

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 蓮蓬減少肝臟脂肪堆積之作用
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 蘇亭語
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-030-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

摘要.....	1
第一章、研究動機研究問題.....	2
第二章、文獻回顧與探討.....	3
1. 脂質代謝(Lipid metabolism).....	3
2. 脂肪肝(Fatty liver disease).....	4
3. 脂肪堆積作用(Lipid accumulation).....	5
4. 脂肪肝炎(Fatty hepatitis).....	6
5. 蓮蓬(Lotus seedpod).....	6
第三章、實驗架構.....	8
第四章、研究方法及步驟.....	9
1. 蓮蓬水萃取物(LSE)製備.....	9
2. 動物實驗.....	9
2.1. 實驗動物來源及分組.....	9
2.2. 代謝症候群小鼠模式之建立.....	9
2.3. 蘇木紫-伊紅染色(Hematoxyline-eosin stain, H&E stain).....	10
2.4. 膠原蛋白染色(Masson's trichrome stain).....	10
2.5. 組織西方墨點法(Tissue Western blotting).....	11
3. 細胞實驗.....	12
3.1. 細胞培養(Cell culture).....	12
3.2. 細胞生長分析(Cell growth assay).....	12
3.3. 油紅染色(Oil red staining).....	13
3.4. 尼羅紅染色和定量試驗(Nile red staining and quatitation).....	13
3.5. 細胞西方墨點法(Cellular Western blotting).....	13
3.6. 統計分析.....	14
第五章、結果與討論.....	15
第六章、參考文獻.....	18
第七章、附圖.....	21

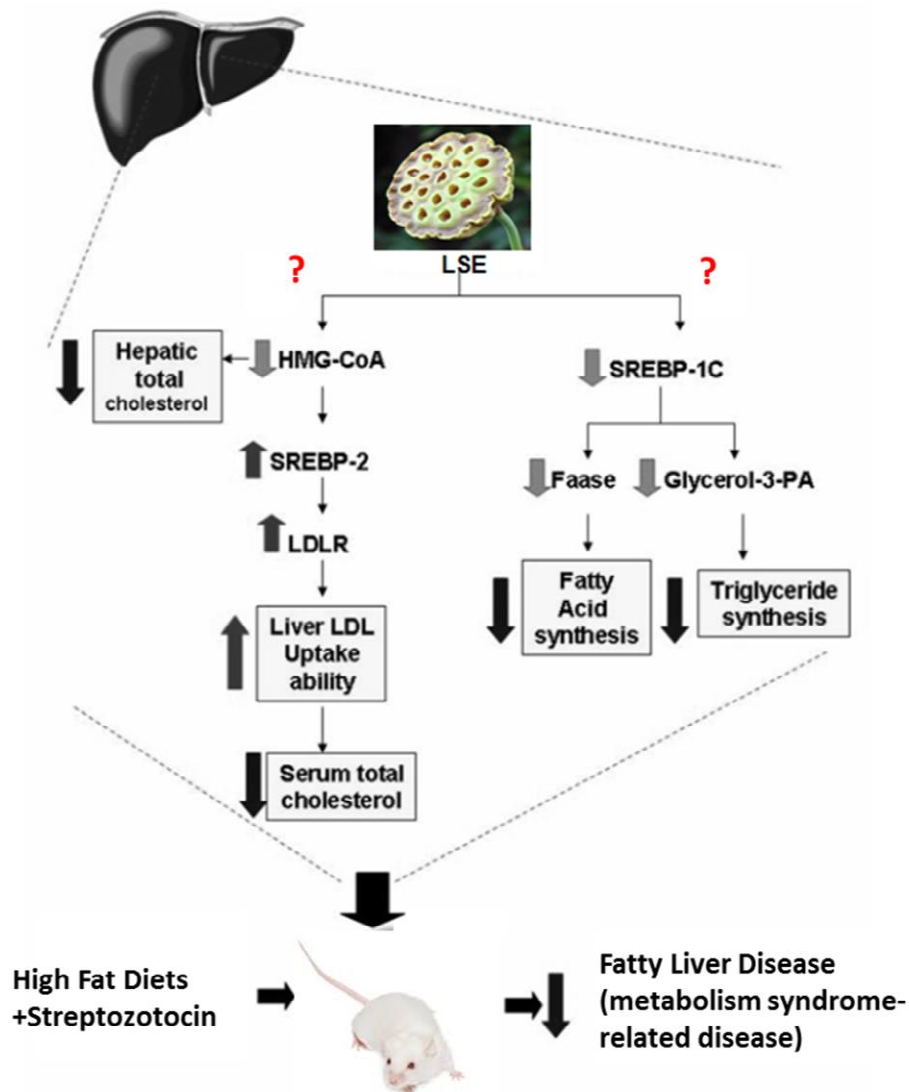
摘要

代謝症候群(metabolism syndrome)相關疾病包含心血管疾病、糖尿病和脂肪肝(fatty liver disease)。其中脂肪肝嚴重威脅國人的健康，成為僅次於病毒性肝炎的第二大肝病，起因於脂肪長期大量堆積於肝臟，因此近年來尋求以天然萃取物來降低肝臟脂肪堆積(lipid accumulation)已成為當前治療脂肪肝的研究重點。蓮蓬(lotus seedpod)為植物蓮的花托，已知其中含有原花青素(procyanidins)成份，先前的研究顯示此原花青素具有抗氧化、降血糖及增加胰島素活性等功效，因此研究想進一步探討蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)是否具有減緩肝臟脂肪堆積之作用。首先，以高脂飲食(high fat diet, HFD)合併鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘發 BALB/c 小鼠產生代謝症候群作為實驗動物模式，試驗組予以 LSE 分析其肝臟組織病變、纖維化以及脂質相關調控分子機制。初步以 H&E 染色結果顯示 LSE 能夠減緩肝組織中脂肪油滴的形成，進一步以膠原蛋白染色(Masson's trichrome stain)發現 LSE 也能有效減少肝臟纖維化形成。再以西方點墨法(Western blotting)進行脂質和醣類代謝及發炎相關調控蛋白表現分析，顯示 LSE 能有效將低膽固醇生成關鍵酵素 HMGCoA reductase 之表現，LSE 也能增加肝醣合成相關調控蛋白 Akt、GSK3 β 相磷酸化和 PI3K 蛋白表現，且能降低發炎反應相關調控蛋白 NF- κ B、COX-2 的表現，以及增加能量代謝關鍵調控蛋白 AMPK 磷酸化之表現。後續，以過氧化氫(H₂O₂)誘導肝細胞 HepG2 脂質代謝異常為細胞實驗模式，探討 LSE 對於減少肝細胞脂肪堆積的作用與機制。藉由油紅染色(Oil red stain)及尼羅紅染色(Nile red stain)試驗結果發現 LSE 可以降低 H₂O₂ 所誘導肝細胞脂肪堆積，且以西方點墨法分析蛋白表現結果與動物實驗相同，得知 LSE 可以抑制脂質生成酵素的表現及增加脂質代謝酵素表現，藉此達到減少肝臟脂質堆積的作用。總結，蓮蓬萃取物具有抑制脂肪肝的潛力。

關鍵字：代謝症候群 (metabolism syndrome)、脂肪肝 (fatty liver disease)、脂肪堆積 (lipid accumulation)、蓮蓬萃取物 (lotus seedsod extract)

第一章、研究動機研究問題

近年來，國內外臨床調查發現在全球人口中脂肪肝(fatty liver disease)大約有20%的比率，隨著經濟的發展，肥胖的人口增加，因此罹患脂肪肝的比率持續上升。植物蓮利用價值高，過去研究顯示蓮的花托部位-蓮蓬(lotus seedpod)富含原花青素(procyanidins) [1]，具有抗氧化、降血糖及增加胰島素活性等功效[2, 3]。因此，本計劃擬探討蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)是否能夠有效的減少肝臟脂肪堆積之作用，希望對於代謝症候群(metabolism syndrome)及其引發之脂肪肝等疾病之保健能有所裨益。



第二章、文獻回顧與探討

1. 脂質代謝(Lipid metabolism)

1.1. 簡介

人體內的脂質(lipids)主要包含膽固醇(cholesterol)、三酸甘油酯(triglyceride, TG)、磷脂質(phospholipid)以及游離脂肪酸(free fatty acid, FFA)。脂質具有重要的生理功能，除了作為熱量來源外，亦提供身體必需脂肪酸、協助脂溶性維生素的吸收、作為細胞膜與體內荷爾蒙的重要成份及參與多種代謝作用，其來源可由外在的飲食中攝取與內在肝臟的代謝合成作用產生。肝臟是處理脂質最主要的器官，可以將乳糜微粒與脂質體(liposomes)轉化為各種形式的脂蛋白(lipoprotein)，其中最主要的是極低密度脂蛋白(VLDL)以及低密度脂蛋白(LDL)兩種。肝臟製造出極低密度脂蛋白並釋放到血液中運輸，周遭組織會將極低密度脂蛋白分解為代謝所需要的脂肪酸和低密度脂蛋白。低密度脂蛋白被釋回血液中繼續循環直到被低密度脂蛋白受體(LDL receptor)吸收，這讓低密度脂蛋白可以被細胞吸收並轉化為膽固醇以及組成低密度脂蛋白的其他部件。肝臟可以藉由分解血液中的低密度脂蛋白，調控血液中的膽固醇濃度。另外，還有一種高密度脂蛋白(HDL)可以將膽固醇、甘油以及脂肪酸收集起來並運回肝臟處理。

1.2. 脂質代謝相關分子機制

在內生性脂質合成過程中，需要許多酵素參與反應，其中 AMP-activated protein kinase (AMPK) 為上游調控蛋白。AMPK 為人體體內的能量代謝關鍵調控蛋白，藉由調控細胞代謝途徑來調節全身能量的平衡，一旦能量低時，會經由磷酸化調控蛋白進而打開 ATP-producing pathway，例如：脂肪酸的氧化[4]及糖解作用，同時也會關上 ATP-consuming anabolic pathway，例如：脂肪生成作用。在肝臟中，活化的 AMPK 會抑制脂肪及膽固醇的合成並促進脂肪的分解[5]，藉由調控多種酵素，例如: HMGCoA reductase、SREBPs 等使得脂肪酸、膽固醇及三酸甘油酯合成受到抑制。HMGCoA reductase 位於內質網上的膜蛋白，在膽固醇

合成過程中扮演重要角色[6]，細胞可藉由 HMGCoA reductase mRNA 的轉錄作用 (transcription)、阻礙其轉譯作(translation)、加速此酵素的降解(degradation)及活性 (activity)的調節[7]，以達成負回饋調節來維持細胞內膽固醇的恆定，因此活化的 AMPK 會藉由抑制 HMGCoA reductase 的表現來減少膽固醇的合成。SREBPs 為調節人體內脂肪酸及膽固醇生成的轉錄因子[8]，而活化的 AMPK 也會經由抑制 SREBPs 的表現來抑制脂肪酸及膽固醇的生成。此外，活化的 AMPK 也會促進 PI3K/Akt 訊息路徑的活化，PI3K/Akt 訊息路徑的活化在細胞體內葡萄糖恆定上扮演重要角色，其主要原因為 Akt 活化能調控細胞代謝，其機制包括調整葡萄糖的吸收及利用，因此進而增加胰島素的敏感性，降低血糖[9]，同時 Akt 的活化會抑制 GSK3 β 抑磷酸化的表現。不僅如此，除在代謝方面的調節外外，越來越多研究發現 AMPK 也在發炎反應中扮演重要角色 [10]，在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 或游離脂肪酸刺激的小鼠巨噬細胞中，過表達持續激活型 AMPK (constitutively active AMPK) 可明顯抑制發炎因子 NF- κ B 的活性。

2. 脂肪肝(Fatty liver disease)

脂肪肝為一病理現象，又稱為肝積脂病或肝性肥胖症。脂肪肝之定義為肝脂肪含量超過其總量的 5%以上，或切片上可見肝細胞有脂肪顆粒，一般分為酒精性肝炎(alcoholic fatty liver disease)和非酒精性肝炎(non-alcoholic fatty liver disease)，其區別在於前者一天酒攝取在 20 克以上，而後者無。本研究主要探討非酒精性肝炎(non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD) [11]。NAFLD 的致病機轉相當複雜，但近年來有較明朗的進展。其一是由於肥胖症、高血脂症、糖尿病、及胰島素抗性等原因而肝內脂肪的過度堆積，最後會造成脂肪肝的形成，其二則是因產生氧化壓力(oxidative stress)，造成肝細胞膜上脂質過氧化(oxidation)而進一步造成纖維化，而使脂肪肝炎(fatty hepatitis)形成。

臨床上脂肪肝通常沒有明顯的症狀，少數人會有倦怠、嗜睡、食慾不振、噁

心感、右上腹部不適等現象，嚴重的病人可能會因肝硬化出現黃疸、腹水、水腫、肝昏迷或上消化道出血等併發症[12]。NAFLD 之特性為沒有攝取過量酒精但其脂肪堆積在肝臟實質之細胞內，其包括了單純之脂肪變性(steatosis)到併發發炎反應、壞死、纖維化或肝硬化等一連串的組織學變化皆可稱之[14-14]。NAFLD 在美國罹患率為 15-30%，而亞洲則有 6-25%的罹患率，其罹患率在全世界不斷上升[15]。其中與肥胖、糖尿病和肝臟脂肪代謝有很大的關聯，研究顯示在飲食上改變如降低脂肪及碳水化合物或補充抗氧化劑可以降低氧化壓力，進而降低發炎或纖維化的發生[16]。如果發現肝纖維化就應積極治療，預防肝硬化及肝癌之發生。因此利用健康食品來預防或改善脂肪肝或代謝性相關疾病應有其發展的可行性。

3. 脂肪堆積作用(Lipid accumulation)

脂肪的堆積主要是由脂肪生成(lipogenesis)和脂肪裂解(lipolysis)之間的平衡決定。脂肪生成作用包含脂肪酸和三酸甘油脂的形成[17]，主要是在肝臟生成。其過程主要是經由脂肪酸的攝取[18]，或乳糜微粒中的三酸甘油酯被脂肪組織中酵素 lipoprotein lipase 水解釋放出脂肪酸，當脂肪酸進入脂肪細胞後，會再被酯化以三酸甘油酯的型態儲存。而當食物轉換為葡萄糖(glucose)，葡萄糖糖解生成丙酮酸(pyruvate)，丙酮酸再轉換成乙醯輔酶 A (acetyl-Co 在粒腺體中進行 TCA cycle，acetyl-CoA 透過 acetyl-CoA carboxylase (ACC)酸化成 malonyl CoA，malonyl-CoA 再透過脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)轉變成 FA，進一步透過 glycerol p-acyltransferase 合成 fatty acid-CoA，最後合成 TG。營養狀況和胰島素的濃度也會影響脂質生成的速率，參與的調控蛋白有很多，例如 FAS、ACC、HMGCoA reductase。目前已知胰島素或葡萄糖可以活化轉錄因子 SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein)和 ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein)，在肝臟 SREBP-1c 和 ChREBP 會促進 lipogenic genes 表

現[19]，然而也有研究提出脂質合成會受到肝異受體(Liver X receptor, LXR)所調控，其研究仍持續發展中[20]。

4. 脂肪肝炎(Fatty hepatitis)

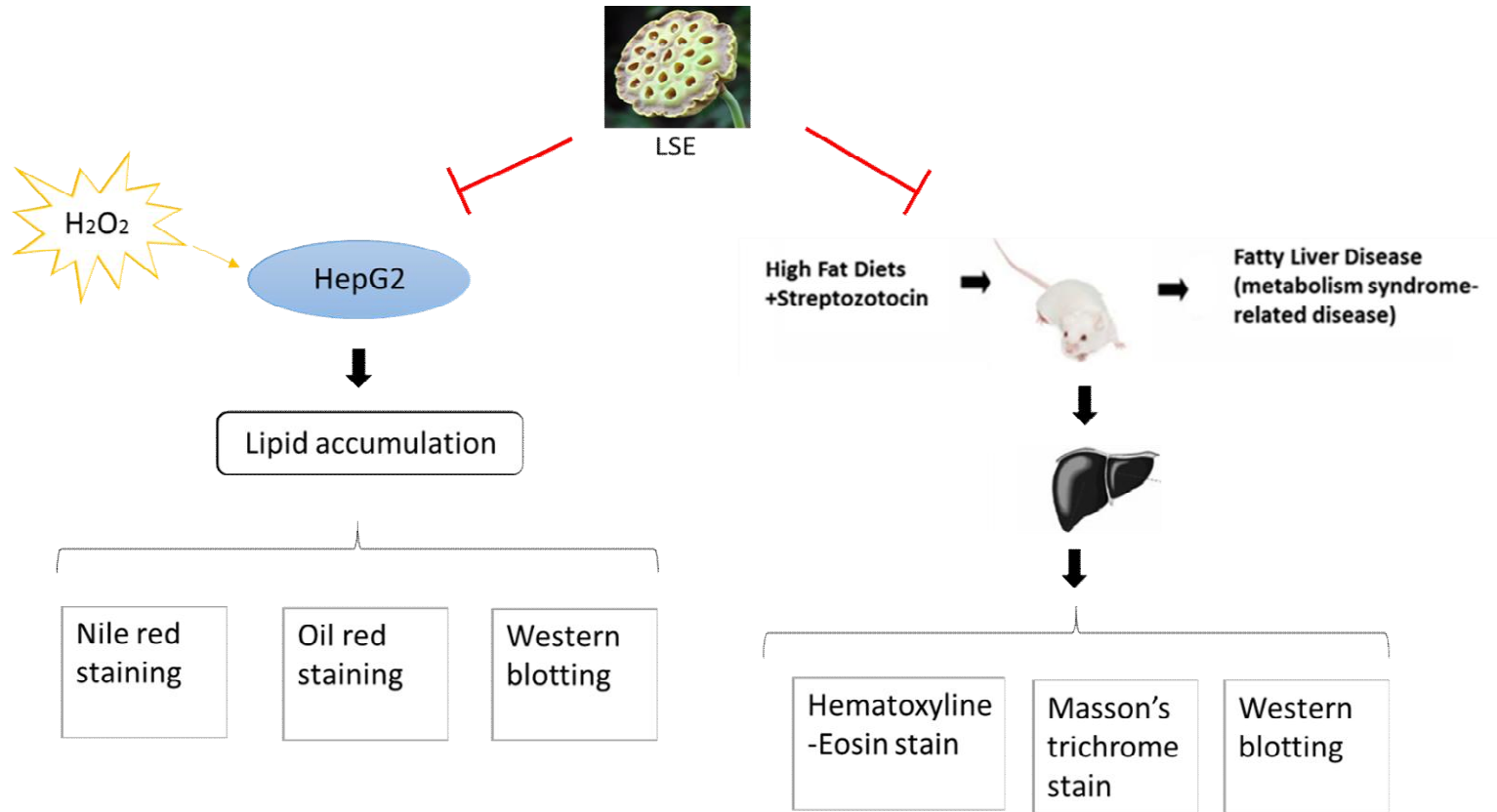
脂肪肝炎是肝臟疾病的一種類型，當脂肪酸及三酸甘油酯異常堆積於肝臟，導致肝細胞產生脂肪變性而病變，以此為基礎，引起慢性氧化壓力及脂質過氧化作用，因而導致肝細胞粒線體損傷及肝臟星狀細胞的活化，肝細胞持續受到傷害，而進一步導致肝臟發炎，末期病態常會導致肝硬化、肝纖維化、肝壞死，甚至導致肝癌的產生[21]。而脂肪肝炎常見於因酗酒而造成的酒精性肝炎，而患有糖尿病、肥胖症、或患有代謝症候群的人也經常發現。脂肪肝炎因肝的病變，連帶的會影響肝臟本身，進而影響血糖的代謝，導致血糖的上升，易有糖尿病的產生[22, 23]，而亦會步入纖維化之併發症一途。

5. 蓮蓬(Lotus seedpod)

蓮蓬又名蓮子肉、藕實、水芝丹，蓮蓬是荷花的蓮房，多做為中藥材來使用，具有消瘀、止血、去濕的功能。過去蓮蓬為不可食用，但已有研究指出其具有原花青素(proanthocyanidins) [1]。原花青素透過增加肝臟抗氧化酶活性，具有改善脂質的氫過氧化物和抗氧化活性，在飲食後高血脂的現象可以有所抑制[24]。此外，原花青素可以透過降低血壓和三酸甘油酯，減少心血管疾病的發生，在飼以高脂肪飲食的高血壓大鼠中，長期服用低聚原花青素後，可以減少肝臟脂質堆積造成的氧化壓力[25]。且原花青素可以預防氧化壓力和隨後的肝損傷，四氯化碳治療會導致酒精和非酒精性脂肪肝，在四氯化碳給藥前7天，以口服原花青素預先處理的大鼠，發現用原花青素治療有效地抑制脂質堆積、肝損傷、DNA 損傷，以及恢復抗氧化酶的平衡[26]。在先前的研究發現於蓮蓬中所萃取出來的原花青素(procyanidins extracted with acetone water from lotus seedpod, LSPCs)，具有抗氧化的能力[2]，可清除氧的自由基並增強抗氧化酵素之作用[27]，因此用於治療認

知功能障礙引起的阿茲海默症能發揮顯著的功效[28]。此外，LSPCs 具有強烈的抗輻射活性，可以保護肝臟、防止放射病、減少輻射誘發的死亡率[29]。綜合上述，我們可以推測蓮蓬具有減少肝臟脂肪堆積的可能性。

第三章、實驗架構



第四章、研究方法及步驟

1. 蓮蓬水萃取物(LSE)製備

秤取乾燥的蓮蓬 100 g，加入 4 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷卻後將其過濾，後將濾液進行冷凍乾燥，所得的粉末即為蓮蓬粗萃取物，最後再進行冷凍乾燥使其為粉末。

2. 動物實驗

2.1. 實驗動物來源及分組

由國家實驗動物中心購入 5 週齡 50 隻雄性 BALB/c ByJNar1 小鼠，飼養於中山醫學大學實驗動物中心。環境條件為室溫控制在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相對濕度設定在 $55 \pm 2\%$ 、自動空氣調節(換氣率每小時 12 次)、自動光照控制(12 小時白晝、12 小時黑夜)，給予標準飼料(MFG22)與一般飲水適應三天。高脂飼料(high fat diet, HFD)是購自 TestDiet #58Y1 DIO Rodent Purified Diet w/60% Energy From Fat-Blue，成份內含各式脂肪、蛋白質及碳水化合物。另外，高脂添加蓮蓬飼料製備是由高脂飼料#58Y1 先用打碎機打成粉末，再分別加入不同劑量克數的蓮蓬水萃取物粉末，均勻混合揉成糰狀後即可餵食。動物分組如下表所示：

組別	飼料
control	5 g 標準飼料/mice/day
HFD+ STZ	5 g 高脂飼料/mice/day
HFD+ STZ+ 1% LSE	5 g 高脂飼料+ 1% 蓮蓬水萃取物/mice/day
HFD+ STZ+ 2% LSE	5 g 高脂飼料+ 2% 蓮蓬水萃取物/mice/day

2.2. 代謝症候群小鼠模式之建立

高脂飲食合併鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘發BALB/c小鼠作為代謝症

候群模式。BALB/c小鼠適應三天後先給予高脂飲食(HFD；60% cal from fat)兩週，再合併注射STZ。STZ注射方式為劑量40 mg/kg BW，溶於以0.1 M citric acid 滴定pH值至4.2的生理食鹽水中，老鼠禁食4~6小時後，每隻老鼠經由腹腔注射200 μ l的STZ溶液，連續注射5天。誘發代謝症候群14天後，由尾巴採血測血糖及口服葡萄糖耐受試驗(oral 25 glucose tolerance test, OGTT)、測血壓和體重加以確認，與正常小鼠相比皆有顯著差異($p < 0.05$)，即代表代謝症候群BALB/c小鼠模式誘發成功。

2.3. 蘇木紫-伊紅染色(Hematoxyline-eosin stain, H&E stain)

H&E stain 是組織學最常用的染色方法之一，利用組織結構對不同染料的結合程度不同，hematoxyline 可以將嗜鹼性結構染成藍紫色，通常包括含有核酸的部分，而 Eosin 可以將嗜酸性結構染成粉紅色，通常為細胞內及細胞間的蛋白質部分。將包埋的臟器切片，以二甲苯、序列酒精（100%、95%、75%）脫蠟，用二次水清洗，再以 Mayer's hematoxylinz 反應 5 分鐘，用二次水清洗，加入 eosin solution 反應 1 分鐘，再以 95%、100%酒精及二甲苯脫水，最後用阿拉伯膠封片。利用光學顯微鏡觀察。

2.4. 膠原蛋白染色(Masson's trichrome stain)

膠原蛋白染色常用於區分細胞周圍的結締組織，會將細胞膠原纖維染成藍色，細胞質呈紅色，而細胞核呈黑色。將包埋的臟器切片，以二甲苯、序列酒精（100%、95%、75%）脫蠟，用二次水清洗，再以 Bouin's solution 於 56°C 反應 15 分鐘，用二次水清洗，共 3 次，加入 Weigert's iron hematoxylin 反應 5 分鐘，用二次水清洗，共 3 次，再以 phosphotungstic/phosphomolybdic acid solution 反應 5 分鐘之後和 aniline blue 反應 5 分鐘，再和 1% acetic acid 反應 2 分鐘，再以 95%、100%酒精及二甲苯脫水，最後用阿拉伯膠封片。利用光學顯微鏡觀察。

2.5. 組織西方墨點法(Tissue Western blotting)

2.5.1. 蛋白萃取與定量

剪取 100 mg 肝臟，加入 RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholic acid、0.1% SDS、50 mM Tris-base，pH 7.5)後，再加入蛋白酶抑制劑 (1 mM sodium orthovanadate、100 μ g PMSF、170 μ g/ml leupeptin)。以均質機破壞組織後，加入蛋白酶抑制劑，於 4°C、12000 rpm 下離心 10 分鐘，保留上清液。以 BCA protein assay kit 定量，以 562 nm 測定吸光值並換算蛋白濃度，調整蛋白量。

2.5.2. Western blotting

首先將清洗好的架膠玻璃擦拭乾淨，架起玻璃後加入 ddH₂O 並放置 15 分鐘測漏，若不會則將 ddH₂O 倒掉，並以紙巾吸乾其中的 ddH₂O。再以 ddH₂O、30% Acrylamide mix、1.5M Tris (pH 8.8)、10% SDS、10% APS 及 TEMED 以適當比例配成 8% 聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 下膠，均勻混合後倒入玻璃間，靜置至少 3 小時候待其膠完全凝固後，以 ddH₂O、30% Acrylamide mix、1.5M Tris (pH 6.8)、10% SDS、10% APS 及 TEMED 配置呈成上膠，倒入玻璃間及插上齒梳，當完全凝固則可使用。再以定量出的蛋白濃度調整蛋白，將所需的蛋白濃度調整至一致，以二次水補至相同體積後再加入 loading dye，將所配置的 sample 以加熱器用 100°C 加熱 10 分鐘使其變性。將樣本離心，與 8% 聚丙烯醯胺凝膠進行電泳，以 70 伏特的電壓電泳約三小時，依其分子量不同而分離。將海綿，兩片濾紙，8% 聚丙烯醯胺凝膠，硝化纖維膜，兩片濾紙，海綿，依順序夾好，再將夾子放置於轉置槽中，以電壓 100 伏特 100 分鐘使蛋白轉印到硝化纖維膜上。將轉印完成的硝化纖維膜以麗春紅紅染，裁剪所需的蛋白部分，再以 TBS (tris-buffered saline) 將紅染清洗掉。接著浸泡在 5% 的脫脂牛奶中浸泡一個小時，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，再以 TBS+tween 清洗三次，每次十分鐘，之後加入對應的二級抗體反應一小時，再以 TBS+tween 清洗三次，每次十分鐘。將顯影劑 ECL 加在硝化纖維膜上，用冷光儀拍攝，最後以分析軟體透過深淺不同來定量蛋白質表現情形。

3. 細胞實驗

3.1. 細胞培養(Cell culture)

3.1.1. 細胞培養條件

本實驗以肝細胞株 HepG2 作為實驗對象，以 MEM (minimum essential medium eagle) 培養基進行培養。MEM 中另外添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、2 mM L-glutamine、2.2 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM non-essential amino acids (NEAA) 以及 1.0 mM sodium pyruvate 共同培養。繼代解凍後將細胞置於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養，每兩天換一次培養液，並在無菌操作環境下操作。

3.1.2. 細胞加藥

將細胞培養於 6-well 中，待細胞貼壁、型態完全後，以 PBS 潤洗細胞後加入 starvation medium (不含有 10% FBS 的培養液)，再放回 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養；待 24 小時後，將培養液換回添加 10% FBS 的 medium，加入 200 μM H₂O₂，再分別加入不同劑量的 LSE 萃取物 (0、0.1、0.5、1、5、10、50、100 μg/ml)，於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養 24 小時。

3.2. 細胞生長分析(Cell growth assay)

在無菌操作下，將以 LSE 處理過的細胞去除舊 medium 並加入適量的胰蛋白酶 (trypsin)，於 37°C 的溫箱中反應 10 分鐘，將細胞打下，再加入適量 medium 終止 trypsin 的反應；以 trypan blue 染色，用細胞計數盤進行計數。

3.3. 油紅染色(Oil red staining)

Oil red O 為蘇丹染劑之一，對脂肪具有親和力，為脂溶性染料，在脂肪內能高度溶解使中性脂肪著色，因此藉由染色後表現的紅色得知細胞內脂質含量。將 oil red 粉末溶解於異丙醇配成原液(5 mg/ml)，再與水稀釋 1.5 倍，靜置十分鐘後以 0.22 μm 的 filter 過濾。細胞以 PBS 潤洗 2 次，加入 4% paraformaldehyde 固定 1 小時，再加入 oil red 染劑於室溫下反應 15 分鐘，用 PBS 洗去多餘染劑，最後以倒立式顯微鏡觀察。

3.4. 尼羅紅染色和定量試驗(Nile red staining and quatitation)

尼羅紅染劑為親脂性螢光染劑，可以針對脂質染色，再激發光下發出紅色螢光，而螢光的強度代表脂質的濃度，因此可以得知細胞內脂質含量。細胞以 PBS 潤洗 2 次，加入 4% Paraformaldehyde 固定 1 小時，以 PBS 稀釋染劑(1 mg/ml)，在室溫下避光染色 5 分鐘，用 PBS 洗去多餘染劑，用雷射光 488 nm 激發觀察。用流式細胞儀偵測細胞螢光強度並進行分析。

3.5. 細胞西方墨點法(Cellular Western blotting)

3.5.1. 蛋白萃取與定量

培養細胞於 10 公分 dish 中，待細胞貼壁型態完全後，以 PBS 潤洗細胞後加入 starvation medium，24 小時後，加入 0.6 mM 油酸及分別加入不同劑量的 LSE 萃取物培養 24 小時。去除舊的 medium 並加入適量的 trypsin，於 37°C 的溫箱中反應 10 分鐘，將細胞打下並以 1000 rpm 離心 5 分鐘，移去上清液。再加入 1 ml PBS 打散細胞，再以 1000 rpm 離心 5 分鐘後移去上清液，此步驟重複兩次。加入 RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholic acid、0.1% SDS、50 mM Tris-base, pH 7.5)後，再加入蛋白酶抑制劑(1 mM sodium orthovanadate、100 μg PMSF、170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin)。以均質機破壞細胞後，於 4°C、12000 rpm 下離心 10 分鐘，保留上清液。以 BCA protein assay kit 定量，562 nm 測定吸光值並換算蛋白濃度，調整蛋白量。

3.5.2. Western blotting

實驗方法同上述 2.5.2。

3.6. 統計分析

以 Sigma-Plot 軟體分析數據，mean \pm SD 表示。利用 t-test-Unpaired 來評估統計差異。以*表示 $P < 0.05$ ，**則表示 $P < 0.01$ 。

第五章、結果與討論

5.1. 探討 LSE 對 HFD 合併 STZ 誘發代謝症候群小鼠肝臟組織型態變化之影響

實驗以 HFD 合併 STZ 誘發代謝症候群小鼠為模式，其中試驗組小鼠以 60% 高脂飲食餵食 11 週，並在第三週連續 5 天注射 STZ，再開始予以添加 LSE (1% 及 2%) 的高脂飲食或是管餵 simvastatin (30 mg/ml)，連續處理 6 周後進行犧牲，並進行後續研究。藉由犧牲小鼠取得之血清進行分析血脂方面，誘導組膽固醇與對照組相比上升約 1.3 倍，而 LSE 組與誘導組相比下降約 1.2 倍。在分析血糖方面，誘導組膽固醇與對照組相比上升約 6.8 倍，而 LSE 組與誘導組相比下降約 1.8 倍 (Table. 1)，因此判斷成功誘導出代謝症候群之模式且推斷 LSE 能有效將低 HFD 合併 STZ 誘發之高血脂及高血糖。另外，動物實驗取得之肝組織並進行切 HE 染色，正常組的肝組織中並沒有發現有脂肪油滴的形成。觀察誘導組方面，我們發現其病理切片上有明顯的脂肪堆積，組織細胞呈現不規則型態排列之現象，且可觀察到肝臟巨噬細胞(Kuffer cell)；而在飼料中給予 LSE 1%和 2%後，肝臟脂肪堆積情形則明顯下降(Fig. 1A)。進一步以膠原蛋白染色(Masson's trichrome stain)發現 LSE 也能有效減少肝臟纖維化形成(Fig. 1B)。

5.2. 探討 LSE 對 HFD 合併 STZ 誘發代謝症候群小鼠肝臟組織中脂質代謝相關調控蛋白表現之影響

進一步分析動物實驗取得之肝組織蛋白，以西方墨點法探討脂質相關調控分子，例如 HMGCR、SREBPs 等的蛋白表現量在 HFD 合併 STZ 誘導組、以及 LSE 試驗組有何影響。由實驗結果得知，誘導組中 HMG CoA reductase、SREBP-1、SREBP-2 蛋白表現與控制組相比相對增加，而在 LSE 試驗組與 HFD 合併 STZ 誘導組相比相對減少(Fig. 2A)，因此推斷 LSE 能降低膽固醇合成。而在 LSE 試驗組與誘導組相比，Akt、GSK3 β 磷酸化、PI3K 蛋白表現相對增加(Fig. 2B)，因此推斷 LSE 能有效促使肝糖合成。分析在 NF- κ B 和 COX-2 的蛋白表現上，誘導組中 NF- κ B 表現、COX-2 蛋白表現與控制組比相對增加，而在 LSE 試驗組與誘

導組相比相對減少(Fig. 3C)，因此推斷 LSE 能有效降低發炎反應。而在 LSE 試驗組與誘導組相比，AMPK 磷酸化蛋白表現相對增加(Fig. 2D)，因此推斷 LSE 能藉由 AMPK 磷酸化蛋白表現的增加，以影響後續參與在膽固醇、血糖及發炎相關調控蛋白等的表現，然而其上下游的調控關係仍需進一步釐清。

5.3. 探討以不同濃度的 H₂O₂ 及 LSE 單獨及合併處理肝細胞 HepG2 存活之影響

細胞實驗利用人類肝臟細胞 HepG2 處理不同劑量的 H₂O₂ (0、10、20、50、100、200、300、500 μM) 反應 24 小時，並藉由細胞計數進行生長分析，結果發現在高濃度 H₂O₂ (300、500 μM) 對於 HepG2 細胞之生長有較明顯的抑制效果 (Fig. 3A)，因此後續實驗選擇對細胞生長無顯著影響的 H₂O₂ 劑量 200 μM 進行肝細胞脂質堆積之研究。此外，以不同濃度的 LSE (0.1、0.5、1、5、10、50、100 μg/ml) 處理 HepG2 細胞並藉由細胞計數進行生長分析，結果發現在高濃度 LSE (50、100 μg/ml) 對於 HepG2 細胞有較明顯的抑制生長效果 (Fig. 3B)，因此後續實驗選擇對細胞生長無顯著影響的 LSE 劑量進行實驗。Fig. 3C 合併 200 μM H₂O₂ 及不同濃度 LSE (1、5 μg/ml) 處理 HepG2 細胞，觀察對細胞存活之影響。由結果得知，在 LSE 處理 24 小時後，LSE 對細胞之存活率皆無明顯之改變 (Fig. 3C)，後續並以此合併處理的細胞模式探討 LSE 對於 H₂O₂ 誘導 HepG2 細胞脂質堆積作用之影響。

5.4. 探討 LSE 對於 H₂O₂ 誘導 HepG2 細胞脂質堆積之影響

在培養 HepG2 細胞後，以 200 μM H₂O₂ 及不同濃度 LSE (1、5 μg/ml) 處理 24 小時後，以油紅染色試驗之結果顯示在 H₂O₂ 處理細胞中紅色油滴明顯表現 (Fig. 4A)，且量化結果也明顯上升 (Fig. 4B)，而加入不同濃度 LSE (1、5 μg/ml) 處理後，減低細胞中紅色油滴之表現 (Fig. 4A)，且量化結果也明顯下降 (Fig. 4B)，因此推斷 LSE 能有效降低細胞中脂肪之堆積。另外各實驗組別以尼羅紅染色 (Nile red stain)，再藉由流式細胞儀 (flow cytometry) 進行分析，藉由偵測其螢光強度來判斷其細胞內脂質堆積之含量。結果顯示經 H₂O₂ 處理的細胞內脂質含量明顯上

升，且量化結果也呈現明顯上升的趨勢(Fig. 4C)，而加入不同濃度 LSE (1、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 處理後，細胞內之脂質堆積含量表現明顯下降(Fig. 4C)，因此推斷 LSE 能有效降低肝細胞中脂肪含量。

5.5. 探討 LSE 對於 H_2O_2 誘導 HepG2 細胞脂質代謝相關調控蛋白表現之影響

在培養 HepG2 細胞後，以 200 μM H_2O_2 及不同濃度 LSE (1、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 處理 24 小時後，以西方墨點法探討脂質相關調控分子，例如 HMGCR、SREBPs 等蛋白表現量在 H_2O_2 誘導組、以及 LSE 試驗組有何影響。由實驗結果得知，誘導組中 HMG CoA reductase、SREBP-2 蛋白表現與控制組相比相對增加，而在 LSE 試驗組與 H_2O_2 誘導組相比相對減少(Fig. 5A)，因此推斷 LSE 能降低膽固醇合成。而在 LSE 試驗組與誘導組相比，GSK3 誘蛋白表現相對減少，而 Akt 磷酸化、PI3K 蛋白表現相對增加(Fig. 5B)，因此推斷 LSE 能有效促使肝糖合成。分析在 NF- κB 促使和 COX-2 的蛋白表現上，誘導組中 NF- κB 表現表現、COX-2 蛋白表現與控制組比相對增加，而在 LSE 試驗組與誘導組相比相對減少(Fig. 5C)，因此推斷 LSE 能有效降低發炎反應。而在 LSE 試驗組與誘導組相比，AMPK 磷酸化蛋白表現相對增加(Fig. 5D)，因此推斷 LSE 能藉由 AMPK 磷酸化蛋白表現的增加，以影響後續參與在膽固醇、血糖及發炎相關調控蛋白等的表現。

5.6. 總結

由上述實驗結果發現，LSE 藉由抑制脂質生成酵素的表現及增加脂質代謝酵素表現(Fig. 6)，以達到減少肝臟脂質堆積的效果，由此可推論 LSE 具有抑制脂肪肝病程發展之作用。

第六章、參考文獻

1. Xiao JS, Xie BJ, Cao YP, Wu H, Sun ZD, Xiao D. Characterization of oligomeric procyanidins and identification of quercetin glucuronide from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seedpod. *J Agric Food Chem*. 2012;60:2825-9.
2. Ling ZQ, Xie BJ, Yang EL. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J Agric Food Chem*. 2005;53: 2441-5.
3. Wu Q, Chen H, Lv Z, Li S, Hu B, Guan Y, Xie B, Sun Z. Oligomeric procyanidins of lotus seedpod inhibits the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Chem*. 2013;138:1493-502.
4. Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. 2006;116:1776-83
5. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci*. 2004;117:5479-87.
6. Brown MS, Goldstein JL. J Lipid Res. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res*. 1980;21:505-17.
7. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343:425-30.
8. Xu X, So JS, Park JG, Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis*. 2013;33:301-11.
9. Zheng T, Yang X, Wu D, Xing S, Bian F, Li W, Chi J, Bai X, Wu G, Chen X, Zhang Y, Jin S. Salidroside ameliorates insulin resistance through activation of a mitochondria-associated AMPK/PI3K/Akt/GSK3 β pathway. *Br J Pharmacol*. 2015;172:3284-301.
10. Kamoshita M, Ozawa Y, Kubota S, Miyake S, Tsuda C, Nagai N, Yuki K, Shimmura S, Umezawa K, Tsubota K. AMPK-NF- κ B axis in the photoreceptor disorder during retinal inflammation. *PLoS One*. 2014 21;9:e103013.
11. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114:842-5.
12. Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, Sollano JD; Asia-Pacific Working Party on NAFLD. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:775-7.
13. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002 ;346:1221-31.
14. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21:3-16.

15. Sun C, Huang F, Liu X, Xiao X, Yang M, Hu G, Liu H, Liao L. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *Int J Mol Med*. 2015.
16. Ordonez R, Carbajo-Pescador S, Mauriz JL, Gonzalez-Gallego J. Understanding nutritional interventions and physical exercise in non-alcoholic Fatty liver disease. *Curr Mol Med*. 2015;15:3-26.
17. Sander Kersten . Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis .*EMBO Rep*. 2001;2:282–286.
18. Zechner R, Strauss J, Frank S, Wagner E, Hofmann W, Kratky D, Hiden M, Levak-Frank S. The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24 Suppl 4:S53-6.
19. Stoeckman AK, Towle HC. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J Biol Chem*. 2002;277:27029-35.
20. Darimont C, Avanti O, Zbinden I, Leone-Vautravers P, Mansourian R, Giusti V, Macé K. Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes. *Biochimie*. 2006;88:309-18.
21. Yopp AC, Choti MA. Non-Alcoholic Steatohepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma: A Growing Epidemic? *Dig Dis*. 2015;33:642-647.
22. Sobhonslidsuk A, Pulsombat A, Kaewdoun P, Petraksa S. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and significant hepatic fibrosis defined by non-invasive assessment in patients with type 2 diabetes. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16:1789-94.
23. Clark JM, Diehl AM. Hepatic steatosis and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*. 2002;2:210-5.
24. Fernández-Iglesias A, Quesada H, Díaz S, Pajuelo D, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ, Mulero M. Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. *Food Chem*. 2014;165:14-20.
25. Pons Z, Guerrero L, Margalef M, Arola L, Arola-Arnal A, Muguerza B. Effect of low molecular grape seed proanthocyanidins on blood pressure and lipid homeostasis in cafeteria diet-fed rats. *J Physiol Biochem*. 2014;70:629-37.
26. Duan Y1, Wang Z, Zhang H, HEHe Y, Lu R, Zhang R, Sun G, Sun X. The preventive effect of lotus seedpod procyanidins on cognitive impairment and oxidative damage induced by extremely low frequency electromagnetic field exposure. *Food Funct*. 2013;4:1252-62.

27. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H, Yao P, Zhang X, Zhang Y, Liu L. Rejuvenation of antioxidant and cholinergic systems contributes to the effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2009;19:851-60
28. Duan Y, Zhang H, Xie B, Yan Y, Li J, Xu F, Qin Y. Whole body radioprotective activity of an acetone-water extract from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. seedpod. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:3374-84.
29. Dai N, Zou Y, Zhu L, Wang HF, Dai MG. Antioxidant properties of proanthocyanidins attenuate carbon tetrachloride (CCl₄)-induced steatosis and liver injury in rats via CYP2E1 regulation. *J Med Food.* 2014;17:663-9.

第七章、附圖

TABLE 1. Effects of LSE on the serum biochemical parameters of rabbits induced by a HFD plus STZ^a

variable ^b	Control group	HFD + STZ group	HFD + STZ + 1% LSE group	HFD + STZ + 2% LSE group	HFD + STZ + statin group
Cholesterol (mg/dL)	165.60 ± 17.44	223.75 ± 21.42 ^c	227.33 ± 8.14	182.75 ± 17.06 ^e	189.67 ± 5.13 ^e
Triglycerides (mg/dL)	152.67 ± 18.88	141.67 ± 20.98	106.50 ± 19.36 ^e	93.50 ± 21.46 ^f	102.75 ± 27.29
LDL-c (mg/dL)	35.50 ± 6.35	67.25 ± 8.81 ^c	66.67 ± 12.06	59.75 ± 5.91	62.75 ± 8.54
HDL-c (mg/dL)	89.20 ± 5.45	125.00 ± 17.36 ^c	142.50 ± 8.06	118.00 ± 14.18	114.40 ± 12.18
GOT (U/L)	226.00 ± 56.20	250.00 ± 101.08	228.33 ± 43.02	213.50 ± 33.26	202.20 ± 33.26
GPT (U/L)	76.00 ± 9.90	99.50 ± 9.88 ^d	119.00 ± 36.77	82.00 ± 32.49	65.25 ± 17.99 ^e
BUN (mg/dL)	21.20 ± 2.52	34.04 ± 6.86 ^c	14.67 ± 1.39 ^f	16.80 ± 2.81 ^f	15.87 ± 2.47 ^f
CRE (mg/dL)	0.38 ± 0.05	0.50 ± 0.07 ^d	0.50 ± 0.08	0.46 ± 0.11	0.44 ± 0.05
Glc (mg/dL)	50.10 ± 7.14	342.83 ± 37.30 ^c	225.00 ± 99.82 ^e	182.00 ± 81.43 ^f	194.14 ± 79.92 ^f
Insulin (mg/dL)	1.74 ± 0.46	1.91 ± 0.36	1.70 ± 0.33	1.77 ± 0.34	2.05 ± 0.56

^aEach value is expressed as the mean ± SD (n = 6/group). Duration of the experiment = 6 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test. ^b LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine. ^cp < 0.01 compared with the control group. ^dp < 0.05 compared with the control group. ^ep < 0.05 compared with the HFD+STZ group. ^fp < 0.01 compared with the HFD+STZ group.

Fig. 1

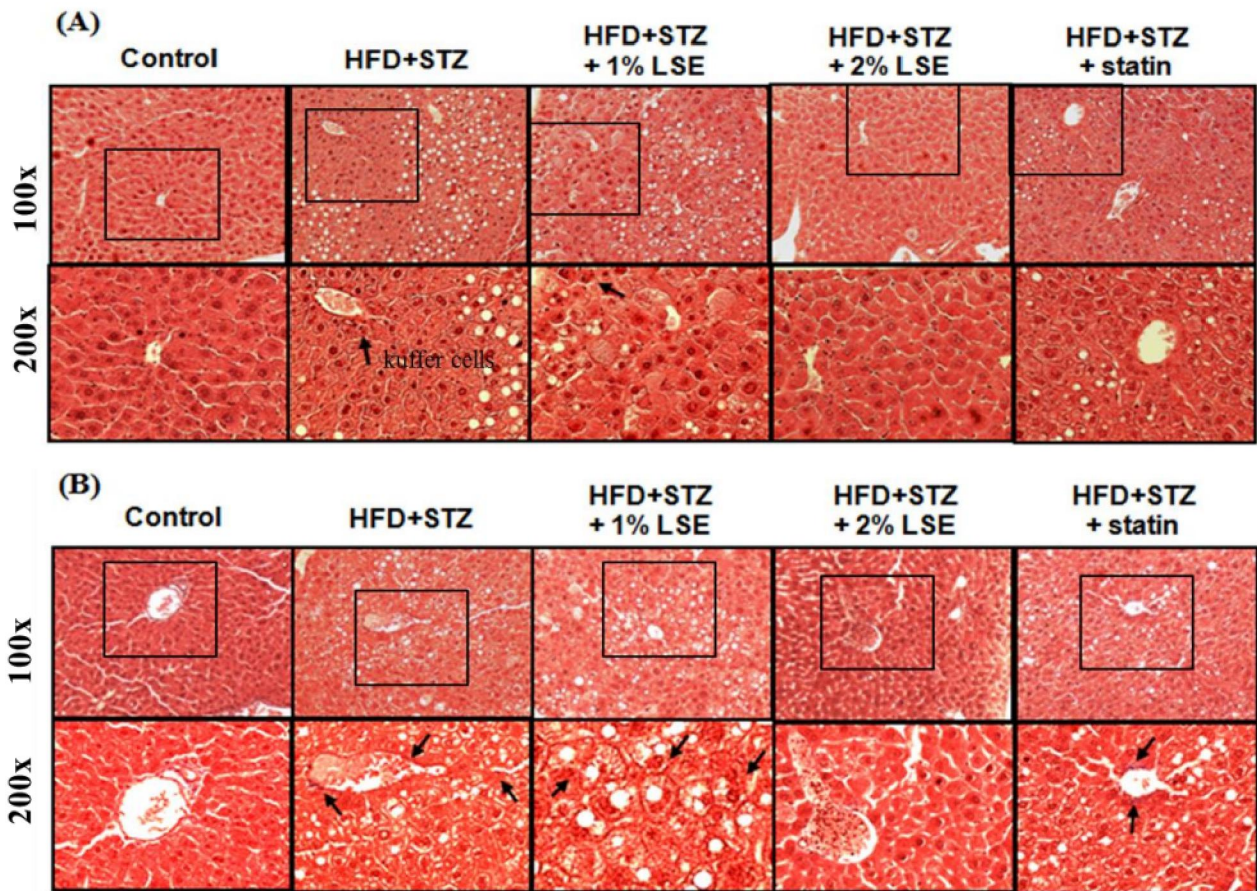
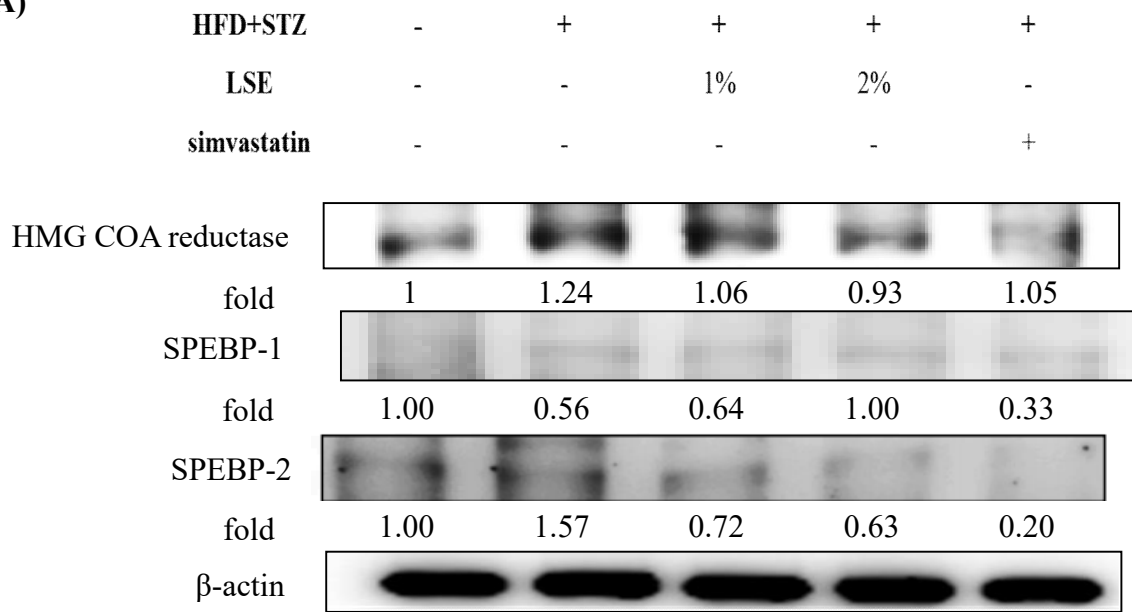


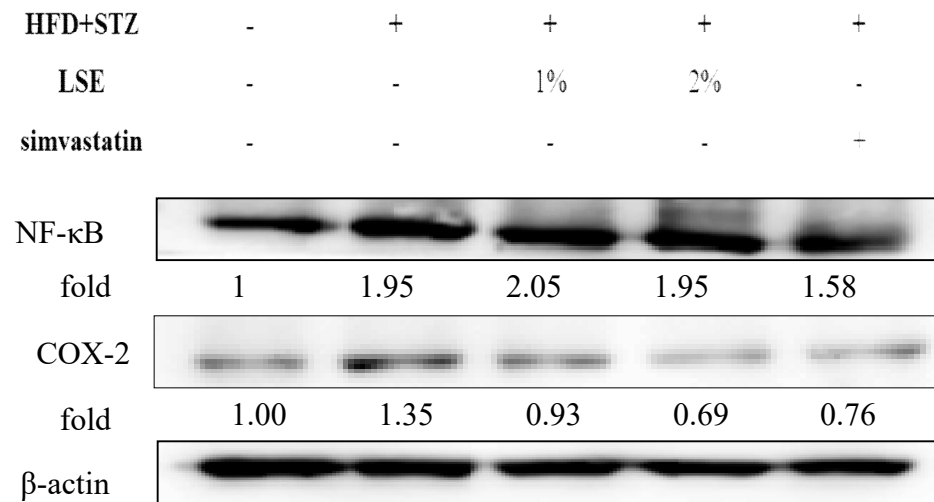
Fig. 1. Effect of LSE on liver histopathology and lipid peroxidation after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin (30 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and liver tissue was collected for analysis. (A) Representative 100X (upper panel) and 200X (down panel) images of liver sections from different dietary treatments (n=10/group) stained with H&E to display the hepatic tissue architecture and presence of macro- and micro-vesicular steatosis (white parts), representing accumulation of lipid droplets in hepatocytes and the distribution of steatosis, and kuffer cells (arrows). (B) Liver sections also were stained with Masson's trichrome to show presence of fibrotic tissue (stained blue, arrows) (100X, upper panel; 200X, down panel).

Fig. 2

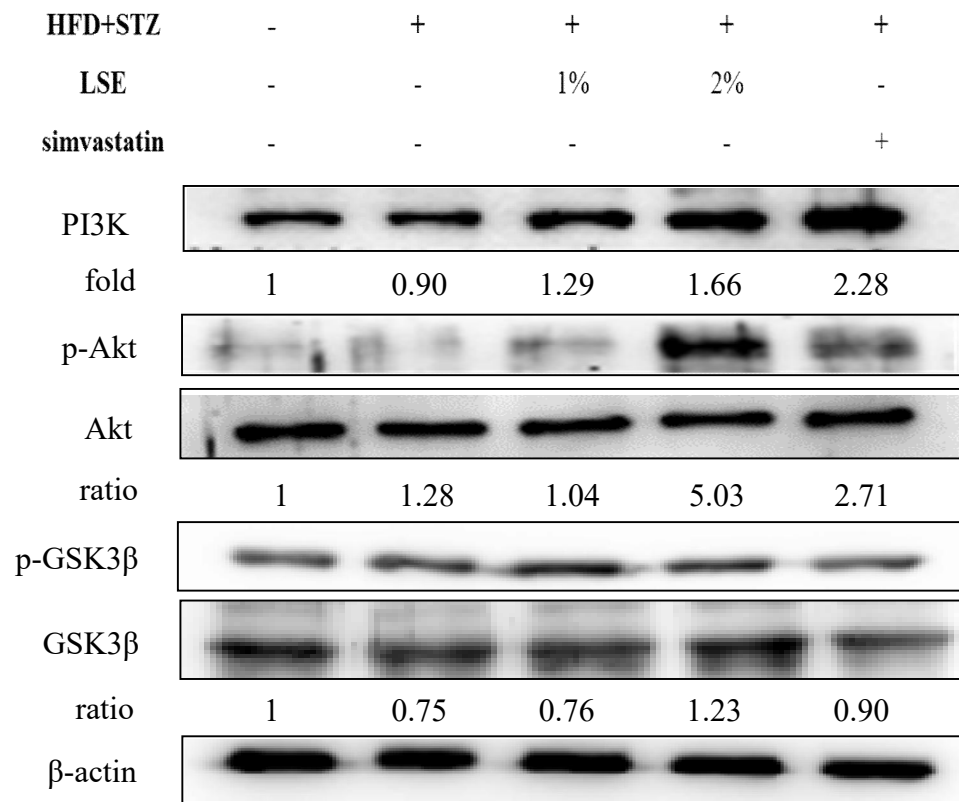
(A)



(B)



(C)



(D)

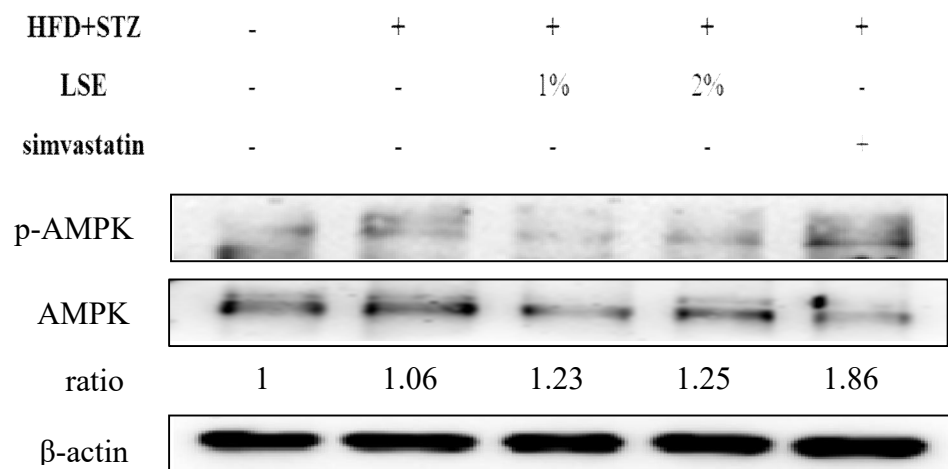


Fig. 2. Effect of LSE on dyslipidemia-, hyperglycemia- and inflammation-related proteins after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin (30 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and liver tissue was collected for analysis. The protein levels of HMGCoA reductase, SREBP-1, SREBP-2 (A), NF-κB, COX-2 (B), p-GSK3β, GSK3β, p-Akt, Akt, PI3K (C), p-AMPK and AMPK (D) were determined by Western blotting. The protein levels (fold) above the figures represent relative density of the bands normalized to β-actin. Results are representative of at least three independent experiments.

Fig. 3

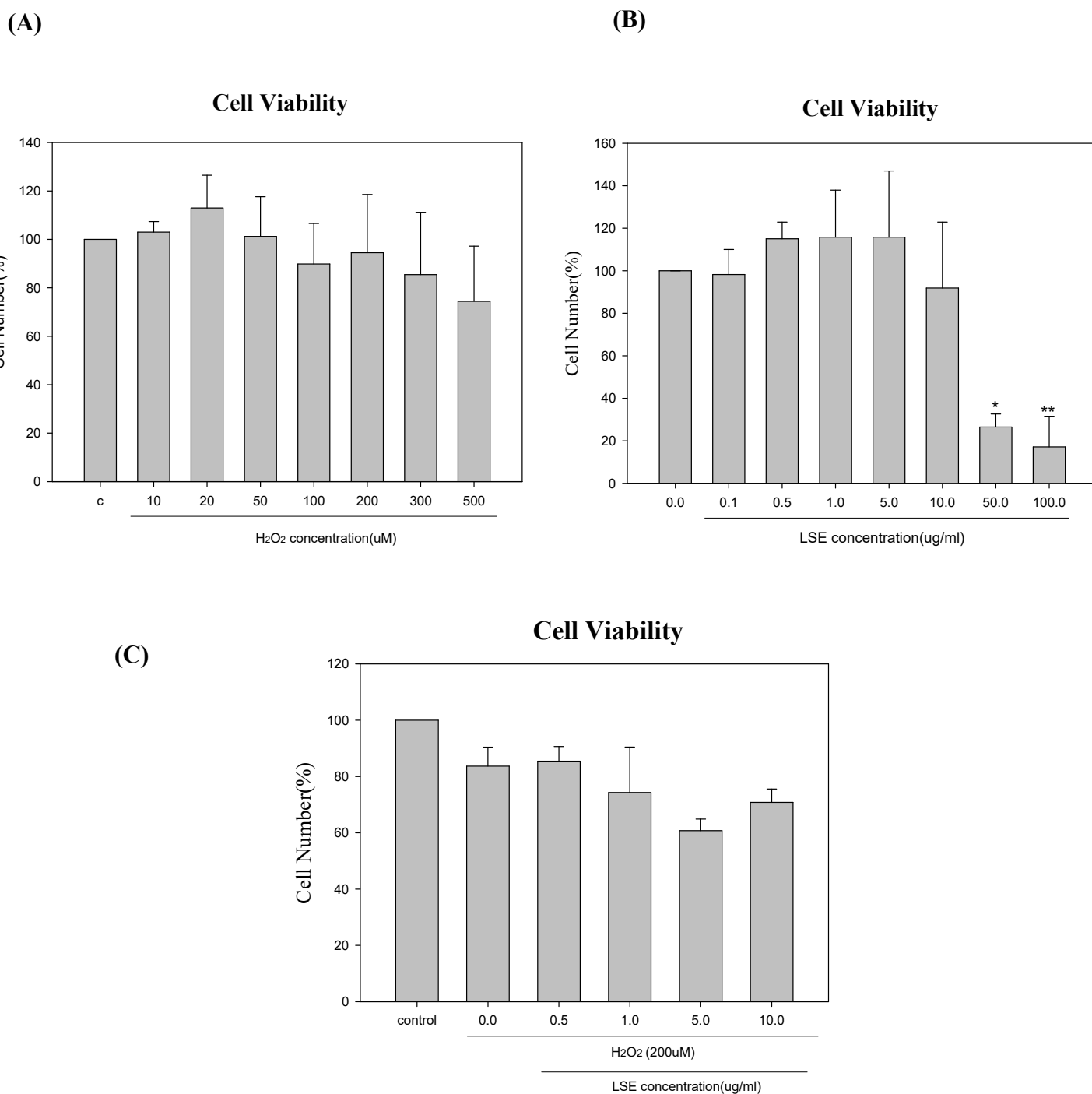
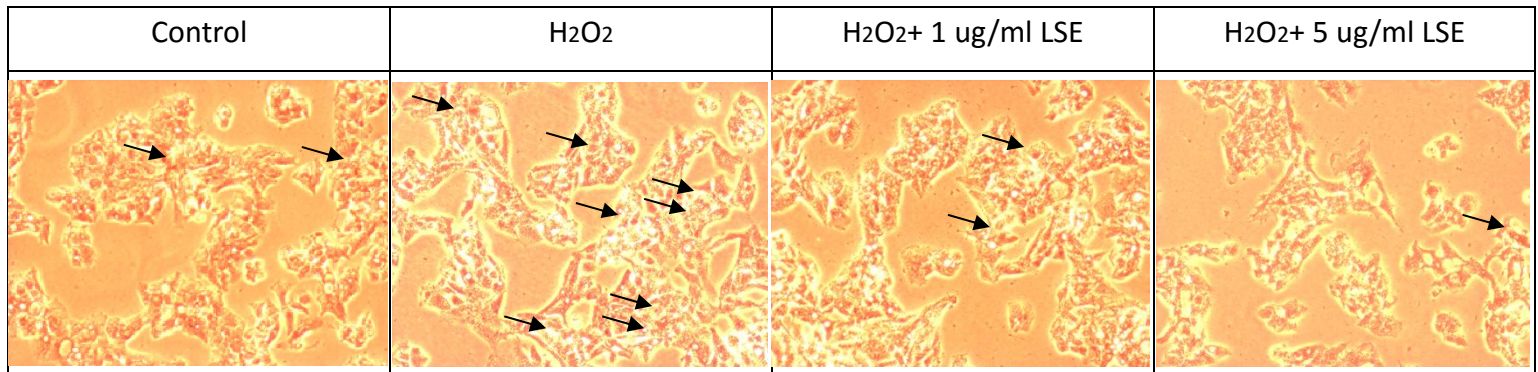


Fig. 3. Effects of LSE in combination of H₂O₂ on HepG2 cell viability. (A-C) HepG2 cells were treated with various concentrations of H₂O₂ (10-500 μM) and LSE (0.1-100 μg/ml) for 24 h. (D) HepG2 cells were treated with 200 μM of H₂O₂ in the presence or absence of various concentrations of LSE (0.5, 1, 5 and 10 μg/ml) for 24 h. Cell viability was analyzed by cell counting assay. The results represent the average of three independent experiments ± SD. *p< 0.06, **p< 0.01 compared with the control.

Fig. 4
(A)



(B)

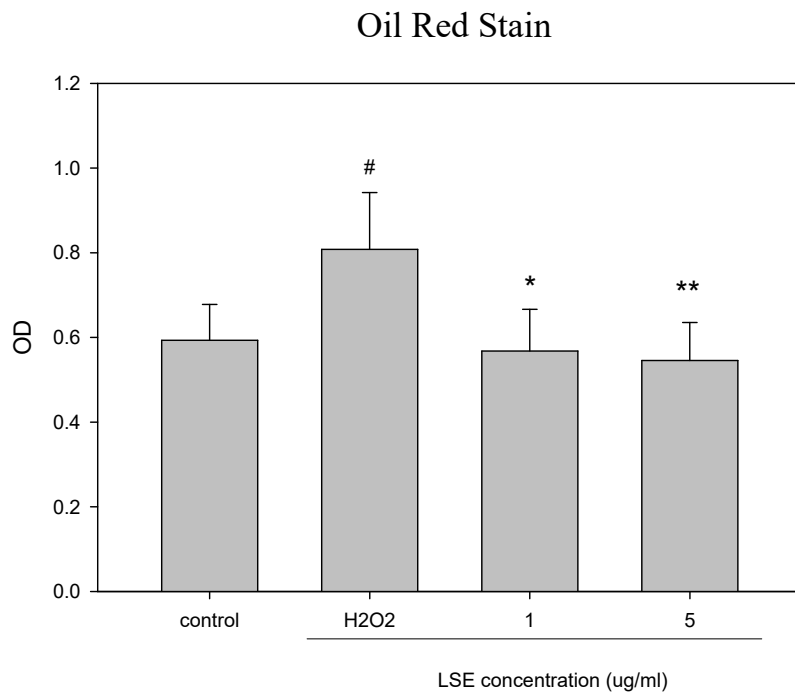


Fig. 4
(C)

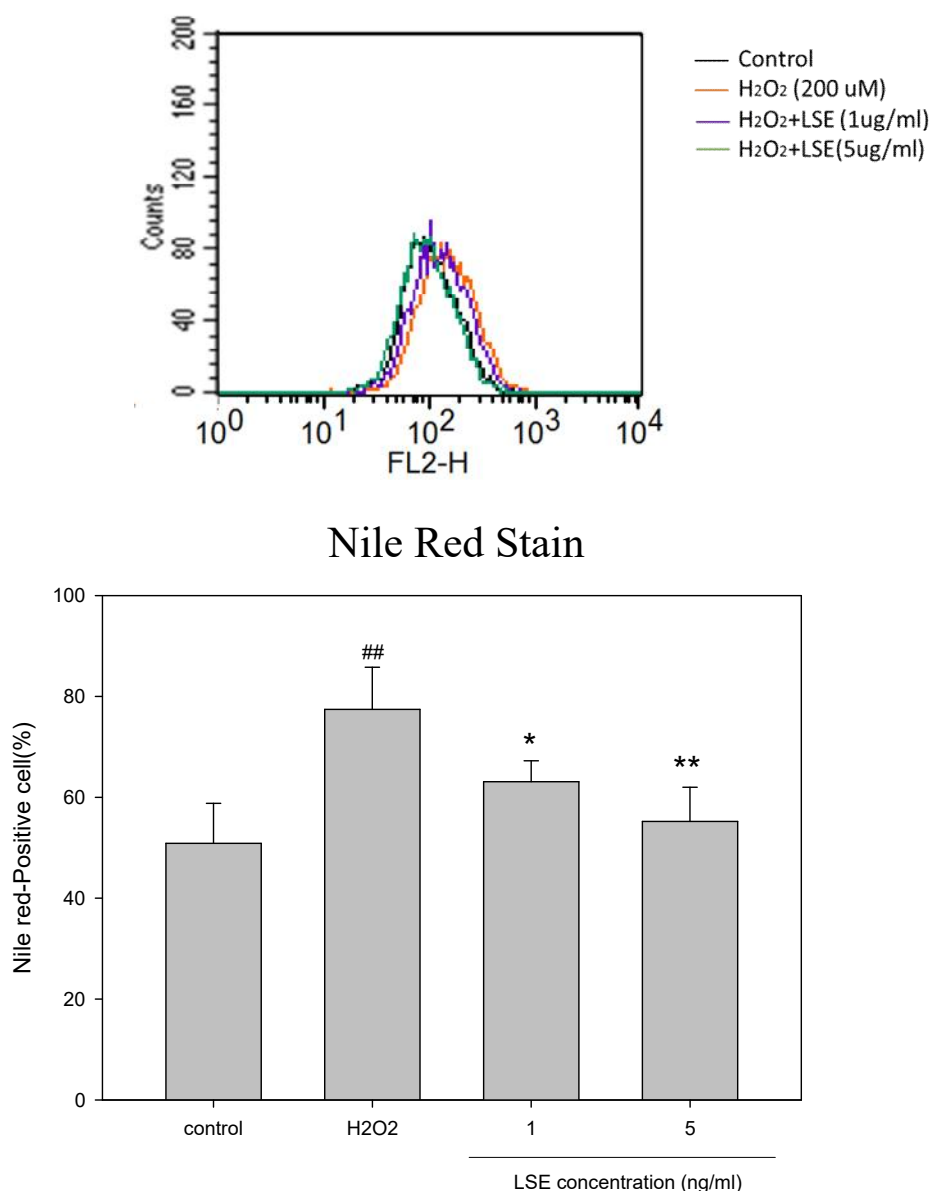
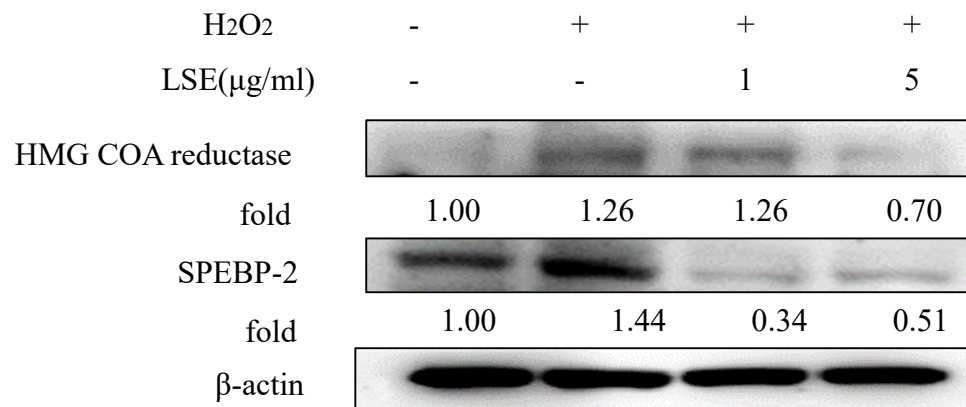
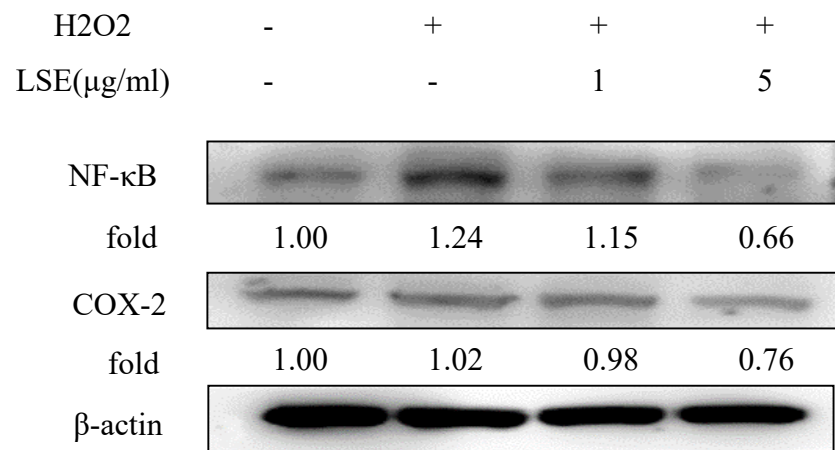


Fig. 4. Inhibitory effect of LSE on the H₂O₂-induced intracellular lipid accumulation. (A) HepG2 cells were treated with 200 μ M of H₂O₂ in the presence or absence of various concentrations of LSE (1 and 5 μ g/ml) for 24 h. After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (200 \times). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. (B) Adding 1 mL of isopropanol to the stained culture dish, the extracted dye was diluted 5 \times in ddH₂O, and then its absorbance was monitored at 492 nm. The quantitative data are presented as means \pm SD of three repeats from one independent study. # p < 0.05 compared with the control. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the H₂O₂-treated group. (C) Quantification of intracellular fat content with flow cytometric analysis, as assessed by Nile red staining.

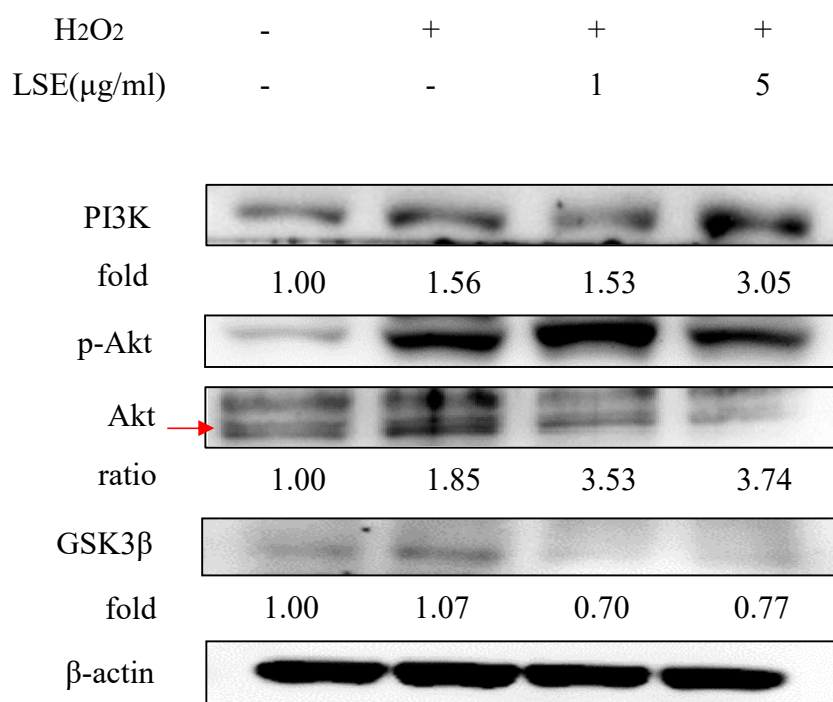
Fig. 5
(A)



(B)



(C)



(D)

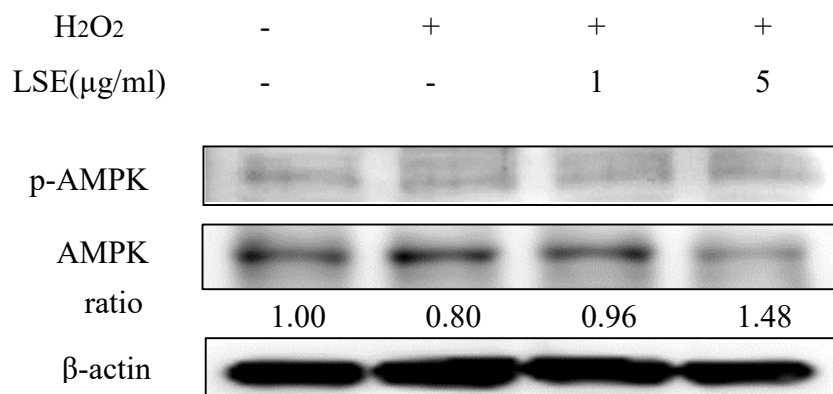


Fig. 5. Effect of LSE or EGC on H₂O₂-induced lipogenesis- proteins. HepG2 cells were treated with 200 μ M of H₂O₂ in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (1 and 5 μ g/ml) for 24 h. The protein levels of HMGCoA reductase, SREBP-2 (A), NF- κ B, COX-2 (B), GSK3 β , p-Akt, Akt, PI3K (C), p-AMPK and AMPK (D) were determined by Western blotting. The protein levels (fold) above the figures represent relative density of the bands normalized to β -actin. Results are representative of at least three independent experiments.

Fig. 6

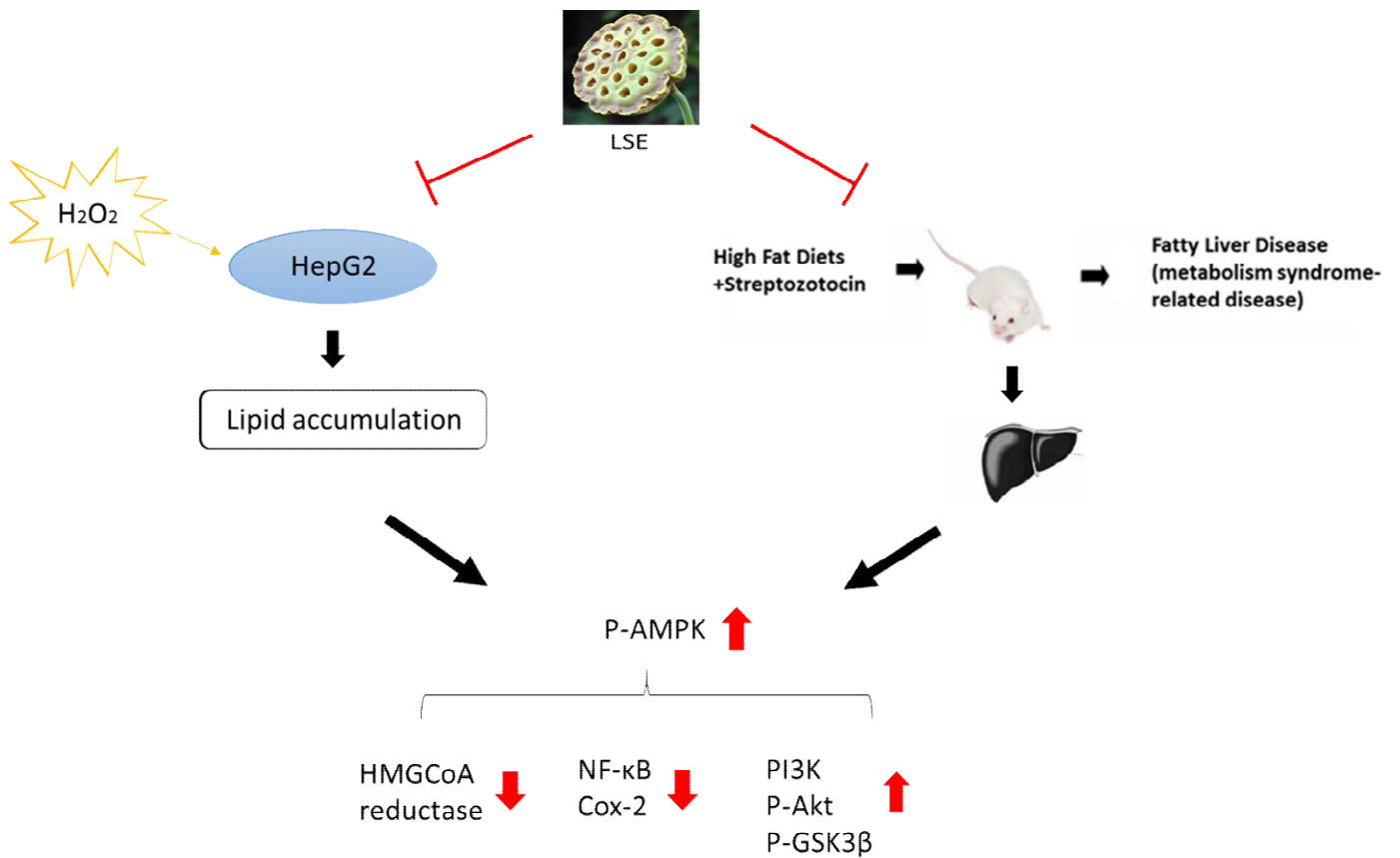


Fig. 6. A proposed model for the inhibitory effect of LSE on hepatic lipid accumulation via downregulations of lipogenesis regulatory proteins in H₂O₂-induced human hepatocyte HepG2 *in vitro* and in HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice *in vivo*.