

行政院國家科學委員會補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : 探討胡蘿蔔萃取物抑制 LPS 誘發的發炎反應及其機制  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 沈庭瑤  
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-036-B  
研究期間： 101年07月01日至102年02月28日止，計8個月  
指導教授： 張元衍

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： 中山醫學大學微生物免疫研究所

中華民國 102年04月02日

行政院國家科學委員會補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\*\*\*\*\*  
\* 計畫 \*  
\* : 探討胡蘿蔔萃取物抑制 LPS 誘發的發炎反應及其機制 \*  
\* 名稱 \*  
\*\*\*\*\*

執行計畫學生：沈庭瑤

學生計畫編號：NSC 101-2815-C-040-036-B

研究期間：101年7月1日至102年2月底止，計8個月

指導教授：張元衍副教授

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可  
公開查詢

執行單位：中山醫學大學 微免所

中華民國 102年 03月 28日

## 二、研究計畫內容（以 10 頁為限）：

### (一)摘要

發炎，初期是一種局部防衛反應，但急性發炎若持續的進行，則會逐漸轉成慢性發炎，而過度或持續的慢性發炎則可能會導致腫瘤等疾病的產生。

胡蘿蔔，含豐富的膳食纖維、礦物質與多種重要抗氧化物如  $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene)、葉黃素(lutein)、玉米素(zeaxanthin)等。 $\beta$ -Carotene 具有良好的脂質親和力，可以捕捉並中和那些會破壞身體細胞膜、脂質、蛋白質、維他命的自由基，預防細胞死亡。本實驗利用甲醇萃取與水萃取的方式去萃取胡蘿蔔(三種不同時期的胡蘿蔔分別為 A、B、C)，發現小鼠巨噬細胞株(RAW 264.7 cells line)中，用水萃取的胡蘿蔔並不具抗 LPS(Lipopolysaccharide)誘導的發炎反應，因此我們以甲醇及 DMSO 溶解甲醇萃取物，再以不同濃度的胡蘿蔔甲醇萃取物處理由 LPS 誘導的巨噬細胞並探討其發炎相關的基因與蛋白質的表現。實驗結果顯示，甲醇萃取的胡蘿蔔明顯的抑制了由 LPS 誘導 RAW264.7 細胞的 NO 表現量，也透過 Real-Time PCR 測量發炎相關基因，IL-1 $\beta$ 、IL-6 以及 TNF- $\alpha$ ，可以看見 A、B、C 三種胡蘿蔔萃取物相對於 DMSO 對照組皆可有效的抑制相關基因的表達。透過 NO 表現量以及 Real-Time PCR 的測量可以發現 C 胡蘿蔔萃取物對於 LPS 所誘導的發炎反應抑制效果最為明顯。因此我之後便以 C 胡蘿蔔萃取物來探討其抑制路徑為何?利用酵素免疫分析法測發炎相關激素 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1，結果發現，C 胡蘿蔔萃取物可以有效抑制 IL-6 和 MCP-1 的表現量，並且也隨著濃度增高而抑制的效果更明顯。最後透過 Western Blot 來探討發炎相關蛋白質，COX-2、iNOS、STAT1、P-STAT1、NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p50，發現 C 胡蘿蔔萃取物皆可有效抑制這些發炎相關蛋白質。綜合以上結果表示，胡蘿蔔萃取物可透過抑制 STAT-1/NF- $\kappa$ B 的路徑來抑制由 LPS 誘導的小鼠巨噬細胞的發炎反應來達成其抗發炎的作用。

### (二)研究動機與研究問題

發炎是人體正常的防禦反應，是為了對抗外來病原菌而產生的保護機制，現在許多文明病的發生往往和慢性發炎有非常密切的關係。

急性發炎是免疫系統對於病原入侵猛烈攻擊所引發的症狀，對人體有保護作用。但是這些攻擊的武器，像是嗜中性球產生的高氧化力自由基，不但對病原有殺傷力，對一般正常細胞的細胞膜、蛋白質、核酸等也都有破壞性。因此在攻擊結束後，免疫系統必須撤離這些破壞性物質，同時讓扮演清道夫的巨噬細胞清除死亡的病原菌、白血球，否則被破壞的組織無法正常修復。白血球在對抗敵人時分泌的一些物質，像是前列腺素、白三烯素等親發炎性二十碳酸，都是引起發炎反應的重要媒介物。這些物質會使血管擴張、組織液滲出，並刺激產生痛覺，這些物質的多寡也決定了攻擊的強度。如果這些物質的產生不受控制，白血球不斷大肆攻擊，前列腺素會使組織又紅又腫，疼痛持續，抗發炎的機制根本無法對抗強大的發炎反應，使整個平衡倒向發炎那邊。如此一來，抗發炎所領導的修復還原工作就不能進行，組織系統的慢性破壞也就愈來愈大，最後會造成被攻擊的組織或器官不能修復而喪失功能。

以前認為與生活習慣有關的文明病，像是心肌梗塞、糖尿病、阿茲海默氏症、癌症、過敏性及自體免疫疾病等，現在有愈來愈多的證據顯示都跟慢性發炎有關。最近發現很多心臟病發作的人，其實本身的膽固醇並不高，血管壁上慢性發炎所造成的粥

狀硬化塊剝落，啟動凝血機制，阻塞冠狀動脈才是心肌梗塞的原因。

因此，本研究即探討胡蘿蔔萃取物對於以 LPS 誘發小鼠巨噬細胞(RAW264.7)發炎反應的模式來探討其抗發炎的能力。

### (三)文獻回顧與探討

目前醫學證實人類老化與細胞氧化息息相關，人體因外在環境因素、個人不良嗜好、化學物質與精神等狀況下，會造成體內自由基累積(Ames et al., 1993)，人體中如含有過多之自由基與活性氧物等物質，將對人體造成傷害，導致肌膚鬆弛、老化，甚至產生慢性病(Snodderly, 1995)。化學活性上，必須具有容易搶得或提供電子之特性，與抗氧化物質相互結合反應或是與氧分子相互作用，可減少體內自由基之產生(Ames et al.,1993; Snodderly, 1995)

研究發現，這些物質多為植物化學成份(phytochemicals)，許多蔬菜及水果中皆富含許多這類抗氧化物質(Valko et al., 2007)，多攝取蔬菜、水果與堅果類食品，可獲取抗氧化所需之礦物質及維生素，如硒(Selenium)、維生素 C、維生素 E 與  $\beta$ -胡蘿蔔素等，是抗氧化物極佳來源，可以輕易地清除人體內自由基之活性，都具有抗氧化之能力與抑制自由基連鎖反應功能(Valko et al., 2006)。

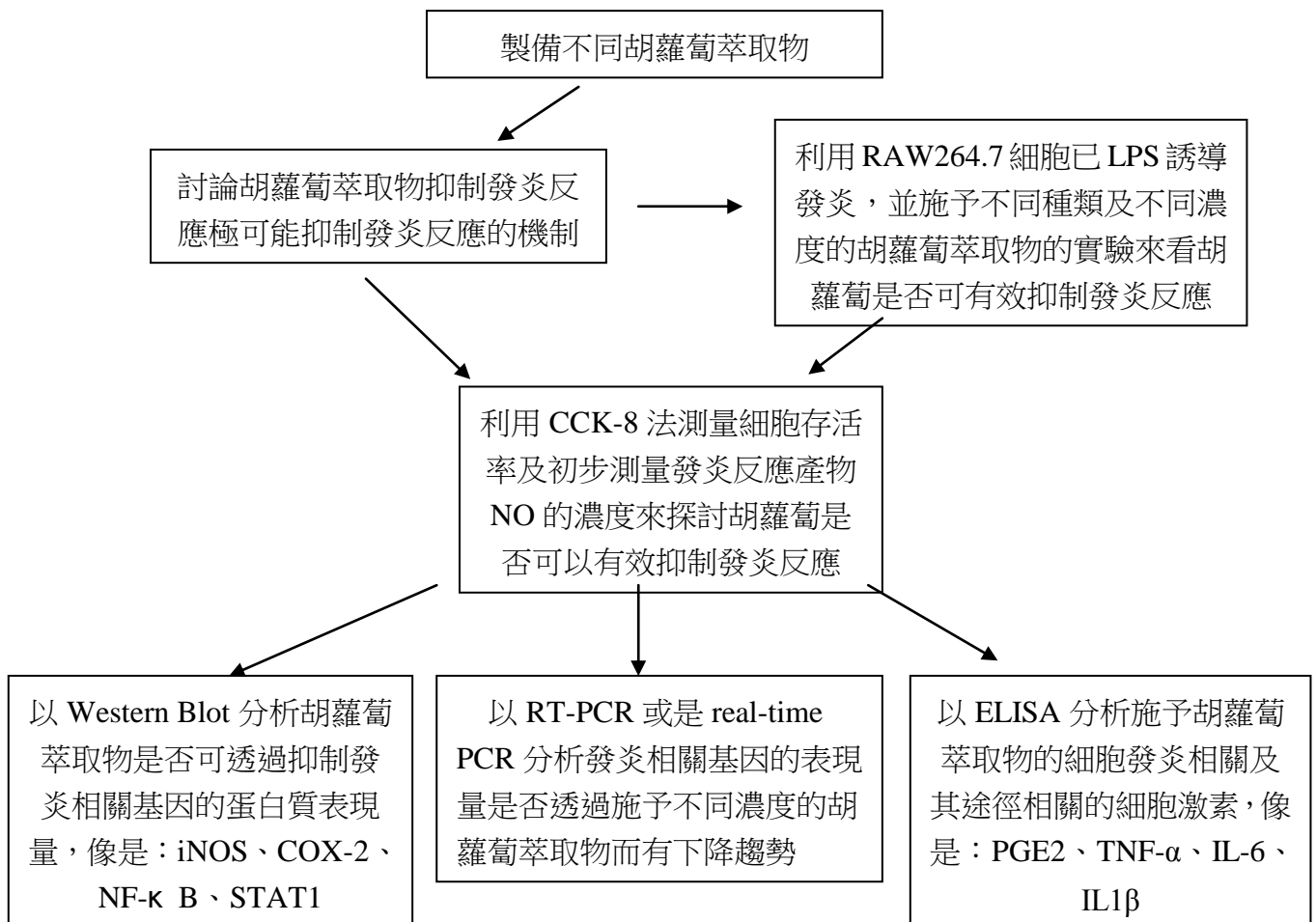
多彩的胡蘿蔔提供了植物化學成分的多樣性，增進以胡蘿蔔作為有益於人體健康的保健食品與食品加工業的機會與挑戰。彩色的胡蘿蔔包括許多類胡蘿蔔素前期的特點，其中包括  $\alpha$ - and  $\beta$ -胡蘿蔔素(carotene)、葉黃素(lutein)和茄紅素(lycopene)(Surles et al., 2004; Grassmann et al., 2007)

多彩的胡蘿蔔亦具有多種的多乙烯類(polyacetylenes)化合物，多乙烯類已被證實具有多種生物活性物質(Roman et al.,2011)，能抑制三酸甘油酯合成酵素的二醯基甘油醯基轉移酶(diacylglycerolacyltransferase, DGAT)(Rho et al., 2005)，而進一步活化一氧化氮合成酶(nitric oxidesynthase；NOS)，乙醯輔酶 A:膽固醇乙醯轉移酶(Acyl CoA-cholesterol acyltransferase,ACAT)，膽固醇酯轉移蛋白(Cholesteryl Ester Transfer Protein, CETP)，以及許多二期解毒酵素(Lee et al., 2009)。這些結果皆說明了胡蘿蔔具有抗發炎、降低血脂作用的潛力，而藉由胡蘿蔔萃取物，可改善高脂肪飲食之人體中 PPAR- $\alpha$  與 PPAR- $\gamma$ ，減少體內脂肪囤積與增加胰島素抗阻並至正常(Shih et al.,2008)。胡蘿蔔亦有報告指出能抑制體重增加且有降低脂肪之可能性(Chen et al., 2003)。然而目前許多這類之研究短期內皆受限於標準之模式動物試驗(Lundasen et al., 2007)。

近年來的研究陸續發現 PPAR family 在抑制發炎反應中扮演媒介之角色。NO 是重要的訊息傳導分子，同時也是自由基成員之一，主要經由一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS) 轉化 L-arginine 過程中產生，調節不同生理功能(Alwayn et al., 2006)。NOS 可分為三種形式:endothelial NOS (eNOS)、neuronal NOS (nNOS)、inducible NOS (iNOS)，eNOS 與 nNOS 不需誘導即自然存在於體內，產生固定量之 NO 為維持體內正常運作之重要訊息傳遞因子；而 iNOS 需被誘導才活化表現，如細胞激素、細菌內毒素、抽煙等皆可誘導 iNOS 之產生。iNOS 誘導生成之 NO 具有殺菌作用，參與宿主防禦機能。iNOS 所誘導出之大量 NO 自由基則會造成細胞的傷害與血管過度的舒張最後造成嚴重的發炎反應以及併發症，如敗血性休克、中風、DNA 受損、突變所造成細胞的癌化等。除了 NO 以外，某些細胞激素(Cytokine)如 PGE2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL1 $\beta$ 、IL-2、IL-8 等在發炎反應過程中也扮演重要的角色(Kuga et al., 1997)。

例如在感染的過程中，葛蘭氏陰性與陽性菌細胞壁成份中之 Lipopolysaccharde (LPS) 與 Lipoteic acid (LTA)。均會誘導大量 NO、PGE2 與細胞激素的產生而進而引起發炎反應，嚴重時甚至會引發敗血性休克而造成病人的死亡(Huanget al., 2002)。IFN- $\gamma$  活化 iNOS 基因的訊息傳遞已確定是經由 JAK/STAT 路徑(Lowenstein et al., 1993; Heitmeier et al.,1999)，而且 IRF-1 也是必要的轉錄因子(Matrin et al., 1994)。因此若能調控巨噬細胞及 T 細胞的活性必能增強宿主的抗感染能力

#### (四)研究方法及步驟



#### 研究方法：

##### 1. 胡蘿蔔的萃取與純化：

秤取待分析樣品1 kg，以整顆肉質根秤取鮮重，以清水清洗後進行冷凍乾燥(FD)。待完全乾燥後秤其乾重，以高速研磨機研磨至粉末狀，裝入夾鏈袋後，置於- 30 °C 冰箱中備用。秤取粉末3.00 g 裝於50 mL 離心瓶中。萃取液使用甲醇，加入30 mL，混合均勻後，置於60 °C 水浴鍋回溶5小時。取出後並以 1 號濾紙進行過濾，過濾後收集萃取液，甲醇萃取之萃取液放置於冷凍保存。再以DMSO回溶成不同濃度，即為胡蘿蔔萃取稀釋液。

##### 2. 細胞毒性分析：

以小鼠巨噬細胞株(RAW264.7)為實驗細胞，將細胞加入CCK-8(Cell Counting Kit-8)再使用全波長酵素免疫分析儀ELISA reader(Molecular Device, Spec384) 以450nm/595nm 的波長測量其OD 值，再以Excel 作圖得到最佳濃度。

### 3. 細胞培養及處理：

將冷凍保存的小鼠巨噬細胞株(RAW264.7) 細胞株自液態氮筒取出後，迅速以1 mL 之 low- glucose medium 溶解，再加入5 mL 之PBS 以pipetman 吸放數次後以4000 rpm 離心3分鐘去除冷凍保存液RAW264.7 細胞株，培養於含10 %胎牛血清(Hyclone)之RPMI- 1640 生長培養液中，並培養於37°C 含5%

CO<sub>2</sub> 之培養箱中。待其成長至單層細胞後進行繼代。而後將 RAW 264.7細胞分盤，每孔細胞數為1\*10<sup>6</sup>，1mL，待其貼附後分別加入不同品種的各個不同濃度的胡蘿蔔萃取稀釋液，以一倍PBS稀釋DMSO當做相對的對照組，放入培養箱培養一個半小時後，施予LPS 1ug/mL做為誘導發炎因子，其中一組無LPS處理當做對照組(mock)，再放入培養箱繼續培養24小時後收細胞培養液測NO濃度與酵素免疫分析法分析各種發炎相關細胞激素，並收集細胞溶解液進行西方墨點法的分析。

### 4. 亞硝酸鹽 (Nitrite)累積量的測定：

一氧化氮是一種易被氧化的不穩定分子，其中亞硝酸鹽是NO的穩定氧化代謝產物之一，故以亞硝酸鹽累積量間接代表 NO 的產量，在測量細胞生成一氧化氮的產生量時，可藉由測量培養液中亞硝酸鹽的含量來推估一氧化氮的產生量(Green et al., 1982)。實驗中所使用的 Griess reagent (0.05 % N-(1-naphthyl)ethylenediamine、0.5 % sulfanilamide、2.5 % phosphoric acid)是廣泛被用來測量亞硝酸鹽濃度的試劑，其原理為 Griess reagent 與亞硝酸鹽反應後會形成紅色溶液，在光譜儀中以 600 nm 波長光照射下有最大吸光值，因此細胞培養液中隨著不同濃度的亞硝酸鹽累積量，溶液會呈現顏色深淺不同，吸光值亦會隨之有所不同的變化。將亞硝酸鈉 (NaNO<sub>2</sub>)溶於去離子水中，配製成不同濃度的亞硝酸鈉標準溶液(0.5,1,2,4,6,8,10 μM)，將標準溶液與欲測的細胞培養液各取 150 μl 加入 96 孔酵素免疫分析盤中，再加入 100 μl 的Griess reagent 於室溫下靜置反應約 5~10 分鐘，將氣泡排除後，以 microplate reader 在 600 nm 波長下讀取吸光值，在由標準濃度所畫出的直線回歸方程式標準曲線後，以內插法推算出培養液中亞硝酸鹽的濃度。

### 5. 西方墨點法(western blot)測發炎相關蛋白：

取出蛋白質電泳系統(Bio-Rad)，並以75%酒精與試鏡紙擦拭鑄膠玻璃，依下表備製分離膠(10% separating gel)與集結膠(4% stacking gel)，注入已裝備好之鑄膠玻璃中，待集結膠凝固後即可自鑄膠器上卸除，架入電泳槽中。

(1) 電泳膠成份詳如下表所示

分離膠製備成份表		集結膠成份表	
10%		4%	
ddH <sub>2</sub> O	4.8ml	ddH <sub>2</sub> O	3.15ml
40% acrylamide	2.5ml	40% acrylamide	0.5ml
1.5M Tris-HCl(pH8.8)	2.5ml	0.5M Tris-HCl(pH6.8)	1.25ml
20% SDS	50ul	20% SDS	25ul
10% APS	100ul	10% APS	50ul
TEMED	20ul	TEMED	5ul

## (2) 蛋白質樣本的前處理

Raw264.7細胞培養液收集後，加lysis buffer(內含protease inhibitor)150ul 至每孔細胞內，冰-80度C隔夜後收至1.5 ml離心管，加入適量之5X sample buffer(含去活性劑)，立即於100°C沸水中煮5分鐘，以進行蛋白質電泳(DS-PAGE)分析之。

## (3) 電泳分析

兩片膠體中間注入新鮮一倍Running buffer(Tris base, Glycine (Usb), SDS)，膠體外則可注入重複使用之一倍Running buffer，以130伏特預跑30分鐘，預跑結束後即可分注蛋白質樣品以及PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)，先以80伏特跑30分鐘，再以130伏特90分鐘跑至marker分子量43kDa接近跳海但未跳海即可結束。

## (4) 蛋白轉印(Transfer)

預先將PVDF轉印膜(ProKin Elmer)泡在甲醇中5分鐘去除表面油漬，再以無菌水洗清PVDF膜，連同3M濾紙、海綿與跑好的SDS-PAGE浸泡在一倍之Transfer buffer中，由下而上依序排列：轉印夾(黑色面)、海綿、濾紙、PVDF膜、SDS-PAGE、濾紙、海綿、轉印夾(紅色面)，並以手掌輕輕壓除夾層中氣泡，置於轉印電泳槽中並放入冰保與倒入一倍Transfer buffer，以400毫安培90分鐘進行蛋白質轉印。待完全轉印後，置於2%脫脂牛奶(安佳脫脂奶粉)中室溫下水平迴轉25 rpm blocking 1小時，再以0.5% PBS-Tween 20於室溫下水平迴轉50 rpm 15分鐘，清洗三次，置入一次抗體中，4°C水平迴轉25 rpm隔夜，隔日同樣以0.5% PBS-Tween 20於室溫下水平迴轉25 rpm 15分鐘，清洗三次，置入二次抗體中，室溫下水平迴轉50 rpm 2小時，再以0.5% PBS-Tween 20於室溫下水平迴轉25 rpm 15分鐘，清洗三次，以1:1比例加入HRP Substrate Peroxide Solution與HRP Substrate Lumine Reagent中，於冷光分析照相系統(Fujifirm)曝光照相，再浸泡於AEC substrate kit(invitrogen)中呈色。

## 6. 免疫酵素沉澱試驗(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)：

將cytokines 的capture Ab 以coating buffer 稀釋250 倍後，取100 µl 加入96 孔盤，於4°C靜置一夜。去除多餘的capture Ab，並以wash buffer (1XPBS+0.05% Tween- 20)清洗3 次(250µl/well)，在加入套組中所附的assay diluents reagent (Amershan)於室溫反應1 小時，接著以wash buffer 清洗3 次，再於盤中指定之位置加入待測的檢體及各cytokines 的標準稀釋品(100 µl/well)，於室溫反應2 小時，接著以wash buffer 清洗3 次，然後加入100 µl/well 的Detection Ab (250 倍稀釋)，於室溫反應1 小時，接著以wash buffer 清洗5次，再加入100 µl/well 的Avidin- HRP 於室溫反應15 分鐘，接著以wash buffer清洗7 次，最後在加入100 µl/well 的substrate solution (1X TMB) 於室溫作用5- 10 分鐘，再加入50µl stop solution (2N H2SO4)去終止反應。以全波長酵素分析儀以450nm 去測量其OD 值，並以標準品來推算帶測檢體之濃度。

## (五)實驗結果

### 1. 細胞毒性分析：

本實驗目前已先行收集台灣2 個流行商業胡蘿蔔品種,分別為橘紅色與橘色肉質根品種，將其定植於明道大學 劉程煒 老師的有機農場內進行田間評估與性狀調查，並進行抗發炎效益評估。本試驗將胡蘿蔔肉質根依成熟期差異分為三個實驗組，分別為重量低於150 公克、重量介於150~300 公克、肉質根重量大於300 公克三個實驗組(圖一)。以感應耦合電漿質譜儀(ICP-MS)分析不同大小胡蘿蔔肉質根之微量元素含量變化，分析結果顯示與抗氧化能力有關之元素硒(Se)含量，橘紅色品種以大果階段元素硒含量最高，橘紅色小果是所有組別中最低的，僅有8.84ug/kg，橘色品種不同階段

含量較平均，但以肉質根重量大於300 公克為最低,每公斤乾種中有11.75ug(表一)。胡蘿蔔(Daucus carota)為台灣重要的根莖類蔬菜,因其肉質根所富含的 $\beta$ -Carotene 已被證實具有極佳的抗氧化能力，近年來胡蘿蔔逐漸受到消費者的喜愛與重視。以LPS mock 的量當100%作相對百分比的比較，發現加入胡蘿蔔萃取物的細胞，存活率並沒有顯著下降，因此對於細胞來說，三種胡蘿蔔萃取物對於細胞並無太大的毒性(圖二)。

本實驗利用 甲醇或水的方式去萃取胡蘿蔔，發現在小鼠巨噬細胞(RAW 264.7 cells line)中，以水萃取的胡蘿蔔產物無法有效抑制LPS (Lipopolysaccharide) 所誘發的NO，因此我們以不同濃度的胡蘿蔔甲醇萃取物處理由LPS 誘導的巨噬細胞並探討其發炎相關的基因與蛋白質的表現。實驗結果顯示，LPS 誘導的Raw264.7 細胞在添加各種濃度的胡蘿蔔甲醇萃取物後明顯的抑制了NO 的分泌及iNOS、COX-2 的表現量(圖三)。

我們也看到三種不同的胡蘿蔔萃取物皆可抑制由LPS 所引發的發炎反應，如抑制NO 釋放，並且有效抑制iNOS 及COX-2 的蛋白質表現量(圖四、圖五)。進一步的酵素免疫分析法測量發炎相關的細胞激素上我們也發現。未來除了繼續以西方墨點法與酵素免疫分析法測發炎相關蛋白質與細胞激素外，以確定其更詳細的發炎機制,並做三種不同的胡蘿蔔萃取的成分分析，純化出胡蘿蔔真正抗發炎的物質，並希望未來此成分可作為很好的抗發炎的保健食品。

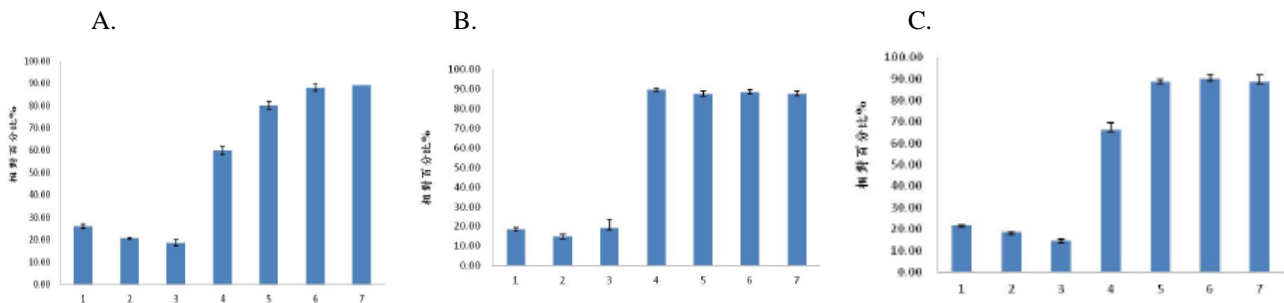


圖一、本計劃初步實驗所分析之二種不同胡蘿蔔樣本。A、C、E 為橘色肉質根品種,B、D、F 為橘紅色肉質根品種。比例尺為3 公分。

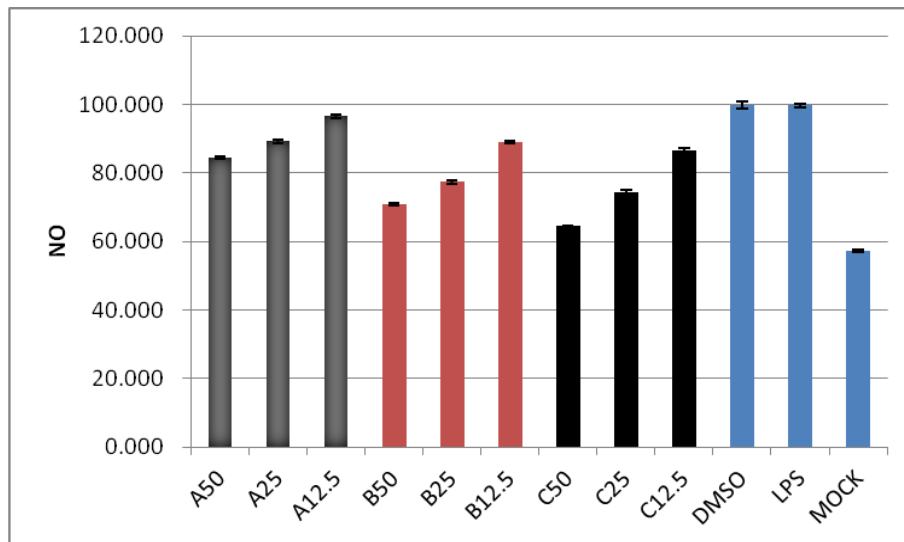
表一、以感應耦合電漿質譜儀(ICP-MS)分析胡蘿蔔肉質根之微量元素含量變化。

樣品名稱	7 Li	27 Al	45 Sc	53 Cr	59 Co	60 Ni	63 Cu	75 As	82 Se	85 Rb	88 Sr	89 Y	105 Pd	111 Cd	118 Sn	121 Sb	208 Pb
	Conc. [ppb]	Conc. [ppm]	Conc. [ppb]	Conc. [ppm]	Conc. [ppb]	Conc. [ppm]	Conc. [ppm]	Conc. [ppb]	Conc. [ppb]	Conc. [ppm]	Conc. [ppm]	Conc. [ppb]	Conc. [ppb]	Conc. [ppb]	Conc. [ppb]	Conc. [ppb]	Conc. [ppb]
橘紅小果	232.78	6.00	7.59	2.14	94.68	2.92	12.19	8.10	<b>8.84</b>	5.34	13.68	2.38	<b>17.83</b>	15.13	57.01	41.82	101.16
中果	268.58	11.65	4.74	2.13	152.05	2.72	13.21	28.75	<b>12.24</b>	11.06	14.25	2.92	4.70	23.26	54.02	23.77	108.76
大果	364.89	11.46	9.88	3.77	144.99	2.84	10.66	36.90	<b>18.10</b>	11.96	16.40	2.41	3.86	21.42	42.60	29.65	<b>305.87</b>
橘色小果	425.12	9.09	4.15	1.13	144.06	3.51	15.27	20.31	<b>16.73</b>	8.02	19.10	2.56	2.54	<b>54.62</b>	47.42	35.96	92.02
中果	287.16	9.76	4.25	1.99	198.11	3.35	14.25	37.33	<b>14.64</b>	14.34	17.06	2.64	2.06	33.78	64.90	31.02	168.41
大果	457.26	17.69	3.98	0.46	95.12	3.06	8.59	14.73	<b>11.75</b>	10.14	22.17	2.53	2.92	12.97	90.29	18.76	74.79

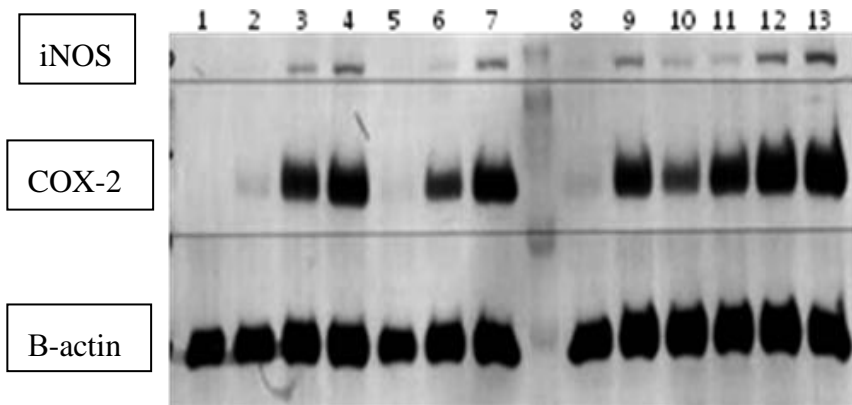




圖二、胡蘿蔔肉質根細胞毒性測試。A:以橘紅色小果組胡蘿蔔萃取物處理RAW264.7細胞株,待24小時後以CCK-8 測試細胞毒性。lane1:5g/ml, lane2:2.5g/ml, lane3:1.25g/ml, lane4:0.625g/ml, lane5:0.3125g/ml, lane6:0.1562g/ml, lane7:0.0781g/ml。B:以橘紅色中果組胡蘿蔔萃取物處理RAW264.7細胞株,待24小時後以CCK-8 測試細胞毒性。lane1:5g/ml, lane2:2.5g/ml, lane3:1.25g/ml, lane4:0.625g/ml, lane5:0.3125g/ml, lane6:0.1562g/ml, lane7: 0.0781g/ml。C:以橘紅色大果組胡蘿蔔萃取物處理RAW264.7細胞株,待24小時後以CCK-8 測試細胞毒性。lane1:5g/ml, lane2:2.5g/ml, lane3:1.25g/ml, lane4:0.625g/ml, lane5:0.3125g/ml, lane6:0.1562g/ml, lane7:0.0781g/ml。



圖三、RAW 264.7 細胞以LPS(1  $\mu$ g/ml)誘導後,再以不同濃度的胡蘿蔔處理待24小時後,測試NO的產量。結果發現這三種品種的胡蘿蔔對LPS誘導的NO 皆有抑制的效果。Lane 1為不處理組; Lane2~4 為橘紅色小果組:濃度為 0.5g/ml(A50);0.25g/ml(A25) 和 0.125g/ml (A12.5); Lane5~7 為橘紅色中果組:濃度為 0.5g/ml(B50);0.25g/ml(B25) 和 0.125g/ml (B12.5); Lane8~10 為橘紅色大果組:濃度為 0.5g/ml(C50);0.25g/ml(C25) 和 0.125g/ml (C12.5); Lane 11~13 為相對濃度之DMSO 量。



圖四、RAW 264.7 細胞以LPS(1  $\mu$ g/ml)誘導後,再以不同濃度的胡蘿蔔處理待24小時後,以Western Bolt 來測NOS 與COX-2 的表現。結果發現這三種品種的胡蘿蔔對LPS誘導的NOS 與COX-2 皆有抑制的效果。Lane 1為不處理組; Lane2~4 為橘紅色小果組:濃度為 0.5g/ml(A50);0.25g/ml(A25) 和 0.125g/ml

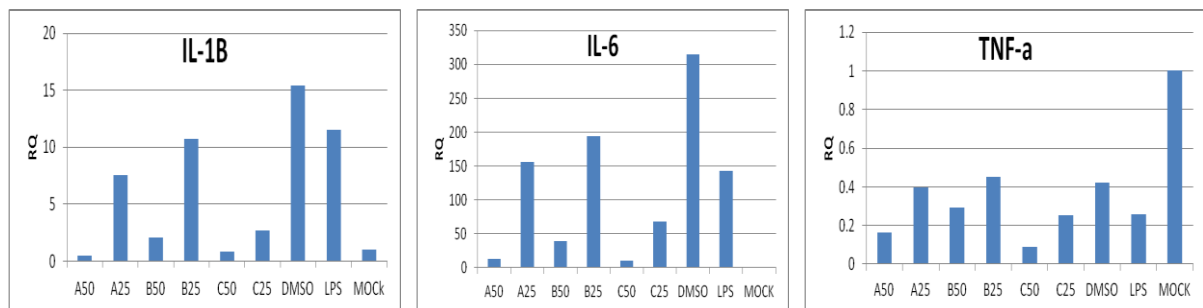
(A12.5); Lane 5~7 為橘紅色中果組:濃度為 0.5g/ml(B50);0.25g/ml(B25) 和 0.125g/ml (B12.5); Lane 8~10 為橘紅色大果組:濃度為 0.5g/ml(C50);0.25g/ml(C25) 和 0.125g/ml (C12.5); Lane 11~13 為相對濃度之 DMSO 量。

## 2. 探討胡蘿蔔萃取物是否可抑制由LPS誘導產生的發炎指標NO以及相關基因調控：

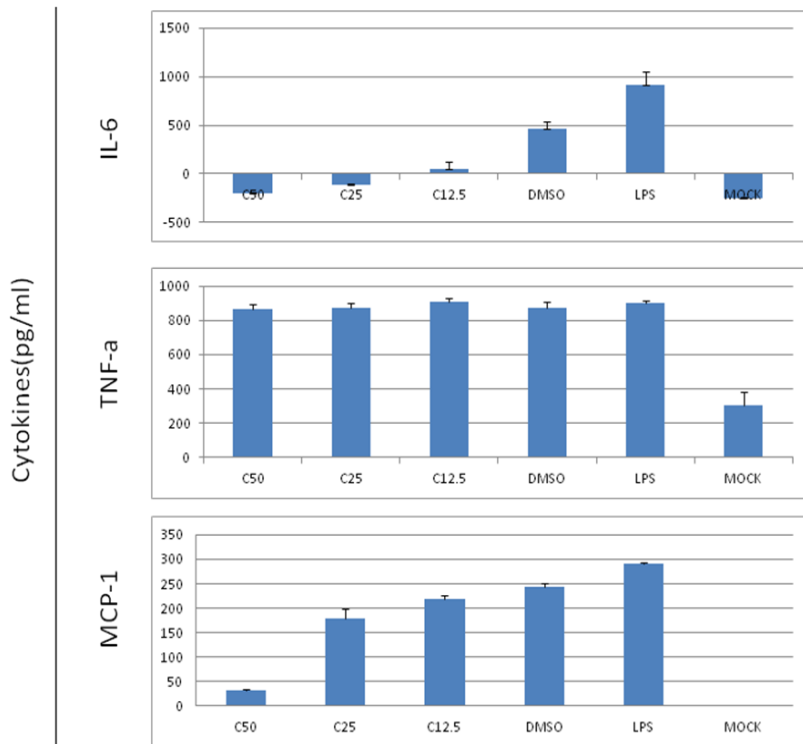
從亞硝酸鹽累積量間接測定NO的產量發現：A、B、C三種胡蘿蔔萃取物皆能有效抑制發炎指標NO的量(圖三)。再來以Real-Time PCR探討相關發炎基因，結果發現IL-1 $\beta$ 、IL-6以及TNF- $\alpha$ 皆有隨著三種胡蘿蔔萃取物的濃度上升而表現量下降(圖五)。透過測量NO以及Real-Time PCR發現，三種胡蘿蔔萃取物，由C胡蘿蔔萃取物抑制LPS引起的發炎反應效果最為明顯，因此利用C胡蘿蔔萃取物來探討發炎相關途徑。

## 3. 以C胡蘿蔔萃取物來探討是透過何種路徑調控相關發炎反應

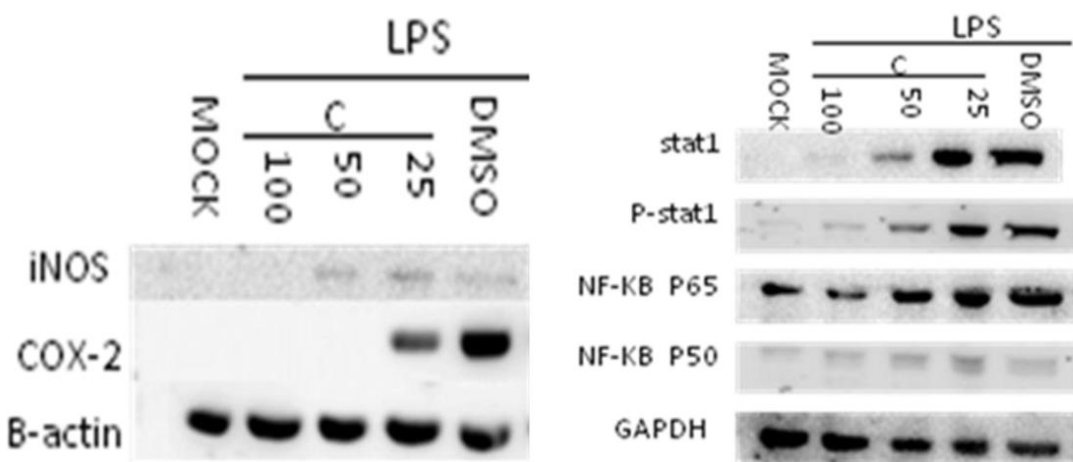
由NO的產量以及Real-Time PCR發現，C胡蘿蔔萃取物抑制LPS誘導的發炎效果最為明顯，以酵素免疫分析法(ELISA)測發炎相關激素的結果也顯示，IL-6與MCP-1的分泌量，皆隨著C胡蘿蔔萃取物的濃度上升而抑制的量越多(圖三)。再來以西方墨點法測發炎相關蛋白，結果發現iNOS、COX-2皆受到C胡蘿蔔萃取物的調控，C胡蘿蔔萃取物越高，其蛋白質表現量則明顯下降(圖七)；透過其他蛋白質STAT1、P-STAT1、NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p50，發現這些蛋白質皆隨著C胡蘿蔔萃取物濃度上升而表現量下降(圖七)。



圖五、Real-Time PCR測量發炎相關基因，IL-1 $\beta$ 、IL-6以及TNF- $\alpha$ ，可以看見A、B、C三種胡蘿蔔萃取物相對於DMSO對照組皆有效的抑制相關基因，並且也以C胡蘿蔔萃取物最為有效。



圖六、酵素免疫分析法測發炎相關激素IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1，結果發現，C胡蘿蔔萃取物可以有效抑制IL-6和MCP-1 的表現量，並且也隨著濃度增高而抑制的效果更明顯。



圖七、RAW 264.7 細胞以LPS(1  $\mu$ g/ml)誘導後,再以不同濃度的胡蘿蔔處理待24 小時後,以Western Bolt 來測NOS 與COX-2 的表現。結果發現胡蘿蔔對LPS 誘導的NOS 、COX-2、STAT-1、pSTAT-1、NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p50 皆有抑制的效果。

## 結果與討論：

巨噬細胞在LPS (Lipopolysaccharde)所引起的發炎反應，扮有重要的角色。被活化的巨噬細胞將分泌細胞激素與自由基如一氧化氮進行致病因子的去除。但同時發炎反應也可能造成慢性或急性之疾病，如敗血症、自體免疫疾病、腦退化和糖尿病等，皆與不正常的發炎反應有關。

當巨噬細胞受到LPS誘導，會產生各種發炎調節因子，誘發一系列的發炎反應，其中一氧化氮(NO)大量的表現會造成細胞死亡。在本研究中，LPS處理RAW264.7

macrophage cells，模擬發炎反應，探討胡蘿蔔萃取物可能會調節巨噬細胞發炎的調節因子釋放程度及相關調控基因的影響。

實驗中我們發現胡蘿蔔萃取物可以有效抑制LPS誘導的發炎指標NO的產生，透過Real-Time PCR測量發炎相關基因，IL-1 $\beta$ 、IL-6以及TNF- $\alpha$ ，也發現胡蘿蔔萃取物也可以有效的抑制發炎相關基因。並且發現C胡蘿蔔的效果最為明顯，利用C胡蘿蔔萃取物和酵素免疫分析法以及Western Blot探討相關Cytokines和蛋白質表現量。在酵素免疫分析法結果中看見IL-6和MCP-1的表現量皆被C胡蘿蔔萃取物有效的抑制，而Western Blot中也看見STAT1、p-STAT1、NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p50的表現量下降。

LPS所誘發的iNOS、COX2蛋白質表現、NO釋放、IL-6與MCP-1等細胞激素的表現量，同時可抑制STAT-1與NF- $\kappa$ B之活化。因此，胡蘿蔔萃取物可能經由抑制STAT/NF- $\kappa$ B轉錄因子的路徑，來抑制LPS產生的發炎反應。

## (六)參考文獻

1. Grassmann, J., W. H. Schnitzler, and R. Habegger. 2007. Evaluation of different coloured carrot cultivars on antioxidative capacity based on their carotenoid and phenolic contents. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 58: 603–611.
2. Heinonen, M. I., V. Ollilainen, E. K. Linkola, P. T. Varo, and P. E. Koivistoinen. 1989. Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *J. Agric. Food Chem.* 37(3): 655–659.
3. Heitmeier, M. R., A. L. Scarim, and J. A. Corbett. 1999. Prolonged STAT1 activation is associated with interferon- $\gamma$  priming for interleukin-1-induced inducible nitric oxide synthase expression by islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* 274: 29266–29273.
4. Ho, S. C., L. S. Hwang, Y. J. Shen, and C. C. Lin. 2007. Suppressive effect of proanthocyanidin-rich extract from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10664–10670.
5. Isomaki, P. and J. Punnonen. 1997. Pro and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann. Med.* 29: 499–507.
6. Jiang, C., A. T. Ting, and B. Seed. 1998. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82–86.
7. Kuga, T., T. Egashira, K. Sueishi, and A. Takeshita. 1997. Vasculoprotective role of inducible nitric oxide synthase at inflammatory coronary lesions induced by chronic treatment with interleukin-1 $\beta$  in pigs in vivo. *Circulation* 96: 3104–3111.
8. Lawrence, T., Gilroy, D. W., P. R. Colville-Nash, and D. A. Willoughby. 2001. Possible new role for NF- $\kappa$ B in the resolution of inflammation. *Nat. Med.* 7: 1291–1297.
9. Lowenstein, C. J., E. W. Alley, P. Raval, A. M. Snowman, S. H. Snyder, S. W. Russell, and W. J. Murphy. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon  $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9730–9734.
10. MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323–350.
11. Makarov, S. S. 2000. NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent

advances.Mol. Med. Today 6: 441–448.

12. Martin, E., Nathan, C. and Xie, Q.W. (1994) Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. J. Exp. Med. 180: 977– 984.

13. Mitchell, J. A., S. Larkin, and T. J. Williams. 1995. Cyclooxygenase 2: regulation and relevance in inflammation. Biochem. Pharmacol. 50: 1535–1542.

### **(七)需要指導教授指導內容**

1. 當實驗遇到困難時給予意見，協助解決問題。
2. 實驗技術的教導與實驗原理的解說。
3. 儀器的主要操作注意事項。
4. 實驗資料與實驗結果討論與分析。