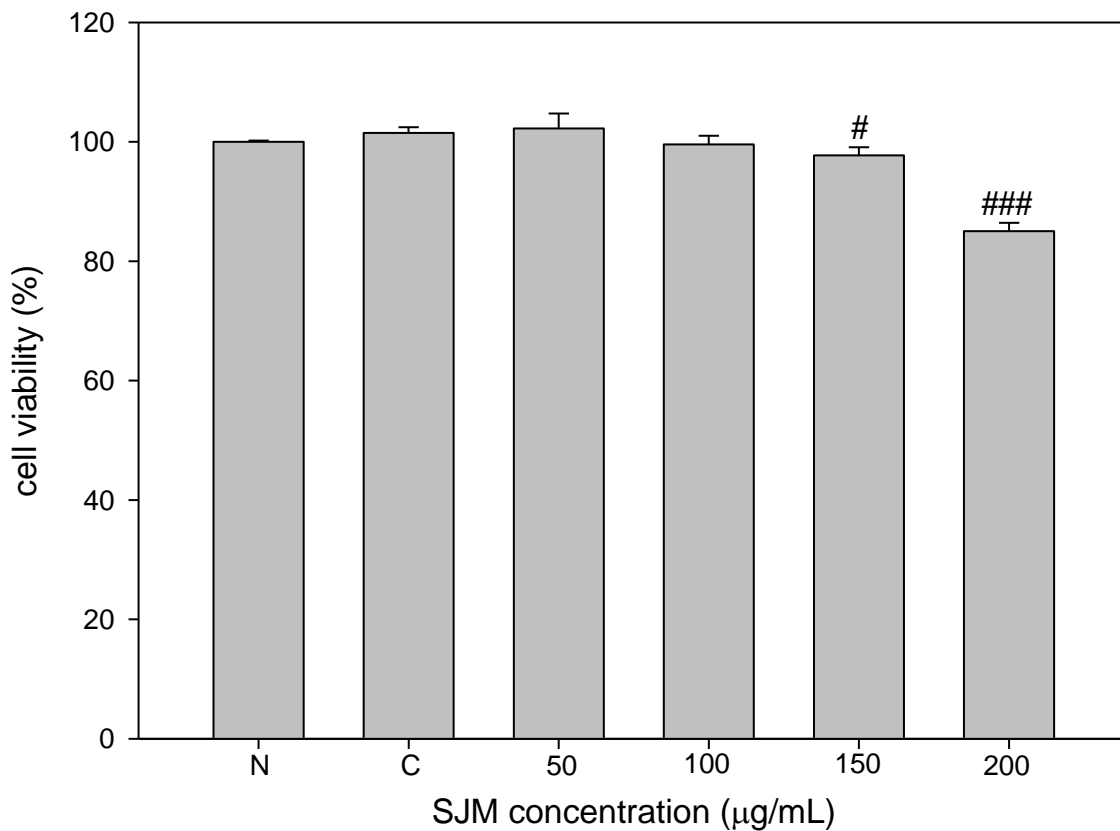
Retention time :  $t_R=54.92$  minutes for triclin and  $t_R=46$  minutes for luteolin. The detection was at 370 nm and the gradient solvent in RP-18 column as described in the text.



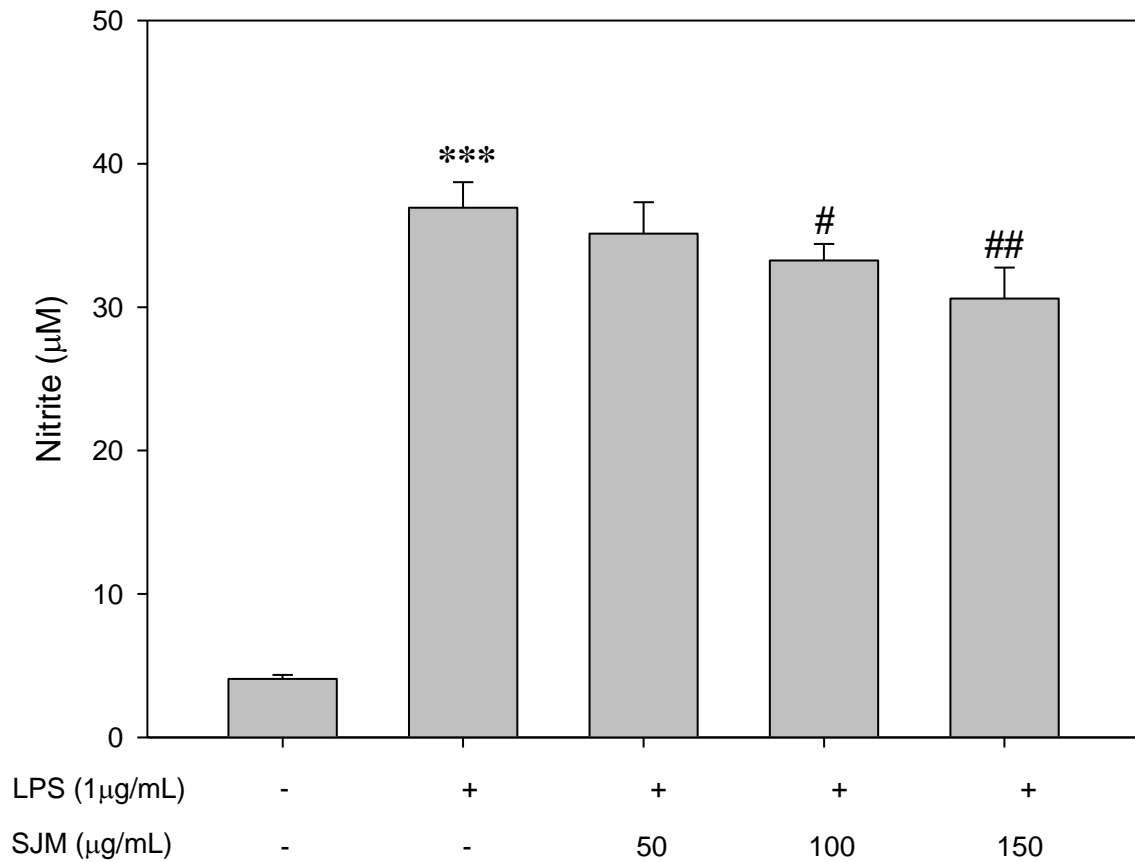
**Figure 3. Effect of DPPH free radical scavenging of SJM.** The reaction was started by addition of DPPH to the test sample. The decrease of absorbance of DPPH was recorded at 517 nm after 30 minutes reaction in the dark. Percent of DPPH bleaching (%) =  $[(\text{control O.D.} - \text{sample O.D.}) / (\text{control O.D.})] \times 100\%$ . Data presented as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*\*\*  $p < 0.001$ , compared with control (lane 1).



**Figure 4. Effect of ferrous chelating ability of SJM.** The reaction was started by addition of 2 mM FeCl<sub>2</sub> and 5 mM ferrozine to the test sample. The increase of absorbance of ferrous chelating ability was recorded at 562 nm after 10 minutes reaction in the dark. Percent of ferrous chelating ability (%) = [(control O.D. – sample O.D.) / (control O.D.)] × 100%. Data presented as means ± S.D. of three independent experiments. \*\*\*  $p < 0.001$ , compared with control (lane 1).



**Figure 5. The cytotoxicity effect of SJM on RAW 264.7 cells by MTT assay.** RAW 264.7 cells were seeded in 24-well plate at  $5 \times 10^4$  cells / well. After attachment, RAW 264.7 cells were treated with various concentration of SJM for 24 hours, and measured the absorbance 540 nm after incubated with MTT for 4 hours. Percent of cell viability (%) =  $[(\text{sample O.D.}) / (\text{control O.D.})] \times 100\%$ . Data presented as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ , compared with control (0.2% DMSO).

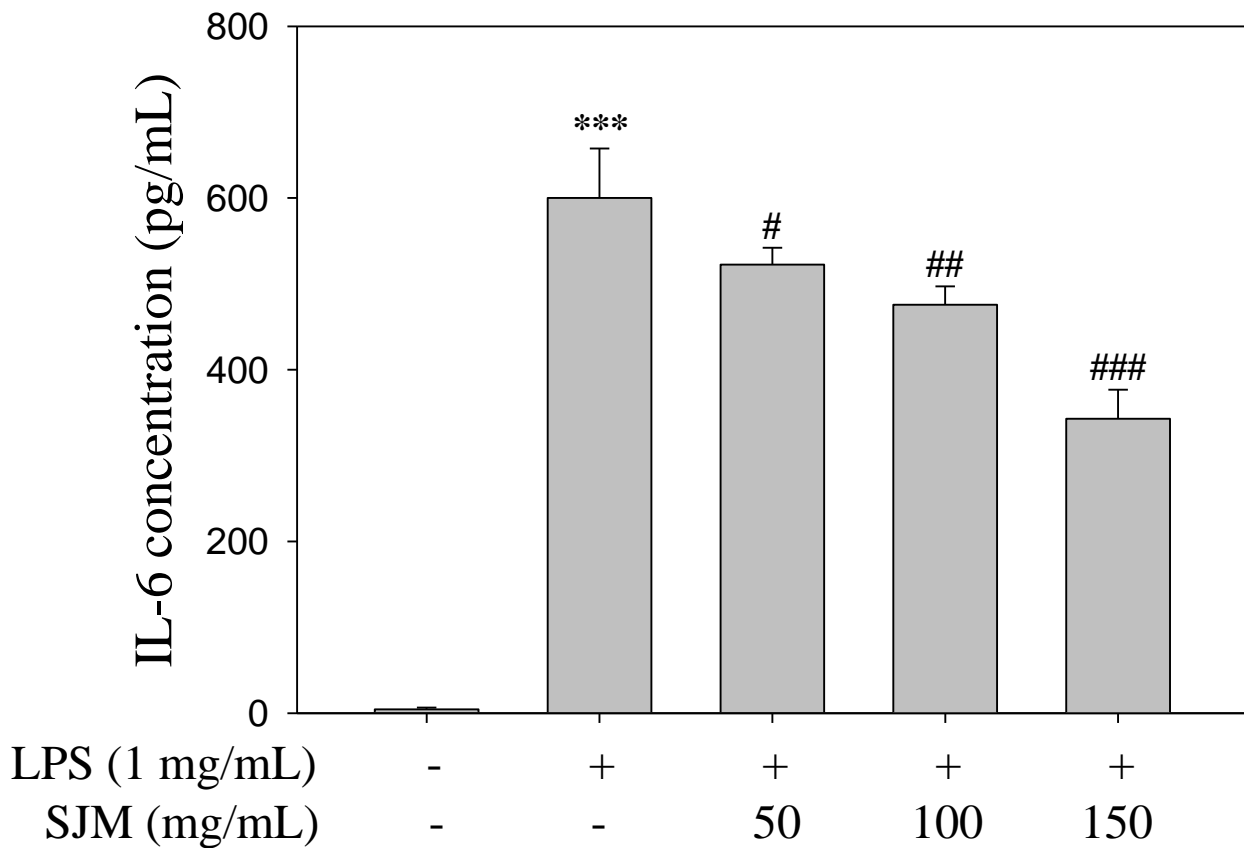


**Figure 6. Effects of SJM on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells.**

RAW 264.7 cells ( $5 \times 10^5$  cells / well) were treated with various concentration of SJM for 30 minutes and stimulates with or without 1µg/mL of LPS for 24 hours.

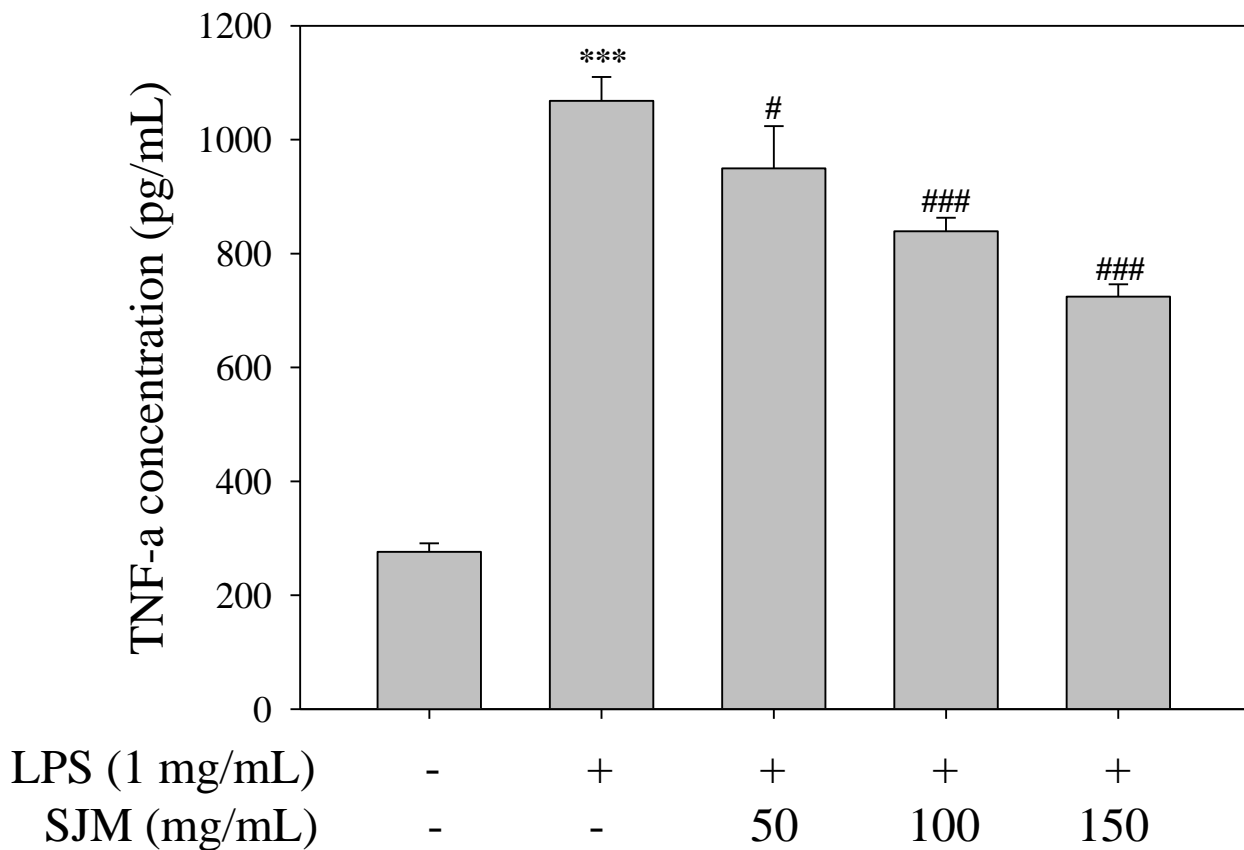
Supernatants were collected for nitrite analysis by Griess reagent and determined by 550 nm. Data presented as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

\*\*\* $p < 0.001$ , compared with control (lane 1). #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , compared with LPS stimulation.



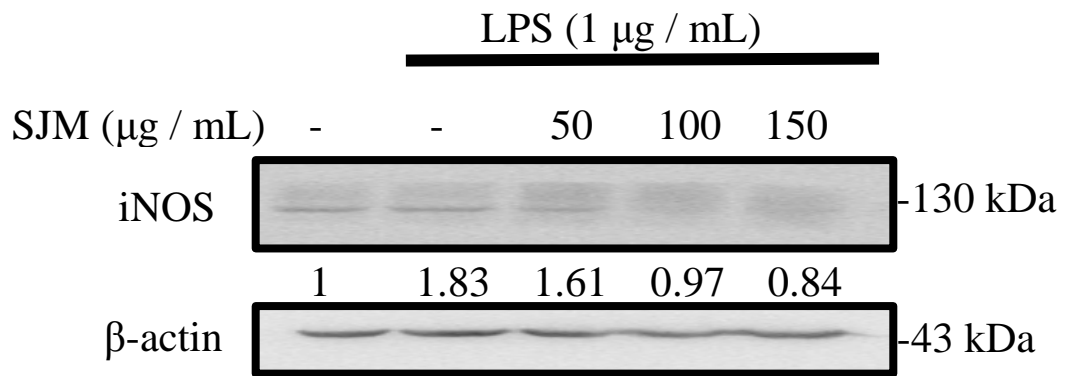
**Figure 7. Effects of SJM on LPS-induced IL-6 production in supernatants of RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $5 \times 10^5$  cells / well) were treated with various concentration of SJM for 30 minutes and stimulates with or without  $1 \mu\text{g/mL}$  of LPS for 24 hours. Supernatants were collected and IL-6 analysis was performed by ELISA assay determined by 450 nm. Data presented as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control (lane 1). #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , compared with LPS stimulation.



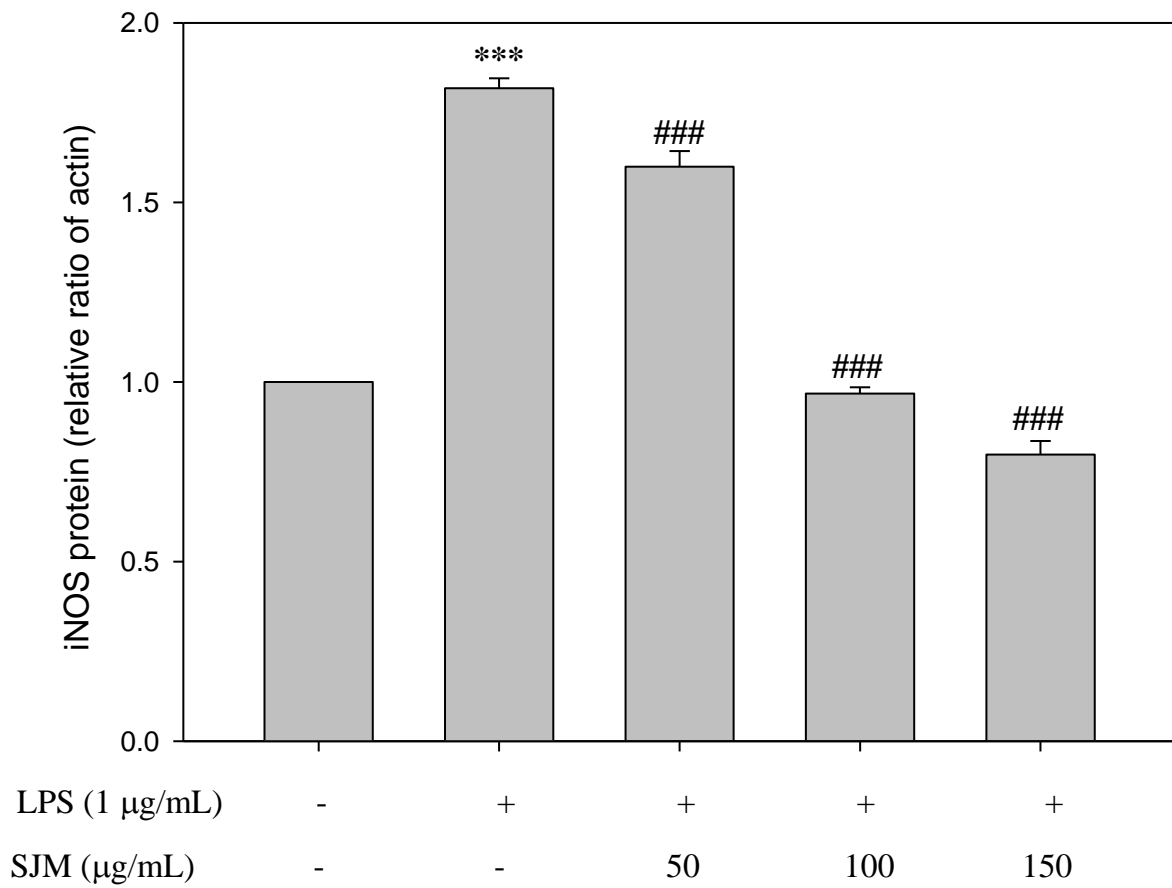


**Figure 8. Effects of SJM on LPS-induced TNF- $\alpha$  production in supernatants of RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $5 \times 10^5$  cells / well) were treated with various concentration of SJM for 30 minutes and stimulates with or without  $1 \mu\text{g/mL}$  of LPS for 24 hours. Supernatants were collected and TNF- $\alpha$  analysis was performed by ELISA assay determined by 450 nm. Data presented as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control (lane 1). #  $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ , compared with LPS stimulation.

(A)

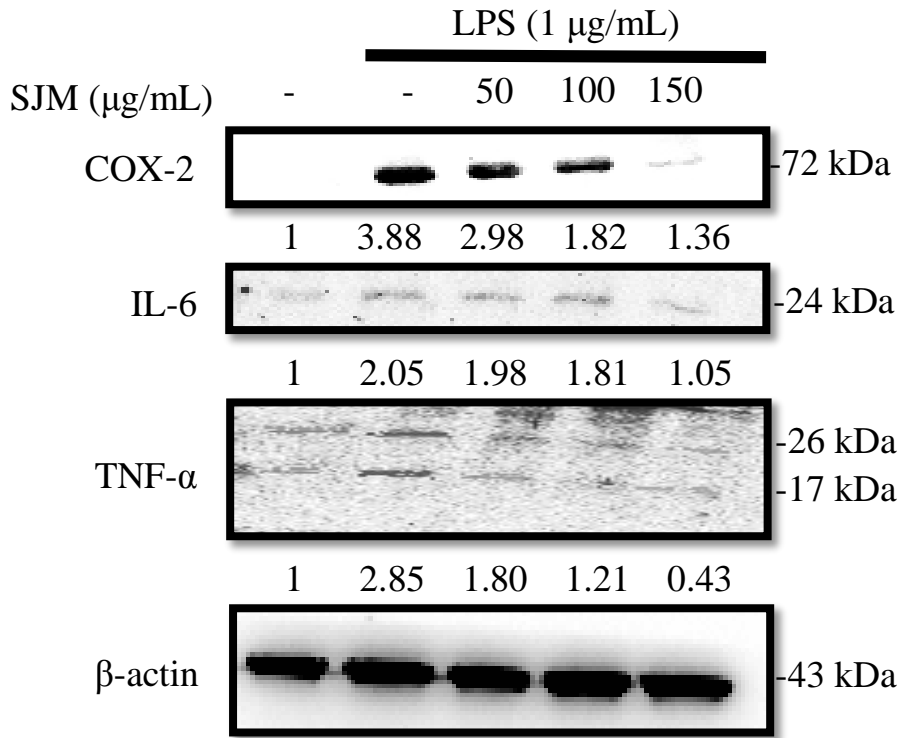


(B)

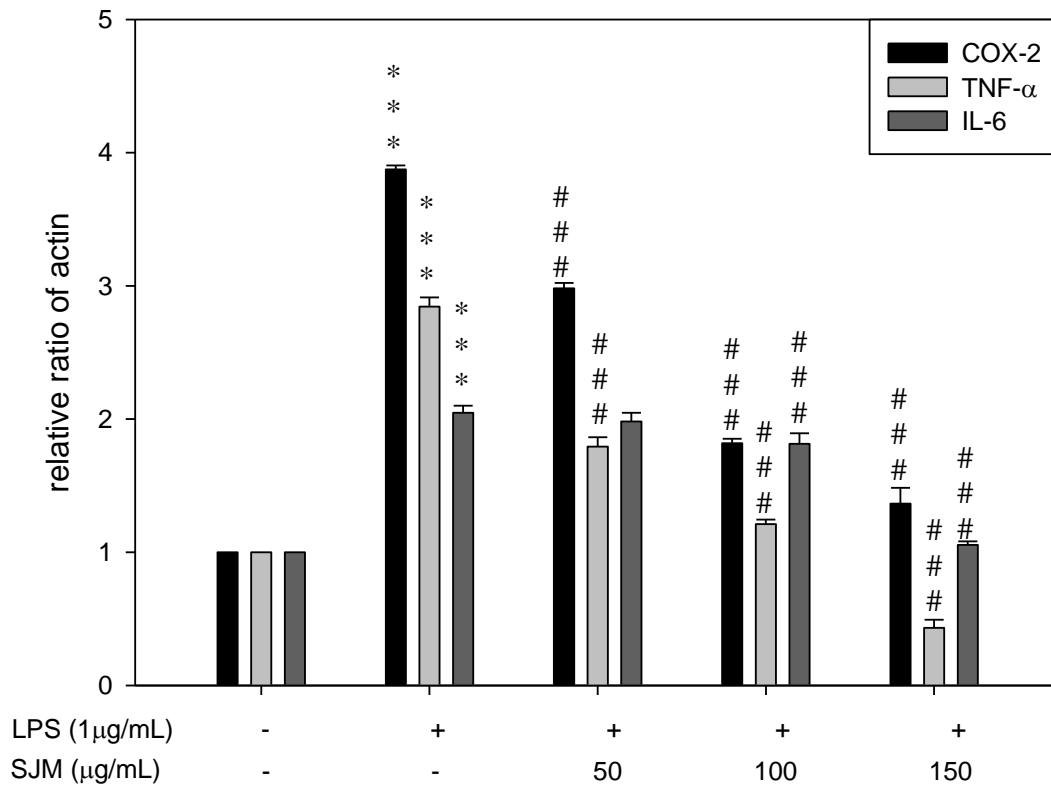


**Figure 9. Effects of SJM on iNOS protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells by western blotting assay.** RAW 264.7 cells were treated with various concentration of SJM for 30 minutes and stimulates with or without 1µg/mL of LPS for 24 hours and the cells were collected for protein extraction. (A) Approximately 45 µg of protein extract from each sample was subjected to SDS-PAGE and immunoblotting was performed using iNOS antibody, and β-actin as internal control. (B) The average densitometric values of three independent experiments is shown as means ± S.D. \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control (lane 1). ### $p < 0.001$ , compared with LPS stimulation.

(A)

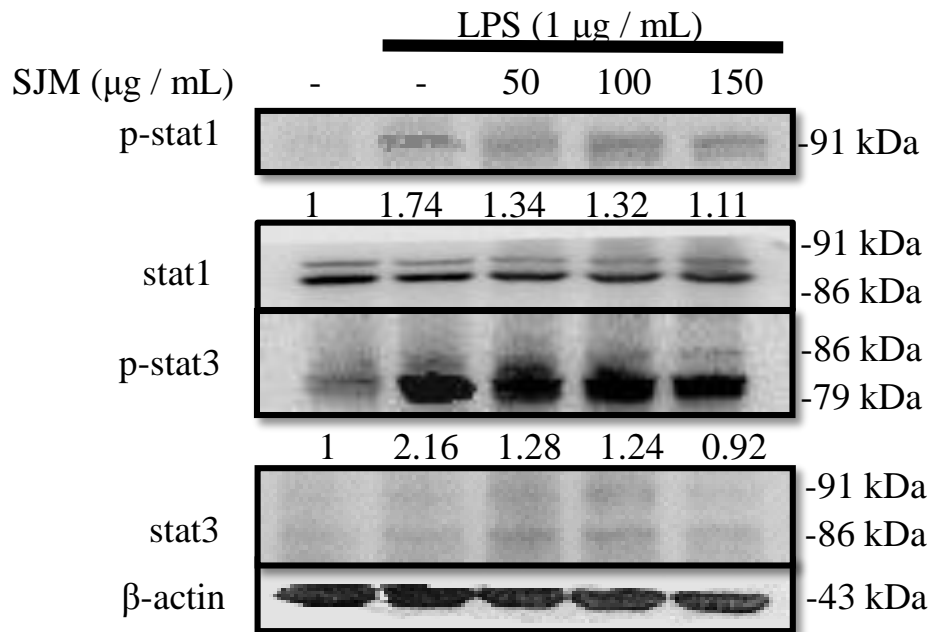


(B)

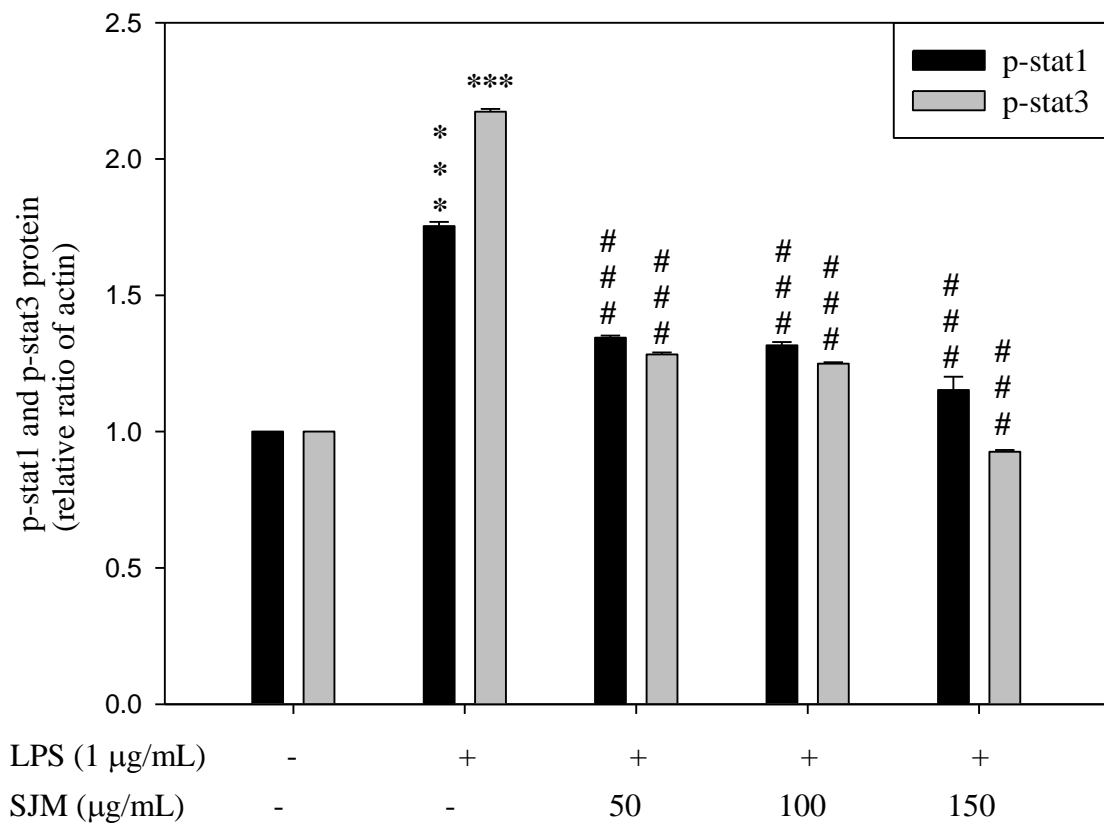


**Figure 10. Effects of SJM on COX-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  proteins expression in LPS-induced RAW 264.7 cells by western blotting assay.** RAW 264.7 cells were treated with various concentration of SJM for 30 minutes and stimulates with or without 1  $\mu$ g/mL of LPS for 24 hours and the cells were collected for protein extraction. (A) Approximately 40  $\mu$ g of protein extract from each sample was subjected to SDS-PAGE and immunoblotting was performed using COX-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  antibodies, and  $\beta$ -actin as internal control. (B) The average densitometric values of three independent experiments is shown as means  $\pm$  S.D. \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control (lane 1). ### $p < 0.001$ , compared with LPS stimulation.

(A)

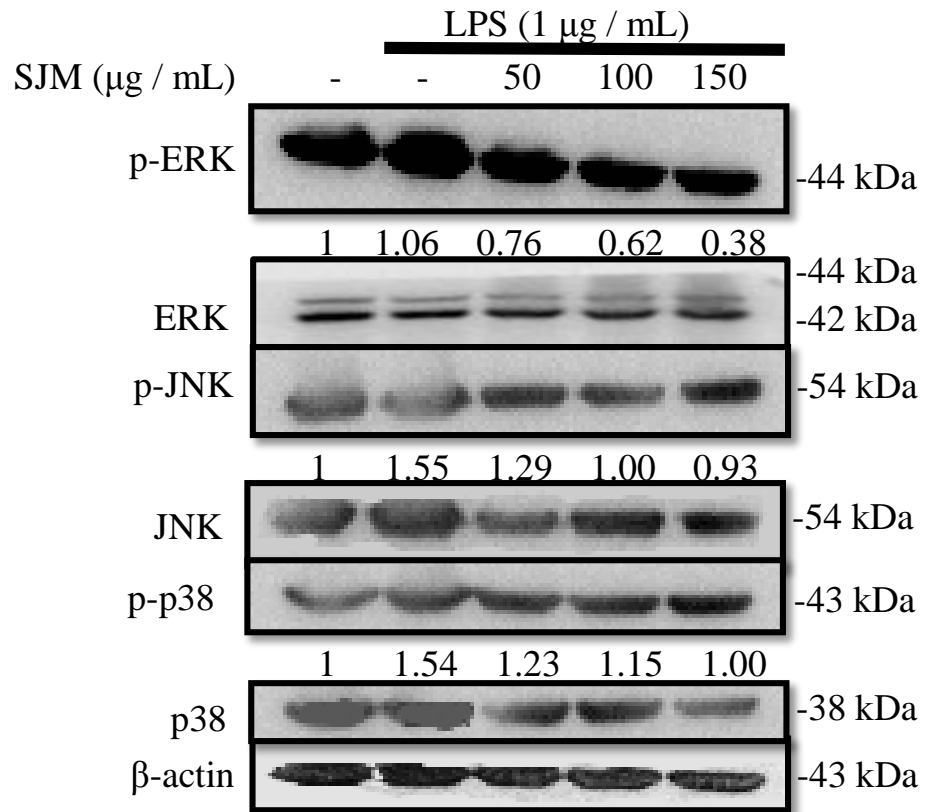


(B)

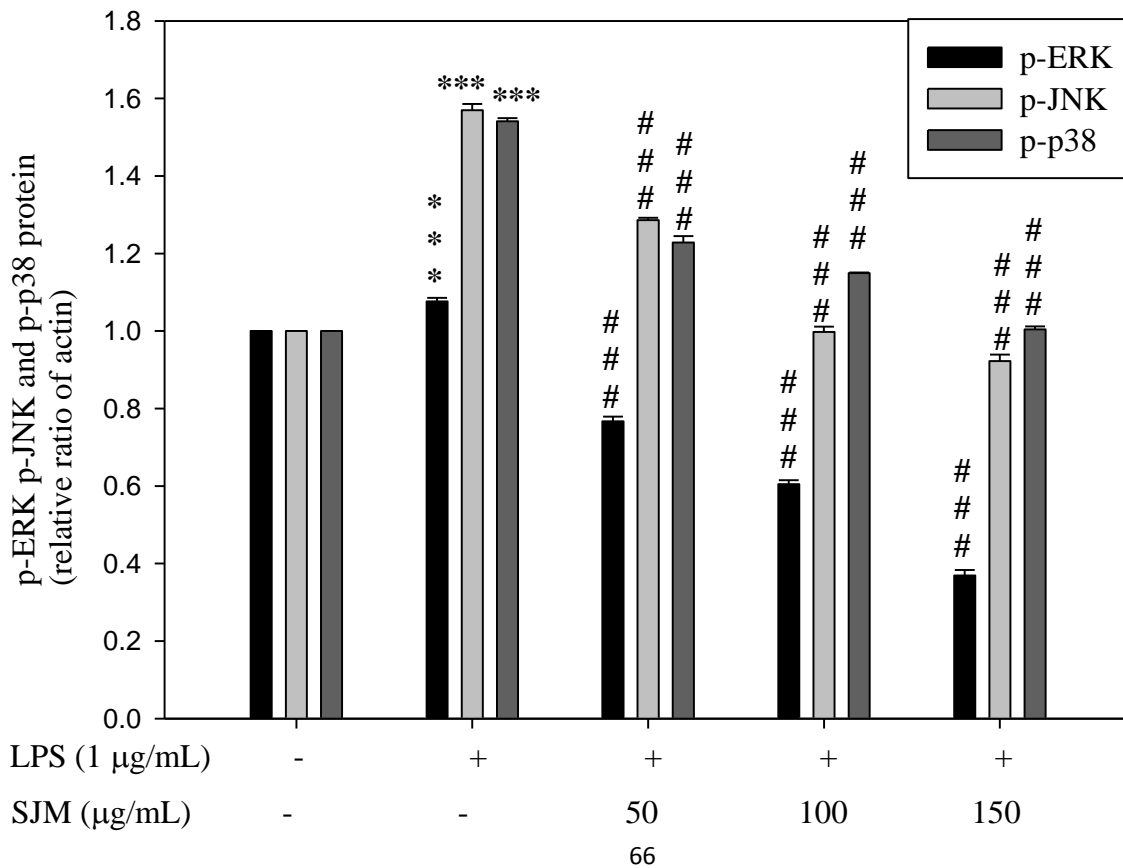


**Figure 11. Effects of SJM on the activation of STAT 1 and STAT 3 pathway in LPS-induced RAW 264.7 cells by western blotting assay.** RAW 264.7 cells were treated with various concentration of SJM for 30 minutes and stimulates with or without 1 µg/mL of LPS for 24 hours and the cells were collected for protein extraction. (A) Approximately 45 µg of protein extract from each sample was subjected to SDS-PAGE and immunoblotting was performed using STAT 1, p-STAT 1, STAT 3, p-STAT 3 antibodies, and β-actin as internal control. (B) The average densitometric values of three independent experiments is shown as means ± S.D. \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control (lane 1). ### $p < 0.001$ , compared with LPS stimulation.

(A)



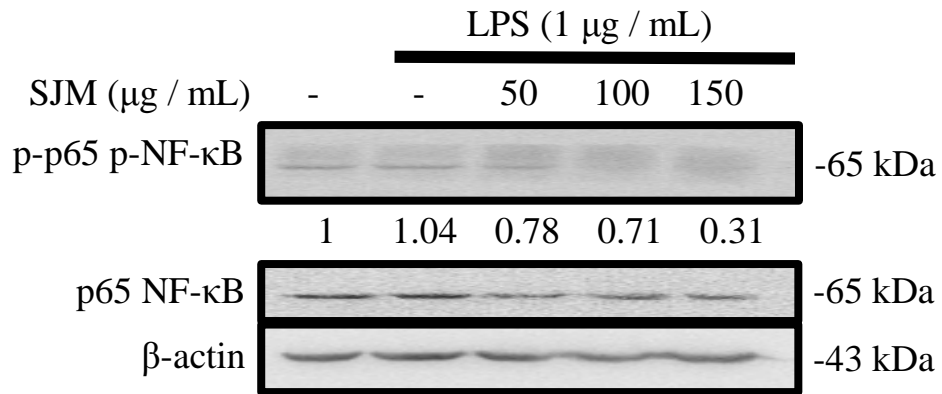
(B)



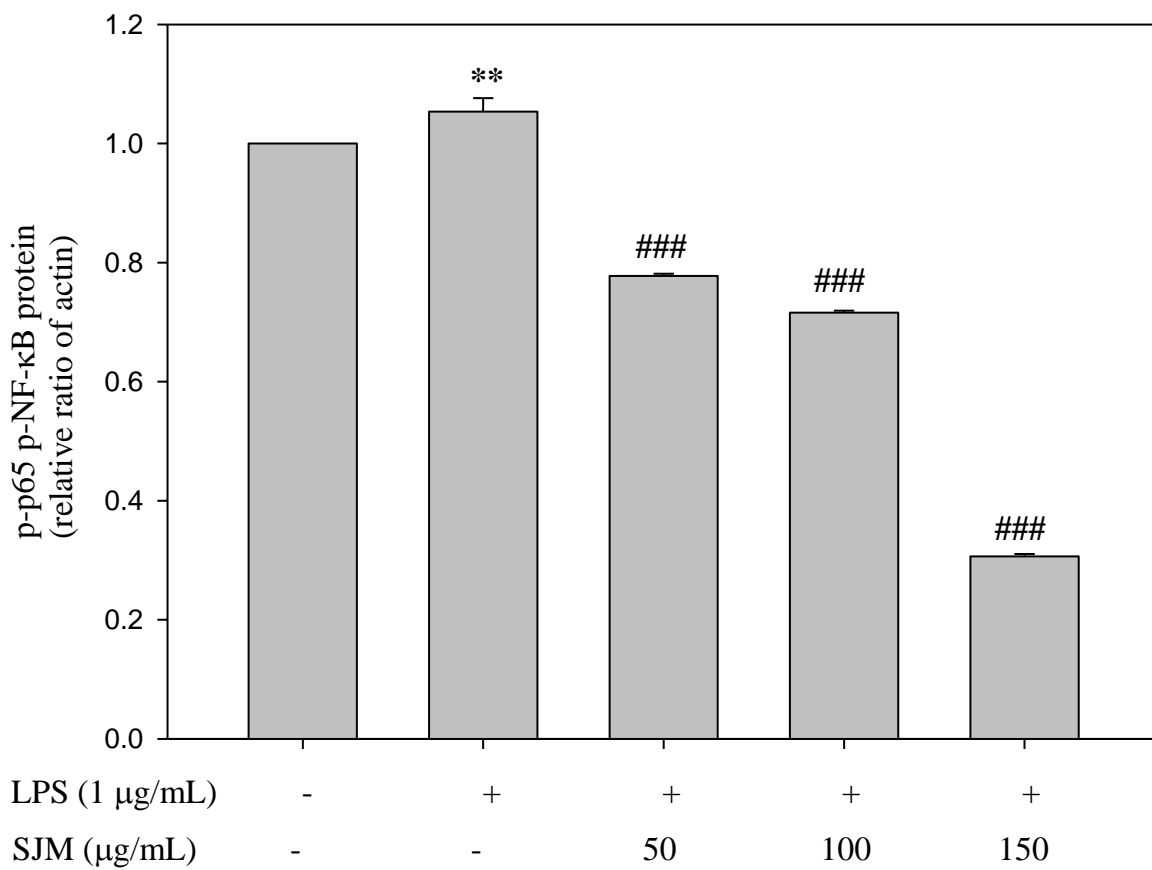


**Figure 12. Effects of SJM on the activation of MAPK pathway in LPS-induced RAW 264.7 cells by western blotting assay.** RAW 264.7 cells were treated with various concentration of SJM for 30 minutes and stimulates with or without 1µg/mL of LPS for 24 hours and the cells were collected for protein extraction. (A) Approximately 45 µg of protein extract from each sample was subjected to SDS-PAGE and immunoblotting was performed using ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38 antibodies, and β-actin as internal control. (B) The average densitometric values of three independent experiments is shown as means ± S.D. \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control (lane 1). ### $p < 0.001$ , compared with LPS stimulation.

(A)



(B)

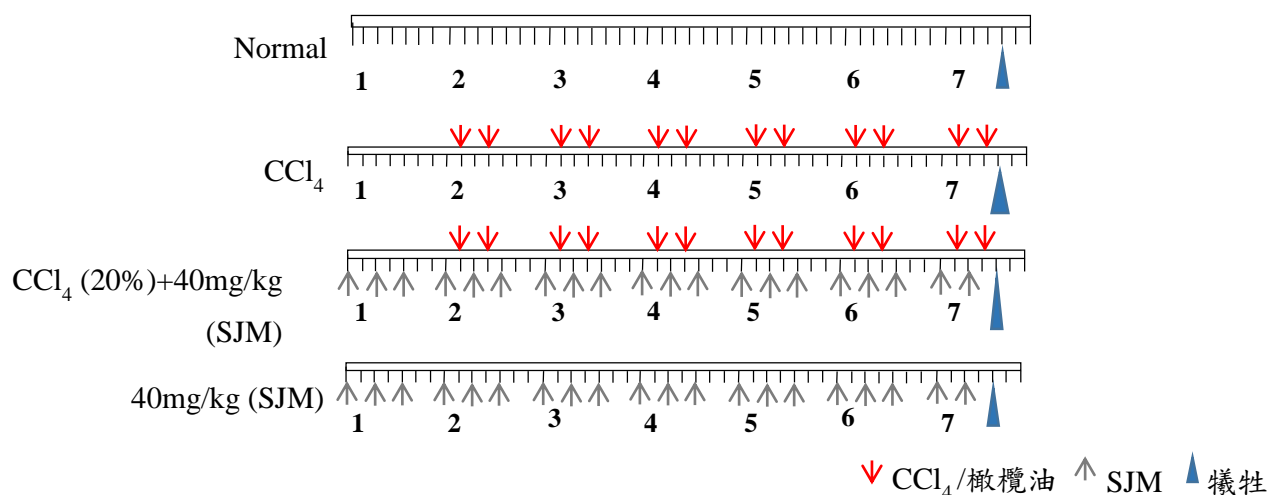


**Figure 13. Effects of SJM on the activation of NF- $\kappa$ B pathway in LPS-induced RAW 264.7 cells by western blotting assay.** RAW 264.7 cells were treated with various concentration of SJM for 30 minutes and stimulates with or without 1  $\mu$ g/mL of LPS for 24 hours and the cells were collected for protein extraction. (A) Approximately 45  $\mu$ g of protein extract from each sample was subjected to SDS-PAGE and immunoblotting was performed using p65 (NF- $\kappa$ B ), p- p65 (p-NF- $\kappa$ B ) antibodies, and  $\beta$ -actin as internal control. (B) The average densitometric values of three independent experiments is shown as means  $\pm$  S.D. \*\* $p < 0.01$ , compared with control (lane 1). ### $p < 0.001$ , compared with LPS stimulation.

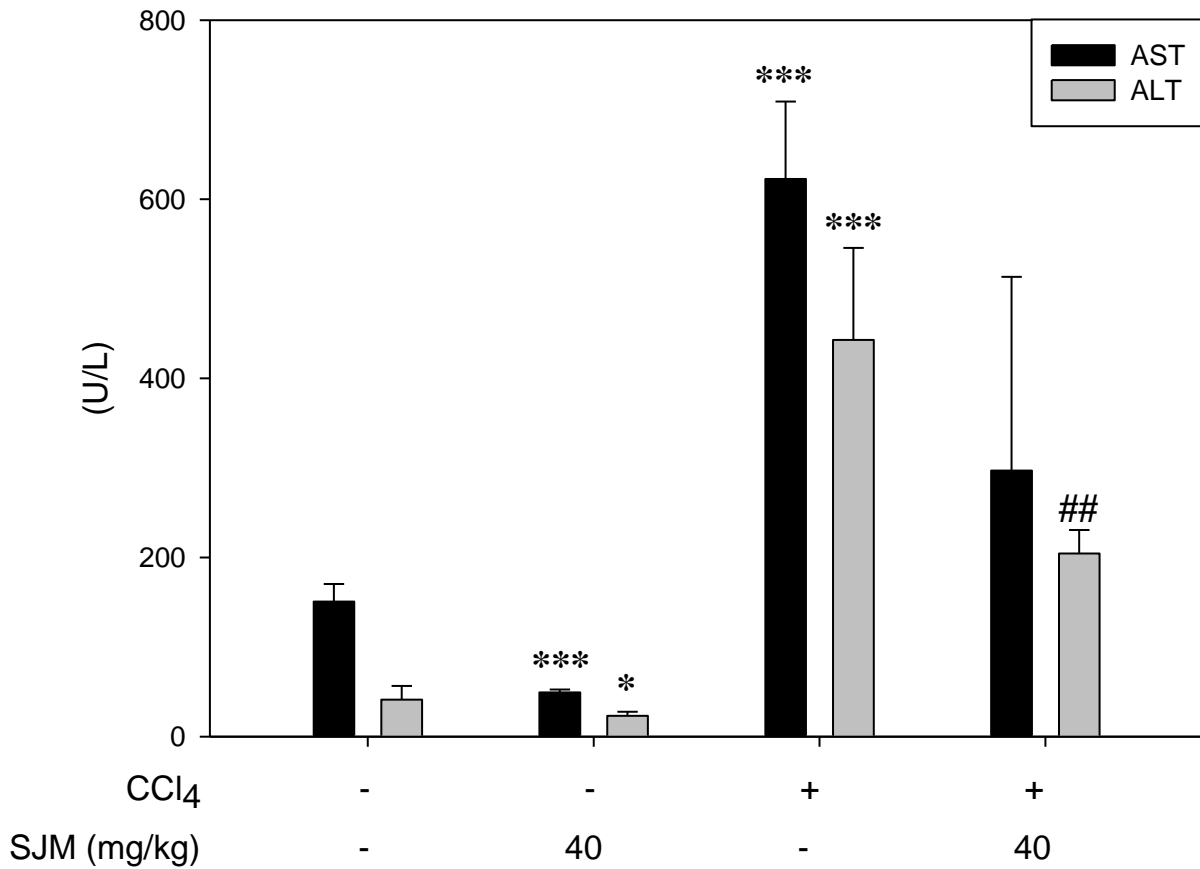
(A)

	1(Normal)	2(Inducer)	3(Experimental)	4(Alone)
CCl <sub>4</sub> (20%) (ig)	-	+	+	-
SJM 40mg/kg (ip)	-	-	+	+

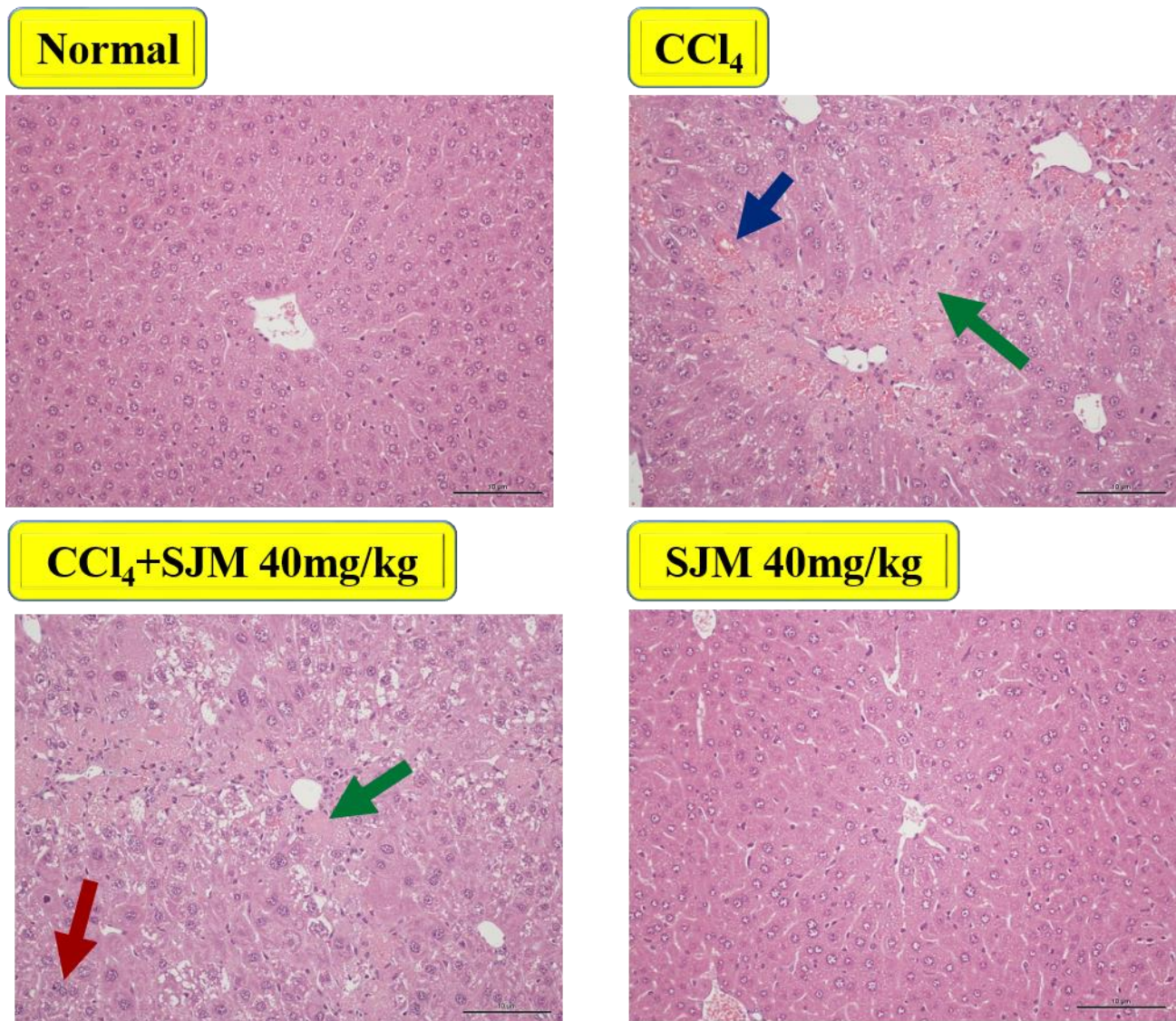
(B)



**Figure 14. *In vivo* experiment design.** (A) Mice were randomly divided into 4 groups; normal, CCl<sub>4</sub>-induced group, CCl<sub>4</sub>+SJM 40mg/kg and SJM 40mg/kg. (B) Animals were injected with SJM intraperitoneally at 40 mg/kg three times a week (↑). The symbol (↓) represents daily intragastric administration of CCl<sub>4</sub> (20%) twice a week. The total experimental period was 7 weeks. Mice were sacrificed (▲) at the end of 7 weeks after the last inducer.



**Figure 15. Effect of SJM on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in mice.** Hepatotoxicity was determined by quantifying the serum activity of AST and ALT. Results are the means  $\pm$  S.D. (n=6). \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control group (lane 1); ## $p < 0.01$ , compared with CCl<sub>4</sub>-treated alone group (lane 3).



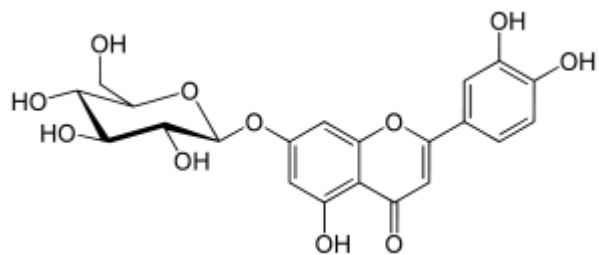
**Figure 16. Effect of SJM on histologic changes and liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in mice.** The sections of mice liver were stained with hematoxylin-eosin (original magnification 200×) and examined by a blinded histologist. The symbol ( ↓ ) represents inflammation zone, the symbol ( ↓ ) represents necrosis, and the symbol ( ↓ ) represents cell division.

## 壹拾、 附圖

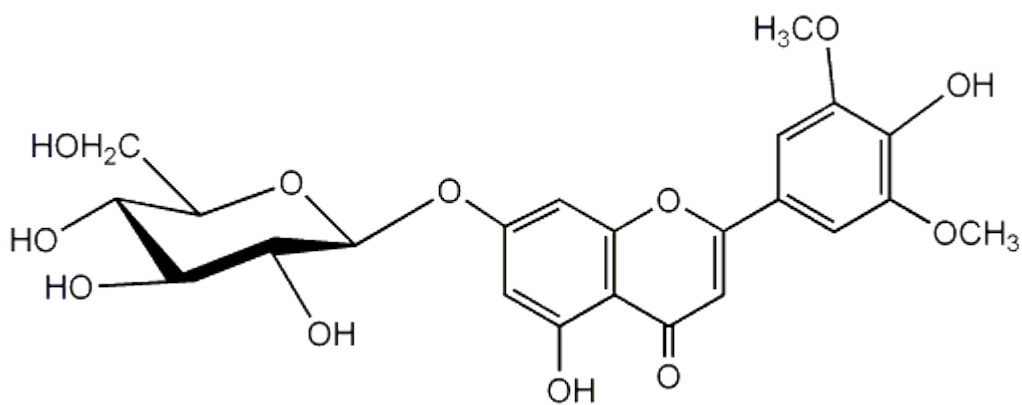
附圖一、 紅甘蔗 *Saccharum officinarum* Linn. cv. Badila



附圖二、 Structure of compound in SJM.



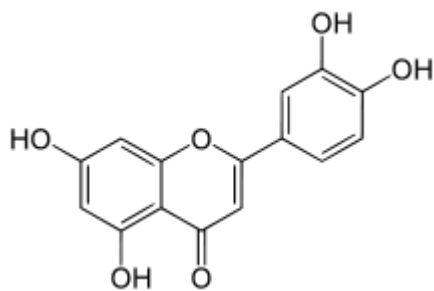
luteolin-7-O-glucoside (cynaroside)



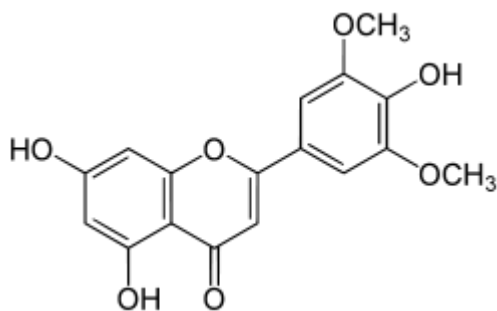
tricetin-7-O-glucoside



附圖三、 Chemical Structure of luteolin and triclin.



luteolin



triclin